



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 38 483 T2** 2008.07.03

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 025 212 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 38 483.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/21672**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 953 487.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/019466**

(86) PCT-Anmeldetag: **14.10.1998**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **22.04.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.08.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **26.09.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.07.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 9/12** (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

61812 P **14.10.1997** **US**

(73) Patentinhaber:

Darwin Molecular Corp., Bothell, Wa., US

(74) Vertreter:

Bohmann & Loosen, 80335 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

BLACK, Margaret E., Pullman, WA 99163, US

(54) Bezeichnung: **THYMIDINKINASE MUTANTEN UND FUSIONPROTEINE MIT THYMIDINKINASE UND GUANYLATEKINASE AKTIVITÄTEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein mutierte Enzyme der Herpesviridae und, genauer, Zusammensetzungen und Verfahren, die Thymidinkinase-Mutanten verwenden. Die vorliegende Erfindung betrifft auch Fusionsproteine, die sowohl eine Guanylatkinase- als auch eine Thymidinkinase-Aktivität aufweisen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Obwohl viele bakterielle Erkrankungen, prinzipiell, leicht mit Antibiotika behandelt werden, existieren sehr wenige wirksame Behandlungen für viele virale, parasitische, Krebs- und genetische Erkrankungen. Krebs, beispielsweise, kann durch chirurgische Entfernung eines soliden Tumors behandelt werden. Nichtsdestotrotz besitzt auch die Mehrheit von Patienten mit soliden Tumoren Mikrometastasen über die primäre Tumorstelle hinaus. Wenn die Patienten nur chirurgisch behandelt werden, werden etwa 70% davon ein erneutes Auftreten des Krebses erfahren. Somit trägt Krebs für ein Fünftel der Gesamtmortalität in den Vereinigten Staaten bei und ist die zweithäufigste Todesursache.

[0003] Zusätzlich zur Chirurgie werden viele Krebserkrankungen nun auch mit einer Kombinationstherapie behandelt, die zytotoxische chemotherapeutische Wirkstoffe (z. B. Vincristin, Vinblastin, Cisplatin, Methotrexat, 5-FU, etc.) und/oder Strahlentherapie umfasst. Eine Schwierigkeit bei diesem Ansatz besteht jedoch darin, dass die radiotherapeutischen und chemotherapeutischen Agenzien für Normalgewebe toxisch sind und oft lebensbedrohliche Nebenwirkungen erzeugen. Zusätzlich weisen diese Ansätze oft extrem hohe Versagens-/Remissionshäufigkeiten auf (bis zu 90%, abhängig von der Art der Krebserkrankung).

[0004] Viele andere Verfahren sind ausprobiert worden, um das eigene Immunsystem eines Individuums zu verstärken, um Krebszellen zu beseitigen. Beispielsweise haben einige Wissenschaftlicher bakterielle oder virale Bestandteile als Adjuvanzen verwendet, um das Immunsystem zu stimulieren, Tumorzellen zu zerstören. Derartige Agenzien waren im Allgemeinen als Adjuvanzen und als nicht spezifische Stimulatoren bei Tiertumormodellen nützlich, haben sich jedoch beim Menschen nicht als allgemein wirksam erwiesen.

[0005] Lymphokine sind ebenfalls bei der Behandlung von Krebserkrankungen (ebenso wie bei viralen und parasitischen Erkrankungen) verwendet worden, um die spezifischen Immunzellen bei der Erzeugung einer Immunantwort zu stimulieren oder zu beeinflussen. Eine Gruppe verwendete, beispielsweise, das Lymphokin Interleukin-2, um periphere Blutzellen zu stimulieren, um zu expandieren und große Mengen an Zellen herzustellen, die für Tumorzellen zytotoxisch sind (Rosenberg et al., N. Engl. J. Med. 313: 1485–1492, 1985).

[0006] Andere haben die Verwendung von Antikörper-vermittelter Behandlung vorgeschlagen unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper oder „Wunderkugeln“, um spezifisch Tumorzellen zu targetieren und abzutöten (Dillman, „Antibody Therapy“, Principles of Cancer Biotherapy, Oldham (Hrsg.), Raven Press, Ltd., New York, 1987). Eine Schwierigkeit besteht jedoch darin, dass die meisten monoklonalen Antikörper murinen Ursprungs sind und somit kann eine Hypersensitivität gegen den murinen Antikörper seine Wirksamkeit beschränken, insbesondere nach wiederholten Therapien. Übliche Nebenwirkungen umfassen Fieber, Schweißausbrüche und Schüttelfrost, Hautausschläge, Arthritis und Nervenlähmungen.

[0007] Ein Ansatz, der in jüngster Zeit erhebliches Interesse erlangt hat, ist die Verwendung von Gentherapie, die verwendet worden ist, um nicht nur genetische Erkrankungen zu behandeln, sondern ebenso virale und Krebserkrankungen (siehe PCT-Veröffentlichung WO 91/02805, EPO 415,731 und WO 90/07936). Kurz gesagt werden speziell konstruierte Vektoren, die von Viren abgeleitet sind, verwendet, um spezielle genetische Informationen in Zellen abzugeben. Derartige Informationen können selbst nützlich sein, um die Expression von schädlichen Proteinen oder Antigenen (z. B. Antisense-Therapie) zu blockieren, können Proteine codieren, die toxisch sind und ausgewählte Zellen töten, können therapeutische Proteine codieren, die die Immunantwort einer Zelle verstärken oder Proteine codieren, die inaktive oder nicht vorhandene Proteine ersetzen.

[0008] Ein Protein, das kürzlich für die Verwendung bei derartigen Therapien vorgeschlagen worden ist, ist die Thymidinkinase von Herpes Simplex-Virus vom Typ 1 (HSVTK-1). Kurz gesagt ist Thymidinkinase ein Salvage-Mechanismus, der natürliche Nukleosidsubstrate ebenso wie Nukleosidanaloga phosphoryliert (siehe Balasubramaniam et al., J. of Gen. Vir. 71: 2979–2987, 1990). Dieses Protein kann therapeutisch verwendet werden, indem ein retroviraler Vektor eingeführt wird, der das Protein in der Zelle exprimiert, gefolgt von der Verabreichung eines Nukleosidanalogs, wie beispielsweise Acyclovir oder Ganciclovir. HSVTK-1 phosphory-

liert dann das Nukleosidanalogue, was ein toxisches Produkt erzeugt, das in der Lage ist, die Wirtszelle zu töten. Die Verwendung von retroviralen Vektoren, die HSVTK exprimieren, ist somit nicht nur für die Behandlung von Krebserkrankungen vorgeschlagen worden, sondern ebenso für andere Erkrankungen.

[0009] Die vorliegende Erfindung stellt neue Thymidinkinase-Mutanten und TK-Fusionsproteine mit erhöhten biologischen Aktivitäten bereit, die für eine Vielzahl von Anwendungen geeignet sind, wie beispielsweise Gentherapie, und liefert weitere, damit im Zusammenhang stehende Vorteile.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Kurz gesagt stellt die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen und Verfahren bereit, die Thymidinkinase-Mutanten von Herpesviridae verwenden. In einem Aspekt der vorliegenden Erfindung werden isolierte Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die Thymidinkinase-Enzyme von Herpesviridae codieren, die eine oder mehrere Mutationen umfassen, wobei wenigstens eine der Mutationen, die eine Aminosäuresubstitution codiert, innerhalb der Q-Substrat-Bindungsdomäne angeordnet ist, wobei die Mutation eine biologische Aktivität der Thymidinkinase verglichen mit der nicht mutierten Thymidinkinase erhöht. In einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung werden isolierte Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die ein Thymidinkinase-Enzym von Herpesviridae codieren, das wenigstens drei Mutationen umfasst, von denen wenigstens zwei Aminosäuresubstitutionen sind, die zum N-Terminus von einer DRH-Nukleosidbindungsstelle hin angeordnet sind (z. B. 1, 2 oder 3 Aminosäuren zum N-Terminus), und wenigstens eine Mutation, die zum C-Terminus von einer DRH-Nukleosid bindenden Stelle angeordnet ist (z. B. 4 oder 5 Aminosäuren zum C-Terminus), was eine biologische Aktivität der Thymidinkinase verglichen mit nicht mutierter Thymidinkinase erhöht. Typische Beispiele geeigneter Thymidinkinase-Enzyme von Herpesviridae umfassen Thymidinkinase vom Herpes Simplex-Virus Typ 1, Herpes Simplex-Virus Typ 2, vom Varicella Zoster-Virus und vom Krallenaffen-Herpesvirus, vom Katzen-Herpesvirus Typ 1, vom Pseudotollwutvirus, vom Pferde-Herpesvirus Typ 1, vom Rinder-Herpesvirus Typ 1, vom Truthahn-Herpesvirus, vom Virus der Marek'schen Krankheit, vom Herpesvirus saimiri und vom Epstein-Barr-Virus. In anderen Ausführungsformen kann die Thymidinkinase eine Thymidinkinase von Primaten-Herpesvirus sein, oder eine Thymidinkinase von Nicht-Primaten-Herpesvirus, wie beispielsweise eine Thymidinkinase von Vogelherpesvirus.

[0011] Eine große Vielzahl von Mutationen wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ins Auge gefasst. Beispielsweise können in einer Ausführungsform Mutationen, wie beispielsweise Aminosäuresubstitutionen, innerhalb einer Region auftreten, die die Q-Substrat-Bindungsdomäne und zusätzlich 11 Aminosäuren von dieser Domäne zum N-Terminus hin umfasst.

[0012] In anderen Ausführungsformen tritt wenigstens eine Mutation innerhalb dieser „expandierten“ Q-Substrat-Bindungsdomäne oder innerhalb der Q-Substrat-Bindungsdomäne auf und wenigstens eine Mutation ist außerhalb dieser zwei Regionen vorhanden. Beispielsweise können eine oder mehrere zusätzliche Mutationen innerhalb einer DRH-Nukleosid-Bindungsstelle angeordnet sein, was eine biologische Aktivität der Thymidinkinase verglichen mit der nicht mutierten Thymidinkinase erhöht. Beispielsweise kann in der DRH-Nukleosid-Bindungsstelle eine Asparaginsäure durch eine Glutaminsäure ersetzt sein, oder es kann Arginin durch einen Histidinrest in der DRH-Nukleosid-Bindungsstelle ersetzt sein.

[0013] Innerhalb eines noch weiteren Aspektes werden isolierte Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die für ein Thymidinkinase-Enzym von Herpesviridae codieren, das wenigstens eine Mutation umfasst, wie beispielsweise eine Aminosäuresubstitution, innerhalb einer Q-Substrat-Bindungsdomäne (oder innerhalb einer expandierten Q-Substrat-Bindungsdomäne) und wobei wenigstens eine zusätzliche Mutation eine Aminosäuresubstitution ist, die zum C-Terminus von einer DRH-Nukleosid-Bindungsstelle hin angeordnet ist (z. B. 4, 5 oder 6 Aminosäuren zum C-Terminus hin), was eine biologische Aktivität der Thymidinkinase verglichen mit der nicht mutierten Thymidinkinase erhöht.

[0014] Alternativ können zusätzliche Mutationen eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen codieren, die von 1 bis 7 Aminosäuren zum N-Terminus von der DRH-Nukleosid-Bindungsstelle angeordnet sind. Beispielsweise wird die Aminosäure, die eine Position zu dem N-Terminus von der DRH-Nukleosid-Bindungsstelle hin angeordnet ist, durch eine Aminosäure ersetzt, die aus der Gruppe ausgewählt ist bestehend aus Valin, Leucin, Cystein und Isoleucin. Innerhalb einer weiteren Ausführungsform wird die Aminosäure, die sieben Aminosäuren zum N-Terminus von der DRH-Nukleosid-Bindungsstelle hin angeordnet ist, durch die Aminosäure Alanin ersetzt. In anderen Ausführungsformen ist das Thymidinkinase-Enzym verkürzt und behält dennoch biologische Aktivität bei.

[0015] In weiteren Ausführungsformen der Erfindung werden isolierte Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die ein Thymidinkinase-Enzym codieren, das in der Lage ist, ein Nukleosidanalogs (z. B. Acyclovir oder Ganciclovir) wenigstens einfach über die Phosphorylierung des Nukleosidanalogs durch ein Wildtyp-Thymidinkinase-Enzym hinaus zu phosphorylieren. In anderen Ausführungsformen phosphoryliert das Thymidinkinase-Enzym ein Nukleosidanalogs wenigstens x-fach über die Phosphorylierung eines Nukleosidanalogs durch ein Wildtyp-Thymidinkinase-Enzym hinaus, wobei x ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 und 5. In noch einer weiteren Ausführungsform ist das Thymidinkinase-Enzym in der Lage, ein Nukleosidanalogs zu phosphorylieren, wobei

$$z < \left[\frac{(TK_mNA_p)(TK_mT_p)}{(TK_{wt}NA_p)(TK_{wt}T_p)} \right]$$

und worin TK_mNA_p die Geschwindigkeit der Phosphorylierung eines Nukleosidanalogs durch eine Thymidinkinase-Mutante ist, TK_mT_p die Geschwindigkeit der Phosphorylierung von Thymidin durch eine Thymidinkinase-Mutante ist, $TK_{wt}NA_p$ die Geschwindigkeit der Phosphorylierung eines Nukleosidanalogs durch ein nicht mutiertes Thymidinkinase-Enzym ist, $TK_{wt}T_p$ die Geschwindigkeit der Phosphorylierung eines Thymidinkinase-Enzyms durch ein nicht mutiertes Thymidinkinase-Enzym ist und z ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 und 5. Typische Beispiele geeigneter Nukleosidanaloga umfassen Ganciclovir, Acyclovir, Fanciclovir, Buciclovir, Penciclovir, Valciclovir, Trifluorthymidin, 1-[2-Deoxy,2-Fluoro,beta-D-Arabinofuranosyl]-5-ioduracil, ara-A, araT 1-beta-D-arabinofuranoxylthymidin, 5-Ethyl-2'-desoxyuridin, 5-Iod-5'-amino-2,5'-Didesoxyuridin, Idoxuridin, AZT, AIU, Didesoxycytidin und AraC.

[0016] Besonderes bevorzugte mutierte Thymidinkinasen für die erhöhte Phosphorylierung von Nukleosidanalogen umfassen jene, wo das Enzym eine Thymidinkinase des Herpes Simplex-Virus vom Typ 1 ist.

[0017] In weiteren Aspekten der vorliegenden Erfindung werden mutierte Thymidinkinase-Enzyme bereitgestellt, die durch die oben beschriebenen Nukleinsäuremoleküle codiert werden, ebenso wie Vektoren, die in der Lage sind, derartige Moleküle zu exprimieren. In einem Aspekt werden Expressionsvektoren bereitgestellt, die einen Promotor umfassen, der funktionsfähig mit einem Nukleinsäuremolekül der vorliegenden Erfindung verbunden ist. In einem bevorzugten Aspekt ist der Vektor ein viraler Vektor, der in der Lage ist, die Expression eines Nukleinsäuremoleküls, das wie oben beschrieben ist, zu steuern. Typische Beispiele derartiger viraler Vektoren umfassen virale Herpes Simplex-Vektoren, adenovirale Vektoren, Adenovirus-assoziierte virale Vektoren, Pockenvektoren, parvovirale Vektoren, Baculovirus-Vektoren und retrovirale Vektoren. In einem weiteren Aspekt werden virale Vektoren bereitgestellt, die in der Lage sind, die Expression eines Nukleinsäuremoleküls zu steuern, das ein Thymidinkinase-Enzym codiert, das eine oder mehrere Mutationen umfasst, wobei wenigstens eine Mutation eine Aminosäuresubstitution codiert, die eine biologische Aktivität von Thymidinkinase verglichen mit nicht mutierter Thymidinkinase erhöht.

[0018] Eine große Vielzahl von Promotoren kann im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden, einschließlich, beispielsweise, Promotoren wie den MoMLV-LTR-, RSV-LTR-, Friend MuLV-LTR-, adenoviralen Promotor, Neomycinphosphotransferase-Promotor/Enhancer, späten Parvovirus-Promotor, Herpes-TK-Promotor, SV40-Promotor, Metallothionen IIa-Gen-Enhancer/Promotor, Immediate Early Promotor des Zytomegalievirus, Immediate Late Promotor des Zytomegalievirus, ebenso wie gewebespezifische Promotoren, wie beispielsweise die Tyrosinase-verwandten Promotoren (TRP-1 und TRP-2), DF3-Enhancer, SLPI-Promotor (sekretorischer Leukoprotease-Inhibitor – exprimiert in vielen Arten von Karzinomen), TRS (gewebespezifische regulatorische Sequenzen), Tyrosinhydroxylase-Promotor, Adipozyten-P2-Promotor, PEPCK-Promotor, CEA-Promotor, α -Fetoprotein-Promotor, saurer Molkepromotor und Casein-Promotor. In verwandten Aspekten können die oben beschriebenen Vektoren als pharmazeutische Zusammensetzungen zusammen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Verdünnungsmittel bereitgestellt werden.

[0019] Die vorliegende Erfindung stellt weiter Nukleinsäuremoleküle bereit, die Fusionsproteine codieren, die einen Thymidinkinase-Teil und einen Guanylatkinase-Teil umfassen. Derartige Fusionsproteine besitzen biologische Aktivitäten von sowohl Thymidinkinase als auch Guanylatkinase. Der Thymidinkinase-Teil kann abgeleitet sein von einer Thymidinkinase vom Wildtyp oder von einer der hierin beschriebenen Thymidinkinase-Mutanten.

[0020] In weiteren Aspekten können Sequenzen, die Thymidinkinase-Mutanten, Thymidinkinase-Fusionsproteine oder Fusionsproteine mit Guanylatkinase- und Thymidinkinase-Aktivität, wie hierin beschrieben, codieren, innerhalb eines gegebenen Vektors enthalten sein, der für die Zwecke der Gentherapie verwendet wird. Zellen, die diese Vektoren enthalten, können nachfolgend durch Verabreichung eines Nukleosidanalogs abge-

tötet werden, um die Bildung von replikationskompetentem Virus oder die aberrante Integration des Vektors in die Wirtszelle zu verhindern. Derartige Zusammensetzungen oder Verfahren werden als „Suizidvektoren“ oder als „pannsicherer“ Ansatz für die Gentherapie bezeichnet.

[0021] In anderen Aspekten der vorliegenden Erfindung werden Wirtszellen bereitgestellt, die einen der oben beschriebenen Vektoren tragen. Typische Beispiele derartiger Zellen umfassen menschliche Zellen, Hundezellen, Affenzellen, Rattenzellen und Mauszellen.

[0022] In weiteren Aspekten der vorliegenden Erfindung werden Verfahren bereitgestellt zum Inhibieren eines pathogenen Agens in einem warmblütigen Tier, umfassend die Schritte, einem warmblütigen Tier einen wie oben beschriebenen Vektor zu verabreichen, so dass das pathogene Agens inhibiert wird. In verschiedenen Ausführungsformen kann der Vektor in vivo, oder Zellen ex vivo, verabreicht werden, die dann in das Tier transplantiert (oder retransplantiert) werden. In weiteren Ausführungsformen kann das pathogene Agens Viren, Bakterien, Parasiten, Tumorzellen oder autoreaktive Immunzellen sein.

[0023] In anderen Aspekten der vorliegenden Erfindung werden Verfahren zum nicht invasiven Überwachen der Aktivität von Thymidinkinase-Aktivität von Herpes simplex bereitgestellt, wie beispielsweise die Überwachung des Fortschreitens einer Gentherapie unter Verwendung von Thymidinkinase von Herpesvirus. Entsprechend derartiger Verfahren wird ein Lebewesen, das einen Vektor erhalten hat, der eine Herpesvirus-Thymidinkinase umfasst, (z. B. unter Verwendung einer klinischen Gamma-Kamera oder durch Einzelphotonen-Emissionstomographie) auf radiomarkierte antivirale Wirkstoffe abgetastet, die Substrate für die Thymidinkinase sind.

[0024] Diese und andere Aspekte der vorliegenden Erfindung werden unter Bezugnahme auf die folgende detaillierte Beschreibung und die beigefügten Zeichnungen offenkundig werden. Zusätzlich werden verschiedene Literaturstellen unten angegeben, die detailliert bestimmte Verfahrensweisen oder Zusammensetzungen (z. B. Plasmide etc.) beschreiben und deshalb durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit aufgenommen sind.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0025] [Fig. 1](#) ist eine schematische Skizze, die eine Strategie darstellt, um eine Bibliothek zu konstruieren, die Zufallsnukleotide enthält, und TK-Mutanten auszuwählen.

[0026] [Fig. 2](#) ist ein Foto, das die Selektion von TK- und AZT-Mutanten zeigt.

[0027] [Fig. 3](#) stellt die Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen dar von: Wildtyp, TKF105, TKI208 und TKF2-TK für die Codons 165 bis 175.

[0028] [Fig. 4](#) ist eine Reihe von Diagrammen, die Thermostabilität von Wildtyp-TK und TK-Mutanten darstellt.

[0029] [Fig. 5](#) ist ein Diagramm, das die Hitzeinaktivierungsprofile für in vitro-translatierte Wildtyp- und TKF2-Thymidinkinasen zeigt.

[0030] [Fig. 6](#) ist ein Autoradiogramm von SDS/PAGE-fraktionierten in vitro translatierten Produkten (Wildtyp und TKF2).

[0031] [Fig. 7](#) ist ein Autoradiogramm von ³⁵S-radiomarkierten zellfreien Translationsprodukten, die SDS-PAGE unterzogen wurden und TCA-präzipitierbaren Zählern.

[0032] [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#) sind zwei Diagramme, die eine Zeitverlaufsanalyse von Mutanten mit hoher Aktivität (A) und niedrigerer Aktivität (B) zeigen, die in einem zellfreien Translationssystem von Kaninchen-Reticulozytenlysat produziert wurden.

[0033] [Fig. 9A](#) und [Fig. 9B](#) sind zwei Diagramme, die die thermische Stabilität von TK-Mutanten mit hoher Aktivität (A) und niedriger Aktivität (B) zeigen.

[0034] [Fig. 10](#) ist ein Balkendiagramm, das eine Phosphorylierung von Nukleosiden und Nukleosidanalogen durch mutierte und Wildtyp-Thymidinkinasen zeigt.

[0035] [Fig. 11](#) ist ein Balkendiagramm, das die TK-Aktivität von Wildtyp-, TKF36- und Dummy (pMDC)-Plas-

miden zeigt.

[0036] [Fig. 12](#) ist ein Diagramm, das die Thymidinaufnahmeaktivität von Zellen, die TKF36-, TKF52-, Wildtyp-Plasmid, TKF99- oder Dummy-Plasmide (pMDC) enthalten, über die Zeit zeigt.

[0037] [Fig. 13](#) ist eine schematische Darstellung eines typischen Beispiels einer Gentherapie unter Verwendung einer HSVTK-Mutante.

[0038] [Fig. 14](#) ist eine Darstellung, die die Nukleotide, die in der LIF-ALL-Bibliothek randomisiert waren, ebenso wie die Ergebnisse der Selektion darstellt.

[0039] [Fig. 15](#) ist eine Tabelle, die Aminosäuresubstitutionen von ausgewählten und nicht ausgewählten Klonen zeigt.

[0040] [Fig. 16](#) ist eine Tabelle, die die Anzahl von Mutanten zeigt, die aus der LIF-ALL-Bibliothek ausgewählt wurden und die gegenüber GCV oder ACV empfindlich waren.

[0041] [Fig. 17](#) ist eine Tabelle, die Nukleotidaustausche in ausgewählten TK-Mutanten zeigt.

[0042] [Fig. 18](#) ist eine Tabelle, die die Aminosäuresequenz an den Positionen 159–161 und 168–170, und das Ausmaß der Phosphorylierung verschiedener mutierter TKs zeigt.

[0043] [Fig. 19](#) ist ein Diagramm, das das Überleben von Zellen zeigt, die auf GCV wuchsen und mit verschiedenen TK-Mutanten transfiziert waren.

[0044] [Fig. 20](#) ist ein Diagramm, das das Überleben von Zellen zeigt, die auf ACV angezogen wurden und mit verschiedenen TK-Mutanten transfiziert wurden.

[0045] [Fig. 21](#) zeigt semi-randomisierte Oligonukleotide, die verwendet wurden, um eine zweite Generation von TK-Mutanten zu erzeugen, die Aminosäuresubstitutionen an den Stellen 159–161 und 168–169 aufweisen.

[0046] [Fig. 22](#) veranschaulicht die Verwendung von speziellen Oligonukleotiden, um TK-Mutanten zu erzeugen, die Aminosäuresubstitutionen an den Resten 112–132 aufweisen.

[0047] [Fig. 23](#) zeigt Nukleotide in dem offenen Leserahmen von HSVTK-1 (SEQUENCE ID No. 1).

[0048] [Fig. 24](#) veranschaulicht eine Nukleotidsequenz und eine abgeleitete Aminosäuresequenz, die für eine menschliche Guanylatkinase typisch ist.

[0049] [Fig. 25](#) veranschaulicht eine Nukleotidsequenz und eine abgeleitete Aminosäuresequenz einer typischen murinen Guanylatkinase.

[0050] [Fig. 26](#) ist ein Diagramm, das die Empfindlichkeit von TK-Klonen gegenüber GCV zeigt.

[0051] [Fig. 27](#) ist ein Diagramm, das die Empfindlichkeit von TK-Klonen gegenüber ACV zeigt.

[0052] [Fig. 28](#) ist ein Diagramm, das die Empfindlichkeit von Guanylatkinase-Transfektanten-Pools gegenüber GCV in TK-exprimierenden Klonen zeigt.

[0053] [Fig. 29](#) ist ein Diagramm, das die Empfindlichkeit von Guanylatkinase-Transfektanten-Pools gegenüber ACV in TK-exprimierenden Klonen zeigt.

[0054] [Fig. 30](#) ist eine Veranschaulichung von gmk/TK-Fusionsproteinkonstrukten.

[0055] [Fig. 31](#) ist ein Diagramm, das eine Ganciclovir-Dosis-Antwort-Kurve zeigt, die Wildtyp-TK mit einem gmk/TK-Fusionsprotein vergleicht.

[0056] [Fig. 32](#) ist ein Diagramm, das das Tumorwachstum nach Transfektion mit verschiedenen Vektoren und nachfolgender Exposition gegenüber ACV zeigt.

[0057] [Fig. 33](#) ist ein Diagramm, das das Tumorwachstum nach Transfektion mit verschiedenen Vektoren und nachfolgender Exposition gegenüber GCV zeigt.

[0058] [Fig. 34](#) ist ein Balkendiagramm, das die prozentuale Veränderung von Tumorgewicht für verschiedene Behandlungen zeigt.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

DEFINITIONEN

[0059] Bevor die Erfindung dargelegt wird, kann es für ein Verständnis derselben hilfreich sein, zuerst Definitionen bestimmter Begriffe, die im Folgenden verwendet werden, anzugeben.

[0060] „Vektor“ bezeichnet eine Anordnung, die in der Lage ist, die Expression des mutierten tk-Gens zu steuern, ebenso wie irgendwelche zusätzliche Sequenz(en) oder irgendwelche(s) zusätzliche(s) Gen/Gene, das/die von Interesse ist/sind. Der Vektor muss transkriptionale Promotor/Enhancer-Elemente enthalten, ebenso wie eine weitere Sequenz, die, wenn transkribiert, funktionsfähig mit dem tk-Gen und/oder anderen interessierenden Genen verbunden ist. Der Vektor kann aus entweder Desoxyribonukleinsäuren („DNA“), Ribonukleinsäuren („RNA“) oder einer Kombination der beiden (z. B. eine DNA-RNA-Chimäre) zusammengesetzt sein. Optional kann der Vektor eine Polyadenylierungssequenz, eine oder mehrere Restriktionsstellen, ebenso wie einen oder mehrere selektierbare Marker, wie beispielsweise Neomycinphosphotransferase oder Hygromycinphosphotransferase enthalten. Zusätzlich, abhängig von der ausgewählten Wirtszelle und dem verwendeten Vektor, können auch andere genetische Elemente, wie beispielsweise Replikationsursprung, zusätzliche Nukleinsäurerestriktionsstellen, Enhancer, Sequenzen, die Transkriptionsinduzierbarkeit vermitteln, und selektierbare Marker in die hierin beschriebenen Vektoren eingebaut sein.

[0061] „Gewebespezifischer Promotor“ bezeichnet transkriptionale Promotor/Enhancer-Elemente, die die Genexpression in einer beschränkten Anzahl von Geweben oder in einem einzelnen Gewebe steuern. Typische Beispiele für gewebespezifische Promotoren umfassen den Tyrosinhydroxylase-Promotor, Adipozyten-P2-Promotor, PEPCK-Promotor, α -Fetoprotein-Promotor, den sauren Molkepromotor und Caseinpromotor.

[0062] „Biologische Aktivität von Thymidinkinase“ bezeichnet die Fähigkeit des Thymidinkinase-Enzyms, Nukleoside (z. B. dT) und Nukleosidanaloga wie beispielsweise Ganciclovir (9-[[2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxymethyl]guanosin), Fanciclovir, Buciclovir, Penciclovir, Valciclovir, Acyclovir (9-[2-Hydroxyethoxy)methyl]guanosin), Trifluorthymidin, 1-[2-Deoxy-,2-Fluoro-,beta-D-Arabinofuranosyl]-5-ioduracil, araA (Adenosin, Arabinosid, Vivarabin), 1-beta-D-Arabinofuranoxylthymidin, 5-Ethyl-2'-desoxyuridin, 5-Iod-5'-amino-2,5'dideoxyuridin, Idoxuridin (5-Iod-2'-deoxyuridin), AZT (3' Azido-3'-Thymidin), ddC (Didesoxycytidin), AIU (5-Iod-5'-amino-2',5'-Dideoxyuridin) und AraC (Cytidinarabinosid) zu phosphorylieren. Wie hierin verwendet wird eine Thymidinkinase-Mutante als eine „erhöhte biologische Aktivität“ aufweisend betrachtet, wenn das Ausmaß der Aktivität oder die Geschwindigkeit der Aktivität sich wenigstens „y“-fach gegenüber der nicht mutierten Thymidinkinase erhöht, wobei y ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 und 5. In bevorzugten Ausführungsformen werden Thymidinkinase-Mutanten als erhöhte biologische Aktivität aufweisend betrachtet, wenn

$$z < \left[\frac{(TK_mNA_p)/(TK_mT_p)}{(TK_{wt}NA_p)/(TK_{wt}T_p)} \right]$$

worin TK_mNA_p die Phosphorylierungsgeschwindigkeit eines Nukleosidanalogs durch eine Thymidinkinase-Mutante ist, TK_mT_p die Phosphorylierungsgeschwindigkeit von Thymidin durch eine Thymidinkinase-Mutante, $TK_{wt}NA_p$ die Phosphorylierungsgeschwindigkeit eines Nukleosidanalogs durch ein nicht mutiertes Thymidinkinase-Enzym ist, $TK_{wt}T_p$ die Phosphorylierungsgeschwindigkeit eines Thymidinkinase-Enzyms durch ein nicht mutiertes Thymidinkinase-Enzym ist und z ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 und 5.

[0063] „Biologische Aktivität von Guanylatkinase“ bezeichnet die Fähigkeit des Guanylatkinase-Enzyms, den reversiblen Transfer der terminalen Phosphorylgruppe von ATP auf ein Akzeptormolekül, wie beispielsweise GMP oder dGMP, zu katalysieren. Guanylatkinase (gmk) kann auch Nukleoside und Nukleosidanaloga phosphorylieren, die durch Thymidinkinase phosphoryliert worden sind. Beispiele für Thymidinkinase-Substrate sind oben beschrieben.

[0064] Zusätzlich zur Fähigkeit von Thymidinkinase und Guanylatkinase, Nukleoside und Nukleosidanaloge zu phosphorylieren, sollte die Formulierung „biologische Aktivität“ auch dahingehend verstanden werden, dass sie sich auf andere biologische Eigenschaften dieser Enzyme bezieht, wie beispielsweise Proteinstabilität (z. B. wie als Resistenz gegenüber dem Abbau durch proteolytische Enzyme wie beispielsweise Trypsin gemessen), und Thermostabilität (z. B. Aufrechterhaltung einer Nukleosidanalogs-Phosphorylierung nach Erhöhung der Temperatur).

[0065] „Pathogenes Agens“ bezeichnet entweder einen Fremdorganismus, der für einen Krankheitszustand verantwortlich ist, oder eine „veränderte“ Zelle, die für einen Krankheitszustand verantwortlich ist. Typische Beispiele von pathogenen Agenzien umfassen Fremdorganismen, wie beispielsweise Viren, Bakterien und Parasiten, ebenso wie veränderte Zellen, wie beispielsweise Tumorzellen und autoreaktive Immunzellen. Wie hierin verwendet, wird ein pathogenes Agens als „inhibiert“ verstanden, wenn entweder das Wachstum oder die Verbreitung des pathogenen Agens verringert wird, oder wenn das pathogene Agens selbst zerstört wird.

[0066] Wie oben angegeben stellt die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen und Verfahren bereit, die Thymidinkinase-Mutanten von Herpesviridae verwenden. Kurz gesagt können Thymidinkinase-Mutanten der vorliegenden Erfindung von einer großen Vielzahl von Thymidinkinase von Herpesviridae hergestellt werden, einschließlich zum Beispiel sowohl Primaten-Herpesvirus als auch Nichtprimaten-Herpesvirus, wie beispielsweise Vogel-Herpesvirus. Typische Beispiele für geeignete Herpesviren umfassen Herpes Simplex-Virus Typ 1 (McKnight et al., *Nuc. Acids Res* 8: 5964, 1980), Herpes Simplex-Virus Typ 2 (Swain und Galloway, *J. Virol.* 46: 1045–1050, 1983), Varicella Zoster-Virus (Davison und Scott, *J. Gen. Virol.* 67: 1759–1816, 1986), Krallenaffen-Herpesvirus (Otsuka und Kit, *Virology* 135: 316–330, 1984), Katzen-Herpesvirus Typ 1 (Nunberg et al., *J. Virol.* 63: 3240–3249, 1989), Pseudotollwutvirus (Kit und Kit, U.S. Patent Nr. 4,514,497, 1985), Pferde-Herpesvirus Typ 1 (Robertson und Whalley, *Nuc. Acids. Res.* 16: 11303–11317, 1988), Rinder-Herpesvirus Typ 1 (Mittal und Field, *J. Virol.* 70: 2901–2918, 1989), Truthahn-Herpesvirus (Martin et al., *J. Virol.* 63: 2847–2852, 1989), Virus der Marek'schen Krankheit (Scott et al., *J. Gen. Virol.* 70: 3055–3065, 1989), Herpesvirus saimiri (Honess et al., *J. Gen. Virol.* 70: 3003–3013, 1989) und Epstein-Barr-Virus (Baer et al., *Nature (London)* 310: 207–311, 1984).

[0067] Derartige Herpesviren können leicht von kommerziellen Anbietern wie der American Type Culture Collection („ATCC“, Rockville, Maryland) erhalten werden. Hinterlegungen bestimmter der oben identifizierter Herpesviren können leicht von der ATCC erhalten werden, beispielsweise: ATCC Nr. VR-539 (Herpes simplex Typ 1); ATCC Nrs. VR-734 und VR-540 (Herpes simplex Typ 2); ATCC Nr. VR-586 (Varicella Zoster-Virus); ATCC Nr. VR-783 (infektiöse Laryngotracheitis); ATCC Nrs. VR-624, VR-987, VR-2103, VR-2001, VR-2002, VR-2175, VR-585 (Virus der Marek'schen Krankheit); ATCC Nrs. VR-584B und VR-584B (Truthahn-Herpesvirus); ATCC Nrs. VR-631 und VR-842 (Rinder-Herpesvirus Typ 1); und ATCC Nrs. VR-2003, VR-2229 und VR-700 (Pferde-Herpesvirus Typ 1). Herpesviren können auch leicht isoliert und identifiziert werden aus natürlicherweise auftretenden Quellen (z. B. von einem infizierten Tier).

[0068] Ein jeder der oben angeführten Herpesviren (ebenso wie andere Mitglieder der Herpesviridae) kann leicht verwendet werden, um Thymidinkinase-Mutanten der vorliegenden Erfindung herzustellen. Kurz gesagt wird eine primäre Region in dem Bereich gefunden, der die Stellen 3 und 4 umgibt (siehe Balasubramaniam et al., *J. Gen. Vir.* 71: 2979–2987, 1990), von der man glaubt, dass sie für die Nukleosidbindung verantwortlich ist. Diese Stellen sind durch hochkonservative Regionen gekennzeichnet und bestehen aus dem Motiv -DRH- (für Stelle 3), und -C(Y/F)P- (für Stelle 4). Obwohl die Nummerierung der Nukleinsäuren wesentlich von einem Herpesvirus zum anderen abweichen kann, wird, wie hierin verwendet, Bezug genommen auf die Position relativ zu der DRH-Nukleosid-Bindungsstelle. Beispielsweise kann für Herpes simplex-Virus Typ 1 (McKnight et al., *Nucl. Acids. Res.* 8: 5949–5964, 1980) an den Aminosäuren 162, 163 und 164 gefunden werden. DRH-Nukleosid-Bindungsstellen für andere typische Herpesviren umfassen: 163, 164 und 165 für Herpes Simplex-Virus Typ 2; 129, 130 und 131 für Varicella Zoster-Virus; 130, 131 und 132 für Krallenaffen-Herpesvirus; und 148, 149 und 150 für Epstein-Barr-Virus.

[0069] Für Herpesviren, die zuvor noch nicht sequenziert worden sind, kann die DRH-Nukleosid-Bindungsstelle leicht identifiziert werden, indem die Nukleinsäuresequenz, die das Enzym codiert, sequenziert wird, oder durch Aminosäuresequenzierung des Enzyms selbst, gefolgt von einem Alignment der Sequenz mit anderen bekannten Herpesvirus-Sequenzen (siehe Balasubramaniam, a. a. O.). In dem Ausmaß, wie mehr als ein -DRH-Motiv identifiziert wird, kann das geeignete Motiv leicht durch, beispielsweise, Kristallstrukturanalyse (Sanderson et al., *J. Mol. Biol.* 202: 917–919, 1988; Montfort et al., *Biochem.* 29(30): 6964–6977, 1990; Hardy et al., *Science* 235: 448–455, 1987) oder Quervernetzungsstudien (Knoll et al., *Bioch. Biophys. Acta* 1121: 252–260, 1992) identifiziert werden.

[0070] Das Thymidinkinase-Gen von dem ausgewählten Herpesvirus kann dann leicht isoliert und wie unten beschrieben mutiert werden, um Nukleinsäuremoleküle zu konstruieren, die ein Thymidinkinase-Enzym codieren, das eine oder mehrere Mutationen umfasst, was eine biologische Aktivität der Thymidinkinase verglichen mit nicht mutierter Thymidinkinase erhöht. Wie hierin verwendet, sollte verstanden werden, dass „nicht mutierte Thymidinkinase“ native oder Wildtyp-Thymidinkinase bezeichnet, wie jene von McKnight et al. beschriebene (Nucl. Acids Res. 8: 5949–5964, 1980). Die biologische Aktivität derartiger Kinasen kann leicht bestimmt werden unter Verwendung eines der Tests, die hierin beschrieben sind, einschließlich z. B. der Bestimmung der Geschwindigkeit der Nukleosidanalogaufnahme, Bestimmung der Geschwindigkeit der Nukleosid- oder Nukleosidanalog-Phosphorylierung (siehe Beispiele 2–4). Zusätzlich können Thymidinkinasen leicht ausgewählt werden, die durch andere biologische Aktivitäten gekennzeichnet sind, wie beispielsweise Thermostabilität (siehe Beispiele 2–4) und Proteinstabilität.

[0071] Eine große Vielzahl von Thymidinkinase-Mutationen werden im Rahmen des Umfangs der vorliegenden Erfindung ins Auge gefasst. Beispielsweise werden in einer Ausführungsform der Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die ein Thymidinkinase-Enzym von Herpesviridae codieren, das eine oder mehrere Mutationen umfasst, wobei wenigstens eine der Mutationen eine Aminosäuresubstitution codiert, die zum N-Terminus von der DRH-Nukleosidbindungsstelle angeordnet ist. Kurz gesagt kann eine Aminosäureposition zum N-Terminus der DRH-Nukleosidbindungsstelle durch eine andere Aminosäure ersetzt werden auf der Grundlage der hierin gemachten Offenbarung. Typische Aminosäuren, die ersetzt werden können (und ihre Ein-Buchstaben-Symbole) umfassen Alanin (A), Arginin (R), Asparagin (N), Asparaginsäure (D), Cystein (C), Glutamin (Q), Glutaminsäure (E), Glycin (G), Histidin (H), Isoleucin (I), Leucin (L), Lysin (K), Methionin (M), Phenylalanin (F), Prolin (P), Serin (S), Threonin (T), Tryptophan (W), Tyrosin (Y) und Valin (V).

[0072] In einer Ausführungsform der Erfindung werden zum Beispiel isolierte Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die ein Thymidinkinase-Enzym von Herpesviridae codieren, das wenigstens drei Mutationen umfasst, wobei wenigstens zwei der Mutationen Aminosäuresubstitutionen sind, die zum N-Terminus einer DRH-Nukleosidbindungsstelle angeordnet sind (z. B. 1, 2 oder 3 Aminosäuren zum N-Terminus), und wenigstens eine Mutation, die zum C-Terminus einer DRH-Nukleosidbindungsstelle hin angeordnet sind (z. B. 4 oder 5 Aminosäuren zum C-Terminus), was eine biologische Aktivität der Thymidinkinase verglichen mit einer nicht mutierten Thymidinkinase erhöht. Kurz gesagt kann eine Aminosäure an einer jeden dieser Positionen durch eine andere Aminosäure ausgetauscht werden im Licht der hierin gegebenen Offenbarung. Typische Aminosäuren, die ersetzt werden können (und ihre Ein-Buchstaben-Symbole) umfassen Alanin (A), Arginin (R), Asparagin (N), Asparaginsäure (D), Cystein (C), Glutamin (Q), Glutaminsäure (E), Glycin (G), Histidin (H), Isoleucin (I), Leucin (L), Lysin (K), Methionin (M), Phenylalanin (F), Prolin (P), Serin (S), Threonin (T), Tryptophan (W), Tyrosin (Y) und Valin (V). Bezüglich TK-Mutanten, die wenigstens zwei Mutationen zum N-Terminus und wenigstens eine Mutation zum C-Terminus von einer DRH-Stelle hin aufweisen, umfassen bevorzugte Aminosäuren, die Aminosäuren einer Wildtypsequenz ersetzen können, Alanin (A), Asparagin (N), Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Phenylalanin (F), Tyrosin (Y) und Valin (V).

