



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101010428 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 02

(21) 申请号 200580028668. 6

CN 1464051 A, 2003. 12. 31, 全文.

(22) 申请日 2005. 06. 17

甄荣芬, 等. 单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶基因部分缺失重组质粒的构建及序列分析. 《细胞与分子免疫学杂志》. 1999, 第 15 卷 (第 2 期), 88 - 90.

(30) 优先权数据

0413702. 2 2004. 06. 18 GB

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2007. 02. 25

DAVID CHALMERS, ET AL. ELIMINATION OF THE TRUNCATED MESSAGE FROM THE HERPES SIMPLEX VIRUS THYMIDINE KINASE SUICIDE GENE. 《MOLECULAR THERAPY》. 2001, 第 4 卷 (第 2 期), 146-148.

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/IB2005/002358 2005. 06. 17

(87) PCT 申请的公布数据

W02005/123912 EN 2005. 12. 29

审查员 吴汀晨

(73) 专利权人 莫尔梅德股份有限公司

地址 意大利米兰

(72) 发明人 F·萨尔瓦托里 S·马萨

M·拉德里扎尼 S·托马

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 程淼 刘玥

(51) Int. Cl.

C12N 15/54 (2006. 01)

C12N 15/10 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 0179502 A2, 2001. 10. 25, 全文.

权利要求书2页 说明书25页

序列表11页 附图14页

(54) 发明名称

胸苷激酶

(57) 摘要

一种多核苷酸, 其含有编码胸苷激酶的核苷酸序列, 其中与剪接供体位点核苷酸对应的核苷酸中的至少一个被其它核苷酸所替换, 并且其中剪接受体位点的核苷酸没有变化。

1. 一种多核苷酸,其编码单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶 (HSV-tk),其中与图 1 中野生型序列 (Tk wt) 中位置 330 上的剪接供体位点核苷酸对应的核苷酸被从 T 改变为 C,并且其中与图 1 中野生型序列的位置 554 和 555 上的剪接受体位点核苷酸对应的核苷酸,以及与位置 662 和 663 上的剪接受体位点核苷酸对应的核苷酸没有变化。

2. 一种多核苷酸,其由图 1 中的 TkMut2 序列组成。

3. 一种多核苷酸,其编码单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶 (HSV-tk),其中与图 1 中的野生型序列 (TK wt) 的位置 330 上的剪接供体位点核苷酸对应的核苷酸被从 T 改变为 C,并且其中与图 1 中的野生型序列的位置 541 上的剪接受体位点核苷酸对应的核苷酸被从 A 改变为 T,与图 1 中的野生型序列的位置 542 上的剪接受体位点核苷酸对应的核苷酸被从 G 改变为 C。

4. 根据权利要求 3 所述的多核苷酸,其中与图 1 中的野生型序列的位置 555 上的剪接受体位点核苷酸对应的核苷酸被从 G 改变为 A。

5. 一种多核苷酸,其由图 1 中的 TkMut23 序列组成。

6. 一种多核苷酸,其由图 1 中的 TkMut234 序列组成。

7. 一种载体,其含有权利要求 1~6 中任一项所述的多核苷酸。

8. 一种宿主细胞,其含有权利要求 1~6 中任一项所述的多核苷酸,或者权利要求 7 所述的载体。

9. 一种药物组合物,其含有权利要求 1~6 中任一项所述的多核苷酸,或者权利要求 7 所述的载体或者权利要求 8 所述的宿主细胞,和药学上可接受的载体。

10. 一种试剂盒,其含有:

(i) 权利要求 1~6 中任一项所述的多核苷酸,或者权利要求 7 所述的载体或者权利要求 8 所述的宿主细胞或者权利要求 9 所述的药物组合物;和

(ii) 基本上无毒的试剂,其能被胸苷激酶转化为毒性试剂,

其中基本上无毒的试剂选自更昔洛韦、阿昔洛韦、三氟胸苷、1-[2-脱氧,2-氟, β -D-阿糖呋喃基]-5-碘尿嘧啶、ara-A、ara1、1- β -D-阿糖呋喃基胸腺嘧啶、5-乙基-2'-脱氧尿苷、5-碘-5'-氨基-2,5'-二脱氧尿苷、碘苷、AZT、AIV、二脱氧胞苷、Ara C 和溴乙烯脱氧尿苷 (BVDU) 中的任一种。

11. 权利要求 1~6 中任一项所述的多核苷酸,权利要求 7 所述的载体,权利要求 8 所述的宿主细胞或权利要求 9 所述的药物组合物在制备用于医药的药物中的用途。

12. 一种破坏细胞的体外方法,其包括:

(i) 将权利要求 1~6 中任一项所述的多核苷酸或者权利要求 7 所述的载体引入所述的细胞;和

(ii) 将所述细胞同时、分别或连续接触基本上无毒的试剂,其中所述基本上无毒的试剂能被胸苷激酶转化为毒性试剂,其中基本上无毒的试剂选自更昔洛韦、阿昔洛韦、三氟胸苷、1-[2-脱氧,2-氟, β -D-阿糖呋喃基]-5-碘尿嘧啶、ara-A、ara1、1- β -D-阿糖呋喃基胸腺嘧啶、5-乙基-2'-脱氧尿苷、5-碘-5'-氨基-2,5'-二脱氧尿苷、碘苷、AZT、AIV、二脱氧胞苷、Ara C 和溴乙烯脱氧尿苷 (BVDU) 中的任一种。

13. 一种破坏细胞的体外方法,其包括:

(i) 将权利要求 1~6 中任一项所述的多核苷酸或权利要求 7 所述的载体引入所述的

细胞；

(ii) 使所述细胞表达胸苷激酶；以及

(iii) 将所述细胞接触基本上无毒的试剂，其中所述基本上无毒的试剂能被胸苷激酶转化为毒性试剂，其中基本上无毒的试剂选自更昔洛韦、阿昔洛韦、三氟胸苷、1-[2-脱氧，2-氟， β -D-阿糖呋喃基]-5-碘尿嘧啶、ara-A、ara1、1- β -D-阿糖呋喃基胸腺嘧啶、5-乙基-2'-脱氧尿苷、5-碘-5'-氨基-2,5'-二脱氧尿苷、碘苷、AZT、AIV、二脱氧胞苷、Ara C 和溴乙烯脱氧尿苷 (BVDU) 中的任一种。

14. 权利要求 1~6 中任一项所述的多核苷酸、权利要求 7 所述的载体或权利要求 8 所述的宿主细胞在制备用于破坏患者中细胞的药物中的应用。

15. 权利要求 1~6 中任一项所述的多核苷酸、权利要求 7 所述的载体或权利要求 8 所述的宿主细胞在制备用于治疗癌症的药物中的应用。

16. 权利要求 1~6 中任一项所述的多核苷酸、权利要求 7 所述的载体或权利要求 8 所述的宿主细胞在制备用于预防移植物抗宿主病的药物中的应用。

胸苷激酶

发明领域

[0001] 本发明涉及一种编码实质上非剪接的胸苷激酶的核酸及其在治疗中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 人们对代谢自杀基因在基因治疗中的用途存在相当大的兴趣。在文献中描述了许多自杀基因,诸如例如编码胞嘧啶脱氨酶、嘌呤核苷酸磷酸化酶或胸苷激酶的基因。从治疗的角度来说,在这些基因中,编码单纯疱疹病毒的胸苷激酶 (HSV-tk) 的基因是特别有利的。HSV-tk 基因表达下述酶,在与核苷酸类似物更昔洛韦 (ganciclovir) 组合使用时,所述酶能够特异性地去除处于分裂中的细胞。特别重要的是与应用 HSV-tk/ 更昔洛韦相关的扩大的毒性作用 (“旁观者”效应) 的存在。这种作用出现在对已经引入胸苷激酶 (tk) 基因的细胞以及周围的细胞的破坏中。

[0004] HSV-tk/ 更昔洛韦系统的作用机制可以被概述如下:被修饰为表达 TK 酶的哺乳动物细胞进行第一步更昔洛韦的磷酸化,以产生更昔洛韦单磷酸酯。接着,细胞激酶使这种更昔洛韦单磷酸酯被连续代谢为二磷酸酯,以及接着为三磷酸酯。由此产生的更昔洛韦三磷酸酯进而通过被插入到 DNA 中产生毒性作用,并且部分抑制细胞 DNA 聚合酶 α , 因此造成 DNA 合成被停止并因此导致细胞死亡 (Moolten, 1986 ;Mullen, 1994)。

[0005] HSV-tk/ 更昔洛韦系统可以被用于很多种治疗应用中,并且在过去的十年中已经完成了大量临床试验。在基因治疗中使用 HSV-tk 基因的方法被公开于例如 W090/07936、US 5, 837, 510、US 5, 861, 290、W098/04290、W0 97/37542 和 US 5, 631, 236 中。

[0006] HSV-tk/ 更昔洛韦系统的一种令人感兴趣的应用是在于防止移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GvHD), GvHD 是能够干扰同种异体 (allogeneic) 骨髓移植结果的疾病,同种异体骨髓移植是多种血液恶性肿瘤的治疗选择。当被移植的干细胞移植物中的 T 细胞开始攻击受体的身体时,将发生 GvHD。从移植物中去除 T 细胞可防止 GvHD, 但也会有助于疾病的复发和移植物的排异反应。为抵挡这些效应,可以在同种异体骨髓移植后的一段延迟时间后,通过引入供体 T 淋巴细胞,对同种异体骨髓移植患者进行治疗。在出现 GvHD 的情况下,将 HSV-tk 基因转入供体 T 淋巴细胞则允许在给药更昔洛韦之后去除 T 淋巴细胞。在一次试验中,患者接受了去除 T 细胞的骨髓移植,以及增加剂量的用 HSV-tk 基因转导过的供体淋巴细胞 (Tiberghien 等人, 2001)。在所有患者中,移植后超过 1 年的时间都可检测到循环状态下的表达 HSV-tk 的细胞。在 12 位患者中有 6 位患者发生了 GvHD 并接受了更昔洛韦,这实质上降低了循环状态下被修饰细胞的数目 (绝对数目上平均降低了 85%)。

[0007] 已经制造了 HSV-tk 基因中的突变体,所述突变体提高了该基因的生物活性。这类突变体 HSV-tk 基因的例子被描述于例如 Kokoris 等人 (1999), W0 95/30007、US 5, 877, 010、W0 99/19466 和 W0 95/14102 中。然而,与胸苷激酶 / 更昔洛韦系统相关的一个严重问题是在 HSV-tk 转导过的细胞中出现对更昔洛韦的抗性。这是特别重要的,因为随着治疗的进程,对更昔洛韦有抗性的细胞的相对比例会快速地提高。

[0008] 在用含有 HSV-tk 基因的反转录病毒载体转导过的成淋巴细胞样人类 T 细胞系中,

对更昔洛韦的抗性的存在被发现与 HSV-tk 基因中 227 个碱基对的缺失相关 (Fillat 等人, 2003)。相同的缺失还存在于用该载体转导的人类初级 T 细胞 (primary T cell) 中以及接受了被转导的供体 T 细胞的 12 位患者中 (Garin 等人, 2001)。WO 01/79502 公开: 这种缺失的原因被认为相信是: 在 HSV-tk mRNA 中作为剪接位点发挥作用的核苷酸序列的存在, 其导致一定比例的携带该基因异常形式的病毒颗粒以及携带全长该基因的其余病毒颗粒的产生。在 WO 01/79502 以及在 Chalmers 2001, *Molecular Therapy* 4:146-148 中公开了胸苷激酶基因的一种突变体, 其中所述剪接位点被去除, 其降低了胸苷激酶基因的异常形式的产生。然而, 该突变体仍然与有害量的基因剪接相关。CD34-tk 融合构建体 (construct) 被公开于 Rettig 等人, 2003 中。这些融合构建体含有经修饰的 HSV-tk 基因。然而, 没有证明这些经修饰的基因降低了 HSV-tk mRNA 的剪接。

[0009] 因此, 存在对下述经修饰的胸苷激酶基因的需要, 所述基因不易 被进行基因剪接, 并解决了与更昔洛韦抗性相关的问题。

发明内容

[0010] 本发明通过提供一种较之之前所公开的 HSV-tk 基因能表达更高比例未剪接 mRNA 的 HSV-tk 基因, 克服了上述的问题。我们已经鉴定出了在之前所鉴定的受体位点上游 14 个碱基对处的剪接受体位点。我们显示: 之前通过修饰前面所鉴定的供体和受体位点来抑制剪接的努力能够激活受体位点以及后续的基因剪接。令人吃惊地, 我们证实, 在某些特定的核苷酸对 HSV-tk 基因的修饰提供了能够表达基本上没有剪接 mRNA 的 HSV-tk 基因。特别地, 我们展示出, 在剪接供体位点上的核苷酸中的至少一个的突变会实质上防止剪接。

[0011] 发明综述

[0012] 根据本发明的第一个方面, 提供了一种多核苷酸, 其含有编码胸苷激酶的核苷酸序列, 其中对应于剪接供体位点核苷酸的核苷酸中的至少一个被其它核苷酸替换, 并且其中剪接受体位点的核苷酸没有变化。

[0013] 优选地, 与图 1 中野生型序列 (Tk wt) 中位置 329 和 330 上剪接供体位点核苷酸对应的核苷酸中的至少一个被其它核苷酸所替换, 并且其中剪接受体位点的核苷酸没有变化。

[0014] 在一个实施方式中, 位置 330 的核苷酸被从 T 变化为 C。

[0015] 根据本发明的第二个方面, 提供了一种多核苷酸, 其含有编码胸苷激酶的核苷酸序列, 其中与图 1 的野生型序列 (Tk wt) 中位置 329 和 330 上剪接供体位点核苷酸对应的核苷酸中的至少一个被其它核苷酸所替换, 并且其中所述剪接受体位点的核苷酸没有变化。

[0016] 在一个实施方式中, 对应于图 1 中野生型序列位置 329 和 330 的两个核苷酸都被其它核苷酸所替换。

[0017] 在一个实施方式中, 对应于位置 330 的核苷酸被从 T 变化为 C。

[0018] 根据本发明的第三个方面, 提供了一种多核苷酸, 其含有编码胸苷激酶的核苷酸序列, 其中与图 1 中野生型序列 (Tk wt) 中位置 329 和 330 上剪接供体位点核苷酸对应的核苷酸中的至少一个被其它核苷酸所替换, 并且其中与图 1 中野生型序列的位置 554 和 555 上剪接受体位点核苷酸对应的核苷酸中的至少一个, 以及与位置 662 和 663 上剪接受体位点核苷酸对应的核苷酸中的至少一个没有变化。

- [0019] 优选地,对应于位置 554 和 555 的两个核苷酸都没有变化。
- [0020] 优选地,对应于位置 662 和 663 的两个核苷酸都没有变化。
- [0021] 在一个实施方式中,与图 1 中野生型序列的位置 329 和 330 上剪接供体位点核苷酸的两个核苷酸都被其它核苷酸所替换
- [0022] 在一个实施方式中,位置 330 的核苷酸被从 T 变化为 C。
- [0023] 根据本发明的第四个方面,提供了一种多核苷酸,其包含图 1 中的 TkMut2 序列。
- [0024] 根据本发明的第五个方面,提供了一种多核苷酸,其含有编码胸苷激酶的核苷酸序列,其中与图 1 的野生型序列的位置 329 和 330 上的核苷酸对应的剪接供体位点核苷酸中的至少一个被其它核苷酸所替换,并且其中与图 1 的野生型序列的位置 541 和 542 上的剪接受体位点核苷酸对应的核苷酸中的至少一个被其它核苷酸所替换。
- [0025] 在一个实施方式中,与图 1 的野生型序列的位置 329 和 330 上的剪接供体位点核苷酸对应的核苷酸中的至少一个被其它核苷酸所替换
- [0026] 在一个实施方式中,与位置 330 对应的核苷酸被从 T 变化为 C。
- [0027] 在另一个实施方式中,与图 1 的野生型序列的位置 541 和 542 上剪接供体位点核苷酸对应的两个核苷酸都被其它核苷酸所替换。
- [0028] 在另一个实施方式中,与位置 541 上的核苷酸对应的核苷酸被从 A 变化为 T。
- [0029] 在另一个实施方式中,与位置 542 上的核苷酸对应的核苷酸被从 G 变化为 C。
- [0030] 在另一个实施方式中,与图 1 中的野生型序列的位置 554 和 555 上的剪接受体位点核苷酸对应的核苷酸中的至少一个也被其它核苷酸所替换,从而不存在剪接位点。
- [0031] 在一个实施方式中,与图 1 中的野生型序列的位置 541 和 542 上的剪接受体位点核苷酸对应的两个核苷酸都被其它核苷酸所替换,从而不存在剪接位点。
- [0032] 在另一个实施方式中,与位置 555 上的核苷酸对应的核苷酸被从 G 变化为 A。
- [0033] 根据本发明的第六个方面,提供了一种多核苷酸,其含有图 1 中的 TkMut23 序列。
- [0034] 根据本发明的第七个方面,提供了一种多核苷酸,其含有图 1 中的 TkMut234 序列。
- [0035] 根据本发明的第八个方面,提供了一种多核苷酸,其含有编码胸苷激酶的核苷酸序列,其中与图 1 的野生型序列 (Tk wt) 的位置 329 和 330 上的核苷酸对应的剪接供体位点核苷酸中的至少一个被其它核苷酸所替换,并且其中与图 1 的野生型序列的位置 554 和 555 上剪接受体位点核苷酸对应的核苷酸被其它核苷酸所替换。
- [0036] 在一个实施方式中,与图 1 中野生型序列 (Tk wt) 的位置 329 和 330 上的剪接受体核苷酸对应的两个核苷酸都被其它核苷酸所替换。
- [0037] 在另一个实施方式中,与图 1 的野生型序列的位置 554 和 555 剪接受体位点核苷酸对应的两个核苷酸都被其它核苷酸所替换。
- [0038] 优选地,与位置 330 上的核苷酸对应的核苷酸被从 T 变化为 C。
- [0039] 优选地,与位置 555 上的核苷酸对应的核苷酸被从 G 变化为 A。
- [0040] 根据本发明的第九个方面,提供了一种多核苷酸,其含有图 1 中的 Tk-Mut24 序列。
- [0041] 根据本发明的第十个方面,提供了一种多核苷酸,其含有编码胸苷激酶的核苷酸序列,其中与图 1 的野生型序列 (Tk wt) 的位置 554 和 555 上剪接受体位点核苷酸对应的核苷酸中的至少一个被其它核苷酸所替换。
- [0042] 在一个实施方式中,与图 1 的野生型序列的位置 554 和 555 上的剪接供体位点核

