

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 964**

51 Int. Cl.:

C12N 15/64 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2014** **PCT/IB2014/000704**
87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014** **WO14118643**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2014** **E 14745845 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019** **EP 2951307**

54 Título: **Métodos para inducir la capacidad de respuesta a un agente antiangiogénico**

30 Prioridad:

04.02.2013 US 201361760601 P
15.03.2013 US 201361800716 P
25.07.2013 US 201361858467 P
21.11.2013 US 201361907286 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.07.2020

73 Titular/es:

VASCULAR BIOGENICS LTD. (100.0%)
8 Hasatat St.
Modiin 7178106, IL

72 Inventor/es:

LEUBITZ, ANDREA, RACHEL;
SHER, NAAMIT;
FEIGE, EREZ y
BREITBART, EYAL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 774 964 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

Métodos para inducir la capacidad de respuesta a un agente antiangiogénico

Antecedentes de la descripción

La angiogénesis es una característica importante y habitual de varias patologías. Entre estas, se encuentran enfermedades en las que la angiogénesis puede mejorar la condición de la enfermedad (tales como la enfermedad cardíaca isquémica) y enfermedades en las que una angiogénesis excesiva es parte de la patología y, por tanto, debe eliminarse. Estas últimas enfermedades incluyen diabetes (retinopatía diabética), enfermedades cardiovasculares (aterosclerosis), inflamación crónica (artritis reumatoide), y cáncer. La angiogénesis aparece en tumores y permite su crecimiento, invasión y metástasis. En 1971, Folkman propuso que el crecimiento de los tumores y las metástasis dependen de la angiogénesis y, por tanto, la inhibición de la angiogénesis puede ser una estrategia para detener el crecimiento tumoral.

Existen varias moléculas implicadas en la angiogénesis, desde factores de transcripción hasta factores de crecimiento. La hipoxia es un factor ambiental importante que conduce a la neovascularización e induce la liberación de varias citoquinas que son factores proangiogénicos. Entre estas se encuentran los factores de crecimiento endotelial vascular ("vascular endothelial growth factors", VEGF) y sus receptores, miembros de la familia de la angiopoyetina, factor de crecimiento de fibroblastos básico, y endotelina-1 (ET-1). Estos factores están implicados en la inducción de la angiogénesis a través de la activación, la proliferación y la migración de células endoteliales.

Se han ensayado formas recombinantes de los inhibidores endógenos de la angiogénesis para el tratamiento del cáncer. Los potenciales inconvenientes farmacocinéticos, biotecnológicos y económicos de la administración crónica de estos inhibidores recombinantes han conducido a los científicos a desarrollar otras estrategias.

El desarrollo del anticuerpo monoclonal anti-VEGF bevacizumab ha validado una estrategia antiangiogénica como modalidad terapéutica complementaria a la quimioterapia. Varios inhibidores de molécula pequeña, que incluyen inhibidores de tirosina quinasa de segunda generación de múltiples dianas también son prometedores como agentes antiangiogénicos para el cáncer.

Sin embargo, los potenciales inconvenientes farmacocinéticos y económicos de la administración crónica de inhibidores recombinantes, anticuerpos y moléculas pequeñas, así como la actividad limitada manifestada cuando se aplican como monoterapia, han conducido a los científicos a evaluar la terapia génica antiangiogénica. La terapia génica es una modalidad emergente para tratar enfermedades humanas heredadas y adquiridas. Sin embargo, existen una serie de obstáculos que limitan el éxito de la terapia génica, que incluyen la duración de la expresión, la inducción de la respuesta inmunológica, la citotoxicidad de los vectores y la especificidad de tejido. Se han propuesto dos estrategias generales para la terapia génica del cáncer: la terapia génica dirigida a tumor o la terapia génica sistémica. La falta de éxito para dirigir los productos de la terapia génica a las células cancerosas o su entorno mediante tratamientos sistémicos provoca que la mayoría de las terapias se administren al propio tumor. Se describe un vector para tratar el cáncer en Triozzi *et al.* (2011), Expert Opinion on Biological Therapy, 11(12), 1669-76, y en Breitbart *et al.* (2011), American Association for Cancer Research Proceedings, 71(8), 1-2.

Breve resumen de la descripción

La presente invención se refiere a las realizaciones según se definen en las reivindicaciones. Así, se refiere a los siguientes puntos:

1. Un vector que comprende la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO:19 para su uso para tratar un tumor en un sujeto que lo necesita en combinación con bevacizumab, en el que: (i) el vector se administra al sujeto antes que el bevacizumab, (ii) la capacidad de respuesta del tumor al bevacizumab se induce o mejora después de la administración del vector, comparada con la capacidad de respuesta del tumor al bevacizumab sin la administración del vector, y (iii) el tumor se deriva o está asociado con un glioblastoma multiforme recurrente.

2. El vector para el uso del punto 1, en el que la capacidad de respuesta al bevacizumab es una propiedad antiangiogénesis del bevacizumab.

3. El vector para el uso del punto 1 o 2, en el que la capacidad de respuesta al bevacizumab es un efecto antitumoral del bevacizumab.

4. El vector para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que el vector se administra en una cantidad eficaz de al menos aproximadamente 1×10^{11} partículas de virus, al menos aproximadamente 1×10^{12} partículas de virus, al menos aproximadamente 1×10^{13} partículas de virus, o al menos aproximadamente 1×10^{14} partículas de virus.

5. El vector para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en el que el bevacizumab se administra en una cantidad eficaz menor que aproximadamente 15 mg/kg, 14 mg/kg, 13 mg/kg, 12 mg/kg, 11 mg/kg, 10 mg/kg, 9 mg/kg, 8 mg/kg, 7 mg/kg, 6 mg/kg, 5 mg/kg, 4 mg/kg, 3 mg/kg, 2 mg/kg, o 1 mg/kg.

6. El vector para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en el que el vector se administra en una cantidad eficaz de 3×10^{12} a 1×10^{13} partículas de virus, y el bevacizumab se administra en una cantidad eficaz de 5 mg/kg a 15 mg/kg.
7. El vector para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en el que el vector se administra repetidas veces.
- 5 8. El vector para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 7, en el que el bevacizumab se administra repetidas veces.
9. El vector para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 8, en el que el vector se administra repetidas veces cada dos meses en una cantidad eficaz de 1×10^{13} partículas de virus, y el bevacizumab se administra repetidas veces cada dos semanas en una cantidad eficaz de 10 mg/kg.
- 10 La presente descripción se dirige a un método para inducir o mejorar la capacidad de respuesta a un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales y el antagonista de VEGF al sujeto, en el que la capacidad de respuesta al antagonista de VEGF se induce o mejora después de la administración del vector, comparado con la capacidad de respuesta al antagonista de VEGF sin la administración del vector.
- 15 La descripción se dirige además a un método para inducir o mejorar la capacidad de respuesta a un antagonista de VEGF en una población de sujetos que lo necesita, que comprende administrar un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales y el antagonista de VEGF al sujeto, en el que la capacidad de respuesta al antagonista de VEGF se induce o mejora después de la administración del vector, comparado con la capacidad de respuesta al antagonista de VEGF sin la administración del vector.
- 20 En un aspecto, el sujeto o la población de sujetos necesita inducir o mejorar la capacidad de respuesta a un antagonista de VEGF. En una realización, la capacidad de respuesta al antagonista de VEGF es una propiedad antiangiogénesis del antagonista de VEGF. En otra realización, la capacidad de respuesta al antagonista de VEGF es un efecto antitumoral del antagonista de VEGF.
- 25 En otro aspecto, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF o una molécula de unión a VEGF. En un aspecto de la presente invención, el antagonista de VEGF es bevacizumab.
- En algunos aspectos, el vector que comprende un gen de quimera-Fas codifica un polipéptido que comprende un dominio extracelular de un polipéptido de receptor 1 de TNF ("TNF Receptor 1", TNFR1) condensado con un dominio transmembrana y un dominio intracelular de un polipéptido de Fas.
- 30 Una característica de la presente descripción consiste en que el vector y el antagonista de VEGF se administran al mismo tiempo o de modo secuencial. Otra característica de la invención consiste en que el vector se administra antes que el antagonista de VEGF.
- En una realización, el vector se administra en una cantidad eficaz igual o menor que aproximadamente 1×10^{13} , 9×10^{12} , 8×10^{12} , 7×10^{12} , 6×10^{12} , 5×10^{12} , 4×10^{12} , 3×10^{12} , 2×10^{12} , 1×10^{12} , 9×10^{11} , 8×10^{11} , 7×10^{11} , 6×10^{11} , 5×10^{11} , 4×10^{11} , 3×10^{11} , 2×10^{11} , 1×10^{11} , 9×10^{10} , 8×10^{10} , 7×10^{10} , 6×10^{10} , 5×10^{10} , 4×10^{10} , 3×10^{10} , 2×10^{10} , o 1×10^{10} partículas de virus.
- 35 En una realización, el vector se administra en una cantidad eficaz de al menos aproximadamente 1×10^{11} partículas de virus. En otra realización, el vector se administra en una cantidad eficaz de al menos aproximadamente 1×10^{12} partículas de virus. En otra realización, el vector se administra en una cantidad eficaz de al menos aproximadamente 1×10^{13} partículas de virus. En otra realización, el vector se administra en una cantidad eficaz de al menos aproximadamente 1×10^{14} partículas de virus.
- 40 En otra realización de la presente invención, el bevacizumab se administra en una cantidad eficaz igual o menor que aproximadamente 15 mg/kg, 14 mg/kg, 13 mg/kg, 12 mg/kg, 11 mg/kg, 10 mg/kg, 9 mg/kg, 8 mg/kg, 7 mg/kg, 6 mg/kg, 5 mg/kg, 4 mg/kg, 3 mg/kg, 2 mg/kg, o 1 mg/kg.
- 45 En otra realización de la presente invención, el vector se administra en una cantidad eficaz de 3×10^{12} a 1×10^{13} partículas de virus, y el bevacizumab se administra en una cantidad eficaz de 5 mg/kg a 15 mg/kg.
- En otras realizaciones, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF de unión al receptor o una molécula de unión al receptor de VEGF. En otra realización, el anticuerpo anti-VEGF de unión al receptor es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un antagonista de VEGF puede seleccionarse de bevacizumab, ranibizumab, VGX-100, r84, aflibercept, IMC-18F1, IMC-1C11, ramucirumab, y cualquiera de sus combinaciones.
- 50 En algunas realizaciones, el vector se administra repetidas veces. El vector puede administrarse repetidas veces a diario, una vez en aproximadamente 2 días, una vez en aproximadamente 3 días, una vez en aproximadamente 4 días, una vez en aproximadamente 5 días, una vez en aproximadamente 6 días, una vez en aproximadamente 7

días, una vez en aproximadamente 2 semanas, una vez en aproximadamente 3 semanas, una vez en aproximadamente 4 semanas, una vez en aproximadamente 5 semanas, una vez en aproximadamente 6 semanas, una vez en aproximadamente 7 semanas, una vez en aproximadamente 2 meses, o una vez en aproximadamente 6 meses. En ciertas realizaciones, el bevacizumab se administra repetidas veces. En otra realización de la invención, el bevacizumab se administra repetidas veces una vez en aproximadamente 7 días, una vez en aproximadamente 2 semanas, una vez en aproximadamente 3 semanas, una vez en aproximadamente 4 semanas, una vez en aproximadamente 2 meses, una vez en aproximadamente 3 meses, una vez en aproximadamente 4 meses, una vez en aproximadamente 5 meses, o una vez en aproximadamente 6 meses.

Realizaciones

- 10 E1. Un método para inducir la apoptosis de una célula endotelial en un tumor de un sujeto que lo necesita, que comprende administrar un antagonista de VEGF al sujeto, en el que al sujeto se le administra un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales antes de la administración del antagonista de VEGF, y en el que la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF aumenta después de la administración del vector.
- 15 E2. Un método para inducir la apoptosis de una célula endotelial en un tumor de un sujeto que lo necesita, que comprende:
 - (i) administrar un vector que comprende un gen de quimera-FAS unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales, en el que la capacidad de respuesta del sujeto a un antagonista de VEGF aumenta después de la administración del vector, y
 - 20 (ii) administrar el antagonista de VEGF al sujeto.
- E3. Un método para inducir la apoptosis de una célula endotelial en un tumor de un sujeto que lo necesita, que comprende:
 - (i) administrar un vector que comprende un gen de quimera-FAS unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales,
 - 25 (ii) administrar el antagonista de VEGF al sujeto, y
 - (iii) medir la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF, en el que la capacidad de respuesta del sujeto aumenta después de la administración del vector.
- E4. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E3, en el que el tamaño del tumor del sujeto se reduce después de la administración del antagonista de VEGF.
- 30 E5. Un método para reducir el tamaño de un tumor en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar un antagonista de VEGF al sujeto, en el que al sujeto se le administra un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales antes de la administración del antagonista de VEGF, en el que la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF aumenta después de la administración del vector y antes de la administración del antagonista de VEGF, y en el que el tamaño del tumor en el sujeto se reduce después de la administración del antagonista de VEGF.
- 35 E6. Un método para reducir el tamaño de un tumor en un sujeto que lo necesita, que comprende:
 - (i) administrar un vector que comprende un gen de quimera-FAS unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales, en el que la capacidad de respuesta del sujeto a un antagonista de VEGF aumenta después de la administración del vector, y
 - 40 (ii) administrar el antagonista de VEGF al sujeto, en el que el tamaño del tumor del sujeto se reduce después de la administración del antagonista de VEGF.
- E7. Un método para reducir el tamaño de un tumor en un sujeto que lo necesita, que comprende:
 - (i) administrar un vector que comprende un gen de quimera-FAS unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales,
 - 45 (ii) administrar el antagonista de VEGF al sujeto, y
 - (iii) medir la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF, en el que la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF aumenta después de la administración del vector.
- E8. El método de una cualquiera de las realizaciones E4 a E7, en el que el tamaño del tumor se reduce comparado con el tamaño del tumor de un sujeto al que no se le administra el vector antes de la administración del antagonista de VEGF.
- 50

- E9. El método de una cualquiera de las realizaciones E4 a E8, en el que el tamaño del tumor se mide comparando el tamaño del tumor antes de la administración del antagonista de VEGF y el tamaño del tumor después de la administración del antagonista de VEGF.
- 5 E10. Un método para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con un tumor en un sujeto, que comprende administrar un antagonista de VEGF a un sujeto que lo necesita, en el que al sujeto se le administra un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales antes de la administración del antagonista de VEGF, y en el que la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF aumenta después de la administración del vector y antes de la administración del antagonista de VEGF.
- E11. Un método para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con un tumor en un sujeto, que comprende:
- 10 (i) administrar un vector que comprende un gen de quimera-FAS unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales, en el que la capacidad de respuesta del sujeto a un antagonista de VEGF aumenta después de la administración del vector, y
- (ii) administrar el antagonista de VEGF al sujeto.
- E12. Un método para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con un tumor en un sujeto, que comprende:
- 15 (i) administrar un vector que comprende un gen de quimera-FAS unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales,
- (ii) administrar el antagonista de VEGF al sujeto, y
- (iii) medir la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF, en el que la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF aumenta después de la administración del vector.
- 20 E13. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E12, en el que el tumor del sujeto progresa después de la administración del vector.
- E14. Un método para identificar un candidato para una terapia con un antagonista de VEGF, que comprende (i) medir el tamaño de un tumor de un sujeto al que se le ha diagnosticado un tumor antes de administrar un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales al sujeto,
- 25 y (ii) medir la progresión del tumor después de la administración del vector, en el que el sujeto se identifica como un candidato después de que el tumor haya progresado.
- E15. Un método para identificar un candidato para una terapia con un antagonista de VEGF, que comprende (i) medir el tamaño de un tumor de un sujeto al que se le ha diagnosticado un tumor antes de administrar un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales al sujeto,
- 30 (ii) medir la progresión del tumor después de la administración del vector, en el que el sujeto se identifica como un candidato después de que el tumor haya progresado, y (iii) dar instrucciones a un asistente médico para que administre un antagonista de VEGF al sujeto.
- E16. El método de una cualquiera de las realizaciones E13 a E15, en el que la progresión del tumor se mide mediante el crecimiento del tumor.
- 35 E17. El método de la realización E16, en el que el crecimiento del tumor se mide mediante MRI.
- E18. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E17, en el que el tumor del sujeto es un tumor recurrente que surge durante el tratamiento con el vector.
- E19. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E18, en el que el tumor del sujeto es un tumor metastásico que surge durante el tratamiento con el vector.
- 40 E20. El método de una cualquiera de las realizaciones E13-E19, en el que la progresión del tumor se mide al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos un mes, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos 11 semanas, al menos 12 semanas, al menos 13 semanas, al menos 14 semanas, al menos 15 semanas, o al menos 16 semanas después de la administración del vector.
- 45 E21. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E20, en el que el tamaño del tumor se mide al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, o al menos ocho semanas antes de la administración del vector.
- E22. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E21, en el que el antagonista de VEGF se administra repetidas veces después de determinar que el tumor del sujeto ha progresado.
- 50 E23. El método de la realización E22, en el que el antagonista de VEGF se administra repetidas veces una vez en

aproximadamente 7 días, una vez en aproximadamente diez días, una vez en aproximadamente 2 semanas, una vez en aproximadamente 3 semanas, una vez en aproximadamente 4 semanas, una vez en aproximadamente 2 meses, una vez en aproximadamente 3 meses, una vez en aproximadamente 4 meses, una vez en aproximadamente 5 meses, o una vez en aproximadamente 6 meses.

- 5 E24. El método de la realización E22, en el que el antagonista de VEGF se administra repetidas veces una vez en aproximadamente dos semanas.

E25. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E24, en el que el vector se administra repetidas veces después de administrar el antagonista de VEGF.

- 10 E26. El método de la realización E25, en el que el vector se administra repetidas veces a diario, una vez en aproximadamente 2 días, una vez en aproximadamente 3 días, una vez en aproximadamente 4 días, una vez en aproximadamente 5 días, una vez en aproximadamente 6 días, una vez en aproximadamente 7 días, una vez en aproximadamente 2 semanas, una vez en aproximadamente 3 semanas, una vez en aproximadamente 4 semanas, una vez en aproximadamente 5 semanas, una vez en aproximadamente 6 semanas, una vez en aproximadamente 7 semanas, una vez en aproximadamente 8 semanas, una vez en aproximadamente 9 semanas, una vez en aproximadamente 2 meses, una vez en aproximadamente 3 meses, una vez en aproximadamente 4 meses, una vez en aproximadamente 5, o una vez en aproximadamente 6 meses.

E27. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E26, en el que el vector se administra cada 2 meses, y el bevacizumab se administra cada 2 semanas.

- 20 E28. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E27, en el que el sujeto necesita una capacidad de respuesta inducida a un antagonista de VEGF.

E29. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E27, en el que el sujeto necesita una capacidad de respuesta mejorada a un antagonista de VEGF.

E30. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E29, en el que la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF es una propiedad antiangiogénesis del antagonista de VEGF.

- 25 E31. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E30, en el que la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF es un efecto antitumoral del antagonista de VEGF.

E32. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E31, en el que el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF o una molécula de unión a VEGF.

- 30 E33. El método de la realización E32, en el que el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo quimérico.

E34. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E33, en el que el antagonista de VEGF comprende Fab, F(ab)2, Fv, o scFv.

E35. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E34, en el que el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF de unión al receptor o una molécula de unión al receptor de VEGF.

- 35 E36. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E35, en el que el antagonista de VEGF se selecciona de bevacizumab, ranibizumab, VGX-100, r84, aflibercept, IMC-18F1, IMC-1C11, ramucirumab, y cualquiera de sus combinaciones.

E37. El método de la realización E36, en el que el antagonista de VEGF es bevacizumab.

- 40 E38. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E37, en el que el producto del gen de quimera-Fas comprende un polipéptido que comprende un dominio extracelular de un polipéptido de receptor 1 de TNF (TNFR1) condensado con un dominio transmembrana y un dominio intracelular de un polipéptido de Fas.

E39. El método de la realización E38, en el que el dominio extracelular del TNFR1 comprende una secuencia de aminoácidos al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:4, en el que el dominio extracelular de TNFR1 es capaz de unirse a TNF- α .

- 45 E40. El método de la realización E39, en el que el dominio transmembrana y el dominio intracelular del polipéptido de Fas comprende una secuencia de aminoácidos al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:8, en el que el dominio transmembrana y el dominio intracelular del polipéptido de Fas es capaz de inducir una apoptosis mediada por Fas.

- 50 E41. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E40, en el que el gen de quimera-Fas comprende una primera secuencia de nucleótidos que es al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:3, y una segunda secuencia de nucleótidos que es al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%,

99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:7.

E42. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E41, en el que el promotor específico de células endoteliales comprende un promotor PPE-1.

5 E43. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E42, en el que el promotor específico de células endoteliales comprende además un potenciador.

E44. El método de la realización E43, en el que el potenciador comprende una secuencia de nucleótidos al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16, en el que el potenciador induce una especificidad de células endoteliales mejorada, comparado con un promotor específico de células endoteliales sin el potenciador.

10 E45. El método de la realización E44, en el que el potenciador comprende SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:12.

E46. El método de la realización E45, en el que el potenciador comprende además SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14.

E47. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E46, en el que el promotor específico de células endoteliales es un promotor PPE-1-3X.

15 E48. El método de la realización E47, en el que el promotor PPE-1-3X comprende una secuencia de nucleótidos al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:18, en el que el promotor PPE-1-3X es capaz de dirigir la expresión del gen de quimera-Fas en células endoteliales.

E49. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E48, en el que el vector no contiene una región E1 de un adenovirus.

20 E50. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E49, en el que el vector y el antagonista de VEGF se administran al mismo tiempo o de modo secuencial.

E51. El método de la realización E50, en el que el vector se administra antes del antagonista de VEGF.

25 E52. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E51, en el que el vector se administra en una cantidad eficaz igual o menor que aproximadamente 1×10^{13} , 9×10^{12} , 8×10^{12} , 7×10^{12} , 6×10^{12} , 5×10^{12} , 4×10^{12} , 3×10^{12} , 2×10^{12} , 1×10^{12} , 9×10^{11} , 8×10^{11} , 7×10^{11} , 6×10^{11} , 5×10^{11} , 4×10^{11} , 3×10^{11} , 2×10^{11} , 1×10^{11} , 9×10^{10} , 8×10^{10} , 7×10^{10} , 6×10^{10} , 5×10^{10} , 4×10^{10} , 3×10^{10} , 2×10^{10} , o 1×10^{10} partículas de virus.

E53. El método de una cualquiera de las realizaciones E36 a E52, en el que el bevacizumab se administra en una cantidad eficaz menor que aproximadamente 15 mg/kg, 14 mg/kg, 13 mg/kg, 12 mg/kg, 11 mg/kg, 10 mg/kg, 9 mg/kg, 8 mg/kg, 7 mg/kg, 6 mg/kg, 5 mg/kg, 4 mg/kg, 3 mg/kg, 2 mg/kg, o 1 mg/kg.

30 E54. El método de una cualquiera de las realizaciones E36 a E53, en el que el vector se administra en una cantidad eficaz de 3×10^{12} a 1×10^{13} partículas de virus, y el bevacizumab se administra en una cantidad eficaz de 5 mg/kg a 15 mg/kg.

35 E55. El método de una cualquiera de las realizaciones E32 a E54, en el que el anticuerpo anti-VEGF o la molécula de unión a VEGF comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que consiste en V_H de CDR1 (SEQ ID NO:28), V_H de CDR2 (SEQ ID NO:29), V_H de CDR3 (SEQ ID NO:30), V_L de CDR1 (SEQ ID NO:31), V_H de CDR2 (SEQ ID NO:32), V_H de CDR3 (SEQ ID NO:33), y cualquiera de sus combinaciones.

E56. El método de la realización E55, en el que el anticuerpo anti-VEGF o la molécula de unión a VEGF comprende V_H de CDR1 (SEQ ID NO:28), V_H de CDR2 (SEQ ID NO:29), y V_H de CDR3 (SEQ ID NO:30).

E57. El método de la realización E55, en el que el anticuerpo anti-VEGF o la molécula de unión a VEGF comprende V_L de CDR1 (SEQ ID NO:31), V_L de CDR2 (SEQ ID NO:32), y V_L de CDR3 (SEQ ID NO:33).

40 E58. El método de la realización E55, en el que el anticuerpo anti-VEGF o la molécula de unión a VEGF comprende V_H de CDR1 (SEQ ID NO:28), V_H de CDR2 (SEQ ID NO:29), V_H de CDR3 (SEQ ID NO:30), V_L de CDR1 (SEQ ID NO:31), V_L de CDR2 (SEQ ID NO:32), y V_L de CDR3 (SEQ ID NO:33).

E59. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E58, en el que el sujeto necesita una reducción de la angiogénesis.

45 E60. El método de la realización E59, en el que el vector y el antagonista de VEGF reducen la angiogénesis.

E61. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E60, en el que el vector es un vector de adenovirus.

E62. El método de la realización E61, en el que el vector de adenovirus es un adenovirus de serotipo 5.

E63. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E62, en el que el vector comprende, consiste en o

consiste fundamentalmente en la SEQ ID NO:19.

E64. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E63, en el que el vector es un virus aislado que tiene el nº de registro de la European Collection of Cell Cultures (ECACC) 13021201.

5 E65. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E64, en el que el promotor comprende un elemento de respuesta a la hipoxia.

E66. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E65, en el que el vector se administra en una cantidad eficaz de aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} , o aproximadamente 1×10^{14} partículas de virus.

E67. El método de una cualquiera de las realizaciones E1 a E66, en el que el tumor es un tumor cerebral.

10 E68. El método de la realización E67, en el que el tumor cerebral es un glioblastoma multiforme.

Breve descripción de los dibujos/figuras

La figura 1 muestra un régimen de terapia de combinación de un adenovirus que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales (por ejemplo, VB-111) y bevacizumab (BEV). Pueden administrarse 1×10^{13} PV de VB-111 cada ocho semanas, y el bevacizumab puede administrarse cada dos semanas. Puede realizarse una evaluación con MRI cada ocho semanas para evaluar la progresión del tumor.

15

La figura 2 muestra el tiempo para la progresión de la enfermedad del glioblastoma desde una primera recaída hasta una segunda recaída en pacientes que reciben un régimen de terapia de combinación de un adenovirus que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales (por ejemplo, VB-111) y bevacizumab (BEV).

20 La figura 3 muestra un ejemplo de un paciente que ha sido tratado con un régimen de combinación de un adenovirus que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales (por ejemplo, VB-111) y bevacizumab (BEV) tras la progresión de la enfermedad del glioblastoma.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

25 A menos que se indique lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos empleados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente solicitud, incluyendo las definiciones. A menos que el contexto indique lo contrario, los términos y expresiones en singular incluyen el plural, y los términos y expresiones en plural incluyen el singular.

30 Aunque pueden emplearse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la práctica o el ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y las reivindicaciones.

35 Para definir más concretamente la invención, en la presente se proporcionan los siguientes términos, expresiones y definiciones.

40 El término “aproximadamente” significa en la presente alrededor de, más o menos, o en la región de. Cuando se emplea el término “aproximadamente” junto con un intervalo numérico, el término modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos indicados. En general, el término “aproximadamente” se usa en la presente para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado en una varianza del 10%, arriba o abajo (más alto o más bajo).

Tal como se emplea en la presente, un “anticuerpo” significa una inmunoglobulina intacta, uno de sus fragmentos de unión al antígeno, o una molécula de unión al antígeno. Los anticuerpos de esta invención pueden ser de cualquier isotipo o clase (por ejemplo, M, D, G, E y A) o de cualquier subclase (por ejemplo, G1-4, A1-2), y pueden tener una cadena ligera kappa (κ) o lambda (λ).

45 La expresión “cantidad eficaz”, tal como se emplea en la presente, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado deseado. Un resultado deseado puede ser, por ejemplo, la reducción o la inhibición de la neovascularización o la angiogénesis *in vitro* o *in vivo*. Una cantidad eficaz no tiene porqué significar la eliminación completa de la neovascularización o la angiogénesis.

50 Tal como se emplea en la presente, una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Un resultado terapéutico puede ser, por ejemplo, la disminución de los síntomas, la regresión o la estabilización del

tamaño del tumor en imágenes radiológicas, una supervivencia prolongada, una movilidad mejorada. No es necesario que un resultado terapéutico sea una "cura". En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad o una dosificación que es necesaria para evitar la aparición de un tumor.

5 Tal como se emplea en la presente, una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. En algunas realizaciones, puesto que se emplea una dosis profiláctica en sujetos antes de la enfermedad o en un estadio anterior de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

10 El término "polinucleótido" o "nucleótido" pretende incluir un único ácido nucleico, así como una pluralidad de ácidos nucleicos, y se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislado, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) o ADN plasmídico (ADNp). En ciertas realizaciones, un polinucleótido comprende un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentran en los ácidos nucleicos peptídicos (ANP)).

15 Tal como se emplean en la presente, un "polinucleótido", un "nucleótido", y un "ácido nucleico" pueden utilizarse de modo intercambiable y contienen la secuencia de nucleótidos de la secuencia de ADN de longitud completa, que incluye las secuencias 5' y 3' no traducidas, las secuencias codificadoras, así como fragmentos, epitopos, dominios y variantes de la secuencia de ácido nucleico. El polinucleótido puede estar compuesto de cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden estar compuestos de ADN monocatenario y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser monocatenario o, más generalmente, bicatenario, o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, los polinucleótidos pueden estar compuestos de regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN, o tanto ARN como ADN. Los polinucleótidos también pueden contener una o más bases modificadas o esqueletos de ARN o ARN modificados para conseguir estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritoladas y bases poco habituales, tales como inosina. Pueden realizarse una diversidad de modificaciones en el ADN y ARN; por tanto, un "polinucleótido" incluye las formas química, enzimática o metabólicamente modificadas.

25 En la presente invención, un polipéptido puede estar compuesto de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, concretamente, isómeros peptídicos, y puede contener otros aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes (por ejemplo, aminoácidos no naturales). Los polipéptidos de la presente invención pueden modificarse mediante procesos naturales, tales como un procesamiento postraduccion, o mediante técnicas de modificación química que son muy conocidas en la técnica. Estas modificaciones están muy bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en un gran número de referencias bibliográficas de investigación. Las modificaciones pueden producirse en cualquier lugar del polipéptido, incluyendo el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de los aminoácidos o los terminales amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en un mismo grado o en grados variables en varios sitios en un polipéptido concreto. Además, un polipéptido concreto puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden estar ramificados, por ejemplo, como resultado de una ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Pueden surgir polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados de procesos naturales postraduccionales o pueden ser preparados mediante métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o un derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o de un derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclajes de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas, tal como arginilación, y ubiquitinación (véase, por ejemplo, *Proteins-Structure And Molecular Properties*, 2ª ed., T. E. Creighton, W.H. Freeman and Company, Nueva York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, ed., Academic Press, Nueva York, pp. 1-12 (1983); Seifter *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 182:626-646 (1990); Rattan *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.*, 663:48-62 (1992)).

30 Los términos "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo", cuando se refieren a cualquier polipéptido o polinucleótido de la presente invención, incluyen cualquier polipéptido o polinucleótido que conserva al menos alguna de las actividades, concretamente, la capacidad para actuar igual que cualquier función natural del polipéptido o polinucleótido. Por ejemplo, un "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo" del receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1) tiene algunas de las actividades que aparecen en el TNFR1 natural de longitud completa, por ejemplo, la capacidad para unirse a un ligando de TNFR1, concretamente, TNF-alfa o linfotoxina. En otro ejemplo, un "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo" de un polipéptido de FAS tiene algunas de las actividades que aparecen en el polipéptido de FAS natural de longitud completa, por ejemplo, la capacidad para inducir la apoptosis. En otros ejemplos, un "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo" de un promotor específico de células endoteliales puede inducir la expresión específica de células endoteliales de un gen unido operablemente al promotor. Otros ejemplos no limitantes de los diversos fragmentos, variantes, análogos o derivados de TNFR1,

polipéptido de FAS y promotores específicos de células endoteliales se describen a continuación.

En la presente invención, un “fragmento de polipéptido” o “fragmento de proteína” se refiere a una secuencia de aminoácidos corta de un polipéptido. Los fragmentos de proteínas o de polipéptidos pueden ser “autónomos” o estar incluidos en un polipéptido más grande del cual dicho fragmento forma una parte de una región. Los ejemplos representativos de fragmentos de polipéptidos de la invención incluyen, por ejemplo, fragmentos que comprenden aproximadamente 5 aminoácidos, aproximadamente 10 aminoácidos, aproximadamente 15 aminoácidos, aproximadamente 20 aminoácidos, aproximadamente 30 aminoácidos, aproximadamente 40 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 60 aminoácidos, aproximadamente 70 aminoácidos, aproximadamente 80 aminoácidos, aproximadamente 90 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos.

Una “sustitución de aminoácido conservativa” es una sustitución en la que el resto aminoácido es reemplazado por un resto aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos aminoácidos con cadenas laterales similares, que incluyen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificación en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, si un aminoácido en un polipéptido es reemplazado por otro aminoácido de la misma familia de cadena lateral, se considera que la sustitución es conservativa. En otra realización, un tramo de aminoácidos puede ser reemplazado de modo conservativo por un tramo similar desde el punto de vista estructural que se diferencie en el orden y/o la composición de los miembros de la familia de la cadena lateral.

La expresión “porcentaje de identidad de secuencia” entre dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas se refiere al número de posiciones apareadas idénticas compartidas por las secuencias a lo largo de una ventana de comparación, tomando en cuenta las adiciones o las delecciones (es decir, huecos) que deben introducirse para conseguir el alineamiento óptimo de las dos secuencias. Una posición apareada es cualquier posición en la que está presente un nucleótido o aminoácido idéntico en ambas secuencias diana y de referencia. Los huecos que aparecen en la secuencia diana no se cuentan, puesto que los huecos no son nucleótidos ni aminoácidos. De modo similar, los huecos que aparecen en la secuencia de referencia no se cuentan, puesto que se cuentan los nucleótidos o aminoácidos de la secuencia diana, y no los nucleótidos o aminoácidos de la secuencia de referencia.

El porcentaje de identidad de secuencia se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico o el resto aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones apareadas, dividiendo el número de posiciones apareadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias pueden lograrse empleando un software fácilmente disponible para su uso en línea y para descargar. Están disponibles programas de software adecuados en varias fuentes, y para el alineamiento de secuencias de proteínas y de nucleótidos. Un programa adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia es *bl2seq*, parte del paquete de programas BLAST disponible en el sitio web de National Center for Biotechnology Information BLAST del gobierno de EE.UU. (blast.ncbi.nlm.nih.gov). *Bl2seq* realiza una comparación entre dos secuencias empleando el algoritmo BLASTN o BLASTP. Se emplea BLASTN para comparar secuencias de ácidos nucleicos, mientras que BLASTP se usa para comparar secuencias de aminoácidos. Otros programas adecuados son, por ejemplo, Needle, Stretcher, Water, o Matcher, parte del paquete de programas bioinformáticos EMBOSS y también disponibles en the European Bioinformatics Institute (EBI) en www.ebi.ac.uk/Tools/psa.

Diferentes regiones dentro de una única secuencia diana polinucleotídica o polipeptídica que se alinean con una secuencia de referencia polinucleotídica o polipeptídica pueden tener cada una su propio porcentaje de identidad de secuencia. Se hace notar que el valor del porcentaje de identidad se redondea hasta la decena más cercana. Por ejemplo, 80,11, 80,12, 80,13, y 80,14 se redondean hacia abajo a 80,1, mientras que 80,15, 80,16, 80,17, 80,18, y 80,19 se redondean hacia arriba a 80,2. También se hace notar que el valor de la longitud siempre será un número entero.

Los expertos en la técnica apreciarán que la generación de un alineamiento de secuencias para el cálculo del porcentaje de identidad de secuencia no se limita a comparaciones binarias de secuencia-secuencia exclusivamente dirigidas por los datos de la secuencia primaria. Pueden obtenerse alineamientos de secuencias de alineamientos de múltiples secuencias. Un programa adecuado para generar alineamientos de múltiples secuencias es *ClustalW2*, disponible en www.clustal.org. Otro programa adecuado es *MUSCLE*, disponible en www.drive5.com/muscle/. *ClustalW2* y *MUSCLE* también pueden obtenerse, por ejemplo, en EBI.

También se apreciará que pueden generarse alineamientos de secuencias integrando los datos de las secuencias con los datos procedentes de fuentes heterogéneas, tales como datos estructurales (por ejemplo, estructuras cristalográficas de proteínas), datos funcionales (por ejemplo, localización de mutaciones) o datos filogenéticos. Un programa adecuado que integra datos heterogéneos para generar un alineamiento de múltiples secuencias es *T-Coffee*, disponible en www.tcoffee.org, y también disponible, por ejemplo, en EBI. También se apreciará que el

alineamiento final usado para calcular el porcentaje de identidad de secuencia puede curarse de modo automático o manual.

Tal como se emplean en la presente, los términos “unido”, “condensado”, “fusión”, “quimérico” y “quimera” se emplean de modo intercambiable. Estos términos se refieren a unir dos o más elementos o componentes por cualquier medio, que incluye la conjugación química o medios recombinantes. Una “fusión dentro de marco” se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abierta (“open reading frames”, ORF) para formar un ORF más largo y continuo, de manera que se mantiene el marco de lectura correcto de los ORF originales. Así, la proteína quimérica o de fusión recombinante resultante es una única proteína que contiene dos o más segmentos que se corresponden con polipéptidos codificados por los ORF originales (segmentos que normalmente no están unidos así en la naturaleza). Aunque así se consigue que el marco de lectura sea continuo a través de los segmentos condensados, los segmentos pueden estar separados física o espacialmente, por ejemplo, mediante una secuencia de conector dentro de marco.

El término “heterólogo” y la expresión “resto heterólogo” significan que un polinucleótido, un polipéptido u otro resto se deriva de una entidad diferenciada de la entidad con la cual se está comparando. Por ejemplo, un polipéptido heterólogo puede ser sintético o puede derivarse de una especie diferente, un tipo de célula diferente de un individuo, o del mismo tipo o un tipo diferente de célula de individuos diferenciados. En un aspecto, un resto heterólogo puede ser un polipéptido condensado a otro polipéptido para producir un polipéptido o proteína de fusión. En otro aspecto, un resto heterólogo puede ser un no polipéptido, tal como PEG conjugado con un polipéptido o una proteína.

En el contexto de los polipéptidos, una “secuencia lineal” o una “secuencia” es un orden de aminoácidos en un polipéptido en la dirección de amino a carboxilo terminal, en la que los restos contiguos entre sí en la secuencia están contiguos en la estructura primaria del polipéptido.

El término “expresión”, tal como se emplea en la presente, se refiere a un proceso mediante el cual un gen produce un producto bioquímico, por ejemplo, un ARN o un polipéptido. El proceso incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen dentro de la célula que incluye, sin limitación, la inactivación del gen, así como la expresión transitoria y la expresión estable. Esto incluye, sin limitación, la transcripción del gen a ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN de horquilla pequeño (ARNhp), ARN de interferencia pequeño (ARNip) o cualquier otro producto de ARN, y la traducción de dicho ARNm en uno o más polipéptidos. Si el producto final deseado es un producto bioquímico, la expresión incluye la creación de este producto bioquímico y cualquiera de sus precursores.

La expresión “región determinante de la complementariedad” (“complementarity determining region”, CDR), tal como se emplea en la presente, se refiere a los restos aminoácidos de un anticuerpo que son los responsables de la unión a un antígeno. Las regiones de CDR de un anticuerpo se encuentran dentro de la región hipervariable de ambas cadenas pesada y ligera del anticuerpo. Los anticuerpos de longitud completa comprenden tres regiones CDR en el dominio variable de cadena pesada y tres regiones CDR en el dominio variable de cadena ligera.

La expresión “administrado repetidas veces”, tal como se emplea en la presente, se refiere a la administración de un agente terapéutico sobre una base repetida a intervalos definidos y fijos. Los intervalos de tiempo entre cada administración pueden alterarse durante el desarrollo de la administración repetida, y pueden ser tan largos como de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año o más.

La expresión “terapia de combinación”, tal como se emplea en la presente, se refiere a la administración de dos o más modalidades terapéuticas para tratar una enfermedad o un trastorno. En un aspecto de la presente invención, la terapia de combinación se refiere a la administración de un antagonista de VEGF y un vector a un sujeto o a una población de sujetos que lo necesita. En algunas realizaciones, la terapia de combinación comprende administrar el antagonista de VEGF antes de administrar el vector. En otra realización, la terapia de combinación comprende administrar el antagonista de VEGF al mismo tiempo que la administración del vector. En otra realización, la terapia de combinación comprende administrar el antagonista de VEGF después de administrar el vector.

II. Construcciones de ácidos nucleicos que comprenden un gen de quimera-FAS y un promotor específico de células endoteliales

La presente invención se refiere a métodos para inducir o mejorar la capacidad de respuesta a un antagonista de VEGF en un sujeto o en una población de sujetos, que comprenden administrar un vector y un antagonista de VEGF. En la presente invención, el gen que codifica la proteína de quimera-FAS (o el producto del gen) puede unirse a un promotor específico de células endoteliales que dirige la expresión del producto del gen de quimera-FAS en una célula endotelial. La expresión de dicho producto de gen citotóxico es útil en una situación en la que no se desea una neovascularización excesiva ni el crecimiento excesivo de vasos sanguíneos, por ejemplo, en un tumor.

La presente invención también proporciona una población homogénea de una construcción de ácido nucleico que comprende un gen de quimera-FAS unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales.

A. Quimera-FAS

Una proteína de quimera-FAS expresada por la construcción de ácido nucleico de la invención comprende al menos dos polipéptidos de "receptor de muerte", y cada uno de los polipéptidos se deriva de una proteína diferente. El primer polipéptido de la proteína de quimera-FAS comprende un dominio de unión al ligando del receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1). El segundo polipéptido de la proteína de quimera-FAS comprende un dominio efector de un polipéptido de FAS.

El dominio de unión al ligando de TNFR1 puede ser cualquier dominio que se une a un ligando de TNFR1. En una realización, el ligando de TNFR1 es TNF- α . En otra realización, el ligando de TNFR1 es linfotóxina- α . El dominio de unión al ligando de TNFR1 puede ser un dominio extracelular de TNFR1 o cualquiera de sus fragmentos, variantes, derivados o análogos. A continuación se describen ejemplos no limitantes de dominio de unión al ligando de TNFR1.

El dominio efector de un polipéptido de FAS útil para la invención comprende cualquier dominio de FAS que forme un complejo de señalización inductor de muerte ("death-inducing signaling complex", DISC), induciendo con ello la apoptosis. En una realización, un dominio efector de un polipéptido de FAS comprende un dominio intracelular, un dominio transmembrana o ambos. A continuación se describen ejemplos no limitantes de dominios efectores del polipéptido de FAS.

El TNFR1 y el polipéptido de FAS pueden unirse mediante un enlace peptídico o mediante un conector. El conector que conecta el dominio de unión al ligando de TNFR1 con el dominio efector de FAS puede ser un conector polipeptídico o un conector no peptídico. Por ejemplo, un conector para la proteína de quimera-FAS puede comprender una o más de glicina, serina, leucina o cualquiera de sus combinaciones. En una realización, un conector útil para la invención comprende Ser-Leu. En otra realización, un conector útil para la invención comprende (GGGS) n (Denise *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 277:35035-35043 (2002)), en el que n puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más (SEQ ID NO:27).

1. Receptor 1 del factor de necrosis tumoral

El polipéptido de TNFR1 humano de longitud completa tiene una longitud de 455 aminoácidos y también se denomina TNF-R1, receptor de tipo I del factor de necrosis tumoral (TNFRI), TNFR-I, TNFRSF1A, TNFAR, p55, P60, o CD120a. Se sabe que el polipéptido de TNFR1 humano natural se une a TNF- α o a la linfotóxina- α homotrimerica. La unión de TNF- α al dominio extracelular conduce a la homotrimerización de TNFR1, que entonces interacciona específicamente con el dominio de muerte de la proteína del dominio de muerte asociada al receptor de tipo 1 del factor de necrosis tumoral ("Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1-Associated Death Domain Protein", TRADD). Diversas proteínas que interaccionan con TRADD, tales como los factores asociados al receptor de TNF ("TNF Receptor Associated Factors", TRAFs), serina/treonina proteína quinasa 1 de interacción con el receptor ("Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 1", RIPK1), y la proteína asociada a Fas con dominio de muerte ("Fas-Associated Protein with Death Domain", FADD) son reclutadas al complejo por su asociación con TRADD. El complejo activa al menos dos cascadas de señalización diferenciadas, la apoptosis y la señalización de NF-kappa-B.

Una secuencia polipeptídica de 454 aa indicada como una secuencia del polipéptido de TNFR1 humano tiene el número de registro P19438-1 en la base de datos UniProtKB. Esta secuencia del polipéptido de TNFR1 humano se denomina en la presente la isoforma A y SEQ ID NO:2. La SEQ ID NO:1 es una secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:2. Se ha indicado que una secuencia polipeptídica de 108 aa es una isoforma de la secuencia del polipéptido de TNFR1 humano y tiene el número de registro P19438-2 en la base de datos UniProtKB. El polipéptido de 108 aa se corresponde con los aminoácidos 108 a 1 de la isoforma A (SEQ ID NO:2) y se denomina en la presente la isoforma B. Se ha indicado otro variante del polipéptido de TNFR1 humano que tiene 232 aa con el número de registro P19438-3 en la base de datos UniProtKB. El polipéptido de 232 aa se corresponde con los aminoácidos 1 a 232 de la isoforma A (SEQ ID NO:2) y se denomina en la presente la isoforma C. Otros variantes naturales del TNFR1 humano incluyen, pero no se limitan al polipéptido de TNFR1 de las isoformas A, B, y C que comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en H51Q, C59R, C59S, C62G, C62Y, P75L, T79M, C81F, C99S, S115G, C117R, C117Y, R121P, R121Q, P305T, y cualquiera de sus combinaciones. Otros variantes de TNFR1 conocidos incluyen el polipéptido de TNFR1 de las isoformas A, B, y C que comprende L13LILPQ, K255E, S286G, R394L, 412:ausente, GPAA443-446APP, o cualquiera de sus combinaciones.

La tabla 1 muestra la secuencia de aminoácidos de TNFR1 de tipo salvaje humano y una secuencia de nucleótidos que codifica el TNFR1 de tipo salvaje.

