

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 341**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01)
C12N 15/00	(2006.01)
A61K 31/522	(2006.01)
A61K 31/713	(2006.01)
C07K 14/005	(2006.01)
C12N 9/12	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/029600**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14153205**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14769552 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2967078**

54 Título: **Ensayo diagnóstico de timidina quinasa para aplicaciones de terapia génica**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361784901 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.03.2019

73 Titular/es:

**GENVIVO, INC. (100.0%)
475 Huntington Drive
San Marino, CA 91108, US**

72 Inventor/es:

**LEVY, JOHN, P.;
REED, REBECCA, A.;
MCNULTY, JOSEPH y
JOHNSON, ROBERT, G., JR.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 703 341 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo diagnóstico de timidina quinasa para aplicaciones de terapia génica

5 REFERENCIA

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/784.901, presentada el jueves, 14 de marzo de 2013.

- 10 Esta solicitud se refiere a las siguientes solicitudes de patente relacionadas: solicitud n.º de serie [aún no asignada], n.º de expediente del agente 30863-722.201, presentada el mismo día junto con la presente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 Las enfermedades proliferativas, como el cáncer, representan un serio desafío para la sociedad. Los crecimientos cancerosos, incluidos los crecimientos malignos cancerosos, poseen características particulares, como la proliferación celular incontrolable dando como resultado, por ejemplo, el crecimiento no regulado de tejido maligno, la capacidad de invadir tejidos locales e incluso remotos, falta de diferenciación, falta de síntomas detectables y, lo más importante, la falta de terapia y prevención efectivas.

20

El cáncer puede desarrollarse en cualquier tejido de cualquier órgano a cualquier edad. La etiología del cáncer no está claramente definida, pero los mecanismos como la susceptibilidad genética, los trastornos de rotura cromosómica, los virus, los factores ambientales y los trastornos inmunológicos se han vinculado a un crecimiento y transformación de células malignas. El cáncer abarca una gran categoría de afecciones médicas que afectan a

25

millones de personas en todo el mundo. Las células cancerosas pueden surgir en casi cualquier órgano y/o tejido del cuerpo. A nivel mundial, a más de 10 millones de personas se les diagnostica cáncer cada año y se estima que este número aumentará a 15 millones de casos nuevos cada año para 2020. El cáncer causa seis millones de muertes cada año o el 12 % de las muertes en todo el mundo. El documento WO 2007/109335 y SERGANOVA Y COL., NUCLEAR MEDICINE AND BIOLOGY, ELSEVIER, NY, EE.UU, vol. 34, n.º 7, 2007, pág. 791-807 describen que los

30

genes reporteros pueden usarse para identificar pacientes que se benefician del tratamiento con terapia génica.

RESUMEN DE LA INVENCION

- En este documento se proporcionan procedimientos y composiciones para identificar sujetos o pacientes que pueden beneficiarse del tratamiento con terapia génica. Más específicamente, en este documento se proporcionan procedimientos y composiciones para identificar sujetos o pacientes que expresan en cantidades suficientes una proteína terapéutica incluida en un agente de terapia génica. La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

40

En consecuencia, en este documento se proporcionan procedimientos para identificar a un paciente capaz de beneficiarse del tratamiento de terapia génica que comprende administrar una partícula retroviral de terapia génica que comprende un polinucleótido de HSV-TK al paciente; administrar al paciente un sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo; medir la cantidad relativa y la ubicación de la señal radioactiva presente en el paciente; y determinar la ubicación de las lesiones en el paciente, donde los pacientes con: señales radioactivas por encima de

45

un determinado umbral, y la ubicación de la señal radioactiva que se correlaciona con las lesiones medidas en la etapa (d) del paciente, se identifican como capaces de beneficiarse del tratamiento con terapia génica.

50

En algunas realizaciones, el sustrato de HSV-TK se elige de entre el grupo que consiste en FHBG (9-[4-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina), FHPG (9-([3-fluoro-1-hidroxi-2-propoxi] metil)guanina), FGCV (fluoroganciclovir), FPCV (fluoropenciclovir), FIAU (1-(2'-deoxi-2'-fluoro-1-β-D-arabinofuranosil)-5-iodouracilo), FEAU (fluoro-5-etil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FMAU (fluoro-5-metil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FHOMP (6-((1-fluoro-3-hidroxiopropan-2-iloxi)metil)-5-metilprimidina-2,4(1H, 3H)-diona), ganciclovir, valganciclovir, aciclovir, valaciclovir, penciclovir, pirimidina radiomarcada con cadena lateral 4-hidroxi-3-(hidroximetil)butilo en N-1 (HHG-5-FEP), o derivados de pirimidina sustituidos con 5-(2-)hidroxietilo y 5-(3-hidroxiopropilo) que contienen cadenas laterales similares al 2,3-dihidroxiopropilo, aciclovir, ganciclovir y penciclovir. En otras realizaciones más, el sustrato de HSV-TK es FHBG (9-(4-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina).

55

En aún otras realizaciones, el indicador radioactivo es ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ^{99m}Te, ¹¹C, ¹⁴C, ¹²⁴I, ¹²³I, ¹³¹I, ¹⁵O, ¹³N y/o ⁸²RbCl. En otras realizaciones, el indicador radioactivo es ¹⁸F.

60

En una realización, el sustrato de HSV-TK es [¹⁸F]FHBG (9-(4-¹⁸F-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina). En aún otras realizaciones, la señal del indicador radioactivo se mide usando exploración de tomografía por emisión de positrones (PET).

5 En aún otras realizaciones, el nivel umbral es al menos por encima de 2,0 SUV (valor de captación estandarizado) o al menos 20 % por encima del fondo en una exploración PET, o entre aproximadamente 1,0 SUV y aproximadamente 3,0 SUV, o entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 40 % por encima del fondo en una exploración PET.

10 En algunas realizaciones, los procedimientos descritos en este documento comprenden además tratar al paciente con la partícula retroviral HSV-TK.

En aún otras realizaciones, la secuencia de localización nuclear viral (NLS) del polinucleótido HSV-TK codificado está mutada. En otras realizaciones más, el polinucleótido de timidina quinasa se muta para incluir una secuencia de exportación nuclear (NES) en o cerca del extremo amino de la proteína timidina quinasa expresada. En una realización, el polinucleótido de timidina quinasa se muta para aumentar la unión al sustrato de la proteína timidina quinasa expresada. En otra realización, la mutación es A168H.

20 En aún otras realizaciones, los procedimientos descritos en este documento comprenden además mutar el polinucleótido de timidina quinasa para eliminar la secuencia de localización nuclear viral (NLS) e incluir una secuencia de exportación nuclear (NES) en o cerca del extremo amino de la proteína timidina quinasa expresada. En algunas realizaciones, el polinucleótido HSV-timidina quinasa es la SEQ ID NO:18.

25 En una realización, los procedimientos descritos en este documento comprenden además una proteína dirigida expresada en la envoltura viral. En algunas realizaciones, la proteína dirigida se une a colágeno, laminina, fibronectina, elastina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos o RGD. En aún otras realizaciones, la proteína dirigida se une al colágeno. En otras realizaciones más, la proteína dirigida es la SEQ ID NO: 25.

30 En este documento también se proporcionan procedimientos y composiciones para identificar a un paciente o sujeto que necesita tratamiento para lesiones y que pueden beneficiarse del tratamiento con terapia génica: a) administrar una partícula retroviral de terapia génica que comprende un polinucleótido HSV-TK y transducir células del paciente con polinucleótido que codifica HSV-timidina quinasa; b) tratar las células con un sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo; c) medir la cantidad relativa de señal radioactiva presente en el tejido objetivo; d) identificar pacientes donde el nivel de sustrato de HSV-TK marcado radioactivamente está por encima de un umbral; e) 35 determinar la ubicación de las lesiones en el paciente; y f) tratar dicho paciente o sujeto con la partícula retroviral de terapia génica que comprende un polinucleótido HSV-TK cuando la señal radioactiva medida en el paciente está por encima de un determinado umbral, y la ubicación de la señal radioactiva medida se correlaciona con las lesiones medidas en la etapa (e) del paciente.

40 En este documento se proporcionan procedimientos y composiciones para medir la actividad enzimática de una HSV-timidina transducida, comprendiendo el procedimiento: a) administrar una partícula retroviral de terapia génica que comprende un polinucleótido HSV-TK y transducir células del paciente con el polinucleótido que codifica la HSV-timidina quinasa; b) tratar las células con un sustrato de HSV-TK unido a un indicador radiactivo; y c) medir la cantidad relativa de señal radioactiva presente en el tejido objetivo.

45 Además, en este documento se proporcionan procedimientos y composiciones para determinar el nivel de una señal indicadora en un sujeto o paciente después de la administración de una partícula de terapia génica, y seleccionar al sujeto o paciente para el tratamiento con la partícula de terapia génica cuando el nivel de la señal indicadora está por encima de un umbral establecido. El indicador es una señal radioactiva. En algunas realizaciones, el elemento 50 indicador radioactivo es ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ^{99m}Te, ¹¹C, ¹⁴C, ¹²⁴I, ¹²³I, ¹³¹I, ¹⁵O, ¹³N y/o ⁸²RbCl.

En otras realizaciones más, en el presente documento se proporcionan procedimientos y composiciones para determinar el nivel de una señal radioindicadora en un sujeto o paciente después de la administración de una construcción de terapia génica con timidina quinasa, y seleccionar al sujeto o paciente para el tratamiento con la construcción de terapia génica cuando el nivel de la señal indicadora está por encima de un umbral establecido. En algunas realizaciones, el indicador es un indicador radioactivo. En otras realizaciones, el elemento indicador radioactivo es ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ^{99m}Te, ¹¹C, ¹⁴C, ¹²⁴I, ¹²³I, ¹³¹I, ¹⁵O, ¹³N y/o ⁸²RbCl. En otras realizaciones más, el elemento indicador radioactivo está acoplado a un nucleósido u objetivo de nucleósido sintético para formar un objetivo radioactivo. En algunas realizaciones, el objetivo de nucleósido es FHBG (9-[4-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina), 60 FHPG (9-([3-fluoro-1-hidroxi-2-propoxi]metil]guanina), FGCV (fluoroganciclovir), FPCV (fluoropenciclovir), FIAU (1-

(2'-deoxi-2'-fluoro-1-β-D-arabinofuranosil)-5-iodouracilo), FEAU (fluoro-5-etil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FMAU (fluoro-5-metil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FHOMP (6-((1-fluoro-3-hidroxiopropan-2-iloxi)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H, 3H)-diona), ganciclovir, valganciclovir, aciclovir, valaciclovir, penciclovir, pirimidina radiomarcada con cadena lateral 4-hidroxi-3-(hidroximetil)butilo en N-1 (HHG-5-FEP), o derivados de pirimidina sustituidos con 5-(2-)hidroxietilo y 5-(3-hidroxi)propilo que contienen cadenas laterales similares al 2,3-dihidroxi)propilo, aciclovir, ganciclovir y penciclovir. Preferentemente, el objetivo radioactivo es [¹⁸F]FHBG (9-(4-¹⁸F-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina).

También se proporcionan en este documento procedimientos que comprenden: (a) determinar el nivel de señal [¹⁸F]FHBG en un sujeto; y (b) seleccionar el sujeto para el tratamiento con una composición donde el nivel de FHBG está por encima de un nivel umbral. En algunas realizaciones, el nivel umbral es de al menos aproximadamente 2,0 SUV (valores de captación estandarizados) o al menos 20 % por encima de la señal de fondo en una exploración PET.

Además, en este documento se proporciona un procedimiento que comprende: (a) determinar el nivel de señal [¹⁸F]FHBG en un sujeto; (b) excluir al sujeto del tratamiento con una composición donde el nivel de FHBG en el sujeto es mayor que aproximadamente 2,0 SUV o mayor que aproximadamente 20 % por encima de la señal de fondo en una exploración PET; y (c) administrar a dicho sujeto un agente anticanceroso.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para identificar a un sujeto que es susceptible a un tratamiento contra el cáncer, comprendiendo el procedimiento: a) identificar la expresión de [¹⁸F]FHBG en el sujeto; b) tratar al sujeto.

En este documento se proporciona un procedimiento para medir el efecto espectador mediado por HSV-TK-FHBG (9-[4-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina), FHPG (9-([3-fluoro-1-hidroxi-2-propoxi]metil]guanina), FGCV (fluoroganciclovir), FPCV (fluoropenciclovir), FIAU (1-(2'-deoxi-2'-fluoro-1-β-D-arabinofuranosil)-5-iodouracilo), FEAU (fluoro-5-etil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FMAU (fluoro-5-metil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FHOMP (6-((1-fluoro-3-hidroxiopropan-2-iloxi)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H, 3H)-diona), ganciclovir, valganciclovir, aciclovir, valaciclovir, penciclovir, pirimidina radiomarcada con cadena lateral 4-hidroxi-3-(hidroximetil)butilo en N-1 (HHG-5-FEP), o derivados de pirimidina sustituidos con 5-(2-)hidroxietilo y 5-(3-hidroxi)propilo que contienen cadenas laterales similares al 2,3-dihidroxi)propilo, aciclovir, ganciclovir y penciclovir, comprendiendo el procedimiento: a) transducir células con un polinucleótido que codifica HSV-TK y una primera proteína fluorescente; b) transducir las células con un polinucleótido que codifica una segunda proteína o proteína bioluminiscente que se puede distinguir ópticamente de la primera proteína fluorescente o bioluminiscente; c) tratar las células con un agente que se vuelve citotóxico al ser fosforilado por HSV-TK; y d) medir la cantidad relativa de expresión de la primera proteína fluorescente y la segunda proteína fluorescente. En una realización, la etapa d) comprende un lector de placas Perkin Elmer, un fluorímetro; un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS); un celómetro o un espectrofotómetro. En otra realización, la etapa d) comprende medir la salida fluorescente de la segunda proteína fluorescente o bioluminiscente *in vivo* en el sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los cuales:

La **Figura 1** ilustra la estructura de f 9-[4-¹⁸F]fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina([¹⁸F]FHBG) y su mecanismo de inhibición.

La **Figura 2** son imágenes coronales de todo el cuerpo de la biodistribución de [¹⁸F]FHBG en un sujeto humano sano en cuatro períodos distintos después de la inyección iv de 4,53 mCi de la [¹⁸F]FHBG.

La **Figura 3** es un esquema para un ensayo clínico de fase IA.

La **Figura 4** es un esquema para un ensayo clínico de fase IB.

La **Figura 5** es la respuesta de un paciente al tratamiento con HSV-TK en partículas de vector retroviral AAV.

Figura 6: medición de la respuesta de un paciente a la administración de [¹⁸F]FHBG en exploración PET (panel superior), exploración CT (panel central) y fusión de señales (panel inferior).

La **Figura 7** es una imagen fluorescente de la biodistribución de las partículas del vector retroviral HSV-TK en animales.

La **Figura 8** es una comparación de imágenes coronales de tres horas de cortes de 5 mm en ratas a las que se administró Reximmune C1 y C2. El tumor de la izquierda expresaba Reximmune-C2 y el de la derecha es

Reximmune-C1.

La **Figura 9** es una representación gráfica de la Figura 8, mostrando los promedios de la media dentro de los tumores para imágenes de una y tres horas. Las barras de error son error estándar de los promedios. B12 es el tumor que expresa Reximmune-C2 y A9 el tumor que expresa Reximmune-C1. C6 es el tumor de la línea celular nativa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En este documento se proporcionan procedimientos y composiciones para identificar un paciente susceptible de tratamiento con un sistema de administración de terapia génica. En este documento también se proporcionan procedimientos y composiciones para identificar sujetos o pacientes que pueden beneficiarse del tratamiento con terapia génica. Además, en este documento se proporcionan procedimientos y composiciones para identificar sujetos o pacientes que expresan en cantidades suficientes una proteína terapéutica incluida en una construcción de terapia génica. La identificación de sujetos o pacientes que son capaces de expresar cantidades suficientes de una proteína terapéutica permite a un facultativo evaluar e identificar a los pacientes que pueden beneficiarse de un tratamiento de terapia génica particular. Al hacerlo, los pacientes y los sujetos se identifican en una etapa temprana que son capaces de administrar agentes contra el cáncer a través de partículas de terapia génica para tratar, por ejemplo, lesiones primarias y metastásicas.

En algunas realizaciones, los agentes anticancerosos expresados a partir de construcciones de terapia génica incluidas en partículas virales pueden administrarse a pacientes mediante infusión intravenosa. En otras realizaciones más, los agentes anticancerosos expresados a partir de construcciones de terapia génica pueden administrarse a pacientes mediante infusión intraarterial. En otras realizaciones más, las partículas virales que contienen agentes anticancerosos pueden administrarse por vía intratumoral. En aún otras realizaciones más, los agentes anticancerosos expresados a partir de construcciones de terapia génica pueden transducirse selectivamente *in vitro* en células objetivo.

En otras realizaciones más, los agentes anticancerosos expresados a partir de construcciones de terapia génica pueden dirigirse a lesiones primarias y metastásicas, liberando de ese modo un gen que destruye tumores en las lesiones primarias y metastásicas mientras se conservan células y tejidos normales. En algunas realizaciones, la dirección de construcciones de terapia génica es específica. En otras realizaciones más, la dirección de construcciones de terapia génica es a una proteína de superficie celular o extracelular. En algunas realizaciones, la proteína de superficie celular o extracelular es colágeno. En otras realizaciones más, la dirección de construcciones de terapia génica es a una proteína específica expresada por células tumorales. Dichos agentes anticancerosos proporcionan una herramienta poderosa que puede dirigirse específicamente a las células cancerosas, mitigando de ese modo los efectos secundarios no deseados de otras terapias contra el cáncer conocidas.

La construcción de terapia génica es un retrovirus. Los retrovirus típicamente tienen tres marcos de lectura abiertos comunes, gag, pol y env, que codifican las proteínas estructurales de matriz, gag y nucleocápside, codifican enzimas que incluyen transcriptasa inversa, integrasa y proteasa, y codifican proteínas de envoltura y proteínas fusogénicas transmembrana, respectivamente. Típicamente, las partículas de vectores retrovirales se producen al empaquetar líneas celulares que proporcionan los productos necesarios de los genes gag, pol y env en trans. (Miller, y col., Human Gene Therapy, vol. 1, págs. 5-14 (1990)). Este enfoque da como resultado la producción de partículas de vectores retrovirales que transducen células de mamíferos, pero son incapaces de replicarse una vez que se han integrado en el genoma de la célula.

En algunas realizaciones, el retrovirus comprende al menos una proteína o carga útil terapéutica suministrada por la construcción de terapia génica. En algunas realizaciones, la proteína o carga útil terapéutica es una enzima. En otras realizaciones más, la proteína o carga útil terapéutica es timidina quinasa. La timidina quinasa es la timidina quinasa del HSV (virus del herpes simple). En otras realizaciones más, la timidina quinasa es timidina quinasa HSV (virus del herpes simple) 1.

En algunas realizaciones, la construcción de terapia génica HSV-TK se optimiza con respecto a la expresión máxima del gen y la actividad de destrucción del tumor tanto *in vitro* e *in vivo*, incluida la terapia génica del cáncer. En algunas realizaciones, el gen HSV-TK está optimizado en codones. En aún otras realizaciones, la construcción de terapia génica HSV-TK está dirigida a una célula o tejido tumoral específico. En otras realizaciones más, la construcción de terapia génica HSV-TK está dirigida a una proteína de la superficie celular expresada específicamente en células tumorales. En otras realizaciones más, la construcción de terapia génica HSV-TK está dirigida a una proteína de la superficie celular expresada en células o tejido tumoral. En otras realizaciones, la construcción de terapia génica HSV-TK está dirigida al colágeno.

5 Cuando se expresa *in vivo* en las células, HSV-TK escinde enzimáticamente un agente nucleósido coadministrado, como ganciclovir, penciclovir, val-ganciclovir, aciclovir y val-aciclovir, y posteriormente transforma el agente coadministrado en un agente citotóxico. Las timidina quinasa de mamíferos son insensibles a estos agentes coadministrados. Por lo tanto, la sensibilidad al agente citotóxico solo se confiere a las células tumorales después de la expresión del gen HSV-TK. El HSV-TK resultante convierte el ganciclovir en un producto monofosforilado, que luego se convierte en di- y trifosfatos por las quinasa del huésped, lo que lleva a la citotoxicidad y la muerte de las células tumorales. Se ha demostrado anteriormente que la terapia con la timidina quinasa viral es prometedora en el tratamiento de varios cánceres, incluidos gliomas, hepatoma y melanoma.

10 HSV-TK también fosforila selectivamente el análogo de nucleósido de, por ejemplo, 9-[4-¹⁸F-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina([¹⁸F]FHBG) (FIG. 1), que escinde el indicador radioactivo ¹⁸F de la molécula de FHBG. Por lo tanto, la expresión de HSV-TK puede controlarse estrechamente con exploraciones de tomografía por emisión de positrones (PET).

15 En consecuencia, en este documento se proporcionan procedimientos y composiciones para determinar el nivel de una señal indicadora en un sujeto o paciente después de la administración de un vector de terapia génica, y seleccionar al sujeto o paciente para el tratamiento con el vector de terapia génica cuando el nivel de la señal indicadora está por encima de un umbral establecido. El indicador es una señal radioactiva. En algunas realizaciones, el elemento indicador radioactivo es ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ^{99m}Te, ¹¹C, ¹⁴C, ¹²⁴I, ¹²³I, ¹³¹I, ¹⁵O, ¹³N y/o ⁸²RbCl.

25 En otras realizaciones más, en el presente documento se proporcionan procedimientos y composiciones para determinar el nivel de una señal radioindicadora en un sujeto o paciente después de la administración de un vector de terapia génica con timidina quinasa, y seleccionar al sujeto o paciente para el tratamiento con el vector de terapia génica cuando el nivel de la señal indicadora está por encima de un umbral establecido. El indicador es un indicador radioactivo. En otras realizaciones, el elemento indicador radioactivo es ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ^{99m}Te, ¹¹C, ¹⁴C, ¹²⁴I, ¹²³I, ¹³¹I, ¹⁵O, ¹³N y/o ⁸²RbCl. En otras realizaciones más, el elemento indicador radioactivo está acoplado a un nucleósido u objetivo de nucleósido sintético para formar un objetivo radioactivo. En algunas realizaciones, el objetivo de nucleósido es FHBG (9-[4-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina), FHPG (9-([3-fluoro-1-hidroxi-2-propoxi]metil)guanina), FGCV (fluoroganciclovir), FPCV (fluoropenciclovir), FIAU (1-(2'-deoxi-2'-fluoro-1-β-D-arabinofuranosil)-5-iodouracilo), FEAU (fluoro-5-etil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FMAU (fluoro-5-metil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FHOMP (6-((1-fluoro-3-hidroxiopropan-2-iloxi)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H, 3H)-diona), ganciclovir, valganciclovir, aciclovir, valaciclovir, penciclovir, pirimidina radiomarcada con cadena lateral 4-hidroxi-3-(hidroximetil)butilo en N-1 (HHG-5-FEP), o derivados de pirimidina sustituidos con 5-(2-)hidroxietilo) y 5-(3-hidroxi)propilo) que contienen cadenas laterales similares al 2,3-dihidroxi)propilo, aciclovir, ganciclovir y penciclovir. Preferentemente, el objetivo radioactivo es [¹⁸F]FHBG (9-(4-¹⁸F-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina).

También se proporcionan en este documento procedimientos que comprenden: (a) determinar el nivel de señal [¹⁸F]FHBG en un sujeto; y (b) seleccionar al sujeto para el tratamiento con una composición de terapia génica donde el nivel de [¹⁸F]FHBG es al menos 2,0 SUV o al menos 20 % por encima del fondo en una exploración PET.

Además, en este documento se proporciona un procedimiento que comprende: (a) determinar el nivel de señal [¹⁸F]FHBG en un sujeto; (b) incluir al sujeto con tratamiento con una composición donde el nivel de FHBG en el sujeto es mayor que aproximadamente 2,0 SUV en la exploración PET; y (c) administrar a dicho sujeto un agente anticanceroso.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para identificar a un sujeto que es susceptible a un tratamiento contra el cáncer, comprendiendo el procedimiento: a) identificar la expresión de [¹⁸F]FHBG en el sujeto; b) tratar al sujeto.

50 En este documento se proporciona un procedimiento para medir el efecto espectador mediado por HSV-TK-FHBG (9-[4-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina), FHPG (9-([3-fluoro-1-hidroxi-2-propoxi]metil)guanina), FGCV (fluoroganciclovir), FPCV (fluoropenciclovir), FIAU (1-(2'-deoxi-2'-fluoro-1-β-D-arabinofuranosil)-5-iodouracilo), FEAU (fluoro-5-etil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FMAU (fluoro-5-metil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FHOMP (6-((1-fluoro-3-hidroxiopropan-2-iloxi)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H, 3H)-diona), ganciclovir, valganciclovir, aciclovir, valaciclovir, penciclovir, pirimidina radiomarcada con cadena lateral 4-hidroxi-3-(hidroximetil)butilo en N-1 (HHG-5-FEP), o derivados de pirimidina sustituidos con 5-(2-)hidroxietilo) y 5-(3-hidroxi)propilo) que contienen cadenas laterales similares al 2,3-dihidroxi)propilo, aciclovir, ganciclovir y penciclovir, comprendiendo el procedimiento: a) transducir células con un polinucleótido que codifica HSV-TK y una primera proteína fluorescente; b) transducir las células con un polinucleótido que codifica una segunda proteína fluorescente o bioluminiscente que se puede

distinguir ópticamente de la primera proteína fluorescente o bioluminiscente; c) tratar las células con un agente que se vuelve citotóxico al ser fosforilado por HSV-TK; y d) medir la cantidad relativa de expresión de la primera proteína fluorescente y la segunda proteína fluorescente. En una realización, la etapa d) comprende un lector de placas Perkin Elmer, un fluorímetro; un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS); un celómetro o un espectrofotómetro. En otra realización, la etapa d) comprende medir la salida fluorescente de la segunda proteína fluorescente o bioluminiscente *in vivo* en el sujeto.

En este documento también se proporcionan procedimientos para determinar el nivel de señal [¹⁸F]FHBG en un sujeto y seleccionar al sujeto para el tratamiento con una composición de terapia génica donde el nivel de [¹⁸F]FHBG es al menos aproximadamente 2,0 SUV o al menos 20 % por encima del fondo en una exploración PET.

DEFINICIONES

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la invención. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para los términos de este documento, prevalecen los de esta sección. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección de ese tipo, se entiende que dichos identificadores pueden cambiar y la información particular en internet puede aparecer y desaparecer, pero se puede encontrar información equivalente buscando en internet. La referencia a la misma evidencia la disponibilidad y difusión pública de dicha información.

Como se usa en este documento, "ácido nucleico" se refiere a un polinucleótido que contiene al menos dos subunidades de nucleótidos o análogos de nucleótidos unidos covalentemente. Un ácido nucleico generalmente es un ácido desoxirribonucleico (ADN), un ácido ribonucleico (ARN) o un análogo de ADN o ARN. Los análogos de nucleótidos están disponibles en el mercado y se conocen procedimientos para preparar polinucleótidos que contienen dichos análogos de nucleótidos (Lin y col. (1994) Nucl. Acids Res. 22:5220-5234; Jellinek y col. (1995) Biochemistry 34:11363-11372; Pagratis y col. (1997) Nature Biotechnol. 15:68-73). El ácido nucleico generalmente es monocatenario, bicatenario o una mezcla de los mismos. Para los fines de este documento, a menos que se especifique de otro modo, el ácido nucleico es bicatenario, o es evidente por el contexto.

Como se usa en este documento, "ADN" pretende incluir todos los tipos y tamaños de moléculas de ADN, incluido el ADNc, los plásmidos y el ADN que incluye los nucleótidos modificados y los análogos de nucleótidos.

Como se usa en este documento, "nucleótidos" incluye nucleósidos mono-, di- y trifosfatos. Los nucleótidos también incluyen nucleótidos modificados, tales como, pero sin limitación, nucleótidos de fosforotioato y nucleótidos de deazapurina y otros análogos de nucleótidos.

El término "polinucleótido", como se usa en este documento, significa una forma polimérica de nucleótido de cualquier longitud, e incluye ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Dicho término también incluye ADN monocatenario y bicatenario, así como ARN monocatenario y bicatenario. El término también incluye polinucleótidos modificados, tales como polinucleótidos metilados o protegidos.

Como se usa en este documento, el término "sujeto" se refiere a animales, plantas, insectos y aves en los que se introducen las grandes moléculas de ADN. Se incluyen organismos superiores, tales como mamíferos y aves, incluyendo seres humanos, primates, roedores, vacas, cerdos, conejos, cabras, ovejas, ratones, ratas, cobayas, gatos, perros, caballos, pollos y otros.

Como se usa en este documento, "administrar a un sujeto" es un procedimiento mediante el cual uno o más agentes de administración y/o moléculas de ácido nucleico grandes, juntas o por separado, se introducen o se aplican en un sujeto de manera que las células objetivo que están presentes en el sujeto con el tiempo se ponen en contacto con el agente y/o las moléculas de ácido nucleico grandes.

Como se usa en este documento, "vector de administración" o "vehículo de administración" o "vector terapéutico" o "sistema terapéutico" se refiere a partículas virales y no virales que albergan y transportan moléculas de ácido nucleico exógenas a una célula o tejido objetivo. Los vehículos virales incluyen, pero sin limitación, retrovirus, adenovirus, virus lentivirales, virus de herpes y virus adenoasociados. Los vehículos no virales incluyen, pero sin limitación, micropartículas, nanopartículas, virosomas y liposomas. "Dirigido", como se usa en este documento, se refiere al uso de ligandos que están asociados con el vehículo de administración y dirigen el vehículo a una célula o tejido. Los ligandos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, receptores y dominios de unión a colágeno.

Como se usa en este documento, "administración", que se usa de manera intercambiable con "transducción", se refiere al procedimiento por el cual las moléculas de ácido nucleico exógenas se transfieren a una célula de tal manera que están ubicadas dentro de la célula. La administración de ácidos nucleicos es un procedimiento distinto de la expresión de ácidos nucleicos.

5

Como se usa en este documento, un "sitio de clonación múltiple (MCS)" es una región de ácido nucleico en un plásmido que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción, cualquiera de los cuales puede usarse junto con tecnología recombinante convencional para digerir el vector. "Digestión de enzimas de restricción" se refiere a la escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona solo en ubicaciones específicas en una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están disponibles en el mercado. El uso de dichas enzimas es ampliamente entendido por los expertos en la materia. Con frecuencia, un vector se linealiza o se fragmenta usando una enzima de restricción que corta dentro del MCS para permitir que las secuencias exógenas se ligan al vector.

10

15 Como se usa en este documento, "origen de replicación" (a menudo denominado "ori"), es una secuencia específica de ácido nucleico en la que se inicia la replicación. Como alternativa, se puede emplear una secuencia de replicación autónoma (ARS) si la célula huésped es levadura.

Como se usa en este documento, los "marcadores seleccionables o detectables" confieren un cambio identificable a una célula que permite una fácil identificación de las células que contienen un vector de expresión. Generalmente, un marcador seleccionable es aquel que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador seleccionable positivo es aquel en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador seleccionable negativo es aquel en el que su presencia impide su selección. Un ejemplo de un marcador seleccionable positivo es un marcador de resistencia a fármacos.

20

Por lo general, la inclusión de un marcador de selección de fármacos ayuda en la clonación e identificación de los transformantes, por ejemplo, los genes que confieren resistencia a la neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores seleccionables útiles. Además de los marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de los transformantes basándose en la implementación de las condiciones, también se contemplan otros tipos de marcadores que incluyen marcadores detectables, como el GFP, cuya base es el análisis colorimétrico. En algunas realizaciones, se utilizan enzimas detectables tales como el virus del herpes simple timidina quinasa (tk) o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Un experto en la materia también sabría cómo emplear marcadores inmunológicos, posiblemente junto con el análisis FACS. El marcador usado no se considera importante, siempre que sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto genético. Otros ejemplos de marcadores seleccionables y detectables son bien conocidos por un experto en la materia.

Como se usa en este documento, "expresión" se refiere al procedimiento mediante el cual el ácido nucleico se traduce en péptidos o se transcribe en ARN, que, por ejemplo, puede traducirse en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el ácido nucleico deriva de ADN genómico, la expresión incluye, si se selecciona una célula u organismo huésped eucariótico adecuado, el empalme del ARNm. Para que el ácido nucleico heterólogo se exprese en una célula huésped, inicialmente debe administrarse en la célula y luego, una vez en la célula, residir en última instancia en el núcleo.

Como se usa en este documento, un "curso terapéutico" se refiere a la administración periódica o programada de los vectores descritos en este documento dentro de un período de tiempo definido. Dicho período de tiempo es de al menos un día, al menos dos días, al menos tres días, al menos cinco días, al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos un mes, al menos dos meses, o al menos seis meses. La administración también podría llevarse a cabo de manera crónica, es decir, por un período de tiempo indefinido. La administración periódica o programada incluye una vez al día, dos veces al día, tres veces al día u otra administración programada.

Tal como se usa en este documento, las expresiones "coadministración", "administrados en combinación con" y sus equivalentes gramaticales o similares pretenden abarcar la administración de los agentes terapéuticos seleccionados a un solo paciente, y pretenden incluir regímenes de tratamiento en los que los agentes se administran por la misma o diferente vía de administración o en el mismo o diferentes momentos. En algunas realizaciones, un agente terapéutico como se describe en la presente solicitud se administrará conjuntamente con otros agentes. Estos términos abarcan la administración de dos o más agentes a un animal de modo que ambos agentes y/o sus metabolitos estén presentes en el animal al mismo tiempo. Incluyen la administración simultánea en composiciones separadas, la administración en diferentes momentos en composiciones separadas, y/o la administración en una composición en la que ambos agentes están presentes. Por lo tanto, en algunas

55

60

realizaciones, un agente terapéutico y el(los) otro(s) agente(s) se administran en una única composición. En algunas realizaciones, un agente terapéutico y el(los) otro(s) agente(s) se mezclan en la composición. En realizaciones adicionales, un agente terapéutico y el(los) otro(s) agente(s) se administran en momentos separados en dosis separadas.

5

El término "célula huésped" indica, por ejemplo, microorganismos, células de levadura, células de insecto y células de mamíferos, que pueden ser, o han sido, usadas como receptores de múltiples construcciones para producir un vector de administración. El término incluye la progenie de la célula original que ha sido transfectada. Por lo tanto, una "célula huésped" como se usa en este documento generalmente se refiere a una célula que ha sido transfectada con una secuencia de ADN exógena. Se entiende que la progenie de una única célula parental puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en el complemento de ADN genómico o total como el progenitor original, debido a una mutación natural, accidental o deliberada

10

Como se usa en este documento, "terapia genética" implica la transferencia de ADN heterólogo a determinadas células, células objetivo, de un mamífero, particularmente un ser humano, con un trastorno o afecciones para las cuales se busca terapia o diagnóstico. El ADN se introduce en las células objetivo seleccionadas de una manera tal que el ADN heterólogo se expresa y se produce de ese modo un producto terapéutico codificado. En algunas realizaciones, el ADN heterólogo, directa o indirectamente, media la expresión del ADN que codifica el producto terapéutico. En algunas realizaciones, el ADN heterólogo codifica un producto, tal como un péptido o ARN que media, directa o indirectamente, la expresión de un producto terapéutico. En algunas realizaciones, la terapia genética se usa para administrar un ácido nucleico que codifica un producto génico para reemplazar un gen defectuoso o complementar un producto genético producido por el mamífero o la célula en la que se introduce. En algunas realizaciones, el ácido nucleico introducido codifica un compuesto terapéutico, como un factor de crecimiento o un inhibidor del mismo, o un factor de necrosis tumoral o un inhibidor del mismo, como un receptor por lo tanto, que generalmente no se produce en el huésped mamífero o que no es producido en cantidades terapéuticamente efectivas o en un momento terapéuticamente útil. En algunas realizaciones, el ADN heterólogo que codifica el producto terapéutico se modifica antes de la introducción en las células del huésped afectado con el fin de mejorar o alterar de otro modo el producto o la expresión del mismo.

