



(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

代理人 杨剑 吴立

(30)优先权数据

62/510,647 2017.05.24 US

62/514,351 2017.06.02 US

(51)Int.Cl.

C12N 7/01(2006.01)

C12N 15/861(2006.01)

A61K 35/761(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.02.03

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/034487 2018.05.24

(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

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 克里斯托弗·拉森

托尼·R·雷德

权利要求书8页 说明书33页

序列表80页 附图13页

(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GGTGTTTTGG (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)、AGTGCCCG (SEQ ID NO:30)、和/或TATTCCCG (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物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)、AGTGCCCG (SEQ ID NO:30) 和/或 TATTCGCG (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、吡哆美辛、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 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、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/CTCF、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 γ 、KRAS、MAGE、MAGE-A3、MART1、melan-A、间皮素、MUC-1、NY-ESO-1、Podocalyxin(Podxl)、p53、TGF- β 、TGF- β 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、 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/pmel17、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- β R11、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GGTGTTTTGG(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)、AGTGCCCG (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、吡哆美辛、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)、AGTGCCCG (SEQ ID NO:30) 或TATTCCTG (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、吡哆美辛、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/pm117、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.polyptide(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- β RII、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- Δ 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- Δ 19k腺病毒(“19k”)的联合治疗。TAV-Ang、TAV-Endo、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($n=10$ /组)。肿瘤体积估算为长 \cdot 宽²/2。

[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- Δ 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- Δ 19k腺病毒(“19k”)的联合治疗。TAV-Ang、TAV-Endo、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($n=10$ /组)。肿瘤体积估算为长 \cdot 宽²/2。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-Δ19k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-Δ19k腺病毒(“19k”)的联合治疗。TAV-Δ19k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²/2。

[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 NO: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 NO: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 NO: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 NO: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 NO: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 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)。CTGACCTC(SEQ ID NO:2)和TCACCAGG(SEQ ID NO:3)定义了Ad5基因组(SEQ ID NO: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(ITR;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、短角病毒科、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疱疹病毒载体。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GGTGTTTTGG(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)、AGTGCCCG(SEQ ID NO:30)或TATTCCCG(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E4ORF6/7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2mm³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理学可接受的载体联合。如本文所述,“药理学可接受的载体”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”。药理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;抗菌剂如苄基醇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 10^2 到 10^{15} 个空斑形成单位(pfus)的范围内,例如 10^2 到 10^{10} 、 10^2 到 10^5 、 10^5 到 10^{15} 、 10^5 到 10^{10} 或 10^{10} 到 10^{15} 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、吡哆美辛、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2mg/kg到约3mg/kg,从约3mg/kg到约5mg/kg,从约3mg/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 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、雄激素受体、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/pm117、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.polyptide(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- β 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 ENZYMOL. 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、原发性甲状旁腺功能亢进、继发性甲状旁腺功能亢进、三级甲状旁腺功能亢进、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 γ 、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 $\pm 10\%$ 。

[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):

ATCTTGGTTACATCTGACCTCGTCGAGTCACCAGGCGCTTTTCCA

[0139]

A (SEQ ID NO: 24)。

[0140] 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。

[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-Δ 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:

ATCTGACCTCGTCGACATGGCTCCCGACCCCAGCAGACGCCTCTG
CCTGCTGCTGCTGTTGCTGCTCTCCTGCCGCCTTGTGCCTGCCAGC
GCTTATGTGCACCTGCCGCCAGCCCGCCCCACCCTCTCACTTGCT
CATACTCATCAGGACTTTCAGCCAGTGCTCCACCTGGTGGCACTG
AACACCCCCCTGTCTGGAGGCATGCGTGGTATCCGTGGAGCAGAT
TTCCAGTGCTTCCAGCAAGCCCGAGCCGTGGGGCTGTCGGGCACC
TTCCGGGCTTTCCTGTCCTCTAGGCTGCAGGATCTCTATAGCATCG
TGCGCCGTGCTGACCGGGGGTCTGTGCCCATCGTCAACCTGAAGG
[0142] ACGAGGTGCTATCTCCCAGCTGGGACTCCCTGTTTTCTGGCTCCC
AGGGTCAACTGCAACCCGGGGCCCGCATCTTTTCTTTTGACGGCA
GAGATGTCCTGAGACACCCAGCCTGGCCGCAGAAGAGCGTATGG
CACGGCTCGGACCCCAGTGGGCGGAGGCTGATGGAGAGTTACTG
TGAGACATGGCGAACTGAACTACTGGGGCTACAGGTCAGGCCT
CCTCCCTGCTGTCAGGCAGGCTCCTGGAACAGAAAGCTGCGAGCT
GCCACAACAGCTACATCGTCCTGTGCATTGAGAATAGCTTCATGA
CCTCTTTCTCCAAATAGCTCGAGTCACCAGGCG (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-Δ 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:

[0144]

ATCTGACCTCGTCGACATGGACCACAAGGAAGTAATCCTTCTGTT
TCTCTTGCTTCTGAAACCAGGACAAGGGAAGAGAGTGTATCTGTC
AGAATGTAAGACCGGCATCGGCAACGGCTACAGAGGAACAATGT
CCAGGACAAAGAGTGGTGTTCCTGTCAAAAGTGGGGTGCCACG
TTCCCCCACGTACCCAACCTACTCTCCAGTACACATCCCAATGAG
GGACTAGAAGAAAATTACTGTAGGAACCCAGACAATGATGAACA
AGGGCCTTGGTGCTACACTACAGATCCGGACAAGAGATATGACT
ACTGCAACATTCTGAATGTGAAGAAGAATGCATGTACTGCAGT
GGCGAAAAGTATGAGGGGAAAATCTCCAAGACCATGTCTGGACT
TGACTGCCAGGCCTGGGATTCTCAGAGCCCACATGCTCATGGATA
CATCCCTGCCAAATTCCCAAGCAAGAACCTGAAGATGAATTATTG
CCGCAACCCTGACGGGGAGCCAAGGCCCTGGTGCTTCACAACAG
ACCCACCAAACGCTGGGAATACTGTGACATCCCCCGCTGCACA
ACACCCCCGCCCCACCCAGCCCAACCTACCAATGTCTGAAAGG
AAGAGGTGAAAATTACCGAGGGACCGTGTCTGTACCGTGTCTG
GGAAAACCTGTCAGCGCTGGAGTGAGCAAACCCCTCATAGGCAC
AACAGGACACCAGAAAATTTCCCCTGCAAAAATCTGGAGGAGAA
TTACTGCCGGAACCCGGATGGAGAAACTGCTCCCTGGTGCTATAC
CACTGACAGCCAGCTGAGGTGGGAGTACTGTGAGATTCCATCCTG
CGAGTCCTCAGCATCACCAGACCAGTCAGATTCCTCAGTTCCACC
AGAGGAGCAAACACCTGTGGTCCAGGAATGCTACCAGAGCGATG
GGCAGAGCTATCGGGGTACATCGTCCACTACCATCACAGGGAAG
AAGTGCCAGTCCTGGGCAGCTATGTTTCCACATAGGCATTCTGAAG
ACGCCAGAGAACTTCCCAGATGCTGGCTTGGAGATGAACTATTGC

AGGAACCCGGATGGTGACAAGGGCCCTTGGTGCTACACCACTGA
CCCGAGCGTCAGGTGGGAATACTGCAACCTGAAGCGGTGCTCAG
AGACAGGAGGGAGTGTTGTGGAATTGCCACAGTTTCCCAGGAA
CCAAGTGGGCCGAGCGACTCTGAGACAGACTGCATGTATGGGAA
[0145] TGGCAAAGACTACCGGGGCAAAACGGCCGTCCTGTCAGCTGGCA
CCCCTTGCCAAGGATGGGCTGCCCAGGAGCCCCACAGGCACAGC
ATCTTCACCCACAGACAAACCCACGGGCAGGTCTGGAAAAGAA
TTATTGCCGAAACCCCGATGGGGATGTGAATGGTCCTTGGTGCTA
TACAACAAACCCTAGATGATAGCTCGAGTCACCAGGCG (SEQ ID
NO:28)。

[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):

ATCTTGGTTACATCTGACCTCGTCGAGTCACCAGGCGCTTTTCCA
[0151] A (SEQ ID NO: 24)。

[0152] 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。

[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-Δ19k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:

[0154]

ATCTGACCTCGTCGACATGGCTCCCTACCCCTGTGGCTGCCACAT
CCTGCTGCTGCTCTTCTGCTGCCTGGCGGCTGCCCCGGGCCAGCTC
CTACGTGCACCTGCGGGCCGGCGCGACCCACAAGCCCACCCGCCC
ACAGCCACCGCGACTTCCAGCCGGTGCTCCACCTGGTTGCGCTCA
ACAGCCCCCTGTCAGGCGGCATGCGGGGCATCCGCGGGGGCCGAC
TTCCAGTGCTTCCAGCAGGCGCGGGCCGTGGGGCTGGCGGGCAC
CTTCCGCGCCTTCCTGTCCTCGCGCCTGCAGGACCTGTACAGCAT
CGTGCGCCGTGCCGACCGCGCAGCCGTGCCCATCGTCAACCTCAA
GGACGAGCTGCTGTTTCCCAGCTGGGAGGCTCTGTTCTCAGGCTC
TGAGGGTCCGCTGAAGCCCGGGGCACGCATCTTCTCCTTTGACGG
CAAGGACGTCCTGAGGCACCCACCTGGCCCCAGAAGAGCGTGT
GGCATGGCTCGGACCCCAACGGGCGCAGGCTGACCGAGAGCTAC
TGTGAGACGTGGCGGACGGAGGCTCCCTCGGCCACGGGGCCAGGC
CTCCTCGCTGCTGGGGGGCAGGCTCCTGGGGCAGAGTGCCGCGA
GCTGCCATCACGCCTACATCGTGCTCTGCATTGAGAACAGCTTCA
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-Δ19k质粒的E1b-19k区。所有人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:

ATCTGACCTCGTCGACATGGAACATAAGGAAGTGGTTCTTCTACT
TCTTTTATTTCTGAAATCAGGTCAAGGAAAAGTGTATCTCTCAGA
GTGCAAGACTGGGAATGGAAAGAACTACAGAGGGACGATGTCCA
AAACAAAAAATGGCATCACCTGTCAAAAATGGAGTTCCACTTCTC
CCCACAGACCTAGATTCTCACCTGCTACACACCCCTCAGAGGGAC
TGGAGGAGAACTACTGCAGGAATCCAGACAACGATCCGCAGGGG
CCCTGGTGCTATACTACTGATCCAGAAAAGAGATATGACTACTGC
GACATTCTTGAGTGTGAAGAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGA
AAACTATGACGGCAAAATTTCCAAGACCATGTCTGGACTGGAAT
GCCAGGCCTGGGACTCTCAGAGCCCACACGCTCATGGATACATTC
CTTCCAAATTTCCAAACAAGAACCTGAAGAAGAATTACTGTCGTA
ACCCCGATAGGGAGCTGCGGCCTTGGTGTTTCACCACCGACCCCA
ACAAGCGCTGGGAACTTTGTGACATCCCCCGCTGCACAACACCTC
CACCATCTTCTGGTCCCACCTACCAGTGTCTGAAGGGAACAGGTG
[0156] AAAACTATCGCGGGAATGTGGCTGTTACCGTGTCCGGGCACACCT
GTCAGCACTGGAGTGCACAGACCCCTCACACACATAACAGGACA
CCAGAAAACCTCCCCTGCAAAAATTTGGATGAAAACACTACTGCCGC
AATCCTGACGGAAAAAGGGCCCCATGGTGCCATACAACCAACAG
CCAAGTGCGGTGGGAGTACTGTAAGATACCGTCCTGTGACTCCTC
CCCAGTATCCACGGAACAATTGGCTCCCACAGCACCACCTGAGCT
AACCCTGTGGTCCAGGACTGCTACCATGGTGATGGACAGAGCT
ACCGAGGCACATCCTCCACCACCACAGGAAAGAAGTGTGAG
TCTTGGTCATCTATGACACCACACCGGCACCAGAAGACCCCAGA
AAACTACCCAAATGCTGGCCTGACAATGAACTACTGCAGGAATC
CAGATGCCGATAAAGGCCCTGGTGTTTTACCACAGACCCCAGCG
TCAGGTGGGAGTACTGCAACCTGAAAAAATGCTCAGGAACAGAA
GCGAGTGTTGTAGCACCTCCGCCTGTTGTCCTGCTTCCAGATGTA
GAGACTCCTTCCGAAGAAGACTGTATGTTTGGGAATGGGAAAGG
ATACCGAGGCAAGAGGGCGACCACTGTTACTGGGACGCCATGCC

[0157] AGGACTGGGCTGCCCAGGAGCCCCATAGACACAGCATTTTCACTC
CAGAGACAAATCCACGGGCGGGTCTGGAAAAAATTACTGCCGT
AACCCTGATGGTGTAGGTGGTCCCTGGTGCTACACGACAAAT
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-Δ19k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
CCTGCTGCTGCTCTTCTGCTGCCTGGCGGCTGCCCGGGCCAGCTC
CTACGTGCACCTGCGGCCGGCGCGACCCACAAGCCCACCCGCCC
ACAGCCACCGCGACTTCCAGCCGGTGCTCCACCTGGTTGCGCTCA
ACAGCCCCCTGTCAGGCGGCATGCGGGGCATCCGCGGGGGCCGAC
TTCCAGTGCTTCCAGCAGGCGCGGGCCGTGGGGCTGGCGGGCAC
CTTCCGCGCCTTCCTGTCCTCGCGCCTGCAGGACCTGTACAGCAT
CGTGCGCCGTGCCGACCGCGCAGCCGTGCCCATCGTCAACCTCAA
GGACGAGCTGCTGTTTCCCAGCTGGGAGGCTCTGTTCTCAGGCTC
TGAGGGTCCGCTGAAGCCCGGGGCACGCATCTTCTCCTTTGACGG
CAAGGACGTCCTGAGGCACCCACCTGGCCCCAGAAGAGCGTGT
GGCATGGCTCGGACCCCAACGGGCGCAGGCTGACCGAGAGCTAC
TGTGAGACGTGGCGGACGGAGGCTCCCTCGGCCACGGGCCAGGC
CTCCTCGCTGCTGGGGGGCAGGCTCCTGGGGCAGAGTGCCGCGA
GCTGCCATCACGCCTACATCGTGCTCTGCATTGAGAACAGCTTCA
TGACTGCCTCCAAGTAGtaacgttactggccgaagccgcttggaataaggccggtgtgcgt

[0160]

ttgtctatatgttattttccaccatattgccgtcttttggcaatgtgagggcccggaacctggccctgtcttctt
gacgagcattcctaggggtctttccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgtgaatgtcgtgaaggaag
cagttcctctggaagcttctgaagacaaacaacgtctgtagcgaccctttgcaggcagcggaacccccca
cctggcgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaccc
cagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggg
gctgaaggatgcccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgcacatgctttacat
gtgttagtcgaggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtggttttctttgaaaaacac
gatgataatATGGAACATAAGGAAGTGGTTCTTCTACTTCTTTTATTTC
TGAAATCAGGTCAAGGAAAAGTGTATCTCTCAGAGTGCAAGACT
GGGAATGGAAAGAACTACAGAGGGACGATGTCCAAAACAAAAA
ATGGCATCACCTGTCAAAAATGGAGTTCCACTTCTCCCCACAGAC
CTAGATTCTCACCTGCTACACACCCCTCAGAGGGACTGGAGGAG
AACTACTGCAGGAATCCAGACAACGATCCGCAGGGGGCCCTGGTG
CTATACTACTGATCCAGAAAAGAGATATGACTACTGCGACATTCT
TGAGTGTGAAGAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGAAAACATG
ACGGCAAAATTTCCAAGACCATGTCTGGACTGGAATGCCAGGCC
TGGGACTCTCAGAGCCCACACGCTCATGGATACATTCCTTCCAAA
TTTCCAAACAAGAACCTGAAGAAGAATTACTGTCGTAACCCCGAT
AGGGAGCTGCGGCCTTGGTGTTTCACCACCGACCCCAACAAGCG
CTGGGAACTTTGTGACATCCCCCGCTGCACAACACCTCCACCATC
TTCTGGTCCCACCTACCAGTGTCTGAAGGGAACAGGTGAAAACATA
TCGCGGGAATGTGGCTGTTACCGTGTCCGGGCACACCTGTCAGCA
CTGGAGTGCACAGACCCCTCACACACATAACAGGACACCAGAAA
ACTTCCCCTGCAAAAATTTGGATGAAAACACTACTGCCGCAATCCTG
ACGGAAAAAGGGCCCCATGGTGCCATACAACCAACAGCCAAGTG
CGGTGGGAGTACTGTAAGATACCGTCCTGTGACTCCTCCCCAGTA
TCCACGGAACAATTGGCTCCCACAGCACCACCTGAGCTAACCCCT
GTGGTCCAGGACTGCTACCATGGTGATGGACAGAGCTACCGAGG
CACATCCTCCACCACCACACAGGAAAGAAGTGTCAGTCTTGGTC
ATCTATGACACCACACCGGCACCAGAAGACCCCAAGAAAACCTACC

[0161]

CAAATGCTGGCCTGACAATGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCC
GATAAAGGCCCCCTGGTGT TTTACCACAGACCCCAGCGTCAGGTGG
GAGTACTGCAACCTGAAAAAATGCTCAGGAACAGAAGCGAGTGT
TGTAGCACCTCCGCCTGTTGTCCTGCTTCCAGATGTAGAGACTCC
TTCCGAAGAAGACTGTATGTTTGGGAATGGGAAAGGATACCGAG
GCAAGAGGGGCGACCACTGTTACTGGGACGCCATGCCAGGACTGG
GCTGCCCAGGAGCCCCATAGACACAGCATTTTCACTCCAGAGAC
AAATCCACGGGCGGGTCTGGAAAAAATTACTGCCGTAACCCTG
ATGGTGATGTAGGTGGTCCCTGGTGCTACACGACAAATCCAAGAT
AGCTCGAGTCACCAGGCG (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-Δ19k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:

[0163]

ATCTGACCTCGTCGACATGGCTCCCGACCCCAGCAGACGCCTCTG
CCTGCTGCTGCTGTTGCTGCTCTCCTGCCGCCTTGTGCCTGCCAGC
GCTTATGTGCACCTGCCGCCAGCCCGCCCCACCCTCTCACTTGCT
CATACTCATCAGGACTTTCAGCCAGTGCTCCACCTGGTGGCACTG
AACACCCCCCTGTCTGGAGGCATGCGTGGTATCCGTGGAGCAGAT
TTCCAGTGCTTCCAGCAAGCCCGAGCCGTGGGGCTGTCGGGCACC
TTCCGGGCTTTCCTGTCCTCTAGGCTGCAGGATCTCTATAGCATCG
TGCGCCGTGCTGACCGGGGGTCTGTGCCCATCGTCAACCTGAAGG
ACGAGGTGCTATCTCCAGCTGGGACTCCCTGTTTTCTGGCTCCC
AGGGTCAACTGCAACCCGGGGCCCGCATCTTTTCTTTTGACGGCA

[0164]

