

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/54
C12N 15/86 C12N 9/12
A61K 48/00

[21] 申请号 95193717.0

[43]公开日 1997 年 6 月 4 日

[11] 公开号 CN 1151186A

[22]申请日 95.5.2

[30]优先权

[32]94.5.2 [33]US[31]08 / 237,592

[86]国际申请 PCT / US95 / 05561 95.5.2

[87]国际公布 WO95 / 30007 英 95.11.9

[85]进入国家阶段日期 96.12.20

[71]申请人 华盛顿大学

地址 美国华盛顿

[72]发明人 L · A · 罗布

M · E · 布莱克

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所
代理人 李 瑛

权利要求书 6 页 说明书 84 页 附图页数 18 页

[54]发明名称 胸苷激酶突变体

[57]摘要

本发明提供了编码 Herpesviridae 胸苷激酶的分
离的核酸分子, 该分子包含一个或多个突变, 其中
至少一个所说突变编码一个 DRH 核苷结合位点上游
的氨基酸取代, 这种取代增加所说胸苷激酶的生物
学活性 (与未突变的胸苷激酶比较)。在另一方面,
一个所说的突变编码一个 DRH 核苷结合位点内的氨
基酸取代, 这种取代增加所说胸苷激酶的生物活性
(与未突变的胸苷激酶比较)。本发明也提供了适
于表达这种 DNA 分子的载体以及使用该载体的方
法。

DRHPIAALLCYP										DRHPIAALLCYP									
V-	T-									VAA	FSY								
F-	YYI									PTQ	SDP								
VLS	RIY																		
-L	FJ									RA-	GDS								
TFY	MF									DGV	CRN								
VVC	T-									DNN	DSP								
-FA	-									ILN	RT _{aa}								
VFS	-									FLD	P-								
-C-	CI									YVY	VS-								
I-A	L-V									(-204)	LRS-N-								
-L	VS-									-NP	CDC								
-LH	VGV									SVG	EKFJ _{aa} -D								
-LS	YH-									YGS	ICP								
FLV	VN-									aa-1	IL _{aa}								
TV-	STF									YTN	GSP								
-T-	GT-									VGR	N-								
-FI	TI-									RLP	NEA								

(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1. 一种编码包含一个或多个突变的 *Herpesviridae* 胸苷激酶的分离的核酸分子, 至少一个所说的突变是一个 DRH 核苷结合位点下游的 5 位氨基酸取代, 这种取代增加所说胸苷激酶的生物学活性 (与未突变的胸苷激酶比较)。

2. 按照权利要求 1 的编码一种胸苷激酶的分离的核酸分子, 其中蛋氨酸或酪氨酸取代所说 DRH 核苷结合位点下游的 5 位氨基酸。

3. 按照权利要求 1 的编码一种胸苷激酶的分离的核酸分子, 进一步包含缬氨酸取代所说 DRH 核苷结合位点下游的 4 位氨基酸。

4. 按照权利要求 1 的编码一种胸苷激酶的分离的核酸分子, 进一步包含半胱氨酸取代所说 DRH 核苷结合位点下游的 6 位氨基酸。

5. 一种编码包含一个或多个突变的 *Herpesviridae* 胸苷激酶的分离的核酸分子, 至少一个所说的突变是半胱氨酸取代一个 DRH 核苷结合位点下游的 6 位氨基酸, 这种取代增加所说胸苷激酶的生物学活性 (与未突变的胸苷激酶比较)。

6. 一种编码包含至少四个突变的 *Herpesviridae* 胸苷激酶的分离的核酸分子, 这种突变增加所说胸苷激酶的生物学活性 (与未突变的胸苷激酶比较), 所说突变包括一个 DRH 核苷结合位点上游的 2 位氨基酸突变成亮氨酸、所说 DRH 核苷结合位点上游的 1 位氨基酸突变成亮氨酸、所说 DRH 核苷结合位点下游的 4 位氨基酸突变成缬氨酸、所说 DRH 核苷结合位点下游的 5 位氨基酸突变成蛋氨酸。

7. 一种编码包含至少四个突变的 *Herpesviridae* 胸苷激酶的分离的核酸分子, 这种取代增加所说胸苷激酶的生物学活性 (与未突变的胸苷激酶比较), 所说突变包括一个 DRH 核苷结合位点上游的 1 位氨基酸突变成亮氨酸、所说 DRH 核苷结合位点下游的 4 位氨基酸突变成缬氨酸、所说 DRH 核苷结合位点下游的 5 位氨基酸突变成酪氨酸。所说 DRH 核苷结合位点下游的 6 位氨基酸突变成半胱氨酸。

8. 按照权利要求 1-7 之任一编码一种胸苷激酶的分离的核酸分子, 其中

所说的胸苷激酶选自单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶和单纯疱疹病毒 2 型胸苷激酶。

9.按照权利要求 1-7 之任一编码一种胸苷激酶的分离的核酸分子，其中所说的酶是截短的或者包含符合读框的缺失。

10.按照权利要求 1-7 之任一编码一种胸苷激酶的分离的核酸分子，其中所说的胸苷激酶能够磷酸化核苷类似物，其磷酸化核苷类似物的能力至少超过野生型胸苷激酶的一倍。

11.按照权利要求 10 的分离的核酸分子，其中所说的核苷类似物选自下列物质： ganciclovir、无环鸟苷、三氟胸苷、1-[2-脱氧，2-氟，(-D-阿糖呋喃基)-5-碘尿嘧啶、ara-A、araT 1-(-D-阿糖呋喃氧基胸腺嘧啶、5-乙基-2'-脱氧尿苷、5-碘代-5'-氨基-2,5'-二脱氧尿苷、碘苷、AZT、AIU、二脱氧胞苷和 AraC。

12.按照权利要求 1-7 之任一编码一种胸苷激酶的分离的核酸分子，其中所说的胸苷激酶能够磷酸化核苷类似物，并且其中

$$Z > \left[\frac{(\text{TKmNAp})/(\text{TKmTp})}{(\text{TKwtNAp})/(\text{TKwtTp})} \right]$$

式中 TKmNAp 是胸苷激酶突变体引起的核苷类似物磷酸化率，TKmTp 是胸苷激酶突变体引起的胸苷激酶磷酸化率，TKwtNAp 是未突变的胸苷激酶引起的核苷类似物磷酸化率，TKwtTp 是未突变的胸苷激酶引起的胸苷激酶磷酸化率，Z 选自 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5 和 5。

13.按照权利要求 12 的分离的核酸分子，其中所说的核苷类似物选自下列物质： ganciclovir、无环鸟苷、三氟胸苷、1-[2-脱氧，2-氟，(-D-阿糖呋喃基)-5-碘尿嘧啶、ara-A、araT 1-(-D-阿糖呋喃氧基胸腺嘧啶、5-乙基-2'-脱氧尿苷、5-碘代-5'-氨基-2,5'-二脱氧尿苷、碘苷、AZT、AIU、二脱氧胞苷和 AraC。

14.一种表达载体，该载体包含可操作连接到权利要求 1-13 之任一核酸分子上的启动子。

15.按照权利要求 14 的表达载体，其中所说的启动子选自 MoMLV

LTR，巨细胞病毒立即早期启动子和巨细胞病毒立即晚期启动子。

16.按照权利要求 15 的表达载体，其中所说的启动子是组织特异性启动子。

17.按照权利要求 16 的表达载体，其中所说的组织特异性启动子选自酪氨酸羟化酶启动子、脂肪细胞 P2 启动子、PEPCK 启动子、甲胎蛋白启动子、乳清酸性启动子和酪蛋白启动子。

18.按照权利要求 14 的表达载体，该载体还包括可操作连接到编码鸟苷酸激酶或 DNA 聚合酶的核酸分子上的启动子。

19.一种能够指导编码一种胸苷激酶的核酸分子表达的病毒载体，所说核酸分子包含一个或多个突变，其中至少一个所说的突变编码氨基酸取代，这种取代增加所说胸苷激酶的生物学活性（与未突变的胸苷激酶比较）。

20.按照权利要求 19 的病毒载体，其中所说的载体选自单纯疱疹病毒载体、腺病毒载体、腺病毒相关载体和逆转录病毒载体。

21.按照权利要求 19 的病毒载体，其中所说的载体包含一种启动子，该启动子选自 MoMLV LTR，巨细胞病毒立即早期启动子和巨细胞病毒立即晚期启动子。

22.按照权利要求 21 的病毒载体，其中所说的启动子是组织特异性启动子，该启动子选自酪氨酸羟化酶启动子、脂肪细胞 P2 启动子、PEPCK 启动子、甲胎蛋白启动子、乳清酸性启动子和酪蛋白启动子。

23.携带权利要求 14-22 之任一载体的宿主细胞。

24.按照权利要求 23 的宿主细胞，其中所说的细胞选自人细胞、狗细胞、猴子细胞、大鼠细胞和小鼠细胞。

25.一种分离的胸苷激酶，该胸苷激酶包含一个或多个突变，至少一个所说突变是一个 DRH 核苷结合位点下游的氨基酸取代，这种取代增加所说胸苷激酶的生物学活性（与未突变的胸苷激酶比较）。

26.按照权利要求 25 的分离的胸苷激酶，其中蛋氨酸或酪氨酸取代所说 DRH 核苷结合位点下游的 5 位氨基酸。

27.按照权利要求 25 的分离的胸苷激酶，该胸苷激酶还包含缬氨酸取代所说 DRH 核苷结合位点下游的 4 位氨基酸。

28. 按照权利要求 25 的分离的胸苷激酶, 该胸苷激酶还包含半胱氨酸取代所说 DRH 核苷结合位点下游的 6 位氨基酸。

29. 一种分离的 Herpesviridae 胸苷激酶, 该胸苷激酶包含一个或多个突变, 至少一个所说的突变是半胱氨酸取代一个 DRH 核苷结合位点下游的 6 位氨基酸, 这种突变增加所说胸苷激酶的生物学活性(与未突变的胸苷激酶比较)。

30. 一种分离的 Herpesviridae 胸苷激酶, 该胸苷激酶包含至少四个突变, 这种突变增加所说胸苷激酶的生物学活性(与未突变的胸苷激酶比较), 所说突变包括一个 DRH 核苷结合位点上游的 2 位氨基酸突变成亮氨酸、所说 DRH 核苷结合位点上游的 1 位氨基酸突变成亮氨酸、所说 DRH 核苷结合位点下游的 4 位氨基酸突变成缬氨酸、所说 DRH 核苷结合位点下游的 5 位氨基酸突变成蛋氨酸。

31. 一种分离的 Herpesviridae 胸苷激酶, 该胸苷激酶包含至少四个突变, 这种突变增加所说胸苷激酶的生物学活性(与未突变的胸苷激酶比较), 所说突变包括一个 DRH 核苷结合位点上游的 1 位氨基酸突变成亮氨酸、所说 DRH 核苷结合位点下游的 4 位氨基酸突变成缬氨酸、所说 DRH 核苷结合位点下游的 5 位氨基酸突变成酪氨酸。所说 DRH 核苷结合位点下游的 6 位氨基酸突变成半胱氨酸。

32. 按照权利要求 25-31 之任一分离的胸苷激酶, 其中所说的胸苷激酶选自单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶和单纯疱疹病毒 2 型胸苷激酶。

33. 按照权利要求 25-31 之任一分离的胸苷激酶, 其中所说的酶是截短的或者包含符合读框的缺失。

34. 按照权利要求 25-31 之任一分离的胸苷激酶, 其中所说的胸苷激酶能够以超过野生型胸苷激酶对核苷类似物的磷酸化至少一倍的方式磷酸化核苷类似物。

35. 按照权利要求 34 的分离的胸苷激酶, 其中所说的核苷类似物选自下列物质: ganciclovir、无环鸟苷、三氟胸苷、1-[2-脱氧, 2-氟, (-D-阿糖呋喃基)-5-碘尿嘧啶、ara-A、araT 1-(-D-阿糖呋喃氧基胸腺嘧啶、5-乙基-2'-脱氧尿苷、5-碘代-5'-氨基-2,5'-二脱氧尿苷、碘苷、AZT、AIU、二脱氧胞苷和 AraC。

36.按照权利要求 25-31 之任一分离的胸苷激酶, 其中所说的胸苷激酶能够磷酸化核苷类似物, 并且其中

$$Z > \left[\frac{(\text{TKmNAp})/(\text{TKmTp})}{(\text{TKwtNAp})/(\text{TKwtTp})} \right]$$

式中 TKmNAp 是胸苷激酶突变体引起的核苷类似物磷酸化率, TKmTp 是胸苷激酶突变体引起的胸苷磷酸化率, TKwtNAp 是未突变的胸苷激酶引起的核苷类似物磷酸化率, TKwtTp 是未突变的胸苷激酶引起的胸苷磷酸化率, Z 选自 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5 和 5。

37.按照权利要求 36 的分离的胸苷激酶, 其中所说的核苷类似物选自下列物质: ganciclovir、无环鸟苷、三氟胸苷、1-[2-脱氧, 2-氟, (-D-阿糖呋喃基)-5-碘尿嘧啶、ara-A、araT 1-(-D-阿糖呋喃氧基胸腺嘧啶、5-乙基-2'-脱氧尿苷、5-碘代-5'-氨基-2,5'-二脱氧尿苷、碘苷、AZT、AIU、二脱氧胞苷和 AraC。

38.一种抑制温血动物病原体的方法, 该方法包括给温血动物施用按照权利要求 14-22 之任一载体以便所说的病原体受到抑制。

39.按照权利要求 38 的方法, 其中所说的载体被体内施用。

40.按照权利要求 38 的方法, 其中所说的病原体选自病毒、细菌和寄生虫。

41.按照权利要求 38 的方法, 其中所说的病原体是肿瘤细胞。

42.按照权利要求 38 的方法, 其中所说的病原体是自体反应性免疫细胞。

43.按照权利要求 38-42 的任一方法, 该方法还包括施用核苷类似物的步骤。

44.按照权利要求 43 的方法, 其中所说的核苷类似物选自下列物质: ganciclovir、无环鸟苷、三氟胸苷、1-[2-脱氧, 2-氟, (-D-阿糖呋喃基)-5-碘尿嘧啶、ara-A、araT 1-(-D-阿糖呋喃氧基胸腺嘧啶、5-乙基-2'-脱氧尿苷、5-碘代-5'-氨基-2,5'-二脱氧尿苷、碘苷、AZT、AIU、二脱氧胞苷和 AraC。

45.一种药物组合物,该组合物包含按照权利要求 14-22 之任一载体和药学上可接受的载体和稀释剂。

46.一种药物组合物,该组合物包括按照权利要求 23 之宿主细胞和药学上可接受的载体和稀释剂。

胸 苷 激 酶 突 变 体

技术领域

本发明总的来说涉及 Herpesviridae 突变体酶,更具体地说涉及利用胸苷激酶突变体的组合物和方法。

发明背景

尽管总的来看细菌性疾病可容易地用抗生素治疗,但对许多病毒性、寄生虫性、癌性和遗传性疾病却很少存在有效的治疗方法。例如,可以经外科切除实体肿瘤(solid tumor)来治疗癌症。然而,大多数有实体肿瘤的病人在主要肿瘤位点之外也具有微小转移灶。若仅外科治疗,则约 70%的这类病人会出现癌症复发。因而,在美国,癌症引起的死亡占总死亡的五分之一,居疾病引起的死亡的第二位。

此外,现在也用涉及细胞毒化疗药物(如,长春新碱、长春花碱、顺式铂氨、氮甲蝶呤、5-FU 等)的疗法和/或放射疗法结合治疗肿瘤。而使用这些方法的困难之一是放疗和化疗剂对正常组织有毒,常常产生危及健康的副作用。另外,这些方法常常具有极高的无效/缓解率(依癌症的类型而变,可高达 90%)。

已尝试了许多其它方法以支持和加强个体自身的免疫系统,从而消灭肿瘤细胞。例如,某些科学家采用细菌或病毒成分为佐剂,以便刺激免疫系统消灭肿瘤细胞。这些药剂已作为佐剂和非特异性刺激剂在动物肿瘤模型中使用,但还未证实对人体有效。

淋巴因子也被用于治疗肿瘤(以及病毒性和寄生虫性疾病),以便在免疫反应的产生中刺激或影响特异性免疫细胞。例如,一个小组采用淋巴因子白细胞介素-2 刺激外周血细胞,以扩增和产生大量对肿瘤细胞为细胞毒性的细胞(Rosenberg et al., N. Engl. J. Med. 313 :1485-1492,1985)。

有人已建议采用特异性单克隆抗体或"魔弹"特异性靶向和杀伤肿瘤细胞的抗体介导性治疗(Dillman, "Antibody Therapy", Principles of Cancer

Biotherapy, Oldham (ed), Raven Press, Ltd., New York, 1987)。然而，有一个困难是大多数单克隆抗体来源于鼠，因而对鼠抗体的超敏反应可能限制其效率，特别是在重复治疗后。通常的副作用包括发烧、盗汗、畏冷、皮肤疹、关节炎和神经瘫痪。

最近已引起极大兴趣的一种方法是使用基因治疗，它不仅已用于治疗遗传性疾病，也已用于治疗病毒性和癌性疾病(参见 PCT 出版物 WO91/02805、EPO415731 和 WO90/07936)。简单地说，是把得自病毒的特别设计的载体用于将特定的遗传信息传递到细胞中。这种遗传信息本身可以用于阻断损坏的蛋白质或抗原的表达(例如，反义治疗)，可以编码对选择的细胞有毒并杀死选择的细胞的蛋白质，可以编码阻断细胞免疫反应的治疗蛋白质或编码取代失活或非成活的蛋白质的蛋白质。

最近推荐用于这种治疗的一种蛋白质是 1 型单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSVTK-1)。简单地说，胸苷激酶是一种磷酸化天然核苷酸底物以及核苷类似物的补救途径酶(参见 Balasubramaniam et al., J. of Gen. Vir. 71:2979-2987,1990)。可以通过将表达这一蛋白质的逆转录病毒引入到细胞中，接着施用核苷类似物(例如，无环鸟苷、ganciclovir)治疗性地使用所述蛋白质。然后，HSVTK-1 磷酸化所说的核苷类似物，产生能够杀死宿主细胞的毒性产物。因此，使用表达 HSVTK 的逆转录病毒载体不仅被建议用于治疗癌症，而且被建议用于其它疾病。

本发明提供了具有增强的生物学活性的新胸苷激酶突变体，该突变体适于多种用途(例如基因治疗)，并具有其它相关的优点。

发明概述

简单地说，本发明提供了利用 Herpesviridae 胸苷激酶的组合物和方法。本发明一方面提供了包含一个或多个突变的编码 Herpesviridae 胸苷激酶的分离的核酸分子，其中至少一个突变编码一个 DRH 核苷结合位点上游的氨基酸取代，这种取代增加所说胸苷激酶的生物学活性(与未突变的胸苷激酶比较)。在本发明的另一方面，所说的突变编码一个 DRH 核苷结合位点内的氨基酸取代，这种取代增加所说胸苷激酶的生物学活性(与未突变的胸苷激酶比较)。本发明另一方面提供了编码包含一个或多个突变的 Herpesviridae 胸苷激酶的分离的核酸分子，其中至少一个突变是一个

DRH 核苷结合位点下游(例如, 下游 4、5 或 6 位核苷酸)的氨基酸取代, 这种取代增加所说胸苷激酶的生物学活性(与未突变的胸苷激酶比较)。本发明也提供了适于表达这种 DNA 分子的载体以及使用该载体的方法。合适的 Herpesviridae 胸苷激酶的代表性例子包括单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶和单纯疱疹病毒 2 型胸苷激酶、水痘-带状疱疹病毒胸苷激酶以及绒猴疱疹病毒、猪疱疹病毒 1 型、Pseudorabies 病毒、马疱疹病毒 1 型、牛疱疹病毒 1 型、火鸡疱疹病毒、Marek's 病病毒、疱疹病毒 saimiri 和 EB 病毒胸苷激酶。在其它实施方案中, 所说的胸苷激酶可以是灵长类疱疹病毒胸苷激酶或非灵长类疱疹病毒胸苷激酶, 例如禽疱疹病毒胸苷激酶。

本发明的内容包含许多种突变。例如在一个实施方案中描述了编码所述 DRH 核苷结合位点上游 1-7 位氨基酸的一个或多个氨基酸取代。在一个优选的实施方案中, 所述 DRH 核苷结合位点上游 1 位的氨基酸被选自缬氨酸、亮氨酸、半胱氨酸和异亮氨酸的氨基酸取代。在另一个优选的实施方案中, 氨基酸丙氨酸取代存在于所说 DRH 核苷结合位点上游 7 位的氨基酸。在另一个实施方案中, 谷氨酸可以取代所说 DRH 核苷结合位点中的天冬氨酸。在另一个实施方案中, 组氨酸可以取代所说 DRH 核苷结合位点中的精氨酸。在另一个实施方案中, 所说胸苷激酶是截短的, 但仍保留生物学活性。

本发明的另外的实施方案提供了分离的核酸分子, 所说的核酸分子编码一种胸苷激酶, 该胸苷激酶能够磷酸化核苷类似物, 其磷酸化核苷类似物的能力至少超过野生型胸苷激酶的一倍。在另一个实施方案中, 所说的胸苷激酶磷酸化核苷类似物的能力至少超过野生型胸苷激酶的 X 倍, 其中 X 选自 1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5 和 5。在另一个实施方案中, 所说胸苷激酶能够磷酸化核苷类似物, 其中

$$Z > \left[\frac{(\text{TKmNAp})/(\text{TKmTp})}{(\text{TKwtNAp})/(\text{TKwtTp})} \right]$$

式中 TKmNAp 是胸苷激酶突变体引起的核苷类似物磷酸化率, TKmTp 是胸苷激酶突变体引起的胸苷激酶磷酸化率, TKwtNAp 是未突变的胸苷

激酶引起的核苷类似物磷酸化率，TKwtTp 是未突变的胸苷激酶引起的胸苷激酶磷酸化率，Z 选自 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5 和 5。合适的核苷类似物的代表性例子包括 ganciclovir、无环鸟苷、buciclovir、famciclovir、penciclovir、valciclovir、三氟胸苷、1-[2-脱氧，2-氟，(-D-阿糖呋喃基)-5-碘尿嘧啶、ara-A、araT 1-(-D-阿糖呋喃氧基胸腺嘧啶、5-乙基-2'-脱氧尿苷、5-碘代-5'-氨基-2,5'-二脱氧尿苷、碘苷、AZT、AIU、二脱氧胞苷和 AraC。

增加核苷类似物磷酸化的特别优选的突变体胸苷激酶包括其中所说的酶是 1 型单纯疱疹病毒胸苷激酶，并且其中丙氨酸取代 155 位脯氨酸，缬氨酸取代 161 位苯丙氨酸的那些。在另一个实施方案中，异亮氨酸可以取代 161 位苯丙氨酸，半胱氨酸可以取代 161 位的苯丙氨酸。

本发明另一方面提供了由上述核酸分子编码的突变体胸苷激酶以及能够表达这些分子的载体。一方面本发明提供了包含可操作连接到本发明的核酸分子上的启动子的表达载体。优选的一方面所说载体是能够指导上述核酸分子表达的病毒载体。这些病毒载体的代表性的例子包括单纯疱疹病毒载体、腺病毒载体、腺病毒相关载体、痘病毒载体、细小病毒载体、杆状病毒载体和逆转录病毒载体。另一方面本发明提供了能够指导一种核酸分子表达的病毒载体，所说核酸分子编码一个胸苷激酶，包含一个或多个突变，其中至少一个所说突变编码一个氨基酸取代，这种取代增加所说胸苷激酶的生物学活性（与未突变的胸苷激酶比较）。

多种启动子可以用于本发明，这些启动子包括，例如 MoMLV LTR、RSV LTR、Friend MuLV LTR、腺病毒启动子、新霉素磷酸转移酶启动子/增强子、晚期细小病毒启动子、疱疹 TK 启动子、SV40 启动子、金属硫蛋白 IIa 基因增强子/启动子、巨细胞病毒立即早期启动子、巨细胞病毒立即晚期启动子之类的启动子，以及组织特异性启动子，例如酪氨酸酶相关启动子(TRP-1 和 TRP-2)、DF3 增强子、SLPI 启动子(分泌白细胞蛋白酶抑制剂-在许多类型的癌中表达)、TRS(组织特异性调节序列)、酪氨酸羧化酶启动子、脂肪细胞 P2 启动子、PEPCK 启动子、CEA 启动子、甲胎蛋白启动子、乳清酸性启动子和酪蛋白启动子。在相关的一方面，上述载体可以与药学上可接受的载体和稀释剂一起以药物组合物被提供。

本发明另一方面提供了携带有一种上述载体的宿主细胞，这种细胞的代表性例子包括人细胞、狗细胞、猴子细胞、大鼠细胞和小鼠细胞。

本发明另一方面提供了一种抑制温血动物病原体的方法，该方法包括给温血动物施用一种上述载体以使所说的病原体受到抑制。在多种实施方案中，所说载体可以体内施用，或者施用到得自体内的细胞上，然后将该细胞移植进或再移植进动物中。所说病原体可以是病毒、细菌、寄生虫、肿瘤细胞或自体反应性免疫细胞。

参照下列详细描述和附图，本发明的这些方面和其它方面会很清楚。此外，以下提出了更详细描述某些方法或组合体(例如，质粒等)的多种参考资料，这些参考资料作为整体一并被参考。

附图简要说明

图 1 是描述构建含随机核苷酸的文库和选择 TK 突变体策略的图解性概要。

图 2 是显示选择 TK 和 AZT 突变体的照片。

图 3 描述了野生型、TKF105、TKI208 和 TKF2 TK 的密码子 165-175。

图 4 是描述野生型 TK 和 TK 突变体热稳定性的系列图。

图 5 是描述体外翻译的野生型和 TKF2 胸苷激酶热失活轮廓的图。

图 6 是 SDS/PAGE-分级分离的体外翻译产物(野生型和 TKF2)的放射自显影。

图 7 是经 SDS-PAGE 和 TCA-可沉淀计数处理的 ³⁵S-标记的无细胞翻译产物的放射自显影。

图 8A 和 8B 是说明在兔网质红细胞裂解物无细胞翻译系统中引起的高活性(A)和低活性(B)突变体的时间过程分析的两个图。

图 9A 和 9B 是说明高活性(A)和低活性(B)突变体的热稳定性的两个图。

图 10 是描述由突变体和野生型胸苷激酶引起的核苷和核苷类似物磷酸化的条线图。

图 11 是说明野生型、TKF36 和沉默质粒 (pMDC)TK 活性的条线图。

图 12 是说明包含 TKF36、TKF52、野生型质粒、TKF99 或沉默质粒(pMDC)的细胞随时间变化的胸苷摄入活性的图。

图 13 是用一种 HSVTK 突变体基因治疗的一个代表性例子的图解性说明。

图 14 是描述在 LIF-ALL 文库中随机化并作为选择结果的核苷酸的图解性说明。

图 15 是表示选择的和未选择的克隆的氨基酸取代的表。

图 16 是说明选自 LIF-ALL 文库的对 GCV 或 ACV 敏感的突变体的数量的表。

图 17 是说明在选择的 TK 突变体中核苷酸变化的表。

图 18 是说明 159-161 和 168-170 位上氨基酸序列和几个突变体 TK 的磷酸化水平的表。

图 19 是说明生长在 GCV 上并用多种 TK 突变体转染的细胞的成活率的图。

图 20 是说明生长在 ACV 上并用多种 TK 突变体转染的细胞的成活率的图。

图 21 说明代表性人鸟苷酸激酶的核苷酸序列和推定的氨基酸序列。

图 22 说明代表性鼠鸟苷酸激酶核苷酸序列和推定的氨基酸序列。

发明详述

定 义

在详细说明本发明之前，给出此后要用到的某些术语的定义对于理解本发明会有帮助。

"载体"指一种能够指导突变的 tk 基因以及任何附加序列或兴趣基因表达的装配体。该载体必须包括转录启动子/增强子元件，以及转录时可操作连接到 tk 基因和/或其它兴趣基因上的其它序列。该载体可由脱氧核糖核酸("DNA")、核糖核酸("RNA")或两者结合(例如，DNA-RNA 嵌合)组成。该载体可包含可不包含一个聚腺苷酸化序列、一个或多个限制位点以及一个或多个选择性标记(例如，新霉素磷酸转移酶或潮霉素磷酸转移酶)。此外，根据所选择的宿主细胞和所使用的载体，其它遗传元件(例如，复制源、附加核酸限制位点、增强子、赋予转录诱导性的序列和选择性标记)也可以掺