[0073] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die Thymidinkinase-Mutanten codieren, entweder mit einer oder mehreren Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Q-Substrat-Bindungsdomäne oder mit einer oder mehreren Aminosäuresubstitutionen innerhalb einer expandierten Region, die die Q-Substrat-Bindungsdomäne und zusätzliche 11 Aminosäurereste umfasst, die zum N-Terminus hin angeordnet sind („die expandierte Q-Substrat-Bindungsdomäne“). Typische Aminosäuren, die ersetzt sein können (und ihre Ein-Buchstaben-Symbole) umfassen Alanin (A), Arginin (R), Asparagin (N), Asparaginsäure (D), Glutamin (Q), Glutaminsäure (E), Glycin (G), Histidin (H), Lysin (K), Methionin (M), Phenylalanin (F), Prolin (P), Serin (S), Threonin (T), Tryptophan (W) und Tyrosin (Y).

[0074] In einer weiteren Ausführungsform werden Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die Thymidinkinase-Mutanten codieren, die eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Q-Substrat-Bindungsdomäne oder innerhalb der expandierten Q-Substrat-Bindungsdomäne aufweisen und wenigstens eine zusätzliche Aminosäuresubstitution, die von zwei bis sechs Positionen zum N-Terminus von der DRH-Nukleosidbindungsstelle angeordnet sind. Typische Aminosäuren, die substituiert sein können, umfassen Alanin (A), Arginin (R), Asparagin (N), Asparaginsäure (D), Cystein (C), Glutamin (Q), Glutaminsäure (E), Glycin (G), Histidin (H), Isoleucin (I), Leucin (L), Lysin (K), Methionin (M), Phenylalanin (F), Prolin (P), Serin (S), Threonin (T), Tryptophan (W), Tyrosin (Y) und Valin (V).

[0075] In weiteren Ausführungsformen werden Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die Thymidinkinase-Mutanten codieren mit einer oder mehreren Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Q-Substrat-Bindungsdomänen oder innerhalb der expandierten Q-Substrat-Bindungsdomäne, und wenigstens einer zusätzlichen Amino-

säuresubstitution, die sieben Positionen zum N-Terminus von der DRH-Nukleosidbindungsstelle hin angeordnet sind. Typische Aminosäuren, die substituiert sein können, umfassen Arginin (R), Asparagin (N), Asparaginsäure (D), Cystein (C), Glutamin (Q), Glutaminsäure (E), Glycin (G), Histidin (H), Isoleucin (I), Leucin (L), Lysin (K), Methionin (M), Phenylalanin (F), Prolin (P), Serin (S), Threonin (T), Tryptophan (W), Tyrosin (Y) und Valin (V).

[0076] In weiteren Aspekten der Erfindung werden Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die Thymidinkinase-Mutanten codieren mit einer oder mehreren Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Q-Substrat-Bindungsdomäne oder innerhalb der expandierten Q-Substrat-Bindungsdomäne, und wenigstens einer zusätzlichen Mutation, wie von Dedieu et al. beschrieben, internationale Patentanmeldung WO 95/14102, die hierin durch Bezugnahme aufgenommen ist.

[0077] In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die Thymidinkinase-Mutanten codieren mit einer oder mehreren Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Q-Substrat-Bindungsdomäne oder innerhalb der expandierten Q-Substrat-Bindungsdomäne, und wenigstens einer zusätzlichen Aminosäuresubstitution innerhalb der DRH-Nukleosidbindungsstelle. In einer Ausführungsform der Erfindung ist die Asparaginsäure in der DRH-Nukleosidbindungsstelle ersetzt durch andere Aminosäuren, einschließlich, beispielsweise, Alanin (A), Arginin (R), Asparagin (N), Cystein (C), Glutamin (Q), Glutaminsäure (E), Glycin (G), Histidin (H), Isoleucin (I), Leucin (L), Lysin (K), Methionin (M), Phenylalanin (F), Prolin (P), Serin (S), Threonin (T), Tryptophan (W), Tyrosin (Y) und Valin (V). In einem weiteren Aspekt der Erfindung ist das Arginin in der DRH-Nukleosidbindungsstelle ersetzt durch andere Aminosäuren, einschließlich, zum Beispiel, Alanin (A), Asparagin (N), Asparaginsäure (D), Cystein (C), Glutamin (Q), Glutaminsäure (E), Glycin (G), Histidin (H), Isoleucin (I), Leucin (L), Lysin (K), Methionin (M), Phenylalanin (F), Prolin (P), Serin (S), Threonin (T), Tryptophan (W), Tyrosin (Y) und Valin (V).

[0078] In weiteren Aspekten der vorliegenden Erfindung werden Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die Thymidinkinase-Enzyme codieren, die zwei oder mehr Mutationen umfassen, was eine biologische Aktivität des Thymidinkinase-Enzyms erhöht, wobei die Mutanten eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Q-Substrat-Bindungsdomäne oder innerhalb der expandierten Q-Substrat-Bindungsdomäne aufweisen, und wenigstens eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, die 1, 2 oder 3 Aminosäuren zum N-Terminus der DRH-Nukleosidbindungsstelle hin angeordnet sind, und/oder eine oder mehrere Substitutionen, die 4, 5 oder 6 Aminosäuren zum C-Terminus von der DRH-Nukleosidbindungsstelle angeordnet sind, oder 1, 2 oder 3 Aminosäuren zum N-Terminus von der CYP-Nukleosidbindungsstelle hin angeordnet sind (siehe [Fig. 14](#)).

[0079] In noch einer weiteren Ausführungsform der Erfindung sind Thymidinkinase-Mutanten dadurch gekennzeichnet, dass sie eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Q-Substrat-Bindungsdomäne oder innerhalb der expandierten Q-Substrat-Bindungsdomäne aufweisen und das Histidin in der DRH-Nukleosidbindungsstelle substituiert ist durch eine andere Aminosäure, einschließlich, beispielsweise, Alanin (A), Arginin (R), Asparagin (N), Asparaginsäure (D), Cystein (C), Glutamin (Q), Glutaminsäure (E), Glycin (G), Isoleucin (I), Leucin (L), Lysin (K), Methionin (M), Phenylalanin (F), Prolin (P), Serin (S), Threonin (T), Tryptophan (W), Tyrosin (Y) und Valin (V).

[0080] In anderen Aspekten der vorliegenden Erfindung werden Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die Thymidinkinase-Enzyme codieren, die zwei oder mehr Mutationen umfassen, die eine biologische Aktivität des Thymidinkinase-Enzyms erhöhen, wobei eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Q-Substrat-Bindungsdomäne oder innerhalb der expandierten Q-Substrat-Bindungsdomäne angeordnet sind und wobei wenigstens eine Mutation eine Aminosäuresubstitution codiert, die von 1 bis 11 Positionen zum C-Terminus von der DRH-Nukleosidbindungsstelle hin angeordnet ist. Diese Aminosäuren können durch andere Aminosäuren substituiert sein, einschließlich, z. B., Alanin (A), Arginin (R), Asparagin (N), Asparaginsäure (D), Cystein (C), Glutamin (Q), Glutaminsäure (E), Glycin (G), Histidin (H), Isoleucin (I), Leucin (L), Lysin (K), Methionin (M), Phenylalanin (F), Prolin (P), Serin (S), Threonin (T), Tryptophan (W), Tyrosin (Y) und Valin (V).

[0081] In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die Thymidinkinase-Enzyme codieren, die eine oder mehrere Mutationen umfassen, die eine biologische Aktivität des Thymidinkinase-Enzyms erhöhen, wobei eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Q-Substrat-Bindungsdomäne oder innerhalb der expandierten Q-Substrat-Bindungsdomäne angeordnet sind, und wobei wenigstens eine Mutation eine Aminosäuresubstitution codiert, die von 12 bis „v“ Positionen zum C-Terminus von der DRH-Nukleosidbindungsstelle hin angeordnet sind, wobei „v“ eine jegliche ganze Zahl größer als 13 (und im Allgemeinen weniger als 202) ist. Diese Aminosäuren können leicht substituiert sein durch andere Aminosäuren, einschließlich, z. B., Alanin (A), Arginin (R), Asparagin (N), Asparaginsäure (D), Cystein

(C), Glutamin (Q), Glutaminsäure (E), Glycin (G), Histidin (H), Isoleucin (I), Leucin (L), Lysin (K), Methionin (M), Phenylalanin (F), Prolin (P), Serin (S), Threonin (T), Tryptophan (W), Tyrosin (Y) und Valin (V).

[0082] In verschiedenen Aspekten können Nukleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung mehrere Aminosäuresubstitutionen codieren. Beispielsweise werden in einer bevorzugten Ausführungsform Thymidinkinase-Mutanten bereitgestellt, die Mutationen mit 1, 2, 3, 4, 5 oder mehr Aminosäuresubstitutionen codieren, ebenso wie Deletionen im Leserahmen. Beispiele für derartige Mutationen umfassen P155A/F161V, P155A/F161C, P155A/D162E, I160L/F161L/A168V/L169M und F161L/A168V/L169Y/L170C.

[0083] Wie hierin beschrieben muss die Mutagenese von Nukleotiden, die die Reste codieren, die die Stellen 3 und 4 von HSV-1 TK umgeben, zu Verbesserungen der kinetischen Parameter (Km) bezüglich Nukleosid-Prodrugs führen. Eine neue und distinkte Region ist kürzlich identifiziert worden, die an der Nukleosidbindung beteiligt ist und die sich innerhalb der Aminosäurereste 112–132 befindet. Die Region, die die Reste 112–132 von HSV-1 TK codierte, wurde in Verbindung gebracht mit Substrat(oder dTMP)-Bindung durch Photoaffinitätsmarkierung unter Verwendung einer 32P-Azido-dUMP-Sonde (Rechtin et al., Anal. Biochem. 237: 135–140, 1996). Diese anfängliche Identifizierung wurde gestützt durch die beobachtete Nähe dieser Reste zu gebundenem Substrat (Thymin oder Ganciclovir), wie durch Röntgenkristallgraphiestudien bestimmt (Wild et al., FEBS Lett. 368: 289–292, 1995; Brown et al., Nature Struct. Biol. 2: 876–881, 1995). Da der Glutamin („Q“)-Rest in TK-Enzymen von einer Vielzahl von Quellen signifikant konserviert ist (siehe beispielsweise Balasubramaniam et al., J. Gen. Virol. 71: 2979–2987, 1990), wird die Region der Aminosäurereste 112–132 als die „Q-Substrat-Bindungsdomäne“ bezeichnet.

[0084] Infolge ihrer Rolle bei der Substratbindung ist diese Region ein ausgezeichnetes Ziel für das Mutagenisieren und Auswählen von Klonen mit geänderten Substratspezifitäten. Derartige Mutanten würden die Wirksamkeit und Spezifität der Suizidgentherapie bei Anwesenheit spezifischer Prodrugs verbessern. Darüber hinaus können diese mutierten Enzyme verwendet werden für Zelllinienablation, Restenose und Auswahl von homologen Rekombinanten.

[0085] Entsprechend umfasst die vorliegende Erfindung Nukleinsäuremoleküle, die Formen von TK mit wenigstens einer Mutation innerhalb der Q-Substrat-Bindungsdomäne codieren. Die vorliegende Erfindung umfasst auch Nukleinsäuremoleküle, die trunkierte TK-Enzyme codieren mit wenigstens einer Mutation innerhalb der Q-Substrat-Bindungsdomäne. Die vorliegende Erfindung umfasst weiterhin mutierte TK-codierende Nukleinsäuremoleküle mit wenigstens einer Modifikation in einer Unterregion der Q-Substrat-Bindungsdomäne, wie beispielsweise innerhalb der Aminosäurereste 123–132, oder mit wenigstens einer Mutation in einer expandierten Region, die die Q-Substrat-Bindungsdomäne und etwa 11 zusätzliche Aminosäuren zum N-Terminus hin (z. B. innerhalb Aminosäurereste 101–132) einschließt. Zur Veranschaulichung beschreibt Beispiel 10 Verfahren für die Mutagenese der Region, die die Aminosäuren 112–132 von HSV-1 TK codiert. In diesem Beispiel wurden TK-Mutanten konstruiert, die 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 oder 21 Mutationen innerhalb der Aminosäurereste 112–132 enthielten.

[0086] Die Identifizierung der Q-Substrat-Bindungsdomäne, die verschieden ist von der DRH-Nukleosidbindungsstelle, erlaubt die Konstruktion vieler Thymidinkinase-Mutationen. Derartige TK-Mutanten umfassen jene, die Aminosäuresubstitutionen in der Q-Substrat-Bindungsdomäne enthalten, mit einer der folgenden typischen Aminosäuren: Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin. Funktionell werden TK-Mutanten mit einer Änderung in der Q-Substrat-Bindungsdomäne durch eine erhöhte biologische Thymidinkinase-Aktivität verglichen mit nicht mutierter Thymidinkinase charakterisiert.

[0087] Obwohl Beispiel 10 die Mutagenese der TK-Q-Substrat-Bindungsdomäne von HSV-1 veranschaulicht, umfasst die vorliegende Erfindung auch eine Vielzahl von Thymidinkinase-Mutanten mit Änderungen in dieser Domäne. Die Identifizierung einer Q-Substrat-Bindungsdomäne in verschiedenen TK-Enzymen kann erreicht werden durch ein Alignmenet einer TK-Aminosäuresequenz mit der HSV-1-TK-Sequenz. Beispielsweise liefern Balasubramaniam et al., J. Gen. Virol. 71: 2979–2987 (1990) ein derartiges Alignment der folgenden TK-Enzyme: HSV-1, HSV-2, Krallenaffen-Herpesvirus, Varicella Zoster-Virus, Katzen-Herpesvirus, Pseudotollwutvirus, Pferde-Herpesvirus Typ 1, Rinder-Herpesvirus Typ 1, Truthahn-Herpesvirus, Virus der Marek'schen Krankheit, Herpesvirus saimiri und Epstein-Barr-Virus.

[0088] Alternativ kann Photoaffinitätsmarkierung verwendet werden, um analoge Q-Substrat-Bindungsdomänen unter Verwendung von Verfahren zu identifizieren, die von Rechtin et al., Anal. Biochem. 237: 135–140 (1996) beschrieben sind, die hierin durch Bezugnahme aufgenommen sind. Zusätzlich kann die Identifizierung

einer Q-Substrat-Bindungsdomäne verifiziert werden durch Kristallstrukturanalyse unter Verwendung von Standardtechniken (siehe zum Beispiel Wild et al., FEBS Lett. 368: 289–292, 1995; Brown et al., Nature Struct. Biol. 2: 876–881, 1995; De Winter und Herdewijn, J. Med. Chem. 39: 4727–4737, 1996). In der Summe können gut bekannte Verfahren verwendet werden, um analoge Q-Substrat-Bindungsdomänen in verschiedenen Thymidinkinasen zu identifizieren. Bevorzugte Quellen für die Mutation der Q-Substrat-Bindungsdomäne sind Thymidinkinasen von Herpesviridae.

[0089] Die vorliegende Erfindung liefert auch TK-Mutanten, die Mutationen in der Q-Substrat-Bindungsdomäne (oder in der expandierten Q-Substrat-Bindungsdomäne) zusätzlich zu wenigstens einer Mutation aufweisen, die mit der DRH-Nukleosidbindungsstelle assoziiert ist, wie oben beschrieben. Beispielsweise fasst die Erfindung TK-Mutanten ins Auge mit wenigstens einer Aminosäuresubstitution in der Q-Substrat-Bindungsdomäne (oder in der expandierten Q-Substrat-Bindungsdomäne) und (1) wenigstens zwei Aminosäuresubstitutionen, die zum N-Terminus einer DRH-Nukleosidbindungsstelle angeordnet sind (z. B. eine, zwei oder drei Aminosäuren zum N-Terminus), und wenigstens eine Mutation, die zu dem C-Terminus von einer DRH-Nukleosidbindungsstelle hin angeordnet sind (z. B. vier oder fünf Aminosäuren zum C-Terminus), (2) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, die von einer bis sieben Aminosäuren zum N-Terminus einer DRH-Nukleosidbindungsstelle angeordnet sind, (3) Aminosäuresubstitutionen, die zwei bis sechs Positionen zum N-Terminus von der DRH-Nukleosidbindungsstelle angeordnet sind, und (4) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen innerhalb der DRH-Nukleosidbindungsstelle. Wiederum sind derartige TK-Mutanten durch eine verglichen mit nicht mutierter Thymidinkinase erhöhte biologische Aktivität von Thymidinkinase charakterisiert.

[0090] Eine jede der oben beschriebenen Thymidinkinase-Mutanten kann leicht auf erhöhte biologische Aktivität gescreent werden mit Blick auf die hierin und in den Beispielen unten beschriebenen Tests.

KONSTRUKTION VON THYMIDINKINASE-MUTANTEN

[0091] Thymidinkinase-Mutanten der vorliegenden Erfindung können konstruiert werden unter Verwendung einer großen Vielzahl von Techniken. Beispielsweise können Mutationen an bestimmten Stellen eingeführt werden durch Synthese von Oligonukleotiden, die eine mutierte Sequenz enthalten, flankiert von Restriktionsstellen, die eine Ligation mit Fragmenten der nativen Sequenz erlauben. Nach der Ligation codiert die sich ergebende rekonstruierte Sequenz ein Derivat mit der erwünschten Aminosäureinsertion, -substitution oder -deletion.

[0092] Alternativ können Oligonukleotid-gesteuerte ortsspezifische (oder segmentspezifische) Mutageneseverfahren verwendet werden, um ein verändertes Gen mit speziellen Codons bereitzustellen, die entsprechend der erforderlichen Substitution, Deletion oder Insertion verändert sind. Deletions- oder Verkürzungsderivate von Thymidinkinase-Mutanten können auch konstruiert werden unter Verwendung von geeigneten Restriktionsendonukleasestellen, die zu der erwünschte Deletion benachbart sind. Nach der Restriktion können Überhänge aufgefüllt werden und die DNA erneut ligiert werden. Beispielhafte Verfahren zur Herstellung der oben angegebenen Änderungen sind von Sambrook et al. (Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) offenbart.

[0093] Thymidinkinase-Mutanten können auch konstruiert werden unter Verwendung von PCR-Mutagenesetechniken, chemischen Mutagenesetechniken (Drinkwater und Klinedinst, PNAS 83: 3402–3406, 1986), durch erzwungenen Nukleotidfehleibau (z. B. Liao und Wise Gene 88: 107–111, 1990) oder durch Verwendung von zufällig mutagenisierten Oligonukleotiden (Horwitz et al., Genome 3: 112–117, 1989). Bevorzugte Verfahren zum Konstruieren von Thymidinkinase-Mutanten werden detailliert unten in den Beispielen angegeben.

HSVTK-VEKTOREN

[0094] Im Kontext der vorliegenden Erfindung sollte der Begriff „Thymidinkinase-Mutante“ so verstanden werden, dass er nicht nur das spezifische, hierin beschriebene Protein (ebenso wie die Nukleinsäuresequenzen, die diese Proteine codieren) umfasst, sondern Derivate davon, die verschiedene strukturelle Formen des primären Proteins umfassen, die eine biologische Aktivität beibehalten. Beispielsweise kann eine Thymidinkinase-Mutante in der Form von sauren oder basischen Salzen oder in neutraler Form vorliegen. Zusätzlich können die einzelnen Aminosäurereste durch Oxidation oder Reduktion modifiziert sein. Weiterhin können verschiedene Substitutionen, Deletionen oder Additionen an den Aminosäure- oder Nukleinsäuresequenzen vorgenommen werden, deren Nettowirkung darin besteht, die erhöhte biologische Aktivität der Mutante beizubehalten oder weiter zu verstärken. Infolge der Degeneriertheit des Codes kann beispielsweise eine erhebliche Variation in den Nukleotidsequenzen vorhanden sein, die die gleiche Aminosäuresequenz codieren.

[0095] Andere Derivate der hierin offenbarten Thymidinkinase-Mutanten umfassen Konjugate von Thymidinkinase-Mutanten zusammen mit anderen Proteinen oder Polypeptiden. Dies kann, beispielsweise, erreicht werden durch die Synthese von N-terminalen oder C-terminalen Fusionsproteinen, die hinzugefügt werden können, um die Reinigung oder Identifizierung von Thymidinkinase-Mutanten zu erleichtern (siehe US-Patent Nr. 4,851,341, siehe auch Hopp et al., *Bio/Technology* 6: 1204, 1988).

[0096] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden verkürzte Derivate von Thymidinkinase-Mutanten bereitgestellt. Beispielsweise kann eine ortsspezifische Mutagenese leicht durchgeführt werden, um die N-terminalen 45 Aminosäuren einer Thymidinkinase-Mutante zu deletieren, wodurch eine trunke Form der Mutante konstruiert wird, die ihre biologische Aktivität beibehält.

[0097] Mutationen in Nukleotidsequenzen, die für die Expression von Derivaten von Thymidinkinase-Mutanten konstruiert sind, sollten die Phase des Leserahmens der codierenden Sequenzen beibehalten. Weiterhin werden die Mutationen bevorzugterweise keine komplementären Regionen erzeugen, die hybridisieren könnten, um sekundäre mRNA-Strukturen, wie beispielsweise Loops oder Hairpins zu produzieren, die die Translation der Rezeptor-mRNA nachteilig beeinträchtigen könnten. Derartige Derivate können leicht konstruiert werden unter Verwendung einer großen Bandbreite von Techniken, einschließlich der oben beschriebenen.

[0098] Wie oben festgestellt, stellt die vorliegende Erfindung rekombinante Vektoren bereit, die entweder synthetische oder von cDNA abgeleitete Nukleinsäuremoleküle umfassen, die Thymidinkinase-Mutanten oder Derivate davon codieren, die funktionsfähig mit geeigneten transkriptionellen oder translationellen regulatorischen Elementen verbunden sind. Geeignete regulatorische Elemente können von einer Vielzahl von Quellen stammen, einschließlich von bakteriellen, Pilz-, viralen, Säugetier-, Insekten- oder Pflanzengen. Die Auswahl geeigneter regulatorischer Elemente hängt ab von der ausgewählten Wirtszelle und kann leicht von einem Fachmann auf dem Gebiet vorgenommen werden. Beispiele für regulatorische Elemente umfassen: eine transkriptionale Promotor- und Enhancer- oder RNA-Polymerase-Bindungssequenz, eine ribosomale Bindungssequenz, einschließlich eines Translationsinitiationssignals.

[0099] Nukleinsäuremoleküle, die eine der oben beschriebenen Thymidinkinase-Mutanten codieren, können leicht durch eine große Bandbreite von prokaryontischen und eukaryontischen Wirtszellen exprimiert werden, einschließlich bakterieller, Säugetier-, Hefe- oder anderer Pilz-, viraler, Insekten- oder Pflanzenzellen. Verfahren für die Transformation oder Transfektion derartiger Zellen, um Fremd-DNA zu exprimieren, sind in der Technik gut bekannt (siehe z. B. Itakura et al., US-Patent Nr. 4,704,362; Hinnen et al., *PNAS USA* 75: 1929–1933, 1978; Murray et al., US-Patent Nr. 4,801,542; Upshall et al., US-Patent Nr. 4,935,349; Hagen et al., US-Patent Nr. 4,784,950; Axel et al., US-Patent Nr. 4,399,216; Goeddel et al., US-Patent Nr. 4,766,075; und Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; für Pflanzenzellen siehe Czako und Marton, *Plant Physiol.* 104: 1067–1071, 1994; und Paszkowski et al., *Biotech.* 24: 387–392, 1992).

[0100] Bakterielle Wirtszellen, die geeignet sind, um die vorliegende Erfindung auszuführen, umfassen *E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella typhimurium* und verschiedene Arten innerhalb der Gattungen *Pseudomonas*, *Streptomyces* und *Staphylococcus*, ebenso wie viele andere bakterielle Arten, die den Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt sind. Typische Beispiele für bakterielle Wirtszellen umfassen DH5 α (Stratagene, LaJolla, Kalifornien).

[0101] Bakterielle Expressionsvektoren umfassen bevorzugterweise einen Promotor, der in der Wirtszelle funktioniert, einen oder mehrere selektierbare phänotypische Marker und einen bakteriellen Replikationsursprung. Typische Promotoren umfassen das β -Lactamase-(Penicillinase) und Lactose-Promotorsystem (siehe Chang et al., *Nature* 275: 615, 1978), den T7-RNA-Polymerase-Promotor (Studier et al., *Meth. Enzymol.* 185:60–89, 1990), den Lambda-Promotor (Elvin et al., *Gene* 87: 123–126, 1990), den *trp*-Promotor (Nichols und Yanofsky, *Meth. in Enzymology* 101: 155, 1983) und den *tac*-Promotor (Russell et al., *Gene* 20: 231, 1982). Typische selektierbare Marker umfassen verschiedene Antibiotika-Resistenzmarker, wie beispielsweise Kanamycin- oder Ampicillin-Resistenzgene. Viele Plasmide, die für die Transformierung von Wirtszellen geeignet sind, sind in der Technik gut bekannt, einschließlich, unter anderem, pBR322 (siehe Bolivar et al., *Gene* 2: 95, 1977), die pUC-Plasmide pUC18, pUC19, pUC118, pUC119 (siehe Messing, *Meth. in Enzymology* 101: 20–77, 1983 und Vieira und Messing, *Gene* 19: 259–268, 1982) und pNH8A, pNH16a, pNH18a und Bluescript M13 (Stratagene, La Jolla, Calif.).

[0102] Hefe- und Pilzwirtszellen, die geeignet sind für die Ausführung der vorliegenden Erfindung, umfassen, unter anderem, *Saccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, die Gattungen *Pichia* oder *Kluyveromy-*

ces und verschiedene Arten der Gattung *Aspergillus*. Geeignete Expressionsvektoren für Hefe und Pilze umfassen, unter anderem, YC_p50 (ATCC Nr. 37419) für Hefe und den amdS-Klonierungsvektor pV3 (Turnbull, *Bio/Technology* 7: 169, 1989). Protokolle für die Transformation von Hefe sind den Fachleuten auf dem Gebiet ebenfalls gut bekannt. Beispielsweise wird die Transformation entweder durch Herstellung von Sphäroplasten von Hefe mit DNA (siehe Hinnen et al., *PNAS USA* 75: 1929, 1978) oder durch Behandlung mit alkalischen Salzen, wie beispielsweise LiCl (siehe Itoh et al., *J. Bacteriology* 153: 163, 1983), erreicht. Die Transformation von Pilzen kann auch durchgeführt werden unter Verwendung von Polyethylenglycol, wie von Cullen et al. (*Bio/Technology* 5: 369, 1987) beschrieben.

[0103] Säugetierzellen, die geeignet sind für die Ausführung der vorliegenden Erfindung, umfassen, unter anderem: COS (z. B. ATCC Nr. CRL 1650 oder 1651), BHK (z. B. ATCC Nr. CRL 6281), CHO (ATCC Nr. CCL 61), HeLa (z. B. ATCC Nr. CCL 2), 293 (ATCC Nr. 1573) und NS-1-Zellen. Geeignete Expressionsvektoren zum Steuern der Expression in Säugetierzellen umfassen im Allgemeinen einen Promotor, ebenso wie andere Transkriptions- und Translation-Steuersequenzen. Übliche Promotoren umfassen SV40, MMTV, Metallothionein-1, Adenovirus E1a, den Immediate Early Promotor und den Immediate Late Promotor des Zytomegalovirus.

[0104] Protokolle für die Transfektion von Säugetierzellen sind den Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt. Typische Beispiele umfassen Kalziumphosphat-vermittelte Transfektion, Elektroporation, Lipofektion, retrovirale, adenovirale und Protoplastenfusions-vermittelte Transfektion (siehe Sambrook et al., oben).

[0105] Thymidinkinase-Mutanten können hergestellt werden durch Kultivieren des oben beschriebenen Wirts/des oben beschriebenen Vektorsystems, um die rekombinanten Thymidinkinase-Mutanten zu exprimieren. Rekombinant hergestellte Thymidinkinase-Mutanten können weiter wie detaillierter unten beschrieben gereinigt werden.

[0106] Wie oben festgestellt, stellt die vorliegende Erfindung auch eine Vielzahl von sowohl viralen als auch nicht viralen Vektoren bereit, die in der Lage sind, die Expression der oben beschriebenen Nukleinsäuremoleküle zu steuern. In einem Aspekt der Erfindung werden virale Vektoren bereitgestellt, die einen Promotor umfassen, der die Expression eines isolierten Nukleinsäuremoleküls steuert, das eine Thymidinkinase-Mutante codiert, wie oben beschrieben. Eine große Vielzahl von Promotoren kann im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden, einschließlich, zum Beispiel, Promotoren wie MoMLV LTR, RSV LTR, Friend MuLV LTR, adenoviraler Promotor (Ohno et al., *Science* 265: 781–784, 1994), Neomycinphosphotransferase-Promotor/Enhancer, später Parvoviruspromotor (Koering et al., *Hum. Gene Therap.* 5: 457–463, 1994), Herpes TK-Promotor, SV40-Promotor, Metallothionein Ila-Gen-Enhancer/Promotor, Zytomegalievirus Immediate Early-Promotor und der Zytomegalievirus Immediate Late Promotor. In besonders bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ist der Promotor ein gewebespezifischer Promotor (siehe z. B. WO 91/02805; EP 0,415,731; und WO 90/07936). Typische Beispiele geeigneter gewebespezifischer Promotoren umfassen die Tyrosinase-verwandten Promotoren (TRP-1 und TRP-2, Vile und Hart, *Canc. Res.* 53: 962–967, 1993), DF3-Enhancer (für Brustzellen, siehe Manome et al., *Canc. Res.* 54: 5408–5413, 1994), SLPI-Promotor (sekretorischer Leukoproteaseinhibitor – exprimiert in vielen Arten von Karzinomen, siehe Garver et al., *Gene Therapy* 1: 46–50, 1994), TRS (gewebespezifische regulatorische Sequenzen, siehe Dynan und Tjian, *Nature* 316: 774–778, 1985), Albumin- und α -Fetoprotein-Promotoren (spezifisch für normale Hepatozyten bzw. transformierte Hepatozyten), den Promotor des karzinoembryonalen Antigens (zur Verwendung bei transformierten Zellen des Gastrointestinaltraktes, Lunge, Brust und anderen Geweben), den Tyrosinhydroxylase-Promotor (für Melanozyten), Cholinacetyl-Transferase- oder Neuron-spezifischen Enolase-Promotor zur Verwendung bei Neuroblastomen, die regulatorische Sequenz für gliale Fibroblastome, den Tyrosinhydroxylase-Promotor, c-erb B-2-Promotor, PGK-Promotor, PEPCK-Promotor, den sauren Molkepromotor (Brustgewebe) und den Caseinpromotor (Brustgewebe) und den Adipozyten-P2-Promotor (Ross et al., *Genes & Dev.* 1318–1324, 1993; und Lowell et al., *Nature* 366: 740–742, 1993). Zusätzlich zu den oben angegebenen Promotoren können andere virus-spezifische Promotoren (z. B. retrovirale Promotoren (einschließlich der oben angeführten, ebenso wie andere, wie beispielsweise HIV-Promotoren), Hepatitis, Herpes (z. B. EBV) und bakterielle, Pilz- oder Parasiten(z. B. Malaria)-spezifische Promotoren verwendet werden, um eine spezifische Zelle oder ein spezifisches Gewebe zu targetieren, das mit einem Virus, Bakterium, Pilz oder Parasiten infiziert ist.

[0107] Thymidinkinase-Mutanten der vorliegenden Erfindung können von einer Vielzahl von viralen Vektoren exprimiert werden, einschließlich, beispielsweise, adenoviralen Vektoren (z. B. Kass-Eisler et al., *PNAS* 90(24): 11498–502, 1993; Kolls et al., *PNAS* 91(1): 215–219, 1994; Li et al., *Hum. Gene Ther.* 4(4): 403–409, 1993; Vincent et al., *Nat. Genet.* 5(2): 130–134, 1993; und Zabner et al., *Cell* 75(2): 207–216, 1993; WO 94/26914, WO 93/9191), Adenovirusassoziierten viralen Vektoren (Flotte et al., *PNAS* 90(22): 10613–10617, 1993), Alphaviren, wie beispielsweise Semliki Forest-Virus und Sindbis-Virus (Hertz und Huang, *J. Vir.* 66(2):

857–864, 1992; Raju und Huang, *J. Vir.* 65(5): 2501–2510, 1991; Xiong et al., *Science* 243: 1188, 1989; US-Patent Nr. 5,091,309; WO 92/10578; WO 95/07994); Baculovirus-Vektoren; virale Herpesvektoren (z. B. US-Patente Nrs. 4,769,331, 4,859,587, 5,288,641 und 5,328,688; und PCT-Veröffentlichungen Nrs. WO 94/14971 und WO 95/04139), Parvovirusvektoren (Koering et al., *Hum. Gene Therap.* 5: 457–463, 1994), Pockenvirusvektoren (Ozaki et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 193(2) 653–660, 1993; und Panicali und Paoletti, *PNAS* 79: 4927–4931, 1982), Pockenviren, wie beispielsweise Kanaren-Pockenvirus oder Vakziniavirus (Fisher-Hoch et al., *PNAS* 86: 317–321, 1989; Flexner et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 569: 86–103, 1989; US-Patente Nrs. 4,603,112, 4,769,330 und 5,017,487; WO 89/01973); und Retroviren (z. B. Baba et al., *J. Neurosurg* 79: 729–735, 1993; Ram et al., *Cancer Res.* 53: 83–88, 1993; Takamiya et al., *J. Neurosci. Res* 33: 493–503, 1992; Vile und Hart, *Cancer Res.* 53: 962–967, 1993; Vile und Hart, *Cancer Res.* 53: 3860–3864, 1993; US-Patent Nr. 5,219,740; EP 0,415,731; WO 90/07936; WO 91/0285, WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218). In verschiedenen Ausführungsformen kann entweder der virale Vektor selbst oder ein virales Partikel, das den viralen Vektor enthält, bei den unten beschriebenen Verfahren und Zusammensetzungen verwendet werden.

[0108] Zusätzlich zu viralen Vektoren können nicht virale Vektorsysteme oder Systeme, die Teile eines viralen Vektors enthalten (z. B. die die Transkription, Translation oder den viralen Eintritt in eine Zelle kontrollieren), verwendet werden, um Nukleinsäuresequenzen der vorliegenden Erfindung abzugeben. Typische Beispiele derartiger Systeme umfassen eine Vielzahl von Nukleinsäure-basierten Transkriptionssystemen (z. B. auf der Grundlage von T7- oder SP6-Promotoren, siehe allgemein Li et al., „Tumor regression in Nude Mice by Direct Injection of a Nonviral Cytoplasmic Gene Expression Vector Containing a Thymidine Kinase Gene“, S. 179, Cold Spring Harbor Meeting in Gene Therapy, Sept. 21–25, 1194; WO 95/07994). Derartige Vektorsysteme können verabreicht und hergestellt werden, wie hierin beschrieben (z. B. in Liposomen, kondensierenden Polykationen oder verknüpft mit einem Liganden).

[0109] Vektoren der vorliegenden Erfindung können eine große Bandbreite von zusätzlichen Nukleinsäuremolekülen zusätzlich zu einem Thymidinkinase-Nukleinsäuremolekül enthalten oder exprimieren, wie hierin beschrieben. Zum Beispiel kann der virale Vektor ein Lymphokin, eine Antisense-Sequenz, Toxin oder „Ersatz“-Protein (z. B. Adenosindesaminase) exprimieren. Typische Beispiele für Lymphokine umfassen IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, Alpha-Interferon, Beta-Interferon, Gamma-Interferon und Tumornekrosefaktoren. Typische Beispiele für Antisense-Sequenzen umfassen Antisense-myc, Antisense p53, Antisense ras ebenso wie Antisense-Sequenzen, die die Expression oder Produktion von Viren, wie beispielsweise HIV, HBV und HCV blockieren. Typische Beispiele für Toxine umfassen Ricin, Abrin, Diphtherie, Toxin, Cholera toxin, Gelonin, virales Protein von Pockweed, Tritin, Shigella-Toxin und Pseudomonas Exotoxin A.

[0110] In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung können ein oder mehrere Gene, die Proteine codieren, die die biologische Aktivität von Thymidinkinase erleichtern oder erhöhen, in den hierin beschriebenen Vektoren enthalten sein und exprimiert werden. Beispielsweise werden in einer Ausführungsform der Erfindung Nukleinsäuremoleküle, die DNA-Polymerase codieren (z. B. eine Herpes-DNA-Polymerase) und/oder Guanylatkinase (Konrad, *J. Biol. Chem.* 267(36): 25652–25655, 1992; Miller und Miller, *J. Biol. Chem.* 255(15): 7204–7207, 1980), entweder von einem oder mehreren getrennten Promotoren (z. B. von mehreren internen Ribosomenbindungsstellen) zusätzlich zu einem Thymidinkinase-Enzym (entweder Wildtyp oder Thymidinkinase-Mutanten wie oben beschrieben) exprimiert. Typische Beispiele derartiger Ausführungsformen sind detaillierter unten in den Beispielen 7 und 11 angegeben. Es sollte verstanden werden, dass, obwohl bestimmte Nukleinsäuremoleküle offenbart sind, die DNA-Polymerase oder Guanylatkinase codieren, die Erfindung insofern nicht beschränkt ist. In der Tat ist, wie oben bezüglich Thymidinkinase-Mutanten diskutiert, eine große Bandbreite von Nukleinsäuremolekülen als im Umfang der vorliegenden Erfindung umfasst betrachtet, die DNA-Polymerase- oder Guanylatkinaseaktivität codieren (z. B. verkürzte Nukleinsäuremoleküle oder Nukleinsäuremoleküle, die bezüglich der codierten Aminosäuresequenz degeneriert sind).

[0111] Thymidinkinase-Mutanten können auch in nicht menschlichen transgenen Tieren, wie beispielsweise Mäusen, Ratten, Kaninchen, Schafen, Hunden und Schweinen (siehe Hammer et al. (*Nature* 315: 680–683, 1985), Palmiter et al. (*Science* 222: 809–814, 1983), Brinster et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4438–4442, 1985), Palmiter und Brinster (*Cell* 41: 343–345, 1985) und US-Patent Nr. 4,736,866) exprimiert werden. Kurz gesagt wird eine Expressionseinheit, die ein Nukleinsäuremolekül, das zusammen mit geeignet angeordneten Expressionssteuersequenzen exprimiert werden soll, in einen Vorkern von befruchteten Eiern, beispielsweise durch Mikroinjektion eingeführt. Integration der injizierten DNA wird nachgewiesen durch Blot-Analyse von DNA aus Gewebeproben. Es ist bevorzugt, dass die eingeführte DNA in die Keimbahn des Tieres eingeführt wird, so dass sie auf die Nachfahren des Tieres übergeht. Gewebespezifische Expression kann erreicht wer-

den durch die Verwendung eines gewebespezifischen Promotors oder durch die Verwendung eines induzierbaren Promotors, wie beispielsweise des Metallothionein-Gen-Promotors (Palmiter et al., 1983, a. a. O.), was die gesteuerte Expression des Transgens erlaubt.

WIRTSZELLEN

[0112] Die oben beschriebenen Nukleinsäuremoleküle, die Thymidinkinase-Mutanten der vorliegenden Erfindung exprimieren (oder die Vektoren, die diese Mutanten enthalten und/oder exprimieren), können leicht in eine große Vielzahl von Wirtszellen eingeführt werden. Typische Beispiele derartiger Wirtszellen umfassen Pflanzenzellen, eukaryotische Zellen und prokaryotische Zellen. In bevorzugten Ausführungsformen werden die Nukleinsäuremoleküle in Zellen von Vertebraten oder warmblütigen Tieren, wie beispielsweise Menschen, Makaken, Hunde, Kuh, Pferde, Schweine, Schaf, Ratten, Hamster oder Maus oder in Fischzelle oder ein Hybrid davon eingeführt.

[0113] Die Nukleinsäuremoleküle (oder Vektoren) können in Wirtszellen durch eine große Bandbreite von Mechanismen eingeführt werden, einschließlich zum Beispiel Calciumphosphat-vermittelter Transfektion (Wigler et al., Cell 14: 725, 1978), Lipofectin; Genkanone (Corsaro und Pearson, Somatic Cell Gen. 7: 603, 1981; Graham und Van der Eb, Virology 52: 456, 1973), Elektroporation (Neumann et al., EMBO J. 1: 841–845, 1982), retrovirale, adenovirale, Protoplastenfusion-vermittelte Transfektion oder DEAE-Dextranvermittelte Transfektion (Ausubel et al., (Hrsg.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, 1987.

KONSTRUKTION VON GUANYLATKINASE-THYMIDINKINASE-FUSIONSPROTEINEN

[0114] Es existieren verschiedene Ansätze zur Verbesserung der Nettowirksamkeit der Suizidgenherapie. Wie oben beschrieben besteht ein Ansatz darin, neue TK-Enzyme zu erzeugen, die effizient systemisch verabreichte Prodrugs in zytotoxische Verbindungen umwandeln. Eine weitere Strategie besteht darin, den nachfolgenden Metabolismus der Prodrug in ihre toxische Form zu erleichtern, indem das Gen eingeführt wird, das das Enzym codiert, das für den zweiten Schritt in dem Nukleotidstoffwechselweg der Prodrug-Aktivierung verantwortlich ist, nämlich Guanylatkinase, in Verbindung mit Thymidinkinase. Im Gegensatz zur zellulären Thymidinkinase kann die HSV TK die initiale Phosphorylierung von Prodrugs, wie beispielsweise GCV und ACV, in ihre monophosphorylierten Zustände durchführen. Zelluläre Kinasen phosphorylieren weiter das Nukleotid zum Triphosphat, welches dann die Kettenverlängerung durch DNA-Polymerase nach Einbau in die naszierende DNA-Kette inhibiert und nachfolgend zum Zelltod führt. Guanylatkinase (gmk), der zweite Schritt in dem Prodrug-Aktivierungsstoffwechselweg, scheint in vivo geschwindigkeitsbeschränkend zu sein. Beispiel 11 veranschaulicht Verfahren zur Konstruktion von Säugetierexpressionsvektoren, die sowohl gmk- als auch TK-Enzyme produzieren.

[0115] In einem noch weiteren Ansatz können Fusionsproteine konstruiert werden, die sowohl gmk- als auch TK-Enzymaktivitäten exprimieren, was die Expression von zwei Enzymfunktionen von einem einzelnen Promotor und einem einzelnen Cistron liefert. Auf diese Art und Weise würde die Verwendung eines Fusionsproteins für die Gentherapie das Erfordernis für zwei Promotoren und die damit verbundene Verringerung der Prodrug-Aktivierung infolge der Unterschiede in der Promotorstärke beseitigen. Darüber hinaus sind Fusionsproteine für Gentherapievektoren vorteilhaft, die keine großen Stücke von Fremd-DNA tolerieren können, wie beispielsweise AAV-Vektoren.

[0116] Beispiel 12 beschreibt die Konstruktion von zwei gmk-TK-Fusionsproteinen. Obwohl die beispielhaft angegebenen Vektoren ein TK-Gen enthalten, das an das 3'-Ende eines gmk-Gens fusioniert ist, können geeignete Fusionsproteine mit Vektoren mit einem gmk-Gen erzeugt werden, das an das 3'-Ende eines TK-Gens fusioniert ist. Beispiel 12 veranschaulicht auch, dass derartige Fusionsproteine nicht die gesamte Aminosäuresequenz eines Kinasegens enthalten müssen. Das heißt, dass Nukleinsäuremoleküle, die ein verkürztes gmk und/oder eine verkürzte TK codieren, verwendet werden können, um Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung zu exprimieren. Derartige trunke Kinasen müssen jedoch die geeignete biologische Aktivität, wie oben definiert, aufweisen. Die biologische Aktivität eines verkürzten gmk oder einer verkürzten TK kann bestimmt werden unter Verwendung der hierin beschriebenen Enzymtests.

