



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106471125 B

(45) 授权公告日 2021.04.06

(21) 申请号 201580023575.8

(22) 申请日 2015.04.30

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106471125 A

(43) 申请公布日 2017.03.01

(30) 优先权数据

14382162.7 2014.04.30 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016.10.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2015/059593 2015.04.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/166082 EN 2015.11.05

(73) 专利权人 贝尔韦什生物医学研究学会

地址 西班牙巴塞罗纳

专利权人 加泰罗尼亚肿瘤研究所

(72) 发明人 莱蒙·阿莱马尼·伯纳斯特里

路易斯·阿方索·罗哈斯·埃斯波西托

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有

限公司 11270

代理人 景鹏 姚开丽

(51) Int.Cl.

C12N 15/34 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2007/050128 A2, 2007.05.03

CN 101802013 A, 2010.08.11

CN 101781636 A, 2010.07.21

CN 102548584 A, 2012.07.04

CN 1439055 A, 2003.08.27

Hongju Wu et al..Identification of Sites in Adenovirus Hexon for Foreign Peptide Incorporation.《Journal of Virology》.2005, 第79卷(第6期),

Ishiko et al..hexon [Human adenovirus 5], GenBank:BAG48782.1.《Genbank》.2008,

Na et al..hexon [Human adenovirus 5], GenBank: AA024099.1.《Genbank》.2003,

审查员 刘宁伟

权利要求书2页 说明书26页

序列表8页 附图9页

(54) 发明名称

包括白蛋白结合部分的腺病毒

(57) 摘要

本发明涉及在腺病毒六邻体蛋白外表面上包括白蛋白结合部分的重组腺病毒,包含该重组腺病毒的药物组合物及其医药用途。具体来说,本发明涉及在六邻体蛋白编码序列的高变区1(HVR1)中插入编码白蛋白结合部分的序列的溶瘤腺病毒,及其在预防和/或治疗癌症中的用途。

1. 一种腺病毒基因组,其特征在于,所述腺病毒基因组包括编码白蛋白结合部分的序列,所述编码白蛋白结合部分的序列插入在六邻体蛋白的高变区1(HVR1)的编码区中,从而得到包括六邻体蛋白和白蛋白结合部分的融合蛋白的表达,并且其中,当所述六邻体蛋白组装在腺病毒衣壳中时,所述白蛋白结合部分位于所述六邻体蛋白的外表面上。

2. 根据权利要求1所述的腺病毒基因组,其中,所述腺病毒为人腺病毒。

3. 根据权利要求2所述的腺病毒基因组,其中,所述人腺病毒选自由血清1型~血清57型的人腺病毒组成的组。

4. 根据权利要求3所述的腺病毒基因组,其中,所述人腺病毒为血清5型人腺病毒。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的腺病毒基因组,其中,所述白蛋白结合部分选自链球菌蛋白G的白蛋白结合结构域、大消化链球菌Peptostreptococcus magnus蛋白PAB的白蛋白结合结构域以及由核心序列DICLPRWGCLW (SEQ ID NO:9) 组成的白蛋白结合肽。

6. 根据权利要求5所述的腺病毒基因组,其中,所述白蛋白结合部分为链球菌蛋白G的白蛋白结合结构域3。

7. 根据权利要求6所述的腺病毒基因组,其中,所述链球菌蛋白G的白蛋白结合结构域3的序列为SEQ ID NO:1。

8. 根据权利要求1~4中任一项所述的腺病毒基因组,其中,编码所述白蛋白结合部分的序列被插入以使所得到的融合蛋白包括在六邻体蛋白的D150氨基酸之后的白蛋白结合部分,所述六邻体蛋白的D150氨基酸是根据GenBank登录号为BAG48782.1的六邻体蛋白进行编号的。

9. 根据权利要求1~4中任一项所述的腺病毒基因组,其中,所述白蛋白结合部分的N-末端和/或C-末端通过连接子序列与所述六邻体蛋白相连。

10. 根据权利要求9所述的腺病毒基因组,其中,所述连接子序列由序列GSGS (SEQ ID NO:2) 组成。

11. 根据权利要求1~4中任一项所述的腺病毒基因组,其中,所述腺病毒基因组进一步包括组织特异性启动子或肿瘤特异性启动子。

12. 根据权利要求11所述的腺病毒基因组,其中,所述组织特异性启动子或肿瘤特异性启动子是控制选自由E1a、E1b、E2和E4组成的组中的一个或多个基因表达的启动子序列。

13. 根据权利要求12所述的腺病毒基因组,其中,所述启动子选自由E2F启动子、端粒酶hTERT启动子、酪氨酸酶启动子、前列腺特异性抗原启动子、甲胎蛋白启动子和COX-2启动子组成的组。

14. 根据权利要求1~4中任一项所述的腺病毒基因组,其中,所述腺病毒为溶瘤腺病毒。

15. 根据权利要求14所述的腺病毒基因组,其中,所述腺病毒基因组进一步包括在选自由E1a、E1b、E4和VA-RNA组成的组中的一个或多个基因中的突变,以实现在肿瘤中的选择性复制。

16. 根据权利要求1~4中任一项所述的腺病毒基因组,其中,所述腺病毒基因组进一步包括衣壳修饰,以增加腺病毒的感染性或使腺病毒靶向肿瘤细胞中存在的受体。

17. 根据权利要求16所述的腺病毒基因组,其中,所述衣壳修饰是在腺病毒纤突蛋白的H1环中插入RGD模体。

18. 根据权利要求16所述的腺病毒基因组,其中,所述衣壳修饰是纤突基因的一部分被取代为不同血清型腺病毒的同源部分,以形成嵌合型腺病毒。

19. 根据权利要求1~4中任一项所述的腺病毒基因组,其中,所述腺病毒基因组包括插入在所述基因组中的一个或多个非腺病毒基因,并且所述非腺病毒基因是用于基因治疗或疫苗接种的基因。

20. 根据权利要求19所述的腺病毒基因组,其中,所述非腺病毒基因是用于癌症基因治疗的基因。

21. 根据权利要求20所述的腺病毒基因组,其中,所述用于癌症基因治疗的基因为选自由前药激活基因、肿瘤抑制基因、编码抗肿瘤的干扰RNA的基因和免疫刺激基因组成的组中的至少一个基因。

22. 一种重组腺病毒,所述重组腺病毒具有根据权利要求1~21中任一项所述的腺病毒基因组。

23. 一种药物组合物,所述药物组合物包括治疗有效量的根据权利要求22所述的重组腺病毒,以及药学上可接受的载体。

24. 根据权利要求22所述的重组腺病毒或根据权利要求23所述的药物组合物在制备药物中的用途。

25. 根据权利要求22所述的重组腺病毒或根据权利要求23所述的药物组合物在制备用于预防和/或治疗哺乳动物的癌症的药物中的用途,其中,所述腺病毒选自:

a) 溶瘤腺病毒,和

b) 具有以下腺病毒基因组的腺病毒,所述腺病毒基因组包括插入在所述腺病毒的基因组中的用于癌症基因治疗的一个或多个非腺病毒基因。

26. 根据权利要求22所述的重组腺病毒或根据权利要求23所述的药物组合物在制备用于预防哺乳动物的传染性疾病的疫苗中的用途。

27. 根据权利要求25或26所述的用途,其中,所述哺乳动物为人。

28. 根据权利要求25或26的用途,其中,所述腺病毒是全身给药的。

## 包括白蛋白结合部分的腺病毒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及疾病治疗的领域,更具体地涉及一种用于基因治疗或病毒治疗的重组腺病毒,该重组腺病毒包括在腺病毒六邻体蛋白表面上的白蛋白结合部分;尤其涉及一种包括白蛋白结合部分的溶瘤腺病毒及其在预防和/或治疗癌症中的用途。所述腺病毒与血流中存在的中和抗体相隔离,因此特别适用于全身给药。

### 背景技术

[0002] 腺病毒已经广泛用作基因治疗中的基因递送载体,以及用于癌症治疗的溶瘤剂。腺病毒展示出几种使其适于上述应用的特征。即,已经对它们结构和生物学性质进行了广泛研究,因此可以很容易地对它们的基因组进行修饰;它们能感染正在复制的细胞也能感染非复制的细胞;并且,在临床使用时能容易地生产高滴度的腺病毒。就安全性而言,腺病毒不会给人带来致命性疾病,它们的基因组是非整合性的,这可以防止插入诱变。虽然仍需对基于腺病毒的载体功效(尤其当病毒进行全身给药时)进行改进,但使用基于腺病毒的载体的临床实验显示出良好的毒理学和安全性表现。

[0003] 在基因治疗领域,可能需要进行全身给药(即注射至静脉或动脉血流中),以对多个器官或播散性细胞起作用。例如,在使用腺病毒载体和溶瘤腺病毒治疗癌症时,需要进行全身给药来治疗处于晚期或转移阶段的播散性肿瘤。然而,腺病毒在注射到血流中时示出一些重要的局限性,这削弱了疗效。在血流中,5型腺病毒(Ad5)遭受多次中和作用,大大降低了病毒的生物可利用度。肝脏隔离代表了治疗的主要障碍,因为>90%的注射剂量被留存在该器官中,主要被留存在名为库普弗(Kupffer)细胞的肝巨噬细胞中,也被留存在肝窦内皮细胞(LSEC)和肝实质细胞中。与血细胞和蛋白质的直接作用也是一个重要障碍。Ad5能与血细胞直接结合,如通过CAR受体与红细胞直接结合以及通过整联蛋白与血小板直接结合。抗体不仅能直接中和病毒,而且还能通过补体激活及通过使单核细胞和中性粒细胞的Fc受体与病毒颗粒对接来触发固有免疫应答。此外,载体的再次给药使抗-Ad的中和抗体(NAb)水平上升,从而中和了病毒。抗体和补体对腺病毒的调理作用还通过Kupffer细胞增强了清除作用。总之,这些相互作用导致Ad在血液中的半衰期很短,在小鼠或人中的半衰期大约为几分钟。

[0004] 已付出很多努力来避免腺病毒全身给药时的抗体和免疫细胞的中和作用。

[0005] 测试了腺病毒衣壳蛋白经聚合物(聚乙二醇(PEG)或N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA))的化学修饰。病毒表面上的聚合物缀合能使病毒逃避抗体和免疫细胞的中和作用,同时能消除CAR、整联蛋白及FX结合。然而缀合至衣壳的聚合物不能传给病毒后代,增加了用于临床应用的大规模GMP生产的复杂性。

[0006] WO 2011/129468A9公开了能逃避中和抗体免疫识别的嵌合型腺病毒。通过对血清5型人腺病毒的衣壳进行基因修饰获得所述腺病毒,其中,编码六邻体蛋白的基因被替换成血清19型猴腺病毒的六邻体基因。所获得的嵌合型腺病毒的抗肿瘤活性高于没有进行基因修饰的同样的腺病毒。

[0007] 为了获得由白蛋白保护的腺病毒,已经进行了几次尝试(见WO 2007/050128A2)。然而,实验证据显示出,具有经白蛋白结合结构域修饰的衣壳的腺病毒不能免于被中和抗体中和(Hedley S.J. et al.2009.The Open Gene Therapy Journal,2:1-11)。

[0008] 因此,仍需要进一步对腺病毒进行基因修饰,以使其适于全身给药并能够逃避中和抗体。

## 发明内容

[0009] 在第一个方面,本发明涉及一种腺病毒基因组,其特征在于,所述腺病毒基因组包括编码白蛋白结合部分的序列,所述编码白蛋白结合部分的序列插入在六邻体蛋白的高变区1(HVR1)的编码区中,从而表达包括六邻体蛋白和白蛋白结合部分的融合蛋白,并且其中,当所述六邻体蛋白组装在腺病毒衣壳中时,所述白蛋白结合部分位于所述六邻体蛋白的外表面上。

[0010] 在第二个方面,本发明涉及一种重组腺病毒,所述重组腺病毒具有根据本发明的腺病毒基因组。

[0011] 在第三个方面,本发明涉及一种药物组合物,所述药物组合物包括治疗有效量的根据本发明的重组腺病毒,以及药学上可接受的载剂。

[0012] 在第四个方面,本发明涉及用于医药的根据本发明的重组腺病毒或药物组合物。

[0013] 在另一方面,本发明涉及用于预防和/或治疗哺乳动物中的癌症的根据本发明的重组腺病毒或药物组合物,其中,所述腺病毒是在其基因组中插入了用于癌症治疗的基因的溶瘤腺病毒或腺病毒。

## 附图说明

[0014] 图1.在ICOVIR15-ABD中插入白蛋白结合结构域(ABD)中的示意图。源自链球菌蛋白G的ABD3(SEQ ID N0:1)的两侧为两个GSGS(SEQ ID N0:2)连接子,将其插入至溶瘤腺病毒ICOVIR15的高变区1(HVR1)的中间,获得ICOVIR15-ABD。LITR/RITR,左、右末端反向重复序列;MLP,主要晚期启动子;E1Ap,经修饰的E1A启动子;E1A-Δ 24,E1A蛋白的突变形式,其中缺失了多肽链第121~129位氨基酸;L1至L5,晚期基因;纤突RGD,通过在纤突H1环上插入RGD肽的经RGD修饰的纤突。

[0015] 图2.包含插入在六邻体中的白蛋白结合结构域(ABD)的腺病毒的图像。与未修饰的腺病毒ICOVIR15(左图)相比,经ABD修饰的病毒ICOVIR15-ABD(右图)包被有血液中存在的白蛋白,使病毒与中和抗体隔离开。

[0016] 图3. ICOVIR15-ABD和ICOVIR15的病毒生产动力学。以800个病毒颗粒(vp)/细胞感染汇合成片的A549细胞。感染4小时(h)后去除病毒,用PBS洗涤细胞三次并用无病毒培养基培养。在感染后4、24、48和72小时收集细胞提取物,并用基于抗六邻体染色的方法测量滴度。样品通过一式三份进行评估。绘制了平均值±SD误差线(虽然由于它们的值太低而难以辨别)。TU/mL,每毫升的转导单位。\*与ICOVIR15组相比具有统计学意义( $p \leq 0.05$ )。

[0017] 图4.比较了存在或不存在人血清白蛋白(HSA)的情况下,ICOVIR15和ICOVIR15-ABD的体外细胞毒性。使用指定病毒以10000~0.0001个病毒颗粒(vp)/细胞感染A549、Sk-mel28、HEK293和MCF-7细胞。示出了感染后第7天的IC<sub>50</sub>值(导致细胞培养物存活力降低50%)

所需的vp/细胞)。对于每一细胞系,对三个不同的重复进行定量。绘制了平均值±SD误差线。MOI,感染复数。

[0018] 图5.用ELISA检测的ICOVIR15-ABD与人和小鼠白蛋白的结合。A)用人血清白蛋白或牛血清白蛋白(HSA或BSA,它们分别与ABD结合或不与ABD结合)包被孔。测试三种不同量的病毒蛋白,来检测结合(0.25ng、2.5ng和25ng)。在与抗六邻体蛋白的抗体以及经过氧化物酶标记的二抗孵育之后,通过比色分析检测与白蛋白包被的孔结合的ICOVIR15腺病毒和ICOVIR15-ABD腺病毒。样品通过一式三份进行评估。绘制了平均值±SD误差线。OD,光密度。\*与其他组相比具有统计学意义( $p \leq 0.05$ )。B)用牛血清白蛋白、人血清白蛋白或小鼠血清白蛋白(BSA、HSA或MSA)包被孔。所测试的病毒蛋白的量为25ng。在与抗六邻体蛋白的抗体以及经过氧化物酶标记的二抗孵育之后,使用比色分析检测与白蛋白包被的孔结合的腺病毒。包括没有腺病毒的对照模拟组。样品通过一式三份进行评估。绘制了平均值±SD误差线。OD,光密度。\*与其他组相比具有统计学意义( $p \leq 0.05$ )。

[0019] 图6.白蛋白结合在体外使腺病毒免受中和抗体的中和。将包被有或未包被人血清白蛋白(HSA)的AdGL和AdGL-ABD腺病毒与系列稀释的中和抗体Ab6982在37°C下孵育1小时。然后加入HEK293细胞,以获得0.5转导单位(TU)/细胞的感染复数。感染后24小时,通过荧光素酶表达来分析细胞的转导。引入不含抗体(Ab)的空白对照组(“无Ab”对照)来获得100%感染值。样品通过一式三份进行评估。绘制了平均值±SD误差线。

[0020] 图7.在使用人血清白蛋白(HSA)保护时,ICOVIR15-ABD在中和抗体存在情况下体外细胞毒性增加。存在或不存在人血清白蛋白(HSA)的情况下,将ICOVIR15和ICOVIR15-ABD与系列稀释的中和抗体Ab6982(Nab,商业化的抗HAd5的多克隆抗体)孵育1小时。加入A549细胞以获得600个病毒颗粒(vp)/细胞的感染复数。感染后第4天测量存活细胞(孔中的蛋白质含量)的百分比。样品通过一式三份进行评估。绘制了平均值±SD误差线。

[0021] 图8. ABD的插入增加了腺病毒的血浆半衰期。给裸鼠注射比例为1:1的ICOVIR15和ICOVIR15-ABD混合物,总剂量为 $5 \times 10^{10}$ 病毒颗粒(vp)/小鼠( $n=5$ )。给药后5分钟、15分钟、1小时、4小时和24小时,收集血液样品,并离心收集血清。对腺病毒六邻体的高变区1(HVR1)进行PCR扩增并使用电泳对样品进行分析。ABD的插入使HVR1的大小由299bp增加至361bp。凝胶给出了ICOVIR15-ABD:ICOVIR15基因组的几种比例(0.2、1、5、10和50)的标准样,注射前的对照(t0),PCR的水阴性对照(H<sub>2</sub>O)和血清样本的PCR结(#1至#5)。

[0022] 图9.体内全身给药后,ICOVIR15-ABD的抗肿瘤活性。向带有黑色素瘤皮下异种移植植物的裸鼠(Sk-me128)注射单次静脉剂量的磷酸盐缓冲液(PBS)、ICOVIR15或ICOVIR15-ABD( $5 \times 10^{10}$ 病毒颗粒(vp)/小鼠)。绘制了肿瘤体积±SEM( $n=10 \sim 12$ )。\*与PBS组相比具有统计学意义( $p \leq 0.05$ )。

[0023] 图10腺病毒预免疫的小鼠中保存的体内肝脏和肿瘤,其中肝脏和肿瘤转导有在六邻体HVR1中经白蛋白结合结构域修饰的腺病毒载体。带有黑色素瘤皮下异种移植植物的C57BL/6小鼠(B16-CAR)经腹膜内注射hAd5wt( $2 \times 10^{10}$ 病毒颗粒(vp)/小鼠)或溶媒(vehicle)来免疫,7天后静脉注射AdGL(GFP-荧光素酶载体)或AdGL-ABD( $3 \times 10^{10}$ vp/小鼠)。3天后通过生物发光成像(IVIS)分析肝脏和肿瘤中的荧光素酶活性。绘制了平均值±SEM(肝脏 $n=4 \sim 6$ ,肿瘤 $n=8 \sim 12$ )。sec:秒;sr:球面度。

[0024] 图11.在高变区5中插入ABD不影响病毒的存活。使用pAdZGL-H5-ABD质粒转染

HEK293细胞以产生AdGL-H5-ABD病毒。一周后,收获细胞及上清液,并且通过三次冻融循环进行裂解。通过噬菌斑测定,确定含病毒的细胞提取物在HEK293中的滴度。示出了对应于稀释1E6、1E7和1E8的孔,其中证明病毒增殖的噬菌斑是明显的。

[0025] 图12. 与在HVR1中插入白蛋白结合结构域相反,在HVR5中插入同样结构域不能使腺病毒免受中和抗体的中和。在HEK293和Sk-me128细胞中进行体外中和实验来比较AdGL、AdGL-H1-ABD和AdGL-H5-ABD。在存在或不存在人血清白蛋白 (HSA) 的情况下,腺病毒与系列稀释的中和抗体Ab6982孵育1小时。随后加入细胞以获得10病毒颗粒 (vp) /细胞 (HEK293) 的感染复数及40vp/细胞 (Sk-me128) 的感染复数。感染后24小时,通过荧光素酶表达来分析细胞的转导。引入不含抗体的对照组 (Ab) (“无Ab”对照) 来获得100% 感染值。样品通过一式三份进行评估。绘制了平均值±SD误差线。

