



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111448309 A

(43)申请公布日 2020.07.24

(21)申请号 201880051792.1

布莱恩·T·奥兰斯基

(22)申请日 2018.05.24

(74)专利代理机构 北京安杰律师事务所 11627

(30)优先权数据

代理人 杨剑 吴立

62/510,647 2017.05.24 US

(51)Int.Cl.

62/514,351 2017.06.02 US

C12N 7/01(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 15/861(2006.01)

2020.02.03

A61K 35/761(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61P 35/00(2006.01)

PCT/US2018/034487 2018.05.24

A61P 9/00(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/218083 EN 2018.11.29

(71)申请人 埃皮辛特瑞柯斯公司

权利要求书8页 说明书33页

地址 美国加利福尼亚州

序列表80页 附图13页

(72)发明人 克里斯托弗·拉森

托尼·R·雷德

(54)发明名称

抗血管生成的腺病毒

(57)摘要

本发明涉及表达内皮抑素、血管抑素、或内皮抑素和血管抑素的组合的重组腺病毒。本发明还涉及治疗需要的受试者癌症的方法，所述方法包含向受试者施用有效量的(i)重组腺病毒和(ii)抗血管生成剂的组合以治疗受试者的癌症。

1. 一种重组腺病毒,其包含编码选自内皮抑素和血管抑素的插入到E1b-19K插入位点的第一个治疗性转基因的第一个核苷酸序列,其中,所述E1b-19K插入位点位于E1b-19K起始位点和E1b-55K起始位点之间。
2. 如权利要求1中所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒是5型腺病毒(Ad5)。
3. 如权利要求1或2中所述的重组腺病毒,其中所述E1b-19K插入位点位于E1b-19K起始位点和E1b-19K终止位点之间。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的重组腺病毒,其中所述E1b-19K插入位点包含临近E1b-19K起始位点从约100至约305、约100至约300、约100至约250、约100至约200、约100至约150、约150至约305、约150至约300、约150至约250、或约150至约200个核苷酸的缺失。
5. 如权利要求1-4中任一项所述的重组腺病毒,其中所述E1b-19K插入位点包含约200个核苷酸的缺失。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的重组腺病毒,其中所述E1b-19K插入位点包含约202个核苷酸的缺失。
7. 如权利要求1-5中任一项所述的重组腺病毒,其中所述E1b-19K插入位点包含约203个核苷酸的缺失。
8. 如权利要求1-7中任一项所述的重组腺病毒,其中所述E1b-19K插入位点包含Ad5基因组(SEQ ID NO:1)第1714-1916位对应核苷酸的缺失。
9. 如权利要求1-8中任一项所述的重组腺病毒,其中所述第一个治疗性转基因被插入到Ad5基因组(SEQ ID NO:1)第1713和1917位对应核苷酸之间。
10. 如权利要求1-9中任一项所述的重组腺病毒,其中所述第一个治疗性转基因被插入到CTGACCTC(SEQ ID NO:2)和TCACCAGG(SEQ ID NO:3)之间。
11. 如权利要求1-10中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒从5'到3'方向包含CTGACCTC(SEQ ID NO:2)、第一个治疗性转基因、以及TCACCAGG(SEQ ID NO:3)。
12. 如权利要求1-11中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含编码选自内皮抑素或血管抑素的第二个治疗性转基因的第二个核苷酸序列。
13. 如权利要求12中所述的重组腺病毒,其中所述第二个治疗性转基因被插入到E1b-19k起始位点,且所述第一个核苷酸序列和所述第二个核苷酸序列通过内部核糖体进入位点(IRES)进行分离。
14. 如权利要求13中所述的重组腺病毒,其中所述IRES选自脑心肌炎病毒(EMCV)IRES、口蹄疫病毒(FMDV)IRES、以及脊髓灰质炎病毒IRES。
15. 如权利要求14中所述的重组腺病毒,其中所述IRES是脑心肌炎病毒(EMCV)IRES。
16. 如权利要求15中所述的重组腺病毒,其中所述IRES包含SEQ ID NO:20。
17. 如权利要求13-16中任一项所述的重组腺病毒,其中所述第一个和第二个治疗性转基因被插入到Ad5基因组(SEQ ID NO:1)第1713和1917位对应核苷酸之间。
18. 如权利要求13-17中任一项所述的重组腺病毒,其中所述第一个和第二个治疗性转基因被插入到CTGACCTC(SEQ ID NO:2)和TCACCAGG(SEQ ID NO:3)之间。
19. 如权利要求13-18中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒从5'到3'方向包含CTGACCTC(SEQ ID NO:2)、第一个治疗性转基因,IRES、第二个治疗性转基因、以及TCACCAGG(SEQ ID NO:3)。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒进一步包含E3缺失,其中所述E3缺失位于pVIII终止位点和Fiber起始位点之间。

21. 如权利要求20中所述的重组腺病毒,其中所述E3缺失位于E3-10.5K终止位点和E3-14.7K终止位点之间。

22. 如权利要求20或21中所述的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含从约500至约3185、从约500至约3000、从约500至约2500、从约500至约2000、从约500至约1500、从约500至约1000、从约1000至约3185、从约1000至约3000、从约1000至约2500、从约1000至约2000、从约1000至约1500、从约1500至约3185、从约1500至约3000、从约1500至约2000、从约2000至约3185、从约2000至约3000、从约2000至约2500、从约2500至约3185、从约2500至约3000、或从约3000至约3185个核苷酸的缺失。

23. 如权利要求20-22中任一项所述的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含临近E3-10.5K终止位点的从约500至约1551、从约500至约1500、从约500至约1000、从约1000至约1551、从约1000至约1500、or从约1500至约1551个核苷酸的缺失。

24. 如权利要求20-23中任一项所述的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含临近E3-10.5K终止位点的约1050个核苷酸的缺失。

25. 如权利要求20-24中任一项所述的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含临近E3-10.5K终止位点的1063个核苷酸的缺失。

26. 如权利要求20-24中任一项所述的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含临近E3-10.5K终止位点的1064个核苷酸的缺失。

27. 如权利要求20-26中任一项所述的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含Ad5 d1309 E3缺失的对应核苷酸的缺失。

28. 如权利要求20-27中任一项所述的重组腺病毒,其中E3缺失包含Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第29773-30836位对应核苷酸的缺失。

29. 如权利要求12中所述的重组腺病毒,其中所述第二个治疗性转基因被插入到E3插入位点,其中所述E3插入位点位于pVIII终止位点和Fiber起始位点之间。

30. 如权利要求29中所述的重组腺病毒,其中所述E3插入位点位于E3-10.5K终止位点和E3-14.7K终止位点之间。

31. 如权利要求29或30中所述的重组腺病毒,其中所述E3插入位点包含从约500至约3185、从约500至约3000、从约500至约2500、从约500至约2000、从约500至约1500、从约500至约1000、从约1000至约3185、从约1000至约3000、从约1000至约2500、从约1000至约2000、从约1000至约1500、从约1500至约3185、从约1500至约3000、从约1500至约2000、从约2000至约3185、从约2000至约3000、从约2000至约2500、从约2500至约3185、从约2500至约3000、或从约3000至约3185个核苷酸的缺失。

32. 如权利要求29-31中任一项所述的重组腺病毒,其中所述E3插入位点包含临近E3-10.5K终止位点的从约500至约1551、从约500至约1500、从约500至约1000、从约1000至约1551、从约1000至约1500、或从约1500至约1551个核苷酸的缺失。

33. 如权利要求29-32中任一项所述的重组腺病毒,其中所述E3插入位点包含临近E3-10.5K终止位点的约1050个核苷酸的缺失。

34. 如权利要求29-33中任一项所述的重组腺病毒,其中所述E3插入位点包含临近E3-

10.5K终止位点的1063个核苷酸的缺失。

35. 如权利要求29-34中任一项所述的重组腺病毒,其中所述E3插入位点包含临近E3-10.5K终止位点的1064个核苷酸的缺失。

36. 如权利要求29-35中任一项所述的重组腺病毒,其中所述E3插入位点包含Ad5 d1309 E3缺失的对应核苷酸的缺失。

37. 如权利要求29-36中任一项所述的重组腺病毒,其中其中所述E3插入位点包含Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第29773-30836位对应核苷酸的缺失。

38. 如权利要求29-37中任一项所述的重组腺病毒,其中所述第二个治疗性转基因被插入到Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第29773-30836位对应核苷酸之间。

39. 如权利要求29-38中任一项所述的重组腺病毒,其中所述第二个治疗性转基因被插入到CAGTATGA (SEQ ID NO:4) 和TAATAAAAAA (SEQ ID NO:5) 之间。

40. 如权利要求29-39中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒从5' 到3' 方向包含CAGTATGA (SEQ ID NO:4) 、第二个治疗性转基因、以及TAATAAAAAA (SEQ ID NO:5) 。

41. 如权利要求1-40中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含编码SEQ ID NO:7的氨基酸序列的核苷酸序列,或包含编码具有与SEQ ID NO:7的80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列。

42. 如权利要求1-41中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含编码SEQ ID NO:8的氨基酸序列的核苷酸序列,或包含编码具有与SEQ ID NO:8的80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列。

43. 如权利要求1-42中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列,或包含具有与SEQ ID NO:9的80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

44. 如权利要求1-43中任一项所述的重组腺病毒,其中重组腺病毒包含编码选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、和SEQ ID NO:16的氨基酸序列的核苷酸序列,或包含编码具有与选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、和SEQ ID NO:16的氨基酸序列80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列。

45. 如权利要求1-44中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含编码SEQ ID NO:17的氨基酸序列的核苷酸序列,或包含编码具有与SEQ ID NO:17的80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列。

46. 如权利要求1-45中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含SEQ ID NO:18的核苷酸序列,或包含具有与SEQ ID NO:18的80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

47. 如权利要求1-46中任一项所述的重组腺病毒,其中所述第一个和/或第二个治疗性转基因不与外源启动子序列操作性地连接。

48. 如权利要求47中所述的重组腺病毒,其中两个治疗性转基因都不与外源启动子序

列操作性地连接。

49. 如权利要求1-48中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒进一步包含Pea3结合位点或其功能部分的缺失。

50. 如权利要求49中所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含E1a起始位点上游约-300至约-250位对应核苷酸的缺失。

51. 如权利要求49或50中所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含E1a起始位点上游约-304至约-255位对应核苷酸的缺失。

52. 如权利要求49或50中所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含E1a起始位点上游约-305至约-255位对应核苷酸的缺失。

53. 如权利要求49-52中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒可包含Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第195-244位对应核苷酸的缺失。

54. 如权利要求49-53中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含序列GGTGTTTGG (SEQ ID NO:22)。

55. 如权利要求49-54中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒不包含E2F结合位点的缺失。

56. 如权利要求1-48中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒进一步包含E2F结合位点或其功能部分的缺失。

57. 如权利要求56中所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒不包含Pea3结合位点或其功能部分的缺失。

58. 如权利要求1-57中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含具有功能性TATA盒缺失的E1a启动子。

59. 如权利要求58中所述的重组腺病毒,其中所述缺失包含整个TATA盒的缺失。

60. 如权利要求58或59中所述的重组腺病毒,其中所述缺失包含E1a启动子的第-27至-24位对应核苷酸缺失。

61. 如权利要求58-60中任一项所述的重组腺病毒,其中所述缺失包含E1a启动子的第-31至-24位对应核苷酸缺失。

62. 如权利要求58-61中任一项所述的重组腺病毒,其中所述缺失包含E1a启动子的第-44至+54位对应核苷酸缺失。

63. 如权利要求58-62中任一项所述的重组腺病毒,其中所述缺失包含E1a启动子的第-146至+54位对应核苷酸缺失。

64. 如权利要求58-63中任一项所述的重组腺病毒,其中所述缺失包含Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第472至475位对应核苷酸的缺失。

65. 如权利要求58-64中任一项所述的重组腺病毒,其中所述缺失包含Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第468至475位对应核苷酸的缺失。

66. 如权利要求58-65中任一项所述的重组腺病毒,其中所述缺失包含Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第455至552位对应核苷酸的缺失。

67. 如权利要求58-66中任一项所述的重组腺病毒,其中所述缺失包含Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第353至552位对应核苷酸的缺失。

68. 如权利要求58-67中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含了一个多

核苷酸缺失,产生了包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO:23)、AGTGCCCC (SEQ ID NO:30)、和/或TATTCCCCG (SEQ ID NO:31)的腺病毒。

69. 如权利要求58-68中任一项所述的重组腺病毒,其中所述E1a启动子包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO:23)。

70. 如权利要求1-69中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含具有功能性CAAT盒缺失的E1a启动子。

71. 如权利要求70中所述的重组腺病毒,其中所述缺失包含整个CAAT盒的缺失。

72. 如权利要求70或71中所述的重组腺病毒,其中所述缺失包含E1a启动子的第-76到-68位对应核苷酸的缺失。

73. 如权利要求70-72中任一项所述的重组腺病毒,其中所述缺失包含Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第423到431位对应核苷酸的缺失。

74. 如权利要求70-73中任一项所述的重组腺病毒,其中重组腺病毒包含了一个多核苷酸缺失,产生包含包含序列TTCCGTGGCG (SEQ ID NO:32) 的腺病毒。

75. 如权利要求1-74中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒在在高增殖细胞中选择性复制。

76. 如权利要求1-75中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒在高增殖细胞中选择性表达内皮抑素和/或血管抑素。

77. 如权利要求75或76中所述的重组腺病毒,其中所述高增殖细胞是癌细胞。

78. 如权利要求1-77中任一项所述的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒是溶瘤腺病毒。

79. 一种药物组合物,其包含权利要求1-78中任一项所述的重组腺病毒和至少一种药学可接受的载体或稀释剂。

80. 一种在靶细胞中表达内皮抑素和/或血管抑素的方法,其包含将细胞暴露于权利要求1-78中任一项所述的有效量的重组腺病毒中以表达内皮抑素和/或血管抑素。

81. 一种抑制肿瘤细胞增殖的方法,其包含将细胞暴露于权利要求1-78中任一项所述的有效量的重组腺病毒中以抑制肿瘤细胞增殖。

82. 一种抑制有需要的受试者肿瘤生长的方法,所述方法包含向受试者施用权利要求1-78中任一项所述的有效量的重组腺病毒以抑制肿瘤细胞的生长。

83. 一种治疗需要的受试者癌症的方法,所述方法包含向受试者施用权利要求1-78中任一项所述的有效量的重组腺病毒以治疗受试者的癌症。

84. 如权利要求83中所述的方法,其中重组腺病毒与抗血管生成剂联合施用。

85. 如权利要求83或84中所述的方法,其中重组腺病毒与选自手术、放疗、化疗、免疫疗法、激素疗法或病毒疗法的一种或多种疗法联合施用。

86. 一种治疗需要的受试者癌症的方法,所述方法包含向受试者施用有效量的(i) 重组腺病毒和(ii) 抗血管生成剂的组合以治疗受试者的癌症。

87. 如权利要求86中所述的方法,其中所述重组腺病毒是5型腺病毒(Ad5)。

88. 如权利要求86或87中所述的方法,其中所述重组腺病毒不包含Pea3结合位点或其功能部分的缺失。

89. 如权利要求86-88中任一项所述的方法,其中所述重组腺病毒包含具有功能性TATA盒缺失的E1a启动子。

90. 如权利要求89中所述的方法,其中所述缺失包含整个TATA盒的缺失。
91. 如权利要求89或90中所述的方法,其中所述缺失包含E1a启动子的第-27至-24位对应核苷酸缺失。
92. 如权利要求89-91中任一项所述的方法,其中所述缺失包含E1a启动子的第-31至-24位对应核苷酸缺失。
93. 如权利要求89-92中任一项所述的方法,其中所述缺失包含E1a启动子的第-44至+54位对应核苷酸缺失。
94. 如权利要求89-93中任一项所述的方法,其中所述缺失包含E1a启动子的第-146至+54位对应核苷酸缺失。
95. 如权利要求89-94中任一项所述的方法,其中所述缺失包含Ad5基因组 (SEQ ID NO: 1) 的第472至475位对应核苷酸的缺失。
96. 如权利要求89-95中任一项所述的方法,其中所述缺失包含Ad5基因组 (SEQ ID NO: 1) 的第468至475位对应核苷酸的缺失。
97. 如权利要求89-96中任一项所述的方法,其中所述缺失包含Ad5基因组 (SEQ ID NO: 1) 的第455至552位对应核苷酸的缺失。
98. 如权利要求89-97中任一项所述的方法,其中所述缺失包含Ad5基因组 (SEQ ID NO: 1) 的第353至552位对应核苷酸的缺失。
99. 如权利要求89-98中任一项所述的方法,其中所述重组腺病毒包含了一个多核苷酸缺失,产生包含包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO: 23)、AGTGCCCC (SEQ ID NO: 30) 和/或TATTCCCCG (SEQ ID NO: 31) 的腺病毒。
100. 如权利要求89-99中任一项所述的方法,其中所述E1a启动子包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO: 23)。
101. 如权利要求86-100中任一项所述的方法,其中所述重组腺病毒包含具有功能性CAAT盒缺失的E1a启动子。
102. 如权利要求101中所述的方法,其中所述缺失包含整个CAAT盒的缺失。
103. 如权利要求101或102中所述的方法,其中所述缺失包含E1a启动子的第-76到-68位对应核苷酸的缺失。
104. 如权利要求101-103中任一项所述的方法,其中所述缺失包含Ad5基因组 (SEQ ID NO: 1) 的第423到431位对应核苷酸的缺失。
105. 如权利要求101-104中任一项所述的方法,其中所述重组腺病毒包含了一个多核苷酸缺失,可导致腺病毒包含包含序列TTCCGTGGCG (SEQ ID NO: 32)。
106. 如权利要求86-105中任一项所述的方法,其中所述重组腺病毒在高增殖细胞中选择性复制。
107. 如权利要求86-106中任一项所述的方法,其中所述重组腺病毒在高增殖细胞中选择性表达内皮抑素和/或血管抑素。
108. 如权利要求106或107中所述的方法,其中所述高增殖细胞是癌细胞。
109. 如权利要求86-108中任一项所述的方法,其中所述重组腺病毒是溶瘤腺病毒。
110. 如权利要求86-109中任一项所述的方法,其中所述重组腺病毒和抗血管生成剂与选自手术、放疗、化疗、免疫疗法、激素疗法或病毒疗法的一种或多种疗法联合施用。

111. 如权利要求83-110中任一项所述的方法,其中所述癌症选自肛门癌、基底细胞癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、癌、胆管癌、宫颈癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌、胃食管癌、胃肠道(GI)癌、胃肠道间质瘤、肝细胞癌、妇科癌、头颈癌、血液癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、间皮瘤、神经内分泌癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、儿童癌、前列腺癌、肾细胞癌、肉瘤、皮肤癌、小细胞肺癌、皮肤鳞状细胞癌、胃癌、睾丸癌和甲状腺癌。

112. 如权利要求83-111中任一项所述的方法,其中所述癌症选自黑色素瘤、皮肤鳞状细胞癌、基底细胞癌、头颈部癌、乳腺癌、肛门癌、宫颈癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、小细胞肺癌、肾细胞癌、前列腺癌、胃食管癌、结直肠癌、睾丸癌、膀胱癌、卵巢癌、肝癌、肝细胞癌、胆管癌、脑和中枢神经系统癌、甲状腺癌、子宫内膜癌、神经内分泌癌、淋巴瘤(如霍奇金和非霍奇金)、白血病、默克尔细胞癌、胃肠道间质瘤、多发性骨髓瘤、子宫癌、肉瘤、肾癌、眼癌,和胰腺癌。

113. 如权利要求83-110中任一项所述的方法,其中所述癌症选自胃食管癌(如胃或胃食管交界腺癌)、非小细胞肺癌(如转移性NSCLC)、结直肠癌(如转移性结直肠癌)、卵巢癌(如铂耐药卵巢癌)、白血病、宫颈癌(如晚期宫颈癌)、脑和中枢神经系统癌(如胶质母细胞瘤)、肾癌(如肾细胞癌)、肉瘤(如横纹肌肉瘤、骨肉瘤和尤因肉瘤)、淋巴瘤(如霍奇金和非霍奇金)、眼癌(如脉络膜黑色素瘤和视网膜母细胞瘤)和冯·希佩尔·林道病。

114. 如权利要求83-110中任一项所述的方法,其中所述癌症选自脑和中枢神经系统癌(如星形细胞瘤、脑干胶质瘤、颅咽管瘤、增生性婴儿神经节细胞瘤、室管膜瘤、高级别胶质瘤、髓母细胞瘤、非典型畸胎样横纹肌瘤、神经母细胞瘤)、肾癌(如肾母细胞瘤(威尔姆氏瘤))、眼癌(如视网膜母细胞瘤)、肉瘤(如横纹肌肉瘤,骨肉瘤和尤因肉瘤)、肝癌(如肝母细胞瘤和肝细胞癌)、淋巴瘤(如霍奇金和非霍奇金)、白血病和生殖细胞瘤。

115. 如权利要求84-114中任一项所述的方法,其中所述抗血管生成剂选自阿柏西普、抗VEGF抗体(如贝伐单抗和雷珠单抗)、舒尼替尼、帕唑帕尼、索拉非尼、瑞格菲尼、凡德他尼、卡博替尼、阿昔替尼、替沃扎尼、利尼伐尼、哌加他尼、安体舒通、吲哚美辛、沙利度胺、白细胞介素-12、FGF抗体、酪氨酸激酶抑制剂、干扰素、苏拉明、苏拉明类似物、生长抑素和生长抑素类似物。

116. 如权利要求84-114中任一项所述的方法,其中所述抗血管生成剂选自阿柏西普、贝伐单抗、雷珠单抗、舒尼替尼、帕唑帕尼、索拉非尼、瑞格菲尼、凡德他尼、卡博替尼、阿昔替尼、替沃扎尼和利尼伐尼。

117. 如权利要求115或116中所述的方法,其中所述抗血管生成剂是贝伐单抗。

118. 如权利要求117中所述的方法,其中所述贝伐单抗以小于约5mg/kg,例如从约1mg/kg到约5mg/kg的剂量施用。

119. 如权利要求118中所述的方法,其中所述贝伐单抗以约2.5mg/kg的剂量施用。

120. 如权利要求83-119中任一项所述的方法,其中所述重组腺病毒与第二种重组腺病毒联合施用。

121. 如权利要求120中所述的方法,其中所述第二种重组腺病毒包含编码多肽或其片段的核苷酸序列,该多肽或其片段选自乙酰胆碱、雄激素受体、抗PD-1抗体重链和/或轻链、抗PD-L1抗体重链和/或轻链、BORIS/CTCFL、BRAF、CD19、CD20、CD30、CD80、CD86、CD137、

CD137L、CD154、CEA、DKK1/Wnt、EGFRvIII、FGF、gp100、Her-2/neu、ICAM、IL-1、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、IL-9、IL-17、IL-23A/p19、p40、IL-24、IL-27、IL-27A/p28、IL-27B/EBI3、IL-35、interferon-gamma(干扰素 $\gamma$ )、KRAS、MAGE、MAGE-A3、MART1、melan-A、mesothelin(间皮素)、MUC-1、NY-ESO-1、Podocalyxin(Podxl)、p53、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$ trap、胸苷激酶和酪氨酸酶。

122. 如权利要求120中所述的方法,其中所述第二种重组腺病毒包含编码多肽或其片段的核苷酸序列,该多肽或其片段选自乙酰胆碱、雄激素受体、抗PD-1抗体重链和/或轻链、抗PD-L1抗体重链和/或轻链、BORIS/CTCFL、BRAF、CD19、CD20、CD30、CD80、CD86、CD137、CD137L、CD154、CEA、DKK1/Wnt、EGFRvIII、FGF、gp100、Her-2/neu、ICAM、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-23A/p19、p40、IL-24、干扰素 $\gamma$ 、KRAS、MAGE、MAGE-A3、MART1、melan-A、间皮素、MUC-1、NY-ESO-1、Podocalyxin(Podxl)、p53、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$ trap、胸苷激酶和酪氨酸酶。

123. 如权利要求120中所述的方法,其中所述第二种重组腺病毒包含编码癌症抗原的核苷酸序列,癌症抗原来源于9D7、雄激素受体、BAGE家族蛋白、 $\beta$ -catenin(连环蛋白)、BING-4、BRAF、BRCA1/2、CAGE家族蛋白、钙激活氯通道2、CD19、CD20、CD30、CDK4、CEA、CML66、CT9、CT10、cyclin-B1(细胞周期蛋白-B1)、EGFRvIII、Ep-CAM、EphA3、fibronectin(纤维连接蛋白)、GAGE家族蛋白、gp100/pme117、Her-2/neu、HPV E6、HPV E7、Ig、不成熟层粘连蛋白受体、MAGE家族蛋白(如MAGE-A3)、MART-1/melan-A、MART2、MC1R、mesothelin(间皮素)、粘蛋白家族蛋白(如MUC-1)、NY-ESO-1/LAGE-1、P. polypeptide(P多肽)、p53、Podocalyxin(Podxl)、前列腺特异性抗原、SAGE家族蛋白、SAP-1、SSX-2、survivin(生存素)、TAG-72、TCR、telomerase(端粒酶)、TGF- $\beta$ RII、TRP-1、TRP-2、tyrosinase(酪氨酸酶)、或XAGE家族蛋白。

124. 如权利要求120-123中任一项所述的方法,其中所述第二种重组腺病毒是溶瘤病毒。

125. 一种在需要的受试者中降低血压的方法,所述方法包括向受试者施用权利要求1-78中任一项所述的重组腺病毒的以降低受试者的血压。

126. 一种在需要的受试者中增加一氧化氮(NO)产生的方法,所述方法包括向受试者施用权利要求1-78中任一项所述的有效量的重组腺病毒以增加受试者中一氧化氮(NO)的产生。

127. 一种治疗和/或预防需要的受试者高血压的方法,所述方法包括向受试者施用权利要求1-78中任一项所述的有效量的重组腺病毒以治疗和/或预防受试者高血压。

128. 如权利要求82-127中任一项所述的方法,其中受试者正在接受或已接受了VEGF抑制剂。

129. 如权利要求80-128中任一项所述的方法,其中重组腺病毒的有效量是例如 $10^2$ - $10^{15}$ 空斑形成单位(pfus)。

130. 如权利要求82-129中任一项所述的方法,其中受试者是人或是动物。

131. 如权利要求130中所述的方法,其中受试者是儿童。

## 抗血管生成的腺病毒

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2017年5月24日提交的美国临时申请序列号62/510,647以及2017年6月2日提交的美国临时申请序列号62/510,647的优先权的权益。

### 技术领域

[0003] 本发明的领域是分子生物学和病毒学,特别是重组腺病毒和使用重组腺病毒治疗癌症的方法。

### 背景技术

[0004] 尽管对导致癌症的潜在分子机制有着广泛的了解,但大多数晚期癌症仍然无法通过当前的化学疗法和放射疗法治愈。溶瘤病毒现在已经成为一种平台技术,有可能显著提高目前各种恶性肿瘤的标准治疗水平(Kumar, S. et al. (2008) 分子治疗学现状 (CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS) 10 (4) :371-379; Kim, D. (2001) 生物治疗专家意见 (EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY) 1 (3) :525-538; Kim D. (2000) ONCOGENE 19 (56) :6660-6669)。这些病毒已显示出作为溶瘤剂的前景,不仅可以通过感染-复制-裂解链式反应直接破坏恶性细胞,还可以间接诱导抗肿瘤免疫。这些免疫刺激特性会随着治疗性转基因的插入和每次病毒复制时对其的复制和表达而增强。

[0005] 先前开发的溶瘤病毒包括溶瘤血清5型腺病毒(Ad5),称为TAV-255,在正常细胞中转录减弱,但在癌细胞中转录活跃(见PCT公开号W02010/101921)。据认为,TAV-255载体实现这种肿瘤选择性的机制是通过靶向删除转录因子Pea3和E2F的三个转录因子(TF)结合位点,Pea3和E2F这两个蛋白质通过与特定DNA序列结合,调节腺病毒进入宿主细胞后最早被转录的基因E1a的表达。

[0006] 尽管迄今为止进行了努力,但仍需要改进溶瘤病毒,以治疗人类受试者的癌症和高增殖性疾病。

### 发明内容

[0007] 本发明部分基于发现了能够有效表达抗血管生成因子(如内皮抑素和/或血管抑素)的重组腺病毒。此外,本发明部分基于发现了当将抗VEGF抗体(如贝伐单抗)与重组腺病毒(如本文所述的表达内皮抑素和/或血管抑素的腺病毒)联合给药时,可以增强用抗VEGF抗体的抗癌治疗。令人惊讶的是,已有发现,对于某些癌症,单独施用本文描述的重组腺病毒或将其与抗VEGF抗体(如贝伐单抗)联合施药,不仅减缓或阻止了肿瘤生长,而且还导致了肿瘤的部分和/或完全缓解。

[0008] 因此,在一方面,本发明提供一种重组腺病毒,其包含编码选自内皮抑素和血管抑素的插入到E1b-19K插入位点的第一个治疗性转基因的第一个核苷酸序列;其中,E1b-19K插入位点位于E1b-19K起始位点和E1b-55K起始位点之间。

[0009] 在某些实施例中,所述重组腺病毒是5型腺病毒(Ad5)。

[0010] 在某些实施例中, E1b-19K插入位点位于E1b-19K起始位点与E1b-19K终止位点之间。在某些实施例中, E1b-19K插入位点包含临近E1b-19K起始位点从约100至约305、约100至约300、约100至约250、约100至约200、约100至约150、约150至约305、约150至约300、约150至约250、或约150至约200个核苷酸的缺失。在某些实施例中, E1b-19K插入位点包含约200个核苷酸, 例如临近E1b-19K起始位点的202个或203个核苷酸的缺失。在某些实施例中, E1b-19K插入位点包含Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第1714-1916位对应核苷酸的缺失, 或第一个治疗性转基因被插入到Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第1713和1917位对应核苷酸之间。在某些实施例中, 第一个治疗性转基因被插入到CTGACCTC (SEQ ID NO:2) 和TCACCAGG (SEQ ID NO:3) 之间, 例如, 从5' 到3' 方向, 重组腺病毒包含CTGACCTC (SEQ ID NO:2), 第一个治疗性转基因, 以及TCACCAGG (SEQ ID NO:3)。

[0011] 在某些实施例中, 重组腺病毒包含编码选自内皮抑素或血管抑素的第二个治疗性转基因的第二个核苷酸序列。在某些实施例中, 第二个治疗性转基因被插入到E1b-19k起始位点, 且第一个核苷酸序列和第二个核苷酸序列通过内部核糖体进入位点 (IRES) 进行分离。IRES可以是, 例如, 选自脑心肌炎病毒 (EMCV) IRES、口蹄疫病毒 (FMDV) IRES、以及脊髓灰质炎病毒IRES。IRES可以是, 例如, 包含SEQ ID NO:20。在某些实施例中, 第一个和第二个治疗性转基因被插入到Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第1713和1917位对应核苷酸之间, 例如, 第一个和第二个治疗性转基因被插入到CTGACCTC (SEQ ID NO:2) 和TCACCAGG (SEQ ID NO:3) 之间, 例如, 从5' 到3' 方向, 重组腺病毒包含CTGACCTC (SEQ ID NO:2), 第一个治疗性转基因, IRES, 第二个治疗性转基因, 以及TCACCAGG (SEQ ID NO:3)。

[0012] 在某些实施例中, 重组腺病毒包含E3缺失。在某些实施例中, E3缺失包含从约500至约3185、从约500至约3000、从约500至约2500、从约500至约2000、从约500至约1500、从约500至约1000、从约1000至约3185、从约1000至约3000、从约1000至约2500、从约1000至约2000、从约1000至约1500、从约1500至约3185、从约1500至约3000、从约1500至约2000、从约2000至约3185、从约2000至约3000、从约2000至约2500、从约2500至约3185、从约2500至约3000、或从约3000至约3185个核苷酸的缺失。在某些实施例中, E3缺失位点位于pVIII终止位点和Fiber起始位点之间。在某些实施例中, E3缺失位点位于E3-10.5K终止位点和E3-14.7K终止位点之间。在某些实施例中, E3缺失包含临近E3-10.5K终止位点的从约500至约1551、从约500至约1500、从约500至约1000、从约1000至约1551、从约1000至约1500、或从约1500至约1551个核苷酸的缺失。在某些实施例中, E3缺失包含临近E3-10.5K终止位点的约1050个核苷酸的缺失, 例如, E3缺失包含临近E3-10.5K终止位点的1063个或1064个核苷酸的缺失。在某些实施例中, E3缺失包含Ad5d1309E3缺失的对应核苷酸的缺失。在某些实施例中, E3缺失包含Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第29773-30836位对应核苷酸的缺失。

[0013] 在某些实施例中, 第二个治疗性转基因被插入到E3插入位点, 其中E3插入位点位于pVIII终止位点和Fiber起始位点之间。在某些实施例中, E3插入位点包含从约500至约3185、从约500至约3000、从约500至约2500、从约500至约2000、从约500至约1500、从约500至约1000、从约1000至约3185、从约1000至约3000、从约1000至约2500、从约1000至约2000、从约1000至约1500、从约1500至约3185、从约1500至约3000、从约1500至约2000、从约2000至约3185、从约2000至约3000、从约2000至约2500、从约2500至约3185、从约2500至约3000、或从约3000至约3185个核苷酸的缺失。在某些实施例中, E3插入位点位于E3-10.5K终止位

点和E3-14.7K终止位点之间。在某些实施例中，E3插入位点包含临近E3-10.5K终止位点的从约500至约1551、从约500至约1500、从约500至约1000、从约1000至约1551、从约1000至约1500、或从约1500至约1551个核苷酸的缺失。在某些实施例中，E3插入位点包含临近E3-10.5K终止位点的约1050个核苷酸的缺失，例如，E3插入位点包含临近E3-10.5K终止位点的1063个或1064个核苷酸的缺失。在某些实施例中，E3插入位点包含Ad5d1309E3缺失的对应核苷酸的缺失。在某些实施例中，E3插入位点包含Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第29773-30836位对应核苷酸的缺失，或者第二个治疗性转基因被插入到Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第29773-30836位对应核苷酸之间。在某些实施例中，第二个治疗性转基因被插入到CAGTATGA (SEQ ID NO:4) 和TAATAAAAAA (SEQ ID NO:5) 之间，例如，从5'到3'方向，重组腺病毒包含CAGTATGA (SEQ ID NO:4)，第二个治疗性转基因，以及TAATAAAAAA (SEQ ID NO:5)。

[0014] 在某些实施例中，在上述任一腺病毒中，所述重组腺病毒包含编码SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的核苷酸序列，或包含具有与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在某些实施例中，在上述任一腺病毒中，所述重组腺病毒包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的核苷酸序列，或包含具有与SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0015] 在某些实施例中，在上述任一腺病毒中，所述重组腺病毒包含编码SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17的氨基酸序列的核苷酸序列，或包含具有与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17的80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在某些实施例中，在上述任一腺病毒中，所述重组腺病毒包含SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19的核苷酸序列，或包含具有与SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19的80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0016] 在某些实施例中，在上述任一腺病毒中，所述重组腺病毒包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列，或包含具有与SEQ ID NO:21的80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0017] 在某些实施例中，上述任一腺病毒可包含至少一个Pea3结合位点或其功能部分的缺失，例如，所述腺病毒可包含E1a起始位点上游约-300至约-250位对应核苷酸的缺失，或E1a起始位点上游约-304或-305至约-255位对应核苷酸的缺失。在某些实施例中，所述重组腺病毒可包含Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第195-244位对应核苷酸的缺失，和/或所述重组腺病毒可包含序列GGTGTGG (SEQ ID NO:22)。在某些实施例中，上述任一重组腺病毒可包含至少一个Pea3结合位点或其功能部分的缺失，并且不包含E2F结合位点的缺失。

[0018] 在某些实施例中，上述任一重组腺病毒可包含至少一个E2F结合位点或其功能部分的缺失。在某些实施例中，上述任一重组腺病毒可包含至少一个E2F结合位点或其功能部分的缺失，并且不包含Pea3结合位点的缺失。

[0019] 在某些实施例中，上述任一重组腺病毒可包含具有功能性TATA盒的缺失(例如，整个TATA盒的缺失)的E1a启动子。例如，在某些实施例中，所述重组腺病毒包含五型腺病毒

E1a启动子-27至-24、-31至-24、-44至+54、-146至+54位对应核苷酸的缺失,其各自对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第472至475、468至475、455至552以及353至552号核苷酸。在某些实施例中,所述重组腺病毒可包含E1a启动子-29至-26、-33至-26、-44至+52、-148至+52位对应核苷酸的缺失。在某些实施例中,所述重组腺病毒包含了一个多核苷酸的缺失,可导致腺病毒包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO:23)、AGTCCCCG (SEQ ID NO:30) 或TATTCCCG (SEQ ID NO:31),这些序列是通过连接位于被删除的多核苷酸序列两侧的两个多核苷酸序列产生。在某些实施例中,所述重组腺病毒包含Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第353-552位对应核苷酸的缺失,和/或所述E1a启动子包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO:23)。

[0020] 在某些实施例中,上述任一重组腺病毒可包含具有功能性CAAT盒的缺失(例如,整个CAAT盒的缺失)的E1a启动子。例如,在某些实施例中,所述重组腺病毒包含五型腺病毒E1a启动子-76至-68位对应核苷酸的缺失,其对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第423至431号核苷酸。在某些实施例中,所述重组腺病毒包含了一个多核苷酸的缺失,可导致腺病毒包含序列TTCCGTGGCG (SEQ ID NO:32),此序列是通过连接位于被删除的多核苷酸序列两侧的两个多核苷酸序列产生。

[0021] 在某些实施方案中,第一个和/或第二个治疗性转基因并非操作性地与外源启动子序列连接。在某些实施例中,两个治疗性转基因都不与外源启动子序列操作性地连接。

[0022] 在某些实施方案中,上述任何重组腺病毒可选择性地在高增殖细胞中复制。在某些实施例中,上述任何重组腺病毒可选择性地在高增殖细胞中表达内皮抑素和/或血管抑素。高增殖细胞可以是癌细胞,例如肺癌细胞、结肠癌细胞和胰腺癌细胞。在某些实施例中,上述任何重组腺病毒可为溶瘤腺病毒。

[0023] 在另一方面,本发明提供一种药物组合物,其包含上述任一重组腺病毒和至少一种药物学可接受的载体或稀释剂。

[0024] 在另一方面,本发明提供了一种治疗受试者癌症的方法。该方法包含向受试者施用有效量的(i)重组腺病毒和(ii)抗血管生成剂的组合以治疗受试者中的癌症。

[0025] 在某些实施例中,抗血管生成剂选自阿柏西普、抗VEGF抗体(如贝伐单抗和雷珠单抗)、舒尼替尼、帕唑帕尼、索拉非尼、瑞格菲尼、凡德他尼、卡博替尼、阿昔替尼、替沃扎尼、利尼伐尼、哌加他尼、安体舒通、吲哚美辛、沙利度胺、白细胞介素-12、FGF抗体、酪氨酸激酶抑制剂、干扰素、苏拉明、苏拉明类似物、生长抑素和生长抑素类似物。在某些实施例中,抗血管生成剂选自阿柏西普、贝伐单抗、雷珠单抗、舒尼替尼、帕唑帕尼、索拉非尼、瑞格菲尼、凡德他尼、卡博替尼、阿昔替尼、替沃扎尼和利尼伐尼。在某些实施例中,抗血管生成剂是贝伐单抗,例如贝伐单抗以约1mg/kg至约5mg/kg的剂量施用,或贝伐单抗以约2.5mg/kg的剂量施用。

[0026] 在上述任何方法的某些实施例中,所述重组腺病毒可包含至少一个Pea3结合位点或其功能部分的缺失,例如,所述腺病毒可包含E1a起始位点上游约-300至约-250位对应核苷酸的缺失,或E1a起始位点上游约-304或-305至约-255位对应核苷酸的缺失。在某些实施例中,所述重组腺病毒可包含Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第195-244位对应核苷酸的缺失,和/或所述重组腺病毒可包含序列GGTGTTTGG (SEQ ID NO:22)。

