



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102174536 B

(45) 授权公告日 2013. 02. 13

(21) 申请号 201110054202. 0

(22) 申请日 2004. 10. 04

(30) 优先权数据

PCT/EP03/50679 2003. 10. 02 EP

(62) 分案原申请数据

200480028695. 9 2004. 10. 04

(83) 生物保藏信息

ECACC 04100101 2004. 10. 01

ECACC 04100102 2004. 10. 01

(73) 专利权人 克鲁塞尔荷兰公司

地址 荷兰莱顿

(72) 发明人 罗纳德·福格尔斯

门佐·扬斯·埃姆科·哈文戈

戴维·A·T·M··祖伊德格斯特

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路 林晓红

(51) Int. Cl.

C12N 15/34 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 5994128 A, 1999. 11. 30,

WO 03031633 A2, 2003. 04. 17,

WO 0240665 A2, 2002. 05. 23,

审查员 潘天耀

权利要求书 1 页 说明书 22 页

序列表 9 页 附图 22 页

(54) 发明名称

用于重组腺病毒的包装细胞

(57) 摘要

在重组腺病毒载体与包装细胞的基因组之间没有实质上的序列重叠的情况下,辅助病毒依赖性含E1颗粒(helper dependent E1-containing particles, HDEP) 可以以低频率形成。本发明提供了降低或防止HDEP产生的方式和方法。为此,本发明提供了新的包装细胞和产生它们的方法。

1. 一种包含编码腺病毒 E1A 蛋白及至少一种腺病毒 E1B 蛋白的核酸序列的重组分子, 其特征在于所述编码 E1A 蛋白的核酸序列与编码至少一种 E1B 蛋白的核酸序列间隔至少 8kb, 或者一套至少两种核酸分子, 其中当该套至少两种核酸分子通过端到端连接形成一个单一分子时将形成所述重组分子。

2. 权利要求 1 的重组分子或一套至少两种核酸分子, 其中所述编码 E1A 蛋白的核酸序列与编码至少一种 E1B 蛋白的核酸序列间隔至少 10kb。

3. 权利要求 2 的重组分子或一套至少两种核酸分子, 其中所述编码 E1A 蛋白的核酸序列与编码至少一种 E1B 蛋白的核酸序列间隔至少 34.5kb。

4. 权利要求 1-3 任一项的重组分子或一套至少两种核酸分子, 其中所述分子或所述至少两种核酸分子是线性的。

5. 包含权利要求 1-3 任一项的重组分子或一套至少两种核酸分子的细胞。

6. 权利要求 5 的细胞, 其中重组核酸分子或至少两种核酸分子整合进所述细胞的基因组。

7. 权利要求 6 的细胞, 其基因组中包含腺病毒 E1A 及 E1B-55K 和 E1B-19K 编码序列, 其中对于基因组中所述 E1A 和 E1B 编码序列的任何拷贝而言, 所述 E1A 和至少一种所述 E1B 编码序列间隔至少 8kb。

8. 权利要求 7 的细胞, 其中对于基因组中所述 E1A 和 E1B 编码序列的任何拷贝而言, 所述 E1A 和至少一种所述 E1B 编码序列间隔至少 10kb。

9. 权利要求 8 的细胞, 其中对于基因组中所述 E1A 和 E1B 编码序列的任何拷贝而言, 所述 E1A 和至少一种所述 E1B 编码序列间隔至少 34.5kb。

用于重组腺病毒的包装细胞

[0001] 本申请为申请日为 2004 年 10 月 4 日、申请号为 200480028695.9、发明名称为“用于重组腺病毒的包装细胞”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及分子和细胞生物学领域,更特别涉及包装细胞及其在产生成批的重组腺病毒中的应用。

[0003] 发明背景

[0004] 复制缺陷的重组腺病毒在例如基因治疗及免疫接种目的中是有用的。它们通常缺少腺病毒的 E1 区域,并因此在提供 E1 序列的互补细胞上增殖。所述包装细胞(packaging cell)提供了被包装在细胞内以形成重组病毒颗粒的载体复制需要的所有信息。包装细胞例如是 293 细胞,其包含腺病毒 5 基因组的第 1-4344 位核苷酸(Louis et al,1997),所述核苷酸包括 5'反向末端重复(ITR)、包装信号、E1A 和 E1B 编码序列及 pIX 编码序列。包装细胞和载体中腺病毒序列之间的重叠可引起这些序列之间的同源重组,导致有复制能力的腺病毒(RCA)产生(Lochmuller et al.,1994)。这个问题已经通过使用由通过缺少这种重叠序列而彼此匹配的细胞系和载体组成的包装系统解决(Fallaux et al,1998;美国专利 5,994,128)。这种应用中特别有用的细胞系例如是 PER.C6[®]细胞系(美国专利 5,994,128;Nichols et al,2002)。

[0005] 最近报道了基于 PER.C6[®]细胞和包含与 PER.C6[®]基因组中 E1 序列仍具有 177bp 序列同源性的载体的联合应用,一个单交换事件可导致辅助病毒依赖性有复制能力的病毒以低频率产生(Murakami et al,2002)。产生的非典型 RCA 称为辅助病毒依赖性含 E1 颗粒(helper-dependent E1 containing particle,HDEP)。正如所期望的,当使用缺少与 PER.C6[®]细胞基因组中 E1 序列重叠的序列的载体时,避免了这种类型颗粒的出现(Murakami et al,2002)。

[0006] 然而,当前出乎意料地出现当使用匹配的载体和 PER.C6[®]细胞的系统时,一些批次的重组腺病毒以极低频率被可在缺少 E1 序列的细胞中导致致细胞病变(CPE)的颗粒污染。这种颗粒是辅助病毒依赖性的并且包含 E1 序列,并且因此也是 HDEP。这个 HDEP 是在载体与包装细胞之间没有实质同源性的情况中产生的(见 Murakami et al,2004)。虽然 RCA 作为潜在问题而由管理机构所公认并且各批次用于临床的 RCA 的检测是强制性的(USDHHS,FDA,CBER.Guidance for Industry,Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy,March 1998),但 HDEP 安全性还不清楚。HDEP 不能复制,因为其缺少自主复制必需的病毒基因并因此 HDEP 在宿主中不传播。然而在同一细胞中存在重组载体或野生型腺病毒可导致 HDEP 的拯救和传播的理论可能性不能被完全排除。因此,至少潜在地需要在重组腺病毒颗粒批量生产期间防止产生包含 E1 的颗粒的方式和方法。为此,本发明提供了制备新的细胞系的方法、新的细胞系及其在批量生产无 RCA 和无 HDEP 的重组腺病毒载体中的应用。

[0007] 附图简述

- [0008] 图 1 :pIG. E1A 的图谱。
- [0009] 图 2 :pIG. E1AB21 的图谱。
- [0010] 图 3 :pE1B 的图谱。
- [0011] 图 4 :pCC. E1A 的图谱。
- [0012] 图 5 :pCC. E1AB21 的图谱。
- [0013] 图 6 :pCC101 的图谱。
- [0014] 图 7 :pCC105 的图谱。
- [0015] 图 8 :pCC. 55Kco1 的图谱。
- [0016] 图 9 :pIG. E1B 的图谱。
- [0017] 图 10 :pCC. E1Bco1 的图谱。
- [0018] 图 11 :pEC. E1B 的图谱。
- [0019] 图 12 :pSC. 55K 的图谱。
- [0020] 图 13 :适于转化原代细胞的大分子的设计实例。
- [0021] I :具有侧翼为间隔 DNA (spacer DNA) 的 E1A 和 E1B 蛋白编码区 (分别为 A 和 B) 的单粘粒载体的示意图。RE = 在所述间隔 DNA 或 E1 序列中不存在的限制酶识别位点。
- [0022] II :具有侧翼为间隔 DNA 的 E1A (A) 或 E1B (B) 编码区的两个单独核酸 (例如质粒或粘粒载体) 的示意图。
- [0023] III :在用 I 的分子或者 II 的两种分子转化并整合进原代细胞的宿主细胞基因组后可能发生的情况。在所述宿主基因组中,插入体由通过间隔 DNA 分隔的 E1A 区域和 E1B 区域及反向的该片段 / 这些片段的第二个拷贝组成。J :反向重复之间的连接处。如果这些序列的一部分 (箭头所指) 重组在重组腺病毒中,则基因组变得太大而不能被包装。ITR :反向末端重复,Φ :包装信号,FI :插入重组病毒中的片段,在此包括反向重复序列。尽管反向重复的存在可协助从病毒基因组中删除其它序列的后续必需步骤,但是反向重复序列的存在导致在病毒基因组复制期间重组病毒的左端镜像复制,并且产生还是由于间隔 DNA 的存在而太大以至不能被包装的基因组 (复制的片段,DF)。
- [0024] 图 14 :pIG. E1A. E1B 的图谱。
- [0025] 图 15 :pCC200 的图谱。
- [0026] 图 16 :pCC205 的图谱。
- [0027] 图 17 :pdys44 的图谱。
- [0028] 图 18 :p44-1. ccE1A 的图谱。
- [0029] 图 19 :来自产生的细胞系的蛋白质裂解物的 Western 印迹。泳道 1 :HER01-B-71,泳道 2 :HER01-H-86,泳道 3 :HER01-H-87,泳道 4 :HER01-H-88,泳道 5 :HER01-H-89,泳道 6 :HER01-B-90,泳道 7 :HER01pn06 细胞,泳道 8 :PER. C6 细胞。
- [0030] 图 20 :E1 缺失的腺病毒载体与转化的细胞克隆互补的实证。 - :阴性对照 ;MOF :平均荧光 ;B-71、B-90、H-86、H-87、H-88、H-89 :所产生的转化的细胞克隆。
- [0031] 图 21 :用于实施例 3 中的转染的 Ad5. E1 构建体的示意图。图中标示了用于消化基因组 DNA 及用于产生探针片段的限制位点。假定 E1A 和 E1B DNA 片段与在包含 E1 的片段的 5' 末端开始编号的核苷酸连接。
- [0032] 图 22 :本发明的一些实施方案的示意图 (不按比例)。调节序列 (如启动子和

polyA 信号) 未描述。

[0033] A. 腺病毒基因组的 E1 区域的天然构型 :E1A 后接 E1B, E1B 由 E1B-19K 和 E1B-55K 组成。在 E1A 和 E1B 之间不存在间隔序列。通过在这种构型中导入 DNA 构建了现有技术的包装细胞, 并因此在所述包装细胞基因组中也具有这种构型的 E1 区域。

