

ARN DEL REPLICÓN-LNP ONCOLÍTICO SINTÉTICO Y
USOS PARA LA INMUNOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER

SOLICITUD RELACIONADA

5 La presente solicitud reivindica prioridad según 35 U.S.C. § 119 (e) de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Número de Serie 62/815,611, presentada el 8 de marzo de 2019, cuyo contenido completo se incorpora aquí por referencia.

ANTECEDENTES

10 La presente divulgación se relaciona con virus oncolíticos sintéticos que comprenden una nanopartícula lipídica que comprende uno o más tipos de lípidos y un ARN del replicón autoamplificador que comprende una secuencia que codifica una molécula inmunomoduladora.

RESUMEN DE LA INVENCION

15 La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el descubrimiento inesperado de que tras la inyección en el sitio de un tumor, un virus oncolítico sintético desencadena con éxito la respuesta inmunitaria anticancerígena de los tumores locales y permite la inmunidad sistémica contra los tumores distales.

20 Por consiguiente, un aspecto de la presente divulgación proporciona un virus oncolítico sintético que comprende una nanopartícula lipídica que comprende uno o más tipos de lípidos y un ARN del replicón autoamplificador que comprende una secuencia que codifica una molécula de interleucina (IL)-12. La nanopartícula lipídica es capaz de desencadenar la muerte celular inmunogénica. La molécula de IL-12 se expresa mediante el
25 ARN del replicón autoamplificador.

 El virus oncolítico sintético comprende una nanopartícula lipídica. La nanopartícula lipídica comprende uno o más tipos de lípidos. En algunas realizaciones, el uno o más tipos de lípidos comprenden un lípido catiónico. En algunas realizaciones, el lípido catiónico es N1, N3, N5-tris(3-(didodecilamino)propil) benceno-1,3,5-tricarboxamida (TT3). En algunas
30 realizaciones, la nanopartícula lipídica comprende TT3, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), colesterol y C14-PEG2000.

 Además, el virus oncolítico sintético comprende un ARN del replicón autoamplificador. En algunas realizaciones, el ARN autoamplificado se deriva de un alfavirus u otros virus del Grupo IV (virus ARN monocatenarios positivos, como el virus de la

hepatitis C (VHC)). En algunas realizaciones, el alfavirus puede ser el virus de la encefalitis equina de Venezuela, el virus del bosque de Semliki o el virus de Sindbis.

En algunas realizaciones, el ARN del replicón autoamplificador comprende una secuencia que codifica una molécula de IL-12. En algunas realizaciones, la secuencia que
5 codifica la molécula de IL-12 está ubicada en una región subgenómica del ARN del replicón autoamplificador.

En algunas realizaciones, el ARN del replicón autoamplificador comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 90 % idéntica al ARN del replicón de tipo salvaje (TS) que tiene una secuencia de SEC ID NO: 1. En algunas realizaciones, el ARN del
10 replicón autoamplificador no es idéntico a la SEC ID NO: 1 y es capaz de expresar la molécula de IL-12 a un nivel más alto en comparación con el ARN del replicón autoamplificador que comprende la SEC ID NO: 1. En algunas realizaciones, el ARN del replicón que es capaz de expresar la molécula de IL-12 a un nivel superior comprende mutaciones puntuales de G3936C y/o A4758G de la SEC ID NO: 1.

15 En algunas realizaciones, el ARN del replicón autoamplificador comprende además una secuencia codificante de albúmina sérica. En algunas realizaciones, el ARN del replicón autoamplificador comprende además una secuencia codificante de Lumican.

En algunos aspectos, el ARN del replicón autoamplificador comprende una secuencia que codifica una molécula de IL-12. En algunas realizaciones, la molécula de IL-12 se
20 selecciona del grupo que consiste en IL-12, una subunidad de IL-12 o una molécula de IL-12 mutante que retiene la función inmunomoduladora. En algunas realizaciones adicionales, la molécula de IL-12 comprende subunidades de IL12 α y/o IL12 β .

En algunas realizaciones, la nanopartícula lipídica tiene un diámetro de aproximadamente 100-120 nm. En algunas realizaciones, la nanopartícula lipídica tiene un
25 potencial zeta de aproximadamente 3-6 mv.

En algunas realizaciones, el lípido y el ARN del replicón autoamplificador tienen una relación de masa de aproximadamente 1:2 a 2:1.

La presente divulgación, al menos en parte, se relaciona con una composición farmacéutica, que comprende el virus oncolítico sintético y un vehículo farmacéuticamente
30 aceptable.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para inyección intratumoral.

La presente divulgación, al menos en parte, se relaciona con un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz

del virus oncolítico sintético de cualquiera de las composiciones farmacéuticas que contienen virus oncolítico sintético.

En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente humano que tiene o se sospecha que tiene cáncer. Cánceres objetivo de ejemplo incluyen, entre otros, melanoma, cáncer de mama y cáncer de colon.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra al sujeto en una sola dosis. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra al sujeto mediante inyección intratumoral.

También dentro de la presente divulgación se encuentran cualquiera de las composiciones farmacéuticas que contienen virus oncolíticos sintéticos que se describen en el presente documento para su uso en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades objetivo que se describen en el presente documento (por ejemplo, cáncer), así como composiciones farmacéuticas que comprenden el oligonucleótido oncolítico sintético para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la siguiente descripción. Otras características o ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de los siguientes dibujos y la descripción detallada de varias realizaciones, y también de las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A-1H son gráficas que muestran los efectos de las células B16F10 transfectadas con DOTAP, lipofectamina (Lipo), nanopartícula TT3 (TT3), ARN del replicón mutante (ARN), DOTAP, Lipo y nanopartícula TT3 que encapsulan ARN del replicón mutante (DOTAP-mtRep, Lipo-mtRep y TT3-mtRep), electroporación (Electro) y electroporación con ARN del replicón mutante (Electro-mtRep). La Figura 1A es un gráfico que muestra la viabilidad de las células B16F10 3 días después de la transfección. La Figura 1B es un gráfico que muestra la expresión de GFP en células B16F10 transfectadas con nanopartículas lipídicas encapsuladas con ARN del replicón mutante o muerto (deRep). La Figura 1C es un gráfico que muestra los porcentajes de células B16F10 muertas anexina V+ PI+ transfectadas con nanopartículas lipídicas o con nanopartículas lipídicas encapsuladas con ARN del replicón. La muerte celular inmunogénica inducida por nanopartículas lipídicas o con nanopartículas lipídicas encapsuladas con ARN del replicón, se mostró mediante el porcentaje de células calreticulina+ (CRT+) (Figura 1D), ATP extracelular (Figura 1E) y liberación de HMGB1 (Figura 1F). La Figura 1G muestra el diámetro de las nanopartículas

lipídicas y las nanopartículas lipídicas cargadas con ARN del replicón mutante. La Figura 1H muestra el potencial zeta de las nanopartículas lipídicas y las nanopartículas lipídicas cargadas con ARN del replicón mutante.

Las Figuras 2A-2J son gráficas que muestran que mtRep y deRep activan la señalización de TLR3 e inducen el complejo ISGF3 a la muerte celular necrótica. El ARN del replicón-LNP desencadena la señalización de TLR3 (Figura 2B y Figura 2E) y activa la expresión de genes estimulados por interferón Stat 1, Stat2, IRF9, IRF3 y cGAS (Figuras 2F-2J), pero no activa TLR2 (Figura 2A), TLR7 (Figura 2C) o TLR9 (Figura 2D).

La Figura 3A-3K son gráficas que muestran que TT3-mtRep recluta células inmunes y retrocede el crecimiento tumoral. La Figura 3A muestra mtRep que recluta más granulocitos Ly6clo Ly6G+ 3 días después de la inyección. La Figura 3B muestra los porcentajes de células mCherry+ en células CD45+ y CD45- en tumores inyectados con TT3-mtRep 3 días después de la inyección. La Figura 3C muestra la expresión del complejo ISGF3 (Stat1/Stat2/IRF9) así como de IRF3 y cGAS 1 día después de la inyección de TT3-mtRep. Las Figuras 3D-3F muestra la infiltración de células inmunes (granulocitos, M-MDSC, monocitos, macrófagos, CD4 T, CD8 T, NK, NKT, DC1 convencional (cDC1) y DC2 convencional (cDC2)) en el tumor en el día 1 (Figura 3D) y en el día 3 (Figura 3E) después de una inyección de TT3-mtRep y en el día 1 después de 3 inyecciones secuenciales (Figura 3F) de TT3-mtRep. Las Figuras 3G-3H muestran que TT3-mtRep induce más muerte celular (Figura 3G), más infiltración de células inmunitarias (Figura 3H), peso tumoral reducido (Figura 3I), área tumoral (Figura 3J) y expresión aumentada de CCL5 (Figura 3K) un día después de 3 inyecciones secuenciales de TT3-mtRep.

Las Figuras 4A-4G son gráficas que muestran TT3-mtRep que codifica IL12-MSA o IL12-MSA-Lumican que modula eficazmente los microambientes tumorales y la infiltración de células inmunes. Las Figuras 4A y 4B muestran la cuantificación de IFN α 2 por ELISA en tumor (Figura 4A) y en suero (Figura 4B) un día y tres días después de la inyección de TT3-mtRep. La Figura 4C muestra que las células B16F10 transfectadas con mtRep-IL12-MSA y mtRep-IL12-MSA-Lumican pueden producir IL-12. La Figura 4D muestra el nivel de IL-12 en tumor un día y tres días después de la inyección única de TT3-mtRep, TT3-mtRep-IL12-MSA o TT3-mtRep-IL12-MSA-lumican. La Figura 4E-4F muestra la infiltración de células inmunes en tumor un día (Figura 4E) y tres días (Figura. 4F) después de la inyección única de TT3-mtRep, TT3-mtRep-IL12-MSA o TT3-mtRep-IL12-MSA-lumican. La Figura 4G muestra números de DC1 convencional (cDC1) en ganglio linfático que drena el tumor un día

y tres días después de la inyección única de TT3-mtRep, TT3-mtRep-IL12-MSA o TT3-mtRep-IL12-MSA-lumican.

Las Figuras 5A-5E son gráficas que muestran efectos anticancerígenos sinérgicos in vivo de la IL12 inmunomoduladora y la muerte celular inmunogénica inducida por TT3-mtRep. Los efectos anticancerígenos sinérgicos se evaluaron mediante cambios de peso corporal (Figura 5A), IFN γ en suero (Figura 5B), área tumoral (Figura 5C) y curva de supervivencia (Figura 5D). La Figura 5E muestra que el tratamiento con TT3-mtRep-IL12 puede prevenir la recurrencia del tumor en ratones curados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el descubrimiento inesperado de que tras la inyección en el sitio del tumor, un virus oncolítico sintético que comprende una nanopartícula lipídica que comprende uno o más tipos de lípidos y un ARN del replicón autoamplificador que comprende una secuencia que codifica una molécula de IL-12 activa con éxito la respuesta inmune anticancerígena de tumores locales y permite la inmunidad sistémica contra tumores distales.

I. Virus oncolítico sintético

La presente divulgación, al menos en parte, se relaciona con un virus oncolítico sintético. Como se usa en el presente documento, el término “sintético” se refiere a un virus oncolítico no natural o manipulado como se divulga en el presente documento, que incluye una nanopartícula lipídica y un ARN del replicón autoamplificador que comprende una secuencia que codifica una molécula de IL-12.

En algunos aspectos, la presente divulgación se relaciona con la utilización de nanopartículas lipídicas (LNP), que son capaces de inducir la muerte celular inmunogénica por sí mismas, para facilitar la administración de un agente biológicamente activo (por ejemplo, un ARN del replicón autoamplificador que codifica una molécula de IL-12)) en las células tumorales.

(i) *Nanopartícula lipídica*

La presente divulgación, al menos en parte, se relaciona con el suministro de moléculas biológicamente activas a células que utilizan nanopartículas lipídicas.

Específicamente, la invención se refiere a un virus oncolítico sintético que comprende IL-12 que expresa ARN del replicón autoamplificador encapsulado por nanopartículas lipídicas, la composición del mismo y métodos de uso del virus oncolítico sintético y la composición del

mismo para tratar a un sujeto que tiene cáncer o se sospecha que tiene cáncer.

Una nanopartícula lipídica (LNP), como se usa en el presente documento, se refiere a una vesícula, tal como una vesícula esférica, que tiene una bicapa lipídica contigua. Las nanopartículas lipídicas se pueden usar en métodos mediante los cuales se administran terapias farmacéuticas a lugares específicos. Ejemplos no limitantes de LNP incluyen liposomas, bolaanfílos, nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), portadores de lípidos nanoestructurados (NLC) y estructuras de membranas monocapa (por ejemplo, arqueosomas y micelas).

La nanopartícula lipídica, como se usa en el presente documento, comprende uno o más tipos de lípidos. Un lípido, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de compuestos orgánicos que incluyen, entre otros, ésteres de ácidos grasos y, en algunas realizaciones, se caracterizan por ser insolubles en agua, pero solubles en muchos disolventes orgánicos. Por lo general, se dividen en al menos tres clases: (1) “lípidos simples” que incluyen grasas y aceites, así como ceras; (2) “lípidos compuestos” que incluyen fosfolípidos y glicolípidos; (3) “lípidos derivados” como los esteroides. Ejemplos no limitantes de lípidos incluyen triglicéridos (por ejemplo, triestearina), diglicéridos (por ejemplo, bahenato de glicerol), monoglicéridos (por ejemplo, monoestearato de glicerol), ácidos grasos (por ejemplo, ácido esteárico), esteroides (por ejemplo, colesterol) y ceras (por ejemplo, palmitato de cetilo). En algunas realizaciones, el uno o más tipos de lípidos en la LNP comprende un lípido catiónico.

Un lípido catiónico, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de una serie de especies de lípidos que llevan una carga neta positiva a un pH seleccionado, como el pH fisiológico. Dichos lípidos incluyen, entre otros, N1,N3,N5-tris(3-(didodecilamino)propil)benceno-1,3,5-tricarboxamida (TT3), cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP); lipofectamina; 1,2-DiLinoleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-Dilineniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), dioctadecildimetilamonio (DODMA), Distearildimetilamonio (DSDMA), cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA); bromuro de N,N-distearil-N,N-dimetilamonio (DDAB); 3-(N—(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol (DC-Chol) y bromuro de amonio de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietil (DMRIE).

En algunas realizaciones, el lípido catiónico es TT3. TT3, como se usa en el presente documento, es capaz de formar nanopartículas lipídicas para el suministro de varios agentes activos biológicos en las células. Además, la presente divulgación también demuestra que un

TT3-LNP descargado puede inducir la muerte celular inmunogénica (ICD) en células cancerosas in vivo e in vitro. La muerte celular inmunogénica, como se describe en el presente documento, se refiere a una forma de muerte celular que puede inducir una respuesta inmunitaria eficaz a través de la activación de células dendríticas (DC) y la consiguiente

5 activación de la respuesta específica de células T. En algunas realizaciones, las células que sufren la muerte celular inmunogénica (ICD) son células tumorales. La muerte de las células tumorales inmunogénicas puede desencadenar una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz. En algunas realizaciones, el virus oncolítico sintético comprende TT3-LNP que encapsula un ARN del replicón autoamplificador que codifica sólo un gen indicador (TT3-LNP-ARN del

10 replicón). El ARN del replicón autoamplificador puede funcionar de forma sinérgica con TT3-LNP para inducir un mayor nivel de ICD en células tumorales en comparación con TT3-LNP solo. En otras realizaciones, el virus oncolítico sintético comprende un TT3-LNP que encapsula un ARN del replicón autoamplificador que codifica una molécula de IL-12. IL-12, que es una citocina inmunorreguladora, provoca una potente respuesta inmunitaria contra el

15 tumor local. Además, la combinación de TT3-LNP, ARN del replicón autoamplificador y expresión de IL-12, no solo es eficaz en la inhibición sinérgica de las células tumorales in situ, sino que también provoca una respuesta inmunitaria antitumoral sistémica para matar células tumorales distales y prevenir la recurrencia de tumores.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico es DOTAP. DOTAP, como se usa en el

20 presente documento, también es capaz de formar nanopartículas lipídicas. DOTAP se puede usar para la transfección altamente eficiente de ADN, incluidos los cromosomas de levadura artificial (YAC) en células eucariotas para la expresión génica transitoria o estable, y también es adecuado para la transferencia eficiente de otras moléculas cargadas negativamente, como ARN, oligonucleótidos, nucleótidos, complejos de ribonucleo-proteína (RNP) y proteínas en

25 muestras de investigación de células de mamíferos.

En otras realizaciones, el lípido catiónico es lipofectamina. La lipofectamina, como se usa en el presente documento, es un reactivo de transfección común, producido y vendido por Invitrogen, usado en biología molecular y celular. Se utiliza para aumentar la eficacia de transfección de ARN (incluidos ARNm y ARNip) o ADN plasmídico en cultivos celulares in

30 vitro mediante lipofección. La lipofectamina contiene subunidades lipídicas que pueden formar liposomas o nanopartículas lipídicas en un entorno acuoso, que atrapan la carga útil de transfección, por ejemplo, ARN del replicón autoamplificador. Los liposomas que contienen ARN (cargados positivamente en su superficie) pueden fusionarse con la membrana plasmática cargada negativamente de las células vivas, debido a la fusión mediadora del co-

lípidos neutros del liposoma con la membrana celular, lo que permite que las moléculas de carga de ácido nucleico se crucen en el citoplasma para la replicación o expresión.

En algunas realizaciones, las LNP se componen principalmente de lípidos catiónicos junto con otros ingredientes lipídicos. Estos incluyen normalmente otras moléculas lipídicas que pertenecen a, entre otros, la clase de fosfatidilcolina (PC) (por ejemplo, 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) y 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), esteroides (por ejemplo, colesterol) y conjugados de Polietilenglicol (PEG)-lipídicos (por ejemplo, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[folato (polietilenglicol)-2000 (DSPE-PEG2000) y 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietilenglicol)-2000 (C14-PEG2000)). La Tabla 1 muestra la formulación de dos LNP, TT3-LNP y DOTAP-LNP.

Tabla 1:

DOTAP-LNP Relación molar	DOTAP 40	DSPC 10	Colesterol 48	DSPE-PEG2000 2
TT3-LNP Relación molar	TT3 20	DOPE 30	Colesterol 40	C14-PEG2000 0,75

El tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas puede afectar la velocidad de liberación del fármaco, la biodistribución, la mucoadhesión, la absorción celular de agua y el intercambio de tampones hacia el interior de las nanopartículas y la difusión de proteínas. En algunas realizaciones, el diámetro de las LNP varía de 30 a 150 nm. En algunas realizaciones, el diámetro de las LNP varía entre 100 y 120 nm. En algunas realizaciones, el diámetro de las LNP puede ser 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 101 nm, 102 nm, 103 nm, 104 nm, 105 nm, 106 nm, 107 nm, 108 nm, 109 nm, 110 nm, 111 nm, 112 nm, 113 nm, 114 nm, 115 nm, 116 nm, 117 nm, 118 nm, 119 nm o 120 nm.

