

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 022**

51 Int. Cl.:
C12N 15/54 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05766582 .0**
96 Fecha de presentación: **17.06.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1781789**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2007**

54 Título: **TIMIDINA QUINASA.**

30 Prioridad:
18.06.2004 GB 0413702

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.01.2012

73 Titular/es:
MOLMED SPA
VIA OLGETTINA 58
20132 MILAN, IT

72 Inventor/es:
SALVATORI, Francesca;
MASSA, Stefania;
RADRIZZANI, Marina y
TOMA, Salvatore

74 Agente: **Campello Estebanz, Reyes**

ES 2 372 022 T3

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

DESCRIPCIÓN

Timidina quinasa.

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica un gen de timidina quinasa sustancialmente no susceptible de remodelación, y su uso en terapia.

Antecedentes de la Invención

10 Existe un interés considerable en el uso de genes suicidas metabólicos en terapia génica. En la bibliografía se describen numerosos genes suicidas, tales como, por ejemplo, los genes que codifican citosina-desaminasa, purina-nucleósido-fosforilasa o una timidina quinasa. Entre estos genes, el gen que codifica la timidina quinasa del virus del herpes simplex tipo 1 (HSV-tk) es especialmente ventajoso desde un punto de vista terapéutico. El gen HSV-tk expresa una enzima que cuando se utiliza en combinación con el análogo de nucleósido ganciclovir, es capaz de eliminar específicamente las células en división. De particular importancia es la presencia de un efecto propagado de toxicidad (efecto "espectador") que está asociado con el uso de HSV-tk/ganciclovir. Este efecto se manifiesta en sí mismo en la destrucción no sólo de las células que han incorporado el gen de timidina quinasa (tk) sino también las células vecinas.

15 El mecanismo de acción del sistema HSV-tk/ganciclovir puede reseñarse como sigue: las células de mamífero modificadas para expresar la enzima TK implementan el primer paso de fosforilación de ganciclovir para producir ganciclovir-monofosfato. Subsiguientemente, las quinazas celulares permiten que este ganciclovir-monofosfato se metabolice sucesivamente a difosfato y luego trifosfato. El ganciclovir-trifosfato así generado, produce luego efectos tóxicos al incorporarse en el DNA, e inhibe parcialmente la polimerasa alfa del DNA celular, causando con ello la detención de la síntesis de DNA y conduciendo por consiguiente a la muerte celular (Moolten, 1986; Mullen, 1994).

20 El sistema HSV-tk/ganciclovir puede utilizarse en un gran número de aplicaciones terapéuticas y se han implementado numerosas pruebas clínicas en la última década. Métodos de utilización del gen HSV-tk en terapia génica se describen, por ejemplo, en los documentos WO 90/07936, US 5.837.510, US 5.861.290, WO 98/04290, WO 97/37542 y US 5.631.236.

25 Una aplicación interesante del sistema HSV-tk/ganciclovir es en la prevención de la enfermedad de rechazo inverso (GvHD), una afección que puede interferir con el resultado del trasplante alogénico de médula ósea, el tratamiento de elección para muchas enfermedades malignas hematológicas. La GvHD ocurre cuando las células T en el injerto de células madre trasplantado comienzan a atacar el cuerpo del receptor. La eliminación de las células T del injerto puede prevenir la GvHD, pero favorece también la recurrencia de la enfermedad y el rechazo del injerto. Para contrarrestar estos efectos, los pacientes de trasplante alogénico de médula ósea pueden tratarse por introducción de linfocitos T del donante después de un cierto retardo subsiguiente al trasplante alogénico de médula ósea. La transferencia del gen HSV-tk a los linfocitos T del donante permite su erradicación después de la administración de ganciclovir en el caso de la aparición de GvHD. En una prueba, los pacientes recibieron un trasplante de médula ósea empobrecido en células T junto con dosis crecientes de linfocitos donantes transducidos con el gen HSV-tk (Tiberghien et al., 2001). Las células circulantes que expresaban HSV-tk pudieron detectarse durante más de un año después del injerto de todos los pacientes. Seis de los doce pacientes desarrollaron GvHD y recibieron ganciclovir, reduciendo sustancialmente el número de células circulantes modificadas (disminución media de 85% en número absoluto).

30 Se han producido mutantes en el gen HSV-tk que aumentan su actividad biológica. Ejemplos de tales genes HSV-tk mutantes se describen, por ejemplo, en Kokoris et al (1999), WO 95/30007, US 5.877.010, WO 99/19466 y WO 95/14102. Sin embargo, un grave problema asociado con el sistema timidina quinasa/ganciclovir es la aparición de resistencia a ganciclovir en las células HSV-tk transducidas. Esto tiene una importancia particular, dado que la proporción relativa de células que son resistentes a ganciclovir puede aumentar rápidamente a lo largo del curso de tratamiento.

35 Se encontró que la presencia de resistencia a ganciclovir en una línea de células T linfoblastoides humanas transducida con un vector retroviral que contiene el gen HSV-tk está asociada con una delección de 227 pares de bases en el gen HSV-tk (Fillat et al., 2003). La misma delección estaba presente también en células T humanas primarias transducidas con el vector y en 12 pacientes que recibieron células T transducidas del donante (Garin et al., 2001). WO 01/79502 describe que la causa de esta delección se cree es debida a la presencia de secuencias de nucleótidos en el mRNA de HSV-tk que actúan como sitios de remodelación para causar la producción de una proporción de partículas de virus que llevan una forma aberrante del gen, llevando el resto el gen de longitud total. Un mutante del gen de timidina quinasa se describe en WO 01/79502 y en Chalmers 2001, Molecular Therapy 4:146-148, en la cual se han eliminado los sitios de remodelación, y que reduce la producción de la forma aberrante del gen de timidina quinasa. Sin embargo, este mutante está asociado todavía con una cantidad perjudicial de

remodelación génica. Constructos de fusión CD34-tk se describen en Rettig et al., 2003. Estos constructos de fusión contienen genes HSV-tk modificados. Sin embargo, no existe demostración alguna de que los genes modificados reduzcan la remodelación del mRNA de HSV-tk.

5 Así pues, persiste la necesidad de un gen de timidina quinasa modificado que no sea susceptible de remodelación génica y que aborde los problemas asociados con la resistencia a ganciclovir.

Sumario de la Invención

10 La presente invención resuelve el problema arriba mencionado proporcionando un gen de HSV-tk que expresa una mayor proporción de mRNA que no ha sufrido remodelación que los genes HSV-tk descritos previamente. Los autores de la presente invención han identificado un sitio aceptor de remodelación 14 pares de bases aguas arriba del sitio aceptor identificado previamente. Se demuestra que los intentos previos para inhibir la remodelación por modificación de los sitios donantes y aceptores identificados previamente pueden dar como resultado la activación de este sitio aceptor y la remodelación génica subsiguiente. Sorprendentemente, los autores de esta invención demuestran que la modificación del gen HSV-tk en ciertos nucleótidos específicos proporciona un gen HSV-tk que es capaz de expresar mRNA sustancialmente exento de remodelación. En particular, se demuestra que la mutación de al menos uno de los nucleótidos en el sitio de remodelación del donante puede prevenir sustancialmente la remodelación.

Exposición de la Invención

20 Se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una timidina quinasa en donde al menos uno de los nucleótidos que corresponden a nucleótidos de sitios donantes de remodelación ha sido reemplazado por otro nucleótido y en donde los nucleótidos de los sitios aceptores de remodelación no se han alterado.

25 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una timidina quinasa en donde al menos uno de los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de los sitios de remodelación del donante en las posiciones 329 y 330 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 (Tk wt) se ha reemplazado por otro nucleótido y en donde los nucleótidos de los sitios aceptores de remodelación no se han alterado.

En una realización, ambos nucleótidos correspondientes a los nucleótidos del sitio donante de remodelación en las posiciones 329 y 330 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 se han reemplazado por otro nucleótido.

En una realización, el nucleótido de la posición 330 ha cambiado de T a C.

30 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una timidina quinasa en donde al menos uno de los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de los sitios donantes de remodelación en las posiciones 329 y 330 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 (Tk wt) se ha reemplazado por otro nucleótido y en donde al menos uno de los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de los sitios aceptores de remodelación en las posiciones 554 y 555 y al menos uno de los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de los sitios aceptores de remodelación en las posiciones 662 y 663 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 no se ha alterado.

Preferiblemente, ambos nucleótidos correspondientes a las posiciones 554 y 555 no se han alterado.

Preferiblemente, ambos nucleótidos correspondientes a las posiciones 662 y 663 no se han alterado.

40 En una realización, ambos nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de los sitios donantes de remodelación en las posiciones 329 y 330 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 se han reemplazado por otro nucleótido.

En una realización, el nucleótido de la posición 330 ha cambiado de T a C.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia TkMut2 de la Figura 1.

45 De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una timidina quinasa en donde al menos uno de los nucleótidos donantes de remodelación correspondientes al o a los nucleótidos en las posiciones 329 y 330 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 (Tk wt) se ha reemplazado por otro nucleótido y en donde al menos uno de los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de los sitios aceptores de remodelación en las posiciones 541 y 542 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 se ha reemplazado por otro nucleótido.

- En una realización, ambos nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de sitios donantes de remodelación en las posiciones 329 y 330 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 se han reemplazado por otro nucleótido.
- En una realización, el nucleótido correspondiente a la posición 330 ha cambiado de T a C.
- 5 En otra realización, ambos nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de sitios aceptores de remodelación en las posiciones 541 y 542 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 se han reemplazado por otro nucleótido.
- En otra realización, el nucleótido correspondiente al nucleótido en la posición 541 está cambiado de A a T.
- En otra realización, el nucleótido correspondiente al nucleótido en la posición 542 está cambiado de G a C.
- En otra realización, al menos uno de los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de los sitios aceptores de remodelación en las posiciones 554 y 555 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 se ha reemplazado también por otro nucleótido de tal modo que no está presente sitio alguno de remodelación.
- 10 En una realización, ambos nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de los sitios aceptores de remodelación en las posiciones 541 y 542 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 se han reemplazado por otro nucleótido de tal modo que no está presente sitio alguno de remodelación.
- En otra realización, el nucleótido correspondiente al nucleótido de la posición 555 ha cambiado de G a A.
- 15 De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia TkMnt23 de la Figura 1.
- De acuerdo con un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia TkMut234 de la Figura 1.
- 20 De acuerdo con un séptimo aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una timidina quinasa en donde al menos uno de los nucleótidos de sitios donantes de remodelación correspondientes al o a los nucleótidos de las posiciones 329 y 330 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 (Tk wt) se ha reemplazado por otro nucleótido y en donde los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de sitios aceptores de remodelación en las posiciones 554 y 555 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 se ha reemplazado por otro nucleótido.
- 25 En una realización, ambos nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de sitios donantes de remodelación en las posiciones 329 y 330 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1, se han reemplazado por otro nucleótido.
- En otra realización, ambos nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de sitios aceptores de remodelación en las posiciones 554 y 555 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1, se han reemplazado por otro nucleótido.
- Preferiblemente, el nucleótido correspondiente al nucleótido de la posición 330 ha cambiado de T a C.
- 30 Preferiblemente, el nucleótido correspondiente al nucleótido de la posición 555 ha cambiado de G a A.
- De acuerdo con un octavo aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia Tk-Mut24 de la Figura 1.
- Se describe también en esta memoria un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una timidina quinasa en donde al menos uno de los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de los sitios aceptores de remodelación en la posición 554 y 555 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 (Tk wt) se ha reemplazado por otro nucleótido.
- 35 Se describe también en esta memoria un polinucleótido que comprende la secuencia Tk-Mut4 de la Figura 1.
- Se describe también en esta memoria un polinucleótido que comprende la secuencia Tk-Mut34 de la Figura 1.
- Preferiblemente, el nucleótido de reemplazamiento no altera la secuencia del polipéptido codificado por dicha secuencia de nucleótidos.
- 40 De acuerdo con un noveno aspecto de la presente invención se proporciona un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención.
- Preferiblemente, el vector es un vector de expresión.
- 45 De acuerdo con un décimo aspecto de la presente invención, se proporciona una célula hospedadora que comprende un polinucleótido o un vector de la presente invención.

De acuerdo con un undécimo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido, un vector o una célula hospedadora de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un duodécimo aspecto de la presente invención, se proporciona un kit que comprende

- 5 (i) un polinucleótido, un vector, una célula hospedadora o una composición farmacéutica de la presente invención; y
(ii) un agente sustancialmente no tóxico que es convertido por una timidina quinasa en un agente tóxico.

De acuerdo con un decimotercer aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido, un vector, una célula hospedadora o una composición farmacéutica de la presente invención para uso en medicina.

- 10 De acuerdo con un decimocuarto aspecto de la presente invención, se proporcionan productos que contienen un polinucleótido, un vector, una célula hospedadora o una composición farmacéutica de la presente invención, y un agente sustancialmente no tóxico para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un paciente con células en necesidad de destrucción, en donde dicho agente sustancialmente no tóxico es convertido por una timidina quinasa en un agente tóxico.

Se describe también en esta memoria un método de destrucción de células que comprende:

- 15 (i) introducir en dichas células un polinucleótido o un vector de la presente invención; y
(ii) simultánea, separada o secuencialmente, poner en contacto dichas células con un agente sustancialmente no tóxico que es convertido por una timidina quinasa en un agente tóxico.

Se describe también en esta memoria un método de destrucción de células que comprende:

- 20 (i) introducir en dichas células un polinucleótido o un vector de la presente invención;
(ii) dejar que dichas células expresen timidina quinasa; y
(iii) poner en contacto dichas células con un agente sustancialmente no tóxico que es convertido por una timidina quinasa en un agente tóxico.

Se describe también en esta memoria un método de tratamiento de un paciente con células en necesidad de destrucción que comprende:

- 25 (i) introducir en el paciente un polinucleótido, un vector o una composición farmacéutica de la presente invención;
(ii) simultánea, separada o secuencialmente, introducir en el paciente un agente sustancialmente no tóxico que es convertido por una timidina quinasa en un agente tóxico.

- 30 Se describe también en esta memoria un método de tratamiento de un paciente con células en necesidad de destrucción que comprende:

- (i) introducir en el paciente un polinucleótido, un vector o una composición farmacéutica de la presente invención;
(ii) dejar que dicho nucleótido o vector sea capturado por dichas células;
(iii) dejar que dichas células expresen timidina quinasa; y
(iv) introducir en el paciente un agente sustancialmente no tóxico que es convertido por una timidina quinasa en un agente tóxico.

- 35 Se describe también en esta memoria un método de tratamiento de un paciente con células en necesidad de destrucción que comprende:

- (i) retirar las células del paciente o células donantes;
(ii) introducir ex vivo en las células un polinucleótido o un vector de la presente invención;
(iii) Introducir las células modificadas en el paciente;
(iv) dejar que las células expresen timidina quinasa; y

(v) administrar al paciente un agente sustancialmente no tóxico que es convertido por una timidina quinasa en un agente tóxico.

Se describe también en esta memoria un método de prevención de la enfermedad de rechazo inverso en un paciente que comprende:

5 (i) administrar a un hospedador células T modificadas por ingeniería genética para incluir un polinucleótido de la presente invención o un vector de la presente invención; y

(ii) administrar a dicho hospedador, antes de la aparición de la enfermedad de rechazo inverso, un agente sustancialmente no tóxico en una cantidad eficaz para destruir dichas células T modificadas por ingeniería genética por interacción de dicho agente con una timidina quinasa.