[0027] 在上述任何方法的某些实施例中,所述重组腺病毒可包含具有功能性TATA盒的缺失(例如,整个TATA盒的缺失)的E1a启动子。例如,在某些实施例中,所述重组腺病毒包含五

型腺病毒E1a启动子-27至-24、-31至-24、-44至+54或-146至+54位对应核苷酸的缺失,其各自对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第472至475、468至475、455至552以及353至552号核苷酸。在某些实施例中,所述重组腺病毒包含了一个多核苷酸的缺失,可导致腺病毒包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO:23)、AGTGCCCC (SEQ ID NO:30) 或TATTCCCC (SEQ ID NO:31),这些序列是通过连接位于被删除的多核苷酸序列两侧的两个多核苷酸序列产生。

[0028] 在上述任何方法的某些实施例中,所述重组腺病毒可包含具有功能性CAAT盒的缺失(例如,整个CAAT盒的缺失)的E1a启动子。例如,在某些实施例中,所述重组腺病毒包含五型腺病毒E1a启动子-76至-68位对应核苷酸的缺失,其对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第423至431号核苷酸。在某些实施例中,所述重组腺病毒包含了一个多核苷酸的缺失,可导致腺病毒包含序列TTCCGTGGCG (SEQ ID NO:32),此序列是通过连接位于被删除的多核苷酸序列两侧的两个多核苷酸序列产生。

[0029] 在上述任何方法的某些实施例中,所述重组腺病毒可选择性地在高增殖细胞中复制。在某些实施例中,上述任何重组腺病毒可选择性地在高增殖细胞中表达内皮抑素和/或血管抑素。高增殖细胞可以是癌细胞,例如肺癌细胞、结肠癌细胞和胰腺癌细胞。在某些实施例中,上述任何重组腺病毒可为溶瘤腺病毒。

[0030] 在另一方面,本发明提供了一种治疗受试者癌症的方法。该方法包含向受试者施用有效量的本文所述重组腺病毒以治疗受试者中的癌症。所述重组腺病毒可以,例如,当与选自手术、放疗、化疗、免疫治疗、激素疗法,和病毒疗法中的一或多种疗法联合施药。在某些实施例中,所述重组腺病毒与一个抗血管生成剂联合施药。在某些实施例中,抗血管生成剂选自阿柏西普、抗VEGF抗体(如贝伐单抗和雷珠单抗)、舒尼替尼、帕唑帕尼、索拉非尼、瑞格菲尼、凡德他尼、卡博替尼、阿昔替尼、替沃扎尼、利尼伐尼、哌加他尼、安体舒通、吲哚美辛、沙利度胺、白细胞介素-12、FGF抗体、酪氨酸激酶抑制剂、干扰素、苏拉明、苏拉明类似物、生长抑素和生长抑素类似物。在某些实施例中,抗血管生成剂选自阿柏西普、贝伐单抗、雷珠单抗、舒尼替尼、帕唑帕尼、索拉非尼、瑞格菲尼、凡德他尼、卡博替尼、阿昔替尼、替沃扎尼和利尼伐尼。在某些实施例中,所述重组腺病毒与贝伐单抗联合施药,例如贝伐单抗以约1mg/kg至约5mg/kg的剂量施用,或贝伐单抗以约2.5mg/kg的剂量施用。

[0031] 在上述任何方法的某些实施例中,所述癌症选自肛门癌、基底细胞癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、癌、胆管癌、宫颈癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌、胃食管癌、胃肠道(GI)癌、胃肠道间质瘤、肝细胞癌、妇科癌、头颈癌、血液癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、间皮瘤、神经内分泌癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、儿童癌、前列腺癌、肾细胞癌、肉瘤、皮肤癌、小细胞肺癌、皮肤鳞状细胞癌、胃癌、睾丸癌和甲状腺癌。

[0032] 在上述任何方法的某些实施例中,所述癌症选自胃食管癌(如胃或胃食管交界腺癌)、非小细胞肺癌(如转移性NSCLC)、结直肠癌(如转移性结直肠癌)、卵巢癌(如铂耐药卵巢癌)、白血病、宫颈癌(如晚期宫颈癌)、脑和中枢神经系统癌(如胶质母细胞瘤)、肾癌(如肾细胞癌)、肉瘤(如横纹肌肉瘤、骨肉瘤和尤因肉瘤)、淋巴瘤(如霍奇金和非霍奇金)、眼癌(如脉络膜黑色素瘤和视网膜母细胞瘤)和冯·希佩尔·林道病。

[0033] 在上述任何方法的某些实施例中,所述癌症选自脑和中枢神经系统癌(如星形细胞瘤、脑干胶质瘤、颅咽管瘤、增生性婴儿神经节细胞瘤、室管膜瘤、高级别胶质瘤、髓母细

胞瘤、非典型畸胎样横纹肌瘤、神经母细胞瘤)、肾癌(如肾母细胞瘤(威尔姆氏瘤))、眼癌(如视网膜母细胞瘤)、肉瘤(如横纹肌肉瘤,骨肉瘤和尤因肉瘤)、肝癌(如肝母细胞瘤和肝细胞癌)、淋巴瘤(如霍奇金和非霍奇金)、白血病和生殖细胞瘤。

[0034] 在另一方面,本发明提供了一种抑制受试者肿瘤细胞增殖的方法。该方法包含向受试者施用本文所述的有效量的重组腺病毒以抑制肿瘤细胞的增殖。

[0035] 在另一方面,本发明提供了一种抑制受试者肿瘤生长的方法。该方法包含向受试者施用本文所述的有效量的重组腺病毒以抑制肿瘤细胞的增殖。

[0036] 在上述任何方法的某些实施例中,所述重组腺病毒与第二种重组腺病毒联合使用。在某些实施例中,第二种重组腺病毒是溶瘤腺病毒。在某些实施例中,第二种重组腺病毒包含编码多肽或其片段的核苷酸序列,该多肽或其片段选自乙酰胆碱、雄激素受体、抗PD-1抗体重链和/或轻链、抗PD-L1抗体重链和/或轻链、BORIS/CTCFL、BRAF、CD19、CD20、CD30、CD80、CD86、CD137、CD137L、CD154、CEA、DKK1/Wnt、EGFRvIII、FGF、gp100、Her-2/neu、ICAM、IL-1、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、IL-9、IL-17、IL-23A/p19、p40、IL-24、IL-27、IL-27A/p28、IL-27B/EBI3、IL-35、interferon-gamma(干扰素γ)、KRAS、MAGE、MAGE-A3、MART1、melan-A、mesothelin(间皮素)、MUC-1、NY-ESO-1、Podocalyxin(Podxl)、p53、TGF-β、TGF-β trap、thymidine kinase(胸苷激酶)和tyrosinase(酪氨酸酶)。在某些实施例中,第二种重组腺病毒包含编码癌症抗原的核苷酸序列,癌症抗原来源于9D7、BAGE家族蛋白、β-catenin(连环蛋白)、BING-4、BRAF、BRCA1/2、CAGE家族蛋白、钙激活氯通道2、CD19、CD20、CD30、CDK4、CEA、CML66、CT9、CT10、cyclin-B1(细胞周期蛋白-B1)、EGFRvIII、Ep-CAM、EphA3、fibronectin(纤维连接蛋白)、GAGE家族蛋白、gp100/pme117、Her-2/neu、HPV E6、HPV E7、Ig、不成熟层粘连蛋白受体、MAGE家族蛋白(如MAGE-A3)、MART-1/melan-A、MART2、MC1R、mesothelin(间皮素)、粘蛋白家族蛋白(如MUC-1)、NY-ESO-1/LAGE-1、P. polypeptide(P多肽)、p53、Podocalyxin(Podxl)、前列腺特异性抗原、SAGE家族蛋白、SAP-1、SSX-2、survivin(生存素)、TAG-72、TCR、telomerase(端粒酶)、TGF-βRII、TRP-1、TRP-2、tyrosinase(酪氨酸酶)、或XAGE家族蛋白。

[0037] 在另一方面,本发明提供了一种降低有需要的受试者血压的方法。所述方法包含向受试者施用本文所述的有效量的重组腺病毒以降低受试者的血压。在另一方面,本发明提供了一种在需要的受试者中增加一氧化氮(NO)生成的方法。所述方法包含向受试者施用本文所述的有效量的重组腺病毒以在受试者中增加一氧化氮(NO)的生成。在另一方面,本发明提供一种在有需要的受试者中治疗和/或预防高血压的方法。所述方法包含向受试者施用本文所述的有效量的重组腺病毒以在受试者中治疗和/或预防高血压。在上述各方面中,受试者也可能正在或已经接受VEGF抑制剂。

[0038] 在上述各方法中,所述重组腺病毒的有效量可以是例如 $10^2$ - $10^{15}$ 空斑形成单位(pfus)。在上述各方法中,受试者可以例如是人,譬如儿童,或是动物。

[0039] 在上述各方法中,所述重组腺病毒可以,例如,通过口服、肠外、经皮、局部、静脉、皮下、肌肉、皮内、眼内、硬膜外、气管内、舌下、口腔、直肠、阴道、鼻腔或吸入给药的方式施用于受试者。

[0040] 在另一方面,本发明提供了在靶细胞中表达内皮抑素和/或血管抑素的方法。该方法包含将细胞暴露于有效量的本文所述重组腺病毒中以表达目标转基因。

[0041] 本发明的这些及其它方面和优点将通过以下附图说明、具体实施方式和权利要求进行说明。

## 附图说明

[0042] 参考以下附图可以更完全地理解本发明。

[0043] 图1A-1H示出了表达内皮抑素或血管抑素的溶瘤腺病毒和/或抗VEGF-A抗体对皮下荷ADS-12瘤小鼠的抗肿瘤作用的线形图,其中图1A表示使用磷酸盐缓冲盐(“PBS”)和病毒制剂缓冲液(“缓冲液”)对照的治疗,图1B表示使用贝伐单抗的小鼠同源物(“Bev”)和病毒制剂缓冲液(“缓冲液”)对照的治疗,图1C表示使用表达血管抑制素的TAV-Ang腺病毒(“Ang”)和磷酸盐缓冲盐(“PBS”)的治疗,图1D表示使用贝伐单抗的小鼠同源物(“Bev”)和表达血管抑制素的TAV-Ang腺病毒(“Ang”)的联合治疗,图1E表示使用内皮抑素表达TAV-Endo腺病毒(“Endo”)和磷酸盐缓冲盐(“PBS”)的治疗,图1F表示使用贝伐单抗的小鼠同源物(“Bev”)和内皮抑素表达TAV-Endo腺病毒(“Endo”)的联合治疗,图1G表示使用空TAV- $\Delta$ 19k腺病毒(“19k”)和磷酸盐缓冲盐(“PBS”)的治疗,以及图1H表示使用贝伐单抗的小鼠同源物(“Bev”)和空TAV- $\Delta$ 19k腺病毒(“19k”)的联合治疗。TAV-Ang、TAV-Endo、TAV- $\Delta$ 19k和病毒制剂缓冲液在第0、4和8天通过皮下注射给药,PBS和Bev分别于第1、5、7、9天通过腹腔注射给药。每条线代表一只小鼠的肿瘤体积( $n=10$ /组)。肿瘤体积估算为长 $\cdot$ 宽<sup>2</sup>/2。

[0044] 图2示出了描绘图1所示单个肿瘤体积平均值的线形图。

[0045] 图3示出了描绘图1所示治疗组无进展生存期的折线图。

[0046] 图4描述了长期跟踪图1中所述相同治疗组的结果。图4A-4H示出了表达内皮抑素或血管抑素的溶瘤腺病毒和/或抗VEGF-A抗体对皮下荷ADS-12瘤小鼠的抗肿瘤作用的线形图,其中图4A表示使用磷酸盐缓冲盐(“PBS”)和病毒制剂缓冲液(“缓冲液”)对照的治疗,图4B表示使用贝伐单抗的小鼠同源物(“Bev”)和病毒制剂缓冲液(“缓冲液”)对照的治疗,图4C表示使用表达血管抑制素的TAV-Ang腺病毒(“Ang”)和磷酸盐缓冲盐(“PBS”)的治疗,图4D表示使用贝伐单抗的小鼠同源物(“Bev”)和表达血管抑制素的TAV-Ang腺病毒(“Ang”)的联合治疗,图4E表示使用内皮抑素表达TAV-Endo腺病毒(“Endo”)和磷酸盐缓冲盐(“PBS”)的治疗,图4F表示使用贝伐单抗的小鼠同源物(“Bev”)和内皮抑素表达TAV-Endo腺病毒(“Endo”)的联合治疗,图4G表示使用空TAV- $\Delta$ 19k腺病毒(“19k”)和磷酸盐缓冲盐(“PBS”)的治疗,以及图4H表示使用贝伐单抗的小鼠同源物(“Bev”)和空TAV- $\Delta$ 19k腺病毒(“19k”)的联合治疗。TAV-Ang、TAV-Endo、TAV- $\Delta$ 19k和病毒制剂缓冲液在第0、4和8天通过皮下注射给药,PBS和Bev分别于第1、5、7、9天通过腹腔注射给药。每条线代表一只小鼠的肿瘤体积( $n=10$ /组)。肿瘤体积估算为长 $\cdot$ 宽<sup>2</sup>/2。图4和图1表示来自于同一组实验的数据。

[0047] 图5示出了描绘图4所示单个肿瘤体积平均值的线形图。

[0048] 图6示出了描绘图4所示治疗组无进展生存期的折线图。

[0049] 图7示出了如实施例4所述,用表达血管抑素的溶瘤腺病毒治疗的小鼠中原发肿瘤体积(上)和继发肿瘤体积(下)的线形图。

[0050] 图8A-8D示出了溶瘤腺病毒和/或抗VEGF-A抗体对皮下荷ADS-12瘤小鼠的抗肿瘤作用的线形图,其中图8A表示使用磷酸盐缓冲盐(“PBS”)和病毒制剂缓冲液(“缓冲液”)对照的治疗,图8B表示使用贝伐单抗的小鼠同源物(“Bev”)和病毒制剂缓冲液(“缓冲液”)对

照的治疗,图8C表示使用空TAV-Δ 19k腺病毒(“19k”)和磷酸盐缓冲盐(“PBS”)的治疗,图8D表示使用贝伐单抗的小鼠同源物(“Bev”)和空TAV-Δ 19k腺病毒(“19k”)的联合治疗。TAV-Δ 19k和病毒制剂缓冲液在第0、4和8天通过皮下注射给药,PBS和Bev分别于第1、5、7、9天通过腹腔注射给药。每条线代表一只小鼠的肿瘤体积。肿瘤体积估算为长·宽<sup>2</sup>/2。

[0051] 图9示出了图8所示治疗组治愈率(肿瘤完全缓解)的表格。

## 具体实施方式

[0052] 本发明部分基于发现了能够有效表达抗血管生成因子(如内皮抑素和/或血管抑素)的重组腺病毒。此外,本发明部分基于发现了当将抗VEGF抗体(如贝伐单抗)与重组腺病毒(如本文所述的表达内皮抑素和/或血管抑素的腺病毒)联合给药时,可以增强用抗VEGF抗体的抗癌治疗。令人惊讶的是,已有发现,对于某些癌症,单独施用本文描述的重组腺病毒或将其与抗VEGF抗体(如贝伐单抗)联合施药,不仅减缓或阻止了肿瘤生长,而且还导致了肿瘤的部分和/或完全缓解。

[0053] 因此,在一方面,本发明提供一种重组腺病毒,其包含编码选自内皮抑素和血管抑素的插入到E1b-19K插入位点的第一个治疗性转基因的第一个核苷酸序列;其中,E1b-19K插入位点位于E1b-19K起始位点(即编码E1b-19k起始密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID N0:1的第1714-1716位对应核苷酸)和E1b-55K起始位点(即编码E1b-55k起始密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID N0:1的第2019-2021位对应核苷酸)之间。在说明书和权利要求中,在两个位点之间的插入,例如,在(i)第一个基因的起始位点(例如E1b-19k)和第二个基因的起始位点(例如E1b-55K)之间,(ii)第一个基因的起始位点和第二个基因的终止位点之间,(iii)第一个基因的终止位点和第二个基因的起始位点之间,或者(iv)第一个基因的终止位点和第二个基因的终止位点之间的插入,被理解为组成插入序列周围给定起始位点或终止位点的全部或部分核苷酸可能存在于或不存在于最终病毒中。类似的,两个核苷酸之间的插入被理解为插入序列周围的核苷酸可能存在于或不存在于最终病毒中。术语“转基因”是指外源的基因或多核苷酸序列。术语“治疗性转基因”是指当在病毒中或由病毒复制和/或表达时在靶细胞、体液、组织、器官、生理系统或受试者中产生治疗作用的转基因。

[0054] 在某些实施例中,E1b-19K插入位点位于E1b-19K起始位点(即编码E1b-19k起始密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID N0:1的第1714-1716位对应核苷酸)与E1b-19K终止位点(即编码E1b-19k终止密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID N0:1的第2242-2244位对应核苷酸)之间。在某些实施例中,E1b-19K插入位点包含临近E1b-19K起始位点从约100至约305、约100至约300、约100至约250、约100至约200、约100至约150、约150至约305、约150至约300、约150至约250、或约150至约200个核苷酸的缺失。在某些实施例中,E1b-19K插入位点包含约200个核苷酸的缺失,如临近E1b-19K起始位点202个或203个核苷酸的缺失。在某些实施例中,E1b-19K插入位点包含Ad5基因组(SEQ ID N0:1)第1714-1916位对应核苷酸的缺失。在某些实施例中,第一个治疗性转基因被插入到Ad5基因组(SEQ ID N0:1)第1713和1917位对应核苷酸之间。在某些实施例中,第一个治疗性转基因被插入到CTGACCTC(SEQ ID N0:2)和TCACCAGG(SEQ ID N0:3)之间,例如,从5'到3'方向,重组腺病毒包含CTGACCTC(SEQ ID N0:2),第一个治疗性转基因,以及TCACCAGG(SEQ ID N0:3)。CTGACCTC(SEQ ID N0:2)和TCACCAGG(SEQ ID N0:3)定义了Ad5基因组(SEQ ID N0:1)中E1b-19K插入位点的唯一边界

序列。在整个描述和权利要求中,邻近某个位点的缺失,例如,邻近基因起始位点的缺失或邻近基因终止位点的缺失,被理解为该缺失可包括组成给定起始位点或终止位点的全部、部分或无核苷酸的缺失。

[0055] 在某些实施例中,重组腺病毒包含编码选自内皮抑素或血管抑素的第二个治疗性转基因的第二个核苷酸序列,第二个治疗性转基因被插入到E1b-19k起始位点,且第一个核苷酸序列和第二个核苷酸序列通过内部核糖体进入位点(IRES)进行分离。IRES可以是,例如,选自脑心肌炎病毒(EMCV)IRES、口蹄疫病毒(FMDV)IRES、以及脊髓灰质炎病毒IRES。IRES可以是,例如,包含SEQ ID NO:20。在某些实施例中,第一个和第二个治疗性转基因被插入到Ad5基因组(SEQ ID NO:1)第1713和1917位对应核苷酸之间,例如,第一个和第二个治疗性转基因被插入到CTGACCTC(SEQ ID NO:2)和TCACCAGG(SEQ ID NO:3)之间,例如,从5'到3'方向,重组腺病毒包含CTGACCTC(SEQ ID NO:2),第一个治疗性转基因,IRES,第二个治疗性转基因,以及TCACCAGG(SEQ ID NO:3)。

[0056] 在某些实施例中,重组腺病毒包含E3缺失。在某些实施例中,E3缺失包含从约500至约3185、从约500至约3000、从约500至约2500、从约500至约2000、从约500至约1500、从约500至约1000、从约1000至约3185、从约1000至约3000、从约1000至约2500、从约1000至约2000、从约1000至约1500、从约1500至约3185、从约1500至约3000、从约1500至约2000、从约2000至约3185、从约2000至约3000、从约2000至约2500、从约2500至约3185、从约2500至约3000、或从约3000至约3185个核苷酸的缺失。在某些实施例中,E3缺失位于pVIII终止位点(即编码pVIII终止密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID NO:1的第27855-2785位对应核苷酸)和Fiber起始位点(即编码Fiber起始密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID NO:1的第31042-31044位对应核苷酸)之间。在某些实施例中,E3缺失位点位于E3-10.5K终止位点(即编码E3-10.5K终止密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID NO:1的第29770-29772位对应核苷酸)和E3-14.7K终止位点(即编码E3-14.7K终止密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID NO:1的第30837-30839位对应核苷酸)之间。在某些实施例中,E3缺失包含临近E3-10.5K终止位点的从约500至约1551、从约500至约1500、从约500至约1000、从约1000至约1551、从约1000至约1500、或从约1500至约1551个核苷酸的缺失。在某些实施例中,E3缺失包含临近E3-10.5K终止位点的约1050个核苷酸的缺失,例如,E3缺失包含临近E3-10.5K终止位点的1063个或1064个核苷酸的缺失。在某些实施例中,E3缺失包含Ad5d1309E3缺失的对应核苷酸的缺失。在某些实施例中,E3缺失包含Ad5基因组(SEQ ID NO:1)第29773-30836位对应核苷酸的缺失。

[0057] 在某些实施例中,E3缺失位于E3-gp19K终止位点(即编码E3-gp19K终止密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID NO:1的第29215-29217位对应核苷酸)和E3-14.7K终止位点(即编码E3-14.7K终止密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID NO:1的第30837-30839位对应核苷酸)之间。在某些实施例中,E3缺失包含临近E3-gp19K终止位点的从约500至约1824、从约500至约1500、从约500至约1000、从约1000至约1824、从约1000至约1500、或从约1500至约1824个核苷酸的缺失。在某些实施例中,E3缺失包含临近E3-gp19K终止位点的约1600个核苷酸的缺失,例如,E3缺失包含临近E3-gp19K终止位点的1622个核苷酸的缺失。在某些实施例中,E3缺失包含Ad5基因组(SEQ ID NO:1)第29218-30839位对应核苷酸的缺失。

[0058] 在某些实施例中,重组腺病毒包含编码选自内皮抑素或血管抑素的第二个治疗性

转基因的第二个核苷酸序列,其中第二个治疗性转基因被插入到E3插入位点。在某些实施例中,E3插入位点位于pVIII终止位点(即编码pVIII终止密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID NO:1的第27855-2785位对应核苷酸)和Fiber起始位点(即编码Fiber起始密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID NO:1的第31042-31044位对应核苷酸)之间。在某些实施例中,E3插入位点包含从约500至约3185、从约500至约3000、从约500至约2500、从约500至约2000、从约500至约1500、从约500至约1000、从约1000至约3185、从约1000至约3000、从约1000至约2500、从约1000至约2000、从约1000至约1500、从约1500至约3185、从约1500至约3000、从约1500至约2000、从约2000至约3185、从约2000至约3000、从约2000至约2500、从约2500至约3185、从约2500至约3000、或从约3000至约3185个核苷酸的缺失。在某些实施例中,E3插入位点位于E3-10.5K终止位点(即编码E3-10.5K终止密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID NO:1的第29770-29772位对应核苷酸)和E3-14.7K终止位点(即编码E3-14.7K终止密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID NO:1的第30837-30839位对应核苷酸)之间。在某些实施例中,E3插入位点包含临近E3-10.5K终止位点的从约500至约1551、从约500至约1500、从约500至约1000、从约1000至约1551、从约1000至约1500、或从约1500至约1551个核苷酸的缺失。在某些实施例中,E3插入位点包含临近E3-10.5K终止位点的约1050个核苷酸的缺失,例如,E3插入位点包含临近E3-10.5K终止位点的1063个或1064个核苷酸的缺失。在某些实施例中,E3插入位点包含Ad5d1309E3缺失的对应核苷酸的缺失。在某些实施例中,E3插入位点包含Ad5基因组(SEQ ID NO:1)第29773-30836位对应核苷酸的缺失。在某些实施例中,第二个治疗性转基因被插入到Ad5基因组(SEQ ID NO:1)第29773和30836位对应核苷酸之间。在某些实施例中,第二个治疗性转基因被插入到CAGTATGA(SEQ ID NO:4)和TAATAAAAAA(SEQ ID NO:5)之间,例如,从5'到3'方向,重组腺病毒包含CAGTATGA(SEQ ID NO:4),第二个治疗性转基因,以及TAATAAAAAA(SEQ ID NO:5)。CAGTATGA(SEQ ID NO:4)和TAATAAAAAA(SEQ ID NO:5)定义了Ad5基因组(SEQ ID NO:1)中E3插入位点的唯一边界序列。

[0059] 在某些实施例中,E3插入位点位于E3-gp19K终止位点(即编码E3-gp19K终止密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID NO:1的第29215-29217位对应核苷酸)和E3-14.7K终止位点(即编码E3-14.7K终止密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID NO:1的第30837-30839位对应核苷酸)之间。在某些实施例中,E3插入位点包含临近E3-gp19K终止位点的从约500至约1824、从约500至约1500、从约500至约1000、从约1000至约1824、从约1000至约1500、或从约1500至约1824个核苷酸的缺失。在某些实施例中,E3插入位点包含临近E3-gp19K终止位点的约1600个核苷酸的缺失,例如,E3插入位点包含临近E3-gp19K终止位点的1622个核苷酸的缺失。在某些实施例中,E3插入位点包含Ad5基因组(SEQ ID NO:1)第29218-30839位对应核苷酸的缺失。在某些实施例中,第二个治疗性转基因被插入到Ad5基因组(SEQ ID NO:1)第29218和30839位对应核苷酸之间。在某些实施例中,第二个治疗性转基因被插入到TGCCTTAA(SEQ ID NO:33)和TAAAAAAAAT(SEQ ID NO:34)之间,例如,从5'到3'方向,重组腺病毒包含TGCCTTAA(SEQ ID NO:33),第二个治疗性转基因,以及TAAAAAAAAT(SEQ ID NO:34)。TGCCTTAA(SEQ ID NO:33)和TAAAAAAAAT(SEQ ID NO:34)定义了Ad5基因组(SEQ ID NO:1)中E3插入位点的唯一边界序列。

[0060] 在某些实施例中,重组腺病毒包含E4缺失。在某些实施例中,E4缺失位于E4-ORF6/7起始位点(即编码E4-ORF6/7起始密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID NO:1的第34075-

34077位对应核苷酸)和右反向末端重复序列(ITS;即SEQ ID NO:1的第35836-35938位对应核苷酸)之间。在某些实施例中,E4缺失位于E4-ORF6/7起始位点和E4-ORF1起始位点(即编码E4-ORF1起始密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID NO:1的第35524-35526位对应核苷酸)之间。在某些实施例中,E4缺失包含E4-ORF6/7起始位点和E4-ORF1起始位点之间的核苷酸序列的缺失。在某些实施例中,E4缺失包含从约500至约2500、从约500至约2000、从约500至约1500、从约500至约1000、从约1000至约2500、从约1000至约2000、从约1000至约1500、从约1500至约2500、从约1500至约2000、或从约2000至约2500个核苷酸的缺失。在某些实施例中,E4缺失包含临近E4-ORF6/7起始位点的从约250至约1500、从约250至约1250、从约250至约1000、从约250至约750、从约250至约500、from 500至约1500、从约500至约1250、从约500至约1000、从约500至约750、from 750至约1500、从约750至约1250、从约750至约1000、从约1000至约1500、或从约1000至约1250个核苷酸的缺失。在某些实施例中,E4缺失包含临近E4-ORF6/7起始位点的约1450个核苷酸的缺失,例如,E4缺失包含临近E4-ORF6/7起始位点的1449个核苷酸的缺失。在某些实施例中,E4缺失包含Ad5基因组(SEQ ID NO:1)第34078-35526位对应核苷酸的缺失。

[0061] 在某些实施例中,所述重组腺病毒是溶瘤腺病毒,例如,表现肿瘤选择性复制和/或病毒介导裂解的腺病毒。在某些实施例中,溶瘤腺病毒允许在高增殖细胞中选择性表达治疗性转基因,例如,相对于非高增殖细胞的癌细胞。在某些实施例中,治疗性转基因在非高增殖细胞中的表达约为在高增殖细胞中表达的约90%、约80%、约70%、约60%、约50%、约40%、约30%、约20%、约10%或约5%。在某些实施例中,腺病毒在非高增殖细胞中未显示出可检测的治疗性转基因的表达。治疗性转基因表达可通过本领域已知的任何适当方法测定,例如Western blot(蛋白印迹)或ELISA(酶联免疫吸附测定)。

[0062] 高增殖细胞可能是癌细胞,如癌、肉瘤、白血病、淋巴瘤、前列腺癌、肺癌、胃肠道癌、结直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃癌、甲状腺癌、间皮瘤、肝癌、肾癌、皮肤癌、头颈癌或脑癌细胞,其将在下面第IV节中作更详细讨论。

[0063] I. 病毒

[0064] 本文所用术语“病毒”是指没有蛋白质合成或能量产生机制的任何专性细胞内寄生性生物。病毒基因组可以是RNA或DNA。在本发明的实践中可用的病毒包括重组修饰的包膜或非包膜DNA和RNA病毒,优选地选自杆状病毒科、细小病毒科、痘病毒科、疱疹病毒科、痘病毒科或腺病毒科。重组修饰病毒在此称为“重组病毒”。重组病毒可例如通过重组DNA技术修饰为复制缺陷、条件性复制、或复制态,和/或通过重组DNA技术修饰以包括外源转基因的表达。利用每个亲代载体特性的有利元素的嵌合病毒载体(参见,例如,Feng et al. (1997) NATURE BIOTECHNOLOGY(自然生物技术) 15:866-870)也可用于本发明的实践。尽管通常倾向于使用来自待治疗物种的病毒,但在某些情况下,使用来自具有良好致病特性的不同物种的载体可能是有利的。例如,在PCT公开号W0 98/27216中描述了用于人类基因治疗的马痘病毒载体。因为马病毒对人类没有致病性,这些载体被描述为对人类的治疗有用。类似地,绵羊腺病毒载体声称可避免针对人类腺病毒载体的抗体,可被用于人类基因治疗。这类载体在PCT公开号W0 97/06826中有所描述。

[0065] 优选的,重组病毒是腺病毒。腺病毒是由核衣壳和双链线性DNA基因组组成的中型(90-100nm)、无包膜(裸)二十面体病毒。腺病毒利用宿主的复制机制在哺乳动物细胞核内

进行复制。术语“腺病毒”指腺病毒科的任何病毒,包括但不限于人、牛、羊、马、犬、猪、鼠和猿猴腺病毒亚属。人类腺病毒包括A-F亚属及其各血清型、各血清型和A-F亚属包括但不限于人类腺病毒1、2、3、4、4a、5、6、7、8、9、10、11(Ad11a和Ad11p)、12、13、14、15、16、17、18、19、19a、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和91型。优选来自人类腺病毒2型和5型的重组病毒。除非另有说明,否则所有腺病毒5型核苷酸编号均参考NCBI参考序列AC\_000008.1,在本文SEQ ID NO:1中进行了描述。

[0066] 腺病毒复制周期有两个阶段:一个早期阶段,在此期间表达4个转录单位(E1、E2、E3和E4);和一个晚期阶段,发生在病毒DNA合成开始后,在此期间晚期转录物主要从主要晚期启动子(MLP)表达。晚期信息编码病毒的大部分结构蛋白。E1、E2和E4的基因产物负责转录激活、细胞转化、病毒DNA复制以及其他病毒功能,是病毒生长所必需的。

[0067] 术语“操作性连接”指功能关系中多核苷酸元素的连接。当一个核酸序列与另一个核酸序列处于功能关系时,它是“操作性连接”的。例如,如果一个启动子或增强子影响基因的转录时,它是与基因操作性连接的。操作性连接的核苷酸序列通常是连续的。然而,由于增强子通常在经数千个碱基分离于启动子时起作用,并且内含子序列可能是可变长度的,一些多核苷酸元素可能是操作性连接的而不是直接侧翼的,并且甚至可能从不同等位基因或染色体的进行反式作用。

[0068] 在某些实施例中,病毒对调节序列或启动子具有一个或多个修饰。对调控序列或启动子的修饰包括与野生型调控序列或启动子的序列相比的一个或多个核苷酸的缺失、替换或添加。

[0069] 在某些实施例中,调节序列或启动子的修饰包括修饰转录因子结合位点的序列以降低对转录因子的亲和力,例如,通过删除其中的一部分,或通过在结合位点中插入单点突变。在某些实施例中,额外修饰的调节序列增强了在肿瘤细胞中的表达,但减弱了在正常细胞中的表达。

[0070] 在某些实施例中,经修饰的调节序列操作性连接到编码蛋白质的序列。在某些实施例中,所述腺病毒E1a和E1b基因(编码区域)中的至少一个与经修饰的调节序列操作性连接。在某些实施例中,E1a基因与经修饰的调节序列操作性连接。

[0071] E1a调节序列包含转录因子Pa3的五个结合位点,命名为Pea3 I、Pea3 II、Pea3 III、Pea3 IV和Pea3 V,其中Pea3 I是最接近E1a起始位点的Pea3结合位点,Pea3 V是最远端的。E1a调节序列还包含转录因子E2F的结合位点,在此命名为E2F I和E2F II,其中E2F I是最接近E1a起始位点的E2F结合位点,E2F II是最远端的。从E1a起始位点开始,结合位点排列为:Pea3 I、E2F I、Pea3 II E2F II、Pea3 III、Pea3 IV和Pea3 V。

[0072] 在某些实施例中,这七个结合位点中的至少一个或其功能部分被删除。“功能部分”是结合位点的一部分,当缺失时,可减少或甚至消除其功能性,例如,结合位点对其各自转录因子(Pea3或E2F)的结合亲和力至,例如相对于完整序列的至少40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%。在某些实施例中,一个或多个整个结合位点被删除。在某些实施例中,一个或多个结合位点的功能部分被删除。“缺失的结合位点”包括整个结合位点的缺失和功能部分的缺失。当两个或两个以上结合位点被删除时,可以使用整个结合位点缺失和功能部分缺失的任何组合。

[0073] 在某些实施例中,至少一个Pea3结合位点或其功能部分被删除。缺失的Pea3结合位点可以是Pea3 I、Pea3 II、Pea3 III、Pea3 IV和/或Pea3 V。在某些实施例中,缺失的Pea3结合位点是Pea3 II、Pea3 III、Pea3 IV和/或Pea3 V。在某些实施例中,缺失的Pea3结合位点是Pea3 IV和/或Pea3 V。在某些实施例中,缺失的Pea3结合位点是Pea3 II和/或Pea3 III。在某些实施例中,缺失的Pea3结合位点是Pea3 II和Pea3 III。在某些实施例中,保留了Pea3 I结合位点或其功能部分。

[0074] 在某些实施例中,至少一个E2F结合位点或其功能部分被删除。在某些实施例中,保留了至少一个E2F结合位点或其功能部分。在某些实施例中,保留的E2F结合位点是E2F I和/或E2F II。在某些实施例中,保留的E2F结合位点是E2F II。在某些实施例中,完全缺失主要包括Pea3 II、Pea3 III、Pea3 IV和/或Pea3 V中的一个或多个或其功能部分。

[0075] 在某些实施例中,所述重组腺病毒具有位于E1a起始位点上游-304到-255处的50个碱基对区域的缺失,例如,对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的195-244,以下称为TAV-255缺失。在某些实施例中,TAV-255缺失导致了包含序列GGTGTTCGG (SEQ ID NO:22) 的E1a启动子。

[0076] 在某些实施例中,所述重组腺病毒包含具有功能性TATA盒的缺失(例如,整个TATA盒的缺失)的E1a启动子。如本文所使用的,“功能性TATA盒”是指能够与TATA盒结合蛋白(TBP)结合的TATA盒,例如,具有相应野生型TATA盒序列的TBP结合活性的至少100%、至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%或至少40%的TATA盒。如本文所使用的,“非功能性TATA盒”是指例如具有对应野生型TATA盒序列的TBP结合活性的小于30%、小于20%、小于10%或0%的TATA盒。本领域已知用于测定TBP是否结合TATA盒的分析方法。示范性结合分析包括电泳迁移率转移分析、染色质免疫沉淀分析和DNA酶足迹分析。

[0077] 例如,在某些实施例中,所述重组腺病毒包含腺病毒5型E1a启动子的第-27至-24、-31至-24、-44至+54或-146至+54位对应核苷酸的缺失,其分别为Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第472至475、468至475、455至552和353至552位对应核苷酸。在某些实施例中,所述腺病毒包含腺病毒5型E1a启动子的第-29至-26、-33至-26、-44至+52或-148至+52位对应核苷酸的缺失。在某些实施例中,所述腺病毒包含Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第353到552位对应核苷酸的缺失。在某些实施例中,所述重组腺病毒包含了一个多核苷酸的缺失,可导致腺病毒包含包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO:23)、AGTGCCCC (SEQ ID NO:30) 或TATTCCCC (SEQ ID NO:31),此序列是通过连接位于被删除的多核苷酸序列两侧的两个多核苷酸序列产生。在某些实施例中,所述重组腺病毒包含了一个多核苷酸的缺失,可导致腺病毒包含包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO:23)。

[0078] 在某些实施例中,重组腺病毒包含具有功能性CAAT盒的缺失(例如,整个CAAT盒的缺失)的E1a启动子。如本文所使用的,“功能性CAAT盒”是指能够与C/EBP或NF-Y蛋白结合的CAAT盒,例如,具有相应野生型CAAT盒序列的C/EBP或NF-Y结合活性的至少100%、至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%或至少40%的CAAT盒。如本文所使用的,“非功能性CAAT盒”是指例如具有相应野生型CAAT盒序列的C/EBP或NF-Y结合活性的小于30%、小于20%、小于10%或0%的CAAT盒。本领域已知用于确定C/EBP或NF-Y蛋白是否与CAAT盒结合的分析方法。示范性结合分析包括电泳迁移率转移分析、染色质免疫沉淀分析和DNA酶足迹分析。

[0079] 例如,在某些实施例中,所述重组腺病毒包括腺病毒5型E1a启动子的第-76到-68位对应核苷酸的缺失,其对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第423到431位对应核苷酸。在某些实施例中,所述重组腺病毒包含了一个多核苷酸的缺失,可导致腺病毒包含包含序列 TTCCGTGGCG (SEQ ID NO:32),此序列是通过连接位于被删除的多核苷酸序列两侧的两个多核苷酸序列产生。

[0080] 腺病毒E1b-19k基因主要作为抗凋亡基因发挥作用,是细胞抗凋亡基因BCL-2的同系物。由于宿主细胞在子代病毒颗粒成熟之前死亡将限制病毒复制,因此E1b-19K作为E1盒的一部分被表达,以防止细胞过早死亡,从而允许继续感染并产生成熟的病毒颗粒。因此,在某些实施例中,提供了包括E1b-19K插入位点的重组病毒,例如,腺病毒具有编码插入到E1b-19K插入位点的治疗性转基因的核苷酸序列。在某些实施例中,腺病毒包含编码插入E1b-19K插入位点的治疗性转基因的核苷酸序列,其中插入位点位于E1b-19K的起始位点(即编码E1b-19k起始密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID NO:1的第1714-1716位对应核苷酸)和E1b-55K的起始位点(即编码E1b-55k起始密码子的核苷酸序列,例如,SEQ ID NO:1的第2019-2021位对应核苷酸)之间。

[0081] 在某些实施例中,提供了包括IX-E2插入位点的重组病毒,例如,腺病毒具有编码治疗性转基因(例如,插入到IX-E2插入位点的内皮抑素和/或血管抑素)的核苷酸序列。在某些实施例中,IX-E2插入位点位于编码IX终止密码子的核苷酸序列和编码IVa2终止密码子的核苷酸序列之间。在某些实施例中,核苷酸序列插入到Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第4029和4093位对应核苷酸之间。在某些实施例中,核苷酸序列插入到Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第4029和4050位对应核苷酸、第4051和4070位对应核苷酸、或第4071和4093位对应核苷酸之间。在某些实施例中,IX-E2插入位点包含约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60个核苷酸的缺失。