El potencial zeta es una medida de la carga eléctrica efectiva en la superficie de la nanopartícula lipídica. La magnitud del potencial zeta proporciona información sobre la estabilidad de las partículas. En algunas realizaciones, el potencial zeta de las LNP varía de -10 milivoltios (mv) a 25 mv. En algunas realizaciones, el potencial zeta de las LNP varía de 3-6 mv. En algunas realizaciones, el potencial zeta de las LNP puede ser 3 mv, 3,1 mv, 3,2 mv, 3,3 mv, 3,4 mv, 3,5mv, 3,6 mv, 3,7 mv, 3,8 mv, 3,9 mv, 4 mv, 4,1 mv, 4,2 mv, 4,3 mv, 4,4 mv, 4,5mv, 4,6 mv, 4,7 mv, 4,8 mv, 4,9 mv, 5 mv, 5,1 mv, 5,2 mv, 5,3 mv, 5,4 mv,

5,5mv, 5,6 mv, 5,7 mv, 5,8 mv, 5,9 mv y 6 mv.

La presente divulgación, al menos en parte, está relacionada con la encapsulación del ARN del replicón con las nanopartículas lipídicas. En algunas realizaciones, la relación de masa entre las LNP y el ARN del replicón varía de 1:2 a 2:1. En algunas realizaciones, la relación de masa entre las LNP y el ARN del replicón puede ser 1:2, 1:1.5, 1:1.2, 1:1, 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 1.6:1, 1.7:1, 1.8:1, 1.9:1 y 2:1. En algunas realizaciones, la relación de masa entre las LNP y el ARN del replicón puede ser de 1:1.

(ii) ARN del replicón autoamplificador

En la presente divulgación, un ARN del replicón autoamplificador que codifica una molécula de IL-12 bajo el promotor subgenómico, en lugar de las proteínas estructurales necesarias para la replicación del virus, es de interés sustancial en la inmunoterapia del cáncer. Como se usa en el presente documento, el término “ARN del replicón autoamplificador” se refiere a un elemento genético autorreplicador que comprende un ARN que se replica a partir de un origen de replicación. Los términos “ARN del replicón” y “ARN del replicón autoamplificador” se usan indistintamente en el presente documento. En algunas realizaciones, el ARN del replicón autoamplificador es un replicón viral.

Un virus es un patógeno pequeño que solo es capaz de replicarse dentro de una célula huésped viva (por ejemplo, células procariotas y eucariotas). Fuera de las células vivas, los virus existen como partículas independientes (por ejemplo, partículas virales o viriones), que comprenden material genético en forma de ADN o ARN, el último de los cuales puede ser monocatenario o bicatenario. Los virus con ADN se denominan virus de ADN y los virus con ARN se denominan virus de ARN. En algunos casos, el virus comprende proteínas asociadas al ácido nucleico y la combinación del virus y las proteínas asociadas al ácido nucleico se denomina nucleoproteína. Además del material genético, los virus tienen una capa de proteína simple o doble, también conocida como cápside, que facilita la unión del virus a los receptores de una célula huésped viva durante la infección y protege el material genético del virus de la degradación enzimática. La combinación de nucleoproteína y cápside se denomina nucleocápside. En algunos casos, los virus tienen una envoltura de bicapa lipídica, compuestos de proteínas asociadas a (trans-) membranas glicosiladas y codificadas por virus. Una vez que un virus ha infectado una célula huésped viva, el virus depende de la célula huésped viva para suministrar la maquinaria necesaria para su replicación y propagación a partir de entonces. El genoma viral codifica algunas proteínas estructurales y proteínas reguladoras no estructurales.

Como se usa en el presente documento, el término “subgenoma” o “subgenómico” se refiere a una sección más pequeña de todo el genoma del replicón. Por consiguiente, la transcripción subgenómica, como se usa en el presente documento, se refiere a la transcripción de uno o más genes en el genoma del replicón, pero no todos los genes que constituyen el genoma del replicón. En una realización, la transcripción subgenómica se refiere a la transcripción de los genes de interés experimental o terapéutico, que se describen en otra parte del presente documento.

El término “proteína estructural”, como se usa en el contexto de virus en el presente documento, se refiere a proteínas que constituyen los componentes estructurales de viriones o partículas de virus que se ensamblan maduros. Ejemplos no limitantes de tales proteínas estructurales incluyen proteínas del núcleo de nucleocápside (por ejemplo, proteínas gag), enzimas empaquetadas dentro de la partícula de virus (por ejemplo, proteínas pol) y componentes de la membrana (por ejemplo, proteínas env). Por el contrario, el término “proteína no estructural”, como se usa en el contexto de virus en el presente documento, se refiere a proteínas que se expresan dentro de la célula huésped pero que no constituyen componentes estructurales de la partícula o virión del virus. Algunas de las funciones de las proteínas no estructurales incluyen, entre otros, formación de replicones, inmunomodulación y transactivación de genes de proteínas estructurales.

En algunas realizaciones, el ARN del replicón autoamplificador se deriva de un alfavirus. A diferencia del ARNm huésped, los ARN del replicón de alfavirus codifican un conjunto de cuatro proteínas no estructurales (nsPs 1-4) que son responsables tanto de la replicación del genoma como, cuando se diseñan para incluir genes que codifican productos no virales, como las moléculas de IL-12, la proporción de transcripción de tales productos no virales bajo el promotor subgenómico. Los alfavirus son parte de la familia de virus del Grupo IV Togaviridae, poseen un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo y se caracterizan por una nucleocápside icosaédrica. Otros ejemplos no limitantes de virus del Grupo IV pueden ser Astroviridae, Caliciviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Picornaviridae, Arteriviridae y Togaviridae. El género alfavirus incluye 26 virus envueltos que infectan eucariotas. Los alfavirus tienen una amplia gama de huéspedes y son transmitidos por mosquitos y artrópodos hematófagos. Ejemplos no limitantes de alfavirus incluyen el virus de la encefalitis equina venezolana (EEV), el virus Semliki Forest (SF), el virus Sindbis (SIN), el virus de la encefalitis equina oriental (EEE), el virus de la encefalitis equina occidental (WEE), el virus Everglades (EVE), el virus Mucambo (MUC), el virus Pixuna (PIX), el virus Semliki Forest (SF), el virus Middelburg (MID), el virus Chikungunya (CHIK), el virus

O'Nyong-Nyong (ONN), el virus Ross River (RR), el virus Barmah Forest (BF), el virus Getah (GET), el virus Sagiyama (SAG), el virus Bebaru (BEB), el virus Mayaro (MAY), el virus Una (UNA), el virus Aura (AURA), el virus Babanki (BAB), el virus Highlands J (HJ) y el virus Fort Morgan (FM).

En la presente divulgación, al menos en parte, el replicón de alfavirus es un replicón de alfavirus EEV. El virus EEV es un patógeno viral que suelen transmitir los mosquitos y que causa encefalomiелitis o EEV predominantemente en especies equinas. Sin embargo, los seres humanos también pueden contraer EEV, y las personas con sistemas inmunitarios debilitados corren un riesgo especial de sufrir complicaciones graves si se infectan con EEV.

El virión de la EEV es esférico y posee una membrana lipídica con proteínas de superficie de glicoproteína repartidas por la superficie exterior. Por lo general, la EEV tiene un genoma de aproximadamente 11,45 kb, excluyendo la cubierta del extremo 5' y el tracto poli(A) del extremo 3', y comprende 4 proteínas no estructurales (nsP) y 5 proteínas estructurales. Las proteínas no estructurales incluyen nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4, mientras que la región estructural codifica las proteínas C, E3, E2, 6K y E1. En algunos casos, el ARN del replicón autoamplificador es un ARN del replicón WT derivado de EEV. La secuencia del ARN del replicón de WT del virus EEV se expone en la SEC ID NO: 1:

```
ATGGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCACGTT
GACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGT
20 AGAAGCCAAGCAGGTCACCTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTGGCTT
CAAACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCC
GCCCCGAGAATGTATTCTAAGCACAGTATCATTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGA
TCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAAACTGTAAGGAAATAACTGATA
AGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTGGCCGCCGTCTATGAGCGACCCCTGACCTGGAAACT
25 GAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGTCTGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGTTTACCA
GGATGTATACGCGGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAG
TCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTATGTTTAAAGAACTTGGCTGGAGCATAT
CCATCATACTCTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATG
CAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTACGCTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGA
30 AACCATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTA
CTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCTG
GTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTCTGTTAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCC
TGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCAAA
GTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTAC
35 ATTGTGTGACCAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGCGGACGACGCGCAAAAAC
TGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTCGCACCCAGAGAAACACCAATACC
ATGAAAAATTACCTTTTGCCCGTAGTGGCCAGGCATTTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAA
GGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTT
GTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATC
40 ATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGCTGCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGA
GATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCA
TTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAA
GCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGGA
```

GGCAGACGTCGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCT
TGATAAAGGTTACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCG
CAGGCTGTACTCAAGAGTGAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGT
5 GATAACACACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATAACCATGGTAAAGTAGTGG
TGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATT
GTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAGGAGC
GCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAACGTCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAATACC
TGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCCTCAAGAAAGAACTAGTCACTGGGCTAGGGCTCACA
10 GGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGC
CGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCA
TCATTTAAAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAACCTGTGCA
GAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTC
AGTGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTT
GTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGC
15 GGGGATCCCAAACAGTGCGGTTTTTTTTTAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAAACCACGA
GATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGG
TCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATT
GTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTTAG
AGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCT
20 CTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCCGGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTG
TACGCACCCACCTCAGAACATGTGAACGTCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTG
GAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACTGCCAAGTACCCTGGGAATTTCA
CTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGA
CCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGCC
25 GGTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATTTTG
AAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGA
CTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCA
CTGGGATAACTCCCCGTCGCCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCT
CTCGCAGGTACCCACAACCTGCCTCGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACT
30 GGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCA
TGCTTTAGTCTCTCCACCATAATGAACACCCACAGAGTGACTTTTCTTCATTTCGTGAGCAAT
TGAAGGGCAGAACTGTCTTGGTGGTTCGGGGAAAAGTTGTCCGTCCCAGGCAAAATGGTTGAC
TGGTTGTGACACCGGCTGAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGA
TGTGCCCAAATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACCATCACTATC
35 AGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCTG
AATCCCGGCGGAACCTGTGTGACGATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCAT
CATTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTG
AAGAGACGGAAGTTCTGTTTGTATTCAATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATTCT
TACAAGCTTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATG
40 TGCACCCTCATATCATGTGGTGCAGGGGATATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAA
ATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTC
CCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGC
TAAACATATCATTTCATGCCGTAGGACCAAACCTTCAACAAAGTTTCGGAGGTTGAAGGTGACA
AACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCA
45 GTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATC
ATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGG
ACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATA
TGCATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAA
GAGTTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAAACTTTCTCATATTTGG
50 AAGGGACCAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTT
GCAACGGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCAGTATTAG
GTCGAAATGCCCCGTGCAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGT

GCATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATT
 ACTGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATG
 CCCCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCG
 TGGAAACACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGG
 5 ACACCTGAACAACCACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGAT
 CATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGATGGCCCCGACCCACCAGG
 TGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCCTGGTCCATT
 CCTCATGCATCCGACTTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAG
 CGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTC
 10 TGGCGCGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCCTCCACATCCCGCTCCGCGC
 ACAAGAACACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCC
 GCCAGGCGTGAAATAGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTC
 CTAGCAGGTGCGTCTCGAGAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATT
 ACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTCTGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCATA
 15 CATCTTTTCCCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTTACAACAAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGC
 TATCCGAAGTGGTGTGGAGAGGACCGAATTGGAGATTTCTGTATGCCCCGCGCCTCGACCAA
 GAAAAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCCACACCTGCTAACAGAAGCAG
 ATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGGCC
 TAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCCCTGCATCCTGTTCCCT
 20 TTGTATTCATCTAGTGTGAACCGTGCCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTGGAAGCCTGTAA
 CGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATG
 CCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGGCCCTGCA
 AAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCC
 TTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAATG
 25 TCACGCAAATGAGAGAATTGCCCCGATTGGATTGCGCGGCCTTTAATGTGGAATGCTTCAAG
 AAATATGCGTGTAATAATGAATATTGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACTGA
 AGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAATTTAAAGGACCAAAGCTGCTGCTCTTTTTTGCGA
 AGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACATACCAATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAG
 AGAGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGAT
 30 CCAGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAGGA
 GATTAAATGCGGTCCCTGCTTCCGAACATTCATACACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTT
 GACGCTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAACTGACATCGCGTC
 GTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAG
 GTGTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTTTCATCAATACAT
 35 TTGCCCACTAAAACTAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTTCTCACACT
 GTTTGTGAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGAACGGCTAACCG
 GATCACCATGTGCAGCATTTCATTGGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAA
 TTAATGGCAGACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGT
 GGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAGGGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAG
 40 CGTGCCGTGTGGCAGACCCCCCTAAAAAGGCTGTTTAAAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGAC
 GATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGCATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGT
 GGGTATTCTTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTCCA
 TCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAAATCATTTCAGCTACCTGAGAGGG
 GCCCCATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCCGCCAAGTCT
 45 AGCATATGGGCGCGCCCTCAGCATCGATTGAATTGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
 GATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAA
 CGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCG
 CCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAG
 TTCATGTACGGCTCCAAGGCCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCT
 50 GTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGTTGA
 CCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGC
 ACCAACTTCCCCCTCCGACGGCCCCGTAAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTC

CGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGA
 AGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAG
 CTGCCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACAC
 CATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGT
 5 ACAAGTAGGAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAAGCTCGCGGCGATTGGCATGCCGCCTTAAAA
 TTTTATTTTTATTTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTTAATATTTCAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAACGCGTCGAGGGGAATTAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCAGGTGG
 CACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATA
 TGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT
 10 ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGT
 TTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAG
 TGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAA
 CGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGTA
 CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACT
 15 CACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCC
 ATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGA
 GCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGG
 AGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACA
 ACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGA
 20 CTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGT
 TTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGG
 CCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGA
 TGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAG
 ACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATC
 25 TAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCA
 CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCG
 TAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAA
 GAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGT
 CCTTCTAGTGAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCCTACATACC
 30 TCGCTCTGCTAATCCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGG
 TTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTG
 CACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATT
 GAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTC
 GGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGT
 35 CGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCC
 TATGGAAAACGCCAGCAACGCGAGCTCTAATACGACTCACTATAG (SEC ID NO: 1)

El ARN del replicón autoamplificador, como se describe en el presente documento,
 comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93
 40 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más, idéntica a la SEC ID NO: 1. En algunas
 realizaciones, el ARN del replicón autoamplificador es al menos 90 % idéntico a la SEC ID
 NO: 1.

El ARN (del replicón) autoamplificador es una nueva plataforma prometedora para la
 terapia génica, pero las aplicaciones aún están limitadas por la breve persistencia de la
 45 expresión en algunos tipos de células y los bajos niveles de expresión transgénica in vivo. Un
 ARN del replicón sintético de evolución in vitro proporciona una estrategia potencialmente
 poderosa para modificar y mejorar la expresión del replicón tanto in vitro como in vivo.

Utilizando el método de evolución in vitro, se identificaron mutaciones en nsP2 y nsP3 del replicón de encefalitis equina venezolana (EEV) que promovieron la expresión subgenómica en células humanas.

En algunas realizaciones, el ARN del replicón autoamplificador comprende

mutaciones que hacen que el ARN del replicón sea capaz de expresar la molécula de IL-12 a un nivel superior en comparación con el ARN del replicón que comprende la SEC ID NO: 1.

En algunas realizaciones, el ARN del replicón autoamplificador comprende al menos una mutación puntual en una posición de ácido nucleico 3936 y/o 4758 del replicón de WT de la

SEC ID NO: 1. En algunas realizaciones, el ARN del replicón autoamplificador comprende al

menos una de las siguientes mutaciones puntuales: guanina a citosina en la posición 3936 (G3936C) y adenina a guanina en la posición 4758 (A4758G) de la secuencia del replicón de WT de la SEC ID NO:1. La mutación G3936C daría como resultado un cambio de glicina a

arginina en el residuo de aminoácido 1309 (G1309R). La mutación A4758G daría como resultado un cambio de serina a glicina en el residuo de aminoácido 1583 (S1583G). En

algunas realizaciones, la secuencia del ARN del replicón autoamplificador mutante (ARN del Replicónmt) se expone en la SEC ID NO:2 con las mutaciones resaltadas (texto subrayado y en negrita):

```
ATGGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCACGTT
GACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGT
20 AGAAGCCAAGCAGGTCACCTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTGGCTT
CAAACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCC
GCCCCGAGAATGTATTCTAAGCACAGTATCATTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGA
TCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAAACTGTAAGGAAATAACTGATA
AGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTGGCCGCCGTCTATGAGCGACCCCTGACCTGGAAACT
25 GAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGTCTGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGTTTACCA
GGATGTATACGCGGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAG
TCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTATGTTTAAGAACTTGGCTGGAGCATAT
CCATCATACTCTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATG
CAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTACGTAAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGA
30 AACCATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTA
CTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCTG
GTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTCTGTTAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCC
TGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCAAA
GTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTAC
35 ATTGTGTGACCAAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGCGGACGACGCGCAAAAAC
TGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTCGCACCCAGAGAAACACCAATACC
ATGAAAAATTACCTTTTGCCCGTAGTGCCCGAGGCATTTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAA
GGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTT
GTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATC
40 ATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGCTGCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGA
GATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCA
TTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAA
GCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGGA
```

GGCAGACGTCGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCT
TGATAAAGGTTACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCG
CAGGCTGTACTCAAGAGTGAAAAATTATCTTGATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGT
5 GATAACACACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATAACCATGGTAAAGTAGTGG
TGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATT
GTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAGGAGC
GCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAACGTCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAATACC
TGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCCTCAAGAAAGAACTAGTCACTGGGCTAGGGCTCACA
10 GGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGC
CGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCA
TCATTTAAAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAACCTGTGCA
GAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAACCTGTGGACTC
AGTGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTT
GTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGC
15 GGGGATCCCAAACAGTGCGGTTTTTTTTTAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAAACCACGA
GATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGG
TCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATT
GTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTTAG
AGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCT
20 CTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCCGGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTG
TACGCACCCACCTCAGAACATGTGAACGTCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTG
GAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACTGCCAAGTACCCTGGGAATTTCA
CTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGA
CCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGCC
25 GGTGCTGAAGACCGCTGGCATAAGACATGACCACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATTTTG
AAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGA
CTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCA
CTGGGATAACTCCCCGTGCGCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTGAGCTCT
CTCGCAGGTACCCACAACCTGCCTCGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACT
30 GGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCA
TGCTTTAGTCTCTCCACCATAATGAACACCCACAGAGTGACTTTTCTTCATTTCGTGAGCAAT
TGAAGGGCAGAACTGTCTTGGTGGTTCGGGGAAAAGTTGTCCGTCCCAGGCAAAATGGTTGAC
TGGTTGTGACACCGGCTGAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGA
TGTGCCCAAATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACCATCACTATC
35 AGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCTG
AATCCCGGCGGAACCTGTGTGACGATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCAT
CATTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTG
AAGAGACGGAAGTTCTGTTTGTATTTCATTCGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATTCT
TACAAGCTTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATG
40 TGCACCCTCATATCATGTGGTGCAGGGGATATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAA
ATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTC
CCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGC
TAAACATATCATTTCATGCCGTAGGACCAAACCTTCAACAAAGTTTCGGAGGTTGAAGGTGACA
AACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCA
45 GTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATC
ATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGG
ACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATA
TGCATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAA
GAGTTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAACCTTTCTCATATTTGG
50 AAGGGACCAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTT
GCAACGGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAGGCATGAGCAGTATTAG
GTCGAAATGCCCCGTGCAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGT

GCATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATT
 ACTGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATG
 CCCCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCG
 TGGAAACACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGG
 5 ACACCTGAACAACCACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGAT
 CATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGATGGCCCCGACCCACCAGG
 TGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCCTGGTCCATT
 CCTCATGCATCCGACTTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAG
 CGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTC
 10 TGGCGCGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCCTCCACATCCCGCTCCGCGC
 ACAAGAACACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCC
 GCCAGGCGTGAAATAGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTC
 CTAGCAGGTGCGTCTCGAGAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATT
 ACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTCTGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCATA
 15 CATCTTTTCCCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTTACAACAAAAATCAGTAAGGCACACGGTGC
 TATCCGAAGTGGTGTGGAGAGGACCGAATTGGAGATTTCTGTATGCCCCGCGCCTCGACCAA
 GAAAAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCCACACCTGCTAACAGAAGCAG
 ATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGGCC
 TAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCCCTGCATCCTGTTCCCT
 20 TTGTATTCATCTAGTGTGAACCGTGCCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTGAAGCCTGTAA
 CGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATG
 CCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGGCCCTGCA
 AAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCC
 TTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAATG
 25 TCACGCAAATGAGAGAATTGCCCCGATTGGATTGCGCGGCCTTTAATGTGGAATGCTTCAAG
 AAATATGCGTGTAATAATGAATATTGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACTGA
 AGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAATTTAAAGGACCAAAGCTGCTGCTCTTTTTTGCGA
 AGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACATACCAATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAG
 AGAGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGAT
 30 CCAGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAGGA
 GATTAAATGCGGTCCCTGCTTCCGAACATTCATACACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTT
 GACGCTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAACTGACATCGCGTC
 GTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAG
 GTGTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTTTCATCAATACAT
 35 TTGCCCCACTAAACTAAATTTAAATTTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTTCTCACACT
 GTTTGTGAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGAACGGCTAACCG
 GATCACCATGTGCAGCATTTCATTGGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAA
 TTAATGGCAGACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGT
 GGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAGGGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAG
 40 CGTGCCGTGTGGCAGACCCCCCTAAAAAGGCTGTTTAAAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGAC
 GATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGCATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGT
 GGGTATTCTTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTCCA
 TCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAAATCATTTCAGCTACCTGAGAGGG
 GCCCCATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCCGCCAAGTCT
 45 AGCATATGGGCGCGCCCTCAGCATCGATTGAATTGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
 GATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAA
 CGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCG
 CCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAG
 TTCATGTACGGCTCCAAGGCCACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCT
 50 GTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGTTGA
 CCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGC
 ACCAACTTCCCCCTCCGACGGCCCCGTAAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTC

CGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGA
 AGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAG
 CTGCCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACAC
 CATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGT
 5 ACAAGTAGGAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAAGTTCGCGGCGATTGGCATGCCGCCTTAAAA
 TTTTTATTTTATTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTAAATATTTCAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAACGCGTCGAGGGGAATTAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCAGGTGG
 CACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATA
 TGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT
 10 ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGT
 TTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAG
 TGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAA
 CGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGGA
 CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACT
 15 CACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCC
 ATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGA
 GCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGG
 AGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACA
 ACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGA
 20 CTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGT
 TTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGG
 CCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGA
 TGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAG
 ACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATC
 25 TAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCA
 CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCG
 TAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAA
 GAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGT
 CCTTCTAGTGATAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACC
 30 TCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGG
 TTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCTGTG
 CACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATT
 GAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTC
 GGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGT
 35 CGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCC
 TATGGAAAACGCCAGCAACGCGAGCTCTAATACGACTCACTATAG (SEC ID NO: 2)

En otras realizaciones, el ARN del replicón autoamplificador se deriva de un virus de
 la hepatitis C (VHC). El VHC es parte de la familia de virus Flaviviridae del Grupo IV, que
 40 posee genomas de ARN monocatenario, lineal, monocatenario de polaridad positiva, de 9,6 a
 12,3 kilobase de longitud. Los extremos 5' de los flavivirus llevan una cubierta de
 nucleótidos metilada, mientras que otros miembros de esta familia no están cubiertos y
 codifican un sitio de entrada de ribosoma interno.

En otras realizaciones, el alfavirus es un virus SF. El virus SF es un patógeno viral
 45 transportado normalmente por mosquitos que causan encefalitis. El virus Semliki Forest es un
 virus de ARN de cadena positiva con un genoma de aproximadamente 13.000 pares de bases
 que codifica nueve proteínas. Los dos tercios 5' del genoma codifican cuatro proteínas no

estructurales relacionadas con la síntesis de ARN y las proteínas estructurales están codificadas en el tercio 3'. De las proteínas estructurales, las proteínas C forman la cápside icosaédrica que está envuelta por una bicapa lipídica, derivada de la célula huésped. La superficie más externa del virus está cubierta casi en su totalidad por heterodímeros de las glicoproteínas E1 y E2, dispuestos en trímeros interconectados, que forman una capa externa. Los trímeros están anclados en la membrana por un dominio citoplásmico E2 que se asocia con la nucleocápside.

En otras realizaciones, el alfavirus es un virus SIN. El virus es transmitido por mosquitos. El virus SIN causa fiebre de Sindbis en humanos y los síntomas incluyen artralgia, erupción cutánea y malestar. Los virus Sindbis son partículas envueltas con una cápside icosaédrica. Su genoma es un ARN monocatenario de aproximadamente 11,7 kb de longitud. Tiene una cubierta 5' y una cola poliadenilada 3', por lo que sirve directamente como ARN mensajero (ARNm) en una célula huésped. El genoma codifica cuatro proteínas no estructurales en el extremo 5' y la cápside y dos proteínas de envoltura en el extremo 3'.

Esto es característico de todos los Togavirus. La replicación es citoplasmática y rápida. El ARN genómico se traduce parcialmente en el extremo 5' para producir las proteínas no estructurales que luego participan en la replicación del genoma y la producción de nuevo ARN genómico y una cadena de ARN subgenómico más corta. Esta cadena subgenómica se traduce en proteínas estructurales. Los virus se ensamblan en las superficies de la célula huésped y adquieren su envoltura a través de la gemación. Se ha descubierto que un elemento de ARN no codificante es esencial para la replicación del genoma del virus Sindbis.

El ARN del replicón viral es capaz de estimular la respuesta inmune a través de receptores tipo Toll (TLR). Un subconjunto de TLR, TLR3, TLR7/8 y TLR9, participa en las respuestas antivirales al desencadenar la producción de citocinas antivirales como los interferones de tipo I (IFN). TLR3 responde al ARN bicatenario, un intermediario de replicación para muchos virus. TLR7/8 reconoce los ARN monocatenarios virales, mientras que TLR9 reconoce motivos CpG no metilados dentro del ADN viral. Los TLR implicados en el reconocimiento de virus se expresan en membranas endosomales y pueden separarse según su requerimiento para la proteína adaptadora MyD88: La actividad de TLR3 es independiente de MyD88, mientras que los TLRs 7/8/9 dependen de MyD88. La activación de TLR3 conlleva a la producción de interferón de tipo I (IFN). La señalización de interferón de tipo I a través del complejo ISGF3 (STAT1/STAT2/IRF9) es necesaria para la activación sostenida de Rip3 y la necroptosis.

En algunas realizaciones, el ARN del replicón-LNP es capaz de estimular la señalización de TLR3 en las células tumorales, lo que conlleva a la muerte celular necrótica de células tumorales. En algunas realizaciones, el ARN del replicón-LNP puede potenciar la muerte celular inmunogénica (ICD) inducida por las LNP. En algunas realizaciones, el ARN del Replicón-LNP-TT3 puede ejercer inhibición tumoral al inducir sinérgicamente ICD en células tumorales y desencadenar una respuesta inmune antitumoral (por ejemplo, reclutamiento de células inmunes tales como granulocitos, monocitos, macrófagos, células supresoras derivadas de mieloides, células dendríticas, células T y células NK). En algunas realizaciones, el virus oncolítico sintético comprende ARN del Replicónmt-LNP-TT3.

En algunas realizaciones, el ARN del replicón comprende una secuencia codificante para una molécula detectable en la región subgenómica. En algunas realizaciones, la molécula detectable es un ácido nucleico o un polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido es una proteína fluorescente. Las proteínas fluorescentes se conocen en el arte y son una subclase de fluoróforos, que son compuestos químicos fluorescentes con la capacidad de reemitir luz tras la excitación. El fluoróforo absorberá la energía luminosa de excitación de una primera longitud de onda específica y luego volverá a emitir energía luminosa en una segunda longitud de onda específica más larga. Cada tipo de fluoróforo responde y emite diferentes longitudes de onda de luz, según la naturaleza de su estructura química y su entorno. En algunas realizaciones, la proteína fluorescente incluye, entre otras, wt-GFP, proteína verde fluorescente (por ejemplo, EGFP, Emerald, Superfolder GFP, Azami Green, mWasabi, TagGFP, TurboGFP, AcGFP, ZsGreen, T-Sapphire, etc.), proteína azul fluorescente (por ejemplo, EBFP, EBFP2, Azurita, mTagBFP, etc.), proteína cian fluorescente (por ejemplo, ECFP, mECFP, Cerulean, mTurquoise, CyPet, AmCyan1, Midori-Ishi Cyan, TagCFP, mTFP1 (Teal), etc.), proteína amarilla fluorescente (por ejemplo, EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, TagYFP, PhiYFP, ZsYellow1, mBanana, etc.), proteína naranja fluorescente (por ejemplo, Kusabira Orange, Kusabira Orange2, mOrange, mOrange2, dTomato, dTomato-Tandem, TagRFP, TagRFP-T, DsRed, DsRed2, DsRed-Express (T1), DsRed-Monomer, mTangerine, etc.), o proteína roja fluorescente (por ejemplo, mRuby, mApple, mStrawberry, AsRed2, mRFP1, JRed, mCherry, HcRed1, mRaspberry, dKeima-Tandem, HcRed-Tandem, mPlum, AQ143, etc.).

En algunos aspectos, como se describe en el presente documento, el ARN del replicón autoamplificador comprende una secuencia codificante para la expresión de IL-12 en la región subgenómica. Un ejemplo de secuencia codificante para IL-12 se expone en la SEC ID NO: 3:

ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCACGATGTGC
 CATGTGGGAGCTGGAGAAAGACGTTTATGTTGTAGAGGTGGACTGGACTCCCGATGCCCTG
 GAGAAACAGTGAACCTCACCTGTGACACGCCTGAAGAAGATGACATCACCTGGACCTCAGAC
 CAGAGACATGGAGTCATAGGCTCTGGAAAGACCCTGACCATCACTGTCAAAGAGTTTCTAGA
 5 TGCTGGCCAGTACACCTGCCACAAAGGAGGCGAGACTCTGAGCCACTCACATCTGCTGCTCC
 ACAAGAAGGAAAATGGAATTTGGTCCACTGAAATTTTAAAAAATTTCAAAAACAAGACTTTC
 CTGAAGTGTGAAGCACCAAATTACTCCGGACGGTTCACGTGCTCATGGCTGGTGCAAAGAAA
 CATGGACTTGAAGTTCAACATCAAGAGCAGTAGCAGTTCCCCTGACTCTCGGGCAGTGACAT
 GTGGAATGGCGTCTCTGTCTGCAGAGAAGGTCACACTGGACCAAAGGGACTATGAGAAGTAT
 10 TCAGTGTCTCTGCCAGGAGGATGTACCTGCCCAACTGCCGAGGAGACCCTGCCCATTTGA
 GGCGTTGGAAGCACGGCAGCAGAATAAATATGAGAACTACAGCACCCAGCTTCTTCATCAGGG
 ACATCATCAAACCAGACCCGCCCAAGAACTTGCAGATGAAGCCTTTGAAGAACTCACAGGTG
 GAGGTGAGCTGGGAGTACCCTGACTCCTGGAGCACTCCCCATTCTTCTCCCTCAAGTT
 CTTTGTTCGAATCCAGCGCAAGAAAGAAAAGATGAAGGAGACAGAGGAGGGGTGTAACCAGA
 15 AAGGTGCGTTTCTCGTAGAGAAGACATCTACCGAAGTCCAATGCAAAGGCGGGAATGTCTGC
 GTGCAAGCTCAGGATCGCTATTACAATTCTCATGCAGCAAGTGGGCATGTGTTCCCTGCAG
 GGTCCGATCCGGAGGTTCCGGTGGTGGATCCGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGATCCAGGGTCA
 TTCCAGTCTCTGGACCTGCCAGGTGTCTTAGCCAGTCCCGAAACCTGCTGAAGACCACAGAT
 GACATGGTGAAGACGGCCAGAGAAAAACTGAAACATTATTCTTGCAGTCTGTAAGACATCGA
 20 TCATGAAGACATCACACGGGACCAAACCAGCACATTGAAGACCTGTTTACCCTGGAACCTAC
 ACAAGAACGAGAGTTGCCTGGCTACTAGAGAGACTTCTTCCACAACAAGAGGGAGCTGCCTG
 CCCCCACAGAAGACGTCTTTGATGATGACCCTGTGCCTTGGTAGCATCTATGAGGACTTGAA
 GATGTACCAGACAGAGTTCCAGGCCATCAACGCAGCACTTCAGAATCACAACCATCAGCAGA
 TCATTCTAGACAAGGGCATGCTGGTGGCCATCGATGAGCTGATGCAGTCTCTGAATCATAAT
 25 GGCGAGACTCTGCGCCAGAAACCTCCTGTGGGAGAAGCAGACCCTTACAGAGTGAAAATGAA
 GCTCTGCATCCTGCTTCACGCCTTCAGCACCCGCGTCTGACCATCAACAGGGTGATGGGCT
 ATCTGAGCTCCGCCTGA (SEC ID NO: 3)

Estructuralmente, IL-12 pertenece a las citocinas de tipo I y tiene una estructura de
 30 haz de cuatro hélices α . IL-12 actúa en forma de proteína heterodimérica (IL-12-p70; IL-12-
 p30/p40) que consta de dos subunidades p30 y p40 unidas covalentemente. Contrariamente a
 la forma heterodimérica, el homodímero de IL-12-p40/p40 actúa principalmente como un
 supresor competitivo de las acciones de IL-12-p70. IL-12 es una citocina pleiotrópica, cuyas
 acciones crean una interconexión entre la inmunidad innata y adaptativa. Se describió por
 35 primera vez IL-12 como un factor secretado a partir de líneas de células B transformadas con
 EBV e inducidas por PMA. Con base en sus acciones, la IL-12 fue inicialmente designada
 como “factor de maduración de linfocitos citotóxicos” y “factor estimulante de células
 asesinas naturales”. Debido al puente entre la inmunidad innata y adaptativa y la estimulación
 potente de la producción de IFN- γ , una citoquina que coordina mecanismos naturales de
 40 defensa anticancerígena, la IL-12 parecía un candidato ideal para la inmunoterapia tumoral en
 humanos. Sin embargo, los efectos secundarios graves asociados con la administración
 sistémica de IL-12 en investigaciones clínicas y el índice terapéutico muy estrecho de esta
 citocina moderaron notablemente el entusiasmo por el uso de esta citocina en pacientes con
 cáncer.

Tras el descubrimiento de IL-12, se han añadido otros tres miembros (IL-23, IL-27 e IL-35) a la familia de IL-12 y se ha demostrado que desempeñan papeles importantes en las funciones de las células Th1. IL-12 es un ligando de un receptor compuesto por dos cadenas de aminoácidos, IL-12R- β 1 e IL-12R- β 2. El receptor de IL-12 se expresa de manera

5 constitutiva (por ejemplo, IL-12R- β 1 en las células B) o inducible (IL-12R- β 2) en una variedad de células inmunes, incluidas las células NK, los linfocitos T y B. La IL-12R- β 2 unida al ligando se fosforila en las tirosinas, lo que proporciona sitios de albergue para dos quinasas, JAK2 y TYK2. Entre la familia STAT de factores de transcripción, STAT4 se considera el mediador más específico de las respuestas celulares provocadas por IL-12. Los

10 elementos principales de las acciones de IL-12 son los siguientes: aumento de la producción de IFN- γ , que es el mediador más potente de las acciones de IL-12, a partir de células NK y T; estimulación del crecimiento y citotoxicidad de células NK activadas, células T CD8+ y CD4+, desplazando la diferenciación de células Th0 CD4+ hacia el fenotipo Th1; mejoramiento de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra células

15 tumorales; e inducción de IgG y supresión de la producción de IgE a partir de células B. La principal fuente de IL-12 en el ser humano son las células presentadoras de antígenos activadas, como las células dendríticas, especialmente del fenotipo CD1c+, así como los fagocitos hematopoyéticos (monocitos, macrófagos y también neutrófilos), pero la IL-12 también puede ser producida por otros tipos de células. Si bien la IL-12 actúa sobre una

20 variedad de células inmunes, la función fisiológica general de la IL-12 parece ser la de orquestar la respuesta inmunitaria de tipo Th1 contra ciertos patógenos.

La presente divulgación, en algún aspecto, describe el suministro local de IL-12 por un ARN del replicón viral encapsulado en LNP, que codifica una molécula de IL-12 en su región subgenómica. Además de la muerte celular inmunogénica (ICD) de células tumorales

25 sinérgicas inducida por el ARN del replicón-LNP, en algunas realizaciones, la expresión de IL12 en el microambiente tumoral puede conducir a una inmunoestimulación adicional y da como resultado una mejora de la respuesta inmune antitumoral. En algunas realizaciones, la combinación de ARN-IL-12 del replicón-LNP en el microambiente tumoral es capaz de inducir una respuesta inmunitaria antitumoral sistémica. En otras realizaciones, la

30 combinación del ARN-IL-12 del replicón-LNP en el microambiente tumoral es capaz de erradicar las células tumorales y prevenir la recurrencia del tumor. En algunas realizaciones, el virus oncolítico sintético comprende ARN-IL12 del Replicónmt-LNP-TT3.