Tabla 1 - Secuencias de TNFR1

SEQ ID NO:	Secuencias
Secuencia de aminoácidos de TNFR1 (SEQ ID NO:2)	MGLSTVPDLLLLPLVLELLLVGIYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCT KCHKGTLYNDPCPGPGQDTCRECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVD RDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECV SCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGTTVLLPLVIFFGCLLSLLFIGLMYRYQRWK SKLYSIVCGKSTPEKEGELEGTTTKPLAPNPSFSPTPGFTPTLGFSPVPSSTFTSSSTYT PGDCPNFAAPRREVAPPYQGADPILATALASDPIPNPLQKWEDSAHKPQSLDTPATLY AVVENVPPLRWKEFVRRGLGLSDHEIDRLELQNGRCLREAQYSMLATWRRRTPRREATLEL LGRVLRDMDLLGCLIEDIEALCGPAALPPAPSLLR
Secuencia de nucleótidos que codifica TNFR1 (SEQ ID NO:1)	Atggggcctctccaccgtgcctgacctgctgctgccgctggtgctcctggagctggtggtg Ggaatatacccctcaggggttattggactggtccctcacctaggggacagggagaagaga Gatagtgtgtgtccccaaggaaaatatatccaccctcaaaataattcgatttgctgtacc Aagtgccacaaaggaacctactgtacaatgactgtccaggcccggggcaggatacggac Tgcagggagtgtgagagcggtccttcaccgcttcagaaaaccacctcagacactgcctc Agctgctccaaatgccgaaaggaaatgggtcaggtggagatctcttcttgacagtggac Cgggacaccgtgtgtggtgcaggaagaaccagtaccggcattattggagtgaacacctt Ttcagtgcttcaattgcagcctctgcctcaatgggaccgtgcacctctcctgccaggag Aaacagaacaccgtgtgcacctgccatgcaggtttcttcttaagagaaaacgagtgtgtc Tcctgtagtaactgtaagaaaagcctggagtgcacgaagttgtgcctacccagattgag Aatgttaagggcactgaggactcaggcaccacagtgtgttggccctgggtcattttcttt Ggtctttgccttttatccctcctcttcattggtttaatgtatcgctaccaacgggtggaag Tccaagctctactccattgtttgtgggaaatcgacacctgaaaaagagggggagcttgaa Ggaactactactaagccctggccccaacccaagcttcagtcacctccaggcttcacc Cccaccctgggcttcagtcacctgcccagttccaccttcacctccagctccacctatacc Cccggtgactgtcccaactttgcggtcccgagagaggtggcaccacctatcagggg Gctgaccccatccttgcgacagccctcgctccgaccccatcccaaccccccttcagaag Tgggaggacagcgccacaagccacagagcctagacactgatgaccccgcgacgctgtac Gcgtggtggagaacgtgccccggttgcgctggaaggaattcggtgcggcgccctagggctg Agcgaccacgagatcgatcggtggagctgcagaacggcgctgctgcgcgaggccagctggagctg Tacagcatgctggcgacctggaggcgggcgacgcccggcgcgaggccagctggagctg Ctgggacgctgctccgcgacatggacctgctgggtgcctggaggacatcgaggaggcg ctttgcggccccgcgcctcccgcccgcgccagctcttctcaga
Secuencia de aminoácidos de un dominio de unión al ligando de TNFR1 (SEQ ID NO:4)	MGLSTVPDLLLLPLVLELLLVGIYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCT KCHKGTLYNDPCPGPGQDTCRECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVD RDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECV SCSNCKKSLECTKLCLP

Secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de unión al ligando de TNFR1 (SEQ ID NO:3)	atgggcctct ccaccgtgcc tgacctgctg ctgccgctgg tgctcctgga gctgttggtg ggaatataacc cctcaggggt tattggactg gtccctcacc taggggacag ggagaagaga gatagtgtgt gtccccaagg aaaatatatc caccctcaaa ataattcgat ttgctgtacc aagtgccaca aaggaaccta cttgtaacaat gactgtccag gcccggggca ggatacggac tgcaggagtg gtgagagcgg ctccctcacc gcttcagaaa accacctcag aactgcctc agctgctcca aatgccgaaa ggaaatgggt cagggtggaga tctcttcttg cacagtggac cgggacaccg tgtgtggctg caggaagaac cagtaccggc attattggag tgaaaacctt ttccagtgtc tcaattgcag cctctgcctc aatgggaccg tgcacctctc ctgccaggag aacagaaca ccgtgtgcac ctgccatgca ggtttcttct taagagaaaa cgagtgtgtc tcctgtagta actgtaagaa aagcctggag tgcacgaagt tgtgcctacc a
---	--

También se indica la secuencia del polipéptido de TNFR1 de ratón y sus variantes. El polipéptido de TNFR1 de ratón de 454 aa tiene el número de registro P25118 en la base de datos UniProtKB. Los polipéptidos de TNFR1 conocidos en otros animales incluyen, pero no se limitan a rata (por ejemplo, P22934 en la base de datos UniProtKB), vaca (por ejemplo, 019131 en la base de datos UniProtKB), cerdo (por ejemplo, P50555 en la base de datos UniProtKB), o caballo (por ejemplo, D1MH71 en la base de datos UniProtKB).

El TNFR1 de longitud completa puede romperse en dos cadenas: (1) el miembro 1A de la superfamilia del receptor de TNF, en la forma de membrana (concretamente, los aminoácidos 22 a 455 que corresponden al TNFR1 de longitud completa), y (2) la proteína 1 de unión a TNF ("TNF-binding protein 1", TBP1) (concretamente, los aminoácidos 41 a 291 que corresponden al TNFR1 de longitud completa). El polipéptido de TNFR1 humano de longitud completa consiste en una secuencia señal (aminoácidos 1 a 21 de SEQ ID NO:2), un dominio extracelular (aminoácidos 212 a 234 de SEQ ID NO:22), un dominio transmembrana (aminoácidos 2 a 235 de SEQ ID NO:211), y un dominio citoplásmico (aminoácidos 455 a 2 de SEQ ID NO:2). El dominio extracelular de TNFR1 comprende cuatro regiones repetidas de cisteína, TNFR-Cys1 (aminoácidos 43 a 82 que corresponden a SEQ ID NO:2), TNFR-Cys2 (aminoácidos 83 a 125 que corresponden a SEQ ID NO:2), TNFR-Cys3 (aminoácidos 126 a 166 que corresponden a SEQ ID NO:2), y TNFR-Cys4 (aminoácidos 167 a 196 que corresponden a SEQ ID NO:2).

Tal como apreciarán los expertos en la técnica, los restos del comienzo y del fin de los dominios listados anteriormente pueden variar dependiendo del programa informático de formación de modelos usado o del método empleado para determinar el dominio. Así, diversos dominios funcionales de TNFR1 pueden ser distintos de los definidos anteriormente.

En una realización, un dominio de unión al ligando de TNFR1 útil para la proteína de quimera-FAS comprende, consiste fundamentalmente o consiste en un dominio extracelular de TNFR1, o cualquiera de sus fragmentos, variantes, derivados o análogos, en el que el dominio extracelular de TNFR1, o cualquiera de sus fragmentos, variantes, derivados o análogos se une a TNF- α . En otra realización, un dominio de unión al ligando de TNFR1 comprende TNFR-Cys1; TNFR-Cys2; TNFR-Cys3; TNFR-Cys4; TNFR-Cys1 y TNFR-Cys2; TNFR-Cys1 y TNFR-Cys3; TNFR-Cys1 y TNFR-Cys4; TNFR-Cys2 y TNFR-Cys3; TNFR-Cys2 y TNFR-Cys4; TNFR-Cys3 y TNFR-Cys4; TNFR-Cys1, TNFR-Cys2 y TNFR-Cys3; TNFR-Cys1, TNFR-Cys2 y TNFR-Cys4; TNFR-Cys2, TNFR-Cys3 y TNFR-Cys4; o TNFR-Cys1, TNFR-Cys2, TNFR-Cys3 y TNFR-Cys4. En otras realizaciones, un dominio de unión al ligando de TNFR1 en la proteína de quimera-FAS comprende la proteína I de unión a TNF. En otras realizaciones, un dominio de unión al ligando de TNFR1 de la proteína de quimera-FAS comprende, consiste fundamentalmente o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a los aminoácidos 22 a 190, aminoácidos 22 a 191, aminoácidos 22 a 192, aminoácidos 22 a 193, aminoácidos 22 a 194, aminoácidos 22 a 195, aminoácidos 22 a 196, aminoácidos 22 a 197, aminoácidos 22 a 198, aminoácidos 22 a 199, aminoácidos 22 a 200, aminoácidos 22 a 201, aminoácidos 22 a 202, aminoácidos 22 a 203, aminoácidos 22 a 204, aminoácidos 22 a 205, aminoácidos 22 a 206, aminoácidos 22 a 207, aminoácidos 22 a 208, aminoácidos 22 a 209, aminoácidos 22 a 210, o aminoácidos 22 a 211 de SEQ ID NO:2, en el que el dominio de unión al ligando se une a un ligando de TNFR1, por ejemplo, TNF- α .

En otras realizaciones, el dominio de unión al ligando de TNFR1 comprende además un péptido señal. Un ejemplo de un péptido señal adecuado es el péptido señal de TNFR1, por ejemplo, los aminoácidos 1 a 21 de SEQ ID NO:2. En otras realizaciones, un dominio de unión al ligando del producto del gen de quimera-FAS comprende, consiste fundamentalmente o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%,

- 98%, 99% o 100% idéntica a los aminoácidos 1 a 190, aminoácidos 1 a 191, aminoácidos 1 a 192, aminoácidos 1 a 193, aminoácidos 1 a 194, aminoácidos 1 a 195, aminoácidos 1 a 196, aminoácidos 1 a 197, aminoácidos 1 a 198, aminoácidos 1 a 199, aminoácidos 1 a 200, aminoácidos 1 a 201, aminoácidos 1 a 202, aminoácidos 1 a 203, aminoácidos 1 a 204, aminoácidos 1 a 205, aminoácidos 1 a 206, aminoácidos 1 a 207, aminoácidos 1 a 208, aminoácidos 1 a 209, aminoácidos 1 a 210, o aminoácidos 1 a 211 de SEQ ID NO:2, en el que el dominio de unión al ligando se une a un ligando de TNFR1, por ejemplo, TNF- α . En una realización específica, un dominio de unión al ligando de TNFR1 de la proteína de quimera-FAS comprende, consiste fundamentalmente o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:4, en el que el dominio de unión al ligando se une a un ligando de TNFR1, por ejemplo, TNF- α .
- En otras realizaciones, el dominio de unión al ligando de TNFR1 es codificado por una secuencia de nucleótidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:3.
- En otras realizaciones, un dominio de unión al ligando de TNFR1 de la proteína de quimera-FAS comprende, consiste fundamentalmente o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a los aminoácidos 22 a 108 de SEQ ID NO:2 (isoforma B de TNFR1), aminoácidos 22 a 232 de SEQ ID NO:2 (isoforma C de TNFR1), o aminoácidos 44 a 291 de SEQ ID NO:2 (TBP1), en el que el dominio de unión al ligando se une a un ligando de TNFR1, por ejemplo, TNF- α .

2. Polipéptido de FAS

- El polipéptido de FAS humano de longitud completa tiene una longitud de 335 aminoácidos y también se denomina miembro 6 de la superfamilia del receptor de necrosis tumoral, antígeno Apo-1, antígeno de superficie de FAS mediador en la apoptosis, receptor de FASLG, o CD95. El polipéptido de FAS natural es un receptor para TNFSF6/FASLG. Cuando el polipéptido de FAS se une al ligando de FAS (FasL), la interacción entre FAS y FasL provoca la formación del complejo de señalización inductor de muerte ("death-inducing signaling complex", DISC), que contiene FADD, caspasa-8 y caspasa-10. En algunos tipos de células (tipo I), la caspasa-8 procesada activa directamente a otros miembros de la familia de la caspasa y activa la ejecución de la apoptosis de la célula. En otros tipos de células (tipo II), el FAS-DISC comienza un bucle de retroalimentación que rápidamente aumenta la liberación de factores proapoptóticos desde las mitocondrias y la activación amplificada de la caspasa-8. La apoptosis mediada por FAS puede desempeñar un papel en la inducción de tolerancia periférica, en el suicidio estimulado por antígenos de las células maduras, o en ambos.
- Una secuencia polipeptídica de 335 aa indicada como una secuencia del polipéptido de FAS humano tiene el número de registro P25445-1 en la base de datos UniProtKB. Esta secuencia del polipéptido de FAS humano se denomina en la presente SEQ ID NO:6. La SEQ ID NO:5 es una secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:6. La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de FAS también se conoce como APT1, FAS1, o TNFRSF6. El polipéptido de FAS de longitud completa contiene un péptido señal (aminoácidos 1 a 25 que corresponden a SEQ ID NO:6), un dominio extracelular (aminoácidos 26 a 173 que corresponden a SEQ ID NO:6), un dominio transmembrana (aminoácidos 174 a 190 que corresponden a SEQ ID NO:6), y un dominio intracelular (o citoplásmico) (aminoácidos 191 a 335 que corresponden a SEQ ID NO:6). El dominio intracelular contiene un dominio de muerte (por ejemplo, aminoácidos 230 a 314 que corresponden a SEQ ID NO:6).
- Tal como apreciarán los expertos en la técnica, los restos del comienzo y del fin de los dominios listados anteriormente pueden variar dependiendo del programa informático de formación de modelos usado o del método empleado para determinar el dominio. Así, diversos dominios funcionales de FAS pueden ser distintos de los definidos anteriormente. La tabla 2 muestra la secuencia de aminoácidos de FAS de tipo salvaje humano y una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de FAS.

Tabla 2 - Secuencias de FAS

	Secuencias
Secuencia de aminoácidos de la proteína FAS humana (SEQ ID NO:6)	MLGIWTLPLVLTSVARLSSKSVNAQVTDINSKGLELRKTVTTVETQNLEGLHHDGQFCH KPCPPGERKARDCTVNGDEPDCVPCQEGKEYTDKAHFSSKCRRCRLCDEGHGLEVEINCT RTQNTKCRCKPNFFCNSVCEHCDPCTKCEHGIIECTLTSTNTKCKEESRSNLGWLCLL LLPIPLIVVVKRKEVQKTCRKHRENQGSHESTLNPETVAINLSDVDLSKYITTIAGVM TLSQVKGFVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQLLRNWHQLHGKKEAYDTLIKDLKK ANLCTLAEKIQTIILKDITSDSENSNFRNEIQSLV

Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de FAS humana (SEQ ID NO:5)	Atgctgggcatctggaccctcctacctctggttcttacctgtctgttgctagattatcgctcc Aaaagtgttaatgcccaagtgactgacatcaactccaagggttggaattgaggaagact Gttactacagttgagactcagaacttggaaggcctgcatcatgatggccaattctgccat Aagccctgtcctccaggtgaaaggaaagctagggactgcacagtcaatggggatgaacca Gactgctgcccctgccaagaagggaaggagtacacagacaaaagccatttttcttccaaa Tgcagaagatgtagattgtgtgatgaaggacatggcttagaagtggaaataaactgcacc Cggaccacagaataccaagtgcagatgtaaaccaacttttttgtaactctactgtatgt Gaacactgtgacccttgaccaaagtgaacatggaatcatcaaggaatgcacactcacc Agcaacaccaagtgc aaagaggaaggatccagatctaacttgggggtggctttgtcttctt Cttttgccaattccactaattgtttgggtgaagagaaaggaagtacagaaaacatgcaga Aagcacagaaaggaaaaccaaggttctcatgaatctccaacttttaaatcctgaaacagtg Gcaataaattttatctgatgttgacttgagtaaatatatcaccactattgctggagtcagt Acactaagtcaagttaaaggcctttgttcgaaagaatggtgtcaatgaagccaaaatagat Gagatcaagaatgacaatgtccaagacacagcagaaacagaaagttcaactgcttcgtaat Tggcatcaacttcatggaaagaaagaagcgtatgacacattgattaaagatctcaaaaaa Gccaatctttgtactcttgcagagaaaattcagactatcatcctcaaggacattactagt Gactcagaaaattcaaacttcagaaatgaaatccaaagccttggtctag
Secuencia de aminoácidos de un dominio efector de FAS (SEQ ID NO:8)	GSRSNLGWLCLLLLPIPLIVVVKRKEVQKTCRKHRENQGS HESPTLNPETVAINLSVDLSKYITTIAGVMTLSQVKGFVR KNGVNEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQLLRNWHQLHGKKEAY DTLIKDLKKANLCTLAEKIQTIILKDITSDSENSNFRNEIQ SLV
Secuencia de nucleótidos que codifica un dominio efector de FAS (SEQ ID NO:7)	Aggatccagatctaacttgggggtggctttgtcttcttcttttgccaattccactaatt Gtttgggtgaagagaaaggaagtacagaaaacatgcagaaagcacagaaaggaaaacc Aaggttctcatgaatctccaaccttaaatcctgaaacagtggcaataaatttatctga Tgttgacttgagtaaatatatcaccactattgctggagtcagtacactaagtcaagtt Aaaggctttgttcgaaagaatggtgtcaatgaagccaaaatagatgagatcaagaatg Acaatgtccaagacacagcagaaacagaaagttcaactgcttcgtaattggcatcaact Tcatggaaagaaagaagcgtatgacacattgattaaagatctcaaaaaagccaatctt Tgtactcttgcagagaaaattcagactatcatcctcaaggacattactagtgcactcag aaaattcaaacttcagaaatgaaatccaaagccttggtctag

También se indica la secuencia del polipéptido de FAS de ratón y sus variantes. El polipéptido de FAS de ratón de 327 aa tiene el número de registro P25446 en la base de datos UniProtKB. Los polipéptidos de FAS conocidos en otros animales incluyen, pero no se limitan a cercopiteco (por ejemplo, Q9BDN4 en la base de datos UniProtKB), mono Rhesus (por ejemplo, Q9BDP2 en la base de datos UniProtKB), rata (por ejemplo, Q63199 en la base de datos UniProtKB), o vaca (por ejemplo, P51867 en la base de datos UniProtKB).

Basándose en la variación de secuencia en el polipéptido de FAS, los expertos en la técnica pueden identificar variaciones de secuencia en el dominio efector del polipéptido de FAS. Por ejemplo, los variantes naturales de los dominios efectores de FAS pueden incluir una o más sustituciones o mutaciones de C178R, L180F, P183L, I184V, T198I, Y232C, T241K, T241P, V249L, R250P, R250Q, G253D, G253S, N255D, A257D, I259R, D260G, D260V, D260Y, I262S, N264K, T270I, T270K, E272G, E272K, L278F, K299N, T305I, I310S, o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización, un dominio efector del polipéptido de FAS útil para la invención comprende un dominio de muerte del polipéptido de FAS. En otra realización, un dominio efector del polipéptido de FAS comprende, consiste

fundamentalmente o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a los aminoácidos 230 a 314 de SEQ ID NO:6. En otras realizaciones, un dominio efector del polipéptido de FAS comprende un dominio intracelular del polipéptido de FAS. En otras realizaciones, un dominio efector del polipéptido de FAS comprende una secuencia de aminoácidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a los aminoácidos 185 a 335, aminoácidos 186 a 335, aminoácidos 187 a 335, aminoácidos 188 a 335, aminoácidos 189 a 335, aminoácidos 190 a 335, aminoácidos 191 a 335, aminoácidos 192 a 335, aminoácidos 193 a 335, aminoácidos 194 a 335, aminoácidos 195 a 335, aminoácidos 196 a 335, aminoácidos 197 a 335, aminoácidos 198 a 335, o aminoácidos 199 a 335 de SEQ ID NO:6.

En otras realizaciones, el dominio efector del polipéptido de FAS comprende además un dominio transmembrana del polipéptido de FAS. En otras realizaciones, un dominio efector del polipéptido de FAS comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a los aminoácidos 174 a 335 de SEQ ID NO:6. En algunas realizaciones, un dominio efector del polipéptido de FAS comprende además aproximadamente diez, aproximadamente nueve, aproximadamente ocho, aproximadamente siete, aproximadamente seis, aproximadamente cinco, aproximadamente cuatro, aproximadamente tres, aproximadamente dos o aproximadamente un aminoácido de la porción C-terminal del dominio extracelular de FAS. En ciertas realizaciones, un dominio efector del polipéptido de FAS comprende una secuencia de aminoácidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a los aminoácidos 179 a 335, aminoácidos 178 a 335, aminoácidos 177 a 335, aminoácidos 176 a 335, aminoácidos 175 a 335, aminoácidos 174 a 335, aminoácidos 173 a 335, aminoácidos 172 a 335, aminoácidos 171 a 335, aminoácidos 170 a 335, aminoácidos 169 a 335, aminoácidos 168 a 335, aminoácidos 167 a 335, aminoácidos 166 a 335, aminoácidos 165 a 335, aminoácidos 164 a 335, o aminoácidos 163 a 335 de SEQ ID NO:6, en el que el dominio efector forma un complejo de señalización inductor de muerte (DISC), activa la caspasa 8, o induce la apoptosis.

En algunas realizaciones, un dominio efector del polipéptido de FAS comprende, consiste fundamentalmente o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:8, en el que el dominio efector forma un complejo de señalización inductor de muerte (DISC), activa la caspasa 8, o induce la apoptosis.

En otras realizaciones, un dominio efector del polipéptido de FAS es codificado por una secuencia de nucleótidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:7.

En una realización, el producto del gen de quimera-FAS para la invención comprende, consiste fundamentalmente o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:10, en el que el producto del gen de quimera-FAS induce la apoptosis. En otra realización, el producto del gen de quimera-FAS es codificado por una secuencia de nucleótidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:9, en el que el producto del gen de quimera-FAS induce la apoptosis.

B. Promotor específico de células endoteliales

La construcción de ácido nucleico que comprende un gen de quimera-FAS comprende además uno o más elementos de control de la expresión útiles para regular la expresión de un gen de quimera-FAS unido operablemente. Los elementos de control de la expresión incluyen, pero no se limitan a promotores, señales de secreción y otros elementos reguladores.

La construcción de ácido nucleico útil para la presente invención utiliza un promotor específico de células endoteliales para dirigir la expresión de la proteína de quimera-FAS en una célula endotelial, induciendo con ello la apoptosis de la célula endotelial.

Para el objetivo de la presente invención, un promotor específico de células endoteliales puede contener uno o más elementos reguladores en cis, que mejoran la especificidad de células endoteliales de los promotores, comparado con un promotor sin los elementos reguladores en cis. En un ejemplo, el elemento regulador en cis comprende un potenciador. En otro aspecto, el elemento regulador en cis comprende un elemento de respuesta a la hipoxia. En otros ejemplos, el elemento regulador en cis comprende un potenciador y un elemento de respuesta a la hipoxia.

En una realización, un elemento regulador en cis útil para la invención comprende una secuencia de nucleótidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:12 (la secuencia complementaria de SEQ ID NO:11), en el que el elemento regulador en cis mejora la especificidad de células endoteliales de un promotor, comparado con un promotor sin el elemento regulador en cis. El elemento regulador en cis puede comprender además una secuencia de nucleótidos adicional al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14 (la secuencia complementaria de SEQ ID NO:13).

En otra realización, un elemento regulador en cis para la invención comprende una secuencia de nucleótidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14 (la secuencia complementaria de SEQ ID NO:13), en el que el elemento regulador en cis mejora la especificidad de células endoteliales de un promotor, comparado con un promotor sin el elemento regulador en cis. El elemento regulador en cis puede comprender además una secuencia de nucleótidos adicional al menos 60%, 70%, 80%, 90%,

95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:12 (la secuencia complementaria de SEQ ID NO:11).

En otras realizaciones, un elemento regulador en cis para la invención comprende una secuencia de nucleótidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16 (la secuencia complementaria de SEQ ID NO:15), en el que el elemento regulador en cis mejora la especificidad de células endoteliales de un promotor, comparado con un promotor sin el elemento regulador en cis. En otras realizaciones, un elemento regulador en cis para la construcción de ácido nucleico comprende SEQ ID NO:7 o cualquiera de sus fragmentos, variantes, derivados o análogos, en el que los fragmentos, variantes, derivados o análogos mejoran la especificidad de células endoteliales de un promotor, comparado sin el elemento regulador en cis.

En algunas realizaciones, un elemento regulador en cis para la invención comprende una secuencia de nucleótidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:23, en el que el elemento regulador en cis mejora la especificidad de células endoteliales de un promotor, comparado con un promotor sin el elemento regulador en cis. En otras realizaciones, un elemento regulador en cis para la construcción de ácido nucleico comprende SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:23 o cualquiera de sus fragmentos, variantes, derivados o análogos, en el que los fragmentos, variantes, derivados o análogos mejoran la especificidad de células endoteliales de un promotor, comparado sin el elemento regulador en cis.

En otras realizaciones, un elemento regulador en cis para la invención comprende una secuencia de nucleótidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:25, en el que el elemento regulador en cis mejora la especificidad de células endoteliales de un promotor, comparado con un promotor sin el elemento regulador en cis. En otras realizaciones, un elemento regulador en cis para la construcción de ácido nucleico comprende SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:25 o cualquiera de sus fragmentos, variantes, derivados o análogos, en el que los fragmentos, variantes, derivados o análogos mejoran la especificidad de células endoteliales de un promotor, comparado sin el elemento regulador en cis.

La tabla 3 muestra diversas secuencias de elementos reguladores en cis útiles para la invención.

Tabla 3 - Promotores y elementos reguladores en cis específicos de células endoteliales

SEQ ID NO:	Secuencias
SEQ ID NO:11	ctggagggtg actttgcttc tggagccagt acttcatact tttcatt
SEQ ID NO:12	aatgaaaagt atgaagtact ggctccagaa gcaaagtcac cctccag
SEQ ID NO:13	gtacttcata cttttcattc caatgggggtg actttgcttc tgga
SEQ ID NO:14	tccagaagca aagtcacccc attggaatga aaagtatgaa gtac
SEQ ID NO:15	Elemento 3X ctccagaagcaaagtcacccattggaatgaaaagtatgaagtacaatgaaaagtatgaagt actggctccagaagcaaagtcaccctccagaagcaaagtcacccattggaatgaaaagtat gaagtac
SEQ ID NO:16	Elemento 3x (secuencia complementara de SEQ ID NO:15) gtacttcatactttttcattccaatgggggtgactttgcttctgagggtgactttgcttctgg agccagtacttcatactttttcattgtacttcatactttttcattccaatgggggtgactttgct tctggag
SEQ ID NO:17	Promotor PPE-1

	gtacgtgtactttctgatcggcgatactagggagataaggatgtgcctgacaaaaccacattg ttgttgttatcattattatttagttttccttccttgctaactcctgacggaatctttctcac ctcaaatgcgaagtacttttagtttagaaaagacttggtggaaggggtggtggtggaagta gggtgatcttccaaactaatctggttccccgccccagtagctgggattcaagagcgaa gagtggggatcggtccccctgtttgatcagaaagacataaaaaggaaaatcaagtgaacaatga tcagccccacctccacccccccccctgcgcgcgcacatacaatctatttaattgtacttc atacttttcattccaatggggtgactttgcttctggagaaaactcttgattcttgaactctgg ggctggcagctagcaaaaggggaagcgggctgctgctctctgcaggttctgcagcggctctct gtctagtgggtgttttcttttcttagccctgcccctggattgtcagacggcggcgctctgc ctctgaagtttagccgtgatttctctagagccgggtcttatctctggctgcacgttgccctgt gggtgactaatcacacaataacattgttttagggctggaatgaagtacagagctgtttaccccc actctataggggttcaatataaaaaggcggcgagaaactgtccgagtcagaagcgttctctgc accggcgctgagagcctgaccgggtctgctccgctgtccttgccgcgtgcctcccggtgcc cgcgacgctttcgccccagtggaagggccacttgcctgcggccgc
SEQ ID NO:18	Promotor PPE-1-3X gtacgtgtactttctgatcggcgatactagggagataaggatgtgcctgacaaaaccacattg ttgttgttatcattattatttagttttccttccttgctaactcctgacggaatctttctcac ctcaaatgcgaagtacttttagtttagaaaagacttggtggaaggggtggtggtggaagta gggtgatcttccaaactaatctggttccccgccccagtagctgggattcaagagcgaa gagtggggatcggtccccctgtttgatcagaaagacataaaaaggaaaatcaagtgaacaatga tcagccccacctccacccccccccctgcgcgcgcacatacaatctatttaattgtacttc atacttttcattccaatggggtgactttgcttctggagaaaactcttgattcttgaactctgg ggctggcagctagcctccagaagcaaagtcacccattggaatgaaaagtatgaagtacaat gaaaagtatgaagtactggctccagaagcaaagtcacccctccagaagcaaagtcacccatt ggaatgaaaagtatgaagtacgctagcaaaaggggaagcgggctgctgctctctgcaggttc tgcagcggctctctgtctagtgggtgttttcttttcttagccctgcccctggattgtcagac ggcggcgctctgcctctgaagtttagccgtgatttctctagagccgggtcttatctctggct gcacgttgccctgtgggtgactaatcacacaataacattgttttagggctggaatgaagtaca gctgtttacccccactctataggggttcaatataaaaaggcggcgagaaactgtccgagtc gaagcgttctctgcacggcgctgagagcctgaccgggtctgctccgctgtccttgccgcgtg cctcccggtgcccgcgacgctttcgccccagtggaagggccacttgcctgcggccgc
SEQ ID NO:22	ggtagctttg cttctggag
SEQ ID NO:23	ctccagaagcaaagtcacc
SEQ ID NO:24	ctccagaagcaaagtcacc
SEQ ID NO:25	aatgaaaagtatgaagtac
SEQ ID NO:26	Elemento de respuesta a la hipoxia gcacgt

Un elemento regulador en cis para la presente invención puede estar unido a un promotor cadena arriba o cadena abajo del promotor, o estar insertado entre los dos nucleótidos en el promotor. El promotor específico de células endoteliales para la presente invención puede utilizar cualquier promotor conocido en la técnica. Por ejemplo, los promotores adecuados que pueden utilizarse para la presente invención incluyen los promotores específicos de células endoteliales preproendotelina-1 (promotor PPE-1), documento US 2010/0282634, publicado el 11 de noviembre de 11; y documento WO 2010/2011, publicado el 14 de julio de 2011); el promotor PPE-1-3X (patentes de EE. UU. n.ºs 7.579.327, 8.071.740, 8.039.261, US2010/0282634, US 2007/0286845, WO 2011/083464, y WO2011/083466); los promotores TIE-1 (S79347, S79346) y TIE-2 (U53603) [Sato T. N., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 15 de octubre de 1993, 90(20): 9355-9658], el promotor de endogлина [Y11653; Rius C., Blood, 15 de diciembre de 1998, 92(12):4677-4690]; el factor de von Willerbrand [AF152417; Collins C. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, julio de 1987, 84(13):4393-4397]; el promotor KDR/flk [X89777, X89776; Ronicke V., Circ. Res., agosto de 1996, 79(2):277-285]; el promotor FLT-1 [D64016, AJ224863; Morishita K., J. Biol. Chem., 17 de noviembre de 1995, 270(46):27948-27953]; el promotor Egr-1 [AJ245926; Sukhatme V. P., Oncogene Res., septiembre-octubre de 1987, 1(4):343-355]; el promotor de E-selectina [Y12462; Collins T., J. Biol. Chem., 5 de febrero de 1991, 266(4):2466-2473]; los promotores de moléculas de adhesión endoteliales: ICAM-1 [X84737; Horley K. J., EMBO J., octubre de 1989, 8(10):2889-2896]; VCAM-1 [M92431; Iadecola M. F., J. Biol. Chem., 15 de agosto de 1992, 267(23):16323-16329]; PECAM-1 [AJ313330, X96849; CD31, Newman P. J., Science, 9 de marzo de 1990, 247(4947):1219-1222]; los elementos específicos del músculo liso vascular: el promotor CArG box X53154 y promotor de proteína similar a carboxipeptidasa aórtica ("aortic carboxypeptidase-like protein", ACLP) [AF332596; Layne M. D., Circ. Res., 2002, 90, 728-736]; y el gen 1 expresado preferentemente aórtico [Yen-Hsu Chen, J. Biol. Chem., vol. 276, número 50, 47658-47663, 14 de diciembre, 2001].

En una realización, un promotor unido al potenciador específico de células endoteliales comprende una secuencia de nucleótidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de SEQ ID NO:17, en el que el promotor unido al elemento induce una especificidad de células endoteliales al gen unido operablemente al promotor. En otra realización, un promotor unido al elemento específico de células endoteliales comprende un fragmento, una variante, un derivado o un análogo de un promotor PPE-1 de tipo salvaje, en el que dicho fragmento, variante, derivado o análogo induce una especificidad de células endoteliales al gen unido operablemente al promotor. En un ejemplo, el elemento específico de células endoteliales puede insertarse entre los restos nucleotídicos 442 y 449 que corresponden a SEQ ID NO:17.

En otras realizaciones, un promotor específico de células endoteliales comprende un elemento de respuesta a la hipoxia. Un elemento de respuesta a la hipoxia ("hypoxia responsive element", HRE) se localiza sobre la hebra antisentido del promotor de endotelina-1. Este elemento es un sitio de unión del factor 1 inducible por hipoxia que es necesario para la regulación positiva del promotor de endotelina-1 (del gen humano, de rata y murino) por la hipoxia. La hipoxia es una señal potente que induce la expresión de varios genes, que incluyen la eritropoyetina (Epo), VEGF, y diversas enzimas glicolíticas. La secuencia central (8 pares de bases) está conservada en todos los genes que responden a condiciones hipóxicas, y las regiones flanqueantes son diferentes de otros genes. El elemento de respuesta a la hipoxia ET-1 está localizado entre los sitios de unión a GAT A-2 y a AP-1. En un ejemplo, un elemento de respuesta a la hipoxia comprende SEQ ID NO:26, o uno de sus fragmentos, variantes, derivados o análogos.

En otras realizaciones, un promotor específico de células endoteliales útil para la invención comprende, consiste fundamentalmente o consiste en una secuencia de nucleótidos al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de SEQ ID NO:18, en el que el promotor unido al elemento regulador en cis induce una especificidad de células endoteliales al gen unido operablemente al promotor. En otra realización, un promotor específico de células endoteliales comprende un fragmento, una variante, un derivado o un análogo de SEQ ID NO:18, en el que dicho fragmento, variante, derivado o análogo induce una especificidad de células endoteliales al gen unido operablemente al promotor.

Pueden encontrarse otras variaciones de los promotores específicos de células endoteliales en los documentos WO2011/083464, WO2011/083466, y WO2012/052423.

La presente invención también proporciona una nueva secuencia de promotor que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:17. En un ejemplo, el promotor comprende además un elemento regulador en cis específico de células endoteliales. En un ejemplo, el elemento regulador en cis específico de células endoteliales comprende SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 o cualquiera de sus fragmentos, variantes, derivados o análogos, en el que los fragmentos, variantes, derivados o análogos mejoran la especificidad de células endoteliales del promotor, comparado con un promotor sin el elemento regulador en cis. En otro ejemplo, el promotor comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:18. La invención incluye una construcción de ácido nucleico que comprende el nuevo promotor y una secuencia de nucleótidos heteróloga. En una realización, la secuencia de nucleótidos heteróloga comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de quimera-Fas descrita en la presente. En otra realización, la secuencia de nucleótidos heteróloga comprende una secuencia de adenovirus.

C. Vector

La invención también proporciona un vector que comprende la construcción de ácido nucleico que comprende un gen de quimera-FAS unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales. Para los objetivos de esta invención, pueden emplearse numerosos sistemas de vector. Por ejemplo, los diversos sistemas de transporte de genes víricos que pueden usarse en la práctica de este aspecto de la invención incluyen, pero no se limitan a un vector adenovírico, un vector de alfavirus, un vector de enterovirus, un vector de pestivirus, un vector lentivírico, un vector baculovírico, un vector de herpesvirus, un vector del virus de Epstein Barr, un vector papovavírico, un vector de poxvirus, un vector del virus de vaccinia, un vector de virus adenoasociado y un vector del virus del herpes simplex.

En otra realización, un vector que comprende un gen de quimera-FAS unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales es un adenovirus. Por ejemplo, el adenovirus puede ser uno o más de la especie A de adenovirus humano (serotipos 12, 18, y 31), B (serotipos 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, y 55), C (serotipos 1, 2, 5, 6, y 57), D (8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54, y 56), E (serotipo 4), F (serotipo 40 y 41), o G (serotipo 52). En una realización particular, el adenovirus para la invención es el adenovirus humano de serotipo 5. En algunas realizaciones, el adenovirus útil para la terapia génica es un adenovirus no replicante recombinante que no contiene una región E1 ni una región E3. En ciertas realizaciones, el adenovirus para la invención es un adenovirus de replicación condicionada que no contiene una región E3, pero sí contiene una región E1.

En una realización, el vector comprende, consiste fundamentalmente o consiste en SEQ ID NO:19. En otra realización, el vector de adenovirus es un virus aislado que tiene el nº de registro de la European Collection of Cell Cultures (ECACC) 13021201.

D. Depósitos biológicos

Los depósitos biológicos se realizaron en European Collection of Cell Cultures (ECACC) localizado en Health Protection Agency Culture Collections, Health Protection Agency, Microbiology Services, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG, Reino Unido, según el Tratado de Budapest y según 37 C.F.R. § 1.808. Las muestras de los materiales depositados estarán disponibles al público tras la concesión de una patente. La invención descrita y reivindicada en la presente no está limitada por el alcance de la cepa depositada, puesto que la realización depositada solo pretende ser una ilustración de la invención.

Cepa	nº de registro de ECACC	Fecha de depósito
VB-111	13021201	12 de febrero de 2013

III. Antagonistas de VEGF

El VEGF, el factor de crecimiento endotelial vascular, es un mitógeno específico de células endoteliales y un inductor de la angiogénesis. El término VEGF incluye los miembros de la familia del gen VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, y VEGF-D. Se considera que VEGF-A es el miembro prototípico de la familia de genes VEGF. A través de un corte y empalme de exones alternativo, VEGF-A existe en cuatro isoformas diferentes: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, y VEGF₂₀₆. Las cuatro isoformas de VEGF-A tienen una longitud de 121, 165, 189 y 206 aminoácidos (respectivamente) después de la escisión de la secuencia señal.

Tras haber sido expresado, el VEGF se segrega fuera de la célula, donde se une a la región extracelular de un receptor de VEGF (VEGFR). Existen dos VEGFR principales, VEGFR-1 o VEGFR-2, siendo ambos receptores de tirosina quinasa. Un tercer VEGFR, VEGFR-3, es un receptor de tirosina quinasa relacionado que solo se une a VEGF-C y VEGF-D. Tras unirse a VEGF, el VEGFR señala acontecimientos corriente abajo que conducen a la proliferación de células endoteliales y a la angiogénesis. Se sabe que VEGF-C y VEGF-D regulan la angiogénesis linfática.

El gen VEGF contiene secuencias de nucleótidos que son altamente homólogas con las del factor-1 inducible por hipoxia (HIF-1). Estas secuencias similares a HIF-1 permiten la inducción de la expresión del gen VEGF bajo condiciones hipóxicas. Así, en condiciones de un bajo contenido en oxígeno, tales como las que aparecen en el microentorno de un tumor, se induce la expresión del gen VEGF. La producción de niveles elevados de VEGF dentro del lecho de un tumor provoca una mayor señalización de VEGFR y, por tanto, de crecimiento de células endoteliales y angiogénesis. La formación de nuevos vasos sanguíneos dentro del tumor proporciona sangre y oxígeno al tumor en crecimiento.

Debido al papel destacado del VEGF en la angiogénesis y el crecimiento y desarrollo del tumor, se estudian a los antagonistas de VEGF como potenciales agentes terapéuticos para el cáncer. Los antagonistas de VEGF pueden evitar la actividad VEGF uniéndose directamente a VEGF y bloqueando su interacción con un VEGFR. Esto reduce la señalización desde el VEGFR y los acontecimientos corriente abajo, con lo cual se produce una reducción en la angiogénesis. En una realización, un antagonista de VEGF útil para la invención es un anticuerpo anti-VEGF o una molécula de unión a VEGF. En otra realización, un anticuerpo anti-VEGF o una molécula de unión a VEGF es un

anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo quimérico. En otra realización, un anticuerpo anti-VEGF o una molécula de unión a VEGF para la terapia comprende Fab, F(ab)₂, Fv, o scFv.

Otro tipo de antagonista de VEGF que puede reducir o inhibir la actividad VEGF es una molécula que se une a VEGFR y, por tanto, bloquea la interacción de VEGFR con VEGF. Esta interferencia de la unión del receptor/ligando evita la señalización de VEGFR y reduce la angiogénesis y la proliferación de células endoteliales. En una realización, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF o una molécula de unión a VEGF. En otra realización, el anticuerpo anti-VEGF o la molécula de unión a VEGF es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo quimérico. En otra realización, el anticuerpo anti-VEGF o la molécula de unión a VEGF comprende Fab, F(ab)₂, Fv, o scFv.

Los antagonistas de VEGF que se unen a VEGF o VEGFR pueden inhibir la actividad VEGF mediante mecanismos de acción similares, ya que evitan la interacción del receptor/ligando, la señalización de VEGFR, y los acontecimientos de señalización corriente abajo, tales como la proliferación de células endoteliales y la angiogénesis. Así, en una realización, el antagonista de VEGF se selecciona del grupo que consiste en bevacizumab (patente de EE. UU. n.º 7.169.901), ranibizumab (patente de EE. UU. n.º 7.297.334), VGX-100 (patente de EE. UU. n.º 7.423.125), r84 (patente de EE. UU. n.º 8.034.905), aflibercept (patente de EE. UU. n.º 5.952.199), IMC-18F1 (patente de EE. UU. n.º 7.972.596), IMC-1C11 (documento PCT/US2000/02180), y ramucirumab (patente de EE. UU. n.º 7.498.414). Una molécula de unión a VEGF incluye otras formas de moléculas derivadas de anticuerpos, por ejemplo, un monocuerpo, un diacuerpo, un minicuerpo o cualquier proteína quimérica que comprenda al menos una CDR de un anticuerpo de unión a VEGF, por ejemplo, bevacizumab.

En una realización, el anticuerpo anti-VEGF o la molécula de unión a VEGF comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que consiste en V_H de CDR1 (SEQ ID NO:28), V_H de CDR2 (SEQ ID NO:29), V_H de CDR3 (SEQ ID NO:30), V_L de CDR1 (SEQ ID NO:31), V_H de CDR2 (SEQ ID NO:32), V_H de CDR3 (SEQ ID NO:33), y cualquiera de sus combinaciones. Véase la tabla 4.

Tabla 4 - Secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de la complementariedad

CDR	Secuencia
V _H de CDR1 (SEQ ID NO:28)	GYTFTNYGMN
V _H de CDR2 (SEQ ID NO:29)	WINTYTGEPTYAADFQR
V _H de CDR3 (SEQ ID NO:30)	YPHYYGSSHWYFDV
V _L de CDR1 (SEQ ID NO:31)	SASQDISNYLN
V _L de CDR2 (SEQ ID NO:32)	FTSSLHS
V _L de CDR3 (SEQ ID NO:33)	QQYSTVPWT

En otra realización, el anticuerpo anti-VEGF o la molécula de unión a VEGF comprende CDR1 (SEQ ID NO:28), CDR2 (SEQ ID NO:29), o CDR3 (SEQ ID NO:30) de la región variable de cadena pesada (V_H) del bevacizumab. Por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF o una molécula de unión a VEGF comprende CDR1 y CDR2 de V_H, CDR1 y CDR3 de V_H, CDR2 y CDR3 de V_H, o CDR1, CDR2 o CDR3 de V_H. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF o la molécula de unión a VEGF comprende CDR1 (SEQ ID NO:31), CDR2 (SEQ ID NO:32), o CDR3 (SEQ ID NO:33) de la región variable de cadena ligera (V_L) del bevacizumab. Por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF o una molécula de unión a VEGF comprende CDR1 y CDR2 de V_L, CDR1 y CDR3 de V_L, CDR2 y CDR3 de V_L, o CDR1, CDR2 y CDR3 de V_L. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF o una molécula de unión a VEGF comprende V_H del bevacizumab. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF o una molécula de unión a VEGF comprende V_L del bevacizumab.

En otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-VEGF o la molécula de unión a VEGF comprende V_H de CDR1 (SEQ ID NO:28), V_H de CDR2 (SEQ ID NO:29), V_H de CDR3 (SEQ ID NO:30), V_L de CDR1 (SEQ ID NO:31), V_L de CDR2 (SEQ ID NO:32), y V_L de CDR3 (SEQ ID NO:33).

IV. Métodos de tratamiento que emplean adenovirus que expresan una proteína de quimera-FAS y un antagonista de VEGF

Una realización de la presente invención proporciona métodos para inducir o mejorar la capacidad de respuesta a un antagonista de VEGF en un sujeto o en una población de sujetos que lo necesita, que comprenden administrar un vector que expresa una proteína de quimera-FAS en combinación con un antagonista de VEGF.

En un aspecto, la presente invención incluye un método para inhibir o reducir la angiogénesis en un sujeto o en una población de sujetos que lo necesita, que comprende (i) identificar un sujeto o una población de sujetos como candidatos para una mejora en la capacidad de respuesta a un tratamiento con un antagonista de VEGF, y (ii) administrar un vector que codifica una proteína de quimera-FAS y el antagonista de VEGF al sujeto o la población de sujetos, en el que el sujeto o la población de sujetos presenta una mejora en la capacidad de respuesta a un antagonista de VEGF después de la administración del vector.

En otro aspecto, la presente invención incluye un método para inhibir o reducir la angiogénesis en un sujeto o en una población de sujetos que necesita una capacidad de respuesta inducida o mejorada a un antagonista de VEGF, que comprende administrar un vector que codifica una proteína de quimera-FAS y el antagonista de VEGF al sujeto o la población de sujetos, en el que el sujeto o la población de sujetos presenta una mejora en la capacidad de respuesta a un antagonista de VEGF después de la administración del vector.

En otros aspectos, la identificación de un sujeto o una población de sujetos como candidatos para una mejora en la capacidad de respuesta a un tratamiento con un antagonista de VEGF comprende (a) administrar un antagonista de VEGF por sí solo, (b) medir la capacidad de respuesta al antagonista de VEGF, (c) administrar un vector que codifica una proteína de quimera-FAS, (d) administrar el antagonista de VEGF, (e) medir la capacidad de respuesta al antagonista de VEGF en (d), y (f) comparar la capacidad de respuesta en (b) con la capacidad de respuesta en (d). El sujeto o la población de sujetos que muestra una mayor capacidad de respuesta en (e) que en (b) puede identificarse como un sujeto que necesita una capacidad de respuesta inducida o mejorada al antagonista de VEGF. El sujeto o la población de sujetos que muestra una capacidad de respuesta igual entre (b) y (e), o una mayor capacidad de respuesta en (b) que en (e) puede identificarse como no candidato y ser excluido de una terapia posterior.

En una realización, la invención se dirige a un método para inducir la apoptosis de una célula endotelial en un tumor de un sujeto que lo necesita, que comprende administrar un antagonista de VEGF al sujeto, en el que al sujeto se le administra un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales antes de la administración del antagonista de VEGF, y en el que la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF aumenta después de la administración del vector. En otra realización, la invención proporciona un método para inducir la apoptosis de una célula endotelial en un tumor de un sujeto que lo necesita, que comprende: (i) administrar un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales, en el que la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF aumenta después de la administración del vector, y (ii) administrar el antagonista de VEGF al sujeto. En otras realizaciones, la invención incluye un método para inducir la apoptosis de una célula endotelial en un tumor de un sujeto que lo necesita, que comprende (i) administrar un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales, (ii) administrar un antagonista de VEGF al sujeto, y (iii) medir la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF, en el que la capacidad de respuesta del sujeto aumenta después de la administración del vector. En otras realizaciones, el tamaño del tumor del sujeto se reduce después de la administración del antagonista de VEGF.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método para reducir el tamaño de un tumor en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar un antagonista de VEGF al sujeto, en el que al sujeto se le administra un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales antes de la administración del antagonista de VEGF, en el que la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF aumenta después de la administración del vector y antes de la administración del antagonista de VEGF, y en el que el tamaño del tumor en el sujeto se reduce después de la administración del antagonista de VEGF. En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para reducir el tamaño de un tumor en un sujeto que lo necesita, que comprende: (i) administrar un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales, en el que la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF aumenta después de la administración del vector, y (ii) administrar un antagonista de VEGF al sujeto, en el que el tamaño del tumor en el sujeto se reduce después de la administración del antagonista de VEGF. La presente invención también incluye un método para reducir el tamaño de un tumor en un sujeto que lo necesita, que comprende: (i) administrar un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales, (ii) administrar un antagonista de VEGF al sujeto, y (iii) medir la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF, en el que la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF aumenta después de la administración del vector. En otras realizaciones, el tamaño del tumor se reduce comparado con el tamaño del tumor de un sujeto al que no se le administra el vector antes de la administración del antagonista de VEGF. En otras realizaciones, el tamaño del tumor se mide comparando el tamaño del tumor antes de la administración del antagonista de VEGF y el tamaño del tumor después de la administración del antagonista de VEGF.