25

Como se usa en este documento, "secuencia de ácido nucleico heteróloga" es generalmente ADN que codifica ARN y proteínas que normalmente no se producen *in vivo* por la célula en la que se expresa o que media o codifica mediadores que alteran la expresión del ADN endógeno al afectar la transcripción, traducción u otros procedimientos bioquímicos regulables. Cualquier ADN que un experto en la materia reconozca o considere como heterólogo o ajeno a la célula en la que se expresa está englobado en este documento por ADN heterólogo. Ejemplos de ADN heterólogo incluyen, pero sin limitación, ADN que codifica proteínas marcadoras trazables, como una proteína que confiere resistencia al fármaco, ADN que codifica sustancias terapéuticamente efectivas, como agentes anticancerosos, enzimas y hormonas, y ADN que codifica otros tipos de proteínas, como los anticuerpos. En algunas realizaciones, los anticuerpos que son codificados por ADN heterólogo se secretan o expresan en la superficie de la célula en la que se ha introducido el ADN heterólogo.

35

Como se usa en este documento, la expresión "timidina quinasa mutante" se refiere no solo a la proteína específica descrita en este documento (así como a las secuencias de ácido nucleico que codifican estas proteínas), sino a derivados de la misma, que pueden incluir diversas formas estructurales de la proteína primaria que conservan actividad biológica.

45

Como se usa en este documento, "timidina quinasa no mutada" se refiere a una secuencia de polipéptido de timidina quinasa nativa o de tipo silvestre.

Como se usa en este documento, "gen suicida" se refiere a un ácido nucleico que codifica un producto, donde el producto causa la muerte celular por sí mismo o en la presencia de otros compuestos.

50

Como se usa en este documento, el término "mutado" o "reemplazado por otro nucleótido" significa que un nucleótido en una posición determinada se reemplaza en esa posición por un nucleótido distinto al que se produce en la secuencia no mutada o mutada anteriormente. Es decir, en algunos aspectos, se pueden hacer modificaciones específicas en diferentes nucleótidos. En algunas realizaciones, los reemplazos se hacen de manera que los sitios relevantes del donante y/o aceptor de empalme ya no están presentes en un gen.

55

Como se usa en este documento, un "aminoácido polar" se refiere a los restos de aminoácidos Asp (N), Cys (C), Gln (Q), Gly (G), Ser (S), Thr (T) o Tyr (Y).

60

Como se usa en este documento, un "aminoácido no polar" se refiere a los restos de aminoácidos Ala (A), Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Pro (P), Trp (W)), o Val (V).

Como se usa en este documento, un "aminoácido básico" se refiere a los restos de aminoácidos Arg (R), His (H) o Lys (K)

Como se usa en este documento, un "aminoácido ácido" se refiere a los residuos de aminoácidos Asp (D) o Glu (E).

TERAPIA DE GENES

10

La terapia génica implica la transferencia de ADN heterólogo a determinadas células de un mamífero, particularmente un ser humano, con un trastorno o afecciones para las cuales se busca terapia o diagnóstico. El ADN se introduce en las células objetivo seleccionadas de una manera tal que el ADN heterólogo se expresa y se produce de ese modo un producto terapéutico codificado.

15

En algunas realizaciones, el ADN heterólogo, directa o indirectamente, media la expresión del ADN que codifica el producto terapéutico. En algunas realizaciones, el ADN heterólogo codifica un producto, tal como un péptido o ARN que media, directa o indirectamente, la expresión de un producto terapéutico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico introducido codifica un compuesto terapéutico, como un factor de crecimiento o un inhibidor del mismo, o un factor de necrosis tumoral o un inhibidor del mismo, como un receptor por lo tanto, que generalmente no se produce en el huésped mamífero o que no es producido en cantidades terapéuticamente efectivas o en un momento terapéuticamente útil.

20

Se han usado procedimientos no virales y virales para administrar ADN terapéutico heterólogo en la célula, incluidas partículas de vectores virales derivadas de retrovirus, adenovirus, partículas virales adenoasociadas, partículas de virus de herpes, virus de la vacuna, lentivirus, virus de la viruela, virus de Semliki y virus pseudotipados.

25

En consecuencia, en este documento se proporcionan construcciones virales para la transferencia de genes a células *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* para terapia génica. Dichas partículas de vectores virales incluyen, pero sin limitación, partículas de vectores retrovirales, partículas de vectores adenovirales, partículas de virus adenoasociadas, partículas de virus del herpes, virus pseudotipados, partículas de vectores lentivirales, partículas de vectores de virus de la viruela, partículas de vectores del virus de la vacuna y partículas no virales. Preferentemente, la partícula de vector viral es una partícula de vector retroviral.

30

35 CONSTRUCCIONES DE RETROVIRAL

En algunas realizaciones, la partícula de vector empleada para el uso de terapia génica es una partícula de vector retroviral. En aún otras realizaciones, la partícula de vector retroviral deriva del virus de la leucemia murina de Moloney y es de la serie LN de vectores, tales como los mencionados anteriormente en este documento, y se describe adicionalmente en Bender, y col., *J. Virol.*, vol. 61, págs. 1639-1649 (1987) y Miller, y col., *Biotechniques*, vol. 7, págs. 980-990 (1989). Dichos vectores tienen una parte de la señal de empaquetamiento derivada de un virus de sarcoma de ratón y un codón de iniciación gag mutado. El término "mutado" como se usa en este documento significa que el codón de iniciación de gag se ha eliminado o alterado de tal manera que la proteína gag o fragmentos o truncamientos de la misma no se expresan.

40

45

En algunas realizaciones, la partícula de vector retroviral incluye una envoltura modificada, que incluye al menos un polinucleótido que codifica al menos un polipéptido heterólogo para expresarse en una célula deseada. El polipéptido heterólogo puede, en una realización, ser un agente terapéutico. El agente terapéutico es la timidina quinasa, más preferentemente HSV-TK.

50

En aún otras realizaciones, los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, factores de crecimiento tales como, por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), eritropoyetina, G-CSF, GM-CSF, TGF α , TGF- β y factor de crecimiento de fibroblastos, citoquinas, que incluyen, pero sin limitación, interleuquinas y factores de necrosis tumoral. Otros agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, anticoagulantes, agentes antiplaquetarios, agentes antiinflamatorios, proteínas supresoras de tumores, factores de coagulación, incluidos el factor VII, factor VIII y factor IX, proteína S, proteína C, antitrombina III y von factor de Willebrand.

55

En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica el agente terapéutico está bajo el control de un promotor adecuado. Los promotores adecuados que pueden emplearse incluyen, pero sin limitación, la LTR retroviral; el

60

promotor SV40; el promotor de citomegalovirus (CMV); el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV); el promotor de histonas; el promotor polIII, el promotor de la β -actina; promotores inducibles, tales como el promotor MMTV, el promotor de metalotioneína; promotores de choque térmico; promotores de adenovirus; el promotor de albúmina; el promotor ApoA1; promotores de parvovirus B19; promotores de la globina humana; promotores de la timidina quinasa viral, tales como el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes simple; LTR retrovirales; 5 promotores de la hormona del crecimiento humano y el promotor inducible por MxIFN. El promotor también puede ser el promotor nativo que controla el polinucleótido que codifica el agente terapéutico.

Los polinucleótidos que codifican el polipéptido de envoltura modificada y el agente terapéutico pueden situarse en 10 un vector adecuado mediante técnicas de ingeniería genética conocidas por los expertos en la materia. Cuando el vector modificado es una partícula de vector retroviral, los polinucleótidos que codifican el polipéptido de envoltura modificada y el agente terapéutico se sitúan en un vector de plásmido retroviral adecuado.

El vector de plásmido retroviral incluye uno o más promotores. Los promotores adecuados que pueden emplearse 15 incluyen, pero sin limitación, la LTR retroviral; el promotor SV40; y el promotor del citomegalovirus humano (CMV) descrito en Miller, y col., Biotechniques, vol. 7, n.º 9, 980-990 (1989), o cualquier otro promotor (por ejemplo, promotores celulares tales como promotores celulares eucariotas que incluyen, pero sin limitación, los promotores de histona, pol III y β -actina). Otros promotores virales que pueden emplearse incluyen, pero sin limitación, promotores de adenovirus, promotores de TK y promotores de parvovirus B19. La selección de un promotor adecuado será 20 evidente para los expertos en la materia a partir de las enseñanzas contenidas en este documento.

En una realización, el vector plasmídico retroviral, que incluye un polinucleótido que codifica la envoltura modificada y un polinucleótido que codifica un agente terapéutico, se emplea para transducir una línea celular de 25 empaquetamiento para formar una línea celular productora, que generará partículas de vectores retrovirales infecciosas. En una realización, la línea celular de empaquetamiento es una línea celular de "empaquetamiento previo" que incluye polinucleótidos que codifican las proteínas retrovirales gag y pol, pero no la proteína de envoltura o env. Dichas líneas celulares, tras la transducción con el vector plasmídico retroviral, generan partículas retrovirales infecciosas que incluyen la envoltura modificada o quimérica y un polinucleótido que codifica el agente terapéutico. El vector puede transducir las células de empaquetamiento a través de cualquier medio conocido en la técnica 30 Dichos medios incluyen, pero sin limitación, electroporación, y el uso de liposomas, tales como los descritos anteriormente, y precipitación con CaPO_4 . Dichas células productoras generan partículas de vectores retrovirales infecciosas que incluyen la envoltura modificada, la envoltura retroviral de tipo silvestre, un polinucleótido que codifica la envoltura modificada, o quimérica, y un polinucleótido que codifica un agente terapéutico.

35 En otra realización, se proporciona una célula de empaquetamiento que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica una envoltura quimérica modificada de acuerdo con la invención, y que puede incluir además secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas gag y pol. Una célula productora para generar partículas virales que incluye una envoltura modificada de acuerdo con la invención se produce introduciendo en dicha célula de empaquetamiento una partícula de vector retroviral o un vector de plásmido retroviral, incluyendo en cada caso 40 un polinucleótido que codifica un agente terapéutico. Por tanto, la línea celular productora genera partículas retrovirales infecciosas que incluyen la envoltura quimérica modificada y el polinucleótido que codifica el agente terapéutico.

ADMINISTRACIÓN DEL VECTOR RETROVIRAL DIRIGIDO

45 En algunas realizaciones, en este documento se proporcionan partículas de vector que tienen una proteína de superficie viral modificada, tal como, por ejemplo, un polipéptido de envoltura viral modificado, para dirigir la partícula de vector a un componente de matriz extracelular. La proteína de la superficie viral se modifica para incluir un polipéptido dirigido que incluye una región de unión que se une a un componente de la matriz extracelular.

50 En algunas realizaciones, el polipéptido dirigido se inserta entre dos restos de aminoácidos numerados consecutivamente de la región de unión al receptor nativo (es decir, sin modificar) de la envoltura retroviral. En otras realizaciones más, los restos de aminoácidos de la región de unión al receptor pueden eliminarse y reemplazarse con el polipéptido dirigido.

55 Como una alternativa a la modificación de la región de unión al receptor, o además de la región de unión al receptor modificada, las partículas retrovirales pueden tener modificaciones en otras regiones de la proteína de envoltura, de manera que otras regiones de la envoltura pueden incluir el polipéptido dirigido, tal como, para ejemplo, la señal secretora o secuencia "líder", la región bisagra o la parte del cuerpo. Dichas modificaciones pueden incluir 60 delecciones o sustituciones de restos de aminoácidos en la envoltura retroviral, donde los restos de aminoácidos de

regiones distintas a la región de unión al receptor de la envoltura se eliminan y reemplazan con el polipéptido dirigido, o el polipéptido dirigido se sitúa entre los restos de aminoácido numerados consecutivamente de regiones distintas de la región de unión al receptor de la envoltura viral.

- 5 En otra realización alternativa, la envoltura retroviral, antes de la modificación de la misma para incluir el polipéptido dirigido que se une al componente de la matriz extracelular, puede ser una envoltura que incluye regiones de diferentes tropismos. Por ejemplo, la envoltura retroviral puede ser una envoltura del virus de la leucemia murina de Moloney que incluye una proteína gp70 que tiene una porción ecotrópica y una porción anfitriónica y/o xenotrópica.
- 10 En general, el polipéptido dirigido incluye una región de unión que se une a un componente de la matriz extracelular, que incluye, pero sin limitación, colágeno (incluido colágeno tipo I y colágeno tipo IV), laminina, fibronectina, elastina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos y secuencias que se unen a fibronectina, como arginina-glicina-ácido aspártico, o secuencias RGD. Las regiones de unión que pueden incluirse en el polipéptido dirigido incluyen, pero sin limitación, dominios polipeptídicos que son dominios funcionales dentro del factor de von Willebrand o derivados del mismo, donde dichos dominios polipeptídicos se unen al colágeno. En una realización, la región de unión es un polipéptido que tiene la siguiente fórmula estructural: Trp-Arg-Glu-Pro-Ser-Phe-Met-Ala-Leu-Ser. (SEQ ID NO: 25).
- 15

Además de la región de unión, el polipéptido dirigido puede incluir además secuencias enlazadoras de uno o más restos de aminoácidos, situadas en el N terminal y/o C terminal de la región de unión, por lo que dichos enlazadores aumentan la flexibilidad rotacional y/o minimizan los obstáculos estéricos del polipéptido de envoltura modificada.

20

HSV-TK

- La timidina quinasa es una enzima de vía de recuperación que fosforila los sustratos de nucleósidos naturales así como los análogos de nucleósidos. En general, la timidina quinasa se usa terapéuticamente mediante la administración de un análogo de nucleósido tal como ganciclovir o aciclovir a una célula que expresa timidina quinasa, donde la timidina quinasa fosforila el análogo de nucleósido, creando un producto tóxico capaz de destruir la célula.
- 25
- 30 Las secuencias polinucleotídicas que codifican la timidina quinasa exógena como se usa en este documento pueden prepararse a partir de una amplia diversidad de timidina quinasa. En algunas realizaciones, el mutante de la timidina quinasa deriva de la timidina quinasa de *Herpesviridae* que incluye, por ejemplo, virus de herpes de primate y virus de herpes no primate tales como virus de herpes aviar. Ejemplos representativos de virus herpes adecuados incluyen, por ejemplo, virus herpes simple (HSV) tipo 1, virus herpes simple tipo 2, virus de la varicela zoster, virus del herpes tíf, virus herpes felino tipo 1, virus pseudorabies, virus del herpes equino tipo 1, virus del herpes bovino tipo 1, virus del herpes del pavo, virus de la enfermedad de Marek, virus del herpes saimir y virus de Epstein-Barr.
- 35

MEJORAS AL GEN TK

- 40 En algunas realizaciones, en este documento, se describe una secuencia de polinucleótidos que codifica HSV-TK. En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos codifica una secuencia de aminoácidos de HSV-TK de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos codifica una secuencia de aminoácidos de HSV-TK mutada.
- 45 Los procedimientos ejemplares que se pueden usar en la preparación de una secuencia polinucleotídica optimizada proporcionada en este documento incluyen, pero sin limitación, optimización de codones; corrección de sitios de empalme, eliminación de trectos de poli-pirimidina y exceso de contenido de GC; adición de una sola secuencia de Kozak, eliminación de secuencias de Kozak no deseadas; inclusión de sitios de restricción para subclonación en vectores retrovirales u otros; eliminación de secuencias de localización nuclear o adición de secuencias de exportación nuclear; adición de secuencias de mutación; adición de secuencias de codones de doble parada; adición de tags, enlazadores y secuencias de fusión; preparación del archivo de secuencias para su presentación a la compañía de síntesis de genes; subclonación del gen sintetizado en vectores retrovirales; inclusión de genes de proteínas fluorescentes en vectores retrovirales; inclusión de genes marcadores seleccionables en vectores retrovirales; preparación de ADN plasmídico Maxiprep; transfección del productor retroviral u otras células;
- 50
- 55 producción en laboratorio, piloto o en escala GMP de retrovirus; transducción de células objetivo con retrovirus; ensayo de destrucción celular mediado por GCV o fármacos análogos; ensayo de selección de hipoxantina/aminopteroína/timidina (HAT); procedimiento de selección del fármaco marcador seleccionable para producir líneas celulares transducidas retrovirales; microscopía de fluorescencia y fotografía para detectar y documentar células objetivo transducidas con retrovirus; detección fluorescente cuantitativa de células objetivo
- 60 transducidas retrovirales; ensayo de expresión de proteínas occidentales; otros procedimientos y ensayos según sea

necesario para el análisis HSV-TK; o una combinación de los mismos. Los protocolos para dichos procedimientos se describen en este documento, están disponibles en el mercado o se describen en la bibliografía pública y las bases de datos.

- 5 En algunas realizaciones, en este documento se describe un procedimiento para obtener una secuencia mejorada de HSV-TK. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: a) corrección y/o eliminación de sitios de empalme; y/o b) ajuste a una sola secuencia de Kozak. Opcionalmente, en algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la inclusión de sitios de restricción para la subclonación de la secuencia HSV-TK. Opcionalmente, o además, en algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la eliminación de
10 secuencias de localización nuclear.

En este documento se proporciona una secuencia de polinucleótidos que codifica una forma mutada de timidina quinasa viral del virus simple humano (HSV-TK), donde la HSV-TK codificada está mutada en el resto de aminoácido 25, 26, 32, 33, 167, 168, o una combinación de los mismos, donde la secuencia de polinucleótidos se muta en
15 comparación con una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 1 o 3. En dichas secuencias se pueden hacer 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 mutaciones.

Las modificaciones pueden ser mutaciones conservativas o no conservativas. Se puede hacer una mutación de tal manera que el aminoácido codificado se modifique a un aminoácido polar, no polar, básico o ácido.

20 En este documento se proporciona una secuencia de polinucleótidos que codifica una forma mutada de timidina quinasa del virus simple humano (HSV-TK), donde el HSV-TK codificado incluye una secuencia de exportación nuclear. En este documento se proporciona una secuencia de polinucleótidos que codifica una forma mutada de timidina quinasa del virus simple humano (HSV-TK), donde el HSV-TK codificado tiene una función mejorada en
25 comparación con el HSV-TK de tipo silvestre y comprende A168H dmNES (sistema CL= potenciador de CMV adecuadamente fusionado a regiones promotoras de LTR), donde NES se refiere a una secuencia de exportación nuclear. En una realización, un mutante HSV-TKA168HdmNES es un gen mutante de HSV-TK para su inclusión en Reximmune-C2. En una realización, el NES se deriva de la MAP quinasa (MAPKK). En otra realización más, la secuencia de polinucleótidos para NES es CTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGCTGGAAGCTGGATGGC (SEQ ID NO:
30 23). En otras realizaciones, la secuencia del polipéptido NES es LQKKLEELELDG (SEQ ID NO: 24).

En algunas realizaciones, en este documento se describen mutaciones a una secuencia de polinucleótidos que codifica la timidina quinasa del virus simple humano (HSV-TK) donde no se realizan mutaciones en la secuencia polipeptídica de HSV-TK de tipo silvestre.

35 Las posiciones de nucleótidos se refieren a una posición en la SEQ ID NO: 1 (secuencia de nucleótidos de tipo silvestre (wt) HSV1-TK) o la SEQ ID NO: 3 (HSV-TK en Reximmune-C HSV-TK; mutante SR39 y mutación R25G-R26S de la señal de localización nuclear HSV-TK (NLS)).

40 En una realización, se proporcionan sitios de restricción Sac I-Kpn I que se unen los oligonucleótidos bicatenarios clonables de la región mutante de HSV-TK SR39 mutante. Véase, por ejemplo, las SEQ ID NOs:6 y 7, donde se muestran los sitios Sac I y Kpn I a la izquierda y la derecha, respectivamente. El subrayado en negrita ilustra los sitios donde se pueden hacer mutaciones. Las SEQ ID NOs:8 y 9 ilustran una secuencia ejemplar después de cortar con Sac I y Kpn I. Los cebadores directos e inversos ejemplares que se pueden usar para hacer las mutaciones se
45 muestran como las SEQ ID NOs: 10 y 11.

Se proporcionan secuencias de polinucleótidos HSV-TK optimizados ejemplares, por ejemplo, como las SEQ ID NOs: 12-22.

50 Sin embargo, cuando se hacen dichas referencias, la invención no pretende limitarse a la secuencia exacta como se expone en la SEQ ID NO: 1 o 3, sino que incluye variantes y derivados de la misma. Por lo tanto, la identificación de ubicaciones de nucleótidos en otras secuencias de timidina quinasa se contempla (es decir, la identificación de nucleótidos en las posiciones que la persona experta consideraría para corresponder a las posiciones enumeradas en la SEQ ID NO: 1 o 3).

55 En algunas realizaciones, los nucleótidos se reemplazan tomando nota del código genético de tal manera que un codón se cambia a un codón diferente que codifica el mismo resto de aminoácido. En algunas realizaciones, los nucleótidos se reemplazan dentro de las regiones codificantes de una secuencia de ácido nucleico que codifica HSV-TK, aunque la secuencia de ácido nucleico mantiene la expresión de la proteína HSV-TK de tipo silvestre.

60

ES 2 703 341 T3

En dichas realizaciones, 5/21 codones contienen "C o G" en tercera posición (24 %); 0/21 codones contienen "C" en tercera posición (0 %); 5/21 codones contienen "G" en tercera posición (24 %); y 16/21 codones contienen "A o T" en tercera posición (76 %).

- 5 En otras realizaciones más, 16/21 codones contienen "C o G" en tercera posición (76 %); 11/21 codones contienen "C" en tercera posición (52 %); 5/21 codones contienen "G" en tercera posición (24 %); y 5/21 codones contienen "A o T" en tercera posición (24 %).

- En algunas realizaciones, los siguientes codones raros no se usan o se evitan en la región codificante de un polinucleótido que codifica HSV-TK, o una variante de los mismos: GCG para alanina; CGA o CGT para arginina; TTA o CTA para leucina; CCG para prolina; TCG para serina; ACG para treonina; y GTA para valina.
- 10

- En algunas realizaciones, la alteración de los codones como se describe en este documento da como resultado aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, o un mayor porcentaje de aumento en la actividad.
- 15

- 20 En algunas realizaciones, en este documento se describe una secuencia de ácido nucleico que codifica una timidina quinasa donde al menos un nucleótido correspondiente a un sitio donante de empalme se reemplaza por otro nucleótido. En realizaciones adicionales, los nucleótidos de los sitios aceptores de empalme no están alterados. En algunas realizaciones, al menos un nucleótido correspondiente a un sitio aceptor de empalme se reemplaza por otro nucleótido.
- 25

- En algunas realizaciones, en este documento se describe una secuencia de ácido nucleico que codifica una timidina quinasa donde al menos uno de los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos del sitio donante de empalme en las posiciones 329 y 330 de una secuencia de polinucleótido (por ejemplo, la SEQ ID NO:1 o 3) es reemplazado por otro nucleótido. En algunas realizaciones, ambos nucleótidos en las posiciones 327 y 555 son reemplazados por otros nucleótidos. Por ejemplo, la posición 327 puede mutarse a un resto de aminoácido seleccionado de entre: G a A. Como alternativa, o además, la posición 555 puede mutarse a un resto de aminoácido seleccionado de entre: G a A. En una realización, el HSV-TK modificado tiene una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 18, en la cual HSV-TK se mejoró de las siguientes maneras:
- 30

- 35 HSV-TK NESdmNLS A168H, CO y SC
NES = secuencia de exportación nuclear de MAP quinasa (MAPKK) dmNLS = secuencia de localización nuclear de HSV-TK mutada doble
CO = codón optimizado
SC = sitio de empalme donante/aceptor corregido en 327 y 555,
- 40 secuencia subrayada

SEQ ID NO: 18

gtcaGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCCTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGCTGGAACT
 GGATGGCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGCCTTCGACCAGGCCGCCCGCAGCCGCGGC
 CACAGCAACGGCAGCACCGCaCTGCGgCCaGGATCTCAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCG
 AGCAGAAGATGCCCCACCTGCTGCGCGTGTACATCGACGGaCCaCACGGCATGGGCAAGACCAC
 CACCACCCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGACGACATCGTGTACGTGCCCGAGCCCATG
 ACCTACTGGCGCGTGTGGGCGCCAGCGAGACCATCGCCAACATCTACACCACCCAGCACCGCC
 TGGACCAaggCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCCGCGTGGTGATGACCAGCGCCCAGATtACaAT
 GGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGCaCCaCACATCGGCGGGCAGGCCGGCAGC
 AGCCACGCaCCaCCaCCaGCaCTGACCCTGATCTTCGACCGgCACCCaATCGCaCACCTGCTGT
 GCTACCCgGCaGCaCGCTACCTGATGGGctccATGACaCCaCaaggCCGTGCTGGCCTTCGTGGC
 CCTGATCCCaCCaACaCTGCCCCGGCACCAACATCGTGCTGGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCAC
 ATCGACCGCCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAGCGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCA
 TCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGCCTACCTGCAGTGGCGGGCAGCTGGCG
 CGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCCaCCaCAGGGCGCCGAGCCaCAGAGCAAC
 GCCGGaCCaCGaCCaCACATCGGCGACACCCTGTTACCCTGTTCCGgGCaCCaGAGCTGCTGG
 CaCCaAACGGCGACCTGTACAACGTGTTCCGCTGGGCCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCC
 CtccATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGtcaCCgGCCGGCTGCCCGGACGCCCTGCTG
 CAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACaACaCCCGGCAGCATCCCaACaATCTGCG
 ACCGTGGCCCCGACCTTCGCCCGCGAGATGGGCGAGGCCAACTAATAGGGATCCCTCGAGAAGCT
 Tgtca

En algunas realizaciones, en este documento se describe una secuencia de ácido nucleico que codifica una timidina quinasa donde al menos uno de los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos del sitio aceptor de empalme en las posiciones 554 y 555, o al menos uno de los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos del sitio aceptor de empalme en las posiciones 662 y 663, o al menos uno de los nucleótidos correspondientes a los sitios aceptores de empalme en las posiciones 541 y 542 de la secuencia de tipo silvestre se reemplaza por otro nucleótido. Por ejemplo, la posición 541 puede mutarse a un resto de aminoácido seleccionado de entre: G a A. La posición 542 puede mutarse a un resto de aminoácido seleccionado de entre: G a A. La posición 554 puede mutarse a un resto de aminoácido seleccionado de entre: G a A. La posición 555 puede mutarse a un resto de aminoácido seleccionado de entre: G a A. La posición 662 puede mutarse a un resto de aminoácido seleccionado de entre: G a A. La posición 663 puede mutarse a un resto de aminoácido seleccionado de entre: G a A.

Una secuencia de Kozak flanquea el codón de inicio AUG dentro del ARNm e influye en el reconocimiento del codón de inicio por los ribosomas eucarióticos. En algunas realizaciones, una secuencia de polinucleótidos que codifica HSV-TK comprende no más de una secuencia de Kozak. En algunas realizaciones, la secuencia de Kozak está corriente arriba de la porción de codificación de la secuencia de ADN. En algunas realizaciones, la secuencia Kozak de un polinucleótido que codifica HSV-TK se modifica para producir una secuencia Kozak con una mayor eficacia de iniciación de la traducción en una célula de mamífero. En algunas realizaciones, la modificación de la secuencia de Kozak no produce una sustitución de aminoácido en el producto de polipéptido HSV-TK codificado. En algunas realizaciones, la modificación de la secuencia de Kozak da como resultado al menos una sustitución de aminoácido en el producto de polipéptido HSV-TK codificado. En una realización, el HSV-TK modificado tiene una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 18 o 22.

En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos que codifica HSV-TK comprende al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más sustituciones de codones. En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos que codifica HSV-TK comprende al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más sustituciones de codones, donde las sustituciones de codones comprenden la sustitución de un codón que tiene una mayor frecuencia de uso en una célula de mamífero que el codón de tipo silvestre en esa posición. Sin embargo, en algunas realizaciones, los codones menos favorecidos pueden elegirse para aminoácidos individuales dependiendo de la situación particular.

En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos que codifica HSV-TK comprende al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más sustituciones de codones tiene menos de aproximadamente 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 3 donde la identidad de secuencia se determina a lo largo de la longitud completa de la secuencia de codificación usando un procedimiento de alineación global. En

algunas realizaciones, la secuencia polipeptídica codificada correspondiente tiene al menos 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos HSV-TK, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2 o 4.

5

En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos que codifica HSV-TK comprende al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 60, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más sustituciones de codones, donde las sustituciones de codones comprenden la sustitución de un codón que tiene la mayor frecuencia de uso en una célula de mamífero para el codón de tipo silvestre en esa posición. En algunas realizaciones, la secuencia polipeptídica codificada correspondiente tiene al menos 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos HSV-TK, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2 o 4.

10

En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos que codifica HSV-TK comprende al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 60, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más sustituciones de codones, donde los codones sustituidos tienen una frecuencia de uso mayor o igual a aproximadamente 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,2, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28, 0,29, 0,3, 0,31, 0,32, 0,33, 0,34, 0,35 o superior. En algunas realizaciones, la secuencia polipeptídica codificada correspondiente tiene al menos 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos HSV-TK, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2 o 4.

15

20

En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos que codifica HSV-TK comprende menos de aproximadamente 45, 40, 35, 30, 25, 20 o menos codones, donde los codones tienen una frecuencia de uso menor que aproximadamente 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,2, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24 o 0,25. En algunas realizaciones, la secuencia polipeptídica codificada correspondiente tiene al menos 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos HSV-TK, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2 o 4.

25

30

En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos que codifica HSV-TK comprende al menos 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o más de codones que tienen una frecuencia de uso mayor o igual a aproximadamente 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,2, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28, 0,29, 0,3, 0,31, 0,32, 0,33, 0,34, 0,35 o superior. En algunas realizaciones, la secuencia polipeptídica codificada correspondiente tiene al menos 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos HSV-TK, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2 o 4.

35

En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos que codifica HSV-TK comprende al menos 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o más de codones que tienen la mayor frecuencia de uso en una célula de mamífero. En algunas realizaciones, la secuencia polipeptídica codificada correspondiente tiene al menos 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos HSV-TK, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2 o 4.

40

45

En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos que codifica HSV-TK comprende menos de aproximadamente 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 % o menos de codones, que tienen una frecuencia de uso menor que aproximadamente 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,2, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24 o 0,25. En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos comprende menos de aproximadamente 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 % o menos de codones, que tienen una frecuencia de uso menor que aproximadamente 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,2, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24 o 0,25 en una célula de mamífero. En algunas realizaciones, la secuencia polipeptídica codificada correspondiente tiene al menos 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos HSV-TK, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2 o 4.

50

55

En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos que codifica HSV-TK comprende sustituciones de codones, donde al menos 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o más de codones que tienen la mayor frecuencia de uso en una célula de mamífero.

60

49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de los codones se han cambiado en comparación con la secuencia de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos que codifica HSV-TK comprende sustituciones de codones, donde al menos 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de los codones se han cambiado a un codón que tiene una mayor frecuencia de uso en una célula de mamífero en comparación con la secuencia de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la secuencia polipeptídica codificada correspondiente tiene al menos 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos HSV-TK, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2 o 4.

En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos que codifica HSV-TK comprende sustituciones de codones, donde al menos 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de los codones se han cambiado a un codón que tiene la mayor frecuencia de uso en una célula de mamífero en comparación con la secuencia de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la secuencia polipeptídica codificada correspondiente tiene al menos 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos HSV-TK, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2 o 4.

El gen de la timidina quinasa viral del virus herpes seleccionado se puede aislar y mutar fácilmente como se describe a continuación, con el fin de construir moléculas de ácido nucleico que codifiquen una enzima timidina quinasa que comprenda una o más mutaciones que aumenten la actividad biológica de la timidina quinasa, en comparación con la timidina quinasa de tipo silvestre. La actividad biológica de una timidina quinasa se puede determinar fácilmente utilizando cualquiera de los ensayos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la determinación de la velocidad de captación de análogos de nucleósidos o la determinación de la velocidad del nucleósido o la fosforilación de análogos de nucleósidos. Además, los mutantes de la timidina quinasa pueden seleccionarse fácilmente los cuales se caracterizan por otras propiedades biológicas, tales como la termoestabilidad y la estabilidad de la proteína.

En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos que codifica HSV-TK se modifica para eliminar o modificar una secuencia de señal predicha. En algunas realizaciones, el polinucleótido se modifica para eliminar o modificar una secuencia de localización nuclear (NLS). En algunas realizaciones, el polinucleótido se modifica para eliminar la secuencia de localización nuclear. En algunas realizaciones, el polinucleótido se modifica para modificar la NLS de modo que, si ya no funciona, localice HSV-TK exclusivamente en el núcleo.

En algunas realizaciones, una secuencia polipeptídica de HSV-TK está mutada en los restos de aminoácidos 167, 168, o ambos. En un ejemplo, la secuencia está mutada en el resto de aminoácido 167. En otro ejemplo, la secuencia está mutada en el resto de aminoácido 168. En otro ejemplo, la secuencia está mutada en los restos de aminoácido 167 y 168. El resto de aminoácido 167 puede mutarse a serina o fenilalanina. El resto de aminoácido 168 puede mutarse a histidina, lisina, cisteína, serina o fenilalanina. En algunas realizaciones, una secuencia polipeptídica de HSV-TK está mutada en los restos de aminoácidos 25 y/o 26. En los aminoácidos, los restos 25 y/o 26 pueden mutarse a un aminoácido elegido de entre el grupo que consiste en: glicina, serina y glutamato. En algunas realizaciones, la secuencia polipeptídica de HSV-TK está mutada en los restos de aminoácidos 32 y/o 33. Los restos de aminoácidos 32 y/o 33 pueden mutarse a un aminoácido elegido de entre el grupo que consiste en: glicina, serina y glutamato. En algunas realizaciones, el polipéptido HSV-TK está mutado en los restos de aminoácidos 25, 26, 32 y/o 33. Los restos de aminoácidos 25, 26, 32 y/o 33 pueden mutarse a un aminoácido elegido de entre el grupo que consiste en: glicina, serina y glutamato. Las modificaciones de los restos de aminoácidos se pueden hacer en comparación con una secuencia polipeptídica de SEQ ID NOs: 2 o 4.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan enzimas timidina quinasa mutantes que están codificadas por las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente, así como vectores que son capaces de expresar dichas moléculas. En algunas realizaciones, se proporcionan vectores de expresión que comprenden un promotor unido operativamente a una molécula de ácido nucleico de la presente invención. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral capaz de dirigir la expresión de una molécula de ácido nucleico. Ejemplos representativos de dichos vectores virales incluyen vectores virales de herpes simple, vectores adenovirales, vectores virales asociados a adenovirus, vectores de viruela, vectores parvovirales, vectores de baculovirus y vectores retrovirales. En algunas realizaciones, se proporcionan vectores virales que son capaces de dirigir la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima timidina quinasa que comprende una o más mutaciones, al menos una de las

mutaciones que codifican una sustitución de aminoácido que aumenta una actividad biológica de la timidina quinasa, en comparación con la timidina quinasa (es decir, de tipo silvestre) no mutada

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico proporcionada en este documento codifica una enzima
 5 timidina quinasa capaz de fosforilar un análogo de nucleósido a un nivel al menos 10 % mayor que el nivel de fosforilación del análogo de nucleósido por una enzima timidina quinasa de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la enzima timidina quinasa es capaz de fosforilar un análogo de nucleósido a un nivel de al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 50 %, al menos 75 %, al menos 100 %, al menos 150 %, al menos 200 %, al menos 300 % o al menos 500 % mayor que el nivel de fosforilación del análogo de nucleósido por una enzima timidina
 10 quinasa de tipo silvestre. Ejemplos representativos de análogos de nucleósidos adecuados incluyen ganciclovir, aciclovir, famciclovir, buciclovir, penciclovir, valciclovir, trifluorotimidina, 1-[2-deoxi, 2-fluoro, beta-D-arabino furanosil]-5-yodouracilo, ara-A, araT, 1-beta-D-arabinofuranosil timina, 5-etil-2'-deoxiuridina, 5-yodo-5'-amino-2,5'-dideoxioxidina, idoxuridina, AZT, AIU, didesoxicitidina y AraC. En algunas realizaciones, el mutante TK mejorado carece de actividad de timidina quinasa.