## 具体实施方式

[0026] 本发明的发明人发现在衣壳外表面上,尤其在腺病毒六邻体蛋白的外表面上经白蛋白结合部分进行基因修饰的腺病毒能够获得白蛋白护罩,使病毒在全身给药后能够逃避中和抗体并延长其在血液中的保留时间。这一结果是出乎意料的,因为在先使用白蛋白结合结构域来修饰腺病毒的尝试,都没有提高腺病毒免受中和抗体的中和 (Hedley S.J. et al. 2009. The Open Gene Therapy Journal, 2:1-11)。

[0027] 此外,当重组腺病毒为溶瘤腺病毒时,白蛋白结合部分的插入改善了它抗肿瘤的活性。从这个意义上讲,上述基因修饰的腺病毒具有克服全身给药(尤其是用于癌症治疗)的局限性的潜在价值。

[0028] 本发明的实例所提供的结果清楚地表明,包括编码链球菌蛋白G白蛋白结合结构域 (ABD) 的序列的选择复制型溶瘤腺病毒 (ICOVIR15-ABD) 在其衣壳上暴露这一结构域,促进了白蛋白结合,使腺病毒与中和抗体相隔离,延长了它的血浆半衰期并改善了它的抗肿瘤功效;其中该编码链球菌蛋白G白蛋白结合结构域 (ABD) 的序列插入在六邻体蛋白编码序列的高变区1 (HVR1) 中。本发明给出的实验实例还表明,将链球菌蛋白G的ABD插入到复制缺陷型溶瘤腺病毒 (AdGL-ABD) 六邻体蛋白的HVR1中,可使该腺病毒免受中和抗体的中和 (图6)。因此,这些结果表明腺病毒上的白蛋白包被起到护罩作用,将病毒蛋白隐藏起来,避开了血液中的多种不期望的相互作用(中和抗体、血细胞吸附和肝摄取),改善了它的药代动力学。这在腺病毒载体用于基因治疗、疫苗或溶瘤腺病毒再次给药时是非常重要的。因此,本发明的经基因修饰的腺病毒适用于全身给药。

### [0029] 本发明的腺病毒

[0030] 本发明获得的结果表明,在腺病毒六邻体蛋白的外表面上包括白蛋白结合部分的腺病毒能为白蛋白所包覆,从而使自身免受血流中存在的中和抗体的中和。复制型腺病毒 (ICOVIR15-ABD) 和非复制型腺病毒 (AdGL-ABD) 均能观察到这一保护效果。

[0031] 在一个方面,本发明涉及具有腺病毒基因组的重组腺病毒,其特征在于,所述腺病毒基因组包括编码白蛋白结合部分的序列,所述编码白蛋白结合部分的序列插入在六邻体蛋白的高变区1 (HVR1) 的编码区中,从而表达包括六邻体蛋白和白蛋白结合部分的融合蛋白,并且其中,当所述六邻体蛋白组装在腺病毒衣壳中时,所述白蛋白结合部分位于所述六邻体蛋白的外表面上。

[0032] 如本文所使用的,术语“腺病毒”是指可被归类为腺病毒的任意病毒,即,任何属于腺病毒(Adenoviridae)科的病毒,其特征为含有双链DNA基因组且具有二十面体核衣壳的无包膜病毒。该术语包括能感染人或动物的任意腺病毒,包括使用CAR作为感染靶细胞的受体的所有群、亚群和血清型。本发明的腺病毒包括但不限于禽、犬、马、牛、羊、猪、人或蛙的腺病毒。在一个优选的实施方式中,本发明的腺病毒是人腺病毒,即,能感染人的腺病毒。根据本发明,“血清型”是指每一不同免疫类型的腺病毒。存在至少57种血清型的人腺病毒,这些血清型的人腺病毒被分为几个亚群(A至G)。本发明考虑使用现有技术已知的任意血清型的腺病毒,包括但不限于表1中所限定的任意血清型。

[0033] 表1.几种适用于本发明的腺病毒的亚群和血清型的例子。

亚群	血清型
A	12、18、31
B	3、7、11、14、16、21、34、35、50、55
C	1、2、5、6、57
D	8、9、10、13、15、17、19、20、22-30、32、33、36-39、42-49、51、53、54、56
E	4
F	40、41
G	52

[0034] [0035] 在一个优选的实施方式中,所述人腺病毒选自由血清1型~血清57型的人腺病毒组成的组。

[0036] 在另一个优选的实施方式中,所述腺病毒属于C亚群,更优选地,所述腺病毒为血清5型

[0037] 血清5型人腺病毒(Ad5)与轻度呼吸道感染有关。可在GenBank:AY339865.1(2007年8月13日的版本)中找到血清5型人腺病毒的基因序列。

[0038] 本发明的腺病毒为重组腺病毒。如本文所使用的,术语“重组”是指非天然出现的腺病毒。相对于野生型腺病毒,该重组腺病毒含有一种或多种修饰。所述修饰包括但不限于对包装在颗粒中的腺病毒基因组进行的修饰,以产生感染性病毒。其他修饰允许通过去除病毒基因组中的复制关键基因,来获得复制缺陷型病毒(即无法增殖的病毒)。示例性修饰包括现有技术已知的缺失,例如缺失E1a、E1b、E2a、E2b、E3或E4编码区中的一个或多个编码区。其他示例性修饰包括缺失腺病毒基因组的整个编码区。这样的腺病毒被称为“无病毒”的腺病毒。还包括由不同血清型的元件组合而成的嵌合型腺病毒。

[0039] 术语“重组”还包括条件复制型腺病毒,该条件复制型腺病毒是优选在特定类型的细胞或组织中复制,而在其他类型的细胞或组织中复制较低或根本不复制。例如在本文所提供的腺病毒中,是在异常增生组织(如实体瘤或其他赘生物)中复制的腺病毒。这些条件复制型腺病毒包括美国专利第5,998,205号和美国专利第5,801,029号公开的病毒。这样的病毒有时被称为“细胞毒性”或“细胞病变”病毒(或载体),并且如果它们对赘生性细胞具有这样的效果时,则被称为“溶瘤”病毒(或载体)。

[0040] 在一个实施方式中,所述腺病毒是复制型腺病毒,尤其是溶瘤腺病毒。

[0041] 在另一个实施方式中,所述腺病毒是非复制型腺病毒或复制缺陷型腺病毒。复制缺陷型腺病毒或非复制型腺病毒是指不能在靶细胞中复制的腺病毒,它在基因治疗中用作基因载体来靶向细胞,因为目的是在细胞内表达治疗性基因而不裂解细胞。

[0042] 本发明的重组腺病毒通过在腺病毒六邻体蛋白的外表面上插入外源序列来进行修饰。优选的,所述外源序列编码白蛋白结合部分。

[0043] 腺病毒颗粒构成包裹病毒DNA的衣壳。如本文所使用的,术语“衣壳”指病毒的蛋白质外壳,由被称作壳粒的亚基形成,壳粒可以是五边形或六边形。腺病毒衣壳具有二十面体,该二十面体具有20个等边三角形面。大多数衣壳由六邻体蛋白形成,每个顶点具有由五邻体基底和纤突蛋白形成的复合物。

[0044] 如本文所使用的,术语“腺病毒六邻体蛋白”或“六邻体蛋白”(以前称为“蛋白II”)是指在腺病毒中发现的主要的结构性衣壳蛋白,六邻体蛋白自结合为三聚体,每个都是六边形。240个六邻体三聚体组装成腺病毒衣壳。六邻体蛋白对病毒衣壳的组装,衣壳二十面体对称性的确定和衣壳的完整性来说是必需的。不同血清型的腺病毒共享六邻体蛋白的主要结构特性,但不同血清型之间的六邻体蛋白的大小和免疫学性质是不同的。在本发明中,术语“六邻体蛋白”涵盖任意腺病毒的六邻体蛋白,包括但不限于:于2014年2月19日提交的UniProt数据库登录号为P04133的序列所限定的蛋白,该蛋白对应于C亚群血清5型人腺病毒的六邻体蛋白;于2014年2月19日提交的UniProt数据库登录号为P03277的序列所限定的蛋白,该蛋白对应于C亚群血清2型人腺病毒的六邻体蛋白;于2014年2月19日提交的UniProt数据库登录号为P42671的序列所限定的蛋白,该蛋白对应于禽腺病毒gal1 (Phelps株)的六邻体蛋白;以及,于2014年2月19日提交的UniProt数据库登录号为P11819的序列所限定的蛋白,该蛋白对应F亚群血清40型人腺病毒的六邻体蛋白。该表述包括六邻体蛋白在其他亚群或血清型中天然出现的所有天然变体。

[0045] 在本发明中,“六邻体蛋白的外表面”这一表述是指六邻体蛋白的暴露在衣壳表面上的区域。为了弄清楚本发明的白蛋白结合部分是被引入到腺病毒六邻体蛋白的内部还是外表面,可如本专利申请实验部分中公开的进行与人血清白蛋白结合的检测测定(例如ELISA测定)或体外中和测定。如果人血清白蛋白能与腺病毒结合,则白蛋白结合部分已经被引入至腺病毒六邻体蛋白的外表面。

[0046] 据报道,六邻体蛋白的环1(L1)和环2(L2)暴露在病毒壳粒结构的外侧。L1含有6个高变区(HVR),即HVR1至HVR6,而L2含有第7高变区(HVR7)。

[0047] 如本文所使用的,术语“高变区”或“HVR”是指长度及序列在各血清型腺病毒之间不同的区域,形成表面暴露的环的一部分。对于三聚体的每一亚单位,腺病毒六邻体有7个高变区(Biere B and Schweiger B.J Clin Virol 2010;47 (4):366-371)。在本发明的上下文中,HVR所用的命名法公开在Crawford-Miksza和Schnurr中(Crawford-Miksza and Schnurr.1996.Virology,224 (2):357-367)。在本发明一个优选的实施方式中,HVR是HVR1。在HVR区域中插入特定残基导致每个腺病毒载体有240次×3或总共720次插入。在一个优选的实施方式中,插入编码白蛋白结合部分的序列,所得到的融合蛋白在六邻体蛋白的D150氨基酸(根据日期为2008年6月14日的GenBank登录号BAG48782.1的六邻体蛋白的编号,该六邻体蛋白对应于来源为血清5型人腺病毒的六邻体蛋白)后含有白蛋白结合部分。在一个

更优选的实施方式中,完整的经修饰的腺病毒六邻体的核苷酸序列为SEQ ID NO:3,该腺病毒六邻体具有插入在HVR1中的ABD (ABD-HVR1)。发明人已经证明在另一个HVR (具体为HVR5) 中插入白蛋白结合结构域产生活病毒,但不能使腺病毒免受中和抗体中和。本专利申请的实例显示,将编码白蛋白结合部分的序列插入至HVR5中,所得到的融合蛋白在六邻体蛋白的A274氨基酸(根据日期为2008年6月14日的GenBank登录号BAG48782.1的六邻体蛋白的编号,该六邻体蛋白对应于来源为血清5型人腺病毒的六邻体蛋白)后含有白蛋白结合部分。完整的经修饰的腺病毒六邻体的核苷酸序列为SEQ ID NO:4,该腺病毒六邻体具有插入在HVR5中的ABD (ABD-HVR5)。图12显示出,白蛋白结合结构域插入在HVR1中时是有功能的,而插入在HVR5中时是没有功能的。

[0048] 白蛋白结合部分可直接附接在六邻体蛋白上,即白蛋白结合部分的N-末端和C-末端直接与六邻体蛋白相连。然而,白蛋白结合部分也可以利用连接子序列与六邻体蛋白相连。因此,在另一个实施方式中,白蛋白结合部分的N-末端和/或C-末端通过连接子序列与六邻体蛋白相连。

[0049] 如本文所使用的,术语“连接子序列”是指在六邻体蛋白与白蛋白结合部分之间作为铰链区的氨基酸序列,其在两个元件间提供了空间,保证六邻体蛋白的二级结构不受ABD部分的存在的影响,反之亦然。连接子可具有允许两个元件彼此独立运动,同时保持各元件的三维形式的任意长度。在一个优选的实施方式中,连接子序列是长度为31个氨基酸或更少的柔性连接子肽。更优选的,连接子序列包括少于10个氨基酸、少于5个氨基酸、少于4个氨基酸或2个氨基酸。在一个实施方式中,连接子序列包括选自由甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸和苏氨酸组成的组中的2个或更多个氨基酸。在另一个实施方式中,所述连接子序列是聚甘氨酸连接子。示例性且非限制性地,连接子序列的实例包括SGGTSGSTSGTGST (SEQ ID NO:5)、AGSSTGSSTGPGSTT (SEQ ID NO:6)、GGSGGAP (SEQ ID NO:7) 和GGGVGGG (SEQ ID NO:8)。这些序列已用于使设计的卷曲螺旋与其他蛋白结构域结合 (Muller, K. M. et al. *Meth. Enzymology*, 2000, 328:261-281)。优选的,连接子序列包括序列GSGS (SEQ ID NO:2)。本领域已知的其他连接子也可替代使用 (Reddy Chichili, VP., Kumar, V., and Sivaraman, J. (2013). *Linkers in the structural biology of protein-protein interactions*. *Protein Science* 22 (2):153-67)。

[0050] 因此,本发明的腺病毒在六邻体蛋白的外表面上具有白蛋白结合部分,从而使腺病毒的衣壳包被有白蛋白。

[0051] 如本文所使用的,术语“白蛋白”是指白蛋白家族蛋白的成员,白蛋白家族蛋白是水溶性球蛋白,适度溶于浓盐溶液中并且经历热变性。白蛋白一般发现于血浆中。血清白蛋白由肝脏产生,溶解于血浆中,是哺乳动物中最丰富的血蛋白。特别的,术语“血清白蛋白”是指人体内由ALB基因 (UniGene Hs.418167) 编码的球蛋白。人血清白蛋白是通过Uniprot数据库登录号为P02768的序列(日期为2014年3月19日)所定义的球蛋白。

[0052] 如本文所使用的,术语“白蛋白结合部分”是指能结合白蛋白的任意氨基酸序列,即具有白蛋白结合亲和力的任意氨基酸序列。优选的,其能结合血清白蛋白;更优选的,能结合人血清白蛋白。术语“白蛋白结合部分”包括但不限于天然存在的白蛋白结合结构域 (ABD) (诸如存在于细菌蛋白中的ABD) 及来自合成肽的白蛋白结合序列。在一个优选的实施方式中,白蛋白结合部分选自链球菌蛋白G的白蛋白结合结构域、大消化链球菌

(Peptostreptococcus magnus)蛋白PAB的白蛋白结合结构域、具有核心序列DICLPRWGCLW (SEQ ID NO:9)的白蛋白结合肽,和它们的功能等同变体。在一个更优选的实施方式中,白蛋白结合结构域来自链球菌蛋白G。

[0053] 术语“白蛋白结合结构域”是指天然存在的蛋白中能以足够的特异性与白蛋白结合,以确保免受中和抗体中和的任意区域。

[0054] 如本文所使用的,术语“链球菌蛋白G的白蛋白结合结构域”或“链球菌蛋白G的ABD”是指由能形成三螺旋束的46个氨基酸残基组成的结构域 (Kraulis P.J. et al. FEBS Lett, 1996; 378:190-4),能以高亲和力与人白蛋白和小鼠白蛋白结合,但不与牛白蛋白结合 (Konig T. and Skerra A.J. Immunol Methods, 1998; 218:73-83)。链球菌蛋白G中有多个白蛋白结合结构域。在一个优选的结构域中,白蛋白结合部分是来自链球菌蛋白G的白蛋白结合结构域3。优选的,链球菌蛋白G的白蛋白结合结构域3的序列为SEQ ID NO:1。

[0055] 如本文所使用的,术语“大消化链球菌(Peptostreptococcus magnus)蛋白PAB的白蛋白结合结构域”是指被称为“GA模块”的,来源于大芬戈尔德菌 (Finegoldia magna) (原名为大消化链球菌 (Peptostreptococcus magnus))蛋白PAB的,能与白蛋白结合的白蛋白结合结构域 (Lejon S et al. 2004. J Biol Chem 279:42924-42928)。大芬戈尔德菌 (Finegoldia magna)蛋白PAB是通过GenBank数据库登录号为CAA54857.1的序列(日期为2004年9月9日)所定义的蛋白。

[0056] 如本文所使用的,术语“具有核心序列DICLPRWGCLW (SEQ ID NO:9)的白蛋白结合肽”是指Dennis MS et al. (J Biol Chem. 2002. 277:35035-35043)中公开的,来源于噬菌体克隆RA和SA的结合白蛋白的肽。

[0057] 本发明还包括上述白蛋白结合部分的功能等同变体。如本文所使用的,术语“功能等同变体”是指来源于白蛋白结合部分,通过插入、缺失或取代一个或多个残基,并仍基本保持与上述白蛋白相互作用的能力的任意多肽。在一个优选的实施方式中,如果多肽与白蛋白的结合能力是SEQ ID NO:1所示白蛋白结合结构域与白蛋白结合能力的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%,则认为该多肽是白蛋白结合部分的功能等同变体。优选的,如果多肽能以SEQ ID NO:1所示白蛋白结合结构域结合白蛋白的效率的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%来结合白蛋白,则认为该多肽是白蛋白结合部分的功能等同变体。

[0058] 适合的功能性变体是指那些与本发明公开的白蛋白结合结构域或白蛋白结合序列有至少25%氨基酸序列同一性,例如至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的功能性变体。两个多肽间的同一性通过本领域技术人员熟知的计算机算法和方法来确定。两个多肽间的同一性优选通过使用BLASTP 算法 [BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)] 来确定,但也可以使用其他类似的算法。根据如本文所述的参数,使用BLAST和BLAST 2.0来确定百分比序列同一性。进行BLAST分析的软件公开于美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information)。

[0059] 白蛋白结合部分的功能等同变体可以是白蛋白结合结构和白蛋白结合序列的衍

生物。术语“衍生物”包括但不限于来源于细菌的,经修饰以增加对白蛋白亲和力的白蛋白结合结构域,如Johansson MU.等(J Biol Chem.2002.277:8114-8120)、Jonsson A.等(Protein Eng Des Sel.2008.21:515-527)和Linhult M.等(Protein Sci.2002.11:206-213)中公开的那些。例如,衍生物可以是Jonsson A.等(Protein Eng Des Sel.2008.21:515-527)中公开的经修饰的链球菌G ABD ABD035。

[0060] 重组腺病毒可通过现有技术中已知的标准分子生物学技术(Chillon and Bosch.Adenovirus.Methods and Protocols.3rd edition.Methods in Molecular Biology,vol.1089.Springer Protocols.Humana Press.(2014))来获得。

[0061] 按照如在夏兰和博氏的腺病毒.方法和步骤.第三版.分子生物学的方法.第1089卷.Springer实验室指南.胡曼那出版社(Chillon and Bosch.Adenovirus.Methods and Protocols.3rd edition.Methods in Molecular Biology,vol.1089.Springer Protocols.Humana Press.(2014)),和Alemany R,Zhang W.的溶瘤腺病毒载体.Totowa,NJ.:胡曼那出版社(Alemany R,Zhang W.Oncolytic adenoviral vectors.Totowa,NJ.:Humana Press,1999)所公开的腺病毒载体领域的标准方法,使含有本发明的白蛋白结合部分的腺病毒进行增殖和扩增。通常用于基因治疗和病毒治疗领域的细胞系为HEK-293和A549细胞系。优选的增殖方法是感染可复制腺病毒的细胞系。肺腺癌A549细胞系是这种细胞系的一个例子。增殖例如通过下述方式进行:将A549细胞接种在塑料细胞培养板上,然后每个细胞使用100个病毒颗粒进行感染。两天后,当细胞分离形成“葡萄状”簇时,细胞病变效应证实了病毒的产生。将细胞收获在管中。1000g离心5分钟后,将细胞沉淀块冻融3次来破碎细胞。得到的细胞提取物1000g离心5分钟,使用氯化铯梯度对含有病毒的上清液分层,35000g离心1小时。收集从梯度中获得的病毒条带,并且使用另一氯化铯梯度对其进行分层,35000g离心16小时。收集病毒条带,并且使用PBS-10%甘油进行透析。分装透析后的病毒并保存于-80℃。按照标准方案,来定量病毒颗粒和空斑形成单位的数量。含5%甘油的磷酸盐缓冲液(PBS)是储存腺病毒的标准制剂。然而,还描述了改善病毒稳定性的其他制剂。