[0034] B. 本发明的两个最简单的可能构型, 其中 E1 区域中存在间隔 (或填充片段)。

1. 在 E1A 与 E1B-19K 之间导入的填充片段。
2. 在 E1B-19K 与 E1B-55K 之间导入的填充片段。

这是为了与天然情况相对比增加 E1A、E1B-19K 和 E1B-55K 之间的距离, 从而降低这三个开放读框同时被摄取到一个腺病毒颗粒中的可能性或完全防止这种摄取 (防止 RCA 和 HDEP)。所述填充片段应该是至少 4kb 以获得本发明的细胞系, 所述细胞在其基因组中包含腺病毒 E1A 及 E1B-55K 和 E1B-19K 编码序列, 特征在于所述细胞基因组中缺少 E1A 和两个 E1B 编码序列间隔少于 4kb 的核苷酸序列节段。所述开放读框的顺序无关紧要, 只要它们均以存在 E1A、E1B-19K 和 E1B-55K 表达的方式存在于基因组中即可。因此, 所述顺序可以是 E1A-E1B/19k-E1B/55k、E1B/19k-E1B/55k-E1A、E1B/55k-E1B/19k-E1A、E1B/55k-E1A-E1B/19k 或 E1B19k-E1A-E1B55k。当 E1B/19k 与 E1B/55k 相邻时, 它们可以作为一个单一转录单位或者作为分开的转录单位而存在, 这对于本发明无关紧要。这两个构型 (1 和 2) 都能产生满足本发明这个间隔标准的细胞系。至少为 6、8、10、15 或 34.5kb 的填充片段长度可以产生本发明的在基因组中具有所有三个开放读框但缺少其中所述 E1A 和两个 E1B 编码序列间隔少于 6、8、10、15 或 34.5kb 的核酸序列节段的细胞。这意味着与 A 中的情况相反, 当包含 E1A+E1B-19K+E1B-55K 的一个片段来自所产生的细胞的基因组时, 这个片段应至少为 7kb (填充片段 4kb)、9kb (填充片段 6kb) 等, 直至至少 37.5kb (填充片段 34.5kb), 而在 A 的情况中, 这些序列可见于用这种构建体产生的包装细胞的基因组中仅 3kb 的片段中 (E1A+E1B-19K+E1B-55K 开放读框包含大约 3kb)。

[0035] C. B 的原理的延伸 : 由于 B 所示片段可以彼此相邻整合, 因此在本发明的优选实施方案中填充片段也可置于 E1A 之前和 / 或 E1B 之后 (防止第一个重复的 E1B 与第二个重复的 E1A 紧密相近)。图中示出了所得包装细胞的基因组, 其中当在串联重复中彼此相邻整合时 E1 区域的两个拷贝之间有填充片段 DNA。本发明的这些包装细胞在其基因组中整合进了 E1A 和 E1B-19K 及 E1B-55K, 但基因组中不包含其中所述 E1A 和两个 E1B 编码序列之间间隔少于 4kb 等的核酸节段, 这取决于填充片段的长度 (在这个实施例中 E1A 与 E1B-19K 之间 (no. 1) 或者 E1B-19K 与 E1B-55K 之间 (no. 2) 应为至少 4kb, 并且位于 E1A 上游至少 2kb 及 E1B-55K 下游 2kb (当直接相邻整合时为 4kb))。

[0036] 发明描述

[0037] 本发明描述了产生包含腺病毒 E1A 和 E1B 序列的包装细胞的方法, 其中 E1A 与至少一个 E1B 编码区域在所述细胞的基因组中是彼此分隔的。为此, 本发明提供了至少三个实施方案。在第一个实施方案中, E1A 和 E1B 可以在不同时间导入前体细胞中, 减少 E1A 和 E1B 共同整合在相同染色体位置上的机会。在第二个实施方案中, 通过将 E1A 和 E1B 编码序列在缺少可导致这些序列之间同源重组的重叠序列的两个不同分子上导入前体细胞中而减少共同整合在相同基因座上的机会。在第三个实施方案中, E1A 和至少一个 E1B 编码区通过一个核酸分子导入, 在所述核酸分子上这些序列以特定距离分隔。应该清楚在第三个实施方案中, 也可以不是一个核酸分子而是两或多个核酸分子被导入, 其应满足 E1A 和

至少一个 E1B 编码区以特定距离相间隔的标准,以防止这两或多个分子例如通过连锁、重组等方式形成一个分子。所得包装细胞特征在于 E1A 和两个 E1B 编码区彼此以一定距离存在,并因此减少了 E1A 和两个 E1B 编码序列一起掺入在这种包装细胞上增殖的重组腺病毒基因组中的机会。

[0038] 本发明提供了一种制备能互补 E1 缺陷的腺病毒载体而不产生辅助病毒依赖性含 E1 颗粒的细胞的方法,包括如下步骤:a) 将编码 E1A 基因功能和 E1B 基因功能的核酸序列导入前体细胞或祖细胞中,或者如果所述前体细胞已经包含一种 E1A 或 E1B 基因功能,则导入编码另一种 E1A 和 E1B 基因功能的核酸序列;b) 选择或鉴别具有获得的 E1A 和 E1B 的细胞,其中所述 E1A 和 E1B 以当所述细胞被用于互补一或多种 E1 基因功能缺陷的重组腺病毒载体时防止辅助病毒依赖性含 E1 颗粒形成的染色体构型存在,所述载体缺少可能导致同源重组的与位于染色体上的 E1 序列实质上重叠的核酸序列。

[0039] 一方面,本发明提供了一种制备在基因组中具有腺病毒 E1A 和 E1B-19K 及 E1B-55K 编码序列的细胞,其中包含所述序列的核酸序列被导入前体细胞中,所述方法特征在于:a) 包含所述序列的至少两个核酸分子一起被导入所述前体细胞中,其中所述 E1A 和至少一个 E1B 编码序列存在于不同的核酸分子上,其在不同的时间被导入所述前体细胞中,其中所述前体细胞不是幼大鼠肾细胞;或者 b) 包含 E1A 编码序列的核酸分子和包含 E1B 编码序列的核酸分子被导入所述前体细胞中,其中所述核酸分子缺少可导致在所述至少两个分子之间同源重组的实质上的重叠;或者 c) 所述包含 E1A 和至少一个 E1B 编码序列的核酸序列在一个核酸分子或者当这些序列会形成一个单一核酸分子时它们在两或多个核酸分子上间隔至少 4kb。优选地,在实施方案 c) 中,所述序列间隔至少 10kb,更优选至少 34.5kb 或者更多。优选地,所述分隔序列是非 E1 序列,由此非常不可能或不能发生 E1A 和 E1B 的表达盒整合在一个单一病毒基因组中。或者,当所述 E1A 和至少一个 E1B 序列间隔 0-15kb 时,可在产生的细胞中筛选缺乏 E1 序列的反向重复,以选择其中当重组腺病毒在产生的细胞中增殖时产生 HDEP 的可能性降低或不存在的细胞。本发明还提供了可以通过本发明的方法获得的细胞。本发明进一步提供了在其基因组中包含腺病毒 E1A 及 E1B-55K 和 E1B-19K 编码序列的细胞,特征在于所述细胞基因组缺少其中所述 E1A 和两个 E1B 编码序列间隔少于 4kb 的核酸序列节段。优选地,所述细胞基因组缺少其中所述 E1A 和两个 E1B 编码序列间隔少于 10kb 的核酸序列节段,更优选地,所述细胞基因组缺少其中所述 E1A 和两个 E1B 编码序列间隔少于 34.5kb 的核酸序列节段。

[0040] 本发明的另一方面提供了一种提供或产生包含腺病毒 E1 序列的细胞的方法,其中所述 E1 序列包括 E1A 和 E1B 编码序列,特征在于所述方法包括选择缺少包含所述 E1 序列的反向重复的细胞的步骤。本发明进一步提供了一种在其基因组中包含腺病毒 E1 序列的细胞,其中所述 E1 序列包括 E1A 和 E1B 编码序列,特征在于所述 E1 序列在所述基因组中不是以反向重复形式存在。在一个实施方案中,所述细胞在其基因组中包含所述腺病毒序列的至少两个拷贝,所述拷贝可以在同一染色体上。在另一个实施方案中,所述细胞在其基因组中包含所述 E1 序列的一个拷贝,并在其基因组中进一步缺少编码腺病毒(功能性)pIX 的序列。

[0041] 本发明另一方面提供了一种产生一批在 E1 区域具有缺失的重组腺病毒的方法,包括如下步骤:a) 将所述重组腺病毒导入包含能互补所述重组腺病毒缺失的 E1 序列的腺

病毒 E1 序列的细胞中 ;b) 培养所述细胞并收获所述重组腺病毒,所述方法特征在于所述细胞是根据本发明的细胞。本领域技术人员清楚不导入所述重组腺病毒,也可以通过使用能形成所述重组腺病毒基因组并且在复制后及在所述细胞中包装后形成所述重组腺病毒的一或多个核酸片段开始产生重组腺病毒。因此,对于这个实施方案,重组腺病毒也可以是所述重组腺病毒的基因组。在一个优选的实施方案中,所述重组腺病毒与所述细胞中存在的 E1 序列缺少可导致同源重组的实质上的序列重叠。在另一个实施方案中,本发明提供了一种包装系统,其包含在基因组中包含 E1 序列的包装细胞和在 E1 区域具有缺失的重组腺病毒载体,其中所述载体的基因组与所述包装细胞的基因组中的 E1 序列缺少实质上的重叠,特征在于所述包装细胞是根据本发明的细胞。

[0042] 发明详述

[0043] 有复制能力的腺病毒 (RCA) 是在细胞中不需要辅助腺病毒即可复制的腺病毒颗粒。本文所用 HDEP(helper dependent E1-containing particle) 是指包含腺病毒的至少 E1A 和 E1B-55K 编码序列的病毒颗粒,所述颗粒在缺少功能性 E1A 和 / 或 E1B-55K 的细胞中在没有“辅助病毒”存在的情况下不能复制。辅助病毒可以是野生型或突变的腺病毒,但也可以是提供 HDEP 中丧失的功能的任何腺病毒载体,并因此可以提供在包装细胞上增殖的 (E1 缺陷的) 希望的重组腺病毒产物。E1A 和 E1B 55K 序列是腺病毒增殖所必需的。HDEP 通常进一步包含 E1B-19K 编码序列。HDEP 中存在的 E1 序列应能互补重组的 E1 缺陷的腺病毒,所述重组的 E1 缺陷的腺病毒可作为 HDEP 的辅助病毒。HDEP 可以通过包装细胞和载体中 E1 序列之间的重叠引起的同源重组而产生 (Murakami et al, 2002), 但目前出乎意料地从一些研究中显示 HDEP 可以在包装细胞与载体的序列之间没有实质上的同源 / 重叠的情况中产生,即通过在此称作非同源重组的程序进行 (见例如 Murakami et al, 2004 针对 HDEP 的可能结构所述)。本文所用“实质上的重叠”是指对于同源重组足够的重叠。在本发明称为“不具有实质上的重叠”的实施方案的任何情况中,如果重叠不超过 50 个核苷酸 (nt)、优选少于 40nt,更优选少于 30nt,更优选少于 20nt,更优选少于 10nt,最优选根本不重叠,则认为达到这个条件。

