

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 183**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2013 PCT/US2013/070087**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14078529**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2013 E 13854686 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 2920312**

54 Título: **Vectores oncolíticos de VHS1 y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

14.11.2012 US 201261726318 P

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

04.08.2020

73 Titular/es:

**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(50.0%)**

75 Francis Street

Boston, MA 02115, US y

OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION (50.0%)

72 Inventor/es:

NAKASHIMA, HIROSHI y

CHIOCCA, ENNIO ANTONIO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 777 183 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

Vectores oncolíticos de VHS1 y métodos de uso de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se dirige a los campos de virología, biología del cáncer y medicina. Más particularmente, se refiere a composiciones y métodos para el tratamiento de cáncer de cerebro en un paciente usando el virus del herpes simple 1 oncolítico (VHS-1) armado con genes terapéuticos.

10

DECLARACIÓN SOBRE LA INVESTIGACIÓN PATROCINADA FEDERALMENTE

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo R21NS0632901, 1P01CA163205 y P01CA069246 otorgado por National Institutes of Health. El gobierno posee ciertos derechos sobre la presente invención.

15

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII. Dicha copia en ASCII, creada el 14 de noviembre de 2013, se llama 043214-076071-PCT_SL.txt y tiene un tamaño de 14.073 bytes.

20

Antecedentes

25

Los tumores malignos que son intrínsecamente resistentes a las terapias convencionales representan desafíos terapéuticos significativos. Tales tumores malignos incluyen, pero no se limitan a gliomas malignos y tumores sólidos sistémicos recurrentes tales como el cáncer de pulmón. Los gliomas malignos son los tumores cerebrales primarios más abundantes, teniendo una incidencia anual de 6,4 casos por 100.000 (CBTRUS, 2002-2003). Estos tumores neurológicamente devastadores son el subtipo más común de tumores cerebrales primarios y son uno de los cánceres humanos más mortales. En la manifestación de cáncer más agresiva, el glioblastoma multiforme (GBM), la mediana de duración de supervivencia para los pacientes es de 14 meses, a pesar de los máximos esfuerzos de tratamiento. Una enfermedad prototípica, el glioma maligno es inherentemente resistente a los regímenes de tratamiento actuales. De hecho, en aproximadamente 1/3 de los pacientes con GBM, el tumor continuará creciendo a pesar del tratamiento con radiación y quimioterapia. La supervivencia media incluso con tratamiento agresivo que incluye cirugía, radiación y quimioterapia es menos de 1 año (Schiffer, 1998). Debido a que hay pocas opciones buenas de tratamiento disponibles para muchos de estos tumores refractarios, la exploración de enfoques terapéuticos novedosos e innovadores es importante.

30

35

40

La terapia génica es un tratamiento prometedor para los tumores, incluyendo los gliomas, y la identificación de anomalías genéticas que contribuyen a tumores malignos está proporcionando información importante para ayudar en el diseño de terapias génicas. Las anomalías genéticas indicadas en la progresión de los tumores incluyen la inactivación de genes supresores de tumores y la sobreexpresión de numerosos factores de crecimiento y oncogenes. El tratamiento tumoral puede lograrse suministrando un polinucleótido que codifique un polipéptido terapéutico u otro terapéutico que se dirija a las mutaciones y las fisiologías aberrantes resultantes de los tumores. Estas mutaciones y fisiologías aberrantes son las que distinguen las células tumorales de las células normales. Un virus selectivo de tumor es una herramienta especialmente prometedora para la terapia génica, y los recientes avances en el conocimiento de cómo se replican los virus se han usado para diseñar virus oncolíticos selectivos de tumor.

45

50

En gliomas, se ha demostrado que varios tipos de virus competentes de replicación condicional son útiles en modelos animales, por ejemplo: reovirus que pueden replicarse selectivamente en tumores con una ruta ras activada (Coffey *et al.* 1998); virus del herpes simple genéticamente alterados (Martuza *et al.* 1991; Mineta *et al.*, 1995; Andreanski *et al.*, 1997), incluyendo aquellos que pueden activarse por la expresión diferente de proteínas en células normales y cancerosas (Chase *et al.*, 1998); y adenovirus mutantes que no pueden expresar la proteína E1B55 kDa y se usan para tratar tumores mutantes de p53 (Bischof *et al.*, 1996; Heise *et al.*, 1997; Freytag *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998). Tomados en conjunto, estos informes confirman la relevancia de los virus oncolíticos (VO) como agentes anticancerígenos. En los tres sistemas, la meta es la diseminación intratumoral del virus y la capacidad de matar selectivamente las células cancerosas. Junto con matar directamente las células cancerosas, los agentes que también pueden influir en el microambiente que rodea el tumor pueden mejorar el efecto terapéutico del VO.

55

60

Los virus oncolíticos selectivos de replicación han demostrado ser muy prometedores como agentes antitumorales para tumores sólidos. Los virus se han construido genéticamente para que sean capaces de replicarse preferentemente dentro de las células tumorales, estando mientras al menos de alguna manera restringidos en su capacidad de replicarse en células normales. El principal mecanismo antitumoral de los virus oncolíticos es a través de un efecto citopático directo a medida que se propagan y se diseminan desde las células tumorales inicialmente infectadas a las células tumorales circundantes, logrando un mayor volumen de distribución y efectos anticancerígenos. Los virus del herpes simple (VHS) oncolíticos se diseñaron y construyeron inicialmente para el

65

tratamiento de tumores cerebrales. Posteriormente, se ha descubierto que son eficaces en otros diversos tumores sólidos humanos, incluyendo cánceres de mama, de próstata, de pulmón, de ovario, de colon y de hígado. La seguridad de los VHS oncolíticos también se ha probado extensamente en ratones y primates, que son extremadamente sensibles al VHS.

5 Los virus oncolíticos basados en VHS-1 son particularmente prometedores debido a: (1) su capacidad de infectar una amplia diversidad de tumores; (2) su naturaleza citolítica inherente; (3) su genoma grande bien caracterizado (152 Kb) que proporciona amplias oportunidades para manipulaciones genéticas en donde muchos de los genes no esenciales pueden reemplazarse por genes terapéuticos; (4) su capacidad de permanecer como episomas que evitan la mutagénesis de inserción en las células infectadas; y (5) la disponibilidad de fármacos antiherpéticos para mantener bajo control la posible replicación no deseada.

15 A pesar de alentadores estudios preclínicos, los resultados de los primeros ensayos clínicos han sugerido que la mayoría de las versiones actuales de los virus oncolíticos, aunque aceptablemente seguros, pueden tener solo actividad antitumoral limitada por sí solos. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, una de las principales razones de la efectividad oncolítica subóptima probablemente se deba a que las deleciones de genes víricos que confieren selectividad tumoral también reducen la potencia del virus en los tumores. Por ejemplo, la eliminación completa de la función γ 34.5 endógena del VHS, uno de los enfoques comunes para la construcción del VHS oncolítico, reduce significativamente el potencial de replicación vírica y, por lo tanto, puede comprometer la capacidad del virus para propagarse dentro de los tumores diana (Kramm *et al.*, 1997). En la revista *Neuro-Oncology* 14 vi25 (Yang *et al.*, 2012) se desvela un mecanismo anticancerígeno de nanopartículas de RG3 en células de glioblastoma.

25 Considerando las limitadas opciones de tratamiento eficaces disponibles para ciertos tipos de cáncer, incluyendo ciertos tipos de cáncer cerebral, sigue existiendo la necesidad en la técnica de virus oncolíticos mejorados.

Sumario

30 En el presente documento se desvela un vector de expresión oncolítico que incluye un ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína GADD34, o una porción biológicamente activa de la misma, en donde dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a una secuencia de control de expresión. En determinadas divulgaciones, el vector es un virus del herpes simple modificado. En algunas divulgaciones, el virus del herpes simple modificado es un virus del herpes simple deficiente para un gen γ 1 34.5. En determinadas divulgaciones, la secuencia de nucleótidos incluye SEQ ID NO: 1 o una variante degenerada de la misma. En diversas divulgaciones, la secuencia de nucleótidos incluye SEQ ID NO: 2 o una variante degenerada de la misma. En algunas divulgaciones, la secuencia de control de la expresión incluye un promotor nestina o una porción biológicamente activa del mismo. En diversas divulgaciones, la secuencia de control de expresión incluye SEQ ID NO: 3 o una variante degenerada de la misma.

40 Se desvela en el presente documento un método para matar células tumorales intracraneales en un sujeto. En algunas divulgaciones, el método incluye introducir en las proximidades de las células tumorales un vector de expresión oncolítico, incluyendo dicho vector de expresión oncolítico un ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica GADD34, o una porción biológicamente activa del mismo, en donde dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a una secuencia de control de expresión. En determinadas divulgaciones, El vector de expresión oncolítico es un virus del herpes modificado. En algunas divulgaciones, el virus del herpes modificado es deficiente para un gen γ 1 34.5. En algunas divulgaciones, la secuencia de nucleótidos incluye SEQ ID NO: 1 o una variante degenerada de la misma. En algunas divulgaciones, la secuencia de nucleótidos incluye SEQ ID NO: 2 o de una variante degenerada de la misma. En determinadas realizaciones, la secuencia de control de la expresión incluye un promotor nestina o una porción biológicamente activa del mismo. En determinadas realizaciones, la secuencia de control de la expresión incluye SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el método también incluye la etapa de mezclar un vehículo farmacológicamente aceptable con el vector de expresión oncolítico antes de la etapa de introducción. En determinadas realizaciones, las células tumorales incluyen una célula de glioblastoma. En algunas realizaciones, las células tumorales incluyen una célula madre cancerosa. En diversas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

55 Se desvela en el presente documento un vector de expresión oncolítico para su uso en el tratamiento de células tumorales intracraneales en un sujeto, incluyendo dicho vector de expresión oncolítico un ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica GADD34, o una porción biológicamente activa del mismo, en donde dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a una secuencia de control de expresión. En algunas divulgaciones, El vector de expresión oncolítico es un virus del herpes modificado. En algunas divulgaciones, el virus del herpes modificado es deficiente para un gen γ 1 34.5. En determinadas divulgaciones, la secuencia de nucleótidos incluye SEQ ID NO: 1 o una variante degenerada de la misma. En diversas divulgaciones, la secuencia de nucleótidos incluye SEQ ID NO: 2 o una variante degenerada de la misma. En algunas realizaciones, la secuencia de control de la expresión incluye un promotor nestina o una porción biológicamente activa del mismo. En algunas realizaciones, la secuencia de control de la expresión incluye SEQ ID NO: 3. En determinadas realizaciones, las células tumorales incluyen una célula de glioblastoma. En determinadas realizaciones, las células tumorales incluyen

una célula madre cancerosa. En diversas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

Breve descripción de los dibujos

5 Se ilustran realizaciones a modo de ejemplo en las figuras a las que se hace referencia. Se pretende que las realizaciones y las figuras desveladas en el presente documento se consideren ilustrativas más que restrictivas.

10 La Figura 1A demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, una representación esquemática de ICP34.5. La proteína multifacética ICP34.5 del VHS-1, codificada por el gen γ_1 34.5, se considera normalmente que tiene 248 aa, aunque las longitudes varían según las cepas. El dominio de homología GADD34 c-terminal contiene PPIa (aa 193 a 195) y dominios de unión a eIF2 α (aa 233-248) para mediar la desfosforilación de eIF2 α fosforilada, cuyo estado fosforilado suprime la traducción a través de la ruta de respuesta inmunológica innata mediada por PKR en respuesta a la infección por VHS1, dando como resultado una reducción significativa de la productividad vírica. El dominio de unión de Beclin1 (aa 68-87) ejerce un efecto inhibitorio contra la autofagia a través de la interacción con Beclin-1, que es una proteína esencial para el proceso de autofagia. Este antagonismo mediado por ICP34.5 de la función de autofagia beclin1 es importante para la neurovirulencia vírica. Las Figuras 1B y 1C demuestran, de acuerdo con una realización de la invención, un virus recombinante VHS-1 que contiene una mutación en ICP34.5 que anula la unión a Beclin 1 está neuroatenuado *in vivo*. (B) Supervivencia de ratones C57BL/6J infectados intracerebralmente con 5×10^5 ufp de 34.5 Δ 68-87 del VHS-1 o su marcador de rescate (34.5 Δ 68-87R del VHS-1). Los resultados mostrados representan datos de supervivencia combinados de cuatro infecciones independientes. Se observaron resultados similares en cada experimento. (C) Replicación vírica de 34.5 Δ 68-87 del VHS-1 y-1 34.5 Δ 68-87R del VHS en tejido cerebral de ratones infectados en el momento indicado después de la infección. Límite inferior de detección = 1,7. Los datos mostrados representan la media \pm título de SEM geométrica para siete a diez ratones por grupo experimental por punto de tiempo.

25 Las Figuras 1D y 1E demuestran, de acuerdo con una realización de la invención, una comparación del efecto ICP34.5 en la terapia de glioma con oHSV1s. (D) Las células de glioma U251, U87dEGFR, U138, MGH238, T98G y Gli36d5 se infectaron con 10^4 ufp de cualquiera de rHsvQ1 (deleción génica γ_1 34.5) o rQNestin34.5 (gen γ_1 34.5 bajo el control de un promotor transcripcional nestina). Los títulos de cada muestra se determinaron 3 días después de la infección. Los títulos de rQNestin34.5 fueron más altos que los de rHsvQ1 en todas las líneas celulares de glioma (*, P < 0,05, prueba t de Student). (E), los astrocitos humanos se infectaron con rQNestin34.5 o rHsvQ 1 y los títulos se determinaron 3 días después. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores (P > 0,1).

35 La Figura 2 demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, una representación esquemática de GADD34. El gen humano GADD34 se mapea en el cromosoma 19q13.2, una región que contiene un complejo de genes de reparación de ADN y tiene 3 exones y abarca al menos 2,6 kb (véase Hollander et al. Mammalian GADD34, an apoptosis- and DNA damage-inducible gene. J Biol Chem. 23 de mayo de 1997;272(21):13731-7). GADD34 Δ Nter carece de los primeros 174 aminoácidos (aa) o 522 pb de secuencia de ADN, donde existe el dominio de localización ER y la región dirigida a degradación del proteasoma de Ubiquitina (Ub). La proteína GADD34 tiene varios dominios, MEMB en la región N-terminal, repetición PEST en el medio y las secuencias KVRFF (SEQ ID NO: 7) y RARA (SEQ ID NO: 8) que contienen el dominio homólogo ICP34.5 en la región C-terminal. El dominio MEMB contribuye a la asociación de la membrana ER y la falta de esta región o las mutaciones en este dominio helicoidal perjudican la localización en el ER y también en las mitocondrias. Las regiones ricas en prolina, ácido glutámico, serina y treonina (PEST) generalmente se conocen como señales proteolíticas, pero la deleción de repeticiones PEST internas no tuvo impacto en la estabilidad de GADD34, sin embargo, moduló la unión y la actividad de PP1 para desfosforilar eIF2 α . Un dominio terminal carboxilo bipartito abarca la secuencia KVRFF altamente conservada (SEQ ID NO: 7) (aa 555-558), un motivo canónico de unión a PP1 y la secuencia RARA (SEQ ID NO: 8), que también se requiere para la unión a PP1. GADD34 y SNF5/INI1, que también se conoce como una proteína supresora de tumores y un componente del complejo de remodelación de cromatina hSWI/SNF, pueden coexistir en un complejo trimérico con proteínas de fusión leucémicas quiméricas HRX, dando lugar a la inhibición de la apoptosis mediada por GADD34 en la leucemia aguda. Y esta región que contiene KVRFF (SEQ ID NO: 7) es el sitio que interactúa con la proteína SNF5, que también se une independientemente a la subunidad catalítica PP1, formando un complejo trimérico estable de SNF5-PP1-GADD34. Por lo tanto, GADD34 media la supresión del crecimiento y funciona como un supresor tumoral, al menos en parte, a través de su interacción con SNF5, que también puede funcionar como una subunidad reguladora de PPI. Los péptidos N-terminales (1-60 aa) exhiben péptidos señal de degradación con una vida media de < 2 h a través del proteasoma 26S.

60 La Figura 3 demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, un mapa esquemático de pTnestin-GADD34 Δ Nter. El gen GADD34 truncado de longitud completa o N-terminal se insertó en los sitios NcoI/HpaI del vector pTnestin-luc-b que inserta el elemento promotor-potenciador nestina-hsp68 en pTransfer, ligando el fragmento obtenido por digestión enzimática de BstXI/XhoI o HpaI/XhoI de extremo romo de un pOTB7-GADD34 (SEQ ID NO: 1), respectivamente. Las construcciones resultantes se denominaron pTnestin-GADD34 o pTnestin-GADD34 Δ Nter. Esos vectores lanzadera se usaron para hacer oHSV1 basado en fHsvQuik como se describe en la Figura 4.

65 La Figura 4A demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, una estrategia esquemática de clonar

el genoma MGH1 en un vector BAC. MGH1 es un mutante VHS-1 derivado de la cepa F que posee deleciones en ambas copias del gen g 1 34.5 y una inserción lacZ en el locus UL 39. Un plásmido BAC dirigido a UL 39, pRBAC-D6GpA-FL, se construyó de manera que contiene dos brazos de homología que pueden recombinarse con el genoma vírico aguas arriba y aguas abajo de la inserción lacZ dentro del locus UL 39. La construcción también tiene (1) un conjunto de dos secuencias de recombinación, sitios loxP y FRT, flanqueando la estructura de BAC, (2) un casete de expresión EGFP que se inserta dentro del cuadro aguas abajo de la secuencia codificante UL 39 truncada y (3) un casete de expresión RFP dentro de la estructura BAC. El ADN de pRBAC-D6GpA-FL linealizado y el ADN de virión MGH1 intacto se cotransfectaron en células Vero y se aisló el virus recombinante que lleva la secuencia BAC (MGH1-BAC). El casete transgénico de interés (X) se clona primero en un plásmido lanzadera pTransfer y el plásmido resultante (pTransfer-X) se electropora junto con un plásmido auxiliar que expresa FLP en bacterias que transportan el plásmido BAC fHsvQuik-1. Los cointegrantes de pTransfer-X y fHsvQuik-1 fusionados en los sitios FRT (fHsvQ1-X) pueden obtenerse fácilmente mediante selección con Cm y Amp a 43 °C. El fHsvQ1-X tiene el casete transgénico insertado en el locus UL 39 y dos sitios loxP unidireccionales ahora flanquean todas las cadenas principales de plásmidos procarióticos, así como el gen marcador RFP. Tras la co-transfección del fHsvQ1-X y un plásmido auxiliar que expresa Cre en células Vero, las estructuras del plásmido procariótico, junto con el casete de expresión RFP, pueden cortarse mediante recombinación específica de sitio mediada por Cre. Como resultado, los vectores VHS recombinantes con el casete transgénico (rHsvQ1-X) pueden rescatarse.