苷酸对应的两个核苷酸都被其它核苷酸所替换。

[0043] 在一个实施方式中,与位置 555 的核苷酸对应的核苷酸被从 G 变化为 A。

[0044] 在一个实施方式中,与图 1 的野生型序列的位置 541 和 542 上的核苷酸对应的剪接受体位点核苷酸中的至少一个也被其它核苷酸所替换。

[0045] 在另一个实施方式中,与图 1 的野生型序列的位置 541 和 542 上的剪接受体位点核苷酸对应的两个核苷酸都被其它核苷酸所替换,从而不存在剪接位点。

[0046] 在另一个实施方式中,与位置 541 上的核苷酸对应的核苷酸被从 A 变化为 T。

[0047] 在另一个实施方式中,与位置 542 上的核苷酸对应的核苷酸被从 G 变化为 C。

[0048] 根据本发明的第十一个方面,提供了一种多核苷酸,其含有图 1 中的 TkMut4 序列。

[0049] 根据本发明的第十二个方面,提供了一种多核苷酸,其含有图 1 中的 TkMut34 序列。

[0050] 优选地,所述的核苷酸替换不改变由所述核苷酸序列所编码的多肽的序列。

[0051] 根据本发明的第十三个方面,提供了一种载体,其含有本发明的多核苷酸。

[0052] 优选地,该载体是表达载体。

[0053] 根据本发明的第十四方面,提供了一种宿主细胞,其含有本发明的多核苷酸或载体。

[0054] 根据本发明的第十五个方面,提供了一种药物组合物,其含有本发明的多核苷酸、载体或宿主细胞以及药学上可以接受的载体。

[0055] 根据本发明的第十六个方面,提供了一种试剂盒,其包括:

[0056] (i) 本发明的多核苷酸、载体、宿主细胞或药物组合物;以及

[0057] (ii) 基本上 (substantially) 无毒的试剂,其能被胸苷激酶转化为毒性试剂。

[0058] 根据本发明的第十七个方面,提供了用于医药的本发明的多核苷酸、载体、宿主细胞或药物组合物。

[0059] 根据本发明的第十八个方面,提供了含有本发明的多核苷酸、载体、宿主细胞或药物组合物以及基本上无毒的试剂的产品,其在对具有需要被破坏的细胞的患者治疗中同时、分别或连续使用,其中所述基本上无毒的试剂能被胸苷激酶转化为毒性试剂。

[0060] 根据本发明的第十九个方面,提供了一种破坏细胞的方法,其包括:

[0061] (i) 将本发明的多核苷酸或载体引入所述细胞;以及

[0062] (ii) 将所述细胞同时、分别或连续接触基本上无毒的试剂,所述基本上无毒的试剂能被胸苷激酶转化为毒性试剂。

[0063] 根据本发明的第二十个方面,提供了一种破坏细胞的方法,其包括:

[0064] (i) 将本发明的多核苷酸或载体引入所述细胞;

[0065] (ii) 使所述细胞表达胸苷激酶;和

[0066] (ii) 使所述细胞接触基本上无毒的试剂,所述基本上无毒的试剂能被胸苷激酶转化为毒性试剂。

[0067] 根据本发明的第二十一方面,提供了一种对具有需要被破坏的细胞的患者进行治疗的方法,其包括:

[0068] (i) 将本发明的多核苷酸、载体或药物组合物引入所述患者;

[0069] (ii) 同时、分别或连续将基本上无毒的试剂引入所述患者,所述基本上无毒的试

剂能被胸苷激酶转化为毒性试剂。

[0070] 根据本发明的第二十二个方面,提供了一种对具有需要被破坏的细胞的患者进行治疗的方法,其包括:

[0071] (i) 将本发明的多核苷酸、载体或药物组合物引入所述患者;

[0072] (ii) 使所述多核苷酸或载体被所述细胞吸收;

[0073] (iii) 使所述细胞表达胸苷激酶;以及

[0074] (iv) 将基本上无毒的试剂引入所述患者,其中所述基本上无毒的试剂能被胸苷激酶转化为毒性试剂。

[0075] 根据本发明的第二十三方面,提供了一种对具有需要被破坏的细胞的患者进行治疗的方法,其包括:

[0076] (i) 从患者或供体细胞移出所述细胞;

[0077] (ii) 将本发明的多核苷酸或载体在体外引入所述细胞;

[0078] (iii) 将经修饰的细胞引入所述患者;

[0079] (iv) 使所述细胞表达胸苷激酶;以及

[0080] (v) 向所述患者施予基本上无毒的试剂,所述基本上无毒的试剂能被胸苷激酶转化为毒性试剂。

[0081] 根据本发明的第二十四方面,提供了一种防止患者中移植物抗宿主病的方法,其包括:

[0082] (i) 向经遗传改造的宿主 T 细胞进行给药,以包括进本发明的多核苷酸或载体;和

[0083] (ii) 在出现移植物抗宿主病之前,以能通过所述试剂与胸苷激酶的相互作用有效杀死经遗传改造的 T 细胞的量,向所述宿主施予基本上无毒的试剂。

[0084] 优选地,在本发明中所使用的基本上无毒的试剂是更昔洛韦、阿昔洛韦(acyclovir)、三氟胸苷、1-[2-脱氧,2-氟, β -D-阿糖呋喃基]-5-碘尿嘧啶、ara-A、ara-1、1- β -D-阿糖呋喃基胸腺嘧啶、5-乙基-2'-脱氧尿嘧啶、5-碘基-5'-氨基-2,5'-二脱氧尿苷、碘苷、AZT、AIV、二脱氧胞嘧啶、Ara C 和溴乙烯脱氧尿苷(BVDU)中的任意一种。

[0085] 根据本发明的第二十五个方面,提供了本发明的多核苷酸、载体或宿主细胞在制备用于破坏患者中细胞的药物中的应用。

[0086] 根据本发明的另一方面,提供了本发明的多核苷酸、载体或宿主细胞在制备用于治疗癌症的药物中的应用。

[0087] 详细描述

[0088] 下面将通过非限制性实施例对本发明的多种优选特征和实施方式进行描述。

[0089] 除非另有指明,本发明的实施将采用在本领域普通技术人员的能力范围之内的化学、分子生物学、重组 DNA 以及免疫学传统技术。在文献中对这些技术进行了解释。参见例如 J. Sambrook, E. F. Fritsch 和 T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. 等人 (1995 以及定期的增刊; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N. Y.); B. Roe, J. Crabtree 和 A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak 和 James O' D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*;

Oxford University Press ;M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis : A Practical Approach*, Irl Press ;D. M. J. Lilley 和 J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology :DNA Structure Part A :Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press ;以及 E. M. Shevach 和 W. Strober, 1992 以及定期增刊, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York, NY。这些常规文献中的每一份都通过引用并入本文。

[0090] HSV-tk 基因

[0091] 本文使用的术语“没有变化”的意思是野生型序列 (Tk wt) 相比没有变化。

[0092] 本文使用的术语“被其它核苷酸替换”的意思是被与野生型序列 (Tk wt) 不同的核苷酸替换。进行所述替换,使得相应的剪接供体位点或剪接受体位点被除去。

[0093] 可以从多种胸苷激酶来制备本发明的胸苷激酶突变体。优选地,所述胸苷激酶突变体衍生自 Herpesviridae 胸苷激酶,包括例如灵长类疱疹病毒和非灵长类疱疹病毒,例如鸟类疱疹病毒。合适的疱疹病毒的代表性例子包括单纯疱疹病毒 I 型 (McKnight 等人, 1980)、单纯疱疹病毒 II 型 (Swain 和 Galloway, 1983)、带状疱疹病毒 (Varicella Zoster Virus) (Davidson 和 Scott, 1986)、绒猴疱疹病毒 (Otsuka 和 Kit, 1984)、猫疱疹病毒 I 型 (Nunberg 等人, 1989)、伪狂犬病病毒 (Kit 和 Kit, 美国专利 No. 4, 514, 497, 1985)、马疱疹病毒 I 型 (Robertson 和 Whalley, 1988)、牛疱疹病毒 I 型 (Mittal 和 Field, 1989)、火鸡疱疹病毒 (Martin 等人, 1989)、马立克氏病病毒 (Marek's disease virus) (Scott 等人, 1989)、猴类疱疹病毒 (herpesvirus saimiri) (Honest 等人, 1989) 和 EB 病毒 (Epstein-Barr virus) (Baer 等人, 1984)。

[0094] 这些疱疹病毒可以容易地从商业来源,例如 American Type Culture collection (“ATCC”, Rockville, Maryland) 获得。上述疱疹病毒中某些的保藏物可以容易地从 ATCC 获得例如 :ATCC No. VR-539 (单纯疱疹病毒 I 型) ;ATCC No. VR-734 和 VR-540 (单纯疱疹病毒 II 型) ;ATCC NO. VR-586 (带状疱疹病毒) ;ATCC No. VR-783 (传染性喉气管炎) ;ATCC No. VR-624、VR-987、VR-2103、VR-2001、VR-2002、VR-2175、VR-585 (马立克氏病病毒) ;ATCC No. VR-584B 和 VR-584B (火鸡疱疹病毒) ;ATCC No. VR-631 和 VR-842 (牛疱疹病毒 I 型) ;以及 ATCC No. VR-2003、VR-2229 和 VR-700 (马疱疹病毒 I 型)。还可以从自然存在的来源 (例如从被感染的动物) 中容易地被分离和鉴定疱疹病毒。

[0095] 如下文所述,胸苷激酶基因可以被容易地分离,以构建编码含有一处或多处突变的胸苷激酶的核酸分子,与未突变的胸苷激酶相比其大幅减少该基因的剪接。正如这里所使用的,应当理解:“未突变的胸苷激酶”指天然或者野生型胸苷激酶例如由 McKnight 等人 (Nucl. Acids Res. 8 :5949-5964, 1980) 所描述的。

[0096] 应当注意,在本申请中,核苷酸的位置参考图 1 中的位置引用。然而,在进行这些参考时,应当理解,本发明并不限于图中所列出的确切序列,其还包括其变体和衍生物。因此,要考虑对其它胸苷激酶序列中核苷酸位置的鉴定 (即本领域技术人员认为与图 1 中所确定的位置相对应的位置上的核苷酸)。本领域技术人员能够容易地对相似的序列进行比对,并定位出相同的核苷酸位置。

[0097] HSV-tk 突变体的构建

[0098] 可以使用多种技术来构建本发明的胸苷激酶突变体。例如,可以通过合成含有突

变序列（其侧翼为能与天然序列的片段相连的限制性位点）的寡核苷酸，在特定的位置引入突变。连接之后，所得到的重新构建的序列编码具有期望氨基酸插入、取代或缺失的衍生物。

[0099] 或者，可以采用寡核苷酸引导的位点特异性（或片断特异性）诱变方法来提供下述改变的基因，所述基因具有根据所需要的取代、缺失或插入而改变的特定密码子。也可以通过利用与所期望缺失相邻的方便的限制性内切酶位点，来构建胸苷激酶突变体的缺失或截短衍生物。在限制性酶切之后，可填补突出端，重新连接 DNA。制备上面所列出的改变的示范性方法由 Sambrook 等人所公开 (Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。

[0100] 也可以通过利用 PCR 诱变、化学诱变、通过强制核苷酸错参 (forced nucleotide misincorporation) (例如 Liao 和 Wise, 1990) 的化学诱变 (Drinkwater 和 Klinedinst, 1986) 技术，或者通过利用随机诱变的寡聚核苷酸来构建胸苷激酶突变体。

[0101] 在本发明的一种优选实施方式中，考虑到遗传密码来修饰核苷酸，使得密码子被改变为编码相同氨基酸残基的简并密码子。通过这种方法，可能可以制备感兴趣的蛋白的质编码区域，其编码野生型蛋白质但不含有功能性剪接位点。

[0102] 剪接位点

[0103] 在剪接过程中被去除（或“被剪掉”）的 RNA 部分通常被称作内含子，典型地，通过剪接被连接在一起的内含子两侧的两段 RNA 被称作外显子（图 2）。

[0104] 剪接供体位点是 RNA 中的下述位点，其位于在剪接过程中被去除的 RNA 的 5' 侧，并且含有被切断并重新连接到剪接受体位点内的核苷酸残基的位点。这样，剪接供体位点是外显子末端和内含子开始处之间的连接，典型地，其末端为二核苷酸 GU。在本发明的一种优选实施方式中，剪接供体位点的末端 GU 二核苷酸（或者相应 DNA 序列中的 GT 二核苷酸）之一或者二者均被改变，以除去该剪接位点。

[0105] 剪接受体位点是 RNA 中的下述位点，其位于在剪接过程中其被去除的 RNA 的 3' 侧，并且含有被切断和重新连接到剪接供体位点内的核苷酸残基的位点。因此，剪接受体位点是内含子末端（典型地，以二核苷酸 AG 结尾）与下游外显子开始处之间的连接。在本发明的一种优选实施方式中，剪接受体位点的末端 AG 二核苷酸之一或者二者均被改变，以除去该剪接位点。

[0106] 多核苷酸

[0107] 在本发明中所使用的多核苷酸可以包括 DNA 或者 RNA。它们可以是单链或双链的。本领域技术人员将理解，作为遗传密码简并性的结果，许多不同的多核苷酸能够编码相同的多肽。另外，应当理解，本领域技术人员能使用常规技术进行下述核苷酸取代，所述取代不影响本发明中所使用的多核苷酸编码的多肽序列，以反映其中将表达多肽的任何特定宿主生物的密码子应用。可以用本领域中可以利用的任何方法对该多核苷酸进行修饰。可以进行这样的修饰以增强本发明多核苷酸的体内活性或者存活期 (life span)。

[0108] 本发明中所使用的多核苷酸可以编码融合蛋白，例如为了辅助所表达多肽的细胞分泌。当例如期望 HSV-tk 多肽从细胞中表达时，加入靶向序列以将蛋白质靶向到特定的细胞区室或者分泌途径可能是人们所期望的。在本领域中，这类靶向序列已经被广泛分析鉴定。

[0109] 多核苷酸,例如 DNA 多核苷酸可通过重组、合成或者通过本领域技术人员可以利用的任何方法来制备。还可通过标准的技术对它们进行克隆。

[0110] 通常使用重组方法来制备较长的多核苷酸,例如使用 PCR(聚合酶链式反应)克隆技术。这将包括制备一对引物(例如大约 15~30 个核苷酸),其侧翼是期望被克隆的肽靶向序列区域,将所述引物与从动物或者人类细胞获得的 mRNA 或 cDNA 进行接触,在能够扩增出所期望区域的条件下进行聚合酶链式反应,分离扩增出的片断(例如通过在琼脂糖凝胶上纯化反应混合物)并回收扩增出的 DNA。引物可以被设计为含有合适的限制性酶识别位点,使得扩增出的 DNA 能够被克隆入合适的克隆载体中。

[0111] 应当认识到,本发明的多核苷酸可以仅含针对突变体胸苷激酶的编码区域。但是,多核苷酸还可以可操作连接的方式含有下述核酸部分将是优选的,所述核酸部分允许在靶细胞内高效翻译编码序列。多核苷酸(以 DNA 的形式存在时)还可以可操作连接的方式含有下述启动子和下述核酸部分将是更加优选的,所述启动子允许对编码区域进行转录,所述核酸部分允许在靶细胞内高效翻译编码序列。

[0112] 蛋白质

[0113] 本文所用的术语“蛋白质”包括单链多肽分子以及多-多肽复合物,其中每种成分多肽以共价或非共价方式连接。本文所用的术语“多肽”和“肽”指下述聚合物,其中单体是氨基酸,它们通过肽键或二硫键被连接在一起。术语亚基和结构域也指具有生物学功能的多肽和肽。

[0114] 变体、衍生物、类似物、同源物和片段

[0115] 除了前面所提到的具体蛋白质和核苷酸外,本发明还包括其变体、衍生物、类似物、同源物和片段的用途。

[0116] 在本发明的上下文中,任何给定序列的变体是下述序列,其中残基(无论是氨基酸或核酸残基)的特定序列被以使得所考虑的多肽或多核苷酸保持其至少一种其内源性功能的方式所修饰。可通过增加、缺失、取代修饰置换和/或变化天然出现的蛋白质中的至少一个残基,来获得变体序列。

[0117] 本文所用的与本发明的蛋白质或者多肽相关的“衍生物”包括对其序列或者来自其序列的一个(或者多个)氨基酸残基的任何取代、变化、修饰、置换、缺失和/或增加,只要所得到的蛋白质或多肽保持其内源性功能的至少一种即可。

[0118] 本文所用的与多肽或者多核苷酸相关的术语“类似物”包括任何模拟物,即具有其所模拟的多肽或多核苷酸的至少一种内源性功能的化合物。

[0119] 典型地,可进行氨基酸取代,例如 1、2 或 3~10 或 20 个取代,只要所经修饰的序列保持所需要的活性或能力即可。氨基酸取代可以包括使用非天然存在的类似物。

[0120] 用于本发明的蛋白质还可以具有氨基酸残基的下述缺失、插入或者取代,它们产生沉默变化,导致功能等价蛋白质的产生。以极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或残基的两亲性特征方面的相似性为基础,可以进行有意的(deliberate)氨基酸取代,只要转运或调节功能被保留。例如带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;以及具有相似的亲水性值、具有不带电荷的极性头部基团的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。

[0121] 可以进行保守取代,例如根据下表进行。在第二列中相同格中的氨基酸,以及优选地,第三列中相同行中的氨基酸可以互相取代。

[0122]

脂肪族的	非极性	G A P
		I L V
	极性-不带电荷	C S T M
		N Q
	极性-带电荷	D E
		K R
芳香族的		H F W Y

[0123] “片段”也是变体,典型地,该术语指在功能上或者例如在检验中令人感兴趣的多肽或多核苷酸的选定片段。因此“片段”指是全长多肽或多核苷酸的一部分的氨基酸或核酸序列。

[0124] 这类变体可以使用标准重组 DNA 技术例如定点诱变来制备。在将被制造插入的位置,合成的 DNA 编码该插入以及插入位点两侧对应于天然存在的序列的 5' 和 3' 侧翼区。该侧翼区将含有对应于天然出现序列中位点的方便的限制性位点,使得该序列可以被合适的酶所切割,并且合成 DNA 被连接到该切割处。接着根据本发明,表达该 DNA,产生所编码的蛋白质。这些方法只是对在 DNA 序列操作领域中所已知的许多标准技术的示例,也可以使用其它已知技术。

[0125] 多核苷酸变体将优选含有经过密码子优化的序列。密码子优化是本领域中作为增强 RNA 稳定性进而增强基因表达的方法已知的。遗传密码的冗余表示若干个不同的密码子可以编码相同的氨基酸。例如,亮氨酸、精氨酸和丝氨酸每种都被 6 种不同的密码子所编码。不同的生物体在它们使用不同密码子的方面展示出了偏好。例如病毒(诸如 HIV)使用大量稀有密码子。通过改变核苷酸序列以使稀有密码子被相应的常用哺乳动物密码子所替换,序列在哺乳动物靶细胞中的表达能获得增加。哺乳动物细胞以及多种其它生物体的密码子应用表是本领域中已知的。优选地,所述序列的至少一部分是经密码子优化的。更优选地,所述序列是全面经密码子优化的。