[0044] 尽管 HDEP 的形成机制目前还不充分明了,但清楚 E1 序列源自包装细胞的基因组。重组腺病毒批次中 E1 序列的存在是不希望的,因为其是 RCA 或 HDEP 形式。本发明提供了使得产生 HDEP 的机会最小化的方法和方式。另外,本发明提供了制备细胞的方法并提供了所得细胞,其中所述细胞具有以这样一种染色体构型存在的 E1A 和 E1B :所述染色体构型防止 E1A 和 E1B 编码序列一起导入重组腺病毒中,并且因此当细胞用于互补 E1 缺陷的重组腺病毒载体时,并在所述载体与位于本发明的互补细胞染色体上的 E1 序列之间不具有实质上的重叠时,防止形成 HDEP。为此,本发明的一个实施方案的细胞的染色体构象是 E1A 和至少一个 E1B 编码区在新细胞的基因组中是分隔的。由于确信反向重复通过刺激腺病毒序列的缺失而有助于 HDEP 的形成,因此在本发明的另一个实施方案中提供了包含 E1A 和 E1B 编码序列的细胞,其中 E1 序列在所述包装细胞的基因组中的反向重复构象中不存在。

[0045] 本发明的细胞在其基因组中包含腺病毒 E1A 和 E1B 编码序列,优选在其基因组中包含所有功能性 E1A 和两个 E1B (E1B-55K 和 E1B-19K) 蛋白的编码序列。根据本发明, E1A 和至少一个 E1B 蛋白可以是相同或者任选是不同血清型的。

[0046] 优选地,在这些实施方案中,至少一个 E1A 和 E1B 是由分别与 E1A 和 E1B 启动子不

同的启动子调节的。

[0047] 本发明的细胞

[0048] 重组腺病毒从其增殖的细胞系中可以获取 > 20kb 的 DNA, 使得可以有效包装的腺病毒的最大基因组长度是大约 38kb (对于基于腺病毒 5 型的载体而言, 这个数字可能略微依赖于血清型)。这个特征用于制备根据本发明的新的互补细胞, 所述细胞包含 E1A 和 E1B 编码序列, 所述细胞特征在于在所述基因组中所述 E1A 和至少一个 E1B 序列间隔至少 4kb, 优选至少 10kb, 更优选至少 34.5kb。这意味着这种细胞的基因组缺少其中所述 E1A 和两个 E1B 编码序列间隔分别少于 4、10 或 34.5kb 的核酸序列节段 (见例如图 22 的示意图所示)。应清楚无论在什么情况下本发明提及在细胞基因组中两个序列间隔至少一定距离时, 当这两个序列存在于分离的染色体上时则认为达到这个要求。因此, 如本文所用, 这两个序列位于不同的染色体上的实施方案可以解释为包括在在基因组中“分开至少 x kb”或“间隔至少 x kb”的含义内。

[0049] 这种实施方案可通过本领域技术人员已知的方法简单检测, 例如通过荧光原位杂交 (FISH), 其可用于确定特定序列所在的染色体和 / 或染色体位置。

[0050] 本发明的细胞在其基因组中包含腺病毒序列, 优选所述腺病毒序列编码所有 E1 蛋白但缺少编码 pIX 或其一部分的序列 (即这种细胞优选不包含来自 pIX 开放读框的序列 (对于具有 Ad5E1 序列的细胞而言, 这意味着它们优选不包含野生型 Ad5 的第 3609-4031 位核苷酸或其一部分), 更优选它们在 pIX 启动子中也具有缺失 (对于具有 Ad5E1 序列的细胞而言, 优选自第 3550 更优选自 3525 位核苷酸下游无 pIX 启动子序列), 以防止与具有在其自身启动子控制下的 pIX 的腺病毒载体明显重叠。包装细胞基因组中不存在 pIX 序列有助于防止所述基因组与重组腺病毒载体之间的重叠 (美国专利 5,994,128)。

[0051] 本发明的细胞可衍生自永生化的细胞如 A549、HeLa 等, 在这种情况下需要选择标记以确定细胞。优选地, 本发明的细胞衍生自原代细胞, 在这种情况下通过 E1A 和 E1B 转化活性提供选择 (见实施例)。在优选的方面, 所述细胞衍生自视网膜细胞。它们可以是任何来源的细胞, 包括人源的细胞。为增殖人腺病毒, 优选人源细胞。所述细胞例如也可以是牛源的, 以增殖重组牛腺病毒 (美国专利 6,379,944)。细胞的来源可以由本领域技术人员选择, 以与所选择的重组腺病毒相容。

[0052] 一方面, 所述细胞衍生自原代人视网膜细胞 (也称作 HER 细胞)。具有腺病毒 E1 序列的这种细胞的永生化例如在美国专利 5,994,128, Byrd 等 1982、1988 及 Gallimore 等 1986 所述。原代 HER 细胞可分离自胚胎 (Byrd et al, 1982, 1988)。在其它实施方案中, 所述细胞衍生自原代人胚胎肾细胞 (见例如 Graham et al, 1977)。在另外的实施方案中, 所述细胞衍生自原代羊水细胞, 如人原代羊水细胞 (见例如美国专利 6,558,948 对于具有腺病毒 E1 序列的原代羊水细胞永生化的方法所述)。

[0053] 细胞的产生

[0054] 本发明的细胞可以通过将腺病毒 E1A 和 E1B-55K 及 E1B-19K 编码序列导入前体细胞或祖细胞中而产生 (因此所述细胞通过向其中导入 E1 序列而衍生自前体细胞或祖细胞)。根据本发明, 所述 E1A 和至少一个 E1B 编码序列以未连锁的方式被导入所述前体细胞中。如在这种涵义下所用的“未连锁的”是指与在腺病毒中发现的 E1A 和 E1B 的天然构型即彼此直接相邻 (见例如图 14, 其中以存在于质粒 pIG. E1A. E1B 中的形式示出 E1A 和 E1B 的

天然的即连锁的构型 pIG. E1A. E1B) 不同的一种构型。注意在本发明之前, 希望获得在其基因组中包含腺病毒 E1A 和两个 E1B 编码序列的包装细胞的本领域技术人员不会设想将 E1A 和至少一个 E1B 序列以未连锁形式导入, 因为: a) 这需要更多的工作并因此不方便, b) E1A 和 E1B 序列均需要永生化。先前为了获得对 E1A 和 E1B 蛋白的转化能力的深入了解所进行的研究已经表明 E1A 和至少一个 E1B 编码序列的导入可确立克隆 (van den Elsen et al., 1982; Gallimore et al., 1986; Jochemsen et al., 1987; Rao et al., 1992; Nevels et al., 2001)。然而, 这些质粒的同时导入和 / 或导入的序列例如质粒序列、调节序列如启动子和 / 或聚腺苷酸化信号、及 E1B-55K 和 E1B-19K 重叠序列之间的重叠很可能导致 E1A 和两个 E1B 编码区共同整合在基因组中的同一基因座上。van den Elsen et al (1982) 确实观测到了这种共同整合。在一种情况中 (Jochemsen et al., 1987), 将幼大鼠肾 (BRK) 细胞首先用 E1A 转染, 然后将挑选的克隆用 E1B 质粒转染, 以研究 E1B 表达对 E1A 表达的影响。显而易见这项研究是在特殊类型的细胞上进行并因此与本申请描述的发明不相关。在本发明之前, 为了产生包装细胞, 没有分别转染 E1A 和至少一个 E1B 编码序列以产生包装细胞的理由。迄今为止没有关于在重组腺病毒的基因组与包装细胞之间不具有实质上的重叠的情况下形成 HDEP 的描述。另外, 本领域技术人员事实上被劝阻不要使用这种方法获得除了 BRK 衍生的细胞之外的细胞例如人细胞, 因为 Gallimore et al. (1986) 已经描述了人细胞通过仅表达 E1A 而仅罕见地发生形态学转化, 大多数克隆原位死亡或者分离后立即死亡。Ad12 (亚组 A) E1A 表达质粒产生一个克隆的唯一情况是在转染后 114 天鉴别并且仅可以在该克隆在培养皿中过度生长后挑取。显然, 本领域技术人员在现有技术的基础上没有理由将 E1A 和至少一个 E1B 基因在不同时间导入前体细胞中。本发明的优点在于提供了获得在其基因组中具有分隔的 E1A 和至少一个 E1B 编码序列的细胞的这些方法。在某些方面, 本发明的细胞优选不是幼大鼠肾 (BRK) 细胞。在一优选的方面, 本发明的细胞是人细胞。在一优选的方面, 所述细胞衍生自 HER 细胞。应清楚其中根据本发明导入了 E1 序列的细胞在所述导入之前在其基因组中优选没有腺病毒 E1A 和 E1B 编码序列, 只是在导入所述序列后才在其基因组中获得 E1 序列, 从而成为永生化的并且能包装 E1 区域中具有缺失的重组腺病毒。例如, W003/031633 描述了将 Ad11E1B-55k 导入 293 细胞中: 显而易见这样不能产生本发明的优点, 因为已经存在于 293 细胞中的 E1 序列保持在原始构型中并且具有与 E1A ORF 间隔不到 4kb 的 E1B ORF。相反, 本发明提供了在其基因组中产生具有腺病毒 E1A 及 E1B-19K 和 E1B-55K 编码序列的细胞的方法, 以及得自该方法的细胞, 由此包含 E1A 和至少一个 E1B 编码序列的核酸序列彼此充分分隔, 以防止细胞基因组的所有 E1A 和 E1B 序列同时导入一个单一腺病毒颗粒的基因组中。

[0055] 根据产生本发明的细胞的第一个实施方案, E1A 和至少一个 E1B 编码序列是通过将它们放置在在不同时间导入所述细胞的不同分子上而分别导入所述前体细胞中的, 并且所述前体细胞不是 BRK 细胞。在一个实施方案中, 首先导入 E1A 和 E1B-21K 编码序列, 稍后导入 E1B-55K 编码序列。

[0056] 根据产生本发明的细胞的第二个实施方案, 包含所述 E1A 和所述 E1B 编码序列的至少两个核酸分子一起导入所述前体细胞中, 特征在于所述至少两个核酸分子不具有实质上的重叠序列。确信这种重叠序列的存在至少以一些方式增强所述至少两个分子之间的相互作用, 及随后所述分子上的序列共同整合进导入所述分子的前体细胞基因组的同一基因

