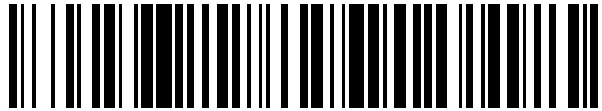


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 211**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 35/768 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2012 PCT/US2012/033684**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12142529**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2012 E 12716971 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2697368**

54 Título: **Cepas clonales de virus vaccinia atenuados y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

15.04.2011 US 201161517297 P
04.11.2011 US 201161628684 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2019

73 Titular/es:

GENELUX CORPORATION (100.0%)
3030 Bunker Hill Road, Suite 301
San Diego, CA 92109, US

72 Inventor/es:

SZALAY, ALADAR, A.;
CHEN, NANHAI, GEORGE;
YU, YONG, A. y
ZHANG, QIAN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

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

ES 2 733 211 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

Cepas clonales de virus vaccinia atenuados y métodos de uso de las mismas.

5 **Campo de la invención**

Productos aislados virales de Vaccinia.

10 **Antecedentes**

Vaccinia es un virus oncolítico y se acumula en los tumores. Se han desarrollado cepas de virus vaccinia atenuadas para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Por ejemplo, los virus atenuados incluyen virus recombinantes que se modifican en uno o más genes virales que dan como resultado la pérdida o reducción de la expresión de un gen viral o la inactivación de una proteína viral. Sin embargo, los métodos para atenuar los virus pueden disminuir o reducir las propiedades oncolíticas del virus. Por lo tanto, todavía existe la necesidad de virus oncolíticos atenuados y métodos para identificar virus oncolíticos atenuados.

15 **Compendio**

20 La presente invención proporciona una cepa LIVP clonal aislada distinta de una cepa clonal cuyo genoma comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10, en donde:

la cepa clonal no contiene ácido nucleico heterólogo no viral que contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína heteróloga no viral;

25 la cepa clonal comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10; y

la cepa clonal tiene mayor antitumorigenicidad y/o menor toxicidad en comparación con GLV-1h68, en donde GLV-1h68 tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9; y

la cepa clonal aislada comprende la secuencia de nucleótidos seleccionados entre:

30 a) nucleótidos 2256 - 181.114 de SEQ ID NO: 1, nucleótidos 11.243 -182.721 de SEQ ID NO: 2, nucleótidos 6.264 - 181.390 de SEQ ID NO: 4, nucleótidos 7.044 - 181.820 de SEQ ID NO: 5, nucleótidos 6.674 - 181.409 de SEQ ID NO: 6, nucleótidos 6.716 - 181.367 de SEQ ID NO: 7 o nucleótidos 6.899 - 181.870 de SEQ ID NO: 8; o

35 b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos 2256 - 181.114 de SEQ ID NO: 1, nucleótidos 11.243 -182.721 de SEQ ID NO: 2, nucleótidos 6.264 - 181.390 de SEQ ID NO: 4, nucleótidos 7.044 - 181.820 de SEQ ID NO: 5, nucleótidos 6.674 - 181.409 de SEQ ID NO: 6, nucleótidos 6.716 - 181.367 de SEQ ID NO: 7 o nucleótidos 6.899 - 181.870 de SEQ ID NO: 8.

40 Se proporcionan cepas clonales aisladas de preparaciones de LIVP de acuerdo con las presentes reivindicaciones. Se proporcionan preparaciones de preparaciones de virus LIVP sustancialmente homogéneas de acuerdo con las presentes reivindicaciones. También se proporcionan preparaciones que resultan de la propagación de una cepa clonal aislada de acuerdo con las presentes reivindicaciones. En particular, se proporcionan en la presente memoria cepas LIVP clonales aisladas que tienen un genoma que contiene una secuencia de nucleótidos distinta de una cepa clonal cuyo genoma contiene la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10. En algunos ejemplos, las cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria tienen una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10, pero no incluye la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10. En dichos ejemplos, la identidad de secuencia se refiere a la identidad de secuencia que se determina alineando secuencias de nucleótidos que contienen nucleótidos correspondientes a las repeticiones terminales invertidas (ITR) (si estuvieran presentes) y utilizando el alineamiento global con GAP, por lo que los huecos terminales no se penalizan. En particular, las cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria tienen una mayor antitumorigenicidad y/o menor toxicidad en comparación con la cepa LIVP designada GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9.

55 En los ejemplos de las cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria, una cepa LIVP clonal aislada es una que está presente en un producto aislado de LIVP o en una preparación de virus propagada a partir de LIVP y la cepa clonal tiene una toxicidad reducida y/o una mayor antitumorigenicidad en comparación con la cepa de virus designada GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9.

60 Una cepa LIVP clonal aislada de acuerdo con la invención es una que tiene un genoma que no contiene ácido nucleico heterólogo no viral que contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína heteróloga no viral y muestra una menor toxicidad y/o una antitumorigenicidad potenciada en comparación con la cepa de virus designada GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9.

65 Las cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria incluyen cepas clonales que tienen una menor toxicidad en comparación con el virus designado GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en

SEQ ID NO: 9. En otros ejemplos, las cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria incluyen cepas clonales que tienen una mayor antitumorigenicidad en comparación con la cepa de virus designada GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9. En ejemplos adicionales, las cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria incluyen cepas clonales que tienen una menor toxicidad y una mayor antitumorigenicidad en comparación con el virus designado GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9.

En cualquiera de las cepas clonales LIVP que se proporcionan en la presente memoria, el genoma de la cepa clonal LIVP tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10, pero no contiene la secuencia de nucleótidos completa expuesta en SEQ ID NO: 10. En dichos ejemplos, la identidad de la secuencia se determina mediante el alineamiento de las secuencias de nucleótidos que contienen nucleótidos correspondientes a las repeticiones terminales invertidas (ITR) y el uso del alineamiento global con GAP con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10, con lo que los huecos terminales no se penalizan.

En cualquiera de las cepas clonales LIVP proporcionadas que presentan una menor toxicidad, la menor toxicidad se puede manifestar tras la administración a un sujeto. Por ejemplo, el sujeto puede ser un ser humano o animal no humano, particularmente un animal domesticado. La menor toxicidad se puede determinar mediante cualquier método para evaluar un efecto tóxico, tal como, pero sin limitarse a, un parámetro indicativo de toxicidad, tal como la disminución de la supervivencia del sujeto, la disminución del peso corporal, fiebre, erupción cutánea, alergia, fatiga, dolor abdominal, etc. Inducción de una respuesta inmunológica en el sujeto, formación de pústulas y/o menor acumulación de virus en tejidos no tumorales en mayor medida que LIVP (un virus con el genoma expuesto en o sustancialmente expuesto en, típicamente al menos 99 %, SEQ ID NO: 10) o GLV-1h68 (un virus con el genoma expuesto sustancialmente como se indica en típicamente al menos 99%, SEQ ID NO: 9). La acumulación se puede detectar mediante cualquier método adecuado, tal como la generación de imágenes del sujeto para detectar la acumulación de virus, en particular en los casos en que el virus expresa una proteína detectable o una proteína que induce una señal detectable u otro marcador similar. La acumulación también se puede detectar mediante el muestreo de tejidos y/o fluidos corporales. En algunos ejemplos, menor toxicidad significa que el sujeto experimenta menos efectos tóxicos o ningún efecto tóxico en comparación con un sujeto al que se ha administrado un virus designado GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9, con lo que el virus designado GLV 1h68 se administra en cantidad similar y bajo el mismo régimen de dosificación que la cepa clonal. En otros ejemplos, la menor toxicidad significa que el sujeto no muere por los efectos tóxicos inducidos durante la administración del virus.

En algunos casos, la cepa clonal LIVP exhibe una menor toxicidad y también una mayor actividad antitumoral, o una combinación de las mismas que la cepa LIVP de referencia, tal como la cepa con el genoma que se indica en SEQ ID NO: 9, en particular, la cepa designada GLV-1h68, también conocida como GL-ONC1. Con cualquiera de las cepas clonales LIVP proporcionadas que muestran una mayor antitumorigenicidad, se puede manifestar o evaluar la mayor antitumorigenicidad *in vitro* o *in vivo* después de la administración a un sujeto. La mayor antitumorigenicidad se puede determinar evaluando *in vitro* o *in vivo* un parámetro indicativo de antitumorigenicidad seleccionado, por ejemplo, entre la infectividad de las células tumorales, la acumulación de virus en los tejidos tumorales, la replicación del ácido nucleico viral, la producción de virus, la expresión génica viral, los efectos en la célula anfitriona, la citotoxicidad, la selectividad de las células tumorales, la selectividad del tipo de célula tumoral, la inmunogenicidad y la cantidad de replicación en las células tumorales. En algunos ejemplos, una mayor antitumorigenicidad significa que la cepa clonal exhibe al menos o aproximadamente al menos 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% o más de antitumorigenicidad en un ensayo *in vitro* o *in vivo* que evalúa un parámetro indicativo de antitumorigenicidad, tal como el cambio en el tamaño del tumor en un período de tiempo dado, en comparación con la antitumorigenicidad de un virus designado GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9 según lo evaluados en el mismo ensayo bajo las mismas condiciones o condiciones similares.

En la presente memoria se proporcionan cepas clonales LIVP que contienen una secuencia de nucleótidos 10.073 - 180.095 de SEQ ID NO: 1, nucleótidos 11.243 -182.721 de SEQ ID NO: 2, nucleótidos 6.264 - 181.390 de SEQ ID NO: 4, nucleótidos 7.044 - 181.820 de SEQ ID NO: 5, nucleótidos 6.674 - 181.409 de SEQ ID NO: 6, nucleótidos 6.716 - 181.367 de SEQ ID NO: 7 o nucleótidos 6.899 - 181.870 de SEQ ID NO: 8. También se proporcionan en la presente memoria cepas clonales LIVP que contienen una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente o al menos 99% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos 10.073 - 180.095 de SEQ ID NO: 1, nucleótidos 11.243 -182.721 de SEQ ID NO: 2 , nucleótidos 6.264 - 181.390 de SEQ ID NO: 4, nucleótidos 7.044 - 181.820 de SEQ ID NO: 5, nucleótidos 6.674 - 181.409 de SEQ ID NO: 6, nucleótidos 6.716 - 181.367 de SEQ ID NO: 7 o nucleótidos 6.899 - 181.870 de SEQ ID NO: 8.

En otros ejemplos, las cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria contienen una secuencia de nucleótidos que incluye una repetición terminal invertida izquierda y/o derecha. Por ejemplo, en la presente memoria se proporcionan las cepas clonales LIVP que contienen una secuencia de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 7 u 8. También se proporcionan en la presente memoria cepas clonales LIVP que contienen una

secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 7 o 8. Entre las cepas clonales LIVP que se proporcionan en la presente memoria se encuentran las cepas clonales LIVP que contienen una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 o una secuencia de nucleótidos que tenga al menos 99% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1. En otros ejemplos, entre las cepas clonales LIVP que se proporcionan en la presente memoria se encuentran las cepas clonales LIVP que contienen una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5. En cualquiera de los ejemplos de cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria, la cepa clonal LIVP se puede obtener aislando un clon de LIVP de un cultivo celular en el que se ha propagado una cepa que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 7 u 8, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 7 u 8.

En la presente memoria se proporciona una preparación de virus LIVP o un virus que contiene un genoma de cualquiera de las cepas clonales LIVP anteriores proporcionadas en la presente memoria.

En la presente memoria se proporcionan cepas de virus LIVP recombinantes o modificadas que contienen un genoma de cualquiera de las cepas clonales LIVP anteriores que se modifican para que también contengan ácido nucleico heterólogo en el genoma, tal como el ácido nucleico que codifica un producto génico heterólogo. En algunos ejemplos, el ácido nucleico heterólogo, tal como el que codifica un producto génico heterólogo, se inserta en o en lugar de un gen o región no esencial en el genoma del virus. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica el producto génico heterólogo se inserta en los loci del gen la hemaglutinina (*HA*), timidina quinasa (*TK*), *F14.5L*, factor de crecimiento de vaccinia (*VGF*), *A35R*, *N1L*, *E2L/E3L*, *K1L/K2L*, locus de superóxido dismutasa, *7.5K*, *C7-K1L*, *B13R+B14R*, *A26L* o *I4L* en el genoma del virus. Los virus proporcionados en la presente memoria se pueden modificar como y/o utilizar en cualquier método, tal como tratamiento de tumores, vacunas contra patógenos de antígenos se insertan en el genoma, para el diagnóstico y para el diagnóstico y tratamiento, conocidos por los expertos en la técnica. Incluyendo las modificaciones y los métodos/ usos descritos, por ejemplo, en cualquiera de la Solicitud PCT internacional Núm. WO 2009/054996, Solicitud PCT Internacional Núm. WO 2009/139921, Publicaciones de los Estados Unidos Núm. US-2009-0081639, US-2009-0053244, US-2009-0098529 y Patentes de Estados Unidos Núm. 7.754.221, 7.588.767, 7.588.771 y 7.662.398.

En las cepas de virus LIVP recombinantes o modificadas proporcionadas en la presente memoria, los productos génicos heterólogos incluyen uno o una pluralidad de agentes o reactivos terapéuticos y/o de diagnóstico. En algunos ejemplos, el producto génico heterólogo es un agente anticanceroso, un agente antimetastásico, un agente antiangiogénico, una molécula inmunomoduladora, un antígeno, un gen degradador de la matriz celular, genes para la regeneración de tejidos y reprogramación de células somáticas humanas a pluripotencia, enzimas que modifican un sustrato para producir un producto o señal detectables o son detectables por anticuerpos, proteínas que se pueden unir a un agente de contraste, genes para la generación de imágenes ópticas o de detección óptica, genes para la generación de imágenes de PET y genes para la generación de imágenes de IRM. Por ejemplo, el agente antimetastásico es aquel que inhibe la colonización metastásica o inhibe la invasión celular en un ensayo de invasión celular *in vitro*. En otro ejemplo, el agente antiangiogénico es aquel que inhibe la formación de vasos sanguíneos en un tumor. En otros ejemplos, el gen para la regeneración tisular y la reprogramación de células somáticas humanas a pluripotencia es un AG (nAG), Oct4, NANOG, Ngn3, Pdx1 o Maf de tritón.

En los ejemplos de una cepa de virus LIVP recombinante o modificada proporcionada en la presente memoria, un producto génico heterólogo es un agente terapéutico seleccionado entre una hormona, un factor de crecimiento, una citocina, una quimiocina, una molécula coestimuladora, ribozimas, una proteína transportadora, un anticuerpo de hebra sencilla, un ARN antisentido, un enzima conversora de profármaco, un ARNip, un microARN, una toxina, un oligopéptido antitumoral, una proteína inhibidora de la mitosis, un oligopéptido antimitótico, un antibiótico polipeptídico anticanceroso, un inhibidor de la angiogénesis, un inhibidor de tumores, una proteína citotóxica, una proteína citostática y un factor tisular. Por ejemplo, el producto génico heterólogo es un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-24 (IL-24), proteína 10 inducida por interferón gamma (IP-10), la expresión inducible por linfotoxina compite con la glicoproteína D del VHS para HVEM, un receptor expresado en linfocitos T (LIGHT), superantígeno p60, OspF, OspG, transductor de señales y activador de proteínas de transcripción (STAT1alfa), STAT1beta, dominio k5 del plasminógeno (hK5), factor de diferenciación del epitelio pigmentario (PEDF), anticuerpo anti-VEGF de hebra sencilla, anticuerpo anti-DLL4 de hebra sencilla, proteína de activación anti-fibroblastos de hebra sencilla (FAP), NM23, cadherina 1 (ECAD o cdh1), relaxina 1 (RLN1), metalopeptidasa 9 de matriz (MMP9), eritropoyetina (EPO), microARN 126 (miR-126), microARN 181, microARN 335, superóxido dismutasa tipo manganeso (MnSOD), proteína ligasa 1 de ubiquitina E3 (HACE1), péptido precursor natriurético A (nppal), carboxipeptidasa G2 (CPG2), alcohol deshidrogenasa (ADH), CDC6, o proteína morfogenética ósea 4 (BMP4). Por ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF de hebra sencilla se designa G6.

En ejemplos de una cepa LIVP recombinante o modificada en la presente memoria que contiene un producto génico heterólogo que codifica un agente de diagnóstico, el agente de diagnóstico es una proteína detectable o una

5 proteína que induce una señal detectable. Por ejemplo, el agente de diagnóstico es una luciferasa, una proteína fluorescente, una proteína bioluminiscente, una proteína receptora o transportadora que se une y/o transporta un agente de contraste, cromóforo, compuesto o ligando que puede detectarse. En dichos ejemplos, la proteína receptora o transportadora que se une a y/o transporta un agente de contraste es un receptor de hierro, un transportador de hierro o un transportador de captación de cobre. En ejemplos concretos, el agente de diagnóstico es una luciferasa de escarabajo verde, un operón lux, una proteína fluorescente infrarrojo, una proteína flavinasa reductasa, una proteína fluorescente en el rojo lejano mNeptune, una proteína verde fluorescente (GFP), una proteína fluorescente roja (RFP), una proteína de unión a celenterazina (CBP), receptor de epinefrina humana (hNET), una proteína del simportador de yoduro de sodio (NIS), una enzima de la familia del citocromo p450, receptor de alostatina A (AlstR), Receptor de Pep1 (PEPR-1), LAT-4, esteroil 14 alfa-desmetilasa (Cyp51), receptor de transferrina (TR), ferritina, transportador de metal divalente (DMT), Magnetotáctica A (MagA) o transportador de entrada de cisplatino (CTR1).

15 En las cepas de virus LIVP recombinante o modificada proporcionadas en la presente memoria, el ácido nucleico que codifica el producto génico heterólogo está unido operablemente a un promotor. Por ejemplo, el promotor es un promotor de mamífero, incluyendo promotores virales. En algunos ejemplos, el promotor es un promotor P_{7.5k}, P_{11k}, P_{SE}, P_{SEL}, P_{SL}, H5R, TK, P28, C11R, G8R, F17R, I3L, I8R, A1L, A2L, A3L, H1L, H5L, H6R, H8R, D1R, D4R, D5R, D9R, D11L, D12L, D13L, D1L, N1L, P4b o K1.

20 En la presente memoria se proporciona una composición que contiene cualquiera de las cepas clonales o cepas de virus proporcionadas en la presente memoria anteriormente. En la presente memoria también se proporciona una composición farmacéutica que contiene cualquiera de las cepas clonales o cepas de virus proporcionadas en la presente memoria anteriormente. En otros ejemplos, la composición o composición farmacéutica proporcionada en la presente memoria puede contener una o más cepas de virus diferentes. En algunos ejemplos, la composición farmacéutica contiene un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria se pueden formular para administración local o sistémica. En otros ejemplos, la composición farmacéutica está formulada para la administración como una vacuna antiviral o anticancerosa o un agente terapéutico anticanceroso.

30 En la presente memoria se describe una combinación que contiene cualquiera de las cepas clonales o cepas de virus proporcionadas en la presente memoria y un agente terapéutico o de diagnóstico. En algunos ejemplos, el agente terapéutico se selecciona entre un agente quimioterapéutico, un agente inmunosupresor y un agente antiviral. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico es un agente antimetastático o un agente antiangiogénico. En algunos ejemplos, el agente quimioterapéutico es una citocina, una quimiocina, un factor de crecimiento, un agente fotosensibilizante, una toxina, un antibiótico anticanceroso, un compuesto quimioterapéutico, un radionúclido, un inhibidor de la angiogénesis, un modulador de señalización, un antimetabolito, una vacuna o agente terapéutico anticanceroso, un oligopéptido anticanceroso, una proteína inhibidora de la mitosis, un oligopéptido antimitótico, un anticuerpo anticanceroso, un antibiótico anticanceroso, un agente inmunoterapéutico o una combinación de cualquiera de los anteriores. En otros ejemplos, el agente quimioterapéutico es cisplatino, carboplatino, gemcitabina, irinotecán, un anticuerpo anti-EGFR o un anticuerpo anti-VEGF. En algunos ejemplos, el agente inmunosupresor es un glucocorticoide, un agente alquilante, un antimetabolito o un anticuerpo. En otros ejemplos, el agente antiviral es cidofovir, Gleevec, ganciclovir, aciclovir o ST-246. Por ejemplo, el agente antiviral es un agente quimioterapéutico. En cualquiera de los ejemplos proporcionados en la presente memoria para una combinación, el virus y el agente quimioterapéutico y/o antiviral se formulan como una composición única o por separado en dos o más composiciones.

45 En la presente memoria se describe un kit que contiene cualquiera de las cepas de virus LIVP anteriores, cualquiera de las composiciones o composiciones farmacéuticas anteriores o cualquiera de las combinaciones anteriores, y opcionalmente instrucciones para la administración de la composición.

50 En la presente memoria se proporciona una composición de acuerdo con las presentes reivindicaciones para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo en un sujeto mediante la administración de cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores, por ejemplo, cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores que contiene cualquiera de las cepas clonales o cepas de virus proporcionadas en la presente memoria. La enfermedad proliferativa puede ser un cáncer. Por ejemplo, el cáncer puede ser cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon o cáncer de páncreas. El trastorno proliferativo puede ser un tumor o una metástasis. El sujeto puede ser un sujeto humano o no humano.

60 En ejemplos de las composiciones para uso en la presente memoria para tratar un trastorno proliferativo, el virus se puede administrarse o se puede formularse en una cantidad que sea al menos o aproximadamente 1×10^5 ufp al menos una vez durante un ciclo de administración. Por ejemplo, el virus se administra o se formula en una cantidad que es al menos o al menos aproximadamente o es 1×10^5 ufp, 1×10^6 ufp, 1×10^7 ufp, 1×10^8 ufp, 1×10^9 ufp, 1×10^{10} ufp, 1×10^{11} ufp, 1×10^{12} ufp, 1×10^{13} ufp, o 1×10^{14} ufp al menos una vez o al menos una vez durante un ciclo de administración. Por ejemplo, la concentración de la cepa del virus en una formulación para las composiciones para su uso en la presente memoria puede ser de 1×10^6 - 1×10^{16} ufp/ml o es al menos o es aproximadamente 1

- x 10⁶ ufp/ml, 1 x 10⁷ ufp/ml, 1 x 10⁸ ufp/ml, 1 x 10⁹ ufp/ml, 1 x 10¹⁰ ufp/ml, 1 x 10¹¹ ufp/ml, 1 x 10¹² ufp/ml, 1 x 10¹³ ufp/ml, 1 x 10¹⁴ ufp/ml, 1 x 10¹⁵ ufp/ml, o 1 x 10¹⁶ ufp/ml. En tales ejemplos, la cantidad de virus se administra dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces o siete veces durante el ciclo de administración. Por ejemplo, la cantidad de virus se administra el primer día del ciclo, el primer y segundo día del ciclo, cada uno de los primeros tres días consecutivos del ciclo, cada uno de los primeros cuatro días consecutivos del ciclo, cada uno de los primeros cinco días consecutivos del ciclo, cada uno de los primeros seis días consecutivos del ciclo, o cada uno de los primeros siete días consecutivos del ciclo. El ciclo de administración puede ser de 7 días, 14 días, 21 días o 28 días.
- 5
- 10 También se puede administrar un segundo agente terapéutico para el tratamiento del trastorno proliferativo. Se puede administrar con el virus, por separado, secuencialmente o intermitentemente. Un experto en la técnica está familiarizado con diversos agentes terapéuticos para los tratamientos de trastornos proliferativos, tales como el cáncer. Por ejemplo, los tratamientos adicionales para los trastornos proliferativos incluyen, pero no se limitan a, cirugía, radioterapia, terapia inmunosupresora o administración de un agente anticanceroso. Por ejemplo, los
- 15 agentes anticancerosos incluyen una citocina, una quimiocina, un factor de crecimiento, un agente fotosensibilizante, una toxina, un antibiótico anticanceroso, un compuesto quimioterapéutico, un radionúclido, un inhibidor de la angiogénesis, un modulador de señalización, un antimetabolito, una vacuna o tratamiento anticancerosos, un oligopéptido anticanceroso, una proteína inhibidora de la mitosis, un oligopéptido antimitótico, un anticuerpo anticanceroso, un antibiótico anticanceroso, un agente inmunoterapéutico o una combinación de cualquiera de los anteriores. El agente anticanceroso puede ser cisplatino, carboplatino, gemcitabina, irinotecán, un anticuerpo anti-EGFR o un anticuerpo anti-VEGF. En tales ejemplos, el virus y el agente anticanceroso se administran
- 20 secuencialmente, simultáneamente o intermitentemente.
- En las composiciones para su uso para tratar un trastorno proliferativo, el virus se administra localmente, tópicamente o sistémicamente, incluyendo por vía intravenosa, intraarterial, intratumoral, endoscópica, intralesional, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intravesicular, intraarticular, intraarticular, percutánea, subcutánea, oral, parenteral, intranasal, intratraqueal, por inhalación, intracraneal, intraprostática, intravítrea, tópica, ocular, vaginal o
- 25 rectal. Por ejemplo, el virus se administra por vía intravenosa o intraperitoneal.
- En la presente memoria se proporcionan composiciones para su uso en la detección de un tumor o metástasis en un sujeto administrando a un sujeto cualquiera de los virus LIVP o cepa clonal proporcionada en la presente memoria o una composición o composición farmacéutica que contiene cualquiera de las cepas de virus LIVP o cepas clonales proporcionadas en la presente memoria. Para el diagnóstico o la detección, el virus contiene ácido nucleico que codifica una proteína detectable o una proteína que induce una señal detectable, y que detecta la proteína detectable o una proteína que induce una señal detectable, con lo que la detección indica la presencia del tumor o metástasis en el sujeto. Para la detección en la presente memoria, la proteína detectable o proteína que induce una
- 30 señal detectable se selecciona entre una luciferasa, una proteína fluorescente, una proteína bioluminiscente, una proteína receptora o transportadora que se une y/o transporta un agente de contraste, cromóforo, compuesto o ligando que se pueda detectar. Por ejemplo, la proteína detectable o proteína que induce una señal detectable es una proteína verde fluorescente (GFP), una proteína roja fluorescente (RFP), un receptor de hierro, un transportador de hierro, un transportador de sodio u otros iones, tales como el receptor de epinefrina humana (hNET) o una proteína del simportador de yoduro de sodio (NIS). Para la detección, la proteína detectable o la señal detectable se detecta mediante generación de imágenes a baja luz, espectroscopia de fluorescencia, generación de imágenes de rayos X, generación de imágenes por resonancia magnética (IRM), espectroscopia de resonancia magnética (MRS), tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT).
- 35
- 40
- 45 En la presente memoria se describe un método para detectar la actividad del virus en un anfitrión mediante la administración de cualquiera de los virus LIVP o la cepa clonal proporcionada en la presente memoria a un sujeto.
- 50 El virus contiene ácido nucleico que codifica una proteína detectable o una proteína que induce una señal detectable y que detecta la proteína detectable o una proteína que induce una señal detectable, con lo que la detección indica que el virus está activo o tiene actividad oncolítica. En tales ejemplos, el sujeto tiene un tumor o cáncer. En ejemplos del método, la etapa de detección de la proteína detectable o de una proteína que induce una señal detectable es de una muestra de fluido corporal del sujeto. Por ejemplo, el fluido corporal es orina, sangre, lágrimas o líquido cefalorraquídeo.
- 55
- En la presente memoria se proporciona una célula anfitriona que contiene cualquiera de las cepas de virus LIVP o cepas clonales que se proporcionan en la presente memoria.
- 60 En la presente memoria se describe un método para seleccionar una cepa clonal LIVP para la terapia y el diagnóstico del cáncer (i) proporcionando una primera muestra de virus LIVP que contiene una mezcla de partículas de virus con diferentes secuencias genómicas; (ii) seleccionando y aislando productos aislados clonales individuales de la muestra; (iii) sometiendo a ensayo cada producto aislado clonal para determinar la toxicidad; (iv) sometiendo a ensayo cada producto aislado clonal para determinar la antitumorogenicidad; y (v) seleccionar una cepa clonal que
- 65 muestre una mayor antitumorogenicidad y una menor toxicidad en comparación con una cepa del virus LIVP de

referencia, con lo que los aislados clonales que presentan una menor toxicidad y una mayor antitumorigenicidad se identifican como cepas clonales LIVP para tratamiento o diagnóstico del cáncer. En el método de selección de una cepa clonal LIVP en la presente memoria, el virus LIVP de referencia puede ser la primera muestra de virus LIVP. En algunos ejemplos, el virus LIVP de referencia es un virus LIVP recombinante atenuado. Por ejemplo, el virus LIVP de referencia es el virus designado GLV-1h68 cuyo genoma tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9 (GLV-1h68).

En los métodos para seleccionar o identificar una cepa clonal LIVP descrita en la presente memoria, la primera muestra de virus LIVP puede ser una cepa de virus LIVP que tenga un LIVP que tenga un genoma expuesto en SEQ ID NO: 10, o un genoma que sea al menos 99% idéntico a SEQ ID NO: 10 o cualquier otra cepa proporcionada en la presente memoria. En otros ejemplos, la primera muestra de virus LIVP es una mezcla obtenida por propagación de células infectadas con una cepa LIVP y otra cepa de virus, ADN genómico o ADN clonado, seguido del aislamiento de una muestra de virus del cultivo, en donde la muestra comprende virus progenie producidos por la infección. Por ejemplo, la otra cepa de virus puede ser un virus de ADN, un virus de ARN de doble hebra, un virus de ARN de sentido positivo de hebra sencilla o un virus de ARN de sentido negativo de hebra sencilla. El virus de ADN puede ser un virus de la viruela, tal como avipoxvirus, virus del mixoma o virus vaccinia; un herpesvirus tal como el virus del herpes simple (HSV), el citomegalovirus (CMV), el virus de Epstein-Barr (EBV), los hepadnavirus (p. ej., virus de la hepatitis B), los virus de polio, los virus del papiloma, los adenovirus y los virus adenoasociados; o virus de ADN monocatenario, tales como los parvovirus. Por ejemplo, la otra cepa del virus es una cepa de vaccinia. En algunos ejemplos, el otro virus es un virus de ARN de doble hebra, el virus de ARN de doble hebra es un reovirus tal como el rotavirus. En ejemplos, en donde el otro virus es un virus de ARN de sentido positivo de hebra sencilla, el virus de ARN de sentido positivo de hebra sencilla es un picornovirus tal como el virus del valle de Séneca, el virus coxackie, el virus de la polio, los enterovirus; togavirus tales como el virus del bosque semliki; y retrovirus tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la leucemia de Maloney (MMLV) o los lentivirus. En ejemplos adicionales, en los que el otro virus es un virus de ARN de sentido negativo monocatenario, el virus de ARN de sentido negativo monocatenario es un ortomixovirus tal como el virus de la gripe; paramixovirus como el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus del sarampión o el virus de las paperas; o rhabdovirus tales como el virus de la estomatitis vesicular (VSV).

En los métodos de la presente memoria para seleccionar o identificar una cepa clonal, la etapa de selección de productos aislados clonales individuales de la muestra se puede realizar mediante un ensayo de placas. Por ejemplo, se seleccionan las placas más grandes en el ensayo de placas. En tales ejemplos, las 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 más grandes se pueden seleccionar y aislar como un producto aislado clonal y someter a ensayo cada uno para determinar la toxicidad y antitumorigenicidad en las etapas (iii) y (iv) del método. En otros ejemplos, la placa que se selecciona es más grande que el tamaño de placa promedio de las placas producidas por la muestra del virus LIVP.

En los métodos descritos en la presente memoria para seleccionar una cepa clonal, en la etapa iii) se evalúa la toxicidad *in vivo* tras la administración de un producto aislado clonal seleccionado a un primer sujeto y la administración del virus de referencia a un segundo sujeto, en donde el primer y segundo sujetos son de la misma especie, tamaño y género y el virus se administra en la misma o similar cantidad y bajo el mismo o similar régimen de dosificación para cada sujeto; y se evalúa y mide un parámetro indicativo de toxicidad en los sujetos como indicador del efecto tóxico. Por ejemplo, el parámetro indicativo de toxicidad es la disminución o la reducción de la supervivencia del sujeto, la disminución del peso corporal, la fiebre, la erupción, la alergia, la fatiga, el dolor abdominal, la inducción de una respuesta inmunológica en el sujeto o la formación de pústulas. En los métodos de la presente memoria para seleccionar una cepa clonal, en la etapa v) seleccionar un virus que muestre una menor toxicidad incluye a) comparar el parámetro medido indicativo de toxicidad entre el primer sujeto y el segundo sujeto; y b) identificar o seleccionar un producto aislado clonal que muestre un menor efecto tóxico en comparación con el efecto tóxico exhibido por el virus de referencia. Por ejemplo, un producto aislado clonal que exhibe una menor toxicidad es aquel que no produce una disminución del peso del primer sujeto o una menor disminución de peso del primer sujeto en comparación con el segundo sujeto. En otros ejemplos, un producto aislado clonal que exhibe una menor toxicidad es aquel que exhibe una mayor supervivencia del primer sujeto en el transcurso del tratamiento en comparación con el segundo sujeto. En ejemplos adicionales, se selecciona un producto aislado clonal que exhibe una menor toxicidad que no de como resultado la muerte del sujeto durante el tratamiento.

En los métodos descritos en la presente memoria para seleccionar una cepa de virus clonal, en la etapa iv) se evalúa la antitumorigenicidad de un producto aislado clonal seleccionado y el virus de referencia *in vitro* o *in vivo* después de la administración a un sujeto; y se evalúa y mide un parámetro indicativo de antitumorigenicidad. Por ejemplo, cuando se evalúa la antitumorigenicidad *in vivo* después de la administración, se administra un producto aislado clonal seleccionado a un primer sujeto y el virus de referencia se administra a un segundo sujeto, en donde el primer y segundo sujetos son de la misma especie, tamaño y género y el virus se administra en la misma o similar cantidad y bajo el mismo o similar régimen de dosificación a cada sujeto. El parámetro indicativo de antitumorigenicidad puede incluir infectividad de células tumorales, acumulación de virus en tejidos tumorales, replicación de ácido nucleico viral en células tumorales, producción de virus en células tumorales, expresión génica viral en células tumorales, citotoxicidad en células tumorales, selectividad de células tumorales, selectividad del tipo

de célula tumoral, disminución del tamaño del tumor, aumento del volumen del tumor, disminución del peso del tumor o iniciación de respuestas inmunitarias antitumorales específicas y no específicas. En los métodos descritos en la presente memoria para seleccionar una cepa de virus clonal, en la etapa v) la selección de un virus que muestre una mayor antitumorigenicidad incluye c) comparar el parámetro medido indicativo de la antitumorigenicidad exhibida por el producto aislado clonal seleccionado y el virus de referencia; y d) identificar o seleccionar un producto aislado clonal que muestre una mayor antitumorigenicidad en comparación con la función antitumoral del virus de referencia. Por ejemplo, una mayor antitumorigenicidad significa que el producto aislado clonal exhibe al menos o aproximadamente al menos o 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% o más de antitumorigenicidad en un ensayo *in vitro* o *in vivo* que evalúa un parámetro indicativo de antitumorigenicidad en comparación con el antitumorigenicidad del virus de referencia según lo evaluado en el mismo ensayo en las mismas condiciones o similares.

En los métodos de la presente memoria para seleccionar una cepa de virus clonal, la etapa de evaluación de la toxicidad o antitumorigenicidad *in vivo* después de la administración a un sujeto es para un sujeto que no es un animal o es un ser humano. En los métodos de la presente memoria, el sujeto puede tener un tumor o cáncer. Por ejemplo, el tumor es un tumor de mama, tumor de próstata, tumor de ovario, tumor de pulmón, tumor de colon o tumor pancreático. El tumor puede ser un xenoinjerto, un aloinjerto o un tumor espontáneo/natural.

En los métodos de la presente memoria para seleccionar una cepa de virus clonal, se puede analizar el genoma de la cepa clonal seleccionada para evaluar la homogeneidad de la secuencia, de manera que solo se seleccionen aquellos productos aislados que tienen una secuencia homogénea del genoma. Por ejemplo, el genoma se analiza mediante un método tal como secuenciación, análisis de restricción, PCR, Transferencia Southern o expresión de proteínas.

En la presente memoria se describe una cepa clonal que se produce o selecciona mediante cualquiera de los métodos de la presente memoria para seleccionar una cepa clonal.

Descripción detallada

Esquema

A. Definiciones

B. Métodos de aislamiento de cepas de virus vaccinia clonales

1. Preparación o mezcla de virus parental
2. Aislamiento de cepas clonales
3. Antitumorigenicidad

- a. Indicador de replicación asociado a tumores
- b. Citotoxicidad
- c. Crecimiento tumoral

4. Toxicidad/Seguridad
5. Análisis del genoma

C. Cepas aisladas de virus clonales

1. LIVP
 2. Cepas Clonales de LIVP
- Cepas clonales LIVP ilustrativas

D. Modificación de las cepas LIVP

1. Ácido nucleico heterólogo
2. Modificaciones ilustrativas
 - a. Productos génicos de diagnóstico
 - b. Productos génicos terapéuticos.
 - c. Antígenos
 - d. Modificaciones para alterar la atenuación de los virus.
3. Control de la expresión de genes heterólogos.
4. Métodos para generar virus modificados.

E. Propagación y producción de virus.

1. Células anfitrionas para propagación
2. Determinación de la concentración
3. Métodos de almacenamiento
4. Preparación de virus

5

F. Composiciones farmacéuticas, combinaciones y kits.

1. Composiciones farmacéuticas
2. Células anfitrionas
3. Combinaciones
4. Kits

10

G. Métodos terapéuticos, de diagnóstico y de seguimiento.

1. Métodos terapéuticos
2. Métodos de diagnóstico y de seguimiento
3. Administración

15

- a. Etapas previos a la administración del virus.
- b. Modo de administración
- c. Dosis y régimen de dosificación
- d. Administraciones conjuntas

20

- i. Administración de una pluralidad de virus.
- ii. Compuestos Terapéuticos
- iii. Inmunoterapia y terapias biológicas.

25

- e. Estado del sujeto

30

4. Seguimiento

- a. Seguimiento de la expresión génica viral.
- b. Seguimiento del tamaño del tumor
- c. Seguimiento del título de anticuerpos
- d. Seguimiento de diagnósticos generales de salud.
- e. Seguimiento coordinado con el tratamiento.

35

H. Ejemplos

40 A. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece/pertenecen invención o invenciones. En caso de que haya una pluralidad de definiciones para los términos en la presente memoria, prevalecerán las de esta sección. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección de este tipo, se entiende que dichos identificadores pueden cambiar y la información concreta en Internet puede ser intermitente, pero se conoce información equivalente y se puede acceder a ella fácilmente, por ejemplo, buscando en Internet. y/o bases de datos apropiadas. La referencia a esto evidencia la disponibilidad y difusión pública de dicha información.

45

Como se emplea en la presente memoria, la cepa Lister del Instituto de Preparaciones Virales (LIVP) o la cepa de virus LIVP se refiere a una cepa de virus que es la cepa Lister atenuada (ATCC, número de catálogo VR-1549) que se produjo por adaptación a la piel de ternera en el Instituto de Preparaciones Virales, Moscú, Rusia (Al'tshtein et al. (1985) Dokl. Acad. Nauk URSS 285:696-699). La cepa LIVP se puede obtener, por ejemplo, del Instituto de Preparaciones Virales, Moscú, Rusia (véase, p. ej., Kutinova et al. (1995) Vaccine 13:487-493); the Microorganism Collection of FSRI SRC VB Vector (Kozlova et al. (2010) Environ. Sci. Technol. 44:5121-5126); o se puede obtener en el Instituto de Virología Ivanovsky de Moscú (C0355 K0602; Agranovski et al. (2006) Atmospheric Environment 40:3924-3929). También es bien conocida por los expertos en la técnica; fue la cepa de vacuna utilizada para la vacunación en la URSS y en toda Asia e India. La cepa ahora es utilizada por los investigadores y es bien conocida (véanse, p. ej., Altshteyn et al. (1985) Dokl. Acad. Nauk URSS 285:696-699; Kutinova et al. (1994) Arch. Virol 134:1-9; Kutinova et al. (1995) Vaccine 13:487-493; Shchelkunov et al. (1993) Virus Research 28:273-283; Sroller et al. (1998) Archives Virology 143:1311-1320.; Zinoviev et al., (1994) Gene 147:209-214; y Chkheidze et al. (1993) FEBS 336:340-342). Entre las cepas LIVP hay una que contiene un genoma que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10, o una secuencia que es al menos o al menos aproximadamente 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10. Una cepa de virus LIVP abarca cualquier cepa de virus o preparación de virus que se obtiene mediante la propagación de LIVP a través de pases repetidos en líneas

65

celulares.

5 Como se emplea en la presente memoria, una cepa clonal LIVP o un producto aislado clonal LIVP se refiere a un virus que se obtiene de la cepa del virus LIVP por aislamiento de placas, u otro método en el que se propaga un solo clon, y que tiene un genoma que tiene una secuencia homogénea. Por lo tanto, una cepa clonal LIVP incluye un virus cuyo genoma está presente en una preparación de virus propagado a partir de LIVP. Una cepa clonal LIVP no incluye un virus LIVP recombinante que está genéticamente diseñado por medios recombinantes utilizando métodos de ADN recombinante para introducir ácido nucleico heterólogo. En particular, una cepa clonal LIVP tiene un genoma que no contiene ácido nucleico heterólogo que contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína heteróloga. Por ejemplo, una cepa clonal LIVP tiene un genoma que no contiene ácido nucleico heterólogo no viral que contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína heteróloga no viral. Sin embargo, como se describe en la presente memoria, se entiende que se puede modificar el genoma de cualquiera de las cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria por medios recombinantes para generar un virus recombinante. Por ejemplo, una cepa clonal LIVP se puede modificar para generar un virus LIVP recombinante que contiene la inserción de nucleótidos que contienen un marco de lectura abierto que codifica una proteína heteróloga.

20 Como se emplea en la presente memoria, LIVP 1.1.1 es una cepa clonal LIVP que tiene un genoma que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1, o un genoma que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1.

25 Como se emplea en la presente memoria, LIVP 2.1.1 es una cepa clonal LIVP que tiene un genoma que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 2, o un genoma que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 2.

30 Como se emplea en la presente memoria, LIVP 4.1.1 es una cepa clonal LIVP que tiene un genoma que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4, o un genoma que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4.

35 Como se emplea en la presente memoria, LIVP 5.1.1 es una cepa clonal LIVP que tiene un genoma que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5, o un genoma que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5.

40 Como se emplea en la presente memoria, LIVP 6.1.1 es una cepa clonal LIVP que tiene un genoma que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 6, o un genoma que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 6.

45 Como se emplea en la presente memoria, LIVP 7.1.1 es una cepa clonal LIVP que tiene un genoma que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 7, o un genoma que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 7.

50 Como se emplea en la presente memoria, LIVP 8.1.1 es una cepa clonal LIVP que tiene un genoma que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 8, o un genoma que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 8.

55 Como se emplea en la presente memoria, una cepa del virus LIVP modificado se refiere a un virus LIVP que tiene un genoma que no está contenido en LIVP, pero es un virus que se produce por modificación de un genoma de una cepa obtenida de LIVP. Normalmente, el genoma del virus se modifica por sustitución (reemplazo), inserción (adición) o delección (truncamiento) de nucleótidos. Las modificaciones se pueden realizar utilizando cualquier método conocido por un experto en la técnica, tal como la ingeniería genética y métodos de ADN recombinante. Por lo tanto, un virus modificado es un virus que se altera en su genoma en comparación con el genoma de un virus parental. Los virus modificados ilustrativos tienen una o más secuencias de ácido nucleico heterólogas insertadas en el genoma del virus. Típicamente, el ácido nucleico heterólogo contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína heteróloga. Por ejemplo, los virus modificados en la presente memoria pueden contener una o más secuencias de ácido nucleico heterólogas en forma de un casete de expresión génica para la expresión de un gen heterólogo.

60 Como se emplea en la presente memoria, "producción por métodos recombinantes" o "métodos que utilizan métodos de ADN recombinante" o variaciones de los mismos se refiere al uso de métodos bien conocidos de biología molecular para expresar proteínas codificadas por ADN clonado.

65 Como se emplea en la presente memoria, un "casete de expresión génica" o "casete de expresión" es una construcción de ácido nucleico, que contiene elementos de ácido nucleico que son capaces de efectuar la expresión de un gen en anfitriones que son compatibles con dichas secuencias. Los casetes de expresión incluyen al menos promotores y, opcionalmente, señales de terminación de la transcripción. Típicamente, el casete de expresión incluye un ácido nucleico que se transcribirá operablemente unido a un promotor. Los casetes de expresión pueden

contener genes que codifican, por ejemplo, un producto génico terapéutico, o una proteína detectable o un gen marcador seleccionable.

5 Como se emplea en la presente memoria, LIVP GLV-1h68 es un virus LIVP que contiene *ruc-gfp* (un gen de fusión de luciferasa y proteína verde fluorescente (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.976.796), genes informadores de beta-galactosidasa (*LacZ*) y beta-glucuronidasa (*gusA*) insertados en los loci F14.5L, J2R (timidina quinasa) y A56R (hemaglutinina), respectivamente. El genoma de GLV-1h68 tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9.

10 Como se emplea en la presente memoria, una preparación de virus, por ejemplo una preparación de virus LIVP, se refiere a una composición de virus obtenida por propagación de una cepa de virus, por ejemplo una cepa de virus LIVP, una cepa clonal LIVP o una cepa de virus modificada o recombinante, *in vivo* o *in vitro* en un sistema de cultivo. Por ejemplo, una preparación de virus LIVP se refiere a una composición viral obtenida por propagación de una cepa de virus en células anfitrionas, típicamente tras la purificación del sistema de cultivo utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica. Una preparación de virus generalmente se compone de una serie de partículas de virus o viriones. Si se desea, el número de partículas de virus en la muestra o preparación se puede determinar utilizando un ensayo de placas para calcular el número de unidades formadoras de placa por volumen unitario de muestra (ufu/mL), suponiendo que cada placa formada es representativa de una partícula infectiva de virus. Cada partícula de virus o virión en una preparación puede tener la misma secuencia genómica en comparación con otras partículas de virus (es decir, la preparación tiene secuencias homogéneas) o puede tener diferentes secuencias genómicas (es decir, la preparación tiene secuencias heterogéneas). Los expertos en la técnica entenderán que, en ausencia de aislamiento clonal, puede producirse heterogeneidad o diversidad en el genoma de un virus a medida que se produce el virus, tal como por eventos de recombinación homóloga que se producen en los procesos de selección natural de cepas de virus (Plotkin y Orenstein (eds) "Recombinant Vaccinia Virus Vaccines" en Vaccines, 3ª edición (1999)).

30 Como se emplea en la presente memoria, una mezcla de virus es una preparación de virus que contiene varias partículas de virus que difieren en sus secuencias genómicas. La mezcla de virus se puede obtener al infectar un sistema de cultivo, por ejemplo, células anfitrionas, con dos o más cepas de virus diferentes, o una cepa de virus y ADN genómico o ADN clonado, seguido de la propagación y purificación del virus resultante. Para los fines de la presente memoria, una preparación de virus LIVP puede incluir una mezcla de virus obtenida por propagación de células infectadas con una cepa LIVP y otro virus, ADN genómico o ADN clonado, seguido del aislamiento de una preparación de virus del cultivo, donde la preparación contiene virus de progenie producidos por la infección. Por ejemplo, la otra cepa del virus puede ser poxvirus, tal como el avipoxvirus, el virus del mixoma u otro virus vaccinia; un herpesvirus tal como el virus herpes simple (HSV), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), hepadnavirus (p. ej., virus de la hepatitis B), virus de polio, virus del papiloma, adenovirus y virus adenoasociados; y virus de ADN monocatenario, tales como parvovirus. El otro virus puede ser un virus atenuado, un virus oncolítico u otro virus con actividad antitumoral conocida y/o toxicidad moderada a leve.

40 Como se emplea en la presente memoria, "virus" se refiere a cualquiera de un gran grupo de entidades infecciosas que no pueden crecer o replicarse sin una célula anfitriona. Los virus típicamente contienen una capa proteica que rodea un núcleo de ARN o ADN de material genético, pero no una membrana semipermeable, y son capaces de crecer y multiplicarse solo en células vivas. Los virus incluyen, pero no se limitan a, poxvirus, herpesvirus, adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus, retrovirus, rabdovirus, virus del papiloma, virus de la estomatitis vesicular, virus del sarampión, virus de la enfermedad de Newcastle, picornavirus, virus del papiloma, virus Coxsackie, virus de la influenza, virus de las paperas, poliovirus y virus del bosque semliki.

50 Como se emplea en la presente memoria, los virus oncolíticos se refieren a virus que se replican selectivamente en células tumorales en sujetos con tumores. Algunos virus oncolíticos pueden destruir una célula tumoral después de la infección de la célula tumoral. Por ejemplo, un virus oncolítico puede causar la muerte de la célula tumoral lisando la célula tumoral o induciendo la muerte celular de la célula tumoral.

55 Como se emplea en la presente memoria, un "virus LIVP atenuado" con referencia a LIVP se refiere a un virus que presenta una virulencia, toxicidad o patogenicidad reducidas o menores en comparación con LIVP.

60 Como se emplea en la presente memoria, "toxicidad" (también denominada virulencia o patogenicidad en la presente memoria) con referencia a un virus se refiere a los efectos nocivos o tóxicos para un anfitrión tras la administración del virus. Para un virus oncolítico, tal como LIVP, la toxicidad de un virus se asocia con su acumulación en órganos o tejidos no tumorales, lo que puede afectar la supervivencia del anfitrión o provocar efectos nocivos o tóxicos. La toxicidad puede medirse evaluando uno o más parámetros indicativos de toxicidad. Estos incluyen la acumulación en tejidos no tumorales y los efectos sobre la viabilidad o la salud del sujeto al que se ha administrado, tales como los efectos sobre el peso.

65 Como se emplea en la presente memoria, un "parámetro indicativo de toxicidad" se refiere a una propiedad mediada

por un virus que está asociada con su toxicidad, virulencia o patogenicidad. Parámetros indicativos de toxicidad en general son evaluados *in vivo* después de la administración a un sujeto. Los parámetros ilustrativos indicativos de toxicidad incluyen, pero no se limitan a, disminución de la supervivencia del sujeto, disminución del peso corporal, fiebre, erupción, alergia, fatiga, dolor abdominal, inducción de una respuesta inmunológica en el sujeto y formación de pústulas. Los ensayos o medidas que evalúan cualquiera de los parámetros anteriores u otras propiedades tóxicas conocidas por un experto en la técnica se describen en la presente memoria o son conocidos por un experto en la técnica. Por lo tanto, un virus que media una o más de las actividades o propiedades anteriores en un anfitrión exhibe cierto grado de toxicidad.

Como se emplea en la presente memoria, "menor toxicidad" significa que los efectos tóxicos o perjudiciales sobre la administración del virus a un anfitrión se atenúan o disminuyen en comparación con un anfitrión no tratado con el virus o en comparación con un anfitrión al que se administra otro virus de referencia o de control. Para los fines de la presente memoria, un ejemplo de un virus de referencia o de control es el virus LVP designado GLV-1h68. Se puede determinar si la toxicidad se reduce o disminuye, evaluando el efecto de un virus y, si fuera necesario, un virus de control o de referencia, en un parámetro indicativo de toxicidad. Se entiende que al comparar la actividad de dos o más virus diferentes, la cantidad de virus (p. ej. ufp) utilizada en un ensayo *in vitro* o administrada *in vivo* es la misma o similar y las condiciones (p. ej. régimen de dosificación *in vivo*) del ensayo *in vitro* o la evaluación *in vivo* son las mismas o similares. Por ejemplo, al comparar efectos sobre la administración *in vivo* de un virus y un virus de control o de referencia los sujetos son de la misma especie, tamaño, género y el virus se administra en la misma cantidad o similar bajo el mismo régimen de dosificación o similar. En particular, un virus con menor toxicidad puede significar que después de la administración del virus a un anfitrión, por ejemplo para el tratamiento de una enfermedad, el virus no se acumula en órganos y tejidos no tumorales en el anfitrión hasta el punto que de como resultado daño o perjuicio al anfitrión, o que afecte a la supervivencia del anfitrión en mayor medida que la enfermedad que se está tratando o en mayor medida que un virus de control o de referencia. Por ejemplo, un virus con menor toxicidad incluye un virus que no provoca la muerte del sujeto durante el tratamiento.

Como se emplea en la presente memoria, la acumulación de un virus en un tejido concreto se refiere a la distribución del virus en tejidos concretos de un organismo anfitrión después de un período de tiempo posterior a la administración del virus al anfitrión, el tiempo suficiente para que el virus infecte los órganos o tejidos del anfitrión. Como reconocerá un experto en la técnica, el período de tiempo para la infección de un virus variará dependiendo del virus, el órgano o los órganos o el tejido o los tejidos, la inmunocompetencia del anfitrión y la dosis del virus. En general, la acumulación se puede determinar en puntos temporales de aproximadamente menos de 1 día, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2, 3 o 4 semanas, de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6 meses o más después de la infección con el virus. Para los fines de la presente memoria, los virus se acumulan preferentemente en tejido inmunoprivilegiado, tal como tejido inflamado o tumoral, pero se eliminan de otros tejidos y órganos, tales como tejidos no tumorales, en el anfitrión en la medida en que la toxicidad del virus es leve o tolerable y como mucho, no fatal.

Como se emplea en la presente memoria, "acumulación preferente" se refiere a la acumulación de un virus en una primera ubicación a un nivel más alto que la acumulación en una segunda ubicación (es decir, la concentración de partículas virales, o título, en la primera ubicación es más alta que la concentración de partículas virales en la segunda localización). Por lo tanto, un virus que se acumula preferentemente en tejido inmunoprivilegiado (tejido que está protegido del sistema inmunitario), tal como tejido inflamado, y tejido tumoral, con respecto a tejidos u órganos normales, se refiere a un virus que se acumula en tejido inmunoprotegido, por ejemplo de tumor, a un nivel superior (es decir, concentración o título viral) que el virus que se acumula en tejidos u órganos normales.

Como se emplea en la presente memoria, "actividad antitumoral" o "antitumorogénica" se refiere a cepas de virus que previenen o inhiben la formación o el crecimiento de tumores *in vitro* o *in vivo* en un sujeto. La actividad antitumoral se puede determinar evaluando un parámetro o parámetros indicativos de actividad antitumoral.

Como se emplea en la presente memoria, un "parámetro indicativo de actividad antitumoral o actividad antitumorogénica" se refiere a una propiedad mediada por un virus que está asociado con la actividad antitumoral. Se pueden evaluar los parámetros indicativos de actividad antitumoral *in vitro* o *in vivo* después de la administración a un sujeto. Los parámetros ilustrativos indicativos de actividad antitumoral incluyen, pero no se limitan a, infectividad de células tumorales, acumulación de virus en tejidos tumorales, replicación de ácido nucleico viral en células tumorales, producción de virus en células tumorales, expresión génica viral en células tumorales, citotoxicidad en células tumorales, selectividad de células tumorales, selectividad del tipo de células tumorales, disminución del tamaño del tumor, aumento del volumen del tumor, disminución del peso del tumor e iniciación de respuestas inmunitarias antitumorales específicas y no específicas. Un experto en la técnica conoce los ensayos que evalúan cualquiera de los parámetros anteriores u otras propiedades antitumorogénicas. Los ensayos ilustrativos se describen en la presente memoria. Por lo tanto, un virus que exhibe una o más de las actividades o propiedades anteriores exhibe actividad antitumoral.

Como se emplea en la presente memoria, actividad "mayor" o "potenciada" con referencia a la actividad antitumoral

o la antitumorogenicidad significa que una cepa de virus es capaz de prevenir o inhibir la formación o el crecimiento de tumores. *in vitro* o *in vivo* en un sujeto en mayor medida que un virus de referencia o de control o en mayor medida que la ausencia de tratamiento con el virus. Para los fines de la presente memoria, un ejemplo de un virus de referencia o de control es el virus L1VP designado GLV-1h68. Se puede determinar si la actividad antitumoral es "mayor" o "potenciada" evaluando el efecto de un virus y, si fuera necesario, un virus de control o de referencia, sobre un parámetro indicativo de actividad antitumoral. Se entiende que al comparar la actividad de dos o más virus diferentes, la cantidad de virus (p. ej. ufp) utilizada en un ensayo *in vitro* o administrada *in vivo* es la misma o similar, y las condiciones (p. ej. régimen de dosificación *in vivo*) del ensayo *in vitro* o la evaluación *in vivo* son los mismos o similares.

Como se emplea en la presente memoria, un ácido nucleico heterólogo (también denominado ácido nucleico exógeno o ácido nucleico foráneo) se refiere a un ácido nucleico que normalmente no es producido *in vivo* por un organismo o virus a partir del cual se expresa o que es producido por un organismo o un virus pero que se encuentra en un lugar diferente, o que media o codifica mediadores que alteran la expresión de ácido nucleico endógeno, tal como ADN, al afectar la transcripción, la traducción, u otros procesos bioquímicos regulables. Por lo tanto, el ácido nucleico heterólogo no suele ser endógeno a un virus en el que se introduce. El ácido nucleico heterólogo puede referirse a una molécula de ácido nucleico de otro virus en el mismo organismo u otro organismo, incluida la misma especie u otra especie. El ácido nucleico heterólogo, sin embargo, puede ser endógeno, pero es un ácido nucleico que se expresa desde un lugar diferente o se altera en su expresión o secuencia (p. ej., un plásmido). Así, el ácido nucleico heterólogo incluye una molécula de ácido nucleico que no está presente en la orientación o posición exactas, ya que la molécula de ácido nucleico homóloga, tal como ADN, se encuentra en un genoma. En general, aunque no necesariamente, dicho ácido nucleico codifica ARN y proteínas que normalmente no son producidos por el virus o de la misma manera en el virus en el que se expresa. Cualquier ácido nucleico, tal como ADN, que un experto en la técnica reconozca o considere como heterólogo, exógeno o ajeno al virus en el que se expresa el ácido nucleico, está incluido en la presente memoria como ácido nucleico heterólogo. Los ejemplos de ácido nucleico heterólogo incluyen, pero no se limitan a, ácido nucleico que codifica péptidos/proteínas exógenos, incluyendo agentes de diagnóstico y/o terapéuticos. Las proteínas codificadas por el ácido nucleico heterólogo pueden expresarse dentro del virus, secretarse o expresarse en la superficie del virus en el que se ha introducido el ácido nucleico heterólogo.

Como se emplea en la presente memoria, una cepa clonal viral o una preparación de cepa viral que contiene ácido nucleico heterólogo se refiere a aquellas cepas que contienen ácido nucleico no presente en la cepa clonal parental. Por ejemplo, el virus cuya secuencia se expone en SEQ ID NO: 10 es una cepa clonal, pero el virus de SEQ ID NO: 9, designado GLV-1h68, contiene ácido nucleico heterólogo, tal como el inserto designado RUC-GFP.

Como se emplea en la presente memoria, una proteína heteróloga o polipéptido heterólogo (también denominada proteína exógena, polipéptido exógeno, proteína foránea o polipéptido foráneo) se refiere a una proteína que normalmente no es producida por un virus.

Como se emplea en la presente memoria, la conexión operativa de ácidos nucleicos heterólogos a secuencias reguladoras y efectoras de nucleótidos, tales como promotores, potenciadores, sitios de parada transcripcional y traduccional, y otras secuencias señal se refiere a la relación entre dicho ácido nucleico, tal como ADN, y tales secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, la conexión operativa de ADN heterólogo a un promotor se refiere a la relación física entre el ADN y el promotor, de manera que la transcripción de dicho ADN se inicia desde el promotor por una ARN polimerasa que reconoce específicamente, se une y transcribe el ADN. Por lo tanto, conectado operativamente o asociado operacionalmente se refiere a la relación funcional de un ácido nucleico, tal como ADN, con secuencias reguladoras y efectoras de nucleótidos, tales como promotores, potenciadores, sitios de parada transcripcional y traduccional, y otras secuencias señal. Por ejemplo, la conexión operativa de ADN a un promotor se refiere a la relación física y funcional entre el ADN y el promotor, de manera que la transcripción de dicho ADN se inicia desde el promotor por una ARN polimerasa que reconoce específicamente, se une y transcribe el ADN. Para optimizar la expresión y/o la transcripción, puede ser necesario eliminar, agregar o alterar porciones 5' no traducidas de los clones para eliminar codones de iniciación (es decir, inicio) de la traducción alternativos adicionales, potencialmente inapropiados u otras secuencias que pueden interferir o reducir la expresión, ya sea a nivel de transcripción o traducción. Además, se pueden insertar sitios de unión al ribosoma consenso inmediatamente 5' del codón de inicio y pueden mejorar la expresión (véanse, p. ej., Kozak J. Biol. Chem. 266: 19867-19870 (1991) y Shine and Delgarno, Nature 254 (5495):34-38 (1975)). La conveniencia de (o la necesidad de) tal modificación se puede determinar empíricamente.

Como se emplea en la presente memoria, un promotor heterólogo se refiere a un promotor que normalmente no se encuentra en el organismo o virus de tipo salvaje o que se encuentra en un lugar diferente en comparación con un organismo o virus de tipo salvaje. Un promotor heterólogo a menudo no es endógeno a un virus en el que se introduce, pero se ha obtenido de otro virus o se ha preparado sintéticamente. Un promotor heterólogo puede referirse a un promotor de otro virus en el mismo organismo u otro organismo, incluida la misma especie u otra especie. Un promotor heterólogo, sin embargo, puede ser endógeno, pero es un promotor que se altera en su secuencia o se produce en un locus diferente (p. ej., en una ubicación diferente en el genoma o en un plásmido). Por

lo tanto, un promotor heterólogo incluye un promotor que no está presente en la orientación o posición exactas, ya que el promotor homólogo se encuentra en un genoma.

5 Un promotor sintético es un promotor heterólogo que tiene una secuencia de nucleótidos que no se encuentra en la naturaleza. Un promotor sintético puede ser una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia sintética o una secuencia obtenida de un promotor nativo o una porción del mismo. Un promotor sintético también puede ser un promotor híbrido compuesto de diferentes elementos derivados de diferentes promotores nativos.

10 Como se emplea en la presente memoria, el régimen de dosificación se refiere a la cantidad de agente, por ejemplo, un virus u otro agente administrado, y la frecuencia de administración en el transcurso de un ciclo de administración. El régimen de dosificación está en función de la enfermedad o afección que se vayan a tratar, y por lo tanto puede variar.

15 Como se emplea en la presente memoria, la frecuencia de administración se refiere al número de veces que se administra un agente durante el ciclo de administración. Por ejemplo, la frecuencia puede ser de días, semanas o meses. Por ejemplo, la frecuencia puede ser administración una vez durante un ciclo de administración, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces o siete veces. La frecuencia puede referirse a días consecutivos durante el ciclo de administración. La frecuencia concreta está en función de la enfermedad o afección concreta tratada.

20 Como se emplea en la presente memoria, un "ciclo de administración" se refiere al programa repetido del régimen de dosificación de administración de un virus que se repite en administraciones sucesivas. Por ejemplo, un ciclo ejemplar de administración es un ciclo de 28 días.

25 Como se emplea en la presente memoria, el tratamiento de un sujeto que tiene una afección, trastorno o enfermedad significa cualquier forma de tratamiento en la que los síntomas de la afección, trastorno o enfermedad se mejoran o se alteran beneficiosamente de otra manera. El tratamiento abarca cualquier uso farmacéutico de los virus descritos y proporcionados en la presente memoria.

30 Como se emplea en la presente memoria, una enfermedad o trastorno se refiere a una afección patológica en un organismo que resulta de, por ejemplo, una infección o defecto genético, y se caracteriza por síntomas identificables. Una enfermedad ilustrativa como se describe en la presente memoria es una enfermedad neoplásica, tal como el cáncer.

35 Como se emplea en la presente memoria, la enfermedad neoplásica se refiere a cualquier trastorno que conlleve cáncer, incluido el desarrollo, el crecimiento, la metástasis y la progresión de tumores.

40 Como se emplea en la presente memoria, cáncer es un término para las enfermedades causadas o caracterizadas por cualquier tipo de tumor maligno, incluidos los cánceres metastásicos, los tumores linfáticos y los cánceres de la sangre. Los cánceres ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, leucemia, linfoma, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de cérvix, cáncer de próstata, tumores glioma, adenocarcinomas, cáncer de hígado y cáncer de piel. Los cánceres ilustrativos en seres humanos incluyen tumor de vejiga, tumor de mama, tumor de próstata, carcinoma de células basales, cáncer del tracto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer cerebral y del SNC (p. ej., tumor glioma), cáncer cervical, coriocarcinoma, cáncer de colon y recto, cáncer de tejido conectivo, cáncer del sistema digestivo; cáncer de endometrio, cáncer de esófago; cáncer de ojo; cancer de cabeza y cuello; cáncer gástrico; neoplasia intraepitelial; cancer de riñón; cáncer de laringe; leucemia; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (p. ej., células pequeñas y células no pequeñas); linfoma que incluye linfoma de Hodgkin y no Hodgkin; melanoma; mieloma, neuroblastoma, cáncer de cavidad oral (p. ej., labio, lengua, boca y faringe); cáncer de ovarios; cáncer pancreático, retinoblastoma; rhabdomyosarcoma; cáncer rectal, cáncer renal, cáncer del sistema respiratorio; sarcoma, cáncer de piel; cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides; cáncer uterino, cáncer del sistema urinario, así como otros carcinomas y sarcomas. Los cánceres ilustrativos comúnmente diagnosticados en perros, gatos y otras mascotas incluyen, pero no se limitan a, linfosarcoma, osteosarcoma, tumores mamarios, mastocitoma, tumor cerebral, melanoma, carcinoma adenoescamoso, tumor carcinoide de pulmón, tumor de la glándula bronquial, adenocarcinoma bronquial, fibroma, mixocondroma, sarcoma pulmonar, neurosarcoma, osteoma, papiloma, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, tumor de Wilm, linfoma de Burkitt, neuroblastoma, osteoclastoma, neoplasia oral, fibrosarcoma, osteosarcoma y rhabdomyosarcoma, carcinoma genital de células escamosas, tumor venéreo transmisible, tumor testicular, seminoma, tumor de células de Sertoli, hemangiopericitoma, histiocitoma, cloroma (p. ej., sarcoma granulocítico), papiloma corneal, carcinoma de células escamosas de la córnea, hemangiosarcoma, mesotelioma pleural, tumor de células basales, timoma, tumor estomacal, carcinoma de la glándula suprarrenal, papilomatosis oral, hemangioendotelioma y cistoadenoma, linfoma folicular, linfosarcoma intestinal, finrosarcoma y carcinoma pulmonar de células escamosas. Los cánceres ilustrativos diagnosticados en roedores, tales como un hurón, incluyen, pero no se limitan a, insulinooma, linfoma, sarcoma, neuroma, tumor de células de los islotes pancreáticos, linfoma MALT gástrico y adenocarcinoma gástrico. Las neoplasias ilustrativas que afectan al ganado agrícola incluyen, pero no se limitan a, leucemia, hemangiopericitoma y neoplasia ocular bovina (en ganado vacuno); fibrosarcoma prepucial, carcinoma

- 5 ulceroso de células escamosas, carcinoma prepucial, neoplasia de tejido conectivo y mastocitoma (en caballos); carcinoma hepatocelular (en cerdos); linfoma y adenomatosis pulmonar (en ovejas); sarcoma pulmonar, linfoma, sarcoma de Rous, retículo-endoteliosis, fibrosarcoma, nefroblastoma, linfoma de células B y leucosis linfoide (en especies aviares); retinoblastoma, neoplasia hepática, linfosarcoma (linfoma linfoblástico), leucemia plasmocitoide y sarcoma de vejiga natatoria (en peces), linfadenitis caseosa (CLA): enfermedad crónica, infecciosa y contagiosa de ovejas y cabras causada por la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, y el tumor pulmonar contagioso de las ovejas causado por jaagsiekte.
- 10 Como se emplea en la presente memoria, una "metástasis" se refiere a la propagación del cáncer de una parte del cuerpo a otra. Por ejemplo, en el proceso metastásico, las células malignas se pueden diseminar desde el sitio del tumor primario en el que surgieron las células malignas y moverse hacia los vasos sanguíneos y linfáticos, que transportan las células a los tejidos normales en otro lugar de un organismo donde las células continúan proliferando. Un tumor formado por células que se diseminaron por metástasis se denomina "tumor metastásico", "tumor secundario" o "metástasis".
- 15 Como se emplea en la presente memoria, el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad neoplásica, que incluye un tumor o metástasis, significa cualquier forma de tratamiento en la que los síntomas de tener la enfermedad neoplásica mejoran o se alteran de manera beneficiosa. Típicamente, el tratamiento de un tumor o metástasis en un sujeto abarca cualquier forma de tratamiento que de como resultado la disminución del crecimiento del tumor, la lisis de las células tumorales, la reducción del tamaño del tumor, la prevención del nuevo crecimiento tumoral o la prevención de la metástasis de un tumor primario, incluida la inhibición de la vascularización del tumor, la división celular tumoral, la migración de la célula tumoral o la degradación de la membrana basal o de la matriz extracelular.
- 20 Como se emplea en la presente memoria, la mejora o el alivio de los síntomas de un trastorno concreto, por ejemplo mediante la administración de una composición farmacéutica concreta, se refiere a cualquier disminución, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria que se pueda atribuir o asociar con la administración de la composición.
- 25 Como se emplea en la presente memoria, una cantidad eficaz, o una cantidad terapéuticamente eficaz, de un virus o compuesto para tratar una enfermedad concreta es una cantidad para mejorar, o de alguna manera reducir los síntomas asociados con la enfermedad. La cantidad variará de un individuo a otro y dependerá de varios factores, entre los que se incluyen, pero no están limitados a, la edad, el peso, el estado físico general del paciente y la gravedad de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz se puede administrar como una dosis única o se puede administrar en múltiples dosis según un régimen, con lo que esta es eficaz. La cantidad puede curar la enfermedad pero, por lo general, se administra para mejorar los síntomas de la enfermedad. Puede requerirse una administración repetida para lograr la mejoría deseada de los síntomas.
- 30 Como se emplea en la presente memoria, una cantidad eficaz, o una cantidad terapéuticamente eficaz, de un virus o compuesto para tratar una enfermedad neoplásica, incluyendo un tumor o metástasis, es una cantidad para mejorar, o de alguna manera reducir los síntomas asociados con la enfermedad neoplásica, incluyendo pero sin limitarse a la ralentización del crecimiento tumoral, la lisis de las células tumorales, la reducción del tamaño del tumor, la prevención del crecimiento de tumores nuevos o la prevención de la metástasis de un tumor primario.
- 35 Como se emplea en la presente memoria, un "índice terapéutico" con respecto al tratamiento de un tumor se refiere a la capacidad de un tratamiento, incluido el tratamiento con un virus proporcionado en la presente memoria o una terapia combinada con un virus proporcionado en la presente memoria, para provocar una desaceleración del crecimiento del tumor y/o la reducción en el volumen de un tumor. Típicamente, el índice terapéutico se expresa como una proporción con respecto a un tratamiento de control, tal como ningún tratamiento con el virus. Cuanto más alto sea el índice terapéutico, más eficaz será el tratamiento para reducir el crecimiento del tumor y/o reducir el volumen del tumor.
- 40 Como se emplea en la presente memoria, "replicación retardada" se refiere a la incapacidad de un virus terapéutico para replicarse eficazmente en un tumor. Los virus terapéuticos que presentan una replicación retardada pueden tener la capacidad de replicarse en las células del tumor, pero lo hacen a una tasa de replicación más lenta. Los virus que muestran una replicación retardada en un tumor después de la infección del tumor no son tan eficaces para la terapia del tumor como los virus que no muestran una replicación retardada.
- 45 Como se emplea en la presente memoria, el término "virus terapéutico" se refiere a un virus que se administra para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, tal como una enfermedad neoplásica, tal como cáncer, un tumor y/o una metástasis o inflamación o herida o su diagnóstico y/o ambos. En general, un virus terapéutico en la presente memoria es uno que muestra actividad antitumoral y toxicidad mínima.
- 50 Como se emplea en la presente memoria, un tumor, también conocido como neoplasia, es una masa anormal de tejido que se produce cuando las células proliferan a una tasa anormalmente alta. Los tumores pueden mostrar una
- 55
- 60
- 65

falta parcial o total de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal. Los tumores pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos). Como se emplea en la presente memoria, se pretende que un tumor abarque tumores hematopoyéticos así como tumores sólidos.

5 Los tumores malignos se pueden clasificar ampliamente en tres tipos principales. Los carcinomas son tumores malignos que surgen de estructuras epiteliales (p. ej., mama, próstata, pulmón, colon, páncreas). Los sarcomas son tumores malignos que se originan en los tejidos conectivos o células mesenquimales, tales como los músculos, cartílagos, grasa o hueso. Las leucemias y los linfomas son tumores malignos que afectan las estructuras hematopoyéticas (estructuras relacionadas con la formación de células sanguíneas), incluidos los componentes del sistema inmunitario. Otros tumores malignos incluyen, pero no se limitan a, tumores del sistema nervioso (p. ej. neurofibromatomas), tumores de células germinales y tumores blásticos.

10 Como se emplea en la presente memoria, los trastornos proliferativos incluyen cualquier trastorno que implique una proliferación anormal de células (es decir, las células proliferan más rápidamente en comparación con el crecimiento de tejido normal), tales como, entre otras, enfermedades neoplásicas.

15 Como se emplea en la presente memoria, una "célula tumoral" es cualquier célula que forma parte de un tumor. Típicamente, los virus proporcionados en la presente memoria infectan preferentemente células tumorales en un sujeto en comparación con las células normales.

20 Como se emplea en la presente memoria, una "célula metastásica" es una célula que tiene el potencial de metástasis. Las células metastásicas tienen la capacidad de metastatizar a partir de un primer tumor en un sujeto y pueden colonizar tejido en un sitio diferente en el sujeto para formar un segundo tumor en el sitio.

25 Como se emplea en la presente memoria, "célula tumorigénica" es una célula que, cuando se introduce en un sitio adecuado en un sujeto, puede formar un tumor. La célula puede ser no metastásica o metastásica.

Como se emplea en la presente memoria, una "célula normal" es una célula que no se obtiene de un tumor.

30 Como se emplea en la presente memoria, el término "célula" se refiere a la unidad básica de estructura y función de un organismo vivo como se entiende comúnmente en las ciencias biológicas. Una célula puede ser un organismo unicelular que es autosuficiente y que puede existir como un todo funcional independientemente de otras células. Una célula también puede ser una que, cuando no está aislada del entorno en el que se encuentra en la naturaleza, forma parte de un organismo multicelular formado por más de un tipo de célula. Tal célula, que se puede considerar como una célula "sin organismo" o "que no forma parte de un organismo", generalmente se especializa en que realiza solo un subconjunto de las funciones realizadas por el organismo multicelular en su totalidad. Por lo tanto, este tipo de célula no es un organismo unicelular. Tal célula puede ser una célula procariota o eucariota, que incluye células animales, tales como células de mamíferos, células humanas y células de animales no humanos o células de mamíferos no humanos. Las células animales incluyen cualquier célula de origen animal que se puede encontrar en un animal. Así, las células animales incluyen, por ejemplo, células que constituyen los diversos órganos, tejidos y sistemas de un animal.

35 Como se emplea en la presente memoria, una "célula aislada" es una célula que existe *in vitro* y está separada del organismo del que originalmente se obtuvo.

40 Como se emplea en la presente memoria, una "línea celular" es una población de células derivadas de una célula primaria que es susceptible de un crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones. Las líneas celulares se conocen comúnmente como líneas celulares "inmortalizadas" para describir su capacidad para propagarse continuamente *in vitro*.

45 Como se emplea en la presente memoria, una "línea celular tumoral" es una población de células que se obtiene inicialmente a partir de un tumor. Tales células típicamente han sufrido algún cambio *in vivo* de tal manera que teóricamente tienen un crecimiento indefinido en cultivo; a diferencia de las células primarias, que se pueden cultivar solo por un período de tiempo finito. Además, dichas células pueden formar tumores preferiblemente después de que se inyectan a animales susceptibles.

50 Como se emplea en la presente memoria, una "célula primaria" es una célula que se ha aislado de un sujeto.

55 Como se emplea en la presente memoria, una "célula anfitriona" o "célula diana" se utilizan indistintamente para significar una célula que puede estar infectada por un virus.

60 Como se emplea en la presente memoria, el término "tejido" se refiere a un grupo, colección o añadido de células similares que generalmente actúan para realizar una función específica dentro de un organismo.

65 Como se emplea en la presente memoria, los términos células inmunoprivilegiadas y tejidos inmunoprivilegiados se

refieren a células y tejidos, tales como tumores sólidos, que se secuestran del sistema inmunitario. En general, la administración de un virus a un sujeto provoca una respuesta inmunológica que elimina el virus del sujeto. Sin embargo, los sitios inmunoprivilegiados están protegidos o secuestrados de la respuesta inmunológica, lo que permite que el virus sobreviva y generalmente se replique. Los tejidos inmunoprivilegiados incluyen tejidos en proliferación, tales como tejidos tumorales.

Como se emplea en la presente memoria, los agentes terapéuticos son agentes que mejoran los síntomas de una enfermedad o trastorno o mejoran la enfermedad o trastorno. El agente terapéutico, el compuesto terapéutico o los regímenes terapéuticos incluyen fármacos convencionales y terapias con fármacos, incluidas las vacunas para el tratamiento o la prevención (es decir, que reducen el riesgo de contraer una enfermedad o trastorno concretos), que son conocidos por los expertos en la técnica y se describen en otra parte en la presente memoria. Los agentes terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad neoplásica incluyen, pero no se limitan a, radicales que inhiben el crecimiento celular o promueven la muerte celular, que pueden activarse para inhibir el crecimiento celular o promover la muerte celular, o que activan otro agente para inhibir el crecimiento celular o promover la muerte celular. Los agentes terapéuticos para su uso en los métodos proporcionados en la presente memoria pueden ser, por ejemplo, un agente anticanceroso. Los agentes terapéuticos ilustrativos incluyen, por ejemplo, microorganismos terapéuticos, tales como virus y bacterias terapéuticas, citocinas, factores de crecimiento, agentes fotosensibilizantes, radionúclidos, toxinas, antimetabolitos, moduladores de señalización, antibióticos anticancerosos, anticuerpos anticancerosos, inhibidores de la angiogénesis, radioterapia, compuestos quimioterapéuticos o una combinación de los mismos.

Como se emplea en la presente memoria, un agente o compuesto anticanceroso (usado indistintamente con "agente antitumoral o antineoplásico") se refiere a cualquier agente o compuesto, utilizado en el tratamiento contra el cáncer. Estos incluyen cualquier agente, cuando se utilizan solos o combinados con otros compuestos o tratamientos, que pueden aliviar, reducir, mejorar, prevenir o colocar o mantener en un estado de remisión de síntomas clínicos o marcadores de diagnóstico asociados con enfermedad neoplásica, tumores y cáncer, y se puede utilizar en métodos, combinaciones y composiciones proporcionadas en la presente memoria. Los agentes anticancerosos incluyen agentes antimetastásicos. Los agentes anticancerosos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, compuestos quimioterapéuticos (p. ej., toxinas, agentes alquilantes, nitrosoureas, antibióticos anticancerosos, antimetabolitos, antimitóticos, inhibidores de la topoisomerasa, citocinas, factores de crecimiento, hormonas, agentes fotosensibilizantes, radionúclidos, moduladores de señalización, anticuerpos anticancerosos, oligopéptidos anticancerosos, oligonucleótidos anticancerosos (p. ej., ARN antisentido y ARNip), inhibidores de la angiogénesis, radioterapia o una combinación de los mismos. Los compuestos quimioterapéuticos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, Ara-C, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, doxorubicina, gemcitabina, camptotecina, irinotecán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, vincristina, 5-fluorouracilo y metotrexato. Como se emplea en la presente memoria, la referencia a un agente anticanceroso o quimioterapéutico incluye combinaciones o una pluralidad de agentes contra el cáncer o quimioterapéuticos a menos que se indique lo contrario.

Como se emplea en la presente memoria, un "agente quimiosensibilizante" es un agente que modula, atenúa, invierte o afecta la resistencia de una célula u organismo a un fármaco o compuesto quimioterapéutico dado. Los términos "modulador", "agente modulador", "atenuador", "agente atenuante" o "quimiosensibilizador" se pueden utilizar indistintamente para significar "agente quimiosensibilizante". En algunos ejemplos, un agente quimiosensibilizante también puede ser un agente quimioterapéutico. Los ejemplos de agentes quimiosensibilizantes incluyen, pero no se limitan a, radiación, bloqueadores de los canales de calcio (p. ej., verapamilo), inhibidores de calmodulina (p. ej., trifluoperazina), alcaloides de indol (p. ej., reserpina), quinolinas (p. ej., quinina), agentes lisosomotrópicos (p. ej., cloroquina), esteroides (p. ej., progesterona), análogos de triparanol (p. ej., tamoxifeno), detergentes (p. ej., Cremophor EL), texafirinas y antibióticos cíclicos (p. ej., ciclosporina).

Como se emplea en la presente memoria, un compuesto producido en un tumor u otro sitio inmunoprivilegiado se refiere a cualquier compuesto que se produce en el tumor o entorno tumoral en virtud de la presencia de un virus introducido, generalmente un virus recombinante, que expresa uno o más productos génicos. Por ejemplo, un compuesto producido en un tumor puede ser, por ejemplo, un polipéptido codificado o ARN, un metabolito o compuesto que se genera por un polipéptido recombinante y la maquinaria celular del tumor o tejido o células inmunoprivilegiados.

Como se emplea en la presente memoria, un sujeto incluye cualquier organismo, incluido un animal para el que se contempla el diagnóstico, el escrutinio, el seguimiento o el tratamiento. Los animales incluyen mamíferos tales como primates y animales domesticados. Un primate ilustrativo es el ser humano. Un paciente se refiere a un sujeto, tal como un sujeto mamífero, primate, ser humano o ganado que padece una dolencia o para el cual se determina una dolencia o se determina el riesgo de una dolencia.

Como se emplea en la presente memoria, un vehículo de suministro para la administración se refiere a una composición basada en lípidos u otra basada en polímeros, tal como liposoma, micela o micela inversa, que se asocia con un agente, como un virus proporcionado en la presente memoria, para el suministro a un sujeto anfitrión.

5 Como se emplea en la presente memoria, vector (o plásmido) se refiere a una construcción de ácido nucleico que contiene elementos discretos que se utilizan para introducir ácido nucleico heterólogo en las células para la expresión del ácido nucleico o la replicación del mismo. Los vectores típicamente permanecen episomales, pero se pueden diseñar para efectuar la integración estable de un gen o parte de él en un cromosoma del genoma. La selección y el uso de tales vectores son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los vectores de expresión incluyen vectores capaces de expresar ADN que está conectado operativamente con secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de los fragmentos de ADN. Por lo tanto, un vector de expresión se refiere a una construcción de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, un virus recombinante u otro vector que, al introducirse en una célula anfitriona apropiada, da como resultado la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen aquellos que son replicables en células eucariotas y/o células procariotas y aquellos que permanecen episomales o aquellos que se integran en el genoma de la célula anfitriona.

15 Como se emplea en la presente memoria, el término "vector viral" se utiliza de acuerdo con su significado reconocido en la técnica. Se refiere a un vector de ácido nucleico que incluye al menos un elemento de origen viral y se puede empaquetar en una partícula de vector viral. Las partículas de vector viral se pueden utilizar con el fin de transferir ADN, ARN u otros ácidos nucleicos a las células, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vectores de poxvirus (p. ej., vectores de vaccinia), vectores retrovirales, vectores de lentivirus, vectores de virus de herpes (p. ej., HSV), vectores de baculovirus, vectores de citomegalovirus (CMV), vectores de papilomavirus, vectores de virus de simios (SV40), vectores de virus de bosque de semliki, vectores de fagos, vectores de adenovirus y vectores de virus adenovirus asociados (AAV).

25 Como se emplea en la presente memoria, los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de los mismos, incluyendo ácidos peptidonucleicos (PNA) y mezclas de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden ser de hebra sencilla o doble. Los ácidos nucleicos pueden codificar productos génicos, tales como, por ejemplo, polipéptidos, ARN reguladores, microARN, ARNip y ARN funcionales.

30 Como se emplea en la presente memoria, una secuencia complementaria a al menos una porción de un ARN, con referencia a oligonucleótidos antisentido, significa una secuencia de nucleótidos que tiene suficiente complementariedad para poder hibridar con el ARN, generalmente en condiciones de rigurosidad moderada o alta, formando un dúplex estable; en el caso de ácidos nucleicos antisentido de doble hebra, una sola hebra del ADN dúplex (es decir, ARNdh) puede así analizarse, o se puede evaluar la formación de tríplex. La capacidad de hibridar depende del grado de complementariedad y la longitud del ácido nucleico antisentido. En general, cuanto más largo sea el ácido nucleico hibridante, más emparejamientos erróneos de bases con un ARN codificante puede contener y aún formar un dúplex estable (o tríplex, según sea el caso). Un experto en la técnica puede determinar un grado tolerable de emparejamientos erróneos mediante el uso de procedimientos convencionales para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

40 Como se emplea en la presente memoria, un marcador detectable o un radical detectable o un radical de diagnóstico (también un marcador de generación de imágenes, un agente de generación de imágenes o un radical de generación de imágenes) se refiere a un átomo, molécula o composición, en donde la presencia del átomo, molécula o composición puede medirse directa o indirectamente. Se pueden utilizar marcas detectables para obtener imágenes de uno o más de cualquiera de los virus incluidos en la presente memoria. Las marcas detectables se pueden utilizar en cualquiera de los métodos que se proporcionan en la presente memoria. Las marcas detectables incluyen, por ejemplo, radicales quimioluminiscentes, radicales bioluminiscentes, radicales fluorescentes, radionúclidos y metales. Los métodos para detectar marcas son bien conocidos en la técnica. Tal marca se puede detectar, por ejemplo, mediante inspección visual, mediante espectroscopia de fluorescencia, mediante medición de reflectancia, mediante citometría de flujo, mediante rayos X, mediante una variedad de métodos de resonancia magnética tal como generación de imágenes por resonancia magnética (IRM) y espectroscopia de resonancia magnética (MRS). Los métodos de detección también incluyen cualquiera de una variedad de métodos tomográficos que incluyen tomografía computarizada (TC), tomografía axial computarizada (TAC), tomografía computarizada por haz de electrones (TCHE), tomografía computarizada de alta resolución (TCAR), tomografía hipocicloidal, tomografía por emisión de positrones (TEP), tomografía computarizada por emisión de fotón único (TCEFU), tomografía computarizada en espiral y tomografía ultrasónica. La detección directa de una marca detectable se refiere, por ejemplo, a la medición de un fenómeno físico de la marca detectable en sí misma, tal como la emisión de energía o partículas o la absorción de la propia marca, tal como rayos X o IRM. La detección indirecta se refiere a la medición de un fenómeno físico de un átomo, molécula o composición que se une directa o indirectamente a la marca detectable, tal como la emisión o absorción de energía o partículas, de un átomo, molécula o composición que se une directa o indirectamente a la marca detectable. En un ejemplo no limitante de detección indirecta, un marcador detectable puede ser biotina, que se puede detectar mediante la unión a avidina. La avidina no marcada se puede administrar sistémicamente para bloquear la unión no específica, seguida de la administración sistémica de avidina marcada. Por lo tanto, se incluye dentro del alcance de una marca detectable o un radical detectable una marca unible o un radical unible, que se refiere a un átomo, molécula o composición, en donde la presencia del átomo, molécula o composición puede detectarse como resultado de la marca o radical de unión a otro átomo, molécula o composición. Las marcas detectables ilustrativas incluyen, por ejemplo, metales tales como oro coloidal, hierro,

gadolinio y galio-67, radicales fluorescentes y radionúclidos. Los radicales fluorescentes y radionúclidos ilustrativos se proporcionan en otra parte en la presente memoria.

5 Como se emplea en la presente memoria, un radionúclido, un radioisótopo o isótopo radiactivo se utiliza indistintamente para referirse a un átomo con un núcleo inestable. El núcleo se caracteriza por el exceso de energía que está disponible para impartirse o bien a una partícula de radiación recién creada dentro del núcleo, o bien a un electrón atómico. El radionúclido, en este proceso, sufre un deterioro radioactivo y emite un rayo gamma y/o partículas subatómicas. Tales emisiones pueden ser detectadas *in vivo* por medio de un método tal como, pero no limitado a, tomografía por emisión de positrones (TEP), tomografía computarizada por emisión de fotón único (TCEFU) o imágenes gamma planas. Los radioisótopos se pueden producir naturalmente, pero también se pueden producir artificialmente. Los radionúclidos ilustrativos para su uso en la generación de imágenes *in vivo* incluyen, pero no se limitan a, ^{11}C , ^{13}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{19}F , ^{32}P , ^{52}Fe , ^{51}Cr , ^{55}Co , ^{55}Fe , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{57}Ni , ^{59}Fe , ^{60}Co , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , $^{60}\text{Cu(II)}$, $^{67}\text{Cu(II)}$, ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{103}Pd , ^{106}Ru , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{137}Cs , ^{153}Gd , ^{153}Sm , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{192}Ir , ^{198}Au , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi y ^{241}Am . Los radioisótopos se pueden incorporar o unir a un compuesto, tal como un compuesto metabólico. Los radionúclidos ilustrativos que se pueden incorporar o unir a un compuesto metabólico, tal como un análogo de nucleósido, incluyen, pero no se limitan a, ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{13}F , ^{19}F , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{75}Br , ^{76}Br , y ^3H . Los compuestos radiomarcados ilustrativos incluyen análogos de nucleósidos, tales como, pero no limitados a, formas radiomarcadas de 1-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)-5-yodouracilo (FIAU), 1-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)-5-etiluracilo (FEAU), 1-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)-5-metiluracilo (FMAU), 3'-desoxi-3'-fluorotimidina (FLT), 9-[4'-fluoro-3'-(hidroximetil)butil]guanina (FHBG) y 9-[(3'-fluoro-1'-hidroxi-2'-propoxi)metil]guanina (FHPG), tal como por ejemplo, [^{125}I]-1-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)-5-yodouracilo ([^{125}I]-FIAU), [^{124}I]-1-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)-5-yodouracilo ([^{124}I]-FIAU), [^{18}F]-1-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)-5-yodouracilo ([^{18}F]-FIAU), [^{18}F]-1-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)-5-etiluracilo ([^{18}F]-FEAU), [^{18}F]-1-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)-5-metiluracilo ([^{18}F]-FMAU), [^{18}F]-3'-desoxi-3'-fluorotimidina ([^{18}F]-FLT), [^{18}F]-9-[4'-fluoro-3'-(hidroximetil)butil]guanina ([^{18}F]-FHBG) y [^{18}F]-9-[(3'-fluoro-1'-hidroxi-2'-propoxi)metil]guanina ([^{18}F]-FHPG).

30 Como se emplea en la presente memoria, la generación de imágenes por resonancia magnética (IRM) se refiere al uso de un espectrómetro de resonancia magnética nuclear para producir imágenes electrónicas de átomos específicos y estructuras moleculares en sólidos, especialmente células, tejidos y órganos humanos. La IRM es una técnica de diagnóstico no invasiva que utiliza resonancia magnética nuclear para producir imágenes transversales de órganos y otras estructuras internas del cuerpo. El sujeto se encuentra dentro de un cilindro grande y hueco que contiene un electroimán fuerte, que hace que los núcleos de ciertos átomos en el cuerpo (tal como, por ejemplo, ^1H , ^{13}C y ^{19}F) se alineen magnéticamente. El sujeto se somete a continuación a ondas de radio, que hacen que los núcleos alineados se volteen; cuando se retiran las ondas de radio, los núcleos vuelven a sus posiciones originales, emitiendo ondas de radio que son detectadas a continuación mediante un receptor y traducidas a una imagen bidimensional por computadora. Para algunos procedimientos de IRM, se utilizan agentes de contraste tal como el gadolinio para aumentar la precisión de las imágenes.

40 Como se emplea en la presente memoria, una radiografía se refiere a un fotón de energía relativamente alta, o una corriente de tales fotones, que tiene una longitud de onda en el rango aproximado de 0,01 a 10 nanómetros. Los rayos X también se refieren a fotografías tomadas con rayos X.

45 Como se emplea en la presente memoria, un compuesto conjugado con un radical se refiere a un complejo que incluye un compuesto unido a un radical, donde la unión entre el compuesto y el radical puede surgir de uno o más enlaces covalentes o interacciones no covalentes tales como enlaces de hidrógeno, o interacciones electrostáticas. Un producto conjugado también puede incluir un conector que conecta el compuesto al radical. Los compuestos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, nanopartículas y sideróforos. Los radicales ilustrativos, incluyen, pero no se limitan a, radicales detectables y agentes terapéuticos.

50 Como se emplea en la presente memoria, la luminiscencia se refiere a radiación electromagnética (EM) detectable, generalmente, radiación ultravioleta (UV), infrarrojo (IR) o EM visible que se produce cuando el producto excitado de un proceso químico exergónico vuelve a su estado fundamental con la emisión de luz. La quimioluminiscencia es la luminiscencia que resulta de una reacción química. La bioluminiscencia es una quimioluminiscencia que resulta de una reacción química que utiliza moléculas biológicas (o versiones sintéticas o análogas de las mismas) como sustratos y/o enzimas. La fluorescencia es una luminiscencia en la que la luz de un color visible se emite desde una sustancia bajo estimulación o excitación por la luz u otras formas de radiación, tales como la radiación ultravioleta (UV), infrarrojo (IR) o visible.

60 Como se emplea en la presente memoria, quimioluminiscencia se refiere a una reacción química en la que la energía se canaliza específicamente a una molécula, lo que provoca que se excite electrónicamente y, posteriormente, libere un fotón, emitiendo así luz visible. La temperatura no contribuye a esta energía canalizada. Por lo tanto, la quimioluminiscencia implica la conversión directa de energía química en energía luminosa.

65 Como se emplea en la presente memoria, la bioluminiscencia, que es un tipo de quimioluminiscencia, se refiere a la

emisión de luz por moléculas biológicas, particularmente proteínas. La condición esencial para la bioluminiscencia es el oxígeno molecular, ya sea unido o libre en presencia de una oxigenasa, una luciferasa, que actúa sobre un sustrato, una luciferina. La bioluminiscencia es generada por una enzima u otra proteína (luciferasa) que es una oxigenasa que actúa sobre un sustrato de luciferina (un sustrato de bioluminiscencia) en presencia de oxígeno molecular y transforma el sustrato a un estado excitado, el cual, al regresar a un nivel de energía más bajo libera la energía en forma de luz.

Como se emplea en la presente memoria, los sustratos y enzimas para producir bioluminiscencia se denominan genéricamente luciferina y luciferasa, respectivamente. Cuando se hace referencia a una especie particular de los mismos, para mayor claridad, cada término genérico se utiliza con el nombre del organismo del que se obtiene, tal como por ejemplo, luciferasa de escarabajo click o luciferasa de luciérnaga.

Como se emplea en la presente memoria, luciferasa se refiere a oxigenasas que catalizan una reacción de emisión de luz. Por ejemplo, las luciferasas bacterianas catalizan la oxidación del mononucleótido de flavina (FMN) y aldehídos alifáticos, cuya reacción produce luz. Otra clase de luciferasas, encontrada entre los artrópodos marinos, cataliza la oxidación de la luciferina de Cypridina (Vargula) y otra clase de luciferasas cataliza la oxidación de la luciferina de Coleoptera. Por lo tanto, luciferasa se refiere a una enzima o fotoproteína que cataliza una reacción bioluminiscente (una reacción que produce bioluminiscencia). Las luciferasas, tales como las luciferasas de luciérnaga y *Gaussia* y *Renilla*, son enzimas que actúan catalíticamente y permanecen inalteradas durante la reacción de generación de bioluminiscencia. Las fotoproteínas de luciferasa, tales como la fotoproteína de aequorina a la que se une de forma no covalente la luciferina, se modifican, por ejemplo mediante la liberación de luciferina, durante la reacción de generación de bioluminiscencia. La luciferasa es una proteína o una mezcla de proteínas (p. Ej., luciferasa bacteriana), que se produce naturalmente en un organismo o una variante o mutante del mismo, tal como una variante producida por mutagénesis que tiene una o más propiedades, tales como estabilidad térmica, que difieren de la proteína natural. Las luciferasas y formas modificadas mutantes o variantes de las mismas son bien conocidas. Para los fines de la presente memoria, la referencia a luciferasa se refiere a las fotoproteínas o luciferasas.

La referencia, por ejemplo, a luciferasa de *Renilla* se refiere a una enzima aislada de un miembro del género *Renilla* o una molécula equivalente obtenida de cualquier otra fuente, tal como la de otro copépodo relacionado, o que se haya preparado sintéticamente. Se pretende abarcar luciferasas de *Renilla* con sustituciones conservativas de aminoácidos que no alteran sustancialmente la actividad. Las sustituciones conservativas de aminoácidos son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden realizar generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la materia reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson et al. Molecular Biology of the Gen, 4ª edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., pág. 224).

Como se emplea en la presente memoria, el sustrato de bioluminiscencia se refiere al compuesto que se oxida en presencia de una luciferasa y cualquier activador necesario y genera luz. Estos sustratos se denominan en la presente memoria luciferinas, son sustratos que experimentan oxidación en una reacción de bioluminiscencia. Estos sustratos de bioluminiscencia incluyen cualquier luciferina o análogo de la misma o cualquier compuesto sintético con el que una luciferasa interactúa para generar luz. Los sustratos típicos incluyen aquellos que se oxidan en presencia de una luciferasa o proteína en una reacción generadora de luz. Los sustratos de bioluminiscencia, por lo tanto, incluyen aquellos compuestos que los expertos en la técnica reconocen como luciferinas. Las luciferinas, por ejemplo, incluyen luciferina de luciérnaga, luciferina de Cypridina (también conocida como Vargula) (celenterazina), luciferina bacteriana, así como análogos sintéticos de estos sustratos u otros compuestos que se oxidan en presencia de una luciferasa en una reacción que produce bioluminiscencia.

Como se emplea en la presente memoria, la capacidad de conversión en un sustrato de bioluminiscencia se refiere a ser susceptible a una reacción química, tal como oxidación o reducción, que produce un sustrato de bioluminiscencia. Por ejemplo, la reacción de producción de luminiscencia de bacterias bioluminiscentes implica la reducción de un grupo mononucleótido de flavina (FMN) a mononucleótido de flavina reducido (FMNH₂) por una enzima flavinasa reductasa. El mononucleótido de flavina reducido (sustrato) reacciona a continuación con el oxígeno (un activador) y la luciferasa bacteriana para formar una peroxiflavina intermedia que sufre una reacción adicional, en presencia de un aldehído de cadena larga, para generar luz. Con respecto a esta reacción, la flavina reducida y el aldehído de cadena larga son sustratos de bioluminiscencia.

Como se emplea en la presente memoria, un sistema generador de bioluminiscencia se refiere al conjunto de reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción bioluminiscente. Por lo tanto, la luciferasa específica, la luciferina y otros sustratos, disolventes y otros reactivos que pueden requerirse para completar una reacción bioluminiscente forman un sistema de bioluminiscencia. Por lo tanto, un sistema generador de bioluminiscencia se refiere a cualquier conjunto de reactivos que, bajo condiciones de reacción apropiadas, produzcan bioluminiscencia. Las condiciones de reacción apropiadas se refieren a las condiciones necesarias para que ocurra una reacción de bioluminiscencia, tal como el pH, las concentraciones de sal y la temperatura. En general, los sistemas de

bioluminiscencia incluyen un sustrato de bioluminiscencia, luciferina, una luciferasa, que incluye enzimas luciferasas y fotoproteínas y uno o más activadores. Un sistema de bioluminiscencia específico puede identificarse mediante la referencia al organismo específico del que se obtiene la luciferasa; por ejemplo, el sistema de bioluminiscencia de *Renilla* incluye una luciferasa de *Renilla*, tal como una luciferasa aislada de *Renilla* o producida utilizando métodos recombinantes o modificaciones de estas luciferasas. Este sistema también incluye los activadores concretos necesarios para completar la reacción de bioluminiscencia, tales como el oxígeno y un sustrato con el que la luciferasa reacciona en presencia del oxígeno para producir luz.

Como se emplea en la presente memoria, una proteína fluorescente (FP) se refiere a una proteína que posee la capacidad de emitir fluorescencia (es decir, para absorber energía en una longitud de onda y emitirla en otra longitud de onda). Por ejemplo, una proteína fluorescente verde (GFP) se refiere a un polipéptido que tiene un pico en el espectro de emisión a 510 nm o aproximadamente 510 nm. Una variedad de FP que emiten a varias longitudes de onda es conocida en la técnica. Los ejemplos de FP incluyen, pero no se limitan a, una proteína fluorescente verde (GFP), una proteína fluorescente amarilla (YFP), una proteína fluorescente naranja (OPF), una proteína fluorescente cian (CFP), una proteína fluorescente azul (BFP) y una proteína fluorescente roja (RFP), proteína fluorescente rojo lejano, o proteína fluorescente de infrarrojo cercano. La extensión del espectro de colores disponibles de las proteínas fluorescentes para las variantes azul, cian, naranja, amarilla y roja proporciona un método para el seguimiento multicolor de proteínas de fusión.

Como se emplea en la presente memoria, *Aequorea* GFP se refiere a GFP del género *Aequorea* y a mutantes o variantes de las mismas. Tales variantes y GFP de otras especies, tales como coral de arrecife *Anthozoa* anémona de mar *Anemonia*, pensamiento del mar *Renilla*, coral *Galaxea*, coral pardo *Acropora*, coral pedregoso *Traquifilia* y *Pectiniidae* y otras especies son bien conocidas y están disponibles y son conocidas por los expertos en la técnica. Las variantes ilustrativas de GFP incluyen, entre otras, BFP, CFP, YFP y OPF. Los ejemplos de proteínas fluorescentes y sus variantes incluyen proteínas GFP, tales como Emerald (Invitrogen, Carlsbad, CA), EGFP (Clontech, Palo Alto, CA), Azami-Green (MBL International, Woburn, MA), Kaede (MBL International, Woburn, MA), ZsGreen1 (Clontech, Palo Alto, CA) y CopGFP (Evrogen/Axxora, LLC, San Diego, CA); Proteínas CFP, tales como Cerulean (Rizzo, Nat Biotechnol. 22 (4): 445-9 (2004)), mCFP (Wang et al., PNAS U.S.A. 101(48): 16745-9 (2004)), AmCyan1 (Clontech, Palo Alto, CA), MiCy (MBL International, Woburn, MA) y CyPet (Nguyen y Daugherty, Nat Biotechnol. 23(3):355-60 (2005)); Proteínas BFP tales como EBFP (Clontech, Palo Alto, CA); Proteínas YFP tales como EYFP (Clontech, Palo Alto, CA), YPet (Nguyen y Daugherty, Nat Biotechnol. 23(3):355-60 (2005)), Venus (Nagai et al., Nat. Biotechnol. 20(1):87-90 (2002)), ZsYellow (Clontech, Palo Alto, CA) y mCitrina (Wang et al., PNAS USA. 101 (48): 16745-9 (2004)); Proteínas OPF tales como cOPF (Stratagene, La Jolla, CA), mKO (MBL International, Woburn, MA) y mOrange; y otras (véanse, por ejemplo, Shaner NC, Steinbach PA, y Tsien RY., Nat Methods. 2(12):905-9 (2005)).

Como se emplea en la presente memoria, la proteína roja fluorescente, o RFP, se refiere a la RFP de *Discosoma* (DsRed) que se ha aislado del coralimorfo *Discosoma* (Matz et al., Nature Biotechnology 17:969-973 (1999)), y proteínas fluorescentes rojas o rojas lejanas de cualquier otra especie, tales como coral de arrecife *Heteractis* y anémona de mar *Actinia* o *Entacmaea*, así como sus variantes. Las RFP incluyen, por ejemplo, variantes de *Discosoma*, tales como la proteína roja fluorescente monomérica 1 (mRFP1), mCherry, tdTomato, mStrawberry, mTangerine (Wang et al., PNAS USA. 101(48):16745-9 (2004)), DsRed2 (Clontech, Palo Alto, CA), y DsRed-T1 (Bevis y Glick, Nat. Biotechnol., 20:83-87 (2002)), J-Red de *Anthomedusa* (Evrogen) y AsRed2 de *Anemonia* (Clontech, Palo Alto, CA). Las proteínas fluorescentes rojo lejano incluyen, por ejemplo, AQ143 de *Actinia* (Shkrob et al., Biochem J. 392(Pt 3):649-54 (2005)), eqFP611 de *Entacmaea* Wiedenmann et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99(18):11646-51 (2002)), variantes de *Discosoma* tales como mPlum y mRaspberry (Wang et al., PNAS USA. 101(48):16745-9 (2004)), y HcRed1 y t-HcRed de *Heteractis* (Clontech, Palo Alto, CA).

Como se emplea en la presente memoria, un método *in vivo* se refiere a un método realizado dentro del organismo vivo de un sujeto.

Como se emplea en la presente memoria, la terapia genética o terapia génica implica la transferencia de ácido nucleico heterólogo, tal como ADN o ARN, a ciertas células, células diana, de un mamífero, particularmente un ser humano, con un trastorno o afecciones para las cuales se busca dicha terapia. Como se emplea en la presente memoria, la terapia genética o la terapia génica pueden implicar la transferencia de ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, a un microorganismo (p. ej., un virus), cuyo microorganismo se puede transferir a un mamífero, particularmente un ser humano, con un trastorno o afecciones para los cuales se busca dicha terapia. El ácido nucleico, tal como el ADN, se introduce en las células diana seleccionadas, por ejemplo directa o indirectamente, de una manera tal que se expresa el ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, y se produce un producto terapéutico codificado. Alternativamente, el ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, puede mediar de alguna manera la expresión del ADN que codifica el producto terapéutico, o puede codificar un producto, tal como un péptido o ARN (p. ej., ARNi, incluido ARNip) que es de alguna manera un producto terapéutico, o que media, directa o indirectamente, la expresión de un producto terapéutico. La terapia genética también se puede utilizar para administrar ácido nucleico que codifica un producto génico que reemplaza un gen defectuoso o complementa un producto génico producido por el mamífero o la célula en la que se introduce. El ácido nucleico introducido puede

codificar un compuesto terapéutico. El ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, que codifica el producto terapéutico puede modificarse antes de la introducción en las células del anfitrión afectado para mejorar o alterar de otro modo el producto o la expresión del mismo. La terapia genética también puede implicar la administración de un inhibidor o represor u otro modulador de la expresión génica.

5 Como se emplea en la presente memoria, los términos producir en exceso o expresar en exceso cuando se utilizan en referencia a una sustancia, molécula, compuesto o composición fabricados en una célula se refieren a la producción o expresión a un nivel que es mayor que el nivel de producción o expresión de referencia, normal o habitual de la sustancia, molécula, compuesto o composición por la célula. Un nivel de producción o expresión de referencia, normal o habitual no incluye producción/expresión o producción/expresión limitada, restringida o regulada. Tal producción en exceso o expresión en exceso se logra típicamente mediante la modificación de la célula.

15 Como se emplea en la presente memoria, un agente o compuesto que modula la actividad de una proteína o la expresión de un gen o ácido nucleico disminuye o aumenta o altera la actividad de la proteína o, de alguna manera, regula por incremento o por disminución o altera la del ácido nucleico en una célula.

20 Como se emplea en la presente memoria, "ácidos nucleicos" incluye ADN, ARN y análogos de los mismos, incluyendo ácidos peptidonucleicos (PNA) y mezclas de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden ser de hebra sencilla o doble. Cuando se hace referencia a sondas o cebadores, que están marcados opcionalmente, tal como con un marcador detectable, tal como un fluorescente o marca radiactiva, se contemplan moléculas de hebra sencilla. Tales moléculas tienen típicamente una longitud tal que su diana es estadísticamente única o de bajo número de copias (típicamente menos de 5, generalmente menos de 3) para sondear o cebar una biblioteca. En general, una sonda o cebador contienen al menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria o idéntica a un gen de interés. Las sondas y los cebadores pueden tener una longitud de 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos.

30 Como se emplea en la presente memoria, un péptido se refiere a un polipéptido que tiene una longitud mayor o igual a 2 aminoácidos, y una longitud menor o igual a 40 aminoácidos.

35 Como se emplea en la presente memoria, los aminoácidos que aparecen en las diversas secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente memoria se identifican de acuerdo con sus abreviaturas conocidas de tres letras o de una letra (Tabla 1). Los nucleótidos que aparecen en los diversos fragmentos de ácido nucleico se designan con las designaciones convencionales de una sola letra que se utilizan habitualmente en la técnica.

40 Como se emplea en la presente memoria, un "aminoácido" es un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo ácido carboxílico. Un polipéptido contiene dos o más aminoácidos. Para los fines de la presente memoria, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos (es decir, aminoácidos en los que el carbono α tiene una cadena lateral).

45 Como se emplea en la presente memoria, "residuo de aminoácido" se refiere a un aminoácido formado después de la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Se supone que los residuos de aminoácidos descritos en la presente memoria están en la forma isomérica "L". Los residuos en la forma isomérica "D", que se designan así, pueden sustituirse por cualquier residuo de L-aminoácido siempre que la propiedad funcional deseada sea retenida por el polipéptido. NH₂ se refiere al grupo amino libre presente en el término amino de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxilo de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura polipeptídica convencional descrita en J. Biol. Chem. 243:3557-3559 (1968), y adoptó las abreviaturas 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, para los residuos de aminoácidos se muestran en la Tabla 1:

50 **Tabla 1 - Tabla de Correspondencia**

SÍMBOLO		
1-Letra	3-Letras	AMINOÁCIDO
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
SYMBOL		
1-Letra	3-Letra	Aminoácido
F	Phe	Fenilalanina
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina

SÍMBOLO		
1-Letra	3-Letras	AMINOÁCIDO
S	Ser	Serina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	Prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gin
W	Trp	Triptófano
R	Arq	Arginina
D	Asp	Ácido aspártico
N	Asn	Asparragina
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido u otro

- 5 Todas las secuencias de residuos de aminoácidos representadas en la presente memoria mediante fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional del término amino al término carboxilo. Además, la frase "residuo de aminoácido" se define para incluir los aminoácidos enumerados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 1) y los aminoácidos modificados e inusuales, tales como los mencionados en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822. Además, se debe tener en cuenta que un guión al principio o al final de una secuencia de residuos de aminoácidos indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácidos, a un grupo amino-terminal tal como NH₂ o a un grupo carboxilo terminal tal como COOH.
- 10 Como se emplea en la presente memoria, los "α-aminoácidos de origen natural" son los residuos de esos 20 α-aminoácidos que se encuentran en la naturaleza que se incorporan a la proteína mediante el reconocimiento específico de la molécula de ARNt cargada con su codón de ARNm cognado en seres humanos. Los aminoácidos de origen no natural incluyen, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos de origen natural e incluyen, pero no se limitan a, los D-isostereómeros de aminoácidos. Los aminoácidos no naturales ilustrativos se describen en la presente memoria y son conocidos por los expertos en la técnica.
- 15 Como se emplea en la presente memoria, una construcción de ADN es una molécula de ADN lineal o circular de hebra sencilla o doble que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera que no se encuentra en la naturaleza. Las construcciones de ADN existen como resultado de la manipulación humana e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.
- 20 Como se emplea en la presente memoria, un segmento de ADN es una porción de una molécula de ADN más grande que tiene atributos específicos. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica un polipéptido especificado es una porción de una molécula de ADN más larga, tal como un plásmido o fragmento de plásmido, que, cuando se lee desde la dirección 5' a 3', codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido especificado.
- 25 Como se emplea en la presente memoria, el término polinucleótido significa un polímero de hebra sencilla o doble de desoxirribonucleótidos o bases de ribonucleótidos leídos desde el extremo 5' al extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse in vitro o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula polinucleotídica se proporciona en la presente memoria en términos de nucleótidos (abreviados "nt") o pares de bases (abreviados "pb"). El término nucleótidos se utiliza para moléculas de hebra sencilla y doble donde el contexto lo permite. Cuando el término se aplica a moléculas de doble hebra, se utiliza para denotar la longitud total y se entenderá que es equivalente al
- 30

término pares de bases. Los expertos en la técnica reconocerán que las dos hebras de un polinucleótido de doble hebra pueden diferir ligeramente en longitud y que sus extremos pueden ser escalonados; por lo tanto, todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido de doble hebra pueden no estar pareados. Tales extremos no pareados, en general, no superarán los 20 nucleótidos de longitud.

5 Como se emplea en la presente memoria, la recitación de que los nucleótidos o aminoácidos "corresponden a" nucleótidos o aminoácidos en una secuencia descrita, tal como se expone en la Lista de secuencias, se refiere a los nucleótidos o aminoácidos identificados al alinearse con la secuencia descrita para maximizar la identidad utilizando una algoritmo de alineamiento convencional, tal como el algoritmo GAP. Al alinear las secuencias, un experto en la
10 técnica puede identificar los residuos correspondientes, por ejemplo, utilizando residuos de aminoácidos conservados e idénticos como guías. En general, para identificar las posiciones correspondientes, las secuencias de aminoácidos se alinean de modo que se obtenga el emparejamiento de mayor orden (véanse, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projectc, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of
15 Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073).

20 Como se emplea en la presente memoria, "identidad de secuencia" se refiere al número de aminoácidos o bases de nucleótidos idénticos o similares en una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de prueba y de referencia. La identidad de la secuencia se puede determinar mediante el alineamiento de secuencias de ácido nucleico o secuencias de proteínas para identificar regiones de similitud o identidad. Para los fines de la presente memoria, la identidad de secuencia generalmente se determina por alineamiento para identificar residuos idénticos. El
25 alineamiento puede ser local o global. Los emparejamientos, los emparejamientos erróneos y los huecos se pueden identificar entre secuencias comparadas. Los huecos son aminoácidos nulos o nucleótidos insertados entre los residuos de secuencias alineadas, de modo que se alinean caracteres idénticos o similares. Generalmente, puede haber huecos internos y terminales. La identidad de la secuencia se puede determinar teniendo en cuenta los huecos como el número de residuos idénticos/longitud de la secuencia más corta x 100. Cuando se utilizan penalizaciones por huecos, la identidad de la secuencia se puede determinar sin penalización para los huecos
30 finales (p. ej. los huecos terminales no son penalizados). Alternativamente, la identidad de la secuencia se puede determinar sin tener en cuenta los huecos como el número de posiciones idénticas/longitud de la secuencia total alineada x 100.

35 Como se emplea en la presente memoria, una "alineamiento global" es un alineamiento que alinea dos secuencias de principio a fin, alineando cada letra en cada secuencia solo una vez. Se produce un alineamiento, independientemente de si existe o no similitud o identidad entre las secuencias. Por ejemplo, una identidad de secuencia de 50% basada en el "alineamiento global" significa que en un alineamiento de la secuencia completa de dos secuencias comparadas, cada una de 100 nucleótidos de longitud, 50% de los residuos son iguales. Se
40 entiende que el alineamiento global también se puede utilizar para determinar la identidad de la secuencia, incluso cuando la longitud de las secuencias alineadas no es la misma. Las diferencias en los extremos terminales de las secuencias se tomarán en consideración al determinar la identidad de la secuencia, a menos que se seleccione "sin penalización para los huecos finales". Generalmente, se utiliza un alineamiento global en secuencias que comparten una similitud significativa en la mayor parte de su longitud. Los algoritmos ilustrativos para realizar el alineamiento global incluyen el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman et al. J. Mol. Biol. 48: 443 (1970). Los programas
45 ilustrativos para realizar el alineamiento global están disponibles públicamente e incluyen la Global Sequence Alignment Tool disponible en el sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (ncbi.nlm.nih.gov/), y el programa disponible en deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html.