[0062] 用于预防或治疗癌症的含白蛋白结合部分的腺病毒的纯化方法,与所描述的用于癌症的病毒治疗或基因治疗的其他腺病毒或腺病毒载体的纯化方法相同。

[0063] 腺病毒可用于靶向异常细胞,例如,在体内有害的或其他不需要的任何细胞。广泛例子包括引起自身免疫疾病、再狭窄和瘢痕组织形成的细胞。

[0064] 本发明的腺病毒可在体内选择性分布在特定的组织中,而在非靶向或非肿瘤组织中不表达或表达显著减少。

[0065] 本发明的复制型腺病毒可能在其基因组序列中具有修饰,赋予其在细胞中选择性复制的能力。为了引导腺病毒在需要表达的组织中或待治疗的肿瘤组织中表达,本发明的腺病毒可包括组织特异性启动子或肿瘤特异性启动子。因此,在一个实施方式中,腺病毒进一步包括组织特异性启动子或肿瘤特异性启动子。

[0066] 在一个优选的实施方式中,组织特异性启动子或肿瘤特异性启动子是控制选自由E1a、E1b、E2和E4组成的组中的一个或多个基因表达的启动子序列。优选的,启动子控制E1a的表达。

[0067] 如本文所使用的,术语“启动子”根据本领域公认的含义使用。这旨于指与RNA聚合酶结合并且将酶导向正确的转录起始位点的DNA区域,通常在基因编码序列的上游。所述启

动子控制启动复制的病毒基因。

[0068] 术语“组织特异性”旨于指启动子在该组织中特异性起发挥功能,以便在该组织中进行复制,其中复制所须基因与该启动子可操作地连接。这可通过激活启动子的阳性转录因子存在于该组织中,而不存在于非靶组织中来发生。这还可通过缺乏转录抑制因子来发生,其中转录抑制因子正常存在于非靶组织中并且通过启动子而阻止转录。因此,当发生转录时,它进行到复制所须基因中,从而在靶组织中发生载体的复制及伴随的功能。

[0069] 对于靶向特定组织类型的异常对应部分的同时,避开该组织的正常对应部分,或者在避开除异常组织之外的周围不同类型的组织的同时来治疗异常组织,组织特异性是特别有意义的。在一个具体的实施方式中,启动子是“肿瘤特异性的”,这意味着启动子特异性地在肿瘤组织中发挥功能。例如,本发明的重组腺病毒可用于治疗肝转移。一个具体例子是结肠癌,其经常转移至肝脏中。已发现即使是在结肠癌转移至肝脏中时,CEA启动子在转移灶的细胞中是有活性的,而在正常肝脏细胞中是没有活性的。因此,成年人正常肝脏不支持病毒的复制,该病毒具有与结肠癌CEA特异性启动子相连的复制所须的病毒基因。复制会发生在原发性癌细胞中。另一个例子是甲胎蛋白启动子,其仅在肝细胞癌中有活性。又一个例子是酪氨酸酶启动子,其仅在黑色素瘤中有活性,而在正常皮肤中没有活性。在每种情况下,仅希望在异常细胞中进行复制,而不在正常细胞中进行复制。

[0070] 组织特异性启动子的例子是但不限于甲胎蛋白启动子、DE3启动子、酪氨酸酶启动子、癌胚抗原(CEA)启动子、表面活性蛋白启动子、E2F启动子、端粒酶hTERT启动子、前列腺特异性抗原启动子、COX-2启动子、白蛋白基因启动子、肝炎病毒核心启动子、与甲状腺素结合的球蛋白结合蛋白的启动子以及ErbB2启动子。

[0071] 在一个优选的实施方式中,启动子选自由E2F启动子、端粒酶hTERT启动子、酪氨酸酶启动子、前列腺特异性抗原启动子、甲胎蛋白启动子和COX-2启动子组成的组。

[0072] 本发明的腺病毒尤其可用于治疗癌症。所有肿瘤潜在地能使用本发明的腺病毒进行治疗。肿瘤类型包括但不限于造血系统、胰腺、神经系统、肝脏、胃肠道、内分泌、胆道、窦肺、头和颈、软组织肉瘤和癌、皮肤、生殖道等。治疗的优选肿瘤是那些相对正常组织有着高有丝分裂指数的肿瘤,优选实体瘤。

[0073] 在一个优选的实施方式中,本发明的腺病毒是溶瘤腺病毒。

[0074] 如本文所使用的,术语“溶瘤腺病毒”是指在肿瘤细胞中能够复制或具备复制能力的任意腺病毒,甚至没有选择性。溶瘤腺病毒的治疗作用基于复制和裂解待消除的肿瘤细胞的能力。肿瘤细胞的死亡可通过现有技术中的任意方法来检测,例如确定活细胞数量、细胞病变效应、肿瘤细胞凋亡、肿瘤细胞中的病毒的合成(例如通过代谢标记、病毒蛋白的蛋白印记(Western blot)或使用复制所需病毒基因的反转录来进行PCR)或肿瘤尺寸的减小。

[0075] 实现在肿瘤中的选择性复制的另一个策略是缺失正常细胞中复制所需的,但在肿瘤细胞中不需要的病毒功能。这包括,例如缺失阻断视网膜母细胞瘤(pRB)通路的早期E1A功能。几篇现有技术文献已经证实了这些突变体的选择性复制。与pRB直接相互作用的其他病毒基因,如E4和E4orf6/7,是待缺失的候选基因,以在肿瘤细胞中实现选择性复制。

[0076] 另一个在肿瘤中实现选择性复制的修饰是缺失编码病毒相关RNA(VA-RNA)的腺病毒基因。这些RNA阻断干扰素的抗病毒活性,而它们的缺失引起腺病毒对干扰素抑制敏感。由于干扰素通路在肿瘤细胞特中特有的截断,所述腺病毒在肿瘤中正常复制。

[0077] 因此,在另一个实施方式中,本发明的腺病毒进一步包括在选自由E1a、E1b、E4和VA-RNA组成的组的一个或多个基因中的突变,从而实现在肿瘤中的选择性复制。优选的,突变在E1a中。在一个优选的实施方式中,E1a中的突变是缺失E1A蛋白中影响E1A与pRB相互作用的一些氨基酸,优选缺失多肽链的第121~129位氨基酸( $\Delta$  24缺失)。

[0078] 如本文所使用的,“选择性复制”的表述是指腺病毒在肿瘤细胞中的复制效率高于在正常细胞中的复制效率(例如比正常细胞中高1000倍)。

[0079] 如本文所使用的,术语“复制”是指在核酸水平或在感染性病毒颗粒水平上发生的腺病毒载体的加倍。在DNA病毒的情况下,核酸水平的复制是DNA复制。然而,复制还包括感染性DNA病毒颗粒的形成。

[0080] 可通过熟知技术来测定腺病毒的复制。对细胞中腺病毒载体复制的测定通常涉及检测多核苷酸、病毒粒子或感染性病毒。可用于这一目的各种熟知方法涉及确定在给定时段中,掺入细胞多核苷酸中的标记底物的数量。

[0081] 当复制涉及DNA多核苷酸时,常用<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶作为标记底物。在这种情况下,通过从大量细胞DNA中分离载体DNA并测量特异性掺入载体DNA的氚量,来确定复制的量。

[0082] 还可通过裂解或渗透细胞以释放多核苷酸,然后分离多核苷酸并直接定量所回收的DNA或RNA,来检测多核苷酸载体的复制。还可通过定量PCR来检测多核苷酸的复制,其中定量PCR使用特异性针对待测多核苷酸的引物。

[0083] 可通过以下方式来测定病毒粒子:本领域熟知的电子显微镜计数技术;分离病毒粒子并确定蛋白和核苷酸量;以及,对病毒基因组多核苷酸或病毒粒子蛋白进行标记,并且根据多核苷酸或蛋白的量确定病毒粒子的量。

[0084] 实现腺病毒对肿瘤细胞的选择性的另一个策略是,修饰感染宿主细胞所牵涉的病毒衣壳蛋白,使腺病毒靶向肿瘤细胞中存在的受体。修饰病毒用来感染细胞的衣壳蛋白也可用于增加腺病毒的感染性(即增加病毒进入细胞中)。还可腺病毒靶向肿瘤也可通过双官能团配体来实现,其中双官能团配体的一个末端与病毒结合,另一末端与肿瘤受体结合。

[0085] 因此,在另一个实施方式中,本发明的腺病毒进一步包括增加其感染性或将其靶向肿瘤细胞中存在的受体的衣壳修饰。在一个更优选的实施方式中,衣壳修饰是将RGD模体(精氨酸-甘氨酸-天冬酰胺模体)插入在腺病毒纤突蛋白的H1环中。该插入使腺病毒能用整合素停靠于细胞中,而不像野生型腺病毒那样仅仅内化。使用整合素作为病毒的细胞受体增加了感染性和溶瘤的效力。在另一个实施方式中,溶瘤腺病毒具有利用腺病毒纤突中的KKTK (SEQ ID NO:10) 硫酸乙酰肝素结合结构域被替换为结构域RGDK (SEQ ID NO:11) (N.Bayo et al. Human Gene Therapy 2009, 20:1214-21) 进行修饰的衣壳。另一个增加腺病毒对靶细胞的感染性的策略是纤突的一部分被替换为不同血清型的同源部分。通常,源自血清5型的人腺病毒的纤突轴(shaft)和纤突结(knob)被替换为源自血清3型或血清35型人腺病毒的纤突轴和纤突结。具有来自不同血清型的基因组的重组腺病毒在本领域中被称作嵌合型腺病毒。在另一个实施方式中,本发明的腺病毒进一步包括源自不同的血清型腺病毒的嵌合型衣壳。在另一个优选的实施方式中,对衣壳的修饰是将纤突基因的一部分替换为不同血清型腺病毒的同源部分,从而形成嵌合型腺病毒。

[0086] 在一个优选的实施方式中,溶瘤腺病毒是肿瘤选择性复制的腺病毒,其特征是:含有E1A蛋白的突变体,其中缺失了多肽链中影响E1a与pRB相互作用的第121~129位氨基酸

( $\Delta$  24缺失)；在E1a内源启动子中插入了4个E2F结合位点和一个Sp1结合位点,以控制E1a的表达；最后,在腺病毒纤突中插入了RGD肽,以增加病毒的感染性。ICOVIR15-ABD是本发明的一个优选实施方式。所述修饰可以单独存在,或组合地存在于同一腺病毒中。

[0087] 在一个优选的实施方式中,溶瘤腺病毒是肿瘤选择性复制的腺病毒,其特征是在E1A蛋白中缺失了影响E1a与pRB相互作用的一些氨基酸,优选缺失了多肽链的第121~129位氨基酸( $\Delta$  24缺失)。

[0088] 在另一个优选的实施方式中,溶瘤腺病毒是肿瘤选择性复制的腺病毒,其特征是在E1a内源启动子中插入了4个E2F结合位点和一个Sp1结合位点,以控制E1a的表达。

[0089] 在另一个优选的实施方式中,溶瘤腺病毒是肿瘤选择性复制的腺病毒,其特征是在腺病毒纤突中插入了RGD肽,以增加病毒的感染性。

[0090] 腺病毒的基因组可还含有编码治疗性蛋白的外源基因,以便该外源基因可在感染的细胞内表达。如本文所使用的,“治疗性蛋白”是指当在给定细胞内表达时预期能提供一些治疗益处的蛋白。所述外源基因产物可以被包含在复制或非复制的腺病毒中。插入的治疗性基因可以是基因治疗或疫苗接种中使用的任何基因。优选的,外源基因用于癌症的基因治疗。在溶瘤腺病毒基因组中插入治疗性基因生成“武装溶瘤腺病毒”,增加了溶瘤腺病毒对肿瘤细胞的细胞毒性。例如,所述外源基因能引起肿瘤细胞的死亡,激活免疫系统来对抗肿瘤,抑制血管生成,消除细胞外机制,诱导凋亡等。在这些情况下,治疗性基因的表达方式和时间对治疗方法的最终结果是至关重要的。

[0091] 因此,在一个实施方式中,腺病毒包括插入所述腺病毒基因组中的一个或多个非腺病毒基因。在一个优选的实施方式中,所述基因是用于基因治疗或疫苗接种的基因。在一个更优选的实施方式中,所述基因是用于癌症的基因治疗的基因。优选的,用于癌症的基因治疗的基因是选自由前药激活基因、肿瘤抑制基因、编码抗肿瘤干扰RNA的基因和免疫刺激基因组成的组中的至少一种基因。

[0092] 如本文所使用的,术语“非腺病毒基因”是指在野生型腺病毒基因组中不存在的外源基因。

[0093] 如本文所使用的,术语“用于基因治疗的基因”是指可用作药物的基因,该药物通过将所述治疗性DNA递送至患者细胞中来预防或治疗遗传性或获得性疾病或病症。如本领域技术人员所理解的,术语基因治疗涉及使用编码功能性、治疗性基因的DNA来替代突变基因,或使用编码治疗性蛋白的DNA。例如,DNA可编码具有治疗价值的酶、激素、受体或多肽。可用于治疗适用基因治疗的疾病的任何基因都可以插入至本发明的腺病毒的腺病毒基因组中。用于基因治疗的基因可以是但不限于编码酶、血液衍生物、激素、白介素、干扰素、TNF、生长因子、神经递质,或它们前体或合成酶,营养因子(即BDNF、CNTF、NGF、IGF、GMF、aFGF、bFGF、NT3、NT5等)的基因;载脂蛋白,即ApoAI、ApoAIV、ApoE等;肌营养不良蛋白或小肌营养不良蛋白;肿瘤抑制基因,即p53、Rb、Rap1A、DCC、k-rev;编码参与凝血的因子(即因子VII、因子VIII、因子IX)的基因;前药激活基因,即胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶;天然或人工免疫球蛋白(Fab、ScFv等)的全部或一部分。治疗基因还可以是反义基因或序列,该反义基因或序列在靶细胞中的表达能使基因表达或细胞mRNA的转录受到控制。

[0094] 如本文所使用的,术语“用于疫苗接种的基因”是指编码抗原肽的基因,该抗原肽能够在人或动物中生成免疫应答,以生产预防性或治疗性疫苗。所述抗原肽可以是但不限

于对人类疱疹病毒 (Epstein-Barr virus)、HIV病毒、乙型肝炎病毒、伪狂犬病毒和肿瘤特异性肽具有特异性的那些抗原肽。

[0095] 如本文所使用的,术语“前药激活基因”是指编码以下产物的基因,该产物作用于无毒性前药,使该无毒性前药转化为对靶组织有毒性的形式。优选的,毒素具有抗肿瘤活性或消除细胞增殖。

[0096] 前药激活基因的例子包括但不限于胸苷激酶的基因。单纯疱疹病毒的胸苷激酶使更昔洛韦磷酸化,以产生核苷酸毒素更昔洛韦磷酸盐。该化合物起到链终止子和DNA聚合酶抑制剂的作用,阻止DNA合成,因此是有细胞毒性的。在一个实施方式中,前药激活基因是胸苷激酶的基因,优选是选自由单纯疱疹病毒胸苷激酶、巨细胞病毒胸苷激酶和水痘带状疱疹病毒胸苷激酶组成的组中的病毒胸苷激酶。当使用病毒胸苷激酶时,相互作用剂或化疗剂优选是核苷类似物,例如选自由更昔洛韦、阿昔洛韦和1-2-脱氧-2-氟-D-阿拉伯呋喃糖基-5-碘尿嘧啶 (FIAU) 组成的组中的一种。病毒胸苷激酶有效地利用上述相互作用剂作为底物,从而使上述相互作用剂极具威胁地掺入至表达病毒胸苷激酶的肿瘤细胞的DNA中,从而导致靶细胞死亡。在另一个实施方式中,前药激活基因是胞嘧啶脱氨酶。胞嘧啶脱氨酶将5'-氟胞嘧啶转化为具有高细胞毒性的抗癌药物5'-氟尿嘧啶。因此,表达胞嘧啶脱氨酶基因的靶细胞将5'-氟胞嘧啶转化为5'-氟尿嘧啶并被杀死。关于这种“自杀”基因的讨论,参见 Blaese, R.M. et al., Eur. J. Cancer 30A:1190-1193 (1994)。

[0097] 如本文所使用的,术语“肿瘤抑制基因”是指抗癌基因,或保护细胞免于在通向癌症之路上的一个步骤的基因。当这些基因中的一个发生突变导致其功能丧失或降低时,细胞会发展为癌症,这通常与其他基因变化相结合。

[0098] 肿瘤抑制基因的例子是但不限于TP53基因编码的p53肿瘤抑制蛋白,PTEN、pVHL、APC、CD95、ST5、YPEL3、ST7和ST14。

[0099] 如本文所使用的,术语“编码抗肿瘤干扰RNA的基因”是指编码用于治疗肿瘤的治疗有用性RNA分子的基因,即siRNA (Dorsett and Tuschl (2004) Nature Rev Drug Disc 3: 318-329)。在一些情况下,基因可以掺入本发明的重组腺病毒中,以进一步增强腺病毒根除单核细胞/巨噬细胞系的能力,但对细胞本身没有任何直接影响。这包括编码能抑制因子活性的siRNA的基因,其损害MHC I类呈递、阻断补体、抑制IFN和IFN诱导的机制、趋化因子和细胞因子、基于NK细胞的杀伤、下调免疫应答(如IL-10、TGF- $\beta$ ),和能够分解细胞外基质的金属蛋白酶,并且增强病毒在肿瘤内的播散。

[0100] 如本文所使用的,术语“免疫刺激基因”是指激活免疫系统来对抗肿瘤的基因。外源基因或其片段的进一步例子包括编码免疫调节蛋白,如细胞因子或趋化因子的那些外源基因或其片段。例子包括:白细胞介素2,美国专利号4,738,927或5,641,665;白细胞介素7,美国专利号4,965,195或5,328,988;和白细胞介素12,美国专利号5,457,038;肿瘤坏死因子 $\alpha$ ,专利号4,677,063或5,773,582;干扰素 $\gamma$ ,美国专利号4,727,138或4,762,791;或GM CSF,美国专利号5,393,870或5,391,485, Mackensen et al. (1997) Cytokine Growth Factor Rev. 8:119-128)。

[0101] 腺病毒基因组中的这些修饰不相互排斥。

[0102] 本发明的腺病毒基因组

[0103] 本发明还涉及腺病毒的基因组。在一方面,本发明涉及腺病毒基因组,其特征是该

腺病毒基因组包括插入在六邻体蛋白高变区1 (HVR1) 编码区中的编码白蛋白结合部分的序列,这样得到包括六邻体蛋白和白蛋白结合部分的融合蛋白的表达,其中当所述六邻体蛋白组装在腺病毒衣壳中时,所述白蛋白结合部分位于所述六邻体蛋白的外表面上。

[0104] 如本文所使用的,“腺病毒基因组”的表述是指双链DNA序列,该双链DNA序列在合适的蛋白存在时可以被包装,以得到完整的腺病毒颗粒。为了发生这一包装,所述序列必须符合一些条件,将这些条件总结如下:

[0105] -呈现隔离开的腺病毒ITR,在它的一个端点上一个;

[0106] -包括在两个ITR之间的包装信号Psi,其位置使得包装信号Psi的5'末端与最接近的ITR3'末端之间的距离不超过会阻止天然腺病毒包装的距离;在血清5型人腺病毒情况下为200个碱基对的距离,通过类推,假设该距离在其他血清型的情况下近似相等,因为已经发现在天然隔开ITR和包装信号的序列内,在它们之间引入序列降低了腺病毒基因组包装能力,导致获得的腺病毒颗粒的总数减少,但它们包装所需的时间没有明显变化;

[0107] -两个ITR末端之间的距离不应大于天然存在的腺病毒基因组大小的105%,其中形成衣壳的蛋白质属于该天然存在的腺病毒基因组。

[0108] 腺病毒基因组优选缺少病毒复制所需的至少一种基因功能,从而得到“复制缺陷型”腺病毒载体。“复制缺陷型”是指腺病毒载体包括缺少至少一种复制必需的基因功能的腺病毒基因组(即,使得腺病毒载体在典型的宿主细胞中不复制,尤其是在使用本发明进行疗法期间,可被腺病毒载体感染的人类患者中的那些宿主细胞)。

[0109] 更优选的,复制缺陷型腺病毒载体包括缺少腺病毒基因组一个或多个区域的至少一种复制必需基因功能的腺病毒基因组。在这一方面,腺病毒载体缺少病毒复制所需的腺病毒基因组E4区或E1区的至少一种必需基因功能。除了E1区中的缺陷外,重组腺病毒在主要晚期启动子(MLP)中也具有突变。更优选的,腺病毒载体缺少E3区(即E3区的Xba I缺失)至少一部分和E1区中的至少一种必需基因功能。关于E1区,腺病毒载体可缺少(如缺失)E1a区的至少一部分和E1b区的至少一部分。例如,腺病毒载体可包括腺病毒基因组的整个E1区和部分E3区的缺失(即,核苷酸第355至3511位和第28593至30470位)。单一缺陷型腺病毒载体可以缺失大约核苷酸第356至3329位和第28594至30469位(基于血清5型腺病毒基因组)。或者,腺病毒载体基因组可以缺失大约核苷酸第356至3510位和第28593至30470位(基于血清5型腺病毒基因组),从而得到在腺病毒基因组的E1、E3和E4区中有缺失的腺病毒载体。