座的可能性,而本发明的一个目的就是解决这个问题。在一个实施方案中,至少一个 E1A 和 E1B 编码区被置于不同的异源调节序列如启动子和聚腺苷酸化序列的控制下。在另一个实施方案中,重叠的 E1B-55K 和 E1B-19K 序列是分隔的并且这些编码序列之间的所有重叠根据本领域技术人员已知的方法使用遗传密码冗余性知识通过遗传工程除去,从而使得可以独立地导入这些 E1B 编码序列并且彼此不连锁。在这个实施方案中, E1A 和 E1B 编码区的导入可以是同时进行的,例如通过共转染所述至少两个分子,但是显然也可以组合第一个和第二个实施方案,即导入至少两个分子,所述至少两个分子包含一起包含 E1A 和两个 E1B 编码序列的核酸序列,其中所述至少两个分子彼此不具有实质上的重叠,且其中所述至少两个分子在不同时间导入前体细胞。

[0057] 在第三个实施方案中,编码 E1A 和至少一个 E1B 编码序列的序列通过将它们置于一个单一核酸分子上而不连锁,其中所述 E1A 和至少一个 E1B 编码序列(显然这可以是两个 E1B 编码序列)间隔至少 4kb,优选至少 6kb,更优选至少 8kb,更优选至少 10kb,更优选至少 15kb,最优选至少 34.5kb 核酸,在本文该核酸称作“间隔(spacer)”或“填充片段(stuffer)”核酸。间隔核酸序列可以有利地具有前述间隔核酸序列的性质,特别是所述序列不具有 E1A 和 E1B 编码序列,可以组合至少部分内含子序列,并且可以包含 E1A 和/或 E1B 编码序列的调节序列。本领域技术人员随即清楚在第三个实施方案的等效变化中,所述 E1A 和至少一个 E1B 编码序列可以存在于不同的核酸分子上而不是存在于一个分子上(见例如图 13I、II,及例如实施例 3 所述),只要当所述不同的核酸分子例如通过(同源)重组或连接或末端与末端连接而形成一个单一分子时,所述序列仍间隔至少指定距离即可。这个观点在 E1A 和至少一个 E1B 编码序列当整合进前体细胞基因组时间间隔至少 4kb、优选至少 6kb、更优选至少 8kb、更优选至少 10kb、更优选至少 15kb、最优选至少 34.5kb 的情况中也是如此(见例如实施例 3 和图 21 所述)。换句话说,本发明的第三个实施方案可因此通过将包含 E1A 及 E1B-19K 和 E1B-55K 编码序列的一个核酸分子(“分子 A”)导入前体细胞中而进行,这三个编码序列的至少两个序列间隔至少 4kb(实施方案 3a);或者相等地通过导入两或多个核酸分子而进行,当这些分子形成一个单一核酸分子时将形成“分子 A”(实施方案 3b)。在第三个实施方案的某些方面,在 E1A 和 E1B 侧翼的间隔核酸之间不具有实质上的重叠序列,在 E1A 和 E1B 编码序列的调节序列中也没有实质上的重叠序列,以减少这些分隔的序列之间相互作用和可能的同源重组的机会。

[0058] 编码 E1A 和 E1B 的重组分子

[0059] 一方面,本发明提供了一种包含编码腺病毒 E1A 蛋白和至少一种腺病毒 E1B 蛋白的核酸序列的重组分子,特征在于所述编码 E1A 的核酸序列和所述编码至少一个 E1B 蛋白的核酸序列间隔至少 4kb,优选至少 10kb,更优选至少 34.5kb。这种分子可用于本发明的方法中以产生本发明的细胞。这种分子可以是本领域技术人员已知的各种形式,如质粒、粘粒、细菌人工染色体、YAC 等等。

[0060] 在一个等价的实施方案中,所述 E1A 和 E1B 蛋白编码核酸最初以单独的分子存在也是可能的。这种分子可任选通过同源重组、连接、位点特异性重组、末端与末端连接等而形成单一分子。因此本发明的一个方面提供了一套至少两个核酸分子,其包含:a) 编码腺病毒 E1A 蛋白的核酸分子,其中所述核酸分子在所述 E1A 编码序列的两侧均具有至少 5kb、优选至少 17kb 的间隔核酸序列,所述间隔核酸不编码 E1B 蛋白;b) 编码腺病毒 E1B

蛋白的核酸分子,其中所述核酸分子在所述 E1B 编码序列的两侧均具有至少 5kb,优选至少 17kb 的间隔核酸序列,所述间隔核酸不编码 E1A 蛋白。所述间隔核酸可以是任何核酸,优选其是惰性的,即不包含编码序列,优选无已知调节元件,无可导致染色体不稳定的高度重复的区域等等。优选地, E1A 编码序列侧翼的所述间隔核酸序列与 E1B 编码序列侧翼的所述间隔核酸序列不具有实质同源性。所述间隔片段可包括 E1A 或 E1B 表达盒的调节序列,如异源启动子和 / 或聚腺苷酸化位点。

[0061] 当重组分子是环形形式时,其在宿主中的增殖通常可以方便地进行。在某些方面,本发明的重组分子是线性形式。这样可以有助于前体细胞系的转染,当使用线性分子时转染通常更有效。线性化可例如通过用一或多种方便的限制酶消化重组分子而实现,如本领域技术人员所已知。

[0062] 缺少反向重复方向的 E1 序列的细胞系

[0063] 无论在包装细胞与重组腺病毒之间不具有实质上的重叠的情况中产生 HDEP 的机制如何,很可能第一个步骤是来自包装细胞基因组的 E1 序列整合进病毒基因组中。为了容纳这些额外的序列,病毒随后必须删除腺病毒序列 (Murakami et al, 2002)。当存在反向重复时,这个步骤可能更有效 (Steinwaerder et al, 1999)。PER. C6[®]细胞系在其基因组中包含用于产生该细胞系的一些 pIG. E1A. E1B 质粒的重复,这些重复中有一些彼此是反向的。因此, PER. C6[®]细胞基因组中 E1 区域的反向重复的存在可影响产生 HDEP 的频率。应注意 HDEP 颗粒的形成也可以在其它腺病毒包装细胞系中出现,但在这些细胞系中由于正统的 RCA 的出现而无法检测到。当重组腺病毒在这种包装细胞上增殖时,包装细胞系中反向重复方向的 E1 序列的不存在很可能导致较低频率的 HDEP 产生或者甚至完全不产生。

[0064] 因此当产生或选择在其基因组中包含 E1 区域的新细胞系时,可希望选择缺少反向重复,而仅具有直向重复,或者甚至 E1 序列单一整合的克隆。因此本发明的一方面提供了包含腺病毒 E1 序列的细胞及提供或产生这种细胞的方法,特征在于所述方法包括选择缺少包含所述 E1 序列的反向重复的细胞的步骤。本发明提供了在其基因组中包含腺病毒 E1 序列的细胞,其中所述 E1 序列包括 E1A 及 E1B-19K 和 E1B-55K 编码序列的至少一个功能性拷贝,特征在于所述 E1 序列 或其一部分不以反向重复形式存在于所述基因组中。在这个实施方案中,所述细胞不是 293 细胞或其衍生物。如果反向重复存在,优选这种反向重复在所述细胞中不在 10kb 以内存在,并且对于本发明而言,具有至少 10kb 的非 E1 插入序列的反向重复不再进一步被认为是反向重复。原因是当 E1 序列的一个拷贝整合在染色体的某处,反向拷贝以足够大的距离整合在同一染色体以防止在腺病毒颗粒中摄取包含这两个重复的完整 DNA 节段时,这样就没有问题了。当所述距离可能引起片段摄取时 (即 10kb),得自反向重复序列的左侧端的复制提供了太大以至于不能被包装的病毒基因组 (图 13 所例证)。病毒基因组中 E1 序列的插入位点对于 HDEP 最后的总长度是重要的。显而易见,当更多地插入病毒左侧端时,包含 E1 的基因组片段的掺入产生可包装的基因组的机会增加。如果插入位点就在最小包装信号的 3' 端,则插入体可以大如 18.5kb (包括 E1A 和 E1B 的一个拷贝及一个反向重复序列) 并且仍可包装 (假定左侧至右侧端复制包括 350bp ITR 和包装信号)。这不意味着例如 17kb 的插入体将易于产生 HDEP,因为仍产生可包装大小的病毒的这个片段的可能的掺入位点限于就在最小包装序列 3' 端的 1.5kb。因此, HDEP 产生的频率随着 E1A 与 E1B 编码区之间距离的增加而降低,并且当该距离远小于所述的 18.5kb 时仍

旧检测不到。

[0065] 在不具有反向重复序列的情况下,E1A 和 E1B 的直向插入也如此。在这种情况下,腺病毒基因组中的全部插入不能长于 37.5kb(包括大约 3kb 的 E1A 和 E1B 区),只有当直接插入在最小包装信号的 3' 端时可以如此。因此,当包装细胞基因组中 E1A 和至少一个 E1B 编码序列间隔至少 34.5kb 时,才能阻止这两个序列均插入重组腺病毒中。

[0066] 另外,完整腺病毒基因组应该在随后的步骤中删除,这个程序在不具有反向重复序列的情况中可能效力低很多(Steinwaerder et al, 1999)。在任何情况中,不管基因组中是否存在反向的 E1 序列,当 E1A 和至少一个 E1B 编码序列在基因组中是分隔的时候,则产生包含 E1A 和 E1B 序列的颗粒的机会降低。因此,在某些实施方案中,本发明的细胞的基因组中所述 E1A 和至少一个 E1B 编码序列间隔至少 4kb、6kb、8kb、10kb、12kb。在这些实施方案中,优选所述 E1 序列不以反向重复形式存在。

[0067] 优选地,所述序列间隔至少 15kb 并且无反向的 E1 序列存在,这样将保证通过将来自所述细胞系基因组中的 E1 序列导入腺病毒中而在这种细胞中产生 HDEP 的理论可能性实际上降低为零(见图 13 所示)。在其它实施方案中,所述 E1A 和至少一个 E1B 编码序列间隔至少 18kb、20kb、25kb、30kb。最优选地,所述序列间隔至少 34.5kb。这样将保证衍生自该细胞基因组的 E1A 和 E1B 的单一整合不引起 HDEP 产生。显而易见,如上所述,在某些等价的实施方案中,所述 E1A 和至少一个 E1B 编码序列存在于细胞基因组的不同染色体上。