[0126] 载体

[0127] 正如本领域中所熟知的,载体是允许或者辅助将实体从一种环境转入其它环境的工具。根据本发明,以示例的方式,在重组 DNA 技术中所使用的某些载体能够使实体(例如 DNA 片段(例如异源 DNA 片断,例如异源 cDNA 片断))转入宿主内和/或靶细胞内,以达到复制含有本发明中所使用核苷酸序列的载体和/或表达本发明所使用蛋白质的目的。在重组 DNA 技术中所使用的载体的例子包括但不限于质粒、染色体、人工染色体或病毒。

[0128] 本发明中使用的多核苷酸优选被并入到载体中。优选地,用于本发明中的载体中的多核苷酸被可操作地连接到控制序列上,所述控制序列能提供宿主细胞对编码序列的表达,即该载体是表达载体。术语“可操作地连接”指所述组分以使其以它们预期的方式发挥作用的关系存在。被“可操作地连接”到编码序列上的调控序列是以下述方式连接的,所述

方式使得能在与控制序列兼容的条件下获得所述编码序列的表达。

[0129] 所述控制序列可以被修饰,例如通过加入另外的转录调控元件,以使由控制序列所引导的转录水平应答于转录调节剂(modulator)。

[0130] 载体可以被转化或转染入合适的宿主中,以提供 tk 基因产物的表达。该过程可以包括:在能提供载体对编码该蛋白的编码序列的表达的条件下,培养用上述表达载体转化过的宿主细胞,以及可选地回收所表达的蛋白质。

[0131] 在本发明中所使用的载体可以为例如质粒或病毒载体,其被提供有复制起点,以及可选地用于表达多核苷酸的启动子,以及可选地该启动子的调节子。所述载体可以含有一种或者多种可选择的标记物基因,和/或可追踪的标记物如 GFP。载体可用于例如转染或转化宿主细胞。

[0132] 用于本发明的、与编码蛋白质的序列可操作地连接的控制序列包括启动子/增强子以及其它表达调控信号。这些控制序列可以被选择为与表达载体被设计为用于其中的宿主细胞兼容。术语“启动子”是本领域中所熟知的,其包括大小和复杂性范围为从最小程度的启动子至包括上游元件和增强子的启动子的核酸区域。

[0133] 典型地,启动子选自在哺乳动物细胞中发挥功能的启动子,尽管也可以使用原核启动子和在其它真核细胞中发挥功能的启动子。典型地,启动子源自病毒或真核基因的启动子序列。例如,其可以是源自将发生表达的细胞基因组的启动子。关于真核启动子,它们可以是以普遍方式发挥功能的启动子(例如 α -肌动蛋白、 β -肌动蛋白、微管蛋白的启动子)或者是以组织特异性的方式发挥功能的启动子(例如丙酮酸激酶基因的启动子)。也可以使用病毒启动子,例如莫洛尼鼠白血病病毒长末端重复(MMLV LTR)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR启动子或人类细胞肥大病毒(CMV)IE启动子。

[0134] 对启动子而言,可诱导的同样是有利的,这样异源基因的表达水平能够在细胞的生命期内被调节。可诱导指使用该启动子所得到的表达水平可以被调节。

[0135] 另外,可以被通过加入另外的调控序列,例如增强子序列,对这些启动子中的任何而修饰。也可以使用嵌合启动子,其包括来自上述两种或更多种不同启动子的序列元件。

[0136] 优选地,所述病毒载体优先转导某种细胞类型或某些细胞类型。

[0137] 反转录病毒载体

[0138] 在一个实施方式中,在本发明中所使用的载体是下述基于反转录病毒的载体,其已经经过遗传改造,使得:一旦病毒进入靶细胞,其不能够复制及产生后代有传染性的病毒颗粒。有许多种在组织培养条件和活体生物条件下被广泛使用以运送基因的反转录病毒。例子包括但不限于鼠白血病病毒(MLV)、人类免疫缺陷病毒(HIV-1)、马传染性贫血病病毒(EIAV)、消暑乳腺肿瘤病毒(MMTV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)、藤浪肉瘤病毒(FuSV)、莫洛尼鼠白血病病毒(Mo-MLV)、FBR 鼠骨肉瘤病毒(FBR MSV)、莫洛尼鼠肉瘤病毒(Mo-MSV)、埃布尔森鼠白血病病毒(A-MLV)、禽类髓细胞组织增生病毒-29(MC29)以及禽类成红血细胞增多症(AEV)以及所有其它反转录病毒(retroviridae),包括慢病毒(lentiviruses)。反转录病毒的详细列表可以在 Coffin 等人,1997,“反转录病毒(retroviruses)”,Cold Spring Harbour Laboratory PressEds.:JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 758-763 中发现。

[0139] 反转录病毒基因组的基本结构是 5' LTR 和 3' LTR,在其之间或在其内部定位有使得基因组能被包装的包装信号、引物结合位点、使得能够整合入宿主细胞基因组的整合位

点以及编码包装组分的 gag、pol 和 env 基因 - 它们是病毒颗粒装配所必需的多肽。更复杂的反转录病毒具有额外的特征, 例如 HIV 中的 rev 和 RRE 序列, 其能够使整合的前病毒 RNA 转录子从被感染的靶细胞的细胞核向细胞质高效输出。

[0140] 在前病毒中, 这些基因两个末端侧翼是被称作长末端重复 (LTR) 的区域。所述 LTR 负责前病毒的整合和转录。LTR 还可以作为增强子 - 启动子序列, 并控制这些病毒基因的表达。通过位于病毒基因组 5' 末端的 psi 序列, 发生用壳体包裹反转录病毒 RNA 的过程。

[0141] LTR 自身是相同序列 (identical sequence), 其可以被分成被称作 U3、R 和 U5 的三种元件。U3 源自 RNA 的 3' 末端所特有的序列。R 源自在 RNA 的两个末端都重复的序列, U5 源自 RNA 的 5' 末端所特有的序列。三种元件的大小在不同的反转录病毒中可以有相当大的变化。

[0142] 在缺陷型反转录病毒载体基因组中, gag、pol 和 env 可不存在或者没有功能。在 RNA 两末端的 R 区是重复的序列。U5 和 U3 分别代表在 RNA 基因组的 5' 和 3' 末端所特有的序列。

[0143] 更优选地, 所述病毒载体是靶向载体, 其具有与原始病毒相比被改变的组织趋向性, 这样所述载体能靶向到特定的细胞。这可以通过修饰反转录病毒 Env 蛋白来获得。优选地, 所述包膜蛋白是无毒的包膜, 或者是在初级 (primary) 靶细胞中以无毒的量产生的包膜, 例如 MMLV 两栖包膜或者被修饰的两栖包膜。

[0144] 优选地, 所述包膜是能够转化人类细胞的。适当的 env 基因的例子包括但不限于 VSV-G、MLV 两栖 env 诸如 4070A env、RD114 猫白血病病毒 env 或来自流感病毒的血细胞凝集素 (HA)。Env 蛋白质可以是能够结合有限数目的人类细胞类型上的受体的, 并可以是经工程改造的含有靶向部分的包膜。env 和 gag-pol 编码序列从在所选择的包装细胞系中有活性的启动子以及可选地, 增强子转录, 转录单元由多聚腺嘌呤化信号终止。例如, 如果该包装细胞是人类细胞, 则来自人细胞肥大病毒主要即刻早期 (hCMV-MIE) 基因和来自 SV40 病毒的多聚腺嘌呤化信号的合适启动子 - 增强子组合可以被使用。其它合适的启动子和多聚腺嘌呤化信号是本领域中已知的。

[0145] MLV

[0146] 优选地, 本发明中所使用的反转录病毒载体是鼠白血病病毒 (MLV) 载体。从两栖莫洛尼白血病病毒 (MLV-A) 获得的反转录病毒载体在世界范围内的临床方案中是通常使用的。这些病毒使用细胞表面磷酸转运受体, 以进入并接着永久整合入增殖中的细胞染色体。接着, 所述基因在细胞的生命期中被保持。在基于 MLV 的构建体上的基因活性是容易被控制的, 并长时间有效。使用这些基于 MLV 的系统进行的临床试验已显示: 它们能够被很好地忍受而没有不利的副作用。

[0147] 用于本发明的 MLV 载体的例子是源自 SFCMM-3 的载体, 其携带自杀基因 HSV-tk 和标记物基因 Δ LNGFR (Verzeletti 98, Human GeneTherapy 9:2243)。在制备 SFCMM-3 的过程中所使用的原始载体是 LXS (Miller 等人 Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. BioTechniques 7:980-990, 1989) (Genebank 索取号 #28248)。LXS 载体通过下述过程被修饰: 将 HSV-tk 基因插入到唯一的 HpaI 位点 (“平末端切割”), 使用 Hind III 和 NaeI 消化去除 neo 基因, 以及在该位点插入编码 Δ LNGFR 的 cDNA。

[0148] 慢病毒载体

[0149] 在一个实施方式中,本发明的载体可以是慢病毒载体。慢病毒载体是一组更大的反转录病毒载体的一部分。慢病毒的详细列表可以在 Coffin 等人 (“Retroviruses” 1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 758-763) 中发现。简单地说,慢病毒可以被分为灵长类组和非灵长类组。灵长类慢病毒载体包括但不限于:人类获得性免疫缺陷综合症 (AIDS) 的致病源——人类免疫缺陷病毒 (HIV), 和猴免疫缺陷病毒 (SIV)。非灵长类慢病毒组包括原形“缓慢病毒 (slow virus)”梅迪和维斯纳 (visna/maedi) 病毒 (VMV), 以及相关的山羊关节炎-脑炎病毒 (CAEV)、马传染性贫血病病毒 (EIAV) 以及更近来所描述的猫免疫缺陷病毒 (FIV) 和牛免疫缺陷病毒 (BIV)。

[0150] 慢病毒家族和其它类型反转录病毒之间的区别是慢病毒具有感染处于分裂中的和不处于分裂的细胞的能力 (Lewis, 1992; Lewis and Emerman, 1994)。相反,其它的反转录病毒 (例如 MLV) 不能够感染不处于分裂中的或者分裂缓慢的细胞,例如构成例如肌肉、脑、肺和肝组织的细胞。由于慢病毒能够转导最终分化的 / 初级细胞,所以利用慢病毒筛选策略能够在初级靶不处于分裂中的或者缓慢分裂的宿主细胞中进行文库选择。

[0151] 腺病毒载体

[0152] 在另一个实施方式中,本发明的载体可以是腺病毒载体。腺病毒载体是双链、线性 DNA 病毒,其不经历 RNA 中间体。存在超过 50 种的不同人类腺病毒血清型,根据基因序列的同源性,其被分成 6 个亚组。腺病毒的天然靶是呼吸道和肠胃上皮,通常其只引发温和症状。血清型 2 和 5 (具有 95% 的序列同源性) 是腺病毒载体系统中最常使用的,并且通常与年轻人的上呼吸道感染有关。

[0153] 腺病毒是没有包膜的规则二十面体。典型的腺病毒包括壳体包裹的 140nm DNA 病毒。该病毒的二十面体对称是由 152 个壳粒构成的:240 个六邻体 (hexon) 和 12 个五邻体 (penton)。颗粒的核含有 36kb 线性双链 DNA,其在 5' 末端与作为用于 DNA 复制的引物的末端蛋白 (TP) 共价连接。该 DNA 具有反向末端重复 (ITR),其长度随血清型变化。

[0154] 腺病毒是双链 DNA 无包膜的病毒,其能够在体内和体外转导宽范围的人类和非人类来源的细胞类型。这些细胞包括呼吸道上皮细胞、肝细胞、肌肉细胞、心肌细胞、关节滑膜细胞、初级哺乳动物上皮细胞和有丝分裂后最终分化的细胞,例如神经元。

[0155] 腺病毒载体也能够转导不处于分裂中的细胞。这对于下述疾病 (例如囊肿性纤维化) 是非常重要的,所述疾病中,在肺上皮中所感染的细胞具有缓慢的更新速率。事实上,许多试验正在进行,它们利用了腺病毒介导的、囊肿性纤维化转运蛋白 (CFTR) 向患有成人囊肿性纤维化的病人的肺中的转移。

[0156] 腺病毒已经被用作为基因治疗和表达异源基因的载体。大基因组 (36kb) 能够容纳高达 8kb 的外源插入 DNA,并能够在补体细胞系 (complementing cell lines) 中高效复制,产生高达 10^{12} 的效价。因此,腺病毒是用于研究基因在初级非复制细胞中表达的最佳系统之一。

[0157] 来自腺病毒基因组的病毒基因或外源基因的表达不需要正在复制中的细胞。腺病毒载体通过受体介导的内吞作用进入细胞。一旦在细胞中,腺病毒载体很少整合进宿主染色体。取而代之的是:其作为线性染色体在宿主细胞核中游离地发挥作用 (独立于宿主染色体)。因此,使用重组腺病毒能减轻与随机整合入宿主染色体有关的问题。

[0158] 痘病毒载体

[0159] 根据本发明可以使用痘病毒载体,因为 DNA 大片段容易被克隆进其基因组中,通过重组被削弱的牛痘变体已经被描述 (Meyer, 等人,1991 ;Smith and Moss,1983)。

[0160] 痘病毒载体的例子包括但不限于野兔痘病毒 :Upton, 等人,1986, (Shope 纤维瘤病毒);山羊痘病毒 :Gershon, 等人,1989, (Kenya 羊 -1);正痘病毒 :Weir, 等人,1983, (牛痘);Esposito, 等人,1984, (猴痘和天花病毒);Hruby, 等人,1983, (牛痘);Kilpatrick, 等人,1985, (Yaba 猴肿瘤病毒);禽痘病毒 :Binns, 等人, (1988) (鸟痘);Boyle, 等人, 1987, (鸟痘);Schnitzlein, 等人,1988, (鸟痘、鹤鹑痘);昆虫痘 (Lytvyn, 等人,1992)。

[0161] 痘病毒载体被广泛用作为在真核细胞中表达感兴趣的基因的载体。特别地,它们容易在多种宿主细胞中克隆和繁殖,使得:特别地,可广泛使用痘病毒载体用于表达外源蛋白质和作为疫苗抗原的运送载体 (Moss,1991)。

[0162] 牛痘病毒载体

[0163] 本发明的载体可以是牛痘病毒载体例如 MVA 或 NYVAC。最优选的是牛痘株:被修饰的病毒 Ankara (MVA) 或者源自其的病毒株。牛痘载体的替换物包括禽痘 (avipox) 载体,例如被称作 ALVAC 的鸟痘 (fowlpox) 或金丝雀痘 (canarypox),以及从其衍生的病毒株,它们能够在人类细胞中感染和表达重组蛋白质,但不能复制。

[0164] 运送系统

[0165] 本发明还提供了用于本发明的突变体 tk 多核苷酸的运送系统。

[0166] 本发明的运送系统可以是病毒或非病毒运送系统。非病毒运送机制包括但不限于脂介导的转染、脂质体、免疫脂质体、Lipofectin、阳离子表面亲和 (CFA) 及其组合。

[0167] 可以通过任何合适的基因运送载体 (GDV) 将多核苷酸运送到靶细胞。这包括但不限于:DNA,其被配方在脂类或蛋白质复合物中,或者作为裸露的 DNA 通过注射或生物射弹 (biolistic) 施予,病毒,例如反转录病毒、腺病毒、慢病毒、干病毒、牛痘病毒、腺相关病毒、鼠白血病病毒、西门利克森林病毒 (semliki forest viruse) 和杆状病毒。或者,通过细胞运送多核苷酸,例如单细胞、巨噬细胞、淋巴细胞或造血干细胞。特别地,使用依赖细胞的运送系统。在该系统中,编码 TK 蛋白质的多核苷酸被离体 (ex vivo) 导入一个或者多个细胞中,接着被导入到患者中。

[0168] 本发明的试剂可以单独施予,但通常可以作为药物组合物施予。

[0169] 宿主细胞

[0170] 本发明的载体和多核苷酸可以被引入宿主细胞中,以达到对载体 / 多核苷酸进行复制和 / 或对本发明多核苷酸编码的 TK 加以表达的目的。宿主细胞可以是细菌细胞或真核细胞例如酵母、昆虫或哺乳动物细胞。

[0171] 宿主细胞可以是用于包装或者繁殖病毒的细胞,例如本领域中所熟知的反转录病毒包装细胞系。

[0172] 宿主细胞可以是期望被破坏的动物或患者 (无论人类或动物) 的细胞。本发明的多核苷酸和载体能够用于靶向将被破坏的细胞。表达 TK 的细胞可以与能被 TK 转化成毒性形式的基本无毒的试剂进行接触。

[0173] 破坏细胞的方法

[0174] 在本发明的一个方面,提供了一种破坏细胞的方法,其包括:

[0175] (i) 向所述细胞中导入本发明的多核苷酸或载体；

[0176] (ii) 使所述细胞表达胸苷激酶；和

[0177] 将所述细胞与能被 TK 转化成毒性形式的基本上无毒的试剂接触。

[0178] 将多核苷酸或载体导入细胞中以及将细胞与基本上无毒的试剂进行接触，可以接任何顺序进行。将被破坏的细胞可以是在体外的，例如在培养物中生长的细胞，或者它们可以是动物的一部分的细胞。期望被破坏的细胞的代表性例子是 T 细胞，自身免疫细胞，肿瘤细胞，不表达或不正确表达特定基因的细胞，以及被细菌、病毒或其它细胞内寄生物所感染的细胞。

[0179] 治疗

[0180] 应当认识到，本文提到的治疗包括治愈性的、缓解性的和预防性的治疗。对哺乳动物的治疗是特别优选的。对人类的治疗和兽医治疗都在本发明的范围内。

[0181] 在本发明的一个方面，提供了一种对具有需要被破坏的细胞的患者进行治疗的方法，其包括：

[0182] (i) 将本发明的多核苷酸、载体或药物组合物引入患者中；

[0183] (ii) 使所述多核苷酸或表达载体被所述细胞吸收；

[0184] (iii) 使所述细胞表达胸苷激酶；以及

[0185] (iv) 将能被胸苷激酶转化成毒性形式的基本上无毒的试剂引入患者。

[0186] 在本发明的另一方面，提供了一种对具有需要被破坏的细胞的患者进行治疗的方法，其包括：

[0187] (i) 从患者或者供体细胞中取出细胞；

[0188] (ii) 在体外将本发明的多核苷酸或表达载体引入所述细胞中；

[0189] (iii) 将被修饰的细胞引入患者中；

[0190] (iv) 使所述细胞表达胸苷激酶；以及

[0191] 向患者施予能被胸苷激酶转化成毒性形式的基本上无毒的试剂。

[0192] 可以通过本发明的多核苷酸、载体和方法治疗的疾病的代表性例子包括下述疾病，例如癌症、眼角膜细胞增多、前列腺肥大、甲状腺功能亢进、多种内分泌疾病、自体免疫疾病、再狭窄、HIV 和 AIDS、肝炎等多种病毒性疾病和细胞内寄生虫疾病。