[0110] 如本文所使用的,在基因、基因功能、基因区域或基因组区域中的缺陷被定义为,缺失病毒基因组的足以损害或消除基因功能的遗传物质,其中该基因缺失其全部或部分的核苷酸序列。通常不需要缺失整个基因区域,来在破坏复制所需的基因功能。然而,为了在腺病毒基因组中提供足够的空间用于一个或多个转基因,可除去基因区域的大部分。虽然缺失遗传物质是优选的,但通过添加或取代对遗传物质进行突变也适用于破坏基因功能。复制所需的基因功能是指复制(如增殖)需要的那些基因功能,由例如腺病毒早期区域(如E1、E2和E4区)、晚期区域(如L1~L5区)、参与病毒包装的基因(如IVa2基因)和病毒相关RNA(如NA-RNA-1和/或NA-RNA-2)编码。

[0111] 除了ITR和包装序列之外,腺病毒载体也可以基本上除去整个腺病毒基因组。这样的载体在本领域中称作无肠(gutless)腺病毒载体或辅助依赖性腺病毒载体。在这种情况下,由辅助腺病毒提供经修饰含有白蛋白结合部分的六邻体序列。包括ITR和包装序列的腺

病毒基因组的5'区或3'区不需要来源于与病毒基因组剩余部分相同的血清型腺病毒。例如,血清5型腺病毒基因组的5'区(即,基因组的5'到腺病毒E1区的区域)可被替换为血清2型腺病毒基因组的相应区域(例如,Ad5基因组的5'区到腺病毒基因组的E1区被替代为Ad2基因组的第1~456位核苷酸)。然而,本发明方法的腺病毒载体的腺病毒基因组的缺陷优选限于由腺病毒基因组早期区域编码的复制必需的基因功能。

[0112] 根据本发明,末端反向重复序列或ITR理解为,在腺病毒的线性基因组的两侧,对于腺病毒基因组复制所必需的大约100个碱基对的序列(Stow,N.D.,1982,Nucl.Acid.Res,10:5105-5109)。

[0113] 根据本发明,腺病毒包装信号 $\psi$ 理解为约160个碱基对长的序列,在血清2型和5型腺病毒的情况下,该序列在基因组的第190位至第350位之间延伸。去除腺病毒基因组的该序列能阻止在病毒增殖期间产生的DNA分子有效并入最近形成的衣壳中(Hearing,P.et al.,1987,J.Virol.,61:2555-2558),但它们不能阻止所述基因组在包装细胞中的复制,这与消除ITR不同。

[0114] 在本发明的腺病毒的上下文中公开的所有实施方式均适用于本发明的腺病毒基因组。

[0115] 具体地,在一个实施方式中,腺病毒基因组来自人腺病毒,优选选自由血清1型至血清57型人腺病毒组成的组,更优选来自血清5型人腺病毒。

[0116] 在另一个实施方案中,白蛋白结合部分选自来自链球菌蛋白G的白蛋白结合结构域、来自大消化链球菌(*Peptostreptococcus magnus*)蛋白PAB的白蛋白结合结构域、具有核心序列DICLPRWGCLW(SEQ ID NO:9)的白蛋白结合肽,及它们的功能等同变体。在一个更优选的实施方式中,白蛋白结合部分是来自链球菌蛋白G的白蛋白结合结构域3,优选具有序列SEQ ID NO:1。

[0117] 在另一个实施方式中,插入编码白蛋白结合部分的序列,所得到的融合蛋白在六邻体蛋白的D150氨基酸(根据GenBank登录号为BAG48782.1的六邻体蛋白进行编号)后含有白蛋白结合部分。在一个优选的实施方式中,在HVR中插入ABD的经完全修饰的腺病毒六邻体的核苷酸序列为SEQ ID NO:3。

[0118] 在另一个实施方式中,白蛋白结合部分的N-末端和/或C-末端通过连接子序列,优选包括序列GSGS(SEQ ID NO:2)的连接子序列与六邻体蛋白连接。

[0119] 在另一个实施方式中,腺病毒基因组进一步包括组织特异性启动子或肿瘤特异性启动子。在一个优选的实施方式中,组织特异性启动子或肿瘤特异性启动子是:控制选自由E1a、E1b、E2和E4组成的组中的一个或多个基因表达的启动子序列;更优选选自由E2F启动子、端粒酶hTERT启动子、酪氨酸酶启动子、前列腺特异性抗原启动子、甲胎蛋白启动子和COX-2启动子组成的组中的启动子。

[0120] 在另一个实施方式中,腺病毒是溶瘤腺病毒,优选是以下的腺病毒,在该腺病毒中的腺病毒基因组在选自由E1a、E1b、E4和VA-RNA组成的组中的一个或多个基因中进一步包括突变,以在肿瘤中实现选择性复制。

[0121] 在另一个实施方式中,腺病毒基因组进一步包括增加腺病毒感染性或将其靶向肿瘤细胞中存在的受体的衣壳修饰。优选的,衣壳修饰是将RGD模体插入在腺病毒纤突蛋白的H1环中。在另一个实施方式中,腺病毒基因组是源自一给定血清型的嵌合型腺病毒基因组,

其中该给定血清型的片段或部分被替代为来自另一血清型的基因组的同源部分。优选的，所述嵌合型腺病毒是血清5型人腺病毒，其中纤突基因的一部分被替代为来自另一血清型(优选3型人腺病毒或35型人腺病毒)的同源部分。在一个优选的实施方式中，对衣壳的修饰是纤突基因的一部分被取代为不同血清型腺病毒的同源部分，从而形成嵌合型腺病毒。

[0122] 在另一个实施方式中，腺病毒基因组包括插入所述基因组中的其它基因。在一个实施方式中，这些基因用于基因治疗或疫苗接种。优选的，这些基因是用于癌症基因治疗的基因，更优选地是至少选自由前药激活基因、肿瘤抑制基因、编码抗肿瘤干扰RNA的基因和免疫刺激基因组成的组中的基因。

[0123] 本发明的组合物

[0124] 本发明的重组腺病毒可用于制备药物组合物。因此，本发明的另一方面是一种药物组合物，该药物组合物包括治疗有效量的根据本发明的重组腺病毒及药学上可接受的载剂。

[0125] 当用于本发明时，表述“药物组合物”是指一种制剂，该制剂适用于向细胞、细胞群、器官、组织或生物体给药预定剂量的一种或多种治疗有用的试剂。

[0126] 重组腺病毒以有效量给药。“治疗有效量”被理解为能提供治疗效果的量，并且可以由本领域技术人员通过常规手段来确定。在保健医生的知识和经验内，有效量会随着治疗的具体症状，接受治疗的受试者的年龄和身体状况，症状的严重性，治疗的持续时间，同时或组合治疗的性质(如果有的话)，具体给药途径和类似因素而变化。通常优选使用最大剂量，即根据合理的医学判断得到的最高安全剂量。例如，如果受试者有肿瘤，则有效量可以是减小肿瘤体积或负荷(例如通过对肿瘤成像来确定)的量。有效量还可以通过癌细胞在血液或其他体液或组织中的存在和/或频率来测定(例如活检)。如果肿瘤影响组织或器官的正常功能，则可以通过测量组织或器官的正常功能来测定有效量。本领域技术人员应理解，也可以根据戈德曼和高曼的治疗药理学基础，第九版(1996)，附录II，第1707~1711页(Goodman and Goldman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition (1996), Appendix II, pp.1707-1711)，和戈德曼和高曼的治疗药理学基础，第十版(2001)，附录II，第475~493页(Goodman and Goldman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Tenth Edition (2001), Appendix II, pp.475-493)的指导来确定用量。

[0127] 如本文所使用的，术语“药学上可接受的载剂”是指从药理学/毒理学观点上患者可接受的，以及从物理/化学角度上(关于组成、配方、稳定性、患者接受性和生物利用度)制药化学家可接受的任意类型的无毒的惰性固体、半固体或液体填充剂，稀释剂，包封材料或制剂助剂。由热那洛编辑的雷明顿制药科学，麦克出版社，伊斯顿(Remington's Pharmaceutical Sciences. Ed. by Gennaro, Mack Publishing, Easton, Pa., 1995)公开了用于配制药物组合物的各种载剂及其制备的已知技术。可作为药学上可接受的载剂使用的材料的一些例子包括但不限于：糖，如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，如玉米淀粉和马铃薯淀粉；纤维素及其衍生物，如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素；黄芪胶粉末；麦芽；明胶；滑石；辅料，如可可脂和栓剂蜡；油，如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；二醇，如丙二醇；酯，如油酸乙酯和月桂酸乙酯；琼脂；洗涤剂，如TWEEN<sup>TM</sup> 80；缓冲剂，如氢氧化镁和氢氧化铝；藻酸；无热原水；等渗盐水；林格氏溶液；乙醇；和磷酸盐缓冲溶液，以及其他无毒的相容性润滑剂，如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁，以及着色剂、释放剂、包

衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂,根据配方调试员的判断,防腐剂和抗氧化剂也可存在于组合物中。如果过滤或其他最终灭菌方法不可行,则可在无菌条件下制造制剂。

[0128] 本发明的药物组合物可以通过本领域已知的包括口服和肠胃外途径的任何手段向患者给药。根据这样的实施方案,本发明的组合物可以通过注射(例如,静脉内、皮下或肌内、腹膜内注射)来给药。在一个具体实施方式中,对需要全身给药的受试者给药本发明的重组腺病毒,例如,通过静脉输液或注射来给药。可注射制剂,例如无菌可注射的水性或油性悬浮液可根据已知技术使用合适的分散剂或润湿剂以及悬浮剂来配制。无菌可注射制剂还可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射的溶液、悬浮液或乳液,例如,作为1,3-丁二醇溶液。在可接受的溶媒(vehicle)和溶剂中,可使用水、林格氏溶液、U.S.P.和等渗氯化钠溶液。此外,无菌的不挥发油常规用作溶剂或悬浮介质。出于该目的,可以使用任何温和的不挥发油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸如油酸用于制备注射剂。在一个实施方式中,将重组腺病毒悬浮于含1% (w/v) 羧甲基纤维素钠和0.1% (v/v) TWEEN™ 80的载体流体中。可注射制剂可以例如通过细菌截留过滤器进行过滤或通过掺入灭菌剂来灭菌,其中灭菌剂为无菌固体组合物的形式并且在使用前可溶解或分散于无菌水或其它无菌可注射介质中。

[0129] 所述组合物可以包括重组腺病毒作为唯一的试剂或与另一种治疗剂组合。

[0130] 在一个优选实施方式中,所述组合物包括溶瘤腺病毒,或包括插入腺病毒基因组中的用于癌症基因治疗的一个或多个基因的腺病毒。在该具体情况下,所述组合物可以包括这种腺病毒作为唯一的抗肿瘤剂,或与另一种治疗剂(如化疗药物或插入有治疗基因的载体)组合。

[0131] 本发明的腺病毒的治疗用途

[0132] 在基因治疗领域和疫苗接种领域中使用复制缺陷型腺病毒和可复制的腺病毒有着广泛的经验。

[0133] 在另一方面,本发明涉及本发明的重组腺病毒或根据本发明的药物组合物用于医药用途。本发明的腺病毒可以设计用于治疗需要将这种腺病毒给药至血流中的任意种类的疾病。

[0134] 本发明人已示出本发明的腺病毒对癌症治疗是特别有用的。

[0135] 在另一方面,本发明涉及本发明的重组腺病毒或根据本发明的药物组合物用于预防和/或治疗哺乳动物中的癌症,其中,所述腺病毒是溶瘤腺病毒,或包括插入在腺病毒基因组中的用于癌症基因治疗的一个或多个基因的腺病毒。

[0136] 可选的,本发明涉及本发明的重组腺病毒或根据本发明的药物组合物在制备用于预防和/或治疗哺乳动物中的癌症的药物中的用途,其中所述腺病毒是溶瘤腺病毒,或包括插入在腺病毒基因组中的用于癌症基因治疗的一个或多个基因的腺病毒。

[0137] 可选的,本发明涉及预防和/或治疗哺乳动物中的癌症的方法,该方法包括向所述哺乳动物给药本发明的重组腺病毒或根据本发明的药物组合物,其中,所述腺病毒是溶瘤腺病毒,或包括插入在腺病毒基因组中的用于癌症基因治疗的一个或多个基因的腺病毒。

[0138] 如本文所使用的,术语“预防”是指是指:预防性(prophylactic)或防止性(preventive)方法,其中所述腺病毒在疾病的初始阶段或早期阶段(即肿瘤的恶化前阶段)给药;或者,也指防止其发作。

[0139] 腺病毒载体已经被普遍用于制备诱发针对病原体蛋白质的免疫的疫苗。例如,已经公开描述了针对HIV、狂犬病病毒、登革热病毒、埃博拉病毒、疱疹冠状病毒、人乳头瘤病毒、丙型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒、巨细胞病毒、2型单纯疱疹病毒、爱泼斯坦巴尔病毒、流感病毒、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)和恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*),以及针对其他病原体的重组腺病毒疫苗。

[0140] 在另一方面,本发明涉及本发明的重组腺病毒或根据本发明的药物组合物用于预防哺乳动物中的传染病。

[0141] 可选的,本发明涉及本发明的重组腺病毒或根据本发明的药物组合物用于制备用于预防哺乳动物中的传染病的药剂,优选疫苗。

[0142] 可选的,本发明涉及预防哺乳动物中的传染病的方法,所述方法包括向所述哺乳动物给药本发明的重组腺病毒或根据本发明的药物组合物。

[0143] 本文所用的表述“传染病”或“感染”是指由于以下物质入侵宿主生物体所引起的疾病:感染性或病原性因子,如病毒、类病毒和朊病毒;微生物,如细菌;寄生虫,如线虫(包括蛔虫和蛲虫);节肢动物,如蜱、螨、跳蚤和虱;真菌和原生动物。

[0144] 本发明的重组腺病毒适用于制备用于预防任何种类的传染病的疫苗。

[0145] 在一个优选的实施方式中,传染病由选自由HIV、狂犬病毒、登革热病毒、埃博拉病毒、疱疹冠状病毒、人乳头瘤病毒、丙型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒、巨细胞病毒、2型单纯疱疹病毒、爱泼斯坦巴尔病毒、流感病毒、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)和恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)组成的组中的病原体引起。

[0146] 术语“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”是指治疗性治疗,其目标是在临床症状出现之前或之后控制疾病的发展。疾病发展的控制被理解为有益或期望的临床结果,其包括但不限于症状的减轻、疾病持续时间的缩短、病理状态的稳定(特别是避免额外的损伤)、延缓疾病发展、改善病理状态和缓解(部分和完全)。对疾病发展的控制还涉及与未施用治疗的期望存活相比,存活延长。

[0147] 例如,在治疗癌症的情况下,可以通过观察以下效果中的一种或多种来监测应答:(1)在一定程度上抑制肿瘤生长,包括(i)减缓、(ii)抑制血管生成和(iii)完全生长停滞;(2)肿瘤细胞数量的减少;(3)维持肿瘤尺寸;(4)肿瘤尺寸减小;(5)抑制,包括肿瘤细胞浸润到外周器官的(i)减少、(ii)减缓或(iii)完全预防;(6)抑制,包括转移的(i)减少、(ii)减慢或(iii)完全预防;(7)抗肿瘤免疫应答的增强,其可以导致(i)维持肿瘤尺寸、(ii)减小肿瘤尺寸、(iii)减慢肿瘤的生长、(iv)减少、减慢或预防入侵,和/或(8)在一定程度上缓解与病症相关的一种或多种症状的严重性或数量。

[0148] 术语“癌症”是指具有以下特征的疾病:不受控的细胞分裂(或存活或细胞凋亡抗性增加),细胞具有侵入其他相邻组织的能力(侵入),或通过淋巴管和血管扩散到身体的细胞正常不位于其中(转移)的其他区域。如本文所使用的,术语癌症包括但不限于以下类型的癌症:乳腺癌;胆道癌;膀胱癌;脑癌,包括成胶质细胞瘤和成神经管细胞瘤;宫颈癌;绒毛膜癌;结肠癌;子宫内膜癌;食道癌;胃癌;血液肿瘤,包括急性淋巴细胞性白血病和骨髓性白血病;T细胞急性淋巴细胞白血病/淋巴瘤;毛细胞白血病;慢性骨髓性白血病,多发性骨髓瘤;AIDS相关性白血病和成人T细胞白血病/淋巴瘤;上皮内肿瘤,包括博文氏病(Bowen's disease)和佩吉特氏病(Paget's disease);肝癌;肺癌;淋巴瘤,包括霍奇金氏病

(Hodglun's disease) 和淋巴细胞性淋巴瘤；神经母细胞瘤；口腔癌，包括鳞状细胞癌；卵巢癌，包括起源于上皮细胞、基质细胞、生殖细胞和间充质细胞的卵巢癌；胰腺癌；前列腺癌；直肠癌；肉瘤，包括平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和骨肉瘤；皮肤癌，包括黑色素瘤、梅克尔细胞癌、卡波西肉瘤 (Kaposi's sarcoma)、基底细胞癌和鳞状细胞癌；睾丸癌，包括生殖性肿瘤，如精原细胞瘤，非精原细胞瘤 (畸胎瘤、绒毛膜癌)、基质瘤和生殖细胞肿瘤；甲状腺癌，包括甲状腺腺癌和髓质癌；及肾癌，包括腺癌和肾母细胞瘤 (Wilms tumour)。在一个实施方式中，癌症是乳腺癌。在另一个实施方式中，癌症是黑色素瘤。其它癌症对本领域普通技术人员来说是公知的。

[0149] 本发明的腺病毒可以给药予哺乳动物。如本文所使用的，术语“哺乳动物”是指任意哺乳动物物种，包括但不限于家畜和耕畜 (牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿动物)、灵长类动物和人。优选的，哺乳动物是人。在本发明的上下文中，哺乳动物患有癌症或有患癌症的风险。

[0150] 为了治疗动物模型或患者的肿瘤，腺病毒可以通过肿瘤内或腔内注射来局部或区域给药来递送，或者通过注射至血液中进行全身给药来递送。病毒也可以给药至肿瘤的脉管系统中。由于本发明的重组腺病毒免受血流中存在的中和抗体的中和，因此它们特别适合于全身给药。因此，在一个优选的实施方式中，本发明的腺病毒是全身给药的。本文所使用的，表述“全身给药”是指给药至循环系统中使得全身受到影响的途径。优选地，给药是肠胃外给药 (通常是动脉内或静脉内注射，输液或植入)。

[0151] 本发明的腺病毒理论上在结合血清白蛋白之前给药，其在所治疗的受试者的血液中与白蛋白结合。然而，为了增加腺病毒在血液中的持久性，从而增加到达弥散性肿瘤淋巴结的可能性，可在腺病毒给药之前用白蛋白包覆衣壳。

[0152] 如之前在溶瘤腺病毒的领域中所述，用本发明的腺病毒治疗肿瘤可以与其它治疗方式如化疗或放疗联合使用。

[0153] 使用本发明所述的腺病毒治疗癌症的方案与在使用腺病毒进行病毒治疗和基因治疗的领域中所使用的步骤是相同的。

[0154] 本发明还涉及以下：

[0155] [1]一种腺病毒基因组，其特征在于，所述腺病毒基因组包括编码白蛋白结合部分的序列，所述编码白蛋白结合部分的序列插入在六邻体蛋白的高变区 (HVR) 的编码区中，从而表达包括六邻体蛋白和白蛋白结合部分的融合蛋白，并且其中，当所述六邻体蛋白组装在腺病毒衣壳中时，所述白蛋白结合部分位于所述六邻体蛋白的外表面上。

[0156] [2]根据[1]的腺病毒基因组，其中，所述基因组来自人腺病毒。

[0157] [3]根据[2]的腺病毒基因组，其中，所述人腺病毒选自由血清1～57型人腺病毒组成的组。

[0158] [4]根据[3]的腺病毒基因组，其中，所述人腺病毒为血清5型。

[0159] [5]根据[1]、[2]、[3]或[4]的腺病毒基因组，其中，所述白蛋白结合部分选自链球菌蛋白G的白蛋白结合结构域、大消化链球菌 (Peptostreptococcus magnus) 蛋白PAB的白蛋白结合结构域、具有核心序列DICLPRWGCLW (SEQ ID NO:9) 的白蛋白结合肽，及它们的功能等同变体。