La Figura 4B demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, VHS1, NG34 y NG34C novedosos oncolíticos. Usando un sistema de vector del VHS1 oncolítico basado en BAC (genes de producto Δ ICP6 y Δ ICP34.5) que se denomina "sistema HSVQuik" (véase Gene Ther 13 (8): 705-14, 2006), se desarrollaron dos vectores oHSV1, que insertan el gen GADD34 derivado del gen humano truncado de longitud completa y N-terminal bajo el control del promotor nestina que está activo en las células de glioma, donde el previamente desarrollado rQNestin34.5 alberga una copia del gen gamma (1) 34.5 (véase Cancer Res. 1 de abril de 2005;65(7):2832-9).

La Figura 5A demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, la fosforilación de eIF2 α se suprimió en respuesta a la infección por NG34 y NG34C en el glioma. La transferencia Western de los lisados celulares a las 16 horas después de la infección de oHSV1 con un MOI de 0,1 mostró que mientras que la infección por rHSVQ1 mutante nula ICP34.5 (Δ ICP6, Δ ICP34.5) dio como resultado una fuerte fosforilación de eIF2 α para suprimir el inicio de la traducción, los virus NG34 y NG34C, así como rQNestin34.5 invirtieron los niveles de fosforilación. Los anticuerpos contra VHS-1, eIF2 α , fosfo(Ser51)-eIF2 α , PP1, ICP4 y α Tubulina se usaron en el ensayo.

La Figura 5B demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, la expresión de GADD34 sobre la infección por NG34 y NG34C. La GADD34 de longitud completa o la GADD34 de región N-terminal truncada se sobreexpresó a partir de las células en respuesta a la infección por NG34 y NG34C, respectivamente, a las 16 h después de la infección con un MOI de 0,1, mientras que la cepa F de HSV1 de tipo silvestre y otra infección por oHSV1 no codificante de GADD34 no causaron la expresión de GADD34. Se realizaron transferencias Western usando anticuerpos contra GADD34, ICP4 y α Tubulina.

La Figura 6A demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, el rápido ciclo de vida vírico de NG34C en las células de glioma. Se infectaron cuatro oHSV1 diferentes en células U251 durante 24, 48 y 72 horas antes de recolectar células y medios. Se realizaron valoraciones en células Vero para medir unidades formadoras de placa (UFP).

La Figura 6B demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, imágenes microscópicas de contraste de fase tomadas a las 48 h después de la infección para representar los tamaños de placa de cada oHSV1 en células U251.

La Figura 7 demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, la infectividad equivalente de NG34C como rQNestin34.5 en células de glioblastoma primario aisladas de pacientes. rQNestin34.5 y NG34C se infectaron en 5 GBM diferentes cultivadas en medio Neurobasal sin suero en placas recubiertas con PLL/laminina durante tres días, posterior a la valoración en Vero. N=3

La Figura 8 demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, NG34C se replica más en células de glioblastoma primario cultivadas en condiciones de bajo oxígeno. rQNestin34.5 y NG34C a una MOI de 0,1 se infectaron en 4 GBM diferentes cultivadas en medio Neurobasal libre de suero en placas recubiertas con PLL/laminina en condiciones de normoxia (21 % de O₂) u oxígeno fisiológico menor (5 % de O₂) durante tres días, posterior a la valoración en Vero. N=3

La Figura 9 demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, Las células tisulares normales primarias permisivas a la cepa F son resistentes a la infección por NG34C. Líneas celulares de glioma (U87dEGFR y U251) y tejidos humanos primarios (Astrocito, Hepatocito, Músculo liso y Fibroblasto de pulmón) se infectaron con VHS1 de tipo silvestre (cepa F) y VHS-1 mutante (rHSVQ1, rQNestin34.5 y NG34C). Estos tejidos primarios permisivos de VHS1 de tipo silvestre no admitían la replicación de VHS1 mutante.

La Figura 10 demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, Las células infectadas con el virus NG34C produjeron más virus de progenie en medio (sup) que las membranas intracelulares o celulares. Los rendimientos del virus de la progenie fueron similares entre rQNestin34.5, NG34 o NG34C y 2 dígitos menores por el virus rHSVQ1 como se esperaba. Sin embargo, la progenie NG34C fue mayor en medio que en/sobre células infectadas, mientras que otros oHSV1 fueron más bajos en el medio, sugiriendo que NG34C es capaz de una distribución más rápida entre las células que NG34 o rQNestin34.5 mientras que la producción vírica total no cambia mucho entre esos oHSV1.

La Figura 11 demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, que NG34C es más resistente al

microambiente de hipoxia al 1 %, en comparación con rQNestin34.5 y NG34. Bajo condiciones de oxígeno severamente más bajas o condiciones de hipoxia (1 % de O₂, 5 % de CO₂ y 94 % de N₂), la replicación de oHSV1 fue limitada y el efecto de ICP34.5 o GADD34 no se observó en las células U251 infectadas con rQNestin34.5 o NG34, cuando se compararon los rendimientos víricos con el virus rHSVQ1 nulo ICP34.5. En

5 contraste, los rendimientos de NG34C fueron aún más bajos en hipoxia que en normoxia (21 %), pero más altos que otros virus. La Figura 12A demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, la citotoxicidad de la infección por oHSV1 usando células de glioma U87ΔEGFR. Las diluciones seriadas de diversos VHS1 (F, hrR3, rHSVQ1, NG34C) de 0 a 1 UFP/célula se usaron para infectar U87ΔEGFR en una placa de 96 pocillos durante

10 5 días antes de medir cuantitativamente la lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima citosólica estable que se libera tras la lisis celular, usando el kit de ensayo de citotoxicidad CytoTox 96 (Promega). N = 4

Los datos de la Figura 12B del panel (a) se representaron en el gráfico superior y los valores de dosis de efecto de mediana (D_m) (como MOI) se calcularon en la tabla. m: una medición de la sigmoidicidad de la curva dosis-efecto, r: el coeficiente de corrección lineal de la gráfica de efecto de mediana.

15 Las Figuras 13A y 13B demuestran, de acuerdo con una realización de la invención, la evaluación del efecto citotóxico sinérgico de oHSV1 y TMZ. Para investigar la sinergia de oHSV1 con el fármaco quimioterapéutico convencional, temozolomida (TMZ), el oHSV1 se diluyó en serie en una placa de 96 pocillos y se mezcló con/sin dosis EC30 de TMZ (66 μM para U87ΔEGFR) antes de colocar en placa las células en un número de 5.000. Después de 5 días, la LDH liberada se midió usando el kit de ensayo de citotoxicidad CytoTox 96. La sinergia se calculó usando la fórmula de los índices de combinación de Chou-Talalay (CalcuSyn, BioSoft Inc.). IC: índice de

20 combinación.

La Figura 13C demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, que se trazaron los datos de las tablas de 13A y 13B. Menos de 1 indica sinergia y más de 1 indica antagonismo. NG34 y rQNestin34.5 muestran más sinergia a los valores de D_m y NG34C mostró más que los valores de D_m. NG34, NG34C y rQNestin34.5 representaron un intervalo más amplio de efectos sinérgicos con TMZ que rHSVQ1 o F-hrR3 de tipo silvestre.

25 La Figura 13D demuestra, de acuerdo con una realización de la invención, una representación gráfica del intervalo de efectos sinérgicos.

Descripción

30 A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); y Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001), proporcionan a un experto en la materia una guía general de

35 muchos de los términos usados en la presente solicitud.

El experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento, que podrían usarse en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita en modo alguno a los métodos y materiales descritos. Para los fines de la presente invención, ciertos

40 términos se definen a continuación.

En algunas realizaciones, los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etcétera, usados para describir y reivindicar ciertas realizaciones de la solicitud han de entenderse como modificadas en algunos casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, en

45 algunas realizaciones, los parámetros numéricos expuestos en la descripción escrita y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener mediante una realización particular. En algunas realizaciones, los parámetros numéricos deben interpretarse a la luz del número de dígitos significativos indicados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo habituales. A pesar de

50 que los intervalos numéricos y parámetros que establecen el amplio alcance de algunas realizaciones de la solicitud sean aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se presentan de la forma más precisa practicable.

"Mamífero", como se usa en el presente documento, se refiere a un miembro de la clase Mammalia, incluyendo, sin limitación, seres humanos, así como primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como ganado bovino, ovejas, cerdos, cabras y caballos; animales domesticados tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas y similares. El término no denota una edad o género en particular. De esta manera, sujetos recién nacidos y sujetos

55 infantiles, así como fetos, sean macho o hembra, están destinados a estar incluidos dentro del alcance de este término.

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula vehículo de ácido nucleico en donde puede insertarse una secuencia de ácido nucleico para su introducción en una célula donde puede replicarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo que significa que es extraña a la célula en donde se

65 introduce el vector o que la secuencia es homóloga a una secuencia en la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en donde normalmente no se encuentra la secuencia. Los vectores incluyen

plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófago, virus animales y virus vegetales) y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la materia estaría bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes convencionales (véase, por ejemplo, Maniatis et al., 1988 y Ausubel et al., 1994). Adicionalmente, las técnicas descritas en el presente documento y demostradas en las figuras a las que se hace referencia también son instructivas con respecto a la construcción eficaz de vectores.

La frase "vector de expresión" se refiere a cualquier tipo de construcción genética que comprende un ácido nucleico que codifica un ARN capaz de transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen después en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una diversidad de "secuencias de control" que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante unida operativamente en una célula hospedadora particular. Además de las secuencias de control que rigen la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que también cumplen otras funciones y se describen a continuación.

El término "promotor", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que regula, tanto directa como indirectamente, la transcripción de una secuencia codificante de ácido nucleico correspondiente a la que está unida operativamente. El promotor puede funcionar solo para regular la transcripción o, en algunos casos, puede actuar en concierto con una o más secuencias reguladoras tales como un potenciador o silenciador para regular la transcripción del gen de interés. El promotor comprende una secuencia reguladora de ADN, en donde la secuencia reguladora deriva de un gen, que es capaz de unirse a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (dirección 3'). Un promotor generalmente comprende una secuencia que funciona para posicionar el sitio de inicio para la síntesis de ARN. El ejemplo más conocido de esto es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de una caja TATA, tales como, por ejemplo, el promotor para el gen de desoxinucleotidil transferasa terminal de mamífero y el promotor para los genes tardíos SV40, un elemento discreto sobre el sitio de inicio en sí ayuda a fijar el lugar de inicio. Los elementos promotores adicionales regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Normalmente, estos se localizan en la región 30-110 pb aguas arriba del sitio de inicio, aunque se ha demostrado que varios promotores contienen elementos funcionales aguas abajo del sitio de inicio también. Para poner una secuencia codificante "bajo el control de" un promotor, uno puede colocar el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del marco de lectura transcripcional "aguas abajo" de (es decir, 3' del) promotor elegido. El promotor "aguas arriba" estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del ARN codificado.

El espacio entre los elementos promotores con frecuencia es flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o mueven uno con respecto al otro. Dependiendo del promotor usado, los elementos individuales pueden funcionar de manera cooperativa o independiente para activar la transcripción. Los promotores descritos en el presente documento pueden usarse o no junto con un "potenciador", que se refiere a una secuencia reguladora de acción en cis implicada en la activación de la transcripción de una secuencia de ácido nucleico, tales como aquellas para los genes, o porciones o equivalentes funcionales de las mismas, listadas en el presente documento.

Un promotor puede ser uno asociado de forma natural a una secuencia de ácido nucleico, como puede obtenerse aislando las secuencias 5' no codificantes ubicadas aguas arriba del segmento codificante y/o exón. Dicho promotor puede denominarse "endógeno". De forma similar, un potenciador puede ser uno asociado de forma natural a una secuencia de ácido nucleico, localizado aguas abajo o aguas arriba de esa secuencia. Alternativamente, pueden obtenerse ciertas ventajas colocando el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, que se refiere a un promotor que normalmente no está asociado a la secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Un potenciador recombinante o heterólogo se refiere también a un potenciador no asociado normalmente a una secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Dichos promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes y promotores o potenciadores aislados de cualquier otro virus o células procariotas o eucariotas, y los promotores o potenciadores que no "son de origen natural", es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras de la transcripción y/o mutaciones que alteran la expresión. Por ejemplo, los promotores que se usan más comúnmente en la construcción de ADN recombinante incluyen la beta-lactamasa (penicilinas), sistemas promotores de lactosa y triptófano (trp). Como se demuestra en el presente documento, en algunas realizaciones, un promotor nestina se usa para impulsar la expresión del gen de interés. Además de producir secuencias de ácido nucleico de promotores y potenciadores de forma sintética, pueden producirse secuencias usando clonación recombinante y/o tecnología de amplificación de ácido nucleico, en relación con las composiciones descritas en el presente documento (véanse las patentes de EE.UU. N.º 4.683.202 y 5.928.906). Adicionalmente, se contemplan las secuencias de control que dirigen la transcripción y/o expresión de secuencias dentro de orgánulos no nucleares tales como las mitocondrias, los cloroplastos y similares, pueden emplearse igualmente.

La frase "vector VHS-1 recombinante" como se usa en el presente documento, define un vector VHS-1 recombinante que comprende: (a) el ADN de, o correspondiente a, al menos una porción del genoma de un VHS-1 que es capaz de transducir en una célula diana al menos un gen seleccionado y es capaz de promover la replicación y el empaquetamiento; y (b) al menos un gen seleccionado (o transgen) unido operativamente a al menos una secuencia

reguladora que dirige su expresión, el gen flanqueado por el ADN de (a) y capaz de expresarse en la célula diana *in vivo* o *in vitro*. De esta manera, un "VHS recombinante" (rVHS) significa VHS que ha sido genéticamente alterado, por ejemplo, por la adición o inserción de un gen seleccionado.

- 5 Un "gen", o una "secuencia que codifica" una proteína particular, es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de una o más secuencias reguladoras apropiadas. Un gen de interés puede incluir, pero no se limita de ninguna manera a, ADNc de ARNm eucariótico, secuencias de ADN genómico de ADN eucariótico e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción generalmente se ubicará en 3' de la secuencia del gen. Normalmente, se proporciona una señal de poliadenilación para terminar la transcripción de genes insertados en un virus recombinante.

- 15 El término "polipéptido" o "proteína", como se usa en el presente documento, significa un polímero de aminoácidos unidos en una secuencia específica por enlaces peptídicos. Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a la forma estereoisómera D o L del aminoácido, a menos que se designe específicamente lo contrario.

- 20 El término "transgen" se refiere a una secuencia particular de ácido nucleico que codifica un polipéptido o una porción de un polipéptido para expresarse en una célula en la que se inserta la secuencia de ácido nucleico. El término "transgen" pretende incluir (1) una secuencia de ácido nucleico que no se encuentra de forma natural en la célula (es decir, una secuencia de ácido nucleico heteróloga); (2) una secuencia de ácido nucleico que es una forma mutante de una secuencia de ácido nucleico que se encuentra de forma natural en la célula en que se ha insertado; (3) una secuencia de ácido nucleico que sirve para añadir copias adicionales de la misma (es decir, homóloga) o una secuencia de ácido nucleico similar que ocurre naturalmente en la célula en la que se ha insertado; o (4) una secuencia de ácido nucleico silenciosa de origen natural u homóloga cuya expresión se induce en la célula en la que se ha insertado. Una secuencia de "forma mutante" o "ácido nucleico modificado" o "nucleótido modificado" significa una secuencia que contiene uno o más nucleótidos que son diferentes de la secuencia de tipo natural o natural, es decir, la secuencia de ácido nucleico mutante contiene una o más sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de nucleótidos. En algunos casos, el gen de interés también puede incluir una secuencia que codifica un péptido líder o una secuencia de señal de modo que el producto transgénico pueda secretarse de la célula.

- 35 Como se usa en el presente documento, el término "transfección" se refiere a la captación de ADN extraño por una célula de mamífero. Una célula ha sido "transfectada" cuando se ha introducido ADN exógeno dentro de la membrana celular. Se conocen en la técnica numerosas técnicas de transfección. Véase, Graham et al. (1973) Virology, 52:456; y Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York. Pueden usarse dichas técnicas para introducir uno o más restos de ADN exógeno, tales como un vector vírico y otras moléculas de ácido nucleico, en células hospedadoras adecuadas. El término se refiere tanto a la captación estable como transitoria del material genético.

- 40 La frase "actividad oncolítica" como se usa en el presente documento, se refiere a efectos citotóxicos *in vitro* y/o *in vivo* ejercidos sobre las células tumorales sin ningún efecto perjudicial apreciable o significativo para las células normales en las mismas condiciones. Los efectos citotóxicos bajo las condiciones *in vitro* se detectan por diversos medios como se conoce en la técnica anterior, por ejemplo, mediante tinción con una tinción selectiva para células muertas, mediante inhibición de la síntesis de ADN o mediante apoptosis. La detección de los efectos citotóxicos bajo las condiciones *in vivo* se realiza mediante métodos conocidos en la técnica.

- 50 Una porción "biológicamente activa" de una molécula, como se usa en el presente documento, se refiere a una porción de una molécula más grande que puede realizar una función similar a la molécula más grande. Simplemente a modo de ejemplo no limitante, una porción biológicamente activa de un promotor es cualquier porción de un promotor que conserva la capacidad de influir en la expresión génica, aunque solo sea ligeramente. De forma similar, una porción biológicamente activa de una proteína es cualquier porción de una proteína que retiene la capacidad de realizar una o más funciones biológicas de la proteína de longitud completa (por ejemplo, unión con otra molécula, fosforilación, etc.), aunque solo sea ligeramente.

- 55 Con las descripciones y definiciones preliminares anteriormente mencionadas en mente, se proporcionan antecedentes adicionales a continuación en el presente documento para proporcionar un contexto para la génesis y el desarrollo de los vectores, las composiciones y los métodos de la invención descritos en el presente documento.

- 60 Los vectores mutantes actuales de VHS-1 que se dirigen al glioma maligno se basan en los dos genes mutantes de delección, ICP6 (producto génico U_L39), la subunidad grande de la ribonucleótido reductasa (RR) de VHS-1 e ICP34.5 (producto del gen 34.5), una proteína multifuncional que también está relacionada con la neurovirulencia. Si bien la falta de ICP6 restringe la replicación del virus a las células que no se dividen pero permite que la replicación continúe en las células con defectos en la vía supresora de tumores *p16*, las delecciones de ambos genes γ_2 34.5 suprimen la encefalitis por VHS-1. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, esto puede deberse a la facilitación de ICP34.5 de la función de autofagia Beclin-1, esencial para la neurovirulencia. Además de este efecto inhibidor autofágico, ICP34.5 también contrarresta un mecanismo de defensa del hospedador desencadenado por

una infección vírica. Este mecanismo activa la PKR (ARN bicatenario proteína quinasa) que después fosforila el factor de traducción, eIF2 α , dando lugar a la inhibición de la traducción. ICP34.5 se une y activa directamente PP1 (proteína fosfatasa 1) que desfosforila eIF2 α , permitiendo que continúe la traducción del ARNm vírico. El VHS-1 oncolítico con genes y34.5 mutados (por ejemplo, G207, 1716) ha demostrado ser seguro para la administración en humanos con gliomas en múltiples ensayos clínicos, pero la efectividad ha sido esquiva, probablemente debido a su limitada replicación vírica.