[0193] 本发明的多核苷酸、载体和方法可用于同种异体骨髓移植之后的治疗过程。同种异体骨髓移植是许多血液恶性肿瘤（例如白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤）的治疗选择。移植同种异体骨髓，特别是当与高剂量的化放疗一起使用时，已展示出：产生了与自体或同源移植物相比而言好的结果。

[0194] 在进行同种异体骨髓移植时，可以从移植物中去除同种反应活性 T 淋巴细胞，以防止移植物抗宿主病 (GvHD)。当被移植的干细胞移植物中的 T 细胞开始攻击受体的身体时，发生 GvHD。然而，这样的细胞去除过程将提高疾病复发、移植物排斥和病毒感染的再活化的发生率。为了抵挡这些作用，可以通过在同种异体骨髓移植后的一段延迟时间后，引入供体 T 淋巴细胞，对同种异体骨髓移植患者进行治疗。然而，在同种异体骨髓移植之后延迟引入供体 T 淋巴细胞的治疗期望会受到 GvHD 的限制，GvHD 是该治疗的常见和潜在的致死并发症。这个问题已通过下述方法解决：向患者施予被遗传改造为包括编码“自杀基因”的多核苷酸的患者 T 细胞。在这方面，可以使用编码突变体 TK 的、本发明多核苷酸和载体。

[0195] 由此,在本发明的一个方面,提供了一种预防患者中移植物抗宿主病的方法,其包括:

[0196] (i) 向宿主施予被遗传改造为包括本发明多核苷酸或载体的 T 细胞;和

[0197] (ii) 在发生移植物抗宿主病之前,以能够通过所述试剂与胸苷激酶的相互作用有效杀死能在所述患者中提供移植物抗宿主病作用的经遗传改造的 T 细胞的量,向所述宿主施予基本上无毒的试剂。

[0198] 含有编码突变体 tk 基因的多核苷酸或载体的细胞优选包括可用于监测突变体 tk 基因出现的标记基因。优选地,所述标记基因由本发明的多核苷酸或表达载体编码。一种这类标记物基因的例子是经修饰的低亲和力神经生长因子受体 (Δ LNGFR)。当在被转导的细胞表面表达时,经修饰的 Δ LNGFR 保留了相应的未经修饰 NGF 受体与其配体的结合性能,而不能影响作为配体结合结果的信号传导。具体的 Δ LNGFR 修饰的例子被描述于美国申请 No. 08/602,791 中。

[0199] 药物组合物

[0200] 药物组合物是含有药学有效量的药学活性试剂或由药学有效量的药学活性试剂组成的组合物。其优选包括药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂(包括其组合)。用于治疗应用的可接受的载体或稀释剂是制药领域中熟知的,并被描述于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985) 中。对药物载体、赋形剂或稀释剂的选择可以根据所期望的施予路线和标准药物实践来选择。药物组合物可以包括(或另外包括)赋形剂或稀释剂、任何合适的粘结剂、润滑剂、悬浮剂、包被剂、增溶剂。

[0201] 药学上可接受的载体的例子包括例如水、盐溶液、乙醇、硅树脂、蜡、凡士林油、植物油、聚乙二醇、丙二醇、脂质体、糖、凝胶、乳糖、淀粉糖、硬脂酸镁、云母、表面活性剂、硅酸、粘性石蜡、香精油(perfume oil)、脂肪酸单甘油酯和二甘油酯、石油烃脂肪酸酯(petroethral fatty acid ester)、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0202] 在适当的情况下,所述药物组合物可以通过下列的一种或者多种方式施予:吸入,以栓剂或阴道栓剂的形式施予,以洗液、溶液、乳膏、药膏或爽身粉的形式进行局部施予,以含有赋形剂(如淀粉或乳糖)的药片的形式口服,或者以胶囊或胚珠(ovule)单独施予或与赋形剂混合的形式施予,或以含有调味剂或着色剂的酏剂、溶液或悬浮液的形式施予,或者它们可以经非肠道注射例如腔内、静脉内、肌肉内或皮下注射。对于经非肠道给药,所述组合物可以最好以可以含有其它物质(如,能够使该溶液与血液等渗的足够的盐或单糖)的无菌水溶液的形式进行使用。对于口腔施予或者舌下给药,所述组合物可以被以能通过传统方法配制的药片或锭剂的形式施予。

[0203] 取决于不同的运送系统,可以有不同的组合物/制剂的需求。举例而言,本发明的药物组合物可以被配制为:使用迷你泵或者通过粘膜路线运送,例如作为鼻喷雾或者用于吸入或摄取溶液的气雾剂,或者通过非肠道给药,其中所述组合物以注射的形式配制以运送,例如静脉内、肌肉内或皮下路线。或者,所述制剂可以被设计为通过两种路线运送。

[0204] 下面将参考附图,以及通过非限制性的实施例来描述本发明的其它优选特征和实施方式,附图中:

[0205] 图 1 展示了 HSV-1 胸苷激酶基因(HSV-tk)突变体(TkMut2(SEQID NO 2)、

TkMut23(SEQ ID NO :3)、TkMut24(SEQ ID NO :4)、TkMut34(SEQ ID NO :5)、TkMut4(SEQ ID NO :6) 和 TkMut234(SEQ ID NO :7) 的核苷酸序列的多条比对。从野生型 HSV-tk 序列的 ATG 起始密码子对碱基进行编号。将序列与 TK wt 序列 (TK wt, SEQ ID NO :1) 进行比对。通过对比上面的数字,指示了突变的位置。位置 (330)、(541 和 542) 以及 (555) 的突变分别由数字 2、3 和 4 表示。

[0206] 图 2 表示剪接共有 (consensus) 序列。

[0207] 图 3 展示了从用 SFCMM-3 (Verzelletti, 1998, Human GeneTherapy 9 :2243-2251) 和 / 或 TK3 (scSFCMM-3) (Chalmers, 2001) 载体转染的 echotropic 包装细胞系 GP+E86 和来自双嗜性 (amphotropic) 包装细胞系的上清液制备的 cDNA 的 HSV-tk PCR 产物。

[0208] 图 4 展示了在用 SFCMM-3 和 / 或 TK3 (scSFCMM-3) 载体转导的上皮血淋巴细胞 (PBL) 中 PCR 扩增出的 HSV-tk。

[0209] 图 5 展示了 SFCMM-3 与 TK3 (scSFCMM-3) 相比中 HSV-tk 基因的关键部分的序列。SFCMM-3 和 TK3 (scSFCMM-3) 载体之间不同的核苷酸位置被方框框起来。在 SFCMM-3 和 TK3 的被剪接型中缺失的基因部分以斜体表示。相应的剪接供体和受体位点被指出。

[0210] 图 6 展示了对导入 SFCMM-3 载体的突变的示范性总结。

[0211] 图 7 展示了源自 E86 细胞的上清液的 cDNA 的 HSV-tk PCR 产物,其中 E86 经过了从含有图 1 中所示的 HSV-tk 突变体的 SFCMM-3 获得的重组质粒的转染。

[0212] 图 8 展示了源自 Am12 培养物上清液的 cDNA 的 HSV-tk PCR 产物,其中 Am12 培养物已用从图 7 所描述的 E86 培养物收集的上清液转导过。

[0213] 图 9 展示了源自 CEM A301 细胞的 DNA 的 TKA1/TKB1 HSV-tk PCR 产物,其中 CEM A301 细胞已用从图 8 所描述的 Am12 培养物收集的上清液转导过。

[0214] 图 10 展示了源自 CEM A301 细胞的 DNA 的 TKY1/TKY2 和 TKZ1/TKZ2 HSV-tk PCR 产物,其中 CEM A301 细胞已用从图 8 所描述的 Am12 培养物收集的上清液转导过。

[0215] 图 11 展示了来自 PBL 的 DNA 的 TKA1/TKB1 HSV-tk PCR 产物,其中 PBL 已用从图 8 所描述的 Am12 培养物收集的上清液转导过。

[0216] 图 12 表示源自 PBL 的 DNA 的 TKZ1/TKZ2 HSV-tk PCR 产物,其中 PBL 已用从图 8 所描述的 Am12 培养物收集的上清液转导过。

[0217] 实施例 1-SFCMM-3#35 上清液和被转导细胞中 HSV-tk 的被剪接形式的相对频率

[0218] 通过使用 TaqMan 7700 系统,用特异于每种 HSV-tk 形式的两种定量实时 RT-PCR (来自上清液的 RNA) 或 PCR (来自被转导的淋巴细胞) 对剪接形式的相对频率 (被剪接形式 / (被剪接加未被剪接) 的百分比) 进行评估。

[0219] 材料和方法

[0220] SFCMM-3 反转录病毒载体

[0221] GP+envAm12 (Am12)- 衍生的生产细胞系 (producer cell line), SFCMM-3 克隆 35 (Am12/SFCMM-3#35) 在 DMEM (Cambrex) 培养基中 被铺展 (expand) 了 5 天,其中所述 DMEM (Cambrex) 培养基含有 2mM 谷氨酰胺和 10% 经辐射的 FBS (Hyclone)。在 33°C 下温育细胞 24 小时后,从汇合 (confluent) 的瓶中收集补充有 2mM 谷氨酰胺的 X-VIVO15 培养基 (Cambrex) 中的反转录病毒上清液。对含有病毒的上清液进行过滤,并存储在 -80°C 下直到进一步的应用。

[0222] T 细胞转导

[0223] 从健康的供体收集外周血单核细胞,并通过在 Lymphoprep (Nycomed) 上离心进行分离。

[0224] 使用 OKT3(30ng/ml) (Orthoclone) 对外周血淋巴细胞 (PBL) 进行刺激,并在 RPMI (Hyclone) 中进行培养,所述 RPMI 含有 3% 的自体血浆、2mM 谷氨酰胺并补充有重组人白介素 2, 600IU/ml (Proleukin)。对 PBL 的转导是通过反转录病毒颗粒 (来自 Am12/SFCMM-3#35 的上清液) 进行离心在经 OKT3 刺激的 PBL 上进行的。在 OKT3 刺激后的第二天和第三天进行两次离心循环。

[0225] 在转导期之后,收集白细胞,并通过 FACS 分析,借助作为细胞表面标记物的 Δ LNGFR 分子,评估实际被转导的细胞的百分比。接着通过桥联到磁珠 (Dynabeads) 上的抗体对经转导的细胞进行挑选,在培养物中铺展几天,并在总共培养 10 天后冷冻。

[0226] 样品制备

[0227] 通过使用 QIAamp Mini 试剂盒 (Qiagen),根据厂商提供的方案,从 $1 \sim 2 \times 10^6$ 个细胞来纯化 DNA,并通过测量 OD_{260} 确定其产率。通过使用 QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen),根据厂商提供的方案,从 $140 \mu\text{l}$ 上清纯化 RNA。首先在 25°C 下对 $13.5 \mu\text{l}$ 纯化的 RNA 进行 20 分钟的 DNase 处理,并 95°C 处理 5 分钟使 DNase 失活。然后在 42°C 下使用 M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) 和 Oligo dT,对经过 DNase 处理的 RNA 中的一半进行 1 小时的反转录。在用于实时 PCR 之前,对所合成的 cDNA 进行 5 倍稀释。

[0228] 通过实时 PCR 对被剪接形式的定量

[0229] 已经通过将 HSV-tk 的未被剪接的和经截短形式亚克隆进 pCR2.1TOPO 载体 (Invitrogen),制备了 DNA 标准曲线。已经使用 PrimerExpress™ 1.5 软件 (PE Applied Biosystems) 设计了两组不同的引物和探针,其能够选择性地扩增和检测 HSV-tk 的未被剪接和被剪接形式。使用 TaqMan 7700 序列检测系统,设定特异于每种 HSV-tk 形式的两种定量实时 RT-PCR。

[0230] 为了建立特异于 HSV-tk 未被剪接形式的定量实时 PCR,引物和探针被设计在 HSV-tk 基因的被剪接区。针对被剪接形式的实时 PCR 在 $25 \mu\text{l}$ 的反应混合物中进行,所述反应混合物含有 100–500ng 基因组 DNA 或 $10 \mu\text{l}$ 上面所制备的 cDNA、1XTaqMan Universal PCR MasterMix (PE Applied Biosystems)、每种都是 300nM 的两种引物 TKwtfor ($5' -\text{CGG CGG TGG TAA TGA CAA G}-3'$) 和 Tkwtrrev ($5' -\text{GCG TCGGTC ACG GCA TA}-3'$)、以及 200nM TKwt MGB 探针 ($5' -\text{FAM CCAGAT AAC AAT GGG C}-3'$)。

[0231] 包含剪接连接处的 TaqMan 探针被设计为能选择性地检测 HSV-tk 的被剪接形式。针对 TK 的被剪接 (被截短) 形式的定量实时 PCR 在 $25 \mu\text{l}$ 的反应混合物中进行,所述反应混合物含有 100–500ng 基因组 DNA 或 $10 \mu\text{l}$ 上面所制备的 cDNA、1X Master Mix (PE Applied Biosystems)、每种都是 300nM 的两种引物 TKSP18 ($5' -\text{GGA TGA GGGCCA CGA A}-3'$) 和 TKSP16 ($5' -\text{CGA ACA TCT ACA CCA CAC AACA}-3'$) 以及 200nM Taq Man 探针 PSP10 ($5' -\text{FAM-CCA GCA CGG CCCTGG TCG-TAMRA 3}'$)。热循环条件如下:在 50°C , 2 分钟起始 UNG 的活化,接着 95°C , 15 分钟活化 Taq Gold 并使 UNG 失活。随后进行 40 个扩增循环: 95°C , 15 秒和 60°C , 1 分钟。使用 ABI Prism 7700 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems),在 MicroAmp 光学 96 孔反应板 (Applied Biosystems) 中平行进行两项 PCR。

从第 3 ~ 15 个 PCR 循环计算平均基线荧光, Ct 被定义为报告染料 (reporter dye) 经过标准化后的荧光强度达到 0.05 的 PCR 循环。通过将 Ct 值对起始输入 DNA 量的对数值进行作图, 在每项 TaqMan 检验中产生了具有已知拷贝数目 ($10^6 \sim 4$ 个拷贝 / 反应) 的两条标准曲线。分别以两次和三次重复对标准稀释液和 cDNA 样品进行分析。两个 PCR 都被证实有效, 它们表现出扩大的动力学范围 (6log)、高灵敏度 (< 10 个拷贝 / 反应)、良好的再现性 ($CV < 5\%$) 和可重复性 ($CV < 5\%$)。

[0232] 结果

[0233] 结果展示于表 1 中。对 6 份临床级别的 SFCMM-3 载体上清液以及 9 份被转导的淋巴细胞制备物进行分析。

[0234] 在全部 6 份临床级别的 SFCMM-3 上清液中 (1.12 \pm 0.75, 范围 0.65-2.60) 以及在 9 份被 SFCMM-3 上清液转导的 T 淋巴细胞制备物中 (1.89 \pm 1.22, 范围 0.84-4.00), 被剪接形式的相对频率低于 5%。

[0235] 实施例 2-scSFCMM-3 上清液和被转导细胞中被剪接 TK 的变体材料和方法

[0236] scSFCMM-3 反转录病毒载体和生产细胞系

[0237] 通过磷酸钙共沉淀法, 将载体 DNA TK3 (TK3 Molmed 和 TK3 是相同质粒 scSFCMM-3 的不同制备物, 其被描述于 Chalmers 2001, Molecular Therapy 4:146-148 中) 转染进 echotropic 包装细胞系 GP+E-86 (E86) 中。过滤从对 E86 细胞的瞬时转染获得的上清液, 然后将其用于感染 Am12 细胞系。通过使用免疫磁力选择分离含有 TK3 的细胞部分, 并将所得到的大量培养物进行铺展。在对 Am12/TK3 大量培养物进行有限次稀释后, 基于高生长能力和对 T 淋巴细胞的转导效率, 选出克隆 #53、#71 和 #80。

[0238] 将 Am12/TK3 克隆铺展在含有 2mM 谷氨酰胺和 10% 经辐射的 FBS (Hyclone) 的 DMEM (Cambrex) 中。在 33°C 下温育细胞 24 小时后, 从汇合的瓶中收集补充有 2mM 谷氨酰胺的 X-VIVO 15 培养基 (Cambrex) 中的反转录病毒上清液。使用 0.22 μ m 的过滤器对含有病毒的上清液进行过滤, 并存储在 -80°C 下直到进一步的应用。

[0239] T 细胞转导

[0240] 从若干健康的供体收集外周血单核细胞, 并通过在 Lymphoprep (Nycomed) 上的离心进行分离。

[0241] 使用 OKT3 (30ng/ml) (Orthoclone) 对外周血淋巴细胞 (PBL) 进行刺激, 并在 RPMI (Hyclone) 中进行培养, 所述 RPMI 含有 3% 的自体血浆、2mM 谷氨酰胺并补充有重组人白介素 2, 600IU/ml (Proleukin)。对 PBL 的转导是通过对反转录病毒颗粒 (来自 Am12/SFCMM-3#35 的上清液) 离心在经 OKT3 刺激的 PBL 上进行的。在 OKT3 刺激后的第二天和第三天进行两次离心循环。

[0242] 在转导期之后, 收集白细胞, 并通过 FACS 分析, 借助作为细胞表面标记物的 Δ LNGFR 分子来评估实际被转导的细胞的百分比。接着通过桥联到磁珠 (Dynabeads) 上的抗体对经转导的细胞进行拣选, 在培养物中铺展几天, 并制备沉淀用于 PCR 分析。

[0243] 聚合酶链式反应

[0244] 对大量生产细胞系 (Am12/TK3 Bulk 2) 以及经有限次稀释 (Am12/TK3#53、#71 和 #80) 获得的单生产细胞克隆进行分析。从含有传染性病毒颗粒的培养物上清液提取 RNA。

[0245] 使用 HTK4+(5' -TTC TCT AGG CGC CGG AAT TCG TT-3') 和 HTK2-(5' -ATC CAG

GAT AAA GAC GTG CAT GG-3') 引物, 或 TKA1(5' -CGT ACC CGA GCC GAT GAC TT-3') 和 TKB1(5' -TGTGTC TGT CCT CCG GAA GG-3') 引物进行 RT-PCR。使用 Titan Onetube RT-PCR System(Roche) 在 50 μ l 反应混合物中进行 RT-PCR, 所述反应混合物含有 10 μ l 经过 DNase 处理的 RNA, 具有 1.5mM MgCl₂ (PE Applied Biosystems)、200nM 每种脱氧核苷酸 (dNTP)、200nM 每种引物、5mM 二硫苏糖醇 (DTT)、20U RNase 抑制剂、1 μ l Titan Enzyme 混合物的 1X RT-PCR 缓冲液。