10 Preferiblemente, el agente sustancialmente no tóxico utilizado en la presente invención es uno cualquiera de ganciclovir, aciclovir, trifluorotimidina, 1-[2-desoxi, 2-fluoro, β -D-arabinofuranosil]-5-yodouracilo, ara-A, ara-1,1- β -D-arabinofuranosil-timina, 5-etil-2'-desoxiuridina, 5-yodo-5'-amino-2,5'-didesoxiuridina, idoxuridina, AZT, AIV, didesoxicitudina, AraC y bromovinil-desoxiuridina (BVDU).

15 De acuerdo con un decimoquinto aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido, un vector o una célula hospedadora de la presente invención para destruir células en un paciente.

De acuerdo con un decimosexto aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido, un vector o una célula hospedadora de la presente invención para uso en el tratamiento del cáncer.

De acuerdo con un decimoséptimo aspecto de la presente invención se proporciona un polinucleótido, un vector o una célula hospedadora de la presente invención para uso en la prevención de la enfermedad de rechazo inverso.

20 Se describe también en esta memoria el uso de un polinucleótido, un vector o una célula hospedadora de la presente invención en la preparación de un medicamento para destrucción de células en un paciente.

Se describe también en esta memoria el uso de un polinucleótido, un vector o una célula hospedadora de la presente invención en la preparación de un medicamento para tratamiento del cáncer.

Descripción Detallada

25 Diversas características y realizaciones preferidas de la presente invención se describirán a continuación por vía de ejemplos no limitantes.

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, DNA recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de una persona con experiencia ordinaria en la técnica. Dichas técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, caps. 9, 13, y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press; y E. M. Shevach y W. Strober, 1992 y suplementos periódicos, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY. Cada uno de estos textos generales se incorpora en la presente memoria por referencia.

Gen HSV-tk

40 Como se utiliza en esta memoria, la expresión "no alterado" significa no alterado con respecto a la secuencia de tipo salvaje (Tk wt).

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "reemplazado por otro nucleótido" significa reemplazado por un nucleótido que difiere de la secuencia de tipo salvaje (Tk wt). Los reemplazamientos se hacen de tal modo que se retira el sitio relevante donante de remodelación o los sitios aceptores de remodelación.

45 Los mutantes timidina quinasa de la presente invención pueden prepararse a partir de una gran diversidad de timidina quinasa. Preferiblemente, el mutante de timidina quinasa se deriva de timidina quinasa de Herpesviridae que incluyen por ejemplo herpesvirus de primates, y herpesvirus de no primates tales como herpesvirus aviáres. Ejemplos representativos de herpesvirus adecuados incluyen el Virus del Herpes Simplex Tipo1 (McKnight et al., 1980), el Virus del Herpes Simplex Virus Tipo 2 (Swain y Galloway, 1983), el Virus Zóster de la Varicela (Davidson y Scott, 1986), el herpesvirus del tíf (Otsuka y Kit, 1984), el herpesvirus de los felinos tipo 1

(Nunberg et al., 1989), el virus de la pseudorrabia (Kit y Kit, Patente U.S. No. 4.514.497, 1985), el herpesvirus de los equinos tipo 1 (Robertson y Whalley, 1988), el herpesvirus de los bovinos tipo 1 (Mittal y Field, 1989), el herpesvirus del pavo (Martin et al., 1989), el virus de la enfermedad de Marek (Scott et al., 1989), el herpesvirus saimiri (Honest et al., 1989) y el virus Epstein-Barr (Baer et al., 1984).

5 Tales herpesvirus pueden obtenerse fácilmente de fuentes comerciales tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC", Rockville, Maryland). Depósitos de algunos de los herpesvirus arriba identificados pueden obtenerse fácilmente de la ATCC, por ejemplo: ATCC No. VR-539 (Herpes simplex tipo 1); ATCC Nos. VR-734 y VR-540 (Herpes Simplex tipo 2); ATCC NO. VR-586 (Virus Zoster de la Varicela); ATCC No. VR-783 (laringotraqueítis infecciosa); ATCC Nos. VR-624, VR-987, VR-2103, 10 VR-2001, VR-2002, VR-2175, VR-585 (virus de la enfermedad de Marek); ATCC Nos. VR-584B y VR-584B (herpesvirus del pavo); ATCC Nos. VR-631 y VR-842 (herpesvirus de los bovinos tipo 1); y ATCC Nos. VR-2003, VR-2229 y VR-700 (herpesvirus de los equinos tipo 1). Los herpesvirus pueden aislarse e identificarse también fácilmente de fuentes existentes naturalmente (v.g., de un animal infectado).

15 El gen de timidina quinasa puede aislarse y mutarse fácilmente como se describe más adelante, con objeto de construir moléculas de ácido nucleico que codifiquen un gen de timidina quinasa que comprende una o más mutaciones que reducen sustancialmente la remodelación génica, en comparación con una timidina quinasa no mutada. Como se utiliza en esta memoria, debería entenderse que la expresión "timidina quinasa no mutada" hace referencia a una timidina quinasa nativa o de tipo salvaje tal como la descrita por McKnight et al., (Nucl. Acids Res. 8:5949-5964, 1980).

20 Debe indicarse que en esta solicitud las posiciones de los nucleótidos se asignan tomando como referencia una posición de la Figura 1. Sin embargo, al asignar dichas referencias, se entenderá que la invención no debe considerarse limitada a la secuencia exacta tal como se presenta en la figura, sino que incluye variantes y derivados de la misma. Así, se contempla la identificación de las localizaciones de nucleótidos en otras secuencias de timidina quinasa (v.g., nucleótidos en posiciones que la persona experta podría considerar corresponden a las posiciones 25 identificadas de la Figura 1). La persona experta en la técnica puede alinear fácilmente secuencias similares y localizar las mismas localizaciones de nucleótidos.

Construcción de Mutantes HSV-tk

Pueden construirse mutantes de timidina quinasa de la presente invención utilizando una diversidad de técnicas. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones en loci particulares por síntesis de oligonucleótidos que contienen una 30 secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permiten la ligación a fragmentos de la secuencia nativa. Después de la ligación, la secuencia resultante reconstruida codifica un derivado que tiene la inserción, sustitución o delección de aminoácidos deseada.

35 Alternativamente, pueden emplearse procedimientos de mutagénesis de sitio específico dirigida por oligonucleótidos (o de segmentos específicos) que proporcionan un gen alterado que tiene codones particulares alterados de acuerdo con la sustitución, delección o inserción requerida. Pueden construirse también derivados por delección o truncación de mutantes de timidina quinasa utilizando sitios de endonucleasas de restricción convenientes adyacentes a la delección deseada. Subsiguientemente a la restricción, pueden rellenarse los salientes, y religarse el DNA. Métodos ilustrativos de realización de las alteraciones arriba indicadas han sido descritos por Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

40 Pueden construirse también mutantes de timidina quinasa utilizando técnicas de mutagénesis PCR, mutagénesis química, mutagénesis química (Drinkwater y Klinedinst, 1986) por incorporación errónea forzada de nucleótidos (v.g., Liao y Wise, 1990), o por el uso de oligonucleótidos mutagenizados aleatoriamente (Horwitz et al., 1989).

45 En una realización preferida de la presente invención, los nucleótidos se modifican tomando nota del código genético de tal modo que un codón se cambie por un codón degenerado que codifica el mismo residuo de aminoácido. De este modo, es posible construir regiones codificantes de la proteína de interés que codifican proteína de tipo salvaje pero que no contienen un sitio de remodelación funcional.

Sitios de remodelación

50 La proporción de RNA que se retira (o "se corta") durante la remodelación se denomina típicamente un intrón, y las dos piezas de RNA a cada lado del intrón que se unen por remodelación se denominan típicamente exones (Figura 2).

Un sitio donante de remodelación es un sitio en el RNA que se encuentra en el lado 5' del RNA que se elimina durante el proceso de remodelación y que contiene el sitio que se corta y se une de nuevo a un residuo nucleotídico en un sitio aceptor de remodelación. Así pues, un sitio donante de remodelación es la unión entre el extremo de un

exón y el comienzo del intrón, terminando típicamente en el dinucleótido GU. En una realización preferida de la presente invención, uno o ambos dinucleótidos terminales GU (o dinucleótidos GT en la secuencia de DNA correspondiente) del sitio donante de remodelación se ha(n) alterado para eliminar el sitio de remodelación.

5 Un sitio aceptor de remodelación es un sitio en el RNA que se encuentra en el lado 3' del RNA que se retira durante el proceso de remodelación y que contiene el sitio que se corta y se une de nuevo a un residuo de nucleótido dentro de un sitio donante de remodelación. Así pues, un sitio aceptor de remodelación es la unión entre el extremo de un intrón (que termina típicamente con el dinucleótido AG) y el comienzo del exón de aguas abajo. En una realización preferida de la presente invención, uno o ambos dinucleótidos terminales AG del sitio aceptor de remodelación está(n) alterados para eliminar el sitio de remodelación.

10 Polinucleótidos

Los polinucleótidos utilizados en la invención pueden comprender DNA o RNA. Los mismos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Las personas expertas comprenderán que numerosos polinucleótidos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. Adicionalmente, debe entenderse que las personas expertas pueden, utilizando técnicas de rutina, realizar sustituciones de nucleótidos que no afectan a la secuencia de polipéptidos codificada por los polinucleótidos utilizados en la invención a fin de reflejar el uso de codones en cualquier organismo hospedador particular en el cual deban expresarse los polipéptidos. Los polinucleótidos pueden modificarse por cualquier método disponible en la técnica. Dichas modificaciones pueden realizarse a fin de mejorar la actividad o duración de vida in vivo de los polinucleótidos de la invención.

20 Los polinucleótidos utilizados en la invención pueden codificar proteínas de fusión, por ejemplo para ayudar a la secreción celular de los polipéptidos expresados. En el caso en que, por ejemplo, se desea que un polipéptido HSV-tk sea expresado por la célula, puede ser deseable añadir secuencias de direccionamiento para direccionar las proteínas a compartimientos particulares de la célula o a caminos secretorios. Tales secuencias de direccionamiento han sido caracterizadas extensamente en la técnica.

25 Los polinucleótidos tales como polinucleótidos de DNA pueden producirse por recombinación, por síntesis, o por cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. Los mismos pueden clonarse también por técnicas estándar.

Los polinucleótidos más largos se producirán generalmente utilizando medios recombinantes, por ejemplo utilizando técnicas de clonación PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará construir un par de iniciadores (v.g. de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) que flanquean una región de la secuencia lipídica de direccionamiento que se desea clonar, poner en contacto los iniciadores con mRNA o cDNA obtenidos de una célula animal o humana, realizar una reacción en cadena de polimerasa en condiciones que provocan la amplificación de la región deseada, aislar el fragmento amplificado (v.g. por purificación de la mixtura de reacción en un gel de agarosa) y recuperar el DNA amplificado. Los iniciadores pueden diseñarse de modo que contengan sitios de reconocimiento por enzimas de restricción adecuadas a fin de que el DNA amplificado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

30 Se apreciará que el polinucleótido de la invención puede contener solamente una región codificante para la timidina quinasa mutante. Sin embargo, se prefiere que el polinucleótido comprenda además, en enlace operativo, una porción de ácido nucleico que permita la traducción eficiente de la secuencia codificante en la célula diana. Adicionalmente, se prefiere que el polinucleótido (cuando se encuentra en forma de DNA) comprenda además un promotor en enlace operativo que permita la transcripción de la región codificante y la porción de ácido nucleico que permita una traducción eficiente de la región codificante en la célula diana.

Proteínas

45 Como se utiliza en esta memoria, el término "proteína" incluye moléculas polipeptídicas monocatenarias así como complejos múltiples de polipéptidos en los cuales los polipéptidos individuales constituyentes están unidos por medios covalentes o no covalentes. Como se utiliza en esta memoria, los términos "polipéptido" y "péptido" hacen referencia a un polímero en el cual los monómeros son aminoácidos y están unidos unos a otros por enlaces peptídicos o enlaces disulfuro. Los términos subunidad y dominio pueden hacer referencia también a polipéptidos y péptidos que tienen función biológica.

50 Variantes, Derivados, Análogos, Homólogos y Fragmentos

Además de las proteínas y nucleótidos específicos mencionados en esta memoria, la presente invención abarca también el uso de variantes, derivados, análogos, homólogos y fragmentos de los mismos.

5 En el contexto de la presente invención, una variante de cualquier secuencia dada es una secuencia en la cual la secuencia específica de residuos (sean residuos de aminoácidos o de ácido nucleico) se ha modificado de tal manera que el polipéptido o polinucleótido en cuestión retiene al menos una de sus funciones endógenas. Una secuencia variante puede obtenerse por adición, delección, sustitución, modificación, reemplazamiento y/o variación de al menos un residuo presente en la proteína existente naturalmente.

El término "derivado", como se utiliza en esta memoria, en relación con las proteínas o polipéptidos de la presente invención incluye cualquier sustitución de, variación de, modificación de, reemplazamiento de, delección de y/o adición de uno (o más) residuos de aminoácido de o a la secuencia con tal que la proteína o polipéptido resultante retenga al menos una de sus funciones endógenas.

10 El término "análogo", como se utiliza en esta memoria, en relación con los polipéptidos o polinucleótidos incluye cualquier mimético, es decir, un compuesto químico que posee al menos una de las funciones endógenas de los polipéptidos o polinucleótidos a los cuales mimetiza.

15 Típicamente, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos, por ejemplo de 1, 2 ó 3 a 10 ó 20 sustituciones con tal que la secuencia modificada retenga la actividad o aptitud requerida. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el uso de análogos no existentes naturalmente.

20 Las proteínas para uso en la presente invención pueden tener también delecciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen una carga silenciosa y dan como resultado una proteína funcionalmente equivalente. Pueden hacerse sustituciones deliberadas de aminoácidos sobre la base de semejanza en polaridad, carga, solubilidad, carácter hidrófobo, carácter hidrófilo y/o la naturaleza anfipática de los residuos con tal que se retenga la función de transporte o modulación. Por ejemplo, aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que tienen valores similares de carácter hidrófilo incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina, y tirosina.

25 Pueden hacerse sustituciones conservadoras, por ejemplo de acuerdo con la tabla siguiente. Los aminoácidos del mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea de la tercera columna pueden sustituirse unos por otros:

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar - sin carga	C S T M
		N Q
	Polar – con carga	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

5 Los "fragmentos" son también variantes y el término hace referencia típicamente a una región seleccionada del polipéptido o polinucleótido que presenta interés sea funcionalmente o, por ejemplo, en un ensayo. Así pues, "fragmento" hace referencia a una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico que es una porción de un polipéptido o polinucleótido de longitud total.

10 Dichas variantes pueden prepararse utilizando técnicas estándar de DNA recombinante tales como mutagénesis orientada. En los casos en que deben hacerse inserciones, DNA sintético que codifica la inserción junto con regiones flanqueantes 5' y 3' correspondientes a la secuencia existente naturalmente a cualquier lado del sitio de inserción. Las regiones flanqueantes contendrán sitios de restricción convenientes correspondientes a sitios en la secuencia existente naturalmente de tal modo que la secuencia pueda cortarse con la o las enzimas apropiadas y el DNA sintético pueda ligarse en el corte. El DNA se expresa luego de acuerdo con la invención para fabricar la proteína codificada. Estos métodos son únicamente ilustrativos de los numerosos métodos estándar conocidos en la técnica para manipulación de secuencias de DNA y pueden utilizarse también otras técnicas conocidas.