15 En algunas realizaciones, el valor K_m de la actividad de timidina quinasa de un mutante HSV-TK descrito es de al menos 2,5 μm . En algunas realizaciones, el valor K_m de un mutante HSV-TK descrito es de al menos 5 μm , al menos 10 μm , al menos 15 μm , al menos 20 μm , al menos 25 μm , al menos 30 μm , al menos 40 μm , al menos 50 μm , al menos 60 μm , al menos 70 μm , al menos 80 μm , al menos 90 μm , al menos 100 μm , al menos 150 μm , al menos
 20 200 μm , al menos 250 μm , al menos 300 μm , al menos 400 μm , al menos 500 μm , al menos 600 μm , al menos 700 μm , al menos 800 μm , al menos 900 μm , o al menos 1000 μm . En algunas realizaciones, el porcentaje K_m de un mutante HSV-TK descrito en comparación con el HSV-TK de tipo silvestre es de al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos el 100 %, al menos el 150 %, al menos el 200 %, al menos el 300 %, o al menos el 500 %.

25 En una realización de la presente invención, se proporcionan derivados truncados de mutantes de HSV-TK. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio se puede realizar fácilmente con el fin de eliminar los 45 aminoácidos N-terminales de un mutante de la timidina quinasa, construyendo de ese modo una forma truncada del mutante que conserva su actividad biológica.

30 Las mutaciones en secuencias de nucleótidos construidas para la expresión de derivados de mutantes de timidina quinasa deben preservar la fase de lectura de las secuencias codificantes. Además, las mutaciones preferentemente no crearán regiones complementarias que podrían hibridarse para producir estructuras de ARNm secundarias, tales como bucles u horquillas, que afectarían de forma adversa la traducción del ARNm del receptor. Dichos derivados
 35 pueden construirse fácilmente usando una amplia diversidad de técnicas, incluidas las analizadas anteriormente.

En algunas realizaciones, una secuencia polipeptídica de HSV-TK está mutada en los restos de aminoácidos 167, 168, o ambos. En un ejemplo, la secuencia está mutada en el resto de aminoácido 167. En otro ejemplo, la secuencia está mutada en el resto de aminoácido 168. En otro ejemplo, la secuencia está mutada en los restos de aminoácido
 40 aminoácido 167 y 168. El resto de aminoácido 167 puede mutarse a serina o fenilalanina. El resto de aminoácido 168 puede mutarse a histidina, lisina, cisteína, serina o fenilalanina. En algunas realizaciones, una secuencia polipeptídica de HSV-TK está mutada en los restos de aminoácidos 25 y/o 26. En los aminoácidos, los restos 25 y/o 26 pueden mutarse a un aminoácido elegido de entre el grupo que consiste en: glicina, serina y glutamato. En algunas realizaciones, la secuencia polipeptídica de HSV-TK está mutada en los restos de aminoácidos 32 y/o 33.
 45 Los restos de aminoácidos 32 y/o 33 pueden mutarse a un aminoácido elegido de entre el grupo que consiste en: glicina, serina y glutamato. En algunas realizaciones, el polipéptido HSV-TK está mutado en los restos de aminoácidos 25, 26, 32 y/o 33. Los restos de aminoácidos 25, 26, 32 y/o 33 pueden mutarse a un aminoácido elegido de entre el grupo que consiste en: glicina, serina y glutamato. Las modificaciones de los restos de aminoácidos se pueden hacer en comparación con una secuencia polipeptídica de SEQ ID NOs: 2 o 4.

50 De acuerdo con la presente invención, se proporcionan enzimas timidina quinasa mutantes que están codificadas por las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente, así como vectores que son capaces de expresar dichas moléculas. En algunas realizaciones, se proporcionan vectores de expresión que comprenden un promotor unido operativamente a una molécula de ácido nucleico de la presente invención. En algunas realizaciones, el vector es un
 55 vector viral capaz de dirigir la expresión de una molécula de ácido nucleico. Ejemplos representativos de dichos vectores virales incluyen vectores virales de herpes simple, vectores adenovirales, vectores virales asociados a adenovirus, vectores de viruela, vectores parvovirales, vectores de baculovirus y vectores retrovirales. En algunas realizaciones, se proporcionan vectores virales que son capaces de dirigir la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima timidina quinasa que comprende una o más mutaciones, al menos una de las
 60 mutaciones que codifican una sustitución de aminoácido que aumenta una actividad biológica de la timidina quinasa,

en comparación con la timidina quinasa (es decir, de tipo silvestre) no mutada

- En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico proporcionada en este documento codifica una enzima timidina quinasa capaz de fosforilar un análogo de nucleósido a un nivel al menos 10 % mayor que el nivel de fosforilación del análogo de nucleósido por una enzima timidina quinasa de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la enzima timidina quinasa es capaz de fosforilar un análogo de nucleósido a un nivel de al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 50 %, al menos 75 %, al menos 100 %, al menos 150 %, al menos 200 %, al menos 300 % o al menos 500 % mayor que el nivel de fosforilación del análogo de nucleósido por una enzima timidina quinasa de tipo silvestre. Ejemplos representativos de análogos de nucleósidos adecuados incluyen ganciclovir, aciclovir, famciclovir, buciclovir, penciclovir, valciclovir, trifluorotimidina, 1-[2-deoxi, 2-fluoro, beta-D-arabino furanosil]-5-yodouracilo, ara-A, araT 1-beta-D-arabinofuranoxil timina, 5-etil-2'-deoxiuridina, 5-yodo-5'-amino-2,5'-dideoxioxididina, idoxuridina, AZT, AIU, didesoxicitidina y AraC. En algunas realizaciones, el mutante TK mejorado carece de actividad de timidina quinasa..
- 15 En una realización de la presente invención, se proporcionan derivados truncados de mutantes de timidina quinasa. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio se puede realizar fácilmente con el fin de eliminar los 45 aminoácidos N-terminales de un mutante de la timidina quinasa, construyendo de ese modo una forma truncada del mutante que conserva su actividad biológica.
- 20 Las mutaciones en secuencias de nucleótidos construidas para la expresión de derivados de mutantes de timidina quinasa deben preservar la fase de lectura de las secuencias codificantes. Además, las mutaciones preferentemente no crearán regiones complementarias que podrían hibridarse para producir estructuras de ARNm secundarias, tales como bucles u horquillas, que afectarían de forma adversa la traducción del ARNm del receptor. Dichos derivados pueden construirse fácilmente usando una amplia diversidad de técnicas, incluidas las analizadas anteriormente.
- 25 Usando los procedimientos descritos en este documento, los inventores determinaron que la mayoría de los candidatos para los genes de HSV-TK optimizados parecían ser compatibles con un sistema de expresión retroviral y producir títulos retrovíricos biológicamente útiles.
- 30 Además, los genes de HSV-TK optimizados que incorporaron la mayoría de estas optimizaciones (SEQ ID NO: 18) mostraron actividad de enzima GCV pro-fármaco y selectividad por su capacidad para matar células cancerosas después de la administración de la transducción retroviral. El gen A168H de HSV-TK mutante, que se optimizó en codones y se corrigió en empalme, parece tener la mayor actividad de destrucción del cáncer mediada por GCV (SEQ ID NOs: 12, 16, 18 o 22). La misma versión de este gen HSV-TK A168H y mutado en los aminoácidos 159-161 de LIF a IFL mostró actividad de destrucción de células cancerosas mediada por GCV.
- 35 El gen A167F de HSV-TK mutante (SEQ ID NOs: 13, 17 o 19), que se optimizó en codones y se corrigió en empalme, tuvo una actividad de destrucción de cáncer mediada por GCV muy alta después de la administración de la transducción retroviral, pero más sorprendentemente no tuvo actividad de timidina quinasa como se determinó expresando este gen después de la administración de la transducción retroviral en células 3T3 TK (-) seleccionadas con medio HAT. Por lo que saben los investigadores, este es el producto génico sintético HSV-TK más selectivo para GCV para la activación de GCV que no tiene actividad de timidina (ensayo HAT) jamás evaluado biológicamente.
- 40 El gen A167F + A168H de HSV-TK mutante doble (SEQ ID NO: 14) anula inesperadamente tanto la actividad enzimática de GCV como la de timidina al mostrar muy poca actividad de destrucción de cáncer mediada por GCV y muy poca actividad de timidina (ensayo HAT),
- Los presentes inventores identificaron que es posible producir fusiones funcionales de HSV-TK de genes tales como la citosina desaminasa bacteriana, la citosina desaminasa de levadura, la neomicina fosfotransferasa e incluir secuencias enlazadoras y conservar la actividad de destrucción de células cancerosas mediada por HSV-TK GCV.
- 45 En una realización, puede elaborarse un gen HSV-TK optimizado en codón con actividad de destrucción del cáncer mediada por GCV que conserva una o más secuencias de localización nuclear que no están fusionadas con uno o más genes terapéuticos.
- 50 Las modificaciones y/o evaluaciones adicionales de un gen de HSV-TK optimizado descrito en este documento pueden incluir uno o más de los siguientes: eliminación de secuencias de localización nuclear conocidas dentro de HSV-TK; aumento de la actividad de la enzima GCV pro-fármaco y selectividad por su capacidad para destruir células cancerosas, evaluar el uso de más etiquetas, proteínas de fusión y enlazadores de HSV-TK a otros genes y
- 60

proteínas, coexpresión de genes optimizados de HSV-TK con otros genes destructores del cáncer y suicidas optimizados en las células cancerosas, incluyen genes HSV-TK optimizados en un sistema de vector retroviral tipo Reximmune-C; producción y prueba de un producto GMP tipo Reximmune-C, o cualquier combinación de los mismos.

5

En una realización, una secuencia de polinucleótidos descrita en este documento comprende una señal de exportación nuclear. Por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos puede comprender TK168dmNES.

En otra realización, un vector retroviral para su uso en los procedimientos descritos en este documento comprende una o más modificaciones del sitio de empalme.

En otra realización, un vector retroviral para su uso en los procedimientos descritos en este documento comprende HSV-TK A167Fsm (SEQ ID NO: 13).

15 En otra realización, un vector retroviral para su uso en los procedimientos descritos en este documento comprende HSV-TK A168Hsm (SEQ ID NO: 12).

En otra realización, un vector retroviral para su uso en los procedimientos descritos en este documento comprende HSV-TK A167Fdm (SEQ ID NO: 17).

20

En otra realización, un vector retroviral para su uso en los procedimientos descritos en este documento comprende HSV-TK A168dm (SEQ ID NO: 16).

En otra realización, un vector retroviral para su uso en los procedimientos descritos en este documento comprende HSV-TK A167Fdm (y un NES SEQ ID NO: 19).

25

En otra realización, un vector retroviral para su uso en los procedimientos descritos en este documento comprende HSV-TK A168Hdm y un NES (SEQ ID NO: 18). En dicha realización la secuencia comprende HSV-TK A168H.

30 En otra realización, un vector retroviral para su uso en los procedimientos descritos en este documento comprende un HSV-TK, donde dicho vector comprende un dominio de unión al sustrato mejorado y un conjunto mNLS/NES.

En otra realización, un vector retroviral para su uso en los procedimientos descritos en este documento comprende un HSV-TK, donde el vector comprende un marcador seleccionable, un gen brillante y/o uno o más genes de destrucción.

35

En otra realización, un vector retroviral para su uso en los procedimientos descritos en este documento comprende al menos dos modificaciones.

40 Usando los procedimientos descritos en este documento, los inventores determinaron que la mayoría de los genes de HSV-TK optimizados parecían ser compatibles con un sistema de expresión retroviral y producir títulos retrovirales biológicamente útiles.

El gen A167F de HSV-TK mutante (SEQ ID NOs:13, 17 o 19), que se optimizó en codones y se corrigió en empalme, tuvo una actividad de destrucción de cáncer mediada por GCV muy alta después de la administración de la transducción retroviral, pero más sorprendentemente no tuvo actividad de timidina quinasa como se determinó expresando este gen después de la administración de la transducción retroviral en células 3T3 TK (-) seleccionadas con medio HAT. Este es un gen sintético de HSV-TK altamente selectivo para GCV.

45

50 El gen A167F + A168H de HSV-TK mutante doble (SEQ ID NO: 14) mostró muy poca actividad de destrucción de cáncer mediada por GCV y muy poca actividad de timidina; por lo tanto, un doble mutante adecuado puede tener propiedades nulas sorprendentes.

Los presentes inventores identificaron que es posible producir fusiones funcionales de HSV-TK de genes tales como la citosina desaminasa bacteriana, la citosina desaminasa de levadura, la neomicina fosfotransferasa e incluir secuencias enlazadoras y conservar la actividad de destrucción de células cancerosas mediada por HSV-TK GCV.

55

En una realización, puede elaborarse un gen HSV-TK completamente optimizado en codón con actividad de destrucción del cáncer mediada por GCV que conserva una o más secuencias de localización nuclear que no están fusionadas con uno o más genes terapéuticos.

60

- Las modificaciones y/o evaluaciones adicionales de un gen de HSV-TK optimizado descrito en este documento pueden incluir uno o más de los siguientes: eliminación de secuencias de localización nuclear conocidas dentro de HSV-TK; aumento de la actividad de la enzima GCV pro-fármaco y selectividad por su capacidad para destruir células cancerosas, evaluar el uso de más etiquetas, proteínas de fusión y enlazadores de HSV-TK a otros genes y proteínas, coexpresión de genes optimizados de HSV-TK con otros genes destructores del cáncer y suicidas optimizados en las células cancerosas, incluyen genes HSV-TK optimizados en un sistema de vector retroviral tipo Reximmune-C; producción y prueba de un producto GMP tipo Reximmune-C, o cualquier combinación de los mismos.
- Los vectores terapéuticos pueden administrarse solos o junto con otros tratamientos terapéuticos o agentes activos. Ejemplos de otros agentes activos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, agentes quimioterapéuticos, agentes antiinflamatorios, inhibidores de proteasa, tales como inhibidores de proteasa de VIH, análogos de nucleósidos, tales como AZT. En algunas realizaciones, los procedimientos de tratamiento comprenden además administrar al sujeto un agente quimioterapéutico, un agente biológico o radioterapia antes, al mismo tiempo o después de la administración de las partículas virales terapéuticas. Un experto en la materia apreciará que las partículas retrovirales descritas en este documento pueden administrarse por la misma vía que el uno o más agentes (por ejemplo, el vector retroviral y el agente se administran ambos por vía intravenosa) o por diferentes vías (por ejemplo, el vector retroviral se administra por vía intravenosa y el uno o más agentes se administran por vía oral).
- La dosificación de las partículas virales terapéuticas se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de ese intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Una dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración de plasma circulante que incluye la IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una infección media máxima o una inhibición media máxima) según lo determinado en el cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante los procedimientos RT-qPCR o ddPCR.
- Una cantidad efectiva o terapéuticamente efectiva de las partículas retrovirales descritas en este documento para ser administradas a un sujeto que necesita tratamiento puede determinarse de diversas maneras. A modo de ejemplo, la cantidad puede basarse en el título viral o la eficacia en un modelo animal. Como alternativa, los regímenes de dosificación usados en los ensayos clínicos pueden usarse como directrices generales.
- En algunas realizaciones, la dosis diaria se puede administrar en una sola dosis o en porciones a diversas horas del día. En algunas realizaciones, puede requerirse una dosificación más alta y puede reducirse con el tiempo cuando se obtiene la respuesta inicial óptima. En algunas realizaciones, el tratamiento puede ser continuo durante días, semanas o años, o puede ser a intervalos con períodos de descanso intermedios. En algunas realizaciones, la dosificación se modifica de acuerdo con otros tratamientos que el individuo puede estar recibiendo. Sin embargo, el procedimiento de tratamiento no se limita de ninguna manera a una concentración o intervalo particular de la partícula retroviral y puede variar para cada individuo que se esté tratando y para cada derivado usado.
- Puede requerirse la individualización de la dosificación para lograr el máximo efecto para un individuo determinado.
- En algunas realizaciones, la dosificación administrada a un individuo que está siendo tratado varía según la edad, la gravedad o la etapa de la enfermedad del individuo y la respuesta al curso del tratamiento. En algunas realizaciones, los parámetros clínicos para determinar la dosificación incluyen, pero sin limitación, tamaño del tumor, alteración en el nivel de los marcadores tumorales usados en pruebas clínicas para tumores malignos particulares. En algunas realizaciones, el médico tratante determina la cantidad terapéuticamente efectiva a usar para un individuo dado.
- En algunas realizaciones, las terapias descritas en este documento se administran con la frecuencia que sea necesaria y durante el período de tiempo que el médico tratante considere necesario.
- Los vectores terapéuticos, que incluyen, pero sin limitación, las partículas retrovirales terapéuticas que son específicamente para la célula o sistema de interés pueden administrarse sistémicamente o regionalmente (localmente) a un sujeto que necesita tratamiento. Por ejemplo, los vectores terapéuticos pueden administrarse sistémicamente por vía intravenosa. Como alternativa, los vectores terapéuticos también pueden administrarse por vía intraarterial. Los vectores terapéuticos también pueden administrarse por vía tópica, intravenosa, intraarterial, intratumoral, intracolónica, intratraqueal, intraperitoneal, intranasal, intravascular, intratecal, intracraneal, intramedular, intrapleural, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraocular, intraósea y/o intrasinovial o estereotáctica. También se puede usar una combinación de modos de administración, por ejemplo, un paciente

puede recibir los vectores terapéuticos tanto por vía sistémica como regional (local) para mejorar las respuestas tumorales con tratamiento de los vectores terapéuticos.

En algunas realizaciones, múltiples cursos terapéuticos (por ejemplo, primer y segundo curso terapéutico) se administran a un sujeto que necesita tratamiento. En algunas realizaciones, el primer y/o segundo curso terapéutico se administra por vía intravenosa. En otras realizaciones, el primer y/o segundo curso terapéutico se administra mediante infusión intraarterial, que incluye, pero sin limitación, infusión a través de la arteria hepática, arteria cerebral, arteria coronaria, arteria pulmonar, arteria ilíaca, tronco celíaco, arteria gástrica, arteria esplénica, arteria renal, arteria gonadal, arteria subclavia, arteria vertebral, arteria axilar, arteria braquial, arteria radial, arteria cubital, arteria carótida, arteria femoral, arteria mesentérica inferior y/o arteria mesentérica superior. La infusión intraarterial se puede realizar usando procedimientos endovasculares, procedimientos percutáneos o abordajes quirúrgicos abiertos. En algunas realizaciones, el primer y segundo curso terapéutico pueden administrarse secuencialmente. En otras realizaciones más, el primer y/o segundo curso terapéutico pueden administrarse simultáneamente. En aún otras realizaciones, el tercer curso terapéutico opcional puede administrarse secuencialmente o simultáneamente con el primer y segundo curso terapéutico.

En algunas realizaciones, los vectores terapéuticos descritos en este documento pueden administrarse junto con un curso o cursos terapéuticos secuenciales o administrados simultáneamente en dosis altas de forma acumulativa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, a un paciente que lo necesite se le puede administrar por vía sistémica, por ejemplo, administrársele por vía intravenosa, un primer curso terapéutico de al menos 1×10^9 TVP, al menos 1×10^{10} TVP, al menos 1×10^{11} TVP, al menos 1×10^{12} TVP, al menos 1×10^{13} TVP, al menos 1×10^{14} TVP, al menos 1×10^{15} TVP, al menos 1×10^{16} TVP, al menos 1×10^{17} TVP, al menos 1×10^{18} TVP, al menos 1×10^{19} TVP, al menos 1×10^{20} TVP, al menos 1×10^{21} TVP o al menos 1×10^{22} TVP de vector de administración de forma acumulativa. El primer curso terapéutico puede administrarse por vía sistémica. Como alternativa, el primer curso terapéutico puede administrarse de manera localizada, por ejemplo, por vía intraarterial, por ejemplo, a un paciente que lo necesite se le puede administrar mediante infusión intraarterial con al menos de al menos 1×10^9 TVP, al menos 1×10^{10} TVP, al menos 1×10^{11} TVP, al menos 1×10^{12} TVP, al menos 1×10^{13} TVP, al menos 1×10^{14} TVP, al menos 1×10^{15} TVP, al menos 1×10^{16} TVP, al menos 1×10^{17} TVP, al menos 1×10^{18} TVP, al menos 1×10^{19} TVP, al menos 1×10^{20} TVP, al menos 1×10^{21} TVP o al menos 1×10^{22} TVP de vector de administración de forma acumulativa.

En otras realizaciones más, un sujeto que lo necesite puede recibir una combinación, secuencial o simultánea, de la administración de infusiones sistémicas e intraarteriales de altas dosis de vector de administración. Por ejemplo, a un paciente que lo necesite se le puede administrar primero por vía sistémica con al menos de al menos 1×10^9 TVP, al menos 1×10^{10} TVP, al menos 1×10^{11} TVP, al menos 1×10^{12} TVP, al menos 1×10^{13} TVP, al menos 1×10^{14} TVP, al menos 1×10^{15} TVP, al menos 1×10^{16} TVP, al menos 1×10^{17} TVP, al menos 1×10^{18} TVP, al menos 1×10^{19} TVP, al menos 1×10^{20} TVP, al menos 1×10^{21} TVP o al menos 1×10^{22} TVP de vector de administración de forma acumulativa, seguido de un curso terapéutico adicional de infusión intraarterial, por ejemplo, infusión arterial hepática, de vector de administración administrado de al menos de al menos 1×10^9 TVP, al menos 1×10^{10} TVP, al menos 1×10^{11} TVP, al menos 1×10^{12} TVP, al menos 1×10^{13} TVP, al menos 1×10^{14} TVP, al menos 1×10^{15} TVP, al menos 1×10^{16} TVP, al menos 1×10^{17} TVP, al menos 1×10^{18} TVP, al menos 1×10^{19} TVP, al menos 1×10^{20} TVP, al menos 1×10^{21} TVP o al menos 1×10^{22} TVP de vector de administración de forma acumulativa. En aún otra realización más, un paciente que lo necesite puede recibir una combinación de infusión intraarterial y administración sistémica del vector de administración en dosis altas. Por ejemplo, a un paciente que lo necesite se le puede administrar primero mediante infusión intraarterial con al menos de al menos 1×10^9 TVP, al menos 1×10^{10} TVP, al menos 1×10^{11} TVP, al menos 1×10^{12} TVP, al menos 1×10^{13} TVP, al menos 1×10^{14} TVP, al menos 1×10^{15} TVP, al menos 1×10^{16} TVP, al menos 1×10^{17} TVP, al menos 1×10^{18} TVP, al menos 1×10^{19} TVP, al menos 1×10^{20} TVP, al menos 1×10^{21} TVP o al menos 1×10^{22} TVP de vector de administración de forma acumulativa, seguido de un curso terapéutico adicional de vector de administración administrado por vía sistémica de al menos de al menos 1×10^9 TVP, al menos 1×10^{10} TVP, al menos 1×10^{11} TVP, al menos 1×10^{12} TVP, al menos 1×10^{13} TVP, al menos 1×10^{14} TVP, al menos 1×10^{15} TVP, al menos 1×10^{16} TVP, al menos 1×10^{17} TVP, al menos 1×10^{18} TVP, al menos 1×10^{19} TVP, al menos 1×10^{20} TVP, al menos 1×10^{21} TVP o al menos 1×10^{22} TVP de forma acumulativa. Los cursos terapéuticos también pueden administrarse simultáneamente, es decir, un curso terapéutico de dosis altas de vector de administración, por ejemplo, al menos de al menos 1×10^9 TVP, al menos 1×10^{10} TVP, al menos 1×10^{11} TVP, al menos 1×10^{12} TVP, al menos 1×10^{13} TVP, al menos 1×10^{14} TVP, al menos 1×10^{15} TVP, al menos 1×10^{16} TVP, al menos 1×10^{17} TVP, al menos 1×10^{18} TVP, al menos 1×10^{19} TVP, al menos 1×10^{20} TVP, al menos 1×10^{21} TVP o al menos 1×10^{22} TVP de vector de administración de forma acumulativa, junto con un curso terapéutico de infusión arterial, por ejemplo, infusión arterial hepática, de vector de administración administrado de al menos de al menos 1×10^9 TVP, al menos 1×10^{10} TVP, al menos 1×10^{11} TVP, al menos 1×10^{12} TVP, al menos 1×10^{13} TVP, al menos 1×10^{14} TVP, al menos 1×10^{15} TVP, al menos 1×10^{16} TVP, al menos 1×10^{17} TVP, al menos 1×10^{18} TVP, al menos 1×10^{19} TVP, al menos 1×10^{20} TVP, al menos 1×10^{21} TVP o al menos 1×10^{22} TVP de

forma acumulativa.

En aún otras realizaciones, un sujeto que lo necesite puede, además, recibir, ya sea secuencialmente o simultáneamente el primer y segundo cursos terapéuticos, cursos terapéuticos adicionales (por ejemplo, un tercer curso terapéutico, cuarto curso terapéutico, quinto curso terapéutico) de dosis acumulativa de vector de administración, por ejemplo, al menos de al menos 1×10^9 TVP, al menos 1×10^{10} TVP, al menos 1×10^{11} TVP, al menos 1×10^{12} TVP, al menos 1×10^{13} TVP, al menos 1×10^{14} TVP, al menos 1×10^{15} TVP, al menos 1×10^{16} TVP, al menos 1×10^{17} TVP, al menos 1×10^{18} TVP, al menos 1×10^{19} TVP, al menos 1×10^{20} TVP, al menos 1×10^{21} TVP o al menos 1×10^{22} TVP del vector de administración de forma acumulativa.

En algunas realizaciones, al sujeto que necesita tratamiento se le administra, por vía sistémica (por ejemplo, vía intravenosa), una dosis de al menos 1×10^{11} TVP seguido de la administración mediante infusión intraarterial (por ejemplo, infusión arterial hepática) de una dosis de al menos 1×10^{11} TVP. En algunas realizaciones, al paciente que necesita tratamiento se le puede administrar, por vía sistémica (por ejemplo, vía intravenosa), una dosis acumulativa de al menos 1×10^{12} TVP seguido de la administración mediante infusión intraarterial (por ejemplo, infusión arterial hepática) de una dosis de al menos 1×10^{12} TVP. En algunas realizaciones, al paciente que necesita tratamiento se le puede administrar, por vía sistémica (por ejemplo, vía intravenosa), una dosis de al menos 1×10^{13} TVP seguido de la administración mediante infusión intraarterial (por ejemplo, infusión arterial hepática) de una dosis de al menos 1×10^{13} TVP. En otras realizaciones más, al paciente que necesita tratamiento se le puede administrar, por vía sistémica (por ejemplo, vía intravenosa), una dosis de al menos 1×10^{14} TVP simultáneamente con la administración mediante infusión intraarterial (por ejemplo, infusión arterial hepática) de una dosis de al menos 1×10^{14} TVP. En aún otras realizaciones más, al paciente que necesita tratamiento se le puede administrar, por vía sistémica (por ejemplo, vía intravenosa), una dosis de al menos 1×10^{15} TVP junto con la administración mediante infusión intraarterial (por ejemplo, infusión arterial hepática) de una dosis de al menos 1×10^{15} TVP. En otras realizaciones más, al paciente que necesita tratamiento se le puede administrar, por vía sistémica (por ejemplo, vía intravenosa), una dosis de al menos 1×10^{16} TVP simultáneamente con la administración mediante infusión intraarterial (por ejemplo, infusión arterial hepática) de una dosis de al menos 1×10^{16} TVP. En aún otras realizaciones más, al paciente que necesita tratamiento se le puede administrar, por vía sistémica (por ejemplo, vía intravenosa), una dosis de al menos 1×10^{17} TVP junto con la administración mediante infusión intraarterial (por ejemplo, infusión arterial hepática) de una dosis de al menos 1×10^{17} TVP.

También se puede administrar a un sujeto que necesite tratamiento, ya sea por vía sistémica o localizada (por ejemplo, infusión intraarterial, como infusión arterial hepática) un curso terapéutico de vector de administración durante un periodo de tiempo definido. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo puede ser de al menos un día, al menos dos días, al menos tres días, al menos cuatro días, al menos cinco días, al menos seis días, al menos siete días, al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos 2 meses, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos diez meses, al menos once meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años o al menos cinco años. La administración también podría llevarse a cabo de manera crónica, es decir, por un periodo de tiempo no definido o indefinido.

La administración del vector terapéutico también se puede producir de manera periódica, por ejemplo, al menos una vez al día, al menos dos veces al día, al menos tres veces al día, al menos cuatro veces al día, al menos cinco veces al día. La administración periódica del vector de administración puede depender del momento del vector de administración así como del modo de administración. Por ejemplo, la administración parenteral puede tener lugar solo una vez al día durante un periodo de tiempo prolongado, mientras que la administración oral del vector de administración puede tener lugar más de una vez al día, donde la administración del vector de administración tiene lugar durante un periodo de tiempo más corto.

En una realización, se permite que el sujeto descanse de 1 a 2 días entre el primer curso terapéutico y el segundo curso terapéutico. En algunas realizaciones, se permite que el sujeto descanse de 2 a 4 días entre el primer curso terapéutico y el segundo curso terapéutico. En otras realizaciones, se permite que el sujeto descanse al menos 2 días entre el primer y segundo curso terapéutico. En otras realizaciones más, se permite que el sujeto descanse al menos 4 días entre el primer y segundo curso terapéutico. En aún otras realizaciones, se permite que el sujeto descanse al menos 6 días entre el primer y segundo curso terapéutico. En otras realizaciones, se permite que el sujeto descanse al menos 1 semana entre el primer y segundo curso terapéutico. En otras realizaciones más, se permite que el sujeto descanse al menos 2 semanas entre el primer y segundo curso terapéutico. En otra realización, se permite que el sujeto descanse al menos un mes entre el primer y segundo curso terapéutico. En algunas realizaciones, se permite que el sujeto descanse al menos 1-7 días entre el segundo curso terapéutico y el

tercer curso terapéutico opcional. En otras realizaciones más, se permite que el sujeto descanse al menos 1-2 semanas entre el segundo curso terapéutico y el tercer curso terapéutico opcional.

5 DIAGNÓSTICO A UN PACIENTE QUE ES SUSCEPTIBLE AL TRATAMIENTO DE TERAPIA GÉNICA CON TIMIDINA QUINASA

Las pruebas de formación de imágenes, que incluyen el uso de indicadores radiactivos, la tecnología de formación de imágenes de contraste y otra tecnología de formación de imágenes pueden usarse para identificar a los pacientes que son susceptibles al tratamiento con terapia génica, incluido el tratamiento de terapia génica con timidina quinasa, y por lo tanto, es más probable que se beneficien de dichas medidas terapéuticas.

En una realización preferida, las exploraciones de tomografía por emisión de positrones (PET) se usan para identificar pacientes capaces de transducir partículas de vectores retrovirales que contienen construcciones de timidina quinasa para la expresión *in vivo*. Una exploración PET produce imágenes tridimensionales de procedimientos funcionales en el cuerpo al detectar pares de rayos gamma emitidos indirectamente por indicadores radioactivos situados en una molécula activa biológica. Las exploraciones PET detectan la energía emitida por partículas cargadas positivamente (positrones).

A los pacientes a los que se les administró una partícula de vector retroviral que contiene el polinucleótido timidina quinasa se les administra conjuntamente un agente de indicador radioactivo capaz de ser escindido por la timidina quinasa expresada. Un ejemplo es [¹⁸F]FHBG (9-[4-[¹⁸F]fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina), que es un sustrato de alta afinidad para la enzima HSV-TK, con una afinidad relativamente baja para las enzimas TK de mamíferos. Véase Yaghoubi y Gambhir, Nat. Protocolo 1: 3069-75 (2006); Green y col., J. Nucl. Med. 45:1560-70 (2004). [¹⁸F]FHBG está fosforilada por HSV1-TK o HSV1-sr39TK, que luego queda atrapada dentro de las células que expresan la enzima timidina quinasa. Por tanto, la escisión de este sustrato *in vivo* en pacientes a los que se administraron vectores retrovirales que contienen un polinucleótido de timidina quinasa, incluidas las construcciones de timidina quinasa mutadas y/u optimizadas descritas en este documento, indica una transducción eficiente de las partículas del vector retroviral por parte de los sujetos y pacientes, y por lo tanto una susceptibilidad inicial del paciente o sujeto a la terapia génica mediada por la timidina quinasa.

Como alternativa, otros procedimientos para medir la actividad viral de la TK incluyen resonancia magnética de formación de imágenes de transferencia de saturación por intercambio químico con 5-metil-5,6-dihidrotimidina y compuestos relacionados.

En consecuencia, en algunas realizaciones descritas en este documento, se proporcionan procedimientos y composiciones para detectar la expresión de timidina quinasa en pacientes a los que se administra una partícula viral retroviral que contiene un polinucleótido que codifica una proteína timidina quinasa. La timidina quinasa deriva de la timidina quinasa de *Herpesviridae*. La timidina quinasa es HSV-TK. En otras realizaciones, la timidina quinasa es HSV-TK1. En aún otras realizaciones, la timidina quinasa es una versión optimizada de HSV-TK1.

En algunas realizaciones, el gen HSV-TK es optimizado en codón para una expresión y/o transducción eficientes. En otras realizaciones, el extremo amino de la timidina quinasa se altera para eliminar o suprimir la secuencia de localización nuclear (NLS) de la secuencia de la timidina quinasa viral. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos de la timidina quinasa incluye una secuencia de exportación nuclear (NES) unida al extremo amino. En algunas realizaciones, la secuencia de exportación nuclear es LQKKLEELDGLD (SEQ ID NO: 24).

En otras realizaciones más, la secuencia codificante de la timidina quinasa se muta para aumentar la unión al sustrato de la proteína timidina quinasa expresada. En aún otras realizaciones, la secuencia codificante de la timidina quinasa incluye una mutación A168H.

Otros ejemplos de sustratos dirigidos por la timidina quinasa, incluida la proteína HSV-TK, incluyen: FHPG (9-([3-fluoro-1-hidroxi-2-propoxi]metil)guanina), FGCV (fluoroganciclovir), FPCV (fluoropenciclovir), FIAU (1-(2'-deoxi-2'-fluoro-1-β-D-arabinofuranosil)-5-iodouracilo), FEAU (fluoro-5-etil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FMAU (fluoro-5-metil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FHOMP (6-((1-fluoro-3-hidroxiopropan-2-iloxi)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H, 3H)-diona), ganciclovir, valganciclovir, aciclovir, valaciclovir, penciclovir, pirimidina radiomarcada con cadena lateral 4-hidroxi-3-(hidroximetil)butilo en N-1 (HHG-5-FEP), o derivados de pirimidina sustituidos con 5-(2-)hidroxietilo y 5-(3-hidroxi)propilo que contienen cadenas laterales similares al 2,3-dihidroxi)propilo, aciclovir, ganciclovir y penciclovir. Ejemplos de radioindicadores que se pueden usar para determinar si una proteína terapéutica, como la timidina quinasa, se expresa en un individuo tratado con los vectores de terapia génica con timidina quinasa descritos en este documento también incluyen ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ^{99m}Te, ¹¹C, ¹⁴C, ¹²⁴I, ¹²³I, ¹³¹I, ¹⁵O, ¹³N y/o ⁸²RbCl.

Los ensayos clínicos para 9-[4-¹⁸F-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina (FHBG) para PET se pueden encontrar en el siguiente sitio web: www.clinicaltrials.gov. Los procedimientos para medir FHBG con PET en uso clínico se pueden encontrar en los ensayos clínicos NCT00871702, NCT00185848 y NCT01082926.