[0246] 将来自 Am12/SFCMM-3#35 的上清液和来自经 SFCMM-3 转导的淋巴细胞的 DNA 作为对照。RT- 对照也被平行进行。

[0247] RT-PCR 循环方案由以下步骤构成: 首先在 50°C 下进行 30 分钟反转录步骤, 在 94°C 进行 2 分钟变性步骤, 接着是 40 个 95°C 变性 30 秒、60°C 退火 30 秒以及 68°C 延伸 1 分钟的循环, 以及最后在 68°C 下进行一个延伸 10 分钟的最后步骤。通过琼脂糖凝胶电泳对 10 微升扩增产物进行分析。

[0248] 从经 SFCMM-3 或 TK3 载体转导的若干供体的 PBL 提取基因组 DNA。在 25 μ l 的反应混合物中进行 PCR, 所述反应混合物含有 100-500ng 基因组 DNA, 具有 1.5mM MgCl₂(Applied Biosystems)、200nM 每种 dNTP、1600nM 每种引物 TK2S(5' -CCA TAG CAA CCG ACGTAC G-3') 和 TKAS(5' -GAA TCG CGG CCA GCA TAG C-3') 的 1XPCR 缓冲液。RT-PCR 循环方案由以下步骤构成: 首先在在 94°C 15 分钟进行变性步骤, 接着是 38 个 95°C 变性 1 分钟、65°C 退火 30 秒以及 72°C 延伸 1 分钟的循环, 以及在 72°C 下延伸 10 分钟的最后一步。通过琼脂糖凝胶电泳对 10 微升扩增产物进行分析。

[0249] 在 25 μ l 的反应混合物中对相同的样品进行, 所述反应混合物含有 100-500ng 基因组 DNA, 具有 1.5mM MgCl₂(Applied Biosystems)、200nM 每种 dNTP、300nM 每种引物 HTK4+(5' -TTC TCT AGG CGC CGG AAT TCG TT-3') 和 HTK2-(5' -ATC CAG GAT AAA GAC GTGCAT GG-3') 和 1.25U AmpliTaq Gold(Applied Biosystems) 的 1X PCR 缓冲液。该 PCR 循环方案由以下步骤构成: 首先在在 94°C 15 分钟进行变性步骤, 接着是 40 个 95°C 变性 30 秒、65°C 退火 50 秒以及 72°C 延伸 1 分钟的循环, 以及在 72°C 下延伸 10 分钟的最后一步。通过琼脂糖凝胶电泳对 10 微升扩增产物进行分析。

[0250] 对 TK3 被剪接形式的 cDNA 序列分析

[0251] 通过使用自动荧光 DNA 测序设备, 对用 HTK4+/HTK2- 引物从 Am12/TK3#53 上清液所扩增的产物的靠下条带进行测序。通过 PRIMM(Milan, Italy) 进行测序。

[0252] 结果

[0253] 对来自培养物上清液的 RNA 进行 HSV-tk RT-PCR

[0254] 检测两种 PCR 产物, 以分析来自 Am12 和 E86 包装细胞系所产生的 SFCMM-3 和 TK3 的 RNA(图 3)。TK3 载体对应于所描述的 scSFCMM-3 载体 (Chalmers, 2001)。所有样品中, 主要的产物(靠上的条带)对应于 HSV-tk 的未剪接形式(使用 HTK4+/HTK2- 引物得到的 1020 对碱基对 (bp); 使用 TKA1/TKB1 引物得到的 401bp)。在 SFCMM-3 样品中较小产物(靠下的条带)对应于所述的被剪接形式, 其中检测到了 227bp (Garin 2001, Blood97: 122-129)。

[0255] 相反, TK3 样品中次要产物的大小稍微大些, 这暗示存在不同剪接形式, 其中较小片段缺失; SFCMM-3 和 TK3 样品之间的这种区别在使用 TK2S/TKAS 引物时特别明显。另外,

仅使用 HTK4+/HTK2- 引物时观察到的中间产物被认为是可能的 PCR 人造伪产物。

[0256] 对来自被转导的淋巴细胞的 DNA 的 HSV-tk PCR

[0257] 检测两种 PCR 产物,以分析来自经 SFCMM-3 和 TK3 转导的 PBL 的 DNA(图 3)。主要的产物(靠上的条带)对应于 HSV-tk 的未剪接形式(使用 TK2S/TKAS 引物得到的 644bp;使用 HTK4+/HTK2- 引物得到的 1020bp)。在 SFCMM-3 样品中靠下条带(对应于所描述的被剪接形式)的大小为:使用 TK2S/TKAS 引物时,417bp,使用 HTK4+/HTK2- 引物时,793bp。

[0258] SFCMM-3 与 TK3 相比时 HSV-tk 基因关键部分的序列

[0259] 图 5 中展示了 SFCMM-3 与 TK3 相比时 HSV-tk 基因关键部分的序列。SFCMM-3 和 TK3 的被剪接形式中所缺失的基因部分用斜体表示。相应的剪接供体和受体位点被标记下划线。

[0260] 序列数据确认了在 SFCMM-3(227bp 缺失)和 TK3(214bp 缺失)样品中产生了不同的被剪接形式。正如所期待的,两种情况下,GU 和 AG 二核苷酸都分别出现在所缺失序列的 5' 和 3' 末端。

[0261] 实施例 3- 通过定点诱变消除剪接

[0262] 材料和方法

[0263] 从野生型 SFCMM-3 载体开始,通过定点诱变制备在 HSV-tk 基因中具有不同突变的重组质粒(图 6)。三碱基简并变化被引入,所以在所有情况中都保留了 HSV-tk 酶的野生氨基酸序列。

[0264] 定点诱变

[0265] 为了产生 pcDNA3.1-tk 质粒,使用 EcoRI 和 XhoI 对 SFCMM-3 质粒进行消化,并将 EcoRI/XhoI 片段连接到 EcoRI/XhoI 消化过的 pcDNA3.1(Invitrogen)上。

[0266] 从 pcDNA3.1-tk 质粒,使用 QuickChange Site-Directed Mutagenesis 试剂盒(Stratagene),通过定点诱变产生了所有的 HSV-tk 突变体。用于引入所期望的突变的寡核苷酸引物与载体的反向链互补。在下表中报道了正义引物的序列:

[0267]

突变位置	寡核苷酸序列 ^a	所产生的突变体	质粒克隆 ^b
t330c	5'-CCTCGACCAGGG <u>C</u> GAGATATCGGCCG-3'	TkMut2	10.1
t330c	5'-CCTCGACCAGGG <u>C</u> GAGATATCGGCCG-3'	TkMut24	177.3
g555a	5'ATGACCCCCCA <u>A</u> GCCGTGCTGGCG-3'		
a541t/g542 c/g555a	5'- TACCTTATGGGCT <u>C</u> CATGACCCCCCA <u>A</u> GCC GTGC-3'	TkMut34	57.1
g555a	5'-ATGACCCCCCA <u>A</u> GCCGTGCTGGCG-3'	TkMut4	19.1
t330c	5'-CCTCGACCAGGG <u>C</u> GAGATATCGGCCG-3'	TkMut234	171.1
a541t/g542 c/g555a	5'- TACCTTATGGGCT <u>C</u> CATGACCCCCCA <u>A</u> GCC GTGC-3'		

[0268] ^a 核苷酸突变的位置以黑体下划线表示。

[0269] ^b 数字代表每个 SFCMM-3 HSV-tk 质粒克隆突变体的号码。

[0270] 对所得到的载体进行测序以验证正确的核苷酸取代。接着通过 EcoRI 和 XhoI 消化从 pcDNA3.1 中去除 HSV-tk 突变的片段，接着克隆进 SFCMM-3 质粒，以产生 SFCMM-3 HSV-tk 突变体。

[0271] 在对 SFCMM-3 HSV-tk 突变体进行序列确认后（图 1），每种类型取一种质粒克隆用于瞬时转染 E86 细胞。将 SFCMM-3 和 TK3 质粒用作对照。从 E86 培养物中收集上清液，以稳定转导在实施例 2 的材料和方法部分中所描述的双嗜性包装细胞系 Am12。针对 ΔLNGFR 的表达对所得到的细胞群加以选择。

[0272] 从含有感染性反转录病毒颗粒的 E86 和 Am12 培养物上清液中提取 RNA。使用 TKA1 和 TKB1 引物根据实施例 2 的材料和方法部分所描述的方案在来自 E86 和 Am12 上清液的 RNA 上进行 RT-PCR 反应。

[0273] 对 CEM A301 细胞系和 PBL 的转导和 PCR 分析

[0274] 在补充有 10% FBS(Hyclone) 和 2mM 谷氨酰胺的 RPMI 1640(Hyclone) 中培养 CEM A301 细胞。使用含有 SFCMM-3HSV-tk 突变体 2 和 234 的 Am12 培养物上清液感染 CEM A301

细胞。在转导前一天,培养 5×10^5 细胞 /ml。接着通过对反转录病毒载体颗粒的一次离心循环对细胞进行转导。在转导期之后,收集细胞,并通过 FACS 分析实际被转导的细胞的百分比。使用含有 SFCMM-3HSV-tk 突变体 2 以及 SFCMM-3 的 Am12 上清液对来自不同供体的 PBL 进行转导(如实施例 2 的材料和方法部分中所描述的)。

[0275] 接着针对 Δ LNGFR 的表达对经转导的细胞进行拣选,并在培养物中铺展数天。

[0276] 从实施例 2 的材料和方法部分所描述的被转导未被选择的细胞以及从被转导被选择的细胞制备用于 PCR 分析的沉淀。从沉淀的细胞提取基因组 DNA,并使用 TKA1 和 TKB1 或 TKY1 和 TKY2 或 TKZ1 和 TKZ2 引物(如下表所示)在 25μ l 的反应混合物中进行 PCR 反应,所述反应混合物含有 100-500ng 基因组 DNA,具有 1.5mM $MgCl_2$ (Applied Biosystems)、200nM 的每种 dNTP、300nM 的每种引物、1.25 单位 AmpliTaq Gold(Applied Biosystems) 的 1X RT-PCR 缓冲液。RT-PCR 循环方案由以下步骤构成:首先在 $94^\circ C$ 进行变性 15 分钟步骤,接着是 40 个 $94^\circ C$ 变性 30 秒、 $60^\circ C$ 退火 50 秒以及 $72^\circ C$ 延伸 1 分钟的循环,以及在 $72^\circ C$ 下延伸 10 分钟的最后一个步骤。通过琼脂糖凝胶电泳对 10 微升扩增产物进行分析。

[0277]

引物名称	引物序列	PCR 产物长度 (未剪接的 HSV-tk)
TKA1 TKB1	5' -CGT ACC CGA GCC GAT GAC TT-3' 5' -TGT GTC TGT CCT CCG GAA GG-3'	401bp
TKY1 TKY2	5' -TTA TAT AGA CGG TCC TCA CGG G-3' 5' -CCA GCA TAG CCA GGT CAA GC-3'	542bp
TKZ1 TKZ2	5' -GCC ACC ATG GCT TCG TAC-3' 5' -CGA GTT AAT TCT CAG TTA GCC TCC-3'	1149bp

[0278] [0278] 结果

[0279] E86 上清液中 HSV-tk 突变体的剪接特性

[0280] 在除了阴性对照(来自未被转染的 E86 细胞、E86C- 的上清液)之外的所有样品中都检测到了对应于 HSV-tk 非剪接形式的(401bp)的主要产物(靠上的条带)。

[0281] 在来自于所有突变体载体的 RNA 中,与 SFCMM-3 和 TK3 载体相比,E86 包装细胞系所产生的次要产物(靠下的条带)量较少。

[0282] Am12 上清液中 HSV-tk 突变体的剪接特性

[0283] 在除了阴性对照外(来自未感染细胞、Am12C- 和 H_2O)之外的所有的样品中都检测到了 HSV-tk 的未剪接形式(图 8)。在 TkMut4(突变 4)和 TkMut34(突变 3+4)突变体检测到了靠下的条带,其分别对应 TK3 和 SFCMM-3 样品的靠下的条带。溴化乙啶信号的强度比 TK3 和 SFCMM-3 低,这说明被剪接的产物在突变体中所出现得要少。该条带在 TkMut2(突变 2)、TkMut234(突变 2+3+4)和 TkMut24(突变 2+4)突变体中没有被检测到。事实上,在 TkMut2、TkMut234 和 TkMut24 突变体中检测到了大约 100 和 200bp 的两条非常弱的条带。

[0284] 经转导的 CEMA301 细胞和 PBL 中 HSV-tk 突变体的剪接特性

[0285] 通过使用 TKA1/TKB1 引物进行 PCR,对来自经 TkMut2 和 TkMut234 突变体以及 SFCMM-3 和 TK3 上清液转导的 CEM A301 的基因组 DNA 进行分析。在除了阴性对照外(未被转导的细胞、CEM NT 和 H_2O)之外的所有样品中都检测到了 HSV-tk 的未剪接形式(401bp)(图 9)。在 TK3 和 SFCMM-3 预选和选择后样品中检测到了靠下的条带,其对应于 HSV-tk 基因的被剪接形式。在选择前和选择后,在经 TkMut2 和 TkMut234 突变体转导的 CEM 中都没有观察到靠下的条带。

[0286] 为了排除在 HSV-tk 基因的不同区域发生替代性剪接事件的可能性,使用 TKY1/TKY2 和 TKZ1/TKZ2 引物,对被 TkMut2 和 SFCMM-3 上清液进行了更加广泛的分析。

[0287] 在所有的样品中都检测到了 HSV-tk 的未剪接形式(分别 542bp 和 1149bp)(图

10)。在预选和选择后样品 SFCMM-3 中检测到了靠下的条带,其对应于 HSV-tk 基因的被剪接形式。使用 TKY1/TKY2 或使用 TKZ1/TKZ2PCR 引物都没有在经 TkMut2 转导的 CEM 中观察到靠下 的条带。

[0288] 通过使用 TKA1/TKB1 引物进行 PCR,对经 SFCMM-3 和 / 或 TkMut2 上清液转导的三种不同供体 (Don1、Don2 和 Don3) 的 PBL 的基因组 DNA 进行分析。在所有的样品中都检测到了 HSV-tk 的未剪接形式 (401bp) (图 11)。在 SFCMM-3 样品中检测到了靠下的条带,其对应于 HSV-tk 基因的被剪接形式。在经 TkMut2 转导的 PBL 中没有观察到靠下的条带。使用 TKZ1/TKZ2 引物得到了相同的结果 (图 12),其包括全长的 HSV-tk 基因,这样排除了引入的突变可能产生不同的剪接变体的可能性。

[0289] 所有的这些发现都表明:所引入的突变消除了或者至少非常显著地降低了在经转导的 CEM 以及在经转导的淋巴细胞中任何被剪接形式的 HSV-tk 基因。

[0290] 表 1 针对 SFCMM-3 上清液和经转导的 PBL 分析被剪接形式的 HSV-tk

[0291]

SFCMM-3 载 体上清 批号	% 被剪接 HSV-tk/未被剪接 HSV-tk + 被剪接 HSV-tk	
	RNA (上清)	DNA (被转导的 PBLs)
50.302-22	0.65	0.84
		1.25
50.302-23	0.65	1.50
50.302-24	0.98	1.58
50.302-26	0.72	1.00
		0.92
		2.02
02/047	1.10	3.86
03/087	2.60	4.00
平均	1.12	1.89
标准偏差	0.75	1.22
n	6	9
最低	0.65	0.84
最高	2.60	4.00

[0292] 上面说明书中所提到的所有出版物都通过引用并入本文。对于本领域技术人员而言,在不偏离本发明范围和精神的情况下,对本发明所述方法和系统进行的多种修饰和变化是显而易见的。尽管已经根据具体的优选实施方式对本发明进行了描述,但是应当理解,所要求权利的本发明不应当被不适当地限定为这些具体实施方式。事实上,对于生物化学、

生物技术或相关领域的技术人员来说显而易见的、对用于开展本发明的所述模式的多种修饰都被认为在后面权利要求的范围内。

[0293] 参考文献

- [0294] Moolten, *Cancer Res.* 46, p5276 (1986)
- [0295] Mullen, *Pharmac. Ther.* 63, p199 (1994)
- [0296] Marini 等人, *Gene Therapy* 2, p655 (1995)
- [0297] Kokoris 等人, *Gene Therapy* 6, p1415-1426 (1999)
- [0298] Fillat 等人, *Current. Gene Therapy* 3, p132003
- [0299] Tiberghien 等人, *Blood* 97, p63 (2001)
- [0300] Garin 等人, *Blood* 97, p122 (2001)
- [0301] Chalmers, *Molecular Therapy* 4p146 (2001)
- [0302] Rettig 等人, *Molecular Therapy* 8, p29 (2003)
- [0303] McKnight 等人, *Nuc. Acids Res* 8, p5949 (1980)
- [0304] Swain 和 Galloway, *J. Virol.* 46, p1045 (1983)
- [0305] Davidson 和 Scott, *J. Gen. Virol.* 67, p1759 (1986)
- [0306] Otsuka 和 Kit, *Virology* 135, p316-330, (1984)
- [0307] Nunberg 等人, *J. Virol.* 63 p3240 (1989)
- [0308] Robertson 和 Whalley, *Nuc. Acids Res.* 16 p11303 (1988)
- [0309] Mittal 和 Field, *J. Virol* 70 p2901 (1989)
- [0310] Martin 等人, *J. Virol.* 63 p2847 (1989)
- [0311] Scott 等人, *J. Gen. Virol.* 70 p3055 (1989)
- [0312] Honess 等人, *J. Gen. Virol.* 70 p3003 (1989)
- [0313] Baer 等人, *Nature (London)* 310 p207 (1984)
- [0314] McKnight 等人, *Nucl. Acids Res.* 8 p5949 (1980)
- [0315] Drinkwater 和 Klinedinst, *PNAS* 83 p3402 (1986)
- [0316] Liao 和 Wise *Gene* 88 p107 (1990)
- [0317] Horwitz 等人, *Genome* 3 p112 (1989)
- [0318] Lewis 等人, *EMBO. J* 11p3053 (1992)
- [0319] Lewis 和 Emerman *J. Virol.* 68 p510 (1994)
- [0320] Meyer, 等人, *J. Gen. Virol.* 72p1031 (1991)
- [0321] Smith 和 Moss *Gene*, 25p21 (1983)
- [0322] Upton, 等人, *J. Virology* 60p920 (1986)
- [0323] Gershon, 等人, *J. Gen. Virol.* 70p525 (1989)
- [0324] Weir, 等人, *J. Virol.* 46 p530 (1983)
- [0325] Esposito, 等人, *Virology* 135p561 (1984)
- [0326] Hruby, 等人, *PNAS*, 80p3411 (1983)
- [0327] Kilpatrick, 等人, *Virology* 143 p399 (1985)
- [0328] Binns, 等人, *J. Gen. Virol* 69 p1275 (1988)
- [0329] Boyle, 等人, *Virology* 156p355 (1987)

-
- [0330] Schnitzlein, 等人, J. Virological Method, 20 p341 (1988)
 - [0331] Lytvyn, 等人, J. Gen. Virol. 73 p3235 (1992)
 - [0332] Moss Science 252 p1662 (1991)
 - [0333] Verzeletti, Hum. Gene Therapy 9p2243 (1998)
 - [0334] Chalmers, Mol. Therapy 4p146 (2001)

[0001]

DOCS1-#5272151-v1-P019962WO_Sequence_Listing.TXT
SEQUENCE LISTING

<110> MOLMED SPA
 <120> Thymidine Kinase
 <130> P019962WO
 <140> PCT/IB2005/002358
 <141> 2005-06-17
 <150> GB 0413702.2
 <151> 2004-06-18
 <160> 36
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 1131
 <212> DNA
 <213> Herpes simplex virus type 1

<400> 1
 atggcttcgt acccctgcc tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc 60
 ggccatagca accgacgtac ggcgttgccg cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc 120
 cgcttgagc agaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacgggcc tcacgggatg 180
 gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctggggt cgcgcgacga tatcgtctac 240
 gtacccgagc cgatgactta ctggcagggt ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc 300
 tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcgggtgta 360
 atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ccttatgccg tgaccgacgc cgttctggct 420
 cctcatgtcg ggggggagc tgggagtca catgccccgc ccccgccct caccctcacc 480
 ttcgaccgcc atcccatcgc cgccctctg tgctaccggc ccgcgcgata ccttatgggc 540
 agcatgaccc cccaggccgt gctggcgttc gtggccctca tcccgccgac cttgcccggc 600
 acaaacatcg tgttgggggc ccttccggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc 660
 cagcggcccg gcgagcggct tgacctggct atgctggccg cgattcggcg cgtttacggg 720
 ctgcttgcca atacggtgcg gtatctgcag ggcggcgggt cgtggtggga ggattgggga 780
 cagctttcgg ggacggccgt gccgccccag ggtgccgagc cccagagcaa cgcgggcccc 840
 cgaccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg cccccgagtt gctggcccc 900
 aacggcgacc tgtataacgt gtttgctggt gccttgagc tcttgccaa acgcctccgt 960
 cccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcggccg ccggctgccc ggacgcctg 1020
 ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cacgtcacca cccaggtc cataccgacg 1080
 atctgcgacc tggcgcgcac gtttgccgg gagatggggg aggctaactg a 1131

<210> 2
 <211> 1131
 <212> DNA
 <213> Artificial

[0002]

DOCS1-#5272151-v1-P019962WO_Sequence_Listing.TXT

<220>

<223> HSV-1 thymidine kinase mutant sequence.