[0068] 本领域技术人员已知筛选产生的克隆中 E1 序列的反向重复是否存在的方法,所述方法可包括 PCR、Southern 印迹、限制酶分析、Fiber-FISH 等。在使用包含 E1 基因的质粒如 pIG.E1A.E1B 质粒(美国专利 5,994,128)产生细胞克隆时,首先可确立克隆,在筛选循环中挑选缺少所述反向重复的那些克隆以进一步应用。来自所挑选的克隆的细胞然后可适当地用于产生重组腺病毒,期望这些细胞与包含所述反向重复的细胞相比,HDEP 的产生频率显著较低(或甚至不存在)。因此,本发明的另一方面提供了在其基因组中包含腺病毒 E1A 和 E1B 编码序列的细胞,特征在于所述基因组中不存在反向重复形式的所述 E1 序列。对于本发明的这个方面,由至少 10kb 的非 E1 序列间隔的序列不被认为是反向重复。在一特殊方面,所述 E1A 和 E1B 序列在所述基因组中以每个基因组至少两个拷贝存在。一方面,所述至少两个拷贝包括一个染色体上存在的至少两个拷贝。在另一个实施方案中,所述细胞在其基因组中仅包含 E1A 和 E1B 编码区的一个拷贝,同时缺少编码腺病毒 pIX 的序列。当然,在其基因组中仅包含所述 E1 序列的一个拷贝的细胞期望具有较低 HDEP 产生频率(或甚至不存在)。

[0069] 细胞的应用

[0070] 另一方面,本发明提供了一种在本发明的细胞中产生重组腺病毒的方法。这将产生与在本领域已知的系统上产生的重组腺病毒批次相比 HDEP 的频率显著降低的重组腺病毒批次,优选根本没有 HDEP。在特别优选的实施方案中,用于产生所述重组腺病毒的载体和包装细胞缺少实质上的序列重叠(即优选少于 10nt,或者更优选根本不重叠),优选无重叠,从而使得载体与包装细胞的序列之间同源重组的机会最小,产生不包含 E1 的颗粒的病毒批次(HDEP, RCA)。

[0071] 注意本发明提供的新细胞也可以如早先所述用于产生重组蛋白(WO 00/63403),及如早先所述用于产生其它(非腺病毒)病毒(WO01/38362)。

[0072] 本领域技术人员清楚转基因的血清型或性质对于本发明不是关键的。例如随即技术人员就会清楚用于产生细胞的腺病毒 E1 编码序列可以取自与在细胞上增殖的腺病毒相适应的任何方便的血清型,如 Ad5、Ad35、Ad11、Ad16、Ad49 等,或其组合,即来自一种血清型的 E1A 及来自另一种血清型的至少一个 E1B 编码序列(见例如 W002/40665)。技术人员也清楚在不偏离本发明范围或精神的范围内对本发明可以进行各种改变。现在通过如下非限制性实施例对本发明加以例证。

实施例

[0073] 除非特别说明,则本发明以本领域技术人员已知的分子生物学、细胞生物学和重组 DNA 的常规技术进行。见例如 Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FM, et al, eds, 1987; the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR2: A Practical Approach*, MacPherson MJ, Hams BD, Taylor GR, eds, 1995 所述。

[0074] 实施例 1: 使用编码 E1A 和 E1B 蛋白的单独的核酸产生互补细胞系

[0075] 腺病毒 E1 基因对原代细胞的完全形态学转化是 E1A 和 E1B 区域编码的蛋白质的组合活性的结果。对不同的 E1 蛋白在细胞溶解性感染和转化中的作用已经进行了充分研究(见 Zantema and van der Eb, 1995; White, 1995, 1996 综述)。腺病毒 E1A 蛋白是原代细胞转化所必需的。E1B-19K 和 E1B-55K 都可以抵消诱导伴随的编程性细胞死亡, 尽管通过不同的机制。尽管 E1A 区域编码一些蛋白质, 但完整的区域通常称作 E1A 编码区, 在所有实施方案中, 本文所用的“E1A 编码序列”是指编码所有 E1A 蛋白的序列。

[0076] 在啮齿动物细胞中, E1A 与 E1B-19K 或 55K 的一起的活性对于完全转化而言是足够的, 但是两种 E1B 蛋白一起表达效力增加为两倍 (Gallimore et al., 1985; Rao et al., 1992)。然而在人细胞中, E1B-55K 蛋白的活性看起来更重要, 因为观测到 E1B-55K 在确立永生化的转化的细胞系中是不可缺少的 (Gallimore et al., 1986)。在腺病毒感染和病毒增殖中, E1A 蛋白发挥激活包括 E1B 及其它早期区域的腺病毒基因的功能, 可能通过与 TATA 结合蛋白的相互作用而进行(综述参见 Zantema and van der Eb, 1995)。E1B-55K 的表达在关闭宿主蛋白合成及从细胞核将病毒编码的蛋白质选择性转运至胞质的感染晚期阶段中是重要的 (Babiss et al., 1985; Pilder et al., 1986)。缺失 E1B-55K 的腺病毒示出在非互补的人细胞系上的复制降低 (Harada and Berk, 1999)。因此, E1A 和 E1B-55K 编码的蛋白质是原代人细胞转化及病毒在人细胞中有效复制所必需的。

[0077] 非同源重组可导致包装细胞的细胞基因组中的 E1 序列掺入重组腺病毒中。最终得自最初重组的腺病毒的辅助病毒依赖性含 E1 颗粒能互补复制缺陷的载体在非互补(人)细胞上的复制, 但是不能自主复制。这种互补是由 E1A 和 E1B-55K 二者及可能的 E1B-19K 功能介导的。因此, 如果 E1A 和 E1B-55K 二者(及优选 E1B-19K)的功能在腺病毒载体中结束的机会被消除或减少, 则 HDEP 的形成将被消除或减少。

[0078] 在此我们描述了用于产生具有彼此分隔的 E1A 和 E1B-55K 区域的腺病毒包装细胞系的表达 E1A、E1A 和 E1B-19K、E1B(E1B-19K+E1B-55K) 或 E1B-55K 的功能性质粒的实例。

[0079] 先前已经描述了构建体 pIG.E1A.E1B(图 14; SEQ ID NO:1), 其包含 Ad5-E1 区

(Ad5 基因组的第 459-3510 位核苷酸 (Genbank Acc.No.M73260), 与人磷酸甘油酸激酶 (PGK) 启动子和乙型肝炎病毒聚腺苷酸化序列可操纵地连接 (美国专利 5, 994, 128)。

[0080] 构建体 pIG. E1A 的产生

[0081] 构建体 pIG. E1A 通过用 HincII 消化 pIG. E1A. E1B, 随后使用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 根据厂商指导从凝胶中纯化所得 5kb 片段而产生。将分离的片段再连接并转化进 STBL2 感受态细胞 (Invitrogen) 中产生 pIG. E1A (图 1)。这个构建体包含 Ad5 基因组的第 459-1578 位核苷酸 (Genbank Acc. No. M73260)。

[0082] 构建体 pIG. E1AB21 的产生

[0083] 将构建体 pIG. E1A 用 XbaI 和 HpaI 消化并将所得 4. 8kb 片段如上述从凝胶中分离。将构建体 pIG. E1A. E1B 用 BsrGI 消化并用 Klenow 酶 (New England Biolabs) 处理以使得 5' 突出端平端化。然后将 DNA 用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 根据厂商指导进行纯化, 随后用 XbaI 消化。将包含 E1A 和 E1B19K 编码序列的 3' 部分的所得 913bp 片段如上述从凝胶中分离。连接两个分离的片段并转化进 DH5 α -T1r 细胞 (Invitrogen) 中, 产生构建体 pIG. E1AB21 (图 2)。这个构建体因此包含 Ad5 基因组的第 459-2253 位核苷酸 (Genbank Acc. No. M73260), 从而所述 E1A 序列由 PGK 启动子驱动, 所述 E1B 启动子驱动 E1B-19K 基因。

[0084] Ad5E1B-19K 基因有时也称作 Ad5E1B-21K 基因, 因为预测的氨基酸序列构成一个 20. 6KD 蛋白质 (例如, 本申请中的一些质粒和引物用 21K 作为其名称的一部分)。

[0085] 构建体 pCR5B 的产生

[0086] 接下来如下产生包含 Ad5-E1B 区域的构建体。首先, 使用 pIG. E1A. E1B DNA 作为模板及根据厂商指导使用 Pwo DNA 聚合酶 (Roche), 使用终浓度为 3% 的 DMSO, 使用如下引物产生 PCR 片段, :

[0087] 5E1Bfor-1 :5' -CGG AAT TCG GCG TGT TAA ATG GGG CG-3' (SEQ ID NO :2)

[0088] 5E1B-rev :5' -TAG CAG GCG ATT CTT GTGTC-3' (SEQ ID NO :3)。

[0089] 扩增程序为 94°C 2 分钟, 随后进行 30 次循环 (94°C 30 秒, 50°C 30 秒及 72°C 1 分钟), 以 72°C 10 分钟结束。根据厂商指导, 将所得 481bp 扩增的片段用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化, 并与来自 PCR 克隆试剂盒 (Stratagene) 的 pCR-ScriptAmp 载体在存在 SrfI 酶的情况下连接。(平端) 连接在载体中产生两个方向的插入体, 选择具有在插入体 5' 末端 EcoRI 位点与载体 EcoRI 位点之间的最大片段的那个。这样产生了构建体 pCR5B。靶序列 (KpnI 和 EcoRI 位点 之间) 的正确扩增通过测序核实。

[0090] 构建体 pE1B 的产生

[0091] 将 pCR5B 用 KpnI 和 EcoRI 消化, 使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 从凝胶中分离 415bp 的片段。然后将构建体 pIG. E1A. E1B 用 EcoRI 和 KpnI 消化, 并将所得 5. 2kb 载体片段如上述从凝胶中分离。连接分离的片段并转化进 DH5 α -T1r 细胞 (Invitrogen) 中产生构建体 pE1B (图 3)。这个构建体中的 E1B 序列构成 Ad5 基因组的第 1642-3510 位核苷酸。

[0092] 然后测试与全长 Ad5E1 表达构建体相比, 新构建体的转化能力。为此, 分离原代人胚胎视网膜 (HER) 细胞 (见例如 Byrd et al, 1982, 1988), 并在 6cm 培养皿中接种于补加了 10% 热失活的胎牛血清 (FBS, Gibco BRL) 的 DMEM 培养基 (GibcoBRL) 中。在 60-70% 铺满

时,将细胞使用 CaPO_4 共沉淀试剂盒 (Invitrogen) 根据厂商指导用总共 $20 \mu\text{g}$ DNA/ 培养皿转染。两周后,在原代细胞单层中可见作为转化灶的转化的克隆。转化灶中的细胞示出与原代细胞显然不同的形态。表 2 描述了使用每种转染获得的转化的克隆的量。

[0093] 结果证实了先前所观测到的原代细胞可以用 Ad5-E1A 和 E1B19K 基因 (pIG. E1AB21) 转化的结果。

[0094] 应注意这些转化灶与用存在完整的 E1B 区域的转染获得的转化灶相比通常较小。同样,在挑选得自用构建体 pIG. E1AB21 转染的转化灶并接种于 96 孔平板中后,未获得持续的细胞生长,并且所有细胞均死亡。在所有其它情况中,大多数挑选的转化灶均产生存活的细胞克隆。

