



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101208425 B

(45) 授权公告日 2011.01.26

(21) 申请号 200580048072.2

(22) 申请日 2005.12.12

(30) 优先权数据

60/635,561 2004.12.13 US

60/674,488 2005.04.25 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.08.13

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/045097 2005.12.12

(87) PCT申请的公布数据

W02006/065827 EN 2006.08.24

(73) 专利权人 坎吉有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·A·霍维 S·J·谢里尔

K·威尔斯 R·O·拉尔斯顿二世

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 刘冬 梁谋

(51) Int. Cl.

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

(56) 对比文件

Evaluation of E1-Mutant Adenoviruses as Conditionally Replicating Agents for Cancer Therapy. John A. Howe, et al. JOURNAL OF VIROLOGY 74 13. 2000, 74(13), 6147-6155.

KONSTANTIN DORONIN, et al. Tumor-Specific, Replication-Competent Adenovirus Vectors Overexpressing the Adenovirus Death Protein. MOLECULAR THERAPY 2 5. 2000, 2(5), 485-495.

ANDREA AMALFITANO, et al. Production and Characterization of Improved Adenovirus Vectors with the E1, E2b, and E3 Genes Deleted. JOURNAL OF VIROLOGY 72 2. 1998, 72(2), 926-933.

审查员 唐宁

权利要求书 1 页 说明书 48 页 附图 20 页

(54) 发明名称

产生复制缺陷型腺病毒的细胞系

(57) 摘要

本发明提供用于产生补充 E1A 和 E1B 功能的 E1- 缺失的腺病毒 (rAd) 载体的细胞系。本发明也提供用于产生补充 E1A、E1B 和 E2B 聚合酶功能的 E1- 和 E2- 缺失的腺病毒载体的细胞系。本发明提供特定细胞系, 该特定细胞系通过插入含 243R 和 289R 蛋白突变的 E1A 序列和包含 E1B-55K 基因的 E1B 序列, 补充 E1A 功能。称为 SL0003 和 SL0006 的所得产生者细胞系的产率, 与从 293 细胞获得的产率类似, 但不产生可检测的重组可复制腺病毒 ("RCA")。

1. 一种称为 SL0003 的制备重组腺病毒的细胞系,所述细胞系在美国典型培养物保藏中心(ATCC)保藏,保藏编号为 PTA-6231。
2. 一种称为 SL0006 的制备重组腺病毒的细胞系,所述细胞系在美国典型培养物保藏中心(ATCC)保藏,保藏编号为 PTA-6663。
3. 一种制备重组腺病毒的方法,所述方法包括在允许病毒基因组在细胞系中复制的条件下,培养用重组腺病毒载体转染的称为 SL0003 的人细胞系,其中所述人细胞系在美国典型培养物保藏中心保藏,保藏编号为 PTA-6231。
4. 一种制备重组腺病毒的方法,所述方法包括在允许病毒基因组在细胞系中复制的条件下,培养用重组腺病毒载体转染的称为 SL0006 的人细胞系,其中所述人细胞系在美国典型培养物保藏中心保藏,保藏编号为 PTA-6663。
5. 权利要求 3 或 4 的方法,其中所述重组腺病毒是复制缺陷型的。
6. 权利要求 3 或 4 的方法,其中所述重组腺病毒包含异源基因。

产生复制缺陷型腺病毒的细胞系

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求于 2004 年 12 月 13 日递交的美国临时专利申请序号 :60/635,561 和 2005 年 4 月 25 日递交的美国临时专利申请序号 :60/674,488 的 35USC § 119(e) 的优先权,其公开内容通过引用整体结合到本文中。

[0003] 1. 发明领域

[0004] 本发明涉及用于有效产生复制缺陷型腺病毒的细胞系。本发明也描述了使用此类细胞系产生复制缺陷型腺病毒的方法。

[0005] 2. 发明背景

[0006] 重组腺病毒 (rAd) 载体具有理想的基因送递特征 (包括宽的组织和细胞向性)、适应大表达盒的能力及高转导效率。另外,由于病毒生长到高特异性的滴度,并且已经建立了规模化制备方法,因此腺病毒非常适用于药物开发 (Huyghe 等, (1995) Hum. Gene Ther. 6 : 1403-1416 ;Shabram 等, (1997) Hum. Gene Ther. 8 :453-465)。rAd 载体的产生需要能补充从病毒基因组中除去的功能的工程化细胞系。对药物开发和病毒载体的商业制备而言,载体-细胞系组合也必须适于规模化制备,并且能提供足够质量和纯度的材料。

[0007] 用于基因疗法用途的复制缺陷型 rAd 载体通常缺失了病毒早期区 1 (E1)。E1 含有两个转录单位 E1A 和 E1B,它们编码在裂解周期的早期和晚期相中起关键作用的许多蛋白。rAd 载体的产生需要补充这些 E1 活性。E1A 和 E1B 基因功能已经被广泛表征。在 Bayley 等 (1994) International J. of Oncology 5 :425-444 及 Shenk 等 (1996) 在 Adenoviridae :The Viruses and Their Replication, Fields Virology (K. D. M. Fields B. N., and Howley, P. M., Ed.), 2 Lippincott-Raven, Philadelphia, PA 中提供了 E1A 和 E1B 功能的综述。最初的 E1 互补系 -293 通过用物理法剪切的腺病毒 5DNA 转染初生胚胎肾细胞产生 (Graham 等, (1977) J. Gen. Virol. 36 :59-74)。基因分析随后显示 293 细胞携带有完整的腺病毒基因组左手端片段 (碱基 1-4344),该片段含有 E1 区和另外的侧翼序列 (Louis 等, (1997) Virology 233 :423-429)。

[0008] 虽然 293 细胞以可接受的水平产生 E1- 缺陷 rAd 载体,称为可复制腺病毒 (" RCA ") 的不期望的污染物,有时可通过 rAd 载体和存在于 293 基因组中的腺病毒序列之间的同源重组产生 (Lochmuller 等, (1994) Hum. Gene Ther. 5 :1485-1491 ;Zhu 等, (1999) Hum. Gene Ther. 10 :113-121)。为了降低由同源重组产生 RCA 的风险, Fallaux 等 (Hum. Gene Ther. 9 :1909-1917 (1998)) 用含 E1 基因的重组质粒转染人胚胎成视网膜细胞,其中 E1A 启动子和 E1B 聚腺苷酸化序列被异源控制元件代替。E1 质粒中腺病毒侧翼序列的缺失生成细胞系 PER. C6,当采用细胞系匹配的 rAd 载体时,它不通过同源重组产生 RCA (Fallaux 等, (1998) Hum. Gene Ther. 9 :1909-1917)。然而,最近的研究显示当非匹配的腺病毒载体在 PER. C6 细胞中繁殖时,可形成称为依赖辅助病毒的 E1 阳性颗粒的非典型形式的 RCA (Murakami 等, (2002) Hum. Gene Ther. 13 :1909-1920)。

[0009] 用于 293 细胞和 PER. C6 细胞中 E1- 缺失的腺病毒补充的 E1 区包括整个 E1B 转录单位,其编码两种主要蛋白 :E1B-19K 和 E1B-55K。在腺病毒复制中,E1B-19K 和 E1B-55K 蛋

白在早期裂解周期中起限制 E1A 诱导的细胞凋亡的作用 (Querido 等, (1997) *J. Virol.* 71 : 3788-3798 ; Rao 等, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 7742-7746 ; White 等, (1991) *J. Virol.* 65 : 2968-2978)。另外, E1B-55K 在晚期相中起刺激病毒晚期 mRNA 的蓄积和翻译的作用 (Babiss 等, (1985) *Mol. Cell Biol.* 5 : 2552-2558 ; Harada 和 Berk, (1999) *J. Virol.* 73 : 5333-5344)。E1B 也显示在转化初级细胞中与 E1A 协同 (Branton 等, (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 780 : 67-94), 及特别是防止细胞凋亡的 E1A 敏化 (White 等, (1991) *J. Virol.* 65 : 2968-2978)。

[0010] 能有效地并且高效地补充复制缺陷型腺病毒载体的稳定人细胞系的构建可能是困难的。开发补充 E1 的细胞系的障碍是与高水平的 E1A 基因产物表达相关的毒性。例如, E1 蛋白的组成型表达 (尤其是 E1A) 已在公认的细胞系中证明是困难的 (Imler 等, (1996) *Gene Ther.* 3 : 75-84)。已显示 E1A 抑制细胞生长并且诱导细胞失巢凋亡 (Frisch, (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 9077-9081 ; Frisch 和 Mymryk, (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 : 441-452 ; Mymryk 等, (1994) *Oncogene* 9 : 1187-1193 ; Rao 等, (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 7742-7746)。因此, 组成型表达 E1A 蛋白的互补细胞系, 例如本领域已知的那些, 可能与腺病毒载体产生之前和 / 或腺病毒载体产生期间存活率差有关。

[0011] 其他人先前已使用了人类肿瘤细胞系, 例如 A549 细胞系来开发补充 E1 的细胞系。例如, Massie (美国专利 5, 891, 690) 用 E1 区表达盒转化 A549 细胞, 其中腺病毒 E1A 启动子被人类 α -肌动蛋白启动子代替。然而, 显示表达细菌 β -半乳糖苷酶基因的腺病毒基因疗法载体的产率比 293 细胞的低。Imler 等使用受调节的 E1 诱导作为避免与 E1A 组成型表达相关的毒性的策略, 允许基于 A549 细胞的 rAd 产生者细胞系的产生 (Imler 等, (1996) *Gene Ther.* 3 : 75-84)。据报道, 由这些 Gal4- 诱导的产生者细胞系产生的 rAd 载体的产率比 293 细胞的低 5-10 倍 (Imler 等, 同上)。

[0012] 因此, 对产生复制缺陷型腺病毒 (即含有缺失 E1A 和 E1B 编码区的腺病毒基因组的腺病毒) 的更有效的重组细胞系有需求, 该复制缺陷型腺病毒具有低的 RCA, 并具有与 293 细胞系的野生型腺病毒产生相似的产生水平。

[0013] 3. 发明概述

[0014] 本发明通过提供新细胞系解决了前述需求, 该新细胞系基于结合所选择的病毒和腺病毒复制所需要的宿主功能, 产生重组腺病毒。

[0015] 本发明提供用于产生宿主细胞的辅助腺病毒核酸序列, 这些宿主细胞补充本文中所描述的重组腺病毒载体及重组腺病毒。本发明的辅助腺病毒核酸序列 : (i) 提供复制重组腺病毒载体和 / 或其包装在感染病毒体中所需的病毒功能 ; 及 (ii) 不以可测定的程度被复制或装配在病毒颗粒中。辅助腺病毒核酸序列可得自和 / 或衍生自任何腺病毒科病毒或腺病毒科病毒的组合。在优选的实施方案中, 辅助腺病毒核酸序列可得自和 / 或衍生自人类腺病毒科病毒。

[0016] 在一个实施方案中, 辅助腺病毒核酸序列包括 : (i) 包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列的核酸分子, 所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷 ; 及 (ii) 包含编码腺病毒 E1B 蛋白, 例如 E1B-55K 和 / 或 E1B-19K 的核苷酸序列的核酸分子。根据该实施方案, 辅助腺病毒核酸序列也可包括一种、两种或多种以下分子 : (i) 包含编码腺病毒 E2 蛋白的核苷酸序列的核酸分子 ; (ii) 包含编码腺病毒 E4 蛋白的核苷酸

序列的核酸分子 ;和 / 或 (iii) 包含编码腺病毒 L4100K 蛋白的核苷酸序列的核酸分子。腺病毒 E2 蛋白的非限定性实例包括 E2A 结合蛋白、E2B 聚合酶、E2B 终端前蛋白及 E2B IVa2 蛋白。腺病毒 E4 蛋白的非限定性实例包括由可读框 (ORF)-6、ORF3 和 ORF6/7 编码的那些。下表 1 提供了人类腺病毒血清型 5E1A 蛋白、E1B-55K 蛋白、E1B-19K 蛋白和 E2B 聚合酶蛋白的核苷酸及氨基酸序列的实例。

[0017] 表 1 :本发明的序列

[0018]

序列	序列号
质粒 pRcRSV-E1Ad/01/07	SEQ ID NO :1
质粒 pcDNA3.1(+)-E1B55K Hygro	SEQ ID NO :2
编码野生型、5 型人类腺病毒 289RE1A 的核苷酸序列	SEQ ID NO :3
5 型人类腺病毒 289R E1A 野生型蛋白的氨基酸序列	SEQ ID NO :4
5 型人类腺病毒 243R E1A 野生型的核苷酸序列	SEQ ID NO :5
5 型人类腺病毒 243R E1A 野生型蛋白的氨基酸序列	SEQ ID NO :6

[0019]

5 型人类腺病毒 E1A289R 野生型蛋白的氨基酸残基 4-25	SEQ ID NO :7
5 型人类腺病毒 E1A243R 野生型蛋白的氨基酸残基 4-25	SEQ ID NO :8
5 型人类腺病毒 E1A289R 野生型蛋白的氨基酸残基 36-49	SEQ ID NO :9
5 型人类腺病毒 E1A243R 野生型蛋白的氨基酸残基 36-49	SEQ ID NO :10
5 型人类腺病毒 E1A289R 野生型蛋白的氨基酸残基 111-123	SEQ ID NO :11
5 型人类腺病毒 E1A243R 野生型蛋白的氨基酸残基 111-123	SEQ ID NO :12
5 型人类腺病毒 E1A289R 野生型蛋白的氨基酸残基 124-127	SEQ ID NO :13
5 型人类腺病毒 E1A243R 野生型蛋白的氨基酸残基 124-127	SEQ ID NO :14
5 型人类腺病毒 E1B-55K 编码区的核苷酸序列	SEQ ID NO :15
5 型人类腺病毒 E1B-55K 蛋白的氨基酸序列	SEQ ID NO :16
5 型人类腺病毒 E1A 基因的核苷酸序列	SEQ ID NO :17
5 型人类腺病毒 E1B-55K 和 E1-19K 编码区的核苷酸序列	SEQ ID NO :18
质粒 pVITRO21RESPuroE1b	SEQ ID NO :19
质粒 pMGCME2Bbp01	SEQ ID NO :20
5 型人类腺病毒 E1B-19K 编码区的核苷酸序列	SEQ ID NO :21
5 型人类腺病毒 E1B-19K 蛋白的氨基酸序列	SEQ ID NO :22
5 型人类腺病毒 E2B 编码区的核苷酸序列	SEQ ID NO :25
5 型人类腺病毒 E2B 聚合酶编码区的核苷酸序列	SEQ ID NO :23
5 型人类腺病毒 E2B 聚合酶蛋白的氨基酸序列	SEQ ID NO :24
E1Ad/01/07 的核苷酸序列	SEQ ID NO :26
E1Ad/01/07 的氨基酸序列	SEQ ID NO :27

[0020] 在具体的实施方案中,辅助腺病毒核酸序列包括:(i) 包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列的核酸分子,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷;及(ii) 包含编码腺病毒 E1B 蛋白的核苷酸序列的核酸分子,其中 E1B 蛋白包含 E1B-55K 蛋白但不包含 E1B-19K 蛋白。在优选的实施方案中,辅助腺病毒核酸序列包括:(i) 包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列的核酸分子,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷;(ii) 包含编码腺病毒 E2B 聚合酶的核苷酸序列的核酸分子;及(iii) 包含编码腺病毒 E1B-55K 和 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列的核酸分子。

[0021] 为了产生与细胞蛋白 p300/CBP 和 pRb 结合有缺陷的 E1A 蛋白,可以在 E1A289R

和 E1A243R 编码区引入突变。在具体的实施方案中, E1A 蛋白包含:(a) 第一缺失, 该缺失对应于:(i) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101); 或 (ii) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 36-49 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 36-49; 及 (b) 第二缺失, 该缺失对应于:(i) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107); 或 (ii) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108)。在优选的实施方案中, E1A 蛋白包含:(a) 第一缺失, 该缺失对应于 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101); 及 (b) 第二缺失, 该缺失对应于 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107)。

[0022] 本发明提供用辅助腺病毒核酸序列转染或转化的宿主细胞。此类细胞用于重组腺病毒, 特别是复制缺陷型重组腺病毒的产生。本发明的宿主细胞补充了重组腺病毒载体或目的重组腺病毒中失去的功能(即腺病毒 E1A, 例如 SEQ IDNO:17 及 E1B, 例如 SEQ IDNO:18, 编码区)。优选宿主细胞含互补腺病毒基因, 该基因与目的重组腺病毒载体的那些基因缺乏任何同源性, 它减少了病毒基因组与细胞 DNA 重组产生可复制腺病毒的可能性。补充本文中所描述的重组腺病毒载体和重组腺病毒的宿主细胞有时在本文中称为“补充细胞系”、“产生 rAd 的细胞系”、“rAd 补充细胞”及“补充 rAd 的细胞系”。

[0023] 在具体的实施方案中, 本发明提供了分离的宿主细胞, 该细胞包含:(a) 第一核酸分子, 该核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列, 所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷; 及 (b) 第二核酸分子, 该核酸分子包含编码腺病毒 E1B-55K 蛋白的核苷酸序列。按照该实施方案, 在某些实施方案中, 第二核酸分子不包含编码腺病毒 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列。此外, 按照该实施方案, 宿主细胞可还包含另外的核酸分子, 该核酸分子包含编码腺病毒 E2a DNA 结合蛋白、腺病毒 E2b 终端前蛋白、腺病毒 E2b 1Va2 蛋白、腺病毒 E4 蛋白(例如腺病毒 E4 基因的 ORF6、ORF3 和 ORF6/7) 和 / 或由 L4100K 编码的腺病毒蛋白的核苷酸序列。

[0024] 在优选的实施方案中, 本发明提供分离的宿主细胞, 该细胞包含:(a) 第一核酸分子, 该核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列, 所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷; (b) 第二核酸分子, 该核酸分子包含编码腺病毒 E2B 聚合酶的核苷酸序列; 及 (c) 包含编码腺病毒 E1B-55K 和 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列的第三核酸分子。按照该实施方案, 宿主细胞可还包含另外的核酸分子, 该核酸分子包含编码腺病毒 E2a DNA 结合蛋白、腺病毒 E2b 终端前蛋白、腺病毒 E2b 1Va2 蛋白、腺病毒 E4 蛋白(例如腺病毒 E4 基因的 ORF6、ORF3 和 ORF6/7) 和 / 或由 L4100K 编码的腺病毒蛋白的核苷酸序列。

[0025] 在具体的实施方案中, 由宿主细胞表达的 E1A 蛋白包含:(a) 第一缺失, 该缺失对应于:(i) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101); 或 (ii) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 36-49 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 36-49; 及 (b) 第二缺失, 该缺失对应于:(i) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107); 或 (ii) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108)。在优选的实施方案中, 由宿主细胞表达的 E1A 蛋白包含:(a) 第一缺失, 该缺失对应于 E1A289R 蛋白的氨基

酸残基 4-25(d/1101) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) ;及 (b) 第二缺失,该缺失对应于 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107)。

[0026] 可用任何类型的细胞作为宿主细胞。在优选的实施方案中,使用容许腺病毒,优选人类腺病毒感染的细胞。在优选的实施方案中,人细胞(包括初级细胞和细胞系)用作宿主细胞。人类建立的细胞系例如来自人肿瘤细胞或人肿瘤细胞系的那些,具有在培养中无限复制的能力。在具体的实施方案中,宿主细胞为 A549、HCT-15、IGROV-1、HeLa、U87、W162 或 293-D22 细胞。在优选的实施方案中,宿主细胞为 A549 细胞。

[0027] 在一个实施方案中,本发明提供包含稳定整合的核酸序列的人细胞,该细胞包含:(a) 第一表达盒,该表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E1A 蛋白的核酸序列有效连接,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷,其中所述蛋白在所述人细胞中表达;及 (b) 第二表达盒,该表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E1B 蛋白的核酸序列有效连接,其中所述 E1B 蛋白包含 E1B-55K 蛋白但不包含 E1B-19K 蛋白,其中所述 E1B-55K 蛋白在所述人细胞中表达。在特定的实施方案中,由人细胞表达的 E1A 蛋白包含:(a) 第一缺失,该缺失对应于:(i)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);或 (ii)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 36-49 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 36-49;及 (b) 第二缺失,该缺失对应于:(i)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107);或 (ii)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108)。在优选的实施方案中,由人细胞表达的 E1A 蛋白包含:(a) 第一缺失,该缺失对应于所述 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及所述 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);及 (b) 第二缺失,该缺失对应于所述 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及所述 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107)。

[0028] 本发明提供上述人细胞,其中第一表达盒包含 SEQ ID NO:26 阐明的核酸序列,和/或第二表达盒包含 SEQ ID NO:15 阐明的核酸序列。在具体的实施方案中,第一表达盒包含 SEQ ID NO:1 阐明的核酸序列,和/或第二表达盒包含 SEQ ID NO:2 阐明的核酸序列。本发明也提供上述人细胞,其中该细胞称为 SL0003,在美国典型培养物保藏中心(ATCC)保藏,保藏编号为 PTA-6231。在本发明的具体实施方案中,制备重组腺病毒的细胞系是称为 SL0003 的细胞系,在美国典型培养物保藏中心(ATCC)保藏,保藏编号为 PTA-6231。

[0029] 在一个实施方案中,本发明提供包含稳定整合的核酸序列的人细胞,该细胞包含:(a) 第一表达盒,该表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E1A 蛋白的核酸序列有效连接,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷,其中所述蛋白在所述人细胞中表达;(b) 第二表达盒,该表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E2B 聚合酶蛋白的核酸序列有效连接,其中所述蛋白在所述人细胞中表达;及 (c) 第三表达盒,该表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E1B-55K 和 E1B-19K 蛋白的核酸序列有效连接,其中所述蛋白在所述人细胞中表达。在特定的实施方案中,由人细胞表达的 E1A 蛋白包含:(a) 第一缺失,该缺失对应于:(i)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及 E1A243R 蛋

白的氨基酸残基 4-25(d/1101) ;或 (ii)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 36-49 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 36-49 ;及 (b) 第二缺失,该缺失对应于 : (i)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) ;或 (ii)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108)。在优选的实施方案中,由人细胞表达的 E1A 蛋白包含 : (a) 第一缺失,该缺失对应于所述 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及所述 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) ;及 (b) 第二缺失,该缺失对应于所述 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及所述 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107)。

[0030] 本发明提供上述人细胞,其中第一表达盒包含 SEQ ID NO :26 阐明的核酸序列,第二表达盒包含 SEQ ID NO :23 阐明的核酸,和 / 或第三表达盒包含 SEQ ID NO :18 阐明的核酸序列。在具体的实施方案中,第一表达盒包含 SEQ ID NO :1 阐明的核酸序列,第二表达盒包含 SEQ ID NO :20 阐明的核酸,和 / 或第三表达盒包含 SEQ ID NO :19 阐明的核酸序列。本发明也提供上述人细胞,其中该细胞称为 SL0006,在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 保藏,保藏编号为 PTA-6663。在本发明的优选实施方案中,制备重组腺病毒的细胞系是称为 SL0006 的细胞系,在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 保藏,保藏编号为 PTA-6663。

[0031] 可采用本领域已知的和 / 或本文中描述的技术,用辅助腺病毒核酸序列瞬时或稳定地转染宿主细胞。优选辅助腺病毒核酸序列稳定地整合到宿主细胞的核基因组中。

[0032] 本发明提供产生用于制备复制缺陷型腺病毒的宿主细胞的方法,该方法包括用第一核酸分子和第二核酸分子转化或转染细胞 (优选人细胞), 其中第一核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷 (此类腺病毒蛋白的实例在下面描述), 第二核酸分子包含编码腺病毒 E1B-55K 蛋白的核苷酸序列 (并且优选不包含编码腺病毒 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列)。细胞可以任何顺序,用第一和第二核酸分子同时或顺序转化或转染。在具体的实施方案中,细胞用第一核酸分子然后用第二核酸分子转化或转染。

[0033] 本发明提供产生用于制备复制缺陷型腺病毒的细胞的方法,该方法包括用第一核酸分子、第二核酸分子和第三核酸分子转化或转染细胞 (优选人细胞), 其中第一核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷 (此类腺病毒蛋白的实例在下面描述), 第二核酸分子包含编码腺病毒 E2B 聚合酶的核苷酸序列,第三核酸分子包含编码腺病毒 E1B-55K 蛋白的核苷酸序列,并且优选编码腺病毒 E1B-55K 蛋白和 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列。细胞可用第一、第二和第三核酸分子同时或以任何顺序顺序转化或转染。在具体的实施方案中,细胞用第一核酸分子、第二核酸分子,然后用第三核酸分子转化或转染。

[0034] 在一个实施方案中,本发明提供产生用于制备复制缺陷型腺病毒的人细胞的方法,该方法包括 : (a) 将人细胞用第一表达盒转化,其中所述第一表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E1A 蛋白的核酸序列有效连接,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷,其中所述蛋白在所述人细胞中表达 ;及 (b) 将所述人细胞用第二表达盒转化,该第二表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E1B 蛋白的核酸序列有效连接,其中所述 E1B 蛋白包含 E1B-55K 蛋白但不包含 E1B-19K 蛋白,其中所述 E1B-55K 蛋白在所述人细胞中表达。在

特定的实施方案中,由第一表达盒编码的 E1A 蛋白包含:(a) 第一缺失,该缺失对应于:(i) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);或(ii)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 36-49 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 36-49;及(b) 第二缺失,该缺失对应于:(i)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107);或(ii)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108)。在另一个实施方案中,由第一表达盒编码的 E1A 蛋白包含:(a) 所述第一缺失,该缺失对应于所述 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及所述 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);及(b) 所述第二缺失,该缺失对应于所述 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及所述 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107)。

[0035] 本发明提供上述方法,其中细胞衍生自己确立的细胞系、肿瘤细胞系、A549 细胞系及 HeLa 细胞系。本发明也提供上述方法,其中第一表达盒包含 SEQ ID NO:26 阐明的核酸序列,和/或第二表达盒包含 SEQ ID NO:15 阐明的核酸序列。在具体的实施方案中,第一表达盒包含 SEQ ID NO:1 阐明的核酸序列,和/或第二表达盒包含 SEQ ID NO:2 阐明的核酸序列。

[0036] 在一个实施方案中,本发明提供产生用于制备复制缺陷型腺病毒的人细胞的方法,该方法包括:(a) 将人细胞用第一表达盒转化,其中所述第一表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E1A 蛋白的核酸序列有效连接,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷,其中所述蛋白在所述人细胞中表达;(b) 将所述人细胞用第二表达盒转化,该第二表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E2B 聚合酶蛋白的核酸序列有效连接,其中所述蛋白在所述人细胞中表达;及(c) 将所述人细胞用第三表达盒转化,该第三表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E1B-55K 和 E1B-19K 蛋白的核酸序列有效连接,其中所述蛋白在所述人细胞中表达。在特定的实施方案中,由第一表达盒编码的 E1A 蛋白包含:(a) 第一缺失,该缺失对应于:(i)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);或(ii)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 36-49 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 36-49;及(b) 第二缺失,该缺失对应于:(i)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107);或(ii)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108)。在另一个实施方案中,由第一表达盒编码的 E1A 蛋白包含:(a) 所述第一缺失,该缺失对应于所述 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及所述 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);及(b) 所述第二缺失,该缺失对应于所述 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及所述 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107)。

[0037] 本发明提供上述方法,其中细胞衍生自己确立的细胞系、肿瘤细胞系、A549 细胞系及 HeLa 细胞系。本发明也提供上述方法,其中第一表达盒包含 SEQ ID NO:26 阐明的核酸序列,第二表达盒包含 SEQ ID NO:23 阐明的核酸序列和/或第三表达盒包含 SEQ ID NO:18 阐明的核酸序列。在具体的实施方案中,第一表达盒包含 SEQ ID NO:1 阐明的核酸序列,第二表达盒包含 SEQ ID NO:20 阐明的核酸序列和/或第三表达盒包含 SEQ ID NO:19 阐明的核酸序列。

[0038] 按照本发明,可通过用 rAd 载体转染产生 rAd 的细胞系产生重组腺病毒(优选重组复制缺陷型腺病毒),而产生重组腺病毒(优选重组复制缺陷型腺病毒)。在具体的实施方案中,本发明提供制备重组腺病毒的方法,该方法包括在允许病毒基因组在细胞系中复制的条件下,培养用重组腺病毒载体转染的补充 rAd 的细胞系,其中该细胞系包含:(a) 第一核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷(参见上述有关此类 E1A 蛋白的描述);及(b) 第二核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1B-55K 蛋白的核苷酸序列(并且优选不包含编码腺病毒 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列)。在优选的实施方案中,本发明提供制备重组腺病毒的方法,该方法包括在允许病毒基因组在细胞系中复制的条件下,培养用重组腺病毒载体转染的补充 rAd 的细胞系,其中该细胞系包含:(a) 第一核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷(参见上述有关此类 E1A 蛋白的描述);(b) 第二核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E2B 聚合酶的核苷酸序列;及(c) 第三核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1B-55K 蛋白,并且优选腺病毒 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列。

[0039] 转染到产生 rAd 的细胞系中的重组腺病毒载体包含腺病毒核苷酸序列,并且任选一个或多个异源核苷酸序列。在优选的实施方案中,重组腺病毒载体包含与辅助腺病毒核苷酸序列缺乏任何同源性的腺病毒核苷酸序列。腺病毒辅助病毒核苷酸序列和重组腺病毒载体之间同源性的缺乏,减少了病毒基因组重组产生可复制腺病毒的可能性。在优选的实施方案中,重组腺病毒载体编码复制缺陷型腺病毒。按照该实施方案,可通过例如在腺病毒基因组中引入一种或多种突变(例如在一个或多个腺病毒蛋白的编码区中引入缺失),将重组腺病毒载体工程化,以包含突变的腺病毒基因组。优选腺病毒基因组中的突变产生比野生型腺病毒更低的腺病毒蛋白表达水平。腺病毒蛋白表达的减少减少了受试者对腺病毒蛋白的免疫反应。

[0040] 在具体的实施方案中,重组腺病毒载体编码复制缺陷型腺病毒,并且包含 E1A 编码区(例如 SEQ ID NO:17)和 E1B 编码区(例如 SEQ ID NO:18)部分或完全(优选完全)缺失的突变基因组,及可包括一个或多个异源核苷酸序列。在另一个实施方案中,重组腺病毒载体编码复制缺陷型腺病毒,并且包含 E1A 编码区(例如 SEQ ID NO:17)、E1B 编码区(例如 SEQ ID NO:18)和 E2B 聚合酶编码区(例如 SEQ ID NO:23)部分或完全(优选完全)缺失的突变基因组,及包括一个或多个异源核苷酸序列。异源核苷酸序列可被引入到基因组的任何区域(例如氨基或羧基端)。在具体的实施方案中,异源核苷酸序列被引入到突变的腺病毒基因组中有缺失的腺病毒编码区之一,例如 E1A 或 E2B 编码区中。在优选的实施方案中,重组腺病毒载体编码复制缺陷型腺病毒,并且包含 E1A 编码区(例如 SEQ ID NO:17)、E1B 编码区(例如 SEQ ID NO:18)、E2B 聚合酶编码区(例如 SEQ ID NO:23)和 E3 编码区部分或完全(优选完全)缺失的突变基因组,及在有缺失的 E3 编码区中包括异源核苷酸序列。