Para superar esta limitación, se diseñó por ingeniería previamente un VHS1, en donde el gen ICP34.5 está bajo el control transcripcional del promotor de células madre de glioma para nestina. rQNestin34.5 ha mostrado una efectividad aumentada en modelos de glioma y actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico de fase I en adultos con glioblastoma. Sin embargo, sigue habiendo una posible preocupación con la expresión de ICP34.5 en el cerebro, particularmente en individuos (niños y adultos jóvenes) cuyos cerebros aún pueden ser relativamente ricos en células progenitoras neurales positivas para nestina y donde la expresión de ICP34.5 podría desencadenar neurovirulencia. También se ha informado que la expresión de ICP34.5 contribuye a la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas al suprimir la función de autofagia en las neuronas. Finalmente, la inhibición de la autofagia de ICP34.5 puede reducir la efectividad terapéutica de las quimio y radioterapias convencionales que dependen de la muerte celular tumoral mediada por la autofagia en los gliomas malignos resistentes a la apoptosis.

el gen inducible de detención de crecimiento y daño de ADN (Growth Arrest and DNA-Damage) 34 (GADD34), también conocido como PPP1R15A, fue descubierto mediante el cribado de una biblioteca de ADNc de células de leucemia mieloblástica tratada con radiación. El tratamiento de diversas líneas celulares humanas con agentes que dañan el ADN mejoró la expresión de GADD34. Una proteína GADD34 inducible por estrés también interactúa con PP1 y revierte la fosforilación de eIF2 α , previniendo el cierre completo de la síntesis de proteínas durante condiciones de estrés de la misma manera que lo hace ICP34.5, dado que su extremo c comparte una homología significativa con el extremo C de GADD34. Además de la síntesis mejorada de proteínas a través del complejo PP1 durante condiciones de estrés celular, GADD34 forma un complejo estable con complejo de esclerosis tuberosa (TSC) 1/2, provoca la desfosforilación de TSC e inhibe la vía de señalización de mTOR. Por lo tanto, GADD34 podría ser un inhibidor potencial de mTOR para la terapia contra el cáncer. De hecho, la sobreexpresión condicionalmente ectópica de GADD34 en células de glioma humano U251 probablemente indujo retraso en el crecimiento celular y senescencia (datos no mostrados). Esta supresión de mTOR a través del complejo TSC1-GADD34 también puede inducir autofagia citoprotectora bajo la condición de expresión de proteína mutante mal plegada y durante la inanición. Además, recientemente se informó que GADD34 era un factor neuroprotector en la enfermedad neurodegenerativa, incluyendo las enfermedades de Alzheimer, de Parkinson y priónicas. Las enfermedades neurodegenerativas están asociadas a la acumulación de proteínas específicas de la enfermedad mal plegadas, desencadenando la vía de respuesta a la proteína desplegada (UPR), dando como resultado el cierre transitorio de la traducción de proteínas, a través de la fosforilación de eIF2 alfa. En ratones enfermos por priones, la sobreexpresión de GADD34 restableció las tasas vitales de traducción durante la enfermedad por priones, rescatando los déficits sinápticos y la pérdida neuronal, aumentando de esta manera significativamente la supervivencia.

Debido a que es un factor inducible por estrés, el recambio de la proteína GADD34 es rápido y los péptidos N-terminales (1-60 aa) exhiben un péptido señal de degradación (degron) con una vida media de < 2 h a través del proteasoma 26S. Cabe observar que, recientemente se informó que la fosforilación de la tirosina-262 también contribuye a la tasa de renovación de GADD34 y una forma mutante sin fosforilación (Y262F) mostró un aumento significativo $t_{1/2} > 2$ h. También, los 180 restos N-terminales de GADD34 dirigen la localización al retículo endoplasmático (RE) y dirigen la isoforma alfa de PP1 al RE. De forma interesante, aunque esta forma truncada N-terminal (180-674aa) aún retiene la capacidad de desfosforilar eIF2 alfa a través de PP1, carece de localización específica de ER. Un mutante truncado (513-674 aa), que abarcaba el dominio de homología ICP34.5, estaba exclusivamente en nucleolos y carece de la capacidad de desfosforilación de eIF2 alfa.

En general, estos descubrimientos indican que el uso de GADD34 en un vector oncolítico HSV1 puede mejorar la efectividad terapéutica, mientras se reduce la citotoxicidad en células no cancerosas. Debido a la doble función de GADD34 de la síntesis de proteínas mejorada a través de la desfosforilación de eIF2 α , y la inducción de la autofagia a través de la vía TSC1/mTOR, podría soportar la replicación vírica en las células cancerosas y eludir la limitación de la expresión de ICP34.5 dando lugar a una posible neurovirulencia en respuesta a la infección por oHSV1.

Se evaluó una forma truncada N terminal (GADD34 Δ N), en la cual se retiraron los primeros 174 restos de aminoácidos para evitar la degradación rápida de la proteína GADD34 y para suprimir la posible inducción de estrés ER. Para probar la hipótesis de que la expresión de GADD34 en el contexto de oHSV permite una replicación robusta y citotoxicidad en células de glioma, pero no en células normales, novedosos virus oncolíticos VHS1, NG34 y NG34C, se diseñaron para expresar la longitud completa (1-674 aa) y la forma truncada N-terminal (175-674 aa) del gen GADD34 bajo el control de un promotor nestina, respectivamente. Un resumen de las características relevantes descubiertas, y descritas anteriormente, se proporciona en la Tabla I.

Tabla I.

Resumen	HSV1 ICP34.5	GADD34 ts (1-674 aa)	GADD34ANter (175-674 aa)
Interacción PP1	+	+	+
eIF2α	+	+	+
localización de la desfosforilación ER		+	
Interacción Beclin-1	+	-	-
Desfosforilación de TSC	-	+	+
Degradación proteasómica	-	+	-
Actividad de autofagia neurovilurencia	Descendente	Ascendente	Ascendente
Efecto neuroprotector	+	Sin informe	Sin informe
	Descendente	Ascendente	Ascendente

5 Con los descubrimientos anteriores en mente, ciertas realizaciones de la invención enseñan un vector de expresión oncolítico. El vector de expresión oncolítico incluye un ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos de interés que codifica la proteína GADD34, una porción biológicamente activa de la misma (tal como una versión truncada de la misma) o un equivalente funcional de la misma. La secuencia de nucleótidos de interés está operativamente unida a una secuencia de control de expresión. En algunas realizaciones, La secuencia de control de la expresión incluida en el vector de expresión oncolítico es un promotor. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor nestina. En determinadas realizaciones, el vector oncolítico es un vector VHS-1 recombinante. En algunas realizaciones, el vector VHS-1 recombinante es deficiente para el gen γ_1 34.5. En diversas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína GADD34 incluye SEQ ID NO: 1 o una variante degenerada de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos codifica un gen GADD34 truncado. En algunas realizaciones, el gen GADD34 truncado es GADD34C. GADD34C está codificado por SEQ ID NO: 2. Un experto en la materia apreciaría fácilmente que una variante degenerada de SEQ ID NO: 2 podría usarse como una alternativa a SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de control de la expresión incluye el promotor nestina, como se demuestra en SEQ ID NO: 3. Un experto en la materia apreciaría fácilmente que también podría usarse una versión modificada de la SEQ ID NO: 3, siempre que retenga una actividad biológica similar. Simplemente a modo de ejemplo no limitante, la 2^a secuencia de intrones de nestina (potenciador) representada en SEQ ID NO: 4 y el promotor mínimo hsp68 representado en SEQ ID NO: 5, podría usarse sola o combinada al diseñar diversas construcciones contempladas en el presente documento. En algunas realizaciones, el elemento potenciador de la nestina puede estar operativamente unido a un promotor mínimo de la proteína de choque térmico 68 (hsp68) para impulsar la expresión de GADD34 delta-Nter, como se demuestra en SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, pueden incorporarse secuencias de control de expresión alternativas o adicionales en los vectores de expresión oncolíticos para iniciar o influir en la expresión de cualquiera de las secuencias de nucleótidos de interés mencionadas anteriormente. Simplemente a modo de ejemplos no limitantes, cualquier promotor específico de tumor o tejido u otras secuencias de control de expresión, tales como secuencias diana de microARN, pueden usarse. Los ejemplos de promotores específicos incluyeron, pero no se limitan a, CEA para células de cáncer de colon, Muc1 para células de cáncer de mama, Myb1 para todas las células cancerosas, Tirocinasa para células de melanoma, PSA para células de cáncer de próstata. Los ejemplos de secuencias de control traduccional miR incluyen, pero no se limitan a: miR128 o miR124 para diferenciar las células de glioma de las células neurales normales. En algunas realizaciones, los vectores de expresión oncolíticos alternativos, aparte de VHS-1, pueden usarse para facilitar la expresión de GADD34, GADD34C o una o más porciones biológicamente activas de los mismos.

35 En diversas realizaciones, la presente invención proporciona un vector de expresión del virus del herpes simple modificado oncolítico para su uso en un método de tratamiento de células tumorales intracraneales en un sujeto, como se define en la reivindicación 6. En determinadas realizaciones, el método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector de expresión con actividad oncolítica. En algunas realizaciones, el vector de expresión es un vector de replicación condicional específico de tumor. En algunas realizaciones, el vector es un vector VHS-1 recombinante. En algunas realizaciones, el vector VHS-1 recombinante incluye una o más copias de una secuencia de ADN de interés que codifica una proteína GADD34, una o más porciones de la proteína GADD34 o un equivalente funcional de la proteína GADD34. En algunas realizaciones, la secuencia de ADN de interés es GADD34C. En algunas realizaciones, una o más de las secuencias de ADN mencionadas anteriormente están operativamente unidas a una secuencia de control de expresión, que puede incluir cualquiera de esas secuencias de control de expresión descritas anteriormente en el presente documento. En algunas realizaciones, la secuencia de control de la expresión es un promotor configurado para facilitar la expresión de la secuencia de ADN. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor nestina. En algunas realizaciones, un promotor alternativo, tales como cualquiera de aquellos descritos en el presente documento, o diseñados de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, pueden usarse. En algunas realizaciones, la enfermedad neoplásica que se trata es el cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de cerebro. Simplemente a modo de ejemplos no limitantes, los tipos de cáncer cerebral que pueden tratarse pueden incluir glioblastoma, astrocitoma anaplásico, astrocitoma, astrocitoma pilocítico, glioma pontino intrínseco difuso, oligodendroglioma, oligodendroglioma anaplásico, oligo-astrocitoma mixto y pendimoma. En algunas realizaciones, las células madre cancerosas se tratan con el método de la invención. En algunas realizaciones, el sujeto tratado es un mamífero. En determinadas

realizaciones, el sujeto tratado es un ser humano.

Los métodos para tratar cualquiera de las enfermedades neoplásicas descritas en el presente documento, incluyendo cáncer cerebral, pueden incluir la administración de los compuestos de realizaciones a modo de ejemplo como un único agente activo, o en combinación con métodos adicionales de tratamiento que incluyen, pero no se limitan a, terapia basada en células madre, inmunoterapia, radioterapia, terapia con agentes inmunosupresores, agentes quimioterapéuticos o antiproliferativos, incluyendo citocinas. Los métodos de tratamiento de esta divulgación pueden ser paralelos a, anteriores a o siguientes a los métodos adicionales de tratamiento.

Como se ha indicado anteriormente, las secuencias de ADN de GADD34 o GADD34C, o porciones de las mismas que pueden usarse junto con las construcciones de la invención y los métodos descritos en el presente documento incluyen aquellos que se han modificado. Cuando se expresan, las secuencias de ADN modificadas incluyen aquellas que pueden dar como resultado sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, en uno o más de los restos de aminoácidos importantes) de la proteína GADD34 o GADD34C. Una proteína GADD34 o GADD34C modificada puede tener actividad biológica alterada (aumentada o disminuida) o sustancialmente la misma actividad (funcionalmente equivalente), en comparación con la proteína GADD34 o GADD34C no modificada, especialmente con respecto a facilitar la desfosforilación de eIF2 alfa.

En algunas divulgaciones, el promotor operablemente unido al gen de interés, que puede incluir pero no se limita al gen GADD34, al gen GADD34 truncado N-terminal, al gen GADD34 modificado de otra manera o a un equivalente funcional del gen GADD34, usado en los vectores, composiciones y métodos descritos en el presente documento, es preferentemente un promotor que puede dirigir la expresión del gen de interés en una célula cancerosa. En realizaciones preferidas, el promotor usado en los vectores, las composiciones y los métodos de la invención, facilitan niveles de expresión del gen de interés que son suficientes para dar como resultado (1) fosforilación reducida de eIF2 alfa y/o (2) replicación vírica significativa y/o (3) oncólisis significativa, de tal manera que se obtengan algunos beneficios terapéuticos. "Beneficio terapéutico", como se usa en el presente documento, incluye cualquier disminución en el número de células cancerosas, tasa de proliferación de células cancerosas o metástasis. En algunas realizaciones, el promotor usado en el presente documento facilita la expresión selectiva o aumentada del gen de interés asociado en uno o más tipos de células cancerosas de interés, en comparación con una célula normal.

La expresión "unido operativamente", como se usa en el presente documento, se refiere a la disposición de diversos elementos de la molécula de ácido nucleico entre sí de tal manera que los elementos estén conectados funcionalmente y puedan interactuar entre sí. Dichos elementos pueden incluir, sin limitación, un promotor, un potenciador, una secuencia de poliadenilación, uno o más intrones y/o exones y una secuencia codificante de un gen de interés a expresarse. Los elementos de secuencia de ácido nucleico, cuando están unidos operativamente, pueden actuar juntos para modular la actividad de los demás y, en última instancia, pueden afectar al nivel de expresión del gen de interés, incluyendo cualquiera de aquellos codificados por las secuencias descritas anteriormente.

La secuencia de ácido nucleico del gen GADD34 de "longitud completa" usada en los experimentos informados en el presente documento y descritos en las figuras a las que se hace referencia se proporciona en el presente documento como SEQ ID NO: 1. La secuencia de ácido nucleico del gen GADD34 truncado N-terminal se proporciona en el presente documento como SEQ ID NO: 2. La secuencia de ácido nucleico de la secuencia de control del promotor nestina usada en los experimentos informados en el presente documento se proporciona como SEQ ID NO: 3. Aunque se proporcionan estas secuencias específicas, las moléculas de ácido nucleico usadas en los vectores, las composiciones y los métodos de la invención no se limitan estrictamente a moléculas que incluyen las secuencias establecidas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. Más bien, las realizaciones específicas abarcan moléculas de ácido nucleico que llevan modificaciones tales como sustituciones, pequeñas deleciones, inserciones o inversiones. En esta divulgación se incluyen moléculas de ácido nucleico, cuya secuencia de nucleótidos es al menos un 95 % idéntica (por ejemplo, al menos un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % idéntica) a la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 en el Listado de secuencias.

También se incluye en esta divulgación una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que es una variante degenerada de un ácido nucleico desvelado en el presente documento, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Una agrupación secuencial de tres nucleótidos, un "codón", codifica un aminoácido. Ya que hay 64 codones posibles, pero solo 20 aminoácidos naturales, la mayoría de los aminoácidos están codificados por más de un codón. Esta "degeneración" natural o "redundancia" del código genético es bien conocida en la técnica. De esta manera se apreciará que las secuencias de ácido nucleico mostradas en el Listado de Secuencias proporcionan solamente un ejemplo dentro de un grupo grande pero definido de secuencias de ácido nucleico que codificarán los polipéptidos como se describió anteriormente.

De manera importante, los vectores de las realizaciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para la introducción de genes adicionales en terapia génica. De esta manera, por ejemplo, los vectores del VHS de esta invención pueden contener uno o más genes exógenos adicionales para la expresión de una proteína eficaz en la

regulación del ciclo celular, tales como p53, Rb, o mitosina, o una variante biológicamente activa de las mismas, o para inducir la muerte celular, como el gen de suicidio condicional timidina quinasa, este último debe usarse junto con un metabolito de timidina quinasa para que sea eficaz, o cualquier otro gen antitumoral, tales como por ejemplo una toxina.

5 Cuando se usa farmacéuticamente, las realizaciones del vector oncolítico discutidas en el presente documento pueden combinarse con diversos vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos farmacéuticamente
10 aceptables adecuados son bien conocidos por aquellos expertos en la materia. Las composiciones pueden administrarse después terapéutica o profilácticamente, en cantidades eficaces, descritas con mayor detalle a continuación.

15 Como se usa en el presente documento, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de vector que ejerce actividad oncolítica, provocando atenuación o inhibición de la proliferación de células tumorales, que da lugar a la regresión tumoral. Una cantidad eficaz variará, dependiendo de la patología o afección a tratar, por el
20 paciente y su estado y otros factores bien conocidos por los expertos en la materia. Los expertos en la materia determinan fácilmente las cantidades eficaces. En algunas realizaciones, un intervalo terapéutico es de 10^3 a 10^{12} unidades formadoras de placas introducidas una vez. En algunas realizaciones, una dosis terapéutica en el intervalo terapéutico mencionado anteriormente se administra a intervalos de cada día a cada mes por vía intratumoral, intratecal, mejorada por convección, intravenosa o intraarterial.

25 Aunque ciertas vías de administración se proporcionan en la descripción anterior, puede adaptarse cualquier vía de administración adecuada de los vectores y, por lo tanto, las vías de administración descritas anteriormente no pretenden ser limitantes. Las vías de administración pueden incluir pero no se limitan a, intravenosa, oral, bucal, intranasal, inhalación, aplicación tópica a una membrana mucosa o inyección, incluyendo intratumoral, intradérmica,
30 intratecal, intracisternal, intralesional o cualquier otro tipo de inyección. La administración puede realizarse de forma continua o intermitente y variará con el sujeto y la afección a tratar. Un experto en la materia apreciará fácilmente que las diversas vías de administración descritas en el presente documento permitirán que los vectores o composiciones de la invención se administren, en o cerca del tumor o de las células cancerosas dirigidas. Un
35 experto en la materia también apreciará fácilmente que las diversas vías de administración descritas en el presente documento permitirán que los vectores y composiciones descritos en el presente documento se administren a una región en la proximidad al tumor o células individuales a tratar. "En la proximidad" puede incluir cualquier tejido o fluido corporal en el sujeto que esté suficientemente cerca del tumor o de las células cancerosas individuales de manera que al menos una parte de los vectores o composiciones administrados al sujeto alcancen sus dianas deseadas y ejerzan sus efectos terapéuticos.