合进这里所述的载体中。

"组织特异性启动子"指控制基因在有限数量的组织或在单个组织中表达的转录启动子/增强子元件。该组织特异性启动子的代表性例子包括酪氨酸羟化酶启动子、脂肪细胞 P2 启动子、PEPCK 启动子、甲胎蛋白启动子、乳清酸性启动子和酪蛋白启动子。

胸苷激酶的"生物学活性"指胸苷激酶磷酸化核苷(例如, dT)和核苷类似物的能力,所说的核苷类似物例如, : ganciclovir(9-[2-羟基-1-(羟甲基)乙氧基]甲基}鸟苷)、 famciclovir 、 buciclovir 、 penciclovir 、 valciclovir、无环鸟苷(9-[2-羟基乙氧基]甲基)鸟苷)、三氟胸苷、1-[2-脱氧, 2-氟, (-D-阿糖呋喃基]-5-碘尿嘧啶、 ara-A 腺苷、阿拉伯糖苷、vivarabine)、1-(-D-阿糖呋喃氧基胸腺嘧啶、5-乙基-2'-脱氧尿苷、5-碘代-5'-氨基-2,5'-二脱氧尿苷、碘苷(5-碘-2'-脱氧尿苷)、AZT(3'-叠氨基-3'-胸苷)、ddC(二脱氧胞苷)、AIU(5-碘-5'-氨基-2',5'-二脱氧尿苷)、和 AraC(胞苷阿拉伯糖苷)。如本文所使用的, 如果某种胸苷激酶突变体的活性水平或比率超过未突变的胸苷激酶的至少"y"倍, 则该突变体被认为具有"增加的生物学活性", 其中 y 选自 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5 和 5。在优选的实施方案中, 当

$$Z > \left[\frac{(\text{TKmNAp})/(\text{TKmTp})}{(\text{TKwtNAp})/(\text{TKwtTp})} \right]$$

时, 胸苷激酶突变体被认为具有增加的生物学活性, 其中 TKmNAp 是胸苷激酶突变体引起的核苷类似物磷酸化率, TKmTp 是胸苷激酶突变体引起的胸苷磷酸化率, TKwtNAp 是未突变的胸苷激酶引起的核苷类似物磷酸化率, TKwtTp 是未突变的胸苷激酶引起的胸苷磷酸化率, Z 选自 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5 和 5。

除了胸苷激酶磷酸化核苷和核苷类似物的能力外, 术语"生物学活性"也应理解为指胸苷激酶的其他生物学活性, 例如蛋白质稳定性(如, 经抵抗胰蛋白酶之类的蛋白酶降解测得的)和热稳定性(如, 温度增加时保持对核苷类似物磷酸化作用)。

"病原体"指引起病态的外源生物体或引起病态的"改变的"细胞。病原体的代表性例子包括象病毒、细菌和寄生虫之类的外源生物体以及象肿瘤细胞和自体反应性免疫细胞之类的改变的细胞。如本文所使用的, 如果病原体的生长或扩散减慢或者病原体本身被消灭, 则病原体被认为是"被抑制的"。

如上所述, 本发明提供了利用 Herpesviridae 胸苷激酶突变体的组合物和方法。简单地说, 可以从许多种 Herpesviridae(包括, 例如灵长类疱疹病毒和象禽疱疹病毒之类的非灵长类疱疹病毒)制备本发明的胸苷激酶突变体。合适的疱疹病毒的代表性例子包括单纯疱疹病毒 1 型(McKnight 等人, 核酸研究 8:5949-5964,1980)、单纯疱疹病毒 2 型(Swain 和 Galloway, 病毒学杂志 46:1045-1050,1983)、水痘-带状疱疹病毒(Davison 和 Scott, 遗传病毒学杂志 67:1759-1816,1986)、绒猴疱疹病毒(Otsuka 和 Kit, 病毒学 135:316-330,1984)、猪疱疹病毒 1 型(Nunberg 等人, 病毒学杂志. 63:3240-3249,1989)、Pseudorabies 病毒(Kit 和 Kit, 美国. 专利 4,514,497,1985)、马疱疹病毒 1 型(Robertson 和 Whalley ,N 核酸研究 11307,1988)、牛疱疹病毒 1 型(Mittal 等人, 病毒学杂志 70:2901-2918,1989)、火鸡疱疹病毒(Martin 等人, 病毒学杂志. 63:2847-2852,1989)、Marek's 病病毒(Scott 等人, 遗传病毒学杂志 70:3055-3065,1989)、疱疹病毒 saimiri(honess 等人, 遗传病毒学杂志 70:3003-3013,1989)和 EB 病毒(Baer 等人, 自然(伦敦)310:207-311,1984)。

这些疱疹病毒可以容易地从商业途径(例如从美国典型培养物保藏中心("ATCC", Rockville, Maryland))获得。以上指出的疱疹病毒的某些保藏物可以容易地从 ATCC 获得, 例如, ATCC No. VR-539(单纯疱疹病毒 1 型)、ATCC No. VR-734 和 VR-540(单纯疱疹病毒 2 型)、ATCC No. VR-586(水痘-带状疱疹病毒)、ATCC No. VR-783(感染性喉气管炎)、ATCC Nos. VR-624、VR-987、VR=2103、VR-2001、VR-2002、VR-2175、VR-585(Marek's 病病毒)、ATCC Nos. VR-584B 和 VR-584B(火鸡疱疹病毒)、ATCC Nos. VR-631 和 VR-842(牛疱疹病毒 1 型)、ATCC Nos. VR-2003、VR-2229 和 VR-700(马疱疹病毒 1 型)。疱疹病毒也可以容易地从

天然来源(例如, 从感染的动物)分离和鉴别。

任何以上提到的疱疹病毒(以及 Herpesviridae 的其它成员)都可容易地用于制备本发明的胸苷激酶突变体。简单地说, 人们发现被认为决定核苷结合的主要区在位点 3 和 4 周围的区域(参见 Baladubramaniam et al., J Gen. Vir.71:2979-2987,1990)这些位点有高保守区的特征, 由基序-DRH-(位点 3)和-C(Y/F)P-(位点 4)组成。如本文所采用的, 尽管核酸的编号在不同的疱疹病毒之间有很大的变化, 但可以参照与 DRH 核苷结合位点相关的位置。例如, 对单纯疱疹病毒 1 型(McKnight et al., Nuc. Acids Res 8:5949-5964,1980)来说, 这一位点被发现在氨基酸 162、163 和 164 位。其它代表性的疱疹病毒的 DRH 核苷结合位点包括: 163、164 和 165(单纯疱疹病毒 2 型); 129、130 和 131(水痘-带状疱疹病毒); 130、131 和 132(绒猴疱疹病毒); 以及 148、149 和 150(EB 病毒)。

对从前没有测序的疱疹病毒来说, 可以通过测序编码所述酶的核酸序列, 或者通过酶本身的氨基酸测序, 接着将所得序列与其它已知疱疹病毒序列对比(参见 Baladubramaniam, 同上)容易地识别所说的 DRH 核苷结合位点。识别出一个以上的-DRH-基序后, 就可以容易地经例如晶体结构分析(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)或交联研究(Knoll et al., Bioch. Biophys. Acta 1121:252-260,1992)识别正确的基序。

然后来源于选择的疱疹病毒的胸苷激酶基因可以按如下的描述容易地分离和诱变, 以构建编码包含一个或多个突变的胸苷激酶的核酸分子, 所说突变增加所说胸苷激酶的生物学活性(与未突变的胸苷激酶比较)。如本文所采用的, 应当理解"未突变的胸苷激酶"指天然的或野生型胸苷激酶, 例如 McKnight et al.,(Nucl.Acids Res.8:5949-5964,1980)所描述的那些。用本文所述的任何试验方法可以容易地测定这些激酶的生物学活性, 所述方法包括, 例如, 核苷类似物摄入率测定、核苷或核苷类似物磷酸化率测定(参见实施例 2-40)。此外, 可以容易地选择具有其它生物学性质(如, 热稳定性(参见实施例 2-4)和蛋白质稳定性)的胸苷激酶。

本发明的内容中包括许多种胸苷激酶突变体。本发明的一个实施方案

提供了包含一个或多个突变的编码 Herpesviridae 胸苷激酶的分离的核酸分子，其中至少一个突变编码一个 DRH 核苷结合位点上游(5')的氨基酸取代。简单地说，任何所述 DRH 核苷结合位点上游(5')位置上的氨基酸都可以按本文的说明用另一个氨基酸取代。可被取代的代表性氨基酸包括(括号内为其单字母代码)：丙氨酸(A)、精氨酸(R)、天冬酰胺(N)、天冬氨酸(D)、半胱氨酸(C)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、甘氨酸(G)、组氨酸(H)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、赖氨酸(K)、蛋氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、脯氨酸(P)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)和缬氨酸(V)。

本发明的一个实施方案提供了编码在-DRH-核苷结合位点上游 1-7 位具有一个或多个氨基酸取代的胸苷激酶的核酸分子。在一个实施方案中，DRH 核苷结合位点上游 1 位的氨基酸被另一个氨基酸取代，包括，例如，丙氨酸(A)、精氨酸(R)、天冬酰胺(N)、天冬氨酸(D)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、甘氨酸(G)、组氨酸(H)、赖氨酸(K)、蛋氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、脯氨酸(P)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)。特别优选的取代包括缬氨酸(V)、亮氨酸(L)和半胱氨酸(C)。

在另一个实施方案中，DRH 核苷结合位点上游 2-6 位的氨基酸被其它氨基酸取代，包括，例如，丙氨酸(A)、精氨酸(R)、天冬酰胺(N)、天冬氨酸(D)、半胱氨酸(C)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、甘氨酸(G)、组氨酸(H)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、赖氨酸(K)、蛋氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、脯氨酸(P)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)和缬氨酸(V)。

在其它实施方案中，DRH 核苷结合位点上游 7 位的氨基酸被其它氨基酸取代，包括，例如，精氨酸(R)、天冬酰胺(N)、天冬氨酸(D)、半胱氨酸(C)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、甘氨酸(G)、组氨酸(H)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、赖氨酸(K)、蛋氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、脯氨酸(P)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)和缬氨酸(V)。特别优选的取代包括丙氨酸(A)。

本发明另一方面提供了编码包含一个或多个突变(这种突变增加所说胸苷激酶的生物学活性)的胸苷激酶的核酸分子，所说的突变编码 DRH 核苷结合位点上游 w 为的氨基酸取代，其中 w 是大于 8(一般小于 162)的整数。可以被取代的代表性氨基酸包括，例如，丙氨酸(A)、精氨酸(R)、天冬酰胺

(N)、天冬氨酸(D)、半胱氨酸(C)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、甘氨酸(G)、组氨酸(H)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、赖氨酸(K)、蛋氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、脯氨酸(P)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)和缬氨酸(V)。

本发明的另一个实施方案提供了编码在-DRH-核苷结合位点中具有一个或多个氨基酸取代的胸苷激酶的核酸分子。在一个实施方案中，-DRH-核苷结合位点中的天冬氨酸被另一个氨基酸取代，所述氨基酸包括，例如，丙氨酸(A)、精氨酸(R)、天冬酰胺(N)、半胱氨酸(C)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、甘氨酸(G)、组氨酸(H)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、赖氨酸(K)、蛋氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、脯氨酸(P)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)和缬氨酸(V)。

在另一个实施方案中，-DRH-核苷结合位点中的精氨酸被另一个氨基酸取代，所述氨基酸包括，例如，丙氨酸(A)、天冬酰胺(N)、天冬氨酸(D)、半胱氨酸(C)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、甘氨酸(G)、组氨酸(H)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、赖氨酸(K)、蛋氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、脯氨酸(P)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)和缬氨酸(V)。

本发明某些优选的方面提供了编码包含一个或多个突变(这种突变增加所说胸苷激酶的生物学活性)的胸苷激酶的核酸分子，所说的突变编码 DRH 核苷结合位点上游(5')的一个或多个氨基酸取代，和/或 DRH 核苷结合位点下游 4、5 或 6 位或者 CYP 核苷结合位点(参见图 4)上游 1、2 或 3 位的一个或多个氨基酸取代。以下实施例 8 和图 8 更详细地给出了这种突变体的特定的说明。

在另一个实施方案中，-DRH-核苷结合位点中的组氨酸被任何其它的氨基酸取代，所述氨基酸包括，例如，丙氨酸(A)、精氨酸(R)、天冬酰胺(N)、天冬氨酸(D)、半胱氨酸(C)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、甘氨酸(G)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、赖氨酸(K)、蛋氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、脯氨酸(P)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)和缬氨酸(V)。

本发明另一方面提供了编码包含一个或多个突变(这种突变增加所说胸苷激酶的生物学活性)的胸苷激酶的核酸分子，所说的突变编码 DRH 核苷结合位点下游(3')1-11 位的一个或多个氨基酸取代，这些氨基酸可被其它氨基酸取代，包括，例如，丙氨酸(A)、精氨酸(R)、天冬酰胺(N)、天冬氨酸

(D)、半胱氨酸(C)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、甘氨酸(G)、组氨酸(H)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、赖氨酸(K)、蛋氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、脯氨酸(P)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)和缬氨酸(V)。

本发明另一方面提供了编码包含一个或多个突变(这种突变增加所说胸苷激酶的生物学活性)的胸苷激酶的核酸分子,所说的突变编码 DRH 核苷结合位点下游 12-v 位的氨基酸取代,其中 v 是大于 13(一般小于 202)的整数。这些氨基酸可以容易地被其它氨基酸取代,包括,例如,丙氨酸(A)、精氨酸(R)、天冬酰胺(N)、天冬氨酸(D)、半胱氨酸(C)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、甘氨酸(G)、组氨酸(H)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、赖氨酸(K)、蛋氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、脯氨酸(P)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)和缬氨酸(V)。

在各方面,本发明的核酸分子编码几个氨基酸突变。例如,一个优选的实施方案提供了编码具有 1、2、3、4 个或多个氨基酸取代的突变以及符合读框的缺失的胸苷激酶突变体。就此而言,特别优选的突变包括 P155A/F161V、P155A/F161C、P155A/D162E、I160L/F161L/A168V/L169M 和 F161L/A168V/L169Y/L170C。

按照本文描述的试验方法和以下实施例,可以容易地筛选具有增加的生物学活性的任何以上所述的胸苷激酶突变体。

胸苷激酶突变体的构建

可以用多种方法构建本发明的胸苷激酶突变体。例如,可以通过合成寡核苷酸在特定位置引入突变,所说寡核苷酸包含侧翼于使其能连接到天然序列上的限制位点的突变序列。连接后,所形成的再构序列编码具有所需氨基酸插入、取代或缺失的衍生物。

另外,寡核苷酸指导的位点特异性(或节段特异性)诱变可用于提供具有特定的按所需取代、缺失或插入改变的密码子的改变的基因。经采用邻近于所需缺失的便利的限制内切核酸酶位点也可以构建胸苷激酶突变体的缺失或截短衍生物。限制酶切后,可引入突出端,并再连接 DNA。Sambrook 等人(分子克隆:实验室手册,第二版,冷泉港实验室出版社,1989)公开了获得以上提出的改变的示范性方法。

也可以用 PCR 诱变、化学诱变技术 Drinkwater 和 Klinedinst, PNAS 83:3402-3406,1986), 经迫使核苷酸错掺(例如, Lian 和 Wise 基因 88:107-111,1990)或经使用随机诱变寡核苷酸(Horwetz 等人, 基因组 3:112-117,1989)构建胸苷激酶突变体。以下实施例 1-4 中提出了构建胸苷激酶突变体的特别优选的方法。

HSVTK 载体

本发明中, 术语"胸苷激酶突变体"应理解为不仅包括本文描述的特定蛋白质(以及编码这些蛋白质的核酸序列), 而且包括其衍生物(可以包括保持生物学活性的一级蛋白质(primary protein)的多种结构形式)。例如, 胸苷激酶可以是酸性或碱性形式, 或者是中性形式。此外, 单个氨基酸残基可以被氧化或还原修饰。而且, 可以对氨基酸或核苷酸序列进行取代、缺失或添加, 其净效果是使突变体增强的生物学活性保留或进一步增强。由于密码简并, 编码相同氨基酸序列的核苷酸序列会有相当大的变化。

本发明公开的胸苷激酶突变体的其它衍生物包括胸苷激酶与其它蛋白质或多肽的缀合物。这可以通过合成 N-端或 C-端融合蛋白(其可添加来促进胸苷激酶突变体的纯化或鉴别)来获得(参见, 美国专利 4,851,341, 也参见, Hopp 等人, 生物技术 6:1204,1988)。

本发明的一个实施方案提供了胸苷激酶突变体的截短的衍生物。例如, 可以容易地进行定点诱变以缺失胸苷激酶突变体 N-端 45 位氨基酸, 从而构建保持其生物学活性的突变体的截短的形式。

为表达胸苷激酶衍生物构建的核苷酸序列应保留编码序列的读框相(phase)。此外, 突变最好不产生可杂交产生二级 mRNA 结构(例如, 环状结构或发夹结构)的互补区。采用多种技术(包括以上讨论的那些)可以容易地构建这些衍生物。

如以上所指出的, 本发明提供了重组载体, 这些载体包括编码胸苷激酶突变体或其衍生物的合成的或 cDNA-衍生的核酸分子, 它们可操作连接到合适的转录或翻译调节元件上。合适的调节元件可以得自多种来源, 包括细菌、真菌、病毒、哺乳动物、昆虫或植物基因。合适的调节元件的选择取决于所选择的宿主细胞, 可以由本领域普通技术人员容易地完成。调

节元件的例子包括转录启动子和增强子或者 RNA 聚合酶结合序列、核糖体结合序列，包括转录起始信号。

编码以上所述的任一胸苷激酶突变体的核酸分子可以被许多种原核和真核宿主细胞(包括细菌、哺乳动物、酵母或其它真菌、病毒、昆虫或植物细胞)容易地表达。转化或转染这些细胞以表达外源 DNA 的方法是本领域公知的(参见，例如，Itakura 等人，美国专利 4,704,362,Hinnen 等人，PNAS U S A 75:1929-1933,1978,Murray 等人，美国专利 4,801,542;Upshall 等人，美国专利 4,935,349;Hagen 等人，美国专利 4,784,950;Axel 等人，美国专利 4,399,216;Goeddel 等人，美国专利 4,766,075;和 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第二版，冷泉港实验室出版社，1989；对植物细胞参见 Czako 和 Marton,植物生理 104:1067-1071,1994;和 Paszkowski 等人，生物技术.24:387-392,1992)。

适于进行本发明的细菌宿主细胞包括大肠杆菌、枯草芽胞杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和假单胞菌属、链霉菌属、葡萄球菌属的各个种，以及许多本领域技术人员熟知的其它的细菌种。细菌宿主细胞的代表性例子包括 DH5((Stratagene,Lajolla,加利福尼亚)。

细菌载体最好包含在宿主细胞中起作用的启动子、一个或多个可选择的表型标记和细菌复制源。代表性的启动子包括(-内酰胺酶(青霉素酶)和乳糖启动子系统(参见，Chang 等人，自然 275:615,1978)、T7 RNA 聚合酶启动子(Studier 等人，酶学方法 185:60-89,1990)、(启动子(Elvin 等人，基因 87:123-126,1990)、trp 启动子(Nichols 和 Yanofsky,酶学方法 101:155,1983)和 tac 启动子(Russell 等人，基因 20:231,1982)。代表性的选择性标记包括多种抗生素抗性标记，例如卡拉霉素或氨苄青霉素抗性基因。适于转化宿主细胞的许多质粒是本领域已知的，其中包括 pBR3229(参见 Bolivar 等人，基因 2:95,1977)、pUC 质粒(pUC18、pUC19、pUC118、pUC119)(参见 Messing, 酶学方法 101:20-77,1983；Vieira 和 Messing,基因 19:259-268,1982)和 pNH8A、pNH16a、pNH18a 以及 Bluescript M13(Stratagene, La Jolla,加利福尼亚)。

适于进行本发明的酵母和真菌宿主细胞包括 Saccharomyces pombe、啤酒糖酵母、毕赤氏酵母属、克鲁维氏酵母属、和曲霉属的各个种。酵母

和真菌合适的表达载体包括 YCp50 (ATCC No37419)(用于酵母), 和 amdS 克隆载体 pV3(Turnbull, 生物技术 7:169,1989)。转化酵母的方案也是本领域普通技术人员熟知的。例如, 可以经用 DNA 制备酵母原生质球(参见 Hinnen 等人, PNAS USA 75:1929,1978)或经用 LiCl 之类的碱金属盐处理(参见 Itoh 等人, 生物/技术 153:163,1983)容易地完成转化。也可以按 Cullen 等(生物/技术 5:369,1987)的描述用乙二醇进行真菌的转化。

适于进行本发明的哺乳动物细胞包括: COS(如, ATCC No. CRL 1650 或 1651)、BHK(如, ATCC No.CRL 6281)、CHO(ATCC No.CCL 61)、HeLa(如, ATCC No. CCL 2)、293(ATCC No.1573)和 NS-1 细胞。指导在哺乳动物中表达的合适的表达载体通常包含启动子以及其它转录和翻译控制序列。普通启动子包括 SV40、MMTV、金属硫蛋白-1、腺病毒 E1a、巨细胞病毒立即早期启动子和巨细胞病毒立即晚期启动子。

转化哺乳动物的方案是本领域普通技术人员熟知的。代表性的方法包括磷酸钙介导的转染; 电穿孔; 脂转染; 逆转录病毒、腺病毒和原生质体融合-介导的转染(参见 Sambrook 等人, 见上)。

可通过培养上述宿主/载体系统以表达重组胸苷激酶突变体制备胸苷激酶突变体。可以进一步按以下更详细的描述纯化重组产生的胸苷激酶突变体。

如以上所指出的, 本发明也提供了多种适于指导上述核酸分子表达的病毒和非病毒载体。本发明一方面提供了病毒载体, 该载体包含指导编码上述胸苷激酶突变体的核酸分子表达的病毒启动子。可用于本发明的多种启动子包括, 例如, MoMLV LTR、RSV LTR、Friend MuLv LTR、腺病毒启动子(Ohno 等人, 科学 265:781-784,1994)、新霉素磷酸转移酶启动子/增强子、晚期细小病毒启动子 Koering 等人, 人体基因治疗 5:457-463,1994)、疱疹 TK 启动子、SV40 启动子、金属硫蛋白 IIa 基因增强子/启动子、巨细胞病毒立即早期启动子、巨细胞病毒立即晚期启动子之类的启动子。在本发明特别优选的实施方案中, 所述启动子是组织特异性启动子(参见, 例如, WO91/02805; EP0415731 和 WO90/07936)。合适的组织特异性启动子的代表性例子包括酪氨酸酶相关启动子(TRP-1 和 TRP-2, Vile 和 Hart, 癌症研究 53:962-967,1993)、DF3 增强子(用于胸腺细

胞, 参见 Manome 等人, 癌症研究 54:5708-5413,1994)、SLPI 启动子(分泌白细胞蛋白酶抑制剂-在许多类型的癌中表达,参见, Garver 等人, 基因治疗 1:46-50,1994)、TRS(组织特异性调节序列,参见 Dynan 和 Tjian, 自然 316:774-778,1985)、白蛋白和(胎蛋白启动子(分别对正常肝细胞和转化肝细胞特异)、癌胚抗原启动子(用于转化的胃肠道、肺、乳房和其它组织的细胞)、酪氨酸羟化酶启动子(用于黑色素细胞)、胆碱乙酰转移酶或神经元特异性烯醇化酶(用于成神经细胞瘤)、胶质成纤维细胞调节序列、酪氨酸羟化酶启动子、c-erb B-2 启动子、PGK 启动子、PEPCK 启动子、乳清酸性启动子(乳房组织)、酪蛋白启动子(乳房组织)以及脂肪细胞 P2 启动子(Ross 等人, 基因及开发. 1318-1324,1993; 和 Lowell 等人, 自然 366:740-742, 1993)。除了以上提到的启动子外, 可以使用其它病毒特异性启动子(如, 逆转录病毒启动子(包括以上提到的那些以及象 HIV 之类的其它启动子); 肝炎、疱疹(如, EBV)和细菌、真菌或寄生虫(例如, 疟疾)特异性启动子, 以靶向病毒、细菌、真菌或寄生虫感染的特定细胞或组织。

本发明的胸苷激酶突变体可以从多种病毒载体表达, 所述载体包括, 例如, 疱疹病毒载体(如美国专利 5,288,641)、逆转录病毒载体(例如, EP 0,415,731;WO 90/07936;WO 91/0285,WO 94/03622;WO 93/25698;WO 93/25234;美国专利 5,219,740;WO 93/11230;WO 93/10218;Vile 和 Hart, 癌症研究. 53:3860-3864,1993;Vile 和 Hart,癌症研究 53:962-967,1993;Ram 等人, 癌症研究 53:83-88,1993;Takamiya 等人,神经科学研究 33:493-503,1992;Baba 等人, 神经外科杂志 79:729-735,1993), 假型病毒, 腺病毒载体(例如, WO 94/26914,WO 93/9191;Kolls 等人, PNAS 91(1):215-219,1994;Kass-Eisler 等人, PNAS 90(24):11498-502,1993;Guzman 等人, 循环系统 88(6):2838-48,1993; Guzman et al., 循环系统研究 73(6):1202-1207,1993;Zabner 细胞 75(2):207-216,1993;Li 等人, 人体基因治疗 4(4):403-409,1993;Caillaud 等人, 欧洲神经科学杂志 5(10):1287-1291,1993;Vincent 等人, 自然遗传学 5(2):130-134,1993;Jaffe 等人, 自然遗传学 1(5): 372-378,1992;和 Levrero 等人, 基因 101(2):195-202,1991), 腺病毒-相关病毒载体(Flotte 等人, PNAS 90(22):10613-10617,1993)、细小病毒载体(Koering 等人, 人体基因 治疗 5:457-463,1994)、杆状病毒载体和

痘病毒载体(Panicaoi 和 Paoletti, PNAS 79:4927-4931,1982 ;Ozaki 等人, 生物生理研究通讯 193 (2) :653-660,1993)。在各实施方案中, 病毒载体本身或含有病毒载体的病毒粒子可用于以下所述的方法和组合物中。

除了以上所述的胸苷激酶核酸分子外, 本发明的载体还可以包含或表达许多种附加核酸分子。例如, 病毒载体可以表达淋巴因子、反义序列、毒素或"置换型"蛋白质(如腺苷脱氨酶)。淋巴因子的代表性例子包括 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、(-干扰素、(-干扰素、(-干扰素和肿瘤坏死因子。反义序列的代表性例子包括反义 myc、反义 p53、反义 ras 以及阻断病毒(如 HIV、HBV 和 HCV)表达和产生的反义序列。毒素的代表性例子包括蓖麻毒蛋白、红豆因、白喉毒素、霍乱毒素、gelonin、商陆抗病毒蛋白、tritin、志贺氏菌属毒素和假单胞菌属外毒素。

在本发明优选的实施方案中, 编码增强或增加胸苷激酶生物学活性的蛋白质的一个或多个基因可以包含在本文所述的载体中, 并可以由所述载体表达。例如, 在本发明的一个实施方案中, 除了编码胸苷激酶(野生型或以上所述的胸苷激酶突变体)外, 编码 DNA 聚合酶(如, 疱疹 DNA 聚合酶)和/或鸟苷酸激酶(Konrad, 生化杂志 267(36):25652-25655,1992; Miller 和 Miller, 生化杂志 255(15):7204-7207, 1980)的核酸分子从一个或几个分开的启动子(如, 从多个内核糖体结合位点)表达。这类实施方案的代表性例子在实施例 7 和 9 中更详细地给出。应当理解, 尽管公开了某些编码 DNA 聚合酶或鸟苷酸激酶的核酸分子, 但本发明不受到这样的限制。事实上, 如以上所讨论的, 就胸苷激酶突变体而言, 许多种编码 DNA 聚合酶或鸟苷酸激酶活性的核酸分子(如, 截短的核酸分子或就所编码的氨基酸而言是简并的核酸分子)都被认为包括在本发明的范围内。

胸苷激酶突变体也可以在非人转基因动物(如, 小鼠、大鼠、兔、羊、狗和猪)中表达(参见, Hammer 等人, 美国自然科学研究汇刊 82:4438-4442,1985),Palmiter 和 Brinster(细胞 41:343-345,1985)和美国专利 4,736,866)。简单地说, 将表达单位(包括待表达的核酸分子以及邻近位置的表达控制序列)引入到(例如, 经微注射)受精卵的前核中。注射的 DNA 的整