[0041] 按照本发明,重组腺病毒(rAd)载体包含得自和/或衍生自任何腺病毒科病毒或腺病毒科病毒组合的腺病毒基因组或其一部分。在优选的实施方案中,重组腺病毒载体包含得自和/或衍生自人类腺病毒科病毒的腺病毒基因组或其一部分。在另一个优选的实施方案中,重组腺病毒载体包含得自和/或衍生自人类腺病毒血清型 2 或 5 的腺病毒基因组

或其一部分。

[0042] 按照本发明,任何重组腺病毒均可用本文中描述的产生 rAd 的细胞系产生和 / 或繁殖。在本发明的优选实施方案中,重组腺病毒衍生自人类腺病毒科病毒。在本发明的另一个优选实施方案中,重组腺病毒衍生自人类腺病毒血清型 2 或 5。在具体的实施方案中,重组腺病毒是复制缺陷型腺病毒,并且包含 E1A 编码区 (例如 SEQ ID NO:17) 和 E1B 编码区 (例如 SEQ ID NO:18) 部分或完全 (优选完全) 缺失的突变基因组,及可包括一个或多个另外的异源基因。在本发明优选的实践中,重组腺病毒是复制缺陷型腺病毒,并且包含 E1A 编码区 (例如 SEQ ID NO:17)、E1B 编码区 (例如 SEQ ID NO:18) 和 E2B 聚合酶编码区 (例如 SEQ ID NO:23) 部分或完全 (优选完全) 缺失的突变基因组,及包括一个或多个异源核苷酸序列。本发明优选的重组腺病毒包含与在产生 rAd 的细胞系中的腺病毒 DNA 序列缺乏任何同源性的病毒 DNA 序列,它减少了病毒基因组与细胞 DNA 重组产生 RCA 的可能性。

[0043] 在一个实施方案中,本发明提供产生和 / 或繁殖重组腺病毒的方法,该方法包括:(a) 感染人细胞,包含稳定整合的核酸序列的所述人细胞包括:(i) 第一表达盒,该表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E1A 蛋白的核酸序列有效连接,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷,其中所述蛋白在所述人细胞中表达;及(ii) 第二表达盒,该表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E1B 蛋白的核酸序列有效连接,其中所述 E1B 蛋白包含 E1B-55K 蛋白但不包含 E1B-19K 蛋白,其中所述 E1B-55K 蛋白在所述人细胞中表达;(b) 将所述感染的细胞在允许病毒基因组在细胞中复制的条件下培养;(c) 收获所述细胞;及(d) 回收所述重组腺病毒,其中步骤(c)和(d)是任选的。

[0044] 本发明也提供上述方法,其中所述 E1A 蛋白包含:(a) 第一缺失,该缺失对应于:(i)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);或(ii)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 36-49 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 36-49;及(b) 第二缺失,该缺失对应于:(i)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107);或(ii)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108)。本发明也提供上述方法,其中所述 E1A 蛋白包含:(a) 所述第一缺失,该缺失对应于所述 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及所述 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);及(b) 所述第二缺失,该缺失对应于所述 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及所述 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107)。

[0045] 本发明也提供上述方法,其中所述细胞衍生自己确立的细胞系、肿瘤细胞系、A549 细胞系及 HeLa 细胞系。本发明也提供上述方法,其中所述细胞称为 SL0003,在 ATCC 保藏,保藏编号为 PTA-6231。

[0046] 本发明也提供上述方法,其中第一表达盒包含 SEQ ID NO:27 阐明的核酸序列;和提供上述方法,其中第二表达盒包含 SEQ ID NO:15 阐明的核酸序列。在具体的实施方案中,第一表达盒包含 SEQ IDNO:1 阐明的核酸序列;并且上述方法中,其中第二表达盒包含 SEQ IDNO:2 阐明的核酸序列。本发明也提供上述方法,其中重组腺病毒包含 E1A 和 E1B 编码区的缺失。本发明也提供上述方法,其中重组腺病毒是复制缺陷型的。本发明也提供上述方法,其中重组腺病毒还包含异源基因。

[0047] 在一个实施方案中,本发明提供产生和 / 或繁殖重组腺病毒的方法,该方法包括:(a) 感染人细胞,包含稳定整合的核酸序列的所述人细胞包括:(i) 第一表达盒,该表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E1A 蛋白的核酸序列有效连接,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷,其中所述蛋白在所述人细胞中表达;(ii) 第二表达盒,该表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E2B 聚合酶蛋白的核酸序列有效连接,其中所述 E2B 聚合酶蛋白在所述人细胞中表达;及 (iii) 第三表达盒,该表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E1B-55K 和 E1B-19K 蛋白的核酸序列有效连接,其中所述蛋白在所述人细胞中表达;(b) 将所述感染的细胞在允许病毒基因组在细胞中复制的条件下培养;(c) 收获所述细胞;及 (d) 回收所述重组腺病毒,其中步骤 (c) 和 (d) 是任选的。

[0048] 本发明也提供上述方法,其中所述 E1A 蛋白包含:(a) 第一缺失,该缺失对应于:(i) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);或 (ii) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 36-49 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 36-49;及 (b) 第二缺失,该缺失对应于:(i) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107);或 (ii) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108)。本发明也提供上述方法,其中所述 E1A 蛋白包含:(a) 所述第一缺失,该缺失对应于所述 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及所述 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);及 (b) 所述第二缺失,该缺失对应于所述 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及所述 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107)。

[0049] 本发明也提供上述方法,其中所述细胞衍生自己确立的细胞系、肿瘤细胞系、A549 细胞系及 HeLa 细胞系。本发明也提供上述方法,其中所述细胞称为 SL0006,在 ATCC 保藏,保藏编号为 PTA-6663。

[0050] 本发明也提供上述方法,其中第一表达盒包含 SEQ ID NO:27 阐明的核酸序列,第二表达盒包含 SEQ ID NO:23 阐明的核酸序列,和 / 或第二表达盒包含 SEQ ID NO:18 阐明的核酸序列。在具体的实施方案中,第一表达盒包含 SEQ ID NO:1 阐明的核酸序列,第二表达盒包含 SEQ ID NO:20 阐明的核酸序列,和 / 或第二表达盒包含 SEQ ID NO:19 阐明的核酸序列。本发明也提供上述方法,其中重组腺病毒包含 E1A、E2b 聚合酶及 E1B 编码区的缺失。本发明也提供上述方法,其中重组腺病毒是复制缺陷型的。本发明也提供上述方法,其中重组腺病毒还包含异源基因。

[0051] 本发明的重组腺病毒可在体外用于表达蛋白、多肽和目的肽。本发明的重组腺病毒也可用于基因疗法。此外,本发明的重组腺病毒可用于使受试者免疫。通过用重组腺病毒免疫,对抗原产生的抗体可用于诊断性免疫测试、被动免疫疗法和抗独特型抗体的产生。

[0052] 本发明也提供产生 rAd 产生细胞的质粒系统,该 rAd 产生细胞用于产生和 / 或繁殖重组腺病毒。在一个实施方案中,本发明提供在独立的容器中产生和 / 或繁殖用于产生和 / 或繁殖重组腺病毒的人细胞的质粒系统,该系统包含:(a) 第一表达盒,该表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E1A 蛋白的核酸序列有效连接,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷;及 (b) 第二表达盒,该表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E1B 蛋白

的核酸序列有效连接,其中所述 E1B 蛋白包含 E1B-55K 蛋白但不包含 E1B-19K 蛋白。本发明也提供上述质粒系统,其中所述 E1A 蛋白包含:(a) 第一缺失,该缺失对应于:(i) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);或(ii) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 36-49 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 36-49;及(b) 第二缺失,该缺失对应于:(i) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107);或(ii) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108)。本发明还提供上述质粒系统,其中所述 E1A 蛋白包含:(a) 所述第一缺失,该缺失对应于所述 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及所述 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);及(b) 所述第二缺失,该缺失对应于所述 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及所述 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107)。本发明也提供上述质粒系统,其中所述细胞衍生自己确立的细胞系、肿瘤细胞系、A549 细胞系及 HeLa 细胞系。本发明也提供上述质粒系统,其中第一表达盒包含 SEQ ID NO:26 阐明的核酸序列。在具体的实施方案中,第一表达盒包含 SEQ ID NO:1 阐明的核酸序列。本发明也提供上述质粒系统,其中第二表达盒包含 SEQ ID NO:15 阐明的核酸序列。在具体的实施方案中,第二表达盒包含 SEQ ID NO:2 阐明的核酸序列。

[0053] 本发明还提供在独立的容器中产生用于产生和/或繁殖重组腺病毒的人细胞的质粒系统,该系统包含:(a) 第一表达盒,该表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E1A 蛋白的核酸序列有效连接,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷;(b) 第二表达盒,该表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E2B 聚合酶蛋白的核酸序列有效连接;及(c) 第三表达盒,该表达盒包含在所述人细胞中有活性的启动子,该启动子与编码腺病毒 E1B-55K 和 E1B-19K 蛋白的核酸序列有效连接。本发明也提供上述质粒系统,其中所述 E1A 蛋白包含:(a) 第一缺失,该缺失对应于:(i) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);或(ii) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 36-49 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 36-49;及(b) 第二缺失,该缺失对应于:(i) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107);或(ii) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108)。本发明还提供上述质粒系统,其中所述 E1A 蛋白包含:(a) 所述第一缺失,该缺失对应于所述 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及所述 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);及(b) 所述第二缺失,该缺失对应于所述 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及所述 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107)。本发明也提供上述质粒系统,其中所述细胞衍生自己确立的细胞系、肿瘤细胞系、A549 细胞系及 HeLa 细胞系。本发明也提供上述质粒系统,其中第一表达盒包含 SEQ ID NO:26 阐明的核酸序列。在具体的实施方案中,第一表达盒包含 SEQ ID NO:1 阐明的核酸序列。本发明也提供上述质粒系统,其中第二表达盒包含 SEQ ID NO:23 阐明的核酸序列。在具体的实施方案中,第二表达盒包含 SEQ ID NO:20 阐明的核酸序列。本发明也提供上述质粒系统,其中第三表达盒包含 SEQ ID NO:25 阐明的核酸序列。在具体的实施方案中,第三表达盒包含 SEQ ID NO:19 阐明的核酸序列。

[0054] 3.1 术语

[0055] 如本文中使用的,术语“A549”指本领域中通常已知的人类肺癌细胞系。在一个实施

方案中,用于产生补充 E1 的细胞系的 A549 亲代细胞系是 ATCC 株 CCL-185。

[0056] 如本文中使用的,术语“腺病毒”指腺病毒属病毒。术语“重组腺病毒”指能够感染细胞的腺病毒属病毒,所述细胞的病毒基因组已通过常规重组 DNA 技术修饰。术语重组腺病毒也包括嵌合(或者甚至多聚体)载体,即用来自超过一种病毒亚型的互补编码序列构建的载体。

[0057] 如本文中使用的,术语“腺病毒科”统指哺乳动物腺病毒属的动物腺病毒,包括但不限于人、牛、羊、马、犬、猪、鼠和猿腺病毒亚属。特别是,人腺病毒包括 A-F 亚属及其各血清型。A-F 亚属包括但不限于 1、2、3、4、4a、5、6、7、7a、7d、8、9、10、11 (Ad11A 和 Ad11P)、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、34a、35、35p、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48 及 91 型人腺病毒。

[0058] 如本文中使用的,术语“在允许病毒基因组复制的条件下培养”是指维持用重组腺病毒感染和/或用 rAd 载体转染补充 rAd 的细胞系的条件,以便允许病毒在细胞中繁殖。需要控制条件以使由各细胞产生的病毒颗粒的数量最大化。因此,监测并控制反应条件例如温度、所溶解的氧、pH 等将是必要的。可从商业上获得的生物反应器例如 CelliGen Plus Bioreactor(可从 New Brunswick Scientific, Inc. 44Talmadge Road, Edison, NJ 获得)提供了此类参数的监测和维持。最佳的感染、转染和培养条件将多少有点变化,然而,可由本领域技术人员考虑,例如产生者细胞系的已知性质、病毒的性质和生物反应器的类型,达到有效复制和产生病毒的条件。

[0059] 如本文中使用的,术语“基因缺乏”或“基因功能缺乏”是突变的一种类型,它起损害或排除其核酸序列全部或部分突变的基因功能的作用。

[0060] 如本文中使用的,术语“结合有缺陷”是指在生理条件下,与其底物形成复合物的基因产物,该复合物含有少于 50% 的热力学稳定性野生型基因产物复合物。例如含有 p300 结合区缺失的 13S 基因产物将以少于 50% 的热力学稳定性野生型 13S 蛋白与 p300 蛋白结合。结合的热力学稳定性可易于由常规测试技术测定,以确定生理条件下的平衡结合常数。

[0061] 如本文中使用的,术语“E1A 基因”是指首先转录接着感染的腺病毒基因组的立即早期基因。该基因组序列代表至少五个编码 9S、10S、11S、12S 和 13S 蛋白的 mRNA 转录。12S 和 13S 蛋白在早期中表达接着感染,而 9S、10S 和 11S 蛋白在腺病毒周期中后期表达。12S 和 13S 蛋白分别具有 243 和 289 个氨基酸。12S 和 13S 蛋白也分别称为 243R 和 289R 蛋白。在 E1A 基因组序列中有三个保守区,称为保守区 (“CR”)-1、CR2 和 CR3。CR1 代表 12S 和 13S 蛋白的氨基酸 41-80。CR2 代表 12S 和 13S 序列的氨基酸 121-139。

[0062] 完全人腺病毒 5 型基因组的 GenBank® 保藏是可获得的,参见例如 AY339865 和 AC000008。SEQ ID NO:4 定义人腺病毒 5 型、289R、野生型、氨基酸序列。SEQ ID NO:6 定义人腺病毒 5 型、243R、野生型、氨基酸序列。人腺病毒 5 型、289R、野生型、氨基酸序列的 GenBank® 保藏也是可获得的,参见例如 AP000197、AY339865 和 AC000008。人腺病毒 5 型、243R、野生型、氨基酸序列的 GenBank® 保藏也是可获得的,参见例如 AY339865。

[0063] 如本文中使用的,术语“表达盒”在本文中用于定义能够引导异源编码序列及待表达的异源编码序列转录和翻译的核苷酸序列。表达盒包含与异源编码序列有效连接,以实现由细胞中所述异源编码序列编码的蛋白产物表达的调节元件。

[0064] 如本文中使用的,术语“辅助腺病毒核酸序列”是指:(i) 为重组腺病毒载体和/或其

包装至感染病毒体中的复制提供病毒功能 ;及 (ii) 不以可测量的程度被复制或装配到病毒颗粒中的核酸序列。

[0065] 如本文中使用的,在核酸序列、氨基酸序列和抗原的上下文中术语“异源”是指对特定的腺病毒而言,是外来的及不是天然存在的核酸序列、氨基酸序列和抗原。

[0066] 如本文中使用的,术语“感染”是指在有利于具有重组腺病毒的产生者细胞感染的条件下,将重组腺病毒暴露于产生 rAd 的细胞系。在已被多拷贝特定病毒感染的细胞中,病毒复制和病毒体包装所必需的活性是协同的。因此,优选调整条件,以使细胞用病毒感染繁殖的概率显著增加。提高病毒在细胞中产生的条件的实例是增加病毒在感染相中的浓度。然而,每细胞病毒感染的总数有可能过度,导致对细胞的毒性作用。因此,应努力维持感染的病毒浓度在 10^6 – 10^{10} 病毒体/ml 的范围内,优选约 10^9 病毒体/ml。也可采用化学试剂增加细胞系的感染性。例如本发明提供通过包含钙蛋白酶抑制剂增加用于病毒感染的细胞系感染性的方法。用于本发明实施的钙蛋白酶抑制剂的实例包括钙蛋白酶抑制剂 1 (也称为 N-乙酰基-亮氨酸-亮氨酸-正亮氨酸 (norleucinal), 商业上可从 Boehringer Mannheim 获得)。已观察到钙蛋白酶抑制剂 1 能增加重组腺病毒的细胞系感染性。

[0067] 如本文中使用的,术语“有效连接”是指多核苷酸元件功能关系的连接。当与另一个核酸序列一起置于功能关系中时,核酸序列“有效连接”。例如,如果它影响编码序列的转录,那么启动子或增强子与编码序列有效连接。有效连接是指被连接的核苷酸序列通常是邻近的。然而,由于增强子通常被可以是各种长度的几千碱基和内含子序列与启动子分离时起作用,所以某些多核苷酸元件可以有效连接,但是不直接侧面连接,并且可以甚至在不同等位基因或染色体的转运中起作用。

[0068] 如本文中使用的,术语“p300 蛋白家族成员”是指与包括 p300 和 CBP 的 E1A 氨基端相关的蛋白。特别是 p300 共激活反式激活基因 Myb 和 C/EBP 的活性 (Mink 等 (1997) *Molecular and Cellular Biology* 17 :6609–6617)。人类 p300 蛋白在本领域是已知的,并可自 Swiss-Prot 数据库以保藏编号 Q09472 公开得到,其相应的 mRNA 可从 GenBank 以保藏编号 U01877 获得,于 1994 年 6 月 6 日保藏,并且在 Eckner 等 (1994) *Genes Dev.* 8 :869–884 中有描述。

[0069] 如本文中使用的,术语“调节元件”是指启动子、增强子、转录终止子、绝缘子区、沉默区、聚腺苷酸化位点等。术语“启动子”以其常规的含义使用,指编码序列的起始和转录速度在其处被控制的核苷酸序列。启动子含有 RNA 聚合酶结合的位点,也含有调节因子 (例如阻抑蛋白或转录因子) 的结合位点。启动子可以是天然存在的或合成的。当使用的载体是病毒载体时,启动子可以是病毒的内源性物质或来自其他来源。可以排列调节元件,以允许、增强或促进转基因仅在特定细胞类型中表达。例如可设计表达盒,使转基因在启动子的控制之下,该启动子有组成活性,或者暂时地被控制 (时序启动子),在对外部刺激的反应时被激活 (可诱导),在特定细胞类型或细胞状态 (选择性) 组成型启动子、时序病毒启动子或可调节启动子中有活性。

[0070] 如本文中使用的,术语“重组腺病毒载体”是指包含腺病毒核苷酸序列并且任选一个或多个异源核苷酸序列的载体构建体。在优选的实施方案中,重组腺病毒载体包含与辅助腺病毒核酸序列缺乏任何同源性的腺病毒核苷酸序列。在另一个优选的实施方案中,重组腺病毒载体编码复制缺陷型腺病毒。按照该实施方案,可通过例如在腺病毒基因组中引入

一种或多种突变（例如在腺病毒蛋白的一个或多个编码区引入缺失），将重组腺病毒载体工程化，以包含突变的腺病毒基因组。

[0071] 如本文中使用的术语“产生 rAd 的细胞系”、“rAd 补充细胞”和“补充 rAd 的细胞系”是同义词，是指通过向重组腺病毒和 / 或其包装至感染病毒体中的复制提供病毒功能，能够繁殖重组腺病毒的细胞。

[0072] 如本文中使用的术语“Rb 蛋白家族成员”是指成视网膜细胞瘤基因产物 (p105)、p107 和 p130。成视网膜细胞瘤基因在本领域中已充分表征。人类 Rb 的氨基酸序列可从 GenBank 以保藏编号 190959 获得，于 1995 年 7 月 12 日保藏，mRNA 序列可从 GenBank 以保藏编号 M15400 获得，并且在 Lee 等 (1988) PNAS (USA) 85 :6017-6021 中有描述。

[0073] 如本文中使用的术语“稳定整合”关于外源性核酸序列，是指该序列被整合到细胞的基因组中，以使后续的各代细胞保留外源性核酸序列。

[0074] 如本文中使用的术语“转染”或“转化”是指将核酸引入到细胞中。接受所引入的 DNA 或 RNA 的宿主细胞已被“转化”，并且是“转化体”或“克隆”。本领域众所周知的转化方法实例包括脂质体递送、电穿孔、CaPO₄ 转化、DEAE- 葡聚糖转化、微量注射和病毒感染。

[0075] 如本文中使用的，在体外动物细胞培养的上下文中，术语“转化”也可以指假定通过不可逆遗传改变发生的细胞表型的永久改变。“转化细胞”通常是在与产生它的有限或初级细胞系的细胞比较时，在其他有潜力的表型特征中具有无限或显著（或非常）延长寿命的细胞。其中使用该术语的上下文将决定其含义。

[0076] 4. 附图简述

[0077] 图 1 为 243R 和 289R E1A 蛋白的功能域简图。细胞蛋白 p300/CBP 和 pRb 结合所需要的区域，表示为激活细胞凋亡、在休眠细胞中诱导细胞周期进展和腺病毒早期基因区的转录激活所必需的功能域。

[0078] 图 2. pRcRSV-E1Ad/01/07 的质粒图谱。

[0079] RSV 启动子 :起始 :209 结束 :605

[0080] BGH 聚腺苷酸信号 :起始 :1556 结束 :1782

[0081] f1 起源 :起始 :1838 结束 :2360

[0082] SV40 启动子 :起始 :2422 结束 :2747

[0083] SV40 起源 :起始 :2616 结束 :2701

[0084] 新霉素抗性基因 :起始 :2753 结束 :3547

[0085] SV40 聚腺苷酸信号 :起始 :3551 结束 :3760

[0086] pUC19 序列 (448-2622) :起始 :3900 结束 :6074

[0087] ColE1 起源 :起始 :4083 结束 :4606

[0088] 氨苄青霉素抗性基因 :补体 (5090.. 5950)

[0089] E1A12S CDS N- 端 :起始 :633 结束 :944

[0090] E1A 蛋白起始 (ATG) :起始 :633 结束 :635

[0091] E1A13S CDS N- 端 :起始 :633 结束 :1082

[0092] E1A12s mRNA 的剪接供体 :起始 :942 结束 :942

[0093] E1A13s mRNA 的剪接供体 :起始 :1080 结束 :1080

[0094] E1A12S/13S CDS C- 端 CDS :起始 :1199 结束 :1513

- [0095] E1A32k/27k 的终止 TAA :起始 :1511 结束 :1513
- [0096] d/1101 突变 (WT 的氨基酸 4-25 缺失) :起始 :644 结束 :645
- [0097] d/1107 突变 (WT 的氨基酸 111-123 缺失) :起始 :896 结束 :897
- [0098] 图 3. pcDNA3.1 (+)E1B-55k Hygro 的质粒图谱。
- [0099] CMV 启动子 :起始 :209 结束 :863
- [0100] T7 启动子 / 引导位点 :起始 :863 结束 :882
- [0101] pcDNA3.1BGH 反向引导位点 :起始 :2470 结束 :2487
- [0102] BGH 聚腺苷酸信号 :起始 :2469 结束 :2683
- [0103] f1 起源 :起始 :2746 结束 :3159
- [0104] SV40 启动子和起源 :起始 :3224 结束 :3548
- [0105] 潮霉素抗性基因 CDS :起始 :3566 结束 :4589
- [0106] SV40 早期聚腺苷酸信号 :起始 :4602 结束 :4974
- [0107] pMB1 (pUC 衍生的) 起源 :补体 (5234..5904)
- [0108] 氨苄青霉素抗性基因 :补体 (6049..6909)
- [0109] E1B55K (495R) CDS :起始 :942 结束 :2430
- [0110] 图 4. pVITRO21RESPuroE1b 的质粒图谱 :质粒编码整个 E1b 和 pIX 编码序列, 该序列由人类铁蛋白重亚单位启动子和 SV40 增强子驱动, 并且用于细胞选择的嘌呤霉素抗性基因在腺病毒序列的 IRES 元件下游后面。
- [0111] 图 5. pMGCMVE2Bpol 的质粒图谱。质粒用 CMV 启动子驱动全长 E2b 聚合酶编码序列的表达, E2b 聚合酶编码序列后面是 IRES 序列和用于选择的潮霉素抗性基因。
- [0112] 图 6. 病毒构建体的示意代表图。其中表明了病毒构建体在 E1、E2b 和 E3 区的类似之处和不同之处。CMV-GFP 表达盒被插入到 GFCB 和 CGAB 病毒的 E1 区, 并且按 5' -3' 方向插入到 42GC、2GCP 和 46GC 的 E3 区。如图所示, CONG 在 E1 和 E3 区中均具有表达盒。2GCP 构建体在防止其表达的 E2b 病毒 DNA 聚合酶区具有缺失。更多的细节可在实施例 2 中找到。
- [0113] 图 7. E2b 聚合酶在细胞中的表达, 及对缺失 E2b 聚合酶的病毒的病毒产生力的影响。图 A) 相对于不补充 E2b 聚合酶的亲代克隆 4 和未修饰的 A549 细胞, 分离的克隆 3C4、3C9 和 3D8 的细胞裂解产物的 E2b 聚合酶蛋白 Western 分析。Western 分析的较低部分显示 β -肌动蛋白缺失, 证实每泳道总蛋白载量相等。图 B) 每个细胞所产生的病毒颗粒用缺失 E2b 聚合酶的 2GCP 病毒感染。将得自一式两份 10cm 板的指示克隆的结果绘图, 该克隆用 5×10^8 P/ml $\pm$ 标准偏差纯化的 2GCP 病毒感染。
- [0114] 图 8. E1b 补充和对病毒生产力的影响。图 A) 用 5×10^8 P/ml GFCB 或 CONG 病毒感染的各克隆在感染后 48 小时 GFP 荧光图。图 B) 绘制了用 Cytofluor 分析法测定 CONG 感染细胞的 GFP 荧光与用 GFCB 病毒感染的相同克隆的荧光的比率。图 C) 每个指示克隆的细胞所产生的病毒颗粒, 该克隆用 5×10^8 P/ml $\pm$ 标准偏差纯化的 2GCP 病毒感染。
- [0115] 图 9. 不同细胞系中病毒的生产力及克隆 15M15 的稳定性。图 A) 每个亲代克隆 3D8 (无 E1b 补充)、所选择的克隆 15M15 (有 E1b 补充) 或 C7 细胞 (基于 293 的 E2b 聚合酶补充) 的细胞所产生的病毒颗粒。将得自一式两份 10cm 板的指示克隆结果绘图, 该克隆用 5×10^8 P/ml $\pm$ 标准偏差纯化的 2GCP 病毒感染。图 B) 克隆 15M15 的病毒生产力。将细胞

感染,并在含有潮霉素、嘌呤霉素和 G418 的选择混合培养基中或者在无选择药物的常规生长培养基中,在生长 1、5 或 10 代后收获。如所示,细胞用 2GCP 病毒以 2×10^9 或 1×10^9 P/ml 病毒感染。各样品的结果以病毒颗粒 / 细胞绘图。图 C) E1a 和 E2b 聚合酶蛋白表达。将图 B 所示的平行感染样品收获,并用 Western 分析法分析细胞裂解产物的 E1a 和 E2b 聚合酶蛋白水平。将样品以基于 Bradford 实验结果的相等总蛋白浓度 / 孔负载。

[0116] 图 10. 感染细胞的晚期 Ad 基因表达。图 A-D 显示由感染细胞表达并用 Western 分析法测定的六邻体和纤维水平。图 A) 克隆 15M15 产生细胞系。图 B) 不补充 CHO 的细胞系。图 C) 和 D) 分别为部分 E1a 功能补充细胞系 HeLa 和 HepG2。病毒表示 :G = GFCB, C = CGAB, 4 = 42GC, 2 = 2GCP, 6 = 6GCP, U = 未感染的, L = 梯。

[0117] 图 11. 体外 GFP 表达。图 (A)-(D) 用 5×10^8 P/ml CGAB、42GC 或 2GCP 病毒感染后, HOF 或 Saos2 细胞随时间的 GFP 表达。图绘制了一式两份感染孔 GFP 表达的 Cytofluor 定量值 $\pm$ 标准偏差,而右侧显示感染细胞感染后 8 天的照片。图 (E)-(F) 图带 -D 的感染 CHO 细胞的 GFP 表达。图绘制了一式两份感染孔 GFP 表达的 Cytofluor 定量值 $\pm$ 标准偏差,而上面的照片显示感染后 15 天的感染细胞。

[0118] 5. 发明详述

[0119] 其中,本发明提供产生 rAd 的细胞系,产生产生 rAd 的细胞系的方法,及用产生 rAd 的细胞系制备重组腺病毒的方法。

[0120] 按照本发明,可采用本领域技能范围内的常规分子生物学、微生物学和重组 DNA 技术。此类技术在文献中有解释。参见例如 Sambrook, Fritsch&Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (本文中 "Sambrook 等, 1989"); DNA Cloning: A Practical Approach, 卷 I 和 II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames&S. J. Higgins eds. (1985)); Transcription And Translation (B. D. Hames&S. J. Higgins, eds. (1984)); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1986)); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, (1986)); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F. M. Ausubel 等 (编辑), Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley&Sons, Inc. (1994)。

[0121] 5.1 辅助腺病毒核酸序列

[0122] 本发明的辅助腺病毒核酸序列:(i) 向重组腺病毒构建体的复制和 / 或其包装至感染病毒体中提供病毒功能;及 (ii) 不以可测量的程度被复制或装配在病毒颗粒中。辅助腺病毒核酸序列可得自和 / 或衍生自任何腺病毒科病毒或腺病毒科病毒的组合。在优选的实施方案中,辅助腺病毒核酸序列得自和 / 或衍生自人腺病毒科病毒。在另一个优选的实施方案中,辅助腺病毒核酸序列得自和 / 或衍生自人腺病毒血清型 2 或 5。例如,可从 GenBank 数据库或类似数据库、文献出版物或通过常规克隆和测序,获得腺病毒蛋白的核酸序列。

[0123] 在一个实施方案中,辅助腺病毒核酸序列包括:(i) 包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列的核酸分子,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷;及 (ii) 核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1B 蛋白,例如 E1B-55K 和 / 或 E1B-19K 的核苷酸序列。按照该实施方案,辅助腺病毒核酸序列也可包括一个、两个或多个

以下分子：(i) 包含编码腺病毒 E2 蛋白的核苷酸序列的核酸分子；(ii) 包含编码腺病毒 E4 蛋白的核苷酸序列的核酸分子；和 / 或 (iii) 包含编码腺病毒 L4100K 蛋白的核苷酸序列的核酸分子。腺病毒 E2 蛋白的非限定性实例包括 E2A 结合蛋白、E2B 聚合酶、E2B 终端前蛋白及 E2B IVa2 蛋白。腺病毒 E4 蛋白的非限定性实例包括由可读框 (ORF)-6、ORF3 和 ORF6/7 编码的那些。表 1 提供了人腺病毒血清型 5E1A 蛋白、E1B-55K 蛋白、E1B-19K 蛋白和 E2B 聚合酶蛋白的核苷酸及氨基酸序列的实例。

[0124] 在某些实施方案中，辅助腺病毒核酸序列包括包含下列序列的核酸分子：(i) 编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列，所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷；及 (ii) 编码腺病毒 E1B 蛋白，例如 E1B-55K 和 / 或 E1B-19K 的核苷酸序列。按照这些实施方案，核酸序列也可包括一个、两个或多个以下序列：(i) 编码腺病毒 E2 蛋白的核苷酸序列；(ii) 编码腺病毒 E4 蛋白的核苷酸序列；和 / 或 (iii) 编码腺病毒 L4100K 蛋白的核苷酸序列。

[0125] 在某些实施方案中，辅助腺病毒核酸序列编码融合或嵌合蛋白产物，该蛋白产物包含通过肽键与异源蛋白序列结合的腺病毒蛋白。此类嵌合产物可通过本领域已知的方法，将编码所期望氨基酸的适当核酸序列相互连接在一起，以适当的编码框，并且通过本领域通常已知的方法，在合适的宿主中表达嵌合产物来制备。

