

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 96127865

A61K 48/00 (2006.01)

※申請日期： 96.12.30

※IPC 分類：C12N 15/63 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

C12N 15/861 (2006.01)

增加重組腺病毒載體組織趨性之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR INCREASING TISSUE
TROPISM OF RECOMBINANT ADENOVIRAL VECTORS

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

澳大利亞國家科學工業研究所

COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH
ORGANISATION

代表人：(中文/英文)

強 哈伯特 瓦可

WALKER, JOHN HERBERT

住居所或營業所地址：(中文/英文)

澳大利亞首都特市坎培區李內斯頓區

LIMESTONE AVENUE, CAMPBELL, AUSTRALIA CAPITAL
TERRITORY, 2612, AUSTRALIA

國 籍：(中文/英文)

澳大利亞 AUSTRALIA

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 傑佛瑞 麥可 哈蒙
HAMMOND, JEFFREY MICHAEL
2. 麥可 安東尼 強森
JOHNSON, MICHAEL ANTHONY

國 籍：(中文/英文)

1. 澳大利亞 AUSTRALIA
2. 澳大利亞 AUSTRALIA

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2006年07月28日；60/833,985

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於用於增加重組腺病毒組織趨性之方法及組合物，其包含使用向重組腺病毒提供第二纖維之重組細胞，藉此改變重組腺病毒之趨性。本發明亦係關於製造及使用具有改變之趨性的重組腺病毒之方法。

【先前技術】

腺病毒導致人類以及家畜及實驗室動物之腸或呼吸道感染。腺病毒纖維蛋白質藉由與促使進入易感宿主細胞中之特異性細胞受體相互作用而在病毒附著中起必要作用。因此，纖維蛋白質決定特定腺病毒之特異性組織趨性(Chroboczek等人，1995)。因此認為纖維係在病毒粒子與靶細胞之附著中最重要之病毒表面分子。

為探索此靶向特性，已使用若干方法來改變特定人類腺病毒所攜帶之纖維蛋白質。已採取若干方法來使腺病毒顆粒重新靶向不同細胞類型，包括使用具有經修飾纖維結構之重組腺病毒(Wickham等人，1997；Dimitriev等人，1998；Wirtz等人，1999)、單鏈抗體(scFv)(Watkins等人，1997；Douglas等人，1999)、嵌合纖維蛋白質(Krasnykh等人，1996；Stevenson等人，1997)及不同血清型纖維蛋白質之交換(Gall等人，1996)。該等方法要求對降低用於將外來基因併入病毒基因組中之已受限制可用空間的腺病毒基因組進行遺傳操縱，或要求使雙特異性結合物與腺病毒顆粒複合。

Von Seggern等人(1998)使用不同方法構建穩定地表現人類腺病毒血清型5 (HAdV5)纖維蛋白質之細胞株。在經由此細胞株使HAdV3繼代後，病毒顆粒含有血清型5纖維蛋白質。纖維缺乏突變體HAdV在此細胞株中之生長使得可產生纖維陽性人類腺病毒。

另外，亦已報導表現使得腺病毒載體能夠與大量調節基因中之缺失互補的基因之細胞株(Wang等人，1995；Amalfitano等人，1996；Amalfitano等人，1997)。

迄今公開之關於纖維導向標靶之所有工作似乎集中在使腺病毒自一種特異性靶組織類型重新定向至另一種特異性靶組織，且在某些情況下極大限制腺病毒可附著之靶細胞。仍需要其他方法來拓寬重組腺病毒可結合之動物靶組織類型。該等方法可適用於增加或上調因抵抗特定抗原而產生之免疫反應的量及/或品質或免疫調節分子之治療作用。

【發明內容】

本發明探索表現纖維蛋白質之細胞株以在無須經遺傳學方式將第二纖維基因插入重組腺病毒基因組之情況下，提供將第二纖維添加至重組腺病毒載體。在此情況下，該等細胞及其使用方法使得特定腺病毒之特異性組織趨性增加。另外，第二基因無需經遺傳學方式插入重組腺病毒中之事實使得病毒基因組中存在更大空間可用於插入外來基因。

因此，本發明在一態樣中提供一種包含腺病毒之重組腺

病毒載體，該腺病毒包含腺病毒原生之纖維基因，且另外包含與腺病毒異源性之第二纖維基因，其中第二纖維基因係藉由使重組腺病毒在穩定表現第二纖維基因之細胞株中生長而由重組腺病毒獲得。腺病毒載體可為任何腺病毒載體，其包括(但不限於)選自由豬、人類、鳥禽、牛、馬及羊腺病毒組成之群之腺病毒載體。熟習此項技術者應意識到存在多種腺病毒血清型，且應瞭解本發明之腺病毒載體不必限於任何特定血清型。本發明尤其涵蓋包含本發明之重組腺病毒載體之組合物。該等組合物較佳為包含醫藥學上可接受之賦形劑或稀釋劑之醫藥組合物。

在特定實施例中，腺病毒可為選自由以下各物組成之群之重組豬腺病毒：重組豬腺病毒血清型(PAdV-1)、重組PAdV-2、重組PAdV-3、重組PAdV-4及重組PAdV-5、重組PAdV-6及重組PAdV-7。豬腺病毒血清型PAdV-1至PAdV-5為熟習此項技術者所熟知且已良好表徵。亦已展示存在PAdV-6及PAdV-7且由Kadoi (Kadoi等人，New Microbiol., 20:215-220, 1997；及Kadoi, New Microbiol., 20:89-91, 1997)表徵。在較佳實施例中，重組腺病毒載體為重組PAdV-3。

在其他實施例中，腺病毒為重組HAdV、重組牛腺病毒(BAdV)、重組羊腺病毒(OAdV)、重組鼠腺病毒(MAdV)、重組猴腺病毒(SAdV)或重組犬腺病毒(CAdV)。

在本發明之特異性重組腺病毒載體中，第二纖維蛋白質為選自PAdV-1、PAdV-2、PAdV-3、PAdV-4及PAdV-5之纖

維蛋白質。

在本發明之某些態樣中，重組腺病毒載體為進一步包含不同於第一或第二纖維蛋白質之第三纖維蛋白質之腺病毒載體(例如PAdV基載體)。

在較佳態樣中，重組載體中之第二纖維蛋白質包含來自PAdV-4之纖維蛋白質。

本發明之重組腺病毒載體可為複製勝任型或複製缺陷型。例如，複製缺陷型載體可為包含經插入PAdV基因組之必要區域中的異源性核苷酸序列之重組PAdV，且穩定表現纖維基因之細胞株亦表現異源性核苷酸序列所插入之PAdV基因組的必要區域。

複製勝任型之例示性重組腺病毒載體為其中重組腺病毒包含經插入腺病毒基因組之不必要區域中的異源性核苷酸序列之彼等重組腺病毒載體。在某些實施例中，異源性核苷酸序列可為編碼選自由以下各物組成之群的蛋白質之異源性基因：免疫調節劑、抗原、病原體、免疫原性多肽、治療性多肽、生長激素及細胞激素。

本發明之另一態樣係關於包含腺病毒之宿主細胞，該腺病毒包含豬腺病毒原生之纖維基因，且其中宿主細胞為表現與腺病毒異源性之纖維基因且能夠經豬腺病毒感染之重組細胞。細胞可為哺乳動物細胞或鳥禽細胞。例示性哺乳動物細胞包括(但不限於)豬細胞、人類細胞、牛細胞及羊細胞。在某些態樣中，細胞為重組豬細胞。

本發明之另一態樣係關於一種能夠誘發哺乳動物受檢者

之免疫反應的組合物，該組合物包含本發明之重組腺病毒載體及醫藥學上可接受之賦形劑。

在其他態樣中，本發明描述引發哺乳動物受檢者之免疫反應的方法，其包含將該組合物投與哺乳動物受檢者。例如，哺乳動物受檢者為豬。

本發明亦係關於一種製備腺病毒之方法，其包含在適於以腺病毒感染重組宿主細胞之條件下培養該表現腺病毒纖維基因之重組宿主細胞；使細胞與包含殼體化所必需之腺病毒序列及編碼異源性蛋白質之異源性基因的重組腺病毒載體接觸，且其中重組腺病毒包含不同於宿主細胞中之纖維基因的纖維基因；且視情況收集腺病毒。在特定實施例中，其中異源性蛋白質為選自由以下各物組成之群之蛋白質：免疫調節劑、抗原、病原體、免疫原性多肽、治療性多肽、生長激素及細胞激素。

在特定實施例中，該方法為其中與未與重組宿主細胞接觸之腺病毒載體相比，所收集之腺病毒載體包含更廣泛組織特異性之方法。

另外，在上述方法中，腺病毒載體中可視情況刪除非複製所必需之一或多種腺病毒蛋白質之部分或全部。

本發明亦係關於一種用於保護哺乳動物宿主抵抗感染之疫苗，其包含本發明之重組腺病毒載體及視情況醫藥學上可接受之賦形劑。在特定實施例中，不必要區域係選自由E3區域、E4之ORF 1-2及4-7、E4末端與豬腺病毒基因組之ITR之間的區域組成之群。

本文中亦描述一種包含表現腺病毒纖維基因之宿主細胞及包含在表現控制序列之控制下編碼異源性蛋白質之核酸之重組腺病毒載體的組合物，其中重組腺病毒載體包含載體腺病毒原生之纖維基因。在較佳態樣中，宿主細胞已經重組豬腺病毒載體感染。

本發明進一步係關於治療方法，諸如對動物進行疫苗接種之方法，其包含向動物投與治療有效量之本文所述之疫苗。

本發明之其他方法係關於增加重組腺病毒載體之宿主組織細胞特異性，其包含使重組腺病毒在包含不同於重組腺病毒之纖維蛋白質的第二纖維蛋白質之宿主細胞中生長。在該等方法中，重組腺病毒載體可為選自重組 PAdV-1、重組 PAdV-2、重組 PAdV-3、重組 PAdV-4 及重組 PAdV-5 之重組 PAdV。第二纖維蛋白質較佳為選自 PAdV-1、PAdV-2、PAdV-3、PAdV-4 及 PAdV-5 之纖維蛋白質。在本發明之方法中，重組 PAdV 可進一步包含不同於第一或第二纖維蛋白質之第三纖維蛋白質。

在增加重組腺病毒載體之宿主組織細胞特異性的較佳方法中，所用之重組 PAdV 為重組 PAdV-3。在特定實施例中，該重組 PAdV-3 包含來自 PAdV-4 之纖維蛋白質。在該等方法中，重組 PAdV 可為複製勝任型或複製缺陷型。在特定較佳實施例中，重組 PAdV 包含經插入 PAdV 基因組之不必要區域中的異源性核苷酸序列。在例示性實施例中，異源性核苷酸序列為編碼選自由以下各物組成之群的蛋白質

之基因：免疫調節劑、抗原、病原體、免疫原性多肽、治療性多肽、生長激素及細胞激素。

本發明之其他特徵及優點自下文實施方式將顯而易見。然而應瞭解，儘管實施方式及特定實例指示本發明之較佳實施例，但其僅以說明方式給出，因為本發明之精神及範疇內之各種變化及變更對於熟習此項技術者而言由此實施方式將顯而易見。

【實施方式】

本發明係關於經改良之腺病毒載體之發現及構造。儘管使用豬腺病毒載體作為模型系統來例示本文所述之方法及組合物，但易於顯而易見，本發明之方法可易於適用於製備感染除豬以外之宿主的重組腺病毒載體。本發明之方法及組合物用以改變重組腺病毒載體之趨性，藉此增加使載體靶向通常不受感染之組織的載體之適用性。在本發明中，藉由使重組腺病毒載體在表現第二纖維基因之細胞株中生長而向重組腺病毒提供該第二纖維基因，其中在該細胞株中之生長與重組腺病毒載體之趨性的改變相關。繁殖重組腺病毒之細胞株中所含之第二纖維使得腺病毒可感染細胞株中之纖維基因具特異性之組織。本發明涵蓋探索此發現之方法及組合物。

本文中術語"腺病毒載體"("adenovirus vector")與術語"腺病毒載體"("adenoviral vector")可互換使用。本文所採用之腺病毒載體為包含用於表現藉由該腺病毒載體傳遞之蛋白質之聚核苷酸構築體的重組載體。聚核苷酸構築體較

佳將包含編碼待傳遞之蛋白質的DNA。該DNA可包含核苷酸鹼基A、T、C及G，而且可包括該等鹼基之任何類似物或經修飾形式。該等類似物及經修飾鹼基為熟習此項技術者所熟知且包括(但不限於)甲基化核苷酸、諸如不帶電鍵聯及硫醇酯(thioate)之核苷酸間修飾，使用糖類似物及經修飾及/或替代主鏈結構，諸如聚醯胺。

本文所用之腺病毒載體在靶細胞中可為複製勝任型或複製缺陷型。若載體為複製缺陷型，則載體可需要使用輔助細胞或輔助病毒以促進複製。使用輔助細胞或輔助病毒以促進複製缺陷型腺病毒載體之複製在此項技術中為常規的且已熟知。該等輔助細胞通常提供已剔除重組腺病毒載體基因之實體功能以使其具複製缺陷性。另一方面，複製勝任型載體可稱為"輔助游離病毒載體"，此係由於其並不需要第二病毒或細胞株來提供在載體中具缺陷性之某些事物。

如上所述，本發明係用以改變所給腺病毒載體之趨性，亦即改變腺病毒之特異性。術語"改變趨性"涵蓋改變腺病毒之物種特異性以及改變組織或細胞特異性。在本發明之例示性實施例中，藉由向載體提供第二纖維蛋白質來改變腺病毒載體之特異性。腺病毒載體中存在兩種纖維蛋白質使得達成所需之腺病毒載體趨性的變化。

A. 纖維基因

本發明向重組腺病毒提供第二纖維以改變彼等載體之趨性。在較佳實施例中，本發明之方法包含改變重組豬腺病

毒載體之趨性。PAdV感染已與腦炎、肺炎、腎臟病變及腹瀉相關。(Derbyshire (1992)見："Diseases of Swine" (Leman等人編)，第7版，Iowa State University Press, Ames, Iowa.第225-227頁)。此外，PAdV能夠刺激受感染小豬腸內之體液性反應與黏膜抗體反應。Tuboly等人(1993) Res. in Vet. Sci. 54:345-350。已描述至少5種PAdV血清型(PAdV-1、PAdV-2、PAdV-3、PAdV-4、PAdV-5；Derbyshire等人(1975) J. Comp. Pathol. 85:437-443；及Hirahara等人(1990) Jpn. J. Vet. Sci. 52:407-409)。該等血清型之每一者均可易於用以製備重組腺病毒載體以用於(例如)產生豬疫苗。已選殖PAdV-3之整個序列(Reddy等人，1998；美國專利第6,492,343號，以引入的方式併入本文中)。另外，已使用限制片段之限制定位及選殖廣泛表徵PAdV-3以及PAdV-1及PAdV-2之基因組。參見Reddy等人(1993) Intervirology 36:161-168；Reddy等人(1995b) Arch. Virol. 140:195-200。

各種PAdV血清型之各種區段之核苷酸序列為熟習此項技術者所熟知。例如，PAdV-3 E3、pVIII及纖維基因展示於Reddy等人(1995)之Virus Res. 36:97-106中。PAdV-1及PAdV-2 E3、pVIII及纖維基因展示於Reddy等人(1996)之Virus Res. 43:99-109中。Kleiboeker提供PAdV-4 E3、pVIII之序列及纖維基因序列(Kleiboeker 1994 Virus Res. 31:17-25)。藉由Kleiboeker (1995) Virus Res. 39:299-309測定PAdV-4纖維基因序列。此項技術中亦已知PAdV-1、PAdV-

2、PAdV-3、PAdV-4及PAdV-5各自之反轉末端重複序列(Reddy等人(1995) Virology 212:237-239)。藉由McCoy等人(1996) Arch. Virol. 141:1367-1375測定PAdV-3五鄰體之序列。PAdV-4之E1區域之核苷酸序列展示於Kleiboeker(1995) Virus Res. 36:259-268中。藉由McCoy等人(1996) DNA Seq. 6:251-254測定PAdV-3之蛋白酶(23K)基因之序列。PAdV-3六鄰體基因(及23K蛋白酶基因之14 N末端密碼子)之序列已以寄存編號U34592寄存於GenBank資料庫中。PAdV-3 100K基因之序列已以寄存編號U82628寄存於GenBank資料庫中。此項技術中已知PAdV-3 E4區域之序列(Reddy等人(1997) Virus Genes 15:87-90)。Vrati等人(1995, Virology, 209:400-408)揭示OAdV之序列。PAdV-5之纖維及HNF-61 pVIII、ORF2、ORF3、ORF4序列展示於Genbank寄存編號AF186621中。PAdV-5之完整基因組序列以Genbank寄存編號AC_000009 BK000411展示，其中纖維基因展示為介於26487..27989之間，指定為Genbank寄存編號AP_000254。以Genbank寄存編號NC_002702給出豬腺病毒C之完整序列，其中纖維基因展示為介於26487..27989之間且指定為Genbank寄存編號NP_108675.1。PAdV-4之纖維序列展示於Genbank寄存編號U25120中。

人類腺病毒HAdV-3、HAdV-4、HAdV-5、HAdV-9及HAdV-35在此項技術中充分表徵且獲自美國組織培養物保存中心(American Tissue Culture Collection, ATCC)。在國家生物技術資訊中心，Ad5之GenBank寄存編號為M73260/

M29978、Ad9之GenBank寄存編號為X74659且Ad35之GenBank寄存編號為U10272。Chow等人(1977, Cell 12:1-8)揭示人類腺病毒2序列；Davison等人(1993, J. Mole. Biol. 234:1308-1316)揭示HAdV-40之DNA序列；Sprengel等人(1994, J. Virol. 68:379-389)揭示HAdV-12 DNA之DNA序列；Vrati等人(1995, Virology, 209:400-408)揭示OAdV之序列；Morrison等人(1997, J. Gen. Virol. 78:873-878)揭示CAdV-1 DNA序列；且Reddy等人(1998, Virology, 251:414)揭示PAdV之DNA序列。各種人類腺病毒之纖維序列在GenBank以寄存編號Y14241 (HAdV-28纖維基因)、Y14241(HAdV-17纖維基因)獲得；HAdV-17之完整基因組序列展示為AC_000006 BK000406之完整基因組，其中纖維CDS介於30935..32035之間，指定為Genbank寄存編號AP_000157.1；X76706 (HAdV-15H9 (Morrison)纖維基因)、X76548(纖維蛋白質之HAdV-31基因)；AB125751 (HAdV-6纖維基因之完整cds)、AB125750 (HAdV-1纖維基因之完整cds)、AB073168 (HAdV-34纖維基因之完整cds)；Genbank寄存編號S75136展示HAdV-8之纖維基因序列。HAdV-3纖維基因之部分序列以Genbank寄存編號AB244095寄存，且人類腺病毒之完整基因組序列以Genbank寄存編號DQ086466給出，其展示纖維序列位於位置31368..32327處，其經指定為Genbank寄存編號ABB17809.1。HAdV-12之完整序列展示為AC_000005 BK000405，其中纖維基因CDS位於位置29368..31131處，

指定為 Genbank 寄存編號 AP_000135.1。人類腺病毒 5 之完整序列展示為 Genbank 寄存編號 AC_000008，其中纖維 CDS 位於 31042..32787 處，指定為 Genbank 寄存編號 AP_000226.1。人類腺病毒 2 之完整序列展示為 Genbank 寄存編號 AC_000007 BK000407，其中纖維 cds 位於 31030..32778 處，指定為 Genbank 寄存編號 AP_000190.1。纖維蛋白質菌株 130H 之 HAdV-9 基因序列展示於 Genbank 寄存編號 AB098565 中。另一 HAdV-9 纖維基因序列位於 Genbank 寄存編號 X74659 處。HAdV-37 之纖維基因展示為 Genbank 寄存編號 X94484。HAdV-19 之纖維基因展示為 Genbank 寄存編號 X94485。HAdV-15 之纖維基因展示為 Genbank 寄存編號 X72934。HAdV-7(連同 E3 區域一起)之纖維基因展示於 Genbank 寄存編號 Z48954 中。HAdV-4 纖維基因之序列展示於 Genbank 寄存編號 X76547 中。HAdV-31 纖維基因之序列展示於 Genbank 寄存編號 X76548 中。HAdV-8 纖維基因之序列展示於 Genbank 寄存編號 X74660 中。HAdV-3 纖維基因之序列展示於 Genbank 寄存編號 X01998 M12411 中。HAdV-21 纖維基因之序列展示於 Genbank 寄存編號 AY380332 中。HAdV-7 纖維基因之序列展示於 Genbank 寄存編號 AY380326 中。

猴腺病毒 1 完整基因組展示為 Genbank 寄存編號 NC_006879，其中纖維位於位置 28731..29822 處，且指定為 Genbank 寄存編號 YP_213988.1，纖維 2 變異體指定為 Genbank 寄存編號 YP_213989.1。猴腺病毒 A 之完整序列以

Genbank 寄存編號 NC_006144 給出，其中纖維位於 29606..31246 處且指定為 Genbank 寄存編號 YP_067930。猴腺病毒 25 之完整基因組序列展示為 Genbank 寄存編號 AF394196，其中纖維 cds 為 32137..33414 且指定為 Genbank 寄存編號 AAL35536.1。