合经组织样品的 DNA 印迹分析检测。引入的 DNA 整合进动物的种系以便其遗传给动物的子代是优选的。可经使用组织特异性启动子或经使用可诱导启动子(例如, 允许转基因调节表达的金属硫蛋白基因启动子(Palmiter 等人,1983,同上))获得组织特异性表达。

宿主细胞

以上所述的编码本发明的胸苷激酶突变体的核酸分子(包含和/或表达这些突变体的载体)可以容易地引入到许多种宿主细胞中。这种宿主细胞的代表性例子包括植物细胞、真核细胞和原核细胞。在优选的实施方案中, 所述核酸分子引入到脊椎动物或温血动物细胞(如, 人、猕猴、奶牛、马、猪、羊、鼠或鱼细胞, 或者它们的任何杂种)中。

可以用许多种机制将所说核酸分子(或载体)引入到宿主细胞中, 所说机制包括磷酸钙介导的转染 (Wigler 等人, 细胞 14:725,1978);脂转染;基因枪 (Corxaro 和 Pearson,体细胞遗传 7:603,1981;Graham 和 Van der Eb. 病毒学 52:456,1973);电穿孔(Neumann 等人, EMBO J.1:841-845,1982);逆转录病毒、腺病毒和原生质体融合-介导的转染或 DEAE-葡聚糖介导的转染 (Ausubel 等人, (eds.), 分子生物学现行方案, John Wiley 和 Sons 公司, 纽约,1987)。

抗体的制备

按照本文公开的内容可以容易地制备本文所述的胸苷激酶突变体或鸟苷酸激酶蛋白质的抗体。在本发明的内容中, 抗体被理解为包括单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段(如, Fab 和 F(ab)₂ 以及其可用多种重组方法产生的部分)。如果其以大于或等于 10⁷M 的 K_a 结合, 则该抗体被认为是抗胸苷激酶反应性的。可以开发出不仅结合到配体(如胸苷激酶突变体)上, 而且阻断或抑制所说突变体生物学活性的抗体, 这一点是本领域普通技术人员所能理解的。

简单地说, 本领域普通技术人员可以容易地从多种温血动物(如, 马、奶牛、多种家禽、兔、小鼠或大鼠)产生多克隆抗体。简单地说, 经腹膜内、肌肉内、眼睛内或皮下注射胸苷激酶突变体(在抗-鸟苷酸激酶抗体是所需的时为鸟苷酸激酶)和佐剂(如 Freund's 完全或不完全佐剂)免疫动物。在几次加强免疫后, 收集血清样品, 并试验对胸苷激酶突变体的反应性。特别优选

的多克隆抗血清在这些试验的一个中会给出一个至少大于基底三倍的信号。一旦有关胸苷激酶突变体或鸟苷酸激酶的动物的滴度达到高原值时，就可以容易地经每周取血或经给动物放血获得大量的抗血清。

也可以用常规的技术容易地产生单克隆抗体(参见美国专利 RE32011、4902614、4545439 和 4411993, 它们一并在本文中作为参考; 也参见单克隆抗体杂交瘤: 生物分析的新范围, Plenum Press, Kennett, McKearn, 和 Bechtol (编辑), 1980, 和抗体: 实验室手册, Harlow 和 Lane (编辑) 和冷泉港实验室出版社, 1988, 它们也一并在本文中作为参考)。

简单地说, 在本发明的有关实施方案中, 用如上所述的胸苷激酶突变体或鸟苷酸激酶注射受试动物。所述胸苷激酶突变体或鸟苷酸激酶可与佐剂(如 Freund's 完全或不完全佐剂)预混合, 以增强所产生的免疫反应。在初免后的 1 和 3 周之间, 动物可以用另一次加强免疫再免疫动物, 并用以上所述的试验方法试验对胸苷激酶突变体或鸟苷酸激酶的反应性。一旦动物具有对所说突变体反应性的高原值, 就将其宰杀, 收获含大量 B-细胞的组织(如, 脾脏和淋巴结)。

从免疫动物获得的细胞可以由用病毒(如 EB 病毒(EBV)转染无限增殖化(参见 Glasky 和 Reading, 杂交瘤 8(4):377-389, 1989)。另外, 在一个优选的实施方案中, 将所收获的脾脏和/或淋巴结细胞悬液与已知合适的骨髓瘤细胞融合, 以产生分泌单克隆抗体的"杂交瘤"。合适的骨髓瘤细胞系包括, 例如 NS-1(ATCC No.TIB 18)和 P3X63-Ag 8.653(ATCC NO. CRL 1580)。

融合后, 可将细胞置入包含合适培养基(例如, RPMI 1640 或 DMEM(Dulbecco's Modified Eagles Medium)(JRH 生物科学, Lenexa, Kansas))以及其它组份(例如胎牛血清(FBS, 即, 来源于 Hyclone, Logan, Utah, 或 JRH 生物科学的))的培养平板上。此外, 培养基应包含选择性地容许融合的脾脏和骨髓瘤细胞生长的试剂, 例如 HTA(次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷)(Sigma 化学有限公司 Louis, Missouri)。约 7 天的培养后, 可以筛选所形成的融合细胞或杂交瘤细胞, 以检测抗胸苷激酶突变体或鸟苷酸激酶反应性的抗体的存在。许多种试验(包括, 例如, 对流免疫-电泳放射免疫测

定、放射免疫沉淀法、酶联免疫吸附测定(ELISA)、斑点印迹测定、蛋白质印迹法、免疫沉淀法、抑制或竞争测定、和夹心测定)可以用于检测抗本发明的蛋白质反应性的抗体的存在(参见, 美国专利 4376110 和 4486530; 也参见抗体: 实验室手册, Harlow 和 Lane (编辑), 冷泉港实验室出版社, 1988)。在几次克隆稀释和再测定后, 可以分离到抗胸苷激酶突变体反应性的杂交瘤产生的抗体。

其它技术也可以用于构建单克隆抗体(参见 William D.Huse 等人, “免疫球蛋白全组分的大型重组文库在 λ 噬菌体中的增殖”, 科学 246:1275-1281, 12 月 1989; 也参见 L.Sastry 等人, “免疫总组分在用于单克隆催化抗体生成的大肠杆菌中的克隆: 重链可变区域特异性 cDNA 文库的构建”, 美国自然科学研究汇刊 86:5728-5732, 1989 年 8 月; 也参见 Michelle Alting-Mees 等人, “单克隆抗体表达文库: 对杂交瘤的迅速更替”, 分子生物学策略 3:1-9, 1990 年 1 月。这些参考资料描述了一个可从 Stratacyte, La Jolla, California 获得的市售系统, 该系统使得可经重组技术产生抗体)。简言之, 从 B 细胞群分离 mRNA, 并用于在 kImmunoZap(H) 和 kImmunoZap(L) 载体中产生重链和轻链免疫球蛋白 cDNA 表达文库。这些载体可被单独筛选或共表达以形成 Fab 片段或抗体(参见 Huse 等人, 同上; 也参见 Sastry 等人, 同上)。阳性噬斑可接着转化成容许从大肠杆菌高水平表达单克隆抗体的非裂解性质粒。

类似地, 也可以用重组 DNA 技术掺合编码特异性结合抗体的基因的可变区来构建抗体部分。在一个实施方案中, 用可变区核苷酸引物扩增编码杂交瘤产生的兴趣单克隆抗体的可变区的基因。这些引物可由本领域普通技术人员合成, 或者可以由商业途径购得。Stratacyte(La Jolla, Calif.) 出售小鼠和人可变区引物, 其中包括 VH_a、VH_b、VH_c、VH_d、CH1、VL 和 CL 区引物。这些引物可以用于扩增重链或轻链可变区, 这些可变区然后可分别插入到载体(例如, ImmunoZAPTMH 或 Immuno ZAPTML (Stratacyte)。然后将这些载体引入到大肠杆菌中表达。采用这些技术, 可以产生大量的包含 VH 和 VL 融合的单链蛋白质(参见, Bird 等人, 科学 242:423-426, 1988)。此外, 这些技术可用于将鼠抗体变化成人抗体, 而不改变抗体的结合特异性。

一旦获得合适的抗体,就可以用本领域普通技术人员熟知的许多技术分离或纯化它们(参见,抗体:实验室手册, Harlow 和 Lane(编辑),冷泉港实验室出版社 1988)。合适的技术包括肽或蛋白质柱层析、HPLC 或 RP-HPLC、在蛋白质 A 或蛋白质 G 上的纯化、或者这些技术的任何组合。

抗体的标记

可以用多种分子(包括,例如,荧光分子、毒素和放射性核素)标记以上所述的抗-胸苷激酶或抗-鸟苷酸激酶抗体。荧光分子的代表性例子包括荧光素、藻红蛋白、杆菌胺(rodamine)、德克萨斯红和荧光素酶。毒素的代表性例子包括蓖麻毒蛋白、红豆因、白喉毒素、霍乱毒素、gelonin、商陆抗病毒蛋白、tritin、志贺氏菌属毒素和假单胞菌属外毒素 A。放射性核素的代表性例子包括 Cu-64, Ca-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 和 Bi-212。此外,以上所述的抗体也可被标记或结合到配体结合对的一半上。代表性的例子包括亲和素-生物素和核黄素-核黄素结合蛋白质。

用以上提出的代表性标记来结合或标记以上讨论的抗-胸苷激酶或抗-鸟苷酸激酶抗体的方法可以由本领域普通技术人员容易地完成(参见, Trichothecene 抗体共轭物; 美国专利 4,744, 981; 抗体共轭物, 美国专利 5,106,951; 产荧光材料及标记技术, 美国专利 4,018,884; 用于诊断及治疗的金属/放射性核素标记蛋白质, 美国专利 4,897,255; 和改善螯合动力学的金属放射性核素螯合化合物, 美国专利 4,988,496; 也参见 Inman, 酶学方法: 34 卷, 亲和技术, 酶提纯: B 部分, Jakoby 和 Wilchek(编辑), 学术研究出版社, 纽约, p.30, 1974; 也参见 Wilchek 和 Bayer, "生物分析应用中的抗生物素蛋白-生物素复合体", 分析生物化学 171:1-32, 1988)。

药物组合物

如以上所指出的, 本发明也提供了多种药物组合物, 该组合物包含一种以上所述的胸苷激酶突变体(如, 核酸分子、载体或蛋白质)以及药学上或生理学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。一般来说, 这些载体在所使用的剂量和浓度时对受治疗者是无毒的。通常, 这些组合物需要将治疗剂与缓冲剂、抗氧化剂(如抗坏血酸)、低分子量(少于 10 个残基)多肽、蛋白质、

氨基酸、碳水化合物(包括葡萄糖、蔗糖或糊精)、螯合剂(如 EDTA、谷胱甘肽)和其它稳定剂和赋形剂组合。中性缓冲盐水或与非特异性血清白蛋白混合的盐水是非常合适的稀释剂。

此外, 本发明的药物组合物可以制备成由不同途径给药的制剂, 所说的途径包括, 例如, 关节内、颅内、真皮内、肌内、眼内、腹膜内、鞘内、静脉内、皮下或者甚至直接进入肿瘤(例如, 经定向注射)。另外, 本发明的药物组合物可置入容器内, 附带给出有关使用这些药物组合物的说明的包装材料。一般来说, 这种说明包括描述药剂浓度的明确的说明以及(在某些实施方案中)构成所说药物组合物必需的赋形剂组份或稀释剂(如, 水、盐水或 PBS)的相对量。

方 法

本发明也提供了抑制温血动物病原体的方法, 该方法包括给温血动物施用如上所述的载体(如, 表达载体、病毒载体或包含载体的病毒粒子), 以使所说病原体受到抑制。本领域技术人员会很清楚, 施用量和次数当然取决于待治疗疾病的性质和严重程度、所需的反应、病人的状况等因素。典型地, 所说组合物可以由多种方法给药, 所说的方法包括, 例如, 关节内、颅内、真皮内、肌内、眼内、腹膜内、鞘内、静脉内、皮下或者甚至直接进入肿瘤(例如, 经定向注射)。在本发明的其它实施方案中, 包含或表达编码以上所述胸苷激酶突变体的核酸分子的载体, 或者甚至核酸分子本身可以用多种可替换的方法施用, 所说方法包括, 例如, 施用与聚(L-赖氨酸)DNA 复合物结合的脱唾液酸血清类粘蛋白(ASOR)(Cristano 等人., PNAS 92122-92126,1993)、与杀灭的腺病毒连接的 DNA(Michael 等人, 生物化学杂志 268(10):6866-6869,1993; Curiel 等人, 人体基因治疗 3(2):147-154,1992)、细胞转染剂介导的引入(DMRIE-DOPE, Vical, Calif.)、直接 DNA 注射(Acsadi 等人, 自然 352:815-818, 1991)、DNA 配体(Wu 等人, 生物化学杂志 264:16985-16987,1989)、脂转染(Felgner 等人, 美国自然科学研究汇刊 84:7413-7417,1989)、脂质体(Pickering 等人, 循环系统 89(1):13-21,1994;Wang et al., PNAS 84:7851-7855,1987)、微粒轰击(Williams 等人, PNAS 88:2726-2730,1991)、逆转录转座子、运铁蛋白-DNA

复合物(Zenke)和直接单独(vile 和 Hart, 癌症研究 53:3860-3864,1993)或采用 PEG-核酸复合物运送编码酶本身的核酸。

本发明的一个方面提供了抑制温血动物肿瘤或癌症的方法, 该方法包括给温血动物施用如上所述的一种载体(或编码本发明的胸苷激酶突变体或鸟苷酸激酶的核酸分子), 以使所说的肿瘤或癌症受到抑制。在另一实施方案中, 这些方法还包括施用核苷类似物的步骤。这些核苷类似物的代表性例子包括 ganciclovir、无环鸟苷、三氟胸苷、1-[2-脱氧, 2-氟, (-D-阿糖呋喃基)-5-碘尿嘧啶、ara-A、araT 1-(-D-阿糖呋喃氧基胸腺嘧啶、5-乙基-2'-脱氧尿苷、5-碘代-5'-氨基-2,5'-二脱氧尿苷、碘苷、AZT、AIU(5-碘-5'-氨基-2',5'-二脱氧尿苷)、二脱氧胞苷和 AraC。简言之, 采用这些方法可以治疗多种肿瘤(早期的和恶性的)。这些肿瘤的代表性例子包括实体肿瘤, 例如, 肺癌、肾细胞癌、乳腺癌、结肠癌和黑素瘤, 以及弥散性癌(如, 白血病和淋巴瘤)。

本发明另一方面提供了用以上所述的核酸分子或载体治疗多种其中一组细胞以病态或改变为特征的疾病的方法。这些疾病的代表性例子包括表皮角化病(牛皮癣)、前列腺肥大、甲状腺机能亢进、多种内分泌病、自体免疫疾病(由象 T 细胞某些亚类之类的自体免疫反应性细胞引起)、变态反应病(如, 通过调节对变态反应起决定作用的 IgE 表达细胞的活性)、再狭窄(如,

经杀灭在血管向内生长和/或堵塞中起决定作用的细胞)、多种病毒病(如, AIDS(HIV)、肝炎(HCV 或 HBV)和胞内寄生性疾病。本发明的其它实施方案提供了抑制按惯例不与疾病相关的细胞生长或杀灭该细胞的方法。例如, 在某些实施方案中, 施用抑制或消除脂肪细胞的载体(或单独的核酸分子)以使动物重量减轻, 或者消除毛发囊泡(作脱毛发剂)。

本发明的其它方面提供了在原核细胞、真核细胞、植物(Czako and Morton, Plant physiol. 104:1067-1071,1994)、寄生虫(例如, 锥虫)或病毒中将以上所述的胸苷激酶突变体用作阴性-选择标记基因(参见, 例如, Czako and Narton, Plant Physiol. 104:1067-1071,1994)的方法。此外, 这些突变体可以用作同源重组的条件致死标志(Mansour et al., Nature 336:348-352,1988)。代表性的例子在以下实施例 6 中更详细地给出。

下列实施例以说明的方式而不是限制的方式给出。

实 施 例

实 施 例 1

用 20%随机文库构建包含 165-175 位密码子突变的 TK 突变体

实施例 1 描述了用 20%随机文库构建包含 165-175 位密码子突变的 TK 突变体。图 1 中给出了描述这一实施例中采用的策略的图解性概要。

A. TK 突变体的产生

1. 寡核苷酸的产生

用操纵子技术(Operon Technologies)(San Pablo, CA)合成具有野生型 tk 序列的 52 链节寡核苷酸(SEQ. ID NO. No.2)和包含 tk 基因(SEQ. ID NO. No.1-注, SEQ. ID NO. No.1 仅列出 HSVTK-1 开放读框中的核苷酸)165-175 位密码子简并核苷酸的 56 链节寡核苷酸(SEQ. ID NO. No.3)(其中 N= 在各位置上 80%野生型核苷酸和 20%其它三种的混合物。两种寡聚物沿 3'-末端 12 个碱基相互互补。

5'-TG GGA GCT CAC ATG CCC CGC CCC CGG CCC TCA CCC TCA TCT TCG
ATC GCC AT-3' (SEQ ID No. 2)

5'-ATG AGG TAC CGN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN
NNA TGG CGA TCG AA-3' (SEQ ID No. 3)

为构建以下描述的 pKTPD, 用磷酸胺化学由操纵子技术合成两个附加

的寡核苷酸。 这些寡核苷酸是: 5'-CCC CTC GAG CGC GGT AC-3' (SEQ ID No. 4)
5'-CGC GCT CGA GGG GAG CT-3' (SEQ ID No. 5)

2. 包含随机序列的文库的产生

1). 载体 pMDC 和 pMCC 的构建

基本上按以下的描述从质粒 pHETK1 和 pHETK2 产生嵌合载体 pMDC(产生失活的 TK 基因产物)和 pMCC(产生野生型 TK)。简言之, 质粒 pHETK1 和 pHETK2(Waldman et al., J. Biol. Chem. 258:11571-11575,1983)是包含 HSV-1tk 结构基因的表达载体, 并且是 pBR322 的衍生物。在 Waldman et al., J. Biol. Chem. 258:11571-11575,1983(描述了这些质粒的构建)中可以发现 pHETK1 和 pHETK2 的限制图。质粒 pHETK2 含有(PL 和(PR 启动子、ampR 和 c1 857 温度敏感性阻抑物, 而质粒 pHETK1 含有除了(PL 启动子外的所有上述那些。质粒 pHETK1 和 pHETK2 从 Dr. William Summers(School of Medicine, Yale University, New Haven)获得。

为构建 pMDC 和 pMCC, 首先按 Dube 等在 Biochem. 30:11760-11767,1991 中描述的方法构建一个沉默(dummy)载体(指定为 pKTPD)。简言之, 首先将寡核苷酸 SEQ. ID No.4 和 5(各 25pmol)磷酸化, 然后退火形成具有 KpnI 和 SstI-匹配末端并具有内 XhoI 位点的双链寡核苷酸。此外, 用 SstI 和 KpnI 限制性内切核酸酶消化 pHETK2,经琼脂糖凝胶电泳和后续电洗脱分离大片段, 将 2pmol 大片段与 6pmol 双链寡核苷酸连接。将所形成的双链环状 DNA 产物(指定为 pKTPD)用于转化感受态大肠杆菌 KY895, 大肠杆菌 KY895 是从 Summers, Yale University, new Haven, CT 获得的 TK-缺陷菌株(K12 tdk-,F-,ilv276)。将包含重组质粒 pKTPD 的克隆在含 50(g/ml 羧苄青霉素的 LB 平板上生长。经在 XhoI 位点切割证实重组质粒 DNA 的存在。在胸苷激酶选择培养基中 pKTPD 不能支持大肠杆菌 KY895 的生长表明它没有产生功能性胸苷激酶。

将 pHETK1 和 pKTPD 用于构建一个新的嵌合沉默载体(指定为 pMDC)。简言之, 经用 SphI 和 pvuII 消化, pHETK1 被切成两个片段。较大片段含有 ampR、c1857、(PR 序列和跨越从 BamHI 到 SphI 位点的 tk 基因部分。较小片段含有 tk 基因从 SphI 到 PvuII 的剩余部分。类似地,

经用两种相同的酶消化, pKTPD 被切成一个较大的片段和一个较小的片段。pKTPD 的 SphI/PvuII 片段在 tk 基因的 KpnI 和 SacI 位点内含有沉默或失活序列。将 pHETK1 的较大片段与 pKTPD 的较小片段连接产生嵌合载体(pMDC), 该载体产生失活的 tk 基因产物。

经将 pHETK1 的较大片段与将 pHETK2 的较小片段连接类似地构建另一含有野生型 tk 基因的嵌合载体(pMCC)。如以上所指出的, pMCC 产生活性野生型 TK。

2) 文库的产生

按以下所述构建包含 20%随机核苷酸序列的文库。简言之, 将包含野生型序列的 52-链节寡核苷酸(SEQ. ID No.2)杂交到包含跨越 165-175 位密码子的简并序列的 56-链节寡核苷酸(SEQ. ID No.3)上。

用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的克列诺片段延伸杂交体以产生完整的双链 DNA 产物。策略是互补以避免合成包含 SEQ. ID No.3 的长的随机核苷酸序列, 因为载体中 KpnI 和 SacI 位点(插入位点)位置需要长的弹夹。用两种合成引物对克列诺片段产生的双链 DNA 进行聚合酶链反应扩增: 第一引物, a: 相应于寡核苷酸 SEQ. ID No.2 的 5'末端的 21-碱基序列的 5'-TGG GAG CTC ACA TGC CCC GCC-3'(SEQ. ID No.6)。b: 相应于寡核苷酸 SEQ. ID No.3 的 5'末端的 11-碱基序列的 5'-ATG AGG TAC CG-3'(SEQ. ID No.7)。所述聚合酶链反应扩增反应在 100 μ l 终反应体积中含有 20mM tris-HCl(pH 8.3)、25mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.05% Tween20、0.1mg/ml BSA、四种脱氧寡核苷酸三磷酸盐各 50 μ M、20pmol 引物"a"、40pmol 引物"b"、约 1pmol 作为模板的延伸的双链寡核苷酸和 2 单位 Taq 聚合酶(Cetus)。各混合物用矿物油覆盖并进行 30 圈温度循环: 94 $^{\circ}$ C 1 分钟、34 $^{\circ}$ C 2 分钟和 72 $^{\circ}$ C 7 分钟。

用 Centricon 30 超滤单位经离心从聚合酶链反应产物中除去低分子量组份和过量引物, 并用 KpnI 和 SacI 消化扩增的 DNA。再用 Centricon 30 单位纯化包含随机序列的双链寡核苷酸, 在 10 μ l 体积中有 1mM ATP 和 1 单位 T4 DNA 连接酶(BRL)存在时以 10: 1 摩尔比率连接到 pMDC 的 KpnI/SacI 消化的大片段上。于 14 $^{\circ}$ C 培养 18 小时, 用苯酚-氯仿提取接着用乙醇沉淀终止反应。

3) TK 突变体的选择

将上述沉淀干燥并溶解到 10(l 水中, 用于经电穿孔转化感受态大肠杆菌 KY895。将 1(l 连接产物与 50(l 感受态细胞混合, 用 Gene-pulser 电穿孔器(Bio-Rad)在 2KV、25(FH 400 Ohms 下电穿孔。脉冲后, 加入 1ml SOC 介质(2% Bacto-胰化蛋白胨、0.5% Bacto 酵母膏、10mM NaCl 2.5mM KCl 10mM MgCl₂、10mM MgSO₄ 和 20mM 葡萄糖)。接着于 37 °C 伴随连续搅拌培养 1.5 小时。将各转化溶液的一小份喷射到含 50(g/ml 羧苄青霉素的 LB-琼脂培养基上, 以测定转化体的总数量。在含有 50(g/ml 羧苄青霉素、10(g/ml 5'氟脱氧尿苷、2(g/ml 胸苷、20(g/ml 尿苷、2%BBL 蛋白胨、0.5%NaCl、0.2%葡萄糖和 0.8% Gel-Rite(Scott Laboratories, Inc., Carson, CA)的 TK 选择培养基上进行活性 TK 克隆的选择(图 1)。于 37 °C 在羧苄青霉素培养基上培养菌落 14-16 小时, 而于 37 °C 在培养的 TK 选择培养基上培养 24 小时。

生长在羧苄青霉素培养基上的总共 53000 个转化体中, 190 个能补充大肠杆菌 KY895TK 功能。

实 施 例 2

用 100%随机文库构建包含 165-175 位密码子突变的 TK 突变体

实施例 2 描述了用 100%随机文库构建包含 165-175 位密码子突变的 TK 突变体。这一实施例所采用的策略类似以上实施例 1 描述的。

A. TK 突变体的产生

1. 寡核苷酸的产生

用操纵子技术(Operon Technologies)(San Pablo, CA)合成具有野生型 tk 序列和 5'末端 KpnI 位点的 52-聚体 5'-d(TG GGA GCT CAC ATG CCC CGC CCC CGG CCC TCA CCC TCA TCT TCG ATC GCC AT)-3'(SEQ. ID No.8)。此外, 也合成包含相应于 HSV-1 tk 165-175 位密码子随机核苷酸和包含 3'末端 SacI 位点的 56 聚体 5'-d(ATG AGG TAC CGN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNA TGG CGA TCG AA)-3'(SEQ. ID No.3), 其中 N=G、A、T 或 C 的等摩尔浓度。通过经 20%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离寡核苷酸, 接着在反相小柱 9Glen Research, Sterling, VA)上纯化。

2. 包含 100%随机序列的文库的产生

将相应于野生型 HSV-1tk 序列的 52-聚体与包含随机核苷酸的 56-链节杂交。然后，基本上按以上实施例 1 的描述用 DNA 聚合酶 I 的克列诺片段延伸杂交体、PCR 扩增和连接到 pMDC 上。

3. TK⁺ 突变体的选择

基本上按以下所述基于其磷酸化 dT 的能力经 TK 选择培养基上菌落形成识别功能性 TK 突变体。简言之，将连接产物引入到 tk⁻ 大肠杆菌菌株 KY895 中。通过在每毫升含 50 微克羧苄青霉素的 LB 琼脂上平板接种测定转化体的总数量，通过在 TK 选择培养基[2%BBL 蛋白胨、0.5%NaCl、0.2%葡萄糖和 0.8% Gel-Rite(Scott Laboratories, Carson, CA)、50(g/ml 羧苄青霉素、10(g/ml 氟脱氧尿苷、2(g/ml dT、20(g/ml 尿苷]上平板接种测定产生酶促活性胸苷激酶的转化体的数量。

从 100%随机文库筛选出 2 百万个转化体，其中 1540 个在 TK 选择培养基上形成菌落。

B. AZT-敏感突变体的选择

将 100%随机文库(TKI)的 690 个突变体和 20%简并文库(TKF)的 190 个突变体的亚类在含 AZT 的培养基上进行第二次阴性选择，以识别表现出增强的 AZT 磷酸化作用的突变体。这一筛选是基于假定具有与 dT 相关的增强的磷酸化 AZT 能力的突变体能在 AZT-选择培养基上形成菌落。特别是，产物 AZT 单磷酸盐会进一步被宿主细胞非特异性核苷酸激酶或可能被突变体 TK 磷酸化，经宿主 DNA 聚合酶掺入到细菌 DNA 中，终止 DNA 合成，从而阻止宿主染色体复制。

简言之，首先使 TK 突变体以单个菌落在 TK-选择培养基(1.0(g/ml dT)上生长，然后复制铺板到 AZT-选择培养基(0.05(g/ml AZT, 1.0(g/ml dT)上。AZT-选择培养基中的所有其它组份与 TK-选择培养基中的相同。选择那些在 AZT-选择培养基上不生长的 TK 突变体再试验分别在 TK-和 AZT-选择培养基上的生长。

在筛选的 880 个初步选择体中，仅两个突变体(TKF105(从 20%文库)和 TKI208(从 100%文库))以类似于包含有野生型质粒的大肠杆菌的效率在 TK-选择培养基上形成菌落而不在 AZT-选择培养基上形成菌落(图 2)。

图 3 给出了 TKF105 和 TKI208 的核苷酸和推定的氨基酸序列。两种氨基酸在相同的位置含有单个氨基酸取代: Leu-170 变成 Ile(TKF105)和 Val(TKI208)。在周围 220 个核苷酸中未观察到其它取代。

为了确保 TKF105 和 TKI208 之间的不同不是由于包含突变体和野生型质粒的大肠杆菌中 TK 的差异表达,比较了包含 TKI208 或野生型质粒细胞抽提物的蛋白质印迹。在免疫反应性染色蛋白质的数量或电泳迁移率上未观察到明显不同。也测定了每毫克蛋白质磷酸化率,发现类似于包含 TKI208、TKF105 和野生型质粒的大肠杆菌抽提物。