[0117] Allgemeine Verfahren zum Produzieren von Fusionsproteinen sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Siehe beispielsweise Ausubel et al. (Hrsg.), Short Protocols in Molecular Biology, 3. Aufl., S. 16–16 bis 16–37 (John Wiley & Sons, Inc. 1995). Beispiel 11 beschreibt Verfahren zum Erhalten von sowohl menschlichen als auch murinen gmk-Klonen (siehe auch Brady et al., J Biol. Chem. 271: 16734–16740, 1996). Die Fachleute können Nukleinsäuremoleküle, die gmk codieren, aus einer Vielzahl von Quellen unter Verwendung

von Standardtechniken erhalten. Beispielsweise beschreibt Konrad, J. Biol. Chem. 267: 25652–25655 (1992) die Isolierung von gmk-Sequenzen aus *Saccharomyces cerevisiae*, Gaidarov et al., FEBS Lett. 335: 81–84 (1993) offenbart Rinder-Guanylatkinase-Sequenzen, Zschocke et al., Eur. J. Biochem. 213: 263–269 (1993) stellt Schweine-Guanylatkinase-Sequenzen zur Verfügung, und eine *E. coli*-Guanylatkinase-Sequenz wird von Gentry et al., J. Biol. Chem. 268: 14316–14321 (1993) bereitgestellt. Zusätzlich sind Nukleinsäuremoleküle, die Guanylatkinaseenzyme codieren, kommerziell erhältlich. Beispielsweise können DNA-Moleküle, die gmk von *Mycoplasma genitalium* produzieren, von der American Type Culture Collection (ATCC Nr. 623592) erhalten werden. Geeignete TK-Gene umfassen sowohl bekannte TK-Gene als auch TK-Mutanten der vorliegenden Erfindung. Quellen für TK-Gene, geeignete Expressionsvektoren und geeignete Wirtszellen sind oben beschrieben.

HERSTELLUNG VON ANTIKÖRPERN

[0118] Antikörper gegen Thymidinkinase-Mutanten, Guanylatkinaseprotein oder Fusionsproteine, wie sie hierin beschrieben sind, können leicht hergestellt werden mit Blick auf die hierin gegebene Offenbarung. Im Kontext der vorliegenden Erfindung werden Antikörper so verstanden, dass sie monoklonale Antikörper, polyklonale Antikörper, Antikörperfragmente (z. B. Fab und F(ab')₂) ebenso wie Teile davon enthalten, die durch verschiedene rekombinante Verfahren hergestellt werden können. Antikörper werden so verstanden, dass sie mit einer Thymidinkinase-Mutante oder Fusionsprotein reagieren, wenn sie/es mit einer K_a von mehr als oder gleich 10⁷ M binden. Wie von den Fachleuten anerkannt werden wird, können Antikörper entwickelt werden, die nicht nur einen Liganden, wie beispielsweise eine Thymidinkinase-Mutante oder ein Fusionsprotein binden, sondern solche, die auch die biologische Aktivität der Mutante oder des Fusionsproteins blockieren oder inhibieren.

[0119] Kurz gesagt können polyklonale Antikörper leicht von einem Fachmann von einer Vielzahl von warmblütigen Tieren erzeugt werden, wie beispielsweise Pferden, Kühen, verschiedenen Geflügelarten, Kaninchen, Mäusen oder Ratten. Kurz gesagt wird eine Thymidinkinase-Mutante (oder Guanylatkinase-Enzym oder Fusionsprotein, wenn derartige Antikörper erwünscht sind) verwendet, um das Tier durch intraperitoneale, intramuskuläre, intraokulare oder subkutane Injektionen zu immunisieren, ein Adjuvans wie beispielsweise Freund'sches vollständiges oder unvollständiges Adjuvans. Nach mehreren Auffrischungsimpfungen werden Serumproben gesammelt und auf Reaktivität mit der Thymidinkinase-Mutante (oder Guanylatkinase oder Fusionsprotein) getestet. Besonders bevorzugte polyklonale Antiseren werden ein Signal in einem dieser Tests ergeben, das wenigstens dreimal so groß wie der Hintergrund ist. Wenn der Titer des Tieres ein Plateau hinsichtlich seiner Reaktivität mit der Thymidinkinase-Mutante, dem Guanylatkinase-Enzym oder dem Fusionsprotein erreicht hat, werden größere Mengen an Antiseren leicht entweder durch wöchentliche Blutentnahme oder durch Ausbluten des Tieres erhalten.

[0120] Monoklonale Antikörper können auch leicht erzeugt werden unter Verwendung herkömmlicher Techniken (siehe US-Patente Nrs. RE 32,011, 4,902,614, 4,543,439 und 4,411,993, die hierin durch Bezugnahme aufgenommen sind; siehe auch *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKearn und Bechtol (Hrsg.), 1980, und *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988, die hierin ebenfalls durch Bezugnahme aufgenommen sind).

[0121] Kurz gesagt wird in einer Ausführungsform einem tierischen Lebewesen wie einer Ratte oder Maus eine Thymidinkinase-Mutante, ein Guanylatkinase-Enzym oder ein Fusionsprotein, wie oben beschrieben, injiziert. Die Thymidinkinase-Mutante, das Guanylatkinase-Enzym oder das Fusionsprotein kann mit einem Adjuvans, wie beispielsweise Freund'schem vollständigen oder unvollständigen Adjuvans vermischt sein, um die sich ergebende Immunantwort zu erhöhen. Zwischen einer und drei Wochen nach der anfänglichen Immunisierung kann das Tier mit einer weiteren Auffrischungsimpfung erneut immunisiert werden und auf Reaktivität gegenüber der Thymidinkinase-Mutante, dem Guanylatkinase-Enzym oder dem Fusionsprotein getestet werden unter Verwendung von den oben beschriebenen Tests. Wenn das Tier einmal ein Plateau hinsichtlich seiner Reaktivität gegenüber der Mutante erreicht hat, wird es getötet und die Organe, die eine große Anzahl von B-Zellen enthalten, wie beispielsweise Milz und Lymphknoten, werden geerntet.

[0122] Zellen, die von dem immunisierten Tier erhalten werden, können durch Transfektion mit einem Virus, wie beispielsweise dem Epstein-Barr-Virus (EBV) immortalisiert werden (siehe Glasky und Reading, *Hybridoma* 8(4): 377–389, 1989). Alternativ werden in einer bevorzugten Ausführungsform die geernteten Milz- und/oder Lymphknoten-Zellsuspensionen mit einer geeigneten Myelomzelle fusioniert, um ein „Hybridom“ zu erzeugen, das monoklonale Antikörper sekretiert. Geeignete Myelomlinien umfassen, beispielsweise, NS-1

(ATCC Nr. TIB 18) und P3X63 – Ag 8.653 (ATCC Nr. CRL 1580).

[0123] Nach der Fusion können die Zellen in Kulturplatten gegeben werden, die ein geeignetes Medium, wie beispielsweise RPMI 1640 oder DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas) ebenso wie zusätzliche Bestandteile, wie beispielsweise fötales Rinderserum (FBS, d. h. von Hyclone, Logan, Utah, oder JRH Biosciences erhalten), enthalten. Zusätzlich sollte das Medium ein Reagens enthalten, das selektiv das Wachstum von fusionierten Milz- und Myelomzellen erlaubt, wie beispielsweise HAT (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri). Nach etwa sieben Tagen können die sich ergebenden fusionierten Zellen oder Hybridome gescreent werden, um die Anwesenheit von Antikörpern zu bestimmen, die mit einer Thymidinkinase-Mutant, einem Guanylatkinase-Enzym oder einem Fusionsprotein reaktiv sind. Eine große Bandbreite von Tests kann verwendet werden, um die Anwesenheit von Antikörpern zu bestimmen, die mit den Proteinen der vorliegenden Erfindung reagieren, einschließlich beispielsweise Gegenstrom-Immunelektrophorese, Radioimmuntests, Radioimmunpräzipitationen, Enzymgekoppelte Immunosorbenttests (ELISA), Dot Blot-Tests, Western Blots, Immunpräzipitation, Inhibitions- oder Kompetitionstests und Sandwich-Tests (siehe US-Patente Nrs. 4,376,110 und 4,486,530; siehe auch *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Nach mehreren klonalen Verdünnungen und erneuerten Tests kann ein Hybridom, das Antikörper produziert, die mit der Thymidinkinase-Mutante (oder dem Guanylatkinase-Enzym oder dem Fusionsprotein) reagieren, isoliert werden.

[0124] Andere Techniken können ebenfalls verwendet werden, um monoklonale Antikörper zu konstruieren (siehe William D. Huse et al., „Generation of a Large Combinational Library of the Immunglobulin Repertoire in Phage Lambda," *Science* 246: 1275–1281, Dezember 1989; siehe auch L. Sastry et al., „Cloning of the Immunological Repertoire in *Escherichia coli* for Generation of Monoclonal Catalytic Antibodies: Construction of a Heavy Chain Variable Region-Specific cDNA Library," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5728–5732, August 1989; siehe auch Michelle Alting-Mees et al., „Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas," *Strategies in Molecular Biology* 3: 1–9, Januar 1990; diese Literaturstellen beschreiben ein von Stratacyte, La Jolla, Kalifornien, erhältliches kommerzielles System, was die Produktion von Antikörpern durch rekombinante Techniken erlaubt). Kurz gesagt wird mRNA aus einer B-Zellpopulation isoliert und verwendet, um cDNA-Expressionsbibliotheken für schwere und leichte Ketten von Immunglobulin in den kImmunoZap(H)- und kImmunoZap(L)-Vektoren zu erzeugen. Diese Vektoren können einzeln gescreent oder co-exprimiert werden, um Fab-Fragmente oder Antikörper zu bilden (siehe Huse et al., a. a. O.; siehe auch Sastry et al., a. a. O.). Positive Plaques können nachfolgend in nicht-lytische Plasmide umgewandelt werden, was eine Expression von monoklonalen Antikörperfragmenten von *E. coli* auf hohem Niveau erlaubt.

[0125] In ähnlicher Weise können Teile von Antikörpern konstruiert werden unter Verwendung von rekombinanten DNA-Techniken, um variable Regionen eines Gens aufzunehmen, die für einen spezifisch bindenden Antikörper codieren. In einer Ausführungsform werden die Gene, die die variable Region von einem Hybridom codieren, das einen interessierenden monoklonalen Antikörper produziert, amplifiziert unter Verwendung von Nukleotidprimern für die variable Region. Diese Primer können durch die Fachleute synthetisiert werden oder können von kommerziell erhältlichen Quellen gekauft werden. Stratacyte (La Jolla, Kalifornien) verkauft Primer für Maus- und menschliche variable Regionen, einschließlich, unter anderem, Primer für $V_{H\alpha}$, $V_{H\beta}$, $V_{H\gamma}$, $V_{H\delta}$, C_{H1} , V_L - und C_L -Regionen. Diese Primer werden verwendet, um die variablen Regionen der schweren oder leichten Kette zu amplifizieren, die dann in Vektoren eingefügt werden können, wie beispielsweise ImmunoZAP™ H bzw. ImmunoZAP™ L (Stratacyte). Diese Vektoren können dann in *E. coli* für die Expression eingeführt werden. Unter Verwendung dieser Techniken können große Mengen an einzelkettigen Proteinen, die eine Fusion der V_H - und V_L -Domänen enthalten, hergestellt werden (siehe Bird et al., *Science* 242: 423–426, 1988). Zusätzlich können derartige Techniken verwendet werden, um einen „murinen" Antikörper in einen „humanen" Antikörper zu überführen, ohne die Bindungsspezifität des Antikörpers zu ändern.

[0126] Wenn einmal geeignete Antikörper erhalten worden sind, können sie isoliert oder gereinigt werden durch Techniken, die den Fachleuten auf dem Gebiet sehr gut bekannt sind (siehe *Antibodies: A Laboratory Manual*; Harlow and Lane (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Geeignete Techniken umfassen Peptid- oder Proteinaffinitätsäulen, HPLC oder RP-HPLC, Reinigung an Protein A- oder Protein G-Säulen oder irgendeine Kombination dieser Techniken.

MARKIERUNG VON ANTIKÖRPERN

[0127] Anti-Thymidinkinase-, anti-Guanylatkinase- oder anti-Fusionsprotein-Antikörper, die oben beschrieben sind, können mit einer Vielzahl von Molekülen markiert werden, einschließlich, beispielsweise, fluoreszie-

renden Molekülen, Toxinen und Radionukliden. Typische Beispiele für fluoreszierende Moleküle umfassen Fluorescein, Phycoerythrin, Rodamin, Texasrot und Luziferase. Typische Beispiele für Toxine umfassen Ricin, Abirin, Diphtherietoxin, Cholera toxin, Gelonin, antivirales Protein von Pokeweed, Tritin, Shigella-Toxin und Pseudomonas Exotoxin A. Typische Beispiele für Radionuclide umfassen Cu-64, Ga-67, Ga-68, Zr-89, Ru-97, Tc-99m, Rh-105, Pd-109, In-111, I-123, I-125, I-131, Re-186, Re-188, Au-198, Au-199, Pb-203, At-211, Pb-212 und Bi-212. Zusätzlich können die oben beschriebenen Antikörper auch mit einem Partner eines Ligandenbindungspaares markiert oder konjugiert sein. Typische Beispiele umfassen Avidin-Biotin und Riboflavin-Riboflavin-Bindungsprotein.

[0128] Verfahren zum Konjugieren oder Markieren der oben diskutierten anti-Thymidinkinase-, anti-Guanylatkinase- oder anti-Fusionsprotein-Antikörper mit beispielhaften Markierungen, wie sie oben angegeben sind, können leicht durch den Fachmann auf dem Gebiet erfolgen (siehe Trichothecene Antibody Conjugate, US-Patent Nr. 4,744,981; Antibody Conjugate, US-Patent Nr. 5,106,951; Fluorogenic Materials and Labeling Techniques, US-Patent Nr. 4,018,884; Metal Radionuclide Labeled Proteins for Diagnosis and Therapy, US-Patent Nr. 4,897,255; und Metal Radionuclide Chelating Compounds for Improved Chelation Kinetics, US-Patent Nr. 4,988,496; siehe auch Inman, Methods In Enzymology, Bd. 34, Affinity Techniques, Enzyme Purification: Part B, Jakoby and Wilchek (Hrsg.), Academic Press, New York, S. 30, 1974; siehe auch Wilchek und Bayer, "The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications," Anal. Biochem. 171: 1-32, 1988).

PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNGEN

[0129] Wie oben festgestellt, stellt die vorliegende Erfindung auch eine Vielzahl von pharmazeutischen Zusammensetzungen (oder Medikamenten) bereit, die eine der oben beschriebenen Thymidinkinase-Mutanten, Guanylatkinasen oder Fusionsproteine (z. B. entweder das Nukleinsäuremolekül, den Vektor oder das Protein), zusammen mit einem pharmazeutisch oder physiologisch akzeptablen Träger, Bindemittel, oder Verdünnungsmittel umfasst. Im Allgemeinen sollten derartige Träger für den Empfänger bei den verwendeten Dosierungen und Konzentrationen nicht toxisch sein. Üblicherweise bringt die Herstellung derartiger Zusammensetzungen das Kombinieren des therapeutischen Agens mit Puffer, Antioxidanzien, wie beispielsweise Ascorbinsäure, Polypeptiden mit geringem Molekulargewicht (weniger als etwa 10 Reste), Proteinen, Aminosäuren, Kohlenhydraten einschließlich Glukose, Saccharose oder Dextrinen, Chelatbildnern wie beispielsweise EDTA, Glutathion und andere Stabilisatoren und Bindemittel einher. Neutrale gepufferte Saline oder Saline gemischt mit nicht spezifischem Serumalbumin sind beispielhafte geeignete Verdünnungsmittel.

[0130] Zusätzlich können die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung für die Verabreichung hergestellt werden vermittels einer Vielzahl von verschiedenen Wegen, einschließlich, beispielsweise, intraartikular, intrakranial, intradermal, intramuskulär, intraokular, intraperitoneal, intrathekal, intravenös, subkutan oder sogar direkt in einen Tumor (zum Beispiel durch stereotaktische Injektion). Zusätzlich können die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung in Behältnissen platziert sein zusammen mit Verpackungsmaterial, welches Anweisungen liefert hinsichtlich der Verwendung derartiger Zusammensetzungen. Im Allgemeinen werden derartige Anweisungen eine fassbare Form umfassen, die die Reagenzkonzentration, sowie bei bestimmten Ausführungsformen relative Mengen der Bindemittelbestandteile oder Verdünnungsmittel (z. B. Wasser, Saline oder PBS) beschreibt, die notwendig sind, um die pharmazeutische Zusammensetzung zu rekonstituieren.

VERFAHREN

[0131] Die vorliegende Erfindung stellt auch Verfahren bereit zum Inhibieren eines pathogenen Agens in einem warmblütigen Tier, welches die Verabreichung eines Vektors an das warmblütige Tier (z. B. Expressionsvektor, viralen Vektor oder virales Partikel, das den Vektor enthält), umfasst, wie oben beschrieben, so dass das pathogene Agens inhibiert wird. Typische Beispiele für pathogene Agenzien umfassen Autoimmunzellen, Tumorzellen, Zellen, die ein spezielles Gen nicht oder in nicht angemessener Weise exprimieren, und Zellen, die mit Bakterien, Viren oder anderen intrazellulären Parasiten infiziert sind. Wie für den Fachmann offenkundig sein wird, wird die Menge und Häufigkeit der Verabreichung natürlich von Faktoren abhängen, wie der Art und Schwere der zu behandelnden Indikation, der erwünschten Antwort, des Zustandes des Patienten usw. Typischerweise können die Zusammensetzungen durch eine Vielzahl von Techniken verabreicht werden, einschließlich, beispielsweise, intraartikular, intrakranial, intradermal, intramuskular, intraokular, intraperitoneal, intrathekal, intravenös; subkutan oder sogar direkt in einen Tumor (beispielsweise durch stereotaktische Injektion).

[0132] In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung können die Vektoren, die die Nukleinsäuremoleküle

enthalten oder exprimieren, die Thymidinkinase (und/oder Guanylatkinase) oder Fusionsprotein codieren, wie oben beschrieben, oder sogar die Nukleinsäuremoleküle selbst, verabreicht werden durch eine Vielzahl von alternativen Techniken, einschließlich beispielsweise Verabreichung von Asialoosomuroid (ASOR), das mit poly(L-Lysin)-DNA-Komplexen konjugiert ist (Cristano et al., PNAS 92122–92126, 1993), DNA, die mit abgetöteten Adenviren verbunden ist (Michael et al., J. Biol. Chem. 268(10): 6866–6869, 1993; und Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3(2): 147–154, 1992), Zytotoxik-vermittelte Einführung (DMRIE-DOPE, Vical, Calif.), direkte DNA-Injektion (Acsadi et al., Nature 352: 815–818, 1991); DNA-Liganden (Wu et al., J. of Biol. Chem. 264: 16985–16987, 1989); Lipofektion (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413–7417, 1989); Liposomen (Pickering et al., Circ. 89(1): 13–21, 1994; und Wang et al., PNAS 84: 7851–7855, 1987); Mikroprojektilbombardierung (Williams et al., PNAS 88: 2726–2730, 1991); Retrotransposons, Transferrin-DNA-Komplexe (Zenke) und direkte Abgabe von Nukleinsäuren, die das Enzym selbst kodieren, entweder alleine (Vile und Hart, Cancer Res. 53: 3860–3864, 1993) oder unter Verwendung von PEG-Nukleinsäurekomplexen.

[0133] In einem Aspekt der Erfindung werden Verfahren zum Inhibieren eines Tumors oder einer Krebserkrankung in einem warmblütigen Tier bereitgestellt, die die Verabreichung von einem der oben beschriebenen Vektoren (oder Nukleinsäuremoleküle, die Thymidinkinase-Mutanten, Guanylatkinase-Enzyme oder Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung codieren) an das warmblütige Tier umfassen, so dass der Tumor oder die Krebserkrankung inhibiert wird. In einer Ausführungsform können ausgewählte Zellen aus einem warmblütigen Tier entfernt werden, ein oder mehrere der oben beschriebenen Vektoren in die entfernten Zellen eingeführt werden und die Zellen in dasselbe oder ein anderes warmblütiges Tier erneut eingeführt werden. In anderen Ausführungsformen können Vektoren oder Nukleinsäuremoleküle, die Thymidinkinase (oder Mutanten, wie hierin beschrieben) oder Guanylatkinase oder Fusionsprotein codieren, getrennt verabreicht oder eingeführt werden. In einer weiteren Ausführungsform umfassen derartige Verfahren weiter den Schritt der Verabreichung eines Nukleosidanalogs. Typische Beispiele derartiger Nukleosidanaloga umfassen Ganciclovir, Acyclovir, Trifluorthymidin, 1-[2-Deoxy-,2-Fluoro-,beta-D-Arabinofuranosyl]-5-ioduracil, ara-A, araT 1-beta-D-Arabinofuranoxylthymidin, 5-Ethyl-2'-desoxyuridin, 5-Iod-5'-amino-2,5'-didesoxyuridin, Idoxuridin, AZT, AIU (5-Iod-5'-amino 2', 5'-didesoxyuridin), Didesoxycytidin und AraC. Kurz gesagt kann unter Verwendung derartiger Verfahren eine große Bandbreite von Tumoren (sowohl benigne als auch maligne) behandelt werden. Typische Beispiele derartiger Tumoren umfassen solide Tumoren, wie beispielsweise Lungenkarzinome, Nierenzellkarzinome, Brustkarzinome, Kolorektalkarzinome und Melanome ebenso wie diffuse Krebserkrankungen wie beispielsweise Leukämien und Lymphome.

[0134] In anderen Aspekten der vorliegenden Erfindung werden Verfahren zur Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen bereitgestellt, wobei eine Untergruppe von Zellen als „erkrankt“ oder verändert gekennzeichnet werden kann unter Verwendung der oben beschriebenen Nukleinsäuremoleküle oder Vektoren. Typische Beispiele für derartige Erkrankungen umfassen Hyperkeratose (Psoriasis), Prostatahypertrophie, Hyperthyroidismus, eine große Vielzahl von Endokrinopathien, Autoimmunerkrankungen (infolge autoimmunreaktiver Zellen, wie beispielsweise bestimmter Untergruppen von T-Zellen), Allergien (z. B. durch Modulieren der Aktivität von IgE-exprimierenden Zellen, die für eine allergische Reaktion verantwortlich sind), Restenose (z. B. durch Abtöten von Zellen, die für das Einwachsen und/oder Verstopfen eines Blutgefäßes verantwortlich sind), eine große Anzahl von viralen Erkrankungen, wie beispielsweise AIDS (HIV), Hepatitis (HCV oder HBV) und intrazelluläre parasitische Erkrankungen. In anderen Ausführungsformen der Erfindung werden Verfahren bereitgestellt zum Inhibieren des Wachstums oder zum Zerstören von Zellen, die traditionell nicht mit einer Krankheit verbunden sind. Beispielsweise ist es bei bestimmten Ausführungsformen wünschenswert, einen Vektor (oder ein Nukleinsäuremolekül alleine) zu verabreichen, welches Fettzellen inhibiert oder zerstört, um Gewichtsverlust in einem Tier zu initiieren, oder um Haarfollikel zu zerstören (als Enthaarungsmittel).

[0135] In noch weiteren Aspekten können Vektoren, die die Nukleinsäuremoleküle enthalten und exprimieren, die Thymidinkinase-Mutanten und/oder Guanylatkinase oder Fusionsprotein codieren (oder die Nukleinsäuremoleküle selbst) verwendet werden; um aberrante Expression eines Gens innerhalb einer Zelle zu korrigieren, oder ein spezifisches Gen zu ersetzen, welches hinsichtlich der richtigen Expression defekt ist. Typische Beispiele für derartige Erkrankungen umfassen Adenosindesaminasemangel, Alzheimer'sche Erkrankung (siehe zum Beispiel Goat et al., Nature 394: 704, 1991; Sherrington et al., Nature 375: 754, 1995; Levy-Labad et al., Science 269: 973, 1995), zystische Fibrose ebenso wie, beispielsweise, Erkrankungen wie Hämophilie.

[0136] In weiteren Aspekten der vorliegenden Erfindung werden Verfahren zur Verwendung der oben beschriebenen Thymidinkinase-Mutanten oder Fusionsproteine bereitgestellt als Negativselektionsmarkergen (siehe z. B. Czako und Marton, Plant Physiol. 104: 1067–1071, 1994) in prokaryontischen Zellen, eukaryotischen Zellen, Pflanzen (Czako und Morton, Plant Physiol. 104: 1067–1071, 1994), Parasiten (z. B. Trypanosomen) oder Viren. Alternativ können derartige Mutanten verwendet werden als konditional lethale Marker für

homologe Rekombination (Mansour et al., Nature 336: 348–352, 1988). Ein typisches Beispiel ist detaillierter unten als Beispiel 6 angegeben.

[0137] In anderen Aspekten der vorliegenden Erfindung werden Verfahren für das nichtinvasive Überwachen von Gentherapie unter Verwendung von Thymidinkinase-Mutanten und Fusionsproteinen mit Thymidinkinase- und Guanylatkinase-Aktivitäten bereitgestellt. Verfahren sind entwickelt worden für die nichtinvasive Bildgebung von HSV-1-Thymidinkinase-Genexpression unter Verwendung einer klinischen Gamma-Kamera und durch Einzelphotonen-Emissionstomographie mit radioaktiv markiertem Thymidinkinase-Substrat (siehe zum Beispiel Tjuvajev et al., Cancer Res. 55: 6126–6132, 1995; Tjuvajev et al., Cancer Res. 56: 4087–4095, 1996). Der grundsätzliche Ansatz besteht darin, einen markierten antiviralen Wirkstoff zu verabreichen, der selektiv durch HSV-1-Thymidinkinase phosphoryliert wird, und den Fortschritt der Therapie zu überwachen unter Verwendung von Standardabtastverfahren für die Diagnose am Menschen. Geeignete radioaktiv markierte antivirale Wirkstoffe, die Substrate für HSV-1-Thymidinkinase sind, wie beispielsweise IVFRU, sind den Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt. Siehe z. B. Wiebe et al., Q. J. Nucl. Med. 41: 79–89 (1997), die eine Diskussion bezüglich Bildgebung mit radioaktiv markierten Nukleosidsubstraten für HSV-1 TK enthält und durch Bezugnahme aufgenommen wird. Die mutierten Thymidinkinase und Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung, die eine verstärkte Thymidinkinaseaktivität aufweisen, stellen ein Mittel dar, um die Empfindlichkeit eines derartigen nichtinvasiven Überwachens zu erhöhen.

[0138] Die folgenden Beispiele werden zu Zwecken der Veranschaulichung, aber nicht zu Zwecken der Beschränkung angegeben.

BEISPIELE

BEISPIEL 1

KONSTRUKTION VON TK-MUTANTEN, DIE MUTATIONEN AN DEN CODONS 165–175 AUFWEISEN UNTER VERWENDUNG EINER 20% ZUFALLSBIBLIOTHEK

[0139] Beispiel 1 beschreibt die Konstruktion von TK-Mutanten, die Mutationen an den Codons 165 bis 175 enthalten unter Verwendung einer 20% Zufallsbibliothek. Eine schematische Darstellung, die die Strategie, die in diesem Beispiel verwendet wird, darstellt, ist in [Fig. 1](#) gezeigt.

A. Erzeugen von TK-Mutanten

1. Erzeugen von Oligonukleotiden

[0140] Ein 52-mer Oligonukleotid mit einer Wildtyp-tk-Sequenz (SEQUENCE ID. No. 2) und ein 56-mer, das degenerierte Nukleotide enthält, die sich vom Codon 165 bis 175 (SEQUENCE ID. No. 3) des tk-Gens erstrecken ([Fig. 23](#) offenbart Nukleotide in dem offenen Leserahmen von HSVTK-1 [SEQUENCE ID. NO. 1]), (wobei N = 80% Wildtypnukleotide und eine 20%-Mischung der anderen drei an einer jeden Position), wurden von Operon Technologies (San Pablo, CA) synthetisiert. Beide Oligomere waren komplementär zueinander über 12 Basen an ihrem 3'-Ende.

**5'-TG GGA GCT CAC ATG CCC CGC CCC CGG CCC TCA CCC TCA TCT TCG
ATC GCC AT-3' (SEQUENCE ID No. 2)**
**5'-ATG AGG TAC CGN NNN
NNA TGG CGA TCG AA-3' (SEQUENCE ID No. 3)**

[0141] Für die Konstruktion des unten beschriebenen pKTPD wurden zwei zusätzliche Oligonukleotide von Operon Technologies unter Verwendung von Phosphoramidchemie synthetisiert. Diese Oligonukleotide waren die folgenden:

5'-CCC CTC GAG CGC GGT AC-3' (SEQUENCE ID No. 4)
5'-CGC GCT CGA GGG GAG CT-3' (SEQUENCE ID No. 5)

2. Erzeugen von Zufallssequenz-enthaltenden Bibliotheken

a. Konstruktion der Vektoren pMDC und pMCC

[0142] Die chimären Vektoren pMDC (der ein inaktives TK-Genprodukt erzeugt) und pMCC (der eine Wildtyp-TK erzeugt) wurden hergestellt aus den Plasmiden pHETK1 und pHETK2, wie im Wesentlichen unten beschrieben. Kurz gesagt sind die Plasmide pHETK1 und pHETK2 (Waldman et al., J. Biol. Chem. 258: 11571–11575, 1983) Expressionsvektoren, die ein HSV-1 tk-Strukturgen enthalten, und sie sind Derivate von pBR322. Restriktionskarten von pHETK1 und pHETK2 können in Waldman et al., J. Biol. Chem. 258: 11571–11575, 1983, gefunden werden, die die Konstruktion dieser Plasmide beschreiben. Plasmid pHETK2 enthält die λP_L - und λP_R -Promotoren, ampR und den cl857 temperaturempfindlichen Repressor, wohingegen pHETK1 alle der oben genannten mit Ausnahme des λP_L -Promotors enthält. Die Plasmide pHETK1 und pHETK2 wurden von Dr. William Summers (School of Medicine, Yale University, New Haven) erhalten.

[0143] Um pMDC und pMCC zu konstruieren, wurde zuerst ein Dummy-Vektor, bezeichnet als pKTPD, konstruiert, wie von Dube et al. in Biochem. 30: 11760–11767, 1991, beschrieben. Kurz gesagt wurden die Oligonukleotide SEQUENCE ID. Nos. 4 und 5 (jeweils 20 pmol) zuerst phosphoryliert und dann aneliert, um ein doppelsträngiges Oligonukleotid mit KpnI- und SstI-kompatiblen Enden und mit einer internen XhoI-Stelle auszubilden. Zusätzlich wurde pHETK2 mit SstI- und KpnI-Restriktionsendonukleasen verdaut und die zwei großen Fragmente durch Agarosegelelektrophorese und nachfolgende Elektroelution isoliert. Zwei Picomol des großen Fragmentes wurden mit 6 pMol des doppelsträngigen Oligonukleotids ligiert. Das sich ergebende doppelsträngige zirkuläre DNA-Produkt (bezeichnet als „pKTPD“) wurde verwendet, um kompetente E. coli KY895-Zellen zu transformieren. E. coli KY895 ist ein TK-defizienter Stamm (K12 tdk⁻, F⁻, ilv 276), der von William Summers, Yale University, New Haven, CT, erhalten wurde. Klone, die das rekombinante Plasmid pKTPD enthalten, wachsen auf LB-Platten, die 50 µg/ml Carbenicillin enthalten. Die Anwesenheit von rekombinanter Plasmid-DNA wurde verifiziert durch die Spaltung an der XhoI-Stelle. Die Unfähigkeit von pKTPD, das Wachstum von E. coli KY895 in dem Thymidinkinase-Selektionsmedium zu unterstützen, zeigt an, dass es keine funktionelle Thymidinkinase produziert.

[0144] pHETK1 und pKTPD wurden dann verwendet, um einen neuen chimären Dummy-Vektor zu konstruieren, der als pMDC bezeichnet wird. Kurz gesagt wird nach Verdau mit SphI und PvuII pHETK1 in zwei Fragmente gespalten. Das größere Fragment enthält ampR, cl857, λP_R -Sequenzen und teilweise das tk-Gen, das sich von der BamHI bis zur SphI-Stelle erstreckt. Das kleinere Fragment enthält den Rest des tk-Gens von SphI bis PvuII. In ähnlicher Weise wird pKTPD nach Verdau mit den gleichen zwei Enzymen in ein größeres und ein kleineres Fragment gespalten. Das kleinere SphI/PvuII-Fragment von pKTPD enthält eine Dummy- oder inaktive Sequenz innerhalb der KpnI- und SacI-Stellen des tk-Gens. Die Ligation des größeren Fragmentes von pHETK1 mit dem kleineren Fragment von pKTPD führt zu einem chimären Vektor, pMDC, der ein inaktives tk-Genprodukt produziert.

[0145] Ein weiterer chimärer Vektor, pMCC, der das Wildtyp-tk-Gen enthält, wurde in ähnlicher Weise durch Ligieren des größeren Fragmentes von pHETK1 mit dem kleineren Fragment von pHETK2 konstruiert. Wie oben festgehalten produziert pMCC aktive Wildtyp-TK.

b. Erzeugen einer Bibliothek

[0146] Eine Bibliothek, die 20% Zufallsnukleotidsequenzen enthält, wurde wie folgt konstruiert. Kurz gesagt wurde ein 52-mer Oligo, das Wildtypsequenzen (SEQUENCE ID. No. 2) enthält, mit einem 56-mer Oligo hybridisiert, das degenerierte Sequenzen enthielt, die sich über die Codons 165 bis 175 erstrecken (SEQUENCE ID. No. 3).

[0147] Das Hybrid wurde mit dem Klenow-Fragment der E. coli-DNA-Polymerase I verlängert, um ein vollständiges doppelsträngiges DNA-Produkt zu produzieren. Die Strategie wurde implementiert, um die Synthese einer langen Zufallsnukleotid-enthaltenden SEQUENCE ID. No. 3 zu vermeiden, da die Orte der KpnI- und SacI-Stellen (Insertionsstellen) in dem Vektor eine lange Kasette erforderlich machen. Das Klenow-Fragment erzeugte doppelsträngige DNA, die dann einer Polymerase-Kettenreaktionsamplifikation unterzogen wurde unter Verwendung von zwei synthetischen Primern. Der erste Primer, a: 5'-TGG GAG CTC ACA TGC CCC GCC-3' (SEQUENCE ID. No. 6) entspricht der 21-Basensequenz des 5'-Terminus des Oligos SEQUENCE ID. No. 2. Der zweite Primer, b: 5'-ATG AGG TAC CG-3' (SEQUENCE ID. No. 7) entspricht der 11-Basensequenz des 5'-Terminus von Oligo SEQUENCE ID. No. 3. Die Polymerase-Kettenreaktionsamplifikationsreaktionen enthielten 20 mM Tris-HCl (pH 8,3), 25 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ und 0,05% Tween 20, 0,1 mg/ml BSA, 50 µM

von einem jeden der vier Desoxynukleosidtriphosphate, 20 pMol von Primer „a“, 40 pMol von Primer „b“, etwa 1 pMol des verlängerten doppelsträngigen Oligonukleotids als Matrix und 2 Einheiten Taq-Polymerase (Cetus) in 100 µl Endreaktionsvolumina. Eine jede Mischung wurde mit Mineralöl überschichtet und 30 Runden einem Temperaturzyklus unterzogen: 94°C für 1 Minute, 34°C für 2 Minuten und 72°C für 7 Minuten.

[0148] Niedermolekulare Bestandteile und überschüssige Primer wurden von dem Polymerase-Kettenreaktions-amplifizierten Produkt durch Zentrifugation mit einer Centricon 30 Ultrafiltrationseinheit entfernt und die amplifizierte DNA wurde mit KpnI und SacI verdaut.

[0149] Das vedaute doppelsträngige Oligonukleotid, das die Zufallssequenz enthielt, wurde erneut mit einer Centricon 30-Einheit gereinigt und mit dem KpnI/SacI verdauten großen Fragment von pMDC bei einem molaren Verhältnis von 10:1 in Gegenwart von 1 mM ATP und 1 Einheit T4-DNA-Ligase (BRL) in einem Volumen von 10 µl ligiert. Die Inkubation erfolgte für 18 Stunden bei 14°C und die Reaktion wurde durch Phenol-CHCl₃-Extraktion beendet, gefolgt von Ethanolpräzipitation.

c. Selektion von TK-Mutanten

[0150] Das oben beschriebene Präzipitat wurde getrocknet und in 10 µl Wasser gelöst und dann verwendet, um kompetente E. coli KY895 durch Elektroporation zu transformieren. Ein µl ligiertes Produkt wurde mit 50 µl kompetenten Zellen gemischt und bei 2 KV, 25 µF und 400 Ohm mit einem Gene-pulser Elektroporator (Bio-Rad) elektroporiert. Nach dem Puls wurde 1 ml SOC-Medium (2% Bacto-Trypton, 0,5% Bacto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 20 mM Glukose) hinzugegeben, gefolgt von Inkubation bei 37°C für 1,5 Stunden unter fortgesetztem Schütteln. Ein Aliquot einer jeden Transformationslösung wurde auf LB-Agarmedium verteilt, das 50 µg/ml Carbenicillin enthielt, um die Gesamtanzahl von Transformanten zu bestimmen. Die Selektion auf aktive TK-Klone wurde durchgeführt auf TK-Selektionsmedium, das 50 µg/ml Carbenicillin, 10 µg/ml 5'-Fluordesoxyuridin, 2 µg/ml Thymidin, 20 µg/ml Uridin, 2% BBL Pepton, 0,5% NaCl, 0,2% Glucose und 0,8% Gel-Rite enthielt (Scott Laboratories, Inc., Carson, CA) ([Fig. 1](#)). Kolonien auf Carbenicillin-Medium wurden bei 37°C für 14–16 Stunden inkubiert, wohingegen inokuliertes TK-Selektionsmedium bei 37°C für 24 Stunden inkubiert wurde.

[0151] Von insgesamt 53.000 Transformanten, die auf Carbenicillinmedium wuchsen, waren 190 in der Lage, E. coli KY895 hinsichtlich TK-Funktion zu komplementieren.

BEISPIEL 2

KONSTRUKTION VON TK-MUTANTEN, DIE MUTATIONEN AN DEN CODONS 165–175 ENTHALTEN UNTER VERWENDUNG EINER 100% ZUFALLSBIBLIOTHEK

[0152] Beispiel 2 beschreibt die Konstruktion von TK-Mutanten, die Mutationen an den Codons 165–175 enthalten unter Verwendung einer 100% Zufallsbibliothek. Die Strategie, die für dieses Beispiel verwendet wurde, ist ähnlich der, wie im Zusammenhang mit Beispiel 1 oben beschrieben.

A. Erzeugen von TK-Mutanten

1. Erzeugen von Oligonukleotiden

[0153] Ein 52-mer 5'-d(TG GGA GCT CAC ATG CCC CGC CCC CGG CCC TCA CCC TCA TCT TCG ATC GCC AT)-3' (SEQUENCE ID. No. 8) mit einer Wildtyp-tk-Sequenz und einer KpnI-Stelle an dem 5'-Ende wurde synthetisiert von Operon Technologies (San Pablo, CA). Zusätzlich wurde auch ein 56-mer synthetisiert, das Zufallsnukleotide enthielt, entsprechend den HSV-1-tk-Codons 165–175, und das eine SacI-Stelle an dem 3'-Ende enthielt, 5'-d(ATG AGG TAC CGN NNN NNA TGG CGA TCG AA)-3' (SEQUENCE ID. No. 3), wo N = äquimolare Konzentrationen von G, A, T oder C sind. Die Oligonukleotide wurden durch Elektrophorese durch ein 20% denaturierendes Polyacrylamidgel getrennt, gefolgt von Reinigung auf einer Umkehrphasen-Minisäule (Glen Research, Sterling, VA).

2. Erzeugen einer 100% Zufallssequenz-enthaltenden Bibliothek

[0154] Das 52-mer, entsprechend der Wildtyp HSV-1-tk-Sequenz, wurde mit dem 56-mer hybridisiert, das Zufallsnukleotide enthielt. Das Hybrid wurde dann mit dem Klenow-Fragment von DNA-Polymerase I verlängert, PCR-amplifiziert und in pMDC ligiert, im Wesentlichen wie oben in Beispiel 1 beschrieben.

3. Selektion von TK⁺-Mutanten

[0155] Funktionale TK-Mutanten wurden identifiziert durch Koloniebildung auf TK-Selektionsmedium auf der Grundlage ihrer Fähigkeit, dT zu phosphorylieren, im Wesentlichen wie unten beschrieben. Kurz gesagt wurde das ligierte Produkt in tk⁻ E. coli-Stamm KY895 eingeführt. Die Gesamtanzahl von Transformanten wurde bestimmt durch Ausplattieren auf LB-Agar, der 50 µg Carbenicillin pro ml enthielt und die Anzahl der Transformanten, die katalytisch aktive Thymidinkinase produzierten, durch Ausplattieren auf TK-Selektionsmedium bestimmt [2% BBL Pepton, 0,5% NaCl, 0,2% Glucose, 0,8% Gel-Rite (Scott Laborstories, Carson, CA)], 50 µg 1 ml Carbenicillin, 10 µg/ml Fluorodesoxyuridin, 2 µg/ml dT und 20 µg/ml Uridin.

[0156] Zwei Millionen (2×10^6) Transformanten wurden aus der 100% Zufallsbibliothek gescreent, von denen 1540 Kolonien auf dem TK-Selektionsmedium bildeten.

B. Selektion von AZT-empfindlichen Mutanten

[0157] Eine Untergruppe von 96 Mutanten aus der 100% Zufallsbibliothek (TKI) und 190 Mutanten aus der 20% degenerierten Bibliothek (TKF) (in Beispiel 1 oben beschrieben) wurden einer zweiten Negativselektion auf Medium unterzogen, das AZT enthielt, um Mutanten zu identifizieren, die erhöhte Phosphorylierung von AZT zeigten. Dieser Screen basiert auf der Prämisse, dass Mutanten mit erhöhter Fähigkeit AZT relativ zu dT zu phosphorylieren, nicht in der Lage sein würden, Kolonien auf dem AZT-Selektionsmedium zu bilden. Insbesondere würde das Produkt, AZT-Monophosphat weiter phosphoryliert werden durch die nicht spezifischen Nukleotidkinasen der Wirtszelle oder möglicherweise durch die mutierte TK, in bakterielle DNA durch Wirts-DNA-Polymerasen eingebaut werden, DNA-Synthese terminieren und somit die Replikation des Wirtschromosoms verhindern.