Reddy 等人 (1998) (Journal of Virology 72:1394) 揭示 BAdV-3 之核苷酸序列。在彼序列中，BAdV-3 之五鄰體區域於 12919 處起始且於 14367 處終止；六位體區域於 17809 處起始且於 20517 處終止；BAdV-3 之纖維區域於 27968 處起始且於 30898 處終止。纖維序列及牛腺病毒類型 3 pVIII 基因、早期區域 3 及纖維蛋白質之序列已以寄存編號 D16839 寄存於 GenBank。牛腺病毒 D 之完整基因組以 NC_002685 給出，其中纖維基因經註釋位於 22343..23950 之間，且纖維基因以 Genbank 寄存編號 NP_077404.1 給出。同樣，牛腺病毒 A 之完整基因組以 Genbank 寄存編號 NC_006324 給出，其中纖維位於位置 27483..29294 處且以 Genbank 寄存編號 YP_094049.1 描述。牛腺病毒 4 菌株 THT/62 完整基因組展示為 Genbank 寄存編號 AF036092，其中纖維基因位於位置 22343..23950 處，指定為 Genbank 編號 AAK13185.1。BAdV-3 之完整序列展示為 Genbank 寄存編號 AC_000002 BK000401，其中纖維 cds 位於 27968..30898 處，指定為 Genbank 寄存編號 AP_000041.1。BAdV-2 纖維及 17K 蛋白質序列展示為 AF308811。

CAdV-1 之完整基因組序列以 Genbank 寄存編號

AC_000003 BK000402給出，其中纖維cds經註釋位於位置25887..27518處，其中蛋白質及相關編碼序列以Genbank寄存編號AP_000069.1寄存。CAdV-2之編碼序列展示為Genbank寄存編號AC_000020 BK000403，其中纖維cds經註釋位於位置26592..28220處，其中蛋白質及相關編碼序列以Genbank寄存編號AP_000632.1寄存。Genbank寄存編號Z37498展示CAdV-2纖維基因之序列。

OAdV-7之完整基因組序列以Genbank寄存編號NC_004037給出，其中纖維cds經註釋位於位置22273..23904處，其中蛋白質及相關編碼序列以Genbank寄存編號NP_659529.1寄存。

貓腺病毒之纖維序列已以寄存編號AY518270寄存於GenBank。

鼠腺病毒A完整基因組展示為Genbank寄存編號NC_000942，其中纖維基因cds位於25412..27253處且指定為Genbank寄存編號NP_015554.1。

Genbank寄存編號AC_000013 BK001451展示家禽腺病毒9之完整基因組，其中纖維CDS經註釋位於位置30161..31876處，其中蛋白質及相關編碼序列以AP_000390.1寄存。FAdV-10纖維序列展示為Genbank寄存編號AF007579。家禽腺病毒D完整基因組展示為Genbank寄存編號NC_000899，其中纖維基因cds位於30161..31876處且指定為Genbank寄存編號NP_050293.1。家禽腺病毒A完整基因組展示為Genbank寄存編號NC_001720，其中纖

維基因 CDS 位於 28363..30495 處且指定為 Genbank 寄存編號 NP_043891.1。火雞腺病毒 3 完整基因組展示為 Genbank AC_000016 BK001454，其纖維經註釋位於位置 22518..23882 處且指定為 Genbank 寄存編號 AP_000495.1。

蛙腺病毒基因組序列以 Genbank 寄存編號 NC_002501 給出，其中纖維 cds 位於位置 22343..23632 處，其經指定為 Genbank 寄存編號 NP_062452.1。

在特定例示性實施例中，本發明使用 PAdV-4 之纖維序列。以 SEQ ID NO:1 給出 PAdV-4 之新穎纖維編碼序列之核苷酸序列。PAdV-1 之新穎纖維編碼序列之核苷酸序列展示於 SEQ ID NO:2 中。PAdV-2 之新穎纖維編碼序列之核苷酸序列展示於 SEQ ID NO:3 中。

如由上文描述顯而易見，熟習此項技術者瞭解各種腺病毒類型之纖維基因的多種編碼序列。應瞭解，本發明不限於使用該等纖維序列中之任一者。實際上，可使用上文所提及之任何纖維、彼等纖維之任何變異體以及自各種其他腺病毒菌株所鑑定之纖維來進行本發明之方法及組合物。熟習此項技術者將能夠經由腺病毒之基因組組織知識且經由上文討論之例示性序列知識而易於鑑定該等額外纖維。在此方面，應注意美國專利公開案第 20020034519 號(以引入的方式全部併入本文中)，其圖 12-17 特定註釋為展示各種纖維蛋白質之序列，包括 HAdV-5 纖維蛋白質(其中圖 12)、BAdV-3(其中圖 13)、羊腺病毒 287 纖維蛋白質(其中圖 14)；PAdV-3 纖維蛋白質(其中圖 15)；CAdV-2 纖維蛋白質

(其中圖 16)；且圖 17A-17G 描述使用多重對準程式之叢集方法來進行哺乳動物腺病毒纖維區域之胺基酸對準。

在本發明之例示性實施例中，使已經由用以製備重組腺病毒載體之習知方法所製備之重組腺病毒載體在表現不同於重組腺病毒中所存在之纖維基因的纖維基因之重組細胞株的細胞株中繁殖。應瞭解，儘管重組腺病毒較佳含有與彼血清型相關之纖維基因(例如，若重組腺病毒為 PAdV-3 基重組腺病毒，則彼重組腺病毒中之纖維基因為原生 PAdV-3 纖維基因)，亦可能使用本發明來改變其中原生纖維基因已經修飾(例如由另一腺病毒之纖維置換，或突變為不同於原生野生類型纖維基因)之重組腺病毒的趨性。

如本文所用之術語"繁殖"可與"複製"互換使用且係指腺病毒載體再生或增殖之能力。該等術語在此項技術中已得以充分理解。如本文所用，複製包括產生腺病毒蛋白質且通常係指腺病毒載體之再生。可使用此項技術中及本文中所述之標準檢定(諸如爆發檢定或斑塊檢定)來量測複製。"複製"及"繁殖"包括病毒製造過程中直接或間接涉及之任何活動，包括(但不限於)病毒基因表現；病毒蛋白質、核酸或其他組份之產生；病毒組份封裝於完整病毒中及細胞溶解。

在例示性實施例中，編碼第二纖維蛋白質之聚核苷酸序列的部分或全部表現於腺病毒載體欲繁殖之重組宿主細胞中。重組腺病毒載體於該宿主細胞中繁殖改變腺病毒之趨性。在本文所揭示之一個特定實施例中，製備表現 PAdV-4

纖維基因之重組細胞。在例示性實施例中，產生穩定表現 PAdV-4 纖維基因之細胞株。PAdV-3 纖維促使病毒附著至豬消化道中之細胞，而 PAdV-4 血清型纖維使病毒附著至豬呼吸道細胞。一種現有之表現 CSFV 之 gp55 基因的豬腺病毒重組載體 [Hammond 等人，2000] 可生長於該等細胞株中，所得祖 (progenitor) 病毒含有原生 PAdV-3 纖維及其他 PAdV-4 纖維蛋白質。病毒衣殼上存在兩種不同纖維蛋白質可擴大該載體之細胞趨性。因此使得該載體能夠靶向更多種類之動物細胞類型，且使得所傳遞之外來基因暴露於更大範圍之宿主免疫反應。此外，經基因工程刪除纖維基因來提供更多空間以供插入外來基因之 PAdV 載體可藉由通過表現纖維蛋白質之細胞株傳代來補充。該方法可產生具有其他 DNA 封裝能力之纖維陽性病毒。

預期重組 PAdV 經由該等細胞株之生長將可由擴展其宿主細胞之標靶範圍來增加載體之功效且增加可插入載體之外來遺傳物質的量，因而可於一種載體中併入且隨後傳遞若干抗原或抗原加免疫調節劑 (諸如細胞激素)。

"宿主細胞" 為已藉由或可藉由外源性 DNA 序列轉型之細胞。在本發明中，宿主細胞為可支持腺病毒載體複製 (亦即可由腺病毒感染且腺病毒可於其中複製) 且已由編碼所有或部分纖維蛋白質之外源性 DNA 序列轉型之細胞。細胞 "轉型" 需要將外源性 DNA 引入細胞中。儘管應瞭解外源性 DNA 可整合或可不整合 (共價鍵聯) 於構成細胞基因組之染色體 DNA 中，但在本發明中，細胞經編碼纖維之聚核苷酸

穩定轉型。穩定轉型之細胞為外源性DNA已與染色體整合因而其可藉由子細胞染色體複製而遺傳之細胞。對於哺乳動物細胞而言，該穩定性係藉由該細胞形成包含外源性DNA之子細胞群之細胞株或純系之能力來證明。

在例示性實施例中，本發明提供經穩定轉型之豬細胞的實例，該等豬細胞已經編碼PAdV-4纖維之外源性DNA穩定地轉型。更特定言之，兩種例示性連續(穩定)細胞株豬腎臟15(PK15)及豬睪丸(ST)經工程設計以含有且表現PAdV-4之纖維基因。該等細胞株分別稱為PK-743及ST-743。展示纖維基因經表現，此由兩種細胞株中存在PAdV-4纖維mRNA而得以證明。使用相對於兩種纖維共有之肽或相對於對PAdV-4纖維具特異性之肽培養的兔多株抗體之西方墨點分析明確證明經修飾病毒中存在兩種纖維。細胞株用於感染研究中，其中PK15A(未經修飾之對照)及PK-743(經修飾)細胞經在細胞展示80%細胞病變效應時所收集之重組PAdV-3-gp55及子代病毒感染。

可使用熟習此項技術者已知之標準技術分析子代病毒。例如，子代病毒之蛋白質含量的西方墨點分析證明病毒粒子中存在PAdV-3與PAdV-4纖維蛋白質兩者。PAdV-3纖維之預期分子量帶(45 kD)存在於兩種病毒製劑中，而在經修飾之病毒製劑中特定偵測到PAdV-4纖維之預期分子量帶(77 kD)。

儘管本發明提供例示性豬宿主細胞，但其他合適之宿主細胞可易於製備且將包括任何支持腺病毒基因組與腺病毒

纖維在宿主細胞中重組之細胞。宿主細胞經含有重組腺病毒基因組之質體轉染，以在彼等宿主細胞中產生病毒顆粒。真核細胞及哺乳動物細胞株之生長為熟習此項技術者所熟知之程序。

如上所述，重組腺病毒載體之製備將採用熟習此項技術者所熟知之技術。使用該等技術，將一或多種異源性聚核苷酸序列插入腺病毒基因組之一或多個區域中以產生重組腺病毒載體。該等載體之製備僅受給定腺病毒基因組之插入容量及重組腺病毒載體表現所插入之異源性序列的能力限制。一般而言，腺病毒基因組可接受將重組腺病毒之尺寸增加至野生型基因組長度之約105%且仍能夠封裝於病毒顆粒中之插入物。可藉由刪除不必要區域及/或刪除諸如E1功能之必要區域來增加插入容量，其功能隨後可由諸如提供E1功能者之輔助細胞株來提供。在某些實施例中，將編碼蛋白質之異源性聚核苷酸插入腺病毒E3基因區域中。在其他實施例中，將E3區域之不必要部分刪除且將編碼蛋白質之異源性聚核苷酸插入由刪除所留下之缺口處。在某些較佳實施例中，其中重組腺病毒載體為PAdV-3基腺病毒載體，可將異源性基因插入在PAdV-3 E3之聚腺苷酸化信號後且在PAdV-3纖維基因之ORF起始之前定位之PAdV-3基因組區域中。

在某些實施例中，產生腺病毒，其中插入或刪除後插入係在腺病毒之E1基因區域中，隨後使載體在提供E1功能之輔助細胞株中繁殖。異源性基因可插入之其他區域包括E4

區域。若重組腺病毒載體為 PAdV-3 基載體，則除編碼 ORF3 之區域以外的整個 E4 區域均可經刪除從而為異源性基因留出空間。如 Li 等人 (Virus Research 104 (2004) 181-190) 中所示，位於基因組右手端之 PAdV-3 E4 區域經在左側方向上轉錄且具有編碼 7 個 (p1-p7) ORF 之潛能。其中僅 ORF p3 為複製所必需。因而，若非全部，則大量剩餘 E4 區域可在不使得病毒複製為缺陷型的情況下易於刪除，藉此允許更多空間用於異源性插入物。

在本發明之一實施例中，插入可藉由構建含有腺病毒基因組區域之質體而達成，該腺病毒基因組區域中需要插入 (諸如) 編碼所需治療性蛋白質之聚核苷酸。隨後以在質體之彼腺病毒部分中具有識別序列之限制酶消化質體，且將異源性聚核苷酸序列插入限制消化之位點。將含有具有插入之異源性序列的腺病毒基因組之一部分的質體連同腺病毒基因組或含有腺病毒基因組之線性化質體一起共轉型於細菌細胞 (諸如大腸桿菌 (*E. coli*)) 中。質體之間的同源性重組產生含有插入之異源性序列的重組腺病毒基因組。在該等實施例中，腺病毒基因組可為全長基因組或可含有一或多種如本文所論述之刪除。

可藉由熟習此項技術者所熟知之方法實現腺病毒序列之刪除以 (例如) 提供插入異源性序列之位點，或以提供用於在不同位點插入之額外容量。例如，對於選殖於質體中之腺病毒序列而言，以一或多種限制酶 (在腺病毒插入物中以至少一個識別序列) 消化，繼而接合在某些情況下將使

得限制酶識別位點之間的序列刪除。或者，在腺病毒插入物內之單一限制酶識別位點消化，繼而以外切核酸酶處理，繼而接合將使得鄰近於限制位點之腺病毒序列刪除。含有一或多個具有一或多處刪除之腺病毒基因組之部分、如上所述構建之質體可連同腺病毒基因組(全長或經刪除)或含有全長或經刪除基因組之質體一起共轉染於細菌細胞中以藉由同源重組產生含有在一或多個特異位點具有刪除之重組基因組的質體。隨後可藉由以含有重組腺病毒基因組之質體轉染哺乳動物細胞來獲得含有刪除之腺病毒病毒粒子，該等哺乳動物細胞包括(但不限於)經穩定轉型之含有本文所述之另一纖維基因的細胞。

插入位點可鄰近於且轉錄上處於腺病毒之內源性啟動子的下游。"內源性"啟動子、增強子或控制區域為腺病毒原生或自腺病毒衍生。由熟習此項技術者自需要插入之腺病毒基因組之部分或全部序列的知識可易於測定可用作插入位點之給定啟動子下游的限制酶識別序列。或者，各種活體外技術均可用於在特定位點插入限制酶識別序列或用於在不含有限制酶識別序列之位點插入異源性序列。該等方法包括(但不限於)寡核苷酸介導之非互補雙螺旋形成以供插入一或多種限制酶識別序列(參見例如 Zoller 等人(1982) *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500 ; Brennan 等人(1990) *Roux's Arch. Dev. Biol.* 199:89-96 ; 及 Kunkel 等人(1987) *Meth. Enzymology* 154:367-382)及 PCR 介導之方法以供插入較長序列。參見例如 Zheng 等人(1994) *Virus Research*

31:163-186。

在並非位於內源性啟動子下游之位點插入之異源性序列的表現亦可藉由提供異源性序列、在真核細胞中具有活性之轉錄調節序列來實現。該等轉錄調節序列可包括諸如病毒啟動子(諸如疱疹病毒、腺病毒及乳多泡病毒啟動子)之細胞啟動子及反轉錄病毒長末端重複(LTR)序列之DNA複本。在該等實施例中，將異源性基因引入表現構築體中，其中異源性基因與該等轉錄調節要素操作性連接。

在特定例示性實施例中，將PAdV-4纖維基因置於CMV啟動子之控制下以提供強組成性轉錄。需要在病毒感染晚期中發生之病毒封裝期間持續產生纖維。已展示人類腺病毒藉由使宿主細胞轉譯起始因子失活而切斷宿主細胞之蛋白質合成(Zhang等人，1994)。因此，預期藉由包涵PAdV-3 TPL序列來維持晚期病毒訊息之有效轉譯。TPL包含3個外顯子，總計248個核苷酸(nt)，其經剪接至晚期病毒mRNA之5'末端上(Reddy等人，1998)。認為該序列藉由在mRNA之5'末端處提供有序性較低之結構來賦予對宿主細胞起始複合物之獨立性而發揮功能(Dolph等人，1988；Dolph等人，1990)。為確保連續轉譯重組纖維mRNA，將PAdV-4纖維基因置於pCI-TPL中之PAdV-3 TPL序列的下游。已報導將HAdV 5 TPL添加至表現螢光素酶之構築體來增加甚至未受感染細胞中之表現水平(Sheay等人，1993)。

可用於調節異源性基因表現之調節序列可為(例如)轉錄

調節序列、啟動子、增強子、上游調節結構域、剪接信號、聚腺苷酸化信號、轉錄終止序列、轉譯調節序列、核糖體結合位點及轉譯終止序列。

應瞭解，重組腺病毒載體之製備包括使所選殖之腺病毒基因組作為質體繁殖且自含有質體之細胞援救感染病毒。

可藉由熟習此項技術者已知之技術偵測病毒核酸之存在，該等技術包括(但不限於)雜交檢定、聚合酶鏈反應及其他類型之擴增反應。類似地，偵測蛋白質之方法為熟習此項技術者所熟知且包括(但不限於)各種類型之免疫測定、ELISA、西方墨點法、酶促檢定、免疫組織化學等。包含本發明核苷酸序列之診斷套組亦可含有用於細胞破裂及核酸純化之試劑以及用於形成、選擇及偵測雜交體之緩衝劑及溶劑。包含本發明之多肽或胺基酸序列之診斷套組亦可包含用於蛋白質分離及用於形成、分離、純化及/或偵測免疫複合物之試劑。

本發明提供重組腺病毒載體之修飾以改變其趨性。彼等載體較佳用以向靶細胞傳遞各種外來基因或核苷酸序列或編碼序列(原核及真核)。該等載體尤其適用作疫苗以提供抵抗各種疾病之保護且許多該等基因在此項技術中已知。病毒疫苗包括(但不限於)DNA疫苗(亦即使用質體、載體或其他習知載劑以向豬體內直接注射DNA)、活疫苗、經修飾之活疫苗、滅活疫苗、次單位疫苗、減毒疫苗、經遺傳工程設計之疫苗等。

併入腺病毒中之外源性(亦即外來)核苷酸序列可由所關

注之一或多種基因或其他並非基因但具有其他功能之核苷酸序列組成，且較佳由所關注之治療劑組成。在本發明之情況下，所關注之核苷酸序列或基因可編碼反義RNA、短髮夾狀RNA、核糖核酸酶或mRNA，其隨後將經轉譯為所關注之蛋白質。該核苷酸序列或基因可包含基因組DNA、互補DNA(cDNA)或混合型(小基因，其中刪除至少一個內含子)。核苷酸序列或基因可編碼調節或治療功能、成熟蛋白質、成熟蛋白質之前驅體、尤其包含信號肽之前驅體、起源於各種起點之序列之融合的嵌合蛋白質或顯示經改良或修飾之生物特性的天然蛋白質之突變體。該突變體可藉由刪除、取代及/或添加一或多種編碼天然蛋白質之基因的核苷酸或編碼天然蛋白質之序列的任何其他類型變化(諸如換位或反轉)而獲得。

可將藉由載體傳遞之基因置於適用於其在宿主細胞中表現之要素(DNA控制序列)的控制下。合適之DNA控制序列應理解為意謂將基因轉錄為RNA(反義RNA或mRNA)且將mRNA轉譯為蛋白質所需之一組要素。例如，該等要素將至少包括啟動子。啟動子可為組成性啟動子或可調節啟動子，且可自任何真核、原核或病毒起點且甚至腺病毒起點之基因分離。或者，其可為所關注基因之天然啟動子。一般而言，用於本發明之啟動子可經修飾以含有調節序列。當基因靶向給定組織類型時，例示性啟動子可包括組織特异性啟動子。可使用之其他習知啟動子包括(但不限於)HSV-1 TK(疱疹病毒1型胸苷激酶)基因啟動子、腺病毒

MLP(主要晚期啟動子)、RSV(勞氏肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus))、LTR(長末端重複)、CMV即刻早期啟動子、SV-40即刻早期啟動子及PGK(磷酸甘油酸激酶)基因啟動子，例如使得可在大量細胞類型中表現。