[0126] 在具体的实施方案中，辅助腺病毒核酸序列包括：(i) 包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列的核酸分子，所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷；及 (ii) 包含编码腺病毒 E1B 蛋白的核苷酸序列的核酸分子，其中 E1B 蛋白包含 E1B-55K 蛋白但不包含 E1B-19K 蛋白。在另一个优选的实施方案中，辅助腺病毒核酸序列包括：(i) 包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列的核酸分子，所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷；及 (ii) 包含编码腺病毒 E2B 聚合酶的核苷酸序列的核酸分子；及 (iii) 包含编码腺病毒 E1B-55K 和 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列的核酸分子。

[0127] 编码腺病毒突变体 E1A 蛋白的核苷酸序列，按照本发明它用作辅助腺病毒核酸序列，仅向产生高水平的 E1- 缺失的腺病毒载体提供所需功能。更具体地说，核苷酸序列编码 E1A 蛋白，E1A 蛋白与细胞蛋白 p300/CBP 和 pRb 结合有缺陷，但是仍然带有野生型 CR3 功能域，该 CR3 功能域反式激活裂解生长的初期阶段所需的早期病毒启动子。该核苷酸序列的使用克服了与肿瘤细胞中野生型腺病毒 E1A 蛋白相关的毒性。

[0128] 使用编码 E1A 蛋白（其在 p300 和 pRb 结合上有缺陷）的核苷酸序列的原理，部分基于图谱研究，该图谱研究已经将诱导细胞 DNA 合成和早期腺病毒转录单位激活所需的 E1A 功能分开。在所有成功产生感染的产生细胞系中需要 E1A 腺病毒蛋白激活早期转录单位的能力，但是在连续分裂的已确立细胞系中可能不需要 E1A 诱导细胞周期的能力。本文中描述的编码突变的腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列保留了激活转录的能力，但是缺乏诱导细胞 DNA 合成的能力。刺激细胞 DNA 合成所需的腺病毒 E1A 区也可以引起诱导细胞凋亡，这可能阻碍 E1- 补充细胞系的成功建立。

[0129] 为了产生与细胞蛋白 p300/CBP 和 pRb 结合有缺陷的 E1A 蛋白，可引入 E1A289R 和 E1A243R 编码区的突变。在具体的实施方案中，引入 E1A289R 和 E1A243 编码区的缺失，以达到 p300 和 pRb 家族成员与 E1A 蛋白的结合减少。优选实现 p300 和 pRb 结合的减少所必需

的 E1A289R 和 E1A243R 编码序列的缺失尽可能最少,以防止 E1A289R 和 E1A243R 蛋白的二级和三级结构的主要分裂。

[0130] 为了消除 p300 结合,优选在编码 E1A289R 和 E1A243R 的 p300 结合域的核苷酸序列中引入突变。E1A-12S 和 13S 蛋白的 p300 结合域已被退缩到最初的 69 个氨基酸 (Egan 等 (1988) *Mol. Cell Biol.* 8 :3955-3959)。然而,已显示:氨基酸 26-35 对 p300 结合不是必需的。在 12S 和 13S 分子中从大约氨基酸残基 4-25 到氨基酸残基 36-49 有两个 p300 结合域。除去一个或两个足够使 p300 结合中断。优选采取除去氨基酸残基 4-25,以消除 p300 结合功能。优选 C-端区少于约 30 个氨基酸的缺失,以排除 p300 结合,虽然更优选更小的修饰。在具体的实施方案中,C-端区排除 p300 结合的缺失为 25 个氨基酸或更少、20 个氨基酸或更少、15 个氨基酸或更少或 10 个氨基酸或更少。289R 和 243R 蛋白的氨基酸残基 4-25 的缺失足够中断 p300 结合,而不影响 CR3 的反式激活功能。“CR3 功能域的反式激活功能”是指以后在病毒周期中,E1A 基因的产物例如 E1B 和 E3 激活启动子转录的能力。CR3 域在功能上仅存在于 13S 蛋白中,并代表氨基酸 140-188。在 CR3 域中包含 E1A 基因产物的反式激活功能。或者,优选氨基酸残基 30-氨基酸残基 49(d/1103),并且更特别是氨基酸残基 36-氨基酸残基 49 的氨基酸缺失,以除去 p300 结合。

[0131] 足够中断结合 p300 的点突变是特别优选的。例如 289R 蛋白中从精氨酸到甘氨酸的第二个氨基酸 (Arg2-Gly2) 的点突变,已显示能中断 p300 结合(参见例如 pm563,Whyte 等,(1989) *Cell* 56 :67-75)。

[0132] E1A-12S 和 13S 蛋白的 Rb-105 结合域已表征为位于氨基酸 111-127 中。类似地,关于排除 pRb105 结合,最少的修饰是优选的。在具体的实施方案中,引入了少于 20 个氨基酸、15 个氨基酸或更少、10 个氨基酸或更少的 pRb 结合域缺失。pRb105 结合域选择性氨基酸例如氨基酸 111-123(d/1107) 和氨基酸 124-127(d/1108) 的除去是优选的。在一个实施方案中,由 Moran 等提出的突变 (pm928(C124G)) 用于中断 pRb105 结合((1986) *Mol Cell Biol.* 6(10):3470-3480)。

[0133] 在具体的实施方案中,包含编码腺病毒 E1A 突变体 E1Ad/01/07 蛋白的核苷酸序列的核酸分子,用作辅助腺病毒核酸序列。E1Ad/01/07 蛋白结合细胞蛋白 p300/CBP 和 pRb 有缺陷,但是仍然带有野生型 CR3 功能域,该功能域反式激活裂解生长初始阶段所需的早期病毒启动子。它具有影响腺病毒 E1A 蛋白诱导细胞 DNA 合成和细胞凋亡能力的突变,但是仍然带有野生型 CR3 功能域,该功能域反式激活裂解生长初始阶段所需的早期病毒启动子 (Winberg 和 Shenk, (1984) *EMBO J.* 3:1907-1912)。

[0134] 辅助腺病毒核酸序列可在微生物中繁殖,例如作为细菌质粒或噬菌体的一部分。编码腺病毒蛋白的核苷酸序列可通过本领域众所周知的方法插入到重组质粒、噬菌体等中。

[0135] 在具体的实施方案中,包含编码腺病毒蛋白的核苷酸序列的核酸分子有效地与调节元件连接。在特定的实施方案中,编码腺病毒蛋白的核苷酸序列被插入到适当表达载体,即含有所插入编码蛋白的序列转录和翻译必需的元件的载体中。必需的转录和翻译信号可通过腺病毒蛋白的天然启动子和 / 或异源启动子提供。可用本领域中可获得的任何方法,将核苷酸序列插入到载体中,构建含有适当转录 / 翻译控制信号和编码蛋白的序列的表达载体。

[0136] 在一个实施方案中,将编码腺病毒蛋白的各核苷酸序列插入到表达载体中。在替代实施方案中,将两个或多个编码腺病毒蛋白的核苷酸序列插入到一个表达载体中。

[0137] 在具体的实施方案中,使用载体,该载体包含与编码腺病毒蛋白的核苷酸序列有效连接的启动子、一个或多个复制源,并且任选一种或多种可选择的标记(例如抗生素抗性基因)。按照该实施方案,启动子可以是熟练的技术人员已知的任何启动子。例如启动子可以是组成型启动子、组织特异性启动子或诱导型启动子。可按照本发明使用的启动子的实例包括:SV40 早期启动子(Bemoist 和 Chambon,1981,Nature290:304-310)、包含在鲁斯氏肉瘤病毒的3'长端重复的启动子(Yamamoto 等,1980,Cell122:787-797)、疱疹胸苷激酶启动子(Wagner 等,1981,Proc. Natl. Acad. Sci. USA78:1441-1445)、金属硫蛋白基因的调节序列(Brinster 等,1982,Nature296:39-42)、 β -肌动蛋白启动子、CMV 启动子、SR- α 启动子、hFer/SV40 启动子、RSV 启动子、E1f-1 启动子、Tet 启动子、蜕皮激素启动子和纳巴霉素启动子。

[0138] 在具体的实施方案中,天然启动子用于调节编码腺病毒蛋白的核苷酸序列表达。在替代实施方案中,不是编码被表达蛋白的腺病毒基因天然的启动子(即是异源启动子)用于调节蛋白的表达。在某些实施方案中,启动子是组成型启动子(例如病毒、细胞或杂合组成型启动子)。在其他实施方案中,启动子是诱导型启动子。在还其他实施方案中,启动子是组织-特异性启动子。

[0139] 在某些实施方案中,最好使用组成型启动子,例如 CMV 启动子、 β -肌动蛋白启动子、SR- α 启动子或 hFer/SV40 启动子,来调节编码一种或多种以下蛋白的核苷酸序列表达:E1B 蛋白、E2A 蛋白和/或 E2B 蛋白。在某些其他实施方案中,最好使用组成型启动子,例如 RSV 启动子、SV40 启动子或 E1f-1 启动子,调节编码一种或多种以下蛋白的核苷酸序列表达:E1A 蛋白和/或 E4 蛋白。在再其它实施方案中,最好使用诱导型启动子,例如 Tet 启动子或蜕皮激素启动子,调节 L4100K 的表达。

[0140] 含有目标核苷酸序列的表达载体可通过三种一般方法鉴别:(1)核酸杂交,(2)“标记”基因功能的有或无,及(3)插入序列的表达。在第一种方法中,编码序列可通过核酸杂交,探测包含与插入序列同源和互补的序列来检测。在第二种方法中,重组载体/宿主系统可基于载体中目标序列的插入引起的某些“标记”功能(例如抗生素抗性、杆状病毒中包涵体形成等)的有或无鉴别和选择。例如,如果编码腺病毒蛋白的核苷酸序列或其一部分被插入到载体的标记基因序列中,用编码的蛋白或部分转染的细胞将由标记基因功能的缺乏鉴别(例如 β -半乳糖苷酶活性的丧失)。在第三种方法中,表达载体可通过测试重组载体表达的腺病毒蛋白来鉴别。例如,此类测试可基于体外试验系统中相互作用物质的物理或功能性质,例如与抗体的结合特性。

[0141] 辅助腺病毒核酸可插入到细胞系中,因此避开了共转染辅助腺病毒核酸序列和重组腺病毒载体序列的需要。相反,用重组腺病毒载体转染含辅助腺病毒核酸序列的细胞系,将直接导致重组腺病毒的产生。本发明提供此类细胞系。参见下文第 5.3 节。

[0142] 5.2 重组腺病毒构建体

[0143] 本发明的重组腺病毒载体包含腺病毒核苷酸序列,并且任选一个或多个异源核苷酸序列。在优选的实施方案中,重组腺病毒载体包含与辅助腺病毒核酸序列缺乏同源性的腺病毒核苷酸序列。腺病毒辅助病毒核酸序列和重组腺病毒载体之间同源性的缺乏减少了

病毒基因组重组产生可复制腺病毒的可能性。在优选的实施方案中,重组腺病毒载体编码复制缺陷型腺病毒。按照该实施方案,通过例如将一种或多种突变引入到腺病毒基因组中(例如在腺病毒蛋白的一个或多个编码区中引入缺失),可将重组腺病毒载体工程化,以包含突变的腺病毒基因组。优选腺病毒基因组中的突变导致比野生型腺病毒更低的腺病毒蛋白表达水平。腺病毒蛋白表达的减少降低了受试者对腺病毒蛋白的免疫反应。

[0144] 在具体的实施方案中,重组腺病毒载体编码复制缺陷型腺病毒,并且包含 E1A 编码区(例如 SEQ ID NO:17)和 E1B 编码区(例如 SEQ ID NO:18)的部分或完全(优选完全)缺失的突变基因组,及可包括一个或多个异源核苷酸序列。在另一个实施方案中,重组腺病毒载体编码复制缺陷型腺病毒,并且包含 E1A 编码区(例如 SEQ ID NO:17)、E1B 编码区(例如 SEQ ID NO:18)和 E2B 聚合酶编码区(例如 SEQ ID NO:23)部分或完全(优选完全)缺失的突变基因组,及包括一个或多个异源核苷酸序列。异源核苷酸序列可被引入到基因组的任何区(例如氨基或羧基端)。在具体的实施方案中,异源核苷酸序列被引入到突变的腺病毒基因组中有缺失的腺病毒编码区之一,例如 E1A 或 E2B 编码区中。在优选的实施方案中,重组腺病毒载体编码复制缺陷型腺病毒,并且包含 E1A 编码区(例如 SEQ ID NO:17)、E1B 编码区(例如 SEQ ID NO:18)、E2B 聚合酶编码区(例如 SEQ ID NO:25)和 E3 编码区部分或完全(优选完全)缺失的突变基因组,及在已缺失 E3 编码区中包括异源核苷酸序列。

[0145] 按照本发明,重组腺病毒(rAd)载体包含得自和/或衍生自任何腺病毒科病毒或腺病毒科病毒的组合的腺病毒基因组或其一部分。在优选的实施方案中,重组腺病毒载体包含得自和/或衍生自人腺病毒科病毒的腺病毒基因组或其一部分。在另一个优选的实施方案中,重组腺病毒载体包含得自和/或衍生自人腺病毒血清型 2 或 5 的腺病毒基因组或其一部分。

[0146] 本发明的 rAd 载体可插入任何异源核苷酸序列,包括基因或基因的部分。可最好插入具有可容易检测的产物的基因(在本领域中称为标记、记录器或报道基因)作为 rAd 载体的一部分,虽然本发明不限于此类构建体。报道基因的非限定性实例包括 β -半乳糖苷酶、新霉素磷酸转移酶、氯霉素乙酰基转移酶、胸苷激酶、萤光素酶、 β -葡糖醛酸糖苷酶及黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶,仅列举一些。

[0147] 在本发明的实施方案中,异源核苷酸序列得自和/或衍生自不同于 rAd 载体的来源。在某些实施方案中,异源核苷酸序列编码病毒的抗原蛋白、多肽或肽,所述病毒属于腺病毒的不同种、亚类或变型,该腺病毒不同于衍生 rAd 载体的种、亚类或变型。在其他实施方案中,异源核苷酸序列不是病毒来源的。按照这些实施方案,异源核苷酸序列可编码具有所期望的生物学性质或活性的部分、肽、多肽或蛋白。该异源核苷酸序列可编码标记(tag)或标记。该异源核苷酸序列可编码生物反应调节剂,其实例包括白介素、激素和生长因子。

[0148] 在某些实施方案中,异源核苷酸序列编码得自和/或衍生自不同于腺病毒的病毒的抗原蛋白、多肽或肽。此类病毒的非限定性实例来自以下科病毒:腺病毒科(例如沙粒病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、Ippp 病毒和拉沙病毒)、动脉炎病毒(例如马动脉炎病毒)、星状病毒科(例如星状病毒)、布尼亚病毒科(例如布尼亚病毒、布尼奥罗病毒、汉坦病毒、克里米亚-刚果出血热病毒、白蛉病毒和立夫特山谷热复合物)、杯状病毒科(例如杯状病毒)、冠形病毒科(例如冠形病毒、环状病毒和 SARS)、delta 病毒、线状病毒科(例如

线状病毒、马儿堡病毒和扎伊尔埃博拉病毒)、黄病毒科(例如黄病毒、黄热病病毒、蜱传脑炎病毒组、日本脑炎病毒组、pestivirus 和丙型肝炎病毒)、嗜肝 DNA 病毒科(例如乙型肝炎病毒)、疱疹病毒科(例如 1 型人疱疹病毒、varicellovirus、3 型人疱疹病毒、巨细胞病毒、5 型人疱疹病毒、roseolovirus、6 型人疱疹病毒和 4 型人疱疹病毒)、正粘病毒科(例如流感病毒 A、B 和 C)、乳多空病毒科(例如乳头瘤病毒)、副粘病毒科(例如副粘病毒、1 型人副流感病毒、麻疹病毒(morbillivirus)、麻疹病毒、rubulavirus、腮腺炎病毒、肺病毒和人呼吸道合胞病毒)、细小病毒科(例如细小病毒和腺伴随病毒(AAV))、小 RNA 病毒科(例如肠道病毒、1 型人脊髓灰质炎病毒、鼻病毒、肝病毒、人甲型肝炎病毒、心病毒、脑心肌炎病毒、口疮病毒及 O 型口蹄疫病毒)、痘病毒科(例如痘苗病毒、禽痘病毒和粘液瘤病毒)、呼肠病毒科(例如呼肠病毒、轮状病毒、coltivirus、质型多角体病毒属和斐济病毒属)、反转录病毒科(例如鼠白血病病毒、人 T 淋巴细胞白血病(HTLV)-1 型和 2 型以及慢病毒属例如 1 型人免疫缺陷性病毒、2 型人免疫缺陷性病毒和猿猴免疫缺陷性病毒)、弹状病毒科(例如水泡性病毒、狂犬病病毒属和狂犬病病毒)及披盖病毒科(例如新培斯病毒、Rubivirus 和风疹病毒)。关于病毒和病毒抗原的描述参见,例如 Fields 等(ed.),1991,Fundamental Virology,第二版,Raven Press,New York,其通过引用而整体结合到本文中。

[0149] 在某些实施方案中,异源核苷酸序列编码得自和/或衍生自细菌、真菌和/或其他病原体或寄生虫的抗原蛋白、多肽或肽。得自和/或衍生自细菌的异源核苷酸序列的实例包括但不限于编码抗原的核苷酸序列,所述抗原衍生自以下属的各种细菌:沙门氏菌属(*Salmonella*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、衣原体(*Chlamydia*)、螺杆菌(*Helicobacter*)、耶尔森氏菌(*Yersinia*)、Bordetella、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、奈瑟氏球菌属(*Neisseria*)、弧菌属(*Vibrio*)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、支原菌属(*Mycoplasma*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、密螺旋体属(*Treponema*)、考克斯氏体属(*Coxiella*)、埃里希氏体属(*Ehrlichia*)、布鲁氏菌属(*Brucella*)、链杆菌属(*Streptobacillus*)、Fusospirocheta、螺菌属(*Spirillum*)、尿支原体(*Ureaplasma*)、螺旋体属(*Spirochaeta*)、支原体属(*Mycoplasma*)、放线菌(*Actinomycetes*)、疏螺旋体属(*Borrelia*)、拟杆菌(*Bacteroides*)、Trichomonas、布兰汉氏球菌(*Branhamella*)、巴斯德氏菌属(*Pasteurella*)、梭状芽胞杆菌(*Clostridium*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、李斯特氏菌属(*Listeria*)、芽胞杆菌属(*Bacillus*)、丹毒丝菌属(*Erysipelothrix*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、埃希氏杆菌属(*Escherichia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、Pseudomonas、肠杆菌(*Enterobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、军团菌(*Legionella*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、变形杆菌属(*Proteus*)、弯曲杆菌(*Campylobacter*)、肠球菌(*Enterococcus*)、无色杆菌(*Acinetobacter*)、摩根氏菌(*Morganella*)、摩拉克氏菌属(*Moraxella*)、柠檬酸杆菌(*Citrobacter*)、立克次氏体(*Rickettsia*)、Rochlimesae 以及细菌种例如:铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*);大肠杆菌(*E. coli*)、洋葱伯克氏菌(*P. cepacia*)、表皮葡萄球菌(*S. epidermis*)、粪肠球菌(*E. faecalis*)、*S. pneumoniae*、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、脑膜炎奈瑟氏球菌(*N. meningitidis*)、化脓性链球菌(*S. pyogenes*)、多杀巴斯德氏菌(*Pasteurella multocida*)、苍白密螺旋体(*Treponema pallidum*)和奇异变形杆菌(*P. mirabilis*)。

[0150] 衍生自真菌的异源核苷酸序列的实例包括但不限于编码抗原的核苷酸序列,

所述抗原得自和 / 或衍生自真菌例如新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitidis*)、皮炎阿耶洛霉 (*Aiellomyces dermatitidis*) ; 荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*) ; 粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)、念珠菌属 (*Candida*) 包括白色念珠菌 (*C. albicans*)、热带假丝酵母 (*C. tropicalis*)、近平滑假丝酵母 (*C. parapsilosis*)、季也蒙假丝酵母 (*C. guilliermondii*) 和克鲁斯假丝酵母 (*C. krusei*)、曲霉属 (*Aspergillus*) 包括烟曲霉 (*A. fumigatus*)、黄曲霉 (*A. flavus*) 和黑曲霉 (*A. niger*)、根霉属 (*Rhizopus*)、根毛霉属 (*Rhizomucor*)、小克银汉霉属 (*Cunninghamella*)、节壶霉属 (*Apophysomyces*) 包括 *A. saksenae*、*A. mucor* 和 *A. absidia* ; 申克孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*)、*Paracoccidioides brasiliensis*、*Pseudallescheria boydii*、光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*) ; 发癣菌属 (*Trichophyton*)、小孢子菌属 (*Microsporum*) 和皮肤真菌属 (*Dermatophytes*) 以及任何其他已知或以后鉴定为致病的酵母或真菌。

[0151] 最后,得自和 / 或衍生自寄生虫的异源核苷酸基因序列包括但不限于编码抗原的核苷酸序列,所述抗原衍生自以下寄生虫的成员,顶复门 (*Apicomplexa*),例如巴贝虫属 (*Babesia*)、弓浆虫属 (*Toxoplasma*)、疟原虫属 (*Plasmodium*)、艾美球虫属 (*Eimeria*)、等孢子球虫属 (*Isospora*)、非弓浆虫属 (*Atoxoplasma*)、*Cystoisospora*、*Hammondia*、贝斯虫属 (*Besnoitia*)、肉孢子虫属 (*Sarcocystis*)、弗伦虫属 (*Frenkelia*)、血变虫属 (*Haemoproteus*)、住白虫属 (*Leucocytozoon*)、泰来虫属 (*Theileria*)、鞭孢簇虫属 (*Perkinsus*) 和簇虫属 (*Gregarinaspp.*) ; 卡氏肺囊虫 (*Pneumocystis carinii*) ; 微孢子门 (*Microspora*) 成员例如微孢子虫属 (*Nosema*)、*Enterocytozoon*、脑居虫属 (*Encephalitozoon*)、*Septata*、姆拉虫属 (*Mrazekia*)、钝孢虫属 (*Amblyospora*)、*Ameson*、格留虫属 (*Glugea*)、匹里虫属 (*Pleistophora*) 和 *Microsporidium spp.* ; 及囊孢子门 (*Ascetospora*) 成员例如单孢子虫属 (*Haplosporidium spp.*) 以及包括以下的各属寄生虫 : 恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*P. vivax*)、卵形疟原虫 (*P. ovale*)、三日疟原虫 (*P. malaria*) ; 鼠弓浆虫 (*Toxoplasma gondii*) ; 墨西哥利什曼原虫 (*Leishmania mexicana*)、热带利什曼原虫 (*L. tropica*)、大型利什曼原虫 (*L. major*)、埃塞俄比亚利什曼原虫 (*L. aethiopica*)、多氏利什曼原虫 (*L. donovani*)、克鲁斯锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、布鲁斯锥虫 (*T. brucei*)、孟氏裂体吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、埃及裂体吸虫 (*S. haematobium*)、日本裂体吸虫 (*S. japonicum*) ; 旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*)、班氏吴策线虫 (*Wuchereria bancrofti*)、马来布鲁线虫 (*Brugia malayi*) ; 痢疾内变形虫 (*Entamoeba histolytica*) ; 蛲虫 (*Enterobius vermicularis*)、猪带绦虫 (*Taenia solium*)、牛肉绦虫 (*T. saginata*)、阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*)、人毛滴虫 (*T. hominis*)、口腔毛滴虫 (*T. tenax*)、吸吮贾第虫 (*Giardia lamblia*) ; *Cryptosporidium parvum* ; 卡氏肺囊虫 (*Pneumocystis carinii*)、牛巴贝虫 (*Babesia bovis*)、分离巴贝虫 (*B. divergens*)、田鼠巴贝虫 (*B. microti*)、贝氏等孢子虫 (*Isosporabelli*)、*L. hominis*、脆弱双核变形虫 (*Dientamoeba fragilis*)、旋盘尾丝虫 (*Onchocerca volvulus*)、似引蛔线虫 (*Ascaris lumbricoides*) ; 美洲板口线虫 (*Necator americanus*)、十二指肠钩口线虫 (*Ancylostoma duodenale*)、粪类圆线虫 (*Strongyloides stercoralis*)、菲律宾毛细线虫 (*Capillaria philippinensis*)、广州管圆线虫 (*Angiostrongylus cantonensis*)、

矮小啮齿绦虫 (*Hymenolepis nana*) ; 阔节裂头绦虫 (*Diphyllobothrium latum*) ; 细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*)、多房棘球绦虫 (*E. multilocularis*) ; 卫氏并殖吸虫 (*Paragonimus westermani*)、*P. caliensis*、*Chlonorchis sinensis* ; 猫后睾吸虫 (*Opisthorchis felinae*)、*G. Viverini*、肝片形吸虫 (*Fasciola hepatica*)、疥螨 (*Sarcoptes scabiei*)、体虱 (*Pediculus humanus*)、阴虱 (*Phthirus pubis*) ; 和人皮蝇 (*Dermatobia hominis*) 以及任何其他已知或以后鉴定为致病的寄生虫。

[0152] 本发明的其他异源核苷酸序列包括编码抗原的核苷酸序列, 该抗原具有自身免疫性疾病的特征。这些抗原通常将衍生自哺乳动物组织的细胞表面、细胞质、细胞核、线粒体等。此类抗原的实例包括但不限于具有糖尿病、多发性硬化症、全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、恶性贫血、阿狄森氏病、硬皮病、自身免疫性萎缩性胃炎、青少年糖尿病和盘状红斑狼疮特征的抗原。

[0153] 在某些实施方案中, 本发明的异源核苷酸序列包括是变应原的抗原。是变应原的抗原通常包括蛋白或糖蛋白, 包括衍生自花粉、灰尘、霉菌、孢子、皮屑、昆虫和食物的抗原。在其他实施方案中, 本发明的异源核苷酸序列包括肿瘤抗原。肿瘤抗原通常将衍生自肿瘤组织细胞的细胞表面、细胞质、细胞核、细胞器等。肿瘤抗原的非限定性实例包括突变的致癌基因编码的蛋白 ; 与肿瘤相关的病毒蛋白 ; 及糖蛋白。肿瘤包括但不限于源自以下类型癌症的那些 : 唇、鼻咽、咽和口腔癌、食管、胃、结肠、直肠、肝、胆囊、胰腺、喉、肺和支气管癌、皮肤黑素瘤、乳腺、宫颈、子宫、卵巢、膀胱、肾、子宫、脑和神经系统的其他部分、甲状腺、前列腺、睾丸癌、何杰金氏病、非何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤和白血病。

[0154] 在某些实施方案中, 异源核苷酸序列编码生物反应调节剂, 例如细胞因子、细胞因子受体、激素、生长因子或生长因子受体。此类生物反应调节剂的非限定性实例包括干扰素 (IFN)- α 、IFN- β 、IFN- γ 、白介素 (IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-23、红细胞生成素 (EPO)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、酸性成纤维细胞生长因子 (aFGF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、血小板衍生生长因子 (PDGF)、表皮生长因子 (EGF)、胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP)、TNFR 和 TNFR 配体超家族成员包括 TNFRSF18 和 TNFSF18。在其他实施方案中, 异源核苷酸序列编码抗体。在还其他实施方案中, 异源核苷酸序列编码嵌合或融合蛋白。

[0155] 根据本发明, 如果 rAd 载体的异源核苷酸序列要在宿主细胞中表达, 应提供转录控制元件, 也称为启动子 / 增强子序列。启动子 / 增强子序列可具有广泛的活性, 或者可以是组织特异性的。启动子 / 增强子序列可衍生自非腺病毒来源或可为腺病毒启动子。在优选的实施方案中, 用于调节异源核苷酸序列表达的启动子 / 增强子序列不与调节辅助腺病毒核酸序列表达的那些启动子 / 增强子序列分享。在某些实施方案中, 启动子是组成型启动子。在其他实施方案中, 启动子是诱导型启动子。在还其他实施方案中, 启动子是组织特异性启动子。启动子的实例参见上述 5.1 节。

[0156] 所插入的非腺病毒或异源核苷酸序列的期望大小限于允许将 rAd 载体包装进病毒体的大小, 并且取决于所保留腺病毒序列的大小。人腺病毒基因组的长度大约为 36 千碱基对 (Davison 等 (2003) *J. Gen. Virology* 84 (Pt11), 2895-2908 测定为 35938 个核苷酸的长度)。待包装进病毒体的 rAd 的总大小应为约 37735 个核苷酸的长度 (约为正常基因组长度的 105%)。因此, 为了使所插入的异源核苷酸序列的表达最大化, 可能需要将 rAd 载体

中的腺病毒基因组的一部分排除。

[0157] 可通过用异源核苷酸序列完全代替病毒编码区或通过部分代替或通过用异源核苷酸序列加入到病毒基因组中,实现将外源基因序列插入到本发明的 rAd 载体中。完全代替通过使用 PCR- 定向诱变完成可能最好。简而言之,PCR- 引物 A 从 5' -3' 端将含有:唯一限制酶位点,例如 IIS 类限制酶位点(即“移位器”酶;它识别特定的序列,但是将该序列的上游或下游 DNA 分裂);对待被代替的基因区进行补充的一段核苷酸;及对异源核苷酸序列的羧基端编码部分进行补充的一段核苷酸。PCR- 引物 B 从 5' -3' 端将含有:唯一限制酶位点;对待被代替的基因进行补充的一段核苷酸;及对应于异源或非天然基因的 5' 编码部分的一段核苷酸。用这些具有异源或非天然基因的克隆拷贝的引物进行 PCR 反应后,产物可被切除并用唯一限制位点克隆。用 IIS 类酶消化,及用纯化的噬菌体聚合酶转录将产生 RNA 分子,该 RNA 分子含有现在带有异源或非天然基因插入的病毒基因准确未翻译的终端。在替代实施方案中,PCR- 引物反应可用于制备含噬菌体启动子序列和杂交基因序列的双链 DNA,使 RNA 模板可不克隆直接转录。

[0158] 当将异源核苷酸序列插入到本发明的 rAd 载体中时,可改变异源核苷酸序列的编码序列终端和下游基因的编码序列开始之间的基因间区,以达到所期望的效果。如本文中使用的,术语“基因间区”指一个基因的停止信号和下一个下游可读框的编码序列起始密码子(例如 AUG)之间的核苷酸序列。基因间区可包含基因的非编码区,即该基因的转录起始位点和编码序列的起始(AUG)之间。该非编码区在某些病毒的基因中自然地存在。

[0159] 所插入的异源核苷酸序列的表达可通过包括但不限于蛋白或 mRNA 表达水平的各种指标测定,由以下非限定性试验的实例测定:免疫染色、免疫沉淀法和免疫印迹法、酶联免疫吸附测定、核酸检测(例如 DNA 印迹分析、RNA 印迹分析、蛋白质印迹分析)、报道基因的应用(例如使用报道基因,例如绿荧光蛋白(GFP)或增强的绿荧光蛋白(eGFP),以与目标异源基因相同的方式整合至病毒基因组以观察蛋白表达)或其组合。进行这些试验的方法在本领域中是众所周知的(参见例如 Flint 等, PRINCIPLES OF VIROLOGY, MOLECULAR BIOLOGY, PATHOGENESIS, AND CONTROL, 2000, ASM Press pp25-56, 其整个正文通过引用结合到本文中)。