15 Las variantes de polinucleótidos comprenderán preferiblemente secuencias de codones optimizadas. La optimización de codones se conoce en la técnica como un método de aumento de la estabilidad del RNA y por tanto de la expresión génica. La redundancia del código genético significa que varios codones diferentes pueden codificar el mismo aminoácido. Por ejemplo, leucina, arginina y serina son codificados cada uno por 6 codones diferentes. Los diferentes organismos exhiben preferencias en su uso de los diferentes codones. Los virus tales como el HIV, por ejemplo, utilizan un gran número de codones raros. Por cambio de una secuencia nucleotídica de tal modo que los codones raros se reemplacen por los codones correspondientes de mamífero utilizados comúnmente, puede conseguirse una expresión incrementada de las secuencias en células diana de mamífero. Se conocen en la técnica tablas de uso de codones para células de mamífero, así como para una diversidad de otros organismos. Preferiblemente, al menos parte de la secuencia está optimizada en codones. Aún más preferiblemente, la secuencia está totalmente optimizada en codones.

Vectores

30 Como es bien conocido en la técnica, un vector es un instrumento que permite o facilita la transferencia de una entidad de un ambiente a otro. De acuerdo con la presente invención, y a modo de ejemplo, algunos vectores utilizados en técnicas de DNA recombinante permiten que entidades, tales como un segmento de DNA (tal como un segmento de DNA heterólogo, tal como un segmento de cDNA heterólogo), se transfieran a un hospedador y/o una célula diana con el propósito de replicación de los vectores que comprenden las secuencias de nucleótidos utilizadas en la invención y/o que expresan las proteínas utilizadas en la invención. Ejemplos de vectores utilizados en técnicas de DNA recombinante incluyen, pero sin carácter limitante, plásmidos, cromosomas, cromosomas artificiales o virus.

35 Los polinucleótidos utilizados en la invención se incorporan preferiblemente en un vector. De modo preferible, un polinucleótido en un vector para uso en la invención está enlazado operativamente a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificante por la célula hospedadora, es decir, el vector es un vector de expresión. El término "enlazado operativamente" significa que los componentes descritos se encuentran en una relación que permite que los mismos funcionen de su manera deseada. Una secuencia reguladora "enlazada operativamente" a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

40 Las secuencias de control pueden modificarse, por ejemplo, por la adición de elementos reguladores de la transcripción adicionales que hacen que el nivel de transcripción dirigida por las secuencias de control sea más sensible a los moduladores de la transcripción.

Los vectores pueden transformarse o transfectarse en un hospedador adecuado para proporcionar la expresión del producto del gen tk. Este proceso puede comprender cultivar una célula hospedadora transformada con un vector de expresión como se ha descrito arriba en condiciones que proporcionan la expresión por el vector de una secuencia codificante que codifica la proteína, y recuperar opcionalmente la proteína expresada.

- 5 Los vectores utilizados en la presente invención pueden ser, por ejemplo, vectores plasmídicos o vectores de virus provistos de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de un polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, y/o un marcador rastreable tal como GFP. Pueden utilizarse vectores, por ejemplo, para transfectar o transformar una célula hospedadora.
- 10 Las secuencias de control enlazadas operativamente a secuencias que codifican proteínas para uso en la invención incluyen promotores/intensificadores y otras señales de regulación de la expresión. Estas secuencias de control pueden seleccionarse de modo que sean compatibles con la célula hospedadora para la cual está diseñado el vector de expresión a utilizar. El término "promotor" es bien conocido en la técnica y abarca regiones de ácido nucleico comprendidas en tamaño y complejidad desde promotores mínimos a promotores que incluyen elementos e
- 15 intensificadores aguas arriba.

El promotor se selecciona típicamente de promotores que son funcionales en células de mamífero, aunque pueden utilizarse promotores procariotas y promotores funcionales en otras células eucariotas. El promotor se deriva típicamente de secuencias promotoras de genes virales o eucariotas. Por ejemplo, puede tratarse de un promotor derivado del genoma de una célula en la cual debe producirse la expresión. Con respecto a los promotores

20 eucariotas, los mismos pueden ser promotores que funcionan de una manera ubicua (tales como promotores de α -actina, β -actina, tubulina) o, alternativamente, de una manera específica del tejido (tales como promotores de los genes para piruvato-quinasa). Pueden utilizarse también promotores virales, por ejemplo el promotor de la repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV LTR), el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), o el promotor IE del citomegalovirus humano (CMV).

- 25 Puede ser también ventajoso que los promotores sean inducibles a fin de que los niveles de expresión del gen heterólogo puedan regularse durante el tiempo de vida de la célula. Inducible significa que los niveles de expresión obtenidos utilizando el promotor pueden regularse.

Adicionalmente, cualquiera de estos promotores puede modificarse por la adición de secuencias reguladoras adicionales, por ejemplo secuencias intensificadoras. Pueden utilizarse también promotores quiméricos que

30 comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes arriba descritos.

Preferiblemente, el vector viral transduce con preferencia un cierto tipo o tipos de células.

Vectores retrovirales

En una realización, el vector utilizado en la presente invención es un vector basado en retrovirus que ha sido modificado por ingeniería genética de tal modo que no puede replicarse ni producir partículas de virus infecciosas

35 de progenie una vez que el virus ha entrado en la célula diana. Existen muchos retrovirus que se utilizan ampliamente para suministro de genes tanto en condiciones de cultivo de tejidos como en organismos vivos. Ejemplos incluyen, sin carácter limitante, el virus de la leucemia murina (MLV), el virus de la inmunodeficiencia humana (HN-1), el virus de la anemia infecciosa de los equinos (EIAV), el virus del tumor mamario del ratón (MMTV), el virus del sarcoma de Rous (RSV), el virus del sarcoma de Fujinami (FuSV), el virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MLV), el virus

40 de osteosarcoma murino FBR (FBR MSV), el virus del sarcoma murino de Moloney (Mo-MSV), el virus de la leucemia murina de Abelson (A-MLV), el virus-29 de la mielocitomatosis aviar (MC29), el virus de la eritroblastosis aviar (AEV) y todos los restantes *retroviridae* con inclusión de lentivirus. Una lista detallada de lentivirus puede encontrarse en Coffin et al., 1997, "retroviruses", Cold Spring Harbour Laboratory Press. Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus págs. 758-763.

- 45 La estructura básica de un genoma retroviral es una LTR 5' y una LTR 3', entre o dentro de las cuales están localizadas una señal de empaquetamiento para permitir que el genoma se empaquete, un sitio de fijación de iniciador, sitios de integración para permitir la integración en un genoma de la célula hospedadora y genes gag, pol y env que codifican los componentes de empaquetamiento – estos son polipéptidos requeridos para el ensamblaje de las partículas virales. Retrovirus más complejos tienen características adicionales, tales como las secuencias rev y
- 50 RRE en el HIV, que permiten la exportación eficiente de transcritos de RNA del provirus integrado del núcleo al citoplasma de una célula diana infectada.

En el provirus, estos genes están flanqueados en ambos extremos por regiones denominadas repeticiones terminales largas (LTRs). Las LTRs son responsables de la integración proviral, y la transcripción. Las LTRs sirven también como secuencias intensificador-promotor y pueden controlar la expresión de los genes virales. La

encapsidación de los RNAs retrovirales ocurre en virtud de una secuencia psi localizada en el extremo 5' del genoma viral.

5 Las LTRs propiamente dichas son secuencias idénticas que pueden dividirse en 3 elementos, que se denominan U3, R y U5. U3 se deriva de la secuencia única del extremo 3' del RNA. R se deriva de una secuencia repetida en ambos extremos del RNA, y U5 se deriva de la secuencia única del extremo 5' del RNA. Los tamaños de los 3 elementos pueden variar considerablemente entre diferentes retrovirus.

En un genoma de vector retroviral deficiente, gag, pol y env pueden estar ausentes o no ser funcionales. Las regiones R en ambos extremos del RNA son secuencias repetidas. U5 y U3 representan secuencias singulares en los extremos 5' y 3' del genoma del RNA, respectivamente.

10 De modo más preferible, el vector viral es un vector direccionado, es decir que tiene un tropismo tisular que se ha alterado en comparación con el virus nativo, de tal modo que el vector está direccionado a células particulares. Esto puede conseguirse por modificación de la proteína retroviral Env. Preferiblemente, la proteína de la envoltura es una envoltura no tóxica o una envoltura que puede producirse en cantidades no tóxicas en el interior de la célula diana primaria, tal como por ejemplo una envoltura anfotrópica de MMLV o una envoltura anfotrópica modificada.

15 Preferiblemente, la envoltura es una que permite la transducción de células humanas. Ejemplos de genes env adecuados incluyen, pero sin carácter limitante, VSV-G, un env anfotrópico tal como el env 4070A, el env del virus de la leucemia de los felinos RD114 o la hemaglutinina (HA) de un virus de la gripe. La proteína Env puede ser una que sea capaz de fijarse a un receptor en un número limitado de tipos de células humanas, y puede ser una envoltura modificada por ingeniería genética que contenga restos de direccionamiento. Las secuencias codificantes de evb y gag-pol se transcriben a partir de un promotor y opcionalmente un intensificador activo en la línea de células de empaquetamiento seleccionada, y la unidad de transcripción termina en una señal de poliadenilación. Por ejemplo, si la célula de empaquetamiento es una célula humana, una combinación adecuada promotor-intensificador es la del gen temprano inmediato mayor del citomegalovirus humano (hCMV-MIE) y puede utilizarse una señal de poliadenilación del virus SV40. Otros promotores y señales de poliadenilación adecuadas se conocen en la técnica.

25 MLV

Preferiblemente, el vector retroviral utilizado en la presente invención es un vector del Virus de la Leucemia Murina (MLV). Vectores retrovirales derivados del virus anfotrópico de la leucemia murina de Moloney (MLV-A) se utilizan comúnmente en protocolos clínicos en todo el mundo. Estos virus utilizan receptores transportadores de fosfato de la superficie celular para su entrada y se integran luego permanentemente en los cromosomas de las células proliferantes. Los genes se mantienen luego durante todo el tiempo de vida de la célula. La actividad génica en constructos basados en MLV es fácil de controlar y puede ser eficaz durante largo tiempo. Pruebas clínicas realizadas con estos sistemas basados en MLV han demostrado que los mismos son bien tolerados sin efectos secundarios adversos de ningún tipo.

35 Un ejemplo de un vector MLV para uso en la presente invención es un vector derivado de SFCMM-3, que es portador a la vez del gen suicida HSV-tk y el gen marcador Δ LNGFR (Verzeletti 98, Human Gene Therapy 9:2243). El vector original utilizado en la preparación de SFCMM-3 es LXSXN (Miller et al. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. BioTechniques 7:980-990, 1989) (acceso a GeneBank #28248). El vector LXSXN se modificó por inserción del gen HSV-tk en el sitio singular Hpa I ("corte romo"), eliminación del gen neo por digestión con Hind III y Nae I, e inserción del cDNA codificante de Δ LNGFR en este sitio.

40 Vector lentiviral

En una realización, el vector de la presente invención puede ser un vector lentiviral. Los vectores lentivirales forman parte de un grupo mayor de vectores retrovirales. Una lista detallada de lentivirus puede encontrarse en Coffin et al ("Retroviruses" 1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus págs. 758-763).

45 Resumidamente, los lentivirus pueden dividirse en grupos de primates y no primates. Ejemplos de lentivirus de primates incluyen, pero sin carácter limitante: el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA), y el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV). El grupo de lentivirus de no primates incluye el prototipo del virus visna/maedi (VMV) "virus lento", así como el virus relacionado con la artritis-encefalitis caprina (CAEV), el virus de la anemia infecciosa de los equinos (EIAV), y el virus de la inmunodeficiencia de los felinos (FIV) y el virus de la inmunodeficiencia de los bovinos (BIV), descritos más recientemente.

Una distinción entre la familia de lentivirus y otros tipos de retrovirus es que los lentivirus tienen la capacidad de infectar tanto células en estado de división como células que no se hallan en estado de división (Lewis, 1992; Lewis y Emerman, 1994). En contraste, otros retrovirus - tales como MLV - son incapaces de infectar las células que no se dividen o que se dividen sólo lentamente tales como las que constituyen, por ejemplo, tejido muscular, cerebral,

pulmonar y hepático. Dado que los lentivirus son capaces de transducir las células diferenciadas terminalmente /primarias, el uso de una estrategia de cribado de lentivirus permite la selección de bibliotecas en una célula hospedadora primaria diana que no se divide o que se divide lentamente.

Vectores de adenovirus

5 En otra realización, el vector de la presente invención puede ser un vector de adenovirus. El adenovirus es un virus lineal de DNA bicatenario que no atraviesa un compuesto intermedio de RNA. Existen más de 50 serotipos humanos diferentes de adenovirus, divididos en 6 subgrupos basados en la homología de secuencia genética. La diana natural del adenovirus son los epitelios respiratorios y gastrointestinales, que dan lugar generalmente a síntomas sólo moderados. Los serotipos 2 y 5 (con homología de secuencia de 95%) se utilizan muy comúnmente en sistemas vectores de adenovirus y están asociados normalmente con infecciones del tracto respiratorio superior en los jóvenes.

10 Los adenovirus son icosaedros regulares sin envoltura. Un adenovirus típico comprende un virus de DNA encapsidado de 140 nm. La simetría icosaédrica del virus está compuesta de 152 capsómeros: 240 exones y 12 pentones. El núcleo de la partícula contiene el DNA dúplex lineal de 36 kb que está asociado covalentemente en los extremos 5' con la Proteína Terminal (TP) que actúa como iniciador para la replicación del DNA. El DNA tiene repeticiones terminales invertidas (ITR) y la longitud de éstas varía con el serotipo.

15 El adenovirus es un virus de DNA bicatenario sin envoltura que es capaz de transducción in vivo e in vitro de una amplia gama de tipos de células de origen humano y no humano. Estas células incluyen células epiteliales de las vías respiratorias, hepatocitos, células musculares, miocitos cardiacos, sinoviocitos, células epiteliales mamarias primarias y células post-mitóticas diferenciadas terminalmente, tales como neuronas.

20 Los vectores de adenovirus son capaces también de transducir células que no se hallan en estado de división. Esto es muy importante para enfermedades tales como la fibrosis quística, en la cual las células afectadas en el epitelio pulmonar tienen una tasa de renovación lenta. De hecho, se encuentran en fase de realización varias pruebas que utilizan la transferencia mediada por adenovirus del transportador de la fibrosis quística (CFTR) a los pulmones de pacientes adultos afligidos de fibrosis quística.

25 Los adenovirus han sido utilizados como vectores para terapia génica y para expresión de genes heterólogos. El genoma grande (36 kilobases) puede acomodar hasta 8 kb de DNA de inserción extraño y es capaz de replicarse eficientemente en líneas de células complementarias para producir títulos muy altos de hasta 10¹². El adenovirus es por tanto uno de los mejores sistemas para estudiar la expresión de genes en células primarias no replicativas.

30 La expresión de genes virales o extraños del genoma del adenovirus no requiere una célula replicante. Los vectores de adenovirus entran en las células por endocitosis mediada por receptores. Una vez en el interior de la célula, los vectores de adenovirus se integran raramente en el cromosoma hospedador. En su lugar, el mismo funciona episómicamente (con independencia del genoma del hospedador) como un genoma lineal en el núcleo hospedador. Por tanto, el uso de adenovirus recombinantes alivia los problemas asociados con la integración aleatoria en el genoma del hospedador.

Vectores de poxvirus

Pueden utilizarse vectores de poxvirus de acuerdo con la presente invención, dado que los fragmentos grandes de DNA se clonan fácilmente en su genoma y se han descrito variantes recombinantes atenuadas de vaccinia (Meyer et al., 1991; Smith y Moss, 1983).