[0158] Kurz gesagt wurden TK-Mutanten zuerst als Einzelkolonien auf TK-Selektionsmedium (1,0 µg/ml dT) angezogen und dann replikuplatiert auf AZT-Selektionsmedium (0,05 µg/ml AZT, 1,0 µg/ml dT). Alle anderen Bestandteile des AZT-Selektionsmediums waren die gleichen wie bei dem TK-Selektionsmedium. Diejenigen TK-Mutanten, die nicht auf dem AZT-Selektionsmedium wuchsen, wurden ausgewählt und erneut auf Wachstum auf sowohl TK- als auch AZT-Selektionsmedium separat getestet.

[0159] Von den 880 primären Selektanten, die gescreent wurden, bildeten nur zwei Mutanten, TKF 105 (aus der 20% Bibliothek) und TKI 208 (aus der 100% Bibliothek), Kolonien auf TK-Selektionsmedium mit einer Wirksamkeit ähnlich der von E. coli, der das Wildtypplasmid enthält, aber nicht auf dem AZT-Selektionsmedium ([Fig. 2](#)).

[0160] Die Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenzen von TKF 105 und TKI 208 sind in [Fig. 3](#) dargestellt. Beide Mutanten enthalten eine einzelne Aminosäuresubstitution an der gleichen Position: Leu-170 wurde zu Ile in TKF 105 und zu Val in TKI 208 geändert. Keine anderen Substitutionen wurden in den umgebenden 220 Nukleotiden gefunden.

[0161] Um zu gewährleisten, dass der Unterschied zwischen TKF 105 und TKI 208 nicht auf differentieller Expression von TK in E. coli beruhte, der Mutanten- und Wildtyp-Plasmide enthält, wurden Western Blots von Extrakten von Zellen, die entweder TKI 208 oder Wildtypplasmide enthielten, verglichen. Es wurde kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Menge oder elektrophoretischen Mobilität von immunreaktiven färbenden Proteinen beobachtet. Auch wurde die Geschwindigkeit der dT-Phosphorylierung pro mg Protein bestimmt und es wurde festgestellt, dass sie in Extrakten von E. coli, die TKI 208, TKF 105 und Wildtypplasmide enthielten, ähnlich waren.

[0162] Um zu zeigen, dass der Wachstumsverlust dieser zwei Mutanten auf AZT-Selektionsmedium auf erhöhter Phosphorylierung von AZT beruhte, wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

1. Geschwindigkeit der [³H]AZT-Aufnahme

[0163] Zuerst wurde die Geschwindigkeit der [³H]AZT-Aufnahme relativ zu [³H]dT in E. coli bestimmt, der Wildtyp- und Mutantenplasmide enthielt. Diese Studien zeigten an, dass E. coli, der AZT-empfindliche Mutanten TKF 105 und TKI 208 enthielt, eine 4-fache Erhöhung des Verhältnisses von AZT- zu dT-Aufnahme verglichen mit E. coli mit dem Wildtypplasmid aufwies.

2. Affinitätsreinigung von TK

[0164] Die Reinigung von Wildtyp- und Mutanten-TKs wurde durchgeführt mittels Affinitätschromatographie auf CH-Sepharose 4B (Pharmacia), die an p-Aminophenylthymidin-3'-Phosphat gekoppelt war. Kurz gesagt wurde roher Bakterienextrakt dreimal über eine Affinitätssäule mit einem Bettvolumen von 7 ml geführt. Die Säule wurde dann sequenziell gewaschen unter Verwendung von jeweils 30 ml Puffer A [0,1 M Tris HCl, pH 7,5/5 mM Dithiothreitol (DTT)/10% Glycerin], Puffer B (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5/0,5 M KCl/5 mM DTT/10% Glycerin) und Puffer A. TK wurde eluiert unter Verwendung eines linearen 60 ml-Gradienten von 0–600 μM dT in Puffer C (0,3 M Tris HCl, pH 7,4/50 mM KCl/10% Glycerin). Aktive Fraktionen wurden vereint und gegen dreimaligen Austausch von jeweils 2 Litern 50 mM Tris-HCl, pH 7,4/5 mM DTT/10% Glycerin dialysiert. Mit Ausnahme der letzten Dialyse enthielten alle obigen Puffer 50 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin und 2 $\mu\text{g/ml}$ von jeweils Pepstatin und Leupeptin.

3. Kinetiken der AZT-Phosphorylierung

[0165] Zweitens wurden die Kinetiken der AZT-Phosphorylierung durch die beiden Mutanten bestimmt. Kurz gesagt wurden Reaktionen in einem Endvolumen von 100 μl ausgeführt, das 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM ATP, 4 mM MgCl_2 , 2,5 mM DTT, 12 mM KCl, 0,18 mg/ml Rinderserumalbumin, 5% Glycerin, 0,08 μCi [^3H]AZT (Sigma), verschiedene Konzentrationen von nicht markiertem AZT (0–4,0 μM) und gereinigte Enzyme (4 bzw. 1,2 Einheiten für Wildtyp und TKI 208) enthielt. (Eine Enzymeinheit ist definiert als diejenige Menge, die 1,0 pMol dT zu TMP in 1 Minute unter den oben beschriebenen Bedingungen phosphorylieren kann.) Die Inkubation erfolgte bei $34^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ für 10 Minuten und die Reaktionen wurden durch Hinzugeben von 1,0 mM von nicht markiertem dT und Abkühlen auf Eis gestoppt. Die Hälfte der Reaktionsmischungen wurden auf eine DEAE-Zellulosescheibe (25 mm) pipettiert, in destilliertes Wasser eingetaucht (1 Minute), gefolgt von viermaligem Waschen in absolutem Alkohol. Die Menge an Radioaktivität, die auf der Scheibe adsorbiert war, wurde durch Szintillationspektroskopie bestimmt. K_m - und V_{max} -Werte wurden bestimmt unter Verwendung des Cleland SUBIN program (Cleland, Methods Enz. 63: 103–138, 1979). Die Werte für k_{cat} wurden berechnet unter Verwendung der Gleichung $V_{\text{max}} = k_{\text{cat}}[E]_0$, wobei $[E]_0$ = Gesamtenzymkonzentration ist. TK-Tests, worin Phosphorylierung von dT gemessen wurde, wurden durchgeführt in einem Endvolumen von 50 μl unter Verwendung von 0,3 μCi ([^3H -methyl]dT: 87 Ci/mmol: Amersham), verschiedenen Konzentrationen von nicht markiertem dT (0–4,0 μM) und 1,1 und 0,5 Einheiten TK für den Wildtyp bzw. TKI 208. Alle anderen Bestandteile in den Reaktionsmischungen und den Inkubationsbedingungen waren wie oben für die Phosphorylierung von AZT beschrieben.

[0166] Wie unten in Tabelle 1 gezeigt, zeigt die AZT-empfindliche Variante TKI 208 einen niedrigeren K_m (4,4 μM) verglichen mit dem des Wildtyps (8,5 μM). Durch Vergleichen des k_{cat}/K_m zwischen den beiden Substraten (AZT gegenüber dT) kann erkannt werden, dass TKI 208 AZT 2,3-fach wirksamer selektiv phosphoryliert als dT. Ähnliche vorläufige Experimente mit gereinigter TKF 105-TK zeigten auch einen niedrigeren K_m (3,7 μM) für AZT, aber ähnliche Werte für k_{cat}/K_m verglichen mit dem Wildtyp.

TABELLE I

FÄHIGKEIT VON WILDTPY- UND TKI 208-TKS, AZT UND DT ZU PHOSPHORYLIEREN

Phosphorylierung	K_m , μM	K_{cat} , s^{-1}	k_{cat}/K_m $\text{s}^{-1}, \text{M}^{-1}$	k_{cat}/K_m (AZT) k_{cat}/K_m (dT)
AZT				
Wildtyp	$8,46 \pm 1,3$	$3,6 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^3$	$1,7 \times 10^{-3}$
TKI 208	$4,40 \pm 0,43^*$	$3,0 \times 10^{-2}$	$6,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10^{-3}$
dT				
Wildtyp	$0,475 \pm 0,10$	1,21	$2,5 \times 10^6$	
TKI 208	$0,35 \pm 0,008$	0,56	$1,57 \times 10^6$	

C. Thermostabilitätsanalyse von mutierten TKs

[0167] Mutanten wurden hinsichtlich Thermostabilität im Wesentlichen wie unten beschrieben analysiert. Kurz gesagt wurden 25 μg eines jeden Extraktes in 0,3 ml 28 mM Tris-HCl, pH 7,5 enthaltend 0,28 mg/ml Rin-

derserumalbumin, 28 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml (jeweils) von Pepstatin und Leupeptin, bei 42°C für 0,5, 10, 20, 30 oder 40 Minuten präinkubiert. Zu jedem Zeitpunkt wurden 30 µl (2,5 µg) Aliquots auf Rest-TK-Aktivität in einem Gesamtreaktionsvolumen von 50 µl getestet, das 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM ATP, 4 mM MgCl₂, 2,5 mM DTT, 12 mM KCl, 0,18 mg/ml Rinderserumalbumin, 5% Glycerin und 1 µM [³H-methyl]dT (60 × 10³ dpm/pmol) enthielt. Inkubation erfolgte bei 34°C für 10 Minuten. Die Reaktion wurde abgestoppt durch Kühlen auf Eis und 25 µl wurden auf eine DEAE-Zellulosescheibe pipettiert. Wasch- und Testbedingungen für die Scheiben wurden wie für den AZT-Test oben beschrieben durchgeführt.

[0168] Die Testergebnisse von nicht fraktionierten Extrakten von TKF 2, TKF 56, TKF 75, TKF 446 und Wildtyp-TK sind in den [Fig. 4A–Fig. 4D](#) gezeigt. Eine der Mutanten, TKF 2, war thermostabiler bei 42°C als eine jede der anderen Mutanten oder der Wildtyp. Mit Ausnahme von TKF 2 wiesen alle der getesteten Mutanten, einschließlich des Wildtyps, Verhältnisse von Restaktivität nach Präinkubation mit 42°C verglichen mit 34°C von 0,05–0,30 auf: TKF 2 wies ein Verhältnis von 0,7 auf. TKF 2 enthält drei Aminosäuresubstitutionen: Pro-165 → His, Ala-167 → Ser und Ala-174 → Val ([Fig. 3](#)). TKF 75 enthielt eine Ala-167 → Ser-Substitution, TKF 56 eine Ala-174 → Val- und TKF 440 eine Pro-165 → Ala-Substitution auf. Die Thermolabilität der Mutanten TKF 56 und TKF 75 mit Ala-174 → Val- bzw. Ala-167 → Ser-Substitutionen war ähnlich der vom Wildtyp. Beide verloren > 80% ihrer Aktivität nach Inkubation für 5 Minuten bei 42°C. TKF 440 mit einem Pro-165 → Ala ist stabiler, war aber nicht so stabil wie TKF 2, die Dreifachmutante.

[0169] Zwei Arten von Experimenten wurden durchgeführt, um die Thermostabilität von TKF 2 zu verifizieren. Zuerst wurde TK-Protein von TKF 2 und dem Wildtypplasmid enthaltenden *E. coli* auf nahezu Homogenität durch Affinitätschromatographie gereinigt und wie oben beschrieben getestet. Wie zuvor ist der Verlust an Aktivität bei TKF 2 weniger als bei dem Wildtyp nach Präinkubation bei 42°C ([Fig. 4E](#)).

[0170] Zweitens wurden tk-Gene von TKF 2 und Wildtyp-TK in einen Vektor mit einem Promotor für T3-RNA-Polymerase transformiert. Genauer wurden die Vollängen-Bgl II-Pvu I-Fragmente von tk-Genen aus Wildtyp und TKF-2-Plasmiden isoliert und in den pBluescript SK⁺(Stratagene)-Vektor zwischen die SpeI- und EcoRI-Stellen mit der Verwendung eines synthetischen Linkers subkloniert. In-vitro-Transkription unter Verwendung des T3-Promotors wurde durchgeführt unter Verwendung des Promega-Transkriptionssystems. In-vitro-Translation wurde durchgeführt unter Verwendung eines Retikulozyten-Lysatsystems (Promega) entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Der Verlust an TK-Aktivität der in vitro synthetisierten Proteine von den Wildtyp- und TKF 2 tk-Genen als eine Funktion der Präinkubation bei 42°C ist in [Fig. 5](#) gezeigt. Das von TKF 2 codierte Protein verlor < 10% seiner Aktivität nach Präinkubation nach 45 Minuten. Im Gegensatz dazu verlor das durch das Wildtypgen codierte Protein > 80% seiner anfänglichen Aktivität. Das Ausmaß der Thermostabilität, die von dem in vitro synthetisierten TKF 2 gezeigt wurde, war ähnlich oder höher als die von Rohextrakten, die das ursprüngliche TKF 2-Plasmid enthielten. Für die SDS/PAGE-Analyse wurden die translatierten Produkte mit [³⁵S]Methionin markiert.

[0171] Ein Autoradiogramm der markierten Proteine nach SDS-PAGE ist in [Fig. 6](#) gezeigt. Der Pfeil zeigt die erwartete Größe von translatierten TKs an, wie beurteilt durch Molekülmassenstandards (Bio-Rad). Von diesem Autoradiogramm ist offenkundig, dass die Translationsprodukte als Doppelbanden wandern, von denen eine einem Protein mit 43 kDa entspricht, was in Übereinstimmung mit der berichteten Größe von HSV-1 TK ist, das in *E. coli* exprimiert wird. Die zweite Bande könnte bedingt sein durch den proteolytischen Abbau eines 32-Reste-Fragmentes am Amino-terminalen Ende, welches die TK-Aktivität der HSV-1-TK nicht nachweisbar ändert.

BEISPIEL 3

KONSTRUKTION UND ANALYSE VON TK-MUTANTEN MIT MUTATIONEN AN DEN CODONS 155 UND 161 UNTER VERWENDUNG EINER 20% ZUFALLSBIBLIOTHEK

[0172] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion und Analyse von TK-Mutanten, die an den Codons 155 und 161 bis 165 mutagenisiert sind. Bakterienstämme und Materialien, die in diesem Beispiel verwendet wurden, sind im Folgenden angegeben.

[0173] Bakterienstämme. *E. coli*-Stamm KY895 (F⁻, tdk⁻, 1-ilv), ursprünglich beschrieben von Igarashi et al. (Genetics 57: 643–654, 1967), wurde in dem genetischen Komplementationstest für Thymidinkinaseaktivität verwendet. *E. coli*-Stamm NM522 (F['] lacI^q Δ (lacZ)M15 proAB/supE thi Δ (lac pro-AB)Δ(hsdMS-mcrB)5(r_k⁻McrB⁻)) (NEB, Beverly, MA) wurde als ein Empfänger bei allen Subklonierungsexperimenten verwendet. Der Helferphage VCM13 (Stratagene, La Jolla, CA) wurde bei der Herstellung von Einzel-

strangphagen für das Sequenzieren verwendet.

[0174] Materialien. L-[³⁵S]Methionin/Cystein (spezifische Aktivität, 1140 Ci/mmol) für Proteinsynthesebestimmung und [methyl-³H]-Thymidin (spezifische Aktivität, 87 Ci/mmol) wurden von Amersham gekauft. Andere Radioisotope [[Seitenketten-2-³H]Acyclovir (spezifische Aktivität, 28,6 Ci/mmol) und [5-³H]-Desoxycytidin (spezifische Aktivität, 29 Ci/mmol)] wurden von Du Pont – New England Nuclear (Boston, MA) gekauft und [8-³H]-Ganciclovir (spezifische Aktivität, 22 Ci/mmol) und [methyl-³H]-3'-azido-3'-desoxythymidin (spezifische Aktivität, 14 Ci/mmol) wurden von Moravек (Brea, CA) gekauft. Restriktionsendonucleasen und T4-DNA-Ligasen wurden von New England Biolabs (NEB) gekauft. Promega (Madison, WI) war die Quelle für die in-vitro-Transkriptions- und Translationsreagenzien mit Ausnahme des Cap-Analogs, ⁷m(5')Gppp(5')G, das von NEB gekauft wurde. Oligonukleotide, die für das Sequenzieren und die Polymerase-Kettenreaktionsamplifikationen verwendet wurden, wurden von Operon (Alameda, CA) erhalten. Andere Chemikalien wurden von Sigma (St. Louis, MO) gekauft, sofern nicht anders angegeben.

A. Erzeugung von TK-Mutanten

1. Erzeugung von Oligonukleotiden

[0175] Zwei Oligonukleotide wurden von American Synthesis, Inc. (Pleasanton, CA) synthetisiert: MB110 (70mer) 5'-TGGGAGCTCA CATGCCCGC CC[CCG]GCCCT CACCCTCATC [TTCGACCGCC ATCC]ATCGC CGCCCTCTG-3' (SEQUENCE ID No. 9) und MB111 (38mer) 5'-ATGAGGTACC GCGCAGCTGG GTAGCACAGG AGGGCGGC-3' (SEQUENCE ID No. 10). Innerhalb dieser Oligonukleotide wurden Nukleotide in Klammern zu 80% Wildtyp-Nukleotid und 20% als die anderen drei Nukleotide synthetisiert.

[0176] Am 5'-Ende von MB 110 befindet sich eine SacI-Restriktionsstelle und am 5'-Ende von MB111 eine KpnI-Stelle. Diese Restriktionsstellen wurden verwendet in einem späteren Schritt nachdem die Zweitstrangsynthese erfolgte. Weiterhin wurde als eine interne Kontrolle eine PvuII-Stelle (stille Änderung) in MB 111 eingeführt, um die Einführung einer Zufallssequenzeinführung vor der Sequenzierung zu bestätigen. Zwölf Nukleotide am 3'-Ende eines jeden Oligonukleotids sind komplementär, um eine Hybridisierung der zwei Stränge miteinander zu erlauben. Ein jedes Oligonukleotid wurde einer Elektrophorese in einem 20% Acrylamidharnstoffgel unterzogen und durch UV-Schattengebung auf einer PEI-Zellulose TLC-Platte (Baker, Phillipsburg, NJ) visualisiert, wobei der Teil des Gels, der das Oligonukleotid mit der richtigen Größe enthielt, ausgeschnitten und das Oligonukleotid aus dem Gel in 0,5 M NH₄Ac/10mM MgOAc₂ über Nacht bei 37°C eluiert wurde. Das eluierte Oligonukleotid wurde dann Ethanol-präzipitiert und in Wasser suspendiert. Eine Messung bei OD₂₆₀ wurde vorgenommen und der Extinktionskoeffizient für ein jedes Oligonukleotid wurde verwendet, um die Konzentration zu bestimmen.

[0177] Äquimolare Mengen von MB 110 und MB 111 (25 pMol) wurden in einem geringen Volumen (20 µl) in 1 × Annelierungspuffer (10 × Annelierungspuffer = 70 mM Tris (pH 7,5)/60 mM MgCl₂/200 mM NaCl) für 5 Minuten bei 95°C anneliert, dann auf 65°C für 20 Minuten verschoben, gefolgt von langsamem Abkühlen auf Raumtemperatur. Zu den annelierten Oligonukleotiden (20 µl) wurden 2 µl 10 × Annelierungspuffer, 2,8 µl 10 mM dNTPs, 0,8 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT), 2,4 µl DNA-Polymerase I-Klenow-Fragment (5 Einheiten/µl) und H₂O hinzugegeben, um das Volumen auf 40 µl zu bringen. Die Mischung wurde bei 37°C für 30 Minuten, bei 65°C für 10 Minuten und schließlich bei Raumtemperatur für 10 Minuten gehalten. Die Verifizierung eines vollständig verlängerten radioaktiven Oligonukleotids wurde vorgenommen, indem die Proben einer denaturierenden Acrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie unterzogen wurden. Die Amplifikation der verlängerten Produkte wurde bestätigt unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion mit Taq-Polymerase (Stratagene). Die 100 µl-Reaktionen enthielten 20 mM Tris (pH 8,3)/25 mM KCl/1,5 mM MgCl₂/0,05% Tween 20) 0,1 mg/ml BSA/50 µM eines jeden der vier Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)/22 pMol PCR-Primer 1/20 pMol PCR-Primer 2/2 Einheiten Taq-Polymerase und 6 pMol des verlängerten Zufallsoligonukleotids; Primer 1 = 5' TGGGAGCTCACATGCCCGCC-3' (SEQUENCE ID No. 6) und Primer 2 = 5'-ATGAGGTACCG-3' (SEQUENCE ID No. 7). Ein Tropfen Mineralöl wurde zu einem jeden Röhrchen hinzugegeben, das in einen Thermocycler von Perkins Elmer-Cetus (Norwalk CT) gegeben wurde und für 30 Zyklen aus 95°C für 1 Minute und 34°C für 2 Minuten programmiert. Am Ende der 30 Zyklen wurden die Reaktionen bei 72°C 7 Minuten stehen gelassen und dann wurde der Cycler bei 4°C gehalten. Nach Bestätigung der Amplifikation durch 2% Agarosegelelektrophorese wurden die Produkt-enthaltenden Reaktionen vereinigt, präzipitiert und mit KpnI und SacI verdaut. Doppelte restringierte Fragmente wurden von einfach geschnittenen oder nicht geschnittenen Fragmenten auf nicht denaturierenden Acrylamidgelen unterschieden und das geeignete Fragment wurde ausgeschnitten und wie oben beschrieben isoliert.

2. Erzeugung einer Zufallssequenz-enthaltenden Bibliothek

[0178] Cäsiumchloridgradienten gereinigter pMDC („Dummy“-Vektor) wurde konstruiert, wie oben in Beispiel 1 beschrieben, mit KpnI- und SacI-Restriktionsendonukleasen verdaut und Gelisoliert aus einem 1% Agarose/1 × TBE-Gel unter Verwendung von GenClean II (Bio101, La Jolla, CA). Dieser Vektor wurde mit dem Gel-isolierten PCR-amplifizierten Zufallsfragment über Nacht bei 16°C mit 1 Einheit T4-DNA-Ligase ligiert.

3. Selektion von TK-Mutanten

[0179] Die ligierte Mischung wurde dann verwendet, um KY895 durch Elektroporation (BioRad Gene pulser, 2 kV, 25 µF, 400 Ω) zu transformieren. Kurz gesagt wurden die Zellen für die Elektroporation gemäß einem Protokoll vorbereitet, das von BioRad (Richmond, CA) bereitgestellt wird. Nach einem jeden Puls wurde 1 ml SOC (2% Bactotrypton/0,5% Hefeextrakt/10 mM NaCl/2,5 mM KCl/10 mM MgCl₂/10 mM MgSO₄/20 mM Glucose) zu der Kürette hinzugegeben und die Elektroporationsmischung in ein 25 ml-Falcon-Röhrchen mit einem Schnappdeckel überführt. Nachdem die Röhrchen für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt wurden, wurden die Zellen auf LB-Platten ausplattiert [pro Liter: 10 g Trypton/5 g Hefeextrakt/10 g NaCl (pH 7)], die Carbenicillin (50 µg/ml) enthielten, („LB+ carb⁵⁰-Platten“) und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Anzahl von Kolonien wurde gezählt, mit einem Zahnstocher aufgenommen und auf TK-Selektionsmedium ausgestrichen [2% BBL-Trypticase-Peptone (Becton Dickenson, Cockeysville, MD)/0,5% NaCl/0,8% Gel-Rite (Scott Laborstories, Carson, CA)/0,2% Glucose/50 µg/ml Carbenicillin/10 µg/ml 5'-Fluorodesoxyuridin/2 µg/ml Thymidin/12,5 µg/ml Uridin]. Die Basis dieser Selektion ist die, dass 5'-Fluorodesoxyuridin (FUdR) durch Thymidinkinase phosphoryliert wird, um FdUMP zu bilden, einen Inhibitor des de novo-Pathway-Enzyms, Thymidylatsynthase. Das Erfordernis für dTMP kann dann nur durch eine aktive Thymidinkinase erfüllt werden. Uridin wird hinzugegeben, um Thymidinphosphorylase zu inhibieren. Nach 16–24 Stunden wurden die TK-Selektionsplatten hinsichtlich Wachstum bewertet und alle Positiven gepickt und erneut auf TK-Selektionsplatten und LB + carb⁵⁰-Platten ausgestrichen, um den Phänotyp zu bestätigen.

[0180] Etwa 260 Zufallstransformanten wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, KY895, einen TK-defizienten *E. coli*, auf TK-Selektionsmedium zu komplementieren, gescreent. Von diesen waren 82 positiv und wurden sequenziert. Deshalb codierten etwa 32% aller Transformanten funktionale Enzyme.

B. Analyse von Mutanten

[0181] TK-Mutanten wurden isoliert und sequenziert wie folgt. Kurz gesagt wurde Mutanten-DNA aus Über-Nacht-Kulturen isoliert, die in 2 × YT (pro Liter: 16 g Trypton/10 g Hefeextrakt/5 g NaCl) + carb⁵⁰ angezogen wurden, unter Verwendung des Promega Magic miniprep Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers mit der Ausnahme, dass 3 ml Kultur pro Isolierung verwendet wurden infolge der niedrigen Kopienzahl des Plasmids. Zehn Mikroliter einer jeden dsDNA wurden Alkali-denaturiert, präzipitiert und in Sequenase-Reaktionspuffer, H₂O und Sequenzierungsprimer (5'-CATGCCTTATGCCGTGA-3') (SEQUENCE ID No. 11) resuspendiert. Der Primer wurde dann annealiert und die DNA einer Didesoxysequenzierung (Sanger et al., 1977) unter Verwendung von Sequenase gemäß den Anweisungen des Herstellers (USB, Cleveland, OH) unterzogen.

[0182] Elf der Klone codierten Wildtyp-Aminosäuresequenzen (13,4%), wobei sieben von diesen die Wildtyp-Nukleotidsequenz enthielten. Drei Klone mit den Wildtyp-Aminosäuresequenzen enthielten einzelne Nukleotidaustausche (alle verschieden) und einer enthielt drei Nukleotidaustausche. Wie in Tabelle IA unten gezeigt wurden insgesamt 49 TK-positive Klone identifiziert, die einzelne Aminosäureaustausche enthielten (59,8%). Neunzehn Doppelaminosäuremutationen (23,2%), zwei Dreifach- (2,4%) und ein Klon, der vier Aminosäureaustausche (1,2%) enthielt, wurden identifiziert. Innerhalb Tabelle IA sind Wildtyp HSV-I TK-Aminosäuren, die mutiert sind, in dem in Fettdruck umrandeten Feld angegeben, wobei die Restennummer und die Art des bei der Mehrzahl der Sequenzen gefundenen Restes angegeben ist [O = hydrophob; I = hydrophil; (+) = positiv geladen; (–) = negativ geladene Reste]. Unter den Wildtyp-Resten sind die Häufigkeiten einer speziellen Aminosäuresubstitution angegeben, die gefunden wurden. Im unteren Abschnitt sind die Prozentzahlen eines jeden gefundenen Restetyps angegeben.

[0183] Die Aminosäuresequenzen von Klonen mit Mehrfachänderungen sind in Tabelle IB gezeigt. Die Wildtyp-Aminosäuren und ihre Positionen in dem HSV-1 TK-Polypeptid sind oben in der Tabelle angegeben. Doppel-, Dreifach- und Vierfach-Aminosäuresubstitutionen sind in den entsprechenden Kategorien gezeigt. Wenn ein Satz von Mutationen mehr als einmal identifiziert wurde, ist die Anzahl des Auftretens links in Klammern angegeben.

TABELLE IA

Wildtyp-Sequenz	O P 155	O F 161	(-)I D 162	(+)I R 163	(+)I H 164	O P 165
Substitutionen an einer jeden Position	3L	4I	5E	5C	3N	3L
	2A	4Y	1G	1S	1T	2T
	2T	3C				2S
	1Q	2L				IN
	1R	1S				1A
Arten von Substitutionen	11% (+)	57% I	83% (-)I	100% I	100% I	10% (+)
	33% I	43% O	17% I			50% I
	56% O					40% O

TABELLE IB

Anzahl der Änderungen	P 155	F 161	D 162	R 163	H 164	P 165
Doppelt	A	V				
	Q	I				
	Q		E			
	R		E			
(4)	R		G			
	T		E			
(2)		I		H		
		I				R
		N				S
			Y	C		
			N		K	
(2)			E		N	
				P	Q	
					Q	L
	Q		E			L
Dreifach	A			P		T
Vierfach			N	S	N	A

C. Sekundärscreening und Subklonierung

[0184] Die Fähigkeit von pMCC (KY895) und 35 log-Phasen-Mutante pMDC (KY895)-Kulturen, Kolonien auf Acyclovir („ACV“) oder AZT-Platten zu produzieren, wurde in einem zweiten Screen wie unten beschrieben bestimmt. Kurz gesagt wurden log-Phasenkulturen von TK-positiven Klonen seriell in 0,9% NaCl verdünnt und auf Acyclovir- oder AZT-Platten verteilt (TK-Selektionsplatten mit Ausnahme von 1 µg/ml Thymidin + 1 µg/ml Acyclovir oder 0,05 µg/ml AZT). Mutantenkulturen wurden auch auf Doppel-TK-Selektion- und LB + cab⁵⁰-Platten ausgebreitet. Ein Satz von TK-Selektionsplatten und LB + carb⁵⁰-Platten wurden bei 42°C inkubiert. Alle anderen Platten wurde bei 37°C inkubiert. Nach 16–24 Stunden wurden die Platten bewertet.

[0185] Die Ergebnisse sind in Tabelle II unten angegeben. Kurz gesagt sind nur Mutanten gezeigt, die Ergebnisse ergaben, die sich von den beim Wildtyp pMCC (KY895) beobachteten unterschieden. Mutanten werden mit dem Wildtyprest und Positionsnummer, gefolgt von der Aminosäuresubstitution angegeben, die von der Nukleotidsequenz abgeleitet ist; z. B. zeigt F161I an, dass Isoleucin Phenylalanin am Rest 161 bei dieser speziellen Mutante ersetzt. (++) zeigt an, dass die gleiche Anzahl von Kolonien beobachtet wurde verglichen mit Kontrollplatten; (+) zeigt an, dass weniger (< 20% der mit pMCC beobachteten) und allgemein kleinere (~ 50% kleinerer Durchmesser) Kolonien beobachtet wurden verglichen mit Kontrollplatten; und (-) zeigt an, dass keine Kolonien beobachtet wurden.

TABELLE II

Klone	ACV	AZT	LB	37°C	42°C
pMCC (Wildtyp)	++	++	++	++	++
P155A/F161V	++	+	++	++	++
F161I	+	+	++	++	++
F161C	+	-	++	++	++
F161L	++	++	++	++	-
R163P/H164Q	+	+	++	++	-
F161I/R163H	++	++	++	++	+
pMDC	-	-	++	-	-

[0186] Wie in Tabelle II gezeigt, bildeten alle Kolonien auf Kontroll-TK-Selektions- und LB + carb⁵⁰-Platten. Im Vergleich zum Wildtyp schienen mehrere Mutanten ein oder beide Nukleosidanaloga bevorzugterweise gegenüber Thymidin zu verwenden (P155A/F161V, F161I, F161C und R163P/H164Q). Zusätzlich waren mehrere Mutanten nicht in der Lage, Kolonien auf TK-Selektionsplatten bei 42°C zu bilden (F161L und R163P/H164Q), und eine (F161I/R163H) zeigte eine gravierend verringerte Fähigkeit, Kolonien bei 42°C zu bilden.

D. Expression von mutierten Enzymen in einem zellfreien Translationssystem

1. Suklonierung von ausgewählten Mutanten

[0187] Um die Eigenschaften der mutierten TKs zu studieren, wurde das 1,07 kbp MluI-BssHII-Fragment von acht Mutanten in den in-vitro-Vektor pT7:HSVTKII subkloniert. Genauer wurden DNAs von ausgewählten Klonen mit MluI und BssHII restringiert, um ein 1,07 kbp-Fragment [Nukleotidnummern ~ 335 bis 1400 auf der McKnight Sequence (Nucl. Acids Res. 8: 5949–5964, 1980; der McKnight-Stamm wurde von dem mp-Stamm von HSV-1 abgeleitet, Wagner, PNAS 78: 1441–1445, 1981)] freizusetzen. Die Fragmente wurden Gel-isoliert aus 1% Agarosegelen unter Verwendung von GenCleanII und mit pT7:HSVTKII Vektor-DNA ligiert, die mit MluI und BssHII restringiert worden war, mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm behandelt und Gel-isoliert worden war. pT7:HSVTKII wurde von pT7:HSVTK-Transkriptionsvektor abgeleitet, der von Black und Hruby in J Biol. Chem. 267: 9743–9748, 1992, beschrieben wurde. Kurz gesagt unterscheidet sich pT7:HSVTKII von pT7:HSVTK nur durch den Verlust eines NcoI-BamHI-Fragmentes 3' zum Ende des HSV-1 tk-Gens, das ursprünglich verwendet wurde, um bei dem initialen Klonieren des tk-Gens zu helfen.

2. Sequenzanalyse

[0188] In der finalen Sequenzanalyse der acht Mutantenfragmente, die in den pT7:HSVTKII-Vektor subkloniert waren, wurden zwei zusätzliche Aminosäureunterschiede zwischen diesen tk-Genen identifiziert. Die Sequenz von pT7:HSVTKII ist genau die gleiche wie die von McKnight publizierte (Nuc. Acids Res. 8(24): 5949–5963, 1980). pMCC, das Eltern-Plasmid von pMDC und somit der Vektor, in den die Zufallssequenzen ligiert wurden, enthält zwei Aminosäureaberrationen gegenüber der McKnight-Sequenz. Diese befindet sich an Position 434 (C → T) und 575 (G → A) und führt zu einem Prolin-49 zu Leucin- und einem Arginin-89 zu Glutamin-Austausch. Deshalb enthalten alle Mutanten diese zwei Mutationen zusätzlich zu den beschriebenen. Zusätzlich wurde auch ein Einzelnukleotidunterschied an Position 480 (C → T) identifiziert, der aber nicht zu einem Aminosäureaustausch führt.

[0189] Da alle in-vitro-Analysen gegen pT7:HSVTKII als den Wildtyp verglichen wurden, wurde das MluI-BssHII-Fragment von pMCC in die korrespondierenden Stellen von pT7:HSVTKII (nun als pT7:MCC bezeichnet)

subkloniert und das nachfolgende Produkt der zellfreien Translation mit jenen verglichen, die von pT7:HSVTKII abgeleitet wurden. Zeitverlauf und Thermostabilitätsanalysen zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen pP7:HSVTKII- und pT7:MCC-abgeleiteten Translationsprodukten. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Phosphorylierungseffizienz zwischen pT7:MCC und pT7:HSVTKII beobachtet, wenn Thymidin (1,3-fach), Desoxycytidin (1,3-fach), GCV (0,8-fach), ACV (0,95-fach) oder AZT (1,1-fach) als Substrat verwendet wurden. Weiterhin berichteten Sanderson et al. (J. Mol. Biol. 202: 917–919, 1988), dass der K_m für Thymidin und ATP und die V_{max} von TK, die aus *E. coli*, der pHETK2 enthält (das Elternplasmid von pMCC), und HSV-1-infizierten Zellen gereinigt waren, nicht unterscheidbar waren. Deshalb können die bei den Eigenschaften der Mutanten-TKs beobachteten Änderungen den Nukleotidsubstitutionen innerhalb der Zielregion zugeschrieben werden und dass jegliche Unterschiede zwischen den Vektoren (pT7:MCC und pT7:HSVTKII) nur geringfügige Änderungen in den katalytischen Eigenschaften ausübten.

3. In-vitro-Transkription und -Translation

[0190] Die oben beschriebenen Transkripte wurden dann in einem zellfreien Translationssystem von Kaninchen-Retikulozytenlysat verwendet, um aktive Enzyme zu synthetisieren. Die zellfreie Translation wurde gemäß Promega durchgeführt unter Verwendung von Nukleasebehandelten Kaninchen-Retikulozytenlysaten.

[0191] Die Expression von Vollängenproteinen wurde analysiert, indem ^{35}S -radiomarkierte zellfreie Translationsprodukte SDS-PAGE und Autoradiographie unterzogen wurden. Kurz gesagt wurde 1 μl einer jeden radiomarkierten mutierten mRNA, die aus zellfreier Translation in vitro abgeleitet wurde, einer SDS-enthaltender Polyacrylamid (12%)-Gelelektrophorese unterzogen. Ein Autoradiogramm dieses Gels ist in [Fig. 7](#) gezeigt. Die erste Spur enthält ^{14}C -markierte Regenbogenmolekulargewichtsmarker (Amersham), wobei das apparente Molekulargewicht ($\times 10^{-3}$) auf der linken Seite angegeben ist. Die zweite Spur entspricht einer zellfreien Translation, die in Abwesenheit irgendeiner hinzugegebenen mRNA durchgeführt wurde. Die dritte Spur entspricht dem Wildtyp pT7:HSVTKII-mRNA-Translatiortsprodukt. Alle anderen Spuren enthielten Translationsprodukte der mutierten mRNAs, die wie oben beschrieben produziert wurden. Wie aus [Fig. 7](#) ersichtlich, wandert das radiomarkierte Haupttranslationsprodukt von einem jeden Mutantentranskript während der Elektrophorese als ein ~ 43 kDa Protein mit der gleichen elektrophoretischen Mobilität wie bei Translationsprodukten von Wildtyp-pT7:HSVTKII-Transkripten beobachtet.

[0192] Um das Ausmaß an Proteinsynthese für eine jede Translation zu quantifizieren, wurde eine Bestimmung von Trichloressigsäure-präzipitierbaren Zählern von einer jeden der gleichen Proben dreifach durchgeführt. Die Menge an Säure-präzipitierbaren Zählern läuft in etwa parallel mit der Bandenintensität einer jeden Mutante in [Fig. 7](#).

E. Zeitverlaufsanalyse von Mutanten-Enzymen

[0193] Auf der Grundlage von TK-Aktivitäten wurden Mutanten-TKs in zwei Untergruppen eingeteilt: (1) hochaktive Mutanten (P155A/F161V, F161I, F161C und D162E); (2) Niederaktivitätsmutanten (F161I/R163H, F161L, D162G und R163P/H164Q). Für die Hochaktivitäts-Mutantenenzyme wurden nicht markierte Translationsprodukte 1/9 verdünnt und für 0, 5, 10, 10 oder 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in [Fig. 8A](#) gezeigt. Die TK-Aktivitätsergebnisse (Zähler pro Minute) wurden eingestellt, um äquivalente Proteinsyntheseniveaus wiederzugeben, unter Verwendung der entsprechenden TCA-präzipitierbaren Zähler (^{35}S cpm). Zwei der Mutanten (F161I und P155A/F161V) zeigten eine statistisch höhere Affinität für Thymidin als die Wildtyp-TK. Standardabweichungen von F161C- und D162E-Aktivitäten (Ergebnisse nicht gezeigt) zeigen keine Unterschied hinsichtlich der Aktivitäten verglichen mit den Wildtyp-TK-Enzymaktivitäten.

[0194] Die Niedrigaktivitätsmutanten wurden 1/5 verdünnt und die Geschwindigkeit der Phosphorylierung als eine Funktion der Zeit ebenfalls bestimmt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in [Fig. 8B](#) gezeigt. Die Zeitverlaufsanalyse zeigt an, dass die meisten der Mutanten weniger als 10% Wildtypaktivität aufwiesen. Eine, F161L, zeigte jedoch eine moderate Fähigkeit, Thymidin zu phosphorylieren, gleichwohl bei einer stark verringerten Geschwindigkeit von HSVTKII.

F. Thermostabilitätstests

[0195] In den Tests für Koloniebildung auf TK-Selektionsplatten waren mehrere Mutanten nicht in der Lage, KY895 bei 42°C zu komplementieren, was vorschlägt, dass diese Mutanten-TKs temperaturempfindlich waren. Um diese Beobachtung zu erhärten, wurden Produkte einer zellfreien Translation bei 42°C für zunehmende Zeiten inkubiert, bevor sie auf Enzymaktivität getestet wurden. Kurz gesagt wurden Produkte aus zellfreier

Translation ("CFT") von einer jeden Hochaffinitätsmutante, -RNA und HSVTKII-Proben 1/9 verdünnt und für 0, 5, 10 und 20 Minuten bei 42°C inkubiert. Die vorinkubierten Proben wurden dann für 5 Minuten (P155A/F161V und F161I) oder 20 Minuten (-RNA, HSVTKII, F161C und D162E) getestet. Die Prozent verbleibender Aktivität wurden bestimmt, wobei die nicht behandelten Proben auf 100% gesetzt waren. Wie in [Fig. 9A](#) gezeigt, zeigten mit Ausnahme von F161C alle Hochaffinitätsmutanten Thermostabilitäten ähnlich wie HSVTKII nach 42°C-Präinkubationsphasen von so lange wie 60 Minuten (Ergebnisse nicht gezeigt). Da F161C mehr als 90% Enzymaktivität innerhalb der ersten 20 Minuten bei 42°C verlor, wurden kürzere Inkubationszeiträume bei 42°C durchgeführt (0, 5, 10 und 20 Minuten). F161C war außergewöhnlich thermolabil und zeigte einen ~ 85%-igen Aktivitätsverlust nach nur 5 Minuten bei 42°C.

[0196] Niederaktivitätsmutanten-CFT-Produkte wurden 1/5 verdünnt und für 0, 20, 40 oder 60 Minuten bei 42°C inkubiert. Die präinkubierten Proben wurden dann dreifach hinsichtlich Thymidinphosphorylierung für 60 Minuten getestet. Die Prozent verbleibender Aktivität wurden bestimmt unter Verwendung der nicht behandelten (Zeit 0) Probe als 100%. Wie in [Fig. 9B](#) gezeigt, war für die Niederaktivitätsmutanten-Untergruppe ein Translationsprodukt (F161L) thermolabiler als HSVTKII. Andere in diesem Satz (R163P, F161I/R163H, H164Q und D162G) waren äquivalent zu HSVTKII.

G. Substratspezifitätstests

[0197] Drei der Mutanten (P155A/F161V, F161I und F161C) wurden dreifach getestet hinsichtlich der relativen Phosphorylierungsniveaus unter Verwendung von Thymidin, Desoxycytidin, ACV, GCV oder AZT als Substrate. Kurz gesagt wurden achtundvierzig Mikromol eines jeden mit Tritium versehenen Substrates in einer jeden Testreaktion verwendet. Translationsprodukte wurden für einen jeden Nukleosidtest wie folgt verdünnt (Translation/H₂O): 1/100, Thymidin; 2/3, Desoxycytidin, GCV und AZT; 4/1, ACV. Ein jeder Testsatz wurde für 2 Stunden bei 30°C inkubiert und die Menge an phosphoryliertem Produkt bestimmt.

[0198] Die Zähler pro Minute von einem jeden Testsatz wurde angepasst und wie in [Fig. 10](#) aufgetragen. Kurz gesagt zeigten sowohl P155A/F161V und F161I eine erhöhte Fähigkeit, Thymidin relativ zu HSVTKII zu phosphorylieren, nämlich 2,6- bzw. 2,2-fach. Die Phosphorylierung von Desoxycytidin durch die Mutantenzyme reichte von 1,9- bis 2,8-fach gegenüber dem Wildtyp-Enzym (F161I, 1,9-fach; F161C, 2,8-fach; P155A/F161V, 2,8-fach). Zwei Mutanten schienen eine erhöhte Stabilität miteinander aufzuweisen, um ACV zu phosphorylieren (2,4- und 2-fach über HSVTKII durch F155A/F161V bzw. F161C. Alle Mutanten zeigten in etwa Wildtyp-Niveaus bei AZT-Phosphorylierung. Alle getesteten Mutanten schienen eine große Erhöhung der GCV-Phosphorylierung um das 3,9- bis 5,2-Fache verglichen mit Wildtyp-Phosphorylierungsniveaus miteinander zu teilen.