50 Como se emplea en la presente memoria, un "alineamiento local" es un alineamiento que alinea dos secuencias, pero que solo alinea aquellas porciones de las secuencias que comparten similitud o identidad. Por lo tanto, un alineamiento local determina si los subsegmentos de una secuencia están presentes en otra secuencia. Si no hay similitud, no corresponderá alineamiento. Los algoritmos de alineamiento local incluyen el algoritmo BLAST o Smith-Waterman (Adv. Apl. Mates. 2: 482 (1981)). Por ejemplo, 50% de identidad de secuencia basada en "alineamiento local" significa que en un alineamiento de la secuencia completa de dos secuencias comparadas de cualquier
55 longitud, una región de similitud o identidad de 100 nucleótidos de longitud tiene 50% de los residuos que son los mismos en la región de similitud o identidad.

60 Para los fines de la presente memoria, la identidad de la secuencia se puede determinar mediante programas de algoritmo de alineamiento convencionales que se utilizan con las penalizaciones por hueco establecidas por cada proveedor. Los parámetros predeterminados para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribskov et al. Nucl. Acids Res. 14: 6745 (1986), como describen Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pág. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 por cada hueco y una penalización adicional de 0,10 por cada símbolo en cada hueco; y (3) no hay penalización
65 para los huecos finales. Se puede determinar si dos moléculas cualesquiera de ácido nucleico tienen secuencias de

nucleótidos (o dos polipéptidos cualesquiera tienen secuencias de aminoácidos) que sean al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% "idénticas" u otras variaciones similares que recitan un porcentaje de identidad, utilizando algoritmos informáticos conocidos basados en alineamiento local o global (véase p. ej., wikipedia.org/wiki/Sequence_alignment_software, que proporciona enlaces a docenas de bases de datos y programas de alineamiento conocidos y disponibles al público). En general, para los fines de la presente memoria, la identidad de secuencia se determina mediante algoritmos informáticos basados en el alineamiento global, tal como la herramienta de alineamiento de secuencia global de Needleman-Wunsch disponible en NCBI/BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&Page_TYPE=BlastHome); LAlign (William Pearson que implementa el algoritmo de Huang y Miller (Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357)); y el programa de Xiaoqui Huang disponible en deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html. En general, cuando se comparan secuencias de nucleótidos en la presente memoria, se utiliza un alineamiento sin penalización para los huecos finales (p. ej., los huecos terminales no están penalizados).

Por lo tanto, como se utiliza en la presente memoria, el término "identidad" representa una comparación o alineamiento entre un polipéptido o polinucleótido de prueba y de referencia. En un ejemplo no limitante, "al menos 90% idéntico a" se refiere a identidades porcentuales de 90 a 100% con respecto al polipéptido o polinucleótido de referencia. La identidad a un nivel de 90% o más es indicativa del hecho de que, suponiendo que con fines ilustrativos se compara una longitud de polipéptido o polinucleótido de prueba y de referencia de 100 aminoácidos o nucleótidos, no más de 10% (es decir, 10 de 100) de los aminoácidos o nucleótidos en el polipéptido o polinucleótido de prueba difiere de la de los polipéptidos de referencia. Se pueden hacer comparaciones similares entre polinucleótidos de prueba y de referencia. Tales diferencias se pueden representar como mutaciones puntuales distribuidas al azar en toda la longitud de una secuencia de aminoácidos o se pueden agrupar en una o más ubicaciones de longitud variable hasta el máximo permitido, por ejemplo, una diferencia de 10/100 aminoácidos (aproximadamente 90% de identidad). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o deleciones de ácidos nucleicos o aminoácidos. Dependiendo de la longitud de las secuencias comparadas, a nivel de homologías o identidades por encima de aproximadamente 85-90%, el resultado puede ser independiente del programa y los parámetros por hueco establecidos; estos altos niveles de identidad pueden evaluarse fácilmente, a menudo sin depender del soporte lógico.

Como se emplea en la presente memoria, equivalente, cuando se hace referencia a dos secuencias de ácidos nucleicos, significa que las dos secuencias en cuestión codifican la misma secuencia de aminoácidos o proteínas equivalentes. Cuando equivalente se utiliza para referirse a dos proteínas o péptidos u otras moléculas, significa que las dos proteínas o péptidos tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos con solo sustituciones de aminoácidos (tal como, pero no limitados a, cambios conservativos) o estructura y que cualquier cambio no altera sustancialmente la actividad o función de la proteína o péptido. Cuando equivalente se refiere a una propiedad, no es necesario que la propiedad esté presente en la misma medida (p. ej., dos péptidos pueden mostrar diferentes tasas del mismo tipo de actividad enzimática), pero las actividades suelen ser sustancialmente las mismas. Complementaria, cuando se refiere a dos secuencias de nucleótidos, significa que las dos secuencias de nucleótidos son capaces de hibridar, típicamente con menos de 25%, 15% o 5% de emparejamientos erróneos entre nucleótidos opuestos. Si fuera necesario, se especificará el porcentaje de complementariedad. Normalmente, las dos moléculas se seleccionan de modo que hibriden en condiciones de alta rigurosidad.

Como se emplea en la presente memoria, sustancialmente puro significa lo suficientemente homogéneo para parecer libre de impurezas fácilmente detectables según lo determinado por métodos de análisis convencionales, tales como cromatografía de capa fina (TLC), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), utilizados por los expertos en la técnica para evaluar dicha pureza, o suficientemente puro para que una purificación adicional no altere de forma detectable las propiedades físicas y químicas, tales como las actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los expertos en la técnica conocen métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente químicamente puros. Sin embargo, un compuesto sustancialmente químicamente puro puede ser una mezcla de estereoisómeros o isómeros. En tales casos, una purificación adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.

Como se emplea en la presente memoria, se pretende que el término evaluación o determinación incluya la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de un producto, y también de obtener un índice, proporción, porcentaje, visual u otro valor indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta.

Como se emplea en la presente memoria, la actividad se refiere a las actividades *in vitro* o *in vivo* de un compuesto o virus proporcionadas en la presente memoria. Por ejemplo, actividades *in vivo* se refieren a las respuestas fisiológicas que resultan después de la administración *in vivo* de los mismos (o de una composición u otra mezcla). La actividad, por lo tanto, abarca los efectos terapéuticos resultantes y la actividad farmacéutica de tales compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades se pueden observar en sistemas *in vitro* y/o *in vivo* diseñados para someter a prueba o utilizar tales actividades.

Como se emplea en la presente memoria, una "composición" se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos o

compuestos. Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, acuosa, no acuosa, o cualquier combinación de los mismos.

5 Como se emplea en la presente memoria, "una combinación" se refiere a cualquier asociación entre dos o más unidades o elementos. Las combinaciones ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, dos o más composiciones farmacéuticas, una composición que contiene dos o más ingredientes activos, tal como dos virus, o un virus y un agente anticanceroso, tal como un compuesto quimioterapéutico, dos o más virus, un virus y un agente terapéutico, un virus y un agente de generación de imágenes, un virus y una pluralidad de agentes terapéuticos y/o de generación de imágenes, o cualquier asociación de los mismos. Tales combinaciones se pueden envasar en forma de kits.

10 Como se emplea en la presente memoria, un kit es una combinación envasada, opcionalmente, que incluye instrucciones para el uso de la combinación y/u otras reacciones y componentes para tal uso.

15 Como se emplea en la presente memoria, un "control" o "patrón" se refiere a una muestra que es sustancialmente idéntica a la muestra de prueba, excepto que no se trata con un parámetro de prueba o, si es una muestra de plasma, puede ser de un voluntario normal no afectado por la afección de interés. Un control también puede ser un control interno. Por ejemplo, un control puede ser una muestra, tal como un virus, que tiene una propiedad o actividad conocidas.

20 Como se emplea en la presente memoria, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen sus referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un" agente incluye uno o más agentes.

25 Como se emplea en la presente memoria, el término "o" se utiliza para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiera solo a alternativas o las alternativas se excluyan mutuamente.

30 Como se emplea en la presente memoria, los intervalos y las cantidades se pueden expresar como "aproximadamente" un valor o intervalo concreto. Aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por lo tanto, "aproximadamente 5 bases" significa "aproximadamente 5 bases" y también "5 bases".

35 Como se emplea en la presente memoria, "opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia que se describe posteriormente ocurre o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho evento o circunstancia ocurre y casos en los que no. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo no está sustituido o está sustituido.

40 Como se emplea en la presente memoria, las abreviaturas para cualquier grupo protector, aminoácidos y otros compuestos, son, a menos que se indique lo contrario, de acuerdo con su uso común, abreviaturas reconocidas, o de la Comisión IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica (véase, (1972) Biochem. 11:1726).

45 Para mayor claridad de la descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada se divide en las subsecciones que siguen.

B. Métodos de aislamiento de cepas de virus vaccinia clonales

50 En la presente memoria se describen métodos para aislar productos aislados clonales de un virus a partir de una preparación o mezcla de virus Vaccinia que tiene mejores respuestas antitumorales, así como una patogenicidad/toxicidad similar o menor que la preparación o mezcla de virus de partida u otra cepa o producto aislado de referencia. Los métodos se utilizan en la selección e identificación de las cepas del virus Vaccinia que tienen una menor toxicidad y mejores o mayores propiedades antitumorogénicas en comparación con las cepas de virus existentes.

55 Vaccinia se utiliza como un vector oncolítico debido a su eficaz replicación, lisis celular, diseminación, rango de anfitrión y tropismo natural para tejidos tumorales (Shen et al. (2004) Mol. Ther., 11:180). Por ejemplo, el virus vaccinia es más potente en la replicación y propagación que los vectores de adenovirus. Sin embargo, aunque vaccinia es un virus atenuado conocido que tiene propiedades antitumorogénicas, muchas cepas existentes de vaccinia, incluyendo cepas recombinantes, presentan variaciones en la virulencia y seguridad que hacen que muchas sean inadecuadas para la aplicación clínica. Además, los candidatos al virus vaccinia oncolíticos existentes son virus recombinantes que contienen genes foráneos insertados en el genoma viral, por ejemplo, para minimizar la toxicidad del virus o para aumentar o aumentar las propiedades antitumorogénicas. Se encuentra en la presente memoria que se pueden seleccionar virus que son altamente antitumorogénicos con una toxicidad mínima en ausencia de genes foráneos introducidos. Así, por ejemplo, un propósito del método es seleccionar productos aislados clonales que tengan un perfil de seguridad mejorado, incluida la patogenicidad y la toxicidad, al tiempo que conservan o tienen propiedades de antitumorogénicidad potenciadas que son independientes de la inserción de genes heterólogos. En particular, las cepas clonales seleccionadas son candidatas a virus oncolíticos para

5 diagnóstico y terapia de tumores. Las cepas clonales aisladas de vaccinia se pueden utilizar como virus terapéuticos para su uso en el tratamiento de trastornos proliferativos, tales como cáncer, y para uso en otros métodos terapéuticos y/o de diagnóstico como se describe en la presente memoria. Además, las cepas clonales también se pueden utilizar en métodos de vacunación. Las cepas clonales seleccionadas o identificadas también se pueden utilizar como virus vaccinia parentales en la construcción de virus oncolíticos recombinantes.

10 En el método, se selecciona una preparación o mezcla de virus vaccinia parental que contiene varias partículas de virus que tienen genomas que tienen diferentes secuencias genómicas. La preparación o mezcla de virus parental puede ser cualquier cepa de virus vaccinia que sea una población mixta, es decir, no es clonal o no tiene secuencia homogénea. Como se explica más adelante, la preparación se puede obtener a partir de la propagación repetida de un virus en un sistema de cultivo. También se puede obtener una preparación de virus en forma de una mezcla mezclando diferentes cepas de virus vaccinia para permitir que ocurra la recombinación, ya sea *in vitro* o *in vivo*. La mezcla también se puede obtener mezclando diferentes tipos de virus, por ejemplo mezclando una cepa del virus herpes simplex (HSV) y una cepa del virus vaccinia. En el método, la preparación de virus parental se propaga o amplifica *in vitro* o *in vivo* y se obtienen productos aislados clonales (p. ej. por ensayo de placas). Los clones de virus aislados y seleccionados se someten a prueba para determinar su antitumorigenicidad y patogenicidad/toxicidad en ensayos *in vitro* y/o *in vivo*. Una propiedad no es determinante en la selección de un candidato oncolítico y, por lo tanto, los clones se analizan para determinar su antitumorigenicidad y propiedades de toxicidad o seguridad. Por ejemplo, un clon viral que exhibe propiedades antitumorigénicas sorprendentes, pero que es extremadamente tóxico, no es un candidato oncolítico ideal. Por lo tanto, se desea un equilibrio de estas propiedades. Los clones de virus con las mejores respuestas antitumorales pero con una toxicidad mínima se seleccionan como candidatos. En particular, el clon de virus identificado o seleccionado es uno que tiene mejores propiedades de toxicidad y antitumorigenicidad en comparación con una cepa de virus de referencia.

25 En un ejemplo, los virus seleccionados que tienen menos toxicidad en comparación con la preparación de virus parental u otra cepa de virus de referencia (p. ej. virus recombinante) exhiben o exhiben entre 0% y 99%, por ejemplo, menos de 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o menos de la toxicidad de la preparación o mezcla de virus parental u otra cepa de virus de referencia en un ensayo o método para evaluar un parámetro indicativo de toxicidad. En otros ejemplos, los virus seleccionados tienen una actividad antitumoral potenciada o mejor en comparación con la preparación o mezcla de virus parental u otra cepa de virus de referencia (p. ej. virus recombinante) exhiben o exhiben entre 120% a 1000%, por ejemplo, al menos 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 1000% o más de la actividad antitumorigénica de la preparación o mezcla de virus parental u otra cepa de virus de referencia en un ensayo o método para evaluar un parámetro indicativo de antitumorigenicidad. En algunos ejemplos, se selecciona el virus que retiene o tiene una toxicidad y/o actividad antitumorigénica similar en comparación con la preparación o mezcla de virus parental u otra cepa del virus de referencia (p. ej., la cepa recombinante), tal como entre 70% y 120%, por ejemplo, al menos o aproximadamente o 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 110%, 115% o 120% de la toxicidad o actividad antitumorigénica de la preparación o mezcla del virus parental u otra cepa del virus de referencia en un ensayo o método para evaluar un parámetro indicativo de toxicidad.

40 Una descripción de las etapas del método se proporciona en las subsecciones a continuación. Se entiende que las etapas que se detallan a continuación se pueden realizar en cualquier orden. Por ejemplo, los parámetros indicativos de toxicidad se pueden evaluar antes de evaluar los parámetros indicativos de antitumorigenicidad de la preparación o mezcla de virus o productos aislados individuales. En otro ejemplo, los clones se pueden aislar individualmente después de evaluar las propiedades antitumorigénicas de la preparación del virus, preseleccionando así los clones con propiedades antitumorigénicas antes del aislamiento de clones individuales. En un ejemplo alternativo, se pueden aislar productos aislados clonales individuales de una preparación de virus antes de evaluar las propiedades antitumorigénicas o de virulencia de cada clon individual. En un ejemplo concreto, el método se realiza seleccionando una preparación o mezcla de virus, pasando la preparación o mezcla al cultivo celular y aislando clones individuales (p. ej. por ensayo de placas *in vitro*), propagando y purificando cada clon de un sistema de cultivo y evaluando cada cepa clonal en busca de parámetros indicativos de antitumorigenicidad y seleccionando cepas clonales que son antitumorigénicas, y a partir de aquellas cepas clonales seleccionadas que evalúan parámetros indicativos de toxicidad y seleccionando un subconjunto que tiene toxicidad mínima. Se pueden realizar las etapas de evaluación de antitumorigenicidad y toxicidad *in vitro* o *in vivo*. Típicamente, las cepas clonales seleccionadas son probadas *in vivo* en modelos animales para determinar las propiedades antitumorigénicas y tóxicas. El genoma de la cepa clonal se puede secuenciar para confirmar que es homogéneo.

60 Además, al seleccionar o identificar cepas clonales con las propiedades indicadas, todos o algunos de las etapas del método se pueden realizar en paralelo con una cepa de referencia con fines comparativos para ayudar a la selección de un virus. Por ejemplo, en las etapas de evaluación de antitumorigenicidad o toxicidad, se pueden evaluar las propiedades antitumorigénicas o tóxicas de la preparación o mezcla de virus de partida, y se pueden comparar las cepas clonales analizadas para identificar aquellas que retienen (es decir tienen similares) o que tienen propiedades antitumorigenicidad o tóxicas potenciadas o mejores en comparación con la preparación o mezcla de virus de partida.

65

En otro ejemplo, se puede evaluar un virus recombinante atenuado conocido por sus propiedades antitumorígenicas o tóxicas, y los productos aislados clonales probados pueden compararse para identificar aquellos que han retenido (es decir similares) o que tienen propiedades de antitumorogenicidad o tóxicas potenciadas o mejores en comparación con el virus recombinante. Los métodos para la generación de virus recombinantes utilizando técnicas de ADN recombinante son bien conocidos en la técnica (p. ej., véanse las Patentes de Estados Unidos. Núm. 4.769.330; 4.603.112; 4.722.848; 4.215.051; 5.110.587; 5.174.993; 5.922.576; 6.319.703; 5.719.054; 6.429.001; 6.589.531; 6.573.090; 6.800.288; 7.045.313; He et al. (1998) PNAS 95(5):2509-2514; Racaniello et al. (1981) Science 214:916-919; y Hruby et al. (1990) Clin Micro Rev. 3:153-170). Los virus vaccinia recombinantes atenuados y antitumorígenicos son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, GLV-lh68 (expuesto en SEQ ID NO: 9; un derivado de LIVP, véase p. ej. Zhang et al. (2009) Mol. Genet. Genomics, 282:417-435), GLV-1h64 (establecido en SEQ ID NO: 326) y cualquiera de los descritos en las patentes o solicitudes publicadas (véanse, por ejemplo las Pub. de Estados Unidos Núm. US2003-0059400, US2003-0228261, US2009-0117034, US2009-0098529, US2009-0053244, US2009-0081639 y US2009-0136917; la Patentes de Estados Unidos Núm. 7.588.767 y 7.763.420; y Pub Internacional. Núm. WO 2009/139921). Otras cepas del virus vaccinia recombinante incluyen, pero no se limitan a, VVHEA (un derivado de Lister, véase, por ejemplo Tysome et al. (2009) Gene Ther., 16:1223-1233), rVV-p53 (un derivado de Lister; véase, por ejemplo Timiryasova et al. (1999) Int. J. Oncol., 14:845-854; JX-594 (un derivado de la cepa Wyeth, véase, por ejemplo Kim et al. (2006) Mol. Ther. 14:370) y JX-963 (un derivado de la cepa WR, véase, por ejemplo, Thorne et al. (2007) J. Clin. Inves., 117:3350).

20 1. Preparación o mezcla de virus parental

En los métodos, se selecciona para su uso en el método una preparación inicial o parental de virus vaccinia o mezcla de virus vaccinia y otro virus que no tenga un genoma que tenga secuencia homogénea. El virus vaccinia en la preparación o población mixta es típicamente una cepa de virus no recombinante que no ha sido diseñada para contener genes heterólogos. Por lo tanto, el método permite la identificación de cepas clonales del virus vaccinia que exhiben antitumorogenicidad y toxicidad mínima independiente de los genes insertados. Como se explica más adelante, las cepas seleccionadas resultantes se pueden modificar o diseñarse mediante la inserción de genes foráneos para modular adicionalmente las propiedades del virus.

Típicamente, la preparación de partida o la mezcla de virus es o contiene un virus atenuado, tal como cepas atenuadas de poxvirus (p. ej., virus vaccinia). Se conoce una variedad de cepas de virus vaccinia y están disponibles para un experto en la técnica. Las cepas de vaccinia ilustrativas se enumeran en la Tabla 2 e incluyen, entre otras, Lister, Western Reserve (WR), Copenhagen (Cop), Berna, París, Tashkent, Tian Tan, Wyeth (DRYVAX), IHD-J, IHD W, Brighton, Ankara, CVA382, Vaccinia Ankara modificada (MVA), Dairen I, LC16m8, LC16M0, LIVP, ACAM2000, WR 65-16, Connaught, New York City Board of Health (NYCBH), EM-63, o virus vaccinia NYVAC. LIVP se origina a partir de la cepa Lister, que se adaptó a la piel de ternera en el Instituto de Preparaciones Virales, Moscú, Rusia (Al'tshtein et al. (1985) Dokl Akad Nauk SSSR, 285:696-699). Western Reserve (WR) se obtiene del New York City Board of Health (NYCBH) por pases repetidos en el cerebro del ratón (Henderson y Moss (1999) Smallpox and Vaccinia. En: Plotkin S, Orenstein W (eds) Vaccines. W.B. Saunders, Filadelfia, pág. 74-97).

TABLA 2

Nombre	Abreviaturas	Referencia (p. ej., número de acceso de GenBank)
Cepa Western Reserve de virus Vaccinia	WR	AY243312
Cepa Copenhagen de virus Vaccinia	COP	M35027
Cepa principal de Vaccinia Lister	LIST	AY678276
Producto aislado LC16MO de Vaccinia Lister	LC	AY678277
Clon VACV107 de Vaccinia Lister	VACV107	DQ121394
Cepa ACAM2000 de Virus Vaccinia	ACAM	AY313847
Cepa DUKE de virus Vaccinia	DUKE	DQ439815; Li et al. (2006) Virology J, 3:88
Cepa Ankara de virus Vaccinia	MVA	U94848
Clon 3 de virus vaccinia	CLONE3	AY138848

Las preparaciones de virus, incluidas las poblaciones mixtas, de virus vaccinia que tienen secuencia heterogénea pueden crearse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la diversidad en la preparación del virus se puede generar en base a eventos de recombinación homóloga que ocurren en los procesos de selección natural de las cepas de virus. Por ejemplo, se sabe que la recombinación homóloga entre poxvirus se produce cuando las células se infectan conjuntamente con dos virus, o se infectan con un virus y ADN genómico o ADN clonado (Plotkin y Orenstein (eds) "Recombinant Vaccinia Virus Vaccines" in Vaccines, 3ª edición (1999)). Por

lo tanto, en un ejemplo, las preparaciones de virus se pueden generar mediante pases repetidos de una o más cepas virales en cultivo de tejidos o *in vivo* a través de la infección de tejidos tumorales u otros tejidos de mamíferos (p. ej. pase sobre la piel de ternera), que puede dar como resultado la acumulación de mutaciones puntuales o eventos de recombinación. En algunos ejemplos, se pueden hacer pases de dos o más cepas virales. Los métodos para la infección de células *in vitro* y la infección de sujetos animales *in vivo* con virus, tales como virus vaccinia, son bien conocidos en la técnica. La generación de modelos animales que contienen tumores para el pase de un virus o mezclas de virus también es bien conocida en la técnica y se describe en otra parte en la presente memoria.

En otro ejemplo, se puede efectuar la mutagénesis de una o más cepas virales para crear una preparación de virus con una variedad de modificaciones genéticas. En este ejemplo, se pueden utilizar varias estrategias de mutagénesis de una provisión de partida de virus para mutagenizar aleatoriamente un conjunto de virus. Por ejemplo, se puede utilizar ácido nítrico para efectuar mutaciones aleatorias (véase, p. ej. Williams et al. (1971) J. Gen. Virol., 11:95-101). La preparación de virus resultante puede ser una que tiene un genoma heterogéneo.

Típicamente, la preparación o mezcla de virus parental es una preparación en la que no se hace ningún intento de purificar clonalmente el inóculo antes de utilizarlo en el método. En algunos ejemplos, la preparación del virus se obtiene mediante pase de una cepa del virus una o más veces *in vivo*. En algunos ejemplos, la preparación del virus se obtiene mediante pase una o más veces *in vitro*. En algunos ejemplos, la preparación del virus se obtiene mediante pase una o más veces *in vitro* y una o más veces adicionales *in vivo*. En otro ejemplo, la preparación de virus se obtiene mediante la propagación de una mezcla obtenida infectando un sistema de cultivo con una población de cepas de virus, tales como cepas clonales de vaccinia, cepas no clonales de vaccinia, o una combinación de cepas clonales y no clonales de virus vaccinia.

En un ejemplo concreto, la preparación o mezcla de virus parental incluye una cepa de virus vaccinia Lister. En otro ejemplo, la preparación o mezcla de la cepa de virus parental incluye una cepa de virus obtenida de una cepa de virus vaccinia Lister pasada en cultivo celular. En un ejemplo concreto, la preparación o mezcla de la cepa del virus parental se obtiene de una cepa del virus vaccinia Lister pasada en un cultivo celular, tal como por ejemplo, en un cultivo de células tumorales. En un ejemplo concreto, la preparación o mezcla de la cepa del virus parental se obtiene de una cepa del virus vaccinia Lister pasada *in vivo*, tal como por ejemplo, en un tumor injertado. En un ejemplo concreto, la mezcla de la cepa del virus parental se obtiene de una cepa del virus vaccinia Lister pasada *in vivo* mediante inoculación cutánea de un sujeto, tal como, por ejemplo, inoculación de piel de ternera.

Una preparación o mezcla de cepa de virus parental ilustrativa para su uso en la presente memoria incluye el virus vaccinia LIVP que tiene un genoma que no tiene secuencia homogénea. LIVP se originó a partir de la cepa Lister (Catálogo ATCC Núm. VR-1549), que se adaptó a piel de ternera en el Instituto de Preparaciones Virales, Moscú, Rusia (Al'tshtein et al. (1985) Dokl. Acad. Nauk URSS 285:696-699). La cepa LIVP se puede obtener del Instituto de Preparaciones Virales, Moscú, Rusia (Kutinova et al. (1995) Vaccine, 13:487-493); Colección de Microorganismos del vector FSRI SRC VB (Kozlova et al. (2010) Environ. Sci. Technol., 44: 5121-5126); o se puede obtener del Instituto de Virología Ivanovsky de Moscú (C0355 K0602; Agranovski et al. (2006) Atmospheric Environment, 40:3924-3929). También es bien conocida por los expertos en la técnica; la cepa de vacuna utilizada para la vacunación en la URSS y en toda Asia e India. La cepa ahora es utilizada por los investigadores y es bien conocida (véanse, por ejemplo, Altshteyn et al. (1985) Dokl. Acad. Nauk URSS 285:696-699; Kutinova et al. (1994) Arch. Virol. 134:1-9; Kutinova et al., (1995) Vaccine 13:487-493; Shchelkunov et al., (1993) Virus Research 28:273-283; Sroller et al. (1998) Archives Virology 143:1311-1320; Zinoviev et al., (1994) Gene 147:209-214; Chkheidze et al. (1993) FEBS 336:340-342). LIVP exhibe menos virulencia que la cepa WR. Un derivado recombinante de LIVP, designado GLV-1h68 (expuesto en SEQ ID NO: 9; GenBank Acc. EU410304) y GLV-1h64 (expuesto en SEQ ID NO: 326) exhiben propiedades de direccionamiento tumoral y un perfil de seguridad mejorado en comparación con su cepa LIVP parental (expuesta en SEQ ID NO: 10) y la cepa WR (Zhang et al. (2009) Mol. Genet. Genomics, 282:417-435).

En ejemplos concretos, se crea la preparación de virus que contiene una población mixta de virus vaccinia infectando células o tejidos con una cepa de vaccinia, tal como LIVP, y con otro tipo de virus o con ADN genómico o ADN clonado. Algunos ejemplos de otros tipos de virus incluyen, pero no se limitan a, virus de ADN, tales como otros poxvirus (p. ej. avipoxvirus, mixomavirus), herpesvirus (p. ej., virus herpes simplex (HSV), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), hepadnavirus (p. ej., virus de la hepatitis B), virus de poliovirus, virus del papiloma, adenovirus y virus adenoasociados; virus de ADN monocatenario, tales como parvovirus; virus de ARN de doble hebra, tales como reovirus (p. ej., rotavirus); virus de ARN de sentido positivo de una hebra, tales como los picornavirus (p. ej., virus del valle de Séneca, virus coxsackie, poliovirus, enterovirus), togavirus (p. ej., virus del bosque semliki) y retrovirus (p. ej., virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la leucemia de Maloney murina (MMLV), lentivirus); Virus de ARN de sentido negativo de hebra sencilla, tales como ortomixovirus (p. ej., virus de la influenza), paramixovirus (p. ej., virus de la enfermedad de Newcastle, virus del sarampión, virus de las paperas y rabdovirus (p. ej., virus de la estomatitis vesicular (VSV)).

2. Aislamiento de cepas clonales

A partir de la preparación de virus que contiene una población mixta de virus vaccinia, se seleccionan aislados

clonales. Los métodos para aislar clones individuales de una mezcla de virus son bien conocidos por los expertos en la técnica. Un ejemplo de tal método es un ensayo de placas convencional. Un ensayo de placas mide la formación de placas virales, que son zonas de lisis viral de las células después de la infección de una monocapa celular por un virus. Cada placa individual representa una única cepa clonal de virus.

5 En un ensayo de placas típico, las monocapas de células se cultivan hasta casi la confluencia y a continuación se infectan con diluciones seriadas de una preparación o mezcla de virus como se describe en la presente memoria. La infección de células con virus da como resultado la lisis celular y la infección de células inmediatamente adyacentes, de modo que una placa refleja la infección de un grupo de células. En general, cada placa representa un virus único que tiene una secuencia genómica homogénea. Se emplean diluciones seriadas de virus para asegurar el aislamiento de placas bien definidas que representan cepas de virus clonales únicas. Normalmente, se utiliza una capa de agarosa para mantener las células estables y para limitar la propagación del virus. Las cepas de virus clonales se pueden purificar aislando las placas individuales.

15 Se puede utilizar cualquiera de una variedad de tipos de células para la infección. Un experto en la técnica puede identificar líneas celulares diana apropiadas para su uso en un ensayo de placas. La selección de una línea celular apropiada para un ensayo de placas puede depender de factores conocidos, tales como, por ejemplo, la infectividad celular y la capacidad del virus para propagarse y lisar la célula diana. Las líneas celulares ilustrativas utilizadas habitualmente para la infección por virus de ADN en los ensayos de placas incluyen, pero no se limitan a, CV-1 (riñón de mono), Vero (riñón de mono), BHK (riñón de hámster), RK13 (riñón de conejo) y HEK-293 (células de riñón embrionario humano). En algunos ejemplos, el virus puede seleccionarse mediante la infección de una monocapa celular de la línea celular tumoral, tal como por ejemplo, HT29 (colon), A549 (pulmón), H2009 (pulmón), DU145 (próstata), PC-3 (próstata), MB231 (mama), GI-101A (mama), Panc-1 (páncreas), Hlac (cabeza y cuello) u otra línea de células tumorales que pueden formar monocapas celulares.

25 En un ejemplo, las células se infectan con una preparación o mezcla de virus vaccinia y las monocapas celulares crecen como se ha descrito. La placa generalmente se selecciona a partir de una placa que contiene menos de 50 placas para evitar la contaminación con virus de otras placas. Una vez que se ha seleccionado una placa concreta, la cepa del virus clonal se puede purificar mediante recuperación utilizando métodos convencionales. Por ejemplo, la placa seleccionada se puede recoger utilizando una micropipeta o tubo estéril retirando un tapón de agarosa directamente sobre la placa a un nuevo tubo que contiene medio de cultivo de tejidos. Las partículas de virus se pueden eluir de la agarosa mezclando o rotando el tubo. Los medios eluidos se pueden diluir en los pocillos de una bandeja o placa de cultivo celular que contiene células y se pueden incubar para permitir que el virus se propague. El sobrenadante del virus se puede recolectar y centrifugar para eliminar los residuos y almacenarse. Se pueden emplear pases sucesivos para provisiones de partida adicionales, aunque el número de pases se debe minimizar y registrar. Se pueden emplear una o más rondas sucesivas de selección en placa para asegurar el aislamiento de una única cepa de virus clonal. La identidad del virus se puede confirmar mediante secuenciación, análisis de restricción, PCR, Transferencia Southern o mediante expresión de proteínas.

40 En ejemplos concretos del método de la presente memoria, las cepas de virus clonales se seleccionan basándose en las propiedades deseables para el tratamiento de tumores o metástasis. Por ejemplo, las placas formadas en un ensayo de placas se forman debido a las propiedades replicativas o infecciosas del virus. El tamaño de las placas es una indicación de la infectividad y la producción viral. Por ejemplo, cuanto mayor sea el tamaño de la placa, mayor será la tasa de lisis celular y la propagación del virus. Para el tratamiento de tumores, generalmente es deseable que el virus tenga una alta tasa de infección y/o una alta tasa de lisis de las células. En consecuencia, las placas de virus que se seleccionan son típicamente de gran tamaño (es decir gran diámetro). Así, en algunos ejemplos del método en la presente memoria descrito, se seleccionan las placas más grandes en un ensayo de placas (p. ej. en una placa). Por ejemplo, en una selección de placas, donde las placas difieren en tamaño, se seleccionan las placas más grandes, tal como por ejemplo, se seleccionan al menos las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 más grandes o más, 15 o más, 20 o más, 25 o más placas. Cada placa seleccionada se aísla, se propaga y se recupera el virus clonal. Cada provisión de partida clonal de virus se puede analizarse para determinar su antitumorigenicidad y toxicidad.

55 En otro ejemplo, antes del aislamiento de un virus clonal, la mezcla de preparación del virus se puede preseleccionar por su antitumorigenicidad o toxicidad del virus. Por ejemplo, la preselección puede ser mediante pasa de la mezcla de virus *in vitro* en líneas de células tumorales (Yan et al. (2003) J Virol. 77: 2640-2650) o pase *in vivo* en modelos animales de tumores (Gros et al. (2008) Cancer Res. 68:8928) o por pase *in vivo* en modelos animales sanos. Un experto en la técnica conoce varias líneas de células tumorales o modelos animales de tumores y se describen en la presente memoria. Por ejemplo, la mezcla de virus se puede utilizar para infectar células tumorales *in vitro* o animales y sujetos a múltiples rondas de selección. Por ejemplo, para la selección *in vitro*, el virus se puede pasar seriadamente en líneas de células tumorales y el virus se puede recuperar de las células asociadas con efectos citopáticos (CPE). En otro ejemplo, para la selección *in vivo*, el virus se puede utilizar seriadamente para infectar los animales portadores de tumores, los pesos corporales y los volúmenes tumorales monitorizados, y el virus se puede recuperar de la sangre o del tumor de ratones asociado con la inhibición del crecimiento tumoral. En un ejemplo adicional, para la selección *in vivo* para preseleccionar para determinar la toxicidad, el virus se puede utilizar seriadamente para infectar animales normales, controlar el peso corporal y el recuperar el virus de la sangre de

ratones asociado con una disminución mínima en el peso corporal. El virus recuperado, que se preselecciona por sus propiedades de antitumorigenicidad y/o toxicidad, se puede aislar a continuación utilizando un ensayo de placas. Como antes, las placas más grandes se pueden seleccionar para aislar clones virales que tienen propiedades replicativas o infecciosas altas.

5 Tras el aislamiento de una o más cepas de virus clonales de la preparación o mezcla de virus, se puede seleccionar adicionalmente una cepa de virus clonal como candidata para terapia basada en sus propiedades antitumoral y de toxicidad.

10 3. Antitumorigenicidad

El virus aislado se somete a prueba adicionalmente para determinar los parámetros indicativos de su propiedad antitumorigénica. En general, los parámetros seleccionados son deseables para el tratamiento de enfermedades y trastornos proliferativos, incluido el tratamiento de un tumor o metástasis. Por ejemplo, un virus puede destruir las células tumorales mediante la replicación, de modo que la amplificación continua del virus provoca la infección de las células adyacentes y su posterior destrucción. Los virus oncolíticos también exhiben antitumorigenicidad por expresión de proteínas que son citotóxicas para las células cancerosas. En ejemplos adicionales, los virus pueden exhibir antitumorigenicidad al iniciar respuestas inmunitarias antitumorales específicas y no específicas, por ejemplo, el inicio de la expresión de citocinas a partir de células infectadas (p. ej. TNF) o a través de una respuesta específica (p. ej. respuesta CTL). Por lo tanto, cualquiera de los parámetros anteriores se puede evaluar como indicativo de antitumorigenicidad de un virus.

Por ejemplo, el virus aislado se somete a prueba en uno o más ensayos *in vitro* y/o *in vivo* que evalúan la infectividad, la replicación de ácidos nucleicos virales, la producción de virus, la expresión génica viral a partir de células tumorales, los efectos en la célula anfitriona, la citotoxicidad de las células tumorales, la selectividad de células tumorales, la selectividad del tipo de célula tumoral, la respuesta inmunológica específica y no específica y la eficacia terapéutica. Se pueden evaluar los parámetros indicativos de antitumorigenicidad *in vitro* o *in vivo*. En ejemplos concretos, se evalúa la antitumorigenicidad *in vivo*. Los parámetros *in vivo* de antitumorigenicidad incluyen, pero no se limitan a, un índice terapéutico deseable en un modelo animal de cáncer, liberación de antígenos tumorales y acumulación preferente del virus en tejidos tumorales después de la administración. A continuación se describen ejemplos de ensayos o métodos para evaluar dichos parámetros.

a. Indicador de replicación asociado a tumores

35 Para la selección como candidato para la terapia, el virus generalmente muestra replicación y/o infectividad en células tumorales. Por lo tanto, se seleccionan cepas clonales que se replican en células tumorales. El indicador de replicación que se mide es cualquier parámetro a partir del cual se pueda evaluar o inferir el nivel o la cantidad o la cantidad relativa de replicación viral, típicamente en el plazo de un día de la administración a las células tumorales. En algunos ejemplos, la replicación se puede evaluar mediante la medición de un indicador de replicación viral, tal como, por ejemplo, el título viral (*es decir* según lo determinado por el número de placas producidas en un ensayo de placas) o los cambios en la expresión de genes virales o la expresión de genes del anfitrión (véanse, p. ej., Pub. de Patente de Estados Unidos Núm. 2009-0136917). Por ejemplo, la replicación se puede determinar infectando o introduciendo el virus de prueba en una célula tumoral y evaluando un indicador de replicación en un momento determinado o en función del tiempo. Esto se puede comparar con un patrón predeterminado, por ejemplo, la preparación o mezcla de virus parental u otra cepa de referencia (p. ej. virus recombinante), o en comparación con otras cepas clonales candidatas de prueba. Se seleccionan los virus que se replican en una célula tumoral según lo evaluado *in vitro* o *in vivo*. En ejemplos concretos, se seleccionan virus que se replican selectivamente en células tumorales en comparación con células normales.

50 Los ensayos para evaluar la replicación se pueden realizar en productos lisados celulares de virus propagados *in vitro* en varias líneas de células tumorales, tejidos primarios o células, así como en células tumorales, tal como por ejemplo, en una biopsia. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de tejido o de células (p. ej., biopsia) de un sujeto (p. ej., sujeto humano o no humano), y la muestra se puede infectar con uno o más tipos de virus. En otros ejemplos, se pueden utilizar líneas de células tumorales. Las líneas de células tumorales son conocidas y están disponibles para un experto en la técnica, por ejemplo, de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATTC, por sus siglas en inglés; Manassas, VA) o de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC, por sus siglas en inglés). Las líneas de células tumorales también están disponibles en el Repositorio de Tumores de la División de Tratamiento y Diagnóstico del Cáncer (DCTD, por sus siglas en inglés) (Instituto Nacional del Cáncer/Instituto Nacional de la Salud; dtp.nih.gov/index.html). Los ejemplos de líneas de células tumorales incluyen seres humanos y otros animales. las líneas celulares incluyen, entre otras, células de carcinoma de próstata humano DU145, células de cáncer de próstata humano LNCaP, células de cáncer de mama humano MCF-7, células de fibroblasto de pulmón humano MRC-5, células de cáncer de mama humano MDA-MB-438, células de carcinoma de mama humano MDA-MB-231, células de cáncer de próstata humano PC3, células de cáncer de mama humano T47D, células de leucemia mieloide humana THP-1, células de glioblastoma humano U87, células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, células de Saos-2 humanas, células de carcinoma de pulmón humano A549, células de carcinoma de ovario

humano A2780, células de colon humano HCT 116, células de colon humano HT-29, células de colon humano SW260, fibrosarcoma humano HT-180, células de carcinoma pancreático humano MIA PaCa-2, células pancreáticas humanas PANC-1, células de ratón CMT 64 C57BL/6, células mamarias de ratón JC, células hepáticas de ratón TIB-75, células de carcinoma de colon de ratón CT26 WT, células de adenocarcinoma de ratón MC-38, células de melanoma de ratón B16-F10, células de carcinoma mamario murino 4T1 y células HP-1 de tumor pancreático de hámster.

Por ejemplo, las células o líneas celulares se pueden sembrar en los pocillos de una placa. A continuación se puede agregar el virus y permitir que infecte las células. Al final de la infección, se pueden cambiar los medios para eliminar cualquier virus residual y e incubar las células adicionalmente. A continuación, las células se pueden raspar al medio y recolectar. Las células se pueden lisar, por ejemplo, mediante congelación-descongelación y/o sonicación, para obtener productos lisados que contienen virus. La extensión de la replicación se puede medir, por ejemplo mediante la determinación del título viral o la expresión de genes como se describe más adelante. Se entiende que la extensión y el grado de replicación y/o la eficacia de la infectividad de un virus diferirán entre los distintos tipos de células tumorales.

Los ensayos para evaluar la replicación también se pueden realizar en virus cosechados de tumores propagados *in vivo* tras la infección de animales portadores de tumores. Tal ensayo es una medida de la acumulación del virus en los tejidos tumorales. Como se explica más adelante, los tumores se pueden establecer en animales mediante la implantación de diferentes tipos de células tumorales. Por ejemplo, los animales portadores de tumores se pueden infectar con virus, virus propagados en tumores y virus o tumores extraídos de los mismos. La extensión de la replicación se puede medir, por ejemplo mediante la determinación del título viral o la expresión de genes, como se describe adicionalmente más adelante.

En un ejemplo, los sobrenadantes de cultivo celular o los productos lisados celulares de las células infectadas o los extractos de células tumorales se pueden obtener después de la infección y se pueden someter a ensayos para medir el título viral. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo de placas convencional. El ensayo de placas puede indicar la actividad biológica en diferentes tipos de células, incluidos diferentes tipos de células tumorales. El experto en la técnica conoce la titulación de virus por medio de ensayo de placas. En un ejemplo de un ensayo de placas, se recogen sobrenadantes o células de productos lisados de tumores o células infectadas con el virus y se pueden realizar ensayos de placas. Típicamente, se realizan diluciones seriadas del sobrenadante del virus o del producto lisado en el intervalo de 10^{-2} (1:100) a 10^{-10} , y en particular a partir de 10^{-5} a 10^{-10} . El virus diluido se añade a una monocapa de células, por ejemplo, monocapas de líneas celulares permisivas, tales como, por ejemplo, líneas celulares CV-1, Vero, BHK, RK13 o HEK-293, y se incuba con el virus. En algunos ejemplos, el ensayo de placas se puede realizar directamente en una monocapa celular de células tumorales siempre que las células tumorales puedan formar una monocapa. Después de la incubación, se añade una capa de agarosa a la monocapa de células sin desalojar las células, y la placa se incuba adicionalmente hasta que las placas se hacen visibles. Se añade a cada uno de los pocillos o placas una solución de tinte o colorante que es absorbida por las células sanas pero no por las células muertas, como rojo neutro. Después de la incubación, el tinte o el colorante se eliminan de manera que se observa que las placas son transparentes, mientras que las células no lisadas permanecen teñidas. El título (ufp/mL) se calcula contando el número de placas en el pocillo y dividiendo por el factor de dilución (d) y el volumen (V) de virus diluido añadido al pocillo (Núm. placas/d x V). El rendimiento del virus se puede convertir a ufp/célula al dividir la cantidad total de virus presente en la muestra por el número de células originalmente infectadas en la muestra.

Generalmente, en el método de la presente memoria, el virus se selecciona como que exhibe un parámetro indicativo de antitumorigenicidad si la ufp/ml es o está aproximadamente entre 1×10^2 a 1×10^{10} , como 5×10^3 a 1×10^9 , por ejemplo 1×10^4 a 1×10^8 , y en particular es al menos 1×10^{31} x 10^{41} x 10^{51} x 10^{61} x 10^{71} x 10^8 , o 1×10^9 . En otros ejemplos, en el método de la presente memoria, el virus se selecciona por exhibir un parámetro indicativo de antitumorigenicidad si la ufp/célula es o está entre 2 a 10000, por ejemplo, 10 a 5000, por ejemplo 100 a 2000, y en particular en o al menos 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 o más. Típicamente, el virus se selecciona para que muestre un parámetro indicativo de antitumorigenicidad si la replicación (ufp/ml o ufp/célula) es similar o mejor que una preparación o mezcla de virus de referencia u otro virus de referencia (p. ej., proteína recombinante) como se describe en la presente memoria más arriba.

También se pueden evaluar otros indicadores de replicación. Por ejemplo, se puede evaluar la expresión de genes virales, proteínas tumorales y/o genes constitutivos que se correlacionan con la replicación viral y/o la infectividad en células tumorales (véase, p. ej. la Pub. de Patente de Estados Unidos Núm. 2009-0136917). Por ejemplo, se puede evaluar la expresión de genes constitutivos u otros genes en células tumorales asociadas con la replicación del virus y la infectividad (Pub. de Patente de Estados Unidos Núm. 2009-0136917). Por ejemplo, se evalúa la expresión de una pluralidad de tales genes, tales como los genes constitutivos, cuya expresión aumenta en las células tumorales tras la infección con el virus. Los ejemplos de tales genes que se pueden evaluar incluyen la expresión de uno o más genes que codifican una proteína seleccionada entre IL-18 (interleucina-18), MCP-5 (Proteína Quimioatrayente de Monocitos 5; CCL12), IL-11 (Interleucina-11), MCP-1 (Proteína Quimioterapéutica de Monocitos-1), MPO (Mieloperoxidasa), Apo A1 (Apolipoproteína A1), TIMP-1 (Inhibidor Tisular de la Metaloproteínasa Tipo 1), CRP

(Proteína Reactiva C), Fibrinógeno, MMP-9 (Metaloproteínasa 9 de Matriz), Eotaxina (CCL11), GCP-2 (Proteína Quimiotáctica de Granulocitos 2; CXCL6), IL-6 (Interleucina-6), Factor tisular (TF), SAP (Suero Amiloide P), FGF-básico (Factor de Crecimiento de Fibroblastos Básico), MCP-3 (Proteína Quimioatrayente de Monocitos 3; CCL7), IP-10 (CXCL 10), MIP-2, Trombopoyetina, Antígeno de cáncer 125, CD40, Ligando de CD40, ENA-78, Ferritina, IL-12p40, IL-12p70, IL-16, MMP-2, PAI-1, TNF RII, TNF-beta y VCAM-1. En otro ejemplo, se evalúa la expresión de una pluralidad de genes, tales como los genes constitutivos, cuya expresión disminuye en las células tumorales tras la infección con el virus. Los ejemplos de tales genes incluyen uno o más genes que codifican una proteína seleccionada entre MIP-1beta (Proteína-1 beta Inflamatoria de Macrófagos), MDC (Quimiocina Obtenida de Macrófagos; CCL22), MIP-1alfa (Proteína-1alfa Inflamatoria de Macrófagos, CCL3), KC/GROalfa (Proteína con Actividad Estimuladora del Crecimiento de Melanoma), VEGF (Factor de Crecimiento de Células Endoteliales Vasculares), endotelina 1, MIP-3 beta (proteína inflamatoria de macrófagos 3 beta; Exodus-3 o ELC), Microglobulina Beta 2, IL-5 (Interleucina-5), IL-1 alfa (Interleucina-1 alfa), EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico), Linfotactina (XCL1), GM-CSF (Factor Estimulante de colonias de Granulocitos y Macrófagos), MIP-1gamma (Proteína Inflamatoria de Macrófagos); CCL4), IL-1beta (Interleucina-1beta), BDNF (Factor Neutrónico Derivado de Cerebro), Antígeno de cáncer 19-9, Antígeno Carcinoembrionario, Proteína C Reactiva, EGF, Proteína de Unión a Ácidos grasos, Factor VII, Hormona de crecimiento, IL 1 alfa, IL-1 beta, IL-1 ra, IL-7, IL-8, MDC, Fosfatasa Ácida Prostática, Antígeno Específico de Próstata, libre, Factor de Células Madre, Factor Tisular, TNF-alfa, VEGF y Factor de Von Willebrand.

La expresión génica se puede analizar después de poner en contacto una muestra de tumor con el virus durante un período de tiempo *in vitro* o *in vivo* y midiendo el nivel de expresión de uno o más genes constitutivos u otros genes. Se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica para evaluar la expresión de genes en un tumor. Por ejemplo, los métodos para medir los niveles de expresión de proteínas que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, análisis de micromatrices, ensayos ELISA, transferencia Western o cualquier otra técnica para la cuantificación de proteínas específicas. Para determinar los niveles de ARN, los ejemplos de técnicas que se pueden utilizar incluyen análisis de micromatrices, PCR cuantitativa, hibridación Northern o cualquier otra técnica para la cuantificación de ácidos nucleicos específicos. En algunos ejemplos, una diferencia en la expresión del mismo marcador entre las muestras biológicas contactadas y no contactadas de aproximadamente menos de 2 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 9 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 60 veces, aproximadamente 70 veces, aproximadamente 80 veces, aproximadamente 90 veces, aproximadamente 100 veces o más que aproximadamente 100 veces es indicativo de replicación específica y/o infectividad de una célula tumoral. En el método de la presente memoria, el virus se selecciona por exhibir un parámetro indicativo de antitumorogenicidad si la replicación (aumento o disminución de la expresión génica) es similar o mejor que una preparación o mezcla de virus de referencia u otro virus de referencia (*p.ej* proteína recombinante).

Para la comparación de la infección por el virus y las tasas de replicación, los ensayos se realizan típicamente a lo largo del tiempo. Por ejemplo, las muestras para la evaluación de la replicación del virus se obtienen típicamente en puntos temporales seleccionados después de la infección de las células por el virus, tal como, por ejemplo, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 1,5 días, 2 días, 2.5 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o más. Un experto en la técnica puede seleccionar puntos temporales apropiados para la evaluación de la replicación viral basándose en la infectividad relativa del virus en comparación con otras cepas de virus conocidas.

Se pueden determinar los retrasos en la replicación entre los virus de prueba y la preparación o mezcla del virus parental u otro virus de referencia o patrón. Se pronostica que los virus que exhiben una replicación retardada en una célula tumoral después de la infección de la célula tumoral no serán eficaces para la terapia del tipo de célula concreto. Del mismo modo, la replicación eficiente y temprana del virus después de la infección de una célula tumoral *in vitro* o *in vivo* es indicativa de una respuesta favorable a la terapia del tumor por el virus *in vivo*. Por lo tanto, los virus que muestran un perfil de replicación sin retraso son generalmente deseables para la selección como virus candidato para la terapia de enfermedades y trastornos proliferativos. El valor de tiempo concreto para la selección se puede determinar empíricamente si fuera necesario. Por lo tanto, el indicador de replicación se puede determinar y, por ejemplo, se puede comparar con un indicador patrón de replicación retrasada o replicación no retrasada. El patrón se puede determinar, tal como una base de datos de valores del indicador que representa la replicación sin retraso o la replicación con retraso. Por lo tanto, por ejemplo, el indicador de replicación se puede comparar con una base de datos de valores predeterminados para los tipos de células tumorales para determinar si el indicador de replicación tiene un valor indicativo de replicación sin retraso (véanse, *p. ej.*, Pub. de Patente de Estados Unidos Núm. 2009-0136917).

Se pueden evaluar diferentes dosis/multiplicidad de infección (MOI; proporción de virus a célula) del virus para evaluar la tasa de infección viral y la producción de virus a diferentes niveles de infección. Los virus que muestran una alta tasa de replicación a una MOI más baja son generalmente deseables para la selección como virus candidato para la terapia de un trastorno o enfermedad proliferativa. Por ejemplo, las células se pueden infectar a una MOI de entre 0,1 y 10, por ejemplo, de 0,5 a 5, por ejemplo, de 0,5 a 2, por ejemplo, una MOI de al menos 0,25,

0,5, 1, 1.5, 2 o más.

En cualquiera de los ejemplos en la presente memoria que evalúan la replicación o la infectividad de un virus, también se puede evaluar la selectividad de las células tumorales del virus. Por ejemplo, las células normales y las células tumorales pueden infectarse con virus, seguido de la evaluación de la replicación y/o la infectividad utilizando cualquiera de los ensayos descritos en la presente memoria o conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la medición del título viral mediante el ensayo de placas o la expresión de genes como se describe a continuación se puede determinar en células tumorales infectadas por virus frente a células normales infectadas por virus. Las células normales o no transformadas incluyen, pero no se limitan a, células fibroblásticas pulmonares MRC-5, células epiteliales bronquiales Beas-2B, células epiteliales bronquiales humanas normales (NHBE), células epiteliales bronquiales de las vías aéreas pequeñas (SAEC). Las células tumorales incluyen cualquiera de las descritas en la presente memoria o conocidas por un experto en la técnica e incluyen, entre otras, células A2780, A549, HCT 116, HT 1080, LNCaP o SW620. En algunos ejemplos, las líneas celulares tumorales y no tumorales emparejadas se pueden infectar con virus y compararse. Un experto en la técnica conoce líneas de células tumorales y no tumorales correspondientes o emparejadas a modo de ejemplo (véanse, por ejemplo, Gazdar et al. (1998) *Int. J. Cancer*, 78:766-774, Theodore et al. (2010) *int. J Oncology*, 37:1477-1482; Niedbala et al. (2001) *Radiation Research*, 155:297-303). En otros ejemplos, los tumores infectados *in vivo* se pueden recolectar y comparar con células o tejidos normales que también se extraen del mismo animal infectado. Se pueden evaluar y comparar la infección y la replicación del virus en células normales y células tumorales. El índice terapéutico del virus se puede determinar por medio de la proporción de replicación en la célula tumoral en comparación con la célula normal (p. ej. virus producido por célula; ufp/célula). En el método de la presente memoria, los virus se seleccionan con un índice o proporción terapéutica que es o es de aproximadamente 2 a 5000, tal como 10 a 5000, por ejemplo 100 a 2000, y en particular al menos 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, por ejemplo, al menos 1000 o al menos 2000.

b. Citotoxicidad

Para la selección como candidato para la terapia, el virus generalmente exhibe actividad citopática citotóxica contra las células tumorales. Por lo tanto, se seleccionan cepas clonales que son citotóxicas o que destruyen células tumorales. Los productos aislados clonales se pueden seleccionar por su capacidad para eliminar células tumorales mediante la inducción de la muerte celular y/o la lisis de la célula tumoral (es decir oncolisis). La actividad de destrucción celular del virus se puede evaluar mediante una variedad de mecanismos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, los ensayos de citotoxicidad/viabilidad celular que se pueden emplear para medir la necrosis celular y/o la apoptosis después de una infección viral, tal como el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y otros ensayos relacionados con sal de tetrazolio relacionados (p. ej. XTT, MTS o WST), ensayos de ATP, ensayos de apoptosis, como la tinción TUNEL de células infectadas, ensayos de fragmentación de ADN, ensayos de escalonamiento de ADN y ensayos de liberación de citocromo C. Tales ensayos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, se puede evaluar la viabilidad de las células infectadas por virus. Se pueden sembrar varias líneas de células tumorales, por ejemplo cualquiera descrita anteriormente o conocida por un experto en la técnica, en una placa de 96 pocillos (p. ej. a aproximadamente 5.000 células/pocillo) u otro tamaño de placa de pocillos y se cultiva durante la noche, y a continuación se puede infectar con una dilución seriada del virus. Por ejemplo, se pueden someter a prueba varias MOI del virus. La MOI puede variar desde, por ejemplo, 1000 a 0,0001, tal como de 100 a 0,001 o de 10 a 0,01. Está dentro del nivel de un experto en la técnica el seleccionar o determinar empíricamente un rango de MOI apropiado en el cual se utiliza. Una vez infectadas, las células se pueden incubar durante un período de tiempo antes de la evaluación de la citotoxicidad. Por ejemplo, las muestras para la evaluación de la citotoxicidad se obtienen típicamente en puntos temporales seleccionados después de la infección por el virus de las células, tal como, por ejemplo, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 1,5 días, 2 días, 2,5 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o más. Un experto en la técnica puede seleccionar puntos temporales apropiados para la evaluación de la replicación viral basándose en la infectividad relativa del virus en comparación con otras cepas de virus conocidas. Generalmente, se permite que la infección proceda al menos 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas, 84 horas, 96 horas o más.

Después de la infección durante el período designado, se reemplazan los medios y se determina la viabilidad de las células basándose en cualquier ensayo o procedimiento conocido por un experto en la técnica. Los ensayos ilustrativos para evaluar la viabilidad son los ensayos colorimétricos que permiten la visualización de células en función de la actividad metabólica y miden el potencial reductor de la sal de tetrazolio de un producto de formazán coloreado (p. ej., ensayo MTT, ensayo MTS o ensayo XTT). Otros ensayos rédox incluyen ensayos que miden la capacidad de las células para convertir una resoxurina rédox colorante en una resorufina producto final fluorescente (McMillian et al. (2002) *Cell Biol. Toxicology*, 18:157-173.; Ensayo de Viabilidad Celular CellTiter-Blue™, Promega). En otros ejemplos, la viabilidad se puede evaluar utilizando una tecnología de recuento de células CASY, que es un sistema de recuento de células multicanal de campo eléctrico basado en la existencia de un campo eléctrico transmitido a través de células dañadas o muertas en comparación con las células normales (p. ej., CASY® Modelo TT Roche Innovatis AG). Los ejemplos adicionales incluyen, pero no se limitan a, ensayo de exclusión de colorante

azul de tripano o yoduro de propidio, medición de lactato deshidrogenasa (LDH; véase, por ejemplo, Kit de Detección de Citotoxicidad LDH, Clontech, Núm de cat. 630117), ensayo de sulfurodamina B (SRB) (p. ej. Ensayo de Citotoxicidad CytoScan™ SRB, GBiosciences, Núm. cat. 786-213, ensayo WST (p. ej. Ensayo de Proliferación Celular Cytoscan™ WST-1, GBiosciences, Núm. de Cat. 786-212), ensayo clonogénico y ensayos basados en ATP basados en luciferasa (p. ej., Ensayo de Viabilidad de Células Luminiscentes CelTiter-Glo™; Promega).

Generalmente, los ensayos se realizan utilizando varios controles. Por ejemplo, cualquier ensayo para evaluar la viabilidad se realiza generalmente con pocillos no tratados que contienen solo células (p. ej., 100% de viables), así como pocillos sin células (0% de viables). Asimismo, además de los pocillos probados de las cepas clonales, se pueden someter a prueba otros virus de control. Por ejemplo, la preparación o mezcla de virus de partida se puede analizar para determinar sus efectos citotóxicos. En otro ejemplo, se puede someter a prueba una cepa de virus de referencia, por ejemplo, una cepa recombinante atenuada conocida. Un ejemplo de tal cepa es GLV-1h68 o un derivado de la misma que contiene genes heterólogos insertados. En los ejemplos en los que el virus se añade como control, el rango de MOI de virus que se utiliza es el mismo que el producto aislado clonal del virus probado.

Se selecciona un virus que muestra un efecto citopático o citotóxico. Por ejemplo, se selecciona una cepa clonal de prueba que exhibe un efecto citopático si se determina que exhibe una reducción en la viabilidad celular con respecto a un pocillo no tratado que contiene solo células (100% de viables). En otros ejemplos, se selecciona una cepa clonal de prueba que exhibe un efecto citopático si se determina que exhibe una reducción de la viabilidad celular con respecto a la viabilidad de las células en un pocillo tratado con la mezcla viral parental. En un ejemplo adicional, se selecciona una cepa clonal de prueba que exhibe un efecto citopático si se determina que exhibe una reducción en la viabilidad celular con respecto a la viabilidad de las células en un pocillo tratado con una cepa de virus atenuada de referencia conocida, tal como un virus recombinante atenuado (p. ej., GLV-1h68 o derivado del mismo). En cualquiera de los ejemplos anteriores, se selecciona una cepa clonal de prueba que exhibe citotoxicidad si, a una MOI dada, la viabilidad celular es inferior a 100% de la viabilidad de las células de control (células no tratadas, mezcla de virus tratada o cepa de virus tratada de control), tal como o entre aproximadamente 0% y 99% de la viabilidad de las células tratadas de control.

Una reducción o disminución de la viabilidad celular significa que el producto aislado clonal sometido a prueba exhibe una mayor citotoxicidad en comparación con las células tratadas de control. La citotoxicidad se puede determinar como una razón de la viabilidad celular de las células tratadas de control en comparación con las células tratadas con la cepa clonal probada (porcentaje de células tratadas de control viables/porcentaje de células tratadas con cepa clonal probadas viables). Se selecciona una cepa de virus clonal que muestra una razón de citotoxicidad que es mayor que 1,0, por ejemplo, que es mayor que 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100. En ejemplos concretos, los resultados se presentan como la MOI en la que 50% de la capa celular es viable (DE_{50}). La citotoxicidad se puede determinar como una razón de DE_{50} de las células tratadas de control en comparación con las células tratadas con las cepas clonales probadas (DE_{50} de células tratadas de control/ DE_{50} de células tratadas con cepa clonal probadas). Se selecciona una cepa de virus clonal que muestra una proporción de citotoxicidad que es mayor que 1,0, por ejemplo, que es mayor que 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 o más. Se entiende que una razón de actividad que es 1,2 o 5 etcétera significa que el virus exhibe 120% o 500% etcétera de la citotoxicidad de referencia o de control.

c. Crecimiento tumoral

Para la selección como candidato para la terapia, se selecciona un virus que exhibe un parámetro indicativo de antitumorogenicidad si causa una reducción del tamaño del tumor y/o retrasa la progresión del tumor. Por lo tanto, se seleccionan cepas clonales que exhiben una disminución del crecimiento o tamaño del tumor. Se puede evaluar el tamaño del tumor *in vivo* en modelos humanos o animales portadores de tumores tratados con virus. La contracción del tumor o el tamaño del tumor se pueden evaluar mediante diversos ensayos conocidos en la técnica, por ejemplo, por peso, volumen o medición física.

Se pueden generar modelos animales portadores de tumores. Los tumores *in vivo* se pueden generar mediante cualquier método conocido, incluidos los tumores de xenoinjerto generados inoculando o implantando células tumorales (p. ej., mediante inyección subcutánea) en un roedor inmunodeficiente, modelos de tumores singénicos generados mediante la inoculación (p. ej., mediante inyección subcutánea) de una línea de células tumorales de ratón o rata en la cepa inmunocompetente de ratón o rata correspondiente, tumores metastásicos generados por metástasis de un tumor primario implantado en el modelo animal, tumores de aloinjerto generados por la implantación de células tumorales en la misma especie que el origen de las células tumorales y tumores espontáneos generados por manipulación genética del animal. Los modelos de tumores se pueden generar de forma ortotópica mediante la inyección de las células tumorales en el tejido u órgano de su origen, por ejemplo, implantación de células tumorales de mama en una almohadilla de grasa mamaria de ratón. Cualquiera de los modelos anteriores proporciona una herramienta consistente y reproducible para evaluar el crecimiento de células tumorales, así como para permitir un fácil acceso para evaluar la masa del tumor.

En ejemplos concretos, se utilizan modelos de xenoinjerto o modelos sintéticos. Por ejemplo, los tumores se pueden establecer mediante inyección subcutánea en la axila derecha con una suspensión celular (p. ej. 1×10^6 a 5×10^6 células/animal) de diferentes tipos de células tumorales en anfitriones inmunocompetentes (singénicos) o anfitriones inmunodeficientes (p. ej. ratones carentes de sistema inmunitario o SCID; xenoinjerto). Los modelos ilustrativos de xenoinjertos de tumores humanos en ratones, tales como ratones carentes de sistema inmunitario o SCID, incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de pulmón humano (células A549, ATCC Núm. CCL-185); tumor de mama humano (células GI-101A, Rathinavelu et al., Cancer Biochem. Biophys., 17:133-146 (1999)); carcinoma de ovario humano (células OVCAR-3, ATCC Núm. HTB-161); carcinoma pancreático humano (células PANC-1, ATCC Núm. CRL-1469 y células MIA PaCa-2, ATCC Núm. CRL-1420); células DU145 (células de cáncer de próstata humano, ATCC Núm. HTB-81); cáncer de próstata humano (células PC-3, ATCC Núm. CRL-1435); carcinoma de colon (células HT-29); melanoma humano (células 888-MEL, células 1858-MEL o células 1936-MEL; véase, p. ej. Wang et al., (2006) J. Invest. Dermatol. 126:1372-1377); y fibrosarcoma humano (células HT-1080, ATCC Núm. CCL-121) y mesotelioma humano (células MSTO-211H). Los modelos ilustrativos de xenoinjerto de tumor de rata en ratones incluyen, pero no se limitan a, tumor de glioma (células C6; ATCC Núm. CCL-107). Los ejemplos de modelos de homoinjerto de tumor de ratón incluyen, pero no se limitan a, melanoma de ratón (células B16-F10; ATCC Núm. CRL-6475). Los modelos ilustrativos de xenoinjerto de tumor de gato en ratones incluyen, pero no se limitan a, fibrosarcoma felino (células FC77.T; ATCC Núm. CRL-6105). Los ejemplos de modelos de xenoinjerto de tumor de perro en ratones incluyen, pero no se limitan a, osteosarcoma canino (células D17; ATCC Núm. CCL-183). Los ejemplos no limitantes de modelos de xenoinjerto humano y modelos de tumores singénicos se exponen en las Tablas 3 y 4 a continuación.

Tabla 3: Modelos de Xenoinjerto de Tumor Humano

Tipo de Tumor	Nombre de la Línea celular	Tipo de Tumor	Línea Celular
Carcinoma adenoide quístico	ACC-2	Leucemia	HL-60
Carcinoma de vejiga	EJ	Carcinoma hepático	Bel-7402
Carcinoma de vejiga	T24	Carcinoma hepático	HepG-2
Carcinoma de mama	BCaP-37	Carcinoma hepático	QGY-7701
Carcinoma de mama	MX-1	Carcinoma hepático	SMMC7721
Carcinoma cervical	Siha	Carcinoma pulmonar	A549
Carcinoma cervical	Hela	Carcinoma pulmonar	NCI-H460
Carcinoma de colon	Ls-174-T	Melanoma	A375
Carcinoma de colon	CL187	Melanoma	M14
Carcinoma de colon	HCT-116	Melanoma	MV3
Carcinoma de colon	SW116	Carcinoma de ovario	A2780
Carcinoma gástrico	MGC-803	Carcinoma pancreático	BXPC-3
Carcinoma gástrico	SGC-7901	Carcinoma de próstata	PC-3M
Carcinoma gástrico	BGC-823	Carcinoma de la lengua	Tca-8113
Carcinoma de riñón	Ketr-3		

Tabla 4: Modelo de Tumor de Ratón Singénico

Tipo de Tumor	Nombre de Línea Celular	Cepa de Ratones
Carcinoma cervical	U14	ICR
Carcinoma hepático	H22	ICR
Carcinoma pulmonar	Lewis	C57BL6
Melanoma	B16F1, B16F10, B16BL6	C57BL6
Sarcoma	S180	ICR

El tamaño y el volumen del tumor se pueden controlar basándose en mecanismos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el tamaño y el volumen del tumor se pueden controlar mediante radiografía, ecografía, necropsia, uso de calibradores, microCT o mediante ^{18}F -FDG-PET. El tamaño del tumor también se puede evaluar visualmente. En ejemplos concretos, el tamaño del tumor (diámetro) se mide directamente utilizando calibradores. En otros ejemplos, el volumen del tumor se puede medir utilizando un promedio de las mediciones del diámetro del

tumor (D) obtenido por calibraciones o evaluaciones de ultrasonido. El volumen se puede determinar a partir de la fórmula $V = D^3 \times \pi/6$ (para el diámetro medido utilizando calibradores) o $V = D^2 \times d \times \pi/6$ (para el diámetro medido mediante ultrasonido donde d es la profundidad o el espesor). Por ejemplo, se pueden realizar mediciones de calibre de la longitud del tumor (l) y el ancho (w) y el volumen del tumor se puede calcular como longitud x ancho² x 0,52. En otro ejemplo, las exploraciones microCT se pueden utilizar para medir el volumen del tumor (véase, por ejemplo Huang et al. (2009) PNAS, 106:3426-3430). En tal ejemplo, a los ratones se les puede inyectar medio de contraste al 74% mediante Ioversol inyectable de Optiray Pharmacy (p. ej. 741 mg de Ioversol/ml), los ratones son anestesiados y se realiza la tomografía computarizada con un escáner MicroCat 1A u otro escáner similar (p. ej. IMTek) (40 kV, 600 μ A, 196 etapas de rotación, ángulo total o rotación = 196). Las imágenes pueden ser reconstruidas utilizando soporte lógico (p. ej. Programa de soporte lógico RVA3; ImTek). Los volúmenes tumorales se pueden determinar utilizando el soporte lógico disponible (p. ej. soporte lógico Amira 3.1; Mercury Computer Systems).

Una vez que los tumores implantados alcanzan un tamaño o volumen predeterminado, los modelos se pueden utilizar para el tratamiento con virus. El volumen final exacto del tumor se puede determinar empíricamente y es una función del tipo concreto de tumor, así como el punto final del análisis. En general, los ratones se sacrifican si el volumen del tumor es superior a 3 cm³.

Los animales portadores de tumores están infectados con virus. La vía de administración para la infección puede ser intraperitoneal, tal como subcutánea, o puede ser intratumoral o intravenosa. El virus se puede administrar a dosis variables. Por ejemplo, el virus se puede administrar a animales portadores de tumores a aproximadamente 1×10^4 a 1×10^8 ufp, tal como 1×10^5 a 1×10^7 ufp, por ejemplo al menos o aproximadamente 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 o 5×10^6 ufp. Los tumores en progreso se visualizan y el tamaño del tumor y el volumen del tumor se pueden medir utilizando cualquier mecanismo conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el volumen del tumor o el tamaño del tumor se pueden medir utilizando cualquiera de las técnicas descritas en la presente memoria. El volumen y el tamaño del tumor se pueden evaluar o medir a intervalos periódicos durante un período de tiempo después de las infecciones por el virus, tal como, por ejemplo, cada hora, cada 6 horas, cada 12 horas, cada 24 horas, cada 36 horas, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, cada 6 días, cada 7 días, cada semana, cada 3 semanas, cada mes o más después de la infección. Se puede elaborar una gráfica del cambio de la mediana en el volumen del tumor a lo largo del tiempo y se puede calcular el área total bajo la curva (AUC). Esto se ilustra en el Ejemplo 4. También se puede calcular un índice terapéutico utilizando la fórmula $AUC_{\text{animales no tratados}} - AUC_{\text{animales tratados con virus}} / AUC_{\text{no tratados}} \times 100$.

En general, se utilizan como controles los animales portadores de tumores generados de la misma manera, al mismo tiempo y con el mismo tipo de células tumorales. Tales animales de control con tumores incluyen aquellos que permanecen sin tratar (no están infectados con el virus). Los controles adicionales incluyen animales infectados con la preparación o mezcla de virus parental o con una cepa de virus de referencia, tal como una cepa recombinante atenuada conocida. Un ejemplo de tal cepa es GLV-1h68 o un derivado de la misma que contiene genes heterólogos insertados. En los ejemplos en los que los animales portadores de tumores se infectan con la preparación o mezcla de virus parental u otra cepa de referencia como control, la cantidad de virus administrado (p. ej. ufp) es la misma que la cepa clonal del virus analizado.

Se selecciona un virus que media una disminución en el tamaño del tumor (p. ej. diámetro), volumen o peso en comparación con los animales portadores de tumores tratados o no tratados de control. Se entiende que una disminución en el tamaño, el volumen o el peso del tumor en comparación con los animales portadores de tumores tratados o no tratados de control significa que el virus mismo está mediando la regresión o la contracción del tumor o que el virus está mediando la progresión del tumor en comparación con los animales portadores de tumores tratados o no tratados de control. La reducción del tumor o el retraso en la progresión del tumor son parámetros indicativos de antitumorogenicidad.

Por ejemplo, se selecciona una cepa clonal probada como mediadora de una disminución en el tamaño o volumen del tumor en función de la evaluación visual del tamaño del tumor en el animal en comparación con los animales portadores de tumores tratados o no tratados de control. En otros ejemplos, se selecciona una cepa clonal probada como mediadora de una disminución en el tamaño o volumen del tumor si el tamaño del tumor disminuye con respecto a su diámetro según se evalúa mediante cualquier medición conocida en la técnica (p. ej. uso de calibradores) en comparación con un animal portador de tumor no tratado o con un animal portador de tumor tratado con la mezcla de virus parental o con otra cepa de virus de referencia (p. ej. virus recombinante atenuado). En un ejemplo adicional, se selecciona un producto aislado clonal probado que media una disminución en el tamaño o volumen del tumor si el volumen del tumor disminuye según se evalúa mediante cualquier mecanismo conocido por un experto en la técnica en comparación con un animal portador de tumor no tratado o en comparación con un animal portador de tumor tratado con la preparación o mezcla del virus parental o con otra cepa de virus de referencia (p. ej. virus recombinante atenuado). Se entiende que la comparación del tamaño o volumen del tumor se puede realizar en cualquier momento predeterminado posterior a la infección, y se puede determinar empíricamente por un experto en la técnica. En algunos ejemplos, se puede realizar una comparación el día en que se sacrifica el control no tratado. En otros ejemplos, se puede realizar un análisis del AUC total, y los valores del AUC se pueden comparar como un indicador del tamaño y volumen del tumor durante el período de tiempo de la infección.

Los efectos de un virus sobre el tamaño o volumen del tumor se pueden presentar como una proporción del tamaño o volumen del tumor en el momento designado posterior a la infección del animal tratado de control en comparación con el animal tratado con la cepa clonal sometido a prueba (tamaño o volumen del tumor de los animales de tratados de control / tamaño o volumen del tumor de los animales tratados con productos aislados clonales). Se selecciona un virus clonal que muestra una proporción de reducción del tumor que es mayor que 1,0, por ejemplo, que es mayor que 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o más. En ejemplos concretos, los resultados se presentan como una razón del área total de AUC durante el curso del tratamiento (AUC del tamaño o volumen del tumor de los animales tratados de control/AUC tamaño o volumen del tumor de los animales tratados con productos aislados clonales). Se selecciona un virus clonal que muestra una razón de reducción del tumor medida mediante el AUC que es mayor que 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o más. Se entiende que una razón de 1,2 o 5 etcétera significa que el virus produce una disminución del tamaño o volumen del tumor y muestra una actividad antitumoral de 120% o 500% y, por lo tanto, en comparación con la referencia o el control.

En ejemplos concretos, el índice terapéutico se determina como una medida de los efectos de un virus sobre el tamaño o volumen del tumor. Se selecciona un virus clonal que exhibe un índice terapéutico que es al menos o aproximadamente al menos o 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300 %, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% o más en comparación con el índice terapéutico de la preparación o mezcla de virus parental o una cepa de virus de referencia de control (p. ej., virus recombinante atenuado).

En ejemplos adicionales, los tumores se pueden extraer de los animales y pesar. Se puede seleccionar un virus que de como resultado una disminución del peso del tumor en comparación con el tumor recolectado de animales de control con tumores que no fueron infectados con el virus. El peso también se puede comparar con los tumores extraídos de animales tratados de control al mismo tiempo después de la infección. El cambio en el peso puede presentarse como una razón del peso del tumor (peso del tumor de animales tratados de control/pesos de tumores de animales tratados con productos aislados clonales). Se selecciona un virus clonal que muestra una razón del peso del tumor que es mayor que 1,0, por ejemplo, que es mayor que 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o más. Se entiende que una razón del peso del tumor que es 1,2 o 5 etcétera significa que el virus produce una disminución del peso del tumor y 120% o 500% etcétera en la actividad antitumoral en comparación con la referencia o el control.

En otros ejemplos, los tumores extraídos se pueden lisar. Por ejemplo, la lisis de los tumores se puede realizar congelando y descongelando varias veces el tumor extraído (p. ej., al menos 2 veces, 3 veces o 4 veces) poco después de la extracción del tumor del animal. Por ejemplo, el tumor se lisa mediante 3 ciclos de congelación y descongelación en el plazo de las 2 horas posteriores a la extracción. El virus en los productos lisados tumorales se puede mezclar como se describió anteriormente y se puede determinar la cantidad de virus en cada muestra tumoral. En algunos ejemplos, el título del virus se puede expresar como una dosis infecciosa de cultivo tisular normalizada al peso del tejido (DICT₅₀/ mg de tejido).

En ejemplos concretos, se puede evaluar el efecto del virus sobre otros órganos o tejidos en el animal. Por ejemplo, otros órganos pueden ser extraídos de los animales, pesados y/o lisados para la determinación del título viral.

4. Toxicidad/Seguridad

El virus aislado también se somete a prueba para determinar los parámetros indicativos de su propiedad de toxicidad/seguridad. Los virus pueden ser tóxicos para sus anfitriones al elaborar uno o más compuestos que empeoran la condición de salud del anfitrión. La toxicidad para el anfitrión se puede manifestar de varias maneras, incluyendo choque séptico, efectos neurológicos o musculares. Se seleccionan los virus proporcionados en la presente memoria que tienen una menor toxicidad para el anfitrión. La menor toxicidad de un virus de los presentes métodos y composiciones puede variar desde una toxicidad en la que el anfitrión no experimenta efectos tóxicos, hasta una toxicidad en la que el anfitrión no muere típicamente por los efectos tóxicos de los microbios.

Se pueden someter a prueba los parámetros indicativos de toxicidad o seguridad de un virus *in vitro* o *in vivo*. Típicamente, la evaluación es *in vivo*. Los métodos ilustrativos incluyen la administración del virus a un sujeto (p. ej., modelo animal) y la evaluación de una o más propiedades asociadas con la toxicidad, que incluyen, entre otras, la supervivencia del sujeto, la disminución del peso corporal, la existencia de efectos secundarios tales como fiebre, erupción u otra alergia, fatiga o dolor abdominal, inducción de una respuesta inmunológica en el sujeto, distribución tisular del virus, cantidad de antígenos tumorales que se liberan y disminución de la tasa de formación de pústulas. Por lo tanto, cualquiera de los parámetros anteriores se puede considerar como indicativo de toxicidad/seguridad de un virus. Se seleccionan los virus que presentan una toxicidad mínima.

Como se mencionó anteriormente, los sujetos (p. ej., animales tales como los modelos animales portadores de tumores) están infectados con virus. La vía de administración para la infección puede ser intraperitoneal, por ejemplo subcutánea, o puede ser intratumoral o intravenosa. El virus se puede administrar a dosis variables. Por ejemplo, el virus se puede administrar a animales portadores de tumores a aproximadamente 1×10^4 a 1×10^8 ufp, tal como $1 \times$

10⁵ a 1 x 10⁷ ufp, por ejemplo al menos o aproximadamente 1 x 10⁶, 2 x 10⁶, 3 x 10⁶, 4 x 10⁶ o 5 x 10⁶ ufp. Para los seres humanos, el virus se puede administrar a aproximadamente 1 x 10⁷ a 1 x 10¹⁴ ufp, tal como 1 x 10⁷ a 1 x 10¹⁰ ufp o 1 x 10⁹ a 1 x 10¹⁰ ufp, por ejemplo al menos o aproximadamente 1 x 10⁹, 2 x 10⁹, 3 x 10⁹, 4 x 10⁹, o 5 x 10⁹ ufp. Los parámetros indicativos de toxicidad, tales como la supervivencia y el peso del sujeto, pueden controlarse a lo largo del tiempo. Por ejemplo, la supervivencia y el peso pueden controlarse a intervalos periódicos durante un período de tiempo después de las infecciones por virus, tal como, por ejemplo, cada hora, cada 6 horas, cada 12 horas, cada 24 horas, cada 36 horas, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, cada 6 días, cada 7 días, cada semana, cada 3 semanas, cada mes o más después de la infección.

En general, los sujetos de control (p. ej., modelos animales, tales como los modelos animales que portan tumores) son controlados de manera similar. Tales sujetos de control incluyen aquellos que permanecen sin tratar (no infectados con virus). Los sujetos de control adicionales incluyen aquellos infectados con la preparación o mezcla de virus parental o con una cepa de virus de referencia, tal como una cepa recombinante atenuada conocida. Un ejemplo de tal cepa es GLV-1h68 o un derivado de la misma que contiene genes heterólogos insertados. En los ejemplos en los que los sujetos están infectados con la preparación o mezcla de virus parental u otra cepa de referencia como control, la cantidad de virus administrado (p. ej. ufp) es la misma que el producto aislado clonal del virus analizado.

En algunas realizaciones, los virus tienen una menor toxicidad de modo que un anfitrión típicamente no tiene un efecto significativo a largo plazo por la presencia de virus en el anfitrión, más allá de cualquier efecto sobre órganos o tejidos tumorales, metastásicos o necróticos. Por ejemplo, la menor toxicidad puede ser una fiebre mínima o una infección mínima, que dura menos de aproximadamente un mes, y después de la fiebre o la infección, el anfitrión no experimenta efectos adversos resultantes de la fiebre o la infección. En otro ejemplo, la menor toxicidad puede medirse como una disminución involuntaria del peso corporal de aproximadamente el 5% o menos para el anfitrión después de la administración de los microbios. En otros ejemplos, el virus no tiene toxicidad para el anfitrión.

Por ejemplo, un virus se selecciona en función de los efectos de la supervivencia de un sujeto en comparación con una cepa de control o de referencia. Se seleccionan virus que dan como resultado que los sujetos tengan una supervivencia similar en comparación con los sujetos tratados con la preparación o mezcla de virus parental u otra cepa de referencia (p. ej., cepa atenuada). En particular, se selecciona un virus que da como resultado que los sujetos tengan una mejor o mejor supervivencia en comparación con los sujetos tratados con la preparación o mezcla del virus parental u otra cepa de referencia (p. ej., cepa atenuada). En general, se seleccionan los virus que dan como resultado la supervivencia de 100% de los sujetos analizados durante el período de tiempo tratado. Por ejemplo, se seleccionan virus que dan como resultado la supervivencia de 100% de los sujetos en el período de tiempo en el que sobrevive 0% de los sujetos de control sin tratar.

En algunos ejemplos, se selecciona un virus en función de los efectos sobre el peso de un sujeto en comparación con un virus de control o de referencia. En general, la disminución o reducción del peso de un sujeto a lo largo del tratamiento se asocia con la toxicidad o patogenicidad del tratamiento. En algunos ejemplos, se seleccionan virus que afectan al peso de un sujeto de manera similar a los sujetos tratados con la preparación o mezcla de virus parental u otra cepa de referencia (p. ej., cepa recombinante). En otros ejemplos, se seleccionan virus que no dan como resultado una disminución del peso de un sujeto o una disminución menor del peso de un sujeto en comparación con los sujetos tratados con la preparación o mezcla de virus parental u otra cepa de referencia (p. ej., una cepa recombinante). En particular, se selecciona un virus clonal que, en el transcurso del tratamiento con el virus, da como resultado un aumento de peso del sujeto.

5. Análisis del genoma

Opcionalmente, el producto aislado clonal se puede purificar y analizar el genoma para evaluar la homogeneidad de la secuencia del producto aislado seleccionado. En general, se selecciona una cepa clonal que tiene una secuencia homogénea. Se pueden emplear varios métodos para confirmar la identidad y/o la homogeneidad del virus, tal como, por ejemplo, la secuenciación, el análisis de restricción, la PCR, la transferencia Southern o mediante la expresión de proteínas. Por ejemplo, los productos aislados clonales seleccionados pueden propagarse en células permisivas, células recolectadas y partículas virales recuperadas. El ADN viral genómico se puede extraer mediante diversos procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar proteinasa K seguido de la extracción con fenol-cloroformo para extraer ADN de viriones purificados (véase, Earl *et al.* en Ausubel *et al.*, (Eds) Current Protocols in Molecular Biology, vol. 3, páginas 16.17.1-16.19-7 (1998)). La secuenciación del ADN se puede completar mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, la secuenciación se puede realizar mediante un enfoque de perdigonada seguido de ensamblaje utilizando varios programas, por ejemplo, el soporte lógico de TIGR Assembler (Sutton *et al.* (1995) Genome Science & Tech., 1: 9-19) o el paquete de soporte lógico Staden en una plataforma Linux (Staden (1991) Nucleic Acids Res. 19:3907-3911; Bonfield *et al.* (1995) Nucleic Acids Res., 23:4992-4999) y utilizando varias estrategias de llenado de huecos (véase, por ejemplo, Flint *et al.* (1998) DNA Seq., 8:241-245.); mediante métodos de cebado aleatorio (véase, por ejemplo, Djikeng *et al.* (2008) BMC Genomics, 9:5); o mediante amplificación de genoma completo y técnicas de secuenciación directa (Mizutani *et al.* (2007) Emerging Infectious Diseases, 13: 322-324).

C. Cepas aisladas de virus clonales

En la presente memoria se proporcionan virus clonales aislados de la cepa LIVP del virus Vaccinia de acuerdo con las presentes reivindicaciones. Las cepas clonales se obtienen a partir de la cepa LIVP del virus vaccinia.

1. LIVP

LIVP es una cepa de vaccinia obtenida de Lister (Núm. de Catálogo ATCC VR-1549). El virus vaccinia tiene un genoma de ADN de doble hebra lineal de aproximadamente 180.000 pares de bases de longitud que se compone de una sola cadena de polinucleótidos continua (Baroudy et al. (1982) Cell, 28:315-324.). La estructura se debe a la presencia de repeticiones terminales invertidas (ITR) de 10.000 pares de bases. Las ITR están involucradas en la replicación del genoma. Se cree que la replicación del genoma implica autocebado, lo que lleva a la formación de concatámeros de alto peso molecular (aislados de células infectadas) que posteriormente se escinden y se reparan para crear genomas de virus. Véase, p. ej., Traktman, P., Capítulo 27, Poxvirus DNA Replication, pág. 775-798, en DNA Replication in Eukaryotic Cells, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996). El genoma codifica aproximadamente 250 genes. En general, el genoma no segmentado, infeccioso se organiza de tal manera que los genes ubicados en el centro son esenciales para la replicación del virus (y, por lo tanto, se conservan), mientras que los genes próximos a los dos extremos afectan a funciones más periféricas, tales como el rango del anfitrión y la virulencia. Los virus vaccinia practican la expresión génica diferencial utilizando marcos de lectura abiertos (ORF) dispuestos en conjuntos que, como principio general, no se solapan.

Como se describe en otra parte de la presente memoria, la cepa LIVP se puede obtener del Instituto Lister de Preparaciones Virales, Moscú, Rusia; Microorganism Collection of FSRI SRC VB Vector; o se puede obtener en el Instituto de Virología Ivanovsky de Moscú (C0355 K0602). Se ha informado de que la cepa LIVP parental tiene secuencia heterogénea (véase p. ej. Zhang et al. (2009) Mol. Genet. Genomics, 282:417-435). Una secuencia de un genoma parental de LIVP se expone en SEQ ID NO: 10.

En la presente memoria se proporcionan cepas clonales LIVP que exhiben propiedades mejoradas sobre los virus LIVP recombinantes existentes en ausencia de ADN heterólogo insertado. Se han generado virus LIVP recombinantes. Por ejemplo, GLV-1h68 (también denominado RVGL21, SEQ ID NO: 9; descrito en la Pub. de Patente de Estados Unidos Núm. 2005-0031643, ahora Patentes de Estados Unidos Núm. 7.588.767, 7.588.771, 7.662.398) es un virus atenuado que contiene inserciones de ADN en loci de genes que son casetes de expresión que codifican proteínas marcadoras detectables en el locus del gen *F14.5L* (también denominado en LIVP *F3*), el locus del gen de la timidina quinasa (*TK*), y el locus del gen de la hemaglutinina (*HA*). Específicamente, GLV-1h68 contiene un casete de expresión que contiene una Molécula de ADNc *Ruc-GFP* (una fusión de ADN que codifica luciferasa de *Renilla* y ADN que codifica GFP) bajo el control de un promotor temprano/tardío sintético de vaccinia $P_{SEL} ((P_{SEL})Ruc-GFP)$ insertado en el locus del gen *F14.5L*; un casete de expresión que contiene una molécula de ADN que codifica beta-galactosidasa bajo el control del promotor temprano/tardío de vaccinia $P_{7.5k} ((P_{7.5k})LacZ)$ y ADN que codifica un receptor de transferrina de rata colocado en la orientación inversa para la transcripción con respecto al promotor temprano/tardío sintético de vaccinia $P_{SEL} ((P_{SEL})rTrfR)$ insertado en el locus del gen *TK* (el virus resultante no expresa la proteína del receptor de transferrina ya que la molécula de ADN que codifica la proteína se coloca en la orientación inversa para la transcripción con respecto al promotor en el casete); y un casete de expresión que contiene una molécula de ADN que codifica β -glucuronidasa bajo el control del promotor tardío de vaccinia $P_{11k} ((P_{11k})gusA)$ insertado en el locus del gen *HA*. Otros virus LIVP recombinantes se obtienen de GLV-1h68 y contienen ADN heterólogo que codifica un producto o productos génicos (véanse, p. ej., las Publicaciones de Estados Unidos Núm. US2003-0059400, US2003-0228261, US2009-0117034, US2009-0098529, US2009-0053244, US2009-0081639 y US2009-0136917; las Patentes de Estados Unidos Núm. 7.588.767 y 7.763.420; y la Publicación Internacional. Núm. WO 2009/139921). Un ejemplo de tal virus recombinante es GLV-1h64 (expuesto en SEQ ID NO: 326).

2. Cepas Clonales LIVP

Las cepas clonales proporcionadas en la presente memoria se obtienen de LIVP y tienen un genoma que difiere de la secuencia parental expuesta en SEQ ID NO: 10. Las cepas clonales proporcionadas en la presente memoria muestran una mayor antitumorigenicidad y/o una menor toxicidad en comparación con la cepa de virus recombinante o modificada denominada GLV-1h68 (que tiene un genoma expuesto en SEQ ID NO: 9). En particular, las cepas clonales proporcionadas en la presente memoria están presentes en una preparación de virus propagada a partir de LIVP. Por lo tanto, las cepas clonales no contienen ácido nucleico heterólogo no viral que contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína heteróloga no viral.

Las cepas clonales proporcionadas en la presente memoria tienen una secuencia de nucleótidos que tienen al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10. Por ejemplo, las cepas clonales tienen una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, pero son menos de 100% idénticas a SEQ ID NO: 10. Tales virus clonales LIVP proporcionados en la presente memoria incluyen virus que difieren en uno o más marcos de lectura abiertos

(ORF) en comparación con la cepa LIVP parental que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10. Por ejemplo, los virus clonales LIVP proporcionados en la presente memoria incluyen virus que difieren en uno o más ORF en comparación con la cepa LIVP parental que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10. Las cepas de virus clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria pueden contener una delección o mutación de nucleótidos en uno o más nucleótidos en cualquier ORF en comparación con SEQ ID NO: 10, o pueden contener una adición o inserción de ADN viral en comparación con SEQ ID NO: 10. Por ejemplo, las cepas de virus clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria pueden contener una delección, mutación o adición (es decir, inserción) de nucleótidos de uno o más nucleótidos en ORF designados gl001/290, gl009/283, gl010/282, gl011/280, gl015, gl032, gl034, gl035, gl037, gl069, gl077, gl079, gl082, gl084, gl088, gl093, gl225, gl239, gl241, gl247, gl257, gl264, gl270, gl273, gl24/105, gl280/011, gl22/011 gl283/009 en comparación con SEQ ID NO: 10. En un ejemplo, se proporcionan cepas de virus clonales LIVP que tienen un ORF que codifica una proteína truncada. En otros ejemplos, se proporcionan en la presente memoria cepas de virus clonales LIVP que contienen inserciones, delecciones o mutaciones en la región promotora de un ORF. En ejemplos concretos, la inserción, supresión o mutación de uno o más nucleótidos en el ORF da como resultado la producción de una proteína no funcional (p. ej., no activa) o elimina la producción de la proteína por el virus.

Las cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria no incluyen cepas de virus modificadas o recombinantes que se modifican para incluir ácido nucleico heterólogo que contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína heteróloga. Por ejemplo, una cepa clonal LIVP proporcionada en la presente memoria no incluye una secuencia de nucleótidos contenida en el virus recombinante designado GLV-1h68 (expuesto en SEQ ID NO: 9) u otras cepas de virus recombinantes derivadas del mismo, tales como el virus designado GLV 164 (expuesto en SEQ ID NO: 326) o un virus designado GLV-li69 (expuesto en SEQ ID NO: 3). En un ejemplo, las cepas clonales proporcionadas en la presente memoria muestran una antitumorigenicidad potenciada o mejor en comparación con la cepa LIVP obtenida del Instituto Lister de Preparaciones Virales, Moscú, Rusia, la cepa LIVP que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10 y/o la cepa LIVP recombinante designada GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9. En ejemplos concretos, las cepas clonales proporcionadas en la presente memoria muestran una antitumorigenicidad similar o una tumorigenicidad menor (es decir antitumorigenicidad potenciada o mejor) en comparación con la cepa GLV-1h68 de LIVP recombinante que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9. Por ejemplo, las cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria exhiben una actividad antitumorigénica potenciada o mejor en comparación con la cepa LIVP obtenida del Instituto Lister de Preparaciones Virales, Moscú, Rusia, la cepa LIVP que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10 y/o la cepa LIVP recombinante designada GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9, tal como en o entre 120% y 1000%, por ejemplo, al menos 120%, 130%, 140%, 150 %, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 1000% o más de la actividad antitumorigénica. La antitumorigenicidad se puede determinar utilizando cualquiera de las pruebas *in vitro* o *in vivo* para los parámetros indicativos de antitumorigenicidad como se ha descrito anteriormente en la Sección B. Por ejemplo, en comparación con la cepa LIVP obtenida del Instituto Lister de Preparaciones Virales, Moscú, Rusia, la cepa LIVP que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10 y/o la cepa LIVP recombinante designada GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9, las cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria muestran una mayor citotoxicidad de las células tumorales en ensayos o modelos *in vitro* o *in vivo*; disminución del crecimiento del tumor o el aumento de la reducción del tumor en ensayos o modelos *in vitro* o *in vivo*; disminución del volumen del tumor, tamaño o peso en ensayos o modelos *in vitro* o *in vivo*; Incremento de la replicación o acumulación en células tumorales en ensayos o modelos *in vitro* o *in vivo*; y aumento de la expresión de genes virales, proteínas tumorales y/o genes constitutivos relacionados con la replicación y/o infectividad viral en células tumorales en ensayos o modelos *in vitro* o *in vivo*.

En otro ejemplo, las cepas clonales proporcionadas en la presente memoria son menos tóxicas (es decir, menos virulentas) en comparación con la cepa LIVP obtenida del Instituto Lister de Preparaciones Virales, Moscú, Rusia, la cepa LIVP que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10 y/o la cepa LIVP recombinante designada GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9. En otros ejemplos, las cepas clonales proporcionadas en la presente memoria muestran una toxicidad similar o menos toxicidad en comparación con la cepa LIVP recombinante GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9. Los parámetros indicativos de toxicidad o virulencia incluyen, pero no se limitan a, reducción o disminución de la tasa de supervivencia del sujeto, disminución del peso corporal, existencia de efectos secundarios tales como fiebre, erupción u otra alergia, fatiga o dolor abdominal, inducción de una respuesta inmunológica en el sujeto, distribución tisular del virus, cantidad de antígenos tumorales que se liberan y disminución de la tasa de formación de pústulas. La toxicidad o virulencia se pueden determinar utilizando cualquiera de las pruebas *in vitro* o *in vivo* descritas anteriormente en la Sección B. Las cepas clonales LIVP que se proporcionan en la presente memoria exhiben entre 0% y 99%, por ejemplo, menos de 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o menos de la toxicidad de la cepa LIVP obtenida del Instituto Lister de Preparaciones Virales, Moscú, Rusia, la cepa LIVP que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10 y/o la cepa LIVP recombinante designada GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9. En otros ejemplos, las cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria exhiben o exhiben entre 70% y 120%, por ejemplo, al menos o aproximadamente o 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 110%, 115% o 120%. de la toxicidad o actividad antitumorigénica en comparación con la cepa LIVP GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos

expuesta en SEQ ID NO: 9 en un ensayo o método para evaluar un parámetro indicativo de toxicidad.

En ejemplos concretos, las cepas clonales proporcionadas en la presente memoria son menos tóxicas (es decir, menos virulentas) y exhiben una antitumorigenicidad potenciada en comparación con la cepa LIVP obtenida del Instituto Lister de Preparaciones Virales, Moscú, Rusia, la cepa LIVP que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10 y/o la cepa LIVP recombinante designada GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9. Por ejemplo, las cepas clonales proporcionadas en la presente memoria son menos tóxicas y exhiben una antitumorigenicidad potenciada o mayor en comparación con la cepa LIVP recombinante designada GLV-1h68 (SEQ ID NO: 9).

Por ejemplo, las cepas clonales son menos tóxicas (es decir, menos virulentas) cuando se administran a un sujeto en una cantidad eficaz para inducir la actividad antitumorigénica. Tales cantidades pueden ser determinadas empíricamente por un experto en la técnica y dependen de una variedad de factores tales como el sujeto en particular, la enfermedad o afección que se vayan a tratar, el tipo de tumor o cáncer, la etapa o progresión de la enfermedad y otros factores similares. Para el tratamiento de un ratón u otro sujeto de tamaño similar, las cantidades terapéuticas ilustrativas de una cepa clonal están en el intervalo de aproximadamente 1×10^4 a 1×10^9 ufp, tal como 1×10^5 a 1×10^7 ufp, por ejemplo al menos o aproximadamente 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 o 5×10^6 ufp. Para el tratamiento de un sujeto humano u otro sujeto de tamaño similar, las cantidades terapéuticas ilustrativas de una cepa clonal están en el intervalo de aproximadamente 1×10^7 a 1×10^{14} ufp, 1×10^7 a 1×10^{10} ufp, tal como 1×10^9 a 1×10^{10} ufp, por ejemplo al menos o aproximadamente 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , o 5×10^9 ufp. Los regímenes de dosificación pueden variar como se describe en otra parte de la presente memoria. En particular, las cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria a lo largo del curso de un régimen de tratamiento, muestran una supervivencia de 100% de los sujetos y no están asociadas con la disminución o reducción del peso de un sujeto durante el curso del tratamiento. En un ejemplo, las cepas clonales proporcionadas en la presente memoria, cuando se administran a un sujeto, exhiben una tasa de supervivencia que se incrementa en comparación con la tasa de supervivencia de los sujetos administrados con la misma o similar cantidad terapéutica que una cepa LIVP obtenida del Instituto Lister de Preparaciones Virales, Moscú, Rusia, la cepa LIVP que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10 y/o la cepa recombinante LIVP designada GLV-1h68 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9.

Los virus clonales LIVP aislados proporcionados en la presente memoria pueden obtener del aislamiento de la placa de LIVP que se propaga a través de las pases repetidos en líneas celulares. Por ejemplo, los productos aislados clonales LIVP pueden obtenerse mediante pase de virus en cultivos de huevos de gallina embrionados, en fibroblastos de embrión de pollo (CEF), células HeLa S3, células CV-1 o células BHK-21. Los productos aislados clonales LIVP proporcionados en la presente memoria tienen secuencia homogénea. Los virus clonales LIVP ilustrativos son productos aislados clonales seleccionados en el método de la presente memoria que muestran propiedades antitumorigénicas y menor toxicidad.

Cepas Clonales LIVP

Las cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria incluyen aquellas que tienen una secuencia de nucleótidos correspondiente a los nucleótidos 10.073-180.095 de SEQ ID NO: 1, los nucleótidos 11.243 a 182.721 de SEQ ID NO: 2, los nucleótidos 6.264 a 181.390 de SEQ ID NO: 4, los nucleótidos 7.044 a 181.820 de SEQ ID NO: 5, los nucleótidos 6.674 - 181.409 de SEQ ID NO: 6, los nucleótidos 6.716 - 181.367 de SEQ ID NO: 7 o los nucleótidos 6.899 - 181.870 de SEQ ID NO: 8. Las cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria también incluyen generalmente nucleótidos terminales correspondientes a una repetición terminal invertida (ITR) izquierda y/o derecha. Las cepas clonales LIVP ilustrativas proporcionadas en la presente memoria incluyen aquellas que tienen una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 7 u 8, o un complemento de la misma, o que muestran una toxicidad y antitumorigenicidad similares con respecto a una cepa clonal que tiene una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 7 u 8.

Las cepas clonales LIVP proporcionadas en la presente memoria también incluyen variantes de cualquiera de estos virus, que tienen secuencias que son similares, pero no idénticas, a las de un virus que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 7 u 8. En particular, los virus variantes comprenden secuencias de nucleótidos que son al menos 99% idénticas a las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 7 o 8. Por ejemplo, los virus variantes pueden incluir secuencias de nucleótidos que son, por ejemplo, al menos 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,99%, 99,995% o 99,999 % o más idénticas a las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 7 u 8. Las cepas clonales variantes presentan una toxicidad y antitumorigenicidad similares a las de una cepa clonal que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NOS: 1, 2, 4, 5, 6, 7 u 8.

Las cepas clonales ilustrativas de LIVP proporcionadas en la presente memoria son LIVP 1.1.1, LIVP 2.1.1, LIVP 4.1.1, LIVP 5.1.1, LIVP 6.1.1, LIVP 7.1.1 o LIVP 8.1.1 o cepas clonales que exhiben una toxicidad y antitumorigenicidad similares como cualquiera de las cepas clonales LIVP 1.1.1, LIVP 2.1.1, LIVP 4.1.1, LIVP 5.1.1, LIVP 6.1.1, LIVP 7.1.1 o LIVP 8.1.1. Las cepas clonales o preparaciones de las mismas se pueden aislar de células

cultivadas en las cuales LIVP parental, LIVP 1.1.1, LIVP 2.1.1, LIVP 4.1.1, LIVP 5.1.1, LIVP 6.1.1, LIVP 7.1.1 o LIVP 8.1.1, o una variante de las mismas, ha sido cultivada. Por ejemplo, las cepas clonales o sus preparaciones pueden obtenerse aislando clones de LIVP de cultivos celulares en los cuales LIVP parental, LIVP 1.1.1, LIVP 2.1.1, LIVP 4.1.1, LIVP 5.1.1, LIVP 6.1.1, LIVP 7.1.1 o LIVP 8.1.1, o una variante de las mismas, ha sido propagada. En algunos ejemplos, las cepas clonales se aíslan de una mezcla de virus mediante el método descrito anteriormente en la presente memoria para identificar las cepas clonales que muestran un antitumorigenicidad potenciada y una toxicidad mínima en comparación con una preparación o mezcla de virus parental u otra cepa de referencia. Las cepas de virus LIVP clonales aisladas ilustrativas proporcionadas en la presente memoria incluyen una cepa de virus LIVP clonal aislada seleccionada de la mezcla de LIVP producida por la adaptación de la cepa de Lister sobre la piel de ternera (LIVP producida por el Instituto Lister de preparaciones virales, Moscú, Rusia).

D. Modificación de las cepas LIVP

En la presente memoria se proporcionan cepas de virus LIVP modificadas cuya secuencia genómica se modifica. El genoma viral ADN_h lineal del virus vaccinia tiene un tamaño de aproximadamente 200 kb, codificando un total de aproximadamente 250 genes. El genoma del virus vaccinia tiene una gran capacidad de carga para genes foráneos, donde se pueden insertar hasta 25 kb de fragmentos de ADN exógenos (aproximadamente 12% del tamaño del genoma de vaccinia). Los genomas de varias de las cepas de vaccinia se han secuenciado completamente, y se han identificado muchos genes esenciales y no esenciales. Debido a la alta homología de secuencia entre diferentes cepas, la información genómica de una cepa de vaccinia se puede utilizar para diseñar y generar virus modificados en otras cepas. Finalmente, las técnicas para la producción de cepas de vaccinia modificadas por ingeniería genética están bien establecidas (Moss, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 86-90 (1993); Broder y Earl, *Mol. Biotechnol.* 13: 223-245 (1999); Timiryasova et al., *Biotechniques* 31: 534-540 (2001)).

Por ejemplo, en la presente memoria se incluye un virus LIVP, una secuencia genómica del cual se modifica en comparación con la secuencia genómica expuesta en SEQ ID NO: 1 (LIVP 1.1.1), SEQ ID NO: 2 (LIVP 2.1.1), SEQ ID NO: 4 (LIVP 4.1.1), SEQ ID NO: 5 (LIVP 5.1.1), SEQ ID NO: 6 (LIVP 6.1.1), SEQ ID NO: 7 (LIVP 7.1.1), SEQ ID NO: 8 (LIVP 8.1.1) o SEQ ID NO: 9 (GLV1h68). Las modificaciones pueden incluir cualquier cambio en el genoma del virus, tal como la mutación, inserción, delección o sustitución (reemplazo) del ácido nucleico u otra modificación de la secuencia genómica del virus. Por ejemplo, los virus proporcionados en la presente memoria se pueden modificar para que contengan una o más moléculas de ácido nucleico heterólogo insertadas o reemplazadas en el genoma del virus. En un ejemplo, las modificaciones pueden incluir la inserción o reemplazo de uno o más nucleótidos, como al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o más nucleótidos.

Una molécula de ácido nucleico heterólogo puede contener un marco de lectura abierto o puede ser una secuencia no codificante. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo reemplaza todo o una porción de un gen viral. El gen viral puede reemplazarse por un gen homólogo de otro virus o un gen diferente. En otros ejemplos, los virus proporcionados en la presente memoria se pueden modificar mediante la inserción de una o más moléculas de ácido nucleico heterólogo. Por ejemplo, se pueden insertar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más moléculas de ácido nucleico heterólogo. En general, el ácido nucleico heterólogo que se inserta es una secuencia contigua de nucleótidos que contiene un marco de lectura abierto y corresponde a una región codificante de un gen. Por ejemplo, se puede insertar una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un gen heterólogo. En general, el gen heterólogo es un gen que codifica una proteína no viral. Los genes insertados o reemplazados se pueden transcribir y/o traducir del genoma viral después de la infección de una célula anfitriona, tal como una célula tumoral. Como se describe a continuación, el ácido nucleico heterólogo puede contener una secuencia reguladora para controlar la expresión del gen. Por ejemplo, el ácido nucleico heterólogo puede conectarse operativamente a un promotor para la expresión de un marco de lectura abierto.

Las modificaciones de los virus proporcionados en la presente memoria pueden dar como resultado una modificación de las características o propiedades del virus, incluidas aquellas asociadas con parámetros indicativos de toxicidad o antitumorigenicidad. Las inserciones, mutaciones o delecciones ilustrativas son aquellas que dan como resultado un virus vaccinia atenuado con respecto a la cepa clonal que no contiene la modificación. Por ejemplo, las inserciones, mutaciones o delecciones pueden disminuir la patogenicidad de la cepa clonal, por ejemplo, reduciendo la toxicidad, reduciendo la capacidad de infección, reduciendo la capacidad de replicación o reduciendo el número de órganos o tejidos no tumorales en los que el virus vaccinia se puede acumular. Otras inserciones, mutaciones o delecciones ilustrativas incluyen, entre otras, aquellas que aumentan la antigenicidad del virus, las que permiten la detección o la generación de imágenes, las que alteran la atenuación del virus y las que alteran la infectividad. Se pueden realizar modificaciones, por ejemplo, en genes que están implicados en el metabolismo de nucleótidos, las interacciones con el anfitrión y la formación de virus.

Por ejemplo, las cepas clonales modificadas proporcionadas en la presente memoria pueden exhibir una toxicidad o patogenicidad reducida en comparación con la cepa clonal que no contiene la modificación. En otro ejemplo, las cepas clonales modificadas proporcionadas en la presente memoria pueden exhibir una antitumorigenicidad potenciada en comparación con la cepa clonal que no contiene la modificación. Por ejemplo, las cepas clonales

modificadas pueden mostrar una capacidad mejorada para acumularse preferentemente en el tumor, la capacidad de lisar células o causar la muerte celular, la capacidad de provocar una respuesta inmunológica contra las células de los tumores, la inmunogenicidad y la capacidad de replicación. En otros ejemplos, las cepas clonales modificadas exhiben una menor toxicidad y una mayor antitumorogenicidad.

5 En otros ejemplos, se pueden realizar modificaciones mediante la inserción de moléculas de ácido nucleico heterólogo que codifican un gen para la expresión de una proteína y/o la expresión de una molécula de ARN. Las una o más moléculas de ácido nucleico heterólogo pueden codificar, por ejemplo, un producto génico terapéutico; un producto génico detectable o un producto génico capaz de inducir una señal detectable, tal como un producto génico que puede utilizarse para diagnóstico, seguimiento u generación de imágenes; un antígeno (p. ej., un superantígeno), tal como un antígeno para terapia tumoral. Cualquiera de los genes heterólogos expresados por un virus proporcionado en la presente memoria se puede preparar con el fin de recoger el producto génico expresado.

1. Ácido nucleico heterólogo

15 El gran tamaño del genoma de los poxvirus, tales como los virus proporcionados en la presente memoria, permite que se incorporen al genoma grandes insertos de ADN heterólogo y/o múltiples insertos de ADN heterólogo (Smith y Moss (1983) *Gene* 25(1):21-28). Los virus proporcionados en la presente memoria, por ejemplo, cualquier cepa clonal proporcionada en la presente memoria, se pueden modificar mediante la inserción de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 20 10 o más moléculas de ADN heterólogas. En general, una o más moléculas de ADN heterólogas se insertan en una región no esencial del genoma del virus. Por ejemplo, una o más moléculas de ADN heterólogas se insertan en un lugar del genoma del virus que no es esencial para la replicación en células en proliferación, tales como las células tumorales. Los sitios de inserción ilustrativos se proporcionan a continuación en la presente memoria y son conocidos en la técnica.

25 En algunos ejemplos, el virus se puede modificar para expresar un gen exógeno o heterólogo. Los productos génicos exógenos ilustrativos incluyen proteínas y moléculas de ARN. Los virus modificados pueden expresar un producto génico terapéutico, un producto génico detectable, un producto génico para elaboración o recolección, un producto génico antigénico para la recolección de anticuerpos o un producto génico viral. Las características de tales productos génicos se describen en la presente memoria y en otros lugares.

30 En algunos ejemplos, los virus se pueden modificar para expresar dos o más productos génicos, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más productos génicos, donde cualquier combinación de los dos o más productos génicos pueden ser uno o más productos génicos detectables, productos génicos terapéuticos, productos génicos para elaboración o recolección o productos génicos antigénicos para recolección de anticuerpos o un producto génico viral. En un ejemplo, un virus se puede modificar para expresar un producto génico anticanceroso. En otro ejemplo, un virus se puede modificar para expresar dos o más productos génicos para la detección o dos o más productos génicos terapéuticos. En algunos ejemplos, una o más proteínas implicadas en la biosíntesis de un sustrato de luciferasa se pueden expresar junto con luciferasa. Cuando se introducen dos o más genes exógenos, los genes se pueden regular bajo la misma o diferentes secuencias reguladoras, y los genes se pueden insertar en las mismas o diferentes regiones del genoma viral, en una sola o una pluralidad de etapas de manipulación genética. En algunos ejemplos, un gen, tal como un gen que codifica un producto génico detectable, puede estar bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que un segundo gen, tal como un gen que codifica un producto génico terapéutico, puede estar bajo el control de un promotor inducible. Los métodos para insertar dos o más genes en un virus son conocidos en la técnica y se pueden realizar fácilmente para una amplia variedad de virus utilizando una amplia variedad de genes exógenos, secuencias reguladoras y/u otras secuencias de ácido nucleico.

35 En particular, los virus proporcionados en la presente memoria se pueden modificar para expresar genes *in vivo* y *in vitro*. En algunos ejemplos, los virus pueden expresar genes heterólogos que se secretan de la célula anfitriona. En algunos ejemplos, los virus pueden expresar genes heterólogos que se liberan de la célula anfitriona tras la muerte celular, la lisis o el escape de la membrana celular durante la infección. En algunos ejemplos, los virus pueden expresar genes heterólogos a niveles lo suficientemente altos como para permitir la obtención de productos del gen heterólogo del tumor u otra muestra biológica del paciente, tal como la muestra de sangre o de linfa. En algunos ejemplos, el virus puede expresar un antígeno tumoral para la inducción de una respuesta inmunológica en un sujeto. En tales ejemplos, pueden recogerse anticuerpos contra el antígeno.