40 Ejemplos de vectores de poxvirus incluyen, pero sin carácter limitante, leporipoxvirus: Upton, et al., 1986, (fibromavirus de Shope); capripoxvirus: Gershon, et al., 1989, (oveja-1 de Kenia); ortopoxvirus: Weir, et al., 1983, (vaccinia); Esposito, et al., 1984, (poxvirus de los monos y virus variola); Hruby, et al., 1983, (vaccinia); Kilpatrick, et al., 1985, (virus del tumor de los monos Yaba); avipoxvirus: Binns, et al., (1988) (Yaba); Boyle, et al., 1987, (poxvirus de las aves de corral); Schnitzlein, et al., 1988, (poxvirus de las aves de corral, poxvirus de la codorniz); entomopox (Lytvyn, et al., 1992).

45 Los vectores de poxvirus se utilizan extensamente como vehículos de expresión para genes de interés en células eucariotas. Su facilidad de clonación y propagación en una diversidad de células hospedadoras ha conducido, en particular, al uso generalizado de vectores de poxvirus para expresión de proteínas extrañas y como vehículos de suministro para antígenos de vacunas (Moss, 1991).

Vectores virales de vaccinia

50 El vector de la presente invención puede ser un vector de virus vaccinia tal como MVA o NYVAC. El más preferido es el virus modificado de la cepa vaccinia ankara (MVA) o una cepa derivada del mismo. Alternativas a los vectores vaccinia incluyen los vectores avipox tales como el poxvirus de las aves de corral o el poxvirus del canario conocido

como ALVAC y cepas derivadas de los mismos que pueden infectar y expresar proteínas recombinantes en células humanas pero son incapaces de replicarse.

Sistemas de Suministro

5 La invención proporciona adicionalmente un sistema de suministro para el polinucleótido mutante tk de la presente invención.

El sistema de suministro de la presente invención puede ser un sistema de suministro viral o no viral. Mecanismos de suministro no virales incluyen, pero sin carácter limitante, transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, anfífilos faciales catiónicos (CFAs) y combinaciones de los mismos.

10 Los polinucleótidos pueden administrarse a la población de células diana por cualquier Vehículo de Suministro de Genes, GDV, adecuado. Esto incluye, pero sin carácter limitante, DNA, formulado en complejos lipídicos o proteínicos o administrado como DNA desnudo por inyección o suministro biolístico, virus tales como retrovirus, adenovirus, poxvirus, lentivirus, herpesvirus, virus vaccinia, virus adeno-asociados, virus de la leucemia murina, virus del bosque de Semliki y virus baculovirales. Alternativamente, los polinucleótidos son suministrados por células tales como monocitos, macrófagos, linfocitos o células madre hematopoyéticas. Se utiliza en particular un sistema de suministro dependiente de células. En este sistema, los polinucleótidos que codifican la proteína TK se introducen en una o más células ex vivo y se introducen luego en el paciente.

15 Los agentes de la presente invención pueden administrarse solos, pero generalmente se administran como una composición farmacéutica.

Células Hospedadoras

20 Los vectores y polinucleótidos de la invención pueden introducirse en células hospedadoras para el propósito de replicación de los vectores/polinucleótidos y/o expresión del TK codificado por el polinucleótido de la invención. La célula hospedadora puede ser una célula bacteriana o una célula eucariota, por ejemplo una célula de levadura, insecto o mamífero.

25 La célula hospedadora puede ser una célula para empaquetamiento y propagación de un virus, tal como líneas de células de empaquetamiento retrovirales que son bien conocidas en la técnica.

La célula hospedadora puede ser una célula en un animal o paciente (sea humano o animal) que se desea destruir. Los polinucleótidos y vectores de la presente invención son útiles para direccionamiento a las células a destruir. Las células que expresan TK pueden ponerse en contacto con un agente que es sustancialmente no tóxico, que es convertido en una forma tóxica por una TK.

30 Método de destrucción de células

En un aspecto de la presente invención se proporciona un método de destrucción de células que comprende

(i) Introducir en dichas células un polinucleótido o un vector de la presente invención;

(ii) dejar que dichas células expresen timidina quinasa; y

35 poner en contacto dichas células con un agente sustancialmente no tóxico que es convertido por la timidina quinasa en un agente tóxico.

40 La introducción en las células del polinucleótido o vector, y el contacto de las células con el agente sustancialmente no tóxico, puede realizarse en cualquier orden. Las células a destruir pueden encontrarse in vitro, tales como células que crecen en cultivo, o puede tratarse de células que son parte de un animal. Ejemplos representativos de células que se desea destruir son células T, células autoinmunes, células tumorales, células que no expresan o expresan inadecuadamente un gen particular, y células infectadas con bacterias, virus, u otros parásitos intracelulares.

Tratamiento

Debe apreciarse que todas las referencias a tratamiento en esta memoria incluyen tratamiento curativo, paliativo y profiláctico. Se prefiere particularmente el tratamiento de mamíferos. Tratamientos tanto humanos como veterinarios están dentro del alcance de la presente invención.

45 En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento de un paciente con células que es necesario destruir, que comprende

(i) introducir en el paciente un polinucleótido, un vector a una composición farmacéutica de la presente invención;

(ii) dejar que dicho nucleótido o factor de expresión sea absorbido por dichas células;

(iii) dejar que dichas células expresen timidina quinasa; y

(iv) introducir en el paciente un agente sustancialmente no tóxico que es convertido por una timidina quinasa en un agente tóxico.

5 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento de un paciente con células que es necesario destruir, que comprende

(i) retirar las células del paciente o células donantes;

(ii) introducir ex vivo en las células un polinucleótido o un vector de expresión de la presente invención;

(iii) introducir las células modificadas en el paciente;

10 (iv) dejar que las células expresen timidina quinasa; y

administrar al paciente un agente sustancialmente no tóxico que es convertido por la timidina quinasa en un agente tóxico.

15 Ejemplos representativos de enfermedades que pueden ser tratadas por los polinucleótidos, vectores y métodos de la presente invención incluyen enfermedades tales como cáncer, hiperqueratosis, hipertrofia prostática, hipertiroidismo, una gran diversidad de endocrinopatías, enfermedades autoinmunes, alergias, restenosis, una gran diversidad de enfermedades virales tales como HN y SIDA, hepatitis y enfermedades por parásitos intracelulares.

20 Los polinucleótidos, vectores y métodos de la presente invención pueden utilizarse en el curso de terapia subsiguiente al trasplante alogénico de médula ósea. El trasplante alogénico de médula ósea es el tratamiento de elección para muchas enfermedades malignas hematológicas, tales como leucemia, linfoma y mieloma múltiple. Se ha demostrado que el trasplante alogénico de médula ósea, particularmente cuando se emplea con quimiorradioterapia a dosis alta, produce resultados superiores en comparación con los trasplantes autólogos o singénicos.

25 En la realización del trasplante alogénico de médula ósea, los linfocitos T alorreactivos pueden retirarse del injerto para prevenir la enfermedad de rechazo inverso (GvHD). La GvHD ocurre cuando las células T en el injerto trasplantado de células madre pueden comenzar a atacar el cuerpo del receptor. Sin embargo, dicha retirada de células puede aumentar la incidencia de relapso de la enfermedad, rechazo del injerto y reactivación de la infección viral. Para contrarrestar estos efectos, los pacientes de trasplante alogénico de médula ósea pueden ser tratados por introducción de linfocitos T del donante después de un retardo subsiguiente al trasplante alogénico de médula ósea. Sin embargo, la terapéutica prometedora de la introducción retardada de linfocitos T del donante después del trasplante alogénico de médula ósea está limitada por la GvHD, una combinación frecuente y potencialmente letal del tratamiento. Este problema ha sido abordado por la administración a un paciente de células T modificadas por ingeniería genética para incluir un polinucleótido que codifica un "gen suicida". A este respecto pueden utilizarse los polinucleótidos y vectores de la presente invención que codifican la TK mutante.

35 Así pues, en un aspecto de la presente invención se proporciona un método para prevenir la enfermedad de rechazo inverso en un paciente que comprende:

(i) administrar a un hospedador células T modificadas por ingeniería genética que incluyen un polinucleótido o vector de la presente invención;

y

40 (ii) administrar a dicho hospedador, antes de la aparición de la enfermedad de rechazo inverso, un agente sustancialmente no tóxico en una cantidad eficaz para destruir las células T modificadas por ingeniería genética capaces de producir un efecto de rechazo inverso en dicho paciente por interacción de dicho agente con una timidina quinasa.

45 Las células que comprenden el polinucleótido o vector que codifica el gen mutante tk comprenden preferiblemente un gen marcador que puede utilizarse para monitorizar la presencia del gen tk mutante. Preferiblemente, el gen marcador está codificado por el polinucleótido o vector de expresión de la presente invención. Un ejemplo de un gen marcador de este tipo es un receptor del factor de crecimiento de los nervios de afinidad baja modificado (Δ LNGFR). El LNGFR modificado, cuando se expresa en la superficie de células transducidas, retiene las propiedades de fijación del receptor NGF no modificado correspondiente con respecto a su ligando, pero no puede efectuar la transducción de señales como resultado de la fijación del ligando. Ejemplos de modificaciones específicas del LNGFR se describen en la Solicitud US No. 08/602.791.

50

Composiciones farmacéuticas

Una composición farmacéutica es una composición que comprende o está constituida por una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente farmacéuticamente activo. La misma incluye preferiblemente un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipientes (con inclusión de combinaciones de los mismos). Vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro Edit. 1985). La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con relación a la ruta de administración propuesta y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como - o además de - el vehículo, excipiente o diluyente cualesquiera aglomerante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento(s), y agente(s) solubilizantes adecuados.

Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, petrolatum, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, agentes tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceites perfumados, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres petroterales de ácidos grasos, hidroximetil-celulosa, polivinilpirrolidona, y análogos.

En caso apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por uno cualquiera o más de: inhalación, en forma de un supositorio o pesario, tópicamente en forma de una loción, solución, crema, ungüento o polvo de espolvoreo, por el uso de un parche en la piel, por vía oral en forma de tabletas que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos sea solos o en mezcla con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes saborizantes o colorantes, o pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo por las rutas intracavernosa, intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para administración parenteral, las composiciones pueden utilizarse óptimamente en la forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo sales o monosacáridos suficientes para hacer la solución isotónica con la sangre. Para administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de tabletas o pastillas que pueden formularse de manera convencional.

Pueden existir diferentes requerimientos de la composición/formulación que dependen de los diferentes sistemas de suministro. A modo de ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para ser suministrada utilizando una minibomba o ruta mucosal, por ejemplo, como pulverización nasal o aerosol para inhalación o solución ingerible, o por vía parenteral en la cual la composición está formulada en forma inyectable, para suministro, por ejemplo, por ruta intravenosa, intramuscular o subcutánea. Alternativamente, la formulación puede diseñarse para suministro por ambas rutas.

Características y realizaciones preferidas adicionales de la presente invención se describirán a continuación a modo de ejemplo no limitante y con referencia a los dibujos que se adjuntan, en los cuales:

La Figura 1 muestra la alineación múltiple de secuencias de nucleótidos de mutantes del gen de la timidina quinasa de HSV-1 (HSV-tk) (TkMut2 (SEQ ID NO:2), TkMut23 (SEQ ID NO:3), TkMut24 (SEQ ID NO:4), TkMut34 (SEQ ID NO:5), TkMut4 (SEQ ID NO:6) y TkMut234 (SEQ ID NO:7)). Las bases se numeran a partir del codón de inicio ATG de la secuencia de tipo salvaje de HSV-tk. Las secuencias se alinean contra la secuencia TK wt (TK wt, SEQ ID NO:1). La posición de las mutaciones se indica por un número encima de la alineación. Las mutaciones en las posiciones (330), (541 y 542), y (555) se representan por los números 2, 3 y 4 respectivamente.

La Figura 2 muestra la secuencia de remodelación de consenso.

La Figura 3 muestra el producto HSV-tk PCR de cDNA preparado a partir del sobrenadante de la línea de células de empaquetamiento ecotrópico GP+E86 preparado a partir de la línea de células de empaquetamiento anfotrópico gp+envAm12 (Am12) transfectada con el vector SFCMM-3 (Verzelletti, 1998, Human Gene Therapy 9:2943-2951) y/o TK3 (scSFCMM-3) (Chalmers, 2001).

La Figura 4 muestra HSV-tk amplificado por PCR en linfocitos de sangre periférica (PBL) transducidos con el vector SFCMM-3 y/o TK3 (scSFCMM-3).

La Figura 5 muestra la secuencia de la porción crítica del gen HSV-tk en SFCMM-3 frente a TK3 (scSFCMM-3). Las posiciones de los nucleótidos diferentes entre SFCMM-3 y TK3 (scSFCMM-3) están limitadas por un cuadrado. Los segmentos de genes que están delecionados en las formas remodeladas de SFCMM-3 y TK3 se indican en cursiva. Se indican los sitios donantes y aceptores de remodelación correspondientes.

La Figura 6 muestra un resumen esquemático de las mutaciones introducidas en el vector SFCMM-3.

La Figura 7 muestra el producto HSV-tk PCR de cDNA derivado de sobrenadantes de células E86 transfectadas transitoriamente con plásmidos recombinantes derivados de SFCMM-3 que comprenden los mutantes HSV-tk que se muestran de la Figura 1.

5 La Figura 8 muestra el producto HSV-tk PCR de cDNA derivado de sobrenadantes de cultivos Am 12 que se ha transducido con los sobrenadantes recogidos de los cultivos E86 descritos en la Figura 7.

La Figura 9 muestra el producto TKA1/TKB1 HSV-tk PCR de DNA derivado de células CEM A301 transducidas con los sobrenadantes recogidos de los cultivos Am12 descritos en la Figura 8.

La Figura 10 muestra los productos TKY1/TKY2 y TKZ1/TKZ2 HSV-tk PCR de DNA derivado de células CEMA 301 transducidas con los sobrenadantes recogidos de los cultivos Am12 descritos en la Figura 8.

10 La Figura 11 muestra el producto TKA1/TKB1 HSV-tk PCR de DNA derivado de PBLs transducidos con los sobrenadantes recogidos de los cultivos Am12 descritos en la Figura 8.

La Figura 12 muestra el producto PCR TKZ1/TKZ2 HSV-tk de DNA derivado de PBLs transducidos con los sobrenadantes recogidos de los cultivos Am12 descritos en la Figura 8.

15 **Ejemplo 1 – Frecuencia relativa de la forma remodelada de HSV-tk en sobrenadante SFCMM-3#35 y células transducidas**

La frecuencia relativa de la forma remodelada (porcentaje de forma remodelada frente a remodelada más no remodelada) se evaluó por dos RT-PCR cuantitativas en tiempo real (RNA del sobrenadante) o PCR (DNA de los linfocitos transducidos), específica para cada forma de HSV-tk, utilizando el sistema TaqMan 7700.

Materiales y métodos

20 *Vector retroviral SFCMM-3*

La línea de células productoras derivada de GP+enAm12 (Am12), clon 35 SFCMM-3 (Am12/SFCMM-3#35) se expandió durante 5 días en medio DMEM (Cambrex) que contenía 2 mM glutamina y 10% de FBS irradiado (Hyclone). Los sobrenadantes retrovirales se cosecharon a partir de matraces confluentes en medio X-VIVO15 (Cambrex) complementado con 2 mM glutamina después de 24 horas de incubación de las células a 33°C. Los sobrenadantes que contenían virus se filtraron y se guardaron a -80°C hasta su uso posterior.

Transducción de las células T

Se recogieron células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos y se aislaron por centrifugación en Lymphoprep (Nycomed).