[0095] 由于利用 pIG. E1AB21 的转染最初会产生转化的细胞,因此可以用 E1B-55K 表达构建体再次转该细胞,例如在首次转染后 5-10 天再次转染。这样保证了获得在基因组的同一基因座上掺入这两个表达盒的细胞。

[0096] 这个实验进一步证实了通过使用 E1A 和 E1B 基因的两个单独的质粒 (pIG. E1A+pE1B) 可以产生并确立转化的细胞克隆。然而,由于这两个质粒是一起转染的并且包含相当多的序列重叠 (质粒主链和启动子 /polyA),因此 E1A 和 E1B 的整合发生在基因组的同一基因座中是可能的。

[0097] 这可以使用仅具有表达盒 (无载体序列) 并且无序列重叠的片段而避免。所述序列重叠可以通过使用具有 E1A 和 E1B 序列的两个表达构建体的不同的调节序列而从调节元件中除去,如从启动子和聚腺苷酸化 (polyA) 序列中除去。优选地,这些序列充分不同以防止可导致在同源重组过程中形成成对结构的重叠。任何启动子和 polyA 序列均可以使用。优选地,所述调节序列与来自在这些细胞上增殖的重组腺病毒的转基因的那些调节序列不同。显而易见,这仅在当特定的重组腺病毒在这些细胞上增殖晚期阶段时才可确定并且依赖于特定的重组腺病毒。因此,稍后再选择这种转基因的调节序列是方便的,以使得它们与本发明确立的细胞中 E1A 和 E1B 序列的那些调节序列不同。然而,由于许多目前可利用的重组腺病毒载体携带 CMV 启动子和 SV40polyA 序列调节的转基因,因此本文所示例的 E1A 和 E1B 构建体的优选的调节序列与 CMV 启动子和 SV40polyA 序列不同。考虑到调节问题,这些调节序列进一步优选不是病毒源的。为此,上述质粒如下述进一步修饰。

[0098] 构建体 pCC. E1A 和 pCC. E1AB21 的产生

[0099] 将 E1A 序列用如下引物扩增:

[0100] 5E1A-For :5' -CCG AAT TCG ATC GTG TAG TG-3' (SEQ ID NO :4)

[0101] 5E1A-rev :5' -CGG GAT CCA TTT AAC ACG CCA TGC AAG-3' (SEQ ID NO :5)

[0102] 反应在 pIG. E1A. E1B 模板 DNA 上使用 Pwo DNA 聚合酶 (Roche) 根据厂商指导进行,但使用终浓度为 3% 的 DMSO。PCR 程序设定为 94°C 2 分钟,随后 30 次循环 (94°C 30 秒, 58°C 30 秒及 72°C 120 秒),最后在 72°C 进行 8 分钟。所得 1.2kb 片段包含来自 Ad5 的 E1A 序列 (Genbank Acc. No. M73260 的第 459-1655 位核苷酸),侧翼为 EcoRI (5') 和 BamHI (3') 位点。

[0103] 第二个 PCR 片段使用引物 5E1A-For 及反向引物 5E1AB21-rev :5' -CGG GAT CCT CAT TCC CGA GGG TCCAG-3' (SEQ ID NO :6) 使用相同条件产生。所得 1.8kb 片段包含 Ad5 的 E1A 和 E1B-19K 序列 (Genbank Acc. No. M73260 的第 459-2244 位核苷酸),侧翼为在

EcoRI (5′) 和 BamHI (3′) 位点。将这两个 PCR 片段从琼脂糖凝胶中分离,用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 纯化,并克隆进 PCR 克隆载体 pCR-TOPOblunt (Invitrogen) 中;并核实序列。然后将该构建体用 EcoRI 和 BamHI 消化,插入的片段使用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 如上述从凝胶中分离。

[0104] 然后将每个分离的片段连接进首先用 EcoRI 和 BamHI 消化并如上述从凝胶中纯化的载体 pCC101 (见下述) 中。转化进电感受态 DH10B 细胞 (Invitrogen) 中产生构建体 pCC.E1A (图 4) 和 pCC.E1AB21 (图 5)。在这些质粒 (衍生自 WO 02/40665 所述构建体 pCC271) 中存在一个合成的聚腺苷酸化信号 (SPA)。

[0105] pCC101 的产生

[0106] 将 pCC100 (见下述) 用 XbaI 消化并将所得线性片段使用 QIAEXII 凝胶提取试剂盒如上述从凝胶中纯化。通过将寡核苷酸 X-SM-1:5′ -CTAGGTCGACCAATTG-3′ (SEQ ID NO:7) 与 X-SM-2:5′ -CTAGCAATTGGTCGAC-3′ (SEQ ID NO:8) 退火制备一个接头。为此,将 1 μg 每种寡核苷酸与 2 μl 10×NEB2 缓冲液 (NEB) 和 milliQ H₂O 混合,终体积为 20 μl。将混合物置于 98℃,在 PCR 设备中缓慢冷却至 4℃ (冷却速度为 2℃/分钟)。然后使用相对于片段 4 倍摩尔过量的接头,将退火的接头与分离的 XbaI 消化的片段连接。连接的 DNA 使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 根据厂商指导纯化,并用 XbaI 消化以除去自身连接的载体 DNA。在 XbaI 酶热失活后,将混合物用于转化 DH5 α-T1^r 感受态细胞,产生 pCC101 (图 6)。

[0107] pCC100 的产生

[0108] 将构建体 pCC271 (WO 02/40665 描述) 用 EcoRI 和 PstI 消化,并将 3kb 载体片段如上述从凝胶中分离。通过退火寡核苷酸 EcoPst-3:5′ -AAT TGA TAT CGA ATT CGC CGA GCT CGT AAG CTT GGA TCC CTG CA-3′ (SEQ ID NO:9) 与寡核苷酸 EcoPst-4:5′ -GGG ATC CAA GCT TAC GAG CTC GGC GAA TTC GAT ATC-3′ (SEQ ID NO:10) 制备接头。为此,将寡核苷酸如上述混合并通过在 98℃ 温育 2 分钟、65℃ 温育 30 分钟及在室温温育 2 小时而退火。然后将分离的载体片段与过量退火的寡核苷酸连接,并转化进 DH5 α-T1^r 感受态细胞中,产生构建体 pCC100。

[0109] pCC200 的产生

[0110] 将质粒 pBR322 (GenBank J01749.1) 用 EcoRI 消化,然后用 Klenow 酶平端化,随后用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化。在用 NheI 第二次消化后,将 4150bp 载体片段使用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 从琼脂糖凝胶中分离。相同地,将构建体 pCC100 用 BsaAI 消化,用 Klenow 酶平端化并用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化,随后用 XbaI 第二次消化并从琼脂糖凝胶中分离 350bp 片段。然后连接该片段并转化进化学感受态 STBL-2 细胞 (Invitrogen) 中,产生 pCC200 (图 15)。

[0111] pCC105 的产生

[0112] 构建体 pCC105 包含人 PGK 启动子和衍生自人 COL1A2 基因的聚腺苷酸化序列。

[0113] 首先,将 COL1A2 聚腺苷酸化序列 (Natalizio et al., 2002) 如作者所述通过 PCR 从人基因组 DNA 中扩增,使用重组 Taq 聚合酶 (Invitrogen) 和引物 COL1A2F:5′ -CAG CTA GCC TGC AGG AAG TAT GCA GAT TAT TTG-3′ (SEQ ID NO:11) 及 COL1A2R-sal:5′ -ACA CGT CGA CGG CTG GTA GAG ATG C-3′ (SEQ ID NO:12) 进行。

[0114] 同此,将公布的序列在 5' 末端由 SbfI 限制序列延伸,在 3' 末端由 SalI 限制序列延伸。将所得 PCR 片段使用 pCR-TOP04TA 克隆试剂盒 (Invitrogen) 克隆进 pCR-TOP0-TA 中。在通过测序核实插入体后,将 277bp 插入体通过用 SbfI 和 SalI 消化分离自 TOP0 载体,并用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化。相同地,将质粒 pCC101 也用 SbfI 和 SalI 消化,随后进行凝胶电泳。使用 GeneClean 试剂盒 (Bio101) 根据厂商指导从琼脂糖凝胶中分离 2965bp 载体片段。将这个载体片段以等摩尔量与纯化的 COL1A2pA 片段连接,并转化进化学感受态 STBL-2 细胞 (Invitrogen) 中。由此产生质粒 pCC105 (图 7)。

[0115] pCC205 的产生

[0116] 构建体 pCC205 通过用 SalI 和 EcoRI 消化 pCC200,随后使用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 从琼脂糖凝胶中纯化 4225 个核苷酸的载体片段而产生。相同地,将 310 个核苷酸的 COL1A2polyA 通过用 EcoRI 和 SalI 消化,随后通过凝胶电泳及使用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒纯化而从构建体 pCC105 中分离。然后将这个两个片段以等摩尔量连接并转化进 DH5 α -T1r 中,产生 pCC205 (图 16)。

[0117] pCC. 55Kcol 的克隆

[0118] 载体 pCC205 用于构建表达 Ad5E1B-55k 蛋白的质粒。为此,使用如下引物产生 PCR 产物:55KforE:5' -GGA ATT CGC CAC CAT GGA GCG AAGAAA CCC ATC TGA-3' (SEQ ID NO:13) 和 55KrevB:5' -gga tcc TCA ATC TGT ATC TTC ATC GCT AGAGCC-3' (SEQ ID NO:14)。PCR 使用 Pwo DNA 聚合酶根据厂商指导在存在 3% DMSO 的情况下进行。扩增在 pIG. E1A. E1B 上进行,程序设定为在 94°C 2 分钟,随后 30 次循环 (94°C 30 秒,60°C 30 秒及 72°C 90 秒),最后在 72°C 8 分钟。所得 1510bp 扩增的片段包含 Ad5 序列的 E1B-55K 序列第 2019-3510 位核苷酸。将该片段用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化,用 EcoRI 和 BamHI 消化,随后凝胶电泳以除去被切割的末端。然后将这个片段使用 GeneCleanII 试剂盒 (Bio101) 从琼脂糖凝胶中纯化,并连接进也如上述用 EcoRI 和 BamHI 消化并分离自琼脂糖凝胶的 pCC205 中。将连接混合物转化进化学感受态 STBL2 细胞 (Invitrogen) 中,产生构建体 pCC. 55Kcol (图 8)。