40 Por ejemplo, los genes ilustrativos incluyen una lista de genes que incluye la lista de genes humanos y trastornos genéticos creados y editados por el Dr. Victor A. McKusick y sus colegas en la Universidad Johns Hopkins y en otros lugares, y desarrollados para la World Wide Web por NCBI, el Centro Nacional de Información Biotecnológica; en línea, Herencia Mendeliana en el Hombre, Centro OMIM™ de Genética Médica, Johns Hopkins University (Baltimore, Md.) y el Centro Nacional de Información Biotecnológica, Biblioteca Nacional de Medicina (Bethesda, Md.), 1999; y aquellos disponibles en bases de datos públicas, como PubMed y GenBank (véanse, p. ej., (ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM)). Estos genes incluyen, pero no se limitan a: 239f2h9, 3pk, 4ebp1, 4ebp2, al1, al2m1, al2m2, al2m3, al2m4, al5, alb, albg, alst, a2m, a2mr, a2mrap, aa, aaa, aaa, aabt, aac1, aac2, aact, aadac, aanat, aars, aas, aat, aavs1, abc1, abc2, abc3, abc7, abc8, abcr, abi1, abl1, abl2, abl1, abo, abp, abp1,

abpa, abpx, abr, acaa, acac, acaca, acacb, acad1, acadm, acads, acadsb, acadv1, acat, acat1, acat2, acc, accb, accn1, accn2, accpn, ace1, ach, ache, achm1, achm2, achrb, achrd, achrg, acis, acly, aco1, aco2, acox, acox1, acox2, acox3, acp1, acp2, acp5, acpp, acr, acrv1, acs3, acs3, acs4, act2, act35, acta1, acta2, acta3, actb, actc, actg1, actg2, act11, actn1, actn2, actn3, actsa, acug, acvr1, acvr2b, acvrl1, acvrlk1, acvrlk2, acvrlk3, acy1, ad1, ad2, ad3, ad4, ad5, ada, adam10, adam11, adam12, adam3, adam3a, adam3b, adam8, adar, adarb1, adarb2, adcp1, adcp2, adcy1, adcy2, adcy3, adcy3, adcy4, adcy5, adcy6, adcy7, adcy8, adcy9, adcyap1, adcyapl1, add1, add2, add3, add1, adfn, adh1, adh2, adh3, adh4, adh5, adh7, adhps, adhc1@, adhr, adhr, adk, ad1, adm, admix, adora1, adora2a, adora2b, adora21, adora21, adora3, adprt, adrala, adralb, adralc, adrald, adra2a, adra2b, adra2c, adra211, adra212, adra2r, adrb1, adrb1r, adrb2, adrb2r1, adrb3, adrbk1, adrbk2, ads1, adss, adtb1, adx, adxr, ae1, ae2, ae3, aegl1, aemk, aes, af10, af17, af4, af6, af8t, af9, afd1, afdn, afg3, afg311, afm, afp, afx1, aga, agc1, ager, ag1, agmx1, agmx2, agp1, agp7, agps, agrn, agrp, agrt, ags, agt, agti1, agr1, agr1a, agr2, agr11, agxt, ahc, ahcy, ahd, ahds, ahnak, aho2, ahr, ahsg, ahx, aib1, aic, aic1, aied, aih1, aih2, aih3, aim1, air, airc, aire, ak1, ak2, ak3, akap149, ak1, akt2, aku, alad, alas1, alas2, alb, alb2, alba, alcam, aid, ald1, ald10, ald12, ald3, ald4, ald5, ald6, ald9, ald11, aldoa, aldob, aldod, aldr1, aids, alk, alk1, alk2, alk3, alk6, alms1, alox12, alox15, alox5, alp, alpi, alp1, alpp, alpp12, alr, alr, als1, als2, als4, als5, alss, ambn, ambp, amcd1, amcd2b, amcn, amcn1, amcx1, amd1, amdmd, amelx, amely, amfr, amg, amg1, amgx, amh, amhr, amhr2, aml1, aml1t1, aml2, aml3, amog, amp1, amp2, amp3, amph, amph1, ampk, amt, amy1a, amy1b, amy1c, amy2a, amy2b, an2, anc, ancr, ang, ang1, anh1, ank1, ank2, ank3, anop1, anova, anp, anpep, anpra, anprb, anprc, ans, ant1, ant2, ant3, ant3y, anx1, anx11, anx13, anx2, anx214, anx3, anx4, anx5, anx6, anx7, anx8, aoah, aoc2, aox1, ap2tf, apah1, apba1, apba2, apbb1, apbb2, apc, apcs, ape, apeced, apeh, apex, api1, api2, api3, apj, aplp, aplp1, aplp2, apnh, apo31, apoa1, apoa2, apoa4, apob, apobec1, apoc1, apoc2, apoc3, apoc4, apod, apoe, apoer2, apoh, apolmt, apolpl@, apolp2@, app, appbp1, appl1, aprf, aprt, aps, apt1, aptl1g1, apx1, apy, aqdq, aqp0, aqp1, aqp2, aqp21, aqp3, aqp4, aqp5, aqp6, aqp7, ar, ar1, ara, araf1, araf2, arcn1, ard1, ard1, areg, arf1, arf2, arf3, arf41, arf5, arg, arg1, args, arh12, arh6, arh9, arha, arhb, arhc, arhg, arhgap2, arhgap3, arhgap6, arhgdia, arhgdib, arhh, arix, ar12, armd1, arnt, arnt1, aro, arp, arp1, arpkd, arr3, arrb1, arrb2, arsa, arsacs, arsb, arsc1, arsc2, arsd, arse, arsf, art, art1, art3, art4, arts, arvd1, arvd2, arvd3, arvd4, as, asat, asb, ascl1, ascl2, asclt1, asd1, asd2, asgr1, asgr2, ash1, asip, as1, asln, asm1, asma, asmd, asmt, asmtlx, asmtly, asnrs, asns, aspa, ass, astm1, astn, asv, at, at1, at2r1, at3, ata, atbf1, atcay, atf1, ath1, aths, atm, atoh1, atox1, atp1a1, atp1a2, atp1a3, atp1a11, atp1b1, atp1b2, atp1b3, atp1b11, atp1g1, atp2a1, atp2a2, atp2a3, atp2b, atp2b1, atp2b2, atp2b2, atp2b3, atp2b4, atp4a, atp4b, atp5, atp5a, atp5b, atp5g1, atp5g2, atp5g3, atp5o, atp6a, atp6b1, atp6c, atp6e, atp6n1, atp7a, atp7b, atpm, atpsb, atpsk1, atpsk2, atq1, atr, atr, atr1, atr1, atr2, atrc1, atrc2, atrx, ats, atsv, atx1, atx2, au, auf1, auf1a, aut, avcd, aved, avp, avpr1a, avpr1b, avpr2, avpr3, avrp, avsd, awa1, ax1, ax11g, axsf, azf1, azf2, azgp1, azu1, b120, b144, b1g1, b29, b2m, b2mr, b3galt4, b4galt1, ba2r, bab1, bag1, bai1, bai2, bai3, bai3, bam22, bap1, bap135, bapx1, bard1, bark2, bas, bat1, bat2, bat3, bat4, bat5, bax, bb1, bbbg1, bbbg2, bbs1, bbs2, bbs3, bbs4, bbs5, bcas1, bcat1, bcat2, bcate2, bcd1, bcei, bche, bckdha, bckdha, bcl1, bcl10, bcl2, bcl2a1, bcl212, bcl3, bcl5, bcl6, bcl7, bcl7a, bcl8, bcl9, bclw, bcm, bcm1, bcma, bcns, bcns, bcp, bcpm, bcpr, bcr, bcr12, bcr13, bcr14, bcsg1, bct1, bct2, bdb, bdb1, bdc, bde, bdkrb1, bdkrb2, bdmf, bdmr, bdnf, bed, bedp, bek, bene, bevi, bf, bf1, bf2, bfhd, bfic, bfis, bfnc2, bfp, bfsp1, bft, bglap, bgmr, bgn, bgp, bhd, bhpcdh, bhr1, bicd1, bid, bigh3, bin1, bir, bjs, bkma1, blast1, blau, blk, blm, blmh, bltr, blvra, blvr, blym, bmal1, bmd, bmh, bmi1, bmp1, bmp2, bmp2a, bmp2b1, bmp3, bmp4, bmp5, bmp6, bmp7, bmp8, bmp1a, bmp1b, bmx, bmyb, bn51t, bnc, bnc1, bnp, bor, bpad, bpag1, bpag2, bpes, bpes1, bpes2, bpgm, bph1, bpi, br, br140, braf, brca1, brca2, brca3, brcacox, brcd1, brcd2, brdt, brf1, brhc, bric, brks, brn3a, brn3b, brn3c, brn1, brwl, brwl, bs, bsap, bsep, bsf2, bsg, bsnd, bss1, bst1, bst2, btak, btc, btd, bteb, bteb1, btg1, btg2, bths, btk, btk1, btn, bts, bub1b, bubr1, bwr1a, bwr1b, bws, bwscr1a, bwscr1b, bzrp, bzx, c11orf13, c1nh, c1qa, c1qb, c1qbp, c1qg, c1r, c1s, c2, c21orf1, c21orf2, c21orf3, c2ta, c3, c3br, c3dr, c3g, c4a, c4b, c4bpa, c4bpb, c4f, c4s, c5, c5ar, c5r1, c6, c7, c8a, c8b, c8g, c9, ca1, cal2, cal25, ca2, ca21h, ca3, ca4, ca5, ca6, ca7, ca8, ca9, caaf1, cabp9k, cac, cac@, caca, cacd, cacnala, cacnalb, cacnalc, cacnald, cacnale, cacna1f, cacna1s, cacna2, cacnb1, cacnb2, cacnb3, cacnb4, cacng, cacnl1a1, cacnl1a2, cacnl1a3, cacnl1a4, cacnl1a5, cacnl1a6, cacnl2a, cacnlb1, cacnlg, cacp, cact, cacy, cad, cad11, cadasi1, cae1, cae3, caf, cafla, caga, cagb, cain, cak, cak1, cal11, calb1, calb2, calb3, calc1, calc2, calca, calcb, calcr, cald1, calla, calm1, calm2, calm3, calm11, calm13, calna, calna3, calnb, calnb1, calr, cals, calt, calu, cam, camk4, camkg, caml1, camlg, camp, can, canp3, canx, cap2, cap3, cap37, capb, capg, cap1, capn1, capn2, capn3, capn4, cappa2, cappb, capr, caps, capza2, capzb, car, carp, cars, cart1, cas, cas2, casi1, casp1, casp10, casp2, casp3, casp3, casp4, casp5, casp6, casp7, casp8, casq1, casq2, casr, cast, cat, cat1, cat4, catf1, catm, cav1, cav2, cav3, cbbm, cbd, cbfa1, cbfa2, cbfa2t1, cbfa3, cbfb, cbg, cb1, cbl2, cbln2, cbp, cbp, cbp2, cbp68, cbr1, cbs, cbt, cbt1, cc10, cca, cca1, cca11, cca12, ccb11, ccckr5, ccg1, ccg2, cchl1a1, cchl1a2, cchl1a3, cchl1b1, cck, cckar, cckbr, cc1, ccm1, ccm2, ccm3, ccn1, ccna, ccnb1, ccnc, ccnd1, ccnd2, ccnd3, ccne, ccnf, ccng1, ccnh, ccnt, ccnt1, cco, ccr10, ccr2, ccr3, ccr9, ccsp, cct, ccv, cczs, cd, cd10, cd11a, cd11b, cd11c, cd13, cd137, cd14, cd15, cd151, cd156, cd16, cd164, cd18, cd19, cd1a, cd1b, cd1c, cd1d, cdle, cd2, cd20, cd22, cd23, cd24, cd26, cd27, cd271, cd28, cd281g, cd281g2, cd30, cd32, cd33, cd34, cd36, cd3611, cd3612, cd37, cd38, cd39, cd3911, cd3d, cd3e, cd3g, cd3z, cd4, cd40, cd401g, cd41b, cd43, cd44, cd45, cd46, cd47, cd48, cd49b, cd49d, cd5, cd53, cd57, cd58, cd59, cd51, cd6, cd63, cd64, cd68, cd69, cd7, cd70, cd71, cd72, cd74, cd79a, cd79b, cd80, cd81, cd82, cd82, cd86, cd8a, cd8b, cd8b1, cd9, cd94, cd95, cd97, cd99, cda, cda1, cda3, cdan1, cdan2, cdan3, cdb2, cdc2, cdc20, cdc25a, cdc25b, cdc25c, cdc27, cdc211, cdc212, cdc214, cdc34, cdc42, cdc51, cdc7, cdc711, cdcd1, cdcd2, cdcd3, cdc11, cdcre1, cdg1, cdgd1, cdgg1, cdgs2, cdh1, cdh11, cdh12, cdh13, cdh14, cdh15, cdh16, cdh16, cdh17, cd2, cdh3, cdh3, cdh5, cdh7, cdh8, cdhb, cdhh, cdhp, cdhs, cdk2, cdk3, cdk4, cdk5, cdk7, cdk8, cdk9, cdkn1, cdkn1a, cdkn1b, cdkn1c, cdkn2a, cdkn2b, cdkn2d, cdkn3, cdkn4, cdl1, cdm, cdmp1, cdmt, cdp1, cdp2, cdp3, cdp62a, cdsn, cdsp, cdtb, cdw50, cdx1, cdx2, cdx3, cdx4, cea, cebp, cebpa,

ES 2 733 211 T3

cebpb, cebpd, cebpe, cecr, ce1, cell, cen1, cenpa, cenpb, cenpc, cenpc1, cenpe, cenpf, cerd4, ces, ces1, cetn1,
 cetp, cf, cf2r, cfag, cfag, cfc, cfd1, cfeom1, cfeom2, cfh, cfl1, cfl2, cfnf, cfn, cftr, cg1, cga, cgat, cgb, cgd, cgf1, cgh,
 cgrp, cgs23, cgt, cgthba, chac, chat, chc1, chd1, chd2, chd3, chd4, chd5, chdr, che1, che2, ched, chek1, chga, chgb,
 chgc, chh, chi311, chip28, chit, chk1, chl1r, chl2r, chm, chm1, chn, chn1, chn2, chop10, chr, chr39a, chr39b, chr39c,
 5 chrm1, chrm2, chrm3, chrm4, chrma5, chrna1, chrna2, chrna3, chrna4, chrna5, chrna7, chrnb1, chrnb2, chrnb3,
 chrnb4, chrnd, chrne, chrng, chrs, chs1, chx10, ciipx, cip1, cirbp, cish, ck2a1, ckap1, ckb, ckbb, ckbe, ckm, ckmm,
 ckmt1, ckmt2, ckn1, ckn2, ckr3, ckr11, ckr13, c1, cl100, cla1, cla1, clac, clapb1, clapm1, claps3, clc, clc7, clck2,
 clcn1, clcn2, clcn3, clcn4, clcn5, clcn6, clcn7, clcnka, clcnkb, cld, cldn3, cldn5, clg, clg1, clg3, clg4a, clg4b, cli, clim1,
 10 clim2, clk2, clk3, cln1, cln2, cln3, cln5, cln6, cln80, clns1a, clns1b, clp, clpp, clps, clta, cltb, cltc, cltc11, cltd, clth, clu,
 cmal, cmah, cmar, cmd1, cmd1a, cmd1b, cmd1l, cmd1d, cmdle, cmdlf, cmd3a, cmdj, cmh1, cmh2, cmh3, cmh4,
 cmh6, cmkbr1, cmkbr2, cmkbr3, cmkbr5, cmkbr6, cmkbr7, cmkbr8, cmkbr9, cmkbr12, cmklr1, cmkr11, cmkr12, cml,
 cmm, cmm2, cmoat, cmp, cmpd1, cmpd2, cmpd3, cmpd3, cmpx1, cmt1a, cmt1b, cmt2a, cmt2b, cmt2d, cmt2d,
 cmt4a, cmt4b, cmtnd, cmtx1, cmtx2, cna1, cna2, cnbp1, cnc, cncg1, cncg2, cncg31, cnd, cng3, cnga1, cnga3, cngb1,
 15 cnn1, cnn2, cnn3, cnp, cnr1, cnsn, cntf, cntfr, cntn1, co, coca1, coca2, coch, cod1, cod2, coh1, coil, col10a1,
 col11a1, col11a2, col12a11, col13a1, col15a1, col16a1, col17a1, col18a1, col19a1, col1a1 col1a2, col1ar, col2a1,
 col3a1, col4a1, col4a2, col4a3, col4a4, col4a5, col4a6, col5a1, col5a2, col6a1, col6a2, col6a3, col7a1, col8a1,
 col8a2, col9a1, col9a2, col9a3, colq, comp, comt, copeb, copt1, copt2, cord1, cord2, cord5, cord6, cort, cot,
 cox10, cox4, cox5b, cox6a1, cox6b, cox7a1, cox7a2, cox7a3, cox7am, cox8, cp, cp107, cp115, cp20, cp47, cp49,
 20 cpa1, cpa3, cpb2, cpb2, cpd, cpe, cpetr2, cpm, cpn, cpn2, cpo, cpp, cpp32, cppy2, cppi, cps1, cpsb, cpsd,
 cprt1a, cptlb, cpi2, cpu, cpx, cpx, cpxd, cr1, cr2, cr3a, crabp1, crabp2, crabb, crarf, crat, crbp1, crbp2, crd, crd1, creb1,
 creb2, crebbp, creb11, crem, crfb4, crfr2, crh, crhbp, crhr, crhr1, crhr2, criip, crk, crk1, crm1, crmp1, crmp2, crp,
 crp1, crs, crslc, crs2, crs3, crsa, crt, ctrl1, crtm, crx, cry1, cry2, crya1, crya2, cryaa, cryab, cryb1, cryb2, cryb3, cryba1,
 cryba2, cryba4, crybb1, crybb2, crybb3, cryg1, cryg2, cryg3, cryg4, cryg8, cryg@, cryga, crygb, crygc, crygd, crygs,
 crym, cryz, cs, csa, csb, csbp1, csci, csd, csd2, csda, cse, cse11, csf1, csflr, csf2, csf2ra, csf2rb, csf2ry, csf3, csf3r,
 25 csh1, csh2, csk, csmf, csn1, csn10, csn2, csn3, csnb1, csnb2, csnb3, csnkla1, csnk1d, csnkle, csnklg2, csnk2a1,
 csnk2a2, csnk2b, csnu3, cso, cspb, cspg1, cspg2, cspg3, csr, csrb, csrp, csrp1, csrp2, cst1, cst2, cst3, cst4,
 cst4, cst5, cst6, csta, cstb, csx, ct2, ctaa1, ctaa2, ctag, ctb, ctbp1, ctbp2, ctgf, cth, cthm, ctk, cta1, cta3, cta4, cta8,
 ctm, ctna1, ctna2, ctmb1, ctmb2, ctnd, ctnd1, ctnr, ctns, ctp, ctpt, ctpr, ctr1, ctr2, ctrb1, ctr1, ctsa, ctsb, ctsc, ctscd,
 ctse, ctsg, ctsg12, ctsh, ctsk, cts1, ctss, ctsw, ctsz, ctx, cubn, cul3, cul4b, cul5, cut11, cvap, cvd1, cvl, cx26, cx31,
 30 cx32, cx37, cx40, cx43, cx46, cx50, cxb3s, xcxc4, cxorf4, cyb5, cyb561, cyba, cybb, cyc1, cyk4, cyld1, cyp,
 cyp1, cyp11a, cyp11b1, cyp11b2, cyp17, cyp19, cypla1, cyp1a2, cyp1b1, cyp21, cyp24, cyp27, cyp27a1, cyp27b1, cyp2a,
 cyp2a3, cyp2a6, cyp2b, cyp2c, cyp2c19, cyp2c9, cyp2d, cyp2d@, cyp2e, cyp2e1, cyp2f1, cyp2j2, cyp3a4, cyp4a11,
 cyp4b1, cyp51, cyp7, cyp7a1, cyr61, cynr1, cynr2, czp3, d10s105e, d10s170, d10s170, d11s302e, d11s636,
 35 d11s813e, d11s833e, d12s2489e, d12s53e, d13s1056e, d13s25, d14s46e, d15s12, d15s226e, d15s227e,
 d16s2531e, d16s469e, d17s136e, d17s811e, d18s892e, d19s204, d19s381e, d1s111, d1s155e, d1s166e, d1s1733e,
 d1s2223e, d1s61, d2h, d2s201e, d2s448, d2s488e, d2s69e, d3s1231e, d3s1319e, d3s48e, d4, d4s90, d5s1708,
 d5s346, d6, d6s1101, d6s207e, d6s2245e, d6s228e, d6s229e, d6s230e, d6s231e, d6s51e, d6s52e, d6s54e, d6s81e,
 d6s82e, d7s437, d8s2298e, d9s46e, da1, da2b, dab2, dac, dad1, daf, dag, dag1, dag2, dagk1, dagk4, dam10, dam6,
 damox, dan, dao, dap, dap3, dap5, dapk1, dar, dat1, dax1, daxx, daz, dazh, daz1, dba, dbccr1, dbcn, dbh, dbi, dbi,
 40 db1, dbm, dbn1, dbp, dbp, dbp2, dbpa, dbt, dbx, dby, dcc, dce, dci, dck, dcn, dcoh, dcp1, dcr, dcr3, dct, dct1,
 dcx, ddb1, ddb2, ddc, ddh1, ddh2, ddi1, ddi2, ddost, ddp, ddpac, ddr, ddx1, ddx10, ddx11, ddx12, ddx15, ddx16,
 ddx2a, ddx3, ddx5, ddx6, ddx9, dec, decr, def1, def4, def5, def6, defa1, defa4, defa5, defa6, defb1, defb2, dek, denn,
 dents, dep1, der12, des, dff1, dffa, dffrx, dffry, dfn1, dfn2, dfn3, dfn4, dfn6, dfna1, dfna10, dfna11, dfna12, dfna13,
 45 dfna2, dfna2, dfna4, dfna5, dfna6, dfna7, dfna8, dfna9, dfnb1, dfnb12, dfnb13, dfnb14, dfnb16, dfnb17, dfnb18,
 dfnb2, dfnb3, dfnb4, dfnb5, dfnb6, dfnb7, dfnb8, dfnb9, dgcr, dgcr2, dgcr2, dgcr6, dgi1, dgka, dgkq, dgpt, dgpt,
 dgs, dgs2, dgsi, dgu, dhc2, dhcr7, dhfr, dhlag, dhp, dhpr, dhps, dhrd, dhtr, di, di1, dia, dia1, dia2, dia4, diaph1, diaph2,
 dif2, diff6, dipi, dir, dkc, dkc1, dlc1, dld, dlg1, dlg2, dlg3, dlg4, dlst, dlx1, dlx2, dlx2, dl3, dlx4, dlx5, dlx6, dlx7, dlx8,
 dm, dm2, dmahp, dmbt1, dmd, dmda1, dmd1, dmh, dmk, dmp1, dmpk, dmsfh, dmt, dmt1, dmtn, dna21, dnah, dnah1,
 50 dnah11, dnah12, dnah2, dnahc1, dnahc11, dnahc2, dnahc3, dnase1, dnase111, dnase113, dnase2, dnch2, dnc1,
 dncm, dnec1, dne11, dn1, dn11, dn111, dnm1, dnmt1, dnmt2, dnkp1, dns, dntt, do, doc1, doc2, dock1, dock180,
 dod, dok1, dom, dp1, dp1, dp2, dp3, dpagt2, dpc4, dpd, dpde1, dpde2, dpde3, dpde4, dpep1, dph212, dpp, dpp4,
 dpp6, dpt, dpzd, dpys, dpys11, dpys12, dr1, dr3, dr31g, dr5, dra, drad, drada, dra1, drd1, drd1b, drd1b, drd112, drd2,
 drd3, drd4, drd5, dri11, drp1, drp1, drp2, drp2, drp3, drp1a, drt, dsc1, dsc2, dsc3, dsc3, dsc4, dscam, dscr, dsg1,
 55 dsg2, dsg3, dsp, dspg3, dspp, dss, dss1, dtd, dtdp2, dtdst, dtna, dtr, dts, dus, dusp1, dusp11, dusp2, dusp3, dusp4,
 dusp5, dusp6, dusp7, dusp8, dut, dv1, dv11, dv11, dv13, dx68s1e, dxs1272e, dxs128, dxs1283e, dxs423e,
 dxs435e, dxs522e, dxs648, dxs707, dxs8237e, dxys155e, dylx2, dyrk, dys, dysf, dyt1, dyt3, dyt5, dyt6, dyt7, dyt8,
 dyt9, dyx1, dyx2, e11s, e14, e1b, e2a, e2f1, e2f2, e2f3, e2f4, e3, e4f, e4f1, e4tfla, e4tflb, ea1, eaac1, eaat1, eaat2,
 eac, ead, eag, eap, ear1, ear2, ear3, ebaf, ebf, ebi1, ebm, ebn1, ebn1, ebn2, ebr2a, ebs1, ebvm1, ebvs1, ec1, eca1,
 ecb2, ece1, ecgf1, ech1, echs1, eck, ecm1, ecp, ecs1, ect2, ed1, ed2, ed3, ed4, eda, eda3, eddr1, edg3, edg6, edh,
 60 edh17b2, edh17b2, edh17b3, edm1, edm2, edm3, edmd, edmd2, edn, edn1, edn2, edn3, edna, ednrb, eec1, eec2,
 eef1a1, eef1a2, eef1b1, eeflb2, eeflb3, eeflb4, eef2, eeg1, eegv1, eek, een, efla, ef2, efe2, efemp1, ef16, efmr,
 efna1, efna3, efna4, efnb1, efnb2, efnb3, efp, eftu, egf, egr1, egi, egr1, egr2, egr3, egr4, ehhadh, ehoc1, ei, eifla, eif2g
 A, eif2s3 A, eif3s10, eif3s6, eif4a1, eif4a2, eif4c, eif4e, eif4ebp1, eif4e2, eif4e11, eif4e12, eif4g, eif4g1, eif4g2, eif5a,
 ejm1, el1, ela1, ela2, elam1, elanh2, elav11, elav12, elav14, elc, ele1, elf3, elk1, elk2, elk3, elk4, el1, eln, em9, emap,
 65 emap1, emd, emd2, emk 1, emp1, emp55, emr1, ems1, emt, emtb, emx1, emx2, en1, en2, ena78, end, endog,

enf12, eng, en1, enol, eno2, eno3, enep, ent1, entk, enur1, enur2, enx2, eos, ep3, ep300, epa, epb3, epb311,
 epb41, epb4112, epb42, epb49, epb72, epha1, epha2, epha3, epha8, ephb1, ephb2, ephb3, ephb4, ephb6, ept1,
 ept2, ept3, ephx1, ephx2, epim, eplg1, eplg2, eplg3, eplg4, eplg5, eplg8, epm1, epm2, epm2a, epmr, epo, epor,
 5 eppk, eprs, eps15, eps8, ept, erba1, erba2, erba12, erba13, erbb2, erbb3, erbb4, erc55, ercc1, ercc2, ercc3, ercc4,
 ercc5, ercc6, ercm1, erda1, erf1, erg, erg3, ergic53, erh, erk, erk1, erk2, erk3, erm, erp11, erv1, erv1, erv3, ervr,
 ervtlerv2, ervt3, ervt4, ervt5, eryf1, es1, es130, esa, esa1, esa4, esat, esb3, esd, esg, esr, esr1, esr2, esr11, esr12,
 esrra, esrrb, esrrg, ess1, est, est, est2, est25263, esx, etfa, etfb, etfdh, etk1, etk2, etm1, etm2, eto, ets1, ets2, etv1,
 10 etv3, etv4, etv5, etv6, evc, evc1, evda, evdb, evil, evi2, evi2a, evi2b, evp1, evr1, evx1, evx2, ews, ewsr1, exlm1, ext1,
 ext2, ext3, ext11, ext12, eya1, eya2, eya3, eyc11, eyc13, ezh1, ezh1, ezh2, f10, f11, f12, f13a, f13a1, f13b, f2, f2r,
 f2r12, f2r13, f3, f5, f5f8d, f7, f7e, f7r, f8a, f8b, f8c, f8vfv, f9, fa, fa1, faa, fabp1, fabp2fabp3, fabp4, fabp6, fac1, faca,
 facc, facd, face, fac11, fac12, fac13, fac14, facv11, fad, fadd, fadk, fah, fak2, faldh, fal139, falz, fanca, fanc, fancd,
 fance, fancg, fap, fapa, farr, fas, fas1, fasn, fast1, fat, fau, fbln1, fbln2, fbn1, fbn2, fbn1, fbp1, fcar, fcc1, fce, fce2,
 fcer1a, fcer1b, fcerlg, fcer2, fcgr1a, fcgrlb, fcgrlc, fcgr2a, fcgr3a, fcgrt, fcnd, fcn1, fcn2, fcp, fcp1, fcp, fct3a, fdc,
 15 fdft1, fdh, fdps11, fdps12, fdps13, fdps14, fdps15, fdx1, fdxr, fe65, fe6511, fea, feb1, feb2, fecb, fech, fen1, feo, feom,
 feom1, feom2, fer, fes, fet1, fevr, ffm, fga, fgarat, fgb, fgc@, fgd1, fgdy, fgf1, fgf10, fgf11, fgf12, fgf13, fgf14, fgf2, fgf2,
 fgf3, fgf4, fgf5, fgf6, fgf7, fgf8, fag9, fga, fgb, fgfr1, fgfr2, fgfr3, fgfr4, fgg, fgr, fgs1, fh, fh, fh3, fhc, fnf1, fhf3, fhf4, fhf2,
 fhit, fh11, fh12, fhr2, fic1, figf, fih, fim, fim1, fim3, fimg, fkbp12, fkbp1a, fkbp2, fkh2, fkh11, fkh110, fkh112, fkh115,
 fkh116, fkh117, fkh12, fkh15, fkh16, fkh17, fkh18, fkh19, fkh1, fkg, fli1, flii, fln1, fln2, flna, flnb, flnms, flot2, flt1,
 20 flt2, flt3, flt4, fmf, fmn, fmo1, fmo2, fmo3, fmod, fmr1, fmr2, fms, fl1, fn12, fnra, fnrb, fnrb1, fnra, fnrb, folh, folh1, folr1,
 folr2, folt, fos, fosb, fos11, fos12, fpah, fpc, fpd1, fpdmm, fpf, fpgs, fp1, fpp, fpr1, fprh1, fprh2, fpr11, fpr12, fprp, fps12,
 fps13, fps14, fps15, fr, frap1, fraxa, fraxe, fraxf, frda, freac2, freac6, freac9, frg1, frp1, frv1, frv2, frv3, fsg1, fsgs, fshb,
 fshd1a, fshmd1a, fshprh1, fshr, fssv, fth1, fth16, ft1, ftz1, ftzf1, fuca1, fuca2, fur, fus, fuse, fut1, fut2, fut3, fut4, fut5,
 25 fut6, fut7, fut8, fvt1, fvr1, fxy, fy, fyn, fzd1, fzd2, fzd3, fzd5, fzd6, fzd7, fzt, g0s8, g10p1, g10p2, g17, g17p1, g19p1,
 g1p1, glp2, glp3, g22p1, g6pc, g6pd, g6pd1, g6pd1, g6pt, g6pt1, g6s, g7p1, ga2, gaa, gabatr, gabpa, gabpb1,
 gabra1, gabra2, gabra3, gabra4, gabra5, gabra6, gabrb1, gabrb2, gabrb3, gabrd, gabre, gabrg1, gabrg2, gabrg3,
 gabrr1, gabrr2, gad1, gad2, gad3, gadd153, gadd45, gak, ga1, galpb, galc, gale, galgt, galk1, galk2, gain, galnact,
 galnr, galnr1, gains, galnt1, galnt2, galnt3, galr1, galt, gan, gan1, ganab, ganc, gap, gap1m, gap43, gapd, gar22,
 30 garp, gars, gart, gas, gas1, gas2, gas41, gas6, gas7, gasr, gast, gata1, gata2, gata3, gata4, gata6, gay1, gba, gbas,
 gbbb1, gbbb2, gbe1, gbp1, gbx2, gc, gcap, gcap2, gcdh, gcf1, gcf2, gcf, gcg, gcgr, gch1, gck, gckr, gcn511, gcn512,
 gcnf, gcnt1, gcnt2, gcp, gcp2, gcs, gcs1, gcsf, gcsfr, gcsp, gctg, gcy, gda, gde, gdf5, gdf8, gdh, gdi1, gdi2, gdid4,
 gdld, gdnf, gdnfr, gdnfra, gdnfrb, gdx, gdx, ge, gem, geney, gey, gf1, gf1, gfap, gfer, gfer, gfi1, gfpt, gfra1, gfra2,
 ggcx, ggt1, ggt2, ggta1, ggtb1, ggtb2, gh1, gh2, ghc.RTM., ghdx, ghn, ghr, ghrf, ghrh, ghrhr, ghs, ghv, gif, gifb, gip,
 35 gip, gipr, girk1, girk2, girk3, girk4, gja1, gja3, gja4, gja5, gja8, gjb1, gjb2, gjb3, gk, gk2, gla, glat, glb1, glb2, glc1a,
 glc1b, glc1c, glc1d, glc1f, glc3a, glc3b, glc1c, glc1r, glc2, glc3, glc, glepp1, glg1, gli, gli2, gli3, gli4, glnn, gins, glo1,
 glo2, glp1r, glra1, glra2, glra3, glrb, glrx, gls, glud1, glud2, glu1, glur1, glur2, glur3, glur4, glur5, glur6, glur7, glut1,
 glut2, glut3, glut4, glut5, glvr1, glvr2, gly96, glya, glyb, gly1, glyt1, glyt1, glyt2, gm2a, gma, gmcsf, gmds, gm1, gmpr,
 gmps, gna11, gna15, gna16, gna1, gna12, gna12a, gna12b, gna121, gna13, gna1, gnao1, gnaq, gnas, gnas1, gnat1,
 40 gnat2, gnaz, gnb1, gnb2, gnb3, gng5, gn11, gnpta, gnhr1, gnhr2, gnhr, gns, gnt1, golga4, got1, got2, gp130, gp1ba,
 gp1bb, gp2, gp2b, gp39, gp3a, gp75, gp78, gp9, gpa, gpam, gpat, gpb, gpc, gpc1, gpc3, gpc4, gpd, gpd1, gpd2,
 gpds1, gpe, gpi, gpi2, gpm6a, gpm6b, gpoa, gpr1, gpr10, gpr11, gpr12, gpr13, gpr15, gpr17, gpr18, gpr19, gpr2,
 gpr20, gpr21, gpr22, gpr25, gpr29, gpr3, gpr30, gpr32, gpr35, gpr37, gpr39, gpr4, gpr5, gpr6, gpr7, gpr8,
 45 gpr9, gprcy4, gprk21, gprk4, gprk5, gprk6, gprv28, gpsa, gpsc, gpt, gpx1, gpx2, gpx3, gpx4, gr2, grb1, grb10,
 grb2, grf2, gria1, gria2, gria3, gria4, grid2, grik1, grik2, grik3, grik4, grik5, grin1, grin2a, grin2b, grin2c, grin2d, grina,
 grk1, grk5, grk6, gr1, gr111, grm3, grm8, grmp, grn, gro1, gro2, gro3, grp, grp58, grp78, grpr, grx, gs, gs1, gsas, gsc,
 50 gsc1, gse, gshs, gs1, gsm1, gsn, gsp, gsp1, gsr, gss, gst12, gst11, gst2, gst2, gst3, gst4, gst5, gsta1, gsta2, gstm1,
 gstm11, gstm2, gstm3, gstm4, gstm5, gstp1, gstt2, gt1, gt335, gta, gtb, gtb, gtd, gtf2e2, gtf2f1, gtf2h1, gtf2h2,
 gtf2h4, gtf2i, gtf2s, gtf3a, gtg, gucla2, gucla3, guclb3, guc2c, guc2d, guc2f, guca1a, gualb, guca2, guca2a,
 guca2b, gucsa3, gucsb3, gucyla2, gucyla3, gucylb3, gucy2c, gucy2d, gucy2f, guk1, guk2, gulo, gulop, gusb, gusm,
 gust, gxp1, gypa, gypb, gypc, gype, gys, gys1, gys2, gzma, gzmb, gzmh, gzmm, h, h142t, h19, h1f0, h1f1, hlf2, h1f3,
 55 hlf4, hlf5, hlfv, h2a, h2ax, h2az, h2b, h2b, h3f2, h3f3b, h3ft, h3t, h4, h4f2, h4f5, h4fa, h4fb, h4fe, h4fg, h4fh, h4fi, h4fj,
 h4fk, h4fl, h4fm, h4m, h6, ha2, habp1, hadha, hadhb, hadhsc, haf, hagh, hah1, haip1, ha1, hap, hap1, hap2, hars,
 has2, hat1, hausp, hb1, hb1, hb6, hba1, hba2, hbac@, hbb, hbbc@, hbd, hbe1, hbefg, hbf2, hbg1, hbg2, hbgr, hbhr,
 hbm, hbp, hbq1, hbz, hc2, hc3, hca, hcat2, hccs, hcdh, hcf2, hcf1c, hcg, hck, h11, hc12, hc13, hc1s1, hcp, hcp1, hcs,
 hcvs, hd, hdac1, hdc, hdgf, hdhc7, hdlbp, hdld, hldt1, hdr, hed, hed, hegf1, hek, hek3, heln1, hem1, hema, hemb,
 60 hemc, hempo, hen1, hen2, hep, hep10, her2, her4, herg, herv1, hes1, hesx1, het, hexa, hexb, hf1, hf10, hfc1, hfe,
 hfe2, hfh11, hfsp, hgd, hgf, hgf, hgf1, hg1, hh, hh72, hhc1, hhc2, hhd, hhh, hhmjg, hhr23a, hht1, hht2, hiap2, higm1,
 hilda, hint, hiomt, hip, hip1, hip116, hip2, hir, hira, his1, his2, hive1, hivep1, hivep2, hjcd, hk1, hk2, hk3, hk33, hke4,
 hke6, hkr1, hkr2, hkr3, hkr4, hl 11, hl19, hla-a, hla-b, hla-c, hla-cda12, hla-dma, hla-dmb, hla-dna, hla-dob, hla-
 dpa1hla-dpb1, hla-dqa1, hla-drlb, hla-dra, hla-e, hla-f, hla-g, hla-ha2, hladd, hlaf, hlals, hlcs, hlm2, hlp, hlp3, hlr1,
 65 hlr2, hit, hlx1, hlxb9, hmaa, hmab, hmat1, hmbs, hmcs, hmg1, hmg14, hmg17, hmg2, hmgc1, hmgcr, hmgs1,
 hmgs2, hmgs3, hmgs4, hmgs5, hmgs6, hmgs7, hmgs8, hmgs9, hmgs10, hmgs11, hmgs12, hnd, hnf1a, hnf2,
 hnf3a, hnf3b, hnf4a, hnp36, hnpcc6, hnrpa1, hnrpa2b1, hnrpd, hnrpf, hnrpg, hnrph1, hnrph2, hnrph3, hnrpk, homg,
 hops, hox10, hox11, hox12, hox1@, hox1a, hox1b, hox1c, hox1d, hox1e, hox1f, hox1g, hox1h, hox1i, hox1j, hox2@,
 hox2a, hox2b, hox2c, hox2d, hox2e, hox2f, hox2g, hox2h, hox2i, hox3@, hox3a, hox3b, hox3c, hox3d, hox3e, hox3f,
 70 hox3g, hox4@, hox4a, hox4b, hox4c, hox4d, hox4e, hox4f, hox4g, hox4h, hox4i, hox7, hox8, hoxa1, hoxa10,

hoxa11, hoxa13, hoxa3, hoxa4, hoxa5, hoxa6, hoxa7, hoxa9, hoxa@, hoxb1, hoxb2, hoxb3, hoxb4, hoxb5, hoxb6, hoxb7, hoxb8, hoxb9, hoxb@, hoxc12, hoxc13, hoxc4, hoxc5, hoxc6, hoxc8, hoxc9, hoxc@, hoxd1, hoxd10, hoxd11, hoxd12, hoxd13, hoxd3, hoxd4, hoxd8, hoxd9, hoxd@, hoxhb9, hp, hp4, hpa1p, hpc1, hpc2, hpa, hpa11, hpcx, hpd, hpd1, hpd2, hpe1, hpe2, hpe3, hpe4, hpe5, hpect1, hpfh, hpfh2, hpgd, hplh1, hplh2, hpn, hpr, hprt, hprt1, hps, hpt, hpt1, hptp, hptx, hpv18i1, hpv18i2, hpx, hr, hras, hrb, hrc, hrc1, hrca1, hrd, hres1, hrf, hrg, hrga, hrh1, hrh2, hrmt11, hrpt2, hrx, hry, hsa11, hsa12, hsan1, hsa1, hscr2, hsd11, hsd11b1, hsd11b2, hsd11k, hsd111, hsd17b1, hsd17b2, hsd17b3, hsd17b4, hsd3b1, hsd3b2, hsh, hsn1, hsorc1, hsp27, hsp73, hspa1a, hspalb, hspa11, hspa2, hspa3, hspa4, hspa5, hspa6, hspa7, hspa8, hspa9, hspb1, hspb2, hspc2, hspca11, hspca12, hspca13, hspca14, hspcb, hspg1, hspg2, hsr1, hsst, hstd, hstf1, htc2, htf4, htk, htk1, ht1, htlf, htivr, htn1, htn2, htn3, htnb, htor, htr1a, htr1b, htr1d, htr1e, htr1e1, htr1f, htr2a, htr2b, htr2c, htr3, htr4, htr5a, htr6, htr7, htrx1, hts1, htt, htx, htx1, hub, hud, hup2, hur, hus, hvls, hvbs1, hvbs6, hvbs7, hvem, hvh2, hvh3, hvh8, hxb, hxb1, hy, hya, hyal1, hyd2, hygn1, hy1, hyp, hyplip1, hypp, hypx, hydr, hycr1, hys, ia1, ia2, iap, iapp, iar, iars, ibd1, ibd2, ibm2, ibsp, ica1, icam1, icam2, icam3, icca, ich1, icr2, icr2b, ics1, id1, id2, id3, id4, ida, idd, iddm1, iddm10, iddm11, iddm12, iddm13, iddm15, iddm17, iddm2, iddm3, iddm4, iddm5, iddm6, iddm7, iddm8, iddmx, ide, idg2, idh1, idh2, idh3a, idh3g, ido, ids, idua, ier1, ier3, iex1, if, ifcr, ifgr2, ifi16, ifi27, ifi35, ifi4, ifi5111, ifi54, ifi56, ifi616, ifi78, ifna1, ifna10, ifna13, ifna14, ifna16, ifna17, ifna21, ifna6, ifna7, ifna8, ifna@, ifnai1, ifnar1, ifnar2, ifnb1, ifnb2, ifnb3, ifng, ifngr1, ifngr2, ifngt1, ifnr, ifnw1, ifrd2, iga, igat, igb, igbp1, igd1, igda1, igdc1, igds2, iger, iges, igf1, igflr, igf2, igf2r, igfbp1, igfbp10, igfbp2, igfbp3, igfbp4, igfbp6, igfbp7, igfr1, igfr2, igfr3, igh@, igha1, igha2, ighd, ighdy2, ighc, ighg1, ighg2, ighg3, ighg4, ighj, ighm, ighmbp2, ighr, ighv@, igi, igj, igk@, igkc, igkde1, igkj, igkjb1, igkv, iglc, iglc1, ig1j, iglp1, iglv, igm, igo1, igf1, ihh, ik1, ikba, il10, il10r, il11, il11ra, il12a, il12b, il12rb1, il12rb2, il13, il13ra1, il13ra2, il15, il15ra, il17, il1a, il1b, il1bc, il1r1, il1r2, il1ra, il1rap, il1rb, il1rn, il2, il2r, il2ra, il2rb, il2rg, il3, il3ra, il3ray, il4, il4r, il4ra, il5, il5ra, il6, il6r, il6st, il7, il7r, il8, il8ra, il8rb, il9, il9r, ila, ilfl, illbp, imd1, imd2, imd4, imd5, imd6, impa1, impdh1, impdh2, impdh11, impg1, imp1, indx, infa2, infa4, infa5, ing1, inha, inhba, inhbb, inhbc, inil, ink4b, inlu, inp10, inpp1, inpp5a, inpp5b, inpp5d, inpp11, ins, insig1, ins1, ins13, ins14, insr, insrr, int1, int111, int2, int3, int4, int6, iosca, ip2, ipf1, ip1, ipm150, ipox, ipp, ipp2, ipw, iqgap1, ir10, ir20, ireb1, ireb2, irf1, irf2, irf4, irf4, irr, irs1, isa, iscw, is11, islr, isot, issx, it15, itba1, itba2, itf, itf2, itga1, itga2, itga2b, itga4, itga5, itga6, itga7, itgad, itga1, itgam, itgav, itgax, itgb1, itgb2, itgb3, itgb4, itgb6, itgb7, iti, itih1, itih2, itih3, itih4, itih11, iti1, itk, itm1, itpa, itpka, itpkb, itpr1, itpr2, itpr3, itsn, ivd, iv1, jag1, jak1, jak2, jak3, jbs, jcap, jh8, jip, jk, jme, jmj, joag, jpd, jrk, jrk1, jtkl4, jtv1, jun, junb, jund, jup, jv18jws, k12t, kail, kal1, kar, kars, katp1, kcna1, kcna10, kcna1b, kcna2b, kcna3, kcna4, kcna5, kcna6, kcna7, kcna8, kcna9, kcna11, kcna12, kcna13, kcna14, kcna15, kcna16, kcna18, kcna19, kcna2, kcna22, kcna25, kcna30, kcna32, kcna4, kcna5, kcna6, kcna7, kcna9, kpna3, kpps1, kpps2, krag, kras1p, kras2, krev1, krg2, krn1, krn11, krox20, krt1, krt10, krt12, krt13, krt14, krt15, krt16, krt17, krt18, krt19, krt2a, krt2e, krt3, krt4, krt5, krt6a, krt6b, krt7, krt8, krt9, krtha2, krtha5, krthb1, krthb6, ks, ktn1, ku70, kup, kvlqt1, kwe, 11.2, 11 cam, 123mrp, lab7, lab72, lac, laci, lacs, lad, lad, lad1, laf4, lag3, lag5, lair1, lak1, lalba, lal1, lam1, lama1, lama2, lama3, lama3, lama4, lama5, lamb1, lamb2, lamb2, lamb2t, lamb3, lambr, lamc1, lamc2, lamm, lamnb2, lamp, lamp1, lamp2, lamr1, lams, lap, lap18, laptm5, lar, lar1, lard, large, lars, lbp, lbr, lca, lca1, lcad, lcomb, lcat, lccs, lcfs2, lch, lck, lcn1, lcn2, lco, lcp1, lcp2, lct, ld, ld78, ldb1, ldb2, ldc, ldh1, ldh3, ldha, ldhb, ldhc, ldlr, le, lect2, lef1, lefty1, lefty2, lep, lepr, lerk5, lerk8, leu1, leu7, leut, lfa1a, lfa3, lfh11, lfp, lgals1, lgals3, lgals3bp, lgals7, lgr, lgmd1, lgmd1a, lgmd1b, lgmd1c, lgmd1d, lgmd2b, lgmd2c, lgmd2d, lgmd2e, lgmd2f, lgmd2g, lgmd2h, lgs, lgtm, lhb, lhcg, lhs, lhx1, lhx3, li, li2, lif, lifr, lig1, lig3, lig4, lim1, lim2, limab1, limk1, limpii, lip2, lipa, lipb, lipc, lipd, lipe, lipo, lis1, lis2, liss, litaf, lkb1, lkn1, llg11, lman1, lmn1, lmn2, lmna, lmn1b, lmn2b, lmo1, lmo2, lmo3, lmo4, lmo5, lmp10, lmp2, lmp7, lmpx, lms, lmx1, lmx1a, lmx1b, lmyc, lnhr, lnrh, locr, loh1, lcr2a, lor, lot1, lox, lox1, lox11, lpa, lpaab, lpaata, lpap, lpc1, lpc2d, lpd1, lph, lpi, lp1, lpna3, lpp, lps, lpsa, lqt1, lqt2, lqt3, lqt4, lr3, lrel, lre2, lrp, lrp1, lrp2, lrp5, lrp7, lrp8, lrpap1, lrpr1, lrs1, lsamp, lsirf, ls1, lsn, lsp1, lss, lst1, lta, lta4h, ltb, ltb4r, ltbp1, ltbp2, ltbp3, ltbp3, ltbp, ltc4s, ltf, ltk, ltn, lu, lum, luxs, luzp, lw, ly6a, ly6e, ly9, lyam1, lyb2, lyf1, ly11, lyn, lyp, lyst, lyt10, lyz, lztr1, m11s1, m130, m17s1, m17s2, m195, m1s1, m3s1, m4s1, m6a, m6b, m6p2, m6pr, m6s1, m7v1, m7vs1, mab211, mac1a, mac2, mac25, macam1, macs, mad, mad211, madd, madh1, madh2, madh3, madh4, madh5, madh6, madh6, madh7, madh9, madm, madr1, maf, mafd1, mafd2, mag, mage1, mageb3, mageb4, mage11, magoh, magp, magp1, magp2, mak, ma1, ma11, man2a2, mana1, mana2, mana2x, manb, manb1, manba, maoa, maob, map1a, map1a1c3, map1b, map1b1c3, map2, map4, map80, map97, mapk1, mapkap3, mapkkk4, mapt, mar, mark3, mars, mas1, masp1, matla, mat2a, mata1, mata2, matk, matn1, matn3, max, maz, mb, mbd1, mb1, mb12, mbp, mbp1, mbs, mbs2, mc1r, mc2r, mc3r, mc4r, mc5r, mcad, mcc, mcdc1, mcd1, mcf2, mcf3, mcf1, mch2, mch3, mch4, mch5, mckd, mc1, mc11, mcm, mcm2, mcm2, mcm3, mcm6, mcm7, mcmt, mcp, mcor, mcp, mcp1, mcp3, mcp1, mcr, mcs, mcsf, mcsp, mct1, md1, mdb, mdc, mdc1, mddc, mdeg, mdf1, mdg, mdg1, mdh1, mdh2, mdk, mdk, mdm2, mdm4, mdr1, mdr3, mdrs1, mdrv, mds, mds1, mdu1, mdu2, mdu3, mdx, me1, me2, mea, mea6, mec11, mec2, med, mef, mef2a, mef2b, mef2c, mef2d, mefv, mehmo, meis1, meis2, mekk, mekk1, mekk4, me1, me118, melf, memo1, men1, men2a, meox1, meox2, mep1a, mep1b, mer2, mer6, mest, met, metrs, mfap1, mfap2, mfap3, mfap4, mfd1, mfi2, mfs1, mfs2, mft, mfts, mg50, mga, mga1, mga3, mgat1, mgat2, mgat5, mgc1, mgcn, mgcr, mgct, mgdf, mgea, mgf, mgi, mgmt, mgp, mgsa, mgst1, mgst2, mhc, mhc2ta, mhp2, mhs, mhs2, mhs3, mhs4, mhs6, mia, mic10, mic11, mic12, mic17, mic18, mic2, mic2x, mic2y, mic3, mic7, mica, micb, mid1, midas, mif, mif, mig, mip, mip2a, mip2b, mip3b, mipep, mitf, miwc, mjd, mk, mki67, mkks, mkp2, mkp3, mkpx, mks, mks, mks1, mks2, mla1, mlck, mlf1, mlf2, mlh1, mlk1, mlk3, ml1, ml12, ml111, ml1t2, ml1t3, ml1t4, ml1t6, ml1t7, mlim, mlim, mln, mlp, mlr, mlrg, mlrw, mls, mltn, mlvar,

mlvi2, mlvt, mmac1, mme, mmp1, mmp10, mmp11, mmp12, mmp13, mmp14, mmp15, mmp16, mmp17, mmp19,
 mmp2, mmp21, mmp22, mmp3, mmp7, mmp8, mmp9, mn, mn, mnb, mnbh, mnda, mng1, mnk, mns, mnt, mocod,
 mocs1, mocs2, mody1, mody3, mog, mok2, mom1, mos, mot2, mov34, mox1, mox2, mox44, moz, mp19, mpb1,
 5 mpd1, mpdz, mpe, mpe16, mpg, mpi, mpif2, mp1, mp11g, mpo, mpp1, mpp2, mpp3, mppb, mpri, mprn, mps2,
 mps3a, mps3c, mps4a, mpsh, mpts, mpv17, mpz, mr1, mr77, mrbc, mrc1, mre11, mre11a, mrg1, mrgb, mros, mrp,
 mrp, mrp1, mrp123, mrs, mrsd, mrsr, mrst, mrx1, mrx14, mrx2, mrx20, mrx21, mrx23, mrx29, mrx41, mrx48, mrx49,
 mrx9, mrxa, mrxs1, mrxs2, mrxs3, mrxs4, mrxs5, mrxs6, mrxs8, ms3315, ms336, msg1, msh2, msh3, msh4, msh6,
 msi1, msk16, msk39, msk41, mslr1, msmb, msn, msr1, mss1, mss4, mss4, msse, mst, mst1, mstlr, mstd, mstn,
 10 msud1, msx1, msx2, msla, mtlb, mtle, mtlf, mtlg, mtih, mt1i, mt1j, mt1k, mt1l, mt1x, mt2, mt2a, mt3, mtacr1, mtap,
 mtbt1, mtcp1, mterf, mtf1, mth1, mthfc, mthfd, mthfr, mtk1, mtm1, mtmr1, mtmx, mtnrla, mtnr1b, mtp, mtpa, mtr,
 mtrns, mtrr, mts, mts1, mts2, mttf1, mtz, mtzn, mu, muc1, muc2, muc3, muc4, muc5, muc5ac, muc5b,
 muc6, muc8, mu1, mum1, mupp1, musk, mut, mvk, mvlk, mvwf, mwfe, mx, mx1, mx2, mxi1, mxs1, myb, myb11,
 myb12, mybpc1, mybpc2, mybpc3, mybpcf, mybph, myc, myc11, myc12, myclk1, mycn, myd88, myf3, myf4, myf5,
 15 myf6, myh1, myh10, myh11, myh12, myh2, myh3, myh4, myh6, myh7, myh8, myh9, myk1, my1, my11, my12, myl3,
 my14, my15, mylk, mymy, myo10, myo15, myo1a, myo1c, myo1d, myole, myo5a, myo6, myo7a, myo9b, myoc,
 myod1, myog, myp1, myp2, myp3, myr5, mzf1, n33, nab1, nab2, nabc1, nac1a, naca, nacaе, nacc, nadmr, naga,
 nagc@, naglu, nagr1, naip, namsd, nanta3, nap114, nap2, nap21, napb, naptb, nars, nat1, nat1, nat2, nb, nb4s, nbat,
 nbc3, nbccs, nbccs, nbia1, nbs, nbs, nbs1, nca, ncad, ncam1, ncan, ncbp, ncc1, ncc2, ncc3, ncc4, ncc2, ncf1 , ncf2,
 20 ncf4, ncf1, ncost2, ncx1, ncx2, nd, ndhii, ndn, ndp, ndst1, ndufa1, ndufa2, ndufa5, ndufa7, ndufb8, ndufb9,
 ndufs1, ndufs2, ndufs4, ndufs7, ndufs8, ndufv1, ndufv2, ndufv3, neb, nec1, nec2, nedd1, nedd2, nedd4, nefh, nef1 ,
 negf1 , negf2, ne111, neb112, nem1, neo1, nep, net, net1, neu, neu, neud4, neurod, neurod2, neurod3, nf1, nfla, nf2,
 nfatc1, nfatc2, nfatp, nfe1, nfe2, nfe211, nfe212, nfe2u, nfia, nfib, nfic, nfix, nfkb1, nfkb2, nfkb3, nfkbia, nfkb11, nfrkb,
 nfy, nfyb, nga1, ngbe, ngfb, ngfg, ngfc, ngfr, ng1, ngn, nhbp, nhcp1, nhcp2, nhe1, nhe3, nhe4, nhe5, nh1h1, nhlh2,
 25 nhp211, nhs, nid, niddm1, ninj1, nippl, nipsnap1, nipsnap2, nis, nklr, nkcc1, nkcc2, nkg2, nkg2a, nkg2c, nkg2e, nkg2f,
 nkhc, nkna, nkna, nknb, nkrpla, nks1, nksf2, nktr, nkx2a, nkx3.2, nkx3a, nkx6a, nli, nm, nm1, nm23, nmb, nmb,
 nmdar1, nmdar2a, nmdar2b, nmdar2c, nmdar2d, nmdara1, nme1, nme2, nme4, nmor1, nmor2, mus1, nmyc, nnat,
 nmnt, nno1, nog, noll, nos1, nos2a, nos2b, nos2c, nos3, not, notch1, notch2, notch3, notch4, nov, nov, nov2, nova1,
 nova3, novp, np, np10, npat, npc, npc1, npd, nph1, nph2, nphl2, nphn, nphp1, nphp2, nphs1, npm1, nppa, nppb,
 30 nppc, npps, npr1, npr2, npr3, nps1, npt1, npt2, nptx2, npy, npy1r, npy2r, npy3r, npy5r, npy6r, nqo2, nramp, nramp1,
 nramp2, nrap, nras, nrb54, nrcam, nrd1, nrf1, nrf1, nrf2, nrgn, nrip1, nrk2, nr1, nrtn, nru, ns1, nsf, nsp, nsp11, nsrd9,
 nt4, nt5, nt5, ntcp1, ntcp2, ntf3, ntf4, ntf5, nth11, ntn, ntn, ntn21, ntrk1, ntrk2, ntrk3, ntrk4, ntrkr1, ntrkr3, nts, ntt, ntt,
 nuc1, nucb1, numa1, nup214, nup98, nurr1, nv1, nys1, nys2, nysa, oa1, oa2, oa3, oar, oasd, oat, oat11, oat22,
 oat23, oadp, oaz, ob, ob10, obf1, obp, obr, oca2, ocm, ocp2, ocr1, ocr11, oct, oct1, oct1, oct2, oct3, oct7, octn2,
 35 octs3, odc1, odod, odf1, odg1, odod, ofc1, ofc2, ofc3, ofd1, ofe og22, ogdh, ogg1, ogr1, ogs1, ogs2, ohds, ohs, oias,
 oip1, ok, olf1, olf1f, olfr1, olfr2, omg, omgp, omp, on, op2, opa1, opa2, opa3, opca3, opcm1, opd1, opg1, ophn1,
 op11, opn, oppg, oprd1, oprk1, oprm1, oprt, opta2, optb1, oqt1, orld2, orlf1, orc11, orc21, orc41, orc51, orfx, orm1,
 orm2, orw, osbp, osm, osp, ost, ost48, osx, otc, oft1, oft2, oft3, otm, otot, ots, otx1, otx2, ovc, ovcs, ovo11, ox40,
 oxa11, oxct, oxt, oxt, ozf, p, p, p1, p15, p16, p167, p28, p2rx3, p2rx4, p2ryl, p2ry2, p2ry4, p2ry7, p2u,
 40 p2x3,p2x4,p2y1,p2y2,p2y2,p2y4,p3p40phox,p450c11,p450c17,p450c2a, p450c2d, p450c2e, p450scc, p4ha, p4hal,
 p4ha1, p4hb, p5cdh, p79r, pa2g4, pab1, pab2, pabp2, pabp11, pac1, pac1, pacapr, pace, pace4, paep, paf1, paf2,
 pafah, pafah1b1, pafahlb2, pafahlb3, paga, pah, pahx, pail, pai2, paics, pak1, pak3, palb, pals, pam, pang, pap,
 papa, papa2, pappa, par1, par1, par2, par3, par4, par4, par5, park1, park2, park3, pawr, pax1, pax2, pax3, pax4,
 pax5, pax6, pax7, pax8, pax9, pbca, pbca, pbfe, pbg pbt, pbx1, pbx2, pbx3, pc, pc1, pc2, pc3, pc3, pca1, pcad,
 45 pcap, pcarl, pcbc, pcbd, pcbp1, pcbp2, pcca, pccb, pcdh7, pcdx, pchc, pchc1, pci, pck1, pc1, pc1p, pcm1, pcm1,
 pcm1, pcna, pcnt, pcolce, pcp, pcp4, pcs, pcsk1, pcsk2, pcsk3, pcsk4, pcsk5, pcsk6, pctk1, pctk3, pcy11, pdb, pdb2,
 pdc, pdc, pdc1, pdc2, pddr, pde1a, pde1b, pdelb1, pde3b, pde4a, pde4b, pde4c, pde4d, pde5a, pde6a, pde6b,
 pde6c, pde6d, pde6g, pde6h, pde7a, pdea, pdea2, pdeb pdeb, pdeg, pdeslb, pdgb, pdgfa, pdgfb, pdgfr, pdgfra,
 pdgfrb, pdha1, pdha2, pdhb, pdj, pdk4, pdnp1, pdnp2, pdnp3, pdr, pds, pds1, pdx1, pdyn, pe1, pea15, pebp2a1,
 50 pebp2a3, pecam1, ped, ped, pedf, pee, peg1, peg3, pemp, penk, pent, peo, peo1, peo2, pepa, pepb, pepc, pepd,
 pepe, pepn, peps, per, per2, peta3, pets1, pex1, pex5, pex6, pex7, pf4, pf4v1, pfas, pfbi, pfc, pfd, pfhb1, pfic1, pfic2,
 pfkfb1, pfkfb2, pfk1, pfk-mn, pfkp, pfx, pf1, pfm, pfn1, pfn2, pfrx, pga3, pga4, pga5, pgam1, pgam2, pgamm, pgc,
 pgd, pgf, pgft, pgk1, pgk2, pgka, pg1, pgl1, pgl2, pgm1, pgm2, pgm3, pgm5, pgn, pgg, pgg1, pgr, pgs, pgt, pgy1,
 pgy3, pha1, pha2, pha2a, pha2b, phap1, phb, phc, phela, phe3, phex, phf1, phhi, phhi, phk, phka1, phka2, phkb,
 phkd, phkg1, phkg2, ph1, phl11, phog, phox1, phox2a, php, phplb, phpx, phyh, pi, pi10, pi3, pi4, pi5, pi6, pi7, pi8, pi9,
 55 piga, pigc, pigf, pigh, pigr, pik3c2b, pik3ca, pik3r1, pik4cb, pi1, pim1, pin, pin1, pin11, pip, pip5klb, pir1, pir51, pit, pit1,
 pitpn, pitx1, pitx2, pitx3, pjs, pk1, pk120, pk3, pk428, pkca, pkcb, pkcc, pkcg, pkcs1, pkd1, pkd2, pkd4, pkdts, pkhd1,
 pklr, pkm2, pkp1, pks1, pks1, pks2, pku1, p1, pla2, pla2a, pla2b, pla2glb, pla2g2a, pla2g4, pla2g4a, pla2g5, pla21,
 pla21, plag1, plag11, planh1, planh2, planh3, plat, plau, plaur, plb, plc, plc1, plcb3, plcb4, plcd1, plce, plcg1, plcg2,
 60 plc1, pld1, plec1, plg, plgf, plg1, pli, pln, plod, plod2, plos1, plp, pls, pls1, plt1, pltn, pltp, plzf, pmca1, pmca2, pmca3,
 pmca4, pmch, pmch11, pmch12, pmd, pme117, pmi1, pm1, pmm1, pmm2, pmp2, pmp22, pmp35, pmp69, pmp70,
 pms1, pms2, pms11, pms12, pmx1, pn1, pnd, pnem, pnkd, pnlip, pnmt, pnoc, pod1, podx1, pof, pof1, po12rb, pola,
 polb, pold1, pold2, pole, polg, polr2a, polr2c, polr2e, polr2g, polr2i, polrmt, polz, pomc, pon, pon1, pon2, pon3, por,
 porc, potx, pou1f1, pou2af1, pou3f1, pou3f2, pou3f3, pou3f4, pou4f1, pou4f3, pou5f1, pp, ppl4, pp2, pp4, pp5, ppac,
 ppard, pparg, pparg1, pparg2, ppat, pppb, ppcd, pppd, ppef1, ppef2, ppfia3, ppgb, pph, pph1, ppia, ppid, ppil1, pppb,
 65 ppsk1, ppsk2, pp1, ppla2, ppmx, ppnd, pppoc, ppo1, ppox, ppp1a, ppp1ca, ppp1cb, ppp1cc, ppp1r2, ppp1r5, ppp1r7,

ES 2 733 211 T3

pppdlr8, ppp2b, ppp2ca, ppp2cb, ppp2rlb, ppp2r4, ppp2r5a, ppp2r5b, ppp2r5c, ppp2r5d, ppp2r5e, ppp3ca, ppp3cb,
 ppp3cc, pp3r1, ppp4c, ppp5c, ppt, ppt2, ppx, ppy, ppyr1, pr@, prad1, prb1, prb2, prb3, prb4, prca1, prca2, prcc, prcp,
 prelp, prep, prf1, prg, prg1, prgs, prh1, prh2, prim1, prim2a, prim2b, prip, prk1, prkaa1, prkaa2, prkab1, prkaca,
 prkacb, prkacg, prkag1, prkag2, prkar1a, prkar1b, prkar2b, prkca, prkcb1, prkcd, prkcg, prkci, prkcl1, prkcnh1, prkqc,
 5 prkcs, prkdc, prkg1, prkg1b, prkg2, prkgrlb, prkgr2, prkm1, prkm3, prkm4, prkm9, prkn, prkr, prkx, prky, pr1, prlr,
 prm1, prm2, prmt2, prnp, proa, proc, prodh, prohb, prop1, pros1, pros30, prox1, prp8, prph, prps1, prps2, pipsap1,
 prr1, prr2, prs, prsc1, prss1, prssl1, prss2, prss7, prss8, prss11, prtn3, prts, psa, psa, psach, psap, psbg1, psbg2,
 psc2, psc5, psca, psd, psen1, psen2, psf1, psf2, psg1, psg11, psg12, psg13, psg2, psg3, psg4, psg5, psg6, psg7,
 10 psg8, psg11, pskh1, psm, psma1, psma2, psma3, psma5, psmb1, psmb10, psmb2, psmb3, psmb4, psmb5, psmb8,
 psmb9, psmc1, psmc2, psmc3, psmc5, psmd7, psmd9, psme1, psme2, psors1, psors2, psors3, psp, psp1, psp2,
 pss1, psst, pst, pst1, psti, ptafr, ptc, ptc, ptc, ptch, ptd, pten, ptgds, ptger1, ptger2, ptger3, ptgfr, ptgfr, ptgir,
 ptgs1, ptgs2, pth, pthlh, pthr, pthr1, pthr2, ptk1, ptk2, ptk2b, ptk3, ptk7, ptlah, ptma, ptms, ptn, ptos1, ptp18, ptp1b,
 ptp4a1, ptp4a2, ptpa, ptpa, ptpd, ptpg, ptpg1, ptpgmc1, ptpn1, ptpn10, ptpn11, ptpn12, ptpn13, ptpn14, ptpn2, ptpn5,
 15 ptpn6, ptpn7, ptpra, ptprb, ptprc, ptprcap, ptprd, ptpre, ptprf, ptprg, ptprr, ptpri, ptpri, ptpri1, ptpri2, ptpri, ptpri,
 ptpro, ptpri, ptpri1, ptpri2, ptpri, ptpri, ptpri, ptpri, ptpri, ptpri, ptpri, ptpri, ptpri, ptpri, ptpri, ptpri, ptpri,
 pvt1, pwcr, pwp2, pwp2h, pws, pxa1, pxe, pxe1, pxf, pxmp1, pxmp11, pxmp3, pxx1, pycr1, pycs, pygb, pyg1,
 pygm, pyk2, pyst1, pyst2, pzp, qars, qdpr, qin, qm, qpc, qprs, rab, rab1, rab13, rab1a, rab21, rab3a, rab3b, rab4,
 20 rab5, rab5a, rab6, rab7, rabgdl, rabgdib, rabggta, rabggtb, rabif, rac2, rac3, rad1, rad17, rad23a, rad23b, rad51a,
 rad51c, rad51d, rad5311, rad52, rad54, rad6a, rad6b, raf, rafa1, rag1, rag2, rage, rala, ralb, ralgs, ramp, ranbp211,
 ranbp3, rao, rap1a, rap1b, rap1ga1, rap1gds1, rap2a, rap74, rapsn, rara, rarb, rarg, rars, rasan1, rasan2, rasgr3, rask2,
 rb1, rbbp2, rbbp5, rbbp6, rb11, rb12, rbm1, rbm2, rbm3, rbmy1a1, rbp1, rbp2, rbp3, rbp4, rbp5, rbp56, rbp6, rbq3,
 rbtn1, rbtn11, rbtn12, rca1, rcac@, rcc1, rccp1, rccp2, rcd1, rcd2, rcdp1, rcn1, rcn2, rcp, rcv1, rd, rdbp, rdc7, rdp,
 rdpa, rdrc, rds, rdt, rdx, reca, recc1, recq1, red1, red2, reg, reg1a, reg1, re1, rela, rein, ren, renbp, rens1, rent1, rep8,
 25 req, ret, rev3, rev31, rfc1, rfc2, rfc3, rfc4, rfc5, rfp, rfx1, rfx2, rfx5, rfxank, rfxap, rgc1, rgr, rgs, rgs1, rgs14, rgs16, rgs2,
 rgs2, rgs3, rgs5, rh50a, rhag, rhbd1, rhc, rhce, rhd, rheb2, rho, rho7, rhogap2, rhogap3, rhoh12, rhoh6, rhoh9, rhok,
 rhom1, rhom2, rhom3, rieg1, rieg2, rige, rigui, ring1, ring10, ring11, ring12, ring3, ring31, ring4, ring5, ring6, ring7, rip,
 rip140, riz, rk, r1, rlb1, rif, rln1, rln2, rmch1, rmd1, rmrp, rmrpr, m5s1@, rnase1, rnase2, rnase3, rnase4, rnase5,
 rnase6, rnase1, maseli, rne1, rnf1, rnf3, rnf4, rnf5, rnh, rnpep, mpulz, rnr1, rnr2, rnr3, rnr4, rnr5, rns1, rns2, rns3,
 30 rns4, rns4, rns4i, rntmi, rnu1, rnu15a, rnu17a, rnu17b, rnula, rnu2, rnu3, ro52, rom1, romk1, ron, ror1, rora, rorb, rorc,
 rorg, ros1, rosp1, rox, rp1, rp10, rp105, rp11, rp12, rp13, rp14, rp15, rp17, rp18, rp19, rp2, rp22, rp24, rp25, rp3, rp4,
 rp6, rp7, rp9, rpa1, rpa2, rpa3, rpd311, rpe, rpe65, rpe119rp122, rp123a, rp1231, rp129, rp130, rp135a, rp136a,
 rp17a, rpms12, rpn1, rpn2, rpo12, rps11, rps14, rps17, rps17a, rps17b, rps1711, rps1712, rps18, rps20a, rps20b,
 rps24, rps25, rps3, rps4x, rps4y, rps6, rps6ka1, rps6ka2, rps6ka3, rps8, rpsm12, rptpm, rpu1, rpx, rrad, rras, rrbp1,
 35 rreb1, rrm1, rrm2, rrp, rrp22, rs1, rs1, rsc1a1, rsk1, rsk2, rsk3, rsn, rss, rsts, rsu1, rt6, rtef1, rtkn, rtn1, rtn2, rts, rts, rtt,
 rws, rxra, rxrb, rxrg, ryr1, ryr2, ryr3, rzrb, rzrg, s100a1, s100a10, s100a11, s100a12, s100a13, s100a2, s100a3,
 s100a4, s100a5, s100a6, s100a7,s100a8, s100a9,s100b,s100d,s100e,s100,s100p,s152,s4,s7,saa1, saa2, saa4,
 sacs, safb, sag, sah, sahh, sail, sakap84, sal11, sal12, sams1, sams2, sap, sap1, sap1, sap2, sap62, sar, sar1, sar2,
 40 sard, sas, sat, satb1, satt, sbma, sc, sc1, sc5dl, sca1, sca10, sca2, sca2, sca3, sca4, sca5, sca6, sca7, sca8, sca8,
 scar, scca1, scca2, sccd, scd, sceh, scg1, scg2, scg3, schad, scida, scidx, scidx1, sc1, sclc1, scl1, scn, scn1a,
 scn1b, scn2a, scn2a1, scn2a2, scn2b, scn3a, scn4a, scn5a, scn6a, scn8a, scn11a, scn11b, scn11d, scn11g, scot,
 scp, scp1, scp2, scpn, scra1, scra1, scs, sctr, scya1, scya11, scya14, scya15, scya16, scya19, scya21, scya22,
 45 scya24, scya25,scya3,scya311,scya4,scya5,scya7,scya8,scyb5,scyb6,scyd1,sczd1, sczd2, sczd3,
 sczd4, sczd5, sczd6, sczd7, sczd8, sdc1, sdc2, sdc4, sdf1, sdf2, sdh1, sdh2, sdha, sdhb, sdhc, sdhd, sdhf, sds22,
 sdty3, sdys, se, sea, sec1311, sec13r, sec141, sec7, sed1, sedt, sef2, sel1, sele, sell, selp, selp1g, sema3f, sema4,
 sema5, semg, semg1, semg2, sen1, sep, sepp1, serca1, serca3, serk1, ses1, set, sex, sf, sf1, sfa1, sfd, sfmd, sfrs1,
 sfrs2, sfrs7, sftb3, sftp1, sftp2, sftp4, sftpa1, sftpa2, sftpb, sftpc, sftpd, sgb, sgca, sgcb, sgcd, sgcg, sgd, sgk,
 50 sgl1, sgl1, sgm1, sgne1, sgp2, sgpa, sgsh, sh2dla, sh3bp2, sh3dla, sh3gbr, sh3p17, shb, shbg, shc1, shc11, shfd1, shfd2,
 shfm1, shfm2, shfm3, shh, ship, shmt1, shmt2, shoc2, shot, shox, shox2, shps1, shs, shsf1, si, siah1, siah2, siasd,
 siat1, siat4, siat4c, siat8, sids, si1, silv, sim1, sim2, sipa1, sis, siv, six1, six5, sja, sjs, ski, ski2, ski2w, skiv21, skp1a,
 55 skp1b, skp2, sla, slap, slbp, slc, slc10a1, slc10a2, slc12a1, slc12a2, slc12a3, slc14a1, slc14a2, slc15a1, slc16a1,
 slc16a2, slc17a1, slc17a2, slc18a1, slc18a2, slc18a3, slc19a1, slc1a1, slcla2, slc1a3, slc1a4, slc1a5, slc20a1,
 slc20a2, slc20a3, slc21a2, slc21a3, slc22a1, slc22a2, slc22a5, slc2a1, slc2a2, slc2a3, slc2a4, slc2a5, slc2c, slc3a1,
 slc4a1, slc4a2, slc4a6, slc5a1, slc5a2, slc5a3, slc5a5, slc6a1, slc6a10, slc6a12, slc6a2, slc6a3, slc6a4, slc6a6,
 slc6a8, slc6a9, slc7a1, slc7a2, slc7a4, slc7a5, slc7a7, slc8a1, slc8a2, slc9a1, slc9a2, slc9a3, slc9a4, slc9a5, sld,
 60 sle1, sleb1, slim1, sln, slo, slos, slp76, s1s, slug, sm1, sm22, sma4, smad1, smad1, smad2, smad3, smad4, smad5,
 smad6, smad7, smad9, sma1, smam1, smarca1, smarca2, smarca3, smarca5, smarcb1, smax2, smc1, smcc, smcr,
 smcx, smcy, sml1, smn, smn1, smn2, smnr, smo, smoh, smpd1, sms, smt3, smt3h1, smtn, smubp2, sn, snap25,
 snat, snca, sncb, sncg, snf2h, snf211, snf212, snf213, snf5, sn1, snn, snrp70, snrpa, snrpe, snrpn, snt1, snt2b1,
 65 snt2b2, sntb1, snt1, snx, soat, sod1, sod2, sod3, solh, son, sord, sor11, sos1, sos2, sox1, sox10, sox11, sox2, sox20,
 sox22, sox3, sox4, sox9, sp1, sp1, sp3, sp3, sp4, spa1, spag1, spag4, spam1, sparc, spat, spbp, spch1, spd, spf30,
 spg3a, spg4, spg5a, spg6, spg7, spg8, spg9, spgp, spgyla, sph2, spi1, spink1, spk, spmd, spn, spp1, spp2, sppm,
 spr, sprk, spr1a, sprr1b, sprr2a, sprr2c, sprr3, sps1, spsma, spta1, sptan1, sptb, sptbn1, sra1, sra2, src, src1,
 src1, src2, srd5a1, srd5a2, sreb1, sreb12, sri, srk, srm, srm1, srp14, srp19, srp46, srpr, srpx, srs, srvx, sry, ss, ss,
 ssa, ssa1, ssa2, ssadh, ssav1, ssbp, ssdd, ssr2, ssrc, sst, sstr1, sstr2, sstr3, sstr4, sstr5, ssx1, ssxt, st2, st3, st4, st5,
 70 st6, st8, sta, stac, stam, star, stat, stat1, stat3, stat4, stat5, ssx1, stc1, stch, std, std, ste, step, stf1, stfa, stfb, stgd1,

cheZ, chpA, chpB, chpR, chpS, cirA, citA, citB, cld, cipA, clpB, clpP, clpX, cls, cmk, cmlA, cmr, cmtA, cmtB, coaA, cobS, cobT, cobU, codA, codB, cof, cog?, corA, cpdA, cpdB, cpsA, cpsB, cpsC, cpsD, cpsE, cpsF, cpsG, cpxA, cpxB, cpxP, cpxR, crcA, crcB, creA, creB, creC, creD, crg, cri, crp, crr, csdA, csgA, csgB, csgD, csgE, csgF, csgG, csiA, csiB, csiC, csiD, csiE, csiF, cspA, cspB, cspC, cspD, cspE, cspG, csrA, csrB, cstA, cstC, cup, cutA, cutC, cutE, cutF, cvaA(CoIV), cvaB(CoIV), cvaC(Co-IV), cvi(CoIV), cvpA, cxm, cyaA, cybB, cybC, cycA, cydA, cydB, cydC, cydD, cynR, cynS, cynT, cynX, cyoA, cyoB, cyoC, cyoD, cyoE, cysA, cysB, cysC, cysD, cysE, cysG, cysH, cysl, cysJ, cysK, cysM, cysN, cysP, cysQ, cysS, cysT, cysU, cysW, cysX?, cysZ?, cytR, dacA, dacB, dacC, dacD, dadA, dadB, dadQ, dadX, dam, dapA, dapB, dapD, dapE, dapF, dbpA, dcd, dcm, dcp, dcrB, dctA, dctB, dcuA, dcuB, dcuC, ddIA, ddIB, ddpA, ddpB, ddpC, ddpD, ddpF, ddpX, deaD, dedA, dedD, def, degP, degQ, degS, del, deoA, deoB, deoC, deoD, deoR, dfp, dgd, dgkA, dgkR, dgoA, dgoD, dgoK, dgoR, dgoT, dgsA, dgt, dicA, dicB, dicC, dicF, dinB, dinD, dinF, dinG, dinI, dinY, dipZ, djIA, dksA, dld, dmsA, dmsB, dmsC, dnaA, dnaB, dnaC, dnaE, dnaG, dnaI, dnaJ, dnaK, dnaL, dnaN, dnaQ, dnaT, dnaX, dppA, dppB, dppC, dppD, dppF, dppG, dps, dsbA, dsbB, dsbC, dsbG, dsdA, dsdC, dsdX, dsrA, dsrB, dut, dvl, dxs, ebgA, ebgB, ebgC, ebgR, ecfa, eco, ecpD, eda, edd, efp, enrA, emrB, emrD, emrE, endA, eno, entA, entB, entC, entD, entE, entF, envN, envP, envQ, envR, envT, envY, envZ, epd, EppA, minigene, EppB, minigene, EppC, minigene, EppD, minigene, EppE, minigene, EppG, minigene, EppH, minigene, era, esp, evgA, evgS, exbB, exbC, exbD, expA, exuR, exuT, fabA, fabB, fabD, fabF, fabG, fabH, fabI, fabZ, fadA, fadB, fadD, fadE, fadH, fadL, fadR, farR, fatA, fbaA, fbaB, fbp, fcl, fcsA, fdhD, fdhE, fdhF, fdnG, fdnH, fdnI, fdoG, fdoH, fdol, fdrA, fdx, feaB, feaR, fecA, fecB, fecC, fecD, fecE, fecL, fecR, feoA, feoB, fepA, fepB, fepC, fepD, fepE, fepG, fes, fexB, fff, ffs, fhIA, fhIB, fhuA, fhuB, fhuD, fhuE, fhuF, fic, fimA, fimB, fimC, fimD, fimE, fimF, fimG, fimH, fimI, fipB, fis, fiu, fixA, fixB, fixC, fixX, flkA, flkP, fldA, flgA, flgB, flgC, flgD, flgE, flgF, flgG, flgH, flgI, flgJ, flgK, flgL, flgM, flgN, flhA, flhB, flhc, flhD, fliA, fliC, fliD, fliE, fliF, fliG, fliH, fliI, fliJ, fliK, fliL, fliM, fliN, fliO, flip, fliQ, fliR, fliS, fliT, fliY, fliZ, flk, flu, fmt, fnr, focA, focB, folA, folC, folD, folE, folK, folP, folX, fpr, frdA, frdB, frdC, frdD, frr, fruA, fruB, fruK, fruR, fsr, ftn, ftsA, ftsE, ftsI, ftsJ, ftsK, ftsL, ftsN, ftsQ, ftsW, ftsX, ftsY, ftsZ, fucA, fuel, fucK, fucO, fucP, fucR, fumA, fumB, fumC, fur, fusA, fusB, gabC, gabD, gabP, gabT, gadA, gadB, gadR, galE, galF, galK, galM, galP, galR, galS, galT, galU, gapA, gapC, garA, garB, gatA, gatB, gatC, gatD, gatR, gatY, gatZ, gcd, gcl, gcpE, gcvA, gcvH, gcvP, gcvR, gcvT, gdhA, gef, ggt, gidA, gidB, gip, glcB, glcC, glcD, glcE, glcG, gldA, glf, glgA, glgB, glgC, glgP, glgS, glgX, glk, glmM, glmS, glmU, glmX, glnA, glnB, glnD, glnE, glnG, glnH, glnK, glhL, glnP, glnQ, glnR, glnS, glnT, glnU, glnV, glnW, glnX, gloA, glpA, glpB, glpC, glpD, gipE, gipF, gipG, glpK, glpQ, gipR, glpT, glpX, gltA, gltB, gltD, gltE, gltF, gltH, gltJ, gltK, gltL, gltM, gltP, gltR, gltS, gltT, gltU, gltv, gltW, gltX, glyA, glyQ, glyS, glyT, glyU, glyv, glyW, glyX, glyY, gmd, gmK, gmm, gnd, gntK, gntP, gntR, gntS, gntT, gntU, gntV, goaG, gor, gph, gpmA, gpp, gprA, gprB, gpsA, gpt, greA, greB, groL, groS, grpE, grxA, grxB, grxC, gshA, gshB, gsk, gsp, gsp*, gst, guaA, guaB, guaC, gurB, gurC, gutM, gutQ, gyrA, gyrB, hcaB, hcaC, hcaD, hcaE, hcaF, hcaR, hcaT, hdeA, hdeB, hdeD, hdhA, helD, hemaA, hemB, hemC, hemD, hemE, hemF, hemG, hemH, hemK, hemL, hemM, hemX, hemY, hepA, het, hflB, hflC, hflK, hflX, hflq, hha, hipA, hipB, hisA, hisB, hisC, hisD, hisF, hisG, hisH, hisI, hisJ, hisM, hisP, hisQ, hisR, hisS, hipA, hlyE, hmp, hns, hola, holB, holC, hold, holE, hopB, hopC, hopD, hpt, hrpA, hrpB, hrsA, hscA, hscB, hsdM, hsdR, hsdS, hslC, hslD?, hslE-H, hslJ, hslK, hslL-N, hslO-R, hslU, hslV, hslW, htaA, htpG, htpX, htrB, htrC, htrE, htrL, hupA, hupB, hyaA, hyaB, hyaC, hyaD, hyaE, hyaF, hybA, hybB, hybC, hybD, hybE, hybF, hybG, hycA, hycB, hycC, hycD, hycE, hycF, hycG, hycH, hycl, hydA, hydG, hydH, hydN, hyfA, hyfB, hyfC, hyfD, hyfE, hyfF, hyfG, hyfH, hyfI, hyfJ, hyfR, hypA, hypB, hypC, hypD, hypE, hypF, iadA, iap, ibpA, ibpB, icd, iclR, ihfA, ihfB, ileR, ileS, ileT, ileU, ileV, ileX, ileY, ilvA, ilvB, ilvC, ilvD, ilvE, ilvF, ilvG, ilvI, ilvJ, ilvM, ilvN, ilvR, ilvU, ilvY, imp, inaA, inaR?, infA, infB, infC, inm, insA(IS1), intA, isb(IS1), isfA, ispA, ispB, KanR, katE, katG, kba, kbl, kch, kdgK, kdgR, kdpA, kdpB, kdpC, kdpD, kdpE, kdpF, kdsA, kdsB, kdtA, kdtB, kefB, kefC, kgtp, ksgA, ksgB, ksgC, ksgD, lacA, lacI, lacY, lacZ, lamB, lar, ldcC, ldhA, lepA, lepB, leuA, leuB, leuC, leuD, leuJ, leuO, leuP, leuQ, leuR, leuS, leuT, leuU, leuV, leuW, leuX, leuY, leuZ, lev, lexA, lgt, lhr, ligA, ligT, linB, lipA, lipB, lit, livF, livG, livH, livJ, livK, livM, lldD, lldP, lldR, lolA, lon, lpcA, lpcB, lpd, lplA, lpp, lpxA, lpxB, lpxC, lpxD, lpxK, lrb, lrhA, lrp, lrs, lspA, lysA, lysC, lysP, lysQ, lysR, lysS, lysT, lysU, lysV, lysW, lysX, lysY, lysZ, lytA, lytB, lyx, maa, mac, mae, mafA, mafB, malE, malF, malG, mall, malK, malM, malP, malQ, malS, malT, malX, malY, malZ, manA, manC, manX, manY, manZ, map, marA, marB, marR, mbrB, mcrA, mcrB, mcrC, mcrD, mdaB, mdh, mdoB, mdoG, mdoH, meb, melA, melB, melR, menA, menB, menC, menD, menE, menF, mepA, mesJ, metA, metB, metC, metD, metE, metF, metG, metH, metJ, metK, metL, metR, metT, metU, metV, metW, metY, metZ, mfd, mglA, mglB, mglC, mglR, mgsA, mgtA, mhpA, mhpB, mhpC, mhpD, mhpE, mhpF, mhpR, miaA, miaD, micF, minC, minD, minE, mioC, mltA, mltB, mltC, mltD, mmrA(rhlB?), mng, mntA, moaA, moaB, moaC, moaD, moaE, mobA, mobB, moc, modA, modB, modC, modE, modF, moeA, moeB, mog, molR, motA, motB, mpl, mppA, mprA, mraA-?, mraY, mrcA, mrcB, mrdA, mrdB, mreB, mreC, mreD, mrr, msbA, msbB, mscl, msrA, msyB, mtg, mtgA, mtlA, mtlD, mtlR, mtr, mttA, mttB, mttC, mukB, mukE, mukF, mul, murA, murB, murC, murD, murE, murF, murG, murH, murl, mutG(putative), mutH, mutL, mutM, mutS, mutT, mutY, nac, nadA, nadB, nadC, nadE, nagA, nagB, nagC, nagD, nagE, nalB, nalD, nanA, nanE, nanK, nanR, nanT, napA, napB, napC, napD, napF, napG, napH, narG, narH, narI, narJ, narK, narL, narP, narQ, narU, narV, narW, narX, narY, narZ, ndh, ndk, neaB, nei, nema, nfi, nfnA, nfnB, nfo, nfrA, nfrB, nfrD, nfsA, nhaA, nhaB, nhaR, nika, nikB, nikC, nikD, nikE, nirB, nirC, nirD, nlpA, nlpB, nlpC, nlpD, nmpC(qsr), non, npr, nrdA, nrdB, nrdD, nrdE, nrdF, nrdG, nrfA, nrfB, nrfC, nrfD, nrfE, nrfF, nrfG, nth, ntpA, nuoA, nuoB, nuoC, nuoE, nuoF, nuoG, nuoH, nuol, nuoj, nuok, nuol, nuom, nuon, nupC, nupG, nusA, nusB, nusG, nuvA, nuvC, ogrK, ogt, ompA, ompC, ompF, ompG, ompR, ompT, ompX, oppA, oppB, oppC, oppD, oppE, oppF, opr, ops, oraA, ordL, orf-23(purB, regjorf195(nikA-reg)), orn, osmB, osmC, osmE, osmY, otsA, otsB, oxyR, oxyS, pabA, pabB, pabC, pac, pal, panB, panC, panD, panF, parC, parE, pat, pbpG, pck, pcm, pcnB, pdhR, pdxA, pdxB, pdxH, pdxJ, pdxK, pdxL, pdxY, pepA, pepD, pepE, pepN, pepP, pepQ, pepT, pfkA, pfkB, pflA, pflB, pflC, pflD, pfs, pgi, pgk, pgl, pgm, pgpA, pgpB, pgsA, pheA, pheP, pheS, pheT, pheU, pheV, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnH, phnI, phnJ,

phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, phoA, phoB, phoE, phoH, phoP, phoQ, phoR, phoU, phrB, phxB, pin, pioO, pit, pldA, pldB, plsB, plsC, plsX, pmbA, pncA, pncB, pnp, pntA, pntB, pnuC, poaR, polA, polB, popD, potA, potB, potC, potD, potE, potF, potG, potH, potI, poxA, poxB, ppa, ppc, pphA, pphB, ppiA, ppiB, ppiC, ppk, pppA, pps, ppx, pqiA, pqiB, pqqL, pqqM, prc, prfA, prfB, prfC, priA, priB, priC, prlC, prlZ, prmA, prmB, proA, proB, proC, proK, proL, proM, proP, proQ, proS, proT, proV, proW, proX, prpA, prpC, prpR, prr, prs, psd, psfF, pspA, pspB, pspC, pspE, pspF, pssA, pssR, pstA, pstB, pstC, pstS, psu, pta, pth, ptrA, ptrB, ptsG, ptsH, ptsI, ptsN"-", ptsP, purA, purB, purC, purD, purE, purF, purH, purK, purL, purM, purN, purP, purR, purT, purU, pus, putA, putP, pykA, pykF, pyrB, pyrC, pyrD, pyrE, pyrF, pyrG, pyrH, pyl, qmeC, qmeD, qmeE, qor, queA, racC, racR, radA, radC, ranA, rarD, ras, rbfA, rbn, rbsA, rbsB, rbsC, rbsD, rbsK, rbsR, rcsA, rcsB, rcsC, rcsF, rdgA, rdgB, recA, recB, recC, recD, recE, recF, recG, recJ, recN, recO, recQ, recR, recT, relA, relB, relE, relF, relX, rep, rer, rfaB, rfaC, rfaD, rfaF, rfaG, rfaH, rfaI, rfaJ, rfaL, rfaP, rfaQ, rfaS, rfaY, rfaZ, rfbA, rfbB, rfbC, rfbD, rfbX, rfc, rfe, rffA, rffC, rffD, rffE, rffG, rffH, rffM, rffT, rhaA, rhaB, rhaD, rhaR, rhaS, rhaT, rhIB, rhIE, rho, ribA, ribB, ribC, ribD, ribE, ribF, ridA, ridB, rimB, rimC, rimD, rimE, rimG, rimH, rimI, rimJ, rimK, rimL, rimM, rit, rlpA, rlpB, rluA, rluC, rluD, rmf, rna, rnb, rnc, rnd, rne, rnhA, rnhB, rnk, rnpA, rnpB, rnr, rnt, rob, rorB, rpe, rph, rpiA, rpiB, rpiR, rplA, rplB, rplC, rplD, rplE, rplF, rplI, rplJ, rplK, rplL, rplM, rplN, rplO, rplP, rplQ, rplR, rplS, rplT, rplU, rplV, rplW, rplX, rplY, rpmA, rpmB, rpmC, rpmD, rpmE, rpmF, rpmG, rpmH, rpml, rpmJ, rpoA, rpoB, rpoC, rpoD, rpoE, rpoH, rpoN, rpoS, rpoZ, rpsA, rpsB, rpsC, rpsD, rpsE, rpsF, rpsG, rpsH, rpsI, rpsJ, rpsK, rpsL, rpsM, rpsN, rpsO, rpsP, rpsQ, rpsR, rpsS, rpsT, rpsU, rrfA, rrfB, rrfC, rrfD, rrfE, rrfF, rrfG, rrfH, rrlA, rrlB, rrlC, rrlD, rrlE, rrlG, rrlH, rrmA, rrsA, rrsB, rrsC, rrsD, rrsE, rrsG, rrsH, rsd, rseA, rseB, rseC, rspA, rspB, rssa, rssB, rsuA, rtaA, rtcA, rtcB, rtcR, rtn, rus(qsr)", ruvA, ruvB, ruvC, sad, sanA, sapA, sapB, sapC, sapD, sapF, sbaA, sbcB, sbcC, sbcD, sbmA, sbmC(gyrl), sbp, sdaA, sdaB, sdaC, sdhA, sdhB, sdhC, sdhD, sdiA, sds, secA, secB, secD, secE, secF, secG, secY, selA, selB, selC, selD, semaA, seqA, serA, serB, serC, serR, serS, serT, serU, serV, serW, serX, sfa, sfcA, sfiC, sfsA, sfsB, shiA, sipC, sipD, sir, sixA, sloB, slp, slr, slt, slyD, slyX, smp, smtA, sodA, sodB, sodC, sohA, sohB, solA, soxR, soxS, speA, speB, speC, speD, speE, speF, speG, spf, spoT, sppA, spr, srlA, srlB, srlD, srlE, srlR, srmB, smA, ssaE, ssaG, ssaH, ssb, sseA, sseB, sspA, sspB, sssA, sssS, ssaY, ssaZ, stfZ, stkA, stkB, stkC, stkD, stpA, strC, strM, stsA, sucA, sucB, sucC, sucD, sufl, sugE, suhA, suhB, sulA, supQ, surA, surE, syd, tabC, tag, talA, talB, tanA, tanB, tap, tar, tas, tauA, tauB, tauC, tauD, tbaA, tdcA, tdcB, tdcC, tdcD, tdcE, tdcF, tdcG, tdcR, tdcS, tdi tdk, tehA, tehB, tesA, tesB, tgt, thdA, thdC, thdD, thiB?", thiC, thiD, thiE, thiF, thiG, thiH, thil, thij, thiK, thil, thiM, thrA, thrB, thrC, thrS, thrT, thrU, thrV, thrW, thyA, tig, tktA, tktB, tldD, tlnA, tmk, tnaA, tnaB, tnaC, tnm, tol-orf1, tol-orf2, tolA, tolB, tolC, tolD, tolE, toll, tolJ, tolM, tolQ, tolR, tonB, topA, topB, torA, torC, torD, torR, torS, torT, tpiA, tpr, tpx, treA, treB, treC, treF, treR, trg, trkA, trkD, trkG, trkH, trmA, trmB, trmC, trmD, trmE, trmF, trmH, trmU, trnA, trpA, trpB, trpC, trpD, trpE, trpR, trpS, trpT, truA, truB, trxA, trxB, trxC, tsaA, tsf, tsmA, tsr, tsx, ttdA, ttdB, ttk, tufA, tuffB, tus, tynA, tyrA, tyrB, tyrP, tyrR, tyrS, tyrT, tyrU, tyrV, ubiA, ubiB, ubiC, ubiD, ubiE, ubiF, ubiG, ubiH, ubiX, ucpA[], udk, udp, ugpA, ugpB, ugpC, ugpE, ugpQ, uhpA, uhpB, uhpC, uhpT, uids, uidA, uidB, uidR, umuC, umuD, ung, upp, uppS, ups, uraA, usg-1, usbA, uspA, uup, uvh, uvrA, uvrB, uvrC, uvrD, uvs, uxaA, uxaB, uxaC, uxuA, uxuB, uxuR, valS, valT, valU, valV, valW, valX, valY, valZ, vsr, wrbA, xapA, xapB, xapR, xasA, xerC, xerD, xni, xseA, xseB, xthA, xylA, xylB, xylE, xylF, xylG, xylH, xylR, ycca, yhhP, yihG, yjaB, fl47, yjaD, yohF, yqiE, yrfE, zipA, zntA, znuA, znuB, znuC, zur, y zwf.

Los ejemplos no limitantes de genes de ratón incluyen: Ilr1, Ilr2, Gas10, Tnp1, Inhbb, Inha, Creb1, Mpmv34, Acrd, Acrg , Il110, Otf1, Rab11b-r, Abl1, ald, Amh-rs1, Bcl2B , Cchla3, Ccnb1-rs2, Gpcr16, Htr5b, Idd5, Igfbp2, Igfbp5, I18rb, Kras2-rs1, Mov7, Mpmv6, Mpmv16, Mpmv22, Mpmv25, Mpmv29, Mpmv42, Mtv7, Mtv27, Mtv39, Oprk1, Otf3-rs1, Otf8, Otf1-rs1, Ptgs2, Ren1, Ren2 , Ril3, Sxv, Taz4-rs1, Tgfb2, Wnt6, Xmmv6 , Xmmv9, Xmmv36, Xmmv61, Xmmv74, Xmv21, Xmv32, Xmv41, I12ra, Ab1, Mpmv3, Rap1a-ps2, anx, Mpmv43, Ryr3, Ras12-4, Adra2b, Avp, Glvr1, Il1a, Il1b, Mpmv28, Oxt, Pcsk2, a, Xmv10, Tcf4, Acra, Acra4, Ak1, Bdnf, bs, Cyct, Cyp24, Dbh, Fshb, Gcg, Gdf5 , Gnas, Gpcr8, Grin1, Hcs4, Hior2, Hsp84-2, Idd12, Ilrn, Jund2, Kras3, Mc3r, Mpmv14, Mtv40, Mxi1-rs1, Otf3-rs2, Ptgs1, Ptpa, Rapsn, Src, Svp1, Svp3, Tcf3b, Wt1, Xmmv71, Xmv48, Ccna, Fgf2, Fth-rs1, Csfm , Mov10, Egf, Acrb2, Cap1, Crh, Fim3, Fps11, Glut2, Gpcr2, Gria2, Hsd3b-1, Hsd3b-2, Hsd3b-3, Hsd3b-4, Hsp86-ps2, Idd3, I12, I17, Mpmv9, Mpmv20, Mtv4.8, Ngfb, Npra, Nras, Nras, Ntrk, Otf3-rs3, Otf3-rs4, Rap1a, Tshb, Xmmv22, Xmmv65, Mos, Ras12-7, Lyr, lfa, lfb, Jun, azh, db, lpp, Mp1, Do1, Ak2, Ccnb1-rs4 , Cdc211, Cga, Fgr, Foc1, Fps12 , Gabrr1, Gabrr2, Gdf6, Glut1, Gnb1, Gpcr14, Grb2-ps, GriK3, GriK5, Hsp86-1ps4, Htrlda, Htrldb, Idd9, lfa1, lfa2, lfa3, lfa4, lfa5, lfa6, lfa7, lfa8, lfa9, lfa10, Lap18, Lmyc1, Mpmv19, Mpmv44, Mtv13 , Mtv14, Mtv17, Nppb, Otf6, Otf7, Ri12, Ski, Tnfr2, Wnt4, Xmmv8, Xmmv23, Xmmv62, Xmv1, Xmv2, Xmv8, Xmv9, Xmv14, Xmv44, Xpa, Tec, Fgf5, Nos1, Tcf1, Epo, Gnb2, Flt1, Flt3, Ache, Adra2c, Adrbk2, Afp, Alb1, Ccnb1-rs1, Clock, Cyp3 , Cyp3a11, Cyp3a13, Drd1b, Drd5, Fgfr3, Flk1, Gc, Gnrhr, Gpcr1, Hcs5, Hnf1, Htr5a, I15r, I16, Kit, Ltrm3, Mgsa, Mpmv7, Mpmv13, Mpmv23, Mtv32, Mtv41, Pdgfa, Pdgfra, Por, Txk, Xmmv3, Xmmv5, Xmmv52, Xmv17, Xmv28, Xmv34, Xmv38, Xmv45, Zp3, Trh, Raf1, Fth-rs2, Ntf3, Kras2, Pthlh, Mov1, Alox5, Braf2, Cfr, Egr4, Fpsl10, Fgf6, Gdf3, Ghfr, Glut3, Grin2a, Hior3, Hoxa10, hop, lea1, I15r, Int41, Itpr1, Krag, Mad, Met, Mi, Mtv8, Mtv23, Mtv29, Mtv33, Mtv34, Nkna, Npy, ob, Otf3-rs5, Tgfa, Tnfr1, Wnt2, Wnt5B, Wnt7A, Xmmv27, Xmv24, Xmv61, Fosb, Ryr1, Ngfa, Ufo, Xrcc1, Abpa, Abpga, Gabra4, Gas2, Acra7, Ccnb1-rs7, Egfbp3, Xmv30, Zp2, Fes, Pcsk3, Calc, Ccnb1-rs10, Pth, Ad, Bc13, Cea, Cea2, Cea3, Cea4, Cea5, Cea6, Ceap, Dm9, Dm15, Drd4, Egfbp1, Egfbp2, Ercc2, Fgf3, Fgfr2, Gabra5, Gabrb3, Gtx, Hcs1, Igf1r, Igf2, I14r, Ins2, Int40, Lhb, Mpmv1, Mtv1, Mtv35, Ngfg, Ntf5, Otf2, 2, Pkcc, Ras14, Rras, Ryr, Svp2, Tcf3g, Tgfb1, tub, Xmmv31, Xmmv35, Xmmv73, Xmv33, Xmv53, Taz83, Adrb3, Junb, Jund1, Me1, Gpcr19-rs2, Agt, Cadp, Ccnb1-rs9, E, Fgfr1, Gas6, Gnb-rs1, Hcs2, Insr, Maf, Mov34, Mpmv21, Mpmv41, Mtv21, Mtnr1a, Plat, Ras15-2, Ras16, Sntb2, Xmmv29, Xmv12, Xmv26, Xmv62, Epor, Gpcr13, Otf11, Pthr, Acra3, Acra5, Acrb4, Camk1, Cdc25Mm, Crbp, Crbp2, Csk, Cyp11a, Cyp19, Drd2, Ets1, Fli1, Gnai2, Gnat1, Gpcr6, Gria4, Hgfl, Hior1, Hpx, Hsp86-1ps3, Hst2, Idd2, I11bc,

Lag-rs1, Lap18-rs1, M11, Mpmv27, Penk, Pgr, Ras12-2, Tp11, Trf, Xmmv2, Xmmv67, Xmv15, Xmv16, Xmv25, Xmv60, Mgf, Amh, Braf, Cdc2a, Dmd1, Estr, Fps13, Fps14, Fps15, Gli, Gpcr17, Grik2, Ifgr, Igf1, Mpmv5, Mpmv12, Mpmv40, Myb, Oprm, Pg, Pmch, Ros1, Xmv31, Xmv51, Xmv54, Camk2b, Egfr, Int6, Lif, Mtv44, Ews, Csfm, Flt4, I13, I14, I15, Irf1, Gria1, Glut4, Crhr, Csf, Mov9, Xmv20, Acrb, Mpmv4, Mpmv15, Ngfr, Nos2, Rara, Taz4, Tcf2, Xmv42, Mtv3, Adra1, Crko, df, Erbb2, Gabra1, Gabra6, Gabrg2, Gh, Glra1, Grb2, Hnfb, Hsp86-ps1, Idd4, Igfbp1, Igfbp3, I113, Int4, Mpmv2, Mpmv8, Mpmv18, Mtv45, nu, Pkca, Rab1, Re1, Shbg, Tcf7, Thra, Tnz1, Trp53, Wnt3, Wnt3A, Xmv4, Xmv5, Xmv47, Xmv49, Xmv63, Akt, Amh-rs4, Ccs1, Fps16, Fos, Gdf7, Hcs3, Hsp70-2, Hsp84-3, Hsp86-1, hyt, Ltrm1, Max, Mpmv11, Mpmv24, Mtv9, Mtv30, Pomc1, Tcf3a, Tda2, Tgfb3, Tpo, Tshr, Xmmv21, Xmmv25, Xmmv34, Xmmv50, Gli3, Xmv55, Ryr2, Inhba, Gas1, Pcsk1, Amh-rs2, Ccnb1-rs6, Ccnb1-rs13, Crhpb, Dat1, Drd1a, Fgfr4, Fps17, Fim1, Gpcr15, Gpcr18, Hbvi, Hilda, Htrla, Idd11, I19, Ltrm4, Mak, mes, P11, P12, Pr1, Ra1, Rasa, Srd5a1, Tppb, Xmv13, Xmv27, Rarb, Rbp3, Htr2, Rb1, Acra2, Camkg, Cch11a2, Ccnb1-rs5, Ccnb1-rs12, Gnhr, Mtv11, Nras-ps, Otf3-rs6, Plau, Ptpgr, Trp53-ps, Wnt5A, Xmv19, Ghr, I17r, Lifr, Mlvi2, Prlr, Myc, Ril1, cog, Amh-rs7, I12rb, Pdgb, Acr, CP2, Rarg, Sp1-1, Wnt1, Afr1, Atf4, Bzrp, Ccnb1-rs11, Cyp11b, I13rb1, I13rb2, Ins3, Itga, Mlvi1, Mlvi3, Mtv36, Pdggfec, Svp5, Tef, Trhr, Wnt7B, Xmmv55, Xmmv72, Xmv37, Tnp2, Ets2, Casr, Chuck-rsl, din, Drd3, Erg, G22p1, Gap43, Gas4, Grik1, Htrf, Ifgt, Int53, Ltrm2, Mpmv17, Mtv6, Mtv1, Pit1, Xmv3, Xmv35, Xmv50, Igf2r, Mas, Tcd3, Glp1r, Idd1, Tla, Aeg1, Ccnb1-rs3, Cdc2b, Csi, Cyp21, Cyp21-ps1, Fps18, Gna-rs1, Gpcr19-rs1, Grr1, Grr2, Hom1, Hsc70t, Hsp70, Hsp70-1, Hsp70-3, Hsp84-1, Hst1, Hst4, Hst5, Hst6, Hye, Int3, Itpr3, Lap18-rs2, Otf3, Ptprs, Rab11b, Ras12-1, Ras12-3, Ras13, Rrs, Rxrb, Tas, Tcd1, Tcd2, Tera1, Tla-rs, Tnfa, Tnfb, Tpx1, Tpx2, Xmmv15, Xmv36, Xmv37, Csfmr, Pdgrb, Adrb2, Apc, Camk2a, Camk4, Dcc, Fgf1, Gna1, Gpcr7, Gr11, Grp, Hsp74, Mcc, Mtv2, Mtv38, Ptpn2, Tp12, Xmv22, Xmv23, Xmv29, Fth, Csfgmra, Mxi1, Adra2a, Adrb1, Adrbk1, Chuck, Cyp17, Gna14, Gnb-ps1, Hcs6, Htr7, Ide, Ins1, Lpc1, Pomc2, Seo, Tlx1, Xmmv42, Xmv18, Tcfe3, Araf, Avpr2, mdx, Ar, Zfx, Otf9, Ccg1, Ccnb1-rs8, Fps19, Gabra3, Glra2, Glra4, Gria3, Grpr, Hsp74-ps1, Hst3, Htrlc, I12rg, Mov14, Mov15, Mtv28, Otf3-rs8, Sts, Sxa, Sxr, Xta, Tdy, Hya, Zfy1, Zfy2, Mov15, Mov24, Mtv31, Mtv42, Sdma, Spy, Sts, Sxa, Sxr, XmmvY, Xmv7, Xmv11, y Xmv40.

Los ejemplos no limitantes de genes *Phaseolus vulgaris* incluyen: Acc, ace, Adk, Am, Amv-1, Amv-2, Ane, aph, Arc, Are, arg, Ar1 (Arc), asp, B, bc-u, bc-1.sup.1, bc-1.sup.2, bc-2.sup.1, bc-2.sup.2, bc-3, Bcm, Beg, Bip, blu, Bpm, Bsm, By-1, By-2, C, C/c, c.sup.cr, C.sup.cir, C.sup.ma (M, R.sup.ma), C.sup.r, C.sup.res, C.sup.rho, C.sup.st, [C.sup.st R Acc] (Aeq), c.sup.u (inh, i.sub.e), [c.sup.u Prp.sup.i] (Prp), c.sup.ui, Nud), [c.sup.uprp.sup.st] (prp.sup.st), [C Prp] (Prp), c.sup.v, [C R] (R), [C r] (r), Ca, Cam, Cav, cc, ch1, c1, cm1, Co-1(A), Co-2 (Are), Co-3 (Mexique 1), Co-3.sup.2, Co-4 (Mexique 2), Co-5 (Mexique 3), Co-6, Co-7, cr-1 cr-2, cry, cs, Ct, ctv-1 ctv-2, cyv (by-3), D (Can, Ins), Da, Db, def, dgs (g1, 1e), dia, Diap-1, Diap-2, diff, dis, D1-1 D1-2 (DL.sub.1 DL.sub.2), do, ds (te), dt-1.sup.a dt-2.sup.a, dt-1.sup.b dt-2.sup.b, dw-1 dw-2, Ea Eb, ers (restr), ers-2, Est-1, Est-2, exp, F, Fa, fast, Fb Fc, fa fb fc, Fcr, Fcr-2, fd, Fe-1 Fe-2, Fin (in), Fop-1, Fop-2, Fr, Fr-2, G (Flav, Ca, Och), Ga, gas, g1b, Gpi-c1, Gr, Hb1 (L.sub.HB-1), Hbnc (SC.sub.HB-1), Hbp (PD.sub.HB-1), hmb, Hss, Hsw, Ht-1 Ht-2 (L-1 L-2), I, Ia Ib, ian-1 ian-2 (ia), lbd, ico, Igr (Ih), ilo, ip, iter, iv, iw, J (Sh), Ke, L, Ia, Lan, Ld, Lds (Ds), Lec, Li (L), lo, Ir-1 Ir-2, mar, Me, Mel (Me), Mel-2 (Me-2), mel-3 (me-3), Mf, mi, mia, Mic (Mip), miv, Mrf, Mrf.sup.2, mrf, ms-1, Mue, mu mutator, Nag, Nd-1 Nd-2 (D-1 D-2), nie, nnd (sym-1), nnd-2, No, nts (nod), Nudus, ol, P, p.sup.gri (Gri, v.sup.Pal), pa, pc, pg (pa.sub.1), Pha, Pmv, ppd (neu), Pr, prc (pc), Prx, punc, ram, Rbcs (rbcS), rf-1, rf-2, rf-3, rfi (i), Rfs (m), Rk, rk, rk.sup.d (lin), rn-1 rn-2 (r r), rnd, Ro, Sal, sb, sb.sup.ms, sb-2, sb-3, si1, Skdh, s1, Smv, St, Sur, sw-1 sw-2, T, t (z-1), Th-1 Th-2, Tm, To, Tor (T), Tr, tri, trv, Ts, tw, uni, Uni-2, uni.sup.nde, uni.sup.nie, Ur-1, Ur-2, Ur-2.sup.2, Ur-3 (Ur-3, Ur-4), Ur-3.sup.2, Ur-4, (Up-2, Ur-C), Ur-5, (B-190), Ur-6 (Ur.sub.a, Ur-G), Ur-7 (R.sub.B11), Ur-8 (Up-1), Ur-9 (Ur.sub.p), us, V (B1), v.sup.lae (Cor), v, var, vi (vir.sub.f), wb, Wmv, X.sup.su, y, y Z.

Los ejemplos no limitantes de genes de *Saccharomyces cerevisiae* incluyen: PRE3, PUP1, PUP3, PRE2, PRE10, PRE1, PRE8, SCL1, PUP2, PRE5, PRE7, PRE4, RPT2, RPT3, RPN3, RPN11, RPN12, RPT6, RPN1, RPN2, RPT1, RPT5, RPT4, SKI6, RRP4, DIS3, TSC10, RAT1, GND1, EXO70, ERG10, ACC1, RPP0, ACT1, ARP100, ARP3, PAN1, ARP2, ARP4, ARP9, SPE2, CYR1, ALA1, TPS1, TUB1, ABF1, DED81, NIP1, YHC1, SNU71, ATM1, MAK5, ROK1, DED1, SPB4, AUR1, PSE1, ALG1, TUB2, BPL1, MSL5, ERG24, ERG26, ERG25, CMD1, HCA4, SHE9, SHE10, CAK1, PIS1, CHO1, CDS1, ESR1, NUD1, CDC47, CDC13, CDC37, CDC1, CDC4, CDC20, CDC6, CDC46, CDC3, KAR1, BBP1, HRP1, CCT2, CCT3, HSP10, SMC1, SMC2, CHC1, CFT2, CLP1, COP1, SEC26, SEC27, RET2, SEC21, COF1, CCT4, CCT1, CCT6, SEC24, SEC7, PCF11, RNA15, RNA14, FIP1, YSH1, TFB4, TSM1, APC2, APC5, SEC31, TAF47, TAP42, MPP10, CDC53, CKS1, CDC28, KIN28, CNS1, ERG11, DBP10, DBP8, PRO3, DYS1, ALR1, TID3, DNA2, SSL2, RAD3, RFA3, RFA2, RFA1, RFC4, RFC5, RFC3, RFC2, RFC1, TOP2, RAP1, RPC25, PRI2, PRI1, POL1, POL12, HUS2, CDC2, POL2, DPB2, RPB10, RPA135, RPA190, RPA43, RPB8, RPO26, RPB5, RPC40, RPC19, SRB7, SRB4, RGR1, RPB11, SRB6, RPB2, RPB7, RPO21, RET1, RPO31, RPC31, RPC34, RPC53, RPC82, RPB12, RPB3, DPM1, DIP2, RNT1, CDC8, CDC14, DUT1, UBA2, UBA1, UBC9, CDC34, ENP1, ERD2, SSS1, SEC61, SEC63, SEC62, GNA1, GPI8, DAM1, DUO1, IRR1, PRP3, TIM9, HSH49, SUP35, EXM2, MEX67, ERG9, ERG20, FAS2, FAS1, NOP1, FAD1, AOS1, FBA1, NCB2, BRN1, TUB4, GDI1, GOG5, SRM1, CDC25, SPT16, YIF2, BET4, CDC43, MRS6, BET2, PRO1, GLN1, GLN4, GRS1, YIP1, FOL2, GPA1, CDC42, SARI, YPT1, SEC4, GSP1, TEM1, RHO1, CDC24, RNA1, GUK1, VMA16, PMA1, HKR1, SIS1, MGE1, HSP60, HSF1, HAS1, MOT3, HTS1, ESA1, HSL7, HOM6, RIB7, SLY1, CSL4, PUR5, CSE1, IPP1, MDM1, USO1, SOF1, MAK11, LAS1, TEL2, DPB11, SGD1, FAL1, MTR3, MTR4, SPP2, SIK1, RRP7, POP4, RRP1, POP3, BFR2, CDC5, NRD1, MET30, MCM6, RRP46, SAS10, SCC2, ECO1, PRP43, BET3, BET5, STN1, NFS1, IDI1, SRP1, KAP95, CBF2, SKP1, CEP3, CTF13, ERG7, KRS1, PSA1, PMI40, ALG2, SSF1, MED7, RSC4, CDC54, MCM2, AFG2, ERG12,

MVD1, CDC48, MHP1, ERV1, SSC1, TIM44, TIM17, TIM23, TOM22, TOM40, MAS1, MCD1, MMC1, STU1, JAC1, ABD1, CEG1, PAB1, MTR2, SEC16, ROT1, INO1, MLC1, MYO2, GPI2, SPT14, NAT2, NMT1, TRM1, NCP1, NBP1, ACF2, SPP41, NUT2, LCP5, PRP19, NMD3, RFT1, NNF1, NDC1, CRM1, KAR2, NIP29, NAB2, NIC96, NUP145, NUP49, NUP57, NUP159, NSP1, NUP82, CDC39, NPL4, POP7, NTF2, MAK16, NPL3, NOP2, NOP4, NHP2, NOP10, GAR1, NBP35, WBP1, STT3, SWP1, OST2, OST1, ORC1, ORC6, ORC5, ORC4, ORC3, RRR1, SAT2, PWP2, PEX3, TOR2, PIK1, SEC14, STT4, MSS4, PCM1, GPM1, SEC53, ERG8, YPD1, PAP1, NAB3, RRN7, SEN1, CFT1, PRP11, PRP21, PRP39, PRP24, PRP9, SLU7, PRP28, PRP31, IFH1, PTA1, SUB2, FMI1, MAS2, ESS1, PFY1, POL30, POP1, PDI1, RAM2, CDC7, SMP3, CDC15, YTH1, QRI2, YAE1, SFI1, SEC1, BET1, SEC6, SEC13, SEC2, SEC8, CBF5, CDC19, YRB1, RHC18, DBF4, SDS22, MCM3, CEF1, ALG11, GAA1, MOB1, NIP7, TIP20, SEC5, SEC10, GPI10, RRP3, CDC45, DIB1, MIF2, HOP2, PBN1, NOP5, RPP1, POP5, POP8, POP6, ERO1, MPT1, DNA43, ESP1, SMC3, LST8, STS1, RPM2, RNR1, RNR2, RNR4, RPS20, RPL25, RPL3, RPL30, RPL32, RPL37A, RPL43A, RPL5, RPL10, RPS3, CET1, YRA1, SNM1, GLE1, DBP5, DRS1, DBP6, BRR2, RRN3, RRN6, RRN11, MED6, PRP16, RPR2, DIM1, RRP43, RRP42, RRP45, SEC20, BOS1, CDC12, GLC7, PKC1, IPL1, SGV1, NRK1, RAD53, LCB2, LCB1, MPS1, SES1, SPC3, SEC11, RIO1, ARP7, NEO1, YJU2, POB3, ARH1, IQG1, HRT1, HYM1, MAK21, FUN20, FUN9, NBN1, STB5, YIF1, SMX4, YKT6, SFT1, SMD1, PRP6, LSM2, NUF1, SPC97, SPC42, SPC98, CDC31, SPC19, SPC25, SPC34, SPC24, NUF2, PRP40, MCD4, ERG1, SMC4, CSE4, KRR1, SME1, TRA1, RLP7, SCH9, SMD3, SNP2, SSF2, SPC72, CDC27, CDC23, CDC16, APC1, APC11, APC4, ARC19, RPN6, RPN5, RSC6, RSC8, STH1, SFH1, TIM12, TIM22, TIM10, SQT1, SLS1, JSN1, STU2, SCD5, SSU72, ASM4, SED5, UFE1, SYF1, SYF2, CCT5, TBF1, TOA2, TOA1, SUA7, TAF90, TAF61, TAF25, TAF60, TAF17, TAF145, TAF19, TAF40, TAF67, TFA2, TFA1, FCP1, TFG1, TFG2, TFB1, CCL1, SSL1, TFB3, TFB2, PZF1, BRF1, TFC5, TFC4, TFC3, TFC7, TFC6, TFC1, SPT15, THI80, THS1, SPT6, SPT5, ROX3, REB1, MCM1, MED4, MOT1, MED8, EFB1, YEF3, SUI1, CDC95, TIF11, SUI3, GCD11, SUI2, GCD6, GCD7, GCD2, GCD1, RPG1, GCD10, PRT1, TIF34, CDC33, TIF5, SUP45, GCD14, TIM54, SEC17, TPT1, TRL1, CCA1, SEN54, SEN2, SEN15, SEN34, WRS1, SLN1, TYS1, SNU56, PRP42, CUS1, PRP4, PRP8, SNU114, USS1, UFD1, SMT3, RSP5, QRI1, ALG7, UGP1, VTI1, VAS1, SEC18, CTR86, y ZPR1.