[0082] 在某些实施例中,提供了包括L5-E4插入位点的重组病毒,例如,腺病毒具有编码治疗性转基因(例如,插入到L5-E4插入位点的内皮抑素和/或血管抑素)的核苷酸序列。在某些实施例中,L5-E4插入位点位于编码Fiber终止密码子的核苷酸序列和编码E4-ORF6或E40RF6/7终止密码子的核苷酸序列之间。在某些实施例中,核苷酸序列插入到Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第32785到32916位对应核苷酸之间。在某些实施例中,核苷酸序列插入到Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 第32785和32800位对应核苷酸、第32801和32820位对应核苷酸、第32821和32840位对应核苷酸、第32841和32860位对应核苷酸、第32861和32880位对应核苷酸、第32881和32900位对应核苷酸、或第32901和32916位对应核苷酸之间。在某些实施例中,L5-E4插入位点包含约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125或130个核苷酸的缺失。

## [0083] II. 病毒制备方法

[0084] 用于制备本发明重组病毒的方法为本领域已知的。通常,使用常规技术在适当的宿主细胞系中制备所公开的病毒,包括在适当条件下培养被转染的或受感染的宿主细胞,以允许制备传染性病毒颗粒。编码病毒基因的核酸可以被整合到质粒中,并通过常规的转染或转化技术导入宿主细胞。用于制备所公开病毒的示例性合适的宿主细胞包括人细胞系,例如HeLa、HeLa-S3、HEK293、911、A549、HER96或PER-C6细胞。具体的制备和纯化条件将根据病毒和所采用的制备系统而有所不同。对于腺病毒而言,制备病毒颗粒的传统方法是

共转染,随后在体内重组穿梭质粒(通常包含腺病毒基因组的一小部分,并可选地包含潜在的转基因表达盒)和腺病毒辅助质粒(包含大部分腺病毒基因组)。

[0085] 制备腺病毒的替代技术包括利用细菌人工染色体(BAC)系统、利用含有互补腺病毒序列的双质粒在recA+细菌株中的细菌体内重组,和酵母人工染色体(YAC)系统。

[0086] 制备后,从培养物中回收并选择性地纯化传染性病毒颗粒。典型的纯化步骤可包括菌斑纯化、离心(例如氯化铯梯度离心)、澄清、酶处理(例如苯甲酸酶或蛋白酶处理)、色谱步骤(例如离子交换色谱)或过滤步骤。

[0087] III. 治疗性转基因

[0088] 公开的重组病毒可包含编码选自内皮抑素和血管抑素的治疗性转基因的核苷酸序列。在某些实施例中,公开的重组包含病毒可包含分别编码第一个和第二个治疗性转基因的第一个核苷酸序列和第二个核苷酸序列。第一个和/或第二个治疗性转基因可分别选自内皮抑素和血管抑素。

[0089] 当肿瘤直径超过2mm<sup>3</sup>时,它们需要血管独立网络的增殖,以提供营养和氧气并清除废物。这种新的血管形成,即血管新生,被称为肿瘤血管生成。促血管生成因子包括血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、表皮生长因子(EGF)、白细胞介素8(IL-8)和血管生成素。内皮抑素和血管抑制素是天然生成的抗血管生成蛋白,据报道可抑制血管新生。

[0090] 内皮抑素是XVIII型胶原蛋白的水解片段。SEQ ID NO:6中描述了NCBI参考序列NP\_085059.2对应的示例性人XVIII型胶原蛋白的氨基酸序列。

[0091] 内皮抑素可由XVIII型胶原蛋白在不同部位的蛋白水解剪切引起。内皮抑素的抗血管生成作用通常被认为是由XVIII型胶原C端的非胶原1(NC1)结构域引起的。SEQ ID NO:7中描述了示例性人XVIII型胶原蛋白NC1结构域的氨基酸序列。因此,如本文所用,术语“内皮抑素”被理解为是指包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的蛋白质,或包含与SEQ ID NO:7的序列同一性大于80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列的蛋白质,或上述任一能够非共价寡聚(例如,通过存在于SEQ ID NO:7中的关联域)成三聚体的片段。寡聚反应可以通过本领域已知的任何方法进行分析,包括如,尺寸排除色谱法、分析超速离心法、散射技术、NMR(核磁共振)波谱法、等温滴定量热法、荧光各向异性和质谱法。

[0092] 在某些实施例中,所公开的重组病毒包含编码SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的核苷酸序列,或包含具有与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在某些实施例中,所公开的重组病毒包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的核苷酸序列,或包含具有与SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的序列。

[0093] 血管抑素是纤溶酶原的蛋白水解片段。SEQ ID NO:11中描述了NCBI参考序列NP\_000292.1对应的示例性人纤溶酶原的氨基酸序列。

[0094] 血管抑素可由纤溶酶原在不同部位的蛋白水解剪切引起。纤溶酶原有五个kringle结构域,它们通常被认为是血管抑素抗血管生成作用的原因。SEQ ID NO:12中描述了示例性人纤溶酶原第一kringle结构域的氨基酸序列,SEQ ID NO:13中描述了示例性人

纤溶酶原第二kringle结构域的氨基酸序列,SEQ ID NO:14中描述了示例性人纤溶酶原第三kringle结构域的氨基酸序列,SEQ ID NO:15中描述了示例性人纤溶酶原第四kringle结构域的氨基酸序列,SEQ ID NO:16中描述了示例性人纤溶酶原第五kringle结构域的氨基酸序列。因此,如本文所用,术语“血管抑素”被理解为是指包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16的氨基酸序列的蛋白质,或包含与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16序列同一性大于80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%序列同一性的蛋白质,或上述任何能够拮抗内皮细胞迁移和/或内皮细胞增殖的片段。内皮细胞的迁移和/或增殖可通过本领域已知的任何方法进行分析,包括例如,在Guo et al. (2014) METHODS MOL.BIOL. 1135:393-402中描述的那些方法。

[0095] 在某些实施例中,公开的重组病毒包含编码SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、或SEQ ID NO:17的氨基酸序列的核苷酸序列,或具有与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、或SEQ ID NO:17的80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的序列。在某些实施例中,公开的重组病毒包含SEQ ID NO:18、或SEQ ID NO:19的核苷酸序列,或具有与SEQ ID NO:18、或SEQ ID NO:19的80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的序列。

[0096] 序列同一性可以用本领域技术范围内的各种方式来确定,例如,使用诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件等公开可用的计算机软件。使用blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx程序 (Karlin et al., (1990) PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 87: 2264-2268; Altschul, (1993) J.MOL.EVOL. 36, 290-300; Altschul et al., (1997) NUCLEIC ACIDS RES. 25:3389-3402, 通过引用并入) 中应用的算法进行的BLAST (基本局部比对搜索工具) 分析是为序列相似性搜索量身定制的。有关搜索序列数据库中基本问题的讨论,参见 Altschul et al., (1994) NATURE GENETICS 6:119-129, 通过引用完全并入。本领域的技术人员可以确定合适的参数来测量比对,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。直方图、描述、比对、预期(即,报告与数据库序列相匹配的统计显著性阈值)、截止、矩阵和过滤器的搜索参数处于默认设置。blastp、blastx、tblastn和tblastx使用的默认评分矩阵是BLOSUM62矩阵 (Henikoff et al., (1992) PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 89: 10915-10919, 通过引用完全并入)。四个blastn参数可以调整如下:Q=10(空位创建罚分); R=10(空位延长罚分);wink=1(在查询的每个wink.sup.th位置生成匹配片段(hit)字);gapw=16(设置生成比对空位的窗口宽度)。等效的blastp参数设置可以是Q=9;R=2;wink=1;和gapw=32。也可以使用NCBI (国家生物技术信息中心) BLAST高级选项参数(例如,-G,空位开放的成本[整数]:默认值=核苷酸为5/蛋白质为11;-E,空位延伸的成本[整数]:默认值=核苷酸为2/蛋白质为1;-q,核苷酸不匹配的罚分[整数]:默认值=-3;-r,核苷酸匹配的奖励[整数]:默认值=1;-e,期望值[实数]:默认值=10;-W,字大小[整数]:默认值=核苷酸为11/megablast为28/蛋白质为3;-y,匹配片段的blast延伸的下降(X):默认值=blastn为20/其他为7;-X,空位比对的下降值(以匹配片段为单位):默认值=所有程序为15,不适用于blastn;和-Z,空位比对的最终X下降值(以匹配片段为单位):blastn为50,其

他为25)。也可以使用用于成对蛋白质比对的ClustalW(默认参数可能包括,例如Blosum62矩阵和空位开放罚分=10和空位延伸罚分=0.1)。GCG软件包版本10.0中提供的序列之间的最佳匹配(Bestfit)比较使用了DNA参数GAP=50(空位创建罚分)和LEN=3(空位延伸罚分),以及蛋白质比较中的等效设置为GAP=8和LEN=2。

[0097] IV.治疗方法

[0098] 对于治疗用途,重组病毒优选地与药物学可接受的载体联合。如本文所述,“药物学可接受的载体”是指与人类和动物的组织接触的缓冲剂、载体和赋形剂,其毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的效益/风险比率相称。在与制剂的其他成分相容且对受药者无害的意义上,载体应是“可接受的”。药物学可接受的载体包括缓冲液、溶剂、分散介质、涂层、等张和吸收延迟剂等,它们与药物给药相容。将该介质和试剂用于医药活性物质为本领域已知。

[0099] 含有本文公开的重组病毒的药物成分可以以剂量单位形式呈现并且可以通过任何合适的方法制备。药物成分的配制应与其预期的给药途径相容。给药途径的例子包括静脉(IV)、皮内、吸入、眼内、鼻内、经皮、外用、经粘膜、直肠、口服、肠外、皮下、肌肉内、经眼、硬膜外、气管内、舌下、口腔、阴道和鼻腔给药。

[0100] 一种示例性给药途径是IV输注。可用制剂可通过医药领域中已知的方法制备。例如,见《Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿药物科学)》,第18版(麦克出版公司,1990年)。适用于胃肠外给药的制剂成分包括,无菌稀释剂如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂如苯扎氯铵或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如EDTA;缓冲液如乙酸酯、柠檬酸盐或磷酸盐;以及调节张力的试剂如氯化钠或葡萄糖。

[0101] 静脉给药时,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor)ELTM(BASF,新泽西帕西波尼市)或磷酸盐缓冲液(PBS)。载体应在制造和储存条件下保持稳定,并应防止微生物进入。载体可以是包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚对苯二酚)及其适当混合物的溶剂或分散介质。

[0102] 药物制剂优选无菌。灭菌可通过任何合适的方法完成,例如通过无菌滤膜过滤。如果成分是冻干的,可以在冻干和重组之前或之后进行过滤灭菌。

[0103] 本文中使用的术语“有效量”是指足以产生有益或期望结果的活性成分的量(例如,本发明的重组病毒的量)。有效量可在一次或多次给药、应用或剂量中给药,且不限于特定的制剂或给药途径。

[0104] 在某些实施例中,活性成分的治疗有效量在0.1mg/kg到100mg/kg范围内,例如,1mg/kg到100mg/kg、1mg/kg到10mg/kg、1mg/kg到5mg/kg、10mg/kg、7.5mg/kg、5mg/kg或2.5mg/kg。在某些实施例中,重组病毒的治疗有效量在10<sup>2</sup>到10<sup>15</sup>个空斑形成单位(pfus)的范围内,例如10<sup>2</sup>到10<sup>10</sup>、10<sup>2</sup>到10<sup>5</sup>、10<sup>5</sup>到10<sup>15</sup>、10<sup>5</sup>到10<sup>10</sup>或10<sup>10</sup>到10<sup>15</sup>个空斑形成单位。给药量将取决于变量,诸如待治疗疾病或适应症的类型和程度、受试者的整体健康状况、病毒的体内效力、药物制剂和给药途径。初始剂量可增加到高于上限,以便迅速达到所需的血液水平或组织水平。或者,初始剂量可以小于最佳剂量,并且日剂量可以在治疗过程中逐步增加。人体剂量可优化,例如,在常规I期剂量递增研究中,设计为从0.5mg/kg到20mg/kg进行。根据给药途径、剂量、重组病毒的半衰期和治疗的疾病等因素,给药频率可能有所不同。示例

性给药频率为每天一次、每周一次和每两周一次。首选的给药途径是肠外给药,例如静脉输注。

[0105] 本文公开的重组腺病毒可用于治疗各种医学适应症。例如,重组腺病毒可以用于治疗癌症。将癌细胞暴露于治疗有效量的重组腺病毒以抑制或减少癌细胞的增殖。本发明提供一种在受试者中治疗癌症的方法。所述方法包含向受试者单独或与另一种治疗剂组合施用有效量的本发明重组腺病毒以治疗受试者中的癌症。在某些实施例中,向受试者施用有效量的重组腺病毒可将该受试者中的肿瘤负荷减少至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0106] 如本文所用,“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”是指对受试者(例如人类)的疾病的治疗。这包括:(a)抑制疾病,即阻止其发展;和(b)缓解疾病,即导致疾病状态的退化。如本文所用,术语“受试者”和“患者”是指通过本文所述的方法和成分治疗的生物体。此类生物体优选地包括但不限于哺乳动物(例如,鼠、猿猴、马、牛、猪、犬、猫等),且更优选地包括人类。

[0107] 癌症的例子包括实体肿瘤、软组织肿瘤、造血肿瘤和转移性病变。造血肿瘤的例子包括:白血病、急性白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)、B细胞、T细胞或FAB ALL、急性髓细胞白血病(AML)、慢性髓细胞白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL),例如转化型CLL、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病,骨髓增生综合征(MDS)、淋巴瘤、霍奇金病、恶性淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、多发性骨髓瘤或里氏综合征(里氏转化)。实体瘤的例子包括恶性肿瘤,例如肉瘤、腺癌和各种器官系统的癌,例如影响头部和颈部(包括咽部)、甲状腺、肺(小细胞或非小细胞肺癌(NSCLC))、乳腺、淋巴组织、胃肠道(例如口腔、食道、胃、肝、胰腺,小肠、结肠和直肠、肛管)、生殖器和泌尿生殖道(例如肾、尿路上皮、膀胱、卵巢、子宫、宫颈、子宫内膜、前列腺、睾丸)、中枢神经系统(CNS)(例如神经细胞或神经胶质细胞瘤或胶质瘤)、或皮肤(例如黑色素瘤)。

[0108] 在某些实施例中,所述癌症选自肛门癌、基底细胞癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、癌、胆管癌、宫颈癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌、胃食管癌、胃肠道(GI)癌、胃肠道间质瘤、肝细胞癌、妇科癌、头颈癌、血液癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、间皮瘤、神经内分泌癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、儿童癌、前列腺癌、肾细胞癌、肉瘤、皮肤癌、小细胞肺癌、皮肤鳞状细胞癌、胃癌、睾丸癌和甲状腺癌。

[0109] 在某些实施例中,所述癌症选自胃食管癌(如胃或胃食管交界腺癌)、非小细胞肺癌(如转移性NSCLC)、结直肠癌(如转移性结直肠癌)、卵巢癌(如铂耐药卵巢癌)、白血病、宫颈癌(如,晚期宫颈癌)、脑和中枢神经系统癌(如胶质母细胞瘤)、肾癌(如肾细胞癌)、肉瘤(例如横纹肌肉瘤、骨肉瘤和尤因肉瘤)、淋巴瘤(例如霍奇金和非霍奇金)、眼癌(例如脉络膜黑色素瘤和视网膜母细胞瘤)和冯·希佩尔·林道病。

[0110] 在某些实施例中,所公开的方法用于治疗儿童受试者中的癌症。例如,在某些实施例中,所述癌症选自脑和中枢神经系统癌(如星形细胞瘤、脑干胶质瘤、颅咽管瘤、增生性婴儿神经节细胞瘤、室管膜瘤、高级别胶质瘤、髓母细胞瘤、非典型畸胎样横纹肌瘤、神经母细胞瘤)、肾癌(如肾母细胞瘤(威尔姆氏瘤))、眼癌(如视网膜母细胞瘤)、肉瘤(如横纹肌肉瘤,骨肉瘤和尤因肉瘤)、肝癌(如肝母细胞瘤和肝细胞癌)、淋巴瘤(如霍奇金和非霍奇金)、白血病和生殖细胞瘤。

[0111] 在某些实施例中,重组腺病毒与一种或多种疗法,例如手术、放疗、化疗、免疫疗法、激素疗法或病毒疗法联合施用给受试者。

[0112] 在某些实施例中,重组腺病毒与抗血管生成剂联合施用。在某些实施例中,抗血管生成剂选自阿柏西普、抗VEGF抗体(如贝伐单抗和雷珠单抗)、舒尼替尼、帕唑帕尼、索拉非尼、瑞格菲尼、凡德他尼、卡博替尼、阿昔替尼、替沃扎尼、利尼伐尼、哌加他尼、安体舒通、吲哚美辛、沙利度胺、白细胞介素-12、FGF抗体、酪氨酸激酶抑制剂、干扰素、苏拉明、苏拉明类似物、生长抑素和生长抑素类似物。在某些实施例中,抗血管生成剂是VEGF抑制剂,例如,选自阿柏西普、贝伐单抗、雷珠单抗、舒尼替尼、帕唑帕尼、索拉非尼、瑞格菲尼、凡德他尼、卡博替尼、阿昔替尼、替沃扎尼和利尼伐尼的VEGF抑制剂。在某些实施例中,重组腺病毒与贝伐单抗联合施用。在某些实施例中,抗血管生成剂的施用更具效果,例如,与在没有重组腺病毒的情况下使用抗血管生成剂相比,使用减少剂量的抗血管生成剂可以看到相同的效果。例如,在某些实施例中,重组腺病毒与贝伐单抗联合施用,例如,贝伐单抗以小于5mg/kg、小于4mg/kg、小于3mg/kg、小于2mg/kg、小于1mg/kg、小于0.5mg/kg,从约0.5mg/kg到约5mg/kg,从约0.5mg/kg到约4mg/kg,从约0.5mg/kg到约3mg/kg,从约0.5mg/kg到约2mg/kg,从约0.5mg/kg到约1mg/kg,从约1mg/kg到约5mg/kg,从约1mg/kg到约4mg/kg,从约1mg/kg到约3mg/kg,从约1mg/kg到约2mg/kg,从约2mg/kg到约5mg/kg,从约2mg/kg到约4mg/kg,从约4mg/kg到约5mg/kg,约5mg/kg,约4mg/kg,约3mg/kg,约2.5mg/kg,约2mg/kg,约1mg/kg,或约0.5mg/kg的剂量施用。

[0113] 在某些实施例中,所述重组腺病毒与第二种重组腺病毒联合施用。在某些实施例中,第二种重组腺病毒是溶瘤腺病毒。在某些实施例中,第二种重组腺病毒包含编码多肽或其片段的核苷酸序列,该多肽或其片段选自乙酰胆碱、雄激素受体、抗PD-1抗体重链和/或轻链、抗PD-L1抗体重链和/或轻链、BORIS/CTCFL、BRAF、CD19、CD20、CD30、CD80、CD86、CD137、CD137L、CD154、CEA、DKK1/Wnt、EGFRvIII、FGF、gp100、Her-2/neu、ICAM、IL-1、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、IL-9、IL-17、IL-23A/p19、p40、IL-24、IL-27、IL-27A/p28、IL-27B/EBI3、IL-35、interferon- $\gamma$ (干扰素 $\gamma$ )、KRAS、MAGE、MAGE-A3、MART1、melan-A、mesothelin(间皮素)、MUC-1、NY-ESO-1、Podocalyxin(Podxl)、p53、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$ trap、thymidine kinase(胸苷激酶)和tyrosinase(酪氨酸酶)。在某些实施例中,第二种重组腺病毒包含编码癌症抗原的核苷酸序列,癌症抗原来源于9D7、雄激素受体、BAGE家族蛋白、 $\beta$ -catenin(连环蛋白)、BING-4、BRAF、BRCA1/2、CAGE家族蛋白、钙激活氯通道2、CD19、CD20、CD30、CDK4、CEA、CML66、CT9、CT10、cyclin-B1(细胞周期蛋白-B1)、EGFRvIII、Ep-CAM、EphA3、fibronectin(纤维连接蛋白)、GAGE家族蛋白、gp100/pme117、Her-2/neu、HPV E6、HPV E7、Ig、不成熟层粘连蛋白受体、MAGE家族蛋白(如MAGE-A3)、MART-1/melan-A、MART2、MC1R、mesothelin(间皮素)、粘蛋白家族蛋白(如MUC-1)、NY-ESO-1/LAGE-1、P. polypeptide(P多肽)、p53、Podocalyxin(Podxl)、前列腺特异性抗原、SAGE家族蛋白、SAP-1、SSX-2、survivin(生存素)、TAG-72、TCR、telomerase(端粒酶)、TGF- $\beta$ RII、TRP-1、TRP-2、tyrosinase(酪氨酸酶)、或XAGE家族蛋白。

[0114] 在某些实施例中,本发明的重组腺病毒与酪氨酸激酶抑制剂(如厄洛替尼)联合施用。

[0115] 在某些实施例中,本发明的重组腺病毒与检查点抑制剂(例如,抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)联合施用。示例性抗PD-1抗体包括,例如纳武单抗(Opdivo®,百时美施贵宝公司)、派姆单抗(Keytruda®,默沙东公司)、PDR001(诺华制药)和匹利珠单抗(CT-011、Cure Tech)。示例性抗PD-L1抗体包括,例如,阿替唑单抗(Tecentriq®,基因泰克)、德瓦鲁单抗(阿斯利康)、MEDI4736、阿维鲁单抗和BMS 936559(百时美施贵宝公司)。

[0116] 在某些实施例中,本发明的重组腺病毒与抗炎剂联合施用。在某些实施例中,将本发明的重组腺病毒与抗炎剂联合施用以治疗眼癌。示例性抗炎剂包括类固醇抗炎剂(例如,糖皮质激素(皮质类固醇),例如氢化可的松(皮质醇)、醋酸可的松、强的松、泼尼松龙、甲泼尼龙、地塞米松、倍他米松、曲安奈德、倍氯米松、醋酸氟氢可的松、醋酸去氧皮质酮(doca)和醛固酮)和非甾体抗炎剂(NSAIDs;例如阿司匹林、胆碱和镁水杨酸盐、水杨酸胆碱、塞来昔布、双氯芬酸钾、双氯芬酸钠、双氯芬酸钠与米索前列醇、二氟尼酸、依托度酸、非诺洛芬钙、氟比洛芬、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、水杨酸镁,甲氯芬那酸钠、甲芬那酸、美洛昔康、萘丁美酮、萘普生、萘普生钠、奥沙普嗪、吡罗昔康、罗非昔布、水杨酰水杨酸、水杨酸钠、舒林酸、托美丁钠、伐地昔布和白细胞介素,例如IL-1、IL-4、IL-6、IL-10、IL-11和IL-13)。

[0117] 本发明提供了一种使受试者的血管正常化的方法,即增加血流量和/或向受试者的肿瘤输送氧气。该方法包括向受试者单独或与另一种治疗剂联合施用本发明有效量的重组腺病毒,以使受试者的血管正常化。在某些实施例中,向受试者施用有效量的重组腺病毒可将受试者中肿瘤的血流和/或氧气输送增加至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。血管正常化可以通过本领域已知的方法来检测,包括,例如,对比增强超声(例如,动态对比增强超声)和FLT-PET。相应地,本发明还提供一种向肿瘤增加治疗剂递送的方法。该方法包含向受试者联合施用有效量的本发明重组腺病毒与另一种治疗剂,以增加治疗剂向肿瘤的递送。在某些实施例中,相对于在没有重组腺病毒的情况下施用治疗剂,与另一种治疗剂联合施用有效量的重组腺病毒可将治疗剂向肿瘤的递送增加至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%。在某些实施例中,治疗剂与重组腺病毒同时施用或紧随重组腺病毒施用。

[0118] 本发明还提供了一种在需要的受试者中降低血压的方法。该方法包括向受试者施用本文所述的有效量的重组腺病毒以降低受试者的血压。如本文所用,“血压”可指收缩压、舒张压或收缩压与舒张压之比。在某些实施例中,相对于施用重组腺病毒之前,向受试者施用有效量的重组腺病毒可将受试者的血压降低至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%或至少50%。血压可以通过本领域已知的方法进行测定。本发明还提供一种治疗和/或预防受试者高血压(即高的血压)的方法。该方法包含向受试者施用本文所述的有效量的重组腺病毒以治疗和/或预防受试者高血压。

[0119] 本发明还提供了一种在需要的受试者中增加一氧化氮(NO)产生或增加中一氧化氮(NO)水平的方法。该方法包括向受试者施用本文所述的有效量的重组腺病毒以增加受试者中的NO产生或NO水平。NO在调节血压中起主要作用。在受试者的细胞、体液、组织、器官或生理系统中,NO的产生或水平可能增加。在某些实施例中,NO产生或NO水平在细胞(例如内皮细胞或平滑肌细胞)或体液(例如血清)中增加。在某些实施例中,相对于施用重组腺病毒之前,向受试者施用有效量的重组腺病毒会将受试者中的NO产生或水平增加至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%,或至少100%。NO的产生可用

本领域已知的方法分析,包括,例如,荧光法,如Miles et al. (1996) METHODS ENZYML. 268:105-20中所述。

[0120] 高血压是与VEGF抑制剂相关的剂量限制性毒副作用。因此,在上述每个方法的某些实施例中,受试者为正在接收或已经接收了VEGF抑制剂。

[0121] 本发明还提供一种治疗受试者中血管生成相关疾病的方法。所述方法包括向受试者单独或与另一种治疗剂联合施用本发明有效量的重组腺病毒以治疗受试者中的疾病。如本文所用,血管生成相关疾病是指与过度活跃或致病性血管生成相关的任何疾病。示例性血管生成相关疾病包括良性肿瘤、血源性肿瘤、肥胖、原发性甲状腺功能亢进、继发性甲状腺功能亢进、三级甲状腺功能亢进、角膜移植排斥反应、隐形眼镜过度磨损、莱姆病、白塞病、带状疱疹、梅毒、激光后并发症、镰状细胞贫血,动脉粥样硬化斑块、类风湿性关节炎、银屑病、糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变、酒渣鼻、瘢痕瘤、黄斑变性、血管瘤、甲状腺增生、先兆子痫、结膜毛细血管扩张、硬皮病、克罗恩病、子宫内膜异位症、脂肪细胞病、化脓性肉芽肿、潮红、酒渣鼻、血管纤维瘤和伤口肉芽。

[0122] 本文所用术语“联合”用药被理解为在受试者患有该疾病的过程中向受试者提供两种(或更多)不同的治疗,使得对受试者的疗效在某个时间点重叠。在某些实施例中,一种治疗的递送在第二种治疗的递送开始时仍然发生,因此在给药方面存在重叠。这在本文中有时被称为“同时”或“同步递送”。在其他实施例中,一种治疗的递送结束于另一种治疗的递送开始之前。在这两种情况各自的一些实施例中,由于联合给药,治疗会更有效。例如,第二种治疗更有效,譬如相比于在没有第一种治疗的情况下进行第二种治疗,在较少第二种治疗的情况下看到等效效果,或者第二种治疗能在更大程度上减轻症状,或者,类似的情况出现在第一种治疗中。在某些实施例中,相比于在没有另一种治疗时递送一种治疗所观察到的情况,递送使得症状的减轻或与该疾病相关的其他参数的减少更大。两种治疗的效果可以是部分叠加、完全叠加或大于叠加。所述递送可以使得递送的第一种治疗的效果在递送第二种治疗时仍然可被检测到。

[0123] 在某些实施例中,重组腺病毒的有效量通过测量受试者中对抗原的免疫应答来确定和/或治疗受试者的方法进一步包含测量受试者中对抗原的免疫应答。高增殖性疾病,例如癌症,可以免疫抑制为特征,并且测量受试者中对抗原的免疫应答可表明受试者的免疫抑制水平。因此,测量受试者中对抗原的免疫应答可指示治疗的疗效和/或重组腺病毒的有效量。受试者中对抗原的免疫应答可以通过本领域已知的任何方法来测量。在某些实施例中,通过在受试者皮肤上的注射部位向受试者注射抗原并测量注射部位硬结的大小或炎症的量来测量对抗原的免疫应答。在某些实施例中,通过暴露于抗原时受试者的细胞释放的细胞因子(例如干扰素 $\gamma$ 、IL-4和/或IL-5)来测量对抗原的免疫应答。

[0124] 在整个描述中,如果病毒、成分和系统被描述为具有、包括或包含特定成分,或者如果过程和方法被描述为具有、包括或包含特定步骤,则可以进一步预期,存在主体上由列举成分构成或由列举成分构成的本发明的成分、设备和系统,并且存在主体上由列举处理步骤构成或由列举处理步骤构成的依照本发明的过程和方法。

[0125] 在本申请中,当一个元素或成分被称为包括在和/或选自列举元素或成分列表,则应当理解该元素或成分可以是列举元素或成分中的任何一个,或者该元素或成分选自包含两个或多个列举元素或成分的组。

[0126] 此外,应当理解,本文所描述的病毒、成分、系统、方法或过程的元素和/或特点可以以多种方式组合而不脱离本发明的精神和范围,无论其在本文中是明示的还是暗示的。例如,在提及特定病毒的情况下,除非从上下文中另有理解,否则该病毒可用于本发明的组成的各种实施例和/或本发明的方法中。换言之,在本申请中,以能够书写和绘制的清晰简明的申请的方式描述和描绘了实施例,但本申请旨在并当理解,实施例可以在不脱离本教导和发明的情况下进行各种组合或分离。例如,当理解,本文描述和描绘的所有特点可适用于本文描述和描绘的本发明的所有方面。

[0127] 应当理解,除非上下文和用法中另有理解,否则“至少一个”的表达包括在表达式之后的每个列举对象以及两个或多个列举对象的各种组合。除非上下文中另有理解,与三个或三个以上列举对象有关的“和/或”的表达应理解为具有相同的含义。

[0128] 术语“包括(include)”、“包括(includes)”、“包括(including)”、“具有(have)”、“具有(has)”、“具有(having)”、“包含(contain)”、“包含(contains)”或“包含(containing)”的使用,包括其语法对等词,除非上下文另有明确说明或理解,一般应理解为开放和非限制性的,例如,不排除其他未引用的元素或步骤。

[0129] 在本说明书的各处,以组或范围形式公开了病毒、成分、系统、过程和方法或其特点。其具体意图是,描述包括此类组和范围的成员的各个和每个单独的子组合。作为其他示例,1到20范围内的整数明确地旨在单独公开1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20。

[0130] 当术语“大约”被用于定量值之前,除非另有特别说明,本发明还包括该特定定量值本身。如本文所用,除非另有说明或推断,术语“大约”指与标称值相差±10%。

[0131] 应当理解,只要本发明保持可操作性,步骤顺序或执行某些动作的顺序是无关紧要的。此外,两个或更多的步骤或动作可以同时进行。

[0132] 用到的任何和所有示例,或本文中的示例性语言,例如,“例如”或“包括”,除非声明,仅仅是为了更好地说明本发明,并不限制本发明的范围。说明书中的任何语言都不应被解释为表示对本发明的实施至关重要的任何未声明的元素。

### [0133] 实施例

[0134] 以下示例仅是说明性,并不打算以任何方式限制本发明的范围或内容。

[0135] 实施例1:表达内皮抑素或血管抑素的腺病毒的构建

[0136] 本实施例描述了表达内皮抑素和/或血管抑素的重组腺病毒5型(Ad5)的构建。

[0137] 修饰携带腺病毒5型基因组序列5'部分的质粒使其携带位于E1a起始位点上游-304到-255的核苷酸区域的缺失,以使E1a表达具癌选择性(如先前在美国专利号9,073,980中所述)。被修饰的质粒以下称为TAV质粒,由此产生的任何病毒颗粒以下称为TAV腺病毒。

[0138] 进一步修饰TAV质粒,使其携带在E1b-19k区域开始处的SalI位点和SalI位点3'端200碱基对处的XhoI位点,以有助于治疗性转基因的插入。为了删除E1b-19k区域200碱基对,用SalI和XhoI切割质粒并自连接。修饰的E1b-19k区域的核苷酸序列如下(下划线表示来自融合的SalI和XhoI位点的残基):

**ATCTTGGTTACATCTGACCTCGTCGAGTCACCAGGCGCTTTCCA**

[0139] **A (SEQ ID NO: 24).**

[0140] 被修饰的质粒以下称为TAV-Δ19k质粒,由此产生的病毒颗粒以下称为TAV-Δ19k

腺病毒。

[0141] 将编码小鼠胶原蛋白XVIII的氨基酸残基1-26(对应于信号肽),及随后的编码小鼠胶原蛋白XVIII的残基1577-1774(对应于C-末端片段)的核苷酸序列克隆到被修饰的TAV-△19k质粒的E1b-19k区。所有小鼠胶原蛋白XVIII的氨基酸残基编号均参考UniProt参考序列:P39061,在本文中描述为SEQ ID NO:25。被修饰的质粒在下文中称为TAV-Endo质粒,并且由此产生的任何所得病毒颗粒在下文中均称为TAV-Endo腺病毒。TAV-Endo质粒在E1b-19k区域中的核苷酸序列如下,其中下划线表示包括SalI和XhoI限制性位点的E1b-19k侧翼序列:

ATCTGACCTCGTCGACATGGCTCCGACCCAGCAGACGCCCTCTG  
 CCTGCTGCTGCTGTTGCTGCTCTCCTGCCGCCCTGTGCCTGCCAGC  
 GCTTATGTGCACCTGCCGCCAGCCCCCCCCACCCCTCTCACTTGCT  
 CATACTCATCAGGACTTCAGCCAGTGCTCCACCTGGTGGCACTG  
 AACACCCCCCTGTCTGGAGGCATGCGTGGTATCCGTGGAGCAGAT  
 TTCCAGTGCTTCCAGCAAGCCCGAGCCGTGGGCTGTCGGGCACC  
 TTCCGGGCTTCCTGTCCCTAGGCTGCAGGATCTCTATAGCATCG  
 TGCGCCGTGCTGACCGGGGGTCTGTGCCCATCGAACCTGAAGG  
 ACGAGGTGCTATCTCCCAGCTGGGACTCCCTGTTCTGGCTCCC  
 AGGGTCAACTGCAACCCGGGGCCCGCATTTTCTTGACGGCA  
 GAGATGTCCTGAGACACCCAGCCTGGCCGCAGAAGAGCGTATGG  
 CACGGCTCGGACCCCAGTGGCGGAGGCTGATGGAGAGTTACTG  
 TGAGACATGGCGAACTGAAACTACTGGGGCTACAGGTCAGGCCT  
 CCTCCCTGCTGTCAGGCAGGCTCCTGGAACAGAAAGCTGCGAGCT  
 GCCACAAACAGCTACATCGCCTGTGCATTGAGAATAGCTTCATGA  
CCTCTTCTCCAAATAGCTCGAGTCACCAGGCG (SEQ ID NO:26)。

[0143] 此外,将编码小鼠纤溶酶原的氨基酸残基1-19(对应于信号肽),及随后的编码小鼠纤溶酶原残基96-549(对应于kringle结构域1-5)的核苷酸序列克隆到被修饰的TAV-△19k质粒的E1b-19k区。所有小鼠纤溶酶原的氨基酸残基编号均参考UniProt参考序列:P20918,在本文中描述为SEQ ID NO:27。被修饰的质粒在下文中称为TAV-Ang质粒,并且由此产生的任何所得病毒颗粒在下文中均称为TAV-Ang腺病毒。TAV-Ang质粒在E1b-19k区域中的核苷酸序列如下,其中下划线表示包括SalI和XhoI限制性位点的E1b-19k侧翼序列:

ATCTGACCTCGTCGACATGGACCACAAGGAAGTAATCCTCTGTT  
TCTCTGCTTCTGAAACCAGGACAAGGAAGAGAGTGTATCTGTC  
AGAATGTAAGACCAGGCATCGCAACGGCTACAGAGGAACAATGT  
CCAGGACAAAGAGTGGTGTGCCTGTCAAAAGTGGGTGCCACG  
TTCCCCCACGTACCCAACACTACTCTCCCAGTACACATCCCAATGAG  
GGACTAGAAGAAAATTACTGTAGGAACCCAGACAATGATGAACA  
AGGGCCTTGGTGTACACTACAGATCCGGACAAGAGATATGACT  
ACTGCAACATTCTGAATGTGAAGAAGAATGCATGTACTGCAGT  
GGCGAAAAGTATGAGGGAAAATCTCCAAGACCATGTCTGGACT  
TGACTGCCAGGCCTGGGATTCTCAGAGCCCACATGCTCATGGATA  
CATCCCTGCCAAATTCCAAGCAAGAACCTGAAGATGAATTATTG  
CCGCAACCTGACGGGAGCCAAGGCCCTGGTGTCTCACACAG  
ACCCCCACCAAACGCTGGAAACTGTGACATCCCCGCTGCACA  
ACACCCCCGCCCAACCCAGCCAACCTACCAATGTCTGAAAGG  
AAGAGGTGAAAATTACCGAGGGACCGTGTCTGTACCGTGTCTG  
GGAAAACCTGTCAGCGCTGGAGTGAGCAAACCCCTCATAGGCAC  
AACAGGACACCAGAAAATTCCCTGCAAAATCTGGAGGAGAA  
TTACTGCCGGAACCCGGATGGAGAAACTGCTCCCTGGTGTCTAC  
CACTGACAGCCAGCTGAGGTGGAGTACTGTGAGATTCCATCCTG  
CGAGTCCTCAGCATCACCAGACCAGTCAGATTCTCAGTCCACC  
AGAGGAGCAAACACCTGTGGTCCAGGAATGCTACCAGAGCGATG  
GGCAGAGCTATCGGGGTACATCGTCCACTACCATCACAGGGAAAG  
AAGTGCCAGTCCTGGCAGCTATGTTCCACATAGGCATTCGAAG  
ACGCCAGAGAACTCCAGATGCTGGCTGGAGATGAACATTGC

[0144]

AGGAACCCGGATGGTGACAAGGGCCCTTGGTGCTACACCACTGA  
CCCGAGCGTCAGGTGGAATACTGCAACCTGAAGCGGTGCTCAG  
AGACAGGAGGGAGTGTGGAATTGCCACAGTTCCCAGGAA  
CCAAGTGGGCCGAGCGACTCTGAGACAGACTGCATGTATGGAA  
TGGCAAAGACTACCGGGGCAAAACGGCCGTCACTGCAGCTGGCA  
CCCCTGCCAAGGATGGCTGCCAGGAGCCCCACAGGCACAGC  
ATCTCACCCCACAGACAAACCCACGGGCAGGTCTGGAAAAGAA  
TTATTGCCGAAACCCCGATGGGATGTGAATGGTCCTGGTGCTA  
TACAACAAACCCCTAGATGATAGCTCGAGTCACCAGGCG (SEQ ID  
NO:28)。

[0145] 使用所描述的各种质粒与携带其余5型腺病毒基因组序列(基于菌株d1309)的其他质粒以生成重组腺病毒。

[0146] 使用所描述的各种质粒与携带其余5型腺病毒基因组序列(基于菌株d1309)的其他质粒以生成重组腺病毒。

[0147] 实施例2:表达内皮抑素和/或血管抑素的腺病毒的构建

[0148] 本实施例描述了表达内皮抑素和/或血管抑素的重组腺病毒5型(Ad5)的构建。

[0149] 修饰携带腺病毒5型基因组序列5'部分的质粒使其携带位于E1a起始位点上游-304到-255的核苷酸区域的缺失,以使E1a表达具癌选择性(如先前在美国专利号9,073,980中所述)。被修饰的质粒以下称为TAV质粒,由此产生的任何病毒颗粒以下称为TAV腺病毒。

[0150] 进一步修饰TAV质粒,使其携带在E1b-19k区域开始处的SalI位点和SalI位点3'端200碱基对处的XhoI位点,以有助于治疗性转基因的插入。为了删除E1b-19k区域200碱基对,用SalI和XhoI切割质粒并自连接。修饰的E1b-19k区域的核苷酸序列如下(下划线表示来自融合的SalI和XhoI位点的残基):

