



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 21 471 T2 2007.02.08**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 349 926 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 21 471.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/NL01/00824**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 996 603.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/040665**

(86) PCT-Anmeldetag: **14.11.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **23.05.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.10.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **12.07.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.02.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/10 (2006.01)**

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

713678 15.11.2000 US

(73) Patentinhaber:

Crucell Holland B.V., Leiden, NL

(74) Vertreter:

**Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**VOGELS, Ronald, NL-3461 HW Linschoten, NL;
HAVENGA, Jans, Menzo, NL-2401 KG Alphen a/d
Rijn, NL; MEHTALI, Majid, F-44220 Coueron, FR**

(54) Bezeichnung: **KOMPLEMENTIERENDE ZELLINIEN**

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

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

Beschreibung

Fachgebiet

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der Biotechnologie im Allgemeinen und insbesondere auf komplementierende Zelllinien auf Adenovirusbasis.

Hintergrund

[0002] Typischerweise müssen Vektor und Verpackungszellen aneinander angepasst werden, so dass sie alle notwendigen Elemente aufweisen, aber sie haben keine überlappenden Elemente, die durch Rekombination zu replikationskompetenten Viren führen. Daher können die für eine ordentliche Transcription des Verpackungskonstrukts notwendigen Sequenzen heterologe regulatorische Sequenzen sein, die zum Beispiel von anderen Human-Adenovirus(Ad)-Serotypen, nichthumanen Adenoviren, anderen Viren, wie unter anderem SV40, Hepatitis-B-Virus (HBV), Rous-Sarkom-Virus (RSV), Cytomegalievirus (CMV) usw., oder von höheren Eukaryonten, wie Säugern, abgeleitet sind. Im Allgemeinen umfassen diese Sequenzen einen Promotor, Enhancer und Polyadenylierungssequenzen.

[0003] PER.C6 (ECACC-Hinterlegungsnummer 96 022 940) ist ein Beispiel für eine Zelllinie ohne Sequenzüberlappung zwischen dem Verpackungskonstrukt und dem adenoviralen Vektor (Fallaux et al., 1998). Rekombinante Viren auf der Basis von Untergruppe-C-Adenoviren, wie Ad5 und Ad2, können auf diesen Verpackungszellen effizient vermehrt werden. Die Erzeugung und Vermehrung von Adenoviren aus anderen Serotypen, wie Untergruppe-B-Viren, hat sich auf PER.C6-Zellen als schwieriger erwiesen. Wie jedoch in der Europäischen Patentanmeldung 00 201 738.2 beschrieben ist, können rekombinante Viren auf der Basis von Untergruppe-B-Virus Ad35 durch Cotransfektion eines Expressionskonstrukts, das die Sequenzen des frühen Bereichs 1 von Ad35 (Ad35-E1) enthält, hergestellt werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass auf Ad35 basierende Viren, deren E1A-Sequenzen deletiert wurden, auf PER.C6-Zellen effizient replizieren. Die E1A-Proteine von Ad5 komplementieren also Ad35-E1A-Funktionen, während wenigstens ein Teil der E1B-Funktionen von Ad35 notwendig sind. Diese Serotyp-Spezifität in E1B-Funktionen wurde vor kurzem auch für rekombinante Ad7-Viren beschrieben. In einem Versuch, von Untergruppe-B-Virus Ad7 abgeleitete rekombinante Adenoviren zu erzeugen, waren Abrahamsen et al. (1997) nicht in der Lage, E1-deletierte Viren auf 293-Zellen ohne Kontamination mit Wildtyp(wt)-Ad7 zu erzeugen. Bei Viren, die nach der Plaquereinigung auf 293-ORF6-Zellen (Brough et al., 1996) herausgesucht wurden, wurde gezeigt, dass sie Ad7-E1B-Sequenzen durch nichthomologe Rekombination eingebaut haben. Die effiziente Vermehrung von rekombinanten Ad7-Viren erwies sich also nur in Gegenwart von Ad7-E1B-Expression und Ad5-E4-ORF6-Expression als möglich. Die E1B-Proteine wechselwirken bekanntlich mit zellulären sowie viralen Proteinen (Bridge et al., 1993; White, 1995). Möglicherweise ist der zwischen dem E1B-55K-Protein und E4-ORF6 gebildete Komplex, der notwendig ist, um den mRNA-Export von viralen Proteinen zu erhöhen und den Export der meisten zellulären mRNAs zu hemmen, entscheidend und in irgendeiner Weise serotypspezifisch.

Beschreibung der Erfindung

[0004] Die vorliegende Erfindung stellt neue Verpackungszelllinien bereit, die auf anderen Serotypen als Viren der Untergruppe C, wie Serotypen aus der Untergruppe B, basierende rekombinante Adenoviren, wie Adenovirus Typ 35, komplementieren können.

[0005] In einem Aspekt stellt die Erfindung Verpackungszelllinien bereit, die auf einem Serotyp der Untergruppe B, vorzugsweise des Serotyps 35, basierendes rekombinantes Adenovirus komplementieren können. Der Ausdruck "auf einem Adenovirus basierend oder davon abgeleitet" bedeutet, dass eine Nucleinsäure verwendet wird, die einer Nucleinsäure entspricht, die man in diesem Serotyp findet. Die verwendete Nucleinsäure kann durch PCR-Klonierung oder andere in der Technik bekannte Verfahren abgeleitet sein.

[0006] In einem Aspekt der Erfindung sind die neuen Verpackungszellen von primären diploiden humanen Zellen abgeleitet, wie unter anderem primären humanen Retinoblasten, primären humanen embryonalen Nierenzellen oder primären humanen Amniocyten. Eine Transfektion von primären Zellen oder Derivaten davon mit dem Adenovirus-E1A-Gen allein kann eine unbeschränkte Vermehrung (Immortalisierung) induzieren, führt aber nicht zu einer vollständigen Transformation. Die Expression von E1A führt jedoch in den meisten Fällen zu einer Induktion von programmiertem Zelltod (Apoptose), und gelegentlich wird eine Immortalisierung erhalten (Jochemsen et al., 1987). Eine Coexpression des E1B-Gens ist erforderlich, um eine Induktion der Apoptose zu verhindern, und damit eine vollständige morphologische Transformation stattfindet (Übersicht bei

White, 1995). Daher werden in einem Aspekt der Erfindung primäre humane Zellen oder Derivate davon durch Expression von Adenovirus-E1-Proteinen einer anderen Untergruppe als Untergruppe C, vorzugsweise Untergruppe B, besonders bevorzugt Adenovirus Typ 35, transformiert. Die kombinierte Aktivität der E1A- und E1B-Proteine etabliert ein unbestimmtes Wachstum der Zellen und ermöglicht eine Komplementierung von rekombinanten Adenoviren.

[0007] Die vollständige morphologische Transformation von primären Zellen durch Adenovirus-E1-Gene ist das Ergebnis der kombinierten Aktivitäten der Proteine, die von den E1A- und E1B-Bereichen codiert werden. Die Rollen der verschiedenen E1-Proteine bei der lytischen Infektion und bei der Transformation wurden ausführlich untersucht (Übersicht bei Zantema und van der Eb, 1995; White, 1995, 1996). Die Adenovirus-E1A-Proteine sind für die Transformation von primären Zellen wesentlich. Die E1A-Proteine üben diese Wirkung durch eine direkte Wechselwirkung mit mehreren zellulären Proteinen aus, die an der Regulation der Transcription beteiligt sind. Dazu gehören die pRB-Proteinfamilie, p300/CBP und TATA-Bindungsprotein. Außerdem erhöht E1A die Konzentration an p53 in den Zellen. In Abwesenheit von Adenovirus-E1B-Aktivität führt der Anstieg der p53-Konzentrationen zur Induktion von Apoptose. Beide Proteine, die vom E1B-Bereich codiert werden, wirken durch verschiedene Mechanismen der Induktion von Apoptose entgegen. E1B-21K scheint der Apoptose in ähnlicher Weise wie Bcl-2 über eine Wechselwirkung mit den Effektorproteinen, die im Apoptoseweg nachgeschaltet sind, entgegenzuwirken (Han et al., 1996), während E1B-55K über eine direkte-Wechselwirkung mit p53 funktioniert. Es ist wichtig, dass der molekulare Mechanismus, durch den die E1B-55K-Proteine von Ad2 und 5 (Untergruppe C) und Ad12 (Untergruppe A) in der Fähigkeit, p53 zu neutralisieren, funktionieren, unterschiedlich sein kann. Während Ad5-E1B-55K stark an p53 bindet und der Komplex sich im Cytoplasma lokalisiert, bindet Ad12-E1B-55K nur schwach an p53, und beide Proteine sind im Zellkern lokalisiert (Zantema et al., 1985; Grand et al., 1999). Beide Proteine hemmen jedoch die Transaktivierung anderer Gene durch p53 (Yew und Berk, 1992).

[0008] In Nagerzellen ist die Aktivität von E1A zusammen mit entweder E1B-21K oder 55K für eine volle Transformation ausreichend, obwohl die Expression beider E1B-Proteine zusammen doppelt so effizient ist (Rao et al., 1992). Bei menschlichen Zellen jedoch scheint die Aktivität des E1B-55K-Proteins wichtiger zu sein, da man beobachtet, dass E1B-55K für die Etablierung von transformierten Zellen unverzichtbar ist (Galimore, 1986). Beispiel 6 dieses Patents beschreibt die Bildung von pIG270. In diesem Konstrukt werden die Ad35-E1-Gene ausgehend vom hPGK-Promotor exprimiert, und die Transcription wird durch HBVpA abgebrochen. Der hPGK-Promotor bildet ein HincII-EcoRI-Fragment der von Singer-Sam et al. (1984) beschriebenen Promotorsequenz. Das HBVpA befindet sich in einem BamHI-BglIII-Fragment des Hepatitis-B-Virus-Genoms (Simonsen und Levinson, 1983; siehe auch Genbank HBV-AF090841). Wie bereits erwähnt, können die Promotor- und Polyadenylierungssequenzen der in dieser Erfindung beschriebenen E1-Expressionskonstrukte auch aus anderen Quellen stammen, ohne von der Erfindung abzuweichen. Außerdem können auch andere funktionelle Fragmente der oben erwähnten hPGK- und HBVpA-Sequenzen verwendet werden.

[0009] Die Funktionalität von pIG270 wurde durch Transformation von primären Babyratten-Nierenzellen (BRK-Zellen) gezeigt. Ein Vergleich mit einem äquivalenten Ad5-E1-Expressionskonstrukt lehrte, dass Ad35-E1-Gene bei der Transformation dieser Zellen weniger effizient sind. Dasselbe zeigte sich bei den E1-Genen von Ad12 (Bernards et al., 1982).

[0010] Es ist unklar, welches oder welche E1-Proteine den Unterschied in der Transformationseffizienz von E1-Sequenzen bestimmt, den man bei Adenoviren aus verschiedenen Untergruppen beobachtet. Im Falle von Ad12 ließen Transfektionsstudien mit chimärischen E1A/E1B-Genen vermuten, dass die Effizienz der Transformation von BRK-Zellen durch die E1A-Proteine bestimmt wird (Bernards et al., 1982). Im Folgenden wird gezeigt, dass das E1B-55K-Protein serotypspezifische Funktionen enthält, die für die Komplementierung von E1-deletierten Adenoviren notwendig sind. Wenn diese Funktionen mit der Regulation der mRNA-Verteilung oder einer anderen späten viralen Funktion zusammenhängen, ist es unwahrscheinlich, dass diese an der Transformationseffizienz beteiligt sind.

[0011] Eine Analyse der funktionellen Domänen in den Ad2- oder Ad5-E1B-55K-Proteinen unter Verwendung von Insertionsmutanten hat gezeigt, dass Funktionen, die mit der viralen Replikation, späten Proteinsynthese und dem Ausschalten von Wirtsproteinen zusammenhängen, nicht auf spezifische Domänen beschränkt, sondern entlang dem Protein verteilt sind (Yew et al., 1990). Unter Verwendung derselben Gruppe von Mutanten zeigte sich, dass die für die Wechselwirkung mit p53 und E4-Orf6 wichtigen Domänen restringierter sind. Neben einem gemeinsamen Bindungsbereich (Aminosäuren 262 bis 326) wurde die p53-Bindung durch die Mutationen bei Aminosäure 180 beeinflusst, und die E4-Orf6-Bindung wurde durch Mutationen bei Aminosäure 143 beeinflusst (Yew und Berk, 1992; Rubenwolf et al., 1997).

[0012] Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass es schwierig ist, die mit der Transformation (p53-Bindung) und der späten Proteinsynthese (Orf6-Bindung) zusammenhängenden E1B-55K-Funktionen zu trennen.

[0013] Die Erfindung offenbart neue E1-Konstrukte, die die hohe Effizienz der Transformation von einem Serotyp mit der serotypspezifischen Komplementierungsfunktion eines anderen Serotyps kombiniert. Diese neuen Konstrukte werden verwendet, um primäre humane embryonische Retinoblastenzellen und humane Amniocyten zu transformieren.

[0014] In einem anderen Aspekt der Erfindung sind die transformierenden E1-Sequenzen von verschiedenen Serotypen abgeleitet. Wie in der Europäischen Patentanmeldung 00201738.2 offenbart ist, sind Ad35-E1-Sequenzen in der Lage, Babyrattennieren(BRK)-Zellen zu transformieren, wenn auch mit einer geringeren Effizienz, als man sie bei Ad5-E1-Sequenzen beobachtet. Dies wurde auch für die E1-Sequenzen von Ad12 beobachtet (Bernards et al., 1982). Daher werden in diesem Aspekt der Erfindung primäre diploide humane Zellen oder ihre Derivate mit einem chimärischen E1-Konstrukt transformiert, das aus einem Teil der E1-Sequenzen eines Serotyps, der eine effiziente Transformation von primären humanen Zellen oder Derivaten davon ermöglicht, und einem Teil der E1-Sequenzen eines anderen Serotyps besteht, wobei die E1-Sequenzen für die serotypspezifischen E1B-Funktionen sorgen, die eine effiziente Vermehrung von E1-deletierten Viren dieses Serotyps ermöglichen. In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Aspekts der Erfindung ist der E1A-Bereich von einem Untergruppe-C-Adenovirus abgeleitet, wie unter anderem Ad5, und die E1B-codierenden Sequenzen sind von einem alternativen Adenovirus, insbesondere von einem Adenovirus der Untergruppe B, insbesondere von Adenovirus Typ 35, abgeleitet. E1B-21K-codierende Sequenzen können auch chimärisch sein und sowohl Untergruppe C als auch Untergruppe B codierende Sequenzen umfassen. Vorzugsweise umfassen alle oder die meisten E1B-21K Untergruppe-C-codierende Sequenzen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die E1A-codierenden Sequenzen und die E1B-21K-codierenden Sequenzen von einem Untergruppe-C-Adenovirus, wie unter anderem Ad5, abgeleitet. In einer Ausführungsform umfasst die Zelle weiterhin E1B-55k-codierende Sequenzen, die vorzugsweise, sofern sie nicht mit den 21K-codierenden Sequenzen überlappen, von einem Adenovirus der Untergruppe B, insbesondere von Adenovirus Typ 35, abgeleitet sind. In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform sind alle E1-codierenden Sequenzen von einem Untergruppe-C-Adenovirus, wie unter anderem Ad5, abgeleitet, abgesehen von wenigstens dem Teil der E1B-55K-codierenden Sequenzen, der für die serotypspezifische Komplementierung einer alternativen Adenovirus-Untergruppe, insbesondere Adenovirus-Untergruppe B, insbesondere Adenovirus Typ 35, notwendig ist. Die Erfindung stellt auch eine Verpackungszelllinie bereit, bei der die primären diploiden humanen Zellen oder Derivate davon mit einem chimärischen Adenovirus-E1-Konstrukt transformiert sind, das einen Teil einer ersten Adenovirus-E1-codierenden Sequenz eines ersten Adenovirus-Serotyps, die eine effiziente Transformation von primären humanen Zellen und Derivaten davon ermöglicht, und einen Teil einer zweiten Adenovirus-E1-codierenden Sequenz eines zweiten Adenovirus-Serotyps umfasst, wobei die zweite Adenovirus-E1-codierende Sequenz für die serotypspezifische Adenovirus-E1B-Funktionen sorgt, die eine effiziente Vermehrung von rekombinanten Adenovirus-E1-deletierten Viren des zweiten Adenovirus-Serotyps ermöglichen. Vorzugsweise ist der erste Adenovirus-Serotyp ein Untergruppe-C-Adenovirus, und der zweite Adenovirus-Serotyp ist ein Untergruppe-B-Adenovirus, insbesondere Adenovirus Typ 35. In einer Ausführungsform umfasst die Verpackungszelllinie der Erfindung bovines Adenovirus E1B-55k. Eine solche, bovines E1B-55k exprimierende Zelllinie ist besonders gut geeignet, um hohe Ausbeuten eines komplementierten bovines rekombinanten Adenovirus zu erhalten.

[0015] Die primären diploiden humanen Zellen oder ihre Derivate werden durch Adenovirus-E1-Sequenzen transformiert, die entweder funktionell mit einem DNA-Molekül verknüpft sind oder sich auf zwei getrennten DNA-Molekülen befinden. In letzterem Fall trägt ein DNA-Molekül wenigstens einen Teil der E1-Sequenzen des Serotyps, der die effiziente Transformation ermöglicht, und das zweite DNA-Molekül trägt wenigstens einen Teil der Sequenzen, die für die serotypspezifische Komplementierung notwendig sind. Bereitgestellt wird auch ein Hybridkonstrukt, das E1-Sequenzen des Serotyps, der die effiziente Transformation ermöglicht, und E1-Sequenzen eines anderen Serotyps, der für die serotypspezifische Komplementierung notwendig ist, umfasst. Die Sequenzen, die für eine serotypspezifische Komplementierung sorgen, können selbstverständlich auch weitere Aktivitäten enthalten, die zur Transformation beitragen. Vorzugsweise umfassen die Sequenzen, die eine effiziente Transformation ermöglichen, E1A. Vorzugsweise umfassen diese Sequenzen und die Sequenzen, die für die serotypspezifische Komplementierung notwendig sind, vorzugsweise E1B-Sequenzen. Besonders bevorzugt umfassen die Sequenzen, die eine effiziente Transformation ermöglichen, E1A- und E1B-21K-Sequenzen, und die Sequenzen, die für die serotypspezifische Komplementierung notwendig sind, umfassen E1B-55K-Sequenzen. Bereitgestellt werden auch Zellen, die mit einem solchen Hybridkonstrukt transformiert sind. Solche Zellen können günstigerweise für die Vermehrung von rekombinantem E1-deletier-

tem Adenovirus des anderen Serotyps verwendet werden. Selbstverständlich ist es auch möglich, beide Funktionen von E1-Sequenzen auf getrennten Konstrukten bereitzustellen. In allen Aspekten sind die Sequenzen funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft, die die Transcription und Translation der codierten Proteine ermöglichen. Vorzugsweise umfasst eine Verpackungszelle der Erfindung weiterhin eine DNA, die wenigstens E4-orf6 eines Adenovirus der Untergruppe B, vorzugsweise Adenovirus Serotyp 35, codiert. Vorzugsweise ist das E4-orf6 von dem anderen Serotyp abgeleitet. Vorzugsweise umfasst die Zelle E1B-55K und E4-orf6 desselben Serotyps wie der rekombinante Vektor, der vermehrt/komplementiert oder in anderer Weise produziert werden soll.

[0016] In einem anderen Aspekt der Erfindung werden neue Verpackungszellen beschrieben, die von PER.C6 (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940; Fallaux et al., 1998) abgeleitet sind und Ad35-E1-Sequenzen enthalten, die in ihr Genom integriert sind. Diese Ad35-E1-Sequenzen befinden sich in einer funktionellen Expressionscassette, enthalten aber vorzugsweise keine Sequenzen, die mit Sequenzen überlappen, welche in dem rekombinanten viralen Vektor vorhanden sind. Vorzugsweise besteht die funktionelle Expressionscassette aus einem heterologen Promotor und einem Polyadenylierungssignal, das funktionell mit Ad35-E1-Sequenzen verknüpft ist. Insbesondere sind die Ad35-E1-codierenden Sequenzen funktionell mit dem humanen Phosphoglycerat-Gen-Promotor (hPGK) und Hepatitis-B-Virus-Polyadenylierungssignal (HBV-pA) verknüpft. Vorzugsweise umfassen Ad35-E1-codierende Sequenzen die codierenden Bereiche der E1A-Proteine und die E1B-Promotorsequenzen, die mit den E1B-codierenden Sequenzen bis einschließlich dem Stopcodon des E1B-55K-Proteins verknüpft sind. Vorzugsweise umfassen die Ad35-E1-Sequenzen Nucleotid 468 bis Nucleotid 3400 der Ad35-Wildtypsequenz. Um transfizierte Zellen selektieren zu können, muss ein dominanter Selektionsmarker, wie zum Beispiel das neo^r-Gen, in den Expressionsvektor eingebaut werden, oder der Ad35-Expressionsvektor wird mit einem getrennten Expressionsvektor, der die Expression des Selektionsmarkers vermittelt, cotransfiziert. In beiden Fällen wird der Selektionsmarker in das zelluläre Genom integriert. Es können auch andere Ad5-E1-transformierte Zelllinien, wie 293 (Graham et al., 1977) und 911 (Fallaux et al., 1996), oder etablierte humane Zelllinien, wie A549-Zellen, verwendet werden, ohne von der vorliegenden Erfindung abzuweichen.

[0017] In einem anderen Aspekt der Erfindung werden von PER.C6 abgeleitete Zellen beschrieben, die funktionelle Ad35-E1B-Sequenzen exprimieren. In einer Ausführungsform werden die Ad35-E1B-codierenden Sequenzen vom E1B-Promotor angetrieben und durch ein heterologes Polyadenylierungssignal, wie unter anderem HBVpA, terminiert. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Ad35-E1B-codierenden Sequenzen von einem heterologen Promotor, wie unter anderem dem hPGK-Promotor oder dem Promotor des Verlängerungsfaktors 1 α (EF-1 α), angetrieben und durch ein heterologes pA-Signal, wie unter anderem HBVpA, terminiert. Diese Ad35-E1B-Sequenzen umfassen vorzugsweise die codierenden Bereiche des E1B-21K- und des E1B-55K-Proteins, die sich zwischen den Nucleotiden 1611 und 3400 der Wildtyp(wt)-Ad35-Sequenz befinden. Besonders bevorzugt umfassen die Ad35-E1B-Sequenzen die Nucleotide 1550 bis 3400 der wt-Ad35-Sequenz. In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform umfassen die E1B-Sequenzen die codierenden Sequenzen des E1B-55K-Gens, die sich zwischen den Nucleotiden 1916 und 3400 der wt-Ad35-Sequenz befinden. In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform fehlt einer Verpackungszelllinie oder einer Zelllinie der Erfindung eine funktionelle codierende Sequenz für E1B-21k. Solche Zelllinien produzieren im Allgemeinen signifikant mehr rekombinantes Adenovirus als E1B-21K-positive Zelllinien.

[0018] Die Erfindung stellt weiterhin ein Verfahren zum Komplementieren eines rekombinanten Adenovirus bereit, wobei das Verfahren das Bereitstellen einer Verpackungszelllinie oder einer Zelllinie gemäß der Erfindung mit dem rekombinanten Adenovirus und das Kultivieren der Zelle, um eine Komplementierung zu ermöglichen, umfasst. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren weiterhin das Ernten des komplementierten rekombinanten Adenovirus. Vorzugsweise ist das rekombinante Adenovirus von Adenovirus Untergruppe B abgeleitet. Besonders bevorzugt ist das rekombinante Adenovirus von Adenovirus Serotyp 35 abgeleitet.

[0019] In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung ein rekombinantes Adenovirus bereit, das durch ein Verfahren der Erfindung oder mit einer Verpackungszelle der Erfindung erhalten wird. Ein solches Adenovirus kann im Wesentlichen frei von kontaminierendem Wildtyp-Adenovirus oder replikationskompetentem Adenovirus erhalten werden. Solche rekombinanten Adenoviruspräparate sind sehr gut für die Verabreichung von therapeutischen Sequenzen an somatische Gewebe in vivo zum Beispiel in einer gentherapeutischen Situation geeignet. Bevorzugt sind rekombinante Adenoviren, die eine Deletion von Nucleinsäure umfasst, welche wenigstens ein Protein des E1-Bereichs codiert. Vorzugsweise umfasst ein solches Adenovirus weiterhin eine Deletion einer Nucleinsäure, die wenigstens ein Protein des E3-Bereichs codiert. Vorzugsweise umfasst ein solches Adenovirus weiterhin eine Deletion einer Nucleinsäure, die wenigstens ein Protein des E4-Bereichs co-

diert. Vorzugsweise umfasst ein solches Adenovirus weiterhin eine Deletion einer Nucleinsäure, die wenigstens ein E4-Orf6-Protein codiert. Aus diesem Grund gibt die Erfindung auch die Verwendung eines rekombinanten Adenovirus der Erfindung für die Herstellung eines Medikaments an.

[0020] Der hier verwendete Ausdruck "E1B-55K-Protein" bedeutet das Protein, das vom E1B-Bereich in einem Adenovirus-Serotyp codiert wird, der in diesem Serotyp eine ähnliche Funktion aufweist, wie sie vom E1B-55K-Protein von Ad5 ausgeübt wird.

[0021] Der hier verwendete Ausdruck "E1B-21K-Protein" bedeutet das Protein, das vom E1B-Bereich in einem Adenovirus-Serotyp eingeschlossen wird, der in diesem Serotyp eine ähnliche Funktion aufweist, wie sie vom E1B-19K-Protein von Ad5 ausgeübt wird. Dieselbe Terminologie gilt für die Sequenzen, die diese Proteine codieren. Wenn von Ad35-E1-Sequenzen von einem angegebenen Nucleotid bis zu Nucleotid 3400 die Rede ist, ist "bis einschließlich Nucleotid 3400" gemeint.

[0022] Zelllinien, die den Gegenstand dieser Erfindung bilden, sind unter anderem für die Produktion von rekombinanten Adenoviren geeignet, die für die Gentherapie und Impfung vorgesehen sind. Die Zelllinien, die von Zellen menschlichen Ursprungs abgeleitet sind, eignen sich auch für die Herstellung von humanen rekombinanten therapeutischen Proteinen, wie unter anderem humanen Wachstumsfaktoren, humanen Antikörpern. Außerdem eignen sich die Zelllinien auch für die Herstellung von anderen humanen Viren als Adenovirus, wie unter anderem Influenzavirus, Herpes-simplex-Virus, Rotavirus, Masernvirus.

[0023] Ein bevorzugtes Derivat von primären, diploiden humanen Zellen ist die PER.C6-Zelllinie (ECACC-Hinterlegungsnummer 960022940).

[0024] Es unterliegt dem Können des Fachmanns, für Proteine zu sorgen, die eine gleichartige Funktion haben wie das Adenovirus-E1-Protein, von dem in diesem Dokument die Rede ist. Zum Beispiel kann ein funktioneller Teil bereitgestellt werden, und/oder ein- Derivat mit einer gleichartigen, wenn auch nicht unbedingt gleich intensiven Funktion kann bereitgestellt werden.

Kurzbeschreibung der Figuren

[0025] [Fig. 1](#): Balkendiagramm, das den Prozentsatz von Serumproben zeigt, die bei jedem getesteten humanen Wildtyp-Adenovirus positiv in Bezug auf Neutralisation reagierten (siehe Beispiel 1 wegen einer Beschreibung des Neutralisationsassays).

[0026] [Fig. 2](#): Graphik, die das Fehlen einer Korrelation zwischen dem VP/CCID50-Verhältnis und dem Prozentsatz der Neutralisation zeigt.

[0027] [Fig. 3](#): Balkendiagramm, das den Prozentsatz von Serumproben zeigt, die eine neutralisierende Aktivität gegenüber einer Auswahl von Adenovirus-Serotypen zeigt. Die Seren stammten von gesunden Freiwilligen aus Belgien und dem Vereinigten Königreich.

[0028] [Fig. 4](#): Balkendiagramm, das den Prozentsatz von Serumproben zeigt, die eine neutralisierende Aktivität gegenüber den Adenovirus-Serotypen 5, 11, 26, 34, 35, 48 und 49 zeigt. Die Seren stammten aus fünf verschiedenen Orten in Europa und den Vereinigten Staaten.

[0029] [Fig. 5](#): Sequenz von humanem Adenovirus Typ 35.

[0030] [Fig. 6](#): Karte von pAdApt35IP1.

[0031] [Fig. 7](#): Schematische Darstellung der zum Aufbau von pWE.Ad35.pIX-rITR unternommenen Schritte.

[0032] [Fig. 8](#): Karte von pWE.Ad35.pIX-rITR.

[0033] [Fig. 9](#): Karte von pRSV.Ad35-E1.

[0034] [Fig. 10](#): Karte von PGKneopA.

[0035] [Fig. 11](#): Karte von pRSVpNeo.

- [0036] Fig. 12: Karte von pRSVhbvNeo.
- [0037] Fig. 13: Karte von pIG.E1A.E1B.
- [0038] Fig. 14: Karte von pIG135.
- [0039] Fig. 15: Karte von pIG270.
- [0040] Fig. 16: Karte von pBr.Ad35.leftITR-pIX.
- [0041] Fig. 17: Karte von pBr.Ad35.leftITR-pIX Δ E1A.
- [0042] Fig. 18: Karte von pBr.Ad35. Δ 21K.
- [0043] Fig. 19: Karte von pBr.Ad35. Δ 55K1.
- [0044] Fig. 20: Karte von pBr.Ad35 Δ SM.
- [0045] [Fig. 21](#): Schematische Darstellung von Ad35-E1A/E1B-Deletionskonstrukten.
- [0046] Fig. 22: Karte von pIG.35BL.
- [0047] Fig. 23: Karte von pRSVneo4.
- [0048] Fig. 24: Karte von pIG35Bneo.
- [0049] Fig. 25: Karte von pIG35.55K.
- [0050] Fig. 26: Karte von pIG535.
- [0051] Fig. 27: Karte von pIG635.
- [0052] Fig. 28: Karte von pIG735.
- [0053] Fig. 29: Karte von pCC271.
- [0054] Fig. 30: Karte von pCC535s.
- [0055] Fig. 31: Karte von pCR535E1B.
- [0056] Fig. 32: Karte von pCC2155s.
- [0057] Fig. 33: Karte von pCC536s.
- [0058] Fig. 34: Karte von pIG536.
- [0059] Fig. 35: Karte von pBr.Ad35.PRn.
- [0060] Fig. 36: Karte von pBr.Ad35.PRn Δ E3.
- [0061] Fig. 37: Karte von pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3.
- [0062] Fig. 38: Ausrichtung der Aminosäuresequenzen von E1B-21K (A) und E1B-55K (B) in pCC536s mit wtAd5- und wtAd35-Sequenzen.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

- [0063] Die Erfindung wird unter Verwendung der folgenden veranschaulichenden Beispiele näher erläutert.

Beispiele

Beispiel 1

Hochdurchsatz-Assay zum Nachweis einer neutralisierenden Wirkung in humanem Serum

[0064] Um ein Screening einer großen Menge an humanem Serum auf das Vorhandensein neutralisierender Antikörper gegen alle Adenovirus-Serotypen zu ermöglichen, wurde ein automatisierter Assay für 96 Näpfe entwickelt.

Humane Seren

[0065] Eine Gruppe von 100 Personen wurde ausgewählt. Freiwillige (50% männlich, 50% weiblich) waren gesunde Individuen mit einem Alter zwischen 20 und 60 und ohne Einschränkungen hinsichtlich der Rasse. Alle Freiwilligen unterschrieben ein Einverständnisformular. Personen, die berufsmäßig mit der Adenovirus-Forschung zu tun haben, wurden ausgeschlossen.

[0066] Etwa 60 ml Blut wurde in trockene Röhrchen abgezogen. Innerhalb von 2 h nach der Probennahme wurde das Blut 10 min lang mit 2500 U/min zentrifugiert. Etwa 30 ml Serum wurden in Polypropylenröhrchen übertragen und gefroren bei -20 °C bis zur Weiterverwendung aufbewahrt.

[0067] Serum wurde aufgetaut und 10 min lang bei 56 °C durch Wärme inaktiviert und dann aliquot aufgeteilt, um wiederholte Gefrier-/Tau-Zyklen zu vermeiden. Ein Teil wurde zur Herstellung von fünf Stufen von zweifachen Verdünnungen in einem Medium (DMEM, Gibco BRL) in einer Menge, die zum Füllen von etwa 70 Platten mit je 96 Näpfen ausreichend war, verwendet. Aliquote Teile von unverdünnten und verdünnten Seren wurden in Platten mit tiefen Näpfen (Format mit 96 Näpfen) pipettiert und unter Verwendung eines programmierten PlateMate als aliquote 100- μl -Teile Platten mit 96 Näpfen zudosiert. Auf diese Weise wurden die Platten nach dem unten aufgeführten Schema mit acht verschiedenen Seren in duplo (100 μl /Napf) beladen:

S1/2	S1/4	S1/8	S1/16	S1/32	S5/2	S5/4	S5/8	S5/16	S5/32	-	-
S1/2	S1/4	S1/8	S1/16	S1/32	S5/2	S5/4	S5/8	S5/16	S5/32	-	-
S2/2	S2/4	S2/8	S2/16	S2/32	S6/2	S6/4	S6/8	S6/16	S6/32	-	-
S2/2	S2/4	S2/8	S2/16	S2/32	S6/2	S6/4	S6/8	S6/16	S6/32	-	-
S3/2	S3/4	S3/8	S3/16	S3/32	S7/2	S7/4	S7/8	S7/16	S7/32	-	-
S3/2	S3/4	S3/8	S3/16	S3/32	S7/2	S7/4	S7/8	S7/16	S7/32	-	-
S4/2	S4/4	S3/8	S3/16	S3/32	S8/2	S8/4	S8/8	S8/16	S8/32	-	-
S4/2	S4/4	S3/8	S3/16	S3/32	S8/2	S8/4	S8/8	S8/16	S8/32	-	-

[0068] Während S1/2 bis S8/2 in den Spalten 1 und 6 ein Mal verdünnte Seren darstellen, stellen Sx/4, Sx/8, Sx/16 und Sx/32 die zweifachen seriellen Verdünnungen dar. Die letzten Platten enthielten auch vier Näpfe, die mit 100 μl fetalem Kalbsserum als Negativkontrolle befüllt waren. Die Platten wurden bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gehalten.

Herstellung von humanem Adenovirus-Ausgangsmaterial

[0069] Prototypen aller bekannten humanen Adenoviren wurden in T25-Kolben, die mit PER.C6-Zellen (Fallaux et al., 1998) beimpft waren, inokuliert und nach vollständiger CPE (cytopathischer Wirkung) geerntet. Nach einem Gefrieren/Auftauen wurden 1–2 ml der rohen Lysate zum Inokulieren eines T80-Kolbens mit PER.C6-Zellen verwendet, und das Virus wurde bei vollständiger CPE geerntet. Der Zeitrahmen zwischen der Inokulierung und dem Auftreten der CPE sowie die Virusmenge, die zum Reinfizieren einer neuen Kultur erforderlich war, variierte zwischen den Serotypen. Adenovirus-Ausgangsmaterialien wurden durch Gefrieren/Auf-

tauen hergestellt und zum Inokulieren von 3–4 T175-cm²-Dreischichtkolben mit PER.C6-Zellen verwendet. Beim Auftreten der CPE wurden Zellen durch ein Rütteln des Kolbens geerntet, sedimentiert, und Virus wurde isoliert und mittels eines zweistufigen CsCl-Gradienten wie folgt gereinigt. Zellsedimente wurden in 50 ml eines Puffers aus 10 mM NaPO₄ (pH-Wert 7,2) gelöst und bei –20 °C eingefroren. Nach Auftauen bei 37 °C wurden 5,6 ml Natriumdeoxycholat (5% Gew./Vol.) zugegeben. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und 5–15 min lang bei 37 °C inkubiert, um die Zellen vollständig zu lysieren. Nach einem Homogenisieren der Lösung wurden 1875 µl 1 M MgCl₂ zugegeben. Nach der Zugabe von 375 µl DNase (10 mg/ml) wurde die Lösung 30 min lang bei 37 °C inkubiert. Zellrückstände wurden durch ein 30minütiges, bei RT ohne Bremse erfolgreiches Zentrifugieren bei 1880 × g entfernt. Der Überstand wurde anschließend durch Extraktion mit Freon (3x) von Proteinen gereinigt. Der geklärte Überstand wurde auf einen mit 1 M Tris/HCl gepufferten Cäsiumchlorid-Blockgradienten (Bereich: 1,2/1,4 g/ml) aufgegeben und 2,5 h lang bei 10 °C mit 21 000 U/min zentrifugiert. Die Virusbande wird isoliert, wonach eine zweite Reinigung mittels eines mit 1M Tris/HCl gepufferten kontinuierlichen Gradienten von 1,33 g/ml Cäsiumchlorid durchgeführt wurde. Das Virus wurde dann 17 h lang bei 10 °C mit 55 000 U/min zentrifugiert. Die Virusbande wird isoliert, und Saccharose (50% Gew./Vol.) wird bis zu einer Endkonzentration von 1% zugegeben. Überschüssiges Cäsiumchlorid wird durch Dialyse (drei Mal 1 h bei Raumtemperatur) in Dialyse-Objektträgern (Slide-a-lizer, Ausschlussgrenze 10 000 kDa, Pierce, USA) gegen 1,5 l PBS, ergänzt mit CaCl₂ (0,9 mM), MgCl₂ (0,5 mM) und eine steigende Saccharosekonzentration (1, 2, 5%) entfernt. Nach der Dialyse wird das Virus aus dem Slide-a-lizer entfernt, wonach es in Portionen von 25 und 100 µl aliquot aufgeteilt wird, wonach das Virus bei –85 °C aufbewahrt wird.

[0070] Zur Bestimmung der Anzahl Viruspartikel pro Milliliter werden 50 µl der Viruscharge gemäß der Beschreibung von Shabram et al. (1997) in einen Hochdruck-Flüssigchromatographen (HPLC) aufgegeben. Viren wurden unter Verwendung eines von 0 bis 600 mM reichenden NaCl-Gradienten eluiert. Wie in Tabelle I gezeigt, variierte die NaCl-Konzentration, bei der die Viren eluiert wurden, signifikant zwischen den Serotypen.

[0071] Die meisten humanen Adenoviren vermehrten sich in PER.C6-Zellen mit einigen Ausnahmen gut. Die Adenovirustypen 8 und 40 wurden in 911-E4-Zellen (He et al., 1998) gezüchtet. Gereinigte Ausgangsmaterialien enthielten zwischen 5×10^{10} und 5×10^{12} Viruspartikel/ml (VP/ml; siehe Tabelle I).

Titration von gereinigten humanen Adenovirus-Ausgangsmaterialien

[0072] Adenoviren wurden in PER.C6-Zellen titriert, um die Virusmenge zu bestimmen, die erforderlich ist, um einen vollen CPE innerhalb von 5 Tagen, der Zeitdauer des Neutralisationsassays, zu erhalten. Dazu wurden 100 µl Medium in jeden Napf von Platten mit 96 Nöpfen dosiert. 25 µl Adenovirus-Ausgangsmaterialien, die um 10⁴, 10⁵, 10⁶ oder 10⁷ Mal vorverdünnt waren, wurden in die 2. Längsreihe einer Platte mit 96 Nöpfen gegeben und durch ein 10maliges Herauf- und Herunterpipettieren vermischt. Dann wurden 25 µl von der 2. Längsreihe in die 3. Längsreihe übertragen und erneut vermischt. Dies wurde bis zur 11. Längsreihe wiederholt, wonach 25 µl aus der 11. Längsreihe verworfen wurden. Auf diese Weise wurden ausgehend von einem vorverdünnten Ausgangsmaterial serielle Verdünnungen in 5er-Schritten erhalten. Dann wurden 3 × 10⁴ PER.C6-Zellen (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) in einem 100-µl-Volumen zugegeben, und die Platten wurden fünf oder sechs Tage lang bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert. Die CPE wurde mikroskopisch überwacht. Zur Berechnung der eine 50-%ige Hemmung der Zellkultur bewirkenden Dosis (CCID₅₀) wurde das Verfahren von Reed und Muensch verwendet.

[0073] Parallel wurden identische Platten eingerichtet, die mittels des MTT-Assays (Promega) analysiert wurden. Bei diesem Assay werden lebende Zellen durch eine kolorimetrische Färbung quantifiziert. Dazu wurden 20 µl MTT (7,5 mg/ml in PBS) in die Nöpfe gegeben und 2 h lang bei 37 °C, 5% CO₂, inkubiert. Der Überstand wurde entfernt, und 100 µl einer 20:1-Lösung von Isopropanol/Triton-X100 wurden in die Nöpfe gegeben. Die Platten wurden 3–5 min lang auf einen Schüttler für 96 Nöpfe gegeben, um ausgefallenes angefärbtes Material löslich zu machen. Die Extinktion wurde bei 540 nm und bei 690 nm (Hintergrund) gemessen. Mit diesem Assay können Nöpfe mit fortschreitender CPE oder voller CPE unterschieden werden.

Neutralisationsassay

[0074] Platten mit 96 Nöpfen mit verdünnten Proben von humanem Serum wurden bei 37 °C, 5% CO₂ aufgetaut. Adenovirus-Ausgangsmaterial, das auf 200 CCID₅₀ pro 50 µl verdünnt war, wurde hergestellt, und 50-µl-Aliquote wurden zu den Längsreihen 1–11 der Platten mit Serum gegeben. Die Platten wurden 1 h lang bei 37 °C, 5% CO₂, inkubiert. Dann wurden allen Nöpfen 50 µl PER.C6-Zellen mit 6×10^5 /ml zudosiert und 1 d lang bei 37 °C, 5% CO₂, inkubiert. Der Überstand wurde mit frischen Pipettenspitzen für jede Querreihe entfernt, und 200 µl frisches Medium wurde allen Nöpfen zugegeben, um toxische Wirkungen des Serums zu ver-

meiden. Platten wurden weitere 4 Tage lang bei 37 °C, 5% CO₂, inkubiert. Darüber hinaus wurden parallele Kontrollplatten mit verdünnten positiven Kontrollseren, die in Kaninchen erzeugt wurden und für jeden zu testenden Serotyp spezifisch waren, in Duplikat in den Längsreihen A und B und mit dem negativen Kontrollserum (FCS) in den Längsreihen C und D eingerichtet. Auch in jeder der Längsreihen E–H wurde eine Titration wie oben beschrieben in Schritten von fünffachen Verdünnungen durchgeführt, wobei mit 200 CCID₅₀ eines jeden zu testenden Virus begonnen wurde. Am 5. Tag wurde eine der Kontrollplatten mikroskopisch und mit dem MTT-Assay analysiert. Der experimentelle Titer wurde anhand der mikroskopisch betrachteten Kontroll-Titrationsplatte berechnet. Wenn gefunden wurde, dass die CPE vollständig war, d.h. die erste Verdünnung in dem mittels MTT analysierten Kontroll-Titrationsexperiment zeigt einen klaren Zelltod, wurden alle Assayplatten verarbeitet. War dies nicht der Fall, wurde der Assay für einen bis mehrere Tage fortgesetzt, bis vollständige CPE erkennbar war, wonach alle Platten verarbeitet wurden. In den meisten Fällen wurde der Assay am 5. Tag beendet. Bei Ad1, 5, 33, 39, 42 und 43 wurde der Assay sechs Tage lang und bei Ad2 acht Tage lang stehen gelassen.

[0075] Eine Serumprobe wird als nicht neutralisierend betrachtet, wenn bei der höchsten Serumkonzentration im Vergleich zu den Kontrollen ohne Serum ein maximaler Schutz von 40% zu sehen ist.

[0076] Die Ergebnisse der Analyse von 44 Prototyp-Adenoviren gegen Serum von 100 gesunden Freiwilligen sind in [Fig. 1](#) dargestellt. Wie erwartet, war der Prozentwert der Serumproben, die neutralisierende Antikörper gegen Ad2 und Ad5 enthielten, sehr hoch. Dies galt auch für die meisten der Adenoviren mit kleineren Nummern. Überraschenderweise enthielt keine der Serumproben neutralisierende Antikörper gegen den Adenovirus-Serotypen 35. Auch die Zahl der Personen mit neutralisierenden Antikörper-Titern gegenüber den Serotypen 26, 34 und 48 war sehr niedrig. Daher weisen rekombinante, E1-deletierte Adenoviren auf der Grundlage von Ad35 oder einem der anderen, oben erwähnten Serotypen im Vergleich zu rekombinanten Vektoren auf der Grundlage von Ad5 mit Bezug auf die Clearance der Viren durch neutralisierende Antikörper einen wichtigen Vorteil auf.

[0077] Darüber hinaus werden Vektoren auf der Grundlage von Ad5, bei denen (Teile der) Kapsidproteine, die in die immunogene Antwort des Wirts einbezogen sind, durch die entsprechenden (Teile der) Kapsidproteine von Ad35 oder einen der anderen Serotypen ersetzt sind, weniger oder sogar gar nicht von der großen Mehrheit der humanen Seren neutralisiert.

[0078] Wie aus Tabelle I hervorgeht, war das VP/CCID₅₀-Verhältnis, das aus den Viruspartikeln pro ml und dem für jedes Virus in den Experimenten erhaltene CCID₅₀ hochgradig variabel und reichte von 0,4 bis 5 log. Dies wird wahrscheinlich durch verschiedene Infektionseffizienzen von PER.C6-Zellen (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) und Unterschiede der Replikationseffizienz der Viren verursacht. Weiterhin können Unterschiede bei Chargenqualitäten eine Rolle spielen. Ein hohes VP/CCID₅₀-Verhältnis bedeutet, dass zum Erhalt eines CPE in 5 Tagen mehr Virus in die Nöpfe gegeben wurde. Folglich kann das Ergebnis der Neutralisationsuntersuchung einen systematischen Fehler aufweisen, weil mehr (inaktive) Viruspartikel die Antikörper abschirmen könnten. Um zu überprüfen, ob dieses Phänomen aufgetreten war, wurde das VP/CCID₅₀-Verhältnis gegen den Prozentwert der im Assay als positiv ermittelten Serumproben aufgetragen ([Fig. 2](#)). Das Diagramm zeigt klar, dass es keine negative Korrelation zwischen der Menge der Viren im Assay und der Neutralisation im Serum gibt.

Beispiel 2

Die Prävalenz der Neutralisierungsaktivität (NA) auf Ad35 ist in humanen Seren von verschiedenen geographischen Orten gering

[0079] In Beispiel 1 haben wir die Analyse der Neutralisierungsaktivität (NA) in humanen Seren aus einem Ort in Belgien beschrieben. Bemerkenswerterweise wurde bei einer Testgruppe von 44 untersuchten Adenovirus-Serotypen ein Serotyp, Ad35, bei keinem der untersuchten 100 Seren neutralisiert. Darüber hinaus wurde gefunden, dass wenige Serotypen, Ad26, Ad34 und Ad48, bei 8 % oder weniger der getesteten Seren neutralisiert wurden. Diese Analyse wurde weiterhin auf andere Serotypen von Adenoviren ausgedehnt, die zuvor nicht untersucht wurden, und wurde unter Verwendung einer Auswahl von Serotypen aus dem ersten Screening auch auf Seren von verschiedenen geographischen Orten ausgedehnt.

[0080] Dazu wurden Adenoviren vermehrt, gereinigt und in dem in Beispiel 1 beschriebenen CPE-Inkubationstest auf Neutralisation getestet. Unter Verwendung der Seren aus derselben Charge wie in Beispiel 1 wurden die Adenovirus-Serotypen 7B, 11, 14, 18 bzw. 44/1876 auf Neutralisation getestet. Es wurde gefunden,

dass diese Viren in 59, 13, 30, 98 bzw. 54 % der Seren neutralisiert wurden. Somit wird aus dieser Serie Ad11 mit einer relativ niedrigen Häufigkeit neutralisiert.

[0081] Weil bekannt ist, dass die Häufigkeit der Isolierung von Adenovirus-Serotypen aus menschlichem Gewebe sowie die Prävalenz der NA gegenüber Adenovirus-Serotypen an verschiedenen geographischen Orten verschieden sein kann, haben wir weiterhin eine Auswahl der Adenovirus-Serotypen gegen Seren von verschiedenen Orten untersucht. Humane Seren wurden von zwei zusätzlichen Orten in Europa (Bristol, GB, und Leiden, Niederlande) und von zwei Orten in den Vereinigten Staaten (Stanford, CA, und Great Neck, NY) erhalten. Adenoviren, bei denen festgestellt wurde, dass sie in 20 % oder weniger der Seren des ersten Screenings neutralisiert wurden, sowie Ad2, Ad5, Ad27, Ad30, Ad38, Ad43 wurden auf die Neutralisierung in Seren aus GB getestet. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in [Fig. 4](#) aufgeführt. Die Adenovirus-Serotypen 2 und 5 wurden wiederum in einem hohen Prozentsatz humaner Seren neutralisiert. Weiterhin werden einige der Serotypen, die bei einem niedrigen Prozentsatz von Seren im ersten Screening neutralisiert wurden, bei einem höheren Prozentsatz von Seren aus GB neutralisiert, z.B. Ad26 (7 % im Vergleich zu 30 %), Ad28 (13 % im Vergleich zu 50 %), Ad34 (5 % im Vergleich zu 27 %) und Ad48 (8 % im Vergleich zu 32 %). Eine Neutralisierungsaktivität gegenüber Ad11 bzw. Ad49, die beim ersten Screening bei einem relativ niedrigen Prozentsatz von Seren festgestellt wurde, wurde bei diesem zweiten Screening bei sogar noch einem niedrigeren Prozentsatz ermittelt (13 % im Vergleich zu 5 % bzw. 20 % im Vergleich zu 11 %). Jetzt wurde festgestellt, dass der Serotyp Ad35, der bei keinem der Seren des ersten Screenings neutralisiert wurde, bei einem niedrigen Prozentsatz (8 %) von Seren aus GB neutralisiert wurde. Die Prävalenz der NA in humanen Seren aus GB ist gegenüber den Serotypen Ad11 und Ad35 am niedrigsten.

[0082] Zur weiteren Analyse wurden Seren aus zwei Orten in den US (Stanford, CA und Great Neck, NY) und aus den Niederlanden (Leiden) erhalten. In [Fig. 5](#) ist eine Übersicht von Daten aufgeführt, die mit diesen Seren und den bisherigen Daten erhalten wurden. Mit Ausnahme von Ad5, Ad11 und Ad35 wurden nicht alle Viren in allen Seren getestet. Die allgemeine Folgerung aus diesem umfassenden Screening von humanen Seren besteht darin, dass in westlichen Ländern die Prävalenz der Neutralisationsaktivität gegenüber Ad35 von allen Serotypen am niedrigsten ist: Durchschnittlich 7 % der humanen Seren enthalten eine Neutralisationsaktivität (5 verschiedene Orte). Ein anderer Adenovirus der B-Gruppe, Ad11, wird ebenfalls von einem niedrigen Prozentsatz von humanen Seren (durchschnittlich 11 % in Seren aus 5 verschiedenen Orten) neutralisiert. Der Adenovirus-Typ 5 wird in 56 % der humanen Seren, die an 5 verschiedenen Orten erhalten wurden, neutralisiert. Obwohl der Serotyp 49 der D-Gruppe nicht in allen Seren getestet wurde, wird er ebenfalls mit einer relativ geringen Häufigkeit in Proben aus Europa und von einem Ort in den US neutralisiert (Mittelwert 14 %).

[0083] Bei den oben beschriebenen Neutralisierungsexperimenten wird ein Serum als nicht neutralisierend bewertet, wenn in dem Napf mit der höchsten Serumkonzentration der maximale Schutz des CPE im Vergleich zu den Kontrollen ohne Serum 40 % beträgt. Der Schutz wird wie folgt berechnet:

$$1\% \text{ Schutz} = \frac{\text{OD entsprechender Napf} - \text{OD Viruskontrolle}}{\text{OD nichtinfizierte Kontrolle} - \text{OD Viruskontrolle}} \times 100\%$$

[0084] Gemäß der Beschreibung in Beispiel 1 wird das Serum in fünf verschiedenen, von 4x bis 64x reichenden Verdünnungen ausplattiert. Daher ist eine Unterscheidung zwischen niedrigen NA-Titern (d.h. einer Neutralisation nur bei den höchsten Serumkonzentrationen) und hohen NA-Titern (d.h. auch einer Neutralisation in Nöpfen mit der niedrigsten Serumkonzentration) möglich. Es stellte sich heraus, dass von den in unserem Screening eingesetzten humanen Seren, von denen festgestellt wurde, dass sie eine Neutralisierungsaktivität gegenüber Ad5 aufweisen, 70 % hohe Titer aufwiesen, während nur 15 % derjenigen Seren, die eine NA gegenüber Ad35 aufwiesen, hohe Titer aufwiesen. Von den Seren, die hinsichtlich der NA auf Ad11 positiv waren, hatten nur 8 % hohe Titer. Für Ad49 betrug dieser Wert 5 %. Daher ist nicht nur die Häufigkeit einer NA gegenüber Ad35, Ad11 und Ad49 im Vergleich zu Ad5 viel niedriger, sondern die überwiegende Mehrzahl der Seren, die eine NA gegenüber diesen Viren aufweist, enthält niedrige Titer. Daher haben adenovirale Vektoren auf der Grundlage von Ad11, Ad35 oder Ad49 einen klaren Vorteil gegenüber Vektoren auf der Grundlage von Ad5, wenn sie als Vehikel für die Gentherapie oder Impfvektoren in vivo oder in einer beliebigen Anwendung eingesetzt werden, bei der die Infektionseffizienz durch eine Neutralisierungsaktivität behindert wird.