En particular, los virus proporcionados en la presente memoria se pueden modificar para expresar un anticuerpo antitumoral, un gen antimetastásico o genes supresores de metástasis; genes degradantes de la matriz celular; hormonas; factores de crecimiento; moléculas inmunomoduladoras, que incluyen una citocina, tal como interleucinas o interferones, una quimiocina, incluidas las quimiocinas CXC, moléculas coestimuladoras; ribozimas; proteína transportadora; anticuerpo o fragmento del mismo; ARN antisentido; ARNip; microARN; ligandos proteicos; una proteína inhibidora de la mitosis; un oligopéptido antimiótico; un polipéptido anticanceroso; antibióticos anticancerosos; inhibidores de la angiogénesis; factores antiangiogénicos; factores tisulares; una enzima de conversión de profármaco; genes para la regeneración de tejidos y la reprogramación de células somáticas humanas a pluripotencia; enzimas que modifican un sustrato para producir un producto o señal detectable o son detectables por anticuerpos; un factor de atenuación viral; un superantígeno; proteínas que se pueden unir a un agente de contraste, cromóforo o un compuesto de ligando que puede detectarse; supresores de tumores; proteína citotóxica; proteína citostática; genes para la generación de imágenes ópticas o detección óptica, incluida la luciferasa, una proteína fluorescente tal como una proteína fluorescente verde (GFP) o una proteína similar a GFP, una proteína fluorescente roja (RFP), una proteína fluorescente rojo lejano, una proteína fluorescente de infrarrojo cercano, una proteína fluorescente amarilla (YFP), una proteína fluorescente naranja (OPF), una proteína fluorescente cerúlea (CFP) o una proteína fluorescente azul (BFP), y ficobiliproteínas de ciertas cianobacterias y algas eucarióticas, incluidas las ficoertrinas (rojas) y las ficocianinas (azules); genes para la generación de imágenes de PET; genes para resonancia magnética; o genes para alterar la atenuación de los virus. Por ejemplo, los genes heterólogos ilustrativos para la modificación (p. ej., la inserción) de los virus en la presente memoria se exponen en la Tabla 5.

Los genes heterólogos ilustrativos para la modificación de virus en la presente memoria son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo las Publicaciones de Estados Unidos Núm. US2003-0059400, US2003-0228261, US2009-0117034, US2009-0098529, US2009-0053244, US2009-0081639 y US2009-0136917; Patentes de Estados Unidos Núm. 7.588.767 y 7.763.420; y Publicación Internacional. Núm. WO 2009/139921). Una descripción no limitante de genes ilustrativos que codifican proteínas heterólogas para la modificación de cepas de virus proporcionadas en la presente memoria se expone en la Tabla 5 a continuación. La secuencia del gen y las proteínas codificadas son conocidas por los expertos en la técnica de la bibliografía. Por lo tanto, en la presente memoria se proporcionan las cepas de virus, que incluyen cualquiera de los virus clonales proporcionados en la presente memoria, que contienen nucleótidos que codifican cualquiera de las proteínas heterólogas enumeradas en la Tabla 5.

Tabla 5		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
Generación de Imágenes ópticas		
Luciferasa		
	luciferasa bacteriana	
	luciferasa (de <i>Vibrio Harveyi</i> o <i>Vibrio fischerii</i>)	
	luxA	27
	luxB	28
	luxC	29
	luxD	30
	luxE	31
	luxab	314
	luxcd	317
	luxABCDE	323
	luciferasa de luciérnaga	
	luciferasa de <i>Renilla</i> de <i>Renilla reniformis</i>	
	luciferasa de <i>Gaussia</i>	
	Luciferasas encontradas entre artrópodos marinos.	
	luciferasas que catalizan la oxidación de <i>Cypridina (Vargula) luciferina</i>	
	luciferasas que catalizan la oxidación de <i>Coleoptera luciferina</i>	
fotoproteínas luciferasa		
	fotoproteína de aequorina a la que la luciferina está unida de forma no covalente	
luciferasa de escarabajo click		
	CBG99	
	CBG99-mRFP1	25
Proteínas de fusión		
	Ruc-GFP	24
Proteínas Fluorescentes		
GFP		
	aequorina de <i>Aequorea victoria</i>	
	GFP de <i>Aequorea victoria</i>	
	GFP de <i>Aequorea coerulescens</i>	
	GFP de los celentéreos antozoos <i>Renilla reniformis</i> y <i>Renilla kollikeri</i> (pensamientos marinos)	
	Emerald (Initrogen, Carlsbad, CA)	
	EGFP (Clontech, Palo Alto, CA)	
	Azami-Green (MBL Internacional, Woburn, MA)	
	Kaede (MBL Internacional, Woburn, MA)	
	ZsGreen1 (Clontech, Palo Alto, CA)	
	CopGFP (Evrogen/Axxora, LLC, San Diego, CA)	

Tabla 5		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
	Coral de arrecife Antozoo	
	Anémona de mar Anemonia	
	Pensamiento de mar Renilla	
	Coral Galaxea	
	Coral pardo Acropora	
	Coral pedregoso Trachyphyllia	
	Coral pedregoso Pectiniidae	
	Proteínas similares a GFP	
RFP		
	RFP del coralimorfo <i>Discosoma</i> (DsRed) (Matz et al. (1999) Nature Biotechnology 17:969-973)	
	Coral de arrecife Heteractis, Actinia o Entacmaea anémona de mar	
	RFP de variantes de <i>Discosoma</i>	
	mRFP1 (Wang et al. (2004) PNAS USA.101 (48):16745-9)	
	mCherry (Wang et al. (2004) PNAS USA.101 (48):16745-9)	
	tdtomato (Wang et al. (2004) PNAS USA.101 (48): 16745-9)	
	mStrawberry (Wang et al. (2004) PNAS USA.101 (48): 16745-9)	
	mandarina (Wang et al. (2004) PNAS USA.101 (48): 16745-9)	
	DsRed2 (Clontech, Palo Alto, CA)	
	DsRed-T1 (Bevis y Glick (2002) Nat. Biotechnol. 20: 83-87)	
	J-Red de Antomedusa (Evrogen)	
	AsRed2 de Anemonia (Clontech, Palo Alto, CA)	
proteína fluorescente rojo lejano		
	TurboFP635	283
	mNeptune proteína fluorescente rojo lejano monomérica	85
	AQ143 de Actinia (Shkrob et al. (2005) Biochem J. 392 (Pt 3): 649-54)	
	eqFP611 de Entacmaea (Wiedenmann et al. (2002) PNAS USA. 99(18): 11646-51)	
	Variantes de <i>Discosoma</i>	
	mPlum (Wang et al. (2004) PNAS USA.101 (48): 16745-9)	
	mRaspberry (Wang et al. (2004) PNAS USA.101 (48): 16745-9)	
	HcRed1 y t-HcRed de Heteractis (Clontech, Palo Alto, CA)	
IFP (proteína fluorescente infrarrojo)		284
proteína fluorescente infrarrojo cercano		
YFP		
	EYFP (Clontech, Palo Alto, CA)	
	YPet (Nguyen y Daugherty (2005) Nat Biotechnol. 23 (3): 355-60)	
	Venus (Nagai et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20 (1): 87-90)	
	Zs Yellow (Clontech, Palo Alto, CA)	
	mCitrina (Wang et al. (2004) PNAS USA.101 (48): 16745-9)	

Tabla 5		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
OFP		
	cOFP (Stratagene, La Jolla, CA)	
	mKO (MBL Internacional, Woburn, MA)	
	mOrange (Wang et al. (2004) PNAS USA.101 (48): 16745-9)	
CFP		
	Cerúlea (Rizzo (2004) Nat Biotechnol. 22 (4): 445-9)	
	mCFP (Wang et al. (2004) PNAS USA.101 (48): 16745-9)	
	AmCyan1 (Clontech, Palo Alto, CA)	
	MiCy (MBL International, Woburn, MA)	
	CyPet (Nguyen y Daugherty (2005) Nat Biotechnol. 23 (3): 355-60)	
BFP		
	EBFP (Clontech, Palo Alto, CA);	
	Ficobiliproteínas de ciertas cianobacterias y algas eucarióticas, ficoeritrinas (rojas) y ficocianinas (azules).	
	R-Ficoeritrina (R-PE)	
	B-Ficoeritrina (B-PE)	
	Y-Ficoeritrina (Y-PE)	
	C-Ficocianina (P-PC)	
	R-Ficocianina (R-PC)	
	Ficoeritrina 566 (PE 566)	
	Ficoeritrocianina (PEC)	
	Aloficocianina (APC)	
	frp Flavina Reductasa	84
	CBP Proteína de unión a celenterazina 1	86
Generación de Imágenes de PET		
	Cyp11 1B1 variante de transcrito 1	40
	Cyp11B1 variante de transcrito 2	39
	Cyp11B2	41
	AlstR	87
	PEPR-1	194
	LAT-4 (SLC43A2)	88
	Cyp51 variante de transcrito 1	42
	Cyp51 variante de transcrito 2	43
Proteínas transportadoras		
Familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos (SLC)		
	SLC1 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 2	
	SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3, SLC1A4, SLC1A5, SLC1A6, SLC1A7	
	SLC2 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 2	

Tabla 5	
Productos génicos detectables	SEQ ID NO
SLC2A1, SLC2A2, SLC2A3, SLC2A4, SLC2A5, SLC2A6, SLC2A7, SLC2A8, SLC2A9, SLC2A10, SLC2A11, SLC2A12, SLC2A13, SLC2A14)	
SLC3 familia de proteínas transportadoras de portadores de soluto 3	
SLC3A1, SLC3A2	
SLC 4 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 4	
LC4A1, SLC4A2, SLC4A3, SLC4A4, SLC4A5, SLC4A6, SLC4A7, SLC4A8, SLC4A9, SLC4A10, SLC4A11	
SLC5 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 5	
SLC5A1 cotransportador de sodio/glucosa 1	109
SLC5A2 cotransportador de sodio/glucosa 2	110
SLC5A3 cotransportador de sodio/mio-inositol	111
SLC5A4 cotransportador de baja afinidad de sodio-glucosa	112
SLC5A5 cotransportador de sodio/yoduro	108
SLC5A6 Transportador de multivitaminas dependiente de sodio	113
SLC5A7 Transportador 1 de colina de alta afinidad	114
SLC5A8 Transportador 1 de monocarboxilato acoplado a sodio	115
SLC5A9 cotransportador 4 de sodio/glucosa	116
SLC5A10 cotransportador 5 de sodio/glucosa, isoforma 1	117
cotransportador 5 de sodio/glucosa, isoforma 2	118
cotransportador 5 de sodio/glucosa, isoforma 3	119
cotransportador 5 de sodio/glucosa, isoforma 4	120
SLC5A11 cotransportador 2 de sodio/mio-inositol, isoforma 1	121
cotransportador 2 de sodio/mio-inositol, isoforma 2	122
cotransportador 2 de sodio/mio-inositol, isoforma 3	123
cotransportador 2 de sodio/mio-inositol, isoforma 4	124
SLC5A12 transportador 2 de monocarboxilato acoplado a sodio, isoforma 1	125
transportador 2 de monocarboxilato acoplado de sodio, isoforma 2	126
Simportador de yoduro de sodio (NIS)	
hNIS (NM_000453)	36
hNIS (BC105049)	37
hNIS (BC105047)	38
hNIS (variante de hNIS no funcional que contiene 11 aa adicionales)	
SLC6 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 6	
SLC6A1 transportador 1 de GABA dependiente de sodio y cloruro	130
SLC6A2 transportador de norepinefrina (transportador de noradrenalina dependiente de sodio)	127
SLC6A3 transportador de dopamina dependiente de sodio	129
SLC6A4 transportador de serotonina dependiente de sodio	128
SLC6A5 transportador 1 de glicina dependiente de sodio y cloruro	133

Tabla 5	
Productos génicos detectables	SEQ ID NO
SLC6A6 transportador de taurina dependiente de sodio y cloruro	136
SLC6A7 transportador de prolina dependiente de sodio	135
SLC6A8 transportador de creatina dependiente de sodio y cloruro	138
SLC6A9 transportador 1 de glicina dependiente de sodio y cloruro, isoforma 1	134
transportador 1 de glicina dependiente de sodio y cloruro, isoforma 2	139
transportador 1 de glicina dependiente de sodio y cloruro, isoforma 3	140
SLC6A 10 transportador 2 de creatina dependiente de sodio y cloruro	141
SLC6A11 transportador 3 de GABA dependiente de sodio y cloruro	132
SLC6A12 transportador de betaína dependiente de sodio y cloruro	137
SLC6A13 transportador 2 de GABA dependiente de sodio y cloruro	131
SLC6A14 Transportador de aminoácidos básicos y neutros dependientes de sodio y cloruro B (0+)	142
SLC6A15 Transportador de neurotransmisores dependiente de sodio y cloruro huérfano NTT73	143
SLC6A 16 Transportador de neurotransmisores dependiente de sodio y cloruro huérfano NTT5	144
SLC6A 17 Transportador de neurotransmisores dependiente de sodio y cloruro huérfano NTT4	145
Sodio SLC6A18 Transportador dependiente de sodio y cloruro XTRP2	146
SLC6A19 Transportador de aminoácidos neutro dependiente de sodio B (0)	147
SLC6A20 Transportador dependiente de sodio y cloruro XTRP3	148
Transportador de Norepinefrina (NET)	
Variante 1 de transcripción de Net Humano (hNET) (NM_001172504)	32
variante de transcrito de Net Humano (hNET) 2 (NM_001172501)	33
variante de transcrito de Net Humano (hNET) 3 (NM_001043)	34
variante de transcrito de Net Humano (hNET) 4 (NM_001172502)	35
Net no Humano	
SLC7 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 7	
SLC7A1, SLC7A2, SLC7A3, SLC7A4, SLC7A5, SLC7A6, SLC7A7, SLC7A8, SLC7A9, SLC7A10, SLC7A11, SLC7A13, SLC7A14	
SLC8 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 8	
SLC8A1, SLC8A2, SLC8A3	
SLC9 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 9	
SLC9A1, SLC9A2, SLC9A3, SLC9A4, SLC9A5, SLC9A6, SLC9A7, SLC9A8, SLC9A9, SLC9A10, SLC9A11	
SLC10 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 10	
SLC10A1, SLC10A2, SLC10A3, SLC10A4, SLC10A5, SLC10A6, SLC10A7	
SLC11 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 11	
SLC11A1	
SCL11A2 o hDMT	
SLC11A2 variante de transcrito 4	54
SLC11A2 variante de transcrito 1	55

Tabla 5	
Productos génicos detectables	SEQ ID NO
SLC11A2 variante de transcrito 2	56
SLC11A2 variante de transcrito 3	57
SLC11A2 variante de transcrito 5	58
SLC11A2 variante de transcrito 6	59
SLC11A2 variante de transcrito 7	60
SLC12 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 12	
SLC12A1, SLC12A1, SLC12A2, SLC12A3, SLC12A4, SLC12A5, SLC12A6, SLC12A7, SLC12A8, SLC12A9	
SLC13 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 13	
SLC13A1, SLC13A2, SLC13A3, SLC13A4, SLC13A5	
SLC14 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 14	
SLC14A1, SLC14A2	
SLC15 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 15	
SLC15A1, SLC15A2, SLC15A3, SLC15A4	
SLC16 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 16	
SLC16A1, SLC16A2, SLC16A3, SLC16A4, SLC16A5, SLC16A6, SLC16A7, SLC16A8, SLC16A9, SLC16A10, SLC16A11, SLC16A12, SLC16A13, SLC16A14	
SLC17 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 17	
SLC17A1, SLC17A2, SLC17A3, SLC17A4, SLC17A5, SLC17A6, SLC17A7, SLC17A8	
SLC18 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 18	
SLC18A1, SLC18A2, SLC18A3	
SLC19 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 19	
SLC 19A1, SLC 19A2, SLC19A3	
SLC20 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 20	
SLC20A1, SLC20A2	
SLC21 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 21	
subfamilia 1; SLCO1A2, SLCO1B1, SLCO1B3, SLCO1B4, SLCO1C1	
subfamilia 2; SLCO2A1, SLCO2B1	
subfamilia 3; SLCO3A1	
subfamilia 4; SLCO4A1, SLCO4C1	
subfamilia 5; SLCO5A1	
SLC22 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 22	
SLC22A1, SLC22A2, SLC22A3, SLC22A4, SLC22A5, SLC22A6, SLC22A7, SLC22A8, SLC22A10, SLC22A10, SLC22A10, SLC22A10, SLC22A11, SLC22A11, SLC22A11, SLC22A11, SLC22A14, SLC22A14	
SLC23 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 23	
SLC23A1, SLC23A2, SLC23A3, SLC23A4	
SLC24 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 24	
SLC24A1, SLC24A2, SLC24A3, SLC24A4, SLC24A5, SLC24A6	

Tabla 5		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
	SLC25 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 25	
	SLC25A1, SLC25A2, SLC25A3, SLC25A4, SLC25A5, SLC25A6, SLC25A7, SLC25A8, SLC25A9, SLC25A10, SLC25A11, SLC25A12, SLC25A13, SLC25A14, SLC25A15, SLC25A16, SLC25A17, SLC25A18, SLC25A19, SLC25A20, SLC25A21, SLC25A22, SLC25A23, SLC25A24, SLC25A25, SLC25A26, SLC25A27, SLC25A28, SLC25A29, SLC25A30, SLC25A31, SLC25A32, SLC25A34, SLC25A35, Estado de la embarcación, Estado de la embarcación, Estado de la embarcación, Estado de la embarcación, Estado de la embarcación, Estado de la embarcación, Estado de la embarcación, Estado de la embarcación, Estado de la embarcación, Estado de la embarcación	
	SLC26 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 26	
	SLC26A1, SLC26A2, SLC26A3, SLC26A4, SLC26A5, SLC26A6, SLC26A7, SLC26A8, SLC26A9, SLC26A10, SLC26A11	
	SLC27 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 27	
	SLC27A1, SLC27A2, SLC27A3, SLC27A4, SLC27A5, SLC27A6	
	SLC28 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 28	
	SLC28A1, SLC28A2, SLC28A3	
	SLC29 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 29	
	SLC29A1, SLC29A2, SLC29A3, SLC29A4	
	SLC30 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 30	
	SLC30A1, SLC30A2, SLC30A3, SLC30A4, SLC30A5, SLC30A6, SLC30A7, SLC30A8, SLC30A9, SLC30A10	
	SLC31 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 31	
	SLC31A1	
	SLC32 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 32	
	SLC32A1	
	SLC33 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 33	
	SLC33A1	
	SLC34 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 34	
	SLC34A1, SLC34A2, SLC34A3	
	SLC35 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 35	
	subfamilia A; SLC35A1, SLC35A2, SLC35A3, SLC35A4, SLC35A5	
	subfamilia B; SLC35B1, SLC35B2, SLC35B3, SLC35B4	
	subfamilia C; SLC35C1, SLC35C2	
	subfamilia D; SLC35D1, SLC35D2, SLC35D3	
	subfamilia E; SLC35E1, SLC35E2, SLC35E3, SLC35E4	
	SLC36 familia de proteínas transportadoras de portadores de soluto 36	
	SLC36A1, SLC36A2, SLC36A3, SLC36A4	
	SLC37 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 37	
	SLC37A1, SLC37A2, SLC37A3, SLC37A4	
	SLC38 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 38	
	SLC38A1, SLC38A2, SLC38A3, SLC38A4, SLC38A5, SLC38A6	
	SLC39 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 39	

Tabla 5		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
	SLC39A1, SLC39A2, SLC39A3, SLC39A4, SLC39A5, SLC39A6, SLC39A7, SLC39A8, SLC39A9, SLC39A10, SLC39A11, SLC39A12, SLC39A13, SLC39A14	
	SLC40 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 40	
	SLC40A1	
	SLC41 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 41	
	SLC41A1, SLC41A2, SLC41A3	
	SLC42 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 42	
	RHAG, RhBG, RhCG	
	SLC43 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 43	
	SLC43A1	
	SLC43A2	88
	SLC43A3	
	SLC44 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 44	
	SLC44A1, SLC44A2, SLC44A3, SLC44A4, SLC44A5	
	SLC45 transportador de la familia de proteínas de portadores de solutos 45	
	SLC45A1, SLC45A2, SLC45A3, SLC45A4	
	SLC46 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 46	
	SLC46A1, SLC46A2	
	SLC47 familia de proteínas transportadoras de portadores de solutos 47	
	SLC47A1, SLC47A2	
Generación de Imágenes de MRI		
	Receptor de la transferrina humana	44
	Receptor de la transferrina humana	45
	Receptor de transferrina de ratón	46
	Cadena ligera de ferritina humana (FTL)	47
	Cadena pesada de ferritina humana	48
	FTL 498-199InsTC, una forma mutada de la cadena ligera de ferritina	285
	Ferritina bacteriana	
	<i>E. coli</i>	49
	<i>E. coli</i> cepa K12	50
	<i>S. aureus</i> cepa MRSA252	51
	<i>S. aureus</i> cepa NCTC 8325	52
	<i>H. pylori</i> B8	53
	bacterioferritina	90
	Bacterioferritina con codones optimizados	290
	MagA	280
Enzimas que modifican un sustrato para producir un producto o señal detectable, o son detectables mediante anticuerpos		

Tabla 5		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
	alfa-amilasa	195
	fosfatasa alcalina	196
	fosfatasa alcalina secretada	
	peroxidasa	198
	T4 lisozima	
	oxidorreductasa	199
	pirofosfatasa	200
Genes terapéuticos		
producto génico terapéutico		
antígenos		
	antígenos específicos de tumor	
	antígenos asociados a tumores	
	antígenos específicos del tejido	
	antígenos bacterianos	
	antígenos virales	
	antígenos de levadura	
	antígenos fúngicos	
	antígenos protozoarios	
	antígenos de parásitos	
	mitógenos	
un anticuerpo o fragmento del mismo		
	anticuerpos específicos del virus	
ARN antisentido		
ARNip		
	ARNip dirigido contra la expresión de un gen promotor de tumores	
	un oncogén	
	factor de crecimiento	
	gen que promueve la angiogénesis	
	un receptor	
	molécula de ARNip dirigida contra la expresión de cualquier gen esencial para el crecimiento celular, la replicación celular o la supervivencia celular.	
	molécula de ARNip dirigida contra la expresión de cualquier gen que establezca la membrana celular o que de otro modo limite el número de antígenos de células tumorales liberados por la célula tumoral.	
ligandos de proteínas		
un oligopéptido antitumoral		
un péptido antimetabólico		
	tubulisina	
	fomopsina	

Tabla 5		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
	Hemiasterlina	
	taltobulina (HTI-286, 3)	
	criptoficina	
	una proteína inhibidora de la mitosis	
	un oligopéptido antimitótico	
	un antibiótico polipeptídico anticanceroso	
	antibióticos anticancerosos	
factores tisulares		
	Factor Tisular (TF)	
	Proteína de fusión RGD-integrina $\alpha v \beta 3$	
Moléculas moduladoras inmunológicas		
	GM-CSF	61
	MCP-1 o CCL2 (Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1) Humana	62
	MCP-1 murina	201
	IP-10 o ligando de quimiocina 10 (CXCL10)	66
	LIGHT	281
	P60 o SEQSTM1 (variante de transcrito 1 de Secuestosoma 1)	67
	P60 o SEQSTM1 (variante de transcrito 3 de Secuestosoma 1)	68
	P60 o SEQSTM1 (variante de transcrito 2 de Secuestosoma 1)	69
	OspF	202
	OspG	203
	STAT1alfa	70
	STAT1beta	71
Interleucinas		
	IL-18 (interleucina-18)	204
	IL-11 (interleucina-11)	205
	IL-6 (interleucina-6)	206
	sIL-6R-IL-6	16
	interleucina-12	207
	interleucina-1	208
	interleucina-2	209
	IL-24 (interleucina-24)	15
	Variante de transcrito 1 de IL-24	63
	Variante de transcrito 4 de IL-24	64
	Variante de transcrito 5 de IL-24	65
	IL-4	210
	IL-8	211
	IL-10	212

Tabla 5		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
quimiocinas		
	IP-10 (CXCL)	66
	Trombopoyetina	214
	miembros de las familias de quimiocinas C-X-C y C-C	
	RANTES	215
	MIP1-alfa	216
	MIP1-beta	217
	MIP-2	213
Quimiocinas CXC		
	GRO α	218
	GRO β (MIP-2)	213
	GRO γ	219
	ENA-78	220
	LDGF-PPBP	221
	GCP-2	222
	PF4	223
	Mig	224
	IP-10	66
	SDF-1 α/β	225
	BUNZO/STRC33	
	I-TAC	
	BLC/BCA-1	
	MDC	
	TECK	
	TARC	
	HCC-1	
	HCC-4	
	DC-CK1	
	MIP-3 α	
	MIP-3 β	
	MCP-2	
	MCP-3 (proteína quimioatrayente de monocitos 3, CCL7)	
	MCP-4	
	MCP-5 (proteína quimioatrayente de monocitos 5; CCL12)	
	Eotaxina (CCL11)	
	Eotaxina-2/MPIF-2	
	I-309	
	MIP-5/HCC-2	

Tabla 5		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
	MPIF-1	
	6Cquina	
	CTACK	
	MEC	
	linfotactina	
	fractalquina	
Superfamilia de Inmunoglobulinas de citocinas		
	B7.1	
	B7.2.	
Genes anti-angiogénicos / inhibidores de la angiogénesis		
	Dominio k5 del plasminógeno humano (hK5)	13
	PEDF (SERPINF1) (Humano)	72
	PEDF (ratón)	282
	anticuerpo de cadena sencilla anti-VEGF (G6)	73
	anti-DLL4 s.c. anticuerpo GLAF-3	302
	tTF-RGD (proteína del factor tisular humano truncada fusionada a un péptido RGD)	14
factores de atenuación viral		
	Interferones	
	IFN- γ	
	IFN- α	
	IFN- β	
Anticuerpo o scFv		
	Anticuerpos terapéuticos (es decir, anticuerpos anticancerosos)	
	Rituximab (RITUXAN)	
	ADEPT	
	Trastuzumab (Herceptina)	
	Tositumomab (Bexxar)	
	Cetuximab (Erbix)	
	Ibritumomab (90Y-Ibritumomab tiuxetán; Zevalin)	
	Alemtuzumab (Campath-1H)	
	Epratuzumab (linfocida)	
	Gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg)	
	Bevacimab (Avastina) y Edrecolomab (Panorex)	
	Infliximab	
Genes supresores de metástasis		
	Isoforma NM23 o NME1 a	74
	Isoforma NM23 o NME1 b	75
Genes antimetastásicos		

Tabla 5		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
	E-Cad	76
	Gelsolina	226
	LKB1 (STK11)	227
	RASSF1	228
	RASSF2	229
	RASSF3	230
	RASSF4	231
	RASSF5	232
	RASSF6	233
	RASSF7	234
	RASSF8	235
	Syk	236
	TIMP-1 (inhibidor tisular de la metaloproteinasa tipo 1)	237
	TIMP-2 (inhibidor tisular de la metaloproteinasa tipo 2)	238
	TIMP-3 (inhibidor tisular de la metaloproteinasa tipo 3)	239
	TIMP-4 (inhibidor tisular de la metaloproteinasa tipo 4)	240
	BRMS-1	241
	CRMP-1	242
	CRSP3	243
	CTGF	244
	DRG1	245
	KAI1	246
	KiSS1 (kisspeptina)	247
	fragmentos de kisspeptina	
	kisspeptina-10	
	kisspeptina-13	
	kisspeptina-14	
	kisspeptina-54	
	Mkk4	248
	Mkk6	249
	Mkk7	250
	RKIP	
	RHOGDI2	
	SSECKS	
	TXNIP/VDUP1	
Genes de degradación de la matriz celular		
	Relaxina 1	77
	hMMP9	78

Tabla 5		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
Hormonas		
	Eritropoyetina Humana (EPO)	11
MicroARN		
	pre-miARN 181a (secuencia insertada en el genoma viral)	291
	miARN 181a	292
	mmu-miR-181a MIMAT0000210 miARN maduro 181a	293
	pre-miARN 126 (secuencia insertada en el genoma viral)	294
	miARN 126	295
	hsa-miR-126 MI000471	296
	hsa-miR-126 MIMAT0000445	297
	pre-miARN 335 (secuencia insertada en el genoma viral)	298
	miARNA 335	299
	hsa-miR-335 MI0000816	300
	hsa-miR-335 MIMAT0000765	301
Genes para la regeneración de tejidos y reprogramación de células somáticas humanas a pluripotencia		
	nAG	255
	Oct4	256
	NANOG	257
	Variante de transcrito 1 de Ngn (Neogenina 1)	79
	Variante de transcrito 2 de Ngn (Neogenina 1)	80
	Variante de transcrito 3 de Ngn (Neogenina 1)	81
	Ng3	258
	Pdx1	82
	Mafa	83
Genes Adicionales		
	Myc-CTR1	259
	FCU1	260
	mMnSOD	287
	HACE1	261
	nppa1	262
	GCP-2 (proteína-2 quimiotáctica de granulocitos, CXCL6)	222
	hADH	288
	WT CDC6	264
	Mut CDC6	328
	GLAF-3 scFv anti-DLL4	302
	GLAF-4 anti-FAP (Proteína de Activación de Fibroblastos) scFv (Brocks et al., (2001) Mol. Medicine 7(7):461-469)	306
	GLAF-5 scFv anti-FAP	310

Tabla 5	
Productos génicos detectables	SEQ ID NO
BMP4	265
F14.5L tipo salvaje	266
Otras proteínas	
WT1	267
p53	268
pseudomonas A endotoxina	
toxina diftérica	
Arf o p16	269
Bax	270
timidina quinasa del Virus del herpes simple	
purina nucleósido fosforilasa de E. coli	
angiostatina	
endostatina	
Rb	
BRCA1	271
regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR)	272
Factor VIII	273
receptor de lipoproteínas de baja densidad	274
alfa-galactosidasa	275
beta-glucocerebrosidasa	276
insulina	277
hormona paratiroidea	278
alfa-1-antitripsina	279
rsCD40L	
ligando de Fas	
TRAIL	
TNF	
microcina e492	
xantinguanina fosforibosiltransferasa (XGPRT)	
guanina fosforribosiltransferasa de E. coli (gpt)	
hiperforina	
endotelina-1 (ET-1)	
factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF)	
factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	
ciclooxigenasa	
COX-2	
inhibidor de la ciclooxigenasa-2	
MPO (mieloperoxidasa)	

Tabla 5		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
	Apo A1 (apolipoproteína A1)	
	PCR (proteína reactiva C)	
	Fibrinógeno	
	SAP (suero amiloide P)	
	FGF-básico (Factor de crecimiento de fibroblastos-básico)	
	Agonista de PPAR	
	Proteína de fusión PE37/TGF-alfa	
Reemplazo del gen A34R con otro gen A34R de una cepa diferente para aumentar la forma EEV del virus		
	A34R de VACV IHD-J	286
	A34R con una mutación en el codón 151 (Lys 151 a Asp)	
	A34R con una mutación en el codón 151 (Lys 151 a Glu)	
Secuencia no codificante		
	No proteínas	
	Acido nucleico no codificante	
Ribozimas		
	Intrones del grupo I	
	Intrones del grupo II	
	RNasaP	
	ribozimas en horquilla	
	ribozimas de cabeza de martillo	
Enzimas que convierten profármacos		
	timidina quinasa de varicela zoster	
	citocina desaminasa	
	purina nucleósido fosforilasa (p. ej., de <i>E. coli</i>)	
	betalactamasa	
	carboxipeptidasa G2	
	carboxipeptidasa A	
	citocromo p450	
	citocromo P450-2B 1	
	citocromo P450-4B 1	
	peroxidasa de rábano picante	
	nitrorreductasa	
	carboxilesterasa de conejo	
	tirosinasa de hongos	
	beta galactosidasa (lacZ) (es decir, de <i>E. coli</i>)	
	beta glucuronidasa (gusA)	
	timidina fosforilasa	

Tabla 5		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
	desoxicitidina quinasa	
	inamerasa 1	
Proteínas detectables por anticuerpos.		
	cloranfenicol acetil transferasa	
	hGH	
Factores de atenuación viral.		
	anticuerpos específicos del virus	
	mucinas	
	trombospondina	
	factores de necrosis tumoral (FNT)	
	TNF α	
Superantígenos		
Toxinas		
	toxina diftérica	
	exotoxina de <i>Pseudomonas</i>	
	Toxina shiga de <i>Escherichia coli</i>	
	toxina de <i>Shigella</i>	
	Verotoxina 1 de <i>Escherichia coli</i>	
	Toxina 1 del Síndrome por Choque Tóxico	
	Toxinas Exfoliantes (EXft)	
	Exotoxina Pirogénica Estreptocócica (SPE) A, B y C	
	Enterotoxina <i>Perfringens Clostridial</i> (CPET)	
	enterotoxinas estafilocócicas	
	MAR, SEB, SEC1, SEC2, SED, VER y VER	
	Proteínas del virus del tumor mamario del ratón (MMTV)	
	Proteínas estreptocócicas M	
	antígeno p60 de <i>Listeria monocytogenes</i>	
	superantígenos de artritis de micoplasma	
Proteínas que se pueden unir a un agente de contraste, cromóforo o un compuesto o ligando que pueden detectarse		
	sideróforos	
	enterobactina	
	salmoquelina	
	yersiniabactina	
	aerobactina	
Factores de crecimiento		
	factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDG-F)	
	factor de crecimiento de queratinocitos (KGF)	

Tabla 5		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
	factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1)	
	proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBPs)	
	factor de crecimiento transformante (TGF-alfa)	
	Factores de crecimiento de células sanguíneas	
	Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)	
	Factores de crecimiento que pueden estimular las plaquetas.	
	Otros grupos	
	BAC (Cromosoma Artificial Bacteriano) que codifica varias o todas las proteínas de una vía específica, p. ej. vía de curación de heridas	
	MAC (Cromosoma Artificial de Mamífero) que codifica varias o todas las proteínas de una vía específica, p. ej. vía de curación de heridas	
	antígeno tumoral	
	ARNi	
	ligando proteínas	
	Proteínas que pueden inducir una señal detectable por resonancia magnética.	
	angiogeninas	
	agentes fotosensibilizantes	
	anti-metabolitos	
	moduladores de señalización	
	compuestos quimioterapéuticos	
	lipasas	
	proteasas	
	factores pro-apoptóticos	
	vacuna contra el cáncer	
	vacunas antigénicas	
	vacunas de células completas (es decir, vacunas de células dendríticas)	
	vacunas de ADN	
	vacunas anti-idiotipo	
	supresores de tumores	
	proteína citotóxica	
	proteínas citostáticas	
	moléculas coestimuladoras	
	citocinas y quimiocinas	
	inhibidores del crecimiento del cáncer	
	terapia de genes	
	vacuna BCG para el cáncer de vejiga	
	Proteínas que interactúan con las proteínas de la célula anfitriona.	

2. Modificaciones ilustrativas

a. Productos génicos de diagnóstico

En algunos ejemplos, los virus proporcionados en la presente memoria pueden expresar uno o más genes adicionales cuyos productos son detectables o cuyos productos son capaces de inducir una señal detectable. En algunos ejemplos, los virus proporcionados en la presente memoria contienen ácido nucleico que codifica una proteína detectable o una proteína capaz de inducir una señal detectable. La expresión de tales proteínas permite la detección del virus *in vitro* e *in vivo*. Se conocen en la técnica una variedad de productos génicos detectables, tales como proteínas detectables, y se pueden utilizar con los virus proporcionados en la presente memoria.

Los ejemplos de tales proteínas son enzimas que pueden catalizar una reacción detectable o catalizar la formación de un producto detectable, tal como, por ejemplo, luciferasas, tal como una luciferasa de escarabajo clic, una luciferasa de *Renilla*, una luciferasa de luciérnaga o beta-glucuronidasa (GusA). También son ejemplos de tales proteínas las proteínas que emiten una señal detectable, que incluyen proteínas fluorescentes, tales como una proteína fluorescente verde (GFP) o una proteína fluorescente roja (RFP). Se conoce una variedad de secuencias de ADN que codifican proteínas que pueden emitir una señal detectable o que pueden catalizar una reacción detectable, tales como las proteínas luminiscentes o fluorescentes, y se pueden utilizar en los virus y métodos que se proporcionan en la presente memoria. Los genes ilustrativos que codifican proteínas emisoras de luz incluyen, por ejemplo, genes de luciferasa bacteriana de *Vibrio Harveyi* (Belas et al., Science 218 (1982), 791-793), luciferasa bacteriana de *Vibrio fischerii* (Foran y Brown, Nucleic acids Res. 16 (1988), 177), luciferasa de luciérnaga (de Wet et al., Mol. Cell. Biol. 7 (1987), 725-737), aequorina de *Aequorea victoria* (Prasher et al., Biochem. 26 (1987), 1326-1332), luciferasa de *Renilla* de *Renilla reniformis* (Lorenz et al, PNAS USA 88 (1991), 4438-4442) y proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* (Prasher et al., Gene 111: 229-233 (1987)). Los genes *luxA* y *luxB* de la luciferasa bacteriana pueden fusionarse para producir el gen de fusión (*Fab2*), que se puede expresar para producir una proteína luciferasa completamente funcional (Escher et al., PNAS 86: 6528-6532 (1989)). La transformación y expresión de estos genes en virus puede permitir la detección de una infección viral, por ejemplo, utilizando una cámara de generación de imágenes con poca luz y/o fluorescencia. En algunos ejemplos, las luciferasas expresadas por virus pueden requerir sustratos añadidos exógenamente, tales como decanal o celenterazina para la emisión de luz. En otros ejemplos, los virus pueden expresar un operón *lux* completo, que puede incluir proteínas que pueden proporcionar sustratos de luciferasa tales como el decanal. Por ejemplo, los virus que contienen la secuencia del operón *lux* completa, cuando se inyectó por vía intraperitoneal, intramuscular o intravenosa, permitió la visualización y localización de microorganismos en ratones vivos, lo que indica que la emisión de luz de luciferasa puede penetrar en los tejidos y se puede detectar externamente (Contag et al. (1995) Mol. Microbiol. 18: 593-603).

Las proteínas detectables ilustrativas también incluyen proteínas que se pueden unir a un agente de contraste, cromóforo, o un compuesto o ligando que se puede detectar, tal como un receptor de transferrina o una ferritina; y proteínas informadoras, tales como β -galactosidasa, β -glucuronidasa, xantina-guanina fosforribosiltransferasa (*gpt*) de *E. coli*.

También son ejemplos de proteínas detectables los productos génicos que se pueden unir específicamente a un compuesto detectable, incluidos, pero sin limitarse a, receptores, proteínas de unión a metales (p. ej., sideróforos, ferritinas, receptores de transferrina), proteínas de unión a ligandos y anticuerpos. También son ejemplos de proteínas detectables las proteínas transportadoras que se pueden unir y transportar moléculas detectables. Tales moléculas se pueden utilizar para la detección del virus, por ejemplo para aplicaciones que implican imágenes. Se puede utilizar cualquiera de una variedad de compuestos detectables, y se puede visualizar mediante cualquiera de una variedad de métodos de generación de imágenes conocidos. Los compuestos ilustrativos incluyen ligandos de receptores y antígenos para anticuerpos. El ligando se puede marcar de acuerdo con el método de generación de imágenes utilizado. Los métodos de generación de imágenes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, rayos X, métodos de resonancia magnética, tales como generación de imágenes de resonancia magnética (MRI) y espectroscopia de resonancia magnética (MRS), y métodos tomográficos, incluyendo tomografía computarizada (TC), tomografía axial computada (CAT), tomografía computarizada por haz de electrones (EBCT), tomografía computarizada de alta resolución (TCAR), tomografía hipocicloidea, tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), tomografía computarizada en espiral y tomografía por ultrasonidos.

Las marcas apropiadas para la generación de imágenes de rayos X son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, Bismuto (III), Oro (III), Lantano (III) o Plomo (II); un ion radioactivo, tal como ⁶⁷Cobre, ⁶⁷Galio, ⁶⁸Galio, ¹¹¹Indio, ¹¹³Indio, ¹²³Yodo, ¹²⁵Yodo, ¹³¹Yodo, ¹⁹⁷Mercurio, ²⁰³Mercurio, ¹⁸⁶Renio, ¹⁸⁸Renio, ⁹⁷Rubidio, ¹⁰³Rubidio, ⁹⁹Tecnecio o ⁹⁰Itrio; un isótopo de resonancia magnética nuclear, tal como Cobalto (II), Cobre (II), Cromo (III), Disproso (III), Erblio (III), Gadolinio (III), Holmio (III), Hierro (II), Hierro (III), Manganeso (II), Neodimio (III), Níquel (II), Samario (III), Terbio (III), Vanadio (II) o Iterbio (III); o rodamina o fluoresceína.

Las marcas apropiadas para la generación de imágenes por resonancia magnética son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, quelatos de gadolinio y óxidos de hierro. El uso de quelatos en agentes de contraste es conocido en la técnica. Las marcas apropiadas para los métodos de generación de imágenes tomográficas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, emisores β tales como ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O o ⁶⁴Cu o emisores γ tales como

¹²³I. Otros radionúclidos ilustrativos que se pueden utilizar, por ejemplo, como marcadores para PET incluyen ⁵⁵Co, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁶¹Cu (II), ⁶⁷Cu (II), ⁵⁷Ni, ⁵²Fe y ¹⁸F (p. ej., ¹⁸F-fluorodesoxiglucosa (FDG)). Los ejemplos de agentes útiles marcados con radionúclidos son un fragmento de anticuerpo modificado genéticamente marcado con ⁶⁴Cu (Wu et al. (2002) PNAS USA 97: 8495-8500), somatostatina marcada con ⁶⁴Cu (Lewis et al. (1999) J. Med. Chem. 42: 1341-1347), ⁶⁴Cu-piruvalehído-bis(N4-metiliosemicarbazona) (⁶⁴Cu-PTSM) (Adonai et al. (2002) PNAS USA 99:3030-3035), ⁵²Fe-citrato (Leenders et al. (1994) J. Neural. Transm. Supl. 43: 123-132), ⁵²Fe/^{52m}Mn-citrato (Calonder et al. (1999) J. Neurochem. 73: 2047-2055) y complejo de hidróxido hierro (III)-sacarosa marcado con ⁵²Fe (Beshara et al. (1999) Br. J. Haematol. 104: 288-295,296-302).

5 Un ejemplo de proteínas detectables son proteínas transportadoras que se pueden unir y transportar moléculas detectables, tales como el transportador de epinefrina humana (hNET) o simportador de yoduro de sodio (NIS), que se pueden unir y transportar moléculas detectables, tales como MIBG y otras moléculas marcadas (p. ej., N/A¹²⁵I), a la célula.

15 Otras proteínas detectables ilustrativas son proteínas codificadas por genes para la síntesis de melanina. Se sabe que muchos genes están implicados en la biosíntesis de la melanina (véase, p. ej., Simon et al. (2009) Pigment Cell Melanoma Res, 22: 563-79). La melanina es un pigmento que se puede subdividir en la eumelanina parda/negra y la feomelanina parda rojiza. Los ejemplos de tales genes incluyen, pero no se limitan a, tirosinasa de ratón (*mTYR*),
 20 proteína 1 relacionada con la tirosinasa humana (*tyrp1*) y la proteína relacionada con Dopacromo tautomerasa/tirosinasa humana 2 (*DC2*). Se puede utilizar un virus que expresa un gen para la síntesis de melanina para infectar anfitriones o células para obtener células con altas tasas de absorción de luz en todo el espectro visible. Se pueden obtener imágenes de las células o los animales resultantes utilizando cualquier sistema de generación de imágenes capaz de detectar altas tasas de absorción de luz en todo el espectro visible y/o a través de diferentes escalas de penetración. Por ejemplo, se puede utilizar una tomografía optoacústica/foto (multiespectral) -
 25 (MS)OAT (ver por ejemplo Ntziachristos (2010) Nature Methods, 7: 603-14; Li et al. (2007) J Biomed Optics Letters, 12: 1-3).

Los virus se pueden modificar con el fin de utilizar los virus para la generación de imágenes, incluso con el propósito de generación de imágenes dobles *in vitro* y/o *in vivo* para detectar dos o más productos génicos detectables,
 30 productos génicos que producen una señal detectable, productos génicos que se pueden unir a un compuesto detectable, o productos génicos que se pueden unir a otras moléculas para formar un producto detectable. En algunos ejemplos, los dos o más productos génicos son expresados por virus diferentes, mientras que en otros ejemplos los dos o más productos génicos son producidos por el mismo virus. Por ejemplo, un virus puede expresar un producto génico que emite una señal detectable y también expresar un producto génico que cataliza una reacción detectable. En otros ejemplos, un virus puede expresar uno o más productos génicos que emiten una señal detectable, uno o más productos génicos que catalizan una reacción detectable, uno o más productos génicos que se pueden unir a un compuesto detectable o que pueden formar un producto detectable, o cualquier combinación de los mismos. Cualquier combinación de tales productos génicos puede ser expresada por los virus proporcionados en la presente memoria y puede ser utilizada combinada con cualquiera de los métodos proporcionados en la presente memoria. La generación de imágenes de tales productos génicos se puede realizar, por ejemplo, mediante diversos métodos de generación de imágenes como se describe en la presente memoria y conocidos en la técnica (p. ej., generación de imágenes de fluorescencia, resonancia magnética, PET, entre muchos otros métodos de detección). La generación de imágenes de los productos génicos también se puede realizar utilizando el mismo método, con lo que los productos génicos se distinguen por sus propiedades, tal como por ejemplo las diferencias en las longitudes de onda de la luz emitida. Por ejemplo, un virus puede expresar más de una proteína fluorescente que difiere en la longitud de onda de la luz emitida (p. ej., una GFP y una RFP). En otro ejemplo no limitante, una RFP se puede expresar con una luciferasa. En otros ejemplos no limitantes, un producto génico fluorescente se puede expresar con un producto génico, tal como un receptor de ferritina o transferrina, utilizado para la generación de imágenes por resonancia magnética. Se pueden visualizar *in vitro* o *in vivo* utilizando tales métodos un virus que expresa dos o
 45 más productos génicos detectables o dos o más virus que expresan dos o más productos génicos detectables. En algunos ejemplos, los dos o más productos génicos se expresan como un único polipéptido, tal como una proteína de fusión. Por ejemplo, una proteína fluorescente se puede expresar como una proteína de fusión con una proteína luciferasa.

55 b. Productos génicos terapéuticos

Los virus proporcionados en la presente memoria también pueden contener una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica uno o más productos génicos terapéuticos. Los productos génicos terapéuticos incluyen productos que causan la muerte celular o causan una respuesta inmunológica antitumoral. Se conoce en la técnica una variedad de productos génicos terapéuticos, tales como proteínas tóxicas o apoptóticas, o ARNip, y se pueden utilizar con los virus proporcionados en la presente memoria. Los genes terapéuticos pueden actuar destruyendo directamente la célula anfitriona, por ejemplo, como una proteína lítica o formadora de canales, o desencadenando la apoptosis, o inhibiendo procesos celulares esenciales, o desencadenando una respuesta inmunológica contra la célula, o interactuando con un compuesto que tiene un efecto similar, por ejemplo, convirtiendo un compuesto menos activo en un compuesto citotóxico.

65

- Los productos génicos terapéuticos ilustrativos que pueden ser expresados por los virus proporcionados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, productos génicos (es decir, proteínas y ARN), incluidos aquellos útiles para la terapia de tumores, tales como, por ejemplo, un agente anticanceroso, un agente antimetastásico o un agente antiangiogénico. Por ejemplo, las proteínas ilustrativas útiles para la terapia de tumores incluyen, pero no se limitan a, supresores de tumores, proteínas citostáticas y moléculas coestimuladoras, tales como una citocina, una quimiocina u otras moléculas inmunomoduladoras, un anticuerpo anticanceroso, tal como un anticuerpo de cadena sencilla, ARN antisentido, ARNi, enzima convertidora de profármacos, una toxina, una proteína inhibidora de la mitosis, un oligopéptido antitumoral, un antibiótico polipeptídico anticanceroso, un inhibidor de la angiogénesis o un factor tisular. Por ejemplo, un gran número de proteínas terapéuticas que pueden ser expresadas para el tratamiento de tumores en los virus y los métodos proporcionados en la presente memoria son conocidos en la técnica, incluidos, pero sin limitarse a, un transportador, un receptor de la superficie celular, una citocina, una quimiocina, una proteína apoptótica, una proteína inhibidora de la mitosis, un oligopéptido antimitótico, tales como un factor antiangiogénico (p. ej., hk5), inhibidores de la angiogénesis (p. ej., dominio kringle 5 de plasminógeno, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) scAb, tTF-RGD, factor tisular humano truncado- proteína de fusión de $\alpha_v\beta_3$ integrina-péptido RGD), anticuerpos anticancerosos, tal como un anticuerpo de cadena sencilla (p. ej., un anticuerpo antitumoral o un anticuerpo antiangiogénico, tal como un anticuerpo anti-VEGF o un anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), una toxina, un antígeno tumoral, una enzima de conversión de profármacos, una ribozima, ARNi y ARNi.
- Las moléculas co-estimuladoras para los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen cualquier molécula que sea capaz de mejorar las respuestas inmunitarias a un antígeno/patógeno *in vivo* y/o *in vitro*. Las moléculas co-estimuladoras también abarcan cualquier molécula que promueva la activación, proliferación, diferenciación, maduración o mantenimiento de los linfocitos y/o otras células cuya función es importante o esencial para las respuestas inmunitarias.
- Una lista ilustrativa, no limitante de proteínas terapéuticas incluye supresores de crecimiento tumoral tales como IL-24, WT1, p53, endotoxina A de *Pseudomonas*, toxina diftérica, Arf, Bax, TK de HSV, purina nucleósido fosforilasa de *E. coli*, angiostatina y endostatina, p16, Rb, BRCA1, regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), Factor VIII, receptor de lipoproteínas de baja densidad, beta-galactosidasa, alfa-galactosidasa, beta-glucocerebrosidasa, insulina, hormona paratiroidea, alfa-1-antitripsina, rsCD40L, ligando de Fas, TRAIL, TNF, anticuerpos, microcina E492, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina Shiga de *Escherichia coli*, Verotoxina 1 de *Escherichia coli*, e hiperforina. Las citocinas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, quimiocinas y citocinas clásicas, tales como las interleucinas, que incluyen, por ejemplo, interleucina-1, interleucina-2, interleucina-6 e interleucina-12, factores de necrosis tumoral, tales como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferones tales como interferón gamma (IFN- γ), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina y quimiocinas ilustrativas, que incluyen, entre otras, quimiocinas CXC como IL-8 GRO α , GRO β , GRO γ , ENA-78, LDGF-PBP, GCP-2, PF4, Mig, IP-10, SDF-1 α/β , BUNZO/STRC33, I-TAC, BLC/BCA-1; quimiocinas CC tales como MIP-1 α , MIP-1 β , MDC, TECK, TARC, RANTES, HCC-1, HCC-4, DC-CK1, MIP-3 α , MIP-3 β , MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, Eotaxina, Eotaxina-2/MPIF-2, 1-309, MIP-5/HCC-2, MPIF-1, 6Cquina, CTACK, MEC; linfotactina; y fractalquina. Otras moléculas coestimuladoras ilustrativas incluyen la superfamilia de inmunoglobulinas de citocinas, tales como B7.1, B7.2.
- Las proteínas terapéuticas ilustrativas que pueden ser expresadas por los virus proporcionados en la presente memoria y utilizadas en los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, eritropoyetina (p. ej., SEC ID NO: 329), un anticuerpo de cadena sencilla anti-VEGF (p. ej., SEQ ID NO: 21), un dominio K5 de plasminógeno (p. ej., SEQ ID NO: 190), una proteína de fusión de factor tisular humano-integrina $\alpha_v\beta_3$ y RGD (p. ej., SEC ID NO: 14), interleucina-24 (p. ej., SEQ ID NO: 98), o estimuladores inmunitarios, tales como la proteína de fusión del receptor SIL-6-SIL-6 (p. ej., SEC ID NO: 97).
- En algunos ejemplos, los virus proporcionados en la presente memoria pueden expresar uno o más productos génicos terapéuticos que son proteínas que convierten un compuesto menos activo en un compuesto que causa la muerte de células tumorales. Los métodos ilustrativos de conversión de tal compuesto profármaco incluyen la conversión enzimática y la conversión fotolítica. Una gran variedad de pares de proteínas/compuestos son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, timidina quinasa/ganciclovir del virus del Herpes simple, timidina quinasa del virus del Herpes simple/(E)-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina (BVDU), timidina quinasa de varicela zoster/ganciclovir, timidina quinasa de varicella zoster/BVDU, timidina quinasa de varicella zoster/(E)-5-(2-bromovinil)-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo (BvaraU), citosina desaminasa/5-fluorouracilo, citosina desaminasa/5-fluorocitosina, purina nucleósido fosforilasa/6-metilpurina desoxirribósido, beta-lactamasa/cefalosporina-doxorrubicina, carboxipeptidasa para ácido G2/4-[(2-cloroetil)(2-mesiloilquil)glutámico (CMDA), carboxipeptidasa A/metotrexato-fenilamina, citocromo P450/acetaminofeno, citocromo P450-2B1/ciclofosfamida, citocromo P450-4B1/2-aminoantraceno, 4-ipomeanol, peroxidasa de rábano picante/ácido indol-3-acético, nitrorreductasa/CB1954, carboxilesterasa de conejo/7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carboniloxi-camptotecina (CPT-11), tirosinasa de hongos/bis-(2-cloroetil)amino-4-hidroxifenilaminometanona 28, beta-galactosidasa/1-clorometil-5-hidroxi-1,2-dihidro-3H-benz[e]indol, beta glucuronidasa/glucurónido epirubicina, timidina fosforilasa/5'-desoxi-5-fluorouridina, desoxicitidina quinasa/arabinósido de citosina, y linamerasa/linamarina.

Otros productos génicos terapéuticos que pueden ser expresados por los virus proporcionados en la presente memoria incluyen moléculas de ARNip y microARN. La molécula de ARNip y/o microARN puede dirigirse contra la expresión de un gen promotor de tumores, tal como, por ejemplo, un oncogén, un factor de crecimiento, un gen promotor de la angiogénesis o un receptor. La molécula de ARNip y/o microARN también puede dirigirse contra la expresión de cualquier gen esencial para el crecimiento celular, la replicación celular o la supervivencia celular. La molécula de ARNip y/o microARN también puede dirigirse contra la expresión de cualquier gen que establezca la membrana celular o, de lo contrario, limite el número de antígenos de células tumorales liberados por la célula tumoral. El diseño de un ARNip o microARN se puede determinar fácilmente de acuerdo con la diana seleccionada del ARNip; los métodos de diseño de ARNip y microARN y la regulación por disminución de genes son conocidos en la técnica, como se ilustra en las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Núm. 2003-0198627 y 2007-0044164 y Zeng et al., *Molecular Cell* 9:1327-1333 (2002).

Los productos génicos terapéuticos incluyen factores de atenuación viral, tales como proteínas antivirales. Las proteínas o los péptidos antivirales pueden ser expresados por los virus proporcionados en la presente memoria. La expresión de proteínas o péptidos antivirales puede controlar la patogenicidad viral. Los factores de atenuación viral ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos específicos del virus, mucinas, trombospondina y proteínas solubles tales como citocinas, que incluyen, pero no se limitan a, TNF α , interferones (p. ej., IFN α , IFN β o IFN γ) e interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-12 o IL-18).

Otro producto génico terapéutico ilustrativo que puede ser expresado por los virus proporcionados en la presente memoria es un ligando de proteína, tal como un oligopéptido antitumoral. Los oligopéptidos antitumorales son péptidos proteicos cortos con alta afinidad y especificidad para los tumores. Tales oligopéptidos podrían enriquecerse e identificarse utilizando bibliotecas de fagos asociados a tumores (Akita et al. (2006) *Cancer Sci.* 97(10): 1075-1081). Se ha demostrado que estos oligopéptidos potencian la quimioterapia (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.912.199). Los oligopéptidos pueden ser expresados por los virus proporcionados en la presente memoria. La expresión de los oligopéptidos puede provocar actividades anticancerosas por sí sola o combinada con otros agentes quimioterapéuticos. Un grupo ilustrativo de oligopéptidos antitumorales son los péptidos antimetabólicos, que incluyen, pero no se limitan a, tubulisina (Khalil et al. (2006) *Chembiochem.* 7(4):678-683), fomopsina, hemiasterlina, taltobulina (HTI-286, 3) y criptoficina. La tubulisina proviene de las mixobacterias y puede inducir el agotamiento de los microtúbulos celulares y desencadenar el proceso apoptótico. Los péptidos antimetabólicos pueden ser expresados por los virus proporcionados en la presente memoria y suscitan actividades anticancerígenas por sí solos o combinados con otras modalidades terapéuticas.

Otro producto génico terapéutico ilustrativo que puede ser expresado por los virus proporcionados en la presente memoria es una proteína que secuestra moléculas o nutrientes necesarios para el crecimiento del tumor. Por ejemplo, el virus puede expresar una o más proteínas que se unen a hierro, transportan hierro o almacenan hierro, o una combinación de las mismas. La mayor captación y/o almacenamiento de hierro mediante la expresión de dichas proteínas no solo aumenta el contraste para la visualización y detección de un tumor o tejido en el que se acumula el virus, sino que también agota el hierro del ambiente del tumor. El agotamiento del hierro en el entorno del tumor elimina un nutriente vital de los tumores, desregulando así la homeostasis de hierro en las células tumorales y retrasando la progresión del tumor y/o destruyendo el tumor.

Además, se pueden administrar a un sujeto con tumor hierro u otros metales marcados, ya sea solos o en forma conjugada. Un producto conjugado de hierro puede incluir, por ejemplo, hierro conjugado con un radical de generación de imágenes o un agente terapéutico. En algunos casos, el radical de generación de imágenes y el agente terapéutico son los mismos, p. ej., un radionúclido. La internalización del hierro en el tumor, la herida, la zona de inflamación o infección permite la internalización de hierro solo, un fragmento de generación de imágenes complementario o un agente terapéutico (que puede suministrar citotoxicidad específicamente a las células tumorales o suministrar el agente terapéutico para el tratamiento de la herida, zona de inflamación o infección). Estos métodos se pueden combinar con cualquiera de los otros métodos proporcionados en la presente memoria.

c. Antígenos

Los virus proporcionados en la presente memoria se pueden modificar para expresar uno o más antígenos. Los antígenos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, antígenos específicos de tumores, antígenos asociados a tumores, antígenos específicos de tejidos, antígenos bacterianos, antígenos virales, antígenos de levaduras, antígenos de hongos, antígenos de protozoos, antígenos de parásitos y mitógenos. Los superantígenos son antígenos que pueden activar una gran respuesta inmunológica, a menudo provocada por una gran respuesta de las células T. Se conoce una variedad de superantígenos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, toxina diftérica, enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SED, SEE y SEH), Toxina 1 de Síndrome de Choque Tóxico, Toxinas Exfoliantes (Exft), Exotoxina Pirogénica de *Streptococcus* A, B y C (SPE A, B y C), proteínas del Virus del Tumor Mamario de Ratón (MMTV), proteínas M de *Streptococcus*, Enterotoxina Perfringens Clostridial (CPET), antígeno p60 de *Listeria monocytogenes*, y superantígenos de artritis de micoplasma.

Dado que muchos superantígenos también son toxinas, si se desea la expresión de un virus de menor toxicidad, el

superantígeno puede modificarse para que conserve al menos algo de su superantigenicidad al tiempo que reduce su toxicidad, dando como resultado un compuesto tal como un toxoide. Una variedad de superantígenos recombinantes y toxoides de superantígenos es conocida en la técnica, y pueden ser expresados fácilmente en los virus proporcionados en la presente memoria. Los toxoides ilustrativos incluyen los toxoides de la toxina diftérica, como se ilustra en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.455.673 y toxoides de las enterotoxinas estafilocócicas, como se ilustra en la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2003-0009015.

d. Modificaciones para alterar la atenuación de los virus.

Los virus proporcionados en la presente memoria se pueden atenuar adicionalmente mediante la adición, eliminación y/o modificación de ácido nucleico en el genoma viral. En un ejemplo, el virus se atenúa mediante la adición de ácido nucleico heterólogo que contiene un marco de lectura abierto que codifica uno o más productos génicos (p. ej., un producto génico de diagnóstico o un producto génico terapéutico como se describe en otra parte en la presente memoria). En otro ejemplo, el virus se atenúa mediante la modificación de un ácido nucleico heterólogo que contiene un marco de lectura abierto que codifica uno o más productos génicos. En un ejemplo adicional, el ácido nucleico heterólogo se modifica aumentando la longitud del marco de lectura abierto, eliminando todo o parte del marco de lectura abierto o reemplazando todo o parte del marco de lectura abierto. Tales modificaciones pueden afectar la toxicidad viral por la interrupción de uno o más genes virales o al aumentar o disminuir la carga transcripcional y/o traduccional en el virus (véase, p. ej., la Publicación de Patente Internacional Num. WO 2008/100292).

En otro ejemplo, el virus se puede atenuar mediante la modificación o reemplazo de uno o más promotores contenidos en el virus. Tales promotores pueden ser reemplazados por promotores más fuertes o más débiles, donde el reemplazo da como resultado un cambio en la atenuación del virus. En un ejemplo, un promotor de un virus proporcionado en la presente memoria se reemplaza con un promotor natural. En un ejemplo, un promotor de un virus proporcionado en la presente memoria se reemplaza con un promotor sintético. Los promotores ilustrativos que pueden reemplazar un promotor contenido en un virus pueden ser un promotor viral, tal como un promotor viral de vacuna, y pueden incluir un promotor temprano, intermedio, temprano/tardío o tardío de vaccinia. Se proporcionan promotores virales ilustrativos adicionales en la presente memoria y se conocen en la técnica y se pueden utilizar para reemplazar un promotor contenido en un virus.

En otro ejemplo, el virus se puede atenuar mediante la eliminación de la totalidad o de una porción de una molécula de ácido nucleico heterólogo contenida en el virus. La porción del ácido nucleico heterólogo que se elimina puede tener 1, 2, 3, 4, 5 o más, 10 o más, 15 o más, 20 o más, 50 o más, 100 o más, 1000 o más, 5000 o más bases de nucleótidos. En otro ejemplo, el virus se atenúa mediante la modificación de un ácido nucleico heterólogo contenido en el virus mediante la eliminación o la totalidad o una porción de una primera molécula de ácido nucleico heterólogo y la sustitución por una segunda molécula de ácido nucleico heterólogo, donde la sustitución cambia el nivel de atenuación del virus. La segunda molécula de ácido nucleico heterólogo puede contener una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o puede ser una molécula de ácido nucleico no codificante. En algunos ejemplos, la segunda molécula de ácido nucleico heterólogo contiene un marco de lectura abierto conectado operativamente a un promotor. La segunda molécula de ácido nucleico heterólogo puede contener uno o más marcos de lectura abiertos o uno o más promotores. Adicionalmente, los uno o más promotores de la segunda molécula de ácido nucleico heterólogo pueden ser uno o más promotores más fuertes o uno o más promotores más débiles, o pueden ser una combinación o ambos.

Los virus vaccinia atenuados son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Núm. US 2005-0031643 ahora Patentes de Estados Unidos Núm. 7.588.767, 7.588.771 y 7.662.398, US 2008-0193373, US 2009-0098529, US 2009-0053244, US 2009-0155287, US 2009-0081639, US 2009-0117034 y US 2009-0136917, y la Publicación de Patentes Internacional Núm. WO 2005/047458, WO 2008/100292 y WO 2008/150496.

Los virus proporcionados en la presente memoria también pueden contener una modificación que altera su infectividad o resistencia a los anticuerpos neutralizantes. En un ejemplo no limitante, la delección del gen A35R en una cepa LIVP de vaccinia puede disminuir la infectividad del virus. En algunos ejemplos, los virus proporcionados en la presente memoria se pueden modificar para que contengan una delección del gen A35R. Los métodos ilustrativos para generar tales virus se describen en la Publicación PCT Num. WO2008/100292, que describe los virus LIVP de vaccinia GLV-1j87, GLV-1j88 y GLV-1j89, que contienen la delección del gen A35R.

En otro ejemplo no limitante, la sustitución de proteínas de la cubierta viral (p. ej., A34R, que codifica una glicoproteína de la cubierta viral) por proteínas de la cubierta de cepas de virus más virulentas o menos virulentas puede aumentar o disminuir la eliminación del virus del sujeto. En un ejemplo, el gen A34R en una cepa LIVP de vaccinia puede reemplazarse por el gen A34R de la cepa IHD-J de vaccinia. Tal sustitución puede aumentar la forma del virus con envoltura extracelular (EEV) del virus vaccinia y puede aumentar la resistencia del virus a los anticuerpos neutralizantes.

3. Control de la expresión génica heteróloga.

En algunos ejemplos, el ácido nucleico heterólogo también puede contener una o más secuencias reguladoras para regular la expresión de un marco de lectura abierto que codifica el ARN y/o la proteína heterólogos. Las secuencias reguladoras adecuadas que, por ejemplo, son funcionales en una célula anfitriona de mamífero son bien conocidas en la técnica. La expresión también puede estar influenciada por una o más proteínas o moléculas de ARN expresadas por el virus. Los elementos reguladores genéticos, tales como los promotores y los potenciadores, poseen actividades específicas de tipo celular y pueden activarse por ciertos factores de inducción (p. ej., hormonas, factores de crecimiento, citocinas, agentes citostáticos, irradiación, choque térmico) a través de elementos sensibles. Se puede lograr una expresión controlada y restringida de estos genes utilizando elementos reguladores tales como promotores internos para dirigir la expresión de genes terapéuticos en construcciones de vectores virales.

Por ejemplo, las una o más moléculas de ácido nucleico heterólogo se pueden unir operablemente a un promotor para la expresión del ARN y/o proteína heterólogos. Por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo que está conectado operablemente a un promotor también se denomina casete de expresión. Por lo tanto, los virus proporcionados en la presente memoria pueden tener la capacidad de expresar uno o más genes heterólogos. La expresión génica puede incluir la expresión de una proteína codificada por un gen y/o la expresión de una molécula de ARN codificada por un gen. En algunas realizaciones, los virus proporcionados en la presente memoria pueden expresar genes exógenos a niveles suficientemente altos que permiten la recolección de productos de los genes exógenos del tumor. La expresión de genes heterólogos puede ser controlada por un promotor constitutivo, o por un promotor inducible. En otros ejemplos, la expresión específica de órganos o tejidos puede controlarse mediante secuencias reguladoras. Con el fin de lograr la expresión solo en el órgano diana, por ejemplo, un tumor que se vaya a tratar, la secuencia de nucleótidos foránea se puede conectar a un promotor específico de tejido y se puede utilizar para la terapia génica. Tales promotores son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, p. ej., Zimmermann et al., *Neuron* 12: 11-24 (1994); Vidal et al., *EMBO J.* 9: 833-840 (1990); Mayford et al., *Cell* 81: 891-904 (1995); y Pinkert et al., *Genes & Dev.* 1: 268-76 (1987)).

Los promotores ilustrativos para la expresión de genes heterólogos son conocidos en la técnica. El ácido nucleico heterólogo se puede conectar operativamente a un promotor nativo o un promotor heterólogo que no es nativo para el virus. Se puede utilizar cualquier promotor adecuado, incluidos los promotores sintéticos y naturales y modificados. Los promotores ilustrativos incluyen promotores sintéticos, incluyendo promotores sintéticos virales y animales. El promotor nativo o los promotores heterólogos incluyen, pero no se limitan a, promotores virales, tales como promotores de virus vaccinia y de adenovirus.

En un ejemplo, el promotor es un promotor de poxvirus, tal como, por ejemplo, un promotor de virus vaccinia. Los promotores virales de vaccinia para la expresión de uno o más genes heterólogos pueden ser promotores sintéticos o naturales, e incluyen promotores temprano, intermedio, temprano/tardío y tardío de vaccinia. Los promotores virales de vaccinia ilustrativos para controlar la expresión génica heteróloga incluyen, pero no se limitan a, los promotores P_{7.5k}, P_{11k}, P_{SE}, P_{SEL}, P_{SL}, H5R, TK, P28, C11R, G8R, F17R, I3L, I8R, A1L, A2L, A3L, H1L, H5L, H6R, H8R, D1R, D4R, D5R, D9R, D11L, D12L, D13L, MIL, N2L, P4b o K1. Otros promotores virales incluyen, pero no se limitan a, promotor tardío de adenovirus, promotor ATI de virus de la viruela bovina o promotor T7. Se pueden utilizar promotores tardíos fuertes para lograr altos niveles de expresión de los genes heterólogos. También se pueden utilizar promotores de fase temprana e intermedia. En un ejemplo, los promotores contienen elementos promotores temprano y tardío, por ejemplo, el promotor P_{7.5k} temprano/tardío del virus vaccinia, el promotor P_{11k} tardío de vaccinia, un promotor P_{SEL} de vaccinia temprano/tardío sintético (Patel et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9431-9435; Davison y Moss, (1989) *J Mol Biol* 210: 749-769; Davison et al. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18: 4285-4286; Chakrabarti et al. (1997), *BioTechniques* 23: 1094-1097). Los virus proporcionados en la presente memoria pueden mostrar diferencias en características, tales como la atenuación, como resultado del uso de un promotor más fuerte frente a un promotor más débil. Por ejemplo, en vaccinia, los promotores temprano/tardío y tardío sintéticos son promotores relativamente fuertes, mientras que los promotores temprano, P_{7.5k} temprano/tardío, P_{7.5k} temprano, y P₂₈ tardío de vaccinia sintéticos son promotores relativamente más débiles (véase p. ej., Chakrabarti et al. (1997) *BioTechniques* 23(6) 1094-1097). Se pueden utilizar combinaciones de diferentes promotores para expresar diferentes productos génicos en el mismo virus o dos virus diferentes.

Como se conoce en la técnica, las secuencias reguladoras pueden permitir la expresión constitutiva del gen exógeno o pueden permitir la expresión inducible del gen exógeno. Adicionalmente, la secuencia reguladora puede permitir el control del nivel de expresión del gen exógeno. En algunos ejemplos, tales como la fabricación y recolección de productos génicos, la secuencia reguladora puede dar como resultado altos niveles, constitutivos de expresión génica. En algunos ejemplos, tales como la recolección de anticuerpos anti-(producto génico), la secuencia reguladora puede dar como resultado niveles más bajos, constitutivos de expresión génica. En los ejemplos de terapia tumoral, una proteína terapéutica puede estar bajo el control de un promotor inducible internamente o un promotor inducible externamente.

Por lo tanto, la expresión de genes heterólogos puede ser controlada por un promotor constitutivo o por un promotor inducible. Los promotores inducibles se pueden utilizar para proporcionar la expresión específica de tejido del gen

heterólogo o pueden ser inducibles mediante la adición de una molécula reguladora para proporcionar la inducción temporal específica del promotor. En algunos ejemplos, la expresión inducible puede estar bajo el control de factores celulares u otros factores presentes en una célula tumoral o presentes en una célula tumoral infectada con virus. En ejemplos adicionales, la expresión inducible puede estar bajo el control de una sustancia administrable, que incluye IPTG, RU486 u otros compuestos de inducción conocidos. Se pueden utilizar secuencias reguladoras adicionales para controlar la expresión de uno o más genes heterólogos insertados en el virus. Cualquiera de una variedad de secuencias reguladoras está disponible para un experto en la técnica de acuerdo con factores conocidos y preferencias de diseño.

4. Métodos para generar virus modificados.

Los virus proporcionados en la presente memoria se pueden modificar mediante inserción, eliminación, reemplazo o mutación como se describe en la presente memoria, por ejemplo, inserción o reemplazo de ácido nucleico heterólogo, utilizando metodologías convencionales bien conocidas en la técnica para modificar virus. Los métodos de modificación incluyen, por ejemplo, técnicas de recombinación *in vitro*, métodos sintéticos, clonación directa, y métodos de recombinación *in vivo* tales como los descritos, por ejemplo, por Sambrook et al., en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989)), y en los ejemplos descritos en la presente memoria.

Por ejemplo, la generación de virus recombinantes, incluidos los poxvirus recombinantes, es bien conocida en la técnica, y típicamente implica la generación de casetes de genes o vectores de transferencia utilizando técnicas convencionales en biología molecular (véanse, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 7.588.767 y el documento US2009-0053244-A1, que describen métodos ilustrativos para generar virus vaccinia LVP recombinantes). Tales mecanismos incluyen diversos mecanismos de manipulación de ácidos nucleicos, protocolos de transferencia de ácidos nucleicos, protocolos de amplificación de ácidos nucleicos y otros mecanismos de biología molecular conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones puntuales o pequeñas inserciones o deleciones en un gen de interés mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio mediada por oligonucleótidos. En otro ejemplo, la recombinación homóloga se puede utilizar para introducir una mutación en la secuencia de ácido nucleico o para la inserción o delección de una molécula de ácido nucleico en una secuencia diana de interés. En algunos ejemplos, las mutaciones, inserciones o deleciones de ácido nucleico en un gen concreto pueden seleccionarse para utilizar una presión de selección positiva o negativa. Véase, p. ej., *Current Techniques in Molecular Biology*, (Ed. Ausubel, et al.). Los protocolos de amplificación de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o la amplificación a través de virus u organismos, tales como, pero no limitados a, células de bacterias, levaduras, insectos o mamíferos. El uso de herramientas de ácido nucleico tales como plásmidos, vectores, promotores y otras secuencias reguladoras, son bien conocidos en la técnica para una gran variedad de virus y organismos celulares. Los protocolos de transferencia de ácido nucleico incluyen la transformación/transfección con cloruro de calcio, la electroporación, la transferencia de ácido nucleico mediada por liposomas, la transformación mediada del metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil-N,N,N-trimetilamonio, y otros. Adicionalmente, existe una gran variedad de herramientas de ácido nucleico disponibles de muchas fuentes diferentes, incluidas varias fuentes comerciales. Un experto en la técnica podrá seleccionar fácilmente las herramientas y los métodos apropiados para las modificaciones genéticas de cualquier virus concreto de acuerdo con el conocimiento de la técnica y la elección del diseño.

Por lo tanto, se puede lograr fácilmente cualquiera de una variedad de modificaciones utilizando métodos biológicos moleculares convencionales conocidos en la técnica. Las modificaciones serán típicamente uno o más truncamientos, deleciones, mutaciones o inserciones del genoma viral. En un ejemplo, la modificación puede dirigirse específicamente a una secuencia particular en el genoma viral. Las modificaciones pueden dirigirse a cualquiera de una variedad de regiones del genoma viral, que incluyen, entre otras, una secuencia reguladora, una secuencia que codifica un gen, una secuencia intergénica, una secuencia sin una función conocida o una región no esencial del genoma viral. Cualquiera de una variedad de regiones de genomas virales que están disponibles para su modificación se conocen fácilmente en la técnica para muchos virus, incluyendo LVP.

Las moléculas de ácido nucleico heterólogo se insertan típicamente en el genoma viral en una región intergénica o en un locus que codifica un producto génico viral no esencial. La inserción de ácido nucleico heterólogo en tales sitios generalmente no afecta significativamente la infección viral o la replicación en el tejido diana. Los sitios de inserción ilustrativos son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, J2R (timidina quinasa (TK)), A56R (hemaglutinina (HA)), F14.5L, factor de crecimiento de vaccinia (VGF), A35R, NIL, E2L/E3L, K1L/K2L, locus de superóxido dismutasa, 7.5K, C7-K1L (región génica de rango de anfitrión), B13R+B14R (región hemorrágica), A26L (región de cuerpos de inclusión tipo A (ATI)) o loci del gen I4L (subunidad grande, ribonucleótido reductasa). Los sitios de inserción para los virus que se proporcionan en la presente memoria también incluyen sitios que corresponden a regiones intragénicas descritas en otros poxvirus tales como el virus Vaccini Ankara Modificado (MVA) (los sitios ilustrativos se exponen en Patente de los Estados Unidos Núm. 7.550.147), NYVAC (sitios ilustrativos expuestos en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.762.938).

Los métodos para la generación de virus recombinantes utilizando técnicas de ADN recombinante son bien

conocidos en la técnica (p. ej., véanse las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.769.330; 4.603.112; 4.722.848; 4.215.051; 5.110.587; 5.174.993; 5.922.576; 6.319.703; 5.719.054; 6.429.001; 6.589.531; 6.573.090; 6.800.288; 7.045.313; He et al. (1998) PNAS 95(5): 2509-2514; Racaniello et al., (1981) Science 214: 916-919; y Hruby et al., (1990) Clin Micro Rev. 3:153-170). Los métodos para la generación de virus vaccinia recombinantes son bien conocidos en la técnica (p. ej., véanse Hruby et al., (1990) Clin Micro Rev. 3: 153-170, la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2005-0031643, ahora Patentes de Estados Unidos Núm. 7.588.767. 7.588.771. 7.662.398 y Patente de los Estados Unidos Núm. 7.045.313).

Por ejemplo, la generación de un virus vaccinia recombinante que exprese un producto génico heterólogo incluye típicamente el uso de un plásmido de recombinación que contiene el ácido nucleico heterólogo, opcionalmente unido a un promotor, con secuencias de ADN del virus vaccinia que flanquean el ácido nucleico heterólogo para facilitar la recombinación homóloga e inserción del gen en el genoma viral. En general, el ADN viral que flanquea el gen heterólogo es complementario a un segmento no esencial del ADN del virus vaccinia, de modo que el gen se inserta en una ubicación no esencial. El plásmido de recombinación se puede cultivar y purificar a partir de *Escherichia coli* e introducir en células anfitrionas adecuadas, tales como, por ejemplo, pero no limitadas a, células CV-1, BSC-40, BSC-1 y TK-143. Las células transfectadas se sobreinfectan a continuación con el virus vaccinia que inicia un ciclo de replicación. El ADN heterólogo se puede incorporar al genoma viral de vaccinia mediante recombinación homóloga y empaquetarse en la progenie de infección. Los virus recombinantes pueden identificarse mediante métodos conocidos en la técnica, tal como por ejemplo mediante la detección de la expresión del producto génico heterólogo, o mediante el uso de métodos de selección positivos o negativos (Patente de Estados Unidos Núm. 7.045.313).

En otro ejemplo, el virus vaccinia recombinante que expresa un producto génico heterólogo se puede generar mediante clonación directa (véanse, p. ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 6.265.183 y Scheifflinger et al. (1992) Proc. Natl Acad Sci. USA 89: 9977-9981). En tales métodos, el ácido nucleico heterólogo, opcionalmente unido a un promotor, está flanqueado por sitios de escisión de endonucleasas de restricción para la inserción en un sitio de endonucleasas de restricción único en el virus diana. El ADN del virus se purifica mediante técnicas convencionales y se escinde con la endonucleasa de restricción específica de la secuencia, donde la secuencia es un sitio único en el genoma del virus. Se puede emplear cualquier sitio único en el genoma del virus siempre que la modificación en el sitio no interfiera en la replicación viral. Por ejemplo, en la cepa L1VP del virus vaccinia, el sitio de restricción NotI se encuentra en el ORF que codifica el gen *F14.5L* con función desconocida (Mikryukov et al., Biotekhnologiya 4: 442-449 (1988)). La Tabla 6 proporciona un resumen de los sitios de restricción únicos contenidos en cepas L1VP ilustrativas y designa la posición de nucleótido de cada uno. Tales cepas L1VP se pueden modificar en la presente memoria mediante clonación directa e inserción de ADN heterólogo en el sitio o en los sitios. En general, la inserción se realiza en un sitio que se encuentra en una región no esencial del genoma del virus. Por ejemplo, las modificaciones ilustrativas en la presente memoria incluyen la inserción de una secuencia de ADN foráneo en el ADN del virus digerido con NotI.

Tabla 6. Sitios únicos de escisión por endonucleasas de restricción en productos aislados clonales de L1VP

Enzima de Restricción/Sitio	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GL-ONC-1 Parental
SbfI CCTGCAGG	40033/ 40029	40756/ 40752	39977/ 39973	40576/ 40572	40177/ 40173	40213/ 40209	40493/ 40489	38630/ 38626
NotI GCGGCCGC	42989/ 42998	43712/ 43716	42933/ 42937	43532/ 43536	43133/ 43137	43169/ 43173	43449/ 43453	41586/ 41590
SgrAI CRCCGGYG	114365/ 114369	115107/ 115111	114308/ 114312	114924/ 114928	114489/ 114493	114548/ 114552	114845/ 114849	112975/ 112979
SmaI CCCGGG	159260	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
TspMI CCCGGG	159258/ 159262	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
XmaI CCCGGG	159258/ 159262	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
ApaI CCCGGG	180516/ 180512	N/A	180377/ 180373	181027/ 181023	180638/ 180634	180596/ 180592	180972/ 180968	N/A
PspOMI CCCGGG	180512/ 180516	N/A	180373/ 180377	181023/ 181027	180634/ 180638	180592/ 180596	180968/ 180972	N/A

En algunos ejemplos, el ADN genómico del virus se modifica primero por recombinación homóloga para introducir uno o más sitios de restricción únicos en el virus (véase p. ej. Mackett et al. (1984) J. Virol. 857-864). Después de la

escisión con la endonucleasa de restricción, el ADN escindido se trata opcionalmente con una fosfatasa para eliminar un radical fosfato de un extremo del segmento de ADN que se produce por escisión con la endonucleasa. Típicamente, se genera un vector plasmídico que contiene el ADN heterólogo para la inserción flanqueado por los sitios de restricción. Antes de la inserción en el virus, el ADN heterólogo se escinde del plásmido por escisión con la endonucleasa de restricción de secuencia específica. El ADN heterólogo se liga a continuación al ADN viral escindido y se empaqueta en una línea celular permisiva mediante la infección de las células con un virus auxiliar, tal como, pero sin limitarse a, un virus de la viruela aviar o un virus vaccinia contra la vacuna auxiliar con puv inactivado y la transfección del ADN ligado en las células infectadas.

En algunos ejemplos, los métodos implican la recombinación homóloga y/o el uso de sitios de restricción únicos en el virus. Por ejemplo, se puede preparar un virus vaccinia LIVP recombinante con una inserción, por ejemplo, en el gen *F14.5L* (p. ej., en el sitio de restricción Not I de un producto aislado de LIVP) mediante las siguientes etapas: (a) generando (i) un plásmido lanzadera/de transferencia de vaccinia que contiene la modificación (p. ej. un casete de expresión génica o un gen *F14.5L* modificado) insertada en un sitio de restricción, X (p. ej. Not I), donde el sitio de restricción en el vector está flanqueado por secuencias de virus parental del sitio de inserción diana y (ii) un ADN del virus LIVP digerido en el sitio de restricción X (p. ej. Not I) y opcionalmente desfosforilado; (b) infectando células con el virus vaccinia auxiliar inactivado con PUV y transfectando las células anfitrionas infectadas con una mezcla de las construcciones de (i) y (ii) de la etapa a; y (c) aislando los virus vaccinia recombinantes de los transfectantes. Un experto en la técnica sabe cómo realizar tales métodos (véase, por ejemplo, Timiryasova et al. (Biotechniques 31: 534-540 (2001))). Típicamente, el sitio de restricción X es un sitio de restricción único en el virus como se ha descrito anteriormente.

En un ejemplo, los métodos incluyen la introducción en el virus de una o más modificaciones genéticas, seguido del escrutinio de los virus para determinar las propiedades que reflejan la modificación o para otras propiedades deseadas. En algunos ejemplos, la modificación puede ser total o parcialmente aleatoria, con lo que la selección de cualquier virus modificado concreto se puede determinar de acuerdo con las propiedades deseadas del virus modificado.

E. Propagación y Producción de Virus.

Los virus proporcionados en la presente memoria se pueden producir por métodos conocidos por un experto en la técnica. Los virus resultantes proporcionados en la presente memoria se pueden utilizar en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico, como se describe en la Sección F a continuación.

El virus se propaga en las células anfitrionas, se cuantifica y se prepara para su almacenamiento antes de que finalmente se prepare para su uso en los métodos descritos en la presente memoria. El virus se puede propagar en células anfitrionas adecuadas para ampliar la provisión de partida, cuya concentración se determina a continuación. En algunos ejemplos, se determina el título infeccioso, por ejemplo mediante ensayo de placa. También se puede determinar el número total de partículas virales. Los virus se almacenan en condiciones que promueven la estabilidad e integridad del virus, de modo que se minimiza la pérdida de infectividad a lo largo del tiempo. En algunos ejemplos, se produce una gran cantidad de virus y se almacena en pequeñas alícuotas de concentración conocida que se pueden utilizar para múltiples procedimientos durante un período prolongado de tiempo. Las condiciones que son más adecuadas para varios virus diferirán, y son conocidas en la técnica, pero típicamente incluyen la congelación o el secado, por ejemplo liofilización. Los virus se pueden almacenar a una concentración de 10^5 - 10^{10} ufp/mL, por ejemplo, 10^7 - 10^9 ufp/mL, tal como al menos o aproximadamente 10^6 ufp/mL, 10^7 ufp/mL, 10^8 ufp/mL o 10^9 ufp/mL. Inmediatamente antes de su uso en los métodos proporcionados en la presente memoria, los virus almacenados se reconstituyen (si se secan para su almacenamiento) y se diluyen en un medio o solución apropiados. Las siguientes secciones proporcionan métodos ilustrativos que se pueden utilizar para la producción y preparación de virus para su uso en cualquiera de los métodos proporcionados en la presente memoria.

1. Células anfitrionas para propagación

Las cepas de virus clonales o las cepas de virus recombinantes de las mismas proporcionadas en la presente memoria se pueden propagar en una célula anfitriona apropiada. Tales células pueden ser un grupo de un solo tipo de células o una mezcla de diferentes tipos de células. Las células anfitrionas pueden incluir líneas celulares cultivadas, células primarias y células proliferativas. Estas células anfitrionas pueden incluir cualquiera de una variedad de células animales, tales como células de mamíferos, aves e insectos y tejidos que son susceptibles al virus, tales como el virus vaccinia, la infección, tales como las células de riñón de pollo, conejo, hámster y mono. Las células anfitrionas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células hematopoyéticas (totipotentes, células madre, leucocitos, linfocitos, monocitos, macrófagos, APC, células dendríticas, células no humanas y similares), células pulmonares, células traqueales, células hepáticas, células epiteliales, células endoteliales, células musculares (p. ej., músculo esquelético, músculo cardíaco o músculo liso), fibroblastos y líneas celulares que incluyen, por ejemplo, células CV-1, BSC40, Vero y BSC-1, y HeLa humanas. Típicamente, los virus se propagan en líneas celulares que pueden crecer en monocapas o en suspensión. Por ejemplo, las líneas celulares ilustrativas para la propagación de virus vaccinia incluyen, pero no se limitan a, células CV-1, BSC40, Vero, BGM, BSC-1 y RK-13. Las líneas celulares

ilustrativas para la propagación de adenovirus incluyen, pero no se limitan a, células HeLa, MK, HEK 293 y HDF. Las líneas celulares ilustrativas para la propagación de herpesvirus incluyen, pero no se limitan a, células WI-38 y HeLa. Otras líneas celulares adecuadas para la propagación de una variedad de virus son bien conocidas en la técnica. La purificación de la cepa cultivada del sistema puede efectuarse utilizando métodos convencionales.

5

2. Determinación de concentración

La concentración de virus en una solución, o título de virus, se puede determinar por una variedad de métodos conocidos en la técnica. En algunos métodos, se realiza una determinación del número de partículas de virus infecciosas (típicamente denominadas unidades formadoras de placa (UFP)), mientras que en otros métodos, se realiza una determinación del número total de partículas virales, ya sean infecciosas o no. Los métodos que calculan el número de viriones infecciosos incluyen, pero no se limitan a, el ensayo de placa, en el que se cultivan las titulaciones del virus en monocapas celulares y el número de placas se cuenta después de varios días a varios semanas, y el método de dilución de punto final, que determina el título dentro de un cierto intervalo, en forma de log. Los métodos que determinan el número total de partículas virales, incluidas las infecciosas y las no infecciosas, incluyen, pero no se limitan a, los métodos de tinción inmunohistoquímica que utilizan anticuerpos que reconocen un antígeno viral y que pueden visualizarse mediante microscopía o análisis FACS; absorbancia óptica, tal como a 260 nm; y la medición del ácido nucleico viral, tal como mediante PCR, RT-PCR o cuantificación mediante marcaje con un colorante fluorescente.

20

3. Métodos de almacenamiento

Una vez que el virus se ha purificado (o hasta alcanzar la pureza deseada) y se ha determinado el título, el virus se puede almacenar en condiciones que mantienen de manera óptima su integridad infecciosa. Normalmente, los virus se almacenan en la oscuridad, debido a que la luz sirve para desactivar los virus a lo largo del tiempo. La estabilidad viral en el almacenamiento suele depender de las temperaturas. Aunque algunos virus son termoestables, la mayoría de los virus no son estables durante más de un día a temperatura ambiente, exhibiendo una viabilidad reducida (Newman et al., (2003) J. Inf. Dis. 187: 1319-1322). Para el almacenamiento a corto plazo de virus, por ejemplo, 1 día, 2 días, 4 días o 7 días, generalmente se recomiendan temperaturas de aproximadamente 4°C. Para el almacenamiento a largo plazo, la mayoría de los virus se pueden mantener a -20°C, -70°C o -80°C. Cuando se congela en una solución simple como PBS o Tris (Tris 20 mM, pH 8,0, 200 NaCl, glicerol al 2-3% o sacarosa) a estas temperaturas, el virus puede ser estable durante 6 meses a un año, o incluso más. Sin embargo, generalmente se evitan los ciclos repetidos de congelación y descongelación, ya que pueden causar una disminución en el título viral. El virus también puede congelarse en medios que contienen otros suplementos en la solución de almacenamiento, lo que puede preservar adicionalmente la integridad del virus. Por ejemplo, la adición de suero o albúmina de suero bovino (BSA) a una solución viral almacenada a -80°C puede ayudar a conservar la viabilidad del virus durante períodos de tiempo más prolongados y a través de varios ciclos de congelación y descongelación. En otros ejemplos, la muestra de virus se seca para el almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente. Los virus se pueden secar utilizando diversas técnicas que incluyen, entre otras, secado por congelación, secado con espuma, secado por aspersión y desecación. Otros métodos para el almacenamiento de virus a temperaturas ambiente, refrigerada o de congelación son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.149.653; 6.165.779; 6.255.289; 6.664.099; 6.872.357; y 7.091.030; y en las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Núm. 2003-0153065, 2004-003841 y 2005-0032044.

Los virus pueden reaccionar de manera diferente a cada método de almacenamiento. Por ejemplo, el virus de la polio se degrada fácilmente a temperatura ambiente en suspensión acuosa, es estable durante solo dos semanas a 0°C y se destruye por liofilización. Para este virus en particular, los métodos de almacenamiento generalmente implican la congelación a -70°C o la refrigeración a 4°C. Por el contrario, el virus vaccinia se considera muy estable y se puede almacenar en solución a 4°C, congelar a, por ejemplo, -20°C, -70°C o -80°C, o liofilizarse con poca pérdida de viabilidad (Newman et al., (2003) J. Inf. Dis. 187: 1319-1322, Hruby et al., (1990) Clin. Microb. Rev. 3:153-170). Los métodos y condiciones adecuados para el almacenamiento de virus concretos se conocen en la técnica y se pueden utilizar para almacenar los virus empleados en los métodos presentados en la presente memoria.

El agua es un reaccionante en casi todas las vías destructivas que degradan los virus en el almacenamiento. Adicionalmente, el agua actúa como un plastificante, lo que permite el despliegue y la agregación de proteínas. Dado que el agua participa en casi todas las vías de degradación, la reducción de la solución acuosa de virus a un polvo seco proporciona una metodología de formulación alternativa para mejorar la estabilidad de dichas muestras. La liofilización, o el secado por congelación, es una técnica de secado que se utiliza para almacenar virus (véase p. ej., Cryole et al., (1998) Pharm. Dev. Technol., 3(3), 973-383). Hay tres etapas para la liofilización; congelación, secado primario y secado secundario. Durante estas etapas, el material se congela rápidamente y se deshidrata a alto vacío. Una vez liofilizado, el virus seco puede almacenarse durante largos períodos de tiempo a temperatura ambiente y reconstituirse con una solución acuosa cuando sea necesario. Se pueden incluir varios estabilizantes en la solución antes de la liofilización para mejorar la preservación del virus. Por ejemplo, se sabe que los aditivos estructurales de alto peso molecular, tales como el suero, la albúmina sérica o la gelatina, ayudan a prevenir la agregación viral durante la congelación y brindan apoyo estructural y nutricional en estado liofilizado o seco. Los

65

aminoácidos, tales como la arginina y el glutamato, los azúcares, como la trehalosa, y los alcoholes, tales como el manitol, el sorbitol y el inositol, pueden mejorar la preservación de la infectividad viral durante la liofilización y en el estado liofilizado. Cuando se agregan a la solución viral antes de la liofilización, la urea y el ácido ascórbico pueden estabilizar el estado de hidratación y mantener el equilibrio osmótico durante el periodo de deshidratación. Típicamente, se mantiene un pH relativamente constante de aproximadamente 7,0 durante la liofilización.

4. Preparación de virus

Inmediatamente antes de su uso, el virus se puede preparar a una concentración apropiada en medios adecuados y se puede mantener a una temperatura fría, por ejemplo sobre hielo, hasta su uso. Si el virus se liofilizó o se secó para su almacenamiento, se puede reconstituir en una solución acuosa apropiada. La solución acuosa en la que se prepara el virus es típicamente el medio utilizado en el ensayo (p. ej., DMEM o RPMI) o uno que sea compatible, tal como una solución salina tamponada (p. ej., PBS, TBS, solución de Hepes). Para aplicaciones farmacéuticas, el virus se puede preparar o reconstituirse inmediatamente en una solución farmacéutica. Numerosas soluciones farmacéuticamente aceptables para uso son bien conocidas en la técnica (véase, p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª edición) ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa). En un ejemplo, los virus se pueden diluir en una solución fisiológicamente aceptable, tal como solución salina estéril o solución salina tamponada estéril, con o sin un coadyuvante o portador. En otros ejemplos, la solución farmacéutica puede contener un componente que proporciona viscosidad (p. ej., glicerol) y/o componente que tiene propiedades bactericidas (p. ej., fenol). En algunos ejemplos, el virus se prepara en una solución relativamente concentrada de modo que solo se requiere un pequeño volumen en el ensayo. Por ejemplo, si se están añadiendo 1×10^6 ufp de virus a las células tumorales en una placa de 96 pocillos, el virus se puede preparar a una concentración de 1×10^8 ufp/mL para que solo se añadan 10 μ l a cada pocillo. La concentración concreta puede ser determinada empíricamente por un experto en la técnica dependiendo de la aplicación concreta.

F. Composiciones farmacéuticas, combinaciones y kits.

En la presente memoria se proporcionan composiciones farmacéuticas, que contienen un virus proporcionado en la presente memoria. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir un virus proporcionado en la presente memoria y un portador farmacéutico. Las combinaciones se describen en la presente memoria y pueden incluir, por ejemplo, dos o más virus, un virus y un compuesto detectable, un virus y un compuesto terapéutico, un virus y un compuesto modulador de la expresión viral, o cualquier combinación de los mismos. Los kits se describen con más detalle en la presente memoria y pueden incluir una o más composiciones o combinaciones farmacéuticas, y uno o más componentes, tales como instrucciones de uso, un dispositivo para administrar la composición o combinación farmacéutica a un sujeto, un dispositivo para administrar un compuesto terapéutico o de diagnóstico a un sujeto o un dispositivo para detectar un virus en un sujeto.

Un virus contenido en una composición farmacéutica, combinación o kit puede incluir cualquier virus proporcionado en la presente memoria, incluyendo cualquier cepa de virus clonal aislada descrita en la presente memoria. Las composiciones, combinaciones o kits farmacéuticos pueden incluir uno o más virus adicionales que se pueden seleccionar de un virus proporcionado en la presente memoria u otro virus terapéutico o de diagnóstico.

1. Composiciones farmacéuticas

En la presente memoria se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen un virus proporcionado en la presente memoria y un vehículo farmacéutico adecuado. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye un material sólido, semisólido o líquido que actúa como vehículo portador o medio para el virus. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria se pueden formular en diversas formas, por ejemplo en forma sólida, semisólida, acuosa, líquida, en polvo o liofilizada. Las composiciones farmacéuticas ilustrativas que contienen un virus proporcionado en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, soluciones inyectables estériles, polvos estériles envasados, gotas para los ojos, comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (por ejemplo en forma de sólido o en un medio líquido), pomadas, cápsulas de gelatina blanda y dura y supositorios.

Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, agua, tampones, soluciones salinas, soluciones salinas tamponadas con fosfato, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, alcoholes, goma arábiga, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, gelatina, glicerina, carbohidratos, tales como lactosa, sacarosa, dextrosa, amilosa o almidón, sorbitol, manitol, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de pentaeritritol, hidroximetilcelulosa, polvos, entre otros. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden contener otros aditivos que incluyen, por ejemplo, antioxidantes, agentes conservantes, agentes analgésicos, aglutinantes, disgregantes, colorantes, diluyentes, excipientes, diluyentes, deslizantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes de tonicidad, vehículos, agentes de viscosidad, agentes saborizantes, agentes edulcorantes, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, emulsionantes y agentes de suspensión, tales como acacia, agar, ácido alginico, alginato de sodio, bentonita, carbómero,

5 carragenina, carboximetilcelulosa, celulosa, colesterol, gelatina, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, octoxinol 9, alcohol oleílico, povidona, monoestearato de propilenglicol, laurilsulfato de sodio, ésteres de sorbitán, alcohol estearílico, tragacanto, goma de xantano y derivados de los mismos, disolventes y diversos ingredientes, tales como, pero no limitados a, celulosa cristalina, celulosa microcristalina, ácido cítrico, dextrina, glucosa líquida, ácido láctico, lactosa, cloruro de magnesio, metafosfato de potasio, almidón, entre otros. Tales vehículos y/o aditivos se pueden formular por métodos convencionales y se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. Los agentes estabilizantes, tales como lípidos, inhibidores de nucleasa, polímeros y agentes quelantes pueden preservar las composiciones de la degradación dentro del organismo. Otras formulaciones adecuadas para su uso en una composición farmacéutica se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2005, Vigésimoprimer edición, Gennaro y Gennaro, eds., Lippencott Williams y Wilkins).

15 Las formulaciones farmacéuticas que incluyen un virus proporcionado en la presente memoria para su inyección o administración por vía mucosa incluyen típicamente soluciones acuosas del virus proporcionadas en un tampón adecuado para inyección o administración a través de la mucosa o formas liofilizadas del virus para su reconstitución en un tampón adecuado para su inyección o administración a través de la mucosa. Tales formulaciones pueden contener opcionalmente uno o más portadores y/o aditivos farmacéuticamente aceptables como se describe en la presente memoria o se conoce en la técnica. Las composiciones líquidas para administración oral generalmente incluyen soluciones acuosas, jarabes aromatizados adecuadamente, suspensiones acuosas u oleosas y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como también elixires y vehículos farmacéuticos similares.

25 Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria se pueden formular para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada de un virus como se describe en la presente memoria empleando procedimientos conocidos en la técnica. Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, un virus proporcionado en la presente memoria se mezcla con un portador farmacéutico para formar una composición sólida. Opcionalmente, los comprimidos o píldoras se recubren o se combinan para proporcionar una forma de dosificación que ofrezca la ventaja de una acción prolongada en el sujeto. Por ejemplo, un comprimido o píldora comprenden un componente de dosificación interno y un componente de dosificación externo, el último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica, por ejemplo, que sirve para resistir la disgregación en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o se retrase su liberación. Se utiliza una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, que incluyen, por ejemplo, varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

35 Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos, farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Estas composiciones líquidas o sólidas pueden contener opcionalmente excipientes y/o aditivos farmacéuticamente aceptables adecuados como se describe en la presente memoria o se conoce en la técnica. Tales composiciones se administran, por ejemplo, por la vía respiratoria oral o nasal para efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables se nebulizan mediante el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas se inhalan, por ejemplo, directamente desde el dispositivo de nebulización, desde una máscara de carpa facial adosada o desde una máquina de respiración de presión positiva intermitente. Las composiciones en solución, suspensión o polvo se administran, por vía oral o nasal, por ejemplo, desde dispositivos que suministran la formulación de una manera apropiada, tal como por ejemplo, mediante el uso de un inhalador.

45 Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria se pueden formular para administración transdérmica a través de dispositivos de administración transdérmica ("parches"). Tales parches transdérmicos se utilizan para proporcionar una infusión continua o discontinua de un virus proporcionado en la presente memoria. La construcción y el uso de parches transdérmicos para la administración de agentes farmacéuticos se realizan de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.023.252. Tales parches se construyen para la administración continua, pulsátil o bajo demanda de un virus incluido en la presente memoria.

55 Los sistemas de dispersión coloidal que se pueden utilizar para la administración de virus incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, esferas y sistemas a base de lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua (mixtas), micelas, liposomas y lipocomplejos. Un sistema coloidal ilustrativo es un liposoma. Se pueden utilizar liposomas específicos de órganos o específicos de células para lograr el suministro solo al tejido deseado. La selección de liposomas puede llevarse a cabo por el experto en la técnica mediante la aplicación de métodos comúnmente conocidos. Este direccionamiento incluye el direccionamiento pasivo (utilizando la tendencia natural de los liposomas a distribuirse a las células del RES en órganos que contienen capilares sinusoidales) o el direccionamiento activa (por ejemplo, mediante el acoplamiento del liposoma a un ligando específico, por ejemplo, un anticuerpo, un receptor, azúcar, glicolípido y proteína por métodos conocidos por los expertos en la técnica). Los anticuerpos monoclonales se pueden utilizar para dirigir liposomas a tejidos específicos, por ejemplo, tejido tumoral, a través de ligandos específicos de la superficie celular.

65

2. Células anfitrionas

Se proporcionan células anfitrionas que contienen un virus proporcionado en la presente memoria. Tales células pueden ser empleadas para uso *in vitro* o uso *in vivo*, por ejemplo, como se describe en los métodos de diagnóstico o terapéuticos proporcionados en la presente memoria. Las células anfitrionas pueden ser un grupo de un solo tipo de células o una mezcla de diferentes tipos de células. Las células anfitrionas pueden incluir líneas celulares cultivadas, células primarias y células proliferativas. Las células anfitrionas pueden incluir cualquiera de una variedad de células animales, tales como células de mamíferos, aves e insectos y tejidos que son susceptibles de infección por el virus, incluidos, pero sin limitarse a, seres humanos, primates, roedores (p. ej., ratón, rata, hámster, o conejo) y células embrionarias de pollo. Las células anfitrionas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células hematopoyéticas (totipotentes, células madre, leucocitos, linfocitos, monocitos, macrófagos, APC, células dendríticas, células no humanas y similares), células pulmonares, células traqueales, células hepáticas, células epiteliales, células endoteliales, células musculares (p. ej., músculo esquelético, músculo cardíaco o músculo liso), fibroblastos, células tumorales y líneas celulares que incluyen, por ejemplo, células CV-1, BSC40, Vero, BSC40 y BSC-1, y HeLa humanas. Los métodos para infectar y/o transformar células anfitrionas, seleccionar fenotípicamente células infectadas o transformantes, y otros métodos similares son conocidos en la técnica.

3. Combinaciones

En la presente memoria se describen combinaciones de un virus proporcionado en la presente memoria y un segundo agente, tal como un segundo virus u otro agente terapéutico o de diagnóstico. Una combinación puede incluir un virus proporcionado en la presente memoria con uno o más virus adicionales, que incluyen, por ejemplo, uno o más virus diagnósticos o terapéuticos adicionales. Una combinación puede contener composiciones farmacéuticas que contienen un virus proporcionado en la presente memoria o células anfitrionas que contienen un virus como se describe en la presente memoria. Una combinación también puede incluir cualquier virus o reactivo para efectuar la atenuación del mismo de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente memoria, tales como, por ejemplo, un agente antiviral o quimioterapéutico. Las combinaciones también pueden contener un compuesto utilizado para la modulación de la expresión génica a partir de genes endógenos o heterólogos codificados por el virus.

Las combinaciones pueden contener un virus y un compuesto terapéutico. Los compuestos terapéuticos para las composiciones proporcionadas en la presente memoria pueden ser, por ejemplo, un compuesto anticanceroso o quimioterapéutico. Los compuestos terapéuticos ilustrativos incluyen, por ejemplo, citocinas, factores de crecimiento, agentes fotosensibilizantes, radionúclidos, toxinas, moléculas de ARNip, pares de fármacos enzima/pro E, antimetabolitos, moduladores de señalización, antibióticos anticancerosos, anticuerpos anticancerosos, inhibidores de la angiogénesis, compuestos quimioterapéuticos, compuestos antimetastásicos o una combinación de cualquiera de los mismo. Los virus proporcionados en la presente memoria se pueden combinar con un compuesto anticanceroso, tal como un complejo de coordinación de platino. Los ejemplos de complejos de coordinación de platino incluyen, por ejemplo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, DWA2114R, NK121, IS 3 295 y 254-S. Los agentes quimioterapéuticos ilustrativos también incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, vincristina, adriamicina, cloroetilnitrosoureas que no contienen azúcar, 5-fluorouracilo, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina, dacarbazina, taxol, fragilina, Meglamina GLA, valricicina MM1270, BAY 12-9566, inhibidor de farnesil transferasa de RAS, inhibidor de farnesil transferasa, MMP, MTA/LY231514, lometrexol/LY264618, Glamolec, CI-994, Pvc. Metaret/suramina, BB-94/batimastat, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Incel/VX-710, VX-853, ZD0101, IS1641, ODN 698, TA 2516/marimastat, BB2516/marimastat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Lemonal DP 2202, FK 317, picibanilo/OK-432, valrubicina/AD 32, estroncio-89/Metastrón, Temodal/temozolomida, Yewtaxano/paclitaxel, Taxol/paclitaxel, Paxex/paclitaxel, Ciclopax/paclitaxel oral, Xeloda/capecitabina, Furtulon/doxifluridina, taxoides orales, SPU-077/cisplatino, HMR 1275/flavopiridol, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/inhibidor del oncogén RAS, BMS-182751/platino oral, UFT (Tegafur/Uracilo), Ergamisol/levamisol, Campto/levamisol, potenciador Eniluracilo/776C85/5FU; Camptosar/irinotecán; Tomudex/raltitrexed; Leustatina-cladribina, Caelyx/doxorubicina liposomal, Myocet/doxorubicina liposomal, Doxil/doxorubicina liposomal, Evacet/doxorubicina liposomal, Fludara/fludarabina, Farmorubicina/epirubicina, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/Bis-Naftalimida, LU 103793/Dolastaina, Gemzar/gemcitabina, ZD 0473/Anormed, YM 116, semillas de yodo, inhibidores de CDK4 y CDK2, inhibidores de la PARP, D4809/dexifosfamida, Ifex/Mesnex/ifosfamida, Vumon/tenipósido, Paraplatino/carboplatino, Platinol/cisplatino, VePesid/Eposina/Etopofos/etopósido, ZD 9331, Taxótero/docetaxel, profármacos de arabinósido de guanina, análogos de taxano, nitrosoureas, agentes alquilantes tales como melfalán y ciclofosfamida, aminoglutetimida, asparraginas, busulfán, carboplatino, clorambucilo, citarabina HCl, dactinominina, daunorubicina HCl, fosfato de estramustina sódica, etopósido (VP16-213), floxuridina, fluorouracilo (5-FU), flutamida, hidroxiurea (hidroxicarbamida), ifosfamida, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, acetato de leuprolida (análogo del factor de liberación de LHRH), lomustina (CCNU), mecloretamina HCl (mostaza nitrogenada), mercaptopurina, mesna, mitotano (o,p'-DDD), mitoxantrona HCl, octreotida, plicamicina, procabazina HCl, estreptozocina, citrato de tamoxifeno, tioguanina, tiotepa, sulfato de vinblastina, amsacrina (m-AMSA), azacitidina, eritropoyetina, hexametilmelamina (HMM), interleucina 2, mitoguazona (metil-GAG; metilglioxal-bis-guanilhidrazona; MGBG), pentostatina (2'-deoxicoformicina), semustina (metil-CCNU), tenipósido (VM-26) y sulfato de vindesina. Los compuestos terapéuticos ilustrativos adicionales para el uso en composiciones farmacéuticas y combinaciones

proporcionadas en la presente memoria se pueden encontrar en otra parte en la presente memoria (véase p. ej., la Sección I para ejemplos de citocinas, factores de crecimiento, agentes fotosensibilizantes, radionúclidos, toxinas, moléculas de ARNip, pares de enzimas/profármacos, antimetabolitos, moduladores de señalización, antibióticos anticancerosos, anticuerpos anticancerosos, inhibidores de la angiogénesis y compuestos quimioterapéuticos.

5 En algunos ejemplos, la combinación puede incluir compuestos terapéuticos adicionales tales como, por ejemplo, compuestos que son sustratos para enzimas codificadas y expresadas por el virus, u otros compuestos terapéuticos proporcionados en la presente memoria o conocidos en la técnica para actuar en concierto con un virus. Por ejemplo, el virus puede expresar una enzima que convierte un profármaco en un fármaco de quimioterapia activa para matar la célula cancerosa. Por lo tanto, las combinaciones descritas en la presente memoria pueden contener un compuesto terapéutico, como un profármaco. Una combinación de virus/compuesto terapéutico ejemplar puede incluir un virus que codifica la timidina quinasa del virus del herpes simple con el profármaco ganciclovir. Los pares adicionales de enzimas/profármacos para el uso en combinaciones proporcionadas incluyen, pero no se limitan a, varicela zoster timidina quinasa/ganciclovir, citosina desaminasa/5-fluorouracilo, purina nucleósido fosforilasa/6-metilpurina desoxirribósido, beta-lactamasa/cefalosporina-doxorrubicina, carboxipeptidasa ácido G2/4-[(2-cloroetil)(2-mesiloxietil)amino]benzoil-L-glutámico, citocromo P450/acetaminofeno, peroxidasa de rábano picante/ácido indol-3-acético, nitroreductasa/CB1954, carboxilesterasa de conejo/7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carboniloxicamptotecina (CPT-11), tirosinasa de hongos/bis-(2-cloroetil) amino-4-hidroxifenilaminometanona 28, beta galactosidasa/1-clorometil-5-hidroxi-1,2-dihidro-3H-benz[e]indol, beta-glucuronidasa/epirubicina-glucuronida, timidina fosforilasa/5'-desoxi-5-fluorouridina, desoxicitidina quinasa/arabinósido de citosina, beta-lactamasa y linamerasa/linamarina. Otros profármacos ilustrativos, para el uso en combinaciones, también se pueden encontrar en otras partes de la presente memoria (véase p. ej., la Sección I). Cualquiera de una variedad de combinaciones conocidas descritas en la presente memoria o conocidas de otro modo en la técnica puede incluirse en las combinaciones descritas en la presente memoria.

25 En algunos ejemplos, la combinación puede incluir compuestos que pueden destruir o inhibir el crecimiento viral o la toxicidad. Tales compuestos se pueden utilizar para aliviar uno o más efectos secundarios adversos que pueden resultar de una infección viral (véase, p. ej., la Publicación de Patente de Estados Unidos Num. US 2009-016228-A1). Las combinaciones pueden contener compuestos antibióticos, antifúngicos, antiparasitarios o antivirales para el tratamiento de infecciones. En algunos ejemplos, el compuesto antiviral es un agente quimioterapéutico que inhibe el crecimiento viral o la toxicidad. Los antibióticos ilustrativos que se pueden incluir en una combinación con un virus proporcionado en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, ceftazidima, cefepima, imipenemo, aminoglicósido, vancomicina y β -lactama antipseudomonal. Los agentes antifúngicos ilustrativos que se pueden incluir en una combinación con un virus proporcionado en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, anfotericina B, dapsona, fluconazol, flucitosina, griseofulvina, itraconazol, ketoconazol, miconazol, clotrimazol, nistatina y combinaciones de los mismos. Los agentes antivirales ilustrativos que se pueden incluir en una combinación con un virus proporcionado en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, cidofovir, ésteres alcoxialquílicos de cidofovir (CDV), CDV cíclico y (S)-9-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)adenina, 5-(dimetoximetil)-2'-desoxiuridina, isatin-beta-tiosemicarbazona, N-metanocarbatimidina, brivudina, 7-deazanoplanocina A, ST-246, Gleevec, 2'-beta-fluoro-2',3'-didesoxiadenosina, indinavir, nelfinavir, ritonavir, nevirapina, AZT, ddl, ddC, y combinaciones de los mismos. Típicamente, las combinaciones con un agente antiviral contienen un agente antiviral que se sabe que es eficaz contra el virus de la combinación. Por ejemplo, las combinaciones pueden contener un virus vaccinia con un compuesto antiviral, tal como cidofovir, ésteres alcoxialquílicos de cidofovir, ganciclovir, aciclovir, ST-246, Gleevec y derivados de los mismos.

45 En algunos ejemplos, la combinación puede incluir un compuesto detectable. Un compuesto detectable puede incluir, por ejemplo, un ligando, sustrato u otro compuesto que puede interactuar con y/o unirse específicamente a una proteína o ARN codificado y expresado por el virus, y puede proporcionar una señal detectable, tal como una señal detectable por tomografía, espectroscopia, resonancia magnética u otras técnicas conocidas. En algunos ejemplos, la proteína o ARN son proteína o ARN exógenos. En algunos ejemplos, la proteína o ARN expresados por el virus modifican el compuesto detectable donde el compuesto modificado emite una señal detectable. Los compuestos detectables ilustrativos pueden ser, o pueden contener, un agente de generación de imágenes tal como un agente de generación de imágenes de resonancia magnética, ultrasonido o tomografía, incluido un radionúclido. El compuesto detectable puede incluir cualquiera de una variedad de compuestos como se proporciona en otra parte de la presente memoria o se conoce de otro modo en la técnica. Las proteínas ilustrativas que pueden ser expresadas por el virus y las combinaciones de compuestos detectables empleadas para la detección incluyen, entre otras, luciferasa y luciferina, β -galactosidasa y (4,7,10-tri(ácido acético)-1-(2-(3-galactopiranosiletoxi)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano)gadolinio (Egad), y otras combinaciones conocidas en la técnica.

60 En algunos ejemplos, la combinación puede incluir un compuesto modulador de la expresión génica que regula la expresión de uno o más genes codificados por el virus. Los compuestos que modulan la expresión génica son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, activadores de la transcripción, inductores, supresores de la transcripción, inhibidores de la ARN polimerasa y compuestos de unión al ARN, tales como ARNip o ribozimas. Se puede incluir cualquiera de una variedad de compuestos moduladores de la expresión génica conocidos en la técnica en las combinaciones proporcionadas en la presente memoria. Típicamente, el compuesto modulador de la

65

expresión génica incluido con un virus en las combinaciones proporcionadas en la presente memoria será un compuesto que puede unirse, inhibir o reaccionar con uno o más compuestos, activos en la expresión génica, tales como un factor de transcripción o ARN del virus de la combinación. Un ejemplo de combinación de virus/modulador de la expresión puede ser un virus que codifica un complejo de factor de transcripción quimérico que tiene un receptor de progesterona humano mutante fusionado a un dominio de unión a ADN de GAL4 de levadura y un dominio de activación de la proteína VP 16 del virus del herpes simple y que también contiene un promotor sintético que contiene una serie de secuencias de reconocimiento GAL4 aguas arriba de la caja TATA E1B tardía principal de adenovirus, donde el compuesto puede ser RU486 (véanse, p. ej., Yu et al., (2002) Mol Genet Genomics 268:169-178). Una variedad de otras combinaciones de virus/moduladores de expresión conocidas en la técnica también pueden incluirse en las combinaciones proporcionadas en la presente memoria.

En algunos ejemplos, la combinación puede contener nanopartículas. Las nanopartículas se pueden diseñar de manera tal que porten uno o más agentes terapéuticos proporcionados en la presente memoria. Además, las nanopartículas pueden diseñarse que porten una molécula que dirige las nanopartículas a las células tumorales. En un ejemplo no limitante, las nanopartículas se pueden recubrir con un radionúclido y, opcionalmente, un anticuerpo inmunoreactivo con un antígeno asociado a tumor.