ATCTGGTTACATCTGACCTCGAGTCACCAGGCGCTTTCCA

[0151] A (SEQ ID NO: 24)。

[0152] 被修饰的质粒以下称为TAV-Δ 19k质粒,由此产生的病毒颗粒以下称为TAV-Δ 19k腺病毒。

[0153] 将编码人胶原蛋白XVIII的氨基酸残基1-23(对应于信号肽),及随后的编码人胶原蛋白XVIII的残基1318-1516(对应于C-末端片段)的核苷酸序列克隆到被修饰的TAV-Δ 19k质粒的E1b-19k区。所有人胶原蛋白XVIII的氨基酸残基编号均参考UniProt参考序列:NP\_085059.2,在本文中描述为SEQ ID NO:6。被修饰的质粒在下文中称为TAV-hEndo质粒,并且由此产生的任何所得病毒颗粒在下文中均称为TAV-hEndo腺病毒。TAV-Endo质粒在E1b-19k区域中的核苷酸序列如下,其中下划线表示包括SalI和XhoI限制性位点的E1b-19k侧翼序列:

ATCTGACCTCGTCGACATGGCTCCCTACCCCTGTGGCTGCCACAT  
CCTGCTGCTGCTCTCTGCTGCCTGGCGCTGCCGGGCCAGCTC  
CTACGTGCACCTGCAGGCCGGCGACCCACAAGCCCACCCGCC  
ACAGCCACCGCGACTTCCAGCCGGTGCTCCACCTGGTTGCGCTCA  
ACAGCCCCCTGTCAGGCGGCATGCAGGGCATCCGCAGGGGCCGAC  
TTCCAGTGCTTCCAGCAGGCGCGGGCGTGGGCTGGCGGGCAC  
CTTCCGCGCCTCCTGTCCTCGCGCCTGCAGGACCTGTACAGCAT  
CGTGCGCCGTGCCGACCGCGCAGCCGTGCCCATCGTAAACCTCAA  
GGACGAGCTGCTGTTCCCAGCTGGGAGGCTCTGTTCTCAGGCTC  
TGAGGGTCCGCTGAAGCCCAGGGCACGCATCTTCTCCTTGACGG  
CAAGGACGTCTGAGGCACCCCACCTGGCCCCAGAAGAGCGTGT  
GGCATGGCTCGGACCCCAACGGCGCAGGCTGACCGAGAGCTAC  
TGTGAGACGTGGCGGACGGAGGCTCCCTCGGCCACGGGCCAGGC  
CTCCTCGCTGCTGGGGGGCAGGCTCCTGGGCAGAGTGCCGCGA  
GCTGCCATCACGCCTACATCGTGCCTGCATTGAGAACAGCTTCA  
TGACTGCCTCCAAGTAGCTCGAGTCACCAGGCG (SEQ ID NO:9)。

[0155] 此外,将编码人纤溶酶原的氨基酸残基1-19(对应于信号肽),及随后的编码人纤溶酶原残基97-549(对应于kringle结构域1-5)的核苷酸序列克隆到被修饰的TAV- $\Delta$ 19k质粒的E1b-19k区。所有纤溶酶原的氨基酸残基编号均参考UniProt参考序列:NP\_000292.1,在本文中描述为SEQ ID NO:11。被修饰的质粒在下文中称为TAV-hAng质粒,并且由此产生的任何所得病毒颗粒在下文中均称为TAV-Ang腺病毒。TAV-hAng质粒在E1b-19k区域中的核苷酸序列如下,其中下划线表示包括SalI和XhoI限制性位点的E1b-19k侧翼序列:

ATCTGACCTCGTCGACATGGAACATAAGGAAGTGGTCTTCTACT  
TCTTTATTCTGAAATCAGGTCAAGGAAAAGTGTATCTCTCAGA  
GTGCAAGACTGGAAATGGAAAGAACTACAGAGGGACGATGTCCA  
AAACAAAAAAATGGCATCACCTGTCAAAATGGAGTTCCACTTCTC  
CCCACAGACCTAGATTCTCACCTGCTACACACCCCCTCAGAGGGAC  
TGGAGGAGAACTACTGCAGGAATCCAGACAACGATCCGCAGGGG  
CCCTGGTGCTATACTACTGATCCAGAAAAGAGATATGACTACTGC  
GACATTCTGAGTGTGAAGAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGA  
AAACTATGACGGCAAAATTCCAAGACCATGTCTGGACTGGAAT  
GCCAGGCCTGGGACTCTCAGAGCCCACACGCTCATGGATACATT  
CTTCCAAATTCCAAACAAGAACCTGAAGAAGAATTACTGTCGTA  
ACCCCGATAGGGAGCTCGGCCCTGGTGTTCACCACCGACCCCA  
ACAAGCGCTGGAACTTGTGACATCCCCGCTGCACAACACCTC  
CACCATCTTCTGGTCCCACCTACCAAGTGTCTGAAGGGAACAGGTG  
[0156] AAAACTATCGCGGGAAATGTGGCTGTTACCGTGTCCGGCACACCT  
GTCAGCACTGGAGTGCACAGACCCCTCACACACATAACAGGACA  
CCAGAAAACCTCCCTGCAAAATTGGATGAAAACACTGCCGC  
AATCCTGACGGAAAAAGGGCCCCATGGTGCATACAACCAACAG  
CCAAGTGCAGGGAGTACTGTAAGATAACCGTCCTGTGACTCCTC  
CCCAGTATCCACGGAACAATTGGCTCCCACAGCACCACCTGAGCT  
AACCCCTGTGGTCCAGGACTGCTACCATGGTGTGGACAGAGCT  
ACCGAGGCACATCCTCCACCACCAACAGGAAAGAAGTGTCA  
TCTTGGTCATCTATGACACCACCCGGCACCAGAAGACCCAGA  
AAACTACCCAAATGCTGGCCTGACAATGAACACTGCAGGAATC  
CAGATGCCGATAAAGGCCCCCTGGTGTGTTACCAACAGACCCAGCG  
TCAGGTGGAGTACTGCAACCTGAAAAAAATGCTCAGGAACAGAA  
GCGAGTGTGTTAGCACCTCCGCCTGTTGTCCTGCTCCAGATGTA  
GAGACTCCTCCGAAGAAGACTGTATGTTGGAAATGGGAAAGG  
ATACCGAGGCAAGAGGGCGACCACTGTTACTGGGACGCCATGCC

[0157]

AGGACTGGCTGCCAGGAGCCCCATAGACACAGCATTCACTC  
 CAGAGACAAATCCACGGCGGGCTGGAAAAAAATTACTGCCGT  
 AACCTGATGGTATGTAGGTGGTCCCTGGTACACGACAAAT  
CCAAGATAGCTCGAGTCACCAGGCG (SEQ ID NO:21)。

[0158] 此外,将编码人胶原蛋白XVIII的氨基酸残基1-23(对应于信号肽),及随后的编码人胶原蛋白XVIII的残基1318-1516(对应于C-末端片段)的核苷酸序列,及随后的脑心肌炎病毒(EMCV)IRES,及随后的编码人纤溶酶原的氨基酸残基1-19(对应于信号肽),及随后的编码人纤溶酶原残基97-549(对应于kringle结构域1-5)的核苷酸序列序列克隆到被修饰的TAV- $\Delta$ 19k质粒的E1b-19k区。被修饰的质粒在下文中称为TAV-hEndo-IRES-hAng质粒,并且由此产生的任何所得病毒颗粒在下文中均称为TAV-hEndo-IRES-hAng腺病毒。TAV-hEndo-IRES-hAng质粒在E1b-19k区域中的核苷酸序列如下,其中下划线表示包括SalI和XhoI限制性位点的E1b-19k侧翼序列:

[0159]

ATCTGACCTCGTCGACATGGCTCCCTACCCCTGTGGCTGCCACAT  
 CCTGCTGCTGCTCTGCTGCCTGGCGGCTGCCGGGCCAGCTC  
 CTACGTGCACCTGCAGGCCGGCGACCCACAAGCCCACCCGCC  
 ACAGCCACCGCGACTTCCAGGCCGGTGCCTCACCTGGTTGCGCTCA  
 ACAGCCCCCTGTCAGGCAGGCATGCAGGGCATCCGCCGGGCCGAC  
 TTCCAGTGCTTCCAGCAGGCAGGCCGGCTGGGGCTGGCGGGCAC  
 CTTCCGCCCTCCTGTCCTCGCGCCTGCAGGACCTGTACAGCAT  
 CGTGCGCCGTGCCGACCGCGCAGCCGTGCCATCGTAAACCTCAA  
 GGACGAGCTGCTGTTCCCAGCTGGGAGGCTCTGTTCTCAGGCTC  
 TGAGGGTCCGCTGAAGCCCAGGCACGCATCTCCTCTTGACGG  
 CAAGGACGTCCTGAGGCACCCACCTGGCCCCAGAAGAGCGTGT  
 GGCATGGCTCGGACCCAAACGGCGCAGGCTGACCGAGAGCTAC  
 TGTGAGACGTGGCGGACGGAGGCTCCCTGGCCACGGGCCAGGC  
 CTCCTCGCTGCTGGGGGGCAGGCTCCTGGGCAGAGTGCCGCGA  
 GCTGCCATCACGCCATCGTGCATTGAGAACAGCTTCA  
 TGACTGCCCTCCAAGTAGtaacgttactggccgaagccgcttggaaataaggccggtgtgcgt

ttgtctatatgttattttcaccatattgcgtctttggcaatgtgaggccccggaaacctggccctgtcttctt  
gacgagcattcctagggtcttccctctgccaagaaatgcaaggctgttgaatgtcgtgaaggaag  
cagttcctctggaagcttcttgaagacaacaacgtctgttagcgacccttgcaggcagcggaaaccccca  
cctggcgacaggtgcctctgcccggaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccc  
cagtgccacgttgtaggtggatagtgtggaaagagtcaaatggctctcaagcttattcaacaagg  
gctgaaggatgcccagaaggtacccattgtatggatctgtatctggggcctcggcgcacatgtttacat  
gtgttagtcgaggtaaaaaacgtctaggccccccgaaccacgggacgtggttccttgaaaaaacac  
gatgataatATGGAACATAAGGAAGTGGTCTTCTACTTCTTTATTTC  
TGAAATCAGGTCAAGGAAAAGTGTATCTCTCAGAGTGCAAGACT  
GGGAATGGAAAGAACTACAGAGGGACGATGTCCAAAACAAAAAA  
ATGGCATCACCTGTCAAAAATGGAGTTCCACTTCTCCCCACAGAC  
CTAGATTCTCACCTGCTACACACCCCTCAGAGGGACTGGAGGAG  
AACTACTGCAGGAATCCAGACAACGATCCGCAGGGGCCCTGGTG  
CTATACTACTGATCCAGAAAAGAGATATGACTACTGCGACATTCT  
TGAGTGTGAAGAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGAAAATATG  
ACGGCAAAATTCCAAGACCATGTCTGGACTGGAATGCCAGGCC  
TGGGACTCTCAGAGCCCACACGCTCATGGATACATTCTCCAAA  
TTTCCAAACAAGAACCTGAAGAAGAATTACTGTCGTAACCCGAT  
AGGGAGCTCGGCCTTGGTHTTCAACCACCGACCCAAACAAGCG  
CTGGGAACTTGTGACATCCCCGCTGCACAACACCTCCACCATC  
TTCTGGTCCCACCTACCAGTGTCTGAAGGGAACAGGTGAAAATCA  
TCGCGGGAAATGTGGCTGTTACCGTGTCCGGGCACACCTGTCAGCA  
CTGGAGTGCACAGACCCCTCACACACATAACAGGACACCAGAAA  
ACTTCCCTGCAAAAATTGGATGAAAATCTGCGCAATCCTG  
ACGGAAAAAGGGCCCCATGGTGCATACAACCAACAGCCAAGTG  
CGGTGGGAGTACTGTAAGATAACCGTCTGTGACTCCTCCCCAGTA  
TCCACGGAACAAATTGGCTCCCACAGCACCCACCTGAGCTAACCCCT  
GTGGTCCAGGACTGCTACCATGGTGTGGACAGAGCTACCGAGG  
CACATCCTCCACCAACCACACAGGAAAGAAGTGTCACTTGGTC  
ATCTATGACACCACACCGGCACCAAGAGACCCAGAAAATACC

[0160]

CAAATGCTGGCCTGACAATGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCC  
 GATAAAAGGCCCTGGTGTTCACCACAGACCCAGCGTCAGGTGG  
 GAGTACTGCAACCTGAAAAAAATGCTCAGGAACAGAAGCGAGTGT  
 TGTAGCACCTCCGCCTGTTGTCCTGCTCCAGATGTAGAGACTCC  
 TTCCGAAGAAGACTGTATGTTGGAAATGGGAAAGGATACCGAG  
 [0161] GCAAGAGGGCGACCACTGTTACTGGGACGCCATGCCAGGACTGG  
 GCTGCCAGGAGCCCCATAGACACAGCATTTCACTCCAGAGAC  
 AAATCCACGGCGGGTCTGGAAAAAAATTACTGCCGTAACCCTG  
 ATGGTGATGTAGGTGGTCCCTGGTGCTACACGACAAATCCAAGAT  
AGCTCGAGTCACCAAGGCG (SEQ ID NO:21)。

[0162] 此外将编码小鼠胶原蛋白XVIII的氨基酸残基1-26(对应于信号肽),及随后的编码小鼠胶原蛋白XVIII的残基1577-1774(对应于C-末端片段)的核苷酸序列,及随后的脑心肌炎病毒(EMCV)IRES,及随后的编码小鼠纤溶酶原的氨基酸残基1-19(对应于信号肽),及随后的编码小鼠纤溶酶原残基96-549(对应于kringle结构域1-5)的核苷酸序列克隆到被修饰的TAV-△19k质粒的E1b-19k区。被修饰的质粒在下文中称为TAV-Endo-IRES-Ang质粒,并且由此产生的任何所得病毒颗粒在下文中均称为TAV-Endo-IRES-Ang腺病毒。TAV-Endo-IRES-Ang质粒在E1b-19k区域中的核苷酸序列如下,其中下划线表示包括SalI和XhoI限制性位点的E1b-19k侧翼序列:

ATCTGACCTCGTCGACATGGCTCCCGACCCAGCAGACGCCCTTG  
CCTGCTGCTGCTGTTGCTGCTCTCCTGCCGCCCTGTGCCTGCCAGC  
GCTTATGTGCACCTGCCGCCAGCCGCCACCCCTCTCACTGCT  
CATACTCATCAGGACTTCAGCCAGTGCTCCACCTGGTGGCACTG  
AACACCCCCCTGTCTGGAGGCATGCGTGGTATCCGTGGAGCAGAT  
 [0163] TTCCAGTGCTTCCAGCAAGCCGAGCCGTGGGCTGTCGGGCACC  
TTCCGGGCTTCCTGTCCTCTAGGCTGCAGGATCTCTATAGCATCG  
TGCGCCGTGCTGACCGGGGGCTGTGCCCATCGTCAACCTGAAGG  
ACGAGGTGCTATCTCCCAGCTGGACTCCCTGTTCTGGCTCCC  
AGGGTCAACTGCAACCCGGGGCCCGCATTTTCTTTGACGGCA

GAGATGTCCTGAGACACCCAGCCTGGCCGCAGAAGAGCGTATGG  
CACGGCTCGGACCCCAGTGGCGGAGGCTGATGGAGAGTTACTG  
TGAGACATGGCGAACTGAAACTACTGGGGCTACAGGTCAAGGCCT  
CCTCCCTGCTGTCAGGCAGGCTCCTGGAACAGAAAGCTGCGAGCT  
GCCACAAACAGCTACATCGTCCTGTGCATTGAGAATAGCTTCATGA  
CCTCTTCTCCAAATAAGtaacgttactggccgaagccgcttggataaggccgggtgcgtt  
tgtctatatgttatttccaccatattgccgtttggcaatgtgagggccggaaacctggccctgtcttgcgtt  
acgagcattcetagggctttccctctgccaaaggaatgcaaggctgtgaatgtcgtgaaggaagc  
agttcctctggaagcttcttgaagacaacaacgtctgttagcgacccttgcaggcagcggaaaccccccac  
ctggcgacaggtgcctctgcggccaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaacccc  
agtgccacgttgtagttggatagtgtggaaagagtcaaatggctcctcaagcgtattcaacaagggg  
ctgaaggatgcccagaaggtacccattgtatggatctgatctggccctcggtgcacatgtttacatgt  
gtttagtcgaggtaaaaaacgtctaggccccccgaaccacgggacgtggtttccttggaaaaacacgat  
gataatATGGACCACAAGGAAGTAATCCTCTGTTCTTGCTTCTG  
AAACCAGGACAAGGGAAAGAGAGTGTATCTGTCAGAATGTAAGAC  
CGGCATCGGCAACGGCTACAGAGGAACAAATGTCCAGGACAAAGA  
GTGGTGTGCCTGTCAAAAGTGGGTGCCACGTTCCCCACGTAC  
CCAACTACTCTCCCAGTACACATCCAATGAGGGACTAGAAGAA  
AATTACTGTAGGAACCCAGACAATGATGAACAAAGGGCCTGGTG  
CTACACTACAGATCCGGACAAGAGAGATATGACTACTGCAACATTCC  
TGAATGTGAAGAAGAATGCATGTACTGCAGTGGCGAAAAGTATG  
AGGGGAAAATCTCCAAGACCATGTCTGGACTTGACTGCCAGGCC  
TGGGATTCTCAGAGCCCACATGCTCATGGATACATCCCTGCCAAA  
TTCCCAAGCAAGAACCTGAAGATGAATTATTGCCGCAACCTGAC  
GGGGAGCCAAGGCCCTGGTGCTTCACAACAGACCCCCACCAACG  
CTGGGAATACTGTGACATCCCCGCTGCACAAACACCCCCGCC  
ACCCAGCCAACCTACCAATGTCTGAAAGGAAGAGGGTAAAATT  
ACCGAGGGACCGTGTCTGTCACCGTGTCTGGAAAACCTGTCAGC  
GCTGGAGTGAGCAAACCCCTCATAGGCACAACAGGGACACCAGAA  
AATTCCCCCTGCAAAAATCTGGAGGAGAATTACTGCCGGAACCC

[0164]

GGATGGAGAAACTGCTCCCTGGTGCTATACCACTGACAGCCAGCT  
GAGGTGGGAGTACTGTGAGATTCCATCCTGCGAGTCCTCAGCATC  
ACCAGACCAGTCAGATTCCCTCAGTTCCACCAGAGGAGCAAACAC  
CTGTGGTCCAGGAATGCTACCAGAGCGATGGGCAGAGCTATCGG  
GGTACATCGTCCACTACCACAGGGAAAGAAGTGCCAGTCCTG  
GGCAGCTATGTTCCACATAGGCATTCGAAGACGCCAGAGAACTT  
CCCAGATGCTGGCTTGGAGATGAACTATTGCAGGAACCCGGATG  
GTGACAAGGGCCCTTGGTGCTACACCACTGACCCGAGCGTCAGG  
TGGGAATACTGCAACCTGAAGCGGTGCTCAGAGACAGGAGGGAG  
TGTGTGGAATTGCCACAGTTCCCAGGAACCAAGTGGGCCGAG  
CGACTCTGAGACAGACTGCATGTATGGAATGGCAAAGACTACC  
GGGGCAAAACGGCCGTCACTGCAGCTGGCACCCCTGCCAAGGA  
TGGGCTGCCAGGAGCCCCACAGGCACAGCATCTCACCCACA  
GACAAACCCACGGGCAGGTCTGGAAAAGAATTATTGCCAAACC  
CCGATGGGATGTGAATGGTCCTTGGTGCTATACAACAAACCTA  
**GATGATAGCTCGAGTCACCAGGCG (SEQ ID NO:29) 。**

[0165] [0166] 使用所描述的各种质粒与携带其余5型腺病毒基因组序列(基于菌株d1309)的其他质粒以生成重组腺病毒。

[0167] 实施例3:表达内皮抑素或血管抑素的腺病毒的抗癌活性

[0168] 本实施例描述了如实施例1所述制备的表达内皮抑素或血管抑素的重组腺病毒的抗癌活性。

[0169] 在第0、4和8天,以 $1\times10^9$ PFU/剂量三次瘤内注射缓冲液、TAV- $\Delta$ 19k、TAV-Endo或TAV-Ang腺病毒,和/或在第1、5、9和13天四次腹腔注射磷酸盐缓冲液(PBS)或贝伐单抗的小鼠同源物(Bev)以治疗荷ADS-12瘤的129S4小鼠。图1-3中描绘了初始结果,包括肿瘤体积和无进展生存期。图4-6中描绘了在追踪小鼠更长的时间之后的进一步结果。

[0170] 这些结果证明表达内皮抑素和血管抑素的腺病毒可有效减少肿瘤体积,并且表达内皮抑素和血管抑素的腺病毒和贝伐单抗协同作用以减轻肿瘤负担。令人惊讶的是,对于抗血管生成治疗,某些小鼠显示出肿瘤体积的完全缓解,而不仅仅是肿瘤生长的延迟。这些结果特别令人惊讶,因为贝伐单抗的作用是抑制细胞生长的而非细胞毒性。此外,从整体外观、活动水平和窘迫迹象(例如,弓背或皱毛)观察,小鼠未显示组织毒性的证据。

[0171] 实施例4:表达血管抑素的腺病毒的抗癌活性

[0172] 本实施例描述了如实施例1所述制备的表达血管抑素的重组腺病毒的抗癌活性。

[0173] 129S4小鼠一侧腹腔注射 $1\times10^6$ ADS-12肿瘤细胞,使原发肿瘤生长至 $260-500\text{mm}^3$ 。当原发性肿瘤达到目标体积(第0天)时,在第0、4和8天以 $1\times10^9$ PFU/剂量给小鼠瘤内注射TAV-Ang腺病毒,然后监测原发肿瘤体积。当原发性肿瘤达到目标体积(第0天)时,第7、14或21

天,在小鼠的另一侧额外注射 $1 \times 10^6$ ADS-12肿瘤细胞,并监测该侧继发肿瘤的形成和体积。继发肿瘤未接受直接治疗。图7描绘了结果,并显示尽管没有直接治疗,继发肿瘤大多消退或根本未发展。

[0174] 这些结果表明,本文所述表达血管抑素的腺病毒在减少对侧肿瘤体积方面是有效的。

[0175] 实施例5:腺病毒的抗癌活性

[0176] 本实施例描述了如实施例1所述制备的重组腺病毒的抗癌活性。

[0177] 在第0、4和8天,以 $1 \times 10^9$ PFU/剂量三次瘤内注射缓冲液或TAV- $\Delta$ 19k,和/或在第1、5、9和13天四次腹腔注射磷酸盐缓冲液(PBS)或贝伐单抗的小鼠同源物(Bev)以治疗荷ADS-12瘤的129S4小鼠。图8示出了每种治疗的肿瘤体积。图8示出了肿瘤的完全消退(治愈率)。令人惊讶的是,对于抗血管生成治疗,某些小鼠显示出肿瘤体积的完全缓解,而不仅仅是肿瘤生长的延迟。这些结果特别令人惊讶,因为贝伐单抗的作用是抑制细胞生长的而非细胞毒性。

[0178] 这些结果证明单独或联合贝伐单抗使用的溶瘤病毒(包括TAV- $\Delta$ 19k)可有效减少肿瘤体积,并且单独或联合贝伐单抗使用的溶瘤病毒(包括TAV- $\Delta$ 19k)可导致肿瘤的完全消退。

[0179] 通过引用并入

[0180] 本文提及的每个专利文件和科学文章的全部披露为所有目的均通过引用并入。

[0181] 等效

[0182] 本发明可以以其他特定形式实现,而不背离其精神或根本特征。因此,上述实施例在所有方面都是说明性的,而非限制于本文所描述的本发明。因此,本发明的范围由所附权利要求而非由前述描述来说明,并且在权利要求的含义和等效范围内的所有变化都将包含在内。

## 序列表

<110> 埃皮辛特瑞柯斯公司

<120> 抗血管生成的腺病毒

<130> AJ4309PT1918

<150> US 62/510647

<151> 2017-05-24

<150> US 62/514351

<151> 2017-06-02

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 35938

<212> DNA

[0001] <213> 腺病毒 5 型

<400> 1

catcatcaat aatacacctt attttggatt gaaggccata tgataatgag ggggtggagt 60

ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaaagtgt 120

gatgttgc当地 gtgtggcgga acacatgtaa gcgcacggatg tggcaaaagt gacgttttg 180

gtgtgcgc当地 gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgc当地 gtttttaggc当地 gatgttgttag 240

taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccatttcgc gggaaaactg aataagagga 300

agtgaaatct gaataatttt gtgttactca tagcgc当地 tatttgtcta gggccgc当地 360

gactttgacc gtttacgtgg agactcgccc aggtgtttt ctcaggtgtt ttccgc当地 420

cgggtcaaag ttggcg当地 attattatag tcagctgacg tgttagtgtat ttataccgg 480

tgagttc当地 aagaggccac tctttagtgc cagcgagtag agtttctcc tccgagccgc 540

tccgacaccg ggactgaaaa tgagacata tatactgccc当地 ggaggtgtt当地 ttaccgaaga 600

aatggccgcc	agtctttgg	accagctgat	cgaagaggta	ctggctgata	atcttccacc	660
tcctagccat	tttgaaccac	ctacccttca	cgaactgtat	gatttagacg	tgacggcccc	720
cgaagatccc	aacgaggagg	cggttcgca	gatititccc	gactctgtaa	tgttggcggt	780
gcaggaaggg	attgacttac	tcactttcc	gccggcgccc	ggttctccgg	agccgcctca	840
ccttcccg	cagcccgagc	agccggagca	gagagcctt	ggtccggttt	ctatgccaaa	900
ccttgcattcg	gaggtgatcg	atcttacctg	ccacgaggct	ggcttccac	ccagtgacga	960
cgaggatgaa	gagggtgagg	agtttgtt	agattatgt	gagcaccccg	ggcacggttt	1020
caggtcttgt	cattatcacc	ggaggaatac	gggggaccca	gatattatgt	gttcgcctt	1080
ctatatgagg	acctgtggca	tgtttgtcta	cagtaagtga	aaattatgg	cagtgggtga	1140
tagagtggtg	ggtttggtgt	ggtaattttt	tttttaattt	ttacagtttt	gtggtttaaa	1200
gaattttgta	ttgtgatttt	tttaaaaggt	cctgtgtctg	aacctgagcc	tgagcccgag	1260
[0002]						
ccagaaccgg	agcctgcaag	acctaccgc	cgtcctaaaa	tggcgccctgc	tatcctgaga	1320
cggccgacat	cacctgtgtc	tagagaatgc	aatagtagta	cggatagctg	tgactccggt	1380
ccttctaaca	cacccctga	gatacacccg	gtggtcccg	tgtccccat	taaaccagtt	1440
gccgtgagag	ttggtggcg	tcgccaggct	gtggaatgta	tcgaggactt	gcttaacgag	1500
cctggcaac	cttggactt	gagctgtaaa	cggccaggc	cataagggt	aaacctgtga	1560
ttgcgtgtt	ggtaacgcc	tttggctgt	gaatgagtt	atgttaagttt	aataaagggt	1620
gagataatgt	ttaacttgca	tggcggtt	aatggggcgg	ggcttaaagg	gtatataatg	1680
cggcggtggc	taatcttggt	tacatctgac	ctcatggagg	cttggagtg	tttggaaagat	1740
ttttctgtctg	tgcgttaactt	gctgaaacag	agctctaaca	gtacctctt	gttttggagg	1800
tttctgtggg	gctcatccca	ggcaaagtta	gtctgcagaa	ttaaggagga	ttacaagtgg	1860
gaatttgaag	agctttgaa	atcctgtggt	gagctgttt	attcttgaa	tctgggtcac	1920

caggcgcttt tccaagagaa ggtcatcaag actttggatt tttcacacc gggcgcgct	1980
gcccgtctg ttgtttttt gagtttata aaggataat ggagcgaaga aacccatctg	2040
agcgggggtt acctgctgga ttttctggcc atgcatactgt ggagagcgtt tgtgagacac	2100
aagaatcgcc tgctactgtt gtcttcggtc cggccggcga taataccgac ggaggaggcag	2160
cagcagcagc aggaggaagc caggcgccgg cggcaggagc agagcccatg gaacccgaga	2220
gccggcctgg accctcggtt atgaatgttg tacagggtggc tgaactgtat ccagaactga	2280
gacgcatttt gacaattaca gaggatggc agggctaaa ggggttaaag agggagcggg	2340
gggcttgtga ggctacagag gaggcttagga atctagctt tagcttaatg accagacacc	2400
gtcctgatgt tattactttt caacagatca aggataattt cgctaatgat cttgatctgc	2460
tggcgagaa gtattccata gagcagctga ccacttactg gctgcagcca gggatgatt	2520
ttgaggaggc tattaggta tatgcaaagg tggcacttag gccagattgc aagtacaaga	2580
[0003]	
tcagcaaact tgtaaatatc aggaattgtt gctacatttc tggaaacggg gccgaggtgg	2640
agatagatac ggaggatagg gtggcctta gatgttagcat gataaatatg tggccggggg	2700
tgcttggcat ggacgggtt gttattatga atgtaagggt tactggcccc aattttagcg	2760
gtacggtttt cctggccaat accaacctta tcctacacgg tgtaagcttc tatggttta	2820
acaatacctg tgtgaaagcc tggaccgatg taagggttcg gggctgtgcc ttttactgct	2880
gctgaaaggg ggtgggtgtt cgcccaaaa gcaggcttc aattaagaaa tgccttttg	2940
aaagggtgtac ctgggtatc ctgtctgagg gtaactccag ggtgcgccac aatgtggcct	3000
ccgactgtgg ttgcttcatg ctatgaaaa gcgtggctgt gattaagcat aacatggtat	3060
gtggcaactg cgaggacagg gcctctcaga tgctgacctg ctggacggc aactgtcacc	3120
tgctgaagac cattcacgtt gccagccact ctgcacaggc ctggccatgt tttgagcata	3180
acataactgac ccgctgttcc ttgcatttgg gtaacaggag ggggtgttc ctaccttacc	3240

aatgcaattt gagtcacact aagatattgc ttgagcccga gagcatgtcc aaggtgaacc	3300
tgaacggggt gtttgacatg accatgaaga tctggaaggt gctgaggtac gatgagaccc	3360
gcaccagggtg cagaccctgc gagtgtggcg gtaaaacat at taggaaccag cctgtatgc	3420
tggatgtgac cgaggagctg aggcccgatc acttggtgct ggcctgcacc cgcgctgagt	3480
ttggctctag cgatgaagat acagatttagt gtactgaaat gtgtggcgt ggcttaaggg	3540
tgggaaagaa tatataaggt ggggtctta ttagttttg tatctgtttt gcagcagccg	3600
ccggcccat gagcaccaac tcgtttgatg gaagcattgt gagctcatat ttgacaacgc	3660
gcatgcccccc atggccggg gtgcgtcaga atgtgatggg ctccagcatt gatggtcgcc	3720
ccgtcctgcc cgcaaactct actacccatg cctacgagac cgtgtctgga acgcccgtgg	3780
agactgcagc ctccgccc gcttcagccg ctgcagccac cgccgcggg atttgactg	3840
actttgcctt cctgagcccg cttgcaagca gtgcagctc ccgttcatcc gcccgcgt	3900
[0004]	
acaagttgac ggctcttttgcacaattgg attcttgac ccgggaactt aatgtcgttt	3960
ctcagcagct gttggatctg cgccagcagg tttctgcctt gaaggcttcc tcccctccca	4020
atgcggtttta aaacataaaat aaaaaaccag actctgtttt gatttggatc aagcaagtgt	4080
cttgctgtct ttattttaggg gttttgcgcg cgccgttaggc ccgggaccag cggtctcggt	4140
cgttgggggt cctgtgtatt tttccagga cgtggtaaag gtgactctgg atgttcagat	4200
acatgggcatt aagccgtct ctggggtgga ggtagcacca ctgcagagct tcattgtcg	4260
gggtgggttt gtagatgatc cagtcgttagc aggagcgctg ggcgtggtgc ctaaaaatgt	4320
cttcagcttag caagctgatt gccaggggca gccccttgggt gtaagtgttt acaaagcggt	4380
taagctggga tgggtgcata cgtggggata tgagatgcat cttggactgt attttttaggt	4440
tggctatgtt cccagccata tccctccggg gattcatgtt gtgcagaacc accagcacag	4500
tgtatccggt gcacttggga aatttgtcat gttagctttaga agggaaatgcg tggaagaact	4560

tggagacgcc	cttgtgacct	ccaagattt	ccatgcattc	gtccataatg	atggcaatgg	4620
gcccacgggc	ggcggcctgg	gcgaagatat	ttctggatc	actaacgtca	tagtgtt	4680
ccaggatgag	atcgcatag	gccatttta	caaagcgcg	goggagggtg	ccagactgcg	4740
gtataatggt	tccatccggc	ccagggcgt	agttaccctc	acagattgc	atttcccacg	4800
cttgagttc	agatgggggg	atcatgtcta	cctgcggggc	gatgaagaaa	acggttccg	4860
gggttagggga	gatcagctgg	gaagaaagca	ggttcctgag	cagctgcac	ttaccgcagc	4920
cggtgggccc	gtaaatcaca	cctattaccg	ggtgcaactg	gtagttaaaga	gagctgcagc	4980
tgccgtcatc	cctgagcagg	ggggccactt	cgttaagcat	gtccctgact	cgcatgttt	5040
ccctgaccaa	atccgccaga	aggcgctcgc	cgcgcagcga	tagcagttct	tgcaaggaag	5100
caaagtttt	caacggtttg	agaccgtccg	ccgtaggcat	gctttgagc	gtttgaccaa	5160
gcagttccag	gccccccac	agctcggtca	cctgctctac	ggcatctoga	tccagcatat	5220
[0005]	ctccctcgttt	cgcgggttgg	ggcggcttc	gctgtacggc	agtagtcgg	5280
	acgggccagg	gtcatgtctt	tccacggcg	cagggtcctc	gtcagcgtag	5340
	ggtaaggggg	tgcgtccgg	gctgcgcgt	ggccagggtg	cgctttaggc	5400
	ggtgctgaag	cgctgccgt	cttcgcctg	cgcgtggcc	agtagcatt	5460
	gtcatagtcc	agccctccg	cggcggtggcc	cttggcgcc	agttgcctt	5520
	gccgcacgag	gggcagtca	gacttttag	ggcgtagagc	ttggcgccg	5580
	ttccggggag	taggcatccg	cgcgcaggc	cccgcagacg	gtctcgatt	5640
	ggtgagctct	ggccgttcgg	ggtaaaaaac	caggttccc	ccatgcctt	5700
	cttacctctg	gtttccatga	gccgggtgtcc	acgctcggtg	acgaaaaggc	5760
	cccgataaca	gacttgagag	gcctgtcctc	gagcggtgtt	ccgcggctct	5820
	aaactcggac	cactctgaga	caaaggctcg	cgtccaggcc	agcacgaagg	5880

ggaggggtag cggtcggttgc ccaactagggg gtccactcgc tccagggtgt gaagacacat	5940
gtcgccctct tcggcatcaa ggaagggtat tggttttagt gtgttaggcca cgtgaccggg	6000
tgttcctgaa gggggctat aaaaggggt gggggcgcgt tcgtcctcac tctcttccgc	6060
atcgctgtct gcgagggcca gctgttgggg tgagttactcc ctctaaaag cgggcatgac	6120
ttctgcgcta agattgtcag tttccaaaaa cgaggaggat ttgatattca cctggcccgc	6180
ggtgatgcct ttgagggtgg ccgcattccat ctggtcagaa aagacaatct ttttgggtc	6240
aagcttggtg gcaaaccgacc cgttaggggc gttggacagc aacttggcga tggagcgcag	6300
gttttggttt ttgtcgcat cggcgcttc cttggccgcg atgttttagct gcacgtattc	6360
gcgcgcaacg caccgcatt cgggaaagac ggtggtgcbc tcgtcggca ccaggtgcac	6420
gcgcacaaccg cgggtgtgca gggtgacaag gtcaacgctg gtggctacct ctccgcgtag	6480
gcgcgtcggtt gtccagcaga ggcggccgccc cttgcgcgag cagaatggcg gtaggggtc	6540
[0006] tagctgcgtc tcgtccgggg ggtctgcgtc cacggtaaag accccggca gcaggcgcgc	6600
gtcgaagtag tctatcttgc atccttgc aa gtctagcgcc tgctgccatg cgccggcgcc	6660
aagcgcgccgc tcgtatgggt tgagtgggg accccatggc atgggggtggg tgagcgccgga	6720
ggcgtacatg ccgcaaatgt cgtaaacgta gagggctct ctgagtattc caagatatgt	6780
aggtagcat ctccaccgc ggatgctggc gcgcacgtaa tcgtatagtt cgtgcgagg	6840
agcgaggagg tcgggaccga gttgtacg ggcgggctgc tctgctcgga agactatctg	6900
cctgaagatg gcatgtgagt tggatgat ggttggacgc tgaaagacgt tgaagctggc	6960
gtctgtgaga cctaccgcgt cacgcacgaa ggaggcgtat gagtcgcgcga gcttggtag	7020
cagctcgccgt gtgacctgca cgtctaggc gcagtagtcc agggtttctt tgatgtatgc	7080
atacttatcc tgtccctttt tttccacag ctcgcgggtt aggacaaact cttcgccgtc	7140
tttccagtagtac tcttggatcg gaaaccgcgc ggcctccgaa cggtaagagc ctagcatgt	7200

gaactggttg acggcctggt aggccgacca tccctttct acgggtacgc cgtatgcctg	7260
cgcggccttc cggagcgagg tgtgggtgag cgcaaagggtg tccctgacca tgactttgag	7320
gtactggtat ttgaagttag tgcgtcgca tccgcccgc tcccagagca aaaagtccgt	7380
gcgccttttg gaacgcggat ttggcagggc gaagggtgaca tcgttgaaga gtatcttcc	7440
cgcgcgaggc ataaagttgc gtgtgatgcg gaagggtccc ggcaccccg aacggttgtt	7500
aattacctgg gcggcgagca cgatctcgca aaagccgttg atgttgtggc ccacaatgta	7560
aagttccaag aagcgcggga tgcccttgat ggaaggcaat ttttaagtt cctcgtaggt	7620
gagctttca ggggagctga gcccgtgctc taaaagggcc cagtctgcaa gatgagggtt	7680
ggaagcgcacg aatgagctcc acaggtcacg gcccattagc atttgcaggt ggtcgcaaa	7740
ggtcctaaac tggcgaccta tggccatttt ttctgggtg atgcagtaga aggttaagcgg	7800
gtcttgttcc cagcggtccc atccaagggtt cggcgctagg tctcgccgg cagtcaactag	7860
[0007] aggctcatct ccgcgaact tcatgaccag catgaagggc acgagctgct tcccaaaggc ccccatccaa gtataggctt ctacatcgta ggtgacaaag agacgctcg tgcgaggatg cgagccgatc gggagaact ggatctcccg ccaccaattt gaggagtggc tattgatgt gtgaaaagtag aagtccctgc gacggccga acactcgatc tggctttgt aaaaacgtgc gcagtaactgg cagcggtgca cggcgttac atcctgcacg agttgaccc gacgaccg cacaaggaag cagagtggaa atttggccc ctcgcgtggc gggttggct ggtggcttc tacttcggct gcttgcctt gaccgtctgg ctgctcgagg ggagttacgg tggatcgac caccacgccc cgcgagccca aagtccagat gtccgcgcgc ggcggtcgga gcttgcac aacatcgccgc agatgggagc tgtccatggt ctggagctcc cgcggcgta ggtcaggcgg gagctctgc aggtttaccc cgcatagacg ggtcaggcgc cgggctagat ccaggatgata cctaatttcc agggctggt tggcggccgc gtcgtggct tgcaagaggc cgcattcccg	7920
8100	
8160	
8220	
8280	
8340	
8400	
8460	
8520	