[0160] 例如,表达水平可通过以下方法确定:将培养中的细胞用本发明的重组腺病毒感染,随后例如通过蛋白质印迹分析或 ELISA,使用对异源核苷酸序列的基因产物有特异性的抗体,测定蛋白表达的水平,或者通过例如 RNA 印迹分析,使用对异源序列有特异性的探针测定 RNA 表达水平。类似地,可通过将动物模型感染,并且测定由动物模型中本发明重组病毒的异源核苷酸序列表达的蛋白水平,确定异源序列的表达水平。可通过从所感染的动物获取组织样品,然后对该组织样品进行蛋白质印迹分析或 ELISA,使用对异源序列的基因产物有特异性的抗体测定蛋白水平。此外,如果使用动物模型,由动物对异源序列的基因产物产生的抗体效价可通过熟练技术人员已知的任何技术测定,这些技术包括但不限于 ELISA。

[0161] 根据本发明,为了获得大量的 rAd 载体,rAd 载体可以例如作为细菌质粒或噬菌体的一部分在微生物中繁殖。

[0162] 5.3 用于重组腺病毒产生的细胞系的产生

[0163] 本发明提供包含本文中描述的辅助腺病毒核酸序列的宿主细胞,及产生此类细胞的方法。用辅助腺病毒核酸序列转染或转化的宿主细胞可用于重组腺病毒、特别是复制缺

陷型重组腺病毒的产生。具体地说,本发明的宿主细胞补充了重组腺病毒载体和 / 或目标重组腺病毒所失去的功能 (即腺病毒 E1A,例如 SEQ ID NO:17,和 E1B,例如 SEQ ID NO:18 编码区)。更具体地说,用本文中描述的辅助腺病毒核酸序列转染或转化的宿主细胞表达腺病毒蛋白,该腺病毒蛋白补充本文中描述的重组腺病毒载体。优选宿主细胞含有补充性腺病毒基因,该补充性腺病毒基因与目标重组腺病毒载体中的那些缺乏任何同源性,它减少了病毒基因组与细胞 DNA 重组产生可复制腺病毒的可能性。补充本文中描述的重组腺病毒载体的宿主细胞有时在本文中称为“补充性细胞系”、“产生 rAd 的细胞系”“rAd 补充细胞”和“rAd 补充细胞系”。

[0164] 在具体的实施方案中,本发明提供分离的宿主细胞,该细胞包含:(a) 第一核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷;及 (b) 第二核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1B-55K 蛋白的核苷酸序列。按照该实施方案,在某些实施方案中,第二核酸分子不包含编码腺病毒 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列。在优选的实施方案中,本发明提供分离的宿主细胞,该细胞包含:(a) 第一核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷;(b) 第二核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E2B 聚合酶的核苷酸序列;及 (c) 第三核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1B-55K 和 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列。按照这些实施方案,宿主细胞可还包含另外的核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E2a DNA 结合蛋白、腺病毒 E2b 终端前蛋白、腺病毒 E2b 1Va2 蛋白、腺病毒 E4 蛋白 (例如腺病毒 E4 基因的 ORF6、ORF3 和 ORF6/7) 和 / 或由 L4

[0165] 100K 编码的腺病毒蛋白的核苷酸序列。

[0166] 在某些实施方案中,本发明提供包含核酸分子的分离的宿主细胞,该核酸分子包含:(i) 编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷;及 (ii) 编码腺病毒 E1B-55K 蛋白的核苷酸序列。在某些其他实施方案中,本发明提供包含核酸分子的分离的宿主细胞,该核酸分子包含:(i) 编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷;(ii) 编码腺病毒 E2B 聚合酶的核苷酸序列;及 (iii) 编码腺病毒 E1B-55K 和 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列。

[0167] 在具体的实施方案中,由宿主细胞表达的 E1A 蛋白包含:(a) 第一缺失,该缺失对应于:(i) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);或 (ii) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 36-49 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 36-49;及 (b) 第二缺失,该缺失对应于:(i) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107);或 (ii) E1A289R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108)。在优选的实施方案中,由宿主细胞表达的 E1A 蛋白包含:(a) 第一缺失,该缺失对应于 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);及 (b) 第二缺失,该缺失对应于 E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107) 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107)。

[0168] 在所有成功产生感染的产生细胞系中要求 E1A 腺病毒蛋白激活早期转录单位的

能力,但是在连续分裂的已确立细胞系中不要求 E1A 诱导细胞周期的能力。本发明的 rAd 补充细胞系中表达的突变 E1A 腺病毒基因保留了激活转录的能力,但是在诱导细胞 DNA 合成上有缺陷。刺激细胞 DNA 合成所需的腺病毒 E1A 区也可以引起诱导细胞凋亡,细胞凋亡可阻碍 rAd 补充细胞系的成功建立,该 E1A 区不在本发明的 rAd 补充细胞系中表达。

[0169] 任何类型的细胞均可用作宿主细胞。在优选的实施方案中,使用了容许腺病毒,优选人腺病毒感染的细胞。可选择以所期望的特定方式调节或修饰和处理基因产物表达的宿主细胞株。此类修饰(例如糖基化)和蛋白产物的加工(例如分裂)对该蛋白的功能可能是重要的。不同的宿主细胞具有蛋白和基因产物的翻译后加工和修饰的特征和特定的机理。可选择适当的细胞系以确保所表达的外源蛋白的正确修饰和加工。为了该目的,可使用具有细胞机构的真核宿主细胞(例如哺乳动物宿主细胞),该细胞机构用于基因产物初级转录、糖基化和磷酸化的适当加工。此类哺乳动物宿主细胞的实例包括但不限于 CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20 和 T47D、NS0(不内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030 和 HsS78Bst 细胞。在具体的实施方案中,宿主细胞为 A549、HCT-15、IGROV-1、HeLa、U87、W162 或 293-D22 细胞。在优选的实施方案中,宿主细胞为 A549 细胞。在某些实施方案中,宿主细胞可以在悬浮液中培养和繁殖。

[0170] 在优选的实施方案中,人细胞用作宿主细胞。人类确立细胞系例如来自人类肿瘤细胞或人类肿瘤细胞系的那些具有在培养中无限复制的能力。优选人类肿瘤细胞、来自人类确立细胞系的细胞或来自人类肿瘤细胞系的细胞在产生本发明的补充细胞系上优于人类初级细胞,因为在本发明的 E1- 补充细胞系中表达的突变 E1A 腺病毒基因保持了激活转录的能力,但是在诱导细胞 DNA 合成和初级细胞系向连续复制的细胞系或确立细胞系的转化上有缺陷。此类细胞系可按照标准分子生物学技术产生。

[0171] 宿主细胞可用辅助腺病毒核酸序列瞬时或稳定转染。转染宿主细胞的非限定性方法包括 DEAE 葡聚糖法(McCutchen 和 Pagano, 1968, J. Natl. Cancer Inst. 41 :351-357)、磷酸钙法(Graham 等, 1973, J. Virology 33 :739-748)、微量注射、脂转染法、电穿孔及本领域已知的任何其他方法。优选将辅助腺病毒核酸序列稳定地整合到宿主细胞的细胞核基因组中。据认为需要编码互补因子的异源核酸序列的基因组整合,以产生用于腺病毒载体产生的稳定重组细胞系。此外,由瞬时转染产生的补充是劳动密集性的,难于规模化产生并且可能提供低的腺病毒产率。将异源核酸序列引入和稳定地整合到细胞基因组中,需要本领域技能范围内的标准分子生物学技术(参见,例如 Sambrook, Fritsch&Maniatis, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第二版 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)。

[0172] 对重组腺病毒蛋白的长期、高产率产生而言,优选稳定的表达。例如,可将稳定表达腺病毒蛋白的细胞系工程化,该腺病毒蛋白由辅助腺病毒核酸序列编码。宿主细胞可与由适当表达控制元件(例如启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)控制的核苷酸序列和选择性标记一起转化。引入外源核苷酸序列后,可使工程化细胞在富集的培养基中生长 1-2 天,然后转移到选择性培养基中。重组质粒中选择性标记赋予选择物抗性,并使细胞将质粒稳定地整合到其染色体中,并生长形成转化灶,该转化灶又可在细胞系中克隆和膨胀。最好可用该方法将表达腺病毒蛋白的细胞系工程化,该腺病毒蛋白由辅助腺病毒核酸序列编码。

[0173] 可使用许多选择系统,包括但不限于可分别在 tk⁻、hgp^{rt}⁻ 或 ap^{rt}⁻ 细胞中使用单纯疱疹病毒胸苷激酶 (Wigler 等,1977, Cell111:223)、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (Szybalska&Szybalski,1992, Proc.Natl.Acad. Sci. USA48:202) 和腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (Lowy 等,1980, Cell122:8-17) 基因。同样,抗代谢物抗性可用作选择以下基因的基础:dhfr,它赋予对甲氨蝶呤的抗性 (Wigler 等,1980, Natl.Acad. Sci. USA77:357;0' Hare 等,1981, Proc.Natl.Acad. Sci. USA78:1527);gpt,它赋予对霉酚酸的抗性 (Mulligan&Berg,1981, Proc.Natl.Acad. Sci. USA78:2072);neo,它赋予对氨基糖苷 G-418 的抗性 (Wu 和 Wu,1991, Biotherapy3:87-95;Tolstoshev,1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596;Mulligan,1993, Science260:926-932; 及 Morgan 和 Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217;1993 年 5 月, TIB TECH11(5):155-215);和 hyg^{ro},它赋予对潮霉素的抗性 (Santerre 等,1984, Gene30:147)。在重组 DNA 技术领域中通常已知的方法可常规地用于选择所期望的重组克隆,此类方法例如在 Ausubel 等 (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, NY(1993);Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY(1990);及在第 12 和 13 章,Dracopoli 等 (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley&Sons, NY(1994);Colberre-Garapin 等,1981, J. Mol. Biol. 150:1 中有描述,它们通过引用整体结合到本文中。

[0174] 由辅助腺病毒核酸序列编码的腺病毒蛋白的表达水平可通过载体扩增增加 (综述参见 Bebbington 和 Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987))。当载体系统中表达腺病毒蛋白的标记是可扩增的,增加宿主细胞培养物中的抑制剂水平将增加标记基因拷贝的数量。由于被扩增的区域与腺病毒蛋白相关,因此腺病毒蛋白的产生也将增加 (Grouse 等,1983, Mol. Cell. Biol. 3:257)。

[0175] 本发明提供产生用于制备复制缺陷型腺病毒的宿主细胞的方法,该方法包括将细胞 (优选人细胞) 用第一核酸分子和第二核酸分子转化或转染,其中第一核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷 (参见上述此类腺病毒蛋白的实例),及第二核酸分子包含编码腺病毒 E1B-55K 蛋白的核苷酸序列 (并且优选不包含编码腺病毒 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列)。细胞可用第一和第二核酸分子同时或以任何顺序顺序转化或转染。在具体的实施方案中,细胞用第一核酸分子,然后用第二核酸分子转化或转染。

[0176] 本发明提供产生用于制备复制缺陷型腺病毒的细胞的方法,该方法包括将细胞 (优选人细胞) 用第一核酸分子、第二核酸分子和第三核酸分子转化或转染,其中第一核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷 (参见上述此类腺病毒蛋白的实例),第二核酸分子包含编码腺病毒 E2b 聚合酶的核苷酸序列,及第三核酸分子包含编码腺病毒 E1B-55K 蛋白的核苷酸序列,并且优选编码腺病毒 E1B-55K 蛋白和 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列。细胞可用第一、第二和第三核酸分子同时或以任何顺序顺序转化或转染。在具体的实施方案中,细胞用第一核酸分子、第二核酸分子,然后用第三核酸分子转化或转染。

[0177] 本发明的产生 rAd 的细胞系可用标准细胞培养技术繁殖（参见例如 R. I. Freshney, *Culture of Animal Cells—A Manual of Basic Techniques*, 第二版, Wiley-Liss, Inc. New York, N. Y., 1987）。产生 rAd 的细胞系通过在适当的细胞培养基中培养细胞繁殖, 例如补充 1–10% 胎牛血清（在某些实施方案中是 1% 胎牛血清, 在其他实施方案中是 10% 胎牛血清）、抗生素（例如对 SL0003 而言, 200 μ g/ml 潮霉素 B 和 200 μ g/ml G418, 而对 SL0006 而言 150 μ g/ml 潮霉素 B, 350 μ g/ml G418 及 0.2 μ g/ml 嘌呤霉素）的 Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基。对产生 rAd 的细胞系的悬浮培养而言, 产生 rAd 的细胞系通过将细胞在例如 OptiPro 培养基中培养繁殖, OptiPro 培养基补充 0.1% pluronic F-68、1% 化学纯化脂质、4mM glutamax 和抗生素（例如对 SL0006 而言 15 μ g/ml 潮霉素 B, 35 μ g/ml G418 及 0.02 μ g/ml 嘌呤霉素）。将抗生素例如潮霉素 B、G418 和嘌呤霉素包括在细胞培养基中, 以维持细胞系上的选择压力。在某些实施方案中, 本发明的产生 rAd 的细胞系用悬浮培养繁殖。

[0178] 为了将来使用, 可将细胞深低温保藏并储藏。优选通过以下方法将细胞深低温保藏: 使细胞繁殖至后期指数生长期; 将细胞浓缩; 将生长培养基换成补充冷冻保护剂和稳定剂的培养基; 将细胞冷冻; 及将细胞于 0°C 或更低的温度下储存。优选, 细胞储存在 -70°C 或更低（例如 -80°C）, 或在液氮中或在液氮的气相中储存。细胞可通过本领域已知的任何方法浓缩。例如细胞可通过离心、沉淀、用灌注装置（例如筛）浓缩或通过过滤浓缩。优选, 将细胞浓缩至至少约 1×10^7 细胞/ml。细胞可在本领域已知的任何冷冻保护剂中储存。例如冷冻保护剂可以是二甲基亚砜 (DMSO) 或甘油。细胞可储存在本领域已知的任何稳定剂中。例如稳定剂可以是甲基纤维素或血清。

[0179] 冷冻前, 所浓缩的细胞可分装几个独立的容器中, 以建立细胞库。细胞可以储存在例如玻璃或塑料小瓶或管中, 或者储存在细胞培养袋中。当将来需要使用细胞时, 可从细胞库中选择一部分深低温保藏的细胞（从一个容器中）, 解冻并繁殖。

[0180] 产生 rAd 的细胞系可通过本领域已知的任何哺乳动物细胞培养方法繁殖或生长。可通过一步或多步方法进行繁殖。在一步繁殖法中, 将产生细胞从存储器中取出, 并直接接种到将在其中进行病毒产生的培养容器中。在多步繁殖法中, 将产生细胞从存储器中取出, 并通过许多培养容器繁殖, 容器的大小逐渐增加直到达到将在其中进行重组腺病毒产生的最终培养容器。在繁殖步骤期间, 细胞在生长的优化条件下生长。对于特定细胞系, 培养条件例如温度、pH、所溶解氧的水平等是已知优化的那些条件, 并对该领域熟练的人员或熟练技术人员而言将是显而易见的（参见例如 *Animal Cell culture: A Practical Approach* 第 2 版, Rickwood, D. and Hames, B. D. eds., Oxford University Press, New York (1992)）。

[0181] rAd 产生细胞或产生 rAd 的细胞系可在本领域已知的任何合适的容器中生长。例如可在生物发生器或生物反应器中使细胞生长和培养感染的细胞。一般而言, “生物发生器” 或 “生物反应器” 指培养罐, 通常由不锈钢或玻璃制成, 体积为 0.5 升或更大, 包括搅拌系统、注射 CO₂ 气流的装置和充氧装置。通常, 装备有测量生物发生器内部参数, 例如 pH、所溶解的氧、温度、罐压力或培养物的某些物理化学参数（例如葡萄糖或谷氨酰胺的消耗或乳酸盐和铵离子的产生）的探头。pH、氧和温度探头与永久调节这些参数的生物处理器相连接。在其他实施方案中, 容器为旋转烧瓶、滚瓶、摇瓶或为具有提供机械搅拌的搅拌棒的烧瓶。在另一个实施方案中, 容器为 WAVE 生物反应器 (WAVE Biotech, Bridgewater, NJ,

U. S. A.)。

[0182] 培养物中的细胞密度可通过本领域已知的任何方法测定。例如细胞密度可用显微镜法(例如血细胞计数器)或通过电子细胞计数装置(例如 COULTER 计数器; AccuSizer780/SPOS 单一粒子光学筛分器)测定。

[0183] 5.3.1SL0003 细胞系

[0184] 如实施例 1 中所描述,组成型表达 E1A 突变 E1Ad/01/07 基因的转化细胞系 A549E1Ad/01/07,被选择用于进一步的发展,因为它在比表达野生型 E1A 或单一突变 E1Ad/1101 或 E1Ad/1107 的 A549 细胞克隆更高的水平上支持 E1- 缺失的 rAd 载体的复制。如下述实施例 1 中所示, A549 细胞克隆 A549E1Ad/01/07-1 至 A549E1Ad/01/07-5, 在比 A549 细胞克隆 A549E1Awt-1 至 A549E1Awt-5 或 A549 细胞克隆 A549E1Ad/1101-1 至 A549E1Ad/1101-5 或 A549 细胞克隆 A549E1Ad/1107-1 至 A549E1Ad/1107-5 更高的水平上支持 E1- 缺失的 rAd 载体的复制。

[0185] 转化的细胞系 A549E1Ad/01/07 也被选择用于进一步的发展,因为其在腺病毒载体产生期间降低对细胞凋亡的敏感性。表达野生型 E1A 的 A549 克隆即 A549E1Awt,在用 E1- 缺失的 rAd 载体感染后,对细胞凋亡尤其敏感并且病毒产率极低。克隆 A549E1Awt-2 中细胞凋亡的迅速诱导提示病毒感染中的早期事件可提供死亡信号,该死亡信号可被表达野生型 E1A 但不表达 E1Ad/01/07 的 A549 细胞识别。

[0186] 已报道通过 p53- 依赖性和 p53- 不依赖性途径,刺激腺病毒感染的细胞中细胞凋亡 (Teodoro 等, (1995)Oncogene11 :467-474)。已发现与其中 E2F 和 p53 转录活性类似于亲代 A549 细胞的 A549E1Ad/01/07 克隆相比,在 A549wt-2 克隆中 E2F 和 p53 途径均被刺激。已发现 A549E1Awt-2 细胞由低水平的放线菌酮驱使进入细胞凋亡,但是 A549E1Ad/01/07 克隆不受该处理的影响。野生型 E1A 刺激 E2F 和 p53 途径不足以在 A549wt-2 克隆中诱导细胞凋亡,但是对于增加这些细胞对死亡刺激的敏感性可能有贡献。

[0187] 虽然转化的细胞系 A549E1Ad/01/07 能够产生复制缺陷型腺病毒,据推论病毒产率可通过用 E1B 补充而进一步提高。是否两种 E1B 基因在表达 E1Ad/01/07 的 A549 细胞系中均需要 rAd 载体补充是未知的。使用一系列 E1B 突变型病毒进行的病毒产率分析,显示在 A549E1Ad/01/07-4 细胞中, E1B-55K 克隆的表达足以在野生型水平上产生突变型病毒。这些结果提示通过 E1Ad/01/07 加 E1B55K 可以在 A549 细胞中实现有效的补充,这随后在 SL0003 细胞系中实现。由 SL0003 细胞系得到的 rAd 载体产率与从 293 细胞获得的类似,未产生可检测的可复制腺病毒 (RCA)。

[0188] SL0003 细胞系于 2004 年 9 月 22 日在美国典型培养物保藏中心 (ATCC), 10801University Blvd., Manassas, VA, 20110-2209, USA, 按照布达佩斯协定以如下标示名称和保藏编号保藏:保藏名称: " SL0003 ";ATCC 保藏编号:PTA-6231。在授予专利权后,获取 ATCC 保藏的细胞系的所有限制将取消。

[0189] 5.3.2SL0006 细胞系

[0190] 如实施例 2 所描述,为了提高病毒产率,用包含编码腺病毒 E2b 聚合酶的核苷酸序列的核酸分子,和包含编码腺病毒 E1B-55K 和 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列的核酸分子,转化转化的细胞系 A549E1Ad/01/07。实施例 2 中提供的结果显示由 E1Ad/01/07 加 E2b 聚合酶、E1B-55K 和 E1B-19K 可以在 A549 细胞中实现有效的补充。由 SL0006 细胞系得到的 rAd 载

体产率与从 293 细胞获得的类似,未产生可检测的可复制腺病毒 (RCA)。

[0191] SL0006 细胞系于 2005 年 4 月 7 日在美国典型培养物保藏中心 (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110-2209, USA, 按照布达佩斯协定以如下标示名称和保藏编号保藏:保藏名称: " SL0006 ";ATCC 保藏编号:PTA-6663。在授予专利权后,获取 ATCC 保藏的细胞系的所有限制将取消。

[0192] 5.4 重组腺病毒的产生

[0193] 按照本发明,重组腺病毒(优选重组复制缺陷型腺病毒)可通过将适当的细胞类型用 rAd 载体和辅助腺病毒核酸序列共转染产生。可通过 DEAE 葡聚糖法 (McCutchen 和 Pagano, 1968, J. Natl. Cancer Inst. 41:351-357)、磷酸钙法 (Graham 等, 1973, J. Virol. 33:739-748) 或通过本领域已知的任何其他方法,包括但不限于微量注射、脂转染和电穿孔进行共转染。用于转染的 rAd 载体和辅助腺病毒核酸序列的量大约为 0.2-10 μ g DNA/ 10^6 细胞,但是在不同的 DNA 构建体和细胞类型中可变化。适用于转染的细胞包括任何容许腺病毒感染的细胞系,包括但不限于 HeLa 细胞、293-D22 细胞、A549 细胞、HCT-15 细胞、IGROV-1 细胞、U87 细胞和 W162 细胞。

[0194] 或者, rAd 补充细胞系可用 rAd 载体转染产生重组腺病毒(优选重组复制缺陷型腺病毒)。在具体的实施方案中,本发明提供制备重组腺病毒的方法,该方法包括在允许病毒基因组在细胞系中复制的条件下,培养用重组腺病毒载体转染的补充 rAd 的细胞系,其中该细胞系包含:(a) 第一核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷(参见上述有关此类 E1A 蛋白的描述);及(b) 第二核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1B-55K 蛋白的核苷酸序列(并且优选不包含编码腺病毒 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列)。在优选的实施方案中,本发明提供制备重组腺病毒的方法,该方法包括在允许病毒基因组在细胞系中复制的条件下,培养用重组腺病毒载体转染的补充 rAd 的细胞系,其中该细胞系包含:(a) 第一核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷(参见上述有关此类 E1A 蛋白的描述);(b) 第二核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E2B 聚合酶的核苷酸序列;及(c) 第三核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1B-55K 蛋白,并且优选腺病毒 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列。

[0195] 在具体的实施方案中,本发明提供繁殖重组腺病毒的方法,该方法包括在允许病毒基因组在细胞系中复制的条件下,培养用重组腺病毒(优选复制缺陷型腺病毒)感染的补充 rAd 的细胞系,其中该细胞系包含:(a) 第一核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷(参见上述有关此类 E1A 蛋白的描述);及(b) 第二核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1B-55K 蛋白的核苷酸序列(并且优选不包含编码腺病毒 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列)。在优选的实施方案中,本发明提供繁殖重组腺病毒的方法,该方法包括在允许病毒基因组在细胞系中复制的条件下,培养用重组腺病毒(优选复制缺陷型腺病毒)感染的补充 rAd 的细胞系,其中该细胞系包含:(a) 第一核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷(参见上述有关此类 E1A 蛋白的描述);(b) 第二核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E2B

聚合酶的核苷酸序列；及 (c) 第三核酸分子，该核酸分子包含编码腺病毒 E1B-55K 蛋白，并且优选腺病毒 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列。

[0196] 本发明的重组腺病毒可通过任何合适的方法产生，这些方法中的许多在本领域中是已知的（参见例如 Berkner 等, Nucl. Acids Res. 12 :925-941(1984) ;Berkner 等, Nucl. Acids. Res. 11 :6003-6020(1983) ;Brough 等, Virology 190 :624-634(1992)）。在本发明优选的实施中，重组腺病毒衍生自人腺病毒科病毒。在本发明优选的实施方案中，重组腺病毒衍生自人腺病毒血清型 2 或 5。在本发明另一个优选的实施中，重组腺病毒是复制缺陷型腺病毒，并且包含 E1A 编码区（例如 SEQ ID NO :17）和 E1B 编码区（例如 SEQ ID NO :18）部分或完全（优选完全）缺失的突变基因组，及可包括一个或多个另外的异源基因。在本发明另一个优选的实施中，重组腺病毒是复制缺陷型腺病毒，并且包含 E1A 编码区（例如 SEQ ID NO :17）、E1B 编码区（例如 SEQ ID NO :18）和 E2B 聚合酶编码区（例如 SEQ ID NO :23）部分或完全（优选完全）缺失的突变基因组，及包括一个或多个异源核苷酸序列。在本发明更优选的实施中，重组腺病毒是复制缺陷型腺病毒，并且包含 E1A 编码区、E1B 编码区、E2b 聚合酶编码区和 E3 编码区部分或完全（优选完全）缺失的突变基因组，及在缺失的 E3 编码区中包括一个或多个异源核苷酸序列。本发明优选的重组腺病毒包含与产生 rAd 的细胞中腺病毒 DNA 序列缺乏任何同源性的病毒 DNA 序列，它减少了病毒基因组与细胞 DNA 重组产生 RCA 的可能性。

[0197] 在某些实施方案中，重组腺病毒的量用滴定法测定。滴定培养物中腺病毒的量可通过本领域中已知的技术进行。在特定的实施方案中，病毒颗粒的浓度通过 Shabram 等, Human Gene Therapy 8 :453-465(1997) 描述的 Resource Q 试验测定。如本文中使用的，术语“细胞裂解”指含病毒的细胞破裂。细胞裂解可通过本领域众所周知的各种手段实现。例如哺乳动物细胞可在低压（100-200psi 分压）条件下，通过匀化、通过微流化或通过常规冷冻-解冻方法裂解。无外源的 DNA/RNA 可通过用 DNA 酶 /RNA 酶降解除去。

[0198] 可冷冻含病毒细胞。病毒可从含病毒细胞和培养基中收获。在一个实施方案中，病毒同时从含病毒细胞和培养基中收获。在特定的实施方案中，例如如美国专利号 6, 146, 891 所描述，在同时裂解含病毒细胞和使否则干扰病毒纯化的细胞碎片的培养基澄清的条件下，将产生病毒的细胞和培养基进行交叉流微量过滤。

[0199] 如本文中使用的，术语“收获”指将含重组腺病毒的细胞从培养基中收集，并可包括将重组腺病毒从培养基中收集。这可通过常规方法例如差速离心法或层析手段实现。在该阶段，可储存所收获的细胞，或通过细胞裂解和纯化进一步加工分离重组病毒。对储存而言，所收获的细胞应在或大约生理 pH 下缓冲，并于 -70°C 冷冻。

[0200] 病毒也可分别从含病毒的细胞和培养基中收获。含病毒的细胞可分别从培养基中，通过常规方法例如差速离心法收集。所收获的细胞可冷冻储存，或通过细胞裂解进一步加工以释放病毒。病毒可从培养基中通过层析手段收获。无外源酶 (Exogenase) 的 DNA/RNA 可通过用 DNA 酶 /RNA 酶，例如 BENZONASE (American International Chemicals, Inc.) 降解除去。

[0201] 可进一步进行病毒收获，以通过例如超滤或切向流过滤的方法浓缩病毒，例如美国专利号 6, 146, 891 ;6, 544, 769 和 6, 783, 983 描述。

[0202] 如本文中使用的，术语“回收”指从裂解的产生者细胞并任选从培养基的上清液中

分离基本上纯的重组病毒颗粒群体。在本发明的细胞培养物中产生的病毒颗粒可通过本领域中通常已知的任何方法分离和纯化。可采用常规纯化技术例如层析或差别密度梯度离心法。例如病毒颗粒可通过以下方法纯化：氯化铯梯度纯化、柱或分批层析、二乙基氨基乙基 (DEAE) 层析 (Haruna 等 *Virology*13:264-267(1961); Klemperer 等, *Virology*9:536-545(1959); Philipson *Virology*10:459-465(1960))、羟磷灰石层析 (美国专利申请公布号 US2002/0064860) 和使用其他树脂例如均匀交联多糖的层析, 它包括软凝胶 (例如琼脂糖)、基于合成聚合物的大孔聚合物, 它包括具有大“全孔 (throughpores)”、“触手”吸附剂的灌注层析树脂, 它具有为更快地与蛋白相互作用而设计的触手 (例如 *fractogel*) 和基于刚性外壳的软凝胶的材料, 它利用软凝胶的高容量和复合材料的刚性 (例如 *Ceramic HyperD[®] F*) (Boschetti, *Chromatogr.* 658:207(1994); Rodriguez, *JChromatogr.* 699:47-61(1997))。在本发明优选的实施中, 病毒通过柱层析纯化, 基本上按照 Huyghe 等 (1995) *Human Gene Therapy*6:1403-1416 的方法, 如 1998 年 11 月 17 日颁布的 Shabram 等美国专利 5,837,520 所描述, 其整个内容通过引用结合到本文中。

[0203] 产生病毒的产生 rAd 的细胞系可在本领域已知的任何合适的容器中培养。例如, 可在生物发生器或生物反应器中使细胞生长或培养感染的细胞。一般而言, “生物发生器”或“生物反应器”指培养罐, 通常由不锈钢或玻璃制成, 体积为 0.5 升或更大, 包括搅拌系统、注射 CO₂ 气流的装置和充氧装置。通常, 装备有测量生物发生器内部参数, 例如 pH、所裂解的氧、温度、罐压力或培养物的某些物理化学参数 (例如葡萄糖或谷氨酰胺的消耗或乳酸盐和铵离子的产生) 的探头。pH、氧和温度探头与永久调节这些参数的生物处理器相连接。在其他实施方案中, 容器为旋转烧瓶、滚瓶、摇瓶或具有提供机械搅拌的搅拌棒的烧瓶。在另一个实施方案中, 容器为 WAVE 生物反应器 (WAVE Biotech, Bridgewater, NJ, U.S.A.)。

[0204] 重组腺病毒可在本发明的产生 rAd 的细胞系中繁殖。病毒可通过以下方法产生：培养细胞；任选向细胞中加入新鲜的生长培养基；用病毒接种细胞；温育所接种的细胞；任选向所接种的细胞中加入新鲜的生长培养基；并且任选从细胞和培养基中收获病毒。通常, 如 Shabram 等 *Human Gene Therapy*8:453-465(1997) 所描述, 当通过常规方法例如高效液相色谱法, 使用 Resource Q 柱测定, 病毒颗粒的浓度开始达到峰值时, 进行收获。

[0205] 也可分离和纯化由生长在本发明产生 rAd 的细胞系中的重组腺病毒产生的蛋白 (例如包含 E1A 和 E1B 编码区的缺失及包含异源核苷酸序列的腺病毒, 或包含 E1A、E1B 和 E2B 聚合酶编码区的缺失及包含异源核苷酸序列的腺病毒)。蛋白、多肽和肽可通过标准方法纯化, 包括但不限于盐或醇沉淀、亲和、制备型圆盘凝胶电泳、等电点聚焦、高压液相层析 (HPLC)、反相 HPLC、凝胶过滤、阳离子和阴离子交换和分配色谱及逆流分布。此类纯化方法在本领域中是众所周知的, 并且在例如 “Guide to Protein Purification (蛋白质纯化指南)” . *Methods in Enzymology* Vol.182, M. Deutscher, Ed., 1990, Academic Press, New York, NY 中公开。