[0160] [6]根据[5]的腺病毒基因组，其中，所述白蛋白结合部分为链球菌蛋白G的白蛋白

结合结构域3。

[0161] [7]根据[6]的腺病毒基因组,其中,所述链球菌蛋白G的白蛋白结合结构域3的序列为SEQ ID NO:1。

[0162] [8]根据[1]、[2]、[3]、[4]、[5]、[6]或[7]的腺病毒基因组,其中,所述六邻体蛋白的HVR选自由HVR1、HVR2、HVR3、HVR4、HVR5、HVR6和HVR7组成的组。

[0163] [9]根据[8]的腺病毒基因组,其中,所述六邻体蛋白的HVR为HVR1。

[0164] [10]根据[9]的腺病毒基因组,其中,插入编码所述白蛋白结合部分的序列,以便所得到的融合蛋白包括在六邻体蛋白的D150氨基酸之后的白蛋白结合部分,所述六邻体蛋白的D150氨基酸是根据GenBank登录号为BAG48782.1的六邻体蛋白进行编号的。

[0165] [11]根据[8]的腺病毒基因组,其中,所述六邻体蛋白的HVR为HVR5。

[0166] [12]根据[11]的腺病毒基因组,其中,插入编码所述白蛋白结合部分的序列,以便所得到的融合蛋白在六邻体蛋白的A274氨基酸之后包含白蛋白结合部分,所述六邻体蛋白根据GenBank登录号为BAG48782.1的六邻体蛋白进行编号。

[0167] [13]根据[1]至[12]中任一项的腺病毒基因组,其中,所述白蛋白结合部分的N-末端和/或C-末端通过连接子序列与所述六邻体蛋白相连。

[0168] [14]根据[13]的腺病毒基因组,其中,所述连接子序列包括序列GSGS (SEQ ID NO: 2)。

[0169] [15]根据[1]至[14]中任一项的腺病毒基因组,其中,所述腺病毒基因组进一步包括组织特异性启动子或肿瘤特异性启动子。

[0170] [16]根据[15]的腺病毒基因组,其中,所述组织特异性启动子或肿瘤特异性启动子是控制选自由E1a、E1b、E2和E4组成的组中的一个或多个基因表达的启动子序列。

[0171] [17]根据[16]的腺病毒基因组,其中,所述启动子选自由E2F启动子、端粒酶hTERT启动子、酪氨酸酶启动子、前列腺特异性抗原启动子、甲胎蛋白启动子和COX-2启动子组成的组。

[0172] [18]根据[1]至[17]中任一项的腺病毒基因组,其中,所述腺病毒为溶瘤腺病毒。

[0173] [19]根据[18]的腺病毒基因组,其中,所述腺病毒基因组进一步包括在选自由E1a、E1b、E4和VA-RNA组成的组中的一个或多个基因中的突变,以实现在肿瘤中的选择性复制。

[0174] [20]根据[1]至[19]中任一项的腺病毒基因组,其中,所述腺病毒基因组进一步包括衣壳修饰,以增加腺病毒的感染性或将腺病毒靶向肿瘤细胞中存在的受体。

[0175] [21]根据[20]的腺病毒基因组,其中所述衣壳修饰是在腺病毒纤突蛋白的H1环中插入RGD模体。

[0176] [22]根据[1]至[21]中任一项的腺病毒基因组,其中,所述腺病毒基因组包含插入在所述腺病毒基因组中的一个或多个其他的基因。

[0177] [23]根据[22]的腺病毒基因组,其中,所述其他的基因是用于基因治疗或疫苗接种中的一个或多个非腺病毒基因。

[0178] [24]根据[23]的腺病毒基因组,其中,所述基因是用于癌症基因治疗的基因。

[0179] [25]根据[24]的腺病毒基因组,其中,所述用于癌症基因治疗的基因是至少选自由前药激活基因、肿瘤抑制基因、编码抗肿瘤干扰RNA的基因和免疫刺激基因组成的组中的

基因。

[0180] [26]一种重组腺病毒,所述重组腺病毒具有[1]至[25]中任一项的腺病毒基因组。  
[0181] [27]一种药物组合物,所述药物组合物包括治疗有效量的根据[26]的重组腺病毒,以及药学上可接受的载剂。

[0182] [28]根据[26]的重组腺病毒或[27]的药物组合物用于医药中。

[0183] [29]根据[26]的重组腺病毒或[27]的药物组合物用于预防和/或治疗哺乳动物中的癌症,其中,所述腺病毒为具有根据[24]或[25]的腺病毒基因组的溶瘤腺病毒或腺病毒。

[0184] [30]根据[28]或[29]的用于上述用途的重组腺病毒,其中,所述哺乳动物是人。

[0185] [31]根据[28]、[29]或[30]的用于上述用途的重组腺病毒,其中,所述腺病毒是全身给药的。

[0186] 以下提供的例子仅仅是说明性的,不应解释为限制本发明的范围。

[0187] 实施例

[0188] 材料和方法

[0189] 细胞系. HEK293 (人胚肾) 细胞、A549 (人肺腺癌) 细胞、Sk-me128 (黑色素瘤) 细胞以及MCF7 (人乳腺癌) 细胞获自美国典型培养物保藏中心 (ATCC, Manassas, VA)。除MCF7之外,所有的肿瘤细胞系在37°C, 5% CO<sub>2</sub>下,用补充有5% 胎牛血清的达尔伯克改良的伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 维持。MCF7细胞用补充有10% 胎牛血清的RPMI 1640培养基维持。对所有细胞系都常规测试是否存在支原体。

[0190] 病毒构建. ICOVIR15溶瘤腺病毒之前已进行了描述 (Rojas JJ, et al. Minimal RB-responsive E1A promoter modification to attain potency, selectivity, and transgene-arming capacity in oncolytic adenoviruses. Mol Ther 2010;18 (11) : 1960-71)。AdGL是E1缺失的第一代载体,表达来自pEGFPLuc (Clontech) 的EGFP-荧光素酶融合蛋白盒。按照源自Stanton等人 (Stanton RJ, et al. Re-engineering adenovirus vector systems to enable high-throughput analyses of gene function. Biotechniques 2008;45 (6) :659-62,664-8) 的重组工程方案,基于使用阳性-阴性选择在细菌中进行的同源重组,来插入用于替换E1区的CMV启动子-EGFPLuc-多聚腺苷酸(polyA) 盒。使用侧翼有E1同源区的CMV-GFPLuc盒,来替代pAd5-CV5-E3+的阳性-阴性选择标记物,其通常用于构建E1缺失的腺病毒载体。ICOVIR15在A549细胞中增殖,而复制缺陷型AdGL在HEK293细胞中增殖。

[0191] 通过将侧翼有两个接头 (GSGS) (SEQ ID NO:2) 的白蛋白结合域 (ABD) 插入腺病毒六邻体的高变区1 (HVR1) 的D150氨基酸之后,来构建ICOVIR15-ABD和AdGL-ABD。在HVR1中插入有ABD (ABD-HVR1) 的经完全修饰的六邻体的核苷酸序列为SEQ ID NO:3。所有修饰均按照源自Stanton等人 (Stanton RJ, et al. Re-engineering adenovirus vector systems to enable high-throughput analyses of gene function. Biotechniques 2008;45 (6) : 659-62,664-8) 的重组工程方案,基于利用RpsL-Neo盒的阳性-阴性选择在细菌中进行的同源重组来进行。

[0192] 首先,使用HVR1rpsLF 5' -GCCCTGGCTCCCAAGGGTGCCCCAAATCCTGCGAATGGGGCTGG TGATGATGGC-3' (SEQ ID NO:12) 和HVR1rpsLR 5' -GTAATATTATACCAGAATAAGGCGCTGCCAA ATACGTGAGTTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG-3' (SEQ ID NO:13),通过PCR从pJetRpsLNeo扩增

rpsLNeo盒,其中pJetRpsLNeo为含有克隆在pJet1.2/blunt中的rpsLneo阳性-阴性选择标记物(Genscript,Wheelock House,香港)的质粒。将上述基因盒插入质粒pAdZICOVIR15和pAdZGL的HVR1中,从而构建pAdZICOVIR15-H1-rpsLNeo和pAdZGL-H1-rpsLNeo。其次,使用以下重叠的寡核苷酸,通过PCR产生连接子-ABD-连接子片段:

寡核苷酸	序列	SEQ ID NO:
[0193]	ABDH1F 5'-CCCAAGGGTCCCCAAATCCTGCGAATGG GATGAAGCTGCTACTGCTCTGAAATAAACCT AGAAGAAGAGGACGGCAGCGGATCCCTG-3'	14
	ABDR1 5'-CCCGGTTCGCAAGCACCTTAGCCTCGGCCA GGGATCCGCTGCCCATTC-3	15
	ABDF2 5'-GCTTGCACCGGAACTAGACAAATACG GTGTTCTGATTATTACAAG-3	16
	ABDR2 5'-CGACGGTTTGGCATTGTTAACAAATTCTT GTAATAATCAGAAACACCG-3'	17
	ABDF3 5'-ATGCCAAAACCGTCGAGGGCGTAAAGGCT CTGATCGACGAAATACTGCG-3'	18
	ABDR3 5'-ATACGTGAGTGCTACCAGACCCGGGTAGGG CCGCAAGTATTCTCGTCGATC-3'	19
	ABDH1R 5'-CAGAATAAGGCGCCTGCCAAATACGTGA GTTTTTGCTGCTCAGCTGCTCGTCTACTTC GTCTCGTTGTCATCGCTACCAGACCCGGG-3'	20

[0194] 该片段用于替代两个质粒中的rpsLNeo盒,以创建pAdZICOVIR15-H1-ABD和pAdZGL-H1-ABD。

[0195] 同样,将ABD插入在AdGL高变区5的A274氨基酸之后。具有插入在HVR5中的ABD(ABD-HVR5)的经完全修饰的六邻体的核苷酸序列为SEQ ID NO:4。出于这一目的,通过如下所示的寡核苷酸H5rpsLF和H5rpsLR,通过PCR从pJetRpsLNeo扩增出rpsLNeo盒,

寡核苷酸	序列	SEQ ID NO:
[0196]	H5rpsLF 5'-gaaagctagaaagtcaagtggaaatgcaattttctcaactggcctggatgatggc-3'	21
	H5rpsLR 5'-gtttctatatctacatcttactgtacaataccactttagtcagaagaacctcgtaagaag-3'	22

[0197] 并且插入至pAdZGL质粒中,以构建pAdZGL-H5-rpsLNeo。在第二个重组步骤中,使用如下寡核苷酸ABDH5F和ABDH5R,通过PCR pAdZICOVIR15-H1-ABD扩增出连接子-ABD-连接子片段。

寡核苷酸	序列	SEQ ID NO:
[0198]	ABDH5F 5'-ctggccgaggctaagggtgcgtgcgaaccgggaactagacaaatacg gtgttctgattattacaagaatttgattacaatgccaaaccgtcgaggc gtaaaggctctgatcgacgaaatacttgcggccctaccc-3'	23
	ABDH5R 5'-ctggccgaggctaagggtgcgtgcgaaccgggaactagacaaatacg gtgttctgattattacaagaatttgattacaatgccaaaccgtcgaggc gtaaaggctctgatcgacgaaatacttgcggccctaccc-3'	24

[0199] 该片段用于替换pAdZGL-H5-rpsLNeo中的rpsLNeo,从而构建pAdZGL-H5-ABD。

[0200] 另外,上述结构域还可以插入至六邻体蛋白的任意高变区。为此,应当将rpsLNeo

插入所需区域中,然后被替换为ABD片段,以在特定的高变环中进行重组,其中ABD片段使用同源臂通过PCR来产生。

[0201] 通过用磷酸钙标准方法将产生的质粒转染到HEK293细胞中,产生ICOVIR15-ABD (ABD在HVR1中)、AdGL-ABD (ABD在HVR1中) 和AdGL-H5-ABD (ABD在HVR5中)。溶瘤腺病毒ICOVIR15-ABD经噬菌斑纯化,并在A549细胞中进一步扩增。腺病毒载体AdGL-ABD经噬菌斑纯化,并在HEK293细胞中进一步扩增。根据标准技术,使用双梯度氯化铯来纯化这两种病毒。

[0202] 用含有1mg/ml HSA的培养基,使病毒与人血清白蛋白 (HSA) 孵育在室温1小时。

[0203] 病毒生产测定.用每种病毒以每细胞800个病毒颗粒 (vp) 来感染A549细胞,以获得80%~100%的感染。感染后4小时用PBS洗涤细胞三次,并用新鲜培养基孵育。在指定的时间点,收集细胞并冷融三次以获得细胞提取物。通过抗六邻体染色法获得HEK293细胞中的病毒滴度 (Cascallo M, et al. Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway. Mol Ther 2007;15:1607-15)。

[0204] 体外细胞毒性测定.通过在96孔板中接种10000个HEK293细胞/孔,30000个A549细胞/孔,10000个Sk-mel28细胞/孔和20000个MCF-7细胞/孔,来进行细胞毒性测定。在感染之前,病毒在用培养基或含有1mg/ml人血清白蛋白 (HSA) 的培养基在室温孵育1小时。在正常培养基或含白蛋白的培养基中,以10000vp/细胞起始的系列稀释液(对于HEK293、Sk-mel28和MCF-7细胞为1/3,对于A549细胞为1/5)感染细胞。在感染后第7天,用PBS洗涤板,对总蛋白含量进行染色(二辛可宁酸测定; Pierce Biotechnology, Rockford, IL),并定量吸光度。使用适应性改变的希尔(Hill)方程,通过标准非线性回归(GraFit; Eritacus Software, Horley, UK),根据剂量-反应曲线来确定产生50%生长抑制 (IC<sub>50</sub>) 所需的vp/细胞。

[0205] 检测与人和小鼠血清白蛋白的结合.检测人血清白蛋白 (HSA) 和小鼠血清白蛋白 (MSA) 的结合是根据源自Konig和Skerra的ELISA方案进行的 (Konig T, Skerra A. Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. J Immunol Methods 1998;218:73-83) 来检测与人血清白蛋白 (HSA) 和小鼠血清白蛋白 (MSA) 的结合。在室温下孵育1小时,然后用200μl含有0.1% Tween20的PBS进行三次洗涤步骤,所述PBS也是用于稀释病毒和抗体的缓冲液。

[0206] 用200μl稀释在PBS中的2mg/mL HSA或BSA (Sigma) 包被96孔板。用稀释在含0.5% Tween20的PBS中的2mg/mL BSA封闭塑料表面上的剩余结合位点。在接着的步骤中,加入50μl体积的纯化病毒。测试三种不同量的病毒蛋白,来检测结合 (25、2.5和0.25ng病毒蛋白) (图5A)。使用伯乐蛋白 (Bio Rad Protein) 测定法,对纯化的病毒样品的病毒蛋白浓度进行定量。用来自2Hx-2杂交瘤 (ATCC®HB-8117™) 上清液(每孔50μl,1/5稀释)的抗六邻体的抗体,以及缀合有辣根过氧化物酶的山羊抗小鼠的多克隆抗体 (50μl/孔,1/2000稀释),进行病毒检测。每孔加入100μl新鲜混合的3,3',5,5'-四甲基联苯胺过氧化物酶底物溶液,振荡孵育15分钟,对孔进行染色。加入100μl 2N的硫酸终止反应,并且测量450nm处吸光度。

[0207] 用200μl稀释在PBS中的2mg/mL BSA、HSA或MSA (Sigma) 包被96孔板,并测试25ng病毒蛋白以检测结合,来进行相同的实验。包括没有病毒的对照模拟组 (图5B)。

[0208] 体外抗体介导的中和测定.在感染(使用荧光素酶-GFP报道子腺病毒的转导)和复制水平(有复制能力的腺病毒介导的细胞毒性)上分析抗体介导的中和。使用商业抗体Ab6982(抗-Ad5的兔多克隆抗体,Abcam)作为中和抗体。对于感染性分析,从1/100稀释抗体储液开始,在96孔板中的含有不同腺病毒(AdGL或AdGL-ABD)的培养基中进行抗体的1/6系列稀释。

[0209] 在室温孵育1小时后,每孔加入1E5HEK293细胞或3E4Sk-me128细胞,以获得所需的感染复数(对于HEK293细胞为0.5TU/细胞或10vp/细胞,对于Sk-me128细胞为40vp/细胞)。感染后24小时,除去培养基,加入50μl细胞裂解试剂(Promega, Madison, WI)裂解细胞并冻融一次。裂解物经13000g 4℃离心5分钟,并在发光计(Berthold Junior, Berthold GmbH& Co, KG, 德国)中使用荧光素酶测定试剂(Promega)测量上清液的荧光素酶活性。

[0210] 对于复制的分析,从1/100稀释抗体储液开始,进行抗体的1/2系列稀释。该系列稀释使用含有ICOVIR15或ICOVIR15-ABD的培养基进行。在室温与抗体孵育一小时后,每孔加入3E5A549细胞以获得600vp/细胞的感染复数。在感染后第4天,通过如上在材料和方法部分中的“体外细胞毒性测定”里描述的对总蛋白含量进行染色,来分析细胞活力。

[0211] 体内血液清除率.体内研究在ICO-IDIBELL院(巴塞罗那,西班牙)AAALAC部门1155进行,并获得IDIBELL的动物实验伦理委员会批准。Balb/C nu/nu雌性小鼠静脉内注射ICOVIR15和ICOVIR15-ABD(比例为1:1)的混合物,总剂量为 $5 \times 10^{10}$ vp,体积为PBS中的10ml/kg (n=5)。在给药后5分钟、15分钟、1小时、4小时和24小时,从尾静脉中收集血液样品。将血液样品在4℃、5000g离心5分钟,以分离细胞组分并收集血清。用蛋白酶K和SDS在54℃保持45分钟,然后在90℃保持10分钟来消化血清样品,以对衣壳进行蛋白水解并释放病毒DNA。使用六邻体HVR1-侧翼寡核苷酸Ad19121F 5'-CTGGACATGGCTCCACGTA-3' (SEQ ID NO:25) 和Ad19300R 5'-GCTCGTCTACTCGTCTCG-3' (SEQ ID NO:26),通过PCR扩增经消化的样品,通过1%琼脂糖凝胶电泳进行分析。因为ICOVIR15-ABD在HVR1的中间插入了ABD,所以PCR产物的大小较长:预期来自ICOVIR15-ABD的PCR产物为361bp,而来自ICOVIR15的PCR产物为199bp。

[0212] 体内抗肿瘤功效.通过将 $1 \times 10^7$ Sk-me128细胞注射到6周龄雌性Balb/C nu/nu小鼠的侧腹中,建立皮下黑色素瘤异种移植肿瘤。当肿瘤达到 $150\text{mm}^3$ (实验第0天)时,将小鼠随机分组(每组n=10至12只动物),以10ml/kg的体积(在PBS中)通过尾静脉单次静脉内给药注射PBS或 $5 \times 10^{10}$ vp的ICOVIR15或ICOVIR15-ABD。每周监测肿瘤尺寸和小鼠状态三次。肿瘤体积用数字卡尺来测量,并定义为方程 $V(\text{mm}^3) = \pi/6 \times W^2 \times L$ ,其中W和L分别是肿瘤的宽度和长度。通过双尾未配对t检验评估治疗组之间肿瘤尺寸差异的统计学显著性。

[0213] 体内转导.6周龄雌性C57BL6小鼠(每组n=4~6只动物)的两侧腹皮下植入 $1 \times 10^6$ 个B16-CAR细胞建立黑色素瘤。当肿瘤达到 $100\text{mm}^3$ 时,向小鼠腹膜内注射PBS(空白组)或 $2 \times 10^{10}$ vp hAd5wt(预免疫组)。免疫后7天,以每只小鼠 $3 \times 10^{10}$ 个病毒颗粒的剂量,单次静脉内给药PBS、AdGL或AdGL-ABD来注射动物。载体注射后三天,小鼠接受腹膜内注射250μL D-荧光素(15mg/mL; Biosynth, Staad, 瑞士),并且处死小鼠以收获肝脏和肿瘤用于生物发光成像(IVIS)。将器官在IVIS Lumina XR(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA)上进行成像,并使用Living Image v4.0软件对光发射进行定量。

[0214] 结果

[0215] ICOVIR15-ABD的产生和表征.为了产生白蛋白结合的腺病毒,将来自链球菌属细菌的G蛋白的白蛋白结合结构域3 (SEQ ID NO:1) 插入ICOVIR15六邻体的HVR1中,产生溶瘤腺病毒ICOVIR15-ABD (图1和图2)。该结构域两侧通过的两个连接子 (GSGS) (SEQ ID NO:2) 插入在HVR1中间的D150氨基酸之后,同时不缺失六邻体的任何序列(图1)。