待藉由腺病毒載體傳遞之基因可為任何基因，包括(但不限於)編碼諸如干擾素及介白素之細胞激素之基因；編碼淋巴因子之基因；編碼諸如由病原性生物體(病毒、細菌或寄生蟲)、較佳由HIV病毒(人類免疫缺陷性病毒)識別之受體的膜受體之基因；編碼諸如因子VIII及因子IX之凝血因子的基因；編碼肌縮蛋白之基因；編碼抗原性抗原決定基以增加宿主細胞之免疫性的基因；編碼主要組織相容性複合體I類及II類蛋白質之基因以及編碼作為該等基因之誘導物之蛋白質的基因；編碼抗體之基因；編碼免疫毒素之基因；編碼毒素之基因；編碼生長因子或生長激素之基因；編碼細胞受體及其配位體之基因；編碼腫瘤抑制因子之基因；與心血管疾病有關之基因，包括(但不限於)致癌基因；編碼包括(但不限於)纖維母細胞生長因子(FGF)、血管內皮生長因子(VEGF)及神經生長因子(NGF)之生長因子的基因；e-nos、腫瘤抑制基因，包括(但不限於)Rb(視網膜母細胞瘤)基因；脂蛋白脂肪酶；過氧化物歧化酶(SOD)；過氧化氫酶；氧及自由基淨化劑；脂蛋白元；及pai-1(纖溶酶原活化因子抑制劑-1)；編碼細胞酶或由病原性生物體產生之彼等酶的基因；及自殺基因。

在某些較佳實施例中，製備本發明之疫苗來對豬進行疫

苗接種以防在彼等動物體內引發疾病。例如，疫苗可針對假性狂犬病毒(PRV)gp50；傳染性胃腸炎病毒(TGEV)S基因；豬輪狀病毒VP7及VP8基因；豬呼吸及生殖症候群病毒(PRRS)之基因，尤其為ORF 3、ORF 5及ORF 7；豬流行性腹瀉病毒之基因；豬瘟病毒之基因；豬小病毒之基因；及口蹄疫病毒之基因；與豬環狀病毒相關之基因；及豬流感病毒之基因。代表性牛病原體抗原包括牛疱疹病毒1型；牛腹瀉病毒；牛冠狀病毒；及口蹄疫病毒之基因。代表性人類病原體抗原包括(但不限於)HIV病毒抗原及肝炎病毒抗原。

細胞激素及生長因子，諸如血管內皮生長因子(VEGF)、表皮生長因子、纖維母細胞生長因子、多效生長因子、血小板衍化生長因子、紅血球生成素、幹細胞因子(SCF)、TNF- α ；干擾素，諸如干擾素- γ 、干擾素 β 、干擾素- α 、粒細胞集落刺激因子(G-CSF)、粒細胞巨噬細胞集落刺激因子(GM-CSF)；基質細胞衍化之因子1；巨噬細胞集落刺激因子；RANTES；IGF-1；SDF-1；MIP1 α ；MCP-1及MCP-2；嗜酸性粒細胞趨化因子；嗜酸性粒細胞趨化因子3；嗜酸性粒細胞趨化分子4；LKN1；MPIF-2及LD78 β ；白血病抑制因子(LIF)；介白素，諸如IL-1、IL2、IL-3、IL4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25；TOLL樣受體及配位體；整合素受體及其類似物亦可使用

本發明之載體來傳遞。

應瞭解，儘管在一些情況下需要將全基因併入載體中，但如同在野生型生物體中所見，可構建其他僅包含可用基因之核苷酸序列之一部分(其中該等序列足以產生保護性免疫反應或特異性生物學效應)而非完整序列的載體。若基因含有大量內含子，則cDNA可為較佳的。

如上所述，可在合適啟動子之控制下插入基因。另外，載體亦可包含增強子要素及聚腺苷酸化序列。此項技術中已知在哺乳動物細胞及表現序列盒之構建中提供外來基因之成功表現的啟動子及聚腺苷酸化序列，例如在美國專利第5,151,267號中，其揭示內容以引入的方式併入本文中。

術語"表現序列盒"係指天然或重組產生之核酸分子，其能夠表現細胞內之基因或遺傳序列。表現序列盒通常包括啟動子(容許轉錄起始)及編碼一或多種蛋白質或RNA之序列。表現序列盒可視情況包括轉錄增強子、非編碼序列、剪接信號、轉錄終止信號及聚腺苷酸化信號。RNA表現序列盒通常包括轉譯起始密碼子(容許轉譯起始)及編碼一或多種蛋白質之序列。表現序列盒可視情況包括轉譯終止信號、聚腺苷序列、內部核糖體進入位點(IRES)及非編碼序列。表現序列盒可視情況包括未經轉譯為蛋白質之基因或部分基因序列。核酸可實現靶細胞之DNA或RNA序列變化。此可藉由雜交、多股核酸形成、同源重組、基因轉換、RNA干擾或其他有待描述之機制而達成。

腺病毒載體可包含一種以上之外來基因。本發明之方法

可用於提供保護以防各種影響豬、人類、牛及其他哺乳動物之疾病。本發明之任何重組抗原決定子或重組活病毒均可經實質上與關於抗原決定子疫苗或活疫苗載體所述相同之方式來調配及使用。

儘管本發明之例示性實施例為異源性核苷酸(本文中亦稱作異源性核酸)為編碼蛋白質之異源性核苷酸的實施例，但應瞭解，異源性核苷酸實際上可為任何含有在細胞中需要存在或轉錄之序列的聚核苷酸。因此，載體可用於傳遞任何(例如)導致序列特異性退化或對基因之功能、轉錄或轉譯具抑制作用的聚核苷酸。該等異源性核苷酸可選自包含以下各物之群：siRNA、微RNA、干擾RNA或RNAi、dsRNA、核糖核酸酶、反義聚核苷酸及編碼siRNA、微RNA、dsRNA、核糖核酸酶或反義核酸之DNA表現序列盒。SiRNA包含通常含有15-50個鹼基對且較佳含有19-25個鹼基對且具有與細胞中所表現之靶基因或RNA一致或幾乎一致之核苷酸序列的雙股結構。siRNA可由兩個經黏接之聚核苷酸或形成髮夾狀結構之單一聚核苷酸組成。微RNA(mRNA)為小型非編碼聚核苷酸、約22個核苷酸長，其直接破壞或轉譯抑制其mRNA標靶。反義聚核苷酸包含與基因或mRNA互補之序列。反義聚核苷酸包括(但不限於)：N-嗎啉基、2'-O-甲基聚核苷酸、DNA、RNA及其類似物。該等異源性核苷酸序列可經活體外重組聚合、可含有嵌合序列或可為該等組之衍生物。該等序列可含有核糖核苷酸、脫氧核糖核苷酸、合成核苷酸或任何合適之

組合，以使得靶RNA及/或基因受到抑制。

在例示性實施例中，使經修飾之rPAdV-gp55在PK15-743細胞中生長或使rPAdV-gp55在未經修飾之PK15A細胞中生長。隨後藉由皮下或口服途徑將其投與至市售之大白豬。當經皮下注射或藉由口服途徑給與時，經修飾之疫苗保護豬完全免於CSFV之致命性攻毒。另外，經皮下途徑給與之經修飾疫苗產生最高含量之NPLA抗體，大於在未經修飾疫苗組中所偵測之含量。先前工作已證明，當藉由口服途徑給與未經修飾之疫苗時，在攻毒之前、甚至在加強劑量之後均未能偵測到NPLA抗體力價[Hammond等人，2001；Hammond等人，2003]。然而，在僅單一劑量之經修飾疫苗後，在口服組中偵測到極顯著含量之NPLA抗體，且該等含量藉由第二劑量之投與而加強。此為含有PAdV-3及PAdV-4纖維蛋白質兩者之經修飾疫苗比未經修飾之疫苗靶向更多種類豬組織之證據，且因此在宿主体內產生更廣泛之免疫反應。

本文中特定涵蓋包含治療有效量之根據本發明方法所製備之重組腺病毒載體、重組腺病毒或重組蛋白質以及醫藥學上可接受之媒劑及/或佐劑之醫藥組合物。可製備該醫藥組合物且根據此項技術中熟知之技術確定劑量。本發明之醫藥組合物可藉由任何已知投藥途徑來投藥，該等投藥途徑包括(但不限於)全身(例如靜脈內、氣管內、血管內、肺內、腹膜內、鼻內、非經腸、經腸、肌肉內、皮下、腫瘤內或顱內)、藉由口服投藥、藉由氣霧化或肺內滴注投

藥。投藥可以單一劑量進行或在特定時間間隔後重複一或多次之劑量進行。適當之投藥途徑及劑量將根據情況(例如所治療個體，待治療病症或所關注之基因或多肽)而變化，但其可由熟習此項技術者確定。

本發明進一步提供治療方法，其中將治療有效量之重組腺病毒載體(例如 PAdV-3 腺病毒載體)投與至需要治療之哺乳動物受檢者，該重組腺病毒載體與未在含有纖維基因之細胞株中繁殖之重組載體相比具有改變之趨性。

本發明中所用之抗原可為原生或重組抗原性多肽或片段。其可為部分序列、全長序列或甚至為融合序列(例如具有重組宿主之適當先導序列，或具有另一病原體之其他抗原序列)。待由本發明之病毒系統表現之較佳抗原性多肽含有編碼抗原之全長(或接近全長)序列。或者，可使用具抗原性之較短序列(亦即編碼一或多個抗原決定基)。較短序列可編碼"中和抗原決定基"，其經定義為能夠在活體外檢定中引發中和病毒感染性之抗體的抗原決定基。肽較佳應編碼能夠在宿主中產生"保護性免疫反應"(亦即保護免疫宿主免於感染之抗體及/或細胞介導之免疫反應)的"保護性抗原決定基"。

尤其當包含短寡肽時，用於本發明之抗原可與疫苗載劑結合。疫苗載劑在此項技術中為熟知的：例如牛血清白蛋白(BSA)、人類血清白蛋白(HSA)及匙孔螺血藍蛋白(KLH)。

可插入之所需抗原或其編碼序列之基因包括導致哺乳動

物疾病之彼等生物體，尤其為牛病原體，諸如口蹄疫病毒、牛輪狀病毒、牛冠狀病毒、牛疱疹病毒1型、牛呼吸道融合性病毒、牛副流行性感冒病毒3型(BPI-3)、牛腹瀉病毒、溶血性巴氏桿菌(*Pasteurella haemolytica*)、睡眠嗜血桿菌(*Haemophilus somnus*)及其類似物。編碼人類病原體抗原之基因亦適用於實踐本發明。攜帶外來基因或片段之本發明疫苗亦可於合適口服載劑中、諸如以腸溶衣劑型經口投與。口服調配物包括該等通常採用之賦形劑，例如醫藥級甘露糖醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精纖維素鈉、碳酸鎂及其類似物。口服疫苗組合物可呈溶液、懸浮液、錠劑、丸劑、膠囊、持續釋放型調配物或散劑之形式，含有約10%至約95%之活性成份、較佳約25%至約70%。較佳可經口及/或鼻內進行疫苗接種以產生黏膜免疫性(其在防護病原體感染呼吸道及胃腸道中具有重要作用)以及全身免疫性。

另外，疫苗可經調配為栓劑。對於栓劑而言，疫苗組合物將包括常規黏合劑及載劑，諸如聚烷二醇或甘油三酯。該等栓劑可由含有約0.5%至約10%(w/w)、較佳約1%至約2%範圍內之活性成份的混合物形成。

鑒於本發明之揭示內容，向動物投與本發明之疫苗組合物的方案在此項技術內。熟習此項技術者將選擇疫苗組合物之濃度，其劑量可有效引發抗體及/或T-細胞介導之對抗原性片段的免疫反應或另一類型之治療或預防作用。在廣泛限度內，咸信劑量並非關鍵。通常以在例如約1-10 cc之

便利媒劑體積中傳遞介於約1至約1,000微克之間次單位抗原之方式投與疫苗組合物。單次免疫之劑量較佳將傳遞約1至約500微克次單位抗原，更佳為約5-10至約100-200微克(例如5-200微克)。

投藥之時間安排亦可為重要的。例如，若需要，則較佳在初次接種後進行後續加強接種。儘管可選，但較佳亦可在初始免疫數週至數月後向動物投與第二次加強免疫。為確保持續高水平之疾病防護，可有用的係以規則時間間隔(例如每若干年一次)向動物再次投與加強免疫。或者，可經口投與初始劑量，繼而後續接種，或反之亦然。可經由常規疫苗接種方案實驗確立較佳之疫苗接種方案。

活體內重組病毒疫苗之所有投藥途徑之劑量取決於各種因素(包括宿主/患者之體型、需保護以抵抗之感染之性質、載劑及其類似物)且可易於由熟習此項技術者確定。藉由非限制性實例，可使用介於 10^3 pfu與 10^{15} pfu之間、較佳介於 10^4 與 10^{13} pfu之間、更佳介於 10^5 至 10^{11} pfu之間及其類似範圍之劑量。關於活體外次單位疫苗，可如由所涉及之臨床因素所確定來給與額外劑量。

在本發明之某些實施例中，藉由構建包含(例如)如實例中所示之PADV-4纖維區域的纖維區域之表現序列盒，且以其使宿主細胞轉型以提供含有用於本發明之目的以改變重組腺病毒之趨性的第二纖維基因之細胞來產生重組細胞株。該等重組細胞株能夠使得第二纖維可插入腺病毒載體中。藉由在DNA介導之共轉染後活體內重組，該等細胞株

亦極其適用於產生重組載體，其纖維基因之缺失由編碼外來基因或片段之異源性核苷酸序列置換。此外，宿主細胞亦可提供一或多種經編碼用於腺病毒基因組之必要功能，其中細胞株提供特定缺陷型重組腺病毒載體所缺乏之一或多種功能。因此，含有纖維之重組細胞株亦可與可經由(例如)與輔助病毒一起共感染或藉由整合或者維持於編碼特定病毒功能之病毒基因組片段之穩定形式中來提供病毒功能之細胞株互補。

本發明之重組哺乳動物(尤其為豬)細胞株亦可用於重組產生蛋白質。

本發明亦包括一種用於向哺乳動物，諸如豬、牛、人類、羊、犬、貓或其他有此需要之哺乳動物提供基因傳遞以控制基因缺乏、提供治療性基因或核苷酸序列及/或誘導或校正基因突變之方法。舉例而言，該方法可用於治療包括(但不限於)遺傳病、傳染性疾病、心血管疾病及病毒感染之病狀。熟習此項技術者當前使用該等種類之技術來治療各種疾病病狀。可併入用於習知基因療法之外來基因、核苷酸序列或其部分之實例包括囊腫性纖維化跨膜傳導調節基因、人類微肌縮蛋白基因、 α -1-抗胰蛋白酶基因、與心血管疾病有關之基因及其類似物。

特定而言，本發明之關於人類體內之基因傳遞的實踐意欲用於預防或治療包括(但不限於)以下之疾病：遺傳性疾病(例如血友病、地中海貧血症、肺氣腫、高雪氏病(Gaucher's disease)、囊腫性纖維化、杜興氏肌肉營養不良

症 (Duchenne muscular dystrophy)、杜興氏肌病 (Duchenne's myopathy) 或貝克爾氏肌病 (Becker's myopathy)等)、癌症、病毒疾病(例如 AIDS、疱疹病毒感染、巨細胞病毒感染及乳頭瘤病毒感染)、心血管疾病及其類似疾病。出於本發明之目的，可將藉由本發明之方法製備之載體、細胞及病毒顆粒離體(亦即於自患者移除之細胞中)引入受檢者體內或直接活體內引入待治療之軀體中。

實例：

在本發明之實例中，提供用於產生穩定地表現 PAdV-4 纖維基因之細胞株的方法及組合物之例示性教示。表現典型豬瘟病毒(CSFV)之 gp55 基因的現有豬腺病毒重組載體，例如 PAdV-3 載體 [Hammond 等人，2000] 可在該等細胞株中生長，所得母病毒含有原生 PAdV-3 纖維及另一 PAdV-4 纖維蛋白質。病毒衣殼上存在兩種不同之纖維蛋白質擴展載體之細胞趨性。在此情況下，載體能夠靶向更多種類之動物細胞類型且將所傳遞之外來基因暴露於更大範圍之宿主免疫反應。此外，重組載體可經工程設計以使得刪除纖維基因來提供更大空間以供插入外來基因，該等外來基因可藉由使其經由該等表現纖維蛋白質之細胞株繼代而互補。該方法將使得可產生具有額外 DNA 封裝容量之纖維陽性病毒。

實例 1：材料及方法

細胞 & 病毒：使獲自美國典型微生物菌種保藏中心編號 CCL-33(ATCC-CCL-33)之豬腎臟細胞(PK-15)生長於補充

以 5% 胎牛血清 (FCS)、10 mM N-2-羥乙基哌嗪-N'-2-乙烷-磺酸 (HEPES)、1% 丙酮酸鈉及 2 mM 麩醯胺酸之耶耳氏改質之伊格爾介質 (Earle's modified Eagles medium, EMEM) 中。將來自美國農業部動植物衛生檢驗局 (United States Department of Agriculture-Animal and Plant Health Inspection Services, USDA-APHIS) 之豬睪丸細胞 (ST) 保持於補充以 10% FCS、10 mM HEPES、1% 丙酮酸鈉、0.25% 乳卵白素水解產物 (LAH) 及 2 mM 麩醯胺酸之 EMEM 中。

使豬腺病毒生長於保持在補充以 2% FCS 之 EMEM 中之初級豬腎臟 (1° PK) 細胞中且當 90% 之細胞展示細胞病變效應 (CPE) 時收集。所有介質均另外補充以 2.5 µg/ml 抗黴素 (Squibb)、100 單位/毫升青黴素 (penicillin) 及 100 µg/ml 鏈黴素 (CSL)。

病毒 DNA 製備：藉由 Hirt (1967) 之方法以如 Shinagawa 等人 (1983) 所述之微小改進來製備病毒 DNA；且根據製造商說明書進行限制酶之消化。

質體 DNA 製備：使用 Qiagen 系統根據製造商說明書製備質體 DNA。

自 PAdV-4 DNA 分離 PAdV-4 纖維基因：藉由 PCR 使用以下引子對自 PAdV-4 DNA 擴增 PAdV-4 纖維基因：PAdV-4 5' TTTTGGATCCATGAAGCGGTCCGTCCCGTC 長度 30

***Bam*HI**

PAdV-4 3' TTTTAGATCTCTACAGTATCTGAGGGTAAAC 長度 31

***Bgl*II**

使用 PCR 高級混合器 (Life technologies)，以於 94°C 下歷

時1分鐘、於50℃下歷時2分鐘及於72℃下歷時30秒鐘循環30次(其中各循環延長30秒鐘)之延長方案進行PCR。

質體構築體：將PAdV-4纖維PCR產物經凝膠純化且接合至pGEM-T(Promega)中以得到質體PJJ392(圖1a)。限制酶消化之後，將來自含有PAdV-4纖維基因之pJJ392的*Bam*HI/*Bgl*II片段插入質體pCI-TPL之*Bam*HI位點中以得到pJJ741(圖1b)。隨後藉由將含有TPL-PADV-4纖維基因之pJJ741的*Nhe*I/*Not*I片段插入pCIneo (Promega)中來構建轉移載體pJJ743(圖1c)。藉由限制酶消化檢查質體構築體中正確插入物之存在，且藉由使用結合TPL序列之5'-引子5' TTT ACT GGG CTT GTC GAG ACA G 3'定序來確認。

穩定細胞株之產生及表徵：ST及PK-15細胞生長於各自之介質中，且使用設定為300 V、960 μ F及 ∞ Ω 之Bio-Rad Genepulser，以20 μ g *Xmn*I線性化質體pJJ743 DNA將約 5×10^6 個細胞電穿孔。細胞在補充1.25% DMSO之各自介質(Melkonyan等人，1996)中恢復隔夜。隨後藉由向培養物中添加800 (ST)或1000 (PK15) μ g/ml G418 (Promega)來選擇G418抗性細胞。藉由限制稀釋來分離個別純系並擴大。藉由PCR篩檢各純系中纖維基因之存在，且由RT-PCR確認纖維mRNA之表現。

基因組DNA之純化：根據製造商說明書，使用DNeasy組織套組(Qiagen)純化轉染細胞之基因組DNA。

PCR條件及引子：使用PCR高級混合器(Gibco BRL)以於94℃循環1次歷時10分鐘，於94℃歷時1分鐘、於50℃歷時

1分鐘及於72℃歷時2分鐘之30個循環，及最終於72℃延長10分鐘之標準方案進行PCR。使用引子對5' GCA CTG GAC TCG GAT GGA CA及3' AGC TGC TTG GTC CTG CGT CT 3'偵測具有預期804 bp帶之PADV-4纖維基因。

細胞 mRNA 之 RT-PCR 純化：根據製造商說明書，使用RNeasy微型套組(Qiagen)純化轉染細胞之總RNA。

RT-PCR 第一股 cDNA 合成：根據製造商說明書，使用SUPERScript前置擴增系統(Gibco BRL)於第一股cDNA合成，將mRNA轉化為cDNA。

靶 cDNA 之 RT-PCR 擴增：使用如上所述之PCR方案及引子擴增靶cDNA。

rPAdV-gp55 原料之產生：將PK15A、PK15-743、ST及ST-743細胞培養至90%鋪滿(confluency)，之後以rPAdV-gp55感染。將200 µl rPAdV-gp55添加至細胞層且於37℃吸附1 h。添加20 ml EMEM(補充2%最終濃度之FCS)。燒瓶於37℃於5% CO₂中培育，每日觀察cpe。當燒瓶展示70-80% cpe時，藉由凍/融三次收集病毒。