GAGATGTCCTGAGACACCCAGCCTGGCCGCAGAAGAGCGTATGG
CACGGCTCGGACCCCAGTGGGCGGAGGCTGATGGAGAGTTACTG
TGAGACATGGCGAACTGAACTACTGGGGCTACAGGTCAGGCCT
CCTCCCTGCTGTCAGGCAGGCTCCTGGAACAGAAAGCTGCGAGCT
GCCACAACAGCTACATCGTCCTGTGCATTGAGAATAGCTTCATGA
CCTCTTTCTCCAAATAGtaacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgcgtt
tgtctatatgtattttccaccatattgccgtcttttggcaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttctg
acgagcattcctaggggtctttccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagc
agttcctctggaagcttctgaagacaaacaacgtctgtagcgacccttgcaggcagcggaacccccac
ctggcgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaacccc
agtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaaattggctctcctcaagcgattcaacaagggg
ctgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgcacatgctttacatgt
gtttagtcgaggttaaaaaacgtctaggcccccggaaccacggggacgtggtttcctttgaaaaacacgat
gataatATGGACCACAAGGAAGTAATCCTTCTGTTTCTCTTGCTTCTG
AAACCAGGACAAGGGAAGAGAGTGTATCTGTCAGAATGTAAGAC
CGGCATCGGCAACGGCTACAGAGGAACAATGTCCAGGACAAAGA
GTGGTGTTGCCTGTCAAAAGTGGGGTGCCACGTTCCCCCACGTAC
CCAATACTCTCCCAGTACACATCCCAATGAGGGACTAGAAGAA
AATTACTGTAGGAACCCAGACAATGATGAACAAGGGCCTTGGTG
CTACACTACAGATCCGGACAAGAGATATGACTACTGCAACATTCC
TGAATGTGAAGAAGAATGCATGTACTGCAGTGGCGAAAAGTATG
AGGGGAAAATCTCCAAGACCATGTCTGGACTTGACTGCCAGGCC
TGGGATTCTCAGAGCCCACATGCTCATGGATACATCCCTGCCAAA
TTCCCAAGCAAGAACCTGAAGATGAATTATTGCCGCAACCCTGAC
GGGGAGCCAAGGCCCTGGTGCTTCACAACAGACCCCAACAAACG
CTGGGAATACTGTGACATCCCCCGCTGCACAACACCCCGCCCCC
ACCCAGCCCAACCTACCAATGTCTGAAAGGAAGAGGTGAAAATT
ACCGAGGGACCGTGTCTGTACCGTGTCTGGGAAAACCTGTCAGC
GCTGGAGTGAGCAAACCCCTCATAGGCACAACAGGACACCAGAA
AATTTCCCCTGCAAAAATCTGGAGGAGAATTACTGCCGGAACCC

GGATGGAGAACTGCTCCCTGGTGCTATACCACTGACAGCCAGCT
GAGGTGGGAGTACTGTGAGATTCCATCCTGCGAGTCCTCAGCATC
ACCAGACCAGTCAGATTCTCAGTTCCACCAGAGGAGCAAACAC
CTGTGGTCCAGGAATGCTACCAGAGCGATGGGCAGAGCTATCGG
GGTACATCGTCCACTACCATCACAGGGAAGAAGTGCCAGTCCTG
GGCAGCTATGTTTCCACATAGGCATTCTGAAGACGCCAGAGAACTT
CCCAGATGCTGGCTTGGAGATGAACTATTGCAGGAACCCGGATG
[0165] GTGACAAGGGCCCTTGGTGCTACACCACTGACCCGAGCGTCAGG
TGGGAATACTGCAACCTGAAGCGGTGCTCAGAGACAGGAGGGGAG
TGTTGTGGAATTGCCACAGTTTCCCAGGAACCAAGTGGGCCGAG
CGACTCTGAGACAGACTGCATGTATGGGAATGGCAAAGACTACC
GGGGCAAACGGCCGTCCTGCAGCTGGCACCCCTTGCCAAGGA
TGGGCTGCCCAGGAGCCCCACAGGCACAGCATCTTCACCCACA
GACAAACCCACGGGCAGGTCTGGAAAAGAATTATTGCCGAAACC
CCGATGGGGATGTGAATGGTCCTTGGTGCTATACAACAAACCCTA
GATGATAGCTCGAGTCACCAGGCG (SEQ ID NO:29)。

[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 1×10^9 PFU/剂量三次瘤内注射缓冲液、TAV- Δ 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 1×10^6 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 1×10^9 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 1×10^6 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 1×10^9 PFU/剂量三次瘤内注射缓冲液或TAV- Δ 19k,和/或是在第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- Δ 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- Δ 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 aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt	60
	ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt	120
	gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg	180
	gtgtgcgccg gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgcg gttttaggcg gatgtttag	240
	taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga	300
	agtgaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tatttgtcta gggccgcggg	360
	gactttgacc gtttacgtgg agactcgccc aggtgttttt ctcaggtgtt ttccgcgttc	420
	cgggtcaaag ttggcgtttt attattatag tcagctgacg tgtagtgtat ttataccggg	480
	tgagttcctc aagaggccac tcttgagtgc cagcgagtag agttttctcc tccgagccgc	540
	tccgacaccg ggactgaaaa tgagacatat tatctgccac ggaggtgtta ttaccgaaga	600

	aatggccgcc agtcttttgg accagctgat cgaagaggta ctggctgata atcttccacc	660
	tcttagccat tttgaaccac ctacccttca cgaactgtat gatttagacg tgacggcccc	720
	cgaagatccc aacgaggagg cggtttcgca gatttttccc gactctgtaa tgttggcggg	780
	gcaggaaggg attgacttac tcacttttcc gccggcgccc ggttctccgg agccgcctca	840
	cctttcccgg cagcccagac agccggagca gagagccttg ggtccggttt ctatgccaaa	900
	ccttgtaccg gaggtgatcg atcttacctg ccacgaggct ggctttccac ccagtgcga	960
	cgaggatgaa gagggtaggg agtttgtgtt agattatgtg gagcaccccg ggcacgggtg	1020
	caggtcttgt cattatcacc ggaggaatac gggggaccca gatattatgt gttcgcttgg	1080
	ctatatgagg acctgtggca tgtttgtcta cagtaagtga aaattatggg cagtgggtga	1140
	tagagtgggt gggttgggtg ggtaattttt ttttaattt ttacagttt gtggtttaaa	1200
	gaattttgta ttgtgattt tttaaaagg cctgtgtctg aacctgagcc tgagcccag	1260
[0002]	ccagaaccgg agcctgcaag acctaccgc cgtcctaaaa tggcgctgc taccctgaga	1320
	cgcccgacat cacctgtgtc tagagaatgc aatagtagta cggatagctg tgactccggt	1380
	ccttctaaca cacctcctga gataccccg gtgggtccgc tgtgccccat taaaccagtt	1440
	gccgtgagag ttggtgggcg tcgccaggct gtggaatgta tcgaggactt gcttaacgag	1500
	cctgggcaac ctttggactt gagctgtaaa cgccccaggc cataagggtg aaacctgtga	1560
	ttgcgtgtgt ggttaacgcc ttgttttctt gaatgagttg atgtaagttt aataaagggt	1620
	gagataatgt ttaacttgca tggcgtgtta aatggggcgg ggcttaaagg gtatataatg	1680
	cgccgtgggc taatcttggg tacatctgac ctcatggagg cttgggagtg tttggaagat	1740
	ttttctgtg tgcgtaactt gctggaacag agctctaaca gtacctcttg gttttggagg	1800
	tttctgtggg gctcatccca ggcaaagta gtctgcagaa ttaaggagga ttacaagtgg	1860
	gaatttgaag agcttttgaa atcctgtggg gagctgtttg attctttgaa tctgggtcac	1920

	caggcgcttt tccaagagaa ggtcatcaag actttggatt tttccacacc ggggcgcgct	1980
	gcggctgctg ttgctttttt gagttttata aaggataaat ggagcgaaga aacccatctg	2040
	agcgggggggt acctgctgga ttttctggcc atgcatctgt ggagagcggg tgtgagacac	2100
	aagaatcgcc tgctactgtt gtcttccgtc cgcccggcga taataccgac ggaggagcag	2160
	cagcagcagc aggaggaagc caggcggcgg cggcaggagc agagcccatg gaacccgaga	2220
	gccggcctgg accctcggga atgaatgttg tacagggtggc tgaactgtat ccagaactga	2280
	gacgcatttt gacaattaca gaggatgggc aggggctaaa gggggtaaag agggagcggg	2340
	gggcttgtga ggctacagag gaggctagga atctagcttt tagcttaatg accagacacc	2400
	gtcctgagtg tattactttt caacagatca aggataattg cgctaafgag ctigatctgc	2460
	tggcgcagaa gtattccata gagcagctga ccacttactg gctgcagcca ggggatgatt	2520
	ttgaggaggc tattagggtat tatgcaaagg tggcacttag gccagattgc aagtacaaga	2580
[0003]	tcagcaaact tgtaaatatc aggaattgtt gctacatttc tgggaacggg gccgaggtgg	2640
	agatagatac ggaggatagg gtggccttta gatgtagcat gataaatatg tggccggggg	2700
	tgcttggcat ggacggggtg gttattatga atgtaagggt tactggcccc aatttttagcg	2760
	gtacggtttt cctggccaat accaacctta tcctacacgg tgtaagcttc tatgggttta	2820
	acaataacctg tgtggaagcc tggaccgatg taagggttcg gggctgtgcc ttttactgct	2880
	gctggaaggg ggtggtgtgt cgccccaaaa gcagggcctc aattaagaaa tgctctttg	2940
	aaagggtgtac ctggtgtatc ctgtctgagg gtaactccag ggtgcgccac aatgtggcct	3000
	ccgactgtgg ttgcttcatg ctagtgaata gcgtggctgt gattaagcat aacatggtat	3060
	gtggcaactg cgaggacagg gcctctcaga tgctgacctg ctcggacggc aactgtcacc	3120
	tgctgaagac cattcacgta gccagccact ctgcaaggc ctggccagtg tttgagcata	3180
	acatactgac ccgctgttcc ttgcatttgg gtaacaggag gggggtgttc ctaccttacc	3240

	aatgcaattt gagtcacact aagatattgc ttgagcccga gagcatgtcc aaggtgaacc	3300
	tgaacggggt gtttgacatg accatgaaga tctggaaggt gctgaggtag gatgagaccc	3360
	gcaccagggt cagaccctgc gagtgtggcg gtaaacadat taggaaccag cctgtgatgc	3420
	tggatgtgac cgaggagctg aggcccgatc acttggtgct ggcctgcacc cgcgtgagt	3480
	ttggctctag cgatgaagat acagattgag gtactgaaat gtgtgggcgt ggcttaaggg	3540
	tgggaaagaa tatataaggt gggggtctta ttagtatttg tatctgtttt gcagcagccg	3600
	ccgccgcat gagcaccaac tcgtttgatg gaagcattgt gagctcatat ttgacaacgc	3660
	gcatgcccc atgggccggg gtgcgtcaga atgtgatggg ctccagcatt gatggtcgcc	3720
	ccgtcctgcc cgaaactct actacctga cctacgagac cgtgtctgga acgccgttgg	3780
	agactgcagc ctccgccgc gcttcagccg ctgcagccac cgccgcggg attgtgactg	3840
	actttgcttt cctgagcccg ctgcaagca gtgcagcttc ccgttcaccc gccgcgatg	3900
[0004]	acaagttgac ggctcttttg gcacaattgg attctttgac ccgggaactt aatgtcgttt	3960
	ctcagcagct gttggatctg cgccagcagg tttctgccct gaaggcttcc tcccccca	4020
	atgcggttta aaacataaat aaaaaaccag actctgtttg gatttggatc aagcaagtgt	4080
	cttgctgtct ttatttaggg gttttgcgc cgcggtaggc ccgggaccag cggctcgggt	4140
	cgttgagggt cctgtgtatt tttccagga cgtggtaaag gtgactctgg atgttcagat	4200
	acatgggcat aagccgtct ctggggtgga gtagcacca ctgcagagct tcatgctgcg	4260
	gggtgggtgt gtagatgac cagtcgtagc aggagcgtg ggcgtggtag ctaaaaatgt	4320
	cttcagtag caagctgatt gccaggggca ggcccttggg gtaagtgttt acaaagcgg	4380
	taagctggga tgggtgcata cgtggggata tgagatgcat cttggactgt atttttaggt	4440
	tggctatgtt ccagccata tccctccggg gattcatgtt gtgcagaacc accagcacag	4500
	tgtatccggt gcacttggga aatttgtcat gtagcttaga aggaaatgcg tggaagaact	4560

	tggagacgcc cttgtgacct ccaagatttt ccatgcattc gtccataatg atggcaatgg	4620
	gccacacgggc ggccggcctgg gcgaagatat ttctgggata actaacgtca tagttgtgtt	4680
	ccaggatgag atcgtcatag gccattttta caaagcgagg gcggagggtg ccagactgcg	4740
	gtataatggt tccatccggc ccaggggcgt agttaccctc acagatttgc atttcccacg	4800
	ctttgagttc agatgggggg atcatgtcta cctgcggggc gatgaagaaa acggtttccg	4860
	gggtagggga gatcagctgg gaagaaagca ggttcctgag cagctgcgac ttaccgcagc	4920
	cggtagggccc gtaaatacaca cctattaccg ggtgcaactg gtagttaaga gagctgcagc	4980
	tgccgtcatc cctgagcagg ggggccactt cgtaagcat gtcctgact cgcattgttt	5040
	ccctgaccaa atccgccaga aggcgctcgc cgccagcga tagcagttct tgcaaggaag	5100
	caaagttttt caacggtttg agaccgtccg ccgtaggcat gcttttgagc gtttgaccaa	5160
	gcagttccag gcggtccac agctcggta cctgctctac ggcatctcga tccagcatat	5220
[0005]	ctcctcgttt cgcgggttgg ggccgctttc gctgtacggc agtagtcggt gctcgtccag	5280
	acgggccagg gtcattgtct tccacgggcg cagggtctc gtcagcgtag tctgggtcac	5340
	ggtgaagggg tgcgtccgg gctgcgcgt gccagggtg cgcttgaggc tggctctgct	5400
	ggtgctgaag cgctgccgtt ctccgccctg cgcgtcggcc aggtagcatt tgaccatggt	5460
	gtcatagtcc agcccctccg cggcgtggcc cttggcgcgc agcttgccct tggaggaggc	5520
	gccgcacgag gggcagtgca gacttttgag ggcgtagagc ttgggcgcga gaaataccga	5580
	ttccggggag taggcatccg cgccgcaggc cccgcagacg gtctcgcatt ccacgagcca	5640
	ggtgagctct ggccgttcgg ggtcaaaaac caggtttccc ccatgctttt tgatgcgttt	5700
	cttacctctg gtttccatga gccggtgtcc acgctcgggt acgaaaaggc tgtccgtgtc	5760
	cccgataca gacttgagag gcctgtcctc gagcgggtgt ccgcggtcct cctcgtatag	5820
	aaactcggac cactctgaga caaaggctcg cgtccaggcc agcacgaagg aggctaagt	5880

	ggaggggtag cggtcgttgt ccactagggg gtccactcgc tccagggtgt gaagacacat	5940
	gtcgccctct tcggcatcaa ggaaggtgat tggttttag gtgtaggcca cgtgaccggg	6000
	tgttcctgaa ggggggctat aaaagggggg gggggcgcgt tcgtcctcac tctcttcgc	6060
	atcgtgtct gcgagggcca gctgttgggg tgagtactcc ctctgaaaag cgggcatgac	6120
	ttctgcgcta agattgtcag ttccaaaaa cgaggaggat ttgatattca cctggccgc	6180
	ggtgatgcct ttgagggtgg ccgcatccat ctggtcagaa aagacaatct tttgttgtc	6240
	aagcttggtg gcaaacgacc cgtagagggc gttggacagc aacttggcga tggagcgcag	6300
	ggtttggtt ttgtcgcgat cggcgcgctc cttggccgcg atgttttagt gcacgtattc	6360
	gcgcgcaacg caccgccatt cgggaaagac ggtggtgcgc tcgtcgggca ccaggtgcac	6420
	gcgccaaccg cggttgtgca ggtgacaag gtcaacgctg gtggctacct ctccgcgtag	6480
	gcgctcgttg gtccagcaga ggcgccgcc cttgcgcgag cagaatggcg gtagggggtc	6540
[0006]	tagctgcgtc tcgtccgggg ggtctgcgtc cacggtaaag accccgggca gcaggcgcgc	6600
	gtcgaagtag tctatcttgc atccttgcaa gtctagcgcc tgctgccatg cgcgggcggc	6660
	aagcgcgcgc tcgtatgggt tgagtggggg accccatggc atggggtggg tgagcgcgga	6720
	ggcgtacatg ccgcaaatgt cgtaaagta gaggggctct ctgagtattc caagatatgt	6780
	agggtagcat cttccaccgc ggatgctggc gcgcacgtaa tcgtatagtt cgtgcgagg	6840
	agcgaggagg tcgggaccga ggttgctacg ggcgggctgc tctgctcgga agactatctg	6900
	cctgaagatg gcatgtgagt tggatgatat ggttgacgc tggaagacgt tgaagctggc	6960
	gtctgtgaga cctaccgcgt cacgcacgaa ggaggcgtag gagtcgcgca gcttgttgac	7020
	cagctcggcg gtgacctgca cgtctagggc gcagtagtcc agggtttctt tgatgatgtc	7080
	atacttatcc tgtccctttt tttccacag ctgcgggttg aggacaaact cttcgcggtc	7140
	tttccagtac tcttggatcg gaaaccgctc ggcctccgaa cggtaagagc ctagcatgta	7200

	gaactggttg acggcctggt aggcgcagca tcccttttct acgggtagcg cgtatgcctg	7260
	cgcggccttc cggagcgagg tgtgggtgag cgcaaagggtg tccctgacca tgactttgag	7320
	gtactggtat ttgaagtcag gtctgctgca tccgccctgc tcccagagca aaaagtccgt	7380
	gcgctttttg gaacgcggat ttggcagggc gaaggtagaca tcgttgaaga gtatctttcc	7440
	cgcgcgaggc ataaagttgc gtgtgatgcg gaagggtccc ggcacctcgg aacggttgtt	7500
	aattacctgg gcggcgagca cgatctcgtc aaagccgttg atgttggtggc ccacaatgta	7560
	aagttccaag aagcgcggga tgcccttgat ggaaggcaat tttttaagtt cctcgtaggt	7620
	gagctcttca ggggagctga gcccgtgctc tgaaagggcc cagtctgcaa gatgagggtt	7680
	ggaagcgacg aatgagctcc acaggtcacg ggccattagc atttgcaggt ggtcgcgaaa	7740
	ggtcctaaac tggcgacctt tggccatttt ttctgggggtg atgcagtaga aggtaagcgg	7800
	gtcttgttcc cagcgggtccc atccaagggtt cgcggctagg tctcgcgcgg cagtcactag	7860
[0007]	aggctcatct ccgccgaact tcatgaccag catgaagggc acgagctgct tcccaaaggc	7920
	ccccatccaa gtataggtct ctacatcgta ggtgacaaag agacgctcgg tgcgaggatg	7980
	cgagccgatc gggaagaact ggatctcccg ccaccaattg gaggagtggc tattgatgtg	8040
	gtgaaagtag aagtccttgc gacgggccga aactcgtgc tggcttttgt aaaaacgtgc	8100
	gcagtactgg cagcggtgca cgggctgtac atcctgcacg aggttgacct gacgaccgcg	8160
	cacaaggaag cagagtggga atttgagccc ctgccttggc gggtttggct ggtggtcttc	8220
	tacttcggct gcttgtcctt gaccgtctgg ctgctcgagg ggagttacgg tggatcggac	8280
	caccacgccg cgcgagccca aagtcagat gtccgcgcgc ggcggtcggg gcttgatgac	8340
	aacatcgcgc agatggggagc tgtccatggt ctggagctcc cgcggcgtca ggtcaggcgg	8400
	gagtccttgc aggtttacct cgcatagacg ggtcagggcg cgggctagat ccaggtgata	8460
	cctaatttcc aggggctggt tggtagggcg gtcgatggct tgcaagaggc cgcacccccg	8520