40 Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones acuosas tales como solución salina fisiológicamente tamponada u otros disolventes o vehículos tales como glicoles, glicerol, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de oliva) o ésteres orgánicos inyectables. Puede usarse un vehículo farmacéuticamente aceptable para administrar las composiciones de la invención a una célula *in vitro* o a un sujeto *in vivo*. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede contener un compuesto fisiológicamente aceptable que actúa, por ejemplo, estabilizando la composición o aumentando la absorción del agente. Un compuesto fisiológicamente
45 aceptable puede incluir, por ejemplo, hidratos de carbono, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros estabilizantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes o conservantes, que son particularmente útiles para prevenir el crecimiento o la acción de microorganismos. Diversos conservantes son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, fenol y ácido ascórbico. Un experto en la materia sabría que la elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable, incluyendo un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de la vía de administración del polipéptido. Por ejemplo, un compuesto fisiológicamente aceptable tales como el monoestearato de aluminio o la gelatina, es particularmente útil
50 como agente de retardo, que prolonga la velocidad de absorción de una composición farmacéutica administrada a un sujeto. Algunos ejemplos adicionales de vehículos, estabilizantes o adyuvantes pueden encontrarse en Martin, Remington's Pharm. Sci., 15a Ed. (Mack Publ. Co., Easton, 1975).

55 Ejemplos

60 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la materia deberían apreciar que las técnicas divulgadas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por los inventores para que funcionen bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y aun así obtener un resultado parecido o similar sin apartarse del alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están relacionados tanto química como fisiológicamente pueden sustituirse por los agentes descritos en el presente documento mientras que se obtendrían los mismos resultados o similares. Se considera que todos los sustitutos y modificaciones similares evidentes para aquellos
65 expertos en la materia están dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1*Construcciones vectoriales de los virus oncolíticos NG34 y NG34C*

5 El método HSVQuik se empleó para diseñar vectores de VHS1 como se describe en el presente documento y anteriormente (véase Terada et al. Development of a rapid method to generate multiple oncolytic HSV vectors and their *in vivo* evaluation using syngeneic mouse tumor models. Gene Ther_Abr 2006;13(8):705-14). Primero, se insertó un gen GADD34 de longitud completa o truncado N-terminal en los sitios NcoI/HpaI del vector pTnestin-luc-b que inserta el elemento promotor-potenciador nestin-hsp68 en pTransfer, ligando el fragmento obtenido por digestión
10 enzimática de BstXI/XhoI o HpaI/XhoI de extremo romo de un pOTB7-GADD34 (SEQ ID NO: 1) respectivamente (Figura 3). Estos vectores lanzadera se usaron para transformar *E. coli* que lleva el cromosoma artificial bacteriano (BAC) llamado fHsvQuik2, que tiene dos sitios FRT de recombinación flp dentro de este locus UL39, pero carece del gen EGFP de fHsvQuik1 (véase Terada et al. Development of a rapid method to generate multiple oncolytic HSV
15 vectors and their *in vivo* evaluation using syngeneic mouse tumor models. Gene Ther_Abr 2006;13(8):705-14). La recombinación específica de sitio mediada por FLP-FRT entre los vectores lanzadera y fHsvQuik2 BAC dio como resultado los vectores fHsvQ2-*nestin*-GADD34 y fHsvQ2-*nestin*-GADD34ΔN BAC, respectivamente (Figura 4). Las células Vero se transfectaron con estos BAC y un pc-nCre, un vector de expresión de recombinasa Cre para retirar todas las secuencias procariotas de los sitios loxP flanqueantes del vector lanzadera. Los virus VHS1 resultantes
20 NG34 (que contienen GADD34 de longitud completa) y NG34C (GADD34 truncada) se generaron y empaquetaron en estas células Vero.

Example 2*Descripción del sistema vector HSVQuik*

25 La tecnología HsvQuik se desarrolló como un método novedoso basado en BAC (cromosoma artificial bacteriano) para la generación de VHS-1 oncolítico. Aprovecha los métodos relativamente rápidos y fáciles de clonación convencional combinando dos sistemas secuenciales de recombinación específica del sitio (Flp-FRT y Cre-loxP). La estructura básica para los vectores fHsvQuik ha sido el genoma de un VHS-1 oncolítico designado como MGH1, que
30 consiste en un VHS-1 oncolítico doble mutante (cepa F) que tiene un mutante de inserción del gen lacZ UL39 (que codifica una subunidad grande de ribonucleótido reductasa, ICP6) y deleciones de genes $\gamma_134.5$ diploides que codifican el factor de neurovirulencia ICP34.5 responsable de la encefalitis. Para mantener establemente este gran genoma de VHS-1 en *E. coli*, el locus lacZ: UL39 del genoma MGH1 también se diseñó por ingeniería para expresar genes adicionales que codifican los marcadores fluorescentes, DsRed1 (para fHsvQuik-1 y -2) y EGFP (para
35 fHsvQuik-1). El genoma de fHsvQuik BAC no se manipula directamente, más bien su diseño por ingeniería con secuencias deseadas adicionales se logra a través de un vector lanzadera (pTransfer) que se ha diseñado por ingeniería con sitios de clonación múltiple (MCS) para insertar gen o genes de interés con secuencias reguladoras deseadas (por ejemplo, elementos reguladores transcripcionales). pTransfer contiene un sitio FRT para permitir la integración directa específica del sitio en el ADN de fHsvQuik BAC en *Escherichia coli* (*E. coli*) sin manipulación
40 enzimática (por ejemplo, ligación de ADN). Debido a que el origen de replicación R6Ky del plásmido pTransfer depende de cepas de *E. coli* que poseen el gen *pir*, R6Ky ori no interfiere con el origen de replicación bacteriana del fHsvQuik BAC en cepas de *E. coli* DH10B (*pir*⁻) después de la recombinación Flp-FRT. Para retirar las secuencias BAC del ADN de fHsvQuik, se usa la técnica de recombinación Cre-loxP. Los clones VHS-1 recombinantes resultantes que forman placas individuales se distinguen de los clones VHS-1 no recombinantes que contienen BAC
45 por fluorescencia RFP ya que el gen DsRed1 impulsor del promotor CMV también se corta junto con las secuencias BAC durante la recombinación Cre-LoxP.

Los diversos métodos y técnicas descritos anteriormente proporcionan varias formas de llevar a cabo la solicitud. Por supuesto, debe entenderse que no necesariamente todos los objetivos o ventajas descritos pueden lograrse de
50 acuerdo con cualquier realización particular descrita en el presente documento. De esta manera, por ejemplo, los expertos en la materia reconocerán que los métodos pueden realizarse de una manera que logre u optimice una ventaja o grupo de ventajas como se enseña en el presente documento sin lograr necesariamente otros objetivos o ventajas como se enseña o sugiere en el presente documento. En el presente documento se mencionan diversas alternativas. Debe entenderse que algunas realizaciones preferidas incluyen específicamente una, otra, o varias
55 características, mientras que otras excluyen específicamente una, otra, o varias características, mientras que otras mitigan una característica particular mediante la inclusión de una, otra, o varias características ventajosas.

Adicionalmente, el experto en la materia reconocerá la aplicabilidad de diversas características de diferentes realizaciones. De forma similar, los diversos elementos, características y etapas discutidos anteriormente, así como
60 otros equivalentes conocidos para cada tal elemento, característica o etapa, pueden emplearse en diversas combinaciones por un experto en la materia para realizar métodos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento. Entre los diversos elementos, características y etapas, algunos se incluirán específicamente y otros se excluirán específicamente en diversas realizaciones.

65 Aunque la aplicación se ha desvelado en el contexto de ciertas realizaciones y ejemplos, los expertos en la materia entenderán que las realizaciones de la solicitud se extienden más allá de las realizaciones específicamente descritas

a otras realizaciones alternativas y/o usos y modificaciones y equivalentes de las mismas.

5 En algunas realizaciones, los términos "un" and "uno/una" y "el/la" y referencias similares usadas en el contexto de describir una realización particular de la solicitud (especialmente en el contexto de ciertas de las siguientes reivindicaciones) puede interpretarse que abarcan tanto el singular como el plural. La enumeración de intervalos de valores en el presente documento meramente pretende servir como método abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, cada valor individual se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionado con respecto a ciertas realizaciones en el presente documento tiene la intención meramente de iluminar mejor la solicitud y no plantea una limitación en el alcance de la solicitud reivindicada de otro modo. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva ha de interpretarse como una indicación de que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la solicitud.

10 Las realizaciones preferidas de esta solicitud se describen en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la solicitud. Las variaciones de esas realizaciones preferidas resultarán evidentes para los expertos en la materia al leer la descripción anterior. Se contempla que los artesanos expertos pueden emplear tales variaciones según sea apropiado y la solicitud puede practicarse de otra manera a la específicamente descrita en el presente documento. En consecuencia, muchas realizaciones de esta solicitud incluyen todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto mencionada en las reivindicaciones adjuntas a la misma según lo permitido por la ley aplicable. Además, la solicitud abarca cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de los mismos a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC. OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION
- <120> VECTORES ONCOLÍTICOS DE VHS1 Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS
- <130> 043214-076071-PCT
- 35 <140>
- <141>
- <150> 61/726.318
- 40 <151> 14/11/2012
- <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.5
- 45 <210> 1
- <211> 2022
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- 50 <400> 1

ES 2 777 183 T3

atgccccag gccaaagcacc ccatcaggct accccgtgga gggatgccca ccctttcttc	60
ctcctgtccc cagtgatggg cctcctcagc cgcgcctgga gccgcctgag gggcctggga	120
cctctagagc cctggctggt ggaagcagta aaaggagcag ctctggtaga agctggcctg	180
gagggagaag ctaggactcc tctggcaatc ccccatacc cttggggcag acgccctgaa	240
gaggaggctg aagacagtgg aggccctgga gaggacagag aaacactggg gctgaaaacc	300
agcagttccc ttcctgaagc ctggggactt ttggatgatg atgatggcat gtatggtgag	360
cgagaggcaa ccagtgtccc tagagggcag ggaagtcaat ttgcagatgg ccagcgtgct	420
cccctgtctc ccagccttct gataaggaca ctgcaaggtt ctgataagaa cccaggggag	480
gagaaagccg aggaagaggg agttgctgaa gaggagggag ttaacaagtt ctcttatcca	540
ccatcacacc gggagtgttg tccagccgtg gaggaggagg acgatgaaga agctgtaaag	600
aaagaagctc acagaacctc tacttctgcc ttgtctccag gatccaagcc cagcacttgg	660
gtgtcttgcc caggggagga agagaatcaa gccacggagg ataaaagaac agaaagaagt	720
aaaggagcca ggaagacctc cgtgtcccc cgatcttcag gctccgacct caggtcctgg	780
gagtatcgtt caggagaggc gtccgaggag aaggaggaaa aggcacacaa agaaactggg	840
aaaggagaag ctgccccagg gccgcaatcc tcagccccag cccagaggcc ccagctcaag	900
tcctggtggt gccaaaccag tgatgaagag gagggtgagg tcaaggcttt gggggcagct	960
gagaaggatg gagaagctga gtgtcctccc tgcaccccc caccaagtgc cttcctgaag	1020
gcctgggtgt attggccagg agaggacaca gaggaagagg aagatgagga agaagatgag	1080
gacagtgact ctggatcaga tgaggaagag ggagaagctg aggcttcctc ttccactcct	1140

ES 2 777 183 T3

gctacaggtg tcttcttgaa gtcctgggtc tatcagccag gagaggacac agaggaggag 1200
 gaagatgagg acagtgatac aggatcagcc gaggatgaaa gagaagctga gacttctgct 1260
 tccacacccc ctgcaagtgc tttcttgaag gcctgggtgt atcgccagg agaggacacg 1320
 gaggaggagg aagatgagga tgtggatagt gaggataagg aagatgattc agaagcagcc 1380
 ttgggagaag ctgagtcaga cccacatccc tcccaccgg accagagggc ccaactcagg 1440
 ggctgggat atcgacctg aaaagagaca gaggaagagg aagctgctga ggactggga 1500
 gaagctgagc cctgcccctt ccgagtggcc atctatgtac ctggagagaa gccaccgct 1560
 ccctgggctc ctccctaggct gccctccga ctgcaaaggc ggctcaagcg ccagaaacc 1620
 cctactcatg atccggacc tgagactccc ctaaaggcca gaaaggtgcg cttctccgag 1680
 aaggtcactg tccatttctt ggctgtctgg gcaggccgg cccaggccgc ccgccaggc 1740
 ccctgggagc agcttgctcg ggatcgcagc cgcttcgcac gccgcatcac ccaggcccag 1800
 gaggagctga gcccctgcct caccctgct gcccgggcca gagcctgggc acgcctcagg 1860
 aaccacctt tagcccccct ccctgccctc acccagacct tgccctctc ctctgtccct 1920
 tcgtcccag tccagaccac gcccttgagc caagctgtgg ccacacctc ccgctcgtct 1980
 gctgctgcag cggctgcctt ggacctcagt gggaggcgtg gc 2022

<210> 2
 <211> 1503
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

atgaacaagt tctcttatcc accatcacac cgggagtgtt gtccagccgt ggaggaggag 60
 gacgatgaag aagctgtaa gaaagaagct cacagaacct ctacttctgc cttgtctcca 120
 ggatccaagc ccagcacttg ggtgtcttgc ccaggggagg aagagaatca agccacggag 180
 gataaaagaa cagaaagaag taaaggagcc aggaagacct ccgtgtcccc ccgatcttca 240
 ggctccgacc ccaggtcctg ggagtatcgt tcaggagagg cgtccgagga gaaggaggaa 300
 aaggcacaca aagaaactgg gaaaggagaa gctgccccag ggccgcaatc ctccagcccc 360
 gccagagggc ccagctcaa gtcctggtgg tgccaacca gtgatgaaga ggagggtgag 420
 gtcaaggctt tgggggcagc tgagaaggat ggagaagctg agtgcctcc ctgcatcccc 480
 ccaccaagtg ccttctgaa ggcctgggtg tattggccag gagaggacac agaggaagag 540
 gaagatgagg aagaagatga ggacagtgac tctggatcag atgaggaaga gggagaagct 600
 gaggttctt cttccactcc tgctacaggt gtcttcttga agtcctgggt ctatcagcca 660
 ggagaggaca cagaggagga ggaagatgag gacagtgata caggatcagc cgaggatgaa 720
 agagaagctg agacttctgc ttccacaccc cctgcaagtg ctttcttgaa ggcctgggtg 780

10

ES 2 777 183 T3

tatcggccag gagaggacac ggaggaggag gaagatgagg atgtggatag tgaggataag 840
 gaagatgatt cagaagcagc cttggggagaa gctgagtcag acccacatcc ctcccacccg 900
 gaccagaggg ccacttcag gggctgggga tatcgacctg gaaaagagac agaggaagag 960
 gaagctgctg aggactgggg agaagctgag ccctgcccct tccgagtggc catctatgta 1020
 cctggagaga agccaccgcc tccctgggct cctcctaggc tgcccctccg actgcaaagg 1080
 cggctcaagc gcccagaaac ccctactcat gatccggacc ctgagactcc cctaaaggcc 1140
 agaaaggtgc gcttctccga gaaggtcact gtccatttcc tggctgtctg ggcagggccg 1200
 gcccaggccg cccgccaggg cccctgggag cagcttgctc gggatcgag ccgcttcgca 1260
 cgcgcacatca cccaggccca ggaggagctg agcccctgcc tcaccctgc tgcccgggcc 1320
 agagcctggg cagcctcag gaaccacct ttagcccca tccctgccct caccagacc 1380
 ttgccttct cctctgtccc ttcgtcccca gtccagacca cgcccttgag ccaagctgtg 1440
 gccacacctt cccgctcgtc tgctgctgca gcggctgcc tggacctcag tgggagcgt 1500
 ggc 1503

5 <210> 3
 <211> 1540
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 3

aaccctgaag agtttgtgat cctgagatga gggctttagc cccagtcagt cctctgaggg 60
 gaaggtcca ggcagctctg aggaatgtaa cactggcgt ttgaggtctg aaaaggattt 120
 ggagaagggg agctgaattc atttgctttt gtctgttacc agctctgggg gcagagagag 180
 agccatcccc tgggaacagc ctgagaattc ccacttcccc tgaggagccc tcccttctta 240
 ggccctccag atggtagtgt ggacaaaagg caataattag catgagaatc ggcctccctc 300
 ccagaggatg aggtcatcgg ccttggcctt ggggtggggag gcggagactg atctgaggag 360
 tctgatataa gtgttagcaa ttcatttggc cctgcctccg actgtgggaa tctgcatgtg 420
 gggctcctt gtgtctcaa tatgggttgg ctaagtatat atctgtgggt atatgactgt 480
 gtggctttta tatgacaatg gtcacaatag agattgatcc tgcagtggca ggacatgcta 540
 cctcagctgg agctgaccct atctccccac tccccaccag gactctgctg gaggctgaga 600
 actctcggtt gcagacacct ggacgaggtt caggcttatac atatgactag tagatcctct 660
 aggggcgatc gcgggtaccg agctccagga acatccaaac tgagcagccg gggcccccc 720
 cccccccac cccgccctc cgggcaactt tgagcctgtg ctgggacaga gcctctagtt 780

15

ES 2 777 183 T3

cctaaattag tccatgaggt cagagggcagc actgccattg taacgcgatt ggagaggatc 840
 acgtcaccgg acacgcccc aggcattctcc ctgggtctcc taaacttggc ggggagaagt 900
 tttagccctt aagtttttagc ctttaacccc catattcaga actgtgcgag ttggcgaaac 960
 cccacaaatc acaacaaact gtacacaaca cggagctaga ggtgatcttt cttgtccatt 1020
 ccacacaggc cttagtaatg cgtcgccata gcaacagtgt cactagtagc accagcactt 1080
 cccacacccc tccccctcag gaatccgtac tctccagtga accccagaaa cctctggaga 1140
 gttctggaca agggcggaac ccacaactcc gattactcaa gggaggcggg gaagctccac 1200
 cagacgcgaa actgctggaa gattcctggc cccaaggcct cctccggctc gctgattggc 1260
 ccagcggaga gtgggcgggg cgggtgaaga ctcttaag gcgcagggcg gcgagcaggt 1320
 caccagacgc tgacagctac tcagaaccaa atctggttcc atccagagac aagcgaagac 1380
 aagagaagca gagcgcgagg cgcgttcccg atcctcggcc aggaccagcc tccccagag 1440
 catccctgcc gcggagcgca accttcccag gagcatccct gccgcggagc gcaactttcc 1500
 ccggagcatc cacgccgagg agcgcagcct tccagaagca 1540

