(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
C12N 15/861
C12N 15/63

(11) 공개번호 10-2004-0106363
(43) 공개일자 2004년12월17일

(21) 출원번호 10-2004-7016954
(22) 출원일자 2004년10월21일
번역문 제출일자 2004년10월21일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2003/050125
(87) 국제공개번호 WO 2003/104467
(86) 국제출원출원일자 2003년04월24일
(87) 국제공개일자 2003년12월18일

(30) 우선권주장 PCT/NL02/00280 2002년04월25일 네덜란드(NL)

(71) 출원인 크루셀 홀란드 비.브이.
네덜란드 2333 씨엔 레이덴 아르키메데스웨그 4

(72) 발명자 포헬스,로날드
네덜란드 엔엘-3461 하베 린스호텐 판 라이트라안

바우트,아브라함
네덜란드 엔엘-2751 익스엘 모르카펠레 판 스바안스베이크스트라아트38

(74) 대리인 김윤배
이범일
조영신

심사청구 : 없음

(54) 아데노바이러스 벡터를 생산하기 위한 수단 및 방법

요약

본 발명은 보충 세포계에서 아데노바이러스 벡터의 생산을 위한 방법 및 수단에 관한 것으로, 여기서 초기 영역 4 개방형 해독틀 6(E4-orf6) 암호화 핵산이 아데노바이러스 벡터에 존재하고 여기서 E4-orf6 유전자 생성물은, 아데노바이러스 벡터는 보충 세포에 의해 효율적으로 생성될 수 있도록, 보충 세포에 의해 제공되는 E1 유전자 생성물의 하나 이상의 생성물과 양립할 수 있다.

명세서

기술분야

본 발명은 핵산 전달 매체 및 그것의 용도에 관한 것이며, 더욱 특히 본 발명은 재조합 아데노바이러스 벡터 및 그것의 용도에 관한 것이다.

배경기술

지금까지 51개의 인간 아데노바이러스 혈청형이 동정되었고 이들은 혈구응집 특성 및 서열 상동관계를 기준으로 6개의 서브그룹(A,B,C,D,E 및 F)으로 세분된다(Francki et al. 1991). 아데노바이러스 감염 사이클은 초기 및 후기로 나누어진다. 초기에 바이러스는 비코팅되어 있으며 게놈은 핵으로 운반되고 그 후 초기 유전자 영역(E1, E2, E3 및 E4)은 전사적으로 활성이 된다. E1 영역은 2개의 전사 영역을 함유한다: E1A 및 E1B. E1A는 숙주세포 사이클의 변형과 다른 바이러스성 전사 영역의 활성에 관여하는 단백질을 암호화한다(reviewd by Russell. 2000). E1B 영역은 두개의 주요 단백질을 암호화한다:E1B-19K 및 E1B-55K. 이들은 E1A 단백질의 활성에 의한 세포자멸사 유도를 예방한다(Rao et al, 1992; Yew and Berk 1992; Shenk 1996). 그 밖에, E1B-55K 단백질은 후기에 선택적 바이러스 mRNA 운반 및 숙주 단백질 발현의 억제를 위해 요구된다(Pilder et al. 1986). E2는 또한 2개의 서브영역으로 나뉜다: E2A 및 E2B, 이들은 바이러스성 게놈의 복제에 포함되는 3개의 단백질(DNA 결합 단백질, 바이러스 폴리머라제 및 전-말단 단백질)을 함께 암호화한다(Van der Bilet 1995). E3는 인 비트로에서의 복제에 필수적이지 않고 바이러스 감염에 대한 숙주 방어 메카니즘을 전복시키는 여러 단백질을 암호화한다(Horwitz 2001). E4는 바이러스 mRNA 접합 및 운반, 숙주 세포 mRNA 운반, 바이러스 및 세포 전사 및 형질변환에 관련되는 여러 구별되는 작용에 관여하는 단백질을 암호화하는 적어도 6개의 개방형 해독틀을 감춘다(reviewed by Leppard 1997). 바이러스 캡시드의 형성과 바이러스 게놈의 패키징에 필요한 후기 단백질은 모두, 복제 개시 후 완전한 활성이 되는, 주요 후 전사 유니트(MLTU)로부터 발생된다. 특징적인 접합 및 폴리-아데닐화반응의 복잡한 과정은 3부분으로 이루어진 리더 서열을 공유하는 15개 이상의 mRNA를 야기한다. E1B-55K, E4-orf3 및 E4-orf6 단백질은 후 바이러스 mRNA 과정의 조절 및 핵으로부터의 운반에 중추적 역할을 한다. 이 목적을 위해, E1B-55K는 바이러스 mRNA의 세포질로의 운반을 자극하는 기능적 복합체를 형성하기 위해 E4-orf6와 상호작용하고, 반면에 복합체는 또한 세포 mRNA의 핵으로부터 세포질로의 운반을 억제하는데 관여한다(review in Leppard 1997 및 1998).

서브그룹 C 혈청형 Ad5 또는 Ad2를 기초로 한 E1-결실 벡터의 생산은 293(Graham et al. 1970), 911(Fallaux et al. 1996) 및 REP.C6 ™ (Fallaux et al. 1998; ECACC 기탁번호 96022940)과 같은 E1 보충(complementing) 세포계에서 이루어진다. WO 99/55132 및 WO 01/05945에 기재된 바와 같이, 벡터와 세포계는 세포계와 벡터에서의 아데노바이러스 서열 간의 동종성 재조합을 통한 복제 경쟁 아데노 바이러스의 발생을 막기 위해 조화될 수 있다. 그룹 C로부터 유도된 복제 불완전 아데노바이러스의 효율적인 생산을 위해, 세포계 REP.C6 ™ 이 사용되는 것이 바람직하다. 이 세포계를 사용하여 아데노바이러스 벡터가 조화될 수 있고, 그것에 의해 복제에 적합한 아데노바이러스의 부재하에 그룹 C 아데노바이러스 벡터를 생산할 수 있다(Fallaux et al. 1998; US patent no. 6,033,908). 그러나, 그룹 C 벡터가 직접적인 인비보 적용에 항상 이상적인 매질은 아니며, 이것은 감염 효율이 대부분의 인간에서의 중성화 활성의 고역가의 존재 및 특정 일차 표적 세포(예를 들면 내피세포, 평활근 세포, 활액세포, 단핵세포 및 수지상 세포) 상의 세포형 수용체(Coxsaccki-adenovirus receptor, CAR)의 충분한 양의 부재에 의해 심각하게 방해되기 때문이다. 형질도입을 증가시키기 위한 더 높은 양의 투입은 독성의 증가와, 치료받는 주체의 중성화 역가의 변화에 기인한 예측할 수 없는 임상적 결과를 일으킨다. 이러한 제한은 다른 아데노바이러스 혈청형의 사용에 의해 극복될 수 있다. 예를 들면, Ad5-기재 벡터에 표현될 때 (특히 혈청형 16에서) 서브그룹 B 바이러스의 섬유의 수용체 결합부는 인간 내피세포 및 평활근 세포(WO 00/31285) 및 인간 활액세포(WO 00/31285)의 상당히 증가된 감염을 매개한다. 다른 서브그룹B 아데노바이러스의 섬유, Ad35는 인간 단핵세포 및 수지상 세포(WO 00/03029)의 매개된 감염에 가장 효과적이다(WO 00/03029). 더우기, Ad35는 인간 개체의 거의 대부분이 중화 활성을 갖지 않는 바이러스로서 동정되었다(WO 00/70071).

확장된 혈청형 유용성을 갖는 기술의 개발이 필요하다. 특별한 문제는 이들 다른 혈청형들에 대한 알맞는 패키징 세포계의 부족이다. 통상적으로 Ad5 벡터에 대한 패키징 세포계는 아데노바이러스 혈청형 5로부터 유도된 E1 암호화 단백질을 포함한다. 이와 같은 '표준' 패키징 세포계의 예는 293, 911 및 PER.C6 ™ 이다. 이들 표준 패키징 세포계에서 다른 혈청형으로부터 유도된 벡터들을 생성하려는 시도는 실패하지 않는다 하더라도 어렵다고 판명되었다. 가끔, 사용된 특정 혈청형에 따라, 몇몇 생성물을 볼 수 있다. 그러나, 형질변환되고 Ad5로부터 E1으로 불멸화된 세포계에서 생산된, 서브그룹 C와 다른 아데노바이러스 서브그룹으로부터 유도된 재조합 아데노바이러스 벡터의 수득량은 불충분하다. Abrahamsen et al의 논문에서(1997), E1A-결실된 아데노바일러스 혈청형 7 벡터(서브그룹 B)의 개선된 플라그 정제는, Ad5로부터 E4-orf6 서열이 부족한 293 세포와 비교하여, 아데노바이러스 혈청형 5로부터 유도된 E4-orf6를 포함한다. 그러나, 문제는 플라그-정제된 스톡에서 예상하지 않은 재조합이 관찰됨에 따라 벡터의 안정성에서 마주쳤다. 추가의 문제는 생산 도중 야생형 아데노바이러스 바이러스 오염에서 마주쳤다. 더우기, 대규모의 아데노바이러스 생산의 경우, 이것은 적용을 위해 충분히 높은 역가를 얻기 위한 공동-트란스펙트 E4-orf6에 유용하지 않다. 이와 같은 아데노바이러스를 성장시키기 위한 하나의 선택은, 세포에 보조/패키징 세포계의 게놈으로 안정하게 통합된 E4-orf6 유전자를 제공하는 것이다. 이와 같은 세포들은 선행기술에 기재되어 있다(예를 들면, WO 96/22378). 이 시스템의 단점은 새로운 안정한 세포계가 생성되어야 한다는 것이며, 안정하고 알맞는 세포들이 생성되기 전에 수많은 선택이 되 풀이 행해져야 하는 것이다. 이 과정은 노동집약적이며 시간을 소모하는 일이다. 일반적으로, 예를 들면 서브그룹 B 바이러스와 같은, 혈청형 5 이외의 혈청형으로부터 아데노바이러스의 생성 및 증식은 Ad5 보충 세포에서 어렵다고 알려져 있다고 말할 수 있다. WO 00/70071에 출원인에 의해 기재된 바와 같이, 서브그룹 B 바이러스 Ad35를 기재로 한 재조합 바이러스는 Ad5 초기 영역-1 서열(Ad35-E1)을 함유하는 발현 구조물의 공동-트란스펙션에 의해 제조될 수 있다. 더우기, E1A 서열만이 결실되고 E1B의 경우는 결실되지 않은 Ad35-기재 바이러스는 PER.C6 세포에서 효과적으로 복제되는 것으로 보여지며, 이것은 Ad5의 E1a 단백질이 Ad35-E1A 기능을 보충할 수 있다는 것을 제안한다(본 출원인의 국제출원 PCT/NL01/00824. 아직 공개되지 않았음). 더우기, 실험은 Ad35

-E1B의 부족이 Ad5 보충 세포에 대한 불량한 수득률을 가져온다는 것을 나타낸다. WO 00/70071은 또한 E1 영역이 부족한 재조합 아데노바이러스 혈청형 35 벡터의 보충을 위해 Ad35-E1 서열을 정착시키는 새로운 세포계를 설립해야만 한다는 것을 제안한다(또한 본 출원인의 국제특허 PCT/NL01 /00824호를 참조). 그러나, 상기 논의와 같이, 특정 요구에 대해 특정의 혈청형을 적용하기 원한다면, 모든 특정 혈청형에 대해 새로운 세포계를 설립하거나 또는 아데노바이러스 혈청형 5의 보충은 이용가능한 세포계를 관심있는 혈청형의 보충에 대해 변형시켜야 한다. 이 분야에서 이용가능한 설립된 세포계를 사용하고, 이들을 변형시키지 않고 확립되고 본 분야에 알려진 방법을 적용하는 다른 모든 비-Ad5 혈청형의 생산에 이들을 사용하는 것이 분명히 유리하다. 본 발명까지, 서브그룹 C의 혈청형과 다른 아데노바이러스의 유용한 수들률을 생산할 수 있는 본 분야에서 이 용할 수 있는 적용성이 있고 바람직한 '생산 플레폼'은 없다고 결론지어진다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 제 1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공하며, 여기서 상기 벡터는 E4-orf6 단백질을 암호화하는 서열을 추가로 포함하고, 여기서 상기 서열은 a)상기 제1 형청형과 다른 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; b) 하나 이상의 코돈에서 결실, 돌연변이, 첨가 및/또는 치환의 방법으로 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; 및 c)상기 제1 혈청형과 다른 제2 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부와 제3 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부 사이의 융합물을 포함하는 E4-orf6 암호화 서열로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 제3 혈청형은 상기 제1 혈청형과 동일하거나 또는 다르다.

본 발명은 추가로 제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터들을 생산하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 방법은; a)발현가능한 형태의 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E1B-55K 암호화 서열을 정착시키고 있는 보충 세포에, 상기 보충 세포에 의한 상기 재조합 아데노바이러스 벡터의 조립을 가능하게 하는 아데노바이러스의 필수 요소를 제공하는 단계, 여기서 상기 요소들은 상기 제2 혈청형과 다른 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터의 몇몇 구조적 및 비-구조적 요소들 및 상기 보충 세포중의 상기 발현가능한 E1B-55K 단백질과 양립할 수 있는 기능적 E4-orf6 단백질 또는 그것 의 기능적 일부, 유도체 및/또는 동족체를 암호화하는 서열을 포함하고; b)상기 보충 세포를 아데노바이러스 벡터의 생산 및 조립이 일어나는 것을 가능하게 하는 조건하의 배지에서 배양하는 단계; 및 c)그렇게 생산된 재조합 아데노바이러스 벡터를 배지 및/또는 보충 세포에서 수확하는 단계로 이루어지고, 여기서 양립가능한 E4-orf6 단백질을 암호화하는 서열은 그렇게 생산된 재조합 아데노바이러스 벡터에 존재한다.

본 발명은 또한 본 발명에 따른 아데노바이러스 벡터를 포함하는 약제학적 조성물 및 본 발명에 의해 제공되는 아데노바이러스 벡터를 이용한 개체의 치료에 관한 것이다. 본 발명은 또한 세포계와 본 발명에서 제공된 방법을 실행하기 위해 본 발명에서 제공된 아데노바이러스 벡터를 포함하는 부분의 키트에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 플라즈미드 p△MT.Orf6.Hygro (ECACC 기탁번호 P02041226)의 개략도이다. 분명하기 위해, 대문자 D는 델타(△)를 의미한다.

도 2는 플라즈미드 p△MT.Orf6의 개략도이다. 분명하기 위해, 대문자 D는 델타(△)를 의미한다.

도 3은 플라즈미드 pUC.35-5E4의 개략도이다.

도 4는 pUC.35-5E4를 안내하는 클로닝 단계를 나타낸다.

도 5는 pBr.Ad35.PRn의 개략도이다.

도 6은 pBr.Ad35.PR5E4(ECACC 기탁번호. P02041229)의 개략도이다.

도 7은 pWE.Ad35.pIX-rITR.5E4의 개략도이다.

도 8은 pCRscriptAmp.NFI-NcoIR의 개략도이다.

도 9는 pCRscriptAmp.NcoIF-NR2의 개략도이다.

도 10은 pCR.NF1-NR2의 개략도이다.

도 11은 뉴클레오티드 순서의 결정에 의해 얻어진 바에 따른 아데노바이러스 혈청형 5의 E4-orf6의 아미노산 서열(SEQ. ID NO:21; 상부 서열)과 Ad35 백본으로 암호화된 아데노바이러스 혈청형 5의 E4-orf6 단백질 서열(SEQ.ID:21; 중간서열; NB. Ad5의 E4-orf6으로 동정, 상부서열) 사이의 정렬을 나타내며, 아데노바이러스 혈청형 35(SEQ ID NO:22; 하부서열)의 E4-orf6 단백질의 아미노산 서열을 나타내며, 아데노바이러스 혈청형 35 백본에서 E4-orf6 단백질을 암호화하는 전체 단편이 아데노바이러스 혈청형 5의 E4-orf6 단백질을 암호화하는 단편에 의해 대체되었음을 나타낸다.

도 12는 아데노바이러스 혈청형 5의 E4-orf6/7의 아미노산 서열(SEQ. ID NO:23; 상부 서열)과 아데노바이러스 혈청형 35 E4-orf6/7 단편의 대응 부분을 대체하는 아데노바이러스 혈청형 5 E4-orf6/7 단편에 의해 부분적으로 암호화된 E4-orf6/7 융합 단백질의 아미노산 서열(SEQ.ID:24; 중간서열) 및 아데노바이러스 혈청형 35의 E4-orf6/7의 아미노산 서열 사이의 정렬을 나타내며, orf6/7 서열이, 위치 138의 라이신(K) 잔기에서 거의 융합된, 부분적 키메릭을 나타낸다. 키랄성에 대해, 표시 orf6+7은 개방형 해독틀 orf6/7으로 읽어야 하고, 이것은 당업자들에게 잘 알려져 있는 표시로, 아데노바이러스 주변 orf6와 orf7의 E4 영역 내의 분리된 개방형 해독틀이다.

도 13은 pBr.Ad35.PR.5Orf6(ECACC 기탁번호.P02041227)의 개략도이다.

도 14는 pWE.Ad35.pIX-rITR.5Orf6의 개략도이다.

도 15는 pBr.Ad35.Prn△E3의 개략도이다. 분명하기 위해, 대문자 D는 델타(△)를 의미한다.

도 16은 pBr.Ad35.△E3.PR5E4의 개략도이다. 분명하기 위해, 대문자 D는 델타(△)를 의미한다.

도 17은 pBr.Ad35.△E3.PR5Orf6의 개략도이다. 분명하기 위해, 대문자 D는 델타(△)를 의미한다.

도 18은 이중 동종 재조합 사상을 통한 PER.C6와 같은 세포에서 재조합 아데노바이러스 입자들을 생산하기 위한 시스템을 나타낸다.

도 19는 pWE.Ad35.pIX-EcoRV의 개략도이다.