	cggcgcgact acggtaccgc gcggcgggcg gtgggccgcg ggggtgtcct tggatgatgc	8580
	atctaaaagc ggtgacgcgg gcgagccccc ggaggtaggg ggggctccgg acccgccggg	8640
	agagggggca ggggcacgtc ggcccgcg gcgggcagga gctggtgctg cgcgcgtagg	8700
	ttgctggcga acgcgacgac gcggcgggtg atctcctgaa tctggcgctt ctgcgtgaag	8760
	acgacgggcc cggtagctt gagcctgaaa gagagtcca cagaatcaat ttcggtgtcg	8820
	ttgacggcgg cctggcgcaa aatctcctgc acgtctcctg agttgtcttg ataggcgatc	8880
	tcggccatga actgctgat ctcttctcc tggagatctc cgcgtccggc tcgctccacg	8940
	gtggcggcga ggtcgttga aatgcgggcc atgagctgcg agaaggcgtt gaggcctccc	9000
	tcgttccaga cgcggctgta gaccacgccc ccttcggcat cgcgggcgcg catgaccacc	9060
	tgcgcgagat tgagctccac gtgccgggcg aagacggcgt agtttcgcag gcgtgaaag	9120
	aggtagttga ggggtgtggc ggtgtgttct gccacgaaga agtacataac ccagcgtcgc	9180
[0008]	aacgtggatt cgttgatata cccaaggcc tcaaggcgt ccatggcctc gtagaagtcc	9240
	acggcgaagt tgaaaaactg ggagttgcgc gccgacacgg ttaactcctc ctccagaaga	9300
	cggatgagct cggcgacagt gtcgcgcacc tcgcgtcaa aggctacagg ggcctcttct	9360
	tcttcttcaa tctctcttc cataaggcc tccccttctt ctcttcttg cggcgggtgg	9420
	ggagggggga cacggcggcg acgacggcg accgggaggc ggtcgacaaa gcgtcgatc	9480
	atctccccgc ggcgacggcg catggtctcg gtgacggcg gccgttctc gcgggggcgc	9540
	agttggaaga cgccgccgt catgtccgg ttatgggttg gcggggggct gccatgcggc	9600
	agggatacgg cgctaacgat gcatctcaac aattgttgtg taggtactcc gccccgagg	9660
	gacctgagcg agtccgcatc gaccggatcg gaaaacctct cgagaaaggc gtctaaccag	9720
	tcacagtgc aaggtaggct gagcaccgtg gcggcggca gcgggcggcg gtcggggttg	9780
	tttctggcgg aggtgctgct gatgatgtaa ttaaagtagg cggctctgag acggcggatg	9840

	gtcgacagaa gcacatgtc cttgggtccg gcctgctgaa tgcgcaggcg gtcggccatg	9900
	ccccaggctt cgttttgaca tcggcgcagg tctttgtagt agtcttgcat gagcctttct	9960
	accggcactt cttcttctcc ttctcttgt cctgcatctc ttgcatctat cgctgcggcg	10020
	gcggcggagt ttggccgtag gtggcgccct cttcctccca tgcgtgtgac cccgaagccc	10080
	ctcatcggt gaagcagggc taggtcggcg acaacgcgct cggctaatat ggcctgctgc	10140
	acctgcgtga gggtagactg gaagtcattc atgtccacaa agcgggtgga tgcgccgtg	10200
	ttgatggtgt aagtgcagtt ggccataacg gaccagttaa cggctctggtg acccggctgc	10260
	gagagctcgg tgtacctgag acgcgagtaa gccctcgagt caaatacgta gtcgttgcaa	10320
	gtccgcacca ggtactggta tcccacaaa aagtgcggcg gcggctggcg gtagaggggc	10380
	cagcgtaggg tggccggggc tccggggcg agatcttcca acataaggcg atgatatccg	10440
	tagatgtacc tggacatcca ggtgatgccg gcggcgggtg tggaggcgcg cggaaagtcg	10500
[0009]	cggacgcggt tccagatgtt gcgcagcggc aaaaagtgt ccatggtcgg gacgctctgg	10560
	ccggtcaggc gcgcgcaatc gttgacgctc tagaccgtgc aaaaggagag cctgtaagcg	10620
	ggcactcttc cgtggctctg tggataaatt cgcaagggtg tcatggcgga cgaccggggt	10680
	tcgagccccg tatccggccg tccgccgtga tccatgcggt taccgccgc gtgtcgaacc	10740
	caggtgtgcg acgtcagaca acgggggagt gctccttttg gcttccttcc aggcgcggcg	10800
	gctgctgcgc tagctttttt ggccactggc cgcgcgagc gtaagcggtt aggctggaaa	10860
	gcgaaagcat taagtggctc gctccctgta gccggagggt tattttccaa gggttgagtc	10920
	gcgggacccc cggttcgagt ctcgaccgg ccggactgcg gcgaacgggg gtttgctcc	10980
	ccgtcatgca agaccccgct tgcaaattcc tccggaaaca gggacgagcc cttttttgc	11040
	ttttccaga tgcattccgt gctgcggcag atgcgcccc ctcctcagca gcggcaagag	11100
	caagagcagc ggcagacatg cagggcaccc tcccctctc ctaccgcgtc aggagggcg	11160

	acatccgcgg ttgacgcggc agcagatggt gattacgaac ccccgcgcg ccgggcccg	11220
	cactacctgg acttgaggga gggcgagggc ctggcgcggc taggagcgcc ctctcctgag	11280
	cggtaaccaa ggggtgcagct gaagcgtgat acgcgtgagg cgtacgtgcc gcggcagaac	11340
	ctgtttcgcg accgcgaggg agaggagccc gaggagatgc gggatcgaac gttccacgca	11400
	gggcgcgagc tgcggcatgg cctgaatcgc gagcggttgc tgcgcgagga ggactttgag	11460
	cccgcgcgc gaaccgggat tagtcccgcg cgcgcacacg tggcggccgc cgacctggt	11520
	accgcatacg agcagacggt gaaccaggag attaaccttc aaaaaagctt taacaaccac	11580
	gtgcgtacgc ttgtggcgcg cgaggaggtg gctataggac tgatgcatct gtgggacttt	11640
	gtaagcgcgc tggagcaaaa cccaatagc aagccgctca tggcgcagct gttccttata	11700
	gtgcagcaca gcagggacaa cgaggcattc agggatgcgc tgctaaacat agtagagccc	11760
	gagggccgct ggctgctcga ttgataaac atcctgcaga gcatagtggg gcaggagcgc	11820
[0010]	agcttgagcc tggctgacaa ggtggccgcc atcaactatt ccatgcttag cctgggcaag	11880
	ttttacgccc gcaagatata ccatacccct tacgttccca tagacaagga ggtaaagatc	11940
	gaggggttct acatgcgcat ggcgctgaag gtgcttacct tgagcgacga cctgggcgtt	12000
	tatcgcaacg agcgcaccca caaggccgtg agcgtgagcc ggcggcgcga gctcagcgac	12060
	cgcgagctga tgcacagcct gcaaagggcc ctggctggca cgggcagcgg cgatagagag	12120
	gccgagtcct actttgacgc gggcgctgac ctgcgctggg cccaagccg acgcgccctg	12180
	gaggcagctg gggccggacc tgggctggcg gtggcaccgc cgcgcgctgg caacgtcggc	12240
	ggcgtggagg aatatgacga ggacgatgag tacgagccag aggacggcga gtactaagcg	12300
	gtgatgtttc tgatcagatg atgcaagacg caacggaccc ggcggtgcgg gcggcgctgc	12360
	agagccagcc gtccggcctt aactccacgg acgactggcg ccaggtcag gaccgcatca	12420
	tgtcgctgac tgcgcgcaat cctgacgcgt tccggcagca gccgcaggcc aaccggtct	12480

	ccgcaattct ggaagcgggtg gtcccggcgc gcgcaaacc cagcacgag aaggtgctgg	12540
	cgatcgtaaa cgcgctggcc gaaaacaggg ccatccggcc cgacgaggcc ggcctggtct	12600
	acgacgcgct gcttcagcgc gtggctcgtt acaacagcgg caacgtgcag accaacctgg	12660
	accggctggt gggggatgtg cgcgaggccg tggcgcagcg tgagcgcgcg cagcagcagg	12720
	gcaacctggg ctccatggtt gcactaaacg ctttcctgag tacacagccc gccaacgtgc	12780
	cgcggggaca ggaggactac accaactttg tgagcgcact gcggctaattg gtgactgaga	12840
	caccgcaaag tgagggtgtac cagtctgggc cagactatit tttccagacc agtagacaag	12900
	gcctgcagac cgtaaacctg agccaggctt tcaaaaactt gcaggggctg tggggggtgc	12960
	gggctccac aggcgaccgc gcgaccgtgt ctagcttgct gacgccaac tcgcgcctgt	13020
	tgctgctgct aatagcggcc ttcacggaca gtggcagcgt gtcccgggac acatacctag	13080
	gtcacttgct gacactgtac cgcgaggcca taggtcaggc gcatgtggac gagcatactt	13140
[0011]	tccaggagat tacaagtgtc agccgcgcgc tggggcagga ggacacgggc agcctggagg	13200
	caaccctaaa ctacctgtg accaaccggc ggcagaagat cccctcgttg cacagtttaa	13260
	acagcgagga ggagcgcatt ttgcgctacg tgcagcagag cgtgagcctt aacctgatgc	13320
	gcgacggggt aacgcccagc gtggcgctgg acatgaccgc gcgcaacatg gaaccgggca	13380
	tgatgcctc aaaccggccg tttatcaacc gcctaattga ctacttgcac cgcgcggccg	13440
	ccgtgaacc caggtatttc accaatgcca tcttgaacc gcactggcta ccgccccctg	13500
	gtttctacac cgggggattc gaggtgccc agggtaacga tggattcctc tgggacgaca	13560
	tagacgacag cgtgttttcc ccgcaaccgc agaccctgct agagttgcaa cagcgcgagc	13620
	aggcagaggc ggcgctgcga aaggaaagct tccgcaggcc aagcagcttg tccgatctag	13680
	gcgctgcggc cccgcggcca gatgctagta gccatttcc aagcttgata gggctcttta	13740
	ccagcactcg caccaccgc ccgcgcctgc tgggcgagga ggagtaccta aacaactcgc	13800

	tgctgcagcc gcagcgcgaa aaaaacctgc ctccggcatt tcccaacaac gggatagaga	13860
	gcctagtgga caagatgagt agatggaaga cgtacgcgca ggagcacagg gacgtgccag	13920
	gcccgcgccc gccaccctgt cgtcaaaggc acgacctca gcggggtctg gtgtgggagg	13980
	acgatgactc ggagacgac agcagcgtcc tggatttggg agggagtggc aacctgtttg	14040
	cgcaccttcg ccccaggctg gggagaatgt tttaaaaaa aaaaagcatg atgcaaaata	14100
	aaaaactcac caaggccatg gcaccgagcg ttggttttct tgtattcccc ttagtatgcg	14160
	gcgcgcggcg atgtatgagg aaggtcctcc tccctcctac gagagtgtgg tgagcgcggc	14220
	gccagtggcg gcggcgtgg gttctccctt cgatgctccc ctggaccgcg cgtttgtgcc	14280
	tccgcggtac ctgcggccta ccggggggag aaacagcatc cgttactctg agttggcacc	14340
	cctattcgac accaccgtg tgtacctggt ggacaacaag tcaacggatg tggcatccct	14400
	gaactaccag aacgaccaca gcaactttct gaccacggtc attcaaaaca atgactacag	14460
[0012]	cccgggggag gcaagcacac agaccatcaa tcttgacgac cggtcgcact ggggcggcga	14520
	cctgaaaacc atcctgcata ccaacatgcc aaatgtgaac gagttcatgt ttaccaataa	14580
	gtttaaggcg cgggtgatgg tgtcgcgctt gcctactaag gacaatcagg tggagctgaa	14640
	atacgagtgg gtggagttca cgctgcccga gggcaactac tccgagacca tgaccataga	14700
	ccttatgaac aacgcgatcg tggagcacta cttgaaagtg ggagacaga acggggttct	14760
	ggaaagcgac atcggggtaa agtttgacac ccgcaacttc agactggggt ttgacccgt	14820
	cactggtctt gtcatgcctg gggatatatac aaacgaagcc ttccatccag acatcatttt	14880
	gctgccagga tgcggggtgg acttcacca cagccgctg agcaacttgt tgggcatccg	14940
	caagcggcaa cccttccagg agggctttag gatcacctac gatgatctgg aggggtggtaa	15000
	cattcccga ctgttgatg tggacgccta ccaggcgagc ttgaaagatg acaccgaaca	15060
	gggcgggggt ggcgaggcg gcagcaacag cagtggcagc ggcgcggaag agaactcaa	15120

	cgcggcagcc gcggaatgc agccggtgga ggacatgaac gatcatgcca ttcgcgcgga	15180
	cacctttgcc acacgggctg aggagaagcg cgctgaggcc gaagcagcgg ccgaagctgc	15240
	cgccccgct gcgcaaccg aggtcgagaa gcctcagaag aaaccggtga tcaaaccctt	15300
	gacagaggac agcaagaaac gcagttacaa cctaataagc aatgacagca ccttcaccca	15360
	gtaccgcagc tggtagcttg catacaacta cggcgaccct cagaccggaa tccgctcatg	15420
	gacctgtctt tgcactcctg acgtaacctg cggctcggag caggtctact ggtcgttgcc	15480
	agacatgatg caagaccccg tgaccttcg ctccacgcgc cagatcagca actttccggt	15540
	ggtgggcgcc gagctgttg ccgtgcactc caagagcttc tacaacgacc aggccgtcta	15600
	ctcccaactc atccgccagt ttacctctct gaccacgtg ttcaatcgtt tccccagaa	15660
	ccagattttg gcgcgcccgc cagccccac catcaccacc gtcagtgaac acgttcctgc	15720
	tctcacagat cacgggacgc taccgctgcg caacagcatc ggaggagtcc agcagtgac	15780
[0013]	cattactgac gccagacgcc gcacctgcc ctacgtttac aaggccctgg gcatagtctc	15840
	gccgcgcgtc ctatcgagcc gcactttttg agcaagcatg tccatcctta tatcgcccag	15900
	caataacaca ggctggggcc tgcgttccc aagcaagatg ttggcgggg ccaagaagcg	15960
	ctccgaccaa caccagtgcc gcgtgcgcgg gactaccgc gcgccctggg gcgcgcacaa	16020
	acgcggccgc actgggcgca ccaccgtcga tgacgccatc gacgcggtgg tggaggaggc	16080
	gcgcaactac acgcccacgc cgccaccagt gtccacagtg gacgcggcca ttcagaccgt	16140
	ggtgcgcgga gcccggcgt atgctaaaat gaagagacgg cggaggcgcg tagcacgtcg	16200
	ccaccgccgc cgaccggca ctgccgcca acgcgcggcg gcggccctgc ttaaccgcgc	16260
	acgtcgcacc ggccgacggg cggccatgcg ggccgctcga aggttgcccg cgggtattgt	16320
	cactgtgccc ccaggtcca ggcgacgagc ggccgccgca gcagccgcgg ccattagtgc	16380
	tatgactcag ggtcgcagg gcaacgtgta ttgggtgcgc gactcggta gcggcctgcg	16440

	cgtgcccggtg cgcacccgcc ccccgcgcaa ctagattgca agaaaaaact acttagactc	16500
	gtactgttgt atgtatccag cggcggcggc gcgcaacgaa gctatgtcca agcgcaaaat	16560
	caaagaagag atgtccagg tcatcgcgcc ggagatctat ggccccccga agaaggaaga	16620
	gcaggattac aagccccgaa agctaaagcg ggtcaaaaag aaaaagaaag atgatgatga	16680
	tgaacttgac gacgaggtgg aactgctgca cgctaccgcg cccaggcgac gggtacagtg	16740
	gaaaggctga cgcgtaaaac gtgttttgcg acccggcacc accgtagtct ttacgcccgg	16800
	tgagcgctcc acccgcacct acaagcgct gtatgatgag gtgtacggcg acgaggacct	16860
	gcttgagcag gccaacgagc gcctcgggga gtttcctac ggaaagcggc ataaggacat	16920
	gctggcggtg ccgctggacg agggcaaccc aacacctagc ctaaagcccg taacactgca	16980
	gcagggtgtg cccgcgcttg caccgtccga agaaaagcgc ggcctaaagc gcgagtctgg	17040
	tgacttggca cccaccgtgc agctgatggt acccaagcgc cagcgactgg aagatgtctt	17100
[0014]	ggaaaaaatg accgtggaac ctgggctgga gcccaggtc cgcgtgcggc caatcaagca	17160
	gggtggcgcc ggactgggcg tgcagaccgt ggacgttcag ataccacta ccagtagcac	17220
	cagtattgcc accgccacag agggcatgga gacacaaacg tccccggtg cctcagcgtt	17280
	ggcggatgcc gcggtgcagg cggtcgctgc ggccgcgtcc aagacctcta cggaggtgca	17340
	aacggacccg tggatgtttc gcgtttcagc cccccggcgc ccgcgcggtt cgaggaagta	17400
	cggcgccgcc agcgcgtac tgcccgaata tgccctacat ccttccattg cgcctacccc	17460
	cggctatcgt ggctacacct accgccccag aagacgagca actaccgac gccgaaccac	17520
	cactggaacc cgccgccgcc gtgcgcgtcg ccagcccggtg ctggccccga tttccgtgcg	17580
	cagggtggct cgcgaaggag gcaggacct ggtgctgcca acagcgcgt accaccccag	17640
	catcgtttaa aagccggtct ttgtggttct tgcagatatg gccctacct gccgcctccg	17700
	tttcccggtg ccgggattcc gaggaagaat gcaccgtagg aggggcatgg ccggccacgg	17760

	cctgacgggc ggcatgcgtc gtgcgcacca ccggcggcgg cgcgcgtcgc accgtcgcgt	17820
	gcgcggcggt atcctgcccc tccttattcc actgatcgcc gcggcgattg gcgccgtgcc	17880
	cggaattgca tccgtggcct tgcaggcgca gagacactga ttaaaaacaa gttgcatgtg	17940
	gaaaaatcaa aataaaaagt ctggactctc acgctcgctt ggtcctgtaa ctattttgta	18000
	gaatggaaga catcaacttt gcgtctctgg ccccgcgaca cggctcgcgc ccgttcattg	18060
	gaaactggca agatatcggc accagcaata tgagcgggtg cgccttcagc tggggctcgc	18120
	tgtggagcgg cattaaaaat ttcggttcca ccgttaagaa ctatggcagc aaggcctgga	18180
	acagcagcac aggccagatg ctgagggata agttgaaaga gcaaaatttc caacaaaagg	18240
	tggtagatgg cctggcctct ggcattagcg gggtagtgga cctggccaac caggcagtgc	18300
	aaaataagat taacagtaag ctgatcccc gccctcccgt agaggagcct ccaccggccg	18360
	tggagacagt gtctccagag gggcgtggcg aaaagcgtcc gcgccccgac agggaagaaa	18420
[0015]	ctctggtgac gcaaatagac gagcctccct cgtacgagga ggcactaaag caaggcctgc	18480
	ccaccacccg tccatcgcg cccatggcta ccggagtgtt gggccagcac acaccgtaa	18540
	cgttgacact gcctcccccc gccgacaccc agcagaaacc tgtgctgcca ggcccagccg	18600
	ccgttgttgt aaccgctcct agccgcgcgt ccctgcgccg cgccgccagc ggtccgcgat	18660
	cgttgccgcc cgtagccagt ggcaactggc aaagcacact gaacagcatc gtgggtctgg	18720
	gggtgcaatc cctgaagcgc cgacgatgtt tctgaatagc taacgtgtcg tatgtgtgtc	18780
	atgtatgcgt ccatgtcgcc gccagaggag ctgtgagcc gccgcgcgcc cgctttccaa	18840
	gatggctacc ccttcgatga tgccgcagtg gtcttacatg cacatctcgg gccaggacgc	18900
	ctcggagtac ctgagccccg ggctgggtgca gtttccccgc gccaccgaga cgtacttcag	18960
	cctgaataac aagtttagaa accccacggt ggcgctacg cacgacgtga ccacagaccg	19020
	gtcccagcgt ttgacgtgc ggttcattccc tgtggaccgt gaggatactg cgtactcgta	19080