經純化病毒原料之製備：將來自各組燒瓶之上清液彙集且藉由在Jouan C3000臺式離心機中以2000 rpm離心20 min使其澄清。隨後將上清液傾析至SW28超離心機管中且在20℃下於Beckman LM-80超離心機中以25,000 rpm離心90 min。丟棄上清液且將病毒顆粒再懸浮於500 µl TE中。於-20℃下將材料儲存於1.5 ml螺帽管(Sarstedt)中直至需要。

使用不連續蔗糖密度梯度純化：使用於SW28超離心管

中製備之包含3種於NTE中之蔗糖濃度：60% (w/v)、30% (w/v)及20% (w/v)的不連續蔗糖梯度進一步純化粗病毒製劑。將1 ml病毒原料小心塗層於梯度上且於4℃下於Beckman LM-80超離心機中以28,000 rpm將管離心2 h。使用5 ml注射器及19號針移除經純化之病毒且將其置於SW28超離心機管中，隨後以TE填充SW28超離心機管。隨後於20℃下將經純化之病毒於Beckman LM-80超離心機中以25,000 rpm粒化90 min以移除蔗糖。最後將顆粒再懸浮於TE中且儲存於-20℃下直至需要。

纖維特異性肽兔抗血清之產生：比較PAdV-3與PAdV-4纖維蛋白質之胺基酸序列(Reddy等人，1995；Kleiboeker 1995)且設計並產生兩種合成肽(Auspep Pty Ltd-Australia)。肽1包含在PAdV-3與PAdV-4之間保守之纖維蛋白質區域，且肽2包含對PAdV-4纖維具特異性之序列。

PAdV-3/PAdV-4共用肽：**CGGDFDPVYPYD**

PAdV-4特異性肽：**CAAASEEMPAPPEA**

PAdV-3及PAdV-4纖維蛋白質之完整胺基酸序列及2肽之位置展示於圖5中。為在兔體內產生免疫反應，使兩種肽與KLH(匙孔螺血藍蛋白)結合。將兩種肽結合物注射入兔體內以產生如表1所示之特異性抗血清。

表1：在每一日期之任何治療前對兔放血。向2隻雌性白兔給與佐劑中之特異性肽，且向2隻雌性白兔給與佐劑中之常用肽。用於前兩次給藥之佐劑為Quil A且用於剩餘給藥之佐劑為IFA(不完全弗氏佐劑)，經由皮下途徑投與總計1

ml之於佐劑中之肽($4 \times 250 \mu\text{l}$)。在第113天，將兔放血且分離血清，且儲存於 -20°C 下直至需要。

天數	放血及給定肽	佐劑	肽之量
0	+	QuilA	$4 \times 50 \mu\text{g/ml}$
22	+	QuilA	$4 \times 50 \mu\text{g/ml}$
34	+	IFA	$4 \times 50 \mu\text{g/ml}$
44	+	IFA	$4 \times 50 \mu\text{g/ml}$
70	+	IFA	$4 \times 50 \mu\text{g/ml}$
89	+	IFA	$4 \times 50 \mu\text{g/ml}$
99	+	IFA	$4 \times 50 \mu\text{g/ml}$
113	最終放血	N/A	N/A

檢驗經純化病毒中PAdV-4纖維之存在：SDS-PAGE凝膠分析。分析經純化病毒樣品中PADV-3及PADV-4纖維蛋白質於8-12% Bis-Tris SDS-PAGE預製凝膠(Invitrogen)上之存在。電泳之後，藉由在100 V下免疫轉漬1 h將蛋白質轉移至硝基纖維素膜上。隨後於 4°C 下，將膜於TBS/3%牛血清白蛋白中阻斷隔夜。

檢驗經純化病毒中PAdV-4纖維之存在：西方墨點分析。於室溫下進行所有洗滌及抗體培育。將膜於TBS-Tween/Triton中洗滌兩次，歷時5 min且以TBS洗滌一次，歷時10分鐘。將於TBS/3% BSA中以1/200稀釋之多株兔抗纖維抗體添加至膜，隨後將其培育1 h。將膜於TBS-Tween/Triton中洗滌2次，各歷時5 min，且於TBS中洗滌一

次，歷時10分鐘。隨後以於5%脫脂乳/blotto溶液中以1/500稀釋之與辣根過氧化物酶(HRP)結合之山羊抗兔(Sigma)培育膜。隨後如上洗滌膜且使用增強化學發光(ECL)偵測(Amersham Pharmacia Biotech Ltd)使蛋白質帶顯現。

使用豬實驗之活體內分析。使用下列方式將生長於PK15-743細胞中之經修飾rPAdV-gp55或生長於未經修飾之PK15A細胞中之rPAdV-gp55投與至市售大白豬：

第0天：對所有豬放血且進行疫苗接種

組1：第一劑量-藉由皮下注射投與 2×10^5 TCID₅₀未經修飾之rPAdV-gp55疫苗。

組2：第一劑量-藉由皮下注射投與 2×10^5 TCID₅₀經修飾之rPAdV-gp55。

組3：第一劑量-藉由口服途經投與 2×10^5 TCID₅₀經修飾之rPAdV-gp55。

第22天：

組1：第二加強劑量-藉由皮下注射投與 2×10^5 TCID₅₀未經修飾之rPAdV-gp55疫苗。

組2：第二加強劑量-藉由皮下注射投與 2×10^5 TCID₅₀經修飾之rPAdV-gp55疫苗。

組3：第二加強劑量-藉由口服途經投與 2×10^5 TCID₅₀經修飾之rPAdV-gp55。

第47天：將兩頭潔淨之年齡與體重匹配之豬作為攻毒病毒對照物。

第49天：藉由皮下注射以致死劑量之CSFV 'Weybridge' 菌株(1000 TCID₅₀)對包括潔淨對照物之所有豬進行攻毒。攻毒後每日記錄直腸溫度且每日監控所有豬之疾病臨床跡象，其顯示為食慾不振、不活動、腹瀉及蹄上部變紅。在實驗結束時或當展示嚴重臨床疾病時使豬安樂死且移除脾臟以用於CSFV抗原偵測。死後，對所有安樂處死之豬進行檢查。

偵測抵抗CSFV之血清中和抗體：以每週間隔對豬放血且藉由如Terpstra及同事[1984]所述之中和過氧化物酶酶聯檢定(NPLA)測試血清中抵抗CSFV之中和抗體的存在。NPLA力價表示為中和50%複製培養物中之200 TCID₅₀ Weybridge菌株之血清稀釋的倒數。

抗原捕捉ELISA：藉由抗原捕捉ELISA測定經攻毒豬之脾臟中之CSFV抗原的存在[Shannon等人，1993]。

實例2：載體、細胞株及病毒之製備結果

含有PAdV-4纖維之轉移載體之產生核苷酸定序確定轉移載體pJJ743在PAdV-3 TPL序列之下游含有PAdV-4纖維基因(圖1c)。

組成性表現PAdV-4纖維蛋白質之細胞株之產生以轉移載體pJJ743轉染ST及PK-15細胞，繼而以G418選擇以確立含有整合DNA之純系。藉由PCR測試展示2個PK-15純系(8及9)含有PAdV-4纖維基因(圖2a)。藉由PCR測試以pJJ743(2-14)轉染之12個ST純系且展示10個純系(2、3、5、6、7、8及11-14)含有PAdV-4纖維基因(圖2b及c)。隨後

以細胞類型接著前綴743及純系編號命名陽性純系，亦即PK15-743-9。

隨後藉由RT-PCR評估纖維mRNA在該等細胞純系中之表現。

在細胞株PK15-743-9及ST-743-2、5、6及8中偵測到大量纖維4 mRNA(圖3a及b)。

生長特徵：插入纖維基因後，PK-15-743及ST 743細胞比母細胞株生長得更為緩慢。

檢驗經純化病毒中PAdV-4纖維之存在：以rPAdV-gp55感染細胞株PK15-743-9且當細胞展示80% cpe時收集病毒。純化病毒且於8-12% SDS-PAGE凝膠上分離樣品。轉移至耐綸膜之後，使用相對於上述兩種肽培養之兔抗血清，藉由西方墨點法分析樣品中PAdV-3及PAdV-4纖維蛋白質之存在。

當以相對於PAdV 3及4纖維之共用抗原決定基培養之肽抗血清處理時，在含有生長於未經修飾之PK15細胞中之rPAdV-gp55的泳道(圖5a泳道1)中可見一對對應於預期分子量(45 kD)PAdV-3纖維之帶。相反，含有生長於經修飾之PK15-743-9細胞中之rPAdV-gp55的泳道含有一對對應於PAdV-3纖維之帶以及另一位於預期分子量(77 kD)PAdV-4纖維處之帶(圖5a泳道2)。當以相對於PAdV-4纖維之特異性抗原決定基培養之肽抗血清處理時，在含有生長於未經修飾之PK15細胞中之rPAdV-gp55的泳道中未偵測到帶(圖5b泳道1)，而在含有生長於經修飾之PK15-743-9細胞中之

rPAdV-gp55的泳道中可見位於預期分子量PAdV-4纖維處之單一帶(圖5b泳道2)。

實例3：豬疫苗接種研究之結果

測試具有經修飾纖維概況之rPAdV-gp55功效的豬試驗為測試含有PAdV-3及PAdV-4血清型纖維兩者之經修飾rPAdV-gp55疫苗的功效，將兩種劑量之未經修飾或經修飾疫苗給與大白豬之組，且測定其對CSFV致死性攻毒之易感性。此外，測試經修飾之疫苗在藉由口服途徑投與時誘導中和抗體及給與保護之能力。

豬對疫苗接種之反應：在疫苗製劑經任一途徑之疫苗接種後，對豬不存在不利作用。體溫或臨床跡象之出現均無增加。

攻毒後豬之溫度：對照豬及各組經疫苗接種豬之每日平均溫度及標準誤差展示於圖6中。

對照豬：截至第4天，對照豬出現發燒且展示CSF臨床跡象，其中一頭豬在第4-5天夜間垂死，且一頭豬在攻毒(p.c)後第7天因疾病嚴重而處以安樂死。

組1：給與皮下劑量之未經修飾rPAdV-gp55的豬未出現發燒，直至實驗終止時亦未展示任何CSF臨床跡象。

組2：給與皮下劑量之經修飾rPAdV-gp55的豬未出現發燒，直至實驗終止時亦未展示任何CSF臨床跡象。

組3：給與口服劑量之經修飾rPAdV-gp55的3頭豬中有2頭豬並未出現發燒，直至實驗終止時亦未展示任何CSF臨床跡象。一頭豬在2個獨立非連續日呈現高於40

°C 之溫度，但直至實驗終止時仍未顯示其他 CSF 臨床跡象。重要地，該組之平均溫度在攻毒期間並未升至高於 40°C。

CSFV 特異性中和抗體之產生：在第 0 天對所有豬放血且隨後以每週之間隔放血直至實驗終止，且藉由 NPLA 測試血清中抗 CSFV 之中和抗體的存在 (Terpstra 等人，1984)。NPLA 力價展示於圖 7-9 中。

對照豬：對照豬並未產生可偵測之 CSFV 中和抗體。

組 1：截至疫苗接種後第 14 天，所有豬均產生可偵測之 CSFV 中和抗體，其中 1 頭豬在第 7 天展示可偵測之力價。藉由投與第二劑量使該等水平升高。所有豬經攻毒後均存活，且具有 >8192 之攻毒後力價。

組 2：截至疫苗接種後第 14 天，所有豬均產生可偵測之 CSFV 中和抗體，且藉由投與第二劑量使該等水平升高。所有豬經攻毒後均存活，且具有 >8192 之攻毒後力價。

組 3：截至疫苗接種後第 14 天，所有豬均產生可偵測之 CSFV 中和抗體，且藉由投與第二劑量使該等水平升高。所有豬經攻毒後均存活，且具有 >8192 之攻毒後力價。

測試豬脾臟中 CSFV 抗原之存在：藉由抗原捕捉 ELISA 測定經攻毒豬之脾臟中 CSFV 抗原之存在 [Shannon 等人，1993] 且含量展示於圖 9 中。

對照豬：對照豬在其脾臟中具有高含量之抗原，其指

示終止時正進行感染。

組1：無豬對脾臟中之CSFV抗原呈陽性，此證明所有豬在實驗結束時均無疾病及病毒。

組2：無豬對脾臟中之CSFV抗原呈陽性，此證明所有豬在實驗結束時均無疾病及病毒。

組3：無豬對脾臟中之CSFV抗原呈陽性，此證明所有豬在實驗結束時均無疾病及病毒。

由上述研究證明，含有PAdV-4纖維基因之質體載體經轉染至PK15及ST細胞中且產生表現PAdV-4纖維之經穩定轉染的細胞株。

重組PADV-3 (rPAdV-gp55)在經由表現PAdV-4纖維之PK15-743細胞株繼代後展示含有PAdV-3及PAdV-4血清型纖維。將該經修飾之重組疫苗投與豬且在CSFV攻毒試驗中評估其功效。

當經皮下注射或藉由口服途徑給與時，經修飾之疫苗保護豬完全免於CSFV之致命性攻毒。在給與經修飾與未經修飾疫苗之豬之間，偵測到攻毒後之溫度反應或CSFV抗原自脾臟之清除無顯著差異。然而，藉由皮下途徑給與之經修飾疫苗在所有3個組中產生最高含量之NPLA抗體，大於在未經修飾疫苗組中所偵測到之彼等含量。此外，發明者先前已證明，當藉由口服途徑給與未經修飾之疫苗時，在攻毒之前，甚至在加強劑量之後均不可偵測到NPLA抗體力價[Hammond等人，2001；Hammond等人，2003]。在該實驗中，在僅單次劑量後，即在口服組中偵測到極顯著

含量之NPLA抗體，且該等含量藉由投與第二劑量而升高。此發現提供優良證據：含有PADV-3及PAdV-4纖維蛋白質兩者之經修飾疫苗比未經修飾之疫苗靶向更廣泛種類之豬組織，且因此在宿主體內產生更廣泛之免疫反應。

由上述資料可推斷，當口服投藥時，經修飾之rPAdV-gp55可有效產生抗gp55之血清中和抗體，而未經修飾之疫苗未產生。因而，該具有PAdV-3及PAdV-4纖維兩者之嵌合疫苗已改變及/或增加豬體內之免疫反應的大小。可產生該等疫苗以使得可經口有效傳遞。鑒於本文所教示之例示性實施例，所發展之技術將使得可將PAdV-4纖維併入任何PAdV-3基疫苗中來改良靶向傳遞之功效。此外，可產生其他腺病毒載體及細胞株，其中雙纖維系統之使用將使得可增加重組腺病毒疫苗之趨性。

文獻中存在多個參考文獻，其進一步提供本發明之背景。下文中提供該等參考文獻中之某些且其以引入的方式全部併入本文中。

Amalfitano, A.及Chamberlain, J.S. (1997). Isolation and characterization of packaging cell lines that coexpress the adenovirus E1, DNA polymerase, and preterminal proteins: implications for gene therapy. *Gene Ther* 4, 258-263。

Amalfitano, A.、Begy, C.R.及Chamberlain, J.S. (1996). Improved adenovirus packaging cell lines to support the growth of replication-defective gene-delivery vectors. *Proc Natl Acad Sci* 93, 3352-3356。

Bilbao G., Gomez-Navarro J., & Curiel D.T. (1998). Targeted adenoviral vectors for cancer gene therapy. 見於 : Gene therapy of cancer, Walden 等人編 , Plenum Press, New York 中。

Chiu C.Y., Wu E., Brown S.L., Von Seggern D.J., Nemerow G.R., & Stewart P.L. (2001). Structural analysis of a fibre-pseudotyped adenovirus with ocular tropism suggests differential modes of cell receptor interactions. *Journal of Virology* 75, 5375-5380。

Chroboczek, J., Ruigrok, R.W.H. , 及 Cusack, S. (1995). Adenovirus fibre. *Curr Top Microbiol Immunol* 199, 163-200。

Dmitriev, I., Krasnykh, V., Miller, C.R., Wang, M., Kashentseva, E., Mikheeva, G., Belousova, N. , 及 Curiel, D.T. (1998). An adenovirus vector with genetically modified fibres demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol* 72, 9706-13。

Dolph, P.J., Huang, J.T. , 及 Schneider, R.J. (1990). Translation by the adenovirus tripartite leader: elements which determine independence from cap-binding protein complex. *J Virol* 64, 2669-2677。

Dolph, P.J., Racaniello, V., Villamarin, A., Palladino, F. , 及 Schneider, R.J. (1988). The adenovirus tripartite

leader may eliminate the requirement for cap-binding protein complex during translation initiation. J Virol 62, 2059-2066 .

Douglas, J.T., Miller, C.R., Kim, M., Dmitriev, I., Mikheeva, G., Krashnykh, V. , 及 Curiel, D.T. (1999). A system for the propagation of adenoviral vectors with genetically modified receptor specificities. Nat Biotechnol 17, 470-475 .

Einfeld D.A., Brough D.E., Roelvink P.W., Kovesdi I., & Wickham T.J. (1999). Construction of a pseudoreceptor that mediates transduction by adenoviruses expressing a ligand in fibre or penton base. Journal of Virology 73, 9130-9136 .

Gall, J., Kass-Eisler, A., Leinwand, L. , 及 Falck-Pedersen, E. (1996). Adenovirus type 5 and 7 capsid chimera: fibre replacement alters receptor tropism without affecting primary immune neutralization epitopes. J Virol 70, 2116-2123 .

Hammond J.M., Jansen E.S., Morrissy C.J., Hodgson A.L.M., & Johnson M.A. (2003). Protection Of Pigs Against 'In Contact' Challenge With Classical Swine Fever Following Oral Or Sub-Cutaneous Vaccination With A Recombinant Porcine Adenovirus. Virus Research 97, 151-157 .

Hammond J.M., Jansen E.S., Morrissy C.J., Williamson M.M., Hodgson A.L.M., & Johnson M.A. (2001). Oral and sub-cutaneous vaccination of commercial pigs with a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55 gene. *Archives of Virology* 146, 1-7 .

Hammond J.M., McCoy R.J., Jansen E.S., Morrissy C.J., Hodgson A.L.M., & Johnson M.A. (2000). Vaccination with a single dose of a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55 (E2) gene protects pigs against classical swine fever. *Vaccine* 18, 1040-1050 .

Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* 14, 365-369 .

Kleiboeker, S.B. (1995), Sequence analysis of the fibre genomic region of a porcine adenovirus predicts a novel fibre protein. *Virus Res* 39, 299-309 .

Krashnykh, V.N., Mikheeva, G.V., Douglas, J.T. , 及 Curiel, D.T. (1996). Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibres for altering viral tropism. *J Virol* 70, 6839-6846 .

Magnusson M.K., Hong S.S., Boulanger P., & Lindholm L. (2001). Genetic retargeting of adenovirus: novel strategy employing "deknobbing" of the fibre. *Journal of Virology*

75, 7280-7289 .

Melkonyan, H., Sorg, C. , 及 Klempt, M. (1996). Electroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide (DMSO). *Nucleic Acids Res* 24, 4356-4357 .

Reddy, P.S., Idamakanti, N., Song, J.-Y., Lee, J.-B., Hyun, B.-H., Park, J.-H., Cha, S.-H., Bae, Y.-T., Tikoo, S.K. , 及 Babiuk, L.A. (1998). Nucleotide sequence and transcription map of porcine adenovirus type-3. *Virology* 251, 414-426 .

Reddy, P.S., Nagy, E. , 及 Derbyshire, J.B. (1995). Sequence analysis of putative pVIII, E3 and fibre regions of porcine adenovirus type 3. *Virus Res* 36, 97-106 .

Shannon AD, Morrissy C, Mackintosh SG 及 Westbury HA. (1993). Detection of hog cholera virus antigens in experimentally-infected pigs using an antigen-capture ELISA. *Vet. Microbiol.* 34: 233-248 .

Shayakhmetov D.M., Papayannopoulou T., Stamatoyannopoulos G., & Lieber A. (2000). Efficient gene transfer into human CD34+cells by a retargeted adenovirus vector. *Journal of Virology* 74, 2567-2583 .

Sheay, W., Nelson, S., Martinez, I., Chu, T.H., Bhatia, S. , 及 Dornburg, R. (1993). Downstream insertion of the adenovirus tripartite leader sequence enhances expression

in universal eukaryotic vectors. *Biotechniques* 15, 856-862 .

Shinagawa, M., Matsuda, A., Ishiyama, T., Goto, H. , 及 Sato, G. (1983). A rapid and simple method for preparation of adenovirus DNA from infected cells. *Microbiol Immunol* 27, 817-822 .

Shiraishi M., Nagahama M., Obuchi Y., Taira K., Tomori H., Sugawa H., Kusano T., & Muto Y. (1998). Successful gene transfer to the porcine liver in Vivo with an adenoviral vector. *Journal of Surgical Research* 76, 105-110 .

Stevenson, S.C., Rollence, M., Marshall-Neff, J. , 及 McClelland, A. (1997). Selective targeting of human cells by a chimeric adenovirus vector containing a modified fibre protein. *J Virol* 71, 4782-90 .