<400> 2

```

atggcttcgt acccctgcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc      60
ggccatagca accgacgtac ggcgttgcg cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc      120
cgcttgagc agaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg      180
gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac      240
gtacccgagc cgatgactta ctggcagggt ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc      300
tacaccacac aacaccgcct cgaccagggc gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggta      360
atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ctttatgccg tgaccgacgc cgttctggct      420
cctcatgtcg ggggggagc tgggagttca catgccccgc cccggccct caccctcatc      480
ttcgaccgcc atccatcgc cgccctcctg tgctaccggc ccgcgcgata ctttatgggc      540
agcatgacc cccaggccgt gctggcgttc gtggccctca tcccgccgac cttgccggc      600
acaaacatcg tgttgggggc cttccggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc      660
cagcgccccg gcgagcggct tgacctgct atgctggccg cgattcgccg cgtttacggg      720
ctgcttgcca atacggtgcg gtatctgag ggcggcgggt cgtggtggga ggattgggga      780
cagctttcgg ggacggccgt gccgccccag ggtgccgagc cccagagcaa cgcgggccca      840
cgaccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg cccccgagtt gctggcccc      900
aacggcgacc tgtataacgt gtttgccctg gccttgagc tcttgccaa acgcctccgt      960
cccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcgcccg ccggctgccg ggacgccctg     1020
ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cacgtacca cccaggctc cataccgacg     1080
atctgcgacc tggcgcgcac gtttgcccgg gagatggggg aggctaactg a             1131

```

<210> 3

<211> 1131

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> HSV-1 thymidine kinase mutant sequence.

<400> 3

```

atggcttcgt acccctgcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc      60
ggccatagca accgacgtac ggcgttgcg cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc      120
cgcttgagc agaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg      180
gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac      240
gtacccgagc cgatgactta ctggcagggt ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc      300
tacaccacac aacaccgcct cgaccagggc gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggta      360
atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ctttatgccg tgaccgacgc cgttctggct      420
cctcatgtcg ggggggagc tgggagttca catgccccgc cccggccct caccctcatc      480

```

[0003]

DOCS1-#5272151-v1-P019962WO_Sequence_Listing.TXT

```

ttcgaccgcc atcccatcgc cgccctcctg tgctacccgg ccgcgcgata cttatgggc 540
tccatgacct cccaggccgt gctggcgttc gtggccctca tcccgccgac cttgcccggc 600
acaaacatcg tgttgggggc ctttccggag gacagacaca tcgaccgctt ggccaaacgc 660
cagcgcctcg gcgagcggct tgacctggct atgctggccg cgattcgccg cgtttacggg 720
ctgcttgcca atacggtgcg gtatctgcag ggcggcgggt cgtggtggga ggattgggga 780
cagctttcgg ggacggccgt gccgccccag ggtgccgagc cccagagcaa cgcgggcca 840
cgaccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg cccccgagtt gctggcccc 900
aacggcgacc tgtataacgt gtttgcttgg gccttgagc tcttgccaa acgcctccgt 960
cccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcgcccg ccggctgccg ggacgcctg 1020
ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cacgtcacca cccaggctc cataccgacg 1080
atctgcgacc tggcgcgcac gtttggccgg gagatggggg aggctaactg a 1131

```

<210> 4
 <211> 1131
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> HSV-1 thymidine kinase mutant sequence.

```

<400> 4
atggcttcgt acccctgcc tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc 60
ggccatagca accgacgtac ggcgttgccg cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc 120
cgcttgagc agaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg 180
gggaaaacca ccaccagca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac 240
gtacccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cggaacatc 300
tacaccacac aacaccgctt cgaccagggc gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggtg 360
atgacaagcg cccagataac aatgggcatg cttatgccg tgaccgacgc cgttctggct 420
cctcatgtcg ggggggagc tgggagttca catgccccgc cccggccctt caccctcatc 480
ttcgaccgcc atcccatcgc cgccctcctg tgctacccgg ccgcgcgata cttatgggc 540
agcatgacct cccaagccgt gctggcgttc gtggccctca tcccgccgac cttgcccggc 600
acaaacatcg tgttgggggc ctttccggag gacagacaca tcgaccgctt ggccaaacgc 660
cagcgcctcg gcgagcggct tgacctggct atgctggccg cgattcgccg cgtttacggg 720
ctgcttgcca atacggtgcg gtatctgcag ggcggcgggt cgtggtggga ggattgggga 780
cagctttcgg ggacggccgt gccgccccag ggtgccgagc cccagagcaa cgcgggcca 840
cgaccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg cccccgagtt gctggcccc 900
aacggcgacc tgtataacgt gtttgcttgg gccttgagc tcttgccaa acgcctccgt 960
cccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcgcccg ccggctgccg ggacgcctg 1020
ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cacgtcacca cccaggctc cataccgacg 1080

```

[0004]

DOCS1-#5272151-v1-P019962WO_Sequence_Listing.TXT
 atctgcgacc tggcgcgcac gtttgcccgg gagatggggg aggctaactg a 1131

<210> 5
 <211> 1131
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> HSV-1 thymidine kinase mutant sequence.

<400> 5
 atggcttcgt acccctgcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc 60
 ggccatagca accgacgtac ggcgttgcbg cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc 120
 cgcctggagc agaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacgggcc tcacgggatg 180
 gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctggggt cgcgcgacga tatcgtctac 240
 gtacccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaaacatc 300
 tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggta 360
 atgacaagcg cccagataac aatgggcatg cttatgccg tgaccgacgc cgttctggct 420
 cctcatgcbg ggggggaggc tgggagttca catgccccgc ccccgccct caccctcatc 480
 ttcgaccgcc atcccatcgc cgccctcctg tgctaccggc ccgcbgata cttatgggc 540
 tccatgacct cccaagccgt gctggcgctt gtggccctca tcccggcac cttgcccggc 600
 acaaacatcg tgttgggggc cttccggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc 660
 cagcgcctcg gcbgagcbgt tgacctggct atgctggccg cbattcbccg cgtttacggg 720
 ctgcttgcca atacggtgcb gatctgcbg ggcgcbgggt cbtgggtggga ggattgggga 780
 cbgctttcbg ggacggccgt gccgccccag ggtgccgagc cccagagcaa cbgcbggccca 840
 cbgccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcbgg ccccbgagtt gctggcccc 900
 aacggcbgacc tgtataacgt gtttgcbtgg gccttgcbg tcttgccaa acgcbtcbgt 960
 cccatgcbg tctttatcct ggattacgac caatcbgccc cbggctgcbg ggacgcbtctg 1020
 ctgcaactta cctcbgggat ggtccagacc cbgtcacca ccccbggtc catacbgcbg 1080
 atctgcbgacc tggcbgcbg gtttgcccgg gagatggggg aggctaactg a 1131

<210> 6
 <211> 1131
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> HSV-1 thymidine kinase mutant sequence.

<400> 6
 atggcttcgt acccctgcca tcaacacgcbg tctgcbtctg accaggctgc gcgttctcgc 60
 ggccatagca accgacgtac ggcgttgcbg cctcbgcbggc agcaagaagc cacggaagtc 120
 cgcctggagc agaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacgggcc tcacgggatg 180
 gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctggggt cbgcbgacga tatcgtctac 240

[0005]

DOCS1-#5272151-v1-P019962WO_Sequence_Listing.TXT

gtacccgagc	cgatgactta	ctggcaggtg	ctgggggctt	ccgagacaat	cgcgaacatc	300
tacaccacac	aacaccgcct	cgaccagggc	gagatatcgg	ccggggacgc	ggcgggtgta	360
atgacaagcg	cccagataac	aatgggcatg	ccttatgccg	tgaccgacgc	cgttctggct	420
cctcatgtcg	ggggggaggc	tgggagttca	catgccccgc	ccccggccct	caccctcatc	480
ttcgaccgcc	atcccatcgc	cgccctcctg	tgctaccggg	ccgcgcgata	ccttatgggc	540
agcatgacct	cccaagccgt	gctggcgttc	gtggccctca	tcccgccgac	cttgcccggc	600
acaacatcg	tgttgggggc	ccttccggag	gacagacaca	tcgaccgcct	ggccaaacgc	660
cagcgcctcg	gcgagcggct	tgacctggct	atgctggccg	cgattcgccg	cgtttacggg	720
ctgcttgcca	atacgggtgc	gtatctgcag	ggcggcgggt	cgtggtggga	ggattgggga	780
cagctttcgg	ggacggccgt	gccgccccag	ggtgccgagc	cccagagcaa	cgcgggccca	840
cgaccccata	tcggggacac	gttatttacc	ctgtttcggg	ccccgagtt	gctggccccc	900
aacggcgacc	tgtataacgt	gtttgcctgg	gccttggacg	tcttggccaa	acgcctccgt	960
cccattgcacg	tctttatcct	ggattacgac	caatcgcccc	ccggctgccg	ggacgcctcg	1020
ctgcaactta	cctccgggat	ggtccagacc	cacgtcacca	ccccaggctc	cataccgacg	1080
atctgcgacc	tggcgcgcac	gtttgcccgg	gagatggggg	aggctaactg	a	1131

<210> 7
 <211> 1131
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> HSV-1 thymidine kinase mutant sequence.

<400> 7						
atggcttcgt	acccttgcca	tcaacacgcg	tctgcgttcg	accaggctgc	gcgttctcgc	60
ggccatagca	accgacgtac	ggcgttgccg	cctcgccggc	agcaagaagc	cacggaagtc	120
cgcttgagc	agaaaatgcc	cacgctactg	cggttttata	tagacgggtc	tcacgggatg	180
gggaaaacca	ccaccacgca	actgctggtg	gccctggggt	cgcgcgacga	tatcgtctac	240
gtacccgagc	cgatgactta	ctggcaggtg	ctgggggctt	ccgagacaat	cgcgaacatc	300
tacaccacac	aacaccgcct	cgaccagggc	gagatatcgg	ccggggacgc	ggcgggtgta	360
atgacaagcg	cccagataac	aatgggcatg	ccttatgccg	tgaccgacgc	cgttctggct	420
cctcatgtcg	ggggggaggc	tgggagttca	catgccccgc	ccccggccct	caccctcatc	480
ttcgaccgcc	atcccatcgc	cgccctcctg	tgctaccggg	ccgcgcgata	ccttatgggc	540
tccatgacct	cccaagccgt	gctggcgttc	gtggccctca	tcccgccgac	cttgcccggc	600
acaacatcg	tgttgggggc	ccttccggag	gacagacaca	tcgaccgcct	ggccaaacgc	660
cagcgcctcg	gcgagcggct	tgacctggct	atgctggccg	cgattcgccg	cgtttacggg	720
ctgcttgcca	atacgggtgc	gtatctgcag	ggcggcgggt	cgtggtggga	ggattgggga	780
cagctttcgg	ggacggccgt	gccgccccag	ggtgccgagc	cccagagcaa	cgcgggccca	840

[0006]

DOCS1-#5272151-v1-P019962WO_Sequence_Listing.TXT
 cgaccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg cccccgagtt gctggccccc 900
 aacggcgacc tgtataacgt gtttgctgg gccttgagc tcttgccaa acgcctccgt 960
 cccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcggccg ccggctgccg ggacgccctg 1020
 ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cacgtcacca ccccaggctc cataccgacg 1080
 atctgcgacc tggcgcgcac gtttgcccgg gagatggggg aggctaactg a 1131

<210> 8
 <211> 300
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> HSV-tk gene sequences in vector SFCMM-3.

<400> 8
 ccgcctcgac cagggtgaga tatcggccgg ggacgcggcg gtggtaatga caagcgccea 60
 gataacaatg ggcatgcctt atgccgtgac cgacgccggt ctggctcctc atgtcggggg 120
 ggaggctggg agttcacatg ccccccccc ggccctcacc ctcatcttcg accgccatcc 180
 catcgcgcc ctcctgtgct acccggccgc gcgatacctt atgggcagca tgacccccca 240
 ggccgtgctg gcgttcgtgg ccctcatccc gccgacctg cccggcacia acatcgtgtt 300

<210> 9
 <211> 300
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> HSV-tk sequences in vector TK3.

<400> 9
 ccgcctcgac caaggtgaga tatcggccgg ggacgcggcg gtggtaatga caagcgccea 60
 gataacaatg ggcatgcctt atgccgtgac cgacgccggt ctggctcctc atgtcggggg 120
 ggaggctggg agttcacatg ccccccccc ggccctcacc ctcatcttcg accgccatcc 180
 catcgcgcc ctcctgtgct acccggccgc gcgatacctt atgggcagca tgacccccca 240
 agccgtgctg gcgttcgtgg ccctcatccc gccgacctg cccggcacia acatcgtgtt 300

<210> 10
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Mutations introduced in the SFCMM-3 vector.

<400> 10
 ctcgaccagg gtgag 15

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

[0007]

DOCS1-#5272151-v1-P019962WO_Sequence_Listing.TXT

<220>

<223> Mutations introduced in the SFCMM-3 vector.

<400> 11

Leu Asp Gln Gly Glu
1 5

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Mutations introduced in the SFCMM-3 vector.

<400> 12

atgggcagca tgacccccca ggcc 24

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Mutations introduced in the SFCMM-3 vector.

<400> 13

Met Gly Ser Met Thr Pro Gln Ala
1 5

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotide primer.

<400> 14

cggcgggtgt aatgacaag 19

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotide primer.

<400> 15

gcgtcgggtca cggcata 17

<210> 16

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotide probe.

<400> 16

[0008]

DOCS1-#5272151-v1-P019962WO_Sequence_Listing.TXT		
ccagataaca atgggc		16
<210> 17		
<211> 16		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> oligonucleotide primer.		
<400> 17		
ggatgagggc cacgaa		16
<210> 18		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer.		
<400> 18		
cgaacatcta caccacacaa ca		22
<210> 19		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> oligonucleotide probe.		
<400> 19		
ccagcacggc cctggtcg		18
<210> 20		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> oligonucleotide primer.		
<400> 20		
ttctctaggc gccggaattc gtt		23
<210> 21		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> oligonucleotide primer.		
<400> 21		
atccaggata aagacgtgca tgg		23
<210> 22		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial		

[0009]

DOCS1-#5272151-v1-P019962WO_Sequence_Listing.TXT

```

<220>
<223> oligonucleotide primer.

<400> 22
cgtacccgag cgatgactt                20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide primer.

<400> 23
tgtgtctgtc ctccggaagg                20

<210> 24
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide primer.

<400> 24
ccatagcaac cgacgtacg                19

<210> 25
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide primer.

<400> 25
gaatcgcggc cagcatagc                19

<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide primer.

<400> 26
ttatatagac ggtcctcacg gg            22

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide primer.

<400> 27
ccagcatagc caggtcaagc                20

<210> 28

```

[0010]

DOCS1-#5272151-v1-P019962WO_Sequence_Listing.TXT

<211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer.
 <400> 28
 gccacccatgg cttcgtac 18

<210> 29
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer.
 <400> 29
 cgagttaatt ctcagttagc ctcc 24

<210> 30
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer.
 <400> 30
 cctcgaccag ggcgagatat cggccg 26

<210> 31
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer.
 <400> 31
 cctcgaccag ggcgagatat cggccg 26

<210> 32
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer.
 <400> 32
 atgacccccc aagccgtgct ggcg 24

<210> 33
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer.
 <400> 33

[0011]

DOCS1-#5272151-v1-P019962WO_Sequence_Listing.TXT

taccttatgg gctccatgac cccccaagcc gtgc 34

<210> 34
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleotide primer.

<400> 34
 atgaccccc aagccgtgct ggcg 24

<210> 35
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleotide primer.

<400> 35
 cctcgaccag ggcgagatat cggccg 26

<210> 36
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleotide primer.

