



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 320 434**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03722322 .9**

(96) Fecha de presentación : **21.05.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1509600**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.03.2005**

(54) Título: **Timidina quinasas vegetales y su uso.**

(30) Prioridad: **23.05.2002 DK 2002 00794**
07.02.2003 DK 2003 00178

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.05.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.05.2009

(73) Titular/es: **Wolfgang Knecht**
Husargatan 3
41122 Göteborg, SE
Birgitte Munch-Petersen y
Jure Piskur

(72) Inventor/es: **Knecht, Wolfgang;**
Munch-Petersen, Birgitte y
Piskur, Jure

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Timidina quinasas vegetales y su uso.

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a nuevas timidina quinasas vegetales y a su uso en terapia génica. Más específicamente, la invención proporciona nuevas timidina quinasas obtenidas de tomate.

10 En otros aspectos, la invención proporciona polinucleótidos nuevos que codifican las timidina quinasas vegetales, construcciones de vectores que comprenden el polinucleótido, células huésped que llevan el polinucleótido o vector, procedimientos de sensibilización de células a fármacos, procedimientos de inhibición de agentes patógenos en animales de sangre caliente y procedimientos de síntesis de monofosfatos.

15 En una realización preferida, la invención proporciona una combinación única de una timidina quinasa vegetal y el análogo de nucleósido AZT para tratar el crecimiento celular anómalo.

Técnica anterior

20 El ADN está compuesto de cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósidos, proporcionados por la ruta salvaje o una nueva. La enzima clave de la ruta nueva es la ribonucleótido reductasa, que cataliza la reducción del grupo 2'-OH de los difosfatos de nucleósidos, y las enzimas salvajes clave son desoxirribonucleósido quinasas, que fosforilan desoxirribonucleósidos a los correspondientes monofosfatos de desoxirribonucleósido.

25 Las desoxirribonucleósido quinasas de diferentes organismos difieren en su especificidad de sustrato, regulación de la expresión génica y localización celular. En las células de mamífero hay cuatro enzimas con especificidades que se superponen, las timidina quinasas 1 (TK1) y 2 (TK2), desoxicitidina quinasa (dCK) y desoxiguanosina quinasa (dGK), que fosforilan los desoxirribonucleósidos de purina y pirimidina. TK1 y TK2 son específicas de pirimidina y fosforilan la desoxiuridina (dUrd) y timidina (dThd), y TK2 también fosforila la desoxicitidina (dCyd). dCK fosforila dCyd, desoxiadenosina (dAdo) y desoxiguanosina (dGuo), pero no la dThd. dGK fosforila dGuo y dAdo. TK1 y dCK son citosólicas, y TK2 y dGK se localizan en las mitocondrias, aunque informes recientes indican una localización también citoplasmática de TK2.

35 Basándose en la homología con una timidina quinasa derivada de un virus *Myxoma*, se ha propuesto un gen del arroz que codifica una timidina quinasa [Hemayet Ullah, Dominique Robertson, and Roger C. Fites: A Gene for Thymidine Kinase in Plants (Nº de acceso AF066050; Plant gene register PGR99-048) *Plant Physiol.* 1999 **119** 1567]. Sin embargo, sólo se aisló una secuencia parcial, cuya secuencia no es suficiente para la expresión de la proteína activa.

40 Se han anotado dos trozos de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* como timidina quinasas putativas en GenBank™ (Nº de acceso AAF13097 y BAB09824). Sin embargo, hasta la fecha todavía no se han llevado a cabo trabajos experimentales dirigidos a la caracterización, propiedades, localización, uso o función biológica de quinasas vegetales.

45 La AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina, Zidovudina, Retrovir®) es un análogo de nucleósido usado en el tratamiento de infecciones por el VIH. La etapa limitante de la velocidad de su activación en células humanas es la activación del monofosfato de AZT (AZTMP) al difosfato de AZT.

50 Se ha sugerido usar la timidina quinasa de tipo 1 del virus *Herpes Simplex* humano (HSV1-TK), que tiene una actividad de monofosfato de timidina quinasa endógena, para el tratamiento por terapia génica de infecciones por el VIH. La HSV1-TK está relacionada filogenéticamente con la TK2 humana, pero no con la TK1 humana. Además, se ha sugerido el uso de HSV1-TK con el fin de mejorar la actividad antivírica de la zidovudina, y se ha mostrado que el uso de HSV1-TK en combinación con la AZT es capaz de matar bacterias *E. coli* transformadas. Sin embargo, debido a que se cree que la fosforilación del AZTMP es la etapa limitante de la velocidad en la activación de la AZT en seres humanas, no se han llevado a cabo trabajos experimentales dirigidos a una combinación eficaz de la AZT y una timidina quinasa para usar en el tratamiento del cáncer humano o en otras enfermedades humanas relacionadas con el crecimiento celular anómalo.

Resumen de la invención

60 Un objetivo de la presente invención es proporcionar nuevas timidina quinasas vegetales para convertir análogos de nucleósidos en sustancias tóxicas, y útiles para convertir análogos de nucleósidos en monofosfatos y monofosfatos de análogos de nucleósidos en los correspondientes difosfatos. Los genes de timidina quinasas vegetales aislados se pueden usar en terapia génica para matar selectivamente células que contienen los genes (y que se exponen a al menos un análogo de nucleósido) y las timidina quinasas aisladas proporcionadas por la presente invención se pueden usar para los procedimientos industriales importantes de fosforilación de nucleósidos y/o análogos de nucleósidos. Las timidina quinasas aisladas también se pueden usar para matar células inyectando las enzimas en las células y sometiendo las células a al menos un análogo de nucleósido. Siempre que se haga referencia a un análogo de nucleósido y/o su monofosfato, se entiende que este análogo de nucleósido preferiblemente es un análogo de desoxinucleósido,

más preferiblemente un análogo de desoxirribonucleósido, y más preferiblemente la AZT.

Más específicamente, la invención proporciona una combinación única de una timidina quinasa vegetal y el análogo de nucleósido AZT para tratar el crecimiento celular anómalo.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención proporciona polinucleótidos aislados que codifican enzimas timidina quinasa vegetales obtenidas de tomate (*Lycopersicum esculentum*). Estas timidina quinasa vegetales han resultado ser especialmente eficaces en la fosforilación de la AZT y tienen una actividad de monofosfato quinasa endógena alta inesperada, especialmente en monofosfatos de análogos de nucleósidos tales como el AZTMP.

En otro aspecto la invención proporciona polinucleótidos aislados que codifican enzimas timidina quinasa derivadas de plantas, cuyas enzimas timidina quinasa, cuando se comparan con la timidina quinasa de tipo 1 del virus *Herpes Simplex* humano (HSV1-TK), disminuyen al menos tres (3) veces la dosis letal (DL₁₀₀). Preferiblemente, este análogo de nucleósido es la AZT.

En un tercer aspecto, la invención proporciona polinucleótidos mutados y/o truncados aislados que codifican variantes de la enzima timidina quinasa obtenidas de plantas.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona enzimas timidina quinasa expresadas por un polinucleótido de la invención, o variantes de enzima timidina quinasa expresadas por un polinucleótido mutado (y/o truncado) de la invención.

En un quinto aspecto, la invención proporciona enzimas timidina quinasa vegetales obtenidas de tomate (*Lycopersicum esculentum*).

En un sexto aspecto, la invención proporciona construcciones de vectores que comprenden un polinucleótido de la invención y un promotor operativamente unido al polinucleótido.

En un séptimo aspecto, la invención proporciona líneas celulares empaquetadas capaces de producir viriones infecciosos que comprenden un vector de la invención.

En un octavo aspecto, la invención proporciona células huésped que comprenden un polinucleótido de la invención, o un vector de expresión de la invención.

En un noveno aspecto, la invención proporciona procedimientos de sensibilización de células a profármacos, cuyos procedimientos comprenden las etapas de (i) transfectar o transducir una célula con una secuencia de polinucleótido que codifica una enzima timidina quinasa vegetal que promueve la conversión de dicho profármaco en un fármaco (citotóxico), o suministrar de otra forma la timidina quinasa vegetal a la célula; y (ii) suministrar un profármaco a dicha célula; por los que la célula es más sensible al fármaco (citotóxico) que al profármaco.

En un décimo aspecto, la invención proporciona procedimientos para inhibir agentes patógenos en animales de sangre caliente, cuyos procedimientos comprenden administrar a dichos animales un polinucleótido de la invención, o un vector de la invención.

En un decimoprimer aspecto, la invención se refiere al uso de las enzimas timidina quinasa vegetales de la invención para la fosforilación de nucleósidos o análogos de nucleósidos.

En un decimosegundo aspecto, la invención proporciona procedimientos de fosforilación de nucleósidos o análogos de nucleósidos, cuyos procedimientos comprenden las etapas de (i) someter el nucleósido o análogo de nucleósido a la acción de la enzima timidina quinasa vegetal de la invención, y (ii) recuperar el nucleósido o análogo de nucleósido fosforilado.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a artículos que contienen un análogo de nucleósido y una timidina quinasa obtenida de planta de acuerdo con la invención, o un gen que codifica dicha timidina quinasa obtenida de planta, o un vector que comprende dicho gen que codifica dicha timidina quinasa obtenida de planta, como una combinación para la administración simultánea, separada o sucesiva en terapia de cáncer.

Otros objetivos de la invención serán evidentes para el experto en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos.

Descripción detallada de la invención

Timidina quinasa vegetales

En su primer aspecto la invención proporciona nuevas proteínas que tienen actividad de enzima timidina quinasa (TK), y cuyas proteínas se obtienen de plantas. Más específicamente, las nuevas enzimas timidina quinasa vegetales se obtienen del tomate (*Lycopersicum esculentum*).

En el contexto de la presente invención, una timidina quinasa es una enzima capaz de fosforilar timidina, pero que no se capaz de fosforilar un nucleósido de purina usando los ensayos descritos en el Ejemplo 3, Tabla 5. Una timidina quinasa puede o no fosforilar desoxicitidina.

Las enzimas timidina quinasa de la invención son particularmente útiles para el tratamiento del crecimiento celular anómalo por activación de análogos de nucleósidos, en particular de ATZ.

Basándose en un alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple de Clustal W (1.82) de las timidina quinasas del tomate, pino y arroz, se identificaron tres patrones y varios restos conservados, semiconservados y menos conservados, como se muestran en la siguiente Tabla 1. En la Tabla 1, el alineamiento empieza con el resto de aminoácido nº 65 de la TK1 del arroz, porque los primeros 64 aminoácidos no se alinean con las otras timidina quinasas.

TABLA 1

Alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiples de CLUSTAL W (1.82)

Arroz-TK1	-----	-----	-----	-----	-MRAQPSYP-	-----	(008)
Tomate-TK1	-----	-----	-----	-----	-MAPSSSARN	PVDLRNGSKN	(019)
AT-TK1a	-----	-----	-----	-----	-MATLKASFL	IKTLDSVUTG	(019)
Pino-TK1	-----	-----	-----	-----	-MDSGIYIT-	-----	(008)
AT-TK1b	MRTLISFSLA	PFSLELHKPS	LFSTALRFSP	SINNITPTNS	PPSTISTRL	QTKATRVTS	(060)
Arroz-TK1	-----	-GEIHVIVGP	MFAGKTTALL	RRVQVEAGTG	RNVALIKSDK	DNRYGLDSVV	(057)
Tomate-TK1	SFC-----P	VGEIHVIVGP	MFAGKTTALL	RRVNLESNDG	RRVVLKSSK	DARYAVDAVV	(073)
AT-TK1a	DPLSDLERRG	SGAVHVIMGP	MFSKGSTELL	RRIKSEISDG	RSVAMLESSE	DTRYAKDSVV	(079)
Pino-TK1	-----	SGEIHILIGP	MFAGKTTALI	RKMRAEIQMG	RRVVLVKSOK	DTRYGLMSVV	(058)
AT-TK1b	SSSQPLSSSS	PGEIHVVVGP	MFSKGTITLL	RRILAERTG	KRIAIKSNK	DTRYCTESTV	(120)
		* : : : : *	** : * : * : *	* : : *	: : : : *	* * * : : *	
Arroz-TK1	THDGTRPCW	ALPELSSFD	KLGTDAYD-K	VDVIGIDEAQ	FFDLHDFCC	KAADRDGKIV	(116)
Tomate-TK1	THDGTRPCW	SLPDLSSFKQ	RPGKDAYE-K	VDVIGIDEAQ	FFGDLYEFC	NAADFDGKII	(132)
AT-TK1a	THDGIGPCW	ALPDLMSFPE	KFGLDAYN-K	LDVIGIDEAQ	FFGDLYEFC	KVADDDGKIV	(138)
Pino-TK1	SHDGARPCW	AVADLASFKG	KLGEAYK-Q	VDVIGIDEAQ	FFEDLYSFCQ	VAADRDGKIV	(117)
AT-TK1b	THDGKYPGW	SLPDLSSFKS	RPGFDGYENR	LDVIGIDEAQ	FFGDLYEFCR	EAADDEGKIV	(180)
	: *** :	*** : : : *	: * : *	: : : : *	* * * : *	: * * : *	
				-----	-----	-----	
				Patrón I			
Arroz-TK1	VVAGLDGDYK	RNKFGSVLDI	IPLADSVTKL	TARCELCGR	AFFTLRKTR	TKTELIGGAD	(176)
Tomate-TK1	VVAGLDGDYL	RKSPGSLVDI	IPLADTVTKL	TARCELCNR	AFFTFRKTR	TETELIGGAD	(192)
AT-TK1a	IVAGLDGDYL	RKSPGAVLDI	IPLADSVTKL	TARCEVCGK	AFFTLRKNC	TRTELIGGAD	(198)
Pino-TK1	IVAGLDGDYL	RKSPGSALDI	IPLADSVTKL	KSRCELCGR	ASFTFRKTR	RKTEVVGAD	(177)
AT-TK1b	IVAGLDGDFM	RRRFGSLVDL	IPLADTVTKL	TSRCEVCGKR	ALFTMRKTR	KTELIGGAE	(240)
	: ***** :	*. * : *	** : * : *	: * : *	* * * : *	: * * : *	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	Patrón II		Región Lid				
Arroz-TK1	VYMPVCRQHY	LDGQIVIRAT	RIVLD-LEKS	KVTHAFK---	---	(212)	
Tomate-TK1	IYMPVCRQHY	VNGQSVNESA	KRVLE-SHKV	SNEILLESPL	VDP	(234)	
AT-TK1a	VYMPVCRQHY	ITNEHIVIKAS	KVLEDSKA	RAESCVAATI	---	(238)	
Pino-TK1	IYMPVCRREY	VNGQIVIDTT	RAVLE-SFEV	QYDACAQATT	TSG	(219)	
AT-TK1b	VYMPVCRSHY	VCGQNVLETA	RAVLD---SS	NNHSVVASSL	---	(277)	
	: ***** *	: : * : :	: * :				
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	Patrón III						

- indica patrones (Patrón I, Patrón II y Patrón III)

* indica restos conservados

: indica restos semiconservados

. indica restos menos conservados

Por lo tanto, en una realización preferida, la enzima timidina quinasa vegetal de la invención comprende uno o más de los siguientes tres patrones:

Val Ile Gly Ile Asp Glu Ala Gln Phe Phe (Patrón I)

Val Ala Gly Leu Asp Gly (Patrón II)

Tyr Met Pro Val Cys Arg (Patrón III)

ES 2 320 434 T3

En otra realización preferida, la enzima timidina quinasa vegetal de la invención comprende la región Lid.

Val Al Lys Leu A2 A3 Arg Cys Glu A4 (región Lid), en la que A1 se selecciona de Thr y Val, A2 se selecciona de Thr y Lys, A3 se selecciona de Ala y Ser, y A4 se selecciona de Leu y Val.