<210> 4
 <211> 630
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 4

aaccctgaag agtttgtgat cctgagatga gggcttttagc cccagtcagt cctctgaggg 60
 gaaggggtcca ggcagctctg aggaatgtaa ccaactggcgt ttgaggtctg aaaaggattt 120
 ggagaagggg agctgaattc atttgctttt gtctgttacc agctctgggg gcagagagag 180
 agccatcccc tgggaacagc ctgagaattc ccaacttccc tgaggagccc tcccttctta 240
 ggccctccag atggtagtgt ggacaaaagg caataattag catgagaatc ggcctccctc 300
 ccagaggatg aggtcatcgg ccttggcctt ggggtggggag gcggagactg atctgaggag 360
 tctgatataa gtgtagcaa ttcatttggc cctgcctccg actgtgggaa tctgcatgtg 420
 gggctctccct gtgtctcaaa tatgggttgg ctaagtatat atctgtgggt atatgactgt 480
 gtggctttta tatgacaatg gtcacaatag agattgatcc tgcagtggca ggacatgcta 540
 cctcagctgg agctgaccct atctccccac tccccaccag gactctgctg gaggctgaga 600
 actctcgggt gcagacacct ggacgaggtt 630

<210> 5
 <211> 910
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 777 183 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

5 <400> 5

```

caggcttatc atatgactag tagatcctct aggggcgatc gcgggtaccg agctccagga      60
acatccaaac tgagcagccg gggcccccc cccccccac cccgccctc ccggcaactt      120
tgagcctgtg ctgggacaga gcctctagtt cctaaattag tccatgaggt cagaggcagc      180
actgccattg taacgcgatt ggagaggatc acgtcaccgg acacgcccc aggcattctcc      240
ctgggtctcc taaacttggc ggggagaagt tttagccctt aagttttagc ctttaacccc      300
catattcaga actgtgcgag ttggcgaaac cccacaaatc acaacaaact gtacacaaca      360
ccgagctaga ggtgatcttt cttgtccatt ccacacaggc cttagtaatg cgtcgccata      420
gcaacagtgt cactagtagc accagcactt cccacacccc tccccctcag gaatccgtac      480
tctccagtga accccagaaa cctctggaga gttctggaca agggcggaac ccacaactcc      540
gattactcaa gggaggcggg gaagctccac cagacgcgaa actgctggaa gattcctggc      600
cccaaggcct cctccggctc gctgattggc ccagcggaga gtgggcgggg ccggtgaaga      660
ctccttaaag gcgcagggcg gcgagcaggt caccagacgc tgacagctac tcagaaccaa      720
atctggttcc atccagagac aagcgaagac aagagaagca gagcgagcgg cgcgttcccc      780
atcctcggcc aggaccagcc ttccccagag catccctgcc gcggagcgca accttcccag      840
gagcatccct gccgcggagc gcaactttcc ccggagcatc cagcccgcg agcgcagcct      900
tccagaagca                                     910

```

<210> 6

10 <211> 3058

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 6

```

aaccctgaag agtttgtgat cctgagatga gggctttagc ccagtcagt cctctgaggg      60
gaagggcca ggcagctctg aggaatgtaa ccaactggcgt ttgaggtctg aaaaggattt      120
ggagaagggg agctgaattc atttgctttt gtctgttacc agctctgggg gcagagagag      180
agccatcccc tgggaacagc ctgagaattc ccaactcccc tgaggagccc tcccttctta      240
ggcctccag atggtagtgt ggacaaaagg caataattag catgagaatc ggcctccctc      300
ccagaggatg aggtcatcgg ccttggcctt ggggggggag gcggagactg atctgaggag      360
tctgatataa gtgtagcaa ttcatttggc cctgcctccg actgtgggaa tctgcatgtg      420

```

20

ES 2 777 183 T3

gggtctccct	gtgtctcaaa	tatgggttgg	ctaagtatat	atctgtgggt	atatgactgt	480
gtggctttta	tatgacaatg	gtcacaatag	agattgatcc	tgcagtggca	ggacatgcta	540
cctcagctgg	agctgaccct	atctccccac	tccccaccag	gactctgctg	gaggctgaga	600
actctcgggt	gcagacacct	ggacgaggtt	caggcttatc	atatgactag	tagatcctct	660
aggggcatc	gcgggtaccg	agctccagga	acatccaaac	tgagcagccg	gggtcccccc	720
cacccccac	cccgcccctc	ccggcaactt	tgagcctgtg	ctgggacaga	gcctctagtt	780
cctaaattag	tccatgaggt	cagaggcagc	actgccattg	taacgcgatt	ggagaggatc	840
acgtcaccgg	acacgcccc	aggcatctcc	ctgggtctcc	taaacttggc	ggggagaagt	900
tttagccctt	aagttagc	ctttaacccc	catattcaga	actgtgcgag	ttggcgaaac	960
cccacaaatc	acaacaaact	gtacacaaca	ccgagctaga	ggtgatcttt	cttgtccatt	1020
ccacacaggc	cttagtaatg	cgtcgccata	gcaacagtgt	cactagtagc	accagcactt	1080
ccccacacc	tccccctcag	gaatccgtac	tctccagtga	accccagaaa	cctctggaga	1140
gttctggaca	agggcggaac	ccacaactcc	gattactcaa	gggagggcgg	gaagctccac	1200
cagacgcgaa	actgctggaa	gattcctggc	ccaaggcct	cctccggctc	gctgattggc	1260
ccagcggaga	gtgggcgggg	ccggtgaaga	ctccttaaag	gcgcagggcg	gcgagcaggt	1320
caccagacgc	tgacagctac	tcagaaccaa	atctggttcc	atccagagac	aagcgaagac	1380
aagagaagca	gagcgcgagg	cgcgttcccg	atcctcggcc	aggaccagcc	ttccccagag	1440
catccctgcc	gcggagcgc	accttcccag	gagcatccct	gccgcggagc	gcaactttcc	1500
ccggagcatc	cacgcccggg	agcgcagcct	tccagaagca	gagcgcggcg	ccatgaacaa	1560
gttctcttat	ccaccatcac	accgggagtg	ttgtccagcc	gtggaggagg	aggacgatga	1620
agaagctgta	aagaaagaag	ctcacagaac	ctctacttct	gccttgtctc	caggatccaa	1680
gcccagcact	tgggtgtctt	gcccagggga	ggaagagaat	caagccacgg	aggataaaaag	1740
aacagaaaga	agtaaaggag	ccaggaagac	ctccgtgtcc	ccccgatctt	caggctccga	1800
ccccaggtcc	tgggagtatc	gttcaggaga	ggcgtccgag	gagaaggagg	aaaaggcaca	1860
caaagaaact	gggaaaggag	aagctgcccc	agggccgcaa	tcctcagccc	cagcccagag	1920
gccccagctc	aagtcctggg	ggtgcccaacc	cagtgatgaa	gaggagggtg	aggtcaaggc	1980
tttgggggca	gctgagaagg	atggagaagc	tgagtgtcct	ccctgcatcc	ccccaccaag	2040
tgccttctctg	aaggcctggg	tgtattggcc	aggagaggac	acagaggaag	aggaagatga	2100
ggaagaagat	gaggacagtg	actctggatc	agatgaggaa	gagggagaag	ctgaggcttc	2160
ctcttccact	cctgctacag	gtgtcttctt	gaagtcctgg	gtctatcagc	caggagagga	2220
cacagaggag	gaggaagatg	aggacagtga	tacaggatca	gccgaggatg	aaagagaagc	2280

ES 2 777 183 T3

tgagacttct gcttccacac cccctgcaag tgctttcttg aaggcctggg tgtatcggcc 2340
 aggagaggac acggaggagg aggaagatga ggatgtggat agtgaggata aggaagatga 2400
 ttcagaagca gccttgggag aagctgagtc agaccacat ccctcccacc cggaccagag 2460
 ggcccacttc aggggctggg gatatcgacc tggaaaagag acagaggaag aggaagctgc 2520
 tgaggactgg ggagaagctg agccctgccc cttccgagtg gccatctatg tacctggaga 2580
 gaagccaccg cctccctggg ctccctcctag gctgcccctc cgactgcaaa ggcggctcaa 2640
 gcgcccagaa acccctactc atgatccgga ccctgagact cccctaaagg ccagaaaggt 2700
 gcgcttctcc gagaaggtca ctgtccattt cctggctgtc tgggcagggc cggcccaggc 2760
 cgcccgccag ggcccctggg agcagcttgc tcgggatcgc agccgcttcg cacgccgat 2820
 caccagggc caggaggagc tgagcccctg cctcaccctt gctgcccggg ccagagcctg 2880
 ggcacgcctc aggaaccac ctttagcccc catccctgcc ctcaccaga ccttgccttc 2940
 ctcctctgtc ccttcgtccc cagtccagac cacgcccttg agccaagctg tggccacacc 3000
 ttcccgtcgt tctgctgctg cagcggctgc cctggacctc agtgggaggc gtggctga 3058

5 <210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 7

Lys Val Arg Phe
 1

15 <210> 8
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

20 Arg Ala Arg Ala
 1

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión oncolítico del virus del herpes simple modificado,
 en donde el virus del herpes simple modificado es un virus del herpes simple deficiente para un gen γ_1 34.5,
 5 en donde el vector comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína GADD34 truncada codificada por SEQ ID NO: 2, en donde dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a una secuencia de control de expresión.
2. El vector de expresión oncolítico de la reivindicación 1, en donde la secuencia de nucleótidos comprende la SEQ
 10 ID NO: 2.
3. El vector de expresión oncolítico de la reivindicación 1, en donde la secuencia de control de la expresión comprende un promotor nestina o una porción biológicamente activa del mismo.
- 15 4. El vector de expresión oncolítico de la reivindicación 3, en donde la secuencia de control de expresión comprende SEQ ID NO: 3 o una variante degenerada de la misma.
5. El vector de expresión oncolítico de la reivindicación 4, en donde la secuencia de nucleótidos comprende la SEQ
 20 ID NO: 6.
6. Un vector de expresión del virus del herpes simple modificado oncolítico para su uso en el tratamiento de células
 tumorales intracraneales en un sujeto,
 en donde el virus del herpes simple modificado es un virus del herpes simple deficiente para un gen γ_1 34.5
 en donde dicho vector de expresión oncolítico comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de
 25 nucleótidos que codifica la proteína GADD34 truncada codificada por SEQ ID NO: 2, en donde dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a una secuencia de control de expresión.
7. El vector de expresión oncolítico para su uso de la reivindicación 6, en donde el vector de expresión oncolítico es
 el vector de expresión oncolítico de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
 30
8. El vector de expresión oncolítico para su uso de la reivindicación 7, en donde la secuencia de control de la
 expresión comprende la SEQ ID NO: 3.
9. El vector de expresión oncolítico para su uso de la reivindicación 8, en donde la secuencia de nucleótidos
 35 comprende la SEQ ID NO: 6.
10. El vector de expresión oncolítico para su uso de la reivindicación 6, en donde las células tumorales comprenden
 una célula de glioblastoma.
- 40 11. El vector de expresión oncolítico para su uso de la reivindicación 6, en donde las células tumorales comprenden una célula madre cancerosa.
12. El vector de expresión oncolítico para su uso de la reivindicación 6, en donde el sujeto es un mamífero.
- 45 13. El vector de expresión oncolítico para su uso de la reivindicación 6, en donde el sujeto es un ser humano.
14. El vector de expresión oncolítico para su uso de la reivindicación 6 en donde el tratamiento comprende además
 la etapa de mezclar un vehículo farmacológicamente aceptable con el vector de expresión oncolítico antes de
 introducir el vector en el sujeto.
 50
15. El vector de expresión oncolítico para su uso de la reivindicación 6 en donde el vector de expresión es un vector
 oHSV1 y en donde el tratamiento comprende el uso del vector en combinación con temozolomida.