실시예

본 발명은 Ad5 패키징/보충 세포계의 비-그룹C 아데노바이러스의 감소된 상보성에 관한 특정 어려움을 해결하는 방법 및 수단을 기재한다. 비록 Ad5 보충 세포계에 기능적 Ad5 E1B-55K 발현이 존재하지만, 아데노바이러스 백본이 비-그룹 C 아데노바이러스 기원일 때, 매우 낮은 역가의 아데노바이러스 만이 생성될 수 있다는 것을 발견하였다; 이 발견은 E1B-55K와 다른 (바이러스성) 단백질과의 상호작용에서의 혈청형-특이성을 의미한다. 이러한 혈청형-의존성은 보충적 세포계에 의해 제공되는 E1B-55K 단백질과 양립가능한 E4-orf6 단백질을 제공함에 의해 포위될 수 있다는 것이 기재되어 있다. 본 명세서에 논의된 바와 같이, E1B055K 및 E4-orf6는 핵에서 세포질로의 세포형 mRNA의 운반의 억제에 포함되는 복합체를 형성하는 동안, 복합체는 핵에서 복합체로의 바이러스성 mRNA의 운반 촉진에도 포함된다. 본 발명자들은 패키징 세포에서 바이러스성 벡터의 적당한 상보성은 양립가능한 E1B-55K와 E4-orf6 유전자의 존재를 요구한다는 것을 발견하였다. 세포가 패키징 되어야만 하는 벡터에 의해 보충 기능이 제공되지 않는 단백질을 암호화하는 특정 서열을 포함한다면, 패키징 세포는 또한 보충 세포라고도 불리운다. 그러므로, 본 명세서에서 사용되는 '양립가능한'은 이용가능한 E1B-55K 유전자 생성물간의 복합체가, 이 단백질 복합체가 바이러스 복제, 생식 및/또는 야생형 상황에 양립할 수 있거나 재조합 아데노바이러스 혈청형 5 벡터가 293 또는 PER.C6와 같은 Ad5 보충 세포계 상에서 생성될 때 발견되는 상황과 양립할 수 있는 수준으로 패키징을 지지한다는 의미에서, 이용가능한 E4-orf6 유전자 생성물과 기능적 복합체를 형성할 수 있다는 것을 의미한다. 패키징 세포에서 벡터의 복제는 바이러스가 형성되는 생산기간 동안, 세포가 적어도 양립가능한 E1B-55K 단백질과 E4-orf6 단백질을 포함한다면 효율적이다. 바람직하기는, E1B-55K 및 E4-orf6 서열은 동일한 아데노바이러스 서브그룹(A, B, C, D, E 또는 F) 내의 아데노바이러스로부터이다. 더욱 바람직하기는, E1B-55K와 E4-orf6 서열은 동일한 혈청형으로부터이다. 확립된 세포계는 혈청형 5와 같이, 서브그룹 C의 아데노바이러스의 성장을 지지할 수 있는 본 분야에서 이용가능하므로, E1B-55K와 E4-orf6 유전자가 아데노바이러스 혈청형 5로부터 유도되는 것이 더욱 바람직하다. 당업자들에게 이해되는 바와 같이, 양립성은 아데노바이러스 벡터 생산의 분야에서 당업자의 영역과 같은 상보적 시험 또는 조사에서 결정될 수 있다. 당업자들은 본 발명이 E1B-55K와 E4-orf6 단백질이 양립할 수 있는 한, 어느 보충 세포계 상의 어느 아데노바이러스 혈청형의 생산에도 사용할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 보충 세포계 중의 E1B 와 '매치되는' E4-orf6 유전자 생성물은, 선택된 아데노바이러스 벡터에서 E4-orf6를 패키징 세포계 내에 존재하는 E1B 유전자와 양립할 수 있는 E4-orf6 암호화 서열로 대체함으로써, 아데노바이러스 벡터에 의해 제공될 수 있다는 것이 또한 관찰되

었다. 이 변형은 놀랍게도 벡터의 안정적 복제, 패키징, 조립 및 생산에 대해 심각한 영향을 갖지 않는다는 것이 발견되었다.

본 발명의 특정한 면은 아데노바이러스 혈청형 5, 또는 혈청형 1, 2 및 6와 같은, 서브그룹 C와 다른 혈청형의 생산에 일반적으로 적용되는 세포계 상의 서브그룹 C와 다른 아데노바이러스 혈청형을 효과적으로 생성할 수 있다는 것이다. 본 발명은 상보적 E1B-55K 서열과 양립할 수 있는 E4-orf6 서열이 아데노바이러스 백본에 병합되기 때문에 E4-orf를 갖는 보충(패키징) 세포를 독립적으로 제공할 필요성 없이 비-그룹 C 아데노바이러스의 생산방법을 제공한다.

본 발명은 제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공하며, 여기서 상기 벡터는 추가로 기능적 E4-orf6 단백질을 암호화하는 서열, 그의 기능적 일부, 유도체 및/또는 동족체를 포함하고, 여기서 상기 서열은

a)상기 제1 혈청형과 다른 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열;

b)결실, 돌연변이, 첨가 및/또는 치환을 포함하는 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; 및

c)상기 제1 혈청형과 다른 제2 혈청형으로부터 유도된 E4-orf 암호화 서열의 일부와 제3 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부의 융합물을 포함하고, 여기서 상기 제3 혈청형은 상기 제1 혈청형과 동일하거나 또는 다를 수 있는, E4-orf6 암호화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.

한 구현예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공하며, 여기서 상기 제1 혈청형과 상기 제2 혈청형은 아데노바이러스 서브그룹이 다르다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 재조합 아데노바이러스 벡터가 제공되며, 여기서 상기 제1 혈청형은 서브그룹 C와 다른 서브그룹이고 여기서 상기 E4-orf6 암호화 서열은 서브그룹 C의 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도된다. 더욱 바람직한 것은 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스이며, 여기서 상기 제1 혈청형은 서브그룹 B로부터이고 상기 제2 혈청형은 서브그룹 C로부터이다. 더욱 바람직하기는, 상기 E4-orf6 암호화 서열은 아데노바이러스 혈청형 5로부터 유도된다.

본 분야의 당업자들로부터 중성화된 항체의 다양한 수준이 다른 혈청을 향한 인간에서 배양된다는 것이 인식되어져 왔다. 특정 아데노바이러스 혈청형이 이와같은 중화 항체의 고역가를 만나고 다른 개체군 중의 여러 개체들이 이와 같은 혈청형에 대해 항체의 중화를 실시한다는 것이 발견되어져 왔다. 또한, 특정 혈청형은 오직 소수의 샘플에서만 중화된다는 것이 발견되었다(WO 00/70071). 외관상, 서브그룹 B의 특정 혈청형은 샘플의 소그룹에서만 중화되었다. 그러므로, 본 발명의 바 람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스 벡터가 제공되며, 여기서 상기 제1 혈청형은 아데노바이러스 혈청형 11, 14, 16, 21, 34, 35 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더욱 바람직한 것은 재조합 벡터로, 여기서 상기 제1 혈청형은 혈청형 11 또는 35이며, 반면 이들은 시험된 샘플의 매우 작은 백분률에서만 중화된 항체를 만난다.

본 발명의 벡터는 유전자 치료, 기능적 게놈, 종양 백신화 및/또는 항-바이러스성 백신화와 같은 다양한 환경에 사용될 수 있다. 이것을 위해, 유전자 전달 매체로 작용하는 아데노바이러스 벡터가 필요하며, 여기서 비-천연 유전자가 아데노바이러스 유전자에 병합된다. 아데노바이러스 입자는 이후 관심있는 세포를 표적화하기 위해 특별히 표적화된다; 아데노바이러스는 캡시드 수용체 결합을 통해 또는 다른 수단을 통해 특정 세포에 결합되고, 트란스 유전자를 전달한다. 아데노바이러스의 표적화는 매우 다양한 방법으로 실행될 수 있다. 아데노바이러스 벡터 표적화 분야의 당업자는 관심있는 세포에 아데노바이러스를 전달하기 위해 적용되는 모든 다양한 가능성을 알 것이다. 이와 같은 가능성은 캡시드 변환(섬유, 헥손 및/또는 펜톤 변환, 예를 들면, 결실, 다른 혈청형 섬유들간의 스왑, 및 펩티드 및/또는 다른 결합 부분들의 첨가)을 포함하지만, 이것으로 제한되는 것은 아니며, 여기서 관심있는 세포에 존재하는 수용체를 인식하는 키메릭 섬유가 생성되거나, 여기서 펜톤 기재-결합이 이용된다. 다른 가능성은 캡시드 단백질에 표적 부분을 연결하는 것으로, 여기서 예를 들면 결합 펩티드, 공지되고 강한 결합 단백질, 또는 그것의 항체 또는 부분이 특정 표적화를 얻기 위해 캡시드 단백질에 연결된다. 이와 같은 벡터는 본 발명에 의해 제공되는 방법 및 수단을 사용하여 생산될 수 있다. 그러므로, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스 벡터를 기재하고, 더우기 비-아데노바이러스 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 암호화하는 서열을 포함한다. 이와 같은 서열은 아데노바이러스 백본 내의 다양한 위치에 존재할 수 있고, 그러나 바람직하기는 본 발명의 재조합 아데노바이러스 벡터에서 결핍되는 E1 영역에 위치한다. E1 영역은 보충 세포에 존재하는 (상보성) 요소들에 의해 보충된다. 프로모터, 트란스유전자 및 다른 조절 서열들의 지시는 우측 전화 터미날 반복 뿐만 아니라 좌측 전화 터미날 반복을 향해 지시될 수 있다.

본 발명은 아데노바이러스 및/또는 아데노-연관 바이러스(AAV)와 같은 다른 바이러스를 기초로 한 바이러스 벡터의 생산에도 사용될 수 있고, 여기서 Ad-AAV 키메릭 바이러스와 같은 결합물은 숙주세포 유전자로 통합될 수 있다. 몇몇 방법은 통합 아데노바이러스를 생산하기 위한 분야에 알려져 있다. 일반적으로, 본 발명은 (특이적으로, 또는 비-특이적으로) 통합될 수 있는 아데노바이러스의 생산에 유용하다.

상기와 같이, 몇몇 비-아데노바이러스 트란스유전자는 본 발명의 재조합 아데노바이러스 벡터로 클론될 수 있다. 이것은 강화제, 프로모터(예를 들면, 시토메갈로바이러스 프로모터, SV40 프로모터 및 RSV 프로모터와 같은 강한 비-아데노바이러스성 프로모터) 및 폴리아드레닐화반응과 같은 조절 핵산 서열 뿐만 아니라 치료 목적을 위한 이형 유전자를 포함한다. 그러므로, 본 발명의 한 면에서, 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스 벡터가 제공되고, 여기서 상기 비-아데노바이러스 성 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드는: 폴리펩티드, 병원성 유기체의 항원성 결정인자, 종양 특이 항원, 바이러스성 단백질, 호르몬과 시토킨을 포함하는 세포-치사로 이루어진 군으로부터 선택된다. 병원성 유기체는 세균, 바이러스 및 균류이지만, 이것으로 제한되는 것은 아니다. 비-아데노바이러스 인자, 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드의 비제한적인 예들은 전사인자, 세포내 신호화 단백질, 포스파타제, 키나제, 세포자멸사 억제 인자, 수용체 길항근, 세포막-결합 수용체의 가용성 형태, RNA 억제제, 안티-센스 RNA's, 유인 인자, 리보자임, 및 더욱 특이하기는 티미딘 키나아제, 에리트로포이에틴, 신규한-에리트로포이에시스 자극 단백질(NESP), IL3, ceNOS, 감마-인터페론 및 gp100이다. 비-아데노바이러스성 단백질은 백신화 목적을 위한 본 발명의 방법 및 수단에 의해 제공되는 재조합 아데노바이러스 벡터로 클론화될 수 있다. 이와 같은 바이러스 단백질은 HIV 백신용 gag, pol, env, nef 등, 인간 라필로마 바이러스 백신용 E6 및 E7 단백질, 말라리아 백신용 *Plasmodium* protozoa로부터의 circumporozoite 단백질, 로타바이러스 백신용 로타바이러스 성분, 에볼라바이러스 백신용 에볼라 단백질, RSV 백신용 호흡기 다핵성 바이러스(RSV)로부터의 F 및 G 유전자 생성물, 인플루엔자 백신용 HA 및 NA을 포함하지만, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 재조합 아데노바이러스는 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함한다. 구조적 요소들의 예는 유전자 생성물 자체 뿐만 아니라, 섬유, 헥손 및 펜톤 단백질과 같은 캡시드 단백질을 암호화하는 유전자이다. 비-구조적 요소들의 예는 세포에 감염 후 발현되고 감염 사이클이 진행될 때 하향조절되는 초기 유전자이다. 비-구조적 요소들의 다른 예는, pol과 pTP와 같은, 복제 동안 단백질 활성을 암호화하는 유전자이다. 재조합 아데노바이러스 벡터가 다른 혈청형으로부터 유도된 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함할 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 이와 같은 벡터의 예는 키메릭 섬유를 전달하는 아데노바이러스 입자이다(본 출원인의 특허 출원 WO 00/03029 참조). 분자생물학 기술은 핵산 서열의 무한한 결합을 가능하게 하였다. 분자생물학의 당업자에게, 폴리머라제 사슬반응(PCR) 뿐만 아니라 직접 서브클로닝과 같은, 다양한 분자기술을 이용하여 다른 서열들의 결합을 실행할 수 있다는 것은 명백하다. 본 분야에 알려진 서열과 키메릭 구조물 뿐 아니라 본 발명에 사용되는 많은 서열은 다른 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도된다. 그러므로, 여기서 사용되는 '유도된'의 의미는 이와 같은 결합물이 야생형 바이러스로부터 얻어진 야생형 서열로부터 직접 클로닝을 통해 얻어질 수 있다는 의미이며, 반면 이들은 예를 들면 모형과 같은 DNA의 다른 조각을 사용하여 PCR을 통해 얻을 수 있다. 이것은 또한 이와같은 서열이 변형된 형태 뿐 아니라 야생형이라는 것을 의미한다. 동일한 결과에 도달하기 위한 또 다른 선택은 합성 DNA의 결합을 통해서이다. '유도된'은 야생형 DNA의 직접 클로닝만을 배타적으로 의미하지는 않는다는 것을 이해하여야 한다. 당업자는 또한 핵산의 특정 조각의 변형된 형태를 얻기위해 분자 생물학의 가능성을 염두에 두어야 한다. 이들 돌연변이는 다른 기능을 제공할 수 있지만, 이들은 특정 돌연변이가 DNA의 특정 조각과 그의 암호화된 단백질의 기능성을 변화시키지 않는 방법으로 아무 언급이 없을 수 있다. 그러므로, '기능적 일부, 유도체 및/또는 그의 동족체'라는 용어는 그들이 관련되어 있는 핵산의 등가 물로 이해될 수 있다. 당업자는 특정 결실, 스왑, (점)돌연변이, 첨가 등이 원래의 핵산과 유사한 기능을 갖는 핵산을 가져온다는 것을 이해하여야 한다. 그러므로, E4-orf6 및 E1B-55K 유전자 생성물과 같은 단백질의 기능성을 상당히 변화시키지 않는 이와 같은 변형은 본 발명의 범위라고 이해된다.

핵산의 몇몇 변형, 예를 들면, 하나 이상의 코돈에서 결실, 돌연변이, 첨가 및/또는 치환은 암호화된 유전자 생성물의 구조 및/또는 기능성을 상당히 변화시킬 수 있다. 그러므로, 본 발명은 유전자를 정착시키는 백본, 예를 들면 구조적 및 비-구조적 요소와 같이 동일한 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화된 서열과도 관련되고, 그러나 여기서 E4-orf6 암호화 서열은 아데노바이러스 벡터가 생산되어질 보충 세포에 존재하는 E1 단백질(E1B-55K 유전자 생성물과 같은)과 양립할 수 있도록 변형된다. 코돈은 암호화된 아미노산을 변화시키기 위해 완전히 변형될 수 있지만, 이것은 또한 암호화된 아미노산을 변화시키기 위해 부분적으로 변형될 수 있다. 핵산의 결실은 하나 이상의 암호화된 아미노산의 손실을 가져올 수 있는 반면, 이것은 또한 프레임-이동을 가져올 수 있다. 본 발명은 또한, 다른 혈청형으로부터 유도된 다른 부분들을 포함하는 아데노바이러스 핵산에 존재하는 E4-orf6 서열과 관련되고, 여기서, 단백질 기능성이 상보적이 되는 영역은 하나의 혈청형으로부터 사용될 수 있는 반면, E4-orf6 서열의 나머지 또는 그의 부분은 또 다른 (비)관련 혈청형(예를 들면, 동일한 서브그룹으로부터, 다른 서브그룹 또는 다른 종으로부터, 또는 그들의 결합물)으로부터 유도된다. 그러므로, 이것은 또한 양립할 수 있는 E4-orf6 융합 단백질에 적용할 수 있는 본 발명의 범위 내이다. 이와 같은 융합 단백질은 핵산의 여러 부분의 생성물일 수 있다.

당업자는 모든 인간 아데노바이러스 이외의 수 많은 비-인간 아데노바이러스가 본 분야에서 동정되었다는 것을 알 것이다. 당연히, 또한 비-인간 아데노바이러스는 본 발명에 의해 기재된 것과 동일한 결과에 도달하도록 적용될 수 있다. 당업자들에게, E1B-55K와 E4-orf6 사이의 상보성이 인간 아데노바이러스에 제한되지 않고, 다른 종에 대한 특정 아데노바이러스의 요소들이 양립할 수 있다는 것은 명백하다. 그러므로, 본 발명의 또 다른 관점에서, 비-인간 아데노바이러스는 E1B-55K와 E4-orf6 유전자 생성물이 양립가능한 한, 본 분야에 사용가능한 공지의 패키징 세포계에 대해 고역가를 생산할 수 있다. 본 발명의 방법 및 수단을 이용하여 생산할 수 있는 비-인간 아데노바이러스의 비제한적인 예는 개-, 소-, 양-, 개구리-, 돼지-, 말-, 원숭이- 및 조류 아데노바이러스이다. 그러므로, 여기서 사용되는 혈청형은 종-제한 혈청형을 벗어난다. 예를 들면, 원숭이 아데노바이러스 E4-orf6 유전자 생성물이 패키징 세포

에 의해 제공되는 E1B-55K와 양립할 수 있다면, 이 결합은 본 발명의 범위내이다. 또한, 융합물이 다른 혈청형 간에 적용되거나 또는, 패키징 세포의 E1B 유전자와 양립할 수 있는 인간 및 조류 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 서열간에 적용되면, 이러한 특정 결합물 역시 본 발명의 범위 내이다.

본 발명은 제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은:

a)발현 가능한 형태의 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된, E1B-55K 암호화 서열 또는 기능적 일부, 그의 유도체 및/또는 동족체를 정착시키는 보충 세포에, 상기 보충 세포에 의한 상기 제조합 아데노바이러스의 조립을 허용하도록 아데노바이러스의 필수 요소를 제공하는 단계, 여기서 상기 요소들은 상기 제2 혈청형과 기능적 E4-orf6 단백질을 암호화하는 서열, 또는 기능적 일부, 유도체 및/또는 그의 동족체와 다른 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 적어도 약간의 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함하고, 이것은 상기 보충 세포에서 상기 발현가능한 E1B-55K 단백질과 양립할 수 있고;

b) 상기 보충 세포를 아데노바이러스 벡터의 생산 및 조립이 일어나는 것을 허용하는 조건 하에서 배지에서 배양하는 단계; 및

c) 배지 및/또는 보충 세포로부터 이와 같이 생산된 재조합 아데노바이러스 벡터를 수확하는 단계를 포함하고, 여기서 양립가능한 E4-orf6 단백질을 암호화하는 서열은 이와 같이 생성된 재조합 아데노바이러스 벡터에 존재한다.