Terpstra, C, Bloemraad, M及 Gielkens, AJL. (1984). The neutralising peroxidase-linked assay for detection of antibody against swine fever virus. *Vet. Microbiol.* 9: 113-120 .

von Seggern, D.J., Chiu, C.Y., Fleck, S.K., Stewart, P.L. 及 Nemerow, G.R. (1999). A helper-independent adenovirus vector with E1, E3 and fibre deleted: structure and infectivity of fibreless particles. *J Virol* 73, 1601-1608 .

von Seggern, D.J., Kehler, J., Endo, R.I. , 及 Nemerow, G.R. (1998). Complementation of a fibre mutant adenovirus

by packaging cell lines stably expressing the adenovirus type 5 fibre protein. J Gen Virol 79, 1461-1468 .

Von Seggern D.J., Huang S., Fleck S.K., Stevenson S.C., & Nemerow G.R. (2000). Adenovirus vector pseudotyping in fibre-expressing cell lines: improved transduction of Epstein-Barr virus-transformed B cells. Journal of Virology 74, 354-62 .

Wang, Q., Jia, X.C. , 及 Finer, M.H. (1995). A packaging cell line for propagation of recombinant adenovirus vectors containing two lethal gene-region deletions. Gene Ther 2, 775-783 .

Watkins, S.J., Mesyanzhinov, V.V., Kurochkina, L.P. , 及 Hawkins, R.E. (1997). The 'adenobody' approach to viral targeting: specific and enhanced adenoviral gene delivery. Gene Ther 4, 1004-1012 .

Wickham, T.J., Tzeng, E., Shears II, L.L., Roelvink, P.W., Li, Y., Lee, G.M., Brough, D.E., Lizonova, A. , 及 Kovesdi, I. (1997). Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fibre proteins. J Virol 71, 8221-8229 .

Wirtz, S., Galle, P.R. , 及 Neurath, M.F. (1999). Efficient gene delivery to the inflamed colon by local administration of recombinant adenoviruses with normal or modified fibre structure. Gut 44, 800-807 .

Zhang, Y., Feigenblum, D., 及 Schneider, R.J. (1994). A late adenovirus factor induces eIF-4E dephosphorylation and inhibition of cell protein synthesis. J Virol 68, 7040-7050。

序列資訊

SEQ ID NO:1：自纖維朝右手端(rhe)之2250個鹼基之序列的 PAdV4纖維基因。PAdV3纖維(粗體)良好匹配但所有後續序列為新穎序列。

AACCCACCTGGAACACCAAGTGCCAGATGCTCCAGTTTTTTCTA
CCGCGGGAGTTTCGAAAGTTTACCCTCAGATACTGTAGTCAGACACAAAGAT
GTAAGTGCCWGCATGAGAAAAGTTTATTGGCAATAAAGCTACTGGAAACGAT
GCGTGTGGTGATCTTTCCCCCTCCCCCAAATTTTCATTTTGTAACATACCCTAT
GGGAAGGCCCCGGCCACAGTCAGCCACAGTCTCAAGTTGCTCCAGCTCAGGTG
AGGTAATGCTGATGAACCCAGGCGATATCAGTCTCGCATCCAAGGTGTGATCCA
AACTCTGTGAAAATCATACTCCGCTTGTAAGTTTCGCCAAGGCACCGGGGTTC
ATACACCATCAATCTTCGCAGACGTCGCCGCCGTGCGCCGTCCCGAAAAGCCGG
GTAGAACACTCTCGGTGAGGTCCCCAACTCTCAGCAACCTAAAAGCCTCCTGA
AGCAACTCCCTGCTCTGAACCGCACACTGCCTCACATCACGTTTCATGCAGAGACA
TACATCCAGTACACAAGCGTATAAAGTAGTAATTAGTTGCAGTACAGAGAAATTT
CACAGACGGGCTGACAGTTGCTGCTTCAAAAGCCAAAAGTCATTCCCCTGTCTG
CAGCAAAACACCACAAAGTGCAGCCCCGCCACCATATAGGAGCCCCTGCAAGAG
ATAGCTTTAGGTAAGTCAACACACACCCTCTTCTGCATACCAGATGAAGCTGCGG
TTAAAGAAACAGCCCCTGGGATCACAGACGTAGCCAAAGGTCTTCACCACCACA
CTCCTAGCCCTACATTGCAAGAGAGTGRGGGCTGTCaCAGKTGRMCAATGTATAG
AAAGCACCTCTCGACCATACAAGTAATTtCCCCSAAWaCAGATtGtTAACTCCAAG
GSCCGGGGgcCAGACCCATCCCAGTtCTACGGAGACATTGCAAAGTGGAGCCAG
AAGCAACCAAATCCCAAGGCACCGGAAGATCTAAGTAAGCTGTGAAACATGCTG
CAGGTGGAGTGGTGCTTACCGCTCCAACCTAGATGCTTAGAGTCACATGGTTCAAC
AGAAGTCATTGTCCTGGAAGAGGAAGAGGGAAAGCATTAAAGCACCGAAACAG
CTCAATGGGGGGGCTGGTGTGGTACACAGCCACCATACGGGAACCAAGAAAAGT
CAACAGGCCAGAGGCCAAATCCTGCTGGGACTCCGGAGTTGCAAACAGCCGAGA

GCCCGCCGTGACTGTGATAGTGTGCCTGCCTTGAGGTAAATCAAGCATGCAGCAA
 CAATGCAGAAAAGACTCAGAGCGAGTACCAGGGCGAGTTTCCAAATCAAAGCGA
 ATCAGCAAGTAATCATAAACCAAGGATCTGATCACATCCAgCCAAAGSWCKWCM
 CGAAGGCAAAGTAGGATCCCCTGGCACATCCGTGATGTACAGGTGCCAGGACCA
 AGCGCTGTACACGAAAGTGCCGGACGCCATCTTGCGTACAGATCACTGACCCGT
 GGAGCCGAAACCGCCGGCACCCCTGTCGGTAGGCTGCAGGTCGTCCACCAGCTG
 GCACACGGGTCTCTCAAATTTTCAGGAAAACCAGCTGCGCGATCCGGTCCCCGGG
 AGCGATAAACACAGGCAGAGGCCCACTGTTTCGCCAACAGCACTTTCCTCGCCT
 GTAAGTCCGGGTCAATTGTTCCCGCACAGACGTACACGCCGCGCAACGACAAC
 CGATCGTGAAAAAATCTGCCCGTAGGGCCAGGCGGAGGACTTATGGCGATCCC
 AGAACGGATGATAGTTCGGTCCCCCGGTTCCATGATACGAGCCTCCGGCGAGCA
 AAACGTCTATCCCCCGTGAAGCCGCGTACCGAAAACAGCCGGCCCCCCCCGTCC
 CGCTAACTTCCCCTTTAAGATCCGGAGTGGTCCTGACGGCTCAGAGGGAAAAACC
 GCGAAAAAATTCCGCGAACTCCGCAAAAACCCGAACGGAGTACCGCCCCCGGGA
 ATCCGTGAACTGACATTGGCCGACTTTTATGGCGCCCGGCATGTCGATAGTGACA
 ATACGGGAAGGGAACCAATTACGCATTCTGGGCAGTGTGGGAGAAAGCGGACT
 TACACAATGTGTCTTCGCACCACGGGAAAAGATTACTCGATACCTCATAAGGTGA
 TG

SEQ ID NO:2 自 PadV1 朝向右手端 (rhe) 之纖維的 1858 個
 鹼基之序列。在某些部分 (粗體) 與 PAdV3 良好匹配，新穎
 序列以普通字體顯示。

TATAAACCAAGTTCCACCATGGGACCGAAGAAGCAGAAGCGCGA
GCTCCCCGAGGACTTCGATCCAGTCTACCCCTATGACGCCCCGCAGCTGCA
GATCAATCCACCCTTCGTCAGCGGGGACGGATTCCACCAATCCGTGGACGG
GGTGCTGTCCCTGCACATCGCACCGCCCCCTCGTCTTTGACAACACCAGGGC
CCTCACCTGGCCTTCGGGGATGGTCTACAGCTCTTTAACAACAAGCTCATC
GTTGCCACTGAGGGATCTGGGCTGGTCATCACACGGATGGCAAGCTGGTC
CTCCAGGTCACCTCCCCCTCACCTAGCACCCGATGGCATCTcCCcTGTC
CCcTGGGcCCCCcGGTCTCTCTAGCTCAaGATGACAaGACTCAGCCsTGCAAGGTCA
CATCTCCCCTGCAGCTCCaAAAGCAACTCCCTCGCCCTTTCCCTCGGCAGCG
GTCTCCAAAACACCGAGGGTGGCcGTAGCtTGTCAAGCTGGGGGCTGGTCTC
ACCACGGACAACAGTCAGTCAGTGACAGTCAAGGTGGGAGACGGTCTTAAG
CTGAACGAAGGAGGGCTGCTCACCGTCCCCGTAACAGCACCACTTGTGTCCGGC
GCACCCGGACTATCACTTTAACTACTCCTCCACTGATTTTGAAGTTGATAACGGC

AGCCTCCGTCTGCGTCCTAAGCCGATCTCCGTCACGGCGCCACTGCAATCTACCG
 CTGACACCATCTCCCTGAAGTATTCTGACACTGACTTCTCTTTGGAGGATAACAC
 CACCCTCACTTTAACACCTAAATTA AAAACCGTACACACTGTGGACCGGTAATTCA
 GATACAGCTAATGTGATCCTCAATCACAGCTCCACCCCCAATGGTACATTATTTT
 TATGTCTGACACGTGTGGGTGGRTAGTTTTAGCACTTTGCCCTGAAGACATCATC
 CCTACATTTAGTGATATGACAAACAGCTATCTTATTTTTGATACTTTGTCGACTCA
 GACTCTCACTTATAGGAGTTTGATTAGATCAACACGACGTCATTAGCCCACAGtCC
 ACAGGACTCAGTCCAGCCTGGTTAATGCCAAGCACCTTTATTTACCCTAACTCAT
 CGGGCTCAACTTTGACATCATTCGTAAGAATTAAAGCAACAAATGTTTCATGTGGA
 TATCAGAGTCAACAGCCTCTCCACTAACGGTTTTAGTCTTCAGTTTGAATTTGAA
 AACATGATCATCTCCAGTGCCTTCTCCACCTCCTACGGGACCTTCTGCTACGT
 GCCCCAGAGTGCCTAGAGAACCCTGGCCGTCAGCCGGCCTCCCCCTTCCCA
 TACCACCCGGTAGACCACCCGCTCCATGTTTCTGTATGTGTTCTCCTCCCGC
 CGCTTGTGCGAGCACCACTCCCGCTGCTCGAGCTGAGGATCCGTGATGGAC
 ACAAGCCAGGAAGACACATCCTCAGCTCCGTGGGGGCGTCCAACAACACTGT
 TTGTGCAAGGAAAATATGAAACAATAAAGACTCAGAGAAAAACAAGTTCATAT
 GATTTTTTCTTTTATTGATTGGGGGATTTGATTTCAGGTGGGGTGTACATATC
 ACAAAAAAATCACATCAGCAGCTACACCCTGGAAACATTTCAGACAGGGGTA
 AGGACAGCGCCCTCAGCTTCTGGAACAAACATTAGAAATATTTAACTCGTCTT
 GGAGCTAACACTCTTTTTCCAGAACACATAAACATCCTGTAGA

SEQ ID NO:3 自 PAdV2 纖維朝向右手端(rhe)之 969 個鹼基
 之序列。在包括 PAdV3 之完整 rhe 的某些部分(粗體)與
 PAdV3 良好匹配。新穎序列以普通字體顯示。

AGTGGGGTTCAAAAAAGTTACATAAnCGCGCTTCTCGTGCAGAGAG
 AGCCGGGnAnnGCGCCTCTTCAGCAGTGGGTCTGTTGGGCCGTGAGAGGGGGCT
 GATGGGAAGATGGCCGGTGACTCCTCTCGCCCCGCTTTCGGCTTCTCCTCGT
 CTCGCTCTCCTTGTCTCTCTGTGTGTCAGCGCAGAACTAGTGTGAGCGAAC
 AACGCGAGGGGGCCGGTGATATACCCnCAGCTGATGTGGCCACAGCTGCTA
 TCGGnTAATCACTACCCCATCGTACGATCGnAATTCCCCCGCCTCCTCGTTnC
 GATTAACCCACCCAGAAGTCTCGGGAATTCCCGCCAGCCGGGGCTCCGACCC
 GCGACGTGCGGACTTTGACCCCGCnCCTCGGACATTGACCGGTCCCACGCC
 ACGTCACTTTCCCACTCGACGTCCCGTTCCCGCGCTnCGTCACACCCCTCTC
 CATGAATCTGCTGCAACCGCCTCGAACCCTCTCTTCCAATCAACTCGCCATT
 AAAGGGGCAATAAAAGTG TAGGGTATATGGATTGATGATGGCCAGGTGACCA

GGTCCGAGCGCTTGATCGATTCCGTGGGAAGTGGATGTCAGCTAAGCTCCTAATG
 ACAACCGCCAACCACGGCTGCAGAAGCTCTTCCCTCTAGAGACGCGAGCTAGCA
 TAGACATACTCCATCTATACACTCGCCGTAGACAATGTCATACGCAAATGGGAGG
 ACTAAGGACATCCCGGATCCACCACCTGGGATGTACTCCATCCATCGGGACACTT
 AAACAGCAATAAGAAAGACGCAATTGTTGACGCAGAAATTTGGCTAGAGAGGCG
 GGCAGGACTCATGAGCCTAGAGACCACCCAATTGGGAAAGTGACCTCCCCTCCC
 CCCGTGGAAAACGTGGTATCAAACGAGATCGACAATGCAATTCGGTCACTTTAG
 GGGTACGAGGATATATCACGGA

SEQ ID NO:4：來自第二組資料之PAdV2纖維。1176個
 鹼基之序列與PAdV3良好匹配，但反向取向左手端(粗體)
 表明最後一個引子大概自ITR除去基因組之兩端且得到雙
 序列資訊。

AAAAAAGGCAGGAGCGATGATTGATAGCTCGAGGAATAGCTCAGT
 CACCACATCCCTTCCCTGCACCACTTATAAGGGTATATATAGGCAGAGACACAGA
 CAATCAGTCATCATCACATGCTGTTTATTGAGGTTAATGATTAATCGCGGGGGCG
 CTTCATAGACAGGTCCAAAGGTTGTTTCGCTGCATGAGTCATAGCAGTACTTCCTC
 TTGCGTCCTGGCAGGTCTCCAAGTCCCGGGGAACCCGACCTGTGAGGTGCTGGAG
 AAACAGCTTCTAAAAAGACAAAAAATGGGAAATAGCACATGAGATTTCTTACAA
 GCACTTTTTCTTTTTTTTCCACATAATCCCACAAATGTCCAAAAACACTCACCA
 TAGACAGCAAAGGCATGCATCCTCATGTAGCACAGACTGCACTTCAGATTGG
 GGTCTTGGAGTGAAAGCGATGGTAATCACAAGAGCGGCAGTTCACACCAG
 GTACCTCGGGGCAGTCCAACACAAACGGAGAGGGTGGCGCAAGTGGGTCTCT
 CAAACACCACATCAGCCAGTTCAGACAGCACCTCCGCAGCCACCGCGCTGA
 TATCCTCCTCATTACTGTCCCCCTCTTCTGGGGGGTCCATCTCAAAGACCCC
 CTGAGAGCCACCTGAGTCACCAGCGGCACTCCCACCACTGTCTCAGCTAC
 ACCCCCCTCAGTCACAATCACCTCCACCTCGTCCACACTGTCCAGCCACTCG
 TCCGGCAGTCCATCGACCAGACTCTCCCAGCACGGCTCACAGAAGCCCTCA
 TCCCCCGGAGAGGGGTGCGCGAGATCCACCGGGTCCCATTCCAGCACCGGC
 ACCACCTCGGGGTTTCCGTCCCAGTCCAGGTGAAGTCTGTTCGCCATGTCTGA
 GGGTCTGTTCCGCTGAGAGAAAACCTCTACTCCCTTCGGACTCAAGAGTAGTG
 ACTCTCGGGCGCTGCGCGGACTATATACACTGAGGAGAAAAAATACACCCA

CACACGTCATCTCGGGCGGGCGCCGCGACCTCTCAGCGCGAAGGAAACCCC
 GGCTCAGGTGAATGGTGTCCCGTCGTCAGTGGGGATACGAGCGGCGACGGTG
 TGTGGAAATGCCACACCGGAGGGCGAGGGTCAGTCCAAAAGCAAAAATTCCCGC
 TAACTTCCACTTGTTGGAAATATCTCTGC

SEQ ID NO:5 PAdV2連續序列(contig)之反向互補序列。

GCAGAGATATTTCCAACAAGTGGAAGTTAGCGGGAATTTTTGCTTT
 TGGACTGACCCTCGCCCTCCGGTGTGGCATTTCACACACCGTCGCCGCTCGTAT
 CCCCCTGACGACGGGACACCATTCACCTGAGCCGGGGTTTCCTTCGCGCTGAGA
 GGTCGCGGCGCCCGCCCGAGATGACGTGTGTGGGTGTATTTTTTCTCCTCAGTGT
 ATATAGTCCGCGCAGCGCCCGAGAGTCACTACTCTTGAGTCCGAAGGGAGTAGA
 GTTTTCTCTCAGCGGAACAGACCCTCGACATGGCGAACAGACTTCACCTGGACTG
 GGACGGAAACCCCGAGGTGGTGCCGGTGCTGGAATGGGACCCGGTGGATCTGCG
 CGACCCCTCTCCGGGGGATGAGGGCTTCTGTGAGCCGTGCTGGGAGAGTCTGGTC
 GATGGACTGCCGGACGAGTGGCTGGACAGTGTGGACGAGGTGGAGGTGATTGTG
 ACTGAGGGGGGTGTAGCTGAGGACAGTGGTGGGAGTGCCGCTGGTGACTCAGGT
 GGCTCTCAGGGGGTCTTTGAGATGGACCCCCAGAAGAGGGGGACAGTAATGAG
 GAGGATATCAGCGCGGTGGCTGCGGAGGTGCTGTCTGAACTGGCTGATGTGGTG
 TTTGAGGACCCACTTGCGCCACCCTCTCCGTTTGTGTTGGACTGCCCCGAGGTAC
 CTGGTGTGAACTGCCGCTCTTGTGATTACCATCGCTTTCCTCCAAGGACCCCAA
 TCTGAAGTGCAGTCTGTGCTACATGAGGATGCATGCCTTTGCTGTCTATGGTGAG
 TGTTTTTGGACATTTGTGGGATTATGTGGAAAAAAGGAAAAAGTGCTTGTAAGA
 AATCTCATGTGCTATTTCCCATTTTTTGTCTTTTTTAGAAGCTGTTTCTCCAGCACCT
 CACAGGTCGGGTTCGCCGGGACTTGGAGACCTGCCAGGACGCAAGAGGAAGTAC
 TGCTATGACTCATGCAGCGAACAACCTTTGGACCTGTCTATGAAGCGCCCCGCG
 ATTAATCATTAACCTCAATAAACAGCATGTGATGATGACTGATTGTCTGTGTCTC
 TGCCTATATATACCCTTATAAGTGGTGCAGGGAAGGGATGTGGTGACTGAGCTAT
 TCCTCGAGCTATCAATCATCGCTCCTGCCTTTTTT

【圖式簡單說明】

圖 1：含有 PAdV-4 纖維基因之質體之構造。a)藉由 PCR 自 PAdV-4 DNA 擴增 PAdV-4 纖維基因且選殖至 pGEM-T(Promega)中，得到質體 PJJ392。b)將來自含有 PAdV-4 纖維基因之 pJJ392 的 *Bam*HI/*Bgl*III 片段插入人類巨細胞病毒即

刻早期啟動子-增強子(CMV)啟動子及PAV-3 TPL序列下游之質體 pCI-PAdV-3 三聯先導序列(TPL)之 *Bam*HI位點中，得到 pJJ741。c)藉由將含有 PAdV-3 TPL及 PAdV-4 纖維基因之 pJJ741的 *Nhe*I/*Not*I片段插入 pCI-neo (Promega)中構築轉移載體 pJJ743。

圖 2：對細胞株中之 PAdV-4 纖維 DNA 的 PCR 偵測。將來自經轉染細胞之基因組 DNA 純化且藉由 PCR 測試 PAdV-4 纖維基因之存在。a)泳道 1=PK15 純系 8；泳道 2=PK15 純系 9；泳道 3=pJJ743 對照；M=1Kb DNA 梯形圖譜。b)泳道 1-5=ST 純系 2-6；泳道 6 未經轉染之 ST DNA；泳道 7 PAdV-4 DNA；泳道 8 pJJ743 對照。c)泳道 9-15=ST 純系 7-14；M=1Kb DNA 梯形圖譜。

圖 3：對來自細胞株之 PAdV-4 纖維 mRNA 的反轉錄 PCR(RT-PCR)偵測。自經轉染之細胞製備總 RNA 且藉由 RT-PCR 對彼等經 PCR 測試對於 PAdV-4 纖維基因呈陽性之純系測試 PAdV-4 纖維 mRNA 之合成。a)泳道 1=PK15 純系 8；泳道 2=PK15 純系 9；M=1Kb DNA 梯形圖譜。b)泳道 1-6=ST 純系 2、3、5、6、7 及 8；M=1Kb DNA 梯形圖譜。