[0206] 5.5 重组腺病毒的用途

[0207] 本发明的重组腺病毒可在体外用于表达目标蛋白、多肽和肽。本发明的重组腺病毒也可用于基因疗法。基因疗法的综述可参见 Goldspiel 等, 1993, *Clinical Pharmacy*12:488-505; Wu 和 Wu, 1991, *Biotherapy*3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, *Science*260:926-932(1993); 及 Morgan 和 Anderson,

1993, Ann. Rev. Biochem. 62 :191-217 ;1993 年 5 月, TIBTECH11 (5) :155-215。

[0208] 重组腺病毒可用于体内或离体基因疗法。对体内基因疗法而言, 直接将重组腺病毒给予受试者。对离体基因疗法而言, 细胞在体外用重组腺病毒感染, 然后将感染的细胞移植给受试者。在具体的实施方案中, 直接体内给予重组腺病毒, 其中目标蛋白被表达。

[0209] 在另一个实施方案中, 细胞用重组腺病毒感染, 并且将所得的重组细胞给予受试者。所得的重组细胞可通过本领域已知的各种方法释放给受试者。重组血细胞(例如造血干细胞或祖细胞)优选静脉内给予。预计使用的细胞量取决于所期望的效果、患者的状态等, 并且可由本领域技术人员确定。按照本发明, 任何可用重组腺病毒感染的细胞均可用于基因疗法。非限定性实例包括上皮细胞(例如呼吸上皮细胞)、内皮细胞、角质细胞、成纤维细胞、肌细胞、肝细胞、血细胞(例如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性白细胞、嗜酸性细胞、巨核细胞、粒细胞)及各种干细胞或祖细胞(特别是造血干细胞或祖细胞, 例如从骨髓、脐带血、外周血、胎儿肝脏等获得的那些)。在优选的实施方案中, 用于基因疗法的细胞是受试者自体固有的。在重组细胞用于基因疗法的实施方案中, 由重组腺病毒的基因组编码的蛋白通过细胞或其后代表达, 然后体内给予重组细胞以产生治疗作用。

[0210] 本发明的重组腺病毒可用于使受试者免疫。例如, 重组腺病毒可用于对重组腺病毒表达的异源抗原产生抗体。用于使受试者免疫和免疫方案的重组腺病毒的量将由本领域熟练的医生确定, 并且将参考受试者的免疫反应和抗体滴度给予。

[0211] 通过用重组腺病毒免疫, 对抗原产生的抗体可用于诊断性免疫测定、被动免疫疗法和抗独特型抗体的产生。所产生的抗体可通过本领域已知的标准技术分离(例如免疫亲和层析、离心、沉淀等), 并用于诊断性免疫测定。抗体也可用于监视治疗和 / 或疾病的发展。任何本领域已知的免疫测定系统均可用于该目的, 这些系统包括但不限于竞争性和非竞争性测定系统, 这些系统使用例如放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“三明治”免疫测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体固定测定、免疫放射测定、荧光免疫测定、蛋白 A 免疫测定和免疫电泳测定的技术, 仅例举一些。

[0212] 本发明的重组体可用于产生用于被动免疫疗法的抗体, 其中受试者的短期保护通过给予直接抗异源抗原的预形成抗体来实现。由本发明的重组腺病毒产生的抗体也可用于抗独特型抗体的产生。为了产生结合最初抗原的抗体亚种群, 然后抗独特型抗体又可用于免疫(Jerne, 1974, Ann. Immunol. (Paris) 125c :373 ;Jerne 等, 1982, EMBOJ. 1 :234)。

[0213] 在某些实施方案中, 通过用重组腺病毒免疫产生的抗体在给予受试者之前进行修饰。例如抗体可人源化和 / 或亲合力成熟。

[0214] 5.6 组合物和给予重组腺病毒的方法

[0215] 本发明包括组合物, 该组合物包含由本发明的方法产生的重组腺病毒(优选复制缺陷型重组腺病毒)。在优选的实施方案中, 组合物是适用于给予受试者的药用组合物。

[0216] 本发明的药用组合物包含有效量的重组腺病毒及药学上可接受的载体。在具体的实施方案中, 术语“药学上可接受的”指由联邦或州政府的管理机构批准, 或在美国药典或在其他普遍承认的用于动物, 更特别是人的药典中列出。术语“载体”指与药用组合物一起给予的稀释剂、助剂、赋形剂或溶媒。生理盐水溶液和水性葡萄糖及甘油溶液也可用作液体载体, 特别是对注射溶液而言。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石粉、氯化钠、干脱脂乳、甘油、丙

二醇、水、乙醇等。这些组合物可采取溶液剂、混悬剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、散剂、缓释制剂等形式。这些组合物可配制成栓剂。口服制剂可包括标准载体例如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药物载体的实例在 E. W. Martin 的 "Remington's Pharmaceutical Sciences" 中有描述。此类组合物将含有有效量的重组腺病毒, 优选纯化形式的重组腺病毒, 及合适量的载体, 以向患者提供适当的给药形式。制剂应适合给予方式。

[0217] 在治疗特定疾病或病症中有效的本发明药用组合物的量将取决于疾病或病症的性质, 并可通过标准临床技术确定。另外, 可任选用体外试验帮助确定最佳剂量范围。用于制剂中的精确剂量也将取决于给予途径及疾病或病症的严重程度, 并应根据从业者的判断和每个患者的状况决定。有效剂量可从体外或动物模型试验系统得出的剂量-反应曲线推断。

[0218] 组合物的给药方法包括但不限于皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外及口服途径给予。本发明的药用组合物可通过任何适宜的途径给予, 例如通过输注或推注, 通过经上皮或粘膜内层(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收给予, 并可与其他生物活性药物一起给予。给予可以是全身的或局部的。另外, 可能需要将本发明的药用组合物通过任何合适的途径引入到肺部。例如通过使用吸入器或喷雾器, 并与雾化剂一起配制, 可进行肺部给药。

[0219] 在具体的实施方案中, 可能需要将本发明的药用组合物局部给予到有治疗需要的区域; 例如不是为了限制, 这可通过手术期间局部注入、局部应用实现, 例如与手术后伤口包扎联合, 通过注射、通过导管、通过栓剂或通过植入剂, 所述植入剂是多孔的、无孔的或胶状材料包括膜, 例如 sialastic 膜或纤维。在一个实施方案中, 可通过直接注射在恶性肿瘤或瘤或肿瘤前组织的位置(或形成者位置)来给予。

[0220] 在另一个实施方案中, 药用组合物可以控释系统释放。在一个实施方案中, 可使用泵(参见 Langer, 同前; Sefton, 1987, CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald 等, 1980, Surgery 88:507; Saudek 等, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574)。在另一个实施方案中, 可使用聚合物材料(参见 Medical Applications of Controlled Release, Langer 和 Wise(eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen 和 Ball(eds.), Wiley, New York (1984); Ranger & Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; 也可参见 Levy 等, 1985, Science 228:190; During 等, 1989, Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard 等, 1989, J. Neurosurg. 71:105)。在另一个实施方案中, 控释系统可置于组合物的目标附近, 即肺部, 因此仅需要全身剂量的一部分(参见例如 Goodson, 1984, Medical Applications of Controlled Release(控释的医药应用), 同上, vol. 2, pp. 115-138)。其他控释系统在 Langer 的综述(1990, Science 249:1527-1533)中有讨论。

[0221] 在具体的实施方案中, 本发明的组合物是疫苗或免疫组合物, 该疫苗或免疫组合物包含由本发明的方法产生的重组腺病毒(优选复制缺陷型重组腺病毒)及合适的赋形剂。许多方法可用于引入疫苗组合物, 这些方法包括但不限于鼻内、气管内、口腔、皮内、肌内、腹膜内、静脉内及皮下途径。可优选将重组腺病毒疫苗组合物通过腺病毒感染的天然途径引入。

[0222] 5.7 质粒系统

[0223] 本发明提供产生细胞系的质粒系统,该细胞系用于产生重组腺病毒。在具体的实施方案中,本发明提供在独立的容器中产生细胞系(优选人细胞系)的质粒系统,该细胞系用于产生重组腺病毒,该系统包含:(a)第一表达盒,该表达盒包含与第一核酸分子有效连接的调节元件,所述第一核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷;及(b)第二表达盒,该表达盒在所述细胞系中包含调节元件,该调节元件与第二核酸分子有效连接,第二核酸分子包含编码腺病毒 E1B-55K 蛋白的核苷酸序列。在替代实施方案中,质粒系统包含单一表达盒,该表达盒包含核酸分子,该核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷;和编码腺病毒 E1B-55K 蛋白的核苷酸序列。

[0224] 在具体的实施方案中,本发明提供在独立的容器中产生细胞系(优选人细胞系)的质粒系统,该细胞系用于产生重组腺病毒,该质粒系统包含:(a)第一表达盒,该表达盒包含与第一核酸分子有效连接的调节元件,所述第一核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷;(b)第二表达盒,该表达盒包含与第二核酸分子有效连接的调节元件,第二核酸分子包含编码腺病毒 E2B 聚合酶的核苷酸序列;及(c)第三表达盒,该表达盒包含与第三核酸分子有效连接的调节元件,第三核酸分子包含编码腺病毒 E1B-55K 蛋白的核苷酸序列。在替代实施方案中,质粒系统包含包含核酸分子的单一表达盒,该核酸分子包含(i)编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷,(ii)编码腺病毒 E1B-55K 蛋白的核苷酸序列及(iii)编码腺病毒 E2B 聚合酶的核苷酸序列。

[0225] 在另一个实施方案中,本发明提供在独立的容器中产生细胞系(优选人细胞系)的质粒系统,该细胞系用于产生重组腺病毒,该质粒系统包含:(a)第一表达盒,该表达盒包含与第一核酸分子有效连接的调节元件,所述第一核酸分子包含编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷;(b)第二表达盒,该表达盒包含与第二核酸分子有效连接的调节元件,该第二核酸分子包含编码腺病毒 E2B 聚合酶的核苷酸序列;及(c)第三表达盒,该表达盒包含与第三核酸分子有效连接的调节元件,该第三核酸分子包含编码腺病毒 E1B-55K 蛋白和腺病毒 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列。在替代实施方案中,质粒系统包含包含核酸分子的单一表达盒,该核酸分子包含(i)编码腺病毒 E1A 蛋白的核苷酸序列,所述腺病毒 E1A 蛋白与 p300 蛋白家族成员及 pRb 蛋白家族成员结合有缺陷,(ii)编码腺病毒 E1B-55K 和 E1B-19K 蛋白的核苷酸序列及(iii)编码腺病毒 E2B 聚合酶的核苷酸序列。

[0226] 在具体的实施方案中,由第一表达盒编码的 E1A 蛋白包含:(a)第一缺失,该缺失对应于:(i)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101)及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 4-25(d/1101);或(ii)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 36-49 及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 36-49;及(b)第二缺失,该缺失对应于:(i)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107)及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 111-123(d/1107);或(ii)E1A289R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108)及 E1A243R 蛋白的氨基酸残基 124-127(d/1108)。

[0227] 6. 实施例

[0228] 以下实施例仅是说明性的,并无意限制本文中所描述的本发明范围。

[0229] 实施例 1:产生 E1A 和 E1b 补充细胞系及该细胞系在产生重组腺病毒中的用途

[0230] 该实施例证明 E1A 和 E1b 补充细胞系在产生高滴度复制缺陷型、不依赖辅助病毒的重组病毒中的用途。

[0231] I. 材料和方法

[0232] 细胞培养

[0233] 293(AT CC#CRL-1573)、A549(ATCC#CCL-185) 和 HeLa(ATCC#CCL-2) 细胞从美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, VA) 获得。细胞系在补充 10% (v/v) 胎牛血清(JRH Biosciences, Lenexa, KS)、1% (v/v) 抗生素-抗真菌剂溶液(Cellgro, Kansas, MO) 及 1mM 丙酮酸钠(BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD) 的 Dulbecco 氏改良 Eagle 培养基(DMEM) 中培养。

[0234] 质粒

[0235] 将 Ad5 野生型 E1A 基因和含有 E1Ad/1101、E1Ad/1107 和 E1Ad/01/07 突变的 E1A 序列通过标准方法,从 pXC1(McKinnon 等, (1982)Gene19 :33-42) 或 Ad-d/01/07(Howe 等, (1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA87 :5883-5887) 克隆到 pRc/RSV-Neo 的 RSV 启动子/SV40polyA 表达盒(Invitrogen, Carlsbad CA) 中,建立 pRc/RSV-E1A wt、pRc/RSV-E1Ad/1101、pRc/RSV-E1Ad/1107 和 pRc/RSV-E1Ad/01/07。通过用 PCR,将 E1B-55K 基因从 pXC1 克隆到 pcDNA3.1-hygro 的 CMV 启动子/BGH polyA 表达盒(Invitrogen Carlsbad, CA) 中,构建 pcDNA3.1-E1B-55K。p53con-luc 含有 4 个共有序列 p53 结合位点,及来自猿猴病毒 -40(SV40) 早期启动子的 TATA 盒(Ramachandra 等, (2001)Nat. Biotechnol. 19 :1035-1041),该 TATA 盒在 pGL3-basic 中位于萤光素酶基因的上游(Promega, Madison, WI)。pE2F-luc 含有 E2F 结合位点的 4 个拷贝,该 E2F 结合位点来自腺病毒早期区 2 启动子和 pGL3-basic 中萤光素酶基因的 SV40TATA 盒上游。

[0236] 病毒构建体

[0237] rAd- β -gal 和 rAd-GFP 是表达盒插入 E1- 缺失的 E1/E3 缺失腺病毒载体,并且在组成活性 CMV 立即早期启动子的控制下,它含有 β -半乳糖苷酶(β -gal) 基因或绿色荧光蛋白(GFP) 基因(Cheney 等, (1998)Cancer Res. 58 :2331-2334;Wills 等, (1994)Hum. Gene Ther. 5 :1079-1088)。p53 报道基因 rAd-PRE-GFP 在 E3- 缺失中含有表达盒,其中 p53- 效应元件(Ramachandra 等, (2001)Nat. Biotechnol. 19 :1035-1041) 调节 GFP 的表达。Ad5-d/309(Jones 和 Shenk, (1979)Proc. Natl. Acad. Sci. 76 :3665-3669) 用作野生型控制病毒。先前已描述了不产生 E1B-19K 蛋白的基于 Ad5-d/309 的突变型病毒 E1B/19K-(Marcellus 等, (1996)J. Virol. 70 :6207-6215),及在 E1A 区具有大的缺失的 NT1010(Whyte 等, (1989)Cell56 :67-75)。d/1520(Barker 和 Berk, (1987)Virology156 :107-121) 是嵌合腺病毒(Ad2 和 Ad5-d/309),在 E1B 编码区(Ad5 协调 2496-3233) 含有缺失,及终止密码子在 E1B-55K 的第三密码子。通过由 Eco/VI 和 Bg/II 消化,除去质粒 pXC1 中的 E1B 编码区,Klenow 补平及平端连接产生 pXC1-E1B-,构建 Ad-E1B- 病毒。含突变 E1B 区的 Ad 序列从 pXC1-E1B- 转移到更大的转移质粒 pTG9530(Transgene S. A, Strasbourg),产生 pTG9530-E1B-。通过 pTG9530-E1B- 和病毒质粒 pTG4213-Ad5-d/309 的转化,用大肠杆

菌 (Ecoli) 株 BJ5183 (Chartier 等, (1996) J. Virol. 70 :4805-4810) 的同源重组产生感染性 Ad-E1B- 腺病毒 DNA。将所得 Ad-E1B⁻ 质粒分离并转染到 293 细胞中, 产生病毒。所有病毒均用先前描述的方法, 通过柱层析纯化 (Huyghe 等, (1995) Hum. Gene Ther. 6 :1403-1416)。颗粒浓度通过基于离子交换 HPLC 的方法 (RQ-HPLC) 评价, 该方法测定完整腺病毒颗粒相对于腺病毒内标的浓度 (Shabram 等, (1997) Hum. Gene Ther. 8 :453-465)。

[0238] 选择表达 E1Awt、E1A- 突变型蛋白和 E1B-55K 的 A549 细胞克隆

[0239] 为了选择表达 E1Awt 或 E1A- 突变型蛋白的克隆, 将质粒 pRc/RSV-E1Awt、pRc/RSV-E1A1101、pRc/RSV-E1A1107 和 pRc/RSV-E1A01/07 用 Superfect 试剂 (Qiagen, Valencia CA) 转染到 A549 细胞中。温育两天后, 在含 350 μ g/ml 新霉素 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的生长培养基中开始选择。将来自用 E1Awt 或 E1A- 突变型选择质粒转染的培养物的耐药集落经胰蛋白酶消化, 作为细胞库建立, 并在 96 孔板中稀释克隆。在含新霉素的培养基中的选择进行了三个多星期, 随后将来自各转染的 48 个独立克隆膨胀, 并筛选病毒产生潜力。用相同的方法, 不同之处在于 A549-E1Ad/01/07-4 细胞用 pcDNA3.1-E1B-55K 转染, 并用 350 μ g/ml 潮霉素 (Invivogen, San Diego, CA) 选择, 将基于 A549-E1Ad/01/07-4 的细胞系工程化, 表达 E1B-55K。

[0240] 产生补充 E1 的细胞系

[0241] 通过标准方法, 将含 E1Ad/01/07 突变的 Ad5E1A 序列由 Ad-d/01/07 (Howe 等, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 :5883-5887) 克隆到 pRc/RSV-E1A 的 RSV 启动子 / SV40polyA 表达盒中, 产生 pRc/RSV-E1Ad/01/07。参见图 2pRc/RSV-E1Ad/01/07 图谱。通过用 PCR, 将 E1B-55K 基因从 pXC1 (McKinnon 等, (1982) Gene 19 :33-42) 克隆到 pcDNA3.1-hygro (Invitrogen Carlsbad, CA) 的 CMV 启动子 / BGHpoly A 表达盒, 构建 pcDNA3.1-E1B-55K。参见图 3pcDNA3.1-E1B-55K 图谱。

[0242] 将质粒 pRc/RSV-E1A01/07 用 Superfect 试剂 (Qiagen, Valencia CA) 转染到 A549 细胞中。温育两天后, 在含 350 μ g/ml 新霉素 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的生长培养基中开始选择。将来自转染的培养物的耐药集落经胰蛋白酶消化, 作为细胞库建立, 并在 96 孔板中稀释克隆。在含新霉素的培养基中的选择进行了三个多星期, 随后将来自转染的 48 个独立克隆膨胀, 并筛选病毒产生潜力。将质粒 pcDNA3.1-E1B-55K 用 Superfect 试剂转染到转化的细胞系 A549-E1Ad/01/07-4 中。温育两天后, 在含潮霉素 (350 μ g/ml) (Invivogen, San Diego, Ca) 的生长培养基中开始选择。将来自转染培养物的耐药集落经胰蛋白酶消化, 作为细胞库建立, 并在 96 孔板中稀释克隆。在补充 10% (v/v) 胎牛血清 (JRH Biosciences, Lenexa, KS)、潮霉素 (200 μ g/ml) 和新霉素 (200 μ g/ml) 的 Dulbecco 氏改良 Eagle 培养基 (DMEM) 中的选择进行了三个多星期, 随后将来自转染的 48 个独立克隆膨胀, 并筛选病毒产生潜力。

[0243] 细胞克隆的筛选方法

[0244] 通过用 rAd-GFP (1×10^8 颗粒 /ml) 感染接种在 6 孔板上的细胞, 评价表达 E1Awt 或 E1A- 突变型蛋白的基于 A549 的克隆的病毒产生潜力。病毒复制效率通过检测蛋白绿色荧光强度和致细胞病变效应 (CPE) 估计。为了筛选通过用 pcDNA3.1-E1B-55K 转染建立的基于 E1A01/07-4 的克隆, 将细胞用 rAd-PRE-GFP (1×10^8 颗粒 /ml) 感染, 并以低 GFP 强度克隆, 建议减少 p53 活性, 并选择强的 CPE, 以进一步表征。

[0245] 通过测定每细胞基础上产生的颗粒数目,确定在所选择克隆中的病毒产生。对该试验而言,将细胞用 rAd 载体以 5×10^8 颗粒 /ml 感染,在感染的时间,使重复的板或烧瓶中的细胞经胰蛋白酶消化,并用 Coulter 计数器 (Beckman-Coulter, Miami, FL) 计数。在感染完成 (3-4 天) 的时间点,收集细胞和培养基,冷冻 / 解冻三次,并离心除去细胞碎片。澄清的细胞裂解产物中的颗粒浓度用阴离子交换高效液相层析法测定 (Shabram 等, (1997) Hum. Gene Ther. 453-465)。

[0246] 测定 E1A 蛋白水平的蛋白质印迹分析

[0247] 通过在裂解 A 缓冲液 (50mM Tris[pH8.0], 150mM NaCl, 0.5% [vol/vol] IGEPAL CA-630 [Sigma, St. Louis, MO] 和蛋白酶 - 抑制剂混合物 [Roche, Indianapolis, IN]) 中温育所标明的细胞,接着离心,制备全细胞蛋白裂解产物。裂解产物中的总蛋白浓度通过 Bio-Rad 蛋白测试 (Bio-Rad, Hercules, CA) 测定,并将 50 μ g 等分试样用采用梯度 (4% -12%) NUPAGE 凝胶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离。转移到 PVDF 膜 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 上后,用 E1A (M73, Calbiochem, La Jolla, CA) 或 α -肌动蛋白 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 特异性抗体进行蛋白质印迹检测。通过将膜与辣根过氧化物酶结合的抗小鼠免疫球蛋白 G 和 M (Roche, Indianapolis, IN) 一起温育,并通过增强的化学发光检测 (AmershamBioSciences, Piscataway, NJ), 确定结合模式。

[0248] 病毒 DNA 的分析

[0249] 从 6 孔板上用 rAd- β -gal (1×10^8 颗粒 /ml) 感染的细胞中,在指定的时间点,用改进的 Hirt 提取法 (Hirt, 1967) 分离小分子量 DNA。被感染的细胞通过刮除收获,并在 TNE 缓冲液 [500mM NaCl, 10mM Tris (7.5), 10mM EDTA, 1% SDS, 0.5mg/ml 蛋白酶 K (Sigma), 0.25mg/ml 链霉菌蛋白酶 E (Sigma)] 中裂解。经过冷冻 - 解冻循环后,将裂解产物通过离心澄清,用苯酚:氯仿混合物 (Sigma, St. Louis, MI) 提取并用乙醇沉淀。将核酸颗粒悬浮在 60 μ l 含 TE 的 RNA 酶 (Ambion, Austin, TX) 中,其后用 XhoI 限制 12 μ l 样品,在 1% 琼脂糖凝胶上分离。DNA 限制图谱通过溴化乙锭染色来显示。

[0250] 用 FITC-VAD-FMK 进行细胞凋亡的流式细胞计数测定

[0251] 将 E1Awt、E1A- 突变型克隆和 A549 控制细胞以 150,000 细胞 / 孔接种在 6 孔板上,并在 24 小时用 rAd- β -gal (1×10^8 颗粒 /ml) 感染。感染后 20 小时,将 5 μ M CaspACE FITCTM-VAD-FMK (Promega, Madison, WI) 直接加入到培养基中。于 20°C 温育 20 分钟后,将细胞用胰蛋白酶消化,用 PBS 洗涤两次,并于 20°C,用 0.5% 甲醛固定 30 分钟。流式细胞分析用 FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) 进行,并在 530nm 处测定荧光 (488nm 的激发)。

[0252] 荧光素酶测试

[0253] 按照制造商说明书,将使用 Superfect (Qiagen, Valencia, CA) 用报道质粒转染的细胞裂解产物与重组的荧光素酶底物 (Promega, Madison, WI) 混合。各裂解产物的荧光素酶活性用 Analyst AD (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 测定。

[0254] E1B-55K 的免疫沉淀

[0255] 将按上述制备的蛋白裂解产物 (1mg 总蛋白),用蛋白 -G 琼脂糖凝胶珠 (Amersham BioSciences, Piscataway, NJ) 预澄清,并与 5 μ g E1B-55K 特异性小鼠单克隆抗体

2A6 (Sarnow 等, (1982) Cell 128 :387-394) 一起温育。将 E1B-55K- 免疫球蛋白复合物在蛋白 -G 琼脂糖凝胶上纯化,用裂解缓冲液充分洗涤,并用含还原剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的 SDS-PAGE 样品缓冲液温育。将样品在 SDS-PAGE 凝胶上分离,并将 E1B-55K 蛋白用上面描述的蛋白质印迹法,用 2A6 单克隆抗体检测。

[0256] 293 或 SL0003 中 E1- 缺失的 rAd- 载体的连续传代

[0257] 首先将用于连续传代的 rAd- β -gal 病毒噬斑纯化三次,用生长在细胞工厂 (NuncA/S, Kamstrupvej, Denmark) 中的 SL0003 细胞繁殖并经柱层析纯化。用下面描述的 21 天生物测试检测,所得病毒原种 rAd- β -gal (p0) 无可复制腺病毒 (RCA)。对第一连续传代而言,含 293 或 SL0003 的细胞工厂用纯化的 rAd- β -gal (p0) 以 5×10^8 颗粒 /ml 感染。用在感染完成时制备的细胞裂解产物,感染接种在细胞工厂中的第二组新鲜 293 或 SL0003 细胞。类似地,制备用于感染的 2-5 代细胞裂解产物,并在第 5 代,通过柱层析纯化病毒。

[0258] RCA 测试

[0259] 使用在 293 或 SL0003 繁殖后纯化的 rAd- β -gal 的 1×10^{11} 总颗粒,用基于先前描述方案的改进生物测试法 (Zhu 等, (1999) Hum. Gene Ther. 10 :113-121) 检测 RCA。对最初的 RCA 生物测试感染而言,将 10-T225 烧瓶各自用 A549 细胞的 1×10^7 细胞接种并感染,24 小时后,每烧瓶用由 293 或 SL0003 细胞制备的 rAd- β -gal 的 1×10^{10} 颗粒接种并感染。三天后,用由感染的 A549 细胞制备的细胞裂解产物感染第二组烧瓶,该第二组烧瓶已用 3×10^6 A549 细胞接种。对于第二次感染,将 rAd- β -gal 及来自第一次感染的对照裂解产物分成一半,并用于感染 5-T225 烧瓶组。最初感染后的第 12 天,制备来自第二次感染的裂解产物。将各裂解产物分成一半,并用于感染用 3×10^6 A549 细胞接种的 5 个烧瓶,并再温育 9 天。对照样品包括 Ad5 野生型 (每 10 个烧瓶 6 种病毒颗粒), rAd- β -gal 的 1×10^{11} 病毒颗粒掺加 (spiked) Ad5 野生型的 6 种病毒颗粒。掺加的和野生型腺病毒对照均要求在 21 天的感染期间产生 CPE。如果在生物测试期间,在 rAd- β -gal 样品中观察到 CPE,将低分子量 DNA 从大约 1×10^7 细胞中分离,用于病毒 DNA 分析。

[0260] II 结果

[0261] 产生水平

[0262] 在所选择细胞系中的病毒产生潜力通过用可复制病毒 Ad5-d/309 感染评价。A549 细胞和 HeLa 细胞分别产生 558,000 和 444,000 颗粒 / 细胞的病毒。测试的其他细胞系包括 DLD-1、U87MG、MDA468 和 IGROV-1,所有这些均产生少于 120,000 颗粒 / 细胞。293 细胞以 139,000 颗粒 / 细胞产生 Ad5-d/309 病毒,和以 127,000 颗粒 / 细胞产生 rAd- β -gal 病毒。HeLa 和 A549 细胞系中的 Ad5-d/309 产生能力提示,这些人类肿瘤细胞系是用于 E1- 补充细胞系开发的最好候选物。

[0263] A549 细胞中 E1A 的补充

[0264] 已报道野生型 E1A 的表达降低 A549 细胞的增殖能力,并导致血清耗尽条件下的细胞凋亡 (Hubberstey 等, (2002) Cancer Gene Ther. 9 :321-329)。为了限制 A549 细胞中与 E1A 表达相关的毒性,测试了几种 E1A 突变体的稳定表达和用于 rAd 载体产生的 E1 功能补充。所使用的 E1A 突变体 E1Ad/1101、E1Ad/1107 和 E1Ad/01/07 在 E1A 蛋白区有细胞周期发展和细胞凋亡的诱导所需的缺失 (图 1),但是不包含刺激其他早期病毒启动子所需的 E1A 反向激活域。具体地说, E1Ad/1101 和 E1Ad/1107 突变体分别与细胞蛋白 p300/CBP 和

pRb 的结合是有缺陷的,而 E1Ad/01/07 突变体与两种细胞蛋白结合是有缺陷的。

[0265] 在 RSV 启动子的控制下,用表达 E1Ad/1101、E1Ad/1107、E1Ad/01/07 或野生型 E1A 的质粒转染 A549 细胞。质粒也含有作为可选择标记的新霉素抗性基因。将来自 G418 抗性细胞库的各克隆分离,并通过 rAd-GFP 感染筛选。48 个克隆中 GFP 表达的水平用视力检查,然后选择五个克隆用于进一步表征。如本文描述,通过每细胞产生 rAd-GFP 颗粒的定量,确定各克隆 (A549E1Ad/1101-1 至 A549E1Ad/1101-5、A549E1Ad/1107-1 至 A549E1Ad/1107-5、A549E1Ad/01/07-1 至 A549E1Ad/01/07-5、A549E1Awt-1 至 A549E1Awt-5) 的产生能力。产生测试的结果 (见表 2) 显示表达 E1Awt 或 E1Ad/1101 的细胞克隆具有低的病毒生产力。从 E1Ad/1107 分离的细胞克隆通常给出差的产率,细胞克隆 E1Ad/1107-1 除外,它具有超过 20,000 颗粒 / 细胞的产率。相反,从 E1Ad/01/07 转染库分离的细胞克隆具有最高的产率,因为所测试的五个细胞克隆中四个的颗粒浓度在 20,000-30,000 / 细胞之间。

[0266] 表 2 :所指定细胞克隆的 rAd-GFP 产率 (病毒颗粒 / 细胞)

[0267]

细胞克隆#	克隆和 E1A 状态			
	E1Ad/1101	E1Ad/1107	E1Ad/01/07	E1Awt
克隆#1	2700	21000	7800	1800
克隆#2	2200	800	25000	400
克隆#3	800	4200	23000	0
克隆#4	3600	1200	32000	800
克隆#5	1200	1200	20000	700

[0268] 在表达 E1A 的 A549 克隆中测定 E1A 蛋白水平

[0269] 通过蛋白质印迹分析,使用在 E1A 的 C- 端区识别表位的 E1A- 特异性单克隆抗体 (Harlow 等, (1985) J. Virol. 55 :533-546), 测定所选择的克隆 (E1Ad/1101-1 至 E1Ad/1101-5、E1Ad/1107-1 至 E1Ad/1107-5、E1Ad/01/07-1 至 E1Ad/01/07-5、E1Awt-1 至 E1Awt-5) 中的 E1A 蛋白水平。该表位不受 d/1101 和 d/1107 突变的影响。蛋白质印迹分析显示 E1A 蛋白的表达水平在克隆之间变化很大。另外,所表达的野生型或突变型 E1A 蛋白的量与产率不相关。所有表达野生型 E1A 或 E1Ad/1101 突变体的细胞克隆是无效的产生者,不管所表达的 E1A 蛋白的量。在 E1Ad/1107 细胞克隆中,仅 E1Ad/1107-1 是有效的产生者,尽管表达几乎不可检测水平的 E1A 蛋白。E1Ad/1107-1 细胞克隆未进一步分析,因为它生长差,生长差在产生细胞系中是不期望的特征。E1Ad/01/07 细胞克隆也显示出各种水平的蛋白,与具有相对高水平的 E1Ad/01/07-5 相比,最好的产生者细胞克隆 E1Ad/01/07-4 表达更低水平。