- 5 Brevemente, los pacientes recibirán una dosis de medicamento terapéutico el día 1. En los días 3 a 6, preferentemente el día 4, o en un período de tiempo después de recibir la dosis de medicamento terapéutico que codifica un HSV-TK modificado como se describe en este documento se les infundirá [¹⁸F]FHBG por vía intravenosa y se formarán imágenes mediante exploración PET 1 a 5 horas más tarde, preferentemente 0,5, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3,0, 3,5 o 4,0 horas más tarde u otro momento adecuado después de la administración para exploración, para la acumulación en los sitios tumorales donde se muestra el HSV-1 TK a expresar. Los pacientes que muestren captación de FHBG se inscribirán en el ensayo; aquellos que no serán excluidos como se describe en este documento. La cantidad de FHBG se determinará y se basará en estudios anteriores. Se pueden encontrar protocolos adicionales para FHBG/PET, por ejemplo, en las referencias 15-39 a continuación.
- 15 En consecuencia, en este documento se proporcionan procedimientos y composiciones para medir un sustrato marcado de timidina quinasa, incluyendo HSV-TK, que incluye, FHBG (9-[4-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina), FHPG (9-([3-fluoro-1-hidroxi-2-propoxi]metil)guanina), FGCV (fluoroganciclovir), FPCV (fluoropenciclovir), FIAU (1-(2'-deoxi-2'-fluoro-1-β-D-arabinofuranosil)-5-iodouracilo), FEAU (fluoro-5-etil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FMAU (fluoro-5-metil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FHOMP (6-((1-fluoro-3-hidroxiopropan-2-iloxi)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H, 3H)-diona), ganciclovir, valganciclovir, aciclovir, valaciclovir, penciclovir, pirimidina radiomarcada con cadena lateral 4-hidroxi-3-(hidroximetil)butilo en N-1(HHG-5-FEP) o derivados de pirimidina sustituidos con 5-(2-)hidroxietilo y 5-(3-hidroxi)propilo que contienen cadenas laterales similares al 2,3-dihidroxi)propilo, aciclovir, ganciclovir y penciclovir, comprendiendo el procedimiento: a) transducir células con un polinucleótido que codifica HSV-TK; b) tratar las células con un sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo; y c) medir la cantidad relativa de señal radioactiva presente en el tejido objetivo. En una realización, la etapa c) comprende medir la salida del indicador radioactivo *in vivo* en el sujeto usando PET (tomografía por emisión de positrones)
- 20 En este documento también se proporcionan procedimientos y composiciones para identificar un paciente o sujeto capaz de beneficiarse de un tratamiento con terapia génica, que comprende medir un sustrato marcado de timidina quinasa incluyendo HSV-TK, que incluye FHBG (9-[4-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina), FHPG (9-([3-fluoro-1-hidroxi-2-propoxi]metil)guanina), FGCV (fluoroganciclovir), FPCV (fluoropenciclovir), FIAU (1-(2'-deoxi-2'-fluoro-1-β-D-arabinofuranosil)-5-iodouracilo), FEAU (fluoro-5-etil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FMAU (fluoro-5-metil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FHOMP (6-((1-fluoro-3-hidroxiopropan-2-iloxi)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H, 3H)-diona), ganciclovir, valganciclovir, aciclovir, valaciclovir, penciclovir, pirimidina radiomarcada con cadena lateral 4-hidroxi-3-(hidroximetil)butilo en N-1 (HHG-5-FEP), o derivados de pirimidina sustituidos con 5-(2-)hidroxietilo y 5-(3-hidroxi)propilo que contienen cadenas laterales similares al 2,3-dihidroxi)propilo, aciclovir, ganciclovir y penciclovir. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: a) administrar una partícula retroviral de terapia génica que comprende un polinucleótido HSV-TK y transducir células con el polinucleótido que codifica la HSV-timidina quinasa; b) tratar las células con un sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo; c) medir la cantidad relativa de señal radioactiva presente en el tejido objetivo; y d) identificar a los pacientes donde el nivel de sustrato de HSV-TK marcado radiactivamente está por encima de un umbral establecido. En una realización, la etapa c) comprende medir la salida del indicador radioactivo *in vivo* en el sujeto usando PET (tomografía por emisión de positrones)
- 30 En algunas realizaciones, los pacientes capaces de beneficiarse de un protocolo de terapia génica incluyen pacientes o sujetos que muestran un nivel por encima de un umbral establecido en una exploración PET. En algunas realizaciones, el nivel de sustrato de HSV-TK radioactivo es al menos aproximadamente 2,0 SUV o al menos 20 % por encima del fondo en una exploración PET. En algunas realizaciones, el nivel de sustrato de HSV-TK radioactivo es al menos aproximadamente 1,9 SUV o al menos 20 % por encima del fondo en una exploración PET. En otras realizaciones más, el nivel de sustrato de HSV-TK radioactivo es al menos aproximadamente 1,0 SUV, aproximadamente 1,5 SUV, aproximadamente 2,0 SUV o aproximadamente 2,5 SUV o más, o al menos un 10 % por encima del fondo, al menos un 20 % por encima del fondo, al menos un 30 % sobre el fondo, al menos un 40 % por encima del fondo o al menos un 50 % por encima del fondo o más en una exploración PET.
- 45 En algunas realizaciones, en este documento se proporcionan procedimientos y composiciones para identificar a un paciente o sujeto que necesita tratamiento para lesiones benignas o metastásicas y que pueden beneficiarse del tratamiento con terapia génica. En algunas realizaciones, el procedimiento para identificar pacientes capaces de beneficiarse de la terapia génica para el tratamiento de lesiones benignas o metastásicas incluye la medición de un sustrato marcado de timidina quinasa, incluyendo HSV-TK, que incluye FHBG (9-[4-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina), FHPG (9-([3-fluoro-1-hidroxi-2-propoxi] metil)guanina), FGCV (fluoroganciclovir), FPCV
- 50
- 55
- 60

(fluoropenciclovir), FIAU (1-(2'-deoxi-2'-fluoro-1-β-D-arabinofuranosil)-5-iodouracilo), FEAU (fluoro-5-etil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FMAU (fluoro-5-metil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FHOMP (6-((1-fluoro-3-hidroxiopropan-2-iloxi)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H, 3H)-diona), ganciclovir, valganciclovir, aciclovir, valaciclovir, penciclovir, pirimidina radiomarcada con cadena lateral 4-hidroxi-3-(hidroximetil)butilo en N-1 (HHG-5-FEP), o derivados de pirimidina sustituidos con 5-(2-)hidroxietilo y 5-(3-hidroxiopropilo) que contienen cadenas laterales similares al 2,3-dihidroxiopropilo, aciclovir, ganciclovir y penciclovir después de la administración del tratamiento con terapia génica. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: a) administrar una partícula retroviral de terapia génica que comprende un polinucleótido HSV-TK y transducir células con el polinucleótido que codifica la HSV-timidina quinasa; b) tratar las células con un sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo; c) medir la cantidad relativa de señal radioactiva presente en el tejido objetivo; y d) identificar a los pacientes donde el nivel de sustrato de HSV-TK marcado radiactivamente está por encima de un umbral establecido; y e) tratamiento de dicho paciente o sujeto con la partícula retroviral de terapia génica. En una realización, la etapa c) comprende medir la salida del indicador radioactivo *in vivo* en el sujeto usando PET (tomografía por emisión de positrones) En algunas realizaciones, los pacientes capaces de beneficiarse de un protocolo de terapia génica incluyen pacientes o sujetos que muestran un nivel por encima de un umbral establecido en una exploración PET. En algunas realizaciones, el nivel de la señal de [¹⁸F]FHBG es al menos aproximadamente 2,0 SUV o al menos 20 % por encima del fondo en una exploración PET. En algunas realizaciones, el nivel de sustrato de HSV-TK radioactivo es al menos aproximadamente 1,9 SUV o al menos 20 % por encima del fondo en una exploración PET. En otras realizaciones más, el nivel de sustrato de HSV-TK radioactivo es al menos aproximadamente 1,0 SUV, aproximadamente 1,5 SUV, aproximadamente 2,0 SUV o aproximadamente 2,5 SUV o más, o al menos un 10 % por encima del fondo, al menos un 20 % por encima del fondo, al menos un 30 % sobre el fondo, al menos un 40 % por encima del fondo o al menos un 50 % por encima del fondo o más en una exploración PET.

También se proporcionan en este documento procedimientos que comprenden: (a) determinar el nivel de señal [¹⁸F]FHBG en un sujeto; y (b) seleccionar al sujeto para el tratamiento con una composición donde el nivel de FHBG es al menos 2,0 SUV o al menos 20 % por encima del fondo en una exploración PET. En algunas realizaciones, el nivel de sustrato de HSV-TK radioactivo es al menos aproximadamente 1,9 SUV o al menos 20 % por encima del fondo en una exploración PET. En otras realizaciones más, el nivel de sustrato de HSV-TK radioactivo es al menos aproximadamente 1,0 SUV, aproximadamente 1,5 SUV, aproximadamente 2,0 SUV o aproximadamente 2,5 SUV o más, o al menos un 10 % por encima del fondo, al menos un 20 % por encima del fondo, al menos un 30 % sobre el fondo, al menos un 40 % por encima del fondo o al menos un 50 % por encima del fondo o más en una exploración PET.

Además, en este documento se proporciona un procedimiento que comprende: (a) determinar el nivel de señal [¹⁸F]FHBG en un sujeto; (b) excluir al sujeto del tratamiento con una composición donde el nivel de FHBG en el sujeto es mayor que aproximadamente 2,0 SUV o al menos por encima de 20 % por encima de la señal de fondo en una exploración PET; y (c) administrar a dicho sujeto un agente anticanceroso. En algunas realizaciones, el nivel de sustrato de HSV-TK radioactivo es al menos aproximadamente 1,9 SUV o al menos 20 % por encima del fondo en una exploración PET. En otras realizaciones más, el nivel de sustrato de HSV-TK radioactivo es al menos aproximadamente 1,0 SUV, aproximadamente 1,5 SUV, aproximadamente 2,0 SUV o aproximadamente 2,5 SUV o más, o al menos un 10 % por encima del fondo, al menos un 20 % por encima del fondo, al menos un 30 % sobre el fondo, al menos un 40 % por encima del fondo o al menos un 50 % por encima del fondo o más en una exploración PET.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para identificar a un sujeto que es susceptible a un tratamiento contra el cáncer, comprendiendo el procedimiento: a) identificar la expresión de [¹⁸F]FHBG en el sujeto; b) tratar al sujeto.

En este documento también se proporcionan composiciones y procedimientos para medir la fosforilación de FHBG (9-[4-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina), FHPG (9-([3-fluoro-1-hidroxi-2-propoxi]metil)guanina), FGCV (fluoroganciclovir), FPCV (fluoropenciclovir), FIAU (1-(2'-deoxi-2'-fluoro-1-β-D-arabinofuranosil)-5-iodouracilo), FEAU (fluoro-5-etil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FMAU (fluoro-5-metil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FHOMP (6-((1-fluoro-3-hidroxiopropan-2-iloxi)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H, 3H)-diona), ganciclovir, valganciclovir, aciclovir, valaciclovir, penciclovir, pirimidina radiomarcada con cadena lateral 4-hidroxi-3-(hidroximetil)butilo en N-1 (HHG-5-FEP), o derivados de pirimidina sustituidos con 5-(2-)hidroxietilo y 5-(3-hidroxiopropilo) que contienen cadenas laterales similares al 2,3-dihidroxiopropilo, aciclovir, ganciclovir y penciclovir mediada por HSV-TK usando un sistema de formación de imágenes por fluorescencia. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende: a) transducir células con un polinucleótido que codifica HSV-TK y una primera proteína fluorescente; b) transducir las células con un polinucleótido que codifica una segunda proteína fluorescente o bioluminiscente que se puede distinguir ópticamente de la primera proteína fluorescente o bioluminiscente; c) tratar las células con un agente que se vuelve

citotóxico al ser fosforilado por HSV-TK; y d) medir la cantidad relativa de expresión de la primera proteína fluorescente y la segunda proteína fluorescente. En una realización, la etapa d) comprende un lector de placas Perkin Elmer, un fluorímetro; un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS); un celómetro o un espectrofotómetro. En otra realización, la etapa d) comprende medir la salida fluorescente de la segunda proteína fluorescente o bioluminiscente *in vivo* en el sujeto usando un sistema de formación de imágenes por fluorescencia o bioluminiscencia.

USOS DIAGNÓSTICOS DE LA TIMIDINA QUINASA

- 10 En algunas realizaciones, en el presente documento se describe un procedimiento para seleccionar un paciente para terapia, o para excluir a un paciente de la terapia. En una realización, la terapia génica de la timidina quinasa. En otras realizaciones, la timidina quinasa es timidina quinasa HSV del virus herpes simple (HSV-TK). En otras realizaciones más, la timidina quinasa es HSV-TK1.
- 15 Como se describe en este documento, [¹⁸F]FHBG y otros sustratos marcados con HSV-TK se pueden usar como un marcador para la selección o exclusión de sujetos para terapia génica. Por ejemplo, las células que expresan HSV-TK después de la administración de una partícula de vector retroviral que comprende un polinucleótido que codifica HSV-TK fosforilarán selectivamente el análogo de nucleósido 9-[4-fluoro-3-(hidroximetil) butil]guanina ([¹⁸F]FHBG). Véase, por ejemplo, Yaghoubi y Gambhir, Nat. Protocols 1:3069-75 (2006). La formación de imágenes de [¹⁸F]FHBG
- 20 por encima de un determinado umbral se puede usar luego para identificar células positivas para HSV-TK y para seleccionar o excluir a un paciente para terapia génica

En consecuencia, en una realización, a un sujeto se le administra una composición de terapia génica, donde la composición de terapia génica codifica un polipéptido HSV-TK. Al sujeto se le administra un sustrato análogo de nucleósido HSV-TK marcado después de un período de tiempo predeterminado, y se controla hasta que se alcanza el fondo del sustrato marcado en el sujeto. La actividad de la etiqueta se mide y se compara con una exploración que detecta lesiones en el sujeto. Si la actividad de la formación de imágenes: 1) está por encima de un umbral establecido; y 2) se correlaciona con la ubicación de la lesión en el sujeto, entonces el sujeto es un candidato para la terapia génica HSV-TK.

30 En algunas realizaciones, el análogo de nucleósido es FHBG (9-[4-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina), FHPG (9-([3-fluoro-1-hidroxi-2-propoxi]metil)guanina), FGCV (fluoroganciclovir), FPCV (fluoropenciclovir), FIAU (1-(2'-deoxi-2'-fluoro-1-β-D-arabinofuranosil)-5-iodouracilo), FEAU (fluoro-5-etil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FMAU (fluoro-5-metil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FHOMP (6-((1-fluoro-3-hidroxiopropan-2-ilo)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H, 3H)-diona), ganciclovir, valganciclovir, aciclovir, valaciclovir, penciclovir, pirimidina radiomarcada con cadena lateral 4-hidroxi-3-(hidroximetil)butilo en N-1 (HHG-5-FEP), o derivados de pirimidina sustituidos con 5-(2-)hidroxietilo y 5-(3-hidroxi)propilo que contienen cadenas laterales similares al 2,3-dihidroxi)propilo, aciclovir, ganciclovir y penciclovir. En algunas realizaciones, la etiqueta es ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ^{99m}Te, ¹¹C, ¹⁴C, ¹²⁴I, ¹²³I, ¹³¹I, ¹⁵O, ¹³N y/o ⁸²RbCl. Preferentemente, el sustrato análogo de nucleósido HSV-TK marcado es [¹⁸F]FHBG (9-(4-¹⁸F-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina).

40 En algunas realizaciones, el patrón de aclaramiento en un sujeto determina la duración del tiempo de retardo para medir el fondo y determinar, por ejemplo, la actividad de la formación de imágenes de [¹⁸F]FHBG. En los seres humanos, por ejemplo, el fondo de [¹⁸F]FHBG disminuye rápidamente de la mayoría de los tejidos fuera del abdomen inferior, como se ve en la Figura 2. Como se ve, entre 7,6 y 42,6 minutos después de la administración de [¹⁸F]FHBG, los niveles son altos en el hígado, los riñones y la vejiga. Esto contrasta con el corazón y los pulmones, por ejemplo, que prácticamente no muestran señal de fondo [¹⁸F]FHBG después de la administración. Después de 45,3 minutos a 80,3 minutos, los niveles de [¹⁸F]FHBG han disminuido significativamente en el hígado y los riñones, con una señal alta y persistente en la vejiga. Desde 83,3 minutos hasta 155,6 minutos, los niveles en el hígado y los riñones disminuyeron aún más, con el mantenimiento de niveles de señal altos en la vejiga. En consecuencia,

50 dependiendo del órgano y del sujeto individual, puede requerirse cierto tiempo para que los niveles de fondo disminuyan con el fin de medir la expresión del gen HSV-TK. No se necesita tiempo para la medición en sistemas de órganos fuera de la región inferior del abdomen, como se ve en el corazón y los pulmones. En estos sistemas orgánicos, un umbral suficiente para la idoneidad de la terapia génica puede ser, por ejemplo, al menos por encima de 1,0 SUV, al menos por encima de 1,5 SUV, al menos por encima de 2,0 SUV, al menos por encima de 2,5 SUV,

55 al menos por encima de 3,0 SUV, al menos por encima de 3,5 SUV o al menos por encima de 4,0 SUV.

A diferencia, puede que se requiera cierto retraso con el fin de obtener imágenes de señales por encima de los niveles de fondo, por ejemplo, en el hígado y los riñones. Véase Yaghoubi y col. Nat. Protocolos en el vol. 1, p. 3073. Debido a las señales de fondo en estos sistemas de órganos, un umbral suficiente para la determinación de la idoneidad para el tratamiento de terapia génica puede ser, por ejemplo, al menos un 10 % por encima del fondo, al

menos un 15 % por encima del fondo, al menos un 20 % por encima del fondo, al menos un 25 % por encima del fondo, al menos un 30 % por encima del fondo, al menos un 35 % por encima del fondo, al menos un 40 % por encima del fondo, al menos un 45 % por encima del fondo, al menos un 50 % por encima del fondo, al menos un 55 % por encima del fondo, al menos un 60 % por encima del fondo, al menos un 65 % por encima del fondo, al menos un 70 % por encima del fondo, al menos un 75 % por encima del fondo, al menos un 80 % por encima del fondo, al menos un 85 % por encima del fondo, al menos un 90 % por encima del fondo, al menos un 95 % por encima del fondo o al menos un 100 % o más por encima del fondo cuando se mide después de un período de tiempo predeterminado. Por ejemplo, como se ve en la Figura. 2, las señales de fondo en el hígado son considerablemente menores después de al menos 1 a 1-1/2 horas después de la administración de [¹⁸F]FHBG. En consecuencia, las mediciones de la señal de [¹⁸F]FHBG en el hígado no deben tomarse hasta después de que los niveles de la señal de [¹⁸F]FHBG hayan disminuido al fondo, aproximadamente 1 a 1-1/2 horas, dependiendo de la velocidad de aclaramiento en cada sujeto individual.

En algunos sistemas orgánicos, la expresión del gen HSV-TK puede no ser medible, por ejemplo, en la vejiga, donde se mantienen altos niveles de señal de fondo a lo largo del tiempo.

En otras realizaciones, se mide una relación de señal de [¹⁸F]FHBG administrada a [¹⁸F]FHBG medida para determinar si un sujeto debe incluirse o excluirse de un protocolo de terapia génica. Por ejemplo, si un sujeto que se inyecta con, por ejemplo, 500 MBq de [¹⁸F]FHBG, y excede el umbral, de por ejemplo, 50 MBq de la señal de [¹⁸F]FHBG, el sujeto es capaz de producir una cantidad terapéuticamente efectiva de ganciclovir fosforilado, o un derivado del mismo, de una construcción descrita en este documento para ser terapéutica, lo que indica que el sujeto puede responder en una situación de terapia génica. En dicha realización, el sujeto es un candidato para el tratamiento con una construcción de terapia génica descrita en este documento.

En otras realizaciones, el sujeto se inyecta con 100-750 MBq o 100-600 MBq o 100-500 MBq o 200-500 MBq o 200-400 MBq, o 2,0 a 15,5 MBq/kg o 2,0 a 12,0 MBq/kg o 2,0 a 10,0 MBq/kg o 2,0 a 7,5 MBq/kg de [¹⁸F]FHBG y excede el umbral de, por ejemplo, 10-100 MBq o 10-90 MBq o 10-80 MBq o 10-70 MBq o 10-60 MBq o 20-50 MBq o 20-40 MBq de la señal [¹⁸F]FHBG. En algunas realizaciones, el sujeto se inyecta con 200-500 MBq de [¹⁸F]FHBG y excede el umbral de, por ejemplo, 20-50 MBq de la señal [¹⁸F]FHBG. En algunas realizaciones, la relación de señal [¹⁸F]FHBG inyectada a señal [¹⁸F]FHBG medida es de 2:1, 5:1, 10:1, 20:1 30:1, 40:1 o 50:1. En algunas realizaciones, la relación de señal [¹⁸F]FHBG inyectada a señal [¹⁸F]FHBG medida es de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 50:1, de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 40:1, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 30:1, desde aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1, desde aproximadamente 5:1 a aproximadamente 10:1 o aproximadamente 10:1.

En otra realización, si un sujeto produce suficiente FHBG fosforilado para generar una señal de más de 2,0 SUV o al menos un 20 % por encima del fondo en la exploración PET, es probable que el sujeto produzca una cantidad terapéuticamente efectiva de TK a partir de una construcción descrita en este documento y es probable que el sujeto responda en una situación de terapia génica. En algunas realizaciones, el sujeto puede seleccionarse para una terapia de combinación con otro agente o tratamiento anticanceroso descrito en este documento.

En otras realizaciones, el sujeto produce suficiente FHBG fosforilado para generar una señal de más de aproximadamente 1,5 SUV, más de aproximadamente 2,0 SUV, más de aproximadamente 2,5 SUV, más de aproximadamente 3,0 SUV, más de aproximadamente 4,0 SUV o más de aproximadamente 5,0 SUV. En otras realizaciones más, el sujeto genera una señal de al menos un 10 % por encima del fondo, al menos un 20 % por encima del fondo, al menos un 30 % por encima del fondo, al menos un 40 % por encima del fondo o al menos un 50 % o más por encima del fondo.

CÁNCERES

Ejemplos no limitantes de cánceres pueden incluir: leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el SIDA, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitomas, carcinoma de células basales, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cánceres de hueso, tumores cerebrales, como astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, vía visual y glioma hipotalámico, cáncer de mama, adenomas bronquiales, linfoma de Burkitt, carcinoma de origen primario desconocido, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, cáncer cervical, cánceres infantiles, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, linfoma cutáneo de células T, tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, tumores de células germinales, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal,

tumor del estroma gastrointestinal, gliomas, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de corazón, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer de la hipofaringe, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de labios y cavidad oral, cáncer de hígado, cánceres de pulmón, como cáncer de pulmón de células no pequeñas y células pequeñas, linfomas, leucemias, macroglobulinemia, histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma, meduloblastoma, melanomas, mesotelioma, cáncer metastásico de cuello escamoso con primario oculto, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, síndromes mielodisplásicos, leucemia mieloide, cavidad nasal y cáncer de seno paranasal, carcinoma nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer bucal, cáncer de orofaringe, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, 5
10
15
20

En otras realizaciones, los cánceres a tratar se eligen de entre el grupo que consiste en carcinoma hepatocelular primario, carcinoma de mama metastásico al hígado, cáncer pancreático metastático al hígado, cáncer gástrico metastásico al hígado, cáncer esofágico metastático al hígado, cáncer de pulmón metastásico al hígado, melanoma metastásico al hígado, carcinoma ovárico metastásico al hígado y cáncer renal metastásico al hígado.

FORMULACIONES

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un vector terapéutico pueden formularse de cualquier manera convencional mezclando una cantidad seleccionada del vector terapéutico con uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables. Por ejemplo, el vector terapéutico puede suspenderse en un portador tal como PBS (solución salina tamponada con fosfato). Los compuestos activos pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, por vía oral, parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutánea o tópica, en forma líquida, semilíquida o sólida y se formulan de una manera adecuada para cada vía de administración.

En algunas realizaciones, el vector terapéutico y las sales y solvatos fisiológicamente aceptables se formulan para la administración por inhalación o insuflación (ya sea a través de la boca o la nariz) o para la administración oral, bucal, parenteral o rectal. En algunas realizaciones, para la administración por inhalación, el vector terapéutico se administra en forma de una presentación en aerosol desde paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En algunas realizaciones, una unidad de dosificación de aerosol presurizada o una válvula para administrar una cantidad medida. En algunas realizaciones, las cápsulas y cartuchos (por ejemplo de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador están formulados con una mezcla en polvo de un compuesto terapéutico y una base en polvo adecuada, como lactosa o almidón.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan para la administración oral en forma de comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno fosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). En algunas realizaciones, los comprimidos están recubiertos por procedimientos bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, las preparaciones líquidas para la administración oral están en forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se formulan como un producto seco para la constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. En algunas realizaciones, dichas preparaciones líquidas se preparan por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). En algunas realizaciones, las preparaciones también contienen sales tampón, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según sea 50
55
60

dar una liberación controlada del compuesto activo. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan para vía bucal en forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

5 En algunas realizaciones, el vector terapéutico se formula para la administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, inyección de bolo, o infusión continua. En algunas realizaciones, las formulaciones para la inyección están en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. En algunas realizaciones, las composiciones se formulan como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos. En algunas realizaciones, las formulaciones comprenden agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, en algunas realizaciones, el principio
10 activo está en forma de polvo liofilizado para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

En algunas realizaciones, el vector terapéutico se formula como una preparación de liberación prolongada. En algunas realizaciones, dichas formulaciones de acción prolongada se administran por implantación (por ejemplo, por
15 vía subcutánea, intramuscular o directamente en o cerca de un tumor) o por inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, en algunas realizaciones, los compuestos terapéuticos se formulan con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

20 En algunas realizaciones, los agentes activos se formulan para una aplicación local o tópica, como para la aplicación tópica en la piel y las membranas mucosas, como en el ojo, en forma de geles, cremas y lociones y para la aplicación en el ojo o para la aplicación intracisternal o intraespinal. En algunas realizaciones, dichas soluciones, particularmente aquellas destinadas a uso oftálmico, se formulan como soluciones isotónicas al 0,01 % -10 %, pH de aproximadamente 5 a 9, con sales adecuadas. En algunas realizaciones, los compuestos se formulan como
25 aerosoles para la aplicación tópica, tal como por inhalación.

La concentración de compuesto activo en la composición del fármaco dependerá de las velocidades de absorción, inactivación y excreción del compuesto activo, el programa de dosificación y la cantidad administrada, así como otros factores conocidos por los expertos en la materia.

30 En algunas realizaciones, las composiciones se presentan en un paquete o dispositivo dispensador que comprende una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. En algunas realizaciones, el paquete puede comprender una lámina de metal o plástico, tal como un envase de blíster. En algunas realizaciones, el paquete o dispositivo dispensador va acompañado de instrucciones para la administración.

35 En algunas realizaciones, los agentes activos se empaquetan como artículos de fabricación que contienen material de empaquetado, un agente proporcionado en este documento y una etiqueta que indica el trastorno para el cual se proporciona el agente.

40 **MODELOS ANIMALES**

En algunas realizaciones, las partículas de vector retroviral, descritas anteriormente en este documento, se administran a un animal *in vivo* como parte de un modelo animal para el estudio de la eficacia de un tratamiento de terapia génica. En algunas realizaciones, las partículas de vector retroviral se administran en dosis variables a
45 diferentes animales de la misma especie. A continuación, los animales se evalúan para determinar la expresión *in vivo* del agente terapéutico o de diagnóstico deseado. En algunas realizaciones, a partir de los datos obtenidos de dichas evaluaciones, un experto en la materia determina la cantidad de partículas de vectores retrovirales que se administrarán a un paciente humano.

50 **KITS**

También se proporcionan kits o sistemas de administración de fármacos que comprenden las composiciones para su uso en los procedimientos descritos en este documento. Todos los materiales esenciales y reactivos necesarios para la administración de las partículas retrovirales descritas en este documento pueden ensamblarse en un kit (por
55 ejemplo, construcción de células de empaquetamiento o línea celular, vector de expresión de citoquinas). Los componentes del kit pueden proporcionarse en una diversidad de formulaciones como se describió anteriormente. La una o más partículas retrovirales terapéuticas se pueden formular con uno o más agentes (por ejemplo, un agente quimioterapéutico) en una sola composición farmacéuticamente aceptable o composiciones farmacéuticamente aceptables separadas.

60

Los componentes de estos kits o sistemas de administración de fármacos también pueden proporcionarse en formas secas o liofilizadas. Cuando los reactivos o componentes se proporcionan como una forma seca, la reconstitución generalmente se realiza mediante la adición de un disolvente adecuado, que también se puede proporcionar en otro medio de envase.

5

Los medios de envase de los kits pueden incluir generalmente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa y/u otro medio de envase, en el que se puede colocar la al menos una sustancia.

Los kits descritos en este documento también pueden comprender instrucciones con respecto a la dosificación y o la información de administración para la partícula retroviral. Las instrucciones pueden incluir instrucciones para practicar cualquiera de los procedimientos descritos en este documento, incluidos los procedimientos de tratamiento. Además, las instrucciones pueden incluir indicaciones de un criterio de valoración clínico satisfactorio o cualquier síntoma adverso que pueda producirse, o información adicional requerida por agencias reguladoras como la administración de alimentos y medicamentos para su uso en un sujeto humano.

15

Las instrucciones pueden estar en "material impreso", por ejemplo, en papel o cartón dentro o pegado al kit, o en una etiqueta pegada al kit o al material de empaquetado o adherida a un vial o tubo que contenga un componente del kit. Además, las instrucciones pueden incluirse en un medio legible por computadora, como un disco (disquete o disco duro), CD óptico como CD o DVD-ROM/RAM, cinta magnética, medios de almacenamiento eléctrico como RAM y ROM, punta IC e híbridos de estos, tales como medios de almacenamiento magnético/óptico.

20

En algunas realizaciones, los kits o sistemas de administración de fármacos incluyen un medio para contener los viales en confinamiento cercano para la venta comercial tal como, por ejemplo, inyección o recipientes de plástico moldeados por soplado en los que se conservan los viales deseados. Independientemente del número o el tipo de recipientes, los kits también pueden comprender, o empaquetarse con, un instrumento para ayudar con la inyección/administración o colocación de la composición compleja definitiva dentro del cuerpo de un sujeto. Dicho instrumento puede ser un aplicador, inhalante, jeringa, pipeta, fórceps, cuchara medidora, cuentagotas o cualquier otro vehículo de administración aprobado médicamente.

25

Los paquetes y kits pueden incluir además una etiqueta que especifique, por ejemplo, una descripción del producto, el modo de administración y/o la indicación del tratamiento. Los paquetes proporcionados en este documento pueden incluir cualquiera de las composiciones como se describe en este documento. El paquete puede incluir además una etiqueta para tratar una o más enfermedades y/o afecciones.

30

La expresión "material de empaquetamiento" se refiere a una estructura física que contiene los componentes del kit. El material de empaquetamiento puede mantener los componentes de forma estéril y puede estar hecho de material comúnmente usado para dichos fines (por ejemplo, papel, fibra ondulada, vidrio, plástico, papel, ampollas, etc.). La etiqueta o prospecto pueden incluir instrucciones escritas adecuadas. Además, los kits pueden incluir etiquetas o instrucciones adicionales para usar los componentes del kit en cualquier procedimiento descrito en este documento.

35

Un kit puede incluir un compuesto en un paquete o dispensador junto con instrucciones para administrar el compuesto en un procedimiento descrito en este documento.

40

EJEMPLOS

Con el fin de que los expertos en la materia puedan practicar mejor las composiciones y los procedimientos descritos en este documento, los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos.

Ejemplo 1: ensayo clínico.

Se realizó un ensayo de aumento de la dosis para evaluar la seguridad, la farmacocinética y la farmacodinámica de Reximmune-C2 (genes de timidina quinasa y GM-CSF) en sujetos refractarios con carcinoma hepatocelular primario o tumores metastásicos en el hígado.

50

Antecedentes y justificación

55

Reximmune-C2 consta de una plataforma de distribución genética que contiene una carga útil interna que codifica proteínas terapéuticas de interés. La plataforma de distribución genética se ha dosificado en más de 280 sujetos en todo el mundo; aproximadamente 270 sujetos fueron tratados con el vector que contenía dnG1 como una carga útil (Rexin-G) y 16 sujetos con timidina quinasa (vTK) y el factor de estimulación inmune de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) como una carga útil (Reximmune-C). La plataforma de distribución genética es un vector viral

60

Moloney de ratón no recombinante (MoMLV) obtenido por ingeniería. Anteriormente, se realizó un ensayo de aumento de dosis de fase 1 investigando la combinación de Rexin-G y Reximmune-C en sujetos con tumores sólidos refractarios primarios o metastásicos (ensayo Genevieve). Este ensayo clínico de fase I propuesto (titulado ensayo Genevieve 2) es una extensión de un ensayo que se realizó investigando Reximmune-C2 solo, sin el Rexin-G) utilizando una forma mejorada de timidina quinasa en una combinación de timidina quinasa más GM-CSF.

En el ensayo original de Genevieve, dieciséis sujetos fueron reclutados en 3 niveles de dosis, siendo la exposición media en el grupo de dosis más alta de $8,0 \times 10^{10}$ ufc (# de pts = 7) y la duración más larga fue de 6 ciclos (intervalo de ciclos 3-6). Para la parte A del estudio, el tratamiento consistió en una dosis segura y efectiva (óptima) de Rexin-G previamente determinada, y dosis crecientes de Reximmune-C. Específicamente, Rexin-G, 2×10^{11} ufc, en los días 1, 3, 5, 8, 10 y 12, Reximmune-C, 1,0, 2,0 o $3,0 \times 10^{10}$ ufc en el día 3 (niveles de dosis I, II, III respectivamente) y valaciclovir a 1 g po tres veces al día en los días 6-19, como un ciclo. Para la parte B del estudio, los sujetos que no tuvieron toxicidad o en quienes la toxicidad se resolvió a grado 1 o menos podrían recibir ciclos adicionales de terapia hasta un total de 6 ciclos de tratamiento.

No hubo toxicidad limitante de la dosis en ningún nivel de dosis. Se informaron eventos adversos no relacionados para los 16 sujetos en el estudio, pero el número de eventos fue bajo (en la mayoría de los casos 1 o 2 apariciones por término preferido), y la mayoría fueron de grado 1 o 2. Los eventos adversos no graves relacionados se produjeron en 2 sujetos y ambos fueron de grado 2. Cuatro sujetos experimentaron eventos adversos graves, los cuales se consideraron no relacionados con el fármaco del estudio.

La justificación para la continuación de este ensayo de fase 1 es que: (1) la timidina quinasa en sí misma podría demostrar ser un agente anticanceroso eficaz, particularmente en sujetos cuyos tumores demuestran un efecto espectador; (2) la administración de la plataforma de distribución genética hasta la fecha a un grupo internacional de sujetos ha demostrado un muy alto grado de seguridad; y (3) la biodistribución en animales sugiere una alta biodistribución en el hígado. Además, la adición de GM-CSF podría contribuir a un efecto inmunológico y una mayor destrucción de las células tumorales a través de antígenos asociados al tumor mediante el reclutamiento de las células inmunitarias adecuadas.

La biodistribución de las partículas virales es mayor en el hígado, seguida del bazo, luego el pulmón: esta es la razón para enfocarse inicialmente en los tumores hepatocelulares donde la intensidad de la dosis debe ser la más alta. También existe una alta necesidad clínica insatisfecha de agentes anticancerosos eficaces para estos cánceres.

Se entiende que las realizaciones descritas en este documento no están limitadas a los procedimientos y componentes particulares y otros procedimientos descritos, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en este documento se usa con el fin de describir solo realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención. Debe observarse que, tal como se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen la referencia plural, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, una referencia a una "proteína" es una referencia a una o más proteínas, e incluye equivalentes de las mismas conocidos por los expertos en la materia y así sucesivamente.

A menos que se indique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Se describen procedimientos, dispositivos y materiales específicos, aunque cualquier procedimiento y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento se pueden usar en la práctica o el ensayo de la presente invención.

Todas las publicaciones citadas en este documento, se incorporan por la presente como referencia, incluidos todos los artículos de revistas, libros, manuales, solicitudes de patente publicadas y patentes emitidas. Además, se proporciona el significado de determinados términos y frases empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas. Las definiciones no pretenden ser de carácter limitativo y sirven para proporcionar una comprensión más clara de determinados aspectos de la presente invención.

Ejemplo 2: ensayo de diagnóstico de TK para aplicaciones de terapia génica

Estudios en animales y humanos han demostrado previamente la utilidad de medir la expresión de vTK mediante la formación de imágenes PET usando [^{18}F]-FHBG. Estas herramientas de formación de imágenes se utilizarán como una prueba sustituta personalizada para acceder a la dosis y exposición adecuadas y se usarán en la parte del IB

para determinar qué sujetos tienen la mejor oportunidad de beneficiarse de los fármacos candidatos.