为了说明两种突变体在 AZT-选择培养基上不生长是由于 AZT 增强的磷酸化,进行了下列试验。

1).[3H]AZT 摄入率

首先测定了包含野生型和突变体质粒的大肠杆菌的相对于[3H]dT 的 [3H]AZT 摄入率。研究表明,与具有野生型质粒的大肠杆菌相比,包含 AZT 敏感突变体、TKF105 和 TKI208 的大肠杆菌表现出 AZT 对 dT 摄入比率增加 4 倍。

2).TK 的亲纯化

通过连接到 p-氨基苯基胸苷 3'-磷酸盐上的 CH-琼脂糖凝胶 4B(Pharmacia)上的亲和层析进行野生型和突变体 TK 的纯化。然后柱子依次用缓冲液 A[0.1M TrisHCl,pH7.5/5mM 二硫苏糖醇(DTT)/10%甘油]、缓冲液 B(0.1M TrisHCl,pH7.5/0.5M KCl/5mM DTT/10%甘油)和缓冲液 A 各 30 毫升洗脱。用 60 毫升缓冲液 C(0.3M TrisHCl,pH7.4/50mM KCl/10%甘油)中的 0-600(M dT 线性梯度液洗脱 TK。收集活性组份并对 2 升 50mM TrisHCl,pH7.4/5mM DTT/10%甘油透析 3 次,除最终透析外,所有上述缓冲液均包含 50(g/ml 抑蛋白酶肽以及抑胃酶肽和亮抑蛋白酶肽各 2(g/ml)。

3).AZT 磷酸化动力学

其次测定了由两种突变体引起的 AZT 磷酸化的动力学。简言之,在含有 50mM TrisHCl、5mM ATP、4mMMgCl₂、2.5mM DTT、12mM KCl、0.18mg/ml 牛血清白蛋白、5%甘油、0.08(Ci[3H]AZT(Sigma)、各种浓度的未标记的 AZT(0-4.0(M)和纯化酶(对野生型和 TKI208 分别为 4 和

1.2 单位, 酶的 1 单位定义为在以上描述的条件下 1 分钟能磷酸化 1.0pmol dT 成 TMP 的量)的 100 微升终体积中进行反应。在 34 °C (1 °C 下 10 分钟, 加入 1.0mM 未标记的 dT 和在冰上冷却终止反应。将一半反应混合物移取到 DEAE-纤维素盘(25 毫米)上, 浸入蒸馏水中, 接着用无水乙醇洗涤 4 次。经闪烁光谱法测定吸附到盘上的放射活性的量。用 Cleland SUBIN 方案 (Cleland, Methods Enz. 63:103-138, 1979) 测定 K_m 和 V_{max} 值。用等式 $V_{max} = K_{cat}[E]_0$ 计算 K_{cat} 值, 其中 $[E]_0$ = 总酶浓度。用 0.3(Ci([3H-甲基]dT:87Ci/mmol:Amersham)、各种浓度的未标记 dT(0-4.0(M)以及 1.1(对野生型)和 0.5(对 TKI208)单位的 TK 在 50 微升终体积中进行测定 dT 磷酸化的 TK 试验。反应混合物中的所有其它组份和培养条件如以上 AZT 磷酸化中所描述的。

如以下表 1 所示, 与野生型(8.5(M)相比, AZT-敏感变体 TKI208 表现出较低的 K_m (4.4(M)。通过比较两种底物(AZT 对 dT)增加的 K_{cat}/K_m 可以看出, TKI208 选择性磷酸化 AZT 的效率较 dT 高出 2.3 倍。用纯化的 TKF 105 TK 进行的类似的初步试验也表明 AZT 较低的 K_m (3.7(M), 但与野生型比较有类似的 K_{cat}/K_m 值。

表 1

野生型和 TKI208 磷酸化 AZT 和 dT 的能力

磷酸化	$K_m, \mu M$	k_{cat}, s^{-1}	k_{cat}/K_m s^{-1}, M^{-1}	$k_{cat}/K_m(AZT)$ $k_{cat}/K_m(dT)$
AZT				
野生型	8.46 ± 1.3	3.6×10^{-2}	4.2×10^3	1.7×10^{-3}
TKI 208	$4.40 \pm 0.43^*$	3.0×10^{-2}	6.5×10^3	4.0×10^{-3}
dT				
野生型	0.475 ± 0.10	1.21	2.5×10^6	
TKI 208	0.35 ± 0.008	0.56	1.57×10^6	

C. 突变体 TK 的热稳定性分析

基本上按以下所述分析突变体的热稳定性。简言之, 将 25 微克各提取物在包含 0.28(g/ml 牛血清白蛋白、50(g/ml 抑蛋白酶肽、2(g/ml 抑胃酶肽和 2(g/ml 亮抑蛋白酶肽的 0.3 毫升 28mM Tris-HCl(pH7.5)中于 42 °C 预培

养 0.5、10、20、30 或 40 分钟。在各时间点包含 50mM Tris-HCl(pH7.5)、5mM ATP、4mM MgCl₂、2.5mM DTT、12mM KCl、0.18mg/ml 牛血清白蛋白、5% 甘油和 1(M[3H-甲基]dT(60 × 103dpm/pmol)的总反应体积中试验 30 微升(2.5 微克)样品的残余 TK 活性。于 34 °C 培养 10 分钟。在冰上冷却终止反应。将 25 微升移取到 DEAE-纤维素盘上。盘的洗涤和试验条件如以上 AZT 试验所述的。

TKF2、TKF56、TKF75、TKF446 和野生型 TK 的未分级处理的试验结果示于图 4A-4D 中。一种突变体(TKF2)在 42 °C 比其它任何突变体或比野生型对热更稳定。除了 TKF2 外,所有试验的突变体(包括野生型)在与 34 °C 比较于 42 °C 预培养时具有 0.05-0.30 的残余活性比率: TKF2 具有 0.7 的比率。TKF2 包含三个氨基酸取代: Pro-165*His,Ala-167*Ser 和 Ala-174*Val(图 3)。TKF75 包含一个 Ala-167*Ser 取代,TKF56 包含一个 Ala-174*Val 取代,TKI440 包含一个 Pro-165*Ala 取代。具有 Ala-174*Val 和 Ala-167*Ser 取代的突变体 TKF56 和 TKF75 的热稳定性分别类似于野生型。在于 42 °C 培养 5 分钟后,两者均丧失 80% 以上的活性。具有 Pro-165*Ala 的 TKF440 更稳定,但不如 TKF2(三重突变体)稳定。进行了两种类型的试验证实 TKF2 的热稳定性。首先,将来源于包含 TKF2 和野生型质粒的大肠杆菌的 TK 蛋白质用亲和层析纯化至接近均质,并按以上的方法试验。与前述相同,在于 42 °C 预培养后,TKF2 的活性损失少于野生型(图 4E)。

其次,将 TKF2 和野生型 TK 的 tk 基因转移进具有 T3 RNA 聚合酶启动子的载体中。更具体地说,分离野生型和 TKF2 质粒的 tk 基因的全长 Bgl II-Pvu I 片段,并采用合成接头在 Spe I 和 Eco RI 位点之间亚克隆进 pBluescript SK((Stratagene)载体。用 Promega 转录系统进行采用 T3 启动子的转录。用网质红细胞裂解物系统(Promega)按供应者的方案进行体外翻译。野生型和 TKF2tk 基因的体外合成蛋白质的 TK 活性损失为 42 °C 预培养的函数示于图 5 中。在预培养 45 分钟后,由 TKF2 编码的蛋白质其活性损失小于 10%。相反,由野生型基因编码的蛋白质其初始活性损失大于 80%。体外合成的 TKF2 表现出的热稳定性的程度类似于或高于基因原始 TKF2 质粒的粗提物。为进行 SDS/PAGE 分析,用[35S]蛋氨酸标记翻译产

物。

SDS/PAGE 分析后的标记产物的放射自显影示于图 6 中。箭头表示按分子量标准(Bio-rad)判断的翻译的 TK 的大小。从这一放射自显影可以清楚看出, 翻译产物以双带迁移, 其中一个相当于 43kDa(与大肠杆菌表达的 HSV-1 TK 的报道的大小一致), 第二条带可能是由于氨基末端的 32-残基片段的蛋白酶降解, 它以不可检测的水平改变 HSV-1 TK 的 TK 活性。

实 施 例 3

用 20%随机文库构建和分析具有 155 和 161-165 位密码子突变的 TK 突变体

这一实施例描述了在 155 和 161-165 位密码子突变的 TK 突变体的构建和分析。以下给出这一实施例中使用的细菌菌株和材料。

细菌菌株 将最初由 Igarashi 等(Genetics 57:643-654,1967)描述的大肠杆菌菌株 KY895 用于胸苷激酶活性的遗传互补试验中。在所有亚克隆试验中大肠杆菌菌株 NM522(F' lacI^q (lacZ)M15 proAB/supE thi (lac proAB)((hsdMS-mcrB)5(rk-McrB-)) (NEB,Beverly,MA)用作受体。辅助噬菌体 VCM13(Stratagene,La Jolla,CA)用于产生用来测序的单链噬菌体。

材料 用于蛋白质合成测定的 L-[³⁵S]蛋氨酸/半胱氨酸(特异活性, 1140 Ci/mmol)和[甲基-³H]胸苷(特异活性, 87 Ci/mmol)从 Amersham 购得。其它放射性同位素[[侧链-2-³H]无环鸟苷(特异活性, 28.6 Ci/mmol)和[5-³H]-脱氧胞苷(特异活性, 29 Ci/mmol)从 Du Pont-New England Nuclear(Boston,MA)购得, ganciclovir(特异活性, 22 Ci/mmol)和[甲基-³H]-3'-叠氮-3'-脱氧胸苷(特异活性, 14 Ci/mmol)从 Moravsek(Brea,CA)购得。限制性内切核酸酶和 T4 连接酶从 New England Biolabs(NEB)购得, Promega(Madison,WI)是转录和翻译试剂的来源(除了帽类似物 ⁷m(5')Gppp(5')G 从 NEB 购得外)。用于测序和聚合酶链反应扩增的寡核苷酸从 Operon(Alameda,CA)购得。除了指明的外, 其它化学品从 Sigma(St. Louis, MO)购得。

A. TK 突变体的产生

1. 寡核苷酸的产生

由 American Synthesis,Inc. (Pleasanton, CA)合成两种寡核苷酸:

(Pleasanton,CA) :MB110 (70 聚体) 5'-TGGGAGCTCA
CATGCCCCGCCC [CCG] GCCCT CACCCTCATC [TTCGACCG
CC ATCCC] ATCGCCGCCCTCCTG - 3' (SEQ ID No.9), 和 MB111
(38 聚体) 5' - ATGAGGTACCGCGCAGCTGG GTAGCACAGG
AGGGCGGC - 3' (SEQ ID No.10)。在这些寡核苷酸中, 括号中合成的
核苷酸 80% 为野生型核苷酸, 20% 为其它三种核苷酸。

MB110 的 5' 末端是 SacI 限制位点, MB111 的 5' 末端是 KpnI 限制位
点。这些限制位点在发生第二链合成后的后面的步骤中使用。而且, 作为
内控, 在 MB111 中引入 PvuII 位点, 以便在测序前证实随机序列的插入。
各寡核苷酸的 3' 末端的 12 个核苷酸互补, 使得两条链可相互杂交。将各寡
核苷酸在 20% 丙烯酰胺-脲凝胶上电泳, 在 PEI-纤维素 TCL 板
(Baker,Phillipsburg,NJ)上经 UV 显影观察, 切下包含合适大小寡核苷酸的
凝胶部分, 在 0.5M 乙酸铵/10 mM 乙酸镁中于 37 °C 过夜从凝胶洗脱寡核
苷酸。然后洗脱的寡核苷酸用乙醇沉淀, 并再悬浮到水中, 进行 OD260 测
定, 各寡核苷酸的消光系数用于确定浓度。

将等摩尔量的 MB110 和 MB111(25pmol)在小体积(20 微升)1 × 退火缓
冲液(10 × 退火缓冲液=70mM Tris(pH7.5)/60mM MgCl₂ /200mM NaCl)
中于 95 °C 退火 5 分钟, 然后于 65 °C 退火 20 分钟, 接着缓慢冷却至室温。
向退火的寡核苷酸(20 微升)中加入 2 微升 10 × 退火缓冲液、 2.8 微升
10mM dNTPs、 0.8 微升 0.1M 的二硫苏糖醇(DTT)、 2.4 微升 DNA 聚合
酶 I 克列诺片段(5 单位/微升)和水, 使体积达到 40 微升。混合物置于 37 °C
下 30 分钟, 65 °C 10 分钟, 最后置于室温下 10 分钟。通过将样品进行变
性丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影完成全延伸放射活性寡核苷酸的证实。
用 Taq 聚合酶(Stratagene)经聚合酶链反应进行延伸产物的扩增。 100uL
反应物包含 20mM Tris(pH8.3)/20mM KCl/1.5mM MgCl₂
/0.05%Tween20/0.1mg/mlBSA/ 四种脱氧核苷酸三磷酸盐(dNTPs)各
50(M/22pmol PCR 引物 1/20pmol PCR 引物 2/2 单位 Taq 聚合酶和 6pmol
延伸的随机寡核苷酸; 引物 1=5'- TGGGAGCTCACATGCC CCGCC-
3'(SEQ. ID No.6), 引物 2=5'-ATGAGGTACCG-3'(SEQ. ID No.7)。向试管
中加入 1 滴矿物油, 然后置入 Perkins Elmer-Cetus 热循环器中, 设定 90

℃ 1 分钟, 34 ℃ 2 分钟的 30 个循环。30 个循环结束后, 将反应物置于 72 ℃ 7 分钟, 然后将循环器保持在 4 ℃。在用 2% 琼脂糖凝胶电泳证实扩增后, 收集含产物的反应物, 沉淀, 并用 KpnI 和 SacI 消化。从非变性聚丙烯酰胺凝胶上的单切或未切片段辨别双限制片段, 按以上所述切下合适的片段并分离。

2. 包含随机序列文库的产生

用 KpnI 和 SacI 限制性内切核酸酶消化氯化铯梯度纯化的 pMDC("沉默"载体)(按以上实施例 1 所述构建), 并用 GenClean II(Bio101, La Jolla, CA) 从 1% 琼脂糖/1 × TBE 凝胶进行凝胶分离。用 1 单位的 T4 DNA 连接酶于 16 ℃ 过夜连接这一载体与凝胶分离的 PCR-扩增随机片段。

3. TK 突变体的选择

然后, 将连接混合物用于经电穿孔(Biorad gene Pulser, 2kV, 25(F, 400)) 转化 KY895。简言之, 按照 BioRad(Richmond, CA)提供的方案制备用于电穿孔的细胞, 在各次脉冲后, 将 1 毫升 SOC(2% Bacto-胰化蛋白胨、0.5% Bacto 酵母膏、10mM NaCl 2.5mM KCl 10mM MgCl₂、10mM MgSO₄ 和 20mM 葡萄糖)加入到小池中, 将电穿孔混合物转移到 25 毫升折反帽(snap-cap)Falcon 管中。在将管于 37 ℃ 振荡 1 小时后, 将细胞平板接种到含有羧苄青霉素(50 微克/毫升)的 LB 平板[每升: 10 克胰化蛋白胨/5 克酵母膏/10 克氯化钠(pH7)]("LB+carb⁵⁰板")上, 于 37 ℃ 培养过夜。计数菌落的数量, 用牙签挑取接种到 TK 选择培养基[2%BBL Trypticase 蛋白胨(Becton Dickenson, Cockeysville, MD) / 0.5%NaCl / 0.8% Gel-Rite(Scott Laboratories, Carson, CA) / 0.2%葡萄糖 / 50(g/ml 羧苄青霉素 / 10(g/ml 5'-氟脱氧尿苷 / 2(g/ml 胸苷 / 12.5(g/ml 尿苷)]上。这一选择的基础是 5'-氟脱氧尿苷(FUdR)被胸苷激酶磷酸化形成 FdUMP(一种从头途径酶胸苷合成酶的抑制剂)。然后对 dTMP 的需要可以仅通过活性胸苷激酶完成。补充尿苷来抑制胸苷磷酸化酶。16-24 小时后, 对 TK 选择平板进行生长评分, 挑出所有阳性的, 再接种到 TK 选择平板和 LB+carb⁵⁰板上证实表型。

对约 260 个随机转化体就在 TK 选择培养基上补充 KY895(一种 TK-缺陷大肠杆菌)的能力进行筛选。其中, 82 个评分为阳性并被测序。因此, 所有转化体的约 32% 编码功能性酶。

B. 突变体分析

按下述分离和测序 TK 突变体。简言之，由于质粒的低拷贝数，除了每次分析使用 3 毫升培养液外，按制造者的说明用 Promega Magic 小量制备试剂盒从在 $2 \times \text{YT}$ (每升: 16 克胰化蛋白胨/10 克酵母膏/5 克氯化钠)+carb⁵⁰ 中过夜生长的培养物中分离突变体 DNA。将 10 微升各 dsDNA 用碱变性，沉淀，并再悬浮到测序酶反应缓冲液、水和测序引物(5'-CATGCCTTATGCCGTGA-3')(SEQ. ID No.11)中。然后将引物退火，按制造者的说明(USB ,Cleveland,OH)用测序酶对 DNA 进行双脱氧测序(Sanger et al.,1977)。

11 个克隆编码野生型氨基酸序列(13.4%)， 7 个包含野生型核苷酸序列。具有野生型氨基酸残基的 3 个克隆包含单个核苷酸变化， 1 个包含 3 个核苷酸变化。如以下表 IA 所示，识别了包含单个氨基酸变化的总共 49 个 TK 阳性克隆(59.8%)。识别了双氨基酸突变的 19 个(23.2%)，三个氨基酸突变的 2 个(2.4%)和四个氨基酸变化的 1 个克隆(1.2%)。在表 IA 中，突变的野生型 HSV-1 TK 氨基酸用粗体给出，带有残基数和主要序列中发现的残基类型[O=疏水的； I=亲水的； (+)=带阳电荷的； (-)=带阴电荷的残基]。野生型残基的下面是发现的特定氨基酸取代的次数的数量。底部列出了发现的各种类型残基的百分比。

具有多个改变的克隆的氨基酸序列示于表 IB 中。表的上部表示了 HSV-1 TK 多肽中的野生型氨基酸和其位置。各自的栏目中显示了双、三和四氨基酸取代。如果一组突变被识别一次以上，则发生的数量在左边的括号中注明。

表 IA

野生型序列	O P 155	O F 161	(-) I D 162	(+) I R 163	(+) I H 164	O P 165
在各位置取代	3L 2A 2T 1Q	4I 4Y 3C 2L	5E 1G	5C 1S	3N 1T	3L 2T 2S 1N

	1R	1S				1A
取代类型	11%(+) 33%I 56%O	57%I 43%O	83%(-I) 17%I	100%I	100%I	10%(+) 50%I 40%O

表 IB

改变的数量	P 155	F 161	D 162	R 163	H 164	P 165
双	A	V				
	Q	I				
	Q		E			
	R		E			
(4)	R		G			
	T		E			
(2)		I		H		
		I				R
		N				S
			Y			
			N		K	
(2)			E		N	
				P	Q	
					Q	L
	Q		E			L
三	A			P		T
四			N	S	N	A

C. 第二次筛选和亚克隆

在以下所述的第二次筛选中，测定了 pMCC(KY895)和 35 个对数期突变体 pMDC(KY895)培养物在无环鸟苷("ACV")或 AZT 平板上产生菌落的能力。简言之，将对数期 TK 阳性克隆培养物用 0.9%氯化钠系列稀释，散布到无环鸟苷或 AZT 平板(TK 选择平板，除了 1 微克/毫升胸苷+1 微克/毫

升无环鸟苷或 0.05 微克/毫升 AZT 外)上。突变体培养物也散布到重复的 TK 选择和 LB+carb⁵⁰ 平板上, 一组 TK 选择平板和 LB+carb⁵⁰ 平板在 42 ℃ 培养, 所有其它平板在 37 ℃ 培养。16-24 小时后评分各平板。

结果示于以下表 II 中。简言之, 仅给出了给出不同于用野生型 pMCC(KY895)观察到的结果的突变体。突变体用野生型残基和位置编号接着从核苷酸序列推导的氨基酸取代基指定, 例如, F161I 指在这一特定的突变体中在 161 位残基上异亮氨酸取代苯丙氨酸。(++)指与对照平板相比观察到相同的菌落数; (+)指与对照平板相比观察到很少(小于用 pMCC 观察到的 20%)和总的来说较小的(约 50%较小直径)菌落; (-)指未观察到菌落。

表 II

克隆	ACV	AZT	LB	37 ℃	42 ℃
pMCC(野生型)	++	++	++	++	++
P155A/F161V	++	+	++	++	++
F161I	+	+	++	++	++
F161IC	+	-	++	++	++
F161L	++	++	++	++	-
R163P/H164Q	+	+	++	++	-
F161I/R163H	++	++	++	++	+
pMDC	-	-	++	-	-

如表 II 所示, 所有培养物在对照 TK 选择和 LB+carb⁵⁰ 平板上形成菌落。与野生型比较, 几种突变体显得优先利用一种和两种核苷类似物而不是胸苷(P155A/F161V, F161I, F161C 和 R163P/H164Q)。此外, 几种突变体在 42 ℃ 在 TK 选择平板上不能形成菌落(F161L 和 R163P/H164Q), 一种在 42 ℃ 表现出形成菌落的能力严重降低(F161I/R163H)。

D. 在无细胞翻译系统中突变体酶的表达

1. 选择的突变体的亚克隆

为了研究突变体 TK 的性质, 将 8 种突变体的 1.07kbp MluI-BssHII 片段体外亚克隆进载体 pT7:HSVTKII 中。更具体地说, 用 MluI 和 BssHII 限制消化选择的克隆的 DNA 以释放出 1.07kbp 片段[McKnight 序列上核苷

酸编号(335-1400(Nucl. Acids Res. 8:5949-5964,1980;McKnight 菌株衍生自 HSV-1 的 mp 菌株, wagner, PNAS 78:1441-1445,1981)]. 用 GenCleanII 从 1% 琼脂糖凝胶分离该片段, 并连接到 pT7:HSVTKII 载体 DNA(已用 MluI 和 BssHII 限制消化, 小牛小肠碱性磷酸酶处理和凝胶分离)上。pT7:HSVTKII 衍生自 Black and Hruby 在 J.Biol. Chem. 267:9743-9748,1992 中描述的 pT7:HSVTK 转录载体。简言之, pT7:HSVTKII 不同于 pT7:HSVTK 仅在于丧失了 HSV-1 tk 基因 3' 末端的 NcoI-BamHI 片段(原来用于帮助 tk 基因的起始克隆)。

2. 序列分析

在亚克隆进 pT7:HSVTKII 载体的 8 种突变体片段的最终序列分析中, 在这些 tk 基因之间识别出了两个附加氨基酸的不同。pT7:HSVTKII 的序列与 McKnight 发表的(Nucl. Acids Res. 8(24):5949-5964,1980)完全相同。pMCC(pMDC 的母体质粒)和因此连接进随机序列的载体含有两个异常于 McKnight 序列的氨基酸。它们在 434(C*T)和 575(G*A)位, 导致脯氨酸-49 向亮氨酸, 精氨酸-89 向谷氨酰胺变化。因此, 除了以上所述的外, 所有突变体都含有这两种突变。此外, 也识别出了 480 位的单个核苷酸不同(C*T), 但没有引起氨基酸的变化。

因为所有体外分析均与作为野生型的 pT7:HSVTKII 比较, 所以将 pMCC 的 MluI-BssHII 片段亚克隆进 pT7:HSVTKII 的相应的位点(现在指定为 pT7:MCC), 并且将后续在无细胞产物与得自 pT7:HSVTKII 的比较。当胸苷(1.3 倍)、脱氧胞苷(1.3 倍)、GCV(0.8 倍)、ACV(0.95 倍)或 AZT(1.1 倍)用作底物时, 在 pT7:MCC 和 pT7:HSVTKII 之间未观察到磷酸化效率的明显不同。而且, Sanderson 等(J. Mol. Biol. 202:917-919,1988)报道胸苷和 ATP 的 K_m 以及从具有 pHEtk2(pMCC 的母体质粒)的大肠杆菌纯化的 TK 和 HSV-1-感染细胞的 V_{max} 是难以区分的。因此, 各种 TK 突变体性质上观察到的变化可以归因于靶向区内的核苷酸取代和在酶促性质上仅发生小的变化的载体(pT7:MCC 和 pT7:HSVTKII)之间的任何不同。

3. 体外转录和翻译

将以上描述的转录物用于兔网质红细胞裂解物无细胞翻译系统以合成活性酶。用核酸酶处理的兔网质红细胞裂解物按 Promega 进行无细胞翻

译。

通过将 ^{35}S -标记的无细胞翻译产物进行 SDS-PAGE 和放射自显影分析全长蛋白质的表达。简言之, 将 1 微升各放射性标记的无细胞翻译体外衍生突变体 mRNA 进行含 SDS 的聚丙烯酰胺(12%)凝胶电泳。这一凝胶的放射自显影图示于图 7 中。第一道包含 ^{14}C -标记的各种分子量标记(Amersham)(带有左边给出的表观分子量($\times 10^{-3}$)。第二道相应于无任何添加的 mRNA 存在时完成的无细胞翻译。第三道相应于野生型 pT7:HSVTKII mRNA 翻译产物。所有其它各道包含按以上描述产生的突变体 mRNA 的翻译产物。图 7 明显说明, 各突变体转录物的主要放射性标记翻译产物在电泳期间作为(43kDa 蛋白质迁移, 具有与用野生型 pT7:HSVTKII 转录物的翻译产物观察到的相同的电泳迁移率。

为了定量各翻译的蛋白质合成水平, 以三次重复进行各相同样品的三氯乙酸可沉淀计数测定。酸可沉淀计数的数量基本上平行于图 7 中各突变体带密度。

E. 突变体酶的时间过程分析

基于 TK 活性, 各突变体 TK 可分成两个亚类; (1)高活性突变体(P155A/F161V, F161I, F161C 和 D162E); (2)低活性突变体(F161I/R163H, F161L, D162G 和 R163P/H164Q)。对高活性的突变体酶, 将未标记的翻译产物稀释 1/9, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 0、5、10、20 和 30 分钟。这一试验的结果示于图 8A 中。用相应的 TCA-可沉淀计数(^{35}S cpm)将 TK 活性结果(每分钟计数)调节到等量蛋白质合成水平。两种突变体(F161I 和 P155A/F161V)表现出对胸苷比对野生型 TK 统计学上较高的亲和力。F161C 和 D162E 活性(数据未给出)的标准偏差表明与野生型 TK 酶活性相比活性上没有不同。

将低活性的突变体稀释 1/5, 也测定作为时间函数的磷酸化率。这一试验的结果示于图 8B 中。时间过程分析表明大多数突变体低于 10%野生型活性。然而, 一个(F161L)表现出磷酸化胸苷的中等能力, 尽管来源于 HSVTKII 的有降低很多的比率。

F. 热稳定性试验

在 TK 选择平板上菌落形成试验中, 几个突变体在 42 $^{\circ}\text{C}$ 不能补充

KY895，表明这些突变体 TK 是温度敏感的。为了证实这一观察结果，将无细胞翻译产物在 42 ℃ 温育，增加试验酶活性试验前的时间。简言之，将各高活性突变体的无细胞翻译("CTF")产物、-RNA 和 HSVTKII 样品稀释 1/9，并于 42 ℃ 培养 0、5、10 和 20 分钟。然后试验预培养样品 5 分钟(P155A/F161V 和 F161I)或 20 分钟(-RNA，HSVTKII，F161C 和 D162E)。以未处理样品组为 100% 确定活性保留百分率。如图 9A 所示，除 F161C 外，所有高活性的突变体在 42 ℃ 长达 60 分钟(数据未给出)的预培养后显示出类似于 HSVTKII 的热稳定性。由于 F161C 在 42 ℃ 开始的 20 分钟内酶活性丧失大于 90%，因此进行了较短时间(0、5、10 和 20 分钟)的培养。F161C 例外的不耐热性表明 42 ℃ 仅 5 分钟活性丧失(85%)。

将各高活性突变体的 CTF 产物稀释 1/5，并于 42 ℃ 培养 0、20、40 和 60 分钟。然后以三次重复试验预培养样品胸苷磷酸化作用 60 分钟。以未处理(时间 0)样品为 100% 确定活性保留百分率。如图 9B 所示，低活性突变体亚类中，一种翻译产物(F161L)比 HSVTKII 更不耐热。这类中的其它(R163P，F161I/R163H，H164Q 和 D162G)等同於 HSVTKII。