BEISPIEL 4

ANALYSE VON TK-MUTANTEN MIT GEÄNDERTEN KATALYTISCHEN WIRKSAMKEITEN

[0199] Um Mutanten mit geänderter katalytischer Aktivität zu identifizieren, wurden 190 der in Beispiel 1 isolierten TK-Mutanten (TKF) in den unten angegebenen Tests analysiert.

A. Koloniebildungsfähigkeit als eine funktionelle Thymidinaufnahme

[0200] Der Proteingehalt der gereinigten Enzyme wurde abgeschätzt durch eine Modifikation des Bio-Rad-Proteinassays. Eine Standardkurve wurde erstellt unter Verwendung von BSA und 25 µl Bio-Rad-Reagens in einem Endvolumen von 125 µl. Die Proteinmenge wurde bestimmt durch Messen der OD bei 595 nm und Vergleich mit der von BSA.

[0201] Um Mutanten mit geänderter TK-Aktivität zu identifizieren, wurde ein sekundäres Screeningprotokoll konzipiert auf der Grundlage der Fähigkeit der Mutanten, auf Medium zu wachsen, das unterschiedliche Konzentrationen an Thymidin enthält (Tabelle 1). Kurz gesagt wurde gefunden, dass 1,0 und 10,0 µg/ml die Minimum- und Maximum-Konzentrationen von Thymidin in dem Medium sind, die das Wachstum von *E. coli* unterstützen, der das Wildtyp tk-Plasmid enthält. Da *E. coli*, der das Wildtyp-Plasmid enthält, nicht in der Lage ist, sichtbare Kolonien auf TK-Selektionsmedium zu erzeugen, das wenig Thymidin enthält (0,05 µg/ml), wurde postuliert, dass das Wachstum bei dieser Thymidinkonzentration eine Anzeige für Mutanten mit einer erhöhten Fähigkeit ist, Thymidin zu phosphorylieren. Entsprechend wurden 0,05 µg/ml Thymidin verwendet, um Varianten mit hoher TK-Aktivität zu selektieren und 20 µg/ml Thymidin für Varianten mit niedriger Aktivität.

[0202] Tabelle I unten zeigt die Fähigkeit ausgewählter Mutanten, funktionelle tk--*E. coli* KY 895 als eine

Funktion einer sich erhöhenden Thymidinkonzentration zu komplementieren. Wenn alle 190 TK-Varianten und der Wildtyp einem Screening unterzogen wurden, bildete bei den in Tabelle I angegebenen Thymidinkonzentrationen nur TKF 36 Kolonien bei der niedrigsten, getesteten Thymidinkonzentration (0,05 µg/ml). Andererseits wuchs nur TKF 41 bei der höchsten Thymidinkonzentration im Medium. Alle anderen 188 Mutanten und der Wildtyp bildeten sichtbare Kolonien auf Medium, das 1 µg/ml Thymidin enthielt.

TABELLE I

KOLONIEBILDUNGSFÄHIGKEIT VON TK- -E. COLI KY895, TRANSFORMIERT MIT WILD-TYP- UND MUTANTEN-PLASMIDEN, ALS EINE FUNKTION DER THYMIDINKONZENTRATION

Mutante	Thymidinkonzentration (µg/ml) ^a				
	0,05	1	2	10	20
Wildtyp	- ^a	+ ^a	+	± ^b	-
TKF 36	+	+	+	±	-
TKF 41	-	-	+	+	+ ^c
TKF 52	-	+	+	+	-
TKF 99	-	+	+	+	-
TKI 208 ^d	-	+	+	+	-

Koloniebildung wurde nach Inkubation bei 37°C für 24 Stunden bestimmt.

^a+ und – gibt die Fähigkeit oder Unfähigkeit von E. coli an, der verschiedene Plasmide enthält, sichtbare Kolonien auf dem angegebenen TK-Selektionsmedium zu bilden.

^b± zeigt initiales Zellwachstum an: Zelltod war apparent nach Inkubation für 20 Stunden und kann auf dem durch exzessive Phosphorylierung von Thymidin in den Mutanten- und Wildtyp-Klonen erzeugten Nukleotidpool-Ungleichgewicht beruhen.

^c Da TKF 41 ein Klon mit sehr niedriger Aktivität zu sein schien, war die Überexpression dieser Mutanten-TK für das Überleben von E. coli auf TK-Selektionsmedium erforderlich. pMCC- und pMDC-Expressionsvektoren weisen ein temperaturempfindliches Regressorgan c1857, das bei 42°C inaktiv wird und es kommt somit zu reiner Überexpression von TK und nachfolgend zum Zelltod. Um eine kontrollierte Expression zu erhalten, wurde ein Screening bei 37°C durchgeführt. TKF 41 enthaltender E. coli wurde jedoch bei 42°C auf 20 µg/ml Thymidin-enthaltendem TK-Selektionsmedium inkubiert.

^d TKI 208 wurde aus der oben in Beispiel 2 beschriebenen Bibliothek erhalten.

B. Sequenzanalyse von Klonen mit hoher und niedriger Aktivität

[0203] Wildtyp-tk und ausgewählte Mutanten wurden wie oben in Beispiel 2 beschrieben sequenziert. Tabelle II zeigt die Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Wildtyp-tk- und ausgewählten Mutanten für die Codons 165 bis 175. Kurz gesagt enthält TKF 36, die Mutante, die auf dem Medium mit geringem Thymidin Kolonien bildet, nur eine einzelne Aminosäuresubstitution (Ala168 → Ser), wohingegen TKF 41 vier Substitutionen enthielt: Pro165 → Ser, Ala167 → Gly, Leu170 → Gln und Ala174 → Val. Interessanterweise wies TKF 52 unterschiedliche Aminosäuresubstitutionen (Ala168 → Thr) an der gleichen Position auf wie TKF 36, ist aber nicht in der Lage, Kolonien auf Medium mit geringem Thymidingehalt zu bilden. TKF 99 enthält zwei Aminosäuresubstitutionen (Cys171 → Leu und Ala 174 → Thi). TKI 208 weist eine einzelne Nukleotidsubstitution auf, die zu einer Leu170 → Val-Substitution führt.

TABELLE II

NUKLEOTID- UND ABGELEITETE AMINOSÄURESEQUENZEN DER WILDTYP- UND MUTANTEN-TK-ENZYMEN IN DER ZIELREGION

	165 ^a	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	SEQ ID
Wildtyp	ccc	atc	gcc	gcc	ctc	ctg	tgc	tac	ccg	gcc	gcg	12
	pro	Ile	Ala	Ala	Leu	Leu	Cys	Tyr	Pro	Ala	Ala	13
TKF36	ccc	atc	gcc	Tcc	ctc	ctg	tgc	tac	ccg	gcc	gcg	14
	Pro	Ile	Ala	SER	Leu	Leu	Cys	Tyr	Pro	Ala	Ala	15
TKF41	Tcc	atc	gGc	gcc	ctA ^b	cAG	tgc	tac	ccg	gTc	gcg	16
	SER	Ile	GLY	Ala	Leu	GLN	Cys	Tyr	Pro	VAL	Ala	17
TKF52	ccc	atc	gcc	Acc	ctc	ctg	tgc	tac	ccg	gcc	gcg	18
	Pro	Ile	Ala	THR	Leu	Leu	Cys	Tyr	Pro	Ala	Ala	19
TKF99	ccc	atc	gcc	gcc	TtA	ctg	tTA	tac	ccg	Acc	gcg	20
	Pro	Ile	Ala	Ala	Leu	Leu	LEU	Tyr	Pro	THR	Ala	21
TKI208	ccc	atc	gcc	gcc	ctc	Gtg	tgc	tac	ccg	gcc	gcg	22
	Pro	Ile	Ala	Ala	Leu	VAL	Cys	Tyr	Pro	Ala	Ala	23

^a zeigt die Codonnummer der Zielregion, die degeneriert war. Die Wildtyp-Nukleotid- und Aminosäuresequenzen sind unter der Codonnummer gezeigt.

^b Die stillen Mutationen. Keine anderen Nukleotidaustausche wurden in der sequenzierten Region (die die Codons 140–182 überspannt) beobachtet. Eine jede Matrize wurde zweimal sequenziert.

[0204] Substituierte Nukleotid- und Aminosäurereste sind in fetten Großbuchstaben gezeigt.

C. Thymidinaufnahme in E. coli, der Wildtyp- und Mutanten-TK-Plasmide enthält

[0205] Um das tatsächliche Ausmaß an Thymidinaufnahme in E. coli zu bestimmen, der Wildtyp- oder Mutanten-Plasmide enthält, wurden die folgenden Tests durchgeführt.

1. [Methyl-³H]Thymidinaufnahmetest

[0206] [Methyl-³H]Thymidinaufnahme in E. coli, der Wildtyp- oder Mutantenplasmide enthält, wurde im Wesentlichen wie folgt bestimmt. Kurz gesagt wurden Über-Nacht-Kulturen von E. coli, der pMDC (inaktive TK), ein Plasmid, das Wildtyp-TK, oder TK36 enthält, 1:100 mit LB-Medium verdünnt, das 100 µg/ml Carbenicillin enthält, auf 0,1 OD bei A₅₅₀ angezogen, auf 37°C verschoben und unter kräftigem Schütteln inkubiert. Nachdem eine OD von 1,0 erreicht wurde, wurde die Kultur auf Raumtemperatur (~ 25°C) gebracht und Thymidin wurde zu 1,0 ml Aliquots bei einer Endkonzentration von 0,21 µM (0,16 µCi [Methyl-³H]Thymidin) hinzugegeben. Nach Inkubation für 0, 5, 10, 20, 30 und 60 s bei 22°C wurden 50 µl Aliquots auf Nitrozellulosefilter (0,45 µm) überführt, unter Vakuum mit 10 ml gekühltem 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,9% NaCl gewaschen, getrocknet und in einem Szintillationszähler unter Verwendung von Scintiverse BD (Fisher) gezählt. Die Ergebnisse sind in [Fig. 11](#) gezeigt. Kurz gesagt trat im Wesentlichen keine Thymidinaufnahme in E. coli auf, der pMDC enthielt. Die Menge an Thymidinaufnahme in E. coli, der TKF 36 enthält, war um 42% größer als die von E. coli, die Wildtyp-Plasmid enthält (18 pMol/10⁸ Zellen verglichen mit 12,7 pMol/10⁸ nach Inkubation für 10 s).

2. Einbau von [Methyl-³H]Thymidin in säureunlösliches Material

[0207] Die Menge an TK-Aktivität in rohen E. coli-Extrakten, die Wildtyp- und Mutanten-Plasmide enthielten, wurde indirekt bestimmt durch Messen des Einbaus von Thymidin in säureunlösliches Material.

[0208] Kurz gesagt wurden Kulturen wie oben in Abschnitt 1 beschrieben angezogen. Zu 0,5 ml Kultur wurde Thymidin hinzugegeben zu einer Endkonzentration von 1,32 μM (0,2 μCi [Methyl- ^3H]Thymidin). Ein 30 μl Aliquot wurde nach bestimmten Inkubationszeiten entnommen und zu 2,0 ml kalter 5% Perchlorsäure hinzugegeben. Das Präzipitat wurde gewaschen und in ein säureunlösliches Material eingebaute Radioaktivität bestimmt, wie im Wesentlichen von Dube et al., 1991, beschrieben.

[0209] [Fig. 12](#) zeigt, dass der Einbau von [Methyl- ^3H]Thymidin in ein säureunlösliches Produkt schneller mit TKF 36 *E. coli* erfolgt als mit *E. coli*, der das Wildtyp-Plasmid oder die anderen getesteten tk-Mutanten enthielt. Eine der Mutanten, TKF 99, mit zwei Aminosäuresubstitutionen (Cys171 \rightarrow Leu und Ala174 \rightarrow Thr) wies die gleiche Thymidineinbaugeschwindigkeit auf wie der Wildtyp. TKF 52 enthielt eine Ala168 \rightarrow Thr-Substitution (vergleiche Ala168 \rightarrow Ser in TKF 36) und ist nicht in der Lage, Kolonien auf dem TK-Selektionsmedium mit dem geringsten Thymidingehalt zu bilden (Tabelle I), baut jedoch Thymidin in säureunlösliches Material mit einer Geschwindigkeit auf, die größer ist als die von Wildtyp, aber geringer als die von TKF 36.

D. Reinigung von Wildtyp-Mutanten und mutierten TKs

[0210] Rohe Extrakte der verschiedenen Mutanten wurden aus 1 l Kulturen erhalten, die bei 30°C auf eine OD von 0,1 bei A_{550} angezogen, auf 37°C verschoben und auf eine OD von 1,0 angezogen wurden. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4°C geerntet, mit 25 ml einer Lösung gewaschen, die 25% (Gew./Vol.) Saccharose, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 5 mM EDTA enthielt. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet (Gewicht \sim 5–6 g) bei -70°C gelagert. Das Zellpellet wurde aufgetaut und in 20 ml Puffer I suspendiert (Puffer I bestand aus 10 Vol. 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10% Saccharose gemischt mit 1 Vol. 0,3 M Spermidin-HCl, 2,0 M NaCl, 10% Saccharose und 0,5 mM PMSF, pH 7,5). Nachdem die Resuspension gleichförmig war, wurden 4,0 ml Puffer I hinzugefügt, der 6,25 mg Lysozym enthielt. Die Lösung wurde in ein gekühltes Zentrifugenröhrchen geschüttet und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Wenn die Zellen nicht innerhalb von 30 Minuten lysierten, wurde das Röhrchen für 4–6 Minuten in ein 37°C Wasserbad gegeben, um die Lyse zu verstärken. Wenn die Zellen anfangen zu lysieren, wie durch zunehmende Fadenförmigkeit beurteilt, wurden 2–3 ml gekühlter Puffer I, der 50 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin und 2 $\mu\text{g/ml}$ von jeweils Leupeptin und Pepstatin enthielt, zu einem Endvolumen von 25 ml hinzugegeben und die Mischung wurde bei 28.000 Upm für 1 Stunde bei 4°C zentrifugiert und der Überstand bei 70°C gelagert.

[0211] Die Wildtyp- und Mutanten-TKs wurden durch Affinitätschromatographie an einer Matrix von p-Aminophenylthymidin 3'-Phosphat, die an CH-Sepharose 4B (Pharmacia) gekoppelt ist, wie von Kowal und Marcus (Prep. Biochem. 6: 369–385, 1976) beschrieben und mit der Modifikation nach Lee und Cheng (J. Biol. Chem. 251: 2600–2604, 1976), gereinigt. Alle bei der Reinigung von TK verwendeten Puffer enthielten 5 mM DTT, 50 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, 2 $\mu\text{g/ml}$ von jeweils Leupeptin und Pepstatin und 1 mM PMSF, sofern nicht anders angegeben. Eine Säule mit einem Bettvolumen von 7 ml wurde mit Puffer A (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 10% Glycerin) äquilibriert und dann mit \sim 25 ml des unfraktionierten Überstandes mit einer Geschwindigkeit von 8–10 ml/Std. beladen. Die Säule wurde mit dem Durchgeflossenen zweimal rezirkuliert und dann nachfolgend mit zehn Bettvolumen jeweils von Puffer B (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 M KCl, 10% Glycerin), gefolgt von Puffer A gewaschen. TK wurde mit einem linearen Gradienten von Thymidin (0–600 μM) unter Verwendung von jeweils 30 ml Puffer A und Puffer C (0,3 M Tris-HCl, pH 7,4, 50 mM KCl, 10% Glycerin) eluiert. Der TK-Test wurde an allen Fraktionen durchgeführt und Spitzen-TK-Fraktionen wurden vereinigt und gegen drei Wechsel von 2 l Dialysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM DTT, 10% Glycerin) dialysiert. Bei der Enddialyse wurden Proteaseinhibitoren aus dem Puffer weggelassen und die dialysierten Fraktionen aufgeteilt und bei -70°C gelagert. Die Säule wurde, wie oben beschrieben, zweimal unter Verwendung des gleichen Wasch- und Elutionsprotokolls gründlich gewaschen vor der Anwendung eines jeden Extraktpräparates.

[0212] Der Proteingehalt der gereinigten Proteine wurde bestimmt durch eine Modifikation des Bio-Rad-Proteinassays. Eine Standardkurve wurde aufgenommen unter Verwendung von BSA und 25 μl Bio-Rad-Reagens in einem Endvolumen von 125 μl . Die Menge an Protein wurde bestimmt durch Messen der OD bei 595 nm und Vergleich mit der von BSA.

[Methyl- ^3H]Thymidin-Aufnahme

[0213] Die Ergebnisse sind in [Fig. 11](#) gezeigt. Kurz gesagt trat im Wesentlichen keine Thymidinaufnahme in *E. coli* auf, der pMDC enthielt. Die Menge an Thymidinaufnahme in *E. coli*, der TKF 36 enthielt, war 42% größer als der von *E. coli*, der das Wildtyp-Plasmid (18 $\text{pMol}/10^8$ Zellen verglichen mit 12,7 $\text{pMol}/10^8$ Zellen nach Inkubation für 10 s).

[0214] Die Menge an TK-Aktivität in rohen *E. coli*-Extrakten, die die Wildtyp- und Mutanten-Plasmide enthielten, wurde indirekt bestimmt durch Messen des Einbaus von Thymidin in säureunlösliches Material.

E. Kinetische Parameter von gereinigten mutierten Thymidinkinasen

[0215] Die drei zellulären Parameter, die bisher untersucht wurden, schlagen vor, dass TKF 36 ein aktiveres Enzym ist als ein jedes andere der getesteten Mutanten-Enzyme oder der Wildtyp. Um die kinetischen Katalyseparameter zu bestimmen, wurden Wildtyp-TKF 36 und drei andere Mutanten-Thymidinkinasen unter Verwendung von Affinitätschromatographie nahezu auf Homogenität wie oben beschrieben gereinigt. Der gereinigte Wildtyp, TKF 36 und TKI 208 wurden durch Elektrophorese in einem SDS-PAGE-System untersucht und es wurde festgestellt, dass sie eine einzelne hervorstechende Bande aufweisen, die bei 43 kDa wanderte, die dahingehend beurteilt wurde, dass sie unter Verwendung von Silberfärbung zu 95% homogen ist.

[0216] Kinetische Parameter wurden bestimmt im Wesentlichen wie unten beschrieben. Kurz gesagt enthielten TK-Testmischungen (50 µl) 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM ATP, 4 mM MgCl₂, 2,5 mM DTT, 12 mM KCl, 0,18 mg/ml BSA, 5% Glycerin, 1 µM Thymidin (0,3 µCi [Methyl-³H]Thymidin) und die angegebenen Mengen an gereinigten Enzymen. Die Kinetiken der Thymidinphosphorylierung wurden bestimmt durch Variieren der unmarkierten Thymidinkonzentration (0–4,0 µM) und der bekannten Menge an gereinigten Enzymen (die spezifischen Aktivitäten der gereinigten TKs waren 1,1, 3,0, 0,5, 0,34 und 0,01 Einheiten für Wildtyp, TKF 36, TKI 208, TKF99 bzw. TKF41). Eine Enzymeinheit ist definiert als die Menge, die 1,0 pMol Thymidin zu Thymidinsäure in 1 Minute unter den oben beschriebenen Bedingungen phosphoryliert. Die Inkubation erfolgte bei 34 ± 1°C für 10 Minuten. Die Reaktion wurde abgestoppt durch das Hinzugeben von 1 mM kaltem Thymidin. Die Hälfte des Reaktionsansatzes wurde auf eine DEAE-Zellulosescheibe (25 mm) pipettiert und die Scheibe wurde in destilliertes Wasser eingetaucht (1 Minute), gefolgt von viermaligem Waschen jeweils in 10 ml absolutem Alkohol. Die auf der Scheibe adsorbierten Produkte wurden in einem Szintillationszähler gezählt. Die kinetischen Parameter K_m und V_{max} wurden bestimmt unter Verwendung des Cleland SUBIN Programms (Cleland, *Methods Enzymol.* 63: 103–138, 1979) und die Werte für k_{cat} wurden aus der Gleichung $V_{max} = k_{cat}[E]_0$ bestimmt, wobei $[E]_0$ die gesamte Enzymkonzentration ist.

[0217] Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabelle III zusammengefasst. Ala168 → Ser-Substitutionen in TKF 36 führte zu einer 4,8-fachen Verstärkung des k_{cat} . Keine der anderen gereinigten Mutatenenzyme (TKF 41, TKF 99 und TKI 208), die analysiert wurden, wiesen eine Erhöhung des k_{cat} auf verglichen mit dem von Wildtyp-TK. Eine 2,2-fache Verringerung des k_{cat} ergab sich aus der Leu170 → Val-Substitution in TKI 208, wohingegen zwei der anderen tk-Mutanten, nämlich TKF 99 und TKF 41, mit verringerten Wirksamkeiten in den in-vivo-Tests, eine 28- und 34 700-fache Verringerung des k_{cat} aufwiesen. Tabelle III zeigt auch die Michaelis-Konstante (K_m) für die Mutanten und den Wildtyp mit Thymidin als ein Substrat. Der apparente K_m für das Wildtypenzym betrug 0,47 µM, was gut mit früher berichteten Werten übereinstimmt (Jamieson und Subak-Sharpe, *J. Gen. Virol.* 24: 481–492, 1974; Elion, *Am. J. Med.* 73: 7–13, 1982; Waldman et al., *J. Biol. Chem.* 258: 11571–11575, 1983). Obgleich TKF 36 einen höheren k_{cat} -Wert zeigte, ist seine Affinität für Thymidinkinase, wie widerspiegelt in dem K_m , 6,2-fach niedriger als die Wildtyp-TK. TKI 208, TKF 41 und TKF 99 weisen einen K_m auf, der ähnlich dem von Wildtyp ist. Interessanterweise ist der k_{cat}/K_m -Wert von TKF 36 [$2,0 \times 10^6 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$] nicht sehr verschieden vom Wildtyp [$2,5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$], wohingegen TKI 208, TKF 99 und TKF 41 niedrigere Werte von $1,57 \times 10^6$, $0,15 \times 10^6$ bzw. $0,00012 \times 10^6 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ aufwiesen.

TABELLE III

VERGLEICH VON KINETIKPARAMETERN DER THYMIDINKINASEN

Enzym	K_m (µM)	k_{cat} (1/s)
Wildtyp	0,47 ± 0,1 ^a	1,2
TKF 36	2,90 ± 0,01	5,7 ^b
TKF 41	0,28 ± 0,16	$3,5 \times 10^{-5b}$
TKF 99	0,29 ± 0,002	0,04 ^b
TKI 208	0,35 ± 0,008	0,5 ^b

^a Daten sind als ± Standardabweichung dargestellt.

^b Der P-Wert ist < 0,02 verglichen mit dem Wildtyp.

BEISPIEL 5

SELEKTIVES ABTÖTEN VON ZELLEN, DIE MIT RETROVIREN Vektoren TRANSFIZIERT SIND, DIE MUTANTEN-HSV-1-TK ENTHALTEN

[0218] Das Beispiel beschreibt die Konstruktion von retroviralen Vektoren, die eine Thymidinkinase vom Herpes Simplex-Virus Typ 1 exprimieren mit einer Prolin-zu-Alanin-Mutation an Position 155 und einer Phenylalanin-zu-Valin-Mutation an Position 161.

A. Vektorkonstruktion

[0219] Das Thymidinkinasegen von P155A/F161V wird verwendet, um die Wildtyp-HSV-tk-Sequenzen in dem Moloney Marine Leukemia Virus („MoMLV“)-basierten Vektor G1TkSvNa.90 von Genetic Therapy, Inc. (Gaithersburg, D; siehe Ram et al., Cancer Research 53: 83, 1993) zu ersetzen. Insbesondere ist das mutierte tk-Gen stromabwärts von der 5' langen terminalen Wiederholungssequenz eingefügt, die das tk-Gen als einen Promotor verwendet. Dieser Vektor enthält auch ein Neomycin-Phosphotransferase-Gen (neo), welches von einem frühen SV40-Promotor exprimiert wird.

B. Produzentenzelllinie

[0220] Die oben beschriebenen retroviralen Vektoren können dann verpackt werden durch die amphotrope retrovirale Verpackungszelllinie GP + envAm12 (US-Patent Nr. 5,278,056) nach Kalziumphosphattransfektion. Ein Vektor, der das Gen für β -Galactosidase enthält, wird als Kontrollvektor verwendet. Die klonierten Vektorproduzentenzellen werden in Kultur gehalten, die Dulbecco's modified Eagle's Medium mit 10% fötalem Kälberserum, 2 mM Glutamin, 50 Einheiten/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin und 2,5 μ g/ml Fungizone enthält. Vor der Verabreichung wird das Medium entfernt und die Zellen mit Saline gewaschen. Die Monolager werden trypsiniert für 5–10 Minuten bei 37°C, gesammelt, zweimal gewaschen und zu $5 - 10 \times 10^8$ Zellen/ml resuspendiert.

C. In-vitro-Empfindlichkeit gegenüber Ganciclovir

[0221] Um die Empfindlichkeit von Zellen zu testen, die mit dem mutierten oder dem Wildtyp-tk-Gen enthaltenden Vektoren transduziert waren, werden 9L-Gliomazellen und menschliche U251 Glioblastomzellen in vitro transduziert durch Exposition der Zellen gegenüber Überstand, der replikationsinkompetente Vektorpartikel enthält. Die transduzierten Zellen werden durch Einschließen von G148 (1 mg/ml) in dem Kulturmedium selektiert. Nicht transduzierte, HSV tk-Wildtyp-transduzierte und HSV tk-mutierte transduzierte Zellen werden dann hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber zunehmenden Titern an Ganciclovir evaluiert. Das Ausmaß der DNA-Synthese wird bestimmt durch Einbau von mit Tritium markiertem Thymidin nach verschiedenen Ganciclovir-Expositionszeiten und Ganciclovirtitern. Die Zellebensfähigkeit wird bestimmt durch Ausplattieren der Zellen in 10 cm Gewebekulturplatten bei Abwesenheit oder Anwesenheit von verschiedenen Ganciclovirkonzentrationen und Auszählen der Anzahl von Zellen in 24-Stunden-Intervallen.

D. In-vivo-Transduktion

[0222] Die Wirksamkeit von in-situ-Transduktion von Tumorzellen und relatives Ausmaß an Vektorgenexpression in den Tumorzellen wird bestimmt unter Verwendung des β -Galactosidase enthaltenden Vektors. Kurz gesagt werden Fischer 344-Ratten betäubt und man injiziert ihnen 4×10^4 syngeneische 9L-Gliosarkomzellen unter Verwendung einer 10 μ l Hamilton-Spritze, die mit einem Apparat für die stereotaktische Injektion verbunden ist. Nach zehn Tagen wird die gleiche stereotaktische Position verwendet, um direkt $1,5 \times 10^6$, 3×10^6 oder 6×10^6 HSVtk (Wildtyp oder mutierte) β -Galactosidase transduzierte oder nicht transduzierte Produzenten-Linienzellen zu injizieren und Produzentenzelllinienüberstände in den 9L-Tumor. Als Kontrolle werden Ratten mit dem gleichen Volumen an steriler Saline anstatt der Zellen injiziert. Ganciclovir wird dann verabreicht und die Ratten geopfert, um die Antitumorwirkung zu bestimmen. Eine histologische Untersuchung wird ebenfalls vorgenommen.

E. Dosisoptimierung von Ganciclovir

[0223] Man injizierte Ratten intrazerebral 4×10^4 HSVtk (Wildtyp oder Mutante) oder β -Galactosidase transduzierte Ratten-9L-Produzentenzellen. Sieben Tage nach Inokulation wird Ganciclovir i. p. mit 5, 20 oder 15 mg/kg zweimal für 7 Tage verabreicht. Kontrollratten erhielten i. p. Salineinjektionen. Alle Ratten wurden geop-

fert nach der Ganciclovirbehandlung und die Gehirne und Tumoren für Gewichtsbestimmung und histologische Untersuchung entfernt.

F. Tumorregression mit Wildtyp und Mutanten-HSV-tk-Transduktion und GCV

[0224] Auf der Grundlage der Ergebnisse der Ganciclovir-Dosisoptimierung werden Rattentumoren, die mit transduzierten und nicht transduzierten Produzentenzellen oder produziertem Zellüberstand inokuliert sind, Ganciclovir-Dosen für eine spezifische Zeitspanne verabreicht. Antitumorwirkungen werden durch Bestimmung von Tumorgewicht und histologische Untersuchung bestimmt.

BEISPIEL 6

DIE VERWENDUNG VON VZV-TK-MUTANTEN ALS ZIELE FÜR SELEKTIERBARE HOMOLOGE REKOMBINATIONEN

[0225] Dieses Beispiel beschreibt die Verwendung einer mutierten Varicella-Zoster-Virus-Thymidinkinase („VZV tk“) als ein Ziel für homologe Rekombination bei der Konstruktion von stabilen transfizierten Zelllinien, Stämmen oder rekombinanten Viren. Insbesondere ist die Konstruktion von Vakziniaviren als Klonierungsvektoren, die mutierte VZV-TKs enthalten, für die Selektion rekombinanter Viren in TK⁺-Zelllinien beschrieben.

A. Konstruktion von rekombinanten Vakzinia-Virus-Plasmiden, die VZV-TK-Mutanten enthalten

[0226] VZV-tk-Gene (Wildtyp und mutiert) werden in ein rekombinantes Plasmid hinter den 7,5 K-Promotor von Vakziniavirus für die konstitutive Genexpression kloniert. Zusätzlich wird das Neomycin-Phosphotransferasegen nach dem 3'-Ende des VZV tk-Gens kloniert, um als selektierbarer Marker zu dienen. Die 5'- oder 3'-Regionen des Vakziniavirus-codierten Thymidinkinasegens flankiert das 5'-Ende de VZV tk-Gens und das 3'-Ende des Neomycin-Phosphotransferasegens (neo). Dies erlaubt die Insertion des VZV-tk-Gens in das virale Genom und die gleichzeitige Inaktivierung des Vakzinia-Thymidinkinasegens. Der Rest des Plasmids basiert auf pUC und enthält ein Ampicillin-Resistenzgen und einen ColE1-Replikationsursprung für die Beibehaltung des Plasmids in E. coli.

B. Konstruktion von rekombinanten Pockenviren

[0227] Das VZV tk (Wildtyp oder mutiert) + neo-rekombinante Plasmid oder rekombinante Plasmid, das nur das neo-Gen enthält, wird mit dem Wildtyp-Vakziniavirus in BSC40-Zellen co-transfiziert. Rekombinante Viren werden selektiert durch Resistenz gegenüber G418. Nach mehreren Plaque-Reinigungsrounden werden die rekombinanten Viren einer Plaque-Hybridisierung und DNA-Analyse unterzogen, um die Insertion und den Ort der Fremdgene zu bestätigen.

C. Dosisoptimierung von Ganciclovir

[0228] BSC40-Zellen, die mit Vakziniavirus infiziert oder nicht infiziert sind, werden einer Behandlung mit verschiedenen Dosen von Ganciclovir unterzogen, um das Toleranzniveau zu bestimmen. Zellen, die mit rekombinanten Viren infiziert sind, die VZV TKs und neo exprimieren, oder jene, die nur neo exprimieren, werden in Gegenwart verschiedener Titer von Ganciclovir angezogen. VZV tk-Gen enthaltende Viren sind empfindlicher gegenüber Ganciclovirbehandlung als die Zellen alleine oder jene, die mit Wildtyp-Vakzinia-Virus infiziert sind. Ein Titer an Ganciclovir wird aus den Ergebnissen dieser Experimente ausgewählt, um auf Verlust an Empfindlichkeit gegen Ganciclovir bei homologer Rekombination mit anderen Genen, die in den VZV tk-Lokus eingefügt werden sollen, zu selektieren.

D. Selektion von rekombinanten VZV tk-Pockenviren unter Verwendung von Ganciclovir

[0229] BSC40 wird mit dem rekombinanten VZV tk-Virus in Gegenwart von einem rekombinanten Plasmid infiziert, das das in das VV-Genom einzuführende Gen trägt, anstoßend an den VV 7,5 K-Promotor, der mit den flankierenden VZV tk-Sequenzen cloniert ist. Rekombinantes Virus wird mit Ganciclovir selektiert.

[0230] Eine jegliche Zelllinie, die stabil mit dem VZV tk-Gen transfiziert ist, kann das Ziel für die Einführung von Fremdgenen durch homologe Rekombination und die Selektion eines derartigen Ereignisses durch Resistenz gegenüber Ganciclovir sein.

BEISPIEL 7

KONSTRUKTION UND ANALYSE VON HSV-1-THYMIDINKINASE UND HSV-1-DNA-POLYMERASEVEKTOREN

A. Konstruktion von Vektoren

[0231] Drei Konstrukte wurden hergestellt, die entweder das HSV-1-DNA-Polymerasegen, HSV-1-Thymidinkinasegen oder beides enthielten.

a) pHSG576:HSVpol

[0232] Das 5,5 kb *HinDIII*/*EcoRI*-Fragment aus pGEM2-702 (David Dorsky, Univ. of Conn.) wurde in pHSG576 (Sweasy und Loeb, J. Biol. Chem. 267: 1407–1410, 1992) in zwei Schritten kloniert:

- 1) Das 2,4 kb *PstI*/*EcoRI*-Fragment wurde in pHSG576 kloniert, das mit *PstI* und *EcoRI* verdaut war. Dieser Klon wurde als pHSG576: 1/2 pol bezeichnet.
- 2) Das 3,1 kb *HinDIII*/*PstI*-Fragment von HSV-DNA-Polymerase wurde in pHSG576: 1/2 pol kloniert, das mit *HinDIII* und *PstI* verdaut war. Dieser Klon wurde als pHSG576:HSV DNA pol bezeichnet.

b) pHSG576:HSV-1 TK

[0233] Das *XbaI*/*Bam*III-Fragment von pET23d:HSVTK (enthält das HSV-1-TK-*NcoI*-*NcoI*-Fragment in pET23d, Novagen) wurde glattendig gemacht und in die *SmaI*-Stelle von pHSG576 kloniert. Der Klon wurde als pHSG576:HSV-1TK bezeichnet.

c) pHSG576:HSV pol/TK

[0234] Dieser Klon enthält sowohl die HSV-1-DNA-Polymerase als auch TK-Gene für Coexpression von dem gleichen Vektor. Er wurde in einem zweistufigen Klonierungsprotokoll erzeugt.

- 1) Das *XbaI*/*Bam*HI glattendig gemacht TK-Fragment wurde in die glattendig gemachte *EcoRI*-Stelle von pHSG576: 1/2 pol kloniert (enthält das 2,4 kb *PstI*/*EcoRI*-Fragment).
- 2) Das 3,1 kb *HinDIII*/*PstI*-Fragment (5'-Ende des Polymerasegens) wurde in pHSG576:1/2pol/TK kloniert, das mit *HinDIII* und *PstI* verdaut war. Dieser Klon wurde als pHSG576:HSVpol/TK bezeichnet.

B. Transformation von E. coli mit einem DNA-Polymerasedefekt

[0235] E. coli JS200 (*polA12recA718*) wurde mit pHSG576:HSV DNA pol oder pHSG576 DNA transformiert und auf Nutrient-Agar (NA) plattiert, der Tetrazyklin (12,5 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) enthielt. Die Platten wurden bei 30°C (permissive Temperatur) inkubiert. Einzelkolonien wurden über Nacht in NB + tet + Cm angezogen. DNA wurde aus diesen Kulturen isoliert und verwendet, um JS200 erneut zu transformieren. Von den zweiten Transformationen wurden mehrere Kolonien aufgenommen und verwendet, um NB + tet + Cm in Gegenwart oder Abwesenheit von IPTG zu inokulieren. Nach Wachstum über Nacht bei 30°C wurde eine einzelne Öse voll einer jeden Kultur von der Mitte der Platte aus in einer divergierenden Spirale erhöhender Verdünnungen verteilt. NA-Platten + tet + Cm +/- IPTG wurden bei 30°C (permissiv) oder 37°C (nicht permissiv) inkubiert.

[0236] Das Wachstumsmuster von Zellen, die pHSG576:HSV DNA pol enthielten, zeigte Wachstum einzelner Kolonien (geringe Zelldichte) bei 37°C, wohingegen Zellen, die nur den Vektor enthielten, nicht in der Lage waren, zu einer geringen Zelldichte bei der nicht permissiven Temperatur zu wachsen.

[0237] Diese Ergebnisse zeigen, dass die Herpes-DNA-Polymerase den E. coli *PolI*-Defekt in vivo komplementieren kann.

BEISPIEL 8

KONSTRUKTION UND ANALYSE VON TK-MUTANTEN MIT MUTATIONEN AN DEN CODONS 159 BIS 161 UND 168 BIS 170 UNTER VERWENDUNG EINER 100% ZUFALLSBIBLIOTHEK

[0238] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion und Analyse von TK-Mutanten, die an den Codons 159 bis 161 und 168 bis 170 mutagenisiert sind.

[0239] Bakterienstämme. SY211 (BL21(DE3) tdk^- , pLysS) wird geheilt von pLysS durch wiederholtes Passagieren auf nicht selektiven Platten (ohne Chloramphenicol). (SY211 ist ein Geschenk von William Summers, Yale University, New Haven, CT, und ist beschrieben in Summers, W. C. und Raskin, P., J. Bact. 175: 6049–6051, 1993). Der sich ergebende Stamm BL21(DE3) tdk^- wird in dem genetischen Komplementations-test für Thymidinkinase verwendet. Andere verwendete Stämme sind in Beispiel 3 beschrieben.

[0240] Zellen. BHK $tk^-(ts13)$ -Zellen (ATCC Nr. CRL-1632) werden von der American Type Culture Collection gekauft und in DMEM + 10% Kälberserum bei 37°C unter 6% CO₂ kultiviert.

[0241] Materialien. Wie in Beispiel 3 beschrieben.

A. Erzeugen von TK-Mutanten

1. Konstruktion von Zufallsinsert

[0242] Zwei Oligonukleotide werden von Operon (Alameda, CA) synthetisiert: MB126 (58mer) 5'-TGGGAG-CTCA CATGCCCGCG CCCC GGCCCT CACCNNNNNN NNNGACCGCC ATCCCATC-3' (SEQUENCE ID No. 24) und MB 127 (51mer) 5'-ATAAGGTACC GCGCGGCCGG GTAGCANNNN NNNNNGGCGA TGGGATGG-CG G-3' (SEQUENCE ID No. 25). Das N bezeichnet eine äquimolare Mischung aller vier Nukleotide während der Synthese.

[0243] Die Reinigung von Oligonukleotiden, Annelieren, Verlängerung und Amplifikation durch PCR ist im Wesentlichen wie in Beispiel 3 beschrieben.

2. Erzeugung von Zufallssequenz enthaltenden Bibliotheken Vektorkonstruktion

[0244] pET23d, gekauft von Novagen, ist das Rückgrat für die Konstruktion von pET23d:HSVTK-Dummy. pET23d:HSVTK-Dummy wird anstelle von pMDC (in Beispiel 1 und 3 beschrieben) für die Insertion von Zufallssequenzen verwendet. Kurz gesagt wird ein 1,7 kb NcoI/HinDIII-Fragment gereinigt von einem Restriktionsverdau von pT7:HSVTKII (Beispiel 3) und in pET23d kloniert, der mit dem gleichen Enzym restringiert wurde, um pET23d:HSVTK zu erzeugen. Der Dummy-Vektor wird konstruiert durch Ersetzen der tk -Sequenzen zwischen den KpnI- und SacI-Stellen durch das KpnI/SacI-Fragment aus pMDC (Beispiel 3).

Konstruktion der Bibliothek

[0245] Qiagen-Säulen-gereinigte pET23d:HSVTK-Dummy-DNA wird mit KpnI und SacI restringiert und der Vektor Gel-isoliert unter Verwendung von GenCleanII (Bio101, La Jolla, CA), um das kleine Insertfragment zu entfernen. Dieser Vektor wird mit dem isolierten PCR-amplifizierten Zufallsfragment über Nacht bei 16°C mit T4-DNA-Ligase ligiert.

3. Selektion von TK-Mutanten

[0246] Die Ligandenmischung wird dann verwendet, um BL21 (DE3) tdk^- -Zellen durch Elektroporation, wie in Beispiel 3 beschrieben, zu transformieren. Die Transformanten werden direkt auf TK-Selektionsplatten (Beispiel 3) plattiert, wobei ein geringer Teil auf 2 × YT (16 g Trypton/10 g Hefeextrakt/5 g NaCl/15 g BactoAgar pro Liter) + Carbenicillin mit 50 µg/ml ($carb^{50}$) ausplattiert wird, um die Gesamtzahl der Transformanten zu bestimmen. Die Platten werden bei 37°C über Nacht inkubiert und hinsichtlich Wachstum auf TK-Selektionsplatten bewertet und die Transformationshäufigkeit bestimmt. Kolonien, die auf den TK-Selektionsplatten wuchsen, werden gepickt und erneut ausgestrichen auf frischen TK-Selektionsplatten und 2 X YT + $carb^{50}$ -Platten. Etwa 426 positive Klone werden aus einer Bibliothek aus $1,1 \times 10^6$ Transformanten identifiziert oder 0,039% aller Transformanten übertrugen TK-Aktivität auf E. coli BL21 (DE3) tdk^- ([Fig. 14](#)).

B. Analyse von Mutanten

1. Sequenz von ausgewählten und nicht ausgewählten Klonen

[0247] Siebzehn Klone, die TK-Aktivität zeigten (ausgewählt) oder von 2 × YT + $carb^{50}$ -Platten (nicht selektiert) stammen, werden erfolgreich sequenziert. DNA wird isoliert unter Verwendung von Qiagen miniprep Kits und doppelsträngiger Sequenzierung unterzogen, wie in Beispiel 3 beschrieben. [Fig. 15](#) zeigt die Sequenzen einer jeden Gruppe und zeigt, dass die anfänglichen Zufallsoligonukleotide randomisiert sind. In sowohl aus-

gewählten als auch nicht ausgewählten tk-Genen wird die Einführung sekundärer Mutationen an Stellen distal zu dem randomisierten Bereich beobachtet. Die Mutationen sind jedoch in erster Linie auf zwei Codon beschränkt, 155 und 156. Diese Mutationen werden am wahrscheinlichsten durch Kontamination während der Synthese der ursprünglichen Zufallsoligonukleotide eingeführt. Alle Änderungen am Codon 155 sind stille Änderungen. Änderungen am Codon 156 führten bei Alanin-zu-Valin-, Serin- oder Prolin-Änderungen. Alignmentstudien zeigen an, dass die Position 156 weder für Alanin noch für die Art von Aminosäure an der Position konserviert ist. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass diese Sekundärmutationen zu einer tatsächlichen Wirkung auf die Enzymaktivität der Mutanten führen. Alle ausgewählten Mutanten enthielten wenigstens zwei Aminosäureaustausche.