En ciertas realizaciones, la invención incluye un método para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con un tumor en un sujeto, que comprende administrar un antagonista de VEGF a un sujeto que lo necesita, en el que al sujeto se le administra un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales antes de la administración del antagonista de VEGF, y en el que la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF aumenta después de la administración del vector y antes de la administración del antagonista de VEGF. La invención también se dirige a un método para tratar una enfermedad o

un trastorno asociado con un tumor en un sujeto, que comprende (i) administrar un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales, en el que la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF aumenta después de la administración del vector, y (ii) administrar el antagonista de VEGF al sujeto. En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con un tumor en un sujeto, que comprende (i) administrar un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales, (ii) administrar un antagonista de VEGF al sujeto, y (iii) medir la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF, en el que la capacidad de respuesta del sujeto al antagonista de VEGF aumenta después de la administración del vector. En otras realizaciones, el tumor del sujeto progresa después de la administración del vector.

En algunas realizaciones, la invención incluye un método para identificar un candidato para una terapia con un antagonista de VEGF, que comprende (i) medir el tamaño de un tumor de un sujeto al que se le ha diagnosticado un tumor antes de administrar un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales al sujeto, y (ii) medir la progresión del tumor después de la administración del vector, en el que el sujeto se identifica como un candidato después de que el tumor haya progresado. En otras realizaciones, la invención proporciona un método para identificar un candidato para una terapia con un antagonista de VEGF, que comprende (i) medir el tamaño de un tumor de un sujeto al que se le ha diagnosticado un tumor antes de administrar un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales al sujeto, (ii) medir la progresión del tumor después de la administración del vector, en el que el sujeto se identifica como un candidato después de que el tumor haya progresado, y (iii) dar instrucciones a un asistente médico para que administre un antagonista de VEGF al sujeto. En ciertos aspectos, la progresión del tumor se mide mediante el crecimiento del tumor. En algunas realizaciones, la progresión clínica se evalúa por medio del deterioro clínico en las señales y los síntomas neurológicos de los pacientes, tales como debilidad muscular y estado mental.

En una realización concreta, el crecimiento del tumor se mide mediante MRI. En otras realizaciones, el tumor del sujeto es un tumor recurrente que surge durante el tratamiento con el vector. En otras realizaciones, el tumor del sujeto es un tumor metastásico que surge durante el tratamiento con el vector.

El término "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero" significa cualquier sujeto, en particular un sujeto mamífero, que tiene o que se espera que tenga una capacidad de respuesta mayor o mejorada a un antagonista de VEGF. En algunas realizaciones, el sujeto es cualquier sujeto que previamente no respondía a un antagonista de VEGF, pero que acaba por responder al antagonista de VEGF después de la exposición al vector. En una realización, el sujeto es un ser humano. En otra realización, el sujeto es un paciente con cáncer.

La expresión "un sujeto o una población de sujetos que necesita una capacidad de respuesta inducida o mejorada a un antagonista de VEGF", tal como se emplea en la presente, indica que el sujeto o la población de sujetos ha sido identificado como candidato o candidatos para la terapia de combinación. El sujeto o la población de sujetos puede identificarse como candidato o candidatos para la terapia de combinación antes de la administración del vector o del antagonista de VEGF.

En ciertas realizaciones, la identificación de un candidato para la terapia de combinación comprende medir diversas características de la angiogénesis tumoral, por ejemplo, una reducción en el tamaño del tumor, la inhibición del crecimiento del tumor, una reducción en la angiogénesis, una reducción en la neovascularización, o cualquier característica conocida de la angiogénesis.

En un aspecto, el sujeto o la población de sujetos que necesita una capacidad de respuesta inducida o mejorada a un antagonista de VEGF presenta un tumor o una metástasis de este, y el antagonista de VEGF y el vector tratan, disminuyen o reducen el tamaño de un tumor o una metástasis de este. En otro aspecto, el sujeto o la población de sujetos que necesita una capacidad de respuesta inducida o mejorada a un antagonista de VEGF necesita la inhibición de la angiogénesis, y el antagonista de VEGF y el vector tratan, disminuyen, previenen o reducen la angiogénesis. En otros aspectos, el sujeto o la población de sujetos que necesita una capacidad de respuesta inducida o mejorada a un antagonista de VEGF tiene cáncer, y el vector y el antagonista de VEGF tratan el cáncer.

En ciertos aspectos, tras identificar al sujeto o a la población de sujetos como candidatos, el antagonista de VEGF se administra antes de administrar el vector, al mismo tiempo que la administración de un vector, o después de la administración de un vector. En otros aspectos, tras identificar al sujeto o a la población de sujetos como candidatos, el vector se administra antes del antagonista de VEGF al menos un día antes, al menos dos días antes, al menos tres días antes, al menos cuatro días antes, al menos cinco días antes, al menos seis días antes, al menos siete días antes, al menos nueve días antes, al menos 10 días antes, al menos dos semanas antes, al menos tres semanas antes, al menos cuatro semanas antes, al menos un mes antes, al menos dos meses antes, o más.

En una realización de la presente invención, la invención incluye un método para estabilizar una enfermedad o un trastorno asociado con un cáncer. En algunas realizaciones, la invención incluye un método para estabilizar una enfermedad o un trastorno asociado con el cáncer colorrectal metastásico ("metastatic colorectal cancer", mCRC), cáncer de pulmón no microcítico no escamoso avanzado ("nonsquamous non-small cell lung cancer", NSCLC),

carcinoma de células renales metastásico ("metastatic renal cell carcinoma", mRCC), glioblastoma multiforme (GBM), cáncer mülleriano, cáncer ovárico, cáncer peritoneal, cáncer de trompas de Falopio, o carcinoma seroso papilar uterino. En unos aspectos, la presente invención reduce el volumen de un fluido peritoneal maligno, por ejemplo, fluido de ascitis, reduce el dolor del sujeto, prolonga la supervivencia del sujeto, o cualquiera de sus combinaciones. El tumor que puede reducirse, inhibirse o tratarse con la combinación del vector y el antagonista de VEGF puede ser un tumor sólido, un tumor primario o un tumor metastásico. El término "metastásico" o "metástasis" se refiere a células tumorales que son capaces de establecer lesiones de tumores secundarios en otras partes u otros órganos.

Un "tumor sólido" incluye, pero no se limita a sarcoma, melanoma, carcinoma, u otro cáncer de tumor sólido. Un "sarcoma" se refiere a un tumor que está formado por una sustancia, tal como tejido conectivo embrionario, y en general está compuesto de células muy compactadas dentro de una sustancia fibrilar u homogénea. Los sarcomas incluyen, pero no se limitan a condrosarcoma, fibrosarcoma, linfosarcoma, melanosarcoma, mixosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Abemethy, sarcoma adiposo, liposarcoma, sarcoma de partes blandas alveolares, sarcoma ameloblástico, sarcoma botrioides, sarcoma cloroma, coriocarcinoma, sarcoma embrionario, sarcoma de tumor de Wilms, sarcoma endometrial, sarcoma estromático, sarcoma de Ewing, sarcoma fascial, sarcoma fibroblástico, sarcoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma de Hodgkin, sarcoma hemorrágico pigmentado múltiple idiopático, sarcoma inmunoblástico de células B, linfoma, sarcoma inmunoblástico de células T, sarcoma de Jensen, sarcoma de Kaposi, sarcoma de células de Kupffer, angiosarcoma, leucosarcoma, sarcoma mesenquimoma maligno, sarcoma parosteal, sarcoma reticulocítico, sarcoma de Rous, sarcoma seroquístico, sarcoma sinovial, o sarcoma telangiectático.

El término "melanoma" se refiere a un tumor se surge del sistema melanocítico de la piel y otros órganos. Los melanomas incluyen, por ejemplo, melanoma lentiginoso acral, melanoma amelanótico, melanoma juvenil benigno, melanoma de Cloudman, melanoma S91, melanoma de Harding-Passey, melanoma juvenil, melanoma maligno de lentigo, melanoma maligno, melanoma metastásico, melanoma nodular, melanoma subungal, o melanoma de propagación superficial.

El término "carcinoma" se refiere a un crecimiento nuevo maligno formado por células epiteliales propensas a infiltrarse en los tejidos circundantes y producir metástasis. Los ejemplos de carcinomas incluyen, por ejemplo, carcinoma acinar, carcinoma acinoso, carcinoma adenoquístico, carcinoma quístico adenoide, carcinoma adenomatoso, carcinoma de córtex adrenal, carcinoma alveolar, carcinoma de células alveolares, carcinoma de células basales, carcinoma de la matriz capilar, carcinoma basaloide, carcinoma de células basoescamosas, carcinoma bronquioalveolar, carcinoma bronquiolar, carcinoma broncogénico, carcinoma cerebriiforme, carcinoma colangiocelular, carcinoma coriónico, carcinoma coloide, comedocarcinoma, carcinoma de corpus, carcinoma cribriforme, carcinoma en coraza, carcinoma cutáneo, carcinoma cilíndrico, carcinoma de células cilíndricas, carcinoma ductal, carcinoma duro, carcinoma embrionario, carcinoma encefaloide, carcinoma epiernoide, carcinoma epitelial adenoide, carcinoma exofítico, carcinoma de úlcera, carcinoma fibroso, carcinoma gelatiniforme, carcinoma gelatinoso, carcinoma de células gigantes, carcinoma gigantocelular, carcinoma glandular, carcinoma de células granulosas, carcinoma de la matriz capilar, carcinoma hematode, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células de Hurthle, carcinoma hialino, carcinoma hipemefroide, carcinoma embrionario infantil, carcinoma in situ, carcinoma intraepidérmico, carcinoma intraepitelial, carcinoma de Krompecher, carcinoma de células de Kulchitzky, carcinoma de células grandes, carcinoma lenticular, carcinoma lenticulare, carcinoma lipomatoso, carcinoma linfoepitelial, carcinoma medullare, carcinoma medular, carcinoma melanótico, carcinoma blando, carcinoma mucinoso, carcinoma mucoso, carcinoma mucocelular, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma mucosum, carcinoma mucoso, carcinoma mixomatodes, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células en avena, carcinoma ossificans, carcinoma osteoide, carcinoma papilar, carcinoma periportal, carcinoma preinvasivo, carcinoma de células espinosas, carcinoma pultáceo, carcinoma de células renales del riñón, carcinoma de células de reserva, carcinoma sarcomatoide, carcinoma schneideriano, carcinoma escirro, carcinoma del escroto, carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma simple, carcinoma de células pequeñas, carcinoma solanoide, carcinoma de células esféricas, carcinoma de células en huso, carcinoma esponjoso, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma de cuerda, carcinoma telangiectático, carcinoma telangiectiote, carcinoma de células de transición, carcinoma tuberosum, carcinoma tuberoso, carcinoma verrugoso, o carcinoma velloso.

Otros cánceres que pueden inhibirse o tratarse incluyen, por ejemplo, leucemia, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de pulmón, rabdomiosarcoma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores de pulmón microcíticos, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulanoma pancreático maligno, carcinoide maligno, cáncer de la vejiga urinaria, lesiones de la piel premalignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, cáncer de tiroides papilar, neuroblastoma, cáncer neuroendocrino, cáncer esofágico, cáncer del tracto genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer cervical, cáncer endometrial, cáncer cortical adrenal, cáncer de próstata, cáncer mülleriano, cáncer ovárico, cáncer peritoneal, cáncer de las trompas de Falopio, o carcinoma seroso papilar uterino.

En otras realizaciones, el sujeto ha recibido hasta tres, hasta dos o hasta una línea previa de quimioterapia. En otras realizaciones, el sujeto no ha recibido más de 3 líneas previas de quimioterapia para un cáncer recurrente.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método para inducir o mejorar la capacidad de respuesta a un

antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en un sujeto o una población de sujetos que lo necesita, que comprende administrar un vector que comprende un gen de quimera-Fas unido operablemente a un promotor específico de células endoteliales y el antagonista de VEGF al sujeto o la población de sujetos, en el que la capacidad de respuesta al antagonista de VEGF se induce o mejora después de la administración del vector, comparado con la capacidad de respuesta al antagonista de VEGF sin la administración del vector.

En ciertas realizaciones, tras identificar al sujeto o a la población de sujetos como candidatos, el método comprende además administrar dosis repetidas del antagonista de VEGF y el vector.

La dosis del vector administrada como parte de la presente invención puede medirse en partículas de virus (PV). En una realización, la dosis del vector en la terapia de combinación con bevacizumab es menor que la dosis que se emplea para la terapia sin bevacizumab (por ejemplo, una terapia que emplea el vector por sí solo). Por ejemplo, una cantidad eficaz del vector en la terapia de combinación con bevacizumab incluye, pero no se limita a igual o menor que aproximadamente 1×10^{13} , 9×10^{12} , 8×10^{12} , 7×10^{12} , 6×10^{12} , 5×10^{12} , 4×10^{12} , 3×10^{12} , 2×10^{12} , 1×10^{12} , 9×10^{11} , 8×10^{11} , 7×10^{11} , 6×10^{11} , 5×10^{11} , 4×10^{11} , 3×10^{11} , 2×10^{11} , 1×10^{11} , 9×10^{10} , 8×10^{10} , 7×10^{10} , 6×10^{10} , 5×10^{10} , 4×10^{10} , 3×10^{10} , 2×10^{10} , o 1×10^{10} partículas de virus.

En una realización, el vector se administra en una cantidad eficaz de al menos aproximadamente 1×10^{11} partículas de virus. En otra realización, el vector se administra en una cantidad eficaz de al menos aproximadamente 1×10^{12} partículas de virus. En otra realización, el vector se administra en una cantidad eficaz de al menos aproximadamente 1×10^{13} partículas de virus. En otra realización, el vector se administra en una cantidad eficaz de al menos aproximadamente 1×10^{14} partículas de virus. En otras realizaciones, el vector se administra en una cantidad eficaz de al menos aproximadamente 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , o 5×10^{10} partículas de virus.

Las dosis del antagonista de VEGF (por ejemplo, bevacizumab) puede medirse en mg/kg de peso corporal. En un aspecto, la dosis de bevacizumab en la terapia de combinación con el vector es menor que la dosis de bevacizumab sin el vector (por ejemplo, una terapia que emplea el bevacizumab por sí solo). Los ejemplos no limitantes de una cantidad eficaz de bevacizumab incluyen igual o menor que aproximadamente 15 mg/kg, 14 mg/kg, 13 mg/kg, 12 mg/kg, 11 mg/kg, 10 mg/kg, 9 mg/kg, 8 mg/kg, 7 mg/kg, 6 mg/kg, 5 mg/kg, 4 mg/kg, 3 mg/kg, 2 mg/kg, o 1 mg/kg.

En una realización específica, el vector se administra en una cantidad eficaz de 3×10^{12} a 1×10^{13} PV, y el bevacizumab se administra en una cantidad eficaz de 5 mg/kg a 15 mg/kg.

La presente invención proporciona métodos para inducir o mejorar la capacidad de respuesta a antagonistas de VEGF, que comprenden administrar un vector y un antagonista de VEGF. El régimen usado para administrar el vector y el antagonista de VEGF comprende la administración repetida del vector y bevacizumab. En una realización, el vector se administra repetidas veces a diario, una vez en aproximadamente 2 días, una vez en aproximadamente 3 días, una vez en aproximadamente 4 días, una vez en aproximadamente 5 días, una vez en aproximadamente 6 días, una vez en aproximadamente 7 días, una vez en aproximadamente 2 semanas, una vez en aproximadamente 3 semanas, una vez en aproximadamente 4 semanas, una vez en aproximadamente 5 semanas, una vez en aproximadamente 6 semanas, una vez en aproximadamente 7 semanas, una vez en aproximadamente 2 meses, o una vez en aproximadamente 6 meses. En otra realización, el bevacizumab se administra repetidas veces una vez en aproximadamente 7 días, una vez en aproximadamente 2 semanas, una vez en aproximadamente 3 semanas, una vez en aproximadamente 4 semanas, una vez en aproximadamente 2 meses, una vez en aproximadamente 3 meses, una vez en aproximadamente 4 meses, una vez en aproximadamente 5 meses, o una vez en aproximadamente 6 meses. En una realización particular, el vector se administra cada 2 meses, y el bevacizumab se administra cada 2 semanas.

V. Composiciones farmacéuticas

En la invención también se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector que expresa una proteína de quimera-FAS empleada en los métodos de la invención. La composición farmacéutica puede formularse para la administración a mamíferos, incluyendo seres humanos. Las composiciones farmacéuticas usadas en los métodos de esta invención comprenden vehículos farmacéuticamente aceptables que incluyen, por ejemplo, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como la albúmina de suero humana, sustancias tamponantes, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, bifosfato de disodio, bifosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sodio, poliácridatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina. En una realización, la composición se formula añadiendo disolución salina.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, por vía parenteral (que incluye, por ejemplo, técnicas infusión o inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasínovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal), intraventricular, oral, mediante un pulverizado para inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. Tal como se describió previamente, la composición comprende una construcción de ácido

nucleico que comprende un gen de quimera-FAS en una célula endotelial y, con ello, induce la apoptosis de la célula endotelial. Por consiguiente, la composición puede inhibir, reducir o disminuir el tamaño de un tumor, o una metástasis de este, mediante la inhibición de la neovascularización y/o la angiogénesis de las células endoteliales tumorales. De modo similar, el antagonista de VEGF usado en combinación con la construcción de ácido nucleico

- 5 inhibe la neovascularización y/o la angiogénesis a través de la inhibición directa de la actividad VEGF. Por tanto, en una realización, la terapia de combinación se administra de modo sistémico o local. Para la administración sistémica o local, la formulación farmacéutica que contiene la construcción de ácido nucleico, el adenovirus, o la población homogénea del adenovirus puede utilizar un dispositivo mecánico, tal como una aguja, una cánula o instrumentos quirúrgicos.
- 10 Las formas inyectables estériles de las composiciones usadas en los métodos de la invención pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones pueden formularse según técnicas conocidas en la técnica empleando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes suspensores. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente
- 15 parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una suspensión en 1,3-butandiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, la disolución de Ringer y la disolución de cloruro de sodio isotónica. Además, de modo convencional se emplean aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite no volátil suave, que incluye mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados de glicérido, son útiles para la
- 20 preparación de inyectables, así como los aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, en especial en sus versiones polioxietiladas. Estas disoluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un dispersante o diluyente de alcohol de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares, que se emplean de modo habitual en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, que incluyen emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos que se emplean habitualmente, tales como Tween, Span y otros agentes emulgentes o potenciadores de la biodisponibilidad que se
- 25 usan habitualmente para la fabricación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptable sólidas, líquidas o de otro tipo, también pueden usarse para la formulación.

Las formulaciones parenterales pueden ser una única dosis en embolada, una infusión o una dosis en embolada de carga, seguida de una dosis de mantenimiento. Estas composiciones pueden administrarse en intervalos fijados o variables específicos, por ejemplo, una vez diaria, o "según sea necesario".

- 30 Ciertas composiciones farmacéuticas usadas en los métodos de esta invención pueden ser administradas por vía oral en una forma de dosificación aceptable que incluye, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, suspensiones o disoluciones acuosas. Ciertas composiciones farmacéuticas también pueden administrarse mediante inhalación o aerosol nasal. Estas composiciones pueden prepararse como disoluciones en disolución salina, empleando alcohol bencílico u otro conservante adecuado, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad y/u otros
- 35 agentes dispersantes o solubilizantes convencionales.

Una cantidad eficaz del agente quimioterapéutico está disponible en la técnica. En un aspecto, por ejemplo, una cantidad eficaz de bevacizumab puede ser al menos aproximadamente 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, o 5 mg/kg.

Ejemplos

- 40 Ejemplo 1: Construcción y clonación del vector vírico

El vector se construyó empleando un esqueleto que contiene la mayor parte del genoma del adenovirus de tipo 5, así como una homología parcial con un plásmido adaptador, que permite la recombinación.

Se delecionó la unidad transcripcional temprana E1 del esqueleto del plásmido, que fue modificado posteriormente delecionando pWE25 y el sitio de marcador de selección de resistencia a la ampicilina (Amp).

- 45 El plásmido adaptador, que contiene secuencias de Ad5, promotor de CMV, MCS, y poliA de SV40, se modificó para delecionar el promotor de CMV, y se insertaron el promotor PPE-1 y el fragmento Fas-c mediante digestión de restricción. Se utilizaron el promotor PPE-1 modificado (PPE-1-3X, SEQ ID NO:18) y el transgén de quimera-Fas (Fas-c, SEQ ID NO:9) para la construcción del vector adenovírico. Se construyó el elemento PPE-1-(3X)-Fas-c (2115 pb) a partir del elemento PPE-1-(3X)-luc. Este elemento contiene 1,4 kb del promotor de preproendotelina murino
- 50 PPE-1-(3X), el gen de luciferasa, el sitio de poliA de SV40 y el primer intrón del gen ET-1 murino, originado a partir del plásmido pEL8 (8848 pb) usado por Harats *et al.* (Harats D. *et al.*, JCI, 1995). Se extrajo el módulo PPE-3-Luc del plásmido pEL8 empleando la enzima de restricción BamHI. El gen de luciferasa se sustituyó por el gen Fas-c [compuesto de los dominios extracelular e intramembrana de TNF-R1 (receptor 1 del factor de necrosis tumoral humano, SEQ ID NO:4) y el dominio intracelular de Fas (p55) (SEQ ID NO:8) (Boldin *et al.*, JBC, 1995)] para obtener
- 55 el módulo PPE-1-3X-Fas-c.

Plásmido PPE-1 (3X)-Fas-c - El módulo después se introdujo en el esqueleto del plásmido mediante digestión de restricción, produciendo el plásmido PPE-1 (3X)-Fas-c.

Plásmido adaptador-PPE-1(3X)-Fas-c - Se extrajo el elemento PPE-1-3X-Fas-c de la construcción del plásmido PPE-1-3X-Fas-c de primera generación, y se amplificó con cebadores de PCR indicados, introduciendo sitios de restricción SnaBI y EcoRI en los extremos 5' y 3', respectivamente. Estos sitios se emplearon para clonar el fragmento PPE-Fas-c en el plásmido adaptador digerido con SnaBI y EcoRI, produciendo el adaptador-PPE-1-3X-Fas-c usado para la transfección de las células hospedantes (por ejemplo, células PER.C6).

Ejemplo 2: Administración de bevacizumab a pacientes previamente tratados con Ad5-PPE-1-3X-Fas-c

OBJETIVOS: Los objetivos de este estudio son: (i) evaluar la seguridad, la tolerabilidad y la eficacia de dosis individuales y múltiples de VB-111 (1×10^{12} , 3×10^{12} , 1×10^{13} partículas víricas [PV]) en pacientes con glioblastoma multiforme recurrente ("recurrent glioblastoma multiforme", GBM); (ii) evaluar la distribución de VB-111 después de múltiples infusiones IV y el nivel de anticuerpos contra el vector adenovírico; y (iii) evaluar la seguridad, la tolerabilidad y la eficacia de un tratamiento de combinación de múltiples dosis de VB-111 (3×10^{12} , o 1×10^{13} partículas víricas) junto con bevacizumab en pacientes con GBM recurrente. Un ejemplo de dicho régimen de tratamiento se muestra en la figura 1.

El VB-111 y el bevacizumab son ambos agentes antiangiogénicos que se dirigen a la vasculatura del tumor. Sin embargo, se basan en dos MOA (mecanismos de acción) distintos: el bevacizumab antagoniza a VEGF, mientras que VB-111 altera directamente los vasos angiogénicos.

Selección de pacientes

Criterios de inclusión

Los sujetos deben presentar un diagnóstico confirmado mediante histología de glioblastoma multiforme o gliosarcoma. Los sujetos con enfermedad recurrente cuya patología de diagnóstico confirma un glioblastoma multiforme o gliosarcoma no necesitan volver a someterse a biopsia;

Enfermedad mensurable mediante los criterios RANO (véase Selección, Día -21-0); véase también la tabla 8 en el ejemplo 4;

Sujetos ≥ 18 años;

Progresión de la enfermedad o recurrencia después de un tratamiento convencional con temozolomida y radiación;

Un intervalo de al menos 4 semanas entre una resección quirúrgica previa y el alistamiento en el estudio;

Un intervalo de al menos 12 semanas entre una radioterapia previa o al menos 4 semanas desde una quimioterapia previa, y el alistamiento en este protocolo;

Recuperado hasta el grado 1 o menor de los efectos tóxicos de cualquier intervención anterior;

Estado de actuación de Karnofsky de al menos 60%;

Función renal, hepática y de médula ósea adecuadas según los siguientes criterios:

- Recuento absoluto de neutrófilos ≥ 1500 células/ml

- Plaquetas ≥ 125.000 células/ml

- Bilirrubina total dentro del límite superior del normal ("upper limit of normal", ULN)

- Aspartato aminotransferasa (AST) $\leq 2,5 \times$ ULN institucional

- Creatinina menor o igual al ULN o eliminación de la creatinina ≥ 50 ml/min para pacientes con niveles de creatinina por encima de los límites normales (eliminación de la creatinina calculada mediante la fórmula de Cockcroft-Gault, véase apéndice II).

- PT, PTT (en segundos) prolongados más allá de $>20\%$ de los límites superiores del normal.

Los sujetos deben tratarse con corticosteroides en el día 0. Los sujetos que ya están recibiendo esteroides deben mantenerse en una dosis estable durante al menos 1 semana antes de la inclusión sin que se prevea la necesidad de aumentar la dosis de esteroides durante el estudio;

Capacidad para comprender y voluntad de firmar un documento de consentimiento informado escrito;

Los hombres y las mujeres fértiles deben utilizar un método anticonceptivo convencional durante el desarrollo del ensayo.

Criterios de elegibilidad adicionales para las cohortes 1 y 2:

Sujetos sin efecto de masa importante del tumor (definido como desplazamiento <5 mm, sin hernia).

Criterios de elegibilidad adicionales para las cohortes 3-4 para más dosificaciones:

- 5 Sujetos que recibieron VB-111 al menos hace 2 meses y siguen sin presentar indicios de progresión de la enfermedad durante al menos 2 meses después de la dosificación. Nota: Los sujetos que recibieron la primera dosis más de 2 meses antes de la aprobación de esta modificación de múltiples dosis pueden ser elegidos para recibir la 2ª dosis más tarde de 2 meses después de la primera dosis, con la condición de que se mantengan con una enfermedad estable. Los sujetos que han progresado más tarde de 2 meses después de la dosis de línea de base pueden ser elegidos para el protocolo de uso compasivo VB-111-122-CU. Los sujetos que progresaron antes de 2 meses después de la dosificación abandonarán el estudio.

En los sujetos que sufrieron un acontecimiento adverso relacionado con el fármaco VB-111 y que están programados para repetir la dosis, esta se retrasará hasta que la gravedad del acontecimiento no sea mayor que CTCAE de grado 1.

- 15 En los sujetos que sufrieron una prolongación de un PTT y que están programados para repetir la dosis, esta se retrasará hasta que el PTT se haya normalizado, volviendo a dentro del 20% del valor de línea de base, tanto si cualquier ensayo de LAC o APLA positivo se haya o no normalizado. Los sujetos con acontecimientos de sangrado o trombóticos clínicamente significativos relacionados con un PTT prolongado no deberían recibir más dosis de VB-111.

Criterios de exclusión

- 20 Terapia antiangiogénica previa que incluye agentes secuestrantes de VEGF (concretamente, bevacizumab, aflibercept, etc.) o inhibidores de VEGFR (cedirinib, pazopanib, sunitinib, sorafenib, etc.);

Radioterapia estereotáctica previa;

Mujeres embarazadas o que están dando el pecho;

- 25 Medicación concomitante que pueda interferir con los resultados del estudio, por ejemplo, agentes inmunosupresores distintos de corticosteroides;

Infección activa;

Evidencia de hemorragia del SNC de CTCAE de grado 2 o mayor en MRI de línea de base;

Previsión de recibir cirugía durante el periodo del estudio;

Sujetos que han padecido un acontecimiento cardíaco agudo dentro de los últimos 12 meses;

- 30 Sujetos con enfermedad vascular activa, miocárdica o periférica (concretamente, síndrome coronario agudo, ictus cerebral, ataque isquémico transitorio o trombosis arterial, o enfermedad vascular periférica sintomática dentro de los últimos 3 meses);

Sujetos con retinopatía proliferativa y/o vascular conocida;

- 35 Sujetos con enfermedad hepática conocida (alcohólica, inducida por fármacos/toxinas, genética, o autoinmunitaria);

Sujetos con malignidades secundarias activas conocidas;

Sujetos que son positivos a uno de los siguientes virus: VIH, VHB y VHC;

Sujetos que se han sometido a cirugía mayor dentro de las últimas 4 semanas antes del alistamiento;

- 40 Sujetos que no han recibido ningún otro agente de investigación dentro de las últimas 4 semanas antes del alistamiento;

Enfermedades intercurrentes descontroladas que incluyen, pero no se limitan a una infección en curso o activa, insuficiencia cardíaca congestiva sintomática, angina de pecho inestable, arritmia cardíaca o enfermedad psiquiátrica/situaciones sociales que limiten el cumplimiento de los requisitos del estudio.

Criterios de exclusión exclusivos del bevacizumab

- 45 Hipertensión no controlada adecuadamente (definida como presión sanguínea sistólica >150 mmHg y/o presión sanguínea diastólica >100 mmHg) dentro de 28 días del primer tratamiento del estudio;

Historia previa de crisis hipertensiva, encefalopatía hipertensiva, síndrome de leucoencefalopatía posterior reversible ("reverse posterior leukoencephalopathy syndrome", RPLS);

Historia previa de perforación gastrointestinal o abscesos;

5 Enfermedad cardiovascular clínicamente significativa (es decir, activa), por ejemplo, accidentes cerebrovasculares ≤ 6 meses antes del alistamiento en el estudio, infarto de miocardio ≤ 6 meses antes del alistamiento en el estudio, angina inestable, insuficiencia cardíaca congestiva ("congestive heart failure", CHF) de grado II o mayor según New York Heart Association (NYHA), o arritmia cardíaca grave no controlada mediante medicación o que potencialmente pueda interferir con el tratamiento del protocolo;

10 Historia o evidencia tras un examen físico/neurológico de una enfermedad del sistema nervioso central (por ejemplo, ataques) no relacionada con cáncer o que potencialmente pueda interferir con el tratamiento del protocolo (a menos que se controle de modo adecuado mediante medicación);

15 Enfermedad vascular significativa (por ejemplo, aneurisma aórtico que requiere reparación quirúrgica o trombosis arterial reciente) dentro de los 6 meses anteriores al inicio del tratamiento del estudio. Cualquier tromboembolia venosa previa >acontecimiento adverso de criterio de toxicidad común de NCI ("common toxicity criteria adverse event", CTCAE) de grado 3;

Historia de hemorragia/hemoptisis pulmonar $\geq$ grado 2 (definida como $\geq 2,5$ ml de sangre de color rojo brillante por episodio) dentro de 1 mes del primer tratamiento del estudio;

Historia o evidencia de diatesis sangrante heredada o coagulopatía significativa en riesgo de sangrado (es decir, en ausencia de anticoagulación terapéutica);

20 Uso actual o reciente (dentro de 10 días del alistamiento del estudio) de aspirina (>325 mg/día), clopidogrel (>75 mg/día) o equivalentes. Se permite el uso profiláctico de anticoagulantes;

25 Procedimiento quirúrgico (incluyendo biopsia previa, resección quirúrgica, revisión de heridas o cualquier otra cirugía mayor que implique la entrada en una cavidad corporal) o lesión traumática significativa dentro de 28 días antes del primer tratamiento del estudio, o previsión de necesitar un procedimiento de cirugía mayor durante el desarrollo del estudio;

Procedimiento de cirugía menor, por ejemplo, biopsia estereotáctica, dentro de 7 días del primer tratamiento del estudio; colocación de un dispositivo de acceso vascular, dentro de 2 días del primer tratamiento del estudio;

Historia de abscesos intracraneales dentro de 6 meses antes del primer tratamiento del estudio;

Historia de sangrado gastrointestinal activo dentro de 6 meses antes del primer tratamiento del estudio;

30 Herida no curada grave, úlcera activa o fractura de hueso no tratada;

Hipersensibilidad conocida a cualquier componente del bevacizumab o a cualquiera de los fármacos del estudio.

Proteinuria durante la selección, demostrada por:

- Proteína de la orina: proporción de creatinina (UPC) $\geq 1,0$ en la selección, o

35 - Tiras reactivas para la orina para la proteinuria $\geq 2+$ (los pacientes que presentan $\geq 2+$ de proteinuria tras un análisis con tiras reactivas para la orina en la línea de base deben someterse a una recogida de orina de 24 horas y deben mostrar ≤ 1 g de proteína en 24 horas para poder ser elegidos).

Plan de tratamiento

40 Este será un estudio de fase $\frac{1}{2}$, multicéntrico, con escalada de dosis, abierto y prospectivo para medir la seguridad, la tolerabilidad, la distribución y la eficacia de dosis individuales o múltiples de VB-111 administrado por vía intravenosa en pacientes con GBM recurrente.

Cohortes de dosis

El VB-111 se administrará como una única infusión intravenosa de 1×10^{12} (cohorte 1) o 3×10^{12} PV (cohorte 2), o múltiples infusiones intravenosas que consisten en una infusión inicial de 3×10^{12} , seguida de posteriores infusiones de 1×10^{13} (cohorte 3) o múltiples infusiones intravenosas de 1×10^{13} (cohorte 4).

45 Los pacientes elegibles, que hayan dado su consentimiento, se alistarán en una de cuatro cohortes de dosificación secuencial como sigue:

Tabla 5 - Plan de dosificación

Cohorte	VB-111 (pv)	n.º de pacientes
1	1×10^{12} dosis única	3-6
2	3×10^{12} dosis única	3-6
3	3×10^{12} dosis inicial + 1×10^{13} dosis repetida	Mínimo de 3, máximo de 29
4	1×10^{13} múltiples dosis	Máximo de 49
3-4 EXT	1×10^{13} (Q2meses) + 10 mg/kg de bevacizumab (Q2semanas)	Máximo de 29

El estudio se llevará a cabo según el método de 2 etapas de Simon. Se prevé que hasta 90 sujetos se alistarán en este estudio, con hasta 29 sujetos en la cohorte 3, y hasta 49 sujetos en la cohorte 4.

- 5 La etapa uno incluirá los primeros 10 pacientes evaluables al nivel de dosis de 1×10^{13} PV o MTD.

Para el análisis de la eficacia, los pacientes evaluables se definen como los pacientes que han recibido al menos una dosis repetida de 1×10^{13} PV o de MTD, o los pacientes que han progresado antes de 2 meses después de una dosis inicial de 1×10^{13} PV.

- 10 Se considera que un sujeto responde si está vivo y sin progresión a los 6 meses o presenta al menos una respuesta tumoral parcial según los criterios de Rano dentro de 6 meses después de la dosificación. Si se observan menos de 2 respuestas en los sujetos de la etapa 1 se detendrá la etapa 2, y por lo demás se alistarán 19 sujetos más en la etapa 2.

Escalada de la dosis y toxicidad limitantes de la dosis

- 15 Las toxicidades se clasificarán según los criterios de toxicidad habituales de NCI, versión 4.0. La toxicidad limitante de la dosis ("dose limiting toxicity", DLT) es cualquier toxicidad de grado 3 o mayor que se considera que está relacionada con el fármaco y que no responde a una terapia médica máxima.

Cohortes 1 y 2:

Se alistaron tres sujetos secuencialmente para recibir 1×10^{12} (cohorte 1) y se observaron durante 28 días para el control de DLT. No se produjeron DLT en la cohorte 1 y el estudio siguió con la cohorte 2.

- 20 Se alistaron tres sujetos secuencialmente para recibir 3×10^{12} (cohorte 2) y se observaron durante 28 días para DLT. No se indicaron DLT en la cohorte 2 y el estudio siguió con la cohorte 3.

Cohorte 3:

- 25 Los sujetos de estudio se alistaron inicialmente en esta cohorte para recibir una única dosis. Tras la aprobación de la versión 6.0 del protocolo, los sujetos que permanecían estables empezaron a recibir dosis bimensuales de VB-111 tras establecer su seguridad con dosis repetidas a una tasa de 1×10^{13} PV.

Cohorte 4:

Los sujetos de estudio se alistaron secuencialmente en la cohorte de múltiples dosis 4 y recibirán VB-111 a 1×10^{13} PV cada 2 meses.

Cohortes 3-4 EXT:

- 30 Tras la progresión de la enfermedad, los sujetos recibirán una combinación de VB-111 y bevacizumab. Los primeros sujetos que reciban este tratamiento de combinación se controlarán para DLT según lo siguiente:

Etapa 1: Un mínimo de 3 sujetos recibirán dosis bimensuales de VB-111 (3×10^{12} PV) y bevacizumab dos veces semanales (10 mg/Kg).

- 35 Etapa 2: Un mínimo de 3 sujetos recibirán dosis bimensuales de VB-111 (1×10^{13} PV) y bevacizumab dos veces semanales (10 mg/Kg).

Se remite al control para las toxicidades limitantes de la dosis, a continuación, para más detalles sobre el control de DLT en las cohortes 3-4.

Control para las toxicidades limitantes de la dosis:

Se realizó un control para DLT para establecer la seguridad al inicio de cada escalada del nivel de dosis (cohortes 1-4; 1×10^{12} - 1×10^{13} PV). No se han observado DLT en este estudio hasta la fecha y, por tanto, el estudio ha seguido según lo planeado.

5 Para las cohortes 3-4 EXT:

Etapas 1: Tras cada aprobación del IRB local de esta modificación del protocolo (7.0), los primeros tres sujetos que progresaron después de recibir al menos una dosis de 1×10^{13} PV (inicial o repetida) recibirán una combinación de una dosis reducida de VB-111 (3×10^{12} PV) y bevacizumab (10 mg/kg). Estos sujetos se controlarán para DLT tras esta primera dosis de combinación [puesto que es necesario un mínimo de 2 meses entre las dosis de VB-111, si un sujeto progresa antes de 2 meses, el sujeto empezará el tratamiento con bevacizumab (10 mg/kg) cada 2 semanas, y a los 2 meses desde la última dosis de VB-111, el sujeto recibirá la dosis de 3×10^{12} PV de VB-111].

Entre los primeros 3 sujetos alistados, si se observa 1 DLT dentro de 4 semanas después de la dosis de combinación inicial, 3 sujetos adicionales recibirán una dosis de combinación y se volverá a evaluar la seguridad.

Si dos de seis sujetos que han recibido una dosis de combinación de VB-111 (3×10^{12} PV) y bevacizumab (10 mg/kg) sufren un DLT, la dosificación en las cohortes 3-4 EXT se detendrá, y todos los sujetos que han progresado recibirán un seguimiento a largo plazo y para la supervivencia.

Si no se observan DLT o solo se observa 1 DLT en 6 pacientes, las dosificaciones posteriores aumentarán hasta los niveles de la etapa 2: VB-111 (1×10^{13} PV) y bevacizumab (10 mg/kg), véase a continuación.

Se alistaron tres sujetos secuencialmente y recibieron 3×10^{12} PV y bevacizumab (10 mg/kg), y se observaron durante 28 días para DLT. No se han observado DLTs en este estudio hasta la fecha y, por tanto, el estudio ha seguido según lo planeado hasta la terapia de combinación de la etapa 2: VB-111 (1×10^{13} PV) y bevacizumab (10 mg/kg), véase a continuación.

Etapas 2:

El control de DLT se realizará para un mínimo de 3 sujetos durante 4 semanas desde la primera dosis de combinación de VB-111 (1×10^{13} PV) y bevacizumab (10 mg/kg).

Entre los primeros 3 sujetos alistados en la dosificación de la etapa 2, si se observa 1 DLT dentro de 4 semanas después de la dosis de combinación inicial, 3 sujetos adicionales recibirán una dosis de combinación y se volverá a evaluar la seguridad.

Si dos de seis sujetos que han recibido una dosis de combinación de VB-111 (1×10^{13} PV) y bevacizumab (10 mg/kg) sufren un DLT, todas las dosis futuras en las cohortes 3-4 EXT se reducirán hasta VB-111 a 3×10^{12} PV y bevacizumab (10 mg/kg).

Si no se observan DLT o solo se observa 1 DLT en 6 pacientes, todas las dosificaciones futuras de las cohortes 3-4 EXT seguirán según lo planeado: VB-111 (1×10^{13} PV) y bevacizumab (10 mg/kg).

Para tener el tiempo suficiente para controlar los DLT, el programa de las dosis de combinación requerirá la aprobación previa de VBL.

Se alistaron tres sujetos secuencialmente y recibieron 1×10^{13} PV y bevacizumab (10 mg/kg), y se observaron durante 28 días para DLT. No se han observado DLT en este estudio hasta la fecha y, por tanto, todos los sujetos siguieron y recibieron una terapia combinada de VB-111 (1×10^{13} PV) y bevacizumab (10 mg/kg).

Visitas del estudio

Selección, Día -21-0

Los pacientes prospectivos se seleccionarán dentro de 3 semanas del alistamiento. Cuando un paciente se somete a la selección, el coordinador del estudio en el sitio le adjudica un número de identificación de paciente ("Patient Identification Number", PIN), que será registrado en un registro de selección de pacientes, y será evaluado para su elegibilidad según los criterios de selección del protocolo. A los pacientes que cumplen los criterios de elegibilidad se les ofrece la oportunidad de participar. El PIN consiste en un número de centro (por ejemplo, 01) más el número del paciente en orden secuencial (por ejemplo, 001, 002, 003, etc.), de modo que el PIN completo para el centro 1 será 01001, 01002, etc.

Los pacientes serán informados de las ventajas, los riesgos y las limitaciones del estudio, y se les pedirá que firmen un formulario de consentimiento informado.

Después los pacientes se evaluarán mediante la historia médica, un examen físico y unas pruebas de laboratorio

que incluyen ECG. Los procedimientos de selección también incluyen registrar la altura, el peso, la fecha de nacimiento, el sexo y la raza del paciente.

Historia médica: Se realizará un examen físico y de la historia médica habitual dentro de 4 semanas antes del alistamiento. Se realizarán evaluaciones de laboratorio de línea de base dentro de 4 semanas antes de iniciar la terapia del protocolo y en la visita de línea de base antes de iniciar la terapia. La historia médica se centrará en enfermedades previas y/o conocidas, que incluyen posibles infecciones conocidas, tales como VHB, VIH, VHC u otras infecciones dentro del último mes, enfermedad cardíaca y enfermedad hepática. Se registran las medicaciones que se toman de modo habitual, incluyendo las que se tomaron en el último mes. Se registran los tratamientos de quimioterapia y radioterapia y/o inmunosupresores recibidos en las 12 semanas previas, así como las cirugías realizadas dentro de este periodo de tiempo. A las mujeres se les pregunta si están embarazadas o si están dando el pecho.

Durante la selección debe realizarse la determinación del estado de actuación de Karnofsky ("Karnofsky Performance Status", KPS) y ECOG.

Examen físico:

El examen físico se centrará en los órganos con tumores y las mediciones del tumor según los criterios de RANO, así como los siguientes: cabeza y cuello; ojos; pulmones; corazón; abdomen; articulaciones; circulación periférica; piel; y neurológicos.

El examen físico incluirá el registro de la altura y el peso (solo en la visita de selección).

ECG: Debe realizarse un electrocardiograma de 12 derivaciones convencional con registros de ritmo.

Análisis de laboratorio: Sangre: Se recogerá sangre en ayunas y se analiza para lo siguiente:

- Hematología: recuento sanguíneo completo con INR, PT y PTT activado
- Química: electrolitos, creatinina y urea en sangre, bilirrubina, fosfatasa alcalina, ALT y AST; calcio, proteínas totales, y albúmina,
- Ensayos de infección por virus: VIH, VHB y VHC

- Se realizará un ensayo en suero de embarazo en las mujeres fértiles

Orina: Se recoge orina para el análisis habitual y se analiza con un examen microscópico para los positivos

Signos vitales: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica supina, frecuencia cardíaca periférica, temperatura, frecuencia respiratoria) durante la selección.

Medición del tumor: Se tomarán imágenes de MRI cerebral de contraste y no contraste durante la selección y dentro de 72 horas de la visita de la línea de base para evaluar la magnitud del cáncer. Si transcurren menos de 2 semanas entre las visitas de selección y de línea de base, solo será necesario 1 MRI.

Embarazo: Las mujeres elegibles serán informadas de las restricciones especiales con respecto al embarazo y a la lactancia durante el periodo del estudio. Tanto los hombres como las mujeres se comprometerán a usar un método anticonceptivo convencional de modo habitual durante el periodo del estudio que comienza desde la selección. Los hombres y las mujeres no deben intentar tener hijos, y las mujeres no deben quedarse embarazadas o dar el pecho mientras participen en este estudio. Si son sexualmente activos, tanto los hombres como las mujeres deben usar un método anticonceptivo eficaz desde la visita de selección y hasta un año después del tratamiento. Los anticonceptivos de barrera (condones o diafragmas) con espermicida, los dispositivos intrauterinos, los anticonceptivos hormonales (Depo-Provera, Norplant), las píldoras anticonceptivas orales, y la abstinencia total son ejemplos de métodos eficaces.

Selección de pacientes final: La decisión final acerca de la elegibilidad del paciente que se va a alistar se realizará después de que todas las evaluaciones de selección estén disponibles. Todos los criterios de inclusión y de exclusión deben cumplirse. La razón para todos los fracasos de selección se incluirá en el registro de selección.

Línea de base (administración del fármaco de estudio), día 0

El VB-111 se administrará como paciente externo. Tras haber determinado que el sujeto es elegible, se le indicará que se presente en el centro clínico dentro de 3 semanas desde la selección en ayunas hasta 30 minutos después de la administración del fármaco de estudio.

Antes de la dosificación (D0): En el día de la admisión en el sitio, cada sujeto será verificado para la elegibilidad según los criterios de inclusión/exclusión (según sea pertinente) y después se ensayará dentro de 24 horas antes de la dosificación para las siguientes evaluaciones.

Análisis de laboratorio (según el manual de ejecución):

Se recogerán muestras de sangre para las siguientes evaluaciones:

- Hematología: hemoglobina, recuento sanguíneo completo con diferencial, INR, PT y PTT activado;
- Química: electrolitos, creatinina y nitrógeno de urea en sangre, bilirrubina, fosfatasa alcalina, ALT y AST, calcio, proteínas totales, y albúmina;
- Anticuerpos, biodistribución (niveles de ADN del adenovirus VB-111) y determinación de la expresión de transgenes.
- Muestras de biomarcadores angiogénicos/citoquinas:
 - Niveles de factor de von Willebrand (vWF) y TNF α (opcional).