圖 4：PAdV-3 及 PAdV-4 纖維蛋白質之完整胺基酸序列及肽之位置。以黑體及下劃線突出用於產生兔抗血清之普通肽及特異性肽之序列 (Reddy 等人，1995；Kleiboeker 1995)。

圖 5：在經修飾疫苗中證明 PAdV-3 及 PAdV-4 纖維。使重組 PAdV-糖蛋白 55(gp55)在 PK15A 細胞(未經修飾)或 PK743

細胞(經修飾)中生長。藉由SDS/PAGE分離雙重複病毒樣品中所存在之蛋白質，印漬至硝基纖維素上且以相對於普通纖維肽(面板a)或相對於PAdV-4特異性纖維肽(面板b)培養之兔抗體染色。泳道1=未經修飾之病毒；泳道2=經修飾之病毒。展示纖維蛋白質之大範圍分子量標記、位置及近似分子量。

圖6：攻毒後豬之溫度。於第0天對豬進行疫苗接種，且在第22天給與加強劑量。在第49天以典型豬瘟病毒(CSFV)對豬進行攻毒。在CSFV攻毒後，每日量測各豬之直腸溫度。展示各組豬之平均溫度及標準誤差條線。◆=未經修飾之rPAdV-gp55 s/c；■=經修飾之rPAdV-gp55 s/c；▲=經修飾之rPAdV-gp55口服；□=對照；+=安樂死。

圖7：疫苗接種後之NPLA力價。於第0天對豬進行疫苗接種，且在第22天給與加強劑量。在第49天以CSFV對豬進行攻毒。在第0天收集全血樣品且隨後每隔一週收集一次，檢定血清中NPLA抗體之存在。展示疫苗接種組之平均NPLA力價。□=未經修飾之rPAdV-gp55 s/c；□=經修飾之rPAdV-gp55 s/c；■=經修飾之rPAdV-gp55，口服；↓=疫苗接種。

圖8：CSFV特異性中和抗體在經口進行疫苗接種之豬體內之發展。於第0天對豬經口進行疫苗接種，且在第22天給與加強劑量。在第49天以CSFV對豬進行攻毒。在第0天收集全血樣品且隨後每隔一週收集一次，檢定血清中NPLA抗體之存在。展示疫苗接種組之平均NPLA力價。□=

未經修飾之 rPAdV-gp55*，■ = 未經修飾之 rPAdV-gp55。

*=Hammond等人，2003中之獨立實驗資料。↓=疫苗接種。

圖9：CSFV特異性中和抗體在經疫苗接種之豬體內之發展的比較。於第0天對豬經口進行疫苗接種，且在第22天給與加強劑量。在第49天以CSFV對豬進行攻毒。在第0天收集全血樣品且隨後每隔一週收集一次，檢定血清中NPLA抗體之存在。展示疫苗接種組之平均NPLA力價。↓=疫苗接種。s/c=經皮下給與之未經修飾之疫苗；mod s/c=經皮下給與之經修飾之疫苗；口服=經口給與之未經修飾之疫苗*；mod 口服=經口給與之經修飾之疫苗。
*=Hammond等人，2003中之獨立實驗資料。

圖10：豬脾臟中之CSFV抗原偵測。死後，藉由抗原捕捉ELISA分析脾臟樣品中CSFV抗原之存在。展示各組之平均抗原力價。Pos=陽性對照脾臟樣品；neg=陰性對照脾臟樣品；+=安樂死。

序列表

PAdV 1
狀態：不完整
自纖維朝右手端 (rhe) 之1858個鹼基之序列
在某些部分 (粗體) 與PAdV3良好匹配，新穎序列以普通字體顯示。
作用：一個以上引子用於rhe

TATAAACCAGTTCCACCATGGGACCGAAGAAGCAGAAGCGCGAGCTCCCCGAGGACTTCGATCCAG
TCTACCCCTATGACGCCCCGCAGCTGCAGATCAATCCACCCTTCGTCAGCGGGGACGGATTCCACC
AATCCGTGGACGGGGTGCTGTCCCTGCACATCGCACCGCCCCCTCGTCTTTGACAACACCAGGGCCC
TCACCCTGGCCTTCGGGGATGGTCTACAGCTCTTTAACAACAAGCTCATCGTTGCCACTGAGGGAT
CTGGGCTGGTCATCACCACGGATGGCAAGCTGGTCTCAGGTACCTCCCCCTCACCCTAGCAC
CCGATGGCATCTcCCcTGTCCTTGGGcCCCcGGTCTCTCTAGCTCAaGATGACAaGACTCAGCCsT
GCAAGGTCACATCTCCCTGCAGCTCCaAAAGCAACTCCCTCGCCCTTTCCCTCGGCAGCGGTCTC
CAAAACACCGAGGGTGCCcGTAGCtTGTCaAGCTGGGGGCTGGTCTCACCACGGACAACAGTCAGT
CAGTGACAGTCAAGGTGGGAGACGGTCTTAAGCTGAACGAAGGAGGGCTGCTCACCGTCCCCGTAA
CAGCACCCTTGTGTCCGGCGCACCCGGACTATCACTTTAACTACTCCTCCACTGATTTTGAACCTT
GATAACGGCAGCCTCCGTCTGCGTCCTAAGCCGATCTCCGTACGGCGCCACTGCAATCTACCGCT
GACACCATCTCCCTGAAGTATTCTGACACTGACTTCTCTTTGGAGGATAACACCACCCTCACTTTA
ACACCTAAATTAAAACCGTACACACTGTGGACCGGTAATTGAGATACAGCTAATGTGATCCTCAAT
CACAGCTCCACCCCCAATGGTACATTATTTCTATGTCTGACACGTGTGGGTGGRTAGTTTTAGCAC
TTTGCCCTGAAGACATCATCCCTACATTTAGTGATATGACAAACAGCTATCTTATTTTTGATACTT
TGTCGACTCAGACTCTCACTTATAGGAGTTTGATTAGATCAACACGACGTCATTAGCCACAGtCC
ACAGGACTCAGTCCAGCCTGGTTAATGCCAAGCACCTTTATTTACCCTAACTCATCGGGCTCAACT
TTGACATCATTCGTAAGAATTAAAGCAACAAATGTTTCATGTGGATATCAGAGTCAACAGCCTCTCC
ACTAACGGTTTTAGTCTTCAGTTTGAATTTGAAAACATGATCATCTCCAGTGCCTTCTCCACCTCC
TACGGGACCTTCTGCTACGTGCCCCAGAGTGCCCTAGAGAACCCTGGCCGTCAGCCGGCCTCCCCCT
TCCCATAACCACCCGGTAGACCACCCGCTCCATGTTTCTGTATGTGTTCTCCTCCCGCCGCTTGTGC
AGCACCACCTCCCGCTGCTCGAGCTGAGGATCCGTGATGGACACAAAGCCAGGAAGACACATCCTC
AGCTCCGTGGGGGCGTCCAACAACCTGTTTGTGCAAGGAAAATATGAAACAATAAAGACTCAGAGAA
AAACAAGTTCATATGATTTTTTTCTTTTATTGATTGGGGGATTGATTGAGGTGGGGTGTACATATC
ACAAAAAAATCACATCAGCAGCTACACCCTGGAAACATTGAGACAGGGGTAAGGACAGCGCCCTCA
GCTTCTGGAACAAACATTAGAAATATTTAACTCGTCTTGAGCTAACACTCTTTTTCCAGAACAC
ATAAACATCCTGTAGA

豬腺病毒血清型3完整基因組，菌株IAF
長度 = 34094
得分 = 454 位元 (229)， 預期值 = 3e-124
一致性 = 238/241 (98%)， 缺口 = 0/241 (0%)
股 = 正 / 正

查詢	1241	CCTTCTCCACCTCCTACGGGACCTTCTGCTACGTGCCCCAGAGTGCCTAGAGAACCCTGG	1300
目標	30888	CCTTCTCCACCTCCTACGGGACCTTCTGCTACGTGCCCCAGAGTGCCTAGAGAACCCTGG	
	30947		
查詢	1301	CCGTCAGCCGGCCTCCCCCTTCCCATAACCACCCGGTAGACCACCCGCTCCATGTTTCTGT	1360
目標	30948	CCGTCAGCCGGCCTCCCCCTTCCCAGGCCACCCGGTACACCACCCGCTCCATGTTTCTGT	
	31007		
查詢	1361	ATGTGTTCTCCTCCCGCCGCTTGTGCAGCACCACTCCCGCTGCTCGAGCTGAGGATCCG	1420
目標	31008	ATGTGTTCTCCTCCCGCCGCTTGTGCAGCACCACTCCCGCTGCTCGAGCTGAGGATCCG	
	31067		

查詢	1421	TGATGGACACAAAGCCAGGAAGACACATCCTCAGCTCCGTGGGGGCGTCCAACAACTGTT	1480
目標	31068	TGATGGACACAAAGCCAGGAAGACACATCCTCAGCTCCGTGGGGGCGTCCAACAACTGTT	
	31127		
查詢	1481	T	1481
目標	31128	T	31128
得分	= 429	位元 (216),	預期值 = 2e-116
一致性	= 487/567 (85%),	缺口	= 9/567 (1%)
股	= 正 / 正		
查詢	1	TATAAACCAGTTCCACCATGGGACCGAAGAAGCAGAAGCGCGAGCTCCCGAGGACTTCG	60
目標	28919	TATAGACCAGTTCCACCATGGGACCGAAGAAGCAGAAGCGCGAGCTACCGAGGACTTCG	
	28978		
查詢	61	ATCCAGTCTACCCCTATGACGCCCCGCGAGCTGCAGATCAATCCACCCTTCGTCAGCGGGG	120
目標	28979	ATCCAGTCTACCCCTATGACGTCCCGCAGCTGCAGATCAATCCACCCTTCGTCAGCGGGG	
	29038		
查詢	121	ACGGATTCCACCAATCCGTGGACGGGGTGCTGTCCCTGCACATCGCACCGCCCCCTCGTCT	180
目標	29039	ACGGATTCAACCAATCCGTGGACGGGGTGCTGTCCCTGCACATCGCACCGCCCCCTCGTTT	
	29098		
查詢	181	TTGACAACACCAGGGCCCTCACCCCTGGCCTTCGGGGATGGTCTACAGCTCTTTAACAACA	240
目標	29099	TTGACAACACCAGGGCCCTCACCCCTGGCCTTCGGGGAGGTCTACAGCTCTCGGGCAAGC	
	29158		
查詢	241	AGCTCATCGTTGCCACTGAGGGATCTGGGCTGGTCATCACACGGATGGCAAGCTGGTCC	300
目標	29159	AGCTCGTCGTTGCCACCGAGGGCTCGGGGCTAACCACCAACCCGGATGGCAAGCTGGTTC	
	29218		
查詢	301	TCCAGGTCACCTCCCCCTCACCCCTAGCACCCGATGGCATCTCCCCTGTCCCTGGGCCCC	360
目標	29219	TCAAAGTCAAGTCCCCCATCACCCCTGACCGCCGAGGGCATCT-CCCTGTCCCTGGG-TCC	
	29276		
查詢	361	CGGTCTCTCTAGCTCAAGATGACAAGACTCAGCCSTGCAAGGTCACATCTCCCCTGCAGC	420
目標	29277	CGGTCTTTCTAACTC-AGA-GACCGGCTCAGTC-TGCAA-GTCACAGCTCCCCTGCAGT	
	29332		
查詢	421	TCCAAAAGCAACTCCCTCGCCCTTTCCCTCGGCAGCGGTCTCCAAAACACCGAGGGTGGC	480
目標	29333	TCC-AGGGCAACGCCCTCACTCTTCCCCTCGCCGCGGTCTCCAAAACACCGATGGTGG-	
	29390		
查詢	481	CGTAGCTTGTCAGCTGGGGGCTGGTCTCACACGGACAACAGTCAGTCAGTGACAGTCA	540
目標	29391	-AATGGGTGTCAAAC TGGGGAGCGGTCTCACACGGACAACAGTCAGGCGGTGACCGTTC	
	29449		
查詢	541	AGGTGGGAGACGGTCTTAAGCTGAACG	567
目標	29450	AGGTGGGAAATGGACTTCAGCTGAACG	29476

得分 = 149 位元 (75), 預期值 = $3e-32$
 一致性 = 164/181 (90%), 缺口 = 7/181 (3%)
 股 = 正 / 正

查詢 1502 AATAAAGACTCAGAGAAAAAC-AAGTTCATATGATTTTTCTTTTATTGATTGGGGGATT 1560
 |||||
 目標 31140 AATAAAGACTCAGAGAAAATCCAAGTTCATATGATTTTT-CTTTTATTGATTGGGGGAAT
 31198

查詢 1561 TGATTTCAGGTGGGGTGTACAT-ATCACHnnnnnnnTCACATCAGCAGCTACACCCTGGAAA 1619
 |||||
 目標 31199 TGATTTCAGGTGGGGTGTGCATAATCAC--AAAAATCACATCAGCAGGTACACACCTGAGA
 31256

查詢 1620 CATTTCAGACAGGGGTAAGGACAGCGCCCTCAGCTTCTGGAACAAACATTAGAAATATTTA 1679
 ||
 目標 31257 CA-TCAGACAGGGGTAAGGACAGCG-CCTCAGCTTCTGGAACAGACATCAGAAATATTTA
 31314

查詢 1680 A 1680
 |
 目標 31315 A 31315

得分 = 85.8 位元 (43), 預期值 = $4e-13$
 一致性 = 43/43 (100%), 缺口 = 0/43 (0%)
 股 = 正 / 正

查詢 1058 CAGGACTCAGTCCAGCCTGGTTAATGCCAAGCACCTTTATTTA 1100
 |||||
 目標 29978 CAGGACTCAGTCCAGCCTGGTTAATGCCAAGCACCTTTATTTA 30020

得分 = 85.8 位元 (43), 預期值 = $4e-13$
 一致性 = 43/43 (100%), 缺口 = 0/43 (0%)
 股 = 正 / 正

查詢 1058 CAGGACTCAGTCCAGCCTGGTTAATGCCAAGCACCTTTATTTA 1100
 |||||
 目標 30702 CAGGACTCAGTCCAGCCTGGTTAATGCCAAGCACCTTTATTTA 30744

得分 = 77.9 位元 (39), 預期值 = $9e-11$
 一致性 = 39/39 (100%), 缺口 = 0/39 (0%)
 股 = 正 / 正

查詢 1241 CCTTCTCCACCTCCTACGGGACCTTCTGCTACGTGCCCC 1279
 |||||
 目標 30164 CCTTCTCCACCTCCTACGGGACCTTCTGCTACGTGCCCC 30202

PAdV 2

狀態；暫時性完整

自纖維朝向右手端 (rhe) 之 969 個鹼基之序列

在包括PAdV3之完整rhe的某些部分(粗體)與PAdV3良好匹配。新穎序列以普通字體顯示。

作用：一個以上引子用於the

AGTGGGGTTCAAAAAAGTTACATAAnCGCGCTTCTCGTG CAGAGAGAGCCGGnAnnGCGCCTCTT
CAGCAGTGGGTCTGTTGGCCGTGAGAGGGGGCTGATGGGAAGATGGCCGTGACTCCTCTCGCCCCG
CTTTTCGGCTTCTCCTCGTCTCGCTCTCCTTGTCTCTCTGTGT CAGCGCAGAACTAGTGTGAGC
GAACAACGCGAGGGGGCCGGTGATATACCCn CAGCTGATGTGGCCACAGCTGCTATCGGnTAATCA
CTACCCCATCGTACGATCGnAATTCCCCCGCCTCCTCGTTnCGATTAAACCCACCCAGAAGTCTCGG
GAATTC CCGCCAGCCGGGCTCCGACCCGCGACGTGCGGACTTTGACCCCGCn CCTCGGACATTGAC
CGGTCCCACGCCACGTCACTTTCCCACTCGACGTCCCGTTCCCGCGCTnCGTCAACCCCTCTCCA
TGAATCTGCTGCAACCGCCTCGAACCTCTCTTCCAATCAACTCGCCATTAAAGGGGCAATAAAAG
TGTAGGGTATATGGATTGATGATGGCCCAGGTGACCAGGTCCGAGCGCTTGATCGATTCCGTGGGA
AGTGGATGTCAGCTAAGCTCCTAATGACAACCGCCAACACGGCTGCAGAAGCTCTTCCCTCTAGA
GACGCGAGCTAGCATAGACATACTCCATCTATACACTCGCCGTAGACAATGT CATA CGCAAATGGG
AGGACTAAGGACATCCCGGATCCACCACCTGGGATGTACTCCATCCATCGGGACACTTAAACAGCA
ATAAGAAAGACGCAATTGTTGACGCAGAAATTTGGCTAGAGAGGCGGGCAGGACTCATGAGCCTAG
AGACCACCCAATTGGGAAAGTGACCTCCCCTCCCCCGTGGA AACCGTG GTATCAAACGAGATCGA
CAATGCAATTCGGTCACTTTAGGGGTACGAGGATATATCACGGA

C2 vs資料庫

豬腺病毒血清型3完整基因組，菌株IAF

長度=34094

得分 = 480 位元 (242), 預期值 = 4e-132
 一致性 = 419/475 (88%), 缺口 = 5/475 (1%)
 股 = 正 / 正

```
查詢 67      CAGCAGTGGGTCGTGGGCCGTGAGAGGGGGCTGATGGGAAGATGGCCGGTGAnnnnnnnnn 126
      |||||
目標 33613    CAGCAGTCGGTCGTGGGCCATGAGAGGGGGCTGATGGGAAGATGGCCGGTGACTCCTCTC
33672
```

[illegible]

```

查詢 187  ACTAGTGTGAGCGAACAACGCGAGGGGGCCGGTGATATACCCNCAGCTGATGTGGCCACA 246
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
目標 33733 ACGAGTGTGAGCGAACACCGCGAGCGGGCCGGTGATATACCCACAGCGGATGTGGCCACG
33792

```

```
查詢      247      GCTGCTATCGGNTAATCACTACCCCATCGTACGATCGNAATTCCCCGCCTCCTCGTT-N      305
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
目標      33793    CCTGCGGTGGTTAATCAGTACCCCATCGTCCGATCGGAATTCCCCGCCTCCGCGTTAA
33852
```

查詢 306 CGATTAACCCACCCAGAAGTCTCGGGAATTCCCGCCAGCCGGGCTCCGACCCGCACGTG 365
|||||
目標 33853 CGATTAACCCGCCAGAAGTCCCGGGAATTCCCGCCAGCC-GGCTCCG--CCGCGACCTG
33909

查詢 366 CGGACTTTTGACCCCGCNCCTCGGACATTGACCGGTCCCACGCCACGTCACTTTCCCCTC 425

查詢	398	ATGTAGCACAGACTGCACTTCAGATTGGGGTCCTTGGAGTGAAAGCGATGGTAATCACAA	457
目標	1017	ATGTAGCACAGACTGCACTTCAGATTGGGGTCCTTGGAGTGAAAGCGATGGTAATCACAA	958
查詢	458	GAGCGGCAGTTCACACCAGGTACCTCGGGGCAGTCCAACACAAACGGAGAGGGTGGCGCA	517
目標	957	GAGCGGCAGTTCACACCAGGTACCTCGGGGCAGTCCAACACAAACGGAGAGGGTGGCGCA	898
查詢	518	AGTGGGTCTCAAACACCACATCAGCCAGTTCAGACAGCACCTCCGCAGCCACCGCGCTG	577
目標	897	AGTGGGTCTCAAACACCACATCAGCCAGTTCAGACAGCACCTCCGCAGCCACCGCGCTG	838
查詢	578	ATATCCTCCTCATTACTGTCCCCCTCTTCTGGGGGGTCCATCTCAAAGACCCCCTGAGAG	637
目標	837	ATATCCTCCTCATTACTGTCCCCCTCTTCTGGGGGGTCCATCTCAAAGACCCCCTGAGAG	778
查詢	638	CCACCTGAGTCACCAGCGGCACTCCCACCACTGTCCTCAGCTACACCCCCCTCAGTCACA	697
目標	777	CCACCTGAGTCACCAGCGGCACTCCCACCACTGTCCTCAGCTACACCCCCCTCAGTCACA	718
查詢	698	ATCACCTCCACCTCGTCCACACTGTCCAGCCACTCGTCCGGCAGTCCATCGACCAGACTC	757
目標	717	ATCACCTCCACCTCGTCCACACTGTCCAGCCACTCGTCCGGCAGTCCATCGACCAGACTC	658
查詢	758	TCCCAGCACGGCTCACAGAAGCCCTCATCCCCGGAGAGGGGTGCGCAGATCCACCGGG	817
目標	657	TCCCAGCACGGCTCACAGAAGCCCTCATCCCCGGAGAGGGGTGCGCAGATCCACCGGG	598
查詢	818	TCCCATTCCAGCACCGGCACCACCTCGGGGTTTCCGTCCCAGTCCAGGTGAAGTCTGTTC	877
目標	597	TCCCATTCCAGCACCGGCACCACCTCGGGGTTTCCGTCCCAGTCCAGGTGAAGTCTGTTC	538
查詢	878	GCCATGTCGAGGGTCTGTTCCGCTGAGAGAAAACCTCTACTCCCTTCGGACTCAAGAGTAG	937
目標	537	GCCATGTCGAGGGTCTGTTCCGCTGAGAGAAAACCTCTACTCCCTTCGGACTCAAGAGTAG	478
查詢	938	TGACTCTCGGGCGCTGCGCGGACTATATACACTGAGGAGAAAAATACACCCACACACGT	997
目標	477	TGACTCTCGGGCGCTGCGCGGACTATATACACTGAGGGGAAAAATACACCCACACACGT	418
查詢	998	CATCTCGGGCGGGCGCCGC - GACCTCTCAGCGCGAAGGAAACCCCGGCTCAGGTGAATGG	1056
目標	417	CATCTCGGGCGGGCGCCGC - GACCTCTCAGCGCGAAGGACACCCC - GCTCAGGTGAGTGG	359
查詢	1057	TGTC - CCGTCGTCAG	1070
目標	358	TGTCACCGTCGTCAG	344