2. Sekundäres Screening auf GCV- und ACV-Empfindlichkeit

[0248] Eine jede der 426 Mutanten wird aufgenommen und verwendet, um 200 µl TK-Selektionsmedium (Beispiel 3) in einem 96-Napf-Mikrotiter-Plattenformat zu inokulieren. Alle 426 Klone werden dann seriell 10^4 verdünnt in 0,9% NaCl mit einem Replikator mit 48 Spitzen (Sigma, St Louis, MO). 30 µl der letzten Verdünnung werden auf TK-Selektionsplatten verteilt, die 1 µg/ml Thymidin plus verschiedene Konzentrationen an Ganciclovir und Acyclovir enthalten. Anfänglich werden 2 µg/ml GCV verwendet und die Klone, die nicht in der Lage sind zu wachsen, werden als positiv bewertet, da eine jegliche Mutante mit erhöhter Konversion einer Prodrug zu einem aktiven Toxin zu Lethalität führt. Bei 2 µg/ml GCV werden 197 Klone identifiziert. Das anfängliche Ausplattieren auf 1 µg/ml und 0,5 µg/ml GCV führt zur Identifizierung von 47 Mutanten. Das Ausplattieren auf ACV-Platten (1 µg/ml) ergab 116 ACV-empfindliche Klone. Um zu gewährleisten, dass die Klone tatsächlich für das Nukleosidanalogue empfindlich sind und nicht punkten wegen der Unfähigkeit, auf den verwendeten niedrigeren Thymidinkonzentrationen zu wachsen, werden die 47 GCV- und 116 ACV-Klone auf TK-Selektionsplatten ausplattiert, die Thymidin zu 1 µg/ml (kein Nukleosidanalogue) enthalten. Fast die Hälfte der Klone war nicht in der Lage, auf geringem Thymidin zu wachsen bei insgesamt 26 GCV-empfindlichen Mutanten und 54 ACV-empfindlichen Mutanten. Die Ergebnisse sind in [Fig. 16](#) gezeigt.

C. In-vitro-Analyse

1. In-vitro-Transkription und -Translation

[0249] Plasmid-DNA wird durch Qiagen-Säulenchromatographie gereinigt. Transkription und Translation der 80 ausgewählten Mutanten erfolgt wie in Beispiel 3 mit der Ausnahme, dass die isolierten Plasmide nicht vor der Transkription linearisiert werden. In-vitro-Translationsprodukte werden doppelt auf Thymidin-, Ganciclovir- und Acyclovir-Phosphorylierung getestet und mit pET23d:HSVTK-mRNA-Translationsprodukttests (siehe Beispiel 3) verglichen.

2. Messen von Enzymaktivität

[0250] Radiomarkierte Nukleoside sind in einem jeden Test mit 1 µM, 7,5 µM und 7,5 µM für Thymidin, Ganciclovir bzw. Acyclovir vorhanden. Das Ausmaß an Aktivität wird eingestellt, um das Ausmaß an Proteinsynthese widerzuspiegeln, wie bestimmt durch die TCA-präzipitierbare Zähler von einer duplizierten Translation mit ^{35}S -Methionin. Für die Mehrzahl der 80 Mutantenzymen ist die Konzentration an Thymidin, Ganciclovir und Acyclovir geringer als 1% von der Wildtyp-TK. Zehn Mutantenzymen zeigten mehr als 10% Phosphorylierung mit wenigstens einem der getesteten Nukleoside. Die Nukleotidsequenzen sind in [Fig. 17](#) gezeigt. Mehrere der Klone enthielten Mutationen außerhalb des randomisierten Bereichs. Zwei Klone, 30 und 84, weisen Mutationen auf, die zu Aminosäureaustauschen führen, nämlich A152V bzw. A156S. Vier Klone enthalten Deletionen im Leserahmen; drei (226, 340 und 411) mit -3-Deletionen und einer (197) mit einer -6-Deletion. Alle diese Mutanten sind um eine GC-reiche Region angeordnet, die für ein Peptid A P P P A codiert. Dieses Prolin-reiche Peptid umfasst wahrscheinlich eine Wendung an der Spitze eines Schleifenabschnittes. Der Verlust von einer oder zwei Aminosäuren kann einfach zu einer Verkürzung der Schleife führen. Alle diese Mutanten enthalten drei bis sechs Aminosäureänderungen innerhalb des randomisierten Bereiches, wie in [Fig. 18](#) gezeigt, wo das entsprechende Aktivitätsmaß in vitro bestimmt wird.

D. Wirkung von GCV und ACV auf Säugetierzellen, die mutierte Thymidinkinasen exprimieren

1. Subklonierung in einen Säugetier-Expressionsvektor

[0251] Drei mutierte Thymidinkinasen werden ausgewählt, um auf Zelltoxizität in vivo in Gegenwart von Ganciclovir oder Acyclovir zu selektieren. Mutierte Klone mit den Nummern 30, 75 und 132 und die Wildtyp-Thymi-

dinkinasegene werden restringiert mit NcoI und glattendig gemacht mit Klenow. Die gelisierten Fragmente (NcoI-glattendig) werden mit pCMV ligiert, das mit NotI restringiert ist, und in E. coli Stamm NM522 transformiert. Das Wildtyp-TK-Gen in der falschen Orientierung relativ zum CMV-Promotor wird auch als Kontrolle verwendet. Qiagen-Säulen-gereinigte Klone werden sequenziert, um die Orientierung zu bestätigen, die Sequenz und den 5'-Berührungsbereich. Die Klone werden als pCMV, pCMV: TK-falsch, pCMV: TK, pCMV:30, pCMV:75 und pCMV:132 bezeichnet.

2. Transfektionen

[0252] Als anfänglicher Schritt, um diese Mutanten zu evaluieren, werden die pCMV-Klone Gegenwart eines Neomycin-resistenten Markerplasmids (pSV2neo) in TS 13 BHK tk-Zellen (Babyhamster-Nierenzellen) durch Kalziumphosphatpräzipitation eingeführt unter Verwendung einer modifizierten Version von Chen und Okayama (Molec. Cell. Biol. 7: 2745–2752, 1987).

[0253] Kurz gesagt werden die Zelltransfektionen wie folgt durchgeführt. Etwa 5×10^5 ts13 BHK tk-Zellen (ATCC CRL-1632) werden auf 100 mm Schalen in DMEM + 10% Kälberserum plattiert. Für eine jede Transfektion werden 1 µg pSV2neo und 10% eines pCMV-Konstruktes (pCMV, pCMV:TK-falsch (HSVTK in der falschen Orientierung relativ zum Promotor), pCMV:HSVTK, pCMV:30, pCMV:75 oder pCMV:132 DNA) in 0,25 M CaCl₂ in 0,5 ml 2 × BBS (siehe Chen und Okayama) gemischt und bei 37°C bei 2,5% CO₂ für 24 Stunden präinkubiert. Die CaCl₂/DNA-Mischung wird tropfenweise zu den Platten hinzugegeben und gut eingemischt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C in einem feuchten 2,5% CO₂-Inkubator werden die Zellen zweifach mit Dulbecco PBS minus Ca/Mg abgewaschen und mit frischem DMEM + 10% Kälberserum versehen. Die Platten werden bei 37°C mit 6% CO₂ inkubiert. Nach 72 Stunden nach der Transfektion werden die Zellen 1:3 aufgeteilt und in DMEM + 10% Kälberserum, das G418 mit 600 µg/ml enthält, plattiert.

3. Selektion und Bestimmungen von ED₅₀

[0254] Die Zellen werden auf G418 (600 µg/ml) bei 37°C für 17 Tage selektiert. Während dieser Zeit werden die Platten vereinigt (für eine jede DNA-Transfektion) und drei Mal in einem Verhältnis von 1:3 aufgeteilt. Etwa 30–40 Klone werden auf diese Weise ausgewählt für jede transfizierte DNA, die ein tk-Gen in der korrekten Orientierung enthält. Die pCMV- und pCMV:TK-falsch-Transfektionen ergaben jeweils zwischen 130 und 140 Klone. G418-resistente Klone werden geerntet, vereinigt und mit einer Dichte von 2000 Zellen/Napf in 100 µl DMEM + 10% Kälberserum und 200 µg/ml G418 + 6% CO₂ in Mikrotiterplatten mit 96 Näpfen ausplattiert. Ein Konzentrationsbereich von entweder Ganciclovir (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 und 20 µM) oder Acyclovir (0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 75 und 100 µM) wird zu einer jeden Platte mit 8-facher Wiederholung einer jeden Konzentration für jede Transfektantenpopulation hinzugegeben (die Kontrolle ohne Nukleosidanalogs wurde jeweils 16-fach wiederholt). Nach drei Tagen in Gegenwart des Nukleosidanalogs wird Alamarblau hinzugegeben und 6 Stunden später werden die Platten abgetastet unter Verwendung eines Fluorometers entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Alamar Biosciences, Inc., Sacramento, CA). Die Platten werden für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert und erneut abgetastet.

[0255] Die Bestimmung des Fluoreszenzniveaus von Zellen, die in Gegenwart von Alamarblau inkubiert sind, korreliert direkt mit der Zelllebensfähigkeit. Das Abziehen der Hintergrundfluoreszenz erlaubt das Zellüberleben über der Konzentration des Nukleosidanalogs aufzutragen, um die wirksame Dosis zum Abtöten von 50% der Zellen (ED₅₀) zu bestimmen. Die Überlebenskurven werden aufgetragen mit Daten aus der zweiten Abtastung und sind in den [Fig. 19](#) (GCV) und [Fig. 20](#) (ACV) gezeigt.

[0256] Nach 4 Tagen auf Nukleosidanalogs werde die wirksamen Dosen für 50% Zellabtötung mit GCV und ACV aus den [Fig. 19](#) und [Fig. 20](#) bestimmt (siehe Tabelle IV).

TABELLE IV

	ED ₅₀ GCV	-fach über Wildtyp	ED ₅₀ ACV	-fach über Wildtyp
WT	20 µM	1	25 µM	1
30	4,4 µM	4,5	18 µM	1,4
75	0,47 µM	43	1,25 µM	20
132	18 µM	1,1	25 µM	1

4. Enzymtests und Immunoblots

[0257] Zellextrakte von $2,4 \times 10^6$ vereinigten Transfektanten werden auf Thymidin-, Ganciclovir- und Acyclovir-Aktivität getestet. Das Ausmaß an Phosphorylierung entsprach sehr gut den in vitro bestimmten Aktivitäten (Translationsprodukte von Kaninchenretikulozyten-Lysaten) und der Menge an Proteinexpression, wie durch Western-Blot-Analysen bestimmt. Es werden keine immunreaktiven Banden in den Spuren gesehen, die pCMV oder pCMV:TK-falsch (TK-Gen in der falschen Orientierung) entsprechen. Sowohl die Wildtyp-TK (pCMV:HSVTK) als auch pCMV:132-transfizierten Zellysate wiesen etwa äquivalente Bandintensitäten auf. Die immunreaktive Bande für pCMV:30-Zellysate ist wesentlich intensiver (5–10-fach) und die von pCMV:75 ist etwa die Hälfte der pCMV:HSVTK-Bandenintensität für die gleiche Zellzahl.

5. Testen von Mutanten in Glioblastomzelllinien

[0258] Glattendige NcoI-Fragmente, die aus pET23d:HSVTK, pET23d:30 und pET23d:75 isoliert sind, werden in die HpaI-Stelle von pLXSN (Miller und Rosman BioTechniques 7: 980, 1989) kloniert. Plasmidreinigung erfolgt durch Qiagen-Chromatographie und die isolierte DNA wird sequenziert, um die Orientierung und die 5'-Übergangsbereiche zu bestätigen. Stabile Transfektanten von C6-Ratten-Glioblastomen (ATCC CCL-107) und eine menschliche Glioblastom-Zelllinie (SF767) werden hergestellt wie oben beschrieben mit der Ausnahme, dass pSV2-neo nicht co-transfiziert wird, da das Neomycin-Phosphotransferasegen von pLXSN codiert ist. Die Selektion und Analyse erfolgt im Wesentlichen wie oben beschrieben.

E. Kinetische Analyse von Mutanten-Thymidinkinasen

1. Überexpression von Mutanten- und Wildtyp-Enzymen

[0259] Eine Einzelkolonie von pET23d:HSVTK, pET23d:30, pET23d:75 und pET23d:132 in BL21(DE3)tk⁻-Zellen wird verwendet, um 5 ml M9ZB-Medium (1% Trypton, 0,5% NaCl, $1 \times$ M9-Salze, 1 mM $MgSO_4$, 100 μ M $CaCl_2$ und 0,2% Glukose), das Cabenicillin mit 20 μ g/ml enthält, zu inokulieren. Die Kultur wird bei 37°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wird die 5 ml Kultur verwendet, um 1 l M9ZB + Cabenicillin mit 20 μ g/ml anzuimpfen und man erlaubt, dass die Kultur bei 37°C auf eine OD600 von 0,1 wächst. Zu diesem Zeitpunkt wird IPTG hinzugegeben mit 0,4 mM und die Kultur wird weitere 3 Stunden inkubiert. Die Zellen werden auf Eis abgekühlt, pelletiert durch Zentrifugation und die Pellets einmal in Zellwaschpuffer (50 mM Tris, pH 7,5, 5 mM EDTA, 10% Saccharose) gewaschen vor dem Einfrieren der Pellets bei -70°C. Am nächsten Tag werden die Zellen in 12 ml Puffer 1 (50 mM Tris, pH 7,5, 10% Saccharose, 2 mM DTT, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF) erneut suspendiert und das Volumen in zwei 13 ml Oakridge-Ultrazentrifugenröhrchen aufgeteilt. 1 ml Puffer 1, der 3 mg Lysozym enthält, wird zu einem jeden Röhrchen hinzugegeben und die Röhrchen werden für 1 Stunde auf Eis gelassen. Zusätzlich 1 ml Puffer 1 + Proteaseinhibitor-Mischung wird hinzugegeben und das Röhrchen bei 35000 Upm in einem Sorvall T-1250-Rotor bei 4°C gedreht. Der geklärte Überstand wird dann aufgeteilt und bei -70°C eingefroren.

2. Affinitätsreinigung

[0260] Eine Thymidyl-Sepharose-Säule wird verwendet für ein einstufiges Reinigungsverfahren (siehe Beispiel 2). Die Säule mit einem Bettvolumen von 1 ml wird hergestellt, indem 10 ml Puffer 1, gefolgt von 10 ml Absorptionpuffer (50 mM Tris, pH 7,5, 10% Saccharose, 2 mM DTT, 25 mM $MgAc_2$, 10 mM ATP) über die Säule geführt werden. Zwei ml des geklärten Lysats werden mit 2 ml Absorptionpuffer gemischt und durch einen 0,2 μ m-Filter geführt. Diese Mischung wird 3-Mal über die Säule geführt. Die Säule wird mit 5 ml Absorptionpuffer dreimal gewaschen und die 5 ml Fraktionen gesammelt. Um das Enzym zu eluieren, werden 3 – 1 ml-Fraktionen Thymidinpuffer (300 mM Tris, pH 7,5, 10% Saccharose, 2 mM DTT, 50 mM KCl, 600 μ M Thymidin) über die Säule geführt und eine jede 1 ml Fraktion gesammelt. Die Säule wird reaktiviert durch Beladen mit 10 ml Hochsalzpuffer (50 mM Tris, pH 7,5, 10% Saccharos, 2 mM DTT, 0,5 M KCl) und 10 ml 50 mM Tris, pH 7,5. Die Säule wird in 50 mM Tris pH 7,5 + 0,004% Natriumazid gelagert. Das Ausmaß der Reinigung wird durch Coomassie-gefärbte SDS:PAGE-Analyse überwacht und die Konzentration an gereinigtem Proten unter Verwendung des BioRad-Reagens (Bradford-Reagens) bestimmt. Die Fraktion, die TK-Protein enthält, wird gegen mehrer Liter 50 mM Tris, pH 7,5, 10% Saccharose, 2 mM DTT bei 4°C dialysiert, um Thymidin zu entfernen.

3. Enzymkinetiken

[0261] Die Kinetiken der Thymidin-, Ganciclovir- und Acyclovir-Phosphorylierung durch die Wildtyp-, Mutan-

te-30- und -75-Thymidinkinaseenzyme mit variierenden Konzentrationen an radioaktivem Nukleosidsubstrat werden im Wesentlichen wie in Beispiel 3 beschrieben bestimmt. K_m - und V_{max} -Werte werden aus doppelt reziproken Auftragungen bestimmt und k_{cat} -Werte berechnet unter Verwendung der gleichen Gleichung $V_{max} = k_{cat}[E_o]$, wobei $[E_o]$ die Gesamtenzymkonzentration ist. Das BioRad-Reagens wurde verwendet, um die Gesamtenzymkonzentration von gereinigten Thymidinkinaseenzymen zu bestimmen. Die Ergebnisse sind unten in Tabelle I gezeigt.

TABELLE V

Kinetische Charakterisierung von HSV-1-TK-Mutanten mit Thymidin, ACV und GCV als Substrat

Substrat	Thymidin			Ganciclovir			Acyclovir		
	W.T.	75	30	W.T.	75	30	W.T.	75	30
Enzym	W.T.	75	30	W.T.	75	30	W.T.	75	30
K_m (μM)	,380	,950	13,3	47,6	10,0	333	417	23	455
k_{cat} (sec^{-1})	,230	,210	,003	,050	,050	,009	,008	,010	,001
k_{cat} (sec^{-1})/ K_m (μM)	,60	,22	2E-4	1E-3	4,8E-3	2,7E-5	1,8E-5	4,5E-4	2,1E-6

* Berechnungen von k_{cat} erfolgen pro aktiver Stelle

BEISPIEL 9

PRODUKTION VON HSV-1-THYMIDINKINASE-MUTANTEN DER ZWEITEN GENERATION MIT AMINOSÄURESUBSTITUTIONEN IN DEN RESTEN 159–161 UND 168–169

[0262] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion und Analyse von TK-Mutanten der zweiten Generation, die an den Codons 159–161 und 168–169 mutagenisiert sind.

A. Isolierung von TK-Mutanten der zweiten Generation

[0263] Wie oben beschrieben zeigen Mutanten, die aus der LIF-ALL-Bibliothek isoliert sind, eine erhöhte Prodrug-Spezifität verglichen mit der Wildtyp-TK (siehe auch Black et al., Proc. Nat'l Acad. USA 93: 3525–3529, 1996). Unter Verwendung von Informationen von den zehn aktivsten Mutanten, die aus der LIF-ALL-Bibliothek isoliert sind, wurde ein neuer Satz an randomisierten Oligonukleotiden synthetisiert und verwendet, um eine Zufallsbibliothek zweiter Generation zu erzeugen. Da die Bibliothek schief war, um Codons zu mutagenisieren, die die Reste 159–161 und 169–170 codieren, um nur einige wenige Aminosäuresubstitutionen zu repräsentieren, wird die Bibliothek als halbzufällig betrachtet.

[0264] **Fig. 21** zeigt die halbzufälligen Oligonukleotide, die verwendet wurden, um die Bibliothek zu erzeugen, und die möglichen erwarteten Aminosäuresubstitutionen. Diese komplementären und teilweise überlappenden Oligonukleotide (DMO2211 und 2212) wurden gereinigt nach Separation auf einem denaturierenden Gel. Nach Annelieren der entsprechenden 3'-Enden wurden die Oligonukleotide mit DNA-Polymerase verlängert, um ein 100 bp doppelsträngiges DNA-Fragment zu bilden. Nach Restriktion mit SacI und KpnI wurden die Zufallsfragmente mit pET23d:HSVTK-Dummy ligiert, das oben und von Black et al., Proc. Nat'l Acad. USA 93: 3525–3529, 1996, beschrieben ist. Vektoren, die die Mischung aus Zufallssequenzen enthielten, wurden verwendet, um einen Thymidinkinase-defizienten E. coli zu transformieren, und der transformierte E. coli wurde auf Wachstumsmedium plattiert, was die Anwesenheit einer funktionellen, von einem Plasmid getragenen TK erfordert. Insgesamt wurden 120 Klone aufgenommen und erneut auf selektives Medium ausgestrichen, um den Phänotyp zu bestätigen. Einzelne Kolonien wurden verwendet, um selektiv Medium zu inokulieren, das in Platten mit 96 Nöpfen aufgeteilt war (ein Klon/Napf). Die Kulturen wurden hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit auf verschiedene Titer von GCV oder ACV untersucht. Lysate von allen 120 Mutanten wurden auf die Fähigkeit, Thymidin, ACV und GCV zu phosphorylieren unter Verwendung der oben beschriebenen Verfahren getestet.

[0265] Sieben Mutanten, die erforderliche Aktivitäten zeigten, wurden für eine weitere Studie ausgewählt. Tabelle VI zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz dieser sieben Mutanten (SR11, SR26, SR39, SR4, SR15, SR32, SR53).

TABELLE VI

Aminosäuresubstitutionen an den Resten 159–161 und 168–169 in halb-zufälligen Mutanten zweiter Generation

Wildtyp-TK	L I F D R H P I A A L L	
SR11	- F L	F N
SR26	- F A	F -
SR39	I F L	F M
SR4	I L L	Y L
SR15	- F A	Y Y
SR32	- F V	V M
SR53	I F V	F Y

B. Analyse von TK-Mutanten zweiter Generation

1. In-vitro-Analyse von halb-zufälligen Mutanten in Zelllinien

[0266] Die sieben Mutanten wurden in den Säugetierexpressionsvektor pREP8D7:dualGFP subkloniert. Dieser Vektor enthält einen konstitutiven Metallothionin-Promotor, der die Expression von grün fluoreszierendem Protein (GFP) steuert, und einem RSV LTR-Promotor, der die Expression der TK-Mutanten stimuliert. Der Vektor enthält auch ein Histidinol-Resistenzgen für die Selektion von Transformanten. Gereinigte Vektor-DNA dieser Konstrukte wurde verwendet, um BHK tk⁻-Zellen durch Elektroporation zu transfizieren. Die Transfektanten wurden durch Resistenz gegenüber Histidinol selektiert und unter Verwendung einer FACS-Analyse auf GFP-Expression hin sortiert. Pools von Transfektanten wurden dann hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber GCV oder ACV über einen Dosisbereich der Prodrug getestet. In sowohl ACV- als auch GCV-Tests zeigten sechs der sieben Mutanten niedrigere IC₅₀-Werte als der Pool mit Wildtyp-TK-Transfektanten. Der verbleibende mutierte Transfektantenpool (SR53) exprimiert TK-Protein auf niedrigem Niveau, was die Ursache für seine niedrigere Prodrug-Empfindlichkeit sein kann. Die in Tabelle VII dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Mutanten SR11, SR26 und SR39 Wildtyp-TK oder Mutante 75 überlegen sind, bei Verwendung von ACV als Substrat. Tabelle VIII veranschaulicht die IC₅₀-Werte von Abtötungskurven von Ratten C6 mit den SR11-, SR26- und SR39-Mutanten.

2. In vivo-Analyse von halb-zufälligen Mutanten zweiter Generation in einem in-vivo-Maus-Xenograft-Tumormodell

[0267] Ratten-C6-Glioblastomzellen wurden mit dem stabilen Expressionsvektor pREP8D7:dualGFP wie oben beschrieben, der verschiedene TK-Mutanten enthielt, transfiziert. Die Zellen wurden mit entweder WT, SR39 oder Mutante 30 (LIF-ALL-Reihe) transfiziert und auf vergleichbares Ausmaß an GFP-Expression sortiert. Experimente wurden durchgeführt, um Dosierungsniveaus der Prodrug für Tumorabletion und Therapiewirksamkeit zu etablieren. Nackte Mäuse (JAX Labs, Bar Harbor, Maine) erhielten $0,5 \times 10^6$ transfizierte Ratten-C6-Zellen subkutan injiziert. Nach 5 Tagen wurden Prodrugs (ACV und GCV) zweimal täglich für weitere 5 Tage verabreicht. Die Prodrug wurde mit einer von zwei Konzentrationen (angegeben als mg/kg) verabreicht. Während dieser Zeitspanne und für weitere 6 Tage wurde die Tumorgroße durch Mikrometerschrauben-Messung jeden zweiten Tag überwacht. Am Ende der Zeitspanne wurden die Mäuse geopfert und die Tumoren herausgeschnitten und gewogen.

[0268] Die Daten sind in [Fig. 32](#), [Fig. 33](#) (Tumordurchmesser) und [34](#) (Tumorendgewicht) dargestellt und zeigen, dass SR39 (ebenso wie Mutante 30) eine hochwirksame Mutante ist und erhebliche Tumorroverringung bei Verwendung von entweder ACV oder GCV bedingen kann. Das Ausmaß der Tumoringibierung in vivo unter Verwendung von sowohl Mutante 30 als auch SR39 ist eindeutig überlegen zu der des Wildtyp-Enzyms. Weiterhin schlagen die Daten mit SR39 und ACV zum ersten Mal vor, dass ACV als wirksame Prodrug für Suizidtherapie funktionieren kann.

Tabelle VII

IC50-Werte für ACV-Abtötungskurven

Enzym	ACV (μM)
TK	0,2
75	0,06
SR11	0,025
SR26	0,035
SR39	0,03

Tabelle VIII

IC₅₀-Werte von Abtötungskurven von Ratten-C6

IC ₅₀ (μM)	GCV	relativ zu TK	ACV	relativ zu TK
TK	5	1	> 20	1
30	0,01	500	0,26	> 77
75	> 1	< 5	> 20	-
411	0,1	50	14	> 1,4
SR11	0,15	33	6	> 3
SR26	0,04	125	0,76	> 26
SR39	0,017	294	0,11	> 182

[0269] Enzymkinetische Analyse von gereinigten SR11-, SR26- und SR39-Proteinen wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Tabelle IX zusammengefasst.

Tabelle IX

Kinetiken von Mutanten aus halb-zufälliger Bibliothek

Km (μM)	Thymidin	GCV	ACV
TK	0,4	47	319
SR11	1,0	6,4	5,6
SR26	1,4	17,6	3,4
SR39	6,7	3,3	9,8

BEISPIEL 10

MUTAGENESE EINES BEREICHES INNERHALB DER Q-SUBSTRATBINDUNGSDOMÄNE VON HSV-1-THYRIDINKINASE

[0270] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion und Analyse von TK-Mutanten, die in einem Bereich der kürzlich identifizierten Q-Substratbindungsdomäne identifiziert wurde.

A. Isolierung von TK-Mutanten mit Modifikationen in der Q-Substratbindungsdomäne

[0271] Um einen Dummy-Vektor für die Insertion von Zufallssequenzen zu konstruieren, wurde eine NarI(oder KasI)-Stelle in pET23d:HSVTKII durch ortsspezifische Mutagenese unter Verwendung des Primers DMO1358 (5'-GTCTCGGAGGCGCCCAGCACC-3') innerhalb des offenen Leserahmens der Wildtyp-Thymidinkinase an Nukleotidposition 276 von dem ATG eingeführt. Der pET23d:HSVTKII-Vektor ist von Black et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93: 3525-3529, 1996, beschrieben. Die Restriktion von pET23d:HSVTK-Nar, der der

pET23d:HSVTKII-Vektor mit einer konstruierten NarI-Stelle ist, durch SacI und NarI, erlaubte die Entfernung von TK-Sequenzen und Ersetzen durch ein 1 kb NarI/SacI-Fragment aus dem Vektor pLXSN. Dieser Vektor wurde als pET23d:HSVTK-Nar-Dummy bezeichnet.

[0272] Für die erste Zufallsbibliothek wurden zwei Oligonukleotide synthetisiert, die drei Nicht-Wildtyp-Nukleotide mit einer Häufigkeit von 9% (d. h. die Wildtyp-Nukleotide wurden mit einer Häufigkeit von 91% wiedergegeben) für die Codons entsprechend den Resten 112–132 enthielten. [Fig. 22](#) zeigt die Sequenzen von Oligonukleotiden DMO-1860 und -1861, die komplementär sind und überlappen. Diese Oligonukleotide stellen Wildtyp-Sequenzen dar. Zufallsmutationen wurden eingeführt durch Einbauen von Nicht-Wildtyp-Nukleotiden mit einer Häufigkeit von 9% für die Synthese von Bereichen von DMO-1860 und -1861 Oligonukleotiden, die in Fettdruck gezeigt sind (d. h. nach der in jeder Sequenz angegebenen Diskontinuität). [Fig. 22](#) zeigt auch, wie die Oligonukleotide in einer PCR-Amplifikation verwendet wurden, um das Fragment mit der richtigen Größe zu erzeugen. Kurz gesagt wurde ein initialer Satz an Polymerase-Kettenreaktionen (20 Runden) durchgeführt, um die vier Oligonukleotide (DMO-1860, DMO-1861, DMO-1893 und DMO-1894) zu einem Vollängenprodukt zu kombinieren. Ein zweiter PCR-Satz (10 Runden) verwendete die zwei kleineren Oligonukleotide, die als DMO-1895 und DMO-1896 bezeichnet wurden, um das Produkt zu amplifizieren und überhängende Sequenzen für Restriktionsspaltung hinzuzufügen. Das Produkt dieser Reaktion wurde gespalten mit KasI und SacI und in den pET23d:HSVTK-Nar-Dummy (KasI/SacI)-Vektor ligiert. Nach Elektroporation in BL21(DE3)tdk—E. coli wurden die Zellen auf TK-Selektionsplatten plattiert und hinsichtlich Wachstum bewertet. Alle Kolonien wurden erneut auf frischen Selektionsplatten getestet. Mehrere hundert Klone wurden sequenziert und man stellt fest, dass sie null bis sechs Aminosäuresubstitutionen enthielten, die den 20 Aminosäurebereich überspannten.

[0273] Zwei nachfolgende Bibliotheken wurden konstruiert unter Verwendung von nur einem der mutagenen Oligonukleotide, um die Häufigkeit von einzelnen Aminosäureaustauschen zu erhöhen. Mehrere hundert TK-positive Klone wurden sequenziert. Lysate von diesen Mutanten sind hinsichtlich ihrer Fähigkeit getestet worden, Thymidin, Acyclovir und Ganciclovir zu phosphorylieren, was zeigt, dass die Mutation innerhalb der Q-Substratbindungsdomäne die Substratspezifität ändert.

BEISPIEL 11

ISOLIERUNG VON MENSCHLICHEN UND MAUS-GUANYLATKINASEN UND KONSTRUKTION VON HSV-1-THYMIDINKINASE- UND GUANYLATKINASE-DUAL-EXPRESSIONSVEKTOREN

[0274] Dieses Beispiel beschreibt die Isolierung der humanen und Maus-Guanylatkinasegene und die Vektorkonstruktion für die Dualexpression von Herpes-Thymidinkinase und -Guanylatkinase.

A. Isolierung von menschlichem Guanylatkinasegen

1. Isolierung von menschlichem Guanylatkinasegen

[0275] Zwei Oligonukleotide werden konstruiert, um den ganzen menschlichen Guanylatkinaseoffenen Leserahmen zu amplifizieren. Die folgenden zwei Oligonukleotide werden von GenSet (La Jolla, CA) synthetisiert: 5'-ACTACTGGAT[CCATGG]CGGGCCCCAGGCCTGTG-3', ein 33-mer (SEQUENCE ID No. 26) und 5'-TAC-TACGGATCCTCAGGCGGCGGTCTTTGAGC-3', ein 33-mer (SEQUENCE ID No. 27). Die BamHI-Stellen an einem jeden Ende sind unterstrichen und die NcoI-Stelle an dem initialen Methionincodon ist in Klammern gezeigt. Die Nukleotide in Fettdruck bezeichnen eine Nukleotidänderung gegenüber der ursprünglichen Sequenz (GenBank Zugangsnummer A11042). Das menschliche Guanylatkinasegen wird von einer cDNA-Bibliothek aus menschlichen proliferierenden B-Lymphozyten, die mit alpha-CD3 stimuliert waren, amplifiziert. Die sich ergebende einzelne Bande (~ 600 bp) wird mit BamHI restringiert und in pUC118 (BamHI) kloniert, um pUC118:Hugmk zu ergeben. Das Insert wird in seiner Gesamtheit (beide Stränge) unter Verwendung des folgenden Oligonukleotidsatzes sequenziert: 5'-CTGCTGAAGAGGCTGCTC-3' (18mer) (DMO 512) (SEQUENCE ID No. 28), 5'-ACACAGATGCGGTTTCATG-3' (19mer) (DMO 513) (SEQUENCE ID No. 29), 5'-CTG-GACGTGGACCTGCAG-3' (18mer) (SEQUENCE ID No. 30), 5'-GTAAATGATGACCACATC-3' (18mer) (DMO 515) (SEQUENCE ID No. 31), 5'-TGTAACACGACGCGCCAGT-3' (18mer) (M13 Vorwärtsprimer käuflich erworben von ABI) (SEQUENCE ID No. 32) und 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3' (18mer) (M13 Rückwärtsprimer von ABI) (SEQUENCE ID No. 33). Die Sequenzanalyse ergab eine Identität mit der GenBank-Sequenz mit Ausnahme der angenommenen Änderung an der NcoI-Stelle, was zu einem Austausch von Serin zu Alanin (S2A) führte ([Fig. 24](#)).

2. Northern Blot

[0276] 8 µg Gesamt-RNA aus SP2/0 murinen B-Lymphomzellen wird in 1 × MOPS-Puffer/75% Formamid hergestellt und für 10 Min. bei 55°C hitzedenaturiert und auf ein 1,2% Agarosegel in 1 × MOPS-Puffer geladen. Nach Überführung auf Nitrozellulose wird der Blot mit dem menschlichen gmk-Gen beprobt.

[0277] Das 600 bp BamHI-Fragment wird Gel-isoliert aus pUC118:Hugmk und wird markiert unter Verwendung des Radom primer labeling Kits von Amersham gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die freie Radiomarkierung wird durch Größenausschlusschromatographie entfernt. Nach Hybridisierung und Waschungen wird der Blot gegenüber Röntgenfilm bei -70°C für zwei Tage exponiert. Das Autoradiogramm des Northern Blots ergibt eine einzelne 750 nt RNA-Spezies. In einem ähnlichen Experiment unter Verwendung von poly A+-RNA aus proliferierenden B-Lymphozyten wird ebenfalls eine einzelne ~ 750 nt Bande beobachtet.

B. Isolierung von Maus-Guanylatkinasegen

1. Screenen einer Maus-cDNA-Bibliothek

[0278] Eine Lambda-gt10-cDNA-Bibliothek von Maus 702/3-Zellen (B-Lymphome) wird beprobt unter Verwendung des menschlichen Gens (gleiche Sonde wie für Northern Blot-Analyse verwendet). Die Gesamtanzahl von gescreenten Plaques beträgt 2×10^5 pfu. Neun unabhängige Lambda-Klone hybridisierten mit der menschlichen Sonde und werden Plaquegereinigt.

2. Subklonierung und Sequenzanalyse von positiven Klonen

[0279] Die EcoRI-Fragmente von acht Phagen-DNA-Präparaten werden Gel-isoliert und in pUC 118, der mit EcoRI restringiert und dephosphoryliert ist, subkloniert. Die DNA-Insertgrößen reichen von ~ 300 bp bis 1,2 kb. Vorläufige Sequenzanalyse mit Primer (M13 Vorwärtsprimer) zeigt, dass alle Klone etwa 60 bp 5' zu dem mutmaßlichen ATG-Startcodon begannen, wie durch Sequenz-Alignment mit den menschlichen und Rinder-Guanylatkinase-Sequenzen bestimmt, und variierten an ihren entsprechenden 3'-Enden. Ein typischer Klon (beide Stränge) ist vollständig sequenziert unter Verwendung der folgenden Oligonukleotide: 5'-TGTGTCCCATAC-TACTACAAG-3' (21mer) (DMO 592) (SEQUENCE ID No. 34), 5'-TGAGAACTCAGCAGCATGCTC-3' (21mer) (DMO 594) (SEQUENCE ID No. 35), 5'-GTGCTAGATGTCGACCTA-3' (18mer) (DMO 595) (SEQUENCE ID No. 36), 5'-ACCTGGATAAAGCCTATG-3' (18mer) (DMO 674) (SEQUENCE ID No. 37), 5'-AAGCAGGCG-CTCTCTCTGA-3' (19mer) (DMO 675) (SEQUENCE ID No. 38), 5'-CTATTTCTCATATGATGT-3' (18mer) (DMO 731) (SEQUENCE ID No. 39) und 5'-GTTACAGTGTCTCTAGAG-3' (18mer) (DMO 732) (SEQUENCE ID No. 40), 5'-TCCCCCACCTCCAGGC-3' (16mer) (DMO 748) (SEQUENCE ID No. 52), 5'-CTCAGTGTTGCCAGTTCG-3' (18mer) (DMO 749) (SEQUENCE ID No. 53) und 5'-GCCGAAGATGCTGCTGTG-3' (18mer) (DMO 750) (SEQUENCE ID No. 54). Die finale murine Guanylatkinasegensequenz ist in [Fig. 25](#) mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz gezeigt.

3. Einführung einer neuen Restriktionsstelle

[0280] Eine neue NcoI-Restriktionsstelle wird an dem Startcodon des offenen Leserahmens der Maus-Guanylatkinase eingeführt, wie in Black, M. E. und Hruby, D. E. (J. Biol. Chem. 265: 17584–17592, 1990) beschrieben. Das verwendete mutagene Oligonukleotid ist: 5'-CTAGGTCCTG[CCATGG]CGTCCGCG-3' (24mer) (DMO676) (SEQUENCE ID No. 41) wobei die NcoI-Stelle in Klammern gezeigt ist und die Nukleotide in Fettdruck eine C to G-Änderung zeigen. Der sich ergebende Klon pUC118:Mugmk-NcoI wird sequenziert, um die Orientierung und den 5'-Verbindungsbereich. Zu bestätigen

C. Konstruktion von Vektoren für in-vitro-Transkriptions- und Translationsanalyse

[0281] Sowohl die menschlichen als auch murinen Guanylatkinasegene werden in pET23d (siehe Beispiel 8) subkloniert. Das 600 bp NcoI/BamHI-Fragment von pUC118:Hugmk wird gelisoliert und direktional in pET23d (siehe Beispiel 8) subkloniert, restringiert mit NcoI und BamHI. Das murine Guanylatkinasegen wird Gel-isoliert als ein ~ 800 bp NcoI/EcoRI-Fragment unter Verwendung der eingeführten NcoI-Stelle an dem ATG und der EcoRI-Stelle aus dem pUC118 3'-Polylinker-Bereich und in den pET23d kloniert (siehe Beispiel 8), restringiert mit NcoI und EcoRI. Die sich ergebenden Plasmide, pET23d:HgmK und pET23d:MgmK, werden dann als Matrize für in-vitro-Transkription verwendet und die produzierten mRNAs werden in einem zellfreien Translations-system von Kaninchen-Retikulozytenlysats, wie in den Beispielen 3 und 8 beschrieben, verwendet. Enzymtests, um die Vollängenproteinproduktion und -aktivität zu bestätigen, sind wie in Agarwal et al. (Methods in Enzymol.

51: 483–490, 1978) beschrieben, wobei Rinderguanylatkinase, die von Sigma gekauft ist, als Positivkontrolle dient.

D. Reinigung und Charakterisierung von menschlichen und Maus-Guanylatkinasen

1. Expressionsvektorkonstruktion

[0282] Der pET23d-Vektor (Novagen, Madison, WI) wird als Vektorrückgrat für die Konstruktion von pET:HT verwendet. Dieser Vektor enthält ein 6 Histidin-Restpeptid gefolgt von einer Thrombin-Spaltungsstelle, um die Expression einer entfernbaren Histidin-Markierung zu erlauben, die an den N-Terminus des Zielgenproduktes fusioniert ist. Die Synthese des 6-His-Thrombin-Fusion-codierenden Bereiches erfolgt durch PCR-Amplifikation des Promotorbereiches von pET23d und Verlängerung unter Verwendung der folgenden Primer in drei sequenziellen PCR-Amplifikationsschritten. 5'-ACTACTACTA GATCTCGATC CCGCGAA-3' (27mer) (DMO 604) (SEQUENCE ID No. 42), 5'-ATGATGATGA TGATGGCTGC TAGCCATAGT ATATCTCCTT C-3' (41mer) (DMO 605) (SEQUENCE ID No. 43), 5'-CGGCACCAGG CCGCTGCTGT GATGATGATG ATGATGGCT-3' (39mer) (DMO 606) (SEQUENCE ID No. 44), 5'-AGTAGTAT[CCATGG]AGCTGC CGCGCGGCAC CAGGCCGCTG CT-3' (42mer) (DMO 607) (SEQUENCE ID No. 45). Die Sequenz DMO 604 wird an den BgIII-Bereich von pET23d in allen PCR-Amplifikationsschritten aneliert. Die Sequenz DMO605 wird an den Bereich aneliert, der der NcoI-Stelle in einer 3' → 5'-Orientierung entspricht und führt zum Verlust der NcoI-Stelle infolge einer Nukleotidmutation, die in Fettdruck in der obigen Sequenz gezeigt ist. Nachfolgende Amplifikationen mit Sequenz DMO 606 oder DMO 607 in der 3' → 5'-Orientierung werden mit Sequenz DMO 604 gepaart, um die Sequenz für die Hinzufügung von 6 Histidincodons und eine Thrombinspaltungsstelle zu verlängern. Eine neue NcoI-Stelle wird ebenfalls mit Sequenz DMO 607 eingeführt, wie in Klammern oben gezeigt. Das finale BgIII/NcoI-Fragment wird in pET23d an den korrespondierenden Stellen inkloniert, um pET:HT zu erzeugen. pET:HT wird sequenziert, um die korrekte Synthese und Insertion zu bestätigen. Die Aminosäuresequenz des neuen Vektorfusionspeptids lautet: M A S S H H H H H S S G L V P R G S S M (NcoI-Stelle) (SEQUENCE ID No. 46), wobei die Thrombinspaltungserkennungsstelle untestrichen ist. Die Spaltung mit Thrombin erfolgt zwischen dem Arginin- und Glycinrest.

2. Überexpression in E. coli und Affinitätsreinigung

[0283] Verfahren für die Überexpression und Analyse sind wie in Beispiel 8. Die Affinitätsreinigung unter Verwendung von His-Bind-Harz (Novagen, Madison, WI) wird durchgeführt gemäß den Weisungen des Herstellers. Thrombin wird verwendet, um die 17 terminalen Aminosäuren abzuspalten, um drei Aminosäuren N-terminal zu dem Guanylatkinase initiiierenden Methionin zu belassen. Das Leader-Peptid wird dann entfernt, indem die Spaltungsmischung über die His-Bind-Säule ein zweites Mal geführt wird.