G. 底物特异性试验

用胸苷、脱氧胞苷、ACV、GCV 和 AZT 作为底物以三次重复试验三种突变体(P155A/F161V，F161I 和 F161C)磷酸化相对水平。简言之，48 微摩尔的各含氘底物用于各试验反应中。按以下稀释翻译产物用于各核苷酸试验(翻译产物/水)：1/100，胸苷；2/3，脱氧胞苷、GCV 和 AZT；1/4，ACV。于 30 ℃ 培养各试验组 2 小时，测定磷酸化产物的量。

调整各试验组的每分钟计数，绘制于图 10 中。简言之，P155A/F161V 和 F161I 显示出相对于 HSVTKII 的增强的磷酸化胸苷的能力(各 2.6 和 2.2 倍)。突变体酶磷酸化脱氧胞苷超过野生型酶 1.9-2.8 倍(F161I，1.9 倍；F161C，2.8 倍；P155A/F161V，2.8 倍)。两种突变体表现出具有增加的磷酸化 ACV 的能力(F155A/F161V 和 F161C 分别超过 HSVTKII 2.4 和 2 倍)。所有突变体表现出接近 AZT 磷酸化的野生型水平。与野生型磷酸化水平比较，所有试验的突变体表现出具有 GCV 磷酸化上的大的增加(3.9-5.2 倍)。

实 施 例 4

具有改变的酶促效率的 TK 突变体的分析

为了识别具有改变的酶促活性的突变体, 在以下给出的试验中分析了实施例 1 分离的 190 个 TK 突变体(TKF)。

A. 功能性胸苷摄入的菌落的形成

用改进的 Bio-Rad 蛋白质试验估测纯化酶的蛋白质含量。用 BSA 和 125ul 终体积中 25 微升 Bio-Rad 试剂建立标准曲线。通过测定 595nm 的 OD 值并与 BSA 比较确定蛋白质的量。

为了识别具有改变的 TK 活性的突变体, 基于突变体在含有不同浓度胸苷(表 I)的培养基上的生长能力设计第二筛选方案。简言之, 首先确定 1.0 和 10.0 微克/毫升是支持具有野生型 tk 质粒的大肠杆菌生长的培养基中胸苷的最低和最高浓度。因为具有野生型 tk 质粒的大肠杆菌在含有低浓度的胸苷(0.05 微克/毫升)的 TK 选择培养基上不能形成可见的菌落, 因此在这一胸苷浓度下生长可以指示出具有增强的磷酸化胸苷能力的突变体。因而, 0.05 微克/毫升胸苷用于选择高 TK 活性的变体, 20 微克/毫升胸苷用于选择低活性的变体。以下表 I 示出了作为增加的胸苷浓度的函数的选择的突变体功能性补充 tk-大肠杆菌 KY895 的能力。当 190 个 TK 变体和野生型在表 1 所给出的胸苷浓度下进行筛选时, 仅 1 个(TKF36)在最低胸苷试验浓度(0.05 微克/毫升)下形成菌落。另一方面, 仅 TKF41 在培养基中最高胸苷浓度下生长。所有其它 188 个突变体和野生型在含有 1 微克/毫升胸苷的培养基中形成可见菌落。

表 I

作为胸苷浓度的函数的用野生型和突变体质粒转化的
tk-大肠杆菌 KY895 的菌落形成能力

突变体	胸苷浓度 (μ g/mL) ^a				
	0.05	1	2	10	20
野生型	- ^a	+ ^a	+	$\pm$ ^b	-
TKF 36	+	+	+	$\pm$	-
TKF 41	-	-	+	+	+ ^c
TKF 52	-	+	+	+	-
TKF 99	-	+	+	+	-

TKI 208 ^d	-	+	+	+	-
----------------------	---	---	---	---	---

在于 37 °C 培养 24 小时后确定菌落形成。

a. +和-表示具有不同质粒的大肠杆菌在所指出的 TK-选择培养基上能够或不能够形成菌落。

b. (表示起始细胞生长: 在培养 20 小时后细胞死亡明显, 可能是由于突变体和野生型克隆中胸苷过度磷酸化产生的核苷酸层不平衡。

c. 因 TKF41 显得是非常低活性的克隆, 所以, 这一突变体 TK 的过度表达对大肠杆菌在 TK-选择培养基上成活是必需的. pMCC 和表达载体 pMDC 具有温度敏感性阻抑基因 c1857, 它于 42 °C 失活, 因此, 存在 TK 的过度表达和随后的细胞死亡。为了获得控制表达, 于 37 °C 完成筛选。然而, 将含 TKF41 的大肠杆菌在含 20 微克/毫升胸苷的 TK-选择培养基上于 42 °C 培养。

d. 从以上实施例 2 描述的文库获得 TKI208。

B. 高和低活性克隆的序列分析

按以上实施例 2 的描述测序野生型 tk 和选择的突变体。表 II 示出了野生型 tk 和选择的突变体的 165-175 位密码子的核苷酸和推导的氨基酸序列。简言之, TKF36(在含低胸苷的培养基中形成菌落的突变体)包含单个氨基酸取代(Ala168*Ser), 而 TKF41 包含四个氨基酸取代(Pro165*Ser, Ala167*Gly, Leu170*Gln, Ala174*Val)。有趣的是, TKF52 在相同的位置具有与 TKF36 不同的氨基酸取代(Ala168*Thr), 但在含胸苷浓度低的培养基上不能形成菌落。TKF99 包含两个氨基酸取代(Cys171*Leu, Ala174*Thi), TKI208 具有引起 Leu170*Val 取代的单个核苷酸取代。

表 II

野生型和突变体 TK 酶在靶区的氨基酸和推导的氨基酸序列

	165 ^a	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	SEQ ID
野生型	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	ctg	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. 表示靶区简并密码子的编号，野生型核苷酸和氨基酸序列示于密码子编号的下面。

b. 沉默突变。在测序区(跨越密码子 140-182)未观察到其它核苷酸改变。各模板测序两次。

取代的核苷酸和氨基酸残基用粗的大写字母表示。

c. 在具有野生型和突变体 TK 质粒的大肠杆菌中的胸苷摄入

为了证实具有野生型和突变体质粒的大肠杆菌中的胸苷摄入实际水平，进行了以下试验。

1. [甲基-3H]胸苷摄入试验

基本上按以下所述测定具有野生型和突变体 TK 质粒的大肠杆菌中的 [甲基-3H]胸苷摄入。简言之，用包含 100 微克/毫升羧苄青霉素的 LB-介质以 1: 100 稀释包含 pMDC(失活 TK)(一种含野生型 TK 或 TK36 的质粒)的大肠杆菌的过夜培养物，变成 A550 时的 0.1 OD，移到 37 °C 并在剧烈搅拌下培养。一旦达到 1.0 OD，则将培养物放入室温((25 °C)下，以 0.21(M(0.16(Ci[甲基-3H]胸苷)的终浓度加入 1 毫升等分的胸苷。在于 22 °C 培养 0、5、10、20、30 和 60 秒钟后，将 50(l 转移到硝基纤维素滤膜 (0.45(m) 上，在真空下用 10 毫升预冷的 50mM Tris-HCl,pH7.0,0.9%NaCl 洗涤，干燥并用 scintiverse BD(Fisher)闪烁计数。结果示于图 11 中。简言之，在具有 pMDC 的大肠杆菌中基本上无胸苷摄入。在具有 TKF36 的大肠杆菌中胸苷摄入量比具有野生型质粒的大肠杆菌中的高 42%(培养 10 秒钟后 18 pmol/10⁸ 细胞比 12.7pmol/10⁸ 细胞)。

2. [甲基-3H]胸苷掺合进酸不溶物质

通过测定胸苷掺合进酸不溶物质间接测定包含野生型和突变体质粒的大肠杆菌粗提物中 TK 活性物的量。

简言之,按以上第一部分的描述培养培养物。向 0.5 毫升培养物中加入胸苷至终体积 1.32(M(0.2(Ci[甲基-3H]胸苷)。在预定的培养时间后,取出 30(l 加入到 2.0 毫升冷的 5%高氯酸中。洗涤沉淀,基本上按 Dube et al.,1991 的描述测定掺合进酸不溶物质中的放射活性。

图 12 表明,[甲基-3H]胸苷掺合进酸不溶产物用 TKF36 大肠杆菌比用含有野生型质粒或其它试验的 tk 突变体的大肠杆菌更迅速。具有两个氨基酸取代(Cys168*Leu,Ala174* Thr)的一种突变体(TKF99)表现出与野生型相同比率的胸苷掺合。TKF52 含有 Ala168*Thr 取代(与 TKF36 中 Ala168*Ser 比较),在含最少胸苷的 TK 选择培养基中不能形成菌落(表 I),而胸苷掺合进酸不溶物质的比率大于野生型但小于 TKF36。

D. 野生型和各突变体 TK 的纯化

从 11 种培养物获得不同突变体的粗提物,使其在 30℃生长至 A₅₅₀ 时的 0.1 OD,移到 37℃生长至 1.0 OD。在 4℃下离心收集细胞,用 25 毫升含 25%(w/v)蔗糖、50 mM Tris-HCl,pH7.5 和 5mM EDTA 的溶液洗涤。离心后,细胞沉淀(约 5-6 克)于-70℃贮存。将细胞沉淀冷干并悬浮到 20 毫升缓冲液 I 中(缓冲液由 10 体积 50 mM Tris-HCl,pH7.5, 10%蔗糖与 1 体积 0.3M 亚精胺-HCl,2.0M NaCl,10%蔗糖和 0.5 和 0.5mM PMSF, pH7.5 混合而成)。一旦再悬浮液均一,就加入 4.0 毫升含 6.25 毫克溶菌酶的缓冲液 I。将悬液倒入预冷的离心管中,并置于冰上 30 分钟。如果在 30 分钟内细胞不裂解,则将试管置于 37℃的水浴中 4-6 分钟,增加裂解。一旦细胞开始裂解(由增加的粘度判断),则加入 2-3 毫升预冷的含 50(g/ml 抑蛋白酶肽以及抑胃酶肽和亮抑蛋白酶肽各 2(g/ml 的缓冲液 I 至终体积 25 毫升,于 4℃在 28000r.p.m.下离心混合物 1 小时,于 70℃贮存上清液。

按 Kowal 和 Marcus(生化制剂 6:369-385,1976)的描述和 Lee 和 Cheng(生物化学杂志 251:2600-2604,1976)的改进通过在连接到 p-氨基基胸苷 3'-磷酸盐上的 CH 琼脂糖凝胶 4B(Pharmacia)基质上的亲和层析进行野生型和突变体 TK 的纯化。除非有其它说明,所有用于纯化 TK 的缓

冲液均含有 5mM DTT、50(g/ml 抑蛋白酶肽、2(g/ml 亮抑蛋白酶肽、2(g/ml 抑胃酶肽、1mM PMSF。用缓冲液 A 平衡 7 毫升柱床体积的柱子 (0.1M TrisHCl, pH7.5、10%甘油), 以 8-10 毫升/小时的速率装入约 25 毫升未分级处理的上清液。柱子由两次流过再循环, 然后接着每次用柱床体积的缓冲液 B(0.1M TrisHCl, pH7.5、0.5M KCl、10%甘油)和缓冲液 A 顺序洗涤。用缓冲液 A 和缓冲液 C(0.3M Tris-HCl, pH7.4、50mM KCl、10%甘油)各 30 毫升由胸苷(0-600(M)线性梯度洗脱 TK。收集所有组份和峰值 TK 组份并对 2 升透析缓冲液(50mM Tris-HCl, pH7.4、5mM DTT、10%甘油)透析 3 次完成 TK 试验。在最终透析中, 从缓冲液省去蛋白酶抑制剂, 等分透析组份并在-70℃贮存。在使用各提取物制剂前, 按以上描述的相同的洗涤和洗脱方案充分洗涤柱子两次。

用修改的 Bio-Rad 蛋白质试验估测纯化酶的蛋白质含量。用 BSA 和 125ul 终体积中 25 微升 Bio-Rad 试剂建立标准曲线。通过测定 595nm 的 OD 值并与 BSA 比较确定蛋白质的量。

[甲基-3H]胸苷摄入

结果示于图 11 中。简言之, 在具有 pMDC 的大肠杆菌中基本上无胸苷摄入。在具有 TKF36 的大肠杆菌中胸苷摄入量比具有野生型质粒的大肠杆菌中的高 42%(培养 10 秒钟后 18 pmol/10⁸ 细胞比 12.7pmol/10⁸ 细胞)。

通过测定胸苷掺合进酸不溶物质间接测定包含野生型和突变体质粒的大肠杆菌粗提物中 TK 活性物的量。

E. 纯化突变体胸苷激酶的动力学参数

迄今研究的三种细胞参数表明, TKF36 是比任何其它试验的突变体酶或野生型都更有活性的酶。为了测定催化作用的动力学参数, 用如以上描述的亲和层析将野生型、TKF36 和三种其它突变体胸苷激酶纯化至接近均质。在 SDS-PAGE 系统中经电泳测定纯化的野生型、TKF36 和 TKI208, 发现单个突出的带在 43kDa 迁移, 银染判断其为 95%均质。

基本上按以下的描述测定动力学参数。简言之, TK 试验混合物(50 微升)含有 50mM tris-HCl(pH 7.5)、5mM ATP、4mM MgCl₂、2.5mM DTT、12mM KCl、0.18mg/mlBSA、5%甘油、1(M 胸苷(0.3(Ci[甲基-3H]胸苷)和指定量的纯化酶。用各种未标记的胸苷浓度(0-4.0(M)和纯化酶

的已知数量(野生型、TKF36、TKI208、TKF99和TKF41分别为1.1、3.0、0.5、0.34和0.01单位)的变化测定胸苷磷酸化的动力学。酶的1单位定义为在以上描述的条件下1分钟能磷酸化1.0pmol胸苷成胸苷酸的量。在34℃(1℃下培养10分钟,加入1.0mM冷胸苷终止反应。将一半反应混合物移取到DEAE-纤维素盘(25毫米)上,浸入蒸馏水中(1分钟),接着用无水乙醇洗涤4次。用闪烁计数器计数吸附到盘上的产物。用Cleland SUBIN方案(Cleland, 酶学方法 63:103-138,1979)测定动力学参数 K_m 和 V_{max} 值。用等式 $V_{max}=K_{cat}[E]_0$ 计算 K_{cat} 值,其中 $[E]_0$ =总酶浓度。

这些试验的结果总结在表 III 中。TKF36 中 Ala*Ser 取代引起 K_{cat} 增加 4.8 倍。与野生型 TK 比较,没有被分析的其它纯化突变体酶(TKF41、TKF99 和 TKI208)表现出 K_{cat} 的增加。 K_{cat} 降低 2.2 倍源于 TKI208 中的 Leu170*Val 取代,而两种其它 tk 突变体(TKF99 和 TKF41)在体内试验中具有降低的效率,表现出 K_{cat} 降低 28-和 34 700-倍降低。表 III 也列出了以胸苷为底物的突变体和野生型的 Michaelis 常数(K_m)。野生型酶的表现 K_m 为 0.47(M, 与以前报道的值很吻合(Jamieson 和 Subak-Sharpe, 遗传病毒学杂志 24:481-492,1974; Elion, 美国医学杂志 73:7-13,1982; Waldman 等人, 生物化学杂志 258:11571-11575,1983)。尽管 TKF36 表现出较高的 K_{cat} 值,但 K_m 反映出的其对胸苷的亲合力低于野生型 TK6.2 倍。TKI208、TKF41 和 TKF99 具有与野生型类似的 K_m 。有趣的是,TKF36 的 K_{cat}/K_m 值 $[2.0 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}]$ 与野生型 $[2.5 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}]$ 并无很大不同,但 TKI208、TKF99 和 TKF41 分别表现出较低的值 $1.57 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 、 $0.15 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 和 $0.00012 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 。

表 III

胸苷激酶的动力学参数比较

酶	$K_m(\mu \text{ M})$	$k_{cat}(1/\text{s})$
野生型	0.47 ± 0.1^a	1.2
TKF 36	2.90 ± 0.01	5.7^b
TKF 41	0.28 ± 0.16	3.5×10^{-5b}
TKF 99	0.29 ± 0.002	0.04^b
TKI 208	0.35 ± 0.008	0.5^b

- a. 数据表示为 $\pm$ SE.
- b. 与野生型比较 P 值小于 0.02.

实 施 例 5

选择性杀灭用包含突变体 SHV-1 TK 的逆转录病毒载体转染的细胞

这一实施例描述了逆转录病毒载体的构建, 所述载体表达 1 型单纯疱疹病毒胸苷激酶, 155 位的脯氨酸向丙氨酸突变, 161 位的苯丙氨酸向缬氨酸突变。

A. 载体构建

用 P155A/F161V 的胸苷激酶基因替换以 Moloney 鼠白血病病毒 ("MoMLV") 为基础的载体 GITkSvNa.90 中的野生型 HSV tk 序列, 所述载体得自基因治疗有限公司 (Gaithersburg, MD; 参见, Ram 等人, 癌症研究 53:83,1993)。

具体地说, 突变体 tk 基因插入到 5' 长端重复序列的下游, 该 tk 基因用作启动子。这一载体也包含从 SV40 早期启动子表达的新霉素磷酸转移酶基因(neo)。

B. 产生细胞系

在磷酸钙转染后, 以上描述的逆转录病毒载体可以用兼嗜性逆转录病毒包装细胞系 GP+envAm12(美国专利 5287056)包装。包含(-半乳糖苷酶基因的载体用作对照载体。克隆载体产生细胞保持在包含 Dulbecco's 改进的 Eagle's 培养基(具有 10%胎牛血清、2mM 谷氨酰胺、50 单位/毫升青霉素、50 微克/毫升链霉素和 2.5 微克/毫升 Fungizone)的培养物中。使用前, 除去培养基并用盐水冲洗细胞。于 37 °C 用胰蛋白酶消化细胞单层 5-10 分钟, 收集、洗涤两次, 并以 10×10^8 细胞/毫升再悬浮。

C. 对 ganciclovir 的体外敏感性

为了估测用包含突变体与野生型 tk 基因的载体转导的细胞的敏感性, 通过将细胞露置于包含复制非活性载体颗粒的上清液中体外转导大鼠 9L 神经胶质瘤细胞和人 U251 成胶质瘤细胞。通过将 G148(1 毫克/毫升)包含在培养基中选择转导的细胞。然后估测未转导的、HSVtk 野生型转导的和 HSVtk 突变体转导的细胞对 ganciclovir 增加的敏感性。通过各种 ganciclovir 露置时间和 ganciclovir 水平后的含氟胸苷的掺合测定 DNA 合

成水平. 通过在不存在或存在各种浓度的 ganciclovir 的 10 毫米组织培养板上平板接种测定细胞生存力, 每隔 24 小时计数细胞数量。

D. 体内转导

用包含(-半乳糖苷酶的载体测定肿瘤细胞中原位转导效率和载体基因表达的相对水平。简言之, 麻醉 Fischer 344 大鼠, 用 10 微升与定向性注射装置连接的 Hamilton 注射器注射 4×10^4 同系的 9L 成胶质瘤细胞。10 天后, 相同的定向位置用于将 1.5×10^6 、 3×10^6 、或 6×10^6 HSVtk(野生型或突变体)(-半乳糖苷酶转导的或未转导的产生细胞系和产生细胞系上清液直接注射进 9L 肿瘤。作为对照, 用相同体积的无菌盐水代替细胞注射大鼠。然后施用 ganciclovir, 宰杀大鼠, 测定抗肿瘤作用。也进行组织学检查。

E. ganciclovir 的剂量优选

用 4×10^4 HSVtk(野生型或突变体)或(-半乳糖苷酶转导的大鼠 9L 产生细胞大脑内注射大鼠。接种 7 天后, 以 5、2 或 15 毫克/公斤每天两次腹膜内施用 ganciclovir 7 天。对照大鼠接受腹膜内盐水注射。用 ganciclovir 处理后宰杀所有的大鼠, 移去大脑和肿瘤, 进行重量测定和组织学检查。

F. 野生型或突变体 HSVtk 转导和 GCV 引起的肿瘤消退

基于 ganciclovir 剂量优选的结果, 对用转导的或未转导的产生细胞系和产生细胞系上清液接种的大鼠肿瘤施用 ganciclovir 剂量一段特定的时间期限。通过测定肿瘤重量和组织学检查测定抗肿瘤作用。

实 施 例 6

VZV TK 作为选择性同源重组的靶的用途

这一实施例描述了突变体水痘带状疱疹病毒胸苷激酶("VZV tk")在构建稳定转染的细胞系、菌株或重组病毒中用作同源重组靶的用途。具体地说, 描述了用于在 TK(细胞中选择重组病毒的作为含突变体 VAV TK 的克隆载体的痘苗病毒的构建。

A. 包含 VZV TK 突变体的重组痘苗病毒载体质粒的构建

将 VZV tk 基因(野生型和突变体)克隆进重组质粒的用于组成型基因表达的痘苗病毒 7.5K 启动子后。此外, 将新霉素磷酸转移酶基因克隆到 VZV tk 基因 3'末端后用作选择性标记。痘苗病毒编码胸苷激酶基因的 5'或 3'区

侧翼于 VZV tk 基因的 5' 末端和新霉素磷酸转移酶基因的 3' 末端。这使得可将 VZV tk 基因插入到病毒基因组和伴随灭活痘苗胸苷激酶基因。剩余质粒基于 pUC，包含青霉素抗性基因和 ColE1 复制源(用于保持大肠杆菌中的质粒)。

B. 重组痘病毒的构建

用野生型痘苗病毒将 VZV tk(野生型和突变体)+ neo 重组质粒或仅含有 neo 基因的重组质粒转染进 BSC40 细胞。由对 G418 的抗性选择重组病毒。几次噬斑纯化后，将重组病毒进行噬斑杂交和 DNA 分析，以证实外源基因的插入和位置。

C. ganciclovir 的剂量优选

用各种剂量的 ganciclovir 处理感染和未感染 BSC40 细胞的痘苗病毒，以确定耐受水平。用表达 VZV TK 和 neo 的重组病毒和仅表达 neo 的重组病毒感染的细胞将在各种水平的 ganciclovir 存在时生长。包含 VZV tk 基因的病毒对 ganciclovir 处理比单独的细胞或用野生型痘苗病毒感染的细胞更敏感。从这些试验结果选择对与其它待插入到 VZV tk 基因座的基因的同源重组来说对 ganciclovir 丧失敏感性的 ganciclovir 水平。

D. 用 ganciclovir 选择重组 VZV tk 痘病毒

在携带引入到 VV 基因组(邻近 VV7.5K 启动子，克隆到 VZV tk 序列侧翼)的基因的重组质粒存在下用 VZV tk 重组病毒感染 BSC40，用 ganciclovir 选择重组病毒。

任何用 VZV tk 基因稳定转染的细胞系可以是经同源重组引入外源基因和通过 ganciclovir 抗性选择这种组件的靶。

实 施 例 7

HSV-1 胸苷激酶和 HSV-1 DNA 聚合酶载体的构建

A. 载体的构建

构建含 HSV-1 DNA 聚合酶基因、 HSV-1 胸苷激酶或这两者的构建体。

1) pHSG576:HSVpol

用两个步骤将 5.5 kb pGEM2-702(David Dorsky, 康奈尔大学)的 HindIII/EcoRI 片段克隆到 pHSG576(Sweasy 和 Loeb, 生物化学杂志

267:1407-1410):

(1) 将 2.4 kb PstI/EcoRI 片段克隆到用 PstI 和 EcoRI 消化的 pHSG576 中, 这一克隆指定为 pHSG576: 1/2pol。

(2) 将 3.1 kbHindIII/ PstI 片段克隆进用 HindIII 和 PstI 消化的 pHSG576: 1/2pol 中, 这一克隆指定为 pHSG576:HSV DNApol。

2) pHSG576:HSV-1TK

将 pET23d:HSVTK(含有 pET23d 中 HSV-1 TK NcoI-NcoI 片段, Novagen)的 XbaI/BamHI 片段平端化, 并克隆到 pHSG576 的 SmaI 位点, 这一克隆指定为 pHSG576:HSV -1 TK。

3) pHSG576:HSVpol/TK

这一克隆包含 HSV-1 DNA 聚合酶和 TK 基因(用于从相同载体共表达)。从两步克隆方案产生。

(1) 将 XbaI/BamHI 平端 TK 片段克隆到 pHSG576: 1/2pol(包含 2.4 kb PstI/EcoRI 片段的平端 EcoRI 位点上。

(2) 将 3.1 kb HindIII/ PstI 片段(聚合酶基因的 5'末端)克隆进用 HindIII 和 PstI 消化的 pHSG576: 1/2pol/TK 中, 这一克隆指定为 pHSG576:HSVpol/TK。

B. 具有 DNA 聚合酶缺损的大肠杆菌的转化

用 pHSG576:HSV DNApol 或 pHSG576 DNA 转化大肠杆菌 JS200(polA12recA718), 平板接种到含有四环素(12.5 微克/毫升)和氯霉素(34 微克/毫升)的营养琼脂(NA)上。于 30 ℃(许可的温度)培养平板。单菌落在 NB+ tet+Cm 上生长过夜。从这些培养物分离 DNA, 用于再转化 JS200。从第二次转化中各挑出几个菌落, 用于接种存在或不存在 IPTG 的 NB+ tet+Cm。于 30 ℃过夜生长后, 将单个满环各培养物在分散螺管(从平板中心增加稀度)中分散。于 30 ℃(许可的温度)或 37 ℃(非许可的温度)下培养 NB 板+tet+Cm+/-IPTG。

包含 pHSG576:HSV DNApol 的细胞的生长模式在 37 ℃显示出单菌落(低细胞密度)生长, 而仅包含载体的细胞在非许可温度下不能以低密度生长。

这些结果说明疱疹 DNA 聚合酶能体内补充大肠杆菌 PolII 缺损。

实 施 例 8

用 100%随机文库构建和分析包含 159-161 和 168-170 位
密码子突变的 TK 突变体

这一实施例描述了在 159-161 和 168-170 位密码子突变的 TK 突变体的
构建和分析。

细菌菌株 SY211(BL21(DE3)tdk-,pLysS)经在非选择平板(无氯霉素)
上重复通过由 pLysS 处理(SY211 是从 Wiooiam Summers, Yale University,
New Haven,CT 获得的礼品, 在 Summers, W.C. and Raskin,P., J.
Bact.175:6049-6051,1993 中有描述)。形成的菌株 BL21(DE3)tdk-用于胸苷
激酶活性的遗传互补试验中。其它使用菌株实施例 3 已描述。

细胞 BHK tk-(ts13)细胞(ATCC No.CRL-1632)从美国典型培养物保
藏中心购得, 于 37℃ 在 6%CO₂ 下在 DMEM+10%小牛血清中培养。

材料 如实施例 3 所述。

A. TK 突变体的产生

1. 随机插入体的构建

用操纵子技术(Alameda, CA) 合成两种寡核苷酸:

MB126 (58 聚体) 5'-TGGGAGCTCA CATGCCCCGC
CCCCGGCCCT CACCNNNNNN NNNGACCGCC ATCCCATC-3'(SEQ
ID No.24)和 MB127 (51 聚体) 5'-ATAAGGTACC GCGCGGCCGG
GTAGCANNNN NNNNNGGCGA TGGGATGGCG G-3'(SEQ ID
No.25)。

N 表示合成中所有四种核苷酸等摩尔混合。

基本上按实施例 3 的描述进行寡核苷酸的纯化、退火、延伸和 PCR 扩
增。

2. 包含随机序列的文库的构建

载体构建

从 Novagen 购得的 pET23d 是构建 pET23d:HSVTK-沉默的骨架,
pET23d:HSVTK-沉默用来代替 pMDC(实施例 1 和 3 中描述)插入随机序
列。简言之, 从 pT7:HSVTKII(实施例 3)的限制消化产物纯化出 1.7kb
NcoI/HinDIII 片段, 并克隆进用相同的酶消化的 pET23d, 以产生

pET23d: HSVTK. 通过用 pMDC 的 KpnI/SacI 片段代替 KpnI 和 SacI 位点之间的 tk 序列构建沉默载体(实施例 3).