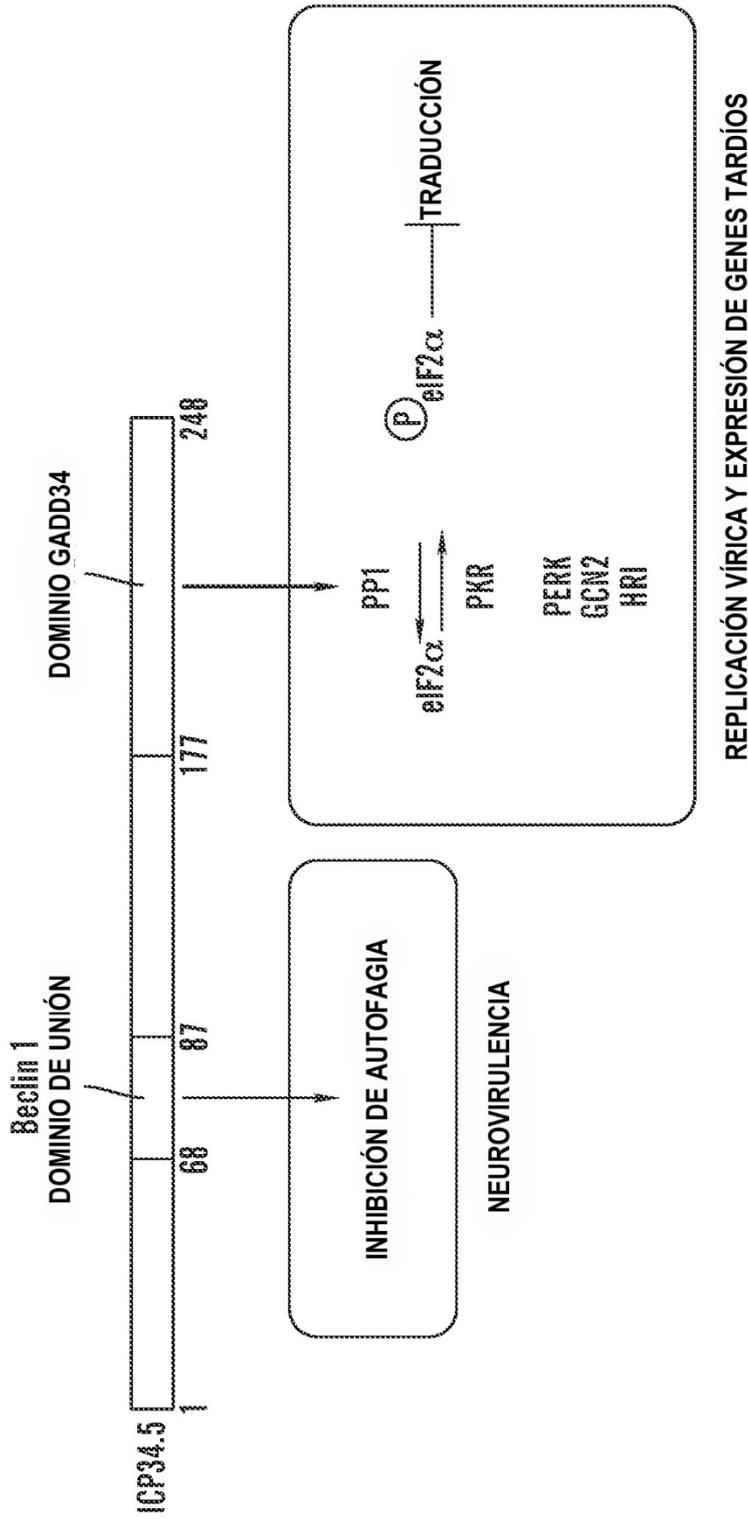


FIG. 1A

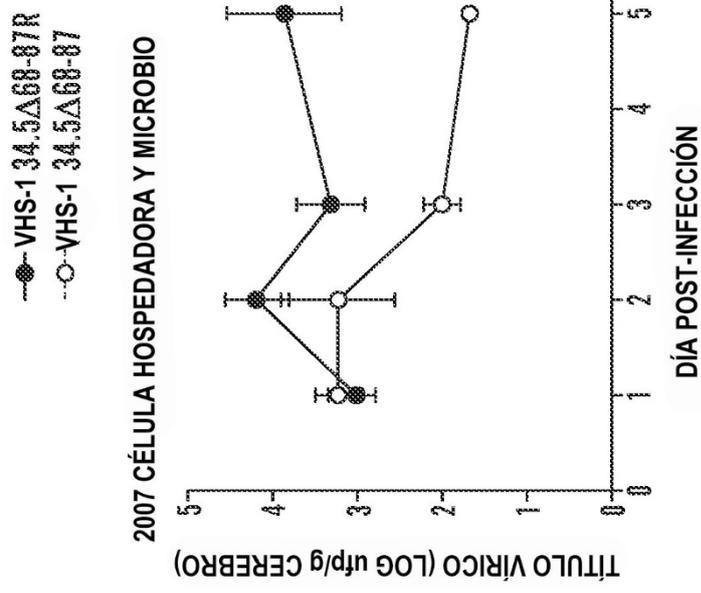


FIG. 1C

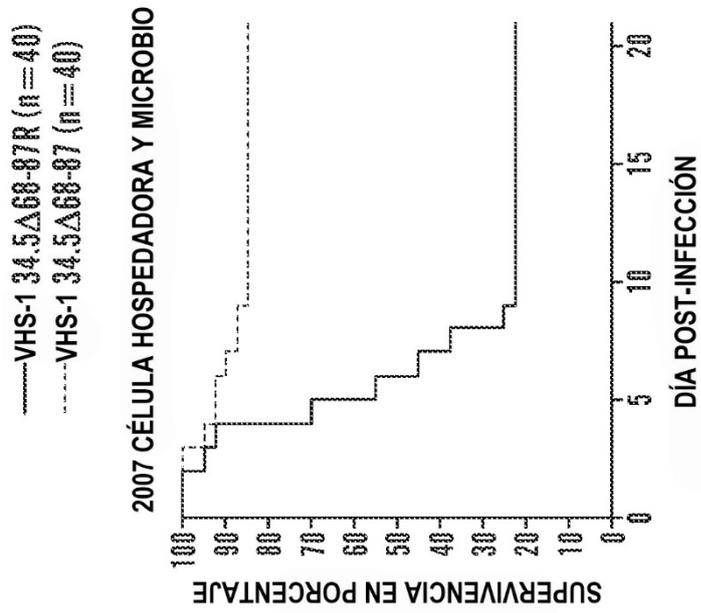


FIG. 1B

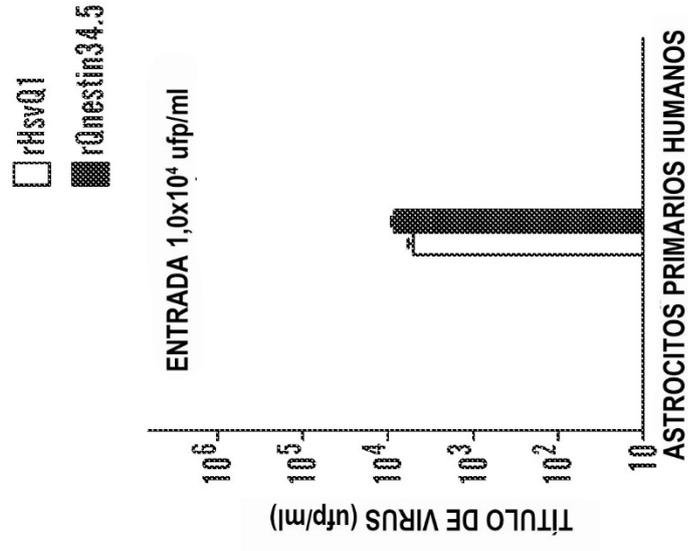


FIG. 1E

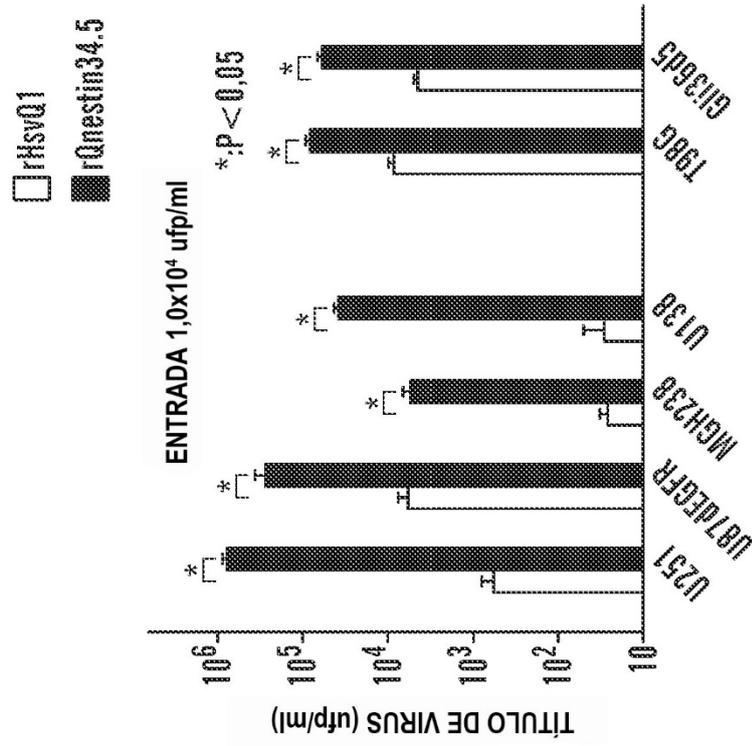


FIG. 1D

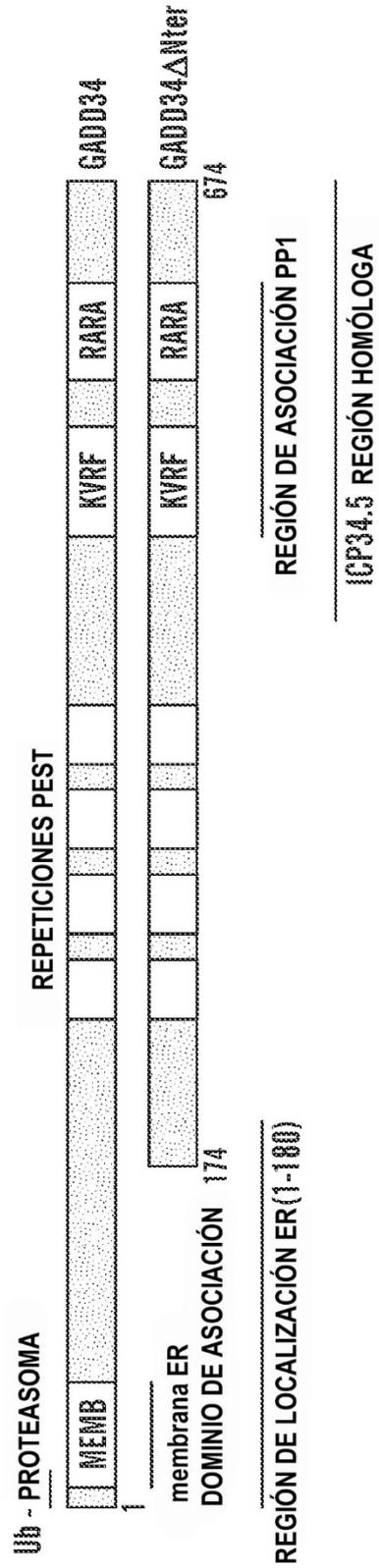


FIG. 2

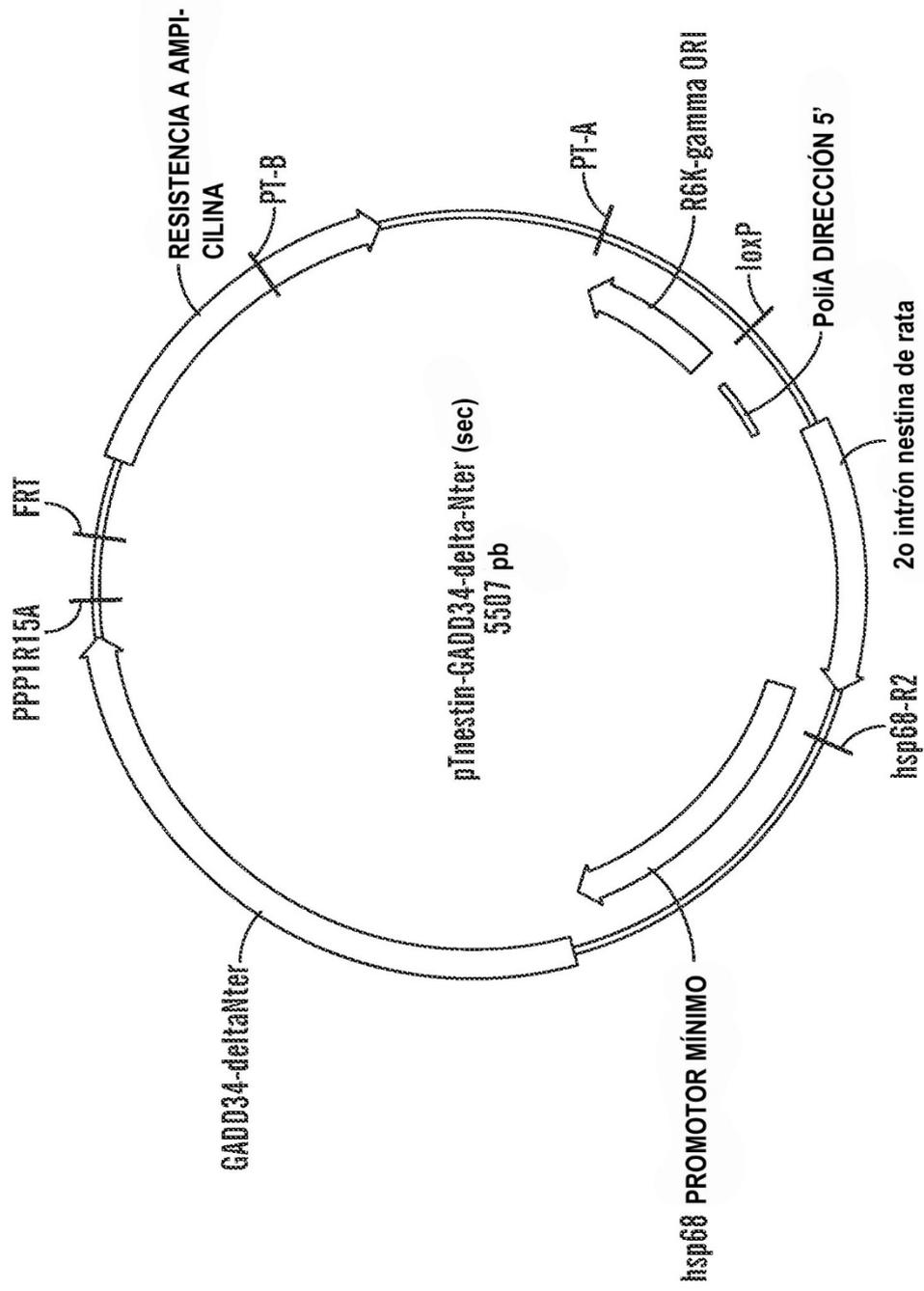


FIG. 3

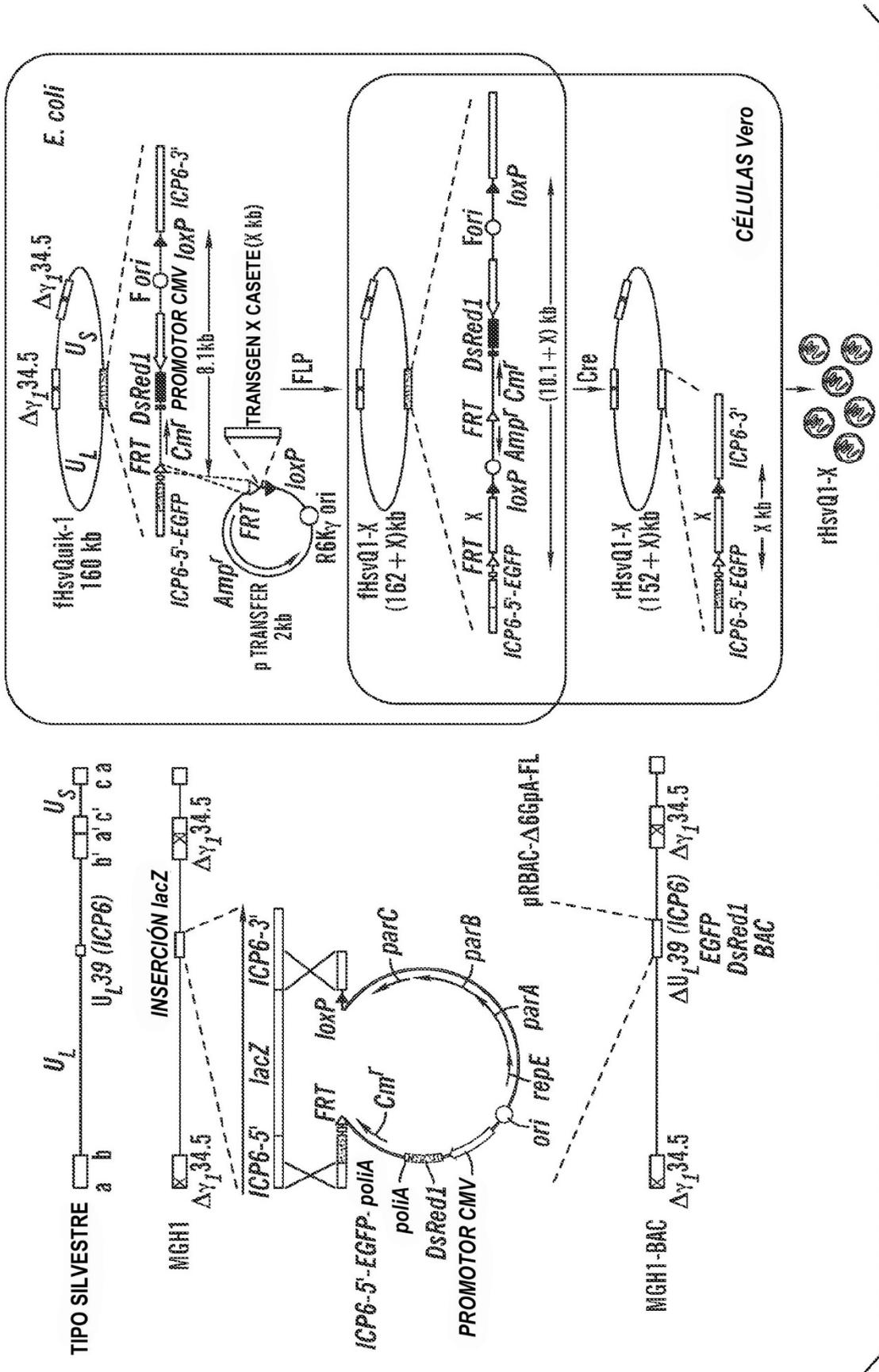


FIG. 4A

CONSTRUCCIONES oHSV1 USANDO EL SISTEMA HSVQuik

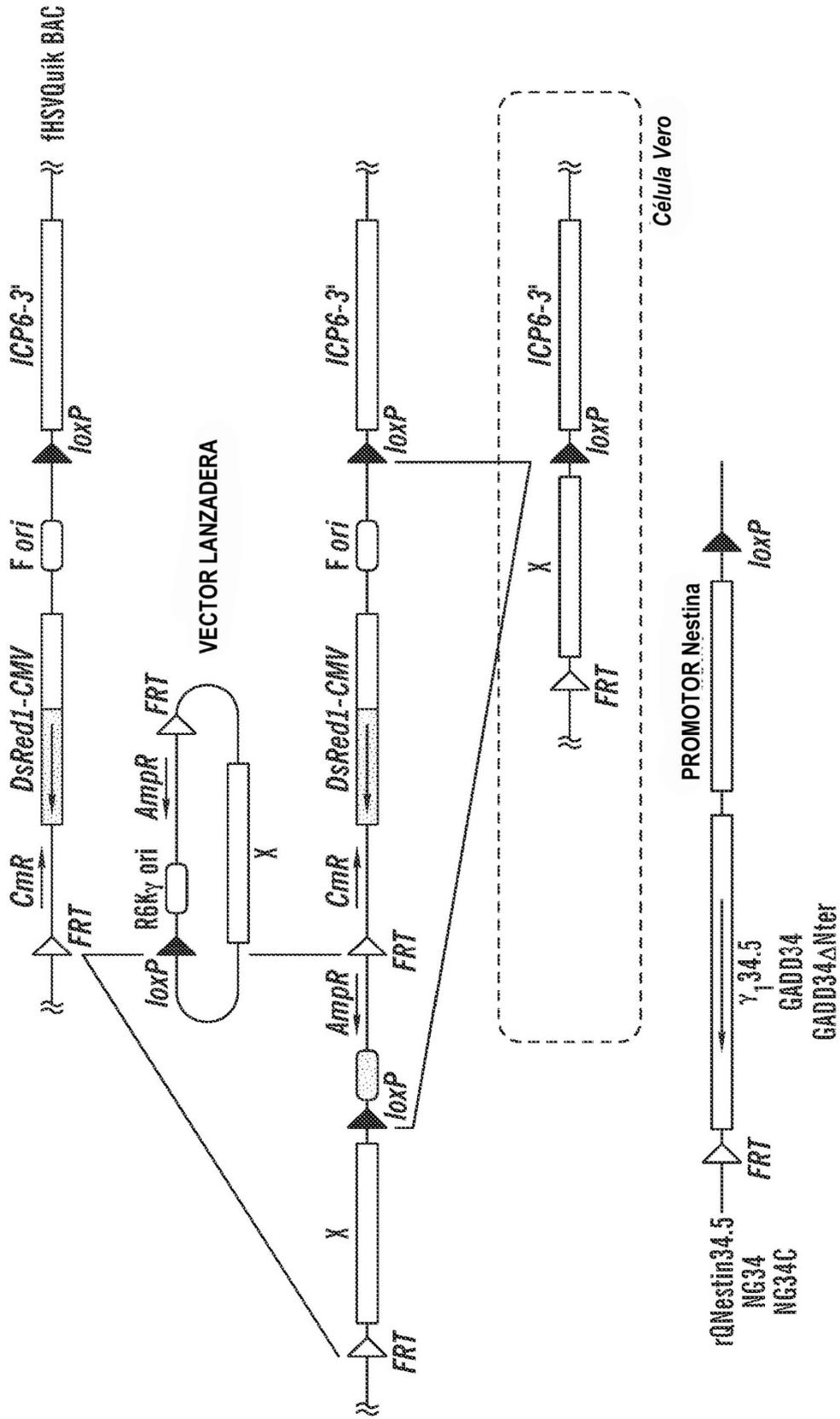


FIG. 4B

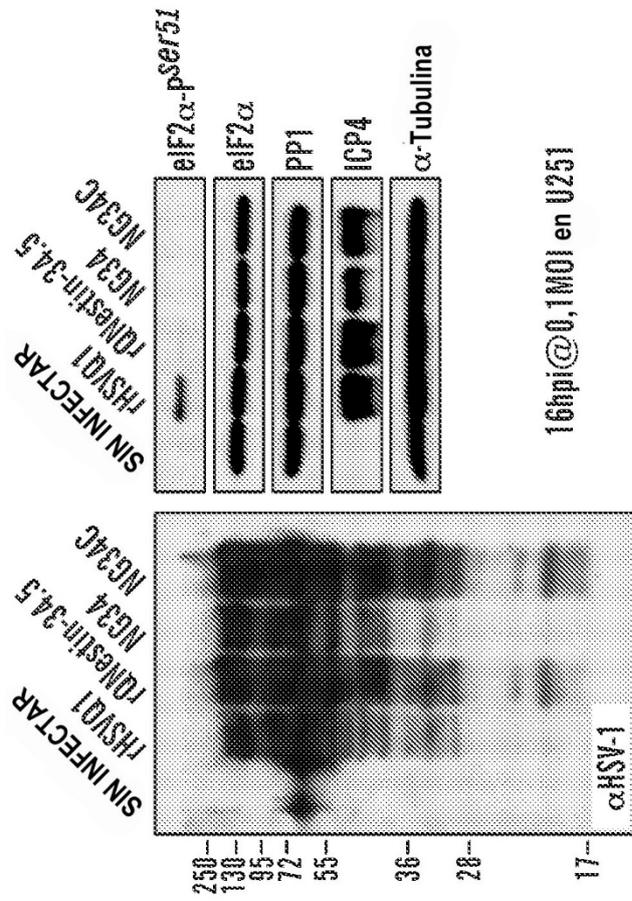


FIG. 5A

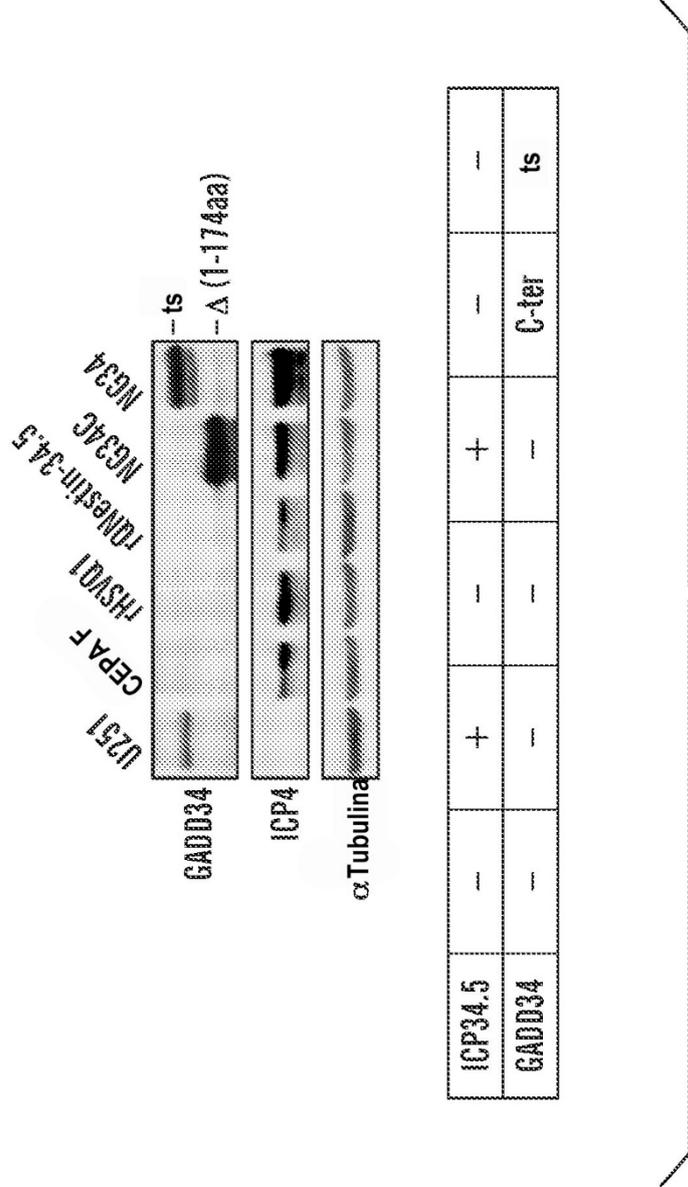


FIG. 5B

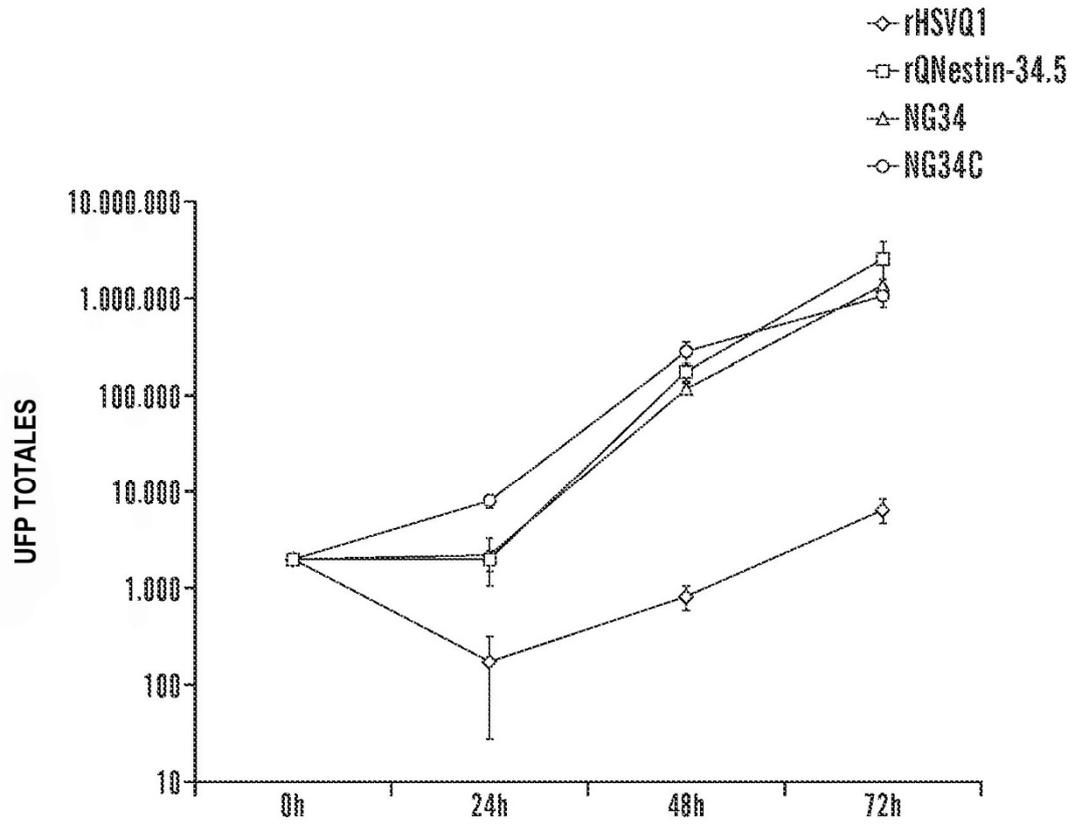


FIG. 6A

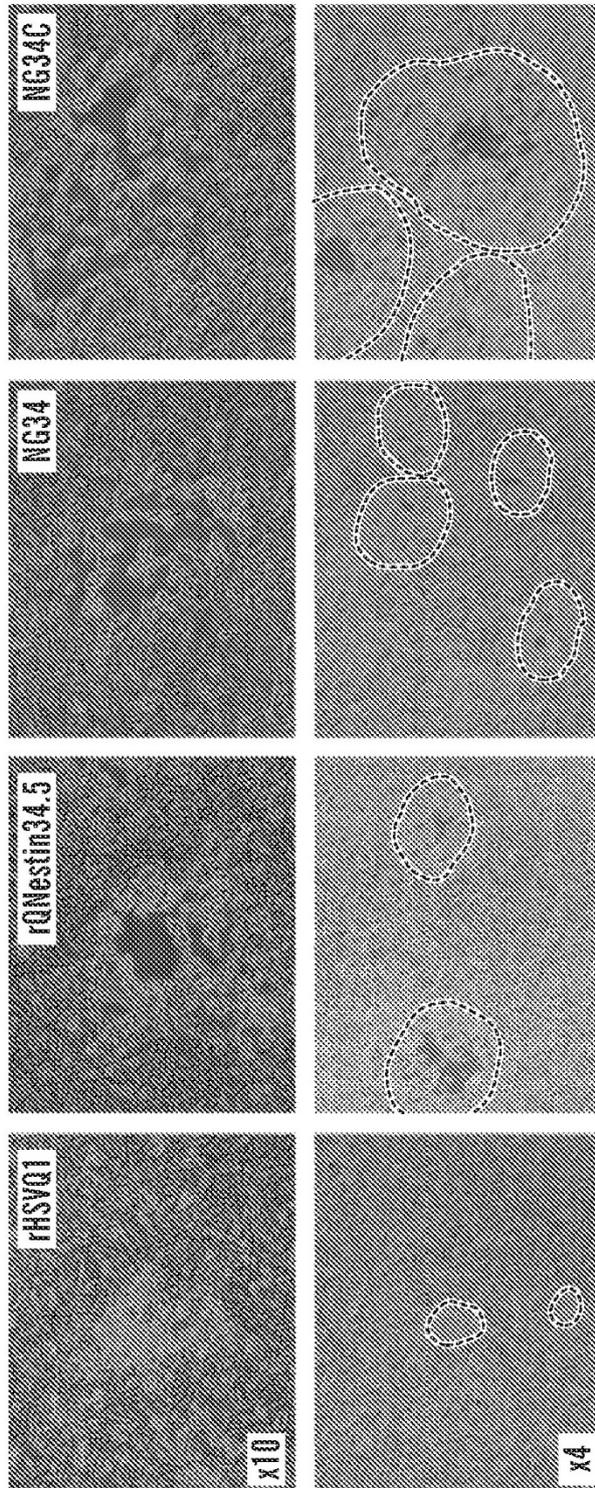


FIG. 6B

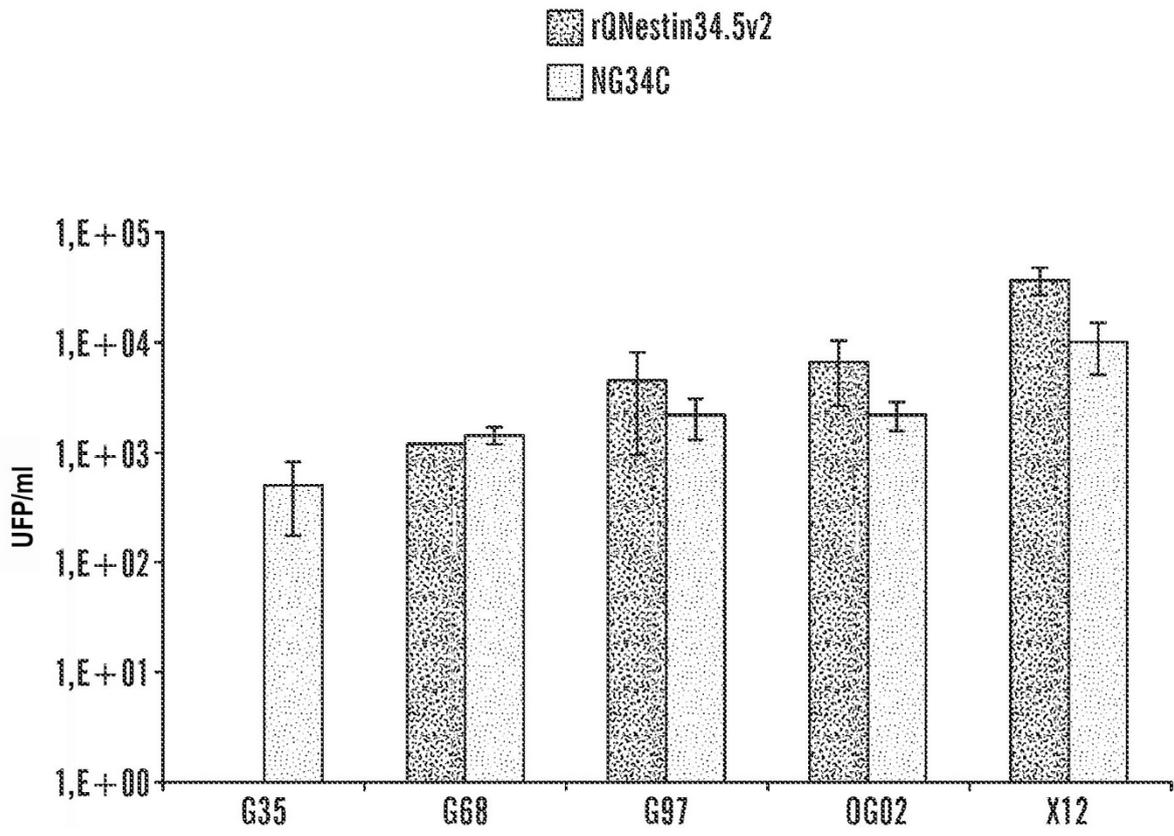


FIG. 7

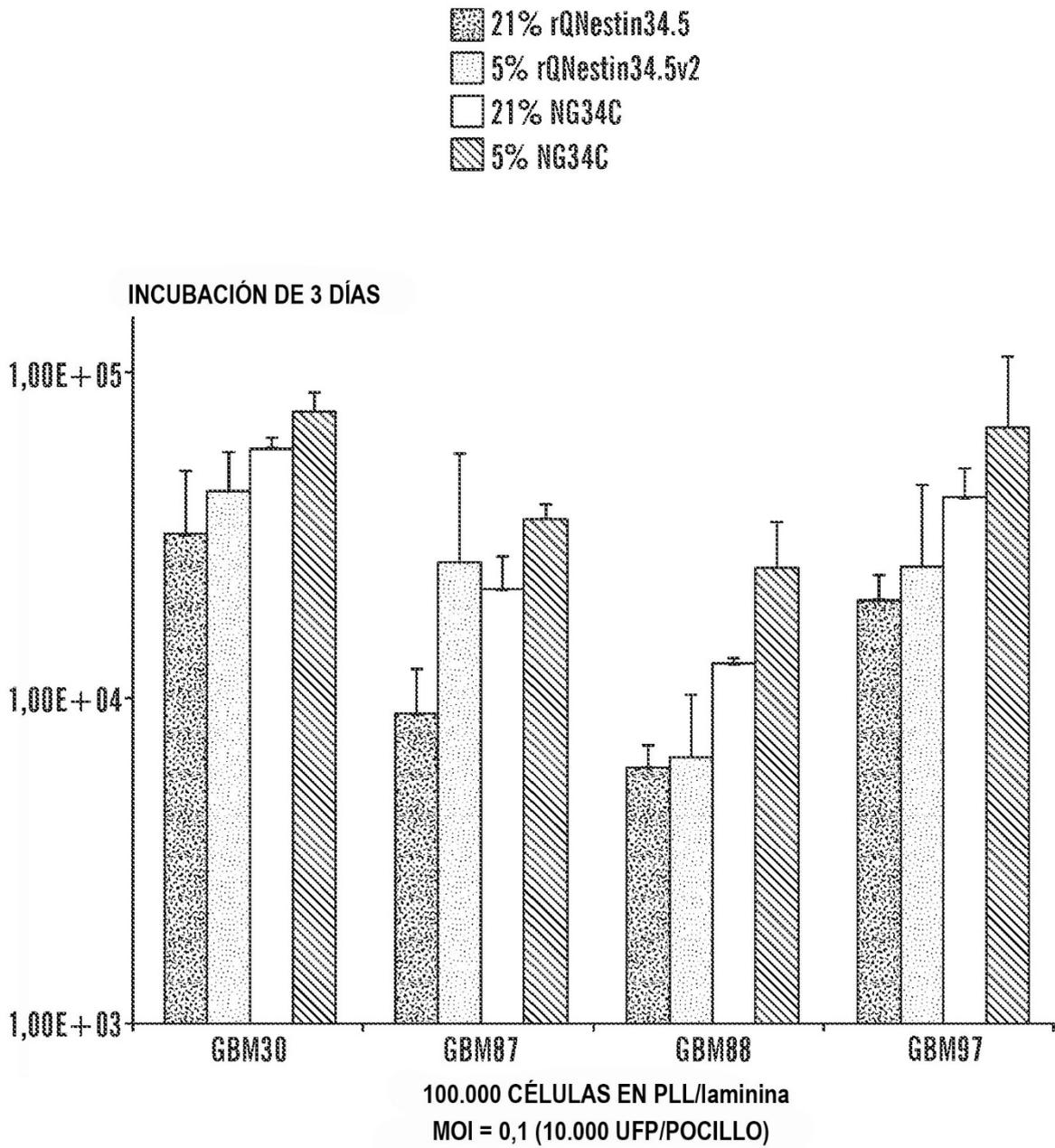


FIG. 8

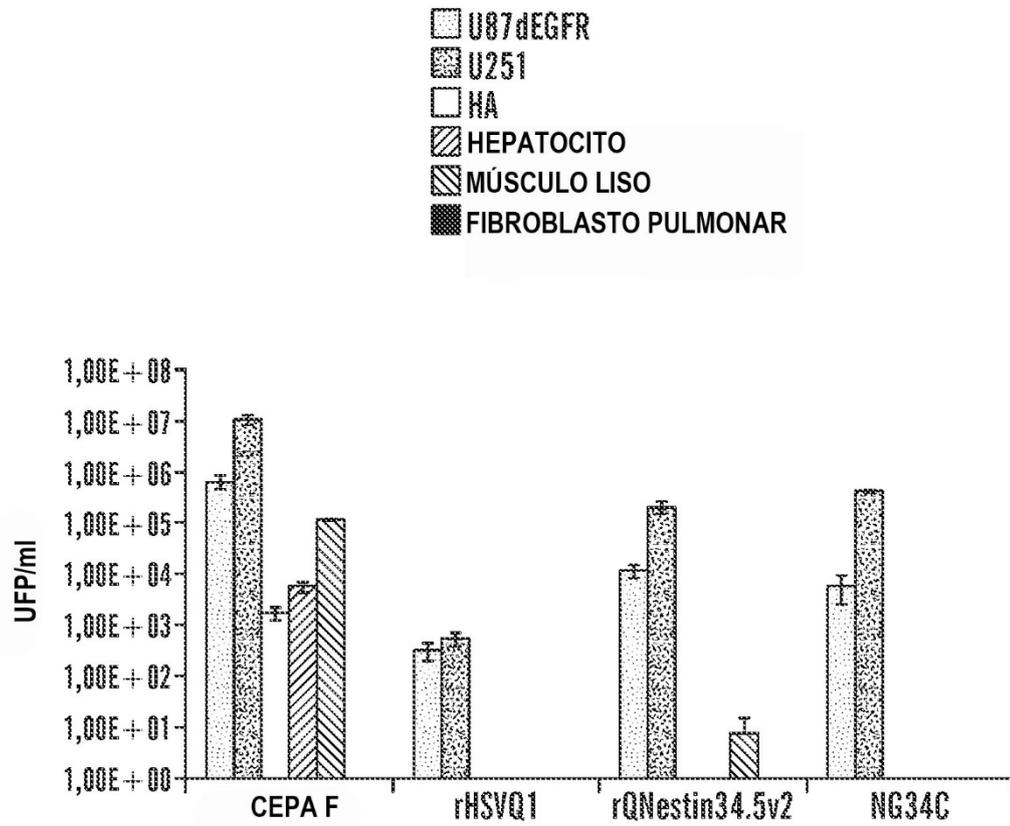


FIG. 9

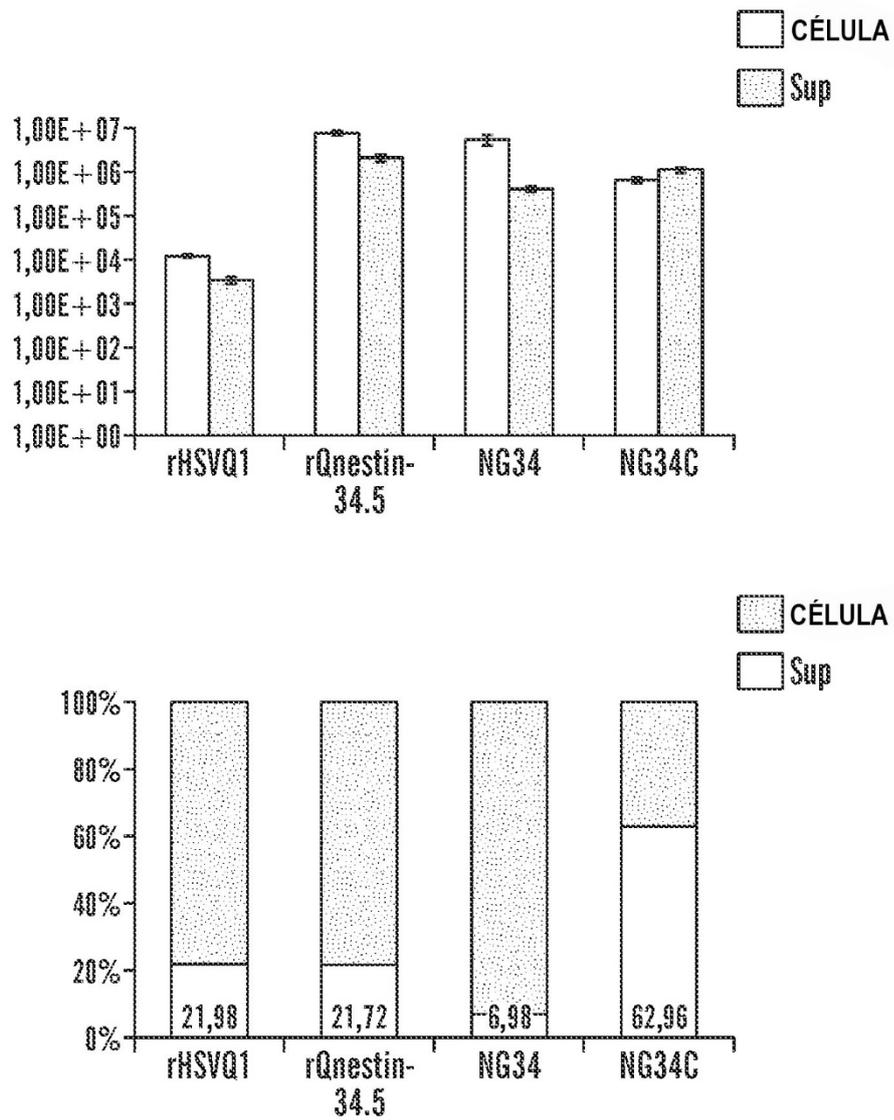


FIG. 10

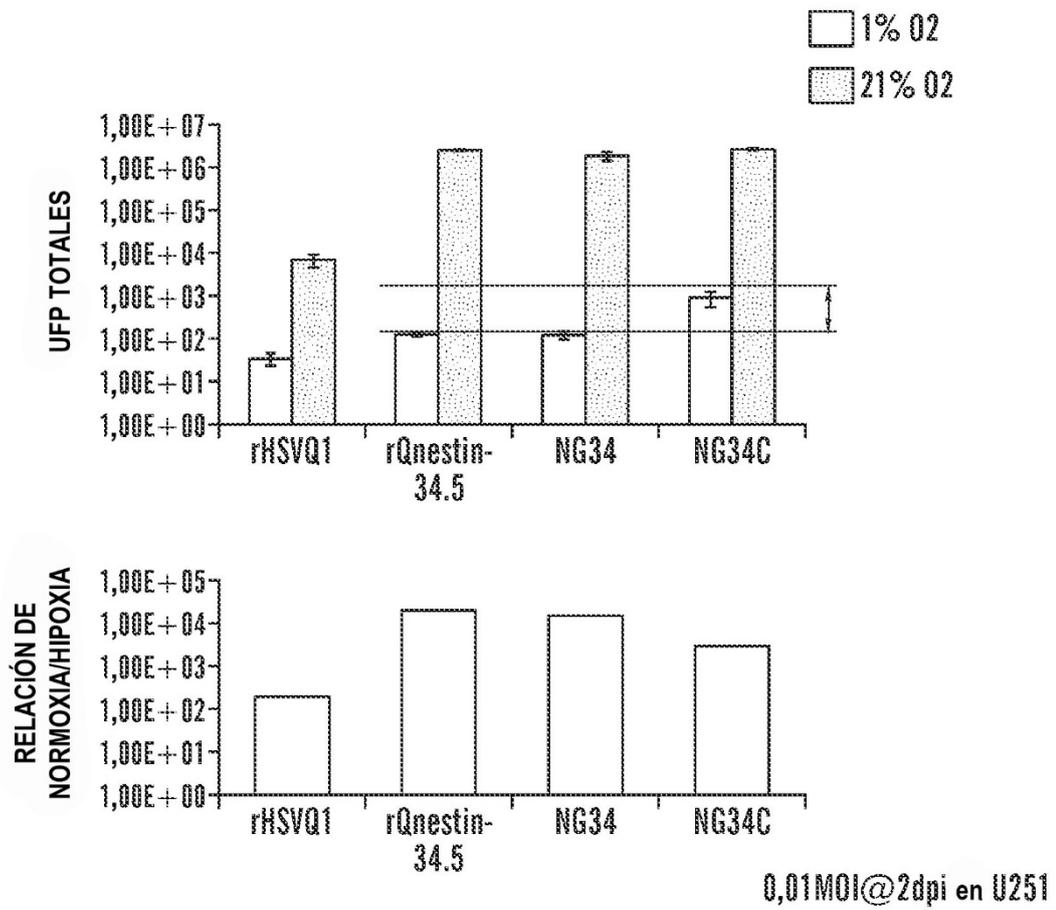


FIG. 11