[0085] In den folgenden Beispielen wird die Konstruktion eines Vektorsystems zur Erzeugung von sicheren, von RCA freien Vektoren auf der Grundlage von Ad35 beschrieben.

Beispiel 3

Sequenz des humanen Adenovirus-Typs 35

[0086] Ad35-Viren wurden auf PER.C6-Zellen vermehrt, und DNA wurde gemäß der Beschreibung in Beispiel 4 isoliert. Die Gesamtsequenz wurde von Qiagen Sequence Services (Qiagen GmbH, Deutschland) erzeugt. Die gesamte virale DNA wurde durch eine Ultraschallbehandlung geschert, und die Enden der DNA wurde mittels T4-DNA-Polymerase glatt gemacht. Gescherte glatte Fragmente wurden auf Agarosegelen nach der Größe getrennt, und es wurden Gelscheiben erhalten, die DNA-Fragmenten mit 1,8 bis 2,2 kb entsprachen. DNA wurde mittels des QIA Gelextraktionsprotokolls von den Gelscheiben gereinigt und in eine Shotgun-Bank von pUC19-Plasmid klonierenden Vektoren subkloniert. Ein Array von Klonen in Platten mit 96 Näpfen, die die Ziel-DNA 8 (+/- 2) Mal abdeckten, wurde zur Erzeugung der gesamten Sequenz verwendet. Die Sequenzierung erfolgte in Thermocyclern 9700 von Perkin-Eimer unter Verwendung der BigDyeTerminator-Chemie und AmpliTaq-FS-DNA-Polymerase, gefolgt von einer Reinigung mittels Sequenzierungsreaktionen unter Verwendung der DyeEx-96-Technologie von QIAGEN. Sequenzierungs-Reaktionsprodukte wurden dann einer automatisierten Trennung und Detektion der Fragmente auf Sequenzern mit 96 Spuren unterzogen. Die Contig-Sequenz der und Lücken in der anfänglichen Sequenz wurden durch ein Lesen von Walking Primern der Ziel-DNA oder durch ein direktes Sequenzieren von PCR-Produkten gefüllt. Es stellte sich heraus, dass die Enden des Virus höchstwahrscheinlich aufgrund von Klonierungsschwierigkeiten, die aus den pTP-Aminosäuren, die nach dem mittels Proteinase K erfolgenden Aufschluss der viralen DNA an den ITR-Sequenzen gebunden blieben, resultierten, in der Shotgun-Bank fehlten. Durch zusätzliche Sequenzläufe an viraler DNA wurden die meisten Sequenzen in diesen Bereichen gelöst, wobei es jedoch schwierig war, eine klare Sequenz der terminalsten Nucleotide zu erhalten. Bei der am 5'-Ende erhaltenen Sequenz handelte es sich um 5'-CCAATAATA-TACCT-3' (SEQ ID Nr.), während es sich bei der am 3'-Ende erhaltenen Sequenz um 5'-AGGTATATTATT-GATGATGGG-3' (SEQ ID Nr.) handelte. Die meisten humanen Adenoviren weisen eine terminate Sequenz 5'-CATCATCAATAATATACC-3' (SEQ ID Nr.) auf. Darüber hinaus stellte sich auch heraus, dass ein Klon, der das 3'-Ende der DNA von Ad35 darstellte, die nach dem Klonieren des terminalen Ad35-EcoRI-Fragments mit 7 kb in pBr322 erhalten wurde (siehe Beispiel 4) ebenfalls die typische CATCATCAATAAT...-Sequenz aufwies. Daher kann Ad35 die typische Endsequenz aufweisen, und die Schwierigkeiten, die beim direkten Sequenzieren an der viralen DNA auftraten, sind auf Artefakte zurückzuführen, die mit Run-off-Sequenzläufen und dem Vorhandensein von restlichen Aminosäuren von pTP zurückzuführen sind.

[0087] Die Gesamtsequenz von Ad35 mit korrigierten terminalen Sequenzen ist in **Fig. 5** aufgeführt. Auf der Grundlage der Sequenzhomologie mit Ad5 (Genbank-Nr. M72360) und Ad7 (partielle Sequenz Genbank Nr. X03000) und der Position der offenen Leseraster ist die Organisation des Virus mit der allgemeinen Organisation der meisten humanen Adenoviren, insbesondere derjenigen von Viren der Untergruppe B, identisch. Die Gesamtlänge des Genoms beträgt 34 794 Basenpaare.

Beispiel 4

Konstruktion eines Vektorsystems auf der Grundlage eines Plasmids zur Erzeugung rekombinanter Viren auf der Grundlage von Ad35.

[0088] Ein funktionelles Vektorsystem auf der Grundlage eines Plasmids zur Erzeugung rekombinanter adenoviraler Vektoren umfasst die folgenden Komponenten:

1. Ein Adapterplasmid, umfassend eine linke ITR und Verpackungssequenzen, die von Ad35 und wenigstens einer Restriktionsstelle stammen, zur Insertion einer heterologen Expressionskassette und fehlenden E1-Sequenzen. Weiterhin enthält das Adapterplasmid Ad35-Sequenzen in Richtung des 3'-Endes der E1B-Kodierungsbereichs einschließlich des pIX-Promoters und Kodierungssequenzen, die ausreichend sind, um eine homologe Rekombination des Adapterplasmids mit einem zweiten Nucleinsäuremolekül zu vermitteln.
2. Ein zweites Nucleinsäuremolekül, umfassend Sequenzen, die zum Adapterplasmid homolog sind, und Ad35-Sequenzen, die zur Vermehrung und zum Verpacken des rekombinanten Virus erforderlich sind, d.h. frühe, intermediäre und späte Gene, die in der Verpackungszelle nicht vorhanden sind.
3. Eine Verpackungszelle, die wenigstens funktionelle E1-Proteine verfügbar macht, die dazu fähig sind, die E1-Funktion von Ad35 zu komplementieren.

[0089] Andere Verfahren zur Erzeugung von rekombinanten Adenoviren in komplementierenden Verpackungszellen sind im Fachgebiet bekannt und können auf Ad35-Viren angewandt werden, ohne von der Erfindung abzuweichen. Als Beispiel wird die Konstruktion eines Systems auf der Grundlage eines Plasmids nach-

folgend ausführlich beschrieben.

1) Konstruktion eines Ad35-Adapterplasmids.

[0090] Dazu wurde das Adapterplasmid pAdApt (beschrieben in der Internationalen Patentanmeldung WO 99/55132) zuerst so modifiziert, dass Adapterplasmide erhalten wurden, die verlängerte Polylinker enthalten und zweckmäßige einzigartige Restriktionsstellen aufweisen, die die linke ITR und die Adenovirus-Sequenz am 3'-Ende flankieren, um die Freisetzung des Adenovirus-Inserts von Plasmidvektorsequenzen zu ermöglichen. Die Konstruktion dieser Plasmide wird nachfolgend ausführlich beschrieben:

Das Adapterplasmid pAdApt wurde mit Sall aufgeschlossen und zur Verminderung einer erneuten Ligation mit Shrimp-Alkalischer-Phosphatase behandelt. Ein Linker, der aus den folgenden beiden phosphorylierten und einem Annealing unterzogenen Oligonucleotiden

ExSalPacF 5'- TCG ATG GCA AAC AGC TAT TAT GGG TAT TAT GGG TTC GAA TTA ATT AA-3' (SEQ ID Nr.) und

ExSalPacR 5'- TCG ATT AAT TAA TTC GAA CCC ATA ATA CCC ATA ATA GCT GTT TGC CA-3' (SEQ ID Nr.) bestand, wurde direkt in das aufgeschlossene Konstrukt ligiert, wodurch die Sall-Restriktionsstelle durch Pi-PspI, SwaI und PacI ersetzt wurde. Dieses Konstrukt wurde als pADAPT+ExSalPac-Linker bezeichnet. Weiterhin wurde ein Teil der linken ITR von pAdApt unter Verwendung der folgenden Primer mittels PCR amplifiziert:

PCLIPMSF: 5'- CCC CAA TTG GTC GAC CAT CAT CAA TAA TAT ACC TTA TTT TGG-3' (SEQ ID Nr.) und pCLIPBSRG1: 5'-GCG AAA ATT GTC ACT TCC TGT G-3' (SEQ ID Nr.). Das amplifizierte Fragment wurde mit MunI und BsrGI aufgeschlossen und in mit EcoRI teilweise aufgeschlossenes pAdS/Clip (beschrieben in der Internationalen Patentanmeldung WO 99/55132) kloniert und nach der Reinigung mit BsrGI aufgeschlossen, wodurch die linke ITR und das Verpackungssignal wieder inseriert wurden. Nach einer Analyse mittels Restriktionsenzymen wurde das Konstrukt mit Scal und SgrAI aufgeschlossen, und ein Fragment mit 800 bp wurde aus dem Gel isoliert und in einen mit Scal/SgrAI aufgeschlossenen pADAPT+ExSalPac-Linker ligiert.

Das resultierende Konstrukt mit der Bezeichnung pIPspSalAdapt wurde mit Sall aufgeschlossen, dephosphoryliert und in den oben erwähnten phosphorylierten, doppelsträngigen Linker ExSalPacF/ExSalPacR ligiert. Ein Klon, bei dem sich die PacI-Stelle der ITR am nächsten befand, wurde durch Restriktionsanalyse identifiziert, und die Sequenzen wurden durch Sequenzanalyse bestätigt. Dieses neue pAdApt-Konstrukt mit der Bezeichnung pIPspAdapt (**Fig. 8**) erntet somit zwei ExSalPac-Linker, die Erkennungssequenzen für PacI, PI-PspI und BstBI enthalten, die den adenoviralen Teil des adenoviralen Adapterkonstrukts umgeben und die zur Linearisierung der Plasmid-DNA vor der Cotransfizierung mit adenoviralen Helferfragmenten verwendet werden können.

[0091] Um transgene Klonierungspermutationen weiter zu verstärken, wurde eine Reihe von Polylinkervarianten auf der Grundlage von pIPspAdapt konstruiert. Zu diesem Zweck wurde pIPspAdapt zuerst mit EcoRI aufgeschlossen und dephosphoryliert. Ein Linker, der aus den beiden folgenden phosphorylierten und einem Annealing unterzogenen Oligonucleotiden:

Ecolinker+: 5'-AAT TCG GCG CGC CGT CGA CGA TAT CGA TAG CGG CCG C-3' (SEQ ID Nr.) und

Ecolinker-: 5'-AAT TGC GGC CGC TAT CGA TAT CGT CGA CGG CGC GCG G-3' (SEQ ID Nr.) bestand, wurde in dieses Konstrukt ligiert, wodurch Restriktionsstellen für Ascl, Sall, EcoRV, ClaI und NotI erzeugt wurden. Beide Orientierungen dieses Linkers wurden erhalten, und Sequenzen wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzanalyse bestätigt. Das Plasmid, das den Polylinker in der Reihenfolge 5'-HindIII, KpnI, AgeI, EcoRI, Ascl, Sall, EcoRV, ClaI, NotI, NheI, HpaI, BamHI und XbaI enthielt, wurde als pIPspAdapt1 bezeichnet, wogegen das Plasmid, das den Polylinker in der Reihenfolge HindIII, KpnI, AgeI, NotI, ClaI, EcoRV, Sall, Ascl, EcoRI, NheI, HpaI, BamHI und XbaI enthielt, als pIPspAdapt2 bezeichnet wurde.

[0092] Zur Erleichterung des Klonierens von Konstrukten mit einem anderen Sinn oder Antisense-Konstrukten wurde ein Linker konstruiert, der aus den beiden folgenden Oligonucleotiden bestand:

pIPspAdapt: HindXba + 5'-AGC TCT AGA GGA TCC GTT AAC GCT AGC GAA TTC ACC GGT ACC AAG CTT A-3' (SEQ ID Nr.) und

HindXba- 5'-CTA GTA AGC TTG GTA CCG GTG AAT TCG CTA GCG TTA ACG GAT CCT CTA G-3' (SEQ ID Nr.), um den Polylinker von pIPspAdapt zu reversieren. Dieser Linker wurde in mit HindIII/XbaI aufgeschlossenes pIPspAdapt ligiert, und das richtige Konstrukt wurde isoliert. Die Bestätigung erfolgte durch Restriktionsenzym-Analyse und Sequenzierung. Dieses neue Konstrukt, pIPspAdaptA, wurde mit EcoRI aufgeschlossen, und der oben erwähnte Ecolinker wurde in dieses Konstrukt ligiert. Beide Orientierungen dieses Linkers wurden erhalten, was zu pIPspAdapt3 führte (**Fig. 10**), das den Polylinker in der Reihenfolge XbaI, BamHI, HpaI, NheI, EcoRI, Ascl, Sall, EcoRV, ClaI, NotI, AgeI, KpnI und HindIII enthält. Alle Sequenzen wurden durch Restriktionsenzymanalyse und Sequenzierung bestätigt.

[0093] Adapterplasmide auf der Grundlage von Ad35 wurden wie folgt konstruiert:

Das linke ITR und die Verpackungssequenz, die den Nucleotiden 1 bis 464 der Wildtyp-Ad35-Sequenzen entspricht (**Fig. 5**), wurden mittels PCR unter Verwendung der folgenden Primer an wtAd35-DNA amplifiziert:

1Primer 35F1:

25'-CGG AAT TCT TAA TTA ATC GAC ATC ATC AAT AAT ATA CCT TAT AG-3' (SEQ ID Nr. _)

Primer 35R2:

5'-GGT GGT CCT AGG CTG ACA CCT ACG TAA AAA CAG-3' (SEQ ID Nr. _)

[0094] Durch die Amplifizierung wird eine PacI-Stelle am 5'-Ende und eine AvrII-Stelle am 3'-Ende der Sequenz eingeführt.

[0095] Zur Amplifizierung wurde das Platinium-Pfx-DNA-Polymeraseenzym (LTI) gemäß den Anweisungen des Herstellers, aber mit 0,6 µM Primern und mit DMSO, das bis zu einer Endkonzentration von 3 % zugegeben wurde, verwendet. Das Amplifizierungsprogramm war wie folgt: 2 min bei 94 °C (30 s bei 94 °C, 30 s bei 56 °C, 1 min bei 68 °C) für 30 Zyklen, gefolgt von 10 min bei 68 °C.

[0096] Das PCR-Produkt wurde mittels eines PCR-Reinigungskits (LTI) gemäß den Anweisungen des Herstellers gereinigt und mit PacI und AvrII aufgeschlossen. Das aufgeschlossene Fragment wurde dann mittels des GeneClean-Kits (Bio 101, Inc.) vom Gel gereinigt. Das Adapterplasmid auf der Grundlage von AdS, pIPspAdApt-3 (**Fig. 10**) wurde mit AvrII aufgeschlossen und dann teilweise mit PacI aufgeschlossen, und das Fragment von 5762, bp wurde in einer Gelscheibe aus LMP-Agarose isoliert und mit dem oben erwähnten PCR-Fragment ligiert, das mit denselben Enzymen aufgeschlossen und in elektrokompetente DH10B-Zellen (LTI) transformiert worden war. Der resultierende Klon hat die Bezeichnung pIPspAdApt3-Ad35IIITR.

[0097] Parallel wurde ein zweites Stück Ad35-DNA unter Verwendung der folgenden Primer amplifiziert:

335F3: 5'-TGG TGG AGA TCT GGT GAG TAT TGG GAA AAC-3' (SEQ ID Nr. _)

435R4: 5'-CGG AAT TCT TAA TTA AGG GAA ATG CAA ATC TGT GAG G-3' (SEQ ID Nr. _)

[0098] Die Sequenz dieses Fragments entspricht den Nucl. 3401 bis 4669 von wtAd35 (**Fig. 5**) und enthält 1,3 kb Sequenzen, die in Richtung des 3'-Endes direkt von der E1B 55k kodierenden Sequenz starten. Die Amplifizierung und Reinigung erfolgte gemäß der obigen Beschreibung für das die linke ITR und die Verpackungssequenz enthaltende Fragment. Das PCR-Fragment wurde dann mit PacI aufgeschlossen und in den Vektor pNEB193 (New England Biolabs) subkloniert, der mit SmaI und PacI aufgeschlossen worden war. Die Integrität der Sequenz des resultierenden Klons wurde durch Sequenzanalyse überprüft. pNEB/Ad35pF3R4 wurde dann mit BglII und PacI aufgeschlossen, und der Ad35-Insert wurde mittels des QIAExII-Kits (Qiagen) vom Gel isoliert. pIPspAdApt3-Ad35IIITR wurde mit BglII und dann teilweise mit PacI aufgeschlossen. Das Fragment von 3624 bp (das Vektorsequenzen, die Ad35-ITR- und Verpackungssequenzen sowie den CMV-Promoter, eine Mehrfach-Klonierungsregion und ein polyA-Signal enthielt), wurde ebenfalls mittels des QIAExII-Kits (Qiagen) isoliert. Beide Fragmente wurden ligiert und in kompetente DH10B-Zellen (LTI) transformiert. Der resultierende Klon, pAdApt35IP3 (**Fig. 11**) weist die Expressionskassette von pIPspAdApt3 auf, enthält aber die linke ITR und Verpackungssequenzen von Ad35 und ein zweites, Nucl. 3401 bis 4669 von Ad35 entsprechendes Fragment. Eine zweite Version des Ad35-Adapterplasmids mit der Mehrfach-Klonierungsstelle in der gegenüberliegenden Orientierung wurde wie folgt angefertigt:

pIPspAdapt1 wurde mit NdeI und BglII aufgeschlossen, und das Band von 0,7 kbp, das einen Teil des CMV-Promotors, das MCS und SV40-polyA enthielt, wurde isoliert und in die entsprechenden Stellen von pAdApt35IP3 inseriert, wodurch pAdApt35IP1 erzeugt wurde (**Fig. 6**).

[0099] Dann wurden die Adapterplasmide pAdApt35.LacZ und pAdApt35.Luc erzeugt, indem die Transgene von pcDNA.LacZ (mit KpnI und BamHI aufgeschlossen) und pAdApt.Luc (mit HindIII und BamHI aufgeschlossen) in die entsprechenden Stellen in pAdApt35IP1 inseriert wurden. Die Erzeugung von pcDNA.LacZ und pAdAptLuc ist in WO99/55132 beschrieben.

2) Konstruktion des Cosmids pWE.Ad35.pIX-rITR

[0100] In **Fig. 7** sind die verschiedenen Schritte veranschaulicht, die zur Konstruktion des Cosmidklons unternommen wurden, der die Ad35-Sequenzen von bp 3401 bis 34 794 (Ende der rechten ITR), die ausführlich unten beschrieben sind, enthält.

[0101] Ein erstes PCR-Fragment (pIX-NdeI) wurde unter Verwendung des folgenden Primersatzes erzeugt:

535F5: 5'-CGG AAT TCG CGG CCG CGG TGA GTA TTG GGA AAA C-3' (SEQ ID Nr. _)

63586: 5'-CGC CAG ATC GTC TAC AGA ACA G-3' (SEQ ID Nr. _)

[0102] Die DNA-Polymerase Pwo (Roche) wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet, wobei jedoch eine Endkonzentration von 0,6 µM der beiden Primer und 50 ng wt Ad35 DNA als Matrize verwendet wurden. Die Amplifizierung wurde wie folgt durchgeführt: 2 min bei 94 °C, 30 Zyklen von 30 s bei 94 °C, 30 s bei 65 °C und 1 min 45 s bei 72 °C, gefolgt von 8 min bei 68 °C. Zur Ermöglichung einer Klonierung in den TA-Klonierungsvektor PCR2.1 wurde eine letzte Inkubierung mit 1 Einheit superTaq-Polymerase (HT Biotechnology LTD) für 10 min bei 72 °C durchgeführt.

[0103] Das amplifizierte Fragment mit 3370 bp enthält Ad35-Sequenzen von bp 3401 bis 6772 mit einer NotI-Stelle, die am 5'-Ende hinzugefügt wurde. Fragmente wurden unter Verwendung des PCR-Reinigungskits (LTI) gereinigt.

[0104] Ein zweites PCR-Fragment (NdeI-rITR) wurde unter Verwendung der folgenden Primer erzeugt:

735F7: 5'-GAA TGC TGG CTT CAG TTG TAA TC-3' (SEQ ID Nr. _)

835R8: 5'-CGG AAT TCG CGG CCG CAT TTA AAT CAT CAT CAA TAA TAT ACC-3' (SEQ ID Nr. _)

[0105] Die Amplifizierung erfolgte mit pfx-DNA-Polymerase (LTI) gemäß den Anweisungen des Herstellers, aber mit 0,6 µM der beiden Primer und 3 % DMSO, wobei 10 ng wtAd35-DNA als Matrix verwendet wurden. Das Programm war wie folgt: 3 min bei 94 °C und 5 Zyklen von 30 s bei 94 °C, 45 s bei 40 °C, 2 min 45 s bei 68 °C, gefolgt von 25 Zyklen von 30 s bei 94 °C, 30 s bei 60 °C, 2 min 45 s bei 68 °C. Zur Ermöglichung einer Klonierung in den TA-Klonierungsvektor PCR2.1 wurde eine letzte Inkubierung mit 1 Einheit superTaq-Polymerase für 10 min bei 72 °C durchgeführt. Das amplifizierte Fragment mit 1,6 kb, das von Nucl. 33 178 bis zum Ende der rechten ITR von Ad35 reichte, wurde mittels des PCR-Reinigungskits (LTI) gereinigt.

[0106] Beide gereinigten PCR-Fragmente wurden in den PCR2.1-Vektor des TA-Klonierungskits (Invitrogen) ligiert und in STBL-2-kompetente Zellen (LTI) transformiert. Klone, die den erwarteten Insert enthielten, wurden sequenziert, wodurch die richtige Amplifizierung bestätigt wurde. Als nächstes wurden beide Fragmente durch einen Aufschluss mit NotI und NdeI aus dem Vektor herausgeschnitten und mittels des GeneClean-Kits (BIO 101, Inc.) vom Gel gereinigt. Der Cosmidvektor pWE15 (Clontech) wurde mit NotI aufgeschlossen, dephosphoryliert und auch vom Gel gereinigt. Diese drei Fragmente wurden ligiert und in STBL2-kompetente Zellen (LTI) transformiert. Einer der richtigen Klone, der beide PCR-Fragmente enthielt, wurden dann mit NdeI aufgeschlossen, und das lineare Fragment wurde mittels des GeneClean-Kits vom Gel gereinigt. Ad35-wtDNA wurde mit NdeI aufgeschlossen, und das Fragment von 26,6 kb wurde mittels Agarase-Enzym (Roche) gemäß den Anweisungen des Herstellers vom LMP-Gel gereinigt. Diese Fragmente wurden zusammenligiert und unter Verwendung von Verpackungsextrakten des λ-Phagen (Stratagene) gemäß dem Protokoll des Herstellers verpackt. Nach der Infektion in STBL-2-Zellen wurden Kolonien auf Platten gezogen und auf das Vorhandensein des kompletten Inserts analysiert. Ein Klon, bei dem das große Fragment nach Aufschlüssen mit drei Enzymen (NcoI, PvuII und Scal) in der richtigen Orientierung und mit den richtigen Restriktionsmustern inseriert war, wurde ausgewählt. Dieser Klon hat die Bezeichnung pWE.Ad35.pIX-rITR. Er enthält die Ad35-Sequenzen von bp 3401 bis zum Ende und ist von NotI-Stellen flankiert (**Fig. 14**).

3) Erzeugung von rekombinanten Viren auf der Grundlage von Ad35 in PER.C6

[0107] Ad35-Wildtyp-Virus kann in PER.C6-Verpackungszellen mit sehr hohen Titern gezüchtet werden. Es ist jedoch unbekannt, ob die Ad5-E1-Region, die in PER.C6 vorhanden ist, dazu fähig ist, E1-deletierte, rekombinante Ad35-Viren zu komplementieren. Um dies zu testen, wurden PER.C6-Zellen mit dem oben beschriebenen Adapterplasmid pAdApt35.LacZ und dem großen Rückgrat-Fragment pWE.Ad35.pIX-rITR cotransfiziert. Zuerst wurde pAdApt35.LacZ mit PacI aufgeschlossen, und pWE.Ad35.pIX-rITR wurde mit NotI aufgeschlossen.

[0108] Ohne weitere Reinigung wurden 4 µg eines jeden Konstrukts mit DMEM (LTI) vermischt und in PER.C6-Zellen transfiziert, und ein T25-Kolben wurde am Vortag mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen beimpft, wobei Lipofectamin (LTI) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet wurde. Als positive Kontrolle wurden 6 µg pWE.Ad35.pIX-rITR-DNA, die mit PacI aufgeschlossen war, mit einem NheI-Fragment von 6,7 kb cotransfiziert, das aus Ad35-wt-DNA isoliert worden war, die das linke Ende des die E1-Region enthaltenden viralen Genoms enthielt. Am nächsten Tag wurde das Medium (DMEM mit 10 % FBS und 10 mM MgCl₂) aufgefrischt, und Zellen wurden weiter inkubiert. Am 2. Tag nach der Transfektion wurden Zellen mit Trypsin behandelt und in T80-Kolben übertragen. Der Kolben mit der positiven Kontrolle wies an fünf Tagen nach der Transfektion CPE auf, was zeigt, dass das Konstrukt pWE.Ad35.pIX-rITR wenigstens in Gegenwart von

Ad35-E1-Proteinen funktionell ist. Die Transfektion mit dem Adapterplasmid Ad35LacZ und pWE.Ad35.pIX-rITR ergab kein CPE. Diese Zellen wurden am 10. Tag im Medium geerntet und ein Mal gefroren/aufgetaut, um das Virus aus den Zellen freizusetzen. 4 ml des geernteten Materials wurden zu einem T80-Kolben mit PER.C6-Zellen (bei einer Konfluenz von 80 %) gegeben und für weitere fünf Tage inkubiert. Diese Ernte/Reinfektion wurde zwei Mal wiederholt, aber es gab keinen Hinweis auf einen virusassoziierten CPE.

[0109] Aus diesem Experiment scheint sich zu ergeben, dass die Ad5-E1-Proteine nicht oder nicht gut genug dazu fähig sind, Ad35-rekombinante Viren zu komplementieren, es kann aber sein, dass die Sequenzüberlappung des Adapterplasmids und des Rückgrat-Plasmids pWE.Ad35.pIX-rITR nicht groß genug ist, um effektiv zu rekombinieren und zu einem rekombinanten Virusgenom zu führen. Die positive Kontrolltransfektion erfolgte mit einem Fragment vom linken Ende mit 6,7 kb, und daher betrug die Sequenzüberlappung etwa 3,5 kb. Das Adapterplasmid und das Fragment pWE.Ad35.pIX-rITR weisen eine Sequenzüberlappung von 1,3 kb auf. Um zu prüfen, ob die Sequenzüberlappung von 1,3 kb zu klein für eine effiziente homologe Rekombination ist, wurde eine Cotransfektion mit pWE.Ad35.pIX-rITR, das mit PacI aufgeschlossen war, und einem PCR-Fragment von Ad35 wtDNA, die mit dem oben erwähnten 35F1 und 35R4 erzeugt worden war, wobei dieselben Verfahren verwendet wurden, die oben erwähnt sind. Das PCR-Fragment enthält somit Sequenzen des linken Endes bis zu bp 4669 und hat daher dieselben Überlappungssequenzen mit pWE.Ad35.pIX-rITR wie das Adapterplasmid pAdApt35.LacZ, verfügt aber über Ad35-E1-Sequenzen. Nach der PCR-Säulenreinigung wurde die DNA mit Sall aufgeschlossen, um mögliche intakte Matrixsequenzen zu entfernen. Eine Transfektion mit dem aufgeschlossenen PCR-Produkt allein diente als negative Kontrolle. Vier Tage nach der Transfektion transfigierte in den Zellen vorliegendes CPE mit dem PCR-Produkt und dem Fragment Ad35 pIX-rITR und nicht in der negativen Kontrolle. Dies zeigt, dass überlappende Sequenzen von 1,3 kb ausreichend sind, um in Gegenwart der Ad35.E1-Proteine Viren zu erzeugen. Wir schließen aus diesen Experimenten, dass das Vorhandensein wenigstens eines der Ad35.E1-Proteine zur Erzeugung von rekombinanten Vektoren auf der Grundlage von Ad35 aus Plasmid-DNA in Ad5 komplementierenden Zelllinien notwendig ist.

Beispiel 5

1) Konstruktion von Ad35.E1-Expressionsplasmiden

[0110] Weil Ad5-E1-Proteine in PER.C6 nicht zur effizienten Komplementierung von rekombinanten Ad35-Viren fähig sind, müssen Ad35.E1-Proteine in Ad5 komplementierenden Zellen (z.B. PER.C6) exprimiert werden, oder eine neuen, Ad35.E1-Proteine exprimierende Verpackungszelllinie muss hergestellt werden, wobei entweder von diploiden, primären humanen Zellen oder etablierten, Adenovirus-E1-Proteine nicht exprimierenden Zelllinien ausgegangen werden muss. Um sich der ersten Möglichkeit zu widmen, wurde die Ad35-E1-Region gemäß der Beschreibung unten in Expressionsplasmiden kloniert.

[0111] Zunächst wurde die Ad35-E1-Region von bp 468 bis bp 3400 aus wtAd35-DNA amplifiziert, wobei der folgende Primersatz verwendet wurde:

135F11: 5'-GGG GTA CCG AAT TCT CGC TAG GGT ATT TAT ACC-3' (SEQ ID Nr. __)

235F10: 5'-GCT CTA GAC CTG CAG GTT AGT CAG TTT CTT CTC CAC TG-3' (SEQ ID Nr. __)

[0112] Diese PCR führt eine KpnI- und eine EcoRI-Stelle am 5'-Ende und eine SbfI- und eine XbaI-Stelle am 3'-Ende ein.

[0113] Eine Amplifizierung an 5 ng Matrix-DNA wurde mit Pwo-DNA-Polymerase (Roche) unter Befolgung der Anweisungen des Herstellers durchgeführt, wobei aber beide Primer mit einer Endkonzentration von 0,6 µM verwendet wurden. Das Programm war wie folgt: 2 min bei 94 °C, 5 Zyklen von 30 s bei 94 °C, 30 s bei 56 °C und 2 min bei 72 °C, gefolgt von 25 Zyklen zu 30 s bei 94 °C, 30 s bei 60 °C und 2 min bei 72 °C, gefolgt von 10 min bei 72 °C. Das PCR-Produkt wurde mittels eines PCR-Reinigungskits (LTI) gereinigt und mit KpnI und XbaI aufgeschlossen. Das aufgeschlossene PCR-Fragment wurde dann an den Expressionsvektor pRSVhvbv-Neo (siehe unten) ligiert, der ebenfalls mit KpnI und XbaI aufgeschlossen war. Ligationen wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers in kompetente STBL-2-Zellen (LTI) transformiert, und Kolonien wurden auf die richtige Insertion von Ad35E1-Sequenzen in den Polylinker zwischen dem RSV-Promoter und HBV-polyA analysiert.

[0114] Der resultierende Klon wurde als pRSV.Ad35-E1 bezeichnet (**Fig. 9**). Die Ad35-Sequenzen in pRSV.Ad35-E1 wurden durch Sequenzanalyse überprüft.

[0115] pRSVhbvNeo wurde wie folgt erzeugt: pRc-RSV (Invitrogen) wurde mit PvuII aufgeschlossen, mit dem TSAP-Enzym (LTI) dephosphoryliert, und das Vektorfragment mit 3 kb wurde in Agarose mit einem niedrigen Schmelzpunkt (LMP) isoliert. Das Plasmid pPGKneoA (Fig. 10; beschrieben in WO96/35798) wurde mit SspI vollständig aufgeschlossen, um das Plasmid zu linearisieren und einen partiellen Aufschluss mit PvuII zu erleichtern. Nach dem partiellen Aufschluss mit PvuII wurden die resultierenden Fragmente auf einem LMP-Agarosegel getrennt, und das PvuII-Fragment mit 2245 bp, das den PGK-Promoter, das Resistenz gegen Neomycin verleihende Gen und HBVpolyA enthielt, wurde isoliert. Beide isolierten Fragmente wurden ligiert, wodurch der Expressionsvektor pRSV-pNeo erhalten wurde, bei dem jetzt die ursprüngliche Expressionskassette SV40promneo-SV40polyA durch eine Kassette PGKprom-neo-HBVpolyA ersetzt war (Fig. 11). Dieses Plasmid wurde zum Ersatz von BGHpA mit HBVpA weiter wie folgt modifiziert: pRSVpNeo wurde mit Scal linearisiert und weiter mit XbaI aufgeschlossen. Das Fragment mit 1145 bp, das einen Teil des Amp-Gens und die RSV-Promotersequenzen und die Polylinker-Sequenz enthielt, wurde mittels des GeneClean-Kits (Bio Inc. 101) vom Gel isoliert. Als nächstes wurde pRSVpNeo mit Scal linearisiert und weiter mit EcoRI partiell aufgeschlossen, und das Fragment mit 3704 bp, das die PGKneo-Kassette und die Vektorsequenzen enthielt, wurde wie oben aus dem Gel isoliert. Ein drittes Fragment, das die durch XbaI bzw. EcoRI am 5'- bzw. am 3'-Ende flankierte HBV-polyA-Sequenz enthielt, wurde dann durch PCR-Amplifizierung in pRSVpNeo erzeugt, wobei der folgende Primersatz verwendet wurde:

3HBV-F: 5'-GGC TCT AGA GAT CCT TCG CGG GAC GTC-3' (SEQ ID Nr. _) und
4HBV-R: 5'-GGC GAA TTC ACT GCC TTC CAC CAA GC-3' (SEQ ID Nr. _)

[0116] Die Amplifizierung erfolgte mit dem Elongase-Enzym (LTI) gemäß den Anweisungen des Herstellers unter den folgenden Bedingungen: 30 s bei 94 °C, dann 5 Zyklen zu 45 s bei 94 °C, 1 min bei 42 °C und 1 min bei 68 °C, gefolgt von 30 Zyklen von 45 s bei 94 °C, 1 min bei 65 °C und 1 min bei 68 °C, gefolgt von 10 min bei 68 °C. Das PCR-Fragment mit 625 bp wurde dann mittels des Qiaquick-PCR-Reinigungskits gereinigt, mit EcoRI und XbaI aufgeschlossen und mittels des GeneClean-Kits aus Gel gereinigt. Die drei isolierten Fragmente wurden ligiert und in DH5a-kompetente Zellen (LTI) transformiert, wodurch das Konstrukt pRSVhbvNeo (Fig. 12) erhalten wurde. Bei diesem Konstrukt sind die transkriptionsregulierenden Regionen der RSV-Expressionskassette und des Neomycin-Selektionsmarkers modifiziert, um eine Überlappung mit adenoviralen Vektoren, die oft die Transkription von CMV und SV40 regulierende Sequenzen enthalten, zu vermindern.

2) Erzeugung von Ad35-rekombinanten Viren in PER.C6-Zellen, die mit einem Ad35-E1-Expressionskonstrukt cotransfiziert sind.

[0117] Ein T25-Kolben wurde mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen mit PER.C6-Zellen beimpft, und am nächsten Tag wurden die Zellen mit einer DNA-Mischung transfiziert, die Folgendes enthielt:

- 1 µg pAdApt35.LacZ, mit PacI aufgeschlossen;
- 5 µg pRSV.Ad35E1, nicht aufgeschlossen;
- 2 µg pWE.Ad35.pIX-rITR, mit NotI aufgeschlossen.

[0118] Die Transfizierung erfolgte mit Lipofectamine gemäß den Anweisungen des Herstellers. 5 h nach der Zugabe der Transfektionsmischung zu den Zellen wurde das Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Nach zwei Tagen wurden Zellen in T80-Kolben überführt und weiter kultiviert. Eine Woche nach der Transfizierung wurde 1 ml des Mediums zu A549-Zellen gegeben, und an den folgenden Tagen wurden Zellen auf die Expression von LacZ gefärbt. Blaue Zellen waren nach einem zweistündigen Färben klar sichtbar, was darauf hindeutet, dass rekombinante, LacZ exprimierende Viren erzeugt wurden. Die Zellen wurden weiter kultiviert, wobei ein klares Auftreten von CPE aber nicht beobachtet wurde. Nach 12 Tagen erschienen aber Zellklumpen in der Einzelzellschicht, und 18 Tage nach der Transfektion wurden Zellen abgetrennt. Dann wurden die Zellen und das Medium geerntet, ein Mal gefroren/aufgetaut, und 1 ml des rohen Lysats wurde zur Infizierung von PER.C6-Zellen in einer Platte mit 6 Näpfen verwendet. Zwei Tage nach der Infektion wurden Zellen auf eine LacZ-Aktivität gefärbt. Nach 2 h waren 15 % der Zellen blau gefärbt. Um auf das Vorhandensein von wt und/oder replikationskompetenten Viren zu testen, wurden A549-Zellen mit diesen Viren infiziert und weiter kultiviert. Es wurden keine Anzeichen von CPE gefunden, was auf das Fehlen von replikationskompetenten Viren hindeutet. Diese Experimente zeigen, dass rekombinante AdApt35.LacZ-Viren in PER.C6-Zellen erzeugt wurden, die mit einem Ad35-E1-Expressionskonstrukt cotransfiziert waren.

[0119] Rekombinante Ad35-Viren entgehen der Neutralisation in humanem Serum, das eine neutralisierende Wirkung gegenüber Ad5-Viren enthält.

[0120] Die AdApr35.LacZ-Viren wurden dann zur Untersuchung der Infektion in Gegenwart von Serum untersucht, das eine neutralisierende Wirkung gegenüber Ad5-Viren enthält. Gereinigte LacZ-Viren auf der Grund-

lage von Ad5 dienen als positive Kontrolle für NA. Dazu wurde eine Platte mit 24 Näpfen mit PER.C6-Zellen mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/Napf beimpft. Am nächsten Tag wurde eine humane Serumprobe mit einer hohen neutralisierenden Aktivität gegenüber Ad5 in fünf Stufen von fünffachen Verdünnungen im Kulturmedium verdünnt. 0,5 ml verdünntes Serum wurden dann mit 4×10^6 Viruspartikeln des Virus AdAprt.LacZ in 0,5 ml Medium vermischt, und nach 30 min einer Inkubierung bei 37 °C wurden 0,5 ml der Mischung in doppelter Ausführung zu PER.C6-Zellen gegeben. Für die AdApr35.LacZ-Viren wurden 0,5 ml der verdünnten Serumproben mit 0,5 ml rohem, das AdApr35.LacZ-Virus enthaltenden Lysat vermischt, und nach der Inkubation wurden 0,5 ml dieser Mischung in Duplikat zu PER.C6-Zellen gegeben. Als positive Kontrolle für die Infektion wurden Virusproben verwendet, die in Medium ohne Serum inkubiert worden waren. Nach 2 h bei einer Infektion bei 37 °C wurde Medium zugegeben, wodurch ein Endvolumen von 1 ml erreicht wurde, und die Zellen wurden weiter inkubiert. Zwei Tage nach der Infektion wurden Zellen auf die LacZ-Aktivität gefärbt. Die Ergebnisse sind in Tabelle II aufgeführt. Aus diesen Ergebnissen geht klar hervor, dass, während AdApt5-LacZ-Viren effizient neutralisiert werden, AdApt35.LacZ-Viren unabhängig vom Vorhandensein von humanem Serum infektiös bleiben. Dies beweist, dass rekombinante Viren auf der Grundlage von Ad35 der Neutralisation in humanen Seren, die NA gegen Viren auf der Grundlage von Ad5 enthalten, entgehen.

Beispiel 6

Erzeugung von Zelllinien, die zur Komplementierung von E1-deletierten Ad35-Viren fähig sind

Erzeugung von pIG135 und pIG270

[0121] Das Konstrukt pIG.E1A.E1B (**Fig. 13**) enthält Sequenzen der E1-Region von Ad5, die den Nucleotiden 459 bis 3510 der wt-Ad5-Sequenz (Genbank-Zugangsnummer M72360) entsprechen, die mit dem humanen Phosphoglycerat-Kinase-Promotor (PGK) und den polyA-Sequenzen des Hepatitis-B-Virus operativ verbunden sind. Die Erzeugung dieses Konstrukts ist in WO97/00326 beschrieben. Die E1-Sequenzen von Ad5 wurden wie folgt durch entsprechende Sequenzen von Ad35 ersetzt. pRSV.Ad35-E1 (in Beispiel 5 beschrieben) wurde mit EcoRI und Sse8387I aufgeschlossen, und das den E1-Sequenzen von Ad35 entsprechende Fragment mit 3 kb wurde aus Gel isoliert. Das Konstrukt pIG.E1A.E1B wurde mit Sse8387I vollständig und mit EcoRI teilweise aufgeschlossen. Das Fragment von 4,2 kb, das Vektorsequenzen ohne den E1-Bereich von Ad5 entsprach, aber noch den PGK-Promotor aufwies, wurde auf LMP-Agarosegel von den anderen Fragmenten abgetrennt, und das richtige Band wurde aus dem Gel herausgeschnitten. Beide erhaltenen Fragmente wurden ligiert, was zu pIG.Ad35-E1 führte.

[0122] Dieser Vektor wurde weiter dahingehend modifiziert, dass die im pUC119-Vektorrückgrat vorhandenen LacZ-Sequenzen entfernt wurden. Dazu wurde der Vektor mit BsaAI und BstXI aufgeschlossen, und das große Fragment wurde vom _ Gel isoliert. Ein doppelsträngiges Oligonucleotid wurde hergestellt, indem die beiden folgenden Oligonucleotide einem Annealing unterzogen wurden:

1BB1: 5'-GTG CCT AGG CCA CGG GG-3' (SEQ ID Nr. _)

2BB2: 5'-GTG GCC TAG GCA C-3' (SEQ ID Nr. _)

[0123] Die Ligation des Oligonucleotids und des Vektorfragments führte zum Konstrukt pIG135 (**Fig. 14**). Die richtige Insertion des Oligonucleotids stellt die Stellen BsaAI und BstXI wieder her und führt eine einzigartige AvrII-Stelle ein. Als Nächstes führten wir eine einzigartige Stelle am 3'-Ende der Ad35-E1-Expressionskassette in pIG135 ein. Dazu wurde das Konstrukt mit SapI aufgeschlossen, und die am 3'-Ende hervorstehenden Enden wurden -durch eine Behandlung mit T4-DNA-Polymerase glatt gemacht. Das so behandelte lineare Plasmid wurde weiter mit BsrGI aufgeschlossen, und das große, den Vektor enthaltende Fragment wurde vom Gel isoliert. Zur Wiederherstellung des 3'-Endes der HBVpolyA-Sequenz und zur Einführung einer einzigartigen Stelle wurde ein PCR-Fragment mit den folgenden Primern erzeugt:

3270F: 5'-CAC CTC TGC CTA ATC ATC TC-3' (SEQ ID Nr. _)

4270R: 5'-GCT CTA GAA ATT CCA CTG CCT TCC ACC-3' (SEQ ID Nr. _)

[0124] Die PCR wurde mit pIG.Ad35.E1-DNA unter Verwendung von Pwo-Polymerase (Roche) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit BsrGI aufgeschlossen und mittels des Tsap-Enzyms (LTI) dephosphoryliert, wobei Letzteres die Dimerisierung des Inserts an der BsrGI-Stelle verhindert. Das PCR-Fragment und das Vektorfragment wurden ligiert, wodurch das Konstrukt pIG270 erhalten wurde (**Fig. 15**).

E1-Sequenzen von Ad35 sind dazu fähig, primäre Rattenzellen zu transformieren

[0125] Neugeborene WAG/RIJ-Ratten wurden in der 1. Trächtigkeitswoche getötet, und die Nieren wurden isoliert. Nach sorgfältiger Entfernung der Kapsel wurden die Nieren durch mehrere Inkubationsrunden in Trypsin/EDTA (LTI) bei 37 °C und eine Isolierung von schwimmenden Zellen in kaltem, 1 % FBS enthaltenden PBS zu einer einzelligen Suspension zerkleinert. Wenn der Hauptteil der Niere mit Trypsin behandelt war, wurden alle Zellen in DMEM resuspendiert, das um 10 % FBS ergänzt war, und durch sterile Gaze filtriert. Von einer Niere erhaltene Baby-Rattennierenzellen wurden in 5 Schalen (Greiner, 6 cm) ausplattiert. Wenn eine Konfluenz von 70–80 % erreicht war, wurden die Zellen mit 1 oder 5 µg DNA/Schale transfiziert, wobei der CaPO₄-Ausfällungskit (LTI) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet wurde. Die folgenden Konstrukte wurden in getrennten Transfektionen verwendet: pIG.E1A.E1B (die Ad5-E1-Region exprimierend), pRSV.Ad35-E1, pIG.Ad35-E1 und pIG270 (wobei Letzteres die Ad35-E1 exprimiert). Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert, bis Herde von transformierten Zellen erschienen. In Tabelle IV ist die Anzahl von Herden aufgeführt, die aus mehreren Transfektionsexperimenten unter Verwendung von zirkularer oder linearer DNA resultierten. Wie erwartet transformierte die E1-Region von Ad5 BRK-Zellen effizient. Herde erschienen auch in der mit E1 von Ad35 transfizierten Zellschicht, wenngleich mit geringerer Effizienz. Die durch Ad35 transformierten Herde erschienen zu einem späteren Zeitpunkt: etwa 2 Wochen nach der Transfektion, verglichen mit 7–10 Tagen für Ad5-E1. Diese Experimente zeigen klar, dass die E1-Gene des B-Gruppenvirus Ad35 dazu fähig sind, primäre Nagerzellen zu transformieren. Dadurch werden die Funktionalität der Ad35-E1-Expressionskonstrukte bewiesen und früher Befunde der Transformationskapazität der B-Gruppen-Viren Ad3 und Ad7 bestätigt (Dijkema, 1979). Um zu testen, ob es die Zellen im Herd tatsächlich transformiert waren, wurden einige Herde abgeimpft und expandiert. Es stellte sich heraus, dass von den 7 abgeimpften Herden wenigstens 5 als etablierte Zelllinien wuchsen.

Erzeugung neuer, von primären humanen Amniozyten stammenden Verpackungszellen

[0126] Nach einer Amniozentese isolierte Amnionflüssigkeit wurde zentrifugiert, und Zellen wurden in AmnioMax-Medium (LTI) resuspendiert und in Gewebekulturkolben bei 37 °C und 10 % CO₂ kultiviert. Wenn Zellen gut wuchsen (etwa eine Zellteilung/24 h), wurde das Medium durch eine 1:1-Mischung des vollständigen AmnioMix-Mediums und DMEM-Medium mit niedrigem Glucosegehalt (LTI), das um Glutamax I (Endkonzentration 4 mM, LTI) und Glucose (Endkonzentration 4,5 g/l, LTI) und 10 % FBS (LTI) ergänzt war, ersetzt. Zur Transfizierung wurden $\sim 5 \times 10^5$ Zellen in Gewebekulturschalen von 10 cm ausplattiert. Am nächsten Tag wurden Zellen mit 20 µg zirkularem pIG270/Schale transfiziert, wobei der CaPO₄-Transfektionskit (LTI) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet wurde, und Zellen wurden über Nacht mit dem DNA-Präzipitat inkubiert. Am nächsten Tag wurden Zellen zur Entfernung des Präzipitats 4 Mal mit PBS gewaschen und für über drei Wochen weiter inkubiert, bis Herde aus transformierten Zellen erschienen. Ein Mal pro Woche wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt. Andere Transfektionsmittel wie, ohne darauf beschränkt zu sein, LipofectAmine (LTI) oder PEI (Polyethylenimin, hohe Molmasse, wasserfrei, Aldrich) wurden verwendet. Von diesen drei Mitteln erreichte PEI bei primären humanen Amniozyten die beste Transfektionseffizienz: ~ 1 % blaue Zellen in 48 h nach der Transfektion von pAdApt35.LacZ.

[0127] Herde werden wie folgt isoliert. Das Medium wird entfernt und durch PBS ersetzt, wonach Herde isoliert werden, indem die Zellen mittels einer 50-200-µl-Gilson-Pipette mit einer Einweg-Filterspitze vorsichtig abgekratzt werden. In 10 µl PBS enthaltene Zellen wurden in eine Platte mit 96 Näpfen überführt, die 15 µl Trypsin/EDTA (LTI) enthielt, und eine Einzellsuspension wurde durch Herauf- und Herunterpipettieren und eine kurze Inkubation bei Raumtemperatur erhalten. Nach der Zugabe von 200 µl der oben beschriebenen 1:1-Mischung aus komplettem AmnioMax-Medium und DMEM mit Ergänzungen und 10 % FBS wurden Zellen weiter inkubiert. Klone, die weiterwuchsen, wurden ausgestrichen, und ihre Fähigkeit zum Komplementieren des Wachstums von E1-deletierten adenoviralen Vektoren verschiedener Untergruppen, insbesondere denjenigen, die von Viren der B-Gruppe, insbesondere von Ad35 oder Ad11 stammen, wurde analysiert.

Bildung neuer Verpackungszelllinien aus HER-Zellen

[0128] HER-Zellen werden isoliert und in DMEM-Medium kultiviert, das um 10 % FBS (LTI) ergänzt war. Am Tag vor der Transfektion wurden $\sim 5 \times 10^5$ Zellen in 6-cm-Schalen ausplattiert und über Nacht bei 37 °C und 10 % CO₂ kultiviert. Die Transfektion erfolgt unter Verwendung des CaPO₄-Ausfällungskits (LTI) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Jede Schale wird 8–10 µg pIG270-DNA entweder als zirkuläres Plasmid oder als gereinigtes Fragment transfiziert. Zum Erhalt des gereinigten Fragments wurde pIG270 mit AvrII und XbaI aufgeschlossen, und das der Ad35-E1-Expressionskassette entsprechende Fragment mit 4 kb wurde durch Agarose-Behandlung (Roche) vom Gel isoliert. Am folgenden Tag wird das Präzipitat vorsichtig durch vier Wasch-

vorgänge mit sterilem PBS gewaschen. Dann wird frisches Medium zugegeben, und transfizierte Zellen werden weiter kultiviert, bis Herde von transformierten Zellen erscheinen. Wenn die Herde groß genug sind (>100 Zellen), werden sie abgeimpft und in die oben beschriebenen Platten mit 96 Näpfen überführt. Klone von transformierten humanen embryonalen Retinoblasten, die weiter wachsen, werden ausgestrichen und auf ihre Fähigkeit zur Komplementation des Wachstums von E1-deletierten adenoviralen Vektoren verschiedener Untergruppen, insbesondere denjenigen, die von Viren der Gruppe B, insbesondere von Ad35 oder Ad11, stammen, getestet.

Neue, von PER.C6 stammende Verpackungszelllinien

[0129] Gemäß der Beschreibung in Beispiel 5 ist es möglich, E1-deletierte Ad35-Viren mit einer Cotransfektion eines Ad35-E1-Expressionskonstrukts, z.B. pRSV.Ad35.E1, in PER.C6-Zellen zu erzeugen und zu ziehen. Eine im großen Maßstab erfolgende Erzeugung von rekombinanten Adenoviren unter Verwendung dieses Verfahrens ist aufwendig, weil für jeden Amplifizierungsschritt eine Transfektion des Ad35-E1-Konstrukts erforderlich ist. Dadurch wird bei diesem Verfahren die Gefahr einer nichthomologen Rekombination zwischen dem Plasmid und dem Virusgenom mit hohen Wahrscheinlichkeiten für die Bildung von rekombinanten, E1-Sequenzen umfassenden Viren erhöht, was zu replikationskompetenten Viren führt. Um dies zu vermeiden, muss die Expression von Ad35-E1-Proteinen in PER.C6 durch integrierte Kopien des Expressionsplasmids im Genom vermittelt werden. Weil PER.C6-Zellen bereits transformiert sind und Ad5-E1-Proteine exprimieren, kann eine Ergänzung um eine zusätzliche Expression von Ad35-E1 für die Zellen toxisch sein, wobei es jedoch nicht unmöglich ist, transformierte Zellen mit E1-Proteinen stabil zu transfizieren, weil Ad5-E1 exprimierende Ad549-Zellen erzeugt worden sind.