[0216] 为了分析ABD插入对病毒复制的影响,我们比较了ICOVIR15和ICOVIR15-ABD在A549细胞中的复制动力学。如图3所示,尽管两种病毒的生产动力学相似,但能看出ICOVIR15-ABD的总产量下降。还分析了病毒在体外杀死癌细胞的能力。在存在或不存在HSA的情况下,在HEK293、A549、Sk-me128和MCF-7细胞中进行了细胞毒性实验。IC<sub>50</sub>值表明病毒在测试的四种细胞系的三种细胞系之间没有显著差异,而在MCF-7细胞中,ICOVIR15-ABD的IC<sub>50</sub>比ICOVIR15增加3倍,这表明细胞毒性在这一细胞系中有一定的损失(图4)。在任何情况下添加HSA都不影响细胞毒性。

[0217] 进行ELISA实验,以证明ICOVIR15-ABD与HSA和MSA的结合。用MSA、HSA或BSA(需注意ABD与MSA和HSA结合,但不与BSA结合)包被孔,并分析ICOVIR15或ICOVIR15-ABD两种病毒的结合情况。当ICOVIR15-ABD添加到HSA包被的孔(图5A)或MSA包被的孔(图5B)中时都获得阳性信号,并且信号强度随着所用病毒量的增加而增加(图5A)。当使用BSA(而不是使用HSA或MSA)时,不管所加入的病毒量如何都观察不到信号,这表明病毒可以结合人白蛋白和鼠白蛋白,但不结合牛白蛋白。如所预期的,在任何情况下都没有检测到ICOVIR15病毒的结合。

[0218] 白蛋白结合在体外使腺病毒免受中和抗体的中和.在已经证明ICOVIR15-ABD与人白蛋白结合的情况下,发明人测试了这种结合是否可以在体外使病毒免于被中和抗体(NAb)的中和。为此,构建了表达在六邻体上经ABD修饰的GFP-荧光素酶融合蛋白的腺病毒载体,该腺病毒载体被称为AdGL-ABD。在存在和不存在HSA的情况下,在与商业中和抗体Ab6982(抗Ad5的兔多克隆抗体)的系列稀释液孵育后,研究HEK293细胞中AdGL-ABD的转导效率。如图6所示,不管是否与白蛋白孵育,非修饰的AdGL载体都有着相似的转导水平。相比之下,HSA保护AdGL-ABD免于被中和。有趣的是,即使在不与白蛋白孵育时,AdGL-ABD相比未修饰的载体AdGL而言中和更少,这表明仅仅用ABD修饰HVR1已经排除了一些NAb的结合。

[0219] 此外,还分析了在中和抗体存在下病毒杀死癌细胞的能力。为此,在存在和不存在HSA的情况下,用提前与系列稀释的中和抗体Ab6982孵育的ICOVIR15或ICOVIR15-ABD感染A549细胞,并在感染后4天分析细胞存活。在不存在人白蛋白的情况下,两种病毒示出相似的杀死肿瘤细胞的能力(图7),并且看出ICOVIR15-ABD的细胞毒性仅少量增加,这可能是由于在转导中观察到的对中和抗体的某种逃避(图6)。重要的是,当将人白蛋白加入到培养基中时,ICOVIR15-ABD的细胞毒性与ICOVIR15的细胞毒性相比显著增强,其中,ICOVIR15的细胞毒性保持不变。

[0220] ICOVIR15-ABD显示出增加的血浆半衰期.为了研究白蛋白结合能否降低血液中腺病毒的快速清除,研究了ICOVIR15-ABD在体内全身给药后的药代动力学。用ICOVIR15和ICOVIR15-ABD的混合物(比例为1:1)注射小鼠并在不同时间点收集血液样品,其中每只小鼠的总剂量为 $5 \times 10^{10}$ 个病毒颗粒。通过PCR扩增血清样品中的六邻体HVR1。由于ABD的插入,用ICOVIR15-ABD获得361bp的条带,而用ICOVIR15获得的条带大小仅为199bp。因此,通过比较各个时间点条带的相对强度,可以确定哪种病毒在血流中持续更久。图8显示了所有样品

的PCR反应的电泳结果,这些样品包括具有若干比率的ICOVIR15-ABD:ICOVIR15 (0.2、1、5、10和50) 标准样,注射前的对照,和水阴性对照。注射前的组和注射后5分钟获得强度相等的条带。从那时起,可看出条带强度的变化,对应于ICOVIR15-ABD的条带变得比ICOVIR15的条带颜色深。在注射后1小时,两种病毒的差异留存时间明显有利于ICOVIR15-ABD。这些数据表明,注射5分钟后,ICOVIR15比ICOVIR15-ABD更快地从血流中清除,证明了ABD-修饰的病毒的药代动力学得到改善。

[0221] 体内全身给药后ICOVIR15-ABD的抗肿瘤活性.在证明了ICOVIR15-ABD的血浆半衰期增加之后,测试这是否反应为全身给药后抗肿瘤功效增加。以 $5 \times 10^{10}$ 个病毒颗粒/小鼠的单次静脉内剂量,向携带Sk-me128(黑色素瘤)异种移植物肿瘤的小鼠注射磷酸盐缓冲盐水(PBS)、ICOVIR15或ICOVIR15-ABD。在治疗后第38天,由于PBS治疗的肿瘤尺寸大而处死动物。与PBS相比,两种病毒都能显著降低肿瘤生长(图9)。然而,可看出ICOVIR15-ABD治疗从第21天直到治疗结束肿瘤生长都有统计学上的减小,而ICOVIR15直到第35天才在统计学上控制肿瘤生长。在第38天处死动物时,ICOVIR15诱导了1.4倍的减小,相比之下,ICOVIR15-ABD诱导了2倍的减小。

[0222] 白蛋白结合保护腺病毒在体内免受抗HAd5的预免疫.通过腹膜内注射hAd5wt的 $2 \times 10^{10}$ 个病毒颗粒或PBS(预免疫或空白组),免疫携带B16-CAR黑色素瘤的有免疫能力的C57BL6小鼠。7天后,小鼠接受 $3 \times 10^{10}$ 个病毒颗粒/小鼠的单次静脉内剂量的PBS、AdGL或AdGL-ABD。载体注射三天后处死小鼠,并且收获肝脏和肿瘤用于体内生物发光成像(IVIS)。载体在空白( naïve )动物的肝脏和肿瘤转导之间没有观察到显著差异(图10)。值得注意的是,当动物被预免疫时,未修饰的AdGL载体被完全中和,因为肝脏和肿瘤的转导完全消除。相反,AdGL-ABD在肝脏和肿瘤中能保持相同的转导水平,这表明免于抗HAd5的预免疫。

[0223] 在高变区5中插入ABD.为了测试这种插入是否也可以在六邻体的其他高变区中进行,我们构建了AdGL-H5-ABD载体。用pAdZGL-H5-ABD质粒转染HEK293细胞以产生AdGL-H5-ABD病毒。转染后一周,收获细胞和上清液,并通过三次冻融循环进行裂解。通过噬菌斑测定,确定含病毒的细胞提取物在HEK293细胞中的滴度。对应稀释1E6、1E7和1E8的孔示于图11中,其中噬菌斑证明了病毒增殖是明显的。通过病毒基因组测序证实HVR5中插入了ABD。这证明了ABD可插入其他高变区中,且不影响病毒存活。

[0224] ABD插入高变区5中不能使腺病毒免受中和抗体的中和.为了检查插入在高变区5中的ABD是否也使腺病毒免受中和抗体的中和,我们比较了在存在或不存在HSA的情况下,与Ab6982NAb的系列稀释物孵育后,HEK293细胞和Sk-me128细胞中的载体AdGL、AdGL-H1-ABD和AdGL-H5-ABD的转导效率。如图6中所观察到的,与HSA的孵育为AdGL-H1-ABD向两个细胞系的转导提供了明显优势,而对未修饰的AdGL载体没有重要的影响(图12)。令人惊讶的是,添加人白蛋白没有提高AdGL-H5-ABD的转导水平。这表明ABD在插入HVR1中时是有功能的,而在插入HVR5中时是没有功能的。

- [0001] 序列表  
[0002] <110> 贝尔韦什生物医学研究学会 (IDIBELL)  
[0003] 加泰罗尼亚肿瘤研究所  
[0004] <120> 包括白蛋白结合部分的腺病毒  
[0005] <130> P10559PC00  
[0006] <150> EP 14382162  
[0007] <151> 2014-04-30  
[0008] <160> 26  
[0009] <170> PatentIn版 3.5  
[0010] <210> 1  
[0011] <211> 36  
[0012] <212> PRT  
[0013] <213> 链球菌  
[0014] <400> 1  
[0015] Cys Glu Trp Asp Glu Ala Ala Thr Ala Leu Glu Ile Asn Leu Glu Glu  
[0016] 1 5 10 15  
[0017] Glu Asp Asp Asp Asn Glu Asp Glu Val Asp Glu Gln Ala Glu Gln Gln  
[0018] 20 25 30  
[0019] Lys Thr His Val  
[0020] 35  
[0021] <210> 2  
[0022] <211> 4  
[0023] <212> PRT  
[0024] <213> 人工序列  
[0025] <220>  
[0026] <223> 连接子  
[0027] <400> 2  
[0028] Gly Ser Gly Ser  
[0029] 1  
[0030] <210> 3  
[0031] <211> 3021  
[0032] <212> DNA  
[0033] <213> 人工序列  
[0034] <220>  
[0035] <223> 具有插入在HVR1中的ABD的经完全修饰的腺病毒六邻体  
[0036] <400> 3  
[0037] atggctaccc cttcgatgat gccgcagtgg tcttacatgc acatctcgcc ccaggacgcc 60  
[0038] tcggagtacc tgagccccgg gctgggtgcag tttgcccggc ccaccgagac gtacttcagc 120  
[0039] ctgaataaca agtttagaaa ccccacggtg ggcgcctacgc acgacgtgac cacagaccgg 180  
[0040] tcccagcggt tgacgctgct gttcatccct gtggaccgtg aggatactgc gtactcgtac 240  
[0041] aaggcgcggc tcaccctagc tgtgggtgat aaccgtgtgc tggacatggc ttccacgtac 300

[0042] tttgacatcc gcggcggtgct ggacaggggc cctacttttta agccctactc tggcaactgcc 360  
 [0043] tacaacgccc tggctccaa gggtgccca aatccttgcg aatggatga agctgctact 420  
 [0044] gctcttggaaa taaacctaga agaagaggac ggcagcggat ccctggccga ggctaaggtg 480  
 [0045] ctgcgaacc gggaaactaga caaatacggt gtttctgatt attacaagaa ttgattaac 540  
 [0046] aatgccaaaa ccgtcgaggg cgtaaaggct ctgatcgacg aaatacttgc ggccctaccc 600  
 [0047] gggctggta gcgatgacaa cgaagacgaa gtagacgagc aagctgagca gcaaaaaact 660  
 [0048] cacgtatttg ggcaggcgcc ttattctggta ataaatattt caaaggaggg tattcaaata 720  
 [0049] ggtgtcgaag gtcaaacacc taaatatgcc gataaaacat ttcaacctga acctcaaata 780  
 [0050] ggagaatctc agtggtaacgaa aacagaaatt aatcatgcag ctggagagt cctaaaaaag 840  
 [0051] actaccccaa tgaaccatg ttacggttca tatgcaaaac ccacaaatga aatggaggg 900  
 [0052] caaggcattc ttgtaaagca acaaataatgaa aagcttagaaa gtcaagtggaa aatgcaattt 960  
 [0053] ttctcaacta ctgaggcagc cgaggcaat ggtgataact tgactcctaa agtggattt 1020  
 [0054] tacagtgaag atgttagat agaaacccca gacactcata tttcttacat gccactatt 1080  
 [0055] aaggaaggtta actcacgaga actaatggc caacaatcta tgcccaacag gcctaattac 1140  
 [0056] attgctttta gggacaattt tattggtcta atgtattaca acagcacggg taatatgggt 1200  
 [0057] gttctggcgcc gccaagcattc gcagttgaat gctgtttagt atttgcaga cagaaacaca 1260  
 [0058] gagctttcat accagctttt gcttgattcc attggtgata gaaccaggta cttttctatg 1320  
 [0059] tggaaatcagg ctgttgacag ctatgatcca gatgttagaa ttattgaaaa tcatggaaact 1380  
 [0060] gaagatgaac ttccaaatattt ctgctttcca ctggaggtg tgattaatac agagactctt 1440  
 [0061] accaaggtaa aacctaaaac aggtcaggaa aatggatggg aaaaagatgc tacagaattt 1500  
 [0062] tcagataaaa atgaaataag agttggaaat aattttgccca tggaaatcaa tctaaatgcc 1560  
 [0063] aacctgtgga gaaatttccct gtactccaac atagcgctgt atttgcggca caagctaaag 1620  
 [0064] tacagtcctt ccaacgtaaa aatttctgat aacccaaacaca cctacgacta catgaacaag 1680  
 [0065] cgagtgggtgg ctcccggtt agtggactgc tacattaacc ttggagcacg ctggccctt 1740  
 [0066] gactatatgg acaacgtcaa cccatttaac caccaccgca atgctggcct ggcgtaccgc 1800  
 [0067] tcaatgttgc tggcaatgg tcgctatgtg cccttccaca tccaggtgcc tcagaagttc 1860  
 [0068] ttgcattttaaaaacccctt tctcttgcgg ggctcataca cctacgagtg gaacttcagg 1920  
 [0069] aaggatgtta acatggttct gcagagctcc ctaggaaatg acctaagggt tgacggagcc 1980  
 [0070] agcatttaagt ttgatagcat ttgcctttac gccacccctt tccccatggc ccacaacacc 2040  
 [0071] gcctccacgc ttgaggccat gcttagaaac gacaccaacg accagtcctt taacgactat 2100  
 [0072] ctctccgccc ccaacatgct ctaccctata cccgccaacg ctaccaacgt gcccatatcc 2160  
 [0073] atccccctccc gcaactgggc ggctttccgc ggctggcct tcacgcgcct taagactaag 2220  
 [0074] gaaaccccat cactgggctc gggctacgac ccttattaca cctactctgg ctctatacc 2280  
 [0075] taccttagatg gaacctttta cctcaaccac accttaaga aggtggccat tacctttgac 2340  
 [0076] tcttctgtca gctggcctgg caatgaccgc ctgcttaccc ccaacgagtt tgaaatthaag 2400  
 [0077] cgctcagttt acggggaggg ttacaacggtt gccagtgta acatgaccaa agactggttc 2460  
 [0078] ctggtaaaaaa tgcttagctaa ctataacatt ggctaccagg gcttctatat cccagagagc 2520  
 [0079] tacaaggacc gcatgtactc cttctttaga aacttccagc ccatgagccg tcaggtggtg 2580  
 [0080] gatgatacta aatacaagga ctaccaacag gtggcatcc tacaccaaca caacaactct 2640  
 [0081] ggatttggta gctacccctgc cccaccatg cgcgaaggac aggcttaccc tgcttaacttc 2700  
 [0082] ccctatccgc ttataggcaa gaccgcagtt gacagcatttta cccagaaaaa gtttcttgc 2760  
 [0083] gatgcaccc ttggcgcat cccattctcc agtaacttta tgtccatggg cgcaactcaca 2820

[0084] gacctgggcc aaaaccttct ctacgccaac tccgcccacg cgctagacat gacttttag 2880  
 [0085] gtggatccca tggacgagcc cacccttctt tatgtttgt ttgaagtctt tgacgtggc 2940  
 [0086] cgtgtgcacc agccgcacccg cggcgtcattc gaaaccgtgt acctgcgcac gcccttctcg 3000  
 [0087] gccggcaacg ccacaacata a 3021  
 [0088] <210> 4  
 [0089] <211> 3021  
 [0090] <212> DNA  
 [0091] <213> 人工序列  
 [0092] <220>  
 [0093] <223> 具有插入在HVR5中的ABD的经完全修饰的腺病毒六邻体  
 [0094] <400> 4  
 [0095] atggctaccc ctgcgtatgat gccgcagtgg tcttacatgc acatctcggg ccaggacgcc 60  
 [0096] tcggagtacc tgagccccgg gctgggtgcag tttgcccgcg ccaccgagac gtacttcagc 120  
 [0097] ctgaataaca agtttagaaa ccccacggtg ggcctacgc acgacgtgac cacagaccgg 180  
 [0098] tcccagcggt tgacgctgcg gttcatccct gtggaccgtg aggataactgc gtactcgtac 240  
 [0099] aaggcgcggt tcacccttagc tgggggtgat aaccgtgtc tggacatggc ttccacgtac 300  
 [0100] ttgacatcc gcggcgtgct ggacaggggc cctacttttta agccctactc tggcactgcc 360  
 [0101] tacaacgccc tggctccaa gggtgccca aatcctgcg aatggatga agctgctact 420  
 [0102] gctcttgaaa taaacctaga agaagaggac gatgacaacg aagacgaagt agacgagcaa 480  
 [0103] gctgagcagc aaaaaactca cgtatttggg caggcgcctt attctggat aataattaca 540  
 [0104] aaggaggta ttcaaataagg tgcgttgcgaa caaacaccta aatatgccga taaaacattt 600  
 [0105] caacctgaac ctc当地tagg agaatctcag tggtacgaaa cagaaattaa tcatgcagct 660  
 [0106] gggagagtcc taaaaaaagac taccccaatg aaaccatgtt acggttcata tgcaaaaccc 720  
 [0107] acaaatacgaaa atggagggca aggattctt gtaaagcaac aaaatggaaa gctagaaagt 780  
 [0108] caagtggaaa tgcaattttt ctcaactact gaggcagccg caggcagcgg atccctggcc 840  
 [0109] gaggctaagg tgcttgcgaa ccggaaacta gacaaatacg gtgttctga ttattacaag 900  
 [0110] aatttgatta acaatgcca aaccgtcgg ggcgttaaagg ctctgtatcga cgaaatactt 960  
 [0111] gcccctac ccgggtctgg tagccgcaat ggtgataact tgactcctaa agtggatttg 1020  
 [0112] tacagtgaag atgttagat agaaacccca gacactcata ttttttacat gcccactatt 1080  
 [0113] aaggaaggta actcactcacta actaatggc caacaatcta tgcccaacag gcctaattac 1140  
 [0114] attgctttta gggacaattt tattggtcta atgtattaca acagcacggg taatatgggt 1200  
 [0115] gttctggcgg gccaagcattc gcagttgaat gctgttgcgtt atttgcaga cagaaacaca 1260  
 [0116] gagctttcat accagctttt gcttgattcc attgggtata gaaccaggta cttttctatg 1320  
 [0117] tggaaatcagg ctgttgcacag ctatgtcca gatgttagaa ttattgaaaa tcatggaaact 1380  
 [0118] gaagatgaac ttccaaatcta ctgtttcca ctgggagggtg tgattaatac agagactt 1440  
 [0119] accaaggtaa aacctaaaac aggtcaggaa aatggatggg aaaaagatgc tacagaattt 1500  
 [0120] tcagataaaa atgaaataag agttggaaat aattttgcca tggaaatcaa tctaaatgcc 1560  
 [0121] aacctgtgga gaaatttctt gtactccaac atagcgctgtt atttgccga caagctaaag 1620  
 [0122] tacagtccctt ccaacgtaaa aatttctgtat aaccctaaaca cctacgacta catgaacaag 1680  
 [0123] cgagtgggtgg ctcccggtt agtggactgc tacattaacc ttggacgcacg ctggccctt 1740  
 [0124] gactatatgg acaacgtcaa cccatttaac caccaccgca atgctggcct ggcgtaccgc 1800  
 [0125] tcaatgttgc tggcaatgg tcgtatgtc cccttccaca tccaggtgcc tcagaagttc 1860