[0270] 分析感染后的病毒复制和细胞凋亡

[0271] 选择表达类似水平的 E1A 蛋白的 E1Awt-2 和 E1Ad/01/07-5 细胞克隆,以进一步表征不同产率的生物学基础。因为 E1Ad/01/07-4 细胞克隆比任何其他细胞系更有效地产生病毒颗粒 (见表 2), 因此它也被选择用于进一步表征。

[0272] 通过所感染细胞中低分子量 DNA 的限制酶消化,分析 A549-E1Awt-2 和两个

A549-E1Ad/01/07 细胞克隆 (E1Ad/01/07-4 和 E1Ad/01/07-5) 支持 E1- 缺失的病毒 rAd- β -gal 病毒复制的能力。限制酶切分析显示从各种细胞系分离的病毒 DNA 的数量和质量有差别。来自 E1Ad/01/07 细胞克隆的 rAd- β -gal DNA 的质量与 293 细胞分离的病毒 DNA 是相当的。从 E1Awt-2 克隆产生非常低的 rAd- β -gal 病毒 DNA 水平,被分离的 DNA 在琼脂糖凝胶上被 DNA 片段污染,提示在这些细胞中存在高水平的细胞凋亡。

[0273] 从克隆 E1Awt-2 产生的病毒 DNA 分析提示细胞凋亡可能正在发生,潜在地限制了产生病毒的量。通过流式细胞计,用 FITC-VAD-FMK 肽测定胱冬酶活性,作为感染后凋亡细胞死亡的指标。如表 3 所示,几乎一半的 E1Awt-2 细胞在感染 20 小时后凋亡,而在 E1Ad/01/07-4 和 E1Ad/01/07-5 细胞克隆中未诱导细胞凋亡。这些结果一起提示 E1Awt-2 细胞的病毒感染诱导过早的细胞凋亡,限制了病毒 DNA 复制和后续的病毒颗粒产生。

[0274] 表 3 :用 rAd- β -gal 感染 20 小时后细胞凋亡的百分比

[0275]

试验	克隆			对照
	E1Awt-2	E1Ad/01/07-4	E1Ad/01/07-5	
试验 1	49%	4%	6%	1%
试验 2	49%	6%	7%	2%

[0276] E1Awt 和 E1Ad/01/07 细胞克隆中 E2F 和 p53 转录因子的状态

[0277] E1A 诱导的细胞凋亡显示与 pRb 和 p300/CBP 的结合有关,该结合导致 E2F 和 p53 转录因子的激活 (Querido 等, (1997) J. Virol. 71 :3526-3533)。为了测定所选择的产生细胞克隆中 E2F 和 p53 活性水平,构建报道质粒,其中在共有序列 p53 启动子或 E2F 启动子的控制下放置萤光素酶基因。发现在 E1Awt-2 克隆中提高了 p53 和 E2F 启动子活性 (见表 4)。相反,E1Ad/01/07-4 和 E1Ad/01/07-5 克隆中的 p53 和 E2F 活性水平与对照 A549 细胞类似。

[0278] 表 4 :所指定细胞克隆中的 p53 和 E2F 转录因子的激活 (相对荧光单位 $\times 1e+6$)

[0279]

报道质粒	克隆			对照
	E1Awt-2	E1Ad/01/07-4	E1Ad/01/07-5	
p53-萤光素酶	3.7+/-0.22	0.81+/-0.14	0.53+/-0.06	1.29+/-0.22
E2F-萤光素酶	4.7+/-0.19	0.53+/-0.17	0.32+/-0.006	1.36+/-0.18

[0280] E1Ad/01/07-4 中 E1B 的补充

[0281] 虽然, E1Ad/01/07-4 克隆能够小规模地产生复制缺陷型腺病毒,但是推断通过用 E1B 补充,可进一步提高产率。为了研究 E1B 补充后 E1Ad/01/07-4 细胞的产率,以两个不同的浓度 (1×10^8 颗粒 /ml 和 5×10^8 颗粒 /ml),用系列 E1 腺病毒突变体感染 E1Ad/01/07-4 细胞,以分别或一起表达 E1B-19K 和 E1B-55K。发现产生非功能性截短的 E1A 和野生型 E1B (Ad-NT1010) 的病毒感染 E1Ad/01/07-4 细胞,产生的病毒与 Ad5-d/309 相当 (见表 5)。相反,表达 E1A 但是不表达 E1B 的突变型病毒 (AdE1B) 在两种浓度的受试病毒感染后,仅产生约 55,000 颗粒 / 细胞。这些结果提示 E1B 的补充增加了产率。为了进一步

定义 E1B 区的贡献,测试单独表达 E1B-19K(d/1520) 或者 E1B-55K(AdE1B-19K) 的病毒在 E1Ad/01/07-4 细胞上的生长。表达 E1B-19K 的病毒生产力比 Ad5-d/309 的低得多,而表达 E1B-55K 的病毒产生的水平比 Ad5-d/309 高。

[0282] 表 5:用各种 E1- 突变型腺病毒(指定的 E1A、E1B-19K、E1B-55K 状态)感染后, E1Ad/01/07-4 细胞的病毒产率

[0283]

		病毒				
		d/309	d/1520	E1B19K	E1B	NT1010
状态	E1A	+	+	+	+	-
	E1B-55K	+	-	+	-	+
	E1B-19K	+	+	-	-	+
病毒 产率	产率(1e+8 p/ml)	155000	86000	231000	55000	177000
	产率(5e+8 p/ml)	242000	84000	306000	58000	261000

[0284] 这些结果提示 E1B-55K 基因的加入增加了 E1Ad/01/07-4 细胞系中病毒的产率。仅使用 E1B-55K 编码序列还可减少 rAd 产生期间产生 RCA 的可能性。使用选择质粒,其中 E1B-55K 基因在 CMV 启动子(pcDNA-55K)的控制下克隆,以在 E1Ad/01/07-4 细胞中补充 E1B-55K 功能。pcDNA-55K 中表达盒的序列通过 DNA 测序验证,完整 E1B-55K 蛋白的表达通过 HeLa 细胞中的瞬时转染证明。

[0285] 将 A549E1Ad/01/07-4 细胞用 pcDNA-55K 转染,其也带有潮霉素抗性标记,通过稀释克隆,从耐药库中选择单一的克隆(A549E1Ad/01/07-4-E1B-55K-1 至 A549E1Ad/01/07-4-E1B-55K-6)。用免疫荧光试验筛选克隆的 E1B-55K 功能,该试验测定在称为 rAd-PRE-GFP 的复制缺陷型腺病毒中带有的、控制 GFP 表达的 p53 反应启动子(PRE)的抑制。在表达野生型 p53 的细胞中,例如亲代 A549E1Ad/01/07-4 细胞系,以高水平表达来自 rAd-PRE-GFP 的 GFP。相反,来自 rAd-PRE-GFP 的 GFP 表达在 293 细胞(对照)和 A549E1Ad/01/07-4-E1B-55K 细胞中低,它表达 E1B-55K 和野生型 p53。用该试验选择包括 A549E1Ad/01/07-4-E1B-55K-2 的几种克隆,并进一步表征 E1B-55K 表达和病毒产生。

[0286] 通过免疫沉淀法,用 E1B-55K 特异性单克隆抗体 2A6,在所有选择的克隆(A549E1Ad/01/07-4-E1B-55K-1 至 A549E1Ad/01/07-4-E1B-55K-6)的细胞裂解产物中检测了类似水平的 E1B-55K 蛋白,并且基于其生长特性和病毒产生,选择以后称为 SL0003 的一个克隆 A549E1Ad/01/07-4-E1B-55K-2 用于进一步的表征。

[0287] 细胞系的稳定性对药物的规模化生产是重要的,因此在 20 代细胞培养期间,评价 SL0003 细胞的病毒生长能力。表 6 显示在第 5、15 和 20 代测试的 SL0003 细胞,以平均约 96,000 颗粒/细胞产生 rAd- β -gal 病毒。

[0288] 表 6:由 SL0003 细胞产生的 rAd- β -gal

[0289]

SL0003 代数	颗粒数目(+/- 标准偏差)
5	88800+/-2800
15	105600+/-3700

20

93021+/-2800

[0290] SL0003 细胞中产生病毒的 RCA 测试

[0291] 为了测试 rAd 载体产生期间的 RCA 产生,用无 RCA 的病毒批次作为初始接种物,使 rAd- β -gal 在生长在细胞工厂中的 SL0003 细胞或 293 细胞中连续传代,该细胞工厂含约 1×10^9 细胞。用于检测 RCA 的生物试验具有每 rAd- β -gal 的 1.7×10^{10} 颗粒 1 野生型病毒颗粒的敏感性水平(见上)。连续传代五代后,由 293 细胞纯化的 rAd- β -gal 病毒中检测出 RCA,但是由 SL0003 细胞纯化的 rAd- β -gal 中未检测出 RCA。PCR 分析证实了在 293 细胞的 RCA 试验中检测到的病毒来自重组,而不是来自 Ad5 的污染。

[0292] III. 讨论

[0293] 如本文中所举例说明,建立了人细胞系(称为“SL0003”),该细胞系插入了独立的表达盒,即第一表达盒,该表达盒含包含 d/01/07 缺失的腺病毒 E1A 基因;和第二表达盒,该表达盒含腺病毒 E1B-55K 基因,该基因向 A549 肿瘤细胞中的补体腺病毒复制提供所选择的病毒和细胞功能。SL0003 细胞系中 E1 补充的优化用顺序加入独立的 E1A 和 E1B 表达盒实现。在 SL0003 细胞系中,组成型表达 E1Ad/01/07 突变型基因,以提供 E1A 功能并减少与野生型 E1A 相关的细胞毒性。SL0003 细胞系中的 E1B 功能通过 E1B-55K 基因的组成型表达提供;不包括 E1B-19K 基因。E1A 和 E1B 盒的分离、突变型 E1A 基因的使用及仅 E1B-55K 基因,排除了通过同源或非同源重组重新组成完整的 E1 区和随后产生 RCA 的可能性。虽然与 293 细胞中野生型 E1 腺病毒序列相比,SL0003 细胞系中用于补充的腺病毒序列被广泛地修饰,但是 SL0003 细胞系显示在与从 293 细胞系获得的那些相当的病毒产生水平产生 rAd 载体,且不产生可检测的 RCA。

[0294] 实施例 2:产生 E1A、E1b 和 E2b 补充细胞系及该细胞系在产生重组腺病毒中的用途

[0295] 该实施例证明 E1A、E1b 和 E2b 补充细胞系在产生高滴度复制缺陷型、不依赖辅助病毒的重组病毒中的用途。

[0296] I. 材料和方法

[0297] 组织培养

[0298] A549、CHO-K1、Saos2、HeLa 和 HepG2 细胞均购自 ATCC。C7 细胞 (Amalfitano 等 (1996)PNAS93:3352-3356) 由 J. Chamberlain, U. of Michigan 友情提供。人眼球筋膜眼成纤维细胞(称为 HOF 细胞)按 Perkins 等((2002)Arch. Ophthalmol. 120:941-9)中的描述分离。克隆 4 细胞的发育在上述实施例 1 中描述;该克隆称为克隆 E1A01/07-4i。A549、C7 和 HepG2 细胞保持在补充 10% 胎牛血清(FBS)的 Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基(DME)中。HeLa 细胞保持在补充 5% FBS 的 Eagle 氏极限必需培养基(MEM)中。CHO-K1 和 Saos2 细胞保持在补充 10% FBS 的 Hams F12/DME 培养基中。HOF 细胞保持在 DME+20% FBS 中。克隆 4 细胞保持在补充 350 μ g/ml G418(Geneticin, Invitrogen)的 DME+10% FBS 中。

[0299] Ad E2b Pol 表达细胞的分离

[0300] 用 CaPO4 转染,用 10 μ g 线性化质粒 pMGCMVE2bPol 转染克隆 4 细胞(Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(1998) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)。转染后,在补充 150 μ g/ml 潮霉素的 DME+10% 血清中选择细胞。该库经历了药物选择下的有限稀释克隆,并选择克隆 3D8。克隆 3D8 在补充 150 μ g/

ml 潮霉素和 350 μ g/ml G418 的 DME+10%血清中生长。

[0301] Ad E1b 表达细胞的分离

[0302] 15M15 衍生自上述克隆 3D8。如前用 CaPO_4 转染, 用 10 μ g 线性化 pVITRO2IRESpuroE1b(图 4) 转染 3D8 细胞。克隆 15 最初从用 0.2 μ g/ml 嘌呤霉素处理的转染库中分离。通过有限稀释分离和在补充 350 μ g/ml G418、150 μ g/ml 潮霉素和 0.2 μ g/ml 嘌呤霉素的 DME+10% FBS 中繁殖, 进一步从克隆 15 分离克隆 15M15。

[0303] 表达腺病毒功能的质粒构建体

[0304] 如 Shu 等, (1988) Virol. 165 :348-356 所描述, 用引物向剩余的 Ad5E2b 聚合酶编码序列中加入最初的三个上游氨基酸' MAL', 通过 PCR, 从质粒 pACN(Wills 等 (1995) Can. Gene Ther. 2 :191-197) 中分离腺病毒 E2b 聚合酶序列。引物也加入了限制位点, 使 PCR 片段被克隆到在 BamHI 限制位点中的 CMV 启动子下游的载体 pMG(InvivoGen, San Diego, CA)。所得的质粒命名为 pMGCMVE2Bpol(图 5)。驱动全长 E2b 聚合酶编码序列的 CMV 后面是 IRES 序列和用于选择的潮霉素抗性基因。

[0305] 将质粒 pIRESpuro2(得自 Clontech, Palo Alto, CA) 用 NdeI 和 BstBI 消化, 按照 Qiagen(Valencia, CA) 的 QIAEX II 凝胶提取试剂盒的方案, 从 1% TAE 琼脂糖凝胶中分离含氨苄西林和嘌呤霉素抗性基因的 4.7kb 片段。将质粒 pVITRO2(得自 InvivoGen, San Diego, CA) 用 NdeI 和 AccI 消化, 按上法, 从 1% TAE 琼脂糖凝胶中分离含人铁蛋白轻和重亚单位启动子及增强子的 3.9kb 片段。将两个片段连接在一起, 形成质粒 pVITRO2IRESpuro。将腺病毒 E1b 序列从腺病毒质粒 pTG4609(Transgene, FR) 中通过 PCR 分离, 并亚克隆到质粒 pCR-Blunt II TOP0(Invitrogen, Carlsbad, CA) 克隆载体中。从那里, 将 E1b 片段用 EcoRI 和 BamHI 消化掉, 用 Klenow 处理, 并平端克隆到 EcoRV 消化的 pVITRO2IRESpuro 中。这建立了质粒 pVITRO2IRESpuroE1b, 该质粒具有由人铁蛋白重亚单位启动子和 SV40 增强子驱动的 E1b 区, 以及用于细胞选择的嘌呤霉素抗性基因。E1b 序列的正确取向通过限制酶切消化图谱验证。

[0306] 病毒构建体

[0307] 先前已经描述了 GFCB 的构建 (Cheney 等, (1998) Can. Res. 58 :2331-2334)。简而言之, 它是 E1、pIX、E3 缺失的病毒, 该病毒表达来自人巨细胞病毒立即早期启动子/增强子的增强的绿色荧光蛋白 (eGFP, Clontech, Palo Alto, CA), 和来自 E1 缺失区的 Ad2TPLcDNA, 用 E1b/pIX 病毒 polyA 信号终止其信息。先前也描述了 CONG。它在类似于 GFCB 的 E1/E3 缺失的病毒主链中缺失的 E3 区中, 含有以 3' -5' 方向驱动 eGFP 的共有序列 p53 效应元件。病毒构建体 CGAB、42GC、46GC 和 2GCP 均使用从质粒 pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA) 分离的相同表达盒。该表达盒含有人 CMV 立即早期启动子/增强子、增强的绿色荧光蛋白基因和 SV40 早期 mRNA 聚腺苷酸化信号。对于 CGAB, 该表达盒代替了在 GFCB 中含有的表达盒。在病毒主链的 E3 缺失区, 42GC、46GC 和 2GCP 在 5' -3' 方向均含有它们的表达盒。42GC 和 2GCP 也是 E1a 和 E1b 缺失的, pIX 保持完整。46GC 是 E1 完整病毒, 并且是可复制的。如 Amalfitano 等, (1998) ((1996) PNAS 93 :3352-3356) 报道, 2GCP 病毒在 E2b 病毒的 DNA 聚合酶区也具有约 600bp 的缺失, 使得它在无外源性 E2b 聚合酶蛋白的情况下不可复制。

[0308] Western

[0309] 为了测定 E2b 聚合酶的表达水平,将克隆 3C4、3C9、3D8 和亲代克隆 4 及 A549 细胞接种到 10cm 皿中。将细胞温育,并使其生长 2 天,然后收获。将由 Bradford 试验 (Bio-Rad cat#500-0006) 测定的相等蛋白置于 4-12 % NuPAGE Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 上。将蛋白转移并阻塞过滤器,然后依次与 1:2,000 稀释的兔抗 E2b 聚合酶多克隆抗体 (由 Dr Padmanabhan, U.Kansas 提供)、1:2,000 稀释的山羊抗兔 IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 一起温育。将过滤器用 SuperSignal West Pico 化学发光试剂盒 (Pierce, Rockford, IL) 显影,并暴露于胶片。然后,将过滤器剥离 (stripped),并用 β -肌动蛋白 (Sigma, St. Louis, MO),以 1:10,000 的稀释度再探测,接着用 1:2,000 稀释度的羊抗小鼠 IgG-HRP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 探测。

[0310] 在测定腺病毒后期基因蛋白表达时,将 CHO、HELA、HepG2 和 15M15 细胞接种到 6 孔板中,并在第二天用 5×10^8 p/ml CGAB、42GC、2GCP、46GC 或 GFCB 病毒感染。转导后第 4 天将细胞收获,并用 Bradford 试验测定总蛋白含量。将相等的总蛋白装到 4-12 % NuPAGE Bis-Tris 凝胶上,并转移到 PVDF 过滤器上 (Millipore Corp, Bedford, MA)。将过滤器依次与 1:2,500 稀释度的兔抗血清腺病毒 5 型 (Access Biomedical, San Diego, CA)、1:2,000 稀释度的山羊抗兔 IgG-HRP 一起温育。然后将过滤器按上述方法处理。

[0311] 病毒生产力

[0312] 为了评价工程化细胞中的病毒生产力,将所选择的克隆接种到 10cm 皿中,并用 5×10^8 p/ml 2GCP 病毒感染。为了在感染的时间计数,将另外的对照板接种。将所感染的细胞在感染后 3-4 天收获,那时大多数细胞集拢在一起并离开板,表明病毒复制已经发生。病毒通过 3 次冷冻/解冻循环从细胞裂解产物中释放,并通过离心除去细胞碎片。然后将病毒纯化,并按照先前描述的 (Shabram 等 (1997) Hum. Gene Ther. 8:453-465) 通过柱层析定量。

[0313] 通过将总病毒颗粒除以感染时间的细胞数目,给出病毒颗粒/细胞比率作为对补充病毒生长中细胞生产力的量度,从而确定生产力。

[0314] Cytofluor/转基因表达

[0315] 将细胞接种到 6 孔板中,并返回到其培养箱中,直到它们达到 80-90 % 融合率。然后以 3ml/孔的总体积,将它们用一式三份的 5×10^8 p/ml 病毒感染。用 CytoFluor 系列 4000 多孔板阅读器 (PerSeptive Biosystems) 测定细胞的 GFP 转基因表达,并用 Hamamatsu 3CCD 模拟照相机和控制器照相。在各时间点,以一式三份孔的相对 Cytofluor 值的平均值,减去背景荧光并 $\pm$ 标准偏差,将 GFP 荧光作图。一周两次,将 0.5ml 新鲜培养基加入到所有细胞的每孔中。

[0316] E1b 补充

[0317] 将待分析 E1b 表达的克隆接种到 6 孔板中,并使其温育和生长,直到它们达到约 80-90 % 的融合率。在该时间点,将细胞用一式三份的 5×10^8 p/ml GFCB 或 CONG 病毒感染。然后所感染的细胞用 Hamamatsu 3CCD 模拟照相机和控制器照相,并在感染后 48 小时,用设置于 450nm 激发及 508nm 发射的 CytoFluor 系列 4000 多孔板阅读器 (PerSeptive Biosystems) 测定 GFP 荧光。以 CONG 荧光对 GFCB 衍生的荧光值的比率,将一式两份孔的平均值 $\pm$ 标准偏差作图。II.

[0318] 结果

[0319] E1a 补充细胞中加入 E2b 聚合酶

[0320] 克隆 4 细胞用表达 E2b 聚合酶的质粒 pMGCMVE2bPol 转染后,通过用潮霉素处理选择抗性细胞,并通过有限稀释纯化以单独的克隆分离。用细胞裂解产物的蛋白质印迹分析,选择特异性表达代表 E2b 聚合酶的 140kd 带的克隆。在图 7A 中,克隆 3C4、3C9 和 3D8 均显示 E2b Pol 所预期的带。该带在亲代克隆 #4 或在所有克隆均基于它的 A549 细胞中不存在。所有泳道均以由 Bradford 试验测定的相等总蛋白浓度加载,并通过 β -肌动蛋白检测验证。因为每泳道加载相等的总蛋白,所以聚合酶带的密度应反映其在该特定克隆中的表达水平。当比较特定克隆产生聚合酶缺失的病毒 2GCP 的能力时,所表达聚合酶的量 and 克隆的生产力之间正相关(图 7B)。因为未将克隆 4 工程化以表达 E2b 聚合酶,因此它不能支持聚合酶缺失的病毒的生长,并且无病毒回收。克隆 3D8 表达了最高量的聚合酶蛋白,并且也产生最多病毒颗粒/细胞。选择该克隆用于进一步分析,并用作引入和表达腺病毒 E1b 蛋白的亲代细胞系。

[0321] 向 3D8 中加入 E1b

[0322] 将克隆 3D8 用编码 E1b 的质粒 pVITR02IRESpuroE1b 转染,如前述选择并分离对嘌呤霉素治疗有抗性的各克隆。在用病毒 CONG 和 GFCB 的分离处理期间,用功能试验检测 E1b 功能。通过有限稀释分离已膨胀到一式两份 6 孔板的克隆,并用 5×10^6 pfu/ml CONG 或 GFCB 病毒感染。48 小时后,所感染克隆的 GFP 表达通过 Cytofluor 分析测定。用 GFCB 感染用于控制腺病毒的克隆感染能力潜在差异,从而可建立 E1b 介导的 GFP 荧光减少的比率。CONG 是使用 p53 共有序列效应元件 (p53RE) 驱动 GFP 表达的病毒。这些克隆基于 A549 细胞,该细胞对 p53 表达呈阳性。因此,基于 A549 的克隆例如 3D8 的感染将导致 p53 介导的 GFP 表达。已知腺病毒 E1b55kd 蛋白与 p53 结合,并且将其从转录激活物转化成转录阻抑物 (Yew 和 Berk (1992) Nature 357 :82-85, Roth 和 Dobbelstein (2003) Methods Mol. Biol. 234 : 135-149)。然后,表达 E1b55 的克隆应与 p53 结合,并且防止或减少来自 CONG 感染细胞的 GFP 荧光。虽然驱动 GFP 表达的 p53RE 是比 GFCB 中使用的 CMV 更弱的启动子,但是表达 E1b 蛋白的克隆,应导致依赖于所表达 E1b55 量的 CONG 的 GFP 表达进一步减少。在图 8A 中,将亲代细胞系 3D8 和用 GFCB 或 CONG 病毒感染的三个克隆照相,它们的 GFP 荧光水平用 Cytofluor 分析定量。在图 8B 中,以 CONG 与 GFCB 的 GFP 荧光比率作图。值的变化表示由于细胞 E1b55kd 表达的差别,CONG 感染相对于亲代 3D8 克隆的 GFP 表达减少的变化程度。克隆 15 显示最大的差别,提示它应表达最大量的 E1b 蛋白。以上显示,加入已经表达 E1a 功能的基于 E1b55 至 A549 的克隆,导致在细胞中生长的病毒生产力提高。当测试图 8 中克隆的 2GCP 病毒生长的生产力时,发现 GFP 表达程度和生产力之间的反比关系(图 8C)。显示 GFP 表达下降最大的克隆,该 GFP 表达下降应由 E1b55 蛋白的更大表达产生,比不表达 E1b 的亲代克隆 3D8 在生产力上具有最大的增加(图 8C)。基于这些结果,选择克隆 C15 用于进一步研究。

[0323] 最终克隆分析 15M15

[0324] 在 G418、潮霉素和嘌呤霉素的组合选择培养基中,通过亚克隆,进一步纯化克隆 15。该组合应选择用于 E1a、E1b 和 E2b 功能的保留。分离克隆通过用 2GCP 病毒的生产力试验进行进一步筛选,导致选择 15M15 作为新补充细胞系的最终选择。图 9A 中显示克隆 15M15 与其亲代克隆 3D8,以及与 C7 细胞相比的 2GCP 生长的生产力。C7 细胞基于补充 Ad E1 的 293 细胞,该 293 细胞已进一步工程化,以便也表达 E2b 聚合酶 (Amalfitano 等, (1996))

PNAS93 :3352-3356)。15M15 细胞系能够比其基于 293 的副本 (counterpart) (C7) 或其缺乏 E1b 的亲代细胞系 3D8 繁殖聚合酶缺失的病毒 2GCP 到更高的程度。通过连续传代和在其完全选择培养基混合物中或只单独在培养基中的细胞感染,测试新细胞系的基因组稳定性。图 9B 显示在各条件下,在第 1、5 和 10 代,用 2 个不同剂量的 2GCP 病毒感染的细胞的病毒生产力结果。克隆补充高产率繁殖聚合酶缺失的病毒所必需的腺病毒功能的能力,经过 10 代似乎非常稳定,甚至未选择培养基中的药物。用蛋白质印迹分析检测来自第 1、5 和 10 代分离的细胞的 E1a 和 E2b 聚合酶蛋白。如图 9C 所示,两个蛋白经过 10 代似乎也稳定,甚至在无选择培养基的情况下。

[0325] 病毒构建体

[0326] 图 6 显示用于该研究的病毒概图。所指定的 E3 和 E1 缺失除了两个病毒外均相同。对于对照病毒 GFCB 而言, E1 缺失将另外 700 个碱基对延伸至 pIX 编码序列中, 允许 E1b/pIX 病毒 polyA 信号用于 GFP 表达盒。病毒 46GC 是 E1 野生型和可复制的。CGAB、42GC、2GCP 和 46GC 病毒的 CMV-GFP-pA 表达盒是相同的, 这由限制酶切分析、PCR 和测序验证。在 CONG 病毒中, 表达盒中的 CMV 启动子被驱动 GFP 基因的 p53 共有序列效应元件代替。2GCP 中的 E2b 聚合酶缺失限制了其生长至表达 E2b 聚合酶的细胞系。2GCP 最初在表达 E2b 聚合酶的细胞系 C7 中分离到。

[0327] 减少的后期 Ad 基因表达

[0328] 使用抗 Ad5 的多克隆抗体, 通过蛋白质印迹分析, 分析感染的细胞裂解产物的腺病毒蛋白表达。将补充产生者细胞系 15M15 用 GFCB、CGAB、42GC 和 2GCP 感染。所有 4 种病毒均能够在该细胞系中很好地复制, 并且所有病毒均显示预期的病毒带 (图 10A)。

[0329] CHO 细胞用 CGAB、42GC、2GCP 和 46GC 病毒感染。如图 10B 所示, 在该非补充细胞系中, 仅可复制 46GC 病毒显示对应于六邻体和纤维的任何病毒带。

[0330] HeLa 和 HepG2 细胞用 CGAB、42GC、2GCP 和 46GC 病毒感染。HepG2 细胞也用 GFCB 病毒感染。由于整合的人乳头瘤病毒的 E7 基因表达, HeLa 细胞能够部分地补充 E1a 功能 (Schneider-Gadicke 和 Schwarz (1986) EMB05 :2285-2292, Phelps 等, (1988) Cell 53 :539-547), 而 HepG2 细胞已报道具有高 NFIL-6 反应活性, 它可功能性代替 E1a 激活其他腺病毒启动子 (Spergel 和 Chen-Kiang (1991) PNAS88 :6472-6476)。在两种细胞系中, 与其他 E1/E3 缺失但聚合酶完整的病毒相比, 用聚合酶缺失的 2GCP 病毒观察到的病毒蛋白表达有很大的减少或缺乏 (图 10C 和 10D)。这些结果与用缺失必要复制功能 (refs, E2b pol, pTp, DBP) 的病毒的其他发现一致。在感染的细胞中, 病毒表达其自身蛋白的能力下降是减少免疫介导的感染细胞清除和延长转基因表达的基础 (Yang 等, (1994) PNAS91 :4407-4411 ; Gilgenkrantz 等, (1995) Hum. Gene Ther. 6 :1265-1274 ; Yang 等, (1995) J. Immunol. 155 :2564-2570)。如预期的那样, 可复制 46GC 病毒显示最高水平的病毒蛋白。

[0331] 提高的转基因表达

[0332] 与体外 GFP 荧光相比, 虽然具有相同的表达盒, 但是仍然有一致等级的构建体。2GCP 的 GFP 荧光始终最大, 其次是 42GC, 然后是 CGAB。这在多种细胞类型中发现, 包括 CHO、Saos2 和人眼成纤维细胞 (HOF) 细胞, 如图 11 中所示。以一式三份感染物的平均值 $\pm$ 其标准偏差, 将 Cytofluor 值作图, 以及图 11A-D 表示用 HOF 和 Saos2 细胞的指定构建体感染细胞的代表图, 图 11E-F 表示 CHO 细胞的指定构建体感染细胞的代表图。新构建体体外表

达的高水平在延长的时间内持续。

[0333] 本发明不限于本文中所描述的具体实施方案的范围。的确,除了本文中所描述的那些外,根据前述描述,本发明的各种修改对本领域技术人员而言将是显而易见的。此类修改将落入权利要求的范围内。