[0130] In einem Versuch, vom Virus 7 der Untergruppe B rekombinante Adenoviren zu erzeugen, waren Abrahamson et al. (1997) nicht in der Lage, in 293-Zellen E1-deletierte Viren ohne eine Kontamination von wt Ad7 zu erzeugen. Es zeigte sich, dass Viren, die nach einer Plattenreinigung in 293-ORF6-Zellen abgeimpft wurden (Brough et al., 1996), durch eine nicht homologe Rekombination eingearbeitete Ad7-E1B-Sequenzen enthielten. Somit erwies sich, dass eine effiziente Fortpflanzung von Ad7-rekombinanten Viren nur in Gegenwart einer Ad7-E1B-Expression und einer Ad5-E4-ORF6-Expression möglich war. Es ist bekannt, dass die E1B-Proteine sowohl mit zellulären als auch mit viralen Proteinen wechselwirken (Bridge et al., 1993; White, 1995). Möglicherweise ist der zwischen dem E1B-55K-Protein und E4-ORF6 gebildete Komplex, der zur Verstärkung des mRNA-Exports von viralen Proteinen und zur Hemmung des Exports der meisten zellulären mRNA erforderlich ist, kritisch und in gewisser Weise serotypenspezifisch. Das obige Experiment lässt vermuten, dass die E1A-Proteine von Ad5 dazu fähig sind, eine Ad7-E1A-Deletion zu komplementieren und dass eine Expression von Ad7-E1B in Adenovirus-Verpackungszellen an sich nicht ausreichend ist, um eine stabile, komplementierende Zelllinie zu erzeugen. Um zu testen, ob eines der Ad35-E1B-Proteine oder beide der einschränkende Faktor bei einer effizienten Fortpflanzung des Ad35-Vektors in PER.C6-Zellen ist bzw. sind, haben wir ein Ad35-Adapterplasmid erzeugt, das den E1B-Promotor und E1B-Sequenzen enthält, dem aber der Promotor und die kodierende Region für E1A fehlt. Dazu wurde das linke Ende von wtAd35-DNA mittels der Primer 35F1 und 35R4 (beide in Beispiel 7 beschrieben) mit Pwo-DNA-Polymerase (Roche) gemäß den Anweisungen des Herstellers amplifiziert. Das PCR-Produkt mit 4,6 kb wurde mittels des PCR-Reinigungskits (LTI) gereinigt und mit den Enzymen SnaBI und ApaI aufgeschlossen. Das resultierende Fragment von 4,2 kb wurde dann mittels des QIAExII-Kits (Qiagen) vom Gel gereinigt. Als Nächstes wurde pAdApt35IP1 (Beispiel 4) mit SnaBI und ApaI aufgeschlossen, und das den Vektor mit 2,6 kb enthaltende Fragment wurde mittels des GeneClean-Kits (BIO 101, Inc.) vom Gel gereinigt. Beide isolierten Fragmente wurden ligiert, wodurch pBr/Ad35.leftITR-pIX erhalten wurde (**Fig. 16**). Die richtige Amplifizierung während der PCR wurde wie folgt durch einen Funktionalitätstest verifiziert:

Die DNA wurde mit BstBI aufgeschlossen, um den Ad35-Insert von Vektorsequenzen zu befreien, und 4 µg dieser DNA wurden mit 4 µg pWE/Ad35.pIX-rITR (Beispiel 4), das mit NotI aufgeschlossen war, in PER.C6-Zellen cotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden am 2. Tag in T80-Kolben überführt, und wiederum zwei Tage später hatten sich CPE gebildet, wodurch gezeigt wird, dass die neue pBr/Ad35.leftITR-pIX-Konstruktion funktionelle E1-Sequenzen enthält. Das pBr/Ad35.leftITR-pIX-Konstrukt wurde dann wie folgt weiter modifiziert. Die DNA wurde mit SnaBI und HindIII aufgeschlossen, und der HindIII-Überhang am 5'-Ende wurde mittels des Klenow-Enzyms aufgefüllt. Die erneute Ligation der aufgeschlossenen DNA und die Transformation in kompetente Zellen (LTI) ergab den Konstrukt pBr/Ad35.leftITR-pIXΔE1A (**Fig. 17**). Dieses letztere Konstrukt enthält das linke Ende von Ad35 mit 4,6 kb mit Ausnahme der E1A-Sequenzen zwischen bp 450 und 1341 (Nummerierung gemäß wtAd35, **Fig. 5**), und somit fehlt ihr der E1A-Promotor und die meisten E1A-kodierenden Sequenzen. pBr/Ad35.leftITR-pIXΔE1A wurde dann mit BstBI aufgeschlossen, und 2 µg dieses Konstrukts wurden mit 6 µg pWE/Ad35.pIX-rITR (Beispiel 4), das mit NotI aufgeschlossen war, in PER.C6-Zellen cotransfiziert. Eine Woche nach der Transfektion hatten sich in den transfizierten Zellen vollständige CPE gebildet.

[0131] Dieses Experiment zeigt, dass die Ad35-E1A-Proteine durch eine Expression von Ad5-E1A in PER.C6 funktionell komplementiert werden und dass wenigstens eines der Ad35-E1B-Proteine durch eine Expression von Ad5-E1 in PER.C6 nicht komplementiert werden kann. Es zeigt weiterhin, dass es möglich ist, eine komplementierende Zelllinie für E1-deletierte Ad35-Viren herzustellen, indem Ad35-E1B-Proteine in PER.C6 exprimiert werden. Eine stabile Expression von Ad35-E1B-Sequenzen aus integrierten Kopien im Genom von PER.C6-Zellen kann vom E1B-Promotor angetrieben und von einem heterologen Polyadenylierungssignal wie, ohne darauf beschränkt zu sein, HBVpA, terminiert werden. Das heterologe pA-Signal ist erforderlich, um eine Überlappung zwischen dem E1B-Insert und dem rekombinanten Vektor zu verhindern, weil die natürliche E1B-Terminierung sich in der pIX-Transkriptionseinheit befindet, die im adenoviralen Vektor vorhanden sein muss. Alternativ kann die E1B-Sequenz von einem heterologen Promotor wie, ohne darauf beschränkt zu sein, den humanen PGK-Promotor oder von einem induzierbaren Promotor wie, ohne darauf beschränkt zu sein, den 7xtetO-Promotor (Gossen und Bujard, 1992) getrieben werden. Auch in diesen Fällen wird die Transkription durch eine heterologe pA-Sequenz, z.B. HBV-pA, vermittelt werden. Die Ad35-E1b-Sequenzen umfassen zumindest einen der kodierenden Bereiche der Proteine E1B 21K und E1B 55K, die sich zwischen den Nucleotiden 1611 und 3400 der wt-Ad35-Sequenz befinden. Der Insert kann auch (einen Teil der) Ad35-E1B-Sequenzen zwischen den Nucleotiden 1550 und 1611 der wt-Ad35-Sequenz einschließen.

Beispiel 7

[0132] Viren auf Ad35-Basis, bei denen die E1A- und E1B-21K-Gene deletiert wurden, vermehren sich effizient auf Ad5-komplementierenden Zelllinien.

[0133] Die Erzeugung von auf Ad35 basierenden Viren, bei denen E1A deletiert ist und der volle E1B-Bereich erhalten bleibt, ist in Beispiel 6 dieser Anmeldung beschrieben. Solche Viren können auf der Ad5-komplementierenden Zelllinie PER.C6 erzeugt und vermehrt werden. Der E1B-Bereich umfasst partiell überlappende codierende Sequenzen für die beiden Hauptproteine 21K und 55K (Bos et al., 1981). Während der produktiven wt-adenoviralen Infektion sind zwar sowohl 21K als auch 55K am Entgegenwirken der apoptoseinduzierenden Wirkungen von E1A-Proteinen beteiligt, doch wurde vorgeschlagen, dass das E1B-55K-Protein zusätzliche Funktionen während der späten Phase der Virusinfektion hat. Dazu gehören die Akkumulation von viralen mRNAs, die Steuerung der Expression von späten viralen Genen und das Ausschalten der meisten Wirts-mRNAs auf dem Niveau des mRNA-Transports (Babiss et al., 1984, 1985; Pilder et al., 1986). Ein zwischen E1B-55K und dem ORF6-Protein, das vom frühen Adenovirus-Bereich 4 codiert wird (Leppard und Shenk, 1989; Bridge und Ketner, 1990), gebildeter Komplex übt wenigstens einen Teil dieser Funktionen aus.

[0134] Um zu analysieren, welche der E1B-Proteine für die Vermehrung von Ad35-E1A-deletierten rekombinanten Viren auf PER.C6-Verpackungszellen erforderlich sind, wurde weiterhin der E1B-Bereich im Konstrukt pBr.Ad35.leftITR-pIXΔE1A (siehe Beispiel 6 und **Fig. 17**) deletiert. In einem ersten Konstrukt, pBr.Ad35Δ21K, bleibt die volle E1B-55K-Sequenz erhalten und sind E1A sowie E1B-21K deletiert. Dazu wurde pBr.Ad35.leftITR-pIXΔE1A mit NcoI und BspE1 verdaut, und das 5-kb-Vektorfragment wurde aus Agarose-Gel isoliert, wobei der GeneClean-Kit (BIO 101, Inc.) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet wurde. Dann wurde ein PCR-Fragment mit pBr.Ad35.leftITR-pIXΔE1A als Matrizen-DNA unter Verwendung der folgenden Primer erzeugt:

135D21: 5'-TTA GAT CCA TGG ATC CCG CAG ACT C-3' (SEQ ID Nr.) und

235B3: 5'-CCT CAG CCC CAT TTC CAG-3' (SEQ ID Nr.).

[0135] Eine Amplifikation erfolgte unter Verwendung von Pwo-DNA-Polymerase (Roche) gemäß den Empfehlungen des Herstellers unter Zugabe von DMSO (Endkonzentration 3%) in das Reaktionsgemisch. Das PCR-Programm war wie folgt: 2 min bei 94 °C, dann 30 Zyklen mit 30 s bei 94 °C, 30 s bei 58 °C und 45 s bei 72 °C und ein letzter Schritt von 8 min bei 68 °C, um glatte Enden zu gewährleisten.

[0136] Durch diese PCR werden Ad35-E1B-Sequenzen von Nucleotid 1908 bis 2528 (Sequenz Ad35, **Fig. 5**) amplifiziert und eine NcoI-Stelle am Startcodon des E1B-55K-codierenden Sequenz (halbfett im Primen 35D21) eingeführt. Das 620-bp-PCR-Fragment wurde unter Verwendung des PCR-Reinigungskits (Qiagen) gereinigt und dann mit NcoI und BspE1 verdaut, wie oben ausgehend von einem Agarose-Gel gereinigt und mit dem oben beschriebenen NcoI/BspE1-verdauten Vektorfragment ligiert, was pBr.Ad35Δ21K ergab (**Fig. 18**).

[0137] Da die codierenden Bereiche des 21K- und des 55K-Proteins überlappen, ist es nur möglich, einen Teil der 55K-codierenden Sequenzen zu deletieren, während 21K erhalten bleibt. Dazu wurde pBr.Ad35.leftITR-pIXΔE1A mit BglII verdaut, und das Vektorfragment wurde religiert, was pBr.Ad35Δ55K1 ergab (**Fig. 19**). Diese Deletion entfernt E1B-codierende Sequenzen von Nucleotid 2261 bis 3330 (Ad35-Sequenz in **Fig. 5**). In

diesem Konstrukt bleiben die N-terminalen 115 Aminosäuren erhalten und werden mit 21 zusätzlichen Aminosäuren aus dem richtigen Leseraster fusioniert, bevor ein Stopcodon auftritt. Der 21K-codierende Bereich ist im Konstrukt pBr.Ad35Δ55K1 intakt.

[0138] Ein drittes Konstrukt, das eine Deletion von E1A, 21K und des größten Teils der 55K-Sequenzen aufweist, wurde wie folgt erzeugt. pBr.Ad35.leftITR-pIX (**Fig. 16**) wurde mit SnaBI und MfeI (Isoschizomer von MnlI) verdaut, und der 5'-Überhang, der aus dem MfeI-Verdau resultiert, wurde mit Hilfe von Klenow-Enzym aufgefüllt. Das 4,4-kb-Vektorfragment wurde unter Verwendung des GeneClean-Kits (Bio 101, Inc.) gemäß den Anweisungen des Herstellers aus Gel isoliert und religiert, was das Konstrukt pBr.Ad35ΔSM ergab (**Fig. 20**). In diesem Konstrukt sind die Ad35-Sequenzen zwischen Nucleotid 453 und 2804 deletiert, und somit bleiben 596 Nucleotide des 3'-Endes von E1b-55K erhalten. Eine weitere Deletion von 55K-Sequenzen erfolgte im Konstrukt pBr.Ad35.ΔE1AΔE1B durch Verdau von pBr.Ad35.leftITR-pIX mit SnaBI und BglII, Klenow-Fragment zum Auffüllen der klebrigen BglII-Enden und Religierung. **Fig. 21** zeigt eine schematische Darstellung der oben genannten Konstrukte.

[0139] Um zu testen, ob mit diesen Konstrukten Ad35-basierte Viren erzeugt werden können, wurde jedes dieser Konstrukte mit NotI-verdautem pWE.Ad35pIX-rITR (siehe Beispiel 4) auf PER.C6-Zellen cotransfiziert. Dazu wurden die jeweiligen Fragmente durch PCR unter Verwendung der Primer 35F1 und 35R4 (siehe Beispiel 4) amplifiziert. Diese PCR-Amplifikation wurde durchgeführt, da einige der Konstrukte schwierig in ausreichenden Mengen zu isolieren waren. So wurde eine gleiche Qualität der verschiedenen Adapterfragmente gewährleistet. Für die Amplifikation wurde Pwo-DNA-Polymerase (Roche) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet, wobei aber DMSO (3% Endkonzentration) zu dem PCR-Gemisch gegeben wird. Von jeder Matrize wurden ca. 50 ng DNA verwendet. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: 2 min bei 94 °C, dann 5 Zyklen mit 30 s bei 94 °C, 45 s bei 48 °C und 4 min bei 72 °C, danach 25 Zyklen mit 30 s bei 94 °C, 30 s bei 60 °C und 4 min bei 72 °C, und ein letzter Schritt von 8 min bei 68 °C.

[0140] PCR-Fragmente wurden aus pBr.Ad35.leftITR-pIX, pBr.Ad35.leftITR-pIXΔE1A, pBr.Ad35Δ21K, pBr.Ad35Δ55K1, pBr.Ad35ΔSM und pBr.Ad35ΔE1AΔE1B erzeugt. Alle Fragmente wurden unter Verwendung des PCR-Reinigungskits (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers erhalten, und die Endkonzentrationen wurden auf mit EtBr angefärbtem Agarose-Gel unter Verwendung des Systems Eagle Eye II Still Video und EagleSight-Software (Stratagene) mit dem Smart-Ladder-Molekulargewichtsmarker (Eurogentec) als Referenz abgeschätzt. PER.C6-Zellen wurden in einer Dichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen in einem T25-Kulturkolben in DMEM, das 10% fetales Kälberserum (FCS) und 10 mM MgSO₄ enthielt, ausgesät und in einem feuchtgehaltenen Inkubator bei 37 °C, 10% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurden jeweils 3 mg der PCR-Fragmente mit 5 µg NotI-verdautem pWE.Ad35pIX-rITR cotransfiziert, wobei man LipofectAmine (GIBCO, Life Technologies Inc.) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendete. Zwei Tage nach der Transfektion wurden alle Zellen in einen T80-Kolben übergeführt und weiter kultiviert. Dann wurden die Kulturen bezüglich des Auftretens von CPE überwacht. Im Einklang mit dem Ergebnis früherer Experimente, die in den Beispielen 4 und 6 beschrieben sind, zeigten pBr.Ad35.leftITRpIX und pBr.Ad35.leftITR-pIXΔE1A innerhalb einer Woche nach der Transfektion eine fast vollständige CPE. Von den Fragmenten mit verschiedenen E1B-Deletionen zeigten nur pBr.Ad35Δ21K zu demselben Zeitpunkt eine CPE wie die obigen beiden Fragmente. Die Konstrukte pBr.Ad35Δ55K1, pBr.Ad35ΔSM und pBr.Ad35ΔE1AΔE1B ergaben überhaupt keine CPE, auch nicht nach dem Ernten durch Frieren-Tauen und Reinfektion des rohen Lysats auf frischen PER.C6-Zellen.

[0141] Aus diesen Experimenten kann geschlossen werden, dass Ad35-E1B-55K und nicht E1B-21K für die Erzeugung und Vermehrung von Viren auf Ad35-Basis auf Ad5-komplementierenden Zelllinien notwendig ist. Daher können Viren auf Ad35-Basis mit einer Deletion der E1A- und E1B-21K-Gene, die das E1B-55K-Gen oder ein funktionelles Fragment davon aufweisen, auf Ad5-komplementierenden Zelllinien gezüchtet werden. Alternativ dazu können Viren auf Ad35-Basis auch auf PER.C6-Zellen gezüchtet werden, die den vollen E1B-Bereich oder das E1B-55K-Gen oder ein funktionelles Fragment davon stabil exprimieren. Das Ad35-E1B-55K-Gen oder funktionelle Teile davon können ausgehend von einem heterologen Promotor, wie unter anderem dem humanen PGK-Promotor, dem Immediate-Early-Promotor des humanen Cytomegalievirus (CMV), dem Rous-Sarkom-Virus-Promotor usw., exprimiert und von einer heterologen Polyadenylierungssequenz (pA), wie unter anderem der Hepatitis-B-Virus-Polyadenylierungssequenz (HBVpA), der Simian-Virus-40-Polyadenylierungssequenz (SV40pA) usw., terminiert werden. Als nichteinschränkende Beispiele sind im Folgenden PER.C6-Zellen, die den Ad35-E1B-Bereich unter der Kontrolle des E1B-Promotors und HBVpA exprimieren, PER.C6-Zellen, die den Ad35-E1B-Bereich unter der Kontrolle des humanen PGK-Promotors und HBVpA exprimieren, und PER.C6-Zellen, die ein funktionelles Fragment von Ad35-E1B-55K unter der Kontrolle des humanen PGK-Promotors und HBVpA exprimieren, beschrieben.

Erzeugung von pIG35BL und pIG35BS

[0142] Wir beschreiben die Erzeugung von zwei Expressionskonstrukten, pIG.35BS und pIG.35BL, die beide die Ad35-E1B-Gene und einen Neomycin-Selektionsmarker tragen. Die beiden Konstrukte unterscheiden sich in der Länge des Fragments, das den E1B-Promotor enthält. In 35BL ist das Promotorfragment länger und beinhaltet das 3'-Ende des E1A-Bereichs (103 Nucleotide codierende Sequenz und pA). Der E1B-Bereich wird durch HBVPolyA terminiert, das *neo^r*-Gen wird durch eine hPGK-Promotor/HBVpA-Cassette gesteuert.

[0143] pIG.35BL wurde wie folgt hergestellt. Das Konstrukt pRSV.Ad35E1 (beschrieben in Beispiel 5, **Fig. 9**) wurde mit NruI und HindIII verdaut, und die vorstehenden Enden wurden durch Klenow-Behandlung aufgefüllt. Das 7-kb-Vektorfragment wurde auf Gel von den kleineren Fragmenten abgetrennt und mit Hilfe des GeneClean-Kits (BIO 101, Inc.) isoliert. Nach der Religierung der DNA und Einführung in kompetente STBL2-Zellen (Gibco, LTI) durch Transformation wurden korrekte Klone isoliert. pIG.35BL (**Fig. 22**) enthält 273 Nucleotide stromaufwärts der Startstelle des E1B-21K-codierenden Bereichs.

[0144] pIG.35BS wurde in derselben Weise wie pIG.35BL hergestellt, außer dass pRSV.Ad35R1 mit NruI und HpaI verdaut wurde (bei den Enzymen lassen glatte Enden zurück), was zu einem kürzeren Fragment stromaufwärts des codierenden Bereichs von E1B-21K von 97 Nucleotiden führt.

[0145] Um Ad35-E1B-exprimierende Zellen zu erzeugen, wurden PER.C6-Zellen in 10-cm-Schalen in einer Menge von 1×10^6 Zellen/Schale ausgesät. Zwei Tage später wurden die Zellen mit Scal-linearisierten Konstrukten transfiziert. Vier Schalen wurden mit 1 und vier mit 2 µg DNA (insgesamt 16 Schalen; Lipofectamin (Gibco, LTI) keine Träger-DNA verwendet) gemäß den Anweisungen des Herstellers transfiziert. Am nächsten Tag erhielten die transfizierten Zellen G418-haltiges Medium (0,75 mg/ml). Kontrolltransfektionen unter Verwendung von LacZ-Expressionskonstrukten (2 µg) wurden nach 48 h angefärbt und zeigten eine Transfektionseffizienz von ~25%. Vier Tage nach der Addition von Selektionsmedium begannen nicht transfizierte Zellen abzusterben, und wiederum drei Tage später wurden Klone sichtbar. Eine Woche später wurden die ersten Klone herausgesucht. Die Transfektion mit 1 µg führte zu weniger und auch anfangs kleineren Klonen (insgesamt ~20 Klone/Schale gegenüber > 50 Klone/Schale bei der Transfektion mit 2 µg DNA). Die positive Kontrolltransfektion unter Verwendung von 2 µg pcDNA3 (Invitrogen) führte zu ~50 Klonen.

[0146] Insgesamt wurden 120 Klone herausgesucht, und 107 wurden erfolgreich etabliert (55 aus pIG35BS und 52 aus pIG35BL).

Erzeugung von pIG35Bneo

[0147] pIG35Bneo ist ein Ad35-E1B-Expressionsplasmid, aus dem heraus die E1B-Gene ausgehend von einem heterologen Promotor (hPGK) exprimiert werden und das auch eine Neomycin-Resistenz-Expressions-cassette enthält. Um eine Instabilität des Plasmids aufgrund von Rekombinationsereignissen auf homologe Sequenzen zu vermeiden, steuert der RSV-Promotor das *neo^r*-Gen. Um dies zu erreichen, wurde das Konstrukt pRSVhbv.Neo (beschrieben in Beispiel 5, **Fig. 12**) mit Scal und BamHI verdaut, und die vorstehenden Enden wurden unter Verwendung von Klenow-Enzym aufgefüllt. Das 1070-bp-Fragment, das einen Teil des Ampicillin-Gens und den RSV-Promotor enthält, wurde unter Verwendung des GeneClean-Kits (BIO 101, Inc.) aus Gel isoliert. Dann wurde pRSVhbvNeo mit Scal und EcoRI verdaut, mit Klenow-Enzym glatt gemacht, und das 3,2-kb-Fragment, das das *neo*-Gen, HBVpA, einen Vektor und einen Teil des Ampicillin-Gens enthält, wurde wie oben isoliert. Die zwei Fragmente wurden dann ligiert, was pRSVneo4 ergab (**Fig. 23**). Dann wurde das Konstrukt pIG270 (**Fig. 15**, beschrieben in Beispiel 6) mit EcoRI und NcoI verdaut, und klebrige Enden wurden mit Klenow-Enzym glatt gemacht. Das vektorhaltige Fragment wurde aus dem Gel isoliert, wie es oben beschrieben ist, und religiert, was pIG270delE1A ergab. Dieses Konstrukt wurde mit AvrII und XbaI verdaut, und die vorstehenden Enden wurden mit Hilfe von Klenow-Enzym aufgefüllt. Das 2,9-kb-Fragment, das den hPGK-Promotor und Ad35.E1B-Sequenzen enthielt, wurde wie oben aus dem Gel isoliert. Dann wurde pRSVneo4 mit BglII verdaut, mit Klenow-Enzym glatt gemacht, dephosphoryliert und aus dem Gel isoliert. Dann wurde das glatt gemachte AvrII/XbaI-Ad35.E1B-Fragment mit dem oben hergestellten pRSVneo4-Vektorfragment ligiert, und die resultierenden Klone wurden analysiert. Ein Klon, der beide Expressionscassetten in derselben Orientierung enthielt, wurde ausgewählt und pIG35Bneo genannt (**Fig. 24**). Eine detaillierte Analyse dieses Klons zeigte, dass eine zusätzliche BglII-Stelle vorhanden war, wahrscheinlich aufgrund einer unvollständigen Klenow-Reaktion (BglII-Stelle bei Nucleotid 2949 in **Fig. 24**).

Erzeugung von pIG35.55K

[0148] Das Konstrukt pIG35.55K ist pIG35Bneo ähnlich, doch fehlt ihm der codierende Bereich von Ad35.E1B-21K. Dazu werden zuerst sowohl die E1A- als auch die E1B-21K-Sequenzen wie folgt aus pIG270 deletiert:

Das Konstrukt pIG270 wird mit EcoRI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und unter Verwendung eines PCR-Reinigungskits (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers gereinigt. Dann wird die gewonnene DNA mit Agel verdaut, und das ~5 kb große Vektorfragment wurde wie oben aus dem Gel isoliert. Dann wurden Ad35-E1B-55K-Sequenzen durch PCR auf pIG270-Matrizen-DNA unter Verwendung der folgenden Primer amplifiziert:

535D21: 5'-FTA GAT CCA TGG ATC CCG CAG ACT C-3' (SEQ ID Nr.) und

635B3: 5'-CCT CAG CCC CAT TTC CAG-3' (SEQ ID Nr.).

[0149] Die für die Amplifikation verwendeten Bedingungen sind wie oben beschrieben. Das PCR-Fragment wird unter Verwendung des PCR-Reinigungskits (Qiagen) gereinigt und mit NcoI verdaut. Nach einer Klenow-Behandlung zum Auffüllen der vorstehenden Enden wird die DNA weiter mit Agel verdaut und wiederum einer Säulenreinigung unterzogen. Das so behandelte PCR-Fragment wird dann in das oben hergestellte EcoRI/Agel-verdaute Vektorfragment kloniert, was pIG270.ΔE1AΔ21K ergab. Die letzten Schritte, um pIG35.55K (**Fig. 25**) zu erhalten, sind äquivalent zu den oben beschriebenen letzten Schritten zur Erzeugung von pIG35Bneo ausgehend von pIG270.ΔE1AΔ21K anstelle von pIG270.ΔE1A.

[0150] Dann wird pIG35.55K mit Scal linearisiert und verwendet, um PER.C6-Zellen zu transfizieren, wie es oben beschrieben ist. Klone, die gegen G418-Selektion resistent sind, werden herausgesucht und auf ihre Fähigkeit analysiert, die Vermehrung von E1-deletierten Ad35-Viren zu komplementieren.

Beispiel 8

[0151] Neue Verpackungszelllinien für die Erzeugung und Vermehrung von E1-deletierten Vektoren auf Ad35-Basis, die von primären humanen Zellen abgeleitet sind

[0152] Die vollständige morphologische Transformation von primären Zellen durch Adenovirus-E1-Gene ist das Ergebnis der kombinierten Aktivitäten der Proteine, die von den E1A- und E1B-Bereichen codiert werden. Die Rollen der verschiedenen E1-Proteine bei der lytischen Infektion und bei der Transformation wurden ausführlich untersucht (Übersicht bei Zantema und van der Eb, 1995; White, 1995, 1996). Die Adenovirus-E1A-Proteine sind für die Transformation von primären Zellen wesentlich. Die E1A-Proteine üben diese Wirkung durch eine direkte Wechselwirkung mit mehreren zellulären Proteinen aus, die an der Regulation der Transcription beteiligt sind. Dazu gehören die pRB-Proteinfamilie, p300/CBP und TATA-Bindungsprotein. Außerdem erhöht E1A die Konzentration an p53 in den Zellen. In Abwesenheit von Adenovirus-E1B-Aktivität führt der Anstieg der p53-Konzentrationen zur Induktion von Apoptose. Beide Proteine, die vom E1B-Bereich codiert werden, wirken durch verschiedene Mechanismen der Induktion von Apoptose entgegen. E1B-21K scheint der Apoptose in ähnlicher Weise wie Bcl-2 über eine Wechselwirkung mit den Effektorproteinen, die im Apoptoseweg nachgeschaltet sind, entgegenzuwirken (Han et al., 1996), während E1B-55K über eine direkte Wechselwirkung mit p53 funktioniert. Es ist wichtig, dass der molekulare Mechanismus, durch den die E1B-55K-Proteine von Ad2 und 5 (Untergruppe C) und Ad12 (Untergruppe A) in der Fähigkeit, p53 zu neutralisieren, funktionieren, unterschiedlich sein kann. Während Ad5-E1B-55K stark an p53 bindet und der Komplex sich im Cytoplasma lokalisiert, bindet Ad12-E1B-55K nur schwach an p53, und beide Proteine sind im Zellkern lokalisiert (Zantema et al., 1985; Grand et al., 1999). Beide Proteine hemmen jedoch die Transaktivierung anderer Gene durch p53 (Yew und Berk, 1992).

[0153] In Nagerzellen ist die Aktivität von E1A zusammen mit entweder E1B-21K oder 55K für eine volle Transformation ausreichend, obwohl die Expression beider E1B-Proteine zusammen doppelt so effizient ist (Rao et al., 1992). Bei menschlichen Zellen jedoch scheint die Aktivität des E1B-55K-Proteins wichtiger zu sein, da man beobachtet, dass E1B-55K für die Etablierung von transformierten Zellen unverzichtbar ist (Galimore, 1986). Beispiel 6 dieses Patents beschreibt die Bildung von pIG270. In diesem Konstrukt werden die Ad35-E1-Gene ausgehend vom hPGK-Promotor exprimiert, und die Transcription wird durch HBVpA abgebrochen. Der hPGK-Promotor bildet ein HincII-EcoRI-Fragment der von Singer-Sam et al. (1984) beschriebenen Promotorsequenz. Das HBVpA befindet sich in einem BamHI-BglII-Fragment des Hepatitis-B-Virus-Genoms (Simonsen und Levinson, 1983; siehe auch Genbank HBV-AF090841). Wie bereits erwähnt, können die Promotor- und Polyadenylierungssequenzen der in dieser Erfindung beschriebenen E1-Expressionskonstrukte auch aus anderen Quellen stammen, ohne von der Erfindung abzuweichen. Außerdem können auch andere

funktionelle Fragmente der oben erwähnten hPGK- und HBVpA-Sequenzen verwendet werden.

[0154] Die Funktionalität von pIG270 wurde durch Transformation von primären Babyratten-Nierenzellen (BRK-Zellen) gezeigt. Ein Vergleich mit einem äquivalenten Ad5-E1-Expressionskonstrukt lehrte, dass Ad35-E1-Gene bei der Transformation dieser Zellen weniger effizient sind. Dasselbe zeigte sich bei den E1-Genen von Ad12 (Bernards et al., 1982).

[0155] Es ist unklar, welches oder welche E1-Proteine den Unterschied in der Transformationseffizienz von E1-Sequenzen bestimmt, den man bei Adenoviren aus verschiedenen Untergruppen beobachtet. Im Falle von Ad12 ließen Transfektionsstudien mit chimärischen E1A/E1B-Genen vermuten, dass die Effizienz der Transformation von BRK-Zellen durch die E1A-Proteine bestimmt wird (Bernards et al., 1982). Im Folgenden wird gezeigt, dass das E1B-55K-Protein serotypspezifische Funktionen enthält, die für die Komplementierung von E1-deletierten Adenoviren notwendig sind. Wenn diese Funktionen mit der Regulation der mRNA-Verteilung oder einer anderen späten viralen Funktion zusammenhängen, ist es unwahrscheinlich, dass diese an der Transformationseffizienz beteiligt sind.

[0156] Eine Analyse der funktionellen Domänen in den Ad2- oder Ad5-E1B-55K-Proteinen unter Verwendung von Insertionsmutanten hat gezeigt, dass Funktionen, die mit der viralen Replikation, späten Proteinsynthese und dem Ausschalten von Wirtsproteinen zusammenhängen, nicht auf spezifische Domänen beschränkt, sondern entlang dem Protein verteilt sind (Yew et al., 1990). Unter Verwendung derselben Gruppe von Mutanten zeigte sich, dass die für die Wechselwirkung mit p53 und E4-Orf6 wichtigen Domänen restringierter sind. Neben einem gemeinsamen Bindungsbereich (Aminosäuren 262 bis 326) wurde die p53-Bindung durch die Mutationen bei Aminosäure 180 beeinflusst, und die E4-Orf6-Bindung wurde durch Mutationen bei Aminosäure 143 beeinflusst (Yew und Berk, 1992; Rubenwolf et al., 1997).

[0157] Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass es schwierig ist, die mit der Transformation (p53-Bindung) und der späten Proteinsynthese (Orf6-Bindung) zusammenhängenden E1B-55K-Funktionen zu trennen.

[0158] Die Erfindung offenbart neue E1-Konstrukte, die die hohe Effizienz der Transformation von einem Serotyp mit der serotypspezifischen Komplementierungsfunktion eines anderen Serotyps kombiniert. Diese neuen Konstrukte werden verwendet, um primäre humane embryonische Retinoblastenzellen und humane Amnocyten zu transformieren.

Die Erzeugung von pIG535, pIG635 und pIG735

[0159] Das Konstrukt pIG535 enthält den Ad5-E1A-Bereich und E1B-Promotorsequenzen, die mit den Ad35-E1B-Sequenzen verknüpft sind. Dazu wurde pIG270 (**Fig. 15**; siehe Beispiel 6) mit EcoRI und NcoI verdaut. Dann wurde das 5,3-kb-Vektorfragment aus Gel isoliert, wobei der GeneClean-Kit (BIO Inc. 101) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet wurde. Dann wurde das Konstrukt pIG.E1A.E1B (**Fig. 13**; siehe Beispiel 6) mit EcoRI und XbaI verdaut, und das resultierende 890-kb-Fragment wurde wie oben isoliert. Ein drittes Fragment wurde durch PCR-Amplifikation auf pIG.E1A.E1B unter Verwendung der folgenden Primer erzeugt:

15E1A-F: 5'-GAG ACG CCC GAC ATC ACC TG-3' (SEQ ID Nr.) und
25E1B-R: 5'-CAA GCC TCC ATG GGG TCA GAT GTA AC-3' (SEQ ID Nr.).

[0160] Das folgende PCR-Programm wurde verwendet: 2 min bei 94 °C, dann 30 Zyklen mit 30 s bei 94 °C, 30 s bei 60 °C und 1 min bei 72 °C und ein letzter Schritt von 10 min bei 72 °C, um glatte Enden zu gewährleisten.

[0161] Das resultierende 400-bp-PCR-Fragment wurde mit XbaI und NcoI verdaut. Nach der Gelisolierung wie oben wurden die drei Fragmente ligiert und durch Transformation in STBL-2-Bakterien eingeführt. Eine Kolonie, die alle drei Fragmente in der richtigen Reihenfolge enthielt, wurde ausgewählt und als pIG535 bezeichnet (**Fig. 26**).

[0162] Das Konstrukt pIG635 enthält den Ad5-E1A- und einen chimärischen Ad5-Ad35-E1B-Bereich, so dass die 21K-Sequenz im Wesentlichen aus Ad5 stammt und mit den Ad35-E1B-55K-Sequenzen verknüpft ist, solange sie nicht mit den 21K-Sequenzen überlappt. Zuerst wird ein Teil der Ad5-E1-Sequenzen durch PCR amplifiziert, wobei man pIG.E1A.E1B als Matrize und die folgenden Primer verwendet:
45AK: 5'-GAG CGA AGA AAC CCA TCT GAG-3' (SEQ ID Nr.) und

52155R: 5'-GGT CCA GGC CGG CTC TCG G-3' (SEQ ID Nr. _).

[0163] Die Amplifikation wird mit Pwo-DNA-Polymerase (Roche) gemäß den Anweisungen des Herstellers erreicht. Dann werden die 210-bp-Fragmente unter Verwendung des PCR-Reinigungskits (Qiagen) aus den Primersequenzen gereinigt.

[0164] Ein zweites PCR-Fragment wird aus pIG270-DNA amplifiziert, wie es oben beschrieben ist, aber mit den folgenden Primern:

62155F: 5'-CCG AGA GCC GGC CTG GAC-3' (SEQ ID Nr. _) und

735F10: 5'-GCT CTA GAC CTG CAG GTT AGT CAG TTT CTT CTC CAC TG-3' (SEQ ID Nr. _).

[0165] Das amplifizierte 1,3-kb-Fragment wird wie oben gereinigt und in einem Stoffmengenverhältnis von 1:1 mit dem ersten PCR-Fragment gemischt. Dann wird das Gemisch zuerst einer PCR-Reaktion ohne die Zugabe von Primern unterzogen, wobei Pwo-DNA-Polymerase und das folgende Programm verwendet wurden: 2 min bei 94 °C und dann 5 Zyklen von 30 s bei 94 °C, 30 s bei 60 °C, 90 s bei 72 °C. Anschließend werden die Primer 5AK und 35F10 in einer Konzentration von 0,6 µM hinzugefügt, und danach wird mit einer letzten PCR ein 1,5-kb-Fragment amplifiziert. Dazu wurde die Temperatur wie folgt eingestellt: 2 min bei 94 °C, dann 30 Zyklen mit 30 s bei 94 °C, 30 s bei 60 °C und 90 s bei 72 °C, dann ein letzter Schritt von 10 min bei 72 °C, um glatte Enden zu gewährleisten. Das resultierende Produkt wird unter Verwendung des PCR-Reinigungskits (Qiagen) wie oben gereinigt und mit KpnI und SbfI (Isoschizomer von Sse8387I) verdaut. Dann wird die verdaute DNA unter Verwendung des GeneClean-Kits (BIO Inc., 101) aus dem Gel isoliert. Das Konstrukt pIG.E1A.E1B wird mit KpnI und SbfI verdaut, und das vektorhaltige Fragment wird wie oben aus dem Gel isoliert. Das Fragment wird mit dem oben hergestellten endgültigen PCR-Produkt ligiert, und das Ligierungsgemisch wird durch Transformation (Gibco, LTI) gemäß den Anweisungen des Herstellers in STBL-2-Zellen eingeführt. Dies ergibt das Konstrukt pIG635 (**Fig. 27**).

[0166] Im Konstrukt pIG735 befindet sich die Grenze zwischen von Ad5 abgeleiteten Sequenzen und von Ad35 abgeleiteten Sequenzen weiter in Richtung 3' als bei dem Konstrukt pIG635. Zuerst wird eine BspEI-Stelle in die Ad5-Sequenz des Konstrukts pIG.E1A.E1B eingeführt, ohne die Aminosäuresequenz zu ändern. Dazu werden Ad5-Sequenzen aus pIG.E1A.E1B amplifiziert, wobei man die folgenden PCR-Primer verwendete: 5AK: siehe oben und Bsp-R: 5'-GCT CTA GAC CTG CAG GGT AGC AAC AAT TCC GGA TAT TTA CAA G-3' (SEQ ID Nr. _). Die Amplifikation wird unter Verwendung von Pwo-DNA-Polymerase (Roche) gemäß den Anweisungen des Herstellers erreicht. Das folgende PCR-Programm wird verwendet: 2 min bei 94 °C, dann 30 Zyklen mit 30 s bei 94 °C, 30 s bei 60 °C und 30 s bei 72 °C und ein letzter Schritt von 10 min bei 72 °C, um glatte Enden zu gewährleisten. Das resultierende 0,6-kb-Fragment wird wie oben gereinigt und mit KpnI und SbfI verdaut und mit dem oben geschriebenen, mit KpnI/SbfI verdauten pIG.E1A.E1B-Vektorfragment ligiert. Die Auswahl von Kolonien nach der Transformation von STBL-2-Bakterien (Life Techn. Inc.) ergibt das Konstrukt pIG.E1Δ55K. Dann wird pIG.E1Δ55K mit SbfI und partiell mit BspEI verdaut. Dann wird das 6,4 kb große, mit SbfI und partiell mit BspEI verdaute Vektorfragment mit Hilfe des GeneClean-Kits (BIO 101, Inc.) aus dem Gel isoliert. Dann wird pIG270 mit BspEI und SbfI verdaut, und das resultierende 915-bp-Fragment wird wie oben aus dem Gel isoliert. Dieses Fragment wird dann mit dem oben hergestellten, mit SbfI und partiell mit BspEI verdauten pIG.E1Δ55K-Vektorfragment ligiert und durch Transformation in kompetente STBL-2-Zellen eingeführt. Dies ergibt das Konstrukt pIG735 (**Fig. 28**). Die Klone werden durch Restriktionsenzymverdau und Sequenzieren analysiert, um die korrekte Ligierung der Fragmente zu gewährleisten. Die Konstrukte pIG535, pIG635 und pIG735 können verwendet werden, um komplementierende Zelllinien aus primären humanen Zellen zu erzeugen, wie es in Beispiel 6 beschrieben ist.

Beispiel 9

Auf PER.C6 basierende komplementierende Zelllinien für E1-deletierte Ad35-Viren

[0167] PER.C6-Zellen wurden in 10-cm-Kulturschalen in einer Dichte von 3×10^6 Zellen/Schale in DMEM (Gibco BRL) ausgesät, das bis zu 10% mit FBS (Gibco BRL) und 10 mM MgCl₂ (4,9 M Stammlösung, Sigma) ergänzt war. Zwei Tage später wurden 9 Schalen mit 1 µg Scal-linearisierter pIG35.55K-DNA (siehe Beispiel 7) transfiziert, und 9 Schalen wurden mit 1,5 µg Scal-linearisierter pIG35.55K-DNA transfiziert. Getrennte Kontrollschalen wurden mit 1 oder 1,5 µg Scal-linearisiertem pAdApt35.LacZ zur Überwachung der Transfektionseffizienz und mit 1 oder 1,5 µg Scal-linearisiertem pcDNA.nlsLacZ linearisiert. pcDNA.nlsLacZ ist ein auf pcDNA3 basierendes Plasmid (invitrogen) mit dem nlsLacZ-Gen (Bonnerot et al., 1987), das vom CMV-Promotor gesteuert wird. pcDNA.nlsLacZ enthält auch eine neo^r-Expressions cassette. Als negative Kontrolle wurde eine zusätzliche Schale mit linearisiertem pAdApt35.LacZ transfiziert, einem Konstrukt, dem das neo^r-Se-

lektionen fehlt. Alle Transfektionen wurden mit dem LipofectAmin-Transfektionskit (Invitrogen/Life Technologies) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt, wobei 5 ml LipofectAmin-Reagens/ μg DNA verwendet wurden. Die Zellen wurden 4 h lang mit dem Transfektionsgemisch inkubiert, und danach wurde das Medium durch PER.C6-Kulturmedium ersetzt. Am nächsten Tag wurde das Medium durch Kulturmedium, das 0,5 mg/ml G418 (Gibco BRL) enthält, ersetzt, außer bei den beiden Schalen, die mit 1 bzw. 1,5 μg pAdApt35.LacZ transfiziert wurden. Die letzteren Schalen wurden verwendet, um die LacZ-Expression zwei Tage nach der Transfektion zu überwachen. Nach der Anfärbung dieser Kulturen mit X-gal wurde die Transfektionseffizienz auf ungefähr 40% geschätzt, wobei in der mit 1,5 μg DNA transfizierten Schale etwas mehr blaue Zellen waren. Das Selektionsmedium wurde in den übrigen transfizierten Schalen zweimal pro Woche erneuert. Innerhalb von zwei Wochen nach der ersten Zugabe von Selektionsmedium waren die meisten Zellen in der negativen Kontrollschale (transfiziert mit 1,5 μg pAdApt35.LacZ) tot. In den Schalen, die mit pcDNA.nls-LacZ transfiziert waren, wurden Zellklone sichtbar. Da die mit pIG35.55K transfizierten Zellen resistenter gegen G418 zu sein schienen, wurde die Konzentration 3 Wochen nach der Transfektion auf 0,75 mg/ml erhöht. Drei Tage bzw. sieben Tage später wurden insgesamt 196 Zellklone aus den mit pIG35.55K transfizierten Schalen herausgesucht und in getrennten Näpfen von 96-Napf-Platten ausgesät.

[0168] Zellen, die nach dem Heraussuchen von Kolonien aus zwei 10-cm-Schalen der Transfektion mit 1 μg pIG35.55K-DNA übrig blieben, wurden trypsinisiert, vereinigt und expandiert, was den Pool PER55K(1.0) ergab. Dasselbe wurde mit zwei Schalen der 1,5- μg -Transfektion durchgeführt. Der PER55K(1.0)-Zellpool wurde expandiert und für die Transfektion zum Testen der Viruserzeugung in vier T25-Kolben in einer Dichte von $3,5 \times 10^6$ Zellen/Kolben ausgesät. Außerdem wurden drei T25-Kolben mit parental PER.C6-Zellen mit derselben Dichte ausgesät. pAdApt35.eGFP (ein Adapterplasmid, das das grüne fluoreszente Protein als Marker-Gen enthält; siehe Beispiel 4) wurde mit PaeI verdaut, um die adenoviralen Sequenzen aus dem Plasmidgerüst freizusetzen. pWE.Ad35.pIXrITS (siehe Beispiel 4) wurde mit NotI verdaut, um die adenoviralen Sequenzen aus dem Cosmid-Rückgrat freizusetzen. Zwei Kolben mit PER.C6-Zellen und zwei Kolben mit PER55K(1.0)-Zellen wurden jeweils mit 2 μg verdautem pAdApt35.eGFP und 6 μg verdautem pWE.Ad35.pIX-rITR transfiziert. Ein Kolben von jeder Zelllinie wurde mit 8 μg pAdApt35.LacZ transfiziert, um die Transfektionseffizienz zu überwachen. Der verbleibende Kolben mit PER55K(1.0)-Zellen diente als negative Kontrolle und wurde wie die anderen behandelt, erhielt jedoch nicht das Transfektionsgemisch. Alle Transfektionen wurden mit LipofectAmin (Invitrogen/Life Techn.) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt, wobei man für jede Transfektion insgesamt 8 μg DNA und 40 μl LipofectAmin-Reagens verwendete. Das Transfektionsgemisch wurde nach 4 h Inkubation entfernt, und frisches Kulturmedium wurde hinzugefügt. Transfektionen wurden am Tag nach dem Aussäen der Zellen durchgeführt, und wiederum zwei Tage später wurden die Zellen in den T25-Kolben in einen T80-Kolben übergeführt, abgesehen von den LacZ-Kontrolltransfektionen. Diese wurden nach einer milden Fixierung mit X-gal-Lösung angefärbt. Nach fünf Stunden Inkubation mit Anfärbungslösung wurde der Prozentsatz an blauen Zellen in beiden Kolben auf ungefähr 90% geschätzt, was zeigte, dass die Transfektion für beide Zelllinien gut verlief. Vier Tage nach der Passage auf die T80-Kolben zeigten die transfizierten PER55K(1.0)-Kulturen beginnende CPE (cytopathogene Wirkung, was eine Virusreplikation anzeigt) mit ungefähr 100 Ereignissen/Kolben. Die untransfizierten PER55K(1.0)-Zellen wurden bis zur Konfluenz gezüchtet, ohne Anzeichen von CPE. Bei den transfizierten PER.C6-Kulturen waren in der konfluenten Monoschicht von Zellen nur drei CPE-Ereignisse sichtbar. Wiederum drei Tage später zeigten die transfizierten PER55K(1.0)-Kulturen eine volle CPE, wobei alle Zellen abgerundet und in Klumpen abgelöst waren. Dagegen waren die wenigen CPE-Ereignisse in den PER.C6-Kulturen nicht fortgeschritten, und die Zellen befanden sich immer noch in einer Monoschicht. Dies bestätigt frühere Beobachtungen, dass die Erzeugung von E1-deletierten, auf Ad35 basierenden Viren auf PER.C6 sehr ineffizient ist. Außerdem zeigten die untransfizierten PER55K(1.0)-Kulturen, wie erwartet, eine konfluente Monoschicht ohne CPE. Die Zellen und das Medium in den PER55K(1.0)-Kolben mit voller CPE wurden geerntet und zwei Frie/Tau-Zyklen unterzogen, und danach wurden die Zelltrümmer durch 10 Minuten Zentrifugation mit 3000 U/min mit einer Tischzentrifuge entfernt. Eines der resultierenden rohen Lysate wurde verwendet, um eine frische Kultur von PER55K(1.0)-Zellen in einem T175-Kolben (1,5 ml/Kolben) zu infizieren. Zellen und Medium wurden vier Tage später mit voller CPE geerntet. Dies zeigt, dass sich bei den anfänglichen Transfektionen infektiöse Viren gebildet hatten. Die GFP-Expression wurde durch Fluoreszenzmikroskopie von A549-Zellen, die mit dem rohen Lysat infiziert waren, bestätigt. Dann wurde das rohe Lysat verwendet, um die Komplementierung dieses E1-deletierten Ad35.AdApt.eGFP-Virus in den individuellen Klonen zu analysieren, wie im Folgenden beschrieben ist.

[0169] Die oben beschriebenen Klone, die aus den mit pIG35.55K transfizierten PER.C6-Zellen herausgesucht worden waren, wurden expandiert und funktionelle auf die Fähigkeit getestet, die Replikation von Ad35.AdApt.eGFP zu unterstützen. Dazu wurden die Klone in zwei Dichten in 6-Napf-Platten ausgesät und einen Tag später mit 15 ml des oben beschriebenen rohen Lysats infiziert. CPE wurde am Tag danach überwacht. Von den so getesteten 146 Klonen ergaben 19 eine volle CPE am Tag 2 oder 3, und 68 ergaben eine

volle CPE am Tag 5 oder 6. Die übrigen Klone wiesen nur eine partielle CPE auf oder zeigten nur wenige, nicht fortschreitende Ereignisse. Letztere waren von PER.C6-Zellen, die als negative Kontrolle mitgenommen wurden, nicht zu unterscheiden.

[0170] Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde eine Auswahl von 24 Klonen getroffen, die weiter auf die Fähigkeit durchmustert wurden, nach der Transfektion des pAdApt35.GFP-Adapterplasmids und des großen pWE.Ad35.pIX-rITR-Cosmidklons rekombinante E1-deletierte Viren zu erzeugen. Dazu wurden Klone in T25-Kolben ausgestrichen und mit 2 µg des Adapters und 6 µg des Gerüstplasmids transfiziert, wobei man LipofectAmin verwendete, wie es oben beschrieben ist. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen auf T80-Kolben übertragen, um eine Überkonfluenz der Kulturen zu verhindern. Fünf von den 24 Klonen ergaben drei Tage nach der Passage auf T80 eine volle CPE, und weitere 13 Klone ergab am Tag danach einen Fortschritt zur vollen CPE. Die übrigen 6 Klone zeigten keine oder nur beginnende CPE. Zum Vergleich: Die Routineerzeugung von E1-deletierten Ad5-Vektoren auf PER.C6-Zellen führt im Allgemeinen vier bis sechs Tage nach der Übertragung auf T80-Kolben zu voller CPE.

[0171] Dies zeigt, dass die neuen Klone E1-deletierte Adenovirus-Vektoren effizient komplementieren. Einer der oben beschriebenen Klone (Klon Nr. 16) wurde verwendet, um mehrere Chargen von E1- und E1/E3-deletierten Ad35-Viren, die verschiedene Transgene enthielten, zu erzeugen und zu produzieren. Dazu wurden Viren in rohen Lysaten, die aus Transfektionen gemäß der obigen Beschreibung, aber unter Verwendung verschiedener Adapterplasmide resultierten, einer Plaque-Reinigung auf der neuen Zelllinie unterzogen. Einzelne Plaques wurden auf Transgenaktivität getestet und dann für die Produktion im mittleren Maßstab in 4-8-Dreifachschichtkolben (3 × 175 cm/Kolben) amplifiziert. Die Zellen wurden mit voller CPE geerntet, und das Virus wurde freigesetzt und gereinigt, wie es routinemäßig für Adenoviren geschieht und in Beispiel 1 beschrieben ist: Der Extraktionsschritt mit Freon zur Entfernung von Zelltrümmern wurde jedoch durch einen Zentrifugationsschritt ersetzt. So wurden die Zelltrümmer nach der Inkubation mit DNase I in konischen 50-ml-Röhrchen (Greiner) 30 Minuten lang bei 4 °C mit 8000 U/min in einer Tischzentrifuge (Beckman Coulter Allegra 21R mit Festwinkelrotor) zentrifugiert. Dieser Schritt wird in einem frischen 50-ml-Röhrchen wiederholt, bis der Überstand klar war (gewöhnlich einmal). Die Menge an Viruspartikeln wurde durch HPLC bestimmt (Shabram et al., 1997). Tabelle IV zeigt die Ausbeuten nach der nachgeschalteten Verarbeitung von Produktionen von E1- und E1/E3-deletierten Ad35-Viren im mittleren Maßstab auf Dreifachschichtkolben mit PER55K-Klon-Nr.-16-Zellen. Die Menge der gereinigten Viruspartikel ist mit den Ausbeuten an Vektoren auf Ad5-Basis auf PER.C6-Zellen vergleichbar.

[0172] Wir schließen daraus, dass wir multiple Zelllinien erzeugt haben, die vollständig E1-deletierte Vektoren auf Ad35-Basis effizient komplementieren. So erleichtert die Ad35-E1B-55K-Expression in einer Ad5-komplementierenden Zelllinie die Replikation von Ad35-Vektoren.

Beispiel 10

Neue komplementierende Zelllinien aus primären Zellen

[0173] Beispiel 8 beschrieb die Erzeugung des Konstrukts pIG535, eines Hybrid-Ad5E1A-Ad35E1B-Expressionsplasmids. pCC536s und pIG536 sind ebenfalls Hybrid-Ad5-Ad35-E1-Konstrukte, aber mit dem E1A-Bereich, dem E1B-Promotor und dem größten Teil des E1B-19K-Gens, das von Ad5 abgeleitet ist, und dem größten Teil des E1B-55K-Gens, das von Ad35 abgeleitet ist. Die Konstrukte pCC536s und pIG536 unterscheiden sich nur in der heterologen Polyadenylierungssequenz, die das E1B-Transcript terminiert: pIG536 weist die HBV-pA-Sequenz auf, und pCC536s weist eine synthetische pA-Sequenz (SpA) auf. Die 5pA-Sequenz besteht aus dem Upstream-Sequenzelement (USE) des humanen C2-Komplement-Gens (Moreira et al., 1995) und der synthetischen pA-Sequenz (SPA), die von Levitt et al., 1989, beschrieben wurde.