- 10 - Además, muestras de sangre para TNF, sTNFR1, sTNFR2, VEGF, FGF, IL-6, IL-8, E-selectina, ICAM-1

Se recogerá orina para las siguientes evaluaciones:

- Análisis de orina habitual
- Solo cohortes 1-2: Biodistribución (niveles de ADN del adenovirus VB-111)

- 15 Signos vitales: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica supina, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria) 15 minutos antes de la dosificación.

Tratamiento antipirético: Para evitar la fiebre después de la administración del fármaco del estudio, todos los pacientes recibirán 1000 mg de acetaminofeno comenzando 1-2 horas antes de la dosificación, seguido de 500 mg PRN 24 horas.

- 20 Tratamiento con corticosteroides: Para reducir la respuesta potencial de edema durante la administración del fármaco se administrará un tratamiento de dexametasona:

Dosis inicial con VB-111: Se administrarán 10 mg 30 minutos antes de la dosificación, seguido de 4 mg $\times$ 2/día durante 14 días después de la dosificación. Dosis posteriores con VB-111: Se administrarán 10 mg 30 minutos antes de la dosificación, seguido de 4 mg $\times$ 2/día durante 3 días después de la dosificación. Se administrarán más tratamientos con corticosteroides según lo decida el investigador. Si cuando los sujetos comienzan el estudio ya están recibiendo esteroides, el investigador debe intentar por cualquier medio no cambiar la dosis de esteroides dentro de 5 días de la evaluación de la enfermedad, a menos que esté clínicamente garantizado. La decisión de continuar con los esteroides o de empezar a disminuirlos gradualmente después de este periodo de tiempo será tomada por el investigador.

- 30 Administración del fármaco de estudio: La preparación del fármaco y la infusión se realizarán según el manual de ejecución. El tiempo máximo del fármaco en disolución salina es de 1,5 horas a temperatura ambiente. Los viales deben abrirse en una cabina de seguridad biológica. El VB-111 se infundirá al paciente a la dosificación pertinente según el peso del paciente, según el manual de ejecución. Para pacientes con un peso menor que 50 kg, la dosis de 3×10^{12} o 1×10^{13} PV se reducirá en 30%. El VB-111 debe administrarse a 1 ml/minuto o 3 ml/minuto (solo 1×10^{13} PV). Se permitirá una comida normal 0,5 horas después de la dosificación. Tal como se había planeado previamente, los primeros tres sujetos que reciben una dosis repetida de 1×10^{13} PV (tras una dosis previa de 3×10^{12} PV en la cohorte 3 o una dosis inicial de 1×10^{13} PV en la cohorte 4) se controlaron en un entorno de pacientes internos durante un periodo 8 horas después de sus infusiones. No se indicaron acontecimientos adversos relacionados con la tasa de infusión.

Hasta 6 horas después de la administración del fármaco, día 0:

- 40 Análisis de laboratorio:

Biodistribución: Se recogerán muestras de sangre para las determinaciones de los niveles de expresión del ADN del adenovirus VB-111 en los siguientes momentos:

- 0 (antes de la dosificación, véase anteriormente)
- Al final de la infusión

- 45 - $3 \pm 0,5$ horas

- $6 \pm 0,5$ horas

Solo cohortes 1-2: Se recogerán muestras de orina para las determinaciones de los niveles de ADN del adenovirus

VB-111:

- 0 (antes de la dosificación, véase anteriormente)

- Entre 0-3 horas

- Entre 3-6 horas

5 Muestras de biomarcadores angiogénicos/citoquinas: Se recogerán muestras de sangre a las 6 horas después de la dosis para determinar:

- Niveles de factor de von Willebrand (vWF) y TNF α (opcional).

- Además, muestras de sangre para TNF, sTNFR1, sTNFR2, VEGF, FGF, IL-6, IL-8, E-selectina, ICAM-1

10 Signos vitales: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria) a los 30 y 60 minutos después de la dosificación, y a las 4 y 6 horas después de la dosificación y/o tras la desaparición de cualquier acontecimiento adverso, cualquiera que suceda primero.

15 Acontecimientos adversos: Se emplearán medidas de apoyo total para todos los pacientes con un acontecimiento adverso. Todos los acontecimientos adversos que aparezcan después de la administración del fármaco se documentarán en los formularios de informe del caso ("case report forms", CRF), junto con la intensidad, las medidas terapéuticas aplicadas, el resultado y la relación con el fármaco investigado. Los acontecimientos adversos relacionados se seguirán hasta la resolución. Los acontecimientos adversos no relacionados se seguirán hasta la resolución o el final del estudio.

20 Medicaciones concomitantes: No existen restricciones acerca de medicaciones concomitantes, más allá de los fármacos listados en los criterios de exclusión. Sin embargo, el VB-111 no debe mezclarse con otros fármacos. Toda la medicación concomitante administrada durante el estudio se documentará desde la línea de base durante toda la participación o hasta la visita de terminación temprana.

25 Otros análisis de laboratorio: Las muestras para los análisis de laboratorio extraídas en respuesta a un acontecimiento clínicamente importante serán documentadas como evaluaciones de laboratorio no programadas. Cuando aparezcan valores de laboratorio anómalos clínicamente importantes, los ensayos se seguirán realizando hasta que los valores vuelvan al intervalo normal y/o hasta que se encuentre una explicación adecuada a la anomalía. Estas investigaciones en el laboratorio se realizarán en el sitio del estudio, excepto para las evaluaciones de distribución, que se enviarán a un laboratorio central independiente. Si alguno de estos resultados requiere de confirmación, se volverán a realizar los ensayos en el mismo laboratorio hospitalario cuando sea posible. A cada laboratorio hospitalario se le deben proporcionar los certificados de acreditación del laboratorio y los intervalos de referencia normales.

30 Seguimiento de las cohortes 1 y 2

En los días 4 ± 1 , 7 ± 1 , 14 ± 2 , 28 ± 3 , 56 ± 3 , 84 ± 3 , 112 ± 3 , 140 ± 3 , 168 ± 7 /terminación temprana, se le indicará a cada paciente que se presente en el centro clínico en ayunas para las siguientes evaluaciones.

35 Signos vitales: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica supina, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria).

Análisis de laboratorio: Se recogerá una muestra de sangre para las siguientes evaluaciones:

- Anticuerpos, biodistribución (niveles de ADN del adenovirus VB-111) y determinación de la expresión de transgenes.

40 - Hematología: hemoglobina, recuento sanguíneo completo, INR, PT y PTT activado

- Química: electrolitos, creatinina y nitrógeno de urea en sangre, bilirrubina, fosfatasa alcalina, ALT y AST, calcio, proteínas totales, y albúmina

Las muestras para los análisis de laboratorio extraídas en respuesta a un acontecimiento clínicamente importante serán documentadas como evaluaciones de laboratorio no programadas.

45 Se recogerán muestras de orina para:

- Análisis de orina habitual

- Determinaciones de los niveles de ADN del adenovirus VB-111

ECG: Se realizará un ECG en el día 28 y el día 168/visita de abandono temprano (si es anterior al día 28).

Mediciones del tumor: La supervisión después del estudio incluirá barridos de MRI cada 2 meses hasta 1 año después de la dosificación, y después cada 3 meses hasta 2 años después de la dosificación, o hasta la progresión. Además, en estos momentos se registrarán los signos vitales.

5 Periodo de seguimiento después de terminar: Los pacientes que progresaron y/o abandonaron el estudio recibirán un seguimiento mediante contacto telefónico cada 2 meses para la supervivencia.

Seguimiento de las cohortes 3 y 4: Día 4 tras la dosis del D0, días 56 y 112 (es decir, días 4, 60 y 116)

En la fecha de aprobación de esta modificación (modificación 11), ya no es necesaria la visita del día 4 para ningún sujeto de este ensayo. Antes de la aprobación de esta modificación, se realizó la siguiente visita clínica (en cursiva):

10 *En 4º día después de la dosis del D0, D56 y D112, se indicará a cada paciente que se presente en el centro clínico en ayunas para las siguientes evaluaciones:*

Signos vitales: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica supina, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria).

Análisis de laboratorio: Se recogerán muestras de sangre para las siguientes evaluaciones:

15 *- Hematología: hemoglobina, recuento sanguíneo completo con diferencial, INR, PT y PTT activado: en el caso de prolongación de PTT por encima de ULN, remítase a la sección 6.2 Retraso/modificación de la dosis para más instrucciones.*

- Química: electrolitos, creatinina y nitrógeno de urea en sangre, bilirrubina, fosfatasa alcalina, ALT y AST, calcio, proteínas totales, y albúmina;

20 *- Anticuerpos, biodistribución (niveles de ADN del adenovirus VB-111) y determinación de la expresión de transgenes.*

- Muestras de biomarcadores angiogénicos/citoquinas:

- Niveles de factor de von Willebrand (vWF) y TNFα (opcional).

- Además, muestras de sangre para TNF, sTNFRI, sTNFRII, VEGF, FGF, IL-6, IL-8, E-selectina, ICAM-1

Se recogerá orina para las siguientes evaluaciones:

25 *- Análisis de orina habitual*

30 *Acontecimientos adversos: En la visita de seguimiento, se preguntará al paciente acerca de posibles acontecimientos adversos que puedan haber aparecido desde el día de la última visita. Todos los acontecimientos adversos se documentarán en los formularios de informe del caso (CRF), junto con la intensidad, las medidas terapéuticas aplicadas, el resultado y la relación con el fármaco investigado. Los acontecimientos adversos relacionados se seguirán hasta la resolución. Los acontecimientos adversos no relacionados se seguirán hasta la resolución o el final del estudio.*

35 *Medicaciones concomitantes: En la visita de seguimiento al investigador, se preguntará al paciente acerca de posibles medicaciones que puedan haber tomado desde el día de la última visita. Todas las medicaciones concomitantes se registrarán con el nombre genérico, la indicación, la dosificación, las unidades, la frecuencia y las fechas de inicio y de fin.*

Tras el análisis de los primeros 6 sujetos que participan en la cohorte 3 y los primeros 6 sujetos que participan en la cohorte 4, se determinará si esta visita (día 4 después de los días 56 y 112), puede eliminarse para cada cohorte.

Se debe realizar un contacto telefónico de seguimiento de seguridad 14 días después de la visita de la segunda dosis (día 56) para los primeros 3-6 sujetos en cada cohorte 3 y 4 para asegurarse de que no hayan aparecido DLT.

40 Seguimiento de las cohortes 3 y 4: Contacto telefónico de seguridad cada mes alterno entre las visitas de dosificación

45 En la fecha de aprobación de esta modificación (versión 7.0), las visitas de los días 28 y 84 al centro clínico ya no son necesarias para ningún sujeto de este ensayo. Debe realizarse una llamada telefónica cada mes alterno entre las visitas de dosificación (días 28, 84, 140, etc.) al sujeto para preguntarle acerca de AE ("adverse event", acontecimiento adverso) y cambios en la medicación.

Antes de la aprobación de esta modificación, se realizó la siguiente visita clínica:

Un mes después de las primeras dos infusiones (es decir, en D28 y día 84), se indicará a cada paciente que se presente en el centro clínico en ayunas para las siguientes evaluaciones:

Signos vitales: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica supina, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria).

Análisis de laboratorio: Se recogerá una muestra de sangre para las siguientes evaluaciones:

- 5 - Hematología: hemoglobina, recuento sanguíneo completo, INR, PT y PTT activado: en el caso de prolongación de PTT por encima de ULN, remítase a la sección 6.2 Retraso/modificación de la dosis para más instrucciones.
- Química: electrolitos, creatinina y nitrógeno de urea en sangre, bilirrubina, fosfatasa alcalina, ALT y AST, calcio, proteínas totales, y albúmina
- Anticuerpos, biodistribución (niveles de ADN del adenovirus VB-111) y determinación de la expresión de transgenes.
- 10 - Muestras de biomarcadores angiogénicos/citoquinas:
 - Niveles de factor de von Willebrand (vWF) y TNF α (opcional).
 - Además, muestras de sangre para TNF, sTNFRI, sTNFRII, VEGF, FGF, IL-6, IL-8, E-selectina, ICAM-1

Las muestras para los análisis de laboratorio extraídas en respuesta a un acontecimiento clínicamente importante serán documentadas como evaluaciones de laboratorio no programadas.

- 15 Se recogerá una muestra de orina para: Análisis de orina habitual

Medición del tumor: Los sujetos se evaluarán para la respuesta usando la formación de imágenes de resonancia magnética cerebral con y sin contraste (MRI), basándose la evaluación en los criterios de RANO.

- 20 Acontecimientos adversos: En la visita de seguimiento al investigador, se preguntará al paciente acerca de posibles acontecimientos adversos que puedan haber aparecido desde el día de la última visita. Deben emplearse medidas de apoyo total en los pacientes con cualquier acontecimiento adverso. Todos los acontecimientos adversos se documentarán en los formularios de informe del caso (CRF), junto con la intensidad, las medidas terapéuticas aplicadas, el resultado y la relación con el fármaco investigado. Los acontecimientos adversos relacionados se seguirán hasta la resolución. Los acontecimientos adversos no relacionados se seguirán hasta la resolución o el final del estudio.

- 25 Medicaciones concomitantes: En la visita de seguimiento al investigador, se preguntará al paciente acerca de posibles medicaciones que puedan haber tomado desde el día de la última visita. Todas las medicaciones concomitantes se registrarán con el nombre genérico, la indicación, la dosificación, las unidades, la frecuencia y las fechas de inicio y de fin.

- 30 Posterior administración de VB-111 a las cohortes 3 y 4 (cada 2 meses después de la dosis inicial: día 56, día 112, día 168, mes 8, etc.)

En el día de admisión al sitio, cada sujeto volverá a ser verificado para la elegibilidad según los criterios de inclusión/exclusión (según sea pertinente) y después se ensayará dentro de 24 horas antes de la dosificación. Los sujetos sin evidencia de enfermedad progresiva serán considerados para una dosificación posterior.

Esta visita y la dosificación de VB-111 se repetirán cada 2 meses hasta la progresión de la enfermedad.

- 35 Se realizarán las siguientes evaluaciones:

Medición del tumor: Los sujetos se evaluarán para la respuesta usando la formación de imágenes de resonancia magnética cerebral con y sin contraste (MRI), basándose la evaluación en los criterios de RANO. La formación de imágenes MRI se realizará hasta 72 horas antes de la dosificación para evaluar la magnitud del cáncer.

- 40 Examen físico: El examen físico se centrará en los órganos con tumores y las mediciones del tumor según los criterios de RANO, así como los siguientes: cabeza y cuello; ojos; pulmones; corazón; abdomen; articulaciones; circulación periférica; piel; y neurológicos.

ECG (solo día 56): Debe realizarse un electrocardiograma de 12 derivaciones convencional con registros de ritmo.

Análisis de laboratorio (según el manual de ejecución): Se recogerá una muestra de sangre para las siguientes evaluaciones:

- 45 - Hematología: hemoglobina, recuento sanguíneo completo con diferencial, INR, PT y PTT activado: en el caso de prolongación de PTT por encima de ULN, remítase a la sección 6.2 Retraso/modificación de la dosis para más instrucciones.
- Química: electrolitos, creatinina y nitrógeno de urea en sangre, bilirrubina, fosfatasa alcalina, ALT y AST, calcio,

proteínas totales, y albúmina;

- Anticuerpos, biodistribución (niveles de ADN del adenovirus VB-111) y determinación de la expresión de transgenes.

5 - Se recogerán muestras de biomarcadores angiogénicos/citoquinas antes de la dosificación y 6 horas después de la dosificación solo cuando el paciente se observa durante un mínimo de 6 horas después de la dosis (a discreción del investigador):

- Niveles de factor de von Willebrand (vWF) y TNF α (opcional).

- Además, muestras de sangre para TNF, sTNFRI, sTNFRII, VEGF, FGF, IL-6, IL-8, E-selectina, ICAM-1

- Ensayo en suero de embarazo

10 Se recogerá orina para la siguiente evaluación: Análisis de orina habitual

Signos vitales: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica supina, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria) 15 minutos antes de la dosificación.

15 Tratamiento antipirético: Para evitar la fiebre después de la administración del fármaco del estudio, todos los pacientes recibirán 1000 mg de acetaminofeno 1-2 horas antes de la dosificación, seguido de 500 mg cada 4 horas durante 24 horas.

20 Tratamiento con corticosteroides: Para reducir la respuesta potencial de edema durante la administración del fármaco se administrará un tratamiento de dexametasona: Dosis posteriores con VB-111: Se administrarán 10 mg 30 minutos antes de la dosificación, seguido de 4 mg $\times$ 2/día durante 3 días después de la dosificación. Se administrarán más tratamientos con corticosteroides según lo decida el investigador. Si cuando los sujetos comienzan el estudio ya están recibiendo esteroides, el investigador debe intentar por cualquier medio no cambiar la dosis de esteroides dentro de 5 días de la evaluación de la enfermedad, a menos que esté clínicamente garantizado. La decisión de continuar con los esteroides o de empezar a disminuirlos gradualmente después de este periodo de tiempo será tomada por el investigador.

25 Administración del fármaco de estudio: La infusión se realizará según el manual de ejecución. Antes de la infusión, la disolución salina debe llevarse a temperatura ambiente. Los viales deben abrirse en una cabina de seguridad biológica e inyectarse en disolución salina normal para infusión según el manual de ejecución. La disolución final para la administración debe administrarse no más de 90 minutos después de la preparación. El VB-111 se infundirá al paciente a la dosificación pertinente según el peso del paciente, según se detalla en el manual de ejecución. Para pacientes con un peso menor que 50 kg, la dosis de 3×10^{12} o 1×10^{13} PV se reducirá en 30%. Las infusiones intravenosas del VB-111 diluido deben administrarse a 1 ml/minuto o 3 ml/minuto (solo 1×10^{13} PV). Se permitirá una comida normal 0,5 horas después de la dosificación.

35 Acontecimientos adversos: Se emplearán medidas de apoyo total para todos los pacientes con un acontecimiento adverso. Todos los acontecimientos adversos que aparezcan después de la administración del fármaco se documentarán en los formularios de informe del caso (CRF), junto con la intensidad, las medidas terapéuticas aplicadas, el resultado y la relación con el fármaco investigado. Los acontecimientos adversos relacionados se seguirán hasta la resolución. Los acontecimientos adversos no relacionados se seguirán hasta la resolución o el final del estudio.

40 Medicaciones concomitantes: No existen restricciones acerca de medicaciones concomitantes, más allá de los fármacos listados en los criterios de exclusión. Sin embargo, el VB-111 no debe mezclarse con otros fármacos. Toda la medicación concomitante administrada durante el estudio se documentará desde la línea de base hasta el día 168 o la visita de terminación temprana.

45 Otros análisis de laboratorio: Las muestras para los análisis de laboratorio extraídas en respuesta a un acontecimiento clínicamente importante serán documentadas como evaluaciones de laboratorio no programadas. Cuando aparezcan valores de laboratorio anómalos clínicamente importantes, los ensayos se seguirán realizando hasta que los valores vuelvan al intervalo normal y/o hasta que se encuentre una explicación adecuada a la anomalía. Estas investigaciones en el laboratorio se realizarán en el sitio del estudio, excepto para las evaluaciones de distribución, que se enviarán a un laboratorio central independiente. Si alguno de estos resultados requiere de confirmación, se volverán a realizar los ensayos en el mismo laboratorio hospitalario cuando sea posible. A cada laboratorio hospitalario se le deben proporcionar los certificados de acreditación del laboratorio y los intervalos de referencia normales.

50 Hasta 6 horas después de la administración del fármaco:

En la fecha de aprobación de esta modificación (modificación 11), ya no es necesario el periodo de observación de 6 horas para ningún sujeto de este ensayo.

Antes de la aprobación de esta modificación, se realizó la siguiente visita clínica (en cursiva):

Análisis de laboratorio: Biodistribución: Se recogerá una muestra de sangre para las determinaciones de los niveles de expresión del ADN del adenovirus VB-111 en los siguientes momentos:

- 0 (antes de la dosificación, véase anteriormente)

5 *- Al final de la infusión*

- 3 ± 0,5 horas

- 6 ± 0,5 horas

Muestras de biomarcadores angiogénicos/citoquinas: Se recogerán muestras de sangre a las 6 horas después de la dosis para determinar:

10 *- Niveles de factor de von Willebrand (vWF) y TNFα (opcional).*

- Además, muestras de sangre para TNF, sTNFR1, sTNFR2, VEGF, FGF, IL-6, IL-8, E-selectina, ICAM-1

Signos vitales: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria) a los 30 y 60 minutos después de la dosificación, y a las 4 y 6 horas después de la dosificación y/o tras la desaparición de cualquier acontecimiento adverso, cualquiera que suceda primero.

15 *Acontecimientos adversos: Se emplearán medidas de apoyo total para todos los pacientes con un acontecimiento adverso. Todos los acontecimientos adversos que aparezcan después de la administración del fármaco se documentarán en los formularios de informe del caso (CRF), junto con la intensidad, las medidas terapéuticas aplicadas, el resultado y la relación con el fármaco investigado. Los acontecimientos adversos relacionados se seguirán hasta la resolución. Los acontecimientos adversos no relacionados se seguirán hasta la resolución o el final del estudio.*

20 *Medicaciones concomitantes: No existen restricciones acerca de medicaciones concomitantes, más allá de los fármacos listados en los criterios de exclusión. Sin embargo, el VB-111 no debe mezclarse con otros fármacos. Toda la medicación concomitante administrada durante el estudio se documentará desde la línea de base hasta el día 168 o la visita de terminación temprana.*

25 *Otros análisis de laboratorio: Las muestras para los análisis de laboratorio extraídas en respuesta a un acontecimiento clínicamente importante serán documentadas como evaluaciones de laboratorio no programadas. Cuando aparezcan valores de laboratorio anómalos clínicamente importantes, los ensayos se seguirán realizando hasta que los valores vuelvan al intervalo normal y/o hasta que se encuentre una explicación adecuada a la anomalía. Estas investigaciones en el laboratorio se realizarán en el sitio del estudio, excepto para las evaluaciones de distribución, que se enviarán a un laboratorio central independiente. Si alguno de estos resultados requiere de confirmación, se volverán a realizar los ensayos en el mismo laboratorio hospitalario cuando sea posible. A cada laboratorio hospitalario se le deben proporcionar los certificados de acreditación del laboratorio y los intervalos de referencia normales.*

30 Tras la progresión de la enfermedad: Extensión de las cohortes 3-4

Administración de VB-111+bevacizumab, cohortes 3 y 4 (cada 2 meses después de la progresión de la enfermedad)

35 *En el momento en que el sujeto sufra una progresión de la enfermedad (cualquier sujeto estable remanente de la cohorte 3 y todos los sujetos de la cohorte 4), se pedirá al sujeto que participe en una fase de extensión de este ensayo, en la que se le administrará VB-111 y bevacizumab como terapia de combinación. El VB-111 (3×10^{12} o 1×10^{13} PV, véanse las toxicidades limitantes de la dosis anteriormente) se administrará de modo bimensual y el bevacizumab se administrará de modo bisemanal.*

40 *Los sujetos serán informados de las ventajas, los riesgos y las limitaciones del estudio, y se les pedirá que firmen un formulario de consentimiento informado. Después los sujetos se evaluarán para asegurarse de que cumplen los criterios del estudio. Remítase a la sección 3.0 para los criterios de inclusión y de exclusión, que incluyen los criterios de exclusión específicos del bevacizumab.*

45 *Puesto que es necesario un mínimo de 2 meses entre las dosis VB-111, si un sujeto progresa antes de 2 meses, el sujeto empezará el tratamiento con bevacizumab (10 mg/kg) cada 2 semanas, y a los 2 meses desde la última dosis de VB-111, el sujeto recibirá la primera dosis de combinación.*

Se realizarán las siguientes evaluaciones:

50 *Medición del tumor: Los sujetos se evaluarán para la respuesta usando la formación de imágenes de resonancia*

magnética cerebral con y sin contraste (MRI), basándose la evaluación en los criterios de RANO. La formación de imágenes La MRI se realizará hasta 72 horas antes de la dosificación para evaluar la magnitud del cáncer.

- 5 Examen físico: El examen físico se centrará en los órganos con tumores y las mediciones del tumor según los criterios de RANO, así como los siguientes: cabeza y cuello; ojos; pulmones; corazón; abdomen; articulaciones; circulación periférica; piel; y neurológicos.

ECG (se realizará cada 6 meses desde la dosis de combinación inicial).

Debe realizarse un electrocardiograma de 12 derivaciones convencional con registros de ritmo.

Análisis de laboratorio (según el manual de ejecución): Se recogerá una muestra de sangre para las siguientes evaluaciones:

- 10 - Hematología: hemoglobina, recuento sanguíneo completo con diferencial, INR, PT y PTT activado: en el caso de prolongación de PTT por encima de ULN, remítase a la sección 6.2 Retraso/modificación de la dosis para más instrucciones.

- Química: electrolitos, creatinina y nitrógeno de urea en sangre, bilirrubina, fosfatasa alcalina, ALT y AST, calcio, proteínas totales, y albúmina;

- 15 - Anticuerpos, biodistribución (niveles de ADN del adenovirus VB-111) y determinación de la expresión de transgenes.

- Se recogen muestras de biomarcadores angiogénicos/citoquinas antes de la dosificación y 6 horas después de la dosificación solo cuando el paciente se observa durante un mínimo de 6 horas después de la dosis (a discreción del investigador):

- 20 - Niveles de factor de von Willebrand (vWF) y TNF α (opcional).

- Además, muestras de sangre para TNF, sTNFR1, sTNFR2, VEGF, FGF, IL-6, IL-8, E-selectina, ICAM-1

- Ensayo en suero de embarazo

Se recogerá orina para la siguiente evaluación:

- Análisis de orina habitual

- 25 - Tiras reactivas para la proteinuria

Signos vitales: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica supina, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria) 15 minutos antes de la dosificación.

- 30 Tratamiento antipirético: Para evitar la fiebre después de la administración del fármaco del estudio, todos los pacientes recibirán 1000 mg de acetaminofeno 1-2 horas antes de la dosificación, seguido de 500 mg cada 4 horas durante 24 horas.

- 35 Tratamiento con corticosteroides: Para reducir la respuesta potencial de edema durante la administración del fármaco se administrará un tratamiento de dexametasona: Dosis posteriores con VB-111: Se administrarán 10 mg 30 minutos antes de la dosificación, seguido de 4 mg $\times$ 2/día durante 3 días después de la dosificación. Se administrarán más tratamientos con corticosteroides según lo decida el investigador. Si cuando los sujetos comienzan el estudio ya están recibiendo esteroides, el investigador debe intentar por cualquier medio no cambiar la dosis de esteroides dentro de 5 días de la evaluación de la enfermedad, a menos que esté clínicamente garantizado. La decisión de continuar con los esteroides o de empezar a disminuirlos gradualmente después de este periodo de tiempo será tomada por el investigador.

Administración del bevacizumab:

- 40 El bevacizumab se administrará mediante infusión a una dosis de 10 mg/kg antes que VB-111 en los días de dosificación. La tasa de infusión será según la inserción en el paquete para el bevacizumab: La dosis inicial de bevacizumab debe administrarse a lo largo de 90 minutos como una infusión IV después de quimioterapia. Si la primera infusión se tolera, la segunda infusión puede administrarse a lo largo de 60 minutos. Si la infusión de 60 minutos se tolera, todas las infusiones posteriores pueden administrarse a lo largo de 30 minutos.

- 45 Administración del fármaco de estudio:

La infusión se realizará según el manual de ejecución. Antes de la infusión, la disolución salina debe llevarse a temperatura ambiente. Los viales deben abrirse en una cabina de seguridad biológica e inyectarse en disolución salina normal para infusión según el manual de ejecución. La disolución final para la administración debe administrarse no más de 90 minutos después de la preparación. El VB-111 se infundirá al paciente a la

dosificación pertinente según el peso del paciente, según se detalla en el manual de ejecución. Para pacientes con un peso menor que 50 kg, la dosis de 3×10^{12} o 1×10^{13} PV se reducirá en 30%. Las infusiones intravenosas del VB-111 diluido deben administrarse a 1 ml/minuto o 3 ml/minuto (solo 1×10^{13} PV).

Hasta 8 horas después de la combinación inicial de VB-111 y bevacizumab:

- 5 Análisis de laboratorio: Biodistribución: Se recogerá una muestra de sangre para las determinaciones de los niveles de expresión del ADN del adenovirus VB-111 en los siguientes momentos:

- 0 (antes de la dosificación, véase anteriormente)

- Al final de la infusión

- $3 \pm 0,5$ horas

- 10 - $6 \pm 0,5$ horas

Muestras de biomarcadores angiogénicos/citoquinas: Se recogerán muestras de sangre a las 6 horas después de la dosis para determinar:

- Niveles de factor de von Willebrand (vWF) y TNF α (opcional).

- Además, muestras de sangre para TNF, sTNFR1, sTNFR2, VEGF, FGF, IL-6, IL-8, E-selectina, ICAM-1

- 15 Signos vitales: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria) a los 30 y 60 minutos después de la dosificación, y a las 4 y 6 horas después de la dosificación y/o tras la desaparición de cualquier acontecimiento adverso, cualquiera que suceda primero.

- 20 Acontecimientos adversos: Se emplearán medidas de apoyo total para todos los pacientes con un acontecimiento adverso. Todos los acontecimientos adversos que aparezcan después de la administración del fármaco se documentarán en los formularios de informe del caso (CRF), junto con la intensidad, las medidas terapéuticas aplicadas, el resultado y la relación con el fármaco investigado. Los acontecimientos adversos relacionados se seguirán hasta la resolución. Los acontecimientos adversos no relacionados se seguirán hasta la resolución o el final del estudio.

- 25 Medicaciones concomitantes: No existen restricciones acerca de medicaciones concomitantes, más allá de los fármacos listados en los criterios de exclusión. Sin embargo, el VB-111 no debe mezclarse con otros fármacos. Toda la medicación concomitante administrada durante el estudio se documentará desde la línea de base durante toda la participación o hasta la visita de terminación temprana.

- 30 Otros análisis de laboratorio: Las muestras para los análisis de laboratorio extraídas en respuesta a un acontecimiento clínicamente importante serán documentadas como evaluaciones de laboratorio no programadas. Cuando aparezcan valores de laboratorio anómalos clínicamente importantes, los ensayos se seguirán realizando hasta que los valores vuelvan al intervalo normal y/o hasta que se encuentre una explicación adecuada a la anomalía. Estas investigaciones en el laboratorio se realizarán en el sitio del estudio, excepto para las evaluaciones de distribución, que se enviarán a un laboratorio central independiente. Si alguno de estos resultados requiere de confirmación, se volverán a realizar los ensayos en el mismo laboratorio hospitalario cuando sea posible. A cada laboratorio hospitalario se le deben proporcionar los certificados de acreditación del laboratorio y los intervalos de referencia normales.

Seguimiento de la fase de extensión de las cohortes 3-4:

Tratamiento bisemanal con bevacizumab

- 40 El bevacizumab se administrará según las prácticas convencionales de modo bisemanal. Durante las visitas al centro clínico para recibir este tratamiento, el investigador debe ver al sujeto para evaluar la seguridad.

Administración del bevacizumab

El bevacizumab se administrará mediante infusión a una dosis de 10 mg/kg según las prácticas convencionales.

- 45 Acontecimientos adversos: Se emplearán medidas de apoyo total para todos los pacientes con un acontecimiento adverso. Todos los acontecimientos adversos que aparezcan después de la administración del fármaco se documentarán en los formularios de informe del caso (CRF), junto con la intensidad, las medidas terapéuticas aplicadas, el resultado y la relación con el fármaco investigado. Los acontecimientos adversos relacionados se seguirán hasta la resolución. Los acontecimientos adversos no relacionados se seguirán hasta la resolución o el final del estudio.

- 50 Medicaciones concomitantes: No existen restricciones acerca de medicaciones concomitantes, más allá de los

fármacos listados en los criterios de exclusión. Sin embargo, el VB-111 no debe mezclarse con otros fármacos. Toda la medicación concomitante administrada durante el estudio se documentará desde la línea de base durante toda la participación o hasta la visita de terminación temprana.

Otros análisis de laboratorio: Las muestras para los análisis de laboratorio extraídas en respuesta a un acontecimiento clínicamente importante serán documentadas como evaluaciones de laboratorio no programadas. Cuando aparezcan valores de laboratorio anómalos clínicamente importantes, los ensayos se seguirán realizando hasta que los valores vuelvan al intervalo normal y/o hasta que se encuentre una explicación adecuada a la anomalía. Estas investigaciones en el laboratorio se realizarán en el sitio del estudio, excepto para las evaluaciones de distribución, que se enviarán a un laboratorio central independiente. Si alguno de estos resultados requiere de confirmación, se volverán a realizar los ensayos en el mismo laboratorio hospitalario cuando sea posible. A cada laboratorio hospitalario se le deben proporcionar los certificados de acreditación del laboratorio y los intervalos de referencia normales.

28 Días después del tratamiento de combinación inicial

Un mes después del tratamiento de combinación inicial, se indicará a cada paciente que se presente en el centro clínico en ayunas para las siguientes evaluaciones:

Signos vitales: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica supina, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria).

Análisis de laboratorio: Se recogerá una muestra de sangre para las siguientes evaluaciones:

- Hematología: hemoglobina, recuento sanguíneo completo, INR, PT y PTT activado: en el caso de prolongación de PTT por encima de ULN, remitase a la sección 6.2 Retraso/modificación de la dosis para más instrucciones.

- Química: electrolitos, creatinina y nitrógeno de urea en sangre, bilirrubina, fosfatasa alcalina, ALT y AST, calcio, proteínas totales, y albúmina

- Las muestras para los análisis de laboratorio extraídas en respuesta a un acontecimiento clínicamente importante serán documentadas como evaluaciones de laboratorio no programadas.

- Se recogerá una muestra de orina para:

- Análisis de orina habitual

- Tiras reactivas para la proteinuria

- No se modificará la dosis para acontecimientos de grado ½

- Grado 3 (UPC>3,5, recolección de orina >3,5 g/24 hr, o tiras reactivas 4+): Detener el tratamiento de bevacizumab hasta ≤grado 2, según se determina mediante la proporción UPC ≤3,5 o 24 hr recolección ≤3,5 g

- Grado 4 (síndrome nefrótico): Detener el bevacizumab

Acontecimientos adversos: En la visita de seguimiento al investigador, se preguntará al paciente acerca de posibles acontecimientos adversos que puedan haber aparecido desde el día de la última visita. Deben emplearse medidas de apoyo total en los pacientes con un acontecimiento adverso. Todos los acontecimientos adversos se documentarán en los formularios de informe del caso (CRF), junto con la intensidad, las medidas terapéuticas aplicadas, el resultado y la relación con el fármaco investigado. Los acontecimientos adversos relacionados se seguirán hasta la resolución. Los acontecimientos adversos no relacionados se seguirán hasta la resolución o el final del estudio.

Medicaciones concomitantes: En la visita de seguimiento al investigador, se preguntará al paciente acerca de posibles medicaciones que puedan haber tomado desde el día de la última visita. Todas las medicaciones concomitantes se registrarán con el nombre genérico, la indicación, la dosificación, las unidades, la frecuencia y las fechas de inicio y de fin.

Final del estudio/terminación temprana

Los sujetos en las cohortes 3 y 4 continuarán recibiendo VB-111 cada 2 meses, con la condición de que sigan estando estables. Cuando los sujetos sufren una progresión de la enfermedad, pueden recibir un tratamiento de combinación con VB-111 o volverán al centro clínico para una visita final del estudio. Además, si los sujetos retiran el consentimiento o el investigador determina que el sujeto no debe continuar en el estudio, el sujeto volverá para una visita de terminación temprana. Los sujetos continuarán con un seguimiento cada 2-3 meses como parte de su seguimiento convencional. El VBL puede pedir datos de estos sujetos (por ejemplo, barridos de MRI, otros tratamientos anticáncer).

Los sujetos que ya no son recibidos en visitas convencionales en el sitio deben ser contactados por teléfono cada 2-3 meses para el seguimiento de la supervivencia y para obtener información con respecto a posteriores tratamientos del glioblastoma. El seguimiento continuará hasta que el paciente expire.

Duración del estudio

- 5 Cohortes 1-2: A cada paciente se le administrará una única inyección de VB-111 y se realizará un seguimiento con evaluaciones y visitas programadas de modo regular durante un periodo de 6 meses después de la dosificación o hasta la progresión o abandono del estudio, y después se le realizará un seguimiento para la supervivencia mediante un contacto telefónico después del estudio cada 2 meses. Además, se realizarán MRI de supervisión cada 2 meses hasta 1 año después de la dosificación, y después cada 3 meses hasta 2 años después de la dosificación.
- 10 Los pacientes pueden decidir abandonar el estudio en cualquier momento. A los pacientes que lo abandonan antes del día 168 ± 7 se les debe pedir que vuelvan al centro clínico para una visita de terminación temprana y se debe seguir en contacto con ellos para preguntarles sobre AE (los pacientes que lo abandonan después del 168 no se consideran terminaciones tempranas). Todos los AE, independientemente de que estén o no relacionados con la enfermedad, serán documentados en el registro del paciente y el CRF.
- 15 Cohortes 3 y 4: Los sujetos se seleccionarán 3 semanas antes de la dosis inicial (D0) y recibirán VB-111 cada 2 meses a través de la progresión de la enfermedad. Después de la progresión de la enfermedad, se realizará un tratamiento convencional; los pacientes recibirán un seguimiento para la actualización del estado de la enfermedad y la supervivencia cada 2-3 meses.

Evaluaciones exploratorias

- 20 Muestras de biopsia opcionales: Pueden recogerse biopsias de tejido cerebral (preferiblemente muestras congeladas en fresco) para el posterior ensayo por VBL como parte del procedimiento clínicamente indicado en cualquier momento del estudio. Si se recoge una muestra de tejido cerebral, debe recolectarse una muestra de sangre para el análisis de transgenes en el mismo día.

- 25 Células endoteliales en circulación (CEC): Opcionalmente, pueden recogerse CEC y analizarse como biomarcadores para la angiogénesis por medio de una citometría de flujo en cualquier momento del estudio, si el sujeto lo consiente y el sitio tiene capacidad local de realizar dicho ensayo.

Otros ensayos exploratorios: Las muestras recogidas para obtener plasma, suero y tejido durante el estudio serán conservadas por VBL o por una persona designada para ello durante hasta 15 años para un ensayo exploratorio para comprender mejor el impacto, la respuesta potencial y la toxicidad del VB-111.

- 30 *Acontecimientos adversos previstos/modificaciones de la dosis*

Acontecimientos adversos previstos

Estudios preclínicos

- 35 El VB-111 provoca una toxicidad mínima en estudios de toxicología preclínicos en ratones. Se observó una anemia suave, una trombocitopenia suave, una leucocitosis suave, esplenomegalia, e hiperplasia de médula ósea. También se observaron unos aumentos transitorios de las enzimas hepáticas sin correlación con la patología clínica.

Vectores de adenovirus y agentes antiangiogénicos

- 40 La administración de vectores de adenovirus sistémicamente ha sido bien tolerada. Los síntomas similares a la gripe (fiebre, fatiga, escalofríos, náuseas y/o vómitos) son los acontecimientos adversos más habituales. La mayoría de las partículas de adenovirus inyectadas por vía intravenosa fueron secuestradas por el hígado que, a su vez, provoca una respuesta inflamatoria caracterizada por una transaminitis aguda y daños vasculares.

La administración de agentes antiangiogénicos sistémicamente también ha sido bien tolerada. Los efectos adversos previstos más importantes fueron trastornos de curación de heridas, sangrado, y acontecimientos tromboembólicos. También se ha indicado hipertensión y proteinuria con la terapia antiangiogénica.

Acontecimientos adversos previstos con el bevacizumab

- 45 Perforación gastrointestinal (GI)

A veces aparece una perforación GI grave, y a veces mortal, con más incidencia en pacientes tratados con bevacizumab, comparado con controles.

Las incidencias de perforación GI varían del 0,3% al 2,4% a través de los estudios clínicos.

Se debe abandonar el bevacizumab en pacientes con perforación GI.

- 50 Complicaciones quirúrgicas y de curación de heridas

La incidencia de complicaciones quirúrgicas y de curación de heridas, que incluyen complicaciones graves y mortales, aumenta en los pacientes tratados con bevacizumab.

- 5 No se debe iniciar el bevacizumab durante al menos 28 días después de una cirugía y hasta que la herida quirúrgica esté totalmente curada. No se ha determinado el intervalo apropiado entre la terminación del bevacizumab y una posterior cirugía electiva requerida para reducir los riesgos de una curación anómala de las heridas/dehiscencia de la herida.

Se debe abandonar el bevacizumab al menos 28 días antes de una cirugía electiva y en pacientes con complicaciones de curación de heridas que requieran una intervención médica.

Hemorragia

- 10 Ha aparecido una hemorragia grave o mortal, incluyendo hemoptisis, sangrado GI, hematemesis, hemorragia del sistema nervioso central, epistaxis, y sangrado vaginal en hasta 5 veces, con más frecuencia en pacientes que reciben bevacizumab. A través de las indicaciones, la incidencia de acontecimientos hemorrágicos de grado ≥ 3 entre pacientes que reciben bevacizumab varía del 1,2% al 4,6%.

- 15 No se debe administrar bevacizumab a pacientes con hemorragia grave o hemoptisis reciente ($\geq 1/2$ tsp de sangre roja).

Se debe abandonar el bevacizumab en pacientes con hemorragia grave (es decir, que requiera una intervención médica).

Otros acontecimientos adversos graves

- 20 Otros acontecimientos adversos graves, y a veces mortales, con mayor incidencia en el brazo tratado con bevacizumab frente al control incluyen:

Formación de una fístula no-GI ($\leq 0,3\%$)

Acontecimientos tromboembólicos arteriales (grado ≥ 3 , 2,6%)

Proteinuria (síndrome nefrótico, $< 1\%$)

- 25 Otros acontecimientos adversos graves con mayor incidencia en el brazo tratado con bevacizumab frente al control incluyen:

Hipertensión (grado 3-4, 5%-18%)

Síndrome de leucoencefalopatía posterior reversible ("reversible posterior leukoencephalopathy syndrome", RPLS) ($< 0,1\%$)

- 30 Las reacciones a la infusión con la primera dosis de bevacizumab son raras ($< 3\%$), y aparecieron reacciones graves en 0,2% de los pacientes.

Se debe informar a las mujeres fértiles del riesgo de insuficiencia ovárica antes de comenzar el tratamiento con bevacizumab.

- 35 Las reacciones adversas más habituales observadas en pacientes con bevacizumab a una tasa de $> 10\%$ y al menos dos veces la tasa del brazo control son epistaxis, dolor de cabeza, hipertensión, rinitis, proteinuria, alteración del gusto, piel seca y hemorragia rectal.

Retrasos en la dosificación/modificación de la dosis

Para los sujetos que participan en múltiples cohortes de dosis, la dosificación puede retrasarse en las siguientes situaciones:

- 40 - En los sujetos que sufrieron un acontecimiento adverso relacionado con el fármaco VB-111 y que están programados para repetir la dosis, esta se retrasará hasta que la gravedad del acontecimiento no sea mayor que CTCAE de grado 1.

- 45 - En los sujetos que sufrieron una prolongación de un PTT y que están programados para repetir la dosis, esta se retrasará hasta que el PTT haya vuelto a dentro del 20% del valor de línea de base, tanto si cualquier ensayo de LAC o APLA positivo se haya o no normalizado. Los casos límite pueden analizarse con el patrocinador en cada caso individual. Los sujetos con acontecimientos de sangrado o trombóticos clínicamente significativos relacionados con un PTT prolongado no deberían recibir más dosis de VB-111.

- En el caso de que un PTT se prolongue por encima de ULN, debe extraerse sangre para el anticoagulante del lupus (LAC) y para anticuerpos antifosfolípidos (IgG e IgM para beta-2-GP-1 y anticardiolipina). Los

pacientes con un PTT prolongado no deben recibir VB-111 hasta que los valores de laboratorio anómalos vuelvan a dentro del 20% del valor de línea de base, tanto si cualquier ensayo de LAC o APLA positivo se haya o no normalizado. Si la repetición del ensayo para LAC/APLA sigue siendo positivo, este debe repetirse cada 12 semanas (desde el ensayo positivo inicial) hasta que vuelva a la normalidad.

- 5 - Durante el control de DLT. Para ajustarse a las restricciones del protocolo con respecto a los periodos de observación de 14 días entre pacientes.

- 10 Los pacientes se asignarán a la cohorte 3 (dosis única o múltiples dosis de 3×10^{12} PV) o a la cohorte 4 (múltiples dosis de 1×10^{13} PV). No se permite la modificación de la dosis en este ensayo. Sin embargo, se infundirá VB-111 al paciente a la dosificación pertinente según el peso del paciente, según se detalla en el manual de ejecución. Para pacientes con un peso menor que 50 kg, la dosis de 3×10^{12} o 1×10^{13} PV se reducirá en 30%. Las infusiones intravenosas del VB-111 diluido deben administrarse a 1 ml/minuto o 3 ml/minuto (solo 1×10^{13} PV).

Estudios correlativos/especiales

- 15 Distribución: Para la evaluación de la distribución, se recogerán muestras de sangre de todos los pacientes según el manual de ejecución. Se ensayarán estas muestras para la determinación del nivel de transgenes de adenovirus y VB-111 en el grupo de dosis máxima tolerada o en la cohorte de dosis mayor. La distribución se evaluará mediante la determinación de los niveles de ADN vírico y transgenes mediante Q-PCR y Q-RT-PCR, respectivamente, en la sangre en momentos predeterminados después de la dosificación. Se recogerán muestras de todos los pacientes en todos los momentos predefinidos. Las muestras en que no aparezcan niveles detectables de ADN vírico después de la dosificación no se ensayarán para los niveles de transgenes y no se evaluarán para momentos posteriores.

- 20 Anticuerpos: Se recogerán muestras de suero para el análisis de los niveles de anticuerpos contra el adenovirus según el manual de ejecución.

Procedimientos para manipular muestras de sangre: Se remite al manual de funcionamiento para obtener instrucciones para una descripción completa de los procedimientos para muestras de seguridad y los procedimientos para las determinaciones con Q-PCR y Q-RT-PCR.

- 25 *Medición del efecto*

- 30 La respuesta tumoral se evaluará usando a formación de imágenes de resonancia magnética cerebral con y sin contraste (MRI), basándose la evaluación en los criterios de RANO, hasta la progresión de la enfermedad (análisis de radiología independiente local y central). Para los pacientes que no progresen o que mueran, la PFS se censurará en el momento de iniciar una terapia anticáncer alternativa, la fecha de la última evaluación radiológica o el momento del último contacto.

Definiciones

- 35 La respuesta y la progresión se evaluarán en este estudio usando los nuevos criterios internacionales propuestos por el grupo de trabajo de Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) [JCO, Updated Response Assessment Criteria for High-Grade Gliomas: Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) Working Group, en impresión].
Nota: Las lesiones son mensurables o no mensurables usando los criterios proporcionados a continuación. El término "evaluable", con referencia a la mensurabilidad, no se utilizará porque no proporciona más significado ni precisión.