30 Los linfocitos de sangre periférica (PBLs) se estimularon con OKT3 (30 ng/ml) (Orthoclone) y se cultivaron en RPMI (Hyclone) que contenía 3% de plasma autólogo, 2 mM glutamina y complementado con interleuquina humana recombinante (2600 UI/ml) (Proleukin). La transducción de los PBLs se realizó por centrifugación de partículas de vector retroviral (sobrenadante de Am12/SFCMM-3#35) sobre PBLs estimulados con OKT3. Se realizaron dos ciclos de centrifugación los días segundo y tercero después de estimulación con OKT3.

35 Después de la fase de transducción, se recogieron los linfocitos y se evaluó el porcentaje de células transducidas realmente por análisis FACS, gracias a la molécula Δ LNGFR, utilizada como marcador de la superficie celular. Las células transducidas se clasificaron luego por anticuerpos conjugados a cuentas magnéticas (Dynabeads), se expandieron por cultivo durante varios días, y se congelaron luego después de un total de 10 días en cultivo.

Preparación de las muestras

40 Se purificó el DNA a partir de $1-2 \times 10^6$ células utilizando el Minikit QIAamp DNA (Qiagen) siguiendo los protocolos del fabricante y se determinó el rendimiento por medida de la DO260. Se purificó el RNA a partir de 140 μ l de sobrenadante utilizando el Minikit QIAamp Viral RNA (Qiagen) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se sometieron primeramente 13,5 μ l de RNA purificado a tratamiento con DNasa a 25°C durante 20 min, y 95°C durante 5 min para desactivar la DNasa. La mitad del RNA tratado con DNasa se sometió luego a transcripción inversa a 42°C durante 1 hora utilizando la Transcriptasa Inversa M-MLV (Invitrogen) y Oligo dT. El cDNA sintetizado se diluyó 45 5 veces antes de utilizarlo en la PCR en tiempo real.

Cuantificación de la forma remodelada por PCR en tiempo real

Se ha preparado una curva estándar de DNA por subclonación de la forma no remodelada y truncada de HSV-tk en el vector pCR2.1 TOPO (Invitrogen). Se han diseñado dos series diferentes de iniciadores y sondas utilizando el

software Primer Express™ 1.5 (PE Applied Biosystems), capaz de amplificar y detectar selectivamente la forma no remodelada y la remodelada de HSV-tk. Se realizaron dos PCRs cuantitativas en tiempo real, específicas para cada forma de HSV-tk, utilizando el sistema de detección de secuencias TaqMan/ABI Prism 7700.

5 Para preparar una PCR Cuantitativa en tiempo real específica para la forma de HSV-tk no remodelada, se diseñaron iniciadores y sonda en la región remodelada del gen HSV-tk. La PCR en tiempo real para la forma no remodelada se realizó en una mezcla de reacción de 25 µl que contenía 100 -500 ng de DNA genómico o 10 µl de cDNA preparado como se ha descrito arriba, 1X TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems) 300 nM de cada uno de los dos iniciadores TKwtfor (5'-CGG CGG TGG TAA TGA CAA G-3') and Tkwtrv (5'-GCG TCG GTC ACG GCA TA-3') y 200 nM de TK wt sonda MGB (5'- FAM CCA GAT AAC AAT GGG C-3').

10 Se diseñó una sonda TaqMan que abarcaba la unión de remodelación para detectar selectivamente la forma de HSV-tk remodelada. La PCR cuantitativa en tiempo real específica para la forma TK remodelada (truncada) se realizó en una mezcla de reacción de 25 µl que contenía 100 -500 ng de DNA genómico o 10 µl de cDNA preparado como se ha descrito arriba, 1X Master Mix (PE Applied Biosystems) 300 nM de cada uno de los dos iniciadores TKSP18 (5'- GGA TGA GGG CCA CGA A-3') y TKSP16 (5'- CGA ACA TCT ACA CCA CAC AAC A-3') y 200nM de sonda Taq Man PSP10 (5' FAM -CCA GCA CGG CCC TGG TCG-TAMRA 3'). Las condiciones de ciclación térmica eran como sigue: activación inicial de UNG a 50°C durante 2 min, seguida por activación de Taq Gold y desactivación de UNG a 25°C durante 15 minutos. Subsiguientemente, se realizaron 40 ciclos de amplificación a 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min. Ambas PCRs se realizaron en paralelo en placas de reacción MicroAmp ópticas de 96 pocillos (Applied Biosystems) utilizando los Sistemas de Detección de Secuencias ABI Prism 7700 (Applied Biosystems). La fluorescencia media de la línea base se calculó a partir de los ciclos PCR 3 a 15, y se definió Ct como el ciclo PCR en el cual la intensidad de fluorescencia normalizada del tinte informador era igual a 0,05. Se generaron dos curvas estándar con números de copias conocidos (desde 106 a 4 copias para reacción) en cada ensayo TaqMan por representación gráfica de los valores Ct contra el logaritmo de la cantidad inicial de aporte de DNA. Se analizaron diluciones estándar y muestras de cDNA por duplicado y triplicado, respectivamente. Se validaron ambas PCRs y exhibían un intervalo dinámico extendido (6 log), sensibilidad alta (< 10 copias/relación), así como reproducibilidad (CV < 5%) y repetibilidad (CV < 5%) satisfactorias.

Resultados

30 Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se analizaron 6 lotes de grado clínico de sobrenadante del vector SFCMM-3, así como 9 preparaciones de linfocitos transducidos. La frecuencia relativa de la forma remodelada es inferior a 5% en la totalidad de los 6 lotes de grado clínico de sobrenadante SFCMM-3 (1,12 ± 0,75, intervalo 0,65-2,60), así como en 9 preparaciones de linfocitos T transducidos con sobrenadante SFCMM-3 (1,89 ± 1,22, intervalo 0,84-4,00).

Ejemplo 2 – Variante de TK remodelada en sobrenadantes scSFCMM-3 y células transducidas

Materiales y métodos

35 *Vector retroviral scSFCMM-3 y líneas de células productoras*

40 El vector DNA TK3 (TK3 Mohned y TK3 son preparaciones diferentes del mismo plásmido scSFCMM-3, descrito en Chalmers 2001, Molecular Therapy 4:146-148) se transfirió en la línea de células de empaquetamiento ecotrópico GP+E-86 (E86) por coprecipitación con fosfato de calcio. El sobrenadante obtenido a partir de la transfección transitoria de las células E86 se filtró y se utilizó luego para infectar la línea de células Am12. La fracción de células que contenían TK3 se aisló utilizando selección inmunomagnética, y el cultivo a granel Am12/TK3 resultante se expandió. Después de dilución limitante del cultivo a granel Am12/TK3, se seleccionaron los clones #53, #71, y #80 sobre la base de alta capacidad de crecimiento y eficiencia de transducción de los linfocitos T.

45 Los clones Am12/TK3 se expandieron en DMEM (Cambrex) que contenía 2 mM glutamina y 10% de FBS irradiado (Hyclone). Los sobrenadantes retrovirales se cosecharon en medio X-VIVO 15 (Cambrex) complementado con 2 mM glutamina después de 24 horas de incubación de las células a 33°C. Los sobrenadantes que contenían virus se filtraron con filtros de 0,22 µm y se guardaron a -80°C hasta su uso ulterior.

Transducción de las células T

Se recogieron células mononucleares de sangre periférica de varios donantes sanos y se aislaron por centrifugación en Lymphoprep (Nycomed).

50 Los linfocitos de la sangre periférica (PBLs) se estimularon con OKT3 (30 ng/ml) (Orthoclone) y se cultivaron en RPMI (Orthoclone) que contenía 3% de plasma autólogo, 2 mM glutamina y estaba complementado con 2600 UI/ml de interleuquina humana recombinante (Proleukin). La transducción de los PBLs se efectuó por centrifugación de las partículas de vector retroviral sobre PBLs estimulados con OKT3. Se realizaron dos ciclos de centrifugación los días

segundo y tercero después de la estimulación con OKT3. Después de la fase de transducción, se recogieron los PBLs y se evaluó el porcentaje de células transducidas realmente por análisis FACS, gracias a la molécula Δ LNGFR, utilizada como marcador de la superficie celular. Las células transducidas se clasificaron luego por anticuerpos conjugados a cuentas magnéticas (Dynabeads), se expandieron durante unos cuantos días en cultivo, y se prepararon pelets para análisis PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa

Se analizaron la línea de células productoras a granel (Am12/TK3 Bulk2) así como clones simples de células productoras obtenidos por dilución limitante (Am12/TK3 #53, #71 y #80). El RNA se extrajo de los sobrenadantes de cultivo que contenían partículas virales infecciosas.

Se realizó la RT-PCR con iniciadores HTK4+ (5'- TTC TCT AGG CGC CGG AAT TCG TT-3') y HTK2- (5'- ATC CAG GAT AAA GAC GTG CAT GG-3') o iniciadores TKA1 (5'- CGT ACC CGA GCC GAT GAC TT-3') y TKB1 (5'-TGT GTC TGT CCT CCG GAA GG-3'). La RT-PCR se realizó utilizando el Sistema RT-PCR Titan One Tube (Roche) en una mixtura de reacción de 50 μ l que contenía 10 μ l de RNA tratado con DNasa, 1 X RT-PCR tampón con 1,5 mM de MgCl₂ (PE Applied Biosystems), 200 μ M de cada desoxinucleótido (dNTP), 200 nM de cada iniciador, 5 mM de ditiotreitól (DDT), 20 U de inhibidor de RNasa, y 1 μ l de mixtura Titan Enzyme.

Se utilizaron como controles sobrenadantes de Am12/SFCMM-3 #35 y DNA de SFCMM-3 linfocitos SFCMM-3 transducidos. Se ejecutaron también en paralelo controles RT-.

El perfil de la ciclación RT-PCR consistía en un primer paso de transcripción inversa durante 30 min a 50°C, un paso de desnaturalización durante 2 min a 94°C seguido por 40 ciclos con desnaturalización durante 30 s a 95°C, reasociación durante 30 s a 60°C y elongación durante 1 min 30 s a 68°C, y un paso de elongación final de 10 min a 68°C. Se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 10 microlitros del producto amplificado.

Se extrajo DNA genómico de PBLs de varios donantes transducidos con SFCMM-3 o vector TK3. La PCR se realizó en una mixtura de reacción de 25 μ l que contenía 100-500 ng de DNA genómico, 1 X tampón PCR con 1,5 mM de MgCl₂ (Applied Biosystems), 200 μ M de cada dNTP, 1600 nM de cada iniciador TK2S (5'-CCA TAG CAA CCG ACG TAC G-3') y TKS (5'-GAA TCG CGG CCA GCA TAG C-3'). El perfil de la ciclación PCR estaba constituido por un primer paso de desnaturalización durante 15 min a 94°C seguido por 38 ciclos con desnaturalización durante 1 min a 95°C, reasociación durante 30 s a 65°C y extensión durante 1 min a 72°C, y un paso final de extensión de 10 min a 72°C. Se analizaron 10 microlitros de producto amplificado por electroforesis en gel de agarosa.

Se realizó sobre las mismas muestras una PCR en una mixtura de reacción de 25 μ l que contenía 100 -500 ng de DNA genómico, 1 x PCR tampón con 1,5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 200 μ M de cada dNTP, 300 nM de cada iniciador HTK4+ (5'-TTC TCT AGG CGC CGG AAT TCG TT-3') y HTK2- (5'-ATC CAG GAT AAA GAC GTG CAT GG-3'), 1,25 U de AmphTaq Gold (Applied Biosystems). El perfil de la ciclación PCR estaba constituido por un primer paso de desnaturalización durante 15 min a 94°C seguido por 40 ciclos con desnaturalización durante 30 s a 95°C, reasociación durante 50 s a 60°C y extensión durante 1 min a 72°C, y un paso final de extensión de 10 min a 72°C. Se analizaron 10 microlitros del producto amplificado por electroforesis en gel de agarosa.

Análisis de la secuencia de cDNA de la forma TK3 remodelada

La banda inferior del producto amplificado con iniciadores HTK4+/HTK2 del sobrenadante Am12/TK3#53 se secuenció utilizando un aparato secuenciador de DNA fluorescente automático. La secuencia fue realizada por PRIMM (Milán, Italia).

Resultados

HSV-tk RT-PCR de: RNA de los sobrenadantes de cultivo

Se detectaron dos productos PCR por análisis de RNA de vectores SFCMM-3 y TK3, producidos por líneas de células de empaquetamiento Am12 y E86 (Figura 3). El vector TK3 corresponde al vector scSFCMM-3 descrito (Chalmers, 2001). El producto principal (banda superior) corresponde a la forma no remodelada de HSV-tk (1020 pares de bases (pb) con iniciadores HTK4+/HTK2-; 401 pb con iniciadores TKA1/TKB1) en todas las muestras. El tamaño del producto menor (banda inferior) en las muestras SFCMM-3 corresponde a la forma remodelada descrita, en la cual se han delecionado 227 pb (Garin 2001, Blood 97:122-129).

Por el contrario, el tamaño del producto menor en las muestras TK3 es ligeramente mayor, sugiriendo la presencia de una forma diferente remodelada, en la cual se ha delecionado un fragmento más pequeño; esta diferencia entre las muestras SFCMM-3 y TK3 es particularmente evidente con los iniciadores TK2S/TKAS. Los productos intermedios adicionales observados con los iniciadores HTK4+/HTK2- se consideraron únicamente como posibles artefactos de la PCR.

PCR de HS V-tk en DNA de linfocitos transducidos

Se detectaron dos productos PCR analizando el DNA de SFCMM-3 así como PBLs transducidos TK3 (Figura 4). El producto principal (banda superior) corresponde a la forma no remodelada de HSV-tk (644 pb con iniciadores TK2S/TKAS, 1020 pb con iniciadores HTK4+/HTK2-). El tamaño de la banda inferior (correspondiente a la forma descrita remodelada) en las muestras SFCMM-3 es 417 pb con iniciadores TK2S/TKAS y 793 pb con iniciadores HTK4+/HTK2-.

Secuencia de la porción crítica del gen HSV-tk en SFCMM-3 frente a TK3

La secuencia de la porción crítica del gen HSV-tk en SFCMM-3 frente a TK3 se muestra en la Figura 5. Los segmentos de gen que están delecionados en las formas remodeladas de SFCMM-3 y TK3 se indican en cursiva. Los sitios correspondientes donantes y aceptores de remodelación correspondientes están subrayados.

Los datos de secuencia confirman que se generan formas remodeladas diferentes en las muestras SFCMM-3 (deleción de 227 pb) y TK3 (deleción de 214 pb). Como sería de esperar, en ambos casos están presentes los dinucleótidos GU y AG en los límites 5' y 3' de la secuencia delecionada, respectivamente.

Ejemplo 3 – Eliminación de la remodelación por mutagénesis orientada

15 Materiales y Métodos

Partiendo del vector SFCMM-3 de tipo salvaje, se prepararon plásmidos recombinantes por mutagénesis orientada con mutaciones diferentes en el gen HSV-tk (Figura 6). Se introdujeron cambios degenerados en la tercera base, con lo que se conservó en todos los casos la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de la enzima HSV-tk.

Mutagénesis orientada

20 Para generar el plásmido pcDNA3.1-tk, se digirió el plásmido SFCMM-3 con EcoRI y XhoI, y el fragmento EcoRI/XhoI se ligó a pcDNA3.1 digerido con EcoRI/XhoI (Invitrogen).