[0174] Die synthetische PolyA-Sequenz wird mit Hilfe der folgenden Oligonucleotide aufgebaut:

C2SPA-1: 5'-CCC TGC AGG GAC TTG ACT CAT GCT TGT TTC ACT TTC ACA TGG AAT TTC CCA GTT ATG AAA TTA ATA AAG-3'

C2SPA-2: 5'-GTC TAG ACA CAC AAA AAA CCA ACA CAC TAT TGC AAT GAA AAT AAA TTT CCT TTA TTA ATT TCA TAA CTG-3'

[0175] Die Oligonucleotide wurden in einer Konzentration von 10 µM in 1x-Assoziationspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) miteinander gemischt, und unter Verwendung einer PCR-Maschine wurde die Lösung 5 Minuten lang auf 94 °C erhitzt und dann mit 0,5 °C/Sekunde auf 65 °C abgekühlt, und nach 5 Minuten Inkubation bei 65 °C wurde sie weiter mit 0,05 °C/Sekunde auf 20 °C abgekühlt. Anschlie-

ßend wurden 10 µl 2 mM dNTPs, 0,5 µl 1 M MgCl₂ und 3 µl Klenow-Fragment (New England Biolabs) zu 87 µl der assoziierten Probe gegeben, und das Gemisch wurde 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 1 µl der assoziierten und Klenow-behandelten Probe unter Verwendung der folgenden Primer amplifiziert:

C2for: 5'-CGG GAT CCC CTG CAG GGA CTT GAC -3' und

SPArev: 5'-TTG CGA CTT AAG TCT AGA CAC ACA AAA AAC C-3'

[0176] Dabei wurde Pwo-DNA-Polymerase (Roche) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet, aber unter Zugabe von DMSO (Sigma) bis zu einer Endkonzentration von 3%. Das PCR-Programm wurde 2 Minuten lang auf 94 °C eingestellt, und danach folgten 30 Zyklen von 30 s bei 94 °C, 30 s bei 55 °C und 20 s bei 72 °C. Wenn in diesem Dokument PCR-Programme beschrieben werden, bedeutet "min" die Zeit im Minuten, und "s" bedeutet die Zeit in Sekunden. Dann wurde die amplifizierte DNA unter Verwendung des QIAquick-PCR-Reinigungskits (Qiagen) gereinigt und mit XbaI und SbfI verdaut. Das Verdauungsprodukt wurde dann erneut mit dem PCR-Reinigungskit gereinigt, um die kleinen verdauten Enden zu entfernen. Das Konstrukt pIG270 wurde ebenfalls mit XbaI und SbfI (Isoschizomer von Sse8387I) verdaut, und das resultierende 5,9-kb-Vektorfragment wurde unter Verwendung des GeneClean-II-Kits (Bio101, Inc.) aus dem Gel isoliert. Dann wurden der behandelte Vektor und das PCR-Insert ligiert, was pCC271 ergab (**Fig. 29**). pCC271 enthält also den PGK-Promotor, den Ad35-E1-Bereich (Nucleotide 468 bis einschließlich 3400 aus der Ad35-Sequenz in Beispiel 3 und FRigur 5) und das synthetische pA (SpA). Dann wurde die synthetische pA-Sequenz wie folgt ebenfalls in das Konstrukt pIG535 kloniert.

[0177] pIG535 wurde mit EcoRI, PstI und Scal (alles Enzyme von New England Biolabs, verdaut in NEB-Puffer 3) verdaut, und das 3-kb-Insert, das dem chimärischen Ad5-Ad35-E1-Bereich entsprach, wurde unter Verwendung des GeneClean-II-Kits (Bio 101, Inc.) gereinigt. Das Konstrukt pCC271 wurde mit EcoRI und PstI verdaut, und das 3-kb-Vektorfragment, das das SpA und den PGK-Promotor enthält, wurde wie oben isoliert. Beide isolierten Fragmente wurden ligiert und durch Transformation in kompetente STBL-2-Zellen (Invitrogen/Life Technologies) eingeführt, was pCC535s ergab (**Fig. 30**). pCC535s enthält dieselben Ad5-Ad35-E1-Sequenzen wie pIG535, aber eine andere pA-Sequenz.

[0178] Für den Aufbau von pCC536s wurde ein Subklon mit den neuen Hybrid-E1B-Sequenzen hergestellt. Dazu wurden Ad5-E1A/E1B-21K-Sequenzen unter Verwendung der Primer 5AK: 5'-GAG CGA AGA AAC CCA TCT GAG-3' und 2155R: 5'-GGT CGA GGC CGG CTC TCG G-3' mit pIG.E1A.E1B (siehe Beispiel 6 und **Fig. 13**) als Matrizen-DNA unter Verwendung von Pwo-Polymerase (Roche) gemäß den Anweisungen des Herstellers und zusätzlich einer Endkonzentration von 3% DMSO amplifiziert. Das Programm wurde eingestellt auf: 2 min bei 94 °C, dann 30 Zyklen mit 30 s bei 94 °C, 30 s bei 58 °C und 45 s bei 72 °C und schließlich 8 min bei 68 °C. Dies führte zu einem 210-bp-Fragment, das den Nucleotiden 2022–2233 der Ad5-Sequenz entsprach. Eine zweite PCR wurde an pCC271 mit den Primern

2155F: 5'-CCG AGA GCC GGC CTG GAC C-3' und

3510: 5'-GCT CTA GAC CTG CAG GTT AGT CAG TTT CTT CTC CAC TG-3' durchgeführt.

[0179] Dasselbe PCR-Programm wurde verwendet, aber jetzt mit einer Verlängerungszeit von 90 s. Das resultierende 1,3-kb-Fragment entspricht den Nucleotiden 2112 bis 3400 der Ad35-Sequenz mit einer SbfI-Stelle am 3'-Ende. Man beachte, dass die Primer 2155 und 2155R vollständig komplementär sind, was ein Zusammenfügen der beiden Fragmente wie folgt ermöglicht:

Beide PCR-Fragmente wurden unter Verwendung des Qiagen-Gel-Extraktionskits aus Gel gereinigt. Dann wurden Aliquote der gereinigten Proben im äquimolaren Verhältnis gemischt und als Matrize für eine Zusammenfügungs-PCR-Amplifikation mit den Primern 5AK und 3510 mit Pwo-DNA-Polymerase wie oben unter Verwendung der folgenden Programmeinstellungen verwendet: 2 min bei 94 °C und 5 Zyklen von 30 s bei 94 °C, 30 s bei 60 °C und 2 min bei 72 °C, gefolgt von 25 Zyklen von 30 s bei 94 °C, 30 s bei 58 °C und 90 s bei 72 °C. Das resultierende 1,5-kb-Fragment wurde unter Verwendung des QIAquick-Gel-Extraktionskits (Qiagen) aus Gel gereinigt, mit dem pCR-Script/Amp-Klonierungsvektor (Stratagene) ligiert und durch Transformation in kompetente DH5a-Zellen (Invitrogen/Life Technologies) eingeführt, was zu pCR535E1B führte (**Fig. 31**). Dieses Konstrukt wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzieren geprüft, um die korrekte Amplifikation der Zielsequenzen zu bestätigen.

[0180] Dann wurde pCR535E1B mit NotI verdaut, und die vorstehenden Enden wurden mit Klenow-Fragment glatt gemacht. Dann wurde die DNA unter Verwendung des QIAquick-PCR-Reinigungskits (Qiagen) gereinigt, und die eluierte DNA wurde mit PstI verdaut. Das 1,5-kb-Fragment, das die chimärischen E1-Sequenzen aus dem pCR535E1B-Vektor enthielt, wurde unter Verwendung des GeneClean-Kits (Bio 101, Inc.) aus Gel gereinigt. Dieses Fragment wurde mit dem mit PvuII und PstI verdauten Vektor pCC535s ligiert und durch Transfor-

mation in kompetente STBL-2-Zellen (Invitrogen/Life Technologies) eingeführt, was pCC2155s ergab (**Fig. 32**). Zur Vervollständigung des pCC536s-Konstrukts wurden dann Ad5-E1-Sequenzen in den pCC2155s-Subklon kloniert. Dazu wurde pIG.E1A.E1B mit EcoRI und KpnI verdaut, und das 1,6-kb-Fragment, das Ad5-E1A und Ad5-E1B-21K (Nucleotide 459 bis 2048 der Ad5-Sequenz) entspricht, wurde unter Verwendung des GeneClean-Kits vom Gel isoliert. pCC2155s wurde mit EcoRI und KpnI verdaut, und das vektorhaltige Fragment wurde ebenfalls einer Gelreinigung unterzogen. Die Ligation der beiden isolierten Fragmente und die Transformation von elektrokompenten DH10B-Zellen (Invitrogen/Life Technologies) führte zu pCC536s (**Fig. 33**). Die Hybrid-E1B-Sequenzen sind in **Fig. 38** ausführlicher gezeigt. **Fig. 38A** zeigt eine Ausrichtung von Proteinsequenzen von E1B-21K im pCC536s-Konstrukt mit Wildtyp(wt)-Ad35- und -Ad5-Sequenzen. Wie man sieht, ist der größte Teil des E1B-21K-Proteins in pCC536s von Ad5 abgeleitet, außer den 6 C-terminalen Aminosäuren, die mit Ad5-E1B-21K identisch sind. **Fig. 38B** zeigt dieselbe Ausrichtung für die E1B-55K-Proteine. In diesem Fall sind die N-terminalen Aminosäuren von pCC536s mit Ad5 bis zu Aminosäure 65 identisch. Der Rest ist mit Ad35-E1B-55K identisch. Offensichtlich können unter Verwendung des oben skizzierten allgemeinen Verfahrens verschiedene Hybrid-E1B-55K-Konstrukte gestaltet werden, ohne von der Erfindung abzuweichen.

[0181] Das Konstrukt pIG536 wurde hergestellt, indem man ein Fragment mit dem SpA in pCC536s durch das entsprechende Fragment aus pIG270 (Beispiel 6, **Fig. 15**), das HBVpA enthielt, ersetzte. Dazu wurde pIG270 mit BamHI und BglII verdaut, und das 1,8-kb-Insert wurde unter Verwendung des GeneClean-II-Kits (Bio101, Inc.) aus dem Gel isoliert. pCC536s wurde mit denselben Enzymen verdaut, und das 4,8-kb-Vektorfragment wurde wie oben aus dem Gel gereinigt. Die Ligation beider isolierter Fragmente und die Transformation von kompetenten STBL-2-Zellen (Invitrogen/Life Technologies) ergab das Konstrukt pIG536 (**Fig. 34**).

[0182] Die erzeugten E1-Konstrukte wurden in primären Babyrattennieren(BRK)-Zellen getestet, wie es in Beispiel 6 beschrieben ist. Die Ergebnisse (Tabelle V) bestätigen frühere Beobachtungen, dass Ad5-E1-Gene primäre BRK-Zellen effizienter transformieren als Ad35-E1-Gene. Die chimärischen Ad5-Ad35-E1-Expressionskonstrukte pCC535s und pCC536s produzierten mehr transformierte Kolonien als die vollen Ad35-E1-Konstrukte pIG270 und pCC271. Weiterhin führte die Verwendung einer synthetischen Polyadenylierungssequenz in pCC535s zu etwas mehr Herden im Vergleich zur HBVpA-Variante pIG535.

[0183] Humane embryonale Retinoblasten-Zellen (HER-Zellen) wurden aus den Augen von fehlgeborenen Feten im Alter von 18 und 21 Wochen isoliert. Die Augen wurden in eine 6-cm-Schale mit PBS gebracht und von dem umgebenden Gewebe befreit. Ein Einschnitt wurde gemacht, um die Innenseite zu erreichen, und die graue Zellschicht auf der inneren Rückseite der Augen, die die Retinoblasten enthielt, wurde abgekratzt. Diese Schicht wurde in ein 14-ml-Röhrchen in 2 ml PBS übergeführt, und das Gewebe wurde sedimentieren gelassen, und danach wurde das PBS entfernt. 2 ml Trypsin (0,25%, kein EDTA, GibcoBRL) wurden hinzugefügt, und es wurde 5 Minuten lang bei 37 °C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Man ließ die Gewebestücke sedimentieren, und 1 ml Trypsin mit Zellen wurde in ein neues Röhrchen übergeführt. Zu diesem Röhrchen wurden 4 ml Kulturmedium (DMEM mit 10% FCS) gegeben, und das Röhrchen wurde auf Eis gelagert. Die übrigen Gewebestücke in Trypsin wurden in eine 6-cm-Schale gebracht und in kleinere Stücke geschnitten. Diese wurden nach Zugabe von 2 ml frischem Trypsin erneut in einem 14-ml-Röhrchen bei 37 °C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Dann wurde dieses Gemisch zu den ersten isolierten Zellen in Kulturmedium gegeben, und das Ganze wurde in einer Tischzentrifuge mit 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, und die Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Die isolierten HER-Zellen wurden in zwei 6-cm-Schalen ausgestrichen und bei 37 °C/10% CO₂ inkubiert. Bei 90% Konfluenz wurden die Kulturen 1:3 aufgeteilt und weiter inkubiert. Dieses Verfahren wurde wiederholt, bis genügend Schalen erhalten worden waren, um sie für die Transfektion und weiteres Kultivieren- zu verwenden. Die Transfektionen erfolgten mit unterschiedlichen Passagezahlen unter Verwendung des CaPO₄-Cotransfektionskits (Invitrogen/Life Technologies) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Für jede Schale (50–70% Konfluenz) wurden 20 µg DNA verwendet. Die anfänglichen Transfektionen wurden mit pIG.E1A.E1B, einem Ad5-E1-Expressionskonstrukt, und mit pIG535, dem Hybrid-Ad5-E1A/Ad35-E1B-Expressionskonstrukt, durchgeführt. Zwei bis drei Wochen nach der Transfektion wurden transformierte Herde in den mit pIG.E1A.E1B transfizierten Schalen sichtbar. Im Durchschnitt wurden 15–20 Herde/Schale in den Schalen gefunden, die mit pIG.E1A.E1B transfiziert waren. Über 30 Klone wurden herausgesucht und auf 96-Napf-Platten übertragen. Nach der Konfluenz wurden die Zellen in größere Kulturplatten oder -kolben übergeführt und schließlich aus einem T175-Kolben lebensfähig in Ampullen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Alle herausgesuchten Klone wurden in dieser Weise etabliert. Transformierte Herde traten in den Schalen, die mit pIG535 transfiziert waren, viel später auf, die ersten etwa fünf Wochen nach der Transfektion. Im Durchschnitt wurden 3–4 Klone pro Schale gefunden. Insgesamt 46 Klone wurden zwischen 7 Wochen und 3 Monate nach den Transfektionen herausgesucht, von denen 14 lebensfähig waren und mehrmals einer Passage unterzogen werden konnten. Von diesen wurden 2 Klone (Klon Nr. 45 und Nr. 75) bis zu einem T175-Kolben gezüchtet und lebensfähig in Ampullen in flüssigem Stickstoff

eingefroren.

[0184] Primäre HER-Zellen wurden auch mit den Konstrukten pCC535s und pCC536s transfiziert.

[0185] Die Transfektion von pCC535s führte zu durchschnittlich 2 Klonen/Schale, und insgesamt 50 Klone wurden herausgesucht. Von diesen herausgesuchten Klonen konnten 2 etabliert werden. Von der Transfektion mit pCC536s konnte wenigstens ein Klon etabliert werden.

[0186] Die oben beschriebenen Experimente zeigen, dass primäre HER-Zellen mit Hybrid-Ad5-Ad35-E1-Sequenzen transformiert werden können. Die Transformationseffizienz war geringer, als sie mit dem vollständigen Ad5-E1-Bereich erhalten wurde. Dann testeten wir, ob die neuen Zelllinien rekombinante, auf Ad35 basierende E1-deletierte Vektoren komplementieren können. Dazu wurde der Klon Nr. 45, der aus der pIG535-Transfektion erhalten wurde, in T25-Kolben in einer Dichte von 7×10^6 Zellen/Kolben ausgesät und mit Ad35.AdApt.eGFP-Virus (siehe Beispiel 9) mit einer Infektionsmultiplizität (MOI) von 5 und 25 Viruspartikeln/Zelle infiziert. Eine volle CPE wurde an den Tagen 4 und 5 für die MOI 25 bzw. 5 beobachtet. Zum Vergleich ergaben parallele Kulturen von Klon-Nr.-45-Zellen, die mit AdS.AdApt.eGFP-Viren infiziert waren, an den Tagen 7 und 8 für die MOI 25 bzw. 5 eine volle CPE. Die anfängliche Infektionseffizienz war für Ad5- und Ad35-Viren vergleichbar, ca. 80% (MOI = 5) bzw. ca. 95% (MOI = 25) der Zellen waren einen Tag nach der Infektion mit GFP-Virus infiziert, was durch Fluoreszenzmikroskopie gemessen wurde. Zellen vom Klon Nr. 75 wurden in einer 6-Napf-Platte in einer Dichte von 2×10^6 Zellen/Napf ausgesät und mit Ad35.AdApt.eGFP oder AdS.AdApt.eGFP mit einer MOI von 5 (VP/Zelle) infiziert. Wiederum war die anfängliche Infektionseffizienz für beide Viren vergleichbar. Die volle CPE wurde im Falle der Ad35.AdApt.eGFP-Infektion am Tag 4 beobachtet, während mit Ad5.AdApt.eGFP infizierte Klon-Nr.-75-Zellen eine volle CPE am Tag 7 ergaben. Der Unterschied in der Replikationseffizienz auf Ad35-komplementierenden Zellen zwischen rekombinanten Ad35- und Ad5-Vektoren ist noch deutlicher, wenn das Virus durch Plasmidtransfektion erzeugt wird. Dies wird beispielhaft durch das folgende Transfektionsexperiment veranschaulicht. Klon-Nr.-45-Zellen wurden in T25-Kolben in einer Dichte von $3,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät und drei Tage später unter Verwendung von LipofectAmin-Reagens (Invitrogen/Life Technologies) gemäß den Anweisungen des Herstellers und der obigen Beschreibung transfiziert. $2 \mu\text{g}$ pAdApt35.eGFP-Adapterplasmid, das mit PacI verdaut wurde, wurde mit $6 \mu\text{g}$ pWE.Ad35.pIX-rITR oder pWE.Ad35.pIXrITR Δ E3-Gerüstcosmid, das mit NotI verdaut wurde, cotransfiziert. $2 \mu\text{g}$ pAdApt.eGFP (Ad5-Adapterplasmid, beschrieben in WO 00/70071), das mit PacI verdaut wurde, wurde mit $6 \mu\text{g}$ pWE.AdS.AfIII-rITRsp (Ad5-Gerüstplasmid, beschrieben in WO-00/70071), das ebenfalls mit PacI verdaut wurde, cotransfiziert. Ein T25 wurde nicht transfiziert und diente als negative Kontrolle. Einen Tag später wurden die Transfektionseffizienzen durch Fluoreszenzmikroskopie überwacht und bei allen eGFP-Transfektionen auf 10–15% geschätzt. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen auf T80-Kolben übertragen und bei $37^\circ\text{C}/10\%$ CO_2 weiter inkubiert. Wiederum drei Tage später wurden CPE-Ereignisse in den Kulturen sichtbar, die mit dem pAdApt35.eGFP und dem pWE.Ad35pIX-rITR+ oder -E3 transfiziert waren. Die Transfektionen mit dem E3-deletierten Gerüst enthielten mehr grüne fluoreszente Zellen und mehr CPE-Ereignisse. Die Transfektion mit Ad5-Plasmiden zeigte nur etwa 20% grüne fluoreszente Zellen, von denen die meisten am Sterben waren, und keine CPE-Ereignisse. Zwei Tage später war dieser Unterschied größer geworden, da Kulturen, die mit dem pAdApt35.eGFP und dem pWE.Ad35pIX-rITR Δ E3 transfiziert waren, 80% CPE zeigten und Kulturen, die mit dem pAdApt35.eGFP und den pWE.Ad35pIX-rITR-Konstrukten transfiziert waren, fortschreitende CPE-Ereignisse zeigten. Die mit Ad5 transfizierte Kultur zeigte keinerlei Fortschritt. Tabelle VI fasst diese Ergebnisse zusammen. Wir schließen daraus, dass die oben beschriebenen neuen komplementierenden Zelllinien die Replikation von E1-deletierten, auf Ad35 basierenden Viren effizient unterstützen und dass die Erzeugung und Replikation von E1-deletierten, auf Ad5 basierenden Viren weniger effizient ist. Anscheinend bilden auch Ad35-E1B55K-Proteine keinen funktionellen Komplex mit Ad5-E4orf6-Proteinen. Die Serotypspezifität der Komplementierung ist jetzt also auch für rekombinante Ad5-Vektoren auf Ad35-Verpackungszellen gezeigt worden.

Beispiel 11

Erzeugung von pWE.Ad.pIX-rITR Δ E3

[0187] Der frühe Bereich 3 von humanen Adenoviren enthält multiple codierende Bereiche für Proteine, die die Immunantwort des Wirtes auf die adenovirale Infektion stören. Wenn adenovirale Vektoren als Impfstoffträger verwendet werden, ist eine solche Störung unerwünscht. Daher konstruierten wir ein Ad35-Gerüstcosmid, dem der E3-Bereich fehlt.

[0188] Dazu wurde das Konstrukt pBr.Ad35.PRn (**Fig. 35**; beschrieben in Beispiel 13 in Publikation EP 1 054

064 A1) mit Stul und Mlul verdaut, und das 17,3-kb-Vektorfragment wurde aus Gel mit niedrigem Schmelzpunkt (LMP) unter Verwendung von Agarase-Enzym (Roche) gemäß den Anweisungen des Herstellers gereinigt. Dann wurde ein PCR-Fragment auf pBr.Ad35.PRn unter Verwendung der folgenden Primer erzeugt:
 35E3for: 5'-AAT GAC TAA TGC AGG TGC GC-3' und
 35E3rev: 5'-CGA CGC GTT GTA GTC GTT GAG CTT CTA G-3',

[0189] Für die Amplifikation wurde Pwo-DNA-Polymerase (Roche) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet, und das Programm wurde eingestellt auf 2 min bei 94 °C, 30 Zyklen von 30 s bei 94 °C, 30 s bei 58 °C und 1 min bei 72 °C und eine letzte Inkubation von 8 min bei 68 °C. Das 833-bp-PCR-Produkt wurde unter Verwendung des QIAquick-PCR-Reinigungskits (Qiagen) gereinigt und mit Mlul und Stul verdaut. Die verdaute DNA wurde unter Verwendung des QIAquick-Gel-Extraktionskits (Qiagen) aus dem Gel gereinigt. Beide isolierten Fragmente wurden ligiert und durch Transformation in kompetente DH5a-Zellen (Invitrogen/Life Technologies) eingeführt, was pBr.Ad35.PRnΔE3 ergab (**Fig. 36**). Das Plasmid wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung des PCR-amplifizierten Inserts überprüft. Dann wurde die E3-Deletion in das pWE.Ad35.pIX-rITR-Cosmidgerüst kloniert. Dazu wurde pWE.Ad35.pIX-rITR (siehe Beispiel 4 und **Fig. 8**) mit PacI verdaut, und die DNA wurde durch Fällung mit Isopropanol und Waschen mit 70% EtOH gereinigt. Nach der Resuspension in milliQ-Wasser wurde die DNA mit Swal verdaut, und das 22,8-kb-Vektorfragment wurde unter Verwendung von Agarase-Enzym wie oben aus dem LMP-Gel gereinigt.

[0190] Das Konstrukt pBr.Ad35.PRnΔE3 wurde in derselben Weise mit PacI und Swal verdaut, und das 16,6-kb-Fragment wurde ebenfalls unter Verwendung von Agarase-Enzym isoliert. Beide isolierten Fragmente wurden unter Verwendung von 0,5–0,6 µg jedes Fragments ligiert. Dann wurden die ligierten Fragmente unter Verwendung von λ-Phage-Verpackungsextrakten (Stratagene) gemäß den Anweisungen des Herstellers verpackt und mit STBL-2-Zellen gemischt. Bakterien wurden auf LB+Amp-Platten ausgestrichen, und die resultierenden Kolonien wurden auf die Anwesenheit des richtigen Konstrukts analysiert. Dies ergab das Konstrukt pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3 (**Fig. 37**). Die E3-Deletion erstreckt sich von Nucleotid 27648 bis 30320 der Ad35-Sequenz (Beispiel 3) und überspannt so einen Bereich von 2,6 kb. Eine Cotransfektion von NotI-verdaulichem pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3 und pIPsp-1-verdaulichem pAdApt35.eGFP auf PER55-Klon-Nr.-16-Zellen (siehe Beispiel 9), wie es oben beschrieben ist, führte zu GFP-exprimierenden Viren auf Ad35-Basis. Nach der Isolierung von viraler DNA aus diesen Viren zeigte eine PCR-Amplifikation des E3-Bereichs, dass die Viren wie erwartet bezüglich 2,6 kb E3-Sequenzen deletiert waren.

Tabelle I

Serotyp	Elution [NaCl] mM	VP/ml	CCID50	log ₁₀ VP/CCID50-Verhältnis
1	597	8,66 x 10 ¹⁰	5,00 x 10 ⁷	3,2
2	574	1,04 x 10 ¹²	3,66 x 10 ¹¹	0,4
3	131	1,19 x 10 ¹¹	1,28 x 10 ⁷	4,0
4	260	4,84 x 10 ¹¹	2,50 x 10 ⁸	3,3
5	533	5,40 x 10 ¹¹	1,12 x 10 ¹⁰	1,7
6	477	1,05 x 10 ¹²	2,14 x 10 ¹⁰	1,7
7	328	1,68 x 10 ¹²	2,73 x 10 ⁹	2,4
9	379	4,99 x 10 ¹¹	3,75 x 10 ⁷	4,1
10	387	8,32 x 10 ¹²	1,12 x 10 ⁹	3,9
12	305	3,64 x 10 ¹¹	1,46 x 10 ⁷	4,4
13	231	4,37 x 10 ¹²	7,31 x 10 ⁸	3,8
15	443	5,33 x 10 ¹²	1,25 x 10 ⁹	3,6
16	312	1,75 x 10 ¹²	5,59 x 10 ⁸	3,5
17	478	1,39 x 10 ¹²	1,45 x 10 ⁹	3,0
19	430	8,44 x 10 ¹¹	8,55 x 10 ⁷	4,0

20	156	$1,41 \times 10^{11}$	$1,68 \times 10^7$	3,9
21	437	$3,21 \times 10^{11}$	$1,12 \times 10^8$	3,5
22	365	$1,43 \times 10^{12}$	$5,59 \times 10^7$	3,4
23	132	$2,33 \times 10^{11}$	$1,57 \times 10^7$	4,2
24	405	$5,12 \times 10^{12}$	$4,27 \times 10^8$	4,1
25	405	$7,24 \times 10^{11}$	$5,59 \times 10^7$	4,1
26	356	$1,13 \times 10^{12}$	$1,12 \times 10^8$	4,0
27	342	$2,00 \times 10^{12}$	$1,28 \times 10^8$	4,2
28	347	$2,77 \times 10^{12}$	$5,00 \times 10^7$	4,7
29	386	$2,78 \times 10^{11}$	$2,00 \times 10^7$	4,1
30	409	$1,33 \times 10^{12}$	$5,59 \times 10^8$	3,4
31	303	$8,48 \times 10^{10}$	$2,19 \times 10^7$	3,6
33	302	$1,02 \times 10^{12}$	$1,12 \times 10^7$	5,0
34	425	$1,08 \times 10^{12}$	$1,63 \times 10^{11}$	0,8
35	446	$3,26 \times 10^{12}$	$1,25 \times 10^{11}$	1,4
36	325	$9,26 \times 10^{12}$	$3,62 \times 10^9$	3,4
37	257	$5,86 \times 10^{12}$	$2,8 \times 10^9$	3,3
38	337	$3,61 \times 10^{12}$	$5,59 \times 10^7$	4,8
39	241	$3,34 \times 10^{11}$	$1,17 \times 10^7$	4,5
42	370	$1,95 \times 10^{12}$	$1,12 \times 10^8$	4,2
43	284	$2,42 \times 10^{12}$	$1,81 \times 10^8$	4,1
44	295	$8,45 \times 10^{11}$	$2,00 \times 10^7$	4,6
45	283	$5,20 \times 10^{11}$	$2,99 \times 10^7$	4,2
46	282	$9,73 \times 10^{12}$	$2,50 \times 10^8$	4,6
47	271	$5,69 \times 10^{11}$	$3,42 \times 10^7$	4,2
48	264	$1,68 \times 10^{12}$	$9,56 \times 10^8$	3,3
49	332	$2,20 \times 10^{12}$	$8,55 \times 10^7$	4,4
50	459	$7,38 \times 10^{12}$	$2,80 \times 10^9$	3,4
51	450	$8,41 \times 10^{11}$	$1,88 \times 10^8$	3,7

Legende zu Tabelle 1:

[0191] Alle humanen Adenoviren, die in den Neutralisationsexperimenten verwendet wurden, wurden auf PER.C6-Zellen (Fallaux et al., 1998) erzeugt und auf CsCl gereinigt, wie es in Beispiel 1 beschrieben ist. Die NaCl-Konzentration, bei der die verschiedenen Serotypen aus der HPLC-Säule eluierten, ist gezeigt. Die Viruspartikel/ml (VP/ml) wurden anhand eines Ad5-Standards berechnet. Der Titer in dem Experiment (CCID50) wurde an PER.C6-Zellen gemäß der Beschreibung in Beispiel 1 durch Titrationen bestimmt, die parallel zu dem Neutralisationsexperiment durchgeführt wurden. Das CCID50 ist für die 44 Viren, die in dieser Studie verwendet wurden, gezeigt und spiegelt die Verdünnung des Virus wider, die notwendig war, um in 50% der Näpfe nach 5 Tagen eine CPE zu erhalten. Das Verhältnis VP/CCID50 ist als \log_{10} angegeben und ist ein Maß für die Infektiosität der verschiedenen Chargen in Bezug auf PER.C6-Zellen.

Tabelle II. AdApt35.LacZ-Viren entkommen der Neutralisation durch Humanserum

Virus	Verdünnung des Humanserums					
	kein Serum	10 x	50 x	250 x	1250 x	6250 x
AdApt5.LacZ MOI: 5 VP/Zelle	100%	0%	0%	1%	40%	80%
AdApt35.LacZ 250 µl Rohlysat	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabelle III: Die Anzahl der Herde, die mit den verschiedenen E1-Expressionskonstrukten in BRK-Transformationsexperimenten erhalten wurden

Mittlere Zahl der Herde/Schale:

	Konstrukt	1 µg	5 µg
Experiment 1	pIG.E1A.E1B	nb	60
	pIG.E1A.E1B	nb	35
	pRSVAd35E1	0	3
	pIG.Ad35.E1	3	7
Experiment 2	pIG.E1A.E1B	37	nb
	pIG.Ad35.E1	nb	2
Experiment 3	pIG.E1A.E1B	nb	140
	pIG.Ad35.E1	nb	20
	pIG270	nb	30

Tabelle IV: Ausbeuten von E1- und E1/E3-deletierten Ad35-Viren auf Klon-Nr.-16-Zellen, die in Dreifachschichtkolben produziert wurden.

Virus	Maßstab (T175III-Kolben)	Gesamtzahl der Viruspartikel nach DSP	VP/Zelle
Ad35.AdApt.eGFP	4	$7,5 \times 10^{11}$	2500
Ad35.ΔE3.AdApt.empty	8	2×10^{12}	3300
Ad35.ΔE3.AdApt.LacZ	8	$3,8 \times 10^{11}$	600
Ad35.ΔE3.AdApt.MV-F	4	$8,8 \times 10^{11}$	2900
Ad35.ΔE3.AdApt.MV-H	8	$2,6 \times 10^{12}$	4250

Tabelle V: Transformationseffizienzen an BRK-Zellen mit verschiedenen Ad-E1-Expressionskonstrukten

	Konstrukt	Transfizierte DNA (μg)	Zahl der Herde pro Schale
Experiment 1	pIG.E1A.E1B	5	44
	pIG270	5	0
	pIG271	5	0
	pIG535	5	1
	pIG535s	5	2,5
Experiment 2	pIG.E1A.E1B	4	15
	pIG271	4	0
	pIG535s	4	3
	pIG536s	4	3

Tabelle VI: Erzeugung von rekombinanten Ad35-Viren auf der neu etablierten komplementierenden Zelllinie Klon Nr. 45

	GFP-Expression			
	Tag 1	Tag 3	Tag 6	Tag 8
Transfizierte Konstrukte				
pAdApt35.eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITR	15%	20%	30%	50%
pAdApt35.eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3	10%	25%	40-50%	100%
pAdApt5.eGFP + pWE.Ad5.AfIII-rITR	15%	25%	20%	20%
untransfiziert	0%	0%	0%	0%
	CPE-Ereignisse			
Transfizierte Konstrukte				
pAdApt35.eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITR	0	0	1	mehrere
pAdApt35.eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3	0	0	mehrere	80%
pAdApt5.eGFP + pWE.Ad5.AfIII-rITR	0	0	0	0
untransfiziert	0	0	0	0

Literatur

Abrahamsen, K, Kong, H-L.,Mastrangeli, A., Brough, D., Lizonova, A., Crystal, R.G. and Falck Pedersen, E.

- (1997). Construction of an adenovirus type 7a E1A vector. *J. Virol.* 71, 11, p8946–8951.
- Babiss, L.E. and Ginsberg, H.S. (1984). Adenovirus type 5 early region 1b gene product is required for efficient shutoff of host protein synthesis. *J. Virol.* 50, p202–2122
- Babiss, L.E., Gipsberg, H.S. and Darnell, J.J. (1985). Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol. Cell. Biol.* 5, p2552–2558.
- Bernards, R., Houweling, A., Schrier, P.I., Bos, J.L. and van der Eb, A.J. (1982). Characterization of cells transformed by Ad5/Ad12 hybrid early region 1 plasmids. *Virology* 120, p422–432.
- Bonnerot, C., Rocancourt, D., Briand, P., Grimber, G. and Nicolas, J.F. (1987). A beta-galactosidase hybrid protein targeted to nuclei as a marker for developmental studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(19), p6795–6799.
- Bos, J.L., Polder, L.J., Bernards, R., Schrier, P., van den Elsen, P.J., van der Eb, A.J. and van Ormondt, H. (1981). The 22 kb mRNA of the E1B region of human adenovirus type 12 and 5 directs the synthesis of two major tumor antigens from different AUG triplets. *Cell* 12, p721–732.
- Bridge, E. and Ketner, G. (1990). Interaction of adenoviral E4 and E1b products in late gene expression. *Virology* 174, p345–353.
- Bridge, E., Medghalchi, S., Ubol, S., Leesong, M. and Ketner, G. (1993). Adenovirus early region 4 and viral DNA synthesis. *Virology* 193, p794–801.
- Brough, D.E., Lizonova, A., Hsu, C., Kulesa, V.A. and Kovesdi, L (1996). A gene transfer vector-cell line system for complete functional complementation of adenovirus early regions 1 and 4. *J. Virol.* 70, p6497–6501.
- Fallaux, F.J., Kranenburg, O., Cramer, S.J., Houweling, A., van Ormondt, H., Hoeben, R.C. and van der Eb, A.J. (1996). Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 7(2), P215–222.
- Fallaux, F.J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D.J., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S.J., van Ormondt, H., van der Eb, A.J., Valerio, D. and Hoeben, R.C. (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication competent adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 9, 1909–1917.
- Gallimore, P.H., Grand, R.J.A. and Byrd, P.J. (1986). Transformation of human embryo retinoblasts with simian virus 40, adenovirus and ras oncogenes. *AntiCancer Res.* 6, p499–508.
- Gossen, M., and H. Bujard (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89; 5547–5551.
- Graham, F.O., Smiley, J., Russell, W. and Naim, R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, p59–72.
- Grand, R.J.A., Parkhill, J., Szeszak, T., Rookes, S.M., Roberts, S. and Gallimore, P.H. (1999). Definition of a major p53 binding site on Ad2E1B58K protein and a possible nuclear localization signal on the Ad12E1B54K protein. *Oncogene* 18, p955–965.
- Han, J., Sabbatini, P., Perez, D., Rao, L., Modha, D. and White, E. (1996). The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev.* 10(4), p461–477.
- Jochimsen, A.G., Peltenburg L.T., te Pas, M.F., de Wit, C.M., Bos, J.L. and van der Eb, A.J. (1987). Activation of adenovirus 5 E1A transcription by region E1B in transformed primary rat cells. *EMBO J.* 6(11), p3399–3405.
- Moreira, A., Wollerton, M., Monks, J. and Proudfoot, N.J. (1995). Upstream sequence elements enhance poly(A) site efficiency of the C2 complement gene and are phylogenetically conserved. *EMBO J.*, 14(15), p3809–3819.
- Leppard, K.N. and Shenk, T.(1989). The adenovirus E1B 55kd protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism. *EMBO J.* 8, p2329–2336. Levitt, N., Briggs, D., Gil, A. and Proudfoot, N.J. (1989). Definition of an efficient synthetic poly(A) site. *Genes Dev.* 3, p1019–1025.
- Pilder, S., Moore, M., Logan, J. and Shenk, T.(1986). The adenovirus E1B 55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 6, p470–476.
- Rao, L., Debbas, M., Sabbatini, P., Hockenbery, D., Korsmeyer, S. and White, E. (1992). The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, p7742–7746.
- Rabenwolf, S., Schütt, H., Nevels, M., Wolf H. and Dobner, T. (1997). Structural analysis of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton-E4orf6 protein complex. *J. Virol.* 71, p1115–1123.
- Singer-Sam, J., Keith, D.H., Tani, K., Simmer, R.L., Shively, L., Lindsay, S., Yoshida, A. and Riggs, A.D. (1984). Sequence of the promoter region of the gene for human X-linked 3-phosphoglycerate kinase. *Gene* 32 (3), p409–417.
- White, E. and Cipriani, R. (1990). Role of adenovirus E1B proteins in transformation: Altered organization of intermediate filaments in transformed cells that express the 19-kilodalton protein. *Mol. Cell. Biol.* 10, p120–130.
- White, E. (1995). Regulation of p53-dependent apoptosis by E1A and E1B. In: *The molecular repertoire of adenoviruses III*. Eds. Doerfler, W. and Böhm, P.. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1995, p33–58.
- White, E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* 10(1), p1–15.

- Yew, P.R., Kao, C.C. and Berk, A.J. (1990). Dissection of functional domains in the adenovirus 2 early region 1B 55K polypeptide by suppressor-linker insertional mutagenesis. *Virology* 179, p795-805.
- Yew, P.R. and Berk, A.J. (1992). Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early region 1B protein. *Nature* 357, p82-85.
- Simonsen, C.C. and Levinson, A.D. (1983). Analysis of processing and polyadenylation signals of the hepatitis B virus surface antigen gene by using simian virus 40-hepatitis B virus chimeric plasmids. *Mol. and Cell. Biol.* 3 (12), p2250-2258.
- Zantema, A., Fransen, J.A., Davis, O.A., Ramaekers, F.C., Vooijs, G.P., DeLeys, B. and van der Eb, A.J. (1985). Localization of the E1B proteins of adenovirus 5 in transformed cells, as revealed by interaction with monoclonal antibodies. *Virology* 142, p44-58.
- Zantema, A. and van der Eb, A.J. (1995). Modulation of gene expression by adenovirus transformation. In: *The molecular repertoire of adenoviruses III*. Eds. Doerfler, W. and Böhm, P. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1995, p1-23.

Patentansprüche

1. Verpackungszelllinie, die auf einem Serotyp der Untergruppe B basierendes rekombinantes Adenovirus komplementieren kann, wobei die Zelllinie von einer humanen Zelle abgeleitet ist, die mit E1-codierenden Sequenzen eines Adenovirus transformiert wurde, wobei die Sequenz, die das E1B-55K-Protein codiert, aus der Untergruppe B stammt.
2. Verpackungszelllinie gemäß Anspruch 1, wobei die humane Zelle eine primäre diploide Zelle oder ein Derivat davon ist.
3. Verpackungszelllinie gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei das Adenovirus der Untergruppe B zum Serotyp 35 gehört.
4. Verpackungszelllinie gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die E1-codierenden Sequenzen funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft sind, die die Transcription und Translation der codierten Proteine ermöglichen.
5. Verpackungszelllinie gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Adenovirus-E1-codierenden Sequenzen entweder auf einem einzigen DNA-Molekül funktionell verknüpft sind oder sich auf zwei getrennten DNA-Molekülen befinden.
6. Verpackungszelllinie gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die primären humanen Zellen aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus primären Retinoblasten, primären embryonalen Nierenzellen und primären Amniocyten besteht.
7. Verpackungszelllinie gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei es sich bei dem Adenovirus der Untergruppe B um Adenovirus Serotyp 35 handelt und wobei alle E1-codierenden Sequenzen vom Serotyp 35 sind.
8. Verpackungszelllinie gemäß Anspruch 7, wobei die E1-codierenden Sequenzen die codierenden Bereiche der E1A-Proteine und die E1B-Promotorsequenz, die mit den E1B-codierenden Sequenzen bis einschließlich dem Stopcodon des E1B-55K-Proteins verknüpft ist, umfassen.
9. Verpackungszelllinie gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei es sich bei dem Adenovirus der Untergruppe B um Adenovirus Serotyp 35 handelt und wobei die E1-codierenden Sequenzen die Nucleotide 468 bis 3400 einer Ad35-Wildtypsequenz umfassen.
10. Verpackungszelllinie, die auf einem Serotyp der Untergruppe B basierendes rekombinantes Adenovirus komplementieren kann, wobei die Zelllinie von einer Zelle abgeleitet ist, die mit einem chimärischen Adenovirus-E1-Konstrukt transformiert wurde, das E1A-codierende Sequenzen und wenigstens einen Teil der E1B-21K-codierenden Sequenzen aus einem Adenovirus, das nicht zur Untergruppe B gehört, umfasst und weiterhin E1B-55K-codierende Sequenzen aus einem Adenovirus der Untergruppe B umfasst.
11. Verpackungszelllinie gemäß Anspruch 10, wobei die E1B-55K-codierenden Sequenzen, die nicht mit den E1B-21K-codierenden Sequenzen überlappen, von einem Adenovirus der Untergruppe B stammen.
12. Verpackungszelllinie gemäß Anspruch 8 oder 9, wobei es sich bei dem Adenovirus der Untergruppe B

um Adenovirus Serotyp 35 handelt.

13. Verpackungszelllinie gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10, wobei die Adenovirus-E1-codierenden Sequenzen funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft sind, die die Transcription und Translation der codierten Proteine ermöglichen.

14. Verpackungszelllinie gemäß einem der Ansprüche 10 bis 13, wobei die Zelle eine primäre diploide humane Zelle oder ein Derivat davon ist.

15. Verpackungszelllinie gemäß Anspruch 14, wobei die primären humanen Zellen aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus primären Retinoblasten, primären embryonalen Nierenzellen und primären Amniocyten besteht.

16. Verpackungszelllinie, die auf einem Serotyp der Untergruppe B basierendes rekombinantes Adenovirus komplementieren kann, wobei die Zelllinie von einer Zelle abgeleitet ist, die mit E1-codierenden Sequenzen eines Adenovirus, das nicht zur Untergruppe B gehört, transformiert wurde und wobei die Zelle weiterhin eine E1B-55K-codierende Sequenz eines Adenovirus der Untergruppe B umfasst, die in das Genom der Zelle integriert ist.

17. Verpackungszelllinie gemäß Anspruch 16, wobei es sich bei dem Adenovirus der Untergruppe B um Adenovirus Serotyp 35 handelt.

18. Verpackungszelllinie gemäß Anspruch 16 oder 17, wobei die E1-codierenden Sequenzen funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft sind, die die Transcription und Translation der codierten Proteine ermöglichen.

19. Verpackungszelllinie gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18, wobei die E1B-55K-codierende Sequenz von einem E1B-Promotor gesteuert und durch ein heterologes Polyadenylierungssignal abgebrochen wird.

20. Verpackungszelllinie gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18, wobei die E1B-55K-codierende Sequenz von einem heterologen Promotor gesteuert wird.

21. Verpackungszelllinie gemäß einem der Ansprüche 16 bis 20, wobei die Adenovirus-E1-codierenden Sequenzen entweder auf einem einzigen DNA-Molekül funktionell verknüpft sind oder sich auf zwei getrennten DNA-Molekülen befinden.

22. Verpackungszelllinie gemäß einem der Ansprüche 16 bis 21, wobei die Zelle eine primäre diploide humane Zelle oder ein Derivat davon ist.

23. Verpackungszelllinie gemäß Anspruch 22, wobei die primären humanen Zellen aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus primären Retinoblasten, primären embryonalen Nierenzellen und primären Amniocyten besteht.

24. Verpackungszelllinie gemäß Anspruch 22, wobei die Zelle, die mit den Adenovirus-E1-codierenden Sequenzen der Untergruppe C transformiert ist, eine PER.C6-Zelle (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940), eine 293-Zelle, eine 911-Zelle oder eine A549-Zelle oder ein Derivat einer dieser Zellen ist.

25. Verpackungszelllinie gemäß einem der Ansprüche 1 bis 24, wobei die E1-Sequenzen des Adenovirus der Untergruppe B keine Sequenzen enthalten, die mit in einem assoziierten rekombinanten viralen Vektor vorhandenen Sequenzen überlappen.

26. Verpackungszelllinie gemäß einem der Ansprüche 10 bis 25, wobei es sich bei dem Adenovirus, das nicht zur Untergruppe B gehört, um Adenovirus Serotyp 5 handelt.

27. Verfahren zum Komplementieren eines rekombinanten Adenovirus, das auf einem Serotyp der Untergruppe B basiert, wobei das Verfahren das Bereitstellen einer Verpackungszelllinie gemäß einem der Ansprüche 1 bis 26 mit einer Nucleinsäure, die das rekombinante Adenovirus codiert, und das Kultivieren der Zelllinie, um eine Komplementierung zu ermöglichen, umfasst.

28. Verfahren gemäß Anspruch 27, das weiterhin das Ernten des komplementierten rekombinanten Ade-

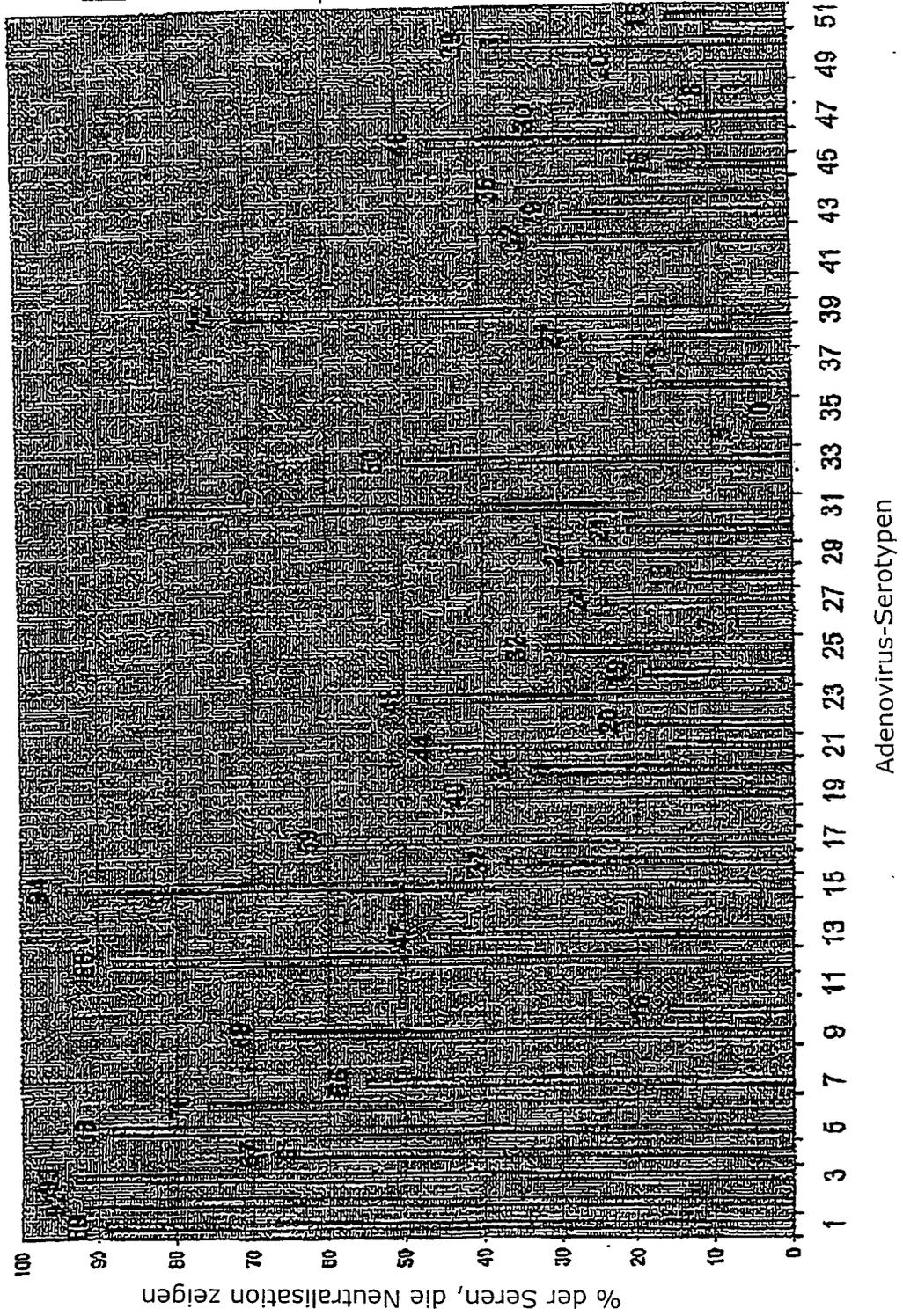
novirus umfasst.