En algunos ejemplos, la combinación puede contener uno o más virus terapéuticos y/o de diagnóstico adicionales u otros microorganismos terapéuticos y/o de diagnóstico (p. ej., bacterias terapéuticas y/o de diagnóstico) para diagnóstico o tratamiento. Los virus terapéuticos y/o de diagnóstico ilustrativos son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, poxvirus, herpesvirus, adenovirus, virus adenoasociados y reovirus de diagnóstico.

4. Kits

Los virus, células, composiciones farmacéuticas o combinaciones proporcionadas en la presente memoria pueden envasarse en forma de kits. Los kits pueden incluir opcionalmente uno o más componentes, tales como instrucciones de uso, dispositivos y reactivos adicionales, y componentes, como tubos, recipientes y jeringas para la práctica de los métodos. Los kits ilustrativos pueden incluir un virus proporcionado en la presente memoria y pueden incluir opcionalmente instrucciones de uso, un dispositivo para detectar un virus en un sujeto, un dispositivo para administrar el virus a un sujeto o un dispositivo para administrar un agente o compuesto adicionales a un sujeto .

En un ejemplo, un kit puede contener instrucciones. Las instrucciones incluyen típicamente una expresión tangible que describe el virus y, opcionalmente, otros componentes incluidos en el kit, y los métodos de administración, incluidos los métodos para determinar el estado adecuado del sujeto, la cantidad de dosis adecuada y el método de administración adecuado, para administrar el virus. Las instrucciones también pueden incluir una guía para el seguimiento del sujeto durante el tiempo de tratamiento.

En otro ejemplo, un kit puede contener un dispositivo para detectar un virus en un sujeto. Los dispositivos para detectar un virus en un sujeto pueden incluir un dispositivo de generación de imágenes con poca luz para detectar luz, por ejemplo, emitida desde la luciferasa o fluorescente desde una proteína fluorescente, tal como una proteína fluorescente verde o roja, un dispositivo de medición de resonancia magnética tal como una resonancia magnética o un dispositivo de RMN, un escáner tomográfico, tal como un PET, CT, CAT, SPECT u otro escáner relacionado, un dispositivo de ultrasonido u otro dispositivo que pueda utilizarse para detectar una proteína expresada por el virus dentro del sujeto. Típicamente, el dispositivo del kit podrá detectar una o más proteínas expresadas por el virus del kit. Se puede incluir cualquiera de una variedad de kits que contienen virus y dispositivos de detección los kits descritos en la presente memoria, por ejemplo, un virus que exprese luciferasa y un generador de imágenes con poca luz o un virus que exprese una proteína fluorescente, tal como una proteína fluorescente verde o roja, y un generador de imágenes con poca luz.

Los kits descritos en la presente memoria también pueden incluir un dispositivo para administrar un virus a un sujeto. Se puede incluir cualquiera de una variedad de dispositivos conocidos en la técnica para administrar medicamentos, composiciones farmacéuticas y vacunas en los kits descritos en la presente memoria. Los dispositivos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, una aguja hipodérmica, una aguja intravenosa, un catéter, un dispositivo de inyección sin aguja, un inhalador y un dispensador de líquido, tal como un cuentagotas. Por ejemplo, se puede incluir un virus que se administra sistémicamente, por ejemplo, por inyección intravenosa, en un kit con una aguja hipodérmica y una jeringa. Normalmente, el dispositivo para administrar un virus del kit será compatible con el virus del kit; por ejemplo, se puede incluir un dispositivo de inyección sin aguja, tal como un dispositivo de inyección de alta presión en kits con virus no dañados por la inyección de alta presión, pero por lo general no se incluye en kits con virus dañados por la inyección de alta presión.

Los kits descritos en la presente memoria también pueden incluir un dispositivo para administrar un agente o compuesto adicional a un sujeto. Se puede incluir cualquiera de una variedad de dispositivos conocidos en la técnica para administrar medicamentos a un sujeto en los kits descritos en la presente memoria. Los dispositivos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, una aguja hipodérmica, una aguja intravenosa, un catéter, un dispositivo de inyección sin aguja, un inhalador y un dispensador de líquido, tal como un cuentagotas. Típicamente, el dispositivo para

administrar el compuesto del kit será compatible con el método de administración deseado del compuesto. Por ejemplo, se puede incluir un compuesto que se administrará de forma sistémica o subcutánea en un kit con una aguja hipodérmica y una jeringa.

5 G. Métodos terapéuticos, de Diagnóstico y de Seguimiento.

Los virus proporcionados en la presente memoria, incluidas las cepas de virus clonales proporcionados en la presente memoria, se pueden utilizar en métodos de diagnóstico, seguimiento y terapéuticos. Por ejemplo, en los métodos terapéuticos, los virus proporcionados en la presente memoria, incluidas las cepas de virus clonales, se pueden utilizar para el tratamiento de trastornos o afecciones proliferativas, incluido el tratamiento de células cancerosas, neoplasias, tumores, metástasis y otras células o tejidos inmunoprivilegiados, tales como tejidos heridos o inflamados. Los virus proporcionados en la presente memoria, incluidas las cepas de virus clonales proporcionadas en la presente memoria, se pueden utilizar en métodos de diagnóstico para detectar y generar imágenes de células cancerosas, tratamiento de seguimiento de tumores y metástasis. En otros ejemplos, los virus proporcionados en la presente memoria, incluidas las cepas de virus clonales, se pueden utilizar en métodos de diagnóstico o seguimiento para detectar la actividad del virus en el anfitrión. Los métodos diagnósticos y terapéuticos descritos incluyen, pero no se limitan a, administrar un virus proporcionado en la presente memoria a un sujeto que contiene un tumor y/o metástasis. En otros ejemplos, los virus proporcionados en la presente memoria, incluidas las cepas de virus clonales proporcionados en la presente memoria, se pueden utilizar como vacunas en los métodos de vacunación.

Los virus administrados poseen una o más características que incluyen atenuación de la patogenicidad, baja toxicidad, acumulación preferente en el tumor, capacidad para activar una respuesta inmunológica contra las células tumorales, inmunogenicidad, capacidad de replicación, capacidad para expresar genes diagnósticos y/o terapéuticos exógenos adicionales y una capacidad para provocar la producción de anticuerpos contra un producto génico expresado. Los virus pueden administrarse para diagnóstico, seguimiento, tal como la terapia de seguimiento y/o terapia de sujetos, tales como, pero sin limitarse a, seres humanos y otros mamíferos, incluidos, pero sin limitarse a, roedores, perros, gatos, primates y ganado. Los virus proporcionados en la presente memoria se pueden utilizar o modificar para su uso en cualquier método (o uso) conocido en el que se hayan empleado o puedan emplearse virus LVP. Se puede utilizar y/o modificar cualquier virus LVP, incluido el virus GLV-lh68 y sus derivados, para su uso en los métodos terapéuticos y de diagnóstico descritos a continuación y comentados a lo largo de la descripción en la presente memoria.

35 1. Métodos terapéuticos

Los virus proporcionados en la presente memoria, incluidas las cepas de virus clonales, por ejemplo, se pueden utilizar para el tratamiento de trastornos o afecciones proliferativas, incluido el tratamiento (tal como la inhibición) de células cancerosas, neoplasias, tumores, metástasis, células madre cancerosas y otras células o tejidos inmunoprivilegiados, tales como tejidos heridos o inflamados. Los virus proporcionados en la presente memoria se acumulan preferentemente en tumores o metástasis. En algunos ejemplos, la administración de un virus proporcionado en la presente memoria da como resultado una desaceleración del crecimiento del tumor. En otros ejemplos, la administración de un virus proporcionado en la presente memoria da como resultado una disminución del volumen del tumor, que incluye la eliminación o erradicación del tumor. Sin embargo, los métodos y usos terapéuticos no requieren que el virus administrado destruya las células tumorales o disminuya el tamaño del tumor. En lugar de eso, los métodos incluyen administrar a un sujeto un virus proporcionado en la presente memoria que puede causar o mejorar una respuesta inmunológica antitumoral en el sujeto. En algunos ejemplos, los virus proporcionados en la presente memoria se pueden administrar a un sujeto sin causar una enfermedad inducida por virus en el sujeto. En algunos ejemplos, los virus pueden provocar una respuesta inmunológica antitumoral en el sujeto, donde típicamente la respuesta inmunológica antitumoral mediada por virus puede desarrollarse, por ejemplo, durante varios días, una semana o más, 10 días o más, dos semanas o más, o un mes o más. En algunos métodos ilustrativos, el virus puede estar presente en el tumor, y puede causar una respuesta inmunológica antitumoral sin que el propio virus cause la muerte de una célula tumoral suficiente para prevenir el crecimiento del tumor. En algunos ejemplos, el tumor es un tumor monoterapéutico o cáncer monoterapéutico, donde el tumor o el cáncer no disminuyen de volumen cuando se tratan con el virus o un agente terapéutico solo.

En algunos ejemplos, los métodos terapéuticos inhiben el crecimiento tumoral en un sujeto, donde los métodos incluyen administrar a un sujeto un virus que se puede acumular en un tumor y/o metástasis, y puede causar o mejorar una respuesta inmunológica antitumoral. La respuesta inmunológica antitumoral inducida como resultado de tumores o metástasis acumuladas puede provocar la inhibición del crecimiento tumoral.

En algunos ejemplos, los métodos terapéuticos inhiben el crecimiento o la formación de una metástasis en un sujeto, donde los métodos incluyen administrar a un sujeto un virus proporcionado en la presente memoria que puede acumularse en un tumor y/o metástasis, y puede causar o mejorar una respuesta inmunológica antitumoral. La inducción de respuesta inmunológica antitumoral como resultado de virus acumulados de tumor o metástasis puede dar como resultado la inhibición del crecimiento o formación de la metástasis.

En otros ejemplos, los métodos terapéuticos disminuyen el tamaño de un tumor y/o metástasis en un sujeto, donde los métodos incluyen la administración a un sujeto de un virus proporcionado en la presente memoria que puede acumularse en un tumor y/o metástasis, y puede causar o mejorar una respuesta inmunológica antitumoral. La respuesta inmunológica antitumoral inducida como resultado de virus acumulados de tumor o metástasis puede dar como resultado una disminución del tamaño del tumor y/o de la metástasis.

En algunos ejemplos, los métodos terapéuticos eliminan un tumor y/o metástasis de un sujeto, donde los métodos incluyen administrar a un sujeto un virus proporcionado en la presente memoria que puede acumularse en un tumor y/o metástasis, y puede causar o mejorar una respuesta inmunológica antitumoral. La respuesta inmunológica antitumoral inducida como resultado de virus acumulados de tumor o metástasis puede dar como resultado la eliminación del tumor y/o metástasis del sujeto.

Los métodos para reducir o inhibir el crecimiento tumoral, inhibir el crecimiento y/o formación de metástasis, disminuir el tamaño de un tumor o metástasis, eliminar un tumor o metástasis y/o células madre cancerosas u otros métodos terapéuticos de tumores en la presente memoria incluyen causar o mejorar una respuesta inmunológica antitumoral en el anfitrión. La respuesta inmunológica del anfitrión, que de naturaleza antitumoral, puede montarse contra tumores y/o metástasis en los cuales se han acumulado virus, y también se puede montar contra tumores y/o metástasis en los cuales no se han acumulado virus, incluyendo tumores y/o metástasis que se forman después de la administración del virus al sujeto. En consecuencia, un tumor y/o metástasis cuyo crecimiento o formación se inhiben, o cuyo tamaño disminuye, o que se elimina, puede ser un tumor y/o metástasis en los cuales los virus se han acumulado, o también puede ser un tumor y/o metástasis en los que los virus no se han acumulado. Por consiguiente, en la presente memoria se describen métodos para reducir o inhibir el crecimiento tumoral, inhibir el crecimiento y/o formación de metástasis, disminuir el tamaño de un tumor o metástasis, eliminar un tumor o metástasis, u otros métodos terapéuticos para tumores, en los que el método incluye la administración a un sujeto de un virus proporcionado en la presente memoria, donde el virus se acumula en al menos un tumor o metástasis y causa o mejora una respuesta inmunológica antitumoral en el sujeto, y la respuesta inmunológica también se monta contra un tumor y/o metástasis en los cuales la célula del virus no se acumula. En otro ejemplo, se describen métodos para inhibir o prevenir la recurrencia de una enfermedad neoplásica o inhibir o prevenir el crecimiento de tumores nuevos, donde los métodos incluyen administrar a un sujeto un virus proporcionado en la presente memoria que puede acumularse en un tumor y/o metástasis, y puede causar o mejorar una respuesta inmunológica antitumoral, y la respuesta inmunológica antitumoral puede inhibir o prevenir la recurrencia de una enfermedad neoplásica o inhibir o prevenir el crecimiento de nuevos tumores.

Los métodos terapéuticos para el tumor o enfermedad neoplásica descritos en la presente memoria, tales como los métodos para reducir o inhibir el crecimiento del tumor, inhibir el crecimiento y/o la formación de metástasis, disminuir el tamaño de un tumor o metástasis, eliminar un tumor o metástasis, u otros métodos terapéuticos para tumores, también pueden incluir administrar a un sujeto un virus proporcionado en la presente memoria que puede causar la lisis de las células tumorales o la muerte de las células tumorales. Tal virus puede ser el mismo virus que el virus que puede causar o mejorar una respuesta inmunológica antitumoral en el sujeto. Los virus, tales como los virus proporcionados en la presente memoria, pueden causar la lisis celular o la muerte celular del tumor como resultado de la expresión de un gen endógeno o como resultado de un gen exógeno. Los genes endógenos o exógenos pueden causar la lisis de células tumorales o inhibir el crecimiento celular como resultado de acciones directas o indirectas, como se conoce en la técnica, incluida la formación de canales líticos o la activación de una vía apoptótica. Los productos génicos, tales como los productos génicos exógenos, pueden actuar activando un profármaco a una forma activa y citotóxica, lo que da como resultado la muerte celular donde se expresan tales genes.

Tales métodos de tratamiento de tumores y/o metástasis pueden incluir la administración de un virus proporcionado en la presente memoria para terapia, tal como para terapia génica, para terapia génica del cáncer o para terapia vacunal. Tal virus se puede utilizar para estimular la respuesta inmunológica humoral y/o celular, inducir fuertes respuestas de linfocitos T citotóxicos en sujetos que pueden beneficiarse de tales respuestas. Por ejemplo, el virus puede proporcionar efectos profilácticos y terapéuticos contra un tumor infectado por el virus u otras enfermedades infecciosas, mediante el rechazo de células de tumores o lesiones utilizando virus que expresan antígenos inmunorreactivos (Earl et al., *Science* 234: 728-831 (1986); Lathe et al., *Nature* (London) 32: 878-880 (1987)), celular tumor-associated antigens (Bernards et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6854-6858 (1987); Estin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1052-1056 (1988); Kantor et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 84: 1084-1091 (1992); Roth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4781-4786 (1996)) y/o citocinas (p. ej., IL-2, IL-12), moléculas coestimuladoras (B7-1, B7-2) (Rao et al., *J. Immunol.* 156: 3357-3365 (1996); Chamberlain et al., *Cancer Res.* 56: 2832-2836 (1996); Oertli et al., *J. Gen. Virol.* 77: 3121-3125 (1996); Qin y Chatterjee, *Human Gene Ther.* 7: 1853-1860 (1996); McAneny et al., *Ann. Surg. Oncol.* 3: 495-500 (1996)), u otras proteínas terapéuticas.

Como se mostró anteriormente, los tumores sólidos se pueden tratar con virus, tales como los virus vaccinia, lo que da como resultado una enorme replicación del virus específica del tumor, que puede conducir a la producción de antígeno tumoral y proteína viral en los tumores (Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2005-0031643, ahora Patentes de Estados Unidos Núm. 7.588.767, 7.588.771, 7.662.398), que proporcionan e ilustran el virus GLV-

lh68 y sus derivados. La administración del virus vaccinia a ratones dio como resultado la lisis de las células tumorales infectadas y una liberación resultante de antígenos específicos de células tumorales. La filtración continua de estos antígenos al organismo llevó a un nivel muy alto de títulos de anticuerpos (en aproximadamente 7-14 días) contra las proteínas tumorales, las proteínas virales y las proteínas de modificadas genéticamente codificadas por el virus en los ratones. Los anticuerpos antitumorales recién sintetizados y el recuento de macrófagos, neutrófilos mejorado se suministraron de forma continua a través del sistema vascular al tumor y, por lo tanto, permitieron el reclutamiento de un sistema inmunitario activado contra el tumor. El sistema inmunitario activado eliminó los compuestos foráneos del tumor, incluidas las partículas virales. Esta liberación interconectada de antígenos foráneos aumentó la producción de anticuerpos y la respuesta continua de los anticuerpos contra las proteínas tumorales para funcionar como un sistema de vacunación autoinmunizante iniciado por la infección y la replicación del virus vaccinia, seguido de la lisis celular, la pérdida de proteínas y la producción mejorada de anticuerpos. Por lo tanto, los virus proporcionados en la presente memoria y los virus generados utilizando los métodos descritos en la presente memoria se pueden administrar en un proceso completo que puede aplicarse a todos los sistemas tumorales con sitios tumorales inmunoprivilegiados como sitio de crecimiento viral privilegiado, lo que puede conducir a la eliminación del tumor por el propio sistema inmunológico del anfitrión.

En un ejemplo, el tumor tratado es un cáncer tal como el cáncer de páncreas, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el mieloma múltiple o la leucemia, aunque el cáncer no está limitado a este respecto, y se pueden tratar otras enfermedades metastásicas con las combinaciones proporcionadas en la presente memoria. Por ejemplo, el tumor tratado puede ser un tumor sólido, tal como el de pulmón y bronquio, mama, colon y recto, riñón, estómago, esófago, hígado y conducto biliar intrahepático, vejiga urinaria, cerebro y otro sistema nervioso, cabeza y cuello, cavidad oral y faringe, cervix, cuerpo uterino, tiroides, ovario, testículos, próstata, melanoma maligno, colangiocarcinoma, timoma, cánceres de piel no melanoma, así como tumores hematológicos y/o tumores malignos, tales como leucemia y linfomas infantiles, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfomas de origen linfocítico y cutáneo, leucemia aguda y crónica, tal como leucemia linfoblástica aguda, mielocítica aguda o mielocítica crónica, neoplasia de células plasmáticas, neoplasias linfoides y cánceres asociados con el SIDA. Los tumores ilustrativos incluyen, por ejemplo, tumores pancreáticos, tumores de ovario, tumores de pulmón, tumores de colon, tumores de próstata, tumores cervicales y tumores de mama. En un ejemplo, el tumor es un carcinoma tal como, por ejemplo, un tumor de ovario o un tumor pancreático.

En otros ejemplos, se describen métodos para inmunizar a un sujeto, donde los métodos incluyen administrar al sujeto un virus que expresa uno o más antígenos, contra cuyos antígenos el sujeto desarrollará una respuesta inmunológica. Los antígenos inmunizantes pueden ser endógenos al virus, tales como los antígenos vaccinia en un virus vaccinia utilizado para la inmunización contra la viruela, el sarampión, las paperas o los antígenos inmunizantes pueden ser antígenos expresados por el virus, tales como los antígenos de influenza o VIH expresados en la superficie de la cápside viral. En el caso de la viruela, por ejemplo, un antígeno proteico específico del tumor puede ser transportado por un virus vaccinia atenuado (codificado por el genoma viral) para una vacuna contra la viruela. Por lo tanto, los virus proporcionados en la presente memoria, incluidos los virus vaccinia modificados, se pueden utilizar como vacunas.

En algunos ejemplos, en la presente memoria se describen métodos para provocar o mejorar la producción de anticuerpos contra un antígeno seleccionado o un tipo de antígeno seleccionado en un sujeto, donde los métodos incluyen administrar a un sujeto un virus que puede acumularse en un tumor y/o metástasis, y provocar la liberación de un antígeno seleccionado o un tipo de antígeno seleccionado del tumor, lo que da como resultado la producción de anticuerpos contra el antígeno seleccionado o el tipo de antígeno seleccionado. Cualquiera de una variedad de antígenos se puede dirigir en los métodos proporcionados en la presente memoria, incluyendo un antígeno seleccionado tal como un producto génico exógeno expresado por el virus, o un tipo de antígeno seleccionado tal como uno o más antígenos tumorales liberados del tumor como resultado de infección viral del tumor (p. ej., por lisis, apoptosis, secreción u otro mecanismo que provoque la liberación de antígenos del tumor).

En algunos ejemplos, puede ser deseable mantener la liberación del antígeno seleccionado o el tipo de antígeno seleccionado durante una serie de días, por ejemplo, al menos una semana, al menos diez días, al menos dos semanas o al menos un mes. En la presente memoria se describen métodos para proporcionar una liberación sostenida de antígeno dentro de un sujeto, donde los métodos incluyen administrar a un sujeto un virus que puede acumularse en un tumor y/o metástasis, y puede causar la liberación sostenida de un antígeno, lo que da como resultado la producción de anticuerpos contra el antígeno. La liberación sostenida de antígeno puede dar como resultado una respuesta inmunológica por parte del anfitrión infectado por el virus, en la que el anfitrión puede desarrollar anticuerpos contra el antígeno y/o el anfitrión puede montar una respuesta inmunológica contra las células que expresan el antígeno, incluida una respuesta inmunológica contra células tumorales. Por lo tanto, la liberación sostenida de antígeno puede dar como resultado la inmunización contra las células tumorales. En algunos ejemplos, la respuesta inmunológica inducida por la liberación sostenida de antígeno mediada por virus contra las células tumorales puede dar como resultado la eliminación completa o la destrucción de todas las células tumorales.

2. Métodos de Diagnóstico y Seguimiento

Los virus proporcionados en la presente memoria, incluidas las cepas de virus clonales proporcionadas en la presente memoria, se pueden utilizar en métodos de diagnóstico para detectar y generar imágenes de células cancerosas, tumores, células madre cancerosas y tratamiento de seguimiento de metástasis. Como se comentó anteriormente, los virus proporcionados en la presente memoria pueden acumularse en tumores o metástasis. Por lo tanto, los métodos se describen en la presente memoria para detectar un tumor o metástasis en un sujeto mediante la administración de una cepa de virus que codifica una proteína detectable o una proteína que induce una señal detectable, con lo que la detección de la proteína detectable que induce una señal detectable indica la presencia del tumor o metástasis. La proteína detectable o proteína que induce una señal detectable puede ser detectada por cualquier mecanismo de generación de imágenes conocido por un experto en la técnica.

En otros ejemplos, los virus proporcionados en la presente memoria, incluidas las cepas de virus clonales, se pueden utilizar en métodos de diagnóstico o seguimiento. Por ejemplo, los virus proporcionados en la presente memoria se pueden utilizar en métodos para detectar la actividad del virus en el anfitrión, tal como la actividad de replicación. Los virus que se proporcionan en la presente memoria son virus oncolíticos, y por lo tanto destruyen y lisan células tumorales. Los virus activos que infectan y se replican dentro de una célula tumoral expresan proteínas (p. ej. endógenas o codificadas por transgenes), que tras la lisis de la célula tumoral pueden filtrarse fuera de la célula tumoral y circular en el organismo. Por lo tanto, las proteínas codificadas por el virus se pueden detectar en el tumor o en otros fluidos corporales como una medida de la actividad, tal como la actividad de replicación, que es una medida de la actividad oncolítica del virus. Además, el método también permite el diagnóstico directo de tumores y confirma la colonización satisfactoria de tumores en pacientes portadores de tumores, ya que el virus activo se acumula y se replica preferentemente en células tumorales. Se pueden utilizar ensayos farmacocinéticos para medir la proteína detectable o la proteína que induce una señal detectable para el seguimiento de la infección y/o la actividad del virus a lo largo del tiempo. Por ejemplo, la proteína expresada por el virus o la proteína detectable se puede detectar en un tumor o líquido corporal después de la administración del virus y seguir después de minutos, horas o días después del tratamiento con el virus. Por ejemplo, se pueden tomar muestras del sujeto y evaluar la proteína expresada por el virus o la proteína detectable o se puede someter al sujeto a generación de imágenes para detectar la presencia de la proteína detectable en el plazo de 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 24 horas o más después de la administración del virus. En otros ejemplos, la proteína expresada por el virus o la proteína detectable se pueden analizar cada día, cada 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días. En el método de detección de la actividad del virus, la detección puede ser mediante métodos invasivos, tal como la obtención de fluidos corporales de un sujeto, o mediante métodos no invasivos, tal como la generación de imágenes.

En los métodos de diagnóstico, detección o seguimiento, la proteína detectable o señal detectable puede ser cualquier proteína codificada por un gen como se proporciona en la presente memoria en la Sección D para cuya expresión ha sido modificado el virus. Por ejemplo, la proteína detectable o proteína que induce una señal detectable incluye, pero no se limita a, una luciferasa, una proteína fluorescente, una proteína bioluminiscente, una proteína receptora o transportadora que se une y/o transporta un agente de contraste, un cromóforo, compuesto o ligando que se puede detectar, o melanina codificada por un gen para la síntesis de melanina. En algunos ejemplos, la proteína detectable o proteína que induce una señal detectable es una proteína verde fluorescente (GFP), una proteína roja fluorescente (RFP), un receptor de hierro, un transportador de hierro, un transportador de hierro, un receptor de epinefrina humana (hNET) y una proteína de simportador de yoduro de sodio (NIS).

En cualquiera de estos ejemplos, la proteína detectable o la señal detectable pueden detectarse mediante un método de generación de imágenes. Los métodos ilustrativos de generación de imágenes incluyen, por ejemplo, generación de imágenes con poca luz, espectroscopia de fluorescencia, generación de imágenes de rayos X, generación de imágenes por resonancia magnética (MRI), espectroscopia de resonancia magnética (MRS), tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) o tomografía optoacústica (multiespectral) (OAT). Está dentro del conocimiento práctico de un experto en la técnica elegir una técnica de generación de imágenes apropiada dependiendo de la proteína detectable concreta o la señal detectable que se esté detectando.

En ejemplos de detección de la actividad del virus por métodos invasivos, tales como los líquidos corporales recolectados de un sujeto o paciente, cualquier líquido corporal se puede recolectar y analizar para determinar la presencia o el nivel de una proteína detectable o proteína que induce una señal detectable. Los ejemplos no limitantes de líquidos corporales incluyen, pero no se limitan a, orina, sangre, lágrimas o líquido cefalorraquídeo (LCR). Se puede utilizar cualquier método de detección de fluorescencia o luminiscencia, por ejemplo, utilizando un espectrómetro de fluorescencia o microscopía; un lector de microplacas de luminiscencia de fluorescencia; o clasificación de células activadas por fluorescencia. En un ejemplo de este método para detectar el virus activo o la colonización del tumor viral, se puede agregar una sonda que puede activarse con beta-glucoronidasa a una muestra de fluido corporal, tal como suero, de sujetos a los que se ha administrado previamente virus que codifican GusA. Los ejemplos de tales sondas son compuestos activables por GusA tales como FDGlcU y 4-MUG. El fluido corporal puede ser una muestra que se recoge después de un cierto tiempo después de la infección del sujeto con el virus. La muestra puede analizarse para determinar el compuesto fluorescente activado.

3. Administración

El virus proporcionado en la presente memoria se puede administrar a un sujeto, incluido un sujeto que tiene un tumor o que tiene células neoplásicas, o un sujeto que se va a inmunizar. El virus administrado puede ser un virus proporcionado en la presente memoria o cualquier otro virus generado utilizando los métodos proporcionados en la presente memoria. En algunos ejemplos, el virus administrado es un virus que contiene una característica tal como atenuación de la patogenicidad, baja toxicidad, acumulación preferente en el tumor, capacidad para activar una respuesta inmunológica contra las células tumorales, alta inmunogenicidad, capacidad de replicación y capacidad para expresar proteínas exógenas y sus combinaciones.

a. Etapas Previas a la Administración del Virus

En algunos ejemplos, se pueden realizar una o más etapas antes de la administración del virus al sujeto. Se puede realizar cualquiera de una variedad de etapas precedentes, que incluyen, pero no se limitan a, diagnosticar al sujeto una afección apropiada para la administración del virus, determinar la inmunocompetencia del sujeto, inmunizar al sujeto, tratar al sujeto con un agente quimioterapéutico, tratar al sujeto con radiación, o tratar quirúrgicamente al sujeto.

Para los ejemplos que incluyen la administración de un virus a un sujeto con tumor para fines terapéuticos, se ha diagnosticado previamente al sujeto una afección neoplásica. Los métodos de diagnóstico también pueden incluir determinar el tipo de afección neoplásica, determinar la estadio de las afecciones neoplásicas, determinar el tamaño de uno o más tumores en el sujeto, determinar la presencia o ausencia de células metastásicas o neoplásicas en los ganglios linfáticos del sujeto, o determinar la presencia de metástasis del sujeto. Algunos ejemplos de métodos terapéuticos para administrar un virus a un sujeto pueden incluir una etapa de determinación del tamaño del tumor primario o la etapa de la enfermedad neoplásica, y si el tamaño del tumor primario es igual o superior a un volumen umbral, o si la etapa de la enfermedad neoplásica está en o por encima de una etapa de umbral, se administra un virus al sujeto. En un ejemplo similar, si el tamaño del tumor primario está por debajo de un volumen de umbral, o si la etapa de la enfermedad neoplásica está en o por debajo de una etapa de umbral, el virus aún no se administra al sujeto; tales métodos pueden incluir el seguimiento del sujeto hasta que el tamaño del tumor o el estadio de la enfermedad neoplásica alcancen una cantidad umbral, y a continuación administrar el virus al sujeto. Los tamaños umbral pueden variar de acuerdo con varios factores, incluida la tasa de crecimiento del tumor, la capacidad del virus para infectar un tumor y la inmunocompetencia del sujeto. Generalmente, el tamaño umbral será un tamaño suficiente para que un virus se acumule y se replique en o cerca del tumor sin que el sistema inmunitario del anfitrión lo elimine por completo, y típicamente también será un tamaño suficiente para mantener una infección viral durante un tiempo lo suficientemente largo como para que el anfitrión monte una respuesta inmunológica contra las células tumorales, por lo general aproximadamente una semana o más, aproximadamente diez días o más, o aproximadamente dos semanas o más. Los tamaños de tumores umbral ilustrativos para virus, tales como los virus vaccinia, son al menos aproximadamente 100 mm³, al menos aproximadamente 200 mm³, al menos aproximadamente 300 mm³, al menos aproximadamente 400 mm³, al menos aproximadamente 500 mm³, al menos aproximadamente 750 mm³, al menos aproximadamente 1000 mm³, o al menos aproximadamente 1500 mm³. Los estadios de la enfermedad neoplásica umbral también pueden variar de acuerdo con varios factores, incluidos los requisitos específicos para clasificar por estadios una enfermedad neoplásica concreta, la agresividad del crecimiento de la enfermedad neoplásica, la capacidad del virus para infectar un tumor o metástasis, y la inmunocompetencia del sujeto. Generalmente, la etapa umbral será una etapa suficiente para que un virus se acumule y se replique en un tumor o metástasis sin que el sistema inmunitario del anfitrión lo elimine por completo, y típicamente también tendrá un tamaño suficiente para mantener una infección viral durante un tiempo lo suficientemente largo como para que el anfitrión monte una respuesta inmunológica contra las células neoplásicas, generalmente aproximadamente una semana o más, aproximadamente diez días o más, o aproximadamente dos semanas o más. Los estadios umbral ilustrativos son cualquier estadio más allá del estadio más bajo (p. ej., Estadio I o equivalente), o cualquier estadio en el que el tumor primario sea más grande que un tamaño umbral, o cualquier estadio donde se detecten células metastásicas.

En otros ejemplos, antes de administrar al sujeto un virus, se puede determinar la inmunocompetencia del sujeto. Los métodos para administrar un virus a un sujeto descrito en la presente memoria pueden incluir causar o mejorar una respuesta inmunológica en un sujeto. Por consiguiente, antes de administrar un virus a un sujeto, se puede determinar la capacidad de un sujeto para montar una respuesta inmunológica. Se puede realizar cualquiera de una variedad de pruebas de inmunocompetencia conocidas en la técnica en los métodos proporcionados en la presente memoria. Las pruebas de inmunocompetencia ilustrativas pueden examinar títulos de hemaglutinación ABO (IgM), deficiencia de adhesión de leucocitos (LAD), función de granulocitos (NBT), cuantificación de células T y B, títulos de anticuerpos contra el tétanos, IgA salival, prueba cutánea, prueba de amígdalas, niveles de C3 de complemento y niveles de factor B, y recuento de linfocitos. Un experto en la técnica puede determinar la conveniencia de administrar un virus a un sujeto de acuerdo con el nivel de inmunocompetencia del sujeto, de acuerdo con la inmunogenicidad del virus y, opcionalmente, de acuerdo con la inmunogenicidad de la enfermedad neoplásica que se vaya a tratar. Típicamente, un sujeto puede considerarse inmunocompetente si el experto en la técnica puede determinar que el sujeto es lo suficientemente competente como para montar una respuesta inmunológica contra el

virus.

5 En algunos ejemplos, el sujeto se puede inmunizar antes de administrar al sujeto un virus de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. La inmunización puede servir para aumentar la capacidad de un sujeto para montar una respuesta inmunológica contra el virus, o aumentar la velocidad a la que el sujeto puede montar una respuesta inmunológica contra un virus. La inmunización también puede servir para disminuir el riesgo para el sujeto de patogenicidad del virus. En algunos ejemplos, la inmunización se puede realizar con un virus de inmunización similar al virus terapéutico que se va a administrar. Por ejemplo, el virus de inmunización puede ser una variante incompetente para la replicación del virus terapéutico. En otros ejemplos, el material de inmunización 10 puede ser productos sometidos a digestión del virus terapéutico que se va a administrar. Cualquiera de una variedad de métodos para inmunizar a un sujeto contra un virus conocido se conoce en la técnica y se puede utilizar en la presente memoria. En un ejemplo, los virus vaccinia tratados con, por ejemplo, 1 microgramo de psoraleno y luz ultravioleta a 365 nm durante 4 minutos, se pueden volver incompetentes para la replicación. En otro ejemplo, el virus se puede seleccionar como el mismo o similar a un virus contra el cual el sujeto ha sido inmunizado previamente, p. ej., en una vacunación infantil.

20 En otro ejemplo, al sujeto se le puede haber administrado un virus sin las etapas previas de tratamiento del cáncer, tales como quimioterapia, radioterapia o extirpación quirúrgica de un tumor y/o metástasis. Los métodos proporcionados en la presente memoria aprovechan la capacidad de los virus para entrar o localizarse cerca de un tumor, donde las células tumorales pueden protegerse del sistema inmunitario del sujeto; los virus pueden a continuación proliferar en dicha región inmunoprotegida y también pueden causar la liberación, típicamente una liberación sostenida, de antígenos tumorales del tumor a una ubicación en la que el sistema inmunitario del sujeto puede reconocer los antígenos tumorales y montar una respuesta inmunológica. En tales métodos, la existencia de un tumor de tamaño suficiente o estado inmunoprotegido suficientemente desarrollado puede ser ventajosa para la administración satisfactoria del virus al tumor, y para la producción suficiente de antígeno tumoral. Si un tumor se extirpa quirúrgicamente, es posible que los virus no puedan localizarse en otras células neoplásicas (p. ej., metástasis pequeñas) debido a que tales células aún no han madurado lo suficiente como para crear un entorno inmunoprotector en el que los virus pueden sobrevivir y proliferar, o incluso si los virus pueden localizarse en las células neoplásicas, el número de células o el tamaño de la masa puede ser demasiado pequeño para que los virus causen una liberación sostenida de antígenos tumorales para que el anfitrión tenga una respuesta inmunológica antitumoral. Así, por ejemplo, en la presente memoria se describen métodos para tratar una enfermedad neoplásica o tumoral en la que se administran virus a un sujeto con una enfermedad neoplásica o tumoral sin extirpar el tumor primario, o a un sujeto con una enfermedad neoplásica o tumoral en el se permite intencionadamente que al menos algunos tumores o células neoplásicas permanezcan en el sujeto. En otros métodos típicos de tratamiento del 35 cáncer, tales como la quimioterapia o la radioterapia, tales métodos suelen tener un efecto secundario de debilitamiento del sistema inmunitario del sujeto. Este tratamiento de un sujeto mediante quimioterapia o radioterapia puede reducir la capacidad del sujeto para desarrollar una respuesta inmunológica antitumoral. Así, por ejemplo, en la presente memoria se describen métodos para tratar una enfermedad neoplásica o tumoral en la que se administran virus a un sujeto con una enfermedad neoplásica o tumoral sin tratar al sujeto con una terapia de debilitamiento del sistema inmunitario, tal como la quimioterapia o la radioterapia.

45 En un ejemplo alternativo, antes de la administración de un virus al sujeto, el sujeto puede tratarse en una o más etapas de tratamiento del cáncer que no eliminan el tumor primario o que no debilitan el sistema inmunológico del sujeto. Se están desarrollando una variedad de métodos de tratamiento del cáncer más sofisticados en los que el tumor se puede tratar sin extirpación quirúrgica o terapia de debilitamiento del sistema inmunológico. Los métodos ilustrativos incluyen la administración de un compuesto que disminuye la velocidad de proliferación del tumor o las células neoplásicas sin debilitar el sistema inmunológico (p. ej., administrando compuestos supresores de tumores o administrando compuestos específicos de células tumorales) o administrando un compuesto inhibidor de la angiogénesis. Por lo tanto, los métodos combinados que incluyen la administración de un virus a un sujeto pueden mejorar adicionalmente la terapia del cáncer. Por lo tanto, en la presente memoria se describen métodos para 50 administrar un virus a un sujeto, antes o después de, por ejemplo, administrar un compuesto que retarda el crecimiento del tumor sin debilitar el sistema inmunitario del sujeto o un compuesto que inhibe la vascularización del tumor.

55 **b. Modo de administración**

Se puede utilizar cualquier modo de administración de un virus a un sujeto, siempre que el modo de administración permita que el virus entre en un tumor o metástasis. Los modos de administración pueden incluir, pero no se limitan a, administración sistémica, parenteral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, transdérmica, intradérmica, intraarterial (p. ej., infusión de la arteria hepática), de perfusión intravesicular, intrapleural, intraarticular, tópica, intratumoral, intralesional, endoscópica, multipunción (p. ej., como se utiliza con las vacunas contra la viruela), inhalación, percutánea, subcutánea, intranasal, intratraqueal, oral, intracavidad (p. ej., administración a la vejiga a través de un catéter, administración al intestino mediante supositorio o enema), administración vaginal, rectal, intracraneal, intraprostática, intravítrea, auditiva u ocular. En algunos ejemplos, también se puede administrar de manera similar un agente de diagnóstico o terapéutico como se describe en otra parte de la presente memoria.

Un experto en la técnica puede seleccionar cualquier modo de administración compatible con el sujeto y el virus, y es probable que el virus alcance tumores y/o metástasis. El experto en la técnica puede seleccionar la vía de administración de acuerdo con cualquiera de una variedad de factores, que incluyen la naturaleza de la enfermedad, el tipo de tumor y el virus particular contenido en la composición farmacéutica. La administración al sitio diana se puede realizar, por ejemplo, mediante suministro balístico, como un sistema de dispersión coloidal, o la administración sistémica se puede realizar mediante inyección en una arteria.

c. Dosificaciones y Régimen de dosificación

El régimen de dosificación puede ser cualquiera de una variedad de métodos y cantidades, y puede ser determinado por un experto en la técnica de acuerdo con factores clínicos conocidos. Como es sabido en las técnicas médicas, las dosis para cualquier paciente pueden depender de muchos factores, incluyendo la especie del sujeto, el tamaño, el área de la superficie corporal, la edad, el sexo, la inmunocompetencia y la salud general, el virus particular que se administrará, la duración y la vía de administración, el tipo y la etapa de la enfermedad, por ejemplo, el tamaño del tumor y otros tratamientos o compuestos, tales como los fármacos quimioterapéuticos, que se administran simultáneamente. Además de los factores anteriores, tales niveles pueden verse afectados por la infectividad del virus y la naturaleza del virus, según lo determine un experto en la técnica.

En los presentes métodos, los niveles de dosificación mínimos apropiados y los regímenes de dosificación de los virus pueden ser niveles suficientes para que el virus sobreviva, crezca y se replique en un tumor o metástasis. Generalmente, el virus se administra en una cantidad que es al menos o aproximadamente 1×10^5 ufp al menos una vez durante un ciclo de administración. Los niveles mínimos ilustrativos para administrar un virus a un ser humano de 65 kg pueden incluir al menos aproximadamente 1×10^5 unidades formadoras de placa (ufp), al menos aproximadamente 5×10^5 ufp, al menos aproximadamente 1×10^6 ufp, al menos aproximadamente 5×10^6 ufp, al menos aproximadamente 1×10^7 ufp, al menos aproximadamente 1×10^8 ufp, al menos aproximadamente 1×10^9 ufp, o al menos aproximadamente 1×10^{10} ufp. Por ejemplo, el virus se administra en una cantidad que es al menos o aproximadamente o es 1×10^5 ufp, 1×10^6 ufp, 1×10^7 ufp, 1×10^8 ufp, 1×10^9 ufp, 1×10^{10} ufp, 1×10^{11} ufp, 1×10^{12} ufp, 1×10^{13} ufp, o 1×10^{14} ufp al menos una vez durante un ciclo de administración.

En el régimen de dosificación, la cantidad de virus se puede administrar como una administración única o varias veces durante el ciclo de administración. Por lo tanto, los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir una administración única de un virus a un sujeto o administraciones múltiples de un virus a un sujeto. En algunos ejemplos, una sola administración es suficiente para establecer un virus en un tumor, donde el virus puede proliferar y puede causar o mejorar una respuesta antitumoral en el sujeto; tales métodos no requieren administraciones adicionales de un virus para causar o mejorar una respuesta antitumoral en un sujeto, lo que puede dar como resultado, por ejemplo, la inhibición del crecimiento tumoral, la inhibición del crecimiento o formación de metástasis, la reducción del tumor o el tamaño, la eliminación de un tumor o metástasis, la inhibición o prevención de la recurrencia de una enfermedad neoplásica o la formación de nuevos tumores u otros efectos terapéuticos del cáncer.

En otros ejemplos, se puede administrar un virus en diferentes ocasiones, separadas en el tiempo, típicamente por al menos un día. Por ejemplo, un virus se puede administrar dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o seis veces o más, con un día o más, dos días o más, una semana o más, o un mes o más de tiempo entre las administraciones. Las administraciones separadas pueden aumentar la probabilidad de administrar un virus a un tumor o metástasis, donde una administración previa no ha sido eficaz para administrar un virus a un tumor o metástasis. Las administraciones separadas pueden aumentar las ubicaciones en un tumor o metástasis donde se puede producir la proliferación del virus o, de lo contrario, aumentar el título de virus acumulado en el tumor, lo que puede aumentar la escala de liberación de antígenos u otros compuestos del tumor para provocar o mejorar una respuesta inmunológica antitumoral del anfitrión, y también puede, opcionalmente, aumentar el nivel de lisis tumoral basada en virus o muerte de células tumorales. Las administraciones separadas de un virus pueden ampliar adicionalmente la respuesta inmunológica de un sujeto contra los antígenos virales, lo que puede ampliar la respuesta inmunológica del anfitrión a los tumores o metástasis en los que se han acumulado virus, y puede aumentar la probabilidad de que un anfitrión tenga una respuesta inmunológica antitumoral.

Cuando se realizan administraciones separadas, cada administración puede ser una cantidad de dosificación que sea igual o diferente con respecto a otras cantidades de dosificación de administración. En un ejemplo, todas las dosis de administración son las mismas. En otros ejemplos, una primera cantidad de dosificación puede ser una cantidad de dosificación mayor que una o más cantidades de dosificación posteriores, por ejemplo, al menos 10 veces mayor, al menos 100 veces mayor, o al menos 1000 veces mayor que las cantidades de dosificación posteriores. En un ejemplo de un método de administraciones separadas en el que la primera cantidad de dosificación es mayor que una o más cantidades de dosificación posteriores, todas las cantidades de dosificación subsiguientes pueden ser la misma, menor cantidad con respecto a la primera administración.

Las administraciones separadas pueden incluir cualquier número de dos o más administraciones, incluidas dos, tres, cuatro, cinco o seis administraciones. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente el número de

administraciones que se deben realizar o la conveniencia de realizar una o más administraciones adicionales de acuerdo con métodos conocidos en la técnica de seguimiento de los métodos terapéuticos y otros métodos de seguimiento proporcionados en la presente memoria. Por consiguiente, los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen métodos para proporcionar al sujeto una o más administraciones de un virus, donde el número de administraciones se puede determinar al realizar el seguimiento al sujeto y, en función de los resultados del seguimiento, determinar si se deben proporcionar o no una o más administraciones adicionales. La decisión de proporcionar o no una o más administraciones adicionales se puede basar en una variedad de resultados de seguimiento, que incluyen, pero no se limitan a, la indicación de crecimiento tumoral o la inhibición del crecimiento tumoral, aparición de nuevas metástasis o inhibición de metástasis, título del anticuerpo anti-virus, el título del anticuerpo antitumoral del sujeto, la salud general del sujeto, el peso del sujeto, la presencia del virus únicamente en el tumor y/o metástasis, la presencia del virus en tejidos u órganos normales.

El período de tiempo entre administraciones puede ser cualquiera de una variedad de períodos de tiempo. El período de tiempo entre administraciones puede estar en función de cualquiera de una variedad de factores, incluidas las etapas de seguimiento, como se describe con relación al número de administraciones, el período de tiempo para que un sujeto monte una respuesta inmunológica, el período de tiempo para que un sujeto elimine el virus del tejido normal, o el período de tiempo para la proliferación del virus en el tumor o metástasis. En un ejemplo, el período de tiempo puede estar en función del período de tiempo para que un sujeto monte una respuesta inmunológica; por ejemplo, el período de tiempo puede ser mayor que el período de tiempo para que un sujeto monte una respuesta inmunológica, tal como más de una semana, más de aproximadamente diez días, más de aproximadamente dos semanas o más de un mes; en otro ejemplo, el período de tiempo puede ser menor que el período de tiempo para que un sujeto monte una respuesta inmunológica, tal como menos de una semana, menos de aproximadamente diez días, menos de aproximadamente dos semanas o menos de un mes. En otro ejemplo, el período de tiempo puede estar en función del período de tiempo para que un sujeto elimine el virus del tejido normal; por ejemplo, el período de tiempo puede ser mayor que el período de tiempo para que un sujeto elimine el virus del tejido normal, tal como más de aproximadamente un día, más de aproximadamente dos días, más de aproximadamente tres días, más de aproximadamente cinco días, o más de una semana. En otro ejemplo, el período de tiempo puede estar en función del período de tiempo para la proliferación de virus en el tumor o metástasis; por ejemplo, el período de tiempo puede ser mayor que la cantidad de tiempo para que surja una señal detectable en un tumor o metástasis después de la administración de un virus que expresa un marcador detectable, tal como aproximadamente 3 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente una semana, aproximadamente diez días, aproximadamente dos semanas, o aproximadamente un mes.

Por ejemplo, una cantidad de virus se administra dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces o siete veces durante un ciclo de administración. La cantidad de virus se puede administrar el primer día del ciclo, el primer y segundo día del ciclo, cada uno de los primeros tres días consecutivos del ciclo, cada uno de los primeros cuatro días consecutivos del ciclo, cada uno de los primeros cinco días consecutivos del ciclo, cada uno de los primeros seis días consecutivos del ciclo, o cada uno de los primeros siete días consecutivos del ciclo. Generalmente, el ciclo de administración es de 7 días, 14 días, 21 días o 28 días. Dependiendo de la capacidad de respuesta o el pronóstico del paciente, el ciclo de administración se repite a lo largo de varios meses o años.

En general, los niveles máximos apropiados de dosificación o los regímenes de dosificación de los virus son niveles que no son tóxicos para el anfitrión, niveles que no causan esplenomegalia de 3 veces o más, niveles que no producen colonias o placas en tejidos u órganos normales después de aproximadamente 1 día o después de aproximadamente 3 días o después de aproximadamente 7 días.

d. Administraciones Conjuntas

También se describen métodos en los que se administra una sustancia terapéutica adicional, tal como un virus terapéutico diferente o un compuesto terapéutico. Estos se pueden administrar de forma simultánea, secuencial o intermitente con el primer virus.

La sustancia terapéutica adicional puede interactuar con el virus o un producto génico del mismo, o la sustancia terapéutica adicional puede actuar independientemente del virus.

El tratamiento de terapia combinada tiene las ventajas de que: 1) evita la resistencia a un solo agente; 2) en una población tumoral heterogénea, puede destruir células por diferentes mecanismos; y 3) seleccionando medicamentos con toxicidades no coincidentes, cada agente se puede utilizar a dosis completas para obtener la máxima eficacia y el efecto sinérgico. La terapia combinada se puede realizar combinando un virus de diagnóstico/terapéutico con uno o más de los siguientes agentes anticancerosos: agentes quimioterapéuticos, anticuerpos terapéuticos, ARNip, toxinas, pares de enzimas y profármacos o radiación.

i. Administración de una pluralidad de virus.

Se describen métodos para administrar a un sujeto dos o más virus. La administración se puede efectuar de forma simultánea, secuencial o intermitente. La pluralidad de virus se puede administrar como una composición única o

como dos o más composiciones. Los dos o más virus pueden incluir al menos dos virus. En un ejemplo concreto, donde hay dos virus, ambos virus son virus vaccinia. En otro ejemplo, un virus es un virus vaccinia y el segundo virus es uno de un adenovirus, un virus adenoasociado, un retrovirus, un virus del herpes simple, un reovirus, un virus de paperas, un virus espumoso, un virus de la influenza, un virus de mixoma, un virus de estomatitis vesicular o cualquier otro virus descrito en la presente memoria o conocido en la técnica. Los virus se pueden elegir basándose en la vía en la que actúan. Por ejemplo, un virus que se dirige a una ruta de Ras activada se puede combinar con un virus que se dirige a células tumorales carentes de la expresión de p53.

La pluralidad de virus se puede proporcionar como combinaciones de composiciones que contienen y/o kits que incluyen los virus empaquetados para administración y, opcionalmente, incluyen instrucciones para ello. Las composiciones pueden contener los virus formulados para administración de dosis única (es decir, para administración directa) y pueden requerir dilución u otras adiciones.

En un ejemplo, al menos uno de los virus es un virus modificado tal como los que se proporcionan en la presente memoria, con una característica tal como baja patogenicidad, baja toxicidad, acumulación preferente en el tumor, capacidad para activar una respuesta inmunológica contra células tumorales, inmunogénico, competente para la replicación, capacidad de expresar proteínas exógenas, y combinaciones de las mismas. Los virus se pueden administrar aproximadamente al mismo tiempo, o se pueden administrar en diferentes momentos. Los virus pueden administrarse en la misma composición o en el mismo método de administración, o pueden administrarse en composiciones separadas o mediante diferentes métodos de administración.

El período de tiempo entre administraciones puede ser cualquier período de tiempo que logre los efectos deseados, como puede ser determinado por un experto en la técnica. La selección de un período de tiempo entre administraciones de diferentes virus se puede determinar de acuerdo con parámetros similares a los de la selección del período de tiempo entre administraciones del mismo virus, incluidos los resultados de las etapas de seguimiento, el período de tiempo para que un sujeto monte una respuesta inmunológica, el período de tiempo para que un sujeto elimine el virus del tejido normal, o el período de tiempo para la proliferación del virus en el tumor o metástasis. En un ejemplo, el período de tiempo puede estar en función del período de tiempo para que un sujeto monte una respuesta inmunológica; por ejemplo, el período de tiempo puede ser mayor que el período de tiempo para que un sujeto monte una respuesta inmunológica, tal como más de una semana, más de aproximadamente diez días, más de aproximadamente dos semanas o más de un mes; en otro ejemplo, el período de tiempo puede ser menor que el período de tiempo para que un sujeto monte una respuesta inmunológica, tal como menos de una semana, menos de aproximadamente diez días, menos de aproximadamente dos semanas o menos de un mes. En otro ejemplo, el período de tiempo puede estar en función del período de tiempo para que un sujeto elimine el virus del tejido normal; por ejemplo, el período de tiempo puede ser mayor que el período de tiempo para que un sujeto elimine el virus del tejido normal, tal como más de aproximadamente un día, más de aproximadamente dos días, más de aproximadamente tres días, más de aproximadamente cinco días, o más de una semana. En otro ejemplo, el período de tiempo puede estar en función del período de tiempo para la proliferación de virus en el tumor o metástasis; por ejemplo, el período de tiempo puede ser mayor que la cantidad de tiempo para que surja una señal detectable en un tumor o metástasis después de la administración de un virus que expresa un marcador detectable, tal como aproximadamente 3 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente una semana, aproximadamente diez días, aproximadamente dos semanas, o aproximadamente un mes.

ii. Compuestos Terapéuticos

Se puede utilizar cualquier agente terapéutico o anticanceroso como segundo agente terapéutico o anticanceroso en los métodos de tratamiento de cáncer combinados descritos en la presente memoria. Los métodos pueden incluir administrar uno o más compuestos terapéuticos al sujeto además de administrar un virus o una pluralidad de los mismos a un sujeto. Los compuestos terapéuticos pueden actuar independientemente, o junto con el virus, para los efectos terapéuticos sobre el tumor.

Los compuestos terapéuticos que pueden actuar independientemente incluyen cualquiera de una variedad de compuestos quimioterapéuticos conocidos que pueden inhibir el crecimiento del tumor, inhibir el crecimiento y/o la formación de la metástasis, disminuir el tamaño de un tumor o metástasis, eliminar un tumor o metástasis, sin reducir la capacidad del virus para acumularse en un tumor, replicarse en el tumor y causar o mejorar una respuesta inmunológica antitumoral en el sujeto.

Los compuestos terapéuticos que actúan junto con los virus incluyen, por ejemplo, compuestos que alteran la expresión de los virus o compuestos que pueden interactuar con un gen expresado por el virus, o compuestos que pueden inhibir la proliferación del virus, incluidos compuestos tóxicos para el virus. Los compuestos terapéuticos que pueden actuar junto con el virus incluyen, por ejemplo, compuestos terapéuticos que aumentan la proliferación, toxicidad, destrucción de células tumorales o respuesta inmunológica que provocan las propiedades de un virus, y también pueden incluir, por ejemplo, compuestos terapéuticos que disminuyen la proliferación, toxicidad o propiedades de destrucción celular de un virus. Opcionalmente, el agente terapéutico puede exhibir o manifestar propiedades adicionales, tales como propiedades que permiten su uso como agente de generación de imágenes,

como se describe en otra parte en la presente memoria.

Los compuestos terapéuticos también incluyen, pero no se limitan a, agentes quimioterapéuticos, nanopartículas, radioterapia, moléculas de ARNip, pares de enzimas/profármacos, agentes fotosensibilizantes, toxinas, microondas, un radionúclido, un inhibidor de la angiogénesis, una proteína inhibidora de la mitosis (p. ej., cdc6), un oligopéptido antitumoral (p. ej., oligopéptidos antimitóticos, péptidos de unión selectiva al tumor de alta afinidad), un modulador de señalización, antibióticos anticancerosos o una combinación de los mismos.

Los agentes fotosensibilizantes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, verde de indocianina, azul de toluidina, ácido aminolevulínico, texafirinas, benzoporfirinas, fenotiazinas, ftalocianinas, porfirinas tales como porfímero de sodio, clorinas tales como tetra(m-hidroxifenil)clorina o estaño(IV) clorina e6, purpurinas tales como estaño etil etiopurpurina, purpurinimidas, bacterioclorinas, feofórbidos, pirofeofórbidos o colorantes catiónicos. En un ejemplo, un virus vaccinia, tal como un virus vaccinia proporcionado en la presente memoria, se administra a un sujeto que tiene un tumor, cáncer o metástasis en combinación con un agente fotosensibilizante.

Los radionúclidos, que dependen del radionúclido, la cantidad y la aplicación, se pueden utilizar para el diagnóstico y/o para el tratamiento. Incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, un compuesto o molécula que contiene ³²Fósforo, ⁶⁰Cobalto, ⁹⁰Itrio, ⁹⁹Tecnicio, ¹⁰³Paladio, ¹⁰⁶Rutenio, ¹¹¹Indio, ¹¹⁷Lutecio, ¹²⁵Yodo, ¹³¹Yodo, ¹³⁷Cesio, ¹⁵³Samarium, ¹⁸⁶Renio, ¹⁸⁸Renio, ¹⁹²Iridio, ¹⁹⁸Oro, ²¹¹Astato, ²¹²Bismuto o ²¹³Bismuto. En un ejemplo, un virus vaccinia, tal como un virus vaccinia proporcionado en la presente memoria, se administra a un sujeto que tiene un tumor, cáncer o metástasis combinado con un radionúclido.

Las toxinas incluyen, pero no se limitan a, compuestos quimioterapéuticos tales como, pero no limitados a, 5-fluorouridina, caliqueamicina y maitansina. Los moduladores de señalización incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, inhibidores del factor inhibidor de macrófagos, agonistas de receptores de tipo Toll e inhibidores de stat3. En un ejemplo, un virus vaccinia, tal como un virus vaccinia proporcionado en la presente memoria, se administra a un sujeto que tiene un tumor, cáncer o metástasis combinado con una toxina o un modulador de señalización.

La terapia combinada entre los agentes quimioterapéuticos y los virus terapéuticos puede ser eficaz/curativa en situaciones en las que el tratamiento con un solo agente no es eficaz. Los compuestos quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodepa, carbocouona, meturedpa y uredepa; etilenimina, metilmelaminas, incluyendo alretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilmelamina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de óxido de mecloretamina, melfalán, novobiocina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomicinas, actinomicina, antramizina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carubicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorrubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido folínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatrexato; defosfamida; demecolcina; diazicuona; eflornitina; acetato de eliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidamina; mitoguzona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; polisacárido-K; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclortrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido de citosina; ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel y docetaxel; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; Navelbina; Novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; Xeloda; ibandronato; CPT11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de la hormona en tumores tales como los antiestrogénicos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, aromatasa que inhibe 4(5)-imidazoles, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Tales compuestos quimioterapéuticos que se pueden utilizar en la presente memoria incluyen compuestos cuyas toxicidades impiden el uso del compuesto en métodos quimioterapéuticos sistémicos generales. Los agentes quimioterapéuticos también incluyen nuevas clases de agentes quimioterapéuticos dirigidos tales como, por ejemplo, imatinib (comercializado por Novartis con el nombre

comercial Gleevec en los Estados Unidos), gefitinib (desarrollado por AstraZeneca con el nombre comercial Iressa) y erlotinib. Los agentes quimioterapéuticos particulares incluyen, pero no están limitados a, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, DWA2114R, NK121, IS 3 295 y 254-S vincristina, prednisona, doxorubicina y L-asparaginasa; mecloretamina, vincristina, procarbazona y prednisona (MOPP), ciclofosfamida, vincristina, procarbazona y prednisona (C-MOPP), bleomicina, vinblastina, gemcitabina y 5-fluorouracilo. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos son, por ejemplo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, DWA2114R, NK121, IS 3 295 y 254-S. En un ejemplo no limitante, un virus vaccinia, tal como un virus vaccinia proporcionado en la presente memoria, se administra a un sujeto que tiene un tumor, cáncer o metástasis combinado con un complejo de coordinación de platino, tal como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, DWA2114R, NK121, IS 3 295, y 254-S. Los tumores, cánceres y metástasis pueden ser cualquiera de los proporcionados en la presente memoria, y en particular, pueden ser un tumor pancreático, un tumor de ovario, un tumor de pulmón, un tumor de colon, un tumor de próstata, un tumor cervical o un tumor de mama; tumores ilustrativos son los tumores pancreáticos y ováricos. Los tumores, cánceres y metástasis pueden ser tumores resistentes a la monoterapia tal como, por ejemplo, uno que no responde a la terapia con virus solo o con agente anticanceroso solo, pero que responde a la terapia con una combinación de virus y agentes anticancerosos. Típicamente, una cantidad de virus terapéuticamente eficaz se administra sistémicamente al sujeto y el virus se localiza y se acumula en el tumor. Después de administrar el virus, al sujeto se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente anticanceroso, tal como cisplatino. En un ejemplo, el cisplatino se administra una vez al día durante cinco días consecutivos. Un experto en la técnica podría determinar cuándo administrar el agente anticanceroso después del virus utilizando, por ejemplo, modelos animales *in vivo*. Utilizando los métodos proporcionados en la presente memoria, la administración de un virus y un agente anticanceroso, tal como cisplatino, puede causar una reducción en el volumen del tumor, puede causar que el crecimiento del tumor se detenga o se retrase o puede causar que el tumor se elimine del sujeto. Se puede realizar el seguimiento del estado de los tumores, cánceres y metástasis después del tratamiento utilizando cualquiera de los métodos proporcionados en la presente memoria y conocidos en la técnica.

Los antibióticos anticancerosos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, antraciclinas tales como hidroclicloruro de doxorubicina (adriamicina), hidroclicloruro de idarrubicina, hidroclicloruro de daunorrubicina, hidroclicloruro de aclarrubicina, hidroclicloruro de epirubicina e hidroclicloruro de pirarrubicina, fleomicinas tales como fleomicina y sulfato de peplomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, actinomicinas tales como actinomicina D, zinostatinestimulámero y polipéptidos tales como neocarzinostatina. En un ejemplo, se administra un virus vaccinia, tal como un virus vaccinia proporcionado en la presente memoria, a un sujeto que tiene un tumor, cáncer o metástasis combinado con un antibiótico anticanceroso.

En un ejemplo, las nanopartículas se pueden diseñar de modo que porten uno o más agentes terapéuticos proporcionados en la presente memoria. Además, las nanopartículas se pueden diseñar para transportar una molécula que dirige las nanopartículas a las células tumorales. En un ejemplo no limitante, las nanopartículas pueden recubrirse con un radionúclido y, opcionalmente, un anticuerpo inmunoreactivo con un antígeno asociado a tumores. En un ejemplo, se administra un virus vaccinia, tal como un virus vaccinia proporcionado en la presente memoria, a un sujeto que tiene un tumor, cáncer o metástasis combinado con una nanopartícula que porta cualquiera de los agentes terapéuticos proporcionados en la presente memoria.

La radioterapia se ha convertido en una de las principales opciones de tratamiento para la mayoría de los pacientes con cáncer. El amplio uso del tratamiento con radiación se debe a la capacidad de la radiación gamma para inducir daños irreversibles en las células seleccionadas con la preservación de la función normal del tejido. La radiación ionizante desencadena la apoptosis, la maquinaria de muerte celular intrínseca en las células cancerosas, y la activación de la apoptosis parece ser el modo principal por el cual las células cancerosas mueren después de la exposición a la radiación ionizante. En un ejemplo, un virus vaccinia, tal como un virus vaccinia proporcionado en la presente memoria, se administra a un sujeto que tiene un tumor, cáncer o metástasis combinado con radioterapia.

Por lo tanto, en la presente memoria se describen métodos para administrar a un sujeto uno o más compuestos terapéuticos que pueden actuar junto con el virus para aumentar la proliferación, toxicidad, destrucción de células tumorales o la respuesta inmunológica que provocan las propiedades de un virus. En la presente memoria también se describen métodos para administrar a un sujeto uno o más compuestos terapéuticos que pueden actuar junto con el virus para disminuir la proliferación, toxicidad o propiedades de destrucción celular de un virus. Los compuestos terapéuticos que se deben administrar pueden ser cualquiera de los proporcionados en la presente memoria o en la técnica.

Los compuestos terapéuticos que pueden actuar junto con el virus para aumentar la proliferación, la toxicidad, la destrucción de células tumorales o la respuesta inmunológica que provocan las propiedades de un virus son compuestos que pueden alterar la expresión génica, donde la alteración de la expresión génica puede dar como resultado una mayor destrucción de células tumorales o un aumento de la respuesta inmunológica antitumoral en el sujeto. Un compuesto que altera la expresión génica puede, por ejemplo, causar un aumento o disminución en la expresión de uno o más genes virales, incluidos genes virales endógenos y/o genes virales exógenos. Por ejemplo, un compuesto que altera la expresión génica puede inducir o aumentar la transcripción de un gen en un virus tal como un gen exógeno que puede causar la lisis celular o la muerte celular, que puede provocar una respuesta

inmunológica, que puede catalizar la conversión de un compuesto de tipo profármaco, o que puede inhibir la expresión de un gen de células tumorales. Cualquiera de una amplia variedad de compuestos que pueden alterar la expresión génica es conocido en la técnica, incluyendo IPTG y RU486. Los genes ilustrativos cuya expresión puede ser regulada por incremento incluyen proteínas y moléculas de ARN, incluidas toxinas, enzimas que pueden convertir un profármaco en un fármaco antitumoral, citocinas, proteínas reguladoras de la transcripción, ARNip y ribozimas. En otro ejemplo, un compuesto que altera la expresión de un gen puede inhibir o disminuir la transcripción de un gen en un virus tal como un gen heterólogo que puede reducir la toxicidad viral o reducir la proliferación viral. Se puede utilizar cualquiera de una variedad de compuestos que pueden reducir o inhibir la expresión génica en los métodos descritos en la presente memoria, incluidos los compuestos de ARNip, inhibidores de la transcripción o inhibidores de los activadores de la transcripción. Los genes ilustrativos cuya expresión puede ser regulada por disminución incluyen proteínas y moléculas de ARN, incluidas proteínas virales o ARN que suprimen la lisis, la síntesis o proliferación de nucleótidos, y proteínas celulares o moléculas de ARN que suprimen la muerte celular, la inmunorreactividad, la lisis o la replicación viral.

En otro ejemplo, los compuestos terapéuticos que pueden actuar junto con el virus para aumentar la proliferación, la toxicidad, la destrucción de células tumorales o la respuesta inmunológica que provocan las propiedades de un virus son compuestos que pueden interactuar con un producto génico expresado viralmente, y tal interacción puede dar como resultado un aumento de la destrucción de células tumorales o un aumento de la respuesta inmunológica antitumoral en el sujeto. Un compuesto terapéutico que puede interactuar con un producto génico expresado viralmente puede incluir, por ejemplo, un profármaco u otro compuesto que tenga poca o ninguna toxicidad u otra actividad biológica en su forma administrada por el sujeto, pero después de la interacción con un producto génico expresado viralmente, el compuesto puede desarrollar una propiedad que da como resultado la muerte de la célula tumoral, incluida, entre otras, la citotoxicidad, la capacidad de inducir la apoptosis o la capacidad de desencadenar una respuesta inmunológica. En un ejemplo no limitante, el virus transporta una enzima a las células cancerosas. Una vez que la enzima se introduce en las células cancerosas, se administra una forma inactiva de un medicamento de quimioterapia (es decir, un profármaco). Cuando el profármaco inactivo llega a las células cancerosas, la enzima convierte el profármaco en el fármaco de quimioterapia activo, de modo que puede destruir la célula cancerosa. Por lo tanto, el tratamiento está dirigido solo a las células cancerosas y no afecta a las células normales. El profármaco se puede administrar de forma simultánea o secuencial al virus. Una variedad de sustancias similares a los profármacos son conocidas en la técnica y un conjunto ilustrativo de tales compuestos se describe en otra parte en la presente memoria, donde tales compuestos pueden incluir ganciclovir, 5-fluorouracilo, desoxirribósido de 6-metilpurina, cefalosporina-doxorrubicina, ácido 4-[(2-cloroetil)(2-mesiloxietil)amino]benzoil-L-glutámico, acetaminofeno, ácido indol-3-acético, CB1954, 7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carboniloxicamptotecina, bis(2-cloroetil)amino-4-hidroxifenil-aminometanona 28, 1-clorometil-5-hidroxi-1,2-dihidro-3H-benz[e]indol, epirubicina-glucurónido, 5'-desoxi-5-fluorouridina, arabinósido de citosina, linamarina y un análogo de nucleósido (p. ej., fluorouridina, fluorodesoxiuridina, arabinósido de fluorouridina, arabinósido de citosina, arabinósido de adenina, arabinósido de guanina, arabinósido de hipoxantina, 6-mercaptopurina-ribósido, teoguanosina-ribósido, nebularina, 5-yodouridina, 5-yododesoxiuridina, 5-bromodesoxiuridina, 5-vinildesoxiuridina, 9-[(2-hidroxi)etoxi]metilguanina (aciclovir), 9-[(2-hidroxi-1-hidroximetil)-etoxi]metilguanina (DHPG), azauridina, azacitidina, azidotimidina, dideoxinosina, didesoxicitidina, dideoxinosina, dideoxiguanosina, didesoxitimidina, 3'-desoxiadenosina, 3'-desoxicitidina, 3'-desoxinosina, 3'-desoxiguanosina, 3'-desoxitimidina).

En otro ejemplo, los compuestos terapéuticos que pueden actuar junto con el virus para disminuir la proliferación, toxicidad o propiedades de destrucción celular de un virus son compuestos que pueden inhibir la replicación viral, inhibir las toxinas virales o causar la muerte viral. Un compuesto terapéutico que puede inhibir la replicación viral, inhibir las toxinas virales o causar la muerte viral generalmente puede incluir un compuesto que puede bloquear una o más etapas en el ciclo de vida viral, incluidos, pero sin limitarse a, compuestos que pueden inhibir la replicación del ADN viral, la transcripción de ARN viral, el ensamblaje de proteínas de la cubierta viral, el ensamblaje de la membrana externa o polisacárido. Cualquiera de una variedad de compuestos que pueden bloquear una o más etapas en un ciclo de vida viral son conocidos en la técnica, incluyendo cualquier compuesto antiviral conocido (p. ej., cidofovir), inhibidores de la ADN polimerasa viral, inhibidores de la ARN polimerasa viral, inhibidores de proteínas que regulan la replicación del ADN o la transcripción del ARN virales. En otro ejemplo, un virus puede contener un gen que codifica una proteína del ciclo de vida viral, tal como la ADN polimerasa o la ARN polimerasa que puede ser inhibida por un compuesto que, opcionalmente, no es tóxico para el organismo anfitrión.

Además de la terapia combinada entre agentes quimioterapéuticos y un virus descrito en la presente memoria, también se podrían aplicar otras estrategias de terapia combinada más complejas. Por ejemplo, una terapia combinada puede incluir agentes quimioterapéuticos, anticuerpos terapéuticos y un virus proporcionado en la presente memoria. Alternativamente, otra terapia combinada puede ser la combinación de radiación, anticuerpos terapéuticos y un virus proporcionado en la presente memoria. Por lo tanto, el concepto de terapia combinada también se puede basar en la aplicación de un virus proporcionado en la presente memoria junto con una o más de las siguientes modalidades terapéuticas, a saber, agentes quimioterapéuticos, radioterapia, anticuerpos terapéuticos, terapia de hiper- o hipotermia, ARNip. Bacterias de diagnóstico/terapéuticas, células de mamíferos de diagnóstico/terapéuticas, inmunoterapia y/o toxinas dirigidas (administradas mediante anticuerpos, liposomas y nanopartículas).

El suministro eficaz de cada componente de la terapia combinada es un aspecto importante de los métodos descritos en la presente memoria. De acuerdo con un aspecto, los modos de administración que se analizan a continuación explotan una o más de las características clave: (i) el suministro de un virus proporcionado en la presente memoria a los tumores mediante un modo de administración para lograr el mayor título de virus y el mayor efecto terapéutico; (ii) administración de cualquier otra modalidad terapéutica mencionada al tumor mediante un modo de administración para lograr el efecto terapéutico óptimo. El esquema de dosis de la terapia combinada administrada es tal que la combinación de las dos o más modalidades terapéuticas es terapéuticamente eficaz. Las dosis variarán de acuerdo con factores tales como la edad, la salud, el sexo, el tamaño y el peso del paciente, la vía de administración, la toxicidad de los fármacos, la frecuencia de tratamiento y las susceptibilidades relativas del cáncer a cada una de las modalidades terapéuticas.

Para las terapias combinadas con compuestos quimioterapéuticos, las dosificaciones para la administración de tales compuestos son conocidas en la técnica o pueden ser determinadas por un experto en la técnica de acuerdo con factores clínicos conocidos (p. ej., especie, tamaño, área de superficie corporal, edad, sexo, inmunocompetencia y salud general, duración y vía de administración, el tipo y la estadio de la enfermedad, por ejemplo, tamaño del tumor y otros virus, tratamientos o compuestos, tales como otros fármacos quimioterapéuticos, que estén siendo administrados simultáneamente. Además de los factores anteriores, tales niveles pueden verse afectados por la infectividad del virus y la naturaleza del virus, según lo determine un experto en la técnica. Por ejemplo, el cisplatino (también llamado cis-platino, platino; cis-diaminodicloroplatino y cDDP) es representativo de una amplia clase de compuestos de coordinación de platino, solubles en agua, empleados frecuentemente en la terapia del cáncer testicular, tumores ováricos y una variedad de otros cánceres (Véase, p. ej., Blumenreich et al. *Cancer* 55(5): 1118-1122 (1985); Forastiere et al. *J. Clin. Oncol.* 19(4): 1088-1095 (2001)). Los métodos para emplear cisplatino clínicamente son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el cisplatino se ha administrado en un solo día durante un período de seis horas, una vez al mes, mediante infusión intravenosa lenta. Para las lesiones localizadas, el cisplatino se puede administrar mediante inyección local. También se puede emplear la infusión intraperitoneal. El cisplatino se puede administrar a dosis tan bajas como 10 mg/m² por tratamiento si fuera parte de un régimen de múltiples medicamentos, o si el paciente tuviera una reacción adversa a una dosis más alta. En general, una dosis clínica es de aproximadamente 30 a aproximadamente 120 o 150 mg/m² por tratamiento.

Típicamente, los agentes quimioterapéuticos que contienen platino se administran por vía parenteral, por ejemplo mediante infusión intravenosa lenta, o mediante inyección local, como se comentó anteriormente. Los efectos de la administración intralesional (intratumoral) e IP de cisplatino se describen en (Nagase et al. *Cancer Treat. Rep.* 71(9): 825-829 (1987); y Theon et al. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202(2): 261-7 (1993)).

En un ejemplo ilustrativo, el virus se administra una vez, de 2 a 6 veces o más, con 0-60 días de diferencia para cada administración, seguido de 1 a 30 días en los que no se administra ningún tratamiento anticanceroso, a continuación se administra cisplatino diariamente durante 1 a 5 días, seguido de 1 a 30 días en los que no se administra tratamiento anticanceroso. Se puede repetir cada componente de la terapia, tratamiento con virus o cisplatino, o la terapia combinada con virus y cisplatino. En otro ejemplo ilustrativo, el cisplatino se administra diariamente de 1 a 5 días, seguido de 1 a 10 días en los que no se administra tratamiento anticanceroso, a continuación el virus se administra una o de dos a seis veces con 0-60 días de diferencia. Tal esquema de tratamiento puede repetirse. En otro ejemplo ilustrativo, el cisplatino se administra diariamente durante 1 a 5 días, seguido de 1 a 10 días en los que no se administra tratamiento anticanceroso, a continuación el virus se administra una o de dos a seis veces con 0-60 días de diferencia. A esto le sigue 5-60 días, cuando no se administra tratamiento anticanceroso, a continuación se administra cisplatino nuevamente durante 1-5 días. Tal esquema de tratamiento puede repetirse.

La gemcitabina (GEMZAR®) es otro compuesto empleado en la terapia del cáncer de mama, el cáncer de pulmón de células no pequeñas y el cáncer de páncreas. La gemcitabina es un análogo de nucleósido que exhibe actividad antitumoral. Los métodos para emplear gemcitabina clínicamente son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la gemcitabina se ha administrado mediante infusión intravenosa a una dosis de 1000 mg/m² más de 30 minutos una vez a la semana durante hasta 7 semanas (o hasta que la toxicidad requiera reducir o mantener una dosis), seguido de una semana de descanso por el tratamiento del cáncer de páncreas. Los ciclos subsiguientes pueden incluir infusiones una vez por semana durante 3 semanas consecutivas de cada 4 semanas. La gemcitabina también se ha empleado combinada con cisplatino en la terapia del cáncer.

En un ejemplo ilustrativo, el virus se administra una o de dos a seis veces, con 0 a 60 días de diferencia, seguido de 1 a 30 días en los que no se administra tratamiento anticanceroso, a continuación se administra la gemcitabina de 1 a 7 veces con 0 a 30 días de diferencia, seguido de 1 a 30 días en los que no se administra tratamiento anticanceroso. Tal esquema de tratamiento puede repetirse. En otro ejemplo, la gemcitabina se administra de 1 a 7 veces con 0 a 30 días de diferencia, seguido de 1 a 10 días en los que no se administra tratamiento anticanceroso, a continuación el virus se administra una o de 2 a 6 veces con 0 a 60 días de diferencia. Esto está seguido de 5 a 60 días en los que no se administra ningún tratamiento anticanceroso. Tal esquema de tratamiento puede repetirse. En otro ejemplo, la gemcitabina se administra de 1 a 7 veces con 0 a 30 días de diferencia, seguido de 1 a 10 días en los que no se administra tratamiento anticanceroso, a continuación el virus se administra una o de 2 a 6 veces con 0

a 60 días de diferencia. A esto le siguen de 5 a 60 días en los que no se administra tratamiento anticanceroso, a continuación se administra la gemcitabina de 1 a 7 veces, con 0 a 30 días de diferencia. Tal esquema de tratamiento puede repetirse.

- 5 Como entenderá un experto en la técnica, el régimen de tratamiento óptimo variará y está dentro del alcance de los métodos de tratamiento para evaluar el estado de la enfermedad bajo tratamiento y la salud general del paciente antes de, y después de uno o más ciclos de terapia combinada con el fin de determinar la combinación terapéutica óptima.

10 **iii. Inmunoterapias y terapias biológicas.**

Los compuestos terapéuticos también incluyen, pero no se limitan a, compuestos que ejercen un efecto inmunoterapéutico, estimulan o suprimen el sistema inmunológico, portan un compuesto terapéutico, o una combinación de los mismos. Opcionalmente, el agente terapéutico puede exhibir o manifestar propiedades adicionales, tales como propiedades que permiten su uso como agente de generación de imágenes, como se describe en otra parte en la presente memoria. Tales compuestos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anticancerosos, radioterapia, moléculas de ARNip y compuestos que suprimen el sistema inmunitario (es decir, inmunosupresores, agentes inmunosupresores). En algunos casos, es deseable administrar un agente inmunosupresor a un sujeto para suprimir el sistema inmunológico antes de la administración del virus para minimizar cualquier reacción adversa al virus. Los agentes inmunosupresores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, agentes alquilantes, antimetabolitos, interferones y anticuerpos inmunosupresores (p. ej., anticuerpos anti-CD3 y anti-receptor de IL2).

25 La inmunoterapia también incluye, por ejemplo, moléculas inmunoestimuladoras (basadas en proteínas o no basadas en proteínas), células y anticuerpos. Los tratamientos de inmunoterapia pueden incluir la estimulación de las células inmunitarias para que actúen de manera más eficaz o para que las células tumorales o los antígenos asociados al tumor sean reconocibles para el sistema inmunitario (es decir, interrupción de la tolerancia).

30 Las citocinas y los factores de crecimiento incluyen, pero no se limitan a, interleucinas, tales como, por ejemplo, interleucina-1, interleucina-2, interleucina-6 e interleucina-12, factores de necrosis tumoral, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferones tales como interferón gamma (IFN- γ), factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), angiogeninas y factores tisulares.

35 Los anticuerpos anticancerosos incluyen, pero no se limitan a, Rituximab, ADEPT, Trastuzumab (Herceptina), Tositumomab (Bexxar), Cetuximab (Erbix), Ibritumomab (Zevalin), Alemtuzumab (Campath-1H), Epratuzumab (Lpac) (Mylotarg), Bevacimab (Avastin), Tarceva (Erlotinib), SUTENT (malato de sunitinib), Panorex (Edrecolomab), RITUXAN (Rituximab), Zevalin (90Y-ibritumomab tiuexetano), Mylotarg (Gemtuzumab Ozogamicina) y Campath (Alemtuzumab).

40 Por lo tanto, en la presente memoria se describen métodos para administrar a un sujeto uno o más compuestos terapéuticos que pueden actuar junto con el virus para estimular o mejorar el sistema inmunológico, mejorando así el efecto del virus. Tal inmunoterapia podría ser administrada como una modalidad terapéutica separada o podría ser codificada (si la inmunoterapia estuviera basada en proteínas) por el virus administrado.

45 Las terapias biológicas son tratamientos que utilizan sustancias naturales del organismo o medicamentos elaborados a partir de sustancias naturales del organismo. Pueden ayudar a tratar el cáncer y controlar los efectos secundarios causados por otros tratamientos contra el cáncer, tales como la quimioterapia. Las terapias biológicas también se denominan a veces Modificadores de la Respuesta Biológica (BRM), agentes biológicos o simplemente "biológicos" porque estimulan el organismo para que responda biológicamente (o naturalmente) al cáncer. La inmunoterapia es un tratamiento que utiliza sustancias naturales que el organismo utiliza para combatir infecciones y enfermedades. Debido a que utiliza sustancias naturales, la inmunoterapia también es una terapia biológica. Existen varios tipos de medicamentos que se incluyen en el término terapia biológica: estos incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales (mAb), vacunas contra el cáncer, factores de crecimiento para las células sanguíneas, inhibidores del crecimiento del cáncer, factores anti-angiogénicos, interferón alfa, interleucina-2 (IL-2), terapia génica y vacuna BCG para el cáncer de vejiga

55 Los anticuerpos monoclonales (mAb) tienen particular interés para el tratamiento del cáncer debido a la especificidad de la unión a un antígeno único y la capacidad de producir grandes cantidades en el laboratorio para la distribución de masa. Los anticuerpos monoclonales se pueden diseñar para que actúen de la misma manera que las proteínas del sistema inmunológico: es decir, para buscar y eliminar sustancias foráneas en su organismo, tales como virus. Los anticuerpos monoclonales se pueden diseñar para reconocer epítopos en la superficie de las células cancerosas. Los anticuerpos se dirigen específicamente a los epítopos y destruyen las células cancerosas o suministran un agente terapéutico a la célula cancerosa. Los métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Se deben producir diferentes anticuerpos para diferentes tipos de

60

65 cáncer; por ejemplo, el rituximab reconoce la proteína CD20 en el exterior de las células del linfoma no Hodgkin;

ADEPT es un tratamiento que utiliza anticuerpos que reconocen el cáncer de colon (colon); y Trastuzumab (Herceptina) reconoce las células de cáncer de mama que producen demasiada proteína HER 2 ("positivas para HER 2"). Otros anticuerpos incluyen, por ejemplo, Tositumomab (Bexxar), Cetuximab (Erbix), Ibritumomab (Zevalin), Alemtuzumab (Campath-1H), Epratuzumab (Linfocida), Gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg) y Bevacimab (Avastin). Por lo tanto, los virus proporcionados en la presente memoria se pueden administrar de manera concurrente o secuencial a uno o más anticuerpos monoclonales en el tratamiento del cáncer. En un ejemplo, la terapia adicional se administra en forma de una o más de cualquiera de las otras modalidades de tratamiento proporcionadas en la presente memoria.

En lugar de intentar prevenir una infección, como es el caso del virus de la influenza, las vacunas contra el cáncer ayudan a tratar el cáncer una vez que se ha desarrollado. El objetivo de las vacunas contra el cáncer es estimular la respuesta inmunológica. Las vacunas contra el cáncer incluyen, por ejemplo, vacunas antigénicas, vacunas de células completas, vacunas de células dendríticas, vacunas de ADN y vacunas anti-idiotipo. Las vacunas antigénicas son vacunas preparadas a partir de antígenos asociados a tumores en, o producidos por, células cancerosas. Las vacunas antigénicas estimulan el sistema inmunológico de un sujeto para atacar el cáncer. Las vacunas de células completas son vacunas que utilizan toda la célula cancerosa, no solo un antígeno específico, para fabricar la vacuna. La vacuna se fabrica a partir de células cancerosas propias de un sujeto, células cancerosas de otro sujeto o células cancerosas cultivadas en un laboratorio. Las células se tratan en el laboratorio, generalmente con radiación, de modo que no puedan crecer, y se administran al sujeto mediante inyección o mediante un goteo intravenoso en el torrente sanguíneo para que puedan estimular el sistema inmunológico para atacar el cáncer. Un tipo de vacuna de células completas es una vacuna de células dendríticas, que ayuda al sistema inmunitario a reconocer y atacar células anormales, tales como las células cancerosas. Las vacunas de células dendríticas se producen mediante el crecimiento de células dendríticas junto con las células cancerosas en el laboratorio. La vacuna se administra para estimular el sistema inmunológico para atacar el cáncer. Las vacunas anti-idiotipo son vacunas que estimulan el organismo para que produzca anticuerpos contra las células cancerosas. Las células cancerosas producen algunos antígenos asociados a tumores que el sistema inmunológico reconoce como foráneos. Pero debido a que las células cancerosas son similares a las células no cancerosas, el sistema inmunológico puede responder débilmente. Las vacunas de ADN estimulan la respuesta inmunológica. Las vacunas de ADN están preparadas a partir de ADN de células cancerosas que portan los genes de los antígenos asociados a tumores. Cuando se inyecta una vacuna de ADN, esta permite que las células del sistema inmunitario reconozcan los antígenos asociados a tumores y activa las células en el sistema inmunitario (es decir, interrupción de la tolerancia). Los resultados más prometedores del uso de vacunas de ADN están en el tratamiento del melanoma. Por lo tanto, los virus proporcionados en la presente memoria se pueden administrar de forma simultánea o secuencial a una vacuna de células completas en el tratamiento del cáncer. En un ejemplo, la terapia adicional se administra en forma de una o más de cualquiera de las otras modalidades de tratamiento proporcionadas en la presente memoria.

Los factores de crecimiento son sustancias naturales que estimulan la médula ósea para producir células sanguíneas. La tecnología recombinante se puede utilizar para generar factores de crecimiento que se pueden administrar a un sujeto para aumentar el número de glóbulos blancos, glóbulos rojos y células madre en la sangre. Los factores de crecimiento utilizados en el tratamiento del cáncer para estimular los glóbulos blancos incluyen el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF), también llamado filgrastim (Neupogen) o lenograstim (Granocyte) y el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF), también llamado molgramostim. Un factor de crecimiento para ayudar a tratar la anemia es la eritropoyetina (EPO). La EPO fomenta que el organismo produzca más glóbulos rojos, lo que a su vez aumenta los niveles de hemoglobina y los niveles de oxígeno en los tejidos corporales. Se están desarrollando otros factores de crecimiento que pueden estimular las plaquetas. Por lo tanto, los virus proporcionados en la presente memoria se pueden administrar de forma concurrente, o secuencial, a un factor de crecimiento tal como GM-CSF, en el tratamiento del cáncer. En un ejemplo, la terapia adicional se administra en forma de una o más de cualquiera de las otras modalidades de tratamiento proporcionadas en la presente memoria.

Los inhibidores del crecimiento del cáncer utilizan moléculas de señalización celular que controlan el crecimiento y la multiplicación de las células, tales como las células cancerosas. Los medicamentos que bloquean estas moléculas de señalización pueden detener el crecimiento y la división de los cánceres. Los factores de crecimiento del cáncer incluyen, pero no se limitan a, tirosina quinasas. Por lo tanto, los fármacos que bloquean las tirosina quinasas son inhibidores de la tirosina quinasa (TKI). Los ejemplos de TKI incluyen, pero no se limitan a, Erlotinib (Tarceva, OSI - 774), Iressa (Gefitinib, ZD 1839) e Imatinib (Glivec, STI 571). Otro tipo de inhibidor del crecimiento es Bortezomib (Velcade) para el mieloma múltiple y para algunos otros tipos de cáncer. Velcade es un inhibidor del proteosoma. Los proteosomas se encuentran en todas las células y ayudan a descomponer las proteínas en las células. Interferir en la acción de los proteosomas provoca una acumulación de proteínas en la célula a niveles tóxicos; destruyendo así las células cancerosas. Las células cancerosas son más sensibles a Velcade que las células normales. Por lo tanto, los virus proporcionados en la presente memoria se pueden administrar de forma concurrente, o secuencial, a un inhibidor del crecimiento del cáncer, tal como Velcade, en el tratamiento del cáncer. En un ejemplo, la terapia adicional se administra en forma de una o más de cualquiera de las otras modalidades de tratamiento proporcionadas en la presente memoria.

Los cánceres necesitan un suministro de sangre para expandirse y hacer crecer sus propios vasos sanguíneos a medida que crecen. Sin su propio suministro de sangre, un cáncer no puede crecer debido a la falta de nutrientes y oxígeno. Los fármacos antiangiogénicos evitan que los tumores desarrollen sus propios vasos sanguíneos. Los ejemplos de estos tipos de medicamentos incluyen, pero no se limitan a, talidomida, principalmente para tratar el mieloma pero también en ensayos para otros tipos de cáncer, y Bevacizumab (Avastina), un tipo de anticuerpo monoclonal que se ha investigado para el cáncer de intestino. Por lo tanto, los virus proporcionados en la presente memoria se pueden administrar de forma concurrente, o secuencial, a un fármaco antiangiogénico en el tratamiento del cáncer. En un ejemplo, la terapia adicional se administra en forma de una o más de cualquiera de las otras modalidades de tratamiento proporcionadas en la presente memoria.

El interferón alfa (IFN- α) es una sustancia natural producida en el organismo, en cantidades muy pequeñas, como parte de la respuesta inmunológica. El IFN- α se administra como un tratamiento para estimular el sistema inmunológico y ayudar a combatir cánceres tales como el cáncer de células renales (riñón), el melanoma maligno, el mieloma múltiple y algunos tipos de leucemias. El IFN- α funciona de varias maneras: puede ayudar a detener el crecimiento de células cancerosas, también puede estimular el sistema inmunológico para ayudarlo a atacar el cáncer y puede afectar el suministro de sangre a las células cancerosas. Por lo tanto, los virus proporcionados en la presente memoria se pueden administrar de forma concurrente, o secuencial, a IFN- α en el tratamiento del cáncer. En un ejemplo, la terapia adicional se administra en forma de una o más de cualquiera de las otras modalidades de tratamiento proporcionadas en la presente memoria.

La administración de IL-2 es una terapia biológica, debido a que es producida naturalmente por el sistema inmunológico. Por lo tanto, también es una inmunoterapia. La interleucina 2 se utiliza para tratar el cáncer de células renales (riñón) y se está probando en ensayos clínicos para detectar otros tipos de cáncer. La IL-2 actúa directamente sobre las células cancerosas al interferir en el crecimiento y la proliferación de las células; estimula el sistema inmunológico al promover el crecimiento de células T asesinas y otras células que atacan las células cancerosas; y también estimula las células cancerosas para secretar sustancias quimioatrayentes que atraen a las células del sistema inmunológico. La IL-2 generalmente se administra como una inyección subcutánea justo debajo de la piel una vez al día durante 5 días, seguido de 2 días de descanso. El ciclo de inyecciones se repite durante 4 semanas seguido de una semana sin tratamiento. El régimen de tratamiento y la cantidad de ciclos administrados dependen del tipo de cáncer y de cómo responda al tratamiento. La IL-2 puede ser autoadministrada o administrada por un profesional de la salud. Alternativamente, la IL-2 se puede administrar por vía intravenosa mediante inyección o goteo. Por lo tanto, los virus proporcionados en la presente memoria se pueden administrar de forma concurrente o secuencial a IL-2 en el tratamiento del cáncer. En un ejemplo, la terapia adicional se administra en forma de una o más de cualquiera de las otras modalidades de tratamiento proporcionadas en la presente memoria.

La terapia génica consiste en tratar el cáncer mediante el bloqueo de genes anormales en las células cancerosas, reparar o reemplazar genes anormales en las células cancerosas, fomentar que incluso más genes se vuelvan anormales en las células cancerosas para que mueran o se vuelvan sensibles al tratamiento, utilizando virus para transportar enzimas que activan el tratamiento en las células cancerosas, o una combinación de los mismos. Como resultado, las células cancerosas mueren debido al daño en la célula. Las células cancerosas se desarrollan como resultado de varios tipos de mutaciones en varios de sus genes. Los genes elegidos como diana incluyen, pero no se limitan a, aquellos que fomentan que la célula se multiplique (es decir, oncogenes), genes que impiden que la célula se multiplique (es decir, genes supresores de tumores) y genes que reparan otros genes dañados. La terapia génica puede implicar la reparación de oncogenes dañados o el bloqueo de las proteínas que producen los oncogenes. El gen supresor de tumores, *p53* está dañado en muchos cánceres humanos. Se han utilizado virus para suministrar un gen *p53* no dañado a las células cancerosas, y los primeros ensayos clínicos están en progreso para tratar el cáncer con virus modificados que producen *p53*. La terapia génica podría utilizarse para reemplazar los genes reparadores del ADN dañados. En un ejemplo alternativo, los métodos para aumentar el daño en el ADN dentro de una célula tumoral pueden promover la muerte de la célula tumoral o causar una mayor susceptibilidad de la célula tumoral a otros tratamientos contra el cáncer, tales como la radioterapia o la quimioterapia. De este modo, los virus proporcionados en la presente memoria pueden administrarse de forma concurrente o secuencial a cualquiera de los métodos de terapia génica proporcionados en la presente memoria o conocidos en la técnica en el tratamiento del cáncer. En un ejemplo, la terapia adicional se administra en forma de una o más de cualquiera de las otras modalidades de tratamiento proporcionadas en la presente memoria.

El tratamiento del cáncer de vejiga en etapa temprana se denomina tratamiento intravesical, que se utiliza principalmente para tratar los cánceres de vejiga en estadio T1 que son de grado alto (grado 3 o G3) o carcinoma *in situ* de la vejiga (también conocido como Tis o CIS). La BCG es una vacuna para la tuberculosis (TB), que también se ha encontrado que es eficaz en el tratamiento del CIS y en la prevención de los cánceres de vejiga. En algunos casos, las vacunas BCG se han utilizado para tratar el cáncer de vejiga precoz de grado 2. Debido a que el cáncer de vejiga puede aparecer en cualquier parte del revestimiento de la vejiga, no se puede extirpar de la misma manera que los cánceres de vejiga papilares. En lugar de eso, se administra una vacuna BCG mediante terapia intravesical; es decir, primero, se inserta un catéter (tubo) en la vejiga, seguido de la administración intra-catéter de una vacuna BCG y/o una quimioterapia. El tratamiento con BCG se realiza semanalmente durante 6 semanas o más, dependiendo del efecto sobre el cáncer de vejiga. El tratamiento con BCG del cáncer de vejiga se puede combinar

con otros tipos de tratamientos, tales como la administración de quimioterapia (intravesical), IL-2, tratamiento con fármacos que hacen que las células sean sensibles a la luz, las vitaminas y la terapia fotodinámica. Por lo tanto, los virus proporcionados en la presente memoria se pueden administrar de forma concurrente o secuencialmente a las vacunas BCG en el tratamiento del cáncer. En un ejemplo, la terapia adicional se administra en forma de una o más de cualquiera de las otras modalidades de tratamiento proporcionadas en la presente memoria.

e. Estado del sujeto

En otro ejemplo, los métodos descritos en la presente memoria para administrar un virus a un sujeto pueden realizarse en un sujeto en cualquiera de una variedad de estados, incluido un sujeto anestesiado, un sujeto alerta, un sujeto con temperatura corporal elevada, un sujeto con temperatura corporal reducida u otro estado del sujeto que se sabe que afecta la acumulación de un virus en el tumor. Como se describe en la presente memoria, se ha determinado que un sujeto que está anestesiado puede tener una tasa reducida de acumulación de un virus en un tumor con respecto a un sujeto que no está anestesiado. Como se ha descrito en la presente memoria, se ha determinado que un sujeto con disminución de la temperatura corporal puede tener una tasa reducida de acumulación de un virus en un tumor en respecto a un sujeto con una temperatura corporal normal. En consecuencia, en la presente memoria se describen métodos para administrar un virus a un sujeto, donde los métodos pueden incluir administrar un virus a un sujeto en el que el sujeto no está bajo anestesia, tal como anestesia general; por ejemplo, el sujeto puede estar bajo anestesia local, o puede no estar anestesiado. En la presente memoria también se describen métodos para administrar un virus a un sujeto, donde los métodos pueden incluir administrar un virus a un sujeto con temperatura corporal alterada, donde la alteración de la temperatura corporal puede influir en la capacidad del virus para acumularse en un tumor; por lo general, una disminución de la temperatura corporal puede disminuir la capacidad de un virus para acumularse en un tumor. Por lo tanto, en un ejemplo ilustrativo, se describe un método para administrar un virus a un sujeto, donde el método incluye elevar la temperatura corporal del sujeto a una temperatura superior a la normal, y administrar un virus al sujeto, donde el virus puede acumularse en el tumor más fácilmente en el sujeto con una temperatura corporal más alta con respecto a la capacidad del virus para acumularse en un tumor de un sujeto con una temperatura corporal normal. En otro ejemplo, las elevaciones localizadas de la temperatura en el área que rodea al tumor se pueden utilizar para aumentar la acumulación del virus en el tumor.

4. Seguimiento

Los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir adicionalmente una o más etapas de seguimiento del sujeto, seguimiento del tumor y/o seguimiento del virus administrado al sujeto. Se puede incluir cualquiera de una variedad de etapas de seguimiento en los métodos descritos en la presente memoria, que incluyen, pero no se limitan a, seguimiento del tamaño del tumor, seguimiento del título de anticuerpos anti- (antígeno tumoral), seguimiento de la presencia y/o el tamaño de las metástasis, seguimiento de los ganglios linfáticos del sujeto, seguimiento del peso del sujeto u otros indicadores de salud, incluidos marcadores de sangre u orina, seguimiento del título de anticuerpos anti-(antígeno viral), seguimiento de la expresión viral de un producto génico detectable y seguimiento directo del título viral en un tumor, tejido u órgano de un sujeto.

El propósito del seguimiento puede ser simplemente para evaluar el estado de salud del sujeto o el progreso del tratamiento terapéutico del sujeto, o puede ser para determinar si se requiere o no una administración adicional del mismo virus o un virus diferente, o para determinar cuándo o si administrar o no un compuesto al sujeto donde el compuesto puede actuar para aumentar la eficacia del método terapéutico, o el compuesto puede actuar para disminuir la patogenicidad del virus administrado al sujeto.

a. Seguimiento de la expresión génica viral.

En algunos ejemplos, los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir el seguimiento de uno o más genes expresados viralmente. Los virus pueden expresar uno o más productos génicos detectables, que incluyen, pero no se limitan a, proteínas detectables (p. ej., proteínas luminiscentes o fluorescentes) o proteínas que inducen una señal detectable (p. ej., proteínas que se unen o transportan compuestos detectables o modifican sustratos para producir una señal). Se pueden generar imágenes de células/tejidos infectados mediante uno o más métodos de generación de imágenes ópticas o no ópticas.

Como se describe en la presente memoria, la medición de un producto génico detectable expresado por un virus puede proporcionar una determinación precisa del nivel de virus presente en el sujeto. Como se describe en la presente memoria con más detalle, la medición de la ubicación del producto génico detectable, por ejemplo, mediante métodos de generación de imágenes que incluyen, pero no se limitan a, resonancia magnética, fluorescencia y métodos tomográficos, puede determinar la localización del virus en el sujeto. Por consiguiente, los métodos descritos que incluyen el seguimiento de un producto génico viral detectable se pueden utilizar para determinar la presencia o ausencia del virus en uno o más órganos o tejidos de un sujeto, y/o la presencia o ausencia del virus en un tumor o metástasis de un sujeto. Además, los métodos que incluyen el seguimiento de un producto génico viral detectable se pueden utilizar para determinar el título del virus presente en uno o más órganos,

tejidos, tumores o metástasis. Los métodos que incluyen el seguimiento de la localización y/o el título de los virus en un sujeto se pueden utilizar para determinar la patogenicidad de un virus; dado que la infección viral, y en particular el nivel de infección, de los tejidos y órganos normales puede indicar la patogenicidad de la sonda, los métodos de seguimiento de la localización y/o la cantidad de virus en un sujeto se pueden utilizar para determinar la patogenicidad de un virus. Dado que los métodos se pueden utilizar para el seguimiento de la cantidad de virus en cualquier ubicación en particular en un sujeto, los métodos que incluyen el seguimiento de la localización y/o el título de los virus en un sujeto se pueden realizar en múltiples puntos temporales y, en consecuencia, pueden determinar la tasa de la replicación viral en un sujeto, incluida la tasa de replicación viral en uno o más órganos o tejidos de un sujeto; por consiguiente, los métodos de seguimiento de un producto génico viral se pueden utilizar para determinar la competencia para la replicación de un virus. Los métodos también se pueden utilizar para cuantificar la cantidad de virus presente en una variedad de órganos o tejidos, y tumores o metástasis, y de este modo pueden indicar el grado de acumulación preferente del virus en un sujeto; por consiguiente, los métodos de seguimiento de productos de genes virales descritos en la presente memoria se pueden utilizar en métodos para determinar la capacidad de un virus para acumularse en tumores o metástasis con preferencia a los tejidos u órganos normales. Dado que los virus utilizados en los métodos descritos en la presente memoria pueden acumularse en un tumor completo o pueden acumularse en múltiples sitios en un tumor, y también pueden acumularse en metástasis, los métodos descritos en la presente memoria para el seguimiento de un producto génico viral se pueden utilizar para determinar el tamaño de un tumor o el número de metástasis que están presentes en un sujeto. El seguimiento de tal presencia de producto génico viral en un tumor o metástasis durante un intervalo de tiempo se puede utilizar para evaluar cambios en el tumor o metástasis, incluido el crecimiento o la reducción de un tumor, o el desarrollo de nuevas metástasis o la desaparición de metástasis, y también puede ser se utiliza para determinar la tasa de crecimiento o la reducción de un tumor, o el desarrollo de nuevas metástasis o la desaparición de las metástasis, o el cambio en la tasa de crecimiento o la reducción de un tumor, o el desarrollo de nuevas metástasis o la desaparición de las metástasis. Por consiguiente, los métodos para el seguimiento de un producto génico viral se pueden utilizar para el seguimiento de una enfermedad neoplásica en un sujeto, o para determinar la eficacia del tratamiento de una enfermedad neoplásica, al determinar la tasa de crecimiento o la reducción de un tumor, o el desarrollo de nuevas metástasis. o la desaparición de metástasis, o el cambio en la tasa de crecimiento o encogimiento de un tumor, o el desarrollo de nuevas metástasis o la desaparición de metástasis.

Se puede detectar cualquiera de una variedad de proteínas detectables en los métodos de seguimiento descritos en la presente memoria; una lista ilustrativa, no limitante de tales proteínas detectables incluye cualquiera de una variedad de proteínas fluorescentes (p. ej., proteínas fluorescentes verdes o rojas), cualquiera de una variedad de luciferasas, transferrina u otras proteínas de unión al hierro; o receptores, proteínas de unión y anticuerpos, donde un compuesto que se une específicamente al receptor, la proteína de unión o el anticuerpo puede ser un agente detectable o puede estar marcado con una sustancia detectable (p. ej., un radionúclido o agente de generación de imágenes); o proteínas transportadoras (p. ej., hNET o hNIS) que se pueden unir y transportar moléculas detectables a la célula. Los virus que expresan una proteína detectable se pueden detectar mediante una combinación del método que se proporciona en la presente memoria y que se conoce en la técnica. Los virus que expresan más de una proteína detectable o dos o más virus que expresan varias proteínas detectables pueden detectarse y distinguirse mediante métodos de generación de imágenes dobles. Por ejemplo, se puede detectar un virus que expresa una proteína fluorescente y una proteína de unión al hierro *in vitro* o *in vivo* mediante generación de imágenes de fluorescencia de luz baja y resonancia magnética, respectivamente. En otro ejemplo, se puede detectar un virus que expresa dos o más proteínas fluorescentes mediante generación de imágenes de fluorescencia a diferentes longitudes de onda. *In vivo* la generación de imágenes duales se pueden realizar en un sujeto al que se le ha administrado un virus que expresa dos o más productos génicos detectables o dos o más virus que expresan uno o más productos génicos detectables.

b. Seguimiento del tamaño del tumor

En la presente memoria también se describen métodos de seguimiento del tamaño y la ubicación del tumor y/o la metástasis. Se puede realizar el seguimiento del tamaño del tumor y de la metástasis mediante cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluidos los métodos de evaluación externa o métodos de generación de imágenes tomográficas o magnéticas. Además de los métodos conocidos en la técnica, los métodos descritos en la presente memoria, por ejemplo, para el seguimiento de la expresión de genes virales, se pueden utilizar para el seguimiento del tamaño del tumor y/o la metástasis.

El seguimiento del tamaño a lo largo de varios puntos temporales puede proporcionar información sobre el aumento o disminución del tamaño de un tumor o de la metástasis, y también puede proporcionar información sobre la presencia de tumores y/o metástasis adicionales en el sujeto. El seguimiento del tamaño del tumor en varios puntos temporales puede proporcionar información sobre el desarrollo de una enfermedad neoplásica en un sujeto, incluida la eficacia del tratamiento de una enfermedad neoplásica en un sujeto.

c. Seguimiento del título de anticuerpos

Los métodos descritos en la presente memoria también pueden incluir el seguimiento del título de anticuerpos en un

sujeto, incluidos los anticuerpos producidos en respuesta a la administración de un virus a un sujeto. Los virus administrados en los métodos descritos en la presente memoria pueden provocar una respuesta inmunológica a antígenos virales endógenos. Los virus administrados en los métodos descritos en la presente memoria también pueden provocar una respuesta inmunológica a genes exógenos expresados por un virus. Los virus administrados en los métodos descritos en la presente memoria también pueden provocar una respuesta inmunológica a antígenos tumorales. La monitorización del título de anticuerpos contra antígenos virales, productos génicos exógenos expresados por virus, o antígenos tumorales se puede utilizar en métodos de monitorización de la toxicidad de un virus, supervisión de la eficacia de los métodos de tratamiento o supervisión del nivel de producto génico o anticuerpos para la producción y/o recolección.

En un ejemplo, el seguimiento del título de anticuerpos se puede utilizar para el seguimiento de la toxicidad de un virus. El título de anticuerpos contra un virus puede variar durante el período de tiempo posterior a la administración del virus al sujeto, donde en algunos puntos temporales en particular, un título bajo de anticuerpos anti-(antígeno viral) puede indicar una mayor toxicidad, mientras que en otros puntos temporales un alto título de anticuerpos anti-(antígeno viral) puede indicar una mayor toxicidad. Los virus utilizados en los métodos descritos en la presente memoria pueden ser inmunogénicos y, por lo tanto, pueden provocar una respuesta inmunológica poco después de administrar el virus al sujeto. En general, un virus contra el cual el sistema inmunitario de un sujeto puede montar rápidamente una fuerte respuesta inmunológica puede ser un virus que tiene baja toxicidad cuando el sistema inmunitario del sujeto puede eliminar el virus de todos los órganos o tejidos normales. Así, en algunos ejemplos, un título alto de anticuerpos contra antígenos virales poco después de administrar el virus a un sujeto puede indicar una baja toxicidad de un virus. En contraste, un virus que no es altamente inmunogénico puede infectar un organismo anfitrión sin provocar una respuesta inmunológica fuerte, lo que puede dar como resultado una mayor toxicidad del virus para el anfitrión. En consecuencia, en algunos ejemplos, un alto título de anticuerpos contra antígenos virales poco después de administrar el virus a un sujeto puede indicar una baja toxicidad de un virus.

En otros ejemplos, el seguimiento del título de anticuerpos se puede utilizar para el seguimiento de la eficacia de los métodos de tratamiento. En los métodos descritos en la presente memoria, el título de anticuerpos, tal como el título de anticuerpos anti-(antígeno tumoral), puede indicar la eficacia de un método terapéutico tal como un método terapéutico para tratar la enfermedad neoplásica. Los métodos terapéuticos descritos en la presente memoria pueden incluir causar o mejorar una respuesta inmunológica contra un tumor y/o metástasis. Por lo tanto, mediante el seguimiento del título de anticuerpos anti-(antígeno tumoral), es posible el seguimiento de la eficacia de un método terapéutico para causar o mejorar una respuesta inmunológica contra un tumor y/o metástasis. Los métodos terapéuticos descritos en la presente memoria también pueden incluir administrar a un sujeto un virus que puede acumularse en un tumor y puede causar o mejorar una respuesta inmunológica antitumoral. Por consiguiente, es posible el seguimiento de la capacidad de un anfitrión para montar una respuesta inmunológica contra los virus acumulados en un tumor o metástasis, lo que puede indicar que un sujeto también ha montado una respuesta inmunológica antitumoral, o puede indicar que es probable que un sujeto monte una respuesta inmunológica antitumoral, o puede indicar que un sujeto es capaz de montar una respuesta inmunológica antitumoral.

En otros ejemplos, el seguimiento del título de anticuerpos puede utilizarse para el seguimiento del nivel de producto génico o anticuerpos para la producción y/o recolección. Como se describe en la presente memoria, los métodos se pueden utilizar para producir proteínas, moléculas de ARN u otros compuestos mediante la expresión de un gen exógeno en un virus que se ha acumulado en un tumor. En la presente memoria se describen adicionalmente métodos para producir anticuerpos contra una proteína, molécula de ARN u otro compuesto producido por la expresión génica exógena de un virus que se ha acumulado en un tumor. El seguimiento del título de anticuerpos contra la proteína, la molécula de ARN u otro compuesto puede indicar el nivel de producción de la proteína, la molécula de ARN u otro compuesto por el virus acumulado en el tumor, y también puede indicar directamente el nivel de anticuerpos específicos para dicha proteína, molécula de ARN u otro compuesto.

d. Seguimiento de diagnósticos de salud general

Los métodos descritos en la presente memoria también pueden incluir métodos de seguimiento de la salud de un sujeto. Algunos de los métodos descritos en la presente memoria son métodos terapéuticos, incluidos los métodos terapéuticos de enfermedades neoplásicas. El seguimiento de la salud de un sujeto se puede utilizar para determinar la eficacia del método terapéutico, como se conoce en la técnica. Los métodos descritos en la presente memoria también pueden incluir una etapa de administración a un sujeto de un virus. El seguimiento de la salud de un sujeto se puede utilizar para determinar la patogenicidad de un virus administrado a un sujeto. Como se conoce en la técnica, se puede controlar cualquiera de una variedad de métodos de diagnóstico de salud para el seguimiento de enfermedades como enfermedades neoplásicas, enfermedades infecciosas o enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario. Por ejemplo, el peso, la presión arterial, el pulso, la respiración, el color, la temperatura u otro estado observable de un sujeto pueden indicar la salud de un sujeto. Además, la presencia o ausencia o nivel de uno o más componentes en una muestra de un sujeto puede indicar la salud de un sujeto. Las muestras típicas pueden incluir muestras de sangre y orina, donde se puede determinar la presencia o ausencia o el nivel de uno o más componentes realizando, por ejemplo, un panel de sangre o una prueba de diagnóstico de panel de orina. Los componentes ilustrativos indicativos de la salud de un sujeto incluyen, pero no se limitan a, recuento de glóbulos

blancos, hematocrito o concentración de proteína reactiva.

e. Seguimiento coordinado con tratamiento.

5 En la presente memoria también se describen métodos para el seguimiento de una terapia, donde las decisiones terapéuticas se pueden basar en los resultados del seguimiento. Los métodos terapéuticos descritos en la presente memoria pueden incluir la administración a un sujeto de un virus, donde el virus puede acumularse preferentemente en un tumor y/o metástasis, y donde el virus puede causar o mejorar una respuesta inmunológica antitumoral. Tales métodos terapéuticos pueden incluir una variedad de etapas que incluyen múltiples administraciones de un virus concreto, la administración de un segundo virus o la administración de un compuesto terapéutico. La determinación de la cantidad, el momento o el tipo de virus o compuesto para administrar al sujeto se puede basar en uno o más resultados del seguimiento del sujeto. Por ejemplo, el título de anticuerpos en un sujeto se puede utilizar para determinar si es deseable o no administrar un virus o compuesto, la cantidad de virus o compuesto que se vaya a administrar y el tipo de virus o compuesto que se vaya a administrar, donde, por ejemplo, un título bajo de anticuerpos puede indicar la conveniencia de administrar virus adicionales, un virus diferente o un compuesto terapéutico tal como un compuesto que induce la expresión de genes virales. En otro ejemplo, el estado de salud general de un sujeto se puede utilizar para determinar si es deseable administrar un virus o compuesto, la cantidad de virus o compuesto que se vaya a administrar y el tipo de virus o compuesto que se vaya a administrar, donde por ejemplo, la determinación de que el sujeto está sano puede indicar la conveniencia de administrar virus adicionales, un virus diferente o un compuesto terapéutico tal como un compuesto que induce la expresión génica viral. En otro ejemplo, el seguimiento de un producto génico expresado viralmente detectable se puede utilizar para determinar si es deseable administrar un virus o compuesto, la cantidad de virus o compuesto para administrar y el tipo de virus o compuesto para administrar. Tales métodos de seguimiento se pueden utilizar para determinar si el método terapéutico es eficaz o no, si el método terapéutico es patogénico o no para el sujeto, si el virus se ha acumulado en un tumor o metástasis, y si el virus se ha acumulado o no en tejidos u órganos normales. Basándose en tales determinaciones, se pueden obtener la conveniencia y la forma de otros métodos terapéuticos.

En un ejemplo, la determinación de si un método terapéutico es o no eficaz se puede utilizar para obtener métodos terapéuticos adicionales. Se puede utilizar cualquiera de una variedad de métodos de seguimiento para determinar si un método terapéutico es o no eficaz, como se proporciona en la presente memoria o se conoce de otro modo en la técnica. Si los métodos de seguimiento indican que el método terapéutico es eficaz, se puede tomar la decisión de mantener el curso actual de la terapia, que puede incluir administraciones adicionales de un virus o compuesto, o se puede tomar la decisión de que no se requieren más administraciones. Si los métodos de seguimiento indican que el método terapéutico no es eficaz, los resultados del seguimiento pueden indicar si un ciclo de tratamiento se debe interrumpir o no (p. ej., cuando un virus es patógeno para el sujeto), o cambiar o no (p. ej., cuando un virus se acumula en un tumor sin dañar el organismo anfitrión, pero sin provocar una respuesta inmunológica antitumoral), o aumentar o no su frecuencia o cantidad (p. ej., cuando poco o ningún virus se acumula en el tumor).

En un ejemplo, el seguimiento puede indicar que un virus es patógeno para un sujeto. En tales casos, se puede tomar la decisión de terminar la administración del virus al sujeto, administrar niveles más bajos del virus al sujeto, administrar un virus diferente a un sujeto o administrar a un sujeto un compuesto que reduzca la cantidad de virus. Patogenicidad del virus. En un ejemplo, la administración de un virus que se determina que es patógeno puede terminar. En otro ejemplo, la cantidad de dosificación de un virus que se determina que es patógeno se puede disminuir para la administración posterior; en una versión de dicho ejemplo, el sujeto se puede tratar previamente con otro virus que puede aumentar la capacidad del virus patógeno para acumularse en el tumor, antes de volver a administrar el virus patógeno al sujeto. En otro ejemplo, a un sujeto se le puede haber administrado un virus que es patógeno para el sujeto; la administración de dicho virus patógeno puede ir acompañada de la administración de, por ejemplo, un compuesto antiviral (p. ej., cidofovir), compuesto atenuante de la patogenicidad (p. ej., un compuesto que regula por disminución la expresión de un producto génico lítico o apoptótico, u otro compuesto que puede disminuir la proliferación, la toxicidad o las propiedades de destrucción celular de un virus, como se describe en otra parte. En una variación de dicho ejemplo, se puede realizar el seguimiento de la localización del virus y, tras determinar que el virus se acumula en el tumor y/o metástasis pero no en tejidos u órganos normales, se puede terminar la administración del compuesto antiviral o el compuesto que atenúa la patogenicidad, y la actividad patogénica del virus puede se activar o aumentar, pero limitarse al tumor y/o metástasis. En otra variación de tal ejemplo, después de terminar la administración del compuesto antiviral o del compuesto que atenúa la patogenicidad, se pueden controlar adicionalmente la presencia del virus y/o la patogenicidad del virus, y se puede reiniciar la administración de tal compuesto si se determina que el virus representa una amenaza para el anfitrión, por ejemplo, al propagarse a órganos o tejidos normales, liberar una toxina en la vasculatura o tener efectos patogénicos que van más allá del tumor o la metástasis.