En una realización más preferida, la enzima timidina quinasa vegetal de la invención comprende todos los restos conservados identificados en la Tabla 1.

Identidad de los polipéptidos

En otra realización preferida, la enzima timidina quinasa vegetal de la invención comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID NO: 4 o como SEQ ID NO: 5, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, todavía más preferido al menos 90%, todavía más preferido al menos 95% de identidad, lo más preferido al menos 98% de identidad, cuando se determina a lo largo de la longitud entera de SEQ. ID.

En el contexto de esta invención "identidad" es una medida del grado de homología de secuencias de aminoácidos. Con el fin de caracterizar la identidad, las secuencias objeto se alinean de modo que se obtenga la homología (correspondencia) de orden mayor. Basándose en estos principios generales, el "porcentaje de identidad" de dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo BLASTP [Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden: Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences; *FEMS Microbiol. Lett.* 1999 **174** 247-250], que está disponible en la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y usando los parámetros por defecto sugeridos en el mismo (es decir, Matriz = Blosum62; Hueco abierto = 11; Extensión de huecos = 1; Penalizaciones por hueco x_dropoff = 50; Esperado = 10; tamaño de palabra = 3; Filtro activado). El algoritmo BLAST determina el % de identidad de secuencia en un intervalo de superposición entre las dos secuencias alineadas. Para los propósitos de la presente invención, el porcentaje de identidad de secuencia se calcula en un intervalo de superposición de al menos 50 aminoácidos, más preferiblemente al menos 75 aminoácidos, más preferiblemente al menos 100 aminoácidos, calculándose el intervalo por BLASTP con los parámetros por defecto.

Los resultados de esta comparación con BLASTP se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2

Comparación con BLASTP de secuencias de proteínas de timidina quinasa de diferente origen vegetal

TK	Tomate	Arroz	AT (a)	AT (b)
Pino	65/82/197	69/84/193	59/77/208	62/83/195
Tomate	-	75/86/196	69/84/193	65/81/208
Arroz	-	-	69/84/193	65/83/197
AT (a)	-	-	-	60/78/215

Identities (%) / Positives (%) / longitud del fragmento comparado

Timidina quinasa de pino (*Pinus taeda*)

Timidina quinasa de tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Timidina quinasa de arroz (*Oryza sativa*)

Timidina quinasa de arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*)

(a) y (b)

En una realización preferida, la enzima timidina quinasa vegetal de la invención se obtiene de tomate, y tiene al menos 80%, incluso más preferidamente al menos 90%, todavía más preferido al menos 95%, lo más preferido al menos 98% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 4 ó 5.

Polipéptidos variantes

En una realización más preferida la enzima timidina quinasa vegetal de la invención comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID NO: 4 o como SEQ ID NO: 5.

En el contexto de esta invención, la expresión “análogo funcional” significa un polipéptido (o proteína) que tiene actividad de timidina quinasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia presentada como SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, en una o más posiciones de aminoácidos. Dichos polipéptidos análogos incluyen polipéptidos que comprenden sustituciones conservativas, variantes de corte y empalme, isoformas, homólogos de otras especies, y polimorfismos.

Como se define en el presente documento, la expresión “sustituciones conservativas” indica la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto biológicamente similar. Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen

(i) la sustitución de un resto no polar o hidrófobo tal como alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, metionina, fenilalanina o triptófano por otro, en particular la sustitución de alanina, leucina, isoleucina, valina o prolina por otro; o

(ii) la sustitución de un resto polar neutro (no cargado) tal como serina, treonina, tirosina, asparagina, glutamina o cisteína por otro, en particular la sustitución de arginina por lisina, glutamina por ácido aspártico o glutamina por asparagina; o

(iii) la sustitución de un resto cargado positivo tal como lisina, arginina o histidina por otro; o

(iv) la sustitución de un resto cargado negativo tal como ácido aspártico o ácido glutámico por otro.

La expresión sustitución conservativa también incluye el uso de un resto aminoácido sustituido en lugar de un resto aminoácido original, con la condición de que los anticuerpos dirigidos contra el polipéptido sustituido también inmunorreaccionen con el polipéptido no sustituido.

Las modificaciones de esta secuencia primaria de aminoácidos pueden dar como resultado proteínas que tienen actividad sustancialmente equivalente comparadas con el polipéptido homólogo no modificado, y por lo tanto se pueden considerar análogos funcionales de las proteínas originales. Dichas modificaciones pueden ser deliberadas, p. ej., por mutagénesis dirigida, o pueden ocurrir espontáneamente, e incluyen variantes de corte y empalme, isoformas, homólogos de otras especies y polimorfismos. Dichos análogos funcionales también están contemplados de acuerdo con la invención.

Deleciones C-terminales

En otra realización la invención proporciona enzimas timidina quinasa vegetales que tienen deleciones C-terminales cuando se comparan con la enzima original (salvaje). Dichas enzimas truncadas se pueden obtener por técnicas convencionales, p. ej., mutagénesis dirigida, o como se describe en los ejemplos de trabajo.

De acuerdo con la invención, se ha encontrado que las deleciones C-terminales crean enzimas con propiedades mejoradas, en particular mayor estabilidad y/o mejor especificidad de sustrato, cuando se compara con la enzima de tipo salvaje.

En una realización más preferida, la invención proporciona enzimas timidina quinasa que tienen una delección C-terminal del orden de 1-60 restos de aminoácidos, preferiblemente 1-50 restos de aminoácidos, más preferido 1-40 restos de aminoácidos, incluso más preferido 1-30 restos de aminoácidos, todavía más preferido 1-26 restos de aminoácidos, lo más preferido 1-24 restos de aminoácidos.

En una realización incluso más preferida, la enzima timidina quinasa vegetal de la invención es una enzima timidina quinasa obtenida del tomate que tiene una delección C-terminal de 26 restos de aminoácidos. En una realización más preferida, la enzima timidina quinasa vegetal de la invención es una enzima timidina quinasa que tiene una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 5.

Polinucleótidos que codifican timidina quinasa vegetales

En otro aspecto, la invención proporciona polinucleótidos aislados que codifican enzimas timidina quinasa vegetales obtenidas de tomate, preferiblemente las enzimas timidina quinasa vegetales descritas antes.

Protocolo de hibridación

En una realización preferida, el polinucleótido aislado de la invención es capaz de hibridar con la secuencia de polinucleótido presentada como el SEQ ID NO: 3, o su cadena complementaria.

La hibridación puede llevarse a cabo al menos en condiciones de restricción baja, pero preferiblemente en condiciones de restricción media o alta.

Las condiciones experimentales adecuadas para determinar la hibridación en condiciones de restricción baja, media o alta, respectivamente, entre una sonda de nucleótidos y una secuencia de ADN o ARN homóloga, implica sumergir

previamente el filtro que contiene los fragmentos de ADN o ARN que se van a hibridar en 5 x SSC [cloruro sódico/citrato sódico; véase, *Sambrook y col.*; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY 1989] durante 10 minutos, y prehibridar el filtro en una solución de 5 x SSC, 5 x solución de Denhardt [véase, *Sambrook y col.*; *citado antes*], SDS al 0,5% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado tratado con ultrasonidos 100 µg/ml [véase, *Sambrook y col.*; *citado antes*], seguido de hibridación en la misma solución que contiene una concentración de 10 ng/ml de una sonda con cebado aleatorio [*Feinberg A P & Vogelstein B*; *Anal. Biochem.* 1983 **132** 6-13], marcada con ³²P-dCTP (actividad específica > 1 x 10⁹ cpm/µg) durante 12 horas a aproximadamente 45°C.

Después el filtro se lava dos veces durante 30 minutos en 2 x SSC, SDS al 0,5% a una temperatura de al menos 55°C (condiciones de restricción baja), más preferido de al menos 60°C (condiciones de restricción media), todavía más preferido de al menos 65°C (condiciones de restricción media/alta), incluso más preferido de al menos 70°C (condiciones de restricción alta), y todavía lo más preferido de al menos 75°C (condiciones de restricción muy altas).

Los ácidos nucleicos complementarios o ácidos nucleicos señal pueden marcarse por procedimientos convencionales conocidos en la materia, para detectar la presencia de oligonucleótidos hibridados. El procedimiento de detección más común es el uso de autorradiografía con, p. ej., sondas marcadas con ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³²P, que después pueden detectarse usando una película de rayos X. Otros marcadores incluyen ligandos, que se unen a anticuerpos marcados, fluoróforos, agentes quimiluminiscentes, enzimas o anticuerpos, que después pueden servir como miembros de parejas de unión específicas para un ligando marcado.

Identidad de las secuencias de ADN

En otra realización preferida, el polinucleótido aislado de la invención tiene al menos 73%, preferiblemente al menos 75%, más preferido al menos 80%, incluso más preferido al menos 90%, todavía más preferido al menos 95%, lo más preferido al menos 98% de identidad con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 3 cuando se determina a lo largo de la longitud entera del SEQ ID NO: 3. Para los propósitos de la presente invención, el porcentaje de identidad de secuencia se calcula cuando BLASTN proporciona un intervalo de solapamiento de al menos 100 nucleótidos, determinándose el intervalo con los parámetros por defecto. Más preferiblemente, el intervalo de superposición es al menos 150 nucleótidos, más preferiblemente al menos 225 nucleótidos, más preferiblemente al menos 300 nucleótidos.

En el contexto de esta invención, "identidad" es una medida del grado de homología de secuencias de nucleótidos. Con el fin de caracterizar la identidad, las secuencias objeto se alinean de modo que se obtenga la homología de orden mayor (correspondencia). Basándose en estos principios generales, el "porcentaje de identidad" de dos secuencias de aminoácidos o dos ácidos nucleicos se determina usando el algoritmo BLASTN [*Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden*: Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences; *FEMS Microbiol. Lett.* 1999 **174** 247-250], que está disponible en la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y usando los parámetros por defecto sugeridos en el mismo (es decir, Recompensa por una correspondencia = 1; Penalización por una correspondencia = -2; Opción de cadena = ambas cadenas; Hueco abierto = 5; Hueco de extensión = 2; Penalizaciones por hueco x_dropoff = 50; Esperado = 10; Tamaño de palabra = 11; Filtro activado). El algoritmo BLAST determina el % de identidad de secuencia en un intervalo de superposición entre las dos secuencias de nucleótidos alineadas. Para los propósitos de la presente invención, el porcentaje de identidad de secuencia se calcula en un intervalo de superposición de al menos 100 nucleótidos, calculándose el intervalo por BLASTN con los parámetros por defecto. Más preferiblemente, el intervalo de superposición es al menos 300 nucleótidos.

Los resultados de esta comparación con BLASTN se presentan en la Tabla 3.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 3

Comparación con BLASTN de secuencias de nucleótidos de timidina quinasa de diferente origen vegetal

TK	Tomate	Arroz	AT (a)	AT (b)
Pino	74/194 * 82/51	76/158	72/236	74/206
Tomate	-	73/383	74/503	74/285
Arroz	-	-	74/315	◇
AT (a)	-	-	-	77/200

Identities (%) / longitud del fragmento comparado

* dividido en un fragmento N y C-terminal

◇ Similitud no significativa

Timidina quinasa de pino (*Pinus taeda*)

Timidina quinasa de tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Timidina quinasa de arroz (*Oryza sativa*)

Timidina quinasa de *Arabidopsis thaliana* (a) y (b)

Secuencias de ADN análogas

En su realización más preferida, el polinucleótido aislado de la invención comprende la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 3 o un análogo funcional de la misma.

En el contexto de esta invención, el término “análogo funcional” cubre polinucleótidos con modificaciones conservativas y polinucleótidos que codifican polipéptidos funcionalmente equivalentes.

En el contexto de esta invención, la expresión “polinucleótidos con modificaciones conservativas” se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas.

Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina es especificada por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los correspondientes codones descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones de modificación conservativa. Todas las secuencias de ácido nucleico en el presente documento, que codifican un polipéptido, también describen todas las posibles variaciones silenciosas del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para la metionina) puede modificarse para dar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico, que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Vectores de expresión

En un tercer aspecto, la invención proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden el polinucleótido aislado de la invención y un promotor operativamente unido al polinucleótido.

El vector de expresión de la invención preferiblemente es uno adecuado para llevar a cabo la expresión en un organismo eucariota.

En una realización más preferida, el vector de expresión de la invención es un vector de virus, en particular un vector de virus *Herpes simplex*, un vector de adenovirus, un vector de virus asociado a adenovirus, un vector de lentivirus, un vector de retrovirus o un vector de virus vaccinia.

Líneas celulares de empaquetamiento

En un cuarto aspecto, la invención proporciona líneas celulares de empaquetamiento capaces de producir un virión infeccioso, cuya línea celular comprende un vector de la invención.

Las células de empaquetamiento se refieren a células que contienen los elementos necesarios para la producción de virus recombinantes infecciosos, de los que carece un vector de virus recombinante. En la técnica anterior se conocen procedimientos para preparar líneas celulares de empaquetamiento.

Células huésped

En un quinto aspecto, la invención proporciona una célula huésped aislada que comprende el polinucleótido aislado de la invención, o el vector de expresión de la invención.

En una realización preferida, la célula huésped de la invención es una célula bacteriana, preferiblemente una célula eucariota, en particular una célula de mamífero, una célula humana, un oocito, o una célula de levadura.

En una realización más preferida, la célula huésped de la invención es una célula humana, una célula de perro, una célula de mono, una célula de rata, una célula de cerdo o una célula de ratón.

Composiciones farmacéuticas

Para usar en terapia, la enzima timidina quinasa vegetal de la invención se puede administrar de cualquier forma conveniente. En una realización preferida, la enzima timidina quinasa vegetal de la invención se incorpora en una composición farmacéutica junto con uno o más adyuvantes, excipientes, vehículos y/o diluyentes, y la composición farmacéutica la prepara el experto usando procedimientos convencionales conocidos en la materia.

Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender la enzima timidina quinasa vegetal de la invención, o anticuerpos contra una timidina quinasa vegetal. La composición puede administrarse sola o combinada con uno o más de otros agentes, fármacos u hormonas.

La composición farmacéutica de esta invención, se puede administrar por cualquier vía adecuada, pero no limitada a la aplicación oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual o rectal, vía bucal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intracisternal, intracapsular, intrapulmnar, transmucosa o por inhalación.

Se pueden encontrar más detalles sobre técnicas para la formulación y administración en la última edición de *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Maack Publishing Co., Easton, PA).

El principio activo se puede administrar en una o varias dosis diarias. Las dosificaciones adecuadas actualmente contempladas son entre 0,5 ng y aproximadamente 50 µg/kg de timidina quinasa/kg de peso corporal por administración, y de aproximadamente 1,0 ng/kg a aproximadamente 100 µg/kg diarios.

La dosis administrada debe, por supuesto, ajustarse con cuidado a la edad, peso y afección del individuo que se va a tratar, así como a la vía de administración, forma y régimen de dosificación, y el resultado deseado y la dosificación exacta debe determinarlos, por supuesto, el médico.

En otras realizaciones, la timidina quinasa vegetal de la invención se puede administrar por suministro genético, usando líneas celulares y vectores como se describe a continuación en los procedimientos de tratamiento.

Por lo tanto, en otra realización preferida, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el polinucleótido de la invención, o un vector de la invención, o una célula de empaquetamiento de la invención, o una célula huésped de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Para generar dichas líneas celulares terapéuticas, el polinucleótido de la invención se puede insertar en un vector de expresión, p. ej. un plásmido, virus u otro vehículo de expresión, y unir operativamente a secuencias de control de la expresión por ligado en una forma en la que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control de la expresión.