連續序列之反向互補序列

GCAGAGATATTTCCAACAAGTGGAAGTTAGCGGGAATTTTGGCTTTTGGACTGACCCTCGCCCTCC
GGTGTGGCATTTCACACACCGTCGCCGCTCGTATCCCCACTGACGACGGGACACCATTCACCTGA
GCCGGGGTTTCCTTCGCGCTGAGAGGTCGCGGCGCCCGCCGAGATGACGTGTGTGGGTGTATTTT
TTCTCCTCAGTGTATATAGTCCGCGCAGCGCCCGAGAGTCACTACTCTTGAGTCCGAAGGGAGTAG
AGTTTTCTCTCAGCGGAACAGACCCTCGACATGGCGAACAGACTTCACCTGGACTGGGACGGAAAC
CCCAGGTGGTGCCGGTGCTGGAATGGGACCCGGTGGATCTGCGCGACCCCTCTCCGGGGGATGAG

GGCTTCTGTGAGCCGTGCTGGGAGAGTCTGGTTCGATGGACTGCCGGACGAGTGGCTGGACAGTGTG
GACGAGGTGGAGGTGATTGTGACTGAGGGGGGTGTAGCTGAGGACAGTGGTGGGAGTGCCGCTGGT
GACTCAGGTGGCTCTCAGGGGGTCTTTGAGATGGACCCCCCAGAAGAGGGGGACAGTAATGAGGAG
GATATCAGCGCGGTGGCTGCGGAGGTGCTGTCTGAACTGGCTGATGTGGTGTGTTGAGGACCCACTT
GCGCCACCCTCTCCGTTTGTGTTGGACTGCCCCGAGGTACCTGGTGTGAACTGCCGCTCTTGTGAT
TACCATCGCTTTCACCTCCAAGGACCCCAATCTGAAGTGCAGTCTGTGCTACATGAGGATGCATGCC
TTTGCTGTCTATGGTGAGTGTTTTTGGACATTTGTGGGATTATGTGGAAAAAAGGAAAAAGTGCT
TGTAAGAAATCTCATGTGCTATTTCCCATTTTTTGTCTTTTGTAGAGCTGTTTCTCCAGCACCTCA
CAGGTCGGGTTCGCCGGGACTTGGAGACCTGCCAGGACGCAAGAGGAAGTACTGCTATGACTCATG
CAGCGAACAACCTTTGGACCTGTCTATGAAGCGCCCCCGCGATTAATCATTAACCTCAATAAACAG
CATGTGATGATGACTGATTGTCTGTGTCTCTGCCCTATATATACCCTTATAAGTGGTGCAGGGAAGG
GATGTGGTGACTGAGCTATTCCTCGAGCTATCAATCATCGCTCCTGCCTTTTTTT

豬腺病毒血清型3完整基因組，菌株IAF
長度 = 34094

得分 = 1861 位元 (939), 預期值 = 0.0
一致性 = 1027/1044 (98%), 缺口 = 9/1044 (0%)
股 = 正 / 正

查詢	106	CTGACGACGG-GACACCATTACCTGAGCCGGGGTTTCCTTCGCGCTGAGAGGTC-GCGG	163
目標	344	CTGACGACGGTGACACCACTACCTGAGC-GGGGTGTCCTTCGCGCTGAGAGGTCCGCGG	402
查詢	164	CGCCCCCGGAGATGACGTGTGTGGGTGTATTTTTTCTCCTCAGTGTATATAGTCCGCGC	223
目標	403	CGGCCGCGGAGATGACGTGTGTGGGTGTATTTTTTCCCCTCAGTGTATATAGTCCGCGC	462
查詢	224	AGCGCCCGAGAGTCACTACTCTTGAGTCCGAAGGGAGTAGAGTTTTCTCTCAGCGGAACA	283
目標	463	AGCGCCCGAGAGTCACTACTCTTGAGTCCGAAGGGAGTAGAGTTTTCTCTCAGCGGAACA	522
查詢	284	GACCCTCGACATGGCGAACAGACTTCACCTGGACTGGGACGGAACCCCGAGGTGGTGCC	343
目標	523	GACCCTCGACATGGCGAACAGACTTCACCTGGACTGGGACGGAACCCCGAGGTGGTGCC	582
查詢	344	GGTGCTGGAATGGGACCCGGTGGATCTGCGCGACCCCTCTCCGGGGGATGAGGGCTTCTG	403
目標	583	GGTGCTGGAATGGGACCCGGTGGATCTGCGCGACCCCTCTCCGGGGGATGAGGGCTTCTG	642
查詢	404	TGAGCCGTGCTGGGAGAGTCTGGTTCGATGGACTGCCGGACGAGTGGCTGGACAGTGTGGA	463
目標	643	TGAGCCGTGCTGGGAGAGTCTGGTTCGATGGACTGCCGGACGAGTGGCTGGACAGTGTGGA	702
查詢	464	CGAGGTGGAGGTGATTGTGACTGAGGGGGGTGTAGCTGAGGACAGTGGTGGGAGTGCCGC	523
目標	703	CGAGGTGGAGGTGATTGTGACTGAGGGGGGTGAGTCAGAGGACAGTGGTGGGAGTGCCGC	762
查詢	524	TGGTGACTCAGGTGGCTCTCAGGGGGTCTTTGAGATGGACCCCCCAGAAGAGGGGGACAG	583
目標	763	TGGTGACTCAGGTGGCTCTCAGGGGGTCTTTGAGATGGACCCCCCAGAAGAGGGGGACAG	822
查詢	584	TAATGAGGAGGATATCAGCGCGGTGGCTGCGGAGGTGCTGTCTGAACTGGCTGATGTGGT	643
目標	823	TAATGAGGAGGATATCAGCGCGGTGGCTGCGGAGGTGCTGTCTGAACTGGCTGATGTGGT	882
查詢	644	GTTTGAGGACCCACTTGCGCCACCCTCTCCGTTTGTGTTGGACTGCCCCGAGGTACCTGG	703
目標	883	GTTTGAGGACCCACTTGCGCCACCCTCTCCGTTTGTGTTGGACTGCCCCGAGGTACCTGG	942

PAdV4
狀態 ； 不完整
自纖維朝向右手端（rhe）之2250個鹼基之序列
與PAdV4纖維良好匹配（粗體），但所有後續序列均為新穎序列。未知PAdV4基因組之大小。
作用：至少2個以上引子完整
連續序列之長度： 2250個鹼基

AACCCACCTGGAACACCAAGTGCCAGATGCTCCAGTTTTTTCTACCGCGGGAGTTTCGAAAGTTTACCTCAGATACTGTAGTCAGACACAAAGATGTAAGTGCCWGCATGAGAAAGTTTATTGGCAATAAA
GCTACTGGAACGATGCGTGTGGTGATCTTTCCCCCTCCCCCAAATTTTCATTTTGTAACATACCCCT
ATGGGAAGGCCCCGGCCACAGTCAGCCACAGTCTCAAGTTGCTCCAGCTCAGGTGAGGTAATGCT
GATGAACCCAGGCGATATCAGTCTCGCATCCAAGGTGTGATCCAAACTCTGTGAAAATCATACTCC
GCTTGTAAGCTTTTCGCCAAGGCACCGGGTTCCATACACCATCAATCTTCGCAGACGTCGCCGCCG
TGCGCCGTCCCGAAAAGCCGGGTAGAACACTCTCGGTGAGGTCCCCAACTCTCAGCAACCTAAA
AGCCTCCTGAAGCAACTCCCTGCTCTGAACCGCACACTGCCTCACATCACGTTTCATGCAGAGACAT
ACATCCAGTACACAAGCGTATAAAGTAGTAATTAGTTGCAGTACAGAGAAATTTACAGACGGGCC
TGACAGTTGCTGCTTCAAAGCCAAAAGTCATTTCCCTGTCTGCAGCAAAACACCACAAAGTGCAG
CCCCGCCACCATATAGGAGCCCCTGCAAGAGATAGCTTTAGGTAAGTCAACACACACCCTCTTCTG
CATACCAGATGAAGCTGCGGTTAAAGAAACAGCCCCCTGGGATCACAGACGTAGCCAAAGGTCTTCA
CCACCACACTCCTAGCCCTACATTGCAAGAGAGTGRGGGCTGTCaCAGKTGRMCAATGTATAGAAA
GCACCTCTCGACCATAAAGTAATtCCCCSAAWaCAGATtGtTTAACTCCAAGGSCCCGGGGgcC
AGACCCATCCCAGTtCTACGGAGACATTGCAAAGTGGAGCCAGAAGCAACCAAATCCCAAGGCACC
GGAAGATCTAAGTAAGCTGTGAAACATGCTGCAGGTGGAGTGGTGTCTTACCGCTCCAAGTAGATGC
TTAGAGTCAATGGTTCAACAGAAGTCATTGTCTTGGAGAGGAAGAGGGAAAGCATTAAAGCACC
GAAACAGCTCAATGGGGGGGCTGGTGTGGTACACAGCCACCATAACGGGAACCAAGAAAAGTCAACA
GGCCAGAGGCCAAATCCTGCTGGGACTCCGGAGTTGCAAACAGCCGAGAGCCCCGCCGTGACTGTGA
TAGTGTGCCTGCCTTGAGGTAAATCAAGCATGCAGCAACAATGCAGAAAAGACTCAGAGCGAGTAC
CAGGGCGAGTTTCAAATCAAAGCGAATCAGCAAGTAATCATAAACCAAGGATCTGATCACATCCA
gCCAAAGSWCKWCMCGAAGGCAAAGTAGGATCCCCTGGCACATCCGTGATGTACAGGTGCCAGGAC
CAAGCGCTGTACACGAAAGTGCCGGACGCCATCTTGCGTACAGATCACTGACCCGTGGAGCCGAAA
CCGCCGGCACCCCCTGTGCGTAGGCTGCAGGTGCTCCACCAGCTGGCACACGGGTCTCTCAAATTTTC
AGGAAAACCAGCTGCGCGATCCGGTCCCCGGGAGCGATAAACACAGGCAGAGGCCCACTGTTCGCC
AACAGCACTTTCACTCGCCTGTAAGTCCGGTCAATTGTTCCCGCACAGACGTACACGCCGCGCAA
CGACAACCTCGATCGTGAAAAAATCTGCCCGTAGGGCCAGGCGGAGGACTTATGGCGATCCCAGAA
CGGATGATAGTTCCGTCCCCCGTTCCATGATACGAGCCTCCGGCGAGCAAAACGTCTATCCCCCG
TGAAGCCGCCGTACCGAAAACAGCCGGCCCCCCCCCGTCCCGCTAACTTCCCCTTTAAGATCCGGAG
TGGTCTTGACGGCTCAGAGGGAAAAACCGCGAAAAAATTCGCGAACTCCGCAAAAACCCGAACGG
AGTACCGCCCCCGGAATCCGTGAACTGACATTGGCCGACTTTTATGGCGCCCGGCATGTGATAG
TGACAATACGGGAAGGGAACCAATTACGCATTCTGGGCAGTGTGGGAGAAAGCGGACTTACACAA
TGTGTCTTCGCACCACGGGAAAAGATTACTCGATACCTCATAAGGTGATG

豬腺病毒4假定性纖維蛋白質基因，完整cds
長度 =2559

得分 = 297 位元 (149)， 預期值 = 1e-76
一致性 = 179/187 (95%)， 缺口 = 2/187 (1%)
股 = 正 / 正

查詢	1	AACCCACCTGGAACACCAAGTGCCAGATGCTCCAGTTTTTTCTACCGCGGGAGTTTCGAA	60
目標	2360	AACCCACCTGGAACACCAAGTGCCAGATACTCCAGTTTTTTCTACTGCGGGAGTTTCGAA	2419

查詢	61	AGTTTACCCTCAGATACTGTAGTCAGACACAAAGATGTAAGTCCWGCATGAGAAAGTTT	120
目標	2420		2479
查詢	121	ATTGGCAATAAAGCTACTGGAAACGATGCGTGTGGT-GATC-TTCCCCCTCCCCCAAAT	178
目標	2480		2539
查詢	179	ATTAGCAATAAAGCTCCTGGAAACGATGCGTGTGGTGGATCTTTCCCCCTCCCCCAAAT	
目標	2540	TTCATTT 185	
目標	2540	TTCATTT 2546	

五、中文發明摘要：

本發明提供用於製備具有改變趨性的腺病毒載體之方法。本發明亦提供包含該等載體之組合物及其使用方法。

六、英文發明摘要：

Methods are provide to allow for the preparation of adenoviral vectors with altered tropism. Compositions comprising such vectors and methods of use thereof also are provided.

十、申請專利範圍：

1. 一種包含腺病毒之重組腺病毒載體，其包含該腺病毒原生之纖維基因及另外包含與該腺病毒異源性之第二纖維基因，其中該第二纖維基因係藉由使該重組腺病毒生長於穩定表現該第二纖維基因之細胞株中而由該重組腺病毒獲得。
2. 如請求項1之重組腺病毒載體，其中該腺病毒載體為一種選自由豬、人類、鳥禽、牛、馬及羊腺病毒組成之群之腺病毒載體。
3. 一種組合物，其包含如請求項1之重組腺病毒載體。
4. 如請求項3之組合物，其另外包含一種醫藥學上可接受之賦形劑。
5. 如請求項1之重組腺病毒載體，其中該腺病毒為一種選自由重組 PAdV-1、重組 PAdV-2、重組 PAdV-3、重組 PAdV-4、重組 PAdV-5、重組 PAdV-6及重組 PAdV-7組成之群之重組豬腺病毒。
6. 如請求項1之重組腺病毒載體，其中該腺病毒為重組人類腺病毒(HAdV)、重組牛腺病毒(BAdV)、重組羊腺病毒(OAdV)、重組鼠腺病毒(MAdV)、重組猴腺病毒(SAdV)或重組犬腺病毒(CAdV)。
7. 如請求項1之重組腺病毒載體，其中該第二纖維蛋白質為選自 PAdV-1、PAdV-2、PAdV-3、PAdV-4及PAdV-5之纖維蛋白質。
8. 如請求項1之重組腺病毒載體，其中該重組腺病毒載體

另外包含不同於該第一或該第二纖維蛋白質之第三纖維蛋白質。

9. 如請求項5之重組腺病毒載體，其中該重組PAdV為重組PAdV-3。
10. 如請求項1之重組腺病毒載體，其中該重組載體包含PAdV-4之纖維蛋白質。
11. 如請求項1之重組腺病毒載體，其中該重組腺病毒載體為複製勝任型。
12. 如請求項1之重組豬腺病毒載體，其中該重組PAdV為複製缺陷型。
13. 如請求項12之重組豬腺病毒載體，其中該重組PAdV包含一個異源性核苷酸序列插入該PAdV基因組之一個必要區域中，且該穩定表現該纖維基因之細胞株亦表現該異源性核苷酸序列已插入之該PAdV基因組之該必要區域。
14. 如請求項1之重組腺病毒載體，其中該重組腺病毒包含一個異源性核苷酸序列插入該腺病毒基因組之一個非必要區域中。
15. 如請求項14之方法，其中該異源性核苷酸序列為一個基因，其編碼一種選自由免疫調節劑、抗原、病原體、免疫原性多肽、治療性多肽、生長激素及細胞激素組成之群之蛋白質。
16. 一種包含腺病毒之宿主細胞，該腺病毒包含該豬腺病毒原生之纖維基因，且其中該宿主細胞為可表現一個與該腺病毒異源性之纖維基因且能夠經豬腺病毒感染之重組

細胞。

17. 如請求項16之宿主細胞，其中該細胞為哺乳動物細胞或鳥禽細胞。
18. 如請求項16之宿主細胞，其中該細胞為選自由豬細胞、人類細胞、牛細胞及羊細胞組成之群之哺乳動物細胞。
19. 如請求項16之宿主細胞，其中該細胞為重組豬細胞。
20. 一種能夠誘導哺乳動物個體免疫反應的組合物，該組合物包含如請求項1之重組腺病毒載體及醫藥學上可接受之賦形劑。
21. 一種引發哺乳動物個體免疫反應的方法，其包含向該哺乳動物個體投與如請求項20之組合物。
22. 如請求項21之方法，其中該哺乳動物個體為豬。
23. 一種製備腺病毒之方法，其包含：
 - a. 一種可表現腺病毒纖維基因之重組宿主細胞在適於該細胞感染腺病毒之條件下培養；
 - b. 使該細胞接觸一種重組腺病毒載體，其包含殼體化所必需之腺病毒序列及一個編碼異源性蛋白質之異源性基因，且其中該重組腺病毒包含一個纖維基因不同於該宿主細胞中之該纖維基因；及視情況收集該腺病毒。
24. 如請求項23之方法，其中該所收集之腺病毒載體與未接觸該重組宿主細胞之腺病毒載體相比，包含更廣泛之組織特異性。
25. 如請求項23之方法，其中該腺病毒載體視情況刪除一或多種非複製所必需之腺病毒蛋白質之部分或全部。

26. 如請求項23之方法，其中該異源性蛋白質為一種選自由免疫調節劑、抗原、病原體、免疫原性多肽、治療性多肽、生長激素及細胞激素組成之群之蛋白質。
27. 一種用於保護哺乳動物宿主以防感染之疫苗，其包含如請求項1之重組腺病毒載體及視情況一種醫藥學上可接受之賦形劑。
28. 如請求項24之方法，其中該非必要區域係選自由該豬腺病毒基因組之E3區域、E4之ORF 1-2及4-7、該E4末端與ITR之間的區域組成之群。
29. 一種組合物，其包含一種表現腺病毒纖維基因之宿主細胞及一種包含編碼異源蛋白質之核酸在表現控制序列控制下的重組腺病毒載體，其中該重組腺病毒載體包含該載體之腺病毒原生之纖維基因。
30. 如請求項29之組合物，其中該宿主細胞已經該重組豬腺病毒載體感染。
31. 一種對動物進行疫苗接種之方法，其包含向該動物投與治療有效量之如請求項27之疫苗。
32. 一種增加重組腺病毒載體之宿主組織細胞特異性之方法，其包含使該重組腺病毒生長於一種包含不同於該重組腺病毒之纖維蛋白質的第二纖維蛋白質之宿主細胞中。
33. 如請求項32之方法，其中該重組腺病毒載體為一種選自重組PADV-1、重組PADV-2、重組PADV-3、重組PADV-4及重組PADV-5之重組豬腺病毒。

34. 如請求項33之方法，其中該第二纖維蛋白質為選自 PAdV-1、PAdV-2、PAdV-3、PAdV-4及PAdV-5之纖維蛋白質。
35. 如請求項33之方法，其中該重組PADV另外包含不同於該第一或該第二纖維蛋白質之第三纖維蛋白質。
36. 如請求項33之方法，其中該重組PADV為重組PADV-3。
37. 如請求項36之方法，其中該重組PADV-3包含該PAdV-4之纖維蛋白質。
38. 如請求項33之方法，其中該重組PADV為複製勝任型。
39. 如請求項33之方法，其中該重組PADV為複製缺陷型。
40. 如請求項33之方法，其中該重組PADV包含一個異源性核苷酸序列插入該PADV基因組之一個非必要區域中。
41. 如請求項40之方法，其中該異源性核苷酸序列為一個基因，其編碼一種選自由免疫調節劑、抗原、病原體、免疫原性多肽、治療性多肽、生長激素及細胞激素組成之群之蛋白質。