En algunas realizaciones, el ARN-IL12 del replicón comprende además una secuencia codificante para la albúmina sérica. La vida media de péptidos y proteínas (por ejemplo,

citocinas) en un entorno biológico (por ejemplo, suero, microambiente tumoral) se ve afectada por varios factores, incluido el tamaño, la carga, la sensibilidad proteolítica, la naturaleza de su biología, el porcentaje de renovación de las proteínas que unen y otros factores. En algunos casos, la vida media de las proteínas en el entorno biológico puede tener una correlación aproximada con su tamaño. Los péptidos y las proteínas menores de aproximadamente 70 kDa (por ejemplo, citocinas) pueden eliminarse mediante filtración renal, por lo que generalmente poseen vidas medias muy cortas. Sin embargo, las proteínas más grandes pueden persistir durante varios días. Tres tipos de proteínas, IgG, albúmina sérica y transferrina, persisten durante mucho más tiempo de lo que se podría predecir solo por su tamaño. En algunas realizaciones, la albúmina sérica es albúmina sérica humana. En algunas realizaciones, la albúmina sérica es albúmina sérica de ratón (MSA). Un ejemplo de secuencia codificante para el ARN-IL12-MSA del replicón se expone en la SEC ID NO: 4:

```

ATGGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCACGTT
GACATCGAGGAAGACAGCCCATTCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGT
AGAAGCCAAGCAGGTCACCTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTGGCTT
CAAACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCC
GCCCCGAGAATGTATTCTAAGCACAGTATCATTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGA
TCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAAACTGTAAGGAAATAACTGATA
AGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTGGCCGCCGTCATGAGCGACCCCTGACCTGGAAACT
GAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGTGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGTTTACCA
GGATGTATACGCGGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAG
TCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACCAACCCCTTTTATGTTTAAAGAACTTGGCTGGAGCATAT
CCATCATACTCTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATG
CAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTCACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGA
AACCATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTA
CTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCTG
GTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTGCTTAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCC
TGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTGCTGCTGCAAA
GTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTAC
ATTGTGTGACCAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGCGGACGACGCGCAAAAAC
TGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTCGCACCCAGAGAAACACCAATACC
ATGAAAAATTACCTTTTGCCCGTAGTGGCCCAGGCATTTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAA
GGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTT
GTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATC
ATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGCTGCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGA
GATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCA
TTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAA
GCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGGA
AGCCGATGTGCACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCT
TGATAAAGGTTACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCG
CAGGCTGTACTCAAGAGTGAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGT
GATAACACACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATAACCATGGTAAAGTAGTGG
TGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATT
GTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAGGAGC
GCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAAGTGTCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAATACC
TGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGTCACTGGGCTAGGGCTCACA

```

GGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGC
CGTCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCA
TCATTAAAAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAAGTGTGCA
5 GAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAAGTGTGGACTC
AGTGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTT
GTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGC
GGGGATCCCAAACAGTGCGGTTTTTTTTTAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAACCACGA
GATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGG
10 TCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATT
GTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTTAG
AGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCT
CTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCCGGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTG
TACGCACCCACCTCAGAACATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTG
15 GAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAAACACTGACTGCCAAGTACCCTGGGAATTTCA
CTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGA
CCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGCC
GGTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATTTTG
AAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGA
20 CTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCA
CTGGGATAACTCCCCGTGCGCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCT
CTCGCAGGTACCCACAACCTGCCTCGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACT
GGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCA
TGCTTTAGTCTCCACCATAATGAACACCCACAGAGTGACTTTTCTTCATTTCGTCAGCAAAT
25 TGAAGGGCAGAACTGTCCTGGTGGTCGGGGAAAAGTTGTCCGTCCCAGGCAAAATGGTTGAC
TGGTTGTGACACCGCCTGAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGA
TGTGCCCAAATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACCATCACTATC
AGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCTG
AATCCCGGCGGAACCTGTGTGACATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCAT
30 CATTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTG
AAGAGACGGAAGTTCTGTTTGTATTTCATTTCGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATTCT
TACAAGCTTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATG
TGCACCCTCATATCATGTGGTGCAGGGGATATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAA
ATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTC
35 CCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGC
TAAACATATCATTTCATGCCGTAGGACCAAACCTTCAACAAAGTTTCGGAGGTTGAAGGTGACA
AACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCA
GTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATC
ATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGG
ACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGAGGAGATA
40 TGCATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGATCCGAA
GAGTTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAAACTTTCTCATATTTGG
AAGGGACCAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTT
GCAACGGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAGGCATGAGCAGTATTAG
GTCGAAATGCCCCGTGCAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGT
45 GCATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATT
ACTGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGAGAAGATCCAATG
CTCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCG
TGGAACACCAACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGG
ACACCTGAACAACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGAT
50 CATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTGAGATGGCCCGACCCACCAGG
TGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTACGGGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCCTGGTCCATT
CCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAG

CGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTC
 TGGCGCGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCCTCCACATCCCGCTCCGCGC
 ACAAGAACACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCC
 GCCAGGCGTGAATAGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTC
 5 CTAGCAGGTGCGTCTCGAGAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATT
 ACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTTCGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCATA
 CATCTTTTCCCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTACAACAAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGC
 TATCCGAAGTGGTGTGGAGAGGACCGAATTGGAGATTTCTGTATGCCCCGCGCCTCGACCAA
 10 GAAAAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCCACACCTGCTAACAGAAGCAG
 ATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGGCC
 TAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCCCTGCATCCTGTTCCCT
 TTGTATTTCATCTAGTGTGAACCGTGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTGCGAGTGGAAGCCTGTAA
 CGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATG
 CCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGCCTTGCA
 15 AAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCC
 TTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAATG
 TCACGCAAATGAGAGAATTGCCCCGATTGGATTGCGCGGCCTTTAATGTGGAATGCTTCAAG
 AAATATGCGTGTAATAATGAATATTGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACTGA
 AGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAATTTAAAGGACCAAAGCTGCTGCTCTTTTTGCGA
 20 AGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACATAACCAATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAG
 AGAGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGAT
 CCAGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAGGA
 GATTAAATGCGGTCTGCTTCCGAACATTCATACACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTT
 GACGCTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAACTGACATCGCGTC
 25 GTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAG
 GTGTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTTTCATCAATACAT
 TTGCCCACTAAAACTAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTTCTCACACT
 GTTTGTGAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGAACGGCTAACCG
 GATCACCATGTGCAGCATTTCATTGGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAA
 30 TTAATGGCAGACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGT
 GGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAGGGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAG
 CGTGCCGTGTGGCAGACCCCCCTAAAAAGGCTGTTTAAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGAC
 GATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGCATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGT
 GGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTCCA
 35 TCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAAATCATTACAGCTACCTGAGAGGG
 GCCCCATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCCGCCAAGTCT
 AGCATATGGGCGCGCCCTCAGCATCGATTGGAATTGGCCACCATGAGGGTCCCCGCTCAGCT
 CCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCACGATGTGCCATGTGGGAGCTGGAGAAAG
 ACGTTTATGTTGTAGAGGTGGACTGGACTCCCGATGCCCTGGAGAAACAGTGAACCTCACC
 40 TGTGACACGCCTGAAGAAGATGACATCACCTGGACCTCAGACCAGAGACATGGAGTCATAGG
 CTCTGGAAAGACCCTGACCATCACTGTCAAAGAGTTTCTAGATGCTGGCCAGTACACCTGCC
 ACAAAGGAGGCGAGACTCTGAGCCACTCACATCTGCTGCTCCACAAGAAGGAAAATGGAATT
 TGGTCCACTGAAATTTTAAAAAATTTCAAAAACAAGACTTTCCTGAAGTGTGAAGCACCAAA
 TTAATCCGGACGGTTCACGTGCTCATGGCTGGTGCAAAGAAACATGGACTTGAAGTTCAACA
 45 TCAAGAGCAGTAGCAGTTCCCCTGACTCTCGGGCAGTGACATGTGGAATGGCGTCTCTGTCT
 GCAGAGAAGGTCACACTGGACCAAAGGGACTATGAGAAGTATTCAGTGTCTGCCAGGAGGA
 TGTACCTGCCAACTGCCGAGGAGACCCTGCCATTGAACTGGCGTTGGAAGCACGGCAGC
 AGAATAAATATGAGAACTACAGCACCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCAAACCAGACCCG
 CCAAGAACTTGAGATGAAGCCTTTGAAGAACTCACAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCC
 50 TGAATCCTGGAGCACTCCCCATTCTTACTTCTCCCTCAAGTTCTTTGTTGCAATCCAGCGCA
 AGAAAGAAAAGATGAAGGAGACAGAGGAGGGGTGTAACCAGAAAGGTGCGTTCTCGTAGAG
 AAGACATCTACCGAAGTCCAATGCAAAGGCGGGAATGTCTGCGTGCAAGCTCAGGATCGCTA

TTACAATTCCCTCATGCAGCAAGTGGGCATGTGTTCCCTGCAGGGTCCGATCCGGAGGTTCCG
 GTGGTGGATCCGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGATCCAGGGTCATTCCAGTCTCTGGACCTGCC
 AGGTGTCTTAGCCAGTCCCGAAACCTGCTGAAGACCACAGATGACATGGTGAAGACGGCCAG
 AGAAAACTGAAACATTATTCCTGCACTGCTGAAGACATCGATCATGAAGACATCACACGGG
 5 ACCAAACCAGCACATTGAAGACCTGTTTACCCTGGAACACACAAGAACGAGAGTTGCCTG
 GCTACTAGAGAGACTTCTTCCACAACAAGAGGGAGCTGCCTGCCCCACAGAAGACGTCTTT
 GATGATGACCTGTGCCTTGGTAGCATCTATGAGGACTTGAAGATGTACCAGACAGAGTTCC
 AGGCCATCAACGCAGCACTTCAGAATCACAACCATCAGCAGATCATTCTAGACAAGGGCATG
 CTGGTGGCCATCGATGAGCTGATGCAGTCTCTGAATCATAATGGCGAGACTCTGCGCCAGAA
 10 ACCTCCTGTGGGAGAAGCAGACCCTTACAGAGTGAAAATGAAGCTCTGCATCCTGCTTCACG
 CCTTCAGCACCCGCGTCTGTGACCATCAACAGGGTGATGGGCTATCTGAGCTCCGCCGGTTCC
 GGTGGCGGATCCGAAGCACACAAGAGTGAGATCGCCCATCGGTATAATGATTTGGGAGAACA
 ACATTTCAAAGGCCTAGTCCTGATTGCCTTTTCCCAGTATCTCCAGAAATGCTCATAACGATG
 AGCATGCCAAATTAGTGCAGGAAGTAACAGACTTTGCAAAGACGTGTGTTGCCGATGAGTCT
 15 GCCGCCAACTGTGACAAATCCCTTCACACTCTTTTTGGAGATAAGTTGTGTGCCATTCCAAA
 CCTCCGTGAAAACCTATGGTGAACCTGGCTGACTGCTGTACAAAACAAGAGCCCCGAAAGAAACG
 AATGTTTCCCTGCAACACAAAGATGACAACCCAGCCTGCCACCATTGAAAGGCCAGAGGCT
 GAGGCCATGTGCACCTCCTTTAAGGAAAACCAACCACCTTTATGGGACACTATTTGCATGA
 AGTTGCCAGAAGACATCCTTATTTCTATGCCCCAGAACTTCTTTACTATGCTGAGCAGTACA
 20 ATGAGATTCTGACCCAGTGTGTGTGCAGAGGCTGACAAGGAAAGCTGCCTGACCCCGAAGCTT
 GATGGTGTGAAGGAGAAAGCATTGGTCTCATCTGTCCGTGAGAGAATGAAGTGCTCCAGTAT
 GCAGAAGTTTGGAGAGAGAGCTTTTAAAGCATGGGCAGTAGCTCGTCTGAGCCAGACATTCC
 CCAATGCTGACTTTGCAGAAATCACCAAATTGGCAACAGACCTGACCAAAGTCAACAAGGAG
 TGCTGCCATGGTGACCTGCTGGAATGCGCAGATGACAGGGCGGAACCTGCCAAGTACATGTG
 25 TGAACCAGGCGACTATCTCCAGCAAACCTGCAGACTTGCTGCGATAAACCACTGTTGAAGA
 AAGCCCCTGTCTTAGTGAGGTGGAGCATGACACCATGCCTGCTGATCTGCCTGCCATTGCT
 GCTGATTTTGTGAGGACCAGGAAGTGTGCAAGAACTATGCTGAGGCCAAGGATGTCTTCCT
 GGGCACGTTCTTGTATGAATATTCAAGAAGACACCCTGATTACTCTGTATCCCTGTTGCTGA
 GACTTGCTAAGAAATATGAAGCCACTCTGGAAAAGTGCTGCGCTGAAGCCAATCCTCCCGCA
 30 TGCTACGGCACAGTGCTTGCTGAATTTACGCCTCTTGTAAGAAGAGCCTAAGAACTTGGTCAA
 AACCAACTGTGATCTTTACGAGAAGCTTGGAATATGGAATCCAAAATGCCATTCTAGTTC
 GCTACACCCAGAAAGCACCTCAGGTGTCAACCCCAACTCTCGTGGAGGCTGCAAGAAACCTA
 GGAAGAGTGGGCACCAAGTGTGTACACTTCCTGAAGATCAGAGACTGCCTTGTGTGGAAGA
 CTATCTGTCTGCAATCCTGAACCGTGTGTGTCTGCTGCATGAGAAGACCCAGTGAGTGAGC
 35 ATGTTACCAAGTGCTGTAGTGGATCCCTGGTGGAAAGGCGGCCATGCTTCTCTGCTCTGACA
 GTTGATGAAACATATGTCCCCAAGAGTTTAAAGCTGAGACCTTCACCTTCCACTCTGATAT
 CTGCACACTTCCAGAGAAGGAGAAGCAGATTAAGAAACAAACGGCTCTTGCTGAGCTGGTGA
 AGCACAAGCCCAAGGCTACAGCGGAGCAACTGAAGACTGTCATGGATGACTTTGCACAGTTC
 CTGGATACATGTTGCAAGGCTGCTGACAAGGACACCTGCTTCTCGACTGAGGGTCCAAACCT
 40 TGCTACTAGATGCAAAGACGCCTTAGCCTGAGCGATCGCTAAATACAGCAGCAATTGGCAAG
 CTGCTTACATAGAACTCGCGGCGATTGGCATGCCGCCTTAAAATTTTTATTTTATTTTCTT
 TTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTTTAATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAC
 GCGTCGAGGGGAATTAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTG
 CGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACA
 45 ATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCC
 GTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTCACCCAGAAACG
 CTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGA
 TCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCA
 CTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTC
 50 GGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCA
 TCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACA
 CTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAC

AACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC
 AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTTAA
 CTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAA
 GTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGG
 5 AGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCC
 GTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATC
 GCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATAT
 ACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTG
 ATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA
 10 GAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC
 AAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTC
 CGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGAGCCGTAG
 TTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTT
 ACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGT
 15 TACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAG
 CGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCC
 CGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGA
 GGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGA
 CTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAA
 20 CGCGAGCTCTAATACGACTCACTATAG (SEC ID NO: 4)

En algunas realizaciones, el ARN-IL-12 del replicón se fusiona con una secuencia
 codificante de albúmina sérica. En algunas realizaciones, la molécula de fusión de IL-12-
 albúmina tiene una vida media más larga en el microambiente tumoral. En algunas
 25 realizaciones, la proteína de fusión de IL-12-albúmina puede persistir en el microambiente
 tumoral durante al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días o más.

En algunas realizaciones, el virus oncolítico sintético comprende ARN-IL-12-
 albúmina sérica del replicón-LNP. En otras realizaciones, el virus oncolítico sintético
 comprende ARN-IL-12-albúmina sérica del replicón-LNP-TT3. En otras realizaciones, el
 30 virus oncolítico sintético comprende ARN-IL-12-albúmina sérica del replicónmt-LNP-TT3.
 La presencia persistente de IL-12 en el microambiente tumoral puede prolongar la respuesta
 inmune antitumoral ejercida por el virus oncolítico sintético.

En algunas realizaciones, el ARN-IL12-albúmina sérica del replicón comprende
 además una secuencia codificante para lumican. Lumican es una de las principales proteínas
 35 extracelulares en la matriz extracelular intersticial (MEC) de la piel, estroma corneal,
 esclerótica, aorta, músculo, pulmón, riñón, hueso, cartílago y discos intervertebrales. Es un
 miembro de la familia de pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRP), con un núcleo de
 proteína de 30-50 kDa que comprende un péptido señal, un dominio N-terminal cargado
 negativamente, un dominio interno rico en leucina altamente conservado y un dominio
 40 carboxilo-terminal. El núcleo de proteína y las cadenas de glicanos de lumican pueden
 interactuar con varios efectores celulares, incluidos citocinas, factores de crecimiento y

receptores de la superficie celular, para modular la adhesión, proliferación y migración celular. Como proteína de unión a colágeno endógena, la presencia de lumican en el microambiente tumoral promovería la retención local de IL-12 para mejorar la eficacia y seguridad de la inmunoterapia tumoral, como se describe en el presente documento. En

5 algunas realizaciones, el ARN-IL-12-MSA del replicón comprende una secuencia codificante de lumican. En otras realizaciones, el ARN-IL-12-MSA del Replicónmt (mtRep-IL12-MSA) comprende una secuencia codificante de lumican. Un ejemplo de secuencia codificante para ARN-IL-12-MSA-lumican del Replicónmt (mtRep-IL12-MSA-Lumican) se expone en la SEC ID NO: 5:

```
10 ATGGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCACGTT
   GACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGT
   AGAAGCCAAGCAGGTCAGTGAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTGGCTT
   CAAAAGTGAATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCAGCC
   GCGCGCAGAAATGTATTCTAAGCACAAGTATCATTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGA
15 TCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAAACTGTAAAGGAAATAACTGATA
   AGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTGGCCGCGTCATGAGCGACCTGACCTGGAAACT
   GAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGTGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGTTTACCA
   GGATGTATACGCGGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAG
   TCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTATGTTTAAGAACTTGGCTGGAGCATAT
20 CCATCATACTCTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATG
   CAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTCACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGA
   AACCATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTA
   CTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTGCG
   GTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTGCTTAAAGAAATAGCTATCAGTCCAGGCC
25 TGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCAAA
   GTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTAC
   ATTGTGTGACCAAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGCGGACGACGCGCAAAAAC
   TGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTTCGCACCCAGAGAAACACCAATACC
   ATGAAAAATTACCTTTTGCCCGTAGTGGCCAGGCATTTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAA
30 GGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTT
   GTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATC
   ATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGCTGCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGA
   GATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCA
   TTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAA
35 GCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGGA
   AGCCGATGTCGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCT
   TGATAAAGGTTACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCG
   CAGGCTGTACTCAAGAGTGAAAAATTATCTTGATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGT
   GATAACACACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATACCATGGTAAAGTAGTGG
40 TGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATT
   GTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAGGAGC
   GCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAAGTGTCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAATACC
   TGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGTCACTGGGCTAGGGCTCACA
   GGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGC
45 CGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCA
   TCATTTAAAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAGAACTGTGCA
   GAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAAGTGTGGACTC
```

AGTGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTT
 GTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGC
 GGGGATCCCAAACAGTGCGGTTTTTTTTTAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAACCACGA
 GATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGG
 5 TCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATT
 GTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTCAG
 AGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCT
 CTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCCGGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTG
 TACGCACCCACCTCAGAACATGTGAACGTCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTG
 10 GAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACTGCCAAGTACCCTGGGAATTTCA
 CTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGA
 CCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCCAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGCC
 GGTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATTTTG
 AAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGA
 15 CTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCA
 CTGGGATAACTCCCCGTGCGCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCT
 CTCGCAGGTACCCACAACCTGCCTCGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACT
 GGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCA
 TGCTTTAGTCTCCACCATAATGAACACCCACAGAGTGACTTTTCTTCATTTCGTCAGCAAAT
 20 TGAAGGGCAGAACTGTCTTGGTGGTGGGGGAAAAGTTGTCCGTCCAGGCAAAATGGTTGAC
 TGGTTGTGACACCGGCTGAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCAGGTGA
 TGTGCCCAAATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACCATCACTATC
 AGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCTG
 AATCCCGGCGGAACCTGTGTCAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCAT
 25 CATTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTG
 AAGAGACGGAAGTTCTGTTTGTATTTCATTCCGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATTCT
 TACAAGCTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATG
 TGCACCCTCATATCATGTGGTGCAGGGGATATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAA
 ATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTC
 30 CCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGC
 TAAACATATCATTTCATGCCGTAGGACCAAACCTTCAACAAAGTTTTCGGAGGTTGAAGGTGACA
 AACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCA
 GTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATC
 ATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGG
 35 ACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGCGTAGGAGAGAAGCAGTGAGGAGATA
 TGCATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAA
 GAGTTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAACTTTCTCATATTTGG
 AAGGGACCAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTT
 GCAACGGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAGGCATGAGCAGTATTAG
 40 GTCGAAATGCCCCGTGGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGT
 GCATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATT
 ACTGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGAGAAAGATCCAATG
 CTTCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCG
 TGGAACACCAACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGG
 45 ACACCTGAACAACCAACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGAT
 CATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTGAGATGGCCCGACCCACCAGG
 TGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCCTGGTCCATT
 CCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCTGGAGGGAGCTAG
 CGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTC
 50 TGGCGCGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCCTCCACATCCCGCTCCGCGC
 ACAAGAACACCGTCACTTGACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCC
 GCCAGGCGTGAATAGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTC

CTAGCAGGTCGGTCTCGAGAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATT
 ACAAGAGAGGAGTTTGTAGGCGTTTCGTAGCACACAACAATGACGGTTTGTATGCGGGTGCATA
 CATCTTTTTCCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTACAACAAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGC
 TATCCGAAGTGGTGTGGAGAGGACCGAATTGGAGATTTTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAA
 5 GAAAAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCCACACCTGCTAACAGAAGCAG
 ATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGGCC
 TAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCCTGCATCCTGTTCTCT
 TTGTATTTCATCTAGTGTGAACCGTGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTGCGAGTGGAAGCCTGTAA
 CGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATG
 10 CCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGGCCTGCA
 AAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCC
 TTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAATG
 TCACGCAAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTTCGGCGGCCTTTAATGTGGAATGCTTCAAG
 AAATATGCGTGTAATAATGAATATTGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACTGA
 15 AGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAATTAAGAGACCAAAGCTGCTGCTCTTTTTGCGA
 AGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACATAACCAATGGACAGGTTTGTAAATGGACTTAAAG
 AGAGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGAT
 CCAGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAGGA
 GATTAAATGCGGTCTCTGCTTCCGAACATTCATACACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTT
 20 GACGCTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAACTGACATCGCGTC
 GTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAG
 GTGTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTTTCATCAATACAT
 TTGCCCACTAAAATAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTTCTCACACT
 GTTTGTGAACACAGTCATTAAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGAACGGCTAACCG
 25 GATCACCATGTGCAGCATTCAATTGGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAA
 TTAATGGCAGACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGT
 GGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAGGGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAG
 CGTGCCGTGTGGCAGACCCCCCTAAAAAGGCTGTTTAAGCTTGGAACCTCTGGCAGCAGAC
 GATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGCATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGT
 30 GGGTATTCTTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTCCA
 TCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAAATCATTTCAGCTACCTGAGAGGG
 GCCCCATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCCGCCAAGTCT
 AGCATATGGGCGCGCCCTCAGCATCGATTTGAATTGGCCACCATGAGGGTCCCCGCTCAGCT
 CCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCACGATGTGCCATGTGGGAGCTGGAGAAAG
 35 ACGTTTATGTTGTAGAGGTGGACTGGACTCCCGATGCCCTGGAGAAACAGTGAACCTCACC
 TGTGACACGCCTGAAGAAGATGACATCACCTGGACCTCAGACCAGAGACATGGAGTCATAGG
 CTCTGGAAAGACCCTGACCATCACTGTCAAAGAGTTTCTAGATGCTGGCCAGTACACCTGCC
 ACAAAGGAGGCGAGACTCTGAGCCACTCACATCTGCTGCTCCACAAGAAGGAAAATGGAATT
 TGGTCCACTGAAATTTTAAAAAATTTCAAAAACAAGACTTTCCTGAAGTGTGAAGCACCAAA
 40 TTAATCCGGACGGTTCACGTGCTCATGGCTGGTGCAAAGAAACATGGACTTGAAGTTCAACA
 TCAAGAGCAGTAGCAGTTCCCCTGACTCTCGGGCAGTGACATGTGGAATGGCGTCTCTGTCT
 GCAGAGAAGGTCACACTGGACCAAAGGGACTATGAGAAGTATTCAGTGTCCTGCCAGGAGGA
 TGTACCTGCCCAACTGCCGAGGAGACCCTGCCATTGAAGTGGCGTTGGAAGCACGGCAGC
 AGAATAAATATGAGAACTACAGCACCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCAAACCAGACCCG
 45 CCAAAGAACTTGAGATGAAGCCTTTGAAGAACTCACAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCC
 TGAATCCTGGAGCACTCCCCATTCTTACTTCTCCCTCAAGTTCTTTGTTTGAATCCAGCGCA
 AGAAAGAAAAGATGAAGGAGACAGAGGAGGGGTGTAACCAGAAAGGTGCGTTCTCGTAGAG
 AAGACATCTACCGAAGTCCAATGCAAAGGCGGGAATGTCTGCGTGCAAGCTCAGGATCGCTA
 TTACAATTCCTCATGCAGCAAGTGGGCATGTGTTCCCTGCAGGGTCCGATCCGGAGGTTCCG
 50 GTGGTGGATCCGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGATCCAGGGTCATTCCAGTCTCTGGACCTGCC
 AGGTGTCTTAGCCAGTCCCGAAACCTGCTGAAGACCACAGATGACATGGTGAAGACGGCCAG
 AGAAAACTGAAACATTATTCCTGCACTGCTGAAGACATCGATCATGAAGACATCACACGGG

ACCAAACCAGCACATTGAAGACCTGTTTACCACTGGAACCTACACAAGAACGAGAGTTGCCTG
 GCTACTAGAGAGACTTCTTCCACAACAAGAGGGAGCTGCCTGCCCCACAGAAGACGTCTTT
 GATGATGACCTGTGCCTTGGTAGCATCTATGAGGACTTGAAGATGTACCAGACAGAGTTCC
 AGGCCATCAACGCAGCACTTCAGAATCACAACCATCAGCAGATCATTCTAGACAAGGGCATG
 5 CTGGTGGCCATCGATGAGCTGATGCAGTCTCTGAATCATAATGGCGAGACTCTGCGCCAGAA
 ACCTCCTGTGGGAGAAGCAGACCCTTACAGAGTGAAAATGAAGCTCTGCATCCTGCTTCACG
 CCTTCAGCACCCGCGTCGTGACCATCAACAGGGTGATGGGCTATCTGAGCTCCGCCGGTTCC
 GGTGGCGGATCCGAAGCACACAAGAGTGAGATCGCCCATCGGTATAATGATTTGGGAGAACA
 ACATTTCAAAGGCCTAGTCCTGATTGCCTTTTCCAGTATCTCCAGAAATGCTCATACGATG
 10 AGCATGCCAAATTAGTGAGGAAGTAACAGACTTTGCAAAGACGTGTGTTGCCGATGAGTCT
 GCCGCCAACTGTGACAAATCCCTTCACACTCTTTTGGAGATAAGTTGTGTGCCATTCCAAA
 CCTCCGTGAAAACCTATGGTGAACCTGGCTGACTGCTGTACAAAACAAGAGCCCCGAAAGAAACG
 AATGTTTCCTGCAACACAAAGATGACAACCCAGCCTGCCACCATTGAAAGGCCAGAGGCT
 GAGGCCATGTGCACCTCCTTTAAGGAAAACCAACCACCTTTATGGGACACTATTTGCATGA
 15 AGTTGCCAGAAGACATCCTTATTTCTATGCCCCAGAACTTCTTTACTATGCTGAGCAGTACA
 ATGAGATTCTGACCCAGTGTTGTGCAGAGGCTGACAAGGAAAGCTGCCTGACCCCGAAGCTT
 GATGGTGTGAAGGAGAAAGCATTGGTCTCATCTGTCCGTCAGAGAATGAAGTGCTCCAGTAT
 GCAGAAGTTTGGAGAGAGAGCTTTTAAAGCATGGGCAGTAGCTCGTCTGAGCCAGACATTCC
 CCAATGCTGACTTTGCAGAAATCACCAAAATGGCAACAGACCTGACCAAAGTCAACAAGGAG
 20 TGCTGCCATGGTGACCTGCTGGAATGCGCAGATGACAGGGCGGAACCTGCCAAGTACATGTG
 TGA AAACCAGGCGACTATCTCCAGCAAACCTGCAGACTTGCTGCGATAAAACCACTGTTGAAGA
 AAGCCCACTGTCTTAGTGAGGTGGAGCATGACACCATGCCTGCTGATCTGCCTGCCATTGCT
 GCTGATTTTGTGAGGACCAGGAAGTGTCGAAGAACTATGCTGAGGCCAAGGATGTCTTCCT
 GGGCACGTTCTTGTATGAATATTCAAGAAGACACCCTGATTACTCTGTATCCCTGTTGCTGA
 25 GACTTGCTAAGAAATATGAAGCCACTCTGGAAGAGTGCTGCGCTGAAGCCAATCCTCCCGCA
 TGCTACGGCACAGTGCTTGCTGAATTTACGCCTCTTGTAAGAGAGCCTAAGAACTTGGTCAA
 AACCAACTGTGATCTTTACGAGAAGCTTGGAAGATATGGATTCCAAAATGCCATTCTAGTTC
 GCTACACCCAGAAAGCACCTCAGGTGTCAACCCCAACTCTCGTGGAGGCTGCAAGAAACCTA
 GGAAGAGTGGGCACCAAGTGTTGTACACTTCCTGAAGATCAGAGACTGCCTTGTGTGGAAGA
 30 CTATCTGTCTGCAATCCTGAACCGTGTGTGTCTGCTGCATGAGAAGACCCCAAGTGAGTGAGC
 ATGTTACCAAGTGCTGTAGTGGATCCCTGGTGGAAGGCGGCCATGCTTCTCTGCTCTGACA
 GTTGATGAAACATATGTCCCCAAAGAGTTTAAAGCTGAGACCTTCACCTTCCACTCTGATAT
 CTGCACACTTCAGAGAAGGAGAAGCAGATTAAGAAACAAACGGCTCTTGCTGAGCTGGTGA
 AGCACAAGCCCCAAGGCTACAGCGGAGCAACTGAAGACTGTCATGGATGACTTTGCACAGTTC
 35 CTGGATACATGTTGCAAGGCTGCTGACAAGGACACCTGCTTCTCGACTGAGGGTCCAAACCT
 TGCTACTAGATGCAAAGACGCCTTAGCCGGCGGAGGTTCCGGTGGCGGATCCCAATACTATG
 ACTACGATATACCCCCTGTTTATGTACGGGCAAATATCTCCAACTGTGCACCAGAATGTAAC
 TGCCCTCACTCATACCCCACTGCAATGTACTGTGACGACCTGAAGTTGAAATCCGTGCCAAT
 GGTGCCTCCTGGGATTAAGTACCTGTACCTCCGCAACAATCAGATCGACCATAATTGACGAGA
 40 AGGCTTTTGAAAACGTCACAGACCTCCAGTGGCTTATCCTGGACCATAACCTGCTTGAAAAT
 AGTAAGATAAAGGGCAAAGTATTTTCCAACTTAAACAGCTTAAAAAACTCCACATCAACTA
 CAATAACCTTACTGAATCCGTGGGACCATTGCCAAAATCTCTCCAAGATTTGCAGTTGACTA
 ACAACAAGATATCCAACTCGGCTCCTTCGATGGGCTGGTTAATCTGACTTTTCATCTACTTG
 CAACACAACCAATTGAAGGAGGATGCAGTTTCAGCTAGTCTTAAAGGTCTGAAAAGCCTTGA
 45 GTATCTTGATCTGTCAATTAATCAAATGTCCAAGCTCCCTGCTGGGCTCCCAACAAGTCTGC
 TGACACTCTATCTCGACAATAACAAGATAAGTAACATTCCCGATGAGTACTTTAAAGATTT
 ACCGGCCTCCAATACTTGCGGCTTTCTCACAACGAGTTGGCAGACTCTGGTGTACCCGGCAA
 CTCCTTTAATATAAGTTCTTCTCGAGCTTGATTTGTCTATAACAACTGAAGAGTATCC
 CTA CTGTCAATGAAAATTTGGAGAATTACTACCTCGAAGTCAATGAGCTTGAGAAGTTTCGAT
 50 GTTAAGTCTTTCTGTAAGATACTGGGTCCATTGTCATACAGCAAGATTAAACATCTTCGCTT
 GGATGGGAATCCCTTGACTCAAAGCTCACTTCCCCCGACATGTACGAATGCCTGAGGGTAG
 CCAACGAAATCACAGTAAACGGAGGTGGCTCCTGAGCGATCGCTAAATACAGCAGCAATTGG

CAAGCTGCTTACATAGAACTCGCGGCGATTGGCATGCCGCCTTAAAATTTTTATTTTATTTT
 TCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTTAATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAACGCGTCGAGGGGAATTAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAA
 TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGA
 5 GACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACAT
 TTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCTTCCCTGTTTTTGCTCACCAGAA
 AACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAC
 TGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATG
 AGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCA
 10 ACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAA
 AGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGAT
 AACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTT
 GCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCA
 TACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTA
 15 TTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA
 TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAAT
 CTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCC
 TCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA
 GATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTTACTCAT
 20 ATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTT
 TTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCC
 CGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGC
 AAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTT
 TTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGAGCC
 25 GTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCC
 TGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGA
 TAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTT
 GGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGC
 TTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGC
 30 ACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCT
 CTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCA
 GCAACGCGAGCTCTAATACGACTCACTATAG (SEC ID NO: 5)

En algunas realizaciones, el virus oncolítico sintético comprende ARN-IL-12-
 albúmina sérica-lumican del replicón-LNP. En otras realizaciones, el virus oncolítico
 35 sintético comprende ARN-IL-12-albúmina sérica-lumican del replicón-LNP-TT3. En otras
 realizaciones, el virus oncolítico sintético comprende ARN-IL-12-albúmina sérica-lumican
 del Replicónmt-LNP-TT3. La retención de IL-12 en el microambiente tumoral puede mejorar
 la eficacia y seguridad del virus oncolítico sintético.

En algunos casos, el ARN del replicón puede comprender uno o más genes de interés
 40 experimental o terapéutico. En algunas realizaciones, el gen o genes de interés experimental o
 terapéutico codifican citocinas, quimiocinas o factores de crecimiento distintos de IL-12. Las
 citocinas son conocidas en el arte, y el término en sí se refiere a un grupo generalizado de
 pequeñas proteínas que son secretadas por ciertas células dentro del sistema inmunológico y
 tienen un efecto sobre otras células. Se sabe que las citocinas mejoran la respuesta inmune
 45 celular y, como se usa en el presente documento, pueden incluir, entre otras, TNF α , IFN- γ ,

IFN- α , TGF- β , IL-1, IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-18 y quimiocinas. Las quimiocinas son útiles para estudios que investigan la respuesta a infecciones, respuestas inmunes, inflamación, trauma, sepsis, cáncer y reproducción, entre otras aplicaciones. Las quimiocinas son conocidas en el arte y son un tipo de citocinas que inducen la quimiotaxis en células

5 sensibles cercanas, normalmente de glóbulos blancos, a los sitios de infección. Ejemplos no limitantes de quimiocinas incluyen CCL14, CCL19, CCL20, CCL21, CCL25, CCL27, CXCL12, CXCL13, CXCL-8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11 y CXCL10. Los factores de crecimiento son conocidos en el arte y el término en sí mismo a veces es intercambiable con el término citocinas. Como se usa en el presente documento, el término “factores de

10 crecimiento” se refiere a una sustancia de origen natural capaz de señalar entre células y estimular el crecimiento celular. Si bien las citocinas pueden ser factores de crecimiento, ciertos tipos de citocinas también pueden tener un efecto inhibitor sobre el crecimiento celular, diferenciando así los dos términos. Ejemplos no limitantes de factores de crecimiento incluyen Adrenomedulina (AM), Angiopoyetina (Ang), Factor de motilidad autocrina,

15 Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), Factor neurotrófico ciliar (CNTF), Factor inhibitor de la leucemia (LIF), Interleucina-6 (IL-6), Factor estimulante de colonias de macrófagos (m-CSF), Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), Factor de crecimiento epidérmico (EGF), Efrín A1, Efrín A2, Efrín A3, Efrín A4, Ephrin A5, Efrín B1, Efrín B2, Efrín B3, Eritropoyetina (EPO),

20 Factor de crecimiento de fibroblastos 1(FGF1), Factor de crecimiento de fibroblastos 2(FGF2), Factor de crecimiento de fibroblastos 3(FGF3), Factor de crecimiento de fibroblastos 4(FGF4), Factor de crecimiento de fibroblastos 5(FGF5), Factor de crecimiento de fibroblastos 6(FGF6), Factor de crecimiento de fibroblastos 7(FGF7), Factor de crecimiento de fibroblastos 8(FGF8), Factor de crecimiento de fibroblastos 9(FGF9), Factor

25 de crecimiento de fibroblastos 10(FGF10), Factor de crecimiento de fibroblastos 11(FGF11), Factor de crecimiento de fibroblastos 12(FGF12), Factor de crecimiento de fibroblastos 13(FGF13), Factor de crecimiento de fibroblastos 14(FGF14), Factor de crecimiento de fibroblastos 15(FGF15), Factor de crecimiento de fibroblastos 16(FGF16), Factor de crecimiento de fibroblastos 17(FGF17), Factor de crecimiento de fibroblastos 18(FGF18),

30 Factor de crecimiento de fibroblastos 19(FGF19), Factor de crecimiento de fibroblastos 20(FGF20), Factor de crecimiento de fibroblastos 21(FGF21), Factor de crecimiento de fibroblastos 22(FGF22), Factor de crecimiento de fibroblastos 23(FGF23), Somatotropina fetal bovina (FBS), Factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), Neurturina, Persefina, Artemina, Factor de diferenciación del crecimiento-9 (GDF9), Factor de

crecimiento de hepatocitos (HGF), Factor de crecimiento derivado del hepatoma (HDGF), Insulina, Factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), Factor de crecimiento similar a la insulina-2 (IGF-2), Interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, Factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), Factor estimulante de la migración (MSF), Proteína estimulante de macrófagos (MSP), Miostatina (GDF-8), Neuregulin 1 (NRG1), Neuregulin 2 (NRG2), Neuregulin 3 (NRG3), Neuregulin 4 (NRG4), Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), Factor de crecimiento nervioso (NGF), Neurotropina-3 (NT-3), Neurotropina-4 (NT-4), Factor de crecimiento placentario (PGF), Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), Renalase (RNLS), Factor de crecimiento de células T (TCGF), Trombopoyetina (TPO), Factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

II. Composiciones farmacéuticas

En algunos aspectos, la presente divulgación, al menos en parte, se refiere a una composición farmacéutica, que comprende el virus oncolítico sintético, como se describe en el presente documento. La composición farmacéutica que se describe en el presente documento puede comprender además un vehículo (excipiente) farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad objetivo. “Aceptable” significa que el vehículo debe ser compatible con el ingrediente activo de la composición (y preferiblemente, capaz de estabilizar el ingrediente activo) y no debe ser perjudicial para el sujeto a tratar. Excipientes (vehículos) farmacéuticamente aceptables que incluyen tampones, que son bien conocidos en el arte. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover.