3. Enzymkinetiken

[0284] Die K_m -, V_{max} - und K_{cat} -Werte für Guanylat, GCV-Monophosphat und Acyclovir-Monophosphat werden bestimmt unter Verwendung von gereinigten menschlichen und Maus-Guanylatkinasen. Zusätzlich zur Verwendung der in Agarwal et al. (Methods in Enzymol. 51: 483–490, 1978) beschriebenen Testprotokolls werden die Nukleotidprodukte, die aus Tests erzeugt werden, die mit Radionukleotidsubstraten durchgeführt werden, durch Dünnschichtchromatographie und Szintillationszählung analysiert.

E. Expression von menschlichen und murinen Guanylatkinasen in Säugetierzellen

1. Vektorkonstruktion

[0285] Sowohl menschliche als auch murine Guanylatkinasegene werden in einem modifizierten pREP8-Vektor kloniert. Kurz gesagt wird für die Konstruktion des modifizierten pREP8 (pREP8-7kb), pREP8 (Invitrogen) mit BstEII und XbaI verdaut, mit Klenow aufgefüllt und erneut ligiert. Das sich ergebende Plasmid, pREP8-7kb, codiert nicht länger für EBNA-1 oder den EBV-Replikationsursprung (oriP). Beide Guanylatkinasen, pEP23d:hgmK und pEP23d:mgmK (oben beschrieben) werden mit NcoI restringiert, glattendig gemacht und dann mit BamHI verdaut, um ein –600 bp NcoI(glattendiges)-BamHI-Fragment nach Gelreinigung zu erhalten. Diese werden mit pREP8-7kb ligiert, das mit HinDIII (glattendig) und BamHI verdaut worden ist. Die neuen Plasmide werden als pREP8-7:hgmK und pREP8-7:mgmK bezeichnet.

2. Isolieren von stabilen Transfektanten, die HSVTK exprimieren

[0286] BHKtk-(ts13)-Zellen werden mit pCMV, pCMV:TK, pCMV:30 und pCMV:75 DNA in Gegenwart von pSV2-neo (Verhältnis 10:1) wie in Beispiel 8 beschrieben transfiziert. Etwa 10–20 einzelne Klone von einer jeden pCMV-DNA-Transfektion werden unter 1 mg/ml G418-Selektion isoliert. Wie in Beispiel 8 werden etwa 2×10^6 Zellen pro Klon für TK-Expressionsniveau durch Western Blot unter Verwendung von polyklonalem anti-TK-Serum untersucht.

[0287] Die Expression von TK-Klon C3 ist sehr hoch, wohingegen 75 D4 und 30 A2 weniger als die Hälfte des TK-Expressionsniveaus von C3 ausmachen. 75 D2-, D3- und D4-Proteinexpression reichte von sehr niedrig, bzw. niedrig bis moderat.

3. Empfindlichkeit von Klonen gegenüber GCV oder ACV

[0288] Die Klone wurde auf Empfindlichkeit gegenüber GCV und ACV wie in Beispiel 8 beschrieben getestet. Die Empfindlichkeit gegenüber GCV und ACV hängt vom Ausmaß der Proteinexpression ab. Dies kann deutlich mit den 75-Klonen, D2, D3 und D4 gesehen werden, wo der Klon D4 mit der höchsten Expression der empfindlichste ist, D3 weniger und D2 noch weniger empfindlich als D3 gegenüber Prodrugs ist. ([Fig. 26](#), [Fig. 27](#))

4. Transfektion von TK-exprimierenden Zellen mit pREP8-7-Guanylatkinasekonstrukten

[0289] pREP8-7, pREP8-7:hgmK und pREP8-7:mgmK werden verwendet, um BHK tk, TK-transfizierten Klon C3 und 75-transfizierten Klon D4 zu transfizieren. Histidinol wird verwendet, um Pools stabiler Transfektanten zu selektieren und einzelne Klone zu isolieren.

[0290] Proteinexpressionsniveaus von Guanylatkinase in den verschiedenen Pools wird durch Immunblotanalyse bestimmt. Kurz gesagt werden 5 µl Pelletlysate von 2×10^6 Zellen (200 µl) einer Elektrophorese unterzogen und auf Nitrozellulose transferiert. Polyklonales anti-Guanylatkinaseserum (bei einer Verdünnung von 1:5.000) und TK-Antiserum (bei einer Verdünnung von 1:10.000) werden verwendet, um die sich ergebenden Proteinbanden nachzuweisen.

5. Empfindlichkeit von Guanylatkinasetransfektantenpools gegenüber GCV und ACV in TK-Expressionsklonen

[0291] Wie in Beispiel 8 werden Pools von Transfektanten in Mikrotiterschalen mit 96 Näpfen zu 1000 Zellen/Napf gegeben. Acht Replikate werden für drei Tage in Gegenwart verschiedener GCV- oder ACV-Konzentrationen inkubiert.

[0292] Wie in den [Fig. 28](#) und [Fig. 29](#) zu sehen ist, steht das Ausmaß an Prodrug-Empfindlichkeit in Beziehung mit dem Ausmaß der TK-Proteinexpression und der Anwesenheit von Guanylatkinase. Guanylatkinase-Expression in Gegenwart von Wildtyp-TK zeigt etwa 2-fach erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ACV verglichen mit TK-Expression alleine. Trotz des halben Expressionsniveaus von Wildtyp-TK ist die Empfindlichkeit gegenüber ACV durch gmK + 75 D4 exprimierende Zellen 6–7 Mal größer als die von TK-exprimierenden Zellen:

F. Konstruktion und Analyse von Dualexpressionsvektoren in vivo

[0293] Das HSV1-tk-Gen wird in die HpaI-Stelle von pLXSN (Miller und Rosman, BioTechniques 7: 980–990, 1989) als ein NcoI (glattendiges) Fragment cloniert und die Orientierung durch Restriktionskartierung bestimmt. Dies ordnet das HSV-1-tk-Gen hinter den MoMLV LTR-Promotor an. Das Neomycin-Phosphotransferasegen wird durch das Guanylatkinasegen (Mensch oder Maus) als ein BamHI- (glattendiges) Fragment ersetzt, so dass die Guanylatkinase-Genexpression vom SV40-Promotor losläuft. Zusätzlich werden Vektoren konstruiert, wo die Reihenfolge des tk- und gmK-Gens umgedreht ist, so dass das tk-Gen von dem SV40-Promotor und gmK von dem LTR-Promotor exprimiert wird. Vektorkonstrukte mit einzelnen Genen (tk oder gmK) werden ebenfalls konstruiert. Weiterhin werden auch Expressionsvektoren, die HSV-1-tk-Mutanten anstelle der Wildtyp-HSV-1-tk-Gene enthalten, konstruiert.

[0294] Wie in Beispiel 8 wird Plasmid-DNA von den oben beschriebenen Konstrukten verwendet, um ts13 BHK tk-Zellen, menschliche SF767 Glioblastomzellen und Ratten-C6-Glioblastomzellen in Gegenwart eines Markerplasmides (pSV2-neo) transfiziert, um die Selektion von Transfektanten auf G418 zu ermöglichen.

[0295] Die Selektion von stabilen Transfektanten und Tests auf erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ACV und GCV sind wie in Beispiel 8 beschrieben.

BEISPIEL 12

KONSTRUKTION UND ANALYSE VON GUANYLATKINASE-THYMIDINKINASE-FUSIONSPROTEINEN

[0296] Dieses Beispiel veranschaulicht die Produktion und Analyse von mehreren Fusionsproteinen, die sowohl Guanylatkinase- als auch Thymidinkinase-Aktivitäten aufweisen.

A. Konstruktion von Fusionsproteinen

[0297] Die Verwendung eines Fusionsproteins für die Gentherapie würde nicht nur das Erfordernis für zwei Promotoren aufheben und die damit verbundene Verringerung der Prodrug-Aktivierung infolge der unterschiedlichen Promotorstärken, es würde auch die Expression von zwei Enzymfunktionen von einem einzelnen Promotor und einem einzelnen Cistron erlauben. Entsprechend sind Fusionsproteine für Gentherapievektoren vorteilhaft, die keine großen Stücke von Fremd-DNA tolerieren können, wie beispielsweise AAV-Vektoren.

[0298] Zwei Fusionsproteine sind konstruiert worden, die sowohl Wildtyp-HSV-1-TK- als auch marine Guanylatkinase (gmk)-Sequenzen enthalten. Diese Proteine unterscheiden sich in der Anzahl von Resten an der Fusionsstelle. Beide Fusionskonstrukte können von pET23d-Rückgratvektoren in *E. coli* überexprimiert werden. In beiden Fällen war Guanylatkinase benachbart dem Promotor angeordnet, wobei TK an die MscI-Stelle an dem 3'-Ende von gmk fusioniert ist, was die zwei C-terminalen Aminosäuren entfernt. Eine Fusion wurde so konstruiert, dass die ersten neun Aminosäuren von TK fehlen (pET23d:gmk/TK-trunk). Die andere Fusion enthielt die gesamte TK-Aminosäuresequenz (pET23d:gmk/TK-fl). Karten dieser Konstrukte sind in [Fig. 30](#) dargestellt.

[0299] Sechs zusätzliche Fusionsproteine sind konstruiert worden, bei denen die Wildtyp-TK-Sequenz von pET23d:gmk/TK-fl durch TK-Mutante 30, Mutante 75, Mutante 411, SR11-, SR26- oder SR39-Sequenzen ersetzt ist. Diese Fusionsproteine werden in BL21(DE3)tk-Zellen überexprimiert.

B. Analyse von Fusionsproteinen

[0300] Alle der obigen Konstrukte wurden in pREP8D7:dualGFP kloniert, wie oben beschrieben. Diese Vektoren wurden verwendet, um BHK tk-Zellen zu transfizieren und Transfektanten wurden auf der Grundlage von Resistenz gegen Histidinol selektiert. Weiteres Screenen auf GFP-Expression wurde durchgeführt unter Verwendung von FACS-Analyse. Zusätzlich wurde das gmk/TK-fl-Konstrukt verwendet, um Ratten-C6-Gliomazellen zu transfizieren und positive Klone/Poolen wurden ausgewählt, wie oben beschrieben. Eine Ganciclovir-Dosis-Antwort-Kurve, die gmk/TK-trunc mit Wildtyp-TK in Ratten-C6-Zellen vergleicht, ist in [Fig. 31](#) gezeigt. Diese Kurve zeigt einen 100-fachen Unterschied hinsichtlich der IC_{50} zwischen den zwei Enzymen, wobei das Fusionsprotein das überlegene ist.

[0301] Beide Wildtyp-TK-gmk-Fusionsproteine werden in *E. coli* überexprimiert und auf Reinheit unter Verwendung von Affinitätschromatographie gereinigt. Michaelis-Menten-Kinetiken für sowohl Thymidinkinase- als auch Guanylatkinase-Aktivitäten wurden untersucht mit beiden Fusionsproteinen und die Ergebnisse sind in Tabelle X gezeigt. Die Thymidinkinase-Aktivität ist ähnlich den Wildtyp-Niveaus. Die gmk-Funktion ist jedoch 3,8- bis 5,8-fach verschlechtert bei den Fusionsproteinen verglichen mit Wildtyp-gmk. Nichtsdestotrotz wiesen die Fusionsproteine sowohl Guanylatkinase als auch TK-Aktivitäten auf.

Tabelle X

Kinetische Analyse von Fusionsproteinen

Km (μ M)	gmk	gmk/TK-trunk	gmk/TK-fl	TK
GMP	25	95	146	-
dGMP	-	218	359	-
Thymidin	-	0,67	0,5	0,3

Patentansprüche

1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das für ein Fusionsprotein kodiert, das einen Guanylatkinaseteil und einen Thymidinkinaseteil umfasst, wobei das Fusionsprotein eine biologische Aktivität einer Guanylatkinase und eine biologische Aktivität einer Thymidinkinase besitzt, wobei der Thymidinkinaseteil entweder eine Thymidinkinase von Herpesviridae oder eine mutierte Thymidinkinase von Herpesviridae ist, die eine verglichen mit nicht mutierter Thymidinkinase erhöhte biologische Aktivität aufweist.
2. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei wenigstens entweder der Guanylatkinaseteil oder der Thymidinkinaseteil verkürzt ist.
3. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei der Guanylatkinaseteil eine Säugetier-Guanylatkinase ist.
4. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 3, wobei der Säugetier-Guanylatkinaseteil eine murine Guanylatkinase oder eine humane Guanylatkinase ist.
5. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei die mutierte Thymidinkinase ein Enzym ist, das eine oder mehrere Mutationen umfasst, wobei wenigstens eine der Mutationen eine Aminosäuresubstitution kodiert, die zum N-Terminus von einer DRH-Nukleosidbindungsstelle hin angeordnet ist.
6. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei die mutierte Thymidinkinase ein Enzym ist, das eine oder mehrere Mutationen umfasst, wobei wenigstens eine der Mutationen eine Aminosäuresubstitution innerhalb einer DRH-Nukleosidbindungsstelle ist.
7. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei die mutierte Thymidinkinase ein Enzym ist, das wenigstens drei Mutationen umfasst, wobei wenigstens zwei der Mutationen Aminosäuresubstitutionen kodieren, die ein, zwei oder drei Aminosäuren zum N-Terminus von einer DRH-Nukleosidbindungsstelle hin angeordnet sind, und wenigstens eine der Mutationen, die eine Aminosäuresubstitution kodieren, vier oder fünf Aminosäuren zum C-Terminus von einer DRH-Nukleosidbindungsstelle hin angeordnet ist.
8. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 5, wobei die mutierte Thymidinkinase ein Enzym ist, das wenigstens eine Mutation in der Q-Substrat-Bindungsstelle umfasst.
9. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei die Thymidinkinase ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Thymidinkinase von Herpes Simplex-Virus Typ 1 und Thymidinkinase von Herpes Simplex-Virus Typ 2.
10. Expressionsvektor umfassend das isolierte Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1.
11. Expressionsvektor nach Anspruch 10, weiter umfassend einen Promotor, der funktionsfähig mit dem Nukleinsäuremolekül verbunden ist.
12. Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2, der für ein Thymidinkinaseenzym von Herpesviridae kodiert, und radioaktiv markierter antiviraler Wirkstoff, der ein Substrat für die Thymidinkinase ist, zur Verwendung in einem Verfahren zum Überwachen des Fortschritts einer Gentherapie in einem Lebewesen, das den Vektor erhalten hat, wobei das Verfahren den Schritt umfasst, das Lebewesen auf die Anwesenheit des radioaktiv markierten antiviralen Wirkstoffes hin abzutasten.

Es folgen 31 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

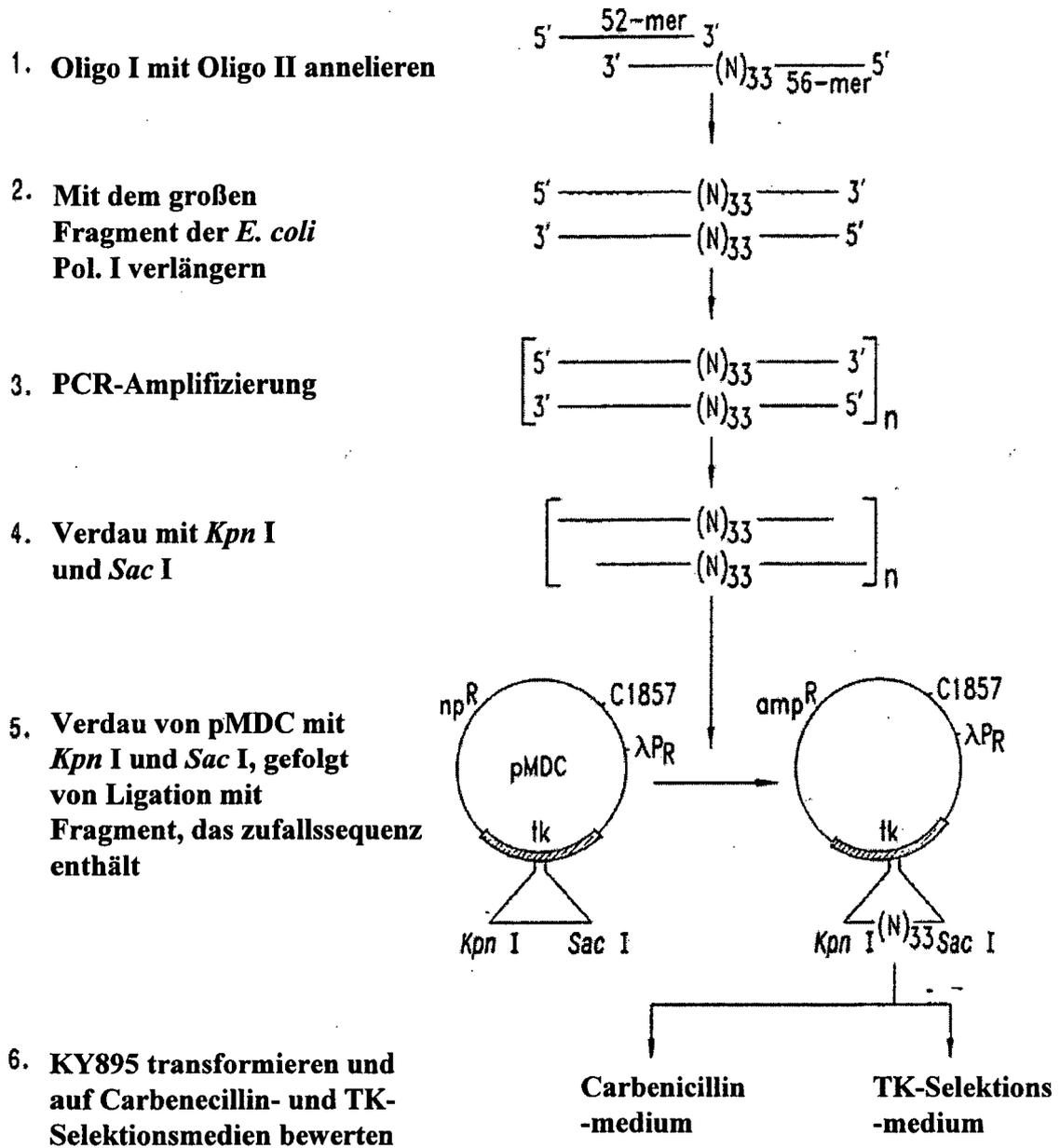


Fig. 1

TK-Selektion

AZT-Selektion



FIG. 2

165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	
CCC	ATC	GCC	GCC	CTC	CTG	TGC	TAC	CCG	GCC	GCG	Wildtyp
Pro	Ile	Ala	Ala	Leu	Leu	Cys	Tyr	Pro	Ala	Ala	
CCC	ATC	GCC	GCC	CTC	ATC	TGC	TAC	CCG	GCC	GCG	TKF 105
Pro	Ile	Ala	Ala	Leu	Ile	Cys	Tyr	Pro	Ala	Ala	
CCC	ATC	GCC	GCC	CTC	GTG	TGC	TAC	CCG	GCC	GCG	TKI 208
Pro	Ile	Ala	Ala	Leu	Val	Cys	Tyr	Pro	Ala	Ala	
CAC	ATC	TCG	GCC	CTC	CTG	TGC	TAC	CCG	GTC	GCG	TKF 2
His	Ile	Ser	Ala	Leu	Leu	Cys	Tyr	Pro	Val	Ala	

Fig. 3

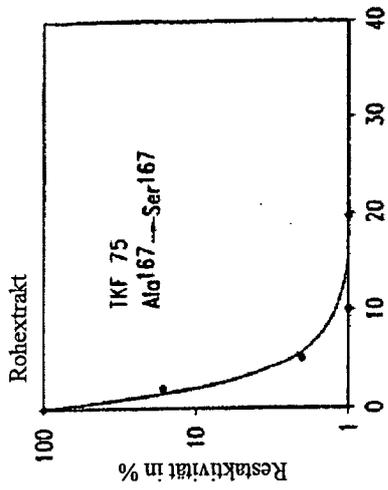


Fig. 4C

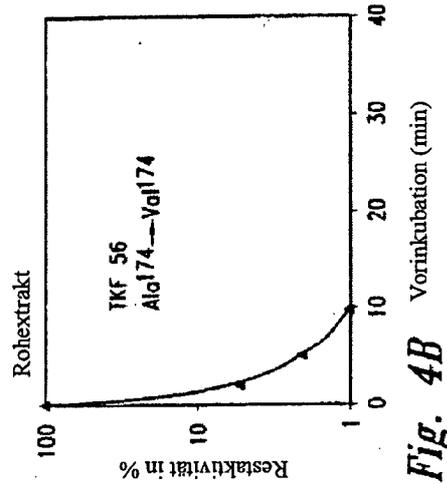


Fig. 4B

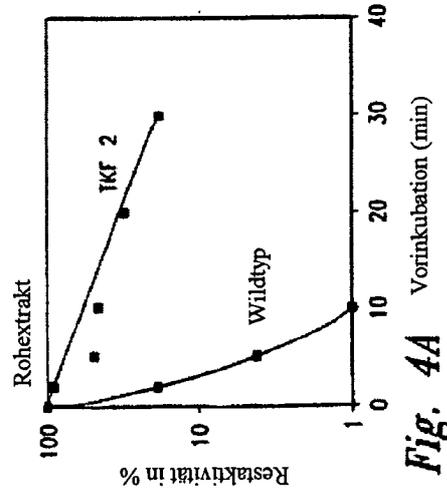


Fig. 4A

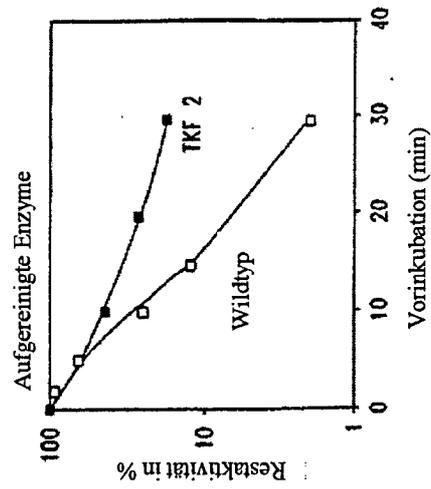


Fig. 4E

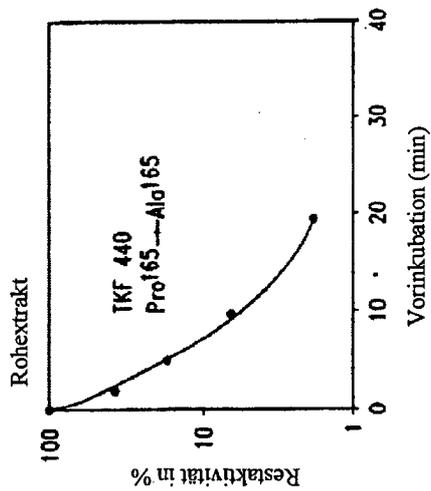


Fig. 4D

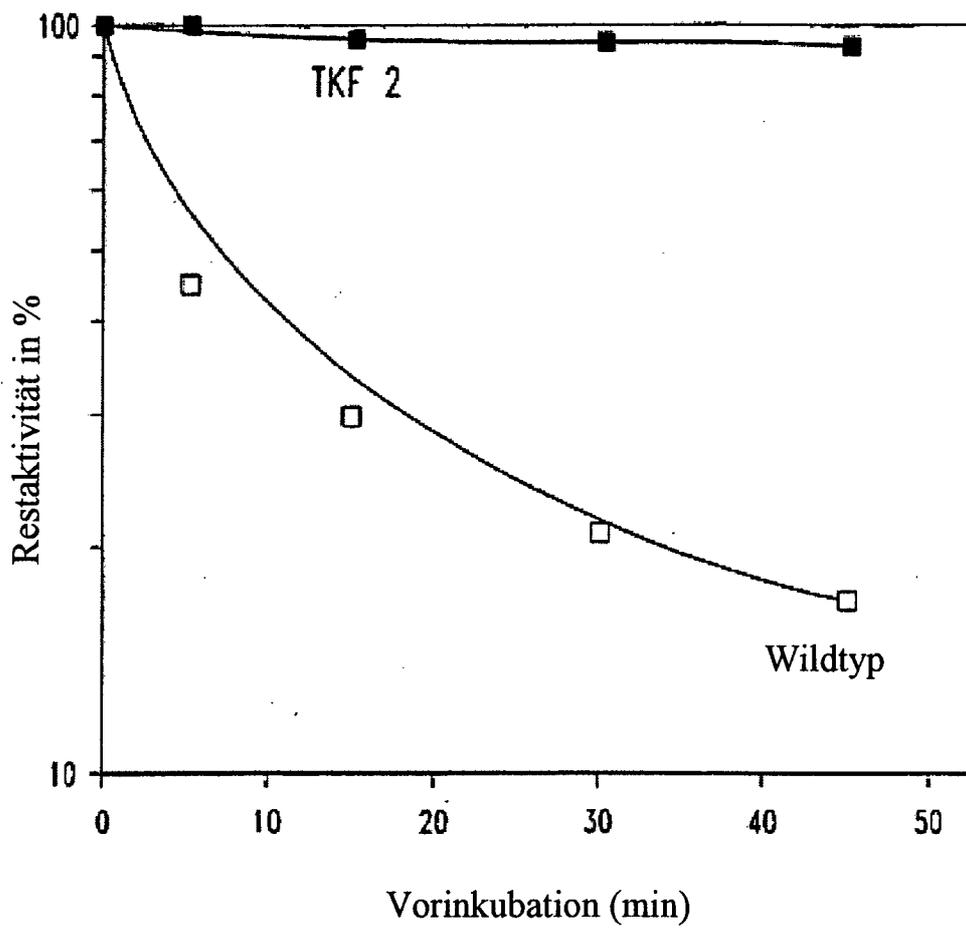


Fig. 5

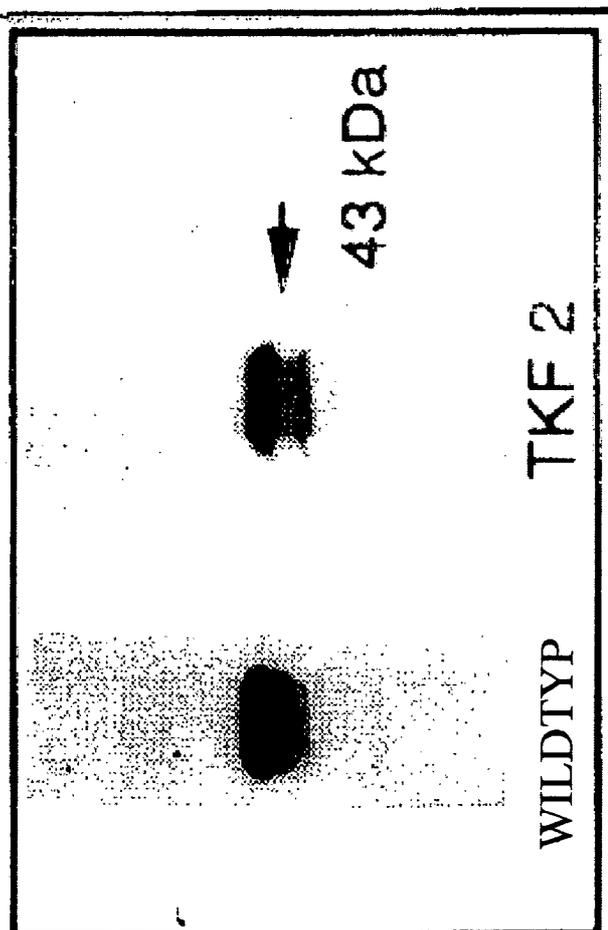


FIG. 6

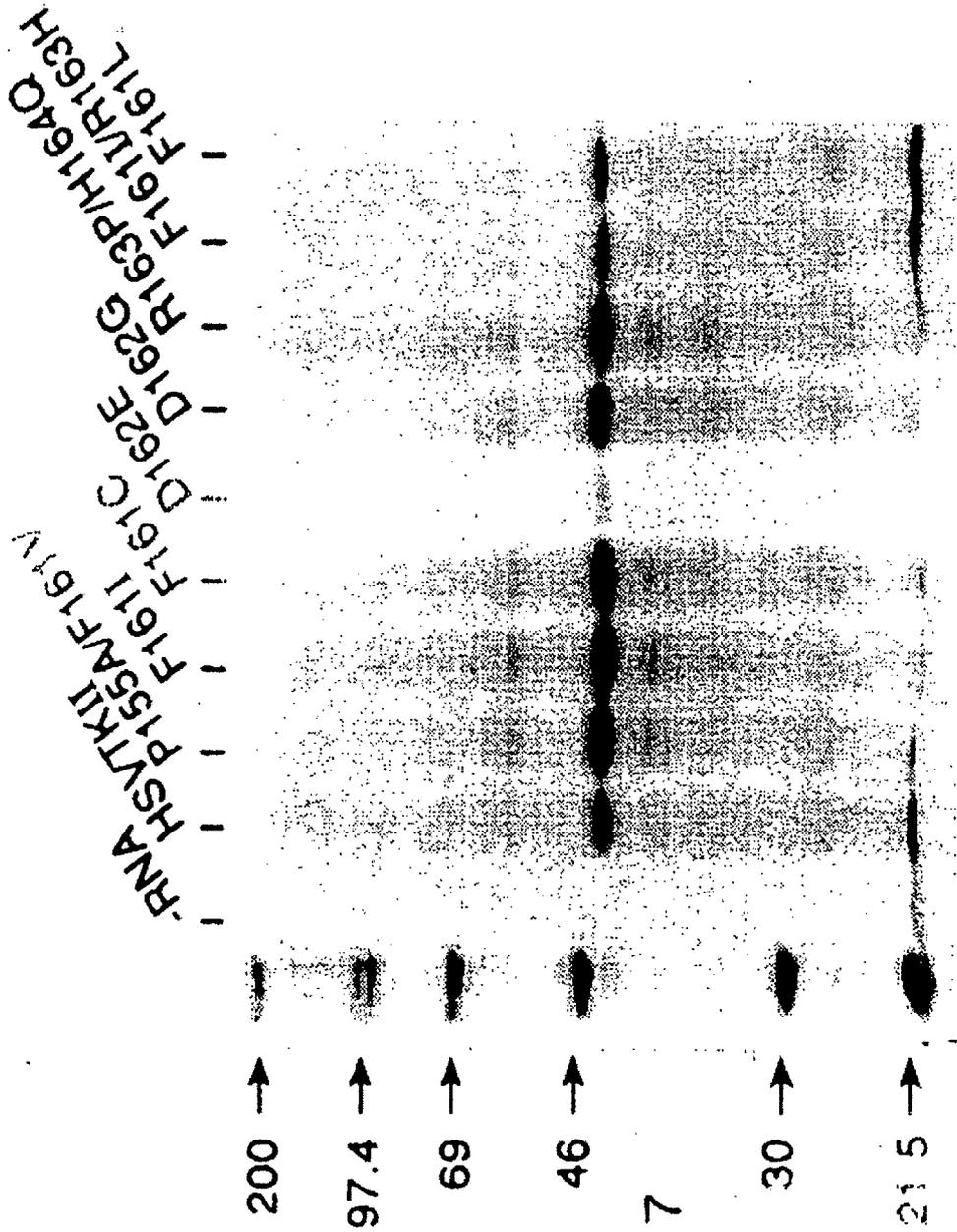


FIG. 7

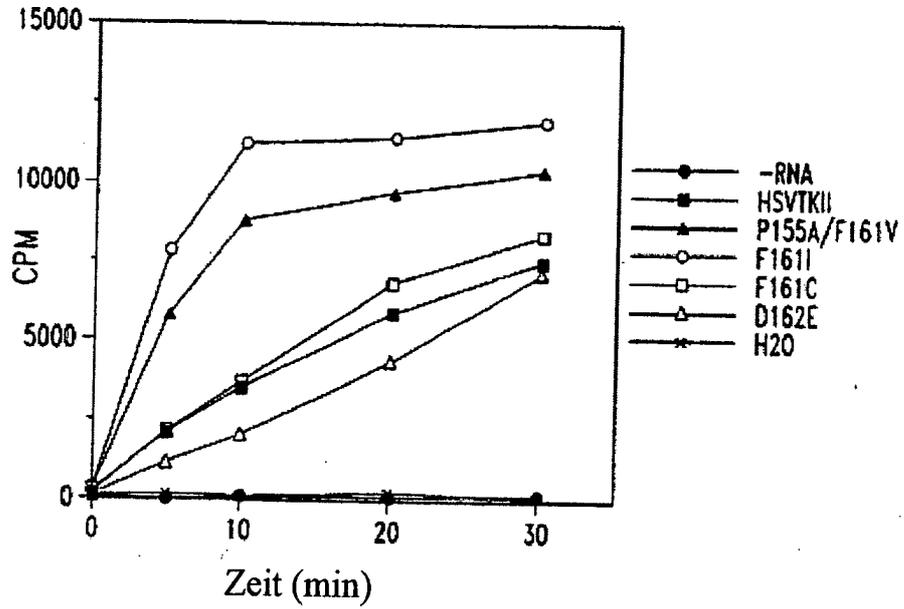


Fig. 8A

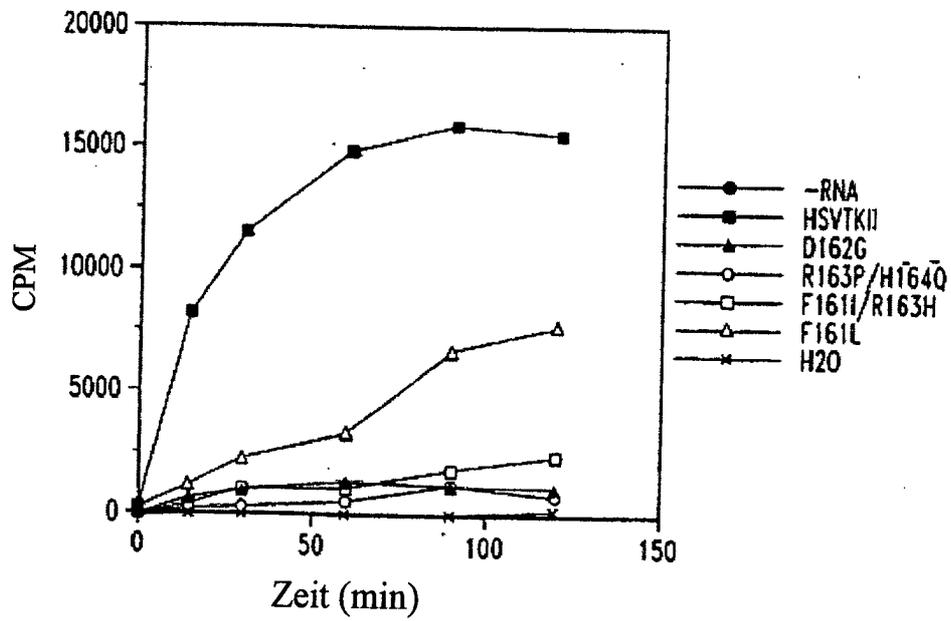


Fig. 8B

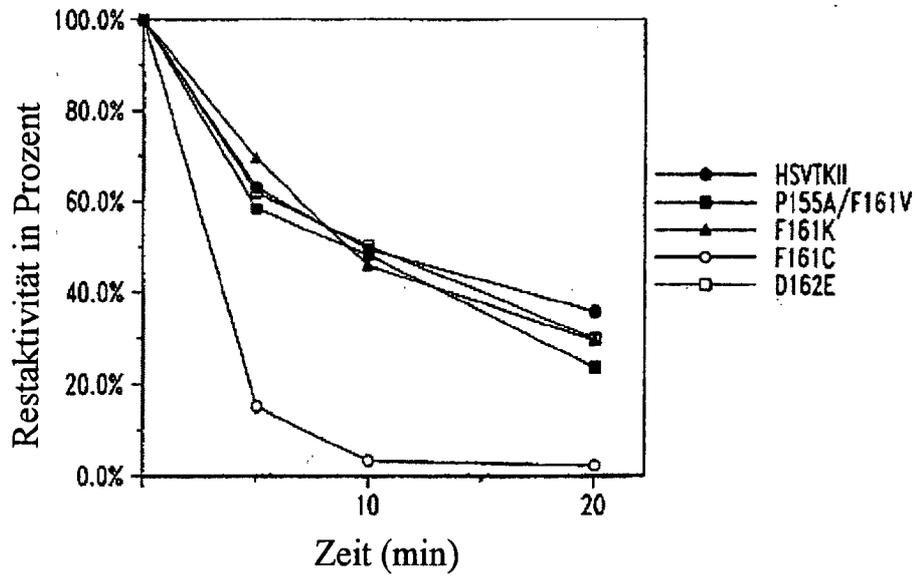


Fig. 9A

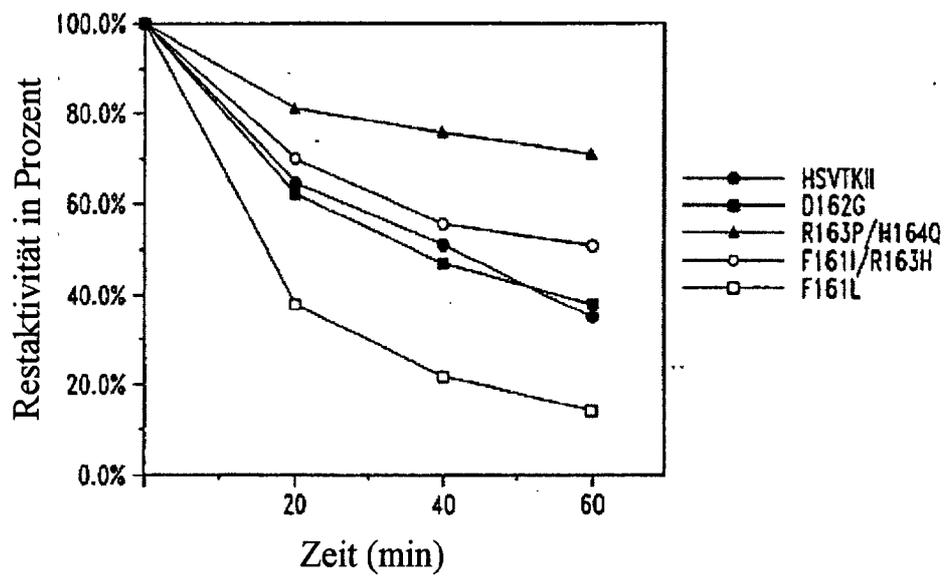


Fig. 9B

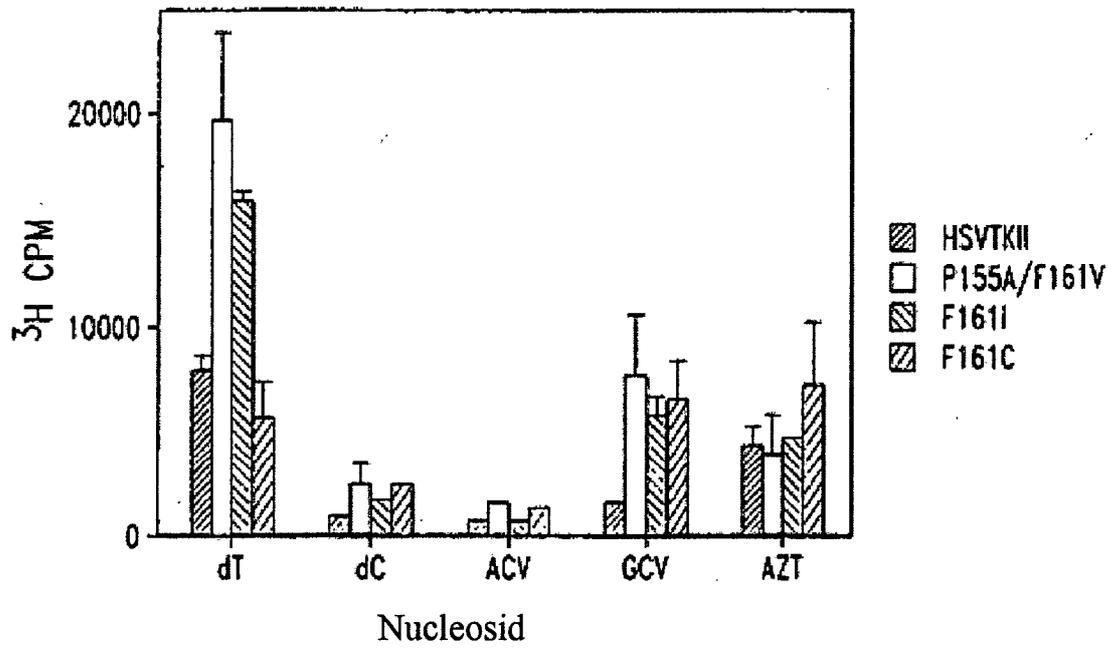


Fig. 10

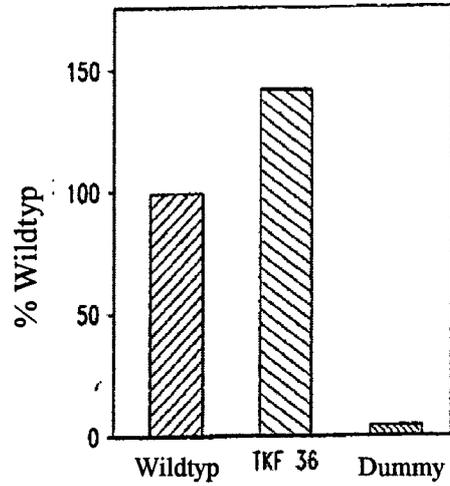


Fig. 11

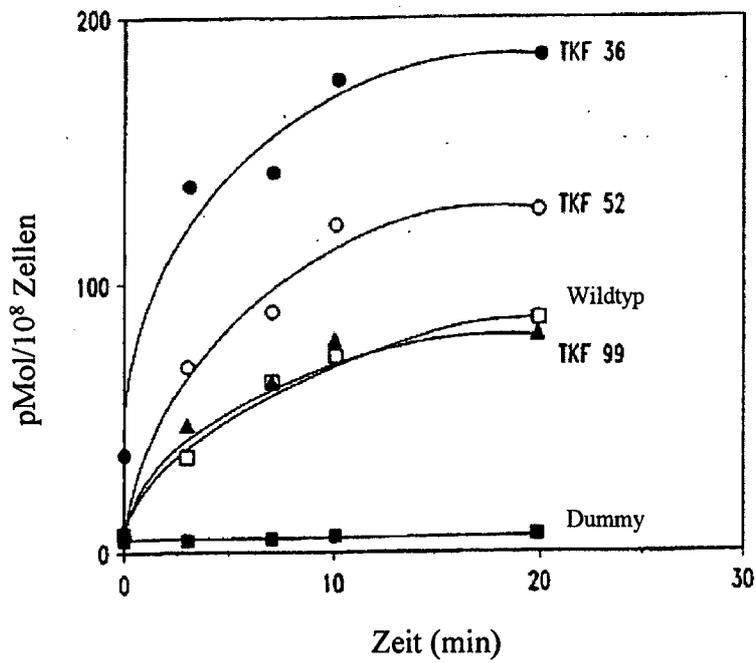


Fig. 12

Gentherapie unter Verwendung von HSV-1-Thymidinkinase

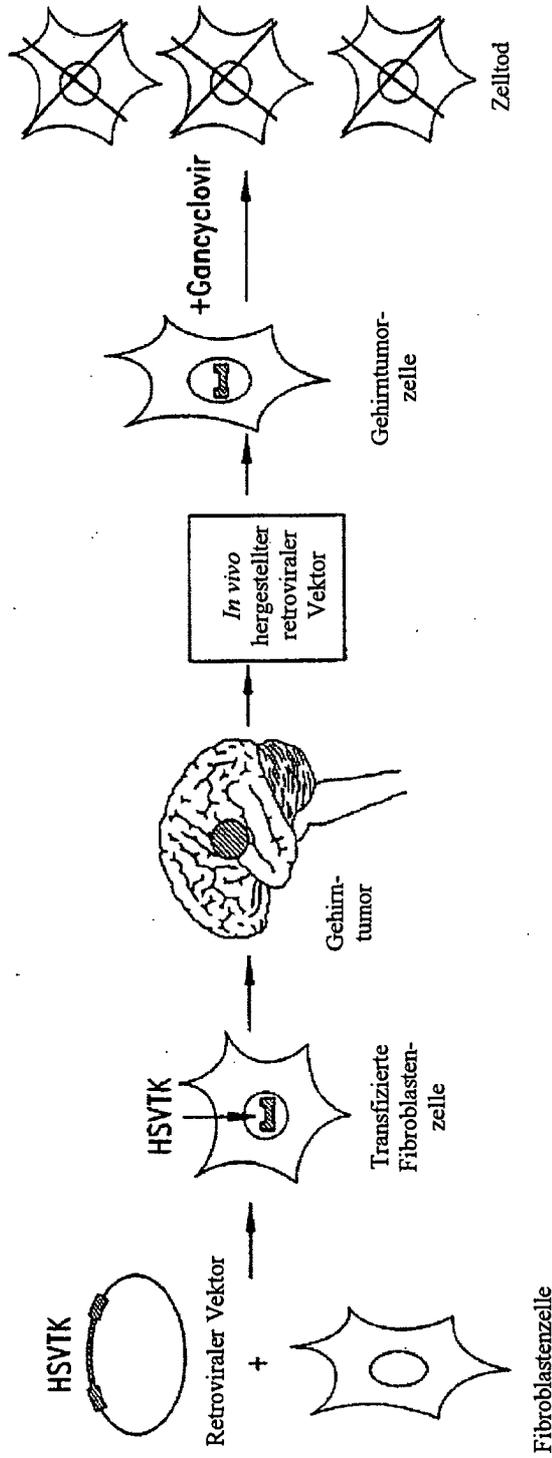


Fig. 13

LIF-ALL -Bibliothek

HSV-1
 TK
 159 160 161
 A L T L I F
 168 169 170
 A A L L
 168 169 170
 P I A A L L
 168 169 170
 D R H P I A A L L
 168 169 170
 C Y P I
 168 169 170
 Stelle 3
 Stelle 4
 Rest
 Nummer

Gescreente 18 Nukleotide
 100 % Zufallstransformanten 1.1 x 10
 Aktive Klone
 Selektionsplatten 428
 Selektionsmedium 426

Fig. 14

Gegen GCV oder ACV empfindliche Mutanten

GCV		ACV	
Selektion	Anz. der Mutanten	Selektion	Anz. der Mutanten
dT (2 µg/ml)	426	dT (2 µg/ml)	426
GCV* (2 µg/ml)	197		
GCV* (1 µg/ml)	51	ACV* (1 µg/ml)	116
GCV* (0.5 µg/ml)	47		
GCV* (0 µg/ml)	26	ACV* (0 µg/ml)	54

*mit Thymidin (1 µg/ml)

Fig. 16

Nukleotidänderungen bei ausgewählten TK-Mutanten

	155	160	165	170	
WT	S H A P P A L T L I F D R H P I A A L L C Y P				
30	TCA CAT GCC CCG CCC GCC CCG CTC ACC CTC ATC TTC GAC CGC CAT CCC ATC GCC CTC CTG TGC TAC CCG				
51	GTC	ATT TTG GCT		GCA TAT TTC TTA	
75		GTA ATA ACA		TGC CTG CTT	
84		CTA CTA CTG		GTG ATG CTA	
132		TTG CTG		AGC TAC TGT	
197		ATG TTC ATG		CAT AAT GTA	
226		ATA TTG CTT		GCA ATT TAC TTA	
302		ATG GTT TTT		GTA GTC	
340		TTG TTC CTC		CTC ATG TGT	
411		GTA TTA	CGT	TAC TAT CTA	CCT
		TGT TTT CTC		TAT TAT CTT	
		-6 (CCG GCC)			
		-3 (G GC)			
		-3 (CCC)			

Kursivschrift zeigt Nukleotide, die sich von der Wildtyp-TK-Sequenz unterscheiden.