본 발명의 한 면에서, 본 발명에 따른 방법이 제공되며, 여기서 상기 E4-orf6 암호화 서열은: ⅰ)상기 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; ⅱ)상기 제1 및 제2 혈청형과 다른 제3 혈청형의 아데노바이러스로 부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; ⅲ)하나 이상의 코돈에서 결실, 돌연변이, 첨가 및/또는 치환을 포함하는 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf 암호화 서열; 및 ⅳ) 제3 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부와 상기 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부의 융합물을 포함하고, 여기서 상기 제3 혈청형은 상기 제1 혈청형과 동일하거나 또는 다 른 것인, E4-orf6 암호화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 상기 제1 및 제2 혈청형은 다른 서브그룹이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 상기 제2 혈청형은 서브그룹 C의 아데노바이러스 혈청형이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 상기 제2 혈청형은 아데노바이러스 혈청형 5이다. 본 발명의 다른 특별한 면에서, 상기 제1 혈청형은 서브그룹 B의 아데노바이러스 혈청형이다. 바람직하기는, 상기 제1 혈청형은 아데노바이러스 혈청형 11, 14, 16, 21, 34, 35 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

재조합 아데노바이러스 벡터를 보충하고 아데노바이러스 입자를 생산, 조립 및 패키징하는데 사용되는 본 분야에 알려진 몇몇의 패키징 세포가 있다. 이와 같은 세포계의 비-제한적 예는 HEK-293, 911 및 PER.C6 ™ 세포이다. 고역가를 전달한다고 이미 증명된 아데노바이러스 스톡의 세포계를 사용하는 것이 바람직하다. 이와 같은 세포계는 안정한 방법으로 E1 단백질을 발현하며, 그러므로 이것은 세포계와 방법을 사용하기 위한 본 발명의 바람직한 면이고, 여기서 상기 E1B-55K 암호화 서열은 상기 보충 세포의 게놈으로 병합된다. 더욱 바람직하기는 1차, 이배체 인간 세포 또는 그의 후손 세포로부터 유도된 보충 세포이다. 더욱 바람직하기는, 상기 보충 세포가 1차 인간 망막아세포, 1차 인간 배아 신장 세포, 1차 인간 신경세포 또는 일차 인간 양수 아세포로부터 유도된다. 가장 바람직하기는 본 발명에 의해 제공되는 방법에서 보충 세포로의 사용이고, 여기서 상기 보충 세포는 PER.C6 세포 또는 그의 유도체이다. PER.C6 세포는 본 분야에서 아데노바이러스성 DNA가 사용될 때 세포에 의해 제공되는 핵산과 오버랩되지 않는 복제 경쟁 아데노바이러스를 발생시키지 않는다고 잘 알려져 있다. 본 분야에 사용되는 많은 아데노바이러스 벡터는 E1 영역이 부족하고, 그러므로, 본 발명의 한 면에서, 상기 보충 세포는 그의 게놈으로 병합된, 적어도 하나의 아데노바이러스 E1A 단백질을 암호화하는 핵산을 포함한다. 바람직하기는 적어도 하나의 아데노바이러스 E1A 단백질을 암호화하는 상기 핵산은 서브그룹 B와 다른 서브그룹의 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도된다. 더욱 바람직하기는, 적어도 하나의 아데노바이러스 E1A 단백질을 암호화하는 상기 핵산은 서브그룹 C로부터 유도된다. 가장 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 아데노바이러스 E1A 단백질을 암호화하는 상기 핵산은 아데노바이러스 혈청형 5로부터 유도된다. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 방법을 제공하고, 여기서 상기 E4-orf6 암호화 서열 및 상기 E1B-55K 암호화 서열은 다른 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도되고, 여기서 상기 다른 아데노바이러스 혈청형은 동일한 아데노바이러스 서브그룹의 맴버들이다. 바람직하기는, 상기 E4-orf6 암호화 서열 및 상기 E1B-55K 암호화 서열은 다른 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도되고 여기서 상기 다른 아데노바이러스 혈청형은 둘 다 서브그룹 C의 맴버들이다. 더욱 바람직하기는 상기 E4-orf6 암호화 서열 및 상기 E1B-55K 암호화 서열은 동일한 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도된다. 가장 바람직한 방법은, 여기서 상기 E4-orf6 암호화 서열과 상기 E1B-55K 암호화 서열이 아데노바이러스 혈청형 5에서 유도되는 것이다.

본 발명은 또한 본 발명에 따른 또는 본 발명의 방법에 의해 얻을 수 있는 재조합 아데노바이러스 벡터를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 약제학적 조성물은 약제 제조 분야의 당업자들에게 일반적으로 적용되는 허용가능한 약제학적 담체를 추가로 포함한다. 더우기, 본 발명은 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스 벡터 또는 본 발명에 의해 제공된 약제학적 조성물을 인간에게 투여하는 것을 포함하는 인간의 치료방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 아

데노바이러스 벡터가 적당한 보충/패키징 세포와 관심있는 아데노바이러스 벡터를 사용하여 제조될 수 있는 방법에 관한 것이다. 효율적인 생산방법을 위해, 적당한 아데노바이러스 벡터에 정확한 세포를 적용시키는 것이 유용하다. 그러므로, 본 발명은 또한:

a)제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 아데노바이러스 요소들을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터를 생산하기 위한 보충 세포 (여기서 상기 세포는 발현가능한 형태의 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E1B-55K 암호화 서열, 또는 그의 기능적 일부, 유도체 및/또는 동족체를 정착시키고 있다); 및

b) 하나 이상의 복제가능한 핵산 상에 있는, 상기 보충 세포에 의한 상기 재조합 아데노바이러스 벡터의 조립을 가능하게 하는 모든 필요한 아데노바이러스 요소를 포함하고, 여기서 상기 요소들은 상기 제2 혈청형과 다른 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 유래된 적어도 몇몇의 구조적 및 비-구조적 요소들 및 상기 보충 세포에서 상기 발현가능한 E1B-55K 단백질과 양립할 수 있는 기능적 E4-orf6 단백질을 암호화하는 서열, 또는 기능적 일부, 유도체 및/또는 그의 동족체를 포함하는 키트에 관한 것이다.

바람직하기는, 부분들의 키트가 사용되고, 여기서 상기 E4-orf6 암호화 서열은 a) 상기 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; b)상기 제1 및 제2 혈청형과 다른 제3 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화서열; c) 하나 이상의 코돈의 결실, 돌연변이, 첨가 및/또는 치환을 포함하는 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도되는 E4-orf6 암호화 서열; 및 d) 제3 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부 (여기서 상기 제3 혈청형은 상기 제1 혈청형과 동일하거나 또는 다르다)와 상기 제2 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부의 융합물을 포함하는 E4-orf6 암호화 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.

본 발명은 특히 아데노바이러스 5 이외의 혈청형으로부터 거의 전적으로 유도된 E1 결실 키메릭 아데노바이러스의 복제에 유용하다. 이와 같은 벡터에는 아데노바이러스 5 E4-orf6 또는 그의 기능적 일부, 유도체 및/또는 동족체를 암호화하는 핵산에 제공되는 것만이 필요하다. 일단 제공된 다음, 벡터는 정상 아데노바이러스 5 E1-보충 패키징 세포계에 효율적으로 복제될 수 있다. 벡터의 안정성이 개선되고, 그리고 벡터는 E1A와 E1B 둘다에서 결실에 대해 상보적일 수 있다. 이와 같은 벡터에 아데노바이러스 E4-orf6 암호화 핵산을 제공함에 의해, 293 또는 911 세포에서 성장할 때, 추가의 야생형 오염 문제가 없이 효율적인 플라그 정제 및 양호한 수득률이 가능하다. 물론, PER.C6 에서, 야생형 아데노바이러스 오염물은 다른 방법으로도 막을 수 있다.

본 발명의 재조합 백터의 추가의 이점은 게놈에 병합되는 핵산으로부터 특정 세포계 아데노바이러스 E4-orf6을 발생시킬 필요가 없다는 것이다. 비록 이와 같은 세포계가 존재하지만, 이들은 양호한 상태로 쉽게 유지되지 않는다. 이것은 적어도 부분적으로는 이형 유전자들이 세포계의 게놈에 많이 삽입됨에 따라 모든 이형 서열 (또는 그들의 발현물)의 안정성을 유지하는 것이 어렵기 때문이다. 본 발명에서 비-아데노바이러스 혈청형 5 기재 벡터의 낮은 수득률 및 아데노바이러스 혈청형 5 패키징 세포계 상의 아데노바이러스 혈청형 7, 11 및 35와 같은, 서브그룹 B로부터의 아데노바이러스 혈청형 벡터의 안정성과 관련된 적어도 몇몇의 문제점들은 본 발명의 재조합 아데노바이러스 벡터로 극복될 수 있다.

실시예

실시예 1. Ad5 보충 세포계 상에서 Ad5-orf 6을 발현하는 E1-결실 Ad35 바이러스의 발생

플라즈미드-기재 벡터 시스템의 구성 및 Ad35-기재 바이러스의 발생 뿐만 아니라 아데노바이러스 혈청형 35 게놈의 서열화가 WO 00/70071에 상세히 기재되어 있다.

pAdapt35IP1으로의 Ad5-E4-orf6 코딩 서열의 클로닝(ECACC 기탁번호 P02041228, 이 플라즈미드의 상세한 클로닝은 WO 00/70071을 참조)을 다음과 같이 실시하였다.

플라즈마를 NheI 및 AvrII로 소화시키고 송아지 인테스틴 포스파타제(New England Biolabs)로 탈인산화하였다. 소화된 DNA를 GeneClean 키트를 사용하여 겔로부터 분리시켰다. 플라즈미드 p△MT.orf6.Hygro (도1, ECACC 기탁번호 P02041226)를 NheI로 소화시키고 이어서 XbaI로 부분적으로 소화시켰다. 겔 상에 생성된 밴드를 분리시킨 후, E4-orf6 서열에 연결된 △MT 프로모터에 대응하는 1350 bp 단편을 겔로부터 정제하였다. 그리고 나서, 분리된 단편들 둘 다를 결실시키고 전기-수용성 DH10B 세포(Invitrogen/LifeTechnologies)로 변환시키고, 그 후 SV40 폴리(A) 시그널에 관한 정확한 배열의 삽입물을 갖는 클로니는 대규모 DNA 제조를 위해 선택된다. 이것은 pAd35.△MT.orf6(도 6)를 구성하고, 이것은 돌연변이된 메탈로티오에닌 프로모터(△MT)에 기능적으로 연결된 Ad5 E4-orf6 코딩 서열을 함유한다. △MT 프로모터는 Hagmeyer et al.에 의해 설명되었다(1996). Ad5 E4-orf6 서열은 Ad5 서열(Genbank 기탁번호 M73260)중의 뉴클레오티드 33193과 뉴클레오티드 34077에 대응한다. Ad5 E4-orf6 단백질의 발현이 Ad5 보충 세포상에 완전한 E1-결실 Ad35 벡터를 생산하는 것이 가능한가를 시험하기 위해, pad35.△MT.orf6을 Ad35 백본 구조물 pWE.Ad35.pIX-rITR과 함께 PER.C6 세포에 공동-트란스펙트 하였다. 여기에, pAd35.△M

T.Orf6를 PI-Psp-1로 소화시키고 pWE.Ad35.pIX-rITR를 NotI로 소화시켜 백본으로부터 아데노바이러스 삽입물을 분리시켰다. 소화된 pAd35.△MT.Orf6 2μg과 소화된 pWE.Ad35.pIX-rITR 6μg을 리포펙트아민을 사용하여 트란스펙션하였다. 트란스펙션 혼합물을 전날 T25 플라스크 당 3.5×10^{6} 세포의 밀도로 접종시킨 PER.C6 세포에 첨가하였다. 다음날, 배지를 PER.C 배양 배지(10% FBS와 10 mM $MgCl_2$ 를 갖는 DMEM)로 바꾸고 세포를 37℃/10% CO_2 에서 추가로 배양하였다. 대조 트란스펙션을 pAdApt35.Luc와 pWE.Ad35.pIX-rITR의 공동-트란스펙션, 그리고 pWE.Ad35.pIX-rITR 단독으로 실시하였다. 트란스펙션 2일 후, 세포를 T25에서 T80 플라스크로 통과시키고 설명과 같이 배양하였다. 다시 3일 후, Ad5 백본과 함께 pAd35.△MT.Orf6로 트란스펙트된 배양물은 바이러스 복제를 표시하는 세포변성 효과(CPE)를 나타내고, 그리고 2일의 추가 배양 후 (세포와 배지를 포함하여) 수확하였다. 세포 현탁액을 2회 냉동/해동 순환 시키고, 생성된 물질(조 용해질)을 -20℃에서 추가 사용시까지 유지하였다. 다른 플라스크는 CPE를 나타내지 않았고 T80으로의 이동 6일 후, T80 플라스크에서 1:3 통과하였다. 다시 5일 후, pAdApt35.Luc + pWE.Ad35.pIX-rITR 트란스펙트된 플라스크는 CPE-류 사상을 약간 보였지만, 이것이 추가 진행되지는 않았다. pAd35.△MT.Orf6 트란스펙트로부터 생긴 조 용해질 0.2 및 0.5 ml를 T80 플라스크에서 약 85%의 합류로 PER.C6 세포를 재감염하는데 사용하였다. 이것은 조 용해질에 감염 바이러스가 존재한다는 것을 표시하는 배양 1일 후 전체 CPE에서 일어난다. 이 배양물은 또한 2회 냉동/해동 순환에 의해 수확된다. PER.C6에서 단독으로 구조물 pAs35.△MT.Orf6에 의한 추가의 대조 트란스펙션이 스스로의 orf6 발현이 세포 독성과 CPE-유사 세포 치사를 일으키지 않는다는 것을 확인하기 위해 실시되었다. 결론적으로, pWE.As35.pIX-rITR과 함께 pAd35.△MT.Orf6에 의한 트란스펙션만이 CPE와 바이러스 복제를 일으켰다.

이전의 E1 영역을 대체하는 Ad5-E4-orf6를 갖는 Ad35-기재 바이러스 게놈의 존재를 확인하기 위해 PCR 분석을 실시하였다. 이것으로부터, 바이러스 DNA를 다음과 같이 조 용해질 샘플로부터 분리하였다. 조 용해질 재료 275 ㎕를 DNaseI 10 ㎕(10mg/ml)로 37 ℃에서 30분동안 배양하였다. 순차적으로, 0.5M EDTA 6.0㎕(pH 8.0), 20% SDS 7.5㎕ 및 20 mg/ml 프로테이나제 K 1.5 ㎕를 첨가하고 소용돌이로 혼합하였다. 그리고 나서 혼합물을 50 ℃에서 1시간 동안 배양하였다. 마지막으로, 바이러스성 DAN를 GeneClean PCR 키트를 사용하여 분리하였다(Bio 101, Inc.). 그리고 나서, 분리된 DNA 2 ㎕를 프라이머 35psi-For 및 35R4를 이용하여 PCR 증폭하였다(표 1). 프로그램을 94℃에서 2분으로 세팅하고, 그리고 94℃에서 30초, 58℃에서 30초 및 72℃에서 5분의 순환을 30회 한 다음, 72℃에서 10분동안 배양하는 것으로 끝마쳤다. 프라이머는 Ad35 서열에 대해 특정되고 패키징 서열에서 nt 4669의 범위로 Ad5 orf6 트란스유전자 카세트를 포함하는 2.9kb의 단편을 발생한다. 얻어진 PCR 단편의 전기영동은 단편이 어뎁터 플라즈미드 pAd35.△MT.Orf6 상에서 발생하는 대조 PCR 단편과 매치되는 예상 길이를 가졌다. 그러므로, 바이러스가 또한 Ad5-E1-orf6를 발현한다면, 완전히 E1-결실된 Ad35-기재 벡터는 Ad5 보충 세포상에 만들어질 수 있다.

실시예 2. pWe.Ad35.pIX-rITRE4의 구성

제1 PCR 단편을 프라이머 DF35-1과 35FR을 사용하여 증폭하였다(표 1). 증폭을 추가의 DMSO(시그마, 최종 농도 3%)를 갖는 Pwo DNA 폴리머라제(Roche)를 사용하여 주형 DNA로서 pWE.Ad35.pIX-rITR(WO 00/70071 참조)로 실시하였다. 프로그램은 다음과 같았다: 94℃에서 2분후, (94℃에서 30초, 52℃에서 30초, 72℃에서 3분)의 순환을 30회 한 후, 마지막 단계로 완전한 단편을 확인하기 위해 72℃에서 8분. 증폭은 Ad35 서열의 nt 30224에서 31805에 대응하는 1.6 kb 단편이 된다. BamHI 부위는 3' 말단에 도입되었다. 증폭된 DNA를 GeneClean 키트를 이용하여 겔로부터 정제하였고 pCRScript/Amp 클로닝 벡터 키트로 결찰하였다. 전기-수용성 DH10B로 형질변환 후 백색 클로니를 추가의 분석을 위해 선택하였다. 블런트 클로닝으로 인해, PCR 단편이 2 위치에 삽입될 수 있다. 5' 말단에서 pCRScript/Amp 벡터의 폴리링커에 BamHI 부위를 갖는 삽입물이 있는 클론이 선택되었다. 그러므로, BamHI로의 소화는 1.6kb 단편을 가져왔다. 서열은 PCR 단편의 정확한 증폭을 확인하였다. 제2 PCR 단편은 프라이머: 5E4F와 5E4R을 사용하여 증폭되었다(표 1). 증폭은 pWE.Ad5.AflII-rITRsp로 실시되었고, 이것은 pWE.Ad5.AflII-rITR(출원인의 국제출원 PCT/NL01/00824에 기재되어 있는 ECACC 기탁번호 P97082116)의 여분의 PacI 부위를 함유하는 코스미드 벡터이다. pWE.Ad5.AflII-rITR도 또한 동일한 목적으로 사용될 수 있지만, 상기와 같이 pWE.Ad5.AflII-rITRsp가 Pwo DAN 폴리머라제를 이용한 주형으로서 작용하였다. 겔로부터 정제한 후, DNA를 (PCR 동안 도입된 두 위치) SstI와 BamHI로 소화시켰고 3kb 단편은 GeneClean 키트를 사용하여 아가로스 겔로부터 정제하였다. 증폭된 Ad5 E4 영역은 Ad5 서열의 bp32795에서 bp35828에 대응한다. 제3 PCR 단편은 프라이머: 355ITR과 353ITR을 사용하여 pWE.Ad35.pIX-rITR 상에서 발생되었다(표 1). PCR 증폭은 상기와 같이 실시되었다. 생성된 160bp 단편은 SstI 부위(5'말단)와 EcoRI 부위(3'말단)에 의해 프랭크 되었다. 상기와 같이 겔로부터 정제된 후, DNA를 SstI와 EcoRI로 소화시켰다. Ad35의 우측 ITR에 대응하는 160bp 단편을 그 후 소화된 말단으로부터 저용융점 아가로스 겔에서 분리하고 겔 중에서 수집하였다. 그 다음, pUC119를 BamHI와 EcoRI로 소화시키고 3.1kb 단편을 GeneClean 키트를 사용하여 겔로부터 정제하였다. 상기 처리된 제2 및 제3 PCR 단편등은 그 후 pUC119로 소화되어 pUC.Ad5E4-35ITR이 되는 BamHI/EcoRI로 결찰하였다. 클론된 PCR 유도 삽입물은 정확한 증폭을 확증하기 위해 서열화하였다. 그 다음, pCR-섬유35 중의 1.6kb 삽입물을 BanHI로 삭제하고 단편을 상기와 같이 겔로부터 정제하였다. pUC.Ad5E4-35ITR을 BamHI로 또한 소화시키고 선형 단편을 겔로부터 정제하였다. 두 단편 모두의 결찰과 서로에 대해 정확한 배열을 갖는 콜론의 선택은 pUC.35-5E4를 가져왔다(도 3). pUC.35-5E4의 구성을 가져오는 단계를 도 4에 나타내었다. pUC.35-5E4 중의 아데노바이러스 삽입물은 pBr.Ad35.PRn (도 5; WO 00/70071), Ad35 3'서열을 갖는 구조물로 서브클론되었다. 여기서, 구조물 pUC.35-5E4는 MluI 및 NotI로 소화되고 4.7 kb 단편은 GeneClean 키트를 사용하여 겔로부터 정제하였다. 이 단편은 그리고 나서 구조물 pBr.ad35.PRn의 MluI와 NotI 소화로 부터 생성

된 벡터 단편으로 결찰되었다. 이 16.3 kb 단편은 아가라제 효소(Roche)를 사용하여 겔로부터 정제되었다. 결찰은 그리고 나서 수용성 DH10B 세포로 변환하였다. 생성된 구조물을 pBr.Ad35.PR5E4로 명명하였다(도 6, ECACC 기탁번호 P02041229). 마지막 단계에서 Ad35 서열의 변형된 3' 말단을 바이러스성 코스미드 클론 pWE.Ad35.pIX-rITR로 클론될 수 있다. 여기서, 두개의 단편은 제조 지침에 따른 람다 파아지 패키징 반응에서 결합되었다(Stratagene). 첫번째 것은 PacI와 SwaI로 소화되어 얻은 pBr.Ad35.PR5E4로 부터의 16.8kb 변형된 Ad35 삽입물이고, 두번째 것은 PacI과 SwaI를 갖는 pWE.Ad35.pIX-rITR의 소화에 의해 얻어진 22.8kb 단편이다. 두 단편의 정확한 결합은 pWE.Ad35.pIX-rITR.5E4를 생성한다(도 7). 그러므로, 이 구조물에서 Ad35 백본에 E4 영역은 Ad5로부터 유도된 대응하는 영역으 로 대치된다.