Las composiciones farmacéuticas que se utilizarán para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones sintéticas que contienen virus oncolíticos pueden colocarse en un contenedor que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o una ampolla que tiene un tapón que puede perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que se utilizará en la presente documento puede formularse para inyección intratumoral. La inyección intratumoral, como se usa en el presente documento, se refiere a inyecciones directas en el tumor, una

composición antitumoral (por ejemplo, virus oncolítico sintético inmunoestimulador). Se puede lograr una alta concentración de composición in situ, mientras se utilizan pequeñas cantidades de fármacos. La administración local de inmunoterapias permite múltiples terapias de combinación, al tiempo que previene una exposición sistémica significativa y toxicidades fuera del objetivo.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica se puede formular para inyección intramuscular, inyección intravenosa o inyección subcutánea.

Las composiciones farmacéuticas que se utilizarán en los presentes métodos pueden comprender vehículos, agentes tampones, excipientes, sales o estabilizadores

farmacéuticamente aceptables en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

Véase, *por ejemplo*, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000)

Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover). Vehículos, excipientes o

estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y las

concentraciones utilizadas, y pueden comprender tampones tales como fosfato, citrato y otros

ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales

como cloruro de octadecil dimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de

benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales

como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol);

polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas,

tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como

polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina,

arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa,

manosa o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa,

manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos

metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como

TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

En algunos ejemplos, la composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende nanopartículas lipídicas que pueden prepararse mediante métodos conocidos en el arte, tales como los descritos en Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985);

Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); y Pat. de EE.UU. No. 4,485,045 y

4,544,545. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se divulgan en la patente de

EE.UU. No. 5.013.556. Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el

método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende

fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los

liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

En otros ejemplos, la composición farmacéutica que se describe en el presente documento se puede formular en formato de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el virus oncolítico sintético cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de EE.UU. No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, acetato de vinilo-etileno no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), isobutirato de acetato de sacarosa y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Agentes tensioactivos adecuados incluyen, en particular, agentes no iónicos, tales como polioxietilenosorbitanos (por ejemplo, TWEEN™ 20, 40, 60, 80 u 85) y otros sorbitanos (por ejemplo, SPAN™ 20, 40, 60, 80 u 85). Las composiciones con un agente tensioactivo comprenderán convenientemente entre el 0,05 y el 5 % de agente tensioactivo, y pueden estar entre el 0,1 y el 2,5 %. Se apreciará que se pueden añadir otros ingredientes, por ejemplo manitol u otros vehículos farmacéuticamente aceptables, de ser necesario.

Las composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento pueden estar en formas de dosificación unitarias tales como tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones, o supositorios, para administración oral, parenteral o rectal, o administración por inhalación o insuflación.

Para preparar composiciones sólidas tales como tabletas, el ingrediente activo principal se puede mezclar con un vehículo farmacéutico, por ejemplo, ingredientes convencionales de tabletas tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas, y otros diluyentes farmacéuticos, por ejemplo, agua, para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención, o su sal no tóxica farmacéuticamente aceptable. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, se quiere decir que el ingrediente activo se dispersa uniformemente por toda la composición de modo que la composición se puede subdividir fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces tales como tabletas,

píldoras y cápsulas. Esta composición de preformulación sólida se subdivide luego en formas de dosificación unitarias del tipo que se describe anteriormente que contienen de 0,1 a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo de la presente invención. Las tabletas o píldoras de la nueva composición pueden recubrirse o componerse de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que ofrezca la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, la tableta o píldora puede comprender un componente de dosificación interior y un componente de dosificación exterior, en donde este último se encuentra en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o se retrase su liberación. Puede usarse una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, tales materiales incluyen varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Se pueden preparar emulsiones adecuadas usando emulsiones grasas disponibles comercialmente, tales como INTRALIPID™, LIPOSYN™, INFONUTROL™, LIPOFUNDIN™ y LIPIPHYSAN™. El ingrediente activo puede disolverse en una composición de emulsión premezclada o alternativamente puede disolverse en un aceite (por ejemplo, aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de maíz o aceite de almendras) y se puede formar una emulsión al mezclar con un fosfolípido (por ejemplo, fosfolípidos de huevo, fosfolípidos de soja o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que se pueden añadir otros ingredientes, por ejemplo, glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas contendrán normalmente hasta un 20 % de aceite, por ejemplo, entre un 5 y un 20 %. La emulsión de grasa puede comprender gotitas de grasa que tienen un tamaño adecuado y pueden tener un pH en el intervalo de 5,5 a 8,0.

Las composiciones farmacéuticas para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o sus mezclas, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se indica anteriormente. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía respiratoria oral o nasal para un efecto local o sistémico.

Las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables preferiblemente estériles se pueden nebulizar mediante el uso de gases. Las soluciones nebulizadas se pueden respirar directamente desde el dispositivo nebulizador o el dispositivo nebulizador se puede

conectar a una mascarilla, tienda o respirador de presión positiva intermitente. Las composiciones en solución, suspensión o polvo se pueden administrar, preferiblemente por vía oral o nasal, desde dispositivos que administran la formulación de una manera apropiada.

5 **III. Aplicaciones terapéuticas**

Las composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento, que comprenden un virus oncolítico sintético, se pueden usar para tratar el cáncer, por ejemplo, inmunoterapia contra el cáncer.

Para practicar el método que se describe en el presente documento, se puede
10 administrar una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en este documento a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que necesite el tratamiento a través de una ruta adecuada, como la administración intratumoral, mediante administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular,
15 intrasinovial, intratecal, oral, inhalatoria o tópica. Los nebulizadores disponibles comercialmente para formulaciones líquidas, incluidos los nebulizadores de chorro y los nebulizadores ultrasónicos, son útiles para la administración. Las formulaciones líquidas se pueden nebulizar directamente y el polvo liofilizado se puede nebulizar después de la reconstitución. De manera alternativa, la composición farmacéutica que contiene virus
20 oncolítico sintético puede aerosolizarse usando una formulación de fluorocarbono y un inhalador de dosis medida, o inhalarse como un polvo liofilizado y molido. En algunos ejemplos, la composición farmacéutica que se describe en el presente documento se formula para inyección intratumoral. En ejemplos particulares, la composición farmacéutica se puede administrar a un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) a través de una ruta local, por
25 ejemplo, inyectarse en un sitio local tal como un sitio tumoral o un sitio infeccioso.

Como se usa en el presente documento, “una cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de cada agente activo necesaria para conferir un efecto terapéutico al sujeto, ya sea solo o en combinación con uno o más de otros agentes activos. En algunas realizaciones, el efecto terapéutico es la reducción de la carga tumoral, la reducción de las células cancerosas o el
30 aumento de la actividad inmunitaria. La determinación de si una cantidad de virus oncolítico sintético logra el efecto terapéutico sería evidente para un versado en la materia. Las cantidades efectivas varían, como reconocen los versados en la materia, dependiendo de la afección particular que se esté tratando, la gravedad de la afección, los parámetros individuales del paciente, incluida la edad, la condición física, el tamaño, el sexo y el peso, la

duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hubiera), la vía específica de administración y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del médico. Estos factores son bien conocidos por los versados en la materia y se pueden abordar con sólo una experimentación de rutina. En general, se prefiere que se use una dosis máxima de los componentes individuales o sus combinaciones, es decir, la dosis más segura de acuerdo con el sano juicio del médico.

Las consideraciones empíricas, como la vida media, generalmente contribuirán a la determinación de la dosis. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse durante el curso de la terapia, y generalmente, pero no necesariamente, se basa en el tratamiento y/o supresión y/o mejora y/o retraso de una enfermedad/trastorno objetivo. De manera alternativa, pueden ser apropiadas las formulaciones de liberación continua y sostenida de un virus oncolítico sintético. En el arte, se conocen diversas formulaciones y dispositivos para lograr una liberación sostenida.

En algunas realizaciones, el tratamiento es una única inyección de la composición farmacéutica que contiene virus oncolítico sintético. En algunas realizaciones, la inyección única se administra por vía intratumoral al sujeto que la necesita.

En algún ejemplo, las dosis para un virus oncolítico sintético como se describe en el presente documento pueden determinarse empíricamente en individuos que han recibido una o más administraciones de oncolítico sintético. Los individuos reciben dosis incrementales de la composición que contiene oncolíticos sintéticos. Para evaluar la eficacia del virus oncolítico sintético, se puede seguir un indicador de la enfermedad/trastorno. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce la supresión deseada de los síntomas o hasta que se alcanzan niveles terapéuticos suficientes para aliviar una enfermedad o trastorno objetivo o su síntoma.

En algunas realizaciones, la frecuencia de dosificación es una vez a la semana, cada 2 semanas, cada 4 semanas, cada 5 semanas, cada 6 semanas, cada 7 semanas, cada 8 semanas, cada 9 semanas o cada 10 semanas; o una vez al mes, cada 2 meses o cada 3 meses o más. El progreso de esta terapia se monitorea fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. El régimen de dosificación del virus oncolítico sintético usado puede variar con el tiempo.

En algunas realizaciones, el método que se describe en el presente documento comprende administrar a un sujeto que necesita el tratamiento (por ejemplo, un paciente humano) una o múltiples dosis de composición farmacéutica que contiene virus oncolítico sintético.

Para el propósito de la presente divulgación, la dosis apropiada de virus oncolítico sintético como se describe en el presente documento dependerá del virus oncolítico sintético específico, el tipo y la gravedad de la enfermedad/trastorno, el virus oncolítico sintético se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica y la

5 respuesta al virus oncolítico sintético del paciente, y la discreción del médico tratante. Un médico puede administrar un virus oncolítico sintético, hasta que se alcance una dosis que logre el resultado deseado. En algunas realizaciones, el resultado deseado es una disminución de la carga tumoral, una disminución de las células cancerosas o un aumento de la actividad inmunitaria. Los métodos para determinar si una dosis dio como resultado el
10 resultado deseado serían evidentes para un versado en la materia. La administración de uno o más virus oncolíticos sintéticos puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, del estado fisiológico del receptor, si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico y otros factores conocidos por los médicos expertos. La administración del virus oncolítico sintético puede ser esencialmente continua durante un período de tiempo
15 preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciadas, por ejemplo, antes, durante o después del desarrollo de una enfermedad o trastorno objetivo.

Como se usa en el presente documento, el término “tratar” se refiere a la aplicación o administración de una composición que incluye uno o más agentes activos a un sujeto, que tiene una enfermedad o trastorno objetivo, un síntoma de la enfermedad/trastorno o una
20 predisposición a la enfermedad/trastorno, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar o afectar el trastorno, el síntoma de la enfermedad o la predisposición a la enfermedad o trastorno.

Aliviar una enfermedad/trastorno objetivo incluye retrasar el desarrollo o la progresión de la enfermedad o reducir la gravedad de la enfermedad. Aliviar la enfermedad
25 no requiere necesariamente resultados curativos. Tal como se usa en el presente documento, “retrasar” el desarrollo de una enfermedad o trastorno objetivo significa diferir, obstaculizar, ralentizar, retrasar, estabilizar y/o posponer la progresión de la enfermedad. Este retraso puede ser de diferentes períodos de tiempo, dependiendo de la historia de la enfermedad y/o de las personas a las que se esté tratando. Un método que “retrasa” o alivia el desarrollo de
30 una enfermedad, o retrasa la aparición de la enfermedad, es un método que reduce la probabilidad de desarrollar uno o más síntomas de la enfermedad en un período de tiempo determinado y/o reduce la extensión de los síntomas en un período de tiempo determinado, en comparación con no utilizar el método. Tales comparaciones se basan normalmente en

estudios clínicos, usando un número suficiente de sujetos para dar un resultado estadísticamente significativo.

“Desarrollo” o “progresión” de una enfermedad significa manifestaciones iniciales y/o progresión subsiguiente de la enfermedad. El desarrollo de la enfermedad puede detectarse y evaluarse usando técnicas clínicas estándar bien conocidas en el arte. Sin embargo, el desarrollo también se refiere a una progresión que puede ser indetectable. A los efectos de esta divulgación, el desarrollo o progresión se refiere al curso biológico de los síntomas. El “desarrollo” incluye la ocurrencia, la recurrencia y la aparición. Como se usa en el presente documento, “aparición” o “ocurrencia” de una enfermedad o trastorno objetivo incluye la aparición y/o recurrencia inicial.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que contiene virus oncolítico sintético como se describe en el presente documento se administra a un sujeto que necesita el tratamiento en una cantidad suficiente para reducir la carga tumoral o el crecimiento de células cancerosas, en al menos un 5 % (por ejemplo, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más) in vivo. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas que contienen virus oncolíticos sintéticos como se describen en el presente documento se pueden administrar en una cantidad eficaz para aumentar la actividad inmunitaria en al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más.

El sujeto que se va a tratar mediante los métodos descritos en el presente documento puede ser un mamífero, como un ser humano, animales de granja, animales deportivos, mascotas, primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas. En una realización, el sujeto es humano. La composición que contiene virus oncolítico sintético como se describe en el presente documento puede usarse para mejorar la actividad inmunitaria, por ejemplo, la actividad de las células T, en un sujeto que necesite el tratamiento.

En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un paciente humano que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de tener un cáncer. Ejemplos no limitantes de cánceres incluyen melanoma, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer gástrico y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, incluido el cáncer de cabeza y cuello de células escamosas. En

algunas realizaciones, el cáncer puede ser melanoma, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de células renales, carcinoma urotelial o linfoma de Hodgkin.

Un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno objetivo (por ejemplo, cáncer) puede identificarse mediante un examen médico de rutina, por ejemplo, pruebas de laboratorio, pruebas funcionales de órganos, imágenes CAT o ultrasonidos. Un sujeto sospechoso de tener cualquiera de tales enfermedades/trastornos objetivo podría mostrar uno o más síntomas de la enfermedad/trastorno. Un sujeto en riesgo de padecer la enfermedad/trastorno puede ser un sujeto que tenga uno o más de los factores de riesgo asociados con esa enfermedad/trastorno. Un sujeto de este tipo también puede identificarse mediante prácticas médicas de rutina.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica sintética que contiene virus oncolíticos puede co-usarse con otro agente terapéutico adecuado (por ejemplo, un agente anticancerígeno, un agente antiviral o un agente antibacteriano) y/u otros agentes que sirven para potenciar y/o complementar el efecto inmunoestimulador de un virus oncolítico sintético. En tal terapia combinada, la composición que contiene un virus oncolítico sintético y el agente terapéutico adicional (por ejemplo, un agente terapéutico anticancerígeno u otros descritos en el presente documento) pueden administrarse a un sujeto que necesite el tratamiento de una manera secuencial, es decir, cada agente terapéutico se administra en un momento diferente. De manera alternativa, estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes, se administran al sujeto de manera sustancialmente simultánea.

La terapia de combinación también puede abarcar la administración de los agentes descritos en el presente documento (por ejemplo, un virus oncolítico sintético que contiene una composición farmacéutica y un agente anticancerígeno) en combinación adicional con otros ingredientes biológicamente activos (por ejemplo, un agente anticancerígeno diferente) y terapias sin fármacos (por ejemplo, cirugía).

Debe apreciarse que cualquier combinación de una composición que contenga virus oncolítico sintético y otro agente anticancerígeno (por ejemplo, un agente quimioterapéutico) puede usarse en cualquier secuencia para tratar un cáncer. Las combinaciones que se describen en el presente documento pueden seleccionarse sobre la base de una serie de factores, que incluyen, entre otros, la eficacia de reducir la formación de tumores o el crecimiento de tumores, reducir las células cancerosas, aumentar la actividad inmunitaria y/o aliviar al menos un síntoma asociado con el cáncer, o la eficacia para mitigar los efectos secundarios de otro agente de la combinación. Por ejemplo, una terapia combinada descrita en el presente documento puede reducir cualquiera de los efectos secundarios asociados con

cada miembro individual de la combinación, por ejemplo, un efecto secundario asociado con el agente anticancerígeno.

En algunas realizaciones, otro agente terapéutico anticancerígeno es una quimioterapia, una radioterapia, una terapia quirúrgica y/o una inmunoterapia. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, entre otros, Carboplatino o Cisplatino, Docetaxel, Gemcitabina, Nab-Paclitaxel, Paclitaxel, Pemetrexed y Vinorelbina. Ejemplos de radioterapia incluyen, entre otros, radiación ionizante, radiación gamma, radioterapia con haz de neutrones, radioterapia con haz de electrones, terapia de protones, braquiterapia, isótopos radiactivos sistémicos y radiosensibilizadores. Ejemplos de una terapia quirúrgica incluyen, entre otras, una cirugía curativa (por ejemplo, cirugía de extirpación de tumores), una cirugía preventiva, una cirugía laparoscópica y una cirugía con láser. Ejemplos de una inmunoterapia incluyen, entre otras, transferencia de células adoptivas y vacunas terapéuticas contra el cáncer.