	caaggcgagg ttcaccctag ctgtgggtga taaccgtgtg ctggacatgg ctccacgta	19140
	ctttgacatc cgcggcgtgc tggacagggg ccctactttt aagccctact ctggcactgc	19200
	ctacaacgcc ctggctccca aggggtgcccc aaatccttgc gaatgggatg aagctgctac	19260
	tgctcttgaa ataaacctag aagaagagga cgatgacaac gaagacgaag tagacgagca	19320
	agctgagcag caaaaaactc acgtatttgg gcaggcgccct tattctggta taaatattac	19380
	aaaggagggt attcaaatag gtgtcgaagg tcaaacacct aaatatgccg ataaaacatt	19440
	tcaacctgaa cctcaaatag gagaatctca gtggtacgaa actgaaatta atcatgcagc	19500
	tgggagagtc cttaaaaaga ctacccaat gaaaccatgt tacggttcat atgcaaaacc	19560
	cacaaatgaa aatggagggc aaggcattct tgtaaagcaa caaatggaa agctagaaag	19620
	tcaagtggaa atgcaatfff tctcaactac tgaggcgacc gcaggcaatg gtgataactt	19680
	gactcctaaa gtggtattgt acagtgaaga tgtagatata gaaacccag acactcatat	19740
[0016]	ttcttacatg cccactatta aggaaggtaa ctcacgagaa ctaatgggcc aacaatctat	19800
	gcccacagg cctaattaca ttgcttttag ggacaatfff attggtctaa tgtattacaa	19860
	cagcacgggt aatatgggtg ttctggcggg ccaagcatcg cagttgaatg ctgttgtaga	19920
	tttgcaagac agaaacacag agctttcata ccagcttttg cttgattcca ttggtgatag	19980
	aaccaggtag ttttctatgt ggaatcaggc tgitgacagc tatgatccag atgttagaat	20040
	tattgaaaat catggaactg aagatgaact tccaaattac tgctttccac tgggaggtgt	20100
	gattaataca gagactctta ccaaggtaaa acctaaaaca ggtaggaaa atggatggga	20160
	aaaagatgct acagaatfff cagataaaaa tgaaataaga gttggaaata attttgcct	20220
	ggaaatcaat ctaaatgcca acctgtggag aaatttctg tactccaaca tagcgctgta	20280
	ttgcccagac aagctaaagt acagtccttc caacgtaaaa atttctgata acccaaacac	20340
	ctacgactac atgaacaagc gagtggtggc tcccgggtta gtggactgct acattaacct	20400

	tggagcacgc tggtccttg actatatgga caacgtcaac ccatttaacc accaccgcaa	20460
	tgtgtggcctg cgctaccgct caatgttgct gggcaatggt cgctatgtgc cctccacat	20520
	ccaggtgcct cagaagtctt ttgccattaa aaacctcctt ctctgccgg gctcatacac	20580
	ctacgagtgg aacttcagga aggatgttaa catggttctg cagagctccc taggaaatga	20640
	cctaagggtt gacggagcca gcattaagtt tgatagcatt tgcctttacg ccaccttctt	20700
	ccccatggcc cacaacaccg cctccacgct tgaggccatg cttagaaacg acaccaacga	20760
	ccagtccttt aacgactatc tctccgccgc caacatgctc taccctatac ccgccaacgc	20820
	taccaacgtg cccatatcca tcccctcccg caactgggcg gctttccgcg gctgggcctt	20880
	cacgcgcctt aagactaagg aaaccccatc actgggctcg ggctacgacc ctatttacac	20940
	ctactctggc tctataccct acctagatgg aaccttttac ctcaaccaca cctttaagaa	21000
	ggtggccatt acctttgact cttctgtcag ctggcctggc aatgaccgcc tgcttacctc	21060
[0017]	caacgagttt gaaattaagc gctcagttga cggggagggt tacaacgttg ccagtgtaa	21120
	catgaccaa gactgggtcc tggtaacaat gctagctaac tacaacattg gctaccaggg	21180
	cttctatata ccagagagct acaaggaccg catgtactcc ttctttagaa acttccagcc	21240
	catgagccgt cagggtgtgg atgatactaa atacaaggac taccaacagg tgggcatcct	21300
	acaccaacac aacaactctg gatttggtgg ctaccttgcc ccacatgc gcgaaggaca	21360
	ggcctaccct gctaacttc cctatccgct tataggcaag accgcagttg acagcattac	21420
	ccagaaaaag tttctttgcg atcgaccct ttggcgcac ccattctcca gtaactttat	21480
	gtccatgggc gcactcacag acctgggcca aaaccttctc tacgccaact ccgccacgc	21540
	gctagacatg acttttgagg tggatcccat ggacgagccc acccttcttt atgttttgtt	21600
	tgaagtcttt gacgtgggtc gtgtgcaccg gccgcaccgc ggcgtcatcg aaaccgtgta	21660
	cctgcgcacg cccttctcgg ccggcaacgc cacaacataa agaagcaagc aacatcaaca	21720

	acagctgccg ccatgggctc cagtgcgcag gaactgaaag ccattgtcaa agatcttggg	21780
	tgtgggcat attttttggg cacctatgac aagcgctttc caggctttgt ttctccacac	21840
	aagctcgcct gcgcatagt caatacggcc ggtcgcgaga ctgggggcgt acactggatg	21900
	gcctttgcct ggaaccgca ctcaaaaaca tgctacctct ttgagccctt tggcttttct	21960
	gaccagcgac tcaagcaggt ttaccagttt gactacaggt cactcctgcg ccgtagcgcc	22020
	attgcttctt ccccgaccg ctgtataacg ctggaaaagt ccacccaaag cgtacagggg	22080
	cccaactcgg cgcctgtgg actattctgc tgcatgtttc tccacgcctt tgccaactgg	22140
	ccccaaactc ccatggatca caaccccacc atgaacctta ttaccggggt acccaactcc	22200
	atgctcaaca gtccccaggt acagcccacc ctgcgtcgca accaggaaca gctctacagc	22260
	ttcctggagc gccactcgc ctacttccgc agccacagtg cgcagattag gagcgccact	22320
	tctttttgtc acttgaaaaa catgtaaaaa taatgtacta gagacacttt caataaaggc	22380
[0018]	aaatgctttt atttgtacac tctcgggtga ttatttacc ccacccttgc cgtctgcgcc	22440
	gtttaaaaat caaaggggtt ctgccgcgca tcgctatgcg cactggcag ggacacgttg	22500
	cgatactggt gtttagtgct ccacttaaac tcaggcaciaa ccatccgcgg cagctcggtg	22560
	aagttttcac tccacaggt gcgcaccatc accaacgcgt ttagcaggtc gggcgccgat	22620
	atcttgaagt cgcagttggg gcctccgccc tgcgcgcgcg agttgcgata cacagggttg	22680
	cagcactgga acactatcag cgccgggtgg tgcacgctgg ccagcacgct cttgtcggag	22740
	atcagatccg cgtccaggtc ctccgcgttg ctgaggcga acggagtcaa ctttggtagc	22800
	tgctttccca aaaagggcgc gtgcccaggc tttgagttgc actcgcaccg tagtggcatc	22860
	aaaaggtgac cgtgcccgtt ctgggcgtta ggatacagcg cctgcataaa agccttgatc	22920
	tgcttaaaag ccactgagc ctttgcgcct tcagagaaga acatgccgca agacttgccg	22980
	gaaaactgat tggccggaca ggccgcgtcg tgcacgcagc accttgctc ggtgttgag	23040

	atctgcacca catttcggcc ccaccggttc ttcacgatct tggccttgct agactgctcc	23100
	ttcagcgcgc gctgcccgtt ttcgctcgtc acatccattt caatcacgtg ctccttattt	23160
	atcataatgc ttccgtgtag acacttaagc tcgccttcga tctcagcgca gcggtgcagc	23220
	cacaacgcgc agcccgtggg ctcgatgatc ttgtaggtca cctctgcaa cgactgcagg	23280
	tacgcctgca ggaatcgccc catcatcgtc acaaaggtct tgttgctggt gaaggtcagc	23340
	tgcaaccgcg ggtgctcctc gtacagccag gtcttgcata cggccgccag agcttccact	23400
	tggtcaggca gtagtttgaa gttcgccttt agatcgttat ccacgtggta ctgtccatc	23460
	agcgcgcgcg cagcctccat gcccttctcc cagcagaca cgatcggcac actcagcggg	23520
	ttcatcaccg taatttcaact ttccgcttcg ctgggctctt cctcttctc ttgcgtccgc	23580
	ataccacgcg ccactgggtc gtcttcattc agccgccgca ctgtgcgctt acctccttg	23640
	ccatgcttga ttagcaccgg tgggttgctg aaaccaccca tttgtagcgc cacatcttct	23700
[0019]	ctttcttctc cgctgtccac gattacctct ggtgatggcg ggcgctcggg cttgggagaa	23760
	gggcgcttct ttttcttctt gggcgcaatg gccaaatccg ccgccgaggt cgatggccgc	23820
	gggctgggtg tgcgcggcac cagcgcgtct tgtgatgagt cttcctcgtc ctcggactcg	23880
	atacgccgcc tcatccgctt ttttgggggc gcccggggag gcggcggcga cggggacggg	23940
	gacgacacgt cctccatggt tgggggacgt cgcgccgcac cgcgtcccg ctcgggggtg	24000
	gtttcgcgt gctcctcttc ccgactggcc atttcttct cctataggca gaaaaagatc	24060
	atggagtcag tcgagaagaa ggacagccta accgccccct ctgagttcgc caccaccgcc	24120
	tccaccgatg ccgccaacgc gcctaccacc ttccccgtcg aggcaccccc gcttgaggag	24180
	gaggaagtga ttatcgagca ggaccaggt tttgtaagcg aagacgacga ggaccgctca	24240
	gtaccaacag aggataaaaa gcaagaccag gacaacgcag aggcaaacga ggaacaagtc	24300
	gggcgggggg acgaaaggca tggcgactac ctagatgtgg gagacgacgt gctgttgaag	24360

	catctgcagc gccagtgcgc cattatctgc gacgcgttgc aagagcgag cgatgtgccc	24420
	ctcgccatag cggatgtcag ccttgcctac gaacgccacc tattctcacc gcgcgtaccc	24480
	cccaaagcc aagaaaacgg cacatgcgag cccaaccgc gcctcaactt ctaccccgta	24540
	tttgccgtgc cagaggtgct tgccacctat cacatctttt tccaaaactg caagataccc	24600
	ctatcctgcc gtgccaaccg cagccgagcg gacaagcagc tggccttgcg gcagggcgct	24660
	gtcatacctg atatcgctc gctcaacgaa gtgccaataa tctttgaggg tcttgagcg	24720
	gacgagaagc gcgcggcaaa cgctctgcaa caggaaaaca gcgaaatga aagtcactct	24780
	ggagtgttgg tggaactcga gggtgacaac gcgcgcctag ccgtactaaa acgcagcatc	24840
	gaggtcacc actttgccta ccgggcactt aacctacccc ccaaggtcat gagcacagtc	24900
	atgagtgagc tgatcgtgcg ccgtgcgcag cccctggaga gggatgcaaa ttgcaagaa	24960
	caaacagagg agggcctacc cgcagttggc gacgagcagc tagcgcgctg gcttcaaagc	25020
[0020]	cgcgagcctg ccgacttga ggagcgacgc aaactaatga tggccgcagt gctcgttacc	25080
	gtggagcttg agtgcattga gcggttcttt gctgaccgag agatgcagcg caagctagag	25140
	gaaacattgc actacacctt tcgacagggc tacgtacgcc aggcctgcaa gatctccaac	25200
	gtggagctct gcaacctggt ctctacctt ggaattttgc acgaaaaccg ccttgggcaa	25260
	aacgtgcttc attccacgt caagggcgag gcgcgccgcg actacgtccg cgactgcgtt	25320
	tacttatttc tatgtacac ctggcagac gccatggcg tttggcagca gtgcttgag	25380
	gagtgaacc tcaaggagct gcagaaactg ctaaagcaaa acttgaagga cctatggacg	25440
	gccttcaacg agcgtccgt ggccgcgcac ctggcggaca tcattttccc cgaacgcctg	25500
	cttaaaaccc tgcaacaggg tctgccagac ttcaccagtc aaagcatgtt gcagaacttt	25560
	aggaacttta tcctagagcg ctcaggaatc ttgcccgcga cctgctgtgc acttcctagc	25620
	gactttgtgc ccattaagta ccgcgaatgc cctccgccgc tttggggcca ctgctacctt	25680

	ctgcagctag ccaactacct tgcctaccac tctgacataa tggaagacgt gagcggtagc	25740
	ggctctactgg agtgtcactg tcgctgcaac ctatgcaccc cgcaccgctc cctggtttgc	25800
	aattcgagc tgcttaacga aagtcaaatt atcggtagct ttgagctgca gggtcctcg	25860
	cctgacgaaa agtccgcggc tccggggttg aaactcactc cggggctgtg gacgtcggct	25920
	taccttcgca aatttgtacc tgaggactac cagccacg agattaggtt ctacgaagac	25980
	caatcccgcc cgccaaatgc ggagcttacc gcctgcgtca ttaccaggg ccacattctt	26040
	ggccaattgc aagccatcaa caaagccgc caagagtttc tgctacgaaa gggacggggg	26100
	gtttacttgg acccccagtc cggcgaggag ctcaacccaa tcccccgcc gccgcagccc	26160
	tatcagcagc agcccgggc ccttgcttcc caggatggca cccaaaaga agctgcagct	26220
	gccgccgcca cccacggacg aggaggaata ctgggacagt caggcagagg aggttttggg	26280
	cgaggaggag gaggacatga tggaagactg ggagagccta gacgaggaag ctcccgaggt	26340
[0021]	cgaagaggtg tcagacgaaa caccgtcacc ctcggtcgca ttccctcgc cggcgcccca	26400
	gaaatcggca accggttcca gcatggctac aacctccgt cctcaggcgc gcccggcact	26460
	gcccgttcgc cgaccaacc gtagatggga caccactgga accagggccg gtaagtcaa	26520
	gcagccgccg ccgttagccc aagagcaaca acagcgcaa ggctaccgt catggcgcg	26580
	gcacaagaac gccatagttg ctgtcttga agactgtggg ggcaacatct ccttcgccc	26640
	ccgctttctt ctctaccatc acggcgtggc ctccccctg aacatcctgc attactaccg	26700
	tcatctctac agccatact gcaccggcgg cagcggcagc ggagcaaca gcagcgcca	26760
	cacagaagca aaggcgaccg gatagcaaga ctctgacaaa gcccaagaaa tccacagcg	26820
	cggcagcagc aggaggagga gcgtgcgtc tggcgcccaa cgaaccgta tcgaccgcg	26880
	agcttagaaa caggattttt cccactctgt atgctatatt tcaacagagc aggggccaag	26940
	aacaagagct gaaaataaaa aacaggtctc tgcgacccct caccgcagc tgctgtatc	27000

	acaaaagcga agatcagctt cggcgcacgc tggaagacgc ggaggctctc ttcagtaa	27060
	actgcgcgct gactcttaag gactagtttc gcgccctttc tcaaatttaa gcgcgaaaac	27120
	tacgtcatct ccagcggcca caccggcgcc cagcacctgt cgtcagcgcc attatgagca	27180
	aggaaattcc cacgccctac atgtggagtt accagccaca aatgggactt gcggctggag	27240
	ctgcccaga ctactcaacc cgaataaact acatgagcgc gggacccac atgatatccc	27300
	gggtcaacgg aatccgcgcc caccgaaacc gaattctctt ggaacaggcg gctattacca	27360
	ccacacctcg taataacctt aatccccgta gttggccgc tgccctggtg taccaggaaa	27420
	gtcccgtcc caccactgtg gtacttccca gagacgcca ggccgaagt cagatgacta	27480
	actcaggggc gcagcttgcg ggcggcttgc gtcacagggt gcggtcgccc gggcagggt	27540
	taactcacct gacaatcaga gggcgaggta ttcagctcaa cgacgagtcg gtgagctcct	27600
	cgcttggtct cgcgccggac gggacatttc agatcggcgg cgccggccgt ccttcattca	27660
[0022]	cgctcgtca ggcaatccta actctgcaga cctcgtctc tgagccgcgc tctggaggca	27720
	ttggaactct gcaatttatt gaggagtttg tgccatcggt ctactttaac cccttctcgg	27780
	gacctccgg ccactatccg gatcaattta ttcctaactt tgacgcggt aaggactcgg	27840
	cggacggcta cgactgaatg ttaagtggag aggagagca actgcgcctg aaacacctg	27900
	tccactgtcg ccgccacaag tgctttgccc gcgactccgg tgagttttgc tactttgaat	27960
	tgcccagga tcatacgag gggccggcgc acggcgccg gcttaccgc caggagagc	28020
	ttgcccgtag cctgattcgg gagtttacc agcggcccct gctagttgag cgggacagg	28080
	gacctgtgt tctcactgtg atttgcaact gtcctaact tggattacat caagatctt	28140
	gttgccatct ctgtgctgag tataataaat acagaaatta aaatatactg gggctcctat	28200
	cgccatcctg taaacgccac cgtcttcacc cgccaagca aaccaaggcg aaccttacct	28260
	ggtactttta acatctctcc ctctgtgatt tacaacagtt tcaaccaga cggagtgagt	28320

	ctacgagaga acctctccga gtcagctac tccatcagaa aaaacaccac cctccttacc	28380
	tgccgggaac gtacgagtgc gtcaccggcc gctgcaccac acctaccgcc tgaccgtaaa	28440
	ccagactttt tccggacaga cctcaataac tctgtttacc agaacaggag gtgagcttag	28500
	aaaaccctta ggggtattagg ccaaaggcgc agctactgtg gggtttatga acaattcaag	28560
	caactctacg ggctattcta attcaggttt ctctagaatc ggggttgggg ttattctctg	28620
	tcttgtgatt ctctttattc ttatactaac gcttctctgc ctaaggctcg ccgcctgctg	28680
	tgtgcacatt tgcatttatt gtcagctttt taaacgctgg ggtcgccacc caagatgatt	28740
	aggtacataa tcctaggttt actcaccctt gcgtcagccc acggtaccac ccaaagggtg	28800
	gattttaagg agccagcctg taatgttaca ttgcgactg aagctaata gaagcaccact	28860
	cttataaaat gcaccacaga acatgaaaag ctgcttattc gccacaaaa caaaattggc	28920
	aagtatgctg tttatgctat ttggcagcca ggtgacacta cagagtataa tgttacagtt	28980
[0023]	ttccagggtg aaagtcataa aacttttatg tatacttttc cattttatga aatgtgcgac	29040
	attaccatgt acatgagcaa acagtataag ttgtggcccc cacaaaattg tgtggaaaac	29100
	actggcactt tctgtgcac tgctatgcta attacagtgc tcgctttggt ctgtacccta	29160
	ctctatatta aatacaaaag cagacgcagc tttattgagg aaaagaaaat gccttaattt	29220
	actaagttac aaagctaatg tcaccactaa ctgctttact cgctgcttgc aaaacaaatt	29280
	caaaaagtta gcattataat tagaatagga tttaaaccac ccggtcattt cctgctcaat	29340
	accattcccc tgaacaattg actctatgtg ggatatgctc cagcgctaca acctgaagt	29400
	caggcttcct ggatgtcagc atctgacttt ggccagcacc tgtcccggg atttgttcca	29460
	gtccaactac agcgaccac cctaacagag atgaccaaca caaccaacgc ggccgcccgt	29520
	accggactta catctaccac aaatacacc caagtttctg cctttgtcaa taactgggat	29580
	aacttgggca tgtggtggtt ctccatagcg cttatgtttg tatgccttat tattatgtgg	29640