文库构建

用 KpnI 和 SacI 限制消化 Qiagen 柱纯化的 pET23d:HSVTK-沉默 DNA, 用 GenCleanII(Bio101, La Jolla, CA)分离载体凝胶以除去小插入片段。用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 过夜连接这一载体和凝胶分离的 PCR-扩增随机片段。

3. TK 突变体的选择

如实施例 3 所述, 经电穿孔将连接混合物用于转化 BL21(DE3)tdk-细胞。将转化体直接平板接种到 TK 选择平板(实施例 3)上, 同时将小部分平板接种到 2 × YT(每升: 16 克胰化蛋白胨/10 克酵母膏/5 克氯化钠/15 克 BactoAgar)+羧苄青霉素(在 50 微克/毫升(carb⁵⁰))以测定转化体的总数。在 37 °C 下培养平板过夜, 对在 TK 选择平板上的生长评分, 并测定转化频率。挑出在 TK 选择平板上生长的菌落, 再接种到新鲜的 TK 选择平板和 2 × YT+carb⁵⁰ 平板上。从 1.1 × 10⁶ 个转化体中识别出约 426 个阳性克隆, 或者所有转化体的 0.039% 具有对 BL21(DE3)tdk-的 TK 活性(图 14)。

B. 突变体分析

1. 选择的和未选择的克隆的序列

成功地测序了 17 个说明 TK 活性(选择的)或取自 2 × YT+carb⁵⁰ 平板(未选择的)的克隆。用 Qiagen 小量制备试剂盒分离 DNA, 并按实施例 3 的描述进行双链测序。图 15 示出了各组序列, 说明起始随机寡核苷酸是随机化的。在选择的和未选择的 tk 基因两者中, 观察到随机化区的远侧位点的第二突变的引入。然而, 突变基本上限制在两个密码子, 155 和 156。这些突变很可能由原始随机寡核苷酸合成期间的沾污引入。所有在密码子 155 上的变化都是沉默的。在密码子 156 上的变化引起丙氨酸向缬氨酸、色氨酸向脯氨酸改变。序列对比研究表明, 156 位对丙氨酸和该位置上的氨基酸类型都不是保守的。因此, 这些第二突变对突变体酶活性产生任何真正的作用是不太可能的。所有选择的突变体包含至少两个氨基酸变化。

2. GCV 和 ACV 敏感性的第二次筛选

挑出 426 个突变体的每一个, 用于接种 200(196 孔微滴板)中的 TK 选择

培养基(实施例 3)上。所有 426 个克隆用 48-prong replicator(Sigma, St. Louis, MO)以 0.9%氯化钠系列稀释 10^4 。将 30 微升最后稀释物散布到包含 1 微克/毫升胸苷以及各种浓度的 ganciclovir 或无环鸟苷的 TK 选择平板上。起始使用 2 微克/毫升 GCV, 将不能生长的克隆记为阳性, 具有增加的原药向活性毒素转化作用的突变体产生致死性。在 2 微克/毫升 GCV 上识别出 197 个克隆。在 1 微克/毫升和 0.5 微克/毫升 GCV 上的系列平板接种导致识别出 47 个突变体。在 ACV 平板(1 微克/毫升)上的平板接种给出 116 个 ACV 敏感克隆。由于在使用的较低浓度的胸苷上不能生长, 为保证所述克隆是真正的对核苷类似物敏感并不被简单地评价, 将 47 个 GCV 和 116 个 ACV 克隆平板接种到含有 1 微克/毫升胸苷(无核苷类似物)的 TK 选择培养基上。几乎一半克隆(总共 26 个 GCV 敏感突变体和 54 个 ACV 敏感突变体)不能在低胸苷上生长。结果示于图 16 中。

C. 体外分析

1. 体外转录和翻译

经 Qiagen 柱层析纯化质粒 DNA。除了转录前分离的质粒非线性化外, 按实施例 3 进行 80 个选择的突变体的转录和翻译。重复试验体外翻译产物的胸苷、ganciclovir 和无环鸟苷的磷酸化作用, 并与 pET23d:HSVTK-mRNA 翻译产物试验比较。

2. 酶活性测定

存在于试验中的放射性标记的核苷胸苷、ganciclovir 和无环鸟苷分别为 1(M、7.5(M 和 7.5(M。从重复翻译的 TCA-可沉淀计数(用 ^{35}S 蛋氨酸)将活性水平调节到反映蛋白质合成水平。对 80 个突变体酶的大多数而言, 胸苷、ganciclovir 和无环鸟苷的水平低于野生型 TK 的 1%。10 个突变体酶显示出大于 10%的磷酸化(至少一种试验的核苷酸)作用。几个克隆在随机区外侧包含突变。两个克隆(30 和 84)具有引起氨基酸变化(分别为 A152V 和 A156S)的突变。四个克隆包含符合读框的缺失: 3 个(226、340 和 411)具有-3 缺失, 1 个(197)具有-6 缺失。所有突变均以编码肽 APPPA 的富-GC 区为中心。这一富含脯氨酸的肽很可能包含环部分顶点上的转变处。如图 18 所示, 所有这些突变体均包含 3-6 个氨基酸改变, 具有各自的体外测定的活性水平。

D. GCV 和 ACV 在表达突变体胸苷激酶的哺乳动物细胞上的作用

1. 亚克隆进哺乳动物表达载体

3 个突变体选择来估价在 ganciclovir 和无环鸟苷存在下的体内细胞毒性。将突变体克隆编号 30、75 和 132 和野生型胸苷激酶基因用 NcoI 限制性消化并克隆诺平端化。将凝胶分离的片段(NcoI 平端)连接到用 NcoI 限制性消化的 pCMV 上, 并转化进大肠杆菌菌株 NM522 中。相对于 CMV 启动子为错误取向的野生型 TK 基因也用作对照。测序 Qiagen 纯化的克隆证实取向、序列和 5'连接区。各克隆指定为 pCMV、pCMV:TK-错误、pCMV:TK、pCMV:30、pCMV:75 和 pCMV:132。

2. 转染

作为估价这些突变体的起始步骤, 用 Chen and Okayama 的改进的方法(Molec. Cell. Biol. 7:2745-2752,1987)经磷酸钙沉淀法, 在新霉素抗性标记质粒(pSV2neo)存在下将 pCMV 基因引入到 TS13 BHK tk-细胞(幼仓鼠肾细胞)中。

简言之, 按如下所述进行细胞转染。将约 5×10^5 ts 13 BHK tk-细胞(ATCC CRL-1632)平板接种到有 DMEM+10%小牛血清的 100 毫米盘中。对各转染, 将 0.25M 氯化钙中的 1 微克 pSV2neo 和 10 微克 pCMV 构建体(pCMV、pCMV:TK-错误(相对于启动子 HSVTK 为错误取向)、pCMV:HSVTK、pCMV:30、pCMV:75 和 pCMV:132 DNA)与 0.5 毫升 $2 \times$ BBS(参见 Chen and Okayama)混合, 于 37 °C 在 2.5%二氧化碳下预培养 24 小时。将氯化钙/DNA 混合物逐滴加入到板上, 充分混合。于 37 °C 在 2.5%二氧化碳湿培养器中培养 24 小时后, 用 Dulbecco PBS-Ca/Mg 冲洗两次, 加入新鲜的 DMEM+10%小牛血清。于 37 °C 在 6%二氧化碳下培养平板。在转染后 72 小时后, 分开细胞 1: 3, 平板接种到包含 600 微克/毫升 G418 的 DMEM+10%小牛血清中。

3. 选择和 ED50 测定

于 37 °C 在 G418(600 微克/毫升)上选择细胞 17 天。在此期间, 库集平板(用于各 DNA 转染), 并以 1: 3 比率分开 3 次。以这种方式对各包含正确取向的 tk 基因的转染 DNA 选择约 30-40 个克隆。pCMV、pCMV:TK-错误转染各产生 130-140 个克隆。收获 G418 抗性克隆, 库集并以 2000 细

胞/孔的密度平板接种到 96 孔微滴板中的 100 微升 DMEM+10%小牛血清和 200 微克/毫升 G418+6%二氧化碳中。将各种浓度的 ganciclovir(0.125、0.25、0.5、1、2.5、5、7.5、10 和 20(M)或无环鸟苷(0.5、1、2.5、5、10、25、50、75 和 100(M)加入到各平板上, 对各转染体群各种浓度 8 次重复(无核苷类似物的对照各 16 次重复)。在核苷类似物存在 3 天后, 加入 Alamar Blue, 6 小时后, 按制造者的方案(Alamar Biosciences, Inc., Sacramento, CA)用荧光计扫描平板。将平板进一步于 37 °C 温育 24 小时, 再次扫描。

在 Alamar Blue 存在下培养细胞的荧光水平的测定与细胞生存力直接相关。扣除基底荧光可以绘制细胞成活对核苷类似物浓度的曲线, 以确定杀灭 50%细胞的有效浓度(ED₅₀)。用第二次扫描的数据绘制成成活曲线, 示于图19(GCV)和 20(ACV)中。

在核苷类似物上 4 天后, 对 GCV 和 ACV, 杀灭 50%细胞的有效浓度从图 19 和 20 确定(参见表 IV)。

表 IV

	ED ₅₀ GCV	超过 WT 倍数	ED ₅₀ ACV	超过 WT 倍数
WT	20 μ M	1	25 μ M	1
30	5 μ M	4	18 μ M	1.4
75	0.4 μ M	50	1.25 μ M	20
132	20 μ M	1	25 μ M	1

4. 酶试验和免疫带

试验 2.4×10^6 个库集转染体细胞抽提物的胸苷、ganciclovir 和无环鸟苷活性。磷酸化水平与体外(兔网质红细胞裂解物翻译产物)测定的活性和蛋白质印迹分析测定的蛋白质表达量非常一致。相应于 pCMV、pCMV:TK-错误(TK 基因为错误取向)的未见免疫反应性带。野生型 TK(pCMV:HSVTK)和 pCMV:132 两者转染的细胞裂解物表现出基本上相等的带强度。pCMV:30 细胞裂解物的免疫反应性带实际上更强(5-10 倍), pCMV:75 的带约为等量细胞数的 pCMV:HSVTK 带强度的一半。

5. 在成胶质细胞瘤中试验突变体

将从 pCMV:HSVTK、pCMV:30 和 pCMV:75 分离的平端 NcoI 片段克隆进 pLXSN(Miller and Rosman BioTechniques 7:980,1989)的 HpaI 位点。用 Qiagen 层析进行质粒纯化,测序分离的 DNA,证实取向和 5'连接区。除了 pSV2-neo 不共转染外(因为新霉素磷酸转移酶基因由 pLXSN 编码),按以上的描述制备鼠 C6 成胶质细胞瘤(ATCC CCL-107)和人成胶质细胞瘤细胞系(SF767)。基本上按以上的描述选择和分析。

E. 突变体胸苷激酶的动力学分析

1. 突变体和野生型酶的过度表达

将在 BL21(DE3)tk- 细胞中的 pET23d:HSVTK、pET23d:30、pET23d:75 和 pET23d:132 的单菌落用于接种 5 毫升含有 20 微克/毫升羧苄青霉素的 M9ZB 培养基(1%胰化蛋白胨、0.5%氯化钠、 $1 \times M9$ 盐、1mM 硫酸镁、100mM 氯化钙和 0.2%葡萄糖)。在 37℃ 培养过夜。第二天,将 5 毫升培养物用于接种 1 升 M9ZB+20 微克/毫升羧苄青霉素,将培养物在 37℃ 生长至 OD₆₀₀ 0.1。加入 IPTG 0.4mM 时,再培养培养物 3 小时。在冰上预冷细胞,离心沉淀,在 -70℃ 冷干沉淀前,在细胞洗涤缓冲液(50mM Tris,pH7.5、5mM EDTA、10%蔗糖)中洗涤沉淀 1 次。次日,将细胞悬浮在 12 毫升缓冲液 1(50mM Tris,pH7.5、10%蔗糖、2mM DTT、5mM EDTA、1mM PMSF)中,将该体积分到两个 13 毫升的 Oakridge 超离心管中。将 1 毫升含有 3 毫克溶菌酶的缓冲液 1 加到各管中,把管置于冰上 1 小时。再加入另外的缓冲液 1+蛋白酶抑制剂,于 4℃ 在 Sorvall T-1250 离心机中以 35 krpm 离心试管。然后等分澄清的上清液,于 -70℃ 冷冻。

2. 亲和纯化

胸苷-琼脂糖凝胶柱用于一步纯化方法中(实施例 2)。由在柱子中通过 10 毫升缓冲液 1,接着通过 10 毫升吸收缓冲液(50mM Tris,pH7.5、10%蔗糖、2mM DTT、25mM 醋酸镁、10mM ATP)制备 1 毫升柱床体积的柱子。将 2 毫升澄清的裂解物与 2 毫升吸收缓冲液混合并通过 0.2 微米过滤器。使这一混合物通过所述柱 3 次。用 5 毫升吸收缓冲液洗涤柱子 3 次,收集 5 毫升组份。为洗脱酶,使 3 毫升胸苷缓冲液(300mM Tris,pH7.5、10%蔗糖、2mM DTT、50mM 氯化钾、600mM 胸苷)通过柱子,收集各

1 毫升组份。经装入 10 毫升高盐缓冲液(50mM Tris,pH7.5、10%蔗糖、2mM DTT、0.5M 氯化钾)和 10 毫升 50 mM Tris,pH7.5 再活化柱子。柱子贮存在 50 mM Tris,pH7.5+0.004%叠氮化钠中。经考马斯染色的 SDS: PAGE 分析监测纯化的程度,用 BioRad 试剂 (Bradford 试剂)测定纯化蛋白质的浓度。于 4℃使包含 TK 蛋白质的组份对几升 50mM Tris,pH7.5、10%蔗糖、2mM DTT 透析以除去胸苷。

3. 酶动力学

以上描述的酶试验用于测定纯化的 TK 酶对底物胸苷、ganciclovir 和无环鸟苷的 K_m 、 V_{max} 和 K_{cat} 。

实 施 例 9

人和小鼠鸟苷酸激酶的分离以及 HSV-1 胸苷激酶和 鸟苷酸激酶双表达载体的构建

这一实施例描述了人和小鼠鸟苷酸激酶的分离以及双表达疱疹胸苷激酶和鸟苷酸激酶的载体构建。

A. 人鸟苷酸激酶基因的分离

1. 人鸟苷酸激酶基因的分离

两种寡核苷酸设计来扩增完整的人鸟苷酸激酶开放读框。下列两种寡核苷酸由 GenSet(La Jolla,CA)合成: 5'-ACTACTGGAT [CCATGG] CGGGCCCCAGGCCTGTG - 3', 33 聚体 (SEQ ID NO.26) 和 5'-TACTACGGATCCTCAGGCGGCGGTCCTTTGAGC-3', 33 聚体 (SEQ ID NO.27)

在各末端的 BamHI 位点是下划线的,在起始蛋氨酸密码子上的 NcoI 位点在括号中表示。粗体核苷酸表示原始序列(GenBank 登记号 A11042)的改变。从用(-CD3 刺激的人增殖的 B 淋巴细胞 cDNA 文库扩增人鸟苷酸激酶基因。用 BamHI 限制性消化所形成的单个带(约 600bp),并克隆进 pUC118(BamHI)以产生 pUC118: Hugmk。用下组寡核苷酸完整测序(双链)插入物:

5'-CTGCTGAAGAGGCTGCTC-3'(18 聚体)(DMO 512)(SEQ ID.NO. 28),
5'-ACACAGATGCGGTTTCATG-3'(19 聚体)(DMO 513)(SEQ ID.NO. 29),

5'-CTGGACGTGGACCTGCAG-3'(18 聚体)(DMO 514)(SEQ ID.NO. 30), 5'-GTTAATGATGACCACATC-3'(18 聚体)(DMO 515)(SEQ ID.NO. 31), 5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3'(18 聚体) (从 ABI 购得的 M13 正向引物)(SEQ ID.NO.32)和 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'(18 聚体)(从 ABI 购得的反向引物)(SEQ ID.NO.33)。序列分析揭示出除了在 NcoI 位点的超前改变(anticipated alteration)(引起丝氨酸向丙氨酸变化)(S2A)外, 与 GenBank 序列相同(图 21)。

2. RNA 印迹

在 $1 \times$ MOPS 缓冲液/75%甲酰胺中制备 SP2/0 鼠 B 淋巴瘤细胞的 8 微克总 RNA, 在 55°C 下变性 10 分钟, 加到 $1 \times$ MOPS 缓冲液中的 1.2% 琼脂糖凝胶上。转移到硝基纤维素滤膜上后, 用人 gmk 基因探测。

从 pUC118: Hugmk 凝胶分离 600bpBamHI 片段, 并按照制造者的说明用随机引物标记试剂盒(得自 Amersham)标记。经大小排阻色谱除去游离的放射性标记。杂交和洗涤后将印迹于 -70°C 露置于 X-光胶片下两天。RNA 印迹的放射自显影揭示出单个约 750ntRNA 物种。在使用 poly A+得自增殖的 B 淋巴细胞的人 RNA 的类似试验中, 也观察到单个约 750nt 的带。

B. 小鼠鸟苷酸激酶基因的分离

1. 筛选小鼠 cDNA 文库

用人基因探测(与用于 RNA 印迹分析相同的探针)小鼠 702/3 细胞(B 淋巴瘤)的(gt10 cDNA 文库。筛选的噬斑的总数量为 2×10^6 pfu。9 个独立的(克隆杂交到人探针上, 被噬斑纯化。

2. 阳性克隆的亚克隆和序列分析

凝胶分离 8 种噬菌体 DNA 制剂的 EcoRI 片段, 亚克隆进用 EcoRI 限制性消化和脱磷酸化的 pUC118 中。DNA 插入物的大小范围从约 300bp-1.2kb。采用引物(M13 正向引物)的基本序列分析揭示出所有克隆从约 60bp 5'开始到推定的 ATG 起始密码子(由人和牛鸟苷酸激酶序列序列对比测定), 在其各自的 3'末端变化。用下列寡核苷酸完全地测序了一个有代表性的克隆(双链):

5'-TGTGTCCCATACTACTACAAG-3'(21 聚体)(DMO 592)(SEQ

ID.NO. 34),5'-TGAGAACTCAGCAGCATGCTC-3'(21 聚体) (DMO 594)(SEQ ID.NO. 35),5' GTGCTAGATGTCGACCTA-3'(18 聚体) (DMO 595)(SEQ ID.NO. 36),5'-ACCTGGATAAAGCCTATG-3'(18 聚体) (DMO 674)(SEQ ID.NO. 37),5'-AAGCAGGCGCTCTCTCTGA-3'(19 聚体) (DMO 675)(SEQ ID.NO. 38),5'-CTATTTCTCATATGATGT-3'(18 聚体) (DMO 731)(SEQ ID.NO. 39)和 5'-GTTACAGTGTGTCTCTAGAG-3'(18 聚体) (DMO 732)(SEQ ID.NO. 40),5'-TCCCCCACCTCCAGGC-3'(16 聚体) (DMO 748)(SEQ ID.NO. 52),5'-CTCAGTGTTGCCAGTCG-3'(18 聚体) (DMO 749)(SEQ ID.NO. 53)和 5'-GCCGAAGATGCTGCTGTG-3'(18 聚体) (DMO 750)(SEQ ID.NO. 54)。

最终的鼠鸟苷酸激酶序列以及推导的氨基酸序列示于图 22 中。

2. 新限制位点的引入

按 Black, M.E.and Hruby,D.E.(J. Biol. Chem. 265:17584-17592,1990) 中的描述将新 NcoI 位点在小鼠鸟苷酸激酶开放读框的起始密码子处引入。使用的诱变寡核苷酸是 5'-CTAGGTCCTG[CCATGG]CGTCCGCG-3'(24 聚体)(DMO)(SEQ.ID. NO.41), NcoI 位点表示在括号中, 粗体核苷酸表示 C 到 G 变化。测序所形成的克隆(pUC118:Mugmk-NcoI)证实取向和 5'连接区。

C. 供体外转录和翻译分析的载体的构建

将人和鼠胸苷激酶基因亚克隆进 pET23d(参见实施例 8)。凝胶分离 pUC118:Mugmk 的 600bp NcoI/BamHI 片段, 直接亚克隆进用 NcoI 和 BamHI 消化的 pET23d(参见实施例 8)中。凝胶分离为约 800bpNcoI/BamHI 片段的鼠鸟苷酸激酶基因(用 ATG 上引入的 NcoI 位点和 pUC118 3'多接头区的 BamHI 位点), 克隆进用 NcoI 和 BamHI 消化的 pET23d(参见实施例 8)中。所形成的质粒 pUC118:Hgm k 和 pUC118:Mgm k 用作体外转录的模板, 产生的 mRNA 用于实施例 3 和 8 中描述的兔网质红细胞裂解物无细胞翻译系统。用从 Sigma 购得的牛鸟苷酸激酶作为阳性对照, 按 Agarwal et al.(Methods in Enzymol.51:483-490,1978)所述进行证实全长蛋白质产生和活性的酶试验。

D. 人和小鼠鸟苷酸激酶的纯化和特征确定

1. 表达载体构建

pET23d 载体(Novagen,Madison,WI)用作构建 pET:HT 的载体骨架。这一载体包含 6 个组氨酸残基肽,接着凝血酶切割位点,允许表达可除去的组氨酸标记融合进靶基因产物的 N 末端。通过 pET23d 启动子区的 PCR 扩增进行 6 个组氨酸-凝血酶融合编码区的合成,用下列引物在 3 个顺序 PCR 扩增步骤中延伸。5'-ACTACTACTA GATCTCGATC CCGCGAA-3'(27 聚体) (DMO 604)(SEQ ID.NO. 42),5'-ATGATGATGATGATGGCTGC TAGCCATAGTATATCTCCTT C-3'(41 聚体) (DMO 605)(SEQ ID.NO. 43),5'-CGGCACCAGG CCGCTGCTGT GATGATGATG ATG ATGATGGCT-3'(39 聚体) (DMO 606)(SEQ ID.NO. 44),5-AGT AGTAT [CC ATGG] AGCTGCCGCGCGGCAC CAGGCCGCTGCT - 3'(42 聚体) (DMO 607)(SEQ ID.NO. 45)。在所有 PCR 扩增步骤中,将序列 DMO 604 退火到 pET23d 的 BglII 区。序列 DMO 605 以 3'到 5'取向退火到相应于 NcoI 位点的区,引起 NcoI 位点的丧失(由于以上序列中粗体所示的核苷酸突变)。用序列 DMO 606 或 DMO 607 以 3'到 5'取向的后续扩增与序列 DMO 604 配对,以延伸序列(附加 6 个组氨酸密码子和凝血酶切割位点)。也用序列 DMO607 引入新的 NcoI 位点(如以上括号中所示)。将最终的 BglII/NcoI 片段在相应的位点克隆进 pET23d,以产生 pET:HT。测序 pET:HT 证实正确的合成和插入。新载体融合肽的氨基酸序列是 M A S S H H H H H S S G L V P R G S S M(NcoI 位点)(SEQ.ID. NO.46),凝血酶切割识别位点有下划线。凝血酶的切割在精氨酸和甘氨酸残基之间。

2. 在大肠杆菌中的过度表达和亲和纯化

过度表达和分析的方法如实施例 8。

按制造者的说明进行采用 His-Bind Resin (Novagen,Madison WI)的亲和纯化。凝血酶用于切割掉末端 17 个氨基酸,留下胸苷激酶起始蛋氨酸的 3 个氨基酸 N-末端。通过将切割混合物过 His-Bind 柱第二次除去引导肽。

3. 酶动力学

用纯化的人和小鼠鸟苷酸激酶测定鸟苷酸、 GCV-单磷酸盐和无环鸟苷单磷酸盐的 K_m 、 V_{max} 和 K_{cat} 值。除了采用 Agarwal et al.(Methods in Enzymol. 51:483-490,1978)中描述的试验方案外,通过薄层层析和闪烁计数

分析从用放射性核苷酸底物完成的试验产生的核苷酸产物。

E. 体内双表达载体的构建和分析

将 HSV-1 tk 基因作为 NcoI(平端)片段克隆进 pLXSN(Miller and Rosman, Biotechniques, 7:980-990,1989)的 HpaI 位点, 用限制酶切作图确定取向。这将 HSV-1 tk 基因置于到 MoMLV LTR 启动子之后。新霉素磷酸转移酶基因被鸟苷酸激酶基因(人和小鼠)(作为 BamHI(平端)片段)取代, 以使鸟苷酸激酶基因的表达不由 SV40 启动子驱动。此外, 构建其中 tk 和 gmk 基因顺序颠倒的载体, 以使 tk 基因从 SV 启动子表达, gmk 基因从 LTR 启动子表达。也构建具有单个具有基因(tk 或 gmk)的载体构建体。也构建包含 HSV-1 tk 突变体(替代野生型 HSV-1 tk 基因)的表达载体。

如实施例 8, 将以上描述的构建体的质粒 DNA 用于在标记质粒(pSV2-neo)存在下, 转染 ts 13 BHK tk-细胞、SF767 人成胶质细胞瘤细胞、鼠 C6 成胶质细胞瘤细胞, 以便能够在 G418 上选择转染体。

稳定转染体的选择和对 ACV 和 GCV 增加的敏感性试验如实施例 8 所述。

从以上的描述可见, 尽管本文为说明目的描述了本发明的特定实施方案, 但在不背离本发明的精神和范围的前提下可作各种修改。因此, 除了所附的权利要求外, 本发明不受其它限制。

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请人: **Loeb, Lawrence A.**

Black, Margaret

(ii) 发明名称: **胸苷激酶突变体**

(iii) 序列数: **54**

(iv) 通讯地址:

(A) 联系人: **Seed and Berry**

(B) 街: **6300 Columbia Center, 701 Fifth Avenue**

(C) 城市: **Seattle**

(D) 州: **Washington**

(E) 国家: **US**

(F): 邮区码: **98104 - 7092**

(v) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: **软盘**

(B) 计算机: **IBM PC 兼容机**

(C) 操作系统: **PC - DOS/MS - DOS**

(D): 软件: **PatentIn Release #1.0 , Version #1.25**

(vi) 目前的申请资料:

(A) 申请号:

(B) 申请日: **1995 年 5 月 2 日**

(C) 分类号:

(viii) 律师/代理人信息

(A) 姓名: **McMasters, David D.**

(B) 登记号: **33 , 963**

(C) 证书号: **240052.409C1**

(ix) 电讯信息

(A) 电话: **(206) 622 - 4900**

(B) 传真: **(206) 682 - 6031**

(C) 电传: **3723836**

(2) SEQ ID NO: 1 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1131 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

ATGGCTTCGT ACCCGGCCA TCAACACGCG TCTGCGTTCG ACCAGGCTGC GCGTTCTCGC	60
GGCCATAGCA ACCGACGTAC GGC GTTGCGC CCTCGCCGGC AGCAAGAAGC CACGGAAGTC	120
CGCCTGGAGC AGAAAATGCC CACGCTACTG CGGGTTTATA TAGACGGTCC TCACGGGATG	180
GGGAAAACCA CCACCACGCA ACTGCTGGTG GCCCTGGGTT CGCGCGACGA TATCGTCTAC	240
GTACCCGAGC CGATGACTTA CTGGCAGGTG CTGGGGGCTT CCGAGACAAT CGCGAACATC	300
TACACCACAC AACACCGCCT CGACCAGGGT GAGATATCGG CCGGGGACGC GGCGGTGGTA	360
ATGACAAGCG CCCAGATAAC AATGGGCATG CTTATGCCG TGACCGACGC CGTTCTGGCT	420
CCTCATATCG GGGGGGAGGC TGGGAGCTCA CATGCCCCGC CCGGGGCCCT CACCCTCATC	480
TTGACCGCC ATCCCATCGC CGCCCTCCTG TGCTACCCGG CGCGCGGTA CTTATGGGC	540
AGCATGACCC CCCAGGCCGT GCTGGCGTTC GTGGCCCTCA TCCCGCCGAC CTTGCCCGGC	600
ACCAACATCG TGCTTGGGGC CTTCCGGAG GACAGACACA TCGACCGCCT GGCCAAACGC	660
CAGCGCCCCG GCGAGCGGCT GGACCTGGCT ATGCTGGCTG CGATTGCGCG CGTTTACGGG	720
CTACTTGCCA ATACGGTGCG GTATCTGCAG TGCGGCGGGT CGTGGCGGGA GGA CTGGGGA	780
CAGCTTTCGG GGACGGCCGT GCCGCCCCAG GGTGCCGAGC CCCAGAGCAA CGCGGGCCCA	840
CGACCCCATATA TCGGGGACAC GTTATTTACC CTGTTTCGGG CCCCCGAGTT GCTGGCCCCC	900
AACGGCGACC TGTATAACGT GTTTGCCTGG GCCTTGACG TCTTGCCAA ACGCCTCCGT	960
TCCATGCACG TCTTTATCCT GGATTACGAC CAATCGCCCG CCGGCTGCCG GGACGCCCTG	1020
CTGCAACTTA CCTCCGGGAT GGTCCAGACC CACGTCACCA CCCCCGCTC CATACCGACG	1080
ATATGCGACC TGGCGCGCAC GTTTGCCCGG GAGATGGGGG AGGCTAACTG A	1131