Ejemplos adicionales de quimioterapia incluyen, entre otros, agentes platinadores, tales como Carboplatino, Oxaliplatino, Cisplatino, Nedaplatino, Satraplatino, Lobaplatino, Triplatino, Tetranitrato, Picoplatino, Prolindac, Aroplatino y otros derivados; Inhibidores de la Topoisomerasa I, tales como Camptotecina, Topotecan, irinotecan/SN38, rubitecan, Belotecan y otros derivados; Inhibidores de la topoisomerasa II, tales como Etopósido (VP-16), Daunorrubicina, un agente de doxorrubicina (por ejemplo, Doxorrubicina, doxorrubicina HCl, análogos de doxorrubicina o doxorrubicina y sales o análogos de los mismos en liposomas), Mitoxantrona, Aclarubicina, Epirubicina, Idarubicina, Amrubicina, Amsacrina, Pirarubicina, Valrubicina, Zorrubicina, Tenipósido y otros derivados; Antimetabolitos, tales como la Familia folic (Metotrexato, Pemetrexed, Raltitrexed, Aminopterina y parientes); Antagonistas de purina (Tioguanina, Fludarabina, Cladribina, 6-Mercaptopurina, Pentostatina, Clofarabina y parientes) y Antagonistas de pirimidina (Citarabina, Floxuridina, Azacitidina, Tegafur, Carmofur, Capacitabina, Gemcitabina, hidroxiurea, 5-Fluorouracilo (5FU) y parientes); Agentes alquilantes, tales como Mostazas nitrogenadas (por ejemplo, Ciclofosfamida, Melfalán, Clorambucilo, mecloretamina, Ifosfamida, Trofosfamida, Prednimustina, Bendamustina, Uramustina, Estramustina y parientes); nitrosoureas (por ejemplo, Carmustina, Lomustina, Semustina, Fotemustina, Nimustina, Ranimustina, Estreptozocina y parientes); Triazenos (por ejemplo, Dacarbazina, Altretamina, Temozolomida y parientes); Alquilsulfonatos (por ejemplo, Busulfán, Manosulfán, Treosulfán y parientes); Procarbazina; Mitobronitol y Aziridinas (por ejemplo, Carboquone, Triaziquone, ThioTEPA, trietilenmalamina y parientes); Antibióticos, tales como

Hidroxiurea, Antraciclinas (por ejemplo, agente de doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina y otros derivados); Antracenodionas (por ejemplo, Mitoxantrona y parientes); Familia de streptomyces (por ejemplo, Bleomicina, Mitomicina C, Actinomicina, Plicamicina); y Luz ultravioleta.

5

III. Kits para uso en terapia

La presente divulgación también proporciona kits para su uso en inmunoterapia contra el cáncer (por ejemplo, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal o cáncer de células renales) y/o para tratar o reducir el riesgo de cáncer. Dichos kits pueden incluir uno o más
10 contenedores que comprenden una composición farmacéutica que contiene un virus oncolítico sintético, por ejemplo, cualquiera de los descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, el kit puede comprender instrucciones de uso de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, las instrucciones incluidas pueden comprender una descripción de la administración de una
15 composición que contiene un virus oncolítico sintético para tratar, retrasar la aparición o aliviar una enfermedad objetivo como las descritas en el presente documento. El kit puede comprender además una descripción de la selección de un individuo adecuado para el tratamiento con base en la identificación de si ese individuo tiene la enfermedad objetivo. En otras realizaciones más, las instrucciones comprenden una descripción de la administración
20 de la composición que contiene virus oncolítico sintético a un individuo con riesgo de padecer la enfermedad objetivo.

Las instrucciones relacionadas con el uso de una composición que contiene virus oncolítico sintético generalmente incluyen información sobre la dosis, el programa de dosificación y la vía de administración para el tratamiento pretendido. Los contenedores
25 pueden ser dosis unitarias, paquetes en volumen (por ejemplo, paquetes multidosis) o subunidades. Las instrucciones suministradas en los kits de la invención suelen ser instrucciones escritas en una etiqueta o prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también se incluyen instrucciones legibles por máquina (por ejemplo, instrucciones en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

La etiqueta o el prospecto indica que la composición se usa para tratar, retrasar la aparición y/o aliviar una enfermedad o trastorno asociado con el cáncer, como los descritos en el presente documento. Se pueden proporcionar instrucciones para practicar cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

Los kits como se describen en el presente documento están en un embalaje adecuado. Los empaquetados adecuados incluyen, entre otros, ampollas, botellas, frascos, empaques flexibles (por ejemplo, Mylar o bolsas de plástico selladas) y similares. También se contemplan empaques para su uso en combinación con un dispositivo específico, como un inhalador, un dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o una ampolla que tiene un tapón que puede perforarse con una aguja de inyección hipodérmica). El contenedor también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o una ampolla que tiene un tapón que puede perforarse con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es una composición que contiene virus oncolítico sintético como las que se describen en el presente documento.

Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales como búferes e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un contenedor y una etiqueta o prospecto(s) en el contenedor o asociados con él. En algunas realizaciones, la invención proporciona artículos manufacturados que comprenden el contenido de los kits descritos anteriormente.

IV. Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de las técnicas del arte. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition* (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al., eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis, et al., eds., 1994);

Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P.

5 *Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995). Sin entrar en más detalle, se cree que un versado en la materia puede, basándose en la descripción anterior, utilizar la presente invención en su máxima extensión. Las

10 siguientes realizaciones específicas, por lo tanto, deben interpretarse solo de manera ilustrativa y de ninguna manera como limitante del resto de la divulgación. Todas las publicaciones citadas en este documento se incorporan por referencia para los fines o la materia a la que se hace referencia en el presente documento.

Sin entrar en más detalle, se cree que un experto en la materia puede, basándose en la

15 descripción anterior, utilizar la presente invención en su máxima extensión. Las siguientes realizaciones específicas, por lo tanto, deben interpretarse solo de manera ilustrativa y de ninguna manera como limitante del resto de la divulgación. Todas las publicaciones citadas en este documento se incorporan por referencia para los fines o la materia a la que se hace referencia en el presente documento.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Líneas celulares y animales

25 Líneas celulares B16F10 (ATCC® CRL-6475™), HEK-blue-TLR2 (Invivogen), HEK-blue-TLR3 (Invivogen), HEK-blue-TLR7 (Invivogen), HEK-blue-TLR9 (Invivogen), Raw-Lucia ISG (Invivogen), y se cultivaron siguiendo las instrucciones del proveedor (37° C, 5 % CO₂). Se compraron ratones hembra C57BL/6J (JAX Stock No. 000664) de 6 a 8

30 semanas de edad y se mantuvieron en la instalación para animales del Instituto de Tecnología de Massachusetts (MIT). Todos los estudios y procedimientos en animales se llevaron a cabo siguiendo las pautas federales, estatales y locales bajo un protocolo animal aprobado por IACUC por el comité de cuidado animal del MIT.

Anticuerpos, tinción y análisis FACS

Los anticuerpos contra Ly6c de ratón (HK1.4), CD11b (M1/70), CD11c (N418), F4/80 (BM8), MHC-II (M5/114.15.2), CD45 (30-F11), CD3 (17A2), CD4 (GK1.5), CD8 (53-6.7), NK1.1 (PK136), CD45.2 (104), CD24 (30-F1), XCR1 (ZET), CD64 (X54-5/7.1) eran de Biolegend. Los anticuerpos contra Ly6G de ratón (1A8), CD16/32 (2.4G2) y CD103 (M290) eran de BD Biosciences. Los anticuerpos contra la calreticulina de ratón (ab2907) eran de Abcam. El tinte vivo/muerto (L34966) era de ThermoFisher.

Los ratones portadores de tumor de melanoma B16F10 se sacrificaron y se les practicó la autopsia siguiendo las pautas federales, estatales y locales bajo un protocolo animal aprobado por IACUC por el comité de cuidado animal del MIT. Posteriormente, se deshicieron en partículas pequeñas los ganglios linfáticos que drenaban el tumor y los tumores se cortaron en rodajas y se digirieron con collagenasa IV (1 mg/ml) durante una hora para suspensiones unicelulares. Las suspensiones unicelulares se filtraron con un inhibidor de nailon de 70 μ m y se tiñeron como se describe¹⁰.

Las muestras teñidas se analizaron con el analizador FACS (LSR-II o LSR-II-Fortessa) de BD Biosciences. analizado en un analizador BD-LSRII Fortessa. Todos los datos de citometría de flujo fueron analizados mediante FlowJo (Flowjo LLC) y los gráficos se prepararon usando GraphPad Prism.

Construcciones, transcripción in vitro, recubrimiento/metilación para ARN del replicón y transfección de neón

La estructura de las construcciones de replicones mutantes procedía de una evolución in vitro en un estudio anterior (en revisión). La IL12-MSA y la IL12-MSA-Lumican se amplificaron a partir de plásmidos del Prof. Dane Wittrup Lab y se diseñaron en la región subgenómica del replicón mutante.

Los ARN del replicón se transcribieron in vitro (IVT) a partir de las plantillas de las construcciones VEE linealizadas anteriores utilizando el kit de transcripción MEGAscript™ T7 (ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ARN del replicón resultantes se taparon y metilaron usando el sistema de taponado ScriptCap™ m7G y el kit ScriptCap™ 2'-O-Metiltransferasa (Cellscript) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel.

Las transfecciones in vitro se llevaron a cabo usando 5 μ g de ARN por cada 500.000 células en 100 μ l de tampón R del kit de electroporación NEON (ThermoFisher) en las condiciones de 1200 de voltaje, 20 milisegundos y 1 pulso.

Formulaciones de nanopartículas lipídicas y encapsulación del ARN del replicón

Para encapsular 10 µg del ARN del replicón en nanopartículas de DOTAP, se preparó en etanol una mezcla de lípidos compuesta de 16,9375 µl de DOTAP (Avanti, Cat# 890890, 10 mg/ml), 15,965 µl de DSPC (Avanti, Cat# 850365, 3 mg/ml), 18,7675 µl de colesterol (Sigma-Aldrich, Cat# C8667, 6 mg/ml), 13,6 µl de DSPE-PEG2000 (Avanti Cat# 880128, 2,5 mg/ml) en una relación molar de 40:10:48:2 y se evaporó bajo N₂ hasta que quedó un tercio del volumen inicial total. Posteriormente se añadieron 10 µg de ARN del replicón (1 mg/ml) en 11,8 µl de tampón citrato 0,1 M (PH 6,0) con pipeteo, seguido de una segunda adición de 22 µl adicionales de tampón citrato 0,1 M (PH 6,0) con pipeteo. La mezcla se agitó durante una hora y posteriormente se dializó frente a PBS durante otra hora a 25° C en un casete de diálisis de 3500 MWCO.

La encapsulación del ARN del replicón en nanopartículas de lipofectamina se realizó siguiendo las instrucciones del reactivo de transfección Lipofectamine™ MessengerMAX™ (thermofisher.com/order/catalog/product/LMRNA008).

Para encapsular 10 µg del ARN del replicón en nanopartículas TT3, se preparó una mezcla de lípidos compuesta por 10 µl de TT3 (10 mg/ml)¹¹, 8,04 µl de DOPE (Avanti, Cat# 850725, 10 mg/ml), 5,572 µl de colesterol (Sigma-Aldrich, Cat# C8667, 10 mg/ml), 3,452 µl de C14-PEG2000 (Avanti Cat# 880150, 2 mg/ml) en una relación molar de 20:30:40:0,75 en 10,437 µl de etanol. A la mezcla se le añadieron 4,167 µl de tampón citrato (PH 3,0, 10 mM). Posteriormente, se añadieron con pipeta 10 µg de ARN del replicón (1 mg/ml) en 31,667 µl de tampón citrato (PH 3,0, 10 mM). La mezcla se dializó frente a PBS durante 80 minutos a 25° C en un casete de diálisis de 3500 MWCO.

Las nanopartículas lipídicas cargadas con replicón resultantes se dividieron en alícuotas en dosis apropiadas para inyección intratumoral (10 µg/ratón) y para transfección in vitro (5 µg/0,5 millones de células en 500 µl de medio).

Tinción con anexina V/PI, ensayo de ATP y Elisa

La tinción con Annexin V/PI sigue las instrucciones del kit de Biolegend (Cat# 640932). El ATP extracelular se analizó mediante el sistema de ensayo ENLITEN® ATP (Promega). HMGB1, CCL5, IFNα2, IL12, IFNγ se midieron mediante kits de ELISA de Chondrex (Cat# 6010, HMGB1), R & D System (Cat# DY478, CCL5), Abcam (Cat# ab215409, IFNα2) y Biolegend (Cat# 88-7121-88, IL12, Cat# 88-7314-88, IFNγ) y siguiendo sus manuales.

Extracción del ARN y análisis cuantitativo de PCR

Para cuantificar los niveles de transcripciones de ARN, se extrajo ARN total de células o tumores transfectados con ARN del replicón-LNP como se indica y se transcribió de forma inversa mediante un kit de reactivos de transcripción inversa TaqMan™ (número de catálogo ABI N8080234), seguido de amplificación con Sybr Green Master Mix (Roche) y cebadores específicos para Stat1 (Cat# MP215434), Stat2 (Cat# MP215434), IRF9 (Cat# MP206708), IRF3 (Cat# MP206702), cGAS (Cat# MP214711) y se detectaron mediante Roche LightCycler 480. Los valores de Ct se normalizaron con el gen doméstico Actina B de ratón para la comparación.

Ejemplo 1: ARN del replicón-LNP sintético todo en uno para inmunoterapia contra el cáncer

Los procesos terapéuticos se pueden simplificar y la eficacia terapéutica se puede amplificar mediante nanopartículas lipídicas (LNP) multifuncionales sintéticas que encapsulan el ARN del replicón, con los componentes de lípidos y ARN, cada uno de los cuales cumple múltiples funciones: una formulación de lípidos que promueve la captación celular/entrega citosólica de ARN a la vez que también desencadena directamente la muerte celular inmunogénica. En conjunto, esta LNP entrega un ARN del replicón autoamplificador que codifica proteínas terapéuticas inmunomoduladoras y proporciona directamente inmunoestimulación que amplifica la respuesta inmune posterior. Funcionalmente, este ARN del replicón de LNP sintética debería inducir la muerte celular inmunogénica local en el tumor y también expresar inmunomoduladores razonablemente en las células transfectadas. La muerte celular inmunogénica podría mejorar la infiltración tumoral mediante células inmunes y proporcionar un depósito de antígenos específicos de tumores que podrían presentarse de forma cruzada para cebar nuevas respuestas de células T. Las formulaciones de LNP que contienen el lípido catiónico TT3 se identificaron como especialmente relevantes para estos objetivos: Se compararon 3 nanopartículas lipídicas catiónicas, cada una de las cuales comprende un lípido catiónico clave-DOTAP, lipofectamina (Lipo) o TT3. Como carga de ARN, se empleó un replicón de alfavirus, derivado del virus de la encefalitis equina de Venezuela, donde las proteínas estructurales fueron reemplazadas por un gen de carga de interés insertado bajo el promotor subgenómico. Cuando se formularon con este ARN del replicón autoamplificador (LNP-mtRep), las formulaciones de lípidos DOTAP, lipo y TT3 formaron partículas con diámetros medios de nanopartículas de 97, 46 y 105 nm, con potenciales zeta de +22,9, -6,7 y +4,3 mv, respectivamente (Fig. 1G-1H). Se evaluó la

toxicidad de las LNP “vacías” frente a las cargadas con ARN (mtRep) al incubar cada formulación con células tumorales de melanoma B16F10 in vitro. Este ensayo reveló que la viabilidad disminuyó significativamente para las células tratadas con TT3 LNP y que mtRep se sinergizó con TT3 para promover una mayor destrucción de las células tumorales 3 días después de la transfección (Fig. 1A). Los TT3 LNP fueron más eficaces que DOTAP o Lipo para promover la muerte de células tumorales. En particular, la electroporación del replicón directamente en las células tumorales fue relativamente no tóxica, lo que indica que la administración de LNP promueve la destrucción de las células. Para determinar si los replicones suministrados por TT3 LNP podrían impulsar la expresión del gen de carga antes de la muerte celular, evaluamos la expresión del gen indicador GFP después del tratamiento con LNP (mtRep). El tratamiento TT3-mtRep llevó a ~ 35,4 % de las células B16F10 a expresar GFP 12 horas después de la transfección, menor que la electroporación (~ 90 %), pero significativamente mejor que los tratamientos de DOTAP-mtRep (~ 0,05 %) o Lipo-mtRep (~ 7,6 %) (Fig. 1B). De acuerdo con la Figura 1A, las células transfectadas con nanopartículas TT3 mostraron una gran población de células muertas de Anexina V+/PI+ y mtRep nuevamente sinergizadas con esta muerte celular (Figura 1C).

Para determinar si la muerte celular desencadenada por TT3 (MtRep) es un tipo de muerte celular inmunogénica (ICD), se midió calreticulina (CRT), que generalmente permanece en el retículo endoplásmico (RE) y se transmite a la superficie celular como una señal *eat-me* durante la ICD1. Se sinergizaron TT3 y mtRep para promover el tránsito de CRT a las superficies celulares (Fig. 1D). El ATP extracelular activa el inflammasoma2 NLRP3 y el HMGB1 extracelular media la inflamación3 durante la ICD. TT3, TT3-mtRep y TT3-deRep indujeron eficazmente la liberación de ATP y HMGB1. (Fig. 1E y 1F). En conjunto, ARN del mtRep-TT3 es una formulación oncolítica prometedora que podría inducir la muerte celular inmunogénica y al mismo tiempo conducir a la expresión transitoria de genes de carga codificados por el replicón.

Ejemplo 2: ARN del replicón que desencadena la señalización de TLR3 e induce el complejo ISGF3 vinculado a la muerte celular necrótica

Para determinar los mecanismos subyacentes a la sinergia de la muerte celular por replicón y TT3 LNP, se transfectaron nanopartículas DOTAP, Lipo o TT3 con o sin mtRep encapsulado que codifica un gen indicador (o que encapsula un replicón “muerto” (deRep) mutante que carece de expresión génica funcional) en células indicadoras HEK-TLR2, HEK-TLR3, HEK-TLR7 o HEK-TLR9 (invivogen.com). Tanto Lipo como TT3 LNP que llevaban

mtRep o deRep activaron la señalización TLR3, pero ninguno de los otros TLR probados fue estimulado (Fig. 2A-D). Cuando se probó en células indicadoras Raw-Lucia-ISG (invivogen.com), los genes estimulados con interferón fueron inducidos significativamente por estas mismas formulaciones de LNP (Fig. 2E). Estos datos sugieren que TLR3 reconoce el ARN del replicón e induce respuestas de interferón en respuesta a la administración mediada por LNP.

Dado que el ARN del replicón activa la señalización de TLR3 a través de TRIF para la producción de interferón tipo I⁴ que conduce a la activación del complejo ISGF3 (Stat 1/Stat 2/IRF9) para la muerte celular necrótica⁵, analizamos los niveles de transcripción de ARNm de los componentes del complejo ISGF3, Stat1, Stat2 y IRF9, así como genes de la vía STING, IRF3 y cGAS por qPCR. Las nanopartículas TT3 que encapsulan mtRep o deRep aumentaron ~6, ~16 y ~3 veces los niveles de Stat1, Stat2, IRF9 sobre los controles no tratados (Fig. 2F-H), respectivamente. Por el contrario, no tuvo efectos sobre la transcripción de IRF3 o cGAS (Fig. 2I-J). Las formulaciones de DOTAP y Lipo no lograron inducir el complejo ISGF3, probablemente debido a la baja eficiencia de transfección del ARN del replicón mediante estas nanopartículas (Fig. 1B). Estos datos sugirieron que mtRep y deRep probablemente activan la señalización de TLR3 e inducen el complejo ISGF3 para promover la muerte celular necrótica, un tipo de muerte celular inmunogénica.