cggcgcgact acggtaccgc gcggcgccgc gtggccgcg ggggtgtcct tggatgatgc	8580	
atctaaaagc ggtgacgcgg gcgagccccc ggaggttaggg ggggctccgg acccgccggg	8640	
agagggggca ggggcacgtc ggcgcgcgc gcgggcagga gctggtgctg cgcgctagg	8700	
ttgctggcga acgcgacgac gcggcggtt atctcctgaa tctggcgccct ctgcgtgaag	8760	
acgacgggcc cggtgagctt gagcctgaaa gagagttcga cagaatcaat ttgggtgtcg	8820	
ttgacggcggtt cctggcgcaa aatctcctgc acgtctcctg agttgtcttg ataggcgatc	8880	
tcggccatga actgctcgat ctcttcctcc tggagatctc cggtccggc tcgctccacg	8940	
gtggcgccga ggtcggttga aatgcgggcc atgagctgctc agaaggcggtt gaggcctccc	9000	
tcgttccaga cgccggctgta gaccacgccc cttcgcat cgccggcgcat catgaccacc	9060	
tgccgcgagat tgagctccac gtgcggcg aagacggcgat agttcgcag ggcgtgaaag	9120	
aggttagtiga gggtggtggc ggtgtgttct gccacgaaga agtacataac ccagcgctcg	9180	
[0008]	aacgtggatt cggtgatatac ccccaaggcc tcaaggcgct ccatggccctc gtggaaatcc	9240
	acggcgaagt taaaaactg ggagttgcgc gccgacacgg ttaactcctc ctccagaaga	9300
	cggatgagct cggcgacagt gtcgcgcacc tcgcgtcaa aggctacagg ggcctttct	9360
	tcttcttcaa tctcctcttc cataagggcc tccccttctt cttttctgg cggcggtgg	9420
	ggagggggga cacggcgccgc acgacggcgcc accgggaggc ggtcgacaaa ggcgtcgatc	9480
	atctccccgc ggacggcgcatggctcg gtgcggcgcc ggccgttctc gcggggcgcc	9540
	agttggaaga cggcgcccgat catgtccgg ttatgggttg gcggggggct gccatgcggc	9600
	agggatacgg cgctaacatgc acatctcaac aattgttgcg taggtactcc gccgcccggagg	9660
	gacctgagcg agtccgcac gaccggatcg gaaaacctct cgagaaaggc gtctaacccag	9720
	tcacagtcgc aaggtaggct gaggcaccgtg gcggcgccga gcggggcgccgt gtgggttgc	9780
	tttctggcggtt aggtgctgct gatgtatgtaa taaaaggtagg cggcttgcg acggcgatg	9840

gtcgacagaa gcaccatgtc cttgggtccg gcctgctgaa tgcgcaggcg gtcggccatg	9900	
ccccaggcgtt cgttttgaca tcggcgagg tctttgtat agtcttgcgtt gaggcctttct	9960	
accggcactt cttcttctcc ttcccttctgt cctgcatttc ttgcatttat cgctgcggcg	10020	
gccccggagt ttggccgttag gtggccgcct cttccctccca tgcgtgtgac cccgaagccc	10080	
ctcatcggtt gaagcagggc taggtcggcg acaacgcgtt cggctaatat ggcctgctgc	10140	
acctgcgtgtt gggtagactg gaagtcatcc atgtccacaa agcgggtggta tgcgcggcgt	10200	
ttgatgggtt aagtgcgtt ggccataacg gaccagttaa cggctctggtg accccggctgc	10260	
gagagctcgg tgcgttgcgtt acgcgttgcgtt gcccctcgagt caaatacgta gtcgttgca	10320	
gtccgcacca ggtactggta tcccacccaa aagtgcggcg gcccgtggcg gtagaggggc	10380	
cagcgttaggg tggccggggc tccggggcg agatcttcca acataaggcg atgatatccg	10440	
tagatgtacc tggacatcca ggtgtatgcgtt gcccgtgg tggaggcgcg cggaaagtgc	10500	
[0009]	cggacgcgtt tccagatgtt ggcgcggcgtt aaaaagtgtt ccatggtcgg gacgcgttgc	10560
	ccggtcaggc ggcgcgttgcgtt gttgcgttgcgtt tagaccgtgc aaaaggagag cctgtaaagcg	10620
	ggcactttc cgtggtctgg tggataaaatt cgcaagggtt tcatggcgga cgaccgggtt	10680
	tcgagccccg tatccggccg tccgcgttgcgtt tccatgcgtt taccggccgc gtgtcgaacc	10740
	caggtgtgcgtt acgtcagaca acggggagggtt gctccttttgcgtt gtcgttgcgtt	10800
	gctgctgcgtt tagctttttt ggccactggc cgcgcgttgcgtt gtaagcggtt aggctggaaa	10860
	gcgaaaggcat taagtggcgtt gctccctgttgcgtt gcccgtgggtt tattttccaa gggttgagtc	10920
	cgccggaccccg cggttcgttgcgtt ctcggaccgg ccggactgcgtt gcaacgggg gtttgcgttgcgtt	10980
	ccgtcatgcgtt agaccccgctt tgcaaaattcc tccggaaacaa gggacgcgttgcgtt ccttttttgcgtt	11040
	ttttcccgat tgcgttgcgtt gctgcggcgtt atgcgcgttgcgtt ctcctcgttgcgtt gcccgtgggtt	11100
	caagagcgttgcgtt ggcagacatgtt cagggcaccc tccctcgttgcgtt ctcctcgttgcgtt aggagggggcgttgcgtt	11160

acatccgcgg ttgacgcggc agcagatggt gattacgaac cccgcggcg ccggcccccgg	11220	
cactacctgg acttggagga gggcgagggc ctggcgccgc taggagcgcc ctctcctgag	11280	
cgttacccaa gggtgcagct gaagcgtgat acgcgtgagg cgtacgtgcc gcggcagaac	11340	
ctgtttcgcg accgcgaggg agaggagccc gaggagatgc gggatcgaaa gttccacgca	11400	
gggcgcgagc tgccgcatgg cctgaatcgc gagcggttgc tgccgcgagga ggactttgag	11460	
cccgacgcgc gaaccgggat tagtcccgcg cgccgcacacg tggccgcgcg cgacctggta	11520	
accgcatacg agcagacggt gaaccaggag attaacttc aaaaaagctt taacaaccac	11580	
gtgcgtacgc ttgtggcgcg cgaggaggtg gctataggac tgcgtacgc tgccgcgtt	11640	
gtaaagcgcgc tggagcaaaa cccaaatagc aagccgctca tggcgcagct gttccttata	11700	
gtgcagcaca gcaggacaa cgaggcattc agggatgcgc tgctaaacat agtagagccc	11760	
gagggccgct ggctgctcga tttgataaac atcctgcaga gcatagtggt gcaggagcgc	11820	
[0010]	agcttggcc tggctgacaa ggtggccgc atcaactatt ccatgcttag cctggcaag	11880
	ttttacgccc gcaagatata ccataccct tacgttccca tagacaagga ggtaaagatc	11940
	gaggggttct acatgcgcat ggccgtgaag gtgcgttacct tgagcgcacga cctggcggtt	12000
	tatcgcaacg agcgcatcca caaggccgtg agcgtgagcc ggcggcgcga gtcagcgcac	12060
	cgcgagctga tgcacagcct gcaaaggcc ctggctggca cggcagcgg cgatagagag	12120
	gccgagtctt actttgacgc gggcgctgac ctgcgtggg ccccaagccg acgcgcctg	12180
	gaggcagctg gggccggacc tggcgtggcg gtggcacccg cgccgcgtgg caacgtcgcc	12240
	ggcgtggagg aatatgacga ggacgatgag tacgagccag aggacggcga gtactaagcg	12300
	gtgatgtttc tgatcagatg atgcaagacg caacggaccc ggcggcgcgg gcggcgtgc	12360
	agagccagcc gtccggccctt aactccacgg acgactggcg ccaggtcatg gaccgcacca	12420
	tgcgtacgc tgcgcgcaat cctgacgcgt tccggcagca gccgcaggcc aaccggctct	12480

ccgcaattct ggaagcggtg gtcccgccgc gcgcaaacc cacgcacgag aaggtgctgg	12540	
cgatcgtaaa cgcgctggcc gaaaacaggg ccatccggcc cgacgaggcc ggcctggct	12600	
acgacgcgct gcttcagcgc gtggctcggt acaacagcgg caacgtgcag accaacctgg	12660	
accggctggt gggggatgtg cgcgaggccg tggcgcagcg tgagcgcgca cagcagcagg	12720	
gcaacctggg ctccatggtt gcactaaacg ccttccttag tacacagccc gccaacgtgc	12780	
cgcggggaca ggaggactac accaactttg tgagcgcact gcggctaatt gtgactgaga	12840	
caccgcaaag tgaggtgtac cagtctggc cagactattt tttccagacc agtagacaag	12900	
gcctgcagac cgtaaacctg agccaggctt tcaaaaactt gcagggctg tgggggtgc	12960	
gggctccac aggcgaccgc gcgaccgtgt ctagttgt gacgcccac tcgcgcctgt	13020	
tgctgctgct aatagcgccc ttacggaca gtggcagcgt gtcccgac acatacctag	13080	
gtcacttgct gacactgtac cgcgaggcca taggtcaggc gcatgtggac gagcatactt	13140	
[0011]	tccaggagat tacaagtgtc agccgcgcgc tggggcagga ggacacgggc agcctggagg	13200
	caaccctaaa ctacctgctg accaaccggc ggcagaagat cccctcggtg cacagttaa	13260
	acagcgagga ggagcgcatt ttgcgtacg tgcagcagag cgtgagccctt aacctgatgc	13320
	gcgacggggt aacgcccagc gtggcgctgg acatgaccgc gcgcaacatg gaaccggca	13380
	tgtatgcctc aaaccggccg tttatcaacc gcctaattggc ctacttgcatt cgcgccggcg	13440
	ccgtgaaccc cgagtatttc accaatgcca tcttgaaccc gcactggcta ccgcggccgt	13500
	gtttctacac cgggggattc gaggtgcccg agggtaacga tggattccctc tgggacgaca	13560
	tagacgacag cgtgtttcc ccgcaaccgc agaccctgtt agagttgcaa cagcgcgagc	13620
	aggcagaggc ggcgctgcga aaggaaagct tccgcaggcc aagcagcttgc tccgatctag	13680
	gcgctgcggc cccgcggtaa gatgttagta gccatttcc aagcttgcata gggctctta	13740
	ccagcactcg caccacccgc ccgcgcctgc tggcgcagga ggagtaccta aacaactcgc	13800

tgctgcagcc gcagcgcgaa aaaaacctgc ctccggcatt tcccaacaac gggatagaga	13860
gcctagtgga caagatgagt agatggaaga cgtacgcgca ggagcacagg gacgtgccag	13920
gcccgccccc gcccacccgt cgtcaaaggc acgaccgtca gcggggtctg gtgtgggagg	13980
acgatgactc ggcagacgac agcagcgtcc tggatttggg agggagtggc aaccgtttgc	14040
cgcacccctcg ccccaggctg gggagaatgt ttaaaaaaaaaaa aaaaagcatg atgaaaata	14100
aaaaaactcac caaggccatg gcaccgagcg ttggtttct tgtattcccc tttagtatgcgc	14160
ggcgcggcgc atgtatgagg aaggccctcc tccctctac gagagtgtgg tgagcgcggc	14220
gccagtgccgc gcggcgctgg gttccctt cgtgctccc ctggaccgcg cgtttgtgcc	14280
tcccggtac ctgcggccta ccgggggag aaacagcatc cgttactctg agttggcacc	14340
cctattcgac accacccgtg tgtacctggt ggacaacaag tcaacggatg tggcatccct	14400
gaactaccag aacgaccaca gcaactttct gaccacggtc attcaaaaca atgactacag	14460
[0012]	
cccgaaaaag gcaaggcacac agaccatcaa tcttgacgac cggtcgact gggcggcga	14520
cctgaaaaacc atcctgcata ccaacatgcc aaatgtgaac gagttcatgt ttaccaataa	14580
gtttaaggcg cgggtgatgg tgtcgctt gcctactaag gacaatcagg tggagctgaa	14640
atacgagtgg gtggagttca cgctccccga gggcaactac tccgagacca tgaccataga	14700
ccttatgaac aacgcgatcg tggagcacta ctggaaagtgc ggcagacaga acggggttct	14760
ggaaaagcgac atcggggtaa agttgacac ccgcaacttc agactgggtt ttgaccccg	14820
cactggtctt gtcatgcctg ggttatatac aaacgaagcc ttccatccag acatcatttt	14880
gctgccagga tgcgggtgg acttcaccca cagccgcctg agcaacttgt tggcatccg	14940
caagcggcaa ccctccagg agggctttag gatcacctac gatgatctgg agggtgtaa	15000
cattcccgca ctgttggatg tggacgccta ccaggcgagc ttgaaagatg acaccgaaca	15060
ggcgaaaaat ggcgcaggcg gcagcaacag cagtggcagc ggcgcggaaag agaactccaa	15120

cgccggcagcc	cgccggcagcc	gcccgggtgga	ggacatgaac	gatcatgccca	ttcgccggcga	15180	
cacctttgcc	cacctttgcc	acacgggctg	aggagaagcg	cgctgaggcc	gaagcagcgg	ccgaagctgc	15240
cgcggccgt	cgcggccgt	gcccggccgt	gcccggccgt	gcccggccgt	gcccggccgt	gcccggccgt	15300
gacagaggac	gacagaggac	agcaagaaac	gcagttacaa	cctaataaagc	aatgacagca	cttcacccca	15360
gtaccgcagc	gtaccgcagc	tggtaccttg	catacaacta	cggcgaccct	cagaccggaa	tccgctcatg	15420
gaccctgctt	gaccctgctt	tgcactcctg	acgtaacctg	cggctcggag	caggtctact	ggtcgttgcc	15480
agacatgatg	agacatgatg	caagaccccg	tgaccttccg	ctccacgcgc	cagatcagca	actttccgg	15540
ggtgggcgcc	ggtgggcgcc	gagctgtgc	ccgtgcactc	caagagcttc	tacaacgacc	aggccgtcta	15600
ctcccaactc	ctcccaactc	atccgccagt	ttacctctt	gacccacgt	ttcaatcgct	ttcccgagaa	15660
ccagattttg	ccagattttg	gcgcgcgcgc	cagcccccac	catcaccacc	gtcagtgaaa	acgttccctgc	15720
tctcacagat	tctcacagat	cacgggacgc	taccgctg	caacagcatc	ggaggagtcc	agcgagtgac	15780
[0013]	cattactgac	gccagacgcc	gcacactgccc	ctacgtttac	aaggccctgg	gcatagtctc	15840
gccgcgcgtc	gccgcgcgtc	ctatcgagcc	gcacttttg	agcaagcatg	tccatcccta	tatcgcccg	15900
caataacaca	caataacaca	ggctggggcc	tgcgcttccc	aagcaagatg	tttggcgggg	ccaagaagcg	15960
ctccgaccaa	ctccgaccaa	cacccagtgc	gcgtgcgcgg	gcactaccgc	gcccctggg	gcccgcacaa	16020
acgcggccgc	acgcggccgc	actgggcgca	ccaccgtcga	tgacgccatc	gacgcggtgg	tggaggaggc	16080
gcgcaactac	gcgcaactac	acgcccacgc	cgcacccagg	gtccacagt	gacgcggcca	ttcagaccgt	16140
ggtgcgccga	ggtgcgccga	gcccgccgct	atgctaaaat	gaagagacgg	cggaggcgcg	tagcacgtc	16200
ccaccggccgc	ccaccggccgc	cgaccggca	ctgcccggca	acgcgcggcg	gcccgcgtgc	ttaaccgcgc	16260
acgtgcacc	acgtgcacc	ggccgacggg	cggccatgcg	ggccgcgtcg	aggctggccg	cgggtattgt	16320
cactgtgccc	cactgtgccc	cccaggtcca	ggcgacgagc	ggccgcggca	gcagccgcgg	ccattagtgc	16380
tatgactcag	tatgactcag	ggtcgcaggg	gcaacgtgt	ttgggtgcgc	gactcggtt	gcccgcgtcg	16440

cgtccccgtg	cgcacccgcc	ccccgcgcaa	ctagattgca	agaaaaaaact	acttagactc	16500	
gtactgttgt	atgtatccag	cggcggcggc	gcgcaacgaa	gctatgtcca	agcgcaaaat	16560	
caaagaagag	atgctccagg	tcatcgcc	ggagatctat	ggcccccga	agaaggaaga	16620	
gcaggattac	aagccccgaa	agctaaagcg	ggtcaaaaag	aaaaagaaag	atgatgatga	16680	
tgaacttgac	gacgagggtgg	aactgctgca	cgctaccg	cccaggcgac	gggtacagt	16740	
gaaaggcgtga	cgcgtaaaac	gtgtttgcg	accggcacc	accgtagtct	ttacgcccgg	16800	
tgagcgctcc	accgcac	acaagcgt	gtatgatgag	gtgtacggcg	acgaggac	16860	
gcttgcgcag	gccaacgagc	gcctcgggga	gttgcctac	ggaaagcggc	ataaggacat	16920	
gctggcg	ccgctggacg	agggcaaccc	aacacctagc	ctaaagcccg	taacactgca	16980	
gcaggtgctg	cccgcgtt	caccgtccga	agaaaaagcgc	ggcctaaagc	gcgagtctgg	17040	
tgacttggca	cccaccgtgc	agctgatggt	acccaagcgc	cagcgactgg	aagatgtctt	17100	
[0014]	ggaaaaaaatg	accgtgaaac	ctgggctgga	gcccgggtc	cgcgtgcggc	caatcaagca	17160
gg	ggactggcg	tgcagaccgt	ggacgttcag	ataccacta	ccagtagcac	17220	
cagtattgcc	accgccacag	agggcatgga	gacacaaacg	tccccgg	cctcagcggt	17280	
ggcggatgcc	g	cggtgcagg	cggtcgctgc	ggccgcgtcc	aagacctcta	cgaggatgca	17340
aacggacccg	tggatgtt	cggttcagc	ccccggcgc	ccgcgcgtt	cgaggaagta	17400	
cggcgccg	agcg	cgctac	tgcccgaata	tgcctacat	cctccat	cgctacccc	17460
cg	cgctatcg	ggctacac	accgc	ccag	actaccgac	gccgaaccac	17520
cactgg	acc	cgccgc	gtcgccgtc	ccagcccgt	ctggcc	tttccgtgc	17580
cagggtgg	ct	cg	cgaggacc	gtgtgc	acagcgc	accaccc	17640
catcg	ttt	aa	aagccgg	tct	ttgtgtt	tgcagat	17700
tttccgg	tg	ccgg	gatt	cc	gaggaaga	atggc	17760

cctgacgggc ggcatgcgtc gtgcgcacca ccggcggcgg cgcgctgc accgtgcacat	17820	
gcgcggcggt atcctgcccc tccttattcc actgatcgcc gcggcgattg gcccgtgcc	17880	
cggaaattgca tccgtggcct tgcaggcgca gagacactga taaaaaaca aatgtatgt	17940	
aaaaaaatcaa aataaaaagt ctggactctc acgctcgctt ggtcctgtaa ctatttgt	18000	
aatggaaaga catcaacttt gcgtctctgg ccccgacaca cggctcgcc cggttcatgg	18060	
aaactggca agatatcgcc accagcaata tgagcggtgg cgccttcagc tggggctcgc	18120	
tgtggagcgg cattaaaaat ttcggttcca ccgttaagaa ctatggcagc aaggcctgga	18180	
acagcagcac aggcagatg ctgaggata agttgaaaga gcaaaatttca aacaaaagg	18240	
tggtagatgg cctggctct ggcattagcg ggggggtggc cctggccaac caggcagtgc	18300	
aaaataagat taacagtaag cttgatcccc gccctccgt agaggagcct ccaccggccg	18360	
tggagacagt gtctccagag gggcgtggcg aaaagcgtcc ggcggccgac aggaaagaaa	18420	
[0015]	ctctggtac gcaaatagac gagcctccct cgtacgagga ggcactaaag caaggcctgc	18480
	ccaccacccg tcccatcgcc cccatggcta ccggagtgtc gggccagcac acaccgtaa	18540
	cgctggacct gcctcccccc ggcgacaccc agcagaaaacc tggctgcca ggccggaccg	18600
	ccgttgttgc aaccggcct agccgcgtc ccctgcgcgg cgccgcccagc ggtccgcgt	18660
	cgttgcggcc cgtagccagt ggcaactggc aaagcacact gaacagcatc gtgggtctgg	18720
	gggtgcaatc cctgaagcgc cgacgatgtc tctgaatagc taacgtgtcg tatgtgtgc	18780
	atgtatgcgt ccatgtcgcc gccagaggag ctgctgagcc ggcgcgcgcg cgtttccaa	18840
	gatggctacc cttcgatga tgccgcgtg gtcttacatg cacatctcg ggcaggacgc	18900
	ctcggagtagc ctgagcccg ggctggcgtca gtttgcgcgc ggcaccgaga cgtacttcag	18960
	cctgaataac aagtttagaa accccacggt ggcgcctacg cacgacgtga ccacagaccg	19020
	gtcccagcgt ttgacgctgc ggttcatccc tggaccgt gaggatactg cgtactcgta	19080

caaggcgcgg ttcaccctag ctgtgggtga taaccgtgt ctggacatgg cttccacgta	19140
cttgcacatc cgccgcgtgc tggacagggg ccctacttt aagccctact ctggcactgc	19200
ctacaacgcc ctggctccca agggtgcccc aaatccttgc gaatggatg aagctgctac	19260
tgctcttcaa ataaacctag aagaagagga cgatgacaac gaagacgaag tagacgagca	19320
agctgagcag caaaaaactc acgtatttgg gcaggcgct tattctggta taaatattac	19380
aaaggagggt attcaaatacg gtgtcgaagg tcaaacacct aaatatgccg ataaaacatt	19440
tcaacctgaa cctcaaatacg gagaatctca gtggtagcaa actgaaatta atcatgcagc	19500
tgggagagtc cttaaaaaga ctacccaaat gaaaccatgt tacggttcat atgcaaaacc	19560
cacaaatgaa aatggagggc aaggcattct tgtaaagcaa caaaatggaa agctagaaag	19620
tcaagtggaa atgcaatttt tctcaactac tgaggcgacc gcaggcaatg gtgataactt	19680
gactcctaaa gtggattttt acagtgaaga tgttagatata gaaaccccg acactcatat	19740
[0016]	
ttcttacatg cccactattt aggaaggtaa ctcacgagaa ctaatggcc aacaatctat	19800
gcccaacagg cctaattaca ttgcttttag ggacaatttt attggctaa tgtattacaa	19860
cagcacgggt aatatgggt ttctggcggt ccaagcatcg cagttgaatg ctgttgtaga	19920
tttgcaagac agaaacacag agcttcata ccagctttt cttgattcca ttggtgatag	19980
aaccaggtag tttctatgt ggaatcaggc tggtagacagc tatgatccag atgttagat	20040
tattggaaat catgaaactg aagatgaact tccaaattac tgcttccac tggaggtgt	20100
gattaataca gagactctt ccaaggtaaa acctaaaaca ggtcaggaaa atggatggga	20160
aaaagatgct acagaatttt cagataaaaa tgaataaga gttggaaata atttgccat	20220
ggaaatcaat ctaaatgcca acctgtggag aaatttcctg tactccaaca tagcgctgt	20280
tttgcggac aagctaaagt acagtccctc caacgtaaaa atttctgata acccaaacac	20340
ctacgactac atgaacaagc gagtggtggc tccgggtta gtggactgct acattaacct	20400

tggagcacgc tggcccttg actatatgga caacgtcaac ccatttaacc accaccgcaa	20460	
tgctggcctg cgctaccgct caatgttgct gggcaatggt cgctatgtgc cttccacat	20520	
ccaggtgcct cagaagttct ttgccattaa aaacccctt ctcgtccgg gtcatacac	20580	
ctacgagtgg aacttcagga aggatgttaa catggttctg cagagctccc taggaaatga	20640	
cctaagggtt gacggagcca gcattaagtt tgatagcatt tgccttacg ccacccctt	20700	
ccccatggcc cacaacaccg cctccacgct tgaggccatg cttagaaacg acaccaacga	20760	
ccagtcctt aacgactatc tctccgccc caacatgctc taccctatac ccgccaacgc	20820	
taccaacgtg cccatatcca tcccctcccg caactggcg gcttcccg gctggccctt	20880	
cacgcgcctt aagactaagg aaacccatc actgggctcg ggctacgacc cttattacac	20940	
ctactctggc tctataccct acctagatgg aacctttac ctcaaccaca ccttaagaa	21000	
ggtggccatt acctttgact cttctgtcag ctggcctggc aatgaccgac tgcttacccc	21060	
[0017]	caacgagttt gaaattaagc gtcagttga cggggagggt tacaacgttgc cccagtgtaa	21120
	catgaccaaaa gactggttcc tggtacaaat gctagctaac tacaacattg gctaccagg	21180
	cttctatatac ccagagagct acaaggaccg catgtactcc ttcttagaa acttcagcc	21240
	catgagccgt caggtggtgg atgatactaa atacaaggac taccaacagg tggcattcct	21300
	acaccaacac aacaactctg gatttggtgg ctacccgttgc cccaccatgc gcgaaggaca	21360
	ggcctaccct gctaacttcc cctatccgct tataggcaag accgcagttg acagcattac	21420
	ccagaaaaag ttctttgcg atgcaccct ttggcgcatc ccattctcca gtaactttat	21480
	gtccatggc gcactcacag acctggccca aaaccccttc tacgccaact ccgcccacgc	21540
	gctagacatg acttttggagg tggatccat ggacgagccc accccctttt atgtttgtt	21600
	tgaagtcttt gacgtggtcc gtgtgcaccc gcccgcaccc ggcgtcatcg aaaccgtgtaa	21660
	cctgcgcacg cccttctcg ccggcaacgc cacaacataa agaagcaagc aacatcaaca	21720

acagctgccg ccatgggctc cagtgagcag gaactgaaag ccattgtcaa agatcttggt	21780
tgtggccat atttttggg cacctatgac aagcgcttc caggcttgtt ttctccacac	21840
aagctcgctt gcgccatagt caatacgcc ggtcgcgaga ctggggcgt acactggatg	21900
gccttgcctt ggaacccgca ctcaaaaaca tgctacctct ttgagccctt tggctttct	21960
gaccagcgac tcaagcaggt ttaccagttt gagtacgagt cactcctgctt ccgttagcgcc	22020
attgcttctt ccccgaccg ctgtataacg ctggaaaagt ccacccaaag cgtacagggg	22080
cccaactcggtt ccgcctgtgg actattctgc tgcatgttc tccacgcctt tgccaaactgg	22140
ccccaaactc ccatggatca caacccaccatgaaacctta ttaccgggtt acccaactcc	22200
atgctcaaca gtccccaggt acagcccacc ctgcgtcgca accaggaaca gctctacagc	22260
ttcctggagc gccactcgcc ctacttccgc agccacagtgc cgccaggattt gagcggccact	22320
tcttttgtc acttgaaaaaa catgtaaaaaa taatgtacta gagacacttt caataaaggc	22380
[0018] aaatgctttt atttgtacac tctcgggtga ttatttaccc ccacccttgc cgtctgcgccc	22440
gtttaaaaat caaagggtt ctgcgcgcac tcgctatgcg ccactggcag ggacacgttgc	22500
cgatactgggtt gtttagtgctt ccacttaaac tcaggcacaaccatcccgccggc cagctcgggt	22560
aagttttcac tccacaggctt ggcaccatc accaacgcgtt ttagcaggcgtt gggcgccgat	22620
atcttgaagt cgccagggtt ggctccgcgc tgccgcgcgc agttgcgata cacagggttgc	22680
cagcacttggaa acactatcag cgccgggtgg tgcacgcgtt ccagcacgcgtt ctgtcggag	22740
atcagatccg cgtccaggcgtt ctccgcgtt ctcaggcgtt acggaggcataa ctttggtagc	22800
tgccttccca aaaaggcgcc gttggccaggc tttgagttgc actcgacccgcgtt tagtggcata	22860
aaaagggtgac cgtggccgggtt ctggcggtta ggatacagcg cctgcataaa agccttgatc	22920
tgctttaaaat ccaccttgagc ctttgcgcctt tcagagaaga acatgcgcgcgca agacttgcgcgtt	22980
gaaaactgat tggccggaca ggccgcgtcg tgcacgcgtt accttgcgtt ggtgttggag	23040

atctgcacca catttcggcc ccaccgggttc ttcacgatct tggccttgct agactgctcc	23100
ttcagcgcgc gctgcccgtt ttgcgtcgtc acatccattt caatcacgtg ctccttattt	23160
atcataatgc ttccgtgttag acacttaagc tcgccttcga tctcagcgcga gcgggtgcagc	23220
cacaacgcgc agcccggtggg ctcgtatgc ttgttaggtca cctctgcaaa cgactgcagg	23280
tacgcctgca ggaatcgccc catcatcgtc acaaaggctt tggcgtgggtt gaagggtcagc	23340
tgcaacccgc ggtgctcctc gttcagccag gtcttgcata cggccgcag agcttccact	23400
tggtcaggca gtagttttagaa gttcgccttt agatcggtt ccacgtggta cttgtccatc	23460
agcgcgcgcg cagcctccat gcccttctcc cacgcagaca cgatggcac actcagcggg	23520
ttcatcacccg taatttcaact ttccgcgttcg ctgggcttcc ccttttcctc ttgcgtccgc	23580
ataccacgcg ccactgggtc gtcttcattt agccgcgcga ctgtgcgtt acctcccttgc	23640
ccatgcttga ttagcaccgg tgggttgctt aaaccacca tttgttagcgc cacatttct	23700
[0019]	
ctttcttcctt cgctgtccac gattacctt ggtgatggcg ggcgcgtggg cttggagaa	23760
ggcgcttctt ttttcttcctt gggcgcaatg gccaaatccg cccgcgaggt cgatggccgc	23820
gggctgggtg tgccgcggcac cagcgcgtt tttgtatgggtt cttcctcgac ctcggactcg	23880
atacgccgcc tcatccgcctt ttttgggggc gcccggggag gccgcggcga cggggacggg	23940
gacgacacgt cttccatggt tggggacgt cgccgcgcac cgctccgcg ctcgggggtg	24000
gtttcgctt gtccttcctt ccgactggcc atttccttctt cctataggca gaaaaagatc	24060
atggagtcag tcgagaagaa ggacagccta accgccccctt ctgagttcgc caccaccgc	24120
tccaccgatg ccgccaacgc gcctaccacc ttcccggtcg aggaccccccc gcttggggag	24180
gaggaagtga ttatcgagca ggaccagggt tttgtaaagcg aagacgacga ggaccgctca	24240
gtaccaacag aggataaaaaa gcaagaccag gacaacgcag aggccaaacga ggaacaagtc	24300
ggcgcccccc acgaaaggca tggcgactac ctagatgtgg gagacgacgt gctgttgaag	24360

catctgcagc gccagtgcgc cattatctgc gacgcgtgc aagagcgcag cgatgtgcc	24420
ctcgccatag cggatgtcag cttgcctac gaacgccacc tattctcacc gcgcgtaccc	24480
cccaaacgcc aagaaaacgg cacatgcgag cccaacccgc gcctcaactt ctacccgta	24540
tttgcgtgc cagaggtgct tgccacctat cacatcttt tccaaaactg caagataccc	24600
ctatcctgcc gtgccaaccg cagccgagcg gacaaggcgc tggccttgcgc gcagggcgct	24660
gtcatacctg atatcgccctc gctcaacgaa gtgccaaaaa tctttgaggg tcttggacgc	24720
gacgagaagc ggcggcaaa cgctctgcaa cagaaaaaca gcgaaaatga aagtcaactct	24780
ggagtgttgg tggaaactcga gggtgacaac gcgcgcctag ccgtactaaa acgcagcatc	24840
gaggtcaccc actttgccta cccggcactt aacctacccc ccaaggtcat gagcacagtc	24900
atgagtgagc ttagtgcgtgc ccgtgcgcag cccctggaga gggatgcaaa tttgcaagaa	24960
caaacagagg agggcctacc cgcaaggcgc gacgagcgc tagcgcgcgt gcttcaaacg	25020
[0020] cgcgagcctg ccgacttgga ggagcgacgc aaactaatga tggccgcagt gctcggttacc gtggagctt agtgcacatgc gcggttcttt gctgaccgg agatgcagcg caagcttagag gaaacattgc actacaccctt tcgacagggc tacgtacgcc aggcctgcaa gatctccaac gtggagctct gcaaccctgg ttccttaccc ggaattttgc acgaaaaccg cttggcaaa aacgtgttcc attccacgct caagggcgag gcgcgcgcg actacgtccg cgactgcgtt tacttatttc tatgcacac ctggcagacg gccatggcg tttggcagca gtgcttggag gagtgcacc tcaaggagct gcagaaaactg ctaaagcaaa acttgaagga cctatggacg gccttcaacg agcgctccgt ggccgcgcac ctggcggaca tcattttccc cgaacgcctg cttaaaaccc tgcaacaggg tctgcccagac ttccaccagtc aaagcatgtt gcagaacttt aggaacttta tccttagagcg ctcagaatgc ttgcccgcac cctgctgtgc acttcttagc gactttgtgc ccattaagta ccgcgaatgc cctccgcgc tttggggcca ctgcttaccc	25080
	25140
	25200
	25260
	25320
	25380
	25440
	25500
	25560
	25620
	25680

ctgcagctag ccaactacct tgcctaccac tctgacataa tggaagacgt gagcggtgac	25740
ggtctactgg agtgtcactg tcgctgcaac ctatgcaccc cgccaccgctc cctgggttgc	25800
aattcgcagc tgcttaacga aagtcaaatt atcggtacct ttgagctgca gggccctcg	25860
cctgacgaaa agtccgcggc tccggggttg aaactcaactc cggggctgtg gacgtcggct	25920
taccttcgca aatttgtacc tgaggactac cacgcccacg agatttagttt ctacgaagac	25980
caatccgcgc cgccaaatgc ggagcttacc gcctgcgtca ttacccaggg ccacattctt	26040
ggccaaattgc aagccatcaa caaagccgc caagagtttgc tgctacgaaa gggacggggg	26100
gtttacttgg acccccagtc cggcgaggag ctcaacccaa tccccccgc gccgcagccc	26160
tatcagcagc agccgcgggc cttgttcc caggatggca cccaaaaaga agctgcagct	26220
gccgcgcgcca cccacggacg aggaggaata ctgggacagt cagggcagagg aggttttgg	26280
cgaggaggag gaggacatga tggaagactg ggagagccta gacgaggaag cttccgaggt	26340
[0021] cgaagaggtg tcagacgaaa caccgtcacc ctcggcgcga ttccctcgc cggcgcggca	26400
gaaatcggca accgggttcca gcatggctac aacctccgt cctcaggcgc cgccggcact	26460
gcccggttgcg cgacccaaacc gtagatggga caccactgga accagggccg gtaagtccaa	26520
gcagccgcgg ccgttagccc aagagcaaca acagcgccaa ggctaccgct catggcgcgg	26580
gcacaagaac gccatagttt cttgttgcga agactgtggg ggcaacatct cttcgcccg	26640
ccgctttttt ctctaccatc acggcggtgc ctccccgt aacatcctgc attactaccg	26700
tcatctctac agcccataact gcacccggcgg cagcggcagc ggcagcaaca gcagcggcca	26760
cacagaagca aaggcgaccg gatagcaaga ctctgacaaa gccaagaaa tccacagcgg	26820
cggcagcagc aggaggaggaa ggcgtcggtc tggcgccaa cgaacccgta tcgacccgct	26880
agcttagaaaa caggatttt cccactctgt atgctatatt tcaacagagc agggccaaag	26940
aacaagagct gaaaataaaa aacaggcttc tgcgtatccct caccgcagc tgcctgtatc	27000

acaaaagcga agatcagctt cggcgacgc tggaaagacgc ggaggctctc ttcatgtaaat	27060
actgcgcgt gactcttaag gacttagttc gcgccttgc tcaaattaa gcgcgaaaac	27120
tacgtcatct ccagcggcca cacccggcgc cagcacctgt cgtcagcgcc attatgagca	27180
aggaaattcc cacgcctac atgtggagtt accagccaca aatgggactt gcggctggag	27240
ctgccaaga ctactcaacc cgaataaact acatgagcgc gggacccac atgatatccc	27300
gggtcaacgg aatccgcgc caccgaaacc gaattctttt ggaacaggcg gctattacca	27360
ccacacctcg taataaccctt aatcccgta gttggccgc tgccctggtg taccaggaaa	27420
gtcccgctcc caccactgtg gtacttccca gagacgcccggccgaaagtt cagatgacta	27480
actcagggc gcagcttgcg ggcggcttc gtcacagggt gcggtcgccc gggcaggta	27540
taactcacct gacaatcaga gggcgaggtt ttcagctcaa cgacgagtcg gtgagctcct	27600
cgcttggctcgatcccgac gggacatttc agatcgccgg cgccggccgt ctttattca	27660
[0022] cgccctcgta ggcaatccta actctgcaga cctcgcttc tgagccgcgc tctggaggca	27720
ttggaactct gcaatttattt gaggagttt tgccatcggt ctacttaac cccttcgg	27780
gacctccgg ccactatccg gatcaatttta ttccataactt tgacgcggta aaggactcgg	27840
cggacggcta cgactgaatg ttaagtggag aggcagagca actgcgcctg aaacacctgg	27900
tccactgtcg ccgcacaag tgcttgccc gcgactccgg tgatgttgc tactttgaat	27960
tgcccgagga tcatatcgag ggccggcgc acggcgccg gcttaccgcc cagggagagc	28020
ttgcccgtatcccgatcccgagtttaccc agcgcccccgt gctatgttgc cgggacaggg	28080
gaccctgtgt tctcaactgtg atttgcaact gtcctaaacct tggattacat caagatctt	28140
gttgccatct ctgtgctgag tataataat acagaaatta aaatataactg gggctcttat	28200
cggccatcctg taaacgcccac cgtcttcacc cggccaaagca aaccaaggcg aaccttacct	28260
ggtagtttta acatctctcc ctctgtgatt tacaacagtt tcaacccaga cggagtgagt	28320

ctacgagaga acctctccga gctcagctac tccatcagaa aaaacaccac cctccttacc	28380
tgccgggaac gtacgagtgc gtcaccggcc gctgcaccac acctaccgcc tgaccgtaaa	28440
ccagactitt tccggacaga cctcaataac tctgtttacc agaacaggag gtgagcttag	28500
aaaaccctta gggtattagg ccaaaggcgc agctactgtg gggtttatga acaattcaag	28560
caactctacg ggctattcta attcaggttt ctctagaatc ggggttgggg ttattctcg	28620
tcttgtgatt ctctttattc ttatactaac gcttctctgc ctaaggctcg ccgcctgctg	28680
tgtgcacatt tgcatttatt gtcaagtttt taaacgctgg ggtcgccacc caagatgatt	28740
aggtacataa tcctaggtt actcaccctt gcgtcagccc acggtaccac caaaaagggtg	28800
gatttaagg agccagcctg taatgttaca ttgcagctg aagctaataa gtgcaccact	28860
cttataaaat gcaccacaga acatgaaaag ctgcttattc gccacaaaaa caaaattggc	28920
aagtatgctg tttatgctat ttggcagcca ggtgacacta cagagtataa tgttacagtt	28980
[0023]	
ttccagggtta aaagtataa aactttatg tatactttt cattttatga aatgtgcgac	29040
attaccatgt acatgagcaa acagtataag ttgtggcccc cacaatttg tgtggaaaac	29100
actggcactt tctgctgcac tgctatgcta attacagtgc tcgctttggc ctgtacccta	29160
ctctatatta aataaaaaaag cagacgcagc tttattgagg aaaagaaaaat gccttaattt	29220
actaagttac aaagctaataa tcaccactaa ctgcttact cgctgcttc aaaacaattt	29280
aaaaaagttta gcattataat tagaatagga tttaaaaaacc cccgtcattt cctgctcaat	29340
accattcccc tgaacaattt actctatgtg ggatatgctc cagcgctaca accttgaagt	29400
caggcttcct ggatgtcagc atctgacttt ggccagcacc tgtcccgccggttccaa	29460
gtccaaactac agcgaccac cctaacagag atgaccaaca caaccaacgc ggccggcgct	29520
accggactta catctaccac aaatacaccc caagttctg cctttgtcaa taactggat	29580
aacttggca tgtggtggtt ctccatagcg ctatgtttg tatgccttat tattatgtgg	29640