Las secuencias de control de la expresión adecuadas incluyen promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción, codones de inicio, señales de corte y empalme para intrones, y codones de parada, todos mantenidos en el marco de lectura correcto del polinucleótido de la invención, para permitir así la traducción correcta del ARNm. Las secuencias de control de la expresión también pueden incluir componentes adicionales tales como secuencias líder y secuencias de parejas de fusión.

Procedimientos de tratamiento

La presente invención, que se refiere a polinucleótidos y proteínas, polipéptidos, fragmentos de péptidos o derivados producidos a partir de los mismos, así como a anticuerpos dirigidos contra dichas proteínas, péptidos o derivados, se pueden usar para tratar o aliviar trastornos o enfermedades de un cuerpo animal vivo, incluyendo un ser humano, cuyo trastorno o enfermedad sea sensible a la actividad de un agente citotóxico.

El trastorno, enfermedad o afección puede ser en particular un cáncer o una infección vírica.

Las células de cáncer son células que proliferan rápidamente con la capacidad de invadir y metastatizar tejidos adyacentes y por lo tanto comprometen la función de partes del cuerpo esenciales conduciendo a la enfermedad grave y la muerte. Los tratamientos habituales son cirugía, radiación y quimioterapia, y recientemente ha surgido un nuevo tratamiento, la terapia génica. En la terapia con profármacos enzimáticos dirigidos por genes (GDEPT), se suministra un gen a las células de cáncer y se expresa en estas. La correspondiente enzima después convierte el profármaco administrado en una forma activa, parando la proliferación celular. Uno de los sistemas de GDEPT se basa en desoxirribonucleósido quinasas y diferentes profármacos, análogos de nucleósidos.

El polinucleótido de la presente invención puede usarse en particular como un “gen suicida”, es decir, un gen susceptible a fármacos. La transferencia de un gen suicida a una célula diana convierte a la célula en sensible a compuestos o composiciones que son relativamente no tóxicos para células normales.

Por lo tanto, en un séptimo aspecto, la invención proporciona un procedimiento para sensibilizar células diana a profármacos, cuyo procedimiento comprende las etapas de

(i) transfectar o transducir la célula diana con una secuencia de polinucleótido que codifica una enzima timidina quinasa vegetal que promueve la conversión de dicho profármaco en un fármaco (citotóxico), o suministrar de otra forma la timidina quinasa vegetal a la célula; y

(ii) suministrar dicho profármaco a dicha célula diana;

en el que dicha célula diana es más sensible a dicho fármaco (citotóxico) que a dicho profármaco.

La célula diana puede ser cualquier célula de interés, en particular una célula humana, una célula de perro, una célula de mono, una célula de rata, una célula de gato, una célula de cerdo o una célula de ratón. Preferiblemente, la célula diana es una célula humana.

En su aspecto más amplio, se puede usar cualquier enzima timidina quinasa vegetal. Sin embargo, en una realización preferida, la secuencia de polinucleótido que codifica una enzima timidina quinasa vegetal es una secuencia de polinucleótido de la invención.

En una realización más preferida, el profármaco es un análogo de nucleósido.

En el contexto de esta invención, un análogo de nucleósido preferido para usar de acuerdo con la invención se selecciona del grupo que consiste en aciclovir (9-[2-hidroxi-etoxi]-metil-guanosina), buciclovir (9-(3,4-dihidroxibutil)guanina), fanciclovir (diacetato de 2-[2-(2-amino-9H-purin-9-il)etil]-1,3-propanodiol), ganciclovir (9-[2-hidroxi-1-(hidroximetil)etoxil-metil]-guanosina), penciclovir, valciclovir, trifluorotimidina, AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina), AIU (5'-yodo-5'-amino-2',5'-didesoxiuridina), ara-A (arabinósido de adenosina; Vivarabina), ara-C (arabinósido de citidina), ara-G (9-beta-D-arabinofuranosilguanina), ara-T, 1-beta-D-arabinofuranosiltimina, 5-etil-2'-desoxiuridina, 5-yodo-5'-amino-2,5'-didesoxiuridina, 1-[2-desoxi-2-fluoro-beta-D-arabinofuranosil]-5-yodouracilo, idoxuridina (5-yodo-2'-desoxiuridina), fludarabina (9-beta-D-arabinofuranósido de 2-fluoroadenosina), gencitabina, 3'-desoxiadenosina (3-dA), 2',3'-didesoxiinosina (ddI), 2',3'-didesoxicitidina (ddC), 2',3'-didesoxitimidina (ddT), 2',3'-didesoxiadenosina (ddA), 2',3'-didesoxiguanosina (ddG), 2-cloro-2'-desoxiadenosina (2CdA), 5-fluorodesoxiuridina, BVaraU ((E)-5-(2-bromovinil)-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), BVDU (5-bromovinil-desoxiuridina), FIAU (1-(2'-desoxi-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosil)-5-yodouracilo), 3TC (2'-desoxi-3'-tiacitidina), dFdC gemcitabina (2',2'-difluoro-desoxicitidina), dFdG (2',2'-difluorodesoxiguanosina), 5-fluorodesoxiuridina (FdUrd), d4T (2',3'-dideshidro-3'-desoxitimidina), ara-M (arabinonucleósido de 6-metoxipurina), IudR (5-yodo-2'-desoxiuridina), CaFdA (2'-cloro-2'-ara-fluoro-desoxiadenosina), ara-U (1-beta-D-arabinofuranosiluracilo), FBVAU (E)-5-(2'-bromovinil)-1-(2-desoxi-2-fluoro-beta-D-arabinofuranosil)uracilo, FMAU 1-(2-desoxi-2-fluoro-beta-D-arabinofuranosil)-5-metiluracilo, FLT 3'-fluoro-2'-desoxitimidina, 5-Br-dUrd 5-bromodesoxiuridina, 5-C1-dUrd 5-clorodesoxiuridina o dFdU 2',2'-difluoro-desoxiuridina.

En una realización más preferida, el análogo de nucleósido para usar de acuerdo con la invención es la AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina).

La enzima timidina quinasa de la invención se puede usar directamente, por ejemplo, mediante composiciones farmacéuticas inyectadas, implantadas o ingeridas para tratar un proceso patológico sensible a la enzima timidina quinasa.

El polinucleótido de la invención, incluyendo las secuencias complementarias del mismo, se puede usar para la expresión de la enzima timidina quinasa de la invención. Esto se puede lograr mediante líneas de células que expresan dichas proteínas, péptidos o derivados de la invención, o por vectores víricos que codifican dichas proteínas, péptidos o derivados de la invención, o por células huésped que expresan dichas proteínas, péptidos o derivados. Estas células, vectores y composiciones se pueden administrar para el tratamiento de zonas diana para afectar a un proceso patológico sensible a agentes citotóxicos.

Los vectores de expresión adecuados pueden ser un vector vírico derivado de *Herpes simplex*, adenovirus, lentivirus, retrovirus o virus vaccinia, o de diferentes plásmidos producidos con bacterias, y se pueden usar para el suministro *in vivo* de secuencias de nucleótidos a un organismo entero o un órgano, tejido o población celular diana. Otros procedimientos incluyen, pero no se limitan, la transfección de liposomas, electroporación, transfección con péptidos vehículo que contienen señales nucleares u otras señales localizadoras, y suministro de genes por sistemas de liberación lenta. Las células específicas se pueden dirigir usando marcadores de superficie celular, tales como marcadores específicos para células de cáncer. Tanto la proteína como una construcción de vector pueden dirigirse a células usando marcadores de superficie celular. Las células que se dividen pueden dirigirse mediante transducción con un vector retroviral, que sólo infecta células que se dividen.

En otro aspecto más de la invención, las secuencias de nucleótidos “antisentido” complementarias a los nucleótidos de la invención o parte de los mismos, se pueden usar para inhibir o potenciar la expresión de la enzima timidina quinasa.

En otra realización preferida, la invención proporciona procedimientos para inhibir agentes patógenos en animales de sangre caliente, cuyos procedimientos comprenden la etapa de administrar a dicho animal un polinucleótido de la invención o un vector de expresión de la invención.

En una realización más preferida, la secuencia de polinucleótido o el vector de expresión se administran *in vivo*.

En otra realización preferida, el agente patógeno es un virus, una bacteria o un parásito, o incluso una célula tumoral.

En otra realización preferida, el agente patógeno es una célula inmunitaria autorreactiva.

En una realización incluso más preferida, el procedimiento comprende además la etapa de administrar un análogo de nucleósido a dicho animal de sangre caliente.

Preferiblemente, el análogo de nucleósido se selecciona de los descritos antes.

En una realización más preferida, el análogo de nucleósido para usar de acuerdo con la invención es AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina).

Sistemas suicidas

Un uso muy importante de los genes que codifican la timidina quinasa de la presente invención, es para los sistemas suicidas en la terapia basada en células y genes. En todos los tipos de terapias celulares y génicas en mamíferos, es necesario tener sistemas que permitan la muerte irreversible de células transplantadas o células que han sido transducidas por la terapia génica.

Básicamente hay dos tipos de terapias basadas en células, las cuales pueden beneficiarse ambas de tener un sistema suicida incorporado basado en las timidinas quinasas de acuerdo con la presente invención. En la terapia de sustitución celular, se transplantan células desnudas a un sujeto para sustituir células que han perdido la capacidad de cumplir su función en el cuerpo o para sustituir células muertas. Una vez que estas células se han transplantado y están completamente integradas en el cuerpo del sujeto, no pueden eliminarse fácilmente por medios quirúrgicos. Teniendo un sistema de suicidio incorporado en el que una timidina quinasa de la presente invención es expresada de forma constitutiva o inducible, las células pueden matarse administrando al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de nucleósido, tal como AZT. El análogo de nucleósido se puede administrar si las células transplantadas empiezan a proliferar de una forma incontrolada. También se puede querer terminar el tratamiento simplemente porque ya no son necesarias las células de sustitución o porque hay otro tratamiento por otra ruta.

El otro tipo de terapia basada en células incluye células terapéuticas que son transplantadas en el cuerpo para segregar, p. ej., un factor de crecimiento en un determinado sitio. A menudo dichas células terapéuticas están encapsuladas y pueden eliminarse otra vez de forma relativamente fácil del cuerpo, pero se prefiere la incorporación de un sistema suicida porque las células pueden matarse selectivamente sin el uso de cirugía.

En la terapia génica *in vivo*, se aplican las mismas consideraciones que con la terapia de sustitución celular. La incorporación de un gen suicida se puede lograr por construcción de un vector vírico que comprende tanto el gen terapéutico como una timidina quinasa de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, el gen terapéutico y la timidina quinasa se insertan bajo el control del mismo promotor, opcionalmente separándolos por una construcción de IRES.

En el caso en el que las células transplantadas se hayan inmortalizado condicionalmente antes de trasplante, hay un riesgo teórico de que el oncogén inicie la transcripción después de trasplante y que por consiguiente las células transplantadas se conviertan en tumorigénicas. Mediante la presente invención se puede conseguir el control de esta situación. Siempre que las células son inmortalizadas por transducción con un oncogén bajo el control de un promotor inducible (p. ej., el sistema Tet on-off, el promotor Mx1 o similar), se inserta una timidina quinasa en la construcción del vector bajo el control del mismo promotor (o usando una construcción de IRES). Esto asegura que siempre que el oncogén sea transcrito, la timidina quinasa también es transcrita y transducida, y las células tumorigénicas pueden matarse selectivamente por administración de un análogo de nucleósido, tal como AZT.

10 *Procedimiento de fosforilación de nucleósidos*

La enzima timidina quinasa de la invención puede tener diferentes utilidades que incluyen aplicaciones tanto terapéuticas como biotecnológicas.

15 En un octavo aspecto, la invención se refiere al uso de la enzima timidina quinasa vegetal de la invención para fosforilar nucleósidos o un análogo de nucleósido, con la condición de que no sea un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.

20 En una realización preferida, la invención proporciona un procedimiento para fosforilar un nucleósido o un análogo de nucleósido, que comprende las etapas de

- i) someter el nucleósido o análogo de nucleósido a la acción de la enzima timidina quinasa vegetal de la invención; y
- 25 ii) recuperar el nucleósido o análogo de nucleósido fosforilado, con la condición de que no sea un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.

En particular, la timidina quinasa de la presente invención se puede usar para fosforilar didesoxiguanosina.

30 **Breve descripción de los dibujos**

La presente invención se ilustra mejor por referencia a los dibujos que acompañan, en los que:

35 la fig. 1 muestra la actividad de la dTMP quinasa (CPM) a lo largo del tiempo (0 a 120 minutos) de AT-TK1a (■), AT-TK1b (●) y HSV1-TK (▼), respectivamente; y

40 la fig. 2 muestra la actividad de la monofosfato de AZT quinasa (CPM) (0 a 120 minutos) de AT-TK1a (□), AT-TK1b (○) y HSV1-TK (▽), respectivamente.

Ejemplos

La invención se ilustra mejor con referencia a los siguientes ejemplos, que no se pretende que limiten de ninguna forma el alcance de la invención como se reivindica.

45 **Ejemplo 1**

Construcción de un vector de retrovirus que expresa quinasas vegetales

50 Se clonó el ADNc de quinasas vegetales en un vector de retrovirus basado en el virus de la leucemia murina de Moloney (MLV) para generar un retrovirus recombinante de replicación deficiente que contiene las quinasas TK1.

Se amplificaron los fragmentos de ADN con la polimerasa *Pfu* (Stratagene) usando cebadores con sitios diseñados de enzimas de restricción flanqueando.

55 Se cortaron construcciones de Arabidopsis basados en AT-TK1a con *Bam*HI/*Xho*I, y se cortaron fragmentos de la PCR del tomate con *Bgl*II/*Xho*I, y se clonaron en el sitio *Bgl*II/*Xho*I del vector plasmídico pLCXSN, que es un vector de transferencia retroviral obtenido de pLXSN (Clontech, n° cat. K1060-B) por inserción del promotor de CMV secuencia arriba del policonector.

60 Se obtuvieron 4 construcciones: AtTK1 (PZG53), AtTK1ΔC24 (PZG56), TomTK1 (PZG69) y TomTK1ΔC26 (PZG59). Se usaron pLCXSN solo y el vector que contiene HSV1-TK (clonado en el sitio *Bam*HI/*Xho*I) como un control.

65 Los plásmidos se purificaron usando el kit de plásmidos Qiagen (QIAGEN) y se verificaron las secuencias de ADN de los plásmidos construidos por determinación de la secuencia de ADN.

ES 2 320 434 T3

Se usaron las siguientes secuencias de cebadores:

5' ccg ctc gag atg gcg act ctc aaa gct tcc ttt ttg 3' (AT TK1-for; SEQ ID NO: 14);

5' cgc gga tcc tta gat tgt agc agc aac aca gga ttc 3' (AT TK1-rev; SEQ ID NO: 15);

5' cgc gga tcc tta aac aat atg att agt gat gta atg ctt g 3' (AT TK1 DC; SEQ ID NO: 16);

5' gga aga tct tta gac aga ttg tcc att aac ata gtg ctg 3' (T TK1 DC; SEQ ID NO: 17);

5' gga aga tct tta tgg atc aac tag tgg tga ttc taa g 3' (T TK1-rev; SEQ ID NO: 18); y

5' ccg ctc gag atg gct ttt tca tca tct gct aga aac 3' (T TK1-for; SEQ ID NO: 19).

Para la comparación también se construyó un plásmido de expresión para la timidina quinasa de tipo 1 del virus *Herpes simplex* humano (HSV1-TK). La timidina quinasa de HSV1 humano se amplificó usando los cebadores:

5' tat agg atc cgc cac cat ggc ttc gta ccc cgg c 3' (HSV1-TK - for; SEQ ID NO: 20); y

5' tat act cga gga ggt cga ctc agt tag cc 3' (HSV1-TK - rev; SEQ ID NO: 21);

y usando el plásmido pCMV-pacTK descrito por Karreman [Karreman C; *Gene* 1998 **218** 57-62] como molde.