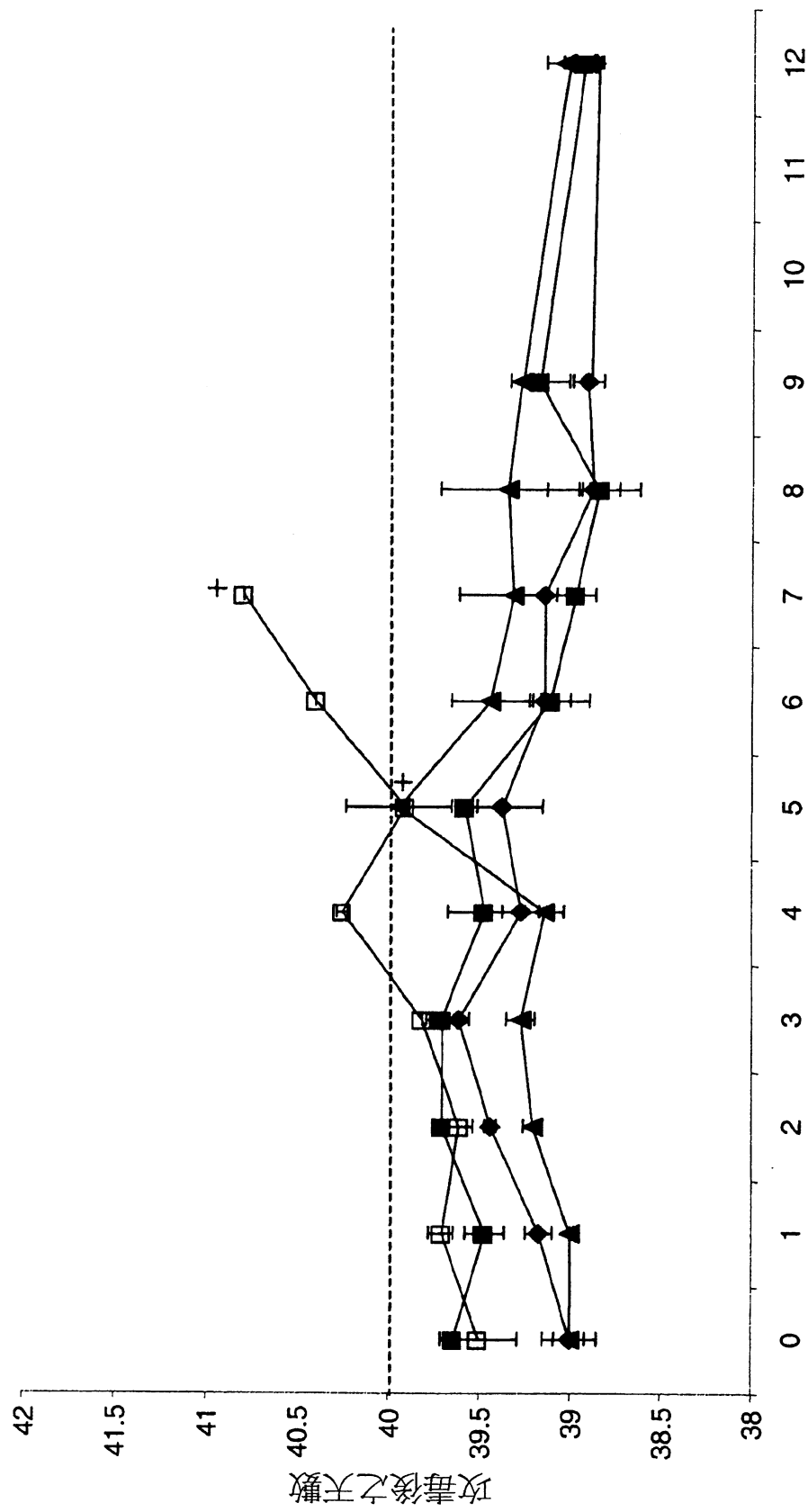
padv3 纖維

MGPKKQKRELPEDFDPVVPYDVPQLQINPPFVSGDGFNQSVDGVLSLHIA
PPLVFDNTRALTAFGGGLQLSGKQLVVATEGSGLTTPNDGKLVLKVKSP
ITLTAEGISLSLGPGLSNSETGLSLQVTAPLQFQGNALTPLAAGLQNTD
GGMGKLGSLTTDNSQAVTVQVGNGLQLNGEGQLTVPATAPLVSGSAGI
SFNYSSNDFVLDNDSLRLPKAISVTPPLQSTEDTISLNYSNDFSVDNGA
LTLAPTFFKPYTLWTGASPTANVILTNTTTPNGTFFLCLTRVGGLVLGSFA
LKSSIDLTSMTKKVNFIFDGAGRLQSDSTYKGRFGFRSNDVIEPTAAGL
SPAWLMPSTFIYPRNTSGSSLTSFVYINQTYVHVDIKVNTLSTNGYSLEF
NFQNMFSAPFSTSYGTFCYVPRRTTHRPRHGPFSLRERRHLFQLLQQ
CGGDFDPVVPYD

padv4 纖維

MKRSVPSDFNPVVPYDYQPISLMPAFYDNYGFHEGPGSVLSLNIANPLGY
TPRKKLCLKLGELALDSDGHLRVQIPDMAQPPLLYQGHRLSLFLDADA
GFHLTEDGALS LTKTLVYPTLWTGPAPEANVTFSGENSPSGILRLCLSRT
GGTVIGTILSVQGS LTNPSTGQTLGMNLYFDADGNVLSSENLVRGSGMKD
QDTLVTPIANGQYLMPNLTAYPRLIQTLTSSYIYTQAHLDHNNSVVDIKI
GLNTDLRPTAAYGLSFTMTFTNSPPTSFGTDLVQFGLGQDSSPSFLREL
PLASEAGYFGKLAAASEMPAPPEAQTQDQAAEPPAPAAEAPAPAAEAE
AEAEPPRKPPRGDLAALYNRVHSDTRAEDTPTSPELVTTLPDPFVLPDP
GVPTGASIVLEGTLPNAVFFTLDLVTGPASLALHFNVRPLEGEKHIVC
NSREGSSNWGEEVRPQEFFEREKPFVLVIVIQSDTYQITVNGKPLVDFF
QRLQGITRASLSGDLVFFTRLTMYPPGDP RPPTLLPPPAAPLDVIPDAYVL
NLPTGLTPRTHLLTVTGTPTPLAEFFIVNLVYDLHYDSKNVALHFNVGFTS
DSKGHIACNARMNGTWGSEITVSDFPFQQRKPFTHLQILTREADFQVLVDK
QPLTQFQYRLKELDQIKYVHMFHGVVQTHLEHQVPDTPVFS TAGVSKVYP
QIL

圖4



攻毒後之天數

圖6

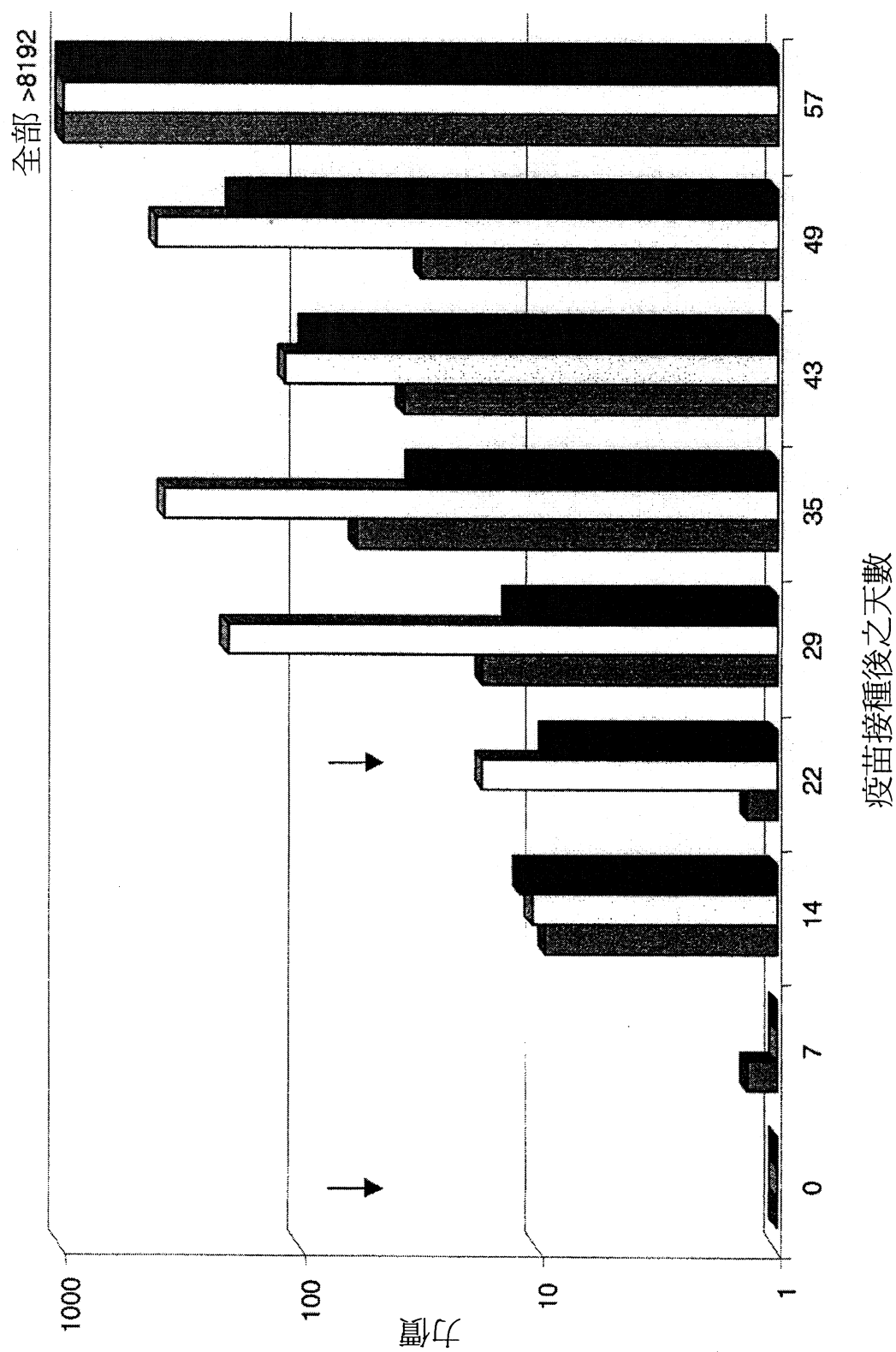


圖7

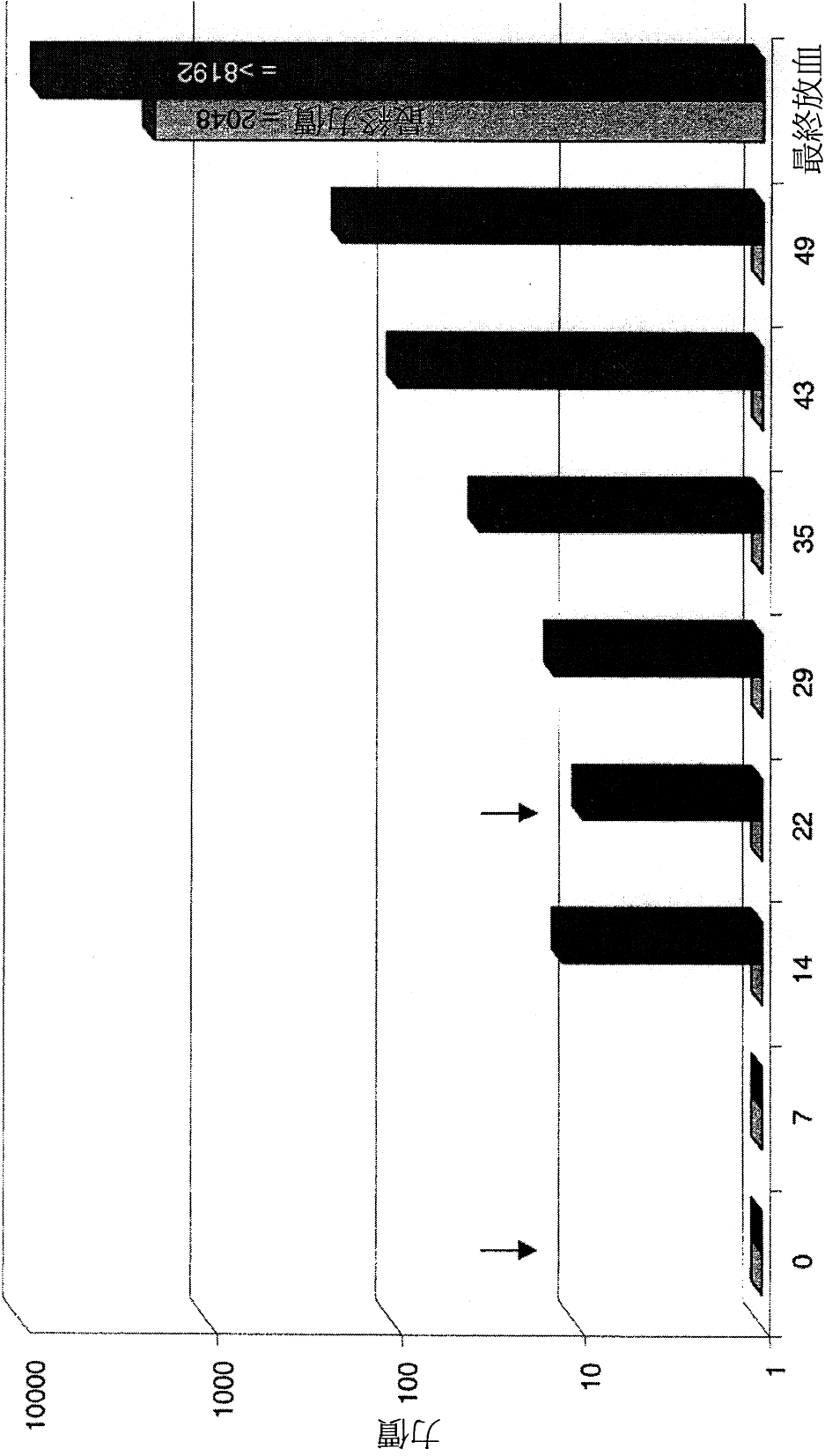
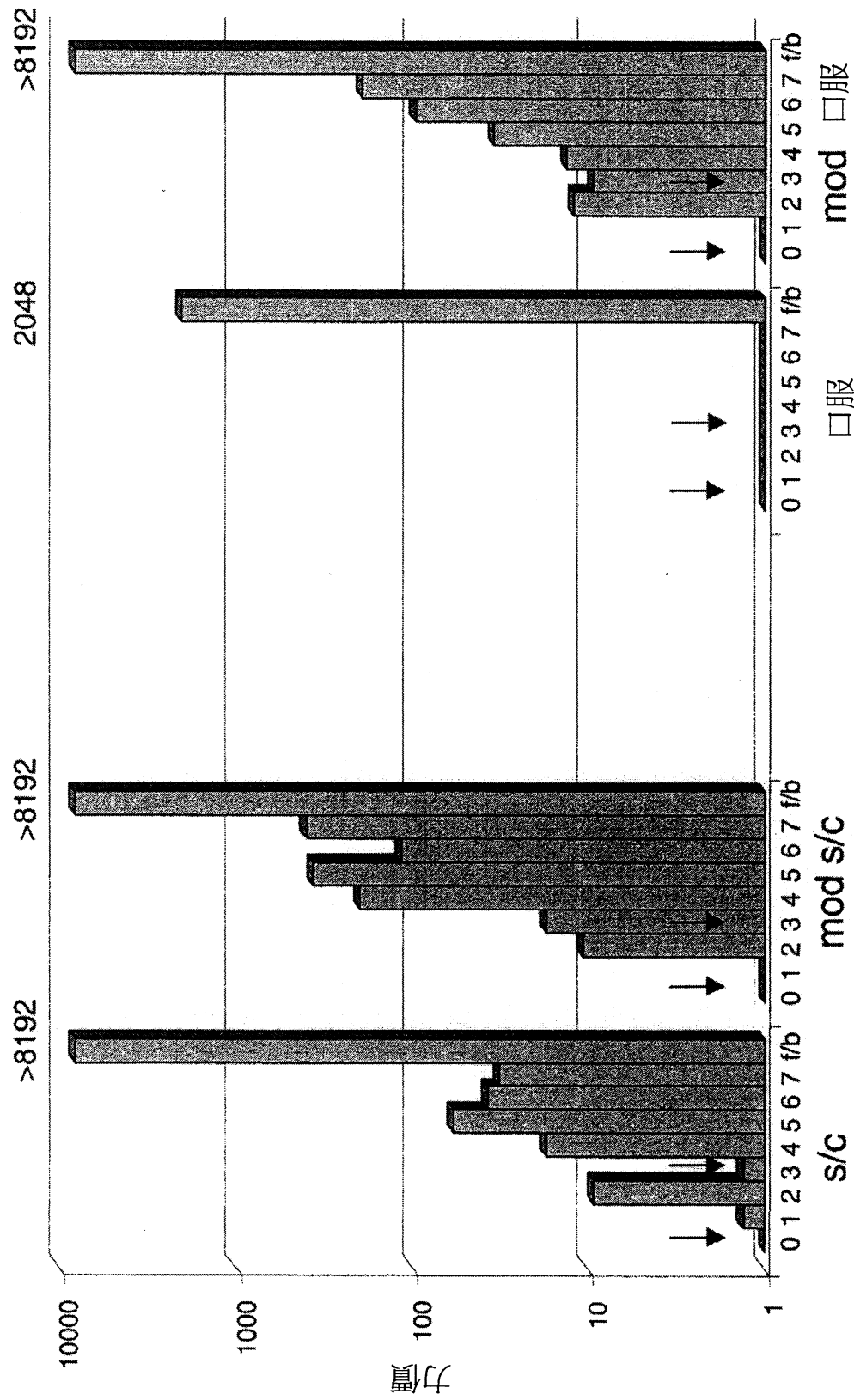


圖8



疫苗接種後之週數

圖9

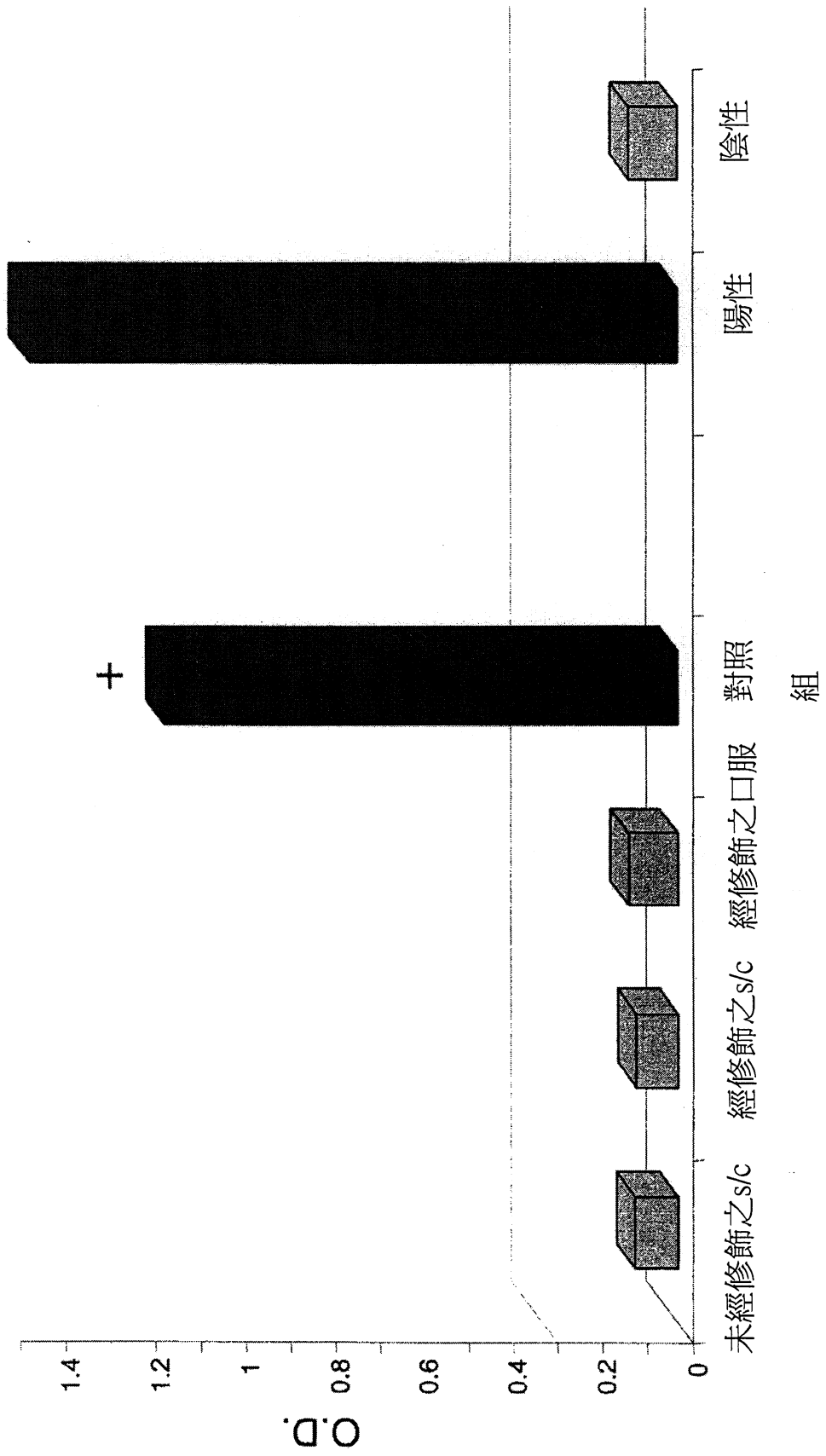


圖10

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)