29. Verfahren gemäß Anspruch 27 oder 28, wobei das rekombinante Adenovirus auf dem Serotyp 35 beruht.

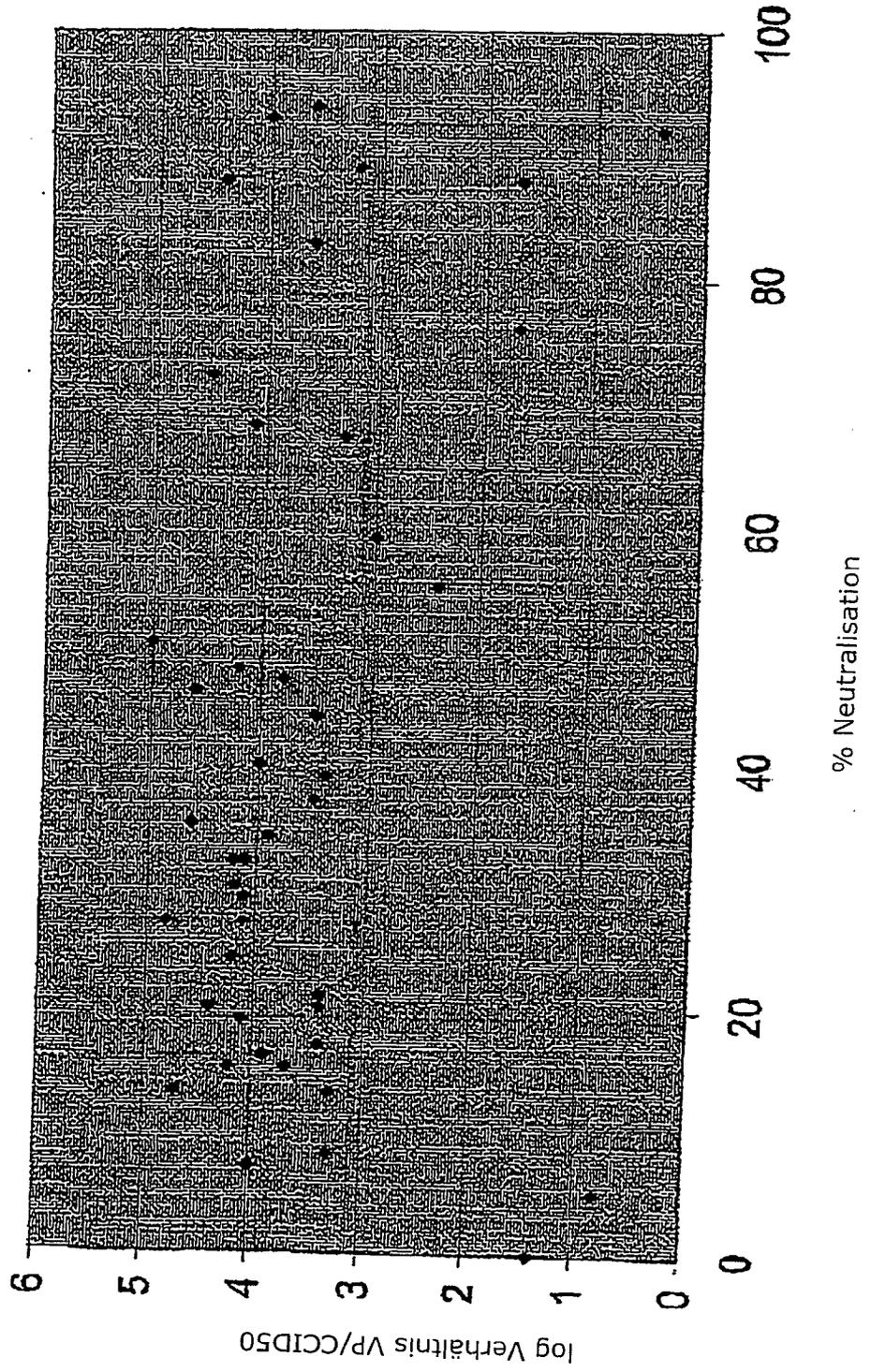
Es folgen 47 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1: % der Humanseren mit Neutralisationsfähigkeit für humanes Adenovirus (n = 100)

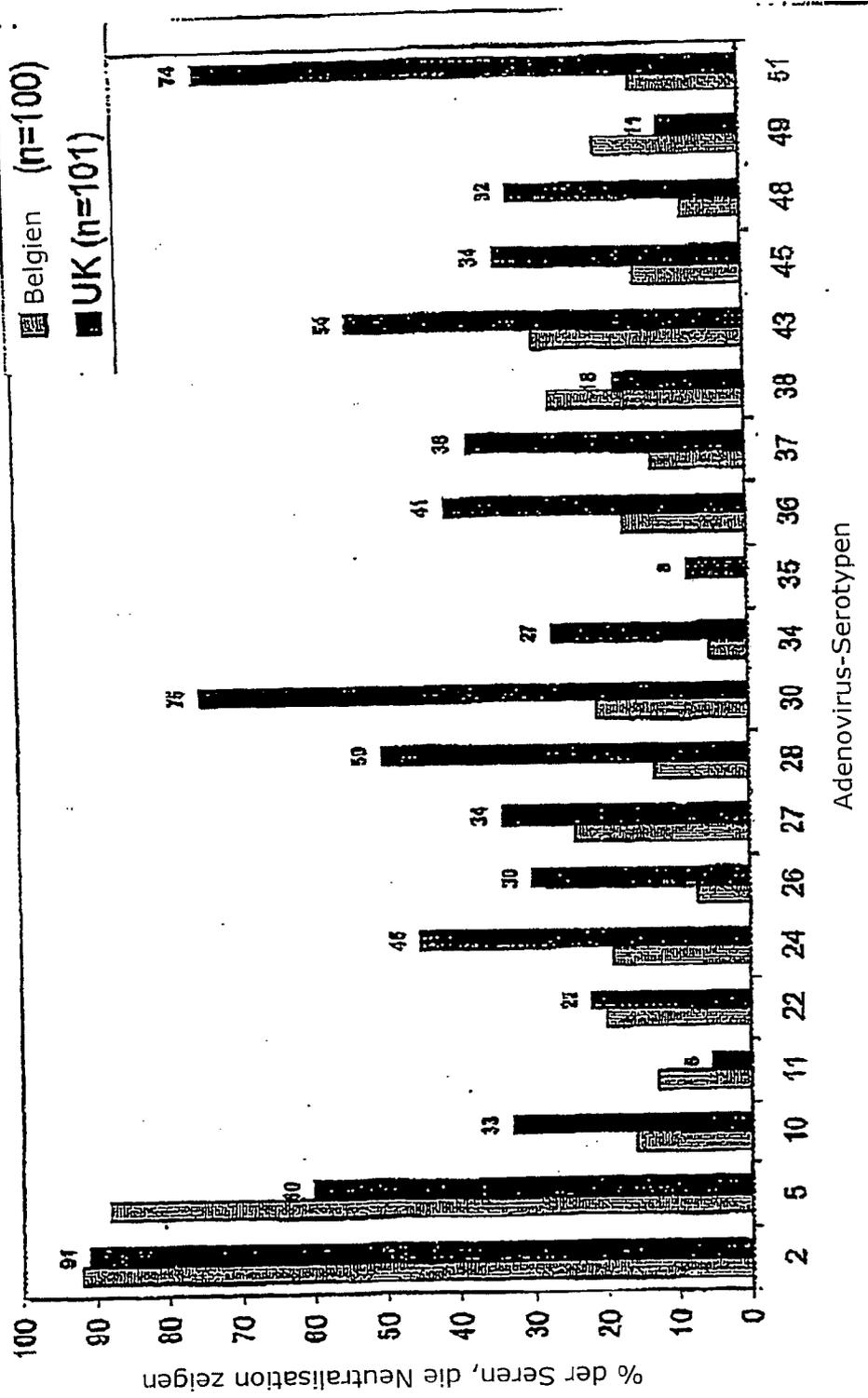


Figur 2



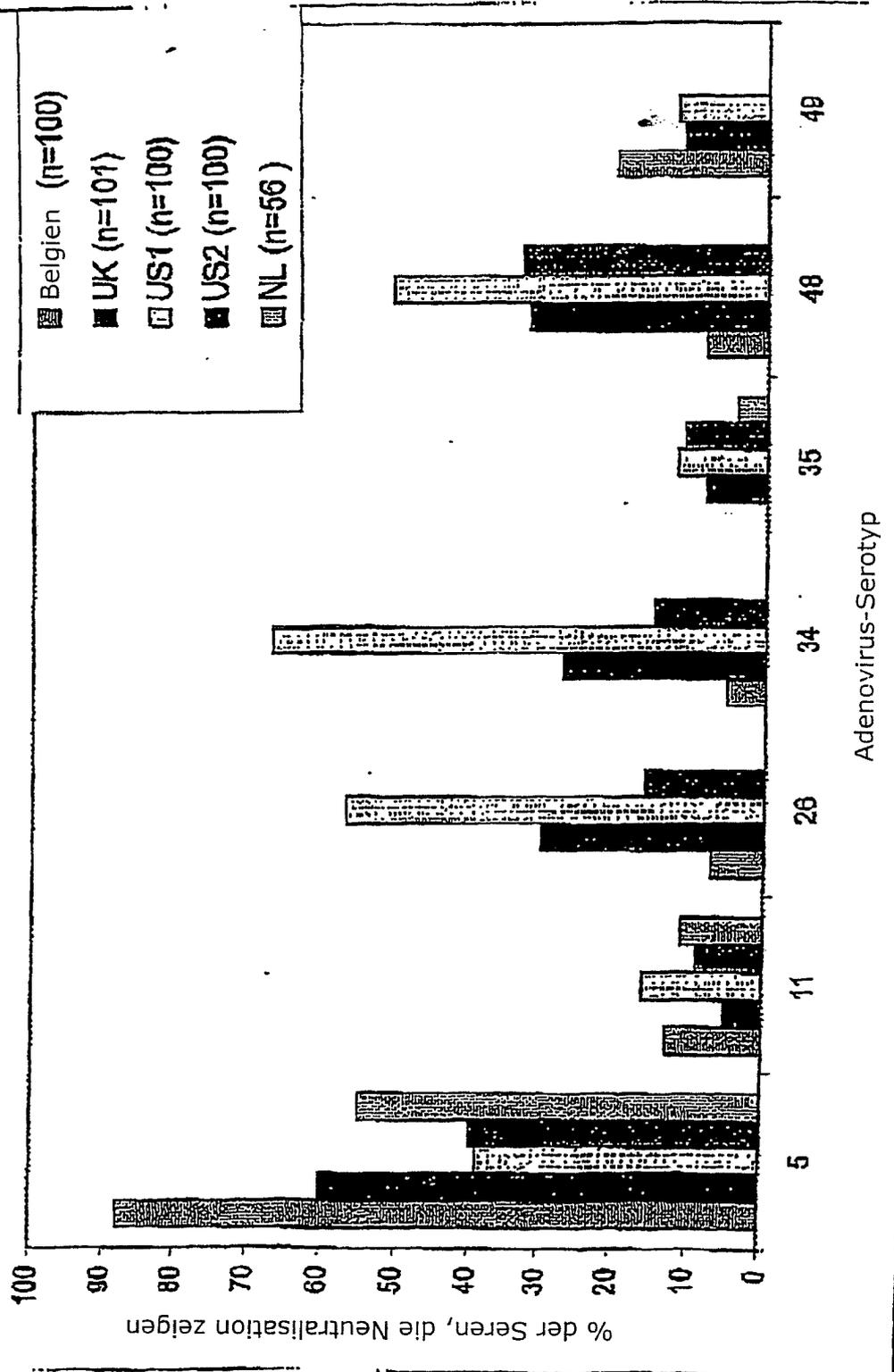
Figur 3

Neutralisation in Humanseren



Figur 4

Neutralisation in Humanseren von verschiedenen geographischen Orten



1	CATCATCAAT	AATATACCTT	ATAGATGGAA	TGGTGCCAA	ATGTAATGA	GGTGATTTTA	AAAAGTCTGG
71	CCCGTGTGGT	GATTGGCTGT	GGCGTTAACG	GTTAAAAGGG	GCGGCGCGGC	CGTGGSAAAA	TGACGTTTTA
141	TGGGGGTGGA	GTTTTTTTGC	AAGTTGTGCG	GGGAAATGTT	ACGCATAAAA	AGBCTTCTTT	TCYCACGGAA
211	CTACTTACTT	TTCCACCGGT	ATTTAACAGG	AAATGAGSTA	GTTTTGACCG	GATGCAAGTG	AAAAATTGCTG
281	ATTTTCGGGC	GAAAACTGAA	TEAGGAAGTG	TTTTTCTGAA	TAATGTGGTA	TTTATGGCAG	GGTGGAGTAT
351	TTGTTCAAGG	CCAGSTAGAC	TTTGACCCAT	TACGTGGAGG	TTTCGATTAC	CGTGTTTTTT	ACCTGAATTT
421	CCGCGTAGCG	TGTCAAAGTC	TTCTGTTTTT	ACGTAGGTGT	CABCTGATCG	CTAGGGTATT	TATACCTCAG
491	GGTTTGTGTC	AAGAGGCCAC	TCTTGAGTGC	CAGCGAGAAG	AGTTTTCTCC	TCTGCGCCGG	CAGTTTAATA
561	ATAAAAAAAT	GAGAGATTTG	CGATTTCTGC	CTCAGGAAAT	AATCTCTGCT	GAGACTGGAA	ATGAAATATT
631	GGAGCTTGTG	GTGCACGCC	TGATGGGAGA	CGATCCGGAG	CCACCTGTGC	AGCTTTTTGA	GCCTCCTACG
701	CTTCAGGAAC	TGTATGATTT	AGAGGTAGAG	GGATCCGAGG	ATTCTAATBA	GGAAAGCTGTG	AAATGCTTTT
771	TTACCGATT	TATGCTTTTTA	GCTGCTAATG	AAGCATTAGA	ATTAGATCCG	CCTTTGGACA	CTTTCAATAC
841	TCCAGGGGTG	ATTGTGGBAAA	GCGGTACAGG	TGTAAGAAAA	TTACCTGATT	TGAGTTCCGT	TGAGTTGAT
911	TTGCACTGCT	ATGAAGACGG	GTTTCTCCB	AGTGTAGAGG	AGBACCATGA	AAAGGAGCAG	TCCATGCAGA
981	CTGCAGCGGG	TGAGGGAGTG	AAGGCTGCCA	ATGTTGGTTT	TCAGTTGGAT	TGCCCGGAGC	TTCTTGGACA
1051	TGGCTGTAA	TCTTGTGAAT	TTACAGGAA	AAATACTGGA	GTAAAAGAAC	TGTTATGTTT	GCITTTGTTAT
1121	ATBAGAACGC	ACTGCCACTT	TATTTACAGT	AAGTGTGTTT	AAGTTAAAAT	TAAAGGAAT	ATGCTGTTTT
1191	TCACATGAT	ATTGAGTGTG	AGTTTTGTG	TTCTTATTAT	AGGTCCCTGTG	TCTGATGCTG	ATBAATCACC
1261	ATCTCCTEAT	TCTACTACCT	CACCTCCTGA	TATTCAAGCA	CCTGTTCCTG	TGGACGTGCG	CAAGCCCATTT
1331	CCTGTSAAGC	TTAAGCCTGG	GAAACGTCCA	GCAGTGGAGA	AACCTTBAGGA	CTTGTACAG	GGTGGGACG
1401	GACCTTTGGA	CTTSAGTACA	CGGAAACGTC	CAAGACAATA	AGTGTTCAT	ATCCGTGTTT	ACTTAAGGTG
1471	ACCTCAAAT	TTGTGTGAGA	GTGCAATGTA	ATAAAAAAT	GTTAACTGTT	CACTGGTTTT	TATTGCTTTT
1541	TGGGCGGGGA	CTCAGGTATA	TAAGTAGAAG	CAGACCTGTG	TGTTTAGCTC	ATAGGAGCTG	GCTTTTCATCC
1611	ATBAGGTTT	GGCCCATTTT	GGAAAGACTT	AGGAAGACTA	BGCAACTGTT	AGAGAGCCT	TCCGACGGAG
1681	TCTCCGTTTT	TTGGAGATTC	TGTTTCCTA	GTGAATTAGC	TAGGGTAGTT	TTTAGGATAA	AACAGGACTA
1751	TAAACAAGAA	TTTGAAGAGT	TGTTGGTAGA	TTGCCAGGSA	CTTTTTGAAG	CTCTTAATTT	GGCCCTCAG
1821	GTTCACTTTA	AAGAAAAAGT	TTTTATCAGT	TTAGACTTTT	CAACCCACGG	TAGAACTGCT	GCTGCTGTGG
1891	CTTTTCTTAC	TTTTATATTA	GATAAATGSA	TCCCGCAGAC	TCATTTCCAG	ATAGGACTACG	TTTTGGATTT
1961	CATAGCCACA	GCAATGTGGA	GAACATGGAA	GTTTCGCAAG	ATGAGGACAA	TCTTAGGTTA	CTGGCCAGTG
2031	CAGCCTTTGG	GTGTAGCCGG	AATCCTGAGG	CATCCACCCG	TCATGCCAGC	GTTTCTGGAG	GAGGAACAGC
2101	AAGAGGAGAA	CCCCGAGACC	GGCCTGGACC	CTCCAGTGG	GGAGGCGGAG	TAGCTGACTT	GTCTCTGAA
2171	CTGCAACGG	TGCTTACTGG	ATCTACGTC	ACTGGACGGG	ATAGGGGCGT	TAAGAGGGAG	AGGGCATCCA
2241	GTTGGTACTGA	GCTAGATCT	GAGTTGGCTT	TAAGTTTAA	GAGTCGCABA	CGTCTGAAA	CCATTTGGTG
2311	GCAATGAGTT	CAGAAAGAGG	CAAGCCATGA	AGTTTCTGTA	TTGCARAGGA	AATATTCACT	GGAACAGGTG
2381	AAAACATGTT	GGTTGGAGCC	AGAGGATGAT	TGGGCGGTGG	CCATTAAGAA	TTATGCCAAG	TTAGCTTTGA
2451	GGCCTGATAA	ACAGTATAAG	ATCAGTAGAC	GGATTAATAT	CCGGAATGCT	TGTTACATAT	CTGSAATGG
2521	GGCTGAGGTG	GTAATAGATA	CTCAGACAA	GACAGTTATT	ABATGCTGCA	TGATGATAT	GTGGCCTGGA
2591	GTAGTCGGTA	TGGAAGCAGT	CACTTTTGTA	AATGTTAAGT	TTAGGGGAGA	TGTTATAAT	GSAATAGTGT
2661	TTATGGCCAA	TACCAAACTT	ATATTBGATG	GTGTGAGCTT	TTTTGGTTTC	AACAATACCT	GTGTAGATEC
2731	CTGGGGACAG	GTTAGTGTAC	GGGGGTGTAG	TTTCTATGGG	TGTTGGATTG	CCACAGCTGG	CAGAACCAAG
2801	AGTCAATTGT	CTCIGAASAA	ATGCATATTC	CAAAGATGTA	ACCTGGGELAT	TCTGAATGAA	GGGGAAGCAA
2871	GGGTCCCTCA	CTCCCTTCT	ACAGATACTG	GATGTTTTAT	TTTAATTAAG	SGAAATGCCA	CGCTAAAGCA
2941	TAACATGATT	TGTGGTGGCTT	CCGATGABAG	GCCTTATCAA	ATGCTCACTT	GTGCTGGTGG	GCATTGTAAT
3011	ATGCTGGCTA	CTGTGCATAT	TGTTTTCCCAT	CAACGCAAAA	AATGGCCTGT	TTTTGATCAC	AATGTGTTGA
3081	CCAAGTGCAC	CATGCATGCA	GGTGGGCGTA	GAGGAATGTT	TATGCTTAC	CAGTGTAAAC	TGAATCATGT
3151	GAAAAGTGTG	TTGGAACCCAG	ATGCCTTTTT	CAGAATGAGC	TETTTGACAT	CTAACAGGAA	GAACACGCAA
3221	ATCTGGGAAG	TCCGTGAGGTA	TGATGATACG	AGATCGAGGG	TGCGGCGATG	CGAATGCGGA	GGCAAGCATG
3291	CCAGSTTCCA	GCCGGTGTGT	GTAGATGTGA	CCGAAGATCT	CAGACCGGAT	CAYTTGGTTA	TTGCCCGCAC
3361	TGGAGCAGAG	TTCCGGATCCA	GTGGAGAAGA	AACGTACTAA	GGTGAGTATT	GGGAAAACTT	TGGGGTGGGA
3431	TTTTAGAGTG	GACAGATTGA	GTAATAATTT	GTTTTTCTG	TCTTGCAGCT	GACATGAGTG	GAAATGCTTC
3501	TTTTAAGGGG	GGAGTCTTCA	GCCCTTATCT	GACAGGGCCT	CTCCCATCCT	GGGCAGGAGT	TCBTCAGAA
3571	GTTATGGGAT	CTACTGTGGA	TGSAABACCC	BTTCAACCCG	CCAATTCCTC	AACGCTGACC	TATGCTACTT
3641	TAAGTTCTTAC	ACCTTTGGAC	GCAGCTGCAG	CCGCTGCCCG	CGCTCTGTG	GCCGCTAACA	CTGTGCTTGG
3711	AAATGGTTTAC	TATGGAAGCA	TCGTGGCTAA	TTCCAATCTC	TCTAATAACC	CTTCTACACT	GACTCAGGAC
3781	AAGTTACTTGG	TCCTTTTGGC	CCAGCTGGAG	GCTTTGACCC	AACGTCTGGG	TGAACTTTCT	CAGCAGSTGG
3851	CCGAGTTGGG	AGTACAAACT	GAGTCTGCTG	TGGGCACGGC	AAAGTCTAAA	TAAAAAAAAT	TCCAGAATCA

```

3921 ATGAATAAAT AAACBAGCTT GTTGTGATT YAAAATCAAG TGTTTTTATT TCATTTTTTC CGCACGGTAT
3991 GCCCTGGACC ACCGATCTCG ATCATTGAQA ACTCGGTGGA YTTTTTCCAG AATCCTATAG AGGTGGGATT
4061 GAATGTTTTAG ATACATGGGC ATTAGGCCGT CTTTGGGSGT GAGATAGCTC CATTGAAGGG ATTCATGCTC
4131 CGGGGTAGTG TTGTAATCA CCCAGTCATA ACAAGGTCGC AGTGCATGGT GTTGACAAAT ATCTTTTABA
4201 AGTAGGCTGA TTGCCACABA TAAGCCCTTG GTGTAGGTGT TTACAAACCG GTTGAGCTGG GAGGGGTGCA
4271 TTCGAGGTGA AATTATGTGC ATTTTGGATT GGATTTTTAA GTTGGCAATA TTGCCGCAA GATCCCCTCT
4341 TGGGTTTCATG TTATGAAGGA CTACCAAGAC GGTGTATCCG GTACATTTAG GAAATTTATC GTGCAGCTTG
4411 GATGGAAAAG CGTGGAAAAA TTTGGAGACA CCCTTGTGTC CTCCGAGATT TTCCATGCAC TCATCCATGA
4481 TAATAGCAAT GGGGCCGTGG GCAGCGGCGC GGGCAAAAC ACCTCCGTGG GTTGACACAT CATAGTTATG
4551 TTCCTGAGTT AAATCATCAT AAGCCATTTT AATGAATTTG GGGCCGAGCG TACCAGATTG GGGTATGAAT
4621 GTTCCYTCGG GCCCCGGAGC ATAGTTCCCC TCACAGATTT GCATTTCCCA AGCTTTCACT TCTGAGGGTG
4691 GAATCATGTC CACCTGGGGG GCTATGAAGA ACACCCTTTC GGGGGCGGGG GTGATTAGTT GGGATBATAG
4761 CAAGTTTTCG AGCAATTGAG ATTTGCCACA YCCGTTGGGG CCATAAATAA TTCCGATTAC AGGTTGCAGG
4831 TGGTAGTTTA GGGAAACGCCA ACTGCCGTCT TCTCGAAGCA AGGGGGCCAC CTCGTTTATC ATTTCCCTTA
4901 CATGCATATT TTCCCGCACC AAATCCATTA GGAGCGCTC TCCTCCTAGT GATAGAAGTT CTTGTAGTGA
4971 GGAAAAGTTT TTCAGCGETT TTAGACCCTC AGCCATGGGC ATTTTGGAAA GAGTTTGTCT CAAAAGTTCT
5041 AGTCTGTTCC ACAGTTCAGT GATGTGTTCT ATGGCATCTC ATGGCGTCC AGCGGTGCCA GGGTTCGGTC CTTCCAGGGT
5111 TGGACGGCTC CTGGAGTAGG GTATGAGACC ATGGCGTCC AGCGGTGCCA GGGTTCGGTC CTTCCAGGGT
5181 CTCAGTGTTC GAGTCAGGGT TGTTCCTGTC ACAGTGAAGG GGTGTGCGCC TGCTTGGGCG CTTGCCAGGG
5251 TGCGTTTCAG ACTCATTCTG CTGGTGBAGA ACTTCTGTCG CTTGGCGCCC TGATGTCCG CCAAGTAGCA
5321 GTTTACCATG ABTTCTGAGT TGAGCGCCTC GGCTGCGTGG CCTTTGGCGC GGAGCTTACC TTTGAAAGTT
5391 TTCTTGCAAT CCGGGCAGTA TAGGCATTTT AGCGCATACA GCTTGGGCGC AAGGAAAATG GATTCTGGGG
5461 AGTATGCAT CCGCGCCGAC GAGGCGCAAA CAGTTTACA TTCCACCAGC CAGGTTAAAT CCGGTTTCAAT
5531 GGGGTCAAAA ACAAGTTTTT CGCCATATTT TTTGATGCGT TTCTTACCTT TGSTCTCCAT AAGTTCTGCT
5601 CCTCGTTGAG TGACAAACAG GCTGTCCGTA TCTCCGTAGA CTGATTTTAC AGGCTCTTTC TCCAGTGGAG
5671 TGCCCTGGTC TTCTTCTGAC AGGAACTCTC ACCACTCTGA TACAAGGCG CGCGTCCAGG CCAGCAAAA
5741 GAGGGCTATG TGGGAGGGGT AGCGATCTGT GTCAACCAGG GGSTCCACCT TTTCCAAAGT ATGCAAACAC
5811 ATGTCACCCCT CTTCAACATC CAGGAATGTG ATTGECTTGT AGGTGTATTT CACGTBACCT GGGTCCCCC
5881 CTGGGGGGGG ATAAAAGGGG BCGSTTCTTT GCTCTTCTC ACTGTCTTCC GGATCGCTBT CCAGGAACGT
5951 CAGCTGTTGG GGTAGGTATT CCTCTCGAA GGGGGGCATG ACCTCTGCAC TCAGSTTGT CAGSTTGT CAGTTCTAAG
6021 AACGAGGAGG ATTTGATATT GACAGTGCCG GTTGAGATGC CTTTTCATG CTTTTCATG ATTTGGTCAG
6091 AAAACACAAT TTTTTATTTG TCAAGTTTGG TGGCAAAATG TCCATACAGG BCGTTGATA AAAGTTTGG
6161 AATGGATCGC ATGGTTTGGT TCTTTTCTT GTCCGCGCGC TCTTTGGCBB CGATSTTGA TTTGGACATC
6231 TCGCGTGCCA GGCACCTCCA TTCGGGAAG ATAGTGTTA ATTCATCTGG CACGATTTCT ACTTGGCACC
6301 CTCGATTATG CAAGGTAATT AAATCCACAC TGSTGGCCAC CTCGCTCGA AGGEGTTCA TGGTCCAACA
6371 GAGCCTACCT CCTTTCCTAG AACAGAAAGG GGGAAAGTGG TCTAGCATAA GTTCATCGG AGGGTCTGCA
6441 TCCATGBTAA AGATTCCCAG AAGTAAATCC TTATCAAAAT ABCTEATGGG AGTGGGTC A TCTAAGGCCA
6511 TTTGCCATTC TCGAGTGGC AGTCCGCGCT CA)A)GGTT AAGGGGACTG CCCCAGGGCA TGGGATGGT
6581 GAGAGCAGAG GCATACATGC CACAGATGTC ATAGACGTAG ATGGGATCCT CAAAGATGCC TATGTAGBT
6651 GGATAGCATC GCCCCCTCT GATACTTGT CCGACATAGT CATATAGTTC ATGTGATGG GCTAGCAGCC
6721 CCGGACCCAA GTTGGTGGGA TTTGGTTTTT CTGTTCTGTA GACGATETGG CGAAAGATGG CTTGAGTGG
6791 GGAAGAGATG STGGGTCTTT GAAAAATGTT GAAATCGCA TGAGGTAGAC CTACAGACT TCTGACAAA
6861 TGGGCATAAG ATTTCTGAAG CTGGTTACC AGTTCGCGGG TGACAAGTAC GTCTAGGGCG CAGTAGTCAA
6931 GTGTTTCTG AATGATGTCA TAACCTGTT GSTTTTTCTT TTCCCACAGT TCGCGGTTGA GAAGBTATTC
7001 TTCGCGATCC TTCCAGTACT CTTCTAGGCG AAACCGTCT TTGTCTGCAC GGTAAAGTCC TAGCATGTAG
7071 AACTGATTA A CTGCTTGTG AGGGCAGCAG CCTTCTCTA CCGGTAGAGA GTATGCTTGA GCAGCTTTTC
7141 GTAGCGAAGC GTGAGTAAGG GCAAAGGTGT CTCTGACCAT GACTTTGASA AATTGGTATT TGAAGTCCAT
7211 BTGCTCACAG GTCCTCTGTT CCCAGAGTTC GAAGTCTACC CGTTTCTTGT AAGCGGGGTT GGGCAAAGCG
7281 AAAGTAACAT CATTGAAGAG AATCTTACC GCTCTGGCA TAAAATTGCG AGTSATGCGG AAAGGCTGTG
7351 GTACTTCCCG TCGATTGTTG ATCACCITGG GCCTCTGACG GATTTCTGTC AAACCGTTGA TGTGTGTCTC
7421 TACGATGTAT AATTCTATGA AACCGCGGCT GCTCTGACG TGAGGTAGCT TACTGAGCTC ATCAAAGGTY
7491 AGGTCTGTGG GGTGAGATAA GGTGTAGTGT TCGAGAGCC ATTCGTGCA GGTGAGGATT GCATGTAGGA
7561 ATGATGACCA AAGATCTACC GCGAGTCTG TTTGTAACB GGTCTGSGGG GTCCSATA TGCAGAAAAT GCGGSCCAAT
7631 TGCCATTTTT TCTGGAGTGA CACASTAGAA GGTCTGSGGG TCTTGTGSC ATCGATCCA CTTGAGTTTA
7701 ATGGCTAGAT CGTGGGCCAT GTTGACGAGA CGCTCTTCTC CTGAGAGTTT CATGACCAGC ATGAAAGGAA
7771 CTAGTTGTTT CCAAAGGAT CCCATCCAGB TGAAGTTTC CACATCGTAG GTCAGGAAGA GTCTTCTBT
7841 GCBAGGATGA GAGCCGATCG GGAAGAACTG GATTTCTGTC CACCAGTTGG ABBATTGCT GTTATSTGA
7911 TGGAAGTAGA AGTTTTCTGC GCGCGCCAG CATTCTGTT TGTCTTGTG CAGACGGCC GATGATGCG

```

```

7981 AGCGTTGCAC GGGTITGATC TCGTGAATGA GCTGTACCTG GCTTCCCTTG ACGAGAAATT TCAGTSGGAA
8051 GCCGAGGCCCT GGCGATTGTA TCTCGTGCTC TTCTATATTC GCTGTATCGG CCTGTTCATC TTCTGTTTTG
8121 ATGGTGGTCA TGCTGACBAG CCCCSCGGG AGGCAAGTCC AGACCTCGGC GCGGGAGGGG CCGAGCTGAA
8191 GBACGAGAGC GCGCAGGCTG GAGCTGTCCA GAGTCTGAG ACGCTGCGBA CTCAGGTTAG TAGGTAGGGA
8261 CAGAAAGATTA ACTTGCATGA TCTTTTCCAG GCGGTGCGGG AGGTTTCAGAT GGTACTTTGAT TTCCACAGGT
8331 TCGTTTTGTAG AGACGTCAAT BECTTGCAGG GTTCCGTGTC CTTTGGGGCG CACTACCGTA CCTTTGTTTT
8401 TTCTTTTGTAT CGGTGGTGGC TCTCTTGCTT CTTGCATGCT CAGAAGCGGT GACGGGGACG ECGCCCGGGC
8471 GGCAGCGGTT GTTCCGGACC CCGGGGCATG GCTGCTAGTG GCACGTGGGC GCCCGCAGG GGCAGGTTCT
8541 GGTATTGCGC TCTGABAAGA CTTGCGTGGC CCACCACGGC TCGATTGACG TCTTGTATCT GACGCTCTG
8611 GGTGAAAGCT ACCGGCCCCG TGAGCTTGA A CTTGAAAGAG AGTTCAACAG AATCAATTTT GGTATCGTTA
8681 ACGGCAGCTT GTCTCAGTAT TTCTTGTACG TCACCAGAGT TGTCTGTTA GCGATCTCC GCCATGAAT
8751 GETCBATTTT TTCTCTCTGA AGATCTCCGC GACCCGCTCT TCGACGGTG GCGGCSAGGT CATTGAGAT
8821 ACGGGCCATG ABTTGGGAGA ATGCATTCAT GCGGCTCTCG TTCCAGACGC GCTGTGTAAC ACGGCCCCC
8891 TCGGAGCTC TGGCGCGCAT CACCACCTGA GCGAGGTTAA GCTCCACGTE TCTGTTGAA ACCGCATAGT
8961 TGCATAGGCG CTGAAAAGG TAGTTGAGTG TGGTGGCAAT GTGTTCSGGC ACGAAGAAAT ACATGATCCA
9031 TCBTCTCAGC GGCATTTCCG TAACATCGCC CAGAGCTTCC AAGCGCTCCA TGCCCTCGTA GAAGTCCAG
9101 BCAAAATTA AAAACTGGGA GTTTCSCCG GACACGGTCA ATTCTCTC AGAAGACGG ATGAGTTCCG
9171 CTATGGTGGC CCSTACTTCS CGTTCGAAG CTCCCBBGAT CTCTTCTTCC TCTTCTATCT CTTCTTCCAC
9241 TAACATCTCT TCTTCTCTT CAGCGGGGG CCGAGGGGGC ACGCGGCGAC GTCGACGGCG CACGGGCAAA
9311 CGGTGATGTA ATCGTTCAAT ACCTCTCCG GATCTCTCC GCATGGTTTC AGTAAGACGG AGTGGGTTCT
9381 CGCGCGGTCG CAGAGTAAAA ACACCGCCSC GCATCTCCTT AAAGTGGTGA CTGGGAGETT CTCGGTTTTG
9451 GAGGGAGAGG GCGCTGATTA TACATTTTAT TAATTGGCCC GTAGGGACTG CCGCAGAGA TCTGATCTG
9521 TCAAGATCCA CCGSATCTGA AAACCTTTCG ACGAAAGCT ATACCAGTC CTAACCAGTC ACAGTCAAA CATAGCTGA
9591 GTACGGCTTC TTGTGGGCG ATGTGCTG ATGTGCTG TGATGAAATT AAAGTAGGCA GTTCTAAGAC GCGGATGGT GGCAGGAGC
9661 AGGTGAGACG ACCAGGCTT TGGGTCGGC TTGCTGGATA GCGAGGCGAT TGGCCATTCC CCAAGCATT TAAGGATCT
9731 TAGCAAGATC TTTGTAGTAG TCTTGCATGA GCGCTTCTAC GGGCAGTTCT TCTCACCCG TTCTGCLATG
9801 CATACGTBTG ABTCAAATC CBGBCATTGG TTGTACCAST GCGAAGTCAG GCGAAGTCAG CTACGACTCT TTCGGCAGG
9871 ATGGCTTGGT GTACTTGGGT AAGGGTGCGT TGAAAGTCAT CAAAATCCAC AAAGCGGTGG TAAGCCCCG
10011 TATTAATGGT GTAAGCACAG TTGGCCATGA CTGACCAGTT AACTGTCTGG TBACCAGGGC GCACGAGCTC
10081 GGTGTATTTA AGGCGCGAAT AGGCGCGGGT GTCAAAGATG TAATCGTTGC ABGTGCGCAC GAGTACTGG
10151 TACCCTATAA GAAAATGCGG CCGTGGTGG CCGTAGAGAG GCCATCGTTC TGTAGCTGGA GCGCCAGGGG
10221 CGAGGCTTTC CAACATAAGG CCGTGTATGC CBTAGATGTA CCTGGACATC CAGGTGATTC CTGCGGGGGT
10291 AGTAGAAGCC CBAGGAAACT GCGCTACGCG GTTCAAATG TTGCGTAGCG GCATGAAGTA GTTCAATGTA
10361 GGCACGGTTT GACCAGTGA GCGCGCGCAG TCAATGATGC TCTATAGACA CCGAAGAAAT GAAAGCGTTC
10431 AGCGACTCGA CTCCGTAGCC TGGAGGAAC TGAACGGGT GGGTCSGGT GTCACCCGGT TCGAGCTTC
10501 TACTCGAGCC GGCAGGAGCC CCGCTAACG TGGTATTGGC ACTCCGCTCT CAGCCAGCC TACAAGAAATC
10571 CAGGATACGG AATCGAGTCG TTTTGTGGT TTCCGAATGG CAGGGAAGTG AGTCTATTT TTTTTTTTTT
10641 TTTGCGGCTC AGATGCATCC CGTGCTGCGA CAGATGCGCC CCAACAACA GCCCCCTCG CAGCAGCAGC
10711 AGCAGCAACC ACAAAAGGCT GTCCCTGCAA CTACTGCAAC TGCCCGCGTG AGCGGTGCGG GACAGCCCGC
10781 CTATGATCTG GACTTGGAAAG AGGGCGAAGG ACTGGCACST CTAGGTGCGC CTTGCGCGA CCGGATCCG
10851 CGAGTTCAAC TGAAAAAGG TTCTCGGAG GCGTATGTGC CCAACAGAA CTTATTTAGA GACAGAGCG
10921 GCGAGGAGCC GAGGAGATG CGAGCTTCCC GCTTTAACGC GGGTCTGAG CTGCGTCAGG GTTTGGACCC
10991 AAGACBAGTG TTSCBAGAG ABGATTTCSA AGTTGATGAA GTGACAGGCA TCAGTCTG CAGGGCACAC
11061 GTGGCTGCAG CCAACCTTGT ATCGGCTTAC GAGCAGACAG TAAAGGAAGA GCGTAACCTT CAAAAGTCTT
11131 TTAATAATCA TGTECGAACC CTGATTGCC CEGAAAGAT TACCCTTGGT TTGATGCATT TGTTGGATTT
11201 GATGGAAGCT ATCATTGAGA ACCCTACTAG CAAACCTCTG ACCGCCCAGC TGTCTCTGGT GGTGCAACAC
11271 AGCABAGACA ATGAGGCTTT CAGAGAGGCG CTGTGAACA TCACCGAACC CAGGGGAGA TGTTGTATG
11341 ATCTTATCAA CATTCTACAG AGTATCATAG TGCAGGAGCG GAGCCTGGG CTGGCCGAGA AGGTAGCTGC
11411 CATCAATTAC TCGTTTTGTA GCTTGGGAAA ATATTACGCT CGCAAAATCT ACAAGACTCC ATACGTTCCC
11481 ATAGACAAGG ASGTGAAGAT AGATGGGTTT TACATGCSA TGACGCTCAA GGTCTTGACC CTEAGCGATG
11551 ATCTTGGGGT BTATCGCAAT GACAGAAATG ATCGCGGCT TAGCCCBAGC AGGAGGCGCG AGTTAAGCGA
11621 CAGGGAACTG ATGACAGAT TSCAAAGAG TCTGACTGGA GCTGGAACCG AGGGTGAGAA TTACTTCGAC
11691 ATGGCAGCTG ACTTSCAGT GCAAGCTACT GCGAGGCTC TBAAGCGCCG GACGGCAGGA TTCTGAGCTE
11761 CTTACATAGA AGAGCGGAT GAAGGCBAGG ACGAAGAGGG CAGTACTT GAGACTGAT GGCACAACCC
11831 GTGTTTTTTG CTAGATGBAA CABCAAAGC CCGATCCCG AATGCGGGCG GCGCTGCAGA GCCAGCCGTC
11901 CGGCATTAAC TCTCGGACG ATTGAGCCCA GGGCATGCAA CGTATCATGG CBTGACGAC TCGCAACCCC
11971 GAAGCCTTTA SACAGCAACC CCAGGCCAAC CGTCTATCGG CCATCATGSA ACCTGTAGTG CCTTCCCGAT

```

12041	CTAATCCCAC	TCATBAGAAG	GTCCGTGCCA	TCGTGAACGC	GTTGGTGGAG	AACAAAGCTA	TYCGTCCAGA
12111	TSAGGCCGGA	CTGGTATACA	ACGCTCTCTT	AGAACCCTGT	GCTCGCTACA	ACAGTAGCAA	TGTSCAAACC
12161	AATTTGGACC	GTATGATAAC	AGATGTACGC	GAAGCCGTGT	CTCAGCCGGA	AAGGTTCCAG	CGTGATGCCA
12251	ACCTGGGTTC	GCTGGTGGCG	TTAAATGCTT	TCTTGAGTAC	TCAGCCTGCT	AATGTCCGCG	GTGGTCAACA
12321	GGATTAATACT	AACTTTTTAA	GTGCTTTBAG	ACTEATGGTA	TCAGAAGTAC	CTCAGAGCGA	AGTGTATCAG
12391	TCCGGTCCCTG	ATTACTTCTT	TCAGACTAGC	AGACAGGGCT	TGCAGACGGT	AAATCTGAGC	CAAGCTTTTA
12461	AAAACCTTAA	AGGTTTGTGG	GGAGTGCATG	CCCCGGTAGG	AGAAAGAGCA	ACCGTGTCTA	GCTTGTAAAC
12531	TCCGAACTCC	CGCCTGTTAT	TACTGTGGT	AGTCCCTTC	ACCGACAGCG	GTAGCATCGA	CCGTAATTCC
12601	TATTTGGGTT	ACCTACTAAA	CCTGTATCGE	GAAGCCATAG	GGCAAAGTCA	GGTGGACGAG	CAGACCTATC
12671	AAGAAATTAC	CCAAGTCACT	CGCCCTTTGG	GACAGGAAGA	CACTGGCAGT	TTGGAAGCCA	CTCTGAACTT
12741	CTTGCTTACC	AAATCGGTCTC	AAAAGATCCC	TCCTCAATAT	GCTCTTACTG	CGGAGGAGGA	GAGGATCCCT
12811	AGATATGTGC	AGCAGAGCGT	GGGATTGTYT	CTGATGCAAG	AGGGGGCAAC	TCCGATGCA	GCATCGACA
12881	TGACAGCGCG	AAATATGGAG	CCCAGCATGT	ATGCCAGTAA	CCGACCTTTC	ATTAACAAAC	TGCTGGACTA
12951	CTTGACACAGA	GCTGGCCGTA	TGAACCTGTA	TYATTTACC	AATGCCATCT	TAAACCCGCA	CTGCTGCCCC
13021	CCACCTGGTT	TCTACAGGG	CGAATATGAC	ATGCCCGGAC	CTAATGACGG	ATTTCTGTGG	GACGACGTGG
13091	ACAGCGATGT	TTTTTCACCT	CTTTCTGATC	ATCGCACGTG	GAAAAAGGAA	GGCGGTGATA	GAATGCATTC
13161	TTCTGCATCG	CTGTCCGGGG	TCATGGGTGC	TACCGCGGCT	GAGCCCGAGT	CTGCAAGTCC	TTTTCTAGT
13231	CTACCCTTTT	CTCTACACAG	TGTACGTAGC	AGCGAAGTGG	GTAGAATAAG	TGCCCCGAGT	TTAATGGGCG
13301	AAGAGGAGTA	CCTAAACBAT	TCCTTGCTCA	GACCCGGCAAG	AGAAAAAAT	TTCCAAACA	ATGGAATAGA
13371	AAGTTTGGTG	GATAAAATGA	GTAGATGGAA	GACTTATGCT	CAGGATCACA	GAGACGAGCC	TGGGATCATG
13441	GGACTACAA	GTAGAGCGAG	CCGTAGACGC	CAGCGCCATG	ACAGACABAG	GGGTCTTGTG	TGGGACGATG
13511	AGGATTCGAG	CGATGATAGC	AGEGTGTTGG	ACTTGGSTGG	GAGAGGAAGG	GGCAACCCGT	TTGCTCAITT
13581	GCGCCCTCGC	TTGGGTGGTA	TGTTGTGAAA	AAAAATAAAA	AAGAAAAACT	CACCAAGGCC	ATGGCGACGA
13651	GCBTACGTTT	GTCTTCTTTT	ATTATCTGTG	TCTAGTATAA	TGAGGCGAGT	CGTGTAGGC	GGAGCGSTGG
13721	TGTATCCGGA	GGGTCTCTCT	CCTTCGTAGC	AGAGCGTGT	GCAGCAGCAG	CAGGCGACGG	CGGTGATCGA
13791	ATCCCACTG	GAGGCTCCCT	TTGTGCTTCC	CCGATACCTG	GCACCTACGG	AGGECAGAAA	CAGCATTCGT
13861	TACTCGGAAC	TGGCACCTCA	GTAGGATACC	ACCAGSTTGT	ATCTGGTGGG	CAACAACTCG	CGGGACATTC
13931	CTTCTCTGAA	CTATCABAAT	GACCACAGCA	ACTTCTTGAC	CACGGTGGTG	CAGAAACAAT	ACTTTACCCC
14001	TACGGAAGCC	ASCACCCAGA	CCATTAACCT	TGATGAACGA	TGCGGTGGG	CGGTCAGCT	AAAGACCATC
14071	ATGCATACTA	ACATGCCAAA	CGTGAACGAG	TATATGTTTA	GTAAACAAGT	CAAAGCCCGT	GTGATCGTGT
14141	CCAGAAAACC	TCCCGACGGT	GCTGCAGTTG	GGGATACTTA	TGATCACAAG	CAGGATATTY	TGGAATATGA
14211	GTGGTTCCGAG	TTTACTTTGC	CAGAAGGCCAA	CTTTTCACTT	ACTATGACTA	TTGATTTGAT	GAACAATGCC
14281	ATCATAGATA	ATTACTTGAA	AGTGGGTAGA	CAGAATGGAG	TGCTTGAAGG	TGACATTTGGT	GTAAAGTTCC
14351	AGCCAGGAA	CTTCAAGCTG	GGATGGGATC	CCGAAACCAA	GTGATCATG	CCTGGAGTGT	ATACGTATGA
14421	ACCCTTCCAT	CCTGACATTC	TCTTACTGCC	TGGCTCGGGA	GTGGATTTTA	CCGAGAGTCC	TTTGAGCAAC
14491	CTTCTTGGTA	TCAGAAAAAA	ACAGCCATTT	CAAGAGGCTT	TTAAGATTTT	STATGAAGAT	TTAGAAGGTG
14561	ETAATATTCC	GGCCCTCTTG	GATGTAGATG	CCTATGAGAA	CAGTAAGAAA	GAACAAAAAG	CCAAAATAGA
14631	AGCTGCTACA	GCTGCTGCAG	AAGCTAAGGC	AAACATAGTT	GCCAGCCSACT	CTACAAGGGT	TGCTAACGCT
14701	GGAGAGSTCA	GAGGAGACAA	TTTTGCCGCA	ACACCTGTTT	CGACTGCAGA	ATCATTATTC	GCCGATGTGT
14771	CTGAAGGAAC	GBACGTGAAA	CTCACTATTC	AACCTGTAGA	AAAAGATAGT	AAGAATAGAA	GCTATAATGT
14841	GTTGGAAGAC	AAAATCAACA	CAGCCTATCG	CAGTGGTAT	CTTTCGTACA	ATTATGGCGA	TCCGAAAAAA
14911	GGAGTGCSTT	CCTGGACATT	GCTCACCCAC	TCAGATGTCA	CCTGCGSAGC	AGAGCAGGTT	TACTGCTCCG
14981	TTCAGACAT	GATGAAGSAT	CCTGTCACTY	TCCGCTCCAC	TAGACAAGTC	AGTAACTACC	CTGTGSTGGG
15051	TGCAGAGCTT	ATGCCCGTCT	TCTCAAAGAG	CCTCTACAAC	GAACAAGCTG	TGTACTCCCA	GCAGCTCCCG
15121	CAGTCCACCT	CGCTTACGCA	CGTCTTCAAC	CGTTTCCCTG	AGAACCAGAT	TTTAATCCGT	CCGCCGGCGC
15191	CCACCATTAC	CACCGTCAGT	GAAAACGTTT	CTGCTCTCAC	DEATCACGGG	ACCTGCGGT	TGCCAGCAG
15261	TATCCCGGGA	GTCCAACBTG	TGACCCTTAC	TGACGCCAGA	CGCCGCACCT	GTCCCTACGT	GTACAAGGCA
15331	CTGGGCATAG	TCCACCCGCG	CGTCCCTTCA	AGCCGCACCT	TCTAAAAAAA	AAAAATGTCC	ATTCTTATCT
15401	CGCCAGTAA	TAACACCGGT	TGGGGTCTGC	GCGETCCAAG	CAAGATGTAC	GGAGGCGCAC	GCAACGTTTC
15471	TACCCAACAT	CCCGTSCGTG	TTCCGGSACA	TTTTCCGCGT	CCATGGGGTG	CCCTCAAGGG	CCGCACTCGC
15541	GTYCGAACCA	CCGTGATGTA	TGTAATCGAT	CAGTGGGTTG	CCGACCCCCG	TAATTATACT	CCTACTGCGC
15611	CTACATCTAC	TGTGATGCA	GTTATTGACA	GGTGTAGTGC	TGACBCTCGC	AACTATGCTC	GACGTAAGAG
15681	CCGGCGAAGG	CGCATTGCCA	GACGCCACCG	AGTACCACCT	GCCATGCGAG	CCGCAAGAGC	TCTGCTACGA
15751	AGAGCTAGAC	GCSTGGGGCG	AAGAGCCATG	CTTAGGGGCG	CCAGACGTGC	AGCTTCGGGG	GCCAGCGCCG
15821	GCAGGTCCCG	CAGSCAAGCA	CGCCGTGTCG	CAGCGGCGAC	TATTGCCGAC	ATGGCCCAAT	CGCGAAGAGG
15891	CAATGTATAC	TGGGTGCGTG	ACGCTGCCAC	CGBTCAACGT	GTACCCGTGC	GCACCCCTCC	CCTCGCACT
15961	TAGAAGATAC	TGAGCAGTCT	CCGATGTTGT	GTCCACGCGG	CGAGGATGTC	CAAGCGCAAA	TACAAGBAAG
16031	AAATGCTGCA	GTTATCGCA	CCTGAAGTCT	ACGGCCAACC	GTTGAAGGAT	GAAAAAAAAC	CCCCAAAAAT

```

16101 CAACCGGGTT AAAAAAGGACA AAAAAAGAAGA GGAAGATGGC GATGATGGGC TGCCGGBAGTT TGTGCGCGAG
16171 TTTGCCCCAC GCGGACCGGT GCAATGGCGT GGGCGCAAAG TTCGACATGT GTTGAGACCT GGAACCTCGG
16241 TGGTCTTTAC ACCCGGCGAG CCGTCAAGCG GCGTTCCTAT GATGAGBTGT ACSSGGATGA
16311 TGATATTCTT GAGCAGGCGG CTGACCGATT AGCGGAGTTT GCTTATGGCA AGCGTAGYAG AATAACTTCC
16381 AAGGATGAGA CAGTGTCAAT ACCCTTGGAT CATGGAATC CCACCCCTAG TCTTAAACCG GTCACTTTGC
16451 AGCAAGTGT ACCCGTAAC CCGCGAACAG GTGTTAAACG CGAAGGTGAA GATTTGTATC CCACTATGCA
16521 ACTGATGGTA CCCAAACGCC AGAAGTTGGA GGACGTTTTG GTAGCGCCTG GTCTGGGGGT ACAAACGTGA GACATTAAGA
16591 CCTGAGGTTA AAGTGAAGCC CATTAAAGAG GTGCAAACCTG AACCCGCAA GCTTACTGCC ACCTCCACTG AAGTGCAAAC
16661 TTTCCACTGA AAGTATGGA GTGCAAACCTG TGACCGCCCG GGTCCCCTC GAAGATCCCG ACGAAAGTAC
16731 GGATECATGG ATGCCCATGC CTATTACAAC GCCCAATTAT GTTGTACACE CATCTATTAT TCCTACTCCT
16801 GGTCCAGCAA GJCTGTGGAT GCCCAATTAT GGTGTACACE TCSCCGCAAG ACACCTGCAA ATCGCAGTCC
16871 GCATCCGTA CTATCGCAGC CGAAACAGTA CCTCCCGCCG GTGCGGCAAG TBTACCBCAA TGGTAGTCCG
16941 TCGCCGTAGA CCGACAAGCA AACCGACTCC CCGCGCCCTG GTGCGGCAAG TBTACCBCAA TGGTAGTCCG
17011 GAACCTTTGA CACTGCCBCG TCGCCGTAC CATCCGACTA TCATCACTTA ATCAATGTTG ATCAATGTTG
17081 CTTGCAGATA TGGCCCTCAC TTGTGCGCTT GCGCTTCCCA TCACCTGGTTA CCGAGGAGA AACTCGCGCC
17151 QTAGAAGAGG GATGTTGGGA CCGGGAATGC GACGCTACAG CCGACCGCGT SCTATCCGCA AGCAATTGCG
17221 GGGTGGTTTT TTACCAGCCT TAATCCAAT JATCGTGCT GCAATTGGCG CGATACCAGG CATAGCTTCC
17291 GTGCGGTTT AGCCCTCGCA AFSACATTGA CATTGAAAA CATTEGAAAA AAAACGTATA AATAAAAAAA AATACAATGG
17361 ACTCTGACAC TCCTGGTCTT GTGACTATGT TTTCTTAGAG ATGGAAGACA TCAATTTTTT ATCTTGGCT
17431 CCGCCACACG CCACGAAGCC GTACATGGGC ACCTGCGCG ACATCGGCA GAGCCAACTG AACSSGGGCG
17501 CCTTCAATTG GAGCAGTATC TGGAGCGGG TTAATAATTT TGGCTCAACC ATAAAAACT ATAAAAACT ACGGGAACAA
17571 AGCTTGAAC AGCAGTACAG GACAGCGCT GATCAATGGA GTGGTAGATT TGGCTAACCA GGAAGAAATC AAAAAAGTAA
17641 GTCBATGGGA TAGCTTCCGG CCAGCAACCC CAGGTGAAAT GCAAGTGGAG GCAAGTGGAG GAAGAAATC
17711 ACAGTCTGTT ACAGCCGCGG GACAAGCGTC CGCTCCCCG TTTGGAGAG ACCTGGTGA CCGCTGABA TBAACCGCT
17781 AAAACGAGGC TCTTATGAGG AAGCAACGAA GCTTGGAAAT CCGACCCTA GACCAGTAC CCGCATAGC ACCGGGTTGA
17851 TGAAACCTTC TCAGTTGCAT CCGCCCGTCA CCTTGGATTT GCGCCCTCC CCTGCTGCTA CTGCTBTACC
17921 CGCTTCTAAG CCTTCTGCTG CCGCGAAACC AGTCCGCGTA GCCAGGTGAC GCGAGGTGAC GTCGCGGTA
18061 CCAAAATGCG ACTGGCAAAA TACTCTGAAC AGCATCTGCG GTTAGGCGT TETAGGCGT GTCAGGCTG
18131 GCTGCTTTTA ATTAATAATC GAAAGAGTCC CACTAGCGCT TAACCTGCT ATCTGTGTAT ATGTGTGATT
18201 ACAGCAGCAG AGGAAAAAAG GAAGAGTCCG GAAAGAGTCC GATGCTGAT TTCAAGTACT TCAAGTACTG
18271 GATGCTGCCC CAATGGCAT ACATGACAT CCGCGSACG GATGCTGAT TCAAGTACTG TCAAGTACTG
18341 GTGCAGTTCG CCGCGCCAC AGACALCTAC TTCAATCTGG GATGCTGAT TCAAGTACTG TCAAGTACTG
18411 CGACCCACGA TGTGACCACC GACCGTAGCC AGCGGCTCAT GTTGCCTTC GTTGCCTTC
18481 CAATACATAC TCTTACAAAG TCGGATACAC CCGTGGCGTG GCGGACAACA GATGCTGAT TCAAGTACTG
18551 ACCTTCTTTG ACATAGGGG CBTGTTGAC AGAGTCCCA GATTGCAAAA GCGGTACCAA GCGGTACCAA
18621 ACTTCTGGC TCTTAAAGGC GCTCCAATG CATCTCAATG GATTGCAAAA GCGGTACCAA GCGGTACCAA
18691 CGCAGGCAAT GGTGAAGAG AACATGAAAC AGAGGAGAAA ACTGCTACTT ACACCTTTGC ACACCTTTGC
18761 GTAAAAGCCG AGGCTCAAAT TACAAAAGAG GCGTTACCAA TAGGTTTGG GATTTGAGT GATTTGAGT
18831 CTAACCCAT CTATGCAGAT AAACCTTATC AGCCAGAACC TCAAGTGGEA GATBAAACTT GATBAAACTT
18901 AGACGGAAAA ACCGAAGAGT ATGGAGGCG GBTCTAAG CCTACTACTA ACATGAAACC ACATGAAACC
18971 TCCATGCGA AGCCTACTAA TTTAAAAGST GGTGAGGCAA AACCGAAAAA CTCGGAAACG CTCGGAAACG
19041 AAATTAATA TGATATTSAC ATGSAATTT TTGATAACT ATGCAAAAG ACAAACTTCA ATGCAAAAG
19111 TGTGATGAT GCAGAAAATG TAGTTTGGG AACGCCAGAC ACTCATGTAG ACTCATGTAG
19181 GACACAAGTT CCGAAGCTAA TTTGGGACAA CAGTCTATGC CCAACAGACC CCAACAGACC CCAACAGACC
19251 ATAACCTTAT TGGACTCAT TACTATAACA GTACTGTTAA CATGGGGTG CATGGGGTG
19321 GTTAAATGCA GTGTTTACT TGCAGGACAG AAACACAGAA CTTTCTTACC AACTCTTACT AACTCTTACT
19391 GCGCAGAGAA CCAGATACTT TAGCATBTGG AATCAGGCTG TGGACAGTTA TGATCCTGAT TGATCCTGAT
19461 TTGAAAATCA TGGTGTGGAA GATGAACCTT CCAACTAITG TTTTCCACTG GACGBCATAG GACGBCATAG
19531 AACCACTTAC AAATCAATAG TTCCAAATG AGAAGATAAT AATAATTGGA AABAACCTGA AABAACCTGA
19601 ACAAGTGA GA TCGGACAGGG TAATTTSTTT GCCATGGAAA TTAACCTTCA AACCTTCA
19671 TCCCTTATTC CAATGTGGCT CTGTATCTCC CAGACTCGTA CAAATACACC CAAATACACC CAAATACACC
19741 AGAAAACAAA AACACCTACG ACTACATGAA CCGGGCGGGT GTGCCBCAT GTGCCBCAT
19811 AACATTTGTT CCAGGTGGT TCTGGATGAA ATGGACAATG TCAACCCATT TCAACCCATT
19881 GCTTGCCTTA CCGATCTATG CTTCTGGTA CTTCTGGTA TGTGCTTTT TGTGCTTTT
19951 ATTCTTCCGT GTTAAAAACC TGCTGCTTCT CCCAGSCTCC TACACTTATG TACACTTATG
20021 GTBAACATGG TTCTACAGAG TTCCCTCGGT AACGACCTGC GGGTAGATGG GGGTAGATGG
20091 GCATCAACCT CTATGCTACT TTTTCCCA TGGCTCACA CACCCTTCC ACCCTTGAAG ACCCTTGAAG