- [0126] tttgccatta aaaacctcct ttcctgccg ggctcataca cctacgagtg gaacttcagg 1920  
 [0127] aaggatgtta acatggttct gcagagctcc ctaggaaatg acctaagggt tgacggagcc 1980  
 [0128] agcattaagt ttgatagcat ttgccttac gccaccttct tccccatggc ccacaacacc 2040  
 [0129] gcctccacgc ttgaggccat gcttagaaac gacaccaacg accagtcctt taacgactat 2100  
 [0130] ctctccgccc ccaacatgtc ctaccctata cccgccaacg ctaccaacgt gcccataatcc 2160  
 [0131] atccccctccc gcaactgggc ggcttccgc ggctggccct tcacgcgcct taagactaaag 2220  
 [0132] gaaaccccat cactgggctc gggctacgac ccttattaca cctactctgg ctctatacc 2280  
 [0133] taccttagatg gaacctttta cctcaaccac accttaaga aggtggccat tacctttgac 2340  
 [0134] tcttctgtca gctggcctgg caatgaccgc ctgcttaccc ccaacgagtt tgaaattaag 2400  
 [0135] cgctcagttg acggggaggg ttacaacggtt gcccagtgtt acatgaccaa agactgggtt 2460  
 [0136] ctggtagaaaa tgcttagctaa ctataacatt ggcttccagg gcttctatat cccagagagc 2520  
 [0137] tacaaggacc gcatgtactc ctttttaga aacttccagc ccatgagccg tcaggtggtg 2580  
 [0138] gatgatacta aatacaagga ctaccaacag gtggcatcc tacaccaaca caacaactct 2640  
 [0139] ggatttggtg gctacccatgc cccaccatg cgcaaggac aggcttaccc tgctaacttc 2700  
 [0140] ccctatccgc ttataggcaa gaccgcgtt gacagcatta cccagaaaaa gtttctttgc 2760  
 [0141] gatgcaccc ttggcgcattt cccattctcc agtaacttta tgtccatggg cgcactcaca 2820  
 [0142] gacctgggcc aaaaccttct ctagccaaac tccgcaccccg cgcttagacat gacttttgag 2880  
 [0143] gtggatccca tggacgagcc cacccttctt tatgtttgtt ttgaagtctt tgacgtggtc 2940  
 [0144] cgtgtgcacc agccgcacccg cggcgtcatc gaaaccgtgt acctgcgcac gcccttctcg 3000  
 [0145] gccggcaacg ccacaacata a 3021  
 [0146] <210> 5  
 [0147] <211> 14  
 [0148] <212> PRT  
 [0149] <213> 人工序列  
 [0150] <220>  
 [0151] <223> 连接子  
 [0152] <400> 5  
 [0153] Ser Gly Gly Thr Ser Gly Ser Thr Ser Gly Thr Gly Ser Thr  
 [0154] 1 5 10  
 [0155] <210> 6  
 [0156] <211> 15  
 [0157] <212> PRT  
 [0158] <213> 人工序列  
 [0159] <220>  
 [0160] <223> 连接子  
 [0161] <400> 6  
 [0162] Ala Gly Ser Ser Thr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Gly Ser Thr Thr  
 [0163] 1 5 10 15  
 [0164] <210> 7  
 [0165] <211> 7  
 [0166] <212> PRT  
 [0167] <213> 人工序列

- [0168] <220>
- [0169] <223> 连接子
- [0170] <400> 7
- [0171] Gly Gly Ser Gly Gly Ala Pro
- [0172] 1 5
- [0173] <210> 8
- [0174] <211> 8
- [0175] <212> PRT
- [0176] <213> 人工序列
- [0177] <220>
- [0178] <223> 连接子
- [0179] <400> 8
- [0180] Gly Gly Gly Val Glu Gly Gly Gly
- [0181] 1 5
- [0182] <210> 9
- [0183] <211> 11
- [0184] <212> PRT
- [0185] <213> 人工序列
- [0186] <220>
- [0187] <223> 白蛋白结合肽的核心序列
- [0188] <400> 9
- [0189] Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
- [0190] 1 5 10
- [0191] <210> 10
- [0192] <211> 4
- [0193] <212> PRT
- [0194] <213> 5型人腺病毒
- [0195] <400> 10
- [0196] Lys Lys Thr Lys
- [0197] 1
- [0198] <210> 11
- [0199] <211> 4
- [0200] <212> PRT
- [0201] <213> 人工序列
- [0202] <220>
- [0203] <223> 经修饰的衣壳结构域
- [0204] <400> 11
- [0205] Arg Gly Asp Lys
- [0206] 1
- [0207] <210> 12
- [0208] <211> 56
- [0209] <212> DNA

- [0210] <213> 人工序列
- [0211] <220>
- [0212] <223> 寡核苷酸HVR1rpsLF
- [0213] <400> 12
- [0214] gccctggctc ccaagggtgc cccaaatcct tgcgaatggg gcctgggtat gatggc 56
- [0215] <210> 13
- [0216] <211> 65
- [0217] <212> DNA
- [0218] <213> 人工序列
- [0219] <220>
- [0220] <223> 寡核苷酸HVR1rpsLR
- [0221] <400> 13
- [0222] gtaatattta taccagaata aggccctgc ccaaatacgt gagttcagaa gaactcgtca 60
- [0223] agaag 65
- [0224] <210> 14
- [0225] <211> 90
- [0226] <212> DNA
- [0227] <213> 人工序列
- [0228] <220>
- [0229] <223> 寡核苷酸ABDH1F
- [0230] <400> 14
- [0231] cccaagggtg ccccaaatcc ttgcaatgg gatgaagctg ctactgctct tggaaataaac 60
- [0232] ctagaagaag aggacggcag cggatccctg 90
- [0233] <210> 15
- [0234] <211> 49
- [0235] <212> DNA
- [0236] <213> 人工序列
- [0237] <220>
- [0238] <223> 寡核苷酸ABDR1
- [0239] <400> 15
- [0240] cccggttcgc aagcacctta gcctggcca gggatccgct gccccattc 49
- [0241] <210> 16
- [0242] <211> 49
- [0243] <212> DNA
- [0244] <213> 人工序列
- [0245] <220>
- [0246] <223> 寡核苷酸ABDF2
- [0247] <400> 16
- [0248] gcttgcgaac cggaaactag acaaatacgg tggatctgtat tattacaag 49
- [0249] <210> 17
- [0250] <211> 50
- [0251] <212> DNA

- [0252] <213> 人工序列
- [0253] <220>
- [0254] <223> 寡核苷酸ABDR2
- [0255] <400> 17
- [0256] cgacggttt ggcatttta atcaaattct tgtaataatc agaaacaccg 50
- [0257] <210> 18
- [0258] <211> 50
- [0259] <212> DNA
- [0260] <213> 人工序列
- [0261] <220>
- [0262] <223> 寡核苷酸ABDF3
- [0263] <400> 18
- [0264] atgccaaaac cgtcgagggc gtaaaggctc tgcgtacgaa aatacttgcg 50
- [0265] <210> 19
- [0266] <211> 50
- [0267] <212> DNA
- [0268] <213> 人工序列
- [0269] <220>
- [0270] <223> 寡核苷酸ABDR3
- [0271] <400> 19
- [0272] atacgtgagt gctaccagac ccgggttaggg ccgcaagtat ttcgtcgatc 50
- [0273] <210> 20
- [0274] <211> 91
- [0275] <212> DNA
- [0276] <213> 人工序列
- [0277] <220>
- [0278] <223> 寡核苷酸ABDH1R
- [0279] <400> 20
- [0280] cagaataagg cgcctgccc aatacgtgag tttttgctg ctcagcttgc tcgtctactt 60
- [0281] cgtttcggtt gtcatcgcta ccagaccgg g 91
- [0282] <210> 21
- [0283] <211> 58
- [0284] <212> DNA
- [0285] <213> 人工序列
- [0286] <220>
- [0287] <223> 寡核苷酸H5rpsLF
- [0288] <400> 21
- [0289] gaaagctaga aagtcaagt gaaatgcaat ttttctcaac tggcctggat atgatggc 58
- [0290] <210> 22
- [0291] <211> 62
- [0292] <212> DNA
- [0293] <213> 人工序列

- [0294] <220>
- [0295] <223> 寡核苷酸H5rpsLR
- [0296] <400> 22
- [0297] gttctatat ctacatctc actgtacaat accacttag gtcagaagaa ctcgtcaaga 60
- [0298] ag 62
- [0299] <210> 23
- [0300] <211> 138
- [0301] <212> DNA
- [0302] <213> 人工序列
- [0303] <220>
- [0304] <223> 寡核苷酸ABDH5F
- [0305] <400> 23
- [0306] ctggccgagg ctaaggtgct tgcgAACCGG gaactagaca aatacggtgt ttctgattat 60
- [0307] tacaagaatt tgattaacaa tgccaaaacc gtcgagggcg taaaggctct gatcgacgaa 120
- [0308] atacttgccg ccctaccc 138
- [0309] <210> 24
- [0310] <211> 138
- [0311] <212> DNA
- [0312] <213> 人工序列
- [0313] <220>
- [0314] <223> 寡核苷酸ABDH5R
- [0315] <400> 24
- [0316] ctggccgagg ctaaggtgct tgcgAACCGG gaactagaca aatacggtgt ttctgattat 60
- [0317] tacaagaatt tgattaacaa tgccaaaacc gtcgagggcg taaaggctct gatcgacgaa 120
- [0318] atacttgccg ccctaccc 138
- [0319] <210> 25
- [0320] <211> 20
- [0321] <212> DNA
- [0322] <213> 人工序列
- [0323] <220>
- [0324] <223> 寡核苷酸Ad19121F
- [0325] <400> 25
- [0326] ctggacatgg cttccacgta 20
- [0327] <210> 26
- [0328] <211> 20
- [0329] <212> DNA
- [0330] <213> 人工序列
- [0331] <220>
- [0332] <223> 寡核苷酸Ad19300R
- [0333] <400> 26
- [0334] gctcgtctac ttcgcttcg 20

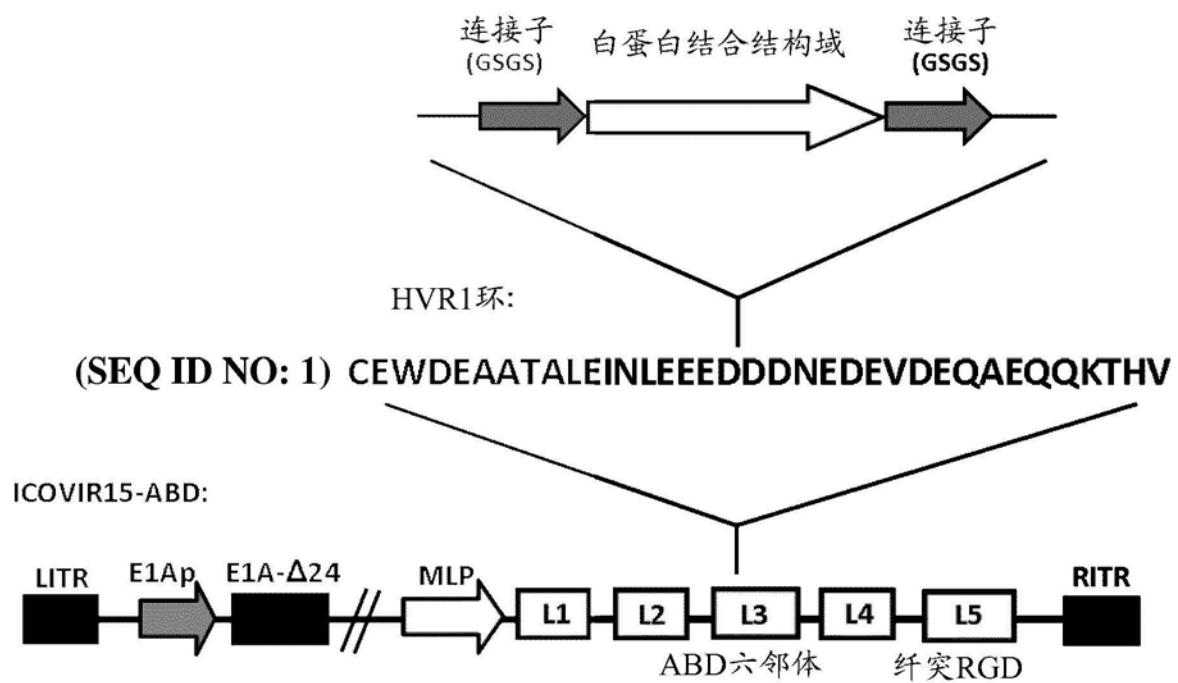


图1

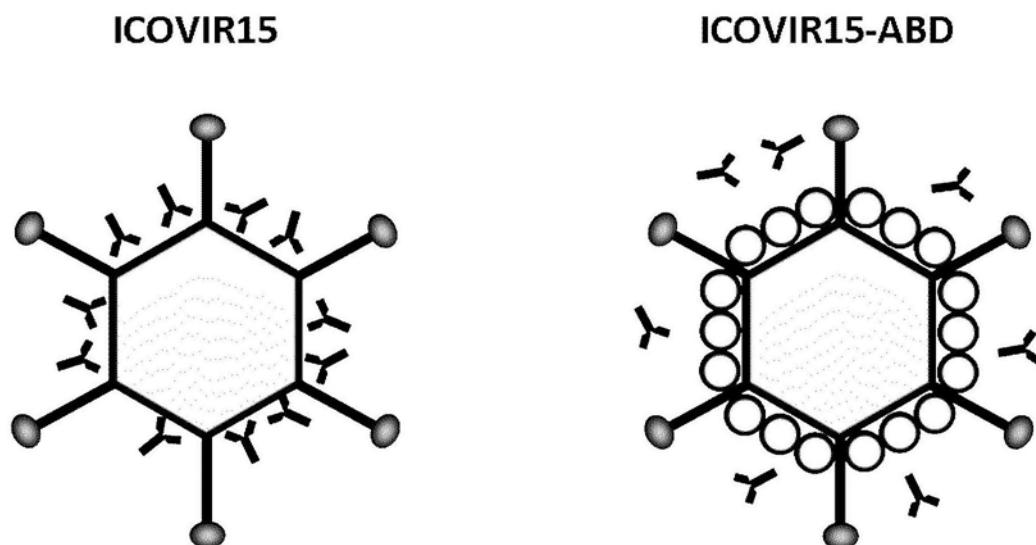
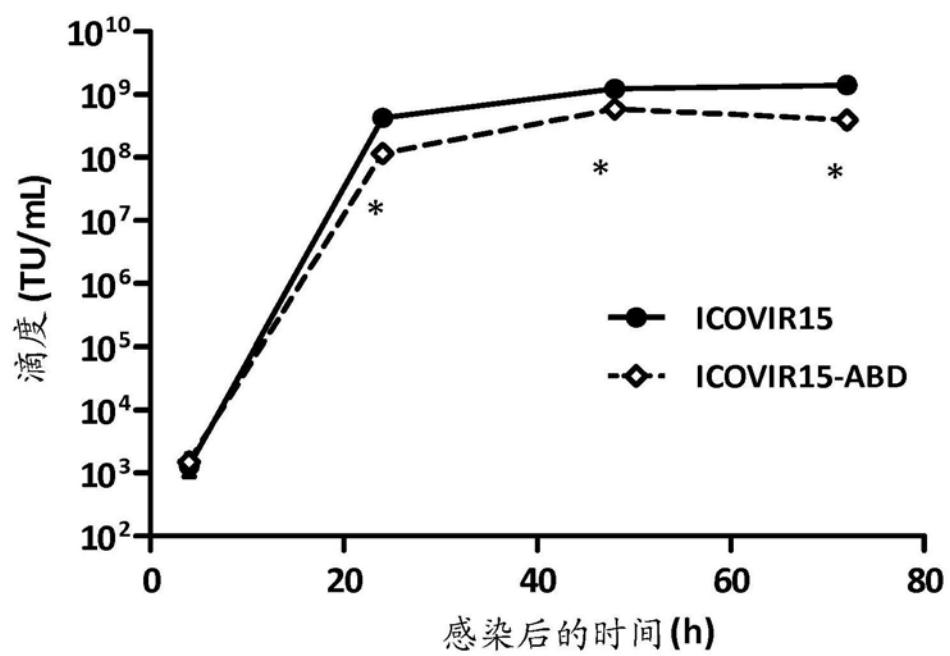


图2



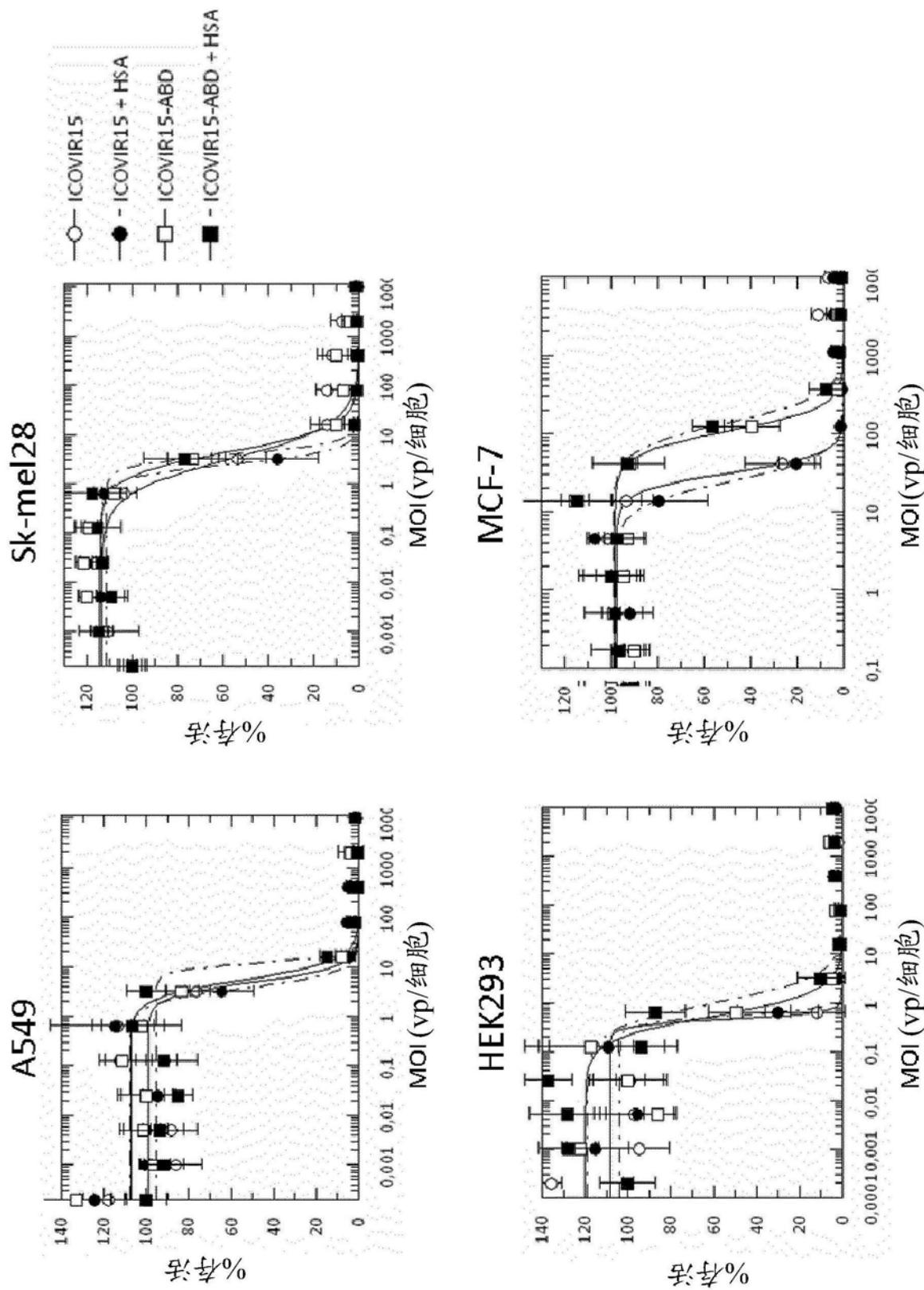
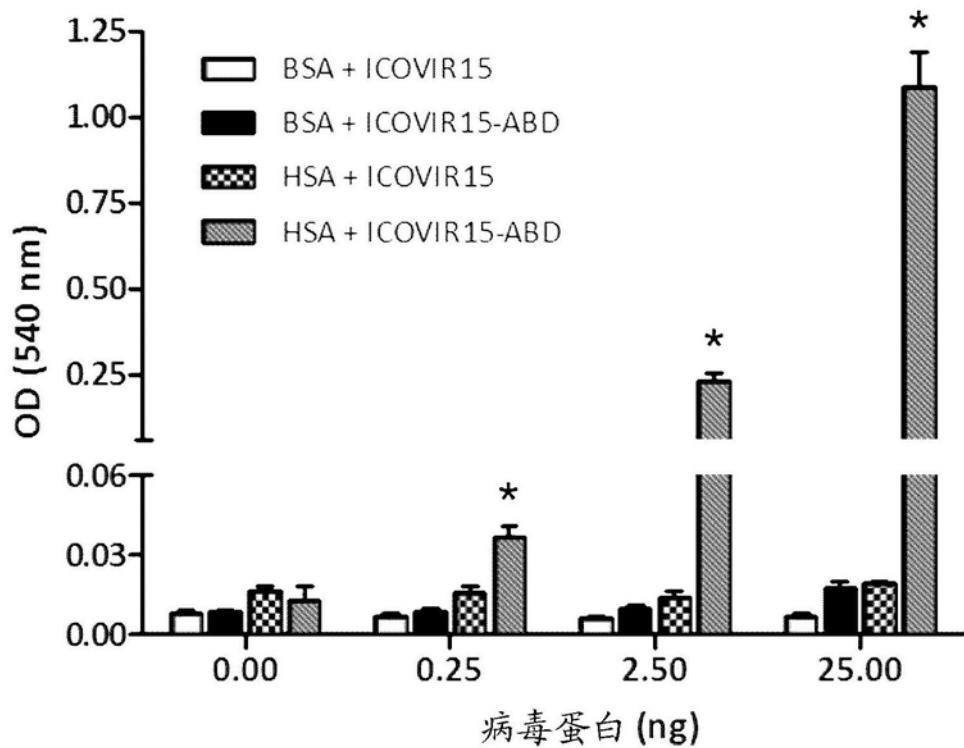