Este ensayo clínico se divide en dos fases: la fase IA en la que Reximmune-C2 se administró como una dosis intravenosa única en tres de los cinco días y la presencia de la expresión de HSV-TK-m2 potencialmente controlada por exploración [¹⁸F]FHBG PET después de 3-8 días (el esquema para la fase IA se ilustra en la Figura 3). La administración de valganciclovir (la forma oral de ganciclovir) se inicia el día 8 durante 5 días, independientemente de los resultados de la exploración PET. A continuación, aproximadamente una semana de receso farmacológico. Cada ciclo tendrá una duración de tres semanas.

10 Habrá tres pacientes en la primera y subsiguientes cohortes hasta que el paciente experimente toxicidad limitante de la dosis (DLT) o dos casos de toxicidades de grado 2 según NCI-CTC atribuidas al fármaco del estudio (excepto náuseas/vómitos, fatiga, anorexia, alopecia o anemia). Si no hay DLT, los pacientes pasarán al siguiente nivel de dosis. Si hay una DLT, la cohorte se ampliará a 6 pacientes y el nivel de dosis no se superará si 2 o más pacientes muestran DLT.

15 Una vez que se alcanza la dosis máxima administrada (MAD), se seguirá un programa modificado de Fibonacci comenzando con la dosis de cohorte que no tenía DLT y continuará hasta que se observen toxicidades limitantes de la dosis en dos pacientes a un nivel de dosis. Una vez que se define la dosis recomendada de fase 2 (RP2D), se reclutarán 6-12 pacientes.

20 La fase IB está diseñada para explorar la actividad de Reximmune-C2 en pacientes de un tipo de tumor definido y una etapa basada en los datos de la fase IA y que tienen exploraciones [¹⁸F]FHBG positivas del día tres al seis después de una dosis (RP2D) de Reximmune-C2. Si la exploración es positiva, se acepta al paciente en la fase de tratamiento de la fase IB del protocolo y se administra la RP2D en tres dosis dentro de los 5 días, seguidos de los 5 días de valganciclovir a partir del día 8 de esa fase, seguidos de una semana de receso farmacológico. Cada ciclo tiene una duración de tres semanas. Los pacientes que tengan una exploración [¹⁸F]FHBG PET negativa después de una dosis única de Reximmune-C2 recibirán una dosis de 5 días de valganciclovir y no continuarán en el estudio.

La DLT del paciente se definirá como la aparición de cualquiera de los siguientes eventos que se atribuyen a Reximmune-C2 y se producen durante el primer ciclo (3 semanas) de administración del fármaco:

35 Neutropenia de grado 4 (es decir, recuento absoluto de neutrófilos (ANC) < 500 células/mm³) durante 7 o más días consecutivos o neutropenia febril (es decir, fiebre ≥ 38,5 °C con un ANC < 1000 células/mm³); trombocitopenia de grado 4 (< 25.000 células/mm³ o episodio de sangrado que requiere transfusión de plaquetas); náuseas y/o vómitos de grado 3 o mayor a pesar del uso de una intervención médica adecuada/máxima y/o profilaxis; cualquier toxicidad no hematológica de grado 3 o mayor (excepto reacción en el sitio de inyección de grado 3, alopecia, fatiga); retraso en la continuación del tratamiento de más de 3 semanas debido a la recuperación retardada de una toxicidad relacionada con el tratamiento con Reximmune-C2; y reacción de hipersensibilidad de grado 3 o mayor a pesar del uso adecuado de premedicación (según los criterios de toxicidad comunes definidos como "broncoespasmo sintomático, que requieren medicamentos parenterales, con o sin urticaria; edema-angioedema relacionado con alergias").

45 Reximmune-C2 se inyecta por vía intravenosa durante 15 a 60 minutos (dependiendo de la dosis) a través de una bomba de infusión. Reximmune-C2 se proporciona en viales de 30 ml almacenados a -80 °C ± 10 °C.

En este ensayo de fase I, se investigará la seguridad, la farmacocinética y la farmacodinámica de dosis crecientes de Reximmune-C2. Se identificará la dosis máxima tolerada y se definirá una dosis recomendada de fase 2 para Reximmune C2. Se describirá cualquier actividad antitumoral y respuestas clínicas al tratamiento con Reximmune-C2.

50 La dosis inicial en este ensayo se basa en: la experiencia de seguridad clínica en seres humanos con los productos farmacológicos relacionados con la plataforma de vectores Rexin-G y Reximmune-C y los resultados del estudio de toxicología de GLP de ratas de 21 días para Reximmune-C2.

55 **Objetivos**

El objetivo principal del estudio es determinar la dosis máxima tolerada (MTD), la toxicidad limitante de la dosis (DLT), la seguridad y una dosis recomendada de fase 2 (RP2D) de Reximmune-C2 administrada durante un ciclo de tres semanas que consiste en una serie de tres dosis administradas por vía intravenosa dentro de los cinco días de la semana 1, seguidas de 5 dosis diarias de valganciclovir en la semana 2 en pacientes inscritos en este estudio a

los que se le han diagnosticado tumores primarios o metastásicos avanzados en el hígado.

Los objetivos secundarios incluyen: (i) evaluación de la farmacocinética plasmática de Reximmune-C2; (ii) evaluación del sustituto de la expresión de la proteína HSV-TK-m2 de Reximmune-C2 a través de la formación de imágenes en serie [¹⁸F]FHBG PET y/o SPECT; (iii) descripción y evaluación de cualquier evidencia preliminar de actividad antitumoral de Reximmune-C2; y (iv) proporcionar pruebas de investigación clínica para anticuerpos contra retrovector gp70 env, retrovirus competentes para la replicación en linfocitos de sangre periférica (PBL); integración de vectores en el ADN genómico de PBL, y la proteína hGM-CSF circulante.

10 **Procedimientos**

Diseño del estudio: ensayo clínico de grupos paralelos, sin enmascaramiento, con aumento escalonado de la dosis y de tres centros.

15 Estratificación: ninguna.

Terapia: Reximmune-C2 se administrará como una infusión intravenosa para separar a los pacientes. En la fase IA, que investiga Reximmune-C2, la dosis se aumentará entre las cohortes de pacientes hasta que se observe DLT. En el RP2D, se reclutarán pacientes adicionales. En la fase IB, los pacientes serán preseleccionados con [¹⁸F]FHBG PET para la expresión de HSV-TK-m2. Aquellos que expresan HSV-TK-m2 recibirán dosis adicionales de Reximmune-C2. Los pacientes no serán medicados previamente a menos que se produzcan reacciones de hipersensibilidad.

Procedimientos estadísticos: las estadísticas descriptivas se usarán para el análisis estadístico.

25 Determinación del tamaño de la muestra: no se puede definir el tamaño preciso de la muestra, ya que depende de la toxicidad observada. Para cada programa, se tratarán cohortes de tres a seis sujetos en cada nivel de dosis hasta que se defina la MTD. Una vez que se identifica la MTD, este nivel de dosis se ampliará a un máximo de 12 pacientes que serán tratados para definir mejor la tolerabilidad y la farmacocinética de la dosis y el programa. Se espera que se inscriban de 45 a 70 sujetos, con 33 a 46 en la parte de IA.

Criterios de inscripción

Los sujetos deben cumplir con todos los siguientes criterios de inclusión para ser elegibles para la asignación al azar en el estudio:

1. Diagnóstico de tumores sólidos adultos en etapa avanzada, primarios o metastásicos en el hígado, histológicamente documentados, que son refractarios a la terapia convencional o para los cuales no existe una terapia convencional curativa.
2. Evidencia de enfermedad medible o evaluable radiográficamente.
3. Todos los efectos tóxicos agudos de cualquier radioterapia, quimioterapia o procedimientos quirúrgicos anteriores deben haberse resuelto según los criterios de toxicidad comunes (CTC) del instituto nacional del cáncer (NCI) (versión 4.0) grado <1.
4. La edad debe ser > 18 años.
5. La última dosis de terapia antineoplásica, excepto la terapia hormonal debe ser > 21 días. La radioterapia de haz externo debe haber sido <25 % de esqueleto que contenga médula ósea.
6. Los pacientes pueden ser positivos para la hepatitis B y C. (Los pacientes pueden continuar con sus medicamentos antivirales).
7. Los pacientes pueden tener metástasis intracraneal de cualquier número si han sido irradiados en el cerebro y estables durante 6 semanas. Los pacientes pueden estar tomando medicamentos anticonvulsivos, pero no deben tomar esteroides.
8. El estado de rendimiento de Karnofsky debe ser ≥ 70.
9. Esperanza de vida de al menos 3 meses.
10. Los pacientes deben poder viajar al centro médico St. Luke's para las exploraciones PET.
11. Los datos de laboratorio iniciales requeridos incluyen:

Recuento absoluto de neutrófilos (ANC)	≥ 1.500/mm ³ [unidades SI 10 ⁹ /l]
Plaquetas	≥ 75.000/mm ³ [unidades SI 10 ⁹ /l]
Hemoglobina	≥ 8,0 g/dl [unidades SI mmol/l]
Creatinina en suero	≤ 1,5 veces el límite superior de laboratorio normal

	(L-ULN)
Bilirrubina	≤ 2,0 mg/dl
Fosfatasa alcalina	≤ 5 veces el L-ULN
AST, ALT	≤ 5 veces el L-ULN
LDH	≤ 5 veces el L-ULN
Prueba de embarazo (mujeres en edad fértil)	Negativo dentro de los 7 días de comenzar el protocolo

12. Consentimiento informado firmado que indica que conocen la naturaleza neoplásica de su enfermedad y han sido informados sobre los procedimientos a seguir, la naturaleza experimental de la terapia, las alternativas, los posibles beneficios, los efectos secundarios, los riesgos y las molestias.

5 13. Dispuesto/a y capaz de cumplir con las visitas programadas, el plan de tratamiento y las pruebas de laboratorio.

La presencia de cualquiera de los siguientes excluirá un tema de la inscripción en el estudio

1. Terapia simultánea con cualquier tratamiento contra el cáncer, incluido cualquier otro agente en investigación.
- 10 2. Edema intracraneal conocido o CVA dentro de las 6 semanas posteriores a la selección.
3. Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia. Las mujeres deben estar de acuerdo en usar un método anticonceptivo efectivo, deben ser quirúrgicamente estériles o deben ser posmenopáusicas. Los hombres deben aceptar el uso de métodos anticonceptivos efectivos o ser estériles quirúrgicamente. La definición de anticoncepción efectiva se basará en el juicio del investigador o de un asociado designado. Todas las mujeres en riesgo deben tener
- 15 una prueba de embarazo negativa dentro de los 7 días anteriores al inicio del tratamiento del estudio.
4. Enfermedad cardíaca clínicamente significativa (New York Heart Association, clase III o IV)
5. Demencia o estado mental alterado que prohibiría el consentimiento informado.
6. Otra condición médica o psiquiátrica grave, aguda o crónica o anomalía de laboratorio que puede aumentar el riesgo asociado con la participación en el estudio o la administración del fármaco de estudio o puede interferir con la
- 20 interpretación de los resultados del estudio y, a juicio del investigador principal, podría hacer que el sujeto no fuera adecuado para este estudio.
7. Efectos secundarios conocidos de los antivirales en la clase de ganciclovir.
8. Pacientes que se sabe que son VIH positivos.
9. El paciente no debe tomar esteroides en el momento de la selección.

25

Justificación de la dosis inicial y el programa

Reximmune-C se ha administrado en 16 pacientes en un intervalo de 1,0, 2,0 o 3,0 x 10¹⁰ ufc (niveles de dosis I, II, III, respectivamente, en el día 3 del ciclo). No hubo toxicidad limitante de la dosis en ningún nivel de dosis. Se

30 informaron eventos adversos no relacionados para los 16 pacientes en el estudio, pero el número de eventos fue bajo (en la mayoría de los casos 1 o 2 apariciones por término preferido), y la mayoría fueron de grado 1 o 2. Los eventos adversos no graves relacionados se produjeron en 2 pacientes y ambos fueron de grado 2. Cuatro pacientes experimentaron eventos adversos graves, los cuales se consideraron no relacionados con el fármaco del estudio. El ensayo se cerró antes de determinar la dosis óptima y el programa de Reximmune-C. En este ensayo, el

35 nuevo ensayo Genevieve-2, la dosificación inicial se basará en la toxicología de 21 días y en el estudio HSV-TK-m1. La dosificación futura continuará usando partículas virales totales (TVP), que es una medida más precisa del título que las ufc por ml.

El programa se basa en el razonamiento de que la exposición a Reximmune-C2 no transduce todas las células tumorales. Por lo tanto, a los pacientes se les administrará la dosis tres veces en un ciclo durante un periodo de 5

40 días.

El tiempo entre la exposición a GDS y la expresión de HSV-TK-m2 (y hGM-CSF) se estima que es de 48 a 72 horas. Por lo tanto, 72 horas después de la tercera dosis de Reximmune-C2, se iniciará valganciclovir. La dosis (que se

45 ajustará para la función renal) se administrará a niveles de dosis antivirales convencionales. Debido a la toxicidad potencial del valganciclovir y las observaciones publicadas de que 5 días de ganciclovir deberían ser suficientes para destruir la mayoría de las células que contienen HSV-TK-m2, se eligieron 5 días de tratamiento. Debido a la toxicidad potencial tanto de Reximmune-C2 como de valganciclovir, esto será seguido por un receso farmacológico de aproximadamente 9 días. El hGM-CSF puede estar en concentraciones suficientes en el momento de la adición

50 de valganciclovir para influir en la presentación de cualquier antígeno asociado al tumor (TAA) que puede aparecer durante la apoptosis de las células tumorales.

Se tomarán muestras de plasma después de la primera y tercera dosis en el ciclo uno y después de la primera dosis

en el ciclo dos para farmacocinética.

Como la distribución es principalmente al hígado, las toxicidades se controlarán cuidadosamente allí y debido a las implicaciones, la médula ósea.

5

Este protocolo clínico exige la administración de Reximmune-C2 mediante infusión intravenosa a pacientes con tumores malignos avanzados, ya sea hepatocelulares primarios o tumores metastáticos al hígado. Habrá dos partes: fase IA (aumento de la dosis 3 dosis/semana cada tres semanas) y fase IB (preselección después de una dosis de Reximmune-C2 y una exploración [¹⁸F]FHBG. Si la exploración PET es positiva, el paciente continuará con el estudio. Si la exploración PET es negativa, el paciente recibirá 5 días de valganciclovir y no continuará en el ensayo.

10

Para la fase IA, el aumento de la dosis seguirá un diseño de titulación acelerada, incorporando tres pacientes por nivel de dosis hasta que se observe un caso de DLT o dos casos de toxicidades de NCI-CTC de grado 2 atribuidas al fármaco del estudio (excepto náuseas/vómitos, fatiga, anorexia, alopecia o anemia). Posteriormente, la dosificación en el protocolo clínico seguirá un programa modificado de Fibonacci hasta que se alcancen las toxicidades limitantes de la dosis. Posteriormente, la dosificación en el protocolo clínico seguirá un programa modificado de Fibonacci hasta que se alcancen las toxicidades limitantes de la dosis.

15

Diseño de prueba

20 Este es un ensayo de fase 1, sin enmascaramiento, de cuatro centros que aumenta la dosis. La dosis aumentará hasta que se observe la DLT y se defina la MTD.

Reximmune-C2 se administrará como una infusión IV durante 15 a 60 minutos. Se anticipa que 33-70 pacientes serán tratados durante el curso del estudio.

25

Para la fase IA, la dosis de Reximmune-C2 se aumentará desde $6,0 \times 10^{11}$ TVP. En la fase de aumento acelerado de la dosis, se incluirán cohortes de tres pacientes en cada nivel de dosis. El aumento de la dosis será del 100 % hasta que se observe una DLT o dos CTC de grado 2 o mayor toxicidad. Cuando finaliza el aumento acelerado de la dosis, el aumento de la dosis para un paciente nuevo en el aumento de la dosis convencional seguirá un esquema de Fibonacci modificado (es decir, incrementos de dosis del 67 %, 50 %, 40 %, 33 % y 25 %). Se inscribirá un mínimo de tres pacientes por nivel de dosis. Para la fase IB, la dosis de Reximmune-C2 será la RP2D. DLT será evaluada. Si se observa una DLT en ≥ 2 de cada seis pacientes a un nivel de dosis, no habrá un aumento de dosis adicional; Este nivel de dosis definirá la dosis máxima administrada (MAD).

30

35 La dosis justo por debajo de la MAD será considerada la MTD. Una vez que se define la MTD, este nivel de dosis se puede ampliar a un máximo de doce pacientes para caracterizar aún más los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos y la idoneidad como una dosis recomendada para los estudios clínicos de fase 2.

Tratamiento de pacientes

40

Solo el personal cualificado que esté familiarizado con los procedimientos que minimizan la exposición indebida a sí mismos y al medio ambiente debe llevar a cabo la preparación, el manejo y la eliminación segura de los agentes bioterapéuticos en un entorno adecuado.

45 Reximmune C2 es una partícula retrovector incompetente de replicación murina de Moloney que contiene los genes que codifican un HSV-TK-m2 y hGM-CSF. El medicamento contiene DMEM (bajo contenido de glucosa), partículas retrovectoras RD, L-glutamina, piruvato de sodio, albúmina de suero humano, ácido n-butírico, Pulmozyme®, magnesio y otros excipientes.

50 El medicamento está disponible en un tamaño de vial: viales de vidrio transparente tipo 1 de 30 ml con un acabado de 20 mm (que contiene 25 ml de $\geq 1,0 \times 10^{10}$ TVP). Los viales se cierran con tapones de suero recubiertos de teflón de 20 mm y tapas abatibles lacadas sobrepuestas de 20 mm.

Reximmune-C2 se administrará por vía intravenosa mediante una bomba de infusión durante 15 minutos hasta un volumen de 100 ml, de > 100 ml a 200 ml durante 30 minutos, de > 200 ml a 300 ml durante 45 minutos y de > 300 ml a 400 ml durante 60 minutos. Los volúmenes de más de 400 ml se administrarán a una velocidad determinada por el investigador y el monitor médico de Gleneagles. Una vez que se haya identificado la MTD para el programa, la hora de administración se puede cambiar, si está indicado (y según lo acordado entre el investigador y el monitor médico de Gleneagles).

60

El valganciclovir se administra por vía oral y se debe tomar con alimentos. La creatinina en suero o los niveles de aclaramiento de creatinina deben controlarse cuidadosamente. Se requiere un ajuste de la dosificación basado en el aclaramiento de creatinina como se muestra en la tabla a continuación. La dosis de valganciclovir puede comenzar el día 7 a 9 del ciclo, pero debe administrarse durante 5 días consecutivos.

5

El aclaramiento de creatinina se puede calcular a partir de la creatinina en suero mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Para hombres} = \frac{(140 - \text{edad}[\text{años}]) \times (\text{peso corporal} [\text{kg}])}{(72 \times (0,011 \times \text{creatinina en suero} [\text{micromol/l}]))}$$

10

$$\text{Para mujeres} = 0,85 \times \text{valor masculino}$$

Tabla I. Dosificación de valganciclovir para pacientes con insuficiencia renal

Cr (ml/min)	CL	Dosis día 1	Dosis días 2-5
≥60 ml/min		900 mg (dos comprimidos de 450 mg) dos veces al día	900 mg (dos comprimidos de 450 mg) una vez al día
40-59 ml/min		450mg dos veces al día	450mg una vez al día
25-39 ml/min		450mg	450 mg día 3 y día 5
10-24 ml/min		450mg	450 mg día 4
<10 ml/min		No recomendado	No recomendado

El objetivo del estudio de la fase 1 es establecer la MTD, la DLT, la seguridad y un RP2D del agente en investigación. Por lo tanto, los efectos tóxicos son el criterio de valoración del estudio y se evaluarán de forma continua. Se obtendrá información de respuesta si los pacientes tienen una enfermedad que se puede medir y volver a evaluar fácilmente. Estas evaluaciones se harán con cada ciclo. Además, se debe anotar una respuesta entre dos exámenes con al menos 6 semanas de diferencia con el fin de que se documente como una respuesta confirmada al tratamiento.

20

- Evaluable para la toxicidad: todos los pacientes serán evaluables para su toxicidad si reciben algún fármaco del estudio.
- Evaluable para la respuesta: todos los pacientes que hayan recibido al menos un solo ciclo de tratamiento y hayan tenido una reevaluación del tumor serán considerados evaluables para la respuesta. Además, aquellos pacientes que desarrollen una enfermedad progresiva temprana también serán considerados evaluables para la respuesta. A los pacientes en terapia durante al menos dos ciclos de tratamiento se les evaluará su respuesta.

25

La determinación de la eficacia antitumoral se basará en las evaluaciones objetivas de tumores realizadas de acuerdo con el sistema de criterios de respuesta inmune (irRC). y las decisiones de tratamiento del investigador se basarán en estas evaluaciones.

30

Dada la presencia del transgén GM-CSF en Reximmune-C2 y la posibilidad de que una respuesta inmune contribuya al efecto del tumor, los criterios de respuesta inmune se utilizarán para la respuesta clínica. Las razones para usar los criterios de respuesta inmune frente a RECIST 1.1 son las siguientes: (1) la aparición de una actividad antitumoral medible puede llevar más tiempo para las terapias inmunitarias que para las terapias citotóxicas; (2) las respuestas a la terapia inmunitaria se producen después de la PD convencional; (3) la interrupción de la terapia inmunitaria puede no ser adecuada en algunos casos, a menos que se confirme la PD (como suele hacerse para la respuesta); (4) se recomienda una PD "clínicamente insuficiente" (por ejemplo, nuevas lesiones pequeñas en presencia de otras lesiones sensibles); y (5) la SD duradera puede representar actividad antitumoral.

35

Las comparaciones entre RECIST 1.1 y los criterios de respuesta relacionados con la inmunidad se enumeran a continuación:

40

Tabla II. Comparación de WHO RECIST y los criterios de respuesta relacionados con la inmunidad

	WHO	irRC
Nuevas lesiones medibles (es decir, 5 x 5 mm)	Representar siempre PD	Incorporado en la carga tumoral
Nuevas lesiones no medibles (es decir, < 5 x 5 mm)	Representar siempre PD	No definir la progresión (pero excluir irCR)
Lesiones no indexadas	Los cambios contribuyen a la definición BOR de CR, PR, SD y PD	Contribuir a la definición de irCR (se requiere desaparición completa)
CR	Desaparición de todas las lesiones en dos observaciones consecutivas de no menos de 4 semanas de diferencia.	Desaparición de todas las lesiones en dos observaciones consecutivas de no menos de 4 semanas de diferencia.
PR	≥ 50 % de disminución en la SPD de todas las lesiones del índice en comparación con el valor inicial en dos observaciones de al menos 4 semanas de diferencia, en ausencia de nuevas lesiones o progresión inequívoca de lesiones sin índice.	≥ 50 % de disminución en la carga tumoral en comparación con el valor inicial en dos observaciones de al menos 4 semanas de diferencia
SD	No se puede establecer una disminución del 50 % en la SPD en comparación con el valor inicial ni un aumento del 25 % en comparación con el nadir, en ausencia de nuevas lesiones o la progresión inequívoca de lesiones no indexadas.	No se puede establecer una disminución del 50 % en la carga tumoral en comparación con el valor inicial ni un aumento del 25 % en comparación con el nadir
PD	Al menos un aumento del 25 % en la SPD en comparación con el nadir y/o la progresión inequívoca de lesiones no indexadas y/o la aparición de nuevas lesiones (en cualquier momento).	Al menos un aumento del 25 % en la carga tumoral en comparación con el nadir (en cualquier momento) en dos observaciones consecutivas de al menos 4 semanas de diferencia

Tiempo y tipo de evaluaciones

- 5 Todas las evaluaciones de tumores basadas en la formación de imágenes basales deben realizarse dentro de los 14 días anteriores al inicio del tratamiento. Para los fines de este estudio, todas las evaluaciones de tumores de los pacientes deben volver a evaluarse comenzando 9 semanas después del inicio del tratamiento y cada 6 semanas después (por ejemplo, semana 9, semana 15, semana 21, etc.) para la fase IA y la fase IB. Todos los pacientes con tumores respondedores (irCR o irPR) deben tener la respuesta confirmada no menos de 6 semanas después de la
- 10 primera documentación de la respuesta. Todos los pacientes con progresión tumoral deben tener confirmada la progresión no menos de 6 semanas después de la primera documentación de la progresión.

Se debe usar el mismo procedimiento de evaluación y la misma técnica para caracterizar cada lesión identificada e informada al inicio y durante el seguimiento. La evaluación basada en la formación de imágenes se prefiere a la

15 evaluación por examen clínico cuando ambos procedimientos se han usado para evaluar el efecto antitumoral del tratamiento. Todas las medidas deben ser registradas en notación métrica.

CT y CT/PET son los procedimientos para la evaluación de tumores. La CT convencional debe realizarse con cortes de 10 mm o menos de espesor de corte de forma contigua. La CT espiral debe realizarse usando un algoritmo de

20 reconstrucción contiguo de 5 mm. Esto se aplica al pecho, el abdomen y la pelvis.

La CT de tórax se usará para la evaluación de las lesiones pulmonares.

Las lesiones clínicas solo se considerarán mensurables cuando son superficiales (por ejemplo, nódulos cutáneos, ganglios linfáticos palpables). En el caso de las lesiones cutáneas, se recomienda la documentación mediante fotografía en color que incluya una regla para estimar el tamaño de la lesión.

Se obtendrán exploraciones [¹⁸F]FHBG PET-CT después de que el paciente reciba las tres primeras dosis de Reximmune-C2 (ciclo 1) en la fase IA y después de la dosis de detección de Reximmune-C2 en la fase IB. En la fase IA, se pueden obtener exploraciones [¹⁸F]FHBG PET-CT adicionales en ciclos posteriores a discreción del investigador y con la aprobación del monitor médico.

El ultrasonido no debe usarse para medir lesiones tumorales que no son fácilmente accesibles para la evaluación de la respuesta objetiva, por ejemplo, lesiones viscerales. Es una posible alternativa a las mediciones clínicas de ganglios palpables superficiales, lesiones SC y nódulos tiroideos. El ultrasonido también podría ser útil para confirmar la desaparición completa de las lesiones superficiales que generalmente se evalúan mediante un examen clínico.

La endoscopia, la laparoscopia y la exploración con radionúclidos no deben usarse para la evaluación de la respuesta.

Todos los archivos e imágenes radiológicas de los pacientes deben estar disponibles para la verificación de la fuente y pueden enviarse para su revisión externa para la evaluación final de la actividad antitumoral.

Quantificabilidad de las lesiones tumorales

Al inicio, el investigador clasificará las lesiones tumorales como medibles o no medibles según los criterios que se describen a continuación:

- Medible: lesiones que se pueden medir con precisión en al menos una dimensión (diámetro más largo a registrar) como ≥ 20 mm con técnicas convencionales o como ≥ 10 mm con exploración CT en espiral. Las lesiones clínicas solo se considerarán mensurables cuando son superficiales (por ejemplo, nódulos cutáneos, ganglios linfáticos palpables).
- No medible: todas las demás lesiones, incluidas las lesiones pequeñas (diámetro más largo <20 mm con técnicas convencionales o <10 mm con exploración CT en espiral) y lesiones óseas, enfermedad leptomenígea, ascitis, derrames pleurales o pericárdicos, linfangitis de la piel o el pulmón, masas abdominales que no están confirmadas y seguidas por técnicas de formación de imagen, lesiones quísticas, lesiones previamente irradiadas y enfermedad documentada solo por evidencia indirecta (por ejemplo, mediante pruebas de laboratorio como la fosfatasa alcalina).

NOTA: Citología e histología: si la enfermedad medible se restringe a una lesión solitaria, su naturaleza neoplásica debe confirmarse mediante citología/histología.

La respuesta al tratamiento también puede evaluarse mediante una revisión a ciegas radiológica central e independiente.

Registro de las mediciones del tumor

Todas las lesiones medibles hasta un máximo de 10 lesiones, representativas de todos los órganos involucrados, deben identificarse como lesiones objetivo y deben medirse y registrarse al inicio y en los intervalos estipulados durante el tratamiento. Las lesiones objetivo deben seleccionarse en función de su tamaño (lesión con los diámetros más largos) y su idoneidad para mediciones repetitivas precisas (ya sea mediante técnicas de formación de imágenes o clínicamente).

El diámetro más largo se registrará para cada lesión objetivo. La suma del diámetro más largo para todas las lesiones objetivo se calculará y se registrará como el valor inicial. La suma de los diámetros más largos debe usarse como referencia para caracterizar aún más la respuesta tumoral objetiva de la dimensión medible de la enfermedad durante el tratamiento. Todas las medidas deben registrarse en notación métrica en centímetros.

Todas las demás lesiones (o sitios de la enfermedad) deben identificarse como lesiones no objetivo y también deben registrarse al inicio. No se requieren mediciones y estas lesiones deben seguirse como "presentes" o "ausentes".

Definiciones de respuesta tumoral

Se seguirán los criterios de los criterios de respuesta relacionados con la inmunidad para evaluar la respuesta del tumor.

5

Determinación de la respuesta global según los criterios de respuesta relacionados con la inmunidad

Lesiones objetivo para tumores sólidos

10 • Respuesta completa (irCR) se define como la desaparición de todas las lesiones (ya sean medibles o no, y no hay nuevas lesiones); confirmación por repetición, evaluación consecutiva no menos de 6 semanas a partir de la fecha en que se documentó por primera vez.

Respuesta parcial (irPR) se define como una disminución de > 50 % en la carga tumoral en relación con el valor inicial confirmada por una evaluación consecutiva al menos 6 semanas después de la primera documentación

15 Enfermedad progresiva (irPD) se define como un aumento de > 25 % en la carga tumoral en relación con el nadir (carga tumoral mínima registrada) confirmada por una repetición, evaluación consecutiva no menos de 6 semanas a partir de la fecha en que se registraron las primeras lesiones documentadas desde el inicio del tratamiento, o la aparición de una o más lesiones nuevas.

Enfermedad estable (irSD) se define como que no cumple con los criterios para irCR o irPR, en ausencia de irPD.

20

Lesiones no objetivo para tumores sólidos

La confirmación citológica del origen neoplásico de cualquier derrame que aparece o empeora durante el tratamiento cuando el tumor medible cumple con los criterios de respuesta o irSD es obligatoria para diferenciar entre respuesta o irSD e irPD.

25

Confirmación de la respuesta del tumor

Para que se le asigne un estado de irPR o irCR, los cambios en las mediciones de tumores en pacientes con tumores de respuesta deben confirmarse mediante estudios de repetición que deben realizarse \geq 6 semanas después de que se cumplen los criterios de respuesta. En el caso de la IRSD, las mediciones de seguimiento deben haber cumplido con los criterios de irSD al menos una vez después de ingresar al estudio en un intervalo mínimo de 6 semanas. Cuando están presentes lesiones objetivo y no objetivo, las evaluaciones individuales se registrarán por separado. La evaluación global de la respuesta implicará todos los parámetros como se muestra en la Tabla III.

35

La mejor respuesta global es la mejor respuesta registrada desde el inicio del tratamiento hasta la progresión/recurrencia de la enfermedad (tomando como referencia para la progresión del tumor las mediciones más pequeñas registradas desde que comenzó el tratamiento). La mejor asignación de respuesta del paciente dependerá del logro de los criterios de medición y confirmación.

40

Los pacientes se definirán como no evaluables (NE) para la respuesta si no hay una evaluación oncológica posterior a la aleatorización. Estos pacientes se considerarán como fallas en el análisis de los datos de respuesta tumoral.

Evaluación de la eficacia clínica: estado de rendimiento.

45

Los pacientes se clasificarán de acuerdo con la escala de estado de rendimiento de Karnofsky como se describe en la Tabla IV.

Tabla IV. Criterios de estado de rendimiento de Karnofsky

Grado	Criterio
100	Normal, sin quejas, no hay muestra de enfermedad
90	Capaz de llevar a cabo una actividad normal, signos o síntomas leves de enfermedad
80	Actividad normal con esfuerzo, algunos signos o síntomas de enfermedad
70	Autoasistencia. Incapaz de realizar actividades normales o hacer trabajo activo
60	Requiere asistencia ocasional, pero puede atender la mayoría de sus necesidades
50	Requiere asistencia considerable y atención médica frecuente
40	Discapacitado, requiere atención y asistencia especial
30	Muy discapacitado, la hospitalización está indicada aunque la muerte no es

	inminente.
20	Hospitalización necesaria, muy enferma, tratamiento de apoyo activo necesario
10	Los procesos moribundos, fatales progresan rápidamente
0	Muerte

Respuesta del marcador tumoral

Procedimiento de evaluación

5 Si bien no es una medida de eficacia completamente validada en muchos tumores malignos, las determinaciones en serie de marcadores tumorales pueden permitir la evaluación de una herramienta clínica de bajo costo, fácil manejo y cuantitativa como un posible medio adicional para seguir el curso de la enfermedad durante el tratamiento.

10 Una disminución o aumento del marcador tumoral no se evaluará como una medida objetiva del resultado. En particular, un valor de marcador tumoral en aumento no se considerará en la definición de progresión tumoral, pero debería provocar una evaluación radiográfica repetida para documentar si se ha producido o no una progresión tumoral radiográfica.

15 Definiciones de criterios de valoración calculados

La supervivencia se define como el tiempo desde la fecha del primer tratamiento farmacológico del estudio hasta la fecha de la muerte. En ausencia de confirmación de muerte, el tiempo de supervivencia se censurará en la última fecha de seguimiento.

20 La tasa de respuesta tumoral se define como la proporción de pacientes con evidencia de irCR o irPR objetiva.

TTP se define como el tiempo desde el tratamiento hasta la primera documentación confirmada de la progresión del tumor o la muerte por cualquier causa. Para los pacientes que no tienen evidencia objetiva de progresión tumoral y que se retiraron del tratamiento del estudio o recibieron un tratamiento antitumoral distinto del tratamiento del estudio, se censurará la TTP. Un aumento del marcador tumoral que cumpla con los criterios para la progresión del marcador tumoral no constituye evidencia objetiva adecuada de la progresión tumoral. Sin embargo, dicho aumento del marcador tumoral debería inducir a una evaluación radiográfica repetida para documentar si se ha producido una progresión objetiva del tumor.

30 TTF se define como el tiempo desde el tratamiento hasta la primera documentación confirmada de la progresión del tumor, o desde la fecha fuera del tratamiento o hasta la muerte por cualquier causa, lo que ocurra primero. Los pacientes que todavía están en tratamiento en el momento del análisis y los pacientes que son retirados de la terapia por sus médicos durante una respuesta objetiva y que, en la fecha del tratamiento no tienen evidencia de progresión objetiva del tumor, no se considerará que hayan experimentado fracaso del tratamiento, a menos que la retirada se deba a la aparición de un evento médico. Para estos pacientes, el TTF será censurado en la fecha fuera del estudio. También se realizará una censura por TTF en aquellos pacientes que reciben tratamiento antitumoral, que no sea el tratamiento del estudio, antes de la primera progresión objetiva del tumor, la fecha fuera del estudio o la muerte. Un aumento del marcador tumoral que cumpla con los criterios para la progresión del marcador tumoral no constituye evidencia objetiva adecuada de fracaso del tratamiento. Sin embargo, dicho aumento del marcador tumoral debería inducir a una evaluación radiográfica repetida para documentar si se ha producido o no una progresión objetiva del tumor (y, por lo tanto, un fracaso del tratamiento).

45 El tiempo hasta el primer empeoramiento del estado de rendimiento definitivo es el tiempo desde el tratamiento hasta la última vez que el estado de rendimiento no fue peor que en el valor inicial o hasta la muerte, debido a cualquier causa, en ausencia de documentación previa de empeoramiento del estado de rendimiento definitivo. Para los pacientes que no tienen un empeoramiento del estado de rendimiento definitivo y que se retiraron del estudio o se les administró un tratamiento antitumoral que no sea el tratamiento de estudio, se censurará el empeoramiento del estado de rendimiento definitivo.