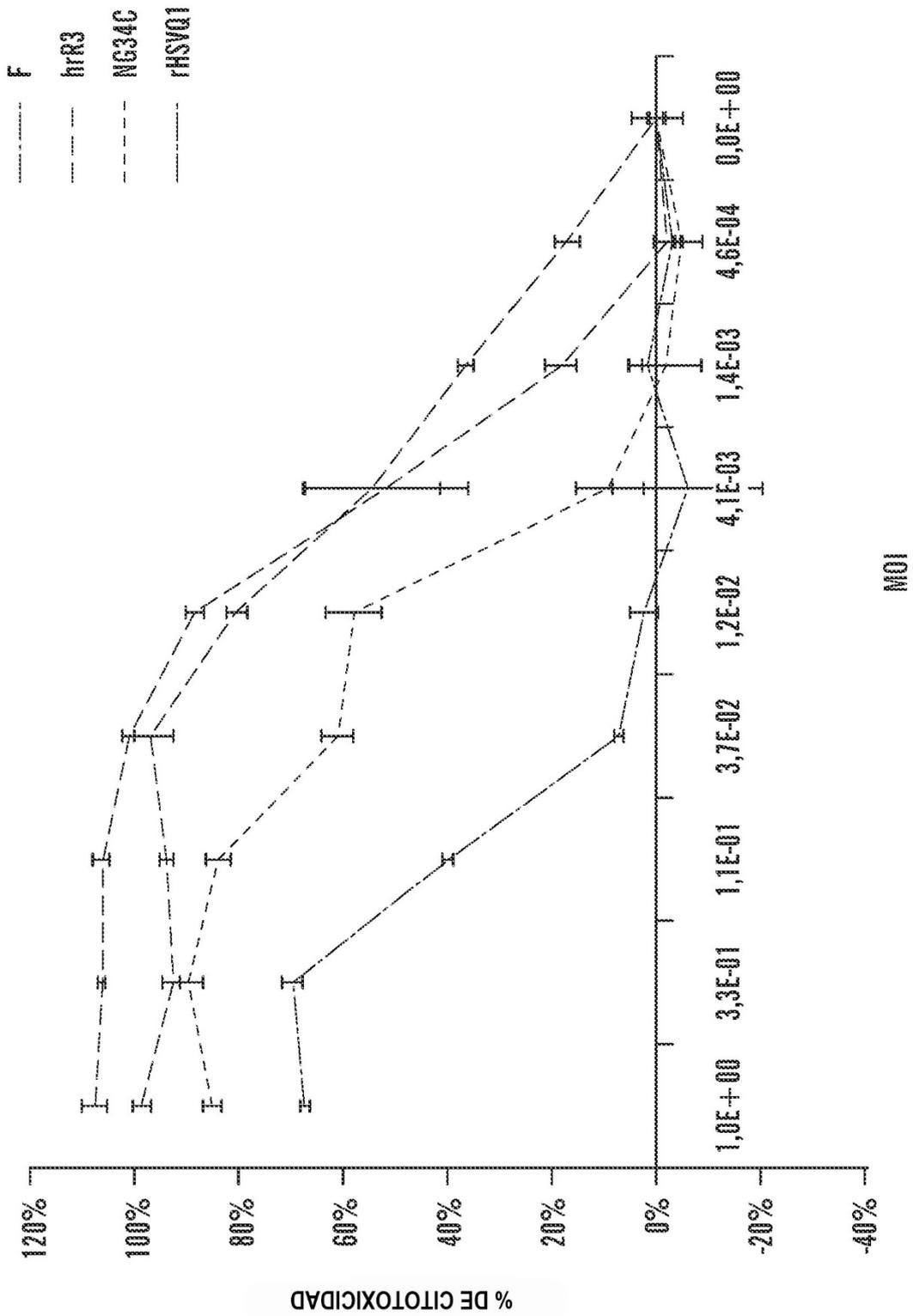
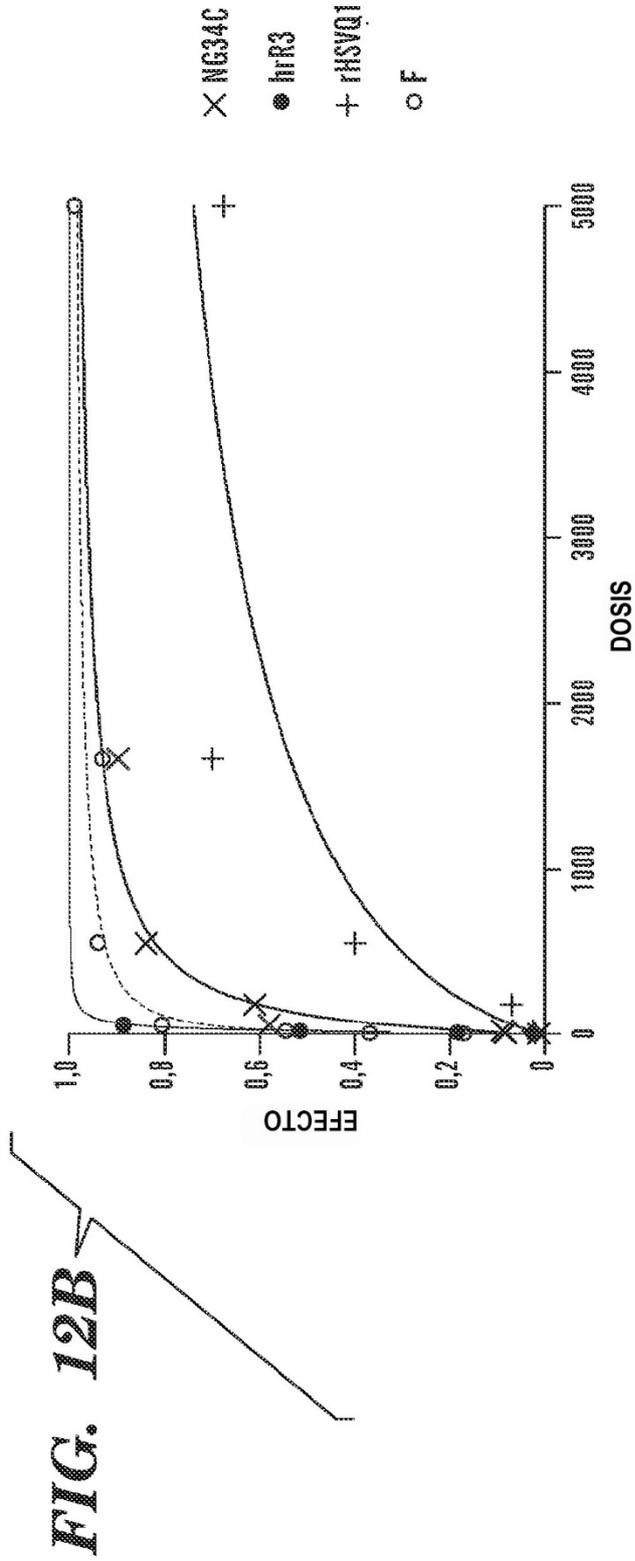


FIG. 12A



Virus	Dm (MOI)	m	r
rHSVQ1	0,27	0,81791 +/- 0,118724	0,96035
rQnes34.5	0,0147	0,72936 +/- 0,088548	0,95851
NG34	0,00779	0,60942 +/- 0,032661	0,99149
NG34C	0,0233	0,97500 +/- 0,101319	0,97405
hrR3	0,00375	1,73104 +/- 0,081637	0,99778
Cepa F	0,00311	0,70743 +/- 0,060976	0,98193

Línea celular U87ΔEGFR(TMZ ED₃₀)

rHSVQ1 (MOI)	OV (%)	OV+TMZ (%)	IC*	Símbolo	Descripción
1,0	67,58	76,95	0,946	±	Casi aditivo
0,33	69,86	74,70	0,459	+++	Sinergia
0,11	40,08	57,71	0,565	+++	Sinergia
0,037	7,03	34,51	1,008	±	Casi aditivo

rQNes34.5 (MOI)	OV (%)	OV+TMZ (%)	IC*	Símbolo	Descripción
0,33	76,8	84,7	0,344	+++	Sinergia
0,11	64,4	76,5	0,363	+++	Sinergia
0,037	39,6	64,4	0,525	+++	Sinergia
0,012	24,3	60,0	0,558	+++	Sinergia
0,0041	12,5	57	0,607	+++	Sinergia

*IC: índice de combinación

FIG. 13A

NG34C (MOI)	OV (%)	OV+TMZ (%)	IC*	Símbolo	Descripción
0,33	89,71	99,22	0,103	++++	Sinergia fuerte