图4

A)



B)

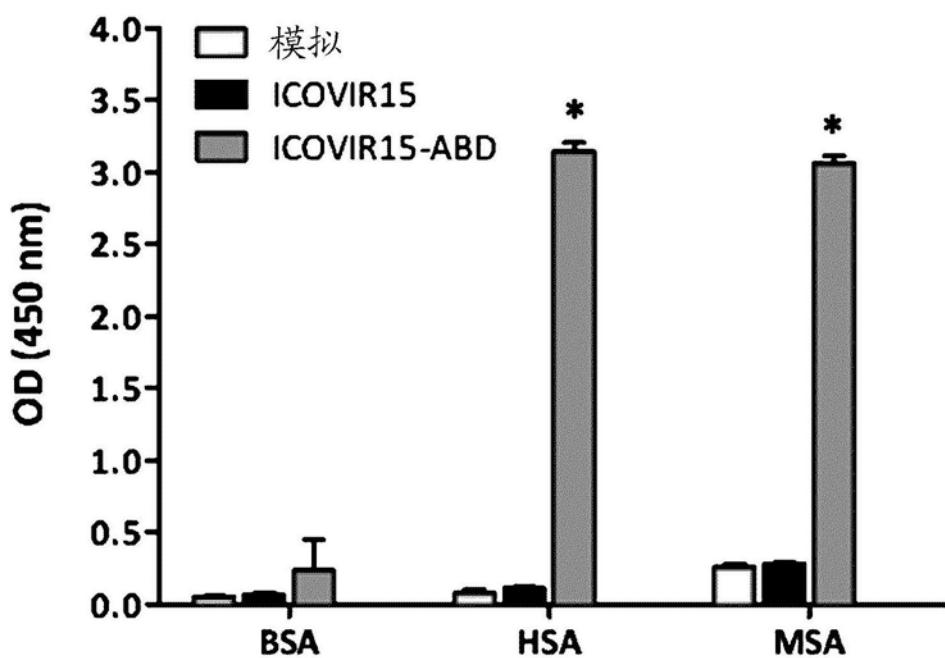


图5

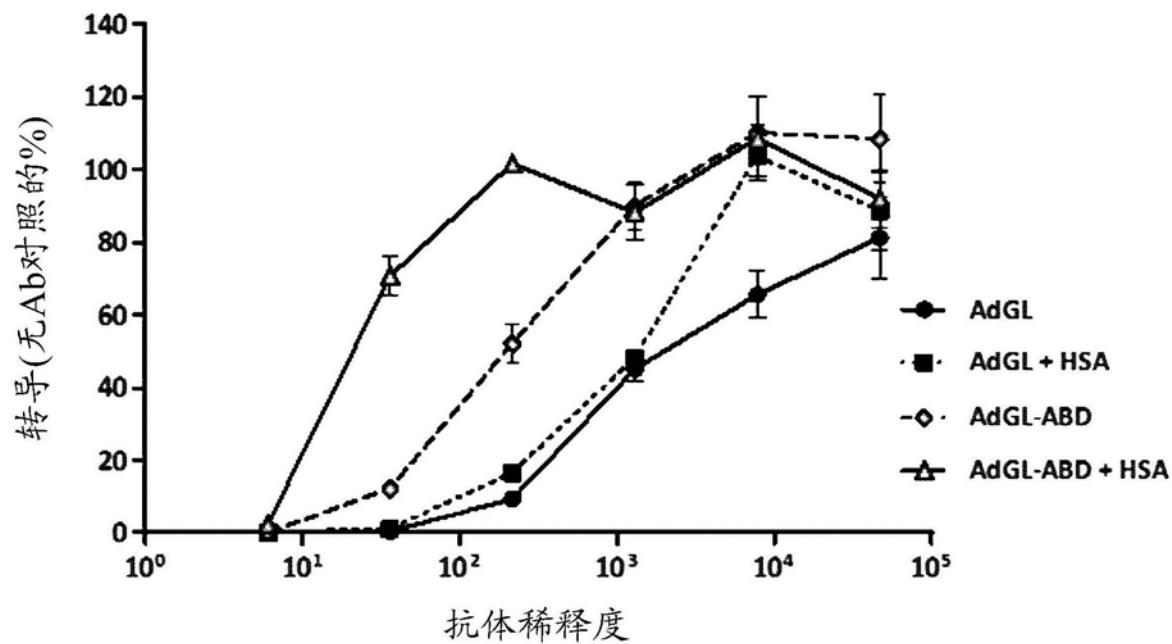


图6

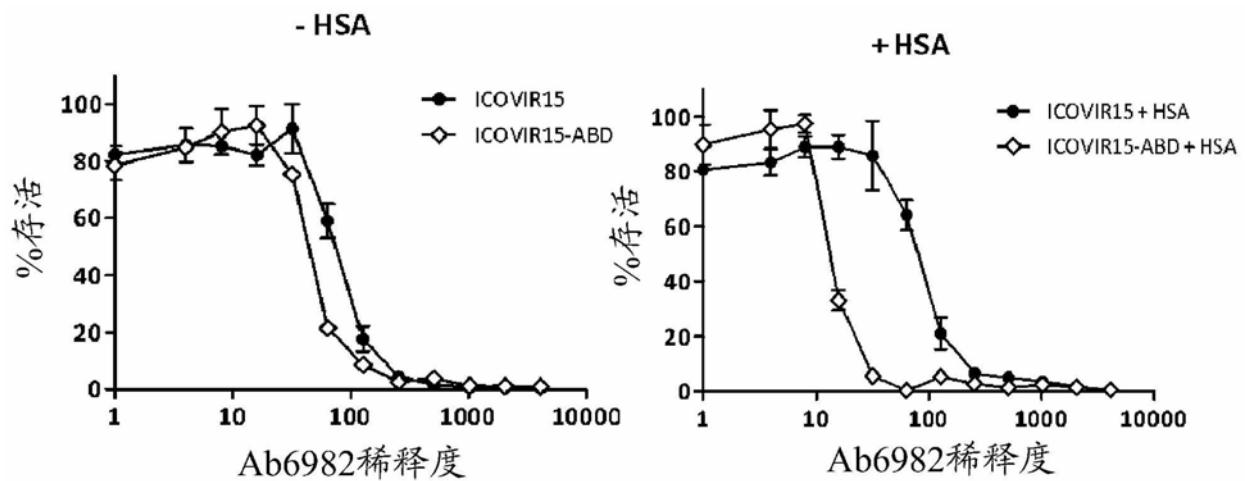


图7

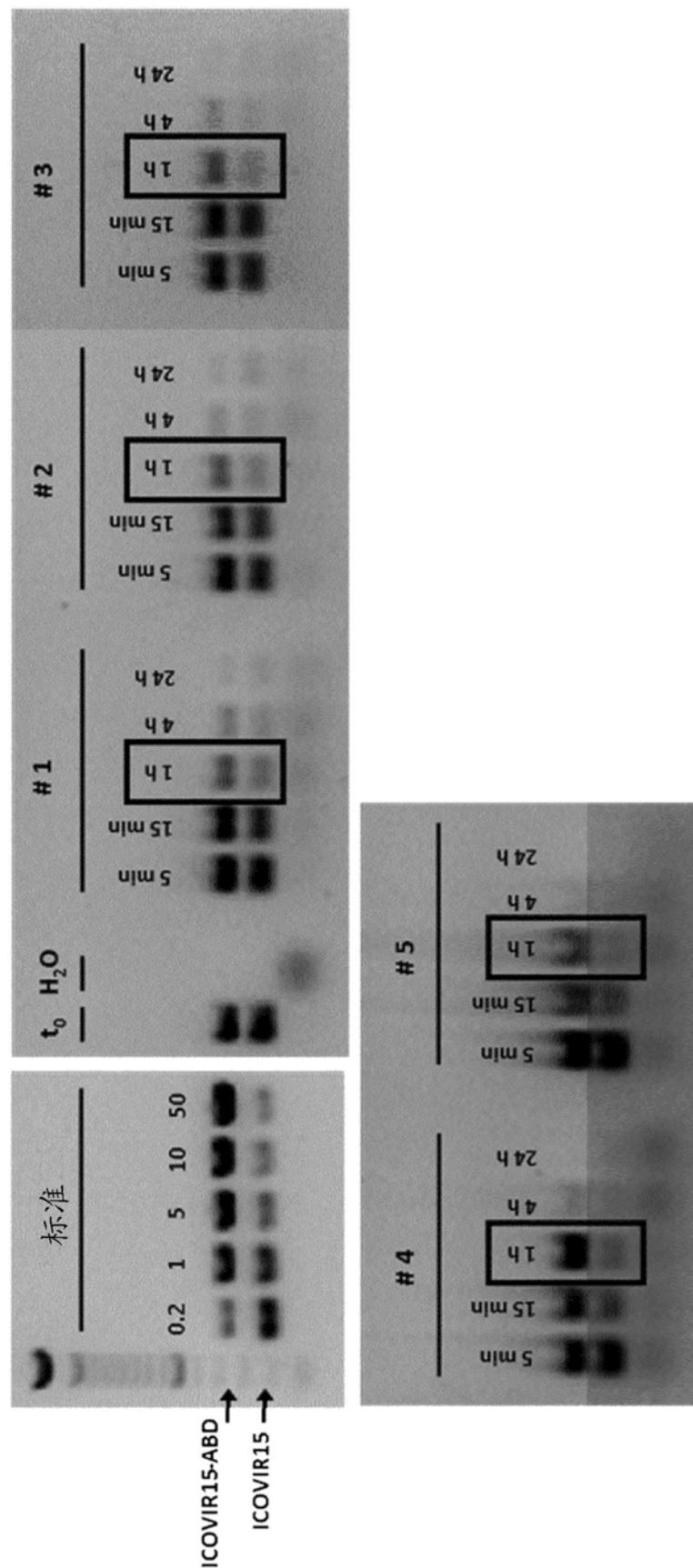


图8

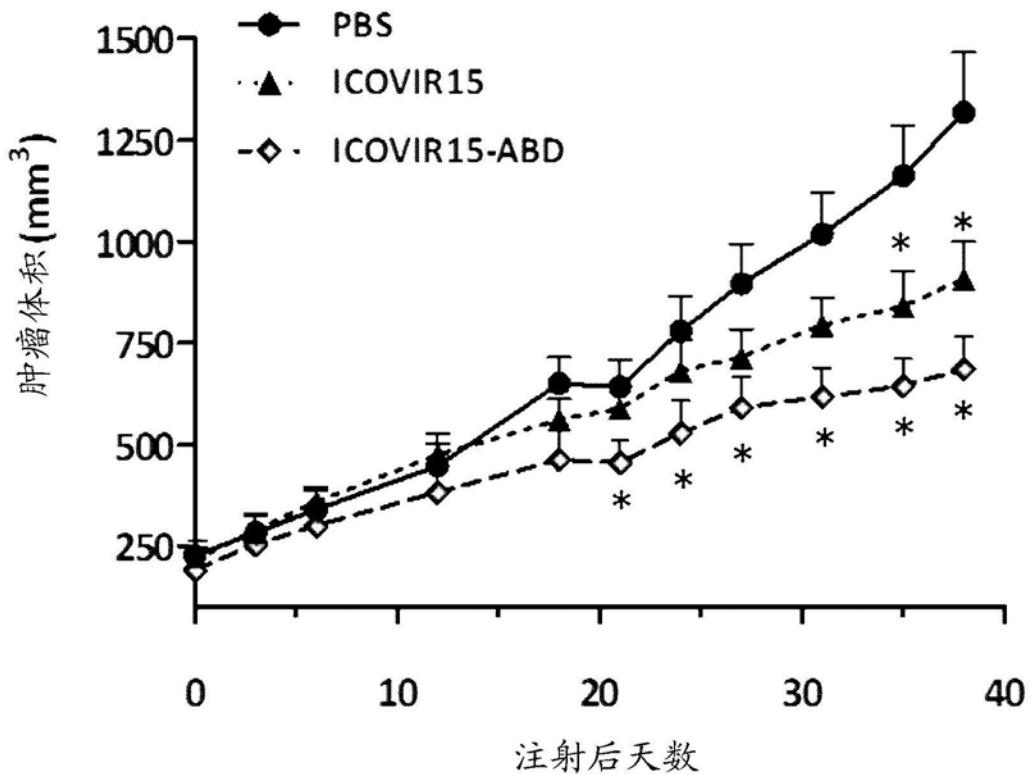


图9

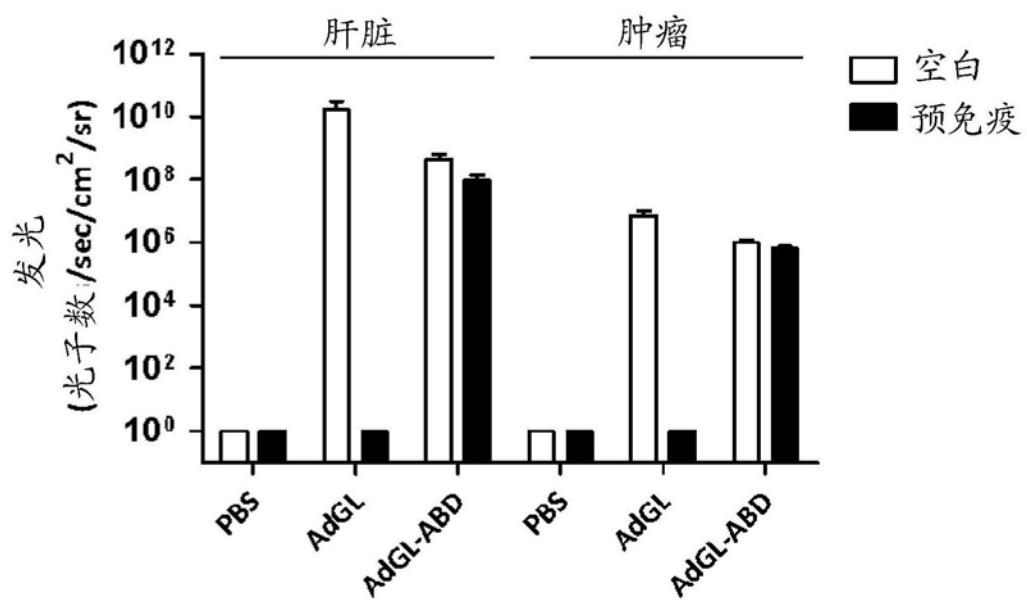


图10

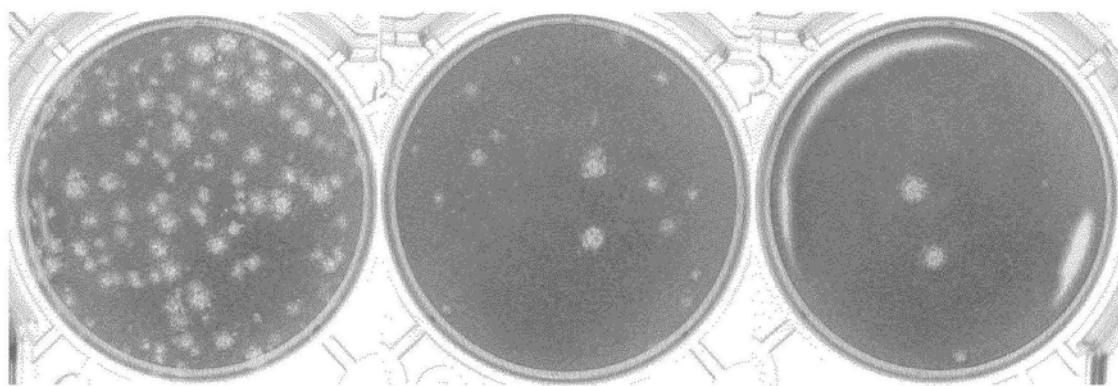


图11

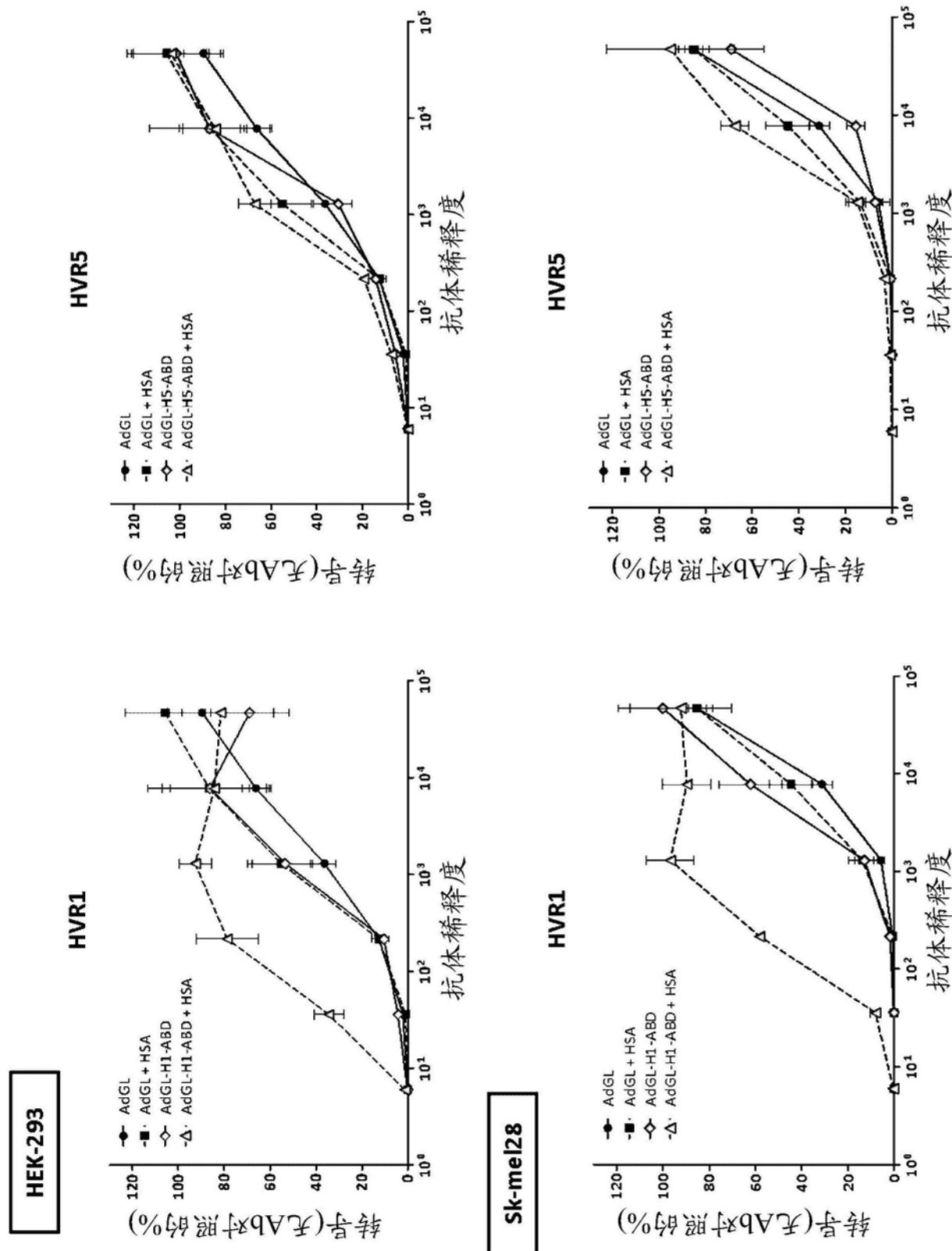


图12