25 A partir del plásmido pcDNA3.1-tk, se generaron todos los mutantes HSV-tk por mutagénesis orientada utilizando el kit de Mutagénesis Orientada QuickChange (Stratagene). Los iniciadores oligonucleotídicos utilizados para introducir la mutación deseada eran cada uno complementario a cadenas opuestas del vector. Las secuencias de los iniciadores de sentido se consignan en la tabla siguiente:

Posición de mutación	Secuencia del oligonucleótido ^a	Mutante generado	Clon plasmídico ^b
t330c	5'-CCTCGACCAGGCGGAGATATCGGCCG-3'	TkMut2	10.1
t330c	5'-CCTCGACCAGGCGGAGATATCGGCCG-3'	TkMut24	177.3
g555a	5'-ATGACCCCCCAAGCCCGTGCTGGCG-3'		
a541t/g542c/g555a	5'- TACCTTATGGGCTCCATGACCCCCCAAGCCCGTGC- 3'	TkMut34	57.1
g555a	5'-ATGACCCCCCAAGCCCGTGCTGGCG-3'	TkMut4	19.1
t330c	5'-CCTCGACCAGGCGGAGATATCGGCCG-3'		
a541t/g542c/g555a	5'- TACCTTATGGGCTCCATGACCCCCCAAGCCCGTGC- 3'	TkMut234	171.1

^a La posición de las mutaciones nucleotídicas está subrayada en negrilla.

^b Los números se refieren al número de cada clon mutante plasmídico SFCMM-3 HSV-tk.

Los vectores resultantes se secuenciaron para confirmar las sustituciones de nucleótidos corregidas. El fragmento de HSV-tk mutado se retiró luego de pcDNA3.1 por digestión con EcoRI y XhoI, y se clonó después en el plásmido SFCMM-3 para generar mutantes SFCMM-3 HSV-tk.

5 Después de la confirmación de la secuencia de los mutantes SFCMM-3 HSV-tk (Figura 1), se utilizó un clon plasmídico de cada tipo para transfectar transitoriamente células E86. Como controles se utilizaron los plásmidos SFCMM-3 y TK3. Se recogió el sobrenadante de los cultivos E86 y se utilizó para transducir establemente la línea de células de empaquetamiento anfotrópico Am12 como se describe en la sección Materiales y Métodos del Ejemplo 2. Las poblaciones de células resultantes se seleccionaron para expresión de Δ LNGFR.

10 Se extrajo el RNA de los sobrenadantes de cultivo E86 y Am12 que contenían partículas retrovirales infecciosas. Se llevaron a cabo reacciones RT-PCR sobre el RNA de los sobrenadantes E86 y Am12 utilizando los iniciadores TKA1 y TKB1 de acuerdo con el protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos del Ejemplo 2.

Transducción y análisis PCR de la línea de células CEM A301 y PBLs

15 Se cultivaron células CEM A301 en RPMI 1640 (Hyclone) complementado con 10% FBS (Hyclone) y 2 mM glutamina. Las células CEM A301 se infectaron con sobrenadante de cultivo Am12 que contenía los mutantes 2 y 234 de SFCMM-3 HSV-tk. El día anterior a la transducción se cultivaron 5×10^5 células/ml. Se realizó luego la transducción por un ciclo de centrifugación de partículas vector retrovirales en células. Después de la fase de transducción, se recogieron las células y el porcentaje de células transducidas realmente se evaluó por análisis FACS. Se transdujeron PBLs de 3 donantes diferentes (como se describe en la sección Materiales y Métodos del Ejemplo 2) con el sobrenadante Am12 que contenía el mutante 2 de SFCMM-3 HSV-tk así como SFCMM-3.

20 Las células transducidas se clasificaron luego respecto a la expresión de Δ LNGFR y se expandieron unos cuantos días en cultivo.

25 Se preparó un pelet para análisis PCR a partir de las células transducidas no seleccionadas y a partir de células transducidas seleccionadas como se describe en la sección Materiales y Métodos del Ejemplo 2. Se extrajo el DNA genómico de las células del pelet y se llevó a cabo una reacción PCR con los iniciadores TKA1 y TKB1 o TKY1 y TKY2 o TKZ1 y TKZ2 (como se indica en la tabla siguiente) en una mezcla de reacción de 25 μ l que contenía 100 - 500 ng de DNA genómico, 1X PCR tampón con 1,5 mM de MgCl₂ (Applied Biosystems), 200 nM de cada uno de los dNTPs, 300 nM de cada iniciador y 1,25 unidades de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). El perfil de la ciclación PCR estaba constituido por un primer paso de desnaturalización durante 15 min a 94°C seguido por 40 ciclos con desnaturalización durante 30 s a 94°C, reasociación durante 50 s a 60°C y extensión durante 1 min a 72°C, y un paso de extensión final de 10 min a 72°C. Se analizaron 10 microlitros del producto amplificado por electroforesis en gel de agarosa.

Nombre del iniciador	Secuencia del iniciador	Longitud del producto PCR (HSV-tk no remodelado)
TKA1 TKB1	5'- CGT ACC CGA GCC GAT GAC TT-3' 5'-TGT GTC TGT CCT CCG GAA GG-3'	401 bp
TKY1 TKY2	5'-TTA TAT AGA CGG TCC TCA CGG G-3' 5'-CCA GCA TAG CCA GGT CAA GC-3'	542 bp
TKZ1 TKZ2	5'-GCC ACC ATG GCT TCG TAC-3' 5'-CGA GTT AAT TCT CAG TTA GCC TCC-3'	1149 bp

Resultados

35 Propiedades de remodelación de los mutantes HSV-tk en los sobrenadantes E86

El producto principal (banda superior) correspondiente a la forma no remodelada de HSV-tk (401 pb) se detecta en todas las muestras excepto en el control negativo (sobrenadante de las células E86 no transfectadas, E86 C-) (Figura 7).

El producto menor (banda inferior) es menos abundante en el RNA de todos los vectores mutantes, en lo que respecta a los vectores SFCMM-3 y TK3, producidos por líneas de células de empaquetamiento E86.

Propiedades de remodelación de los mutantes HSV-tk en los sobrenadantes Am12

5 La forma de HSV-tk no remodelada se detecta en todas las muestras excepto los controles negativos (sobrenadante de células no infectadas, Am12 C-, y H₂O) (Figura 8). Se detecta una banda inferior en los mutantes TkMut4 (mutación 4) y TkMut34 (mutaciones 3 + 4), correspondiente a la banda inferior de las muestras TK3 y SFCMM-3, respectivamente. La intensidad de la señal de bromuro de etidio es menor comparada con TK3 y SFCMM-3, lo que indica que el producto remodelado está menos representado en los mutantes. Esta banda no se detecta en los mutantes TkMut2 (mutación 2), TkMut234 (mutaciones 2 + 3 + 4) y TkMut24 (mutaciones 2 + 4). De hecho, se detectan dos bandas muy débiles de aproximadamente 100 y 200 pb en los mutantes TkMut2, TkMut234 y TkMut24.

Propiedades de remodelación de los mutantes HSV-tk en las células transducidas CEM A301 y PBLs

15 El DNA genómico de CEM A301 transducido con los mutantes TkMut2 y TkMut234, así como con los sobrenadantes SFCMM-3 y TK3 se realizó por PCR utilizando los iniciadores TKA1/TKB1. La forma de HSV-tk no remodelada (401 pb) se detecta en todas las muestras excepto en los controles negativos (células no transducidas, CEM NT y H₂O) (Figura 9). Se detecta una banda inferior en la muestra preselección y postselección TK3 y SFCMM-3, correspondiente a la forma no remodelada del gen HSV-tk. No se observa banda inferior alguna en las CEM transducidas con los mutantes TkMut2 y TkMut234, antes y después de la selección.

20 Para excluir la posibilidad de que ocurran sucesos alternativos de remodelación en las diferentes regiones del gen HSV-tk, se realizó un análisis más a fondo de CEM A301 transducidas con TkMut2 y con los sobrenadantes SFCMM-3 utilizando los iniciadores TKY1/TKY2 y TKZ1/TKZ2.

La forma de HSV-tk no remodelada (542 pb y 1149 pb, respectivamente) se detecta en todas las muestras (Figura 10). Se detecta una banda inferior en las muestras de preselección y postselección SFCMM-3, correspondiente a la forma remodelada del gen HSV-tk. No se observa banda inferior alguna en CEM transducidas con TkMut2, ni con los iniciadores TKY1/TKY2, ni con TKZ1/TKZ2 PCR.

25 El DNA genómico de PBLs de 3 donantes diferentes (Don1, Don2, Don3) transducidos con los sobrenadantes SFCMM-3 y/o TkMut2 se analizó por PCR utilizando los iniciadores TKA1/TKB1. La forma no remodelada de HSV-tk (401 pb) se detecta en todas las muestras (Figura 11). Se detecta una banda inferior en la muestra de SFCMM-3, correspondiente a la forma remodelada del gen HSV-tk. No se observa banda inferior alguna en los PBLs transducidos con TK2. Se obtuvo el mismo resultado utilizando los iniciadores TKZ1/TKZ2 (Figura 12), lo que abarca el gen HSV-tk de longitud total (1149 pb), excluyendo así la posibilidad de que la mutación introducida pudiera generar variantes de remodelación diferentes.

30 En conjunto, estos descubrimientos indican que las mutaciones introducidas anulan o al menos reducen muy significativamente cualquier forma remodelada del gen HSV-tk en CEM transducidas así como en linfocitos transducidos.

35

Tabla 1. Análisis de la forma remodelada HSV-tk en sobrenadantes SFCMM-3 y PBLs transducidos

Sobrenadante del vector SFCMM-3. Número de lote	% HSV-tk Remodelado/ HSV-tk No remodelado + HSV-tk Remodelado	
	RNA (sobrenadante)	DNA (PBLs transducidos)
50.302-22	0.65	0.84
		1.25
50.302-23	0.65	1.50
50.302-24	0.98	1.58
50.302-26	0.72	1.00
		0.92
		2.02
02/047	1.10	3.86
03/087	2.60	4.00
Valor medio	1.15	1.89
sd	0.75	1.22
n	6	9
min	0.65	0.84
max	2.60	4.00

REIVINDICACIONES

- 1.- Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una timidina quinasa, caracterizado porque en el al menos uno de los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de los sitios donantes de remodelación en las posiciones 329 y 330 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 (TK wt) se ha reemplazado por otro nucleótido y en donde los nucleótidos de los sitios aceptores de remodelación no se han alterado.
- 2.- Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque en el mismo ambos nucleótidos correspondiente a los nucleótidos de los sitios donantes de remodelación en las posiciones 329 y 330 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 se han reemplazado por otro nucleótido.
- 3.- Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque en el mismo el polinucleótido correspondiente a la posición 330 está cambiado de T a C.
- 4.- Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una timidina quinasa caracterizado porque en el mismo al menos uno de los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de los sitios donantes de remodelación en las posiciones 329 y 330 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 (Tk wt) se ha reemplazado por otro nucleótido y
- los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de los sitios aceptores de remodelación en las posiciones 554 y 555 y los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de los sitios aceptores de remodelación en las posiciones 662 y 663 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 no se han alterado.
- 5.- Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque en el mismo ambos nucleótidos correspondientes a las posiciones 329 y 330 se han reemplazado por otro nucleótido.
- 6.- Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, caracterizado porque en el mismo el nucleótido correspondiente a la posición 330 está cambiado de T a C.
- 7.- Un polinucleótido que comprende la secuencia TkMut2 de la Figura 1.
- 8.- Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una timidina quinasa caracterizado porque en el mismo al menos uno de los nucleótidos de los sitios donantes de remodelación correspondientes al o a los nucleótidos de las posiciones 329 y 330 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 (Tk wt) se ha reemplazado por otro nucleótido y en donde al menos uno de los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos de los sitios aceptores de remodelación en las posiciones 541 y 542 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 se ha reemplazado por otro nucleótido.
- 9.- Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque en el mismo ambos nucleótidos correspondientes a las posiciones 541 y 542 se han reemplazado por otro nucleótido.
- 10.- Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, caracterizado porque en el mismo ambos nucleótidos correspondientes a las posiciones 329 y 330 se han reemplazado por otro nucleótido.
- 11.- Un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 caracterizado porque en el mismo el nucleótido correspondiente a la posición 330 está cambiado de T a C.
- 12.- Un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 caracterizado porque en el mismo el nucleótido correspondiente a la posición 541 está cambiado de A a T.
- 13.- Un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 caracterizado porque en el mismo el nucleótido correspondiente a la posición 542 está cambiado de G a C.
- 14.- Un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 caracterizado porque en el mismo al menos uno de los nucleótidos correspondiente a los nucleótidos de los sitios aceptores de remodelación en la posición 554 y 555 de la secuencia de tipo salvaje de la Figura 1 se ha reemplazado también por otro nucleótido de tal modo que no está presente sitio alguno de remodelación.
- 15.- Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizado porque en el mismo el nucleótido correspondiente a la posición 555 esta cambiado de G a A.
- 16.- Un polinucleótido que comprende la secuencia TkMut23 de la Figura 1.
- 17.- Un polinucleótido que comprende la secuencia TkMut234 de la Figura 1.

- 18.- Un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 caracterizado porque en el mismo el nucleótido de reemplazamiento no altera la secuencia del polipéptido codificado por dicha secuencia de nucleótidos.
- 19.- Un vector que comprende un polinucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 5 20.- Una célula hospedadora que comprende un polinucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o un vector como se define en la reivindicación 19.
- 21.- Una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, un vector como se define en la reivindicación 19, o una célula hospedadora como se define en la reivindicación 20 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 22.- Un kit que se caracteriza por comprender
- (i) un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18; o un vector como se define en la reivindicación 19, o una célula hospedadora como se define en la reivindicación 20, o una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 21; y
- (ii) un agente sustancialmente no tóxico que es convertido por una timidina quinasa en un agente tóxico.
- 15 23.- Un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, un vector como se define en la reivindicación 19, una célula hospedadora como se define en la reivindicación 20 o una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 21 para uso en medicina.
- 24.- Un polinucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, un vector como se define en la reivindicación 19 o una célula hospedadora como se define en la reivindicación 20 para destruir células en un
- 20 paciente.
- 25.- Un polinucleótido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, un vector como se define en la reivindicación 19 o una célula hospedadora como se define en la reivindicación 20 para tratamiento del cáncer.
- 26.- Un polinucleótido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, un vector como se define en la reivindicación 19 o una célula hospedadora como se define en la reivindicación 20 para prevenir la enfermedad de
- 25 rechazo inverso.
- 27.- Productos que contienen un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, un vector como se define en la reivindicación 19, una célula hospedadora como se define en la reivindicación 20 o una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 21, y un agente sustancialmente no tóxico para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un paciente con células que precisan destrucción, en donde
- 30 dicho agente sustancialmente no tóxico es convertido por una timidina quinasa en un agente tóxico.
- 28.- Un producto de acuerdo con la reivindicación 27 o un kit de acuerdo con la reivindicación 22 en donde el agente sustancialmente no tóxico es uno cualquiera de ganciclovir, aciclovir, trifluorotimidina, 1-[2-desoxi, 2-fluoro, β -D-arabinofuranosil]-5-yodouracilo, ara-A, ara 1,1- β -D-arabinofuranosil-timina, 5-etil-2'-desoxiuridina, 5-yodo-5'-amino-2,5'-didesoxiuridina, idoxuridina, AZT, AIV, didesoxicitidina, Ara C y bromovinil-desoxiuridina (BVDU).

35

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es para comodidad del lector únicamente. No forma parte del documento de la patente europea. Aun cuando se tuvo gran cuidado al reunir las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes (EPO) declina toda responsabilidad a este respecto.