0,11	83,79	95,97	0,204	++++	Sinergia fuerte
0,037	61,05	89,03	0,240	++++	Sinergia fuerte
0,012	58,01	58,03	0,668	+++	Sinergia
0,0041	9,08	41,16	0,804	++	Sinergia moderada
0,00137	8,28	30,88	0,974	±	Casi aditivo

NG34 (MOI)	OV (%)	OV+TMZ (%)	IC*	Símbolo	Descripción
1,0	85,7	86,6	0,752	++	Sinergia moderada
0,33	76,8	84,7	0,389	+++	Sinergia
0,11	64,4	84,8	0,196	++++	Sinergia fuerte
0,037	39,6	72,1	0,371	+++	Sinergia
0,012	24,3	76,1	0,228	++++	Sinergia fuerte
0,0041	12,5	64,0	0,433	+++	Sinergia

FIG. 13B

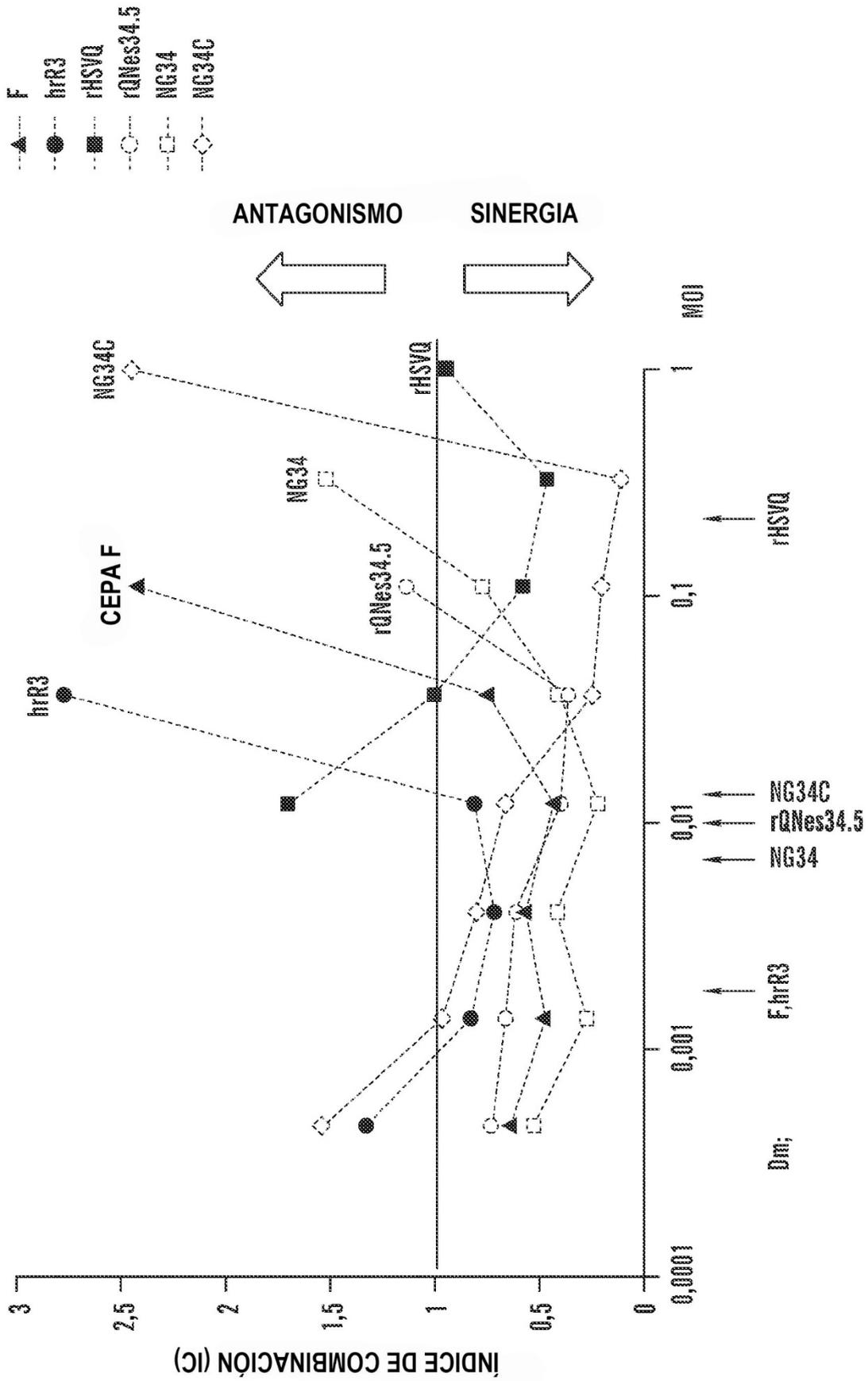
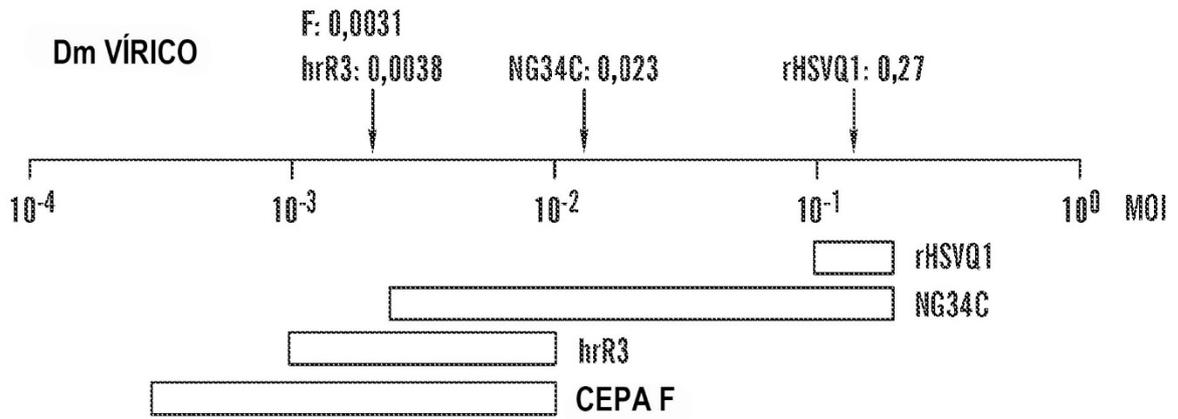


FIG. 13C



INTERVALO QUE MUESTRA EFECTOS SINERGICOS
CARACTERÍSTICAS VÍRICAS Dm (MOI) MOI ÍNDICES DE COMBINACIÓN

CARACTERÍSTICAS VÍRICAS	Dm (MOI)	MOI	ÍNDICES DE COMBINACIÓN
CEPA F	SILVESTRE	0,00311	0,00046-0,012 0,429-0,584
hrR3	ΔICP6	0,00375	0,00137-0,012 0,719-0,821
NG34C	ΔICP6, ΔICP34.5, + GADD34(Δ1-173aa)	0,0233	0,0041-0,33 0,103-0,804
rHSVQ	ΔICP6, ΔICP34.5	0,27	0,11-0,33 0,459-0,565

FIG. 13D