<400> 36
 taccttatgg gctccatgac cccccaagcc gtgc 34

Tk wt : 1 atggcttcgtaccctgccatcaacacgcgtctgcgttcgaccaggctgcgcggttctcgc 60
TkMut2 : atggcttcgtaccctgccatcaacacgcgtctgcgttcgaccaggctgcgcggttctcgc
TkMut23 : atggcttcgtaccctgccatcaacacgcgtctgcgttcgaccaggctgcgcggttctcgc
TkMut24 : atggcttcgtaccctgccatcaacacgcgtctgcgttcgaccaggctgcgcggttctcgc
TkMut34 : atggcttcgtaccctgccatcaacacgcgtctgcgttcgaccaggctgcgcggttctcgc
TkMut4 : atggcttcgtaccctgccatcaacacgcgtctgcgttcgaccaggctgcgcggttctcgc
TkMut234: atggcttcgtaccctgccatcaacacgcgtctgcgttcgaccaggctgcgcggttctcgc

Tk wt : 61 ggccatagcaaccgacgtaeggcgttgcgccctcgcggcagcaagaagccacggaagtc 120
TkMut2 : ggccatagcaaccgacgtaeggcgttgcgccctcgcggcagcaagaagccacggaagtc
TkMut23 : ggccatagcaaccgacgtaeggcgttgcgccctcgcggcagcaagaagccacggaagtc
TkMut24 : ggccatagcaaccgacgtaeggcgttgcgccctcgcggcagcaagaagccacggaagtc
TkMut34 : ggccatagcaaccgacgtaeggcgttgcgccctcgcggcagcaagaagccacggaagtc
TkMut4 : ggccatagcaaccgacgtaeggcgttgcgccctcgcggcagcaagaagccacggaagtc
TkMut234: ggccatagcaaccgacgtaeggcgttgcgccctcgcggcagcaagaagccacggaagtc

Tk wt : 121 cgcctggagcagaaaaatgccacgctactgcggtttatatagacggtcctcacgggatg 180
TkMut2 : cgcctggagcagaaaaatgccacgctactgcggtttatatagacggtcctcacgggatg
TkMut23 : cgcctggagcagaaaaatgccacgctactgcggtttatatagacggtcctcacgggatg
TkMut24 : cgcctggagcagaaaaatgccacgctactgcggtttatatagacggtcctcacgggatg
TkMut34 : cgcctggagcagaaaaatgccacgctactgcggtttatatagacggtcctcacgggatg
TkMut4 : cgcctggagcagaaaaatgccacgctactgcggtttatatagacggtcctcacgggatg
TkMut234: cgcctggagcagaaaaatgccacgctactgcggtttatatagacggtcctcacgggatg

Tk wt : 181 gggaaaaaccaccaccagcaactgctggtggccctgggttcgcgcgacgatatcgtctac 240
TkMut2 : gggaaaaaccaccaccagcaactgctggtggccctgggttcgcgcgacgatatcgtctac
TkMut23 : gggaaaaaccaccaccagcaactgctggtggccctgggttcgcgcgacgatatcgtctac
TkMut24 : gggaaaaaccaccaccagcaactgctggtggccctgggttcgcgcgacgatatcgtctac
TkMut34 : gggaaaaaccaccaccagcaactgctggtggccctgggttcgcgcgacgatatcgtctac
TkMut4 : gggaaaaaccaccaccagcaactgctggtggccctgggttcgcgcgacgatatcgtctac
TkMut234: gggaaaaaccaccaccagcaactgctggtggccctgggttcgcgcgacgatatcgtctac

Tk wt : 241 gtacccgagccgatgacttactggcaggtgctggggcttcgagacaatcgcgaacatc 300
TkMut2 : gtacccgagccgatgacttactggcaggtgctggggcttcgagacaatcgcgaacatc
TkMut23 : gtacccgagccgatgacttactggcaggtgctggggcttcgagacaatcgcgaacatc
TkMut24 : gtacccgagccgatgacttactggcaggtgctggggcttcgagacaatcgcgaacatc
TkMut34 : gtacccgagccgatgacttactggcaggtgctggggcttcgagacaatcgcgaacatc
TkMut4 : gtacccgagccgatgacttactggcaggtgctggggcttcgagacaatcgcgaacatc
TkMut234: gtacccgagccgatgacttactggcaggtgctggggcttcgagacaatcgcgaacatc

2

Tk wt : 301 tacaccaacaacaccgcctcgaccagggtagatatcggccggggacgcggcggtggtgta 360
TkMut2 : tacaccaacaacaccgcctcgaccagggtagatatcggccggggacgcggcggtggtgta
TkMut23 : tacaccaacaacaccgcctcgaccagggtagatatcggccggggacgcggcggtggtgta
TkMut24 : tacaccaacaacaccgcctcgaccagggtagatatcggccggggacgcggcggtggtgta
TkMut34 : tacaccaacaacaccgcctcgaccagggtagatatcggccggggacgcggcggtggtgta
TkMut4 : tacaccaacaacaccgcctcgaccagggtagatatcggccggggacgcggcggtggtgta
TkMut234: tacaccaacaacaccgcctcgaccagggtagatatcggccggggacgcggcggtggtgta

Tk wt : 361 atgacaagcgcgccagataaacaatgggcatgccttatgccgtgaccgacgcggttctggct 420
TkMut2 : atgacaagcgcgccagataaacaatgggcatgccttatgccgtgaccgacgcggttctggct
TkMut23 : atgacaagcgcgccagataaacaatgggcatgccttatgccgtgaccgacgcggttctggct
TkMut24 : atgacaagcgcgccagataaacaatgggcatgccttatgccgtgaccgacgcggttctggct
TkMut34 : atgacaagcgcgccagataaacaatgggcatgccttatgccgtgaccgacgcggttctggct
TkMut4 : atgacaagcgcgccagataaacaatgggcatgccttatgccgtgaccgacgcggttctggct
TkMut234: atgacaagcgcgccagataaacaatgggcatgccttatgccgtgaccgacgcggttctggct

Tk wt : 421 cctcatgtcggggggaggctgggagttcacatgccccgccccggccctcaccctcacc 480
TkMut2 : cctcatgtcggggggaggctgggagttcacatgccccgccccggccctcaccctcacc
TkMut23 : cctcatgtcggggggaggctgggagttcacatgccccgccccggccctcaccctcacc
TkMut24 : cctcatgtcggggggaggctgggagttcacatgccccgccccggccctcaccctcacc
TkMut34 : cctcatgtcggggggaggctgggagttcacatgccccgccccggccctcaccctcacc
TkMut4 : cctcatgtcggggggaggctgggagttcacatgccccgccccggccctcaccctcacc
TkMut234: cctcatgtcggggggaggctgggagttcacatgccccgccccggccctcaccctcacc

Tk wt : 481 ttcgaccgccatcccacgcccctcctgtgctaccggccgcgcgataccttatgggc 540
 TkMut2 : ttcgaccgccatcccacgcccctcctgtgctaccggccgcgcgataccttatgggc
 TkMut23 : ttcgaccgccatcccacgcccctcctgtgctaccggccgcgcgataccttatgggc
 TkMut24 : ttcgaccgccatcccacgcccctcctgtgctaccggccgcgcgataccttatgggc
 TkMut34 : ttcgaccgccatcccacgcccctcctgtgctaccggccgcgcgataccttatgggc
 TkMut4 : ttcgaccgccatcccacgcccctcctgtgctaccggccgcgcgataccttatgggc
 TkMut234: ttcgaccgccatcccacgcccctcctgtgctaccggccgcgcgataccttatgggc
 3 4

Tk wt : 541 agcatgacccccagggcgtgctggcgctcgtggccctcatccgcccagccttgcccggc 600
 TkMut2 : agcatgacccccagggcgtgctggcgctcgtggccctcatccgcccagccttgcccggc
 TkMut23 : tccatgacccccagggcgtgctggcgctcgtggccctcatccgcccagccttgcccggc
 TkMut24 : agcatgacccccagggcgtgctggcgctcgtggccctcatccgcccagccttgcccggc
 TkMut34 : tccatgacccccagggcgtgctggcgctcgtggccctcatccgcccagccttgcccggc
 TkMut4 : agcatgacccccagggcgtgctggcgctcgtggccctcatccgcccagccttgcccggc
 TkMut234: tccatgacccccagggcgtgctggcgctcgtggccctcatccgcccagccttgcccggc

Tk wt : 601 acaaacatcgtgttgggggcccttcggaggacagacacatcgaccgcctggccaaacgc 660
 TkMut2 : acaaacatcgtgttgggggcccttcggaggacagacacatcgaccgcctggccaaacgc
 TkMut23 : acaaacatcgtgttgggggcccttcggaggacagacacatcgaccgcctggccaaacgc
 TkMut24 : acaaacatcgtgttgggggcccttcggaggacagacacatcgaccgcctggccaaacgc
 TkMut34 : acaaacatcgtgttgggggcccttcggaggacagacacatcgaccgcctggccaaacgc
 TkMut4 : acaaacatcgtgttgggggcccttcggaggacagacacatcgaccgcctggccaaacgc
 TkMut234: acaaacatcgtgttgggggcccttcggaggacagacacatcgaccgcctggccaaacgc

Tk wt : 661 cagcgcgccggcgagcggcttgacctggctatgctggccgcgattcgccgcgtttacggg 720
 TkMut2 : cagcgcgccggcgagcggcttgacctggctatgctggccgcgattcgccgcgtttacggg
 TkMut23 : cagcgcgccggcgagcggcttgacctggctatgctggccgcgattcgccgcgtttacggg
 TkMut24 : cagcgcgccggcgagcggcttgacctggctatgctggccgcgattcgccgcgtttacggg
 TkMut34 : cagcgcgccggcgagcggcttgacctggctatgctggccgcgattcgccgcgtttacggg
 TkMut4 : cagcgcgccggcgagcggcttgacctggctatgctggccgcgattcgccgcgtttacggg
 TkMut234: cagcgcgccggcgagcggcttgacctggctatgctggccgcgattcgccgcgtttacggg

Tk wt : 721 ctgcttgccaatacgggtgcggtatctgcagggcggcgggtcgtggtgggaggattgggga 780
 TkMut2 : ctgcttgccaatacgggtgcggtatctgcagggcggcgggtcgtggtgggaggattgggga
 TkMut23 : ctgcttgccaatacgggtgcggtatctgcagggcggcgggtcgtggtgggaggattgggga
 TkMut24 : ctgcttgccaatacgggtgcggtatctgcagggcggcgggtcgtggtgggaggattgggga
 TkMut34 : ctgcttgccaatacgggtgcggtatctgcagggcggcgggtcgtggtgggaggattgggga
 TkMut4 : ctgcttgccaatacgggtgcggtatctgcagggcggcgggtcgtggtgggaggattgggga
 TkMut234: ctgcttgccaatacgggtgcggtatctgcagggcggcgggtcgtggtgggaggattgggga

Tk wt : 781 cagctttcggggacggccgtgccgccccagggtgccgagccccagagcaacgcgggcccc 840
 TkMut2 : cagctttcggggacggccgtgccgccccagggtgccgagccccagagcaacgcgggcccc
 TkMut23 : cagctttcggggacggccgtgccgccccagggtgccgagccccagagcaacgcgggcccc
 TkMut24 : cagctttcggggacggccgtgccgccccagggtgccgagccccagagcaacgcgggcccc
 TkMut34 : cagctttcggggacggccgtgccgccccagggtgccgagccccagagcaacgcgggcccc
 TkMut4 : cagctttcggggacggccgtgccgccccagggtgccgagccccagagcaacgcgggcccc
 TkMut234: cagctttcggggacggccgtgccgccccagggtgccgagccccagagcaacgcgggcccc

Tk wt : 841 cgaccccatatcggggacacgttatttaccctgtttcgggcccccgagttgctggccccc 900
 TkMut2 : cgaccccatatcggggacacgttatttaccctgtttcgggcccccgagttgctggccccc
 TkMut23 : cgaccccatatcggggacacgttatttaccctgtttcgggcccccgagttgctggccccc
 TkMut24 : cgaccccatatcggggacacgttatttaccctgtttcgggcccccgagttgctggccccc
 TkMut34 : cgaccccatatcggggacacgttatttaccctgtttcgggcccccgagttgctggccccc
 TkMut4 : cgaccccatatcggggacacgttatttaccctgtttcgggcccccgagttgctggccccc
 TkMut234: cgaccccatatcggggacacgttatttaccctgtttcgggcccccgagttgctggccccc

Tk wt : 901 aacggcgacctgtataacgtgtttgcctgggccttggacgtcttgccaaaacgcctccgt 960
 TkMut2 : aacggcgacctgtataacgtgtttgcctgggccttggacgtcttgccaaaacgcctccgt
 TkMut23 : aacggcgacctgtataacgtgtttgcctgggccttggacgtcttgccaaaacgcctccgt
 TkMut24 : aacggcgacctgtataacgtgtttgcctgggccttggacgtcttgccaaaacgcctccgt
 TkMut34 : aacggcgacctgtataacgtgtttgcctgggccttggacgtcttgccaaaacgcctccgt
 TkMut4 : aacggcgacctgtataacgtgtttgcctgggccttggacgtcttgccaaaacgcctccgt
 TkMut234: aacggcgacctgtataacgtgtttgcctgggccttggacgtcttgccaaaacgcctccgt

```
Tk wt : 961 cccatgcacgtctttatcctggattacgaccaatcgcccgccggctgccgggacgcctg 1020
TkMut2 : cccatgcacgtctttatcctggattacgaccaatcgcccgccggctgccgggacgcctg
TkMut23 : cccatgcacgtctttatcctggattacgaccaatcgcccgccggctgccgggacgcctg
TkMut24 : cccatgcacgtctttatcctggattacgaccaatcgcccgccggctgccgggacgcctg
TkMut34 : cccatgcacgtctttatcctggattacgaccaatcgcccgccggctgccgggacgcctg
TkMut4 : cccatgcacgtctttatcctggattacgaccaatcgcccgccggctgccgggacgcctg
TkMut234: cccatgcacgtctttatcctggattacgaccaatcgcccgccggctgccgggacgcctg

Tk wt : 1021 ctgcaacttacctccgggatggtccagaccacgtcaccaccccaggctccataccgacg 1080
TkMut2 : ctgcaacttacctccgggatggtccagaccacgtcaccaccccaggctccataccgacg
TkMut23 : ctgcaacttacctccgggatggtccagaccacgtcaccaccccaggctccataccgacg
TkMut24 : ctgcaacttacctccgggatggtccagaccacgtcaccaccccaggctccataccgacg
TkMut34 : ctgcaacttacctccgggatggtccagaccacgtcaccaccccaggctccataccgacg
TkMut4 : ctgcaacttacctccgggatggtccagaccacgtcaccaccccaggctccataccgacg
TkMut234: ctgcaacttacctccgggatggtccagaccacgtcaccaccccaggctccataccgacg

Tk wt : 1081 atctgcgacctggcgcgcacgtttgcccgaggatggggaggctaactga 1131
TkMut2 : atctgcgacctggcgcgcacgtttgcccgaggatggggaggctaactga
TkMut23 : atctgcgacctggcgcgcacgtttgcccgaggatggggaggctaactga
TkMut24 : atctgcgacctggcgcgcacgtttgcccgaggatggggaggctaactga
TkMut34 : atctgcgacctggcgcgcacgtttgcccgaggatggggaggctaactga
TkMut4 : atctgcgacctggcgcgcacgtttgcccgaggatggggaggctaactga
TkMut234: atctgcgacctggcgcgcacgtttgcccgaggatggggaggctaactga
```