Se cultivaron células de empaquetamiento 293T (ATTC CRL-11268) a 37°C en medio OPTIMEM 1 (Life Technologies, Inc.). El vector plasmídico pLCXSN se transfectó en las células de empaquetamiento usando LipofectAMINE PLUS (Life Technology Inc.) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el suministrador. El medio de las células transfectadas se recogió 48 horas después de transfección, se filtró a través de un filtro de 0,45 mm, se hizo sedimentar por centrifugación (50.000 xg, 90 minutos a 4°C) y se disolvió en tampón TEN (NaCl 100 mM, Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM).

El tampón que contenía virus se usó posteriormente para transducir líneas celulares de cáncer con MDI de 5.

Cultivo de células y transducción de retrovirus

Las células de Glioblastoma U-87 MG (ATCC HTB-14), y glioblastoma U-118 MG (ATCC HTB-15) se adquirieron en American Type Culture Collection. Todas las células se cultivaron en medio esencial mínimo, E-MEM M (Bio Whittaker n° de catálogo 12-611) con suero de ternero fetal de origen australiano al 10% (v/v) (Bio Whittaker n° de catálogo 14-701) y 1 ml/l de gentamicina (Bio Whittaker n° de catálogo 17-518 L). Las células se hicieron crecer a 37°C en un incubador humidificado con una fase gaseosa de CO₂ al 5%.

Las líneas celulares se transdujeron con el medio que contenía el retrovirus mezclado con polibreno 5 µg/ml, se incubaron durante 48 horas y después se cultivaron de forma continua durante 3 semanas en presencia de geneticina 200 µg/ml (Life Technologies Inc.).

Ensayos de proliferación celular

Las células se sembraron con 1500-2500 células/pocillo en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-L-lisina. Se añadió AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina; disponible en sigma) después de 24 horas, y el medio que contenía los análogos de nucleósidos no se cambió.

Se ensayó la supervivencia celular con el ensayo de XTT (Roche) después de 5 días de exposición al fármaco.

Cada experimento se realizó por cuadruplicado. El valor de CI₅₀ de los compuestos investigados se calculó como el valor medio de estos experimentos usando SigmaPlot® (Dyrberg Trading, Karlslunde, DK) y se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$d_i = \text{Max} / (1 + ([I]/\text{CI}_{50}))$$

en la que

d_i = crecimiento celular con la concentración inhibidora determinada por el ensayo XTT;

Max = crecimiento celular máximo determinado por el ensayo de XTT;

[I] = la concentración inhibidora; y

CI₅₀ = (concentración inhibidora de 50% del crecimiento) una dosis que inhibe el crecimiento celular en un 50%).

ES 2 320 434 T3

Expresión de quinasas vegetales de mayor sensibilidad a AZT

Se determinó la sensibilidad al AZT de células no transducidas y de células transducidas con el vector retroviral solo o el vector que contenía quinasas vegetales.

La citotoxicidad (CI_{50}) se determinó después de 5 días de exposición al fármaco. Los resultados de esta determinación se presentan en la Tabla 4.

TABLA 4

Sensibilidad (CI_{50}) de líneas de células de glioblastoma a la AZT (mM)

Se muestran las concentraciones que producen 50% de letalidad para cada construcción y línea celular parental. El factor de aumento de sensibilidad se compara con la línea celular parental.

CI_{50}	Nada	PZG53	PZG56	PZG59	PZG69	HSV1-TK	pLCXSN
Líneas celulares policlonales transitorias							
U-87 MG	4,468	0,097	0,303	0,026	0,047	>5	>5
U-118 MG	1,021	0,062	0,296	0,034	0,045	1,923	0,859
Líneas celulares policlonales estables							
U-87 MG	2,439	0,0719	0,1324	0,0251	0,017	2,577	4,0676
U-118 MG	0,779	0,095	0,2027	0,0266	0,1902	2,7264	2,3335

La diferencia de sensibilidad entre las líneas celulares parentales y las células transducidas con el vector pLCXSN solo era menor de 1 vez. Ambas líneas celulares de glioblastoma, que expresaban quinasas vegetales, mostraron un aumento de la sensibilidad a la AZT. El mayor aumento se detectó para la línea celular U-87 MG que expresaba TK1 de tomate con una disminución de casi 240 veces de la CI_{50} comparado con las células no transducidas.

Ejemplo 2

Clonación de timidina quinasas

Este ejemplo describe cómo se identificaron los genes que codifican las timidina quinasas de la invención de tomate, pino, arroz y arabidopsis, y cómo se construyeron los vectores que expresan diferentes timidina quinasas.

Basándose en su homología con la TK1 humana, se identificaron dos secuencias del tomate, ACCN BE463259 y ACCN BG129197 (disponibles en Clemson University Genomics Institute, EE.UU.), una secuencia de pino, ACCN AW755132 (disponible en Dr. Ross Whetten, North Carolina State University, EE.UU.), y una EST, ACCN D24903 (disponible en MAFF DNA Bank, 1-2, 2-chome, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japón) con homología con la TK1 de arroz postulada (ACCN AF066050) usando la herramienta de búsqueda de homología local (tBLASTn) disponible en la página web NCBI, y usando los ajustes estándar (es decir, Filtro activado, Esperado = 10, Tamaño de palabra = 3, Matriz = Blosum62, Coste de los huecos = Existencia 11 Extensión 1).

ES 2 320 434 T3

Partiendo de los cebadores derivados de plásmido, se secuenciaron los insertos. Posteriormente se diseñaron los cebadores basándose en los datos de secuencias recién obtenidos.

La secuencia del inserto en D24903 combinada con la información de secuencia derivada de ACCN AU068889 predecía un ORF para una proteína de 64 aminoácidos más larga que la descrita en AF066050.

Timidina quinasa de tomate

Se amplificó el ORF de la timidina quinasa de tomate por PCR usando los siguientes cebadores:

5' CGC GGA TCC ATG GCT TTT TCA TCA TCT GCT AGA AAC CCA GTT GAC CTG AG 3' (1MS TOTK1-B; SEQ ID NO: 22); y

5' CCG GAA TTC TTA TGG ATC AAC TAG TGG TGA TTC TAA G 3' (2MS TOTK1-E; SEQ ID NO: 23); y

usando el plásmido que contiene ACCN BG129197 como molde.

El fragmento de la PCR posteriormente se cortó con EcoRI/BamHI y se ligó en el vector pGEX-2T (Amersham-Pharmacia), que también se cortó con EcoRI/BamHI. El plásmido resultante se llamó pGEX-2T-TOM-TK1.

Timidina quinasa de Arabidopsis thaliana (AT-TK1a)

Se amplificó el ORF de una TK1a de *Arabidopsis thaliana* (Nº de acceso AAF13097) de una genoteca de ADNc (Stratagene) usando los siguientes cebadores:

5' CGC GGA TCC ATG GCG ACT CTC AAA GCT TCC TTT TTG ATC AAA ACC C 3' (1msAtTK1-B; SEQ ID NO: 24); y

5' CCG GAA TTC TTA GAT TGT AGC AGC AAC ACA GGA TTC AGC 3' (2msAtTK1-E; SEQ ID NO: 25).

El fragmento de la PCR posteriormente se cortó con EcoRI/BamHI y se ligó al vector pGEX-2T (Amersham-Pharmacia) que también se había cortado con EcoRI/BamHI. El plásmido resultante se llamó pGEX-2T-AT-TK1a.

Timidina quinasa de Arabidopsis thaliana (AT-TK1b)

Se amplificó el ORF de TK1b de *Arabidopsis thaliana* (Nº de acceso BAB09824) de una genoteca de ADNc (Stratagene) usando la siguiente estrategia, que también creó varios mutantes de AT-TK1b con delección N-terminal.

Se amplificó la longitud completa del ORF (ACCN BAB09824) de una genoteca de ADNc (Stratagene) usando los cebadores:

5' ATG AGA ACA TTA ATC TCA CCA TCT C 3' (1mtAtTK1L; SEQ ID NO: 26); y

5' CTA AAG TGA ACT TGC TAC AAC ACT ATG 3' (2mtAtTK1L; SEQ ID NO: 27).

Este producto de la PCR de longitud completa se usó para amplificar un fragmento con extremos salientes de BamHI/EcoRI, usando los cebadores

5' CGC GGA TCC ATG AGA ACA TTA ATC TCA CCA TCT C 3' (1mtAtTK1L-B; SEQ ID NO: 28); y

5' CCG GAA TTC CTA AAG TGA ACT TGC TAC AAC AC 3' (2mtAtTK1-E; SEQ ID NO: 29).

El fragmento de la PCR posteriormente se cortó con EcoRI/BamHI y se ligó en el vector pGEX-2T que también se cortó con EcoRI/BamHI. El plásmido resultante se llamó pGEX-2T-AT-TK1b (P661).

De forma análoga se hicieron delecciones N-terminales y se ligaron en pGEX-2T. Se logró una delección N-terminal de 22 aminoácidos usando los cebadores

5' CGC GGA TCC TCC ACC GCT CTT CGC TTC TCC 3' (1mtAtTK1L-B; SEQ ID NO: 30); y

2mtAtTK1-E (SEQ ID NO: 29).

El plásmido resultante se llamó pGEX-2T-AT-ΔN22TK1b (P662).

ES 2 320 434 T3

Se logró una delección N-terminal de 45 aminoácidos usando los cebadores

5' CGC GGA TCC TCC ACC AGA AAG CTA CAA ACG 3' (1mtAtTK1-B; SEQ ID NO: 31); y

2mtAtTK1-E (SEQ ID NO: 29).

El plásmido resultante se llamó pGEX-2T-AT-ΔN45TK1b (P663).

Se logró una delección N-terminal de 63 aminoácidos usando los cebadores

5' CGC GGA TCC CAG CCG CTC TCC TCC TCA TC 3' (1mtATTK1S-B; SEQ ID NO: 32); y

2mtAtTK1-E (SEQ ID NO: 29).

El plásmido resultante se llamó pGEX-2T-AT-ΔN63TK1b (P664).

Timidina quinasa de arroz

La timidina quinasa de arroz se amplificó usando los cebadores

5' CGG GAT CCG GCG GCG GCG GCG GAC AAG TCT CG 3' (1osTK1s-B; SEQ ID NO: 33); y

5' CGG AAT TCT TAC TTG AAA GCA TGG ATA ACC TTG G 3' (2osTK1-E; SEQ ID NO: 34);

y usando D24903 como molde.

El fragmento de la PCR posteriormente se cortó con EcoRI/BamHI y se ligó en el vector pGEX-2T (disponible en Amersham-Pharmacia) que también se cortó con EcoRI/BamHI. El plásmido resultante se llamó pGEX-2T-Rice-TK1.

Timidina quinasa de HSV1 (usada para control)

La timidina quinasa de HSV1 se amplificó usando los cebadores

5' CGC GGA TCC ATG GCT TCG TAC CCC GGC CAT C 3' (HSV1-for A; SEQ ID NO: 35); y

5' CCG GAA TTC TTA GTT AGC CTC CCC CAT CTC CCG 3' (HSV1-rev; SEQ ID NO: 36);

y usando el plásmido pCMV-pacTK descrito por Karreman [Karreman C; *Gene* 1998 **218** 57-62] como molde.

El fragmento de la PCR posteriormente se cortó con EcoRI/BamHI y se ligó en el vector pGEX-2T (Amersham-Pharmacia) que también se cortó con EcoRI/BamHI. El plásmido resultante se llamó pGEX-2T-HSV1-TK.

Ejemplo 3

Expresión y purificación de las timidina quinasas recombinantes

Este ejemplo describe cómo se transformó KY895 con los plásmidos obtenidos de acuerdo con el Ejemplo 2, con el fin de expresar timidina quinasas.

Las células KY895 se transformaron con los plásmidos de expresión del Ejemplo 2, usando técnicas estándar, p. ej., como describen Sambrook y col. [Sambrook y col.; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY 1989].

Las células KY895 transformadas se hicieron crecer a una DO_{600nm} de 0,5-0,6 en medio LB/Ampicilina (100 µg/ml) a 37°C y se indujo la expresión de proteína por adición de IPTG hasta 100 µM. Las células después se hicieron crecer durante 4 h a 25°C y posteriormente se recogieron por centrifugación. El sedimento celular se sometió a tratamiento con ultrasonidos en el tampón de unión A (NaPO₄ 20 mM pH 7,3; NaCl 150 mM; Glicerol al 10%; y Triton X-100 al 0,1%) en presencia de un cóctel inhibidor de proteasa (Complete™ - sin EDTA de Roche Diagnostics).

Se ensayó la capacidad de los extractos para fosforilar los cuatro desoxirribonucleósidos naturales con una concentración fija de 100 µM de los desoxirribonucleósidos. La mayor actividad específica en cada extracto se fijó en 100%. Entre paréntesis se da la actividad específica correspondiente a 100% en mU/mg.

Los resultados de estas evaluaciones se presentan en la Tabla 5.

TABLA 5

Actividad de la desoxirribonucleósido quinasa en extractos de células KY895

4 h de inducción con IPTG 0,1 mM a 25°C

KY895 transformado con	Thd	dAdo	dGuo	dCyd
pGEX-2T	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
pGEX-2T-TOM-TK1	100 (124)	n.d.	n.d.	0,1
pGEX-2T-AT-TK1a	100 (53)	n.d.	n.d.	n.d.
pGEX-2T-AT-TK1b	100 (4,4)	n.d.	n.d.	4
pGEX-2T-AT-ΔN22TK1b	100 (4,4)	n.d.	n.d.	4
pGEX-2T-AT-ΔN45TK1b	100 (5,2)	n.d.	n.d.	3
pGEX-2T-AT-ΔN63TK1b	100 (4)	n.d.	n.d.	1

n.d. indica "no detectable"

Los datos en esta tabla muestran que todas las enzimas son timidina quinazas.

Los extractos se sometieron a centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos, se filtraron y se cargaron en la columna. Después se combinaron dos columnas de 1 ml de glutatión-sepharosa (disponible en Pharmacia) y se equilibraron en tampón de unión A. Después de cargar la muestra, la columna se lavó con 40 ml de tampón de unión A. Posteriormente, la columna se lavó con 5 ml de ATP/MgCl₂ 10 mM en (A) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, y después 30 minutos a 4°C. El ATP/MgCl₂ se eliminó lavando con 10 ml de tampón de unión A.

La proteína GST-tag se escinde de la TK en la columna de unión de GST por escisión con trombina de acuerdo con el protocolo del fabricante (Pharmacia).

Las constantes cinéticas de la TK purificada se determinaron como describen *Munch-Petersen y col.* [*Munch-Petersen B., Knecht W., Lenz C., Søndergaard L., Piškur J.*: Functional expression of a multisubstrate deoxyribonucleoside kinase from *Drosophila melanogaster* and its C-terminal deletion mutants; *J. Biol. Chem.* 2000 **275** 6673-6679].

Los datos cinéticos se evaluaron por análisis de regresión no lineal usando la ecuación de Michaelis-Menten $V = V_{\max} \times [S] / (K_m + [S])$ o ecuación de Hill $v = V_{\max} \times [S]^h / (K_{0.5}^h + [S]^h)$ como describen *Knecht y col.* [*Knecht W., Bergjohann U., Gonski S., Kirschbaum B. & Löffler M.*: Functional expression of a fragment of human dihydroorotate dehydrogenase by means of the baculovirus expression vector system and kinetic investigation of the purified recombinant enzyme; *Eur. J. Biochem.* 1996 **240** 292-301]. K_m es la constante de Michaeli, $K_{0.5}$ define el valor de la concentración de sustrato [S] al que $v = 0,5 V_{\max}$ y h es el coeficiente de Hill [*Cornish-Bowden A*: Fundamentals of enzyme kinetics; Portland Press Ltd., London, 1995, pp. 33; y *Liebecq C*: IUBMB Biochemical nomenclature and related documents; Portland Press Ltd., London, 1992].