실시예 3. pWE.Ad35.pIX-rITR5Orf6의 구성

pIX 유전자(Ad35 서열중의 nt 3401)로부터 우측 ITR의 말단까지의 Ad35 서열을 함유하지만 Ad5 서열의 대응 서열에 대해 교환된 E4-orf6 및 E4-orf6/7에 대한 서열을 갖는 아데노바이러스 백본 구조물을 얻기위해, Ad35 및 Ad5 서열을 아래와 같이 PCR 증폭시키고 결합시켰다. PCR 단편은 최대 3%까지 DMSO를 첨가하여 Pwo DNA 폴리머라제로 발생하였다. 첫번째 PCR은 주형으로 pBr.Ad35.PRn(도 5: WO 00/70071) 그리고 프라이머 E4-F1과 E4-R2(표 1)을 가지고 행했다. 프로그램을 다음과 같이 세팅하였다: 94℃에서 2분, (94℃에서 30초, 50 ℃에서 30초 및 72℃에서 1분) 5 순환, 이어서 (94℃에서 30초, 60℃에서 30초 및 72℃에서 1분) 30 순환, 그리고 68℃에서 8분의 최종 단계로 마감된다. 생성된 1.8kb 단편을 GeneClean 키트를 사용하여 정제하였다. 두번째 PCR은 주형으로 pWE.Ad5.AflII-rITRsp, 이것은 pWE.Ad5.AflII-rITR (ECACC 기탁 번호P97082116, 본 출원인의 국제출원 PCT/NL01/00824에 기재, 아직 공개되지 않았음)의 PacI 부위를 함유하는 코스미드 벡터이고, 그리고 프라이머 E4-F3와 E4-R4(표 1)을 사용하여 실시하였다. 프로그램을 다음과 같이 세팅하였다: 94℃에서 2분, (94℃에서 30초, 62℃에서 30초 및 72℃에서 1분) 30순환, 그리고 68℃에서 8분의 최종 단계로 마감된다. 세번째 PCR은 주형으로 pBr.Ad35.PRn과 프라이머 E4-F5 및 E4-R6를 사용하여 실시하였다(표 1) 프로그램을 다음과 같이 세팅하였다: 94℃에서 2분, (94℃에서 30초, 48 ℃에서 30초 및 72℃에서 45초분) 5 순환, 이어서 (94℃에서 30초, 56℃에서 30초 및 72℃에 서 45초) 30 순환, 그리고 68℃에서 8분의 최종 단계로 마감된다. 336 bp 단편은 상기와 같이 정제되었다. 정제된 단편의 샘플을 농도를 측정하기 위해 겔 위에 놓은 다음, 단편들을 혼합하여 총 30㎕에 700ng PCR-1, 650ng PCR-2와 430ng PCR-3이 함유되도록 하였다. 이 혼합물에 EcoPol 완충액 3㎕(New England Biolabs), 2mM dNTP 용액 3㎕와 H_2O 3㎕ milliQ를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 94℃에서 3분동안 배양하고 그리고 나서 PCR 기계에서 0.5℃/초의 속도로 65℃로 냉각시켰다. 65℃에서 10분동안 배양한 후, 혼합물을 0.05℃/초의 속도로 추가로 냉각시키고 20℃에서 10분 동안 배양하였다. 그리고, Klenow 효소 1 ㎕(5 유니트)(Bew England)를 첨가하고 37℃에서 60분동안 배양하였다. 이 Klenow 혼합물을 주형으로 사용하여 증폭을 2개의 단편으로 다음과 같이 분리하였다. 프라이머 세트 1: NF-1과 NcoI-R(표 1)를, DMSO의 첨가로 최종 농도가 3%인 Pwo DNA 폴리머라제(Roche)를 사용한 반응에서 사용하였고 PCR 기계는 다음과 같이 조절하여 사용했다: 94℃에서 2분, (94℃에서 30초, 66℃에서 30초 및 72℃에서 3분)의 순환 30회, 그리고 마지막으로 68℃에서 8분간 배양. 프라이머 세트 2: NcoI-F와 NR-2(표 1)를, DMSO의 첨가로 최종 농도가 3%인 Pwo DNA 폴리머라제(Roche)를 사용한 반응에서 사용하였고 PCR 기계는 다음과 같이 조절하여 사용했다: 94℃에서 2분, (94℃에서 30초, 62℃에서 30초 및 72℃에서 90초)의 순환 30회, 그리고 마지막으로 68℃에서 8분간 배양. 2.7kb(프라이머 세트 1)과 1.1kb(프라이머 세트 2)의 생성된 단편을 GeneClean Kit를 사용하여 겔로부터 정제하였고 각각을 pCRscriptAmp 벡터(Stratagene)로 결찰하였고 DH10B 전기 상보성 세포로 변환시켰다. 이것은 구조물 pCRscriptAmp.NFI-NcoIR(도 8)과 구조물 pCRscriptAmp.NcoIF-NR2(도 9)를 가져왔다. 삽입물은 블런트 말단을 갖기 때문에 각 클로닝에 대해 두개의 배열이 얻어졌다. KpnI 소화를 이용하여, 추가의 클로닝이 요구되는 배열을 갖는 구성물을 선택하였다(도8 및 도9 참조). 그리고 나서 정확한 증폭을 확인하기 위해 삽입물을 서열화하였다. 그 다음, pCRscriptAmp-NcoIF-NR2로부터 삽입의 일부를 BAmHi와 NcoI를 사용하여 자극시키고 상기와 같이 겔로부터 정제하였다. pCRscriptAmp-NFI-NcoIR을 동일한 효소로 소화시키고 단편을 함유하는 벡터를 겔로부터 정제하였다. 이들 단편의 결찰은 pCR.NF1-NR2를 가져왔다(도 10). pCR.NF1-NR2는 GeneBank (기탁번호 M73260)에서 간행된 Ad35 서열로부터 32968과 34077 사이에 위치하는 Ad35 유도 서열을 대체하는, nt 31879와 32974 사이에 E4-otf6와 E4-orf6/7 서열을 갖는 Ad35 서열의 nt 30162와 33234 사이에 Ad35 서열을 갖는다. 그러므로, 도11 및 도12에 나타낸 아미노산 정렬에 나타나는 바와 같이, 클론된 E4-orf6 단백질의 아미노산 서열은 Ad5에서 발견된 E4-orf6 서열과 동일하고 E4-orf6/7 아미노산 서열은 Ad5에 존재하는 E4-orf6/7 서열과 더 많은 부분이 동일하다. 당연히, 다른 혼성 Ad35-ad5 E4 구조물은 본 발명에서 벗어남 없이 상기 개략된 일반적인 방법을 사용하여 고안될 수 있다. 이 pCR.NF1-BR2로부터의 키메릭 삽입물은 그 후 pWE.Ad35.pIX-rITR로 암호화된다: pCR.NF1-NR-2는 MluI와 NdeI로 소화되었고 생성된 2.8kb 단편은 GeneClean Kit를 사용하여 겔로부터 정제되었다. 구조물 pBr.Ad35.PRn은 또한 MluI 및 NdeI로 소화되었고 18kb 벡터 단편은 아가라제 효소(Roche)를 사용하여 겔로부터 분리되었 다.

두 단편 모두의 결찰은 구조물 pBr.Ad35.PR.5Orf6(도 13, ECACC 기탁번호 P02041227)을 생성하였다. 이 구조물에서 키메릭 E4 영역을 함유하는 PacI와 SwaI 사이의 Ad35 서열은 그 후 상기와 같이 람다-파아지 패키징을 이용하여 구조물 pWE.Ad35.pIX-rITR로 클론되었다. 생성된 pWE.Ad35pIX-rTR.5Orf6(도 14)는 그리고 나서 Ad35 수용체 플라즈미드를 갖는 PER.C6 패키징 세포에 공동-트란스펙션에 의해 재조합 Ad35-기재 바이러스를 발생하는데 사용된다.

실시예 4. pWE.Ad35.pIX-rITR△E3, pWE.Ad35.pIX-rITR△E3.5E4 및 pWE.Ad35.pIX-rITR△E35Orf6의 구성

Ad35의 백본을 E3 서열의 결실에 의해 추가 변형시켰다. E3 단백질은 아데노바이러스 감염에 대한 숙주 세포 반응을 변형시킨다고 알려져 있고 그러므로 재조합 바이러스의 인비트로 생식에 필요하지 않다. 더우기, E3 서열의 결실은 패키징 효율의 양보 없이 벡터에서 더 많은 이형 서열의 삽입을 허용한다. 또한, 백신 매질로서 아데노바이러스 벡터의 적용을 위해, E3 영역에 의해 암호화된 면역조절 유전자의 발현은 바람직하지 않다. pBr.ad35.PRn 플라즈미드(도5)에서 E3 서열의 결실방법을 아래에 기재하였다.

우선, PCR 생성물을 제조 지침에 따라 Pwo DNA 폴리머라제(Roche) 및 주형 DNA로서 pBr.Ad35.PRn를 사용하여 프라이머 35Efor 및 35E3rev(표 1)로 발생시켰다. 프로그램을 94℃에서 2분 및, 94℃에서 30초, 58℃에서 30초 및 72℃에서 1분의 순환 30회, 그리고 나서 68℃에서 8분으로 맞추었다. 증폭된 단편은 nt 26814 에서 27647의 Ad35 서열을 함유하고(WO 00/70071 참조) MluI 부위에 의해 3' 말단에서 플랭크되었다. 생성된 833 bp 단편은 Qiaquick PCR 정제 키트(Qiagen)를 사용하여 정제하였고, MluI 및 StuI로 소화하였다. 소화된 PCR 단편은 그리고 나서 Qiaquick 겔 추출 키트(Qiagen)를 사용하여 LMP 아가로스 겔로부터 정제하였다. 구조물 pBr.ad35.PRn을 MiuL과 StuI로 소화시키고 단편을 함유하는 17.3kb 벡터를 당업자들에게 알려진 방법으로 아가라제 효소(Roche)를 사용하여 아가로스 셀로부터 분리시켰다. 두 분리된 DNA 모두를 결찰시키고 최대-효율 DH5α적합 세균(Invitrogen/LTI)으로 전환하여 pBr.Ad35.PRn△E3을 얻었다(도 15). 결실된 서열은 Ad35 서열의 nt 27648 에서 30320를 포함하여 2673 bp 결실을 가져온다. 그리고 나서, E3 결실을 람다-파아지 패키징 추출물(Stratagene)을 사용하여 구조물 pWE.Ad35.pIX-rTR에 도입시켰다(Stratagene). 여기에, pWE.Ad35.pIX-rITR과 pBr.Ad35.PRn△E3 둘 다를 PacI와 SwaI로 소화시키고 아가라제 효소(Roche)를 이용하여 저융점 아가로스 겔로부터 각각 22.8kb 및 14kb 단편을 분리하였다. STBL-2 세포를 이용한 결찰과 패키징 후(Invitrogen/LTI), 구조물 pWE.Ad35.pIX-rITR△E3를 얻었다.

상기와 같이 E4-변형된 백본 구조물의 E3-결실형을 구성하기 위해, E4 변형물을 다음과 같이 pBr.Ad35.PRn△E3 구조물에 도입하였다. 구조물 pUC.35-5E4(도 3)을 MluI와 NotI로 소화시켰고 4.7kb 단편을 GeneClean II 키트를 사용하여 겔로부터 분리하였다. 구조물 pBr.Ad35.PRn△E3를 또한 MluI와 NotI로 소화시키고 13.6kb 벡터 단편을 GeneClean 스핀 키트를 사용하여 겔로부터 분리하였다. 이들 단편의 결찰은 구조물 pBr.Ad35.△E3.PR5E4 (도 16)을 가져왔다. 구조물 pCR.NF1-NR2 (도 10)을 MluI, NdeI와 BglI로 소화시키고(후자일수록 벡터 단편을 더 작은 단편으로 소화시킴), 그리고 2.8kb 단편을 GeneClean 스핀 키트를 사용하여 겔로부터 분리하였다. 구조물 pBr.Ad35.PRn△E3를 MluI와 NdeI로 소화시켰고, CIP 효소(New English Biolabs)를 사용하여 탈인산화하였고, 15.2kb 벡터 단편을 GeneClean 스핀 키트를 사용하여 분리하였다. 이들 단편의 결찰로 pBr.ad35.△E3.PR5orf6를 구성하였다(도 17). 그리고 나서 pBr.Ad35.△E3.PR5E4 및 pBr.Ad35.△E3.PR5orf6을, 기재한 바와 같이 pBr.Ad35.△E3.PR5E4와 pBr.Ad35.△E3.PR5orf6로부터 대응하는 영역에 대한 pWE.Ad35.pIX-rITR의 3'PacI-SwaI 단편을 교환하기 위해 사용하였다. 이것은 구조물 pWE.Ad35.pIX-rITR△E3.5E4와 pWE.Ad35.pIX-rITR△E3.5orf6을 가져온다. 이들 큰 코스미드들을 발생시키기 위한 선택적 방법은 패키징을 위한 결찰 반응에 세 단편들을 사용하는 것이다: pWE.Ad35.pIX-rITR로부터 14.7 kb NotI-PacI 단편, pBr.Ad35.△E3.PR5E4 또는 pBr.Ad35.△E3.PR5orf6로부터 PacI-NotI 삽입물 및 NotI 결실된 pWE15 코스미드 벡터 단편(Stratagene). 이 마지막 단편은 또한 pWE.Ad35.pIX-rITR의 NotI/PacI 소화로부터 분리될 수 있다.

실시예 5. PER.C6 세포상의 E1- 및 E1/E3-결실된 Ad35-기재 백터의 발생.

pBr.Ad35.PRn-기재 구조물을 사용하여 보충 세포계 PER.C6 상의 재조합 Ad35 바이러스를 발생시키기 위해, 본 발명자들은 우선, Ad35 서열의 bp 3410에서부터 bp 24650의 Ad35 서열을 함유하고 그러므로 어뎁터 플라즈미드와 pBr.Ad35.PRn-기재 구조물과 오버랩하는 새로운 구조물을 제조하였다(WO 00/70071). 이들 3개의 플 라즈미드의 PER.C6 세포로의 트란스펙션 및 이중 상동성 재조합 사상은 도 18에 개략된 바와 같이 완전한 바이러스 게놈 및 재조합 바이러스를 가져온다. 필요한 바이러스는 pWE.Ad35.pIX-rITR의 Ad35 서열의 대부분의 결실에 의해 제조된다. 여기서, pWE.Ad35.pIX-rITR은 EcoRV로 소화되었고 단편을 함유하는 29kb 벡터는 GeneClean 스핀 키트를 사용하여 저융점 겔로부터 정제시켰다. 정제된 DNA를 자가-결찰시키고 DH10B 전기-수용성 세균을 전환시켜 pWE.Ad35.pIX-EcoRV(도 19)를 얻는데 사용하였다.

트란스펙션에 사용되는 모든 DNA를 표 2에 나타낸 바와 같이 소화시키고, 65℃에서 15분 동안 열-불활성시키고 그리고 추가의 처리없이 트란스펙션에 사용하였다. PER.C6 세포는 트란스펙션 전날 T25 플라스크에 3x10 ^{6} 세포/플라스크의 밀도로 접종시키고, 무혈청 DMEM 배지(Gibco/BRL) 중의 트란스펙션 혼합물을 5시간 후 PER.C6 배양 배지(DMEM, 10% FBS 및 10mM $MgCl_2$)에 대해 대체하는 것을 제외하고, 제조사 지침에 따라 리포펙트아민을 사용하여 표 2에 표시한 바와 같이 트란스펙트시켰다(Invitrogen/LTI). 다음 날, 트란스펙션 효율은 형광 현미경법에 의해 50%로 평가되었다. 2일 후, 세포를 트립신처리 하였고 T80 플라스크에서 재접종하였고 37 ℃/10% CO_2 에서 추가로 배양하였다. 감염 후 6일, Ad35.AdApt.eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITR로 트란스펙트된 PER.C6 배양물을 제외한 모든 배양물은 충분한 세포변성효과를 나타냈다(CPE, 바이러스 생식을 나타냄). 1일 후, CPE를 갖는 플라스크의 세포들과 배지들을 수확하였고 2회의 냉동/해동 순환시키고, 원심분리(1500 rpm에서 10 분)에 의해 세포 부스러기로부터 청징시키고 이들 조 용해물 100 ㎕를 T80 플라스크에서 85% 합류에서 신선한 PER.C6 세포를 재-감염시키는

데 사용하였다. CPE의 사인을 나타내지 않은 Ad35.AdApt.eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITR의 트란스펙션을 트립신화하여 수확하고 상기와 같이 처리하였다. 신선한 PER.C6 세포의 감염 2일 후, 모든 플라스크는 초기 수확에서 CPE의 사인을 보이지 않았던 것을 제외하고는 완전한 CPE를 나타내었다. 이것은 완전 E1-결실된 Ad35-기재 바이러스가, Ad5 E4-orf6 유전자 생성물이 Ad 35 백본으로부터 발현될 때 PER.C6 상에서 제조된다는 것을 분명히 나타낸다.