ctcatctgct gcctaaagcg caaacgcgcc cgaccaccca tctatagtcc catcattgtg	29700	
ctacacccaa acaatgatgg aatccataga ttggacggac taaaacacat gttttttct	29760	
cttacagtat gattaaatga gacatgattc ctcgagttt tatattactg acccttgg	29820	
cgctttttg tgcgtgctcc acattggctg cggttctca catcgaagta gactgcattc	29880	
cagcttcac agtctatttgc ttacggat ttgtcaccct cacgctcatc tgcagcctca	29940	
tcactgtggt catgccttt atccagtgc ttgactgggt ctgtgtgcgc ttgcataatc	30000	
tcagacacca tccccagtagc agggacagga ctatagctga gcttcttaga attcttaat	30060	
tatgaaattt actgtgactt ttctgctgat tatttgcacc ctatctgcgt tttgttcccc	30120	
gacctccaag cctcaaagac atatatcatg cagattcaact cgtatatgga atattccaag	30180	
ttgctacaat gaaaaaaagcg atcttccga agcctggta tatgcaatca tctctgttat	30240	
ggtgttctgc agtaccatct tagccctagc tatatatccc taccttgaca ttggctggaa	30300	
[0024]	acgaatagat gccatgaacc acccaacttt ccccgccccc gctatgcttc cactgcaaca	30360
	agttgttgc ggcggcttgc tcccagccaa tcagcctgc cccacttctc ccaccccccac	30420
	tgaaatcagc tacttaatc taacaggagg agatgactga caccctagat ctagaaatgg	30480
	acggaattat tacagagcag cgcctgctag aaagacgcag ggcagcggcc gagcaacagc	30540
	gcatgaatca agagctccaa gacatggta acttgcacca gtgcaaaagg ggtatcttt	30600
	gtctggtaaa gcaggccaaa gtcacctacg acagtaatac caccggacac cgccttagct	30660
	acaagttgcc aaccaagcgt cagaaattgg tggcatggt gggagaaaag cccattacca	30720
	taactcagca ctccggtagaa accgaaggct gcattcaactc accttgcacca ggacctgagg	30780
	atctctgcac ccttattaag accctgtgcgt gtctcaaaga tcttattccc tttaactaat	30840
	aaaaaaaaat aataaagcat cacttactta aaatcagttt gcaaattttcgttca	30900
	ttcagcagca cctccttgcc ctcctccag ctctggattt gcagcttcct cctggctgca	30960

aactttctcc acaatctaaa tggaatgtca gttcctctt gttcctgtcc atccgcaccc	31020
actatcttca tgggttgca gatgaagcgc gcaagaccgt ctgaagatac cttcaacccc	31080
gtgtatccat atgacacgga aaccggctt ccaactgtgc cttttcttac tcctcccttt	31140
gtatccccca atgggtttca agagagtccc cctggggtag tctcttgcg cctatccgaa	31200
cctctagttt cctccaatgg catgcttgcg ctcaaaatgg gcaacggcct ctctctggac	31260
gaggccggca accttacctc ccaaaatgta accactgtga gcccacctct caaaaaaaaacc	31320
aagtcaaaca taaacctgga aatatctgca cccctcacag ttacctcaga agccctaact	31380
gtggctgccc ccgcacccct aatggtcgca ggcaacacac tcaccatgca atcacaggcc	31440
ccgctaaccg tgcacgactc caaacttagc attgccaccc aaggaccctt cacagtgtca	31500
gaaggaaagc tagccctgca aacatcaggc cccctcacca ccaccgatag cagtaccctt	31560
actatcactg cctcacccccc tctaactact gccactggta gcttggcat tgacttgaaa	31620
[0025] gagcccattt atacacaaaaa tggaaaacta ggactaaagt acggggctcc ttgcgtgtca	31680
acagacgacc taaacacttt gaccgttagca actggtccag gtgtgactat taataatact	31740
tccttgcaaa ctaaagttac tggagccctt ggttttgatt cacaaggcaa tatgcaactt	31800
aatgttagcag gaggactaag gattgattct caaaacagac gccttataact tgatgttagt	31860
tatccgtttt atgctaaaaa ccaactaaat ctaagactag gacagggccc tcttttata	31920
aactcagccc acaacttgaa tattaaactac aacaaaggcc tttacttttt tacagcttca	31980
aacaattcca aaaagcttga ggttaaccta agcactgcca aggggtttagt gtttgcgtct	32040
acagccatag ccattaatgc aggagatggg cttgaattt gttcacctaa tgcaccaaac	32100
acaaatcccc tcaaaacaaa aattggccat ggcctagaat ttgattcaaa caaggctatg	32160
gttcctaaac taggaactgg ctttagttt gacagcacag gtgcattac agtaggaaac	32220
aaaaataatg ataagctaac tttgtggacc acaccagctc catctcctaa ctgttagacta	32280

aatgcagaga aagatgctaa actcacttg gtcttaacaa aatgtggcag tcaaatactt	32340	
gctacagttt cagttttggc tgttaaaggc agtttggc tc caatatctgg aacagttcaa	32400	
agtgc tcatc ttattataag atttgac gaa aatggagtgc tactaaacaa ttccctcctg	32460	
gacc cagaat attgg aactt tagaaatgga gatcttactg aaggcacagc ctatacaa ac	32520	
gctgttggat ttatgcctaa cctatcagct tatccaaat ctcacggtaa aactgcca aaaa	32580	
agtaacatttgc tca gtc aatgtt aac ggagaca aaaa ctaaaccctgt aacactaacc	32640	
attacactaa acgg tacaca ggaa acagga gacacaactc caagtgcata ctctatgtca	32700	
ttttcatggg actgg tctgg ccacaactac attaatgaaa tatttgcac atccttac	32760	
actttttcat acattgccc a gaaataaaga atcg tttgtt gttt aactg ttttca acgtgtttat	32820	
ttttcaatttgc cagaaaattt caagtcattt ttcattcagt agtata gccc caccaccaca	32880	
tagcttatac agatcaccgt accttaatca aactcacaga accctagttat tcaacctgccc	32940	
[0026]	accccccctcc caacacacag agtacacagt cctttctccc cggctggcct taaaaggcat	33000
	catatcatgg gtaacagaca tatttttagg ttttatattt cacacggttt cctgtcgagc	33060
	caa acgctca tc agt gat at taataaactc cccggcagc tcacttaatg tcatgtcgct	33120
	gtccagctgc tgagccacag gctgctgtcc aacttgcgg t gcttaacgg gccc gcaagg	33180
	agaagtccac gcctacatgg gggtagagtc ataatgtgc atcaggatag ggcgg tgg t	33240
	ctgcagcagc ggc gaaataa actgctgccc ccggcgtcc gtcctgcagg aatacaacat	33300
	ggcagtggtc tcctcagcga tgattcgcac cggccgcagc ataaggcgc ttgtccctcg	33360
	ggcacagcag cgc accctga tctcacttaa atcagcacag taactgcagc acagcaccac	33420
	aatattgttc aaaatcccac agtgc aaggc gctgtatcca aagctcatgg cggggaccac	33480
	agaacccacg tggccatcat accacaagcg caggttagatt aagtggcgc ac ccctataaa	33540
	cacgctggac ataaacat tta ccttttgg catgtt gtaa ttcaccac tccgg tacca	33600

tataaacctc tgattaaaca tggcccatc caccaccatc ctaaaccagc tggccaaaac	33660
ctgcccggc gctatacact gcagggAACC gggactggaa caatgacagt ggagagccca	33720
ggactcgtaa ccatggatca tcatacgctg catgatatac atgttggcac aacacaggca	33780
cacgtgcata cacttcctca ggattacaag ctcctccgc gttagaacca tatcccaggg	33840
aacaacccat tcctgaatca gcgtaaatcc cacactgcag ggaagacctc gcacgtaact	33900
cacgttgtgc attgtcaaag tgttacattc gggcagcagc ggatgatcct ccagtatgg	33960
agcgcgggtt tctgtctcaa aaggaggtag acgatcccta ctgtacggag tgcgccgaga	34020
caaccgagat cgtgtggc gtagtgtcat gccaaatgga acgcccggacg tagtcatatt	34080
tcctgaagca aaaccaggtg cggcggtgac aaacagatct gcgtctccgg tctcgccgct	34140
tagatcgctc tgtgttagtag ttgttagtata tccactctt caaagcatcc aggcggcccc	34200
tggcttcggg ttctatgtaa actccttcat ggcgcgtgc cctgataaca tccaccacgg	34260
[0027] cagaataagc cacacccagc caacctacac attcggttctg cgagtcacac acgggaggag	34320
cgggaagagc tggaaagaacc atgtttttt ttttatttca aaagattatc caaaacctca	34380
aaatgaagat ctattaagtg aacgcgtcc cctccggtag cgtggtaaaa ctctacagcc	34440
aaagaacaga taatggcatt tgtaagatgt tgcacaatgg cttccaaaag gcaaacggcc	34500
ctcacgtcca agtggacgta aaggctaaac cttcagggt gaatctcctc tataaacatt	34560
ccagcacctt caaccatgcc caaataattc tcatacgcc acttctcaa tataatctta	34620
agcaaatccc gaatatttaag tccggccatt gtaaaaaatct gctccagagc gcccctccacc	34680
ttcagcctca agcagcgaat catgattgca aaaattcagg ttcctcacag acctgtataa	34740
gattcaaaag cgaaacattt aaaaaataac cgccatcccg taggtccctt cgccggcca	34800
gctgaacata atcgtgcagg tctgcacgga ccagcgcggc cacttcccg ccaggaacca	34860
tgacaaaaga acccacactg attatgacac gcatactcg agctatgcta accagcgtag	34920

ccccgatgta agcttgtgc atggcgccg atataaaatg caaggtgctg ctcaaaaat	34980
caggcaaagc ctcgcgcaa aaagaaaagca catcgtagtc atgctcatgc agataaaggc	35040
aggtaagctc cggaaccacc acagaaaaag acaccatittt tctctcaaac atgtctgcgg	35100
gtttctgcat aaacacaaaaa taaaataaca aaaaaacattt taaacatttt aagcctgtct	35160
tacaacagga aaaacaaccc ttataagcat aagacggact acggccatgc cgccgtgacc	35220
gtaaaaaaaaac tggtcaccgt gattaaaaag caccaccgac agtcctcgg tcatgtccgg	35280
agtctataatg taagactcgg taaacacatc aggttggattt acatcggtca gtgctaaaaa	35340
gcgaccgaaa tagccgggg gaatacatac ccgcaggcgt agagacaaca ttacagcccc	35400
cataggaggt ataacaaaaat taataggaga gaaaaacaca taaacacctg aaaaaccctc	35460
ctgcctaggc aaaatagcac cctccgctc cagaacaaca tacagcgctt ccacagcgcc	35520
[0028] agccataaca gtcagccta ccagtaaaaa agaaaaaccta ttaaaaaaaac accactcgac	35580
acggcaccag ctcaatcagt cacagttaa aaaaggccca agtgcagagc gagtatatat	35640
aggactaaaaa aatgacgtaa cggtaaagt ccacaaaaaa cacccagaaa accgcacgac	35700
aacctacgcc cagaaacgaa agccaaaaaa cccacaactt cctcaaatcg tcacttccgt	35760
tttcccacgt tacgttaactt cccatttaa gaaaactaca attccaaaca catacaagtt	35820
actccgcctt aaaacctacg tcacccgccc cgttcccacg ccccgccca cgtcacaaac	35880
tccacccctt cattatcata ttggcttcaa tccaaaataa ggtatattat tgatgatg	35938
<210> 2	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> 腺病毒 5 型	
<400> 2	
ctgacctc	8

<210> 3  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> 腺病毒 5 型

<400> 3  
 tcaccagg

8

<210> 4  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> 腺病毒 5 型

<400> 4  
 cagtatga

8

[0029] <210> 5  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> 腺病毒 5 型

<400> 5  
 taataaaaaaa

10

<210> 6  
 <211> 1516  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 6

Met Ala Pro Tyr Pro Cys Gly Cys His Ile Leu Leu Leu Leu Phe Cys  
 1 5 10 15

Cys Leu Ala Ala Ala Arg Ala Asn Leu Leu Asn Leu Asn Trp Leu Trp  
 20 25 30

Phe Asn Asn Glu Asp Thr Ser His Ala Ala Thr Thr Ile Pro Glu Pro  
 35 40 45

Gln Gly Pro Leu Pro Val Gln Pro Thr Ala Asp Thr Thr Thr His Val  
 50 55 60

Thr Pro Arg Asn Gly Ser Thr Glu Pro Ala Thr Ala Pro Gly Ser Pro  
 65 70 75 80

Glu Pro Pro Ser Glu Leu Leu Glu Asp Gly Gln Asp Thr Pro Thr Ser  
 85 90 95

Ala Glu Ser Pro Asp Ala Pro Glu Glu Asn Ile Ala Gly Val Gly Ala  
 100 105 110

Glu Ile Leu Asn Val Ala Lys Gly Ile Arg Ser Phe Val Gln Leu Trp  
 115 120 125

[0030] Asn Asp Thr Val Pro Thr Glu Ser Leu Ala Arg Ala Glu Thr Leu Val  
 130 135 140

Leu Glu Thr Pro Val Gly Pro Leu Ala Leu Ala Gly Pro Ser Ser Thr  
 145 150 155 160

Pro Gln Glu Asn Gly Thr Thr Leu Trp Pro Ser Arg Gly Ile Pro Ser  
 165 170 175

Ser Pro Gly Ala His Thr Thr Glu Ala Gly Thr Leu Pro Ala Pro Thr  
 180 185 190

Pro Ser Pro Pro Ser Leu Gly Arg Pro Trp Ala Pro Leu Thr Gly Pro  
 195 200 205

Ser Val Pro Pro Pro Ser Ser Glu Arg Ile Ser Glu Glu Val Gly Leu  
 210 215 220

Leu Gln Leu Leu Gly Asp Pro Pro Pro Gln Gln Val Thr Gln Thr Asp  
 225 230 235 240

Asp Pro Asp Val Gly Leu Ala Tyr Val Phe Gly Pro Asp Ala Asn Ser  
 245 250 255

Gly Gln Val Ala Arg Tyr His Phe Pro Ser Leu Phe Phe Arg Asp Phe  
 260 265 270

Ser Leu Leu Phe His Ile Arg Pro Ala Thr Glu Gly Pro Gly Val Leu  
 275 280 285

Phe Ala Ile Thr Asp Ser Ala Gln Ala Met Val Leu Leu Gly Val Lys  
 290 295 300

[0031] Leu Ser Gly Val Gln Asp Gly His Gln Asp Ile Ser Leu Leu Tyr Thr  
 305 310 315 320

Glu Pro Gly Ala Gly Gln Thr His Thr Ala Ala Ser Phe Arg Leu Pro  
 325 330 335

Ala Phe Val Gly Gln Trp Thr His Leu Ala Leu Ser Val Ala Gly Gly  
 340 345 350

Phe Val Ala Leu Tyr Val Asp Cys Glu Glu Phe Gln Arg Met Pro Leu  
 355 360 365

Ala Arg Ser Ser Arg Gly Leu Glu Leu Glu Pro Gly Ala Gly Leu Phe  
 370 375 380

Val Ala Gln Ala Gly Gly Ala Asp Pro Asp Lys Phe Gln Gly Val Ile  
 385 390 395 400

Ala Glu Leu Lys Val Arg Arg Asp Pro Gln Val Ser Pro Met His Cys  
 405 410 415

Leu Asp Glu Glu Gly Asp Asp Ser Asp Gly Ala Ser Gly Asp Ser Gly  
 420 425 430

Ser Gly Leu Gly Asp Ala Arg Glu Leu Leu Arg Glu Glu Thr Gly Ala  
 435 440 445

Ala Leu Lys Pro Arg Leu Pro Ala Pro Pro Pro Val Thr Thr Pro Pro  
 450 455 460

Leu Ala Gly Gly Ser Ser Thr Glu Asp Ser Arg Ser Glu Glu Val Glu  
 465 470 475 480

[0032] Glu Gln Thr Thr Val Ala Ser Leu Gly Ala Gln Thr Leu Pro Gly Ser  
 485 490 495

Asp Ser Val Ser Thr Trp Asp Gly Ser Val Arg Thr Pro Gly Gly Arg  
 500 505 510

Val Lys Glu Gly Leu Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Val Pro  
 515 520 525

Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Pro Pro Gly Ser Pro Cys Leu Pro Gly  
 530 535 540

Pro Pro Gly Leu Pro Cys Pro Val Ser Pro Leu Gly Pro Ala Gly Pro  
 545 550 555 560

Ala Leu Gln Thr Val Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly  
 565 570 575

Arg Asp Gly Thr Pro Gly Arg Asp Gly Glu Pro Gly Asp Pro Gly Glu  
 580 585 590

Asp Gly Lys Pro Gly Asp Thr Gly Pro Gln Gly Phe Pro Gly Thr Pro  
 595 600 605

Gly Asp Val Gly Pro Lys Gly Asp Lys Gly Asp Pro Gly Val Gly Glu  
 610 615 620

Arg Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser  
 625 630 635 640

Phe Arg His Asp Lys Leu Thr Phe Ile Asp Met Glu Gly Ser Gly Phe  
 645 650 655

[0033] Gly Gly Asp Leu Glu Ala Leu Arg Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly Pro  
 660 665 670

Pro Gly Pro Pro Gly Val Pro Gly Leu Pro Gly Glu Pro Gly Arg Phe  
 675 680 685

Gly Val Asn Ser Ser Asp Val Pro Gly Pro Ala Gly Leu Pro Gly Val  
 690 695 700

Pro Gly Arg Glu Gly Pro Pro Gly Phe Pro Gly Leu Pro Gly Pro Pro  
 705 710 715 720

Gly Pro Pro Gly Arg Glu Gly Pro Pro Gly Arg Thr Gly Gln Lys Gly  
 725 730 735

Ser Leu Gly Glu Ala Gly Ala Pro Gly His Lys Gly Ser Lys Gly Ala  
 740 745 750

Pro Gly Pro Ala Gly Ala Arg Gly Glu Ser Gly Leu Ala Gly Ala Pro  
 755 760 765

Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly  
 770 775 780

Pro Gly Leu Pro Ala Gly Phe Asp Asp Met Glu Gly Ser Gly Gly Pro  
 785 790 795 800

Phe Trp Ser Thr Ala Arg Ser Ala Asp Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly  
 805 810 815

Leu Pro Gly Leu Lys Gly Asp Pro Gly Val Pro Gly Leu Pro Gly Ala  
 820 825 830

[0034] Lys Gly Glu Val Gly Ala Asp Gly Val Pro Gly Phe Pro Gly Leu Pro  
 835 840 845

Gly Arg Glu Gly Ile Ala Gly Pro Gln Gly Pro Lys Gly Asp Arg Gly  
 850 855 860

Ser Arg Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Lys Asp Gly Val Gly Gln Pro  
 865 870 875 880

Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Val Val Tyr Val Ser  
 885 890 895

Glu Gln Asp Gly Ser Val Leu Ser Val Pro Gly Pro Glu Gly Arg Pro  
 900 905 910

Gly Phe Ala Gly Phe Pro Gly Pro Ala Gly Pro Lys Gly Asn Leu Gly  
 915 920 925

Ser Lys Gly Glu Arg Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Glu Lys Gly Glu  
 930 935 940

Pro Gly Ser Ile Phe Ser Pro Asp Gly Gly Ala Leu Gly Pro Ala Gln  
 945 950 955 960

Lys Gly Ala Lys Gly Glu Pro Gly Phe Arg Gly Pro Pro Gly Pro Tyr  
 965 970 975

Gly Arg Pro Gly Tyr Lys Gly Glu Ile Gly Phe Pro Gly Arg Pro Gly  
 980 985 990

Arg Pro Gly Met Asn Gly Leu Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp  
 995 1000 1005

[0035] Ala Ser Leu Gly Phe Gly Met Arg Gly Met Pro Gly Pro Pro Gly  
 1010 1015 1020

Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Thr Pro Val Tyr Asp Ser  
 1025 1030 1035

Asn Val Phe Ala Glu Ser Ser Arg Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro  
 1040 1045 1050

Gly Asn Gln Gly Pro Pro Gly Pro Lys Gly Ala Lys Gly Glu Val  
 1055 1060 1065

Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Gln Phe Pro Phe Asp Phe Leu Gln  
 1070 1075 1080

Leu Glu Ala Glu Met Lys Gly Glu Lys Gly Asp Arg Gly Asp Ala  
 1085 1090 1095

Gly Gln Lys Gly Glu Arg Gly Glu Pro Gly Gly Gly Gly Phe Phe  
 1100 1105 1110

Gly Ser Ser Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly  
 1115 1120 1125

Tyr Pro Gly Ile Pro Gly Pro Lys Gly Glu Ser Ile Arg Gly Gln  
 1130 1135 1140

Pro Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Ile Gly Tyr Glu  
 1145 1150 1155

Gly Arg Gln Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro  
 1160 1165 1170

[0036] Ser Phe Pro Gly Pro His Arg Gln Thr Ile Ser Val Pro Gly Pro  
 1175 1180 1185

Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Thr Met Gly Ala  
 1190 1195 1200

Ser Ser Gly Val Arg Leu Trp Ala Thr Arg Gln Ala Met Leu Gly  
 1205 1210 1215

Gln Val His Glu Val Pro Glu Gly Trp Leu Ile Phe Val Ala Glu  
 1220 1225 1230

Gln Glu Glu Leu Tyr Val Arg Val Gln Asn Gly Phe Arg Lys Val  
 1235 1240 1245

Gln Leu Glu Ala Arg Thr Pro Leu Pro Arg Gly Thr Asp Asn Glu  
 1250 1255 1260

Val Ala Ala Leu Gln Pro Pro Val Val Gln Leu His Asp Ser Asn  
 1265 1270 1275

Pro Tyr Pro Arg Arg Glu His Pro His Pro Thr Ala Arg Pro Trp  
 1280 1285 1290

Arg Ala Asp Asp Ile Leu Ala Ser Pro Pro Arg Leu Pro Glu Pro  
 1295 1300 1305

Gln Pro Tyr Pro Gly Ala Pro His His Ser Ser Tyr Val His Leu  
 1310 1315 1320

Arg Pro Ala Arg Pro Thr Ser Pro Pro Ala His Ser His Arg Asp  
 1325 1330 1335

[0037] Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn Ser Pro Leu Ser  
 1340 1345 1350

Gly Gly Met Arg Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln Cys Phe Gln  
 1355 1360 1365

Gln Ala Arg Ala Val Gly Leu Ala Gly Thr Phe Arg Ala Phe Leu  
 1370 1375 1380

Ser Ser Arg Leu Gln Asp Leu Tyr Ser Ile Val Arg Arg Ala Asp  
 1385 1390 1395

Arg Ala Ala Val Pro Ile Val Asn Leu Lys Asp Glu Leu Leu Phe  
 1400 1405 1410

Pro Ser Trp Glu Ala Leu Phe Ser Gly Ser Glu Gly Pro Leu Lys  
 1415 1420 1425

Pro Gly Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asp Gly Lys Asp Val Leu Arg  
 1430 1435 1440

His Pro Thr Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp His Gly Ser Asp Pro  
 1445 1450 1455

Asn Gly Arg Arg Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Glu Thr Trp Arg Thr  
 1460 1465 1470

Glu Ala Pro Ser Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu Gly Gly  
 1475 1480 1485

Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala Tyr Ile  
 1490 1495 1500

[0038] Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Ala Ser Lys  
 1505 1510 1515

<210> 7  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn Ser Pro Leu Ser Gly Gly  
 1 5 10 15

Met Arg Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln Cys Phe Gln Gln Ala Arg  
 20 25 30

Ala Val Gly Leu Ala Gly Thr Phe Arg Ala Phe Leu Ser Ser Arg Leu  
 35 40 45

Gln Asp Leu Tyr Ser Ile Val Arg Arg Ala Asp Arg Ala Ala Val Pro

50 55 60

Ile Val Asn Leu Lys Asp Glu Leu Leu Phe Pro Ser Trp Glu Ala Leu

65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Glu Gly Pro Leu Lys Pro Gly Ala Arg Ile Phe Ser

85 90 95

Phe Asp Gly Lys Asp

100

<210> 8

<211> 199

<212> PRT

<213> 人类

[0039]

<400> 8

Ser Ser Tyr Val His Leu Arg Pro Ala Arg Pro Thr Ser Pro Pro Ala

1 5 10 15

His Ser His Arg Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn

20 25 30

Ser Pro Leu Ser Gly Gly Met Arg Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln

35 40 45

Cys Phe Gln Gln Ala Arg Ala Val Gly Leu Ala Gly Thr Phe Arg Ala

50 55 60

Phe Leu Ser Ser Arg Leu Gln Asp Leu Tyr Ser Ile Val Arg Arg Ala

65 70 75 80

Asp Arg Ala Ala Val Pro Ile Val Asn Leu Lys Asp Glu Leu Leu Phe  
85 90 95

Pro Ser Trp Glu Ala Leu Phe Ser Gly Ser Glu Gly Pro Leu Lys Pro  
100 105 110

Gly Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asp Gly Lys Asp Val Leu Arg His Pro  
115 120 125

Thr Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp His Gly Ser Asp Pro Asn Gly Arg  
130 135 140

Arg Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Glu Thr Trp Arg Thr Glu Ala Pro Ser  
145 150 155 160

Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu Gly Gly Arg Leu Leu Gly Gln  
165 170 175  
[0040]

Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala Tyr Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn  
180 185 190

Ser Phe Met Thr Ala Ser Lys

195

<210> 9

<211> 701

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 9

atctgacactc gtcgacatgg ctccctaccc ctgtggctgc cacatcctgc tgctgcttt 60

ctgctgcctg gcggtgtccc gggccagctc ctacgtgcac ctgcggccgg cgcgacccac 120

aagcccaccc	gcccacagcc	accgcgactt	ccagccggtg	ctccacctgg	ttgcgctcaa	180
cagccccctg	tcagggcggca	tgcggggcat	ccgcggggcc	gacttccagt	gcttccagca	240
ggcgccggcc	gtggggctgg	cgggcacctt	ccgcgccttc	ctgtcctcgc	gcctgcagga	300
cctgtacagc	atcgtgcgcc	gtgccgaccg	cgcagccgtg	cccatcgtca	acctcaagga	360
cgagctgctg	tttcccagct	gggaggctct	gttctcaggc	tctgagggtc	cgctgaagcc	420
cggggcacgc	atcttctcct	ttgacggcaa	ggacgtcctg	aggcacccca	cctggcccca	480
gaagagcgtg	tggcatggct	cggaccccaa	cgggcgcagg	ctgaccgaga	gctactgtga	540
gacgtggcgg	acggaggctc	cctcgccac	gggccaggcc	tcctcgctgc	tggggggcag	600
gctcctgggg	cagagtgccg	cgagctgcc	tcacgcctac	atcgtgctct	gcattgagaa	660
cagcttcatg	actgcctcca	agtagctcga	gtcaccaggc	g		701

[0041] &lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 10

atgttctttt	ctcttacagt	atgattaaat	gagacatggc	tccctacccc	tgtggctgcc	60
acatcctgct	gctgctcttc	tgctgcctgg	cggctgccc	ggccagctcc	tacgtgcacc	120
tgcggccggc	gcgacccaca	agcccacccg	cccacagcca	ccgcgacttc	cagccgggtc	180
tccacctgg	tgcgctcaac	agccccctgt	caggcggcat	gccccggcatc	cgccggggccg	240
acttccagtg	cttccagcag	gcgcgggccc	tggggctggc	gggcaccc	cgccgccttc	300
tgtcctcgcg	cctgcaggac	ctgtacagca	tcgtgcgcgg	tgccgaccgc	gcagccgtgc	360
ccatcgtcaa	cctcaaggac	gagctgctgt	ttcccaagctg	ggaggctctg	ttctcaggct	420

ctgagggtcc gctgaagccc gggcacgca tcttctcctt tgacggcaag gacgtcctga	480
ggcaccccac ctggcccccag aagagcgtgt ggcacggctc ggaccccaac gggcgcaggc	540
tgaccgagag ctactgtgag acgtggcgg a cggaggctcc ctcggccacg ggccaggcct	600
cctcgtgtgt ggggggcagg ctcctgggc agagtgcgcg gagctgccat cacgcctaca	660
tcgtgctctg cattgagaac agttcatga ctgcctccaa gtagggtctc aaagatctta	720
ttcccttaa ctaataaa	738

<210> 11  
 <211> 810  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 11

[0042] Met Glu His Lys Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

Gly Gln Gly Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser  
 20 25 30

Leu Phe Ser Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu  
 35 40 45

Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe  
 50 55 60

Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg  
 65 70 75 80

Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys  
 85 90 95

Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg  
 100 105 110

Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser  
 115 120 125

Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser  
 130 135 140

Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln  
 145 150 155 160

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys  
 165 170 175

[0043] Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn  
 180 185 190

Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala  
 195 200 205

Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe  
 210 215 220

Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu  
 225 230 235 240

Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu  
 245 250 255

Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr  
 260 265 270

Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala  
 275 280 285

Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro  
 290 295 300

His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp  
 305 310 315 320

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His  
 325 330 335

Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys  
 340 345 350

[0044] Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro  
 355 360 365

Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser  
 370 375 380

Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser  
 385 390 395 400

Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr  
 405 410 415

Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp  
 420 425 430

Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr  
 435 440 445

Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro  
 450 455 460

Pro Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp  
 465 470 475 480

Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr  
 485 490 495

Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg  
 500 505 510

His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys  
 515 520 525

[0045] Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr  
 530 535 540

Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys  
 545 550 555 560

Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys  
 565 570 575

Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp  
 580 585 590

Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly  
 595 600 605

Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu  
 610 615 620

Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His  
 625 630 635 640

Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg  
 645 650 655

Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser  
 660 665 670

Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser  
 675 680 685

Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp  
 690 695 700

[0046] Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln  
 705 710 715 720

Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn  
 725 730 735

Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly  
 740 745 750

Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu  
 755 760 765

Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys  
 770 775 780

Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val  
 785 790 795 800

Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn  
805 810

<210> 12  
<211> 83  
<212> PRT  
<213> 人类

<400> 12

Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser  
1 5 10 15

Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro  
20 25 30

His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu  
35 40 45

[0047]

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys  
50 55 60

Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu Glu  
65 70 75 80

Cys Glu Glu

<210> 13  
<211> 81  
<212> PRT  
<213> 人类

<400> 13

Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro  
 20 25 30

His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys  
 35 40 45

Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro Trp Cys Phe  
 50 55 60

Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys  
 65 70 75 80

Thr

[0048]

<210> 14  
 <211> 82  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 14

Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala  
 1 5 10 15

Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro  
 20 25 30

His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp  
 35 40 45

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His  
 50 55 60

Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys  
 65 70 75 80

Asp Ser

<210> 15

<211> 82

<212> PRT

<213> 人类

<400> 15

Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser  
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr Pro  
 20 25 30  
 [0049]

His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Thr  
 35 40 45

Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro Trp Cys Phe  
 50 55 60

Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Lys Cys  
 65 70 75 80

Ser Gly

<210> 16

<211> 82

<212> PRT

<213> 人类

<400> 16

Glu Asp Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala  
1 5 10 15

Thr Thr Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro  
20 25 30

His Arg His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu  
35 40 45

Glu Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp  
50 55 60

Cys Tyr Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro  
65 70 75 80  
[0050]

Gln Cys

<210> 17

<211> 453

<212> PRT

<213> 人类

<400> 17

Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg  
1 5 10 15

Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser  
20 25 30

Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser

35	40	45
----	----	----

Glu	Gly	Leu	Glu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn	Asp	Pro	Gln
50															

Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Glu	Lys	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Cys
65															

Asp	Ile	Leu	Glu	Cys	Glu	Glu	Cys	Met	His	Cys	Ser	Gly	Glu	Asn
85														

Tyr	Asp	Gly	Lys	Ile	Ser	Lys	Thr	Met	Ser	Gly	Leu	Glu	Cys	Gln	Ala
100															

Trp	Asp	Ser	Gln	Ser	Pro	His	Ala	His	Gly	Tyr	Ile	Pro	Ser	Lys	Phe
115															

[0051]

Pro	Asn	Lys	Asn	Leu	Lys	Lys	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Arg	Glu
130															

Leu	Arg	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Thr	Asp	Pro	Asn	Lys	Arg	Trp	Glu	Leu
145															

Cys	Asp	Ile	Pro	Arg	Cys	Thr	Thr	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Pro	Thr
165															

Tyr	Gln	Cys	Leu	Lys	Gly	Thr	Gly	Glu	Asn	Tyr	Arg	Gly	Asn	Val	Ala
180															

Val	Thr	Val	Ser	Gly	His	Thr	Cys	Gln	His	Trp	Ser	Ala	Gln	Thr	Pro
195															

His	Thr	His	Asn	Arg	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Pro	Cys	Lys	Asn	Leu	Asp
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

210	215	220
-----	-----	-----

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His		
225	230	235
		240

Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys		
245	250	255

Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro		
260	265	270

Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser		
275	280	285

Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser		
290	295	300

[0052]

Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr		
305	310	315
		320

Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp		
325	330	335

Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr		
340	345	350

Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro		
355	360	365

Pro Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp		
370	375	380

Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr		
---	--	--

385	390	395	400
Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg			
405	410	415	
His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys			
420	425	430	
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr			
435	440	445	
Thr Thr Asn Pro Arg			
450			
[0053] <210> 18			
<211> 1451			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的			
<400> 18			
atctgacctc gtcgacatgg aacataagga agtggttctt ctacttcttt tatttctgaa			
60			
atcaggtcaa gaaaaagtgt atctctcaga gtgcaagact gggaatggaa agaactacag			
120			
agggacgatg tccaaaacaa aaaatggcat cacctgtcaa aaatggagtt ccacttctcc			
180			
ccacagacct agattctcac ctgctacaca cccctcagag ggactggagg agaactactg			
240			
caggaatcca gacaacgatc cgcaggggcc ctggtgctat actactgatc cagaaaagag			
300			
atatgactac tgcgacattc ttgagttgtga agaggaatgt atgcattgca gtggagaaaa			
360			
ctatgacggc aaaatttcca agaccatgtc tggactggaa tgccaggcct gggactctca			
420			
gagccccacac gctcatggat acattccttc caaatttcca aacaagaacc tgaagaagaa			
480			

ttactgtcgt aaccccgata gggagctgcg gccttggtgt ttcaccaccc accccaacaa	540
gcgcgtggaa ctttgtgaca tccccgctg cacaacacct ccaccatctt ctggtcccac	600
ctaccagtgt ctgaaggaa caggtaaaaa ctatgcggg aatgtggctg ttaccgtgtc	660
cgggcacacc tgtcagcact ggagtgcaca gaccctcac acacataaca ggacaccaga	720
aaacttcccc tgcaaaaatt tggataaaaa ctactgccgc aatcctgacg gaaaaaggc	780
cccatggtgc catacaacca acagccaagt gcgggtggag tactgtaaga taccgtcctg	840
tgactcctcc ccagtatcca cggaacaatt ggctcccaca gcaccacctg agctaacc	900
tgtggtccag gactgctacc atggtgatgg acagagctac cgaggcacat cctccaccac	960
caccacagga aagaagtgtc agtctggtc atctatgaca ccacaccggc accagaagac	1020
cccgaaaaac tacccaaatg ctggcctgac aatgaactac tgcaggaatc cagatgccga	1080
taaaggcccc tggtgtttt ccacagaccc cagcgtcagg tgggagttact gcaacctgaa	1140
[0054] aaaatgctca ggaacagaag cgagtgtgt agcacctcg cctgttgtcc tgcttccaga	1200
tgttagagact cttccgaag aagactgtat gttggaaat gggaaaggat accgaggcaa	1260
gagggcgacc actgttactg ggacgccatg ccaggactgg gctgcccagg agccccatag	1320
acacagcatt ttcactccag agacaaatcc acggcggt ctggaaaaaa attactgccg	1380
taaccctgat ggtgatgttag gtggccctg gtgctacacg acaaatccaa gatagctcga	1440
gtcaccaggc g	1451