En otro ejemplo, el seguimiento puede determinar si un virus se ha acumulado o no en un tumor o metástasis de un sujeto. Tras dicha determinación, se puede tomar la decisión de administrar más virus adicionales, un virus diferente o un compuesto al sujeto. En otro ejemplo, el seguimiento de la presencia de un virus en un tumor se puede utilizar para decidir administrar al sujeto un compuesto, donde el compuesto puede aumentar la patogenicidad, proliferación o inmunogenicidad de un virus o el compuesto puede actuar en conjunto con el virus para aumentar la proliferación,

toxicidad, destrucción de células tumorales o respuesta inmunológica que provocan las propiedades de un virus; en una variación de dicho ejemplo, el virus puede, por ejemplo, tener poca o ninguna capacidad lítica o de eliminación de células en ausencia de dicho compuesto; en una variación adicional de tal ejemplo, el seguimiento de la presencia del virus en un tumor o metástasis se puede acoplar con el seguimiento de la ausencia del virus en tejidos u órganos normales, donde el compuesto se administra si el virus está presente en el tumor o metástasis y en absoluto presente o sustancialmente no presente en órganos o tejidos normales; en una variación adicional de dicho ejemplo, se puede realizar el seguimiento de la cantidad de virus en un tumor o metástasis, donde el compuesto se administra si el virus está presente en el tumor o metástasis a niveles suficientes.

10 H. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

15 Ejemplo 1

Aislamiento de Productos Aislados Clonales de LIVP

Se sembraron células de fibroblasto de riñón de mono verde africano CV-1 (ATCC Num. CCL-70; American Type Culture Collection (Manassas, VA)) en una placa de cultivo 6 pocillos a 5×10^5 células por pocillo y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Mediatech, Inc., Herndon, VA) con un suplemento de solución de antimicótico-antibiótico al 1% (Mediatech, Inc., Herndon, VA) y suero bovino fetal al 10% (FBS, Mediatech, Inc., Herndon, VA) durante la noche a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia. Las células CV-1 se infectaron con diluciones seriadas de 1:10 del virus vaccinia LIVP (una cepa del virus vaccinia, originalmente obtenida de la adaptación de la cepa Lister (Núm. de catálogo VCC-1549 de la ATCC) a la piel de ternera (Institute of Viral Preparations, Moscú, Rusia, Al'tshtein et al., (1983) Dokl. Acad. Nauk URSS 285:696-699)) por duplicado. Se emplearon diluciones seriadas para la infección para asegurar el aislamiento de placas bien separadas. Dos días después de la infección, se seleccionaron ocho placas bien aisladas que exhibían un fenotipo de placa grande con respecto a las otras placas de la placa de cultivo. Estas placas se sometieron a dos rondas más de purificación de placa en células CV-1 y se designaron como productos aislados clonales LIVP 1.1.1, 2.1.1, 3.1.1, 4.1.1, 5.1.1, 6.1.1, 7.1.1, y 8.1.1, respectivamente. LIVP 1.1.1 y 4.1.1 formaron placas más grandes en las células CV-1 que otros productos aislados.

35 Ejemplo 2

Infección *in vitro* de diversas líneas celulares normales y cancerosas.

El crecimiento de los productos aislados clonales de LIVP en varios tipos de células normales y cancerosas se analizó y comparó con el crecimiento de la cepa LIVP parental, dos cepas derivadas de LIVP, GLV-1h68 (véase la Patente de Estados Unidos Núm. 7.588.767) y GLV-1h74 (véanse las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Núm. 2009-0098529 y 2009-0053244), y el virus vaccinia WR (Núm. de catálogo ATCC VR-1354). GLV-1h68 contiene inserciones de ADN en loci génicos de la cepa LIVP (SEC ID NO: 9). GLV-1h68 contiene casetes de expresión que codifican proteínas marcadoras detectables en los loci de los genes *F14.5L* (también designado en LIVP como *F3*), timidina quinasa (*TK*) y hemaglutinina (*HA*). Se insertó un casete de expresión que contenía una molécula de ADN de *Ruc-GFP* (una fusión de ADN que codifica luciferasa de *Renilla* y ADN que codifica GFP) bajo el control de un promotor P_{SEL} temprano/tardío sintético de vaccinia ((P_{SEL})*Ruc-GFP*) en el locus del gen *F14.5L*; se insertó un casete de expresión que contenía una molécula de ADN que codificaba beta-galactosidasa bajo el control del promotor P_{7.5k} temprano/tardío de vaccinia ((P_{7.5k})*LacZ*) y ADN que codifica un receptor de transferrina de rata colocado en la orientación inversa para la transcripción con respecto al promotor P_{SEL} temprano/tardío sintético de vaccinia ((P_{SEL})*rTrfR*) en el locus del gen *TK* (el virus resultante no expresa la proteína del receptor de transferrina ya que la molécula de ADN que codifica la proteína se coloca en la orientación inversa para la transcripción con respecto al promotor en el casete); y se insertó un casete de expresión que contenía una molécula de ADN que codificaba β-glucuronidasa bajo el control del promotor P_{11k} tardío de vaccinia ((P_{11k})*gusA*) en el locus del gen *HA*. GLV-1h74 que se obtuvo a partir de GLV-1h68 al eliminar las tres inserciones en los loci *F14.5L*, *J2R* y *A56R*. GLV-1h74 contiene una molécula de ADN no codificante insertada en el locus del gen *F14.5L* en lugar de (P_{SEL})*Ruc-GFP*, una molécula de ADN no codificante insertada en el locus del gen *TK* en lugar de (P_{SEL})*rTrfR* y (P_{7.5k})*LacZ*, y una molécula de ADN no codificante insertada en el locus del gen *HA* en lugar de (P_{11k})*gusA*.

Las líneas celulares se infectaron con los virus como se indica a continuación y el rendimiento viral se determinó mediante titulación en células CV-1 (Num. ATCC CCL-70; American Type Culture Collection (Manassas, VA)) cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Mediatech, Inc., Herndon, VA) con un suplemento de solución de antimicótico-antibiótico al 1% (Mediatech, Inc., Herndon, VA) y suero bovino fetal al 10% (FBS, Mediatech, Inc., Herndon, VA).

65 A. Líneas celulares normales

1. Células de fibroblastos embrionarios de ratón MEF

Se cultivaron células MEF (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá; Número de catálogo 00321) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, con 4,5 g/L de glucosa y L-glutamina sin piruvato de sodio (Cellgro Núm. 10-017-CV) con un suplemento de solución de antibiótico penicilina/estreptomocina/anfotericina- antimicótico al 1% (Mediatech, Inc., Herndon, VA), 3.5 µL/L de β-mercaptoetanol (Sigma Núm. M3148-25ml) y suero bovino fetal al 10% (FBS, Mediatech, Inc., Herndon, VA). Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%.

Para la infección, las células MEF se cultivaron en placas de 12 pocillos (sembradas a 1,5 x 10⁵ células por pocillo) en medio de cultivo DMEM que contenía FBS al 10% y se infectaron (a 80-90% de confluencia) con productos aislados clonales de virus vaccinia WR, LIVP, GLV-1h68, GLV-1h74 o LIVP (1.1.1, 2.1.1, 3.1.1, 4.1.1, 5.1.1, 6.1.1, 7.1.1 y 8.1.1) en medio de cultivo DMEM que contenía FBS al 2% a una MOI de 0,01 durante 1 hora a 37°C. El inóculo se aspiró y las monocapas celulares se lavaron dos veces con 2 mL de DPBS (Mediatech, Inc., Herndon, VA) y, posteriormente, se añadieron a cada pocillo 2 ml de medio de cultivo celular. El título viral para cada inóculo de virus se confirmó en células CV-1 el mismo día de la infección. Se recogieron tres pocillos de cada virus a las 1, 24, 48 y 72 horas de la infección (hpi). Las células recogidas se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación y se sometieron a sonicación tres veces durante 1 minuto a plena potencia antes de la titulación. El virus se tituló en células CV-1 por duplicado utilizando métodos convencionales.

Los resultados se presentan en la Tabla 7 a continuación, que establece la eficacia de replicación, expresada como las unidades de formación de placa promedio por mililitro (ufp/mL), y la desviación típica. LIVP 7.1.1 replicó mejor que todos los demás productos aislados y cepas analizados, y la cepa WR replicó solo un poco menos eficazmente. GLV-1h68, GLV-1h74 y LIVP 2.1.1 no replicaron bien en las células MEF. LIVP 4.1.1 replicó mejor que LIVP parental y LIVP 1.1.1, 3.1.1, 5.1.1 y 8.1.1 replicaron más lentamente que LIVP parental.

Tabla 7. Crecimiento viral en células de fibroblastos embrionarios de ratón MEF

hpi	GLV-1h68		LIVP		WR		GLV-1h74	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,16E + 04	0,00E + 00	2,18E + 04	0,00E + 00	1,08E + 04	0,00E + 00	2,18E + 04	0,00E + 00
1	3,86E + 01	3,86E + 01	7,72E + 01	3,86E + 01	6,43E + 01	2,23E + 01	0,00E + 00	0,00E + 00
24	0,00E + 00	0,00E + 00	1,16E + 02	1,68E + 02	1,54E + 03	7,39E + 02	1,29E + 01	2,23E + 01
48	0,00E + 00	0,00E + 00	1,43E + 03	1,37E + 03	9,05E + 04	1,34E + 04	1,29E + 01	2,23E + 01
72	0,00E + 00	0,00E + 00	2,16E + 03	2,35E + 03	6,67E + 05	6,32E + 04	0,00E + 00	0,00E + 00
hpi	LIVP 1.1.1		LIVP 2.1.1		LIVP 3.1.1		LIVP 4.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,81E + 04	0,00E + 00	1,19E + 04	0,00E + 00	1,88E + 04	0,00E + 00	1,92E + 04	0,00E + 00
1	5,14E + 01	4,45E + 01	1,29E + 01	2,23E + 01	9,00E + 01	4,45E + 01	9,00E + 01	1,24E + 02
24	6,43E + 01	8,03E + 01	0,00E + 00	0,00E + 00	9,00E + 01	9,71E + 01	3,60E + 02	1,82E + 02
48	7,72E + 01	3,86E + 01	0,00E + 00	0,00E + 00	2,19E + 02	1,56E + 02	3,65E + 03	1,31E + 03
72	1,29E + 01	2,23E + 01	0,00E + 00	0,00E + 00	7,97E + 02	4,57E + 02	3,61E + 04	1,16E + 04
hpi	LIVP 5.1.1		LIVP 6.1.1		LIVP 7.1.1		LIVP 8.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,51E + 04	0,00E + 00	1,31E + 04	0,00E + 00	2,78E + 04	0,00E + 00	1,88E + 04	0,00E + 00
1	5,14E + 01	2,23E + 01	5,14E + 01	5,89E + 01	1,16E + 02	3,86E + 01	1,16E + 02	3,86E + 01
24	1,29E + 01	2,23E + 01	1,29E + 01	2,23E + 01	2,74E + 03	1,57E + 03	5,14E + 01	4,45E + 01
48	5,14E + 01	5,89E + 01	0,00E + 00	0,00E + 00	2,49E + 05	7,66E + 04	2,57E + 01	2,23E + 01
72	1,54E + 02	1,54E + 02	0,00E + 00	0,00E + 00	1,05E + 06	1,63E + 05	2,57E + 01	4,45E + 01

B. Líneas celulares de cáncer

1. Células de melanoma de ratón B16-F10

Se cultivaron células B16-F10 de melanoma de ratón (ATCC Num. CRL-6475; American Type Culture Collection (Manassas, VA)) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Mediatech, Inc., Herndon, VA) complementado con solución de antibiótico-antimicótico al 1% (Mediatech, Inc., Herndon, VA) y suero bovino fetal al 10% (FBS, Mediatech, Inc., Herndon, VA). Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%.

Para la infección, las células B16-F10 se cultivaron en placas de 6 pocillos (en DMEM complementado con FBS al 2%) y se infectaron con virus vaccinia WR, L1VP, GLV-1h68, GLV-1h74 o productos aislados clonales de L1VP (1.1.1, 2.1.1, 3.1.1, 4.1.1, 5.1.1, 6.1.1, 7.1.1 y 8.1.1) a una MOI de 0,01 durante 1 hora a 37°C. El inóculo se aspiró y las monocapas celulares se lavaron dos veces con 2 mL de DPBS (Mediatech, Inc., Herndon, VA) y, posteriormente, se agregaron 2 mL de medio de cultivo celular a cada pocillo. El título viral para cada inóculo de virus se confirmó en células CV-1 el mismo día de la infección. Se recolectaron tres pocillos de cada virus a las 24, 48 y 72 horas de la infección (hpi). Las células recolectadas se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación y se sometieron a sonicación tres veces durante 1 minuto a plena potencia antes de la titulación. El virus se tituló en células CV-1 por duplicado utilizando métodos convencionales.

Los resultados se presentan en la Tabla 8 a continuación, que establece la eficacia de replicación, expresada como unidades formadoras de placa por mililitro (pfu/mL), y la desviación típica. GLV-1h68 replicó solo mínimamente en las células B16-F10. GLV-1h74 replicó significativamente mejor (P <0,05) que GLV-1h68 en todos los puntos temporales examinados, lo que indica que los insertos de genes heterólogos en GLV-1h68 ralentizaron la replicación de este virus en estas células. Los productos aislados L1VP 2.1.1, 3.1.1, 6.1.1, 7.1.1 y 8.1.1 fueron similares o ligeramente más lentos que GLV-1h74 en la replicación. L1VP 5.1.1 replicó significativamente mejor (P <0,01) que GLV-1h74 a 24 y 48 hpi. L1VP 1.1.1 y el virus parental L1VP replicaron de manera similar, pero significativamente mejor (P <0,05) que L1VP 5.1.1 a 24 y 48 hpi. L1VP 4.1.1 fue similar al virus parental L1VP en replicación a 24 hpi, pero mejor que L1VP a 48 (P = 0,057) y 72 (P = 0,003) hpi. Vaccinia virus WR replicó mejor que todos los otros virus probados. Las diferencias en la capacidad de replicación en las células B16-F10 entre los productos aislados de L1VP indicaron la diversidad genética en la población del virus L1VP parental.

Tabla 8. Crecimiento viral en células de melanoma de ratón B16-F10

hpi	GLV-1h68		L1VP		WR		GLV-1h74	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	9,76E + 03	0,00E + 00	2,09E + 04	0,00E + 00	6,04E + 03	0,00E + 00	1,77E + 04	0,00E + 00
24	1,02E + 03	4,26E + 02	1,51E + 05	5,58E + 03	8,27E + 05	8,87E + 04	3,87E + 04	1,18E + 04
48	2,73E + 03	1,17E + 03	1,24E + 06	1,87E + 05	2,76E + 07	6,19E + 06	2,64E + 05	1,07E + 05
72	2,39E + 03	5,45E + 02	1,11E + 06	2,40E + 05	1,85E + 07	1,04E + 07	2,36E + 05	4,83E + 04
hpi	L1VP 1.1.1		L1VP 2.1.1		L1VP 3.1.1		L1VP 4.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,37E + 04	0,00E + 00	2,00E + 04	0,00E + 00	1,53E + 04	0,00E + 00	2,51E + 04	0,00E + 00
24	1,09E + 05	2,24E + 04	1,16E + 04	4,97E + 03	1,60E + 04	3,87E + 03	1,30E + 05	2,80E + 04
48	1,50E + 06	1,93E + 04	1,25E + 05	2,64E + 04	1,34E + 05	1,31E + 04	3,19E + 06	1,26E + 06
72	1,50E + 06	3,23E + 05	1,42E + 05	2,93E + 04	1,23E + 05	2,66E + 04	3,22E + 06	5,37E + 05
hpi	L1VP 5.1.1		L1VP 6.1.1		L1VP 7.1.1		L1VP 8.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,84E + 04	0,00E + 00	8,36E + 03	0,00E + 00	3,04E + 04	0,00E + 00	2,07E + 04	0,00E + 00
24	7,31E + 04	4,29E + 03	1,53E + 04	3,80E + 03	2,32E + 04	1,02E + 04	1,78E + 04	4,67E + 03
48	7,47E + 05	4,77E + 04	1,28E + 05	2,16E + 04	1,30E + 05	9,67E + 03	3,81E + 05	1,53E + 05
72	7,65E + 05	3,31E + 05	2,21E + 05	1,67E + 05	2,20E + 05	5,50E + 04	3,25E + 05	8,26E + 04

2. Células de carcinoma de próstata humano DU 145

Se cultivaron células DU 145 de carcinoma de próstata humano (ATCC Num. HTB-81; American Type Culture Collection (Manassas, VA)) en EMEM (Mediatech, Inc., Herndon, VA) que contenía piruvato sódico al 1% (Mediatech, Inc., Herndon, VA), solución de antibiótico-antimicótico al 1% (Mediatech, Inc., Herndon, VA),

aminoácidos no esenciales al 1% (Mediatech, Inc., Herndon, VA) y FBS al 10%. Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%.

5 Para la infección, las células DU145 se cultivaron en placas de 6 pocillos (DMEM complementado con FBS al 2%) y se infectaron con virus vaccinia WR, LIVP, GLV-1h68, GLV-1h74 o productos aislados clonales de LIVP (1.1.1, 2.1.1, 3.1.1, 4.1.1, 5.1.1, 6.1.1, 7.1.1 y 8.1.1) a una MOI de 0,01 durante 1 hora a 37°C. El inóculo se aspiró y las monocapas celulares se lavaron dos veces con 2 mL de DPBS (Mediatech, Inc., Herndon, VA) y posteriormente se añadieron 2 mL de medio de cultivo celular a cada pocillo. El título viral para cada inóculo de virus se confirmó en células CV-1 el mismo día de la infección. Se recolectaron tres pocillos de cada virus a las 24, 48 y 72 horas después de la infección (hpi). Las células recogidas se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación y se sometieron a sonicación tres veces durante 1 minuto a plena potencia antes de la titulación. El virus se tituló en células CV-1 por duplicado utilizando métodos convencionales.

15 Los resultados se presentan en la Tabla 9 a continuación, que establece la eficacia de replicación, expresada como unidades formadoras de placa por mililitro (pfu/mL), y la desviación típica. GLV-1h68 replicó razonablemente bien en células DU 145. GLV-1h74 replicó significativamente mejor (P <0,01) que GLV-1h68 en todos los puntos temporales examinados, lo que indica que las inserciones foráneas de GLV-1h68 ralentizaron la replicación de este virus en las células DU 145. El virus vaccinia de tipo salvaje WR fue similar a GLV-1h68 en replicación en células DU 145. LIVP 3.1.1 y GLV-1h74 replicaron de manera similar las primeras 24 horas posteriores a la infección. Los rendimientos virales de GLV-1h74 a 48 y 72 hpi fueron significativamente más altos (P <0,01) que los de LIVP 3.1.1. LIVP y los productos aislados LIVP 1.1.1, 2.1.1, 4.1.1, 5.1.1, 6.1.1, 7.1.1 y 8.1.1 replicaron de manera similar, pero significativamente mejor (P <0,01) que GLV-1h74 la primeras 24 horas después de la infección.

Tabla 9. Crecimiento viral en células de carcinoma de próstata humano DU 145

hpi	GLV-1h68		LIVP		WR		GLV-1h74	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	6,75E + 03	0,00E + 00	1,35E + 04	0,00E + 00	1,04E + 04	0,00E + 00	1,04E + 04	0,00E + 00
24	1,16E + 06	7,17E + 04	4,17E + 07	3,54E + 06	2,08E + 06	2,04E + 05	9,62E + 06	7,61E + 05
48	4,30E + 07	5,02E + 06	1,85E + 08	2,04E + 07	2,21E + 07	4,71E + 06	1,90E + 08	8,91E + 06
72	5,12E + 07	1,61E + 06	1,88E + 08	5,42E + 07	3,65E + 07	6,92E + 06	2,55E + 08	7,72E + 06
hpi	LIVP 1.1.1		LIVP 2.1.1		LIVP 3.1.1		LIVP 4.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,54E + 04	0,00E + 00	1,93E + 04	0,00E + 00	1,72E + 04	0,00E + 00	2,24E + 04	0,00E + 00
24	4,32E + 07	4,82E + 06	2,88E + 07	3,96E + 06	8,77E + 06	4,96E + 05	4,22E + 07	1,26E + 07
48	2,34E + 08	2,48E + 07	1,14E + 08	7,81E + 06	5,74E + 07	5,79E + 06	2,03E + 08	1,94E + 07
72	2,62E + 08	3,54E + 07	9,52E + 07	2,19E + 07	5,09E + 07	1,50E + 07	2,16E + 08	3,36E + 07
hpi	LIVP 5.1.1		LIVP 6.1.1		LIVP 7.1.1		LIVP 8.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,49E + 04	0,00E + 00	8,68E + 03	0,00E + 00	2,22E + 04	0,00E + 00	1,91E + 04	0,00E + 00
24	3,58E + 07	5,47E + 06	2,37E + 07	3,21E + 06	2,88E + 07	6,24E + 06	2,52E + 07	6,47E + 06
48	1,42E + 08	2,48E + 06	1,42E + 08	9,30E + 06	1,74E + 08	3,12E + 07	1,24E + 08	5,56E + 06
72	1,61E + 08	5,56E + 07	1,21E + 08	1,82E + 07	1,59E + 08	7,00E + 06	1,18E + 08	1,18E + 07

3. Células de carcinoma de colon de ratón CT26.WT

Se cultivaron células de carcinoma de colon CT26.WT de ratón (ATCC CRL-2638; American Type Culture Collection (Manassas, VA)) en RPMI que contenía piruvato de sodio al 1% (Mediatech, Inc., Herndon, VA), solución de antibiótico/antimicótico de estreptomycin/anfotericina al 1% (Mediatech, Inc., Herndon, VA), HEPES al 1% (Mediatech, Inc., Herndon, VA), 5,6 mL/L de solución de glucosa al 45% (Mediatech, Inc., Herndon, VA) y FBS al 10% . Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%.

Para la infección, las células CT26.WT se cultivaron en placas de 6 pocillos (se colocaron en placas a 5 x 10⁵ células por pocillo) en medio de cultivo RPMI que contenía FBS al 10% y se infectaron (a 80-90% de confluencia) con virus vaccinia WR, LIVP, GLV-1h68, GLV-1h74 o productos aislados clonales de LIVP (1.1.1, 2.1.1, 3.1.1, 4.1.1, 5.1.1,

6.1.1, 7.1.1 y 8.1.1) en medio de cultivo RPMI que contenía 2% de FBS a una MOI de 0,01 durante 1 hora a 37°C con agitación vorticial cada 20 minutos. El inóculo se aspiró y las monocapas de células se lavaron dos veces con 2 mL de DPBS (Mediatech, Inc., Herndon, VA) y, posteriormente, se añadieron a cada pocillo 2 mL de medio de cultivo celular. El título viral para cada inóculo de virus se confirmó en células CV-1 el mismo día de la infección. Se recogieron tres pocillos de cada virus a las 1, 24, 48 y 72 horas de la infección (hpi). Las células recogidas se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación y se sometieron a sonicación tres veces durante 1 minuto a plena potencia antes de la titulación. El virus se tituló en células CV-1 por duplicado utilizando métodos convencionales.

Los resultados se presentan en la Tabla 10 a continuación, que establece la eficacia de replicación, expresada como las unidades formadoras de placa promedio por mililitro (pfu/mL), y la desviación típica. GLV-1h68 replicó solo mínimamente en células CT26.WT. GLV-1h74 replicó mejor que GLV-1h68 en todos los puntos temporales examinados. El virus vaccinia WR replicó mejor que todos los otros virus probados. LIVP 1.1.1, LIVP 5.1.1, LIVP 4.1.1 y el virus parental LIVP replicaron de manera similar, cada uno replica mejor que GLV-1h74. Los productos aislados LIVP 2.1.1, 6.1.1 y 7.1.1 fueron similares o ligeramente más lentos que GLV-1h74 en la replicación.

Tabla 10. Crecimiento viral en células de carcinoma de colon de ratón CT26.WT

hpi	GLV-1h68		LIVP		WR		GLV-1h74	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,20E + 04	0,00E + 00	1,77E + 04	0,00E + 00	1,10E + 04	0,00E + 00	1,56E + 04	0,00E + 00
1	3,07E + 02	7,60E + 01	1,72E + 03	1,83E + 02	5,56E + 02	1,32E + 02	7,60E + 02	2,21E + 02
24	2,41E + 02	1,16E + 02	8,99E + 04	3,05E + 04	2,55E + 05	4,39E + 04	2,25E + 04	3,07E + 03
48	2,19E + 02	1,22E + 02	1,55E + 05	1,59E + 04	1,09E + 06	1,77E + 05	3,22E + 04	2,87E + 03
72	3,87E + 02	4,57E + 01	1,64E + 05	2,99E + 04	1,35E + 06	5,23E + 05	4,39E + 04	8,14E + 03
hpi	LIVP 1.1.1		LIVP 2.1.1		LIVP 3.1.1		LIVP 4.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	2,02E + 04	0,00E + 00	1,16E + 04	0,00E + 00	1,55E + 04	0,00E + 00	1,70E + 04	0,00E + 00
1	1,74E + 03	2,96E + 02	4,90E + 02	2,04E + 02	1,35E + 03	1,67E + 02	1,93E + 03	1,52E + 02
24	5,07E + 04	2,90E + 03	4,69E + 03	5,16E + 02	3,25E + 04	3,35E + 02	7,89E + 04	1,54E + 04
48	1,82E + 05	7,60E + 03	1,07E + 04	1,44E + 03	7,58E + 04	1,99E + 04	1,35E + 05	2,37E + 04
72	1,78E + 05	1,04E + 04	1,18E + 04	2,74E + 03	8,55E + 04	1,16E + 04	1,26E + 05	2,28E + 04
hpi	LIVP 5.1.1		LIVP 6.1.1		LIVP 7.1.1		LIVP 8.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,35E + 04	0,00E + 00	1,20E + 04	0,00E + 00	1,94E + 04	0,00E + 00	1,86E + 04	0,00E + 00
1	1,14E + 03	1,95E + 02	7,02E + 02	1,75E + 02	1,08E + 03	1,59E + 02	9,58E + 02	1,43E + 02
24	4,21E + 04	1,44E + 04	7,27E + 03	1,47E + 03	8,04E + 03	8,86E + 02	1,20E + 04	1,21E + 03
48	2,27E + 05	4,30E + 04	2,65E + 04	5,31E + 03	4,82E + 04	9,34E + 03	6,18E + 04	6,58E + 03
72	2,76E + 05	4,61E + 04	2,74E + 04	5,89E + 03	4,80E + 04	7,93E + 03	9,43E + 04	1,80E + 04

4. Células de adenocarcinoma de ratón MC-38

Se cultivaron células de adenocarcinoma MC-38 de ratón (Jochen Stritzker, Universidad de Würzburg) en RPMI que contenía piruvato de sodio al 1% (Mediatech, Inc., Herndon, VA), solución de antibiótico-antimicótico de estreptomycin/anfotericina al 1% (Mediatech, Inc., Herndon, VA), HEPES al 1% (Mediatech, Inc., Herndon, VA), 5,6 mL/L de solución de glucosa al 45% (Mediatech, Inc., Herndon, VA) y FBS al 10%. Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%.

Para la infección, las células MC-38 se cultivaron en placas de 6 pocillos (se sembraron a 5 x 10⁵ células por pocillo) en medio de cultivo RPMI que contenía FBS al 10% y se infectaron (a 80-90% de confluencia) con virus vaccinia WR, LIVP, GLV-1h68, GLV-1h74 o productos aislados clonales de LIVP (1.1.1, 2.1.1, 3.1.1, 4.1.1, 5.1.1, 6.1.1, 7.1.1 y 8.1.1) en medio de cultivo RPMI que contenía FBS al 2% a una MOI de 0,01 durante 1 hora a 37°C. El inóculo se aspiró y las monocapas celulares se lavaron dos veces con 2 mL de DPBS (Mediatech, Inc., Herndon, VA) y,

posteriormente, se añadieron a cada pocillo 2 mL de medio de cultivo celular. El título viral para cada inóculo de virus se confirmó en células CV-1 el mismo día de la infección. Se recogieron tres pocillos de cada virus a las 1, 24, 48 y 72 horas de la infección (hpi). Las células recogidas se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación y se sometieron a sonicación tres veces durante 1 minuto a plena potencia antes de la titulación. El virus se tituló en células CV-1 por duplicado utilizando métodos convencionales.

Los resultados se presentan en la Tabla 11 a continuación, que establece la eficacia de replicación, expresada como las unidades formadoras de placa promedio por mililitro (pfu/mL), y la desviación típica. GLV-1h68 replicó solo mínimamente en células MC-38. LIVP 5.1.1 replicó lo mejor en los puntos temporales de 1, 24 y 48 horas, solo con WR replicándose mejor en el punto temporal de 72 horas. LIVP replicó ligeramente mejor que GV-1h74. Los productos aislados LIVP 2.1.1, 6.1.1 y 8.1.1 fueron similares o algo más lentos que GLV-1h74 en la replicación.

Tabla 11. Crecimiento viral en células de adenocarcinoma de ratón MC-38

hpi	GLV-1h68		LIVP		WR		GLV-1h74	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	9,20E + 03	0,00E + 00	1,40E + 04	0,00E + 00	8,52E + 03	0,00E + 00	1,39E + 04	0,00E + 00
1	6,06E + 02	1,84E + 02	3,42E + 03	3,67E + 02	1,00E + 03	1,20E + 02	1,14E + 03	2,08E + 02
24	2,12E + 02	1,14E + 02	2,89E + 04	1,01E + 04	2,38E + 04	6,94E + 02	7,64E + 03	9,55E + 02
48	1,06E + 02	2,62E + 01	6,36E + 04	3,72E + 03	7,95E + 04	1,50E + 04	4,39E + 04	3,92E + 03
72	1,67E + 02	1,05E + 02	6,89E + 04	1,16E + 04	2,71E + 05	9,46E + 03	5,20E + 04	1,41E + 04
hpi	LIVP 1.1.1		LIVP 2.1.1		LIVP 3.1.1		LIVP 4.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,25E + 04	0,00E + 00	8,86E + 03	0,00E + 00	1,47E + 04	0,00E + 00	1,60E + 04	0,00E + 00
1	2,53E + 03	1,72E + 02	1,03E + 03	3,65E + 02	2,47E + 03	5,55E + 02	3,61E + 03	2,78E + 02
24	2,02E + 04	2,50E + 03	2,08E + 03	6,81E + 02	1,38E + 04	2,62E + 03	3,55E + 04	1,98E + 03
48	6,42E + 04	6,17E + 03	5,58E + 03	4,55E + 02	4,02E + 04	1,60E + 03	8,65E + 04	2,83E + 04
72	6,27E + 04	1,99E + 04	7,08E + 03	7,08E + 02	4,65E + 04	7,39E + 03	8,45E + 04	7,22E + 03
hpi	LIVP 5.1.1		LIVP 6.1.1		LIVP 7.1.1		LIVP 8.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,40E + 04	0,00E + 00	1,26E + 04	0,00E + 00	1,56E + 04	0,00E + 00	1,50E + 04	0,00E + 00
1	3,41E + 03	8,67E + 02	1,74E + 03	3,67E + 02	2,52E + 03	5,27E + 02	2,18E + 03	5,12E + 02
24	4,05E + 04	4,75E + 03	7,21E + 03	1,14E + 02	1,59E + 04	1,20E + 03	7,33E + 03	3,53E + 02
48	1,85E + 05	6,88E + 04	1,83E + 04	3,92E + 03	5,41E + 04	1,03E + 04	2,26E + 04	17,31E + 03
72	1,71E + 05	6,60E + 04	1,73E + 04	5,00E + 03	5,00E + 04	4,38E + 03	2,94E + 04	4,64E + 03

Ejemplo 3

Construcción de Virus que Codifican un Anticuerpo de Cadena Sencilla Anti-VEGF

1. GLV-1h164

En este ejemplo, se generó GLV-1h164, que contiene un gen (GLAF-2) que incluye el gen del anticuerpo anti-VEGF de cadena sencilla (G6; SEQ ID NO: 73) insertado en el locus A56R bajo el control del promotor sintético tardío VACV, a partir de GLV-1h100 por doble cruce recíproco. GLV-1h100 se obtuvo de GLV-1h68 reemplazando el casete de expresión de β-galactosidasa en el locus J2R con un casete de expresión hNET a través de recombinación homóloga *in vivo* (véanse la Patente de Estados Unidos Núm. 7.588.767 y la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2009-0117034).

Tabla 12. Generación de GLV-1h164			
Nombre del virus	Virus parental	Vector de transferencia VV	Genotipo
GLV-1h68	-	-	F14.5L: (P _{SEL})Ruc-GFP

Tabla 12. Generación de GLV-1h164			
Nombre del virus	Virus parental	Vector de transferencia VV	Genotipo
			TK: (P _{SEL}) <i>rTrfR</i> -(P _{7.5k}) <i>LacZ</i>
			HA: (P _{11k}) <i>gusA</i>
GLV-1h100	GLV-1h68	TK-SE-hNET3	F14.5L: (P _{SEL}) <i>Ruc-GFP</i>
			TK: (P _{SE}) <i>hNET</i>
			HA: (P _{11k}) <i>gusA</i>
GLV-1h164	GLV-1h100	pHA-P _{SL} -GLAF-2	F14.5L: (P _{SEL}) <i>Ruc-GFP</i>
			TK: (P _{SE}) <i>hNET</i>
			HA: (P _{SL}) <i>GLAF-2</i>

El plásmido 0608997-pGA4, que contenía el ADN que codifica el anticuerpo GLAF-1 anti-VEGF de cadena sencilla (SEC ID NO: 12 y 21), que contiene una secuencia líder de cadena ligera de Ig kappa, la secuencia de la cadena V_H del Fab G6, una secuencia del conector (G₄S)₃, la secuencia de la cadena V_L del Fab G6 y una secuencia DDDDK C terminal (SEQ ID NO: 18) fue sintetizado por GeneArt AG (Alemania). Utilizando este vector como molde, se realizó la PCR con los cebadores P-G6-for-b (5'-gtcgaccaccatggagac-3', SEQ ID NO: 19) y P-G6-rev-b (5'-ttaattaattatcgcttaacctccggcccc-3', SEQ ID NO: 20) para amplificar una versión de la secuencia génica de GLAF-1 (SEQ ID NO: 12 y 21) sin la secuencia DDDDK (GLAF-2, SEQ ID NO: 22). Para construir el plásmido final, se utilizó el plásmido lanzadera pHA-P basado en homología de ADN de VACV_{SL}-hNET-1 (SEQ ID NO: 23) que se construyó previamente para la recombinación homóloga de genes foráneos en el locus A56R en el genoma de VACV a través de doble cruce recíproco. El fragmento GLAF-2 se clonó en el plásmido marco a través de los sitios Sall y PacI, reemplazando así la secuencia de ADNc de hNet-1 por el ADNc de GLAF-2, dando como resultado el plásmido pHA-P_{SL}-GLAF-2.

Se emplearon células de fibroblastos de riñón de mono verde africano CV-1 (American Type Culture Collection (Manassas, VA); CCL-70) para la generación y producción viral. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con solución de antibiótico-antimicótico al 1% (Mediatech, Inc., Herndon, VA) y suero bovino fetal al 10% (FBS; Mediatech, Inc., Herndon, VA) a 37°C bajo CO₂ al 5%. Las células CV-1 se infectaron con GLV-1h164 a una MOI de 0,1 por 1 hr. Las células infectadas se transfectaron a continuación utilizando Fugene (Roche, Indianapolis, IN) con el vector de transferencia pHA-PSL-GLAF-2. Dos días después de la infección, las células infectadas/transfectadas se recolectaron y los virus recombinantes se seleccionaron y se purificaron en placa utilizando métodos convencionales como se describió anteriormente (Falkner y Moss (1990) J. Virol. 64:3108-3111).

Diez matraces T225 de células CV-1 confluentes (sembradas a 2 x 10⁷ células por matraz el día antes de la infección) se infectaron con cada virus a una MOI de 0,1. Las células infectadas se recogieron dos días después de la infección y se lisaron utilizando un homogeneizador de vidrio Dounce. El producto lisado celular se clarificó mediante centrifugación a 1.800 g durante 5 min, y a continuación se colocó en capas en un colchón de sacarosa al 36% y se centrifugó a 13.000 rpm en un rotor HB-6, Centrífuga de Alta Velocidad Refrigerada Sorvall RC-5B durante 2 horas. El sedimento de virus se resuspendió en 1 mL de Tris 1 mM, pH 9,0, se cargó en un gradiente de sacarosa continuo de 24% a 40% estéril y se centrifugó a 26.000 g durante 50 min. La banda del virus se recogió y se diluyó utilizando 2 volúmenes de Tris 1 mM, pH 9,0, y a continuación se centrifugó a 13.000 rpm en un rotor HB-6 durante 60 min. El sedimento final del virus se resuspendió en 1 mL de Tris 1 mM, pH 9,0 y el título se determinó en células CV-1 (ATCC Num. CCL-70).

2. GLV-1h109

La generación de GLV-1h109 se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 8.052.968. GLV-1h109 se obtuvo de la cepa GLV-1h68 (SEC ID NO: 9) por reemplazo del gen *LacZ* (beta-galactosidasa) por el gen que codifica GLAF-1 (SEC ID NO: 12 y 21) en el locus A56R. El gen GLAF-1, que codifica un anticuerpo G6 de cadena sencilla anti-VEGF, está bajo el control del promotor sintético tardío (SL) de VACV.

3. GLV-1h158

GLV-1h158 se obtuvo de la cepa GLV-1h68 (SEC ID NO: 9) mediante el reemplazo del gen *gusA* (beta-glucoronidasa) por el gen que codifica GLAF-2 (SEC ID NO: 22) en el locus J2R. El gen GLAF-2, que codifica un anticuerpo G6 de cadena sencilla anti-VEGFR, está bajo el control del promotor sintético temprano/tardío (SEL) de VACV.

4. GLV-1h163

5 GLV-1h163 se obtuvo de la cepa GLV-1h100 (descrita en el Ejemplo 3.1 anterior) mediante el reemplazo del gen gusA (beta-glucuronidasa) por el gen que codifica GLAF-2 (SEQ ID NO: 22) en el locus A56R. El gen GLAF-2 está bajo el control del promotor sintético temprano/tardío (SEL) de VACV. Además, GLV-1h163 porta el transportador de norepinefrina humana (NET) bajo el control del promotor sintético temprano (SE) de VACV en el locus J2R.

Ejemplo 4

10 **Estudios de replicación de virus *In vitro* con producto aislado LIVP 1.1.1**

En este ejemplo, se examinó la replicación del virus *in vitro* del producto aislado 1.1.1 de LIVP en varias líneas celulares de cáncer y se comparó con la de los virus vaccinia GLV-1h68 (descrito en el Ejemplo 1 y la Patente de Estados Unidos Núm. 7.588.767) y GLV-1h164 (descrito en el Ejemplo 3 anterior). Además, cada virus se evaluó después del tratamiento previo con irradiación, como se describe a continuación.

1. Células de melanoma de ratón B16-F10

20 Se cultivaron células B16-F10 de melanoma de ratón (ATCC Num. CRL-6475; American Type Culture Collection (Manassas, VA)) en medio DMEM y se infectaron con virus vaccinia GLV-1h68, GLV-1h164 o producto aislado clonal de LIVP 1.1.1 una MOI de 0,01 por 24, 48 o 72 horas a 37°C.

25 Tratamiento de radiación: Las células se irradiaron a una dosis de 6 Gy un día antes de la infección del virus o no recibieron radiación. La irradiación se administró como una fracción única utilizando un irradiador biológico de rayos X RS2000 (Rad Source Technologies Inc.). La tasa de dosis de radiación fue de 1 Gy/minuto.

30 El virus se tituló en células CV-1 por duplicado utilizando métodos convencionales. Los resultados se presentan en la Tabla 13 a continuación, que establece la eficacia de replicación, expresada como las unidades formadoras de placa promedio por mililitro (pfu/mL), y la desviación típica. Como se muestra en la Tabla, LIVP 1.1.1 mostró una replicación viral significativamente mejorada en las células B16-F10 en comparación con GLV-1h68 y GLV-1h164.

Tabla 13. Crecimiento viral en células de melanoma de ratón B16-F10						
hpi	GLV-1h68		GLV-1h164		LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	2,24E + 03	0,00E + 00	2,24E + 03	0,00E + 00	2,24E + 03	0,00E + 00
24	5,25E + 03	1,98E + 03	2,67E + 03	5,77E + 02	4,59E + 05	1,01E + 05
48	2,50E + 03	6,61E + 02	1,42E + 03	6,29E + 02	7,08E + 05	1,46E + 05
72	2,50E + 02	0,00E + 00	1,33E + 02	2,89E + 01	6,67E + 04	2,89E + 04
hpi	GLV-1h68 + XRT		GLV-1h164 + XRT		LIVP 1.1.1 + XRT	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	2,24E + 03	0,00E + 00	2,24E + 03	0,00E + 00	2,24E + 03	0,00E + 00
24	3,00E + 03	1,39E + 03	2,75E + 03	9,01E + 02	1,25E + 05	8,66E + 04
48	6,25E + 02	3,70E + 02	3,67E + 02	1,76E + 02	2,08E + 05	8,04E + 04
72	833E + 01	3,82E + 01	1,00E + 02	4,33E + 01	5,33E + 04	1,18E + 04

2. Células de carcinoma de pulmón humano A549

35 Las células de carcinoma de pulmón humano A549 (ATCC) se cultivaron en medio F-12K y se infectaron con los virus vaccinia GLV-1h68, GLV-1h164 o el producto aislado LIVP 1.1.1 a una MOI de 0,01 durante 24, 48 o 72 horas a 37°C C. Las células se irradiaron con radiación gamma de 6 Gy o no recibieron tratamiento de radiación como se describió anteriormente. El virus se tituló en células CV-1 por duplicado utilizando métodos convencionales.

40 Los resultados se presentan en la Tabla 14 a continuación, que establece la eficacia de replicación, expresada como las unidades formadoras de placa promedio por mililitro (pfu/mL), y la desviación típica. Como se muestra en la Tabla, LIVP 1.1.1 mostró una replicación viral mejorada en células A549 en comparación con GLV-1h68 y GLV-1h164.

Tabla 14. Crecimiento viral en células de carcinoma de pulmón humano A549

hpi	GLV-1h68		GLV-1h164		LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	2,10E + 03	0,00E + 00	2,10E + 03	0,00E + 00	2,10E + 03	0,00E + 00
24	3,50E + 05	1,09E + 05	5,58E + 05	1,28E + 05	1,28E + 07	4,51E + 06
48	1,06E + 07	4,11E + 06	1,57E + 07	7,75E + 06	1,40E + 08	4,33E + 06
72	1,33E + 07	1,01E + 07	2,42E + 07	1,76E + 07	7,75E + 07	5,02E + 07
hpi	GLV-1h68 + XRT		GLV-1h164 + XRT		LIVP 1.1.1 + XRT	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	2,10E + 03	0,00E + 00	2,10E + 03	0,00E + 00	2,10E + 03	0,00E + 00
24	2,08E + 05	1,13E + 05	1,92E + 05	3,82E + 04	5,58E + 06	1,15E + 06
48	5,08E + 06	1,04E + 06	7,33E + 06	2,04E + 06	3,08E + 07	6,29E + 06
72	2,92E + 07	1,26E + 07	2,17E + 07	1,77E + 07	4,92E + 07	2,32E + 07

3. Células de carcinoma de mama humano MDA-MB-231

- 5 Las células de carcinoma de mama MDA-MB-231 (ATCC) humanas se cultivaron en medio L-15 de Leibovitz y se infectaron con los virus vaccinia GLV-1h68, GLV-1h164, o el producto aislado LIVP 1.1.1 a una MOI de 0,01 para 24, 48 o 72 horas a 37°C. Las células se irradiaron con radiación gamma de 6 Gy o no recibieron tratamiento de radiación como se ha descrito anteriormente. El virus se tituló en células CV-1 por duplicado utilizando métodos convencionales.
- 10 Los resultados se presentan en la Tabla 15 a continuación, que establece la eficacia de replicación, expresada como las unidades formadoras de placa promedio por mililitro (pfu/mL), y la desviación típica. Como se muestra en la Tabla, LIVP 1.1.1 exhibió replicación viral significativamente mejorada en células MDA-MB-231 en comparación con GLV-1h68 y GLV-1h164.

Tabla 15. Crecimiento viral en células de carcinoma de mama humano MDA-MB-231

hpi	GLV-1h68		GLV-1h164		LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,94E + 03	0,00E + 00	1,94E + 03	0,00E + 00	1,94E + 03	0,00E + 00
24	6,42E + 03	1,26E + 03	8,00E + 03	1,64E + 03	3,67E + 05	9,46E + 04
48	1,22E + 05	4,50E + 04	1,07E + 05	3,09E + 04	8,08E + 06	6,87E + 06
72	4,08E + 05	2,98E + 05	6,33E + 05	7,22E + 04	3,33E + 06	1,13E + 06
hpi	GLV-1h68 + XRT		GLV-1h164 + XRT		LIVP 1.1.1 + XRT	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,94E + 03	0,00E + 00	1,94E + 03	0,00E + 00	1,94E + 03	0,00E + 00
24	5,17E + 03	1,77E + 03	4,83E + 03	1,46E + 03	2,92E + 05	3,82E + 04
48	3,42E + 04	2,47E + 04	1,83E + 04	1,38E + 04	3,08E + 06	7,64E + 05
72	5,53E + 04	1,76E + 04	8,17E + 04	2,89E + 03	8,58E + 06	2,60E + 06

- 15
- ### 4. Células de carcinoma pancreático humano MIA PaCa-2
- 20 Las células de carcinoma pancreático humano MIA PaCa-2 (ATCC) se cultivaron en medio DMEM y se infectaron con los virus vaccinia GLV-1h68, GLV-1h164, o el producto aislado LIVP 1.1.1 a una MOI de 0,01 durante 24, 48 o 72 horas a 37°C. Las células se irradiaron con radiación gamma de 6 Gy o no recibieron tratamiento de radiación como se ha descrito anteriormente. El virus se tituló en células CV-1 por duplicado utilizando métodos convencionales.

Los resultados se presentan en la Tabla 16 a continuación, que establece la eficacia de replicación, expresada como las unidades formadoras de placa promedio por mililitro (pfu/mL), y la desviación típica. Como se muestra en la

Tabla, LIVP 1.1.1 mostró una replicación viral mejorada en células MIA PaCa-2 en comparación con GLV-1h68 y GLV-1h164.

hpi	GLV-1h68		GLV-1h164		LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,38E + 03	0,00E + 00	1,38E + 03	0,00E + 00	1,38E + 03	0,00E + 00
24	7,75E + 04	2,18E + 04	1,53E + 05	3,68E + 04	1,33E + 06	1,44E + 05
48	4,67E + 06	1,18E + 06	8,33E + 06	8,78E + 05	9,92E + 07	1,77E + 07
72	7,50E + 06	4,33E + 06	1,42E + 07	5,20E + 06	1,92E + 08	2,89E + 07
hpi	GLV-1h68 + XRT		GLV-1h164 + XRT		LIVP 1.1.1 + XRT	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,38E + 03	0,00E + 00	1,38E + 03	0,00E + 00	1,38E + 03	0,00E + 00
24	3,17E + 04	7,64E + 03	5,17E + 04	4,00E + 04	1,92E + 06	1,38E + 06
48	8,00E + 05	6,61E + 04	1,25E + 06	7,50E + 04	3,17E + 07	1,38E + 07
72	7,17E + 06	2,10E + 06	5,00E + 06	5,00E + 05	5,50E + 07	3,38E + 07

5. Células de cáncer de próstata humano PC-3

Las células de cáncer de próstata humano PC-3 (ATCC) se cultivaron en medio F-12K y se infectaron con los virus vaccinia GLV-1h68, GLV-1h164, o el producto aislado LIVP 1.1.1 a una MOI de 0,01 durante 24, 48 y 72 horas a 37°C. Las células se irradiaron con radiación gamma de 6 Gy o no recibieron ningún tratamiento de radiación como se ha descrito anteriormente. El virus se tituló en células CV-1 por duplicado utilizando métodos convencionales.

Los resultados se presentan en la Tabla 17 a continuación, que establece la eficacia de replicación, expresada como las unidades formadoras de placa promedio por mililitro (pfu/mL), y la desviación típica. Como se muestra en la Tabla, LIVP 1.1.1 mostró una replicación viral ligeramente mejorada en células PC-3 en comparación con GLV-1h68 y GLV-1h164.

hpi	GLV-1h68		GLV-1h164		LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,54E + 03	0,00E + 00	1,54E + 03	0,00E + 00	1,54E + 03	0,00E + 00
24	1,42E + 05	6,29E + 04	2,92E + 05	5,77E + 04	5,42E + 06	1,89E + 06
48	5,41E + 06	4,08E + 06	7,83E + 06	1,76E + 06	8,67E + 06	4,13E + 06
72	7,83E + 05	1,81E + 05	8,33E + 05	2,67E + 05	3,33E + 06	1,76E + 06
hpi	GLV-1h68 + XRT		GLV-1h164 + XRT		LIVP 1.1.1 + XRT	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,54E + 03	0,00E + 00	1,54E + 03	0,00E + 00	1,54E + 03	0,00E + 00
24	3,00E + 05	4,33E + 04	2,08E + 05	1,13E + 05	5,42E + 06	3,82E + 05
48	3,17E + 06	1,51E + 06	3,00E + 06	5,00E + 05	2,58E + 06	1,53E + 06
72	2,67E + 06	2,24E + 06	1,92E + 06	7,64E + 05	4,17E + 06	7,64E + 05

6. Células de glioblastoma-astrocitoma humano U-87 MG

Se cultivaron células U-87 glioblastoma-astrocitoma MG (ATCC) humanas en DMEM y se infectaron con los virus vaccinia GLV-1h68, GLV-1h164, o el producto aislado LIVP 1.1.1 a una MOI de 0,01 durante 24 horas a 37°C. las células se irradiaron con radiación gamma de 6 Gy o no recibieron tratamiento de radiación como se describió anteriormente. El virus se tituló en células CV-1 por duplicado utilizando métodos convencionales.

Los resultados se presentan en la Tabla 18 a continuación, que establece la eficacia de replicación, expresada como las unidades formadoras de placa promedio por mililitro (pfu/mL), y la desviación típica. Como se muestra en la tabla, LIVP 1.1.1 mostró una replicación viral mejorada en células U-87 en comparación con GLV-1h68 y GLV-1h164.

hpi	GLV-1h68		GLV-1h164		LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,28E + 03	0,00E + 00	1,28E + 03	0,00E + 00	1,28E + 03	0,00E + 00
24	6,08E + 03	2,13E + 03	1,23E + 04	3,25E + 03	4,17E + 06	2,50E + 06
48	4,08E + 05	1,01E + 05	5,83E + 05	4,65E + 05	3,83E + 07	2,79E + 07
72	5,75E + 05	2,95E + 05	6,67E + 06	2,40E + 06	6,92E + 07	2,57E + 07
hpi	GLV-1h68 + XRT		GLV-1h164 + XRT		LIVP 1.1.1 + XRT	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
0	1,28E + 03	0,00E + 00	1,28E + 03	0,00E + 00	1,28E + 03	0,00E + 00
24	1,71E + 04	2,74E + 03	3,76E + 04	6,43E + 03	4,67E + 06	1,63E + 06
48	5,83E + 05	2,13E + 05	7,17E + 05	2,32E + 05	5,83E + 07	8,04E + 06
72	2,25E + 06	4,33E + 05	3,75E + 06	1,00E + 06	4,33E + 07	5,77E + 06

5

Ejemplo 5

Estudios de replicación de virus *In vitro* con producto aislado LIVP 5.1.1

10 En este ejemplo, se examinó la replicación de virus *in vitro* del producto aislado LIVP 5.1.1 y se comparó con la del virus vaccinia GLV-1h68 (descrito en el Ejemplo 1 y la Patente de Estados Unidos Núm. 7.588.767) en células de carcinoma de pulmón humano A549 y carcinoma mamario murino 4T1. Se evaluó el crecimiento viral en el sobrenadante y el producto lisado celular.

15 1. Células de carcinoma de pulmón humano A549

Se cultivaron células A549 de carcinoma de pulmón humano (ATCC) en placas de 24 pocillos en medio F-12K y se infectaron con virus vaccinia GLV-1h68 o producto aislado LIVP 5.1.1 a una MOI de 0,1 a 37°C. El sobrenadante del virus y los productos lisados celulares se recogieron a las 1, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de la infección y se titularon en células CV-1 por triplicado utilizando métodos convencionales.

20

Los resultados se presentan en la Tabla 19 a continuación, que establece la eficacia de replicación, expresada como las unidades formadoras de placa promedio por mililitro (pfu/mL), y la desviación típica. Los datos muestran que LIVP 5.1.1 puede replicarse de manera más eficaz que GLV-1h68 en células A549.

25

hpi	Sobrenadante de GLV-1h68		Producto lisado de GLV-1h68		Sobrenadante de LIVP 5.1.1		Producto lisado de LIVP 5.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
1	1,00E + 02	6,07E + 01	6,67E + 01	4,84E + 01	4,20E + 02	1,91E + 02	7,73E + 02	2,20E + 02
6	1,00E + 02	5,51E + 01	2,00E + 01	2,19E + 01	2,60E + 02	8,29E + 01	5,80E + 02	1,61E + 02
12	8,00E + 01	3,58E + 01	1,53E + 02	4,68E + 01	3,60E + 02	1,48E + 02	1,08E + 04	2,07E + 03
24	9,33E + 02	3,27E + 02	9,07E + 03	2,23E + 03	1,73E + 03	7,00E + 02	5,93E + 05	1,20E + 05
48	2,80E + 03	8,00E + 02	1,45E + 05	4,42E + 04	3,73E + 04	1,35E + 04	3,72E + 06	1,54E + 05
72	2,00E + 04	9,12E + 03	2,95E + 05	5,70E + 04	1,18E + 05	3,79E + 04	3,33E + 06	5,47E + 05
96	6,20E + 04	2,77E + 04	2,17E + 05	5,28E + 04	2,58E + 05	5,09E + 04	1,49E + 06	2,20E + 05

2. Células de carcinoma mamario murino 4T1

Se cultivaron células de carcinoma mamario 4T1 (ATCC) de ratón en placas de 24 pocillos en medio RPMI-1640 y se infectaron con virus vaccinia GLV-1h68 o producto aislado LIVP 5.1.1 a una MOI de 0,01 a 37°C. El sobrenadante del virus y los productos lisados celulares se recogieron a las 2, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de la infección y se titularon en células CV-1 por triplicado utilizando métodos convencionales.

5 Los resultados se presentan en la Tabla 20 a continuación, que establece la eficacia de replicación, expresada como las unidades formadoras de placa promedio por mililitro (pfu/mL), y la desviación típica. Los datos muestran que LIVP 5.1.1 puede replicarse más eficazmente que GLV-1h68 en células 4T1.

Tabla 20. Crecimiento viral en células de carcinoma mamario murino 4T1

hpi	Sobrenadante de GLV-1h68		Producto lisado de GLV-1h68		Sobrenadante de LIVP 5.1.1		Producto lisado de LIVP 5.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
1	2,40E + 01	1,68E + 01	3,33E + 01	2,73E + 01	8,33E + 01	5,57E + 01	2,40E + 02	1,10E + 02
6	1,33E + 01	1,49E + 01	1,00E + 01	1,67E + 01	1,23E + 02	5,57E + 01	1,47E + 02	6,53E + 01
12	2,00E + 01	8,39E + 00	2,67E + 01	2,73E + 01	1,33E + 02	8,91E + 01	2,13E + 02	7,45E + 01
24	1,47E + 01	7,87E + 00	5,33E + 01	5,01E + 01	9,33E + 01	6,53E + 01	1,07E + 04	2,37E + 03
48	1,07E + 01	8,26E + 00	1,03E + 02	8,98E + 01	7,33E + 02	3,01E + 02	1,20E + 05 &	2,12E + 04
72	1,60E + 01	1,13E + 01	5,00E + 01	3,74E + 01	4,20E + 03	9,03E + 02	6,47E + 04 y	2,51E + 04
96	3,33E + 01	1,63E + 01	4,00E + 01	3,35E + 01	3,20E + 04	6,69E + 03	1,87E + 04	6,53E + 03

10

Ejemplo 6

Citotoxicidad *in vitro* de productos aislados clonales de LIVP

15 En este ejemplo, se midió la citotoxicidad viral de los productos aislados LIVP 1.1.1 y 5.1.1 *in vitro* en varias líneas celulares de cáncer utilizando un ensayo de proliferación de células XTT. La toxicidad se midió con o sin radioterapia previa.

A. Citotoxicidad *in vitro* del producto aislado clonal LIVP 1.1.1

20

1. Células de melanoma de ratón B16-F10

25 Se cultivaron células B16-F10 de melanoma de ratón (ATCC Num. CRL-6475; American Type Culture Collection (Manassas, VA)) en medio DMEM y se infectaron con virus vaccinia GLV-1h68, GLV-1h164 o producto aislado clonal de LIVP 1.1.1 una MOI de 0,01 durante 24 horas a 37°C.

30 Tratamiento de radiación (XRT): las células se irradiaron a una dosis de 6 Gy un día antes de la infección por el virus y se compararon con las células que no recibieron radiación. La irradiación se administró como una fracción única utilizando un irradiador biológico de rayos X RS2000 (Rad Source Technologies Inc.). La tasa de dosis de radiación fue de 1 Gy/minuto.

35 La toxicidad celular se midió los días 1, 3, 5 y 7 posteriores a la infección con un kit de proliferación celular II (XTT) (Roche). En cada punto temporal posterior a la infección por el virus, se añadieron 50 µl de mezcla de marcaje XTT por pocillo y se incubaron durante 4 horas a 37°C con CO₂ al 6,5%. La absorbancia espectrofotométrica de las muestras se midió utilizando un lector de microplacas (ELISA). La longitud de onda para medir la absorbancia del producto de formazán está entre 450 y 500 nm según los filtros disponibles para el lector ELISA utilizado. La longitud de onda de referencia fue superior a 650 nm.

40 Los resultados se exponen en la Tabla 21 a continuación. La eficacia de la citotoxicidad se expresa como viabilidad celular (sin muerte celular = 1), normalizada a ausencia de tratamiento. Como se muestra en la Tabla, LIVP 1.1.1 indujo una citotoxicidad ligeramente mayor de las células de melanoma de ratón B16-F10 en comparación con el tratamiento con GLV-1h68 y GLV-1h164 a los 3-5 días de la infección. El tratamiento de radiación no mejoró la citotoxicidad en las células B16-F10.

Días p.i.	Sin tratamiento		GLV-1h68		GLV-1h164		LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
1	1,0000	0,0490	0,9102	0,0539	0,8666	0,0771	0,9609	0,0833
3	1,0367	0,0269	1,0000	0,0098	0,9674	0,0067	0,9545	0,0254
5	0,8652	0,2234	0,8710	0,0595	0,8151	0,1612	0,7255	0,2372
7	0,0831	0,2025	-0,5113	0,3082	-0,3765	0,0396	-0,0167	0,1393
Días p.i.	Sin Tratamiento + XRT		GLV-1h68 + XRT		GLV-1h164 + XRT		LIVP 1.1.1 + XRT	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
1	0,7798	0,0350	0,5906	0,0095	0,5957	0,0498	0,4974	0,0169
3	1,0105	0,0495	1,0036	0,1085	1,0491	0,0947	1,0487	0,0788
5	0,7413	0,0409	0,7138	0,0412	0,7568	0,0627	0,7202	0,0689
7	0,0049	0,0045	-0,0145	0,0308	0,0023	0,0028	-0,0047	0,0118

2. Células de carcinoma de pulmón humano A549

5 Las células de carcinoma de pulmón humano A549 (ATCC) se cultivaron en medio F-12K y se infectaron con los virus vaccinia GLV-1h68, GLV-1h164, o el producto aislado LIVP 1.1.1 a una MOI de 0,01 durante 24 horas a 37°C. Las células se irradiaron con radiación gamma de 6 Gy o no recibieron tratamiento de radiación como se describió anteriormente. La toxicidad celular se midió a los 1, 3, 5 y 7 días de la infección con el Kit de Proliferación Celular II (XTT), Roche como se ha descrito anteriormente.

10 Los resultados se exponen en la Tabla 22 a continuación. La eficacia de la citotoxicidad se expresa como viabilidad celular (sin muerte celular = 1), normalizada a ausencia de tratamiento. Como se muestra en la Tabla, LIVP 1.1.1 indujo una citotoxicidad significativamente mayor de las células de carcinoma de pulmón A549 en comparación con el tratamiento con GLV-1h68 y GLV-1h164. El tratamiento de radiación no mejoró la citotoxicidad en las células A549.

Días p.i.	Sin tratamiento		GLV-1h68		GLV-1h164		LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
1	1,0000	0,0244	0,9469	0,0404	0,9462	0,0511	0,9027	0,0615
3	1,0273	0,0783	0,9723	0,0387	0,9931	0,0662	0,9824	0,0530
5	1,0925	0,0151	0,6579	0,0679	0,6927	0,0778	0,0564	0,0080
7	0,8003	0,0606	0,0561	0,0244	0,0540	0,0099	0,0078	0,0015
Días p.i.	Sin Tratamiento + XRT		GLV-1h68 + XRT		GLV-1h164 + XRT		LIVP 1.1.1 + XRT	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
1	1,0350	0,0237	0,9778	0,0457	0,9703	0,0396	0,9683	0,0607
3	1,0200	0,0627	1,0057	0,0437	1,0035	0,0345	1,0153	0,0372
5	1,1328	0,0349	0,6837	0,0822	0,6659	0,0726	0,1440	0,0153
7	0,8423	0,1760	0,0337	0,0118	0,0366	0,0092	0,0040	0,0027

3. Células de carcinoma de mama humano MDA-MB-231

5 Se cultivaron células de carcinoma de mama humano MDA-MB-231 (ATCC) en medio L-15 de Leibovitz y se infectaron con los virus vaccinia GLV-1h68, GLV-1h164, o el producto aislado LIVP 1.1.1 a una MOI de 0,01 durante 24 horas a 37 horas. Las células se irradiaron con radiación gamma de 6 Gy o no recibieron tratamiento de radiación como se describió anteriormente. La toxicidad celular se midió a los 1, 3, 5 y 7 días a la infección con el Kit de Proliferación Celular II (XTT), Roche como se ha descrito anteriormente.

10 Los resultados se exponen en la Tabla 23 a continuación. La eficacia de la citotoxicidad se expresa como viabilidad celular (sin muerte celular = 1), normalizada a ausencia de tratamiento. Como se muestra en la Tabla, LIVP 1.1.1 indujo una citotoxicidad significativamente mayor de las células de carcinoma de mama MDA-MB-231 en comparación con el tratamiento con GLV-1h68 y GLV-1h164. El tratamiento de radiación no mejoró la citotoxicidad de LIVP 1.1.1 en las células MDA-MB-231, pero sí aumentó la citotoxicidad de la cepa GLV-1h164.

Tabla 23. Citotoxicidad en células de carcinoma de mama humano MDA-MB-231

Días p.i.	Sin tratamiento		GLV-1h68		GLV-1h164		LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
1	1,0000	0,0352	0,9370	0,0184	0,9205	0,0371	0,9034	0,0268
3	1,1674	0,0319	1,0368	0,0399	1,0113	0,0300	0,8888	0,0377
5	1,2225	0,1287	0,7901	0,1531	0,7582	0,1669	0,3826	0,1910
7	1,2390	0,0120	0,5518	0,0197	0,5181	0,0229	0,0813	0,0044
Días p.i.	Sin Tratamiento + XRT		GLV-1h68 + XRT		GLV-1h164 + XRT		LIVP 1.1.1 + XRT	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
1	1,0703	0,0220	1,0302	0,0210	0,9888	0,0293	1,0234	0,0560
3	1,1277	0,0241	0,9703	0,0317	0,9482	0,0161	0,7992	0,0220
5	0,9238	0,0099	0,7144	0,0318	0,6117	0,0587	0,3560	0,0307
7	0,9389	0,0256	0,5563	0,0518	0,3034	0,2146	0,0736	0,0100

4. Células de carcinoma pancreático humano MIA PaCa-2

15 Se cultivaron células de carcinoma pancreático humano PaCa-2 (ATCC) en medio DMEM y se infectaron con los virus vaccinia GLV-1h68, GLV-1h164, o con el producto aislado LIVP 1.1.1 a una MOI de 0,01 durante 24 horas a 37°C. las células se irradiaron con radiación gamma de 6 Gy o no recibieron tratamiento de radiación como se describió anteriormente. La toxicidad celular se midió a los 1, 3, 5 y 7 días de la infección con el Kit de Proliferación Celular II (XTT), Roche como se ha descrito anteriormente.

20 Los resultados se presentan en la Tabla 24 a continuación. La eficacia de la citotoxicidad se expresa como viabilidad celular (sin muerte celular = 1), normalizada a ausencia de tratamiento. Como se muestra en la Tabla, LIVP 1.1.1 indujo una citotoxicidad significativamente mayor de las células de carcinoma pancreático MIA PaCa-2 en comparación con el tratamiento con GLV-1h68 y GLV-1h164. El tratamiento de radiación mejoró la citotoxicidad de LIVP 1.1.1 en las células MiaPaCa-2.

Tabla 24. Citotoxicidad en células de carcinoma pancreático humano MIA PaCa-2

Días p.i.	Sin tratamiento		GLV-1h68		GLV-1h164		LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
1	1,0000	0,0381	0,9454	0,0189	0,9383	0,0267	0,9429	0,0196
3	0,9338	0,0385	0,8597	0,0278	0,8113	0,0168	0,7112	0,0313
5	0,9275	0,0083	0,4876	0,0093	0,4857	0,0129	0,3238	0,0145
7	1,0180	0,1760	0,1808	0,0745	0,1499	0,0150	0,0547	0,0328
Días p.i.	Sin Tratamiento + XRT		GLV-1h68 + XRT		GLV-1h164 + XRT		LIVP 1.1.1 + XRT	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
1	1,0036	0,0272	0,8772	0,1197	0,9171	0,0298	0,9003	0,0361
3	0,9186	0,0097	0,7951	0,0174	0,7711	0,0087	0,5760	0,0244

Días p.i.	Sin tratamiento		GLV-1h68		GLV-1h164		LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
5	0,9726	0,0924	0,4018	0,0283	0,4066	0,0126	0,2291	0,0071
7	0,9635	0,1061	0,1081	0,0371	0,0942	0,0145	0,0322	0,0186

5. Células de cáncer de próstata humano PC-3

5 Las células de cáncer de próstata humano PC-3 (ATCC) se cultivaron en medio F-12K y se infectaron con los virus vaccinia GLV-1h68, GLV-1h164 o el producto aislado LIVP 1.1.1 a una MOI de 0,01 durante 24 horas a 37°C. Las células se irradiaron con radiación gamma de 6 Gy o no recibieron tratamiento de radiación como se describió anteriormente. La toxicidad celular se midió a los 1, 3, 5 y 7 días de la infección con el Kit de Proliferación Celular II (XTT), Roche como se ha descrito anteriormente.

10 Los resultados se exponen en la Tabla 25 a continuación. La eficacia de la citotoxicidad se expresa como viabilidad celular (sin muerte celular = 1), normalizada a ausencia de tratamiento. Como se muestra en la Tabla, LIVP 1.1.1 indujo una mayor citotoxicidad de las células de cáncer de próstata PC-3 en comparación con el tratamiento con GLV-1h68 y GLV-1h164. El tratamiento de radiación aumentó ligeramente la citotoxicidad de LIVP 1.1.1 en las células PC-3.

15

Días p.i.	Sin tratamiento		GLV-1h68		GLV-1h164		LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
1	1,0000	0,0646	0,9011	0,0896	0,9427	0,0382	0,8670	0,0448
3	1,2695	0,0497	0,7208	0,1164	0,8390	0,0872	0,6890	0,0236
5	1,0372	0,0768	0,3884	0,0208	0,4264	0,0310	0,1668	0,0093
7	0,8865	0,0195	0,1019	0,0264	0,1213	0,0314	0,0570	0,0146
Días p.i.	Sin Tratamiento + XRT		GLV-1h68 + XRT		GLV-1h164 + XRT		LIVP 1.1.1 + XRT	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
1	0,9718	0,0110	0,8343	0,0290	0,8377	0,0127	0,8895	0,0326
3	1,1729	0,0175	0,7647	0,0365	0,7473	0,0165	0,5235	0,0163
5	0,7378	0,0147	0,2879	0,0308	0,3047	0,0227	0,1232	0,0036
7	0,5878	0,0391	0,0754	0,0285	0,0693	0,0202	0,0426	0,0023

6. Células de glioblastoma-astrocitoma humano U-87 MG

20 Se cultivaron células de glioblastoma-astrocitoma humano U-87 MG (ATCC) y se infectaron con los virus vaccinia GLV-1h68, GLV-1h164, o el producto aislado LIVP 1.1.1 a una MOI de 0,01 durante 24 horas a 37°C. Las células se irradiaron con una radiación gamma de 6 Gy o no recibieron tratamiento de radiación como se describió anteriormente. La toxicidad celular se midió a los 1, 3, 5 y 7 días posteriores a la infección con el Kit de Proliferación Celular II (XTT), Roche como se ha descrito anteriormente.

25 Los resultados se exponen en la Tabla 26 a continuación. La eficacia de la citotoxicidad se expresa como viabilidad celular (sin muerte celular = 1), normalizada a ausencia de tratamiento. Como se muestra en la Tabla, LIVP 1.1.1 indujo una citotoxicidad significativamente mayor de las células glioblastoma-astrocitoma MG U-87 en comparación con el tratamiento con GLV-1h68 y GLV-1h164. El tratamiento de radiación no mejoró la citotoxicidad de LIVP 1.1.1 en las células U-87 MG, pero aumentó ligeramente la citotoxicidad de la cepa GLV-1h164.

30

Días p.i.	Sin tratamiento		GLV-1h68		GLV-1h164		LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
1	1,0000	0,0574	0,8888	0,0117	0,9222	0,0299	0,9513	0,0049

Tabla 26. Citotoxicidad en células de glioblastoma-astrocitoma humano U-87 MG

Días p.i.	Sin tratamiento		GLV-1h68		GLV-1h164		LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
3	1,2915	0,0576	1,2481	0,0606	1,2517	0,0627	0,9378	0,0596
5	1,3241	0,0453	1,2323	0,0354	1,1781	0,0236	0,2976	0,0230
7	1,2996	0,0578	1,1458	0,0232	1,0776	0,0593	0,0381	0,0286
Días p.i.	Sin Tratamiento + XRT		GLV-1h68 + XRT		GLV-1h164 + XRT		LIVP 1.1.1 + XRT	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
1	1,0098	0,0563	0,9070	0,0331	0,9187	0,0390	0,9238	0,0422
3	1,2655	0,0971	1,2116	0,0986	1,1948	0,0530	0,8634	0,0497
5	1,2957	0,0761	1,1931	0,0731	1,1212	0,0967	0,3476	0,0403
7	1,2240	0,0721	1,0459	0,0636	0,7943	0,0536	0,0491	0,0054

B. Citotoxicidad *in vitro* del producto aislado clonal LIVP 5.1.1

1. Células de carcinoma de pulmón humano A549

5 Las células de carcinoma de pulmón humano A549 (ATCC) se cultivaron en placas de 24 pocillos por cuadruplicado en medio F-12K y se infectaron con virus vaccinia GLV-1h68, producto aislado LIVP 5.1.1, PBS, GLV-1h68 + ST-246 5 µM, LIVP 5.1.1 + ST-246 5 µM o PBS + ST-246 5 µM a una MOI de 0,1 durante 24 horas a 37°C. La toxicidad celular se midió a las 24, 48 y 72 horas de la infección con el Kit de Proliferación Celular II (XTT), Roche como se ha descrito anteriormente.

10 Los resultados se presentan en la Tabla 27 a continuación, que establece el promedio de supervivencia celular y la desviación típica. La infección por el virus LIVP 5.1.1 resultó en una erradicación más eficaz de las células A549 en comparación con GLV-1h68 en cultivos celulares. La adición de 5 µM de ST-246 redujo la erradicación de las células A549 mediante LIVP 5.1.1 y GLV-1h68.

Tabla 27. Citotoxicidad en células de carcinoma pulmonar humano A549

hpi	PBS		GLV-1h68		LIVP 5.1.1	
	Promedio de supervivencia celular (%)	D. Típica	Promedio de supervivencia celular (%)	D. Típica	Promedio de supervivencia celular (%)	D. Típica
24	100	0,85	84,11	5,95	79,41	4,97
48	100	3,01	78,89	5,32	73,94	3,35
72	100	2,46	53,01	1,28	48,67	1,63
hpi	PBS + ST-246		GLV-1h68 + ST-246		LIVP 5.1.1+ ST-246	
	Promedio de supervivencia celular (%)	D. Típica	Promedio de supervivencia celular (%)	D. Típica	Promedio de supervivencia celular (%)	D. Típica
24	100,48	3,68	89,93	7,20	80,89	2,53
48	92,66	3,81	98,53	4,81	97,25	6,70
72	93,96	3,64	89,81	3,17	89,81	6,99

Ejemplo 7

20 Efectos de los Productos Aislados Clonales de LIVP sobre la Supervivencia y el Crecimiento Tumoral *In vivo*

A. Efectos de los Virus sobre Xenoinjertos de Carcinoma de Próstata Humano DU145

25 Se evaluaron los efectos *in vivo* de los productos aislados clonales LIVP 1.1.1, 2.1.1, 3.1.1, 4.1.1, 5.1.1, 6.1.1, 7.1.1 y 8.1.1 utilizando un modelo de ratón de cáncer de próstata humano. Para evaluar la seguridad y la eficacia antitumoral de los virus, a ratones macho carentes de sistema inmunitario (Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}; Harlan,

Indianapolis, Ind.; 4-5 semanas de edad) se les inyectaron por vía subcutánea (s.c. en el muslo lateral derecho $1,0 \times 10^7$ células en 100 μ L de PBS) células DU145 (ATCC Num. HTB-81; American Type Culture Collection (Manassas, VA)) para establecer los tumores. Trece días después de la implantación de las células tumorales, a grupos de ratones se les administraron mediante inyección retroorbital $7,0 \times 10^5$ pfu de productos aislados clonales LIVP 1.1.1, 2.1.1, 3.1.1, 4.1.1, 5.1.1, 6.1.1, 7.1.1 o 8.1.1, GLV-1h68, GLV-1h74, o LIVP de tipo salvaje (en 100 μ L de PBS) o PBS solo. El volumen del tumor (mm^3) se midió a los 13, 20, 27, 34, 41, 48, 55, 62 y 69 días de la inyección de células cancerosas.

El índice terapéutico para cada virus se calculó utilizando la fórmula: $\text{AUC}_{\text{sin tratar}} - \text{AUC}_{\text{virus}} / \text{AUC}_{\text{sin tratar}} * 100$. El área bajo la curva (AUC) para cada grupo analizado se calculó utilizando una gráfica del Cambio de la Mediana en el Volumen del Tumor (y) a lo largo del Tiempo (x). El AUC de los datos trazados para cada grupo se calculó utilizando la Regla del Trapezoide. Brevemente, para cada intervalo de tiempo (7 días), se utilizó la fórmula de $[(\text{Cambio de la Mediana en el Volumen del Tumor el último día de ese intervalo de tiempo}) + (\text{Cambio medio en el Volumen del Tumor el primer día de ese intervalo de tiempo}) / 2 * (\text{Tiempo entre el intervalo}) (7 \text{ días})]$ para calcular el AUC para ese intervalo de tiempo. El AUC total para cada línea trazada se calculó sumando las AUC para cada intervalo de tiempo (hasta el día 55 posterior a la implantación del tumor) y multiplicando por 7 (el primer intervalo de tiempo).

Para medir la toxicidad de los virus, se controló el peso corporal neto y la supervivencia de los ratones a lo largo de los experimentos. El peso corporal neto (gramos) se calculó restando el peso del tumor (volumen del tumor/1000) del peso total del animal. El peso resultante representa el peso del animal sin incluir el tumor.

Los resultados se exponen en las Tablas 28-31 a continuación. La Tabla 28 muestra la mediana de los volúmenes tumorales. La Tabla 29 muestra las AUC resultantes y los índices terapéuticos para cada virus. La Tabla 30 muestra los pesos corporales netos de los ratones. La Tabla 31 muestra los datos para el porcentaje de supervivencia de los ratones. LIVP 1.1.1, 5.1.1, 6.1.1 y GLV-1h68 fueron los menos tóxicos, y todos los ratones sobrevivieron durante los 57 días posteriores a la implantación de las células tumorales y mantuvieron el peso corporal. Todos los virus probados causaron una reducción en el crecimiento de células tumorales. Todos los productos aislados clonales de LIVP tuvieron un índice terapéutico más alto que el de GLV-1h68. Los productos aislados clonales LIVP 1.1.1, 5.1.1 y 6.1.1 mostraron una buena reducción del tumor sin ningún efecto secundario citotóxico.

Tabla 28. Efecto de virus sobre el crecimiento de células tumorales DU145

Días P.I.	Mediana del volumen tumoral (mm ³)											
	Cntrl	LIVP	GLV-1h68	GLV-1h74	LIVP 1.1.1	LIVP 2.1.1	LIVP 3.1.1	LIVP 4.1.1	LIVP 5.1.1	LIVP 6.1.1	LIVP 7.1.1	LIVP 8.1.1
13	310.53	401.55	359.25	417.96	340.98	316.19	376.74	357.25	318.64	394.49	337.45	308.71
20	542.95	716.99	703.68	714.83	625.09	673.36	702.89	619.56	755.90	661.43	683.98	599.12
27	905.67	844.70	1040.75	912.05	900.04	869.35	884.22	627.87	929.70	786.31	841.38	843.45
34	1315.76	884.35	1471.85	1127.25	1212.05	1100.26	904.64	521.95	992.20	930.47	824.45	933.40
41	1684.20	548.74	1672.22	1029.72	725.83	1087.58	735.20	369.54	910.59	871.98	829.83	659.79
48	2069.49	187.93	1771.80	836.15	452.00	781.16	462.60	216.87	574.26	868.82	434.97	580.20
55	2707.20	-	1781.31	579.40	414.80	703.28	410.24	121.92	494.33	773.04	461.73	313.47
62	-	-	1470.50	231.91	271.78	433.10	379.89	-	441.51	703.43	341.51	-
69	-	-	1442.53	-	224.68	395.51	-	-	373.15	716.12	310.75	-

Tabla 29. Índice terapéutico		
Tratamiento de virus	Área (AUC)	Índice terapéutico
Control	97261,37	
GLV-1h68	76041,38	21,82
GLV-1h74	30608,98	68,53
LIVP 1.1.1	32290,02	66,80
LIVP 2.1.1	48416,42	50,22
LIVP 3.1.1	23705,58	75,63
LIVP 4.1.1	6198,02	93,63
LIVP 5.1.1	40862,65	57,99
LIVP 6.1.1	29013,09	70,17
LIVP 7.1.1	28888,65	70,30
LIVP 8.1.1	32931,87	66,14

Tabla 30. Peso Corporal Neto												
Días P.I.	Peso Corporal Neto (g)											
	Cntrl	LIVP	GLV-1h68	GLV-1h74	LIVP 1.1.1	LIVP 2.1.1	LIVP 3.1.1	LIVP 4.1.1	LIVP 5.1.1	LIVP 6.1.1	LIVP 7.1.1	LIVP 8.1.1
13	25.85	28.61	26.44	28.71	28.67	26.97	26.75	28.96	27.38	28.30	27.84	29.90
20	27.25	27.97	27.11	27.57	28.42	27.45	25.60	28.94	26.59	28.45	27.80	31.46
27	28.72	27.47	28.72	29.05	28.57	27.40	25.28	29.97	27.67	29.36	28.32	32.60
34	28.51	26.24	28.18	28.99	29.33	27.52	25.65	27.81	28.04	29.62	28.18	30.72
41	28.78	24.39	28.54	27.66	30.57	28.61	29.56	25.39	30.14	30.25	27.28	29.39
48	29.15	23.69	29.12	27.76	30.58	29.18	28.91	21.01	29.59	30.28	25.33	27.65
55	28.27	-	28.96	27.30	30.74	28.83	26.94	18.68	30.31	30.33	25.16	27.09
62	-	-	29.28	31.69	31.26	27.31	22.40	-	30.70	31.77	23.23	-
69	-	-	29.09	-	30.36	26.84	-	-	30.50	31.58	22.36	-

Tabla 31. Tasa de supervivencia

Días P.I.	Tasa de supervivencia (%)											
	Control	LIVP	GLV-1h68	GLV-1h74	LIVP 1.1.1	LIVP 2.1.1	LIVP 3.1.1	LIVP 4.1.1	LIVP 5.1.1	LIVP 6.1.1	LIVP 7.1.1	LIVP 8.1.1
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
22	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
24	100	100	100	100	100	100	87,5	100	100	100	100	100
27	100	100	100	100	100	100	87,5	87,5	100	100	100	100
29	100	87,5	100	100	100	100	87,5	87,5	100	100	100	100
32	100	37,5	100	87,5	100	100	75	75	100	100	100	100
35	100	37,5	100	87,5	100	100	75	75	100	100	100	100
36	100	37,5	100	87,5	100	100	62,5	37,5	100	100	75	87,5
37	100	37,5	100	87,5	100	100	62,5	37,5	100	100	75	87,5
40	100	25	100	87,5	100	100	62,5	37,5	100	100	75	62,5
42	100	25	100	87,5	100	100	62,5	37,5	100	100	75	62,5
46	ND	0	100	75	100	100	62,5	12,5	100	100	62,5	37,5
48	ND	0	100	75	100	100	62,5	12,5	100	100	62,5	37,5
49	ND	0	100	50	100	87,5	62,5	12,5	100	100	50	37,5
51	ND	0	100	50	100	87,5	62,5	12,5	100	100	50	37,5
53	ND	0	100	50	100	75	37,5	12,5	100	100	50	37,5
55	ND	0	100	50	100	75	37,5	12,5	100	100	50	37,5
56	ND	0	100	50	100	62,5	25	0	100	100	37,5	25
57	ND	0	100	50	100	62,5	25	0	100	100	37,5	25

B. Efectos de los Virus sobre los Xenoinjertos de Carcinoma de Próstata Humano DU145 - Estudio de Dosificación

5 Se evaluaron los efectos *in vivo* de dosis crecientes de LIVP 1.1.1, 5.1.1 y 6.1.1 utilizando un modelo de ratón de cáncer de próstata humano. Para evaluar la seguridad y la eficacia antitumoral de dosis variables de los virus, a ratones macho carentes de sistema inmunitario (Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}; Harlan, Indianapolis, Ind.; 4-5 semanas de edad; n = 8 por grupo) se les inyectaron por vía subcutánea (s.c. en el muslo lateral derecho 6,0 x 10⁶ células en 100 µL de PBS) células DU145 (Núm. ATCC HTB-81; American Type Culture Collection (Manassas, VA)) para establecer los tumores. Trece días después de la implantación de las células tumorales, a grupos de ratones se les administraron mediante inyección retro-orbital productos aislados LIVP 1.1.1 (7,0 x 10⁵ pfu, 2,0 x 10⁶ pfu, o 1 x 10⁷ pfu), 5.1.1 (7,0 x 10⁵ pfu, 2,0 x 10⁶ pfu, o 1 x 10⁷ pfu), o 6.1.1 (7,0 x 10⁵ pfu, 2,0 x 10⁶ pfu, o 1 x 10⁷ pfu), GLV-1h68 (7,0 x 10⁵ pfu, 2,0 x 10⁶ pfu, o 1 x 10⁷ pfu) (en 100 µL de PBS) o PBS solo. El volumen del tumor (mm³) se midió a los 13, 20, 27, 34, 41, 48, 55, 62 y 69 días de la inyección de las células cancerosas. Las AUC, los índices terapéuticos y las tasas de supervivencia se calcularon como se ha descrito en el Ejemplo 7A anterior.

10 Los resultados se exponen en las Tablas 32-35 a continuación. La Tabla 32 muestra la mediana de los volúmenes del tumor. La Tabla 33 muestra las AUC resultantes y los índices terapéuticos para cada virus. La Tabla 34 muestra los pesos corporales netos de los ratones. La Tabla 35 muestra los datos para el porcentaje de supervivencia de los ratones. Se observó una disminución en el crecimiento del tumor DU145 después del tratamiento con todas las dosis de productos aislados LIVP 1.1.1, 5.1.1 y 6.1.1 y GLV-1h68. La dosificación a 2,0 x 10⁶ pfu dio como resultado el índice terapéutico más alto para todos los virus analizados. GLV-1h68 fue el más tóxico y LIVP 5.1.1 fue el menos tóxico, con los productos aislados LIVP 1.1.1 y 6.1.1 tienen una toxicidad similar.

25

Tabla 32. Efecto de los virus sobre el crecimiento de células tumorales DU145							
Días P.I.	Mediana del volumen del tumor (mm ³)						
	Control	GLV-1h68	GLV-1h68	GLV-1h68	LIVP 1.1.1	LIVP 1.1.1	LIVP 1.1.1
		7,0 × 10 ⁵ pfu	2,0 × 10 ⁶ pfu	1 × 10 ⁷ pfu	7,0 × 10 ⁵ pfu	2,0 × 10 ⁶ pfu	1 × 10 ⁷ pfu
13	137,88	133,26	127,12	144,92	132,08	133,63	113,99
20	209,81	179,84	202,99	216,54	221,05	225,09	148,72
27	340,88	308,68	413,51	437,14	437,75	371,71	229,08
34	584,44	401,53	621,92	563,89	384,37	210,39	274,99
41	1122,83	845,15	668,20	964,91	492,60	280,52	400,65
48	1392,76	1109,16	510,10	946,54	476,18	95,84	396,67
55	2319,05	1558,99	554,58	807,76	319,77	96,48	606,19
62	3653,76	1786,12	374,35	961,40	157,10	87,85	905,63
69	4195,73	2326,99	373,46	1306,21	202,46	125,84	1183,16
Días P.I.	Mediana del volumen del tumor (mm ³)						
	Control	LIVP 5.1.1	LIVP 5.1.1	LIVP 5.1.1	LIVP 6.1.1	LIVP 6.1.1	LIVP 6.1.1
		7,0 × 10 ⁵ pfu	2,0 × 10 ⁶ pfu	1 × 10 ⁷ pfu	7,0 × 10 ⁵ pfu	2,0 × 10 ⁶ pfu	1 × 10 ⁷ pfu
13	137,88	89,11	111,74	121,18	127,28	141,42	129,65
20	209,81	149,74	175,01	174,51	195,17	209,20	192,61
27	340,88	206,49	338,89	359,80	404,90	310,91	383,25
34	584,44	250,65	282,51	486,05	432,21	234,60	434,55
41	1122,83	452,46	434,56	711,99	482,08	409,16	660,49
48	1392,76	457,71	377,64	571,72	369,14	266,64	595,77
55	2319,05	624,11	388,76	576,55	292,66	434,63	583,47
62	3653,76	345,56	317,82	835,88	216,32	261,37	384,76
69	4195,73	361,94	418,24	1141,66	215,58	296,79	330,08

Tabla 33. Índice terapéutico		
Tratamiento de virus	Área	Índice terapéutico
Control	379803,91	
GLV-1h68 7,0 × 10 ⁵ pfu	233615,69	38,49
GLV-1h68 2,0 × 10 ⁶ pfu	99410,51	73,83
GLV-1h68 1 × 10 ⁷ pfu	150945,16	60,26
LIVP 1.1.1 7,0 × 10 ⁵ pfu	59340,59	84,38
LIVP 1.1.1 2,0 × 10 ⁶ pfu	15714,87	95,86
LIVP 1.1.1 1 × 10 ⁷ pfu	115997,02	69,46
LIVP 5.1.1 7,0 × 10 ⁵ pfu	109944,68	71,05
LIVP 5.1.1 2,0 × 10 ⁶ pfu	73946,59	80,53
LIVP 5.1.1 1 × 10 ⁷ pfu	136609,76	64,03
LIVP 6.1.1 7,0 × 10 ⁵ pfu	59503,93	84,33
LIVP 6.1.1 2,0 × 10 ⁶ pfu	42071,97	88,92

Tabla 33. Índice terapéutico		
Tratamiento de virus	Área	Índice terapéutico
LIVP 6.1.1 1×10^7 pfu	91749,06	75,84

Tabla 34. Peso corporal neto							
Días P.I.	Peso corporal neto						
	Control	GLV-1h68	GLV-1h68	GLV-1h68	LIVP 1.1.1	LIVP 1.1.1	LIVP 1.1.1
		$7,0 \times 10^5$ pfu	$2,0 \times 10^6$ pfu	1×10^7 pfu	$7,0 \times 10^5$ pfu	$2,0 \times 10^6$ pfu	1×10^7 pfu
13	33,74	31,14	33,27	29,86	28,55	31,11	30,23
20	32,91	31,04	32,50	28,98	27,13	30,45	29,64
27	33,40	30,87	31,59	28,46	26,06	30,03	30,64
34	32,13	29,59	31,03	25,76	24,83	31,68	30,44
41	31,50	28,79	31,36	26,98	25,71	32,39	30,66
48	31,15	29,18	32,47	26,00	25,92	32,97	30,58
55	30,44	28,36	31,98	28,19	23,93	32,94	30,37
62	30,21	28,27	32,57	28,09	25,00	33,53	31,32
69	29,75	27,81	32,65	27,92	25,42	32,99	31,52

Días P.I.	Peso corporal neto						
	Control	LIVP 5.1.1	LIVP 5.1.1	LIVP 5.1.1	LIVP 6.1.1	LIVP 6.1.1	LIVP 6.1.1
		$7,0 \times 10^5$ pfu	$2,0 \times 10^6$ pfu	1×10^7 pfu	$7,0 \times 10^5$ pfu	$2,0 \times 10^6$ pfu	1×10^7 pfu
13	33,74	31,27	28,10	30,13	30,29	32,39	30,13
20	32,91	30,48	27,33	29,08	29,55	31,90	29,82
27	33,40	32,31	27,18	28,67	30,83	33,69	29,99
34	32,13	33,05	27,92	28,48	31,00	34,07	30,17
41	31,50	31,18	29,73	28,80	32,42	34,09	30,74
48	31,15	31,52	29,35	30,25	32,93	32,90	31,22
55	30,44	31,54	30,22	30,83	30,81	36,11	28,74
62	30,21	33,25	29,28	31,13	27,80	ND	31,52
69	29,75	32,92	28,62	29,23	27,96	ND	31,84

Tabla 35. Tasa de supervivencia							
Días P.I.	Tasa de supervivencia (%)						
	Control	GLV-1h68	GLV-1h68	GLV-1h68	LIVP 1.1.1	LIVP 1.1.1	LIVP 1.1.1
		$7,0 \times 10^5$ pfu	$2,0 \times 10^6$ pfu	1×10^7 pfu	$7,0 \times 10^5$ pfu	$2,0 \times 10^6$ pfu	1×10^7 pfu
0	100	100	100	100	100	100	100
11	100	100	100	100	100	100	100
20	100	100	100	100	100	100	100
35	100	100	100	100	83	100	100
36	100	100	100	100	83	100	100
42	100	100	100	83	83	100	100
43	100	100	100	83	83	100	100

Tabla 35. Tasa de supervivencia							
Días P.I.	Tasa de supervivencia (%)						
	Control	GLV-1h68	GLV-1h68	GLV-1h68	LIVP 1.1.1	LIVP 1.1.1	LIVP 1.1.1
		7,0 x 10 ⁵ pfu	2,0 x 10 ⁶ pfu	1 x 10 ⁷ pfu	7,0 x 10 ⁵ pfu	2,0 x 10 ⁶ pfu	1 x 10 ⁷ pfu
45	100	100	80	83	83	100	100
49	100	100	80	83	83	100	100
52	100	100	80	83	50	100	83
55	100	100	80	83	50	100	83
Días P.I.	Tasa de supervivencia (%)						
	Control	LIVP 5.1.1	LIVP 5.1.1	LIVP 5.1.1	LIVP 6.1.1	LIVP 6.1.1	LIVP 6.1.1
		7,0 x a ⁵ pfu	2,0 x 10 ⁶ pfu	1 x 10 ⁷ pfu	7,0 x 10 ⁵ pfu	2,0 x 10 ⁶ pfu	1 x 10 ⁷ pfu
0	100	100	100	100	100	100	100
11	100	100	100	100	83	100	100
20	100	100	100	100	83	100	100
35	100	100	80	100	83	100	100
36	100	100	80	100	83	100	100
42	100	100	80	100	83	100	100
43	100	100	80	100	83	100	100
45	100	83	80	100	83	100	83
49	100	83	80	100	83	100	83
52	100	83	60	100	67	100	83
55	100	83	60	100	67	100	83

C. Efectos de LIVP 1.1.1 sobre Xenoinjertos de Carcinoma Esofágico Humano OE19

Se evaluaron los efectos *in vivo* de LIVP 1.1.1 utilizando un modelo de ratón de cáncer de esófago humano. Para evaluar la seguridad y la eficacia antitumoral de los virus, a ratones macho carentes de sistema inmunitario (Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}; Harlan, Indianapolis, Ind.; 4-5 semanas de edad; n = 5 por grupo) se les inyectaron por vía subcutánea (s.c. en el muslo lateral derecho 2,0 x 10⁶ células en 100 µL de PBS) células OE19 (Sigma Aldrich) para establecer los tumores. Trece días después de la implantación de las células tumorales (tamaño del tumor > 300 mm³), a los grupos de ratones (n = 5) se les administraron a través de inyección retroorbital 2,0 x 10⁶ pfu de producto aislado LIVP1.1.1, GLV-1h68, o GLV-1h164 (en 100 µL de PBS) o PBS solo. El volumen del tumor (mm³) se midió a los 13, 20, 27, 34, 41, 48, 55 y 62 días de la inyección de las células cancerosas.

Para medir la toxicidad de los virus, se controlaron el peso corporal neto y la supervivencia de los ratones en el transcurso de los experimentos. El peso corporal neto (gramos) se calculó restando el peso del tumor (volumen del tumor/1000) del peso total del animal. El peso resultante representa el peso del animal sin incluir el tumor.

Los resultados se exponen en las Tablas 36-38 a continuación. La Tabla 36 muestra la mediana de los volúmenes del tumor. La Tabla 37 muestra los pesos corporales netos de los ratones. La Tabla 38 muestra los datos para el porcentaje de supervivencia de los ratones. El producto aislado LIVP 1.1.1 fue más eficaz para reducir el crecimiento de las células tumorales OE19. Los ratones no tratados y los ratones tratados con GLV-1h68 se sacrificaron el día 35 debido al tamaño del tumor y/o problemas de salud. El tratamiento con GLV-1h64 y producto aislado LIVP 1.1.1 redujo el tamaño del tumor y la salud general y aumentó la tasa de supervivencia.

Tabla 36. Efecto de los virus sobre el crecimiento de células tumorales OE19				
Días P.I.	Mediana del volumen del tumor (mm ³)			
	Control	GLV-1h68	GLV-1h164	LIVP 1.1.1
13	248,75	147,45	160,48	153,66

Días P.I.	Mediana del volumen del tumor (mm ³)			
	Control	GLV-1h68	GLV-1h164	LIVP 1.1.1
20	1130,77	722,59	448,55	678,91
27	2270,11	1079,49	619,74	734,08
34	-	2089,88	822,56	710,78
41	-	3459,79	1151,27	1241,51
48	-	-	1920,09	1407,14
55	-	-	3029,65	2424,54
62	-	-	4350,53	3424,26

Días P.I.	Peso corporal neto (g)			
	Control	GLV-1h68	GLV-1h164	LIVP 1,1,1
13	27,70	27,15	30,11	25,86
20	24,58	25,18	27,95	21,49
27	22,78	19,57	26,76	24,29
34	-	25,06	27,59	28,21
41	-	24,49	26,95	26,72
48	-	-	24,88	24,97
55	-	-	25,02	23,78
62	-	-	25,05	23,03

Días P.I.	Tasa de supervivencia (%)			
	Control	GLV-1h68	GLV-1h164	LIVP 1.1.1
0	100	100	100	100
7	100	100	100	100
14	100	100	100	100
21	100	100	100	100
28	100	100	100	100
35	-	-	100	100
37	-	-	100	100
42	-	-	80	100
48	-	-	80	100
49	-	-	80	60

- = ratones muertos debido al tamaño del tumor y/o la salud de los ratones

D. Efectos de LIVP 1.1.1 en xenoinjertos de glioblastoma humano U-87 MG

5

se evaluaron los efectos *in vivo* de LIVP 1.1.1 utilizando un modelo de ratón de glioma humano. Para evaluar la seguridad y la eficacia antitumoral de los virus, a ratones macho carentes de sistema inmunitario (Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}; Harlan, Indianapolis, Ind.; 4-5 semanas de edad) se les inyectaron por vía subcutánea (s.c. en el

muslo lateral derecho $5,0 \times 10^6$ células en 100 μL de PBS) células de glioblastoma-astrocitoma U-87 (ATCC) para establecer los tumores. Catorce días después de la implantación de las células tumorales (tamaño del tumor $>200 \text{ mm}^3$), a los grupos de ratones ($n = 8$) se les administraron mediante inyección retro orbital $2,0 \times 10^6$ pfu de producto aislado LIVP 1.1.1 o GLV-1h68 (en 100 μL de PBS) o PBS solo. El volumen del tumor (mm^3) se midió a los -1, 2, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30, 34, 37, 41, 44, 48, 51 y 55 días de la inyección de las células cancerosas.

Para medir la toxicidad de los virus, se controlaron el peso corporal neto y la supervivencia de los ratones en el transcurso de los experimentos. El peso corporal neto (gramos) se calculó restando el peso del tumor (volumen del tumor/1000) del peso total del animal. El peso resultante representa el peso del animal sin incluir el tumor.

Los resultados de la mediana del volumen del tumor se proporcionan en la Tabla 39. El crecimiento del tumor, como se indica mediante el volumen fraccionario del tumor (V/Vo), se muestra en la Tabla 40. El peso corporal neto se muestra en la Tabla 41. El peso corporal neto se mantuvo estable para todos los animales El producto aislado LIVP 1.1.1 fue más eficaz para inhibir el crecimiento tumoral que GLV-1h68, que fue ligeramente mejor que el control.

Tabla 39. Efecto de los virus sobre el crecimiento de células tumorales U-87

Días P.I.	Mediana del volumen del tumor (mm^3)		
	Control	GLV-1h68	LIVP 1,1,1
-1	217,65	167,25	190,02
2	314,34	241,53	269,91
6	417,32	356,39	404,62
9	693,64	534,24	577,10
13	1080,09	916,43	728,24
16	1384,13	1198,12	798,15
20	1919,33	1892,81	742,00
23	2709,30	2390,18	758,81
27	-	2849,00	669,90
30	-	-	655,13
34	-	-	540,41
37	-	-	516,25
41	-	-	445,37
44	-	-	405,92
48	-	-	398,67
51	-	-	471,02
55	-	-	461,90

Tabla 40. Volumen fraccionario del tumor

Días P.I.	Volumen fraccionario del tumor (V/Vo)					
	Control		GLV-1h68		LIVP 1,1,1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
-1	1	0	1	0	1	0
2	1,65	0,52	1,37	0,22	1,60	0,56
6	2,24	1,05	2,19	0,39	2,81	0,70
9	3,87	1,91	3,63	1,05	4,18	1,62
13	6,13	2,63	5,68	1,24	4,93	2,06
16	8,41	3,56	7,26	1,42	5,08	1,88

Días P.I.	Volumen fraccionario del tumor (V/Vo)					
	Control		GLV-1h68		LIVP 1,1,1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
20	12,20	6,12	10,57	1,96	4,90	1,94
23	17,65	9,46	14,38	2,20	4,45	1,57
27	-	-	17,69	4,94	3,88	1,55
30	-	-	-	-	3,54	1,53
34	-	-	-	-	2,91	0,96
37	-	-	-	-	2,89	0,99
41	-	-	-	-	2,58	0,86
44	-	-	-	-	2,40	1,10
48	-	-	-	-	2,80	1,47
51	-	-	-	-	3,53	2,33
55	-	-	-	-	4,53	3,43

Días P.I.	Peso corporal neto (g)		
	Control	GLV-1h68	LIVP 1.1.1
-1	28,20	27,14	26,06
2	28,36	26,58	26,17
6	29,35	27,29	26,14
9	29,25	26,71	24,44
13	28,85	26,25	24,73
16	27,35	26,12	25,50
20	27,54	25,98	27,51
23	27,00	25,75	27,51
27	-	25,18	27,06
30	-	-	28,89
34	-	-	39,37
37	-	-	29,06
41	-	-	28,15
44	-	-	28,59
48	-	-	28,85
51	-	-	28,53
55	-	-	28,37

E. Efectos de LIVP 1.1.1 combinado con pre- y/o post-irradiación en xenoinjertos de glioblastoma humano U87

5

Se evaluaron los efectos *in vivo* de LIVP 1.1.1 utilizando un modelo de ratón de glioma humano. Los detalles experimentales se exponen en la Tabla 42 a continuación. Los tumores se establecieron en ratones carentes de sistema inmunitario inyectando a ratones macho carentes de sistema inmunitario (Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}; Harlan, Indianapolis, Ind.; 4-5 semanas de edad) por vía subcutánea (s.c. en el muslo lateral derecho 5,0 × 10⁶

5 células en 100 μ L de PBS) células de glioblastoma-astrocitoma MG U-87 (ATCC). Trece días después de la implantación de las células tumorales, se irradiaron varios grupos de ratones a 6 Gy o 3,5 Gy o no recibieron tratamiento. Catorce días después de la implantación de las células tumorales (tamaño del tumor >200 mm³), a los grupos de ratones se les administraron mediante inyección retroorbital $2,0 \times 10^6$ pfu de producto aislado LIVP 1.1.1 o GLV-1h68 (en 100 μ L de PBS) o PBS solo. Un día después de la inyección del virus, varios grupos de ratones se irradiaron a 6 Gy o 3,5 Gy o no recibieron tratamiento. El volumen del tumor (mm³) se midió a los -1, 3, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30, 34, 37, 41 y 44 días de la inyección de las células cancerosas. La distribución viral de LIVP 1.1.1 en órganos sanos se evaluó midiendo el título viral (pfu) los días 3 y 7 después de la infección.

Tabla 42. Diseño experimental.

Grupo	Día 1	Día 0	Día +1
	Pre-irradiación	Virus	Post-irradiación
1 (n = 14)	Ninguna	Tampón	Ninguna
2 (n = 19)	Ninguna	GLV1h68	Ninguna
3 (n = 19)	Ninguna	LIVP 1.1.1	Ninguna
4 (n = 15)	6 Gy	Tampón	Ninguna
5 (n = 19)	6 Gy	LIVP 1.1.1	Ninguna
6 (n = 19)	Ninguna	LIVP 1.1.1	6 Gy
7 (n = 9)	3,5 Gy	Tampón	3,5 Gy
8 (n = 19)	3,5 Gy	LIVP 1.1.1	3,5 Gy

10 Los datos se exponen en las Tablas 43-50 a continuación. Las Tablas 43 y 44 muestran la mediana del volumen del tumor y el crecimiento del tumor, como se indicó mediante el volumen fraccionario del tumor (V/Vo), para LIVP 1.1.1 y GLV-1h68. Las Tablas 45 y 46 muestran la mediana del volumen del tumor y el crecimiento del tumor, como se indicó mediante el volumen fraccionario del tumor (V/Vo), para la radiación LIVP 1.1.1 y 6 Gy. Las Tablas 47 y 48

15 muestran la mediana del volumen del tumor y el crecimiento del tumor, como se indicó mediante el volumen fraccionario del tumor (V/Vo), para la radiación LIVP 1.1.1 y 3,5 Gy. El peso corporal neto se muestra en la Tabla 49. La Tabla 50 muestra la distribución viral de LIVP 1.1.1 en órganos sanos.

20 El producto aislado LIVP 1.1.1 y GLV-1h68 redujeron el crecimiento del tumor a partir de los 20 días posteriores a la inyección. El tratamiento con radiación de 6 Gy produjo un ligero retraso en el crecimiento del tumor. El tratamiento con radiación de 6 Gy, ya sea antes o después de la administración de LIVP 1.1.1, dio como resultado una disminución significativa en el crecimiento del tumor. El tratamiento con dos dosis de radiación a 3,5 Gy retrasó el crecimiento del tumor durante 3 días, pero no inhibió el crecimiento. El tratamiento con radiación de 3,5 Gy 1 día antes y 1 día después de la administración de LIVP 1.1.1 produjo una disminución significativa en el crecimiento del

25 tumor. El peso corporal neto se mantuvo estable para todos los animales.

Tabla 43. Efecto de los virus en el crecimiento de células tumorales U-87

Días P.I.	Mediana del volumen del tumor (mm ³)		
	Control	GLV-1h68	LIVP 1.1.1
-1	282,62	218,20	201,54
3	389,25	337,59	299,00
6	676,87	601,70	498,08
9	1005,43	926,39	976,54
13	1454,11	1303,12	1339,52
16	2099,87	1885,29	1793,33
20	2477,95	1704,78	1524,16
23	-	1564,34	1060,80
27	-	1601,44	896,19
30	-	1277,86	496,16

Tabla 43. Efecto de los virus en el crecimiento de células tumorales U-87

Días P.I.	Mediana del volumen del tumor (mm ³)		
	Control	GLV-1h68	LIVP 1.1.1
34	-	856,15	443,30
37	-	615,19	286,49
41	-	650,75	340,59
44	-	571,47	310,05

Tabla 44. Volumen fraccionario del tumor.

Días P. I.	Volumen fraccionario del tumor (V/Vo)					
	Control		GLV-1h68		LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
-1	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
3	1,43	0,10	1,44	0,13	1,60	0,24
6	2,29	0,31	2,78	0,52	2,70	0,63
9	3,85	0,58	4,41	0,77	4,58	1,09
13	5,93	0,93	5,99	1,24	6,31	1,80
16	8,60	1,08	8,53	2,44	7,94	1,74
20	10,36	1,84	9,38	3,84	8,59	3,38
23	-	-	7,94	4,15	7,02	4,18
27	-	-	8,04	4,55	6,61	4,47
30	-	-	6,83	4,16	5,76	4,99
34	-	-	5,86	4,34	5,39	5,25
37	-	-	5,17	4,68	5,10	5,45
41	-	-	5,43	4,68	5,19	5,40
44	-	-	5,31	4,90	5,21	5,40

Tabla 45. Efecto del virus y la radiación en el crecimiento de células tumorales U-87

Días P.I.	Mediana del volumen del tumor (mm ³)				
	Control	LIVP 1.1.1	Pre 6 Gy	Pre 6 Gy + LIVP 1.1.1	LIVP 1.1.1 + Post 6 Gy
-1	282,62	201,54	193,94	197,06	186,81
3	389,25	299,00	265,61	205,24	255,55
6	676,87	498,08	303,60	269,70	292,92
9	1005,43	976,54	504,60	350,75	394,09
13	1454,11	1339,52	762,78	444,94	456,80
16	2099,87	1793,33	987,89	435,18	513,99
20	2477,95	1524,16	1422,37	381,88	450,66
23	-	1060,80	1934,53	240,03	310,46
27	-	896,19	2256,58	213,44	351,07
30	-	496,16	2601,16	209,38	287,27
34	-	443,30	-	199,26	351,88

Días P.I.	Mediana del volumen del tumor (mm ³)				
	Control	LIVP 1.1.1	Pre 6 Gy	Pre 6 Gy + LIVP 1.1.1	LIVP 1.1.1 + Post 6 Gy
37	-	286,49	-	156,98	229,69
41	-	340,59	-	219,40	267,09
44	-	310,05	-	168,09	261,81

Tabla 46. Volumen fraccionario del tumor

Días P.I.	Volumen fraccionario del tumor (V/Vo)									
	Control		LIVP 1.1.1		Pre 6 Gy		Pre 6 Gy + LIVP 1.1.1		LIVP 1.1.1 + Post 6 Gy	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
-1	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
3	1,43	0,10	1,60	0,24	1,29	0,40	1,12	0,17	1,46	0,43
6	2,29	0,31	2,70	0,63	1,38	0,32	1,36	0,31	1,69	0,46
9	3,85	0,58	4,58	1,09	2,48	0,46	1,98	0,82	2,20	0,37
13	5,93	0,93	6,31	1,80	3,50	0,71	2,23	0,87	2,77	0,62
16	8,60	1,08	7,94	1,74	5,37	1,94	2,64	1,68	3,03	0,87
20	10,36	1,84	8,59	3,38	6,95	2,98	2,35	1,97	2,89	0,96
23	-	-	7,02	4,18	9,99	3,63	1,81	1,82	2,17	1,02
27	-	-	6,61	4,47	11,62	3,55	1,78	1,66	2,21	1,31
30	-	-	5,76	4,99	12,91	3,58	1,57	1,46	1,91	1,08
34	-	-	5,39	5,25	-	-	1,51	1,82	1,95	0,91
37	-	-	5,10	5,45	-	-	1,57	1,93	1,52	0,79
41	-	-	5,19	5,40	-	-	1,66	2,10	1,76	1,08
44	-	-	5,21	5,40	-	-	1,65	2,10	2,03	1,91

Tabla 47. Efecto del virus y la radiación sobre el crecimiento de células tumorales U-87

Días P.I.	Mediana del volumen del tumor (mm ³)			
	Control	LIVP 1.1.1	2x3,5 Gy	2x3,5 Gy + LIVP 1.1.1
-1	282,62	201,54	119,95	206,39
3	389,25	299,00	200,08	196,47
6	676,87	498,08	164,22	286,70
9	1005,43	976,54	246,96	305,94
13	1454,11	1339,52	437,06	321,30
16	2099,87	1793,33	610,43	346,08
20	2477,95	1524,16	957,34	366,04
23	-	1060,80	1153,35	246,24
27	-	896,19	1428,65	243,84
30	-	496,16	2032,37	189,22
34	-	443,30	-	189,00

Días P.I.	Mediana del volumen del tumor (mm ³)			
	Control	LIVP 1.1.1	2x3,5 Gy	2x3,5 Gy + LIVP 1.1.1
37	-	286,49	-	210,47
41	-	340,59	-	171,00
44	-	310,05	-	153,12

Días P.I.	Volumen fraccionario del tumor (V/Vo)							
	Control		LIVP 1.1.1		2x3,5 Gy		2x3,5 Gy + LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
-1	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
3	1,43	0,10	1,60	0,24	1,34	0,20	1,01	0,28
6	2,29	0,31	2,70	0,63	1,32	0,13	1,34	0,39
9	3,85	0,58	4,58	1,09	1,88	0,18	1,64	0,47
13	5,93	0,93	6,31	1,80	3,20	0,42	1,88	0,44
16	8,60	1,08	7,94	1,74	5,21	0,37	2,27	1,11
20	10,36	1,84	8,59	3,38	7,38	1,90	2,32	2,24
23	-	-	7,02	4,18	9,95	0,47	2,72	4,44
27	-	-	6,61	4,47	11,93	0,95	2,95	5,32
30	-	-	5,76	4,99	14,31	1,38	2,83	5,37
34	-	-	5,39	5,25	-	-	2,79	5,39
37	-	-	5,10	5,45	-	-	2,70	5,43
41	-	-	5,19	5,40	-	-	2,69	5,43
44	-	-	5,21	5,40	-	-	2,65	5,45

Días		Peso corporal neto (g)						
PI.	Control	GLV-1h68	LIVP 1.1.1	Pre 6 Gy	Pre 6 Gy + LIVP 1.1.1	LIVP 1.1.1 + Post 6 Gy	2x3,5 Gy	2x3,5 Gy + LIVP 1.1.1
-1	27,94	29,49	28,90	27,27	30,14	28,02	28,48	29,26
6	28,45	28,63	28,52	28,28	30,84	25,58	26,72	28,33
12	28,27	28,98	26,82	28,74	32,37	26,76	28,81	29,16
19	27,26	28,93	26,80	27,83	30,81	28,25	28,53	30,16
26	-	29,47	29,59	26,88	33,21	27,13	27,05	29,32
33	-	29,88	29,77	-	32,72	26,36	-	27,84
40	-	28,98	28,69	-	31,34	26,18	-	26,53

Tabla 50. Distribución viral de LIVP 1.1.1 en órganos sanos a los días 3 y 7 después de la infección

Día 3	pfu/hígado	pfu/pulmones	pfu/bazo	pfu/cerebro
Control	0	0	0	0
GLV-1h68	0	0	0	0
LIVP 1.1.1	0	0	0	0
Pre 6 Gy	0	0	0	0
Pre 6 Gy + LIVP 1.1.1	0	0	0	10,6 ± 30,1
LIVP 1.1.1 + Post 6 Gy	0	0	0	0
2x3,5 Gy	0	0	0	0
2x3,5 Gy + LIVP 1.1.1	0	59,5 ± 168	0	0
Día 7	pfu/hígado	pfu/pulmones	pfu/bazo	pfu/cerebro
Control	0	0	0	0
GLV-1h68	0	0	8,5 ± 24,0	0
LIVP 1.1.1	0	0	54,4 ± 130	0
Pre 6 Gy	0	0	0	0
Pre 6 Gy + LIVP 1.1.1	0	126 ± 355	8,38 ± 23,7	0
LIVP 1.1.1 + Post 6 Gy	0	0	0	0
2x3,5 Gy	0	0	0	0
2x3,5 Gy + LIVP 1.1.1	0	0	0	0

F. Efectos de LIVP 1.1.1 combinado con pre-irradiación en aloinjertos de melanoma de ratón

5 Se evaluaron los efectos *in vivo* de LIVP 1.1.1 utilizando un modelo de melanoma de ratón aloinjerto. Los detalles experimentales se exponen en la Tabla 51 a continuación. Los tumores se establecieron en ratones C57BL/6 inyectando células de melanoma de ratón B16-F10 (ATCC) por vía subcutánea (s.c. en el muslo lateral derecho 2,0 × 10⁵ células en 100 µL de PBS) a ratones hembra (Harlan). Trece días después de la implantación de las células tumorales, varios grupos de ratones se irradiaron a 6 Gy o 4 Gy o no recibieron tratamiento. Catorce días después de la implantación de las células tumorales (tamaño del tumor >200 mm³), a los grupos de ratones se les administraron mediante inyección retroorbital 5,0 × 10⁷ pfu de producto aislado LIVP 1.1.1 o GLV-1h68 (en 100 µL de PBS) o PBS solo. Varios grupos de ratones recibieron una dosis adicional de radiación de 4 Gy a los 1, 6 y 8 días de la inyección del virus o no recibieron tratamiento. El volumen del tumor (mm³) se midió a los -1, 2, 6, 8, 13, 16 y 20 días de la inyección de las células cancerosas.

Tabla 51. Diseño experimental.

Grupo	Día -1 Pre-Irradiación	Día 0 Virus	Día +1 Post-Irradiación	Día +6 Post-Irradiación	Día +8 Post-Irradiación
1 (n = 8)	Ninguna	Tampón	Ninguna	Ninguna	Ninguna
2 (n = 8)	Ninguna	LIVP 1.1.1	Ninguna	Ninguna	Ninguna
3 (n = 8)	6 Gy	Tampón	Ninguna	Ninguna	Ninguna
4 (n = 8)	6 Gy	LIVP 1.1.1	Ninguna	Ninguna	Ninguna
5 (n = 8)	4 Gy	Tampón	4 Gy	4 Gy	4 Gy
6 (n = 8)	4 Gy	LIVP 1.1.1	4 Gy	4 Gy	4 Gy

20 Los resultados del volumen promedio del tumor se proporcionan en la Tabla 52. El volumen fraccionario del tumor (V/V₀) se muestra en la Tabla 53. La Tabla 54 muestra el tiempo medio para que el tumor alcance un volumen fraccionario del tumor de 50 (FTV de 50). Un FTV de 50 corresponde a un volumen del tumor entre 3750 mm³ y 5000 mm³, un punto final en el que los ratones deben retirarse del experimento. El tratamiento con LIVP 1.1.1

ES 2 733 211 T3

produjo una ligera disminución en el volumen del tumor en las células tumorales B16-F10. El tratamiento con radiación de 6 Gy y LIVP 1.1.1 fue similar al tratamiento con solo 6 Gy de radiación, y dio como resultado un retraso de aproximadamente 7 días en el tiempo para alcanzar un volumen fraccionario de tumor de 50. El tratamiento con cuatro dosis de radiación de 4 Gy y LIVP 1.1.1 redujo el volumen del tumor y retrasó el tiempo medio para alcanzar un FTV de 50 a 14 días.