- 40 Enfermedad mensurable: Una enfermedad mensurable se define como lesiones que potencian un contraste bidimensional con márgenes claramente definidos mediante MRI, con dos diámetros perpendiculares de al menos 10 mm, visibles en 2 o más cortes axiales que, preferiblemente, están separados un máximo de 5 mm con un salto de 0 mm. En el caso de que la MRI se realice con cortes más gruesos, el tamaño de una lesión mensurable en la línea de base debe ser dos veces el grosor del corte. En caso de que existan huecos entre los cortes, esto también debe considerarse para la determinación del tamaño de las lesiones mensurables en la línea de base.

- 45 La medición de un tumor alrededor de un quiste o una cavidad quirúrgica es problemática. En general, estas lesiones deben considerarse no mensurables, a menos que exista un componente nodular que mida al menos 10 mm de diámetro. El quiste o la cavidad quirúrgica no debe medirse cuando se determina la respuesta.

Todas las mediciones tumorales deben registrarse en milímetros (o fracciones decimales de centímetros).

Enfermedad no mensurable: Se define como lesiones mensurables de modo unidimensional, masas con márgenes no definidos claramente, o lesiones con diámetros perpendiculares máximos <10 mm.

- 50 Lesiones diana: Todas las lesiones mensurables hasta un máximo de cinco lesiones deben identificarse como lesiones diana y registrarse y medirse (suma de los productos de los diámetros perpendiculares) en la línea de base. Las lesiones diana deben seleccionarse basándose en su tamaño (lesiones con los diámetros más largos) y su idoneidad para mediciones repetidas precisas mediante técnicas de formación de imágenes. A veces, las lesiones más grandes pueden no ser adecuadas para mediciones reproducibles, y deben seleccionarse las siguientes

lesiones más grandes que puedan medirse de modo reproducible.

Lesiones no diana: Para pacientes con enfermedad recurrente que presentan múltiples lesiones, de las cuales solo una o dos están aumentando su tamaño, estas lesiones que aumentan de tamaño deben considerarse las lesiones diana para la evaluación de la respuesta. Las otras lesiones se considerarán lesiones no diana y también deben registrarse.

En muy pocas ocasiones, puede aparecer una progresión inequívoca de una lesión no diana que requiera la detención de la terapia, o el desarrollo de una nueva lesión que potencia el contraste, incluso en el escenario de una enfermedad estable (EE) o una respuesta parcial (RP) en las lesiones diana. Estos cambios se califican como progresión.

Las lesiones no diana también incluyen lesiones mensurables que excedan del número máximo de 5. No son necesarias mediciones de estas lesiones, pero la presencia o la ausencia de cada una de estas deben indicarse durante el seguimiento.

Líneas directrices para la evaluación de una enfermedad mensurable

Todas las mediciones deben tomarse y registrarse en anotación métrica, empleando una regla o calibradores. Todas las evaluaciones de la línea de base deben realizarse dentro de 72 horas antes del inicio del tratamiento.

Es necesaria una MRI convencional, CT no es aceptable. Debe usarse el mismo método de evaluación y la misma técnica para caracterizar cada lesión identificada e informada en la línea de base y durante el seguimiento.

Estas técnicas deben realizarse con cortes de 10 mm o menos en grosor del corte de modo contiguo. Las MRI serán evaluadas por un laboratorio central de modo local y central.

Criterios de respuesta

Evaluación de las lesiones diana: Respuesta completa (RC): Requiere todo lo siguiente:

- Desaparición completa de la enfermedad potenciadora mensurable y no mensurable sostenida durante al menos 4 semanas

- Ausencia de nuevas lesiones

- Lesiones no potenciadoras estables o mejoradas (T2/FLAIR)

- Los pacientes no deben estar tomando corticosteroides

- Clínicamente mejorado o estable

Respuesta parcial (RP): Requiere todo lo siguiente:

- $\geq 50\%$ de disminución comparado con la línea de base en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones potenciadoras mensurables sostenida durante al menos 4 semanas

- Ausencia de progresión de una enfermedad no mensurable

- Ausencia de nuevas lesiones

- Lesiones no potenciadoras estables o mejoradas (T2/FLAIR) en la misma dosis o una dosis menor de corticosteroides, comparado con un barrido de línea de base

- La dosis de corticosteroides en el momento de la evaluación con barrido no debe ser mayor que la dosis en el momento del barrido de línea de base

- Clínicamente mejorado o estable

Enfermedad estable (EE): Requiere todo lo siguiente:

- No competente para respuesta completa, respuesta parcial o progresión

- Lesiones no potenciadoras estables (T2/FLAIR) en la misma dosis o una dosis menor de corticosteroides, comparado con un barrido de línea de base. En el caso de que la dosis de corticosteroides haya aumentado, el último barrido que se considere que muestra enfermedad estable será el barrido obtenido cuando la dosis de corticosteroides era equivalente a la dosis de línea de base

- Clínicamente estable

Progresión: Definida por cualquiera de lo siguiente:

- $\geq 25\%$ de aumento en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de las lesiones potenciadoras, comparado con la medición tumoral más pequeña obtenida en la línea de base (si no hay disminución) o la mejor respuesta, en dosis estables o crecientes de corticosteroides

5 - Aumento significativo en una lesión no potenciadora T2/FLAIR en dosis estables o crecientes de corticosteroides, comparado con el barrido de línea de base o mejor respuesta después del inicio de la terapia, no debido a acontecimientos comórbidos (por ejemplo, terapia de radiación, desmielinización, lesión isquémica, infección, ataques, cambios posoperatorios, u otros efectos del tratamiento).

- Cualquier lesión nueva

10 - Claro deterioro clínico no atribuible a otras causas aparte del tumor (por ejemplo, ataques, efectos secundarios de medicaciones, complicaciones de la terapia, acontecimientos cerebrovasculares, infección, etc.) o cambios en la dosis de corticosteroides

- No poder regresar para la evaluación debido a muerte o condiciones deteriorantes

- Progresión clara de una enfermedad no mensurable

15 Si se producen dudas con respecto a si existe progresión, el paciente debe continuar el tratamiento y permanecer bajo atenta observación. Si posteriores evaluaciones sugieren que el paciente está progresando, la fecha de progresión debe ser el momento en que esta cuestión surgió inicialmente.

Estos criterios de respuesta de RANO también se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 6 - Resumen de los criterios de respuesta de RANO

	RC	RP	EE	EP
T1-Gd+	Ninguno	$\geq 50\%$ de disminución	$< 50\%$ de disminución- $< 25\%$ de aumento	$\geq 25\%$ de disminución
T2/FLAIR	Estable o disminuye	Estable o disminuye	Estable o disminuye	Aumenta*
Nueva lesión	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Presente*
Corticosterol ds	Ninguno	Estable o disminuye	Estable o disminuye	NA
Estado clínico	Estable o aumenta	Estable o aumenta	Estable o aumenta	Disminuye*
Requirimiento de respuesta	Todos	Todos	Todos	Alguno*

RC = respuesta completa; RP = respuesta parcial; EE = enfermedad estable; y EP = enfermedad progresiva.

La progresión aparece cuando cualquier de los criterios marcados con * está presente.

NA: Solo un aumento en los corticosteroides no se considerará cuando se determina la progresión en ausencia de un deterioro clínico persistente

20 Medición de confirmación/Duración de la respuesta

Confirmación

Para poder asignar un estado de RP o RC, deben confirmarse cambios en las mediciones tumorales por medio de evaluaciones repetidas que deben realizarse 4 semanas después de que se hayan cumplido por primera vez los criterios para la respuesta.

25 Duración de la respuesta global

La duración de la respuesta global se mide desde el momento en que se cumplen los criterios de medición para RC o RP (lo que se registre en primer lugar) hasta la primera fecha en que se haya documentado objetivamente una enfermedad recurrente o progresiva (tomando como referencia para la enfermedad progresiva las mediciones más pequeñas registradas desde que se inició el tratamiento).

30 La duración de la RC global se mide desde el primer momento que se cumplen los criterios de medición para RC hasta la primera fecha en que se haya documentado objetivamente una enfermedad recurrente.

Duración de la enfermedad estable

La enfermedad estable se mide desde el inicio del tratamiento hasta que se cumplen los criterios para la progresión, tomando como referencia las mediciones más bajas registradas desde que comenzó el tratamiento.

Consideraciones estadísticas

5 Diseño del estudio

Objetivos: Para evaluar la seguridad, la tolerabilidad y la eficacia de dosis individuales y múltiples de VB-111 (1×10^{12} , 3×10^{12} , 1×10^{13} partículas de virus [PV]) en pacientes con GBM recurrente; para evaluar la distribución de VB-111 después de una única infusión y de múltiples infusiones IV y el nivel de anticuerpos contra el vector adenovirico y los transgenes.

- 10 Se prevé que hasta 90 sujetos se alistarán en este estudio, con hasta 29 sujetos en el nivel de dosis de 3×10^{12} PV, y hasta 49 sujetos en el nivel de dosis de 1×10^{13} PV. Las cohortes 1-2 reclutarán hasta 6 pacientes en cada una. La cohorte 3 se llevará a cabo según el método de 2 etapas de Simon.

La etapa uno incluirá los primeros 10 pacientes evaluables al nivel de dosis de 1×10^{13} PV o MTD.

- 15 Para el análisis de la eficacia, los pacientes evaluables se definen como los pacientes que han recibido al menos una dosis repetida de 1×10^{13} PV o de MTD, o los pacientes que han progresado antes de 2 meses después de una dosis inicial de 1×10^{13} PV (de la cohorte 3 o 4).

- 20 Se considera que un sujeto responde si está vivo y sin progresión a los 6 meses o presenta al menos una respuesta tumoral parcial según los criterios de Rano dentro de 6 meses después de la dosificación. Si se observan menos de 2 respuestas en los sujetos de la etapa 1, se detendrá la etapa 2, y por lo demás se alistarán 19 sujetos más en la etapa 2.

La cohorte 4 reclutará hasta 49 sujetos.

Se prevé que al menos 29 pacientes alistados en las cohortes 3 o 4 serán evaluables después de alistarse en las cohortes 3-4 EXT. Basándose en información histórica, se prevé que esta muestra permitirá una evaluación preliminar de la seguridad y la eficacia de este régimen para el tratamiento de GBM recurrente.

- 25 Se aplicarán las siguientes reglas de detención del estudio:

- Si 3 de 6 sujetos en las cohortes 1 y 2 sufren DLT relacionada con el fármaco (o 5 de 9, o 6 de 12);

- Si 2 de los sujetos en la cohorte 1 sufren una DLT;

- 30 - Si se produce cualquier muerte dentro de dos semanas después de administrar el producto, excepto si la muerte es debida a la progresión de la enfermedad o claramente no está relacionada con el fármaco de estudio. El alistamiento se suspenderá temporalmente para una reunión de IDMC de emergencia ad hoc para analizar el caso y recomendar si puede reiniciarse el alistamiento.

Criterios de valoración de la seguridad y la tolerabilidad

Para evaluar la seguridad y la tolerabilidad de dosis individuales y múltiples de VB-111 (1×10^{12} , 3×10^{12} , 1×10^{13} PV), se evaluarán los siguientes criterios de valoración de la seguridad a lo largo del estudio:

- 35 - Los acontecimientos adversos se registrarán según se produzcan durante la duración completa del estudio. Los acontecimientos adversos se evaluarán para la importancia, la relación con el fármaco de estudio y la gravedad (según CTCAE 4.0).

- Los signos vitales se registrarán en la selección, antes de cada dosificación, 30 y 60 minutos, 4 y 6 horas después de la primera dosificación y en todas las visitas de seguimiento.

- 40 - Se realizarán exámenes físicos en las cohortes 1-2 en la selección, la línea de base, los días 14, 28, 56, 84, 112, 140 y el día 168. En las cohortes 3-4, se realizará un examen físico en la selección/línea de base, antes de cada dosificación, y en la finalización del estudio/terminación temprana.

- 45 - Se obtendrá un ECG de 12 derivaciones en las cohortes 1-2 en la selección, antes de la dosificación, día 28 y día 168 (o ET). En las cohortes 3-4, se obtendrá un ECG en la selección/línea de base, la visita del día 56, y en la visita de la finalización del estudio/terminación temprana.

- Se realizará una evaluación de laboratorio de seguridad (hematología sanguínea, química y análisis de orina) en la selección, antes de la dosificación, y en todas las visitas de los pacientes.

Criterio de valoración de la eficacia primario: Para evaluar la eficacia de dosis individuales y múltiples de VB-111

(1×10^{12} , 3×10^{12} , 1×10^{13} PV) en sujetos con GBM recurrente, se evaluará la supervivencia sin progresión en 6 meses ("progression free survival", PFS), definida como la proporción de sujetos que no han progresado a los 6 meses desde el alistamiento. En otro aspecto, la supervivencia global se evaluará como el criterio de valoración de la eficacia primario, y la PFS en 6 meses se evaluará como criterio de valoración de la eficacia secundario. La supervivencia global se define como el tiempo desde el alistamiento hasta la muerte por cualquier causa. Los

5 pacientes recibirán un seguimiento para el estado de supervivencia después de finalizar el estudio o de retirarse de él por una progresión o por toxicidad, y se incluirán en los análisis de PFS y OS ("overall survival", supervivencia global).

Criterios de valoración de la eficacia secundarios: Para evaluar la eficacia de dosis individuales y múltiples de VB-111 (1×10^{12} , 3×10^{12} , 1×10^{13} PV), o de múltiples dosis de VB-111 junto con bevacizumab en sujetos con GBM recurrente, se evaluarán los siguientes criterios de valoración de la eficacia secundarios:

- En un aspecto, los criterios de valoración de la eficacia secundarios serán evaluados mediante la supervivencia global (OS): La supervivencia global se define como el tiempo desde el alistamiento hasta la muerte por cualquier causa. Los pacientes recibirán un seguimiento para el estado de supervivencia después de finalizar el estudio o de retirarse de él por una progresión o por toxicidad, y se incluirán en los análisis de PFS y OS.

- En otro aspecto, los criterios de valoración de la eficacia secundarios serán evaluados mediante la supervivencia sin progresión (PFS): La supervivencia sin progresión se define como el tiempo desde el alistamiento hasta una progresión objetiva del tumor, evaluada según el grupo de trabajo Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) (véanse los detalles en la sección 8.3.1).

- La supervivencia sin progresión en 6 meses (PFS-6) se define como la proporción de sujetos que no presentan progresión a los 6 meses desde el alistamiento.

- Supervivencia sin acontecimientos ("event free survival", EFS): La supervivencia sin acontecimientos se define como la medición desde la fecha del alistamiento hasta la terminación del tratamiento debido a toxicidad, progresión de la enfermedad, recaída o muerte por cualquier causa.

- Respuesta tumoral: basándose en MRI, evaluada según el grupo de trabajo de Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) (véanse los detalles en la sección 8.3.1).

Consideraciones de potencia y tamaño de muestra

En una realización, el criterio de valoración de la eficacia primario es la supervivencia global. Usando los datos presentados en Friedman *et al.*, "Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma," J. Clin. Oncol., 27(28):4733-4740 (2009), la OS en el grupo de bevacizumab a los 12 meses es del 25%. Basándose en los datos preliminares, se prevé que la tasa de supervivencia global en 12 meses en el grupo de VB-111 será de aproximadamente 50% (cociente de riesgo = 0,5). Suponiendo un modelo de riesgos proporcionales, con un tamaño de muestra de 45 pacientes en el grupo de VB-111 que genere aproximadamente 23 acontecimientos, un ensayo de rangos logarítmicos bilateral de nivel 0,05 tendrá una potencia de 80% para detectar una diferencia en las curvas de supervivencia. El análisis final compara las curvas de supervivencia de Kaplan Meier de BEV (basándose en los datos de Friedman *et al.*) con los datos de supervivencia de VB-111 usando el ensayo de rangos logarítmicos (Piantadosi, 2005).

Como alternativa, este estudio evaluará los criterios de valoración de la eficacia usando un diseño de Simon de dos etapas. En este estudio, la respuesta se define por una PFS en 6 meses o al menos una respuesta tumoral parcial. Con un mínimo de 10 pacientes y un máximo de 29 pacientes, la hipótesis nula sería que la proporción verdadera de PFS-6 es, como máximo, del 10%, frente a la hipótesis alternativa de que la PFS en 6 meses es al menos 30%:

H0: PFS-6 $\leq$ 10%

H1: PFS-6 $\geq$ 30%

Esto tiene un nivel de significancia del 5% cuando la proporción verdadera es 10%, y 80% de potencia cuando la proporción verdadera es al menos 30%.

A menos que aparezca toxicidad o que el estudio se detenga en el análisis interino, este estudio prevé acumular entre 3-6 sujetos en la cohorte 1, 3-6 sujetos en la cohorte 2, hasta 29 sujetos en la cohorte 3, y hasta 49 sujetos en la cohorte 4.

Se prevé que al menos 29 pacientes alistados en las cohortes 3 o 4 serán evaluables después de alistarse en las cohortes 3-4 EXT. Basándose en información histórica, se prevé que esta muestra permitirá una evaluación preliminar de la seguridad y la eficacia de este régimen para el tratamiento de GBM recurrente.

Métodos estadísticos

Todos los datos recogidos se resumirán y se presentarán. Las variables continuas se describirán como el promedio,

la mediana, la desviación estándar y el rango de n observaciones. Los datos categóricos se describirán con tablas de contingencia que incluyen frecuencia y porcentaje. Se generarán y presentarán listados de los sujetos individuales.

- 5 Los intervalos de confianza se calcularán al nivel de confianza del 95% (bilateral) (excepto para los criterios de valoración de la seguridad y la eficacia primarios, que serán del 99% y 95% (unilateral), respectivamente).

Todos los pacientes que cumplan los criterios de elegibilidad que hayan firmado un formulario de consentimiento y hayan recibido VB-111 se considerarán evaluables para el análisis de la seguridad.

Los análisis y las descripciones estadísticas se realizarán usando el programa de análisis estadístico SAS (SAS Institute, Inc., Cary, N.C., EE. UU.).

10 Parámetros demográficos

Los parámetros demográficos que incluyen sexo, edad, altura y peso serán resumidos de forma global y por grupo de tratamiento.

Análisis de la seguridad y la toxicidad

Se utilizará el control de los acontecimientos adversos y los descubrimientos clínicos para evaluar la seguridad.

- 15 Los AE serán categorizados mediante SOC y Términos preferidos, usando el diccionario MedDRA. Se presentará la incidencia de AE, así como la gravedad y la relación con el fármaco del estudio. Según NCI CTCAE versión 4.0, el término toxicidad se define como acontecimientos adversos que se clasifican como posibles, probables o definitivamente relacionados con el tratamiento del estudio. Se registrará el grado máximo para cada tipo de toxicidad para cada paciente, y se usará para el informe. Se repasarán las tablas de frecuencia para determinar patrones de toxicidad. Además, todos los datos de acontecimientos adversos de grado 3, 4 o 5 y clasificados como "no relacionados o con poca probabilidad de estar relacionados" con el tratamiento del estudio en el caso de que se esté desarrollando una relación real, serán repasados.
- 20

Los acontecimientos adversos graves se resumirán de modo similar.

- 25 Los acontecimientos adversos infusionales también serán resumidos en la evaluación de la causalidad del investigador y del patrocinador.

También se presentará el número y la proporción de pacientes con uno o más AE.

- 30 Los descubrimientos clínicos incluirán la evaluación de los exámenes físicos, los signos vitales y los resultados de los ensayos de laboratorio, otras medicaciones concomitantes y los abandonos/terminaciones. Estos descubrimientos se resumirán por grupo de dosis. Las variables continuas se describirán como el promedio, la mediana, la desviación estándar y el rango de n observaciones. Los datos categóricos se describirán con tablas de contingencia que incluyen frecuencia y porcentaje.

Análisis de la eficacia

- 35 La supervivencia global (OS) se define como el tiempo desde la primera fecha del tratamiento del estudio hasta la fecha de la muerte del sujeto por cualquier causa. Para los sujetos que no han muerto, los datos de supervivencia se censurarán en la última fecha conocida en la que el sujeto seguía vivo. Se usará el método de Kaplan-Meier para calcular la distribución y la mediana de OS para sujetos tratados al nivel de MTD.

- 40 La supervivencia sin progresión (PFS) se define como el tiempo desde la primera fecha del tratamiento del estudio hasta una progresión de la enfermedad documentada, o hasta la muerte por cualquier causa, lo que suceda primero. La respuesta tumoral y la progresión de la enfermedad serán evaluadas por el investigador según los criterios de RANO. Se presentará la proporción de sujetos con PFS en 6 meses para cada grupo de tratamiento. Para los pacientes que no progresan o que mueren, la PFS será censurada en el momento de inicio de una terapia anticáncer alternativa, la fecha de la última evaluación del tumor, o el momento del último contacto. Se usará el método de Kaplan-Meier para calcular la distribución y la mediana de PFS para sujetos tratados a los niveles de 3×10^{12} y 1×10^{13} PV, o múltiples dosis de VB-111 junto con bevacizumab.

- 45 La supervivencia sin acontecimientos se define como la medición desde la fecha del alistamiento hasta la terminación del tratamiento debido a toxicidad, progresión de la enfermedad, recaída o muerte por cualquier causa. Se usará el método de Kaplan-Meier para calcular la distribución y la mediana de la supervivencia sin acontecimientos para sujetos tratados al nivel de MTD.

- 50 La respuesta tumoral se define según los criterios de respuesta de RANO. Véase la sección 8.3 para las definiciones de respuesta completa, respuesta parcial, enfermedad estable y progresión. La respuesta tumoral se evaluará durante la selección, antes de la dosificación, días 14, 28, 56, 84, 112, 140 (solo cohortes 1-2) y 168 y cada 2 meses en adelante, usando formación de imágenes de resonancia magnética cerebral con y sin contraste (MRI). La

frecuencia y el porcentaje de respuesta tumoral se presentarán para el momento y el grupo de tratamiento. Para las cohortes 3-4 y la extensión, la respuesta tumoral se evaluará durante la selección, antes de la dosificación, días 28, 56, 84, 112, y cada 2 meses en adelante. Después de esta modificación del protocolo (versión 7.0), se realizarán barridos cada 2 meses desde la dosis inicial.

5 Biodistribución

Se presentará la biodistribución de VB-111 en sangre.

Número de pacientes planeados para ser alistados

Basándose en el diseño del estudio, se calcula que es necesario un máximo de 90 personas elegibles (3-6 en cada una de las cohortes 1 y 2, hasta 29 en la cohorte 3, y hasta 49 en la cohorte 4) con cáncer de GBM recurrente, y 29 pacientes evaluables para la evaluación de la eficacia.

Criterios para terminar el ensayo

El patrocinador se reserva el derecho a terminar el estudio de una forma temprana por razones administrativas (por ejemplo, el centro no cumple con GCP) o de seguridad, como se describe en 4.2.

Procedimiento para tomar en cuenta datos que faltan, no usados y espurios

15 Los datos que faltan se indicarán en los listados, pero se excluirán de todos los análisis descriptivos. Todos los datos serán listados, incluyendo los datos por lo demás no usados. Los datos espurios se identificarán como tales, cuando sea posible.

Selección de los pacientes para ser incluidos en los análisis

20 El conjunto de análisis completo consistirá en todos los pacientes alistados que recibieron la medicación del estudio. El subconjunto de biodistribución consistirá en todos los pacientes para los cuales se obtiene un perfil de VB-111.

Análisis interinos:

25 Se realizará un análisis interino después del alistamiento de 10 pacientes evaluables (tal como se describió anteriormente) que han alcanzado el momento del día 168 (6 meses) o que han abandonado antes de este. Los resultados del análisis interino determinarán si el resto de los pacientes se alistarán en la cohorte 4 para completar el estudio.

Ejemplo 3

Métodos:

30 Se administró VB-111 como una única infusión intravenosa a dosis crecientes desde 1×10^{12} (cohorte 1) a 3×10^{12} (cohorte 2) partículas de virus (PV), seguido de dosis repetidas de 3×10^{12} o 1×10^{13} cada 2 meses (cohortes 3-4). Las evaluaciones incluyeron seguridad, farmacocinética, respuesta tumoral según los criterios de RANO y supervivencia global.

Resultados:

35 Veintiocho pacientes de 26-74 años en 3 centros médicos en EE. UU. recibieron hasta 8 dosis repetidas de VB-111. La mediana de la supervivencia global fue de 360 [rango: 70-574] y 266 días [rango: 28-664] para los pacientes que recibieron al menos una dosis de 1×10^{13} PV (dosis alta) frente a sujetos que recibieron dosis más bajas, respectivamente (p NS). La supervivencia sin progresión fue de 87 frente a 55 días para los pacientes que recibieron la dosis alta y las dosis más bajas, respectivamente (p = 0,01). La mediana del seguimiento fue de 232 días. Tres pacientes presentaron una respuesta parcial (RP) a los 82, 86 y 408 días después de la dosificación inicial de VB-111. Veintiún de los pacientes que progresaron después del tratamiento de VB-111 recibieron bevacizumab fuera del estudio; 7 de los 15 pacientes evaluables (47%) presentaron una RP, comparado con una tasa de RP prevista del 30% según la bibliografía. El VB-111 fue seguro y bien tolerado, se indicaron 53 acontecimientos adversos, y 14 fueron clasificados como posiblemente relacionados con VB-111. Todos los acontecimientos fueron CTCAE de grado 1-2, excepto una embolia pulmonar (EP) de grado 3. No se produjeron muertes relacionadas con el estudio. 40 Un paciente desarrolló un edema peritumoral después de la dosificación, que se resolvió con una terapia con corticosteroides. Los acontecimientos que aparecieron en más del 10% de los pacientes incluyeron dolor de cabeza y fatiga. 45

50 A medida que continuaba el estudio, otros sujetos con enfermedad progresiva fueron tratados con bevacizumab, y los datos del estudio se volvieron a calcular en consecuencia. Veintitrés de los sujetos que presentaron enfermedad progresiva (EP) con el tratamiento de VB-111 recibieron bevacizumab fuera del estudio; 6 de los 15 sujetos evaluables (40%) presentaron una respuesta parcial (RP), comparado con 30% previsto según la bibliografía. Los datos se proporcionan en la siguiente tabla.

Tabla 7 - Respuesta al bevacizumab después de VB-111

ID del sujeto	Exposición al bevacizumab	Mejor respuesta*
60-001	Sí	EP
60-002	Sí	EP
60-003	Sí	EE
60-004	Sí	EE
60-005	Sí	RP
61-001	Sí	Desconocida
61-002	Sí	Desconocida
61-003	Sí	EE
61-004	Sí	Desconocida
61-005	Sí	Desconocida
62-002	No	N/A
62-003	Sí	RP
62-004	Sí	RP
62-005	Sí	Desconocida
62-006	Sí	EE
62-007	Sí	EP
62-008	Desconocida	Desconocida
62-009	Sí	Desconocida
62-010	El sujeto se mantiene estable con VB-111	
62-011	Sí	EP
62-012	Sí	Desconocida
62-013	Sí	RP
62-014	Desconocida	Desconocida
62-015	Sí	EE
62-016	Sí	RP
62-017	Sí	RP
62-018	Sí	Desconocida
62-019	El sujeto se mantiene estable con VB-111	
*EP, enfermedad progresiva; RP, respuesta parcial; EE, enfermedad estable		

Posteriormente se añadieron más pacientes al estudio, y los datos se volvieron a calcular en consecuencia. Cuarenta y seis pacientes de 27-76 años en 4 centros médicos en EE, UU, e Israel recibieron hasta 13 dosis repetidas de VB-111. De estos, 30 pacientes recibieron la dosis alta (1×10^{13} PV). Se produjeron 22 acontecimientos adversos relacionados, 19 CTCAE de grado 1-2; el grado 3 incluyó embolia pulmonar, edema peritumoral y DVT. La mediana de la supervivencia global fue de 360 [rango: 70-574] y 266 días [rango: 28-664] para los pacientes que recibieron al menos una dosis alta frente a los sujetos que recibieron dosis más bajas, respectivamente (p NS). La

supervivencia sin progresión fue de 63 frente a 55 días para los pacientes que recibieron la dosis alta frente a las dosis más bajas, respectivamente ($p = 0,01$). La mediana del seguimiento fue de 232 días. Seis pacientes presentaron una respuesta parcial y/o estabilidad de la enfermedad prolongada (≥ 180 días). Las tasas de crecimiento tumoral mostraron una respuesta a la dosis estadísticamente significativa. Once pacientes recibieron una terapia de combinación de hasta 4 dosis de VB-111 junto con bevacizumab después de la progresión con una monoterapia de VB-111. La mediana del tiempo hasta la segunda progresión fue de 93 días. Estos datos se muestran en la figura 2. La figura 3 proporciona un ejemplo de un paciente que fue tratado con una combinación de VB-111 y bevacizumab tras la progresión de la enfermedad. El VB-111 fue seguro y bien tolerado, como monoterapia y como terapia combinada.

10 Conclusiones:

El VB-111 fue seguro y bien tolerado en pacientes con GBM recurrente con dosis repetidas de hasta 1×10^{13} PV. Se observaron respuestas tumorales. La supervivencia global fue aproximadamente 3 meses más larga, comparada con los datos históricos en GBM recurrente que incluyen agentes antiangiogénicos convencionales. Los datos sugieren que VB-111 potencia la respuesta al bevacizumab administrado cuando se produce una progresión.

15 Ejemplo 4: Administración de múltiples dosis de Ad5-PPE-1-3X-Fas-c combinado con bevacizumab

OBJETIVO: Para evaluar la seguridad, la tolerabilidad y la eficacia de múltiples dosis de VB-111, 1×10^{13} partículas de virus (PV) en pacientes con GBM recurrente cada 8 semanas como monoterapia, combinado con bevacizumab 10 mg/kg cada 2 semanas tras la progresión, comparado con una monoterapia de bevacizumab en pacientes con GBM recurrente.

20 Los pacientes en el brazo de la intervención recibirán en primer lugar VB-111, seguido de una combinación de VB-111 con bevacizumab tras la progresión.

En una realización, también puede observarse una mayor eficacia de VB-111 en combinación con bevacizumab incluso después de la progresión con una monoterapia de VB-111, puesto que la sinergia puede potenciar la actividad de VB-111 y superar la resistencia al fármaco. Además, en algunos casos, se observó una respuesta retrasada al VB-111 en pacientes varios meses después de recibir VB-111. Por tanto, algunos pacientes pueden experimentar una progresión de la enfermedad rápida tras el alistamiento al estudio sin la oportunidad de responder al VB-111. El régimen propuesto puede aprovechar estas respuestas retrasadas.

Criterios de inclusión

30 Primera o segunda progresión o primera recurrencia del glioblastoma (según los criterios de RANO actualizados, véase la tabla 8) después de un tratamiento convencional con temozolomida y radiación;

Un diagnóstico histológicamente confirmado de GBM. Pueden alistarse pacientes con enfermedad quirúrgicamente extirpable en recurrencia, aunque no aparezca enfermedad residual después de la extirpación quirúrgica. Un intervalo de al menos 4 semanas entre una extirpación quirúrgica previa y el alistamiento en el estudio;

35 Tabla 8 - Criterios para la evaluación de la respuesta que incorporan MRI y factores clínicos (procedentes de los criterios de RANO actualizados, según se publicaron en Wen *et al.*, "Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group., *J. Clin. Oncol.*, 28:1963-1972 (2010)).

Respuesta	Criterios
Respuesta completa	Requiere todo lo siguiente: desaparición completa de la enfermedad potenciadora mensurable y no mensurable sostenida durante al menos 4 semanas; ausencia de nuevas lesiones; lesiones no potenciadoras estables o mejoradas (T2/FLAIR); los pacientes no deben estar tomando corticosteroides (o solo toman dosis de reemplazo fisiológico); y clínicamente mejorado o estable. Nota: Los pacientes con enfermedad no mensurable solo no pueden presentar una respuesta completa; la mejor respuesta posible es la enfermedad estable.
Respuesta parcial	Requiere todo lo siguiente: $\geq 50\%$ de disminución comparado con la línea de base en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones potenciadoras mensurables sostenida durante al menos 4 semanas; ausencia de progresión de una enfermedad no mensurable; ausencia de nuevas lesiones; lesiones no potenciadoras estables o mejoradas (T2/FLAIR) en la misma dosis o una dosis menor de corticosteroides, comparado con un barrido de línea de base; la dosis de corticosteroides en el momento de la evaluación con barrido no debe ser mayor que la dosis en el momento del barrido de línea de base; y clínicamente mejorado o estable. Nota: Los pacientes con enfermedad no mensurable solo no pueden presentar una respuesta parcial; la mejor respuesta posible es la enfermedad estable.

Enfermedad estable	Requiere todo lo siguiente: no competente para respuesta completa, respuesta parcial o progresión de la enfermedad; lesiones no potenciadoras estables (T2/FLAIR) en la misma dosis o una dosis menor de corticosteroides, comparado con un barrido de línea de base. En el caso de que la dosis de corticosteroides aumentase por nuevos síntomas y signos sin confirmación de progresión de la enfermedad tras tomar imágenes neuronales, y que la posterior formación de imágenes de seguimiento demostrase que este aumento en los corticosteroides fue necesario debido a la progresión de la enfermedad, el último barrido que se considera que muestra enfermedad estable será el barrido obtenido cuando la dosis de corticosteroides era equivalente a la dosis de línea de base.
Progresión	Definida por cualquiera de lo siguiente: $\geq 25\%$ de aumento en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de las lesiones potenciadoras, comparado con la medición tumoral más pequeña obtenida en la línea de base (si no hay disminución) o la mejor respuesta, en dosis estables o crecientes de corticosteroides*; aumento significativo en una lesión no potenciadora T2/FLAIR en dosis estables o crecientes de corticosteroides, comparado con el barrido de línea de base o mejor respuesta después del inicio de la terapia* no debido a acontecimientos comórbidos (por ejemplo, terapia de radiación, desmielinización, lesión isquémica, infección, ataques, cambios posoperatorios, u otros efectos del tratamiento); cualquier lesión nueva; claro deterioro clínico no atribuible a otras causas aparte del tumor (por ejemplo, ataques, efectos adversos de medicaciones, complicaciones de la terapia, acontecimientos cerebrovasculares, infección, etc.) o cambios en la dosis de corticosteroides; no poder regresar para la evaluación debido a muerte o condiciones deteriorantes; o progresión clara de una enfermedad no mensurable.

Todas las lesiones mensurables y no mensurables deben evaluarse usando la misma técnica que en la línea de base. Abreviaturas: MRI, formación de imágenes de resonancia magnética; FLAIR, recuperación de inversión atenuada por fluidos ("fluid-attenuated inversion recovery"). * Las dosis estables de corticosteroides incluyen a los

5

Criterios de exclusión

Mujeres pacientes embarazadas o que están dando el pecho;

Evidencia de hemorragia del SNC de CTCAE de grado 2 o mayor en MRI de línea de base;

Pacientes que han padecido un acontecimiento cardíaco agudo dentro de los últimos 12 meses;

10 Pacientes con enfermedad vascular activa, miocárdica o periférica (concretamente, síndrome coronario agudo, ictus cerebral, ataque isquémico transitorio o trombosis arterial, o enfermedad vascular periférica sintomática dentro de los últimos 3 meses);

Pacientes con retinopatía proliferativa y/o vascular conocida;

15 Pacientes con enfermedad hepática conocida (alcohólica, inducida por fármacos/toxinas, genética, o autoinmunitológica);

Pacientes que se han sometido a cirugía mayor dentro de las últimas 4 semanas antes del alistamiento;

Procedimiento de cirugía menor, por ejemplo, biopsia estereotáctica, dentro de 7 días del primer tratamiento del estudio; colocación de un dispositivo de acceso vascular, dentro de 2 días del primer tratamiento del estudio;

Historia de abscesos intracraneales dentro de 6 meses antes del primer tratamiento del estudio;

20 Historia de sangrado gastrointestinal activo dentro de 6 meses antes del primer tratamiento del estudio;

Herida no curada grave, úlcera activa o fractura de hueso no tratada.

Plan de tratamiento

25 Este estudio es un estudio de fase 3 multicéntrico, abierto, de 2 brazos, controlado, aleatorizado y prospectivo que mide la eficacia, la seguridad, la tolerabilidad de múltiples dosis de VB-111 administrado por vía intravenosa, seguido de VB-111 y bevacizumab, comparado con una monoterapia de bevacizumab, en pacientes con GBM recurrente.

Los pacientes se seleccionarán para la elegibilidad y después, hasta 28 días después, en la visita de la línea de base, se aleatorizarán en uno de dos grupos de tratamiento a una proporción de 1:1 (brazo de investigación frente a

brazo control). Los pacientes se aleatorizarán y estratificarán según su edad en el momento de la aleatorización (≤ 60 años, < 60 años), KPS (< 80 , ≥ 80) y progresión (1ª progresión, 2ª progresión). El brazo de intervención recibirá una monoterapia con VB-111 administrado como múltiples infusiones intravenosas de 1×10^{13} PV cada 8 semanas, que, cuando aparezca una progresión, se combinarán con bevacizumab 10 mg/kg cada 2 semanas. Este régimen continuará hasta que aparezca otra progresión. El brazo control recibirá una monoterapia con bevacizumab 10 mg/kg cada 2 semanas hasta que aparezca una progresión.

Los pacientes se mantendrán en el estudio hasta que lo abandonen debido a la progresión de la enfermedad o su retirada. Después continuará el seguimiento para la supervivencia hasta que el paciente expire.

En la figura 1 se muestra una descripción general del estudio.

10 Visitas del estudio

Selección, Día -28-0 (todos los pacientes)

Los pacientes prospectivos se seleccionarán dentro de 4 semanas del alistamiento. Los pacientes serán informados de las ventajas, los riesgos y las limitaciones del estudio, y se les pedirá que firmen un formulario de consentimiento informado. A los pacientes que hayan proporcionado su consentimiento se les asignará un número de identificación, que consiste en el número del centro (por ejemplo, 01) más el número del sujeto/paciente en orden secuencial (por ejemplo, 001, 002, 003, etc.). El número de identificación completo para el primer paciente en el centro 01 será 01-001, 01-002, etc.

Los pacientes avanzarán a las evaluaciones de selección tal como se muestra en el ejemplo 2.

Visita de la línea de base, día 1 (todos los pacientes)

20 Se le administrará el tratamiento del estudio (VB-111 o bevacizumab) como paciente externo. Tras haber determinado que el sujeto/paciente es elegible, se le indicará que se presente en el centro clínico dentro de 4 semanas desde la selección en ayunas hasta 30 minutos después de la administración del fármaco de estudio.

Antes de la dosificación (D1):

25 En el día de la admisión al sitio, cada sujeto/paciente volverá a ser verificado para la elegibilidad según los criterios de inclusión/exclusión y después se ensayará dentro de 24 horas antes de la dosificación para las siguientes evaluaciones:

ACONTECIMIENTOS ADVERSOS: A los pacientes se les preguntará acerca de cambios en su estado físico y mental desde que firmaron el formulario de consentimiento.

30 MEDICACIONES CONCOMITANTES: A los pacientes se les preguntará acerca de cambios en sus terapias desde que firmaron el formulario de consentimiento.

MEDICIÓN DEL TUMOR: Se tomarán imágenes de MRI cerebral de contraste y no contraste para evaluar la magnitud del cáncer. Si transcurren menos de 2 semanas entre las visitas de selección y de línea de base, solo será necesario 1 MRI.

Análisis de laboratorio:

35 Muestras de sangre:

- Hematología: hemoglobina, recuento sanguíneo completo con diferencial, INR, PT y PTT activado;
- Química: electrolitos, creatinina y nitrógeno de urea en sangre, bilirrubina, fosfatasa alcalina, ALT y AST, calcio, proteínas totales, y albúmina;
- Anticuerpos contra la muestra del virus Ad-5.

40 Se recogerá orina para las siguientes evaluaciones:

- Análisis de orina habitual
- Tiras reactivas para la proteinuria
 - No se modificará la dosis para acontecimientos de grado $\frac{1}{2}$
 - Grado 3 (UPC $> 3,5$, recolección de orina $> 3,5$ g/24 hr, o tiras reactivas 4+): Detener el tratamiento de bevacizumab hasta $\leq$ grado 2, según se determina mediante la proporción UPC $\leq 3,5$ o 24 hr recolección $\leq 3,5$ g
 - Grado 4 (síndrome nefrótico): Detener el bevacizumab

EVALUACIONES DE LA CALIDAD DE VIDA RELACIONADAS CON LA SALUD: Se rellenarán un cuestionario de calidad de vida central de EORTC (QLQ-C30) y un módulo de cáncer cerebral (BCM20) antes de recibir tratamiento.

ALEATORIZACIÓN: Los pacientes que se ajustan todos los criterios de entrada serán aleatorizados en uno de dos grupos de tratamiento en una proporción 1:1, respectivamente, usando un procedimiento de aleatorización centralizado: (1) monoterapia de VB-111 1×10^{13} PV cada 8 semanas seguida, tras la progresión, por VB-111 cada 8 semanas y bevacizumab 10 mg/kg cada 2 semanas, o (2) monoterapia de bevacizumab: 10 mg/kg cada 2 semanas. La aleatorización se estratificará según su edad en el momento de la aleatorización (≤ 60 años, < 60 años), KPS (< 80 , ≥ 80) y progresión (1ª progresión, 2ª progresión).

SIGNOS VITALES: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica supina, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria) 15 minutos antes de la dosificación.

TRATAMIENTO PROFILÁCTICOS: PACIENTES ALEATORIZADOS EN VB-111: Para los pacientes aleatorizados en el brazo de tratamiento de VB-111, se administrarán los siguientes tratamientos profilácticos:

TRATAMIENTO ANTIPIRÉTICO: Para evitar la fiebre después de la administración del fármaco del estudio, antes del tratamiento solo con VB-111, todos los pacientes recibirán 1000 mg de acetaminofeno comenzando 1-2 horas antes de la dosificación, seguido de 500 mg PRN 24 horas.

TRATAMIENTO CON CORTICOSTEROIDES: Para reducir la respuesta potencial de edema durante la administración del fármaco se administrará un tratamiento de dexametasona antes del tratamiento solo con VB-111:

Dosis inicial con VB-111: Se administrarán 10 mg 30 minutos antes de la dosificación, seguido de 4 mg $\times$ 2/día durante 14 días después de la dosificación.

Dosis posteriores con VB-111: Se administrarán 10 mg 30 minutos antes de la dosificación, seguido de 4 mg $\times$ 2/día durante 3 días después de la dosificación. Se administrarán más tratamientos con corticosteroides según lo decida el investigador.

Si cuando los pacientes comienzan el estudio ya están recibiendo esteroides, el investigador debe intentar por cualquier medio no cambiar la dosis de esteroides dentro de 5 días de la evaluación de la enfermedad, a menos que esté clínicamente garantizado. La decisión de continuar con los esteroides o de empezar a disminuirlos gradualmente después de este periodo de tiempo será tomada por el investigador.

Administración del fármaco de estudio:

VB-111: Antes de la infusión, la disolución salina para inyección debe llevarse a temperatura ambiente. El tiempo máximo del fármaco en disolución salina es de 90 minutos a temperatura ambiente (60 minutos más una ventana de 30 minutos). Los viales deben abrirse en una cabina de seguridad biológica y combinarse con disolución salina (véase la preparación de la infusión de VB-111, a continuación). El VB-111 se infundirá al paciente a la dosificación pertinente según el peso del paciente, según el manual de ejecución. De modo específico, para pacientes con un peso menor que 50 kg, la dosis se reducirá en 30%. Debe administrarse una única infusión de VB-111 a 3 ml/minuto. Los pacientes que reciben VB-111 deben permanecer en el centro clínico durante 8 horas en observación.

BEVACIZUMAB: Se administrará del modo convencional ("standard of care", SOC).

SIGNOS VITALES: PACIENTES ALEATORIZADOS EN VB-111: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria) a los 30 y 60 minutos después de la dosificación, y a las 4 y 6 horas después de la dosificación y/o tras la desaparición de cualquier acontecimiento adverso, cualquiera que suceda primero.

ACONTECIMIENTOS ADVERSOS: Los pacientes se controlarán para acontecimientos adversos mediante su observación después del tratamiento en el centro clínico.

MEDICACIONES CONCOMITANTES: Debe registrarse cualquier medicación concomitante administrada durante la observación del paciente después del tratamiento.

Visitas de seguimiento de la monoterapia de VB-111

Contacto telefónico de seguridad cada mes alterno entre las visitas de dosificación (días 28, 84, 140, etc.)

Debe realizarse una llamada telefónica cada mes alterno entre las visitas de dosificación (días 28, 84, 140, etc.) al sujeto/paciente para preguntarle acerca de AE y cambios en la medicación.

Posterior administración de VB-111 (cada 8 semanas después de la dosis inicial: día 56, día 112, día 168, etc.)

En el día de admisión al sitio, cada sujeto/paciente volverá a ser verificado para la elegibilidad según los criterios de

inclusión/exclusión (según sea pertinente) y después se ensayará dentro de 24 horas antes de la dosificación. Los pacientes sin evidencia de enfermedad progresiva serán considerados para una dosificación posterior. Esta visita y la dosificación de VB-111 se repetirán cada 8 semanas hasta la progresión de la enfermedad.

Se realizarán las siguientes evaluaciones:

- 5 ACONTECIMIENTOS ADVERSOS: A los pacientes se les preguntará acerca de cambios en su estado físico y mental desde la última visita.

MEDICACIONES CONCOMITANTES: A los pacientes se les preguntará acerca de cambios en sus terapias desde la última visita.

- 10 EVALUACIONES DE LA CALIDAD DE VIDA RELACIONADAS CON LA SALUD: Se rellenarán un cuestionario de calidad de vida central de EORTC (QLQ-C30) y un módulo de cáncer cerebral (BCM20) antes de recibir tratamiento.

MEDICIÓN DEL TUMOR: Los pacientes se evaluarán para la respuesta usando la formación de imágenes de resonancia magnética cerebral con y sin contraste (MRI), basándose la evaluación en los criterios de RANO. La formación de imágenes MRI se realizará hasta 72 horas antes de la dosificación para evaluar la magnitud del cáncer (si el paciente presenta una progresión de la enfermedad confirmada, debe considerarse su participación en la terapia de combinación con VB-111 y bevacizumab. Se administrará VB-111 1×10^{13} PV cada 8 semanas, y se administrará bevacizumab cada 2 semanas).

- 15 EXAMEN FÍSICO: El examen físico se centrará en los órganos con tumores y las mediciones del tumor según los criterios de RANO, así como los siguientes: cabeza y cuello; ojos; pulmones; corazón; abdomen; articulaciones; circulación periférica; piel; o neurológicos.

- 20 ECG (solo día 168 y terminación temprana): Debe realizarse un electrocardiograma de 12 derivaciones convencional con registros de ritmo.

ANÁLISIS DE LABORATORIO:

Se recogerán muestras de sangre para las siguientes evaluaciones:

- Hematología: hemoglobina, recuento sanguíneo completo con diferencial, INR, PT y PTT activado;

- 25 - Química: electrolitos, creatinina y nitrógeno de urea en sangre, bilirrubina, fosfatasa alcalina, ALT y AST, calcio, proteínas totales, y albúmina;

- Ensayo en suero de embarazo

- Anticuerpos contra la muestra del virus Ad-5.