(2) SEQ ID NO: 2 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 52 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2:

TGGGAGCTCA CATGCCCCGC CCCCggccCT CACCCTCATC TTCGATCGCC AT

52

(2) SEQ ID NO: 3 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 56 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

ATGAGGTACC GNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNATGGCG ATCGAA

56

(2) SEQ ID NO: 4 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 17 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4:

CCCCTCCAGC GCGGTAC 17

(2) SEQ ID NO: 5 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 17 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5:

CGCGCTCGAG GGGAGCT 17

(2) SEQ ID NO: 6 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

TGGGAGCTCA CATGCCCCGC C 21

(2) SEQ ID NO: 7 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 11 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7:

ATGAGGTACC G 11

(2) SEQ ID NO: 8 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 52 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 8:

TGGGAGCTCA CATGCCCCGC CCCCggccCT CACCCTCATC TTCGATCGCC AT

52

(2) SEQ ID NO: 9 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 70 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: misc 特征

(B) 位置: 23..25

(D) 其它信息: /注 = “ 80 % 野生型核苷酸, 20 % 其它三种核苷酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: misc 特征

(B) 位置: 41..55

(D) 其它信息: /注 = “ 80 % 野生型核苷酸, 20 % 其它三种核苷酸”

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 9:

TGGGAGCTCA CATGCCCCGC CCCCggccCT CACCCTCATC TTCGACCGCC ATCCCATCGC 60

CGCCCTCCTG 70

(2) SEQ ID NO: 10 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 38 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 10:

ATGAGGTACC GCGCAGCTGG GTAGCACAGG AGGGCGGC 38

(2) SEQ ID NO: 11 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 17 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 11:

CATGCCTTAT GCCGTGA 17

(2) SEQ ID NO: 12 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 33 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线型
 (ix) 特征:
 (A) 名称/关键词: CDS
 (B) 位置: 1..33
 (Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 12:

```
CCC ATC GCC GCC CTC CTG TGC TAC CCG GCC GCG
Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala
  1             5             10
```

33

(2) SEQ ID NO: 13 信息:
 (i) 序列特征:
 (A) 长度: 11 个氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线型
 (ii) 分子类型: 蛋白质
 (Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 13:

```
Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala
  1             5             10
```

(2) SEQ ID NO: 14 信息:
 (i) 序列特征:
 (A) 长度: 33 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线型
 (ix) 特征:
 (A) 名称/关键: CDS
 (B) 位置: join(1..3)
 (Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 14:

```
CCC ATC GCC TCC CTC CTG TGC TAC CCG GCC GCG
Pro Ile Ala Ser Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala
  1             5             10
```

33

(2) SEQ ID NO: 15 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 11 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 蛋白质

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 15:

```
Pro Ile Ala Ser Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala
  1             5             10
```

(2) SEQ ID NO: 16 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 33 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: CDS

(B) 位置: 1..3

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 16:

```
TCC ATC GGC GCC CTA CAG TGC TAC CCG GTC GCG
Ser Ile Gly Ala Leu Gln Cys Tyr Pro Val Ala
  1             5             10
```

33

(2) SEQ ID NO: 17 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 11 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 蛋白质

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 17:

Ser Ile Gly Ala Leu Gln Cys Tyr Pro Val Ala
 1 5 10

(2) SEQ ID NO: 18 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 33 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: CDS

(B) 位置: 1..33

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 18:

CCC ATC GCC ACC CTG CTG TGC TAC CCG GCC GCG
 Pro Ile Ala Thr Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala
 1 5 10

33

(2) SEQ ID NO: 19 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 10 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 蛋白质

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 19:

Pro Ile Ala Thr Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala
 1 5 10

(2) SEQ ID NO: 20 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 33 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: CDS

(B) 位置: 1..33

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 20:

```
CCC ATC GCC GCC TTA CTG TTA TAC CCG ACC GCG
Pro Ile Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Pro Thr Ala
  1             5             10
```

33

(2) SEQ ID NO: 21 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 11 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 蛋白质

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 21:

```
Pro Ile Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Pro Thr Ala
  1             5             10
```

(2) SEQ ID NO: 22 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 33 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: CDS

(B) 位置: 1..33

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 22:

```
CCC ATC GCC GCC CTC GTG TGC TAC CCG GCC GCG
Pro Ile Ala Ala Leu Val Cys Tyr Pro Ala Ala
  1             5             10
```

33

(2) SEQ ID NO: 23 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 11 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 蛋白质

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 23:

Pro Ile Ala Ala Leu Val Cys Tyr Pro Ala Ala
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 24 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 58 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 24:

TGGGAGCTCA CATGCCCCGC CCCCGGCCCT CACCNNNNNN NNNGACCGCC ATCCCATC

58

(2) SEQ ID NO: 25 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 51 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 25:

ATAAGGTACC GCGCGGCCGG GTAGCANNNN NNNNNGGCGA TGGGATGGCG G

51

(2) SEQ ID NO: 26 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 33 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 26:

ACTACTGGAT CCATGGCGGG CCCCAGGCCT GTG

33

(2) SEQ ID NO: 27 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 33 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 27:

TACTACGGAT CCTCAGGCGG CGGTCCTTTG AGC

33

(2) SEQ ID NO: 28 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 18 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 28:

CTGCTGAAGA GGCTGCTC 18

(2) SEQ ID NO: 29 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 19 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 29:

ACACAGATGC GGTTTCATG 19

(2) SEQ ID NO: 30 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 18 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 30:

CTGGACGTGG ACCTGCAG 18

(2) SEQ ID NO: 31 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 18 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 31:

GTTAATGATG ACCACATC 18

(2) SEQ ID NO: 32 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 18 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 32:

TGTAAAACGA CGGCCAGT 18

(2) SEQ ID NO: 33 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 18 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 33:

CAGGAAACAG CTATGACC 18

(2) SEQ ID NO: 34 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 34:

TGTGTCCCAT ACTACTACAA G 21

(2) SEQ ID NO: 35 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 35:

TGAGAACTCA GCAGCATGCT C 21

(2) SEQ ID NO: 36 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 18 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 36:

GTGCTAGATG TCGACCTA 18

(2) SEQ ID NO: 37 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 18 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 37:

ACCTGGATAA AGCCTATG 18

(2) SEQ ID NO: 38 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 19 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 38:

AAGCAGGCGC TCTCTCTGA 19

(2) SEQ ID NO: 39 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 18 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 39:

CTATTTCTCA TATGATGT 18

(2) SEQ ID NO: 40 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 18 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 40:

GTTACAGTGT CTCTAGAG 18

(2) SEQ ID NO: 41 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 41:

CTAGGTCCTG CCATGGCGTC CGCG

24

(2) SEQ ID NO: 42 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 27 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 42:

ACTACTACTA GATCTCGATC CCGCGAA

27

(2) SEQ ID NO: 43 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 41 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 43:

ATGATGATGA TGATGGCTGC TAGCCATAGT ATATCTCCTT C

41

(2) SEQ ID NO: 44 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 39 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 44:

CGGCACCAGG CCGCTGCTGT GATGATGATG ATGATGGCT

39

(2) SEQ ID NO: 45 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 42 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 45:

AGTAGTATCC ATGGAGCTGC CGCGCGGCAC CAGGCCGCTG CT

42

(2) SEQ ID NO: 46 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 46:

Met Ala Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser Ser Met
20

(2) SEQ ID NO: 47 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 19 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 47:

Ala Leu Thr Leu Ile Phe Asp Arg His Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys
1 5 10 15

Tyr Pro Ile

(2) SEQ ID NO: 48 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 606 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: CDS

(B) 位置: 7..600

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 48:

GGATCC ATG GCG GGC CCC AGG CCT GTG GTG CTG AGC GGG CCT TCG GGA	48
Met Ala Gly Pro Arg Pro Val Val Leu Ser Gly Pro Ser Gly	
1 5 10	
GCT GGG AAG AGC ACC CTG CTG AAG AGG CTG CTC CAG GAG CAC AGC GGC	96
Ala Gly Lys Ser Thr Leu Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu His Ser Gly	
15 20 25 30	
ATC TTT GGC TTC AGC GTG TCC CAT ACC ACG AGG AAC CCG AGG CCC GGC	144
Ile Phe Gly Phe Ser Val Ser His Thr Thr Arg Asn Pro Arg Pro Gly	
35 40 45	
GAG GAG AAC GGC AAA GAT TAC TAC TTT GTA ACC AGG GAG GTG ATG CAG	192
Glu Glu Asn Gly Lys Asp Tyr Tyr Phe Val Thr Arg Glu Val Met Gln	
50 55 60	
CGT GAC ATA GCA GCC GGC GAC TTC ATC GAG CAT GCC GAG TTC TCG GGC	240
Arg Asp Ile Ala Ala Gly Asp Phe Ile Glu His Ala Glu Phe Ser Gly	
65 70 75	
AAC CTG TAT GGC ACG AGC AAG GTG GCG GTG CAG GCC GTG CAG GCC ATG	288
Asn Leu Tyr Gly Thr Ser Lys Val Ala Val Gln Ala Val Gln Ala Met	
80 85 90	
AAC CGC ATC TGT GTG CTG GAC GTG GAC CTG CAG GGT GTG CGG AAC ATC	336
Asn Arg Ile Cys Val Leu Asp Val Asp Leu Gln Gly Val Arg Asn Ile	
95 100 105 110	
AAG GCC ACC GAT CTG CGG CCC ATC TAC ATC TCT GTG CAG CCG CCT TCA	384
Lys Ala Thr Asp Leu Arg Pro Ile Tyr Ile Ser Val Gln Pro Pro Ser	
115 120 125	

CTG CAC GTG CTG GAG CAG CGG CTG CGG CAG CGC AAC ACT GAA ACC GAG	432
Leu His Val Leu Glu Gln Arg Leu Arg Gln Arg Asn Thr Glu Thr Glu	
130 135 140	
GAG AGC CTG GTG AAG CGG CTG GCT GCT GCC CAG GCC GAC ATG GAG AGC	480
Glu Ser Leu Val Lys Arg Leu Ala Ala Ala Gln Ala Asp Met Glu Ser	
145 150 155	
AGC AAG GAG CCC GGC CTG TTT GAT GTG GTC ATC ATT AAC GAC AGC CTG	528
Ser Lys Glu Pro Gly Leu Phe Asp Val Val Ile Ile Asn Asp Ser Leu	
160 165 170	
GAC CAG GCC TAC GCA GAG CTG AAG GAG GCG CTC TCT GAG GAA ATC AAG	576
Asp Gln Ala Tyr Ala Glu Leu Lys Glu Ala Leu Ser Glu Glu Ile Lys	
175 180 185 190	
AAA GCT CAA AGG ACC GGC GCC TGA GGATCC	606
Lys Ala Gln Arg Thr Gly Ala *	
195	

(2) SEQ ID NO: 49 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 198 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 蛋白质

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 49:

Met Ala Gly Pro Arg Pro Val Val Leu Ser Gly Pro Ser Gly Ala Gly	
1 5 10 15	
Lys Ser Thr Leu Leu Lys Arg Leu Leu Gln Ala His Ser Gly Ile Phe	
20 25 30	
Gly Phe Ser Val Ser His Thr Thr Arg Asn Pro Arg Pro Gly Glu Glu	
35 40 45	
Asn Gly Lys Asp Tyr Tyr Phe Val Thr Arg Glu Val Met Gln Arg Asp	
50 55 60	

Ile	Ala	Ala	Gly	Asp	Phe	Ile	Glu	His	Ala	Glu	Phe	Ser	Gly	Asn	Leu	65	70	75	80
Tyr	Gly	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Val	Gln	Ala	Val	Gln	Ala	Met	Asn	Arg	85	90	95	
Ile	Cys	Val	Leu	Asp	Val	Asp	Leu	Gln	Gly	Val	Arg	Asn	Ile	Lys	Ala	100	105	110	
Thr	Asp	Leu	Arg	Pro	Ile	Tyr	Ile	Ser	Val	Gln	Pro	Pro	Ser	Leu	His	115	120	125	
Val	Leu	Glu	Gln	Arg	Leu	Arg	Gln	Arg	Asn	Thr	Glu	Thr	Glu	Glu	Ser	130	135	140	
Leu	Val	Lys	Arg	Leu	Ala	Ala	Ala	Gln	Ala	Asp	Met	Glu	Ser	Ser	Lys	145	150	155	160
Glu	Pro	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	Val	Ile	Ile	Asn	Asp	Ser	Leu	Asp	Gln	165	170	175	
Ala	Tyr	Ala	Glu	Leu	Lys	Glu	Ala	Leu	Ser	Glu	Glu	Ile	Lys	Lys	Ala	180	185	190	
Gln	Arg	Thr	Gly	Ala	*											195			

(2) SEQ ID NO: 50 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 660 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: CDS

(B) 位置: 25..621

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 50:

CTGGGTCGGG TCCCCGCGGA CGGC ATG GCA GGA CCT AGG CCA GTA GTG CTG	51
Met Ala Gly Pro Arg Pro Val Val Leu	
1 5	
AGC GGG CCG TCA GGG GCA GGG AAG AGC ACT CTG CTC AAG AAG CTG TTC	99
Ser Gly Pro Ser Gly Ala Gly Lys Ser Thr Leu Leu Lys Lys Leu Phe	
10 15 20 25	
CAG GAG CAC AGC AGC ATC TTC GGC TTC AGT GTG TCC CAT ACT ACA AGG	147
Gln Glu His Ser Ser Ile Phe Gly Phe Ser Val Ser His Thr Thr Arg	
30 35 40	
AAC CCA CGA CCT GGT GAA GAA GAT GGC AAA GAT TAC TAC TTT GTG ACC	195
Asn Pro Arg Pro Gly Glu Glu Asp Gly Lys Asp Tyr Tyr Phe Val Thr	
45 50 55	
AGG GAG ATG ATG CAG CGT GAT ATT GCA GCA GGG GAC TTC ATT GAG CAT	243
Arg Glu Met Met Gln Arg Asp Ile Ala Ala Gly Asp Phe Ile Glu His	
60 65 70	
GCT GAG TTC TCA GGG AAC CTG TAC GGG ACA AGC AAG GAA GCT GTT CGG	291
Ala Glu Phe Ser Gly Asn Leu Tyr Gly Thr Ser Lys Glu Ala Val Arg	
75 80 85	
GCT GTG CAG GCC ATG AAC CGC ATC TGC GTG CTA GAT GTC GAC CTA CAA	339
Ala Val Gln Ala Met Asn Arg Ile Cys Val Leu Asp Val Asp Leu Gln	
90 95 100 105	
GGT GTG CGC AGC ATC AAG AAG ACT GAT CTG TGT CCC ATC TAC ATC TTT	387
Gly Val Arg Ser Ile Lys Lys Thr Asp Leu Cys Pro Ile Tyr Ile Phe	
110 115 120	
GTG CAG CCT CCC TCG CTG GAC GTG CTG GAG CAA CGA CTG CGA CTG CGC	435
Val Gln Pro Pro Ser Leu Asp Val Leu Glu Gln Arg Leu Arg Leu Arg	
125 130 135	
AAC ACT GAG ACT GAG GAG AGT CTG GCA AAG CGG CTG GCA GCT GCA CGG	483
Asn Thr Glu Thr Glu Glu Ser Leu Ala Lys Arg Leu Ala Ala Ala Arg	
140 145 150	

ACA GAC ATG GAG AGC AGC AAG GAG CCT GGC TTG TTT GAC CTG GTG ATC 531
 Thr Asp Met Glu Ser Ser Lys Glu Pro Gly Leu Phe Asp Leu Val Ile
 155 160 165

 ATC AAT GAC GAC CTG GAT AAA GCC TAT GCA ACC CTG AAG CAG GCG CTC 579
 Ile Asn Asp Asp Leu Asp Lys Ala Tyr Ala Thr Leu Lys Gln Ala Leu
 170 175 180 185

 TCT GAG GAA ATC AAG AAA GCA CAG GGA ACT GGC CAC GCC TGA 621
 Ser Glu Glu Ile Lys Lys Ala Gln Gly Thr Gly His Ala *
 190 195

 AGGCCTGCTT CATTCCACAG AGTGATGTCT GTGGTCTAA 660

(2) SEQ ID NO: 51 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 199 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 蛋白质

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 51:

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

 Lys Ser Thr Leu Leu Lys Lys Leu Phe Gln Glu His Ser Ser Ile Phe
 20 25 30

 Gly Phe Ser Val Ser His Thr Thr Arg Asn Pro Arg Pro Gly Glu Glu
 35 40 45

 Asp Gly Lys Asp Tyr Tyr Phe Val Thr Arg Glu Met Met Gln Arg Asp
 50 55 60

 Ile Ala Ala Gly Asp Phe Ile Glu His Ala Glu Phe Ser Gly Asn Leu
 65 70 75 80

Tyr Gly Thr Ser Lys Glu Ala Val Arg Ala Val Gln Ala Met Asn Arg
 85 90 95
 Ile Cys Val Leu Asp Val Asp Leu Gln Ala Val Arg Ser Ile Lys Lys
 100 105 110
 Thr Asp Leu Cys Pro Ile Tyr Ile Phe Val Gln Pro Pro Ser Leu Asp
 115 120 125
 Val Leu Glu Gln Pro Leu Arg Leu Arg Asn Thr Glu Thr Glu Glu Ser
 130 135 140
 Leu Ala Lys Arg Leu Pro Ala Ala Arg Thr Asp Met Glu Ser Ser Lys
 145 150 155 160
 Glu Pro Gly Leu Phe Asp Leu Val Ile Ile Asn Asp Asp Leu Asp Lys
 165 170 175
 Ala Tyr Ala Thr Leu Lys Gln Ala Leu Ser Glu Glu Ile Lys Lys Ala
 180 185 190
 Gln Gly Thr Gly His Ala *
 195

(2) SEQ ID NO: 52 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 16 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 52:

TCCCCACCT CCAGGC 16

(2) SEQ ID NO: 53 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 18 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 53:

CTCAGTGTTG CGCAGTCG 18

(2) SEQ ID NO: 54 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 18 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

(Xi) 序列描述: SEQ ID NO: 54:

GCCGAAGATG CTGCTGTC 18

说明书附图

步骤

1. 退火寡核苷酸与寡核苷酸 II

2. 用大肠杆菌 Pol.I 大片段延伸

3. PCR 扩增

4. 用 Kpn I 和 Sac I 消化

5. 用 KpnI 和 Sac I 消化 pMDC，
接着与包含随机序列的片段连接

6. 转化 KY895，在羧苄青霉素和
TK 选择培养基上评分

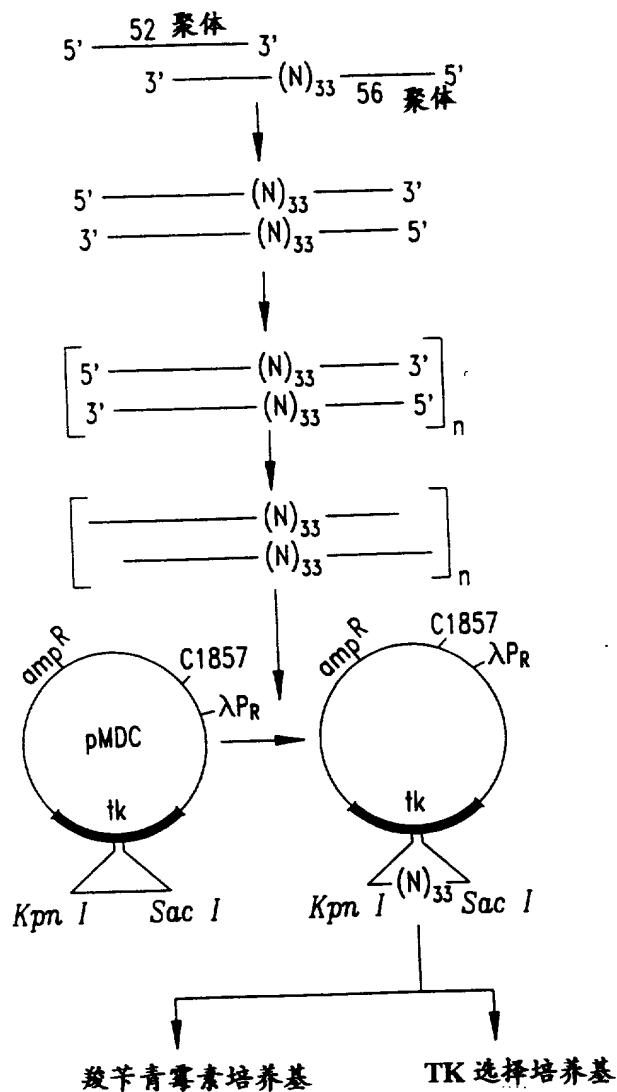
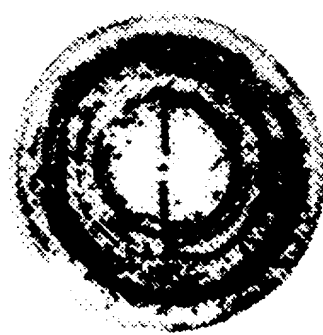
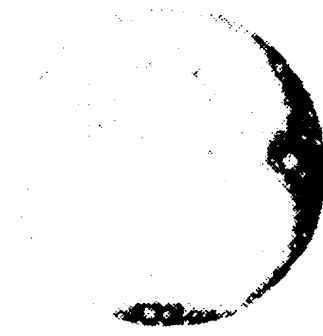
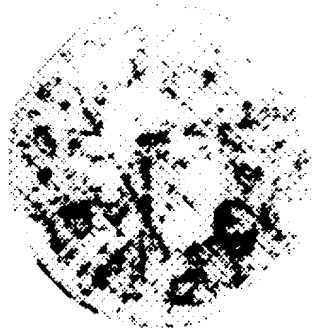
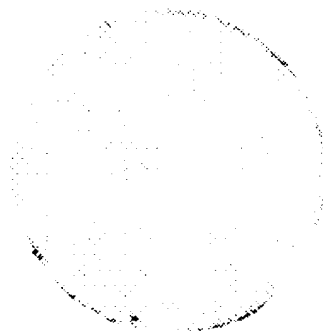
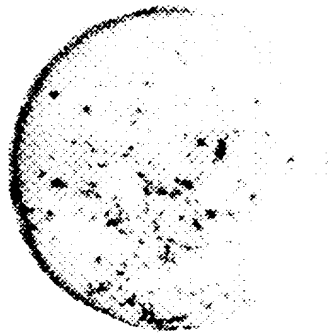
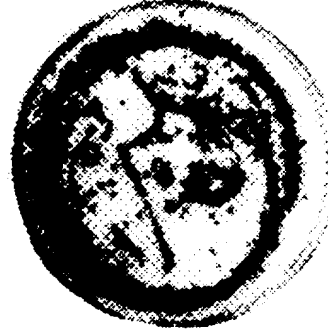
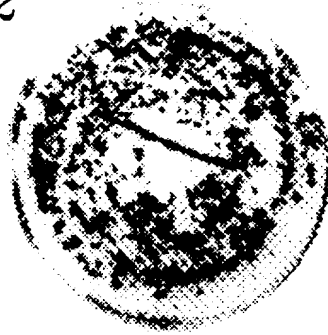


图 1

图 2

TK - 选择

AZT - 选择



165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	
CCC	ATC	GCC	GCC	CTC	CTG	TGC	TAC	CCG	GCC	GCG	WILD-TYPE
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	