TABLA 6

Relación entre velocidad y concentración de sustrato para Thd para quinasas vegetales recombinantes (r)

	K_m (μM)	$V_{m\acute{a}x}$ (mU/mg)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)
rTOM-TK1	0,8	60	0,026	32500
rAT- Δ N45TK1b*	18	165	0,071	3944
rAT-TK1a*	85	452	0,2	2353
rHSV1-TK**	0,38	-	0,46	1200000

*Datos de Le Breton C: In-vitro study of novel deoxyribonucleoside kinases for gene therapy; B. Sc. Report, 2002, University of Paris VII / Technical University of Denmark.

** Datos de Kokoris M.S. y Black M.E.: Characterization of Herpes Simplex Virus type 1 thymidine kinase mutants engineered for improved ganciclovir or acyclovir activity; Protein Science 2002 **11** 2267-2272.

TABLA 7

Relación entre velocidad y concentración de sustrato para la AZT para quinasas vegetales recombinantes

	K_m (μM)	$V_{m\acute{a}x}$ (mU/mg)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)
rTOM-TK1	22,4	1579	0,681	30400
rAT- Δ N45TK1b	1,46	242	0,104	71200
rAT-TK1a	3,55	244	0,106	29900
rHSV1-TK	1,7	4,1	0,028	16500

Las Tablas 6 y 7 demuestran que las TK vegetales fosforilan la AZT de forma más eficaz (k_{cat}/K_m) que Thd, lo cual contrasta mucho con rHSV1-TK que fosforila Thd bastante más eficazmente que AZT. Las relaciones [k_{cat}/K_m (Thd)]/[k_{cat}/K_m (AZT)] para las TK de tomate, Arabidopsis y HSV1 son las siguientes:

rTOM-TK1	1,07
rAT- Δ N45TK1b	0,06
rAT-TK1a	0,08
rHSV1-TK	72,7

Ejemplo 4

Crecimiento de KY895 de E. coli transformadas en placas con análogo de nucleósido

5 Este ejemplo describe cómo las células huésped transformadas con los plásmidos obtenidos de acuerdo con el Ejemplo 2 pueden crecer en placas en presencia del análogo de nucleósido AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina).

El experimento se llevó a cabo como han descrito *Knecht y col.* [*Knecht, W., Munch-Petersen, B. & Piškur, J.: Identification of residues involved in the specificity and regulation of the highly efficient multisubstrate deoxyribonucleoside kinase from Drosophila melanogaster; J. Mol. Biol.* 2000 **301** 827-837].

TABLA 8

Crecimiento de células KY895 en presencia de AZT

KY895 transformadas con	DL ₁₀₀ (μM)
pGEX-2T	> 100
pGEX-2T-TOM-TK1	0,0316
pGEX-2T-AT-TK1a	0,316
pGEX-2T-AT-TK1b	1
pGEX-2T-AT-ΔN22TK1b	0,316
pGEX-2T-AT-ΔN45TK1b	0,1
pGEX-2T-AT-ΔN63TK1b	0,1
pGEX-2T-HSV1-TK	1
pGEX-2T-hu-TK1	1
pGEX-2T-Bm-dNK	100
pGEX-2T-Dm-dNK	100

pGEX-2T es el vector y está disponible en Amersham-Pharmacia;

45 pGEX-2T-Dm-dNK es el vector que contiene el gen que codifica una desoxirribonucleósido quinasa multisustrato obtenida de *Drosophila melanogaster* descrito por *Munch-Petersen y col.* [*Munch-Petersen B., Knecht W., Lenz C., Søndergaard L., Piškur J.: Functional expression of a multisubstrate deoxyribonucleoside kinase from Drosophila melanogaster and its C-terminal deletion mutants; J. Biol. Chem.* 2000 **275** 6673-6679];

50 pGEX-2T-Bm-dNK es el vector que contiene el gen que codifica una desoxirribonucleósido quinasa obtenida de *Bombyx mori* descrita por *Knecht y col.* [*Knecht W., Ebert Petersen G., Munch-Petersen B., Piškur J.: Deoxyribonucleoside kinases belonging to the thymidine kinase 2 (TK2) -like group vary significantly in substrate specificity, kinetics and feed-back regulation; J. Mol. Biol.* 2002 **315** 529-540];

55 pGEX-2T-huTK1 es el vector que contiene el gen que codifica una timidina quinasa humana (TK1) descrito por *Berenstein y col.* [*Berenstein D., Christensen J.F., Kristensen T., Hofbauer R., Munch-Petersen B.: Valine, not methionine, is amino acid 106 in human cytosolic thymidine kinase (TK1). Impact on oligomerization, stability, and kinetic properties; J. Biol. Chem.* 2000 **275** (41) 32187-32192].

60 La Tabla 8 muestra que la timidina quinasa derivada del tomate es la quinasa más potente, cuando se determinó en combinación con el análogo de nucleósido AZT. Esta enzima es aproximadamente 30 veces más activa que la derivada de *Herpes simplex*.

Ejemplo 5

Ensayo de la actividad de TK en placas de selección de TK

Este ejemplo describe la determinación de la actividad de timidina quinasa usando células KY895 transformadas con los plásmidos descritos en el Ejemplo 2.

El ensayo de la actividad de timidina quinasa se llevó a cabo como han descrito *Knecht y col.* [*Knecht, W., Munch-Petersen, B. & Piškur, J.*: Identification of residues involved in the specificity and regulation of the highly efficient multisubstrate deoxyribonucleoside kinase from *Drosophila melanogaster*; *J. Mol. Biol.* 2000 **301** 827-837].

pGEX-2T es el vector disponible en Amersham-Pharmacia usado como control.

La desoxirribonucleósido quinasa multisustrato de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (pGEX-2T-Dm-dNK), obtenida de acuerdo con *Munch-Petersen y col.* [*Munch-Petersen B., Knecht W., Lenz C., Søndergaard L., Piškur J.*: Functional expression of a multisubstrate deoxyribonucleoside kinase from *Drosophila melanogaster* and its C-terminal deletion mutants; *J. Biol. Chem.* 2000 **275** 6673-6679] se usó como control positivo.

TABLA 9

Crecimiento en placas de selección de TK

	Timidina (µg/ml)					
	0,05	1	2	10	20	50
pGEX-2T	-	-	-	-	-	-
pGEX-2T-Dm-dNK	+	+	+	+	+	+
pGEX-2T-TOM-TK1	+	+	+	+	+	+
pGEX-2T-Rice-TK1	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.
pGEX-2T-AT-TK1a	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.

+ crece

- no crece

n.d. no determinado

Este ejemplo demuestra que todas las enzimas pueden fosforilar la timidina.

Ejemplo 6

Fosforilación de monofosfatos de nucleósidos a difosfatos de nucleósidos

Se ensayó la actividad de monofosfato de quinasa determinando los productos de las reacciones catalizadas por timidina quinasa, esencialmente como describen *Munch-Petersen et al.*; *J. Biol. Chem.* 1998 **273** 7 3926-3931.

Brevemente, la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 30 nmol/min de timidina a monofosfato de timidina (30 mU) se incubó en 100 µl de una mezcla de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 (22°C); MgCl₂ 2,5 mM; ATP 2,5 mM; ditiotritol 10 mM; CHAPS 0,5 mM; 3 mg/ml de albúmina de suero bovino; y sustrato marcado con ³H 100 iM (1,8 Ci/mmol).

Se mezclaron muestras de tiempo de 5 µl de mezcla de reacción con 5 µl de timidina, TMP, TDP y TTP 5 mM. Se sembraron 5 µl de esta mezcla en placas de polietilenimina-celulosa, que se desarrollaron de forma ascendente en LiCl₂ 0,5 M. Las manchas con los nucleósidos y nucleótidos se identificaron con luz UV y se cortaron.

La radiactividad en las manchas se extrajo con KCl 0,2 M en HCl 0,1 M, y se determinó por recuento de centelleo de líquidos. 1 pmol de nucleósido/nucleótido radiactivo tiene un recuento de 850 cpm.

ES 2 320 434 T3

Se expresaron y purificaron las timidina quinasas recombinantes como se describe en el Ejemplo 3.

Los resultados de este experimento se presentan en las figuras 1 y 2. Las cpm obtenidas en los tiempos indicados (15, 30, 60, 90 y 120 minutos, respectivamente) se determinaron en las manchas de TDP obtenidas de 2,5 μ l de mezcla de reacción.

Como se esperaba, HSV1-TK fosforila ambos sustratos, pero el sustrato monofosfato de AZT es fosforilado con un grado 10 veces menor que el sustrato timidina. Sin embargo, sorprendentemente, las enzimas TK1 vegetales son capaces de fosforilar el monofosfato de AZT aunque no son capaces de fosforilar TMP. Esta nueva propiedad no se había publicado hasta ahora para ninguna timidina quinasa.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado, que codifica una timidina quinasa vegetal, cuyo polinucleótido tiene

al menos 73%, preferiblemente al menos 75%, más preferido al menos 80%, incluso más preferido al menos 90%, todavía más preferido al menos 95%, lo más preferido al menos 98% de identidad con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 3, cuando se determina a lo largo de su longitud completa.

2. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 3.

3. Una timidina quinasa vegetal, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, o una secuencia de aminoácidos de al menos 80%, incluso más preferido al menos 90%, todavía más preferido al menos 95%, lo más preferido al menos 98% de identidad con una cualquiera de estas secuencias, cuando se determina a lo largo de su longitud completa.

4. La timidina quinasa vegetal de la reivindicación 3, que comprende una o más de los siguientes tres patrones/regiones:

Val Ile Gly Ile Asp Glu Ala Gln Phe Phe (Patrón I)

Val Ala Gly Leu Asp Gly (Patrón II)

Tyr Met Pro Val Cys Arg (Patrón III)

Val A1 Lys Leu A2 A3 Arg Cys Glu A4 (región Lid), en la que A1 se selecciona de Thr y Val, A2 se selecciona de Thr y Lys, A3 se selecciona de Ala y Ser, y A4 se selecciona de Leu y Val.

5. La timidina quinasa vegetal de una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, que comprende todos los restos conservados identificados en la Tabla 1.

6. La timidina quinasa vegetal de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5.

7. La timidina quinasa vegetal de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, que tiene una delección C-terminal del orden de 1-60 restos de aminoácidos, preferiblemente 1-50 restos de aminoácidos, más preferido 1-40 restos de aminoácidos, incluso más preferido 1-30 restos de aminoácidos, más preferido todavía 1-26 restos de aminoácidos, lo más preferido 1-24 restos de aminoácidos.

8. La timidina quinasa vegetal de la reivindicación 8, que es una enzima timidina quinasa obtenida de tomate y que tiene una delección C-terminal de 26 restos de aminoácidos, teniendo dicha enzima timidina quinasa vegetal con delección C-terminal la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

9. La timidina quinasa vegetal de una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, que se obtiene de tomate, y cuya enzima muestra al menos 80%, más preferido al menos 90% más preferido todavía al menos 95%, lo más preferido al menos 98% de identidad con la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID NO: 4.

10. La timidina quinasa vegetal de una cualquiera de las reivindicaciones 3-9, que disminuye al menos tres (3) veces la dosis letal (LD₁₀₀) de al menos un análogo de nucleósido cuando se compara con la acción de una timidina quinasa obtenida de la timidina quinasa del virus *Herpes simplex* de tipo 1 (HSV1-TK).

11. Una construcción de vector que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, y un promotor operativamente unido al polinucleótido.

12. La construcción de vector de la reivindicación 11, que es un vector vírico, en particular un vector del virus *Herpes simplex*, un vector de adenovirus, un vector de virus asociado a adenovirus, un vector de lentivirus, un vector de retrovirus o un vector de virus vaccinia.

13. Una línea celular de empaquetamiento capaz de producir un virión infeccioso que comprende el vector de cualquiera de las reivindicaciones 11-12.

14. Una célula huésped que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 11-12.

ES 2 320 434 T3

15. La célula huésped de la reivindicación 14, que es una célula humana, una célula de perro, una célula de mono, una célula de rata o una célula de ratón.

5 16. Una composición farmacéutica que comprende la enzima timidina quinasa vegetal de una cualquiera de las reivindicaciones 3-10, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

17. Una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, o un vector de cualquiera de las reivindicaciones 11-12, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 18. Una composición farmacéutica que comprende la línea celular de empaquetamiento de la reivindicación 13, o la célula huésped de cualquiera de las reivindicaciones 18-19, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15 19. Un procedimiento de sensibilización de una célula a un profármaco, cuyo procedimiento comprende las etapas de

(i) transfectar o transducir dicha célula con una secuencia de polinucleótido que codifica una enzima timidina quinasa vegetal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-10, que promueve la conversión de dicho profármaco en un fármaco (citotóxico); y

20 (ii) suministrar dicho profármaco a dicha célula; en el que dicha célula es más sensible a dicho fármaco (citotóxico) que a dicho profármaco, con la condición de que el procedimiento no sea un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.

25 20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que la secuencia de polinucleótido que codifica una enzima timidina quinasa vegetal es una secuencia de polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

21. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 19-20, en el que el profármaco es un análogo de nucleósido.

30 22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que el análogo de nucleósido es la AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina).

35 23. Un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, o un vector de cualquiera de las reivindicaciones 11-12, para usar en un procedimiento de inhibición de un agente patógeno en un animal de sangre caliente, cuyo procedimiento comprende administrar a dicho animal dicho polinucleótido o vector.

24. El polinucleótido o vector de la reivindicación 23, en el que dicha secuencia de polinucleótido o dicho vector se administra *in vivo*.

40 25. El polinucleótido o vector de cualquiera de las reivindicaciones 23-24, en el que dicho agente patógeno es un virus, una bacteria o un parásito.

45 26. El polinucleótido o vector de cualquiera de las reivindicaciones 23-24, en el que dicho agente patógeno es una célula tumoral.

27. El polinucleótido o vector de cualquiera de las reivindicaciones 23-24, en el que dicho agente patógeno es una célula inmunitaria autorreactiva.

50 28. El polinucleótido o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 23-27, para usar en un procedimiento de inhibición de un agente patógeno en un animal de sangre caliente, que además comprende la etapa de administrar un análogo de nucleósido a dicho animal de sangre caliente.

55 29. El polinucleótido o vector de la reivindicación 28, para usar en un procedimiento de inhibición de un agente patógeno en un animal de sangre caliente, en el que dicho análogo de nucleósido es AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina).

30. Uso de la enzima timidina quinasa vegetal de una cualquiera de las reivindicaciones 3-10, para la fosforilación de un nucleósido o un análogo de nucleósido, con la condición de que el uso no sea un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.

60 31. Un procedimiento de fosforilación de un nucleósido o un análogo de nucleósido que comprende las etapas de

i) someter el nucleósido o análogo de nucleósido a la acción de la enzima timidina quinasa vegetal de una cualquiera de las reivindicaciones 3-10, y

65 ii) recuperar el nucleósido o análogo de nucleósido fosforilado,

con la condición de que el procedimiento no sea un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.