[0119] pIG. E1B 的克隆

[0120] 使用 Pwo DNA 聚合酶 (Roche) 根据厂商指导在存在 3% DMSO 的情况下产生一个 PCR 片段。在扩增反应中使用如下引物:5E1Bstart:5' -GGA ATT CCT CAT GGA GGC TTG GG-3' (SEQ ID NO:15) 和 5E1Brev2:5' -GTG TCT CAC AAC CGC TCT C-3' (SEQ ID NO:16)。扩增在 pIG. E1A. E1B 上进行,程序设定为 94°C 2 分钟,随后 5 次循环 (94°C 30 秒,56°C 30 秒及 72°C 60 秒),然后再进行 35 次循环 (94°C 30 秒,60°C 30 秒及 72°C 60 秒),最后在 68°C 8 分钟。然后将 390 个核苷酸的 PCR 片段用 KpnI 和 EcoRI 消化,产生 347 个核苷酸的片段,将其使用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 从琼脂糖凝胶中分离。

[0121] 将这个片段与 5713bp pIG. E1A. E1B 载体片段连接,该载体片段是用 KpnI 及用 EcoRI 部分消化,随后使用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 从凝胶中分离并纯化而获得。在连接后,将该混合物转化进化学感受态 STBL-2 细胞中,产生质粒 pIG. E1B (图 9)。pIG. E1B 包含 Ad5 基因组的第 2019-3510 位核苷酸。

[0122] pCC. E1Bcol 的克隆

[0123] 为了构建携带 19K 和 55K Ad5 E1B 这两个编码序列的质粒,将质粒 pCC. 55Kcol

用 EcoRI 和 KpnI 消化。将 5970 个核苷酸的载体片段如上述通过凝胶电泳分离并使用 GeneClean 试剂盒 II (Bio101) 从琼脂糖凝胶中纯化。然后将构建体 pIG. E1B 也用 KpnI 和 EcoRI 消化, 并使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 将 347 个核苷酸的片段从凝胶中分离并纯化。这个插入体与分离的 pCC. 55Kcol 载体片段的连接及转化进 STBL2 细胞中产生了构建体 pCC. E1Bcol (图 10)。这个构建体包含 Ad5 基因组序列的第 1711-3510 位核苷酸。

[0124] pEC. E1B 的克隆

[0125] 人延伸因子 1- α 启动子 (EF1- α) 通过用 EcoRI 和 PmlI 消化分离自质粒 pEF/myc/nuc (Invitrogen)。在消化后, 将片段用 Klenow 酶平端化, 然后将 1183 个核苷酸的 EF1- α 启动子片段通过凝胶电泳分离并使用 GeneCleanII 试剂盒 (Bio101) 纯化。同样地, 将载体 pCC. E1Bcol 用 BstXI 消化, 随后用 T4DNA 聚合酶处理以使得末端平端化, 并经过 PCR 纯化柱 (Qiagen) 纯化。然后用 EcoRV 进行第二次消化, 随后进行凝胶电泳。然后将 5827 个核苷酸的载体片段用 GeneCleanII 试剂盒 (Bio101) 纯化。将 EF1- α 片段与载体片段以等摩尔量连接在一起并转化进化学感受态 STBL-2 细胞 (Invitrogen) 中, 这样产生包含与质粒 pCC. E1Bcol 中同样的 Ad5-E1B 序列的质粒 pEC. E1B (图 11)。

[0126] pSC. 55K 的克隆

[0127] 使用重组 Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen) 及如下引物, 从 pEF/myc/nuc 质粒 DNA (Invitrogen) 中扩增 SV40 启动子: SV40. forS: 5' -CAA CTA GTA CAT GTG GAA TGT GTG TCA GTT AGG-3' (SEQ ID NO:17) 和 SV40. RevERI: 5' -GGA ATT CAG CTT TTT GCA AAA GCC TAG G-3' (SEQ. ID. NO. 18)。扩增程序设定为在 94°C 2 分钟, 随后进行 5 次循环 (94°C 30 秒, 48°C 30 秒及 72°C 45 秒), 然后进行 25 次额外循环 (94°C 30 秒, 58°C 30 秒及 72°C 45 秒), 最后在 68°C 8 分钟结束。将所得 357bp 扩增的片段 (GenBank Acc. No. J02400 的 SV40 序列的第 266 至 -71 位核苷酸) 使用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 从琼脂糖凝胶中分离。然后使用 PCR TOP04blunt 克隆试剂盒 (Invitrogen) 将这个片段克隆进 pCR-TOP0 中。在核实序列后, 将 357bp 插入体通过用 EcoRI 和 SpeI 消化从 TOP0 载体中分离, 并使用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 从琼脂糖凝胶中分离。同样地, 将质粒 pCC. 55Kcol (具有一个 pBR322- 主链) 用 AvrII 和 EcoRI 消化, 随后进行凝胶电泳。如上述从凝胶中分离 5508 个核苷酸的载体片段, 并以等摩尔量与消化的 PCR 片段连接。将该连接混合物转化进化学感受态 STBL-2 细胞中, 产生包含与 pCC. 55Kcol 中相同的 Ad5E1B-55K 序列的质粒 pSC. 55K (图 12)。

[0128] 为了从原代 HER 细胞中产生转化的克隆, 将包含合适的表达盒的 DNA 片段从凝胶中分离。确信 (重叠的) 载体序列的消除减少共同整合的机会。为此, 将 pCC. E1A 和 pCC. E1AB21 用 BsaAI 和 AflIII 消化, 并使用 ELU-Trap 设备 (Schleier and Schuell) 根据厂商指导将插入片段从凝胶中纯化。这个设备可以大量分离 DNA 片段。将构建体 pEC. E1B 和 pSC. 55K 分别用 AatII/HincII 和 AflIII/HincII 消化, 并如上述分离插入片段。如上述培养并转染原代 HER 细胞。组合分离自 pCC. E1A 和 pEC. E1B 的片段以进行转染。将分离自 pCC. E1AB21 的 DNA 与 pSC. 55K 组合或者单独转染。然后将后者培养物在第一次转染后 7-10 天, 根据观察到的克隆的大小用分离自 pSC. 55K 的 DNA 片段再转染。在转染前一天, 将单独用 E1AB21 转染的培养皿的一半传代到 10cm 培养皿, 然后再次转染, 培养皿的另一半进行再

转染而不进行之前的传代。

[0129] 挑选得自这些转染的转化的克隆并在 96 孔平板及后续更大的尺寸中进一步扩展。该片段的整合位点和拷贝数目使用 Southern 印迹研究,并通过 PCR 揭示插入是否在近邻处发生。优选进一步应用转染的细胞基因组中 E1A 和 E1B 55K 二者存在于单一拷贝中的克隆,或者这二者存在于一个以上的拷贝中但无这些序列的反向重复构象的克隆,或者其中 E1A 和至少一个 E1B 编码序列(在这种情况下是 E1B-55K)间隔至少 4kb,优选至少 10kb,更优选至少 34.5kb 的克隆。

[0130] 实施例 2:使用具有由大间隔序列分隔的 E1A 和 E1B 区域的核酸产生互补细胞系

[0131] 如先前的实施例所述,使用 E1A 和 E1B 的单独的质粒,可以从原代细胞中产生稳定转化的细胞克隆。然而,当一起转染 DNA 片段时,仍存在转染的片段彼此紧邻的机会,尽管这个机会在不具有相当的序列重叠的情况下已经减少。E1A 和 E1B 表达盒在它们之间存在少于 30kb 的非 E1 序列的情况下整合在染色体上的可能性可以通过在不同的 E1 表达盒侧翼放置大块的(非 E1)编码 DNA 序列(所谓的“间隔”片段)而避免。如果在产生的包装细胞基因组中携带 E1A 的片段与携带 E1B 的片段相邻整合,则所述大的侧翼序列应产生足够的距离以消除在重组腺病毒载体在所述包装细胞上增殖的基础上 E1A 和 E1B 编码序列重组进同一重组载体分子中的机会。可以使用的大的间隔 DNA 片段非限制性例如是衍生自例如人肌养蛋白基因或人 Apo-E1 基因的大序列。也可以使用其它间隔分子,甚至可以使用来自非人来源的间隔分子。优选地,所述侧翼序列不包含功能蛋白的编码区并因此可衍生自内含子序列。同样,E1A 和 E1B 序列也不需要不同的分子上,可以位于同一个大分子如粘粒上。这些携带 E1A 和 E1B 的分子例如在图 13 中示出。在优选的实施方案中,E1A 和 E1B 编码区之间的距离 > 34.5kb,因为随后这两个区域共插入病毒中产生太大以至于不能包装的基因组。例如当使用具有大致在中间的表达盒的大约 40kb 的两个单独的粘粒片段时出现这种情况。然而,假如反向重复结构形式的 E1 有助于 HDEP 产生的频率,则 E1A 和 E1B 表达盒位于总长度为大约 22kb 的一个单一粘粒片段上的构建体(如图 13I)就足够了,甚至当第二个拷贝以相反方向紧邻第一个拷贝而位于细胞基因组中时也是如此。镜像结构的完全整合将也涉及 > 38kb 的片段。同样,如果反向重复的存在增加 HDEP 形成的频率,则认为多个拷贝直向重复整合的情况问题较少,甚至当包括 E1A 和 E1B 的 2 个完整拷贝的 DNA 片段的长度 ≤ 20kb 时也如此。在不具有反向重复的情况中,比重组病毒中剩余空间大的任何含 E1 的片段(即 38kb 减去重组病毒的实际基因组长度)整合进重组病毒迫使其作为随后的步骤缺失部分必需的病毒序列,以保证包装及因此的增殖。对通过同源重组产生的第一个 HDEP 基因组进行分析(Murakami et al.,2002)示出病毒序列的缺失是可能的。

[0132] 整合进细胞基因组中的 DNA 序列由于染色质相关的阻抑而不总是可以激活转录因子。尤其当使用源自通常在即将用这些序列转导的细胞中无活性的基因组区域的内含子 DNA 的大片段时,基因表达由于失活的染色质而可以被关闭。最近鉴别了可抑制这种阻抑的序列。例如发挥绝缘体序列(insulator sequence)功能的鸡 β-球蛋白 HS4 元件(美国专利 5,610,053)、果蝇 scs 或 scs' 元件(Kellum et al,1991;Farkas et al,1992)、及通过特异性筛选抗阻抑物元件而鉴别的人基因组中的一系列序列(所谓的抗阻抑物元件或 STAR 元件)(Kwaks et al.,2003;WO 03/004704)。这些序列掺入 E1A 和 E1B 表达构建体(该序列阻止 E1A 和/或 E1B 基因的定位沉默(positional silencing))也增强永生化