[0334] 贯穿本申请引用了专利、专利申请、出版物、产品描述和方案,为了所有的目的,它们公开的内容通过引用而整体结合到本文中。

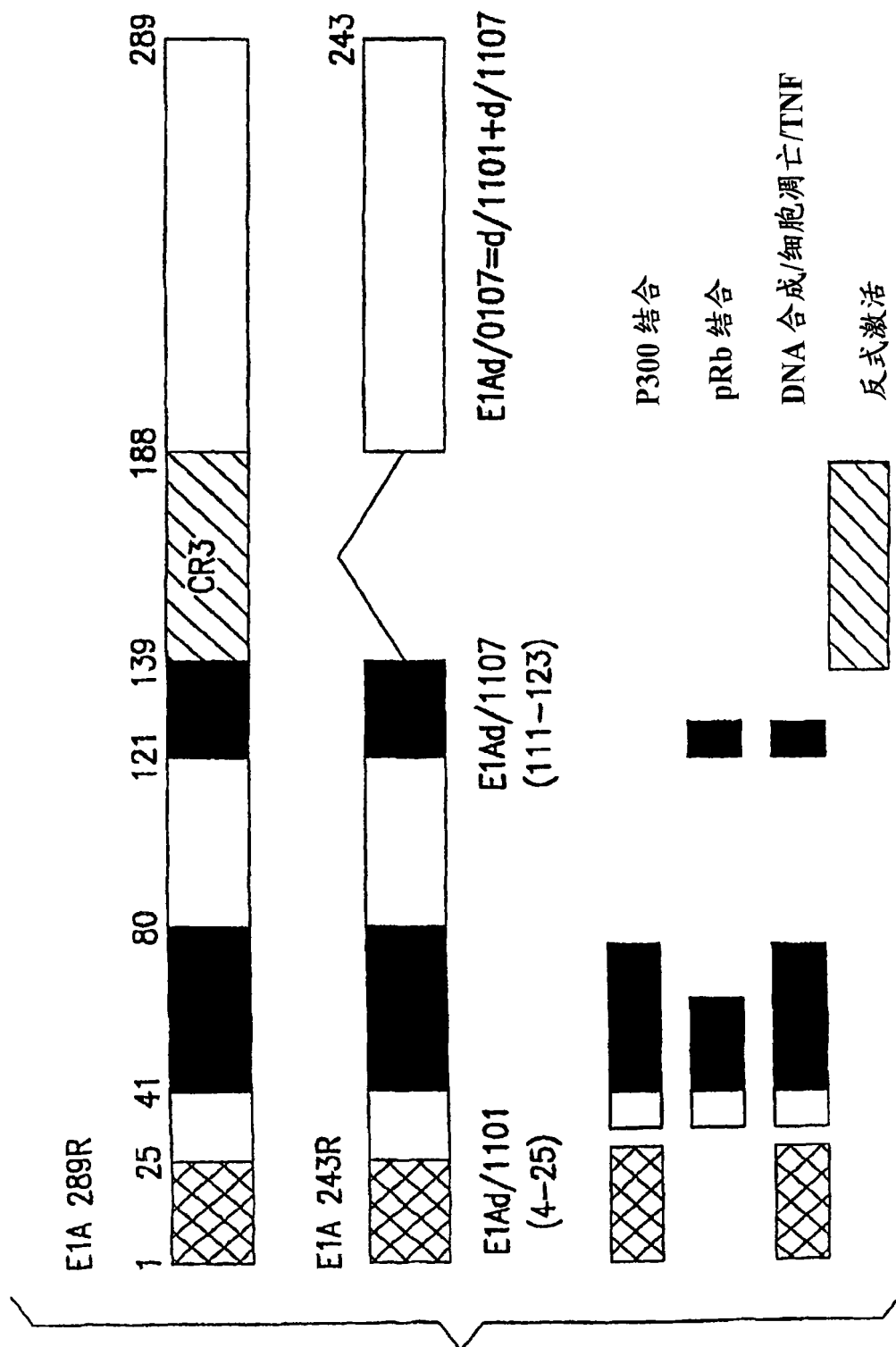


图 1

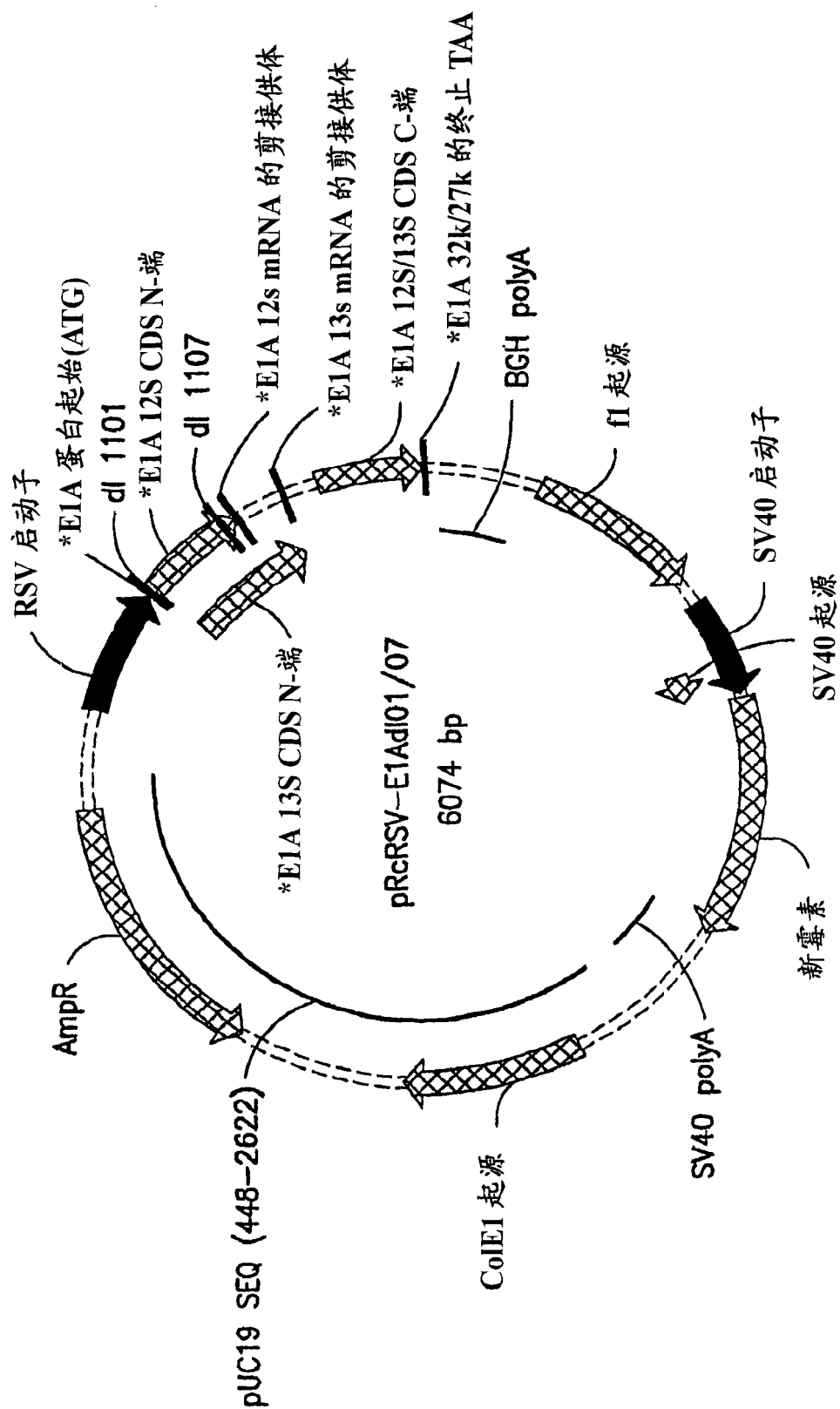


图 2

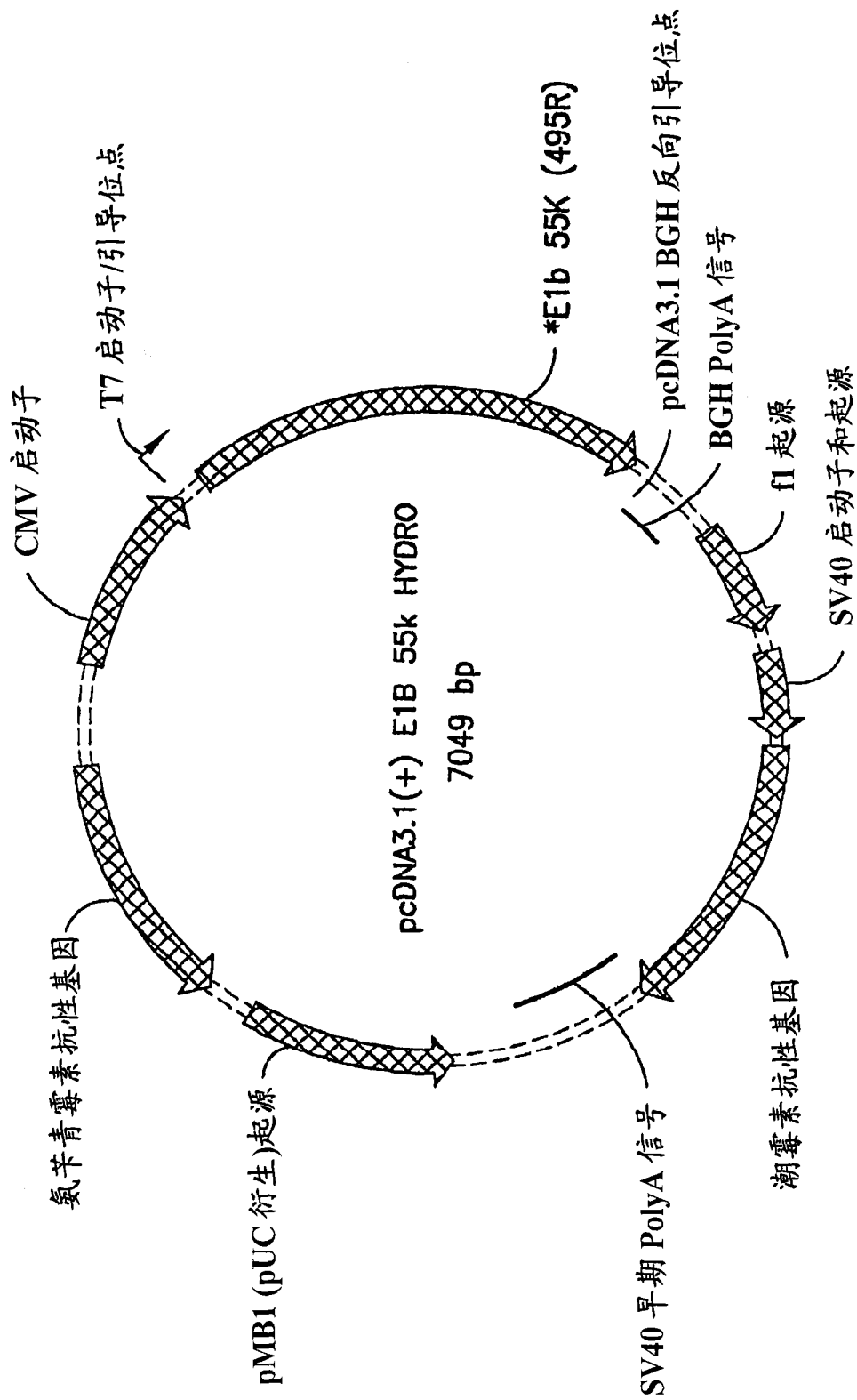


图 3

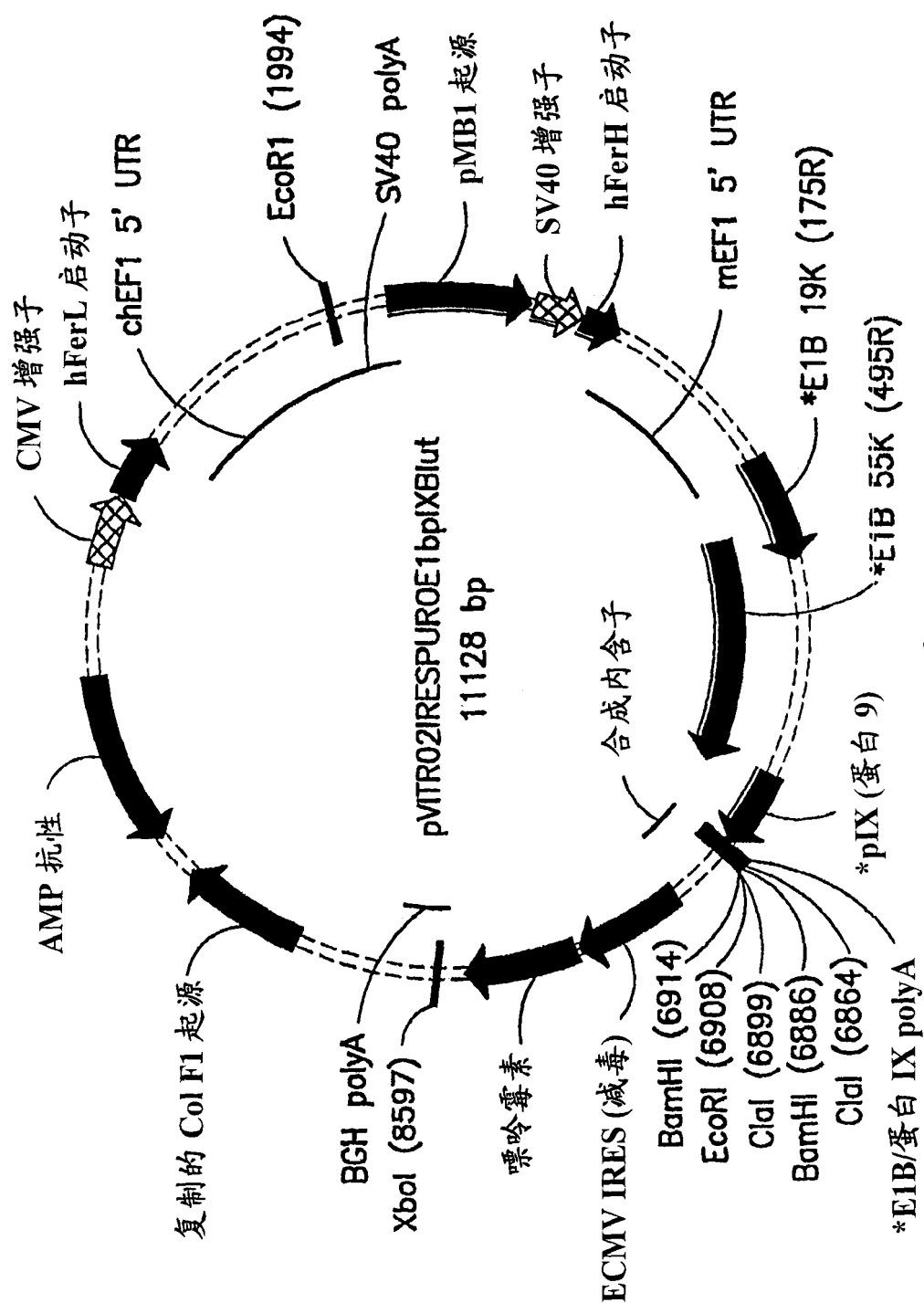


图 4

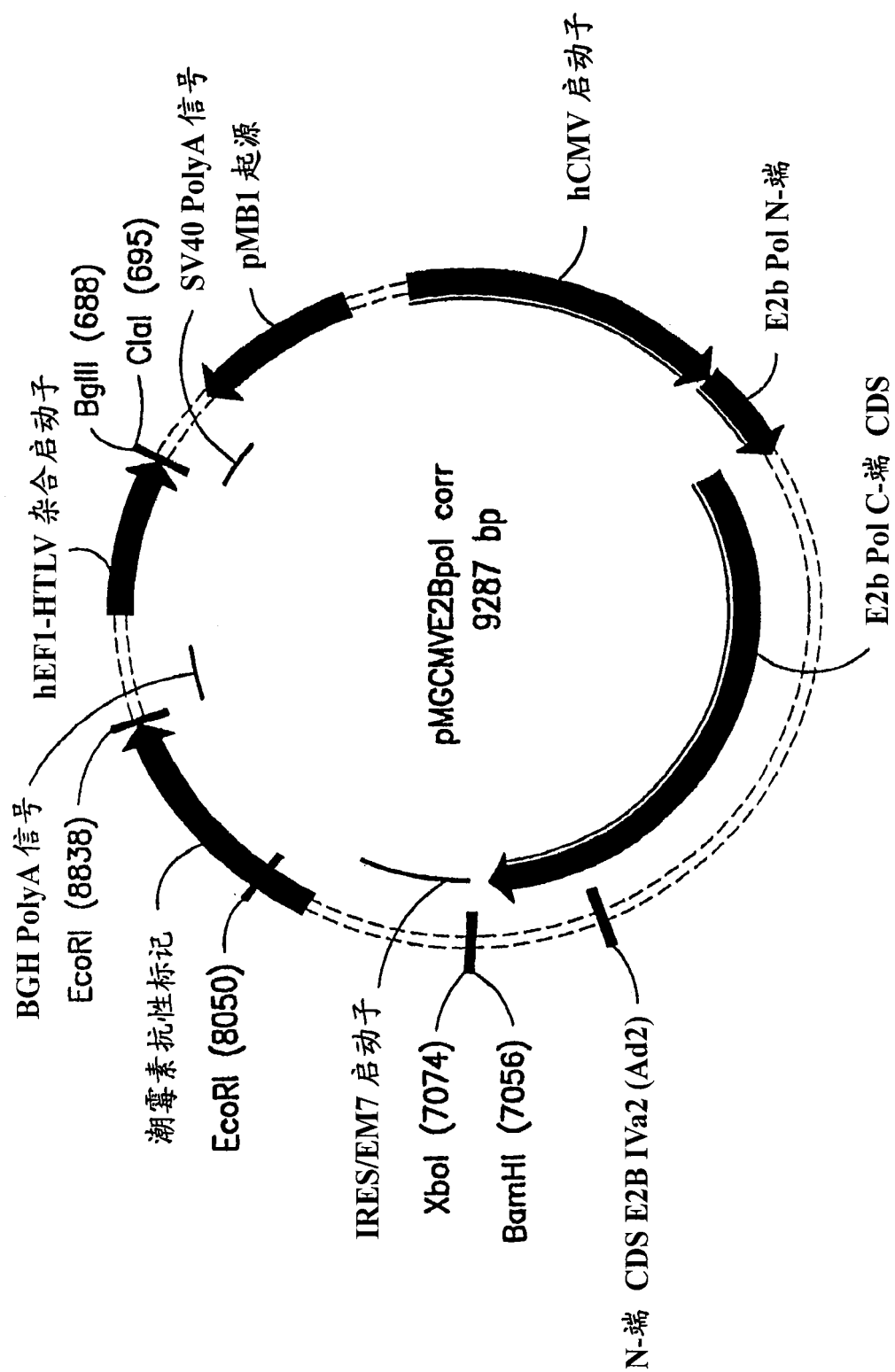


图 5

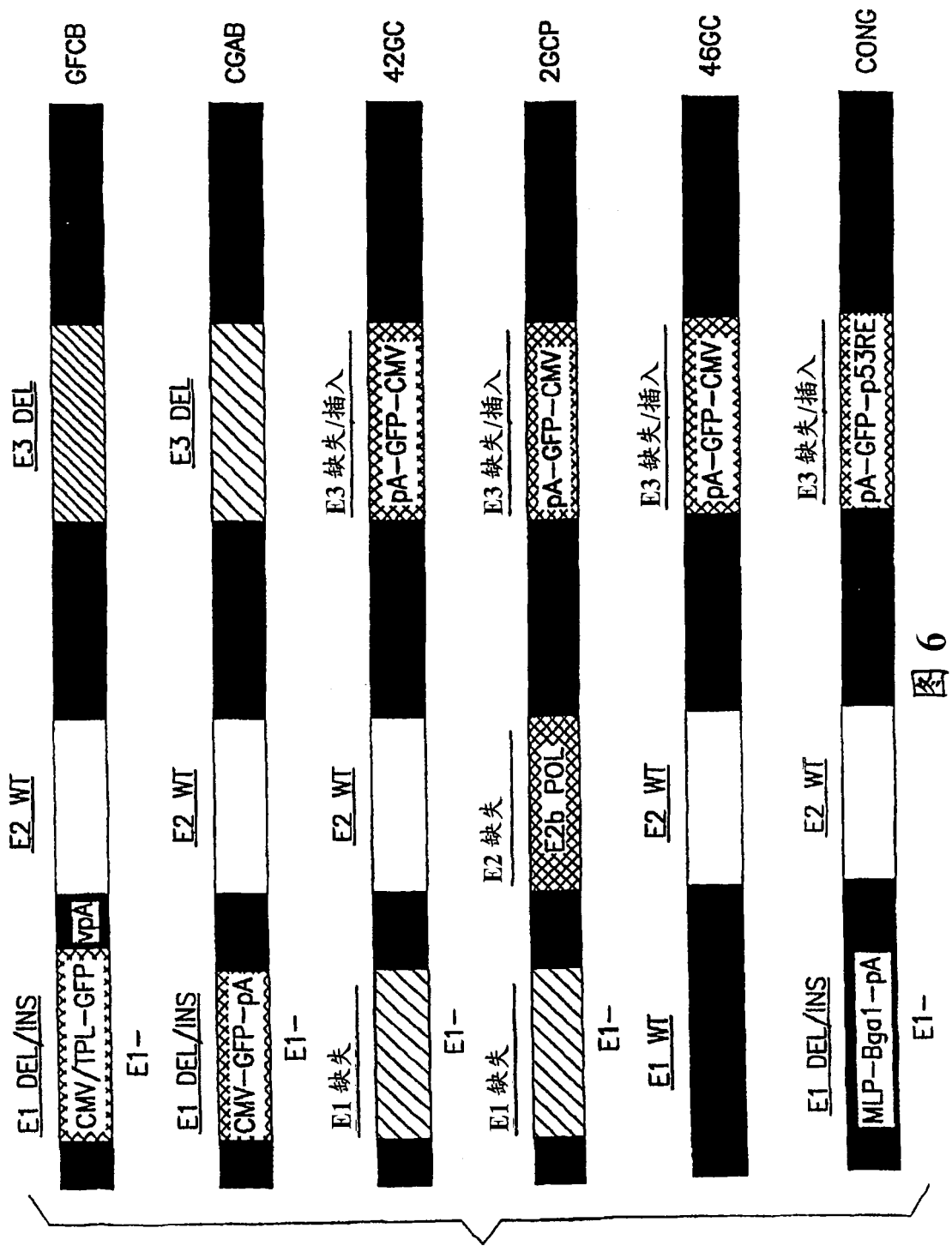


图 6

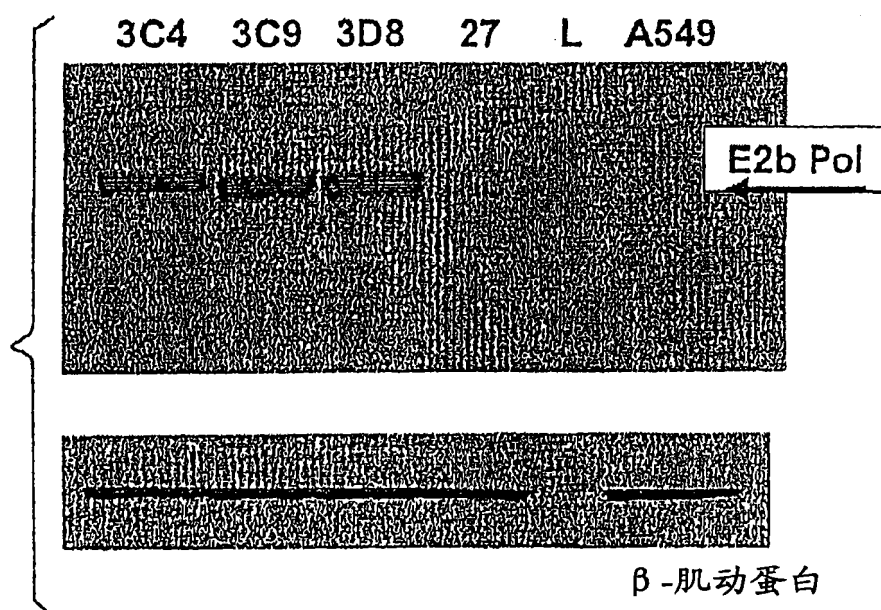


图 7A

E1a + E2b Poly 克隆中 2GCP 的生产力

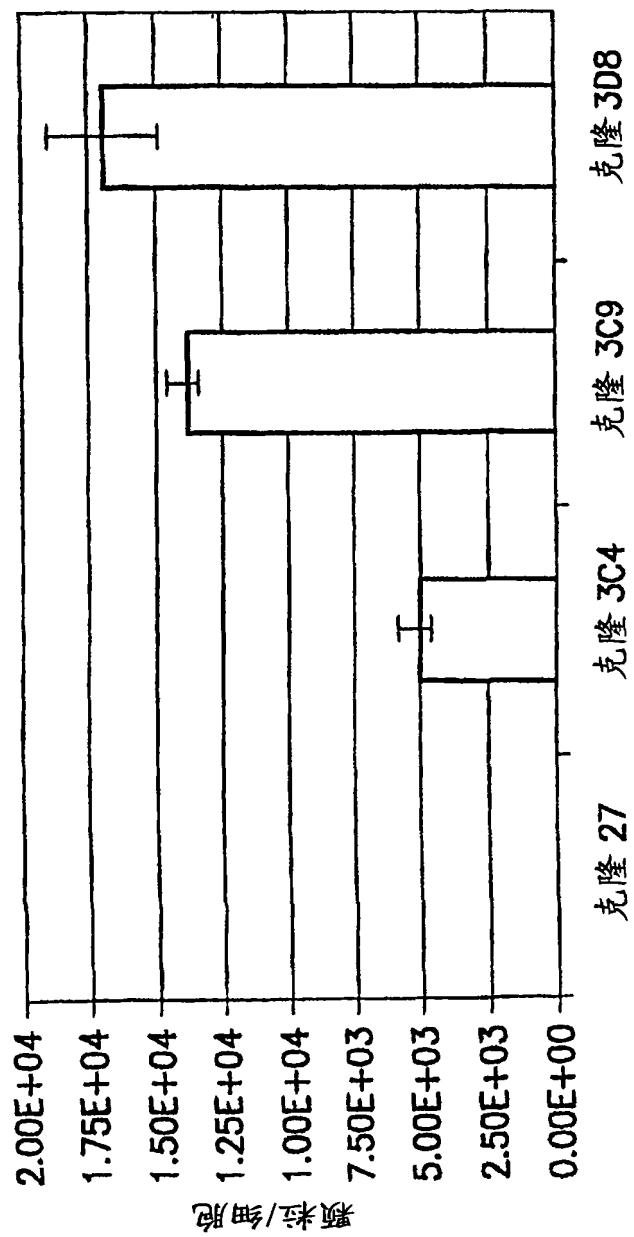
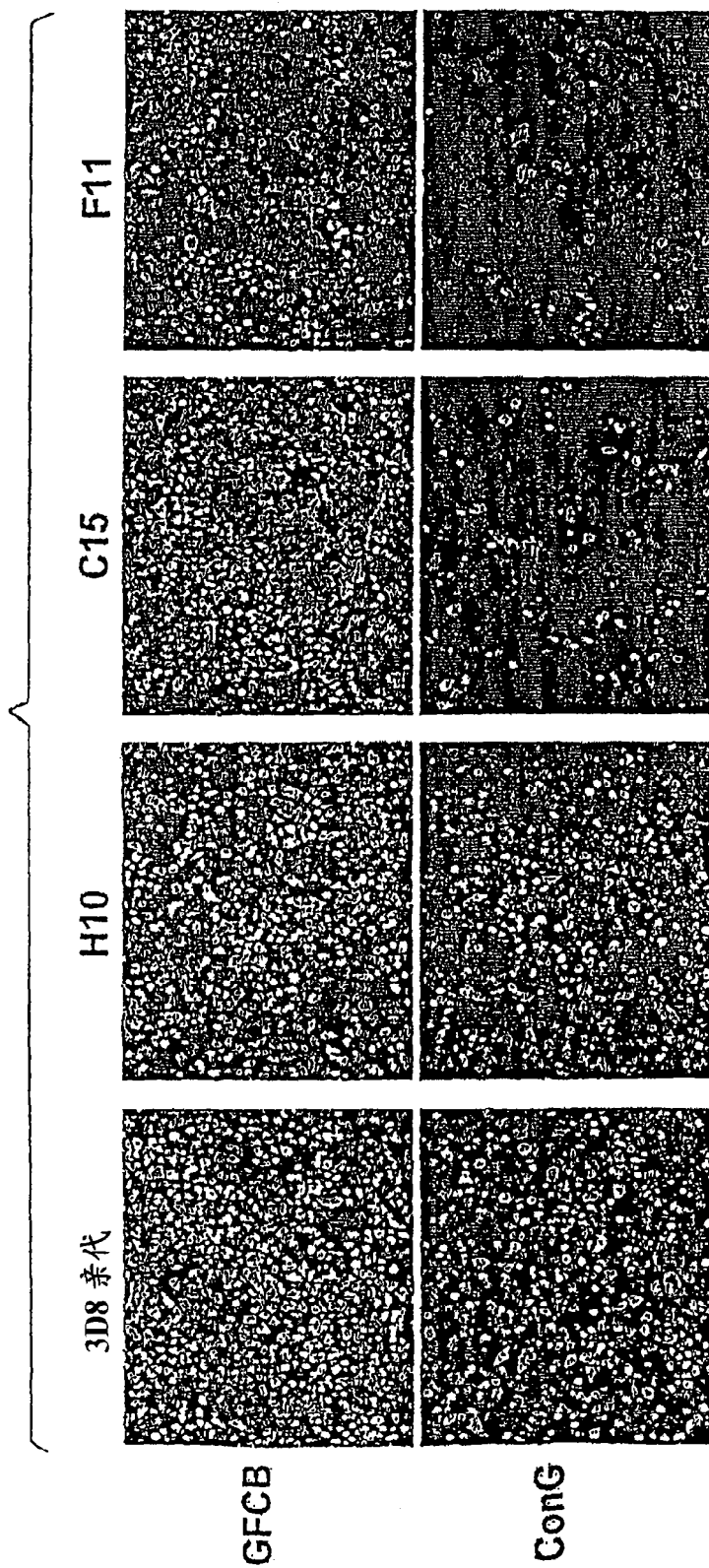