5

Días P.I.	Volumen promedio del tumor (mm ³)					
	Control	LIVP 1.1.1	Pre 6 Gy	Pre 6 Gy + LIVP 1.1.1	4x4 gy	4x4 Gy + LIVP 1.1.1
-1	115,97	82,94	100,82	87,88	85,25	91,30
2	428,15	276,92	235,30	197,59	215,81	233,50
6	2011,62	1257,80	579,50	508,44	767,77	590,66
9	3885,49	2828,71	1138,79	1018,95	1143,95	724,69
13	-	-	2116,73	2409,16	1568,72	963,13
16	-	-	3774,90	4145,31	2183,43	1326,86
20	-	-	-	-	3595,91	2636,58

Tabla 53. Volumen tumoral fraccionario												
Volumen tumoral fraccionario (V/Vo)												
Días P.I.	Cntrl		LIVP 1.1.1		Pre 6 Gy		Pre 6 Gy + LIVP 1.1.1		4x4 Gy		4x4 Gy + LIVP 1.1.1	
	Prom.	D. Típica	Prom.	D. Típica	Prom.	D. Típica	Prom.	D. Típica	Prom.	D. Típica	Prom.	D. Típica
-1	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
2	4.51	3.00	3.91	1.44	2.80	1.51	2.73	1.84	3.06	1.55	2.54	0.49
6	23.91	19.51	17.87	10.58	6.61	4.08	63.87	4.41	9.64	4.53	6.21	2.12
9	49.81	45.78	45.66	29.80	12.69	7.98	14.75	12.52	16.61	10.60	7.45	2.60
13	-	-	-	-	22.76	11.41	35.81	30.67	21.90	12.78	10.68	4.81
16	-	-	-	-	50.15	40.13	64.76	63.82	34.77	28.41	14.93	4.67
20	-	-	-	-	-	-	-	-	51.32	31.32	30.70	11.4

Grupo	Días para FTV = 50	Tiempo de retraso (días)
Control	8,40	-
LIVP 1.1.1	8,94	0,54
Pre 6 Gy	15,76	7,36
Pre 6 Gy + LIVP 1.1.1	14,41	6,01
4x4 gy	17,17	8,77
4x5 Gy + LIVP 1.1.1	22,37	13,97

G. Efectos de LIVP 5.1.1 sobre xenoinjertos de carcinoma de pulmón humano A549

5 Se evaluaron los efectos *in vivo* de LIVP 5.1.1 adicionalmente utilizando un modelo de ratón de cáncer de pulmón humano. Los tumores se establecieron en ratones carentes de sistema inmunitario mediante la inyección de células A549 (ATCC) por vía subcutánea (s.c. en el muslo lateral derecho $5,0 \times 10^6$ células en 100 μ L de PBS) en ratones hembra carentes de sistema inmunitario (Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}; Harlan, Indianapolis, Ind.; 6-8 semanas de edad). Diecisiete días después de la implantación de las células tumorales (tamaño del tumor $>250 \text{ mm}^3$), a los

10 grupos de ratones se les administraron mediante inyección retroorbital $5,0 \times 10^6$ pfu de LIVP 5.1.1, GLV-1h68 (en 100 μ L de PBS), LIVP 1.1.1 + ST-246 2,5 μ M, GLV-1h68 + ST-246 2,5 μ M o PBS solo. El volumen del tumor (mm^3) se midió dos veces a la semana después de la inyección de las células cancerosas. Los ratones se sacrificaron 42 días después de la implantación y se determinaron los títulos virales en tumores y órganos mediante técnicas convencionales.

15 Los resultados de la mediana del volumen del tumor se proporcionan en la Tabla 55. El peso corporal promedio se establece en la Tabla 56. Los títulos virales en tumores y órganos se exponen en la Tabla 57 a continuación, que enumera el título viral en pfu/gramo de tejido para tumor, hígado, bazo, riñones, corazón, pulmón, suero y cerebro. Todos los ratones tratados con virus mostraron una reducción significativa del tumor en comparación con los

20 controles de PBS. La regresión tumoral de los animales inyectados con LIVP 5.1.1 aumentó algo en comparación con GLV-1h68. La adición de ST-246 2,5 μ M, un agente antiviral, además de LIVP 5.1.1 o GLV-1h68 disminuyó la capacidad de cada virus para reducir el tamaño del tumor, pero la reducción del tumor fue mayor que el tratamiento con PBS solo. GLV-1h68 fue ligeramente tóxico para los ratones, como lo demuestra una disminución en el peso corporal promedio. La adición de ST-246 redujo la toxicidad en ratones tratados con GLV-1h68. GLV-1h68 y el

25 producto aislado LIVP 5.1.1 se identificaron principalmente en el tejido tumoral, conteniendo también partículas virales el cerebro y el hígado.

Días P.I.	Mediana del volumen del tumor (mm^3)				
	Control	GLV-1h68	GLV-1h68 + ST-246	LIVP 5.1.1	LIVP 5.1.1 + ST-246
0	300,76	212,85	260,87	248,78	237,46
3	380,01	268,56	348,60	322,92	317,19
6	556,31	410,55	449,24	463,79	438,08
10	828,03	570,49	665,71	652,10	670,91
13	1029,32	631,23	860,09	720,54	930,68
17	1168,51	753,82	1270,42	855,82	1092,80
24	1849,77	779,68	2035,14	761,49	1690,93
27	1952,72	653,42	2641,25	672,55	1757,43
31	2261,62	593,72	2616,03	491,55	1660,64
34	2402,29	526,83	2277,73	428,70	1295,18
38	2876,76	452,59	2081,42	381,56	1169,51
42	3201,92	364,17	1725,74	315,42	1014,24

Días P.I.	Peso corporal promedio (g)				
	Control	GLV-1h68	GLV-1h68 + ST-246	LIVP 5.1.1	LIVP 5.1.1 + ST-246
0	23,80	23,43	24,38	24,45	23,60
3	24,28	22,68	23,90	23,90	22,98
6	24,33	23,88	24,10	23,85	23,60
10	24,90	23,80	23,75	24,20	23,45
13	25,05	24,60	24,95	24,50	23,93
17	26,58	24,18	25,43	25,13	24,15
24	27,13	21,93	26,75	26,00	25,35
27	27,55	21,78	27,38	25,90	25,15
31	28,15	21,88	27,80	26,35	26,38
34	29,18	21,93	27,60	26,40	26,25
38	29,95	21,85	27,40	25,60	25,90
42	29,98	21,28	27,63	26,95	26,25

	GLV-1h68		GLV-1h68 + ST-246		LIVP 5.1.1		LIVP 5.1.1 + ST-246	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
tumor	1,33E + 08	6,65E + 07	1,02E + 08	3,39E + 07	9,50E + 07	4,67E + 07	2,10E + 08	1,30E + 08
hígado	53,33	61,10	10,00	20,00	10,00	20,00	300,00	120,00
bazo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	70,00	140,00
riñones	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
corazón	0,00	0,00	10,00	20,00	0,00	0,00	0,00	0,00
pulmón	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8500,00	17000,00
siero	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
cerebro	133,33	230,94	410,00	451,81	140,00	280,00	260,00	337,05

Ejemplo 8

5 Generación de imágenes de LIVP 5.1.1 y GLV-1H68 en células y tumores A549

A. Morfología de la placa en células de carcinoma de pulmón A459

La morfología de la placa en células de carcinoma de pulmón A549 se determinó mediante tinción con un anticuerpo contra vaccinia y Hoechst. Se cultivaron células humanas de carcinoma de pulmón A549 en medios RPMI-1640 que contenían FCS al 10% y Penicilina/Estreptomocina al 1%. Las células A549 se sembraron en cubreobjetos en placas de 24 pocillos. A una confluencia del 100%, las células se infectaron con 50 pfu/pocillo de GLV-1h68 o producto aislado LIVP 5.1.1. Tres días de la infección (dpi), las células se fijaron con 500 µl de PFA al 4% durante 10 minutos y se lavaron 3 veces con 1x PBS. Para el bloqueo y la permeabilización, las células se incubaron durante 15 minutos con 500 µl de solución de bloqueo (1x PBS/FCS al 5%/Triton-X 100 al 0,1%) por pocillo. Se añadió anticuerpo policlonal de conejo contra el virus vaccinia (diluido 1:500 en solución de bloqueo, (ab35219, abcam)) y las células se incubaron durante la noche a 4°C en un agitador. Posteriormente, las placas de ensayo se lavaron 3 veces con 1x PBS. Para el bloqueo y la permeabilización, las células se incubaron durante 15 minutos con 500 µL de 1x PBS/FCS al 5%/Triton-X100 al 0,1% por pocillo. Se añadieron anticuerpo secundario (Anti-IgG de Conejo AffiniPure conjugado con Cy2, diluido 1:200 en solución de bloqueo (711-225-152, Jackson ImmunoResearch) y Hoechst (Hoechst 33258 diluido 1:400 (861405, Sigma Aldrich)) y se incubaron durante 45 minutos. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con 1x PBS y los cubreobjetos se encajaron en las placas de ensayo. Los resultados muestran un aumento del tamaño de la placa en las células infectadas con LIVP 5.1.1 en comparación con las células infectadas con GLV-1h68.

25 B. Tinción de inmunofluorescencia de tumores A549

Los tumores se establecieron en ratones carentes de sistema inmunitario mediante la inyección de células A549 (ATCC) por vía subcutánea (s.c. en el muslo lateral derecho $5,0 \times 10^6$ células en 100 μ L de PBS) en ratones hembra carentes de sistema inmunitario (Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}; Harlan, Indianapolis, Ind.; 6-8 semanas de edad). Diecisiete (17) días después de la implantación de las células tumorales (tamaño del tumor $>250 \text{ mm}^3$), a los ratones se les administraron mediante inyección en la vena de la cola $5,0 \times 10^6$ pfu de LIVP 5.1.1, GLV-1h68 (en 100 μ l de PBS) o PBS solo. Los ratones se sacrificaron 42 días después de la implantación y los tumores se recogieron y se congelaron. Los tumores congelados se fijaron durante la noche en PFA al 4% a 4°C en un agitador. Los tumores se lavaron 5 veces durante 30 minutos con 1x PBS. Los tumores se redujeron a la mitad y se incluyeron en agarosa al 5% de bajo punto de fusión en 1x PBS en placas de 6 pocillos. Se prepararon secciones en agarosa (100 μ m) con un vibrátomo y se transfirieron directamente a placas de 48 pocillos con 1x PBS. Para la tinción, las secciones se bloquearon y se permeabilizaron durante 1 h con 500 μ l de solución de bloqueo (1xPBS/Triton-X 100 al 0,2%/FCS al 5%) por pocillo. Los anticuerpos primarios se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en un agitador. Los anticuerpos primarios incluyeron un anticuerpo policlonal de conejo contra el virus vaccinia (diluido 1:100 en solución de bloqueo, (ab35219, abcam)) y un anticuerpo de rata anti-MHC de Clase II de ratón (diluido 1:200 en solución de bloqueo, (14-5321-85, eBioscience)). Después de lavar 3 veces con 1x PBS, se añadieron anticuerpos secundarios y Hoechst 33258 (diluido 1:400 en solución de bloqueo) y se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente en un agitador. Los anticuerpos secundarios incluyen Anti-IgG de Conejo de AffiniPure conjugado con Cy2 (diluido 1:200 en solución de bloqueo (711-225-152, Jackson ImmunoResearch)), Anti-IgG de Rata de burro AffiniPure conjugado con Cy3 (diluido 1:200 en solución de bloqueo (712-165-153, Jackson ImmunoResearch)). Los tumores se lavaron 3 veces con 1x PBS y se incluyeron en Moviol. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la propagación viral o la atracción o localización inmunológica de las células entre los tumores infectados con GLV-1h68 y LIVP 5.1.1.

25 **Ejemplo 9**

Efectos de LIVP 1.1.1 sobre el sarcoma de tejido blando canino en un modelo de ratón con xenoinjerto

En este ejemplo, se examinaron los efectos terapéuticos de LIVP 1.1.1 y GLV-1h68 en el sarcoma de tejido blando canino en un modelo de ratón con xenoinjerto.

A. Materiales y métodos

1. Cultivo celular

Se obtuvieron fibroblastos de riñón de mono verde africano (CV-1) de la American Type Culture Collection (ATCC). Morris (MTH52c) se obtiene a partir de un sarcoma de tejido blando [Any MacNeill, datos no publicados]. Las células se cultivaron en DMEM complementado con solución de antibiótico (100 U/ml de penicilina G, 100 unidades/ml de estreptomycin) y suero bovino fetal al 10% (FBS; Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) para CV-1 y FBS al 20% para MTH52c a 37°C en CO₂ al 5%.

2. Cepas de virus

Se emplearon las cepas de vaccinia GLV-1h68 y LIVP 1.1.1 para este estudio y se describen en el Ejemplo 1.

3. Ensayo de viabilidad celular

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Después de 24 h en cultivo, las células se infectaron con LIVP 1.1.1 y GLV-1h68, utilizando multiplicidades de infección (MOI) de 0,1 y 1,0. Las células se incubaron a 37°C durante 1 h, el medio de infección se eliminó y posteriormente las células se incubaron en medio de crecimiento de nueva aportación. La cantidad de células viables después de la infección se midió utilizando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma, Taufkirchen, Alemania). A las 24, 48, 72 o 96 horas de la infección, el medio se reemplazó por 0,5 mL de solución de MTT a una concentración de 2,5 mg/ml de MTT disuelto en RPMI 1640 sin rojo fenol y se incubó durante 2 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Después de eliminar la solución de MTT, la reacción de color se detuvo añadiendo HCl 1 N diluido en isopropanol. La densidad óptica se midió a una longitud de onda de 570 nm. Las células no infectadas se utilizaron como referencia y se consideraron viables en 100%.

4. Replicación viral *in vitro*

Para el ensayo de replicación viral, las células cultivadas en placas de 24 pocillos se infectaron con LIVP 1.1.1 y GLV-1h68 a una MOI de 0,1. Después de una hora de incubación a 37°C con agitación suave cada 20 minutos, se eliminó el medio de infección y se reemplazó por un medio de crecimiento de nueva aportación. Después de 1, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas, se recolectaron las células y los sobrenadantes. Después de tres ciclos de congelación y descongelación, las diluciones en serie de los productos lisados se titularon mediante ensayos de placas

convencionales en células CV-1. Todas las muestras se midieron por triplicado.

5. Análisis de Transferencia Western

5 Tres días antes de la infección, las células Morris se sembraron en placas de 24 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania). Si no se indica lo contrario, la capa de células confluentes al 90% se infectó de forma simulada o se infectó con LIVP 1.1.1 o GLV-1h68 a una MOI de 1,0 durante 1 hora a 37°C. El medio que contenía el virus se aspiró y se reemplazó por medio de nueva aportación que contenía FBS al 20%. Para el aislamiento y la detección de proteínas, las células se recolectaron y se resuspendieron en tampón de muestra de dodecilsulfato de sodio (SDS) a 10 10 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la infección (hpi). Las muestras de proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 10% (PE) y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Whatman GmbH, Dassel, Alemania). A continuación, la membrana se incubó con anticuerpos monoclonales de ratón anti-beta actina (ab6276, Abcam, Cambridge, Reino Unido) o anticuerpo policlonal de conejo anti-virus vaccinia (anti-VACV) (Abcam, Cambridge, Reino Unido), y la detección se realizó utilizando anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano picante contra ratones (ab6728, Abcam, Cambridge, Reino Unido) o conejos (ab6721, Abcam, Cambridge, Reino Unido) seguido de quimioluminiscencia mejorada.

6. Generación de imágenes de fluorescencia

20 Las señales de GFP de células y animales infectados con virus se analizaron con un microscopio de fluorescencia (Leica DM IRB; Wetzlar, Alemania) y un estereomicroscopio de fluorescencia (Leica MZ 16 FA; Wetzlar, Alemania), respectivamente. Las imágenes se capturaron con una cámara electrónica y se procesaron con META-MORPH (Universal Imaging; Downingtown, PA, EE.UU.) y Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA, EE.UU.).

7. Terapia mediada por el virus vaccinia de xenoinjertos de Morris

Los tumores se generaron implantando 1 x 10⁶ células en 100 µl de PBS subcutáneamente en la pata trasera derecha de ratones hembra carentes de sistema inmunitario de 6 a 8 semanas de edad (NCI/Hsd/Athymic Nude-Foxn1nu, Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Alemania). El crecimiento del tumor se controló semanalmente en dos dimensiones utilizando un calibre digital. El volumen del tumor se calculó como [(largo x ancho²)/2]. El día 28, se inyectó en la vena de la cola (i.v.) una dosis única de virus LIVP1.1.1 o GLV-1h68 (1 x 10⁷ unidades formadoras de placa [pfu] en 100 µl de PBS). Los animales de control se inyectaron i.v. sólo con PBS.

La importancia de los resultados se calculó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) utilizando el soporte lógico GraphPad Prism (San Diego, EE.UU.). Los resultados se muestran como medias ± d.t. (desviación típica). Los valores de p <0,05 se consideraron significativos.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el gobierno de Unterfranken y se realizaron de acuerdo con las pautas de protección animal de Alemania.

B. Resultados

1. Citotoxicidad de LIVP 1.1.1 y GLV-1h68 contra células de sarcoma canino en cultivo

45 Las células de Morris se sembraron tres días antes de la infección en placas de 24 pocillos. Las células se infectaron a continuación con LIVP 1.1.1 o GLV-1h68 utilizando MOI de 1,0 y 0,1, respectivamente. La viabilidad celular se analizó 24, 48, 72 y 96 horas después de la infección (hpi) mediante ensayos de MTT como se ha descrito en la Sección A. Los resultados se muestran en la Tabla 58. Los valores se presentan como porcentajes de los controles no infectados respectivos.

50 Noventa y seis horas después de la infección por el virus GLV-1h68 a una MOI de 0,1 y 1,0, solo 19,1% y 13,13% de las células de Morris sobrevivieron al tratamiento. Después de la infección por LIVP 1.1.1, solo 10,1% y 5,1% de las células de Morris vivían en algún punto temporal y MOI. Estos resultados muestran que la infección con el virus LIVP1.1.1 en comparación con GLV-1h68 conduce a una erradicación ligeramente más eficaz de las células de sarcoma canino en cultivo.

Tabla 58. Citotoxicidad de LIVP 1.1.1 y GLV-1h68 en células de sarcoma canino de Morris

h.p.i.	GLV-1h68 MOI 0,1 (% supervivencia rel.)		GLV-1h68 MOI 1,0 (% supervivencia rel.)		LIVP 1.1.1 MOI 0,1 (% supervivencia rel.)		LIVP 1.1.1 MOI 1.0 (% supervivencia rel.)	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
24	85,99	2,70	68,15	6,76	89,98	0,90	84,65	7,69
48	59,13	9,22	33,91	9,22	68,18	3,47	59,82	6,17

h.p.i.	GLV-1h68 MOI 0,1 (% supervivencia rel.)		GLV-1h68 MOI 1,0 (% supervivencia rel.)		LIVP 1.1.1 MOI 0,1 (% supervivencia rel.)		LIVP 1.1.1 MOI 1.0 (% supervivencia rel.)	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
72	33,11	5,73	18,24	1,43	33,43	4,51	16,41	7,74
96	19,19	5,25	13,13	3,03	10,14	1,38	5,07	6,23

2. Eficacia de la replicación de LIVP 1.1.1 o GLV-1h68 en células de Morris.

5 Las células de "Morris" se infectaron con LIVP 1.1.1 o GLV-1h68 a una MOI de 0,1 como se ha descrito anteriormente. Los títulos virales se determinaron en diferentes puntos temporales durante el curso de la infección como pfu por pocillo por triplicado mediante un ensayo de placas convencional en monocapas de células CV-1. Los resultados se presentan en la Tabla 59.

10 Los títulos virales máximos se observaron a las 96 hpi para LIVP 1.1.1 ($2,14 \times 10^7 \pm 5,3 \times 10^6$ pfu/pocillo) y GLV-1h68 ($2,39 \times 10^6 \pm 7,4 \times 10^5$ pfu/pocillo). Estos datos se correlacionaron muy bien con la muerte celular y demostraron que LIVP 1.1.1 replicó más eficazmente que GLV-1h68 en células de Morris en estas condiciones experimentales.

hpi	1h68		LIVP 1.1.1	
	Promedio	D. Típica	Promedio	D. Típica
1	4,36E + 02	2,06E + 02	3,07E + 03	1,96E + 03
6	4,42E + 02	2,32E + 02	2,54E + 03	7,57E + 02
12	2,24E + 03	2,61E + 02	2,22E + 04	7,78E + 02
24	7,56E + 04	1,54E + 04	4,84E + 05	1,97E + 05
48	3,60E + 05	1,20E + 05	3,20E + 06	8,56E + 05
72	6,38E + 05	4,29E + 05	1,70E + 07	4,24E + 06
96	1,51E + 06	3,36E + 05	2,14E + 07	5,34E + 06

15 3. Análisis de los efectos de la infección por LIVP 1.1.1 o GLV-1h68 en células de Morris mediante microscopía

La eficacia de la infección por LIVP 1.1.1 o GLV-1h68 en células de Morris también se analizó mediante microscopía de fluorescencia a una MOI de 0,1 y 1,0, respectivamente. Para este propósito, durante el curso de la infección, las células de Morris tratadas con virus se visualizaron mediante tinción de Hoechst-12222 (color azul, para núcleos) o tinción con yoduro de propidio (color rojo, para células muertas) y se analizaron en diferentes momentos (1, 24, 48, 72 y 96 hpi) utilizando el microscopio de fluorescencia Leica DM IRB. Las imágenes se fusionaron para indicar el grado de infección y lisis de las células. En el caso de la infección por GLV-1h68, también se analizó la expresión del gen marcador viral recombinante GFP (proteína fluorescente verde).

25 En estas configuraciones experimentales, las células de Morris infectadas con GLV-1h68 a una MOI de 0,1 y 1.0 mostraron la expresión de GFP más fuerte a las 48 y 72 h. Además, al utilizar la tinción con yoduro de propidio (PI) específico de células muertas, también se encontró que la mayoría de las células infectadas eran positivas a PI a 96 hpi. Estos datos se correlacionaron muy bien con los datos del ensayo de viabilidad celular de los autores de la presente invención. Se tomaron imágenes en diferentes momentos después de la infección con la cámara digital de un microscopio de fluorescencia Leica DM IRB y se combinaron para mostrar la cantidad de células muertas frente a todas las células. El análisis de la infección por LIVP 1.1.1 en células de Morris demostró que el tratamiento con LIVP 1.1.1 condujo a una tasa de muerte significativamente mayor en las células de Morris en comparación con las células no infectadas.

35 4. Análisis de transferencia Western de la expresión de proteínas mediada por virus en células de Morris después de la infección con LIVP 1.1.1 o GLV-1h68

40 Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se cultivaron hasta que alcanzaron una confluencia del 90%. Las células se infectaron a continuación con LIVP 1.1.1 o GLV-1h68 a una MOI de 1,0 durante 1 hora a 37°C. Los

sobrenadantes se aspiraron y se reemplazaron por medio de crecimiento de nueva aportación para células de Morris. Para el aislamiento y la detección de las proteínas, las células se recolectaron en diferentes puntos temporales (1, 24, 48, 72 y 96 hpi) y se resuspendieron en tampón de dodecilsulfato de sodio (SDS). Las muestras se trataron con Benzonase durante 30 min a 37°C. Las muestras de proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 10% (PE) y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó a continuación con anticuerpos monoclonales de ratón anti-beta actina (1:10.000) o anticuerpos policlonales de conejo anti-virus vaccinia (1:1000) y se detectó utilizando anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano picante contra ratón (1:2.000) o conejo (1:10.000) seguido de quimioluminiscencia mejorada. El análisis de transferencia Western también confirmó una replicación más eficaz de LIVP 1.1.1 en comparación con GLV-1h68 en células de Morris, como lo indica una señal más fuerte de anticuerpos contra el virus vaccinia en muestras infectadas con LIVP 1.1.1.

5. Tratamiento sistémico de xenoinjertos de Morris con GLV-1h68 y LIVP 1.1.1

A doce ratones hembra carentes de sistema inmunitario atímicos FoxN1 a una edad de 6 a 8 semanas se les implantaron 1×10^6 células de Morris. Cuatro semanas después de la implantación, todos los ratones carentes de sistema inmunitario desarrollaron tumores con volúmenes de alrededor de 700 a 1100 mm³. Los animales se separaron en tres grupos (n = 4) y se les inyectaron GLV-1h68, LIPV1.1.1 o PBS (control) respectivamente. El tamaño del tumor se midió semanalmente.

Hasta el día 21 posterior a la infección, todos los ratones del grupo de control desarrollaron tumores con volúmenes superiores a 3000 mm³ y por lo tanto el estudio terminó con este grupo. En contraste, todos los ratones tratados con virus mostraron una reducción significativa del tumor en comparación con los controles en este momento. Los resultados se presentan en la Tabla 60.

La inyección de virus causó una regresión tumoral significativa en todos los ratones tratados con LIVP 1.1.1. Este no fue el caso para el grupo tratado con GLV-1h68, donde dos de cuatro ratones desarrollaron tumores con un volumen mayor a 3000 mm³ a 35 dpi. Este dato sugiere que LIVP 1.1.1 tiene un potencial oncolítico más alto que GLV-1h68 en los xenoinjertos de Morris.

30

Días P.I.	Mediana del volumen del tumor (mm ³)		
	Control	GLV-1h68	LIVP1.1.1
0	984,00	1125,00	666,00
7	1956,30	1557,00	1268,00
14	3044,60	2150,00	1242,00
20	3470,40	1256,00	426,18
28	-	1711,00	462,00
35	-	3063,00	302,30
42	-	-	120,84

Días P.I.	Peso medio (g)		
	Control	GLV-1h68	LIVP 1.1.1
0	27,23	23,69	25,55
7	29,15	26,00	23,65
14	29,93	25,03	24,68
20	31,48	26,23	26,23
28	-	25,98	26,18
35	-	24,88	25,30
42	-	-	25,10

- = los ratones fueron sacrificados debido a un tamaño de tumor superior a 3000 mm³

5 Se encontró que había una mejora significativa en la supervivencia de los ratones a los que se había inyectados LIVP 1.1.1 en comparación con los grupos de ratones de control. No se observó muerte en los ratones a los que se había inyectado LIVP 1.1.1 hasta el día 39 y el último ratón murió el día 105. En comparación, los ratones de control que no recibieron tratamiento con LIVP 1.1.1 se sacrificaron los días 17 y 24 debido a tamaños de los tumores mayores de 3000 mm³, lo que afectó gravemente a la salud general de los ratones. Estos resultados se presentan en la Tabla 62.

Tabla 62. Supervivencia.

Días P.I.	Tasa de supervivencia (%)	
	Control	LIVP 1.1.1
0	100	100
17	80*	100
24	0*	100
39	0	80
48	0	60
58	0	40
98	0	20
105	0	0

* = ratones sacrificados debido a un tamaño de tumor superior a 3000 mm³

10 Ejemplo 10

Análisis de Datos de Secuencia para Productos Aislados de LIVP

15 En este ejemplo, se secuenciaron y analizaron los productos aislados clonales LIVP 1.1.1, 2.1.1, 4.1.1, 5.1.1, 6.1.1, 7.1.1 y 8.1.1, y los resultados se compararon con las secuencias conocidas para las cepas de virus vaccinia GLV-1h68, Western Reserve y Copenhagen.

20 Los productos aislados clonales LIVP 1.1.1, 2.1.1, 3.1.1, 4.1.1, 5.1.1, 6.1.1, 7.1.1 y 8.1.1 se propagaron y se titularon en monocapas de células CV-1. Las células CV-1 infectadas con los productos aislados clonales LIVP 1.1.1, 2.1.1, 3.1.1, 4.1.1, 5.1.1, 6.1.1, 7.1.1 o 8.1.1 se recolectaron mediante centrifugación y se rompieron mediante tres ciclos de congelación y descongelación. Los restos celulares y el ácido nucleico se eliminaron de los productos lisados celulares mediante centrifugación a baja velocidad. Las partículas virales recuperadas se purificaron mediante centrifugación a través de colchones de sacarosa y gradientes de sacarosa (20-40%) utilizando protocolos convencionales. El ADN genómico viral se extrajo de los viriones purificados después del tratamiento con proteinasa K y se realizó una extracción con fenol-cloroformo (véase, Earl *et al.* en Ausubel *et al.*, (Eds) Current Protocols in Molecular Biology, vol. 3, páginas 16.17.1-16.19-7 (1998)).

30 El ADN genómico fue secuenciado mediante enfoque de perdigonada y ensamblado por AGOWA GmbH. El cierre del hueco se realizó mediante rondas de secuenciación adicionales en los clones de la perdigonada o mediante PCR utilizando ADN genómico viral. Las repeticiones terminales invertidas se reconstruyeron comparando la secuencia de complemento inversa con la secuencia, identificando secuencias idénticas y extendiendo la secuencia flanqueante. Los ORF se compararon con los de las cepas conocidas de Vaccinia GLV-1h68 (SEQ ID NO: 9, Núm. de Acceso GenBank EU410304), Western Reserve (SEQ ID NO: 191, Num. de Acceso GenBank AY243312) y Copenhagen (SEQ ID NO: 192, Num. de Acceso GenBank M35027). Las tablas que comparan los ORF mayores y menores en estas cepas se pueden encontrar en Zhang *et al.*, Mol Genet Genomics 282:417-438 (2009). La secuencia de cada producto aislado clonal de LIVP individual se alineó con el producto aislado de LIVP parental GL-ONC-1 (SEQ ID NO: 10) utilizando un programa de Alineamiento de Secuencia de Pares disponible en la Universidad Estatal de Iowa (deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html; Huang, X. (1994) Computer Applications in Biosciences 10: 227-235). El alineamiento se calculó como un "Alineamiento Global con GAP". El programa GAP calcula un alineamiento global óptimo de dos secuencias sin penalizar los huecos terminales. Un espacio largo en la secuencia más corta recibe una penalización constante. Las dos secuencias deben ser del mismo tipo, es decir, ambas son secuencias de ADN o ambas son secuencias de proteínas. GAP proporciona el alineamiento en el espacio lineal, con lo que se pueden alinear secuencias largas. Los parámetros predeterminados se establecieron a "Emparejamiento Máximo" puntuación de 10, "Emparejamiento Erróneo Min", puntuación de -15, "penalización por Apertura de Espacio"

puntuación de 30 y "Extensión de Espacio" puntuación de 3.

5 La Tabla 63 siguiente muestra los productos aislados clonales, que incluyen SEQ ID NO, tamaño del genoma, nucleótidos correspondientes a las repeticiones terminales invertidas y porcentaje (%) de identidad con el producto aislado de LIVP parental GL-ONC-1 (SEQ ID NO: 10). La secuenciación reveló que el producto aislado 3.1.1 de LIVP 1 era una mezcla de al menos 2 secuencias.

Tabla 63. Productos aislados clonales de LIVP

Producto aislado de LIVP	ID SEC NO	Tamaño del genoma	ITR izquierda	ITR Derecha	% de Identidad con SEC ID NO:10
Producto aislado de LIVP parental GL-ONC-1	10	190.217	1...10,072	180,096..190,167	100
1.1.1	1	183.369	1..2255	181,115..183,369	93
2.1.1	2	193.964	1..11,242	182,722..193,964	97
4.1.1	4	187.653	1..6,263	181,391..187,653	93
5.1.1	5	188.863	1..7,043	181,821..188,863	94
6.1.1	6	188.082	1..6,673	181,410..188,082	94
7.1.1	7	188.082	1..6,715	181,368..188,082	94
8.1.1	8	188.768	1..6,898	181,871..188,768	94

10 La Tabla 64 siguiente, muestra los ORF pronosticados, que incluyen el nombre/función, la longitud en los nucleótidos para los productos aislados y para GLV-1h68, y el ORF correspondiente identificado en GLV-1h68, WR y/o Copenhague (COP), donde corresponda. Los ORF fragmentados se indican con un asterisco (*). La Tabla 65 muestra los ORF que se presume son responsables de las diferencias en la actividad oncolítica y la toxicidad.

15 Como se muestra en la Tabla 64 siguiente, varios productos aislados contenían truncamientos en varios ORF. Por ejemplo, la proteína de unión a quimiocina secretada (correspondiente a gl001/290, WR001/218 y C23L/B29R en GLV-1h68, WR y Cop, respectivamente) es truncada por delección en el producto aislado 1.1.1 de LIVP. La proteína hipotética correspondiente a gl093, WR071 e I2L en GLV-1h68, WR y Cop, respectivamente, es truncada en GLV-1h68 y el producto aislado LIVP 2.1.1. La proteína similar a la profilina (correspondiente a gl225, WR167 y A42R en GLV-1h68, WR y Cop, respectivamente) es truncada en el producto aislado 5.1.1 de LIVP. La proteína similar a anquirina (correspondiente a gl257, WR188 y B6R en GLV-1h68, WR y Cop, respectivamente) es truncada en el producto aislado 4.1.1 de LIVP.

25 Se ha observado previamente variabilidad de la longitud de diversos marcos de lectura abiertos correspondientes entre diferentes cepas del virus Vaccinia. Por ejemplo, la proteína de unión a interleucina-18 (IL-18) (que corresponde a gl015/277 y WR 013 en GLV-1h68 y WR, respectivamente) tiene 381 pb en las cepas de Vaccinia WR, Lister y VACV-3737 (Num. Acc. GenBank DQ377945) y tiene 375 pb en cepas de Vaccinia DUKE (Num. Acc. GenBank. DQ439815), LC16 (Num. Acc. GenBank AY678277), Acam3 (Num. Acc. GenBank AY313848) y Acam 2000 (Num. Acc. GenBank AY313847). Entre los productos aislados de LIVP en la Tabla 64, las diferencias de longitud mínimas en el extremo C terminal dan como resultado un ORF de la proteína de unión a IL-18 que tiene 381 pb en los productos aislados 1.1.1, 2.1.1, 4.1.1 y 8.1.1 y tiene 375 pb en los productos aislados 5.1.1, 6.1.1 y 7.1.1. La proteína sensible a alfa-amanitina (correspondiente a gl034, WR029 y N2L en GLV-1h68, WR y Cop, respectivamente) tiene 528 pb en cepas WR, GLV-1h68 y producto aislado LIVP5.1.1, pero solo 513 pb (correspondiente a la delección de 5 aminoácidos) en los productos aislados LIVP 1.1.1, 2.1.1, 4.1.1, 6.1.1, 7.1.1, 8.1.1 y la cepa Acam3000 (GenBank Acc. Num. AY603355). Se ha determinado que la proteína de tipo anquirina (correspondiente a gl035, WR030 y M1L en GLV-1h68, WR y Cop, respectivamente) tiene 1419 pb, 1413 pb o 1410 pb en diversas cepas del virus Vaccinia. Como se muestra en la Tabla 64 a continuación, en el producto aislado 5.1.1 de LIVP, este ORF tiene 1419 pb, mientras que en los productos aislados de LIVP restantes este ORF contiene 1413 pares de bases. El receptor Toll/IL1 (correspondiente a gl230, WR172 y A46R en GLV-1h68, WR y Cop, respectivamente) tiene 723 pb en cepas de Vaccinia WR y productos aislados LIVP 1.1.1, 5.1.1 y 7.1.1, 711 pb en los productos aislados LIVP 2.1.1, 4.1.1, 6.1.1 y 8.1.1, y solo 645 pb en la cepa Cop de Vaccinia. Se observa una variabilidad similar para los abundantes ORF componentes del virosoma (correspondiente a gl077, WR061 y E5R en GLV-1h68, WR y Cop, respectivamente) y ADN polimerasa (correspondiente a gl084, WR065 y E9L en GLV-1h68, WR y Cop, respectivamente).

45 Se determinó que los productos aislados LIVP 6.1.1 y 8.1.1 tienen expansión repetida de DT en proteínas desconocidas (correspondientes a gl264, WR193 y B11R en GLV-1h68, WR y Cop, respectivamente) y tienen 255 pares de bases en oposición a 219 pb en los productos aislados restantes y GLV-1h68. La proteína similar a

5 anquirina (que corresponde a gl273, WR199 y B18R en GLV-1h68, WR y Cop, respectivamente) tiene 1725 pb en las cepas de Vaccinia WR, Cop, DUKE, Acam3, Acam2000 y Acam3000, pero está truncada por un gran deleción en productos aislados LIVP 1.1.1, 4.1.1, 5.1.1, 6.1.1, 7.1.1 y 8.1.1. El inhibidor de IL-1-beta (que corresponde a gl270, WR197 y B16R en GLV-1h68, WR y Cop, respectivamente) generalmente tiene 981 pb pero está fragmentado en la cepa Cop de Vaccinia (873 pb) y contiene deleciones en los productos aislados LIVP 1.1.1, 2.1.1, 5.1.1 y 7.1.1.

10 Además de las variaciones en los ORF, la secuenciación reveló diferencias, incluidas inserciones y deleciones, en las regiones promotoras de varios ORF. Por ejemplo, el producto aislado LIVP 1.1.1 tiene una inserción de 6 nucleótidos en la región promotora del inhibidor de la serina proteasa similar al ORF de SPI-1 (gl009/283). El producto aislado de LIVP 8.1.1 tiene una deleción en la región promotora de la proteína similar al factor de crecimiento epidérmico secretado (gl010/282). El producto aislado LIVP 5.1.1 tiene una deleción de 8 nucleótidos en la región promotora de la proteína similar al ORF de la anquirina (gl037). El producto aislado LIVP 6.1.1 tiene una deleción en la región promotora del ORF que codifica una proteína desconocida (correspondiente a gl079). Los productos aislados LIVP 1.1.1, 4.1.1, 6.1.1 y 7.1.1 contienen 19 deleciones de nucleótidos en la región promotora del ORF que codifica una proteína desconocida (correspondiente a gl088). El producto aislado LIVP 4.1.1 tiene 2 deleciones y el producto aislado 5.1.1 tiene una deleción en la región promotora del ORF para la proteína similar a la profilina (gl225).

Tabla 64. ORF pronosticadas de productos aislados clonales LIVP													
Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*		
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop		
HSPV001/207	147	147	147	147	147	147	147	147					
Supuesto C ORF G/supuesto B ORF H	114	114	114	114	114	114	-	114					
Proteína de unión a quimiocina secretada	777	432	777	777	777	777	777	777	WR001/218		C23L/B29R		
Desconocido (67 aa)	204	-	204	204	204	204	204	204					
Receptor del factor de necrosis tumoral	192	192	192	192	192	192	192	192					
Proteína de tipo receptor de TNF-alfa	369	369	369	369	369	369	369	369	WR004/215		C22L/B28R		
Proteína de tipo ankirina	147	147	147	147	147	147	147	147	WR005/ 214				
List003*A,List1199*D	-	195	195	195	195	195	195	195	Ninguno		C21L/ B27R		
m8RTR06R, m8LTR06L, mOLTR06L, mORTR06R	-	330	330	330	330	330	330	387	WR007/212				
HSPV004/204	-	234	234	234	234	234	234	-					
Proteína hipotética m8LTR04L, m8RTR04R	-	414	414	414	330	330	414	414	WR008/211		C19L/B25R		
Receptor de TNF-alfa de tipo 1 (ACAM3000_mVA 002)	-	165	165	165	165	138	165	165					
m8LTR05R, m3RTR05L, mOLTR05R, mORTR05L	-	240	240	240	213	213	240	240					
Proteína de tipo ankirina	159	438	438	282	438	438	438	438					
Supuesta proteína de tipo C18L	150	150	150	150	150	150	150	150			C18L/B24R		
Supuesta proteína de rango de anfitrión	966	318*	318*	1056	1275	1044	540*	1149			C17L/B23R		
		687	687				492						
Supuesta proteína de tipo C17L	261	261	261			291	261				C17L/B23R		
Inhibidor de serina proteasa de tipo SPI-1	1065	1065	1065	1065	1065	1065	1065	1065	WR205		C12L		
Supuesta proteína tipo promotor temprano y tardío	114	114	114	114	114	114	114	114	WR204.5		264		
Proteína tipo factor de crecimiento epidérmico secretado	417	417	417	417	417	417	417	417	WR009/210		C11R		

(Continuación)

Tabla 64. ORF pronosticadas de productos aislados clonales LIMP

Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*		
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop		
IL-1Ra	996	996	996	996	996	996	996	996	996	WR0 10/209	C10L		
Desconocido	198	198	198	198	198	198	198	198	gI012/281				
Proteína tipo dedo de cinc	252	252	252	252	252	252	252	252	gI013/279	WR0 11/208			
Proteína tipo dedo de cinc	189	189	189	189	189	189	189	189	gI014/278	WR012/207			
Proteína de unión a interleucina 18	375	381	381	381	375	375	375	381	gI015	WR013			
Proteína tipo ankirina	273	273	273	273	273	273	273	273	gI016	WR014			
Proteína tipo ankirina	540	540	429	540	540	540	429	540	gI017	WR014			
Proteína tipo ankirina	414	414	408	414	414	414	408	414	gI018	WR015			
Proteína tipo ankirina	474	474	513	474	474	474	234	474	gI019	WR016, WR017			
Proteína tipo TC10L	180	180	180	180	180	180	180	180	gI020				
Proteína tipo ankirina	1905	1905	1905	1905	1905	1905	1905	1905	gI021	WR019	C9L		
Desconocido	213	213	213	213	213	213	213	213	gI022				
Desconocido	534	534	534	534	534	534	534	534	gI023	WR020	C8L		
Desconocido	138	249	138	138	249	138	138	138	gI023.5				
Desconocido	225	225	225	225	225	225	225	225	gI024				
Proteína rango de anfitrión	453	453	453	453	453	453	453	453	gI025	WR021	C7L		
Desconocido	456	456	456	456	456	456	456	456	gI026	WR022	C6L		
Desconocido	615	615	615	615	615	615	615	615	gI027	WR023	C5L		
Desconocido	951	951	951	951	951	951	951	951	gI028	WR024	C4L		
Unión al complemento secretado	792	792	792	792	792	792	792	792	gI029	WR025	C3L		
Desconocido	210	210	210	210	210	210	210	210	gI030				
Proteína tipo kelch	1539	1539	1539	1539	1539	1539	1539	1539	gI031	WR026	C2L		

(Continuación)

Tabla 64. ORF pronosticadas de productos aislados clonales L1VP													
Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*		
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop		
Desconocido	675	675	675	675	675	675	675	675	675	675	675	WR027	C1L
Virocina	354	354	354	354	354	354	354	354	354	354	354	WR028	N1L
Proteína sensible a alfa-amanitina	528	513	513	513	528	513	513	513	513	513	513	WR029	N2L
Proteína tipo ankirina	1410	1413	1413	1413	1419	1413	1413	1413	1413	1413	1413	WR030	M1L
Desconocido	663	663	663	663	663	663	663	663	663	663	663	WR031	M2L
Proteína tipo ankirina	855	855	855	855	855	855	855	855	855	855	855	WR032	K1L
Proteína tipo inhibidor de serina proteasa	1110	1110	1110	1110	1110	1110	1110	1110	1110	1110	1110	WR033	K2L
Desconocido	246	246	246	246	246	246	246	246	246	246	246		
Desconocido	303	303	303	303	303	303	303	303	303	303	303		
Proteína hipotética GL041	237	237	237	186	237	237	237	237	237	237	237		
Proteína de resistencia a interferón	267	267	267	267	267	267	267	267	267	267	267	WR034	K3L
Proteína tipo fosfolipasa D	1275	1275	1275	1275	1275	1275	1275	1275	1275	1275	1275	WR035	K4L
Supuesta monoglicérido lipasa	135*											WR036	
Supuesta monoglicérido lipasa	405	555	555	555	555	555	555	555	555	555	555	WR037	K5L
Supuesta monoglicérido lipasa	255	255	255	255	255	255	255	255	255	255	255	WR038	K6L
Desconocido	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	WR039	K7R
Proteína hipotética GL048	195	195	195	195	195	195	195	195	195	195	195		
la proteína se localiza exclusivamente en la mitocondria donde funciona inhibiendo la apoptosis	681	681	681	681	681	681	681	681	681	681	681	WR040	F1L
dUTPasa	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	WR041	F2L
Proteína tipo kelch	1443	1443	1443	1443	1443	1443	1443	1443	1443	1443	1443	WR042	F3L
Desconocido	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204		
Subunidad pequeña ribonucleótido reductasa	960	960	960	960	960	960	960	960	960	960	960	WR043	F4L

(Continuación)

Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*			
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop			
Desconocido	237	237	237	237	237	237	237	237	237	237	237	gi054		
Desconocido	291	291	291	291	291	291	291	291	291	291	291	gi055		
Proteína principal de membrana	966	966	966	966	966	966	966	966	966	966	966	gi056	WR044	F5L
Desconocido	225	225	225	225	225	225	225	225	225	225	225	gi057	WR045	F6L
Desconocido	243	243	243	243	243	243	243	243	243	243	243	gi058	WR046	F7L
Proteína con repeticiones de prolina tipo iAcTA	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	gi059	WR047	F8L
Proteína de la ruta de formación de enlace S-S	639	639	639	639	639	639	639	639	639	639	639	gi060	WR048	F9L
Ser/Ther cinasa	1320	1320	1320	1320	1320	1320	1320	1320	1320	1320	1320	gi061	WR049	F10L
Desconocido	258	258	258	258	258	258	258	258	258	258	258	gi062		
Desconocido	1065	1065	1065	1065	1065	1065	1065	1065	1065	1065	1065	gi063	WR050	F11L
Desconocido	1908	1908	1908	1908	1908	1908	1908	1908	1908	1908	1908	gi064	WR051	F12L
Desconocido	216	216	216	216	216	216	216	216	216	216	216	gi065		
Proteína de membrana EEV palmitilada	1119	1119	1119	1119	1119	1119	1119	1119	1119	1119	1119	gi066	WR052	F13L
Desconocido	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	gi067	WR053	F14L
Proteína F14.5L hipotética 5,5k	Inserción	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	gi068	WR053.5	F14.5L
Desconocido	477	477	477	477	477	477	477	477	477	477	477	gi069	WR054	F15L
Desconocido	696	696	696	696	696	696	696	696	696	696	696	gi070	WR055	F16L
Supuesta fosfoproteína de unión a ADN	306	306	306	306	306	306	306	306	306	306	306	gi071	WR056	F17R
Desconocido	213	213	213	213	213	213	213	213	213	213	213	gi072		
Subunidad catalítica VP55 de poli-A polimerasa	1440	1440	1440	1440	1440	1440	1440	1440	1440	1440	1440	gi073	WR057	E1L
Desconocido	2214	2214	2214	2214	2214	2214	2214	2214	2214	2214	2214	gi074	WR058	E2L
Proteína de unión a ARN de doble hebra	573	573	573	573	573	573	573	573	573	573	573	gi075	WR059	E3L

(Continuación)

Producto de ORF	Pares de bases de ORF											ORF*		
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop			
Subunidad rpo30 de ARN polimerasa dependiente de ADN	780	780	780	780	780	780	780	780	780	780	780	WR060	E4L	
Componente abundante de virosoma	1026	996	996	996	1026	996	1026	996	1026	996	996	WR061	E5R	
Desconocido	321	321	321	321	321	321	321	321	321	321	321			
Desconocido	1704	1704	1704	1704	1704	1704	1704	1704	1704	1704	1704	WR062	E6R	
Proteína miristilada soluble	501	501	501	501	501	501	501	501	501	501	501	WR063	E7R	
Desconocido	213	213	213	213	213	213	213	213	213	213	213			
Proteína de membrana	822	822	822	822	822	822	822	822	822	822	822	WR064	E8R	
Desconocido	201	201	201	201	201	201	201	201	201	201	201			
ADN polimerasa	3021	3018	3018	3018	3018	3018	3018	3018	3018	3018	3021	WR065	E9L	
Desconocido	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198			
Sulfhidril oxidasa	288	288	288	288	288	288	288	288	288	288	288	WR066	E10R	
Proteína núcleo del virión	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	WR067	E11L	
Desconocido	2001	2001	2001	2001	2001	2001	2001	2001	2001	2001	2001	WR068	OIL	
Desconocido	348	348	348	348	348	348	348	348	348	348	348			
Desconocido	189	-	189	-	189	-	189	-	189	-	189			
Desconocido ortólogo para CPXV078A	327	324	327	324	327	324	327	324	327	324	327	WR069	O2L	
Glutarredoxina no esencial	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	WR069.5	266	
Supuesto promotor temprano y tardío	939	939	939	939	939	939	939	939	939	939	939	WR070	I1L	
Proteína núcleo de unión a ADN	216	222	171	222	222	222	222	222	222	222	222	WR071	I2L	
Proteína GL093 hipotética	810	810	810	810	810	810	810	810	810	810	810	WR072	I3L	
Fosfoproteína de unión a ADNIhs	2316	2316	2316	2316	2316	2316	2316	2316	2316	2316	2316	WR073	I4L	
Subunidad grande de ribonucleótido reductasa	234	234	234	234	234	234	234	234	234	234	234			
Desconocido	234	234	234	234	234	234	234	234	234	234	234			

(Continuación)

Tabla 64. ORF pronosticadas de productos aislados cionales LIVP													
Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*		
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop		
Supuesta proteína tipo CMP70.56R	165	165	165	165	165	165	165	165	165	165	165	165	
Proteína VP13 de IMV	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	I5L
Desconocido	1149	1149	1149	1149	1149	1149	1149	1149	1149	1149	1149	1149	I6L
Cisteína proteínasa de núcleo viral	1272	1272	1272	1272	1272	1272	1272	1272	1272	1272	1272	1272	I7L
ARN helicasa DExH-NPH-11	2031	2031	2031	2031	2031	2031	2031	2031	2031	2031	2031	2031	I8R
Proteína tipo insulina metaloproteínasa	1776	1776	1776	1776	1776	1776	1776	1776	1776	1776	1776	1776	G1L
Desconocido	336	336	336	336	336	336	336	336	336	336	336	336	G3L
Factor de elongación de transcripción tardía	663	663	663	663	663	663	663	663	663	663	663	663	G2R
Proteína tipo tiorredoxina	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375	G4L
Desconocido	1305	1305	1305	1305	1305	1305	1305	1305	1305	1305	1305	1305	G5R
Subunidad rpo7 de ARN polimerasa dependiente de ADN	192	192	192	192	192	192	192	192	192	192	192	192	G5.5R
Desconocido	498	498	498	498	498	498	498	498	498	498	498	498	G6R
Proteína estructural del virión	1116	1116	1116	1116	1116	1116	1116	1116	1116	1116	1116	1116	G7L
Desconocido	399	399	399	399	399	399	399	399	399	399	399	399	
Desconocido	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	
VLTF-1 transcripción gen tardío	783	783	783	783	783	783	783	783	783	783	783	783	G8R
Proteína miristilada	1023	1023	1023	1023	1023	1023	1023	1023	1023	1023	1023	1023	G9R
Proteína de membrana de IMV	753	753	753	753	753	753	753	753	753	753	753	753	L1R
Desconocido	258	258	258	258	258	258	258	258	258	258	258	258	L2R
Desconocido	1053	1053	1053	1053	1053	1053	1053	1053	1053	1053	1053	1053	L3L
Proteína vp8 núcleo	756	756	756	756	756	756	756	756	756	756	756	756	L4R
Supuesta proteína de membrana	387	387	387	387	387	387	387	387	387	387	387	387	L5R

(Continuación)

Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*		
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop		
	Proteína de virión	462	462	462	462	462	462	462	462	g1119	WR093	J1R	
Timidina quinasa	Inserción	276*	276*	534	276*	276*	534	276*	g1120	WR094	J2R		
Subunidad de poli-A polimerasa multifuncional	1002	1002	1002	1002	1002	1002	1002	1002	g1121				
Subunidad rpo22 de ARN polimerasa dependiente de ADN	558	558	558	558	558	558	558	558	g1122	WR095	J3R		
Supuesta proteína de membrana 16kDa tardía	402	402	402	402	402	402	402	402	g1123	WR096	J4R		
Subunidad rpo147 de ARN polimerasa dependiente de ADN	3861	3861	3861	3861	3861	3861	3861	3861	g1124	WR097	J5L		
Desconocido	216	216	216	216	216	216	216	216	g1125	WR098	J6R		
Tyr/Ser proteína fosfatasa	516	516	516	516	516	516	516	516	g1126				
Desconocido	570	570	570	570	570	570	570	570	g1127	WR099	H1L		
Proteína superficie de unión a heparina IMV	975	975	975	975	975	975	975	975	g1128	WR100	H2R		
Factor transcripción RAP94	2388	2388	2388	2388	2388	2388	2388	2388	g1129	WR101	H3L		
Factor transcripción gen tardío VLTF-4	612	612	612	612	612	612	612	612	g1130	WR102	H4L		
Topoisomerasa tipo IB	945	945	945	945	945	945	945	945	g1131	WR103	H5R		
Proteína tipo CPXV116	183	183	183	183	183	183	183	183	g1132	WR104	H6R		
Desconocido	441	441	441	441	441	441	441	441	g1133				
Subunidad grande de enzima de protec. term. de ARNm	2535	2535	2535	2535	2535	2535	2535	2535	g1134	WR105	H7R		
Proteína GL136 hipotética	255	255	255	255	255	255	255	255	g1135	WR106	D1R		
Proteína del núcleo del virión	441	441	441	441	441	441	441	441	g1136				
Desconocido	243	243	243	243	243	243	243	243	g1137	WR107	D2L		
Proteína del núcleo del virión	714	714	714	714	714	714	714	714	g1138				
Uracil-ADN glicosilasa	657	657	657	657	657	657	657	657	g1139	WR108	D3R		
	657	657	657	657	657	657	657	657	g1140	WR109	D4R		

(Continuación)

Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*		
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop		
Desconocido	210	210	210	210	210	210	210	210	gl141				
NTPasa interacciona con A20R	2358	2358	2358	2358	2358	2358	2358	2358	gl142	WR110	D5R		
Desconocido	219	219	219	219	219	219	219	219	gl143				
Desconocido	243	243	243	243	243	243	243	243	gl144				
Subunidad pequeña de 70 kDa VETF de factor de transcripción	1914	1914	1914	1914	1914	1914	1914	1914	gl145	WR111	D6R		
Proteína GL146 hipotética	192	192	192	192	192	192	192	192	gl146				
Subunidad rpo18 de ARN polimerasa dependiente de ADN	486	486	486	486	486	486	486	486	gl147	WR112	D7R		
Proteína de membrana de IMV	915	915	915	915	915	915	915	915	gl148	WR113	D8L		
Proteína tipo NTP-fosfohidrolasa	642	642	642	642	642	642	642	642	gl149	WR114	D9R		
Proteína tipo NTP-fosfohidrolasa	747	747	747	747	747	747	747	747	gl150	WR115	D10R		
Nucleósido trifosfato fosfohidrolasa-I	1896	1896	1896	1896	1896	1896	1896	1896	gl151	WR116	D11L		
Desconocido	210	210	210	210	210	210	210	210	gl152				
Desconocido	159	159	159	159	159	159	159	159	gl153				
Proteína 7,2 kDa hipotética	186	186	186	186	186	186	186	186	gl154				
Subunidad pequeña de enzima de protec.term. de ARNm	864	864	864	864	864	864	864	864	gl155	WR117	D12L		
Proteína 7,0 kDa hipotética	189	189	189	189	189	189	189	189	gl156				
Desconocido	219	219	219	219	219	219	219	219	gl157				
Proteína de resistencia a rifampicina	1656	1656	1656	1656	1656	1656	1656	1656	gl158	WR118	D13L		
Desconocido	225	225	225	225	225	225	225	225	gl159				
Factor de transcripción del gen tardío VLTf-2	453	453	453	453	453	453	453	453	gl160	WR119	A1L		
Factor de transcripción del gen tardío VLTf-3	675	675	675	675	675	675	675	675	gl161	WR120	A2L		

(Continuación)

Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*		
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop		
	Proteína de la ruta de formación de enlace S-S	231	231	231	231	231	231	231	231	gl162	WR121	A2.5L	
Precursor p4b de proteína del núcleo 4b	1935	1935	1935	1935	1935	1935	1935	1935	gl163	WR122	A3L		
Desconocido	360	360	360	360	360	360	360	360	gl164				
Proteína del núcleo de 39 kDa	846	846	846	846	846	846	846	846	gl165	WR123	A4L		
Desconocido	261	261	261	261	261	261	261	261	gl166				
Subunidad rpo19 de ARN polimerasa dependiente de ADN	495	495	495	495	495	495	495	495	gl167	WR124	A5R		
Proteína del núcleo del virión necesaria para la formación de virus	1119	1119	1119	1119	1119	1119	1119	1119	gl168	WR125	A6L		
Subunidad grande 82 kDa de factor de transcripción VETF	2133	2133	2133	2133	2133	2133	2133	2133	gl169	WR126	A7L		
Desconocido	387	387	387	387	387	387	387	387	gl170				
Desconocido	306	306	306	306	306	306	306	306	gl171				
Subunidad pequeña 32 kDa de factor de transcripción VITF-3	867	867	867	867	867	867	867	867	gl172	WR127	A8R		
Proteína de membrana IMV	327	327	327	327	327	327	327	327	gl173	WR128	A9L		
Precursor p4a de proteína del núcleo 4a	2676	2676	2676	2676	2676	2676	2676	2676	gl174	WR129	A10L		
Desconocido	501	501	501	501	501	501	501	501	gl175				
Desconocido	228	228	228	228	228	228	228	228	gl176				
Desconocido	228	228	228	228	228	228	228	228	gl177				
Desconocido	957	957	957	957	957	957	957	957	gl178	WR130	A11R		
Proteína del núcleo	579	579	579	579	579	579	579	579	gl179	WR131	A12L		
Proteína de membrana IMV	213	213	213	213	213	213	213	213	gl180	WR132	A13L		
Proteína de membrana IMV fosforilada	273	273	273	273	273	273	273	273	gl181	WR133	A14L		

(Continuación)

Tabla 64. ORF pronosticadas de productos aislados clonales LIVP

Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*		
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop		
Proteína de membrana IV e IMV hidrófoba no esencial	162	162	162	162	162	162	162	162	162	WR134	A14.5L		
Desconocido	285	285	285	285	285	285	285	285	gl183	WR135	A15L		
Proteína miristilada soluble	1134	1134	1134	1134	1134	1134	1134	1134	gl184	WR136	A16L		
Proteína de membrana de IMV	612	612	612	612	612	612	612	612	gl185	WR137	A17L		
ADN helicasa	1482	1482	1482	1482	1482	1482	1482	1482	gl186	WR138	A18R		
Desconocido	234	234	234	234	234	234	234	234	gl187	WR139	A19L		
Desconocido	354	354	354	354	354	354	354	354	gl188	WR140	A21L		
Factor procesividad ADN polimerasa viral	1281	1281	1281	1281	1281	1281	1281	1281	gl189	WR141	A20R		
Desconocido	387	387	387	387	387	387	387	387	gl190				
Desconocido	222	222	222	222	222	222	222	222	gl191				
Proteína tardía esencial para la resolución de concatámeros que escinden concatámeros de ADN para dar unidades de longitud del genoma, resolvasa de unión Holiday (HU) de ADN	564	564	564	564	564	564	564	564	gl192	WR142	A22R		
Subunidad grande 45 kDa del factor de transcripción VITF-3	1149	1149	1149	1149	1149	1149	1149	1149	gl193	WR143	A23R		
Subunidad ARN polimerasa dependiente ADN	3495	3495	3495	3495	3495	3495	3495	3495	gl194	WR144	A24R		
tpo132													
Desconocido	222	222	222	222	222	222	222	222	gl195				
Proteína de inclusión tipo A viruela bovina	630	630	630	630	198*	630	630	630	gl196	WR145	A25L		
					471					WR146			
Proteína de inclusión tipo A viruela bovina	684	684	684	684	684	684	684	684	gl197	WR147			
Proteína tipo TAZ8R	174	174	174	174	174	174	174	174	gl198				
TAZ8R, m8186R, mC186R	186	186	186	186	186	186	186	186					

(Continuación)

Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*		
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop		
	Proteína de inclusión tipo A viruela bovina	2166	2178	2166	2178	2178	2178	2166	2178	gl199	WR148		
Proteína de GL200 hipotética	183	183	183	183	183	183	183	183	gl200				
Proteína de inclusión tipo A viruela	1503	1503	1503	1503	1503	1503	1503	1509	gl201	WR149	A26L		
Proteína de GL202 hipotética	495	495	495	495	495	495	495	501	gl202				
Proteína de superficie de IMV	333	333	333	333	333	333	333	333	gl203	WR150	A27L		
Componente de membrana de IMV	441	441	441	441	441	441	441	441	gl204	WR151	A28L		
rpo35 ARN polimerasa dependiente ADN	918	918	918	918	918	918	918	918	gl205	WR152	A29L		
Desconocido	213	213	213	213	213	213	213	213	gl206				
Proteína de IMV	234	234	234	234	234	234	234	234	gl207	WR153	A30L		
Elemento promotor tardío en célula transfectada	129	129	129	129	129	129	129	129	gl207.5	WR153.5	A30.5L		
Desconocido	375	375	375	375	375	375	375	375	gl208	WR154	A31R		
Supuesta ATPasa	813	813	813	813	813	813	813	813	gl209	WR155	A32L		
Desconocido	267	267	267	267	267	267	267	267	gl210				
Fosfoglicoproteína de membrana EEV	558	558	558	558	558	558	558	558	gl211	WR156	A33R		
Glicoproteína de EEV	507	507	507	507	507	507	507	507	gl212	WR157	A34R		
Desconocido	231	231	231	231	231	231	231	231	gl213				
Proteína de virulencia intracelular	531	531	531	531	531	531	531	531	gl214	WR158	A35R		
Fosfoproteína transmembrana IEV	666	666	666	666	666	666	666	666	gl215	WR159	A36R		
Desconocido	792	792	792	792	792	792	792	792	gl216	WR160	A37R		
Desconocido	252	252	252	252	252	252	252	252	gl217				
Desconocido	189	189	189	189	189	189	189	189	gl218	WR161			
Desconocido	177	177	177	177	177	177	177	177	gl219				

(Continuación)

Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*		
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop		
Proteína asociada a antígeno de tipo CD47/Integrina	834	834	834	834	834	834	834	834	834	834	WR162	A38L	
Supuesta proteína tipo A39R	1212	1212	1212	1212	1212	1212	1212	1212	1212	1212	WR163, WR164	A39R	
Desconocido	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270			
Proteína membrana tipo II similar a lectina tipo C	480	480	480	480	480	480	480	480	480	480	WR165	A40R	
Glicoproteína secretada	660	660	660	660	660	660	660	660	660	660	WR166	A41L	
Proteína tipo profilina	402	402	402	402	180	402	402	402	402	402	WR167	A42R	
Supuesta glicoproteína de membrana tipo 1	585	585	585	585	582	585	585	585	585	585	WR168	A43R	
Proteína GL227 hipotética	237	237	237	237	237	237	237	237	237	237	WR169	268	
Hidroxiesteroide deshidrogenasa	1041	1041	1041	1041	1041	1041	1041	1041	1041	1041	WR170	A44L	
Proteína tipo superóxido dismutasa C-Zn	378	378	378	378	378	378	378	378	378	378	WR171	A45R	
Receptor Toll/L1	711	723	711	711	723	711	723	711	723	711	WR172	A46R	
Proteína GL231 hipotética	318	318	318	318	318	318	318	318	318	318			
Desconocido	759	759	759	759	759	759	759	759	759	759	WR173	A47L	
Desconocido	189	189	189	189	180	189	189	189	189	189			
Timidilato quinasa	615	684	615	615	615	684	684	684	684	684	WR174	A48R	
Desconocido	489	489	489	489	489	489	489	489	489	489	WR175	A49R	
ADN ligasa	1659	1659	1659	1659	1659	1659	1659	1659	1659	1659	WR176	A50R	
Desconocido	201	201	201	201	201	201	201	201	201	201			
Desconocido	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204			
Desconocido	1005	1005	261*	1005	1005	1005	1005	1005	1005	1005	WR177	A51R	
			651										
Receptor Toll/L1	573	573	573	573	573	573	573	573	573	573	WR178	A52R	

(Continuación)

Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*		
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop		
Receptor de factor de necrosis	561	561	561	561	561	561	561	561	gl241	WR179	A53R		
Receptor de factor necrosis tumoral (LC16mO)	-	-	-	-	297	-	-	-					
Supuesta proteína tipo CMP170.5L	195	195	195	195	219	195	195	195	gl242				
Supuesta proteína tipo CPXV192	180	180	180	180	180	180	180	180	gl243				
Proteína tipo kelch	1695	1695	1695	1695	1695	1695	1695	1695	gl244	WR180	A55R		
Hemaglutinina	Inserción	930	933	930	942	930	930	930	gl245	WR181	A56R		
Desconocido	114	114	114	114	114	114	114	114	gl245.5	WR181.5	269		
Guanilato quinasa	456	456	456	456	456	456	456	456	gl246	WR182	A57R		
ser/thr quinasa	903	903	903	903	903	903	903	903	gl247	WR183	B1R		
Desconocido	324	324	324	324	324	324	324	324	gl248				
Desconocido	660	660	660	660	660	660	660	660	gl249	WR184	B2R		
Desconocido	201	201	201	201	201	201	201	201	gl250				
Desconocido	288	288	288	288	288	288	288	288	gl251				
Desconocido	375	801	375	801	801	801	183*	801	gl252	WR185	B3R		
							186						
Desconocido	537	147	135	147	147	147	138	147	gl253				
Desconocido	150	126	126	126	126	126	126	126	gl254				
Proteína List 180 hipotética	141	141	141	141	141	141	141	141					
Proteína tipo ankirina	1677	1677	1677	1677	1677	1677	1677	1677	gl255	WR186	B4R		
Glicoproteína de membrana tipo I EEV	954	954	954	954	954	954	954	954	gl256	WR187	B5R		
Proteína tipo ankirina	522	522	522	504	522	522	522	522	gl257	WR188	B6R		
Desconocido	216	216	216	216	216	216	216	216	gl258				
Proteína tipo precursora 21 kDa	549	549	549	549	549	549	549	549	gl259	WR189	B7R		

(Continuación)

Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*					
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop					
Proteína tipo receptor interferón gamma soluble	819	819	819	819	819	819	819	819	819	819	819	819	gl260	WR190	B8R	
Supuesta proteína tipo viruela conejo RPXV171	174	174	174	174	174	195*	174	195*	162	162	162	162	gl261			
Proteína viral intracelular de 6 kDa	234	234	234	234	234	201	234	201	201	201	201	201	gl262	WR191	B9R	
Proteína tipo kelch	501	501	501	501	501	318	501	318	318	318	318	318	gl263	WR192	B10R	
Desconocido	219	219	219	219	219	255	219	255	255	255	255	255	gl264	WR193	B11R	
Proteína tipo ser/thr proteína quinasa	852	852	852	852	852	852	852	852	852	852	852	852	gl265	WR194	B12R	
SPI-2/CrMA	351	351	351	351	351	351	351	351	351	351	351	351	gl266	WR195	B13R	
SPI-2/CrMA	669	669	669	669	669	669	669	669	669	669	669	669	gl267	WR195	B14R	
Proteína B15R de unión a IL-1	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	450	gl268	WR196	B15R	
Desconocido	174	174	174	174	174	276	174	276	174	174	174	174	gl269			
Inhibidor 1L-1-beta	981	972	972	981	972	981	138*	981	981	981	981	981	gl270	WR197	270, B16R	
Desconocido	228	228	228	228	228	228	228	228	228	228	228	228	gl271			
Desconocido	1023	1023	1023	1023	1023	1023	1023	1023	1023	1023	1023	1023	gl272	WR198	B17L	
Proteína tipo ankirina	1725	1242	1725	1242	1239	1242	1242	1242	1242	1242	1242	1242	gl273	WR199	B18R	
Crme [List195, Cowpox]	-	504	-	504	504	504	504	504	504	504	504	504	None			
Proteína m8260R, mO260R hipotética	-	222	-	222	-	222	-	222	-	222	-	-	None			
Proteína anti-apoptótica Golgi [List 196, m8261R, mO261R]	-	714	-	714	714	714	714	714	714	714	714	714	None			
Proteína, mO262L, m8262L hipotética	-	228	-	228	228	228	228	228	228	228	228	228	None			
Proteína m8001R, mO01R hipotética	-	171	-	144	156	174	174	174	174	174	174	174	None			

(Continuación)

Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*		
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop		
	Proteína m8LTR01L, m8RTR01R hipotética	-	198	-	450	444	444	444	444	None			
Glicoproteína secretada tipo receptor de IFN-alfa/beta	1056	-	1056	-	-	-	-	-	gl274	WR200	B19R		
Supuesta proteína tipo B20R	420	-	420	-	-	-	-	-	gl275	WR202	B20R		
Desconocido	162	-	162	-	-	-	-	-	gl276				
Proteína de unión a Interleucina-18	375	-	516	-	-	-	-	-	gl277/105	WR013			
Proteína tipo dedo de cinc	189	-	-	-	-	-	-	-	gl278/014	WR207/012			
Proteína tipo dedo de cinc	252	-	252	-	-	-	-	-	gl279/013	WR208/011			
IL-1 Ra	996	-	996	-	-	-	-	-	gl280/011	WR209/010	C10L		
Desconocido	198	-	198	-	-	-	-	-	gl281/012				
Proteína tipo factor de crecimiento epidérmico secretado	417	-	417	-	-	-	-	-	gl282/010	WR210/009	C11R		
Supuesto promotor temprano y tardío	114	-	114	-	-	-	-	-	gl282.5/009.5	WR204.5	264		
SPI-1 tipo inhibidor de serina proteasa	1065	-	1065	-	-	-	-	-	gl283/009	WR205	C12L		
Supuesta proteína tipo C17L	261	-	261	279	-	291	261	-	gl284/008		B23R/C17L		
Supuesta proteína de rango de anfifitión	966	-	687*	1056	1275	1044	492*	1179	gl285/007		B23R/C17L		
			318				540						
Supuesta proteína tipo C 18L	150	-	150	150	150	150	150	150	gl286/006		B24R/C18L		
Proteína tipo ankirina	159	-	438	282	438	438	438	438	gl287/005				
m8LTR05R, m8RTR05L, mOLTR05R, mORTR05L	-	-	240	240	213	213	240	240	None				
Proteína m8LTR04L, m8RTR04R hipotética	-	-	414	414	330	330	414	414	None		B25R/C19L		

(Continuación)

Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*				
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop				
Tipo receptor de TNF-alfa (ACAM3000_MVA-192)	-	-	165	165	165	138	165	165	165	165	Ninguno				
HSPV004/204	-	-	234	234	234	234	234	-	-	-	Ninguno				
Proteína m8LTR06L, m8RTR06R hipotética	-	-	330	330	330	330	330	387	387	387	Ninguno	WR212/007			
List003*A,List199*D	-	-	195	195	195	195	195	195	195	195	Ninguno	WR213/006	B27R/ C21L		
Proteína tipo ankirina	147	-	147	147	147	147	147	147	147	147	gl287.5/004.5	WR214/005			
Proteína tipo receptor de TNF-alfa	369	-	369	369	369	369	369	369	369	369	gl288/004	WR215/004	B28R/C22L		
Receptor de factor de necrosis tumoral	192	192	192	192	192	192	192	192	192	192	gl289/003				
Proteína de unión a quimiocina secretada	777	432	777	777	777	777	777	777	777	777	gl290/001	WR218/001	B29R/C23L		
Desconocido	204	-	204	204	204	204	204	204	204	204	gl291/002				
Supuesto C ORF G / supuesto B ORF H	114	114	114	114	114	114	114	114	114	114					
Proteína HSPV001/207, CPXV002/228	147	147	147	147	147	147	147	147	147	147					

*ORF gragmentado; - Delección (sin ORF correspondiente) o cambio de nucleótido (ORF demasiado pequeño para ser referido (p.ej., <102 pb))

Tabla 65: ORF seleccionados													
Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*		
	GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop		
Proteína de unión a quimiocina secretada	777	432	777	777	777	777	777	777	777	777	777	WR001/218	C23/B29R
Inhibidor de serina proteasa tipo SPI-1	1065	1065	1065	1065	1065	1065	1065	1065	1065	1065	1065	WR205	C12L
Proteína tipo factor de crecimiento epidérmico secretado	417	417	417	417	417	417	417	417	417	417	417	WR009/210	C11R
IL-1Ra	996	996	996	996	996	996	996	996	996	996	996	WR010/209	C10L
Proteína de unión a interleucina-18	375	381	381	381	375	375	375	375	375	381	381	WR013	
Desconocido	675	675	675	675	675	675	675	675	675	675	675	WR027	C1L
Proteína sensible a alfa-amanitina	528	513	513	513	528	513	513	513	513	513	513	WR029	N2L
Proteína tipo ankirina	1410	1413	1413	1413	1419	1413	1413	1413	1413	1413	1413	WR030	M1L
Proteína tipo ankirina	855	855	855	855	855	855	855	855	855	855	855	WR032	K1L
Desconocido	477	477	477	477	477	477	477	477	477	477	477	WR054	F15L
Componente abundante de virosoma	1026	996	996	996	1026	996	1026	996	1026	996	996	WR061	E5R
Desconocido	1704	1704	1704	1704	1704	1704	1704	1704	1704	1704	1704	WR062	E6R
Proteína de membrana	822	822	822	822	822	822	822	822	822	822	822	WR064	E8R
ADN polimerasa	3021	3018	3018	3018	3018	3018	3018	3018	3018	3021	3021	WR065	E9L
Desconocido	2001	2001	2001	2001	2001	2001	2001	2001	2001	2001	2001	WR068	O1L
Proteína GL093 hipotética	216	222	171	222	222	222	222	222	222	222	222	WR071	I2L
Proteína tipo profilina	402	402	402	402	180	402	402	402	402	402	402	WR167	A42R
Receptor Toll/L1	711	723	711	711	723	711	723	711	723	711	711	WR172	A46R
Desconocido	1005	1005	261*	1005	1005	1005	1005	1005	1005	1005	1005	WR177	A51R
			651										
Receptor de factor de necrosis tumoral	561	561	561	561	561	561	561	561	561	561	561	WR179	A53R
Proteína tipo ankirina	522	522	522	504	522	522	522	522	522	522	522	WR188	B6R
Desconocido	219	219	219	219	219	219	219	219	219	219	219	WR193	B11R
Inhibidor de IL-1 beta	981	972	972	981	972	981	972	981	972	981	981	WR197	B16R

(Continuación)

Tabla 65: ORF seleccionados	Producto de ORF	Pares de bases de ORF										ORF*			
		GLV-1h68	1.1.1	2.1.1	4.1.1	5.1.1	6.1.1	7.1.1	8.1.1	GLV-1h68	WR	Cop			
	Proteína tipo ankirina	1725	1242	1725	1242	1239	1242	1242	1242	732	1242	1242	gl273	WR199	B18R
	Crme (List195, Viruela Bovina)	-	504	-	504	504	504	504	504	504	504	504	Ninguno		
	Proteína anti-apoptótica Golgi [List 196, m8261R, mO261R]	-	714	-	714	714	714	714	714	714	714	714	Ninguno		
	Proteína m8L_TR01L, m8RTR01R hipotética	-	198	-	450	444	444	444	444	444	444	444	Ninguno		
	Glicoproteína secretada tipo receptor de IFN alfa/beta	1056	-	1056	-	-	-	-	-	-	-	-	gl274	WR200	B19R
	Proteína de unión a interleucina 18	375	-	516	-	-	-	-	-	-	-	-	gl277/105	WR013	
	IL-1Ra	996	-	996	-	-	-	-	-	-	-	-	gl280/011	WR209/010	C10L
	Proteína tipo factor de crecimiento epidérmico secretado	417	-	417	-	-	-	-	-	-	-	-	gl282/010	WR210/009	C11R
	Inhibidor de serina proteasa tipo SPI-1	1065	-	1065	-	-	-	-	-	-	-	-	gl283/009	WR205	C12L

Introducción de un gen que codifica una proteína heteróloga en un producto aislado clonal LIVP

5 En este Ejemplo, se inserta un gen que codifica una proteína heteróloga en un producto aislado clonal LIVP mediante 1) clonación directa o 2) recombinación homóloga.

A. Clonación directa

10 En este Ejemplo, se construye un virus LIVP que codifica una proteína heteróloga mediante clonación directa de acuerdo con el método expuesto por Scheifflinger et al. (1992) en Proc. Natl Acad Sci. USA 89:9977-9981 y en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.265.183. En este método, el ácido nucleico que codifica la proteína heteróloga se inserta en un sitio de escisión de endonucleasa de restricción único ubicado en una región no esencial en el genoma viral. Por ejemplo, el gen que codifica la proteína heteróloga se inserta en el sitio NotI de LIVP 1.1.1, LIVP 2.1.1, LIVP 3.1.1, LIVP 4.1.1, LIVP 5.1.1, LIVP 6.1.1, LIVP 7.1.1, LIVP 8.1.1 y GLV-1h68 (GL-ONC1). En la Tabla 66 a continuación se expone una lista de proteínas heterólogas codificadas a modo de ejemplo, y la secuencia de ácido nucleico codificante (SEQ ID NO).

Tabla 66. Genes heterólogos		
Productos genéticos detectables		SEQ ID NO
Generación de imágenes ópticas		
Luciferasa		
	luciferasa (de <i>Vibrio Harveyi</i> o <i>Vibrio fischerii</i>)	
	luxA	27
	luxB	28
	luxC	29
	luxD	30
	luxE	31
	luxAB	314
	luxCD	317
	luxABCDE	323
Luciferasa de escarabajo click		
	CBG99-mRFP1	25
Proteínas de fusión		
	Ruc-G FP	24
Proteínas Fluorescentes		
Proteína fluorescente rojo lejano		
	Vector de expresión TurboFP635	283
	mNeptune Proteína fluorescente rojo lejano monomérica	85
IFP (proteína fluorescente infrarrojo)		284
	Flavina Reductasa frp	84
	Proteína de unión a celenterazina 1 CBP	86

Tabla 66. Genes heterólogos.		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
Imágenes PET		
	Cyp11B1 Variante 1 del transcrito	40
	Cyp11B1 Variante 2 del transcrito	39
	Cyp11B2	41

Tabla 66. Genes heterólogos.		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
Imágenes PET		
	AlstR	87
	PEPR-1	194
	LAT-4 o SLC43A2	88
	Cyp51 Variante 1 del transcrito	42
	Cyp51 Variante 2 del transcrito	43
Proteínas transportadoras		
Familias de proteínas transportadoras de portadores de soluto (SLC)		
SLC5 familia de proteínas transportadoras portadoras de soluto 5		
	SLC5A1 cotransportador de sodio/glucosa 1	109
	SLC5A2 cotransportador de sodio/glucosa 2	110
	SLC5A3 cotransportador de sodio/mio-inositol	111
	SLC5A4 cotransportador de sodio-glucosa de baja afinidad	112
	SLC5A5 cotransportador de sodio/yoduro	108
	SLC5A6 Transportador multivitamínico dependiente de sodio	113
	SLC5A7 Transportador 1 de colina de alta afinidad	114
	SLC5A8 Transportador 1 de monocarboxilato acoplado a sodio	115
	SLC5A9 cotransportador 4 de sodio/glucosa	116
	SLC5A10 cotransportador 5 de sodio/glucosa, isoforma 1	117
	cotransportador 5 de sodio/glucosa, isoforma 2	118
	cotransportador 5 de sodio/glucosa, isoforma 3	119
	cotransportador 5 de sodio/glucosa, isoforma 4	120
	SLC5A11 cotransportador 2 de sodio/mio-inositol, isoforma 1	121
	cotransportador 2 de sodio/mio-inositol, isoforma 2	122
	cotransportador 2 de sodio/mio-inositol, isoforma 3	123
	cotransportador 2 de sodio/mio-inositol, isoforma 4	124
	SLC5A12 transportador 2 de monocarboxilato acoplado a sodio, isoforma 1	125
	transportador 2 de monocarboxilato acoplado a sodio, isoforma 2	126
Simportador de yoduro de sodio (NIS)		
	hNIS (NM_000453)	36
	hNIS (BC105049)	37
	hNIS (BC105047)	38
	hNIS (variante de hNIS no funcional que contiene 11 aa adicionales)	289
SLC6 familia de proteínas transportadoras de portadores de soluto 6		
	SLC6A1 transportador 1 de GABA dependiente de sodio y cloruro	130
	SLC6A2 transportador de norepinefrina (transportador de noradrenalina dependiente de sodio)	127
	SLC6A3 transportador de dopamina dependiente de sodio	129
	SLC6A4 transportador de serotonina dependiente de sodio	128

ES 2 733 211 T3

Simportador de yoduro de sodio (NIS)		
SLC6A5	1 transportador de glicina dependiente de sodio y cloruro	133
SLC6A6	transportador de taurina dependiente de sodio y cloruro	136
SLC6A7	transportador de prolina dependiente de sodio	135
SLC6A8	transportador de creatina dependiente de sodio y cloruro	138
SLC6A9	transportador 2 de glicina dependiente de sodio y cloruro	134
	transportador de glicina dependiente de sodio y cloruro 1, isoforma 2	139
Tabla 66. Genes heterólogos.		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
	transportador 1 de glicina dependiente de sodio y cloruro, isoforma 3	140
SLC6A10	transportador de creatina dependiente de sodio y cloruro	141
SLC6A11	transportador 3 de GABA dependiente de sodio y cloruro	132
SLC6A12	transportador de betaína dependiente de sodio y cloruro	137
SLC6A13	transportador 2 de GABA dependiente de sodio y cloruro	131
SLC6A14	transportador de aminoácidos básicos y neutros dependientes de sodio y cloruro B (0+)	142
SLC6A 15	transportador de neurotransmisores dependiente de sodio y cloruro huérfano NTT73	143
SLC6A16	transportador de neurotransmisores dependiente de sodio y cloruro huérfano NTT5	144
SLC6A 17	transportador de neurotransmisores dependiente de sodio y cloruro huérfano NTT4	145
SLC6A18	transportador dependiente de sodio y cloruro XTRP2	146
SLC6A19	transportador de aminoácidos neutro dependiente de sodio B (0)	147
SLC6A20	transportador dependiente de sodio y cloruro XTRP3	148
Transportador De Norepinefrina (NET)		
	Variante 1 de transcrito Net Humano (hNET) (NM_001172504)	32
	Variante 2 de transcrito Net Humano (hNET) (NM_001172501)	33
	Variante 3 de transcrito Net Humano (hNET) (NM_001043)	34
	Variante 4 de transcrito Net Humano (hNET) (NM_001172502)	35
SLC11 familia de proteínas transportadoras de portadores de soluto 11		
	SCL11A2 o hDMT	
	SLC11A2 variante de transcrito 4	54
	SLC11A2 variante de transcrito 1	55
	SLC11A2 variante de transcrito 2	56
	SLC11A2 variante de transcrito 3	57
	SLC11A2 variante de transcrito 5	58
	SLC11 A2 variante de transcrito 6	59
	SLC11A2 variante de transcrito 7	60
SLC43 familia de proteínas transportadoras de portadores de soluto 43		
	SLC43A2	88
Generación de imágenes de resonancia magnética		

Generación de imágenes de resonancia magnética		
	Receptor humano de transferrina hTfR	44
	Receptor humano de transferrina hTfR	45
	Ratón transferrina receptor mTfR	46
	cadena ligera de ferritina humana FTL	47
	cadena pesada de ferritina humana FTH	48
	FTL 498-499InsTC, una forma mutada de la cadena ligera de ferritina	285
	Ferritina bacteriana ftn	
	<i>E. coli</i>	49
	<i>E. coli</i> cepa K12	50
	<i>S. aureus</i> cepa MRSA252	51
	<i>S. aureus</i> cepa NCTC 8325	52
	<i>H. pylori</i> B8	53
	bacterioferritina	90
	bacterioferritina con codones optimizados	290
	MagA	280
Enzimas que modifican un sustrato para producir un producto o señal detectable, o son detectables por anticuerpos		
	alfa-amilasa	195
Tabla 66. Genes heterólogos.		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
	fosfatasa alcalina	196
	peroxidasa	198
	oxidorreductasa	199
	pirofosfatasa	200
Genes terapéuticos		
Moléculas inmunomoduladoras		
	GM-CSF	61
	MCP-1 (Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1) o CCL2 humana	62
	MCP-1 murina	201
	IP-10 o ligando de quimiocina 10 (CXCL10)	66
	LIGHT	281
	P60 o SEQSTM1 (variante de transcrito 1 de Secuestosoma 1)	67
	P60 o SEQSTM1 (variante de transcrito 3 de Secuestosoma 1)	68
	P60 o SEQSTM1 (variante de transcrito 2 de Secuestosoma 1)	69
	OspF	202
	OspG	203
	STAT1alfa	70
	STAT1beta	71
Interleucinas		
	IL-18 (Interleucina-18)	204

	Interleucinas	
	IL-11 (Interleucina-11)	205
	IL-6 (Interleucina-6)	206
	sIL-6R-IL-6	16
	interleuquina-12A	207
	interleucina-1 A	208
	interleucina-2	209
	IL-24 (interleucina-24)	15
	Variante de transcrito 1 de IL-24	63
	Variante de transcrito 4 de IL-24	64
	Variante de transcrito 5 de IL-24	65
	IL-4	210
	IL-8	211
	IL-10	212
	quimiocinas	
	IP-10 (CXCL)	66
	MIP-2	213
	Trombopoyetina	214
	RANTES	215
	MIP-1 alfa	216
	MIP-1 beta	217
	Quimiocinas CXC	
	GRO α	218
	GRO β (MIP-2)	213
	GRO γ	219
	ENA-78	220
	LDGF-PPBP	221
	GCP-2	222
	PF4	223
Tabla 66. Genes heterólogos.		
	Productos génicos detectables	SEQ ID NO
	Mig	224
	IP-10	66
	SDF-1 α/β	225
	MIP-1 α	216
	MIP-1b	217
	RANTES	215
	Genes anti-angiogénicos/inhibidores de la angiogénesis	
	Dominio k5 de plasminógeno humano (hK5)	13
	PEDF o SERPINF1 (humano)	72
	PEDF o SERPINF1 (ratón)	282

ES 2 733 211 T3

	Genes anti-angiogénicos/inhibidores de la angiogénesis	
	anticuerpo de cadena sencilla anti-VEGF (G6)	73
	anticuerpo de cadena sencilla anti-DLL4 GLAF-3	302
	tTF-RGD	14
	Genes supresores de metástasis	
	Isoforma a o variante 1 de NM23 o NME1	74
	Isoforma b o variante 2 de NM23 o NME1	75
	Genes anti-metastásicos	
	E-Cad	76
	Gelsolina	226
	LKB1 (STK11)	227
	RASSF1	228
	RASSF2	229
	RASSF3	230
	RASSF4	231
	RASSF5	232
	RASSF6	233
	RASSF7	234
	RASSF8	235
	Syk	236
	TIMP-1	237
	TIMP-2	238
	TIMP-3	239
	TIMP-4	240
	BRMS-1	241
	CRMP-1	242
	CRSP3	243
	CTGF	244
	DRG1	245
	KAI1	246
	KiSS1 (kisspeptina)	247
	Mkk4	248
	Mkk6	249
	Mkk7	250
	RKIP	251
	RHOGLI2	252
	SSECKS	253
	TXNIP/VDUP1	254
	Genes de degradación de la matriz celular	
Tabla 66. Genes heterólogos		
Productos genéticos detectables		SEQ ID NO

ES 2 733 211 T3

	Genes anti-metastásicos	
	Relaxina 1	77
	hMMP9	78
Hormonas		
	Eritropoyetina Humana (EPO)	11
MicroARN		
	pre-miARN 181a (secuencia insertada en el genoma viral)	291
	miARN 181a	292
	mmu-miR-181a MIMAT0000210 miARN maduro 181a	293
	pre-miARN 126 (secuencia insertada en el genoma viral)	294
	miARNA 126	295
	hsa-miR-126 MI000471	296
	hsa-miR-126 MIMAT0000445	297
	pre-miARN 335 (secuencia insertada en el genoma viral)	298
	miARN 335	299
	hsa-miR-335 MI0000816	300
	hsa-miR-335 MIMAT0000765	301
Genes para la regeneración de tejidos y la reprogramación de células somáticas humanas a pluripotencia		
	nAG	255
	Oct4	256
	NANOG	257
	Variante de transcrito 1 de Ngn (Neogenina 1)	79
	Variante de transcrito 2 de Ngn (Neogenina 1)	80
	Variante de transcrito 3 de Ngn (Neogenina 1)	81
	Ng3	258
	Pdx1	82
	Mafa	83
Genes Adicionales		
	Myc-CTR1	259
	FCU1	260
	mMnSOD	287
	HACE1	261
	nppal	262
	CPG2	263
	hADH	288
	WT CDC6	264
	Mut CDC6	328
	GLAF-3	302
	GLAF-4	306
	GLAF-5	310

Genes para la regeneración de tejidos y la reprogramación de células somáticas humanas a pluripotencia		
	BMP4	265
	F14.5L tipo salvaje	266
Otras proteínas		
	WT1	267
	p53	268
	ArfOR p16	269
	Bax	270
	BRCA1	271
	regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR)	272
Tabla 66. Genes heterólogos.		
Productos génicos detectables		SEQ ID NO
	Factor VIII	273
	receptor de lipoproteínas de baja densidad	274
	alfa-galactosidasa	275
	beta-glucocerebrosidasa	276
	insulina	277
	hormona paratiroidea	278
	alfa-1-antitripsina	279
Reemplazo del gen A34R por otro gen A34R de una cepa diferente para aumentar la forma EEV del virus		
	Gen A34R reemplazado por el gen A34R de la cepa IHD-J de vaccinia	286

5 Brevemente, primero se construye un casete genético que contiene ácido nucleico que codifica el gen heterólogo unido operablemente a un promotor de virus vaccinia utilizando técnicas convencionales de ADN recombinante. El casete también contiene ácido nucleico que codifica una proteína marcadora unida operablemente a un promotor de virus vaccinia para la selección del virus recombinante. En este ejemplo, el gen de xantina (guanina) fosforribosiltransferasa (*gpt*) de *Escherichia coli* unido operablemente al promotor P7.5 del virus vaccinia está incluido en el casete. El casete del gen está flanqueado por ácido nucleico del sitio de escisión de la endonucleasa de restricción específica. En este Ejemplo, el casete está flanqueado por la secuencia del sitio de escisión de NotI GCGGCCGC (SEQ ID NO: 193). El casete del gen se liga en un vector de clonación para la propagación en bacterias.

15 El ADN viral de LIVP se prepara y se purifica de acuerdo con los métodos convencionales (véanse, p. ej., Gross-Bellard et al. (1973) Eur. J. Biochem. 36: 32-38). El ADN viral se escinde con la endonucleasa de restricción específica, NotI en este Ejemplo y se purifica de acuerdo con métodos convencionales, tales como la extracción con fenol/cloroformo. La integridad de los brazos del vector del virus LIVP se controla mediante electroforesis en gel de inversión de campo (p. ej., gel de agarosa al 1% en Tris 20 mM/ácido acético glacial 10 mM/EDTA 0,5 mM, pH 8,0; pulsos de avance/retroceso alternos de 7 V/cm con 1 segundo de pausa después - 1) F6 R3 (4 hr); 2) F4 R2 (4 h); 3) F2 R1 (4 h); 4) F8 R4 (8 h). El casete genético que codifica la proteína heteróloga y la proteína marcadora se escinden del vector de clonación mediante digestión con NotI y se ligan a la preparación de ADN viral escindido con NotI utilizando ADN-ligasa T4.

25 Para el empaquetamiento del virus, se infecta una monocapa confluyente de la línea celular de riñón de mono verde africano CV-1 a una M.O.I de 0,5 con un virus coadyuvante, viruela aviar HP1.441 durante 1 hora. El ADN viral ligado se transfecta en las células infectadas mediante transfección con fosfato de calcio convencional. Después de 3 días de incubación, las células se recogen y se prepara la provisión de partida viral bruta. La provisión de partida viral se utiliza para infectar monocapas de células CV-1 bajo selección con *gpt* (véase, Issacs, Vaccinia virus and poxvirology: methods and protocols, Humana Press (2004)). Los virus recombinantes que incorporan y expresan el *gpt* de *E. coli* pueden formar placas en un medio que contiene ácido micofenólico (MPA, un inhibidor del metabolismo de la purina) y los precursores de nucleótidos xantina e hipoxantina (véase Falkner y Moss (1988) J.

Viol. 62 (6): 1849-1854).

B. Recombinación homóloga

5 En este Ejemplo, se inserta un gen que codifica una proteína heteróloga (expuesto en la Tabla 66) en un virus LIVP, por ejemplo, LIVP 1.1.1, 2.1.1, 4.1.1, 5.1.1, 6.1.1, 7.1.1, 8.1.1 y GLV-1h68 (GL-ONC1) por medio de recombinación homóloga *in vivo* de acuerdo con un método similar al descrito en Patente de Estados Unidos. 7.588.767, Publicación de Patente de Estados Unidos. 2009-0117034 y Falkner y Moss (1990) J. Virol. 3108-3111. En este método, un gen que codifica una proteína heteróloga se clona en un plásmido lanzadera que se dirige a loci
10 particulares en un producto aislado clonal LIVP. A continuación, el gen se inserta en el genoma del producto aislado clonal mediante doble cruzamiento recíproco.

En resumen, se construye un vector de transferencia lanzadera que contiene ácido nucleico que codifica el gen heterólogo y se inserta en un plásmido que contiene un segmento de ADN de vaccinia deseado utilizando técnicas
15 de ADN recombinante convencionales. Típicamente, el ADN se inserta en un gen no esencial, por ejemplo, los genes F14.5, A56R o HA y se conecta a un promotor de vaccinia. Una lista de proteínas heterólogas ilustrativas se expone en la Tabla 66 anterior. El plásmido también puede incluir una proteína marcadora seleccionable dominante unida operablemente a un promotor del virus vaccinia para la selección del virus recombinante. El vector de transferencia lanzadera se liga en un vector de clonación para la propagación en bacterias.

20 Se emplean células de fibroblastos de riñón de mono verde africano CV-1 (Colección de Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA); CCL-70) para la generación y producción virales. Las células se cultivan en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con un suplemento de solución antibiótica-antimicótica al 1% (Mediatech, Inc., Herndon, VA) y suero bovino fetal al 10% (FBS; Mediatech, Inc., Herndon, VA) a 37 C bajo CO₂ al 5%. Las células CV-1 se infectan con el producto aislado clonal LIVP a una MOI de 0,1 por 1 hr. Las células infectadas se transfectan a continuación utilizando Fugene (Roche, Indianapolis, IN) con el vector de transferencia lanzadera. Dos días después de la infección, las células infectadas/transfectadas se recolectan y los virus recombinantes se seleccionan y se purifican en placa utilizando métodos convencionales como se describió anteriormente (Falkner y Moss (1990) J. Virol. 64: 3108-3111). Por ejemplo, los virus recombinantes que incorporan y expresan el gen *gpt* de
25 *E. coli* pueden formar placas en un medio que contiene ácido micofenólico (MPA, un inhibidor del metabolismo de la purina) y los precursores de nucleótidos xantina e hipoxantina (véase Falkner y Moss (1988) J. Virol. 62(6):1849-1854).

Ejemplo 12

Administración intravenosa de virus a pacientes humanos con cáncer avanzado

35 En este ejemplo, cada uno de los virus LIVP 1.1.1, 2.1.1, 4.1.1, 5.1.1, 6.1.1, 7.1.1, 8.1.1 o GLV-1h68 se administra en forma de una infusión intravenosa a pacientes con cáncer avanzado. Cada virus se administra utilizando ocho (8) regímenes de dosificación o cohortes a lo largo de un ciclo de 28 días y los efectos y respuestas de toxicidad se determinan y se comparan entre las cohortes. Hay tres pacientes en cada cohorte.

40 Para las cohortes 1-5, se administra el virus LIVP 1.1.1, 2.1.1, 4.1.1, 5.1.1, 6.1.1, 7.1.1, 8.1.1 o GLV-1h68 el día 1 del ciclo de 28 días en forma de una infusión intravenosa a dosis crecientes (1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , y 1×10^9 ufp, respectivamente). Las cohortes 6-7 reciben $1,667 \times 10^7$ o $1,667 \times 10^8$ ufp de virus, respectivamente, los días 1-3 del ciclo de 28 días. La cohorte 8 recibe 1×10^9 ufp de virus durante los primeros cinco (5) días consecutivos del ciclo de 28 días. Se lleva a cabo la generación de imágenes de los pacientes en el momento inicial y durante cada ciclo en pacientes con lesiones superficiales o de la mucosa. Los criterios de valoración también se evalúan a diario, lo que incluye seguridad, tolerabilidad, replicación viral, suministro a los tumores, desarrollo de anticuerpos neutralizadores y actividad antitumoral. Se evalúan los efectos tóxicos, tales como fatiga, fiebre, mialgia por rigor, síntomas parecidos a la gripe, erupción por Vaccinia, anemia, piel/cabello grasos y leucocitosis. Por ejemplo, se realiza un análisis de placa viral (VPA) en sangre, orina, heces y esputo para el derramamiento viral cada día del ciclo.

55 Los pacientes también son evaluados para determinar la respuesta a la terapia utilizando RECIST (Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos; RECIST 1.1, publicado en enero de 2009) para determinar si los pacientes mejoran ("responden"), permanecen igual ("estable") o empeoran ("progresión") durante los tratamientos. Los pacientes que tienen enfermedad estable o respuesta parcial continúan recibiendo ciclos de tratamiento posteriores. Los pacientes que tienen enfermedad progresiva se retiran del ensayo. Si el paciente tiene una respuesta al complemento, el tratamiento también se detendrá y el paciente será sometido a un seguimiento y se controlará su estado.

Ejemplo 13

65 **Perfiles transcripcionales de los factores de células anfitrionas del melanoma y expresión génica temprana**

del virus Vaccinia oncolítico - Infección y replicación virales

1. Métodos de análisis transcripcional y procesamiento de datos

5 Las líneas celulares de melanoma 888-MEL y 1936-MEL (líneas celulares de melanoma bien conocidas de metástasis cutáneas temporalmente distintas que se obtuvieron como describen Sabatino et al. (2008) Cancer Res., 68:122-131 y Monsurro et al. (2010) J. Transl. Med., 8:10; véanse también p. ej., Robbins et al. (2002) J. Immunol., 169: 6036-47; y Wang et al. (2006) J. Invest. Dermatol., 126: 1372-7) se infectaron con productos aislados de vaccinia GLV-1h68, LIVP 1.1.1, LIVP 5.1.1 o LIVP 6.1.1 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. Como control negativo, las líneas celulares también se trataron con un medio de infección libre de virus. Después de la infección, las células se incubaron en medio de cultivo celular a 37°C durante los tiempos indicados hasta la recolección. Las células se recolectaron a las 2, 6, 10, 24 y 48 horas después de la infección (hpi). Los títulos virales se determinaron mediante ensayos de placa convencionales en monocapas de células CV-1 para determinar la eficacia de replicación. El ARN total se aisló, amplificó, purificó y marcó utilizando procedimientos convencionales.

15 Los perfiles transcripcionales se generaron a través de plataformas de matrices de vaccinia humanas de 36.000 (36k) (Wang et al. (2005) J. transl. Med., 3:28) o hechas a medida (VACV) (VACGLa520445F, Affymetrix, CA; véase Worschech et al. (2009) BMC Genomics, 10:301). Para la hibridación de matriz humana de 36 k se utilizó un sistema de dos colores; tanto el ARNa de referencia como el de prueba se marcaron directamente utilizando el Kit ULS aRNA Fluorescent Labeling (Kreatech Diagnostics, Ámsterdam, Países Bajos) con Cy3 como muestra de referencia y Cy5 como muestra de prueba y se hibridaron conjuntamente en los portaobjetos. Después de 20 horas de incubación a 42°C, las matrices se lavaron, se secaron y se sometieron a barrido utilizando un escáner Agilent. La expresión del gen de Vaccinia (VACV) se evaluó mediante una plataforma de matrices VACV hecha a medida (VACG1a520445F; Affymetrix, CA) que incluía 308 sondas que representaban 219 genes que cubrían el genoma combinado de varias cepas de VACV, el gen de fusión de luciferasa de *Renilla-Aequorea* y 337 genes "constitutivos" humanos o de ratón (393 sondas) (véase p. ej., Worschech et al. (2009) BMC Genomics, 10:301). La calidad de la matriz se documentó como se describió anteriormente (Wang E (2005) J. Transl. Med., 3:28).

30 Se amplificaron 6,5 µg de ARN a partir del ARN total utilizando el kit GeneChip® 3 'IVT Express (Affymetrix, Santa Clara, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se hibridaron con el chip. Después de 16 horas de incubación en el horno de hibridación a 45°C, las matrices se lavaron y se tiñeron en la estación de Fluidics utilizando el kit GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix). Las matrices se sometieron a barrido utilizando el GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix).

35 Los datos transcripcionales se cargaron en la base de datos de MicroArray (mAdb; disponible en madb.nci.nih.gov o nciarray.nci.nih.gov) y se analizaron adicionalmente utilizando BRBArrayTools desarrollado por Biometric Research Branch, National Cancer Institute (linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html; véase p. ej., Jin et al. (2004) BMC Genomics, 5:55) o el soporte lógico Partek™ Genomics Suite (St. Louis, MO) según corresponda. Los promedios de las razones se corrigieron a través de muestras experimentales y se mostraron de acuerdo con un algoritmo de correlación no centrado. Para el análisis estadístico, el perfil de expresión del conjunto de datos completo después de la infección se filtró para incluir solo 95% de la presencia de genes y una multiplicidad de cambio de 2 en todos los experimentos (filtro 95%, 2 veces) para enriquecer los transcritos informativos. La comparación de clases se realizó mediante la prueba t de Student no pareada paramétrica o ANOVA de 3 vías. Por separado, también se aplicó una exclusión/inclusión de la desviación típica (STDEV, por sus siglas en inglés) a la lista original de genes (no la prefiltrada) porque las estadísticas convencionales no segregaron las muestras de control de las infectadas. Para esto, el primer filtro excluyó los genes con STDEV > 0,25 entre los controles para eliminar los genes expresados de manera diferente por el efecto del cultivo celular no específico para la infección viral, y el segundo filtro incluyó los genes con STDEV > 0,7 (888-MEL) o > 0,4 (1936-MEL) para incluir entre los genes seleccionados por la primera etapa de filtrado solo aquellos con una STDEV elevada en muestras infectadas. La interpretación de la función génica se basó en el Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems). Los datos recuperados de la plataforma de Affymetrix se normalizaron utilizando un método de enfoque Robust Multichip Average (RMA).

2. Resultados

55 a. Cambios transcripcionales de genes humanos

Las muestras no infectadas, tomadas en diferentes momentos, se segregaron junto con muestras infectadas según el tiempo en cultivo (efecto de cultivo celular), incluso después de aplicar estadísticas convencionales (ANOVA). Utilizando los criterios de inclusión/exclusión de STDEV, se obtuvo específicamente una lista de genes afectados por la infección por el virus vaccinia (véanse las Tablas 67 y 68). Específicamente, a partir de los enfoques estadísticos secuenciales diseñados, 507 y 480 genes fueron afectados por el virus en las líneas 888 y 1936, respectivamente. Después de aplicar un filtro de 90%, se identificaron 400 genes que cambiaron en la línea celular 888-MEL y se identificaron 370 genes que cambiaron en la línea celular 1936-MEL, y en total se identificaron 703 genes humanos que cambiaron específicamente debido a la infección del virus. Los genes afectados por el virus estaban involucrados en amplias funciones celulares tales como la muerte celular, el crecimiento y la proliferación celulares,

ES 2 733 211 T3

la síntesis y plegamiento de proteínas y la replicación, la recombinación y la reparación. del ADN.