50 El tiempo hasta la primera pérdida de peso definitiva se define como el tiempo desde el tratamiento hasta la última vez que la disminución del porcentaje de peso desde el inicio fue <5 % o hasta la muerte debido a cualquier causa en ausencia de documentación previa de pérdida de peso definitiva. Para los pacientes que no tienen una pérdida de peso definitiva y que se retiraron del estudio o se les administró un tratamiento antitumoral que no sea el tratamiento de estudio, se censurará la pérdida de peso definitiva.

Las evaluaciones adicionales de los datos pueden incluir la mejor respuesta objetiva, la tasa de respuesta objetiva confirmada y no confirmada, la duración del tratamiento del estudio, el tiempo hasta la primera aparición de nuevas lesiones, el tiempo hasta la respuesta del tumor, la enfermedad estable a las 24 semanas y la tasa de supervivencia sin progresión a las 24 semanas. Los datos pueden ser evaluados por los criterios de RECIST 1.1, si es necesario.

5

Evaluación de la administración del tratamiento

Tanto para la fase IA como para IB: la intensidad de la dosis se define como la dosis total/ciclo multiplicado por el número de semanas entre el inicio del tratamiento y el último tratamiento más 13 días.

10

El porcentaje de intensidad relativa de la dosis se define como la proporción de la intensidad de la dosis real dividida por la intensidad de la dosis planificada para ese mismo período de tiempo.

ABREVIATURAS

15

ALT Alanina aminotransferasa
 ANC Recuento absoluto de neutrófilos
 AST Aspartato aminotransferasa
 AUC Área bajo la curva de concentración-tiempo de plasma

20

BSA Superficie corporal (mg/m²)
 CL Aclaramiento plasmático sistémico
 C_{max} Concentración plasmática máxima
 CR Respuesta completa
 CRF Formulario de informe de caso

25

CT Tomografía computarizada
 CTC Criterios comunes de toxicidad
 DLT Toxicidades limitativas de la dosis
 EOI Fin de la infusión
 FDA Administración de alimentos y medicamentos

30

G-CSF Factor estimulante de colonias de granulocitos (filgrastim, Neupogen®)
 GCP Buena práctica clínica
 GM-CSF Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (sargramostim, Leukine®)
 VIH Virus de la inmunodeficiencia humana
 HR Tasa de riesgo

35

IEC Comité de ética independiente
 ip intraperitoneal
 IRB Junta de Revisión Institucional
 IV intravenoso, por vía intravenosa
 LD₁₀ o dosis que es letal para el 10 % o 50 % de los animales

40

LD₅₀
 LDH Lactato deshidrogenasa
 MAD Dosis máxima administrada
 MRI Formación de imágenes por resonancia magnética
 MTD Dosis máxima tolerada

45

NCI Instituto nacional del cáncer
 NE No evaluable por respuesta tumoral
 NOAEL Nivel de efecto adverso no observado
 No-CR Respuesta no completa
 No-PD Enfermedad no progresiva

50

PBMC Células mononucleares de sangre periférica
 PCE Propilenglicol: Cremophor® EL: Etanol
 PD Enfermedad progresiva
 PR Respuesta parcial
 SAER-S Informe-estudio de eventos adversos graves

55

SC Subcutánea, por vía subcutánea
 SD Enfermedad estable
 STD₁₀ Dosis que es gravemente tóxica para el 10 % de los animales.
 TTP Tiempo de progresión
 TTF Tiempo de fracaso

60

T_½ Semivida

T_{max} Tiempo de concentración plasmática máxima.
 V_{ss} volumen de distribución en estado estable

Aunque las realizaciones preferidas se han mostrado y descrito en este documento, será obvio para los expertos en la materia que dichas realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo. A los expertos en la materia se les ocurrirán numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de las realizaciones descritas. Debe entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las realizaciones descritas en este documento para practicar las realizaciones. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de las realizaciones y que los procedimientos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes se incluyan de ese modo.

Bibliografía

1. Lentivirus-based DsRed-2-transfected pancreatic cancer cells for deep in vivo imaging of metastatic disease. Yu Z, Zhou J, Hoffman RM., *Methods Mol Biol.* 2012;872:69-83. doi: 10.1007/978-1-61779-797-2_5.
2. Color-coded real-time subcellular fluorescence imaging of the interaction between cancer and host cells in live mice. Yamauchi K, Tome Y, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Tsuchiya H, Tomita K, Bouvet M, Hoffman RM. *Anticancer Res.* 2012 Jan;32(1):39-43.
3. Lentivirus-based DsRed-2-transfected pancreatic cancer cells for deep in vivo imaging of metastatic disease. Zhou J, Yu Z, Zhao S, Hu L, Zheng J, Yang D, Bouvet M, Hoffman RM. *J Surg Res.* 2009 Nov;157(1):63-70. doi: 10.1016/j.jss.2008.08.027. Epub 2008 Oct 9.
4. Fluorescent LYVE-1 antibody to image dynamically lymphatic trafficking of cancer cells in vivo. McElroy M, Hayashi K, Garmy-Susini B, Kaushal S, Varner JA, Moossa AR, Hoffman RM, Bouvet M. *J Surg Res.* 2009 Jan;151(1):68-73. doi: 10.1016/j.jss.2007.12.769. Epub 2008 Jan 18.
5. Lentiviral reporter constructs for fluorescence tracking of the temporospatial pattern of Smad3 signaling. Stuelten CH, Kamaraju AK, Wakefield LM, Roberts AB. *Biotechniques.* 2007 Sep;43(3):289-90, 292, 294.
6. Subcellular imaging in the live mouse. Hoffman RM, Yang M. *Nat Protoc.* 2006;1(2):775-82.
7. In vivo color-coded imaging of the interaction of colon cancer cells and splenocytes in the formation of liver metastases. Bouvet M, Tsuji K, Yang M, Jiang P, Moossa AR, Hoffman RM. *Cancer Res.* 2006 Dec 1;66(23):11293-7.
8. Dual-color imaging of nuclear-cytoplasmic dynamics, viability, and proliferation of cancer cells in the portal vein area. Tsuji K, Yamauchi K, Yang M, Jiang P, Bouvet M, Endo H, Kanai Y, Yamashita K, Moossa AR, Hoffman RM. *Cancer Res.* 2006 Jan 1;66(1):303-6.
9. FL-CTL assay: fluorolysometric determination of cell-mediated cytotoxicity using green fluorescent protein and red fluorescent protein expressing target cells. Chen K, Chen L, Zhao P, Marrero L, Keoshkerian E, Ramsay A, Cui Y. *J Immunol Methods.* 2005 May;300(1-2):100-14.
10. Murine leukemia virus (MLV) replication monitored with fluorescent proteins. Sliva K, Erlwein O, Bittner A, Schnierle BS. *Virol J.* 2004 Dec 20;1:14.
11. Real-time whole-body imaging of an orthotopic metastatic prostate cancer model expressing red fluorescent protein. Yang M, Jiang P, Yamamoto N, Li L, Geller J, Moossa AR, Hoffman RM. *Prostate.* 2005 Mar 1;62(4):374-9.
12. Cellular dynamics visualized in live cells in vitro and in vivo by differential dual-color nuclear-cytoplasmic fluorescent-protein expression. Yamamoto N, Jiang P, Yang M, Xu M, Yamauchi K, Tsuchiya H, Tomita K, Wahl GM, Moossa AR, Hoffman RM. *Cancer Res.* 2004 Jun 15;64(12):4251-6.
13. In vivo imaging with fluorescent proteins: the new cell biology. Hoffman RM. *Acta Histochem.* 2004;106(2):77-87.
14. Real-time imaging of individual fluorescent-protein color-coded metastatic colonies in vivo. Yamamoto N, Yang M, Jiang P, Xu M, Tsuchiya H, Tomita K, Moossa AR, Hoffman RM. *Clin Exp Metastasis.* 2003;20(7):633-8.
15. Yaghoubi S, Barrio JR, Dahlbom M, Iyer M, Namavari M, Satyamurthy N, Goldman R, Herschman HR, Phelps ME, Gambhir SS. Human pharmacokinetic and dosimetry studies of [(18)F]FHBG: a reporter probe for imaging herpes simplex virus type-1 thymidine kinase reporter gene expression. *J Nucl Med.* 2001 Aug;42(8):1225-34.
16. Pañeda A, Collantes M, Beattie SG, Otano I, Snapper J, Timmermans E, Guembe L, Petry H, Lanciego JL, Benito A, Prieto J, Rodríguez-Pena MS, Peñuelas I, Gonzalez-Asequinolaza G. Adeno-associated virus liver transduction efficiency measured by in vivo [(18)F]FHBG positron emission tomography imaging in rodents and nonhuman primates. *Hum Gene Ther.* 2011 Aug;22(8):999-1009. doi: 10.1089/hum.2010.190. Epub 2011 Apr 6.
17. Johnson M, Karanikolas BD, Priceman SJ, Powell R, Black ME, Wu HM, Czernin J, Huang SC, Wu L. Titration of variant HSV1-tk gene expression to determine the sensitivity of [(18)F]FHBG PET imaging in a prostate tumor. *J Nucl Med.* 2009 May;50(5):757-64. doi: 10.2967/jnumed.108.058438. Epub 2009 Apr 16.
18. Peñuelas I, Mazzolini G, Boán JF, Sangro B, Martí-Climent J, Ruiz M, Ruiz J, Satyamurthy N, Qian C, Barrio JR, Phelps ME, Richter JA, Gambhir SS, Prieto J. Positron Emission Tomography Imaging of Adenoviral-Mediated Transgene Expression in Liver Cancer Patients *Gastro (2005)128:1787.*
19. Sangro B, Mazzolini G, Ruiz M, Ruiz J, Quiroga J, Herrero I, Qian C, Benito A, Larrache J, Olagüe C, Boan J, Peñuelas I, Sádaba B, Prieto J. A phase I clinical trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced

- hepatocellular carcinoma *Can. Gene Ther.* (2010) 17: 837-843.
20. Willmann JK, Paulmurugan R, Rodriguez-Porcel M, Stein W, Brinton TJ, Connolly AJ, Nielsen CH, Lutz AM, Lyons J, Ikeno F, Suzuki Y, Rosenberg J, Chen IY, Wu JC, Yeung AC, Yock P, Robbins RC, Gambhir SS. Imaging gene expression in human mesenchymal stem cells: from small to large animals. *Radiology.* 2009 Jul;252(1):117-27. doi: 10.1148/radiol.2513081616. Epub 2009 Apr 14. PubMed PMID: 19366903; PubMed Central PMCID: PMC2702468.
21. Yaghoubi SS, Jensen MC, Satyamurthy N, Budhiraja S, Paik D, Czernin J, Gambhir SS. Noninvasive detection of therapeutic cytolytic T cells with [18F]FHBG PET in a patient with glioma. *Nat Clin Pract Oncol.* 2009 Jan;6(1):53-8. doi: 10.1038/ncponc1278. Epub 2008 Nov 18. PubMed PMID: 19015650; PubMed Central PMCID: PMC3526373.
- 10 22. Roelants V, Labar D, de Meester C, Havaux X, Tabilio A, Gambhir SS, Di Ianni M, Bol A, Bertrand L, Vanoverschelde JL. Comparison between adenoviral and retroviral vectors for the transduction of the thymidine kinase reporter gene in rat mesenchymal stem cells. *J Nucl Med.* 2008 Nov;49(11):1836-44. doi: 10.2967/jnumed.108.052175. Erratum in: *J Nucl Med.* 2009 Jan;50(1):17. PubMed PMID: 18984872.
23. Lee SW, Padmanabhan P, Ray P, Gambhir SS, Doyle T, Contag C, Goodman SB, Biswal S. Stem cell-mediated accelerated bone healing observed with in vivo molecular and small animal imaging technologies in a model of skeletal injury. *J Orthop Res.* 2009 Mar;27(3):295-302. doi: 10.1002/jor.20736. PubMed PMID: 18752273.
- 15 24. Chin FT, Namavari M, Levi J, Subbarayan M, Ray P, Chen X, Gambhir SS. Semiautomated radiosynthesis and biological evaluation of [18F]FEAU: a novel PET imaging agent for HSV1-tk/sr39tk reporter gene expression. *Mol Imaging Biol.* 2008 Mar-Apr;10(2):82-91. Epub 2007 Dec 22. PubMed PMID: 18157580.
- 20 25. Yaghoubi SS, Gambhir SS. PET imaging of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk) or mutant HSV1-sr39tk reporter gene expression in mice and humans using [18F]FHBG. *Nat Protoc.* 2006;1(6):3069-75. PubMed PMID: 17406570.
26. Deroose CM, De A, Loening AM, Chow PL, Ray P, Chatzioannou AF, Gambhir SS. Multimodality imaging of tumor xenografts and metastases in mice with combined small-animal PET, small-animal CT, and bioluminescence imaging. *J Nucl Med.* 2007 Feb;48(2):295-303. PubMed PMID: 17268028; PubMed Central PMCID: PMC3263830.
- 25 27. Kim SJ, Doudet DJ, Studenov AR, Nian C, Ruth TJ, Gambhir SS, McIntosh CH. Quantitative micro positron emission tomography (PET) imaging for the in vivo determination of pancreatic islet graft survival. *Nat Med.* 2006 Dec;12(12):1423-8. Epub 2006 Dec 3. PubMed PMID: 17143277.
28. Yaghoubi SS, Couto MA, Chen CC, Polavaram L, Cui G, Sen L, Gambhir SS. Preclinical safety evaluation of [18F]FHBG: a PET reporter probe for imaging herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk) or mutant HSV1-sr39tk's expression. *J Nucl Med.* 2006 Apr;47(4):706-15. PubMed PMID: 16595506.
- 30 29. Xiong Z, Cheng Z, Zhang X, Patel M, Wu JC, Gambhir SS, Chen X. Imaging chemically modified adenovirus for targeting tumors expressing integrin alphavbeta3 in living mice with mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase PET reporter gene. *J Nucl Med.* 2006 Jan;47(1):130-9. PubMed PMID: 16391197.
- 35 30. Shu CJ, Guo S, Kim YJ, Shelly SM, Nijagal A, Ray P, Gambhir SS, Radu CG, Witte ON. Visualization of a primary anti-tumor immune response by positron emission tomography. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Nov 29;102(48):17412-7. Epub 2005 Nov 17. PubMed PMID: 16293690; PubMed Central PMCID: PMC1283986.
31. Sen L, Gambhir SS, Furukawa H, Stout DB, Linh Lam A, Laks H, Cui G. Noninvasive imaging of ex vivo intracoronarily delivered nonviral therapeutic transgene expression in heart. *Mol Ther.* 2005 Jul;12(1):49-57. PubMed PMID: 15963920.
- 40 32. Yaghoubi SS, Barrio JR, Namavari M, Satyamurthy N, Phelps ME, Herschman HR, Gambhir SS. Imaging progress of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase suicide gene therapy in living subjects with positron emission tomography. *Cancer Gene Ther.* 2005 Mar;12(3):329-39. PubMed PMID: 15592447.
33. Miyagawa M, Anton M, Haubner R, Simoes MV, Stadele C, Erhardt W, Reder S, Lehner T, Wagner B, Noll S, Noll B, Grote M, Gambhir SS, Gansbacher B, Schwaiger M, Bengel FM. PET of cardiac transgene expression: comparison of 2 approaches based on herpesviral thymidine kinase reporter gene. *J Nucl Med.* 2004 Nov;45(11):1917-23. PubMed PMID: 15534063.
- 45 34. Green LA, Nguyen K, Berenji B, Iyer M, Bauer E, Barrio JR, Namavari M, Satyamurthy N, Gambhir SS. A tracer kinetic model for [18F]FHBG for quantitating herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene expression in living animals using PET. *J Nucl Med.* 2004 Sep;45(9):1560-70. PubMed PMID: 15347725.
- 50 35. Wu JC, Chen IY, Wang Y, Tseng JR, Chhabra A, Salek M, Min JJ, Fishbein MC, Crystal R, Gambhir SS. Molecular imaging of the kinetics of vascular endothelial growth factor gene expression in ischemic myocardium. *Circulation.* 2004 Aug 10;110(6):685-91. PubMed PMID: 15302807.
36. Su H, Forbes A, Gambhir SS, Braun J. Quantitation of cell number by a positron emission tomography reporter gene strategy. *Mol Imaging Biol.* 2004 May-Jun;6(3):139-48. PubMed PMID: 15193248.
- 55 37. Chen IY, Wu JC, Min JJ, Sundaresan G, Lewis X, Liang Q, Herschman HR, Gambhir SS. Micro-positron emission tomography imaging of cardiac gene expression in rats using bicistronic adenoviral vector-mediated gene delivery. *Circulation.* 2004 Mar 23;109(11):1415-20. Epub 2004 Mar 8. PubMed PMID: 15007006.
38. Sundaresan G, Paulmurugan R, Berger F, Stiles B, Nagayama Y, Wu H, Gambhir SS. MicroPET imaging of Cre-loxP-mediated conditional activation of a herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene. *Gene Ther.*
- 60

- 2004 Apr;11(7):609-18. PubMed PMID: 14724687.
39. Green LA, Yap CS, Nguyen K, Barrio JR, Namavari M, Satyamurthy N, Phelps ME, Sandgren EP, Herschman HR, Gambhir SS. Indirect monitoring of endogenous gene expression by positron emission tomography (PET) imaging of reporter gene expression in transgenic mice. *Mol Imaging Biol.* 2002 Jan;4(1):71-81. PubMed PMID: 14538050.
- 5 40. Ghosh P. Reproducible quantification in PET-CT: Clinical relevance and technological approaches. White Paper Siemens (February 2012).
41. Shankar L.K. et al. Consensus recommendations for the use of 18F-FDG as an indicator of therapeutic response in National Cancer Institute trials. *J. Nucl. Med.* 2006 June; 47:1059-66.
- 10 42. Bar-Shir A. et al. Transforming thymidine into a magnetic resonance imaging probe for gene expression. *J. Am. Chem. Soc.* 2013 Jan; 135:1617-24.
43. Muller U. et al. Synthesis and pre-clinical evaluation of a new C-6 alkylated pyrimidine derivative as a PET imaging agent for HSV1-tk gene expression. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2013; 3:71-84.
44. Mescic A. et al. C-5 hydroxyethyl and hydroxypropyl acyclonucleosides as substrates for thymidine kinase of Herpes simplex virus type 1 (HSV-1 TK): Syntheses and biological evaluation. *Molecules* 2013; 18:5104-24.
- 15

SECUENCIAS

20 SEQ ID NO: 1: secuencia de nucleósidos HSV1-TK de tipo silvestre

atggccttcgtacccccggccatcaaacacgcgtctcgcgttcgaccaggctgcgcgcttctcgcggcc
atagcaaccgacgtaacggcgttgccgctcgcgcgagcaagaagccacggaagtccgccccgga
gcagaaaatgcccacgctactgcccgggtttatatagacgggtccccacgggatggggaaaaccacc
accacgcaactgctggtggccctgggttcgcgcgacgatatcgtctacgtaccgcgacgatga
cttactggcgggtgctgggggcttccgagacaatcgcgaacatctacaccacacaacaccgct
cgaccagggtgagatatcggccggggacgcggcgggtggtaatgacaagcgcgccagataacaatg
ggcatgccttatgcccgtgaccgacgcgcgttctggctcctcatatcgggggggaggctgggagct
cacatgccccgccccggccctcaccctcatcttcgaccgccatcccatcgcgcgcctcctgtg
ctaccggcgcgcggtaccttatgggcagcatgacccccaggcctgctggcgttcgtggcc
ctcatcccgcgaccttgcccggcaccacatcgtgcttggggcccttccggaggacagacaca
tcgaccgcctggccaaaacgcccagcgcccccggcgagcggctggacctggctatgctggctgcgat
tcgcccgcgtttaacgggctacttgccaatacgggtgcgggtatctgcagtgccggcgggtcgtggcgg
gaggactggggacagcttccggggacggcctgcccgcgccaggggtgcccagcggcggcagcaacg
cgggcccacgacccccatcggggacacgcttatccctgttccgggcccccgagttgctggc
ccccaacggcgacctgtataacgtgcttggcctgggacctggacgtcttggccaaaacgctccgt
tccatgcacgtctttatcctggattacgaccaatcgcgcccggtgcccgggacgcctgctgc
aacttacctccgggatggtccagaccacgctcaccacccccggctccataaccgacgatatgcga
cctggcgcgcacgcttgcggggagatgggggaggctaactga

SEQ ID NO: 2: secuencia de aminoácidos HSV1-TK de tipo silvestre

MASYPGHQHASAFDQAARSRGHSNRRTALRPRRQQEATEVRPEQKMPTLLRVYIDGPHGMGKTT
TTQLLVALGSRDDIVY
VPEPMTYWRVLGASETIANIYTTQHRLDQGEISAGDAAVVM TSAQITMGMPYAVTDAVLAPHIG
GEAGSSHAPPPALTLI
FDRHP IAALLCYPAARYLMGSMT PQAVLAFVALI PPTLPGTNIVLGALPEDRHIDRLAKRQRP
ERLDLAMLAAIRRVYG
LLANTVRYLQCGGSWREDWGQLSGTAVPPQGAEPQSNAGPRPHIGDTLFTLFRAPPELLAPNGDL
YNVFAWALDVLAKRLR
SMHVFILDYDQSPAGCRDALLQLTSGMVQTHVTTPGSIPTICDLARTFAREMGEAN

SEQ ID NO: 3: HSV-TK en Reximmune-C HSV-TK; mutante SR 39 y mutación R25G-R26S de NLS

atggcctcgtaccccggccatcaacacgcgtctcgcgttcgaccaggctgcgcggttctcgcggcc
atagcaacggatccacggcggttgccgctcgcggcagcaagaagccacgggaagtccgcccggga
gcagaaaatgcccacgctactgcggtttatatagacgggtccccacgggatggggaaaaccacc
accacgcaactgctggtggccctgggttcgcgcgacgatatcgtctacgtacccgagccgatga
cttactggcggtgctgggggcttcgagacaatcgcgaacatctacaccacacaacaccgct
cgaccagggtgagatatcgcccggggacgcggcggtggtaatgacaagcggccagataacaatg
ggcatgccttatgccgtgaccgacgcccgttctggctcctcatatcgggggggaggctgggagct
cacatgccccgccccggccctcaccatcttctcgcaccgccaatcccatcgccttcatgctgtg
ctacccggccgcgcggtaccttatgggcagcatgacccccaggccgctgctggcggttcgtggcc
ctcatcccgcgaccttgcccggcacaacatcgtgctggggcccttcgggaggacagacaca
tcgaccgcctggccaaacgccagcgcgcccgggcgagcggctggacctggctatgctggctgcgat
5 tcgccgcggttaacgggctacttgccaatacgggtgcgggtatctgcagtgccggcgggtcgtggcgg
gaggactggggacagcttccggggacggccgtgccgccccagggtgccgagccccagagcaacg
cgggcccacgaccccataatcggggacagcttattaccctgttccgggcccccgagttgctggc
ccccaacggcgacctgtataacgtgtttgcctgggccttggaagctcttgccaaacgcctccgt
tccatgcacgtctttatectggattacgaccaatcgcgcccggtgcccgggacgcccgtgctgc
aacttacctccgggatggtccagaccacgtaaccacccccggctccataaccgacgatatgcga
cctggcgcgcacgtttgcccgggagatggggggaggctaactga

SEQ ID NO: 4 (secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 3)

10 MASYPGHQHASAFDQAARSRGHSNGSTALRPRRQQEATEVRPEQKMPTLLRVYIDGPHGMGKTT
TTQLLVALGSRDDIVYVPEPMTYWRVLGASETIANIYTTQHRLDQGEISAGDAAVVM TSAQITM
GMPYAVTDAVLAPHIGGEAGSSHAPPPALTI FLDRHP IAFMLCYPAARYLMGSMT PQAVLAFVA
LI PPTLPGTNIVLGALPEDRHIDRLAKRQRP GERLDLAMLAAIRRVYGLLANTVRYLQCGGSWR
EDWGQLSGTAVPPQGAEPQSNAGPRPHIGDTLFTLFRAPPELLAPNGDL YNVFAWALDVLAKRLR
SMHVFILDYDQSPAGCRDALLQLTSGMVQTHVTTPGSIPTICDLARTFAREMGEAN

SEQ ID NO: 5: los sitios HSV-TK a mutar están en negrita, subrayando (secuencia de localización nuclear HSV-TK, RR, y dominio de unión al sustrato, LIF y AAL)

15

ES 2 703 341 T3

atggcctcgtacccccggccatcaacacgcgtctgcggttcgaccaggetgcgcggttctcgc 60
M A S Y P G H Q H A S A F D Q A A R S R
ggccatagcaac**cgacgt**acggcggttgcgccct**cgccgg**cagcaagaagccacggaagtc
120
G H S N R R T A L R P R R Q Q E A T E V
cgcccggagcagaaaatgccacgctactgcgggtttatatagacgggtccccacgggatg
180
R P E Q K M P T L L R V Y I D G P H G M
gggaaaaccaccaccacgcaactgctggtggccctgggttcgcgcgacgatatcgtctac
240
G K T T T T Q L L V A L G S R D D I V Y
gtacccgagccgatgacttactggcgggtgctgggggcttccgagacaatcgcgaaacatc
300
V P E P M T Y W R V L G A S E T I A N I
tacaccacacaacaccgcctcgaccaggggtgagatatcggccggggacgcggcggtggta
360
Y T T Q H R L D Q G E I S A G D A A V V
atgacaagcgcgccagataacaatgggcatgccttatgccgtgaccgacgcgcgttctggct
420
M T S A Q I T M G M P Y A V T D A V L A
cctcatatcgggggggaggctgggagctcacatgccccgcccccgccctcaccctcatc
480
P H I G G E A G S S H A P P P A L T L I
ttcgaccgccatcccatcgccgcctcctgtgctacccggccgcgcggtaccttatgggc
540
F D R H P I A A L L C Y P A A R Y L M G
agcatgacccccagggcgtgctggcggttcgtggccctcatcccgcgcaccttgccccgc
600

ES 2 703 341 T3

S M T P Q A V L A F V A L I P P T L P G
 accaacatcgtgcttggggcccttccggaggacagacacatcgaccgcttggccaaacgc
 660
 T N I V L G A L P E D R H I D R L A K R
 cagcgcggcgagcggctggacctggtatgctggctgcgattcgccgctttacggg
 720
 Q R P G E R L D L A M L A A I R R V Y G
 ctacttgccaatacgggtgcggtatctgcagtgccggcgggtcgtggcgggaggactgggga
 780
 L L A N T V R Y L Q C G G S W R E D W G
 cagctttcggggacggcctgcccggggcgggtgcccagagccccagagcaacgcgggcccc
 840
 Q L S G T A V P P Q G A E P Q S N A G P
 cgaccccatatcggggacacggtatttaccctgtttcggggcccccgagttgctggcccc
 900
 R P H I G D T L F T L F R A P E L L A P
 aacggcgacctgtataacgtgtttgccctgggccttggacgtcttggccaaacgcctccgt
 960
 N G D L Y N V F A W A L D V L A K R L R
 tccatgcacgtctttatcctggattacgaccaatcgcccggcggctgcccgggacgcctg
 1020
 S M H V F I L D Y D Q S P A G C R D A L
 ctgcaactacctccgggatggtccagaccacgtcaccacccccggctccataccgacg
 1080
 L Q L T S G M V Q T H V T T P G S I P T
 atatgcgacctggcgcgcacgtttggccgggagatgggggaggctaactga
 I C D L A R T F A R E M G E A N *

SEQ ID NOS: 6 y 7: región mutante Sac I-Kpn I (SR39)

GAGCTCACATGCCCGCCCCCGGCCCTCACCA**ATCTTC**CTCGACCGCCATCCCATCGCC-
CTCGAGTGTACGGGGCGGGGGCCGGGAGTGG**TAG****AAG**GAGCTGGCGGTAGGGTAGCGG-

5 Sac I

- **TTC****ATG****GCTGTGCTACCCGGCCGCGCGGTACC** (SEQ ID NO: 6)
- **AAGTACGACACGATGGGCGGCGCGCCATGG** (SEQ ID NO: 7)
 Kpn I

Kpn I	GGTACC	G		G		T		A		C	/	C	GTAC - 3'
		C	/	C		A		T		G		G	
Sac I	GAGCTC	G		A		G		C		T	/	C	AGCT - 3'
		C	/	T		C		G		A		G	

SEQ ID NOS: 8 y 9: región mutante Sac I-Kpn I (SR39) (corte)

CACATGCCCCGCCCCGGCCCTCACCATCTTCCTCGACCGCCATCCCATCGCCTTCATG
 TCGAGTGTACGGGGCGGGGGCCGGGAGTGGTAGAGAGCTGGCGGTAGGGTAGCGGAA

Sac I (cut)

CTGTGCTACCCGGCCGCGCGGTAC (SEQ ID NO: 8)

GTACGACACGATGGGCCGGC (SEQ ID NO: 9)

Kpn I (cut)

5

Kpn I	GGTACC	G		G		T		A		C	/	C	GTAC - 3'
		C	/	C		A		T		G		G	

SEQ ID NOS: 10 y 11: Cebadores

10 SR39sackpn F1

5' CACATGCCCCGCCCCGGCCCTCACCATCTTCCTCGACCGCCATCCCATCGCCTTCATGCTG
 TGCTACCCGGCCGCGCGGTAC 3' (SEQ ID NO: 10)

SR39sackpn R1

5' CGCGCGGCCGGGTAGCACAGCATGAAGGCGATGGGATGGCGGTGAGGAAAGATGGTGAGGGC

15 CGGGGGCGGGGCATGTGAGCT 3' (SEQ ID NO: 11)

SEQ ID NO: 12 Gen #3 mHSV-TK CO A168H(LIF...AHL): longitud: 1185

GTCAGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGC
 CTTTCGACCAGGCCGCCCGCAGCCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCCGCACTGCGGCCACGGCGC
 CAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCACCCTGCTGCGCGTGTACATCG
 ACGGACCACACGGCATGGGCAAGACCACCACCACCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGA
 CGACATCGTGTACGTGCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGGTGGGCGCCAGCGAGACCATC
 GCCAACATCTACACCACCAGCACCCGCTGGACCAAGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCG
 TGGTGATGACCAGCGCCAGATTACAATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGC
 ACCACACATCGGCGGCGAGGCCGGCAGCAGCCACGCACCACCACCAGCACTGACCCTGATCTTC
 GACCGGCACCCAATCGCACACCTGCTGTGCTACCCGGCAGCACGCTACCTGATGGGCTCCATGA
 CACCACAAGCCGTGCTGGCCTTCGTGGCCCTGATCCCAACAACACTGCCCGGCACCAACATCGT
 GCTGGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAG
 CGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGC
 GCTACCTGCAGTGCGGCGGCAGCTGGCGCGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCC
 ACCACAGGGCGCCGAGCCACAGAGCAACGCCGACCACGACCACACATCGGCGACACCCTGTTC
 ACCCTGTTCCGGGCACCAGAGCTGCTGGCACCAACGGCGACCTGTACAACGTGTTTCGCCTGGG
 CCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGCTCCATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGTC
 ACCGGCCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACA
 ACACCCGGCAGCATCCCAACAATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCGGAGATGGGCGAGG
 CCAACTAATAGGGATCCCTCGAGAAGCTTGTCA

20

SEQ ID NO: 13 Gen #4 mHSV-TK CO A167F(LIF...FAL): longitud: 1185

GTCAGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGC
CTTCGACCAGGCCGCCCCGAGCCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCCGCACTGCGGGCCACGGCGC
CAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCACCCCTGCTGCGCGTGTACATCG
ACGGACCACACGGCATGGGCAAGACCACCACCACCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGA
CGACATCGTGTACGTGCCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTGGGGGCCAGCGAGACCATC
GCCAACATCTACACCACCCAGCACCCGCTGGACCAAGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCG
TGGTGATGACCAGCGCCCAGATTACAATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGC
ACCACACATCGGCGGGCAGGCCGGCAGCAGCCACGCACCACCACCAGCACTGACCCTGATCTTC
GACCGGCACCCAATCTTCGCACTGCTGTGCTACCCGGCAGCACGCTACCTGATGGGCTCCATGA
CACCACAAGCCGTGCTGGCCTTCGTGGCCCTGATCCCACCAACACTGCCCGGCACCAACATCGT
GCTGGGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAG
CGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGC
GCTACCTGCAGTGCGGGCGCAGCTGGCGCGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCC
ACCACAGGGCGCCGAGCCACAGAGCAACGCCGGACCACGACCACACATCGGCGACACCCTGTTC
ACCCTGTTCCGGGCACCAGAGCTGCTGGCACCACAAACGGCGACCTGTACAACGTGTTCCGCTGGG
CCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGCTCCATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGTC
ACCGGCCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACA
ACACCCGGCAGCATCCCAACAATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCGCGAGATGGGGCAGG
CCAATAATAGGGATCCCTCGAGAAGCTTGTCA

5

SEQ ID NO: 14 Gen #5 mHSV-TK CO mutante dual A167F-A168H(LIF...FHL): longitud:1185

GTCAGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGC
CTTCGACCAGGCCGCCCCGAGCCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCCGCACTGCGGGCCACGGCGC
CAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCACCCCTGCTGCGCGTGTACATCG
ACGGACCACACGGCATGGGCAAGACCACCACCACCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGA
CGACATCGTGTACGTGCCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTGGGGGCCAGCGAGACCATC
GCCAACATCTACACCACCCAGCACCCGCTGGACCAAGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCG
TGGTGATGACCAGCGCCCAGATTACAATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGC
ACCACACATCGGCGGGCAGGCCGGCAGCAGCCACGCACCACCACCAGCACTGACCCTGATCTTC
GACCGGCACCCAATCTTCCACCTGCTGTGCTACCCGGCAGCACGCTACCTGATGGGCTCCATGA
CACCACAAGCCGTGCTGGCCTTCGTGGCCCTGATCCCACCAACACTGCCCGGCACCAACATCGT
GCTGGGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAG
CGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGC
GCTACCTGCAGTGCGGGCGCAGCTGGCGCGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCC
ACCACAGGGCGCCGAGCCACAGAGCAACGCCGGACCACGACCACACATCGGCGACACCCTGTTC
ACCCTGTTCCGGGCACCAGAGCTGCTGGCACCACAAACGGCGACCTGTACAACGTGTTCCGCTGGG
CCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGCTCCATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGTC
ACCGGCCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACA
ACACCCGGCAGCATCCCAACAATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCGCGAGATGGGGCAGG
CCAATAATAGGGATCCCTCGAGAAGCTTGTCA

SEQ ID NO: 15 Gen #6 mHSV-TK CO MB-IFL A168H(LIF...AHL): longitud: 1185

GTCAGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGC
CTTCGACCAGGCCGCCCGCAGCCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCCGACTGCGGCCACGGCGC
CAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCACCCCTGCTGCGCGTGTACATCG
ACGGACCACACGGCATGGGCAAGACCACCACCACCCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGA
CGACATCGTGTACGTGCCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTGGGCGCCAGCGAGACCATC
GCCAACATCTACACCACCCAGCACCCGCTGGACCAAGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCG

- 74 -

TGGTGATGACCAGCGCCCAGATTACAATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGC
ACCACACATCGCGGGCAGGGCCGGCAGCAGCCACGCACCACCACCAGCACTGACCATCTTCCTG
GACCGGCACCCAATCGCACACCTGCTGTGCTACCCGGCAGCACGCTACCTGATGGGCTCCATGA
CACCACAAGCCGTGCTGGCCTTCGTGGCCCTGATCCCACCAACACTGCCCGGCACCAACATCGT
GCTGGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAG
CGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGC
GCTACCTGCAGTGCGGCGGCAGCTGGCGCGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCC
ACCACAGGGCGCCGAGCCACAGAGCAACGCCGGACCACGACCACACATCGGCGACACCCTGTTC
ACCCTGTTCCGGGCACCAGAGCTGCTGGCACCACAAACGGCGACCTGTACAACGTGTTTCGCCTGGG
CCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGCTCCATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGTC
ACCGGCCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACA
ACACCCGGCAGCATCCCAACAATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCGCGAGATGGGCGAGG

5 CCAACTAATAGGGATCCCTCGAGAAGCTTGTCA

SEQ ID NO: 16 Gen #1 HSV-TK A168H dmNLS CO SC: longitud: 1185

GTCAGCGGCCGACCCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGC
CTTCGACCAGGCCGCCCGCAGCCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCCGACTGCGGCCAGGATCT
CAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCACCCCTGCTGCGCGTGTACATCG
ACGGACCACACGGCATGGGCAAGACCACCACCACCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGA
CGACATCGTGTACGTGCCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTGGGCGCCAGCGAGACCATC
GCCAACATCTACACCACCCAGCACCCGCTGGACCAAGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCG
TGGTGATGACCAGCGCCCAGATTACAATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGC
ACCACACATCGGCGGCGAGGCCGGCAGCAGCCACGCACCACCACCAGCACTGACCCTGATCTTC
GACCGGCACCCAATCGCACACCTGCTGTGCTACCCGGCAGCACGCTACCTGATGGGCTCCATGA
CACCACAAGCCGTGCTGGCCTTCGTGGCCCTGATCCCACCAACACTGCCCGGCACCAACATCGT
GCTGGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAG
CGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGC
GCTACCTGCAGTGCGGCGGCAGCTGGCGCGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCC
ACCACAGGGCGCCGAGCCACAGAGCAACGCCGGACCACGACCACACATCGGCGACACCCTGTTC
ACCCTGTTCCGGGCACCAGAGCTGCTGGCACCAACGGCGACCTGTACAACGTGTTTCGCCTGGG
CCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGCTCCATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGTC
ACCGGCCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACA
ACACCCGGCAGCATCCCAACAATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCGCGAGATGGGCGAGG
CCAATAATAGGGATCCCTCGAGAAGCTTGTCA

SEQ ID NO: 17 Gen #2 HSV-TK A167F dmNLS CO SC: longitud:1185

GTCAGCGGCCGACCCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGC
CTTCGACCAGGCCGCCCGCAGCCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCCGACTGCGGCCAGGATCT
CAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCACCCCTGCTGCGCGTGTACATCG
ACGGACCACACGGCATGGGCAAGACCACCACCACCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGA
CGACATCGTGTACGTGCCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTGGGCGCCAGCGAGACCATC
GCCAACATCTACACCACCCAGCACCCGCTGGACCAAGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCG
TGGTGATGACCAGCGCCCAGATTACAATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGC
ACCACACATCGGCGGCGAGGCCGGCAGCAGCCACGCACCACCACCAGCACTGACCCTGATCTTC
GACCGGCACCCAATCTTCGCACTGCTGTGCTACCCGGCAGCACGCTACCTGATGGGCTCCATGA
5 GCTGGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAG
CGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGC
GCTACCTGCAGTGCGGCGGCAGCTGGCGCGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCC
ACCACAGGGCGCCGAGCCACAGAGCAACGCCGGACCACGACCACACATCGGCGACACCCTGTTC
ACCCTGTTCCGGGCACCAGAGCTGCTGGCACCAACGGCGACCTGTACAACGTGTTTCGCCTGGG
CCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGCTCCATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGTC
ACCGGCCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACA
ACACCCGGCAGCATCCCAACAATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCGCGAGATGGGCGAGG
CCAATAATAGGGATCCCTCGAGAAGCTTGTCA

SEQ ID NO: 18 Gen #3 HSV-TK A168H NESdmNLS CO SC: longitud: 1221

GTCAGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCCTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGCTGGAAC
GGATGGCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGCCTTCGACCAGGCCGCCCGCAGCCGCGGC
CACAGCAACGGCAGCACCGCACTGCGGCCAGGATCTCAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCG
AGCAGAAGATGCCACCCCTGCTGCGCGTGTACATCGACGGACCACACGGCATGGGCAAGACCAC
CACCACCCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGACGACATCGTGTACGTGCCCCGAGCCCATG
ACCTACTGGCGCGTGTGGGCGCCAGCGAGACCATCGCCAACATCTACACCACCCAGCACCCGCC
TGGACCAAGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCGTGGTGTATGACCAGCGCCCAGATTACAAT
GGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGCACCACACATCGGCGGGCAGGCCGGCAGC
AGCCACGCACCACCAGCACTGACCCTGATCTTCGACCGGCACCCAATCGCACACCTGCTGT
GCTACCCGGCAGCACGCTACCTGATGGGCTCCATGACACCACAAGCCGTGCTGGCCTTCGTGGC
CCTGATCCCACCAACACTGCCCGGCACCAACATCGTGTGGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCAC
ATCGACCGCCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAGCGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCA
TCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGCCTACCTGCAGTGCGGCGGCAGCTGGCG
CGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCCACCACAGGGCGCCGAGCCACAGAGCAAC
GCCGGACCACGACCACACATCGGCGACACCCTGTTACCCTGTTCCGGGCACCAGAGCTGCTGG
CACCAAACGGCGACCTGTACAACGTGTTGCCTGGGCCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGGC
CTCCATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGTCACCGGCCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTG
CAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACAACACCCGGCAGCATCCCAACAATCTGCG
ACCTGGCCCGCACCTTCGCCCGCGAGATGGGCGAGGCCAACTAATAGGGATCCCTCGAGAAGCT
TGTC

5 SEQ ID NO: 19 Gen #4 HSV-TK A167F NESdmNLS CO SC: longitud: 1221

GTCAGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCCTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGCTGGAAC
GGATGGCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGCCTTCGACCAGGCCGCCCGCAGCCGCGGC
CACAGCAACGGCAGCACCGCACTGCGGCCAGGATCTCAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCG
AGCAGAAGATGCCACCCCTGCTGCGCGTGTACATCGACGGACCACACGGCATGGGCAAGACCAC
CACCACCCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGACGACATCGTGTACGTGCCCCGAGCCCATG
ACCTACTGGCGCGTGTGGGCGCCAGCGAGACCATCGCCAACATCTACACCACCCAGCACCCGCC
TGGACCAAGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCGTGGTGTATGACCAGCGCCCAGATTACAAT
GGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGCACCACACATCGGCGGGCAGGCCGGCAGC
AGCCACGCACCACCAGCACTGACCCTGATCTTCGACCGGCACCCAATCTTCGCACTGCTGT
GCTACCCGGCAGCACGCTACCTGATGGGCTCCATGACACCACAAGCCGTGCTGGCCTTCGTGGC
CCTGATCCCACCAACACTGCCCGGCACCAACATCGTGTGGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCAC
ATCGACCGCCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAGCGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCA
TCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGCCTACCTGCAGTGCGGCGGCAGCTGGCG
CGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCCACCACAGGGCGCCGAGCCACAGAGCAAC
GCCGGACCACGACCACACATCGGCGACACCCTGTTACCCTGTTCCGGGCACCAGAGCTGCTGG

ES 2 703 341 T3

CACCAAACGGCGACCTGTACAACGTGTTTCGCCTGGGCCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCG
CTCCATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGTCACCGGCCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTG
CAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACAACACCCGGCAGCATCCCAACAATCTGCG
ACCTGGCCCCGCACCTTCGCCCGCGAGATGGGCGAGGCCAACTAATAGGGATCCCTCGAGAAGCT
TGTC

SEQ ID NO: 20 Gen #5 HSV-TK A168H NESdmNLS JCO SC: longitud: 1221

GTCAGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCTCTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGCTGGAAC
GGATGGCTCTTATCCTGGACATCAGCATGCTTCTGCTTTTGATCAGGCTGCCAGATCTAGAGGA
CATTCTAATGGCAGCACAGCACTGCGGCCAGGATCTCAGCAGGAAGCTACAGAAGTGAGACCTG
AACAGAAAATGCCTACACTGCTGAGAGTGTATATTGATGGACCACATGGAATGGGAAAAACAAC
CACAAACCAGCTGCTGGTGGCTCTCGGATCTAGAGATGATATTGTGTATGTGCCTGAACCTATG
ACATATTGGAGAGTGCTGGGAGCTTCTGAAACAATTGCTAATATCTATAACAACACAGCATAGAC
TGGATCAAGGAGAAAATTTCTGCCGGAGATGCTGCCGTGGTGTATGACATCTGCTCAGATTACAAT
GGGAATGCCTTATGCTGTGACAGATGCTGTGCTGGCACCACATATTGGAGGCGAAGCTGGAAGC
TCTCATGCACCACCACCAGCACTGACACTGATTTTTGATCGGCATCCAATTGCACATCTGCTGT
GTTATCCGGCAGCAAGATATCTGATGGGAAGCATGACACCACAAGCCGTGCTGGCTTTTGTGGC
TCTGATTCCACCAACACTGCCTGGAACAAACATCGTGTGCTGGGAGCTCTGCCTGAAGATAGACAT
ATCGATCGGCTGGCCAAACGGCAGAGACCTGGAGAACGGCTGGATCTGGCCATGCTGGCTGCCA
TTCGGAGAGTGTATGGCCTGCTGGCTAACACAGTGAGATATCTGCAGTGTGGAGGCTCTTGGAG
AGAGGATTGGGGACAGCTGTCTGGCACAGCTGTGCCACCACAGGGAGCCGAACCACAGAGCAAT
GCTGGACCACGACCACATATCGGAGACACACTGTTTACACTGTTTTCGGGCACCAGAAGCTGCTGG
CACCAAATGGAGACCTGTACAACGTGTTTGCCTGGGCTCTGGATGTGCTGGCTAAACGGCTGAG
ATCTATGCATGTGTTTATCCTGGACTATGATCAGTCACCGGCCGGATGTCGCGATGCCCTGCTG
CAGCTGACATCTGGGATGGTGCAGACACATGTGACAACACCTGGATCTATCCCAACAATCTGTG
ATCTGGCTAGAACATTCGCTAGGGAGATGGGAGAGGCCAACTAATGAGGATCCCTCGAGAAGCT
5 TGTC

SEQ ID NO: 21 Gen #6 HSV-TK A167F NESdmNLS JCO SC: longitud: 1221

ES 2 703 341 T3

GTCAGCGGCCGACCCGGTACGCGTCCACCATGGCTCTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGCTGGAAC
GGATGGCTCTTATCCTGGACATCAGCATGCTTCTGCTTTTGATCAGGCTGCCAGATCTAGAGGA
CATTCTAATGGCAGCACAGCACTGCGGCCAGGATCTCAGCAGGAAGCTACAGAAGTGAGACCTG
AACAGAAAATGCCTACACTGCTGAGAGTGTATATTGATGGACCACATGGAATGGGAAAAACAAC
CACAAACCAGCTGCTGGTGGCTCTCGGATCTAGAGATGATATTGTGTATGTGCCTGAACCTATG
ACATATTGGAGAGTGCTGGGAGCTTCTGAAACAATTGCTAATATCTATAACAACACAGCATAGAC
TGGATCAAGGAGAAATTTCTGCCGGAGATGCTGCCGTGGTGATGACATCTGCTCAGATTACAAT
GGGAATGCCTTATGCTGTGACAGATGCTGTGCTGGCACCACATATTGGAGGCGAAGCTGGAAGC
TCTCATGCACCACCACCAGCACTGACACTGATTTTTGATCGGCATCCAATTTTCGCACTGCTGT
GTTATCCGGCAGCAAGATATCTGATGGGAAGCATGACACCACAAGCCGTGCTGGCTTTTGTGGC
TCTGATTCCACCAACTGCCTGGAACAAACATCGTGCTGGGAGCTCTGCCTGAAGATAGACAT
ATCGATCGGCTGGCCAAACGGCAGAGACCTGGAGAACGGCTGGATCTGGCCATGCTGGCTGCCA
TTCGGAGAGTGTATGGCCTGCTGGCTAACACAGTGAGATATCTGCAGTGTGGAGGCTCTTGGAG
AGAGGATTGGGGACAGCTGTCTGGCACAGCTGTGCCACCACAGGGAGCCGAACCACAGAGCAAT
GCTGGACCACGACCACATATCGGAGACACACTGTTTACACTGTTTCGGGCACCAGAACTGCTGG
CACCAAATGGAGACCTGTACAACGTGTTTGCCTGGGCTCTGGATGTGCTGGCTAAACGGCTGAG
ATCTATGCATGTGTTTATCCTGGACTATGATCAGTCACCGGCCGGATGTCGCGATGCCCTGCTG
CAGCTGACATCTGGGATGGTGCAGACACATGTGACAACACCTGGATCTATCCCAACAATCTGTG
ATCTGGCTAGAACATTCGCTAGGGAGATGGGAGAGGCCAACTAATGAGGATCCCTCGAGAAGCT
TGTC

5 **SEQ ID NO: 22**

HSV-TK dmNLS A168H, CO y SC

dmNLS = secuencia de localización nuclear mutada
doble

CO = codón optimizado

10 CD = empalme corregido en 327 y 555

Secuencia de Kozak, subrayada

gtcaGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGC
CTTCGACCAGGCCCGCCCGCAGCCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCCGCaCTGCGgCCaGGATCT
CAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCACCCTGCTGCGCGTGTACATCG
ACGGaCCaCACGGCATGGGCAAGACCACCACCACCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGA
CGACATCGTGTACGTGCCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTGGGCGCCAGCGAGACCATC
GCCAACATCTACACCACCAGCACCCGCTGGACCAaGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCG
TGGTGATGACCAGCGCCCAGATtACaATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGC
aCCaCACATCGGCGGCGAGGCCGGCAGCAGCCACGCaCCaCCaCCaGCaCTGACCCTGATCTTC
GACCGgCACCCaATCGCaCACCTGCTGTGCTACCCgGCaGCaCGCTACCTGATGGGctccATGA
CaCCaCaAaGCCGTGCTGGCCCTTCGTGGCCCTGATCCCaCCaACaCTGCCCGGCACCAACATCGT
GCTGGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAG
CGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGC
GCTACCTGCAGTGCGGCGGCAGCTGGCGCGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCC
aCCaCAGGGCGCCGAGCCaCAGAGCAACGCCGGaCCaCCaCCaCACATCGGCGACACCCTGTTC
ACCCTGTTCCGgGCaCCaGAGCTGCTGGCaCCaAACGGCGACCTGTACAACGTGTTTCGCCTGGG
CCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGctccATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGtc
aCCgGCCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACa
ACaCCCGGCAGCATCCCaACaATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCGCGAGATGGGCGAGG
CCAATAATAGGGATCCCTCGAGAAGCTTgtca

SEQ ID NO: 23: secuencia de polinucleótidos de exportación nuclear de MAP quinasa

5 CTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGCTGGAAGTGGATGGC

SEQ ID NO: 24: secuencia de polinucleótidos de exportación nuclear de MAP quinasa

LQKKLEELELDG

10

SEQ ID NO: 25: resto dirigido

WREPSFMALS

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> LEVY, JOHN P.
REED, REBECCA A.
MCNULTY, JOSEPH

20 JOHNSON, JR., ROBERT G.

<120> ENSAYO DIAGNÓSTICO DE TIMIDINA QUINASA PARA APLICACIONES DE TERAPIA GÉNICA

<130> 30863-722.202

25

<140> 14/214,448

<141> 2014-03-14

<150> 61/784,901

30

<151> 14/03/2013

<160> 25

ES 2 703 341 T3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1131

5 <212> ADN

<213> Virus del herpes simple 1

<400> 1

```

    atggcttcgt accccggcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc      60
    ggccatagca accgacgtac ggcggttgcgc cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc      120
    cgcccggagc agaaaatgcc cacgctactg cggggtttata tagacgggtcc ccacgggatg      180
    gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctggggt cgcgcgacga tatcgtctac      240
    gtacccgagc cgatgactta ctggcgggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc      300
    tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggtg      360
    atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ccttatgccg tgaccgacgc cgttctggct      420
    cctcatatcg ggggggagge tgggagctca catgccccgc ccccggccct caccctcatc      480
    ttcgaccgcc atcccatcgc cgccctcctg tgctaccggg ccgcgcggta ccttatgggc      540
    agcatgacc cccaggccgt gctggcgttc gtggccctca tcccgcgac cttgcccggc      600
    accaacatcg tgcttggggc ccttccggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc      660
    cagcgcctcg gcgagcggct ggacctggct atgctggctg cgattcgccg cgtttacggg      720
    ctacttgcca atacggtgcg gtatctgcag tgccggcgggt cgtggcggga ggactgggga      780
    cagctttcgg ggacggccgt gccgccccag ggtgccgagc cccagagcaa cgcgggcccc      840
    cgaccccata tcggggacac gttatattacc ctgtttcggg cccccgagtt gctggcccc      900
    aacggcgacc tgtataacgt gtttgccctg gccttggacg tcttggccaa acgcctccgt      960
    tccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcgcccc ccggctgccg ggacgcctctg     1020
10  ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cacgtcacca cccccggctc cataccgacg     1080
    atatgcgacc tggcgcgcac gtttgcccgg gagatggggg aggctaactg a                1131

```

<210> 2

15 <211> 376

<212> PRT

<213> Virus del herpes simple 1

<400> 2

20

ES 2 703 341 T3

Met Ala Ser Tyr Pro Gly His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala
1 5 10 15

Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg
20 25 30

Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Pro Glu Gln Lys Met Pro Thr
35 40 45

Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr
50 55 60

Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr
65 70 75 80

Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Arg Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr
85 90 95

Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile
100 105 110

Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met
115 120 125

Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Ile Gly
130 135 140

Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile
145 150 155 160

Phe Asp Arg His Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg
165 170 175

Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala
180 185 190

Leu Ile Pro Pro Thr Leu Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu
195 200 205

Pro Glu Asp Arg His Ile Asp Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly
210 215 220

ES 2 703 341 T3

Glu Arg Leu Asp Leu Ala Met Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly
 225 230 235 240

Leu Leu Ala Asn Thr Val Arg Tyr Leu Gln Cys Gly Gly Ser Trp Arg
 245 250 255

Glu Asp Trp Gly Gln Leu Ser Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln Gly Ala
 260 265 270

Glu Pro Gln Ser Asn Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu
 275 280 285

Phe Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu
 290 295 300

Tyr Asn Val Phe Ala Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg
 305 310 315 320

Ser Met His Val Phe Ile Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys
 325 330 335

Arg Asp Ala Leu Leu Gln Leu Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val
 340 345 350

Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe
 355 360 365

Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn
 370 375

<210> 3

<211> 1131

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

10

<400> 3

ES 2 703 341 T3

atggcctcgt accccggcca tcaacacgcg tctgcggtcg accaggctgc gcgttctcgc 60
ggccatagca acggatccac ggcggttgcgc cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc 120
cgcccggagc agaaaatgcc cacgctactg cggggtttata tagacgggtcc ccacgggatg 180
gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctggggtt cgcgcgacga tatcgtctac 240
gtacccgagc cgatgactta ctggcggttg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc 300
tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg cgggggacgc ggcggtggtg 360
atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ccttatgccg tgaccgacgc cgttctggct 420
cctcatatcg ggggggagge tgggagctca catgccccgc ccccggccct caccatcttc 480
ctcgaccgcc atcccatcgc cttcatgctg tgetaccgg ccgcgcggtg ccttatgggc 540
agcatgacc cccaggccgt gctggcgctt gtggccctca tcccgcgac cttgcccggc 600
accaacatcg tgcttggggc ccttccggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc 660
cagcgcctcg gcgagcggct ggacctggct atgctggctg cgattcgccg cgtttacggg 720
ctacttgcca atacggtgcg gtatctgcag tgccggcgggt cgtggcggga ggactgggga 780
cagctttcgg ggacggccgt gccgccccag ggtgccgagc cccagagcaa cgcgggcccc 840
cgaccccata tcggggacac gttatattacc ctgtttcggg cccccgagtt gctggcccc 900
aacggcgacc tgtataacgt gtttgccctg gccttggacg tcttggccaa acgcctccgt 960
tccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcgcccg ccggctgccg ggacgcccctg 1020
ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cacgtcacca cccccggctc cataccgacg 1080
atatgcgacc tggcgcgcac gtttgccccg gagatggggg aggctaactg a 1131

5 <210> 4
<211> 376
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 4

ES 2 703 341 T3

Met Ala Ser Tyr Pro Gly His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala
1 5 10 15

Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Gly Ser Thr Ala Leu Arg Pro Arg
20 25 30

Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Pro Glu Gln Lys Met Pro Thr
35 40 45

Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr
50 55 60

Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr
65 70 75 80

Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Arg Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr
85 90 95

Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile

ES 2 703 341 T3

Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe
355 360 365

Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn
370 375

<210> 5

<211> 1131

5 <212> ADN

<213> Virus del herpes simple 1

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1128)

<400> 5

ES 2 703 341 T3

atg gcc tcg tac ccc ggc cat caa cac gcg tct gcg ttc gac cag gct	48
Met Ala Ser Tyr Pro Gly His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala	
1 5 10 15	
gcg cgt tct cgc ggc cat agc aac cga cgt acg gcg ttg cgc cct cgc	96
Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg	
20 25 30	
cgg cag caa gaa gcc acg gaa gtc cgc ccg gag cag aaa atg ccc acg	144
Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Pro Glu Gln Lys Met Pro Thr	
35 40 45	
cta ctg cgg gtt tat ata gac ggt ccc cac ggg atg ggg aaa acc acc	192
Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr	
50 55 60	
acc acg caa ctg ctg gtg gcc ctg ggt tcg cgc gac gat atc gtc tac	240
Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr	
65 70 75 80	
gta ccc gag ccg atg act tac tgg cgg gtg ctg ggg gct tcc gag aca	288
Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Arg Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr	
85 90 95	
atc gcg aac atc tac acc aca caa cac cgc ctc gac cag ggt gag ata	336
Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile	
100 105 110	
tcg gcc ggg gac gcg gcg gtg gta atg aca agc gcc cag ata aca atg	384
Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met	
115 120 125	
ggc atg cct tat gcc gtg acc gac gcc gtt ctg gct cct cat atc ggg	432
Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Ile Gly	
130 135 140	
ggg gag gct ggg agc tca cat gcc ccg ccc ccg gcc ctc acc ctc atc	480
Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile	
145 150 155 160	
ttc gac cgc cat ccc atc gcc gcc ctc ctg tgc tac ccg gcc gcg cgg	528
Phe Asp Arg His Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg	
165 170 175	

ES 2 703 341 T3

tac ctt atg ggc agc atg acc ccc cag gcc gtg ctg gcg ttc gtg gcc	576
Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala	
180 185 190	
ctc atc ccg ccg acc ttg ccc ggc acc aac atc gtg ctt ggg gcc ctt	624
Leu Ile Pro Pro Thr Leu Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu	
195 200 205	
ccg gag gac aga cac atc gac cgc ctg gcc aaa cgc cag cgc ccc gcc	672
Pro Glu Asp Arg His Ile Asp Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly	
210 215 220	
gag cgg ctg gac ctg gct atg ctg gct gcg att cgc cgc gtt tac ggg	720
Glu Arg Leu Asp Leu Ala Met Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly	
225 230 235 240	
cta ctt gcc aat acg gtg cgg tat ctg cag tgc ggc ggg tcg tgg cgg	768
Leu Leu Ala Asn Thr Val Arg Tyr Leu Gln Cys Gly Gly Ser Trp Arg	
245 250 255	
gag gac tgg gga cag ctt tcg ggg acg gcc gtg ccg ccc cag ggt gcc	816
Glu Asp Trp Gly Gln Leu Ser Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln Gly Ala	
260 265 270	
gag ccc cag agc aac gcg ggc cca cga ccc cat atc ggg gac acg tta	864
Glu Pro Gln Ser Asn Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu	
275 280 285	
ttt acc ctg ttt cgg gcc ccc gag ttg ctg gcc ccc aac ggc gac ctg	912
Phe Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu	
290 295 300	
tat aac gtg ttt gcc tgg gcc ttg gac gtc ttg gcc aaa cgc ctc cgt	960
Tyr Asn Val Phe Ala Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg	
305 310 315 320	
tcc atg cac gtc ttt atc ctg gat tac gac caa tcg ccc gcc ggc tgc	1008
Ser Met His Val Phe Ile Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys	
325 330 335	
cgg gac gcc ctg ctg caa ctt acc tcc ggg atg gtc cag acc cac gtc	1056
Arg Asp Ala Leu Leu Gln Leu Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val	
340 345 350	
acc acc ccc ggc tcc ata ccg acg ata tgc gac ctg gcg cgc acg ttt	1104
Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe	
355 360 365	
gcc cgg gag atg ggg gag gct aac tga	1131
Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn	
370 375	

<210> 6

<211> 89

5 <212> ADN

<213> Virus del herpes simple 1

ES 2 703 341 T3

<400> 6
gagctcacat gccccgcccc cggccctcac catcttctc gaccgccatc ccatgcctt 60
catgctgtgc taccggccg cgcggtacc 89

5 <210> 7
 <211> 89
 <212> ADN
 <213> Virus del herpes simple 1

10 <400> 7

ctcgagtgtc cggggcgggg gccgggagtg gtagaaggag ctggcggtag ggtagcggaa 60
gtacgacacg atgggccggc gcgcatgg 89

<210> 8
 15 <211> 83
 <212> ADN
 <213> Virus del herpes simple 1

<400> 8
 20 **cacatgcccc gccccggcc ctcaccatct tctcgaccg ccatcccatc gccttcatgc** 60
tgtgctaccg gccgcgcgg tac 83

<210> 9
 <211> 79
 25 <212> ADN
 <213> Virus del herpes simple 1

<400> 9

tcgagtgtac ggggcggggg ccgggagtgg tagaaggagc tggcggtagg gtagcggaa 60
tacgacacga tgggccggc 79

<210> 10
 <211> 83
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

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

40 <400> 10

cacatgcccc gccccggcc ctcaccatct tctcgaccg ccatcccatc gccttcatgc 60
tgtgctaccg gccgcgcgg tac 83

<210> 11
 45 <211> 83

 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 703 341 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

5 <400> 11

cgcgcgccg ggtagcacag catgaaggcg atgggatggc ggtcgaggaa gatggtgagg 60

gccgggggcg gggcatgtga gct 83

<210> 12

10 <211> 1185

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 12

ES 2 703 341 T3

gtcagcggcc gcaccggtac gcgtccaacca tggccagcta ccccggccac cagcacgcca 60
 gcgccttcga ccaggccgcc cgcagccgcg gccacagcaa cggcagcacc gcaactgcggc 120
 cacggcgcca gcaggaggcc accgaggtgc gccccgagca gaagatgccc accctgctgc 180
 gcgtgtacat cgacggacca cacggcatgg gcaagaccac caccacccag ctgctggtgg 240
 ccctgggcag ccgcgacgac atcgtgtacg tgcccagacc catgacctac tggcgcgtgc 300
 tgggcgccag cgagaccatc gccaacatct acaccaccca gcaccgcctg gaccaaggcg 360
 agatcagcgc cggcgacgcc gccgtggtga tgaccagcgc ccagattaca atgggcatgc 420
 cctacgccgt gaccgacgcc gtgctggcac cacacatcgg cggcgaggcc ggcagcagcc 480
 acgcaccacc accagcactg accctgatct tcgaccggca cccaatcgca cacctgctgt 540
 gctaccggc agcacgctac ctgatgggct ccatgacacc acaagccgtg ctggccttcg 600
 tggccctgat cccaccaaca ctgcccggca ccaacatcgt gctgggcgcc ctgcccgagg 660
 accgccacat cgaccgcctg gccaaagcgc agcgcgccgg cgagcgcctg gacctggcca 720
 tgctggccgc catccgccgc gtgtacggcc tgctggccaa caccgtgcgc tacctgcagt 780
 gcggcggcag ctggcgcgag gactggggcc agctgagcgg caccgcccgtg ccaccacagg 840
 gcgccgagcc acagagcaac gccggaccac gaccacacat cggcgacacc ctgttcaccc 900
 tgttcggggc accagagctg ctggcaccaa acggcgacct gtacaacgtg ttcgcctggg 960
 ccctggacgt gctggccaag cgctgcgct ccatgcacgt gttcatcctg gactacgacc 1020
 agtcaccggc cggctgccgc gacgcctgc tgcagctgac cagcggcatg gtgcagacct 1080
 acgtgacaac acccggcagc atcccaaaa tctgcgacct ggcccgcacc ttcgcccgcg 1140
 agatgggcga ggccaactaa tagggatccc tcgagaagct tgtca 1185

<210> 13

<211> 1185

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

10

<400> 13

gtcagcggcc gcaccggtac gcgtccaacca tggccagcta ccccggccac cagcacgcca 60

ES 2 703 341 T3

gcgccttcga ccaggccgcc cgcagccgcg gccacagcaa cggcagcacc gcaactgcggc 120
cacggcgcca gcaggaggcc accgaggtgc gccccgagca gaagatgccc accctgctgc 180
gcgtgtacat cgacggacca cacggcatgg gcaagaccac caccaccag ctgctggtgg 240
ccctgggcag ccgcgacgac atcgtgtacg tgccccgagcc catgacctac tggcgcgtgc 300
tgggcgccag cgagaccatc gccaacatct acaccacca gcaccgcctg gaccaagggc 360
agatcagcgc cggcgacgcc gccgtggtga tgaccagcgc ccagattaca atgggcatgc 420
cctacgccgt gaccgacgcc gtgctggcac cacacatcgg cggcgaggcc ggcagcagcc 480
acgcaccacc accagcactg accctgatct tcgaccggca cccaatcttc gcaactgctgt 540
gctaccggc agcacgctac ctgatgggct ccatgacacc acaagccgtg ctggccttcg 600
tggccctgat cccaccaaca ctgcccgga ccaacatcgt gctgggcgcc ctgcccgagg 660
accgccacat cgaccgcctg gccaagcgcc agcgcgccgg cgagcgcctg gacctggcca 720
tgctggccgc catccgccgc gtgtacggcc tgctggccaa caccgtgcgc tacctgcagt 780
gcgccggcag ctggcgcgag gactggggcc agctgagcgg caccgccgtg ccaccacag 840
gcgccgagcc acagagcaac gccggaccac gaccacacat cggcgacacc ctgttcaccc 900
tgttccggc accagagctg ctggcaccaa acggcgacct gtacaacgtg ttcgcctggg 960
ccctggacgt gctggccaag cgcctgcgct ccatgcacgt gttcatcctg gactacgacc 1020
agtcaccggc cggctgccgc gacgcacctg tgcagctgac cagcggcatg gtgcagacct 1080
acgtgacaac acccggcagc atcccaaaa tctgcgacct ggcccgcacc ttcgcccgcg 1140
agatgggcga ggccaactaa tagggatccc tcgagaagct tgtca 1185

<210> 14

<211> 1185

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

10

<400> 14

ES 2 703 341 T3

gtcagcggcc gcaccggtac gcgtccaacca tggccagcta ccccggccac cagcacgcca 60
 gcgccttcga ccaggccgcc cgcagccgcg gccacagcaa cggcagcacc gcaactgcggc 120
 cacggcgcca gcaggaggcc accgaggtgc gccccgagca gaagatgccc accctgctgc 180
 gcgtgtacat cgacggacca cacggcatgg gcaagaccac caccacccag ctgctggtgg 240
 ccctgggcag ccgcgacgac atcgtgtacg tggccgagcc catgacctac tggcgcgtgc 300
 tgggcgccag cgagaccatc gccaacatct acaccaccca gcaccgcctg gaccaaggcg 360
 agatcagcgc cggcgacgcc gccgtggtga tgaccagcgc ccagattaca atgggcatgc 420
 cctacgccgt gaccgacgcc gtgctggcac cacacatcgg cggcgaggcc ggcagcagcc 480
 acgcaccacc accagcactg accctgatct tcgaccggca cccaatcttc cacctgctgt 540
 gctaccggc agcacgctac ctgatgggct ccatgacacc acaagccgtg ctggccttcg 600
 tggccctgat cccaccaaca ctgccggca ccaacatcgt gctgggcgcc ctgcccgagg 660
 accgccacat cgaccgcctg gccaaagcgc agcgcgccgg cgagcgcctg gacctggcca 720
 tgctggccgc catccgccgc gtgtacggcc tgctggccaa caccgtgcgc tacctgcagt 780
 gcggcggcag ctggcgcgag gactggggcc agctgagcgg caccgcccgtg ccaccacag 840
 gcgccgagcc acagagcaac gccggaccac gaccacacat cggcgacacc ctgttcaccc 900
 tgttcggggc accagagctg ctggcaccaa acggcgacct gtacaacgtg ttcgcctggg 960
 ccctggacgt gctggccaag cgcctgcgct ccatgcacgt gttcatcctg gactacgacc 1020
 agtcaccggc cggctgccgc gacgcacctg tgcagctgac cagcggcatg gtgcagaccc 1080
 acgtgacaac acccggcagc atcccaaaa tctgcgacct ggcccgcacc ttcgcccgcg 1140
 agatgggcga ggccaactaa tagggatccc tcgagaagct tgtca 1185

- 5 <210> 15
- <211> 1185
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

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

<400> 15

ES 2 703 341 T3

gtcagcggcc gcaccggtac gcgtccaacca tggccagcta ccccggccac cagcacgcca 60
 gcgccttcga ccaggccgcc cgcagccgcg gccacagcaa cggcagcacc gcactgcggc 120
 cacggcgcca gcaggaggcc accgaggtgc gccccgagca gaagatgccc accctgctgc 180
 gcgtgtacat cgacggacca cacggcatgg gcaagaccac caccacccag ctgctggtgg 240
 ccctgggcag ccgcgacgac atcgtgtacg tgcccagacc catgacctac tggcgcgtgc 300
 tgggcgccag cgagaccatc gccaacatct acaccacca gcaccgcctg gaccaaggcg 360
 agatcagcgc cggcgacgcc gccgtggtga tgaccagcgc ccagattaca atgggcatgc 420
 cctacgccgt gaccgacgcc gtgctggcac cacacatcgg cggcgaggcc ggcagcagcc 480
 acgcaccacc accagcactg accatcttcc tggaccggca cccaatcgca cacctgctgt 540
 gctaccggc agcacgctac ctgatgggct ccatgacacc acaagccgtg ctggccttcg 600
 tggccctgat cccaccaaca ctgcccggca ccaacatcgt gctgggcgcc ctgcccgagg 660
 accgccacat cgaccgcctg gccaaagcgc agcgcgccgg cgagcgcctg gacctggcca 720
 tgctggccgc catccgccgc gtgtacggcc tgctggccaa caccgtgcgc tacctgcagt 780
 gcggcggcag ctggcgcgag gactggggcc agctgagcgg caccgccgtg ccaccacagg 840
 gcgccgagcc acagagcaac gccggaccac gaccacacat cggcgacacc ctgttcaccc 900
 tgttcggggc accagagctg ctggcaccaa acggcgacct gtacaacgtg ttcgcctggg 960
 ccctggacgt gctggccaag cgcctgcgct ccatgcacgt gttcatcctg gactacgacc 1020
 agtcaccggc cggctgccgc gacgccctgc tgcagctgac cagcggcatg gtgcagaccc 1080
 acgtgacaac acccggcagc atcccaaaa tctgcgacct ggcccgcacc ttcgcccgcg 1140
 agatgggcga ggccaactaa tagggatccc togagaagct tgtca 1185

- 5 <210> 16
- <211> 1185
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético
- <400> 16

ES 2 703 341 T3

```

gtcagcggcc gcaccggtac gcgtccacca tggccagcta ccccgccac cagcacgcca      60
gcgcccttcga ccagggccgc cgcagccgcg gccacagcaa cggcagcacc gcaactgcgcc      120
caggatctca gcaggaggcc accgaggtgc gccccgagca gaagatgccc accctgctgc      180
gcgtgtacat cgacggacca cacggcatgg gcaagaccac caccaccag ctgctggtgg      240
ccctgggcag ccgcgacgac atcgtgtacg tgcccagacc catgacctac tggcgcgtgc      300
tgggcgccag cgagaccatc gccaacatct acaccacca gcaccgcctg gaccaaggcg      360
agatcagcgc cggcgacgcc gccgtggtga tgaccagcgc ccagattaca atgggcatgc      420
cctacgccgt gaccgacgcc gtgctggcac cacacatcgg cggcgaggcc ggcagcagcc      480
acgcaccacc accagcactg accctgatct tcgaccgga cccaatcgca cacctgctgt      540
gctaccggc agcacgtac ctgatgggct ccatgacacc acaagccgtg ctggccttcg      600
tgccctgat cccaccaaca ctgccggca ccaacatcgt gctggcgcc ctgccgagg      660
accgccat cgaccgcctg gccaaagcgc agcgccccgg cgagcgctg gacctggcca      720
tgctggccgc catccgccgc gtgtacggcc tgctggccea caccgtgccc tacctgcagt      780
gcggcggcag ctggcgcgag gactggggcc agctgagcgg caccgcccgtg ccaccacagg      840
gcgccgagcc acagagcaac gccggaccac gaccacacat cggcgacacc ctgttcaccc      900
tgttccgggc accagagctg ctggcaccaa acggcgacct gtacaacgtg ttgcctggg      960
ccctggacgt gctggccaag cgctgogct ccatgcacgt gttcatcctg gactacgacc     1020
agtcaccggc cggctgccgc gacgcctgc tgacagctgac cagcggcatg gtgcagaccc     1080
acgtgacaac acccggcagc atcccaaaa tctgcgacct ggcccgcacc ttgcgccgcg     1140

agatgggcga ggccaactaa tagggatccc tcgagaagct tgtca                          1185