	ctcatctgct gcctaaagcg caaacgcgcc cgaccacca tctatagtc catcattgtg	29700
	ctacacccaa acaatgatgg aatccataga ttggacggac tgaaacacat gttcttttct	29760
	cttacagtat gattaaatga gacatgattc ctcgagtttt tatattactg acccttggtg	29820
	cgcttttttg tgcgtgctcc acattggctg cggtttctca catcgaagta gactgcattc	29880
	cagccttcac agtctatttg ctttacggat ttgtcacct cagctcatc tgcagcctca	29940
	tcactgtggt catgccttt atccagtga ttgactgggt ctgtgtgcgc ttgcatatc	30000
	tcagacacca tccccagtac agggacagga ctatagctga gcttcttaga attctttaat	30060
	tatgaaattt actgtgactt ttctgctgat tattgcacc ctatctgcgt ttgtttcccc	30120
	gacctccaag cctcaaagac atatatcatg cagattcact cgtatatgga atattccaag	30180
	ttgctacaat gaaaaaagcg atctttccga agcctgggta tatgcaatca tctctgttat	30240
[0024]	gggtttctgc agtaccatct tagccctagc tataatatccc taccttgaca ttggctggaa	30300
	acgaatagat gccatgaacc acccaacttt ccccgcgccc gctatgcttc cactgcaaca	30360
	agttgttgcc ggcggctttg tcccagccaa tcagcctcgc ccacttctc ccacccccac	30420
	tgaaatcagc tactttaatc taacaggagg agatgactga caccctagat ctagaaatgg	30480
	acggaattat tacagagcag cgcctgctag aaagacgcag ggagcggcc gagcaacagc	30540
	gcatgaatca agagctccaa gacatgggta acttgacca gtgcaaaagg ggtatctttt	30600
	gtctggtaaa gcaggccaaa gtcacctacg acagtaatac caccggacac cgccttagct	30660
	acaagttgcc aaccaagcgt cagaaattgg tggatcatggt gggagaaaag ccattacca	30720
	taactcagca ctcggtagaa accgaaggct gcattcactc acctgtcaa ggacctgagg	30780
	atctctgcac ccttattaag accctgtgcg gtctcaaaga tcttatccc tttaactaat	30840
	aaaaaaaaat aataaagcat cacttactta aaatcagtta gcaaatttct gtccagtta	30900
	ttcagcagca cctccttgcc ctctcccag ctctgggtatt gcagcttctt cctggctgca	30960

	aactttctcc acaatctaaa tggaatgtca gtttcctcct gttcctgtcc atccgcaccc	31020
	actatcttca tgttgttgca gatgaagcgc gcaagaccgt ctgaagatac cttcaacccc	31080
	gtgtatccat atgacacgga aaccggctcct ccaactgtgc cttttcttac tcctcccttt	31140
	gtatccccca atgggtttca agagagtccc cctggggtag tctctttgcg cctatccgaa	31200
	cctctagtta cctccaatgg catgcttgcg ctcaaatgg gcaacggcct ctctctggac	31260
	gaggccggca accttacctc ccaaatgta accactgtga gccacacctt caaaaaaac	31320
	aagtcaaaca taaacctgga aatatctgca cccctcacag ttacctcaga agccctaact	31380
	gtggctgccg cgcacacctt aatggctcgc ggcaacacac tcaccatgca atcacaggcc	31440
	ccgctaaccg tgcacgactc caaacttagc attgccaccc aaggaccctt cacagtgtca	31500
	gaaggaaagc tagccctgca aacatcaggc cccctcacca ccaccgatag cagtaccctt	31560
	actatcactg cctcaccccc tctaactact gccactggta gcttgggcat tgacttgaaa	31620
[0025]	gagcccattt atacacaaaa tggaaaacta ggactaaagt acggggctcc ttgcatgta	31680
	acagacgacc taaacacttt gaccgtagca actggtccag gtgtgactat taataatact	31740
	tccttgcaaa ctaaagttac tggagccttg ggttttgatt cacaaggcaa tatgcaactt	31800
	aatgtagcag gaggactaag gattgattct caaacagac gccttatact tgatgttagt	31860
	tatccgtttg atgctcaaaa ccaactaaat ctaagactag gacagggccc tctttttata	31920
	aactcagccc acaacttgga tattaaactac aacaaaggcc tttacttgtt tacagcttca	31980
	aacaattcca aaaagcttga ggtaaaccta agcactgcc aagggttgat gtttgacgct	32040
	acagccatag ccattaatgc aggagatggg ctggaatttg gttcacctaa tgcaccaaac	32100
	acaaatcccc tcaaaacaaa aattggccat ggcctagaat ttgattcaaa caaggctatg	32160
	gttcctaaac taggaactgg ccttagtttt gacagcacag gtgccattac agtaggaaac	32220
	aaaaataatg ataagctaac ttgttgacc acaccagctc catctcctaa ctgtagacta	32280

	aatgcagaga aagatgctaa actcactttg gtcttaacaa aatgtggcag tcaaatactt	32340
	gctacagttt cagttttggc tgttaaaggc agtttggtc caatatctgg aacagttcaa	32400
	agtgtcatc ttattataag atttgacgaa aatggagtgc tactaaacaa ttccttcctg	32460
	gaccagaat attggaactt tagaaatgga gatcttactg aaggcacagc ctatacaaac	32520
	gctgttgat ttatgcctaa cctatcagct tatccaaaat ctcacggtaa aactgccaaa	32580
	agtaacattg tcagtcaagt ttacttaaac ggagacaaaa ctaaacctgt aacactaacc	32640
	attacactaa acggtacaca ggaaacagga gacacaactc caagtgcata ctctatgtca	32700
	ttttcatggg actggtctgg ccacaactac attaataaaa tatttgccac atcctcttac	32760
	actttttcat acattgccca agaataaaga atcgtttgtg ttatgtttca acgtgtttat	32820
	ttttcaattg cagaaaattt caagtcattt ttcattcagt agtatagccc caccaccaca	32880
	tagcttatac agatcacctg accttaatca aactcacaga accctagtat tcaacctgcc	32940
[0026]	acctccctcc caacacacag agtacacagt cttttctccc cggtggcct taaaaagcat	33000
	catatcatgg gtaacagaca tattcttagg tgttatattc cacacggttt cctgtcgagc	33060
	caaacgctca tcagtgatat taataaactc cccgggcagc tcaactaagt tcatgtcgct	33120
	gtccagctgc tgagccacag gctgctgtcc aacttgcggt tgcttaacgg gcggcgaagg	33180
	agaagtccac gcctacatgg gggtagagtc ataatcgtgc atcaggatag ggcggtggtg	33240
	ctgcagcagc gcgcgaataa actgctgccg ccgccgctcc gtcctgcagg aataacaat	33300
	ggcagtggtc tcctcagcga tgattcgac cgcccgagc ataaggcgcc ttgtcctccg	33360
	ggcacagcag cgcaccctga tctcacttaa atcagcacag taactgcagc acagcaccac	33420
	aatattgttc aaaatccac agtgcaaggc gctgtatcca aagctcatgg cggggaccac	33480
	agaaccacg tggccatcat accacaagcg caggtagatt aagtggcgac cctcataaa	33540
	cacgtggac ataaacatta cctcttttgg catgttgtaa ttcaccacct cccgtacca	33600

	tataaacctc tgattaaaca tggcgccatc caccaccatc ctaaaccagc tggccaaaac	33660
	ctgcccgcg gctatacact gcagggaacc gggactggaa caatgacagt ggagagccca	33720
	ggactcgtaa ccatggatca tcatgctcgt catgatatca atgttggcac aacacaggca	33780
	cacgtgcata cacttcctca ggattacaag ctctcccgc gttagaacca tatcccagg	33840
	aacaacccat tcctgaatca gcgtaaatcc cactatgcag ggaagacctc gcacgtaact	33900
	cacgttgtgc attgtcaaag tgttacattc gggcagcagc ggatgatcct ccagtatgt	33960
	agcgcgggtt tctgtctcaa aaggaggtag acgatcccta ctgtacggag tgcgccgaga	34020
	caaccgagat cgtgttggtc gtagtgtcat gccaaatgga acgccggacg tagtcatatt	34080
	tcctgaagca aaaccagggtg cgggcgtgac aaacagatct gcgtctccgg tctcgccgt	34140
	tagatcgctc tgtgtagtag ttgtagtata tccactctct caaagcatcc aggcgcccc	34200
	tggcttcggg ttctatgtaa actccttcac gcgccgtgc cctgataaca tccaccaccg	34260
[0027]	cagaataagc cacaccagc caacctacac attcgttctg cgagtcacac acgggaggag	34320
	cgggaagagc tggaagaacc atgtttttt tttattcca aaagattatc caaacctca	34380
	aatgaagat ctattaagt aacgcgtcc cctccggtg cgtggcaca ctctacagc	34440
	aaagaacaga taatggcatt tgtaagatg tgcacaatgg ctccaaaag gcaaacggc	34500
	ctcacgtcca agtggacgta aaggctaac cttcagggt gaatctctc tataaacatt	34560
	ccagcacctt caaccatgcc caaataattc tcatctgcc accttctca tatatctcta	34620
	agcaaatccc gaatattaag tccggccatt gtaaaaatct gctccagagc gccctccacc	34680
	ttcagcctca agcagcgaat catgattgca aaaattcagg ttcctcacag acctgtataa	34740
	gattcaaaag cggaacatta acaaaaatac cgcgatcccg taggtccctt cgcagggcca	34800
	gctgaacata atcgtgcagg tctgcacgga ccagcgcggc cacttccccg ccaggaacca	34860
	tgacaaaaga acccacactg attatgacac gcatactcgg agctatgcta accagcgtag	34920

	ccccgatgta agcttgttgc atgggcggcg atataaaatg caaggtgctg ctcaaaaaat	34980
	caggcaaagc ctgcgcaaa aaagaaagca catcgtagtc atgctcatgc agataaaggc	35040
	aggtaagctc cggaaccacc acagaaaaag acaccatitt tctctcaaac atgtctgcgg	35100
	gtttctgcat aaacacaaaa taaaataaca aaaaaacatt taaacattag aagcctgtct	35160
	tacaacagga aaaacaaccc ttataagcat aagacggact acggccatgc cggcgtgacc	35220
	gtaaaaaac tggtcaccgt gattaaaaag caccaccgac agtcctcgg tcatgtccgg	35280
	agtcataatg taagactcgg taaacacatc aggttgattc acatcggta gtgctaaaaa	35340
	gcgaccgaaa tagcccgagg gaatacatc cgcagggcgt agagacaaca ttacagcccc	35400
	cataggaggt ataacaaaat taataggaga gaaaaacaca taaacacctg aaaaaccctc	35460
	ctgcctaggc aaaatagcac cctcccgctc cagaacaaca tacagcgctt ccacagcggc	35520
[0028]	agccataaca gtcagcctta ccagtaaaaa agaaaaccta ttaaaaaaac accactcgac	35580
	acggcaccag ctcaatcagt cacagtgtaa aaaagggcca agtgcagagc gagtatatat	35640
	aggactaaaa aatgacgtaa cggttaaagt ccacaaaaaa caccagaaa accgcacgcg	35700
	aacctacgcc cagaaacgaa agccaaaaaa ccacaactt cctcaaatcg tcacttccgt	35760
	tttcccacgt tacgtaactt ccatttttaa gaaaactaca attccaaca catacaagtt	35820
	actccgcctt aaaacctacg tcacccgccc cgttcccacg ccccgcgcca cgtcacaaac	35880
	tccaccccct 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
	<210> 5	
	<211> 10	
	<212> DNA	
[0029]	<213> 腺病毒 5 型	
	<400> 5	
	taataaaaaa	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 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

atctgacctc gtcgacatgg ctccctaccc ctgtggctgc cacatcctgc tgctgtcttt 60

ctgtgcctg gcggtgccc gggccagctc ctacgtgcac ctgcggccgg cgcgaccac 120

aagcccaccc gccacagcc accgcgactt ccagccggtg ctccacctgg ttgcgtcaa	180
cagccccctg tcaggcggca tgcggggcat ccgcggggcc gacttccagt gttccagca	240
ggcgcggggc 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 cctcggccac gggccaggcc tctcgtctgc tggggggcag	600
gctcctgggg cagagtgcgc cgagctgcca tcacgcctac atcgtgctct gcattgagaa	660
cagcttcatg actgcctcca agtagctcga gtcaccaggc g	701

[0041]

<210> 10

<211> 738

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 10

atgttctttt ctcttacagt atgattaaat gagacatggc tccctacccc tgtggctgcc	60
acatcctgct gctgctcttc tgctgcctgg cggctgcccg ggccagctcc tacgtgcacc	120
tgcggccggc gcgaccaca agcccaccg cccacagcca ccgcgacttc cagccggtgc	180
tccacctggt tgcgtcaac agccccctgt caggcggcat gcggggcatc cgcggggccg	240
acttccagtg cttccagcag gcgcggggccg tggggctggc gggcaccttc cgcgccttcc	300
tgctcctcgc cctgcaggac ctgtacagca tcgtgcgccg tgccgaccgc gcagccgtgc	360
ccatcgtcaa cctcaaggac gagctgctgt ttcccagctg ggaggctctg ttctcaggct	420

<400> 11

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

[0043] Asp Ile Leu Glu Cys Glu 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 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

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

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 55 60

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
65 70 75 80

Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn
85 90 95

Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala
100 105 110

Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe
115 120 125

[0051]

Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu
130 135 140

Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu
145 150 155 160

Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr
165 170 175

Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala
180 185 190

Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro
195 200 205

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 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
 atcagggtcaa ggaaaagtgt atctctcaga gtgcaagact gggaatggaa agaactacag 120
 agggacgatg tccaaaacaa aaaatggcat cacctgtcaa aaatggagtt ccacttctcc 180
 ccacagacct agattctcac ctgctacaca cccctcagag ggactggagg agaactactg 240
 caggaatcca gacaacgac cgcaggggcc ctggtgctat actactgac cagaaaagag 300
 atatgactac tgcgacattc ttgagtgtga agaggaatgt atgcattgca gtggagaaaa 360
 ctatgacggc aaaatttcca agaccatgtc tggactggaa tgccaggcct gggactctca 420
 gagccacac gctcatggat acattccttc caaatttcca aacaagaacc tgaagaagaa 480

	ttactgtcgt aaccccgata gggagctgcg gccttgggtgt ttcaccaccg accccaacaa	540
	gcgctgggaa ctttgtgaca tcccccgctg cacaacacct ccaccatctt ctgggtccac	600
	ctaccagtgt ctgaagggaa cagggtgaaaa ctatcgcggg aatgtggctg ttaccgtgtc	660
	cgggcacacc tgtcagcact ggagtgcaca gaccctcac acacataaca ggacaccaga	720
	aaacttcccc tgcaaaaatt tggatgaaaa ctactgccgc aatcctgacg gaaaaagggc	780
	cccatgggtgc catacaacca acagccaagt gcggtgggag tactgtaaga taccgtcctg	840
	tgactcctcc ccagtatcca cggaacaatt ggctcccaca gcaccacctg agctaacccc	900
	tgtgggtccag gactgctacc atgggtgatg acagagctac cgaggcacat cctccaccac	960
	caccacagga aagaagtgtc agtcttggtc atctatgaca ccacaccggc accagaagac	1020
	cccagaaaac tacccaaatg ctggcctgac aatgaactac tgcaggaatc cagatgccga	1080
	taaaggcccc tgggtgttta ccacagaccc cagcgtcagg tgggagtact gcaacctgaa	1140
[0054]	aaaatgctca ggaacagaag cgagtgttgt agcacctccg cctgttgtcc tgcttccaga	1200
	tgtagagact ccttccgaag aagactgtat gtttgggaat gggaaaggat accgaggcaa	1260
	gagggcgacc actgttactg ggacgccatg ccaggactgg gctgcccagg agccccatag	1320
	acacagcatt ttactccag agacaaatcc acgggcgggt ctggaaaaaa attactgccg	1380
	taacctgat ggtgatgtag gtggtccctg 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 gaaaagtgtg tctctcagag tgcaagactg	120
	ggaatggaaa gaactacaga gggacgatgt ccaaaacaaa aaatggcatc acctgtcaaa	180
	aatggagttc cacttctccc cacagaccta gattctcacc tgctacacac ccctcagagg	240
	gactggagga gaactactgc aggaatccag acaacgatcc gcaggggccc tgggtctata	300
	ctactgatcc agaaaagaga tatgactact gcgacattct tgagtgtgaa gaggaatgta	360
	tgcatcgcag tggagaaaac tatgacggca aaatttccaa gaccatgtct ggactggaat	420
	gccaggcctg ggactctcag agcccacacg ctcatggata cattccttcc aaatttccaa	480
	acaagaacct gaagaagaat tactgtcgtg accccgatag ggagctgcgg ccttgggtgtt	540
	tcaccaccga cccaacaag cgctgggaac tttgtgacat ccccgctgc acaacacctc	600
	caccatcttc tgggtcccacc taccagtgtc tgaagggaac aggtgaaaac tatcgcgga	660
[0055]	atgtggctgt taccgtgtcc gggcacacct gtcagcactg gagtgcacag acccctcaca	720
	cacataacag gacaccagaa aacttcccct gcaaaaattt ggatgaaaac tactgccgca	780
	atcctgacgg aaaaagggcc ccatgggtgcc atacaaccaa cagccaagtg cgggtgggagt	840
	actgtaagat accgtcctgt gactcctccc cagtatccac ggaacaattg gctcccacag	900
	caccacctga gctaaccctt gtgggtccagg actgctacca tggatgatga cagagctacc	960
	gaggcacatc ctccaccacc accacaggaa agaagtgtca gtcttggta tctatgacac	1020
	cacaccgca ccagaagacc ccagaaaact acccaaatgc tggcctgaca atgaactact	1080
	gcaggaatcc agatgccgat aaaggcccct ggtgttttac cacagacccc agcgtcaggt	1140
	gggagtactg caacctgaaa aaatgctcag gaacagaagc gagtgttgta gcacctccgc	1200
	ctgttgtcct gcttcagat gtagagactc ctccgaaga agactgtatg tttgggaatg	1260
	ggaaaggata ccgaggcaag agggcgacca ctgttactgg gacgcatgc caggactggg	1320

	ctgcccagga gccccataga cacagcatTT tcactccaga gacaaatcca cgggcgggtc	1380
	tggaaaaaaa ttactgccgt aacctgatg gtgatgtagg tggTccctgg tgctacacga	1440
	caaatccaag atagggtctc aaagatctta ttccctttaa ctaataaa	1488
	<210> 20	
	<211> 553	
	<212> DNA	
	<213> 脑心肌炎病毒	
	<400> 20	
	taacgttact ggccgaagcc gcttTgaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt	60
	ttccaccata ttgccgtctt ttggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc ctgtcttctt	120
	gacgagcatt cctaggggtc ttTcccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt	180
	cgTgaaggaa gcagttcctc tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct	240
[0056]	ttgcaggcag cggaaccccc cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt	300
	ataagataca cctgcaaagg cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagtTgt	360
	ggaaagagtc aaatggctct cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgccagaa	420
	ggtaccccat tgtatgggat ctgatctggg gcctcggtgc acatgcttta catgtgttta	480
	gtcgaggtta aaaaacgtct agggcccccg aaccacgggg acgtggTTTT cctttgaaaa	540
	acacgatgat aat	553
	<210> 21	
	<211> 2673	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 21	
	atctgacctc gtcgacatgg ctccctaccc ctgtggctgc cacatcctgc tgctgtctct	60