Se recogerá orina para las siguientes evaluaciones:

- 30 - Análisis de orina habitual

- Tiras reactivas para la proteinuria

- No se modificará la dosis para acontecimientos de grado $\frac{1}{2}$

- Grado 3 (UPC >3,5, recolección de orina >3,5 g/24 hr, o tiras reactivas 4+): Detener el tratamiento de bevacizumab hasta $\leq$ grado 2, según se determina mediante la proporción UPC $\leq$ 3,5 o 24 hr recolección $\leq$ 3,5 g

- 35 - Grado 4 (síndrome nefrótico): Detener el bevacizumab

SIGNOS VITALES: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica supina, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria) 15 minutos antes de la dosificación.

- 40 TRATAMIENTO ANTIPIRÉTICO: Para evitar la fiebre después de la administración del fármaco del estudio, antes del tratamiento con VB-111, todos los pacientes recibirán 1000 mg de acetaminofeno comenzando 1-2 horas antes de la dosificación, seguido de 500 mg cada 4 horas durante 24 horas.

TRATAMIENTO CON CORTICOSTEROIDES: Para reducir la respuesta potencial de edema durante la administración del fármaco se administrará un tratamiento de VB-111 y dexametasona: se administrarán 10 mg 30 minutos antes de la dosificación, seguido de 4 mg $\times$ 2/día durante 3 días después de la dosificación. Se administrarán más tratamientos con corticosteroides según lo decida el investigador.

- 45 Si en el momento de la dosificación, el paciente ya está recibiendo esteroides, el investigador debe intentar por cualquier medio no cambiar la dosis de esteroides dentro de 5 días de la evaluación de la enfermedad, a menos que esté clínicamente garantizado. La decisión de continuar con los esteroides o de empezar a disminuirlos

gradualmente después de este periodo de tiempo será tomada por el investigador.

ADMINISTRACIÓN DEL FÁRMACO DE ESTUDIO: La infusión se realizará según el manual de ejecución. Antes de la infusión, la disolución salina debe llevarse a temperatura ambiente. Los viales deben abrirse en una cabina de seguridad biológica e inyectarse en disolución salina normal para infusión según el manual de ejecución (véase la preparación de la infusión de VB-111, a continuación). La disolución final para la administración debe administrarse no más de 90 minutos después de la preparación (60 minutos más una ventana de 30 minutos). El VB-111 se infundirá al paciente a la dosificación pertinente según el peso del paciente, según se detalla en el manual de ejecución. Para pacientes con un peso menor que 50 kg, la dosis de 1×10^{13} PV se reducirá en 30%. Las infusiones intravenosas del VB-111 diluido deben administrarse a 3 ml/minuto.

10 Se permitirá una comida normal 0,5 horas después de la dosificación.

ACONTECIMIENTOS ADVERSOS: Los pacientes se controlarán para acontecimientos adversos mediante su observación después del tratamiento en el centro clínico.

MEDICACIONES CONCOMITANTES: Debe registrarse cualquier medicación concomitante administrada durante la observación del paciente después del tratamiento.

15 Fin de la monoterapia de VB-111 tras la progresión de la enfermedad

Los pacientes continuarán recibiendo VB-111 cada 8 semanas, con la condición de que se mantengan estables. Cuando los pacientes sufren una progresión de la enfermedad, volverán al centro clínico para una visita final del estudio. Además, si los pacientes retiran el consentimiento o el investigador determina que el paciente no debe continuar en el estudio, el paciente volverá para una visita de terminación temprana. Los pacientes serán contactados por teléfono cada 2-3 meses para el seguimiento de la supervivencia.

Administración de VB-111+bevacizumab como tratamiento de combinación

En el momento en que el paciente sufra una progresión de la enfermedad, el sujeto/paciente iniciará un tratamiento con VB-111 y bevacizumab como terapia de combinación. Se administrará VB-111 1×10^{13} PV cada 8 semanas, y se administrará bevacizumab cada 2 semanas.

25 Puesto que es necesario un mínimo de 8 semanas entre las dosis VB-111, si un sujeto/paciente progresa antes de 8 semanas, el sujeto empezará el tratamiento con bevacizumab (10 mg/kg) cada 2 semanas, y a las 8 semanas desde la última dosis de VB-111, el sujeto/paciente recibirá la primera dosis de combinación con VB-111.

A los pacientes se les volverá a informar acerca de las ventajas, los riesgos y las limitaciones de la terapia de combinación. Se realizarán las siguientes evaluaciones en cada día del tratamiento de combinación:

30 ACONTECIMIENTOS ADVERSOS: A los pacientes se les preguntará acerca de cambios en su estado físico y mental desde la última visita.

MEDICACIONES CONCOMITANTES: A los pacientes se les preguntará acerca de cambios en sus terapias desde la última visita.

35 CALIDAD DE VIDA RELACIONADA CON LA SALUD Y FUNCIÓN NEUROCOGNITIVA: Se rellenarán un cuestionario de calidad de vida central de EORTC (QLQ-C30) y un módulo de cáncer cerebral (BCM20) antes de recibir tratamiento.

40 MEDICIÓN DEL TUMOR: Los pacientes se evaluarán para la respuesta usando la formación de imágenes de resonancia magnética cerebral con y sin contraste (MRI), basándose la evaluación en los criterios de RANO. La formación de imágenes MRI se realizará hasta 72 horas antes de la dosificación para evaluar la magnitud del cáncer.

EXAMEN FÍSICO: El examen físico se centrará en los órganos con tumores y las mediciones del tumor según los criterios de RANO, así como los siguientes: cabeza y cuello; ojos; pulmones; corazón; abdomen; articulaciones; circulación periférica; piel; o neurológicos.

45 SIGNOS VITALES: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica supina, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria) 15 minutos antes de la dosificación.

ECG (debe realizarse cada 6 meses desde la dosis de combinación inicial): Debe realizarse un electrocardiograma de 12 derivaciones convencional con registros de ritmo.

Análisis de laboratorio:

Se recogerá una muestra de sangre para las siguientes evaluaciones:

50 - Hematología: hemoglobina, recuento sanguíneo completo con diferencial, INR, PT y PTT activado;

- Química: electrolitos, creatinina y nitrógeno de urea en sangre, bilirrubina, fosfatasa alcalina, ALT y AST, calcio, proteínas totales, y albúmina;

- Ensayo en suero de embarazo;

- Anticuerpos contra la muestra del virus Ad-5.

5 Se recogerá orina para las siguientes evaluaciones:

- Análisis de orina habitual

- Tiras reactivas para la proteinuria

- No se modificará la dosis para acontecimientos de grado ½

10 - Grado 3-(UPC>3,5, recolección de orina >3,5 g/24 hr, o tiras reactivas 4+): Detener el tratamiento de bevacizumab hasta <Grado 2, según se determina mediante la proporción UPC ≤3,5 o 24 hr recolección ≤3,5 g

- Grado 4 (síndrome nefrótico): Detener el bevacizumab

TRATAMIENTO ANTIPIRÉTICO: Para evitar la fiebre después de la administración del fármaco del estudio, antes del tratamiento con VB-111, todos los pacientes recibirán 1000 mg de acetaminofeno comenzando 1-2 horas antes de la dosificación, seguido de 500 mg cada 4 horas durante 24 horas.

15 TRATAMIENTO CON CORTICOSTEROIDES: Para reducir la respuesta potencial de edema durante la administración del fármaco se administrará un tratamiento de VB-111 y dexametasona: se administrarán 10 mg 30 minutos antes de la dosificación, seguido de 4 mg×2/día durante 3 días después de la dosificación. Se administrarán más tratamientos con corticosteroides según lo decida el investigador.

20 Si en el momento de la dosificación, el paciente ya está recibiendo esteroides, el investigador debe intentar por cualquier medio no cambiar la dosis de esteroides dentro de 5 días de la evaluación de la enfermedad, a menos que esté clínicamente garantizado. La decisión de continuar con los esteroides o de empezar a disminuirlos gradualmente después de este periodo de tiempo será tomada por el investigador.

25 ADMINISTRACIÓN DE BEVACIZUMAB: El bevacizumab se administrará mediante infusión a una dosis de 10 mg/kg antes que VB-111 en los días de dosificación. La tasa de infusión será según la inserción en el paquete para el bevacizumab: El bevacizumab debe administrarse a lo largo de 60 minutos (+una ventana de 30 minutos) como una infusión IV. Si la infusión de 60 minutos se tolera, todas las infusiones posteriores pueden administrarse a lo largo de 30 minutos.

30 ADMINISTRACIÓN DE VB-111: La infusión se realizará según el manual de ejecución. Antes de la infusión, la disolución salina debe llevarse a temperatura ambiente. Los viales deben abrirse en una cabina de seguridad biológica e inyectarse en disolución salina normal para infusión según el manual de ejecución (véase la preparación de la infusión de VB-111, a continuación). La disolución final para la administración debe administrarse no más de 90 minutos después de la preparación (60 minutos más una ventana de 30 minutos). El VB-111 se infundirá al paciente a la dosificación pertinente según el peso del paciente, según se detalla en el manual de ejecución. Para pacientes con un peso menor que 50 kg, la dosis de 1×10^{13} PV se reducirá en 30%. Las infusiones intravenosas del
35 VB-111 diluido deben administrarse a 3 ml/minuto.

40 SIGNOS VITALES: Para la dosis de combinación inicial se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria) a los 30 y 60 minutos después de la dosificación, y a las 4 y 6 horas después de la dosificación y/o tras la desaparición de cualquier acontecimiento adverso, cualquiera que suceda primero. Para dosis posteriores, los signos vitales deben registrarse
45 15 minutos antes de la dosificación y 30 minutos después de la dosificación.

ACONTECIMIENTOS ADVERSOS: Los pacientes se controlarán para acontecimientos adversos mediante su observación después del tratamiento en el centro clínico.

MEDICACIONES CONCOMITANTES: Debe registrarse cualquier medicación concomitante administrada durante la observación del paciente después del tratamiento.

45 Seguimiento: Tratamiento de combinación con VB-111 y bevacizumab:

Tratamiento bisemanal con bevacizumab

50 El bevacizumab se administrará según las prácticas convencionales cada 2 semanas. Se prefiere que el sujeto/paciente visite el centro clínico del estudio para recibir su tratamiento y que pueda ser visto por el investigador para evaluar la seguridad (a través de la recogida de información de acontecimientos adversos y de la medicación concomitante). Sin embargo, si el sujeto/paciente vive a más de 1 hora de viaje del centro clínico, el sujeto/paciente

puede recibir su tratamiento de su oncólogo local, y la información de la seguridad (recogida de información de acontecimientos adversos y de la medicación concomitante) debe transferirse al centro clínico del estudio para su inclusión en los registros del estudio. Las visitas locales deben ser previamente aprobadas por el controlador médico en cada paciente.

5 Días después del tratamiento de combinación inicial

Un mes después del tratamiento de combinación inicial, se indicará a cada paciente que se presente en el centro clínico en ayunas para las siguientes evaluaciones:

ACONTECIMIENTOS ADVERSOS: A los pacientes se les preguntará acerca de cambios en su estado físico y mental desde la última visita.

10 **MEDICACIONES CONCOMITANTES:** A los pacientes se les preguntará acerca de cambios en sus terapias desde la última visita.

SIGNOS VITALES: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica supina, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria).

Análisis de laboratorio:

15 Se recogerá una muestra de sangre para las siguientes evaluaciones:

- Hematología: hemoglobina, recuento sanguíneo completo con diferencial, INR, PT y PTT activado
- Química: electrolitos, creatinina y nitrógeno de urea en sangre, bilirrubina, fosfatasa alcalina, ALT y AST, calcio, proteínas totales, y albúmina
- Anticuerpos contra la muestra del virus Ad-5.

20 Las muestras para los análisis de laboratorio extraídas en respuesta a un acontecimiento clínicamente importante serán documentadas como evaluaciones de laboratorio no programadas.

Se recogerá una muestra de orina para las siguientes evaluaciones:

- Análisis de orina habitual
- Tiras reactivas para la proteinuria

25 - No se modificará la dosis para acontecimientos de grado ½

- Grado 3 (UPC>3,5, recolección de orina >3,5 g/24 hr, o tiras reactivas 4+): Detener el tratamiento de bevacizumab hasta ≤grado 2, según se determina mediante la proporción UPC ≤3,5 o 24 hr recolección ≤3,5 g

- Grado 4 (síndrome nefrótico): Detener el bevacizumab

Terminación de la terapia del estudio: Tratamiento de combinación con VB-111 y bevacizumab

30 Los pacientes continuarán recibiendo VB-111 cada 8 semanas y bevacizumab cada 2 semanas, con la condición de que se mantengan estables. Las visitas continuarán en los días del tratamiento de combinación (cada 8 semanas). Cuando los pacientes sufren una progresión de la enfermedad, volverán al centro clínico para una visita final del estudio (véase a continuación). Además, si los pacientes retiran el consentimiento o el investigador determina que el paciente no debe continuar en el estudio, el paciente volverá para una visita final del estudio. Los pacientes serán contactados cada 2-3 meses para el seguimiento de la supervivencia.

35

El seguimiento continuará hasta que el paciente expire.

Administración del bevacizumab como monoterapia

Tratamiento bisemanal con bevacizumab (días 14, 28, 42... 70, 84, 98, etc.)

40 **ADMINISTRACIÓN DE BEVACIZUMAB:** El bevacizumab se administrará dos veces semanales mediante infusión a una dosis de 10 mg/kg según las prácticas convencionales. Durante las visitas al centro clínico para recibir este tratamiento, el investigador debe ver al sujeto/paciente para evaluar la seguridad.

ACONTECIMIENTOS ADVERSOS: A los pacientes se les preguntará acerca de cambios en su estado físico y mental desde que firmaron el formulario de consentimiento.

45 **MEDICACIONES CONCOMITANTES:** A los pacientes se les preguntará acerca de cambios en sus terapias desde que firmaron el formulario de consentimiento.

Tratamiento con bevacizumab (días 56, 112, 168, etc.)

Se realizarán las siguientes evaluaciones:

ACONTECIMIENTOS ADVERSOS: A los pacientes se les preguntará acerca de cambios en su estado físico y mental desde la última visita.

- 5 MEDICACIONES CONCOMITANTES: A los pacientes se les preguntará acerca de cambios en sus terapias desde la última visita.

CALIDAD DE VIDA RELACIONADA CON LA SALUD: Se rellenarán un cuestionario de calidad de vida central de EORTC (QLQ-C30) y un módulo de cáncer cerebral (BCM20) en cada visita antes de recibir tratamiento.

- 10 MEDICIÓN DEL TUMOR: Los pacientes se evaluarán para la respuesta usando la formación de imágenes de resonancia magnética cerebral con y sin contraste (MRI), basándose la evaluación en los criterios de RANO. La formación de imágenes MRI se realizará hasta 72 horas antes de la dosificación para evaluar la magnitud del cáncer.

- 15 EXAMEN FÍSICO: El examen físico se centrará en los órganos con tumores y las mediciones del tumor según los criterios de RANO, así como los siguientes: cabeza y cuello; ojos; pulmones; corazón; abdomen; articulaciones; circulación periférica; piel; o neurológicos.

ECG (debe realizarse 6 meses después de la dosis inicial de bevacizumab): Debe realizarse un electrocardiograma de 12 derivaciones convencional con registros de ritmo.

ANÁLISIS DE LABORATORIO (según el manual de ejecución):

Se recogerá una muestra de sangre para las siguientes evaluaciones:

- 20 - Hematología: hemoglobina, recuento sanguíneo completo con diferencial, INR, PT y PTT activado;
- Química: electrolitos, creatinina y nitrógeno de urea en sangre, bilirrubina, fosfatasa alcalina, ALT y AST, calcio, proteínas totales, y albúmina;
- Ensayo en suero de embarazo
- Anticuerpos contra la muestra del virus Ad-5.

- 25 Se recogerá orina para las siguientes evaluaciones:

- Análisis de orina habitual
- Tiras reactivas para la proteinuria

- No se modificará la dosis para acontecimientos de grado $\frac{1}{2}$
- Grado 3-(UPC>3,5, recolección de orina >3,5 g/24 hr, o tiras reactivas 4+): Detener el tratamiento de bevacizumab hasta <Grado 2, según se determina mediante la proporción UPC $\leq 3,5$ o 24 hr recolección $\leq 3,5$ g
30 - Grado 4 (síndrome nefrótico): Detener el bevacizumab

SIGNOS VITALES: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica supina, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria) 15 minutos antes de la dosificación.

- 35 ADMINISTRACIÓN DE BEVACIZUMAB: El bevacizumab se administrará mediante infusión a una dosis de 10 mg/kg antes que VB-111 en los días de dosificación. La tasa de infusión será según la inserción en el paquete para el bevacizumab: La dosis inicial de bevacizumab debe administrarse a lo largo de 60 minutos (+una ventana de 30 minutos) como una infusión IV.

Final del estudio/terminación temprana: Monoterapia con bevacizumab:

- 40 Los pacientes continuarán recibiendo bevacizumab cada 2 semanas, con la condición de que se mantengan estables. Las visitas continuarán cada 8 semanas. Cuando los pacientes sufren una progresión de la enfermedad, volverán al centro clínico para una visita final del estudio (véase la sección 4.5). Además, si los pacientes retiran el consentimiento o el investigador determina que el paciente no debe continuar en el estudio, el paciente volverá para una visita final.

Los pacientes serán contactados cada 2-3 meses para el seguimiento de la supervivencia.

- 45 El seguimiento continuará hasta que el paciente expire.

Terminación de la terapia del estudio (todas las terapias)

En el momento que el sujeto/paciente se retire del ensayo, debido a la retirada del consentimiento o la progresión de la enfermedad, se realizarán las siguientes evaluaciones como una visita final del estudio:

5 ACONTECIMIENTOS ADVERSOS: A los pacientes se les preguntará acerca de cambios en su estado físico y mental desde la última visita.

MEDICACIONES CONCOMITANTES: A los pacientes se les preguntará acerca de cambios en sus terapias desde la última visita.

CALIDAD DE VIDA RELACIONADA CON LA SALUD Y FUNCIÓN NEUROCOGNITIVA: Se rellenarán un cuestionario de calidad de vida central de EORTC (QLQ-C30) y un módulo de cáncer cerebral (BCM20).

10 MEDICIÓN DEL TUMOR: Los pacientes se evaluarán para la respuesta usando la formación de imágenes de resonancia magnética cerebral con y sin contraste (MRI), basándose la evaluación en los criterios de RANO.

EXAMEN FÍSICO: El examen físico se centrará en los órganos con tumores y las mediciones del tumor según los criterios de RANO, así como los siguientes: cabeza y cuello; ojos; pulmones; corazón; abdomen; articulaciones; circulación periférica; piel; o neurológicos.

15 ECG: Debe realizarse un electrocardiograma de 12 derivaciones convencional con registros de ritmo.

Análisis de laboratorio:

Se recogerá una muestra de sangre para las siguientes evaluaciones:

- Hematología: hemoglobina, recuento sanguíneo completo con diferencial, INR, PT y PTT activado

20 - Química: electrolitos, creatinina y nitrógeno de urea en sangre, bilirrubina, fosfatasa alcalina, ALT y AST, calcio, proteínas totales, y albúmina;

- Ensayo en suero de embarazo

- Anticuerpos contra la muestra del virus Ad-5.

Se recogerá orina para las siguientes evaluaciones:

- Análisis de orina habitual

25 - Tiras reactivas para la proteinuria

SIGNOS VITALES: Se registrarán los signos vitales (presión sanguínea sistólica y diastólica supina, frecuencia cardíaca periférica, temperatura corporal, frecuencia respiratoria).

Duración del estudio

30 Los pacientes se mantendrán en el estudio hasta que lo abandonen debido a la progresión de la enfermedad o una terminación temprana. Después, el paciente será contactado por teléfono cada 2-3 meses para obtener los datos de supervivencia hasta que el paciente expire.

Estudios correlativos/especiales

Anticuerpos

Se recogerán muestras de suero para el análisis de los niveles de anticuerpos contra el adenovirus.

35 *Medición del efecto*

Supervivencia global

La supervivencia global se define como el tiempo desde la primera dosis de la medicación del estudio hasta la muerte por cualquier causa. Los pacientes recibirán un seguimiento para el estado de supervivencia después de finalizar el estudio o de retirarse de él por una progresión o por toxicidad.

40 Medición del tumor: La respuesta tumoral se evaluará usando los mismos criterios descritos en el ejemplo 2.

Líneas directrices para la evaluación de una enfermedad mensurable: Se seguirán las líneas directrices descritas en el ejemplo 2.

Criterios de respuesta: Se evaluarán los criterios de respuesta usando los mismos criterios descritos en el ejemplo 2.

Medición de confirmación/Duración de la respuesta

Confirmación: Para poder asignar un estado de RP o RC, deben confirmarse cambios en las mediciones tumorales por medio de evaluaciones repetidas que deben realizarse 4 semanas después de que se hayan cumplido por primera vez los criterios para la respuesta.

- 5 Duración de la respuesta global: La duración de la respuesta global se mide desde el momento en que se cumplen los criterios de medición para RC o RP (lo que se registre en primer lugar) hasta la primera fecha en que se haya documentado objetivamente una enfermedad recurrente o progresiva (tomando como referencia para la enfermedad progresiva las mediciones más pequeñas registradas desde que se inició el tratamiento).

- 10 La duración de la RC global se mide desde el primer momento que se cumplen los criterios de medición para RC hasta la primera fecha en que se haya documentado objetivamente una enfermedad recurrente.

Duración de una enfermedad estable: La enfermedad estable se mide desde el inicio del tratamiento hasta que se cumplen los criterios para la progresión, tomando como referencia las mediciones más bajas registradas desde que comenzó el tratamiento.

Evaluaciones exploratorias

- 15 Muestras de biopsia opcionales: Puede recogerse biopsias de tejido cerebral (preferiblemente muestras congeladas en fresco) para el posterior ensayo por VBL como parte del procedimiento clínicamente indicado en cualquier momento del estudio. Si se recoge una muestra de tejido cerebral, debe recolectarse una muestra de sangre para el análisis de transgenes en el mismo día.

Consideraciones estadísticas

- 20 Diseño del estudio

Objetivos: Para evaluar la seguridad, la tolerabilidad y la eficacia de múltiples dosis de VB-111 1×10^{13} partículas de virus [PV] Q2 meses como monoterapia, combinado con bevacizumab 10 mg/kg cada 2 semanas tras la progresión, comparado con una monoterapia de bevacizumab en pacientes con GBM recurrente.

- 25 Todos los datos recogidos se resumirán y se presentarán. Las variables continuas se describirán como el promedio, la mediana, la desviación estándar y el rango de n observaciones. Los datos categóricos se describirán con tablas de contingencia que incluyen frecuencia y porcentaje. Se generarán y presentarán listados de los sujetos/pacientes individuales.

Todos los pacientes que cumplan los criterios de elegibilidad que hayan firmado un formulario de consentimiento y hayan recibido VB-111 y/o bevacizumab se considerarán evaluables para el análisis de la seguridad y la eficacia.

- 30 Los análisis y las descripciones estadísticas se realizarán usando el programa de análisis estadístico SAS (SAS Institute, Inc., Cary, N.C., EE. UU.).

Criterios de valoración del estudio

- 35 Criterio de valoración de la eficacia primario: La supervivencia global (OS) se define como el tiempo desde la primera dosis de la medicación del estudio hasta la muerte por cualquier causa. Los pacientes recibirán un seguimiento para el estado de supervivencia después de finalizar el estudio o de retirarse de él por una progresión o por toxicidad.

- 40 Criterios de valoración de la eficacia secundarios: La supervivencia sin progresión (PFS) se define como el tiempo desde la primera dosis de la medicación del estudio hasta una progresión objetiva del tumor, evaluada según RANO. La respuesta tumoral se mide mediante los criterios de RANO, que incluyen respuesta completa, respuesta parcial, enfermedad estable y progresión.

Criterios de valoración de la eficacia terciarios: La tasa de crecimiento tumoral se define mediante la tasa de cambio (pendiente) del tamaño del tumor en cada sujeto/paciente. El tamaño del tumor se determinará como el producto de las dimensiones perpendiculares del tumor.

- 45 Calidad de vida relacionada con la salud y función neurocognitiva [cuestionario de calidad de vida central de EORTC (QLQ-C30) y módulo de cáncer cerebral (BCM20)].

Criterios de valoración de la seguridad y la tolerabilidad: acontecimientos adversos, signos vitales, exámenes físicos, evaluaciones de laboratorio y electrocardiograma (ECG).

Métodos estadísticos

- 50 Todos los datos recogidos se resumirán y se presentarán. Las variables continuas se describirán como el promedio, la mediana, la desviación estándar, mínimos y máximos. Los datos categóricos se describirán con tablas de

contingencia que incluyen frecuencia y porcentaje. Se generarán y presentarán listados de todos los datos de los sujetos/pacientes individuales.

Los análisis y las descripciones estadísticas se realizarán usando el programa de análisis estadístico SAS (SAS Institute, Inc., Cary, N.C., EE. UU.).

5 Poblaciones de estudio

La intención de tratar una población ("intention to treat population", ITT) incluirá a todos los pacientes que cumplan los criterios de elegibilidad que hayan firmado un formulario de consentimiento y hayan recibido VB-111 que se consideran evaluables para los análisis de la seguridad y la eficacia.

10 En un aspecto, los análisis de eficacia también se realizarán en una población según el protocolo. Estos análisis serán exploratorios y se definirán en el plan de análisis estadístico.

En otro aspecto, todos los pacientes que recibieron al menos una dosis repetida de 1×10^{13} PV de VB-111 se consideran evaluables y se incluyen en todos los análisis de la eficacia.

Parámetros demográficos y de línea de base

15 Los parámetros demográficos y de línea de base que incluyen sexo, edad, altura y peso, y los detalles del diagnóstico inicial y la historia de tratamiento se resumirán de modo global y por grupo de tratamiento. Los parámetros de estratificación que incluyen edad (≤ 60 años, > 60 años), KPS (< 80 , ≥ 80), e historia de progresión (1ª progresión, 2ª progresión) se resumirán de modo global por grupo de tratamiento. Todas las variables continuas se resumirán mediante estadísticos descriptivos. Todas las variables discretas se resumirán mediante frecuencias y porcentajes.

20 Duración del estudio y cumplimiento

Todos los datos de administración del fármaco del estudio y de cumplimiento se resumirán.

Medicación anterior y concomitante

25 Toda la medicación anterior pertinente y todas las medicaciones concomitantes se resumirán mediante frecuencias y porcentajes. Todas las medicaciones se codificarán usando el diccionario de fármacos de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Análisis de la eficacia

Análisis de la eficacia primario

30 Se calcularán las tasas de supervivencia global, incluyen la mediana del tiempo de supervivencia y la tasa de supervivencia en 12 meses, usando el método de Kaplan-Meier. La OS se medirá desde el momento de la primera dosis hasta la muerte o hasta la última fecha conocida en que el paciente seguía vivo. Los pacientes recibirán un seguimiento para el estado de supervivencia después de finalizar el estudio o de retirarse de él por una progresión o por toxicidad. Para los pacientes que no han muerto en el momento del análisis, los datos de supervivencia se censurarán en la última fecha conocida en la que el sujeto seguía vivo. Se empleará el ensayo de rangos logarítmicos para comparar las distribuciones de supervivencia de los dos grupos de tratamiento. En otro aspecto, se usará el modelo de regresión de Cox con las variables de estratificación como covariantes de ajuste, para comparar las distribuciones de supervivencia de los dos grupos de tratamiento.

Análisis de la eficacia secundarios

40 Se calcularán las tasas de supervivencia sin progresión usando el método de Kaplan-Meier. La PFS se medirá desde el momento de la primera dosis hasta la fecha de la primera progresión o la muerte, o hasta la última fecha conocida en que el paciente estaba estable. Los pacientes recibirán un seguimiento para el estado de la progresión después de finalizar el estudio. Se empleará el ensayo de rangos logarítmicos para comparar las distribuciones de supervivencia de los dos grupos de tratamiento. En otro aspecto, se usará el modelo de regresión de Cox con las variables de estratificación como covariantes de ajuste, para comparar las distribuciones de supervivencia de los dos grupos de tratamiento.

45 La respuesta tumoral se evaluará cada 2 meses hasta la progresión de la enfermedad. Se resumirán la proporción de pacientes que hayan presentado respuesta completa, respuesta parcial, enfermedad estable y progresión en cada visita por grupo de tratamiento. Las diferencias entre las proporciones en cada grupo se ensayarán usando el ensayo de chi cuadrado. En otro aspecto, se ensayarán las diferencias entre las proporciones en cada grupo usando un ensayo de Cochran Mantel Haenszel (CMH) que controla la edad, KPS, e historia de progresión.

50 Análisis de la eficacia terciarios

Se tomarán mediciones tumorales cada 2 meses hasta la progresión de la enfermedad. Se determinará la tasa de crecimiento tumoral calculando el cambio y el porcentaje de cambio desde la línea de base del tamaño del tumor en cada visita. La tasa de cambio (pendiente) de cada paciente se calculará y se resumirá por grupo de tratamiento. La diferencia en el logaritmo transformado de la tasa de crecimiento tumoral se comparará entre el grupo de tratamiento usando el ensayo de la T de 2 muestras o el ensayo no paramétrico de Wilcoxon, según sea apropiado.

Análisis de los subgrupos

Se realizará un análisis de los subgrupos para los criterios de valoración de la eficacia primario y secundario para las siguientes categorías:

- Edad (≤ 60 , > 60);

- KPR (< 80 , ≥ 80);

- Primera o segunda progresión de la enfermedad;

- Tamaño del tumor residual después de la resección quirúrgica inicial (el límite de exclusión se determinará antes del desenmascaramiento del estudio);

- Tamaño del tumor en el momento de alistarse al estudio (el límite de exclusión se determinará antes del desenmascaramiento del estudio);

- Estado de mutación de MGMT;

- Género;

- País.

Las definiciones detalladas de los análisis de los subgrupos se definirán en términos generales en el plan de análisis estadístico. La estrategia para las interferencias será conservadora, basándose en las interacciones entre el grupo de tratamiento y la categoría del subgrupo, y se ajustarán para múltiples comparaciones.

Análisis de la seguridad y la toxicidad

Se usará el control de los acontecimientos adversos y los descubrimientos clínicos, que incluyen exámenes físicos, signos vitales, resultados de los ensayos de laboratorio, otras medicaciones concomitantes y los abandonos/terminaciones para evaluar la seguridad.

Acontecimientos adversos

Los AE serán categorizados mediante SOC y Términos preferidos, usando el diccionario MedDRA. Se presentará la incidencia de AE, así como la gravedad y la relación con el fármaco del estudio por grupo de tratamiento. Se resumirá la incidencia de AE que conducen al abandono del estudio y los AE graves (SAE) mediante frecuencias y porcentajes.

Según NCI CTCAE versión 4.0, el término toxicidad se define como acontecimientos adversos que se clasifican como posible, probable o definitivamente relacionados con el tratamiento del estudio. Se registrará el grado máximo para cada tipo de toxicidad para cada paciente, y se usará para el informe. Se repasarán las tablas de frecuencia para determinar patrones de toxicidad. Además, todos los datos de acontecimientos adversos de grado 3, 4 o 5 y clasificados como "no relacionados o con poca probabilidad de estar relacionados" con el tratamiento del estudio en el caso de que se esté desarrollando una relación real, serán repasados.

Los acontecimientos adversos graves se resumirán de modo similar.

Los acontecimientos adversos infusionales también serán resumidos en la evaluación de la causalidad del investigador y del patrocinador.

Los descubrimientos clínicos incluirán la evaluación de los exámenes físicos, los signos vitales y los resultados de los ensayos de laboratorio, otras medicaciones concomitantes y los abandonos/terminaciones. Estos descubrimientos se resumirán por grupo de tratamiento. Las variables continuas se describirán como el promedio, la mediana, la desviación estándar y el rango de n observaciones. Los datos categóricos se describirán con tablas de contingencia que incluyen frecuencia y porcentaje.

Análisis interino

Se establecerá un comité de control de datos y seguridad ("Data and Safety Monitoring Committee", DSMC) para analizar los datos sobre la seguridad y la eficacia a medida que se vayan acumulando.

Los datos sobre resultados adversos se analizarán según se produzcan. El comité se reunirá a intervalos regulares

que serán convenidos por los miembros del comité y el patrocinador.

El análisis final de los resultados se realizará después de que todos los pacientes hayan recibido un seguimiento durante al menos 12 meses. Se realizará un único análisis interino formal 8 meses antes del análisis final planeado, cuando se calcula que se haya acumulado 60% del número total previsto de acontecimientos. Las líneas directrices estadísticas para que el comité recomiende una terminación temprana del estudio debido a la eficacia/futilidad se basarán en lograr una diferencia estadísticamente significativa en la dirección del beneficio por VBL-111 al nivel de 0,003 bilateral.

Con la regla de la detención, las simulaciones por ordenador demuestran que, para conservar un nivel de 0,05 bilateral global, el análisis final debe usar un nivel de 0,0493 bilateral, en lugar de 0,05.

En otro aspecto, las líneas directrices estadísticas para que el comité recomiende una terminación temprana del estudio debido a la eficacia/futilidad se basarán en la probabilidad condicional (bajo la hipótesis alternativa) de lograr un resultado estadísticamente significativo al final del ensayo menor que 0,05. Bajo esta regla de detención de futilidad, el nivel de significancia del análisis final se mantendrá al nivel bilateral de 0,05, porque los análisis de futilidad no aumentan la probabilidad de un error de tipo I en la dirección de una ventaja por el tratamiento experimental.

En el momento de este análisis interino, el comité de control de datos y seguridad proporcionará al patrocinador las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier calculadas para los dos grupos de tratamiento junto con el cociente de riesgo calculado y un valor de p bilateral para la comparación.

Potencia y nivel de significancia

El ensayo está diseñado para alistar 252 sujetos/pacientes, que serán aleatorizados en VB-111 frente a bevacizumab, a una proporción de 1:1 Véase la figura 1. El análisis final de los resultados se realizará después de que todos los pacientes hayan recibido un seguimiento durante al menos 12 meses. El número previsto de muertes que se observarán en este momento es de 151, suponiendo que se logre el reclutamiento de todos los pacientes a una tasa uniforme a lo largo de 12 meses. Si el reclutamiento tarda más de 12 meses o las tasas de reclutamiento, en lugar de ser uniformes, aumentan a medida que se desarrolla el ensayo, entonces el número previsto de muertes será mayor que 151. La justificación del tamaño de la muestra se describe a continuación:

Suponiendo un modelo de riesgos proporcional, el cociente de riesgo se calcula como la proporción de los logaritmos de las tasas de supervivencia (en cualquier momento). Suponiendo una tasa de supervivencia en 12 meses del 37,6% en el grupo de tratamiento de bevacizumab (basada en el estudio de bevacizumab) y una tasa de supervivencia en 12 meses del 55% en el grupo de VB-111 (basada en los 12 pacientes tratados con la dosis alta de VB-111 indicada anteriormente), el cociente de riesgo $\lambda = \ln(0,55)/\ln(0,376) = 0,611$.

Se espera que este estudio reclute pacientes durante 12 meses y después realice un seguimiento durante 12 meses.

Se realizará un único análisis interino formal después de que se hayan acumulado 60% del número total previsto de acontecimientos. Para conservar un nivel de significancia de 0,05 bilateral global, el análisis final usará un nivel de 0,0493 bilateral, en lugar de 0,05. Basándose en el estudio de bevacizumab y, cuando fue necesario, en extrapolaciones de descomposición exponencial, se espera que el porcentaje de muertes observadas en el grupo de bevacizumab sea del 75,4%. Con un cociente de riesgo de 0,611, se espera que el porcentaje de muertes observadas en el grupo de VB-111 sea del 58%.

El análisis final comparará las curvas de supervivencia del bevacizumab frente a VB-111 usando el ensayo de rangos logarítmicos. Para calcular el tamaño de muestra requerido, se usó la siguiente fórmula:

$$\frac{1}{d_1} + \frac{1}{d_2} = \frac{(\ln \lambda)^2}{(z_\alpha + z_\beta)^2} \quad (1)$$

en la que:

d_1 = número de muertes observadas en el grupo de VB-111

d_2 = número de muertes observadas en el grupo de bevacizumab

λ = coeficiente de riesgo supuesto = 0,611

z_α = desviación normal estándar para un nivel de significancia bilateral del 4,93% (ajustado para el análisis interino para conservar el nivel global del 5%) = 1,966

z_β = desviación normal estándar para una potencia estadística del 85% = 1,0364

Suponiendo que:

$d_1 = p_1 \times n_1$, en la que n_1 es el tamaño de la muestra en el grupo de VB-111;

$d_2 = p_2 \times n_2$, en la que n_2 es el tamaño de la muestra en el grupo de bevacizumab;

p_1 = proporción global de muertes observadas previstas en el grupo de VB-111 = 0,58;

5 p_2 = proporción global de muertes observadas previstas en el grupo de bevacizumab = 0,754; y $n_1 = n_2$

Se resuelve la fórmula (1) para n_1 y n_2 .

Estos números se dividieron entre 0,9 para tomar en cuenta una tasa de abandono del 10%.

Basándose en las anteriores suposiciones, será necesario un tamaño de muestra de 126 pacientes en el grupo de bevacizumab y de 126 pacientes en el grupo VB-111, dando un total de 252 pacientes (figura 1).

10 Preparación de la infusión de VB-111

Descripción del fármaco

Se suministrarán viales del fármaco del estudio a cada paciente en crioviales de 1,8 ml etiquetados (polipropileno) o viales de 10 ml de borosilicato. Cada criovial contiene un volumen de 1,1 ml (1012 PV/ml). Cada vial de borosilicato contiene un volumen de 5,3 ml (1012 PV/ml). El fármaco se conservará en la farmacia a -65°C o menor. La información del paciente (número del paciente, fecha de visita) se añadirá a mano a la etiqueta usando un rotulador permanente y se registrará en los registros del paciente.

Procedimiento antes de la infusión

El proceso completo de preparación del fármaco se realizará a temperatura ambiente en una sala BSC de tipo II. Después de descongelar, el fármaco puede mantenerse hasta 3 horas en agua helada durante las preparaciones. El fármaco se diluye en disolución salina a temperatura ambiente. La preparación del fármaco y la inyección del fármaco se completarán dentro de 1 hora, con una ventana de 30 minutos (para un tiempo máximo de 90 minutos).

El farmacéutico que prepare el fármaco verificará que la información en el recipiente sea la apropiada para el estudio y para el paciente: nombre del producto, concentración, número de lote.

Para cada paciente se usa la jeringa apropiada, según se especifica en la tabla 9. Se coloca el volumen necesario de disolución salina (que esté a temperatura ambiente) en un tubo de plástico estéril de 50 ml. Se descongelan los viales de disolución de VB-111 frotándolos entre las manos enguantadas. Hay que asegurarse de marcar el momento de la descongelación.

Usando una jeringa de 10 ml, extraer 1 ml de VB-111 de cada uno de los crioviales o 5 ml del vial de borosilicato previsto para el paciente específico. Se añade VB-111 al tubo de plástico que contiene la disolución salina preparada anteriormente. Se extrae el pistón para mezclar el VB-111 remanente en la jeringa con disolución salina, y se vuelve a empujar hacia el tubo de plástico. Se mezcla el fármaco diluido agitando el contenido a mano. Se determina el volumen que se va a aplicar según el peso del paciente y se extrae el volumen requerido para la inyección hacia la jeringa para la administración.

Después de completar la preparación, se realiza un proceso de reconciliación: se comprueba que se ha usado el número correcto de viales fuente; y se registran los viales asignados al paciente en el registro de seguimiento del fármaco.

Después de la preparación de la disolución de fármaco, se limpia el área de la formulación del fármaco en la farmacia según procedimientos farmacéuticos.

Infusión de VB-111

40 Los pacientes deben recibir VB-111 en ayunas. "En ayunas" significa que el paciente no ha comido ni bebido nada durante al menos las 2 horas previas.

Se administrará una única infusión intravenosa de VB-111 diluido según las siguientes instrucciones a 3 ml/minuto.

Puede usarse una bomba de infusión. Puede proporcionarse una comida normal al paciente 30 minutos después de completar la dosificación. En los días de dosificación cuando el paciente se trata con VB-111 y bevacizumab, el bevacizumab se preparará y dosificará antes que el VB-111.

Tabla 9 - Preparación de VB-11

Dosis	1×10^{13}	1×10^{13}
Concentración en el vial (PV/ml)	10^{12}	10^{12}
Volumen de VB-111 en el tubo	1,1 ml	5,3 ml
n.º de viales de VB-111	10	2
Tomar este volumen de VB-111	10×1 ml	2×5 ml
Tipo de jeringa para VB-111	10 ml	10 ml
Volumen de disolución salina	40 ml	40 ml
Tipo de tubo para la disolución salina	50 ml*	50 ml*
Volumen total preparado	50 ml	50 ml
Volumen para inyectar, peso del paciente ≥ 50 kg	Volumen entero (50 ml)	Volumen entero (50 ml)
Volumen para inyectar, peso del paciente < 50 kg	35 ml**	35**
* El fármaco puede usarse como alternativa una bolsa vacía estéril y añadir 40 ml de NS + 10 ml de VB-111 a la bolsa, o el fármaco puede usarse una bolsa de 50 ml de NS y retirar el exceso de volumen y después añadir VB-111. Cualquier forma es una práctica farmacéutica aceptable. ** 35 ml para pacientes < 50 kg representa una reducción del 30% de VB-111 mezclado con disolución salina, según el protocolo "Administración del fármaco del estudio".		

Listado de secuencias

<110> Vascular Biogenics Ltd. Leubitz, Andrea Rachel Sher, Naamit Feige, Erez Breitbart, Eyal

5 <120> MÉTODOS PARA INDUCIR LA CAPACIDAD DE RESPUESTA A UN AGENTE ANTIANGIOGÉNICO.