图 7B

图 8A



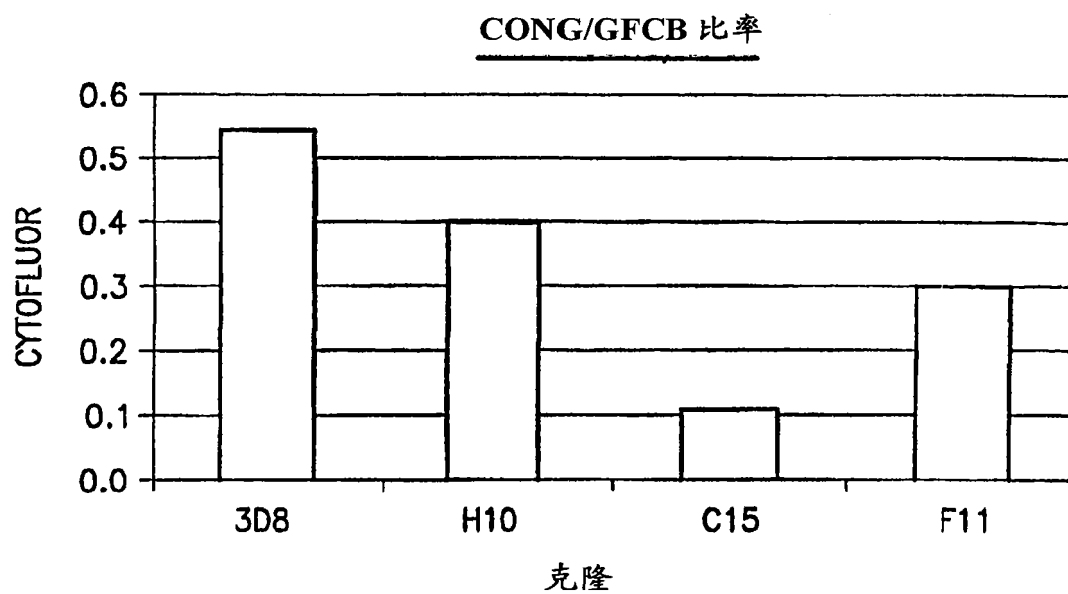


图 8B

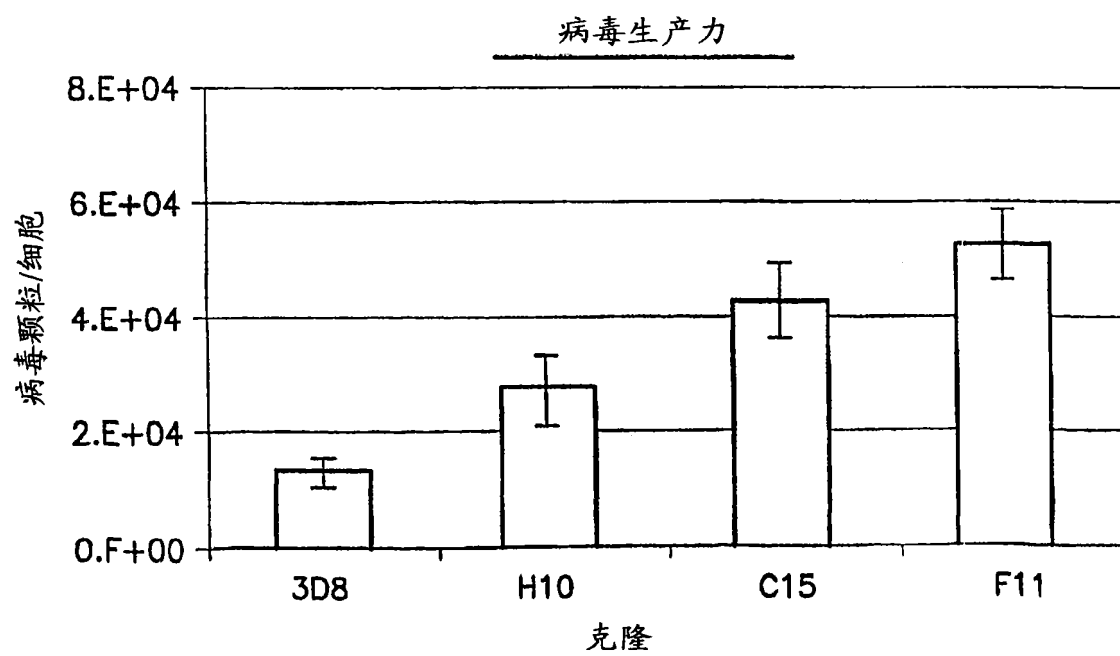
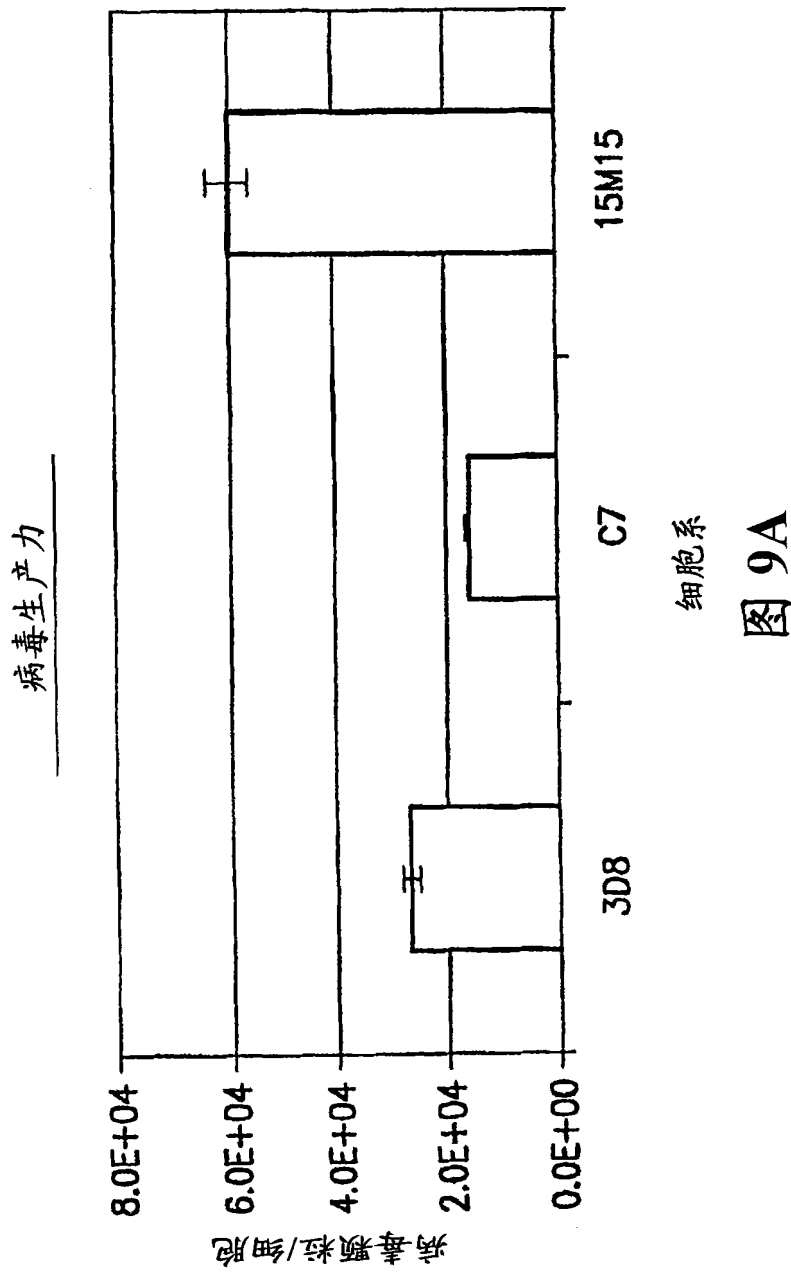


图 8C



克隆 15M15

病毒生产力的稳定性

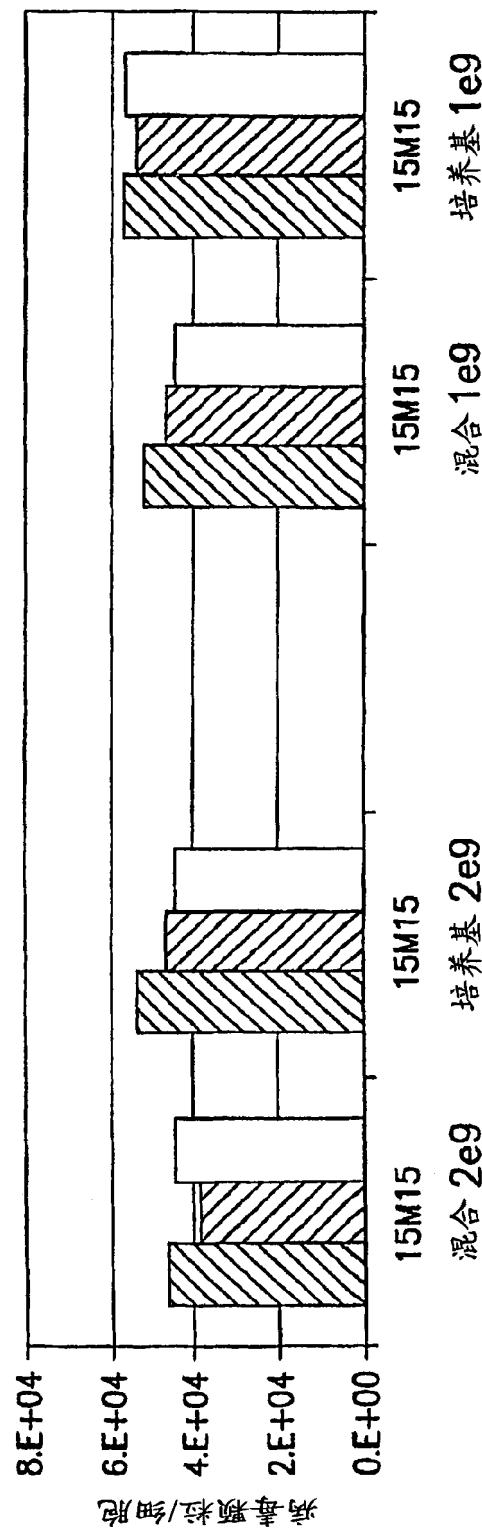
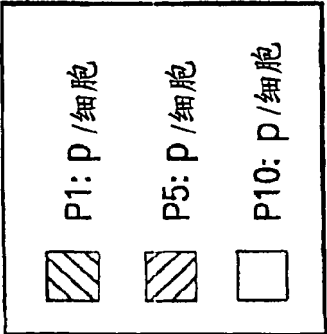


图 9B



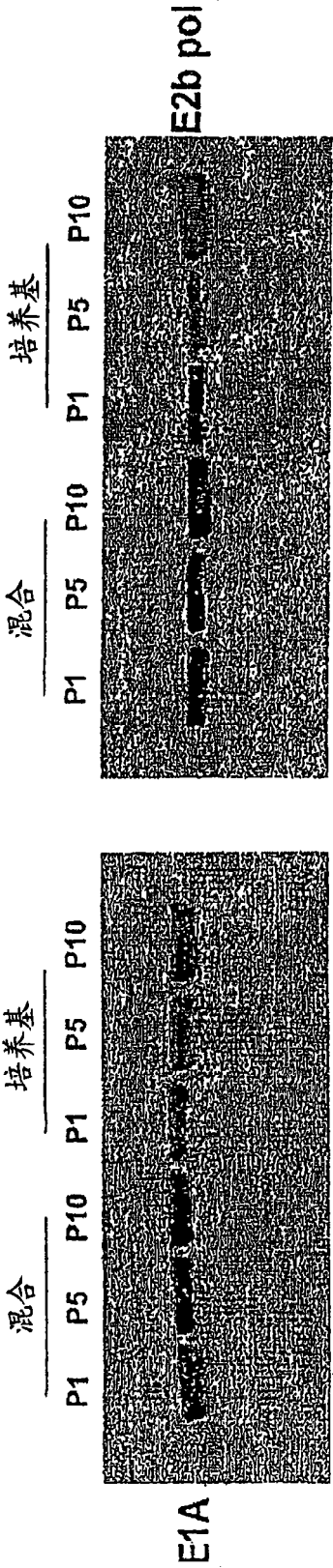
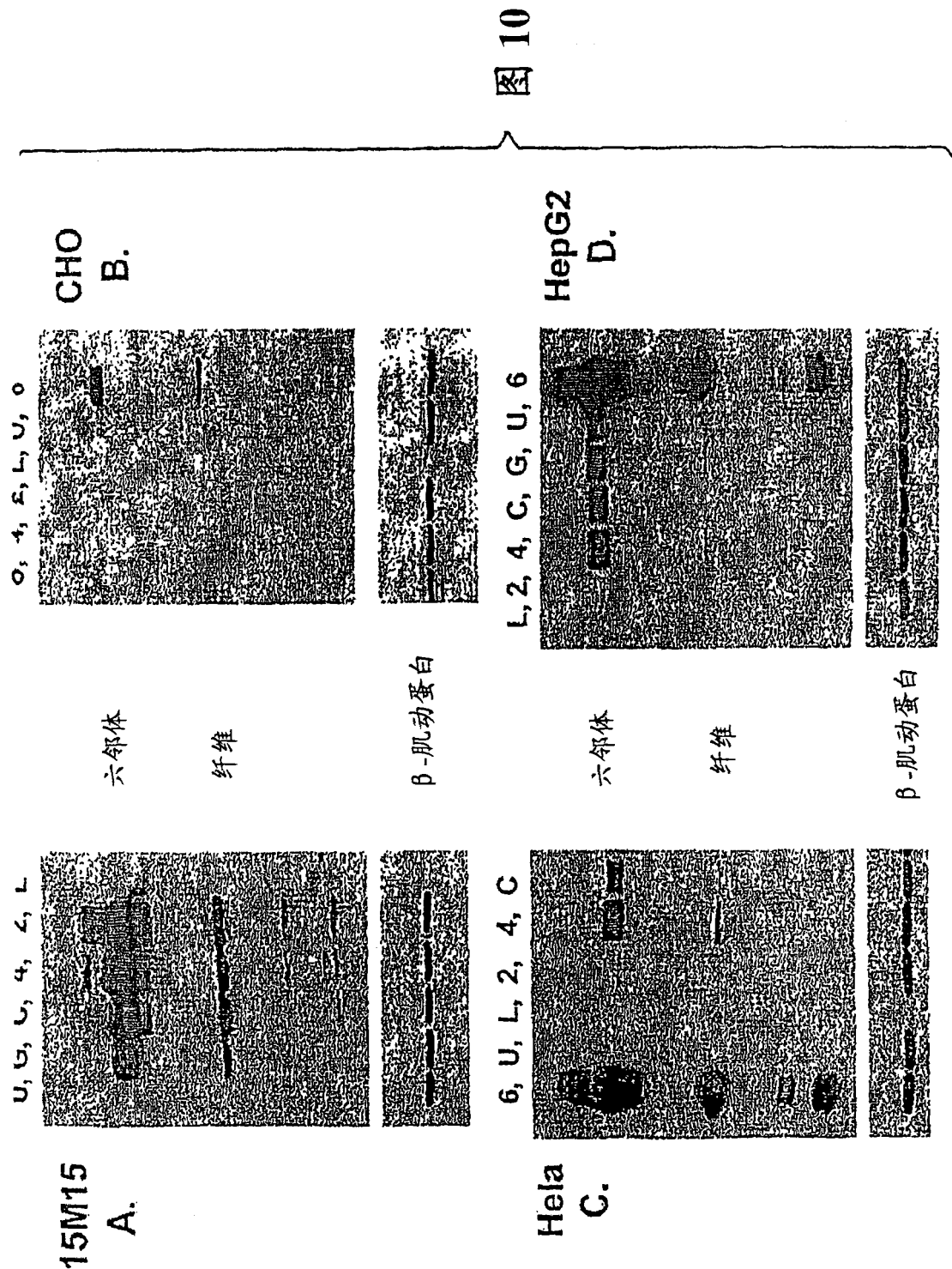


图 9C



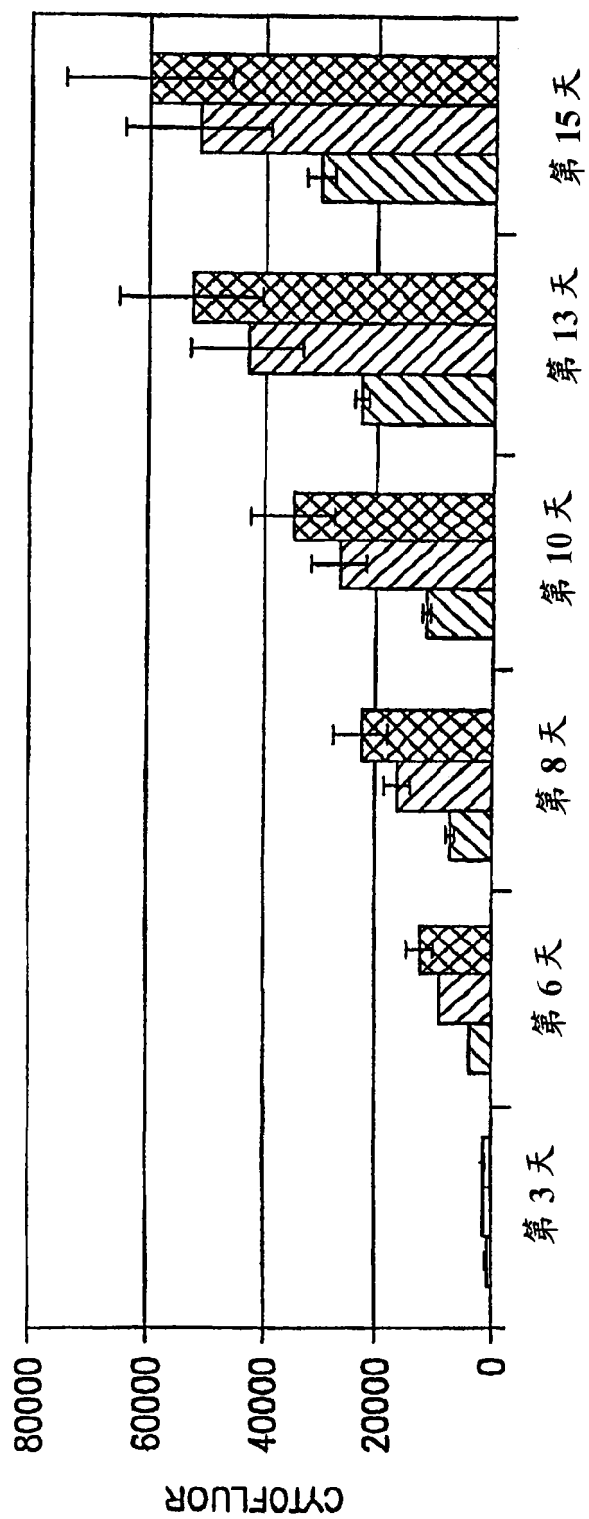
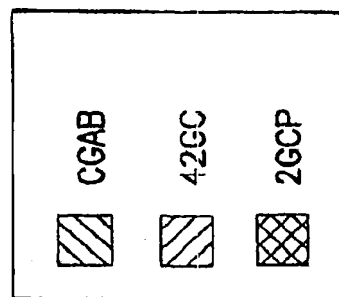
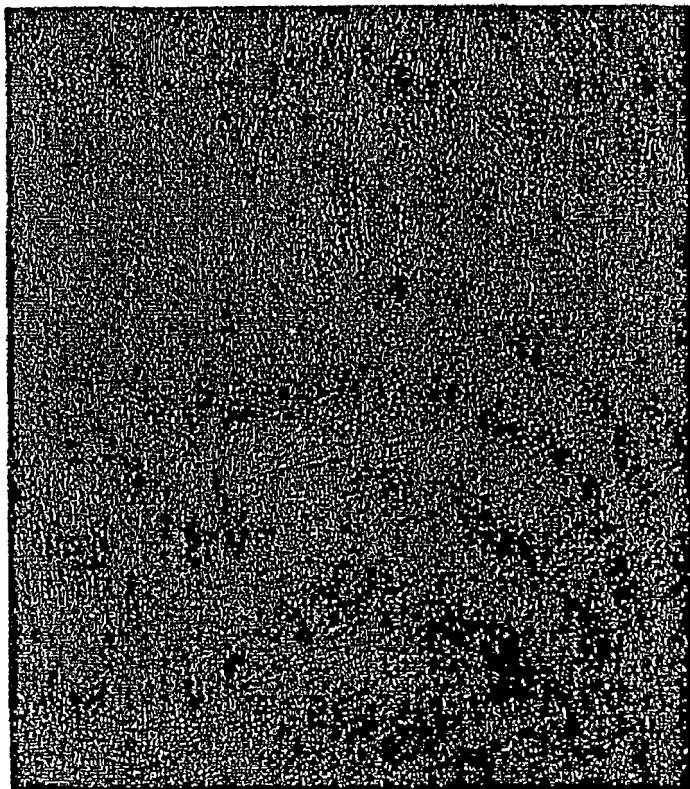
HOF 细胞

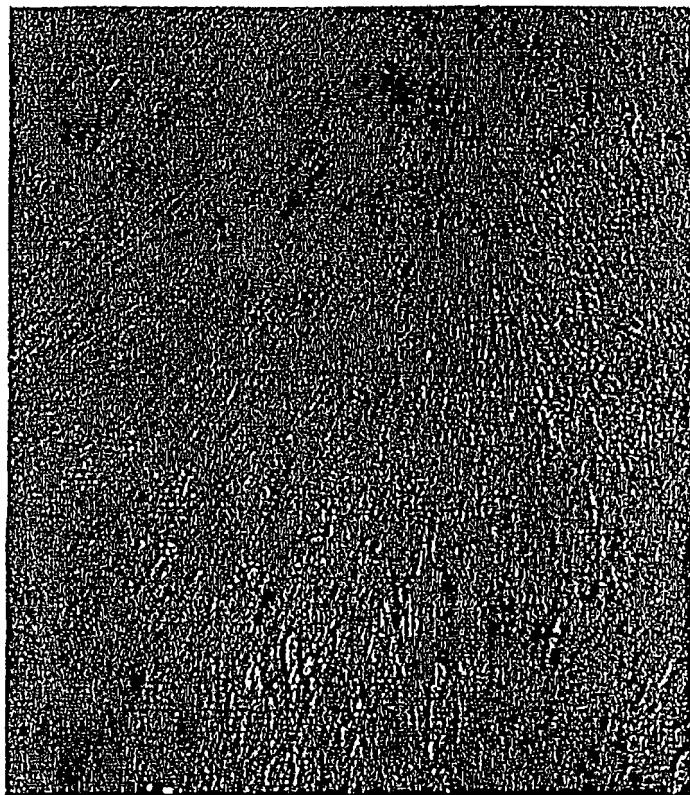
图 11A



HOF 细胞



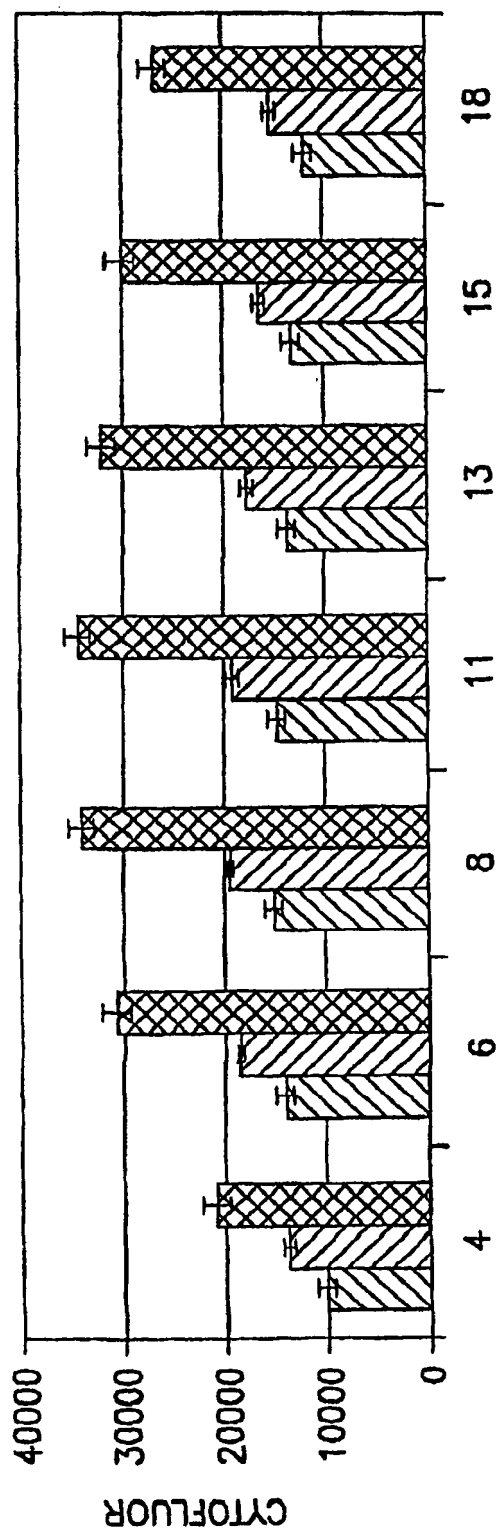
CGAB



2GCP

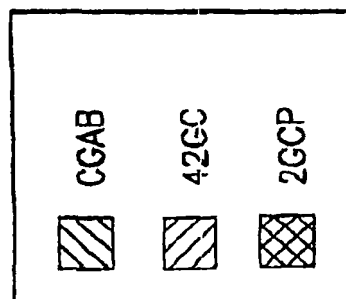
图 11B

SAOS 2 细胞



感染后天数

图 11C



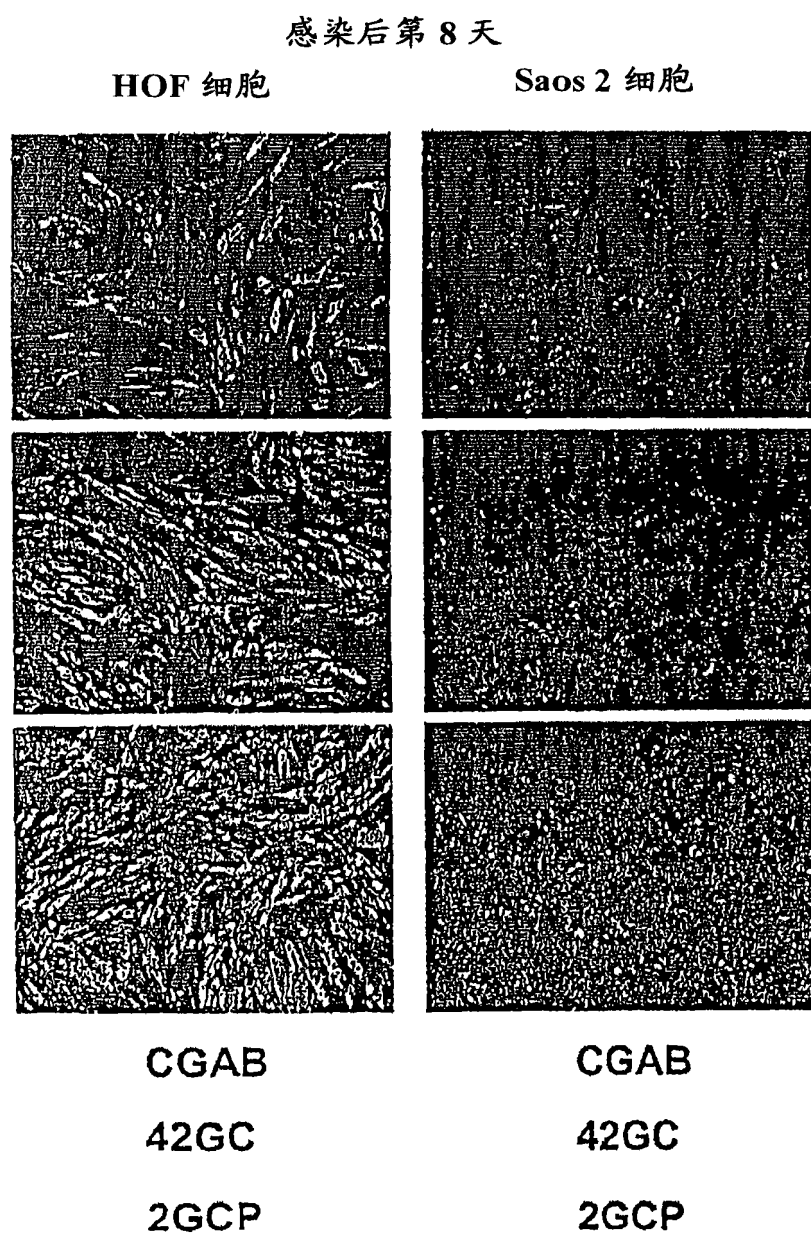
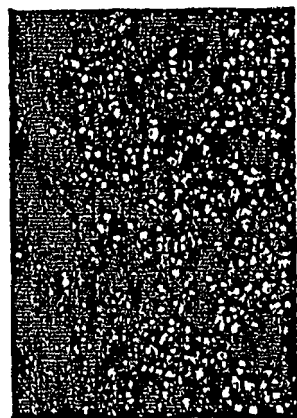
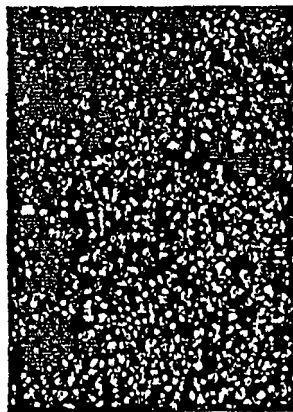


图 11D

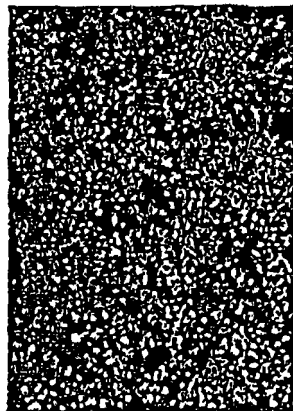
CHO 细胞 第 15 天



CGAB



42GC



2GCP

图 11E

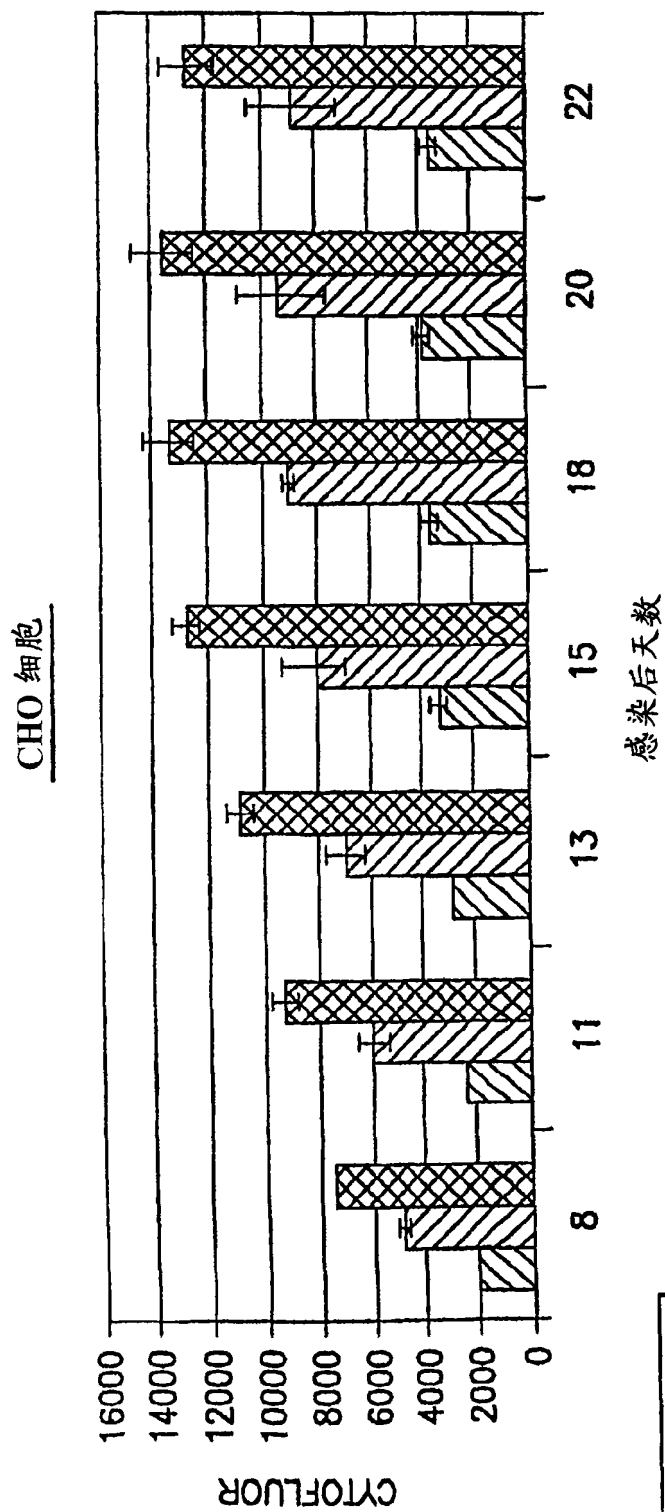


图 11F