Ejemplo 3: TT3-mtRep que recluta células inmunes y revierte tumores establecidos

Fue de interés si TT3-mtRep tiene efectos sobre la muerte celular inmunogénica y la expresión de genes de carga in vivo. El número absoluto de poblaciones granulocíticas Ly6c^{lo} Ly6G⁺, que están asociadas con respuestas a la muerte celular necrótica⁶, se midió en tumores 3 días después de la inyección intratumoral de nanopartículas TT3 que encapsulan el ARN del replicón de tipo salvaje (wtRep), con otro ARN del replicón mutante (mtRep2) y el replicón mutante (mtRep) utilizado anteriormente. Inesperadamente, el mtRep mostró un reclutamiento significativamente mayor (~2 veces mayor) de esta población granulocítica a los tumores (Figura 3A), y una mejor expresión del gen indicador mCherry codificado por el promotor subgenómico (Figura 3B). Por tanto, TT3-mtRep induce la muerte celular inmunogénica con una expresión de gen de carga decente. Posteriormente se llevaron a cabo estudios in vivo utilizando TT3-mtRep.

Se midió el nivel de expresión de Stat1/Stat2/IRF9 así como de los genes de señalización de STING, IRF3 y cGAS in vivo después de la administración intratumoral de replicones por LNP. De acuerdo con la Fig.2F-J in vitro, los tumores inyectados con TT3-

mtRep expresaron Stat1/Stat2/IRF9 (complejo ISGF3) significativamente más alto, pero con niveles comparables de IRF3 y cGAS (Fig. 3C), lo que sugiere que la administración de TT3-mtRep también inició la muerte celular necrótica in vivo.

Para comprender mejor los efectos de TT3-mtRep en la composición inmune en el tumor, se mapearon y cuantificaron células inmunes como granulocitos (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6c^{lo} Ly6G⁺), M-MDSC (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6c^{hi} Ly6G⁺), Monocitos (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6c^{lo} Ly6G⁻), Macrófagos (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6c⁻ Ly6G⁻ F4/80⁺), CD4 T (CD45⁺ CD3ε⁺ CD4⁺), CD8 T (CD45⁺ CD3ε⁺ CD8⁺), NK (CD45⁺ CD3ε⁻ NK1.1⁺), NKT (CD45⁺ CD3ε⁺ NK1.1⁺), convencional DC1 (cDC1, CD45⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ CD24⁺ CD64⁻ CD103⁺ CD11b⁻ XCR1^{hi}), y convencional DC2 (cDC2, CD45⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ CD24⁺ CD64⁻ CD103⁺ CD11b⁺ XCR1^{lo}), en los tumores en 1 día (Fig. 3D) y 3 días (Fig. 3E) después de una inyección, y 1 día (Fig. 3F) después de tres inyecciones secuenciales de ARN del replicón-LNP. En este análisis dinámico de las composiciones inmunes en el tumor, los granulocitos y el cDC1 se reclutaron rápidamente y disminuyeron 1 día después de la inyección del ARN del replicón, respectivamente (Figura 3D), lo que sugiere que los granulocitos podrían ser un evento temprano y que el cDC1 probablemente comience a transitar hacia el ganglio linfático que drena el tumor (TDLN) en respuesta al ARN del replicón-LNP. A los 3 días después de la inyección del ARN del replicón, también se reclutaron células T CD4, T CD8, NK y NKT (Figura 3E). Al administrar 3 inyecciones secuenciales de ARN del replicón-LNP, los monocitos aumentaron y los macrófagos disminuyeron, pero se observaron cambios menos significativos en las células linfoides, como las células T CD4, NK y NKT (Figura 3F). Como efectos de estas ~3 inyecciones secuenciales, hubo ~ 10 % más de muerte celular (Figura 3G), ~4 veces más células inmunes infiltrantes de tumores (Figura 3H) y una reducción de 2 veces en el peso del tumor (Figura 3I) en el muestras del grupo TT3-mtRep, dando como resultado una regresión significativa del crecimiento tumoral (Figura 3J). De acuerdo con la NK y las células NKT aparecen junto con los tratamientos de TT3-mtRep, la expresión de CCL5 se indujo significativamente (Figura 3K), que es secretada principalmente por NK⁷ y células T CD8 activadas (rstats.immgen.org/Skyline/skyline.html). Estos datos indican muerte celular inmunogénica inducida por TT3-mtRep en tumores con expresión de genes de carga como se observa en la Fig. 1 y la Fig. 2 in vitro. Más importante aún, TT3-mtRep moduló significativamente el microambiente tumoral y condujo al reclutamiento tumoral de células T CD8 y células NK.

Ejemplo 4: La codificación TT3-mtRep con IL12-MSA o IL12-MSA-Lumican modula eficazmente los microambientes tumorales y la composición inmune

Si bien la inyección intratumoral de genes indicadores que codifican TT3 (mtRep) por sí sola provocó un retraso en el crecimiento tumoral, la codificación de proteínas

5 inmunomoduladoras en el replicón podría conducir a una mayor immunoestimulación y mejoras de la inmunidad antitumoral. Un candidato atractivo es la IL-12, que podría polarizar los auxiliares T CD4 a Th1 y mejorar los efectos de citotoxicidad de las células T NK y CD8⁸. Una de las subunidades de IL12, también denominada IL12b o IL12p40, se secreta principalmente a partir de las células de presentación de antígenos (CD8⁺ DC)

10 (rstats.immgen.org/Skyline/skyline.html), que podrían activarse funcionalmente mediante el interferón de tipo I⁹. Sin embargo, el interferón $\alpha 2$ (IFN $\alpha 2$), una forma principal de interferón de tipo I, es bajo en el suero (Fig. 4A) o en los tumores (Fig. 4B) el día 1 y el día 3 después de las inyecciones de TT3-mtRep, lo que sugiere que la IL-12 secretada por las DC aún puede estar baja en el microambiente tumoral (TME). Por tanto, se diseñó IL12-MSA o IL12-MSA-Lumican que fusionó IL12 α (P30), IL12 β (P40) con albúmina sérica murina (MSA), o
15 con MSA y Lumican. Lumican es una proteína de unión a colágeno endógena, que razonamos promovería la retención de IL-12 expresada en la TME para mejorar la eficacia y seguridad de la terapia del replicón. Las construcciones del replicón se transfectaron en células B16F10 in vitro mediante transfección con NEON y validamos la secreción de IL12
20 en estas células transfectadas mediante ELISA (Fig. 4C).

De manera consistente, los tumores inyectados con TT3-mtRep que codifica IL12-MSA (TT3-mtRep-IL12-MSA) o IL12-MSA-Lumican (TT3-mtRep-IL12-MSA-Lumican) expresaron altos niveles de IL12 in vivo, alcanzando 40 ng/mg en tumores (Fig. 4D). Al comparar la composición inmune en el tumor en el día 1 después de las inyecciones, los
25 granulocitos aumentaron de 1,5 a 3 veces en los tumores tratados con TT3-mtRep que expresa IL12-MSA e IL12-MSA-Lumican, en contraste con el grupo tratado con TT3-mtRep que codifica con el gen indicador mCherry (Fig. 4E). El día 3, los grupos IL12-MSA e IL12-MSA-Lumican reclutaron ~2-3 veces más granulocitos, células T CD8 y células cDC2 para los tumores en comparación con los replicones que codifican un gen indicador irrelevante
30 (Fig. 4F). Curiosamente, los tumores tratados con genes indicadores que codifican TT3-mtRep, IL12-MSA o IL12-MSA-Lumican mostraron todas disminuciones de células cDC1 en comparación con el grupo no tratado (Fig. 4E-4F). Para determinar si cDC1 se trasladaba al TDLN, numeramos las células cDC1 en él y mostramos que las células cDC1 en los ganglios linfáticos aumentaron significativamente después del tratamiento con TT3-mtRep,

sin importar qué gen de carga estaba codificado (Fig. 4G). Los aumentos de células cDC1 continuaron en el grupo IL12-MSA (Fig. 4G).

Ejemplo 5: La IL12 inmunomoduladora y el ICD inducidos por TT3-mtRep erradican eficazmente el tumor B16F10

Como la administración de proteína IL12 tiene efectos secundarios graves en estudios clínicos, medimos los cambios de peso corporal de ratones portadores de tumores tratados con IL-12 codificada por replicón. El grupo mtRep-IL12-MSA tuvo una pérdida corporal de ~ 5 % que duró una semana. Por el contrario, los grupos mtRep y mtRep-IL12-MSA-Lumican tuvieron sólo ~ 2 % de pérdida corporal y se recuperaron en unos pocos días (Fig. 5A). De manera consistente, no pudimos medir IL-6 o TNF α en suero el día 1 o el día 3 después de la inyección de mtRep-IL12-MSA o mtRep-IL12-MSA-Lumican (datos no mostrados). Pero sí observamos aumentos significativos de IFN- γ en suero en el grupo de mtRep-IL12-MSA (Fig. 5B), consistente con la pérdida corporal en la Fig. 5A. Curiosamente, los replicones que expresan IL12-MSA o IL12-MSA-Lumican mostraron una regresión tumoral dramática, incluso en tumores grandes establecidos con tamaños al tratamiento de 50 mm² (Fig. 5C). Los ratones portadores de tumores tratados con TT3-mtRep que codifica con IL12-MSA e IL12-MSA-Lumican estaban libres de tumor al 60 % y al 80 % a los 75 días después de la inyección de B16F10, respectivamente. Para determinar si estos ratones curados habían provocado una respuesta inmune sistémica que pudiera prevenir la recurrencia del tumor B16F10, estos ratones fueron desafiados con 0,1 millones de células B16F10 en el flanco opuesto. Como se esperaba, todos los ratones curados rechazaron el tumor B16F10 en comparación con los ratones ingenuos que desarrollaron rápidamente el tumor B16F10. Estos datos indican que la sinergia de la IL12 inmunomoduladora y la ICD (muerte celular inmunogénica) podría erradicar eficazmente el tumor B16F10 e inducir respuestas inmunitarias sistémicas para prevenir la recurrencia del tumor B16F10.

Referencias:

- 1 Yun, Y. R. *et al.* Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng* **2010**, 218142, doi:10.4061/2010/218142 (2010).
- 2 Zha, Q. B. *et al.* ATP-Induced Inflammasome Activation and Pyroptosis Is Regulated by AMP-Activated Protein Kinase in Macrophages. *Front Immunol* **7**, 597, doi:10.3389/fimmu.2016.00597 (2016).

- 3 Magna, M. & Pisetsky, D. S. The role of HMGB1 in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases. *Mol Med* **20**, 138-146, doi:10.2119/molmed.2013.00164 (2014).
- 4 Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**, 816-825, doi:10.1038/sj.cdd.4401850 (2006).
- 5 McComb, S. *et al.* Type-I interferon signaling through ISGF3 complex is required for sustained Rip3 activation and necroptosis in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E3206-3213, doi:10.1073/pnas.1407068111 (2014).
- 6 Haverkamp, J. M. *et al.* Myeloid-derived suppressor activity is mediated by monocytic lineages maintained by continuous inhibition of extrinsic and intrinsic death pathways. *Immunity* **41**, 947-959, doi:10.1016/j.immuni.2014.10.020 (2014).
- 7 Bottcher, J. P. *et al.* NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell* **172**, 1022-1037 e1014, doi:10.1016/j.cell.2018.01.004 (2018).
- 15 8 Lasek, W., Zagozdzon, R. & Jakobisiak, M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer Immunol Immunother* **63**, 419-435, doi:10.1007/s00262-014-1523-1 (2014).
- 9 Montoya, M. *et al.* Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* **99**, 3263-3271, doi:DOI 10.1182/blood.V99.9.3263 (2002).
- 10 Li, Y. *et al.* Persistent Antigen and Prolonged AKT-mTORC1 Activation Underlie Memory CD8 T Cell Impairment in the Absence of CD4 T Cells. *J Immunol* **195**, 1591-1598, doi:10.4049/jimmunol.1500451 (2015).
- 11 Li, B. *et al.* An Orthogonal Array Optimization of Lipid-like Nanoparticles for mRNA Delivery in Vivo. *Nano Lett* **15**, 8099-8107, doi:10.1021/acs.nanolett.5b03528 (2015).

OTRAS REALIZACIONES

- 30 Todas las características que se divulgan en la presente especificación pueden combinarse en cualquier combinación. Cada característica que se divulga en la presente especificación puede ser reemplazada por una característica alternativa que tenga el mismo propósito, sea equivalente o similar. Por tanto, a menos que se indique expresamente lo contrario, cada característica divulgada es solo un ejemplo de una serie genérica de
- 35 características equivalentes o similares.

A partir de la descripción anterior, un versado en la materia puede determinar fácilmente las características esenciales de la presente invención y, sin apartarse del espíritu y alcance de la misma, puede realizar varios cambios y modificaciones de la invención para

adaptarla a diversos usos y condiciones. Por tanto, otras realizaciones también están dentro de las reivindicaciones.

EQUIVALENTES

5 Si bien se han descrito e ilustrado varias realizaciones inventivas, los versados en la materia apreciarán fácilmente una variedad de otros medios y/o estructuras para realizar las funciones y/u obtener los resultados y/o una o más de las ventajas aquí descritas y cada una de dichas variaciones y/o modificaciones se considera que está dentro del alcance de las realizaciones inventivas que se describen en el presente documento. Generalmente, los
10 versados en la materia apreciarán fácilmente que todos los parámetros, las dimensiones, los materiales y las configuraciones aquí descritos se consideran a manera de ejemplo y que los parámetros, las dimensiones, los materiales y/o las configuraciones reales dependerán de la aplicación o aplicaciones específicas para las cuales se usan las enseñanzas de la invención. Las personas versadas en la materia reconocerán, o podrán determinar con base en no más
15 que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones inventivas específicas que se describen en el presente documento. Por lo tanto, debe entenderse que las realizaciones precedentes se presentan únicamente a modo de ejemplo y que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y equivalentes a las mismas, las reivindicaciones inventivas se pueden poner en práctica de manera diferente a la que se describe y reivindica
20 de manera específica. Las realizaciones inventivas de la presente divulgación están dirigidas a cada característica, sistema, artículo, material, kit y/o método individual que se describe en el presente documento. Además, cualquier combinación de dos o más de tales características, sistemas, artículos, materiales, kits y/o métodos, si tales características, sistemas, artículos, materiales, kits y/o métodos no son mutuamente inconsistentes, se incluyen dentro del
25 alcance inventivo de la presente divulgación.

Debe entenderse que todas las definiciones, tal como se definen y usan en el presente documento, prevalecen sobre las definiciones de diccionario, definiciones en documentos incorporados por referencia y/o significados ordinarios de los términos definidos. Todas las referencias, patentes y solicitudes de patente que se divulgan en el presente
30 documento se incorporan por referencia con respecto a la materia por la que se cita cada una, que en algunos casos puede abarcar la totalidad del documento.

Los artículos indefinidos “un” y “una”, tal como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, deben entenderse como que significan “al menos uno”.

La frase “y/o”, tal como se usa en el presente documento en la especificación y en las reivindicaciones, se debe entender como “cualquiera o ambos” de los elementos así conectados, es decir, elementos que están presentes conjuntamente en algunos casos y presentes disyuntivamente en otros casos. Los elementos múltiples enumerados con “y/o”

5 deben interpretarse de la misma manera, es decir, “uno o más” de los elementos así unidos. Opcionalmente, pueden estar presentes otros elementos distintos de los elementos identificados específicamente por la cláusula “y/o”, estén relacionados o no con los elementos específicamente identificados. Por lo tanto, como ejemplo no limitante, una referencia a “A y/o B”, cuando se usa junto con un lenguaje abierto como “que comprende”
10 puede referirse, en una realización, solo a (opcionalmente incluyendo elementos distintos de B); en otra realización, solo a B (opcionalmente incluyendo elementos distintos de A); en otra realización, tanto A como B (opcionalmente incluyendo otros elementos); etc.

Tal como se usa en el presente documento en la especificación y en las reivindicaciones, debe entenderse que “o” tiene el mismo significado que “y/o” como se ha
15 definido anteriormente. Por ejemplo, al separar los elementos de una lista, “o” o “y/o” se interpretarán como inclusivos, es decir, la inclusión de al menos uno, pero también incluyendo más de uno, de un número o lista de elementos y, opcionalmente, elementos adicionales no enlistados. Solo los términos que indiquen claramente lo contrario, como “solo uno de” o “exactamente uno de” o, cuando se utiliza en las reivindicaciones, “que
20 consiste en”, se referirá a la inclusión de exactamente un elemento de un número o lista de elementos. En general, el término “o”, tal como se usa en el presente documento, solo se interpretará como que indica alternativas exclusivas (es decir, “uno u otro, pero no ambos”) cuando está precedido por términos de exclusividad, como “cualquiera”, “uno de”, “solo uno de” o “exactamente uno de”. “Consiste esencialmente de”, cuando se usa en las
25 reivindicaciones, tendrá su significado ordinario tal como se utiliza en el campo del derecho de patentes.

Tal como se usa en la especificación y en las reivindicaciones, la frase “al menos uno”, en referencia a una lista de uno o más elementos, debe entenderse que significa al menos un elemento seleccionado entre uno o más de los elementos de la lista de elementos,
30 pero no necesariamente que incluye al menos uno de cada uno de los elementos enumerados específicamente en la lista de elementos y sin excluir ninguna combinación de elementos de la lista de elementos. Esta definición también permite que elementos puedan estar opcionalmente presentes aparte de los elementos identificados específicamente dentro de la lista de elementos a los que se refiere la frase “al menos uno”, estén relacionados o no con los

elementos específicamente identificados. Por lo tanto, como ejemplo no limitante, “al menos uno de A y B” (o, equivalentemente, “al menos uno de A o B” o, equivalentemente “al menos uno de A y/o B”) puede referirse, en una realización, a al menos uno, incluyendo opcionalmente más de uno, A, sin B presente (y opcionalmente incluyendo elementos distintos de B); en otra realización, a al menos uno, incluyendo opcionalmente más de un, B, sin A presente (y opcionalmente incluyendo elementos distintos de A); en otra realización, a al menos uno, incluyendo opcionalmente más de uno, A, y al menos uno, incluyendo opcionalmente más de uno, B (y opcionalmente incluyendo otros elementos); etc.

10 También debe entenderse que, a menos que se indique claramente lo contrario, en cualquier método reivindicado en el presente documento que incluya más de un paso o acto, el orden de los pasos o actos del método no se limita necesariamente al orden en el que los pasos o actos del método se recitan.