	ctgtctgcctg gcggtgccc gggccagctc ctacgtgcac ctgcggccgg cgcgaccac	120
	aagcccaccc gccacagcc accgcgactt ccagccggtg ctccacctgg ttgcgtcaa	180
	cagccccctg tcaggcggca tgcggggcat ccgcggggcc gacttccagt gcttccagca	240
	ggcgcgggcc gtggggctgg cgggcacatt 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 cctcggccac gggccaggcc tcctcgtgc tggggggcag	600
	gctcctgggg cagagtgccg cgagctgcca tcacgcctac atcgtgctct gcattgagaa	660
	cagcttcatg actgcctcca agtagtaacg ttactggccg aagccgcttg gaataaggcc	720
[0057]	ggtgtgcgtt tgtctatatg ttatittcca ccatattgcc gtcttttggc aatgtgaggg	780
	cccggaaacc tggccctgtc ttcttgacga gcattcctag gggctcttcc cctctcgcca	840
	aaggaatgca aggtctgttg aatgtcgtga aggaagcagt tcctctggaa gcttcttgaa	900
	gacaaacaac gtctgtagcg accctttgca ggcagcggaa ccccccacct ggcgacaggt	960
	gcctctgcgg ccaaaagcca cgtgtataag atacacctgc aaaggcggca caacccaggt	1020
	gccacgttgt gagttggata gttgtggaaa gagtcaaatg gctctcctca agcgtattca	1080
	acaaggggct gaaggatgcc cagaaggtag ccattgtat gggatctgat ctggggcctc	1140
	ggtgcacatg ctttacatgt gtttagtcga ggttaaaaaa cgtctaggcc cccgaacca	1200
	cggggacgtg gttttccttt gaaaaacacg atgataatat ggaacataag gaagtggttc	1260
	ttctacttct tttatttctg aaatcaggtc aaggaaaagt gtatctctca gagtgaaga	1320
	ctgggaatgg aaagaactac agagggacga tgtccaaaac aaaaaatggc atcacctgtc	1380

	aaaaatggag ttccacttct cccacagac ctagattctc acctgctaca caccctcag	1440
	agggactgga ggagaactac tgcaggaatc cagacaacga tccgcagggg ccctggtgct	1500
	atactactga tccagaaaag agatatgact actgcgacat tcttgagtgt gaagaggaat	1560
	gtatgcattg cagtggagaa aactatgacg gcaaaatttc caagaccatg tctggactgg	1620
	aatgccaggc ctgggactct cagagccac acgctcatgg atacattcct tccaaatttc	1680
	caaacaagaa cctgaagaag aattactgtc gtaaccccg tagggagctg cggccttggt	1740
	gtttcaccac cgacccaac aagcgtggg aactttgtga catccccgc tgcacaacac	1800
	ctccaccatc ttctggtecc acctaccagt gtctgaaggg aacaggtgaa aactatcgcg	1860
	ggaatgtggc tgttaccgtg tccgggcaca cctgtcagca ctggagtga cagaccctc	1920
	acacacataa caggacacca gaaaacttc cctgcaaaaa ttggatgaa aactactgcc	1980
	gcaatcctga cggaaaaagg gcccctggg gccatacaac caacagcaa gtgcgggtggg	2040
[0058]	agtactgtaa gataccgtcc tgtgactcct cccagtatc cacggaaca ttggtccca	2100
	cagcaccacc tgagctaacc cctgtgttcc aggactgcta ccatggtgat ggacagagct	2160
	accgaggcac atcctccacc accaccacag gaaagaagtg tcagtcttgg tcatctatga	2220
	caccacaccg gcaccagaag accccagaaa actaccaaa tgctggcctg acaatgaact	2280
	actgcaggaa tccagatgcc gataaaggcc cctggtgttt taccacagac cccagcgtca	2340
	ggtgggagta ctgcaacctg aaaaaatgct caggaacaga agcgagtgtt gtagcacctc	2400
	cgctgttgt cctgcttcca gatgtagaga ctccttccga agaagactgt atgtttggga	2460
	atgggaaagg ataccgaggc aagagggcga cactgttac tgggacgcca tgccaggact	2520
	gggtgcca ggagcccat agacacagca ttttactcc agagacaaat ccacgggcgg	2580
	gtctggaaaa aaattactgc cgtaaccctg atggtgatgt aggtggtccc tgggtctaca	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	
	atcttggtta 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	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	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	

	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 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 Gly 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 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 tgetgctgtt 60

gctgctctcc tgccgccttg tgccctgccag cgcttatgtg cacctgccgc cagcccgccc 120

caccctctca ctgtctcata ctcatcagga ctttcagcca gtgtccacc tgggtggcact 180

gaacaccccc ctgtctggag gcatgcgtgg tatccgtgga gcagatttcc agtgcctcca 240

gcaagcccga gccgtggggc tgctggggcac cttccgggct ttctgtcct ctaggetgca 300

ggatctctat agcatcgtgc gccgtgctga ccgggggtct gtgcccatcg tcaacctgaa 360

ggacgaggtg ctatctccca gctgggactc cctgttttct ggctcccagg gtcaactgca 420

accgggggcc cgcacgtttt cttttgacgg cagagatgtc ctgagacacc cagcctggcc 480
gcagaagagc gtatggcacg gctcggaccc cagtgggcgg aggctgatgg agagttactg 540
tgagacatgg cgaactgaaa ctactggggc tacaggtcag gcctcctccc tgctgtcagg 600
caggctcctg gaacagaaag ctgcgagctg ccacaacagc tacatcgtcc tgtgcattga 660
gaatagcttc atgacctctt tctccaaata gctcgagtca ccaggcgc 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 5 10 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 40 45

Cys Leu Ala Lys Cys Glu Gly Glu Thr Asp Phe Val Cys Arg Ser Phe
50 55 60

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

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

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

	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

atctgacctc gtcgacatgg accacaagga agtaatcctt ctgtttctct tgcttctgaa	60
accaggacaa gggaagagag tgtatctgtc agaatgtaag accggcatcg gcaacggcta	120
cagaggaaca atgtccagga caaagagtgg tgttgcctgt caaaagtggg gtgccacgtt	180
ccccacgta cccaactact ctcccagtac acatcccaat gagggactag aagaaaatta	240
ctgtaggaac ccagacaatg atgaacaagg gccttgggtgc tacactacag atccggacaa	300
gagatatgac tactgcaaca ttccctgaatg tgaagaagaa tgcatgtact gcagtggcga	360
[0076] aaagtatgag gggaaaaatct ccaagaccat gtctggactt gactgccagg cctgggattc	420
tcagagccca catgctcatg gatacatccc tgccaaattc ccaagcaaga acctgaagat	480
gaattattgc cgcaaccctg acggggagcc aaggccctgg tgcttcacaa cagaccccac	540
caaacgctgg gaatactgtg acatcccccg ctgcacaaca cccccgccc caccagccc	600
aacctaccaa tgtctgaaag gaagaggtga aaattaccga gggaccgtgt ctgtcaccgt	660
gtctgggaaa acctgtcagc gctggagtga gcaaaccct cataggcaca acaggacacc	720
agaaaatttc ccctgcaaaa atctggagga gaattactgc cggaaccgg atggagaaac	780
tgctccctgg tgctatacca ctgacagcca gctgaggtgg gactactgtg agattccatc	840
ctgcgagtcc tcagcatcac cagaccagtc agattcctca gttccaccag aggagcaaac	900
acctgtggtc caggaatgct accagagcga tgggcagagc tatcgggta catcgtccac	960
taccatcaca gggaagaagt gccagtcctg ggcagctatg tttccacata ggcattcgaa	1020

gacgccagag aacttcccag atgctggctt ggagatgaac tattgcagga acccggatgg	1080
tgacaagggc ccttgggtgt acaccactga cccgagcgtc aggtgggaat actgcaacct	1140
gaagcgggtgc tcagagacag gagggagtgt tgtggaattg cccacagttt cccaggaacc	1200
aagtgggccc agcgactctg agacagactg catgtatggg aatggcaaag actaccgggg	1260
caaaacggcc gtcactgcag ctggcacccc ttgccaagga tgggctgccc aggagcccca	1320
caggcacagc atcttcaccc cacagacaaa cccacgggca ggtctggaaa agaattattg	1380
ccgaaacccc gatggggatg tgaatgttcc ttgggtctat 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

atctgacctc gtcgacatgg ctcccagacc cagcagacgc ctctgcctgc tgctgctgtt	60
gctgctctcc tgccgccttg tgccctgccag cgcttatgtg cacctgccgc cagccccccc	120
caccctctca cttgtctata ctcatcagga ctttcagcca gtgtccacc tggtagcact	180
gaacaccccc ctgtctggag gcatgcgtgg tatccgtgga gcagatttcc agtgcttcca	240
gcaagcccga gccgtggggc tgcggggcac cttccgggct ttctgtctct ctaggctgca	300
ggatctctat agcatcgtgc gccgtgctga ccgggggtct gtgcccatcg tcaacctgaa	360
ggacgagggtg ctatctccca gctgggactc cctgttttct ggctcccagg gtcaactgca	420
acccggggcc cgcacttttt cttttgacgg cagagatgtc ctgagacacc cagcctggcc	480
gcagaagagc gtatggcacg gctcggaccc cagtgggcgg aggctgatgg agagttactg	540

	tgagacatgg cgaactgaaa ctactggggc tacaggtcag gcctcctccc tgcgtgcagg	600
	caggctcctg gaacagaaag ctgcgagctg ccacaacagc tacatcgccc tgtgcattga	660
	gaatagcttc atgacctctt tctccaaata gtaacgttac tggccgaagc cgcttggaat	720
	aaggccggtg tgcgtttgtc tatatgttat tttccaccat attgccgtct tttggcaatg	780
	tgagggcccg gaaacctggc cctgtcttct tgacgagcat tcctaggggt ctttcccctc	840
	tcgccaaagg aatgcaaggt ctgttgaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt	900
	cttgaagaca aacaacgtct gtagcgaccc ttgcaggca gcggaacccc ccacctggcg	960
	acaggtgcct ctgcggccaa aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaac	1020
	cccagtgcc agtttgtgagt tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tcctcaagcg	1080
	tattcaacaa ggggctgaag gatgccaga aggtacccca ttgtatggga tctgatctgg	1140
	ggcctcgggt cacatgcttt acatgtgttt agtcgaggtt aaaaaacgtc taggcccccc	1200
[0078]	gaaccacggg gacgtgggtt tcctttgaaa aacacgatga taatatggac cacaaggaag	1260
	taatccttct gtttctcttg cttctgaaac caggacaagg gaagagagtg tatctgtcag	1320
	aatgtaagac cggcatcggc aacggctaca gaggaacaat gtccaggaca aagagtgggt	1380
	ttgcctgtca aaagtgggt gccacgttcc ccacgtacc caactactct ccagttacac	1440
	atcccaatga gggactagaa gaaaattact gtaggaaccc agacaatgat gaacaagggc	1500
	cttgggtgta cactacagat ccggacaaga gatatgacta ctgcaacatt cctgaatgtg	1560
	aagaagaatg catgtactgc agtggcgaaa agtatgaggg gaaaatctcc aagaccatgt	1620
	ctggacttga ctgccaggcc tgggattctc agagcccaca tgctcatgga tacatccctg	1680
	ccaaattccc aagcaagaac ctgaagatga attattgccg caaccctgac ggggagccaa	1740
	ggccctggtg cttcacaaca gacccacca aacgtggga atactgtgac atccccgct	1800
	gcacaacacc cccgccccca ccagcccaa cctaccaatg tctgaaagga agaggtgaaa	1860

	attaccgagg gaccgtgtct gtcaccgtgt ctgggaaaac ctgtcagcgc tggagtgagc	1920
	aaaccctca taggcacaac aggacaccag aaaatttccc ctgcaaaaat ctggaggaga	1980
	attactgccg gaaccggat ggagaaactg ctccctgggtg ctataccact gacagccagc	2040
	tgaggtggga gtactgtgag attccatcct gcgagtcttc agcatcacca gaccagtcag	2100
	attcctcagt tccaccagag gagcaaacac ctgtgggtcca ggaatgctac cagagcgatg	2160
	ggcagagcta tcgggttaca tcgtccacta ccatcacagg gaagaagtgc cagtccctggg	2220
	cagctatgtt tccacatagg cattcgaaga cgccagagaa cttcccagat gctggcttgg	2280
	agatgaacta ttgcaggaac ccggatgggtg acaagggcc tgggtgctac accactgacc	2340
	cgagcgtcag gtgggaatac tgcaacctga agcgggtgctc agagacagga gggagtgttg	2400
	tggaattgcc cacagtttcc caggaaccaa gtgggccgag cgactctgag acagactgca	2460
[0079]	tgtatgggaa tggcaaagac taccggggca aaacggccgt cactgcagct ggcaccctt	2520
	gccaaggatg ggctgcccag gagccccaca ggcacagcat cttacccca cagacaaacc	2580
	cacgggcagg tctggaaaag aattattgcc gaaaccccg tggggatgtg aatggtcctt	2640
	ggtgctatac aacaaaccct agatgatagc 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

agtgcccg

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	
	tgccctaa	8
	<210> 34	
	<211> 11	
	<212> DNA	
	<213> 腺病毒 5 型	
	<400> 34	
	taaaaaaaaa t	11

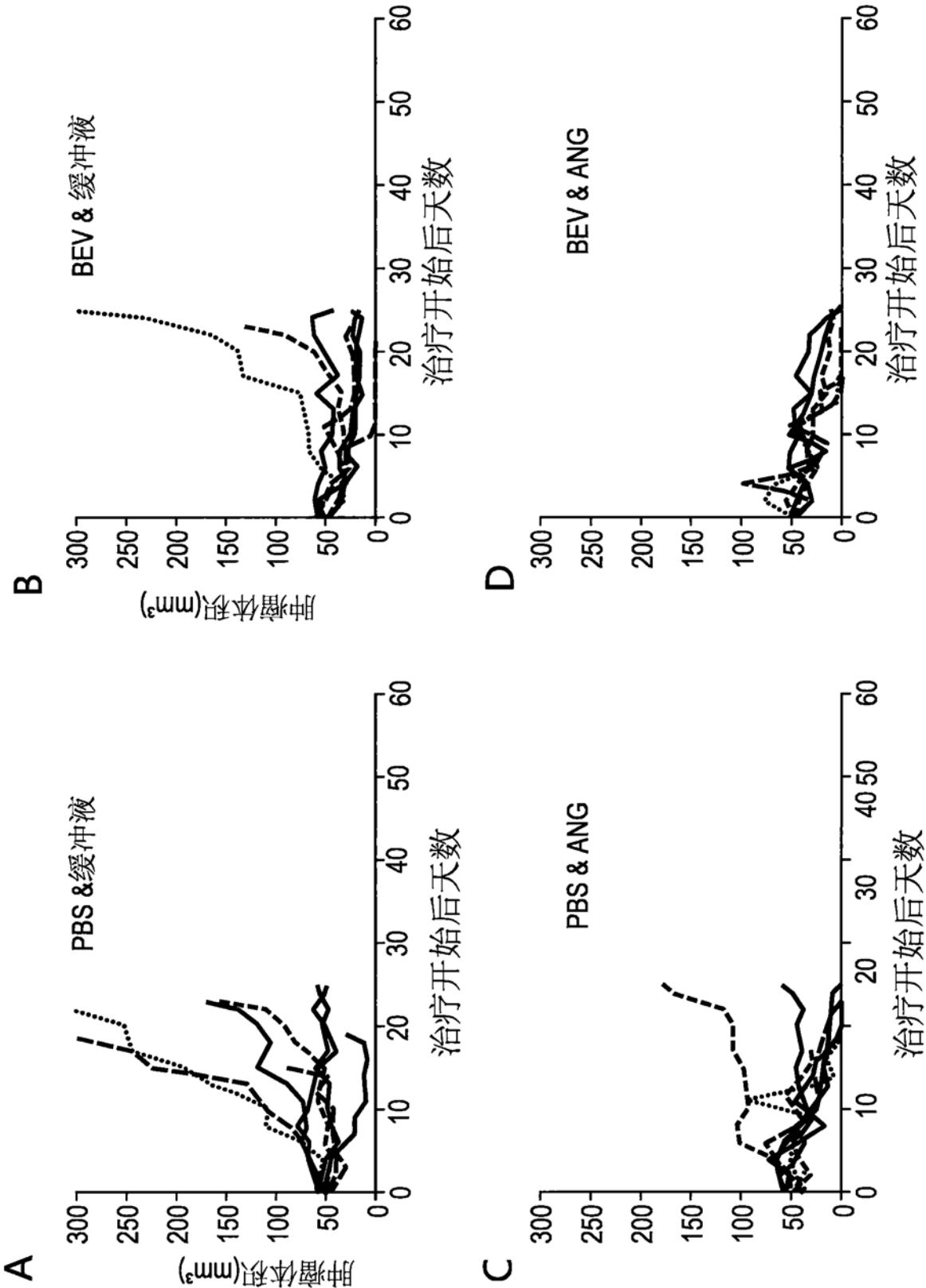


图1

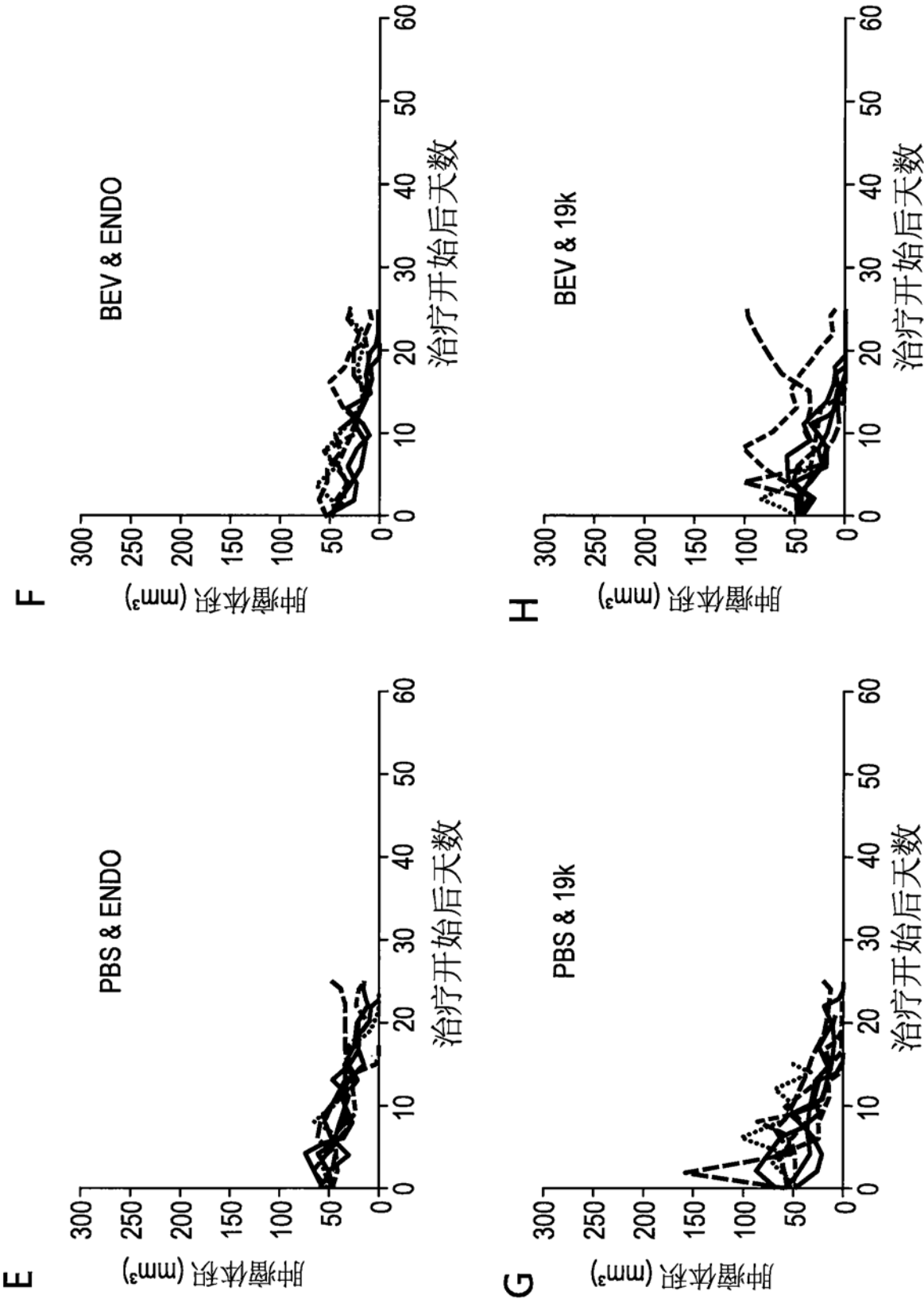


图1 (续)