5 Los documentos de patente citados en la descripción

- WO 9007936 A [0004]
- US 5837510 A [0004]
- US 5861290 A [0004]
- WO 9804290 A [0004]
- WO 9737542 A [0004]
- US 5631 A [0004]
- US 236 A [0004]
- WO 9530007 A, Kokoris [0006]
- US 5877010 A [0006]
- WO 9919466 A [0006]
- WO 9514102 A [0006]
- WO 0179502 A [0007]
- US 4514497 A, Kit and Kit [0064]
- US 1985 A [0064]
- US 08602791 A [0138]

Literatura no de patentes citada en la descripción

- **Chalmers.** *Molecular Therapy*, 2001, vol. 4, 146-148 [0007] [0154]
- **J. Sambrook ; E. F. Fritsch ; T. Maniatis.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 1-3 [0061]
- **Ausubel, F. M. et al.** *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, 1995 [0061]
- **B. Roe ; J. Crabtree ; A. Kahn.** *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques.* John Wiley & Sons, 1996 [0061]
- **J. M. Polak ; James O'D. McGee.** *In Situ Hybridization: Principles and Practice.* Oxford University Press, 1990 [0061]
- *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach.* IrI Press, 1984 [0061]
- **D. M. J. Lilley ; J. E. Dahlberg.** *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology.* Academic Press, 1992 [0061]
- **E. M. Shevach ; W. Strober.** *Current Protocols in Immunology.* John Wiley & Sons, 1992 [0061]
- **McKnight et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1980, vol. 8, 5949-5964 [0066]
- **Sambrook et al.** *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press [0069]
- **Coffin et al.** *retroviruses.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1997, 758-763 [0101]
- **Miller et al.** *Improved retroviral vectors for gene transfer and expression.* *BioTechniques*, 1989, vol. 7, 980-990 [0109]
- **Coffin et al.** *Retroviruses.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1997, 758-763 [0110]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences.* Mack Publishing Co, 1985 [0139]
- **Verzelletti.** *Human Gene Therapy*, 1998, vol. 9, 2243-2251 [0143]
- **Garin.** *Blood*, 2001, vol. 97, 122-129 [0166]
- **Moolten.** *Cancer Res.*, 1986, vol. 46, 5276 [0188]
- **Mullen.** *Pharmac. Ther.*, 1994, vol. 63, 199 [0188]
- **Marini et al.** *Gene Therapy*, 1995, vol. 2, 655 [0188]
- **Kokoris et al.** *Gene Therapy*, 1999, vol. 6, 1415-1426 [0188]
- **Fillat et al.** *Current. Gene Therapy*, 2003, vol. 3, 13 [0188]
- **Tiberghien et al.** *Blood*, 2001, vol. 97, 63 [0188]
- **Garin et al.** *Blood*, 2001, vol. 97, 122 [0188]
- **Chalmers.** *Molecular Therapy*, 2001, vol. 4, 146 [0188]
- **Rettig et al.** *Molecular Therapy*, 2003, vol. 8, 29 [0188]
- **McKnight et al.** *Nuc. Acids Res.*, 1980, vol. 8, 5949 [0188]
- **Swain ; Galloway.** *J. Virol.*, 1983, vol. 46, 1045 [0188]
- **Davidson ; Scott.** *J. Gen. Virol.*, 1986, vol. 67, 1759 [0188]
- **Otsuka ; Kit.** *Virology*, 1984, vol. 135, 316-330 [0188]
- **Nunberg et al.** *J. Virol.*, 1989, vol. 63, 3240 [0188]
- **Robertson ; Whalley.** *Nuc. Acids Res.*, 1988, vol. 16, 11303 [0188]
- **Mittal ; Field.** *J. Virol.*, 1989, vol. 70, 2901 [0188]
- **Martin et al.** *J. Virol.*, 1989, vol. 63, 2847 [0188]
- **Scott et al.** *J. Gen. Virol.*, 1989, vol. 70, 3055 [0188]
- **Honess et al.** *J. Gen. Virol.*, 1989, vol. 70, 3003 [0188]
- **Baer et al.** *Nature (London)*, 1984, vol. 310, 207 [0188]
- **McKnight et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1980, vol. 8, 5949 [0188]
- **Drinkwater ; Klinedinst.** *PNAS*, 1986, vol. 83, 3402 [0188]
- **Liao ; Wise.** *Gene*, 1990, vol. 88, 107 [0188]
- **Horwitz et al.** *Genome*, 1989, vol. 3, 112 [0188]

- **Lewis et al.** *EMBO. J.*, 1992, vol. 11, 3053 [0188]
- **Lewis ; Emerman.** *J. Virol.*, 1994, vol. 68, 510 [0188]
- **Meyer et al.** *J. Gen. Virol.*, 1991, vol. 72, 1031 [0188]
- **Smith ; Moss.** *Gene*, 1983, vol. 25, 21 [0188]
- **Upton et al.** *J. Virology*, 1986, vol. 60, 920 [0188]
- **Gershon et al.** *J. Gen. Virol.*, 1989, vol. 70, 525 [0188]
- **Weir et al.** *J. Virol.*, 1983, vol. 46, 530 [0188]
- **Esposito et al.** *Virology*, 1984, vol. 135, 561 [0188]
- **Hruby et al.** *PNAS*, 1983, vol. 80, 3411 [0188]
- **Kilpatrick et al.** *Virology*, 1985, vol. 143, 399 [0188]
- **Binns et al.** *J. Gen. Virol.*, 1988, vol. 69, 1275 [0188]
- **Boyle et al.** *Virology*, 1987, vol. 156, 355 [0188]
- **Schnitzlein et al.** *J. Virological Method*, 1988, vol. 20, 341 [0188]
- **Lytvyn et al.** *J. Gen. Virol.*, 1992, vol. 73, 3235 [0188]
- **Moss.** *Science*, 1991, vol. 252, 1662 [0188]
- **Verzeletti.** *Hum. Gene Therapy*, 1998, vol. 9, 2243 [0188]
- **Chalmers.** *Mol. Therapy*, 2001, vol. 4, 146 [0188]

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

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

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

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

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

2

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

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

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

ES 2 372 022 T3

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

Tk wt : 541 agcatgacccccagggcctgctggcggtcgtggccctcatcccgcgaccttgcccggc 600
 TkMut2 : agcatgacccccagggcctgctggcggtcgtggccctcatcccgcgaccttgcccggc
 TkMut23 : tccatgacccccagggcctgctggcggtcgtggccctcatcccgcgaccttgcccggc
 TkMut24 : agcatgacccccagggcctgctggcggtcgtggccctcatcccgcgaccttgcccggc
 TkMut34 : tccatgacccccagggcctgctggcggtcgtggccctcatcccgcgaccttgcccggc
 TkMut4 : agcatgacccccagggcctgctggcggtcgtggccctcatcccgcgaccttgcccggc
 TkMut234 : tccatgacccccagggcctgctggcggtcgtggccctcatcccgcgaccttgcccggc

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

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

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

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

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

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

ES 2 372 022 T3

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

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

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

Figura 1

Secuencia de remodelación de consenso:

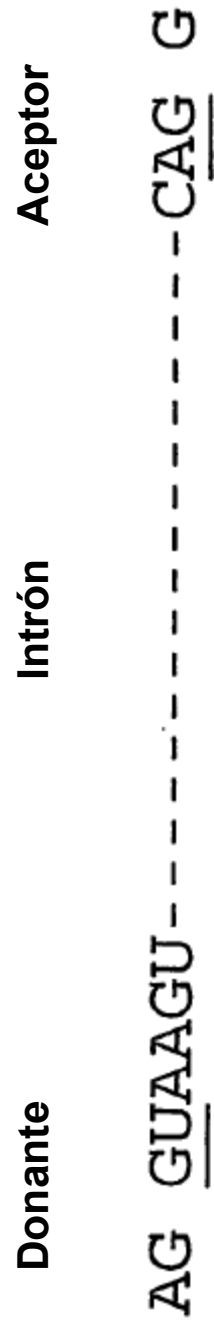


Figura 2

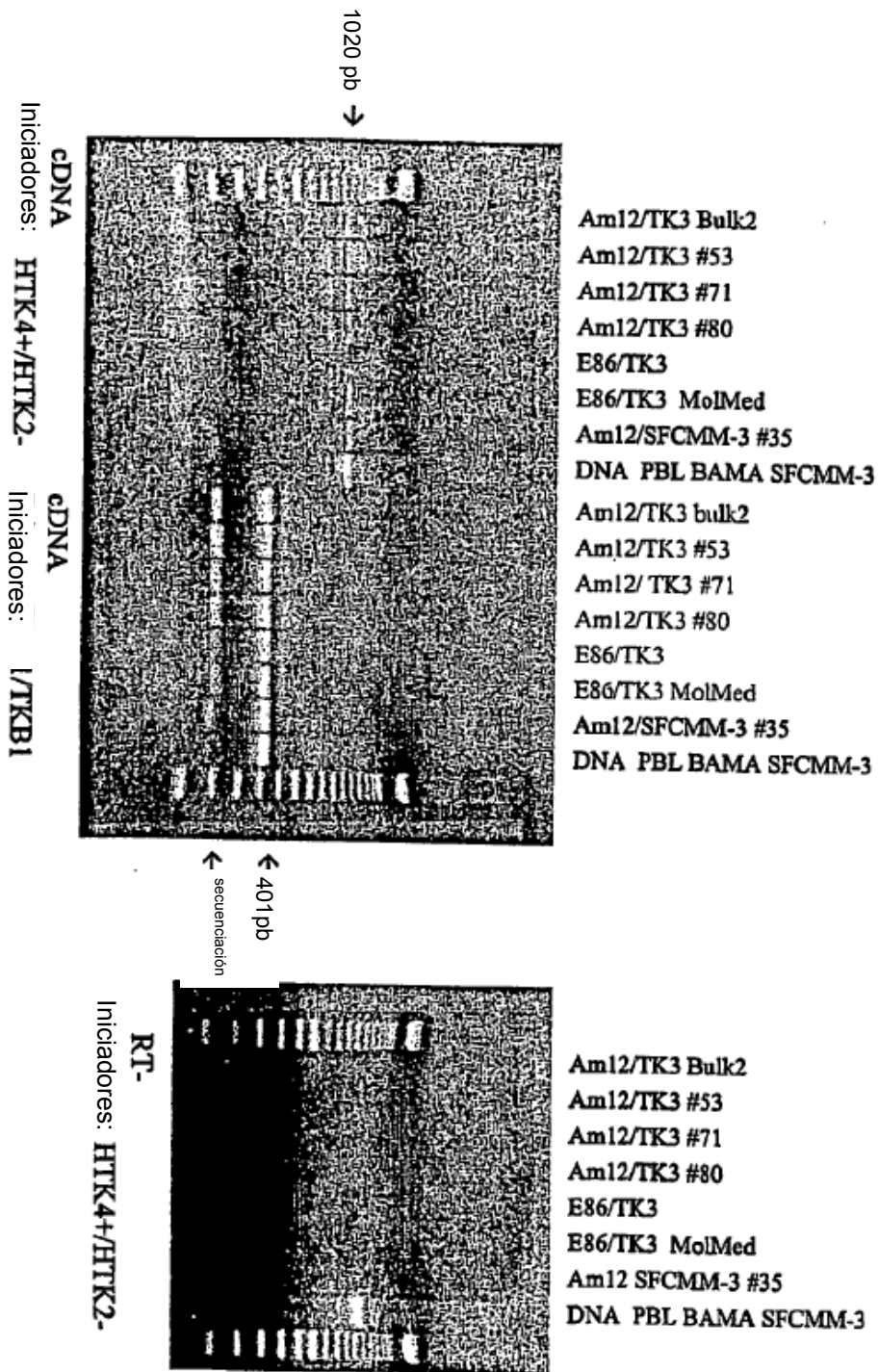


Figura 3

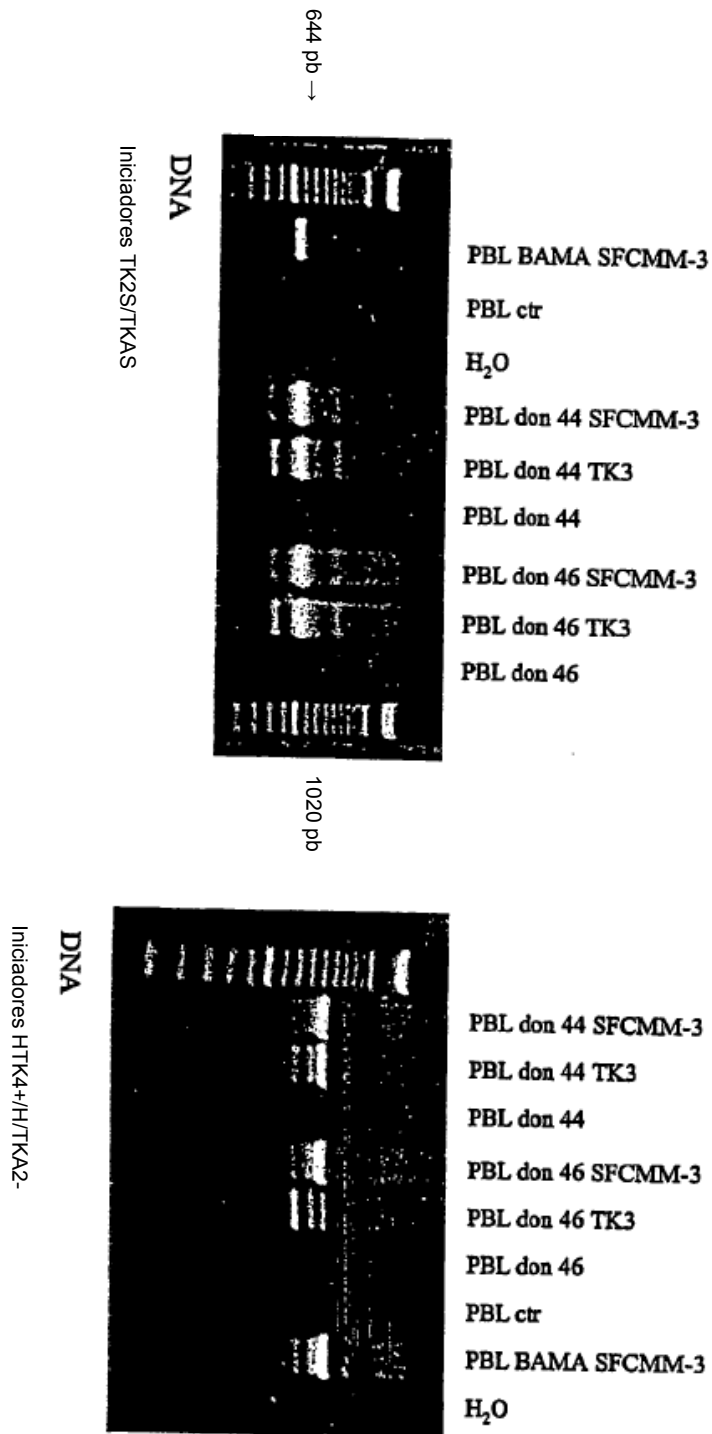


Figura 4

SFCMM-3

donor site
 Sbjct: 1981 cgcctcgacccaagggtgagatatggccgggacgcggctggtaatagacaagcgccca 2040
 Sbjct: 2041 gataacaatgggcatgccttaccgtgaccgacgcccctctctggctcctcatgtcggggg 2100
 Sbjct: 2101 ggaggctgggagttcacatgcccccccgccctcacccctcatcttcgacggccatcc 2160
 Sbjct: 2161 catcgccctcctctgtgtaccggccggcgcgataccttatgggcagcattgacccccca 2220
 acceptor site
 Sbjct: 2221 ggccgtgctggcgttcgtggccctcatcccgccgaccttggccggcacaacaacatcgtggt 2280