图 3

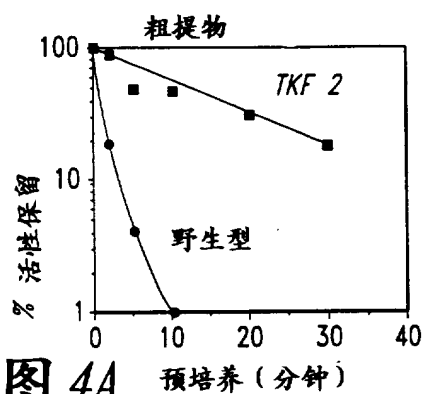


图 4A

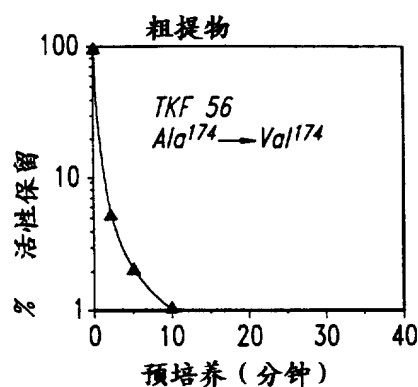


图 4B

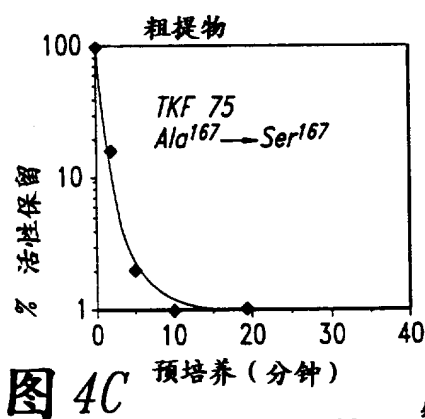


图 4C

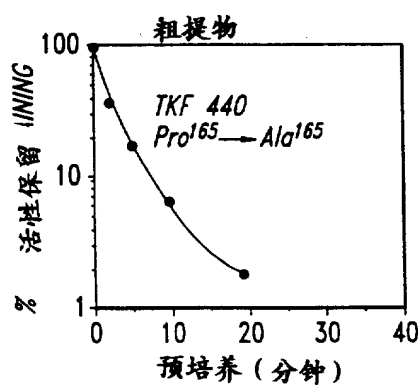


图 4D

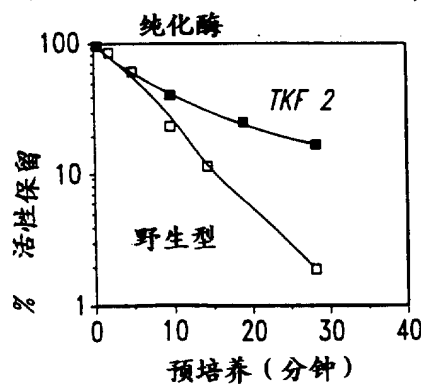


图 4E

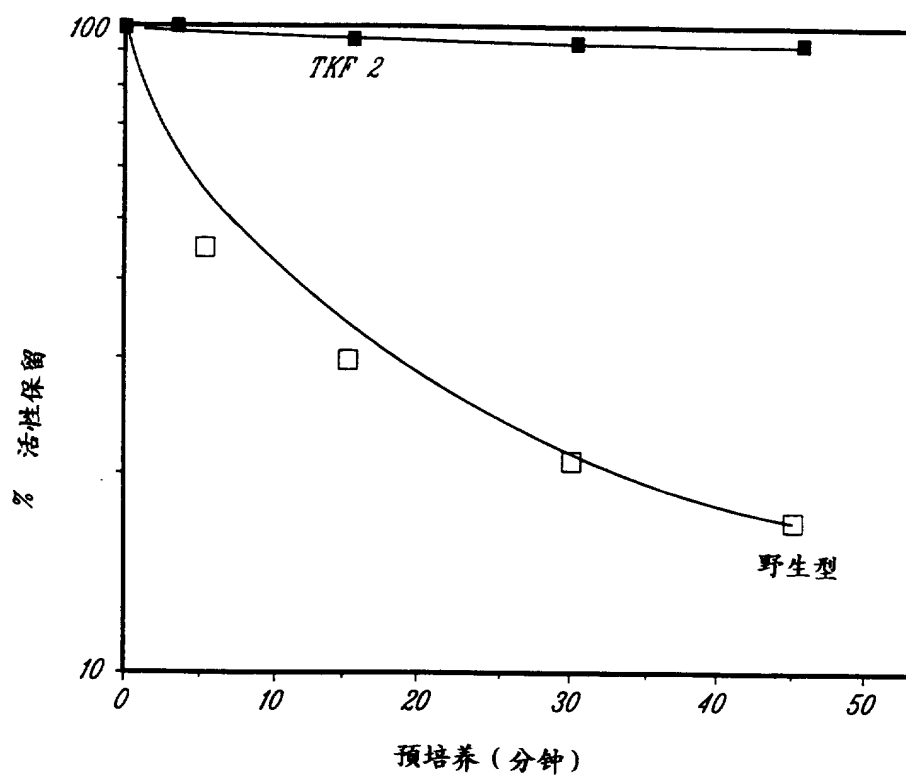


图 5

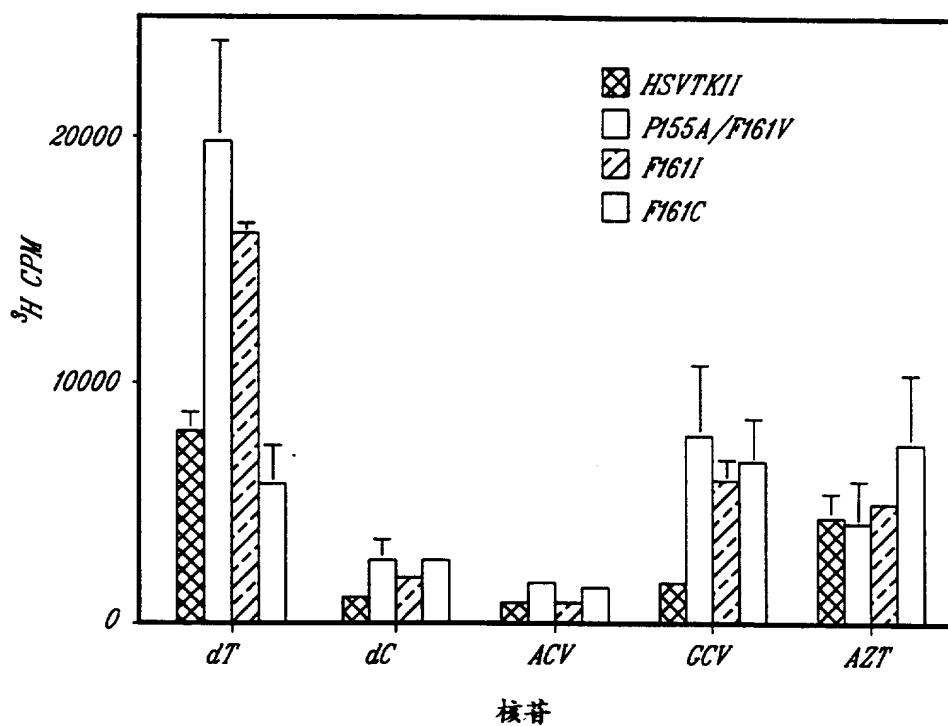


图 10

图 6



43 kDa

TKF 2

野生型

-RNA
 HSVTKII
 P155A/F161V
 F161I
 F161C
 D162E
 D162G
 P163P/H164Q
 F161I/R163H
 F161L

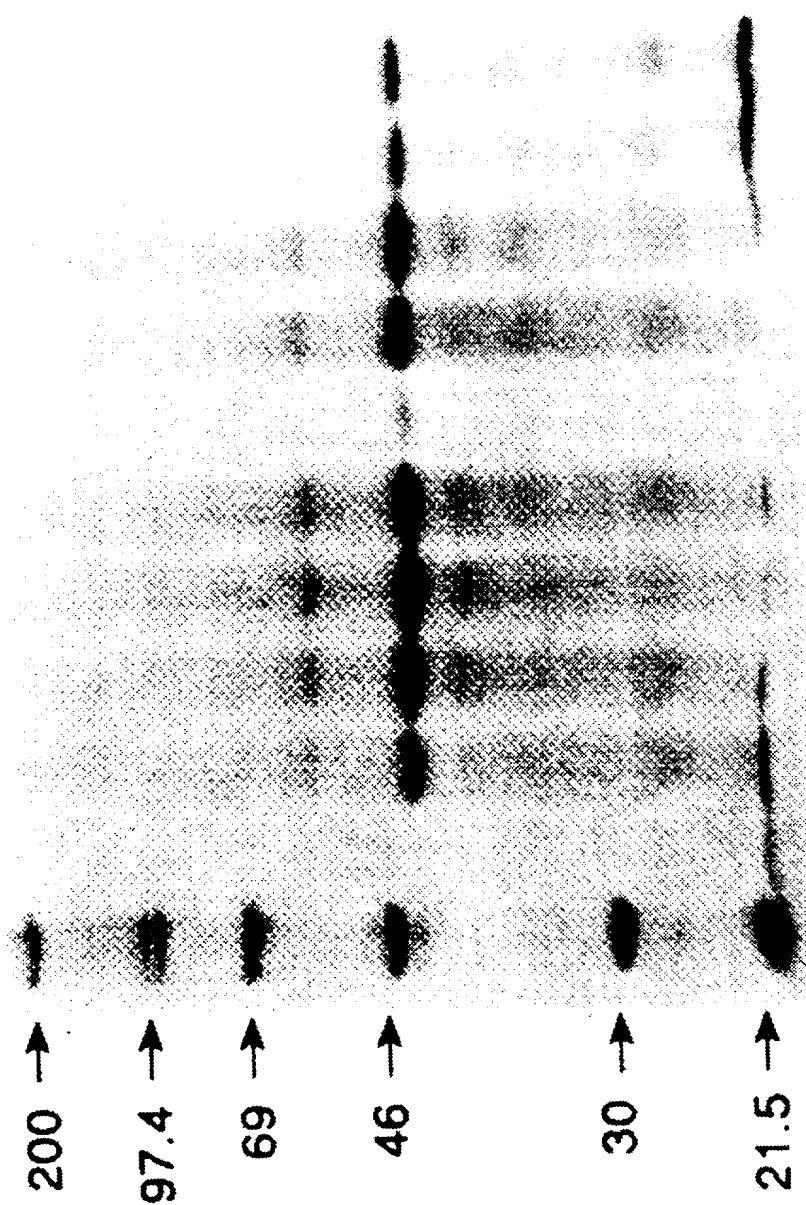


图 7

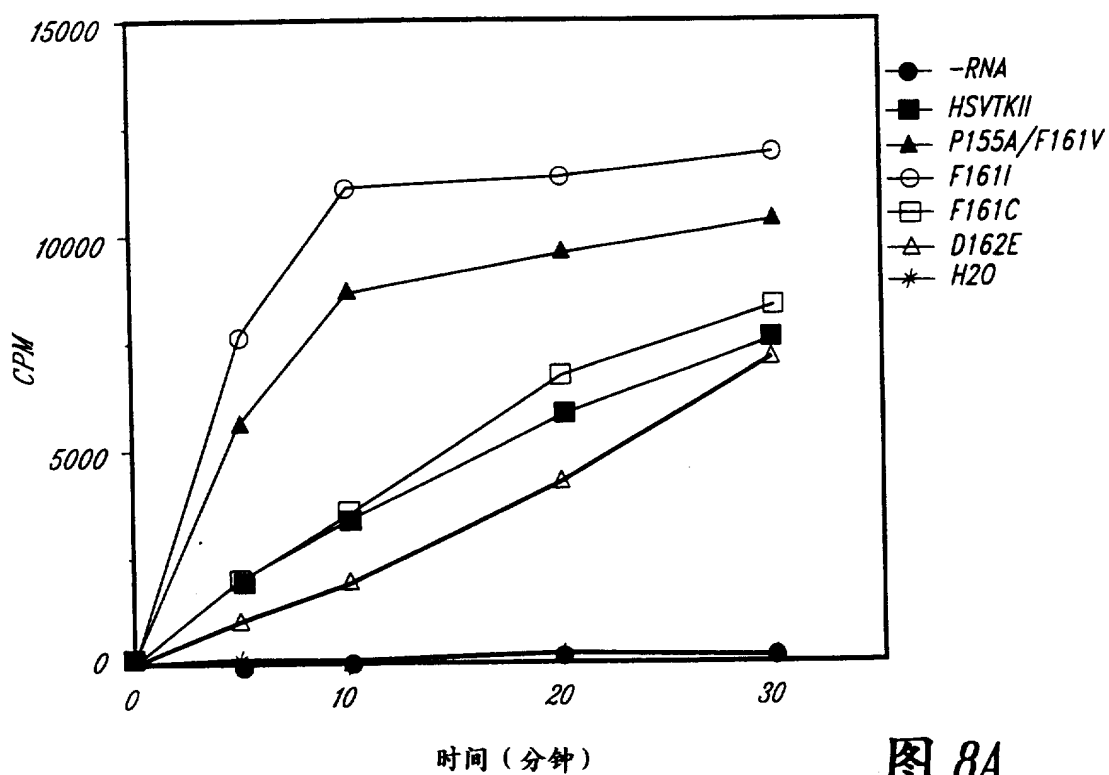


图 8A

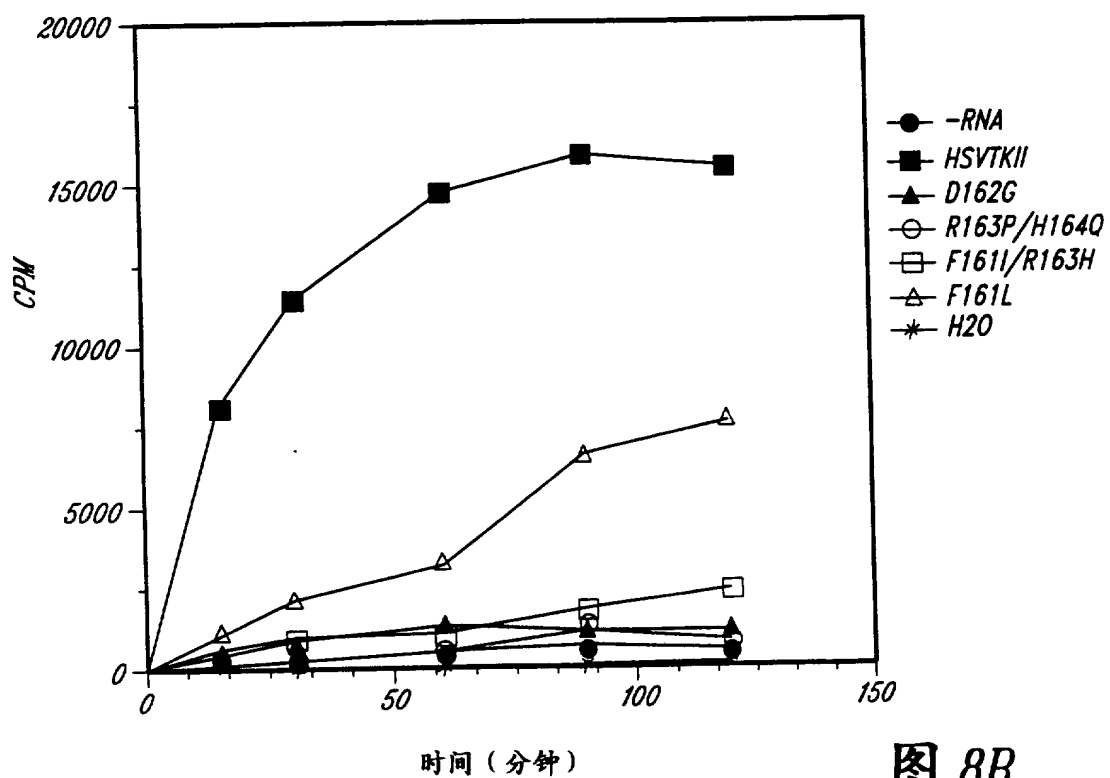


图 8B

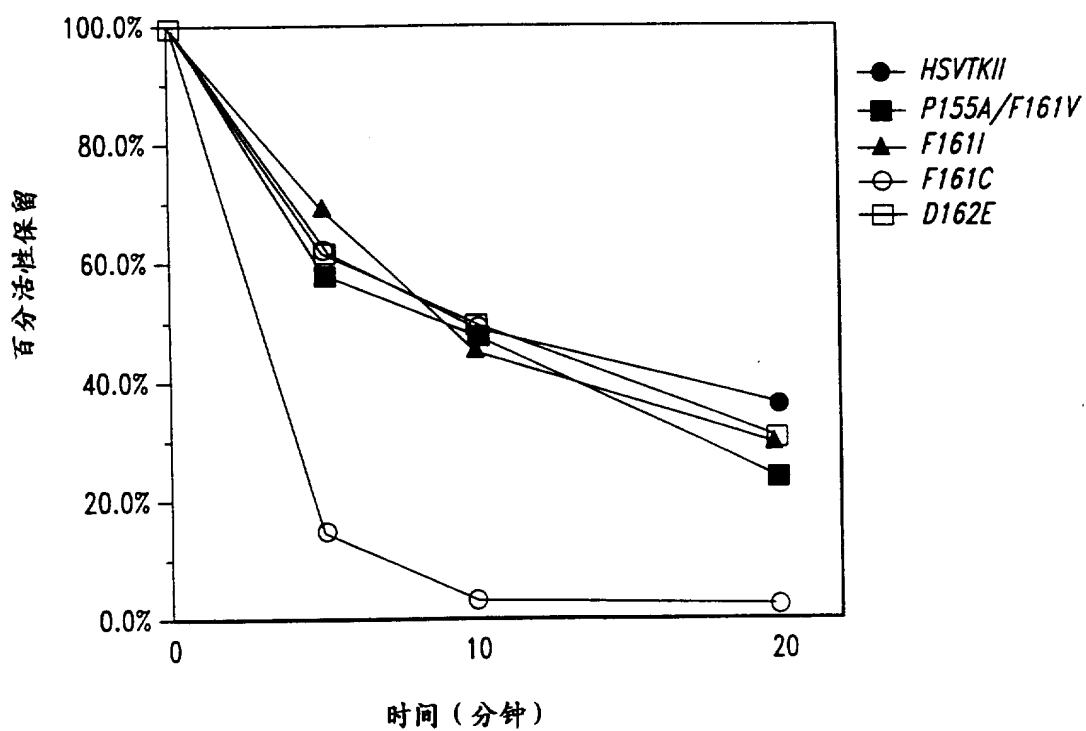


图 9A

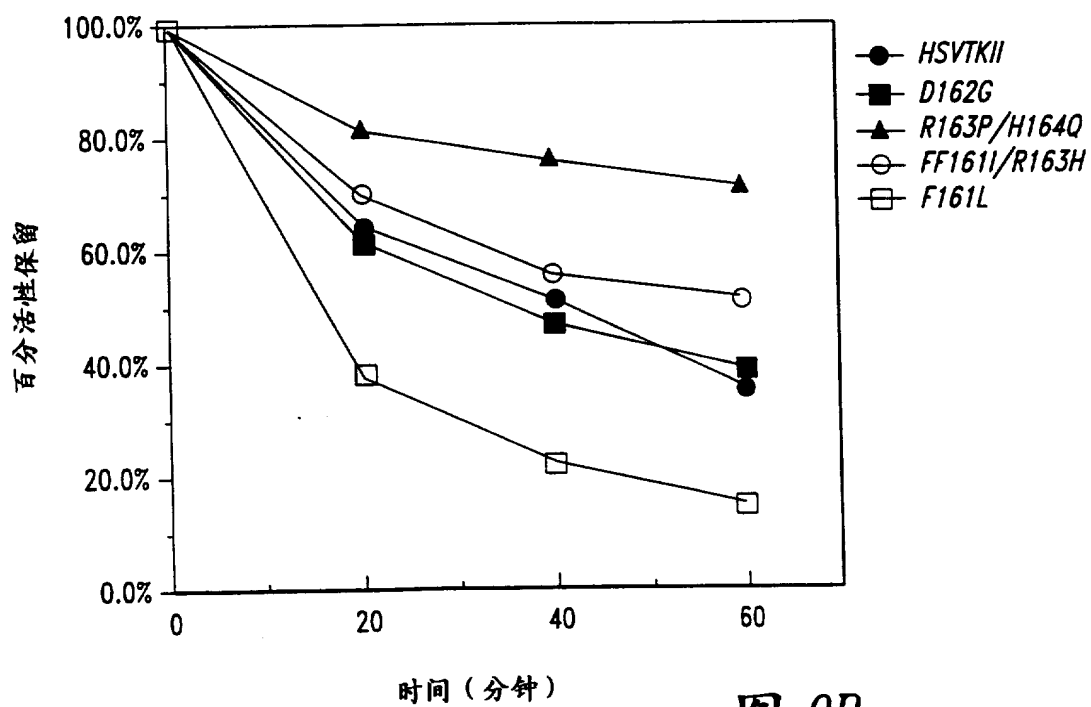


图 9B

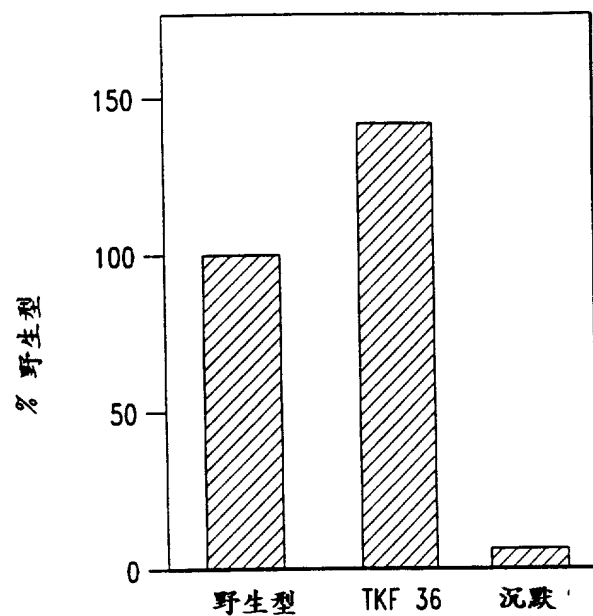


图 11

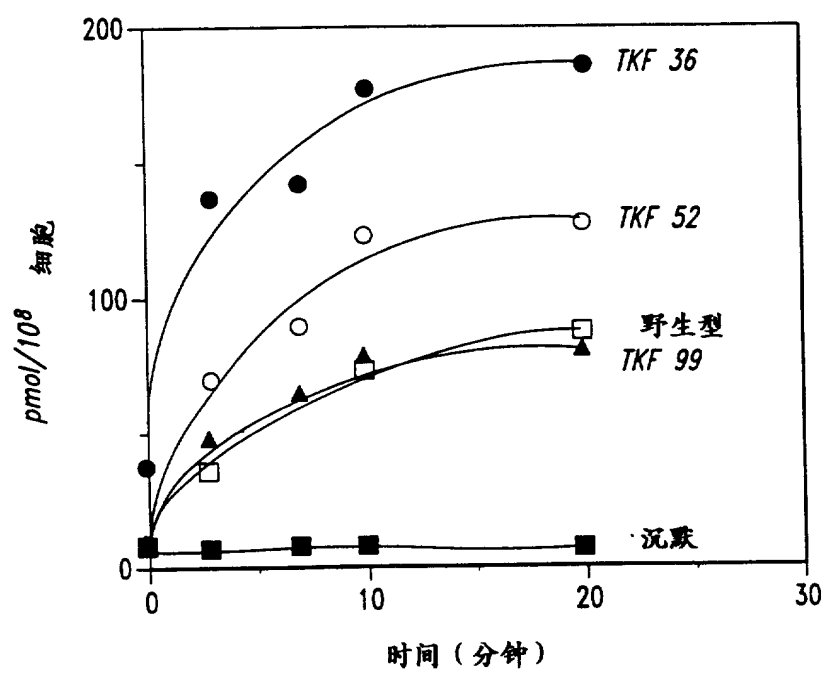


图 12

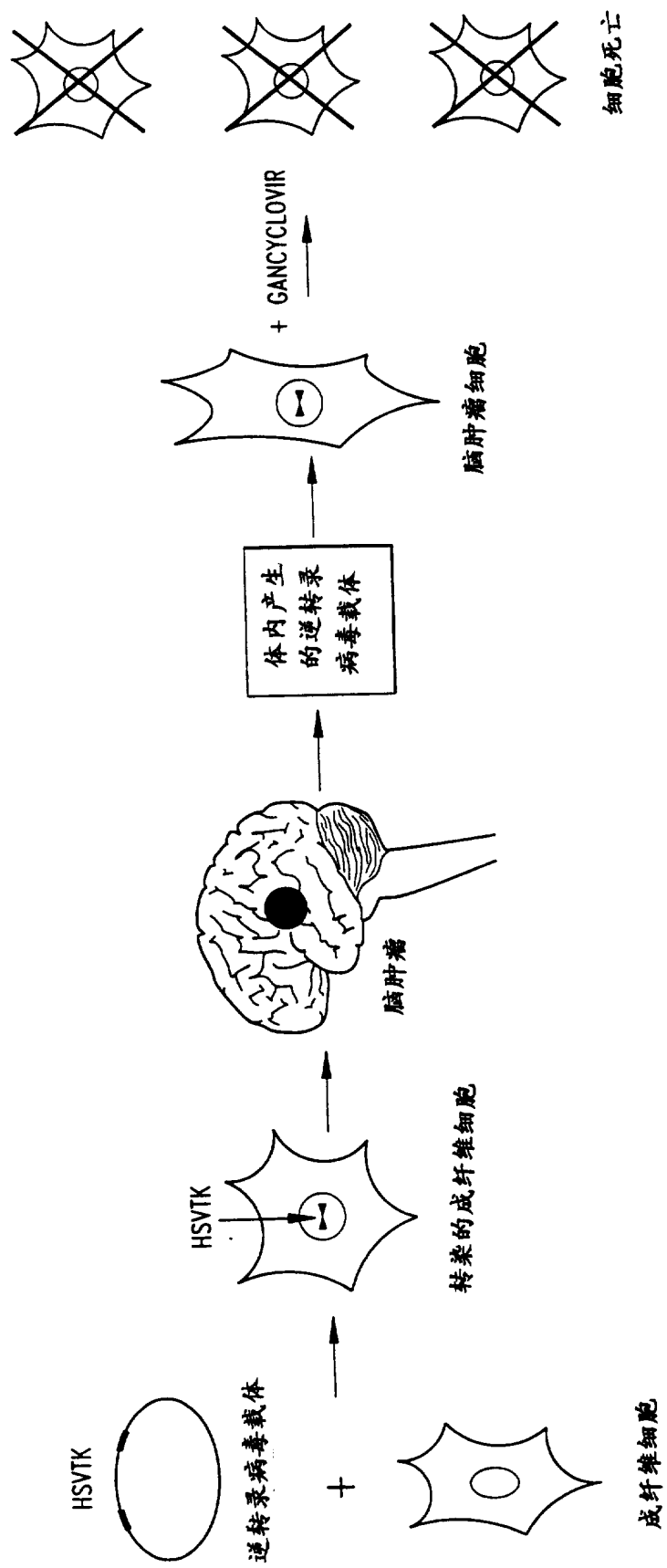


图 13

GCV		ACV	
选择	突变体数	选择	突变体数
dT (2 μ g/ml)	426	dT (2 μ g/ml)	426
GCV* (2 μ g/ml)	197		
GCV* (1 μ g/ml)	51	ACV* (1 μ g/ml)	116
GCV* (0.5 μ g/ml)	47		
GCV* (0 μ g/ml)	26	ACV* (0 μ g/ml)	54

* 用胸苷 (1 g/ml)

图 16

编号	序列	胸苷	相对活性 (% HSVTK)	
			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%

下列克隆在随机化区外侧含有附加氨基酸改变/缺失

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

图 18

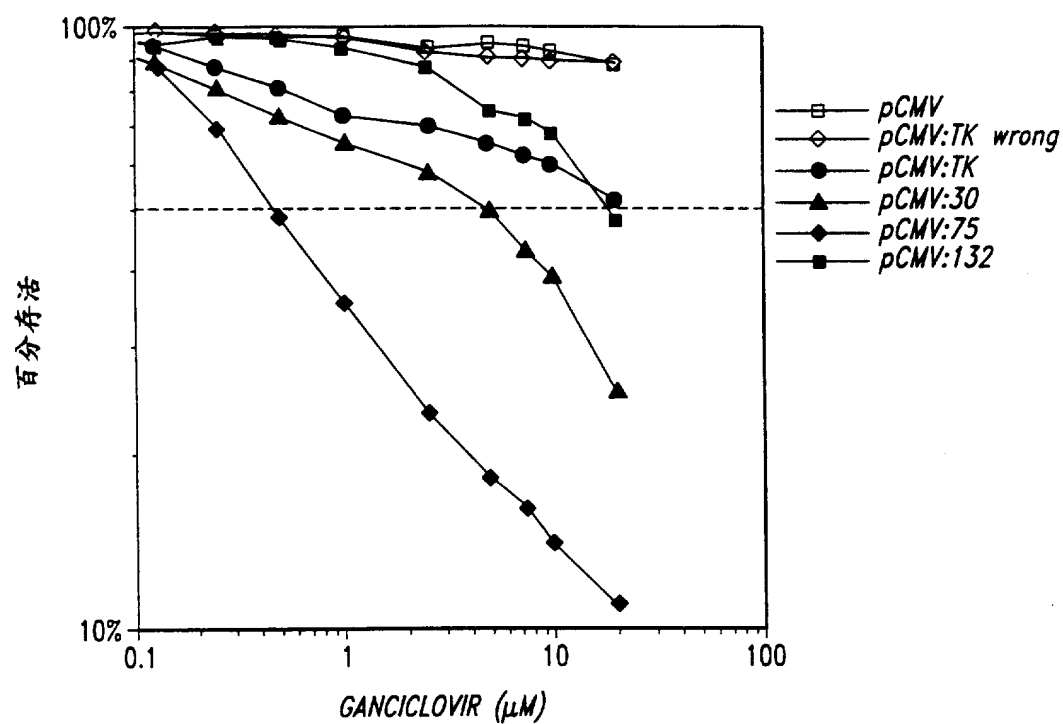


图 19

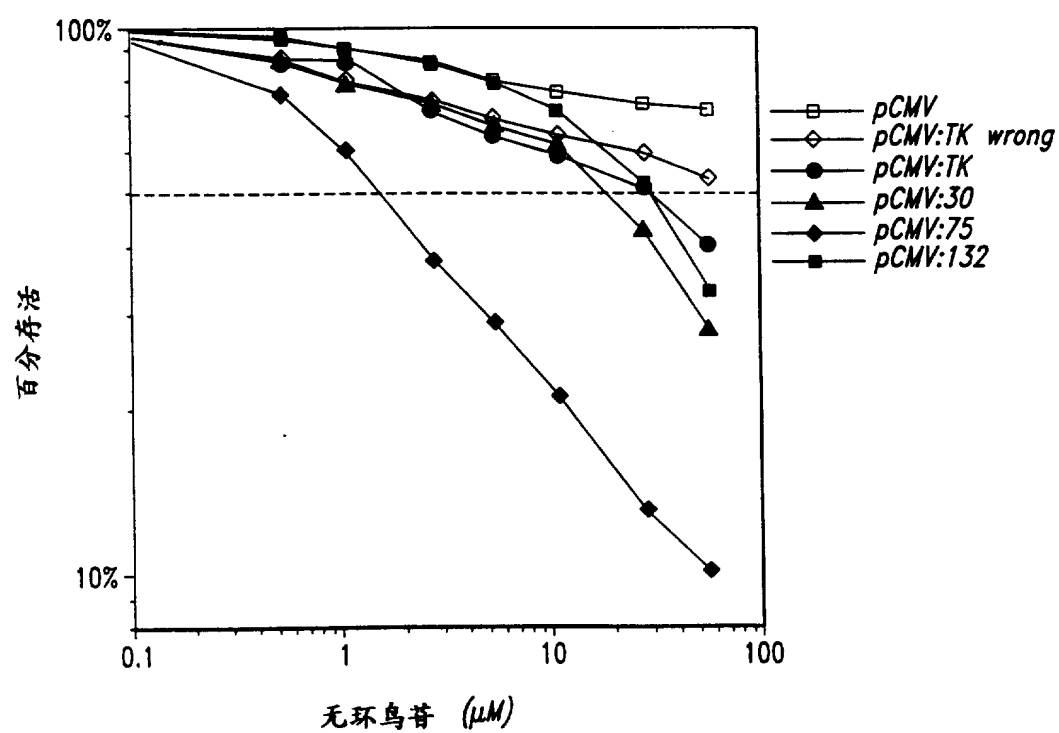


图 20

人鸟苷酸激酶

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 CCC 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 CGG AAC ATC AAG GCC ACC GAT CTG CGG 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 CGG CTG CGG 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 CGG 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 DPA	
601	
GGA TCC	

图 21

鼠鸟苷酸激酶

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 AGG 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 CGG 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
CCC ATG AAC CGC ATC TGC GTG CTA GAT GTC GAC CTA CAA GGT GTG CGC 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 CGG 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
CGG ACA GAC ATG GAG AGC 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	
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

图 22