Fig. 17

Aminosäuresequenzen und Phosphorylierungsgrade von TK-Mutanten

Anzahl	Sequenz	Relative Aktivitäten (% HSVTK)		
		Thymin	GCV	ACV
HSVTK(WT)	L I F A L L	100%	100%	100%
30	I L A Y F -	2%	64%	72%
51	V - T C - -	6.7%	3.5%	13%
75	- L L V M -	65%	71%	434%
84	- - L S Y C	30%	73%	199%
132	M F M H N V	<0.5%	26%	38%
197	I L L I Y -	<0.5%	<0.5%	20%
226	F Y Y P F V	15%	26%	38%
302	- F L L M C	8%	11%	77%
340	- V L Y Y -	<0.5%	13%	47%
411	C F L Y Y -	<0.5%	21%	24%

Die folgenden Klone enthalten zusätzliche Aminosäureänderungen/-deletionen ausserhalb der randomisierten Region:

30	A152V
84	A156S
197	-6 deletion (P155 A156)
226	-3 deletion (P154)
340	-3 deletion (A156)
411	-3 deletion (P155)

Fig. 18

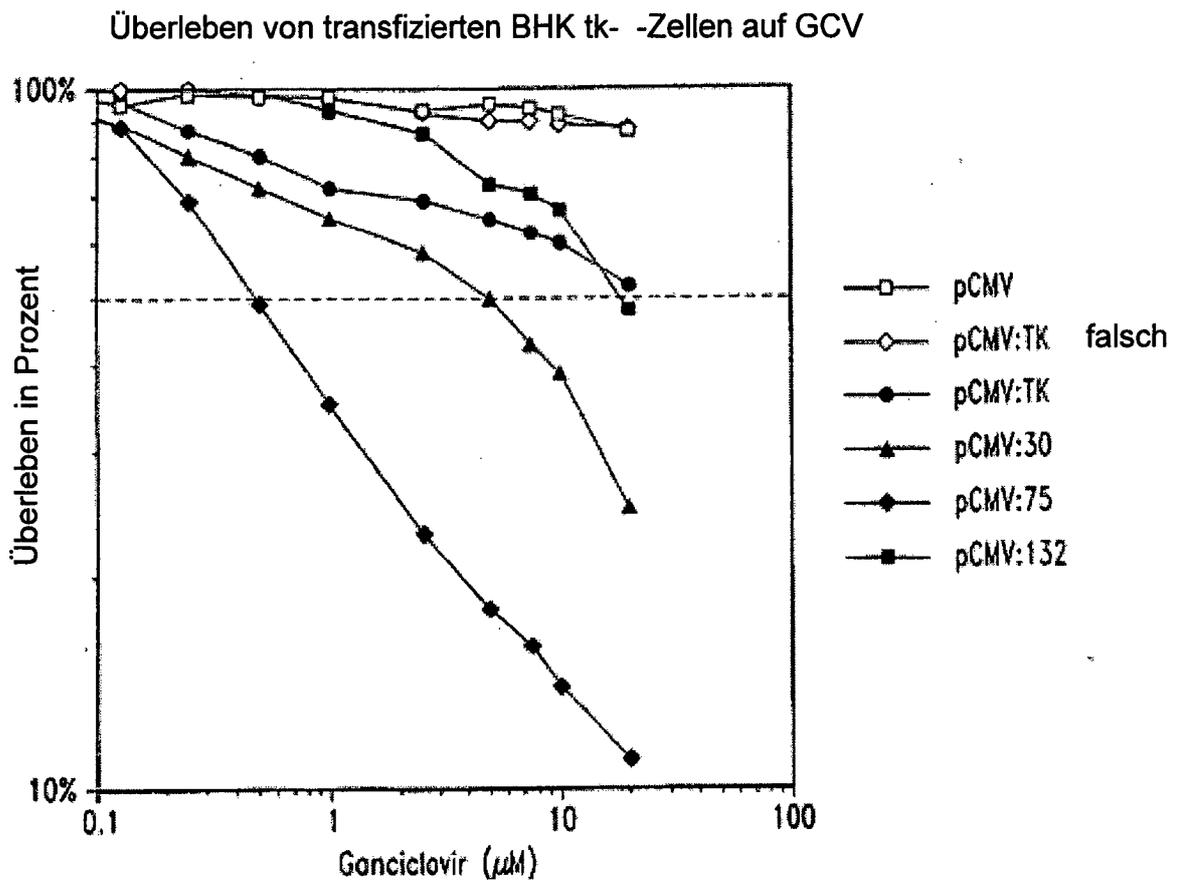


Fig. 19

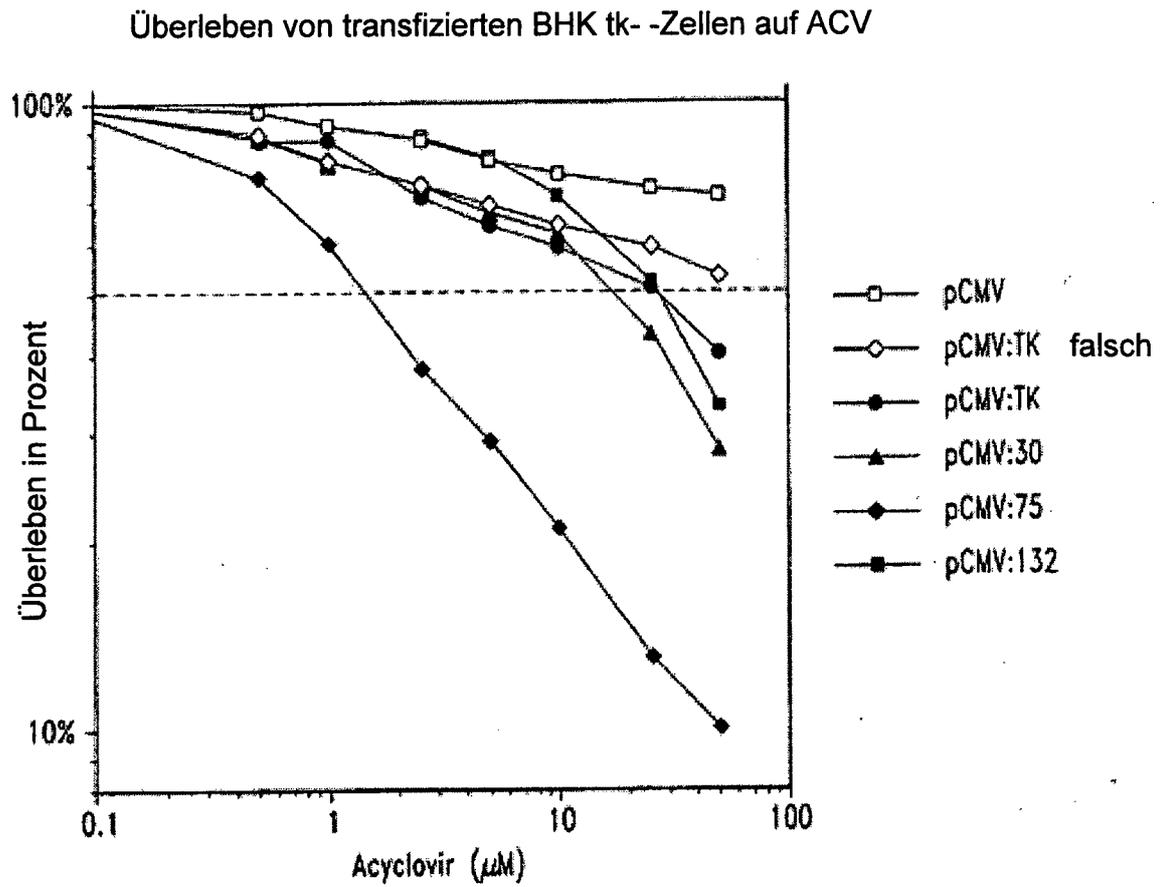


Fig. 20

Fig. 22

DMD-1860	CGCCTCGACCAAGGCTGAG	ATATCGGCCCGGGGACGGGGGCTGGTAAATGACAAAGCG	55 MER
DMD-1861	GAAGGGGGTGGTCAAGGC	ATAGGCAATGCCCATTTGTTATCTGGGGCCTTGTCAATTAC	58 MER
DMD-1893	GGGGCCTCCGAGACATCGGAACTCTACACCACACAAACAGCGCTCGACCAAGGCTGAG		59 MER
DMD-1894	TGGACTGAGCTCCGAGCCTCCGCGGATATGAGGHECCAGAGGGGCTGGGTACAGGC		60 MER
DMD-1895	GCAGCTGGGGCCTCCGAGACATC		24 MER
DMD-1896	TCCACTGAGCTCCGAGCCT		19 MER

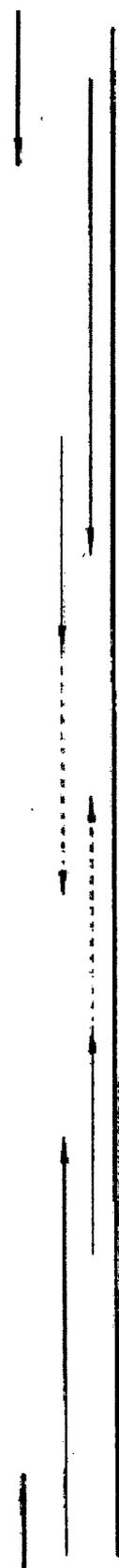


Fig. 23

ATGGCTTEGT A0000GG0CA TCAGCAGCG TGTGCGTTG ACCAGGCTG GCGTTCTG 60
 GGCCATAGCA A00GAGGTAC GGGGTTGCG CCTCGCCGG AGCAAGAAGC CAGGGAAGTC 120
 CGCC0GGAGC AGAAAATG0C CADGCTACTG CGGGTTTATA TAGACGCTCC CCACGGGATG 180
 GGGAAAACCA CCACCAGGCA ACTGCTGCTG G00CTGGGT GGGCGAGCA TATCGTCTAC 240
 GTAC00GAGC CGATGACTTA CTGGCGGGT CTGGGGGCT O0GAGACAAT CGCGAACATC 300
 TACACCACAC AACACCGCCT G0ACCAGGGT GAGATATCG C0GGGGAGC GCGGGTGT 360
 ATGACAAGCG CC0AGATAAC AATGGGATG C0TTATGCCG TGACCGAGC GGTCTGGCT 420
 CCTCATATCG GGGGGAGGC TGGAGCTCA CATGCCCGC C00GGGCT CACCCTCATC 480
 TTGAGCGCC AT00CATCG G00CT0CTG TGCTACCGG C0GCGGATA C0TTATGGG 540
 AGCATGACC C0CAGGCGT GCTGGGTTT GTGG00CTA T00GGCGAC CTG000GG 600
 ACAACATCG TGTGGGGG C0TT00GAG GACAGACACA TGACCGCCT G00CAAAGC 660
 CAGCGCCCG G0GAGGGCT TGACCTGGCT ATGCTGGCG GATTGCGCG G0TTTACGG 720
 CTGCTTG0CA ATAGGTTGG GTATCTGCAG G0GGGGGGT G0TGGCGGA GATTGGGA 780
 CAGCTTTGG G0AGGCGGT G0G000CAG GGTG00GAG C0CAGAGCA GCGGGCCCA 840
 CGACCCATA TGGGGACAC GTTATTTACC CTGTTTGGG C000GAGTT GCTGGCCCC 900
 AACGGGACC TGTACAAGT GTTTG0CTG G0CTTGAGC TCTTGGCAA A0G0CTCGT 960
 CCGATGACG T0TTTATCT G0ATTAGAC CAATG00CG C0GCTGCG G0AG00CTG 1020
 CTGCACTTA C0T00GGAT GATCCAGACC CAGTCA0CA C00CAGGCTC CATA0GAG 1080
 ATCTGGACC TGGCGGAC GTTTG00CG GAGATGGGG AGGTAACTG A 1131

*Fig. 24***Menschliche Guanylatkinase**

1 31
 GGA TCC ATG GCG GGC CCC AGG CCT GTG GTG CTG AGC GGG CCT TCG GGA GCT GGG AAG AGC
 Met Ala Gly Pro Arg Pro Val Val Leu Ser Gly Pro Ser Gly Ala Gly Lys Ser

61 91
 ACC CTG CTG AAG AGG CTG CTC CAG GAG CAC AGC GGC ATC TTT GGC TTC AGC GTG TCC CAT
 Thr Leu Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu His Ser Gly Ile Phe Gly Phe Ser Val Ser His

121 151
 ACC ACG AGG AAC CCG AGG CCG GGC GAG GAG AAC GGC AAA GAT TAC TAC TTT GTA ACC AGG
 Thr Thr Arg Asn Pro Arg Pro Gly Glu Glu Asn Gly Lys Asp Tyr Tyr Phe Val Thr Arg

181 211
 GAG GTG ATG CAG CGT GAC ATA GCA GCC GGC GAC TTC ATC GAG CAT GCC GAG TTC TCG GGG
 Glu Val Met Gln Arg Asp Ile Ala Ala Gly Asp Phe Ile Glu His Ala Glu Phe Ser Gly

241 271
 AAC CTG TAT GGC ACG AGC AAG GTG GCG GTG CAG GCC GTG CAG GCC ATG AAC CGC ATC TGT
 Asn Leu Tyr Gly Thr Ser Lys Val Ala Val Gln Ala Val Gln Ala Met Asn Arg Ile Cys

301 331
 GTG CTG GAC GTG GAC CTG CAG GGT GTG CCG AAC ATC AAG GCC ACC GAT CTG CCG CCC ATC
 Val Leu Asp Val Asp Leu Gln Gly Val Arg Asn Ile Lys Ala Thr Asp Leu Arg Pro Ile

361 391
 TAC ATC TCT GTG CAG CCG CCT TCA CTG CAC GTG CTG GAG CAG CCG CTG CCG CAG CGC AAC
 Tyr Ile Ser Val Gln Pro Pro Ser Leu His Val Leu Glu Gln Arg Leu Arg Gln Arg Asn

421 451
 ACT GAA ACC GAG GAG AGC CTG GTG AAG CCG CTG GCT GCT GCC CAG GCC GAC ATG GAG AGC
 Thr Glu Thr Glu Glu Ser Leu Val Lys Arg Leu Ala Ala Ala Gln Ala Asp Met Glu Ser

481 511
 AGC AAG GAG CCC GGC CTG TTT GAT GTG GTC ATC ATT AAC GAC AGC CTG GAC CAG GCC TAC
 Ser Lys Glu Pro Gly Leu Phe Asp Val Val Ile Ile Asn Asp Ser Leu Asp Gln Ala Tyr

541 571
 GCA GAG CTG AAG GAG GCG CTC TCT GAG GAA ATC AAG AAA GCT CAA AGG ACC GGC GCC TGA
 Ala Glu Leu Lys Glu Ala Leu Ser Glu Glu Ile Lys Lys Ala Gln Arg Thr Gly Ala OPA

601
 GGA TCC

*Fig. 25***Murine Guanylatkinase**

1 31
 CTG GGT CGG GTC CCC GCG GAC GGC ATG GCA GGA CCT AGG CCA GTA GTG CTG AGC GGG CCG
 Met Ala Gly Pro Arg Pro Val Val Leu Ser Gly Pro

61 91
 TCA GGG GCA GGG AAG AGC ACT CTG CTC AAG AAG CTG TTC CAG GAG CAC AGC AGC ATC TTC
 Ser Gly Ala Gly Lys Ser Thr Leu Leu Lys Lys Leu Phe Gln Glu His Ser Ser Ile Phe

121 151
 GGC TTC AGT GTG TCC CAT ACT ACA AGG AAC CCA CGA CCT GGT GAA GAA GAT GGC AAA GAT
 Gly Phe Ser Val Ser His Thr Thr Arg Asn Pro Arg Pro Gly Glu Glu Asp Gly Lys Asp

181 211
 TAC TAC TTT GTG ACC AAG GAG ATG ATG CAG CGT GAT ATT GCA GCA GGG GAC TTC ATT GAG
 Tyr Tyr Phe Val Thr Arg Glu Met Met Gln Arg Asp Ile Ala Ala Gly Asp Phe Ile Glu

241 271
 CAT GCT GAG TTC TCA GGG AAC CTG TAC GGG ACA AGC AAG GAA GCT GTT CCG GCT GTG CAG
 His Ala Glu Phe Ser Gly Asn Leu Tyr Gly Thr Ser Lys Glu Ala Val Arg Ala Val Gln

301 331
 GCC ATG AAC CGC ATC TGC GTG CTA GAT GTC GAC CTA CAA GGT GTG GCG AGC ATC AAG AAG
 Ala Met Asn Arg Ile Cys Val Leu Asp Val Asp Leu Gln Gly Val Arg Ser Ile Lys Lys

361 391
 ACT GAT CTG TGT CCC ATC TAC ATC TTT GTG CAG CCT CCC TCG CTG GAC GTG CTG GAG CAA
 Thr Asp Leu Cys Pro Ile Tyr Ile Phe Val Gln Pro Pro Ser Leu Asp Val Leu Glu Gln

421 451
 CGA CTG CGA CTG CGC AAC ACT GAG ACT GAG GAG AGT CTG GCA AAG CCG CTG GCA GCT GCA
 Arg Leu Arg Leu Arg Asn Thr Glu Thr Glu Glu Ser Leu Ala Lys Arg Leu Ala Ala Ala

481 511
 CCG ACA GAC ATG GAG AAG AGC AAG GAG CCT GGC TTG TTT GAC CTG GTG ATC ATC AAT GAC
 Arg Thr Asp Met Glu Ser Ser Lys Glu Pro Gly Leu Phe Asp Leu Val Ile Ile Asn Asp

541 571
 GAC CTG GAT AAA GCC TAT GCA ACC CTG AAG CAG GCG CTC TCT GAG GAA ATC AAG AAA GCA
 Asp Leu Asp Lys Ala Tyr Ala Thr Leu Lys Gln Ala Leu Ser Glu Glu Ile Lys Lys Ala

601 631
 CAG GGA ACT GGC CAC GCC TGA AGG CCT GCT TCA TTC CAC AGA GTG ATG TCT GTG GTC TAA
 Gln Gly Thr Gly His Ala OPA

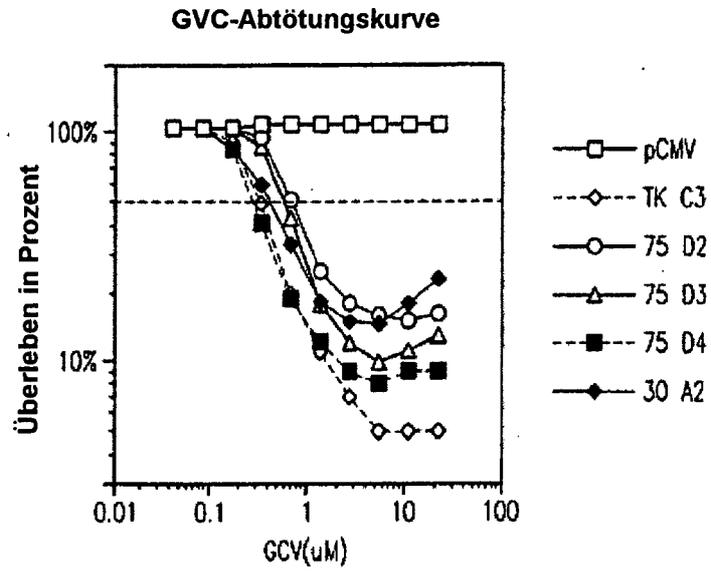


Fig. 26

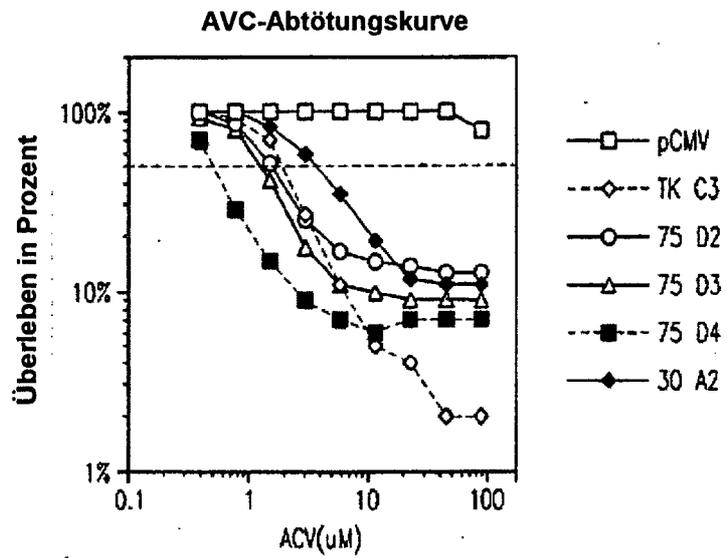


Fig. 27

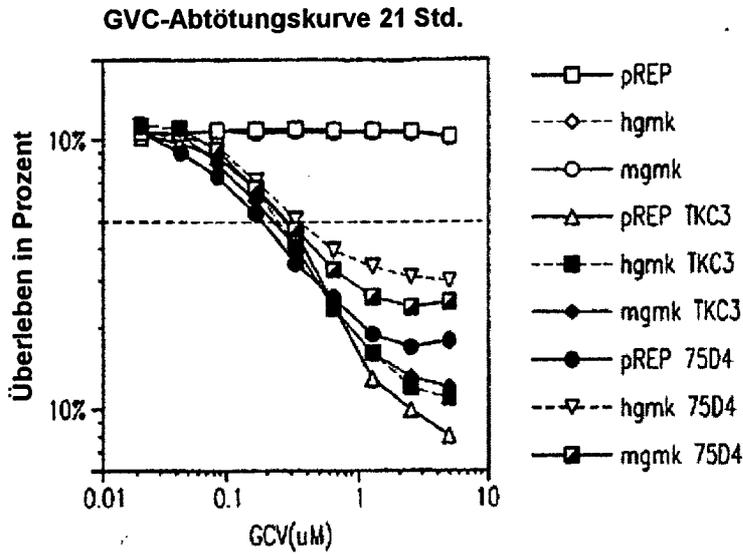


Fig. 28

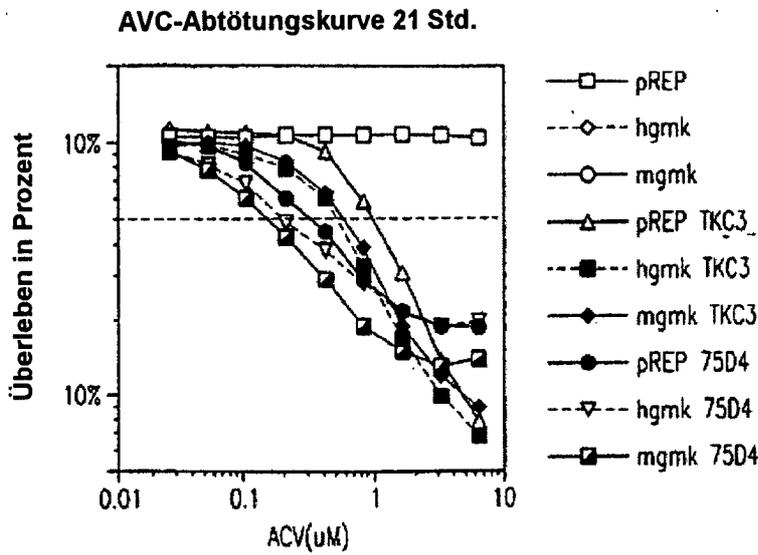


Fig. 29

GMK/TK-Fusionsproteinkonstrukte

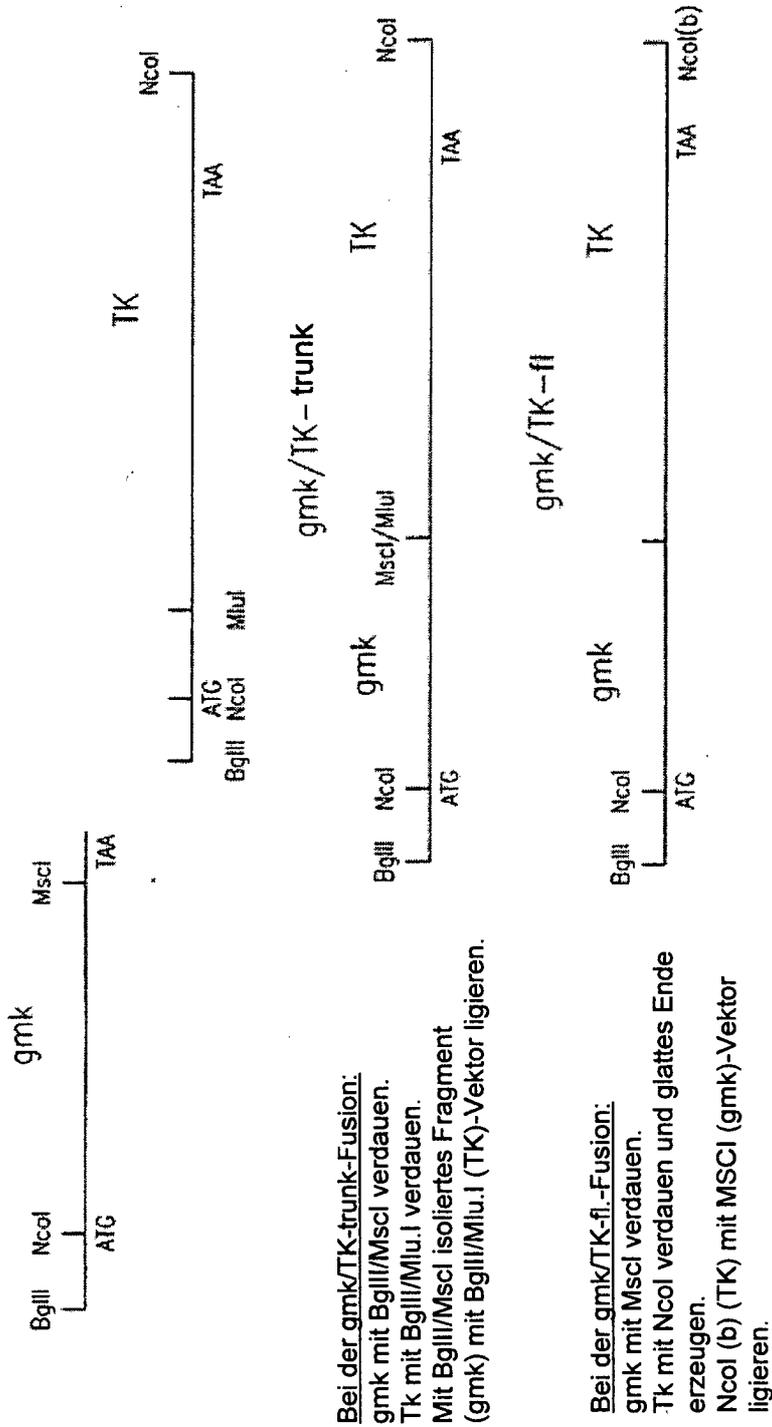


Fig. 30

Bei der gmK/TK-trunk-Fusion:
 gmK mit BglIII/MscI verdauen.
 Tk mit BglIII/Mlu.I verdauen.
 Mit BglIII/MscI isoliertes Fragment
 (gmK) mit BglIII/Mlu.I (TK)-Vektor ligieren.

Bei der gmK/TK-fl.-Fusion:
 gmK mit MscI verdauen.
 Tk mit NcoI verdauen und glattes Ende
 erzeugen.
 NcoI (b) (TK) mit MscI (gmK)-Vektor
 ligieren.

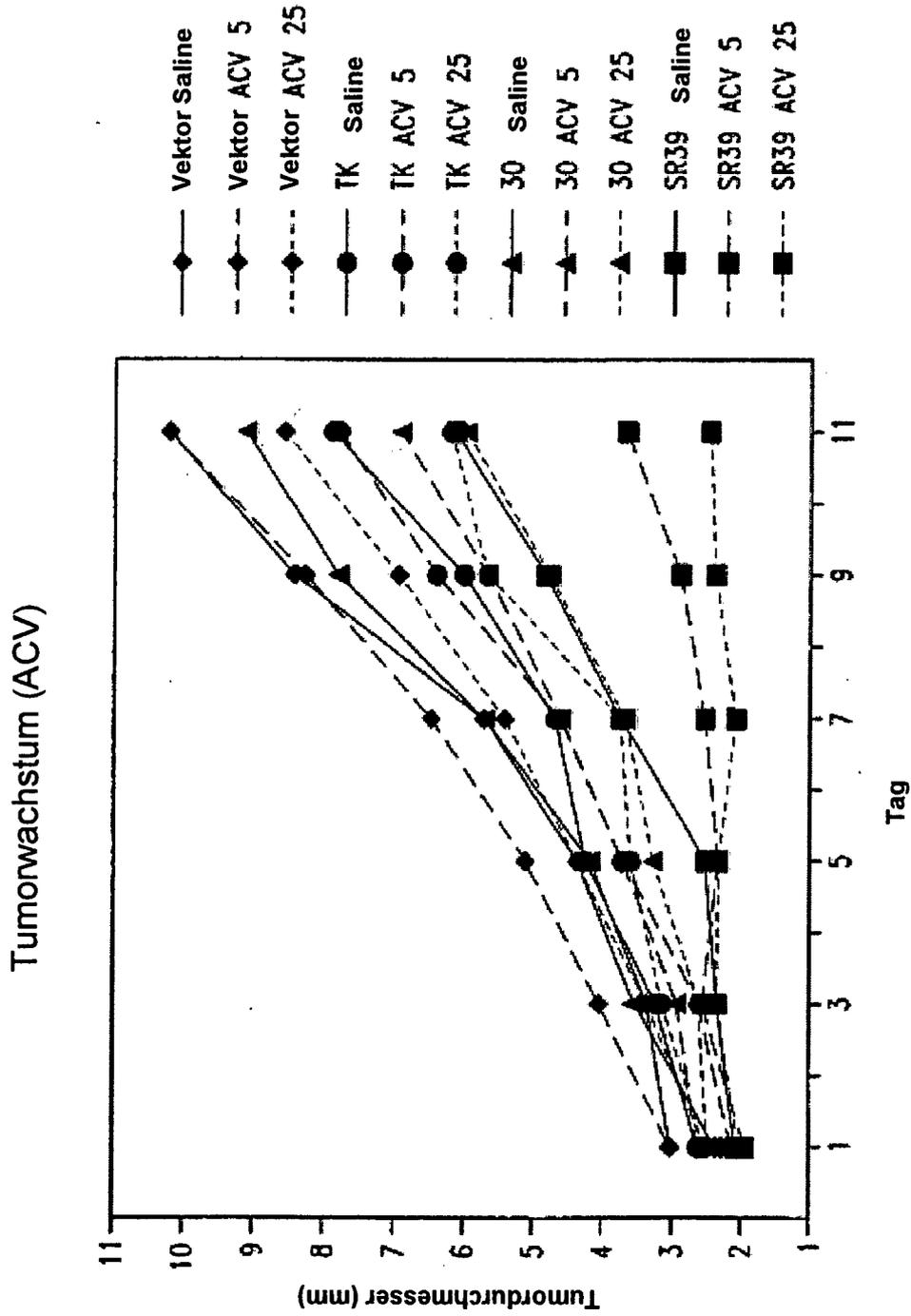


Fig. 32

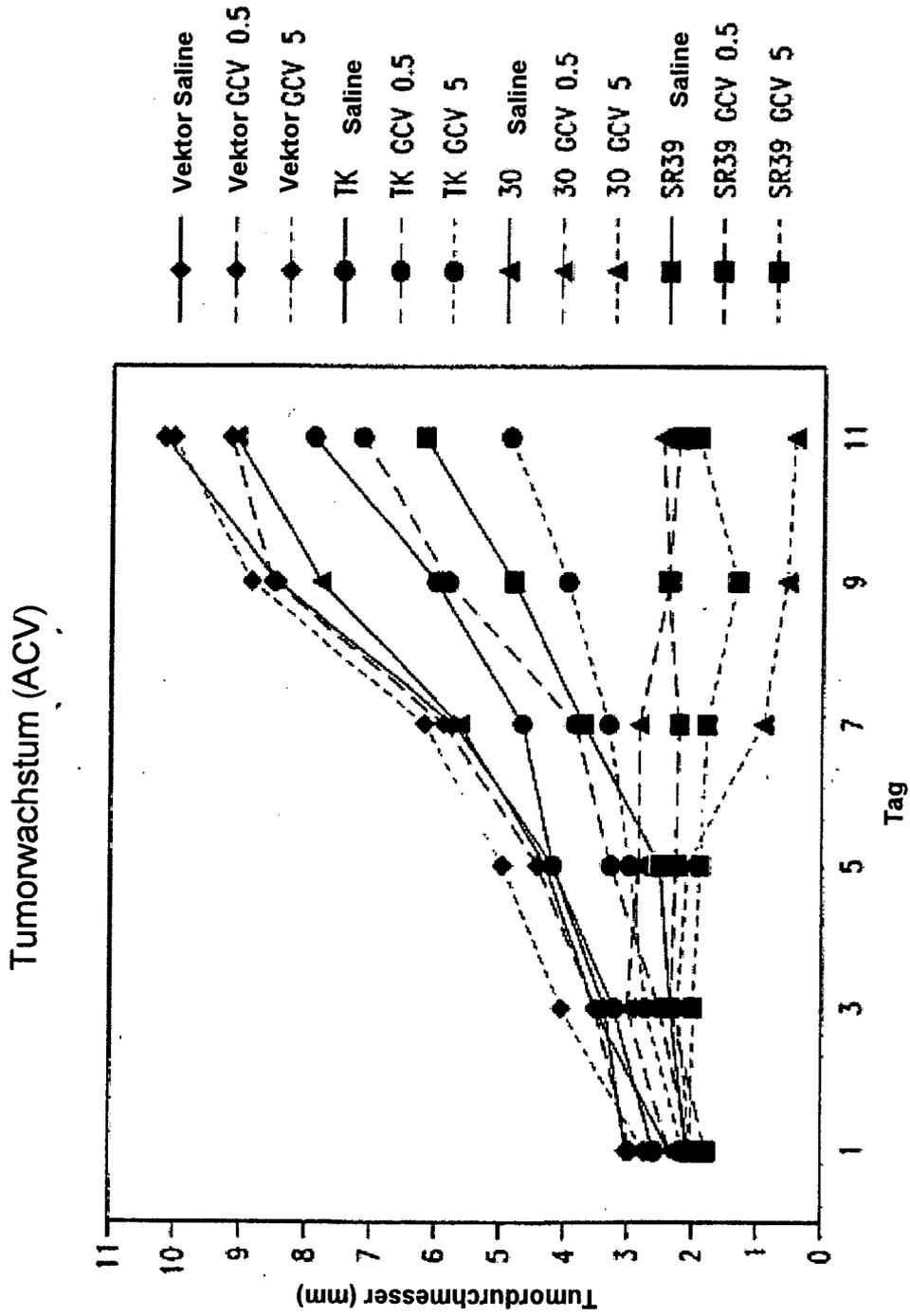


Fig. 33

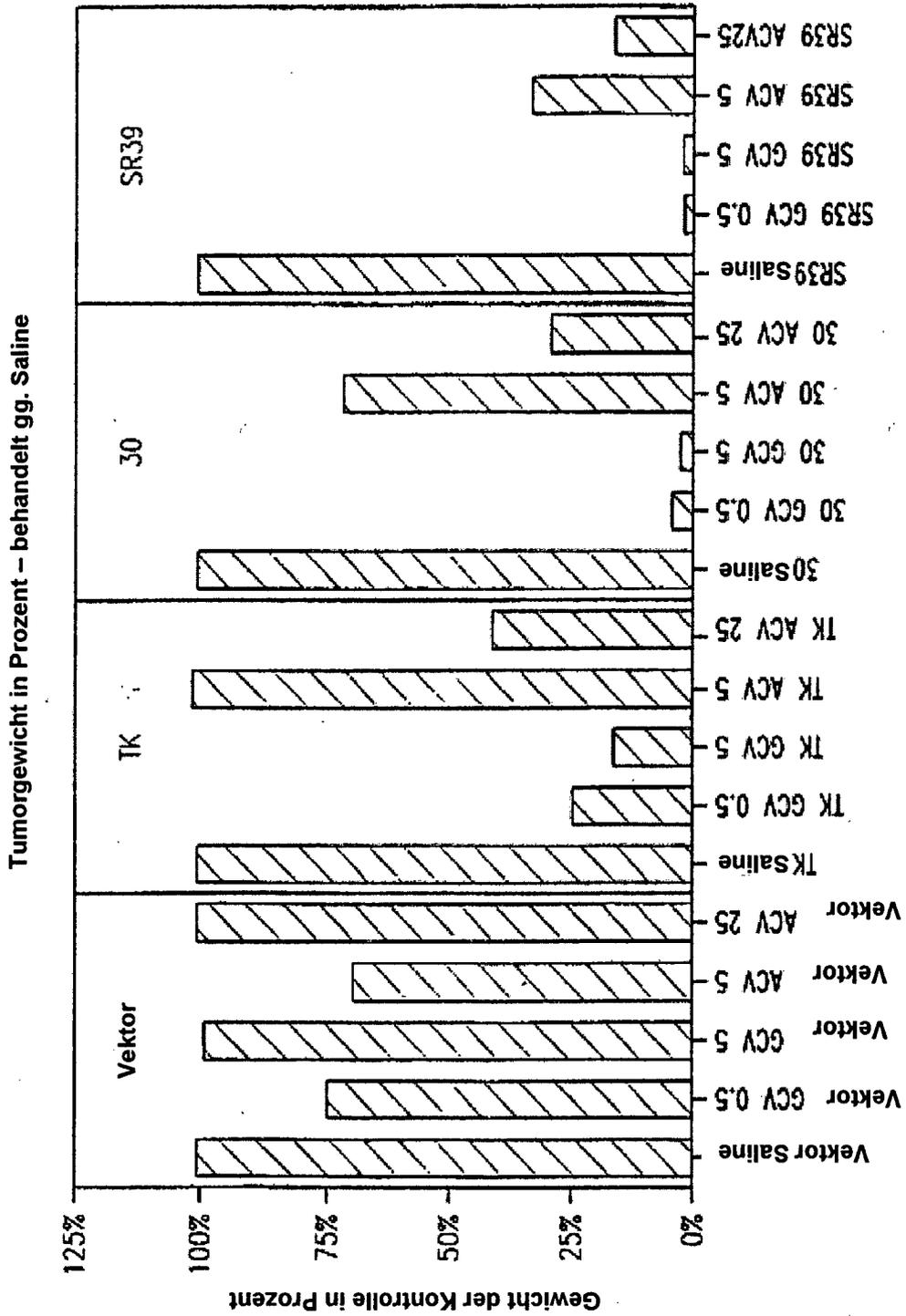


Fig. 34