[표 1]

프라이머 서열

35FR	5′-CGGGATCCACTTTATTTTAGTTGTCGTCTTC-3′ (SEQ ID NO:1)
35R4	5′-CGGAATTCTTAATTAAGGGAAATGCAAATCTGTGAGG-3′ (SEQ ID NO:2)
35psi-For	5′-GTGGTATTTATGGCAGGGTG-3′ (SEQ ID NO:3)
DF35-1	5′-CACTCACCACCTCCAATTCC-3′ (SEQ ID NO:4)
5E4F	5′-CGGGATCCGTTTGTGTTATGTTTCAACGTG-3′ (SEQ ID NO:5)
5E4R	5′-GCTGGCGAGCTCGGCGGAGTAACTTGTATGTG-3′ (SEQ ID NO:6)
355ITR	5′-GATCCGGAGCTCACAACGTCATTTTCCCACG-3′ (SEQ ID NO:7)
353ITR	5′-AGGAATTCGCGGCCGCATTTAAATC-3′ (SEQID NO:8)
E4-F1	5′-AGAGGAACACATTCCCCC-3′ (SEQ ID NO:9)
E4-R2	5′-GGGGAGAAAGGACTGTGTATTCTGTCAAATGG-3′ (SEQ ID NO:10)
E4-F3	5′-TTTCACAGAATACACAGTCCTTTCTCCCCCGCCIGG- 3′ (SEQ ID NO:11)
E4-R4	5′-ACAAAATACGAGAATGACTACGTCCGGCGTTCC- 3′ (SEQ ID NO:12)
E4-F5	5′-GGACGTAGTCATTCTCGTATTTTGTATAGC-3′ (SEQ ID NO:13)
E4-R6	5′-TCACCAACACAGTCGCGG-3′ (SEQ ID NO:14)
NF-1	5′-CCACAACCCCCACTACTCCC-3′ (SEQ ID NO:15)
NR-2	5′ CGTCTCTTCCCTCTCCTCTCC 3′ (SEQ ID NO:16)
NcoI-R	5′-AGGATCATCCGCTGCTGCCC-3′ (SEQ ID NO:17)
NcoI-F	5′-CATCAGGATAGGGCGGTGG-3′ (SEQ ID NO:18)
35E3for	5′-AATGACTAATCCACGTGCGC-3′ (SEQ ID NO:19)
35E3rev	5′-CGACGCGTTGTAGTCGTTGAGCTTCTAG-3′ (SEQ ID NO:20)

[표 2]

실시예 기재와 같은 PER.C6 세포 상의 E1-결실된 Ad35 기재 아데노바이러스의 발생에 사용되는 구조물의 리스트. 어뎁터 구조물은 PacI로 소화되고,pWE.Ad35.pIX-EcoRV는 NotI 와 EcoRV로 소화되며, E4-변형 pBr-기재 구조물은 PacI와 NotI로 소화된다.

No.	Constructs			CPE
1	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-EcoRV	pBr.Ad35.PR5E4	Yes
2	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-EcoRV	pBr.Ad35.PR5Orf6	Yes
3	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-EcoRV	pBr.Ad35.ΔEJPR5E4	Yes
4	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-EcoRV	pBr.Ad35.ΔE3.PR5Orf6	Yes
5	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-rITRxNotI		No
6	pAdApt5.eGFP	pWE.Ad5.AflII-rITRxPacI		Yes

REFERENCES

Abrahamsen K, Kong H-L, Mastrangeli A, Brough D, Lizonova A, Crystal R and Falck-Pedersen E. (1997) Construction of an adenovirus type 7a E1A⁻ vector. J Virol 11:8946-8951.

Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, Van Ormondt H, Hoeben RC and Van der Eb AJ. (1996) Characterization of 911: A new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. Hum Gene Ther 7:215-222.

Fallaux FJ, Bout A, Van der Velde I, Van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, Van Ormondt H, Van der Eb AJ, Valerio D and Hoeben RC. (1998) New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication competent adenoviruses. Hum Gene Ther 9:1909-1917.

Francki RIB, Fauquet CM, Knudson L and Brown F. (1991) Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. Arch Virol Suppl 2:140-144.

Graham FO, Smiley J, Russell W and Nairn R. (1970) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol 36:59-72.

Hagmeyer BM, Duyndam MC, Angel P, De Groot RP, Verlaan M, Elfferich P, Van der Eb AJ and Zantema A. (1996) Oncogene 12:1025-1032.

Horwitz MS. (2001) Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. Virology 279:1-8.

Leppard KN. (1997) E4 gene function in adenovirus, adenovirus vector and adeno-associated virus infections. J Gen Virol 78:2131-2138.

Leppard KN. (1998) Regulated RNA processing and RNA transport during adenovirus infection. Seminars in Virology 8:301-307.

Pilder S, Moore M, Logan J and Shenk T. (1986) The adenovirus E1B 55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. Mol Cell Biol 6:470-476.

Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S and White E. (1992) The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. Proc Natl Acad Sci USA 89:7742-7746.

Russell WC. (2000) Update on adenoviruses and its vectors. J Gen Virol 81:2573-2604.

Shenk T. (1996) Adenoviridae: The viruses and their replication. In Virology, eds. Fields BN, Knipe DM and Howley PM. (Lippincott-Raven, New York) 2:2111-2148.

Van der Vliet PC. (1995) Adenovirus DNA replication. In The molecular repertoire of adenoviruses II, eds. Doerfler W and Böhm P. (Springer-Verlag, Berlin). Current Topics in Microbiology and Immunology 199/II:1-30.

Yew PR and Berk AJ. (1992) Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early region 1B protein. Nature 357:82-85.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터로, 상기 벡터는 기능적 E4-orf6 단백질, 그의 기능적 일부, 유도체 및/또는 동족체를 암호화하는 서열을 추가로 포함하고, 여기서 상기 서열은

1. 상기 제1 혈청형과 다른 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열;

2. 하나 이상의 코돈에서 결실, 돌연변이, 첨가 및/또는 치환을 포함하는 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; 및

3. 상기 제1 혈청형과 다른 제2 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부와, 제3 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부 사이의 융합물을 포함하는 (여기서 상기 제3 혈청형은 상기 제1 혈청형과 동일하거나 또는 다를 수 있다) E4-orf6 암호화 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 재조합 아데노바이러스 벡터.

청구항 2.
제 1항에 있어서, 상기 제1 혈청형과 상기 제2 혈청형이 다른 아데노바이러스 서브그룹으로부터 유래된 재조합 아데노바이러스 벡터.

청구항 3.
제 1항에 있어서, 상기 제1 혈청형이 서브그룹 C 이외의 서브그룹으로부터 유래되고, 상기 E4-orf6 암호화 서열은 서브그룹 C의 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도된 것인 재조합 아데노바이러스 벡터.

청구항 4.
제 1항에 있어서, 상기 제1 혈청형은 서브그룹 B로부터 유래되고, 상기 제2 혈청형은 서브그룹 C로부터 유래된 재조합 아데노바이러스 벡터.

청구항 5.
제 1항에 있어서, 상기 E4-orf6 암호화 서열은 아데노바이러스 혈청형 5로부터 유도된 재조합 아데노바이러스 벡터.

청구항 6.
제 1항 내지 제 5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제1 혈청형이 아데노바이러스 혈청형 11, 14, 16, 21, 34, 35 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 재조합 아데노바이러스 벡터.

청구항 7.
제 1항 내지 제 6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 비-아데노바이러스 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 암호화하는 서열을 추가로 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터.

청구항 8.
제 7항에 있어서, 상기 비-아데노바이러스 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드는; 세포-치사 유도 폴리펩티드, 병원성 유기체의 항원성 결정기, 종양 특이 항원, 바이러스성 단백질, 호르몬 및 시토킨으로 이루어진 군으로부터 선택되는 재조합 아데노바이러스 벡터.

청구항 9.
제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터의 생산방법으로, 상기 방법은

a. 발현 형태로 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된, E1B-55K 암호화 서열, 그들의 기능적 일부, 유도체 및/또는 동족체를 정착시키고 있는 보충 세포에, 상기 보충 세포에 의한 상기 재조합 아데노바이러스 벡터의 조립을 가능하게 하는 아데노바이러스의 필수 요소들을 제공하는 단계, 여기서 상기 요소들은 상기 제2 혈청형과 다른 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터의 몇몇 이상의 구조적 및 비-구조적 요소들 및 (상기 보충 세포의 상기 발현가능한 E1B-55K 단백질과 양립할 수 있는) 기능적 E4-orf6 단백질의 암호화 서열, 또는 그들의 기능적 일부, 유도체 및/또는 동족체를 포함하고;

b. 상기 보충 세포를 아데노바이러스 벡터의 생산 및 조립이 일어나는 것을 가능하게 하는 조건하의 배지에서 배양시키는 단계; 및

c. 그렇게 생산된 재조합 아데노바이러스를 배지 및/또는 보충 세포로부터 수확하는 단계로 이루어지며,

여기서 상기 양립가능한 E4-orf6 단백질을 암호화하는 서열은 그렇게 생산된 재조합 아데노바이러스 벡터에 존재하는 방법.

청구항 10.
제 9항에 있어서, 상기 E4-orf6 암호화 서열이

1. 상기 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열;

2. 상기 제1 및 제2 혈청형과 다른 제3 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열;

3. 하나 이상의 코돈에서 결실, 돌연변이, 첨가 및/또는 치환을 포함하는 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화서열; 및

4. 제3 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부(여기서 상기 제3 혈청형은 상기 제1 혈청형과 동일하거나 또는 다르다)와 상기 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부 사이의 융합물을 포함하는 E4-orf6 암호화 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 11.
제 9항 또는 제 10항에 있어서, 상기 제1 및 제2 혈청형은 다른 서브그룹으로부터 유래된 방법.

청구항 12.
제 9항 내지 제 11항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제2 혈청형이 서브그룹 C의 아데노바이러스 혈청형인 방법.

청구항 13.
제 12항에 있어서, 상기 제2 혈청형이 아데노바이러스 혈청형 5인 방법.

청구항 14.
제 9항 내지 제 13항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제1 혈청형이 서브그룹 B의 아데노바이러스 혈청형인 방법.

청구항 15.
제 14항에 있어서, 상기 제1 혈청형이 아데노바이러스 혈청형 11, 14, 16, 21, 34, 35 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 16.
제 9항 내지 제 15항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 E1B-55K 암호화 서열이 상기 보충 세포의 게놈으로 통합되어 있는 방법.

청구항 17.
제 9항 내지 제 16항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 보충 세포가 1차 이배체 인간 세포 또는 그의 자손 세포로부터 유도되는 방법.

청구항 18.
제 9항 내지 제 17항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 보충 세포가 1차 인간 망막아세포, 1차 인간 배아 신장 세포, 1차 인간 신경세포 또는 일차 인간 양수 아세포로부터 유도되는 방법.

청구항 19.
제 9항 내지 제 18항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 보충 세포가, 그의 게놈으로 통합된, 하나 이상의 아데노바이러스 E1A 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 방법.

청구항 20.
제 19항에 있어서, 상기 하나 이상의 아데노바이러스 E1A 단백질을 암호화하는 핵산이 서브그룹 B와 다른 서브그룹의 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도되는 방법.

청구항 21.

제 19항에 있어서, 상기 하나 이상의 아데노바이러스 E1A 단백질을 암호화하는 핵산이 서브그룹C의 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도되는 방법.

청구항 22.
제 20항에 있어서, 상기 하나 이상의 아데노바이러스 E1A 단백질 암호화 핵산이 아데노바이러스 혈청형 5로부터 유도되는 방법.

청구항 23.
제 9항 내지 제 22항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 E4-orf6 암호화 서열 및 상기 E1B-55K 암호화 서열이 다른 아데노바이러스 혈청형들로부터 유도되고 여기서 상기 다른 아데노바이러스 혈청형들이 동일한 아데노바이러스 서브그룹의 멤버인 방법.

청구항 24.
제 9항 내지 제 22항 중 하나의 항에 있어서, 상기 E4-orf6 암호화 서열 및 상기 E1B-55K 암호화 서열이 다른 아데노바이러스 혈청형들로부터 유도되고 여기서 상기 다른 아데노바이러스 혈청형들은 둘 다 서브그룹 C의 멤버인 방법.

청구항 25.
제 9항 내지 제 22항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 E4-orf6 암호화 서열 및 상기 E1B-55K 암호화 서열이 동일한 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도되는 방법.

청구항 26.
제 25항에 있어서, 상기 E4-orf6 암호화 서열 및 상기 E1B-55K 암호화 서열이 아데노바이러스 혈청형 5로부터 유도되는 방법.

청구항 27.
제 9항에 있어서, 상기 보충 세포가 PER.C6 세포 또는 그의 유도체인 방법.

청구항 28.
제 1항 내지 제 8항 중 어느 하나의 항에 따르거나 또는 제 9항 내지 제 27항 중 어느 하나의 항에 따른 방법으로 얻을 수 있는 재조합 아데노바이러스 벡터를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 29.
제 1항 내지 제 8항 중 어느 하나의 항에 따른 재조합 아데노바이러스 벡터 또는 제 28항에 따른 약제학적 조성물을 인체에 투여하는 것을 포함하는 인체의 치료방법.

청구항 30.
a) 제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터의 생산을 위한 보충 세포, (여기서 상기 세포는 발현가능한 형태의 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된, E1B-55K 암호화 서열, 그의 기능적 일부, 유도체 및/또는 동족체를 정착시키고 있다), 및

b) 하나 이상의 복제가능한 핵산 벡터 상에 있는 상기 보충 세포에 의한 상기 재조합 아데노바이러스 벡터의 조립을 가능하게 하는 모든 필수 아데노바이러스 요소들을 포함하는 키트로, 여기서 상기 요소들은 상기 제2 혈청형과 다른 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 유래된 몇몇 이상의 구조적 및 비-구조적 요소들 및 상기 보충 세포중의 상기 발현가능한 E1B-55K 단백질과 양립할 수 있는 기능적 E4-orf6 단백질, 또는 그들의 기능적 일부, 유도체 및/또는 동족체를 암호화하는 서열을 포함하는 것인 키트.

청구항 31.
제 30항에 있어서, 상기 E4-orf6 암호화 서열은:

1. 상기 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열;

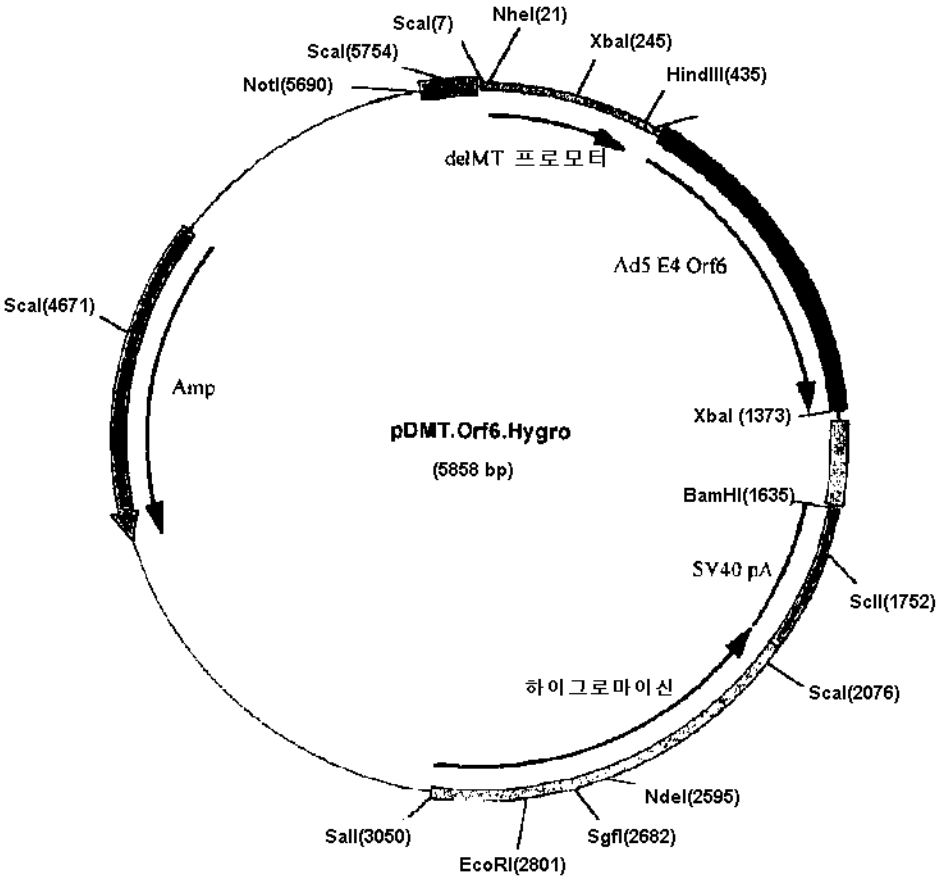
2. 상기 제1 및 제2 혈청형과 다른 제3 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열;

3. 하나 이상의 코돈에서 결실, 돌연변이, 첨가 및/또는 치환을 포함하는 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; 및

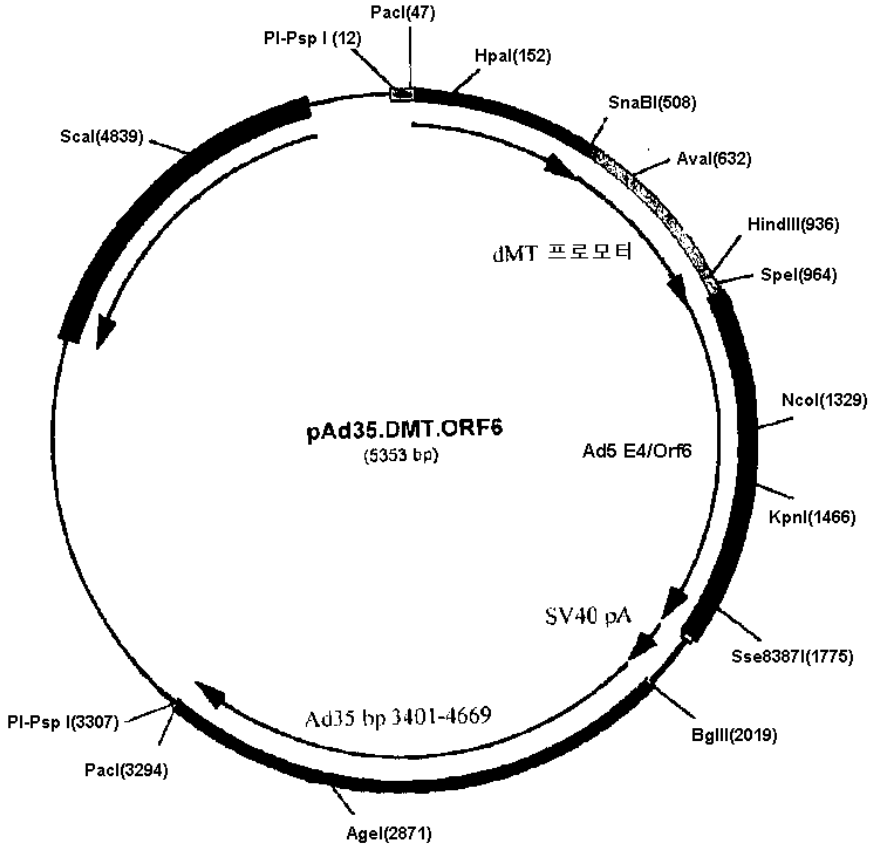
4. 제3 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부(여기서 상기 제3 혈청형은 상기 제1 혈청혈과 동일하거나 또는 다르다)와 상기 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부 사이의 융합물을 포함하는 E4-orf6 암호화 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 키트.