<210> 19

<211> 1488

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 19

atgttctttt ctcttacagt atgattaaat gagacatgga acataaggaa gtggttcttc	60
tacttctttt atttctgaaa tcaggtcaag gaaaagtgtt tctctcagag tgcaagactg	120
ggaatggaaa gaactacaga gggacgatgt cccaaacaaa aatggcatc acctgtcaaa	180
aatggagttc cacttctccc cacagaccta gattctcacc tgctacacac ccctcagagg	240
gactggagga gaactactgc aggaatccag acaacgatcc gcaggggccc tggtgctata	300
ctactgatcc agaaaagaga tatgactact gcgcacattct tgagtgtgaa gaggaatgtt	360
tgcattgcag tggagaaaaac tatgacggca aaatttccaa gaccatgtct ggactggaaat	420
gccaggcctg ggactctcag agcccacacg ctcatggata cattccttcc aaatttccaa	480
acaagaacct gaagaagaat tactgtcgta accccgatag ggagctgcgg ctttgtt	540
tcaccaccga ccccaacaag cgctggaaac ttgtgacat ccccgctgc acaacaccc	600
caccatcttc tggtcccacc taccagtgtc tgaagggaaac aggtgaaaac tatcgccggaa	660
[0055]	
atgtggctgt taccgtgtcc gggcacacct gtcagcactg gagtgcacag acccctcaca	720
cacataacag gacaccagaa aacttccct gcaaaaattt ggatgaaaac tactgccgca	780
atcctgacgg aaaaaggccc ccatggtgcc atacaaccaa cagccaagtg cgggtggagtt	840
actgtaagat accgtcctgt gactcctccc cagtatccac ggaacaattt gctccacag	900
caccacctga gctaaccctt gtggtccagg actgtacca tggtgatgga cagagctacc	960
gaggcacatc ctccaccacc accacaggaa agaagtgtca gtcttggtca tctatgacac	1020
cacaccggca ccagaagacc ccagaaaact acccaaattgc tggcctgaca atgaactact	1080
gcaggaatcc agatgccgat aaaggcccct ggtgtttac cacagacccc agcgctcagg	1140
gggagtaactg caacctgaaa aaatgctcag gaacagaagc gagtgttgta gcaccccg	1200
ctgttgtcct gcttccagat gtagagactc ctccgaaga agactgtatg tttggaaatg	1260
ggaaaggata ccgaggcaag agggcgacca ctgttactgg gacgccatgc caggactgg	1320

ctgcccagga gccccataga cacagcatt tcactccaga gacaaatcca cgggcgggtc	1380
tgaaaaaaa ttactgccgt aaccctgatg gtgatgtagg tggccctgg tgctacacga	1440
caaaatccaag atagggtctc aaagatctt ttcctttaa ctaataaa	1488
<210> 20	
<211> 553	
<212> DNA	
<213> 脑心肌炎病毒	
<400> 20	
taacgttact ggccgaagcc gcttggata aggcgggtgt gcgtttgtct atatgttatt	60
ttccaccata ttgccgtctt ttggcaatgt gagggcccgaa acacctggcc ctgtcttctt	120
gacgagcatt cctaggggtc tttccctct cgcacaaagga atgcaagggtc tggtaatgt	180
cgtgaaggaa gcagttcctc tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct	240
ttgcaggcag cgaaaccccc cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt	300
[0056] ataagataca cctgcaaaagg cggcacaacc ccagtgcac gttgtgagtt ggatagttgt	360
ggaaagagtc aaatggctct cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgcccagaa	420
ggtagccat tgtatggat ctgatctggg gcctcggtgc acatgcttta catgtgttta	480
gtcgaggta aaaaacgtct aggccccccg aaccacgggg acgtggttt ccttgaaaa	540
acacgatgat aat	553
<210> 21	
<211> 2673	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 21	
atctgaccctc gtcgacatgg ctccctaccc ctgtggctgc cacatcctgc tgctgcttt	60

ctgctgcctg gcggtgcggcc gggccagctc ctacgtgcac ctgcggccgg cgcgaccac	120
aagcccaccc gcccacagcc accgcgactt ccagccggtg ctccacctgg ttgcgctcaa	180
cagccccctg tcaggcggca tgcggggcat ccgcggggcc gacttccagt gcttccagca	240
ggcgccggcc gtggggctgg cgggcacctt ccgcgccttc ctgtcctcgc gcctgcagga	300
cctgtacagc atcgtgcgcc gtgccgaccg cgccagccgtg cccatcgta acctaagga	360
cgagctgctg tttccagct gggaggctct gttctcaggc tctgagggtc cgctgaagcc	420
cggggcacgc atcttctcct ttgacggcaa ggacgtcctg aggcacccca cctggccca	480
gaagagcgtg tggcatggct cggacccaa cgggcgcagg ctgaccgaga gctactgtga	540
gacgtggcgg acggaggctc cctcgccac gggccaggcc tcctcgctgc tgggggcag	600
gctcctgggg cagagtgcgc cgagctgcca tcacgcctac atcgtctct gcattgagaa	660
cagcttcatg actgcctcca agtagtaacg ttactggccg aagccgcttg gaataaggcc	720
[0057] ggtgtgcgtt tgtctatatg ttatttcca ccatattgcc gtctttggc aatgtgaggg	780
cccgaaacc tggccctgtc ttcttgacga gcattcctag gggctttcc cctctgcaca	840
aaggaatgca aggtctgtt aatgtcgtga aggaagcagt tcctctggaa gcttcttggaa	900
gacaaacaac gtctgttagcg acccttgca ggcagcggaa ccccccaccc ggcgacaggt	960
gcctctgcgg ccaaaagcca cgtgtataag atacacctgc aaaggcggca caacccagt	1020
gccacgttgt gagttggata gttgtggaaa gagtcaaattg gctctcctca agcgtattca	1080
acaaggggct gaaggatgcc cagaaggtac cccattgtat gggatctgtat ctggggcctc	1140
ggtcacatg cttagatgt gtttagtcga gttaaaaaaaaa cgtctaggcc ccccgaaacca	1200
cggggacgtg gttttccctt gaaaaaacacg atgataatat ggaacataag gaagtggttc	1260
ttctacttct ttatattctg aaatcaggc aaggaaaaatgt gtatctctca gagtgcaga	1320
ctggaaatgg aaagaactac agagggacga tgtccaaaac aaaaaatggc atcacctgtc	1380

aaaaatggag ttccacttct ccccacagac ctagatttc acctgctaca caccctcag	1440
agggactgga ggagaactac tgcaggaatc cagacaacga tccgcagggg ccctgggtct	1500
atactactga tccagaaaag agatatgact actgcgacat tcttggatgt gaagaggaat	1560
gtatgcatttgc cagtggagaa aactatgacg gcaaaatttc caagaccatg tctggactgg	1620
aatgccaggc ctgggactct cagagccac acgctcatgg atacattcct tccaaatttc	1680
caaacaagaa cctgaagaag aattactgtc gtaacccga tagggagctg cggccttggt	1740
gtttcaccac cgaccccaac aagcgctggg aactttgtga catccccgc tgcacaacac	1800
ctccaccatc ttctggtccc acctaccagt gtctgaaggg aacaggtgaa aactatcg	1860
ggaatgtggc tggtaaccgtg tccggcaca cctgtcagca ctggagtgca cagaccctc	1920
acacacataa caggacacca gaaaacttcc cctgaaaaaa ttggatgaa aactactgcc	1980
gcaatcctga cggaaaaagg gccccatggt gccatacaac caacagccaa gtgcgggtgg	2040
[0058]	
agtactgtaa gataccgtcc tgtgactcct cccagatc cacggaaaca ttggctccc	2100
cagcaccacc tgagctaacc cctgtggtcc aggactgcta ccatggatgt ggacagagct	2160
accgaggcac atcctccacc accaccacag gaaagaagt tcagtcttgg tcatctatga	2220
caccacacccg gcaccagaag accccagaaa actacccaaa tgctggcctg acaatgaact	2280
actgcaggaa tccagatgcc gataaaggcc cctgggttt taccacagac cccagcgtca	2340
ggtgggagta ctgcaacctg aaaaaatgct caggaacaga agcgagtgtt gtagcacctc	2400
cgcctgttgt cctgcttcca gatgttagaga ctccctccga agaagactgt atgtttggga	2460
atgggaaagg ataccgaggc aagagggcga ccactgttac tgggacgcc a tggcaggact	2520
gggctgcccggg ggagccccat agacacagca ttttactcc agagacaaat ccacggcgg	2580
gtctggaaaa aaattactgc cgtaaccctg atggatgtt aggtggtccc tggtgctaca	2640
cgacaaatcc aagatagctc gagtcaccag gcg	2673

	<210> 22	
	<211> 10	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> TAV-255 缺失产生的序列	
	<400> 22	
	ggtgttttgg	10
	<210> 23	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 示例性 E1A 启动子 TATA 盒缺失产生的序列	
[0059]	<400> 23	
	ctaggactg	9
	<210> 24	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 示例性修饰的 E1b-19k 区域	
	<400> 24	
	atcttggta catctgacct cgtcgagtca ccaggcgctt ttccaa	46
	<210> 25	
	<211> 1774	
	<212> PRT	
	<213> 小鼠	
	<400> 25	

Met Ala Pro Asp Pro Ser Arg Arg Leu Cys Leu Leu Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Ser Cys Arg Leu Val Pro Ala Ser Ala Asp Gly Asn Ser Leu Ser  
 20 25 30

Pro Leu Asn Pro Leu Val Trp Leu Trp Pro Pro Lys Thr Ser Asp Ser  
 35 40 45

Leu Glu Gly Pro Val Ser Lys Pro Gln Asn Ser Ser Pro Val Gln Ser  
 50 55 60

Thr Glu Asn Pro Thr Thr His Val Val Pro Gln Asp Gly Leu Thr Glu  
 65 70 75 80

[0060] Gln Gln Thr Thr Pro Ala Ser Ser Glu Leu Pro Pro Glu Glu Glu  
 85 90 95

Glu Glu Asp Gln Lys Ala Gly Gln Gly Gly Ser Pro Ala Thr Pro Ala  
 100 105 110

Val Pro Ile Pro Leu Val Ala Pro Ala Ala Ser Pro Asp Met Lys Glu  
 115 120 125

Glu Asn Val Ala Gly Val Gly Ala Lys Ile Leu Asn Val Ala Gln Gly  
 130 135 140

Ile Arg Ser Phe Val Gln Leu Trp Asp Glu Asp Ser Thr Ile Gly His  
 145 150 155 160

Ser Ala Gly Thr Glu Val Pro Asp Ser Ser Ile Pro Thr Val Leu Pro  
 165 170 175

Ser Pro Ala Glu Leu Ser Ser Ala Pro Gln Gly Ser Lys Thr Thr Leu  
 180 185 190

Trp Leu Ser Ser Ala Ile Pro Ser Ser Pro Asp Ala Gln Thr Thr Glu  
 195 200 205

Ala Gly Thr Leu Ala Val Pro Thr Gln Leu Pro Pro Phe Gln Ser Asn  
 210 215 220

Leu Gln Ala Pro Leu Gly Arg Pro Ser Ala Pro Pro Asp Phe Pro Gly  
 225 230 235 240

Arg Ala Phe Leu Ser Ser Ser Thr Asp Gln Gly Ser Ser Trp Gly Asn  
 245 250 255

[0061] Gln Glu Pro Pro Arg Gln Pro Gln His Leu Glu Gly Lys Gly Phe Leu  
 260 265 270

Pro Met Thr Ala Arg Ser Ser Gln Gln His Arg His Ser Asp Val His  
 275 280 285

Ser Asp Ile His Gly His Val Pro Leu Leu Pro Leu Val Thr Gly Pro  
 290 295 300

Leu Val Thr Ala Ser Leu Ser Val His Gly Leu Leu Ser Val Pro Ser  
 305 310 315 320

Ser Asp Pro Ser Gly Gln Leu Ser Gln Val Ala Ala Leu Pro Gly Phe  
 325 330 335

Pro Gly Thr Trp Val Ser His Val Ala Pro Ser Ser Gly Thr Gly Leu  
 340 345 350

Ser Asn Asp Ser Ala Leu Ala Gly Asn Gly Ser Leu Thr Ser Thr Ser  
 355 360 365

Arg Cys Leu Pro Leu Pro Pro Thr Leu Thr Leu Cys Ser Arg Leu Gly  
 370 375 380

Ile Gly His Phe Trp Leu Pro Asn His Leu His His Thr Asp Ser Val  
 385 390 395 400

Glu Val Glu Ala Thr Val Gln Ala Trp Gly Arg Phe Leu His Thr Asn  
 405 410 415

Cys His Pro Phe Leu Ala Trp Phe Phe Cys Leu Leu Ala Pro Ser  
 420 425 430

[0062] Cys Gly Pro Gly Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Cys Arg Gln Phe Cys  
 435 440 445

Glu Ala Leu Glu Asp Glu Cys Trp Asn Tyr Leu Ala Gly Asp Arg Leu  
 450 455 460

Pro Val Val Cys Ala Ser Leu Pro Ser Gln Glu Asp Gly Tyr Cys Val  
 465 470 475 480

Phe Ile Gly Pro Ala Ala Glu Asn Val Ala Glu Glu Val Gly Leu Leu  
 485 490 495

Gln Leu Leu Gly Asp Pro Leu Pro Glu Lys Ile Ser Gln Ile Asp Asp  
 500 505 510

Pro His Val Gly Pro Ala Tyr Ile Phe Gly Pro Asp Ser Asn Ser Gly  
 515 520 525

Gln Val Ala Gln Tyr His Phe Pro Lys Leu Phe Phe Arg Asp Phe Ser  
 530 535 540

Leu Leu Phe His Val Arg Pro Ala Thr Glu Ala Ala Gly Val Leu Phe  
 545 550 555 560

Ala Ile Thr Asp Ala Ala Gln Val Val Val Ser Leu Gly Val Lys Leu  
 565 570 575

Ser Glu Val Arg Asp Gly Gln Gln Asn Ile Ser Leu Leu Tyr Thr Glu  
 580 585 590

Pro Gly Ala Ser Gln Thr Gln Thr Gly Ala Ser Phe Arg Leu Pro Ala  
 595 600 605

[0063] Phe Val Gly Gln Trp Thr His Phe Ala Leu Ser Val Asp Gly Gly Ser  
 610 615 620

Val Ala Leu Tyr Val Asp Cys Glu Glu Phe Gln Arg Val Pro Phe Ala  
 625 630 635 640

Arg Ala Ser Gln Gly Leu Glu Leu Glu Arg Gly Ala Gly Leu Phe Val  
 645 650 655

Gly Gln Ala Gly Thr Ala Asp Pro Asp Lys Phe Gln Gly Met Ile Ser  
 660 665 670

Glu Leu Lys Val Arg Lys Thr Pro Arg Val Ser Pro Val His Cys Leu  
 675 680 685

Asp Glu Glu Asp Asp Glu Asp Arg Ala Ser Gly Asp Phe Gly Ser  
 690 695 700

Gly Phe Glu Glu Ser Ser Lys Ser His Lys Glu Asp Thr Ser Leu Leu  
 705 710 715 720

Pro Gly Leu Pro Gln Pro Pro Pro Val Thr Ser Pro Pro Leu Ala Gly  
 725 730 735

Gly Ser Thr Thr Glu Asp Pro Arg Thr Glu Glu Thr Glu Glu Asp Ala  
 740 745 750

Ala Val Asp Ser Ile Gly Ala Glu Thr Leu Pro Gly Thr Gly Ser Ser  
 755 760 765

Gly Ala Trp Asp Glu Ala Ile Gln Asn Pro Gly Arg Gly Leu Ile Lys  
 770 775 780

[0064] Gly Gly Met Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Ala Gln Gly Pro Pro  
 785 790 795 800

Gly Pro Ala Gly Pro Gln Gly Pro Ala Gly Pro Val Val Gln Ser Pro  
 805 810 815

Asn Ser Gln Pro Val Pro Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly  
 820 825 830

Pro Pro Gly Lys Asp Gly Thr Pro Gly Arg Asp Gly Glu Pro Gly Asp  
 835 840 845

Pro Gly Glu Asp Gly Arg Pro Gly Asp Thr Gly Pro Gln Gly Phe Pro  
 850 855 860

Gly Thr Pro Gly Asp Val Gly Pro Lys Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly  
 865 870 875 880

Ile Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Ser  
 885 890 895

Phe Arg Gln Asp Lys Leu Thr Phe Ile Asp Met Glu Gly Ser Gly Phe  
 900 905 910

Ser Gly Asp Ile Glu Ser Leu Arg Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly Pro  
 915 920 925

Pro Gly Pro Pro Gly Val Pro Gly Leu Pro Gly Glu Pro Gly Arg Phe  
 930 935 940

Gly Ile Asn Gly Ser Tyr Ala Pro Gly Pro Ala Gly Leu Pro Gly Val  
 945 950 955 960

[0065] Pro Gly Lys Glu Gly Pro Pro Gly Phe Pro Gly Pro Pro Gly Pro  
 965 970 975

Gly Pro Pro Gly Lys Glu Gly Pro Pro Gly Val Ala Gly Gln Lys Gly  
 980 985 990

Ser Val Gly Asp Val Gly Ile Pro Gly Pro Lys Gly Ser Lys Gly Asp  
 995 1000 1005

Leu Gly Pro Ile Gly Met Pro Gly Lys Ser Gly Leu Ala Gly Ser  
 1010 1015 1020

Pro Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro  
 1025 1030 1035

Pro Gly Pro Gly Phe Ala Ala Gly Phe Asp Asp Met Glu Gly Ser  
 1040 1045 1050

Gly Ile Pro Leu Trp Thr Thr Ala Arg Ser Ser Asp Gly Leu Gln  
 1055 1060 1065

Gly Pro Pro Gly Ser Pro Gly Leu Lys Gly Asp Pro Gly Val Ala  
 1070 1075 1080

Gly Leu Pro Gly Ala Lys Gly Glu Val Gly Ala Asp Gly Ala Gln  
 1085 1090 1095

Gly Ile Pro Gly Pro Pro Gly Arg Glu Gly Ala Ala Gly Ser Pro  
 1100 1105 1110

Gly Pro Lys Gly Glu Lys Gly Met Pro Gly Glu Lys Gly Asn Pro  
 1115 1120 1125

[0066] Gly Lys Asp Gly Val Gly Arg Pro Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly  
 1130 1135 1140

Pro Pro Gly Pro Val Ile Tyr Val Ser Ser Glu Asp Lys Ala Ile  
 1145 1150 1155

Val Ser Thr Pro Gly Pro Glu Gly Lys Pro Gly Tyr Ala Gly Phe  
 1160 1165 1170

Pro Gly Pro Ala Gly Pro Lys Gly Asp Leu Gly Ser Lys Gly Glu  
 1175 1180 1185

Gln Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Thr  
 1190 1195 1200

Ile Phe Ser Pro Asp Gly Arg Ala Leu Gly His Pro Gln Lys Gly  
 1205 1210 1215

Ala Lys Gly Glu Pro Gly Phe Arg Gly Pro Pro Gly Pro Tyr Gly  
1220 1225 1230

Arg Pro Gly His Lys Gly Glu Ile Gly Phe Pro Gly Arg Pro Gly  
1235 1240 1245

Arg Pro Gly Thr Asn Gly Leu Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly  
1250 1255 1260

Asp Ala Ser Leu Gly Phe Ser Met Arg Gly Leu Pro Gly Pro Pro  
1265 1270 1275

Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Met Pro Ile Tyr Asp  
1280 1285 1290

[0067] Ser Asn Ala Phe Val Glu Ser Gly Arg Pro Gly Leu Pro Gly Gln  
1295 1300 1305

Gln Gly Val Gln Gly Pro Ser Gly Pro Lys Gly Asp Lys Gly Glu  
1310 1315 1320

Val Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Gln Phe Pro Ile Asp Leu Phe  
1325 1330 1335

His Leu Glu Ala Glu Met Lys Gly Asp Lys Gly Asp Arg Gly Asp  
1340 1345 1350

Ala Gly Gln Lys Gly Glu Arg Gly Glu Pro Gly Ala Pro Gly Gly  
1355 1360 1365

Gly Phe Phe Ser Ser Ser Val Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly  
1370 1375 1380

Tyr Pro Gly Ile Pro Gly Pro Lys Gly Glu Ser Ile Arg Gly Pro  
1385 1390 1395

Pro Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Ile Gly Tyr Glu  
1400 1405 1410

Gly Arg Gln Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro  
1415 1420 1425

Ser Phe Pro Gly Pro His Arg Gln Thr Val Ser Val Pro Gly Pro  
1430 1435 1440

Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Met Gly Ala  
1445 1450 1455

[0068] Ser Ala Gly Gln Val Arg Ile Trp Ala Thr Tyr Gln Thr Met Leu  
1460 1465 1470

Asp Lys Ile Arg Glu Val Pro Glu Gly Trp Leu Ile Phe Val Ala  
1475 1480 1485

Glu Arg Glu Glu Leu Tyr Val Arg Val Arg Asn Gly Phe Arg Lys  
1490 1495 1500

Val Leu Leu Glu Ala Arg Thr Ala Leu Pro Arg Gly Thr Gly Asn  
1505 1510 1515

Glu Val Ala Ala Leu Gln Pro Pro Leu Val Gln Leu His Glu Gly  
1520 1525 1530

Ser Pro Tyr Thr Arg Arg Glu Tyr Ser Tyr Ser Thr Ala Arg Pro  
1535 1540 1545

Trp Arg Ala Asp Asp Ile Leu Ala Asn Pro Pro Arg Leu Pro Asp  
 1550 1555 1560

Arg Gln Pro Tyr Pro Gly Val Pro His His His Ser Ser Tyr Val  
 1565 1570 1575

His Leu Pro Pro Ala Arg Pro Thr Leu Ser Leu Ala His Thr His  
 1580 1585 1590

Gln Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn Thr Pro  
 1595 1600 1605

Leu Ser Gly Gly Met Arg Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln Cys  
 1610 1615 1620

[0069] Phe Gln Gln Ala Arg Ala Val Gly Leu Ser Gly Thr Phe Arg Ala  
 1625 1630 1635

Phe Leu Ser Ser Arg Leu Gln Asp Leu Tyr Ser Ile Val Arg Arg  
 1640 1645 1650

Ala Asp Arg Gly Ser Val Pro Ile Val Asn Leu Lys Asp Glu Val  
 1655 1660 1665

Leu Ser Pro Ser Trp Asp Ser Leu Phe Ser Gly Ser Gln Gly Gln  
 1670 1675 1680

Leu Gln Pro Gly Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asp Gly Arg Asp Val  
 1685 1690 1695

Leu Arg His Pro Ala Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp His Gly Ser  
 1700 1705 1710

Asp Pro Ser Gly Arg Arg Leu Met Glu Ser Tyr Cys Glu Thr Trp  
 1715 1720 1725

Arg Thr Glu Thr Thr Gly Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu  
 1730 1735 1740

Ser Gly Arg Leu Leu Glu Gln Lys Ala Ala Ser Cys His Asn Ser  
 1745 1750 1755

Tyr Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Ser Phe Ser  
 1760 1765 1770

Lys

[0070] <210> 26  
 <211> 707  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 26  
 atctgacctc gtcgacatgg ctcccgaccc cagcagacgc ctctgcctgc tgctgctgtt 60  
 gctgctctcc tgccgccttg tgcctgccag cgcttatgtg cacctgccgc cagccgcgc 120  
 caccctctca cttgctcata ctcatcagga cttagcggca gtgctccacc tgggtggcact 180  
 gaacacccccc ctgtctggag gcatgcgtgg tatccgtgga gcagatttcc agtgcttcca 240  
 gcaagcccgaa gccgtggggc tgcgggcac cttccgggct ttccctgtcct ctaggctgca 300  
 ggatctctat agcatcgtgc gccgtgctga ccgggggtct gtgcccacg tcaacctgaa 360  
 ggacgaggtg cttatctccca gctgggactc cctgttttct ggctcccagg gtcaactgca 420

acccggggcc cgcatcttt ctggacgg cagagatgtc ctgagacacc cagcctggcc	480
gcagaagagc gtatggcacg gctcggaccc cagtggcg aggctgatgg agagttactg	540
tgagacaatgg cgaactgaaa ctactggggc tacaggtag gcctcctccc tgctgtcagg	600
caggctcctg gaacagaaag ctgcgagctg ccacaacagc tacatcggtcc tgtgcattga	660
gaatagcttc atgacacctt tctccaaata gctcgagtca ccaggcg	707

<210> 27  
 <211> 812  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 27

Met	Asp	His	Lys	Glu	Val	Ile	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Lys	Pro
1														
														15

[0071] Gly Gln Gly Asp Ser Leu Asp Gly Tyr Ile Ser Thr Gln Gly Ala Ser  
 20 25 30

Leu	Phe	Ser	Leu	Thr	Lys	Lys	Gln	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ser	Asp
35														45	

Cys	Leu	Ala	Lys	Cys	Glu	Gly	Glu	Thr	Asp	Phe	Val	Cys	Arg	Ser	Phe
50														60	

Gln	Tyr	His	Ser	Lys	Glu	Gln	Gln	Cys	Val	Ile	Met	Ala	Glu	Asn	Ser
65														80	

Lys	Thr	Ser	Ser	Ile	Ile	Arg	Met	Arg	Asp	Val	Ile	Leu	Phe	Glu	Lys
85														95	

Arg	Val	Tyr	Leu	Ser	Glu	Cys	Lys	Thr	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Tyr	Arg
100														110	

Gly Thr Met Ser Arg Thr Lys Ser Gly Val Ala Cys Gln Lys Trp Gly  
 115 120 125

Ala Thr Phe Pro His Val Pro Asn Tyr Ser Pro Ser Thr His Pro Asn  
 130 135 140

Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Gln  
 145 150 155 160

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys  
 165 170 175

Asn Ile Pro Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met Tyr Cys Ser Gly Glu Lys  
 180 185 190

[0072] Tyr Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Asp Cys Gln Ala  
 195 200 205

Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Phe  
 210 215 220

Pro Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu  
 225 230 235 240

Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr  
 245 250 255

Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Ser Pro Thr  
 260 265 270

Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser  
 275 280 285

Val Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro  
 290 295 300

His Arg His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu  
 305 310 315 320

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr  
 325 330 335

Thr Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys  
 340 345 350

Glu Ser Ser Ala Ser Pro Asp Gln Ser Asp Ser Ser Val Pro Pro Glu  
 355 360 365

[0073] Glu Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Ser Asp Gly Gln Ser  
 370 375 380

Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser  
 385 390 395 400

Trp Ala Ala Met Phe Pro His Arg His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe  
 405 410 415

Pro Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp  
 420 425 430

Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr  
 435 440 445

Cys Asn Leu Lys Arg Cys Ser Glu Thr Gly Gly Ser Val Val Glu Leu  
 450 455 460

Pro Thr Val Ser Gln Glu Pro Ser Gly Pro Ser Asp Ser Glu Thr Asp  
 465 470 475 480

Cys Met Tyr Gly Asn Gly Lys Asp Tyr Arg Gly Lys Thr Ala Val Thr  
 485 490 495

Ala Ala Gly Thr Pro Cys Gln Gly Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg  
 500 505 510

His Ser Ile Phe Thr Pro Gln Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys  
 515 520 525

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Asn Gly Pro Trp Cys Tyr  
 530 535 540

[0074] Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Leu Cys  
 545 550 555 560

Ala Ser Ala Ser Ser Phe Glu Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys  
 565 570 575

Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala Asn Pro His Ser  
 580 585 590

Trp Pro Trp Gln Ile Ser Leu Arg Thr Arg Phe Thr Gly Gln His Phe  
 595 600 605

Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ala Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His  
 610 615 620

Cys Leu Glu Lys Ser Ser Arg Pro Glu Phe Tyr Lys Val Ile Leu Gly  
 625 630 635 640

Ala His Glu Glu Tyr Ile Arg Gly Leu Asp Val Gln Glu Ile Ser Val  
 645 650 655

Ala Lys Leu Ile Leu Glu Pro Asn Asn Arg Asp Ile Ala Leu Leu Lys  
 660 665 670

Leu Ser Arg Pro Ala Thr Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu  
 675 680 685

Pro Ser Pro Asn Tyr Met Val Ala Asp Arg Thr Ile Cys Tyr Ile Thr  
 690 695 700

Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Arg Leu Lys Glu  
 705 710 715 720

[0075] Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Val Glu Tyr  
 725 730 735

Leu Asn Asn Arg Val Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly Gln Leu Ala  
 740 745 750

Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys  
 755 760 765

Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu  
 770 775 780

Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg  
 785 790 795 800

Phe Val Asp Trp Ile Glu Arg Glu Met Arg Asn Asn  
 805 810

<210>	28
<211>	1457
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	合成的
<400>	28
atctgacatc gtcgacatgg accacaagga agtaatcctt ctgtttctct tgcttctgaa	60
accaggacaa gggaaagagag tgtatctgtc agaatgtaag accggcatcg gcaacggcta	120
cagaggaaca atgtccagga caaagagtgg tttgcctgt caaaagtggg gtgccacgtt	180
cccccaacgtt cccaaactact ctcccaactt acatcccaat gagggacttag aagaaaattt	240
ctgttaggaac ccagacaatg atgaacaagg gccttggtgc tacactacag atccggacaa	300
gagatatgac tactgcaaca ttcctgaatg tgaagaagaa tgcatgtact gcagtggcga	360
[0076] aaagtatgag gggaaaatct ccaagaccat gtctggactt gactgccagg cctgggattc	420
tcaagccca catgctcatg gatacatccc tgccaaattt ccaagcaaga acctgaagat	480
gaattattgc cgcaaccctg acggggagcc aaggccctgg tgcttcacaa cagacccac	540
caaacgctgg gaatactgtg acatccccg ctgcacaaca ccccccggcc caccagccc	600
aacctaccaa tgtctgaaag gaagaggtga aaattaccga gggaccgtgt ctgtcaccgt	660
gtctggaaa acctgtcagc gctggagtga gcaaaccctt cataggcaca acaggacacc	720
agaaaaatttcc cctgcaaaa atctggagga gaattactgc cgaaaccggg atggagaaac	780
tgctccctgg tgctataccca ctgacagcca gctgaggtgg gagtactgtg agattccatc	840
ctgcgagtc tcagcatcac cagaccagtc agattcctca gttccaccag aggagcaaac	900
acctgtggtc caggaatgct accagagcga tggcagagc tatcgggtt catcgccac	960
taccatcaca gggagaagt gccagtcctg ggcagctatg tttccacata ggcattcgaa	1020

gacgccagag aactcccg atgctggcgg tggatgaac tattgcagg acccgatgg	1080
tgacaaggc ccttggtgct acaccactga cccgagcgtc aggtggaaat actgcaacct	1140
gaagcggtgc tcagagacag gaggaggtgt tgtggattt cccacagttt cccaggaacc	1200
aagtggccg agcgactctg agacagactg catgtatggg aatggcaaag actaccgggg	1260
caaaacggcc gtcactgcag ctggcacccc ttgccaagga tggctgccc aggagccca	1320
cagggcacagc atcttcaccc cacagacaaa cccacggca ggtctggaaa agaattattg	1380
ccgaaacccc gatggggatg tgaatggtcc ttggctat acaacaaacc ctagatgata	1440
gctcgagtca ccaggcg	1457

<210> 29  
 <211> 2685  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0077]

<220>	
<223> 合成的	
<400> 29	
atctgaccc tcgtcacatgg ctcccgaccc cagcagacgc ctctgcctgc tgctgctgtt	60
gctgctctcc tgccgccttg tgcctgccag cgcttatgtg cacctgccgc cagccgccc	120
caccctctca cttgctcata ctcatcagga cttagccca gtgctccacc tgggtggcact	180
gaacacccccc ctgtctggag gcatgcgtgg tatccgtgg a cagatttcc agtgcttcca	240
gcaagcccgaa gcccgtggggc tgctcggcac ctccggctt ttcctgtcct ctaggctgca	300
ggatctctat agcatcgtgc gcccgtgtga cccgggggtct gtgcccattcg tcaacctgaa	360
ggacgagggtg ctatctccca gctggactc cctgtttct ggctcccagg gtcaactgca	420
accggggcc cgcacatcttt cttttgcagg cagagatgtc ctgagacacc cagccgtggcc	480
gcagaagagc gtatggcactg gctcggaccc cagtggcgg aggctgatgg agagttactg	540

tgagacatgg cgaactgaaa ctactgggc tacaggttag gcctcctccc tgctgtcagg	600
caggctcctg gaacagaaaag ctgcgagctg ccacaacagc tacatcgatcc tgtgcattga	660
gaatagcttc atgacacctt tctccaaata gtaacgttac tggccgaagc cgcttggaaat	720
aaggccggtg tgcgtttgtc tatatgttat tttccaccat attgccgtct tttggcaatg	780
tgagggcccg gaaacctggc cctgtttct tgacgagcat tccttaggggt ctttcccctc	840
tcgccaaagg aatgcaaggt ctgttgaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt	900
cttgaagaca aacaacgtct gtagcgaccc tttgcaggca gcggaacccc ccacctggcg	960
acaggtgcct ctgcggccaa aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcccacaaac	1020
cccagtgcctt cgttgtgagt tggatagttt tgaaagagt caaatggctc tcctcaagcg	1080
tattcaacaa ggggctgaag gatgccaga aggtacccca ttgtatggta tctgatctgg	1140
ggcctcggtg cacatgctt acatgtttt agtcgagggtt aaaaaacgtc taggcccccc	1200
[0078] gaaccacggg gacgtggttt tccttgaaa aacacgtga taatatggac cacaaggaag	1260
taatccttctt gtttctcttg cttctgaaac caggacaagg gaagagagtg tatctgtcag	1320
aatgttaagac cggcatcgcc aacggctaca gaggaacaat gtccaggaca aagagtggtg	1380
ttgcctgtca aaagtgggtt gccacgttcc cccacgttacc caactactctt cccagttacac	1440
atcccaatga gggactagaa gaaaattact gtaggaaccc agacaatgtt gaacaaggc	1500
cttgggtcta cactacagat ccggacaaga gatgttactt ctgcaacatt cctgtttttt	1560
aagaagaatg catgtactgc agtggcgaaa agtatgaggg gaaaatctcc aagaccatgt	1620
ctggacttga ctgccaggcc tggattctc agagcccaca tgctcatggta tacatccctg	1680
ccaaattccc aagcaagaac ctgaagatga attattggccg caaccctgac ggggagccaa	1740
ggccctgggtg cttcacaaca gacccacca aacgctggta atactgtgac atcccccgct	1800
gcacaacacc cccggccca cccagccaa cctaccaatg tctgaaagga agaggtgaaa	1860

attaccgagg gaccgtgtct gtcaccgtgt ctgggaaaac ctgtcagcgc tggagtgagc	1920
aaaccctca taggcacaac aggacaccag aaaatttccc ctgcaaaaat ctggaggaga	1980
attactgccg gaaccggat ggagaaactg ctccctgggt ctataccact gacagccagc	2040
tgagggtggga gtactgtgag attccatcct gcgagtcctc agcatcacca gaccagtcag	2100
attcctcagt tccaccagag gagcaaacac ctgtggtcca ggaatgctac cagagcgatg	2160
ggcagagcta tcggggtaca tcgtccacta ccatcacagg gaagaagtgc cagtcctgg	2220
cagctatgtt tccacatagg cattcgaaga cggcagagaa cttccagat gctggcttgg	2280
agatgaacta ttgcaggaac ccggatggtg acaagggccc ttggtgctac accactgacc	2340
cgagcgtcag gtgggaatac tgcaacctga agcggtgctc agagacagga gggagtgttg	2400
tggaattgcc cacagttcc caggaaccaa gtgggcccag cgactctgag acagactgca	2460
tgtatggaa tggcaaagac taccgggca aaacggccgt cactgcagct ggcacccctt	2520
[0079] gccaaggatg ggctgcccag gagccccaca ggcacagcat cttcacccca cagacaacc	2580
cacgggcagg tctggaaaag aattattgcc gaaaccccgaa tggggatgtg aatggtcctt	2640
ggtgctatac aacaaacct agatgatgc tcgagtcacc aggcg	2685

<210> 30

<211> 8

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性 E1A 启动子 TATA 盒缺失产生的序列

<400> 30

agtccccg

8

<210> 31

<211> 8

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性 E1A 启动子 TATA 盒缺失产生的序列

<400> 31

tattcccg

8

<210> 32

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性 E1A 启动子 CAAT 盒缺失产生的序列

[0080] <400> 32

ttccgtggcg

10

<210> 33

<211> 8

<212> DNA

<213> 腺病毒 5 型

<400> 33

tgccttaa

8

<210> 34

<211> 11

<212> DNA

<213> 腺病毒 5 型

<400> 34

taaaaaaaaaa t

11

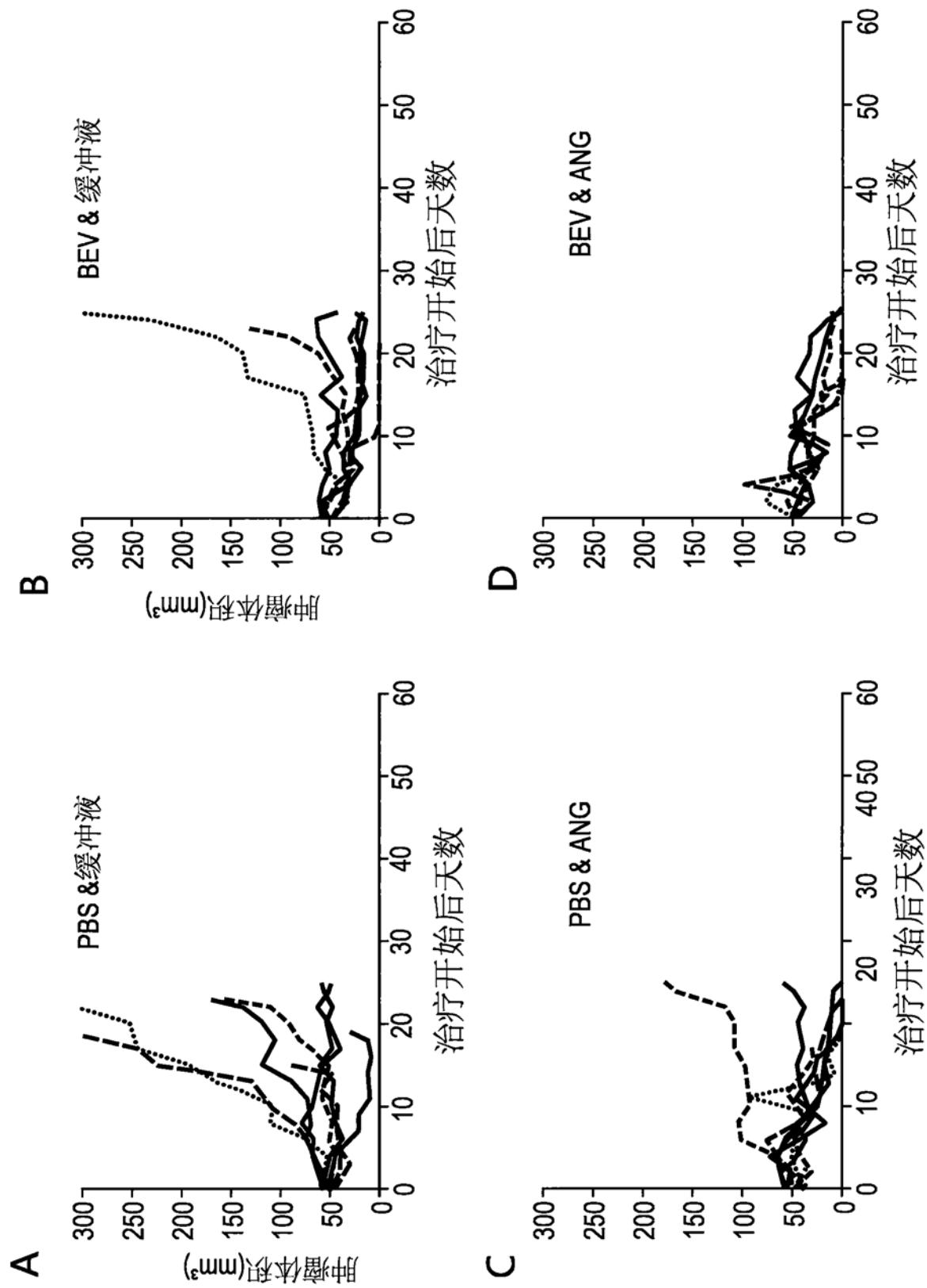


图1

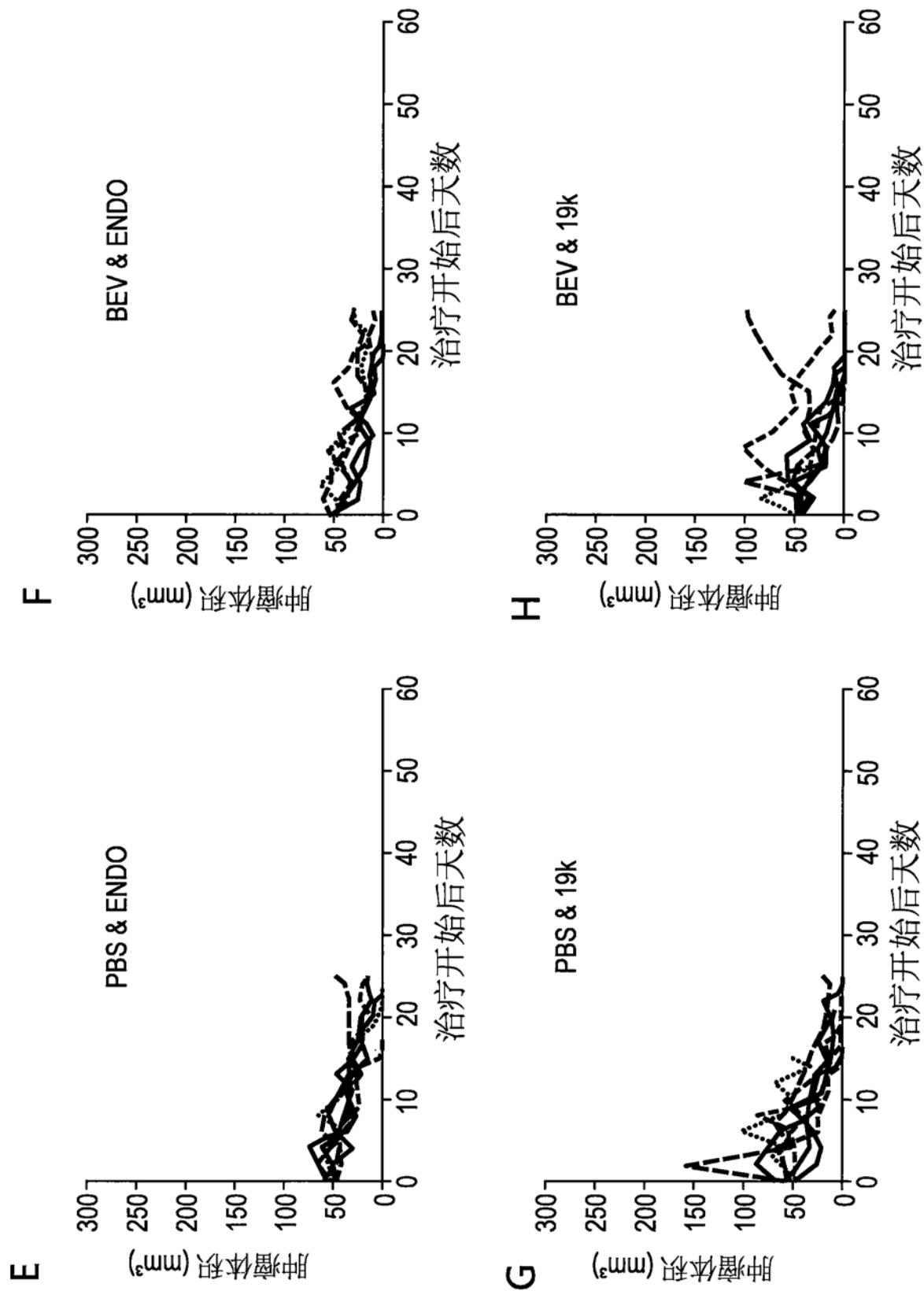


图1 (续)