ES 2 320 434 T3

32. Artículos que contienen un análogo de nucleósido y la timidina quinasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-10, o un gen que codifica dicha timidina quinasa obtenida de planta, o vector que comprende dicho gen que codifica dicha timidina quinasa obtenida de planta, como una combinación para la administración simultánea, separada o sucesiva en la terapia del cáncer.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

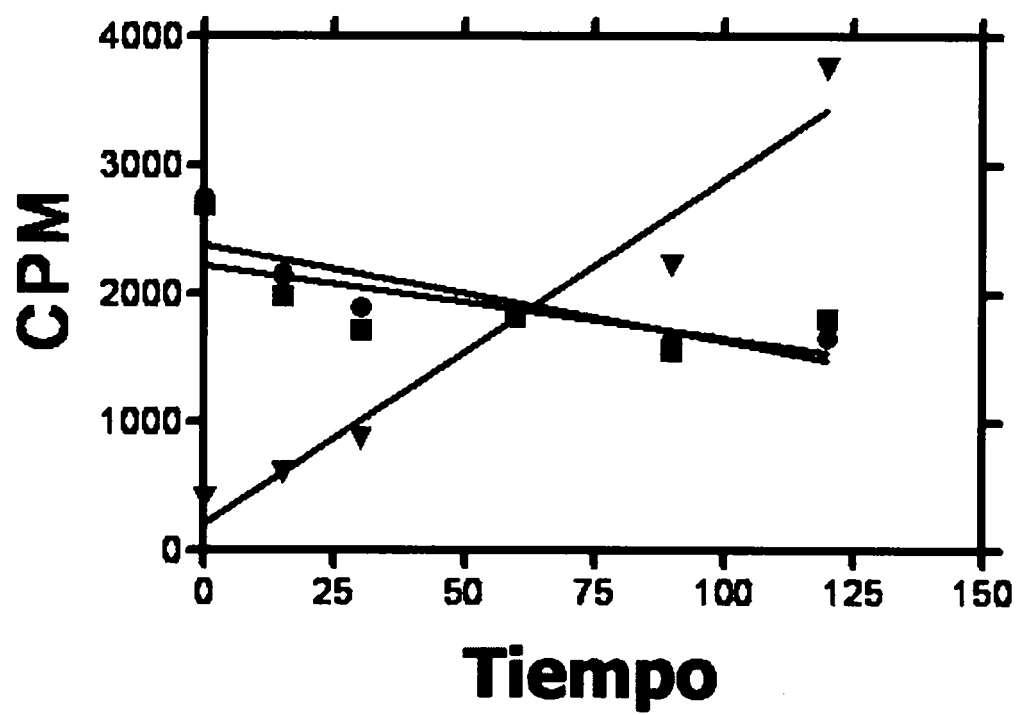


Fig. 1

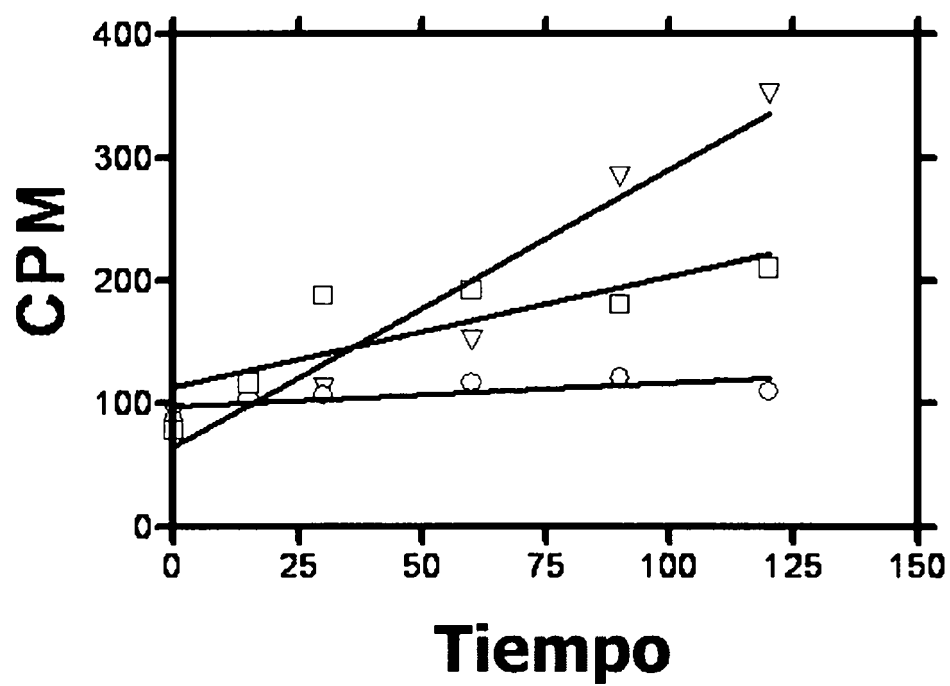


Fig. 2

ES 2 320 434 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Knecht, Wolfgang
Munch-Petersen, Birgitte
5 Piskur, Jure
<120> Timidina quinasas vegetales y su uso
<130> 504-204-WO
<150> DK PA 2002 00794
10 <151> 2002-05-23
<150> DK PA 2003 00178
<151> 2003-02-07
15 <160> 36
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 660
20 <212> ADN
<213> *Pinus taeda*
<220>
25 <221> CDS
<222> (1)..(660)
<223>
30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 320 434 T3

<400> 1

5	atg gat gac tcg ggt atc tac aca agt gga gaa att cat ctt atc ttg Met Asp Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Ser Gly Glu Ile His Leu Ile Leu 1 5 10 15	48
10	ggg cct atg ttc gcg ggc aag acg act gcc ctt att cgt aaa atg cga Gly Pro Met Phe Ala Gly Lys Thr Thr Ala Leu Ile Arg Lys Met Arg 20 25 30	96
15	gca gaa att caa atg ggc aga aga gtg gtg ctt gtg aaa tct gac aag Ala Glu Ile Gln Met Gly Arg Arg Val Val Leu Val Lys Ser Asp Lys 35 40 45	144
20	gat aca aga tat ggg ctg aac tca gtt gtg tct cat gat ggt gca aaa Asp Thr Arg Tyr Gly Leu Asn Ser Val Val Ser His Asp Gly Ala Lys 50 55 60	192
25	atg cct tgc tgg gct gtt gca gat ctt gca tct ttc aaa ggc aaa tta Met Pro Cys Trp Ala Val Ala Asp Leu Ala Ser Phe Lys Gly Lys Leu 65 70 75 80	240
30	gga gag gag gct tac aag cag gta gat gtg atc ggc att gat gaa gca Gly Glu Glu Ala Tyr Lys Gln Val Asp Val Ile Gly Ile Asp Glu Ala 85 90 95	288
35	cag ttc ttc aaa gac ctg tat agt ttt tgt cag gta gca gct gat aga Gln Phe Phe Lys Asp Leu Tyr Ser Phe Cys Gln Val Ala Asp Arg 100 105 110	336
40	gat ggg aaa att gtt att gtt gct ggc ctt gat ggg gat tat ttg agg Asp Gly Lys Ile Val Ile Val Ala Gly Leu Asp Gly Asp Tyr Leu Arg 115 120 125	384
45	aag agc ttt gga tca gct ctt gag ttg ata cct ata gcg gat tct gta Lys Ser Phe Gly Ser Ala Leu Glu Leu Ile Pro Ile Ala Asp Ser Val 130 135 140	432
50	gtt aaa ttg aag tca cgc tgt gag ctg tgt ggt aag gcc gca tca ttt Val Lys Leu Lys Ser Arg Cys Glu Leu Cys Gly Lys Ala Ala Ser Phe 145 150 155 160	480
55	aca ttt cgt aaa aca gga gaa aga aaa act gaa gtt gtt ggt ggt gca Thr Phe Arg Lys Thr Gly Glu Arg Lys Thr Glu Val Val Gly Gly Ala 165 170 175	528
60	gac att tac atg cca gtg tgc cga cgg cac tat gta aat ggg caa att Asp Ile Tyr Met Pro Val Cys Arg Arg His Tyr Val Asn Gly Gln Ile 180 185 190	576
65	gtt att gat aca acg agg gct gtg ctg gaa tcc ccg gag gtg caa tat Val Ile Asp Thr Thr Arg Ala Val Leu Glu Ser Pro Glu Val Gln Tyr 195 200 205	624
70	gat gct tgt gca caa gca acc aca aca tct gga taa Asp Ala Cys Ala Gln Ala Thr Thr Thr Ser Gly 210 215	660

<210> 2

<211> 219

<212> PRT

<213> *Pinus taeda*

ES 2 320 434 T3

<400> 2

5	Met	Asp	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	Thr	Ser	Gly	Glu	Ile	His	Leu	Ile	Leu
	1				5					10					15	
	Gly	Pro	Met	Phe	Ala	Gly	Lys	Thr	Thr	Ala	Leu	Ile	Arg	Lys	Met	Arg
				20					25					30		
10	Ala	Glu	Ile	Gln	Met	Gly	Arg	Arg	Val	Val	Leu	Val	Lys	Ser	Asp	Lys
			35					40					45			
	Asp	Thr	Arg	Tyr	Gly	Leu	Asn	Ser	Val	Val	Ser	His	Asp	Gly	Ala	Lys
		50					55					60				
15	Met	Pro	Cys	Trp	Ala	Val	Ala	Asp	Leu	Ala	Ser	Phe	Lys	Gly	Lys	Leu
	65					70					75					80
	Gly	Glu	Glu	Ala	Tyr	Lys	Gln	Val	Asp	Val	Ile	Gly	Ile	Asp	Glu	Ala
20					85					90					95	
	Gln	Phe	Phe	Lys	Asp	Leu	Tyr	Ser	Phe	Cys	Gln	Val	Ala	Ala	Asp	Arg
				100					105					110		
25	Asp	Gly	Lys	Ile	Val	Ile	Val	Ala	Gly	Leu	Asp	Gly	Asp	Tyr	Leu	Arg
			115					120					125			
	Lys	Ser	Phe	Gly	Ser	Ala	Leu	Glu	Leu	Ile	Pro	Ile	Ala	Asp	Ser	Val
30			130				135					140				
	Val	Lys	Leu	Lys	Ser	Arg	Cys	Glu	Leu	Cys	Gly	Lys	Ala	Ala	Ser	Phe
	145					150					155					160
35	Thr	Phe	Arg	Lys	Thr	Gly	Glu	Arg	Lys	Thr	Glu	Val	Val	Gly	Gly	Ala
					165					170					175	
	Asp	Ile	Tyr	Met	Pro	Val	Cys	Arg	Arg	His	Tyr	Val	Asn	Gly	Gln	Ile
				180					185					190		
40	Val	Ile	Asp	Thr	Thr	Arg	Ala	Val	Leu	Glu	Ser	Pro	Glu	Val	Gln	Tyr
			195					200					205			
	Asp	Ala	Cys	Ala	Gln	Ala	Thr	Thr	Thr	Ser	Gly					
45		210					215									

<210> 3

<211> 705

50 <212> ADN

<213> *Lycopersicon esculentum*

<220>

55 <221> CDS

<222> (1)..(705)

<223>

60

65

ES 2 320 434 T3

<400> 3

5	atg gct ttt tca tca tct gct aga aac cca gtt gac ctg aga aat gga Met Ala Phe Ser Ser Ser Ala Arg Asn Pro Val Asp Leu Arg Asn Gly 1 5 10 15	48
10	tcg aag aac agt ttt tgt ccg gtg ggt gaa ata cat gta att gtt ggt Ser Lys Asn Ser Phe Cys Pro Val Gly Glu Ile His Val Ile Val Gly 20 25 30	96
15	cct atg ttt gct gga aaa acc act gct ctt ctt cgc cgg gtc aat ttg Pro Met Phe Ala Gly Lys Thr Thr Ala Leu Leu Arg Arg Val Asn Leu 35 40 45	144
20	gaa tcc aac gat ggg aga aat gtg gta ctg att aag tca agt aaa gat Glu Ser Asn Asp Gly Arg Asn Val Val Leu Ile Lys Ser Ser Lys Asp 50 55 60	192
25	gca aga tat gct gta gat gca gtg gtg aca cat gat ggg aca aga ttt Ala Arg Tyr Ala Val Asp Ala Val Val Thr His Asp Gly Thr Arg Phe 65 70 75 80	240
30	cca tgt tgg tca ttg ccg gat ctt tca tct ttc aag cag aga ttt gga Pro Cys Trp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Ser Phe Lys Gln Arg Phe Gly 85 90 95	288
35	aaa gat gca tat gaa aag gtg gat gtg att ggc atc gat gaa gct cag Lys Asp Ala Tyr Glu Lys Val Asp Val Ile Gly Ile Asp Glu Ala Gln 100 105 110	336
40	ttc ttt ggg gac ctt tat gag ttc tgc tgc aat gct gct gat ttt gat Phe Phe Gly Asp Leu Tyr Glu Phe Cys Cys Asn Ala Ala Asp Phe Asp 115 120 125	384
45	ggg aaa att ata gtt gtt gca ggc cta gat ggt gat tac ttg agg aag Gly Lys Ile Ile Val Val Ala Gly Leu Asp Gly Asp Tyr Leu Arg Lys 130 135 140	432
50	agt ttt ggt tca gtg ctt gac ata att cca ctt gct gat act gtg acc Ser Phe Gly Ser Val Leu Asp Ile Ile Pro Leu Ala Asp Thr Val Thr 145 150 155 160	480
55	aag ttg act gct aga tgt gag ttg tgt aac aga agg gca ttt ttc acc Lys Leu Thr Ala Arg Cys Glu Leu Cys Asn Arg Arg Ala Phe Phe Thr 165 170 175	528
60	ttc aga aag act aat gag aca gag act gag ctt ata gga ggt gct gat Phe Arg Lys Thr Asn Glu Thr Glu Thr Glu Leu Ile Gly Gly Ala Asp 180 185 190	576
65	att tac atg cct gtt tgt cgt cag cac tat gtt aat gga caa tct gtc Ile Tyr Met Pro Val Cys Arg Gln His Tyr Val Asn Gly Gln Ser Val 195 200 205	624
70	aat gaa tct gca aaa atg gtt ctt gaa tct cat aaa gtg tca aat gaa Asn Glu Ser Ala Lys Met Val Leu Glu Ser His Lys Val Ser Asn Glu 210 215 220	672
75	ctt atc tta gaa tca cca cta gtt gat cca taa Leu Ile Leu Glu Ser Pro Leu Val Asp Pro 225 230	705