<130> 3182.053PC04

<140> Para ser asignado

<141> Con esto

10

<150> 61/760,601

<151> 04-02-2013

<150> 61/800,716

15 <151> 15-03-2013

<150> 61/858,467

<151> 25-07-2013

20 <150> 61/907,286

<151> 21-11-2013

<160> 33

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1365

<212> ADN

30 <213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<223> TNFRSF1A

35

<400> 1

ES 2 774 964 T3

```

atgggcctct ccaccgtgcc tgacctgctg ctgccgctgg tgctcctgga gctgttggtg      60
ggaatatata cctcaggggt tattggactg gtccctcacc taggggacag ggagaagaga      120
gatagtgtgt gtccccaagg aaaatatatc caccctcaaa ataattcgat ttgctgtacc      180
aagtgccaca aaggaaccta cttgtacaat gactgtccag gcccggggca ggatacggac      240
tgcagggagt gtgagagcgg ctccctcacc gcttcagaaa accacctcag aactgcctc      300
agctgctcca aatgccgaaa ggaaatgggt caggtggaga tctcttcttg cacagtggac      360
cgggacaccg tgtgtggctg caggaagaac cagtaccggc attattggag tgaaaacctt      420
ttccagtgtc tcaattgcag cctctgcctc aatgggaccg tgcacctctc ctgccaggag      480
aaacagaaca ccgtgtgcac ctgccatgca ggtttctttc taagagaaaa cgagtgtgtc      540
tcctgtagta actgtaagaa aagcctggag tgcacgaagt tgtgcctacc ccagattgag      600
aatgttaagg gcaactgagga ctcaggcacc acagtgtgtg tgcccctggg cattttcttt      660
ggctctttgc ttttatccct cctcttcatt ggtttaatgt atcgctacca acggtggaag      720
tccaagctct actccattgt ttgtgggaaa tcgacacctg aaaaagaggg ggagcttgaa      780
ggaactacta ctaagcccct ggccccaac ccaagcttca gtccactcc aggcttcacc      840
cccaccctgg gcttcagtcc cgtgcccagt tccaccttca cctccagctc cacctatacc      900
cccggtgact gtcccaactt tgccgctccc cgcagagagg tggcaccacc ctatcagggg      960
gctgacccca tccttgcgac agccctcgcc tccgacccca tccccaaccc ccttcagaag     1020
tgaggaggaca gcgccacaa gccacagagc ctagacactg atgaccccg cgcgctgtac     1080
gccgtggtgg agaacgtgcc cccgttgcg cggaaaggaat tcgtgcggcg cctagggctg     1140
agcgaccacg agatcgatcg gctggagctg cagaacgggc gctgcctgcg cgaggcgcaa     1200
tacagcatgc tggcgacctg gaggcggcgc acgccgggc gcgaggccac gctggagctg     1260
ctgggacgcg tgctccgcga catggacctg ctgggctgcc tggaggacat cgaggaggcg     1320
ctttgcggcc ccgccgccct ccgcccgcg ccagttcttc tcaga                        1365

```

5 <210> 2
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> característica_MISC
 <223> Receptor 1 TNF de tipo salvaje
 <400> 2

ES 2 774 964 T3

Met	Gly	Leu	Ser	Thr	Val	Pro	Asp	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Val	Leu	Leu	
1				5					10					15		
Glu	Leu	Leu	Val	Gly	Ile	Tyr	Pro	Ser	Gly	Val	Ile	Gly	Leu	Val	Pro	
			20					25					30			
His	Leu	Gly	Asp	Arg	Glu	Lys	Arg	Asp	Ser	Val	Cys	Pro	Gln	Gly	Lys	
		35					40					45				
Tyr	Ile	His	Pro	Gln	Asn	Asn	Ser	Ile	Cys	Cys	Thr	Lys	Cys	His	Lys	
	50					55					60					
Gly	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asp	Cys	Pro	Gly	Pro	Gly	Gln	Asp	Thr	Asp	
65					70					75					80	
Cys	Arg	Glu	Cys	Glu	Ser	Gly	Ser	Phe	Thr	Ala	Ser	Glu	Asn	His	Leu	
				85					90					95		
Arg	His	Cys	Leu	Ser	Cys	Ser	Lys	Cys	Arg	Lys	Glu	Met	Gly	Gln	Val	

ES 2 774 964 T3

100	105	110
Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg 115 120 125		
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe 130 135 140		
Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu 145 150 155 160		
Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu 165 170 175		
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr 180 185 190		
Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser 195 200 205		
Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu 210 215 220		
Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys 225 230 235 240		
Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu 245 250 255		
Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser 260 265 270		
Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val 275 280 285		
Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys 290 295 300		
Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly 305 310 315 320		
Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn 325 330 335		
Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp 340 345 350		

ES 2 774 964 T3

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
355 360 365

Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
370 375 380

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
385 390 395 400

Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
405 410 415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
450 455

<210> 3
<211> 591
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> característica_misc

<223> Dominio de unión a ligando de TNFR1

<400> 3
atgggcctct ccaccgtgcc tgacctgctg ctgccgctgg tgctcctgga gctgttggtg 60
ggaatatacc cctcaggggt tattggactg gtccctcacc taggggacag ggagaagaga 120
gatagtgtgt gtccccaagg aaaatatatc caccctcaaa ataattcgat ttgctgtacc 180
aagtgcaca aaggaaccta cttgtacaat gactgtccag gcccggggca ggatacggac 240
tgcagggagt gtgagagcgg ctccctcacc gcttcagaaa accacctcag acactgcctc 300
agctgtcca aatgccgaaa ggaaatgggt caggtggaga tctcttcttg cacagtggac 360
cgggacaccg tgtgtggctg caggaagaac cagtaccggc attattggag tgaaaacctt 420
ttccagtgtc tcaattgcag cctctgcctc aatgggaccg tgcacctctc ctgccaggag 480
aaacagaaca ccgtgtgcac ctgccatgca ggtttctttc taagagaaaa cgagtgtgtc 540
tcctgtagta actgtaagaa aagcctggag tgcacgaagt tgtgcctacc a 591

<210> 4
<211> 197
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> característica_misc
<223> Dominio de unión a ligando de TNFR1
<400> 4

ES 2 774 964 T3

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
50 55 60

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu
85 90 95

Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
145 150 155 160

Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
165 170 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro
195

<210> 5

<211> 1008

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

10 <223> FAS de longitud completa

<400> 5

ES 2 774 964 T3

```

atgctgggca tctggaccct cctacctctg gttcttacgt ctgttgctag attatcgtcc      60
aaaagtgtta atgccaagt gactgacatc aactccaagg gattggaatt gaggaagact      120
gttactacag ttgagactca gaacttgga ggcctgcatc atgatggcca attctgccat      180
aagccctgtc ctccagggtga aaggaaagct agggactgca cagtcaatgg ggatgaacca      240
gactgcgtgc cctgccaaga agggaaggag tacacagaca aagcccattt ttcttccaaa      300
tgcagaagat gtagattgtg tgatgaagga catggcttag aagtggaaat aaactgcacc      360
cggaccacaga ataccaagtg cagatgtaaa ccaaactttt tttgtaactc tactgtatgt      420
gaacactgtg acccttgcac caaatgtgaa catggaatca tcaaggaatg cacactcacc      480
agcaacacca agtgcaaaga ggaaggatcc agatctaact tggggtggct ttgtcttctt      540
cttttgccaa ttccactaat tgtttgggtg aagagaaagg aagtacagaa aacatgcaga      600
aagcacagaa aggaaaacca aggttctcat gaatctccaa ctttaaattc tgaaacagtg      660
gcaataaatt tatctgatgt tgacttgagt aaatatatca ccactattgc tggagtcatg      720
acactaagtc aagttaaagg ctttgttcga aagaatgggtg tcaatgaagc caaaatagat      780
gagatcaaga atgacaatgt ccaagacaca gcagaacaga aagttcaact gcttcgtaat      840
tggcatcaac ttcattggaaa gaaagaagcg tatgacacat tgattaaaga tctcaaaaaa      900
gccaatcttt gtactcttgc agagaaaatt cagactatca tcctcaagga cattactagt      960
gactcagaaa attcaaactt cagaaatgaa atccaaagct tgggtctag      1008

```

<210> 6

<211> 335

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

10 <223> FAS de longitud completa

<400> 6

```

Met Leu Gly Ile Trp Thr Leu Leu Pro Leu Val Leu Thr Ser Val Ala
1           5           10           15

```

```

Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser
          20           25           30

```

ES 2 774 964 T3

Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn
 35 40 45
 Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro
 50 55 60
 Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro
 65 70 75 80
 Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His
 85 90 95
 Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly
 100 105 110
 Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg
 115 120 125
 Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp
 130 135 140
 Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr
 145 150 155 160
 Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn Leu Gly Trp
 165 170 175
 Leu Cys Leu Leu Leu Leu Pro Ile Pro Leu Ile Val Trp Val Lys Arg
 180 185 190
 Lys Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys His Arg Lys Glu Asn Gln Gly
 195 200 205
 Ser His Glu Ser Pro Thr Leu Asn Pro Glu Thr Val Ala Ile Asn Leu
 210 215 220
 Ser Asp Val Asp Leu Ser Lys Tyr Ile Thr Thr Ile Ala Gly Val Met
 225 230 235 240
 Thr Leu Ser Gln Val Lys Gly Phe Val Arg Lys Asn Gly Val Asn Glu
 245 250 255
 Ala Lys Ile Asp Glu Ile Lys Asn Asp Asn Val Gln Asp Thr Ala Glu
 260 265 270
 Gln Lys Val Gln Leu Leu Arg Asn Trp His Gln Leu His Gly Lys Lys
 275 280 285
 Glu Ala Tyr Asp Thr Leu Ile Lys Asp Leu Lys Lys Ala Asn Leu Cys
 290 295 300
 Thr Leu Ala Glu Lys Ile Gln Thr Ile Ile Leu Lys Asp Ile Thr Ser
 305 310 315 320
 Asp Ser Glu Asn Ser Asn Phe Arg Asn Glu Ile Gln Ser Leu Val
 325 330 335

<210> 7
 <211> 505
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> característica_misc
 <223> Dominio efector de FAS
 10
 <400> 7
 aggatccaga tctaacttgg ggtggccttg tcttcttctt ttgccaattc cactaattgt 60
 ttgggtgaag agaaaggaag tacagaaaac atgcagaaag cacagaaagg aaaaccaagg 120
 ttctcatgaa tctccaacct taaatcctga aacagtggca ataaatttat ctgatgttga 180
 cttgagttaa tatatcacca ctattgctgg agtcatgaca ctaagtcaag ttaaaggctt 240
 tgttcgaaag aatggtgtca atgaagccaa aatagatgag atcaagaatg acaatgtcca 300
 agacacagca gaacagaaag ttcaactgct tcgtaattgg catcaacttc atggaaagaa 360
 agaagcgtat gacacattga ttaaagatct caaaaaagcc aatctttgta ctcttcgaga 420
 gaaaattcag actatcatcc tcaaggacat tactagtgac tcagaaaatt caaacttcag 480
 aatgaaatc caaagcttgg tctag 505
 <210> 8
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> Dominio efector de FAS
 20
 <400> 8
 Gly Ser Arg Ser Asn Leu Gly Trp Leu Cys Leu Leu Leu Leu Pro Ile
 1 5 10 15
 Pro Leu Ile Val Trp Val Lys Arg Lys Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg
 20 25 30
 25

ES 2 774 964 T3

Lys His Arg Lys Glu Asn Gln Gly Ser His Glu Ser Pro Thr Leu Asn
35 40 45

Pro Glu Thr Val Ala Ile Asn Leu Ser Asp Val Asp Leu Ser Lys Tyr
50 55 60

Ile Thr Thr Ile Ala Gly Val Met Thr Leu Ser Gln Val Lys Gly Phe
65 70 75 80

Val Arg Lys Asn Gly Val Asn Glu Ala Lys Ile Asp Glu Ile Lys Asn
85 90 95

Asp Asn Val Gln Asp Thr Ala Glu Gln Lys Val Gln Leu Leu Arg Asn
100 105 110

Trp His Gln Leu His Gly Lys Lys Glu Ala Tyr Asp Thr Leu Ile Lys
115 120 125

Asp Leu Lys Lys Ala Asn Leu Cys Thr Leu Ala Glu Lys Ile Gln Thr
130 135 140

Ile Ile Leu Lys Asp Ile Thr Ser Asp Ser Glu Asn Ser Asn Phe Arg
145 150 155 160

Asn Glu Ile Gln Ser Leu Val
165

<210> 9

<211> 1101

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

10 <223> Quimera FAS

<400> 9

atgggcctct ccaccgtgcc tgacctgctg ctgccgctgg tgctcctgga gctgttggtg 60

ggaatatacc cctcaggggt tattggactg gtccctcacc taggggacag ggagaagaga 120

gatagtgtgt gtccccaagg aaaatatatc caccctcaaa ataattcgat ttgctgtacc 180

aagtgccaca aaggaaccta cttgtacaat gactgtccag gcccggggca ggatacggac 240

tgacgggagt gtgagagcgg ctccctcacc gcttcagaaa accacctcag aactgcctc 300

agctgctcca aatgccgaaa ggaaatgggt caggtggaga tctcttcttg cacagtggac 360

cgggacaccg tgtgtggctg caggaagaac cagtaccggc attattggag tgaaaacctt 420

ttccagtgtc tcaattgcag cctctgcctc aatgggaccg tgcacctctc ctgccaggag 480

ES 2 774 964 T3

```

aaacagaaca ccgtgtgcac ctgccatgca ggtttctttc taagagaaaa cgagtgtgtc      540
tcctgtagta actgtaagaa aagcctggag tgcacgaagt tgtgcctacc aagcttagga      600
tccagatcta acttgggggtg gctttgtctt cttcttttgc caattccact aattgtttgg      660
gtgaagagaa aggaagtaca gaaaacatgc agaaagcaca gaaaggaaaa ccaaggttct      720
catgaatctc caaccttaaa tcctgaaaca gtggcaataa atttatctga tgttgacttg      780
agtaaataata tcaccactat tgctggagtc atgacactaa gtcaagttaa aggctttggt      840
cgaaagaatg gtgtcaatga agccaaaata gatgagatca agaatgacaa tgtccaagac      900
acagcagaac agaaagttca actgcttcgt aattggcatc aacttcatgg aaagaaagaa      960
gcgtatgaca cattgattaa agatctcaaa aaagccaatc tttgtactct tgcagagaaa     1020
attcagacta tcatcctcaa ggacattact agtgactcag aaaattcaaa cttcagaaat     1080
gaaatccaaa gcttgggtcta g                                     1101

```

<210> 10

<211> 366

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

10 <223> Quimera FAS

<400> 10

```

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
1          5          10          15

```

```

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
          20          25          30

```

```

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
          35          40          45

```

```

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
          50          55          60

```

```

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
65          70          75          80

```

```

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu
          85          90          95

```

```

Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
          100          105          110

```

15

ES 2 774 964 T3

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
145 150 155 160

Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
165 170 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Ser Leu Gly Ser Arg Ser Asn Leu Gly Trp Leu
195 200 205

Cys Leu Leu Leu Leu Pro Ile Pro Leu Ile Val Trp Val Lys Arg Lys
210 215 220

Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys His Arg Lys Glu Asn Gln Gly Ser
225 230 235 240

His Glu Ser Pro Thr Leu Asn Pro Glu Thr Val Ala Ile Asn Leu Ser
245 250 255

Asp Val Asp Leu Ser Lys Tyr Ile Thr Thr Ile Ala Gly Val Met Thr
260 265 270

Leu Ser Gln Val Lys Gly Phe Val Arg Lys Asn Gly Val Asn Glu Ala
275 280 285

Lys Ile Asp Glu Ile Lys Asn Asp Asn Val Gln Asp Thr Ala Glu Gln
290 295 300

Lys Val Gln Leu Leu Arg Asn Trp His Gln Leu His Gly Lys Lys Glu
305 310 315 320

Ala Tyr Asp Thr Leu Ile Lys Asp Leu Lys Lys Ala Asn Leu Cys Thr
325 330 335

Leu Ala Glu Lys Ile Gln Thr Ile Ile Leu Lys Asp Ile Thr Ser Asp
340 345 350

Ser Glu Asn Ser Asn Phe Arg Asn Glu Ile Gln Ser Leu Val
355 360 365

<210> 11

<211> 47

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Elementos potenciadores específicos de células endoteliales

10

<400> 11

ctggagggtg acttgcttc tggagccagt acttcataact tttcatt 47

<210> 12
<211> 47
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Potenciador específico de células endoteliales
10 <400> 12

aatgaaaagt atgaagtact ggctccagaa gcaaagtcac cctccag 47

15 <210> 13
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Potenciador específico de células endoteliales
<400> 13

25 gtacttcata cttttcattc caatgggggtg acttgcttc tgga 44

<210> 14
<211> 44
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Elemento potenciador específico de células endoteliales

35 <400> 14

tccagaagca aagtcacccc attggaatga aaagtatgaa gtac 44

<210> 15
40 <211> 131
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Elemento potenciador 3X específico de células endoteliales
<400> 15

ctccagaagc aaagtcaccc cattggaatg aaaagtatga agtacaatga aaagtatgaa 60

gtactggctc cagaagcaaa gtcaccctcc agaagcaaag tcacccatt ggaatgaaaa 120

50 gtatgaagta c 131

<210> 16
<211> 131
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Elemento potenciador 3X específico de células endoteliales
60 <400> 16

ES 2 774 964 T3

	gtacttcata cttttcattc caatggggtg actttgcttc tggaggggtga ctttgcttct	60
	ggagccagta cttcatactt ttcattgtac ttcatacttt tcattccaat ggggtgactt	120
	tgcttctgga g	131
5	<210> 17 <211> 850 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Promotor de PPE-1 específico de células endoteliales <400> 17	
	gtacgtgtac ttctgatcgg cgatactagg gagataagga tgtgcctgac aaaaccacat	60
	tgttgtgtgt atcattatta tttagttttc cttccttgct aactcctgac ggaatctttc	120
	tcacctcaaa tgcgaagtac tttagtttag aaaagacttg gtggaagggg tgggtggtgga	180
	aaagtagggg gatcttccaa actaatctgg ttccccgcc gccccagtag ctgggattca	240
	agagcgaaga gtgggggatcg tccccttggt tgatcagaaa gacataaaaag gaaaatcaag	300
	tgaacaatga tcagccccac ctccacccca cccccctgcg cgcgcacaat acaatctatt	360
	taattgtact tcatactttt cattccaatg ggggtgacttt gcttctggag aaactcttga	420
	ttcttgaact ctggggctgg cagctagcaa aaggggaagc gggctgctgc tctctgcagg	480
	ttctgcagcg gtctctgtct agtgggtggt ttctttttct tagccctgcc cctggattgt	540
	cagacggcgg gcgtctgcct ctgaagttag ccgtgatttc ctctagagcc gggctctatc	600
	tctggctgca cgttgctgtg gggtgactaa tcacacaata acattgttta gggctggaat	660
	gaagtcagag ctgtttaccc ccaactctata ggggttcaat ataaaaaggc ggcggagAAC	720
	tgtccgagtc agaagcgttc ctgcaccggc gctgagagcc tgacccggtc tgctccgctg	780
	tccttgccgc ctgcctcccg gctgcccgcg acgctttcgc cccagtggaa gggccacttg	840
	ctgcggccgc	850
15	<210> 18 <211> 987 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Promotor específico de células endoteliales PPE-1 3X <400> 18	

ES 2 774 964 T3

gtacgtgtac ttctgatcgg cgatactagg gagataagga tgtgcctgac aaaaccacat 60
 tgttgtgtgt atcattatta tttagttttc cttccttgct aactcctgac ggaatctttc 120
 tcacctcaaa tgcgaagtac tttagtttag aaaagacttg gtggaagggg tgggtggtgga 180
 aaagtagggg gatcttccaa actaatctgg ttccccgccc gcccagtag ctgggattca 240
 agagcgaaga gtgggggatcg tccccttggt tgatcagaaa gacataaaag gaaaatcaag 300
 tgaacaatga tcagccccac ctccacccca cccccctgcg cgcgcacaat acaatctatt 360
 taattgtact tcatactttt cattccaatg ggggtgacttt gcttctggag aaactcttga 420
 ttcttgaact ctggggctgg cagctagcct ccagaagcaa agtcacccca ttggaatgaa 480
 aagtatgaag tacaatgaaa agtatgaagt actggctcca gaagcaaagt caccctccag 540
 aagcaaagtc accccattgg aatgaaaagt atgaagtacg ctagcaaaag gggaagcggg 600
 ctgctgctct ctgcaggttc tgcagcgtc tctgtctagt ggggtgtttc tttttcttag 660
 ccctgcccc ctgattgtcag acggcgggcg tctgcctctg aagttagccg tgatttcctc 720
 tagagccggg tcttatctct ggctgcacgt tgctgtggg tgactaatca cacaataaca 780
 ttgtttaggg ctggaatgaa gtcagagctg tttaccccca ctctataggg gttcaatata 840
 aaaaggcggc ggagaactgt ccgagtcaga agcgttctg caccggcgct gagagcctga 900
 cccggtctgc tccgtgtcc ttgcgcgtg cctcccggt gcccgcgacg ctttcgcccc 960
 agtggaaggg ccacttgctg cggccgc 987

<210> 19
 <211> 35207
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> construcción completa de VB-111

<400> 19

catcatcaat aatatacctt attttgatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt 60
 ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt 120
 gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg 180
 gtgtgcgcg gtgtacacag gaagtgaaa ttttcgcgcg gttttaggcg gatgtttag 240
 taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga 300
 agtgaaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tatttgtcta gggccgcggg 360
 gactttgacc gtttacgtgg agactcgccc aggtgttttt ctcaggtgtt ttccgcgttc 420

ES 2 774 964 T3

cggggtcaaag ttggcggtttt attattatag tcagtagcgtg cgtgtacttc tgatcggcga	480
tactagggag ataaggatgt gcctgacaaa accacattgt tgttggtatc attattattt	540
agtttttcctt ccttgctaac tcctgacgga atctttctca cctcaaatgc gaagtacttt	600
agtttagaaa agacttggtg gaaggggtgg tgggtgaaaa gtaggggat cttccaaact	660
aatctggttc cccgcccggc ccagtagctg ggattcaaga gcgaagagt gggatcgtcc	720
ccttgtttga tcagaaagac ataaaaggaa aatcaagtga acaatgatca gccccacctc	780
cacccccacc ccctgcgcgc gcacaatata atctatttaa ttgtacttca tacttttcat	840
tccaatgggg tgactttgct tctggagaaa ctcttgattc ttgaactctg gggctggcag	900
ctagcctcca gaagcaaagt caccctattg gaatgaaaag tatgaagtac aatgaaaagt	960
atgaagtact ggctccagaa gcaaagtcac cctccagaag caaagtcacc ccattggaat	1020
gaaaagtatg aagtacgcta gcaaaagggg aagcgggctg ctgctctctg caggttctgc	1080
agcggctctc gtctagtggg tgttttcttt ttcttagccc tgcccctgga ttgtcagacg	1140
gcggcgctct gcctctgaag ttagccgtga ttctctctag agccgggtct tatctctggc	1200
tgacagttgc ctgtgggtga ctaatcacac aataacattg tttagggtct gaatgaagtc	1260
agagctgttt acccccactc tataggggtt caatataaaa agggggcgga gaactgtccg	1320
agtcagaagc gttcctgcac cggcgctgag agcctgaccc ggtctgctcc gctgtccttg	1380
cgcgctgcct cccggtgcc cgcgacgctt tcgccccagt ggaagggcca cttgctgcgg	1440
ccgctaattc tgcagatcgg gatccggcat gggcctctcc accgtgcctg acctgctgct	1500
gccgctggtg ctccctggagc tgttggtggg aatatacccc tcaggggtta ttggactggt	1560
ccctcaccta ggggacaggg agaagagaga tagtgtgtgt ccccaaggaa aatatatcca	1620
ccctcaaaat aattcgattt gctgtaccaa gtgccacaaa ggaacctact tgtacaatga	1680
ctgtccaggc ccggggcagg atacggactg cagggagtgt gagagcggct ccttcaccgc	1740
ttcagaaaac cacctcagac actgcctcag ctgctccaaa tgccgaaagg aaatgggtca	1800
ggtggagatc tcttcttgca cagtggaccg ggacaccgtg tgtggctgca ggaagaacca	1860
gtaccggcat tattggagtg aaaacctttt ccagtgcctc aattgcagcc tctgcctcaa	1920
tgggaccgtg cacctctcct gccaggagaa acagaacacc gtgtgcacct gccatgcagg	1980
tttctttcta agagaaaacg agtgtgtctc ctgtagtaac tgtaagaaaa gcctggagtg	2040
cacgaagttg tgcctaccaa gcttaggatc cagatctaac ttgggggtggc tttgtcttct	2100
tcttttgcca attccactaa ttgtttgggt gaagagaaag gaagtacaga aaacatgcag	2160
aaagcacaga aaggaaaacc aaggttctca tgaatctcca accttaaatc ctgaaacagt	2220
ggcaataaat ttatctgatg ttgacttgag taaatatatc accactattg ctggagtcac	2280
gacactaagt caagttaaag gctttgttcg aaagaatggt gtcaatgaag ccaaaataga	2340

ES 2 774 964 T3

tgagatcaag aatgacaatg tccaagacac agcagaacag aaagttcaac tgcttcgtaa	2400
ttggcatcaa cttcatggaa agaaagaagc gtatgacaca ttgattaaag atctcaaaaa	2460
agccaatcctt tgtactcttg cagagaaaat tcagactatc atcctcaagg acattactag	2520
tgactcagaa aattcaaact tcagaaatga aatccaaagc ttggtctagc tcgagcatgc	2580
atctaggcgg ccgcatggca gaaattcgcg aattcgctag cgtaaacgga tcctctagac	2640
gagatccgaa cttgtttatt gcagcttata atgggtacaa ataaagcaat agcatcacia	2700
atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagttg tggtttgtcc aaactcatca	2760
atgtatctta tcatgtctag atctgtactg aaatgtgtgg gcgtggctta aggggtgggaa	2820
agaatatata aggtgggggt cttatgtagt tttgtatctg ttttgcagca gccgccggcg	2880
ccatgagcac caactcgttt gatggaagca ttgtgagctc atatttgaca acgcgcatgc	2940
ccccatgggc cggggtgcgt cagaatgtga tgggctccag cattgatggc cgccccgtcc	3000
tgcccgcaaa ctctactacc ttgacctacg agaccgtgtc tggaacgccg ttggagactg	3060
cagcctccgc cgccgcttca gccgctgcag ccaccgcccg cgggattgtg actgactttg	3120
ctttcctgag ccgcttgca agcagtgcag cttcccgttc atccgcccg gatgacaagt	3180
tgacggctct tttggcacia ttggattctt tgaccgggga acttaatgtc gtttctcagc	3240
agctgttggg tctgcgccag caggtttctg ccctgaaggc ttcctcccct cccaatgcgg	3300
tttaaaacat aaataaaaaa ccagactctg tttggatttg gatcaagcaa gtgtcttgct	3360
gtctttatth aggggttttg cgcgcgcggg agggccggga ccagcggctc cggtcgttga	3420
gggtcctgtg tattttttcc aggacgtggg aaagggtgact ctggatgttc agatacatgg	3480
gcataagccc gtctctgggg tggaggtagc accactgcag agcttcatgc tgcgggggtg	3540
tgttgtagat gatccagtcg tagcaggagc gctgggcgtg gtgcctaaaa atgtctttca	3600
gtagcaagct gattgccagc ggcaggccct tgggtgaagt gtttaciaag cggttaagct	3660
gggatgggtg catacgtggg gatatgagat gcatcttgga ctgtatthtt aggttggtta	3720
tgthcccagc catatccctc cggggattca tgthgtgcag aaccaccagc acagtgtatc	3780
cgggtgcactt gggaaatttg tcatgtagct tagaaggaaa tgcgtggaag aacttgga	3840
cgcccttggt acctccaaga ttttccatgc attcgtccat aatgatggca atgggcccac	3900
gggcggcggc ctgggcgaag atatttctgg gatcactaac gtcatagttg tgttccagga	3960
tgagatcgtc ataggccatt tttaciaagc gcgggcggag ggtgccagac tgcggtataa	4020
tggthccatc cggcccaggc gcgtagttag cctcacagat ttgcatttcc cagctttga	4080
gttcagatgg ggggatcatg tctacctgcg gggcgatgaa gaaaacgggt tccggggtag	4140
gggagatcag ctgggaagaa agcaggttcc tgagcagctg cgacttaccg cagccggtgg	4200

ES 2 774 964 T3

gcccgtaaat	cacacctatt	accggctgca	actggtagtt	aagagagctg	cagctgccgt	4260
catccctgag	cagggggggc	acttcgttaa	gcatgtccct	gactcgcacg	ttttccctga	4320
ccaaatccgc	cagaaggcgc	tcgccgccca	gcgatagcag	ttcttgcaag	gaagcaaagt	4380
ttttcaacgg	tttgagaccg	tccgccgtag	gcatgctttt	gagcgtttga	ccaagcagtt	4440
ccaggcggtc	ccacagctcg	gtcacctgct	ctacggcatc	tcgatccagc	atatctcctc	4500
gtttcgcggg	ttggggcggc	tttcgctgta	cggcagtagt	cggtgctcgt	ccagacgggc	4560
cagggtcacg	tctttccacg	ggcgcagggt	cctcgtcagc	gtagtctggg	tcacgggtgaa	4620
ggggtgcgct	ccgggtgcgc	cgctggccag	ggtgcgcttg	aggctggtcc	tgctgggtgct	4680
gaagcgctgc	cggctcttcg	cctgcgcgtc	ggccaggtag	catttgacca	tggtgtcata	4740
gtccagcccc	tccgcggcgt	ggcccttggc	gcgcagcttg	cccttgagg	aggcgccgca	4800
cgaggggcag	tgcagacttt	tgagggcgta	gagcttgggc	gcgagaaata	ccgattccgg	4860
ggagtaggca	tccgcgcgc	aggccccgca	gacgggtctcg	cattccacga	gccaggtgag	4920
ctctggccgt	tcgggggtcaa	aaaccaggtt	tcccccatgc	tttttgatgc	gtttcttacc	4980
tctggtttcc	atgagccggc	gtccacgctc	ggtgacgaaa	aggctgtccg	tgtccccgta	5040
tacagacttg	agaggcctgt	cctcgagcgg	tgttccgcgg	tcctcctcgt	atagaaactc	5100
ggaccactct	gagacaaagg	ctcgcgtcca	ggccagcacg	aaggaggcta	agtgggaggg	5160
gtagcggctg	ttgtccacta	gggggtccac	tcgctccagg	gtgtgaagac	acatgtcgcc	5220
ctcttcggca	tcaaggaagg	tgattggttt	gtaggtgtag	gccacgtgac	cgggtgttcc	5280
tgaagggggg	ctataaaagg	gggtgggggc	gcgttcgtcc	tactctctt	ccgcacgct	5340
gtctgcgagg	gccagctggt	ggggtgagta	ctccctctga	aaagcgggca	tgacttctgc	5400
gctaagattg	tcagttttca	aaaacgagga	ggatttgata	ttcacctggc	ccgcgggtgat	5460
gcctttgagg	gtggccgcat	ccatctggtc	agaaaagaca	atctttttgt	tgtcaagctt	5520
ggtggcaaac	gaccgtaga	gggcgttggc	cagcaacttg	gcgatggagc	gcagggtttg	5580
gtttttgtcg	cgatcggcgc	gctccttggc	cgcgatgttt	agctgcacgt	attcgcgcgc	5640
aacgcaccgc	cattcgggaa	agacggtggt	gcgctcgtcg	ggcaccaggt	gcacgcgcca	5700
accgcggttg	tgcagggtga	caaggccaac	gctggtggct	acctctccgc	gtaggcgctc	5760
gttggtccag	cagaggcggc	cgcccttgcg	cgagcagaat	ggcggtaggg	ggtctagctg	5820
cgtctcgtcc	ggggggtctg	cgtccacggt	aaagaccccg	ggcagcaggc	gcgcgtcgaa	5880
gtagtctatc	ttgcatcctt	gcaagtctag	cgctcgtcgc	catgcgcggg	cggcaagcgc	5940
gcgctcgtat	gggttgagtg	ggggacccca	tggcatgggg	tgggtgagcg	cggaggcgta	6000
catgccgcaa	atgtcgtaaa	cgtagagggg	ctctctgagt	attccaagat	atgtagggta	6060
gcatcttcca	ccgcggatgc	tggcgcgcac	gtaatcgtat	agttcgtcgc	agggagcgag	6120

ES 2 774 964 T3

gaggtcggga ccgaggttgc tacgggcggg ctgctctgct cggaagacta tctgcctgaa	6180
gatggcatgt gagttggatg atatggttgg acgctggaag acgttgaagc tggcgtctgt	6240
gagacctacc gcgtcacgca cgaaggaggg gtaggagtcg cgcagcttgt tgaccagctc	6300
ggcggtgacc tgcacgtcta gggcgagta gtccagggtt tccttgatga tgtcatactt	6360
atcctgtccc ttttttttcc acagctcgcg gttgaggaca aactcttcgc ggtctttcca	6420
gtactcttgg atcggaacc cgtcggcctc cgaacggtaa gagcctagca tgtagaactg	6480
gttgacggcc tggtaggcgc agcatccctt ttctacgggt agcgcgtatg cctgcgcggc	6540
cttcgggagc gaggtgtggg tgagcgcaaa ggtgtccctg accatgactt tgaggtactg	6600
gtatttgaag tcagtgtcgt cgcacccgcc ctgctcccag agcaaaaagt ccgtgcgctt	6660
tttggaacgc ggatttgga gggcggaagg gacatcgttg aagagtatct ttcccgcgcg	6720
aggcataaag ttgcgtgtga tgcggaaggg tcccggcacc tcggaacggg tgtaattac	6780
ctggcgggcg agcacgatct cgtcaaagcc gttgatgttg tggccacaa tgtaaagttc	6840
caagaagcgc gggatgccct tgatggaagg caatttttta agttcctcgt aggtgagctc	6900
ttcaggggag ctgagcccgt gctctgaaag ggcccagtct gcaagatgag ggttggaagc	6960
gacgaatgag ctccacaggt cacgggccat tagcatttgc aggtggtcgc gaaaggtcct	7020
aaactggcga cctatggcca ttttttctgg ggtgatgcag tagaaggtaa gcgggtcttg	7080
ttcccagcgg tcccatcaa ggttcgcggc taggtctcgc gcggcagtc ctagaggctc	7140
atctccgccg aacttcatga ccagcatgaa gggcacgagc tgcttcccaa aggcccccat	7200
ccaagtatag gtctctacat cgtaggtgac aaagagacgc tcggtgcgag gatgcgagcc	7260
gatcgggaag aactggatct cccgccacca attggaggag tggctattga tgtggtgaaa	7320
gtagaagtc ctgcgacggg ccgaacactc gtgctggctt ttgtaaaaac gtgcgcagta	7380
ctggcagcgg tgcacgggct gtacatcctg cacgaggttg acctgacgac cgcgcacaag	7440
gaagcagagt gggaatttga gccctcgcc tggcggtttt ggctggtggt cttctacttc	7500
ggctgcttgt ccttgaccgt ctggctgctc gaggggagtt acggtggatc ggaccaccac	7560
gccgcgcgag cccaaagtcc agatgtccgc gcgcggcggc cggagcttga tgacaacatc	7620
gcgcagatgg gagctgtcca tggctctggag ctcccgcggc gtcaggtcag gcgggagctc	7680
ctgcaggttt acctcgcata gacgggtcag ggcgcgggct agatccaggt gataccta	7740
ttccaggggc tggttggtgg cggcgtcgat ggcttgcaag aggccgcac cccgcggcgc	7800
gactacggta ccgcgcggcg ggcggtgggc cgcgggggtg tccttgatg atgcatctaa	7860
aagcggtgac gcgggcgagc ccccgagggt agggggggct ccggaccgcg cgggagaggg	7920
ggcaggggca cgtcggcgcc gcgcgcgggc aggagctggt gctgcgcgcg taggttgctg	7980

ES 2 774 964 T3

gcgaacgcga	cgacgcggcg	gttgatctcc	tgaatctggc	gcctctgcgt	gaagacgacg	8040
ggcccgggtga	gcttgaacct	gaaagagagt	tcgacagaat	caatttcggt	gtcgttgacg	8100
gcggcctggc	gcaaaatctc	ctgcacgtct	cctgagttgt	cttgataggc	gatctcggcc	8160
atgaactgct	cgatctcttc	ctcctggaga	tctccgcgtc	cggtcgcctc	cacggtggcg	8220
gcgaggtcgt	tggaaatgcg	ggccatgagc	tgcgagaagg	cggtgaggcc	tccctcgttc	8280
cagacgcggc	tgtagaccac	gcccccttcg	gcctcgcggg	cgcgcatgac	cacctgcgcg	8340
agattgagct	ccacgtgccg	ggcgaagacg	gcgtagtttc	gcaggcgctg	aaagaggtag	8400
ttgagggtag	tggcgggtgt	ttctgccacg	aagaagtaca	taaccacgcg	tcgcaacgtg	8460
gattcgttga	tatcccccaa	ggcctcaagg	cgctccatgg	cctcgtagaa	gtccacggcg	8520
aagttgaaaa	actgggagtt	gcgcgccgac	acggttaact	cctcctccag	aagacggatg	8580
agctcggcga	cagtgtcgcg	cacctcgcgc	tcaaaggcta	caggggcctc	ttcttcttct	8640
tcaatctcct	cttccataag	ggcctccctt	tcttcttctt	ctggcggcgg	tgggggaggg	8700
gggacacggc	ggcgacgacg	gcgcaccggg	aggcggtcga	caaagcgctc	gatcatctcc	8760
ccgcggcgac	ggcgcatggt	ctcggtagac	gcgcggccgt	tctcgcgggg	gcgcagttgg	8820
aagacgccgc	ccgtcatgtc	ccggttatgg	gttggcgggg	ggctgccatg	cggcagggat	8880
acggcgctaa	cgatgcatct	caacaattgt	tgtgtaggta	ctccgccgcc	gagggacctg	8940
agcgagtccg	catcgaccgg	atcggaatac	ctctcgagaa	aggcgtctaa	ccagtcacag	9000
tcgcaaggta	ggctgagcac	cgtggcgggc	ggcagcgggc	ggcggtcggg	gttgtttctg	9060
gcggagggtc	tgctgatgat	gtaattaaag	taggcgtctt	tgagacggcg	gatggtcgac	9120
agaagcacca	tgtccttggg	tccggcctgc	tgaatgcgca	ggcggtcggc	catgccccag	9180
gcttcgtttt	gacatcggcg	caggctcttg	tagtagctct	gcctgagcct	ttctaccggc	9240
acttcttctt	ctccttcttc	ttgtcctgca	tctcttgcat	ctatcgctgc	ggcggcggcg	9300
gagtttggcc	gtaggtggcg	ccctcttctt	cccatgcgtg	tgaccccgaa	gccccctcat	9360
ggctgaagca	gggctaggtc	ggcgacaacg	cgctcggcta	atatggcctg	ctgcacctgc	9420
gtgagggtag	actggaagtc	atccatgtcc	acaaagcggg	ggtatgcgcc	cgtgttgatg	9480
gtgtaagtgc	agttggccat	aacggaccag	ttaacggtct	ggtgaccggg	ctgcgagagc	9540
tcggtgtacc	tgagacgcga	gtaagccctc	gagtcaaata	cgtagtcgtt	gcaagtccgc	9600
accaggtact	ggtatcccac	caaaaagtgc	ggcggcggct	ggcggtagag	gggccagcgt	9660
agggtagggc	gggctccggg	ggcgagatct	tccaacataa	ggcgatgata	tccgtagatg	9720
tacctggaca	tccagggtgat	gccggcggcg	gtggtggagg	cgcgcggaaa	gtcgcggacg	9780
cggttccaga	tgttgccgag	cggcaaaaag	tgtccatgg	tcgggacgct	ctggccggtc	9840
agggcgcgcg	aatcggtgac	gctctagacc	gtgcaaaaag	agagcctgta	agcgggcact	9900

ES 2 774 964 T3

cttccgtggt ctggtggata aattcgcaag ggtatcatgg cggacgaccg gggttcgagc	9960
cccgatatccg gccgtccgcc gtgatccatg cggttaccgc ccgctgtcgc aaccacggtg	10020
tgcgacgtca gacaacgggg gagtgctcct tttggcttcc ttccaggcgc ggcggctgct	10080
gcgctagctt ttttggccac tggccgcgcg cagcgtaagc ggttaggctg gaaagcgaaa	10140
gcattaagtg gctcgtctcc tgtagccgga gggttatttt ccaaggggtg agtcgcggga	10200
cccccggttc gagtctcga ccggccggac tgcggcgaac gggggtttgc ctccccgtca	10260
tgcaagacc cgttgcaaa ttctccgga aacagggacg agcccccttt ttgcttttcc	10320
cagatgcac cgggtgctgc gcagatgcgc cccctctctc agcagcggca agagcaagag	10380
cagcggcaga catgcagggc accctcccct cctcctaccg cgtcaggagg ggcgacatcc	10440
gcggttgacg cggcagcaga tgggtgattac gaacccccgc ggcgcggggc ccggcactac	10500
ctggacttgg aggagggcga gggcctggcg cggctaggag cgcctctctc tgagcggcac	10560
ccaaggggtc agctgaagcg tgatacgcgt gaggcgtacg tgcgcggca gaacctgtt	10620
cgcgaccgcg agggagagga gcccgaggag atgcgggatc gaaagtcca cgcaggcgc	10680
gagctgcggc atggcctgaa tcgcgagcgg ttgctgcgcg aggaggactt tgagcccgc	10740
gcgcgaaccg ggattagtcc cgcgcgcgca cacgtggcgg ccgccgacct ggtaaccgca	10800
tacgagcaga cgggtgaacca ggagattaac tttcaaaaaa gctttaacaa ccacgtgcgt	10860
acgcttgtgg cgcgcgagga ggtggctata ggactgatgc atctgtggga ctttgaagc	10920
gcgctggagc aaaacccaaa tagcaagccg ctcatggcgc agctgttcct tatagtgcag	10980
cacagcaggg acaacgaggc attcagggat gcgctgctaa acatagtaga gcccgagggc	11040
cgtctggctgc tcgatttgat aaacatcctg cagagcatag tgggtgcagga gcgcagcttg	11100
agcctggctg acaaggtggc gcccatcaac tattccatgc ttagcctggg caagttttac	11160
gcccgcaaga tataccatac cccttacgtt cccatagaca aggaggtaaa gatcgagggg	11220
ttctacatgc gcatggcgct gaaggtgctt accttgagcg acgacctggg cgtttatcgc	11280
aacgagcgca tccacaaggc cgtgagcgtg agccggcggc gcgagctcag cgaccgcgag	11340
ctgatgcaca gcctgcaaag ggcctggct ggcacgggca gcggcgatag agaggccgag	11400
tcctactttg acgcgggcgc tgacctgcgc tggggcccaa gccgacgcgc cctggaggca	11460
gctggggccg gacctgggct ggcggtggca cccgcgcgcg ctggcaacgt cggcggcgtg	11520
gaggaatatg acgaggacga tgagtacgag ccagaggacg gcgagtacta agcggatg	11580
tttctgatca gatgatgcaa gacgcaacgg acccgcggt gcggggcgcg ctgcagagcc	11640
agccgtccgg ccttaactcc acggacgact ggcgccaggt catggaccgc atcatgtcgc	11700
tgactgcgcg caatcctgac gcgttccggc agcagccgca ggccaaccgg ctctccgcaa	11760

ES 2 774 964 T3

ttctggaagc	ggtggtcccg	gcgcgcgcaa	acccacgca	cgagaaggtg	ctggcgatcg	11820
taaacgcgct	ggccgaaaac	agggccatcc	ggcccagca	ggccggcctg	gtctacgacg	11880
cgctgcttca	gcgcgtggct	cgttacaaca	gcggcaacgt	gcagaccaac	ctggaccggc	11940
tgggtgggga	tgtgcgcgag	gccgtggcgc	agcgtgagcg	cgcgagcag	cagggcaacc	12000
tgggctccat	ggttgcaacta	aacgccttcc	tgagtacaca	gcccggccaac	gtgccgcggg	12060
gacaggagga	ctacaccaac	tttgtgagcg	cactgcggct	aatggtgact	gagacaccgc	12120
aaagtgaggt	gtaccagtct	gggccagact	atTTTTTcca	gaccagtaga	caaggcctgc	12180
agaccgtaaa	cctgagccag	gctttcaaaa	acttgcaggg	gctgtggggg	gtgcgggctc	12240
ccacaggcga	ccgcgcgacc	gtgtctagct	tgctgacgcc	caactcgcgc	ctgttgctgc	12300
tgctaatagc	gcccttcacg	gacagtggca	gcgtgtcccg	ggacacatac	ctaggtcact	12360
tgctgacact	gtaccgcgag	gccataggtc	aggcgcagt	ggacgagcat	actttccagg	12420
agattacaag	tgtcagccgc	gcgctggggc	aggaggacac	gggcagcctg	gaggcaaccc	12480
taaactacct	gctgaccaac	cggcggcaga	agatccccctc	gttgcacagt	ttaaacagcg	12540
aggaggagcg	cattttgcgc	tacgtgcagc	agagcgtgag	ccttaacctg	atgcgcgacg	12600
gggtaacgcc	cagcgtggcg	ctggacatga	ccgcgcgcaa	catggaaccg	ggcatgtatg	12660
cctcaaaccg	gccgtttatc	aaccgcctaa	tggactactt	gcatcgcgcg	gccgccgtga	12720
accccgagta	tttcaccaat	gccatcttga	acccgcactg	gctaccgccc	cctggtttct	12780
acaccggggg	attcgaggtg	cccgagggtg	acgatggatt	cctctgggac	gacatagacg	12840
acagcgtggt	ttccccgcaa	ccgcagaccc	tgctagagtt	gcaacagcgc	gagcaggcag	12900
aggcggcgct	gcgaaaggaa	agcttccgca	ggccaagcag	cttgtccgat	ctaggcgctg	12960
cggccccgcg	gtcagatgct	agtagcccat	ttccaagctt	gatagggtct	cttaccagca	13020
ctcgcaccac	ccgcccgcgc	ctgctggggc	aggaggagta	cctaaacaac	tcgctgctgc	13080
agccgcagcg	cgaaaaaac	ctgcctccgg	catttcccaa	caacgggata	gagagcctag	13140
tggacaagat	gagtagatgg	aagacgtacg	cgcaggagca	cagggacgtg	ccaggcccgc	13200
gccccccac	ccgtcgtcaa	aggcacgacc	gtcagcgggg	tctggtgtgg	gaggacgatg	13260
actcggcaga	cgacagcagc	gtcctggatt	tgggagggag	tggcaacccg	tttgcgcacc	13320
ttcgcgccag	gctggggaga	atgtttttaa	aaaaaaaaaa	gcatgatgca	aaataaaaaa	13380
ctcaccaagg	ccatggcacc	gagcgttgg	tttcttgtat	tccccctagt	atgcggcgcg	13440
cggcgatgta	tgagggaagg	cctcctccct	cctacgagag	tgtggtgagc	gcggcgccag	13500
tggcggcggc	gctgggttct	cccttcgatg	ctcccctgga	cccggcgttt	gtgcctccgc	13560
ggtacctgcg	gcctaccggg	gggagaaaca	gcatccgtta	ctctgagttg	gcacccctat	13620
tcgacaccac	ccgtgtgtac	ctggtggaca	acaagtcaac	ggatgtggca	tccctgaact	13680

ES 2 774 964 T3

accagaacga	ccacagcaac	tttctgacca	cggtcattca	aaacaatgac	tacagcccgg	13740
gggaggcaag	cacacagacc	atcaatcttg	acgaccggtc	gcactggggc	ggcgacctga	13800
aaaccatcct	gcataccaac	atgccaaatg	tgaacgagtt	catgtttacc	aataagttta	13860
aggcgcggtg	gatggtgtcg	cgcttgcccta	ctaaggacaa	tcaggtggag	ctgaaatacg	13920
agtgggtgga	gttcacgctg	cccaggggca	actactccga	gaccatgacc	atagacctta	13980
tgaacaacgc	gatcgtggag	cactacttga	aagtgggcag	acagaacggg	gttctggaaa	14040
gcgacatcgg	ggtaaagttt	gacacccgca	acttcagact	ggggtttgac	cccgtcactg	14100
gtcttgtcat	gcctggggta	tatacaaacg	aagccttcca	tccagacatc	attttgctgc	14160
caggatgcgg	ggtggacttc	acccacagcc	gcctgagcaa	cttgttgggc	atccgcaagc	14220
ggcaaccctt	ccaggagggc	tttaggatca	cctacgatga	tctggagggt	ggtaacattc	14280
ccgcactggt	ggatgtggac	gcctaccagg	cgagcttgaa	agatgacacc	gaacagggcg	14340
ggggtggcgc	aggcggcagc	aacagcagtg	gcagcggcgc	ggaagagaac	tccaacgcgg	14400
cagccgcggc	aatgcagccg	gtggaggaca	tgaacgatca	tgccattcgc	ggcgacacct	14460
ttgccacacg	ggctgaggag	aagcgcgctg	aggccgaagc	agcggccgaa	gctgccgccc	14520
ccgctgcgca	acccgaggtc	gagaagcctc	agaagaaacc	ggtgatcaaa	cccctgacag	14580
aggacagcaa	gaaacgcagt	tacaacctaa	taagcaatga	cagcaccttc	accagtacc	14640
gcagctggta	ccttgcatat	aactacggcg	accctcagac	cggaatccgc	tcatggaccc	14700
tgctttgcac	tcctgacgta	acctgcccgt	cggagcaggt	ctactggtcg	ttgccagaca	14760
tgatgcaaga	ccccgtgacc	ttccgctcca	cgcgccagat	cagcaacttt	ccggtggtgg	14820
gcgccgagct	gttgcccgtg	cactccaaga	gcttctacaa	cgaccaggcc	gtctactccc	14880
aactcatccg	ccagttttacc	tctctgaccc	acgtgttcaa	tcgctttccc	gagaaccaga	14940
ttttggcgcg	cccgccagcc	cccaccatca	ccaccgtcag	tgaaaacggt	cctgctctca	15000
cagatcacgg	gacgctaccg	ctgcgcaaca	gcatcgagg	agtccagcga	gtgaccatta	15060
ctgacgccag	acgccgcacc	tgcccctacg	tttacaaggc	cctgggcata	gtctcgcgcg	15120
gcgtcctatc	gagccgcact	ttttgagcaa	gcatgtccat	ccttatatcg	cccagcaata	15180
acacaggctg	gggcctgcgc	ttcccaagca	agatgtttgg	cggggccaag	aagcgctccg	15240
accaacaccc	agtgcgcgtg	cgcgggcact	accgcgcgcc	ctggggcgcg	cacaaacgcg	15300
gccgcactgg	gcgcaccacc	gtcgatgacg	ccatcgacgc	ggtggtggag	gaggcgcgca	15360
actacacgcc	cacgccgcca	ccagtgtcca	cagtggacgc	ggccattcag	accgtggtgc	15420
gcggagcccc	gcgctatgct	aaaatgaaga	gacggcggag	gcgcgtagca	cgtcgccacc	15480
gccgccgacc	cggcactgcc	gcccacgcgc	cggcggcggc	cctgcttaac	cgcgcacgtc	15540