도면

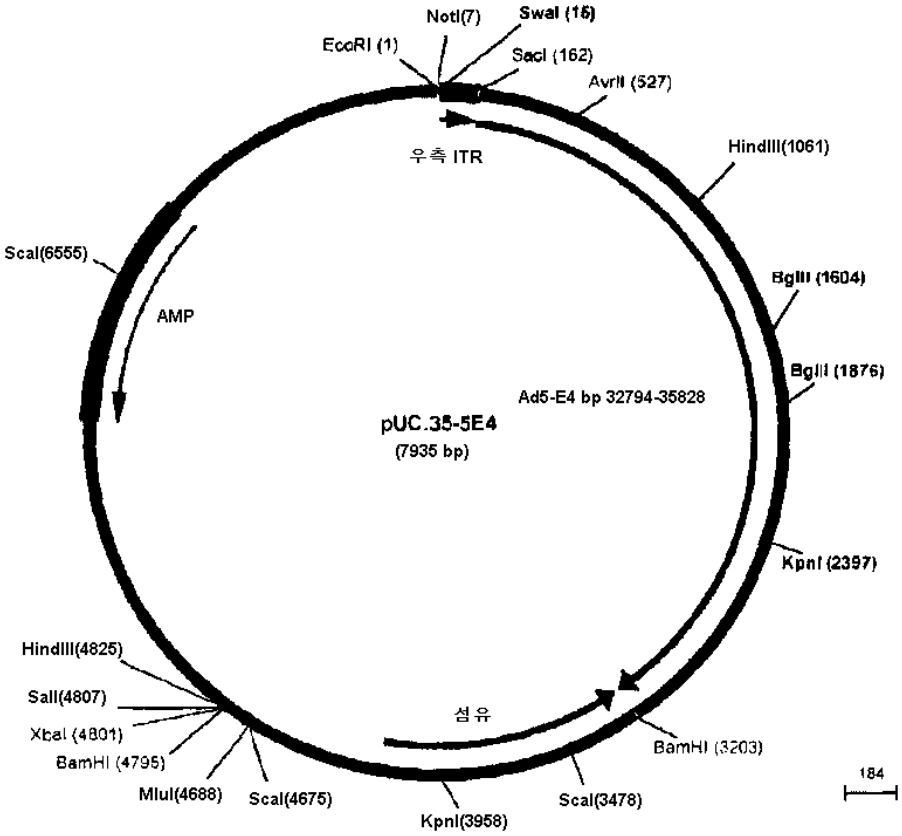
도면1



도면2

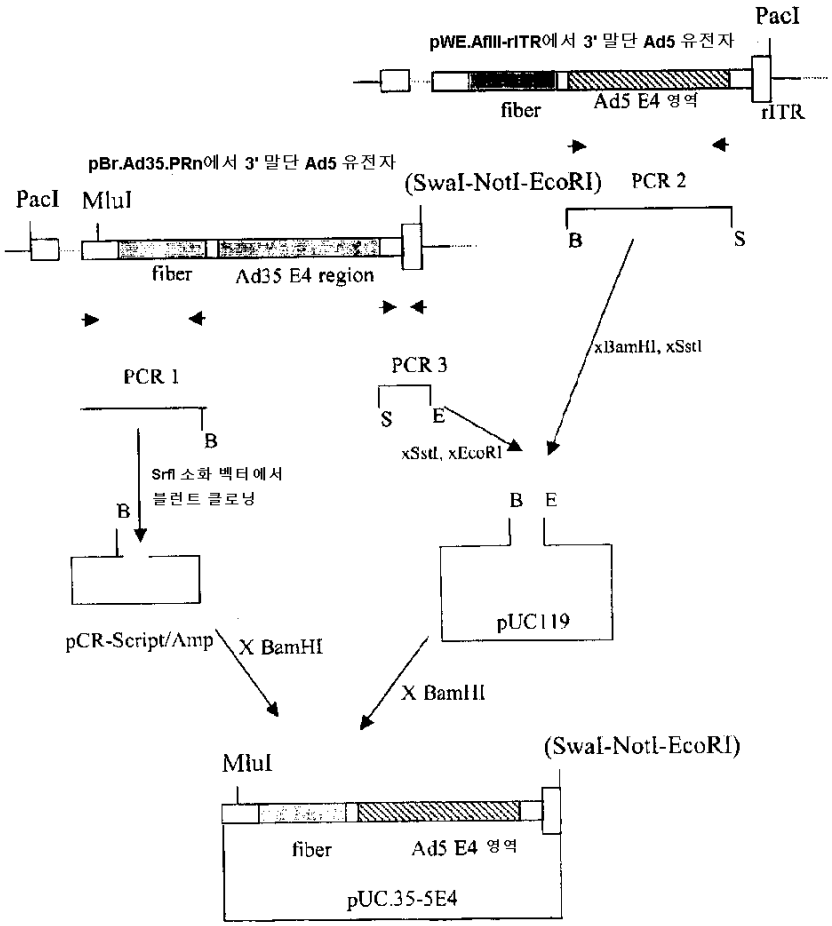

PacI(47)
PI-Psp I (12)
HpaI(152)
SnaBI(508)
ScaI(4839)
AvaI(632)
HindIII(936)
dMT 프로모터
SpeI(964)
NcoI(1329)
pAd35.DMT.ORF6
(5353 bp)
Ad5 E4/Orf6
KpnI(1466)
SV40 pA
Sse8387I(1775)
PI-Psp I(3307)
Ad35 bp 3401-4669
BglII(2019)
PacI(3294)
AgeI(2871)

도면3

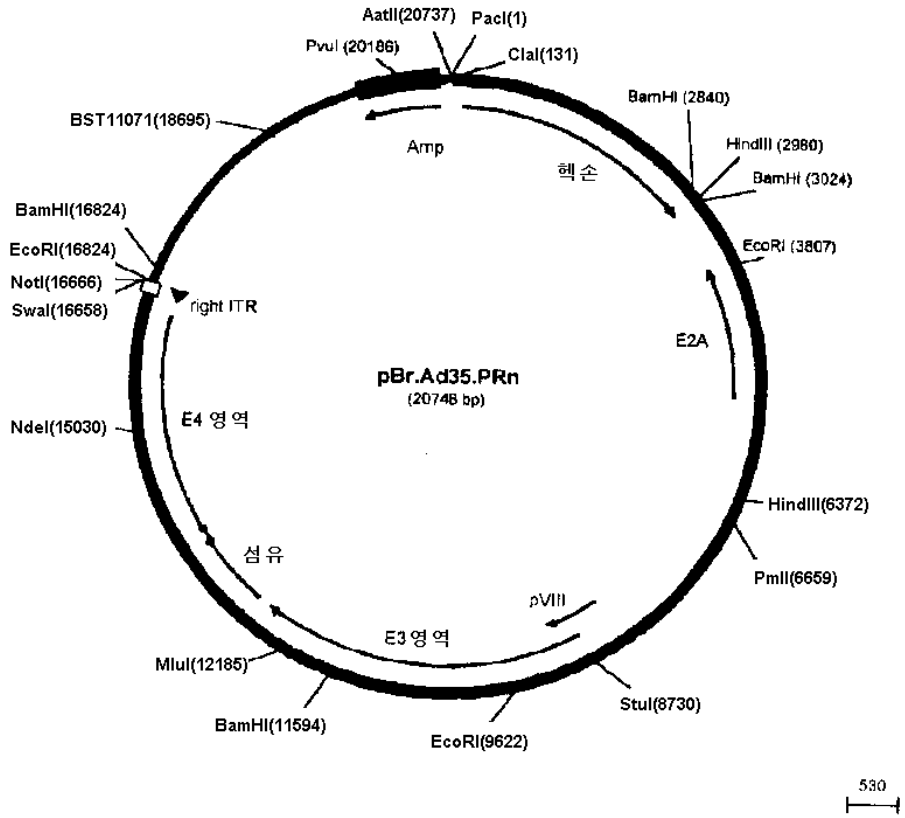

NotI(7)
SwaI (15)
EcoRI (1)
SacI (162)
AvrII (527)
우측 ITR
HindIII(1061)
ScaI(6555)
BglII (1604)
AMP
BglII (1876)
Ad5-E4 bp 32794-35828
pUC.35-5E4
(7935 bp)
KpnI (2397)
HindIII(4825)
SalI(4807)
섬유
XbaI (4801)
BamHI (3203)
BamHI (4795)
MluI(4688)
ScaI(4675)
ScaI(3478)
KpnI(3958)
184

도면4

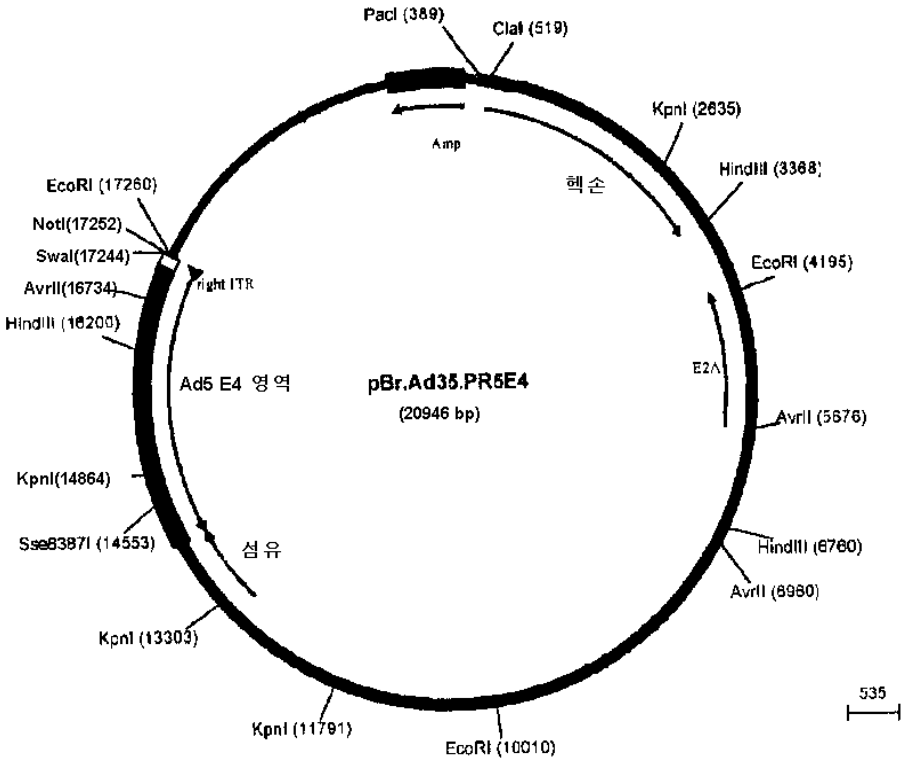
pUC.35-5E4의 클로닝 단계



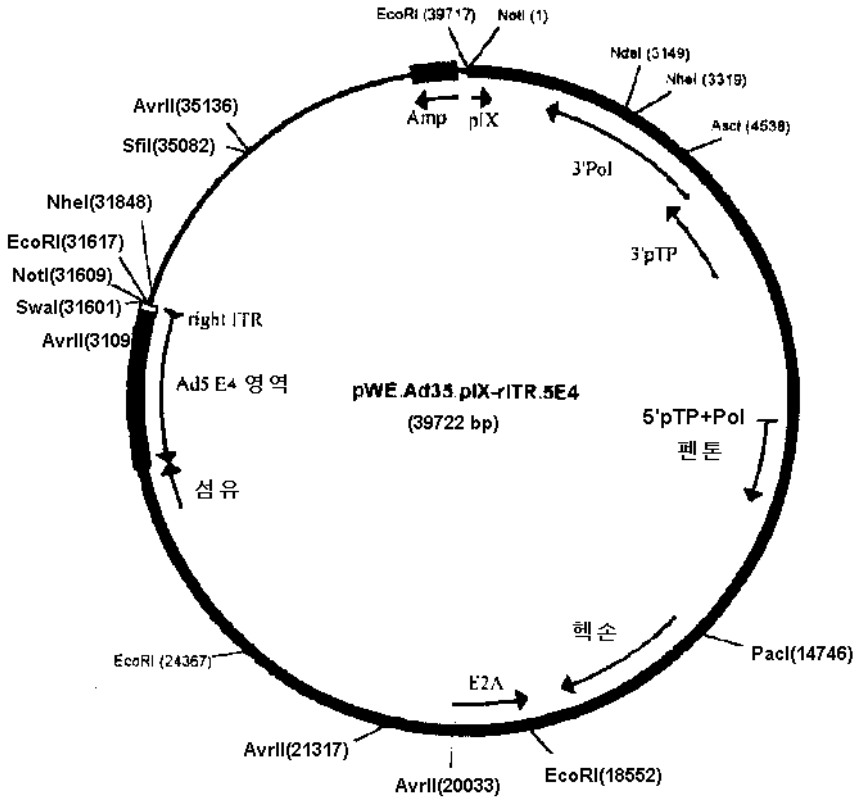
도면5


AatII(20737)
PacI(1)
PvuI (20186)
ClaI(131)
BamHI (2840)
BST11071(18695)
HindIII (2980)
Amp
핵손
BamHI (3024)
BamHI(16824)
EcoRI (3807)
EcoRI(16824)
NotI(16666)
right ITR
SwaI(16658)
E2A
pBr.Ad35.PRn
(20748 bp)
NdeI(15030)
E4 영역
HindIII(6372)
PmlI(6659)
섬유
pVIII
E3영역
MluI(12185)
StuI(8730)
BamHI(11594)
EcoRI(9622)
530

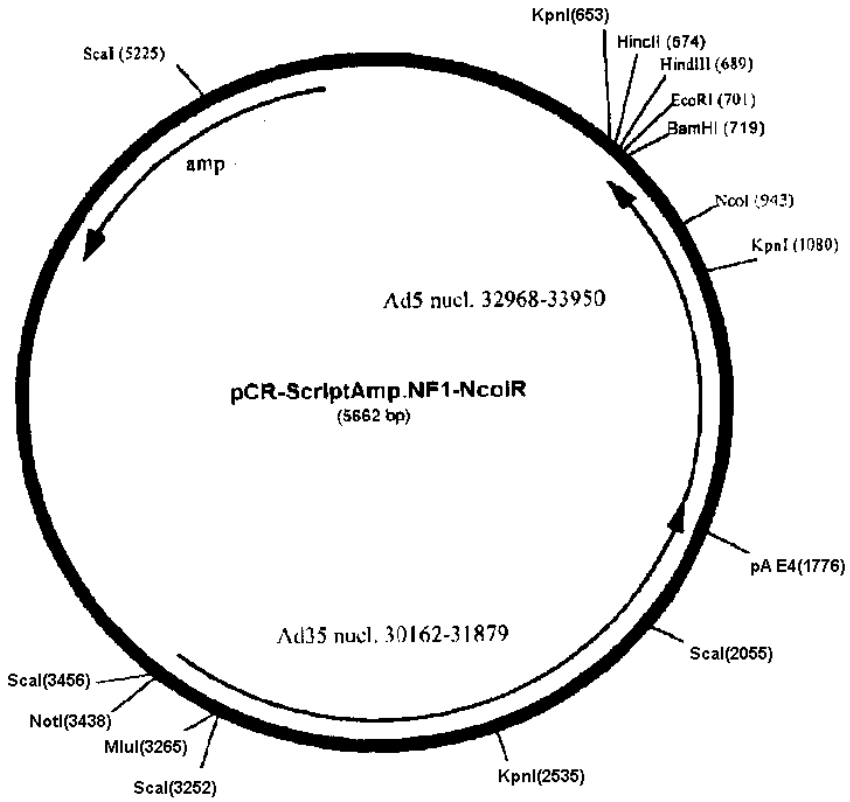
도면6


PacI (389)
ClaI (519)
KpnI (2635)
Amp
HindIII (3368)
핵손
EcoRI (17260)
NotI(17252)
EcoRI (4195)
SwaI(17244)
AvrII(16734)
right ITR
HindIII (16200)
E2A
Ad5 E4 영역
pBr.Ad35.PR5E4
(20946 bp)
AvrII (5876)
KpnI(14864)
Sse8387I (14553)
HindIII (6760)
섬유
AvrII (6980)
KpnI (13303)
KpnI (11791)
EcoRI (10010)
535

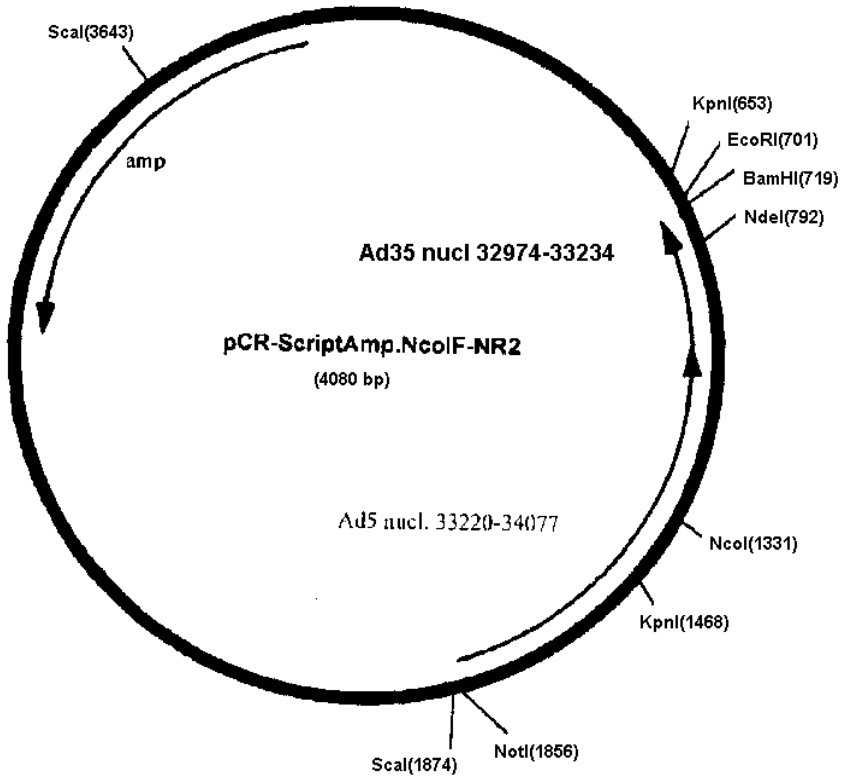
도면7


EcoRI (39717)
NotI (1)
NdeI (3149)
NheI (3319)
AscI (4538)
AvrII(35136)
SfiI(35082)
Amp
pIX
3'Pol
3'pTP
NheI(31848)
EcoRI(31617)
NotI(31609)
SwaI(31601)
AvrII(3109
right ITR
Ad5 E4 영역
pWE.Ad35.pIX-rITR.5E4
(39722 bp)
5'pTP+Pol
펜톤
섬유
헥손
PacI(14746)
EcoRI (24367)
E2A
AvrII(21317)
AvrII(20033)
EcoRI(18552)