<210> 4

<211> 234

<212> PRT

<213> *Lycopersicon esculentum*

ES 2 320 434 T3

<400> 4

5 Met Ala Phe Ser Ser Ser Ala Arg Asn Pro Val Asp Leu Arg Asn Gly
1 5 10 15

Ser Lys Asn Ser Phe Cys Pro Val Gly Glu Ile His Val Ile Val Gly
20 25 30

10 Pro Met Phe Ala Gly Lys Thr Thr Ala Leu Leu Arg Arg Val Asn Leu
35 40 45

Glu Ser Asn Asp Gly Arg Asn Val Val Leu Ile Lys Ser Ser Lys Asp
50 55 60

15 Ala Arg Tyr Ala Val Asp Ala Val Val Thr His Asp Gly Thr Arg Phe
65 70 75 80

20 Pro Cys Trp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Ser Phe Lys Gln Arg Phe Gly
85 90 95

Lys Asp Ala Tyr Glu Lys Val Asp Val Ile Gly Ile Asp Glu Ala Gln
100 105 110

25 Phe Phe Gly Asp Leu Tyr Glu Phe Cys Cys Asn Ala Ala Asp Phe Asp
115 120 125

Gly Lys Ile Ile Val Val Ala Gly Leu Asp Gly Asp Tyr Leu Arg Lys
130 135 140

30 Ser Phe Gly Ser Val Leu Asp Ile Ile Pro Leu Ala Asp Thr Val Thr
145 150 155 160

35 Lys Leu Thr Ala Arg Cys Glu Leu Cys Asn Arg Arg Ala Phe Phe Thr
165 170 175

Phe Arg Lys Thr Asn Glu Thr Glu Thr Glu Leu Ile Gly Gly Ala Asp
180 185 190

40 Ile Tyr Met Pro Val Cys Arg Gln His Tyr Val Asn Gly Gln Ser Val
195 200 205

Asn Glu Ser Ala Lys Met Val Leu Glu Ser His Lys Val Ser Asn Glu
210 215 220

45 Leu Ile Leu Glu Ser Pro Leu Val Asp Pro
225 230

<210> 5

<211> 208

<212> PRT

<213> *Lycopersicon esculentum*

ES 2 320 434 T3

<400> 5

5	Met	Ala	Phe	Ser	Ser	Ser	Ala	Arg	Asn	Pro	Val	Asp	Leu	Arg	Asn	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Lys	Asn	Ser	Phe	Cys	Pro	Val	Gly	Glu	Ile	His	Val	Ile	Val	Gly
			20						25					30		
10	Pro	Met	Phe	Ala	Gly	Lys	Thr	Thr	Ala	Leu	Leu	Arg	Arg	Val	Asn	Leu
			35					40					45			
	Glu	Ser	Asn	Asp	Gly	Arg	Asn	Val	Val	Leu	Ile	Lys	Ser	Ser	Lys	Asp
15		50					55					60				
	Ala	Arg	Tyr	Ala	Val	Asp	Ala	Val	Val	Thr	His	Asp	Gly	Thr	Arg	Phe
	65					70					75					80
	Pro	Cys	Trp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Ser	Phe	Lys	Gln	Arg	Phe	Gly
20					85					90					95	
	Lys	Asp	Ala	Tyr	Glu	Lys	Val	Asp	Val	Ile	Gly	Ile	Asp	Glu	Ala	Gln
				100					105					110		
25	Phe	Phe	Gly	Asp	Leu	Tyr	Glu	Phe	Cys	Cys	Asn	Ala	Ala	Asp	Phe	Asp
			115					120					125			
	Gly	Lys	Ile	Ile	Val	Val	Ala	Gly	Leu	Asp	Gly	Asp	Tyr	Leu	Arg	Lys
30			130				135					140				
	Ser	Phe	Gly	Ser	Val	Leu	Asp	Ile	Ile	Pro	Leu	Ala	Asp	Thr	Val	Thr
	145					150					155					160
	Lys	Leu	Thr	Ala	Arg	Cys	Glu	Leu	Cys	Asn	Arg	Arg	Ala	Phe	Phe	Thr
35					165					170					175	
	Phe	Arg	Lys	Thr	Asn	Glu	Thr	Glu	Thr	Glu	Leu	Ile	Gly	Gly	Ala	Asp
				180					185					190		
40	Ile	Tyr	Met	Pro	Val	Cys	Arg	Gln	His	Tyr	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Val
			195					200					205			

<210> 6

45 <211> 831

<212> ADN

<213> *Oryza sativa*

50 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(831)

<223>

55

60

65

ES 2 320 434 T3

<400> 6

5	atg agc tcc att tgc gcc atg aga tcc ctc ctc gcc gcc tcc acc ttc Met Ser Ser Ile Cys Ala Met Arg Ser Leu Leu Ala Ala Ser Thr Phe 1 5 10 15	48
10	ctc cgc tcc ggc gct tcc cct ctg ctg cgg ccc ctt tcc cgt cct ctc Leu Arg Ser Gly Ala Ser Pro Leu Leu Arg Pro Leu Ser Arg Pro Leu 20 25 30	96
15	cct tcc cgc ctg aat ctt tcc cga ttc ggt ccg gtg agg ccg gtc tct Pro Ser Arg Leu Asn Leu Ser Arg Phe Gly Pro Val Arg Pro Val Ser 35 40 45	144
20	gcg gcg gcg gcg gcg gcg gac aag tct cga ggc gga ggc ggc tcc gcg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Asp Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Ala 50 55 60	192
25	atg gag gcc cag ccg tgc tat ccc ggt gag att cac gtc atc gtg ggc Met Glu Ala Gln Pro Ser Tyr Pro Gly Glu Ile His Val Ile Val Gly 65 70 75 80	240
30	ccc atg ttc gcc ggg aag acc act gcc ctt ctc cga cgc gtg cag gtc Pro Met Phe Ala Gly Lys Thr Thr Ala Leu Leu Arg Arg Val Gln Val 85 90 95	288
35	gag gcc ggc act ggc agg aac gtg gca ctc atc aag tct gac aag gac Glu Ala Gly Thr Gly Arg Asn Val Ala Leu Ile Lys Ser Asp Lys Asp 100 105 110	336
40	aat agg tat gga ttg gat tct gtc gta act cat gat ggc aca aag atg Asn Arg Tyr Gly Leu Asp Ser Val Val Thr His Asp Gly Thr Lys Met 115 120 125	384
45	cca tgc tgg gct cta cct gag ctt tca agt ttc caa gat aaa tta gga Pro Cys Trp Ala Leu Pro Glu Leu Ser Ser Phe Gln Asp Lys Leu Gly 130 135 140	432
50	aca gag gct tac gat aag gtt gat gtc ata ggt att gat gaa gca cag Thr Glu Ala Tyr Asp Lys Val Asp Val Ile Gly Ile Asp Glu Ala Gln 145 150 155 160	480
55	ttt ttt gac gat ctt cat gat ttc tgc tgc aaa gct gct gac cgt gat Phe Phe Asp Asp Leu His Asp Phe Cys Cys Lys Ala Ala Asp Arg Asp 165 170 175	528
60	gga aaa att gtt gta gtc gca ggg cta gat ggt gac tac aaa agg aac Gly Lys Ile Val Val Val Ala Gly Leu Asp Gly Asp Tyr Lys Arg Asn 180 185 190	576
65	aaa ttt ggg tca gtt ctg gac att ata ccc ttg gct gac tcg gtc acc Lys Phe Gly Ser Val Leu Asp Ile Ile Pro Leu Ala Asp Ser Val Thr 195 200 205	624
70	aag ctc acc gca cgc tgt gag ttg tgc ggt cgc cgt gca ttc ttc acg Lys Leu Thr Ala Arg Cys Glu Leu Cys Gly Arg Arg Ala Phe Phe Thr 210 215 220	672
75	ctg agg aag aca cgg gaa act aag acc gag ctc att gga gga gct gat Leu Arg Lys Thr Arg Glu Thr Lys Thr Glu Leu Ile Gly Gly Ala Asp 225 230 235 240	720
80	gtg tac atg cct gta tgt agg caa cac tac ctg gat ggt cag att gtc Val Tyr Met Pro Val Cys Arg Gln His Tyr Leu Asp Gly Gln Ile Val 245 250 255	768
85	att gag gcc aca agg att gtg ctg gat ctt gaa aaa tcc aag gtt atc Ile Glu Ala Thr Arg Ile Val Leu Asp Leu Glu Lys Ser Lys Val Ile 260 265 270	816
90	cat gct ttc aag tga His Ala Phe Lys 275	831

ES 2 320 434 T3

<210> 7

<211> 276

<212> PRT

5 <213> *Oryza sativa*

<400> 7

10	Met	Ser	Ser	Ile	Cys	Ala	Met	Arg	Ser	Leu	Leu	Ala	Ala	Ser	Thr	Phe
	1				5					10					15	
	Leu	Arg	Ser	Gly	Ala	Ser	Pro	Leu	Leu	Arg	Pro	Leu	Ser	Arg	Pro	Leu
				20					25					30		
15	Pro	Ser	Arg	Leu	Asn	Leu	Ser	Arg	Phe	Gly	Pro	Val	Arg	Pro	Val	Ser
			35					40					45			
	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Asp	Lys	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala
20			50				55					60				
	Met	Glu	Ala	Gln	Pro	Ser	Tyr	Pro	Gly	Glu	Ile	His	Val	Ile	Val	Gly
	65					70					75					80
25	Pro	Met	Phe	Ala	Gly	Lys	Thr	Thr	Ala	Leu	Leu	Arg	Arg	Val	Gln	Val
					85					90					95	
	Glu	Ala	Gly	Thr	Gly	Arg	Asn	Val	Ala	Leu	Ile	Lys	Ser	Asp	Lys	Asp
				100					105					110		
30	Asn	Arg	Tyr	Gly	Leu	Asp	Ser	Val	Val	Thr	His	Asp	Gly	Thr	Lys	Met
			115					120					125			
	Pro	Cys	Trp	Ala	Leu	Pro	Glu	Leu	Ser	Ser	Phe	Gln	Asp	Lys	Leu	Gly
35			130				135					140				
	Thr	Glu	Ala	Tyr	Asp	Lys	Val	Asp	Val	Ile	Gly	Ile	Asp	Glu	Ala	Gln
	145					150					155					160
40	Phe	Phe	Asp	Asp	Leu	His	Asp	Phe	Cys	Cys	Lys	Ala	Ala	Asp	Arg	Asp
					165					170					175	
	Gly	Lys	Ile	Val	Val	Val	Ala	Gly	Leu	Asp	Gly	Asp	Tyr	Lys	Arg	Asn
45				180					185					190		
	Lys	Phe	Gly	Ser	Val	Leu	Asp	Ile	Ile	Pro	Leu	Ala	Asp	Ser	Val	Thr
			195					200					205			
50	Lys	Leu	Thr	Ala	Arg	Cys	Glu	Leu	Cys	Gly	Arg	Arg	Ala	Phe	Phe	Thr
		210					215					220				
	Leu	Arg	Lys	Thr	Arg	Glu	Thr	Lys	Thr	Glu	Leu	Ile	Gly	Gly	Ala	Asp
	225					230					235					240
55	Val	Tyr	Met	Pro	Val	Cys	Arg	Gln	His	Tyr	Leu	Asp	Gly	Gln	Ile	Val
					245					250					255	
	Ile	Glu	Ala	Thr	Arg	Ile	Val	Leu	Asp	Leu	Glu	Lys	Ser	Lys	Val	Ile
60				260					265					270		
	His	Ala	Phe	Lys												
				275												

<210> 8

65 <211> 717

<212> ADN

ES 2 320 434 T3

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(717)

<223>

<400> 8

10	atg gcg act ctc aaa gct tcc ttt ttg atc aaa acc ctc gac agt gac	48
	Met Ala Thr Leu Lys Ala Ser Phe Leu Ile Lys Thr Leu Asp Ser Asp	
	1 5 10 15	
15	gtc acc gga gat ttt ctc tcc gat ctg gaa cgt cgt ggg tca ggt gct	96
	Val Thr Gly Asp Phe Leu Ser Asp Leu Glu Arg Arg Gly Ser Gly Ala	
	20	
20	gtt cat gtt atc atg ggt cct atg ttt tct ggg aaa tcg acc tct ctc	144
	Val His Val Ile Met Gly Pro Met Phe Ser Gly Lys Ser Thr Ser Leu	
	35 40 45	
25	ctt cgc cga atc aag tca gag atc agc gac gga aga agt gtt gcg atg	192
	Leu Arg Arg Ile Lys Ser Glu Ile Ser Asp Gly Arg Ser Val Ala Met	
	50 55 60	
30	ctg aaa tcg agt aag gat acg aga tac gca aaa gat tcg gtg gtg aca	240
	Leu Lys Ser Ser Lys Asp Thr Arg Tyr Ala Lys Asp Ser Val Val Thr	
	65 70 75 80	
35	cat gat gga att gga ttc cct tgc tgg gct ctt cca gat ctc atg tca	288
	His Asp Gly Ile Gly Phe Pro Cys Trp Ala Leu Pro Asp Leu Met Ser	
	85 90 95	
40	ttt cct gag aaa ttc gga cta gat gct tat aac aag ctt gat gtg att	336
	Phe Pro Glu Lys Phe Gly Leu Asp Ala Tyr Asn Lys Leu Asp Val Ile	
	100 105 110	
45	ggg att gat gag gct cag ttc ttt gga gat ctt tat gag ttt tgc tgc	384
	Gly Ile Asp Glu Ala Gln Phe Phe Gly Asp Leu Tyr Glu Phe Cys Cys	
	115 120 125	
50	aaa gtc gct gat gat gat ggt aaa att gtg atc gtt gct ggc cta gat	432
	Lys Val Ala Asp Asp Asp Gly Lys Ile Val Ile Val Ala Gly Leu Asp	
	130 135 140	
55	ggg gac tat tta agg agg agt ttt ggg gct gta ctt gac att ata cca	480
	Gly Asp Tyr Leu Arg Arg Ser Phe Gly Ala Val Leu Asp Ile Ile Pro	
	145 150 155 160	
60	ata gct gat tct gtg act aag cta act gca agg tgt gag gtc tgt gga	528
	Ile Ala Asp Ser Val Thr Lys Leu Thr Ala Arg Cys Glu Val Cys Gly	
	165 170 175	
65	cat aaa gct ttc ttc act tta aga aag aat tgt gac acc aga act gag	576
	His Lys Ala Phe Phe Thr Leu Arg Lys Asn Cys Asp Thr Arg Thr Glu	
	180 185 190	
70	ctt att ggt gga gct gat gtc tat atg cct gtt tgt cgc aag cat tac	624
	Leu Ile Gly Gly Ala Asp Val Tyr Met Pro Val Cys Arg Lys His Tyr	
	195 200 205	
75	atc act aat cat att gtt att aaa gcc tct aag aaa gtc ttg gaa gat	672
	Ile Thr Asn His Ile Val Ile Lys Ala Ser Lys Val Leu Glu Asp	
	210 215 220	
80	tct gac aag gct aga gct gaa tcc tgt gtt gct gct aca atc taa	717
	Ser Asp Lys Ala Arg Ala Glu Ser Cys Val Ala Ala Thr Ile	
	225 230 235	

<210> 9

ES 2 320 434 T3

<211> 238

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

5

<400> 9

```

10      Met Ala Thr Leu Lys Ala Ser Phe Leu Ile Lys Thr Leu Asp Ser Asp
      1          5          10          15
      Val Thr Gly Asp Phe Leu Ser Asp Leu Glu Arg Arg Gly Ser Gly Ala
      20          25          30
15      Val His Val Ile Met Gly Pro Met Phe Ser Gly Lys Ser Thr Ser Leu
      35          40          45
      Leu Arg Arg Ile Lys Ser Glu Ile Ser Asp Gly Arg Ser Val Ala Met
      50          55          60
20      Leu Lys Ser Ser Lys Asp Thr Arg Tyr Ala Lys Asp Ser Val Val Thr
      65          70          75          80
      His Asp Gly Ile Gly Phe Pro Cys Trp Ala Leu Pro Asp Leu Met Ser
      85          90          95
      Phe Pro Glu Lys Phe Gly Leu Asp Ala Tyr Asn Lys Leu Asp Val Ile
      100          105          110
30      Gly Ile Asp Glu Ala Gln Phe Phe Gly Asp Leu Tyr Glu Phe Cys Cys
      115          120          125-
      Lys Val Ala Asp Asp Asp Gly Lys Ile Val Ile Val Ala Gly Leu Asp
      130          135          140
35      Gly Asp Tyr Leu Arg Arg Ser Phe Gly Ala Val Leu Asp Ile Ile Pro
      145          150          155          160
40      Ile Ala Asp Ser Val Thr Lys Leu Thr Ala Arg Cys Glu Val Cys Gly
      165          170          175
      His Lys Ala Phe Phe Thr Leu Arg Lys Asn Cys Asp Thr Arg Thr Glu
      180          185          190
45      Leu Ile Gly Gly Ala Asp Val Tyr Met Pro Val Cys Arg Lys His Tyr
      195          200          205
      Ile Thr Asn His Ile Val Ile Lys Ala Ser Lys Lys Val Leu Glu Asp
      210          215          220
50      Ser Asp Lys Ala Arg Ala Glu Ser Cys Val Ala Ala Thr Ile
      225          230          235

```

55

<210> 10

<211> 645

<212> ADN

60

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(645)