ES 2 774 964 T3

gcaccgggccg	acggggcgccc	atgcggggccc	ctcgaaggct	ggccgcgggt	attgtcactg	15600
tgccccccag	gtccaggcga	cgagcggccc	ccgcagcagc	cgcggccatt	agtgcctatga	15660
ctcagggtcg	caggggcaac	gtgtattggg	tgcgcgactc	ggttagcggc	ctgcgcgtgc	15720
ccgtgcgcac	ccgccccccg	cgcaactaga	ttgcaagaaa	aaactactta	gactcgtact	15780
gttgtatgta	tccagcggcg	gcggcgcgca	acgaagctat	gtccaagcgc	aaaatcaaag	15840
aagagatgct	ccaggtcatc	gcgccggaga	tctatggccc	cccgaagaag	gaagagcagg	15900
attacaagcc	ccgaaagcta	aagcgggtca	aaaagaaaaa	gaaagatgat	gatgatgaac	15960
ttgacgacga	ggtggaactg	ctgcacgcta	ccgcgcccag	gcgacgggta	cagtggaaag	16020
gtcgcgcgct	aaaacgtgtt	ttgcgacccc	gcaccaccgt	agtctttacg	cccggtgagc	16080
gctccacccc	cacctacaag	cgcgtgtatg	atgagggtga	cggcgacgag	gacctgcttg	16140
agcaggccaa	cgagcgcctc	ggggagtttg	cctacggaaa	gcggcataag	gacatgctgg	16200
cgttgccgct	ggacgagggc	aacccaacac	ctagcctaaa	gcccgtaaca	ctgcagcagg	16260
tgctgcccg	gcttgccacc	tccgaagaaa	agcgcggcct	aaagcgcgag	tctggtgact	16320
tggcaccac	cgtgcagctg	atggtaccca	agcgccagcg	actggaagat	gtcttggaag	16380
aatgaccgt	ggaacctggg	ctggagcccc	aggtccgctg	gcggccaatc	aagcaggtgg	16440
cgcggggact	gggcgtgcag	accgtggacg	ttcagatacc	cactaccagt	agcaccagta	16500
ttgccaccgc	cacagagggc	atggagacac	aaacgtcccc	ggttgccctc	gcgggtggcg	16560
atgccgcgg	gcaggcggtc	gctgcggccc	cgtccaagac	ctctacggag	gtgcaaacgg	16620
accctggat	gtttcgcgtt	tcagccccc	ggcgcccgcg	ccgttcgagg	aagtacggcg	16680
ccgccagcgc	gctactgccc	gaatatgccc	tacatccttc	cattgcgcct	acccccggct	16740
atcgtggcta	cacctaccgc	cccagaagac	gagcaactac	ccgacgccga	accaccactg	16800
gaaccgcgcg	ccgccgtcgc	cgtcgccagc	ccgtgctggc	cccgatttcc	gtgcgcaggg	16860
tggctcgga	aggaggcagg	accctgggtg	tgccaacagc	gcgctaccac	cccagcatcg	16920
tttaaaagcc	ggtctttgtg	gttcttgag	atatggccct	cacctgcgcg	ctccgtttcc	16980
cgggtccggg	attccgagga	agaatgcacc	gtaggagggg	catggccggc	cacggcctga	17040
cgggcggcat	gcgtcgtgcg	caccaccggc	ggcggcgcgc	gtcgcaccgt	cgcacgcgcg	17100
gcggtatcct	gcccctcctt	attccactga	tcgcgcgggc	gattggcgcc	gtgcccgga	17160
ttgcatccgt	ggccttgag	gcgcagagac	actgattaaa	aacaagttgc	atgtggaaaa	17220
atcaaaataa	aaagtctgga	ctctcacgct	cgttggttcc	tgtaactatt	ttgtagaatg	17280
gaagacatca	actttgcgtc	tctggccccg	cgacacggct	cgcgcccgtt	catgggaaac	17340
tggcaagata	tcggcaccag	caatatgagc	ggtggcgccct	tcagctgggg	ctcgcgtgtg	17400
agcggcatta	aaaatttcgg	ttccaccgtt	aagaactatg	gcagcaaggc	ctggaacagc	17460

ES 2 774 964 T3

agcacaggcc	agatgctgag	ggataagttg	aaagagcaaa	atttccaaca	aaaggtggtg	17520
gatggcctgg	cctctggcat	tagcggggtg	gtggacctgg	ccaaccaggc	agtgcaaaat	17580
aagattaaca	gtaagcttga	tccccgccct	cccgtagagg	agcctccacc	ggccgtggag	17640
acagtgtctc	cagagggcg	tggcgaaaag	cgtccgcgcc	ccgacaggga	agaaactctg	17700
gtgacgcaaa	tagacgagcc	tccctcgtac	gaggaggcac	taaagcaagg	cctgcccacc	17760
acccgtccca	tcgcgccc	ggctaccgga	gtgctggggc	agcacacacc	cgtaacgctg	17820
gacctgcctc	ccccgcgcga	caccagcag	aaacctgtgc	tgccaggccc	gaccgcggtt	17880
gttgtaaccc	gtcctagccg	cgctccctg	cgccgcgccg	ccagcgggtc	gogatcggtg	17940
cggcccgtag	ccagtggcaa	ctggcaaagc	acactgaaca	gcatcgtggg	tctgggggtg	18000
caatccctga	agcgccgacg	atgcttctga	tagctaactg	gtcgtatgtg	tgtcatgtat	18060
gcgtccatgt	cgccgccaga	ggagctgctg	agccgccgcg	cggccgcttt	ccaagatggc	18120
tacccttctg	atgatgccgc	agtggcttta	catgcacatc	tcgggccagg	acgcctcgga	18180
gtacctgagc	ccggggctgg	tgcagtttgc	ccgcgccacc	gagacgtact	tcagcctgaa	18240
taacaagttt	agaaacccca	cggtggcgcc	tacgcacgac	gtgaccacag	accggtccca	18300
gcgtttgacg	ctgcggttca	tccctgtgga	ccgtgaggat	actgcgtact	cgtacaaggc	18360
gcggttcacc	ctagctgtgg	gtgataaccg	tgtgctggac	atggcttcca	cgtactttga	18420
catccgcggc	gtgctggaca	ggggccctac	ttttaagccc	tactctggca	ctgcctacaa	18480
cggcctggct	cccaagggtg	ccccaaatcc	ttgcgaatgg	gatgaagctg	ctactgctct	18540
tgaataataa	ctagaagaag	aggacgatga	caacgaagac	gaagtagacg	agcaagctga	18600
gcagcaaaaa	actcacgtat	ttgggcaggc	gccttattct	ggtataaata	ttacaaagga	18660
gggtattcaa	ataggtgtcg	aaggtcaaac	acctaaatat	gccgataaaa	catttcaacc	18720
tgaacctcaa	ataggagaat	ctcagtggta	cgaaacagaa	attaatcatg	cagctgggag	18780
agtcctaaaa	aagactaccc	caatgaaacc	atgttacggg	tcatatgcaa	aaccacaaa	18840
tgaaaatgga	gggcaaggca	ttcttgtaaa	gcaacaaaat	ggaaagctag	aaagtcaagt	18900
ggaaatgcaa	tttttctcaa	ctactgaggc	agccgcaggc	aatggtgata	acttgactcc	18960
taaagtggta	ttgtacagtg	aagatgtaga	tatagaaacc	ccagacactc	atatttctta	19020
catgcccact	attaaggaag	gtaactcacg	agaactaatg	ggccaacaat	ctatgccc	19080
caggccta	tacattgctt	ttagggacaa	ttttattggt	ctaattgtatt	acaacagcac	19140
gggtaatatg	ggtgttctgg	cgggccaagc	atcgcagttg	aatgctgttg	tagatttgca	19200
agacagaaac	acagagcttt	cataccagct	tttgcttgat	tccattgggtg	atagaaccag	19260
gtacttttct	atgtggaatc	aggctgttga	cagctatgat	ccagatgtta	gaattattga	19320

ES 2 774 964 T3

aaatcatgga	actgaagatg	aacttccaaa	ttactgcttt	ccactgggag	gtgtgattaa	19380
tacagagact	cttaccaagg	taaaacctaa	aacaggtcag	gaaaatggat	gggaaaaaga	19440
tgctacagaa	ttttcagata	aaaatgaaat	aagagttgga	aataattttg	ccatggaaat	19500
caatctaaat	gccaacctgt	ggagaaat	cctgtactcc	aacatagcgc	tgtatttgcc	19560
cgacaagcta	aagtacagtc	cttccaacgt	aaaaatttct	gataacccaa	acacctacga	19620
ctacatgaac	aagcgagtgg	tggctcccg	gctagtggac	tgctacatta	accttggagc	19680
acgctggtcc	cttgactata	tggacaacgt	caaccattt	aaccaccacc	gcaatgctgg	19740
cctgcgtac	cgctcaatgt	tgctgggcaa	tggtcgctat	gtgccttcc	acatccaggt	19800
gcctcagaag	ttctttgcc	ttaaaaacct	ccttctcctg	ccgggctcat	acacctacga	19860
gtggaacttc	aggaaggatg	ttaacatggt	tctgcagagc	tccctaggaa	atgacctaa	19920
ggttgacgga	gccagcatta	agtttgatag	catttgctt	tacgccacct	tcttcccat	19980
ggccacaa	accgcctcca	cgcttgaggc	catgcttaga	aacgacacca	acgaccagtc	20040
ctttaacgac	tatctctccg	ccgccaacat	gctctaccct	ataccgcga	acgctaccaa	20100
cgtgccata	tccatccct	cccgcaactg	ggcggctttc	cgcggtggg	ccttcacgcg	20160
ccttaagact	aaggaaacct	catcactggg	ctcggtctac	gaccttatt	acacctactc	20220
tggctctata	ccctacctag	atggaacctt	ttacctcaac	cacaccttta	agaagggtggc	20280
cattaccttt	gactcttctg	tcagctggcc	tggcaatgac	cgctgctta	ccccaacga	20340
gtttgaaatt	aagcgctcag	ttgacgggga	gggttacaac	gttgcccagt	gtaacatgac	20400
caaagactgg	ttcctggtac	aatgctagc	taactataac	attggctacc	agggttcta	20460
tatcccagag	agctacaagg	accgcatgta	ctccttcttt	agaaacttcc	agcccatgag	20520
ccgtcaggtg	gtggatgata	ctaaatacaa	ggactaccaa	caggtgggca	tcctacacca	20580
acacaacaac	tctggatttg	ttggctacct	tgccccacc	atgcgcgaag	gacaggccta	20640
ccctgctaac	ttccctatc	cgcttatagg	caagaccgca	gttgacagca	ttaccagaa	20700
aaagtttctt	tgcgatcgca	ccctttggcg	catccattc	tccagtaact	ttatgtccat	20760
gggcgcactc	acagacctgg	gccaaaacct	tctctacgcc	aactccgcc	acgcgctaga	20820
catgactttt	gaggtggatc	ccatggacga	gcccaccctt	ctttatgttt	tgtttgaagt	20880
ctttgacgtg	gtccgtgtgc	accagccgca	ccgcggcgtc	atcgaaaccg	tgtacctgcg	20940
cacgccttc	tcggccggca	acgccacaac	ataaagaagc	aagcaacatc	aacaacagct	21000
gccgccatgg	gctccagtga	gcaggaaactg	aaagccattg	tcaaagatct	tggttggtggg	21060
ccatatTTTT	tgggcacct	tgacaagcgc	tttccaggct	ttgtttctcc	acacaagctc	21120
gcctgcgcca	tagtcaatac	ggccggtcgc	gagactgggg	gcgtacactg	gatggccttt	21180
gcctggaacc	cgactcaaaa	aacatgctac	ctctttgagc	cctttggctt	ttctgaccag	21240

ES 2 774 964 T3

cgactcaagc	aggtttacca	gtttgagtac	gagtcactcc	tgcgcgtag	cgccattgct	21300
tcttcccccg	accgctgtat	aacgctggaa	aagtccaccc	aaagcgtaca	ggggcccaac	21360
tgggcccgt	gtggactatt	ctgtgcatg	tttctccacg	cctttgccaa	ctggcccaaa	21420
actcccatgg	atcacaaccc	caccatgaac	cttattaccg	gggtacccaa	ctccatgctc	21480
aacagtcccc	aggtacagcc	caccctgcgt	cgcaaccagg	aacagctcta	cagcttcctg	21540
gagcgccact	cgccctactt	ccgcagccac	agtgcgcaga	ttaggagcgc	cacttctttt	21600
tgtcacttga	aaaacatgta	aaaataatgt	actagagaca	ctttcaataa	aggcaaatgc	21660
ttttatttgt	acactctcgg	gtgattatth	acccccaccc	ttgccgtctg	cgccgtttaa	21720
aatcaaagg	ggttctgccg	cgcatcgcta	tgcgccactg	gcagggacac	gttgcgatac	21780
tgggtgtttg	tgtctcactt	aaactcaggc	acaaccatcc	gcggcagctc	ggtgaagttt	21840
tcactccaca	ggctgcgcac	catcaccaac	gcgttttagca	ggtcgggagc	cgatatcttg	21900
aagtcgcagt	tggggcctcc	gccctgcgcg	cgcgagttgc	gatacacagg	gttgcagcac	21960
tggaacacta	tcagcgccgg	gtggtgcacg	ctggccagca	cgctcttgct	ggagatcaga	22020
tccgcgtcca	ggtcctccgc	gttgctcagg	gcgaacggag	tcaacttttg	tagctgcctt	22080
cccaaaaagg	gcgcgtgccc	aggctttgag	ttgcactcgc	accgtagtgg	catcaaaagg	22140
tgaccgtgcc	cggtctgggc	gttaggatac	agcgctgca	taaaagcctt	gatctgctta	22200
aaagccacct	gagcctttgc	gccttcagag	aagaacatgc	cgcaagactt	gccgaaaac	22260
tgattggccg	gacaggccgc	gtcgtgcacg	cagcaccttg	cgtcggtgtt	ggagatctgc	22320
accacatttc	ggccccacgg	gttcttcacg	atcttgccct	tgctagactg	ctccttcagc	22380
gcgcgctgcc	cgttttcgct	cgtcacatcc	atttcaatca	cgctgctcct	atttatcata	22440
atgcttcctg	gtagacactt	aagctgcct	tcgatctcag	cgcagcgggt	cagccacaac	22500
gcgcagcccg	tgggctcgtg	atgcttgtag	gtcacctctg	caaacgactg	caggtacgcc	22560
tgcaggaatc	gccccatcat	cgtcacaaaag	gtcttggtgc	tgggaagggt	cagctgcaac	22620
ccgcggtgct	cctcgctcag	ccaggtcttg	catacggccg	ccagagcttc	cacttggtca	22680
ggcagtagtt	tgaagttcgc	ctttagatcg	ttatccacgt	ggtacttgct	catcagcgcg	22740
cgcgagcct	ccatgccctt	ctcccacgca	gacacgatcg	gcacactcag	cggttcatc	22800
accgtaattt	cactttccgc	ttcgctgggc	tcttctctt	cctcttgctg	ccgcatacca	22860
cgcgccactg	ggctgctctc	attcagccgc	cgactgtgc	gcttacctcc	tttgccatgc	22920
ttgattagca	ccggtgggtt	gctgaaaccc	accatttgta	gcgccacatc	ttctctttct	22980
tcctcgctgt	ccacgattac	ctctggtgat	ggcgggcgct	cggtctggg	agaaggcgcg	23040
ttctttttct	tcttggggcg	aatggccaaa	tccgcccgg	aggtcgatgg	ccgcgggctg	23100

ES 2 774 964 T3

ggtgtgcgcg	gcaccagcgc	gtcttgtgat	gagtcttctc	cgctctcgga	ctcgatacgc	23160
cgctcatcc	gcttttttgg	gggcgcccgg	ggaggcggcg	gcgacgggga	cggggacgac	23220
acgtcctcca	tggttggggg	acgtcgcgcc	gcaccgcgtc	cgcgctcggg	ggtgggtttcg	23280
cgctgctcct	cttcccgact	ggccatttcc	ttctcctata	ggcagaaaaa	gatcatggag	23340
tcagtcgaga	agaaggacag	cctaaccgcc	ccctctgagt	tcgccaccac	cgctccacc	23400
gatgccgcca	acgcgcctac	caccttcccc	gtcgaggcac	ccccgcttga	ggaggaggaa	23460
gtgattatcg	agcaggaccc	aggttttcta	agcgaagacg	acgaggaccg	ctcagtagca	23520
acagaggata	aaaagcaaga	ccaggacaac	gcagaggcaa	acgaggaaac	agtggggcgg	23580
ggggacgaaa	ggcatggcga	ctacctagat	gtgggagacg	acgtgctgtt	gaagcatctg	23640
cagcgccagt	gcgccattat	ctgcgacgcg	ttgcaagacg	gcagcgatgt	gccccctgcc	23700
atagcgggat	tcagccttgc	ctacgaacgc	cacctattct	caccgcgcgt	accccccaaa	23760
cgccaagaaa	acggcacatg	cgagcccaac	ccgcgcctca	acttctaccc	cgtatttgcc	23820
gtgccagagg	tgcttgccac	ctatcacatc	tttttccaaa	actgcaagat	acccctatcc	23880
tgccgtgcca	accgcagccg	agcggacaag	cagctggcct	tgcggcaggg	cgctgtcata	23940
cctgatatcg	cctcgctcaa	cgaagtgcga	aaaatctttg	aggtgcttgg	acgcgacgag	24000
aagcgcgcgg	caaacgctct	gcaacaggaa	aacagcgaaa	atgaaagtca	ctctggagtg	24060
ttggtggaac	tcgagggtga	caacgcgcgc	ctagccgtac	taaaacgcag	catcgaggtc	24120
accacttttg	cctacccggc	acttaacctc	ccccccaagg	tcatgagcac	agtcagtgtg	24180
gagctgatcg	tgcgccttgc	gcagcccttg	gagaggggatg	caaatttgca	agaacaaaca	24240
gaggagggcc	taccgcagct	tggcgacgag	cagctagcgc	gctggcttca	aacgcgcgag	24300
cctgccgact	tggaggagcg	acgcaaaact	atgatggccg	cagtgcctcg	taccgtggag	24360
cttgagtgcg	tgcagcgggt	ctttgctgac	ccggagatgc	agcgcaagct	agaggaaaca	24420
ttgcaactaca	cctttcgaca	gggctacgta	cgcagggcct	gcaagatctc	caacgtggag	24480
ctctgcaacc	tggctctcta	ccttgaattt	ttgcacgaaa	accgccttgg	gcaaaaacgtg	24540
cttcattcca	cgctcaaggg	cgaggcgcgc	cgcgactacg	tccgcgactg	cgtttactta	24600
tttctatgct	acacctggca	gacggccatg	ggcgtttggc	agcagtgcct	ggaggagtgc	24660
aacctcaagg	agctgcagaa	actgctaaag	caaaacttga	aggacctatg	gacggccttc	24720
aacgagcgct	ccgtggccgc	gcacctggcg	gacatcattt	tccccgaacg	cctgcttaaa	24780
accctgcaac	agggctctgc	agacttcacc	agtcaaagca	tgttgacagaa	ctttaggaac	24840
tttatcctag	agcgctcagg	aatcttgccc	gccacctgct	gtgcacttcc	tagcgacttt	24900
gtgcccatca	agtaccgcga	atgcctcccg	ccgctttggg	gccactgcta	ccttctgcag	24960
ctagccaact	accttgccca	ccactctgac	ataatggaag	acgtgagcgg	tgacgggtcta	25020

ES 2 774 964 T3

ctggagtgtc actgtcgtcg caacctatgc accccgcacc gctccctggt ttgcaattcg	25080
cagctgctta acgaaagtca aattatcggg acctttgagc tgcaggggcc ctgcctgac	25140
gaaaagtccg cggctccggg gttgaaactc actccggggc tgtggacgtc ggcttacctt	25200
cgcaaatctg tacctgagga ctaccacgcc cagagatta ggttctacga agaccaatcc	25260
cggccgccta atgaggagct taccgcctgc gtcattaccg agggccacat tcttgccaa	25320
ttgcaagcca tcaacaaagc ccgcaagag tttctgctac gaaagggacg ggggggttac	25380
ttggaccccc agtccggcga ggagctcaac ccaatcccc cgcgcgcga gccctatcag	25440
cagcagccgc gggcccttgc ttcccaggat ggcacccaaa aagaagctgc agctgccgc	25500
gccaccacag gacgaggagg aatactggga cagtcaggca gaggagggtt tggacgagga	25560
ggaggaggac atgatggaag actgggagag cctagacgag gaagcttccg aggtcgaaga	25620
ggtgtcagac gaaacaccgt caccctcggg cgcattcccc tcgccggcgc ccagaaaac	25680
ggcaaccggg tccagcatgg ctacaacctc cgctcctcag gcgcgcgcg cactgccgt	25740
tcgccgaccc aaccgtagat gggacaccac tggaaccagg gccggttaagt ccaagcagcc	25800
gccgcccgtt gcccaagagc aacaacagcg ccaaggctac cgctcatggc gcgggcacaa	25860
gaacgccata gttgcttgct tgcaagactg tgggggcaac atctccttcg ccgcccgtt	25920
tcttctctac catcacggcg tggccttccc ccgtaacatc ctgcattact accgtcatct	25980
ctacagccca tactgcaccg gcggcagcgg cagcaacagc agcggccaca cagaagcaaa	26040
ggcgaccgga tagcaagact ctgacaaagc ccaagaaatc cacagcggcg gcagcagcag	26100
gaggaggagc gctgcgtctg gcgcccacg aaccctatc gaccgcgag cttagaaaca	26160
ggatttttcc cactctgtat gctatatttc aacagagcag gggccaagaa caagagctga	26220
aaataaaaaa caggtctctg cgatccctca ccgcgagctg cctgtatcac aaaagcgaag	26280
atcagcttcg gcgcacgctg gaagacgcgg aggtctctct cagtaaatac tgcgcgctga	26340
ctcttaagga ctagtttcgc gccctttctc aaatttaagc gcgaaaacta cgtcatctcc	26400
agcggccaca ccggcgcgca gcacctgttg tcagcgccat tatgagcaag gaaattccca	26460
cgcctacat gtggagttac cagccacaaa tgggacttgc ggctggagct gcccaagact	26520
actcaacccc aataaactac atgagcgcgg gacccacat gatatcccgg gtcaacggaa	26580
tacgcgcccc ccgaaaccga attctcctgg aacaggcggc tattaccacc acacctcgta	26640
ataaccttaa tccccgtagt tggcccgtg ccctggtgta ccaggaaagt ccgctccca	26700
ccactgtggt acttcccaga gacgcccagg ccgaagtcca gatgactaac tcaggggcgc	26760
agcttgccgg cggctttcgt cacagggtgc ggtcgcccgg gcagggtata actcacctga	26820
caatcagagg gcgaggtatt cagctcaacg acgagtcggg gagctcctcg cttggtctcc	26880

ES 2 774 964 T3

gtccggacgg gacatttcag atcggcgggc cggcccgctc ttcattcacg cctcgtcagg	26940
caatcctaac tctgcagacc tcgtcctctg agccgcgctc tggaggcatt ggaactctgc	27000
aatttattga ggagtttgtg ccatcggtct actttaaccc cttctcggga cctcccggcc	27060
actatccgga tcaatttatt cctaactttg acgcggtaaa ggactcggcg gacggctacg	27120
actgaatggt aagtggagag gcagagcaac tgcgcctgaa acacctggtc cactgtcgcc	27180
gccacaagtg ctttgcccg cactccggtg agttttgcta ctttgaattg cccgaggatc	27240
ataticgagg cccggcgcac ggcgccggc ttaccgcccc gggagagctt gcccgtagcc	27300
tgattcggga gtttaccag cgcctcctgc tagttgagcg ggacagggga ccctgtgttc	27360
tcactgtgat ttgcaactgt cctaaccctg gattacatca agatctttgt tgccatctct	27420
gtgctgagta taataaatac agaaattaaa atatactggg gctcctatcg ccatcctgta	27480
aacgccaccg tcttcacccg cccaagcaaa ccaaggcgaa ccttacctgg tacttttaac	27540
atctctccct ctgtgattta caacagtttc aaccagacg gagtgagtct acgagagaac	27600
ctctccgagc tcagctactc catcagaaaa aacaccaccc tccttacctg ccgggaacgt	27660
acgagtgcgt caccggccgc tgcaccacac ctaccgcctg accgtaaacc agactttttc	27720
cggacagacc tcaataactc tgtttaccag aacaggaggt gagcttagaa aacccttagg	27780
gtattaggcc aaaggcgag ctactgtggg gtttatgaac aattcaagca actctacggg	27840
ctattctaatt tcaggtttct ctagaatcgg gggtggggtt attctctgtc ttgtgattct	27900
ctttattctt atactaacgc ttctctgcct aaggctcgcc gcctgctgtg tgcacatttg	27960
catttattgt cagcttttta aacgctggg tgcgcccca agatgattag gtacataatc	28020
ctaggtttac tcacccttgc gtcagccac ggtaccaccc aaaaggtgga ttttaaggag	28080
ccagcctgta atgttacatt cgcagctgaa gctaagtgt gcaccactct tataaaatgc	28140
accacagaac atgaaaagct gcttattcgc caaaaaaca aaattggcaa gtatgctgtt	28200
tatgctattt ggcagccagg tgacactaca gagtataatg ttacagtttt ccagggtaaa	28260
agtcataaaa cttttatgta tacttttcca ttttatgaaa tgtgcgacat taccatgtac	28320
atgagcaaac agtataagtt gtggccccc caaaattgtg tggaaaacac tggcactttc	28380
tgctgcactg ctatgctaatt tacagtgtc gctttggtct gtaccctact ctatattaaa	28440
tacaaaagca gacgcagctt tattgaggaa aagaaaatgc ctttaatttac taagttacaa	28500
agctaagtgc accactaact gctttactcg ctgcttgcaa aacaaattca aaaagttagc	28560
attataatta gaataggatt taaaccccc ggtcatttcc tgcctcaatac cattcccctg	28620
aacaattgac tctatgtggg atatgctcca gcgctacaac cttgaagtca ggcttcctgg	28680
atgtcagcat ctgactttgg ccagcacctg tcccgcggtt ttgttcagc ccaactacag	28740
cgaccacccc taacagagat gaccaacaca accaacggg ccgccgctac cggacttaca	28800

ES 2 774 964 T3

tctaccacaa	atacacccca	agtttctgcc	tttgtcaata	actgggataa	cttgggcatg	28860
tggtggttct	ccatagcgct	tatgtttgta	tgccttatta	ttatgtggct	catctgctgc	28920
ctaaagcgca	aacgcgccc	accacccatc	tatagtccca	tcattgtgct	acacccaaac	28980
aatgatggaa	tccatagatt	ggacggactg	aaacacatgt	tcttttctct	tacagtatga	29040
ttaaagtaga	catgattcct	cgagttttta	tattactgac	ccttggtgcg	ctttttttgt	29100
gcggtgctca	cattggctgc	ggtttctcac	atcgaagtag	actgcattcc	agccttcaca	29160
gtctatttgc	tttacggatt	tgtcacccctc	acgctcatct	gcagcctcat	cactgtggtc	29220
atcgccctta	tccagtgc	tgactgggtc	tgtgtgcgct	ttgcatactc	cagacaccat	29280
ccccagtaca	gggacaggac	tatagctgag	cttcttagaa	ttctttaatt	atgaaattta	29340
ctgtgacttt	tctgctgatt	atttgcaccc	tatctgcgtt	ttgttcccc	acctccaagc	29400
ctcaaagaca	tatatcatgc	agattcactc	gtatatggaa	tattccaagt	tgctacaatg	29460
aaaaaagcga	tctttccgaa	gcctgggttat	atgcaatcat	ctctgttatg	gtgttctgca	29520
gtaccatctt	agccctagct	atatatccct	accttgacat	tggttggaac	gcaatagatg	29580
ccatgaacca	cccaactttc	ccgcgcgcc	ctatgcttcc	actgcaacaa	gttgttgccg	29640
gcggctttgt	cccagccaat	cagcctcgcc	caccttctcc	cacccccact	gaaatcagct	29700
actttaatct	aacaggagga	gatgactgac	accctagatc	tagaaatgga	cggaattatt	29760
acagagcagc	gcctgctaga	aagacgcagg	gcagcgccg	agcaacagcg	catgaatcaa	29820
gagctccaag	acatgggttaa	cttgcaccag	tgcaaaagg	gtatcttttg	tctggtaaag	29880
caggccaag	tcacctacga	cagtaatacc	accggacacc	gccttagcta	caagttgcca	29940
accaagcgtc	agaaattggt	ggtcatggtg	ggagaaaagc	ccattaccat	aactcagcac	30000
tcggtagaaa	ccgaaggctg	cattcactca	ccttgtcaag	gacctgagga	tctctgcacc	30060
cttattaaga	ccctgtgcg	tctcaaagat	cttattccct	ttaactaata	aaaaaaaaata	30120
ataaagcatc	acttacttaa	aatcagttag	caaatttctg	tccagtttat	tcagcagcac	30180
ctccttgccc	tctcccagc	tctggtattg	cagcttcctc	ctggctgcaa	actttctcca	30240
caatctaaat	ggaatgtcag	tttcctcctg	ttcctgtcca	tccgcaccca	ctatcttcat	30300
gttgttgca	atgaagcgcg	caagaccgtc	tgaagatacc	ttcaaccccg	tgtatccata	30360
tgacacggaa	accggtcctc	caactgtgcc	ttttcttact	cctccctttg	tatcccccaa	30420
tggtgttcaa	gagagtcccc	ctgggtact	ctctttgctc	ctatccgaac	ctctagttac	30480
ctccaatggc	atgcttgctc	tcaaaatggg	caacggcctc	tctctggacg	aggccggcaa	30540
ccttacctcc	caaaatgtaa	ccactgtgag	cccacctctc	aaaaaaacca	agtcaaacat	30600
aaacctggaa	atatctgcac	ccctcacagt	tacctcagaa	gccctaactg	tggtgcccgc	30660

ES 2 774 964 T3

cgcacctcta atggctcggg gcaacacact caccatgcaa tcacaggccc cgctaaccgt	30720
gcacgactcc aaacttagca ttgccacca aggaccctc acagtgtcag aaggaaagct	30780
agccctgcaa acatcaggcc ccctcaccac caccgatagc agtaccctta ctatcactgc	30840
ctcaccctct ctaactactg ccactggtag cttgggcatt gacttgaaag agcccattta	30900
tacacaaaat ggaaaactag gactaaagta cggggctcct ttgcatgtaa cagacgacct	30960
aaacactttg accgtagcaa ctgggtccagg tgtgactatt aataaactt ccttgcaaac	31020
taaagttaact ggagccttgg gttttgattc acaaggcaat atgcaactta atgtagcagg	31080
aggactaagg attgattctc aaaacagacg ccttataactt gatgttagtt atccgtttga	31140
tgctcaaaac caactaaatc taagactagg acagggccct ctttttataa actcagccca	31200
caacttggat attaaactaca acaaaggcct ttacttgttt acagcttcaa acaattccaa	31260
aaagcttgag gttaacctaa gcactgccaa ggggttgatg tttgacgcta cagccatagc	31320
cattaatgca ggagatgggc ttgaatttgg ttcacctaat gcaccaaaca caaatcccct	31380
caaaaacaaa attggccatg gcctagaatt tgattcaaac aaggctatgg ttcctaaact	31440
aggaactggc cttagttttg acagcacagg tgccattaca gtaggaaaca aaaataatga	31500
taagctaact ttgtggacca caccagctcc atctcctaac tgtagactaa atgcagagaa	31560
agatgctaaa ctcacttttg tcttaacaaa atgtggcagt caaataacttg ctacagtttc	31620
agttttggct gttaaaggca gtttggtctc aatatctgga acagttcaaa gtgctcatct	31680
tattataaga tttgacgaaa atggagtgtc actaaacaat tccttcctgg acccagaata	31740
ttggaacttt agaaatggag atcttactga aggcacagcc tatacaaacg ctgttgatt	31800
tatgcctaac ctatcagctt atccaaaatc tcacggtaaa actgccaaaa gtaacattgt	31860
cagtcaagtt tactttaaag gagacaaaac taaacctgta aactaacca ttactactaa	31920
cggtagacag gaaacaggag acacaactcc aagtgcatac tctatgtcat tttcatggga	31980
ctggtctggc cacaactaca ttaatgaaat atttgccaca tcctcttaca ctttttcata	32040
cattgcccaa gaataaagaa tcgttttgtt tatgtttcaa cgtgtttatt tttcaattgc	32100
agaaaatttc aagtcatttt tcattcagta gtatagcccc accaccacat agcttataca	32160
gatcaccgta ccttaatcaa actcacagaa ccctagtatt caacctgcc cctccctccc	32220
aacacacaga gtacacagtc ctttctcccc ggttgccctt aaaaagcatc atatcatggg	32280
taacagacat attcttaggt gttatatcc acacggtttc ctgtcgagcc aaacgctcat	32340
cagtgatatt aataaactcc cggggcagct cacttaagtt catgtcgctg tccagctgct	32400
gagccacagg ctgctgtcca acttgcggtt gcttaacggg cggcgaagga gaagtccacg	32460
cctacatggg ggtagagtca taatcgtgca tcaggatagg gcggtggtgc tgcagcagcg	32520
cgcgaataaa ctgctgccgc cgccgctccg tcctgcagga atacaacatg gcagtggctc	32580

ES 2 774 964 T3

cctcagcgat gatttcgcacc gcccgcgagca taaggcgccct tgtcctccgg gcacagcagc	32640
gcaccctgat ctcaacttaaa tcagcacagt aactgcagca cagcaccaca atattgttca	32700
aaatcccaca gtgcaaggcg ctgtatccaa agctcatggc ggggaccaca gaacccacgt	32760
ggccatcata ccacaagcgc aggtagatta agtggcgacc cctcataaac acgctggaca	32820
taaacattac ctcttttggc atgttgtaat tcaccacctc ccggtaccat ataaacctct	32880
gattaaacat ggcgccatcc accaccatcc taaaccagct ggccaaaacc tgcccggcgg	32940
ctatacactg cagggaaaccg ggactggaac aatgacagtg gagagcccag gactcgtaac	33000
catggatcat catgctcgtc atgatatcaa tgttggcaca acacaggcac acgtgcatac	33060
acttcctcag gattacaagc tcctcccgcg ttagaacat atcccaggga acaacccatt	33120
cctgaatcag cgtaaattccc acactgcagg gaagacctcg cacgtaactc acgttgtgca	33180
ttgtcaaagt gttacattcg ggcagcagcg gatgatcctc cagtatggta gcgcgggttt	33240
ctgtctcaaa aggaggtaga cgatccctac tgtacggagt gcgcggagac aaccgagatc	33300
gtgttggtcg tagtgtcatg ccaaattgaa cgccggacgt agtcatatct cctgaagcaa	33360
aaccagggtgc gggcgtgaca aacagatctg cgtctccggt ctccgcccgt agatcgtctc	33420
gtgtagtagt tgtagtatat ccactctctc aaagcatcca ggcgccccct ggcttcgggt	33480
tctatgtaaa ctcttcatg cgccgctgcc ctgataacat ccaccaccgc agaataagcc	33540
acaccagcc aacctacaca ttcgttctgc gagtcacaca cgggaggagc gggaagagct	33600
ggaagaacca tggttttttt tttattccaa aagattatcc aaaacctcaa atgaagatc	33660
tattaagtga acgcgctccc ctccggtggc gtgggtcaaac tctacagcca aagaacagat	33720
aatggcattt gtaagatgtt gcacaatggc ttccaaaagg caaacggccc tcacgtccaa	33780
gtggacgtaa aggctaaacc cttcagggtg aatctcctct ataaacattc cagcaccttc	33840
aaccatgccc aaataattct catctcgcca ccttctcaat atatctctaa gcaaattccc	33900
aatattaagt ccggccattg taaaaatctg ctccagagcg ccctccacct tcagcctcaa	33960
gcagcgaatc atgattgcaa aaattcaggt tcctcacaga cctgtataag attcaaaagc	34020
ggaacattaa caaaaataacc gcgatcccgt aggtcccttc gcaggggccag ctgaacataa	34080
tcgtgcaggt ctgcacggac cagcgcggcc acttccccgc caggaaccat gacaaaagaa	34140
cccacactga ttatgacacg catactcgga gctatgctaa ccagcgtagc cccgatgtaa	34200
gcttgttgca tgggcggcga tataaaatgc aaggtgctgc tcaaaaaatc aggcaaagcc	34260
tcgcgcaaaa aagaaagcac atcgtagtca tgctcatgca gataaaggca ggtaagctcc	34320
ggaaccacca cagaaaaaga caccatTTTT ctctcaaaaca tgtctgctggg tttctgcata	34380
aacacaaaat aaaataacaa aaaaacattt aaacattaga agcctgtctt acaacaggaa	34440

ES 2 774 964 T3

```

aaacaaccct tataagcata agacggacta cggccatgcc ggcgtgaccg taaaaaaact 34500
ggtcaccgtg attaaaaagc accaccgaca gtcctcgggt catgtccgga gtcataaatgt 34560
aagactcgggt aaacacatca ggttgattca catcgggtcag tgctaaaaag cgaccgaaat 34620
agcccggggg aatacatacc cgcaggcgta gagacaacat tacagccccc ataggaggta 34680
taacaaaatt aataggagag aaaaacacat aaacacctga aaaaccctcc tgcctaggca 34740
aaatagcacc ctcccgtctc agaacaacat acagcgcttc cacagcggca gccataacag 34800
tcagccttac cagtaaaaaa gaaaacctat taaaaaaaca ccactcgaca cggcaccagc 34860
tcaatcagtc acagtgtaaa aaagggccaa gtgcagagcg agtatatata ggactaaaaa 34920
atgacgtaac ggttaaagtc cacaaaaaac acccagaaaa ccgcacgcga acctacgccc 34980
agaaacgaaa gccaaaaaac ccacaacttc ctcaaatcgt cacttccggt ttcccacggt 35040
acgtcacttc ccattttaag aaaactacaa ttcccaacac atacaagtta ctccgcccta 35100
aaacctacgt caccgcgccc gttcccacgc cccgcgccac gtcacaaact ccaccccctc 35160
attatcatat tggcttcaat ccaaaataag gtatattatt gatgatg 35207

```

<210> 20
<400> 20
000

5

<210> 21

<400> 21
000

10

<210> 22
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Elemento potenciador específico de células endoteliales

20

<400> 22

ggtgactttg ctctggag 19

<210> 23
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Elemento potenciador específico de células endoteliales

30

<400> 23

ctccagaagc aaagtcacc 19

35

<210> 24
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Elemento potenciador específico de células endoteliales

<400> 24

gtacttcata cttttcatt 19

<210> 25
<211> 19
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Elemento potenciador específico de células endoteliales
10
<400> 25

aatgaaaagt atgaagtac 19

15 <210> 26
<211> 6
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Elemento de respuesta a hipoxia

<400> 26

25 gcacgt 6

<210> 27
<211> 40
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> conector peptídico

35 <400> 27

Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10					15	

Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser
			20					25					30		

Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser
		35					40

40 <210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> VH CDR1

<400> 28

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	Gly	Met	Asn
1				5					10

50 <210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> VH CDR2

<400> 29

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

5 <210> 30
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> VH CDR3

<400> 30

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
15 1 5 10

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL CDR1

25 <400> 31

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

30 <210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> VL CDR2

<400> 32

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

40 <210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> VL CDR3

<400> 33

50 Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un vector que comprende la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO:19 para su uso para tratar un tumor en un sujeto que lo necesita en combinación con bevacizumab, en el que: (i) el vector se administra al sujeto antes que el bevacizumab, (ii) la capacidad de respuesta del tumor al bevacizumab se induce o mejora después de la administración del vector, comparada con la capacidad de respuesta del tumor al bevacizumab sin la administración del vector, y (iii) el tumor se deriva o está asociado con un glioblastoma multiforme recurrente.
2. El vector para el uso de la reivindicación 1, en el que la capacidad de respuesta al bevacizumab es una propiedad antiangiogénesis del bevacizumab.
3. El vector para el uso de la reivindicación 1 o 2, en el que la capacidad de respuesta al bevacizumab es un efecto antitumoral del bevacizumab.
4. El vector para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el vector se administra en una cantidad eficaz de al menos aproximadamente 1×10^{11} partículas de virus, al menos aproximadamente 1×10^{12} partículas de virus, al menos aproximadamente 1×10^{13} partículas de virus, o al menos aproximadamente 1×10^{14} partículas de virus.
5. El vector para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el bevacizumab se administra en una cantidad eficaz menor que aproximadamente 15 mg/kg, 14 mg/kg, 13 mg/kg, 12 mg/kg, 11 mg/kg, 10 mg/kg, 9 mg/kg, 8 mg/kg, 7 mg/kg, 6 mg/kg, 5 mg/kg, 4 mg/kg, 3 mg/kg, 2 mg/kg, o 1 mg/kg.
6. El vector para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el vector se administra en una cantidad eficaz de 3×10^{12} a 1×10^{13} partículas de virus, y el bevacizumab se administra en una cantidad eficaz de 5 mg/kg a 15 mg/kg.
7. El vector para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el vector se administra repetidas veces.
8. El vector para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el bevacizumab se administra repetidas veces.
9. El vector para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el vector se administra repetidas veces cada dos meses en una cantidad eficaz de 1×10^{13} partículas de virus, y el bevacizumab se administra repetidas veces cada dos semanas en una cantidad eficaz de 10 mg/kg.

FIGURA 1

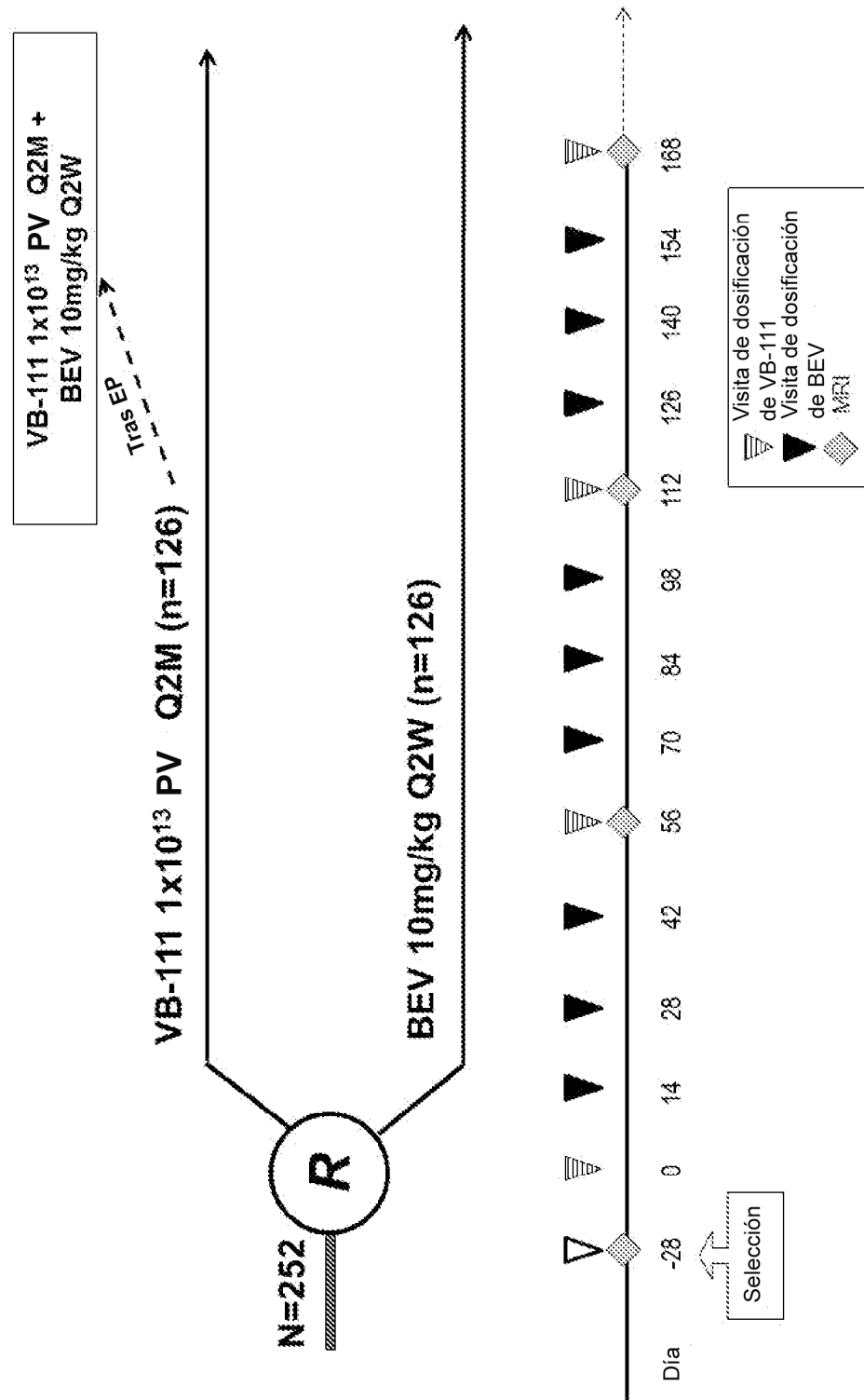


FIGURA 2

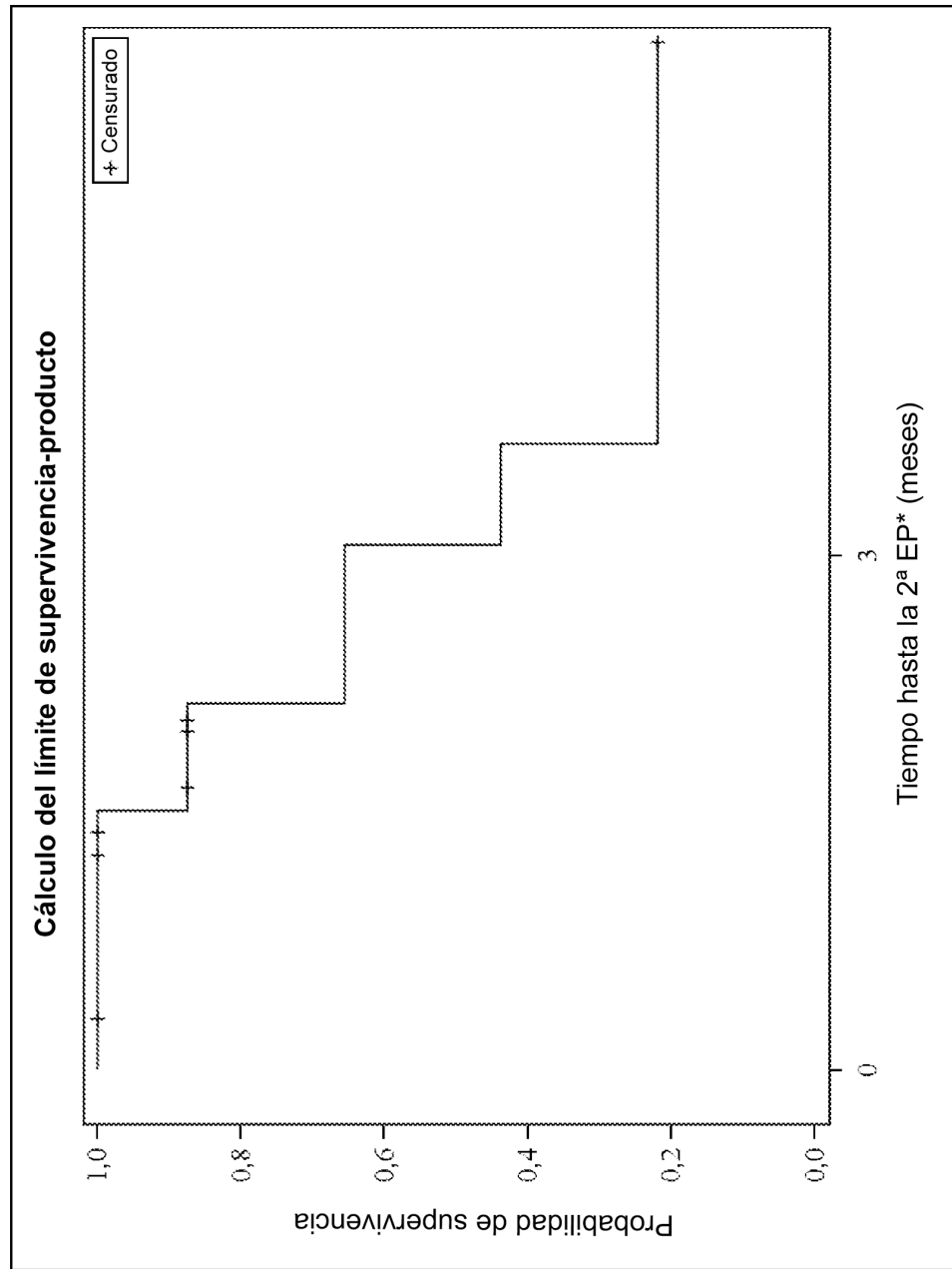


FIGURA 3

- Diagnosticado con GBM
- Se sometió a cirugía, recibió radioterapia y quimioterapia (Temodar)