```

20181 GAATGACACC AATGATCAGT CATTCAACGA CTACCTATCT GCAGCTAACA TGCTCTACCC GATTCCTGC
20231 AATGCAACCA ATATTCCCAT TTCCATTCTT TCTCGCAACT GGCGCGCTTT CAGAGGCTGG TCATTYACC
20301 GACTGAAAAC CAAAGAAACT CCCTCTTTGG GGCTCTGGAT TGACCCCTAC TTTGTCTATT CTGGTTCTA
20371 TCCCTACCTG GATGGTACCT TCTACCTGAA CCACACTTTT AASAAAGSTT CCATCATGTT TGACTCTTC
20441 GTGAGCTGGC CTGGAAATGA CAGGTTACTA TCTCCTAACG AATTTGAAAT AAAGCGCACT GTGGATGGC
20511 AAGSCTACAA CGTAGCCCAA TGCAACATGA CCAAAGACTG GTTCTTGGTA CAGATGCTCG CCAACTACA
20581 CATCGGCTAT CAGGGCTTCT ACATTCCAGA AGSATAAAA GATCGCATGT ATTCATTTTT CAGAAACTTI
20651 CAGCCCATGA GCAGGCAGBT GGTTSATGAG GTCAATTACA AAGACTTCAA GGCCGTCCG ATACCCTAC
20721 AACACAACAA CTCTGGCTTT GTGGSTTACA TGGCTCCGAC CATGCGCCAA GGTCAACCCT ATCCCCTA
20791 CTATCCCTAT CCACTCATTG SAACAACTGC CSTAAATAGT GTTACGCAGA AAAAGTCTT GTGTGACAG
20861 ACCATGTGGC GCATACCGTT CTCGAGCAAC TTCATGTCTA TGGGGGCCCT TACAGACTTG GGACAGAATA
20931 TGCTCTATGC CAACTCAGCT CATGCTCTGG ACATGACCTT TGAGGTGGAT CCCATGGATG AGCCCACTC
21001 GCTTTATCTT CTCTTCGAAG TTTTCGACGT GGTGAGAGTG CATCAGCCAC ACCGCGGCAT CATCGAGGCA
21071 GTCTACCTGC GTACACCGTT CTGCGCCGCT AACGCTACCA CGTAAGAAGC TTCTTCTCTC TTGCAAATA
21141 CAGCTGCACA CATGGCCTGC GSATCCCAA ACBCTCCAG CBAGCAAGAG CTCAGAGCCA TTGTCCAAGA
21211 CCTGGGTTGC GAGCCCTATT TTTTGGGAAC CTACGATAAG CGCTTCCCGG GGTTCATGTC CCCCATAAG
21281 CTCGCTGTG CCATTGTAAA TACGGCCGGA CGTGAGACGG GGGGAGAGCA CTGGTTGGCT TTCGGTTGGA
21351 ACCCAGCTTC TAACACCTGC TACCCTTTTG ATCCTTTTGG ATTCTCGGAT GATCGTCTCA AACAGATTTA
21421 CCAGTTTGA TATBAGGGTC TCCTGCGCCG CAGCGCTCTA GCTACCAAGG ACCGCTGTAT TACGCTGGA
21491 AAATCTACCC AGACCGTGCA GGGCCCCCT TCTCCGCTT GCGGACTTTT CTGCTGCATG CCCATGGATG AGCCCACTC
21581 CCTTTGTGCA CTGGCCTGAC CGTCCCATGG ACBGAADCC CACCATGAAA TTGCTAACTG GAGTGCCTAA
21631 CAACATGCTT CATTCTECTA AAGTCCAGCC CACCTGTGTG GACAATCAA AAGCACTCTA CCATTTCTT
21701 AATACCCATT CGCCTTATTY TCGCTCTCAT CGTACACACA GTTCAATAAA CATCACTTTA TTTTTTACA TGATCAAGG
21771 ATGTTCAATA ATGACTCATG TAAACAACGT GTTCAATAAA CATCACTTTA TTTTTTACA TGATCAAGG
21841 CTCTGGATTA CTTATTYATT TACAAGTCSA ATGGTTCTG ACGGAAATCA GAATGACCCG CAGGCABTGA
21911 TAGCTTCCGG AACTGATACT TGGGTGCCA CTTGAAATCG GSAATCACA ACTTGGGAAC CGGTATATCG
21981 GGCABGATGT CACTCCACAG CTTTCTGGTC ABCTGCAAAG CTCCAAGCAG GTCAGGAGCC GAAATCTTGA
22051 AATCACAATT AGGACCAGTG CTCTGAGCGC SAGAGTTGCG GTACACCGGA TTGACGCACT GAAACACCAT
22121 CAGGACCGGA TGCTCACGCG TTGCGAGCAG GBTGGGATC SCAATCATGC CCACATCCA ATCTTCAGCA
22191 TTGGCAATGC TGAACBGGGT CATCTTGACG GTCTGCTATC ECATGGCGBG CACCCAAATG GCGTGTGGT
22261 TGCAATCGCA GTGCAGGGGG ATCAGTATCA TCTTGGCCTG ATCCTGTCTG ATTCCTGGAT ACACGGCTCT
22331 CATGAAAAGCA TCATATTGCT TGAAAAGCCTG CTGGCTTTA CTACCCTCGG TATAAAACTT CCGGACGGAC
22401 CTGCTCGAAA ACTGTTAGC TGACACCGTG GCATATTCA CACAGCAGCG GCGCTATTG TTGGCTATTT
22471 GCACCCACT CTGCCCCAG CGCTTTTGGG TGAATTTGGT TCGCTCGGGA TTCTCTTTA TCTCTCGTTG
22541 TCCGTTCTCG CTGSCACAT CCACTCTCGAT AATCTGCTE TCTGAAATCA TAATATTGCC ATGACGGCAC
22611 TTCAGCTTGC CCTCATAATC ATTGACGCTA TGAGCCACA ACCGACAGCC TGTACATTC CAATTATGGT
22681 GGGCGATCTG ASAAAAABAA TGTATCATTC COTGCAGAAA YCTTCCATC ATCGTGTCTA GTGTCTTGTG
22751 ACTAGTGAAG GTTAACTGGA TGCCCTCGST CTCTTCGTTT ACGTACTGGT GACAGATGCG CTTGTATTGT
22821 TCGTGTGCT CAGGCATTAG TTTAAAACAG GTTCTAAGST CGTTATCCAG CCTGTACTTC TCCATCAGCA
22891 GACACATCAD TTCCATGCCT TTCTCCCAAG CAGACACCGG GGGCAAGCTA ATCGGATTCT TAACAGTGA
22961 GGCAGCAGCT CCTTTAGCCA GAGGGTATC TTTAGCGATC TTCTCAATGC TTCTTTTGC ATCCTTCTCA
23031 ACGATGCGCA CGGGCGGGTA GCTGAAAACC ACTGCTACAA GTTGGCGCTC TTCTCTTCT TCTTCGCTGT
23101 CTTGACTGAT GTCTTGCAAG GGSATATGTT TGGTCTTCTT TGGCTTCTT TTGGGGGTA TCGSAGGAGG
23171 ABBACTGTG CTCCGTTCCG CAGACAGGGA GGATTTCTGAC GTTTCGCTCA CCATTACCA CTGACTGTG
23241 BTAGAAGAAC CTGACCCAC ACBGGCAGAG GTGTTTTCT TCGGGGCGAG AGBTGAGGC GATTGCGAAG
23311 GCTGCGGTC CAGCCTGGA GCGGATGAC TGGCAGAACC CTTCCGCGT TCGGGGSGT SCTCCCTG
23381 GCGGTGCTT AACTGATTT CTTGCGGCT GGCATTGTG TTCTCCTAGG CAGAGAAACA ACAGACATGG
23451 AAACCTAGCC ATTGCTGTCA ACATCGCCAC GAGTGCCATC ACATCTGTC CTCAGCGAG AGCAAAAGGA
23521 GCAGAGCTTA AGCATTCCAC CGCCAGTCC TGCCACCACC TCTACCCTAG AAGATAAGGA GGTGACGCA
23591 TCTCATGACA TGCAGAAATA AAAAGCGAAA GAGTCTGAGA CAGACATCGA GCAAGACCCG GGTATGTA
23661 CACCGTGGG ACACGAGGAA GAGTTGAAAC GCTTTCTAGA GAGAGAGGAT GAAAACCTGC CAAAACAGCG
23731 AGCAGATAAC TATACCAAG ATGCTGAAA TAGGGATCAG AACACCGACT ACCTCATAGG GCTTGAAGG
23801 GAAGACGCGC TCCTTAAACA TCTAGCAAGA CAGTCTGCTA TAGTCAAGGA TGCATTATTG GACAGAACTG
23871 AAGTGCCAT CAGTGTGGAA GAGCTCAGCT GCGCTACGA GCTTAACTTT TTTTCACTE GTACTCCCC
23941 CAAACGTCAG CCAAACGGCA CCTGCGAGCC AAATCTGCG TTAACCTTT ATCCAGCTTT TGCTGTGCA
24011 GAAGTACTGG CTACCTATCA CATCTTTTT AAAAATCAA AAATTCAGT CTTACCTGAT ATAGCTTCT TGAAGAGBT
24081 CCGCGCCGA TGCCCTACT AATCTGGGAC CTGGTTCAG CTTACCTGAT ATAGCTTCT TGAAGAGBT
24151 TCCAAAGATC TTCGAGGGTC TGGCAATAA TGAGACTCGG GCGCAAAATG CTCYCAAAA GGGABAAAAT

24221	GGCATGGATG	AGCATCACAG	CGTTCTGGTG	GAATTGGAAG	GCGATAATGC	CAGACTCGCA	GTACTCAAGC
24291	GAAGCGTCBA	GGTCACACAC	TTCGCATATC	CCGCTGTCAA	CCTGCCCCCT	AAAGTCATGA	CGCGGGTCAT
24361	GGACCAGTTA	CTCATTAAGC	GCACAAGTCC	CCTTTTCABAA	GACATGCATG	ACCCAGATGC	CTGTGATGAG
24431	GGTAAACCCAG	TGCTCAAGTGA	TGAGCAGCTA	ACCCGATGBC	TBBGCACCSA	CTCTCCCCGG	GATTTGSAAG
24501	AGCGTCGCAA	GCTTATGATG	GCCGTGCTGC	TGSTTACCCT	AGAAGTAGAG	TGCTCCCGAC	GTTTCTTTAC
24571	CGATTACAGAA	ACCTTGCAGCA	AACTCGAAGA	GBAACTCACC	TACACTTTTA	GACACGGCTT	TGTGCGGCAG
24641	GCATGCAAGD	TATCTAACGT	GBAACTCACC	AACTGTGTTT	CCTACATGGG	TATTCTGCAT	GAGAATCGCC
24711	TAGGACAAAG	CGTGTCTGCAC	AGCACCTTFA	AGGGGGAAGC	CCGCGGTGAT	TACATCCGGG	ATTGTGTCTA
24781	TCTCTACCTG	TGCCACACGT	GGCAAACCGG	CATGGSTGTA	TGGCAGCAAT	GTTTAGAAGA	ACAGAACTTG
24851	AAAGAGCTTG	ACAAGCTCTT	ACAGAAATCT	CTTAAAGTTC	TGTGGACAGG	GTTGACAGAG	CGCACCGTCC
24921	CTTCCGACCT	GGCAGACCTC	ATCTTCCCAG	AGCGTCTCAG	GGTTACTTTG	CGAAACGGAT	TGCCCTGACTY
24991	TATGAGCCAG	AGCATGCTTA	ACAATTTTCG	CTCTTTTCATC	CTGGAACGCT	CCGATATCCT	GCCCGCCACC
25061	TGCTGCGCAC	TGCCCTCCGA	CTTGTGTGCT	CTCACCTACC	GCGAGTGCCT	CCGCGCGCTA	TGGAGTCACT
25131	GCTACCTGTT	CCGTCTGSCC	AACTATCTCT	CCTACCACCTC	GGATGTGATC	GAGGATBTGA	GCGGAGACCG
25201	CTTGTCTGGAG	TGCCACTGCC	GCTGCAATCT	GTGCACGGCC	CACCGGTCCC	TAGCTTGCAA	CCCCCAGTTG
25271	ATGAGCGAAA	CCAGATAAAT	AGGCACCTTT	GAATTGCAAG	GCCCCAGCAG	CCAAAGGCTG	GGTCTTCTC
25341	CTGGGCAAGG	TTTAAACTG	ACCCCGGAC	TGTGGACCTC	CGCCTACTTG	CGCAAGTTTG	CTCCGGAAGA
25411	TTACCACCCC	TATGAAATCA	AGTTCTATGA	GGACCAATCA	CAGCCTCCAA	AGCCGGAACT	TTCCGCTTGC
25481	GTCATCACCC	AGGGGGCAAT	TCTGGCCCCA	TTGCAAGCCA	TCCAAAATC	CGGCCAAGAA	TTTCTACTGA
25551	AAAAGGGTAA	GGGGGTCTAC	CTTGACCCCC	AGACCGGCGA	GGAACTCAAC	ACAAAGTTCC	CTCAGGATGT
25621	CCCAACGAGC	AGAAAACAAG	AAGTTGAAGG	TGCAGCCGCC	GCCCCAGAA	GATATGGAGG	AAGATTGGGA
25691	CAGTCAGGCA	GAGGAGGGGG	AGGAGGACAG	TCTGGAGGAC	AGTCTGGAGG	AABACAGTTY	GGAGGAGGAA
25761	AACGAGGAGG	CAGAGGAGGT	GGAAAGABTA	ACCGCCGACA	AACAGTTATC	CTCGGCTGCG	GAGACAAGCA
25831	ACAGERTACT	CATCTCCGCT	CCGATCTGAG	GAACCCGGCG	CCCTCCAGC	AGTAGATGGG	ACCAGACCCG
25901	ACGCTTCCGG	AACCCAACCA	CGGCTTCCAA	GACCGGTAAG	AAGGATCGGC	AGGGATACAA	GTCTTGGCGG
25971	GGGCATAAGA	ATGCCATCAT	CTCCTGCTTG	CATGAGTGGG	GGGGCAACAT	ATCCTTCCAG	CGCCTACTACT
26041	TGCTATTCCA	CCATGGGGTG	AACTTTCGCG	GCAATGTTTT	GCATTACTAC	CGTCACTTCC	ACAGCCCCTA
26111	CTATAGCCAG	CAAATCCCGA	CAGTCTCGAC	AGATAAAGAC	AGCGCCGGCG	ACCTCCAACA	GAAAACCCAG
26181	AGCGGCGAGT	AGAAAATACA	CAACAAGTGC	AGCAACAGGA	GGATTAAGAA	TTACAGCCAA	CGAGCCAGCG
26251	CAAACCCGAG	AGTTAAGAAA	TCCGATCTTT	CCAACCTGTG	ATGCCATCTT	CCAGCAGAGT	CCAGGTCAAAG
26321	AGCAGGAACT	GAAAATAAAA	AACCGATCTC	TGCCTTCCCT	CACCAGAAGT	TGTTTGTATC	ACAAGAGCSA
26391	AGATCAACTT	CAGCGCACTC	TCCAGGACGC	CGAGGCTCTC	TTCAACAACT	ACTCCGCGCT	SACTCTTAAA
26461	GAGTAGGCAE	CGACCRCGCT	TATTCAAAAA	AGCCGGGAAT	TACATCATCC	TCGACATGAG	TAGAGAAATT
26531	CCCACGCTTT	ACATGTGAG	TTATCAACCC	CAAATGGGAT	TGGCAGCAGG	CGCCTCCAG	GACTACTCCA
26601	CCCGCATGAA	TTGGCTCAG	CCCGGGCCTT	CTATGATTTT	TGGAGTTAAT	GATATACCGG	CCTACCGAAA
26671	CCAAATACTT	TTGGAACAGT	CAGCTCTTAC	CACCACGCCC	CGCCAACACC	TTAATCCAG	AAATTGGGCC
26741	GCCGCCCTAG	TGTACCAGGA	AAGTCCCGCT	CCCACCACTG	TATTACTTCC	TCGAGACGCC	CAGGGCAAGG
26811	TCCAAATGAC	TAATGCAGGT	GCGCAGTTAG	CTGGCCGGCTC	CACCCATATGT	CGTCAAGGCC	ETCCCEATAA
26881	TATAAAACGC	CTGATGATCA	GAGGCCGAGG	TATCCAGCTC	AACGACGAGT	CGGTGAGCTC	TCCGCTTGGT
26951	CTACGACCCAG	ACGGAACTCT	TCAGATTTGC	GCTGCGGGGA	GATCTTCCCT	CACCCCTCGT	CAGGCTGTTT
27021	TGACTTTGGA	AAGTTCGCTT	TCGCAACCCC	GCTCGGGGCG	AAATCGGGACC	GTTCAATTTG	TAGAGGAGTT
27091	TACTCCCTCT	GTCTACTTCA	ACCCCTTCTC	CGGATCTCCT	GGGCACTACC	CGGACGABTT	CATACCGAAT
27161	TTGACGCGGA	TTAGCGAGTC	AGTGGACGGC	TACGATTTGAT	GTCTGGTGAC	CGGCTGAGC	TATCTCGSCT
27231	GCGACATCTA	GACCACTGEC	GCCGCTTTTC	ETGCTTTGCC	CGGAACTTA	TTGAGTTTAT	CTACTTCGAA
27301	CTCCCAAGG	ATCACCCCTCA	AGGTCCGGCC	CACGGAGTGC	GGATTACTAT	CGAAGGCAAA	ATAGACTCTC
27371	GCCTGCAACB	AATTTTCTCC	CAGCGGCCCG	TGCTGATCGA	GCGAGACCCAG	GGAAACACCA	CGGTTTCCAT
27441	CTACTGCATT	TGTAATCACC	CCGGATTGCA	TGAAAGCCTT	TGTTGTCTTA	TGTGTACTGA	GTTTAAATAAA
27511	AACTGAATTA	AGACTCTCCT	ACGSACTGCC	GCTTCTTCAA	CCCGGATTTT	ACAACCCAGAA	GAACAAAACCT
27581	TTTTCTGTCG	TCCAGSACTC	TGTTAACTTC	ACCTTTCTTA	CTCACAACCT	AGAAGCTCAA	CGACTACACC
27651	GCTTTTCCAG	AAGCATTTTC	CCTACTAATA	CTACTTTCAA	AACCGGAGGT	GAGCTCCACG	GTCTCCCTAC
27721	AGAAAACCCCT	TGGGTGGAGG	CGGGCCTTGT	AGTACTAGGA	ATCTTTGCGG	ATCTTTGCGG	GATTATCTTT
27791	TGCTACCTAT	ACACACCTTG	CTTCACTTTC	CTAGTGGTGT	TGTGGTATTG	GTTTAAAAAA	TGGGGCCCAT
27861	ACTAGTCTTG	CTTGTTTTAC	TTTCCGTTTT	GGAAACCGGT	YCTGCCAATT	ACGATCCATG	TCTAGACTTT
27931	GACCCAGAAA	ACTGCACACT	YACTTTTGCA	CCCGACACAA	GCCGCATCTG	TGGAGTCTTT	ATTAAGTGGG
28001	GATGGGAATG	CAGGTCCGTT	GAAATTACAC	ACAATAACAA	AACCTGGAAC	AATACCTTAT	CCACCACATG
28071	GGAGCCAGBA	GTTCCCGAGT	GGTACACTGT	CTCTBTCCGA	GGTCTGACG	GTTCCATCCG	CATTAGTAAC
28141	AACACTTTCA	TTTTTTCTGA	AATGTGCGAT	CTGGCCATGT	TCATGAGCAA	ACAGTATTTT	CTATGGCCCTC
28211	CTAGCAAGGA	CAACATCGTA	ACGTTCTCCA	TTGCTTATTG	CTTGTCGCGT	TGCCTTCTTA	CTGCTTTACT

28281	GTGCGTATGC	ATACACCTGC	TTGTAACCAC	TGCGATCAAA	AACGCCAATA	ACAAAGAAAA	AATGCGTTA
28351	CCTCTTTCTG	TTTACAGACA	TGCTTCTCT	TACATCTCTC	ATATTTGTCA	GCATTGTCCAC	TGCCGCTCA
28421	GGACAAACAG	TCGTCTCTAT	CCCCTAGGA	CATAATTACA	CTCTCATAGG	ACCECCAATC	ACTTCACAG
28491	TCATCTGGAC	CAAACCTGGGA	AGCGTTGATT	ACTTTGATAT	AATCTGTAA	AAAACAAAAC	CAATAATAG
28561	AACCTGCAAC	ATACAAAATC	TTACATTGAT	TAATGTTAGC	AAAGTTTACA	GCGGTTACTA	TTATGGTTA
28631	GACAGATACA	GTAGTCAATA	TAGAAATTAC	TTGGTTCTGT	TTACCCAGTT	GAHAACCACG	AAAATGCCA
28701	ATATGGCAAA	GATTGATCC	GATGACAATT	CTCTAGAAAC	TTTTACATCT	CCCACCACAC	CCGACGAAA
28771	AAACATCCCA	GATTCATGA	TTGCAATTGY	TGCAGCGGTG	GCAGTGGTGA	TGGCACTAAT	AATAATATG
28841	ATGCTTTTAT	ATGCTTTGTC	CTACA AAAAG	TTTCACTCTA	AAAAACAAGA	TCTCTACTA	AGGCTTAAC
28911	TTTAATTTCT	TTTTATACAG	CCATGGTTTT	CACCTACCACA	TTCTTATG	TTACTAGTCT	CGCAACTCT
28981	ACTTCTGCTC	GCTCACACCT	CACCTGTAAC	ATAGTCTCAA	ACTGCACACT	AAAAGBACCT	CAAGGTGTT
29051	ATGCTTTTTE	GTGGAGAATA	TATGACAATG	GATGGTTTAC	AAAACCATGT	GACCAACCTB	GTAGATTTT
29121	CTGCAACGGC	AGAGACCTAA	CCATTATCAA	CGTGACAGCA	AATGACAAA	ECTTCTATTA	TGGAACCGA
29191	TATAAAAGTA	GTTTAGATTA	TACATTATT	GTACTGCCAT	CTACCCTCC	AGCACCCCGC	ACAACACTG
29261	TCTCTAGCAG	CAGTGTGCTC	AAACAATCAA	TTTCCAATCC	AACTTTTGG	GCGCTTTTAA	AACGCACTG
29331	GAATAATTCT	ACAACCTCAC	ATAGACAAT	TTCCAATCA	ACAATCAGCA	TCATCGCTGC	AGTGACAAT
29401	GGAAATCTTA	TTCTTGT TTT	TACCATAACC	TACTACGCTT	GCTGCTATAG	AAAAGACAAA	CATAAAGGT
29471	ATCCATTACT	TAGATTGAT	ATTTAATTTG	TTCTTTTTTT	TTATTTACAG	TATGGTGAAC	ACCAATCAT
29541	GTACCTAGAA	ATTTCTTCTT	CACCAATCT	ATCTGTGCTT	TTAATGTTTG	CGCTACTTTC	CAAGGTGTT
29611	CLACAGCAAC	CCCAGACTGT	ATAGGABCAT	TTGCTTCTTA	TGCACCTTTT	GCTTTTGTTA	CTTGCATCT
29681	CGTATGTAGC	ATAGTCTGCC	TGTTTATTAA	TTTTTCCCAA	CTTCTAGACT	GGATCCTTGT	GCGAATTGCT
29751	TACCTGCGCC	ACCATCCCGA	ATACCGCAAC	CAAAATATCG	CGGCACTTCT	TAGACTCATC	TAAACCATC
29821	CAGGCTATAC	TACCAATATT	TTTGTCTCTA	TTGCTTCCCT	ACGCTGTCTC	AACCCCACT	CCCTATAGT
29891	CTCCACCAGC	ACACCTTAGA	AAATGCAAT	TCCAACAACC	GTGGTCATTT	CTTGTCTGCT	ATCGAGAAA
29961	ATCAGAAATC	CCCCCAAATT	TAATAATGAT	TGCTGGAATA	ATTAATATAA	TCGTGTGCAC	CATAATTTCA
30031	TTTTTGATAT	ACCCCTTATT	TGATTTTGGC	TGGAATGCTC	CCAATGCACA	TGATCATGCA	CAAGACCCCA
30101	AGAAACACAT	TCCCCACAA	AACATGCAAC	ATCCAATAGC	GCTAATAGAT	TACGAAAAGTG	AAACCAACI
30171	CCCCTACTC	CCTGCTATTA	GTTACTTCAA	CCTAACCGGC	GGAGATGACT	GAACACTCA	CCACCTCCA
30241	TTCCBCCGAG	BATCTGCTCG	ATATGGACGG	CCGCGTCTCA	GAACAACGAC	TTGCCCAACT	ACGCTCCCG
30311	CAGCAGCAGG	AACGCGTGGC	CAAAGAGCTC	AGAGA TGCA	TCCAATTTCA	CCAATGCAAA	AAAGGCATA
30381	TCTGTTTGGT	AAAACAAGCC	AAGATATCCT	ACGAGATCAC	CGCTACTGAC	CATCBCTCT	CTTACGAAC
30451	TGCCCCCAA	CGACAAAAT	TTACCTGCAT	BGTGGGAATC	AACCCCATAG	TTATCAECCA	ACAAAGTGG
30521	GATACTAAGG	BTGCAATCA	CTGCTCTG	GATTCATCB	AGTGCACTA	CACCCCTGCT	AAAGCCCTA
30591	BGCGCTAAG	AGACCTGCTA	CCAATGAATT	AAAAAAAAT	GATTAATAAA	AAATCACTTA	CTTGAATCA
30661	GCAATAAGBT	CTCTGTTGAA	ATTTTCTCCC	AGCAGCACT	CACCTTCCCT	TTCCCAACTC	TGGTATTCTA
30731	AACCCCGTTC	AGCGGCATAC	TTTTCTCCATA	CTTTAAAGGG	GATGTCAAAT	TTTAGCTCT	CTCCTGTACC
30801	CACAATCTTC	ATGCTTTCT	TCCAGATGA	CCAAGBAGBT	CCGGCTCAGT	BACTCCTTCA	ACCTGTCTA
30871	CCCCATBAA	BATGAAAAGCA	CCTCCCAACA	CCCCTTATA	AACCCAGGBT	TTATTTCCC	AAATGGCTTC
30941	ACACAAAGCC	CAGACGGAGT	TCTTACTTTA	AAATGTTTAA	CCCCACTAAC	AACCCACAGGC	GGATCTCTAC
31011	AGCTAAAAGT	GGGAGGGGGA	CTTACAGTGG	ATGACACTGA	TGGTACCTTA	CAAGAAAACA	TACGTGTCTAC
31081	AGCACCCATT	ACTAAAATA	ATCACTCTGT	AGAACTATCC	ATTGGAATG	GATTAGAAA	TCAAAAACAT
31151	AAACTATGTC	CCAAATGGG	AAATGGBTTA	AAATTTAACA	ACGGTGACAT	TTGTATAAAG	GATAGTATTA
31221	ACACCTTATG	GACTGGAATA	AACCCCTCCAC	CTAACTGTCA	AATTGTGGAA	AACAETAATA	CAAAATGATGG
31291	CAAACTTACT	TTAGTATTAG	TAAAAAATGG	AGGGCTTGT	AATGGCTACG	TGTCTCTAGT	TGGTATATCA
31361	GACACTGTGA	ACCAAATGTT	CACACAAAAG	ACACAAAACA	TCCAATTAAG	ATTATATTTT	GACTCTTCTG
31431	GAAATCTATT	AACTGAGGAA	TCAGACTTAA	AAATTTCCACT	TAAAAATAAA	TCTTCTACAG	CGACCAGTGA
31501	AACGTGATCC	AGCAGCAAAG	CCTTTATGCC	AGTACTTACA	GCTTATCCCT	TCAACACCAC	TACTAGGGAT
31571	AGTGA AAACT	ACATT CATGG	AAATATGTTAC	TACATGACTA	GTTATGATAG	AGBTCTATTT	CCCTTGAACA
31641	TTTCTATAAT	GCTAAAACAGC	CGTATGATTT	CTTCCAATGT	TGCTTATGCC	ATACAATTTG	AATGGAACT
31711	AAATGCAAGT	GAATCTCCAG	AAAGCAACAT	AGCTACGCTG	ACCACATCCC	CCTTTTTCTT	TTCTTACATT
31781	ACAGAAAGCG	ACAACCTAAA	TAAAGTTTAA	GTGTTTTTAT	TTAAAATCAC	AAAATTCGAG	TAGTTATTTT
31851	GCCTCCACCT	TCCCATTGGA	CAGAATACAC	CAATCTCTCC	CCACGCACAG	CTTTAAACAT	TTGGATACCA
31921	TTAGAGATAG	ACATTGTTTT	AGATTCCACA	TTCCAAGCAG	TTTCAGAGCG	AGCCAATCTG	GGTCACTGA
31991	TABATAAAAA	TCCATCGCGA	TAGTCTTTTA	AAGCGCTTTC	ACAGTCCAAC	TGCTGCGGAT	GCGACTCCGG
32061	AGTTTGGATC	ACGGTCACTC	GGAAAGAGAA	CGATGGGAAT	CATAATCCBA	AAACBBTATC	GGACGATTTG
32131	GTCTCATCAA	ACCCACAAGC	AGGEGAGTGC	TGCGTGCCTC	CGTGEGACTG	CTGTTTTATG	GATCAGGGTC
32201	GCAGTTTTCC	TBAAGCATBA	TTTTAATAGC	CCTTAACTAC	AACCTTCTGG	TGCGATGCGG	GCAGCAACGC
32271	ATTCTGATTT	CACCTCAAATC	TTTGCAGTAE	GTACAACACA	TTATTACAA	ATTGTTTAA	AAACCATAA

32341 TAAAAGCGCT CCAGCCAAAA CTCATATCTG ATATAATGCG CCTGCATGA CCATCATACC AAAGTTTAAAT
32411 AATAATTTAA TGACGTTCCC TCAAAAAACAC ACTACCCACA TACATGATCT CTTTTGGCAT GTGCATATTA
32481 ACAATCTGTC TGTACCATGG ACAACGTTGG TTAATCATGC AACCCAATAT AACCTTCEGG AACCACACTG
32551 CCAACACCGC TCCCCCAGCC ATGCATTGAA GTGAACCCTG CTGATTACAA TGACAATGAA GAACCCAATT
32621 CTCTCGACCG TGAATCACTY GAGAATGAAA AATATCTATA GTGGCACAAC ATAGACATAA ATGCATGCAT
32691 CTTCTCATAA TTTTAACTC CTCAGGATTT AGAAACATAT CCCAGGGAAT AGGAAGCTCT TGCAGAACAG
32761 TAAAGCTGGC AGAACAAGGA AGACCACGAA CACAACYTAC ACTATGCATA GTCATAGTAT CACAATCTGG
32831 CAACAGCGGG TGGTCTCAG TCA TAGAAGC TCGGTTTTCA TTTTCTCAC AACGTGGTAA CTGGGCTCTG
32901 GTGTAAAGGGT GATGTCGGC GCATGATGTC GAGCGTGGCG GCAACCTTGT CATAATGGAG TTGCTTCTG
32971 ACATTCTCGT ATTTTGTATA GCAAAAACGGC GCCCTGGCAG AACACACTCT TCTTGGCCTT CTATCCTGCC
33041 GCTTAGCGTG TTCCGTGTGA TAGTTCAGT ACAGCCACAC TCTTAAGTGG GTCAAAAAGAA TGGTGGCTTC
33111 AGTTGTAATC AAAACTCCAT CGCATCTAAT TGTTCAGG AAATCATCCA CGGTAGCATA TGCAAATCCC
33181 AACCAAGCAA TGCAACTGGA TTGCGTTTTCA AGCAGGAGAG GAGAGGGGAG AGACGGAAGA ACCATGTTAA
33251 YTTTTATTCC AAACGATCTC GCAGTACTTC AAATTGTAGA TCGCGCAGAT GGCATCTCTC GCCCCCACTG
33321 TGTTGGTGAA AAAGCACAGC TAAATCAAAA GAAATGCGAT TTTCAAGGTG CTCAACGBTG GCTTCCAACA
33391 AAGCCTCCAC GCGCACATCC AAGAACA AAAAAGGAGCA TTTTCTAACT CCTCAATCAT
33461 CATATTACAT TCCTGCACCA TTCCAGATA ATTTTCAGCT TTCCAGCCTT GAATTATTCTG TGTCAATTCT
33531 TGTGGTAAAT CCAATCCACA CATTACAAAC AAGTCCCAGG GGGC GCCCTC CACCACCATT CTTAAACACA
33601 CCTCATAAT GACAAAATAT CTTGCTCCTG TGTACCTGT AGCGAATTGA EAATGGCAAC ATCAATTGAC
33671 ATGCCCTTGG CTCTAAGTTC TTCTTTAAGT TCTAETTGT AAAACTCTCT CATATTATCA CCAAACTGCT
33741 TAGCCAGAA G CCCCCGGGA ACAAGAGCAG GGGACGCTAC AGTGCAGTAC AAGCGCAGAC CTCCCCAATT
33811 GGCTCCAGCA AAAACAAGAT TGGATAAAGC ATATTGGGAA CCACCAGTAA TATCATCGAA GTTGTCTGGAA
33881 ATATAATCAG BCAGAEYTTT TTGTAGAAAT TGAATAAAG AAAAATITGC CAAAAAACA TTCAAAACCT
33951 CTGGGATGCA AATGCAATAG GTTACCQCC TCGCCTCCAA CATTGTTAGT TTTGAATTAG TCTGCAAAAA
34021 TAAAAA AAA ACAAGCGTCA TATCATAETA GCCTGACGAA FAGGTGGATA AATCAGTCTT TCCATCACAA
34091 GACAAGCCAC AGGGTCTCCA GCTCGACCCCT CGTAAAACCT GTCATCGTGA TTAACAACA GCACCGAAAG
34161 TTCTTCGCGG TGACLAGCAT GAATAGTCT TGATGAAGCA TACAATCCAG ACATETTAG ATCAGTTAAG
34231 GAGAAAAAAC AGCCAACATA GCCTTTGGGT ATAATTATGC TTAATCGTAA GTATAGCAA GCCACCCCTC
34301 GCGGATACAA AGTAAAAGGC ACAGGAGAA TAAAAATATA ATTATTTCTC TGCTGCTGTT TAGGCAACBT
34371 CGCCCCCGGT CTTCTATAAT ACACATACAA AGCCTCATCA GCCATGGCTT ACCAGAGAAA GTACAGCGGG
34441 CACACAAACC ACAAGCTETA AAGTCACTCT CCAACCTSTC CACAATATAT ATACACAAGC CCTAAACTGA
34511 CGTAATGGEA CTAAAGTSTA AAAAATCCCG CCAACCCAA CACACACCCC GAAACTGCGT CACCAGGGAA
34581 AAGTACAGTT TCACTTCCGC AATCCCAACA AEGCTCACTT CCTTTTTCTC ACGGTACGTC ACATCCCATT
34651 AACTTACAAC BTCATTTTCC CACGGCCBCG CCGCCCCCTT TAACGTTAA CCCCACAGCC AATCACCACA
34721 CGCCCCACAC TTTTAAAAAT CACCTCATTT ACATATTGGC ACCATTCCAT CTATAAGGTA TATTATTGAT
34791 GATG

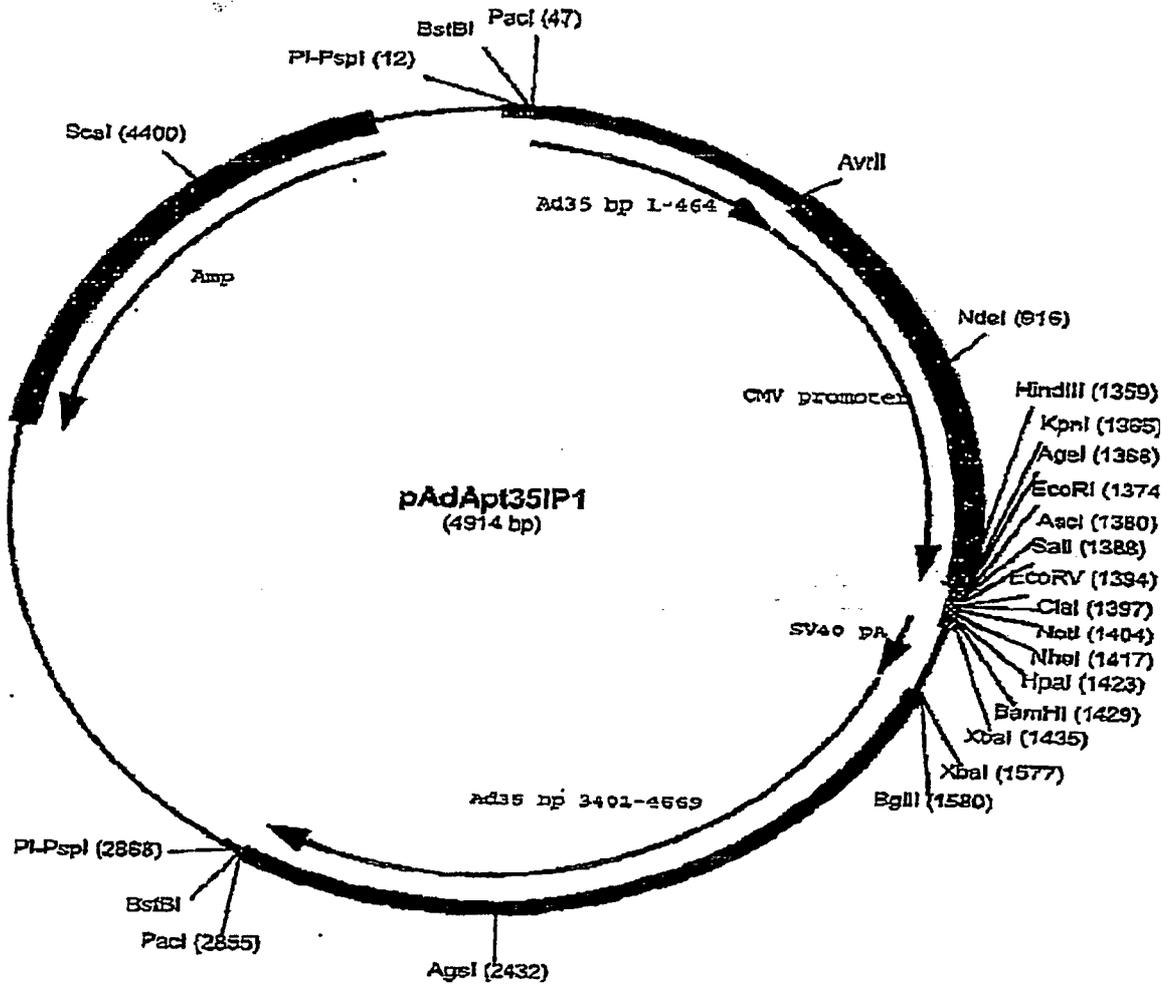
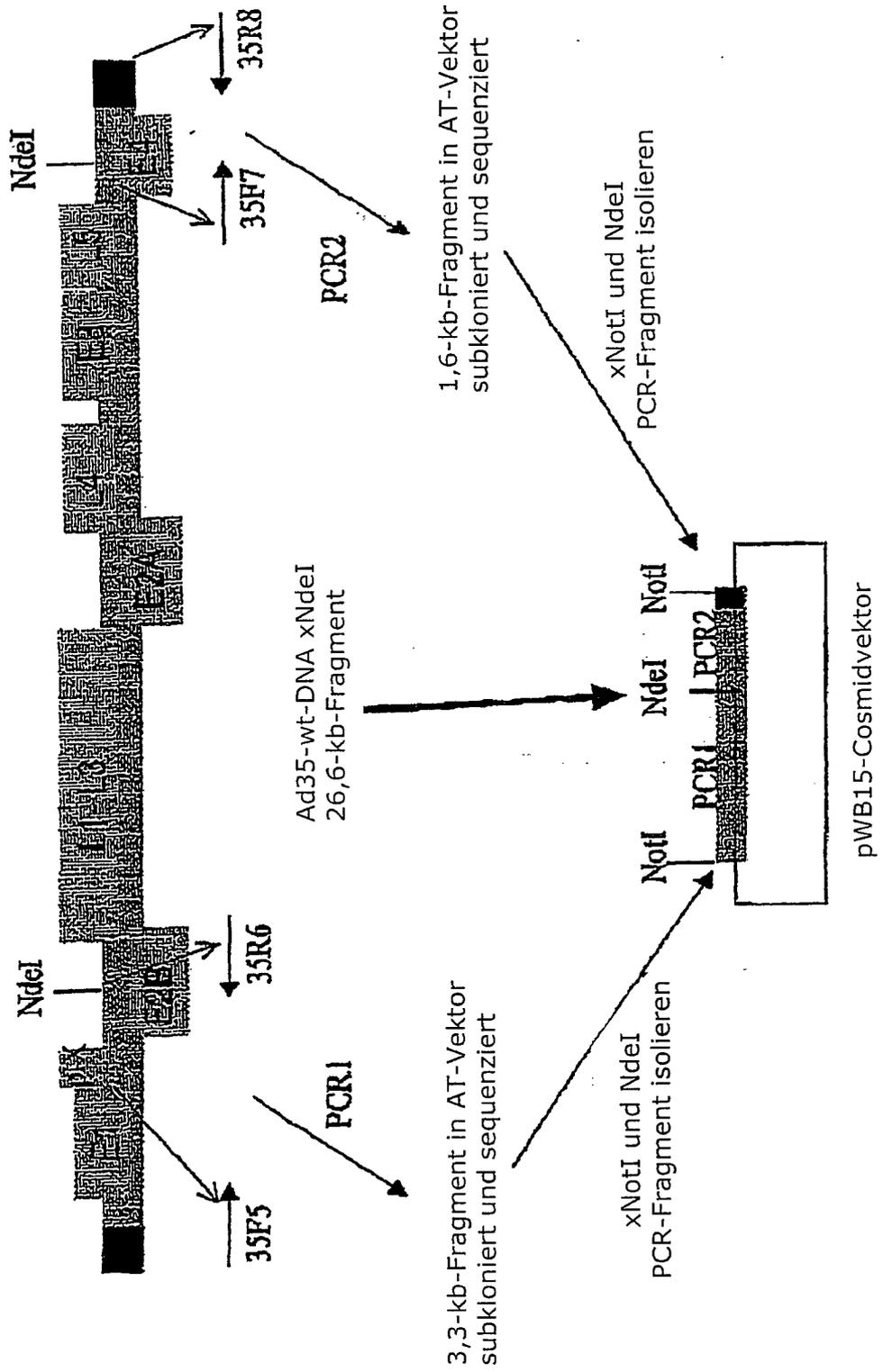
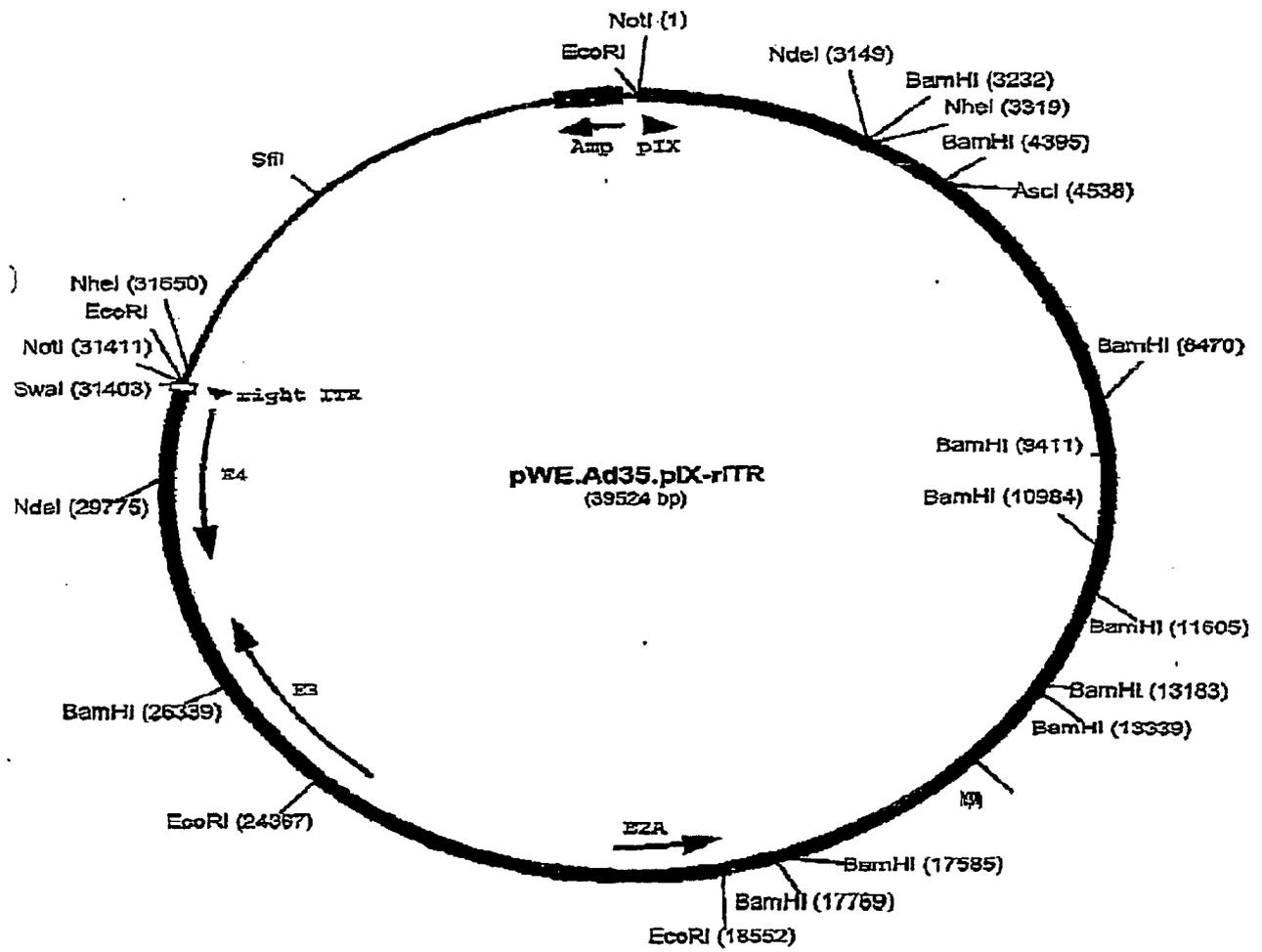
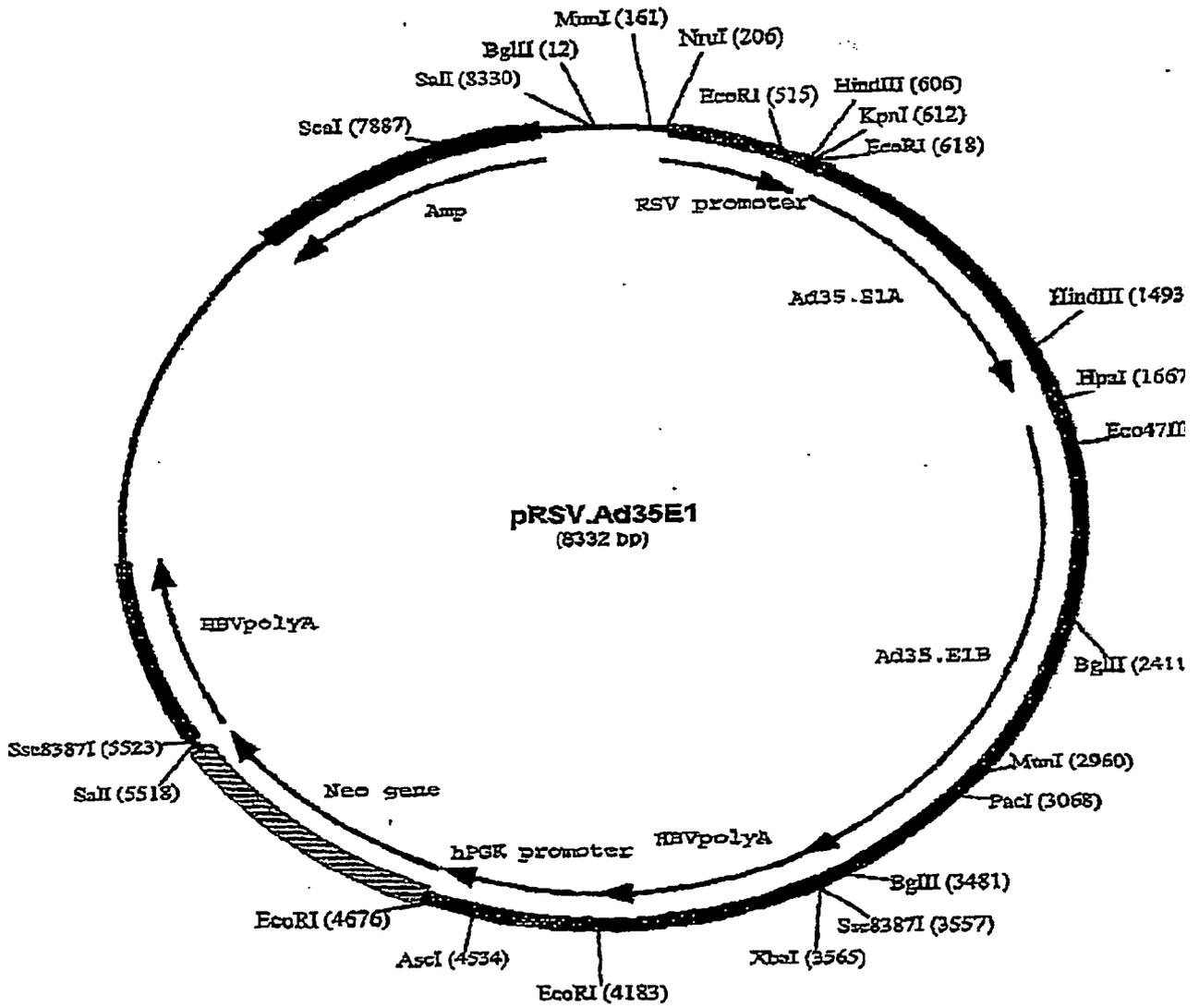
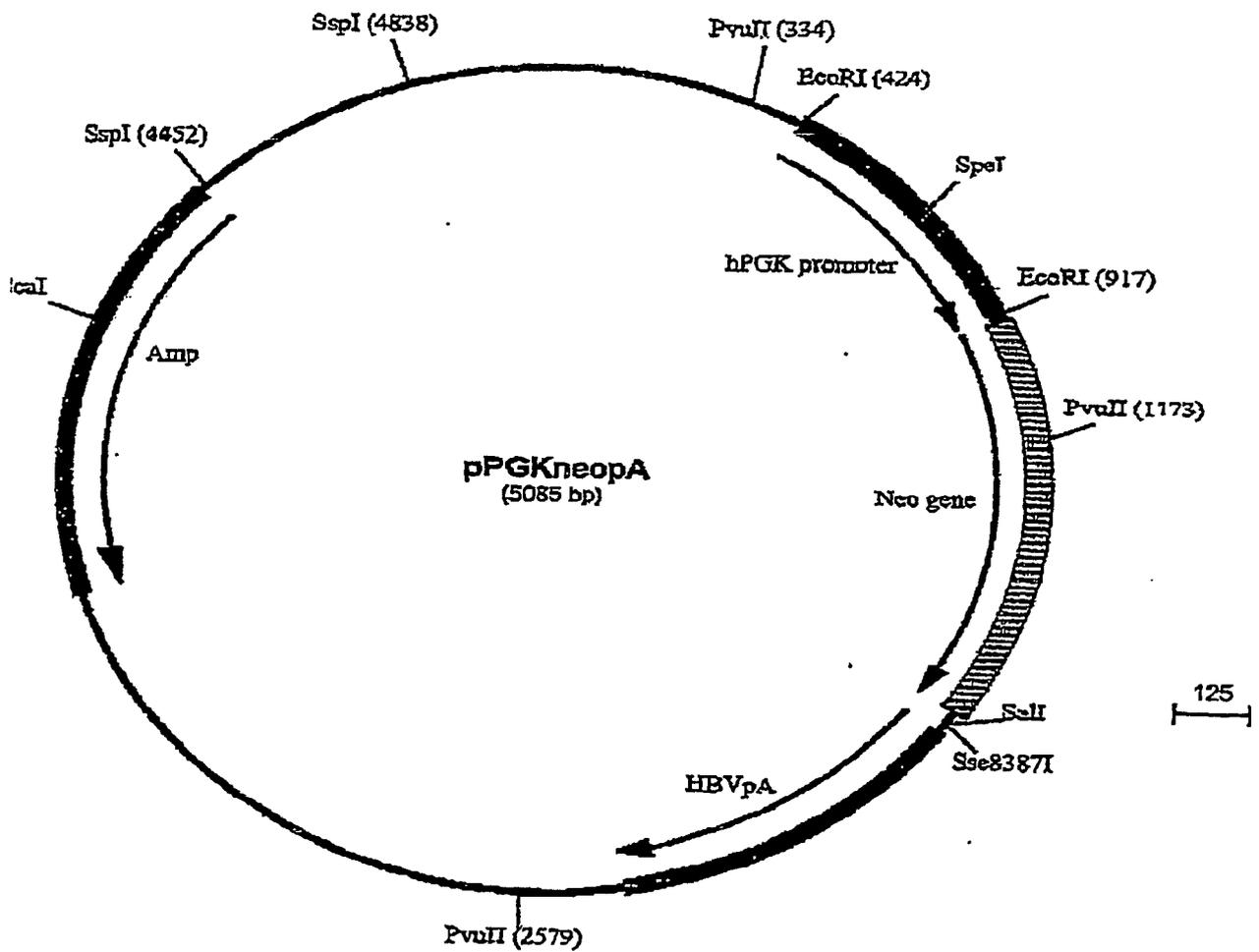