```

<210> 17
 <211> 1185

5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

10 <400> 17

ES 2 703 341 T3

gtcagcggcc gcaccggtac gcgtccaoca tggccagcta ccccggccac cagcacgcca 60
 gcgccttcga ccaggccgcc cgcagccgcg gccacagcaa cggcagcacc gcaactgcggc 120
 caggatctca gcaggaggcc accgaggtgc gccccgagca gaagatgccc accctgctgc 180
 gcgtgtacat cgacggacca cacggcatgg gcaagaccac caccacccag ctgctggtgg 240
 ccctgggcag ccgcgacgac atcgtgtacg tgcccagacc catgacctac tggcgcgtgc 300
 tgggcgccag cgagaccatc gccaacatct acaccaccca gcaccgcctg gaccaaggcg 360
 agatcagcgc cggcgacgcc gccgtggtga tgaccagcgc ccagattaca atgggcatgc 420
 cctacgccgt gaccgacgcc gtgctggcac cacacatcgg cggcgaggcc ggcagcagcc 480
 acgcaccacc accagcactg accctgatct tcgaccggca cccaatcttc gcaactgctgt 540
 gctaccggc agcacgctac ctgatgggct ccatgacacc acaagccgtg ctggccttcg 600
 tggccctgat cccaccaaca ctgcccggca ccaacatcgt gctgggcgcc ctgcccgagg 660
 accgccacat cgaccgcctg gccaaagcgc agcgcgccgg cgagcgcctg gacctggcca 720
 tgctggccgc catccgcgc gtgtacggcc tgctggccaa caccgtgcgc tacctgcagt 780
 gcggcggcag ctggcgcgag gactggggcc agctgagcgg caccgcccgtg ccaccacagg 840
 gcgccgagcc acagagcaac gccggaccac gaccacacat cggcgacacc ctgttcaccc 900
 tgttccgggc accagagctg ctggcaccaa acggcgacct gtacaacgtg ttcgcctggg 960
 ccctggacgt gctggccaag cgootgogot ccatgacagt gttcatcctg gactacgacc 1020
 agtcaccggc cggctgccgc gacgcctgc tgcagctgac cagcggcatg gtgcagacct 1080
 acgtgacaac acccggcagc atcccaacaa tctgcgacct ggcccgcacc ttcgcccgcg 1140
 agatgggcga ggccaactaa tagggatccc tcgagaagct tgtca 1185

<210> 18

<211> 1221

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

10

<400> 18

ES 2 703 341 T3

gtcagcggcc gcaccggtac gcgtccaacca tggccctgca gaaaaagctg gaagagctgg 60
aactggatgg cagctacccc ggccaccage acgccagcgc cttcgaccag gccgcccgca 120
gccgcgccca cagcaacggc agcaccgcac tgcggccagg atctcagcag gaggccaccg 180
aggtgcgccc cgagcagaag atgcccaccc tgctgcgcgt gtacatcgac ggaccacacg 240
gcatgggcaa gaccaccacc acccagctgc tggaggccct gggcagccgc gacgacatcg 300
tgtacgtgcc cgagcccatg acctactggc gcgtgctggg cgccagcagag accatcgcca 360
acatctacac caccagcac cgcctggacc aaggcgagat cagcgccggc gacgccggcg 420
tggatgatgac cagcgcccag attacaatgg gcatgcccta cgccgtgacc gacgccgtgc 480
tggcaccaca catcggcggc gaggccggca gcagccacgc accaccacca gactgacc 540
tgatcttcga ccggcaccca atcgcacacc tgctgtgcta cccggcagca cgctacctga 600
tgggctccat gacaccacaa gccgtgctgg cottgctggc cctgatccca ccaacactgc 660
ccggcaccaa catcgtgctg ggcgccctgc ccgaggaccg ccacatcgac cgcctggcca 720
agcggcagcg ccccgcgag cgcctggacc tggccatgct ggccgcatc cgccgcgtgt 780
acggcctgct ggccaacacc gtgcgctacc tgcagtgcgg cggcagctgg cgcgaggact 840
ggggccagct gagcggcacc gccgtgccac cacagggcgc cgagccacag agcaacgccg 900
gaccagcacc acacatcggc gacaccctgt tcaccctggt ccgggcacca gagctgctgg 960
caccaaacgg cgacctgtac aacgtgttcg cctgggccct ggacgtgctg gccaaagcgc 1020
tgcgctccat gcacgtgttc atcctggact acgaccagtc accggccggc tgccgcgacg 1080
ccctgctgca gctgaccage ggcatggtgc agaccacgt gacaacaccc ggcagcatcc 1140
caacaatctg cgacctggcc cgcaccttcg cccgcgagat gggcgaggcc aactaatagg 1200
gatccctcga gaagcttgtc a 1221

<210> 19
<211> 1221

5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

10 <400> 19

ES 2 703 341 T3

gtcagcggcc gcaccggtac gcgtccaacca tggccctgca gaaaaagctg gaagagctgg 60
 aactggatgg cagctacccc ggccaccagc acgccagcgc cttcgaccag gccgcccgca 120
 gccgcgccca cagcaacggc agcaccgcac tgcggccagg atctcagcag gaggccaccg 180
 aggtgcgccc cgagcagaag atgcccaccc tgctgcgcgt gtacatcgac ggaccacacg 240
 gcatgggcaa gaccaccacc acccagctgc tgggtggccct gggcagccgc gacgacatcg 300
 tgtacgtgcc cgagcccatg acctactggc gcgtgctggg cgccagcag accatcgcca 360
 acatctacac caccagcac cgctggacc aaggcgagat cagcgccggc gacgccgccc 420
 tggatgatgac cagcgcccag attacaatgg gcatgcccta cgccgtgacc gacgccgtgc 480
 tggcaccaca catcgggcgc gaggccggca gcagccacgc accaccacca gcaactgacc 540
 tgatcttga ccggcaccca atcttcgcac tgctgtgcta cccggcagca cgctacctga 600
 tgggctccat gacaccacaa gccgtgctgg ccttcgtggc cctgatccca ccaacactgc 660
 ccggcaccaa catcgtgctg ggcgcccctgc ccgaggaccg ccacatcgac cgctggcca 720
 agcgcagcgc ccccggcgag cgctggacc tggccatgct ggccgccatc cgccgctgt 780
 acggcctgct ggccaacacc gtgcgctacc tgcagtgcgg cggcagctgg cgcgaggact 840
 ggggcccagct gagcggcacc gccgtgccac cacagggcgc cgagccacag agcaacgccg 900
 gaccacgacc acacatcggc gacaccctgt tcaccctgtt ccgggcacca gagctgctgg 960
 caccaaacgg cgacctgtac aacgtgttcg cctgggcccct ggacgtgctg gccaaagcgc 1020
 tgcgctccat gcacgtgttc atcctggact acgaccagtc accggccggc tgccgcgacg 1080
 ccctgctgca gctgaccagc ggcatggtgc agaccacgt gacaacaccc ggcagcatcc 1140
 caacaatctg cgacctggcc cgcaccttcg cccgcgagat gggcgaggcc aactaatagg 1200
 gatccctcga gaagcttgtc a 1221

- 5 <210> 20
- <211> 1221
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

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

<400> 20

ES 2 703 341 T3

gtcagcggcc gcaccggtac gcgtccacca tggctctgca gaaaaagctg gaagagctgg 60
 aactggatgg ctcttatcct ggacatcagc atgcttctgc ttttgatcag gctgccagat 120
 ctagaggaca ttctaattggc agcacagcac tgcggccagg atctcagcag gaagctacag 180
 aagtgagacc tgaacagaaa atgcctacac tgctgagagt gtatattgat ggaccacatg 240
 gaatgggaaa aacaaccaca acccagctgc tggggctctc cggatctaga gatgatattg 300
 tgtatgtgcc tgaacctatg acatattgga gagtgtctggg agcttctgaa acaattgcta 360
 atatctatac aacacagcat agactggatc aaggagaaat ttctgccgga gatgctgccg 420
 tggatgatgac atctgctcag attacaatgg gaatgcctta tgctgtgaca gatgctgtgc 480
 tggcaccaca tattggaggc gaagctggaa gctctcatgc accaccacca gcaactgacac 540
 tgatTTTTGA tcggcatcca attgcacatc tgctgtgtta tccggcagca agatatctga 600
 tgggaagcat gacaccacaa gccgtgctgg cttttgtggc tctgattcca ccaacactgc 660
 ctggaacaaa catcgtgctg ggagctctgc ctgaagatag acatatcgat cggctggcca 720
 aacggcagag acctggagaa cggctggatc tggccatgct ggctgccatt cggagagtgt 780
 atggcctgct ggctaacaca gtgagatata tgcagtgtgg aggctcttgg agagaggatt 840
 ggggacagct gtctggcaca gctgtgccac cacagggagc cgaaccacag agcaatgctg 900
 gaccacgacc acatatcgga gacacactgt ttacactggt tcgggcacca gaactgctgg 960
 caccaaatgg agacctgtac aacgtgtttg cctgggctct ggatgtgctg gctaaacggc 1020
 tgagatctat gcatgtgttt atcctggact atgatcagtc accggccgga tgtcgcgatg 1080
 ccctgctgca gctgacatct gggatggtgc agacacatgt gacaacacct ggatctatcc 1140
 caacaatctg tgatctggct agaacattcg ctaggagat gggagaggcc aactaatgag 1200
 gatccctcga gaagcttgtc a 1221

- 5 <210> 21
- <211> 1221
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

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

<400> 21

ES 2 703 341 T3

gtcagcggcc gcaccggtac gcgtccacca tggctctgca gaaaaagctg gaagagctgg	60
aactggatgg ctcttatcct ggacatcagc atgcttctgc ttttgatcag gctgccagat	120
ctagaggaca ttctaattggc agcacagcac tgcggccagg atctcagcag gaagctacag	180
aagtgagacc tgaacagaaa atgcctacac tgctgagagt gtatattgat ggaccacatg	240
gaatgggaaa aacaaccaca acccagctgc tggtggtctt cggatctaga gatgatattg	300
tgtatgtgcc tgaacctatg acatattgga gagtgtctggg agcttctgaa acaattgcta	360
atatctatac aacacagcat agactggatc aaggagaaat ttctgccgga gatgctgccg	420
tggatgatgac atctgctcag attacaatgg gaatgcctta tgctgtgaca gatgctgtgc	480
tggcaccaca tattggaggc gaagctggaa gctctcatgc accaccacca gcaactgacac	540
tgatTTTTGA tcggcatcca attttcgcac tgctgtgtta tccggcagca agatatctga	600
tgggaagcat gacaccacaa gccgtgctgg cttttgtggc tctgattcca ccaacactgc	660
ctggaacaaa catcgtgctg ggagctctgc ctgaagatag acatatcgat cggctggcca	720
aacggcagag acctggagaa cggctggatc tggccatgct ggctgccatt cggagagtgt	780
atggcctgct ggctaacaca gtgagatata tgcagtgtgg aggctcttgg agagaggatt	840
ggggacagct gtctggcaca gctgtgccac cacagggagc cgaaccacag agcaatgctg	900
gaccacgacc acatatcgga gacacactgt ttacactggt tcgggcacca gaactgctgg	960
caccaaattg agacctgtac aacgtgtttg cctgggctct ggatgtgctg gctaaacggc	1020
tgagatctat gcatgtgttt atcctggact atgatcagtc accggccgga tgtcgcgatg	1080
ccctgctgca gctgacatct gggatggtgc agacacatgt gacaacacct ggatctatcc	1140
caacaatctg tgatctggct agaacattcg ctaggagat gggagaggcc aactaatgag	1200
gatccctcga gaagcttgtc a	1221

5 <210> 22
 <211> 1185
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 22

ES 2 703 341 T3

gtcagcggcc gcaccggtac gcgtccacca tggccagcta ccccggccac cagcacgcca 60
 ggccttcga ccaggccgcc cgcagccgcg gccacagcaa cggcagcacc gactgcggc 120
 caggatctca gcaggaggcc accgaggtgc gccccgagca gaagatgcc accctgctgc 180
 gcgtgtacat cgacggacca cacggcatgg gcaagaccac caccaccag ctgctggtgg 240
 ccctgggcag ccgcgacgac atcgtgtacg tgcccagacc catgacctac tggcgcgtgc 300
 tgggcgccag cgagaccatc gccaacatct acaccacca gcaccgcctg gaccaaggcg 360
 agatcagcgc cggcgacgcc gccgtggtga tgaccagcgc ccagattaca atgggcatgc 420
 cctacgccgt gaccgacgcc gtgctggcac cacacatcgg cggcgaggcc ggcagcagcc 480
 acgcaccacc accagcactg accctgatct tcgaccggca cccaatcgca cacctgctgt 540
 gctaccggc agcacgctac ctgatgggct ccatgacacc acaagccgtg ctggccttcg 600
 tggcctgat cccaccaaca ctgccggca ccaacatcgt gctgggcgcc ctgcccagg 660
 accgccacat cgaccgcctg gccaaagcgc agcgcgccgg cgagcgcctg gacctggcca 720
 tgctggccgc catccgcgc gtgtacggcc tgctggccaa caccgtgcgc tacctgcagt 780
 gggcgccag ctggcgcgag gactggggcc agctgagcgg caccgccgtg ccaccacagg 840
 ggcggagcc acagagcaac gccggaccac gaccacacat cggcgacacc ctgttcacc 900
 tgttcgggc accagagctg ctggcaccia acggcgacct gtacaacgtg ttcgcctggg 960
 ccctggacgt gctggccaag cgctgcgct ccatgcacgt gttcatcctg gactacgacc 1020
 agtcaccggc cggctgcgc gacgcctgc tgcagctgac cagcggcatg gtgcagaccc 1080
 acgtgacaac acccggcagc atcccaaaa tctgcgacct ggcccgcacc ttcggccgcg 1140
 agatgggcca ggccaactaa tagggatccc tcgagaagct tgtca 1185

<210> 23
 <211> 36
 5 <212> ADN
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Descripción de desconocido: oligonucleótido de señal de exportación nuclear

10 <400> 23

ctgcagaaaa agctggaaga gctggaactg gatggc 36

15 <210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Desconocido

ES 2 703 341 T3

<220>

<223> Descripción de desconocido: péptido de señal de exportación nuclear

<400> 24

5

Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Gly
1 5 10

<210> 25

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de desconocido: péptido del resto dirigido de exportación nuclear

15

<400> 25

Trp Arg Glu Pro Ser Phe Met Ala Leu Ser
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Una partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK que comprende una secuencia de exportación nuclear (NES), y un sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo; para su uso en un procedimiento para identificar a un paciente con lesiones capaces de beneficiarse del tratamiento con terapia génica, comprendiendo dicho procedimiento:
- a) administrar al paciente la partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK que comprende una secuencia de exportación nuclear (NES);
 - b) administrar al paciente el sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo;
 - c) medir la cantidad relativa y la ubicación de la señal radioactiva presente en el paciente; y
 - d) determinar la ubicación de las lesiones en el paciente, donde los pacientes que tienen (i) una ubicación de señal radioactiva se correlacionan con las lesiones medidas en la etapa (d), y (ii) señales radioactivas por encima de un determinado umbral; se identifican como capaces de beneficiarse del tratamiento de terapia génica.
2. La partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK que comprende una secuencia de exportación nuclear (NES), y el sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el sustrato de HSV-TK se elige de entre el grupo que consiste en FHBG (9-[4-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina), FHPG (9-([3-fluoro-1-hidroxi-2-propoxi] metil)guanina), FGCV (fluoroganciclovir), FPCV (fluoropenciclovir), FIAU (1-(2'-deoxi-2'-fluoro-1-β-D-arabinofuranosil)-5-iodouracilo), FEAU (fluoro-5-etil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FMAU (fluoro-5-metil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FHOMP (6-((1-fluoro-3-hidroxiopropan-2-iloxi)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H, 3H)-diona), ganciclovir, valganciclovir, aciclovir, valaciclovir, penciclovir, pirimidina radiomarcada con cadena lateral 4-hidroxi-3-(hidroximetil)butilo en N-1 (HHG-5-FEP), o derivados de pirimidina sustituidos con 5-(2-)hidroxietilo) y 5-(3-hidroxi)propilo) que contienen cadenas laterales similares al 2,3-dihidroxi)propilo, aciclovir, ganciclovir y penciclovir.
3. La partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK que comprende una secuencia de exportación nuclear (NES), y el sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo, para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el nivel umbral es de al menos por encima de 2,0 SUV (valor de captación estandarizado) o de al menos 20 % por encima del fondo en una exploración de tomografía por emisión de positrones (PET).
4. La partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK que comprende una secuencia de exportación nuclear (NES), y el sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo, para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el nivel umbral está entre 1,0 SUV y 3,0 SUV, o entre 20 % a 40 % por encima del fondo en una exploración PET.
5. La partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK que comprende una secuencia de exportación nuclear (NES), y el sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo, para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, a) donde la secuencia de localización nuclear viral (NLS) del polinucleótido HSV-TK codificado está mutada en relación con un polinucleótido HSV-TK de tipo silvestre, y/o b) donde el polinucleótido timidina quinasa está mutado en relación con un polinucleótido HSV-TK de tipo silvestre para aumentar la unión al sustrato de la proteína timidina quinasa expresada.
6. La partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK que comprende una secuencia de exportación nuclear (NES), y el sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo, para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polinucleótido HSV-TK comprende una mutación A168H.
7. La partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK que comprende una secuencia de exportación nuclear (NES), y el sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo, para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la partícula retroviral comprende el polinucleótido de la SEQ ID NO:18.
8. La partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK que comprende una secuencia de exportación nuclear (NES), y el sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo, para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde la partícula retroviral comprende además un polinucleótido que codifica una proteína dirigida expresada en la envoltura viral de la partícula retroviral.
9. La partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK que comprende una secuencia de exportación nuclear (NES), y un sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo, para el uso de acuerdo con la reivindicación 1: que comprende además tratar a dicho paciente con la partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK

si: (i) la señal radioactiva medida en el paciente está por encima del umbral, y (ii) la ubicación de la señal radioactiva medida se correlaciona con la ubicación de las lesiones medidas en la etapa (d).

10. La partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK que comprende una secuencia de exportación nuclear (NES), y el sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo, para cualquiera de los usos de acuerdo con la reivindicación 9, donde el sustrato de HSV-TK se elige de entre el grupo que consiste en FHBG (9-[4-fluoro-3-(hidroximetil)butil]guanina), FHPG (9-([3-fluoro-1-hidroxi-2-propoxi] metil)guanina), FGCV (fluoroganciclovir), FPCV (fluoropenciclovir), FIAU (1-(2'-deoxi-2'-fluoro-1-β-D-arabinofuranosil)-5-iodouracilo), FEAU (fluoro-5-etil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FMAU (fluoro-5-metil-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FHOMP (6-((1-fluoro-3-hidroxiopropan-2-iloxi)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H, 3H)-diona), ganciclovir, valganciclovir, aciclovir, valaciclovir, penciclovir, pirimidina radiomarcada con cadena lateral 4-hidroxi-3-(hidroximetil)butilo en N-1 (HHG-5-FEP), o derivados de pirimidina sustituidos con 5-(2-)hidroxietilo y 5-(3-hidroxi)propilo) que contienen cadenas laterales similares al 2,3-dihidroxi)propilo, aciclovir, ganciclovir y penciclovir.
- 15 11. La partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK que comprende una secuencia de exportación nuclear, y el sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo, para cualquiera de los usos de acuerdo con la reivindicación 9, donde el nivel umbral es de al menos por encima de 2,0 SUV (valor de captación estandarizado) o de al menos 20 % por encima del fondo en una exploración PET.
- 20 12. La partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK que comprende una secuencia de exportación nuclear, y el sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo, para cualquiera de los usos de acuerdo con la reivindicación 9, donde el nivel umbral está entre 1,0 SUB y 3,0 SUV.
13. La partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK que comprende una secuencia de exportación nuclear (NES), y el sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo, para cualquiera de los usos de acuerdo con la reivindicación 9, a) donde la secuencia de localización nuclear viral (NLS) del polinucleótido HSV-TK codificado está mutada en relación con un polinucleótido HSV-TK de tipo silvestre, y/o b) donde el polinucleótido de timidina quinasa está mutado en relación con un polinucleótido HSV-TK de tipo silvestre para aumentar la unión al sustrato de la proteína timidina quinasa expresada.
- 30 14. La partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK que comprende una secuencia de exportación nuclear, y el sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo, para cualquiera de los usos de acuerdo con la reivindicación 9, donde la partícula retroviral comprende el polinucleótido de la SEQ ID NO:18.
- 35 15. La partícula retroviral que comprende un polinucleótido HSV-TK que comprende una secuencia de exportación nuclear, y el sustrato de HSV-TK unido a un indicador radioactivo, para cualquiera de los usos de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende además una proteína dirigida expresada en la envoltura viral de la partícula retroviral.

FIG.1

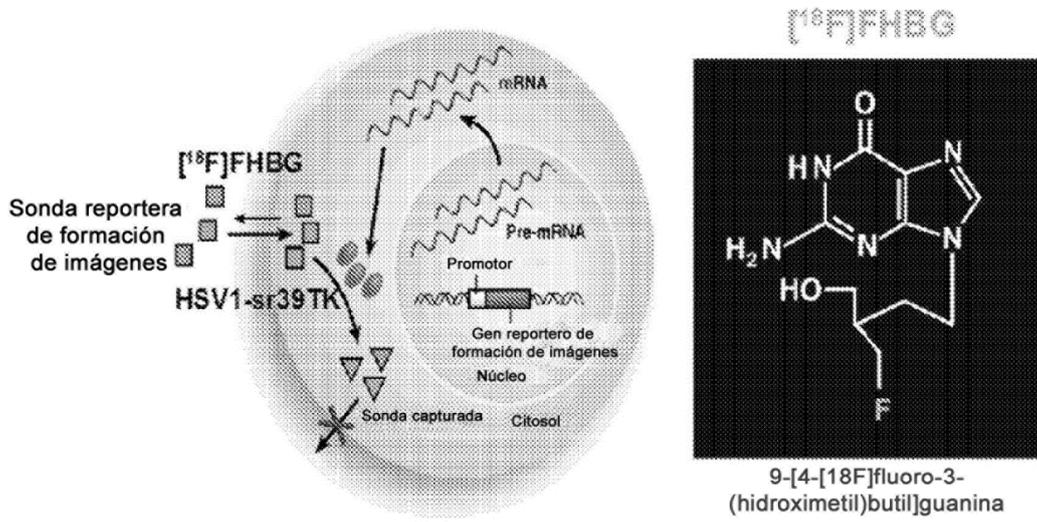


FIG. 2

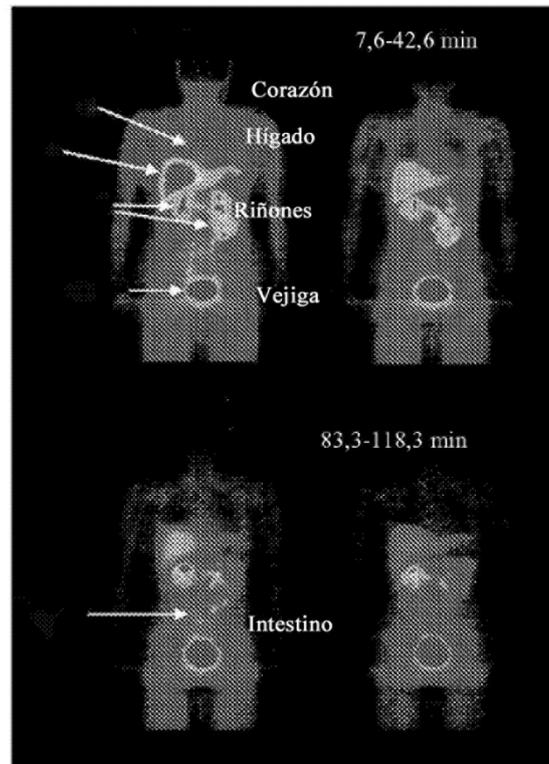


FIG. 3

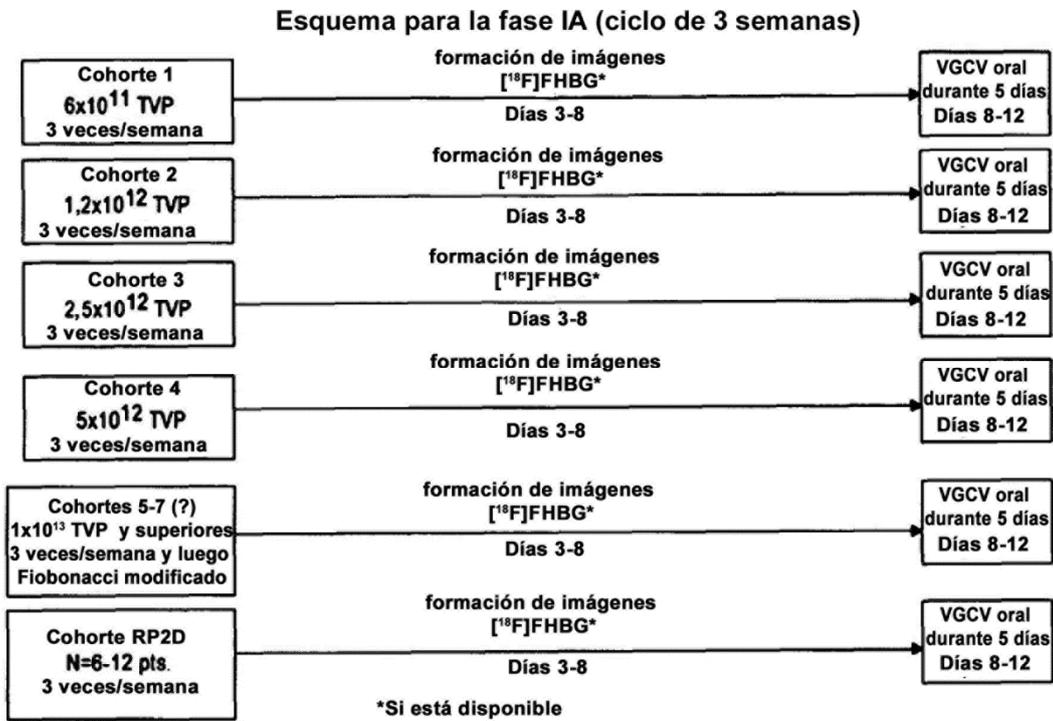


FIG. 4

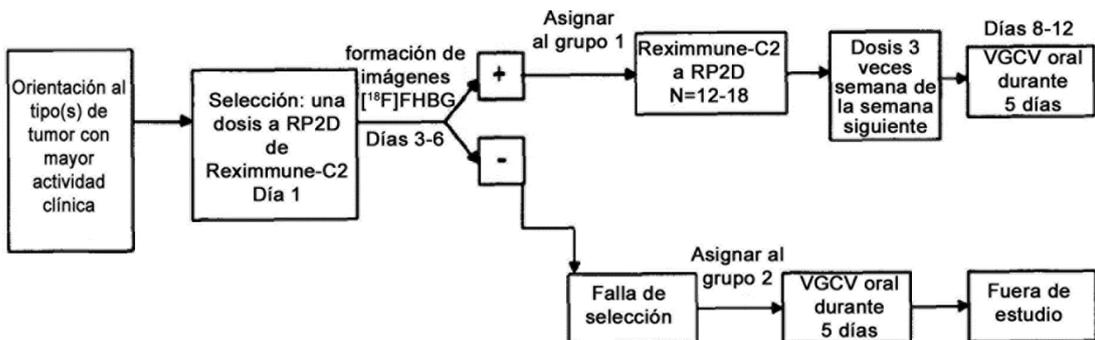


FIG. 5

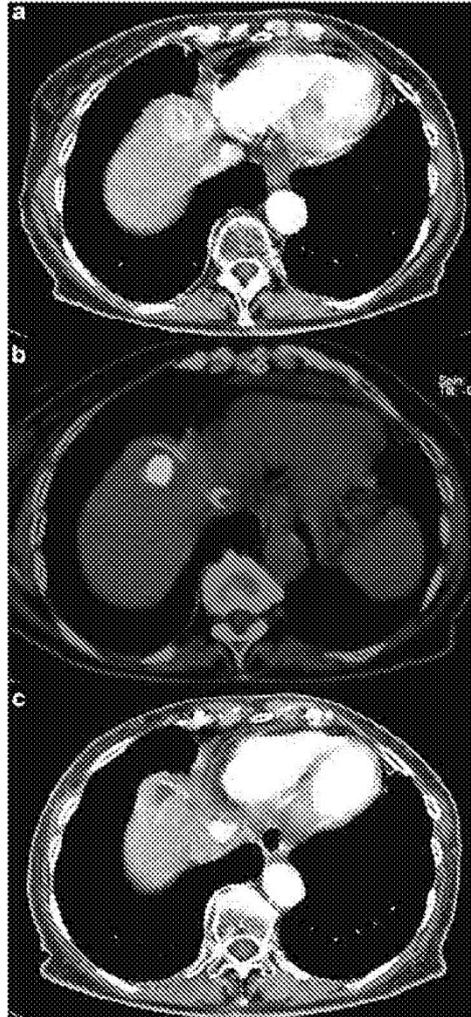


FIG. 6

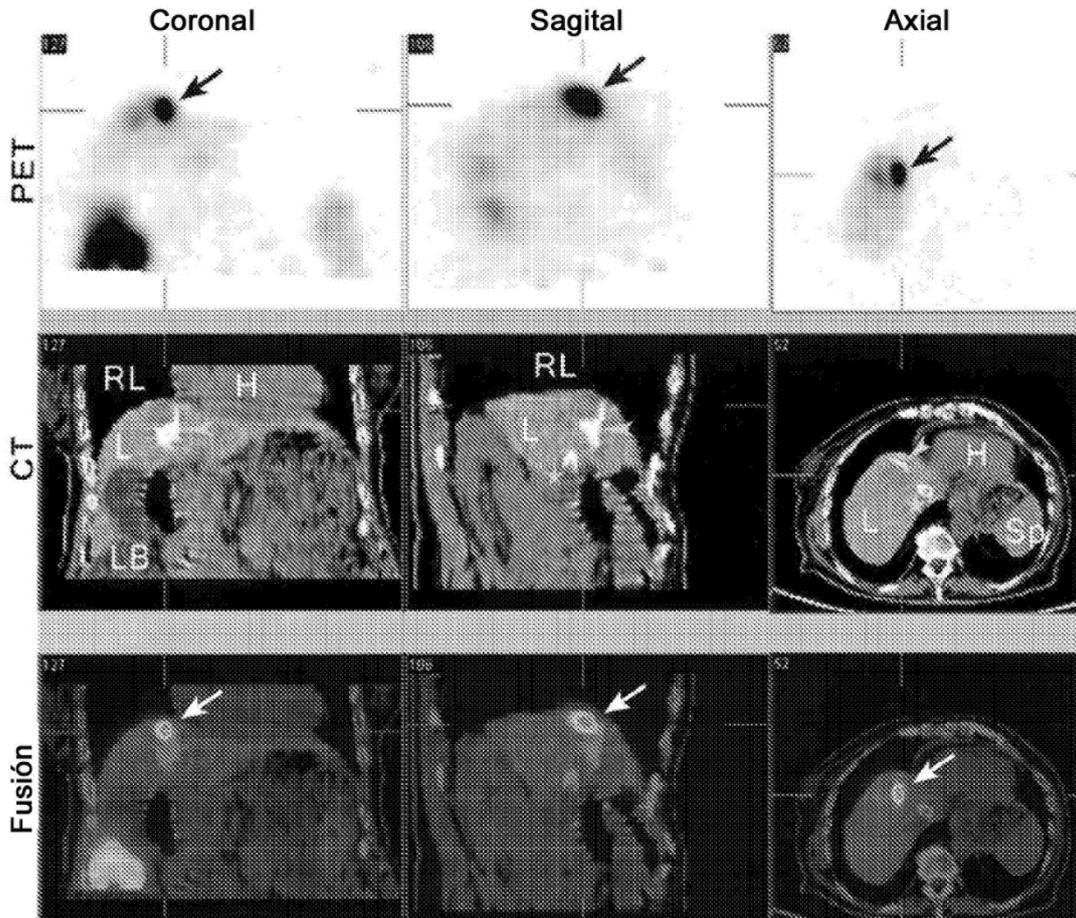


FIG. 7

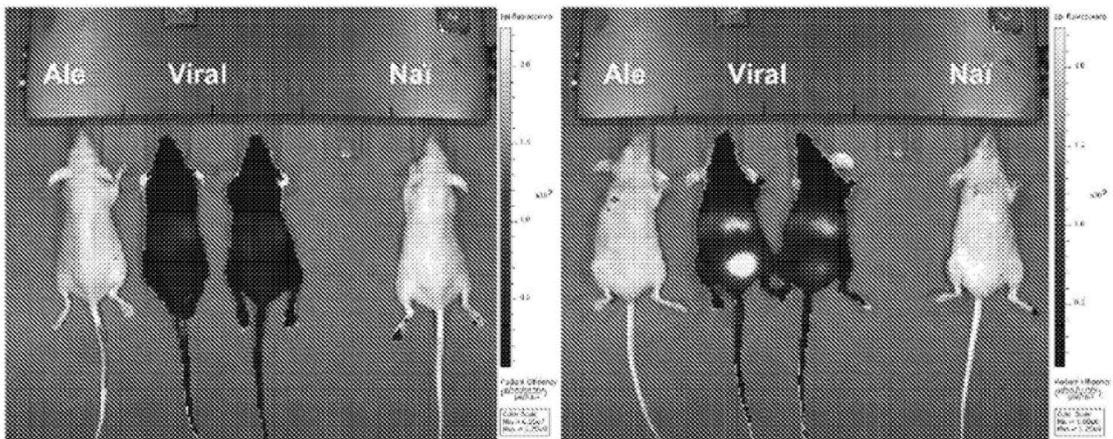


FIG. 8

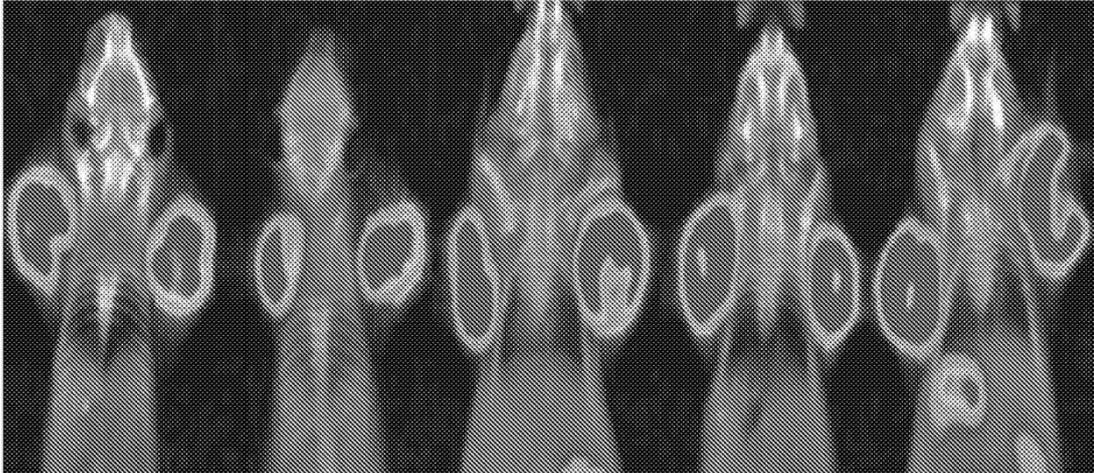


FIG. 9