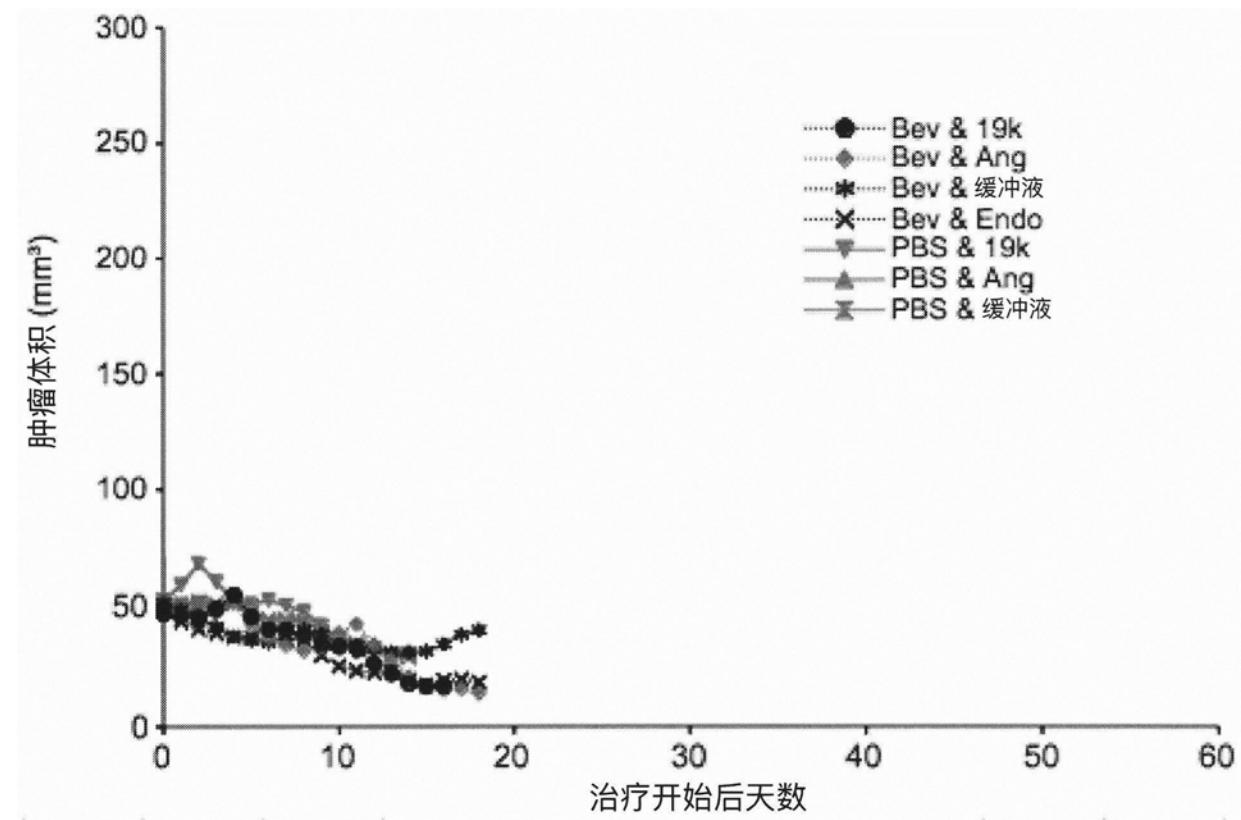


图2

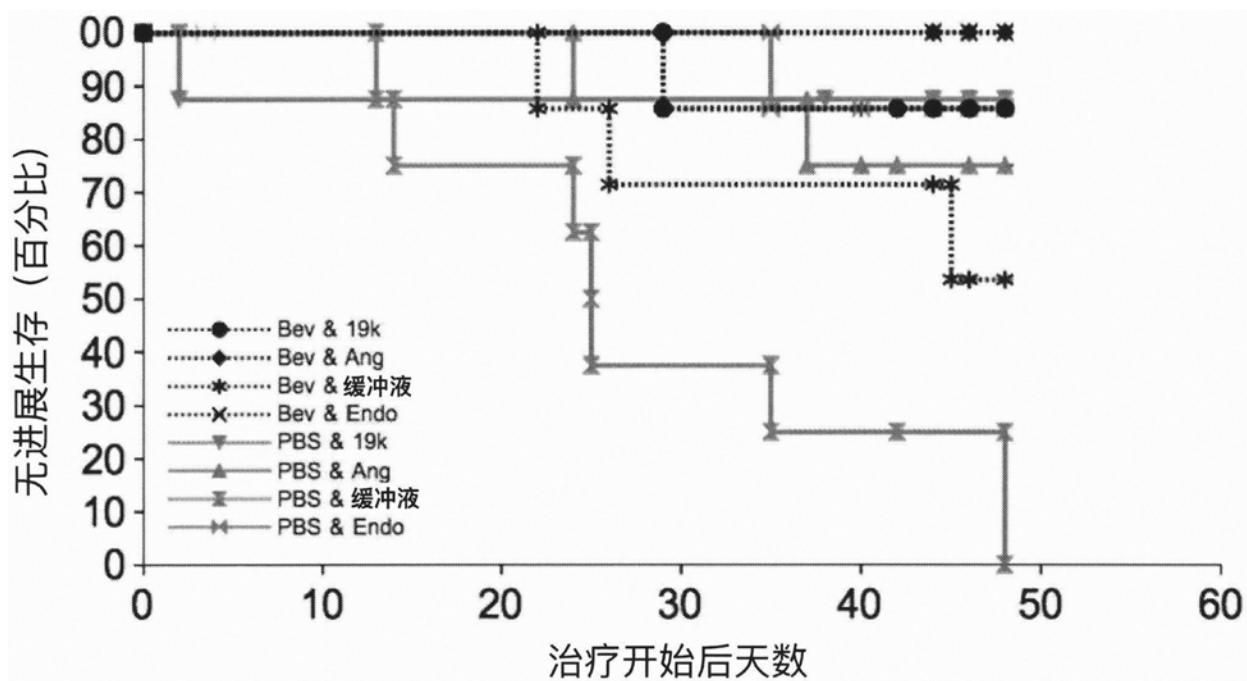


图3

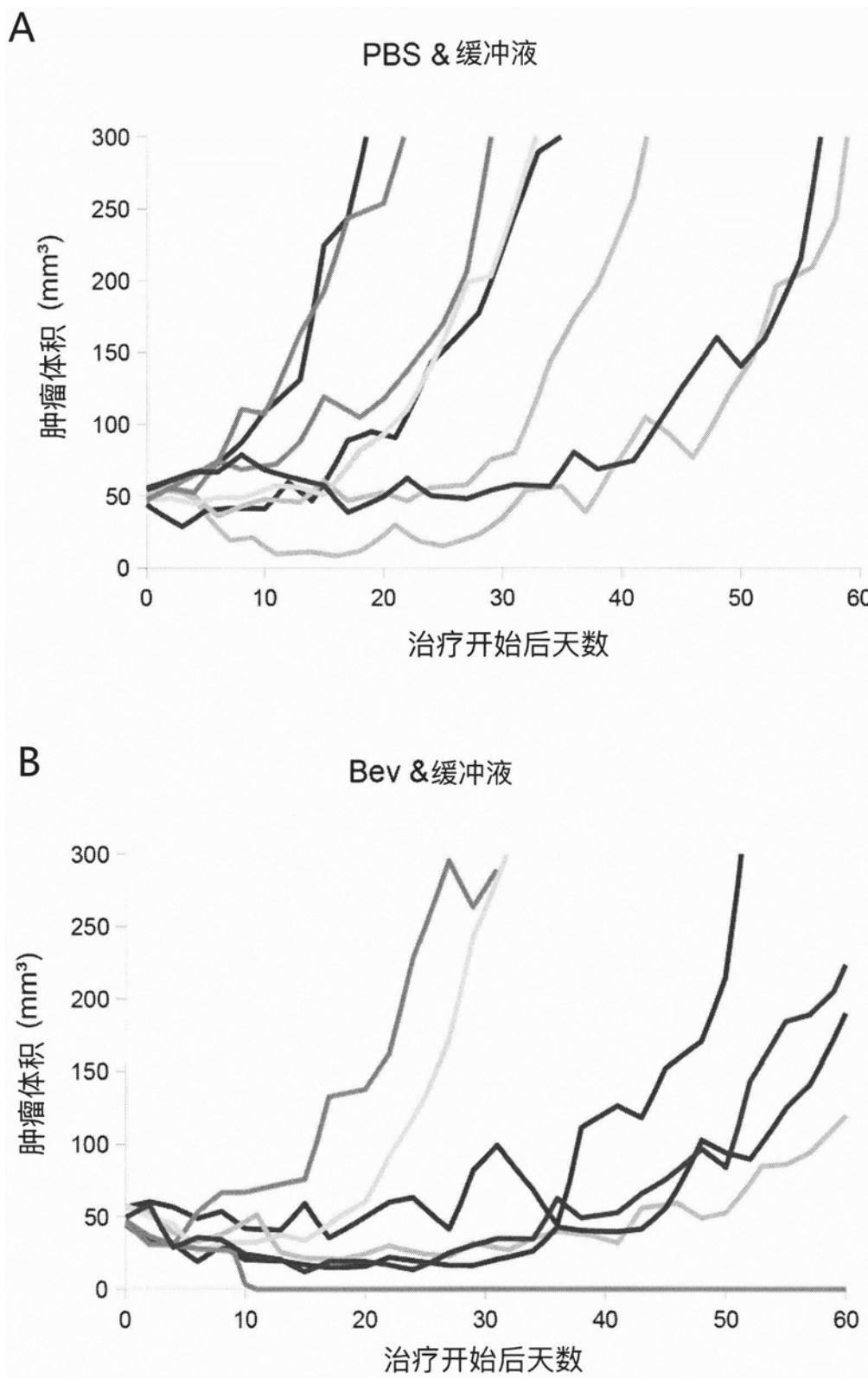


图4

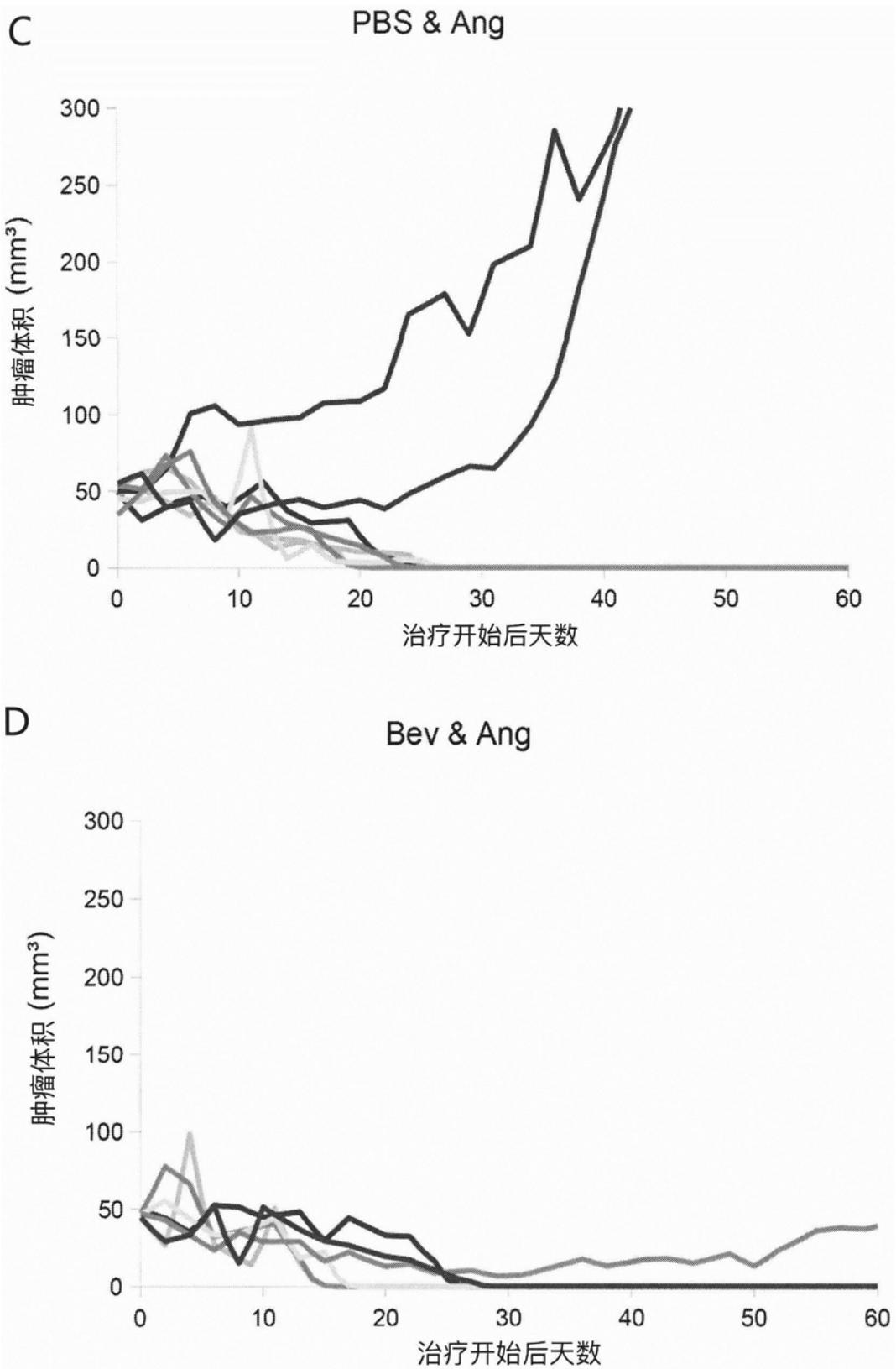


图4(续)

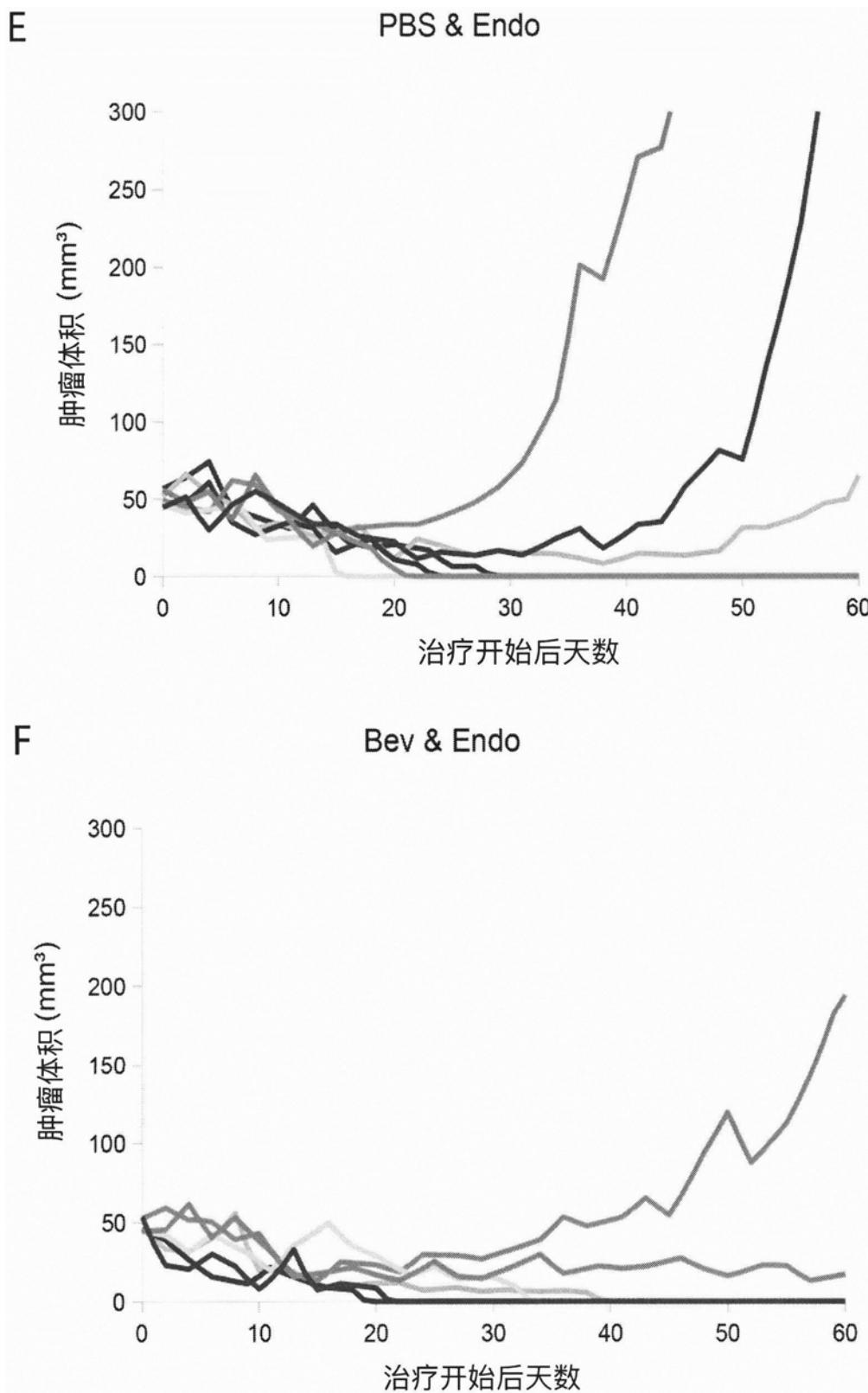


图4(续)

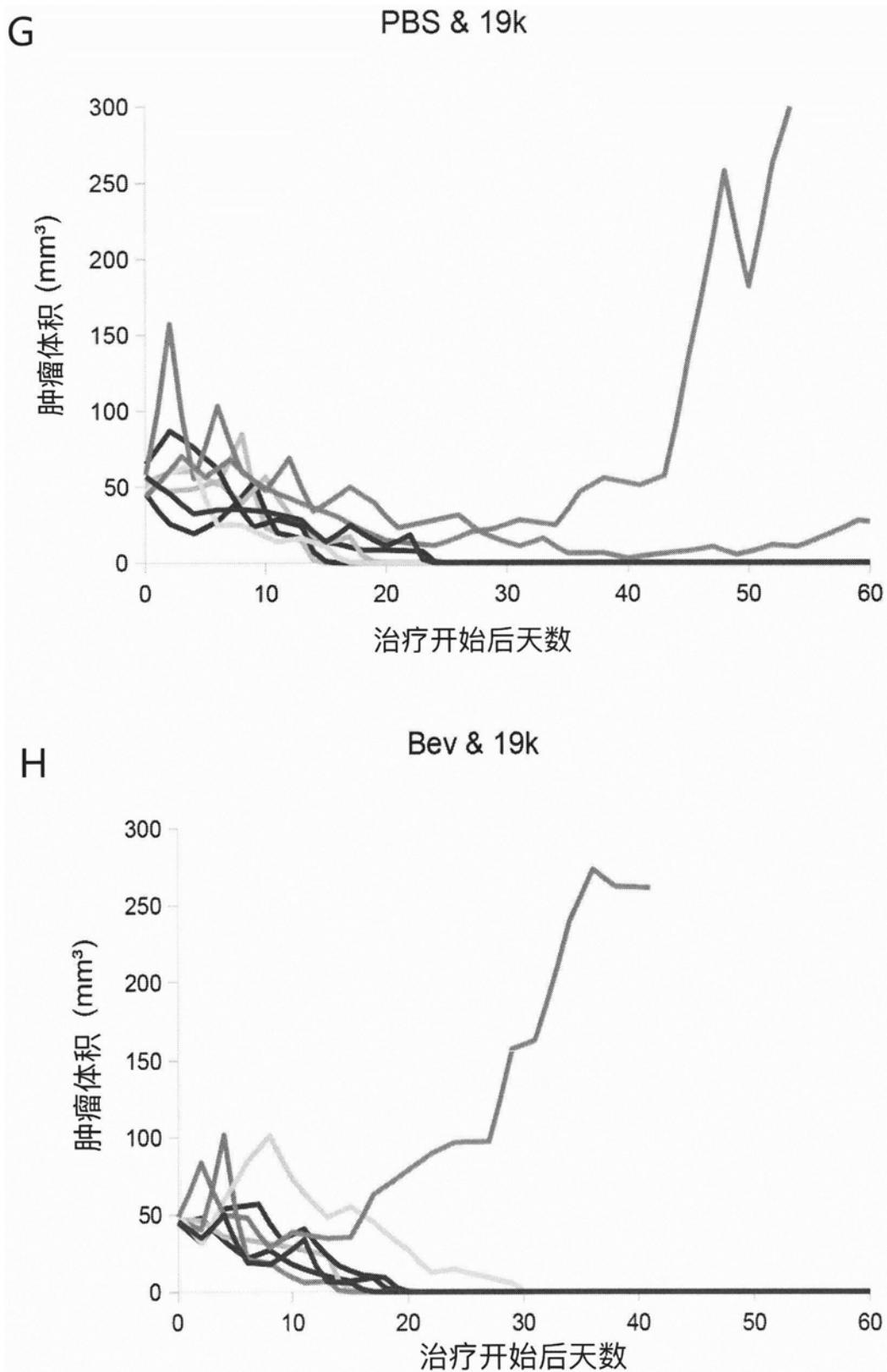


图4 (续)

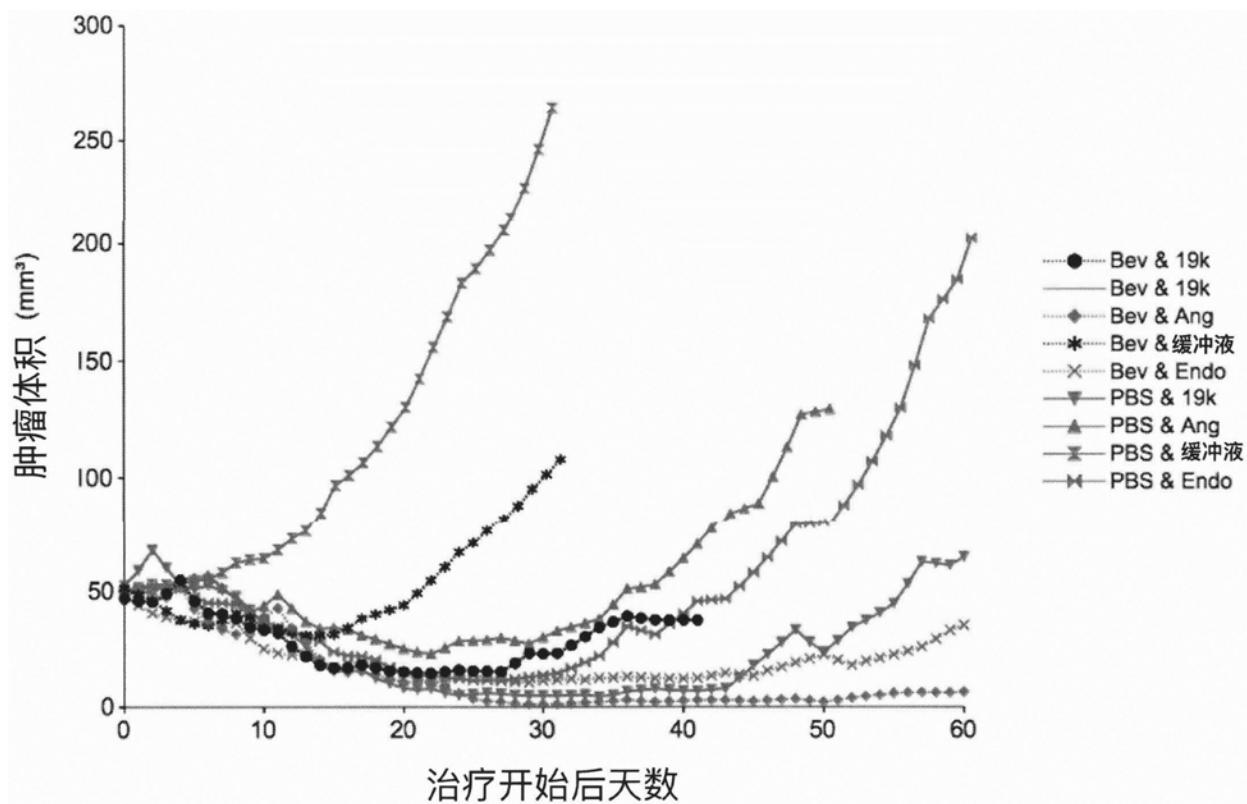


图5

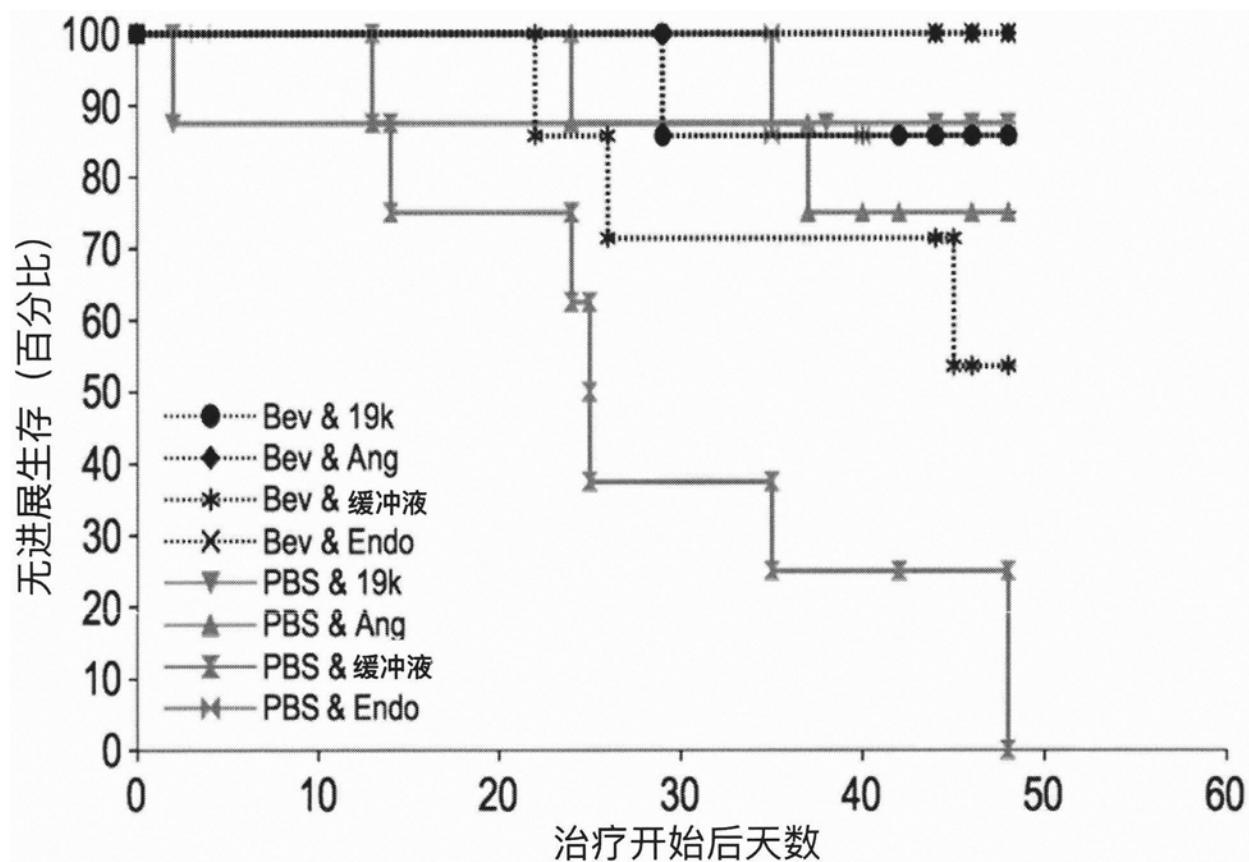


图6

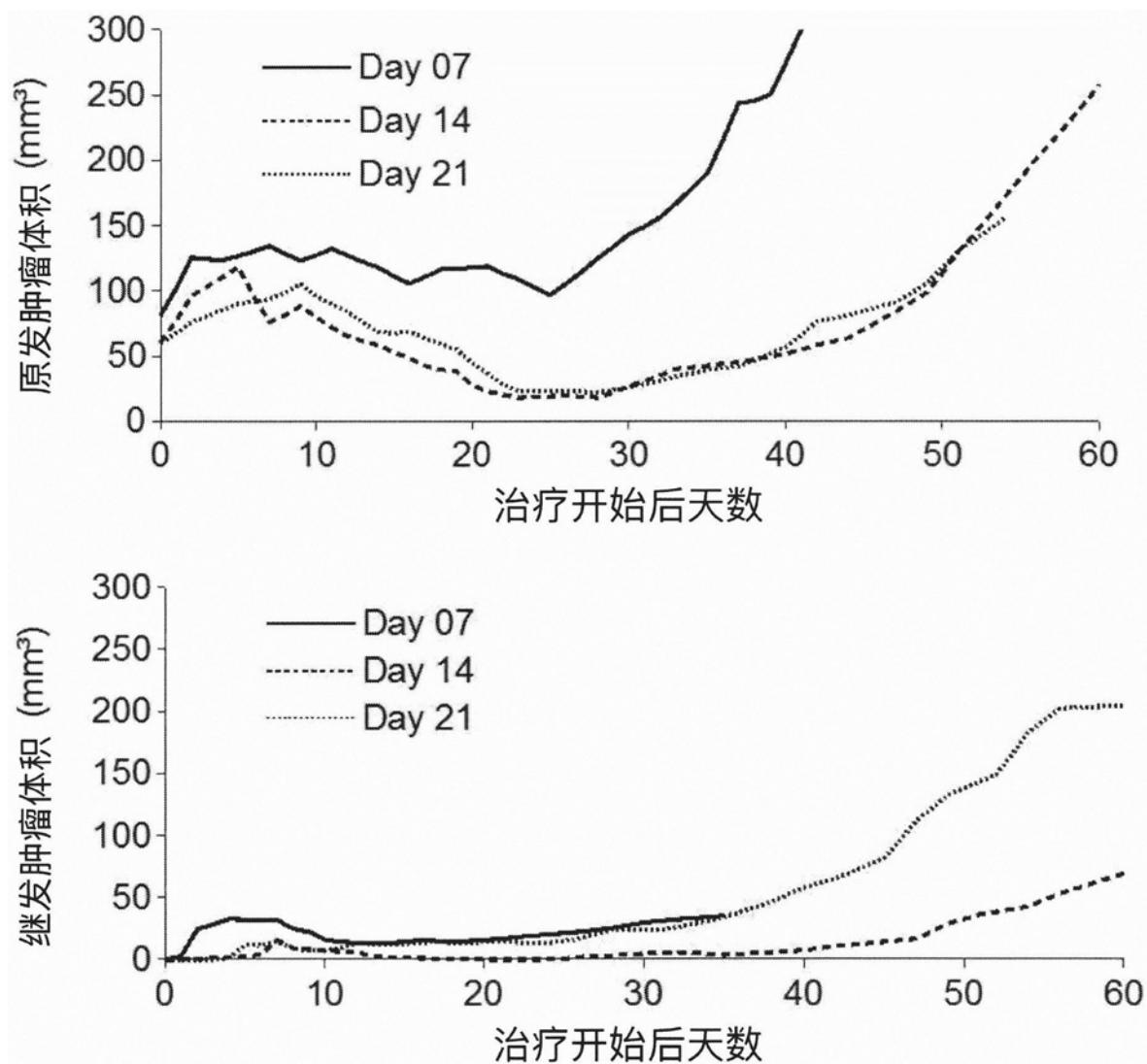


图7

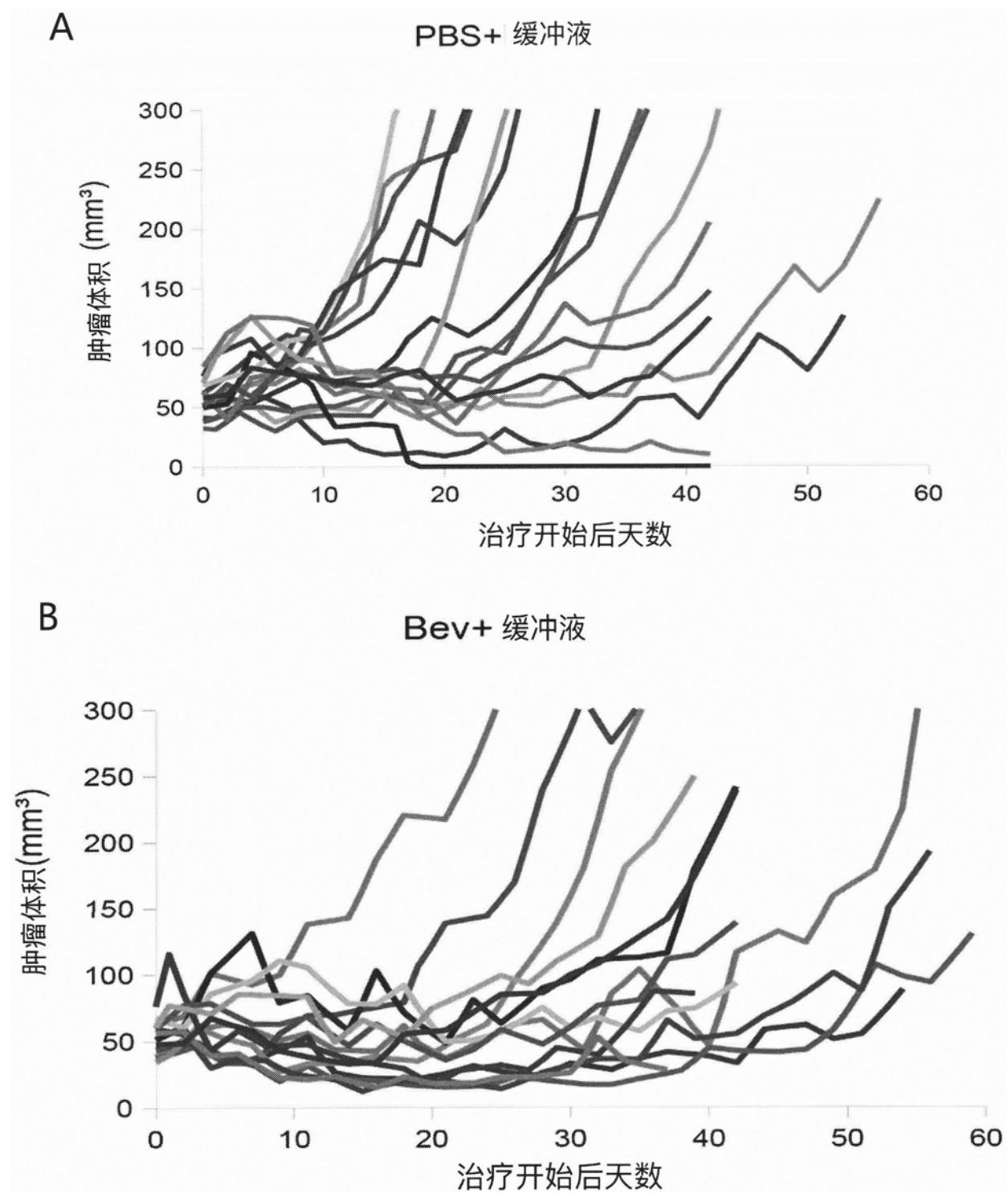
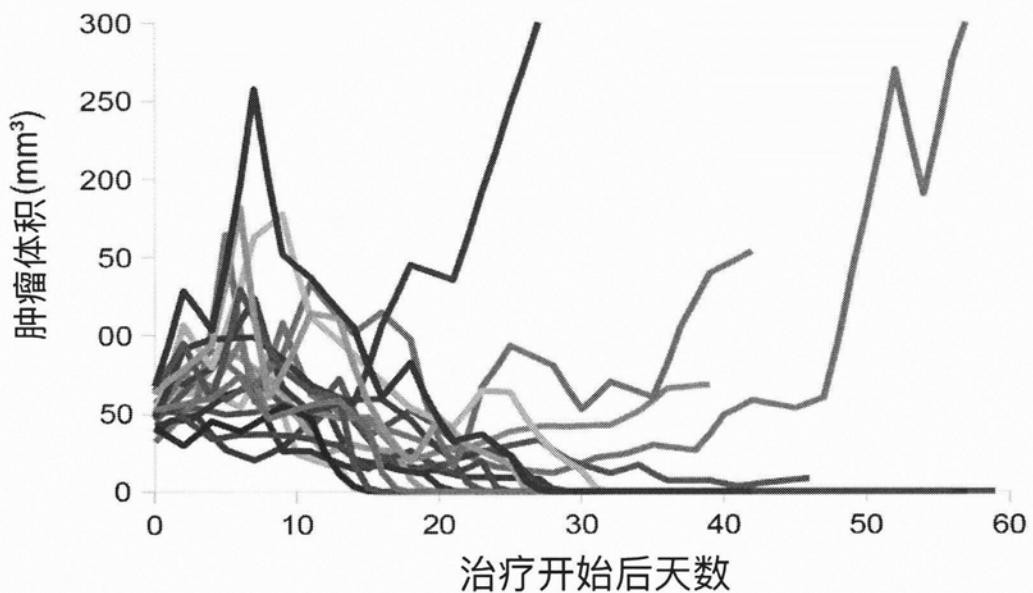


图8

C

PBS+19k



D

Bev+19k

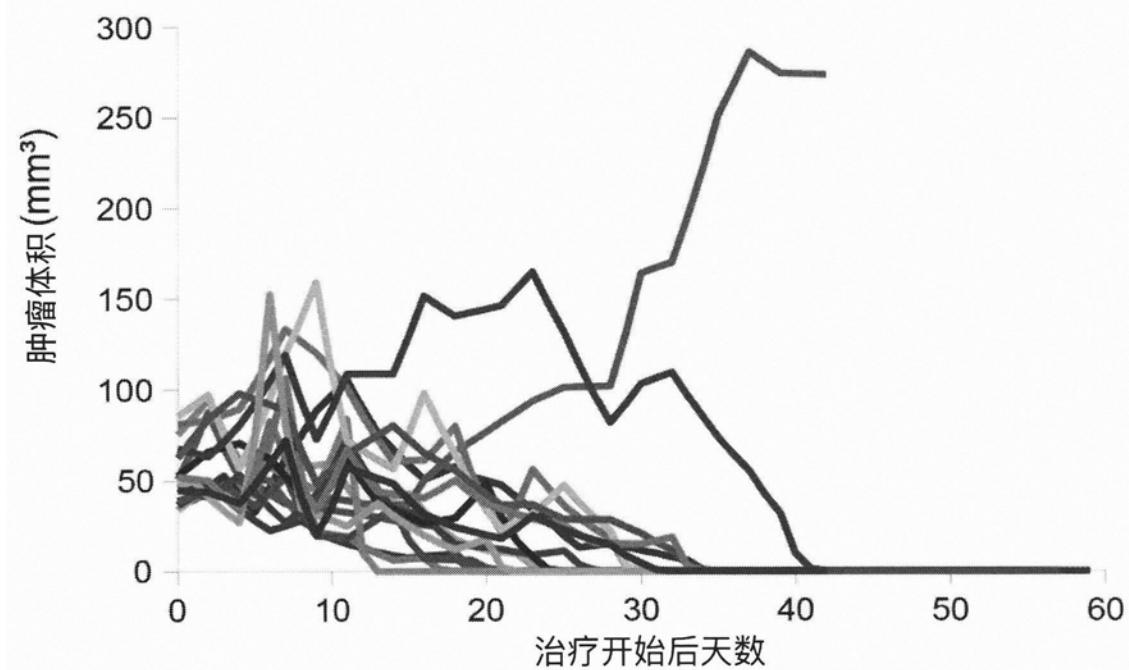


图8 (续)

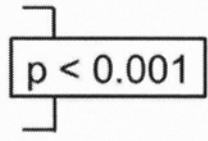
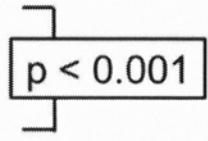
治疗组	治愈率 (%)	
PBS (n=17)	1/17 (5.9%)	
TAV-Δ19K (n=18)	13/18 (72.2%)	
Bev (n=14)	0/14 (0%)	
Bev + TAV-Δ19K (n=17)	16/17 (94.1%)	

图9