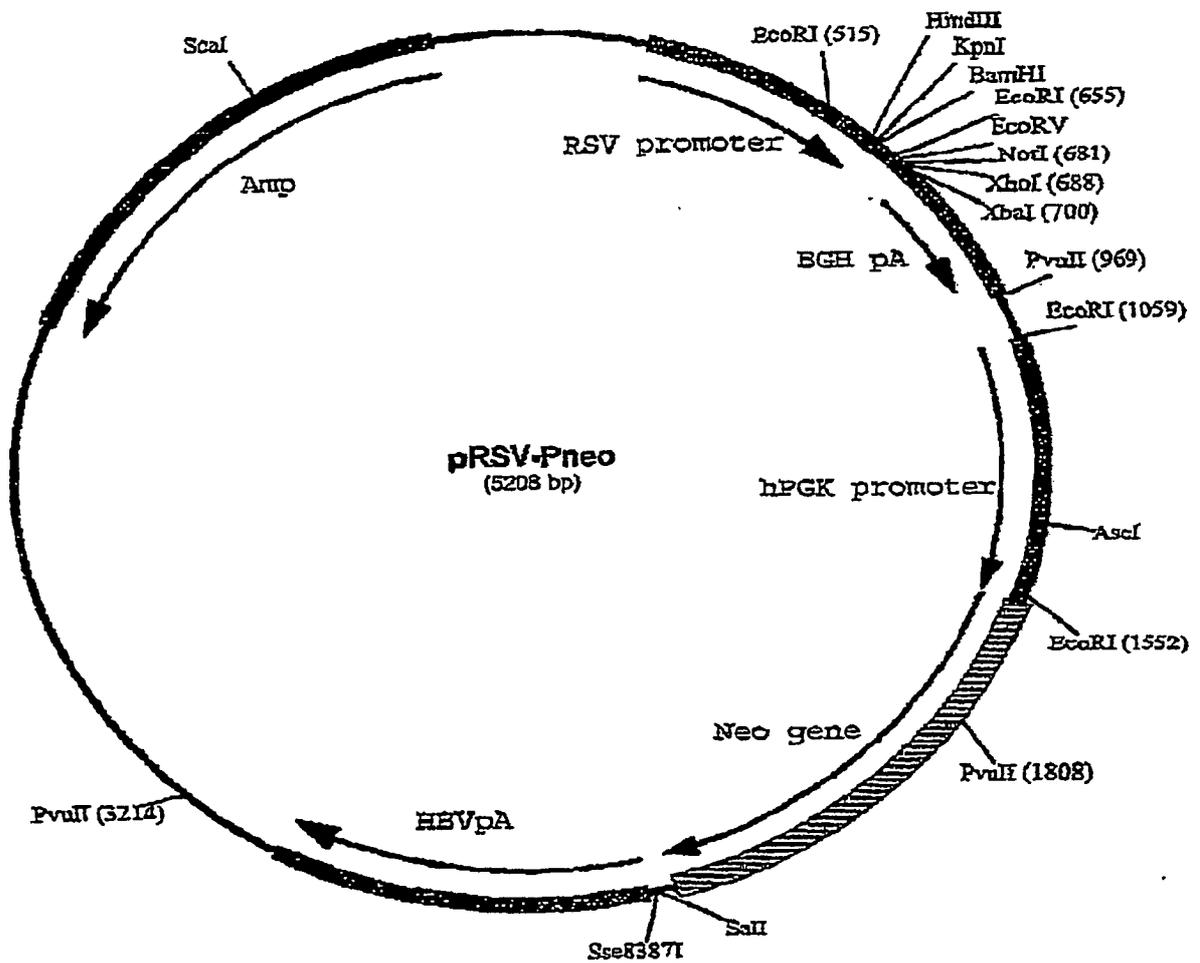
FIG. 7: Konstruktion des Cosmidvektors
pWE.Ad35.pIX-rITR