TK3

(donor site SFCMM-3/TK3)
 Sbjct: 1981 cgcctcgacccaagggtgagatatggccgggacgcggctggtaatagacaagcgccca 2040
 Sbjct: 2041 gataacaatgggcatgccttaccgtgaccgacgcccctctctggctcctcatgtcggggg 2100
 Sbjct: 2101 ggaggctgggagttcacatgcccccccgccctcacccctcatcttcgacggccatcc 2160
 acceptor site TK3
 Sbjct: 2161 catcgccctcctctgtgtaccggccggcgcgataccttatgggcagcattgacccccca 2220
 (acceptor Site SFCMM-3)
 Sbjct: 2221 ggccgtgctggcgttcgtggccctcatcccgccgaccttggccggcacaacaacatcgtggt 2280

Figure 5

sitio donante

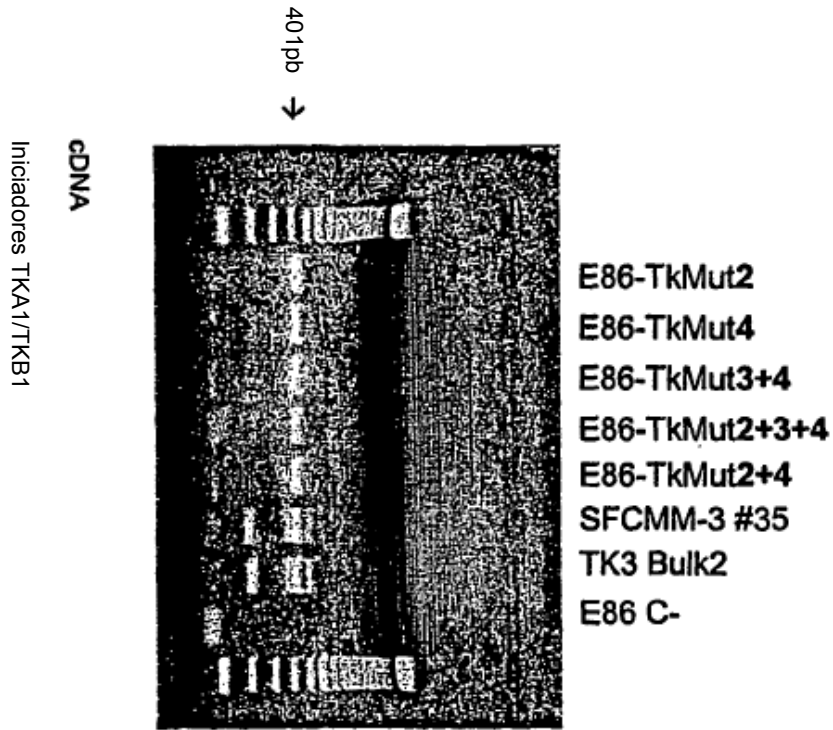


Figura 7

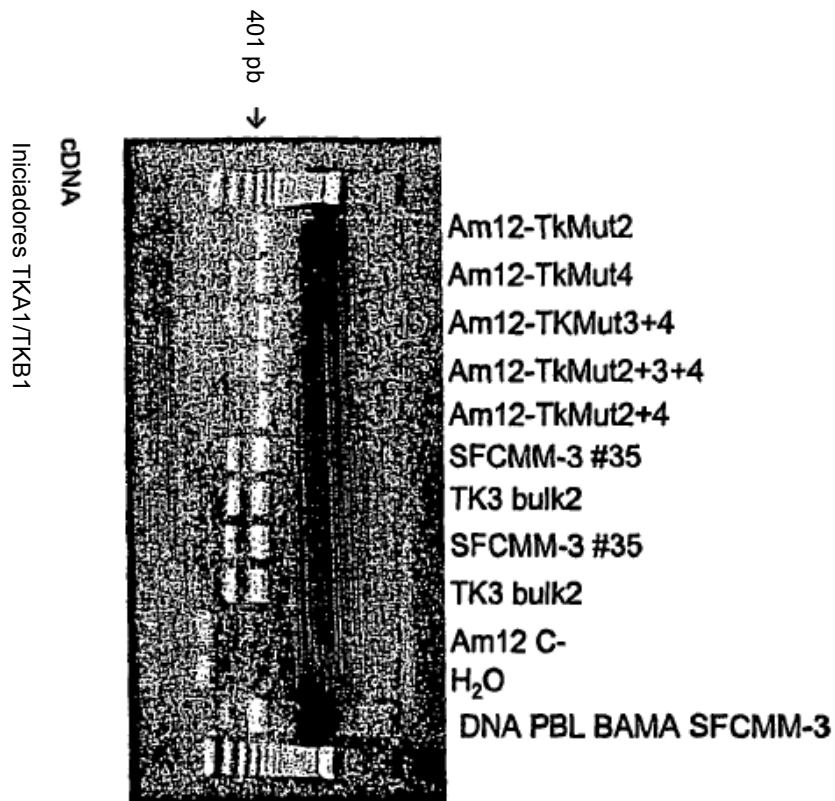
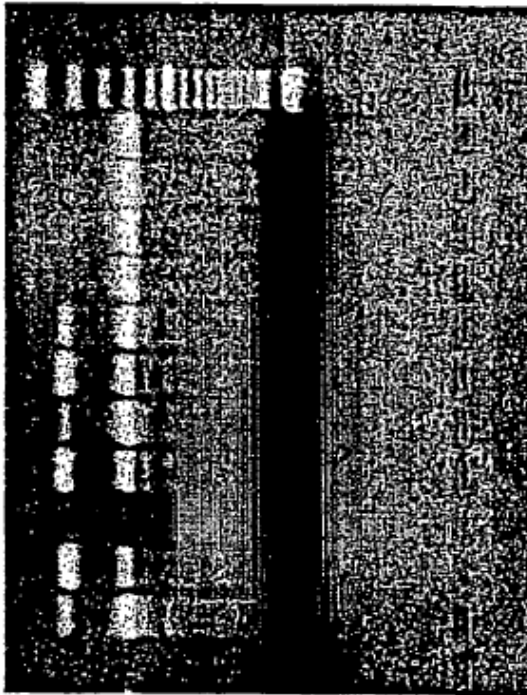


Figura 8

Iniciadores TKA1/TKB1

401 pb
↓



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

Figura 9

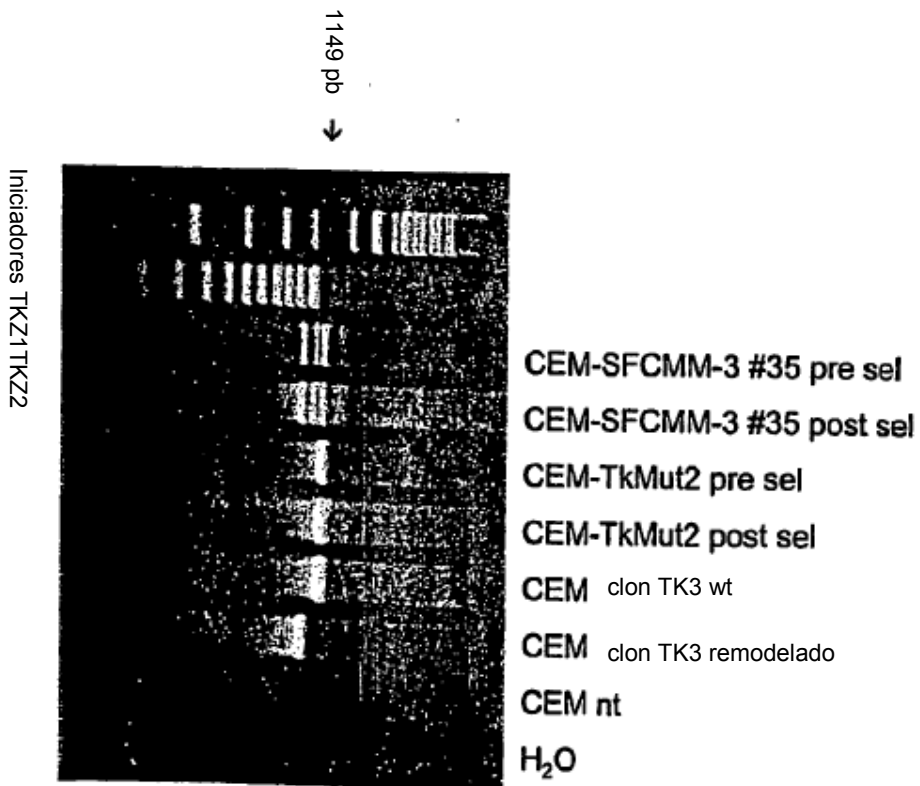
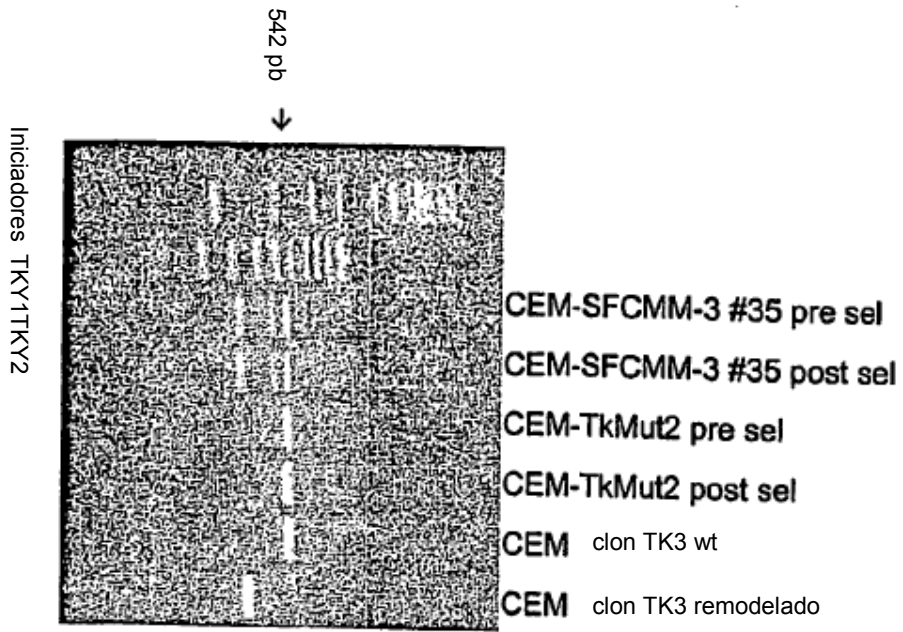


Figura 10

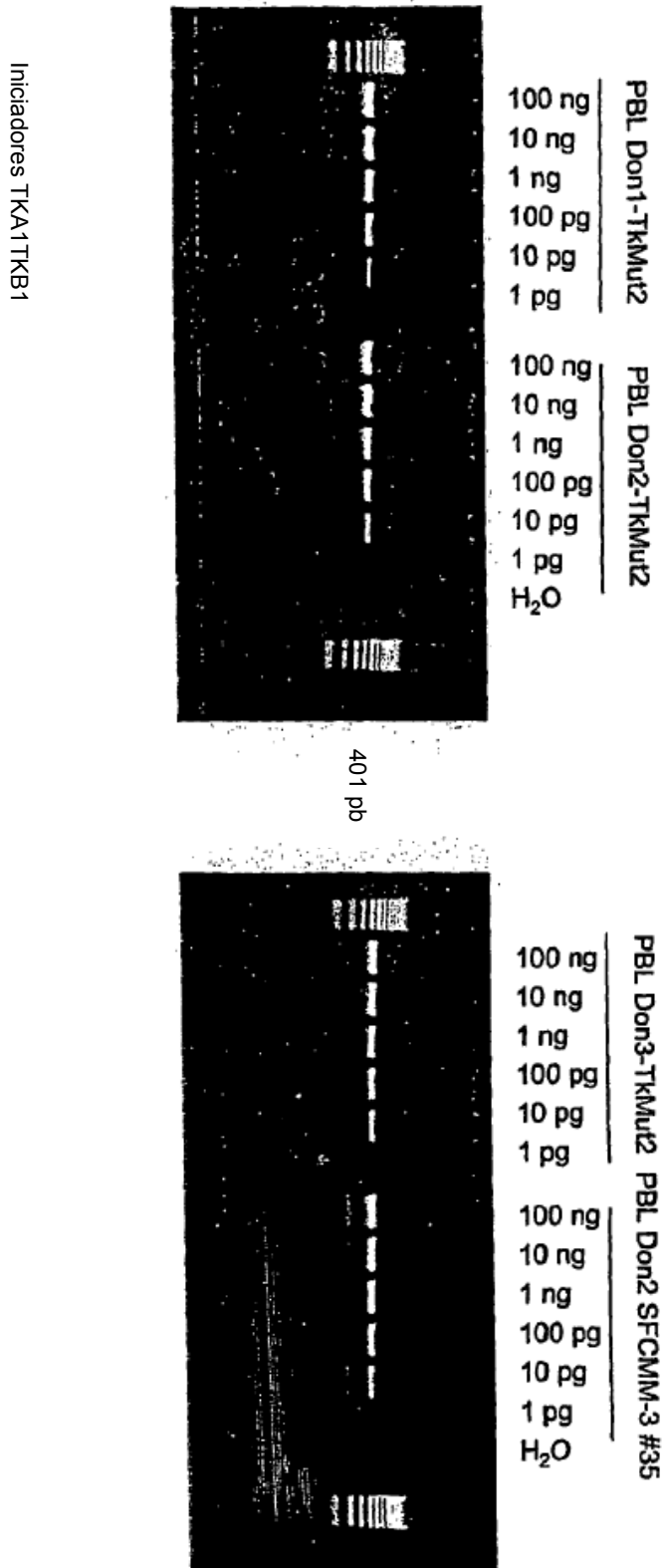
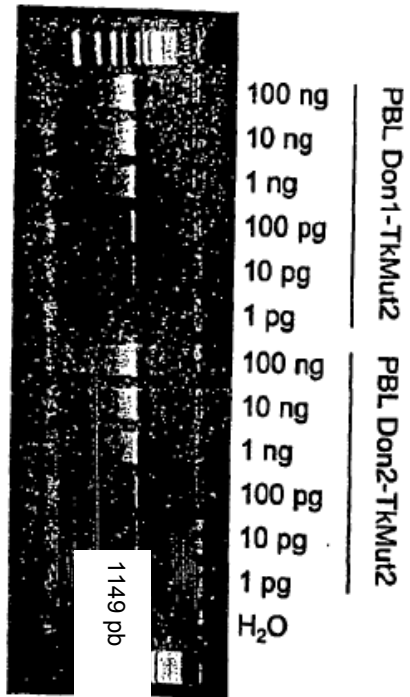


Figura 11

Iniciadores TKZ1TKZ2



1149 bp

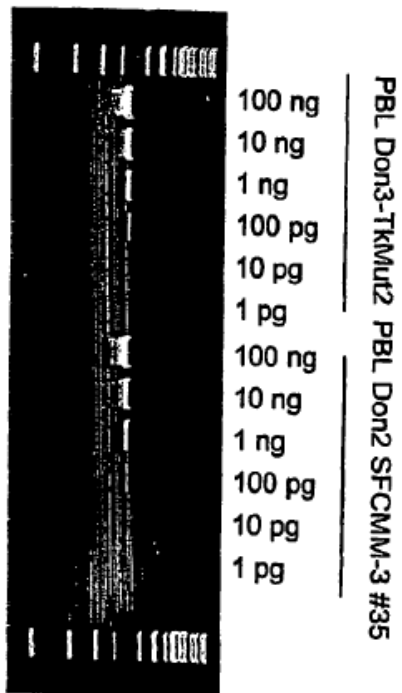


Figura 12