65

<223>

ES 2 320 434 T3

<400> 10

5	atg gcg act ctc aaa gct tcc ttt ttg atc aaa acc ctc gac agt gac Met Ala Thr Leu Lys Ala Ser Phe Leu Ile Lys Thr Leu Asp Ser Asp 1 5 10 15	48
10	gtc acc gga gat ttt ctc tcc gat ctg gaa cgt cgt ggg tca ggt gct Val Thr Gly Asp Phe Leu Ser Asp Leu Glu Arg Arg Gly Ser Gly Ala 20 25 30	96
15	gtt cat gtt atc atg ggt cct atg ttt tct ggg aaa tcg acc tct ctc Val His Val Ile Met Gly Pro Met Phe Ser Gly Lys Ser Thr Ser Leu 35 40 45	144
20	ctt cgc cga atc aag tca gag atc agc gac gga aga agt gtt gcg atg Leu Arg Arg Ile Lys Ser Glu Ile Ser Asp Gly Arg Ser Val Ala Met 50 55 60	192
25	ctg aaa tcg agt aag gat acg aga tac gca aaa gat tcg gtg gtg aca Leu Lys Ser Ser Lys Asp Thr Arg Tyr Ala Lys Asp Ser Val Val Thr 65 70 75 80	240
30	cat gat gga att gga ttc cct tgc tgg gct ctt cca gat ctc atg tca His Asp Gly Ile Gly Phe Pro Cys Trp Ala Leu Pro Asp Leu Met Ser 85 90 95	288
35	ttt cct gag aaa ttc gga cta gat gct tat aac aag ctt gat gtg att Phe Pro Glu Lys Phe Gly Leu Asp Ala Tyr Asn Lys Leu Asp Val Ile 100 105 110	336
40	ggg att gat gag gct cag ttc ttt gga gat ctt tat gag ttt tgc tgc Gly Ile Asp Glu Ala Gln Phe Phe Gly Asp Leu Tyr Glu Phe Cys Cys 115 120 125	384
45	aaa gtc gct gat gat gat ggt aaa att gtg atc gtt gct ggc cta gat Lys Val Ala Asp Asp Asp Gly Lys Ile Val Ile Val Ala Gly Leu Asp 130 135 140	432
50	ggg gac tat tta agg agg agt ttt ggg gct gta ctt gac att ata cca Gly Asp Tyr Leu Arg Arg Ser Phe Gly Ala Val Leu Asp Ile Ile Pro 145 150 155 160	480
55	ata gct gat tct gtg act aag cta act gca agg tgt gag gtc tgt gga Ile Ala Asp Ser Val Thr Lys Leu Thr Ala Arg Cys Glu Val Cys Gly 165 170 175	528
60	cat aaa gct ttc ttc act tta aga aag aat tgt gac acc aga act gag His Lys Ala Phe Phe Thr Leu Arg Lys Asn Cys Asp Thr Arg Thr Glu 180 185 190	576
65	ctt att ggt gga gct gat gtc tat atg cct gtt tgt cgc aag cat tac Leu Ile Gly Gly Ala Asp Val Tyr Met Pro Val Cys Arg Lys His Tyr 195 200 205	624
70	atc act aat cat att gtt taa Ile Thr Asn His Ile Val 210	645

<210> 11

<211> 214

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

ES 2 320 434 T3

<400> 11

5	Met	Ala	Thr	Leu	Lys	Ala	Ser	Phe	Leu	Ile	Lys	Thr	Leu	Asp	Ser	Asp	1	5	10	15
	Val	Thr	Gly	Asp	Pro	Leu	Ser	Asp	Leu	Glu	Arg	Arg	Gly	Ser	Gly	Ala	20	25	30	
10	Val	His	Val	Ile	Met	Gly	Pro	Met	Phe	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Ser	Leu	35	40	45	
	Leu	Arg	Arg	Ile	Lys	Ser	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Arg	Ser	Val	Ala	Met	50	55	60	
15	Leu	Lys	Ser	Ser	Lys	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ala	Lys	Asp	Ser	Val	Val	Thr	65	70	75	80
	His	Asp	Gly	Ile	Gly	Phe	Pro	Cys	Trp	Ala	Leu	Pro	Asp	Leu	Met	Ser	85	90	95	
20	Phe	Pro	Glu	Lys	Phe	Gly	Leu	Asp	Ala	Tyr	Asn	Lys	Leu	Asp	Val	Ile	100	105	110	
25	Gly	Ile	Asp	Glu	Ala	Gln	Phe	Phe	Gly	Asp	Leu	Tyr	Glu	Phe	Cys	Cys	115	120	125	
	Lys	Val	Ala	Asp	Asp	Asp	Gly	Lys	Ile	Val	Ile	Val	Ala	Gly	Leu	Asp	130	135	140	
30	Gly	Asp	Tyr	Leu	Arg	Arg	Ser	Phe	Gly	Ala	Val	Leu	Asp	Ile	Ile	Pro	145	150	155	160
	Ile	Ala	Asp	Ser	Val	Thr	Lys	Leu	Thr	Ala	Arg	Cys	Glu	Val	Cys	Gly	165	170	175	
35	His	Lys	Ala	Phe	Phe	Thr	Leu	Arg	Lys	Asn	Cys	Asp	Thr	Arg	Thr	Glu	180	185	190	
40	Leu	Ile	Gly	Gly	Ala	Asp	Val	Tyr	Met	Pro	Val	Cys	Arg	Lys	His	Tyr	195	200	205	
45	Ile	Thr	Asn	His	Ile	Val											210			

<210> 12

<211> 834

50 <212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

55 <221> CDS

<222> (1)..(834)

<223>

60

65

ES 2 320 434 T3

<400> 12

5	atg aga aca tta atc tca cca tct ctt gct ccc ttc tct ctt cat ctc Met Arg Thr Leu Ile Ser Pro Ser Leu Ala Pro Phe Ser Leu His Leu 1 5 10 15	48
10	cat aaa ccc tct ctc ttc tcc acc gct ctt cgc ttc tcc ttc tca atc His Lys Pro Ser Leu Phe Ser Thr Ala Leu Arg Phe Ser Phe Ser Ile 20 25 30	96
15	aac aac ata acc ccc aca aat tca cct cct tcc acc att tcc acc aga Asn Asn Ile Thr Pro Thr Asn Ser Pro Pro Ser Thr Ile Ser Thr Arg 35 40 45	144
20	aag cta caa acg aaa gcg acg agg gta aca tca tca tca tca tct cag Lys Leu Gln Thr Lys Ala Thr Arg Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Gln 50 55 60	192
25	ccg ctc tcc tcc tca tct ccc ggc gaa atc cac gtc gta gtc ggt cca Pro Leu Ser Ser Ser Ser Pro Gly Glu Ile His Val Val Val Gly Pro 65 70 75 80	240
30	atg ttc tcc ggt aaa aca aca aca ctt ctc cgc cgt ata ctc gcc gaa Met Phe Ser Gly Lys Thr Thr Thr Leu Leu Arg Arg Ile Leu Ala Glu 85 90 95	288
35	aga gaa acc ggt aaa aga atc gca atc atc aaa tcc aac aaa gac aca Arg Glu Thr Gly Lys Arg Ile Ala Ile Ile Lys Ser Asn Lys Asp Thr 100 105 110	336
40	aga tac tgc acc gaa tca ata gtt act cac gac ggt gag aaa tac cct Arg Tyr Cys Thr Glu Ser Ile Val Thr His Asp Gly Glu Lys Tyr Pro 115 120 125	384
45	tgc tgg tca ctc ccc gat ctc tgc tcc ttc aaa gag aga ttc gga ttc Cys Trp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Ser Phe Lys Glu Arg Phe Gly Phe 130 135 140	432
50	gac gac tac gag aat cga tta gat gtg att gga atc gac gaa gct caa Asp Asp Tyr Glu Asn Arg Leu Asp Val Ile Gly Ile Asp Glu Ala Gln 145 150 155 160	480
55	ttc ttc gga gat ctt tac gag ttt tgc cgt gaa gct gct gat aaa gag Phe Phe Gly Asp Leu Tyr Glu Phe Cys Arg Glu Ala Ala Asp Lys Glu 165 170 175	528
60	ggt aaa act gta att gtt gct gga ttg gat ggt gat ttt atg agg agg Gly Lys Thr Val Ile Val Ala Gly Leu Asp Gly Asp Phe Met Arg Arg 180 185 190	576
65	agg ttt ggt tgc gtt ctt gat ttg att ccg att gcg gat acg gtt acg Arg Phe Gly Ser Val Leu Asp Leu Ile Pro Ile Ala Asp Thr Val Thr 195 200 205	624
70	aag ctg acg tca cgg tgt gag gtt tgt ggg aag aga gct ttg ttt acg Lys Leu Thr Ser Arg Cys Glu Val Cys Gly Lys Arg Ala Leu Phe Thr 210 215 220	672
75	atg agg aag acg gag gag aaa gag acg gag ttg atc ggt ggt gct gaa Met Arg Lys Thr Glu Glu Lys Glu Thr Glu Leu Ile Gly Gly Ala Glu 225 230 235 240	720
80	gtt tat atg cct gtg tgt agg agt cat tac gtt tgc ggt caa aac gtt Val Tyr Met Pro Val Cys Arg Ser His Tyr Val Cys Gly Gln Asn Val 245 250 255	768
85	ttg gaa acc gct cgt gcc gtt ttg gat tca agc aat aat cat agt gtt Leu Glu Thr Ala Arg Ala Val Leu Asp Ser Ser Asn Asn His Ser Val 260 265 270	816
90	gta gca agt tca ctt tag Val Ala Ser Ser Leu 275	834

<210> 13

<211> 277

ES 2 320 434 T3

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

5 <400> 13

	Met	Arg	Thr	Leu	Ile	Ser	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Phe	Ser	Leu	His	Leu	
	1				5					10					15		
10	His	Lys	Pro	Ser	Leu	Phe	Ser	Thr	Ala	Leu	Arg	Phe	Ser	Phe	Ser	Ile	
				20					25					30			
	Asn	Asn	Ile	Thr	Pro	Thr	Asn	Ser	Pro	Pro	Ser	Thr	Ile	Ser	Thr	Arg	
			35				40						45				
15	Lys	Leu	Gln	Thr	Lys	Ala	Thr	Arg	Val	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gln	
	50						55					60					
	Pro	Leu	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro	Gly	Glu	Ile	His	Val	Val	Val	Gly	Pro	
20	65					70					75					80	
	Met	Phe	Ser	Gly	Lys	Thr	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Arg	Ile	Leu	Ala	Glu	
					85					90					95		
25	Arg	Glu	Thr	Gly	Lys	Arg	Ile	Ala	Ile	Ile	Lys	Ser	Asn	Lys	Asp	Thr	
				100					105					110			
	Arg	Tyr	Cys	Thr	Glu	Ser	Ile	Val	Thr	His	Asp	Gly	Glu	Lys	Tyr	Pro	
30			115					120					125				
	Cys	Trp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Ser	Phe	Lys	Glu	Arg	Phe	Gly	Phe	
		130					135					140					
35	Asp	Asp	Tyr	Glu	Asn	Arg	Leu	Asp	Val	Ile	Gly	Ile	Asp	Glu	Ala	Gln	
	145					150					155					160	
	Phe	Phe	Gly	Asp	Leu	Tyr	Glu	Phe	Cys	Arg	Glu	Ala	Ala	Asp	Lys	Glu	
40					165					170					175		
	Gly	Lys	Thr	Val	Ile	Val	Ala	Gly	Leu	Asp	Gly	Asp	Phe	Met	Arg	Arg	
				180					185					190			
45	Arg	Phe	Gly	Ser	Val	Leu	Asp	Leu	Ile	Pro	Ile	Ala	Asp	Thr	Val	Thr	
				195				200					205				
	Lys	Leu	Thr	Ser	Arg	Cys	Glu	Val	Cys	Gly	Lys	Arg	Ala	Leu	Phe	Thr	
		210					215					220					
50	Met	Arg	Lys	Thr	Glu	Glu	Lys	Glu	Thr	Glu	Leu	Ile	Gly	Gly	Ala	Glu	
	225					230					235					240	
	Val	Tyr	Met	Pro	Val	Cys	Arg	Ser	His	Tyr	Val	Cys	Gly	Gln	Asn	Val	
55					245					250					255		
	Leu	Glu	Thr	Ala	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Ser	Asn	Asn	His	Ser	Val	
				260					265					270			
60	Val	Ala	Ser	Ser	Leu												
					275												

<210> 14

65 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 320 434 T3

	<220>		
	<223> cebador de PCR		
5	<400> 14		
	ccgctcgaga tggcgactct caaagcttcc ttttg		36
10	<210> 15		
	<211> 36		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> cebador de PCR		
	<400> 15		
20	cgcgatcct tagattgtag cagcaacaca ggattc		36
	<210> 16		
25	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> cebador de PCR		
	<400> 16		
35	cgcgatcct taaacaatat gattagtgtat gtaatgcttg		40
	<210> 17		
40	<211> 39		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> cebador de PCR		
	<400> 17		
50	ggaagatctt tagacagatt gtccattaac atagtgtg		39
	<210> 18		
	<211> 37		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador de PCR		
60	<400> 18		
65	ggaagatctt tatggatcaa ctagtggtga ttctaag		37
	<210> 19		
	<211> 36		

ES 2 320 434 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> cebador de PCR	
	<400> 19	
10	ccgctcgaga tggcttttc atcatctgct agaaac	36
	<210> 20	
	<211> 34	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> cebador de PCR	
	<400> 20	
25	tataggatcc gccaccatgg ctctgtacc cggc	34
	<210> 21	
	<211> 29	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
35	<400> 21	
40	tatactcgag gaggtcgact cagtagcc	29
	<210> 22	
	<211> 50	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
50	<400> 22	
	cgcggatcca tggcttttc atcatctgct agaaaccag ttgacctgag	50
55	<210> 23	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> cebador de PCR	
65	<400> 23	
	ccggaattct tatggatcaa ctagtgtga ttctaag	37

ES 2 320 434 T3

	<210> 24	
	<211> 46	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
10	<400> 24	
	cgcggatcca tggcgactct caaagcttc ttttgatca aaaccc	46
15	<210> 25	
	<211> 39	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
25	<400> 25	
	ccggaattct tagattgtag cagcaacaca ggattcagc	39
30	<210> 26	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> cebador de PCR	
40	<400> 26	
	atgagaacat taatctcacc atctc	25
45	<210> 27	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 27	
55	ctaaagtgaa cttgctacaa cactatg	27
60	<210> 28	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> cebador de PCR	

ES 2 320 434 T3

	<400> 28	
	cgcggatcca tgagaacatt aatctcacca tctc	34
5	<210> 29	
	<211> 32	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
15	<400> 29	
	ccggaattcc taaagtgaac ttgctacaac ac	32
20	<210> 30	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador de PCR	
30	<400> 30	
	cgcggatcct ccaccgctct tcgtttctcc	30
35	<210> 31	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador de PCR	
	<400> 31	
45	cgcggatcct ccaccagaaa gctacaaacg	30
	<210> 32	
50	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> cebador de PCR	
	<400> 32	
60	cgcggatccc agccgctctc ctctctatc	29
	<210> 33	
	<211> 32	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 320 434 T3

	<220>		
	<223> cebador de PCR		
5	<400> 33		
	cgggatccgg cggcggcggc ggacaagtct cg		32
10	<210> 34		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> cebador de PCR		
	<400> 34		
20	cggaattctt acttgaaagc atggataacc ttgg		34
	<210> 35		
25	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> cebador de PCR		
	<400> 35		
35	cgcggatcca tggcttcgta ccccgccat c		31
	<210> 36		
40	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> cebador de PCR		
	<400> 36		
50	ccggaattct tagttagcct ccccatctc ccg		33
55			
60			
65			