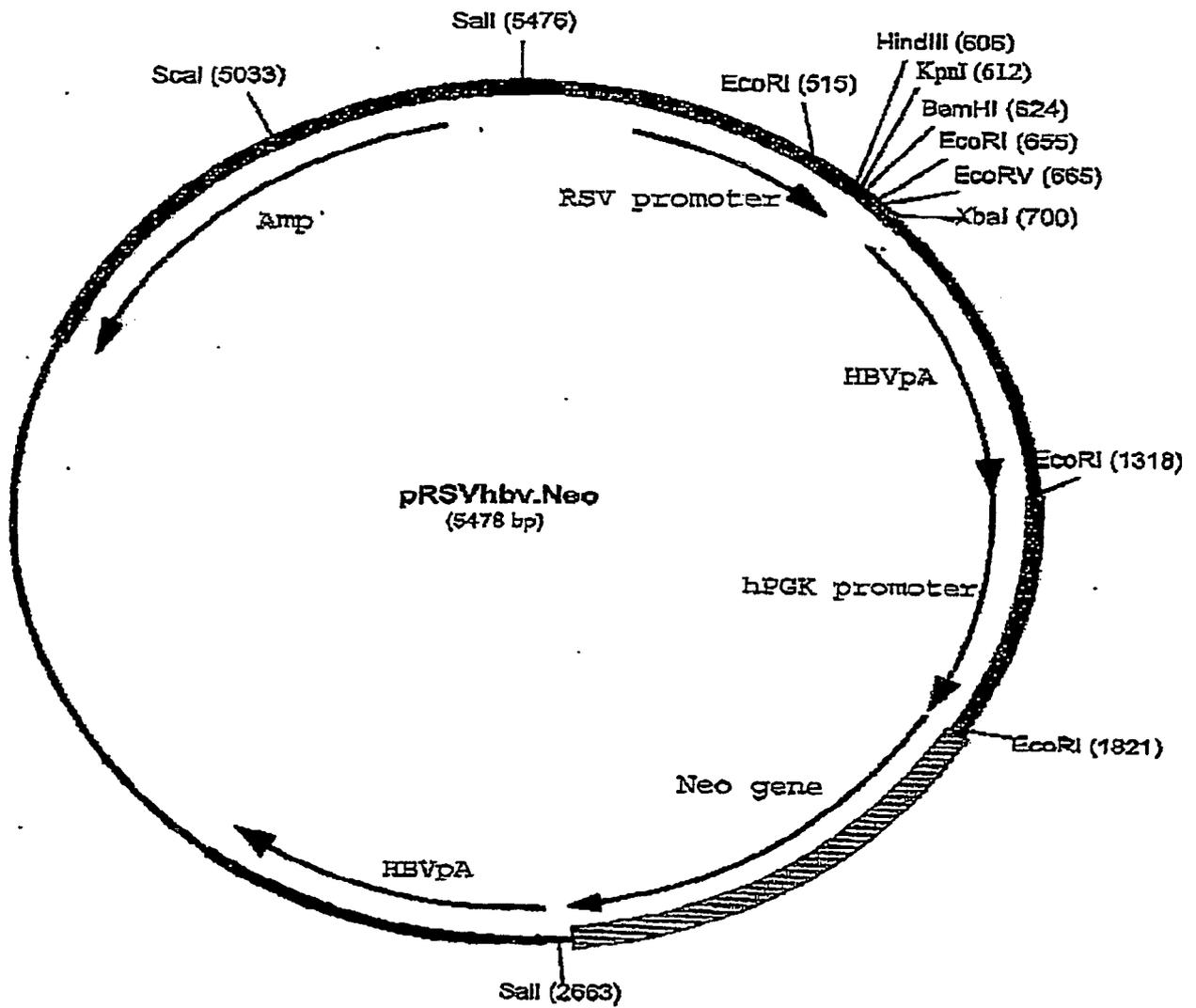


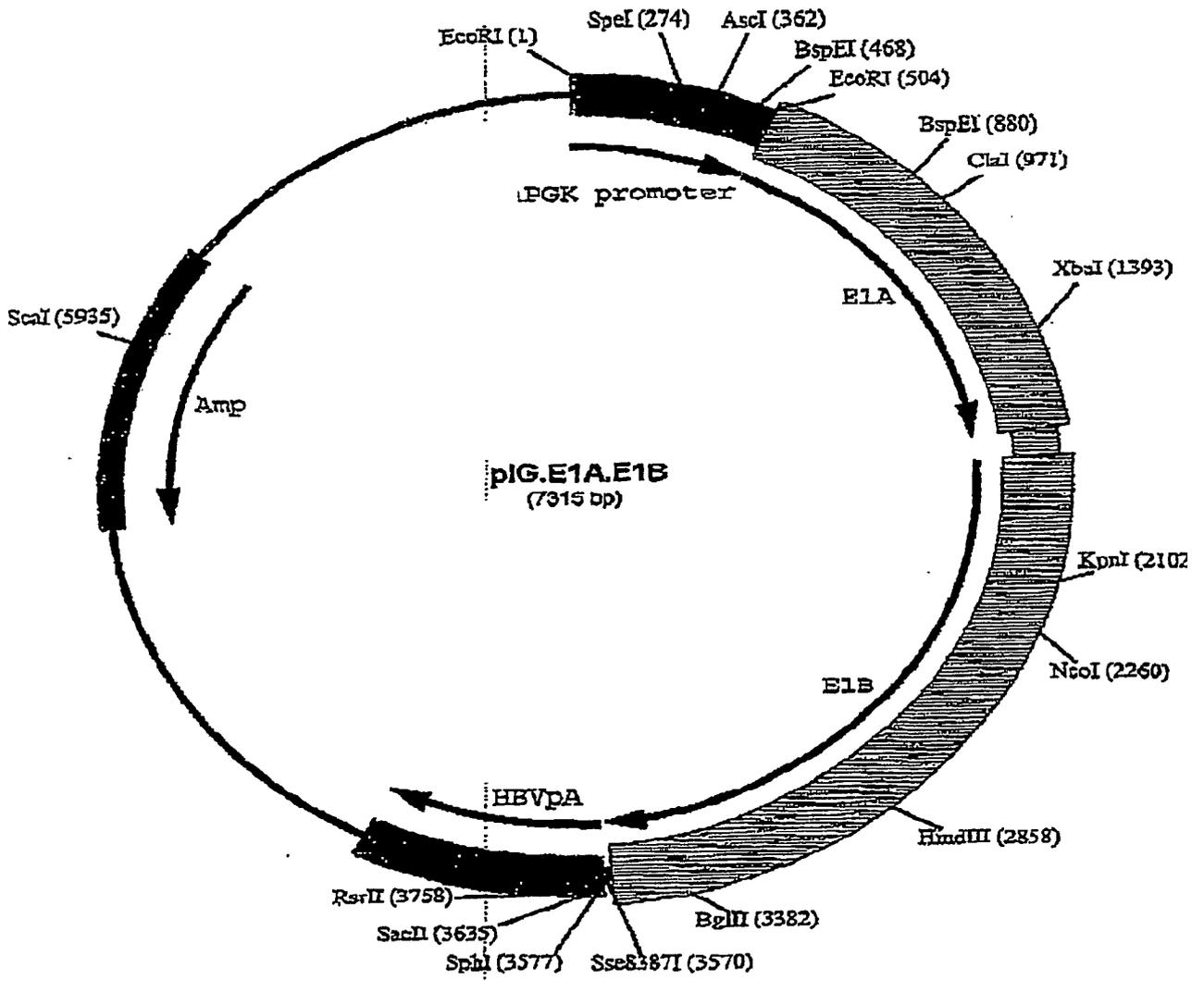


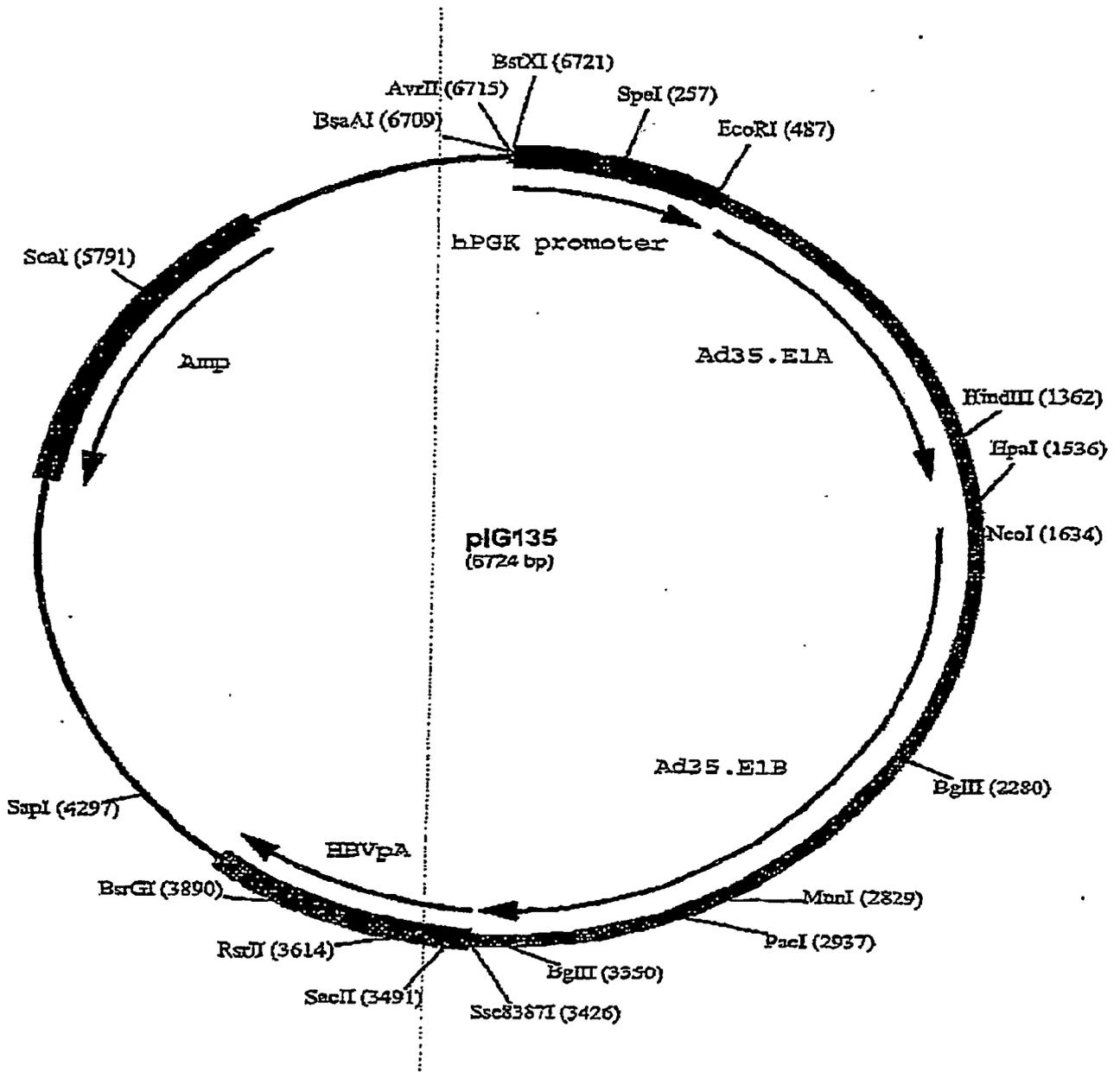


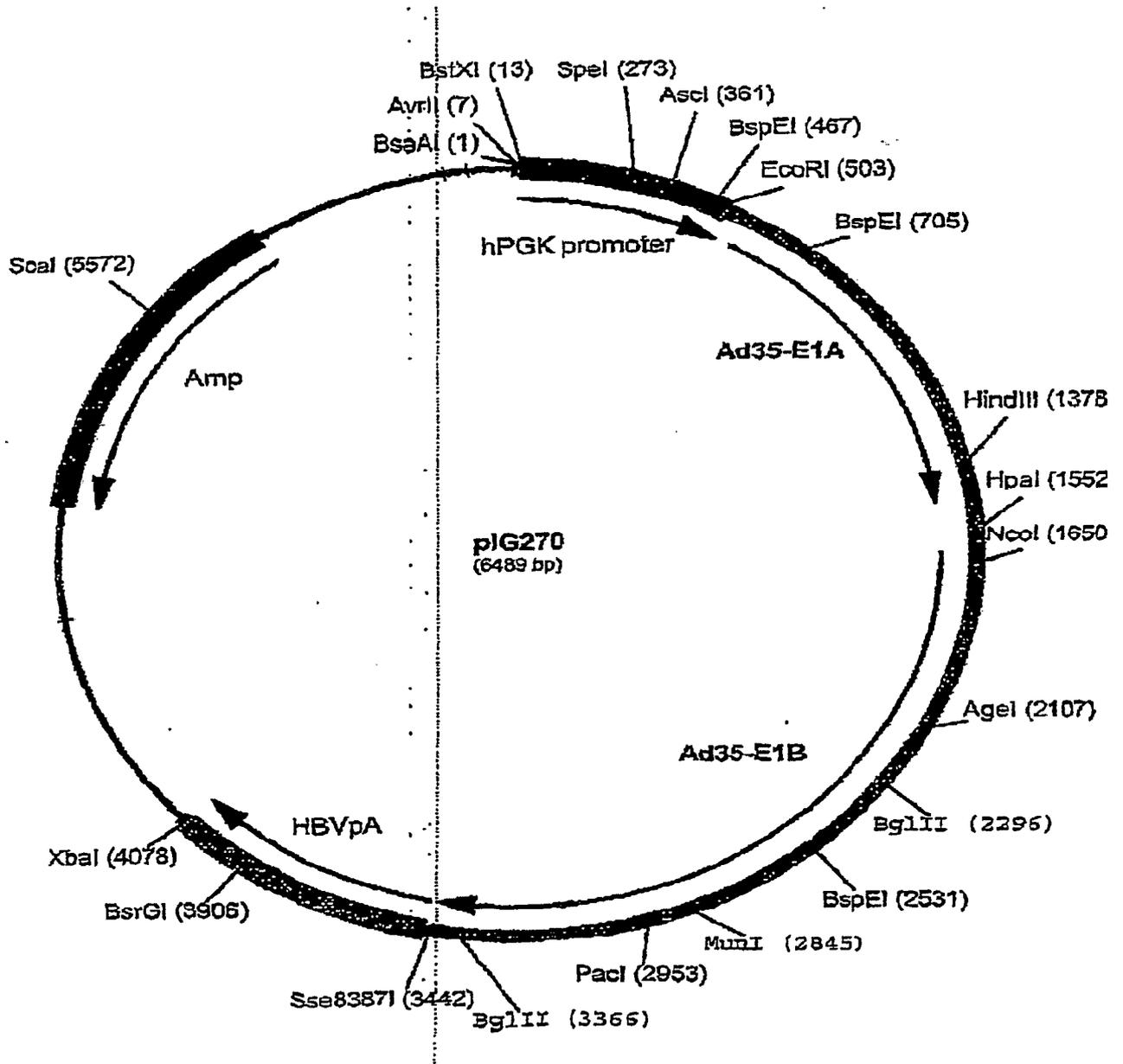


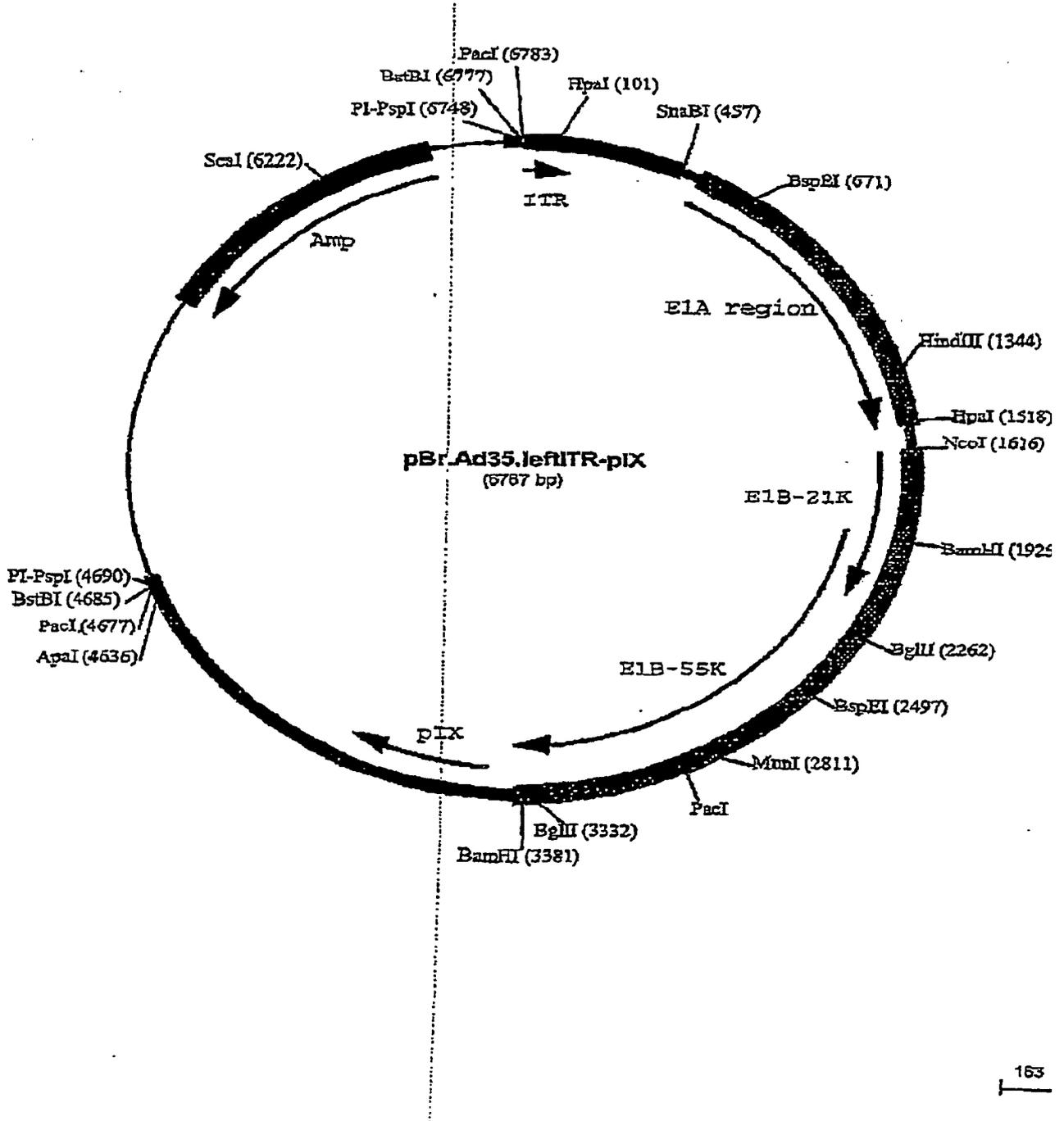


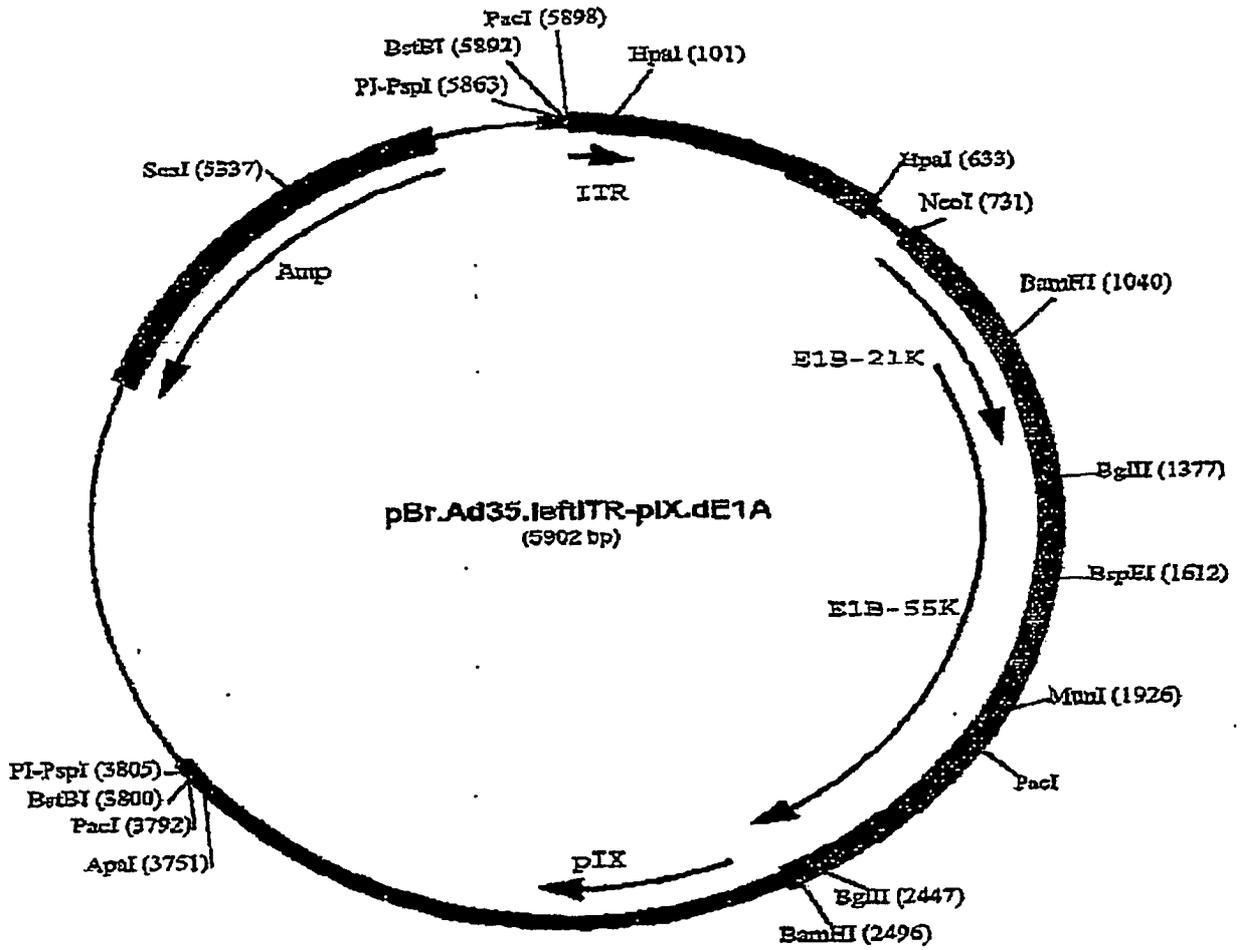




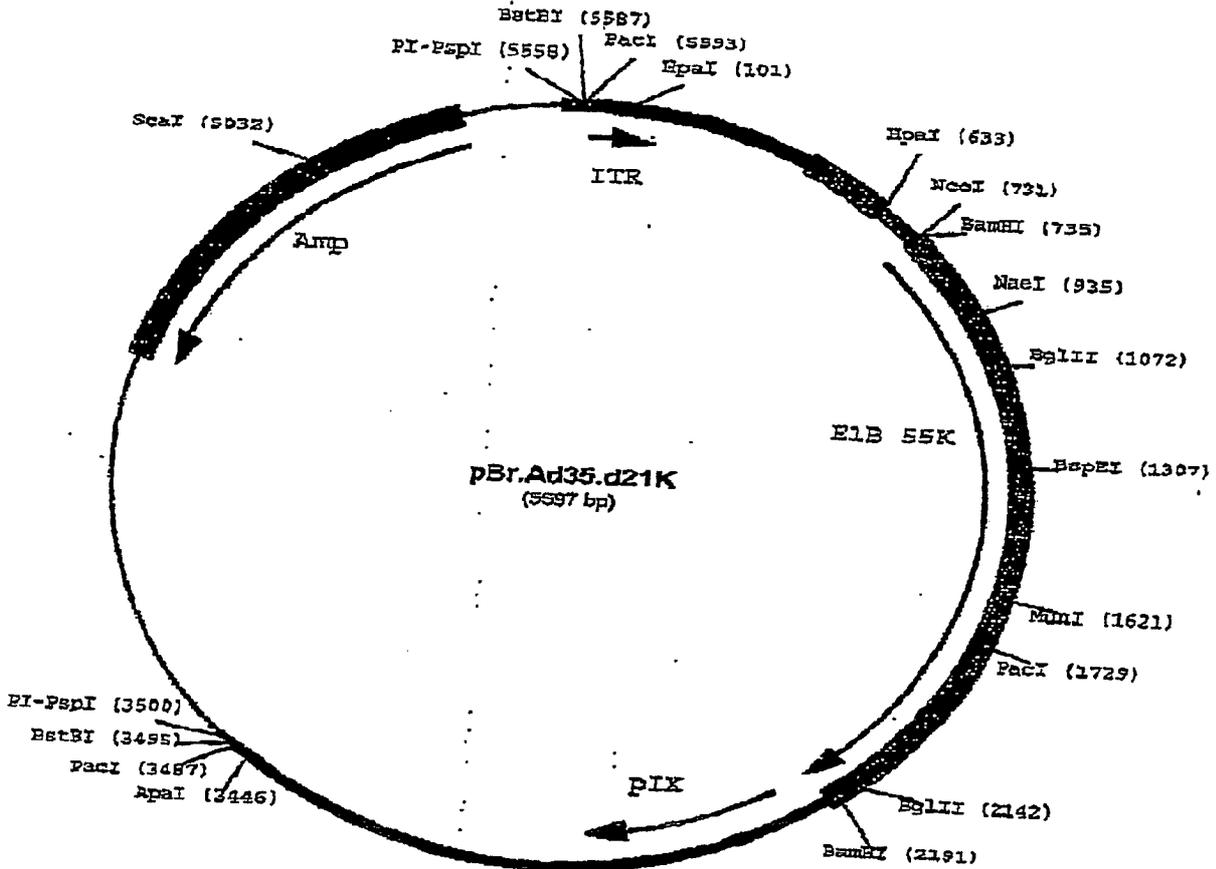


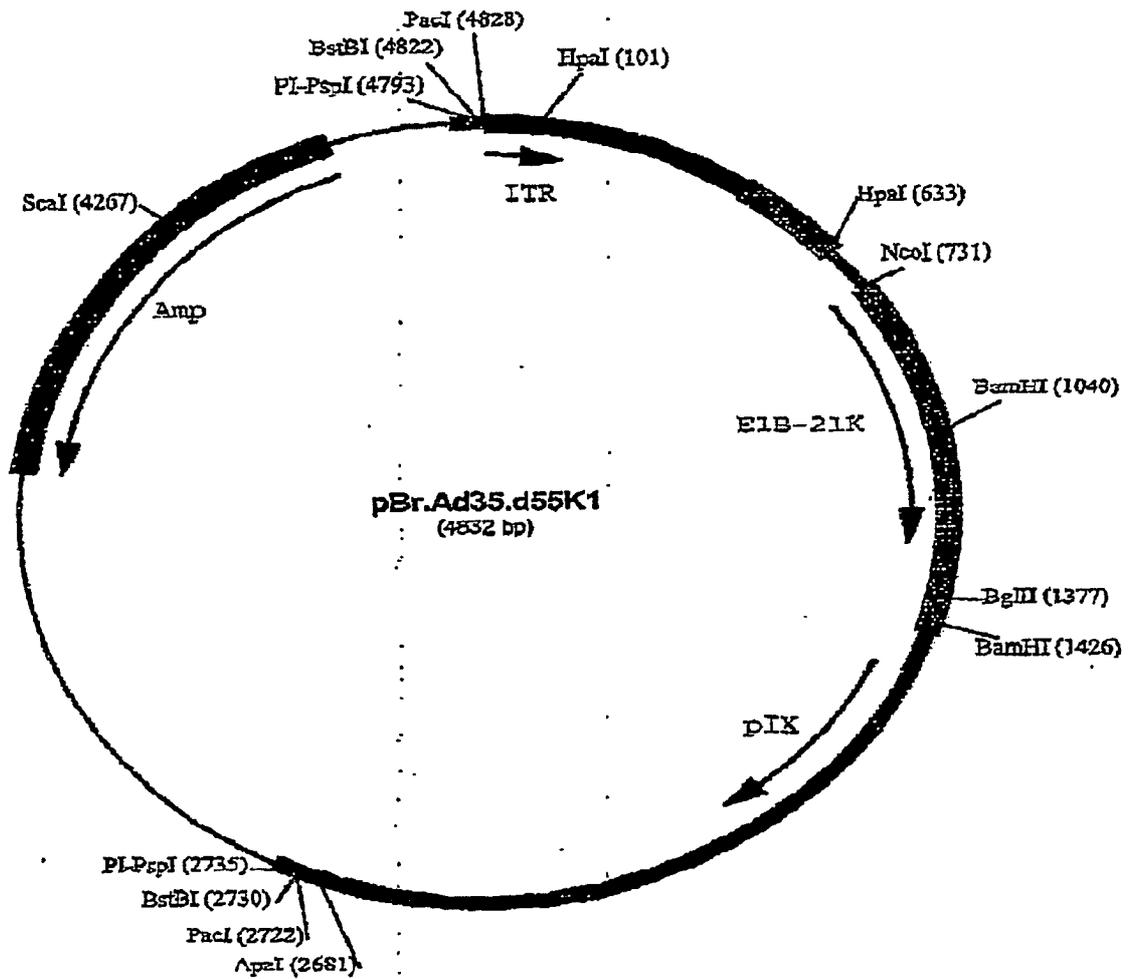


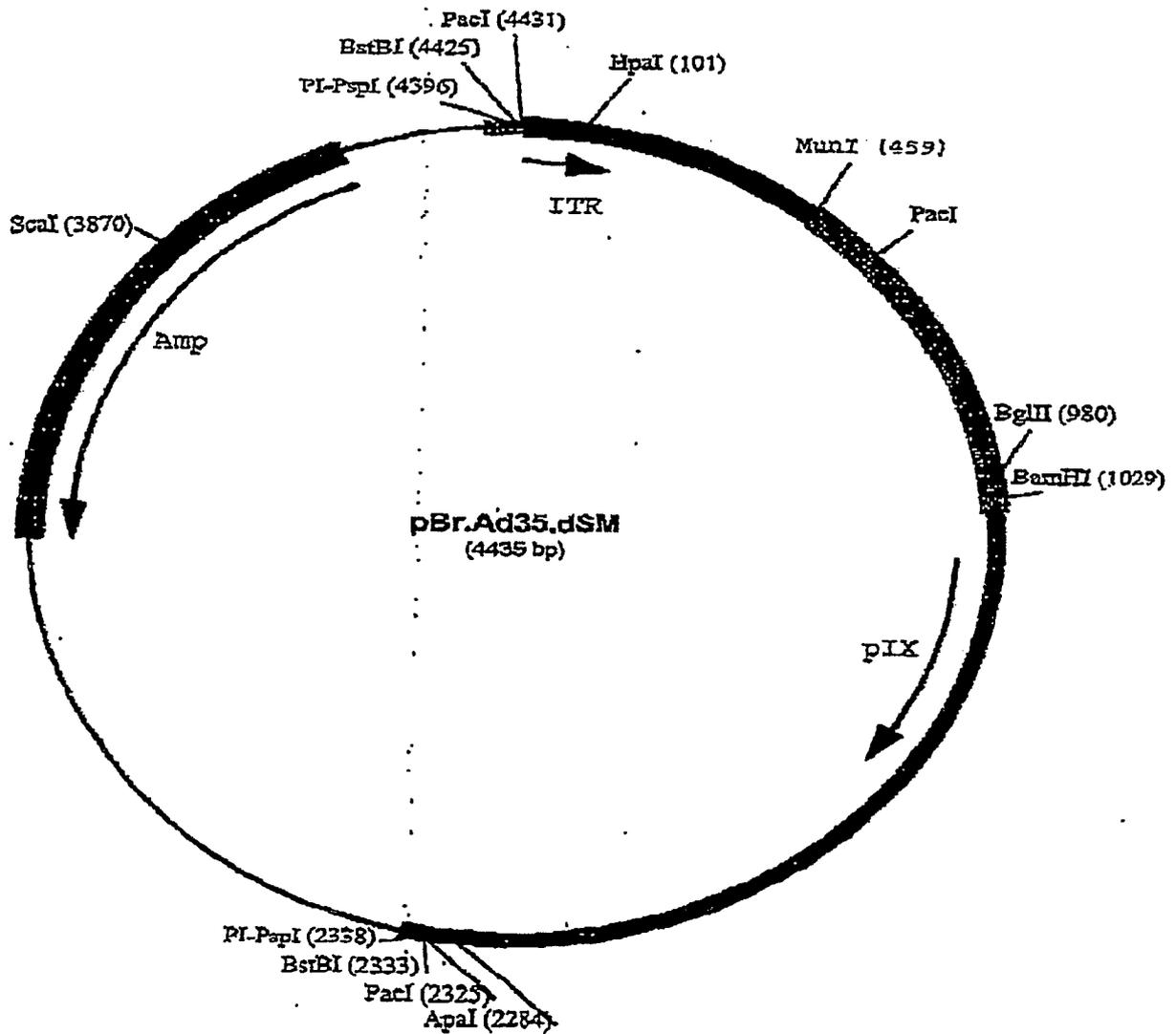




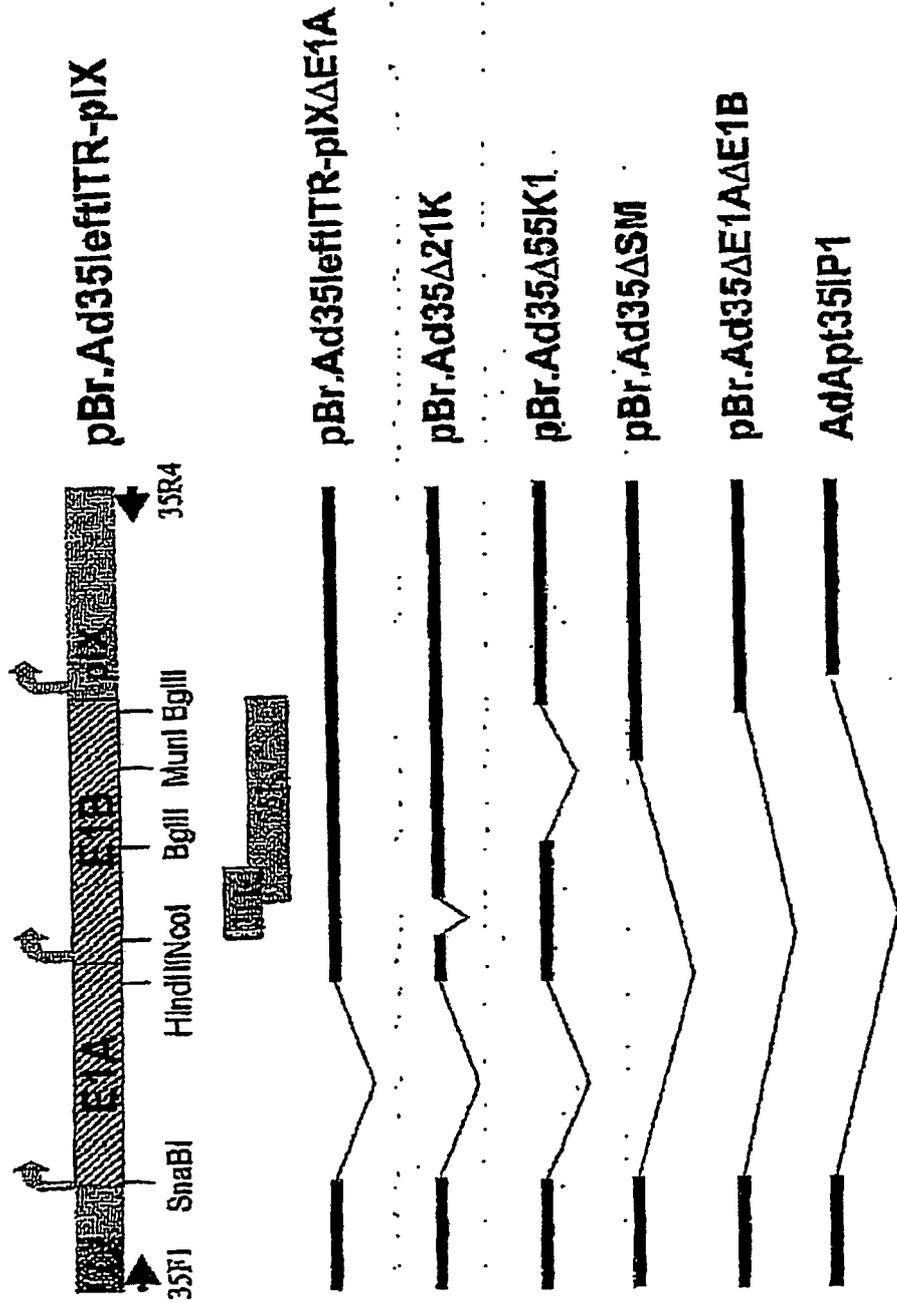
142

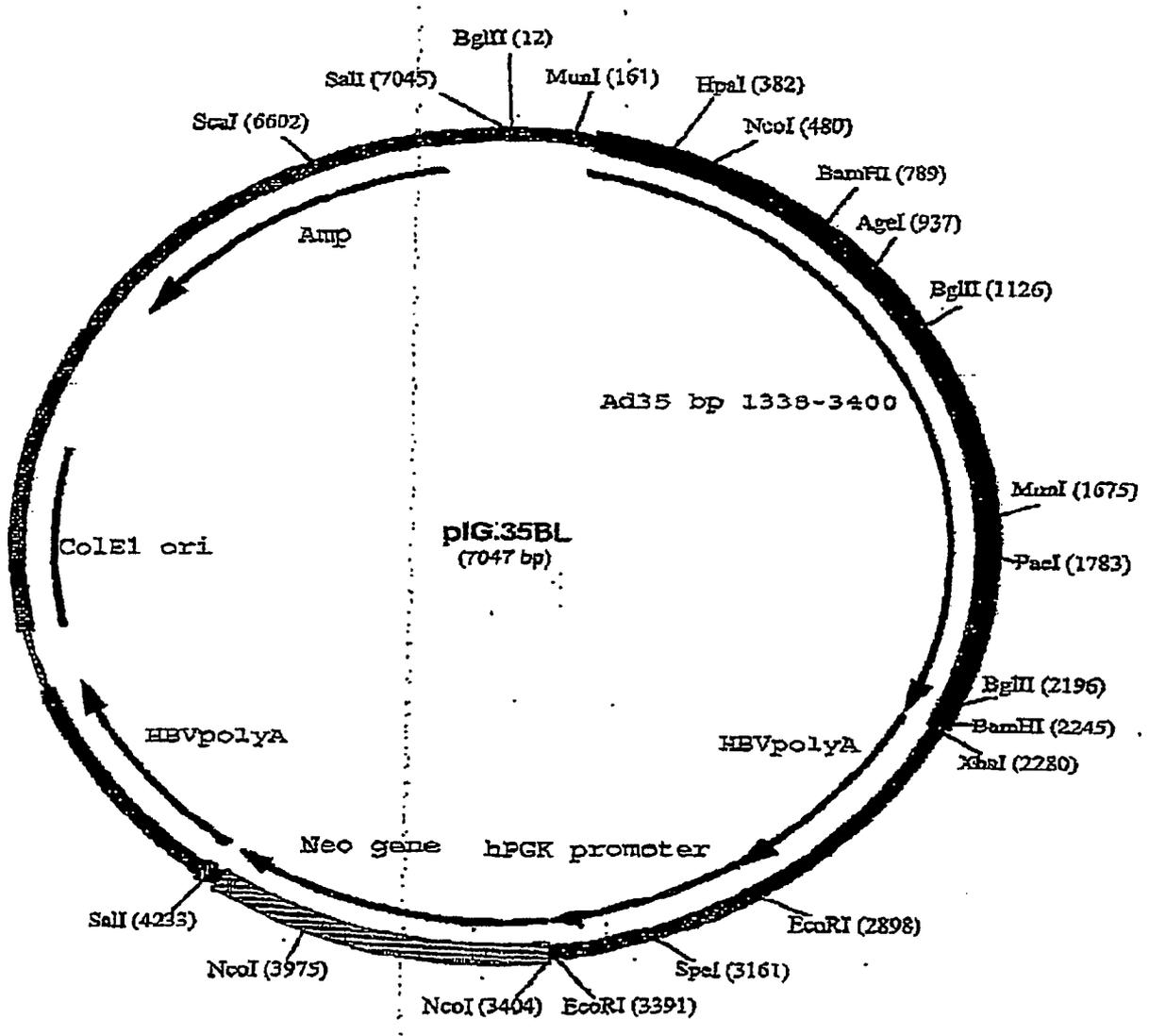


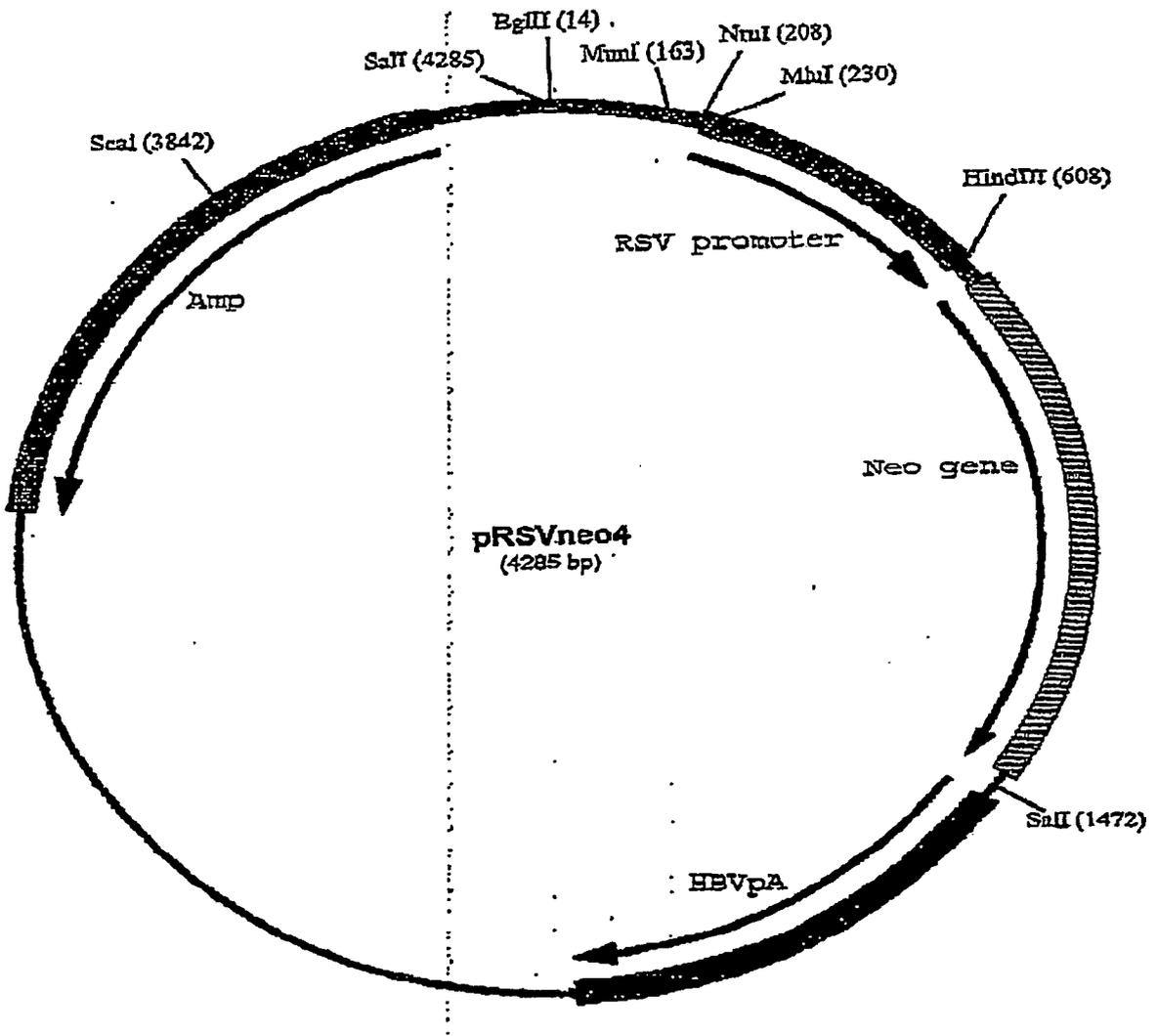


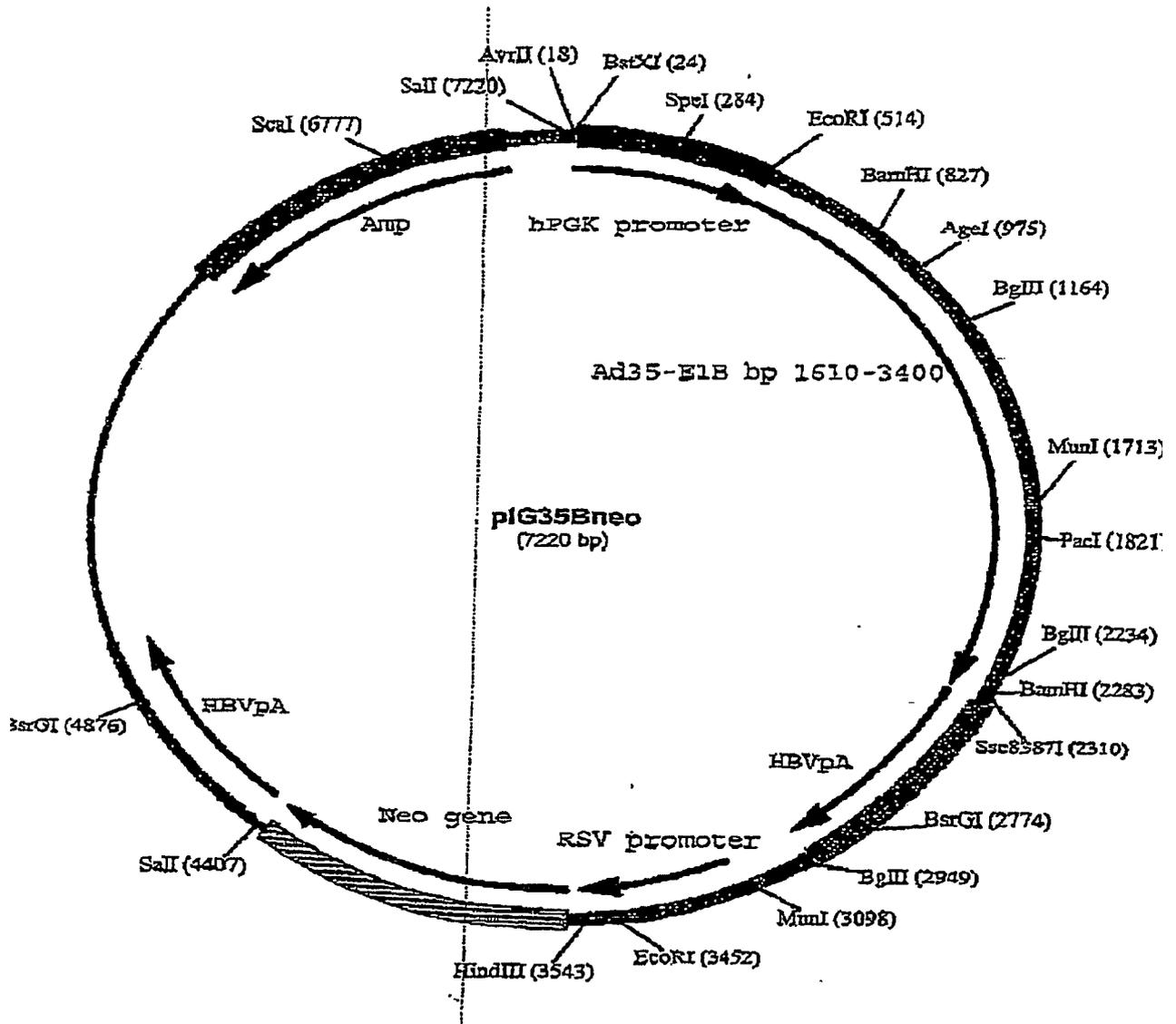


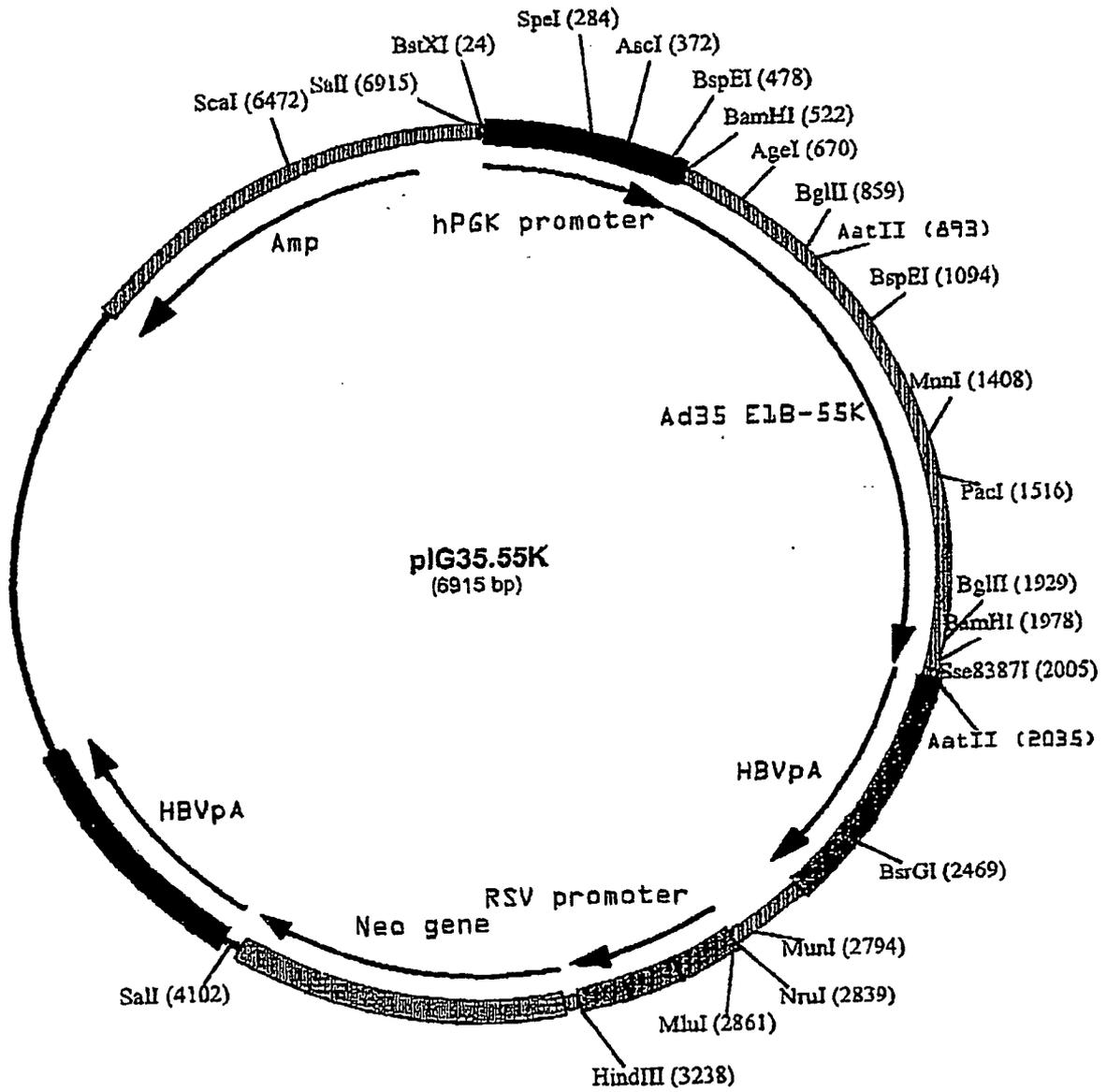
Figur 21

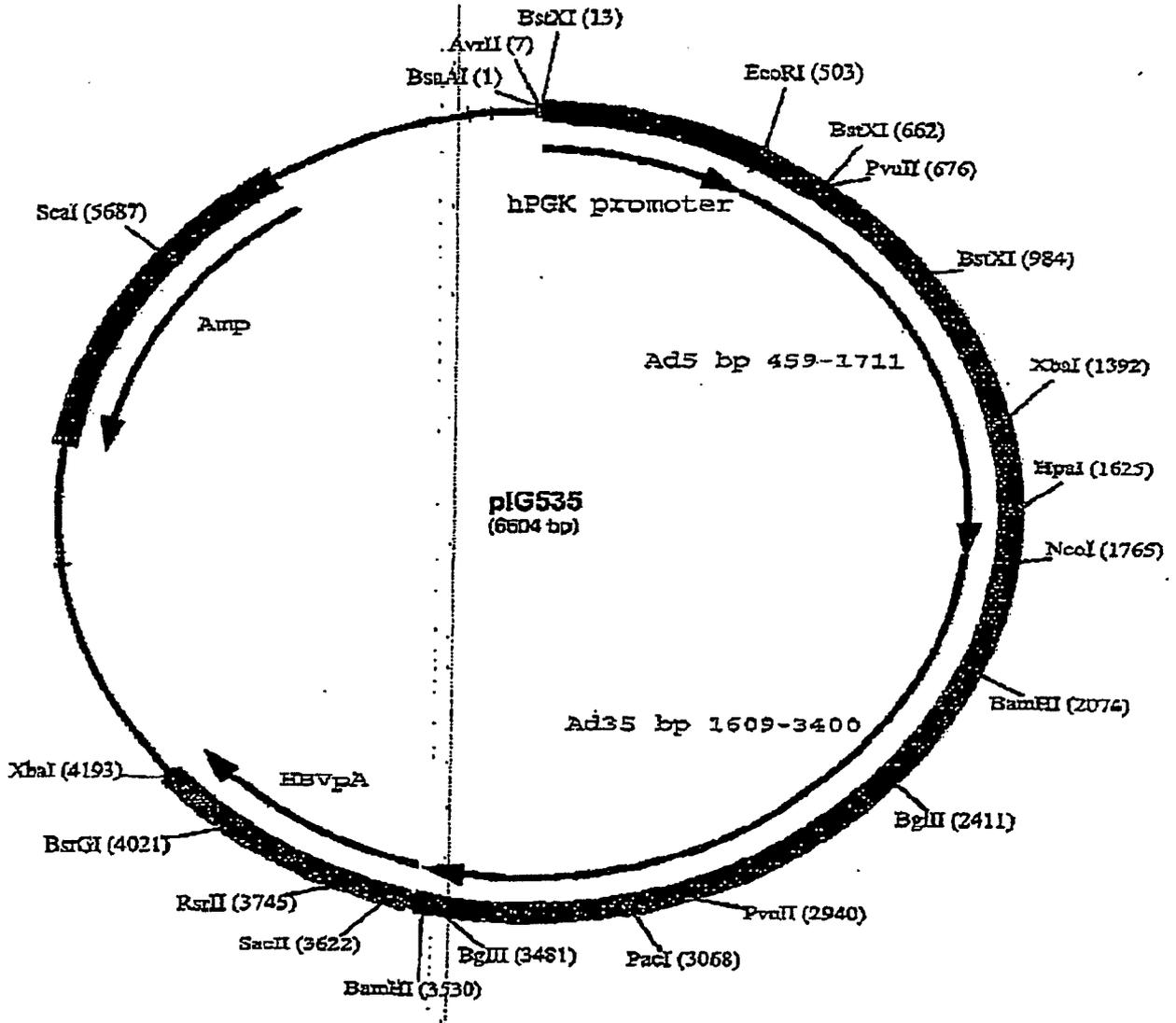


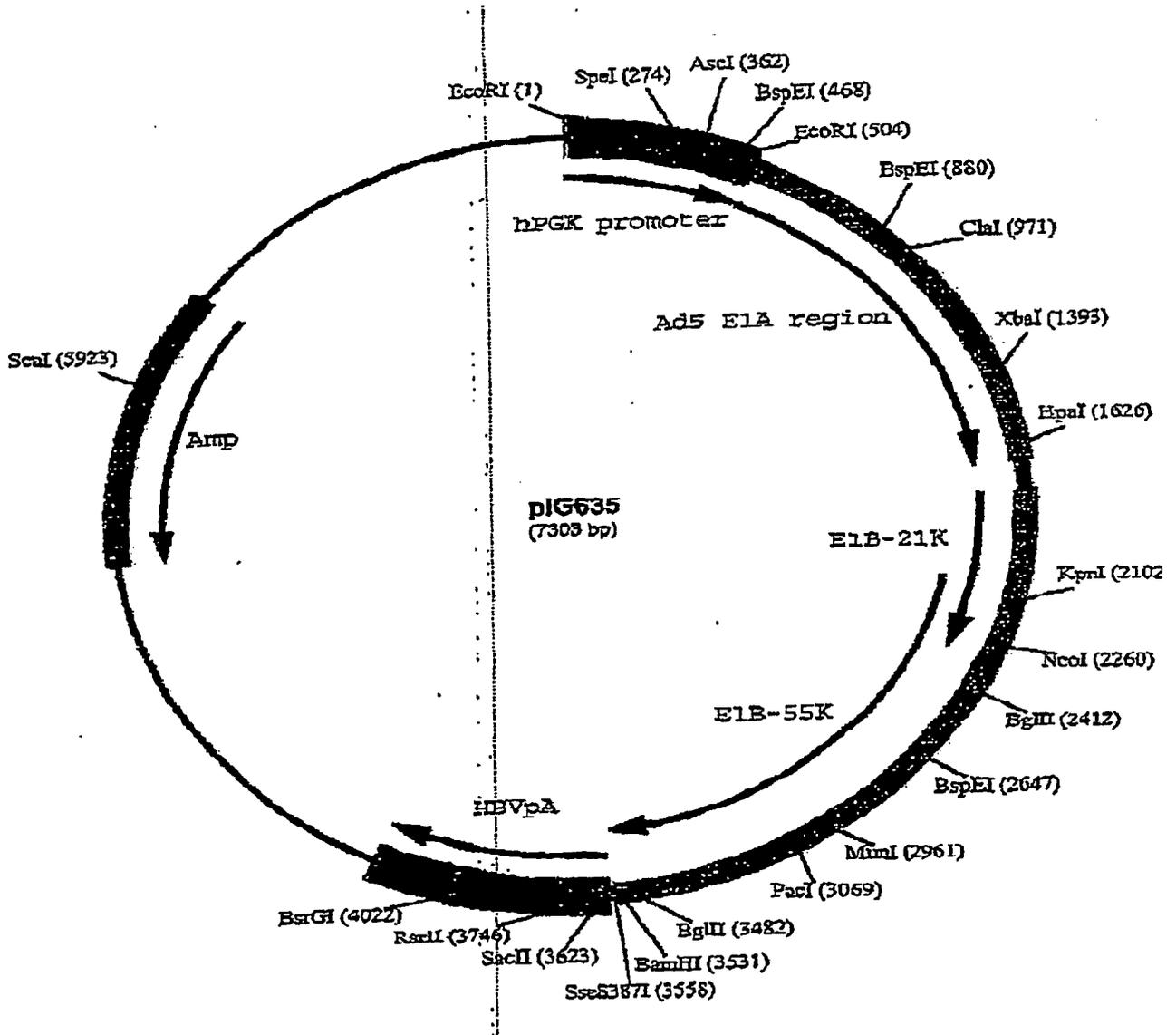


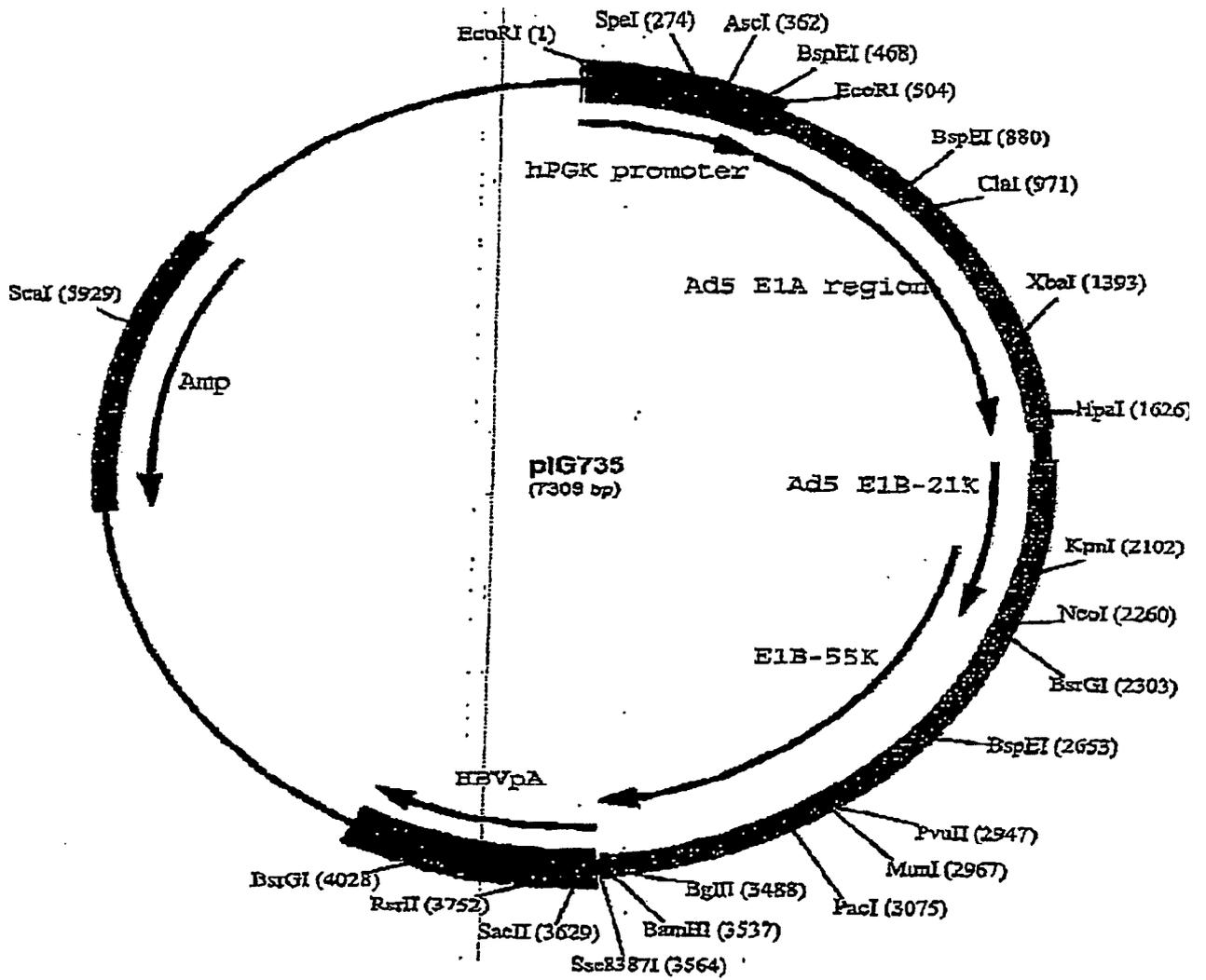


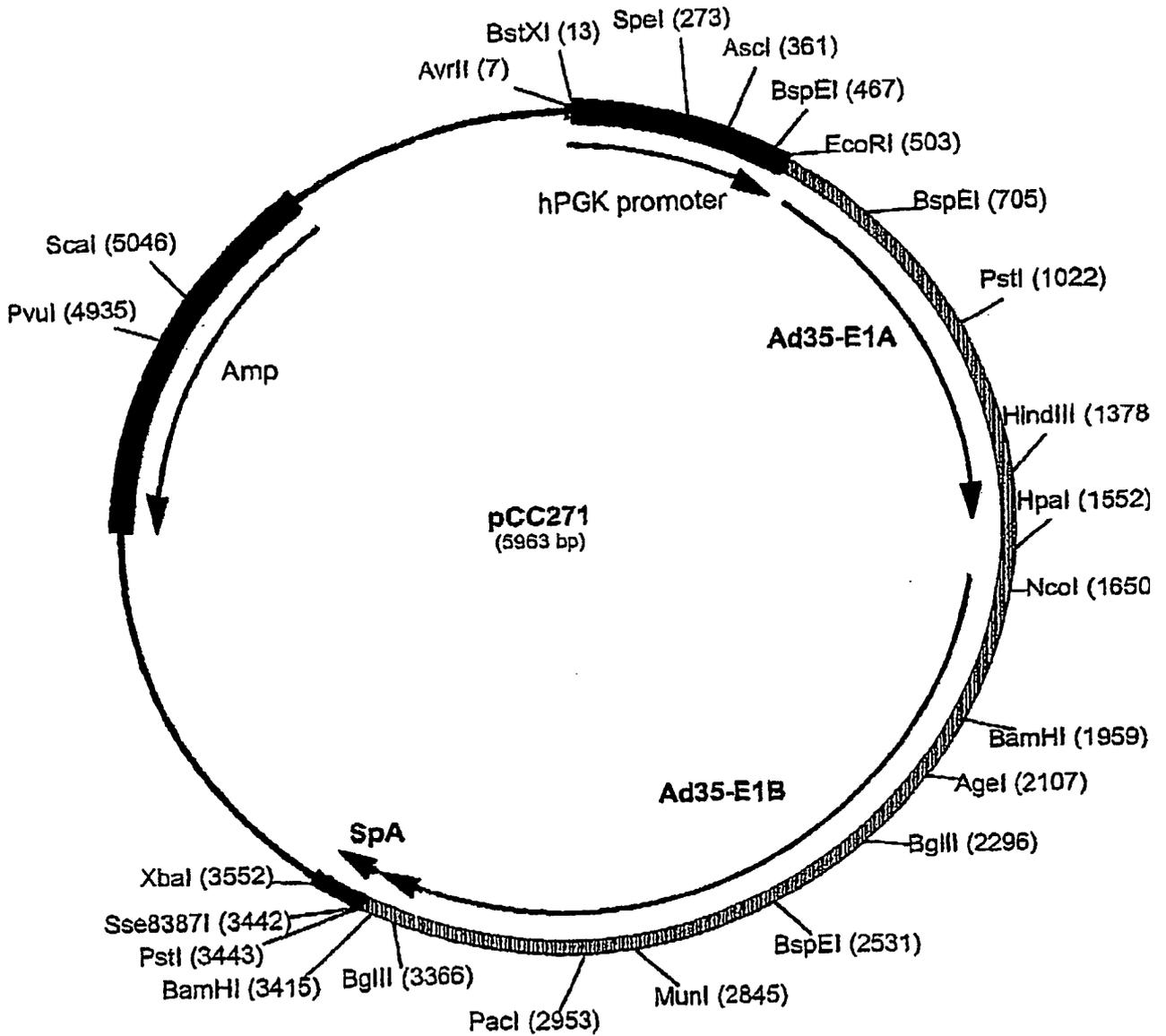


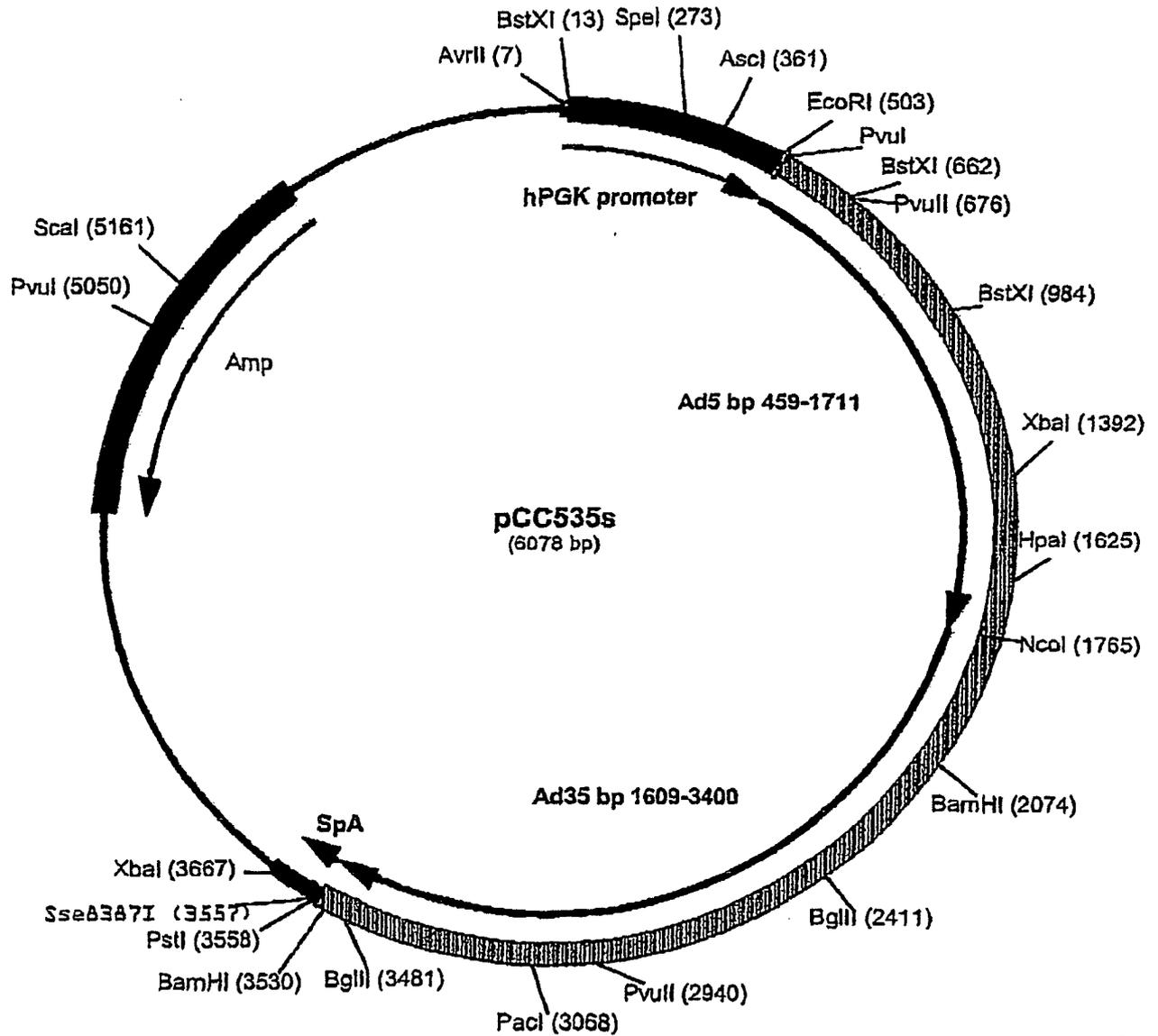


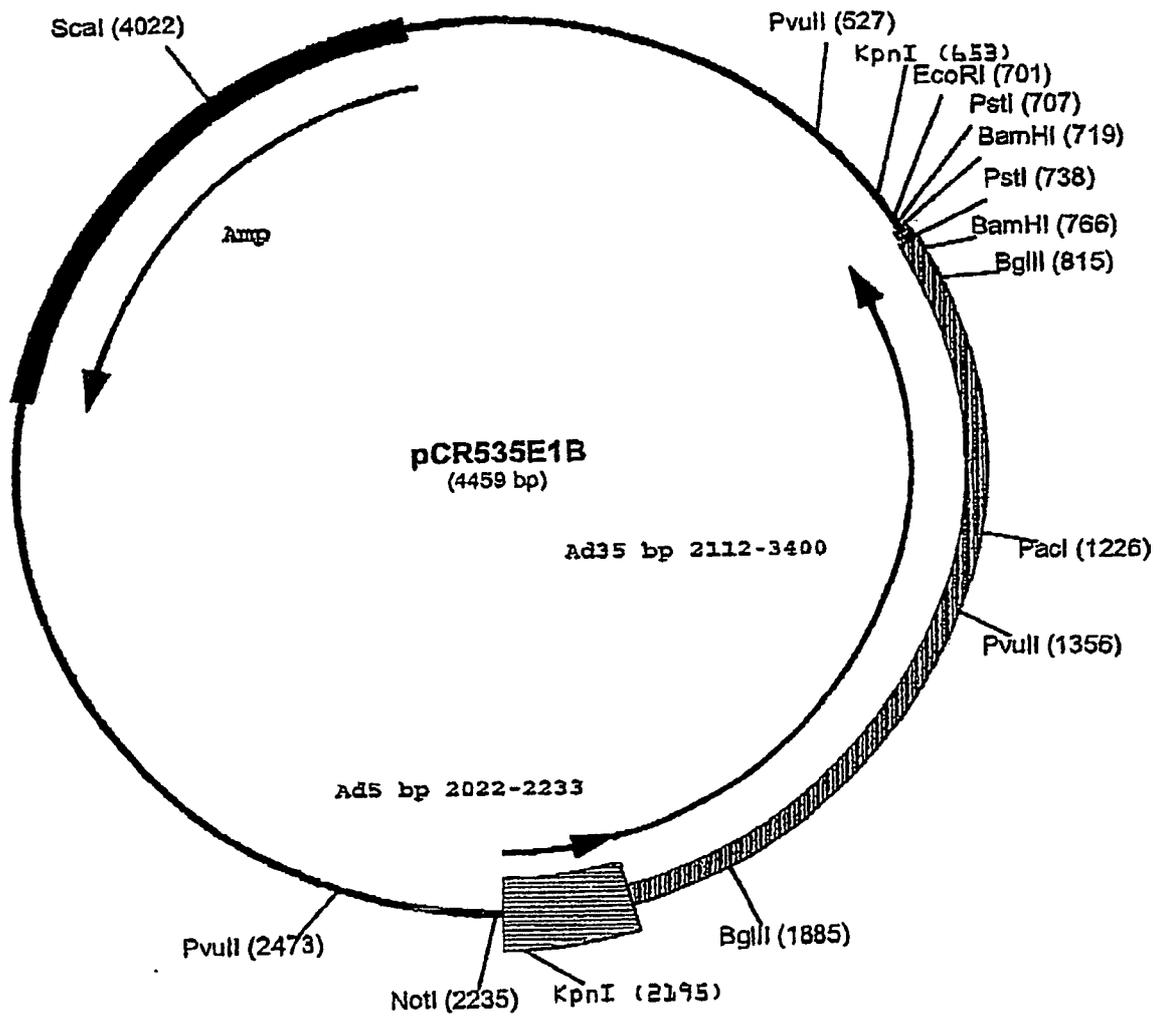


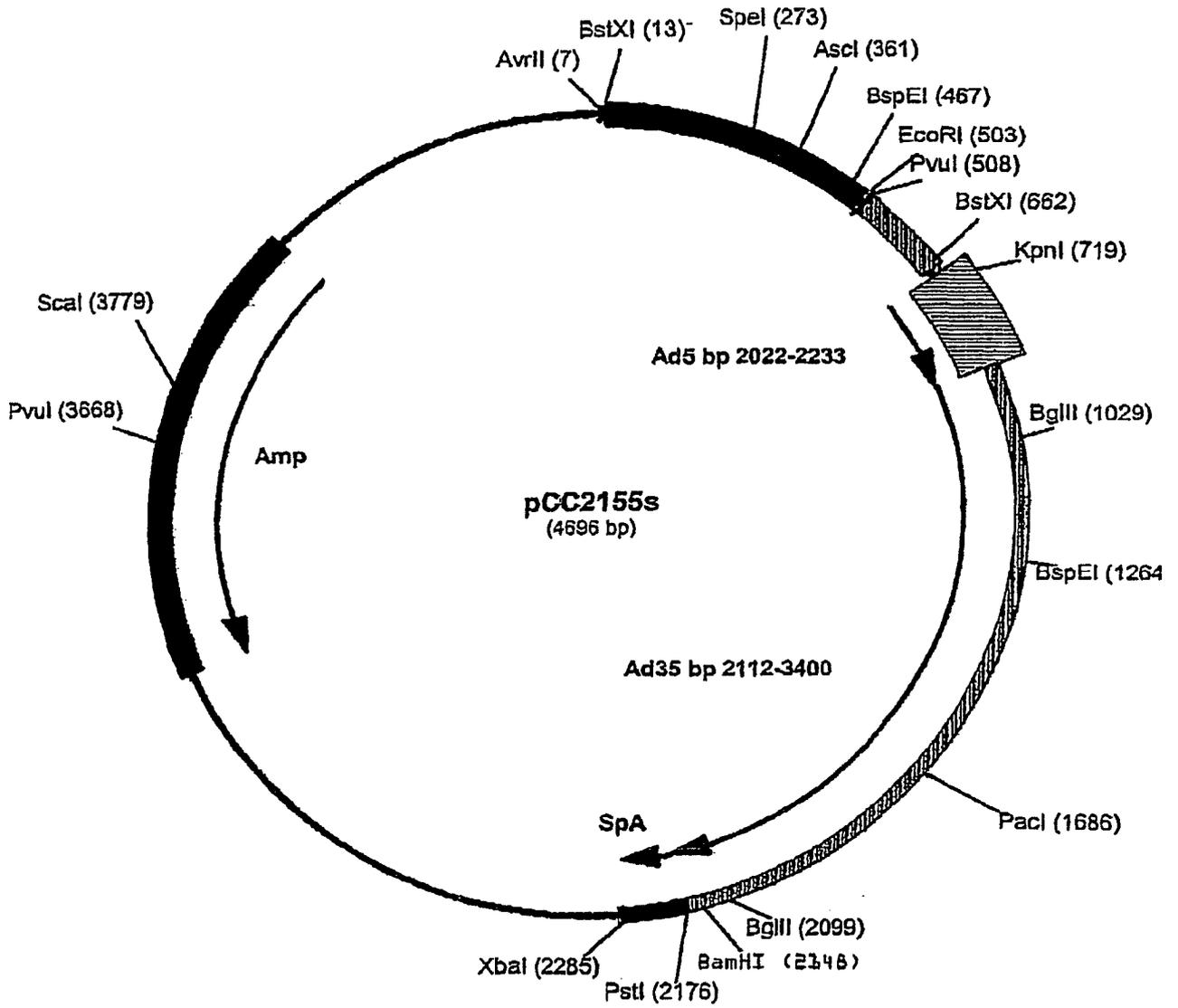


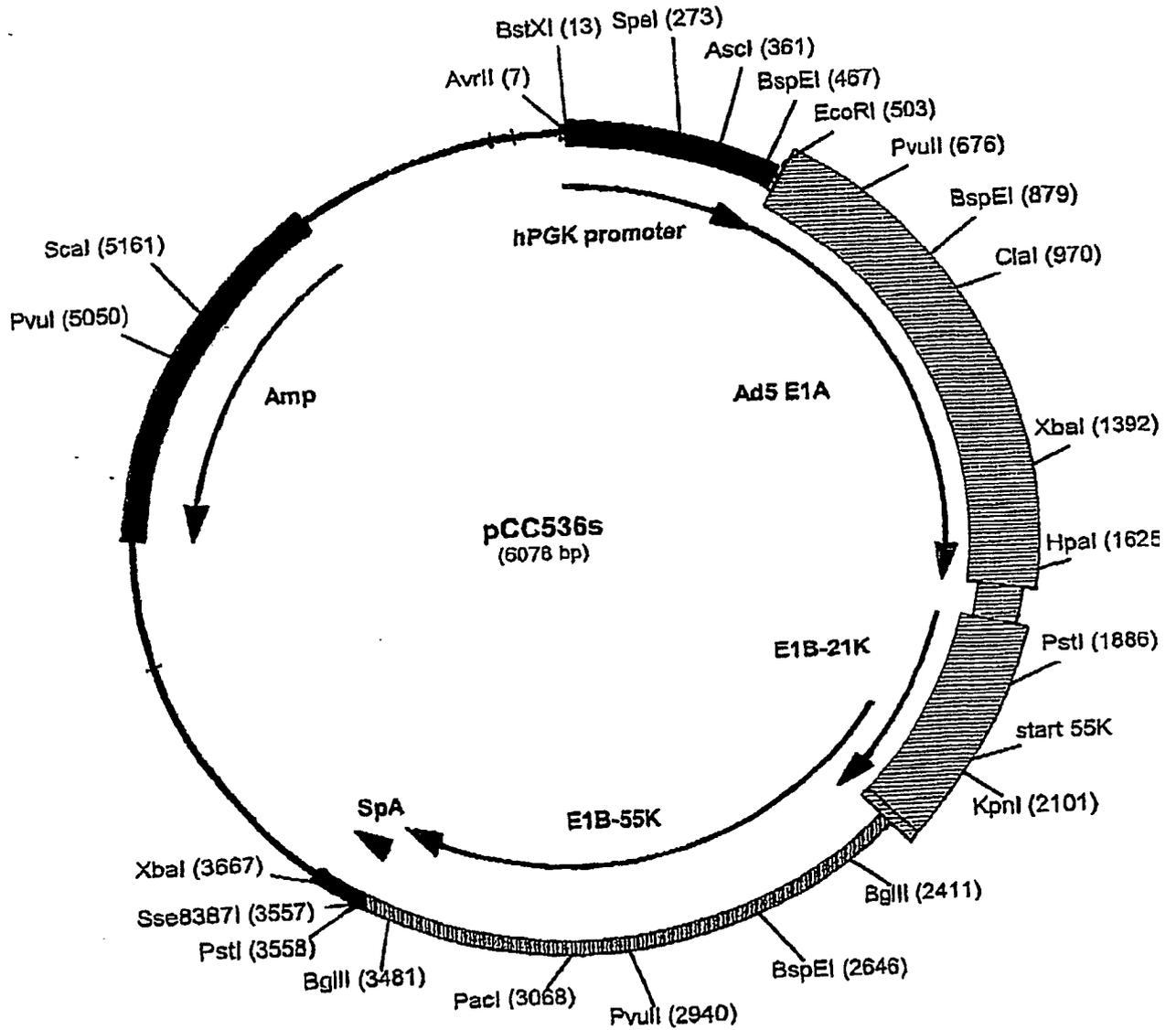


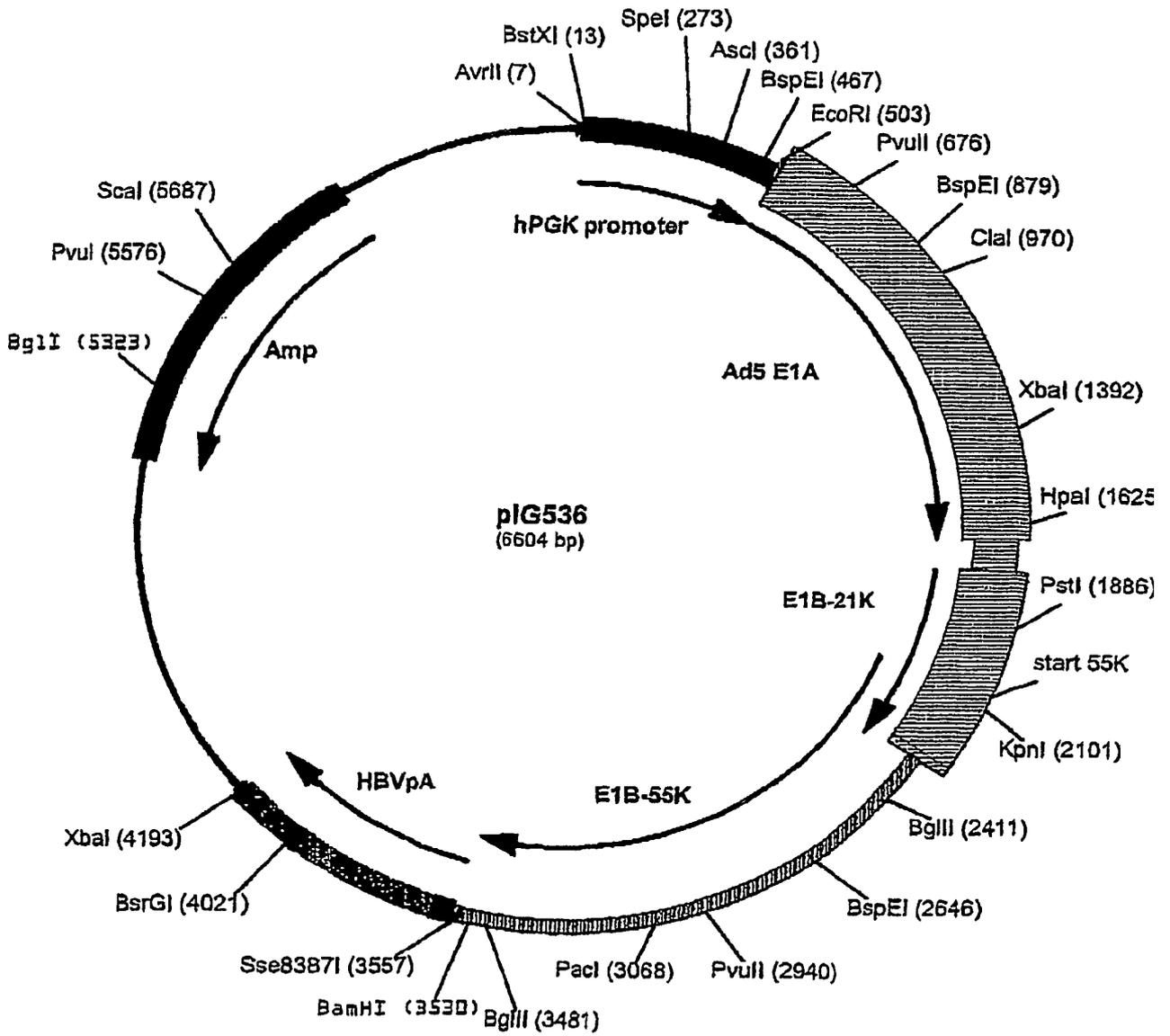


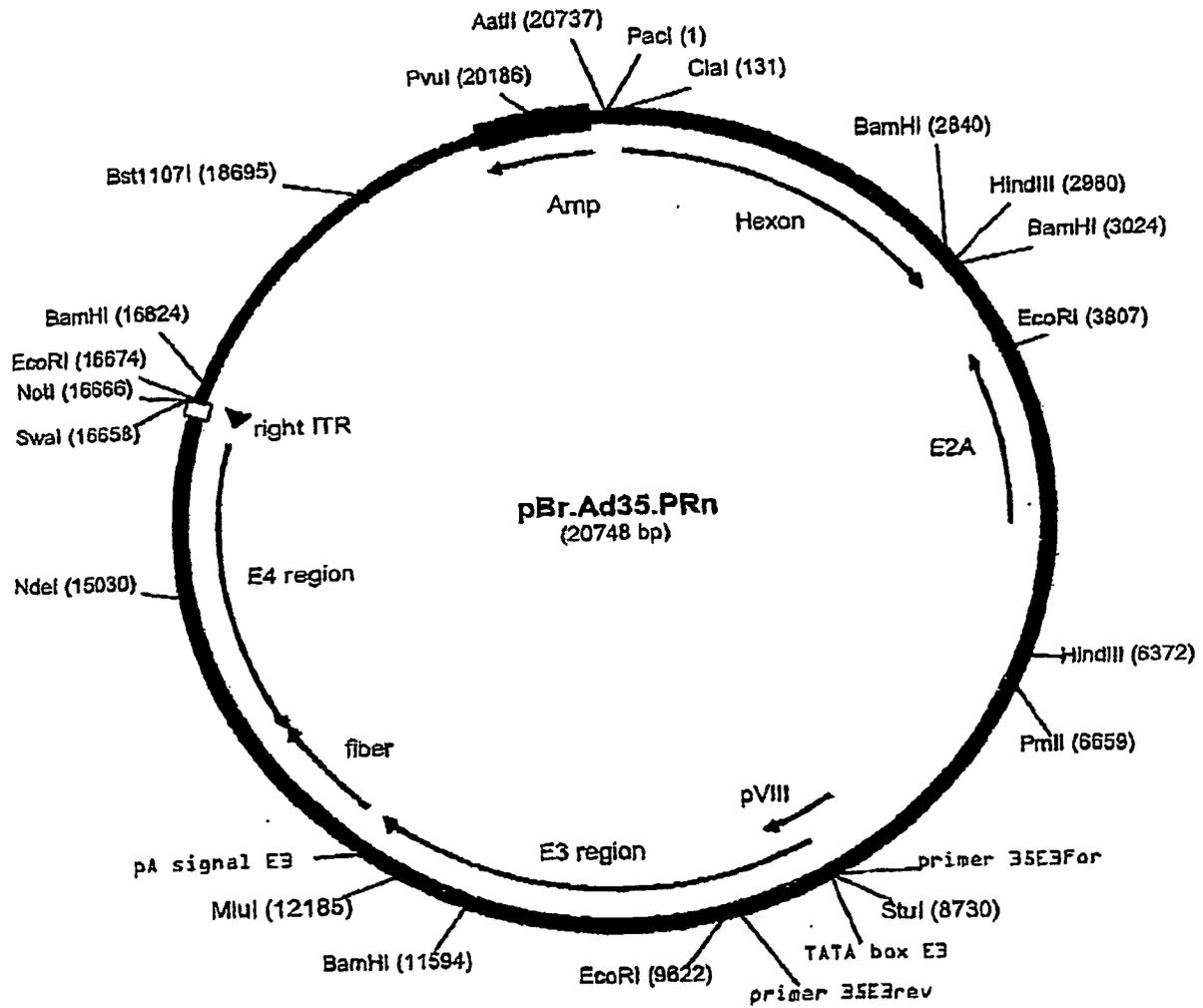




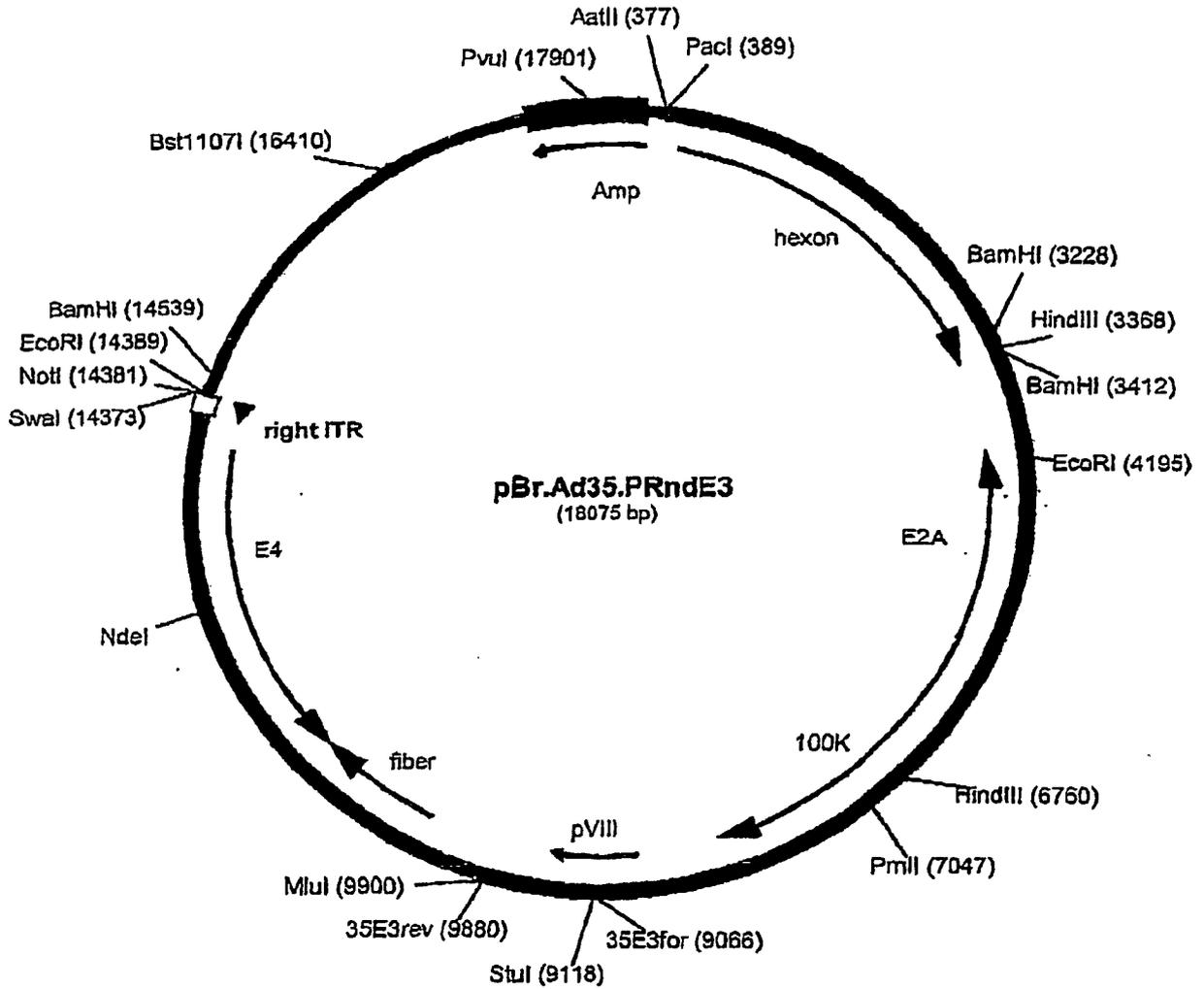




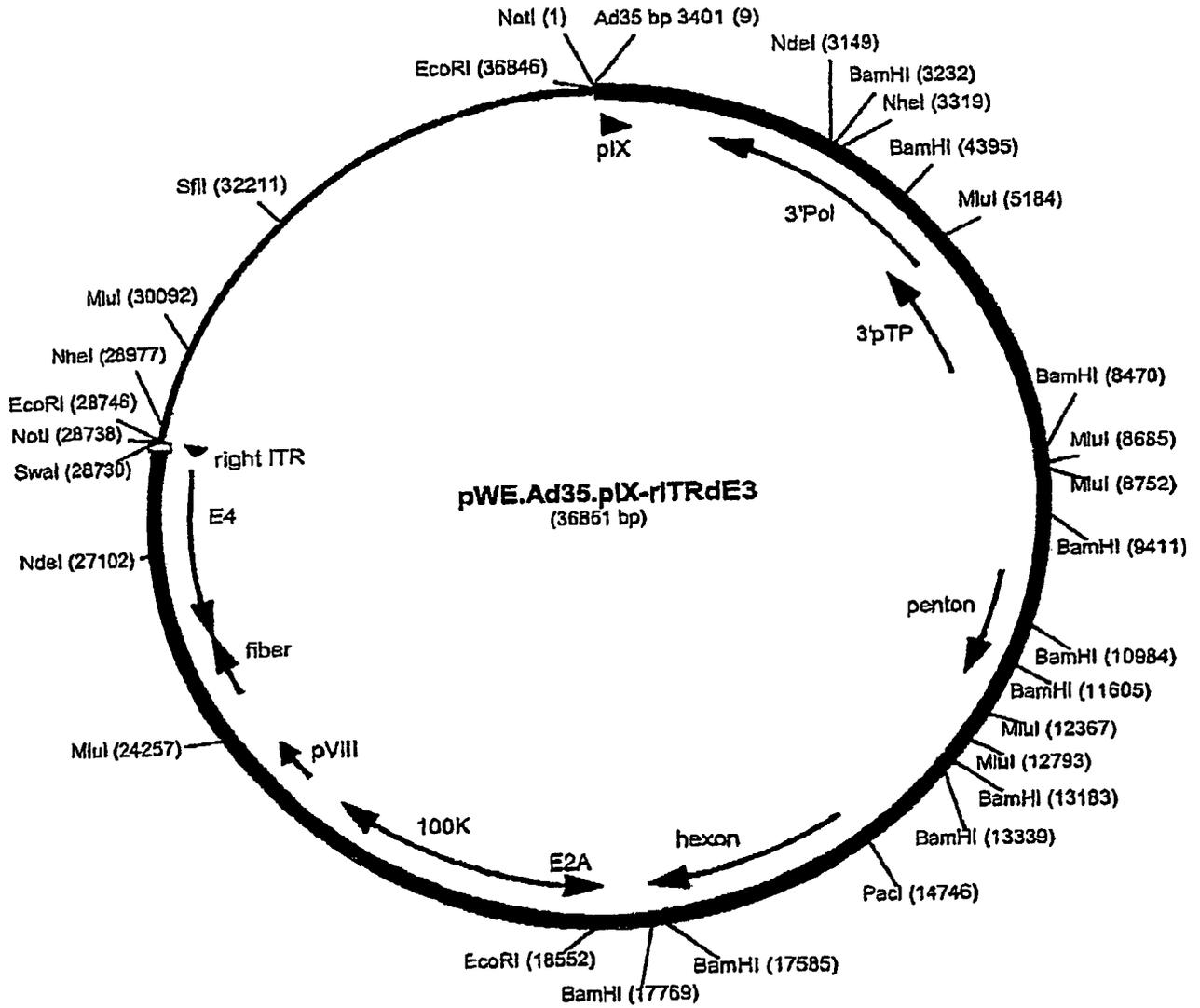




530



462



Figur 38 B: Ausrichtung von E1B-55K-Sequenzen von pCC536s, wtAd35 und wtAd5

```

1  MERRNPSEKGVPA G F S G H A S V E S G C E T D E S P A T V V F R P P G D H T D G G A A A A A G G S Q A A A A G pCC536s:55K.PRO
2  M D P A D B F Q Q G L R F G F H B H S I V E N M E G S Q D E D N L R L L A S A A F G C S G N P E A S T G H A S G S G G G Ad35:E1B-55K.pro
3  MERRNPSEKGVPA G F S G H A S V E S G C E T Q E S P A T V V F R P P G D N T D G G A A A A A G G S Q A A A A G Ad5:E1B-55K.pro
61  A E P M E P E S R P G P S S . G G G G V A D L S P E L Q R V L T G S T S T G R D R G V K R E R A S S . G T D A R S E L A pCC536s:55K.PRO
61  T A R G Q P E S R P G P S S . G G G G V A D L S P E L Q R V L T G S T S T G R D R G V K R E R A S S . G T D A R S E L A Ad35:E1B-55K.pro
81  A E P M E P E S R P G P S G M N V V Q V A E L Y P E L R R I L T I T E D G Q G L K I G V K R E R G A C E A T I E E A R N L A Ad5:E1B-55K.pro
119 L S L M S R R R P E T I W W H E V Q K E G R D E V S V L Q E K Y S L E Q V K T C W L E P E D D W A V A I K N Y A K I A L pCC536s:55K.PRO
119 L S L M S R R R P E T I W W H E V Q K E G R D E V S V L Q E K Y S L E Q V K T C W L E P E D D W A V A I K N Y A K I A L Ad35:E1B-55K.pro
121 F I S L M T R R P E C I T F Q Q I K D N C A N E L D L L A Q K Y S L E Q L T I Y W L Q P G D D F E E A I R V Y A K V A L Ad5:E1B-55K.pro
179 K P D K O Y K I G R R I N I R N A C Y I S G N G A E V V I D T Q D Y T Y : P C C M M C M V P G V V G M E A V T F Y A V K pCC536s:55K.PRO
179 R P D K D Y K I S R R I N I R N A C Y I S G N G A E V V I D T O D K T V I R C C M M D M W P G V V G M E A V T F V N V K Ad35:E1B-55K.pro
181 R P D C K I Y K I S K L V N I R N C C Y I S G R G A E V E I D T E D R V A F R C B I M I N M W P G V L G M D G V V I M N V R Ad5:E1B-55K.pro
239 F R G D G Y H G I V F M A N T K L I L H G C S F F G F N N T C V D A W G Q V S V R G C S F Y A C W I A T A G R T K S Q L pCC536s:55K.PRO
239 F R G D G Y N G I V F M A N T K L I L H G C S F F G F H N T C V D A W G Q V S V R G C S F Y A C W I A T A G R T K S Q L Ad35:E1B-55K.pro
241 F T G P N F S G T V F L A N T I N L I L H G V S F Y G F H N T C V E A W T D V R V R G C A F Y C C W K G V V C R P K S R A Ad5:E1B-55K.pro
289 S L K K C I F Q R C N L G I L N E G E A R V R H C A S T D T G C F I L I K G N A S V K H H M I C G A S D E R P Y Q M L T pCC536s:55K.PRO
289 S L K K C I F Q R C N L G I L N E G E A R V R H C A S T D T G C F I L I K G N A S V K H H M I C G A S D E R P Y Q M L T Ad35:E1B-55K.pro
301 S I K K C C L F E R C T L G I L S E G N S R V R H H V A S D G G C F W L V K S V A V I K H N M M V C G N C E D R A S Q M I T Ad5:E1B-55K.pro
359 C A G G H C N M L A T V H I V S H O R K K W P V F D H N V L T K C T M H A G G R R G M F M P Y Q C H M N H V K V L L E P pCC536s:55K.PRO
359 C A G G H C N M L A T V H I V S H Q R K K W P V F D H N V L I K C T M H A G C R R G M F M P Y Q C N M N H V K V L L E P Ad35:E1B-55K.pro
361 C S D G N C H L L K T I D H V A S H S R K A W P V F E H H I L T R C S L H L G M R R G V F L P Y Q C N L S H T K J L L E P Ad5:E1B-55K.pro
419 D A F S R M S L T G I F D M N T Q I W K I L R Y D D T R S R V R A C E C G G K K A R F Q P V C V D V T E D L R P D H L V pCC536s:55K.PRO
419 D A F S R M S L T G I F D V N T Q I W K I L R Y D D T R S R V R A C E C G G K K A R F Q P V C V D V T E D L R P D H L V Ad35:E1B-55K.pro
421 E S M S K V N L N G V F D M T M K I W K V L R Y D E T R T R C R P C E C G G K K I R N Q P V M L L D V T E E L R P D H L V Ad5:E1B-55K.pro
479 I A R T G A E F G S S G E E T D pCC536s:55K.PRO
479 I A R T G A E F G S S G E E T D Ad35:E1B-55K.pro
481 L A C T R A E F G S S D E D T D Ad5:E1B-55K.pro

```

Reste, die sich von pCC536s.55K.PRO unterscheiden, sind eingerahmt