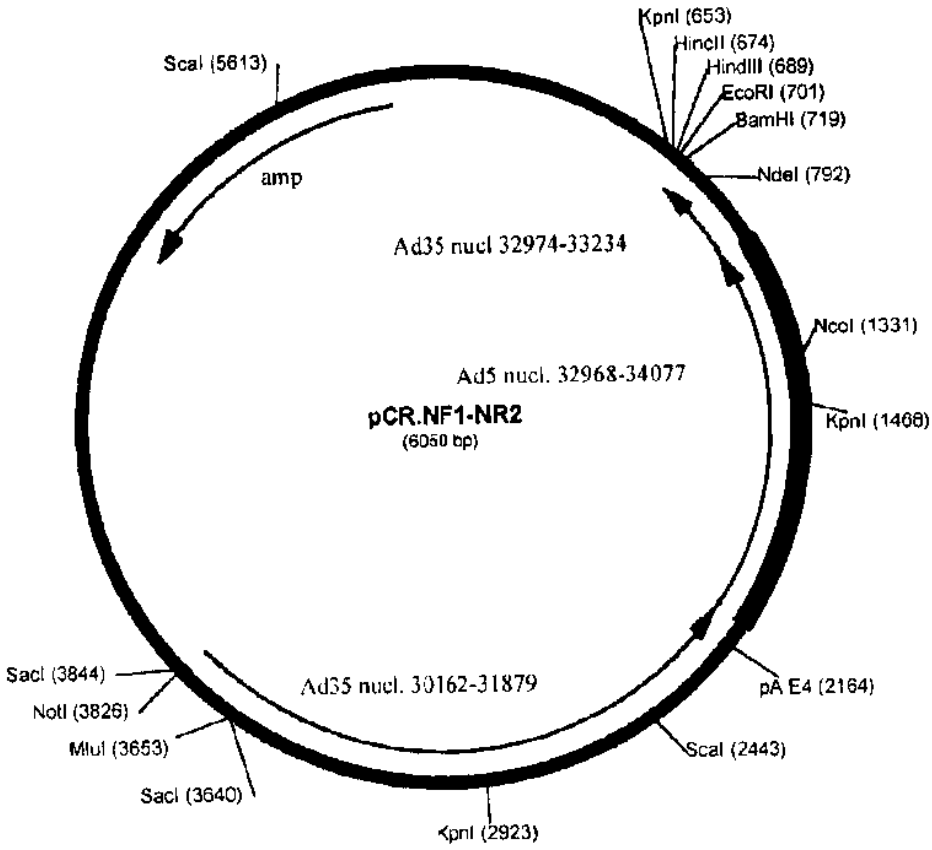
도면8


KpnI(653)
HincII (674)
HindIII (689)
EcoRI (701)
BamHI (719)
ScaI (5225)
amp
NcoI (943)
KpnI (1080)
Ad5 nucl. 32968-33950
pCR-ScriptAmp.NF1-NcoIR
(5662 bp)
pA E4(1776)
Ad35 nucl. 30162-31879
ScaI(2055)
ScaI(3456)
NotI(3438)
MluI(3265)
ScaI(3252)
KpnI(2535)

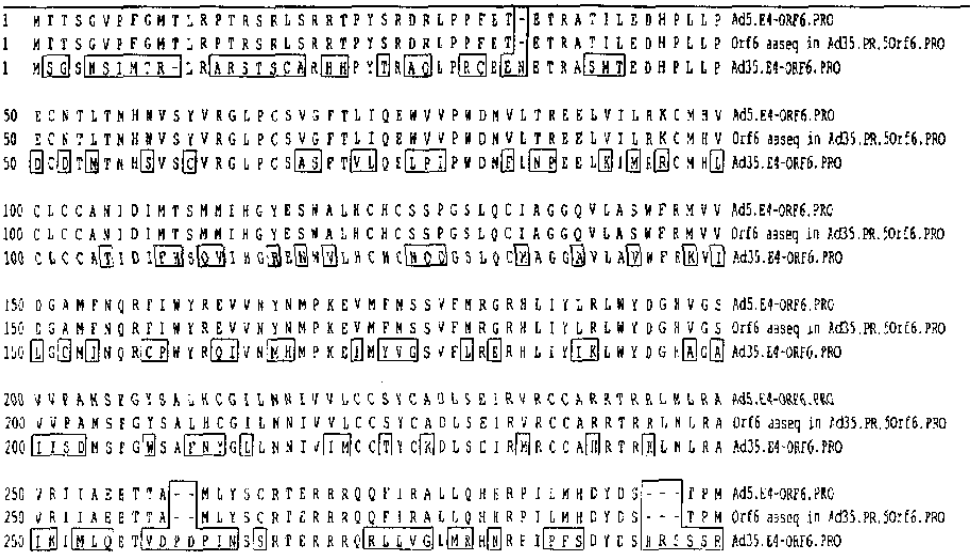
도면9


ScaI(3643)
amp
KpnI(653)
EcoRI(701)
BamHI(719)
NdeI(792)
Ad35 nucl 32974-33234
pCR-ScriptAmp.NcoIF-NR2
(4080 bp)
Ad5 nucl. 33220-34077
NcoI(1331)
KpnI(1468)
NotI(1856)
ScaI(1874)

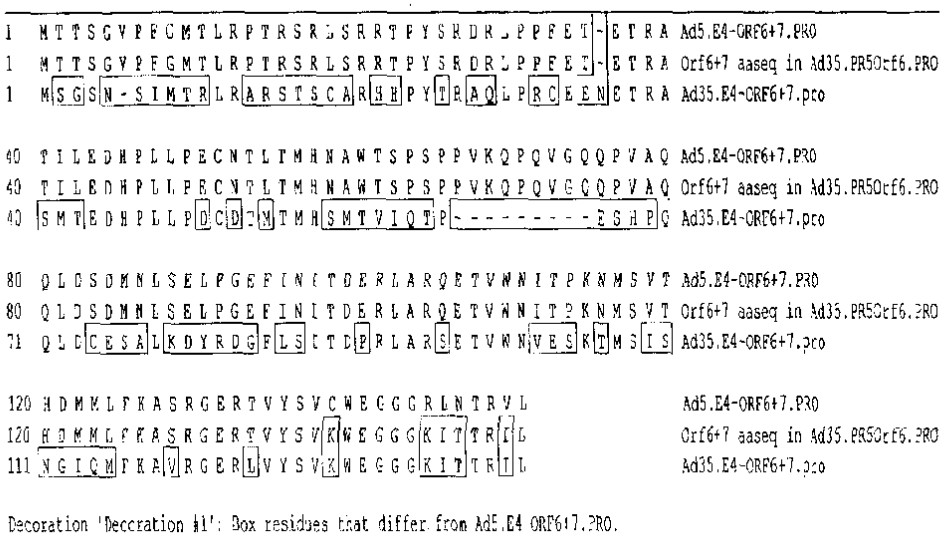
도면10


KpnI (653)
HincII (674)
HindIII (689)
EcoRI (701)
BamHI (719)
ScaI (5613)
amp
NdeI (792)
Ad35 nucl 32974-33234
NcoI (1331)
Ad5 nucl. 32968-34077
pCR.NF1-NR2
(6050 bp)
KpnI (1468)
SacI (3844)
NotI (3826)
MluI (3653)
SacI (3640)
Ad35 nucl. 30162-31879
pA E4 (2164)
ScaI (2443)
KpnI (2923)

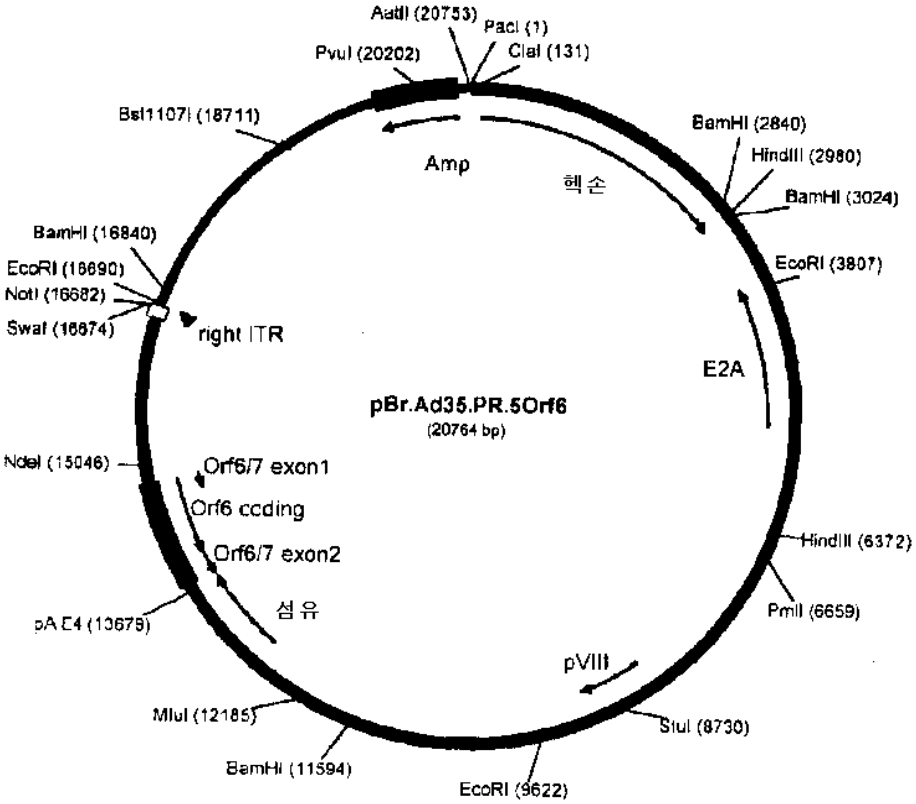
도면11


Ad5.E4-ORF6.PRO
Orf6 aaseq in Ad35.PR.5Orf6.PRO
Ad35.E4-ORF6.PRO
Decoration 'Decoration #1': Box residues that differ from Ad5.E4-ORF6.PRO.

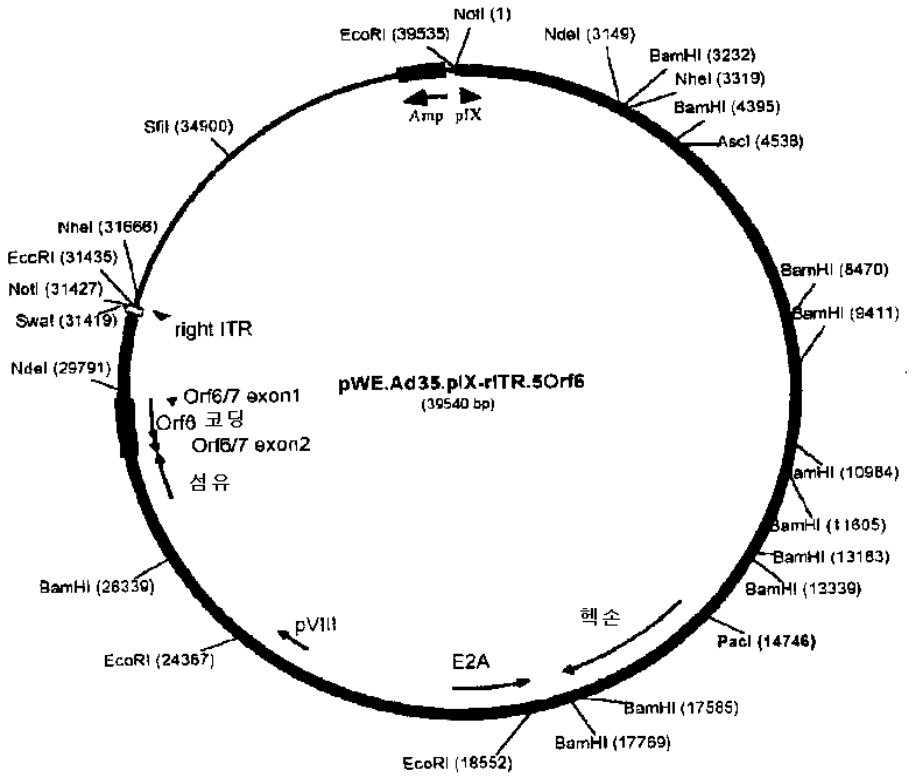
도면12


Ad5.E4-ORF6+7.PRO
Orf6+7 aaseq in Ad35.PR5Orf6.PRO
Ad35.E4-ORF6+7.pro
Decoration 'Decoration #1': Box residues that differ from Ad5.E4 ORF6+7.PRO.

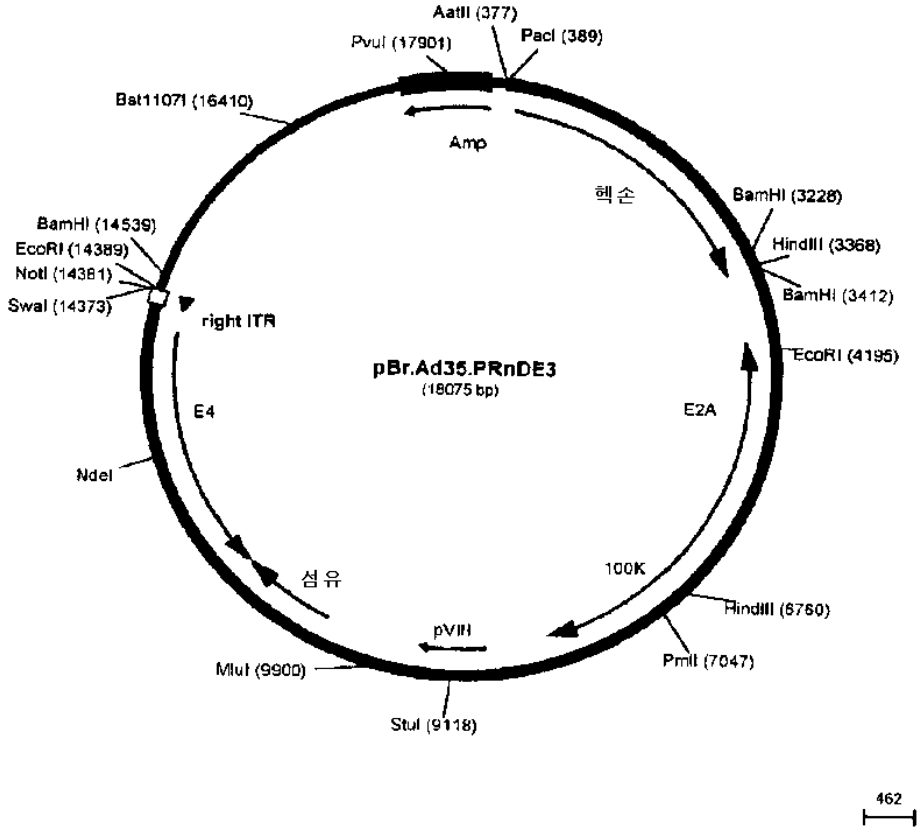
도면13


AatII (20753)
PacI (1)
PvuI (20202)
ClaI (131)
Bsl1107I (18711)
BamHI (2840)
HindIII (2980)
Amp
헥손
BamHI (3024)
BamHI (16840)
EcoRI (16690)
EcoRI (3807)
NotI (16682)
SwaI (16674)
right ITR
E2A
pBr.Ad35.PR.5Orf6
(20764 bp)
NdeI (15046)
Orf6/7 exon1
Orf6 ccding
HindIII (6372)
Orf6/7 exon2
섬유
pA E4 (13679)
PmlI (6659)
pVIII
MluI (12185)
SfiI (8730)
BamHI (11594)
EcoRI (9622)

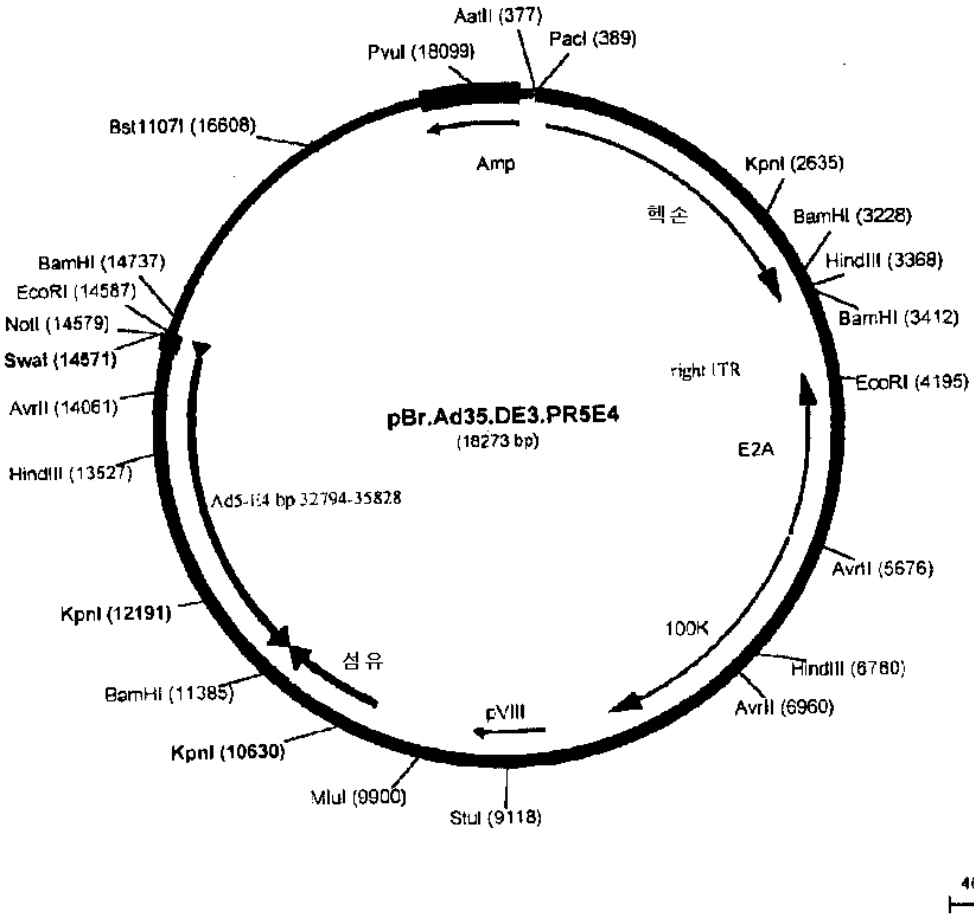
도면14


NotI (1)
EcoRI (39535)
NdeI (3149)
BamHI (3232)
NheI (3319)
Amp pIX
BamHI (4395)
SfiI (34900)
AscI (4538)
NheI (31666)
EccRI (31435)
BamHI (8470)
NotI (31427)
BamHI (8411)
SwaI (31419)
right ITR
NdeI (29791)
pWE.Ad35.pIX-rITR.5Orf6
(39540 bp)
Orf6/7 exon1
Orf6 코딩
Orf6/7 exon2
amHI (10984)
섬유
BamHI (11605)
BamHI (13183)
BamHI (26339)
BamHI (13339)
pVIII
헥손
PacI (14746)
EcoRI (24367)
E2A
BamHI (17585)
BamHI (17769)
EcoRI (18552)