图 1

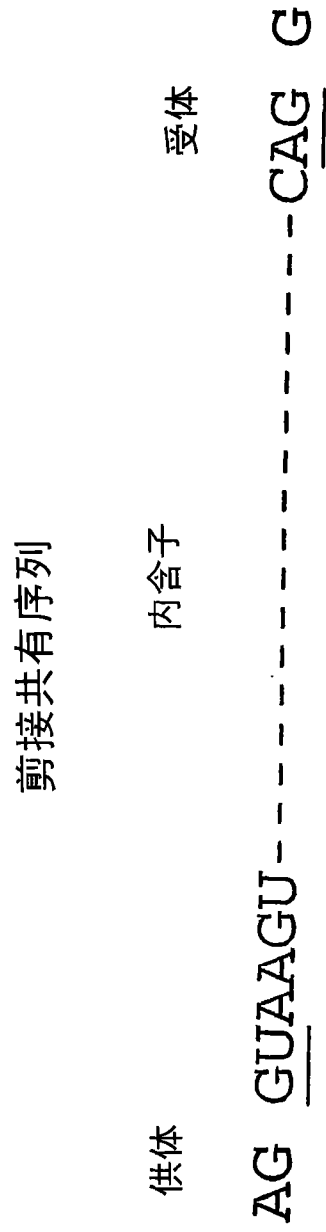


图 2

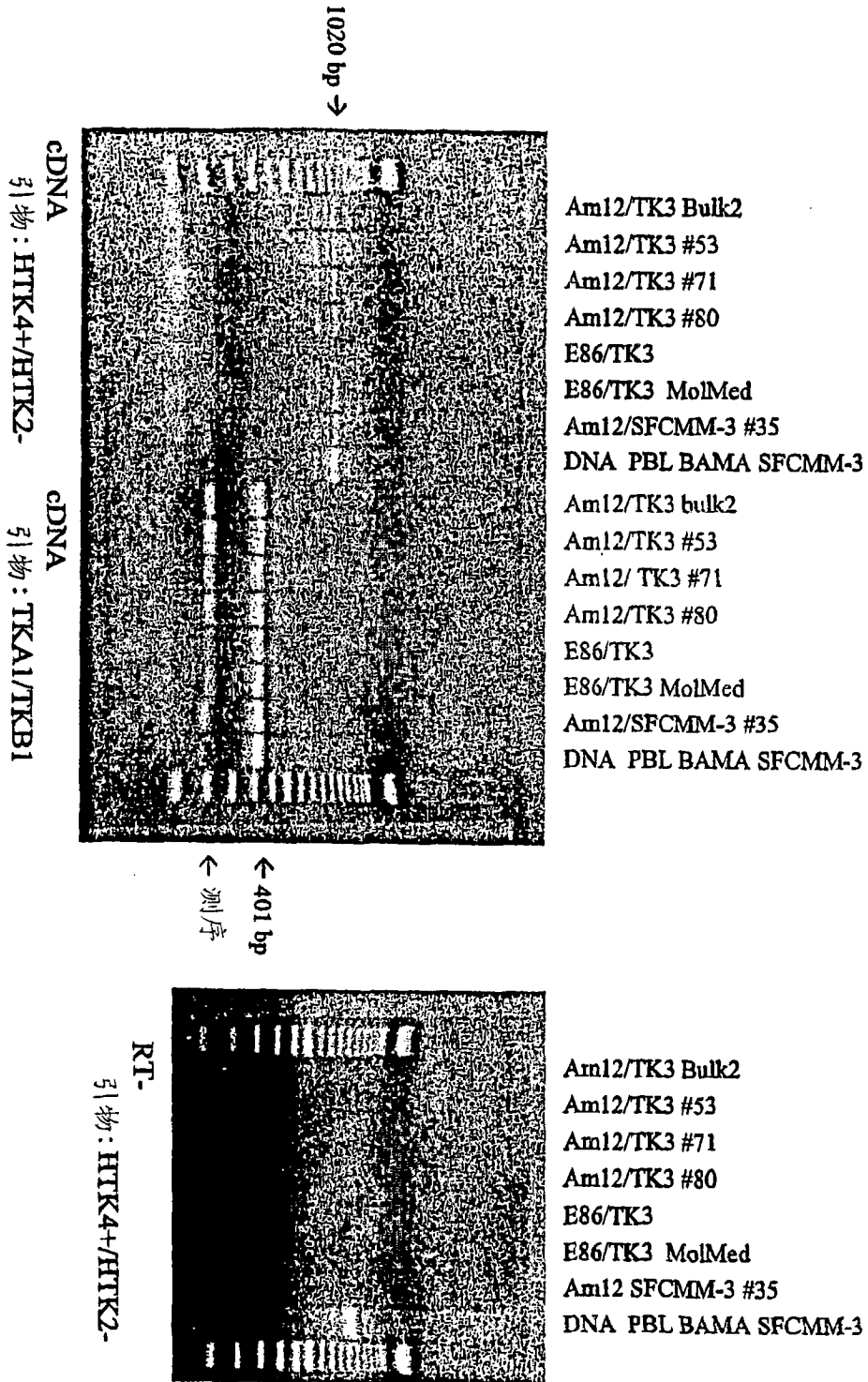


图 3

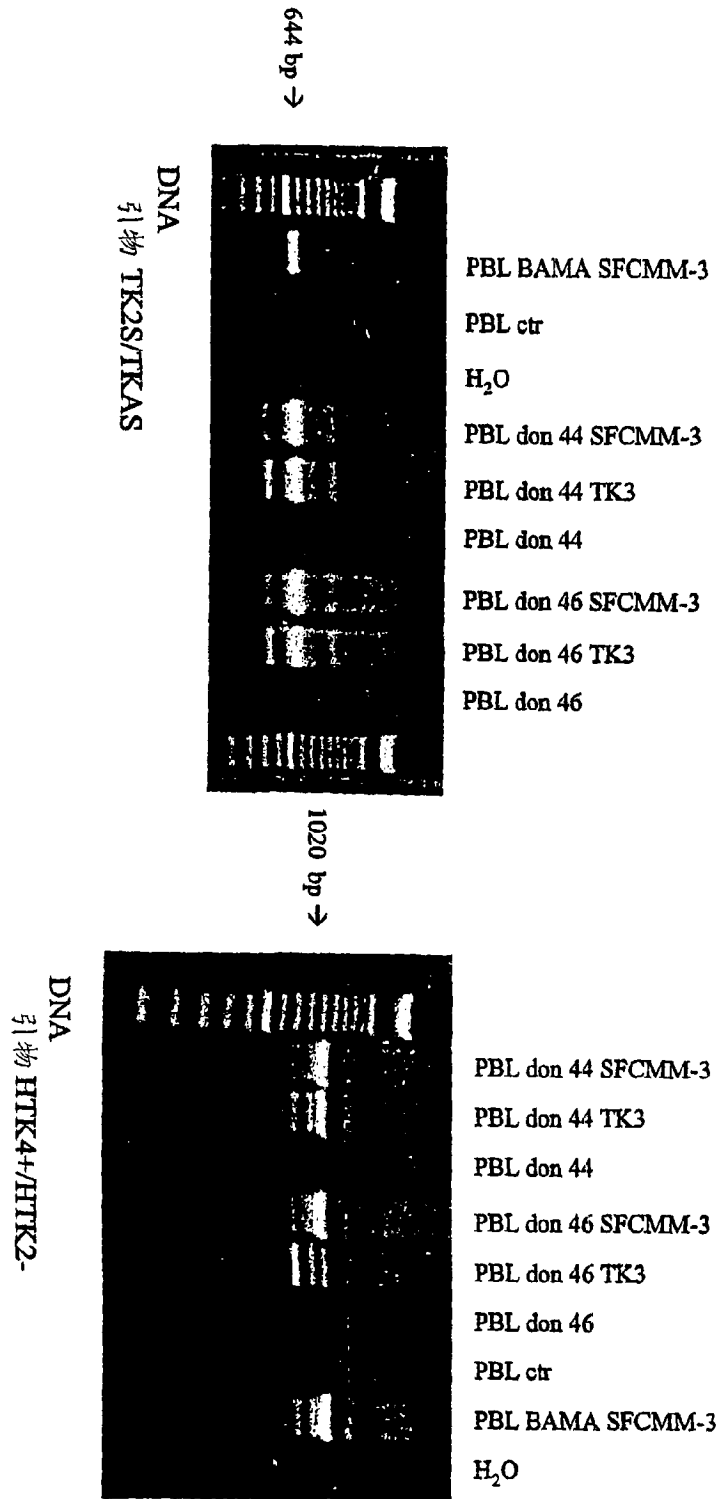


图 4

SFCMM-3

供体位点

Sbjct: 1981 ccgcctcgaccaggtgagatatcggccgggacgcggcgggtgtaatgacaagcgccca 2040

Sbjct: 2041 gataacaatgggcatgccttatgccgtgaccgacgcgttcttgctcctcatgtcggggg 2100

Sbjct: 2101 ggaggctgggagttcacatgccccgccccggccctcacocctcatcttcgaccgccatcc 2160

Sbjct: 2161 catcgcccccctcctgtgctacccggccgcgagataccttatgggcagcatgacccccca 2220
受体位点

Sbjct: 2221 ggcggtgctggcgcttcgctggccctcatcccgccgaccttgccccggcacaacacatcgtgtt 2280

TK3

(供体位点 SFCMM-3/TK3)

Sbjct: 1981 ccgcctcgaccaggtgagatatcggccgggacgcggcgggtggtaaatgacaagcgccca 2040

Sbjct: 2041 gataacaatgggcatgccttatgccgtgaccgacgcgttcttgctcctcatgtcggggg 2100

Sbjct: 2101 ggaggctgggagttcacatgccccgccccggccctcacocctcatcttcgaccgccatcc 2160
受体位点 TK3

Sbjct: 2161 catcgcccccctcctgtgctacccggccgcgagataccttatgggcagcatgacccccca 2220
(受体位点 SFCMM-3)

Sbjct: 2221 ggcggtgctggcgcttcgctggccctcatcccgccgaccttgccccggcacaacacatcgtgtt 2280

图 5

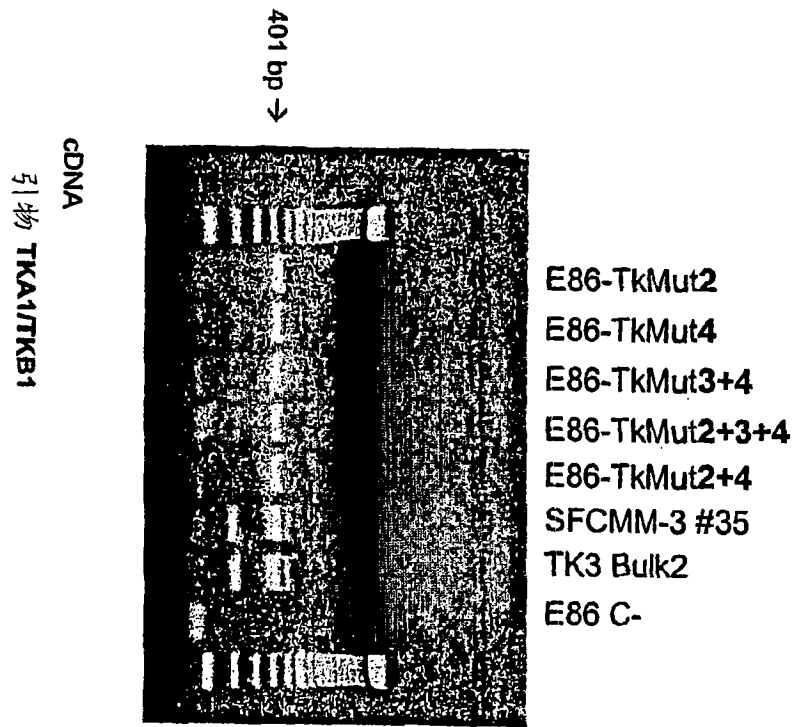


图 7

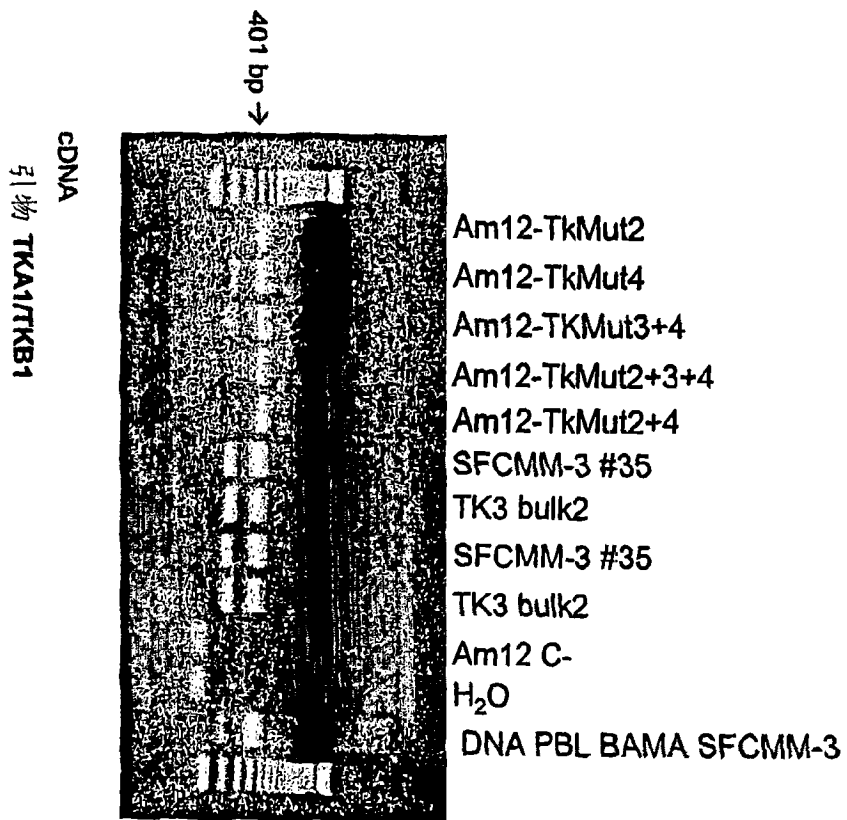
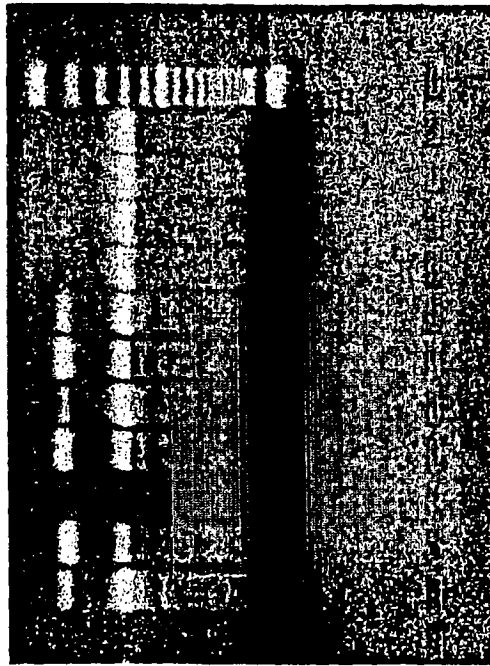


图 8

引物: TKAI7KB1

401 bp
→



CEM-TkMut2 pre sel
CEM-TkMut2 post sel
CEM-TkMut234 pre sel
CEM-TkMut234 post sel
CEM-SFCMM-3 pre sel
CEM-SFCMM-3 post sel
CEM-SFCMM-3 #35 pre sel
CEM-SFCMM-3 #35 post sel
CEM-NT
CEM-TK3 Bulk 2 post sel
DNA PBL BAMA SFCMM-3
H₂O

图 9

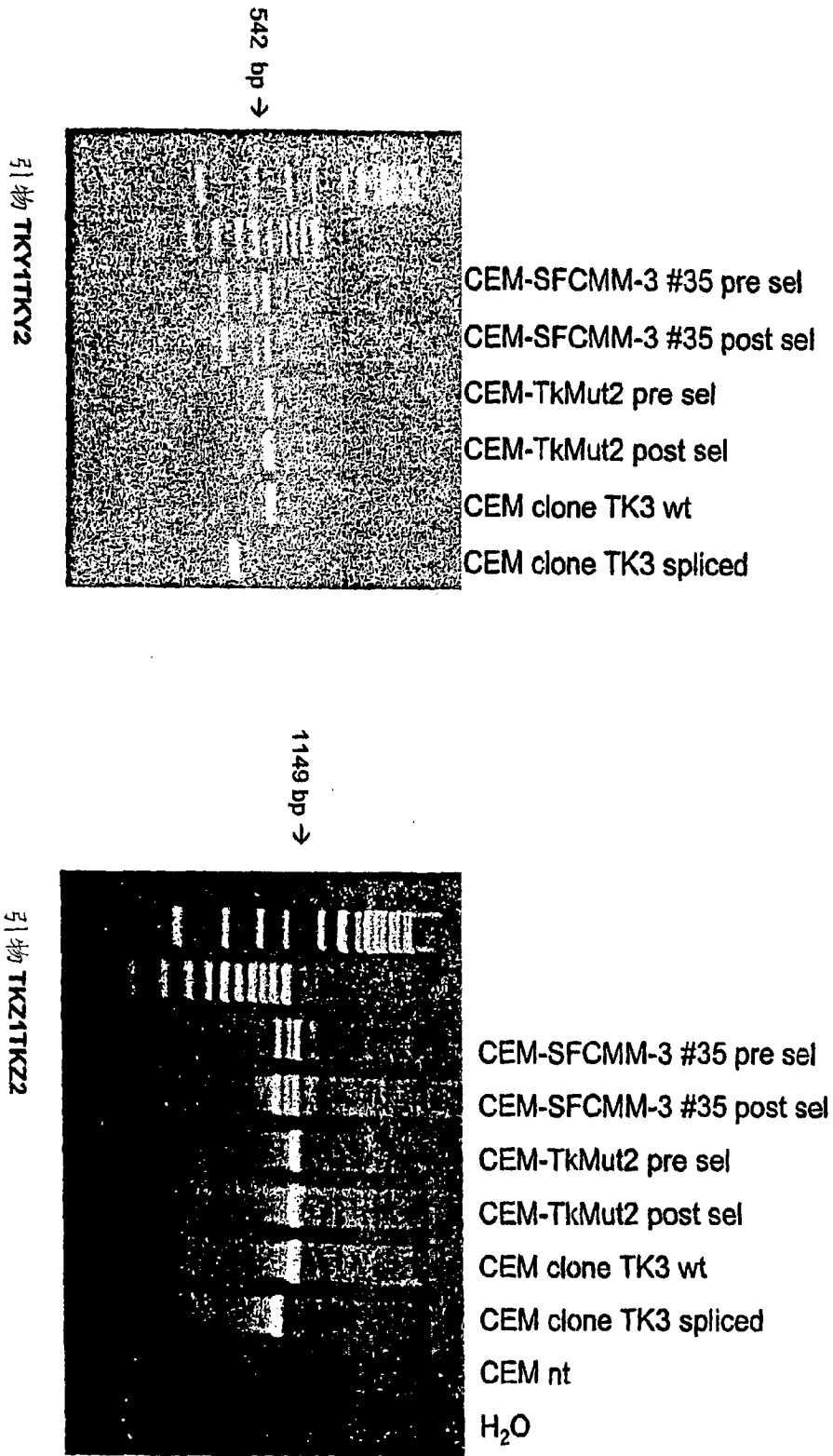


图 10

引物 TKATKB1



图 11

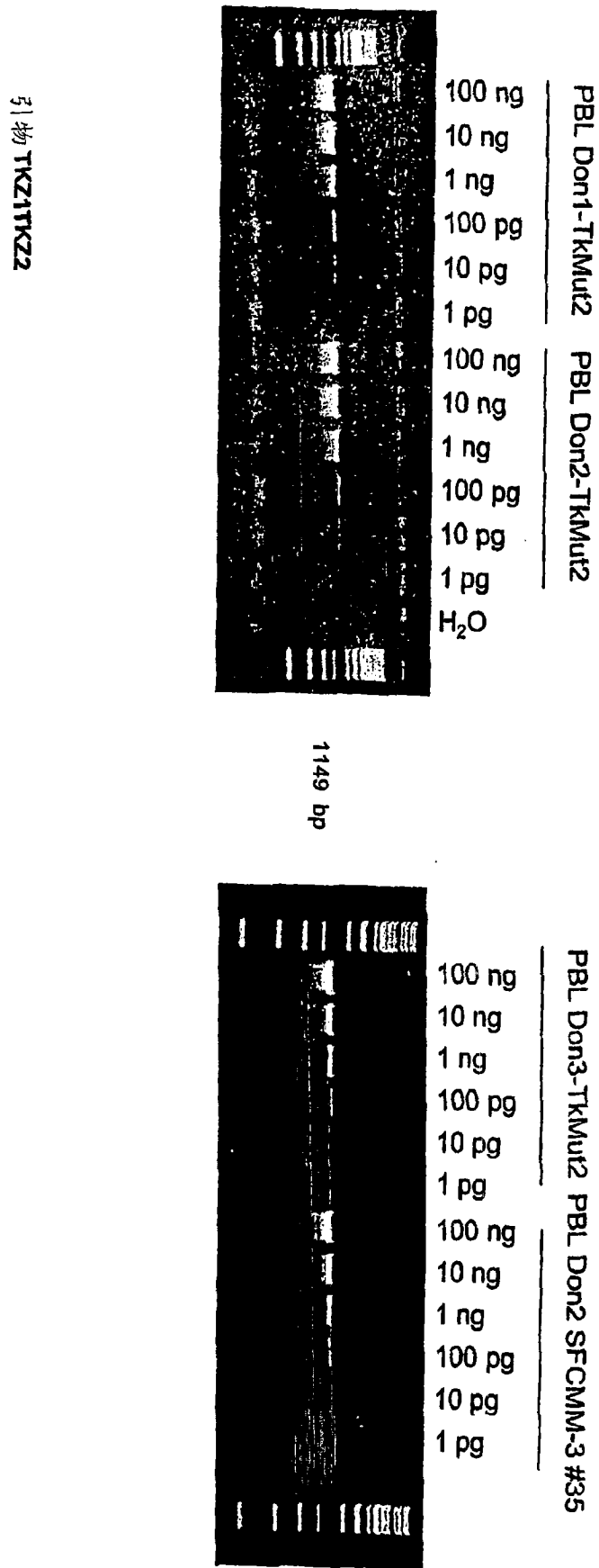


图 12