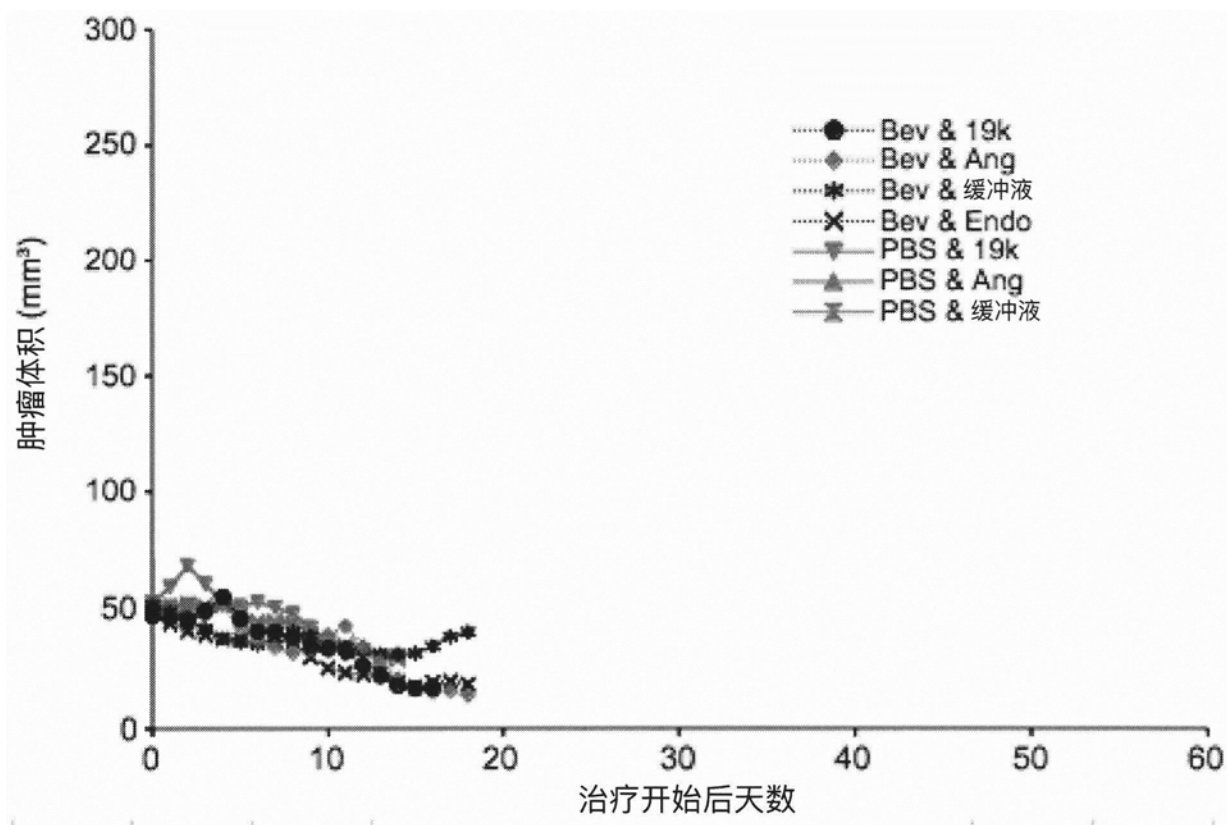


图2

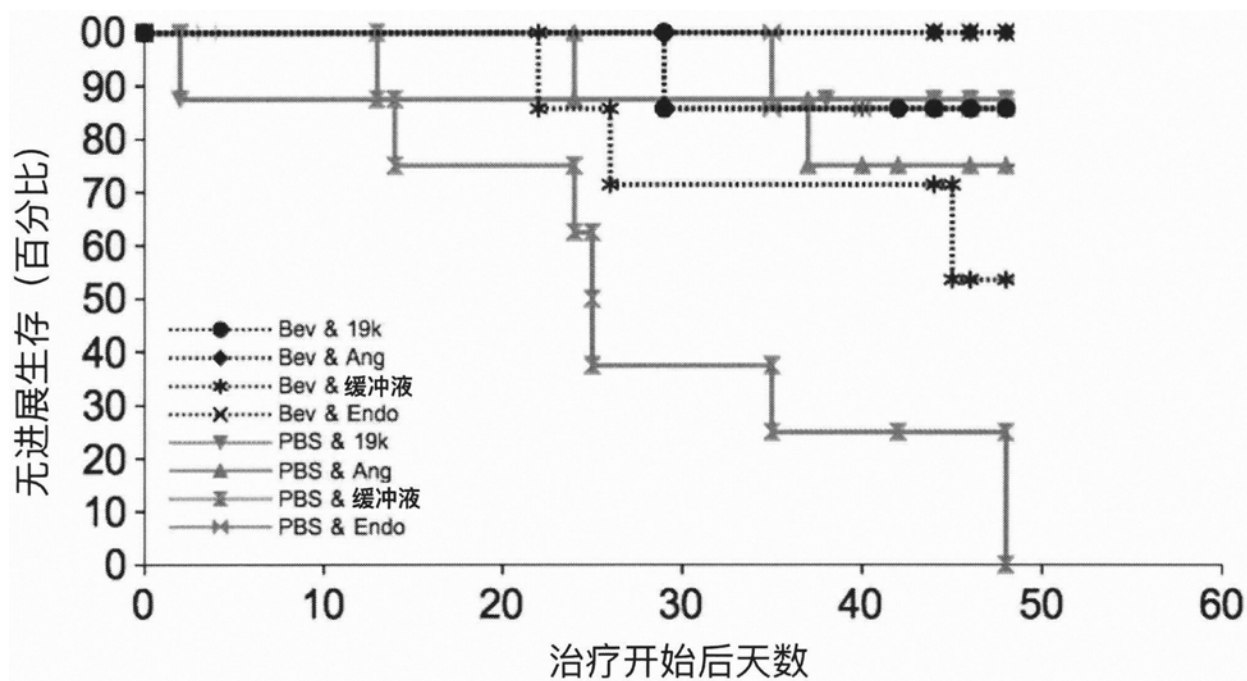


图3

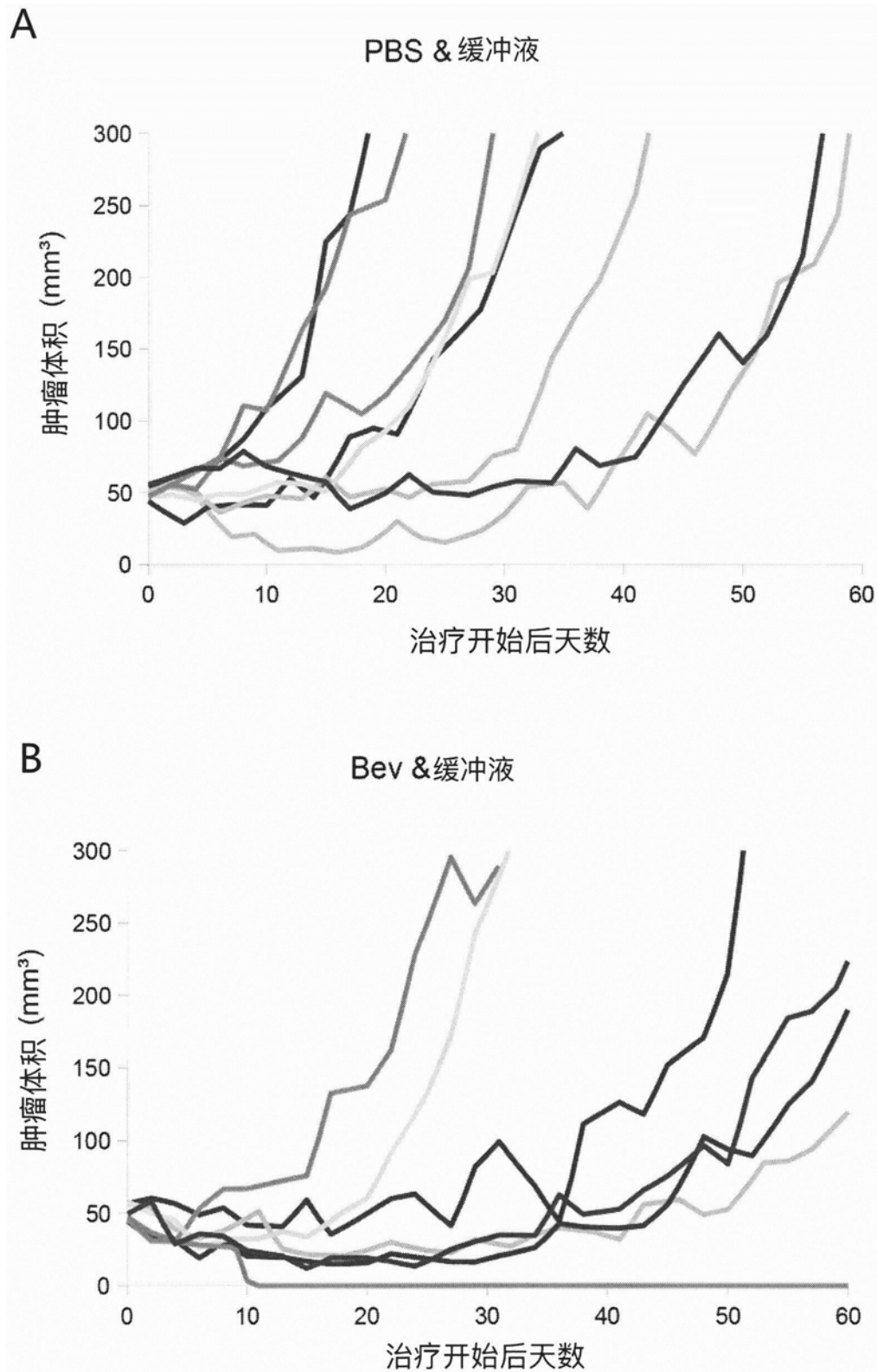


图4

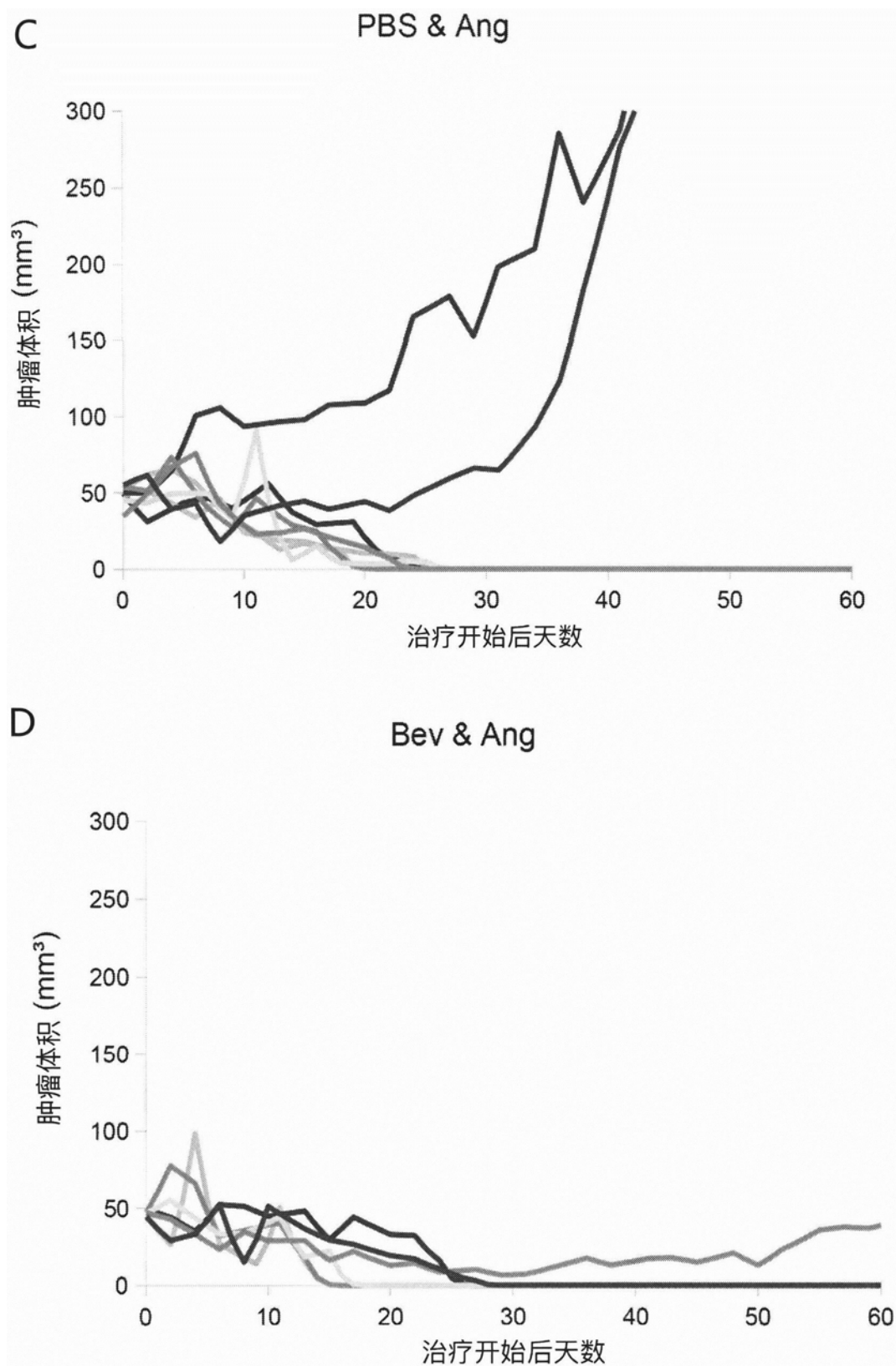


图4(续)

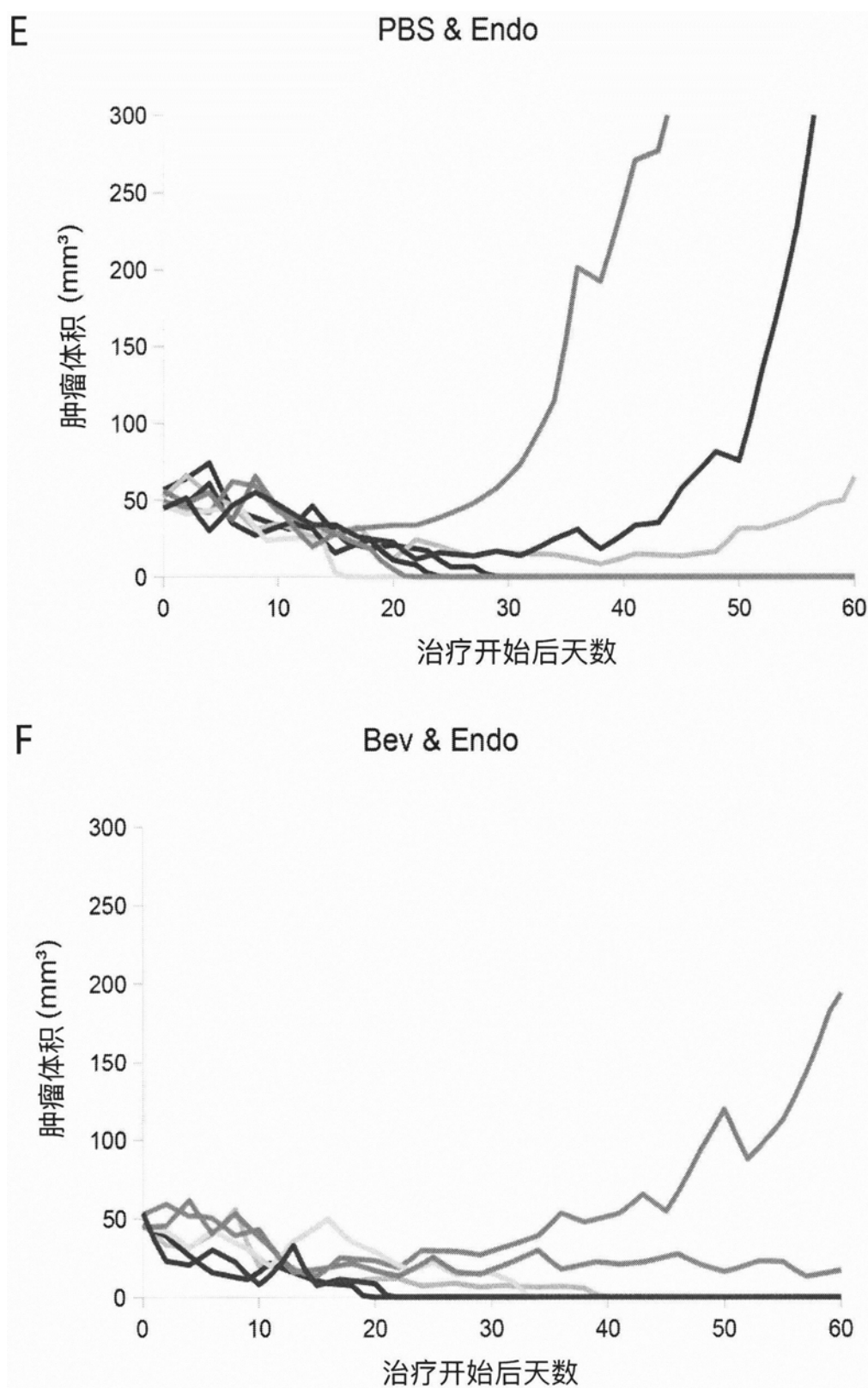


图4(续)

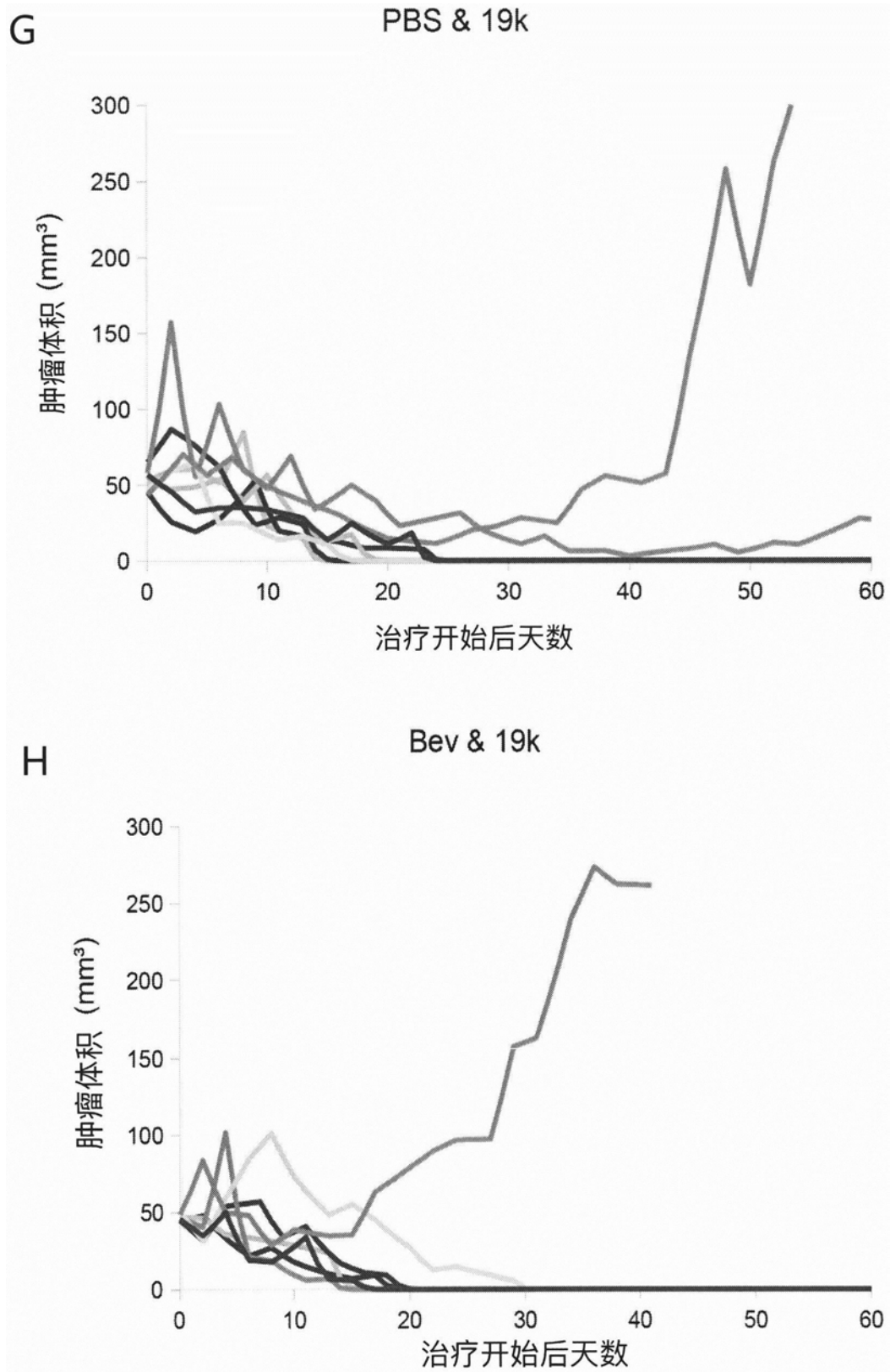


图4(续)