TABLA 67: Cambios transcripcionales de MEL-1936 (exclusión/inclusión de STDEV sin filtro)
WDR3 - dominio de repeticiones WD 3 (WDR3), ARNm
MAFF - homólogo de oncogén de fibrosarcoma musculoaponeurótico v-maf F (aviar) (MAFF), variante de transcrito 1, ARNm
NUP155 - nucleoporina 155 kDa (NUP155), variante de transcrito 1, ARNm
VGF - factor de crecimiento nervioso inducible (VGF), ARNm
CDH24 - cadherina 24, tipo 2 (CDH24), variante de transcrito 2, ARNm
DNAJB13 - homólogo de DnaJ (Hsp40), subfamilia B, miembro 13 (DNAJB13), ARNm
MYCN - oncogén relacionado con el virus de la mielocitomatosis v-myc, neuroblastoma derivado (aviar) (MYCN), ARNm
PLEKHO2 - dominio de homología de pleckstrina que contiene el miembro 2 de la familia O (PLEKHO2), variante de transcrito 2, ARNm
RXRA - receptor de retinoides X, alfa (RXRA), ARNm
GTSE1 - Fase G-2 y S expresado 1
KIAA0913 - KIAA0913
ARL10 - 10 de tipo ribosilación de ADP (ARL10), ARNm
HLA-DPB1 - complejo principal de histocompatibilidad, clase II, DP beta 1 (HLA-DPB1), ARNm
PNPLA6 - Dominio de fosfolipasa de tipo Patatina que contiene 6
DOCK6 - dedicator de citocinesis 6 (DOCK6), ARNm
ZNF238 - proteína de dedo de zinc 238 (ZNF238), variante de transcrito 1, ARNm
KIAA1683 - KIAA1683 (KIAA1683), variante de transcrito 2, ARNm
ANK3 - anquirina 3, nódulo de Ranvier (anquirina G) (ANK3), variante de transcrito 1, ARNm
MRPL9 - proteína ribosomal mitocondrial L9 (MRPL9), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
MARCKS - sustrato de proteína cinasa C rica en alanina miristoilada (MARCKS), ARNm
TBC1D9B - Familia de dominios TBC1, miembro 9B (con dominio GRAM) (TBC1D9B), variante de transcrito 2, ARNm
- Locus transcrito, muy similar a NP_113751.3 proteína 1 de unión a elemento sensible a nucleasa [Rattus norvegicus]
RILPL1 - Proteína lisosomal que interactúa con Rab similar a 1 (RILPL1), ARNm
ZDHHC8P1: dedo de zinc, tipo DHHC que contiene 8 pseudogenes 1 (ZDHHC8P1), ARN no codificante
LOC390282 - PRONOSTICADO: similar a hCG2040283 (LOC390282), ARNm
BEX1 - expresado en el cerebro, ligado a X 1 (BEX1), ARNm
UNC13B - unc-13 homólogo B (C. elegans) (UNC13B), ARNm
YY1 - Factor de transcripción YY1 (YY1), ARNm
BAX - proteína X asociada a BCL2 (BAX), variante de transcrito alfa, ARNm
INTS3 - subunidad 3 del complejo integrador (INTS3), ARNm
WDR74 - dominio de repeticiones WD 74 (WDR74), ARNm
PPPDE2: dominio peptidasa PPPDE que contiene 2 (PPPDE2), ARNm
PARP9 - familia de poli (ADP-ribosa) polimerasa, miembro 9 (PARP9), variante de transcrito 2, ARNm
LOC80154 - LOC80154 hipotético (LOC80154), ARN no codificante
YIPF4 - Familia de dominios Yip1, miembro 4 (YIPF4), ARNm

ES 2 733 211 T3

TABLA 67: Cambios transcripcionales de MEL-1936 (exclusión/inclusión de STDEV sin filtro)
SLC25A4 - familia de portadores de soluto 25 (portador mitocondrial; translocador de nucleótidos de adenina), miembro 4 (SLC25A4), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
CSRNP2 - proteína nuclear rica en cisteína-serina 2 (CSRNP2), ARNm
PDLIM7 - dominio PDZ y LIM 7 (enigma) (PDLIM7), variante de transcrito 4, ARNm
BCAR1: resistencia anti-estrógenos en cáncer de mama 1 (BCAR1), variante de transcrito 2, ARNm
CCDC85C - dominio de bobina enrollada que contiene 85C (CCDC85C), ARNm
SCAMP3 - proteína 3 de la membrana portadora secretora (SCAMP3), variante de transcrito 2, ARNm
ADPRHL2 - ADP-ribosilhidrolasa similar a 2 (ADPRHL2), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
POLDIP2 - polimerasa (dirigida por ADN), proteína que interactúa en delta 2 (POLDIP2), ARNm
SIGMAR1: receptor intracelular no opioide sigma 1 (SIGMAR1), variante de transcrito 1, ARNm
PKM2 - piruvato quinasa, músculo (PKM2), variante de transcrito 2, ARNm
C1orf106 - marco de lectura abierto del cromosoma 1 106 (C1orf106), variante de transcrito 1, ARNm
AKT2 - homólogo 2 del oncogén viral de timoma murino v-akt (AKT2), ARNm
POLR2A - Polimerasa (ARN) II (ADN dirigida) polipéptido A, 220 kDa (POLR2A), ARNm
CAPN2 - calpaína 2, (m/II) subunidad grande (CAPN2), variante de transcrito 1, ARNm
APEH - N-acilaminoacil-péptido hidrolasa (APEH), ARNm
CEP55 - proteína centrosomal 55 kDa (CEP55), variante de transcrito 1, ARNm
PLK1 - quinasa tipo polo 1 (PLK1), ARNm
DHX9 - DEAH (Asp-Glu-Ala-His) cuadro polipéptido 9 (DHX9), variante de transcrito 1, ARNm
TUSC2 - candidato supresor de tumores 2 (TUSC2), ARNm
GEMIN5 - proteína asociada a gem (orgánulo nuclear) 5 (GEMIN5), ARNm
PPP1CC - proteína fosfatasa 1, subunidad catalítica, isoenzima gamma (PPP1CC), ARNm
TAF11 - ARN polimerasa II de TAF11, factor asociado a la proteína de unión a la caja TATA (TBP), 28 kDa (TAF11), ARNm
CTBP2 - proteína de unión C-terminal 2 (CTBP2), variante de transcrito 1, ARNm
CANX - calnexina (CANX), variante de transcrito 2, ARNm
TCEB2 - factor de elongación de la transcripción B (SIII), polipéptido 2 (18 kDa, elongina B) (TCEB2), variante de transcrito 1, ARNm
HMGB3 - grupo de alta movilidad caja 3 (HMGB3), ARNm
ADRM1 - molécula reguladora de adhesión 1 (ADRM1), variante de transcrito 2, ARNm
SIVA1 - SIVA1, factor inductor de apoptosis (SIVA1), variante de transcrito 1, ARNm
C2orf7 - marco de lectura abierto 7 del cromosoma 2 (C2orf7), ARNm
TRAM1 - proteína 1 de membrana asociada a la traslocación (TRAM1), ARNm
ATIC - 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa/IMP ciclohidrolasa (ATIC), ARNm
MRPS26 - proteína ribosomal mitocondrial S26 (MRPS26), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
GSPT1: transición de la fase G1 a S 1 (GSPT1), variante de transcrito 2, ARNm
LRP3 - proteína 3 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP3), ARNm
STAR: proteína reguladora aguda esteroideogénica (STAR), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
COQ4 - homólogo de coenzima Q4 (S. cerevisiae) (COQ4), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
ABCB6: casete de unión a ATP, subfamilia B (MDR/TAP), miembro 6 (ABCB6), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm

ES 2 733 211 T3

TABLA 67: Cambios transcripcionales de MEL-1936 (exclusión/inclusión de STDEV sin filtro)
LAPTM4B - proteína lisosomal transmembrana 4 beta (LAPTM4B), ARNm
ACAA2 - acetil-CoA aciltransferasa 2 (ACAA2), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
UROS - uroporphyrinogen III sintasa (UROS), ARNm
C20orf3 - marco de lectura abierto 3 del cromosoma 20 (C20orf3), ARNm
IARS2 - isoleucil-ARNt sintetasa 2, mitocondrial (IARS2), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
TACO1 - activador de la traducción de la citocromo c oxidasa I codificada mitocondrialmente (TACO1), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
CENPV - proteína centromérica V (CENPV), ARNm
DGCR2 - gen 2 de la región crítica del síndrome de DiGeorge (DGCR2), variante de transcrito 3, ARNm
NOC4L - homólogo asociado a complejo nucleolar 4 (S. cerevisiae) (NOC4L), ARNm
PUF60 - factor de empalme de unión a poli-U 60 KDa (PUF60), variante de transcrito 2, ARNm
PDCD6 - muerte celular programada 6 (PDCD6), ARNm
C7orf42 - marco de lectura abierto 42 del cromosoma 7 (C7orf42), ARNm
YWHAB - proteína de activación de tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa, polipéptido beta (YWHAB), variante de transcrito 2, ARNm
CUL1 - culina 1 (CUL1), ARNm
GLT25D1 - dominio de glicosiltransferasa 25 que contiene 1 (GLT25D1), ARNm
FIBP - proteína de unión intracelular (FIBP) al factor de crecimiento de fibroblastos (ácido), variante de transcrito 2, ARNm
WDR18 - dominio de repeticiones WD 18 (WDR18), ARNm
KEAP1 - proteína 1 asociada a ECH de tipo kelch (KEAP1), variante de transcrito 2, ARNm
POLR2E - Polimerasa (RNA) II (ADN dirigida) polipéptido E, 25kDa (POLR2E), ARNm
ATP5A1 - ATP sintasa, H ⁺ transportadora, complejo mitocondrial F1, subunidad alfa 1, músculo cardíaco (ATP5A1), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 2, ARNm
NUCKS1 - caseína quinasa nuclear y sustrato de quinasa dependiente de ciclina 1
IQSEC3 - Motivo IQ y dominio Sec7 3 (IQSEC3), variante de transcrito 1, ARNm
SOCS2 - supresor de la señalización de citocinas 2 (SOCS2), ARNm
NCOA5 - coactivador del receptor nuclear 5 (NCOA5), ARNm
ATP5B - ATP sintasa, transportadora de H ⁺ , complejo mitocondrial F1, polipéptido beta (ATP5B), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
ALDH3A2 - familia de aldehído deshidrogenasa 3, miembro A2 (ALDH3A2), variante de transcrito 2, ARNm
EIF3J - factor 3 de iniciación de la traducción eucariótica 3, subunidad J (EIF3J), ARNm
MRFAP1 - proteína 1 asociada a la familia Mof4 (MRFAP1), ARNm
PKMYT1 - proteína quinasa, tirosina/treonina 1 asociada a membrana (PKMYT1), variante de transcrito 1, ARNm
SNRPC - polipéptido C de ribonucleoproteína nuclear pequeña (SNRPC), variante de transcrito 1, ARNm
CD320 - molécula CD320 (CD320), variante de transcrito 1, ARNm
GALK1 - galactosidasa 1 (GALK1), ARNm
PDF - péptido desformilasa (mitocondrial) (PDF), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
SRD5A1 - esteroide-5-alfa-reductasa, alfa polipéptido 1 (3-oxo-5 alfa-esteroide delta 4-deshidrogenasa alfa 1) (SRD5A1), ARNm
LANCL2 - componente tipo 2 de la lantionina sintetasa (bacteriana) (LANCL2), ARNm
CETN2 - centrina, proteína mano EF, 2 (CETN2), ARNm

ES 2 733 211 T3

TABLA 67: Cambios transcripcionales de MEL-1936 (exclusión/inclusión de STDEV sin filtro)
DNAJA2 - homólogo de DnaJ (Hsp40), subfamilia A, miembro 2 (DNAJA2), ARNm
ALDH7A1 - familia aldehído deshidrogenasa 7, miembro A1 (ALDH7A1), ARNm
PREP - prolil endopeptidasa (PREP), ARNm
GNA11 - proteína de unión a nucleótido de guanina (proteína G), alfa 11 (clase Gq) (GNA11), ARNm
GYS1 - glucógeno sintasa 1 (músculo) (GYS1), variante de transcrito 1, ARNm
MTP18 - proteína mitocondrial 18 kDa (MTP18), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 1, ARNm
DCXR - dicarbonil/L-xilulosa reductasa (DCXR), variante de transcrito 2, ARNm
PABPC4 - proteína de unión a poli(A), citoplásmica 4 (forma inducible) (PABPC4), variante de transcrito 2, ARNm
CDK4 - quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4), ARNm
ARFIP2 - proteína 2 que interactúa con el factor de ribosilación de ADP (ARFIP2), ARNm
ARHGEF10 - Factor de intercambio de nucleótidos de guanina rho (GEF) 10 (ARHGEF10), ARNm
PTDSS1 - fosfatidilserina sintasa 1 (PTDSS1), ARNm
SAMM50: homólogo del componente 50 de la maquinaria de clasificación y ensamblaje (<i>S. cerevisiae</i>) (SAMM50), ARNm
KIAA2013 - KIAA2013
IRAK1 - quinasa 1 asociada al receptor de interleucina-1 (IRAK1), variante de transcrito 2, ARNm
PWP2 - homólogo a la proteína de triptófano periódica PWP2 (levadura) (PWP2), ARNm
CSK - c-src tirosina quinasa (CSK), variante de transcrito 2, ARNm
MRPS2 - proteína ribosomal mitocondrial S2 (MRPS2), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
NDUFAF3 - NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, factor de ensamblaje 3 (NDUFAF3), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 2, ARNm
CARS2 - cisteinil-ARNt sintetasa 2, mitocondrial (supuesto) (CARS2), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
PSMD2: subunidad 26S de proteosoma (prosoma, macropáina), no ATPasa, 2 (PSMD2), ARNm
ACTB - actina, beta (ACTB), ARNm
LYN - homólogo del oncogén relacionado con el virus del sarcoma de Yamaguchi v-yes-1 (LYN), variante de transcrito 2, ARNm
HSD17B10 - hidroxisteroide (17-beta) deshidrogenasa 10 (HSD17B10), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 2, ARNm
C9orf140 - marco de lectura abierto 140 del cromosoma 9 (C9orf140), ARNm
PLK1 - quinasa tipo polo 1 (PLK1), ARNm
RUVBL2 - 2 tipo RuvB (<i>E. coli</i>) (RUVBL2), ARNm
TSEN54 - homólogo de endonucleasa de empalme de ARNt 54 (<i>S. cerevisiae</i>) (TSEN54), ARNm
EPHB4 - receptor de EPH B4 (EPHB4), ARNm
ADCY3 - adenilato ciclasa 3 (ADCY3), ARNm
HNRNPL - ribonucleoproteína heterogénea nuclear L (HNRNPL), variante de transcrito 1, ARNm
CECR5 - región cromosómica del síndrome del ojo de gato, candidato 5 (CECR5), variante de transcrito 1, ARNm
HNRNPM - ribonucleoproteína heterogénea nuclear M (HNRNPM), variante de transcrito 2, ARNm
CRIP2: proteína 2 rica en cisteína (CRIP2), ARNm
TAX1BP3 - proteína de unión a Tax1 (virus de la leucemia de células T humana tipo I) 3 (TAX1BP3), ARNm
CDK2AP1 - proteína 1 asociada a la quinasa 2 dependiente de ciclina (CDK2AP1), ARNm

ES 2 733 211 T3

TABLA 67: Cambios transcripcionales de MEL-1936 (exclusión/inclusión de STDEV sin filtro)
NT5DC2- 2 que contiene el dominio de nucleotidasa 5' (NT5DC2), variante de transcrito 1, ARNm
C8orf55 - marco de lectura abierto 55 del cromosoma 8 (C8orf55), ARNm
AKAP8 - proteína de anclaje de quinasa A (PRKA) 8 (AKAP8), ARNm
ENTPD6 - ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 6 (supuesto) (ENTPD6), variante de transcrito 2, ARNm
HYAL2 - hialuronoglucosaminidasa 2 (HYAL2), variante de transcrito 2, ARNm
MYH10 - miosina, cadena pesada 10, no muscular (MYH10), ARNm
B3GALT6 - UDP-Gal:betaGal beta 1,3-galactosiltransferasa polipéptido 6 (B3GALT6), ARNm
C19orf43 - marco de lectura abierto 43 del cromosoma 19 (C19orf43), ARNm
PDCD2 - muerte celular programada 2 (PDCD2), variante de transcrito 1, ARNm
FEM1A - homólogo a de fem-1 (C. elegans) (FEM1A), ARNm
LUC7L3 - 3 tipo LUC7 (S. cerevisiae)
TAF4B - ARN polimerasa II de TAF4b, factor asociado a la proteína de unión a la caja TATA (TBP), 105 kDa (TAF4B), ARNm
LOC1119358 - PRONOSTICADA: similar a hCG2040270 (LOC1 19358), ARNm
C18orf22 - marco de lectura abierto 22 del cromosoma 18 (C18orf22), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 2, ARNm
ANAPC13 - subunidad 13 del complejo que promueve la anafase (ANAPC13), variante de transcrito 1, ARNm
KHSRP: proteína reguladora de empalme de tipo KH (KHSRP), ARNm
C16orf75 - marco de lectura abierto 75 del cromosoma 16 (C16orf75), ARNm
SLC25A3 - familia de portadores de solutos 25 (portador mitocondrial; portador de fosfato), miembro 3 (SLC25A3), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 3, ARNm
MRPL45 - proteína ribosomal mitocondrial L45 (MRPL45), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
SLC10A3 - familia de portadores de solutos 10 (familia cotransportadora de sodio/ácido biliar), miembro 3 (SLC10A3), variante de transcrito 3, ARNm
PATZ1 - POZ (BTB) y dedo de cinc 1 que contiene gancho AT (PATZ1), variante de transcrito 3, ARNm
HMBS - hidroximetilbilano sintasa (HMBS), variante de transcrito 2, ARNm
ASB13 - repetición de anquirina y que contiene caja SOCS 13 (ASB13), variante de transcrito 1, ARNm
IMPA2 - inositol (mio) -1 (o 4) -monofosfatasa 2 (IMPA2), ARNm
CKB: creatina quinasa, cerebro (CKB), ARNm
SLC8A2 - familia portadora de solutos 8 (intercambiador de sodio/calcio), miembro 2 (SLC8A2), ARNm
TXNRD3 - tiorredoxina reductasa 3 (TXNRD3), variante de transcrito 1, ARNm
HARS - histidil-ARNt sintetasa (HARS), ARNm
C2orf28 - marco de lectura abierto 28 del cromosoma 2 (C2orf28), variante de transcrito 1, ARNm
STOML2 - estomatina (EPB72) - tipo 2 (STOML2), ARNm
C17orf85 - marco de lectura abierto 85 del cromosoma 17 (C17orf85), variante de transcrito 1, ARNm
SHROOM3 - miembro de la familia shroom 3 (SHROOM3), ARNm
RAVER2-ribonucleoproteína, unión a PTB 2 (RAVER2), ARNm
CHCHD4: 4 que contiene dominio de hélice-bobina enrollada-hélice-bobina enrollada (CHCHD4), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 1, ARNm
ANKRD54 - dominio de repetición de anquirina 54 (ANKRD54), variante de transcrito 1, ARNm
LOC100130894 - LOC100130894 hipotética (LOC100130894), ARN no codificante
BTF3L3 - Factor de transcripción básico 3, tipo 3

ES 2 733 211 T3

TABLA 67: Cambios transcripcionales de MEL-1936 (exclusión/inclusión de STDEV sin filtro)
TMEM107 - proteína transmembrana 107 (TMEM107), variante de transcrito 2, ARNm
WBP2 - proteína de unión al dominio WW 2 (WBP2), ARNm
CSDA - proteína A del dominio de choque frío (CSDA), variante de transcrito 1, ARNm
HLA-J - complejo principal de histocompatibilidad, clase I, J (pseudogen) (HLA-J), ARN no codificante
RFPL1 - proteína en dedo de cinc ret 1 (RFPL1), ARNm
ANPEP - alanil (membrana) aminopeptidasa (ANPEP), ARNm
ASXL2 - Peines sexuales adicionales tipo 2 (Drosophila)
CSNK1G2 - caseína quinasa 1, gamma 2 (CSNK1G2), ARNm
RPL27 - proteína ribosomal L27 (RPL27), ARNm
RPL10 - proteína ribosomal L10 (RPL10), variante de transcrito 1, ARNm
PTPN9 - proteína tirosina fosfatasa, no receptor tipo 9 (PTPN9), ARNm
RABL2B - RAB, miembro de la familia del oncogén RAS tipo 2B (RABL2B), variante de transcrito 5, ARNm
TRIM11 - 11 que contiene motivo tripartito
RPL6 - proteína ribosomal L6 (RPL6), variante de transcrito 1, ARNm
MXD1 - proteína de dimerización MAX 1 (MXD1), ARNm
HLA-DRB5 - complejo principal de histocompatibilidad, clase II, DR beta 5 (HLA-DRB5), ARNm
PSMB9: subunidad proteosoma (prosome, macropain), tipo beta, 9 (peptidasa multifuncional grande 2) (PSMB9), ARNm
HLA-DRB3 - complejo principal de histocompatibilidad, clase II, DR beta 3 (HLA-DRB3), ARNm
TNFAIP3: factor de necrosis tumoral, proteína inducida por alfa 3 (TNFAIP3), ARNm
IGKC - Inmunoglobulina kappa constante
ID2 - inhibidor de la unión de ADN 2, proteína en hélice-bucle-hélice dominante negativa (ID2), ARNm
HES1: piloso y potenciador de la división 1, (Drosophila) (HES1), ARNm
LOC100132984 - Proteína hipotética LOC100132984
ZNF706 - proteína de dedo de zinc 706 (ZNF706), variante de transcrito 3, ARNm
NCRNA00183 - ARN no codificante de proteína 183
PDZD11: 11 que contiene dominio PDZ (PDZD11), ARNm
C1orf147 - PRONOSTICADO: marco de lectura abierto 147 del cromosoma 1 (C1orf147), miscARN
RIPK2 - serina-treonina quinasa 2 que interactúa con el receptor (RIPK2), ARNm
ISG20 - gen de exonucleasa estimulada por interferón 20kDa (ISG20), ARNm
HLA-L - complejo principal de histocompatibilidad, clase I, L, pseudogen (HLA-L), ARN no codificante
FTSJD2 - 2 que contiene el dominio FtsJ metiltransferasa
LCP1 - proteína citosólica de linfocitos 1 (L-plastina) (LCP1), ARNm
SYNGR3 - sinaptogirina 3 (SYNGR3), ARNm
MAP1LC3B2 - cadena ligera 3 beta 2 de la proteína 1 asociada a microtúbulos (MAP1LC3B2), ARNm
ANKRD13D - familia del dominio 13 de repetición de anquirina, miembro D (ANKRD13D), variante de transcrito 1, ARNm
IDS - iduronato 2-sulfatasa (IDS), variante de transcrito 1, ARNm
DPY19L2P2 - pseudogen 2 similar a dpy 19 2 (C. elegans) (DPY19L2P2), variante de transcrito 2, ARN no codificante
BCYRN1 - ARN citoplasmático cerebral 1 (no codificante de proteína) (BCYRN1), ARN no codificante

ES 2 733 211 T3

TABLA 67: Cambios transcripcionales de MEL-1936 (exclusión/inclusión de STDEV sin filtro)
ZNF492 - proteína de dedo de zinc 492 (ZNF492), ARNm
LCK - proteína tirosina quinasa específica de linfocitos (LCK), variante de transcrito 1, ARNm
HSPA1B - proteína 1B de choque térmico 70 kDa (HSPA1B), ARNm
LILRA2 - receptor de tipo inmunoglobulina leucocitaria, subfamilia A (con dominio TM), miembro 2 (LILRA2), variante de transcrito 2, ARNm
HLA-H - complejo principal de histocompatibilidad, clase I, H (pseudogén) (HLA-H), ARN no codificante
IL7R - receptor de interleucina 7 (IL7R), ARNm
GMFG - Factor de maduración de la glía, gamma
LGALS2 - lectina, unión de galactosido, soluble, 2 (LGALS2), ARNm
CCL5 - ligando 5 de quimiocina (motivo C-C) (CCL5), ARNm
FAM65B - familia con similitud de secuencia 65, miembro B (FAM65B), variante de transcrito 2, ARNm
DENND1C - dominio DENN/MADD que contiene 1C (DENND1C), ARNm
MYST3 - MYST histona acetiltransferasa (leucemia monocítica) 3 (MYST3), variante de transcrito 3, ARNm
FCGR3B - Fragmento Fc de IgG, IIIb de baja afinidad, receptor (CD16b) (FCGR3B), ARNm
RGS2 - regulador de la señalización de la proteína G 2, 24 kDa (RGS2), ARNm
CARD16 - familia de dominios de reclutamiento de caspasa, miembro 16 (CARD16), variante de transcrito 1, ARNm
PLXDC2: 2 que contiene dominio de plexina (PLXDC2), ARNm
CLC - proteína cristalina de Charcot-Leyden (CLC), ARNm
AOAH - aciloxiacil hidrolasa (neutrófilo) (AOAH), variante de transcrito 2, ARNm
GPR183 - receptor acoplado a proteína G 183 (GPR183), ARNm
TRPM2: canal de cationes con potencial de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 2 (TRPM2), ARNm
MMP25 - metalopeptidasa de la matriz 25 (MMP25), ARNm
LDLRAD2 - 2 que contiene dominio de clase A del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLRAD2), ARNm
C8orf51 - marco de lectura abierto 51 del cromosoma 8 (C8orf51), ARN no codificante
TUBB3 - tubulina, beta 3 (TUBB3), ARNm
LOC729213 - PRONOSTICADA: similar a la ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 5 (función supuesta) (LOC729213), ARNm
ZNF532 - Proteína de dedo de zinc 532
MGC23270 - LOC196872 hipotética (MGC23270), ARN no codificante
AHCY - adenosilhomocisteinasa (AHCY), variante de transcrito 1, ARNm
FLJ46838 - PRONOSTICADA: proteína FLJ46838 (FLJ46838), miscARN
HLA-DMA - complejo principal de histocompatibilidad, clase II, DM alfa (HLA-DMA), ARNm
C1orf91 - marco de lectura abierto 91 del cromosoma 1
DCP1A - homólogo la enzima de desprotección terminal A DCP1 (S. cerevisiae) (DCP1A), ARNm
ARC - proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (ARC), ARNm
CHN2 - quimerina (quimerina) 2 (CHN2), variante de transcrito 2, ARNm
RN18S1 - ARN, 18S ribosomal 1 (RN18S1), ARN ribosomal
UPK3A - uroplaquina 3A (UPK3A), variante de transcrito 2, ARNm
MBD3L5 - proteína 3 con dominio de unión a metil-CpG similar a 5 (MBD3L5), ARNm
HIST2H3C - grupo de histonas 2, H3c (HIST2H3C), ARNm
HIST2H3D - grupo de histonas 2, H3d (HIST2H3D), ARNm

ES 2 733 211 T3

TABLA 67: Cambios transcripcionales de MEL-1936 (exclusión/inclusión de STDEV sin filtro)
ZFAND2A - dedo de cinc, dominio 2A de tipo AN1 (ZFAND2A), ARNm
MICAL3 - monoxigenasa asociada a microtúbulos, calponina y dominio LIM de tipo 3 (MICAL3), variante de transcrito 2, ARNm
--Homo sapiens, clon IMAGE: 3862165, ARNm
ZNF354B - Proteína de dedo de zinc 354B
CEBPB - proteína de unión a CCAAT/potenciador (C/EBP), beta (CEBPB), ARNm
LTB4R - receptor de leucotrieno B4 (LTB4R), variante de transcrito 2, ARNm
RN28S1 - ARN, ribosomal 28S 1 (RN28S1), RNA ribosomal
HIST1H3D - grupo de histonas 1, H3d (HIST1H3D), ARNm
FLJ31662 - LOC440594 hipotética (FLJ31662), ARN no codificante
MLL5 - leucemia mieloide/linfoide o de linaje mixto 5 (homólogo de trithorax, Drosophila) (MLL5), variante de transcrito 2, ARNm
CALB2 - calbindina 2 (CALB2), variante de transcrito CALB2c, ARNm
IER5: respuesta temprana inmediata 5 (IER5), ARNm
SLC38A9 - familia portadora de solutos 38, miembro 9
AFF1 - familia AF4/FMR2, miembro 1
C8orf79 - marco de lectura abierto 79 del cromosoma 8 (C8orf79), variante de transcrito 2, ARNm
ABCA4 - Casete de unión a ATP, subfamilia A (ABC1), miembro 4 (ABCA4), ARNm
TUBB2B - tubulina, beta 2B (TUBB2B), ARNm
SULT4A1 - familia de sulfotransferasa 4A, miembro 1 (SULT4A1), ARNm
HELLS - Helicasa, específica linfoide
TBL2 - transducina (beta) - tipo 2 (TBL2), ARNm
GPN3 - GPN-bucle GTPasa 3 (GPN3), variante de transcrito 2, ARNm
HMGB1 - grupo de alta movilidad caja 1 (HMGB1), ARNm
TPTE2P2 - fosfoinositido 3-fosfatasa transmembrana y homólogo de tensina 2 pseudogén 2 (TPTE2P2), ARN no codificante
TPTE2P2 - fosfoinositido transmembrana 3-fosfatasa y tensina homólogo 2 pseudogén 2 (TPTE2P2), ARN no codificante.
H2BFS - familia de histonas H2B, miembro S
ALAS2 - aminolevulinato, delta, sintasa 2 (ALAS2), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 3, ARNm
PHF10 - proteína de dedo PHD 10
LOC150519 - PRONOSTICADA: LOC150519 hipotética (LOC150519), miscARN
RNF175 - proteína de dedo anular 175 (RNF175), ARNm
S100A11P - PROTEÍNA DE UNIÓN A CALCIO S100 A14
BRWD1 - 1 que contiene bromodominio y dominio de repetición de WD (BRWD1), variante de transcrito 2, ARNm
DUSP6 - fosfatasa 6 de especificidad dual (DUSP6), variante de transcrito 1, ARNm
CITED2 - transactivador que interactúa con Cbp/p300, con dominio carboxi-terminal rico en Glu/Asp, 2 (CITED2), variante de transcrito 1, ARNm
FBLN1 - fibulina 1 (FBLN1), variante de transcrito C, ARNm
SNX17 - nexina de clasificación 17 (SNX17), ARNm
CTBP1 - proteína de unión C-terminal 1 (CTBP1), variante de transcrito 2, ARNm

ES 2 733 211 T3

TABLA 67: Cambios transcripcionales de MEL-1936 (exclusión/inclusión de STDEV sin filtro)
REEP6 - proteína accesoria receptora 6 (REEP6), ARNm
ZC3H4 - 4 que contiene dedo de zinc tipo CCCH (ZC3H4), ARNm
BCKDK - cetoácido deshidrogenasa quinasa de cadena ramificada (BCKDK), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 1, ARNm
UBA1 - enzima activadora modificadora de tipo ubiquitina 1 (UBA1), variante de transcrito 2, ARNm
CBX1 - cromobox homólogo 1 (CBX1), variante de transcrito 1, ARNm
CBX5 - cromobox homólogo 5 (CBX5), variante de transcrito 3, ARNm
NUBP2 - proteína de unión a nucleótidos 2 (homólogo de MinD, E. coli) (NUBP2), ARNm
NFIC - factor nuclear I/C (factor de transcripción de unión a CCAAT) (NFIC), variante de transcrito 2, ARNm
EP400 - proteína de unión a E1A p400 (EP400), ARNm
WDR6 - dominio de repeticiones WD 6 (WDR6), ARNm
CHCHD10 - 10 que contiene dominio de hélice de bobina enrollada - hélice de bobina enrollada (CHCHD10), ARNm
CD81 - molécula CD81 (CD81), ARNm
GRB2 - proteína unida al receptor del factor de crecimiento 2 (GRB2), variante de transcrito 2, ARNm
XPOT - exportina, ARNt (receptor de exportación nuclear para ARNt) (XPOT), ARNm
TFPT - compañero de fusión TCF3 (E2A) (en Leucemia infantil) (TFPT), ARNm
OBSL1 - 1 similar a obscurina (OBSL1), variante de transcrito 3, ARNm
C8orf85 - marco de lectura abierto 85 del cromosoma 8 (C8orf85), ARNm
TMED1: 1 que contiene dominio de transporte de la proteína emp24 transmembrana (TMED1), ARNm
NOMO1 - modulador NODAL 1 (NOMO1), ARNm
CDT1 - licencia de cromatina y factor de replicación de ADN 1 (CDT1), ARNm
ARID5B: dominio interactivo rico en AT 5B (similar a MRF1) (ARID5B), ARNm
MGAT4B - manosil (alfa-1,3-)-glicoproteína beta-1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa, isozima B (MGAT4B), variante de transcrito 2, ARNm
ATP5D - ATP sintasa, transporte de H+, complejo mitocondrial F1, subunidad delta (ATP5D), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 1, ARNm
P4HB - prolil 4-hidroxilasa, polipéptido beta (P4HB), ARNm
PHB2 - prohibitina 2 (PHB2), variante de transcrito 2, ARNm
EFHD1 - Familia de dominio de mano EF, miembro D1 (EFHD1), variante de transcrito 1, ARNm
PTGES2 - prostaglandina E sintasa 2 (PTGES2), variante de transcrito 1, ARNm
AMZ2 - metalopeptidasa 2 (AMZ2) de la familia de las arquelisinas, variante de transcrito 6, ARNm
EIF4EBP2 - proteína de unión 4E al factor de inicio de la traducción eucariótica 2 (EIF4EBP2), ARNm
TMEM203 - proteína transmembrana 203 (TMEM203), ARNm
DHTKD1 - 1 que contiene deshidrogenasa E1 y dominio transcetolasa (DHTKD1), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
RTN2 - reticulon 2 (RTN2), variante de transcrito 3, ARNm
CCNB2 - ciclina B2 (CCNB2), ARNm
POP7 - procesamiento del precursor 7, subunidad ribonucleasa P/MRP (S. cerevisiae) (POP7), ARNm
FAM162A - familia con similitud de secuencia 162, miembro A (FAM162A), ARNm
YTHDF2 - familia del dominio YTH, miembro 2 (YTHDF2), variante de transcrito 3, ARNm
LOC152217 - LOC152217 hipotético (LOC152217), ARN no codificante

ES 2 733 211 T3

TABLA 67: Cambios transcripcionales de MEL-1936 (exclusión/inclusión de STDEV sin filtro)
RAB24 - RAB24, miembro de la familia del oncogén RAS (RAB24), variante de transcrito 1, ARNm
C9orf86 - marco de lectura abierto 86 del cromosoma 9 (C9orf86), variante de transcrito 1, ARNm
FAM57A - familia con similitud de secuencia 57, miembro A (FAM57A), ARNm
AKR7A2 - familia 7 de aldo-ceto reductasa, miembro A2 (afatoxina aldehído reductasa) (AKR7A2), ARNm
TNPO1 - transportina 1 (TNPO1), variante de transcrito 2, ARNm
GHITM - proteína transmembrana inducible por la hormona del crecimiento (GHITM), ARNm
HSPBP1 - proteína de unión a HSPA (choque térmico 70 kDa), cochaperona citoplásmica 1 (HSPBP1), variante de transcrito 2, ARNm
PRELID2: 2 que contiene dominio PRELI (PRELID2), variante de transcrito 1, ARNm
C1orf43 - marco de lectura abierto 43 del cromosoma 1 (C1orf43), variante de transcrito 2, ARNm
PPM1B - proteína fosfatasa, dependiente de Mg ²⁺ /Mn ²⁺ , 1B (PPM1B), variante de transcrito 3, ARNm
SARS - seril-ARNt sintetasa (SARS), variante de transcrito 1, ARNm
RPL37A - proteína ribosomal L37a (RPL37A), ARNm
-Región de control de secuencias de ADN mitocondrial 1 del Dpto. Forense del FBI (Anderson HV 1)
HNRNPA1 - ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1 (HNRNPA1), variante de transcrito 1, ARNm
PHPT1 - fosfohistidina fosfatasa 1 (PHPT1), variante de transcrito 3, ARNm
hsa-mir-214 - tallo bucle de microARN miR-214 de Homo sapiens
- Locus transcrito, moderadamente similar a NP_001164551.1 Isoforma 2 de la proteína de unión a ARN 41 [Homo sapiens]
ZBTB 1 - 1 que contiene dedo de zinc y dominio BTB (ZBTB1), variante de transcrito 2, ARNm
SHROOM4 - miembro de la familia shroom 4 (SHROOM4), variante de transcrito 1, ARNm
MLC1 - leucoencefalopatía megalencefálica con quistes subcorticales 1 (MLC1), variante de transcrito 2, ARNm
HSD3B7 - Hidroxi-delta-5-esteroide deshidrogenasa, 3 beta- y esteroide delta-isomerasa 7
LCE2A - envoltura de cornificación tardía 2A (LCE2A), ARNm
KRTAP10-2 - proteína asociada a la queratina 10-2 (KRTAP10-2), ARNm
SLC22A18 - familia de portadores de soluto 22, miembro 18 (SLC22A18), variante de transcrito 1, ARNm
LOC388796 - LOC388796 hipotética (LOC388796), variante de transcrito 1, ARN no codificante
M6PR - receptor de manosa-6-fosfato (dependiente de cationes) (M6PR), ARNm
XP_945475.1 - PRONOSTICADA: similar a la proteína ribosomal S3a [Fuente: RefSeq_peptide_predicted; Acc: XP_940681]
RPL6 - proteína ribosomal L6 (RPL6), variante de transcrito 1, ARNm
TMPRSS4 - proteasa transmembrana, serina 4 (TMPRSS4), variante de transcrito 5, ARNm
GNG5: proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), gamma 5 (GNG5), ARNm
TMEM134 - proteína transmembrana 134 (TMEM134), variante de transcrito 2, ARNm
RPL12 - proteína ribosomal L12 (RPL12), ARNm
RPS10 - proteína ribosomal S10 (RPS10), ARNm
SLC2A13 - familia de portadores de soluto 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 13 (SLC2A13), ARNm
SHPK - sedoheptuloquinasa (SHPK), ARNm
ZBTB9: 9 que contiene dedo de zinc y dominio BTB (ZBTB9), ARNm
PC - piruvato carboxilasa (PC), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 1, ARNm
USP 19 - Peptidasa específica de biquitina 19

ES 2 733 211 T3

TABLA 67: Cambios transcripcionales de MEL-1936 (exclusión/inclusión de STDEV sin filtro)
RNPEPL1 - arginil aminopeptidasa (tipo aminopeptidasa B) 1 (RNPEPL1), ARNm
OR5111 - receptor olfativo, familia 51, subfamilia I, miembro 1 (OR5111), ARNm
WNK1 - proteína quinasa deficiente en lisina WNK 1 (WNK1), variante de transcrito 3, ARNm
APLP2 - proteína 2 semejante a un precursor de beta amiloide (A4) (APLP2), variante de transcrito 2, ARNm
GIMAP6 - GTPasa, miembro de la familia IMAP 6 (GIMAP6), variante de transcrito 1, ARNm
VTI1B - transporte de vesículas a través de la interacción con el homólogo 1B de t-SNARE (levadura) (VTI1B), ARNm
STT3A - STT3, subunidad del complejo de oligosacariltransferasa, homólogo A (S. cerevisiae) (STT3A), ARNm
DEK - oncogén DEK (DEK), variante de transcrito 2, ARNm
CREG1 - represor celular de los genes estimulados por E1A 1 (CREG1), ARNm
CCT8: chaperonina que contiene TCP1, subunidad 8 (theta) (CCT8), ARNm
PTDSS1 - fosfatidilserina sintasa 1 (PTDSS1), ARNm
TEX261 - 261 expresada en testículo (TEX261), ARNm
NEIL2 - endonucleasa nei VIII tipo 2 (E. coli) (NEIL2), variante de transcrito 2, ARNm
C7orf26 - marco de lectura abierto 26 del cromosoma 7 (C7orf26), ARNm
TMEM176B-proteína transmembrana 176B (TMEM176B), variante de transcrito 1, ARNm
COL6A2 - colágeno, tipo VI, alfa 2 (COL6A2), variante de transcrito 2C2a', ARNm
GRK6 - quinasa del receptor 6 acoplada a proteína G (GRK6), variante de transcrito 1, ARNm
OPN1MW2 - opsina 1 (pigmentos de cono), sensible a onda media 2 (OPN1MW2), ARNm
GBP5 - proteína de unión a guanilato 5 (GBP5), variante de transcrito 2, ARNm
SAMHD1: dominio SAM y dominio HD 1 (SAMHD1), ARNm
HLA-B - complejo principal de histocompatibilidad, clase I, B (HLA-B), ARNm
GPR173 - receptor 173 acoplado a proteína G (GPR173), ARNm
APOLD1 - 1 que contiene dominio de apolipoproteína L (APOLD1), variante de transcrito 2, ARNm
FLJ46836 - proteína FLJ46836
EIF5A - factor de inicio de la traducción eucariótico 5A (EIF5A), variante de transcrito B, ARNm
ZBTB17 - 17 que contiene dedo de zinc y dominio BTB (ZBTB17), ARNm
UBE2L6 - enzima conjugadora de ubiquitina E2L 6 (UBE2L6), variante de transcrito 1, ARNm
SPHK2 - esfingosina quinasa 2 (SPHK2), ARNm
AKR1A1 - familia aldo-ceto reductasa 1, miembro A1 (aldehído reductasa) (AKR1A1), variante de transcrito 2, ARNm
LOC100287879 - LOC100287879 hipotética (LOC100287879), ARN no codificante
LOC100288814 - proteína LOC100288814 hipotética (LOC100288814), ARNm
SMN1 - supervivencia de la neurona motora 1, telomérica (SMN1), variante de transcrito b, ARNm
OSR2 - 1 relacionada con Odd Skipped 2 (Drosophila) (OSR2), variante de transcrito 1, ARNm
PDZRN4 - dominio PDZ que contiene el dedo anular 4 (PDZRN4), variante de transcrito 2, ARNm
C19orf60 - marco de lectura abierto 60 del cromosoma 19
PI15 - inhibidor de peptidasa 15 (PI15), ARNm
PCNXL2 - 2 tipo Pecanex (Drosophila) (PCNXL2), variante de transcrito 1, ARNm
ATP5S - ATP sintasa, transporte de H+, complejo Fo mitocondrial, subunidad s (factor B) (ATP5S), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 3, ARNm
LGTN - ligatina (LGTN), ARNm

ES 2 733 211 T3

TABLA 67: Cambios transcripcionales de MEL-1936 (exclusión/inclusión de STDEV sin filtro)
PAPD7: 7 que contiene dominio asociado a PAP (PAPD7), variante de transcrito 2, ARNm
GNS - glucosamina (N-acetil) -6-sulfatasa (GNS), ARNm
CLTC - clatrina, cadena pesada (Hc) (CLTC), ARNm
MRPS18B - proteína ribosomal mitocondrial S18B (MRPS18B), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
STRADB - adaptador beta de quinasa relacionado con STE20 (STRADB), ARNm
AIMP2 - proteína multifuncional que interactúa con el complejo de aminoacil ARNt sintetasa 2 (AIMP2), ARNm
NAP 1 L4 - proteína 1 del ensamblaje del nucleosoma tipo 4 (NAP1L4), ARNm
SSU72 - homóloga de fosfatasa de CTD de SSU72 ARN polimerasa II (S. cerevisiae) (SSU72), ARNm
CCDC107 - 107 que contiene dominio de bobina enrollada (CCDC107), variante de transcrito B, ARNm
DYRK3 - quinasa 3 de doble especificidad regulada por fosforilación en tirosina (Y) (DYRK3), variante de transcrito 2, ARNm
ITPKA - inositol 1,4,5-trisfosfato 3-quinasa A (ITPKA), ARNm
FAM134A - familia con similitud de secuencia 134, miembro A (FAM134A), ARNm
EIF2AK4 - factor de inicio de la traducción eucariota 2 alfa quinasa 4 (EIF2AK4), ARNm
MTIF2 - factor de inicio de la traducción mitocondrial 2 (MTIF2), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 1, ARNm
C7orf25 - marco de lectura abierto 25 del cromosoma 7 (C7orf25), variante de transcrito 2, ARNm
MRPS35 - proteína ribosomal mitocondrial S35 (MRPS35), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 1, ARNm
NPO3 - transportina 3 (TNPO3), variante de transcrito 1, ARNm
CMAS - ácido citidin monofosfato N-acetilneuramínico sintetasa (CMAS), ARNm
SLC22A13 - familia de portadores de solutos 22 (transportador de aniones orgánicos), miembro 13 (SLC22A13), ARNm
OSMR - receptor de oncostatina M (OSMR), variante de transcrito 1, ARNm
PSMG3 - chaperona de ensamblaje de proteosoma (prosome, macropain) 3 (PSMG3), variante de transcrito 2, ARNm
PARD3 - homóloga de par 3 de partición defectuosa 3 (C. elegans) (PARD3), variante de transcrito 5, ARNm
TXNDC5 - 5 que contiene dominio de tiorredoxina (retículo endoplásmico) (TXNDC5), variante de transcrito 3, ARNm
PPP1CB - proteína fosfatasa 1, subunidad catalítica, isoenzima beta (PPP1CB), variante de transcrito 1, ARNm
RCN1 - reticulocalbina 1, dominio de unión a calcio de mano EF (RCN1), ARNm
E2F5 - factor de transcripción E2F 5, unión a p130 (E2F5), variante de transcrito 3, ARNm
TOMM22 - translocasa del homólogo de la membrana mitocondrial externa 22 (levadura) (TOMM22), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
UBR7 - ubiquitina proteína ligasa E3 componente n-Recognina 7 (supuesta) (UBR7), variante de transcrito 3, ARNm
EZH2 - potenciador de homólogo de zeste 2 (Drosophila) (EZH2), variante de transcrito 2, ARNm
EIF5A - factor de inicio de la traducción eucariótica 5A (EIF5A), variante de transcrito A, ARNm
CHCHD2 - 2 que contiene dominio de hélice de bobina enrollada - hélice de bobina enrollada (CHCHD2), ARNm
MAPKAPK3 - proteína quinasa 3 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MAPKAPK3), ARNm
SPHAR - Respuesta en fase S (relacionada con ciclina) (SPHAR), ARNm
ARHGEF10L - péptido 10 similar al factor de intercambio nucleotídico guanina Rho (GEF) (ARHGEF 10L), variante de transcrito 1, ARNm
TMCC2: familia de dominios transmembrana y de bobina enrollada 2 (TMCC2), ARNm

TABLA 67: Cambios transcripcionales de MEL-1936 (exclusión/inclusión de STDEV sin filtro)
PPP1R12B - proteína fosfatasa 1, subunidad reguladora (inhibidora) 12B (PPP1R12B), variante de transcrito 4, ARNm
LOC100130557 - LOC100130557 hipotética (LOC100130557), ARN no codificante
CDCA4 - 4 asociada al ciclo de división celular (CDCA4), variante de transcrito 1, ARNm
C9orf125 - marco de lectura abierto 125 del cromosoma 9 (C9orf125), ARNm
SLC25A33 - familia de portadores de soluto 25, miembro 33 (SLC25A33), ARNm
UBE2M - enzima de conjugación con ubiquitina E2M (homólogo de UBC12, levadura) (UBE2M), ARNm
CCDC47 - 47 que contiene dominio de bobina enrollada (CCDC47), ARNm
C5orf30 - marco de lectura abierto 30 del cromosoma 5 (C5orf30), ARNm

TABLA 68: Cambios Transcripcionales MEL-888 (inclusión/exclusión de STDEV sin filtro)
SFRP5 - proteína secretada relacionada con frizzled 5 (SFRP5), ARNm
KIAA0087 - KIAA0087 (KIAA0087), ARN no codificante
TMEM 181 - proteína transmembrana 181 (TMEM181), ARNm
PAPL - proteína similar a la fosfatasa ácida púrpura/hierro (zinc), ARNm
HMBOX1 - 1 que contiene Homeobox
PDGFD - factor de crecimiento D derivado de plaquetas (PDGFD), variante de transcrito 2, ARNm
ALAS2 - aminolevulinato, delta, sintasa 2 (ALAS2), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 3, ARNm
CACNB3: canal de calcio, dependiente de voltaje, subunidad beta 3 (CACNB3), ARNm
MRPS 11 - proteína ribosomal mitocondrial S11 (MRPS11), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 2, ARNm
SSRP1 - proteína de reconocimiento específico de estructura 1 (SSRP1), ARNm
FAM86A - familia con similitud de secuencia 86, miembro A (FAM86A), variante de transcrito 2, ARNm
PDK3 - piruvato deshidrogenasa quinasa, isozima 3 (PDK3), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 2, ARNm
LMAN2 - lectina, unión a manosa 2 (LMAN2), ARNm
FBLN1 - fibulina 1 (FBLN1), variante de transcrito C, ARNm
CYTSA - citospina A (CYTSA), variante de transcrito 2, ARNm
CYBASC3 - citocromo b, dependiente de ascorbato 3 (CYBASC3), variante de transcrito 2, ARNm
C21orf70 - marco de lectura abierto 70 del cromosoma 21 (C21orf70), ARNm
TIMM50 - translocasa del homólogo de la membrana mitocondrial interna 50 (S. cerevisiae) (TIMM50), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
MYO9B - miosina IXB (MYO9B), variante de transcrito 1, ARNm
RFNG - RFNG O-fucosil péptido 3-beta-N-acetilglucosaminiltransferasa (RFNG), ARNm
DDX11 - polipéptido 11 de caja DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) (DDX11), variante de transcrito 2, ARNm
PTPRM - proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, M (PTPRM), variante de transcrito 2, ARNm
C20orf3 - marco de lectura abierto 3 del cromosoma 20 (C20orf3), ARNm
SREBF2 - factor de transcripción de unión al elemento regulador de colesterol 2 (SREBF2), ARNm
SLC25A39 - familia de portadores de soluto 25, miembro 39 (SLC25A39), variante de transcrito 2, ARNm
TACO1 - activador de la traducción de la citocromo c oxidasa I codificada mitocondrialmente (TACO1), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm

ES 2 733 211 T3

TABLA 68: Cambios Transcripcionales MEL-888 (inclusión/exclusión de STDEV sin filtro)
SIGMAR1: receptor intracelular no opioide sigma 1 (SIGMAR1), variante de transcrito 1, ARNm
CERCAM - molécula de adhesión de células endoteliales cerebrales (CERCAM), ARNm
MYO 1 D-miosina ID (MYO1D), ARNm
PKM2 - piruvato quinasa, músculo (PKM2), variante de transcrito 2, ARNm
CDK4 - quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4), ARNm
CMAS - ácido citidina monofosfato N-acetilneuramínico sintetasa (CMAS), ARNm
SRRD: que contiene el dominio SRR1 (SRRD), ARNm
FAHD2B: 2B que contiene el dominio de fumarilacetoacetato hidrolasa (FAHD2B), ARNm
SLC25A23 - familia de portadores de solutos 25 (portador mitocondrial; portador de fosfato), miembro 23 (SLC25A23), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
FKBP9 - proteína de unión a FK506 9, 63 kDa (FKBP9), ARNm
DAB2 - homólogo con discapacidad 2, fosfoproteína sensible a mitógenos (<i>Drosophila</i>) (DAB2), ARNm
RAB38 - RAB38, miembro de la familia del oncogén RAS (RAB38), ARNm
C 17orf58 - marco de lectura abierto 58 del cromosoma 17 (C 17orf58), variante de transcrito 2, ARNm
PPPDE2: 2 que contiene dominio peptidasa PPPDE (PPPDE2), ARNm
PHB2 - prohibitina 2 (PHB2), variante de transcrito 2, ARNm
TBRG4 - regulador 4 del factor de crecimiento transformante beta (TBRG4), variante de transcrito 3, ARNm
AMZ2 - metalopeptidasa 2 (AMZ2) de la familia de las arqueolisinas, variante de transcrito 6, ARNm
PSMG1 - chaperona 1 de ensamblaje de proteosoma (prosome, macropain) (PSMG1), variante de transcrito 2, ARNm
SAMM50: homólogo del componente 50 de la maquinaria de clasificación y ensamblaje (<i>S. cerevisiae</i>) (SAMM50), ARNm
RGS 10 - regulador de la señalización de la proteína G 10 (RGS10), variante de transcrito 2, ARNm
SLC3A2 - familia de portadores de solutos 3 (activadores del transporte de aminoácidos dibásicos y neutros), miembro 2 (SLC3A2), variante de transcrito 4, ARNm
PLXNA2 - plexina A2 (PLXNA2), ARNm
PIGT - biosíntesis de anclaje de fosfatidilinositolglicano, clase T (PIGT), variante de transcrito 3, ARNm
CDK2 - quinasa 2 dependiente de ciclina (CDK2), variante de transcrito 2, ARNm
TMEM203 - proteína transmembrana 203 (TMEM203), ARNm
PHGDH - fosfoglicerato deshidrogenasa (PHGDH), ARNm
GUSB - glucuronidasa, beta (GUSB), ARNm
SIL1 - homólogo de SIL1, chaperona del retículo endoplásmico (<i>S. cerevisiae</i>) (SIL1), variante de transcrito 2, ARNm
ATP6V1E1 - ATPasa, transportadora de H ⁺ , lisosomal 31kDa, subunidad E1 de V1 (ATP6V1E1), variante de transcrito 3, ARNm
NCOR2 - co-represor del receptor nuclear 2 (NCOR2), variante de transcrito 1, ARNm
LRPAP1 - proteína asociada a la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 (LRPAP1), ARNm
ATP5B - ATP sintasa, transportadora de H ⁺ , complejo mitocondrial F1, polipéptido beta (ATP5B), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
RAB32 - RAB32, miembro de la familia de oncogén RAS (RAB32), ARNm
IMMT: proteína de la membrana interna, mitocondrial (IMMT), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 3, ARNm
UCKL1 - 1 de tipo uridina-citidina quinasa 1 (UCKL1), variante de transcrito 1, ARNm

ES 2 733 211 T3

TABLA 68: Cambios Transcripcionales MEL-888 (inclusión/exclusión de STDEV sin filtro)
FAM127C - familia con similitud de secuencia 127, miembro C (FAM127C), ARNm
HNRNPL - ribonucleoproteína L heterogénea nuclear (HNRNPL), variante de transcrito 1, ARNm
MRPS11 - proteína ribosomal mitocondrial S11 (MRPS 11), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 1, ARNm
SEPT5 - septina 5 (SEPT5), ARNm
POLD2 - polimerasa (ADN dirigida), delta 2, subunidad reguladora 50 kDa (POLD2), variante de transcrito 2, ARNm
C10orf35 - marco de lectura abierto 35 del cromosoma 10 (C10orf35), ARNm
VEGFB - factor de crecimiento endotelial vascular B (VEGFB), ARNm
BLVRB - biliverdina reductasa B (flavina reductasa (NADPH)) (BLVRB), ARNm
ANAPC11 - subunidad 11 del complejo promotor de la anafase (ANAPC11), variante de transcrito 4, ARNm
CREG1 - represor celular de los genes estimulados por E1A 1 (CREG1), ARNm
SPCS1 - homólogo de la subunidad 1 del complejo peptidasa señal (<i>S. cerevisiae</i>) (SPCS1), ARNm
PARP1 - poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1), ARNm
USP19 - peptidasa específica de ubiquitina 19
HLA-F - Complejo principal de histocompatibilidad mayor, clase I, F
TRIOBP - proteína de unión a TRIO y a actina F (TRIOBP), variante de transcrito 1, ARNm
SLC22A18 - familia de portadores de soluto 22, miembro 18 (SLC22A18), variante de transcrito 1, ARNm
MARCKSL1 - 1 de tipo MARCKS (MARCKSL1), ARNm
TM9SF2 - miembro 2 de la superfamilia transmembrana 9 (TM9SF2), ARNm
EID1 - inhibidor de la diferenciación 1 (EID1) que interactúa con EP300, ARNm
NME4: células no metastásicas 4, proteína expresada en (NME4), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
CYC1 - citocromo c-1 (CYC1), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
TP53I13 - proteína 13 inducible por proteína tumoral p53 (TP53I13), ARNm
GNB1 - proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), polipéptido beta 1 (GNB1), ARNm
FAHD1: 1 que contiene dominio de fumarilacetoacetato hidrolasa (FAHD1), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 2, ARNm
NOC4L - homólogo asociado a complejo nucleolar 4 (<i>S. cerevisiae</i>) (NOC4L), ARNm
NDUFV2 - NADH deshidrogenasa (ubiquinona) flavoproteína 2, 24 kDa (NDUFV2), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
COX5B - subunidad Vb de citocromo c oxidasa (COX5B), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
TMEM147 - proteína transmembrana 147 (TMEM147), ARNm
NDUFB9 - NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo beta, 9, 22kDa (NDUFB9), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
RPN2 - riboforina II (RPN2), variante de transcrito 1, ARNm
MRPL41 - proteína ribosomal mitocondrial L41 (MRPL41), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
UQCRQ - ubiquinol-citocromo c reductasa, complejo III subunidad VII, 9,5 kDa (UQCRQ), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
GYPC - glicoforina C (grupo sanguíneo de Gerbich) (GYPC), variante de transcrito 2, ARNm
HMGN1 - dominio 1 de unión a nucleosoma del grupo de alta movilidad (HMGN1), ARNm
SCO1 - homólogo 1 deficiente en citocromo oxidasa SCO (levadura) (SCO1), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm

ES 2 733 211 T3

TABLA 68: Cambios Transcripcionales MEL-888 (inclusión/exclusión de STDEV sin filtro)
MGRN1 - mahogunina, dedo anular 1 (MGRN1), variante de transcrito 4, ARNm
LOC402175 - PRONOSTICADA: similar a NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo beta, 4, 15 kDa (LOC402175), miscARN
SNX10 - nexina de clasificación 10 (SNX10), ARNm
UROS - uroporfirinógeno III sintasa (UROS), ARNm
FAM195A - familia con similitud de secuencia 195, miembro A (FAM195A), ARNm
NDUFB11 - NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo beta, 11, 17,3 kDa (NDUFB11), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 2, ARNm
UBE2D4 - enzima conjugadora de ubiquitina E2D 4 (putativa) (UBE2D4), ARNm
NME2P1: células no metastásicas 2, proteína (NM23B) expresada en pseudogen 1 (NME2P1), ARN no codificante
MRPS 15 - proteína ribosomal S15 mitocondrial (MRPS 15), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
RNASEH1 - ribonucleasa H1 (RNASEH1), ARNm
LSM4 - homólogo de LSM4, ARN nuclear pequeño U6 asociado (<i>S. cerevisiae</i>) (LSM4), ARNm
PPIAL4G - peptidilprolil isomerasa A (ciclofilina A), similar a 4G (PPIAL4G), ARNm
AKR1B1 - familia 1 de aldo-ceto reductasa, miembro B1 (aldosa reductasa) (AKR1B1), ARNm
PWP1 - homólogo de PWP1 (<i>S. cerevisiae</i>) (PWP1), ARNm
KDSR - 3-cetodihidroesfingosina reductasa (KDSR), ARNm
RAB4A - RAB4A, miembro de la familia del oncogén RAS (RAB4A), ARNm
STARD7 - 7 que contiene el dominio de transferencia de lípidos relacionado con StAR (START) (STARD7), ARNm
SF3B2: factor de empalme 3b, subunidad 2, 145 kDa (SF3B2), ARNm
C20orf11 - marco de lectura abierto 11 del cromosoma 20 (C20orf11), ARNm
ADSL - adenilosuccinato liasa (ADSL), variante de transcrito 1, ARNm
UGCG - UDP-glucosa ceramida glucosiltransferasa (UGCG), ARNm
PSMB4 - subunidad proteosoma (prosome, macropain), tipo beta, 4 (PSMB4), ARNm
KDEL2 - receptor de retención de proteínas del retículo endoplásmico KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) 2 (KDEL2), variante de transcrito 1, ARNm
HDGF: factor de crecimiento derivado de hepatoma (HDGF), variante de transcrito 1, ARNm
MRPL55 - proteína ribosomal mitocondrial L55 (MRPL55), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 4, ARNm
C7orf42 - marco de lectura abierto 42 del cromosoma 7 (C7orf42), ARNm
MRPL34 - proteína ribosomal mitocondrial L34 (MRPL34), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
TSPO - proteína translocadora (18 kDa) (TSPO), variante de transcrito PBR, ARNm
LIPA - lipasa A, ácido lisosomal, colesterol esterasa (LIPA), variante de transcrito 2, ARNm
CDC42EP3 - proteína efectora CDC42 (unión a Rho GTPasa) 3 (CDC42EP3), ARNm
CARS2 - cisteinil-ARNt sintetasa 2, mitocondrial (supuesta) (CARS2), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
PSMD8 - subunidad 26S de proteosoma (prosome, macropain), no ATPasa, 8 (PSMD8), ARNm
SDCCAG3 - antígeno 3 del cáncer de colon definido serológicamente (SDCCAG3), variante de transcrito 1, ARNm
PSMG3 - chaperona de ensamblaje de proteosoma (prosome, macropain) 3 (PSMG3), variante de transcrito 2, ARNm
TMEM204 - Proteína transmembrana 204
RAB9A - RAB9A, miembro de la familia del oncogén RAS (RAB9A), variante de transcrito 2, ARNm

ES 2 733 211 T3

TABLA 68: Cambios Transcripcionales MEL-888 (inclusión/exclusión de STDEV sin filtro)
BOLA3 - homólogo de bolA 3 (E. coli) (BOLA3), variante de transcrito 2, ARNm
RRAGA - A de unión a GTP relacionada con Ras (RRAGA), ARNm
HSD17B10 - hidroxiesteroide (17-beta) deshidrogenasa 10 (HSD17B10), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 2, ARNm
NQO1 - NAD (P) H deshidrogenasa, quinona 1 (NQO1), variante de transcrito 3, ARNm
GSTP1 - glutatión S-transferasa pi 1 (GSTP1), ARNm
TRAPPC5 - complejo de partículas de proteína en tráfico 5 (TRAPPC5), variante de transcrito 3, ARNm
CSTB - cistatina B (estefina B) (CSTB), ARNm
FAM96B - familia con similitud de secuencia 96, miembro B (FAM96B), variante de transcrito 1, ARNm
STOM - estomatina (STOM), variante de transcrito 1, ARNm
TAF10 - ARN polimerasa II de TAF10, factor asociado a la proteína de unión a la caja TATA (TBP), 30 kDa (TAF10), ARNm
HIATL1 - 1 de tipo transcrito abundante en el hipocampo (HIATL1), ARNm
PDCD6 - muerte celular programada 6 (PDCD6), ARNm
ATP5F1 - ATP sintasa, transportadora de H+, complejo de Fo mitocondrial, subunidad B1 (ATP5F1), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
SH3GLB1 - endofilina B1 similar a GRB2 de dominio SH3 (SH3GLB1), ARNm
FAM50A - familia con similitud de secuencia 50, miembro A (FAM50A), ARNm
PPM1F - proteína fosfatasa, dependiente de Mg ²⁺ /Mn ²⁺ , 1F (PPM1F), ARNm
ADCK2 - quinasa 2 que contiene el dominio aarF (ADCK2), ARNm
LARP1: familia de dominios de ribonucleoproteína La, miembro 1 (LARP1), variante de transcrito 1, ARNm
CHKB - colina quinasa beta (CHKB), ARNm
CDC34 - homólogo del ciclo de división celular 34 (S. cerevisiae) (CDC34), ARNm
HNRNPU - ribonucleoproteína U heterogénea nuclear (factor de unión A del andamio) (HNRNPU), variante de transcrito 2, ARNm
NEIL2 - endonucleasa nei VIII tipo 2 (E. coli) (NEIL2), variante de transcrito 2, ARNm
UBE2Z - enzima conjugadora de ubiquitina E2Z (UBE2Z), ARNm
EEA1: antígeno temprano del endosoma 1 (EEA1), ARNm
PCBP1 - proteína de unión a poli(rC) 1 (PCBP1), ARNm
KHNYN - que contiene el dominio KH y NYN (KHNYN), ARNm
POLR2E - polipéptido E polimerasa (ARN) II (ADN dirigida), 25kDa (POLR2E), ARNm
WDR18 - dominio de repeticiones WD 18 (WDR18), ARNm
CERK - ceramida quinasa (CERK), ARNm
RABAC1 - aceptor de Rab 1 (prenilado) (RABAC1), ARNm
DULLARD - homólogo de dullard (Xenopus laevis) (DULLARD), variante de transcrito 2, ARNm
CST3 - cistatina C (CST3), ARNm
DDB1 - proteína de unión a ADN específica del daño 1, 127 kDa (DDB1), ARNm
FIBP - proteína de unión intracelular al factor de crecimiento de fibroblastos (ácido) (FIBP), variante de transcrito 2, ARNm
TRADD - TNFRSF1A-asociado a través del dominio de muerte (TRADD), ARNm
XPNPEP1 - X-prolil aminopeptidasa (aminopeptidasa P) 1, soluble (XPNPEP1), variante de transcrito 1, ARNm
ADA - adenosina desaminasa (ADA), ARNm

ES 2 733 211 T3

TABLA 68: Cambios Transcripcionales MEL-888 (inclusión/exclusión de STDEV sin filtro)
PSMD9: subunidad 26S de proteosoma (prosoma, macropain), no ATPasa, 9 (PSMD9), ARNm
AURKAIP1 - proteína 1 que interactúa con aurora quinasa A (AURKAIP1), variante de transcrito 2, ARNm
KEAP1 - proteína asociada a ECH de tipo kelch 1 (KEAP1), variante de transcrito 2, ARNm
ACAA1 - acetil-CoA aciltransferasa 1 (ACAA1), variante de transcrito 2, ARNm
RPRD1 B - regulación de la proteína 1B que contiene el dominio pre-ARNm nuclear (RPRD 1B), ARNm
RAB5C - RAB5C, miembro de la familia del oncogén RAS (RAB5C), variante de transcrito 1, ARNm
AFG3L2 - AFG3 gen 2 de la familia de ATPasa tipo 3 (<i>S. cerevisiae</i>) (AFG3L2), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
P4HB - prolil 4-hidroxilasa, polipéptido beta (P4HB), ARNm
DKC1 - disqueratosis congénita 1, disquerina (DKC1), variante de transcrito 2, ARNm
RIC8A - resistencia a los inhibidores del homólogo A de colinesterasa 8 (<i>C. elegans</i>) (RIC8A), ARNm
ACBD6 - dominio de unión a acil-CoA que contiene 6 (ACBD6), ARNm
PGM1 - fosfoglucomutasa 1 (PGM1), variante de transcrito 1, ARNm
SCO2 - homólogo 2 deficiente en citocromo oxidasa SCO (levadura) (SCO2), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 2, ARNm
NMU - neuromedina U (NMU), ARNm
DENND1A - DENN/MADD que contiene dominio A (DENND1A), variante de transcrito 2, ARNm
NDUFAF3 - NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, factor de ensamblaje 3 (NDUFAF3), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 2, ARNm.
CSNK2B - caseína quinasa 2, polipéptido beta (CSNK2B), ARNm
C18orf22 - marco de lectura abierto 22 del cromosoma 18 (<i>C</i> 18orf22), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 2, ARNm
ATP5H - ATP sintasa, transportadora de H ⁺ , complejo Fo mitocondrial, subunidad d (ATP5H), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 1, ARNm
RNPEP - arginil aminopeptidasa (aminopeptidasa B) (RNPEP), ARNm
BSG - basigina (grupo sanguíneo Ok) (BSG), variante de transcrito 2, ARNm
DDT - D-dopacromo tautomerasa (DDT), variante de transcrito 2, ARNm
DDT - D-dopacromo tautomerasa (DDT), variante de transcrito 2, ARNm
LOC119358 - PRONOSTICADA: similar a hCG2040270 (LOC1 19358), ARNm
BAMBI - homólogo del inhibidor unido a membrana BMP y activina (<i>Xenopus laevis</i>) (BAMBI), ARNm
TBCB - cofactor de plegamiento de tubulina B (TBCB), ARNm
NDUFA8 - NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, factor de ensamblaje 8, 19 kDa (NDUFA8), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm.
APEX1 - nucleasa APEX (enzima de reparación de ADN multifuncional) 1 (APEX1), variante de transcrito 2, ARNm
ZNF706 - proteína de dedo de zinc 706 (ZNF706), variante de transcrito 3, ARNm
NDUFB2 - NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo beta, 2, 8 kDa (NDUFB2), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
CDK2AP1 - proteína 1 asociada a la quinasa 2 dependiente de ciclina (CDK2AP1), ARNm
NHP2L1 - proteína cromosómica 2 no histónica NHP2 tipo 1 (<i>S. cerevisiae</i>) (NHP2L1), variante de transcrito 2, ARNm
C16orf42 - marco de lectura abierto 42 del cromosoma 16 (C16orf42), ARNm
YWHAQ - proteína de activación de tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa, polipéptido theta (YWHAQ), ARNm

ES 2 733 211 T3

TABLA 68: Cambios Transcripcionales MEL-888 (inclusión/exclusión de STDEV sin filtro)
C1QBP - componente 1 del complemento, proteína de unión al subcomponente q (C1QBP), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
PDIA6 - proteína disulfuro isomerasa familia A, miembro 6 (PDIA6), ARNm
CALM1 - calmodulina 1 (fosforilasa quinasa, delta) (CALM1), variante de transcrito 2, ARNm
PSMD2: subunidad 26S de proteosoma (prosoma, macropáina), no ATPasa, 2 (PSMD2), ARNm
NUP50 - nucleoporina 50 kDa (NUP50), variante de transcrito 2, ARNm
DAXX - proteína asociada al dominio muerte (DAXX), variante de transcrito 3, ARNm
HINT1 - proteína de unión al nucleótido de la tríada de histidina 1 (HINT1), variante de transcrito 1, ARNm
SPG21 - paraplejia espástica 21 (autosómica recesiva, síndrome de Mast) (SPG21), variante de transcrito 1, ARNm
VTI1B - transporte de vesículas a través de la interacción con el homólogo 1B de t-SNARE (levadura) (VTI1B), ARNm
ARL2BP - proteína de unión 2 de tipo factor de ribosilación de ADP (ARL2BP), ARNm
MC1R - receptor de melanocortina 1 (receptor de hormona estimulante de melanocitos alfa) (MC1R), ARNm
SPARC - proteína secretada, ácida, rica en cisteína (osteonectina) (SPARC), ARNm
PFN1 - profilina 1 (PFN1), ARNm
NME2 - células no metastásicas 2, proteína (NM23B) expresada en (NME2), variante de transcrito 3, ARNm
C20orf24 - marco de lectura abierto 24 del cromosoma 20 (C20orf24), variante de transcrito 1, ARNm
COX8A - subunidad VIIIA de citocromo c oxidasa (ubicua) (COX8A), ARNm
TSPO - proteína translocadora (18 kDa) (TSPO), variante de transcrito PBR, ARNm
PTP4A2 - proteína tirosina fosfatasa tipo IVA, miembro 2 (PTP4A2), variante de transcrito 3, ARNm
SSR4 - receptor de secuencia señal, delta (proteína delta asociada a translociones) (SSR4), ARNm
ARPC1B - complejo de proteína 2/3 relacionada con actina, subunidad 1B, 41kDa (ARPC1B), ARNm
USP14 - peptidasa específica para ubiquitina 14 (ARNt-guanina transglicosilasa) (USP14), variante de transcrito 2, ARNm
FBXO9 - proteína caja F 9 (FBXO9), variante de transcrito 3, ARNm
GTF3A - factor de transcripción general IIIA (GTF3A), ARNm
MRPS24: proteína ribosomal mitocondrial S24 (MRPS24), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
EIF3J - factor 3 de inicio de la traducción eucariótica, subunidad J (EIF3J), ARNm
BAG1 - atánogén asociado a BCL2 (BAG1), variante de transcrito 1, ARNm
IFI6 - proteína 6 inducible por interferón alfa (IFI6), variante de transcrito 1, ARNm
HSD17B12 - hidroxiesteroide (17-beta) deshidrogenasa 12 (HSD17B12), ARNm
PSMD2: subunidad 26S de proteosoma (prosoma, macropáina), no ATPasa, 2 (PSMD2), ARNm
SLBP - proteína de unión de tallo-bucle (SLBP), ARNm
STK24 - serina/treonina quinasa 24 (STK24), variante de transcrito 1, ARNm
GUSB - glucuronidasa, beta (GUSB), ARNm
DUS3L - dihidouridina sintasa tipo 3 (S. cerevisiae) (DUS3L), variante de transcrito 2, ARNm
MAN1B1: manosidasa, alfa, clase IB, miembro 1 (MAN1B1), ARNm
PIGY - biosíntesis de anclaje de fosfatidilinositolglicano, clase Y (PIGY), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 1, ARNm
DCTD - DCMP desaminasa (DCTD), variante de transcrito 2, ARNm
SSU72 - homóloga de fosfatasa de CTD de SSU72 ARN polimerasa II (S. cerevisiae) (SSU72), ARNm

ES 2 733 211 T3

TABLA 68: Cambios Transcripcionales MEL-888 (inclusión/exclusión de STDEV sin filtro)
GLUD1 - glutamato deshidrogenasa 1 (GLUD1), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
NOMO1 - modulador NODAL 1 (NOMO1), ARNm
C7orf47 - marco de lectura abierto 47 del cromosoma 7 (C7orf47), ARNm
YME1L1 - YME1 tipo 1 (S. cerevisiae) (YME1L1), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 3, ARNm
RBX1 - caja de anillo 1 (RBX1), ARNm
CCDC72 - dominio de bobina enrollada que contiene 72 (CCDC72), ARNm
SEC11C - homólogo C de SEC11 (S. cerevisiae) (SEC11C), ARNm
EIF1AX - factor de inicio de la traducción eucariótica 1A, ligado a X (EIF1AX), ARNm
ANKRD62 - dominio de repetición de anquirina 62
YBX1 - proteína de unión 1 a la caja Y
RCN1 - reticulocalbina 1, dominio de unión a calcio EF-hand (RCN1), ARNm
NBN - nibrina (NBN), ARNm
CTSL1 - catepsina L1 (CTSL1), variante de transcrito 1, ARNm
ALG3 - glicosilación 3 unida a asparragina, homólogo de alfa-1,3-manosiltransferasa (S. cerevisiae) (ALG3), variante de transcrito 1, ARNm
UPP1 - uridina fosforilasa 1 (UPP1), variante de transcrito 1, ARNm
UPP1 - uridina fosforilasa 1 (UPP1), variante de transcrito 1, ARNm
RPN2 - riboforina II (RPN2), variante de transcrito 1, ARNm
FTHL3 - ferritina, polipéptido pesado similar a 3 (FTHL3), ARN no codificante
SPR - sepiapterina reductasa (7,8-dihidrobiopterina:NADP + oxidorreductasa) (SPR), ARNm
NDUFS3 - NADH deshidrogenasa (ubiquinona) proteína Fe-S 3, 30 kDa (NADH-coenzima Q reductasa) (NDUFS3), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
Clorf57 - marco de lectura abierto 57 del cromosoma 1 (Clorf57), ARNm
CHCHD10 - 10 que contiene dominio de hélice-bobina enrollada-hélice-bobina enrollada (CHCHD10), ARNm.
DUSP4 - fosfatasa de especificidad dual 4 (DUSP4), variante de transcrito 2, ARNm
CCDC92: 92 que contiene dominio de bobina enrollada (CCDC92), ARNm
ATP5H - ATP sintasa, transportadora de H ⁺ , complejo Fo mitocondrial, subunidad d (ATP5H), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 2, ARNm
ALKBH7 - alkB, homólogo de reparación de alquilación 7 (E. coli) (ALKBH7), ARNm
TMED4: 4 que contiene el dominio de transporte de la proteína emp24 transmembrana (TMED4), ARNm
DNAJC1 - homólogo de DnaJ (Hsp40), subfamilia C, miembro 1 (DNAJC1), ARNm
CIB1 - 1 de unión a calcio e integrina (calmirina) (CIB1), ARNm
KLF14 - factor similar a Kruppel 14 (KLF14), ARNm
PDXK - piridoxal (piridoxina, vitamina B6) quinasa (PDXK), ARNm
CCDC107 - 107 que contiene dominio de bobina enrollada (CCDC107), variante de transcrito B, ARNm
COMTD1 - 1 que contiene dominio de catecol-O-metiltransferasa (COMTD1), ARNm
CD99 - molécula CD99 (CD99), variante de transcrito 1, ARNm
LRR-FIP2: proteína 2 que interactúa con la repetición rica en leucina (en FLII) (LRRFIP2), variante de transcrito 1, ARNm
TMEM49 - proteína transmembrana 49 (TMEM49), ARNm
UQCRC1 - proteína central I de ubiquinol-citocromo c reductasa (UQCRC1), ARNm

ES 2 733 211 T3

TABLA 68: Cambios Transcripcionales MEL-888 (inclusión/exclusión de STDEV sin filtro)
SYTL2 - sinaptotagmina tipo 2 (SYTL2), variante de transcrito b, ARNm
SGSH - N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa (SGSH), ARNm
FAM134A - familia con similitud de secuencia 134, miembro A (FAM134A), ARNm
TIMP2 - inhibidor de metalopeptidasa TIMP 2 (TIMP2), ARNm
PTDSS2 - fosfatidilserina sintasa 2 (PTDSS2), ARNm
DGAT1 - diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (DGAT1), ARNm
SNX1 - nexina de clasificación 1 (SNX1), variante de transcrito 1, ARNm
GNAS - locus de complejo GNAS (GNAS), variante de transcrito 7, ARNm
C1orf151 - marco de lectura abierto 151 del cromosoma 1 (C1orf151), variante de transcrito 1, ARNm
ATP51 - ATP sintasa, transportadora de H ⁺ , complejo Fo mitocondrial, subunidad E (ATP51), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 1, ARNm
ARL6IP4 - proteína 4 que interactúa con el factor de ribosilación de ADP 6 (ARL6IP4), variante de transcrito 1, ARNm
STARD3NL - STARD3 tipo N-terminal (STARD3NL), ARNm
ITGB1 BP 1 - proteína de unión 1 a integrina beta 1 (ITGB1 BP 1), variante de transcrito 1, ARNm
YBX1 - proteína 1 de unión a la caja Y (YBX1), ARNm
- Locus transcrito, muy similar a la proteína 1 de unión a elemento sensible a nucleasa NP_113751.3 [Rattus norvegicus]
FUCA1: fucosidasa, alfa-L-1, tejido (FUCA1), ARNm
SNX17 - nexina de clasificación 17 (SNX17), ARNm
CTSB - catepsina B (CTSB), variante de transcrito 5, ARNm
AK2 - adenilato quinasa 2 (AK2), variante de transcrito AK2A, ARNm
CSTB - cistatina B (estefina B) (CSTB), ARNm
KIFC3 - miembro de la familia de la kinesina C3 (KIFC3), variante de transcrito 3, ARNm
ARFGAP1 - proteína 1 activadora de GTPasa del factor de ribosilación de ADN (ARFGAP1), variante de transcrito 1, ARNm
FAM20B - familia con similitud de secuencia 20, miembro B (FAM20B), ARNm
NAP1L4 - proteína del ensamblaje del nucleosoma 1 tipo 4 (NAP1L4), ARNm.
STT3A - STT3, subunidad del complejo de oligosacaril transferasa, homólogo A (S. cerevisiae) (STT3A), ARNm
RRP36 - homólogo de procesamiento de ARN ribosomal 36 (S. cerevisiae) (RRP36), ARNm
S100A11 - S100 proteína de unión a calcio A11 (S100A11), ARNm
SREBF1 - factor de transcripción de unión al elemento regulador de esteroles 1 (SREBF1), variante de transcrito 1, ARNm
GMPT7 - guanosina monofosfato reductasa (GMPT7), ARNm
MRP63 - proteína ribosomal mitocondrial 63 (MRP63), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
PSMD8 - subunidad 26S de proteosoma (prosome, macropéptida), no ATPasa, 8 (PSMD8), ARNm
PSEN2 - presenilina 2 (enfermedad de Alzheimer 4) (PSEN2), variante de transcrito 2, ARNm
LAPTM4B - proteína lisosomal transmembrana 4 beta (LAPTM4B), ARNm
BLVRA - biliverdina reductasa A (BLVRA), ARNm
AKT2 - homólogo 2 del oncogén viral del timoma murino v-akt (AKT2), ARNm
LOC152217 - LOC152217 hipotética (LOC152217), ARN no codificante
GLCCI1 - transcrito inducido por glucocorticoides 1 (GLCCI1), ARNm

ES 2 733 211 T3

TABLA 68: Cambios Transcripcionales MEL-888 (inclusión/exclusión de STDEV sin filtro)
SLC35B1 - familia de portadores de soluto 35, miembro B1 (SLC35B1), ARNm
EMP1 - proteína de la membrana epitelial 1 (EMP1), ARNm
TNFRSF17 - superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 17 (TNFRSF17), ARNm
RBPMS - proteína de unión a ARN con empalme múltiple (RBPMS), variante de transcrito 3, ARNm
LOC80154 - LOC80154 hipotética (LOC80154), ARN no codificante
LGMN - legumaína (LGMN), variante de transcrito 1, ARNm
POLDIP2 - polimerasa (dirigida por ADN), proteína que interactúa en delta 2 (POLDIP2), ARNm
TSPAN5 - tetraspanina 5 (TSPAN5), ARNm
NFKBIA: inhibidor alfa del factor nuclear potenciador del gen del polipéptido ligero kappa de las células B (NFKBIA), ARNm
PTPN3 - proteína tirosina fosfatasa, tipo 3 no receptora (PTPN3), variante de transcrito 5, ARNm
ZNF259 - proteína de dedo de zinc 259 (ZNF259), ARNm
ITM2A - proteína integrante de la membrana 2A (ITM2A), variante de transcrito 1, ARNm
CHPT1- colina fosfotransferasa 1 (CHPT1), ARNm
AGPS - alquilglicerona fosfato sintasa (AGPS), ARNm
XKR9 - proteína relacionada con XK 9. [Fuente: Uniprot/SWISSPROT; Acc: Q5GH70]
CCDC47 - 47 que contiene dominio de bobina enrollada (CCDC47), ARNm
INPP4A - inositol polifosfato de 4-fosfatasa, tipo I, 107 kDa (INPP4A), variante de transcrito c, ARNm
WBP5 - proteína de unión al dominio WW 5 (WBP5), variante de transcrito 4, ARNm
TMPRSS9 - proteasa transmembrana, serina 9 (TMPRSS9), ARNm
CLSTN1 - calstentina 1 (CLSTN1), variante de transcrito 2, ARNm
HYI - hidroxipiruvato isomerasa (supuesta) (HYI), variante de transcrito 1, ARNm
FGF13 - factor de crecimiento fibroblastos 13 (FGF13), variante de transcrito 2, ARNm
SLC35B4 - familia de portadores de soluto 35, miembro B4 (SLC35B4), ARNm
AOAH - aciloxiacil hidrolasa (neutrófilo) (AOAH), variante de transcrito 2, ARNm
CREB5 - proteína de unión al elemento sensible a AMPc 5 (CREB5), variante de transcrito 3, ARNm
EMR3: receptor hormonal de tipo mucina que contiene un módulo similar a Egf 3
SPRYD4 - 4 que contiene dominio SPRY (SPRYD4), ARNm
KCNS1 - canal de potasio controlado por voltaje, rectificador retardado, subfamilia S, miembro 1 (KCNS1), ARNm
C15orf21 - marco de lectura abierto 21 del cromosoma 15 (C15orf21), ARN no codificante
NPHS2: nefrosis 2, idiopática, resistente a esteroides (podocina) (NPHS2), ARNm
MAPK12 - proteína quinasa 12 activada por mitógeno (MAPK12), ARNm
NAPSB - pseudogén napsina B aspártico peptidasa NAPSB (NAPSB), ARN no codificante
PMS2L2: pseudogén 2 similar a segregación postmeiótica aumentada tipo 2 (PMS2L2), el ARN no codificante
METRNL - meteorina, similar a regulador de diferenciación de células gliales (METRNL), ARNm
DNAJB1 - homólogo de DnaJ (Hsp40), subfamilia B, miembro 1 (DNAJB1), ARNm
PRKD2 - proteína quinasa D2 (PRKD2), variante de transcrito 2, ARNm
C21orf89 - PRONOSTICADO: marco de lectura abierto 89 del cromosoma 21 (C21orf89), miscARN
LOC100289224 - PRONOSTICADO: proteína hipotética LOC100289224 (LOC100289224), ARNm
C8orf51 - marco de lectura abierto 51 del cromosoma 8 (C8orf51), ARN no codificante

ES 2 733 211 T3

TABLA 68: Cambios Transcripcionales MEL-888 (inclusión/exclusión de STDEV sin filtro)
BAI2 - inhibidor de la angiogénesis específico de cerebro 2 (BAI2), ARNm
HORMAD1 - 1 que contiene dominio HORMA (HORMAD1), ARNm
KRT19 - queratina 19 (KRT19), ARNm
C19orf26 - marco de lectura abierto 26 del cromosoma 19 (C19orf26), ARNm
ZNF638 - proteína de dedo de zinc 638 (ZNF638), variante de transcrito 2, ARNm
HUS1B - homólogo b de punto de control HUS1 (S. pombe) (HUS1B), ARNm
KIAA1244 - KIAA1244 (KIAA1244), ARNm
ARHGAP39 - proteína activadora de Rho GTPasa 39 (ARHGAP39), ARNm
SRCIN1 - inhibidor de señalización de la quinasa SRC 1 (SRCIN1), ARNm
C15orf51 - marco de lectura abierto 51 del cromosoma 15 (C15orf51), ARN no codificante
SEPT7P2 - Septina 7 pseudogen 2
DUSP8 - fosfatasa de especificidad dual 8 (DUSP8), ARNm
MGC23270 - LOC1 196872 hipotética (MGC23270), ARN no codificante
KLHL38 - 38 tipo kelch (Drosophila) (KLHL38), ARNm
CHN2 - quimerina (quimerina) 2 (CHN2), variante de transcrito 2, ARNm
UPK3A - uroplaquina 3A (UPK3A), variante de transcrito 2, ARNm
C1orf91 - Marco de lectura abierto 91 del cromosoma 1
LOC729213 - PRONOSTICADO: similar a ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 5 (función supuesta) (LOC729213), ARNm
AHCY - adenosilhomocisteinasa (AHCY), variante de transcrito 1, ARNm
ZNF483 - Proteína de dedo de zinc 483
LDLRAD2 - 2 que contiene dominio de clase A del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLRAD2), ARNm
MBD3L5 - proteína 3 con dominio de unión a metil-CpG similar a 5 (MBD3L5), ARNm
ZNF705D - proteína de dedo de zinc 705D (ZNF705D), ARNm
HIATL2 - 2 de tipo transcrito abundante en el hipocampo (HIATL2), ARN no codificante
RAB11FIP1 - proteína 1 que interactúa con la familia Rab11 (Rab11-FIP1) (proteína de acoplamiento Rab). [Fuente: Uniprot/S WISSPROT; Acc: Q6WKZ4]
DEM1 - defectos en la morfología homólogo 1 (S. cerevisiae) (DEM1), ARNm
BCDIN3D - que contiene el dominio BCDIN3 (BCDIN3D), ARNm
MICAL3 - monoxigenasa asociada a microtúbulos, calponina y dominio LIM de tipo 3 (MICAL3), variante de transcrito 2, ARNm
ZNF354B - Proteína de dedo de zinc 354B
P2RX2 - receptor purinérgico P2X, canal iónico activado por ligando, 2 (P2RX2), variante de transcrito 6, ARNm
RUNDC2C - 2C que contiene dominio RUN
ANKRD25 - dominio de repetición de anquirina 25 [Fuente: RefSeq_peptide; Acc: NP_056308]
AURKA - aurora quinasa A (AURKA), variante de transcrito 1, ARNm
OR1J1 - receptor olfativo, familia 1, subfamilia J, miembro 1 (OR1J1), ARNm
ZNF69 - proteína de dedo de zinc 69 (ZNF69), ARNm
RIMS2: proteína 2 que regula la exocitosis de la membrana sináptica (molécula que interactúa con Rab3 2) (RIM 2). [Fuente: Uniprot/SWISSPROT; Acc: Q9UQ26]
ZNF93 - Proteína de dedo de zinc 93

ES 2 733 211 T3

TABLA 68: Cambios Transcripcionales MEL-888 (inclusión/exclusión de STDEV sin filtro)
AP1S3 - complejo de proteínas relacionado con el adaptador 1, subunidad sigma 3 (AP1S3), ARNm
TRPM6 - Canal de cationes con potencial de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 6
PARP14 - Familia de poli (ADP-ribosa)polimerasa, miembro 14
RASA4 - activador 4 de la proteína RAS p21 (RASA4), variante de transcrito 1, ARNm
ATAD3A - familia ATPasa, 3A que contiene dominio AAA
FKBP14 - proteína 14 de unión a FK506, 22 kDa (FKBP14), ARNm
RSPH3 - homólogo de 3 de patrón radial (Chlamydomonas)
FGR - homólogo de oncogén del sarcoma felino viral (v-fgr) de Gardner-Rasheed, variante de transcrito 3, ARNm
HIST2H3D - grupo de histonas 2, H3d (HIST2H3D), ARNm
ZBTB43 - 43 que contiene dedo de zinc y dominio BTB (ZBTB43), variante de transcrito 2, ARNm
ZNF91 - proteína de dedo de zinc 91 (ZNF91), ARNm
HSPA8 - proteína 8 de choque térmico 70 kDa
LYPD3 - 3 que contiene dominio LY6/PLAUR (LYPD3), ARNm
ALG10 - glicosilación 10 unida a asparragina, homólogo de alfa-1,2-manosiltransferasa (S. pombe) (ALG10), ARNm
VARV-gp134 - proteína gp134 del virus Variola
ZNF532 - Proteína de dedo de zinc 532
TRIM 15 - 15 que contiene motivo tripartito (TRIM 15), ARNm
GADD45B - proteína B de respuesta al daño del ADN y detención del crecimiento, beta (GADD45B), ARNm
C1orf147 - PRONOSTICADA: marco de lectura abierto 147 del cromosoma 1 (C1orf147), miscARN
FLJ46838 - PRONOSTICADA: proteína FLJ46838 (FLJ46838), miscARN
DKFZp564H213 - LOC440432 hipotética
LY6H - complejo de antígeno linfocítico 6, locus H (LY6H), variante de transcrito 1, ARNm
MRPL39 - proteína ribosomal mitocondrial L39 (MRPL39), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcrito 2, ARNm
LOC100131551 - LOC100131551 hipotética
CCT6P1: TCP1 que contiene chaperonina, subunidad 6 (zeta) pseudogén 1 (CCT6P1), ARN no codificante
CACNA1G - Canal de calcio, dependiente de voltaje, tipo T, subunidad alfa 1G
ABCD3: casete de unión a ATP, subfamilia D (ALD), miembro 3 (ABCD3), variante de transcrito 2, ARNm
GALNTL2 - UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 2 (GALNTL2), ARNm
LOC390414 - PRONOSTICADA: LOC390414 hipotético (LOC390414), miscARN
SRGAP2 - proteína 2 activadora de la SLIT-ROBO Rho GTPasa (SRGAP2), variante de transcrito 3, ARNm
C20orf107 - marco de lectura abierto 107 del cromosoma 20 (C20orf107), ARNm
ZBTB32 - 32 que contiene dedo de zinc y dominio BTB (ZBTB32), ARNm
C7orf68 - marco de lectura abierto 68 del cromosoma 7
ZNF492 - proteína de dedo de zinc 492 (ZNF492), ARNm
BCYRN1 - ARN citoplasmático cerebral 1 (codificación no proteica) (BCYRN1), ARN no codificante
C14orf126 - marco de lectura abierto 126 del cromosoma 14 (C14orf126), ARNm
JMJD6 - 6 que contiene dominio jumonji (JMJD6), variante de transcrito 1, ARNm
ZMYM2 - dedo de zinc, tipo MYM 2 (ZMYM2), variante de transcrito 1, ARNm
TNKS1BP1 - Proteína 1 de unión a Tanquirasa 1, 182 kDa

ES 2 733 211 T3

TABLA 68: Cambios Transcripcionales MEL-888 (inclusión/exclusión de STDEV sin filtro)
SPEN - homólogo de spen, regulador de la transcripción (Drosophila) (SPEN), ARNm
RBPJ-proteína de unión a la señal de recombinación para la región kappa J de la inmunoglobulina
MRGPRES - GPR relacionado con MAS, miembro E (MRGPRES), ARNm
XP_292723.3 - PRONOSTICADA: similar a 5 que contiene dedo de zinc y dominio SCAN [Fuente: péptido RefSeq predicho; Acc: XP 943301]
CEBPE - proteína de unión a CCAAT/potenciador (C/EBP), épsilon (CEBPE), ARNm
TPTE2P2 - fosfoinositido 3-fosfatasa transmembrana y pseudogén 2 del homólogo 2 de tensina (TPTE2P2), ARN no codificante
FBXO4 - proteína con caja F 4 (FBXO4), variante de transcrito 1, ARNm
ZNF620 - proteína de dedo de zinc 620 (ZNF620), variante de transcrito 1, ARNm
NANS - ácido N-acetilneuramínico sintasa (NANS), ARNm
DCTN5 - dinactina 5 (p25) (DCTN5), ARNm
ZNF79 - proteína de dedo de zinc 79 (ZNF79), ARNm
TERF1 - factor de unión a repetición telomérica (que interactúa con NIMA) 1 (TERF1), variante de transcrito 2, ARNm
NCRNA00268 - ARN no codificante de proteína 268
UBA52 - producto de fusión 1 de la proteína ribosomal del residuo 52 de ubiquitina A (UBA52), variante de transcrito 2, ARNm
PDE4B - fosfodiesterasa 4B, específica de AMPc (PDE4B), variante de transcrito a, ARNm
DOCK2 - dedicada a la citocinesis 2 (DOCK2), ARNm
LOC100128164 - pseudogen con cuatro dominios LIM y medio 1 (LOC100128164), variante de transcrito 2, ARN no codificante
FLJ46134 - LOC400799 hipotética
LOC388948 - LOC388948 hipotética (LOC388948), ARN no codificante
TAPBP - proteína de unión a TAP (tapasina) (TAPBP), variante de transcrito 3, ARNm
NPPB - precursor de péptido natriurético B (NPPB), ARNm
MFN1 - mitofusina 1 (MFN1), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
SPHK2 - esfingosina quinasa 2 (SPHK2), ARNm
LOC 100288570 - PRONOSTICADA: similar al homólogo 1 de la proteína de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (levadura) (LOC100288570), ARNm
RN5S1 - ARN, ribosomal 5S 1 (RN5S1), ARN ribosomal
OSCAR - Receptor de tipo inmunoglobulina asociado a osteoclastos
RGS 1 - regulador de la señalización de la proteína G 1 (RGS1), ARNm
HSD3B7 - Hidroxi-delta-5-esteroide deshidrogenasa, 3 beta- y esteroide delta-isomerasa 7 (HSD3B7), variante de transcrito 1, ARNm
CGN - cingulina (CGN), ARNm
ADAMTS9 - motivo metalopeptidasa ADAM con motivo de trombospondina tipo 1, 9 (ADAMTS9), ARNm
NDUFA9 - NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, 9 39 kDa (NDUFA9), gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, ARNm
DCAKD - que contiene dominio desfosfo-CoA quinasa (DCAKD), variante de transcrito 1, ARNm
UBQLNL: de tipo ubiquilina (UBQLNL), ARNm
YIF1A - homólogo A del factor de interacción con Yip1 (S. cerevisiae) (YIF1A), ARNm
NAA16 - N (alfa) -acetiltransferasa 16, subunidad auxiliar NatA (NAA16), variante de transcrito 3, ARNm

TABLA 68: Cambios Transcripcionales MEL-888 (inclusión/exclusión de STDEV sin filtro)
LOC645212 - LOC645212 hipotética (LOC645212), variante de transcrito 1, ARN no codificante
CYBB - citocromo b-245, polipéptido beta (CYBB), ARNm
SLIT3 - homólogo de hendidura 3 (Drosophila) (SLIT3), ARNm
C7orf69 - marco de lectura abierto 69 del cromosoma 7 (C7orf69), ARNm
PSG3 - beta-1-glicoproteína específica del embarazo 3 (PSG3), ARNm

b. Cambios Transcripcionales del Gen del Virus Vaccinia

5 Se analizaron tres grupos de matrices (control, 2 hpi; genes tempranos y 10 hpi; genes tardíos). Además, también se
 10 analizaron 4 grupos de genes principales (C1, C2, C3a/3b y C4). Los grupos de matrices mostraron que el punto
 temporal y la infección influyen más en el patrón de expresión génica, como se muestra en base a la segregación
 entre controles, 2 hpi y 10 hpi. Los grupos de genes mostraron patrones específicos, reflejando de ese modo
 15 diferentes clases de expresión temporal y categorías funcionales, tales como: entrada y propagación de VACV,
 estructura y ensamblaje de VACV, replicación de ADN y transcripción de ARN de VACV, interacciones del anfitrión y
 20 modulaciones inmunitarias, y otras funciones/desconocidas. Los resultados mostraron que había una expresión baja
 similar a las 2 y 10 horas hpi de los genes tempranos/tardíos y que los genes se intercalaban en todas las
 categorías. Hubo un aumento de la expresión a 10 hpi de los genes tardíos con enriquecimiento de estructura y
 clase de ensamblaje de los genes. Hubo una disminución en la expresión a 10 hpi de los genes tempranos y
 tempranos/tardíos con enriquecimiento de replicación de ADN/clase de transcripción de ARN. También hubo una
 alta expresión similar a las 2 y 10 hpi de los genes tempranos y tempranos/tardíos con enriquecimiento de la
 replicación del ADN/transcripción del ARN y de interacciones del anfitrión/moduladores inmunitarios. Por lo tanto, los
 resultados mostraron que los cambios transcripcionales del gen del virus vaccinia con el tiempo después de la
 infección relacionada con los genes afectaban a la entrada y propagación del virus vaccinia, la estructura y el
 ensamblaje, la replicación del ADN/la transcripción del ARN, la interacción del anfitrión/la modulación inmunitaria.
 Otros genes de función desconocida también se asociaron con cambios transcripcionales.

c. Eficacia de Replicación

25 La eficacia de la replicación se determinó a partir de las curvas de crecimiento de los títulos virales obtenidos en
 puntos temporales de 0 a 10 hpi. Los títulos estaban en unidades de formación de placa por 10⁶ células. Para todos
 los virus sometidos a prueba, la eficacia de la replicación inicialmente disminuyó 2 hpi, pero después se incrementó
 paulatinamente de manera dependiente del tiempo a 10 hpi. GLV-1h68 mostró la eficacia de replicación más baja.
 LIVP 1.1.1, LIVP 5.1.1 y LIVP 6.1.1. mostraron una eficacia de replicación similar, aunque LIVP 6.1.1. mostró los
 30 títulos más altos. LIVP 5.1.1 y LIVP 1.1.1. mostraron eficacias de replicación comparables.

La eficacia de la replicación se comparó con los niveles de transcripción del gen vaccinia. Se utilizaron siete (7)
 genes tempranos de vaccinia (V149, V194, V189, V104, V069, V167 y V106) para el análisis de correlación por
 agrupamiento jerárquico de los niveles de expresión. La jerarquía de los niveles de expresión génica en un conjunto
 de 7 genes virales tempranos coincidió con la eficacia de replicación respectiva a las 2 hpi (véanse las Tablas 69 y
 35 70, que establecen los niveles de expresión de los genes a las 2 hpi). De manera similar a los resultados de eficacia
 de replicación, GLV-1h68 mostró los niveles de transcripción génica media más bajos, mientras que LIVP 6.1.1
 mostró los valores de expresión más altos. LIVP 1.1.1 y LIVP 5.1.1 exhibieron niveles transcripcionales comparables
 a 2 hpi. Estos datos indican una correlación entre la transcripción del gen temprano de vaccinia y la replicación del
 40 genoma temprano de vaccinia.

TABLA 69: Correlación de la expresión del gen temprano de vaccinia con la eficacia de replicación (888-MEL)				
Gen	1h68	L511	L111	L611
VACGL069_desconocido	7,38001	7,52207	7,55892	7,65163
VACGL104_factor de elongación de la transcripción tardío	6,95362	7,42775	7,5386	7,99347
VACGL106_proteína de formación de membrana viral	7,25516	7,78636	7,9264	8,49585
VACGL149_contiene motivo de tipo mutT de NTP-fosfohidrolasa para la reparación de ADN	6,84707	7,0116	7,09935	7,25484
VACGL167_subunidad rpo 19 de ARN polimerasa dependiente de ADN	7,51383	7,68261	7,91613	8,14413
VACGL189_factor de procesividad de ADN polimerasa viral	6,64873	7,42331	7,39033	7,98892
VACGL194_subunidad rpo132 de ARN polimerasa dependiente de ADN	6,89847	7,25057	7,22874	7,4784

TABLA 70: Correlación de la expresión del gen temprano de vaccinia con la eficacia de replicación (1936-MEL)

Gen	1h68	L511	L111	L611
VACGL069_desconocido	7,20523	7,54097	7,55534	7,64865
VACGL104_ factor de elongación de la transcripción tardío	7,18112	7,83809	7,853	8,195
VACGL106_ proteína de formación de membrana viral	8,11503	8,75754	8,96633	9,07872
VACGL149_ contiene motivo de tipo mutT de NTP-fosfohidrolasa para la reparación de ADN	7,1184	7,19542	7,53341	7,68812
VACGL167_ subunidad rpo 19 de ARN polimerasa dependiente de ADN	7,96658	8,03929	8,18193	8,185
VACGL189_ factor de procesividad de ADN polimerasa viral	7,12139	7,82778	7,96655	8,00612
VACGL194_ subunidad rpo132 de ARN polimerasa dependiente de ADN	6,91024	7,28462	7,46623	7,62953

Además, la eficacia de la replicación también se comparó con los niveles de transcripción de genes humanos. Los resultados mostraron que 114 genes humanos mostraban fuertes correlaciones ($R^2 \geq 0,6$) con la transcripción del gen inicial de vaccinia promediada. Estos genes se organizaron en las siguientes redes: modificación postraduccional, expresión génica, muerte celular y crecimiento y proliferación celular. Las funciones moleculares principales fueron el ciclo celular, el movimiento celular, el crecimiento y la proliferación y la señalización de célula a célula. Los genes candidatos virales identificados por su comportamiento transcripcional, que es característico de la replicación viral, se utilizaron para ver si había genes humanos que pudieran influir en estos genes virales y, por lo tanto, en la eficacia de la replicación. Los genes humanos con los correlatos positivos más fuerte con la transcripción viral según lo determinado a partir del análisis de correlación por agrupamiento jerárquico de los niveles de expresión (correlación de Pearson, $R^2= 0,8$) fueron MLL5, LRRFIP2, CSRNP2, EFHD1, TXNRD3, ARFIP2, ENTPD6, ITPKA, YTHDF2, MRSPS11 y PREP. Los análisis de correlación entre la expresión del gen del anfitrión y los genes candidatos virales revelaron una fuerte correlación negativa o positiva con un conjunto de genes humanos.

3. Compendio

Los resultados indican una correlación directa entre la replicación viral, la expresión del gen temprano y la respectiva respuesta del anfitrión.

Ejemplo 14

Generación de una Línea Celular de Sarcomas de Tejido Blando Canino (CSTS) designada STSA-1

La línea celular STSA-1 se obtuvo de un tumor de un perro golden retriever, macho, castrado, de siete años de edad, que presentaba una masa eritematosa firme y dolorosa en la extremidad anterior izquierda. La masa se extrajo quirúrgicamente con la extirpación de los músculos flexores digitales profundos y carpos flexores, ya que estaban muy infiltrados por el tumor. El sujeto se sometió a radioterapia de curso completo. En un examen de revisión de tres meses, las radiografías torácicas y la ecografía abdominal no mostraron evidencia de metástasis, pero las radiografías de la extremidad delantera izquierda revelaron una lisis severa de la ulna distal, radio distal caudal y los huesos del carpo. La aspiración con aguja fina de un ganglio linfático prescapular izquierdo agrandado se diagnosticó mediante citología como una neoplasia mesenquimática metastásica. En este momento, se amputó la extremidad y se extirparon los ganglios linfáticos agrandados. La histología en muestras fijadas con formalina de la extremidad y los ganglios linfáticos axilar y prescapular confirmaron que la lesión era compatible con sarcoma de tejido blando de grado intermedio con invasión vascular, infiltración de células tumorales en la cavidad de la médula ósea y metástasis en los ganglios linfáticos de drenaje.

Las células se aislaron asépticamente de la masa tumoral para el cultivo. Brevemente, el tumor fue extirpado quirúrgicamente y la grasa y el tejido necrótico fueron disecados de una sección no fijada del tumor. A continuación la masa se trocó en cubos de un milímetro, se colocaron en un matraz de cultivo celular de 25 cm² (Nunc, Wiesbaden, Alemania), y se dejó que se adhirieran durante 10 minutos a temperatura ambiente, con la adición posterior de medio esencial mínimo con sales de Earle con un suplemento de glutamina 2 mM, penicilina G de 50 U/mL, estreptomina de 50 µg/mL, Piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM (MEM-C) y FBS al 10%, a continuación se incubaron a 37°C, CO₂ al 5% y 100% de humedad. La tripsinización y el pase de las células cultivadas se realizaron cuando las células cubrían aproximadamente 80% de la superficie del matraz o antes si los explantes de tejido estaban en descomposición. Una vez que se estableció un cultivo primario, se mantuvo en MEM-C con FBS al 10% y se incubó como anteriormente.

El tipo de célula se analizó mediante tinciones citoquímicas e inmunocitoquímicas. Brevemente, las células primarias

se cultivaron en placas de 35 mm de diámetro (Nunc) como se describió anteriormente. A continuación, las células se tripsinizaron, se recogieron en MEM-C con FBS al 10% y se sedimentaron por centrifugación a 400 x g durante 5 min. Los sedimentos celulares se suspendieron en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a partir de la cual se citocentrifugaron alícuotas de 100 µl de células a 1000 rpm durante 3 minutos en portaobjetos de vidrio cargados. Posteriormente, las células adherentes se incubaron durante 10 minutos con sustrato de fosfatasa BCIP/NBT (KPL, Inc., Gaithersburg, Maryland, EE. UU.) para detectar la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), que es detectable en células derivadas de hueso, hígado, riñón e intestino. Las células adherentes también fueron inmunoteñidas directamente con un anticuerpo monoclonal anti-CD18 canino murino (CA16.3C10, del Dr. Peter Moore, de la Universidad de California, Davis, CA), que es un marcador para las células histiocíticas. Se sometieron diapositivas adicionales a recuperación de antígenos en una Decloaking Chamber (Biocare Medical, Concord, CA) y se incubaron con un cóctel de anticuerpos anti-AEL y anti-AE3 monoclonales murinos (Biogenex, San Ramon, CA) para detectar la citoqueratina (encontrada dentro de las células de origen epitelial) o con un anticuerpo monoclonal anti-vimentina murino (V-9, Biogenex) (presente en las células mesenquimales). Las respuestas mostraron que las células eran positivas para vimentina, pero negativas para otras proteínas, lo que apoya el diagnóstico de sarcoma de tejido blando.

La PCR múltiple específica de la especie y el análisis de repetición en tándem corto también confirmaron que las células eran de origen canino (O'Donoghue et al. (2011) J. Vet. Diagn. Invest., 23: 780-785).

20 Ejemplo 15

Efectos de LIVP 1.1.1, LIVP 5.1.1 y LIVP 6.1.1 sobre varias líneas celulares de cáncer canino y en modelos de ratón con xenoinjerto canino

25 1. Efectos Terapéuticos de LIVP 1.1.1, LIVP 5.1.1 y LIVP 6.1.1 *in vitro* frente a un panel de líneas celulares de cáncer canino

Varias líneas celulares de cáncer canino cultivadas en placas de 24 pocillos se infectaron por separado con uno de los virus vaccinia GLV-1h68, GLV-1h109, GLV-1h163, LIVP 1.1.1., LIVP 5.1.1. y/o LIVP 6.1.1 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 o 1,0 como se indica en la Tabla 70. Las líneas celulares de cáncer canino analizadas fueron: STSA-1 (descrita en el Ejemplo 14), DT08/40 (proporcionada por Dr. Nolte, Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Alemania), D17 (ATCC núm. CCL-183) o CHAS (proporcionado por el Dr. Greg Ogilvie, Angel Care Center, Carlsbad, CA). Las células se incubaron a 37°C durante 1 hora con agitación suave cada 20 minutos. A continuación, se eliminó el medio de infección y se reemplazó por medio de crecimiento de nueva aportación. El sobrenadante del virus y los productos lisados celulares se recolectaron 1, 6, 24, 48, 72 y 96 horas después de la infección y se evaluaron varios parámetros asociados con el efecto terapéutico, incluyendo la replicación viral y la citotoxicidad.

Línea celular	GLV-1h68	GLV-1h109	GLV-1h158	GLV-1h163	LIVP 1.1.1	LIVP 5.1.1	LIVP 6.1.1
STSA-1	X	X			X	X	X
DT08 /40		X					X
D17	X	X	X	X	X		X
CHAS		X	X	X			X

40 a. Replicación Viral

Después de tres ciclos de congelación y descongelación de los productos lisados celulares recolectados, las diluciones en serie de los productos lisados se tiñeron mediante ensayos de placa convencionales en células CV-1 como se describió anteriormente. Todas las muestras se midieron por triplicado. Los resultados mostraron que se observaba una replicación viral eficaz en todas las líneas celulares y en todas las cepas de virus sometidas a prueba. En general, hubo un aumento del título de más de 100 veces en 48 o 72 horas.

b. Citotoxicidad

La citotoxicidad se evaluó midiendo la viabilidad de las células infectadas utilizando un ensayo MTT (Sigman, Taufkirchen, Alemania). A las 24, 48, 72 o 96 horas de la infección de las células, el medio se reemplazó por 0,5 ml de solución de MTT a una concentración de 2,5 mg/ml de MTT disuelto en RPMI 1640 sin rojo fenol y se incubó durante 2 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Después de eliminar la solución de MTT, la reacción de color se detuvo agregando HCl 1 N diluido en isopropanol. La densidad óptica se midió a continuación a una longitud de onda de 570 nm. Las células no infectadas se utilizaron como referencia y se consideraron como 100% viables. Los resultados se muestran en la Tabla 71 y muestran el porcentaje de células destruidas en las 72 horas posteriores a

la infección (hpi; excepto para la actividad citotóxica de LIVP 6.1.1 sobre DT08/40, que se evaluó a 96 hpi).

Tabla 71				
Línea celular	Tipo de tumor canino	Virus	Porcentaje de células destruidas a 72 hpi	
			MOI = 0,1	MOI = 1,0
STSA-1	sarcoma de tejidos blandos	GLV-1h68	60%	77%
		LIVP 1.1.1	82%	86%
		LIVP 5.1.1	92%	93%
		LIVP 6.1.1	73%	83%
		GLV-1h109	72%	80%
CHAS	melanoma	GLV-1h109	29%	84%
		GLV-1h158	38%	89%
		GLV-1h163	18%	84%
		LIVP 6.1.1	100%	100%
D17	osteosarcoma	GLV-1h68	12%	79%
		GLV-1h109	12%	80%
		GLV-1h158	0%	68%
		GLV-1h163	0%	66%
		LIVP 1.1.1	12%	54%
		LIVP 6.1.1	54%	87%
DT08 /40	carcinoma de próstata	LIVP 6.1.1	55%*	85%*
		GLV-1h109	63%	80.7%

* Actividad de citotóxica a las 96 horas de la infección (hpi)

2. Efecto de LIVP 1.1.1, LIVP 5.1.1 y LIVP 6.1.1 sobre el Crecimiento y la Terapia caninos

5 Se generó un modelo de xenoinjerto de sarcoma de tejido blando (STSA-1), un modelo de xenoinjerto de melanoma canino (CHAS), un modelo de xenoinjerto de osterosarcoma canino (D17) y un modelo de crecimiento de xenoinjerto de carcinoma de próstata canino (DT08/40) para someter a prueba los efectos de las cepas del virus in vivo.

a. Sarcoma de Tejidos Blandos Canino

10 Se evaluó el efecto terapéutico de GLV-1h68, GLV-1h109, LIVP 1.1.1, LIVP 5.1.1 y LIVP 6.1.1 sobre la progresión de xenoinjertos subcutáneos de tumores de sarcoma de tejidos blandos *in vivo* midiendo los volúmenes de los tumores en ratones portadores de tumores tratados con el virus dos veces por semana durante ocho semanas (42 días después de la infección viral). Los tumores se generaron implantando 1×10^6 células de sarcoma de tejidos blandos canino STSA-1 por vía subcutánea en la pata trasera derecha de ratones carentes de sistema inmunitario hembra de 6 a 8 semanas de edad (NCI/Hsd/Athymic Nude-Foxn1^{nu}). Cuatro semanas después de la implantación, todos los ratones desarrollaron tumores con volúmenes de 400 a 500 mm³.

1) GLV-1h68, LIVP 1.1.1, LIVP 5.1.1

20 El día 28, se inyectó por vía intravenosa (i.v.) una dosis única (1×10^7 ufp) de GLV-1h68, LIVP 1.1.1 o LIVP 5.1.1 en la vena lateral de la cola. A los animales de control se les inyectó i.v. solamente PBS (n = 6/grupo). El volumen del tumor se midió dos veces por semana. Debido a la carga tumoral excesiva (> 3000 mm³), todos los animales del grupo de control se sacrificaron a los 21 días de la infección viral. Los resultados muestran que la administración sistémica de GLV-1h68, LIVP 1.1.1 o LIVP 5.1.1 condujo a una inhibición significativa del crecimiento tumoral en comparación con los ratones de control. Si bien LIVP 5.1.1 y GLV-1h68 ralentizaron el crecimiento del tumor en comparación con los animales de control, dos de los seis ratones en cada uno de estos grupos de tratamiento desarrollaron tumores con volúmenes mayores de 3000 mm³ hasta 35 días después de la infección del virus. Estos datos indican que LIVP 1.1.1 tenía un potencial oncolítico más alto que GLV-1h68 o LIVP 5.1.1 contra xenoinjertos de sarcoma de tejidos blandos canino.

30 En un segundo conjunto de experimentos (n = 4), una sola inyección i.v. de LIVP 1.1.1 en los xenoinjertos de 208

sarcoma de tejidos blandos canino STSA-1 llevó a una regresión del tumor casi completa durante un período de 42 días sin toxicidad observada.

5 Además, en un experimento de supervivencia a largo plazo, la inyección de LIVP 1.1.1 produjo una mejora significativa en la supervivencia de los ratones portadores de sarcoma en comparación con los ratones de control tratados con PBS ($P = 0,0039$ por análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con la prueba post-hoc de Bonferroni).

2) GLV-1h109 y LIVP 6.1.1

10 El efecto terapéutico de GLV-1h109 y LIVP 6.1.1 se evaluó en el mismo modelo descrito anteriormente. En este caso, el volumen del tumor de inicio medio antes de la inyección del virus fue a las cinco semanas de la implantación, donde todos los ratones desarrollaron tumores con volúmenes de 600 a 1000 mm³, lo que representa un estadio posterior del desarrollo tumoral. Los animales se separaron en cuatro grupos ($n = 6/\text{grupo}$) y se les inyectó una dosis única de GLV-1h68 (1×10^7 ufp), LIVP 6.1.1 (1×10^7 ufp), LIVP 6.1.1 (5×10^6 ufp) o PBS por vía intravenosa en la vena lateral de la cola. El volumen del tumor se midió dos veces por semana. Debido a la carga tumoral excesiva (> 3000 mm³), todos los animales del grupo control con PBS se sometieron a eutanasia 14 días después de la infección. La inhibición del crecimiento del tumor en comparación con los animales de control fue generalmente la misma para todos los grupos tratados con virus en todos los puntos temporales analizados, y dio lugar a diferencias significativas en el crecimiento del tumor en comparación con los controles. Por ejemplo, los días 21, 28 y 35 después de la infección, el volumen del tumor para todos los grupos tratados con virus fue de aproximadamente 500 mm³ a aproximadamente 1000 mm³, evidenciando una reducción sustancial en la carga tumoral en comparación con los animales de control. Los resultados fueron similares entre los animales tratados con 1×10^7 ufp o 5×10^6 ufp LIVP 6.1.1.

b. Crecimiento del Xenoinjerto de Melanoma Canino

25 Se evaluó el efecto terapéutico de GLV-1h163 y LIVP 6.1.1 sobre la progresión de los xenoinjertos de tumores de melanoma canino *in vivo* midiendo los volúmenes de los tumores en ratones portadores de tumores tratados con el virus una vez a la semana durante más de ocho semanas. Los tumores se generaron por inyección subcutánea de 5×10^6 células CHAS en los muslos laterales derechos de ratones macho carentes de sistema inmunitario (Hsd/Athymic Nude-*Foxn1^{nu}*; Harlan, Indianapolis, IN). Tres semanas después de la implantación, todos los ratones desarrollaron tumores con volúmenes de 400 a 500 mm³. Tres semanas después de la implantación, a los grupos de ratones ($n = 5-6$) se les inyectaron retroorbitalmente 2×10^6 ufp de LIVP 6.1.1 o GLV-1h163 o PBS. El volumen del tumor se midió una vez a la semana. Los resultados muestran que GLV-1h163, pero no LIVP 6.1.1, dio lugar a un retraso significativo en el crecimiento del tumor a los 42 días de la infección. A los 42 días de la infección, el volumen del tumor de los ratones tratados con GLV-1h63 fue de aproximadamente 2000 mm³, mientras que el volumen del tumor de los ratones de control o de los ratones tratados con LIVP 6.1.1 fue de aproximadamente 4000 mm³. Los ratones del grupo control y de los grupos tratados con LIVP 6.1.1 se sacrificaron el día 42.

c. Crecimiento de Xenoinjerto de Osteosarcoma Canino

40 Se evaluó el efecto terapéutico de GLV-1h163 y LIVP 6.1.1 sobre la progresión de xenoinjertos de osteosarcoma canino *in vivo* midiendo los volúmenes de tumores en ratones portadores de tumores tratados con el virus una vez a la semana durante más de ocho semanas. Los tumores se generaron por inyección subcutánea de 5×10^6 células D17 en los muslos laterales derechos de ratones macho carentes de sistema inmunitario (Hsd/Athymic Nude-*Foxn1^{nu}*; Harlan, Indianapolis, IN). Cuarenta y cuatro días después de la implantación, a los grupos de ratones ($n = 5-6/\text{grupo}$) se les inyectaron retroorbitalmente 2×10^6 ufp de virus LIVP 6.1.1 o GLV-1h163. A un grupo de control de ratones se le administró PBS. Los resultados muestran que el tratamiento con LIVP 6.1.1 y GLV-1h163 retrasó el crecimiento del osteosarcoma a partir de los 21 días posteriores a la infección. Por ejemplo, los días 28-42 (medido en los días 28, 35 y 42), el volumen tumoral de los animales tratados con LIVP 6.1.1 o GLV-1h163 osciló entre aproximadamente 1200 mm³ y 2500 mm³, mientras que los animales de control mostraron un aumento constante en el crecimiento del tumor en estos puntos temporales con volúmenes de tumor de aproximadamente 2800 mm³, 3800 mm³ y 7800 mm³, respectivamente.

d. Crecimiento de Xenoinjerto de Carcinoma de Próstata canino

55 Se evaluó el efecto terapéutico de GLV-1h109 y LIVP 6.1.1 sobre la progresión de los tumores de próstata caninos *in vivo* midiendo los volúmenes de tumores en ratones portadores de tumores tratados con el virus una vez a la semana durante siete semanas. Los tumores se generaron implantando 5×10^6 células DT08/40 por vía subcutánea en la pata trasera derecha de ratones carentes de sistema inmunitario de 6 a 8 semanas de edad (NCI/Hsd/Athymic Nude-*Foxn1^{nu}*; Harlan, Winkelmann GmbH, Borcheln, Alemania). Cuarenta y nueve días después de la implantación de células tumorales, se inyectaron a los grupos de ratones ($n = 7/\text{grupo}$) 5×10^6 ufp de virus LIVP 6.1.1 o GLV-1h109 por vía intravenosa (i.v.) en la vena lateral de la cola. A un grupo control de ratones se le administró PBS. Los resultados muestran que una inyección única con el virus vaccinia LIVP 6.1.1 o GLV-1h109 condujo a una inhibición significativa del crecimiento tumoral en comparación con los animales de control con PBS comenzando después del día 14 tras la infección y fueron similares entre los grupos de animales tratados con los dos virus. Por ejemplo, los días 21-49 (medido en los días 21, 28, 35, 42 y 49), el volumen tumoral de los grupos de animales tratados con virus

ES 2 733 211 T3

generalmente fue de aproximadamente 250 mm³ a 300 mm³. Para el grupo de control de animales durante estos puntos temporales, el crecimiento del tumor aumentó constantemente con volúmenes de tumor de aproximadamente 380 mm³, 440 mm³, 480 mm³, 580 mm³ y 750 mm³, respectivamente.

- 5 Dado que las modificaciones serán evidentes para los expertos en esta técnica, se pretende que esta invención esté limitada únicamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa LIVP clonal aislada distinta de una cepa clonal cuyo genoma comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10, en donde:

5 la cepa clonal no contiene ácido nucleico heterólogo no viral que contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína heteróloga no viral;
 la cepa clonal comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10; y
 10 la cepa clonal tiene mayor antitumorigenicidad y/o menor toxicidad en comparación con GLV-1h68, en donde GLV-1h68 tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9; y
 la cepa clonal aislada comprende la secuencia de nucleótidos seleccionados entre:

15 a) nucleótidos 2.256 - 181.114 de SEQ ID NO: 1, nucleótidos 11.243-182.721 de SEQ ID NO: 2, nucleótidos 6.264-181.390 de SEQ ID NO: 4, nucleótidos 7.044 - 181.820 de SEQ ID NO: 5, nucleótidos 6.674 - 181.409 de SEQ ID NO: 6, nucleótidos 6.716 - 181.367 de SEQ ID NO: 7 o nucleótidos 6.899 - 181.870 de SEQ ID NO: 8; o
 b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos 2.256 - 181.114 de SEQ ID NO: 1, nucleótidos 11.243 -182.721 de SEQ ID NO: 2,
 20 nucleótidos 6.264 - 181.390 de SEQ ID NO: 4, nucleótidos 7.044 - 181.820 de SEQ ID NO: 5, nucleótidos 6.674 - 181.409 de SEQ ID NO: 6, nucleótidos 6.716 - 181.367 de SEQ ID NO: 7 o nucleótidos 6.899 - 181.870 de SEQ ID NO: 8.

2. Una cepa LIVP clonal aislada distinta de una cepa clonal cuyo genoma comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10, en donde:

25 la cepa clonal no contiene ácido nucleico heterólogo no viral que contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína heteróloga no viral;
 la cepa clonal comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10; y
 30 la cepa clonal tiene mayor antitumorigenicidad y/o menor toxicidad en comparación con GLV-1h68, en donde GLV-1h68 tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9; y
 la cepa clonal aislada comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 7 u 8, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 7 u 8.
 35

3. Una preparación de LIVP producida propagando la cepa LIVP clonal aislada de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.

40 4. Un cultivo celular o célula aislada, que comprende una cepa clonal de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.

5. Una cepa de virus LIVP recombinante, que comprende:

45 un genoma de una cepa clonal LIVP de la reivindicación 1 o la reivindicación 2; y
 ácido nucleico que codifica un producto génico heterólogo en el genoma.

6. La cepa de virus LIVP recombinante de la reivindicación 5, en donde el producto génico heterólogo es un agente terapéutico o de diagnóstico.

50 7. La cepa del virus LIVP recombinante de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde el producto génico heterólogo se selecciona entre un agente anticanceroso, un agente antimetastásico, un agente antiangiogénico, una molécula inmunomoduladora, un antígeno, un gen de degradación de la matriz celular, genes para la regeneración de tejidos y la reprogramación de células somáticas humanas a pluripotencia, enzimas que modifican un sustrato para producir un producto o señal detectable o que son detectables por anticuerpos, proteínas que se pueden unir a un agente de contraste, genes para la generación de imágenes ópticas o de detección óptica, genes para la generación de imágenes de PET y genes para la generación de imágenes de MRI.
 55

8. La cepa de virus LIVP recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde el producto génico heterólogo es un agente terapéutico seleccionado entre una hormona, un factor de crecimiento, una citocina, una quimiocina, una molécula coestimuladora, ribozimas, una proteína transportadora, un anticuerpo de cadena sencilla, un ARN antisentido, un enzima convertora de profármaco, un ARNip, un microARN, una toxina, un oligopéptido antitumoral, una proteína inhibidora de la mitosis, un oligopéptido antimitótico, un antibiótico polipeptídico anticanceroso, un inhibidor de la angiogénesis, un supresor de tumores, una proteína citotóxica, una proteína citostática y un factor tisular.
 60
 65

9. La cepa del virus LIVP recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en donde el producto génico heterólogo es un agente terapéutico seleccionado entre un factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina-24 (IL-24), proteína 10 inducida por interferón gamma (IP-10), la expresión inducible por linfotoxina compite con la glicoproteína D del VHS por HVEM, un receptor expresado en linfocitos T (LIGHT), superantígeno p60, OspF, OspG, transductor de señales y activador de la proteína de transcripción (STAT1alfa), STAT1beta, dominio k5 de plasminógeno (hK5), pigmento de diferenciación del epitelio pigmentado (PEDF), anticuerpo anti-VEGF de cadena sencilla, anticuerpo anti-DLL4 de cadena sencilla, proteína de activación anti-fibroblastos de cadena sencilla (FAP), NM23, cadherina 1 (ECAD o cdh1), relaxina 1 (RLN1), metalopeptidasa 9 de la matriz (MMP9), eritropoyetina (EPO), microARN126 (miR-126), microARN 181, microARN, superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD), E3 ubiquitina proteína ligasa 1 (HACE1), precursor A del péptido natriurético (nppa1), carboxipeptidasa G2 (CPG2), alcohol deshidrogenasa (ADH), CDC6 y proteína morfogenética ósea 4 (BMP4).
10. Una composición farmacéutica, que comprende un virus LIVP o una cepa clonal de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-9 en un portador farmacéuticamente aceptable.
11. Una célula anfitriona aislada o un cultivo celular, que comprende la cepa del virus LIVP recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 5-9.
12. Una composición para uso en la detección de un tumor o metástasis en un sujeto, en donde:
- la composición comprende la cepa de virus LIVP recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 5-7; y el virus comprende un ácido nucleico que codifica una proteína detectable o una proteína que induce una señal detectable.
13. El uso de la cepa del virus LIVP recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 5-7 en la preparación de una composición farmacéutica para detectar un tumor o metástasis en un sujeto, en donde el virus comprende ácido nucleico que codifica una proteína detectable o una proteína que induce una señal detectable.
14. Una composición para utilizar en la detección de la replicación de virus en un anfitrión, en donde:
- la composición comprende la cepa de virus LIVP recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 5-7; y el virus comprende un ácido nucleico que codifica una proteína detectable o una proteína que induce una señal detectable.
15. El uso de la cepa de virus LIVP recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 5-7 en la preparación de una composición farmacéutica para detectar la replicación del virus en un anfitrión, en donde el virus comprende ácido nucleico que codifica una proteína detectable o una proteína que induce una señal detectable.
16. Una composición para su uso en un método para tratar una enfermedad proliferativa en un sujeto, en donde la composición comprende un virus LIVP o una cepa clonal de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-9.
17. El uso de un virus LIVP o cepa clonal de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-9 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno proliferativo en un sujeto.
18. La composición para su uso de la reivindicación 16 o su uso de la reivindicación 17, en donde el trastorno proliferativo es cáncer.
19. La composición para uso o uso de la reivindicación 18, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon o cáncer de páncreas.
20. La composición para uso o uso de la reivindicación 18 o la reivindicación 19, en donde el cáncer es un cáncer de tumor sólido o un cáncer metastásico.
21. La composición para uso o uso de la reivindicación 20, en donde el tumor o metástasis es un tumor de mama, tumor de próstata, tumor de ovario, tumor de pulmón, tumor de colon o tumor pancreático.