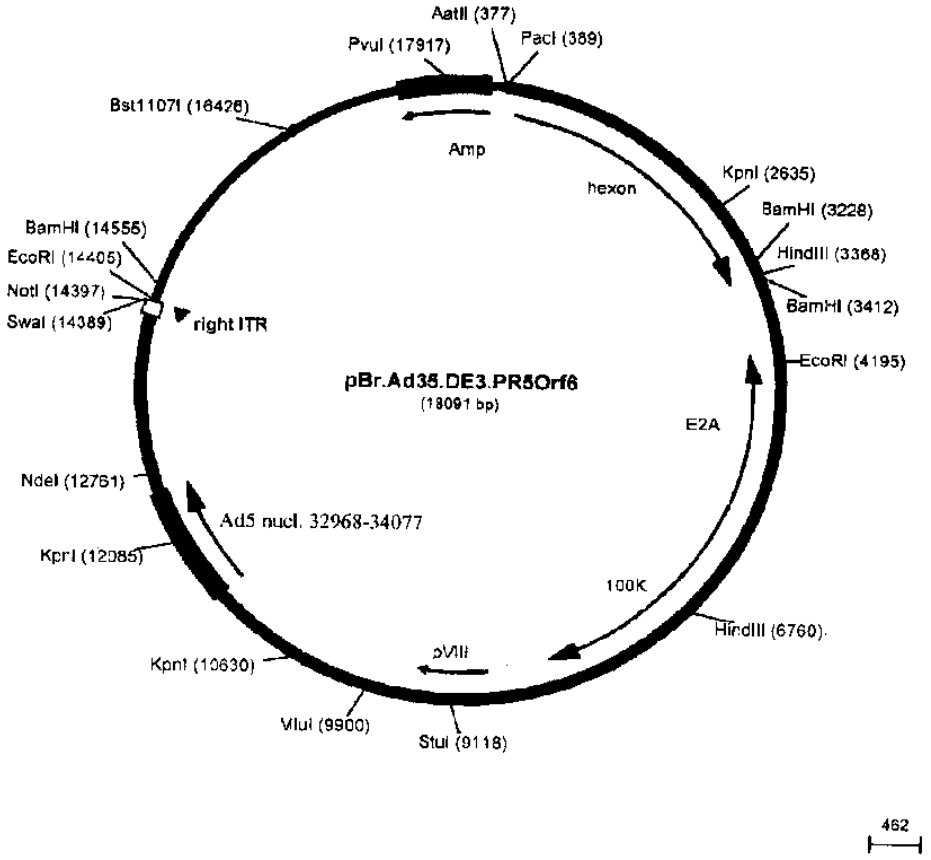
도면15


AatII (377)
PacI (389)
PvuI (17901)
Bst1107I (16410)
Amp
헥손
BamHI (3228)
HindIII (3368)
BamHI (3412)
EcoRI (4195)
BamHI (14539)
EcoRI (14389)
NotI (14381)
SwaI (14373)
right ITR
pBr.Ad35.PRnDE3
(18075 bp)
E4
E2A
NdeI
섬유
100K
HindIII (6760)
pVIII
PmlI (7047)
MluI (9900)
StuI (9118)
462

도면16

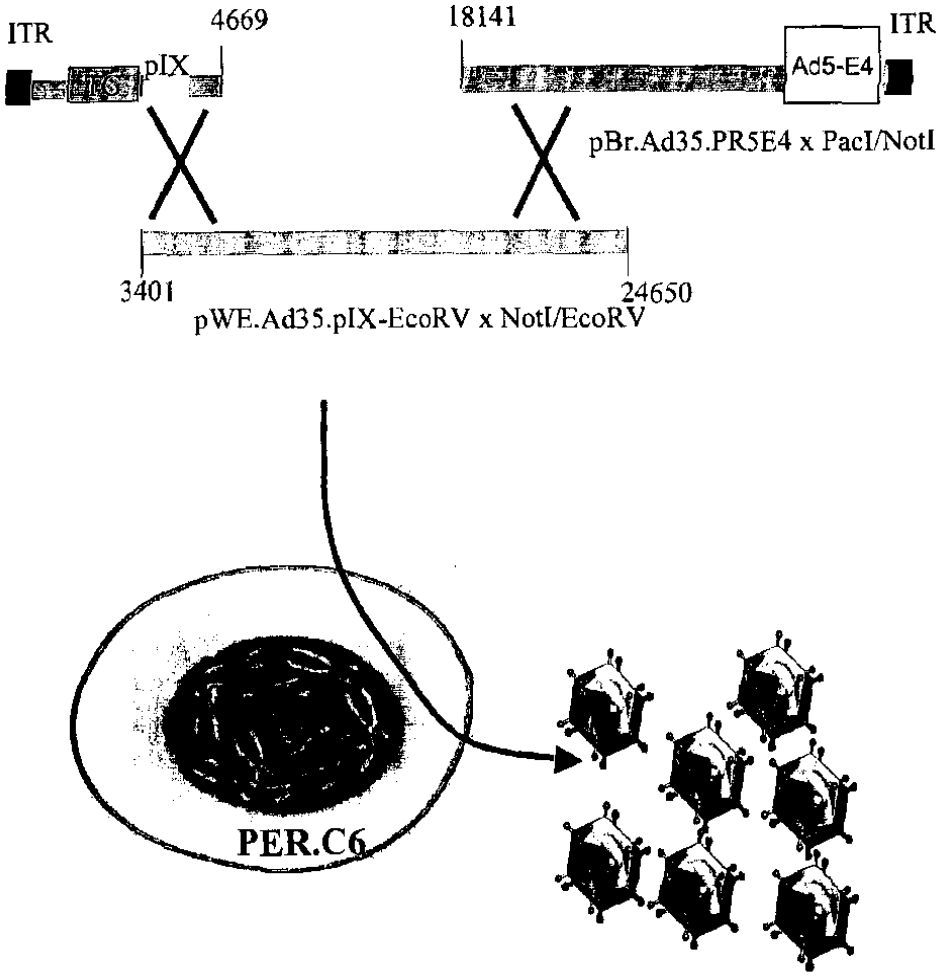

AatII (377)
PacI (389)
PvuI (18099)
Bst1107I (16608)
Amp
KpnI (2635)
헥손
BamHI (3228)
HindIII (3368)
BamHI (14737)
EcoRI (14587)
NotI (14579)
SwaI (14571)
BamHI (3412)
right ITR
EcoRI (4195)
AvrII (14061)
pBr.Ad35.DE3.PR5E4
(18273 bp)
HindIII (13527)
E2A
Ad5-E4 bp 32794-35828
AvrII (5676)
KpnI (12191)
100K
섬유
HindIII (6760)
BamHI (11385)
AvrII (6960)
pVIII
KpnI (10630)
MluI (9900)
StuI (9118)
467

도면17

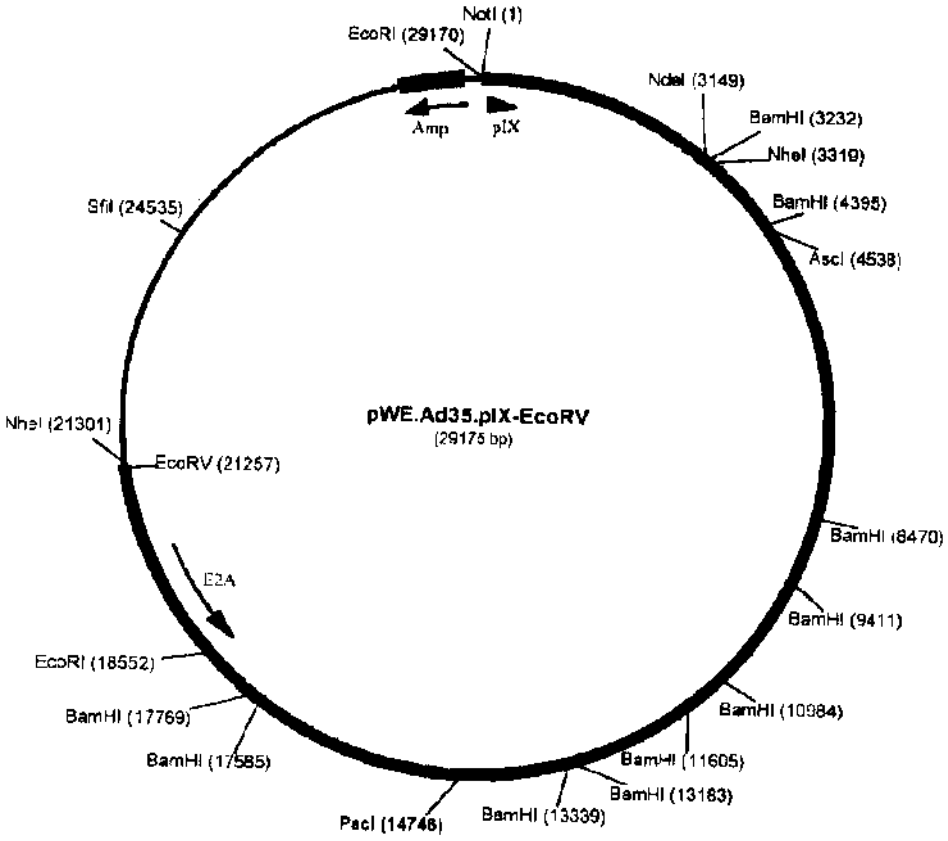

AatII (377)
PacI (389)
PvuI (17917)
Bst1107I (16426)
Amp
hexon
KpnI (2635)
BamHI (3228)
HindIII (3368)
BamHI (14555)
EcoRI (14405)
NotI (14397)
SwaI (14389)
right ITR
BamHI (3412)
EcoRI (4195)
pBr.Ad35.DE3.PR5Orf6
(18091 bp)
E2A
NdeI (12761)
Ad5 nucl. 32968-34077
KpnI (12085)
100K
HindIII (6760)
pVIII
KpnI (10630)
MluI (9900)
StuI (9118)
462

도면18

PER.C6 세포에서 이중 동종 재조합을 통한
E1-결실된 Ad35 바이러스의 발생



도면19



SEQUENCE LISTING

<110> Crucell Holland B.V.

Vogels, Ronald

Bout, Abraham

<120> Means and methods for the production of adenovirus vectors

<130> 0075WO000RD

<140>

<141> 2003-04-24

<160> 25

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 35FR

<400> 1
cgggatccac tttattttag ttgtcgtctt c 31

<210> 2
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 35R4

<400> 2
cggaattctt aattaaggga aatgcaaatc tgtgagg 37

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 35psi-For

<400> 3
gtggtattta tggcagggtg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer DF35-1

<400> 4

cactcaccac ctccaattcc 20

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 5E4F

<400> 5

cgggatccgt ttgtgttatg tttcaacgtg 30

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 5E4R

<400> 6

gctggcgagc tcggcggagt aacttgtatg tg 32

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 355ITR

<400> 7

gatccggagc tcacaacgtc attttcccac g 31

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 353ITR

<400> 8

aggaattcgc ggccgcattt aaatc 25

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer E4-F1

<400> 9

agaggaacac attccccc 18

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer E4-R2

<400> 10

ggggagaaag gactgtgtat tctgtcaaat gg 32

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer E4-F3

<400> 11

tttgacagaa tacacagtcc tttctccccg gctgg 35

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer E4-R4

<400> 12

acaaaatacg agaatgacta cgtccggcgt tcc 33

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer E4-F5

<400> 13

ggacgtagtc attctcgtat tttgtatagc 30

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer E4-R6

<400> 14

tcaccaacac agtggggg 18

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer NF-1

<400> 15

ccacaacccc cactactccc 20

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer NR-2

<400> 16

cgtctcttcc ctctcctctc c 21

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer NcoI-R

<400> 17

aggatcatcc gctgctgccc 20

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer NcoI-F

<400> 18

catcaggata gggcggtgg 19

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 35E3for

<400> 19

aatgactaat gcaggtgcgc 20

<210> 20

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 35E3rev

<400> 20

cgacgcgttg tagtcgttga gcttctag 28

<210> 21

<211> 294

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of the E4-orf6 protein of Adenovirus type 5

<400> 21

Met Thr Thr Ser Gly Val Pro Phe Gly Met Thr Leu Arg Pro Thr Arg
1 5 10 15

Ser Arg Leu Ser Arg Arg Thr Pro Tyr Ser Arg Asp Arg Leu Pro Pro
20 25 30

```
Phe Glu Thr Glu Thr Arg Ala Thr Ile Leu Glu Asp His Pro Leu Leu
        35                  40                  45

Pro Glu Cys Asn Thr Leu Thr Met His Asn Val Ser Tyr Val Arg Gly
    50                  55                  60

Leu Pro Cys Ser Val Gly Phe Thr Leu Ile Gln Glu Trp Val Val Pro
65                  70                  75                  80

Trp Asp Met Val Leu Thr Arg Glu Glu Leu Val Ile Leu Arg Lys Cys
                85                  90                  95

Met His Val Cys Leu Cys Cys Ala Asn Ile Asp Ile Met Thr Ser Met
            100                 105                 110

Met Ile His Gly Tyr Glu Ser Trp Ala Leu His Cys His Cys Ser Ser
        115                 120                 125

Pro Gly Ser Leu Gln Cys Ile Ala Gly Gly Gln Val Leu Ala Ser Trp
    130                 135                 140

Phe Arg Met Val Val Asp Gly Ala Met Phe Asn Gln Arg Phe Ile Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Arg Glu Val Val Asn Tyr Asn Met Pro Lys Glu Val Met Phe Met
                165                 170                 175

Ser Ser Val Phe Met Arg Gly Arg His Leu Ile Tyr Leu Arg Leu Trp
            180                 185                 190

Tyr Asp Gly His Val Gly Ser Val Val Pro Ala Met Ser Phe Gly Tyr
        195                 200                 205

Ser Ala Leu His Cys Gly Ile Leu Asn Asn Ile Val Val Leu Cys Cys
```

210 215 220

Ser Tyr Cys Ala Asp Leu Ser Glu Ile Arg Val Arg Cys Cys Ala Arg
225 230 235 240

Arg Thr Arg Arg Leu Met Leu Arg Ala Val Arg Ile Ile Ala Glu Glu
245 250 255

Thr Thr Ala Met Leu Tyr Ser Cys Arg Thr Glu Arg Arg Arg Gln Gln
260 265 270

Phe Ile Arg Ala Leu Leu Gln His His Arg Pro Ile Leu Met His Asp
275 280 285

Tyr Asp Ser Thr Pro Met
290

<210> 22
<211> 299
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence of the E4-orf6 protein of Adenovirus type 35

<400> 22

Met Ser Gly Ser Asn Ser Ile Met Thr Arg Leu Arg Ala Arg Ser Thr
1 5 10 15

Ser Cys Ala Arg His His Pro Tyr Thr Arg Ala Gln Leu Pro Arg Cys
20 25 30

Glu Glu Asn Glu Thr Arg Ala Ser Met Thr Glu Asp His Pro Leu Leu

35 40 45

Pro Asp Cys Asp Thr Met Thr Met His Ser Val Ser Cys Val Arg Gly
50 55 60

Leu Pro Cys Ser Ala Ser Phe Thr Val Leu Gln Glu Leu Pro Ile Pro
65 70 75 80

Trp Asp Met Phe Leu Asn Pro Glu Glu Leu Lys Ile Met Arg Arg Cys
85 90 95

Met His Leu Cys Leu Cys Cys Ala Thr Ile Asp Ile Phe His Ser Gln
100 105 110

Val Ile His Gly Arg Glu Asn Trp Val Leu His Cys His Cys Asn Gln
115 120 125

Gln Gly Ser Leu Gln Cys Met Ala Gly Gly Ala Val Leu Ala Val Trp
130 135 140

Phe Arg Lys Val Ile Leu Gly Cys Met Ile Asn Gln Arg Cys Pro Trp
145 150 155 160

Tyr Arg Gln Ile Val Asn Met His Met Pro Lys Glu Ile Met Tyr Val
165 170 175

Gly Ser Val Phe Leu Arg Arg Arg His Leu Ile Tyr Ile Lys Leu Trp
180 185 190

Tyr Asp Gly His Ala Gly Ala Ile Ile Ser Asp Met Ser Phe Gly Trp
195 200 205

Ser Ala Phe Asn Tyr Gly Leu Leu Asn Asn Ile Val Ile Met Cys Cys
210 215 220

Thr Tyr Cys Lys Asp Leu Ser Glu Ile Arg Met Arg Cys Cys Ala His
225 230 235 240

Arg Thr Arg Lys Leu Met Leu Arg Ala Ile Lys Ile Met Leu Gln Glu
245 250 255

Thr Val Asp Pro Asp Pro Ile Asn Ser Ser Arg Thr Glu Arg Arg Arg
260 265 270

Gln Arg Leu Leu Val Gly Leu Met Arg His Asn Arg Pro Ile Pro Phe
275 280 285

Ser Asp Tyr Asp Ser His Arg Ser Ser Ser Arg
290 295

<210> 23
<211> 150
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence of the E4-orf6+7 protein of Adenovirus type 5

<400> 23

Met Thr Thr Ser Gly Val Pro Phe Gly Met Thr Leu Arg Pro Thr Arg
1 5 10 15

Ser Arg Leu Ser Arg Arg Thr Pro Tyr Ser Arg Asp Arg Leu Pro Pro
20 25 30

Phe Glu Thr Glu Thr Arg Ala Thr Ile Leu Glu Asp His Pro Leu Leu
35 40 45

Pro Glu Cys Asn Thr Leu Thr Met His Asn Ala Trp Thr Ser Pro Ser
50 55 60

Pro Pro Val Lys Gln Pro Gln Val Gly Gln Gln Pro Val Ala Gln Gln
65 70 75 80

Leu Asp Ser Asp Met Asn Leu Ser Glu Leu Pro Gly Glu Phe Ile Asn
85 90 95

Ile Thr Asp Glu Arg Leu Ala Arg Gln Glu Thr Val Trp Asn Ile Thr
100 105 110

Pro Lys Asn Met Ser Val Thr His Asp Met Met Leu Phe Lys Ala Ser
115 120 125

Arg Gly Glu Arg Thr Val Tyr Ser Val Cys Trp Glu Gly Gly Gly Arg
130 135 140

Leu Asn Thr Arg Val Leu
145 150

<210> 24
<211> 150
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence of the E4-orf6+7 fusion protein from Adenovirus type 5 and Adenovirus type 35

<400> 24

Met Thr Thr Ser Gly Val Pro Phe Gly Met Thr Leu Arg Pro Thr Arg

1 5 10 15

Ser Arg Leu Ser Arg Arg Thr Pro Tyr Ser Arg Asp Arg Leu Pro Pro
20 25 30

Phe Glu Thr Glu Thr Arg Ala Thr Ile Leu Glu Asp His Pro Leu Leu
35 40 45

Pro Glu Cys Asn Thr Leu Thr Met His Asn Ala Trp Thr Ser Pro Ser
50 55 60

Pro Pro Val Lys Gln Pro Gln Val Gly Gln Gln Pro Val Ala Gln Gln
65 70 75 80

Leu Asp Ser Asp Met Asn Leu Ser Glu Leu Pro Gly Glu Phe Ile Asn
85 90 95

Ile Thr Asp Glu Arg Leu Ala Arg Gln Glu Thr Val Trp Asn Ile Thr
100 105 110

Pro Lys Asn Met Ser Val Thr His Asp Met Met Leu Phe Lys Ala Ser
115 120 125

Arg Gly Glu Arg Thr Val Tyr Ser Val Lys Trp Glu Gly Gly Gly Lys
130 135 140

Ile Thr Thr Arg Ile Leu
145 150

<210> 25
<211> 141
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of the E4-orf6+7 protein of Adenovirus type 35

<400> 25

Met Ser Gly Ser Asn Ser Ile Met Thr Arg Leu Arg Ala Arg Ser Thr
1 5 10 15

Ser Cys Ala Arg His His Pro Tyr Thr Arg Ala Gln Leu Pro Arg Cys
20 25 30

Glu Glu Asn Glu Thr Arg Ala Ser Met Thr Glu Asp His Pro Leu Leu
35 40 45

Pro Asp Cys Asp Thr Met Thr Met His Ser Met Thr Val Ile Gln Thr
50 55 60

Pro Glu Ser His Pro Gln Gln Leu Asp Cys Glu Ser Ala Leu Lys Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Asp Gly Phe Leu Ser Ile Thr Asp Pro Arg Leu Ala Arg Ser
85 90 95

Glu Thr Val Trp Asn Val Glu Ser Lys Thr Met Ser Ile Ser Asn Gly
100 105 110

Ile Gln Met Phe Lys Ala Val Arg Gly Glu Arg Leu Val Tyr Ser Val
115 120 125

Lys Trp Glu Gly Gly Gly Lys Ile Thr Thr Arg Ile Leu
130 135 140