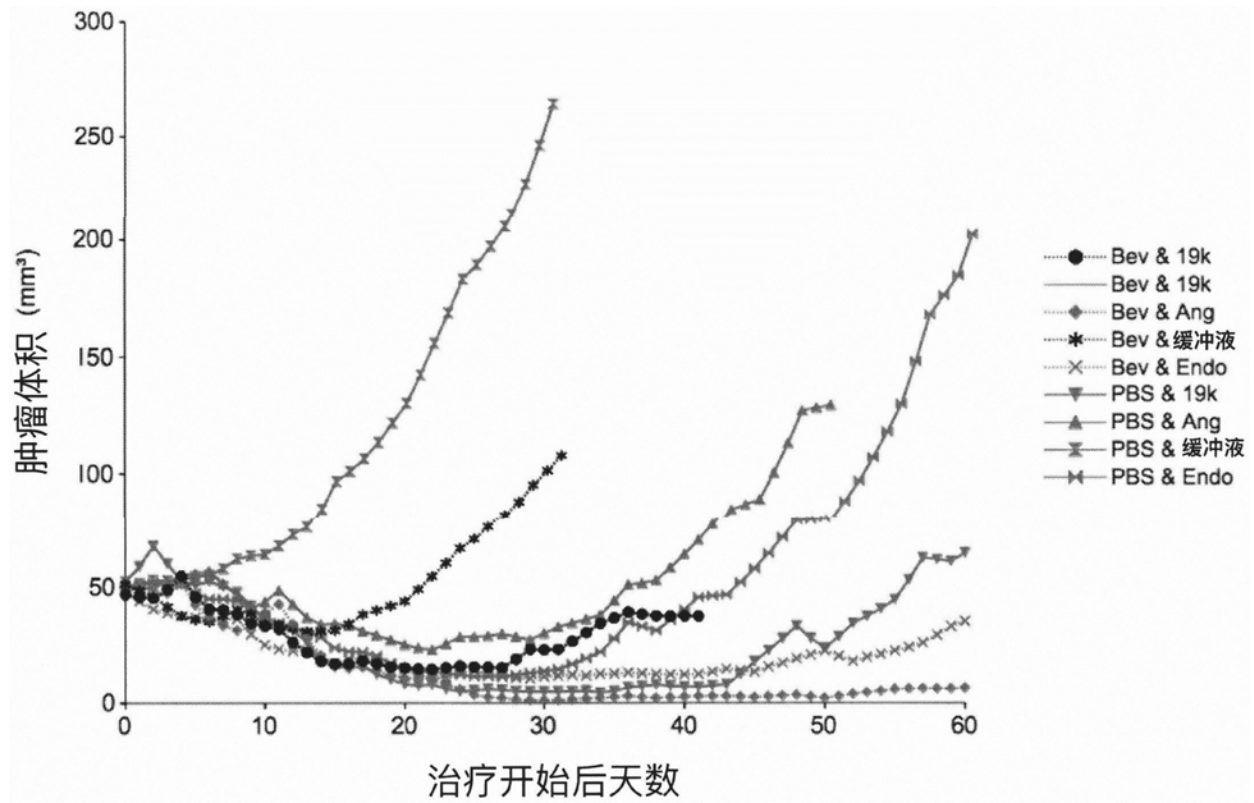


图5

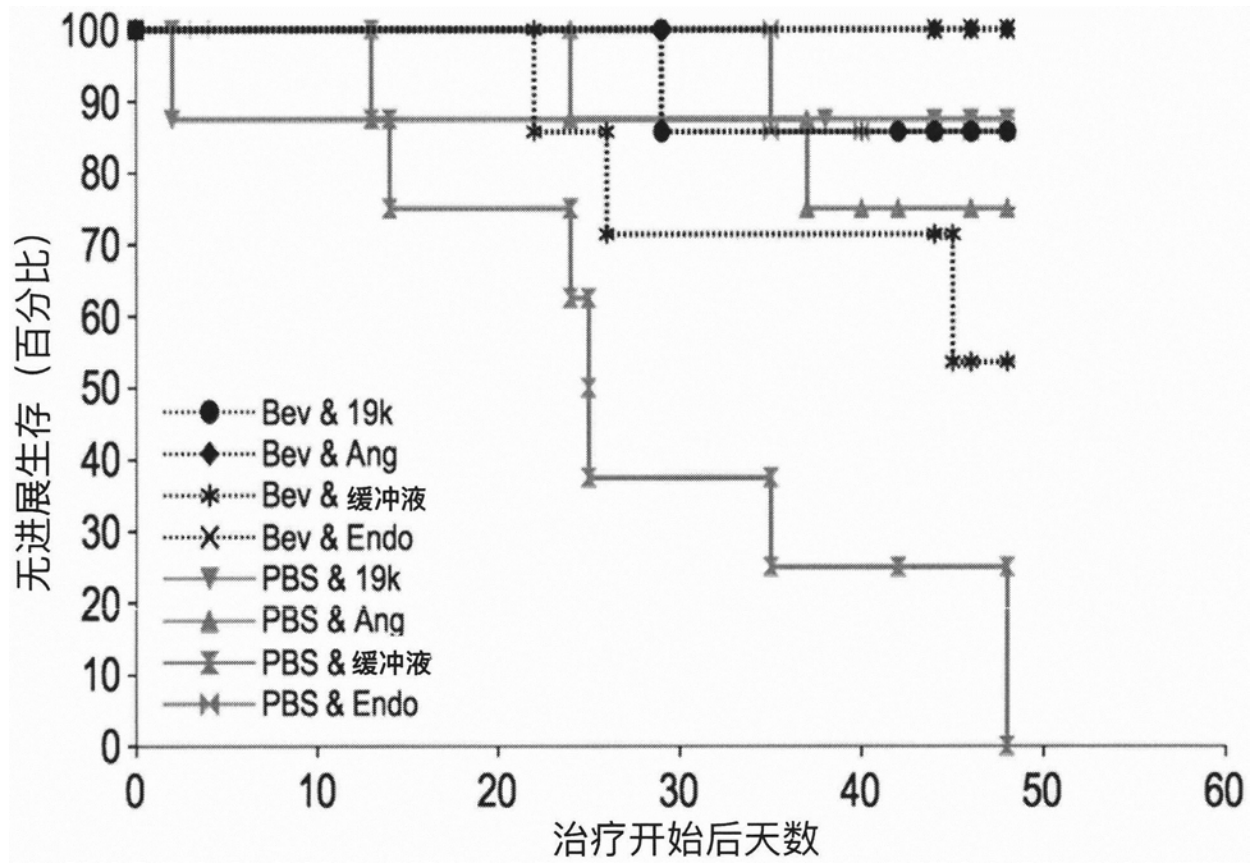


图6

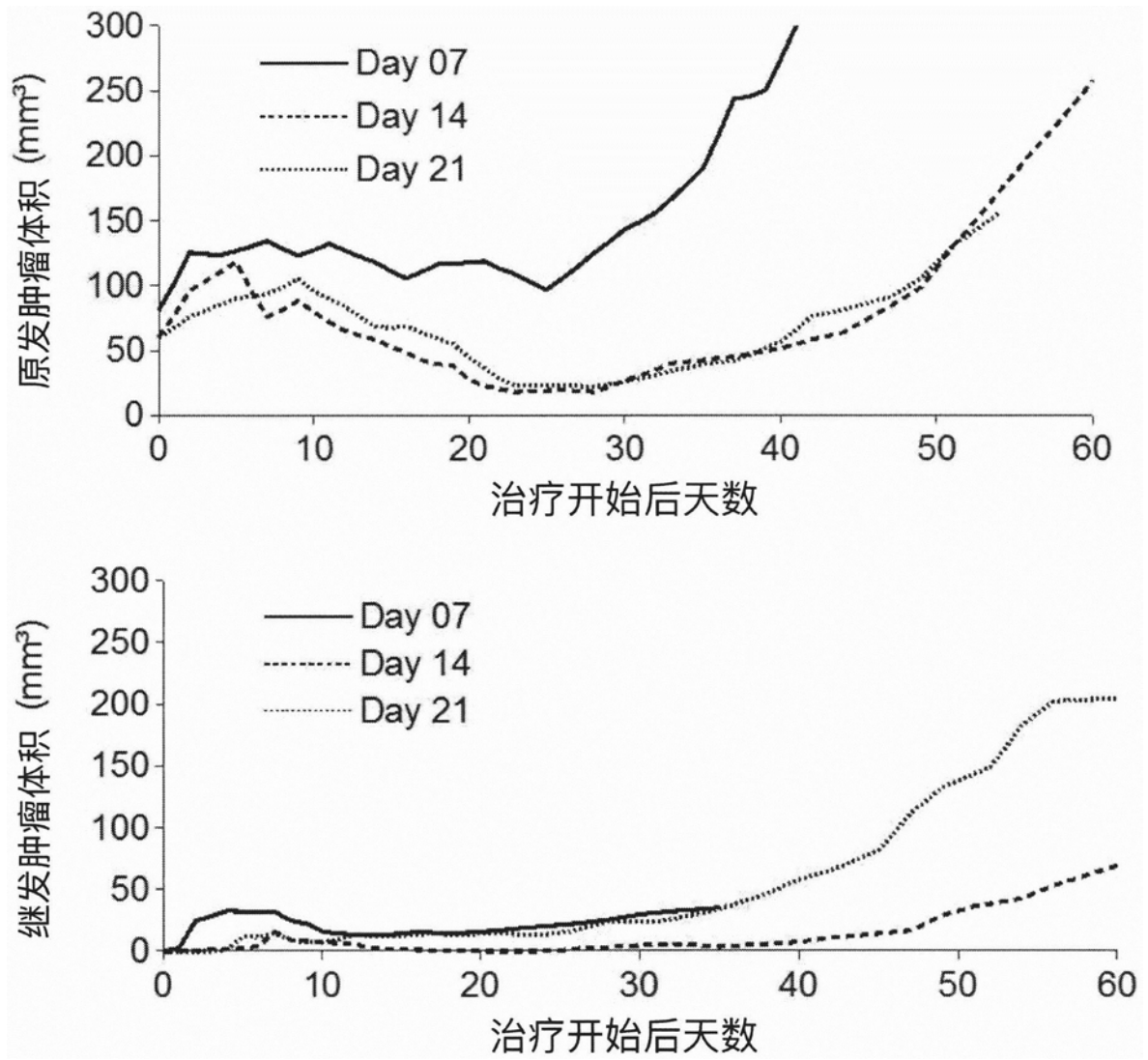


图7

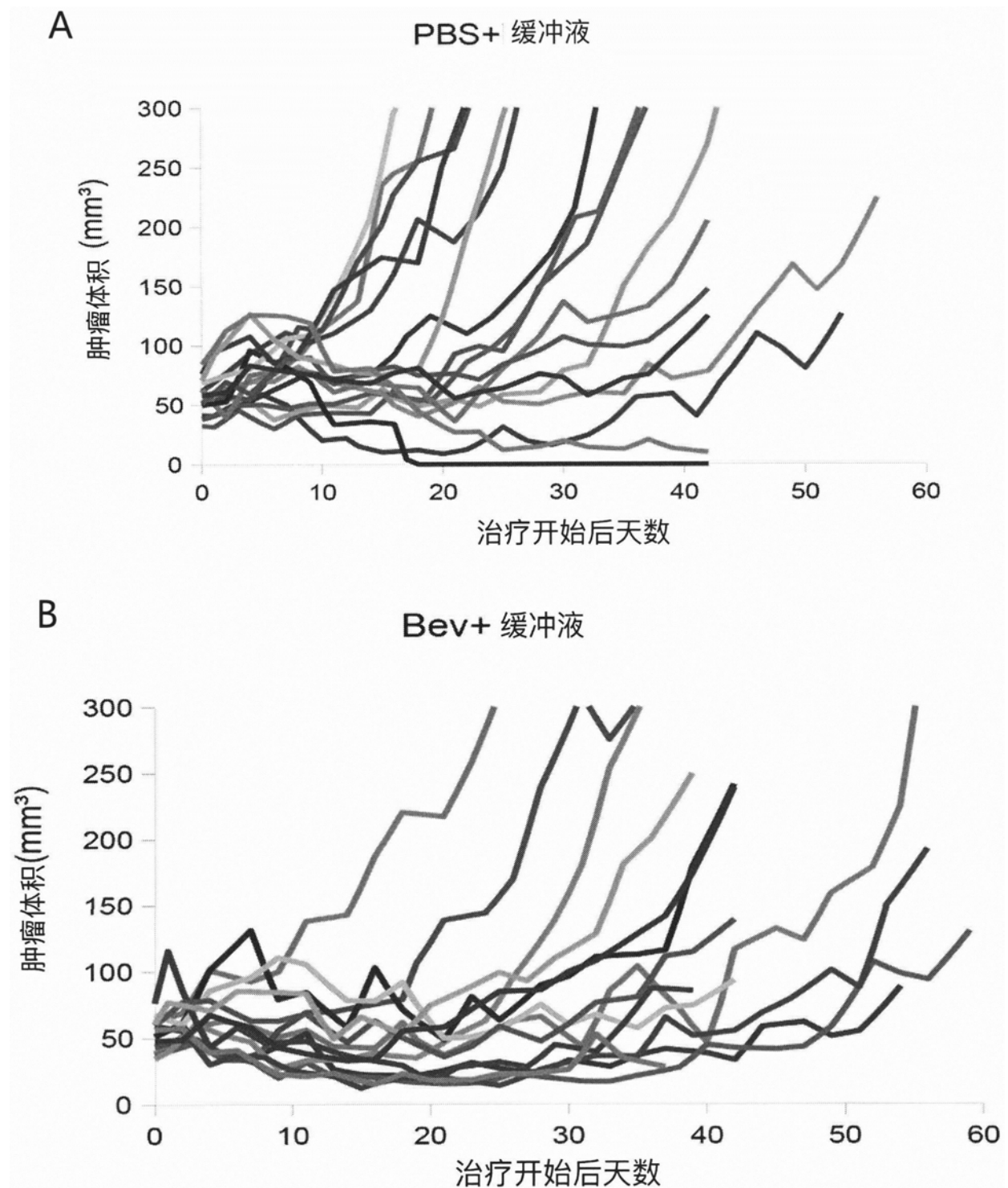


图8

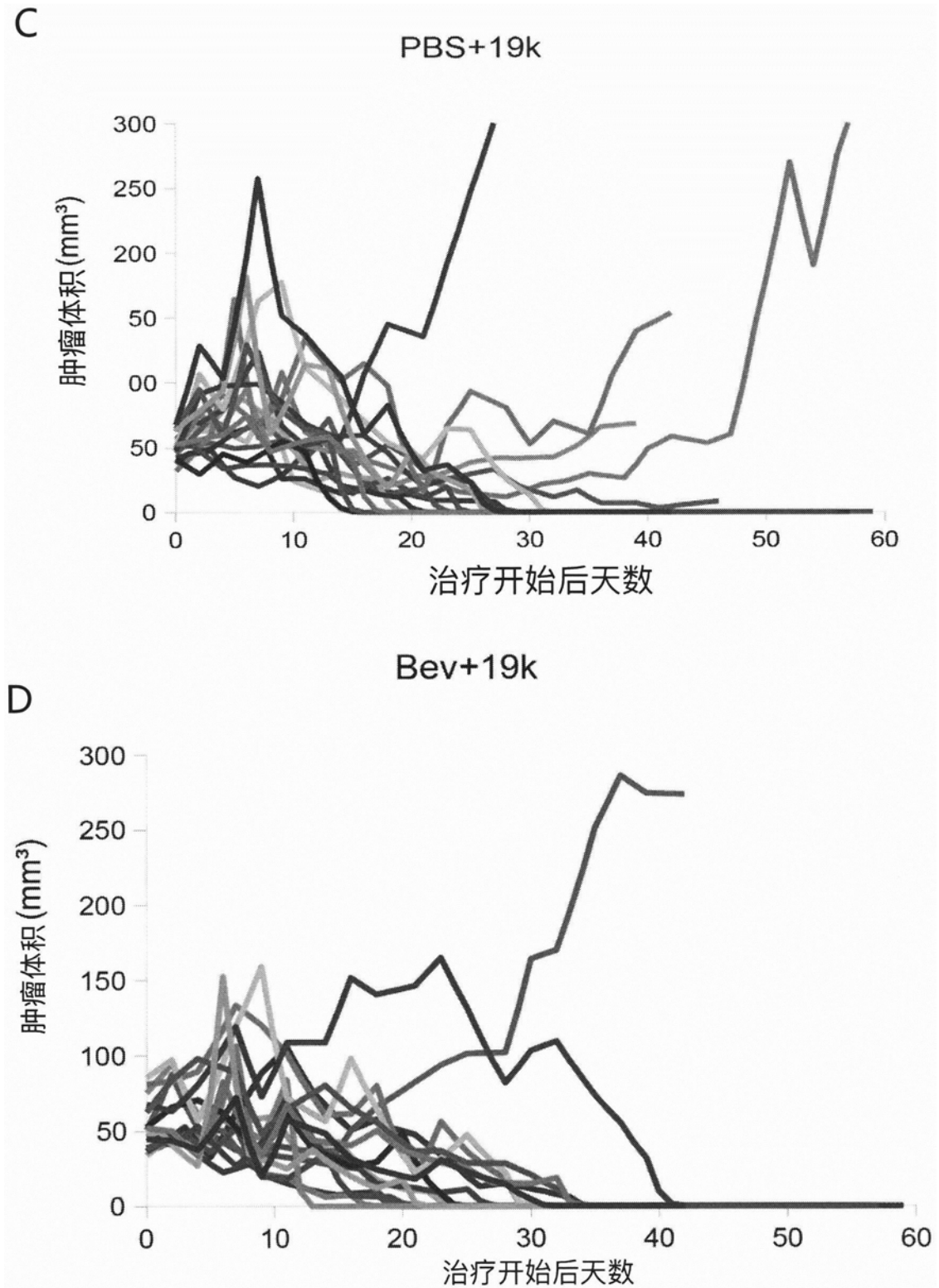


图8(续)

治疗组	治愈率 (%)	
PBS (n=17)	1/17 (5.9%)	p < 0.001
TAV-Δ19K (n=18)	13/18 (72.2%)	
Bev (n=14)	0/14 (0%)	p < 0.001
Bev + TAV-Δ19K (n=17)	16/17 (94.1%)	

图9