的克隆的量。因此,在本发明的某些实施方案中,在至少一个 E1A 和 / 或 E1B 表达构建体中存在一或多个 STAR 元件,例如 STAR 7(Genbank 登记号 AY190751) 或者 STAR 40(Genbank 登记号 AY190756)。优选所述元件在 E1A 和 / 或 E1B 编码序列的两侧,即表达构建体可包含(从 5' 至 3'):STAR 元件—表达调节序列(例如启动子)—E1A 编码序列;或者 E1A+ 一个 E1B 编码序列;或者一个 E1B 编码序列;或者两个 E1B 编码序列—聚腺苷酸化序列—STAR 元件。

[0133] 实施例 3:具有在单独的构建体上并且侧翼有填充 DNA 的 E1A 和 E1B 的细胞系的产生

[0134] 这个实施例描述了本发明的新的细胞系的产生,所述细胞系通过共转染具有 E1A 表达盒及侧翼有大的填充 DNA 的第一个 DNA 片段和具有 E1B 表达盒及侧翼有质粒 DNA 的第二个 DNA 片段而产生。

[0135] 取这个实施例中克隆进粘粒载体主链中的人肌养蛋白内含子 44 序列(Genbank Acc. No. M86524)(pdys44;图 17) 作为 E1A 表达质粒周围的填充 DNA。

[0136] 将构建体 pCC.E1A(实施例 1 中描述;图 4) 用 AflIII 和 AvrII(New England Biolabs) 消化,并将突出端用 Klenow 酶(New England Biolabs) 平端化。将消化的片段在 0.5% TAE 琼脂糖凝胶上分离并将相应于 PGK-E1A 表达盒的 2kb 片段使用凝胶提取试剂盒(Qiagen) 根据厂商指导纯化。

[0137] 将构建体 pdys44(图 17) 用 BglIII(New England Biolabs) 消化,并将突出端用 Klenow 酶平端化。将片段在 0.5% TAE 琼脂糖凝胶上分离并切离含有主链质粒和部分肌养蛋白内含子的 27kb 片段。然后将凝胶切片置于含有少量玻璃绒的注射器中,用注射器柱塞将含有 DNA 的缓冲液推进 eppendorf 管的末端。由此获得的 DNA 溶液含有大约 5ng/ μ l, 并直接用于与纯化的 2kb PGK-E1A 片段的连接反应中。转化进 DH5 α T1 感受态细胞产生构建体 p44-1.ccE1A(图 18)。这个构建体含有在人 PGK 启动子控制下的 E1A 和一个合成的 polyA 信号。

[0138] 构建体 pE1B(实施例 1 中描述;图 3) 在这个实施例中用作 E1B 表达质粒。这个质粒含有在其自身启动子控制下的 E1B 和乙型肝炎病毒(HBV)polyA 信号。

[0139] 将构建体 p44-1.ccE1A 用 XhoI 和 PmeI 消化,并将消化的 DNA 通过苯酚/氯仿(1:1) 提取及随后的乙醇沉淀而纯化(产生在侧翼具有大约 11.6kb 上游(包括 PGK 启动子)和大约 6.5kb 下游(包括合成的 polyA 信号)填充片段的 E1A 编码序列)。然后沉淀 DNA,用 70%乙醇洗涤并无菌溶解于无菌的无内毒素的 TE 中。将质粒 pE1B 用 ScaI 消化并如上述纯化(产生在侧翼具有大约 1.4kb 上游和 2.3kb 以上的下游填充片段的 E1B 编码序列,所述下游填充片段包括 HBV polyA 序列)。

[0140] 培养原代人 HER 细胞并在一系列转染中对传代数 6(PN6) 进行转染,及在另一系列转染中对 PN9 进行转染。HER 细胞培养和转染根据实施例 1 所述的方法进行。在独立的转染中将如上述制备的含有 E1A 和 E1B 的 DNA 以不同比例混合(衍生自载体序列或调节序列的两个片段彼此缺少显著重叠),从而减少这两个片段之间同源重组的机会;如果这两个片段会形成一个单一核酸分子(例如通过末端与末端接合或者连接,理论上可能)并随后作为一个单一单位整合进基因组中,则所得细胞中的 E1A 和 E1B 编码序列将被 4kb 以上的填充序列间隔(理论上在 E1A 和 E1B 编码序列之间存在至少 6.5kb(E1A 下游)+1.4kb(E1B

上游) = 至少 7.9kb 间隔)。将总共 8 个培养皿用大约等摩尔比率的这两个构建体 (17 μ g E1A 和 3 μ g E1B 质粒) 转染, 将 3 个培养皿用 10 μ g 每个片段转染。在这两个系列的转染中均观测到转化灶, 但在用 10 μ g 每个构建体的情况中获得相对更多的转化灶。在单独的培养皿上的用 AseI 和 BglI 消化的构建体 pIG. E1A. E1B 用作阳性对照 (2 μ g DNA/ 培养皿)。正如所期望的, (单一的) 阳性对照质粒与两个单独片段 (来自 p44-1. ccE1A 和 pE1B) 相比转化灶形成的效率更高。pIG. E1A. E1B 质粒的效率更高出大约 10 倍。对于用阳性对照质粒和两个片段转染, 发现挑选的转化的细胞克隆中大约 80-90% 是存活的并建立细胞系。

[0141] 这些实验清楚示出通过用单独的 DNA 片段上的侧翼有 (非重叠的) 填充 DNA 的 E1A 和 E1B 基因共转染以转化原代细胞是可行的。进一步分析共 6 个克隆: HER01-B-71 (人细胞系, 2004 年 10 月 1 日保藏在欧洲动物细胞保藏中心 (ECACC), 保藏号 04100101)、HER01-H-87 (人细胞系, 2004 年 10 月 1 日保藏在欧洲动物细胞保藏中心 (ECACC), 保藏号 04100102)、HER01-H-86、HER01-H-88、HER01-H-89 和 HER01-B-90。

[0142] E1 基因的表达在 Western 印迹上使用 E1 蛋白的特异性抗体分析。在 Western 印迹分析中使用总量为 10 μ g 的得自产生的细胞克隆的裂解物的蛋白质。将样品在加入 1/4 体积的 NuPage 样品缓冲液 (Invitrogen) 后在 70 °C 变性 15 分钟。作为阳性对照, 使用 **PER.C6**® 细胞裂解物。未转染的原代 HER 细胞裂解物 (传代数为 6) 作为阴性对照。将样品在 10% BisTris SDS page 凝胶 (Invitrogen) 上运行, 旁边是 Seeblue plus2 预染色的标记 (Invitrogen)。从凝胶中制备 Western 印迹。使用如下抗体: 1) E1A: 小鼠抗人 Ad2. E1A (1 : 400, Santa Cruz), 或者 2) E1B. 19K: 大鼠抗人 E1B 21K 单克隆抗体 (1 : 500, Oncogene), 或者 3) E1B. 55K: 小鼠抗人 55Kda (自杂交瘤细胞系 C9A1C6 中收获, 得自 Dr. R. Hoebe, LUMC, Leiden)。如下抗体用作二级抗体: 1) E1A: 山羊抗小鼠 IgG-HRP (Biorad), 2) E1B. 19K: 山羊抗大鼠 IgG-HRP (Epcam), 3) E1B. 55K: 山羊抗小鼠 IgG-HRP (Biorad)。使用 ECL+ 分析 (Amersham) 观测蛋白质。

[0143] 从这些实验中获知所有测试的克隆均表达 E1A 和 E1B 蛋白, 并且水平与在 **PER.C6**® 细胞中的表达水平相当 (图 19)。这证实了原代细胞的转化确实是由 Ad5E1 表达诱导的, 不是自发事件的结果。

[0144] Ad5E1 基因在这些细胞系中的功能性表达也可以通过示出该细胞能互补 E1 缺失的 Ad5 病毒而测试。因此对 6 个不同的细胞克隆测试了 Ad5. eGFP 载体的复制情况, 这是一种 E1 缺失的 (缺失 Ad5 序列的第 455-3510 位核苷酸) 基于 Ad5 的表达绿色荧光蛋白的腺病毒载体。为此, 将细胞以 1×10^6 个细胞 / 孔的密度接种并在第二天用感染复数 (MOI) 为 5 个病毒颗粒 (VP) / 细胞感染。作为阳性对照, 将 **PER.C6**® 细胞也进行接种并用 MOI = 5 感染。5 天后, 在所有孔中均见到完全的致细胞病变 (CPE)。收获细胞和培养基, 冷冻 / 解冻三次, 离心除去细胞碎片。然后将上清 (粗裂解物) 用于感染 A549 细胞。为此, 将 5×10^5 个 A549 细胞接种在 24 孔平板中, 第二天用 50 μ l 所述粗裂解物感染。2 天后, 收获 A549 细胞并通过 FACS 分析 GFP 表达情况。结果示出所有克隆均能互补 Ad5. eGFP 载体 (图 20)。

[0145] 特别地, 所述腺病毒载体 (缺失 E1, 无第 455-3510 位核苷酸) 与细胞系中存在的 E1 序列 (Ad5, 第 459-3510 位核苷酸) 无重叠, 因此这个实施例中的腺病毒载体与新细胞系的组合相当于本发明的包装系统, 这个实施例中重组腺病毒的产生相当于产生本发明的一批重组腺病毒的方法。

[0146] 将产生的细胞系的基因组 DNA 在 Southern 印迹上使用 E1A 和 E1B 探针进行测试,以论证 E1A 和 E1B 编码序列在细胞基因组中间隔 4kb 以上。为此,将基因组 DNA 用限制性核酸内切酶 EcoRV 和 BglIII 消化(图 21)。将消化的 DNA 通过凝胶电泳进行大小分离(例如使用倒转电场凝胶电泳(FIGE),以使得可以分离大的 DNA 片段),然后通过毛细管印迹移至尼龙膜上。为进行印迹杂交,将三个不同的探针放射性标记。一个是 Ad5. E1A 探针,其是从位于 Ad5. E1A 基因中 EcoRV 位点的 3' 端的 EcoRV-SalI 限制片段(1330bp;见图 21)中产生的。产生两个 Ad5. E1B 探针:Ad5. E1B(5'),从 BssHII-BglIII 片段(1354bp)中产生;Ad5. E1B(3'),从 BglIII-BsrGI 片段(652bp)中产生,分别位于 Ad5. E1B 基因中 BglIII 位点的 5' 和 3' 侧。制备包含产生的细胞系的经消化的基因组 DNA 的相同印迹,或者在与第一个探针杂交后剥离印迹,然后与第二个探针杂交。每种方法均应可以覆盖用 E1A 和 E1B 探针获得的信号。

[0147] 在转化的细胞系产生期间转染和整合后,如果 E1A 片段整合为紧邻包含 E1B 的片段,则用 E1A 和 E1B 的探针检测到印迹上的相同条带,条带的大小反映两个基因之间的距离。由于 E1A 和 E1B 片段彼此的方向未知,因此单独使用能杂交 BglIII 限制位点的 5' 或 3' 片段的两个 E1B 探针。如果 E1A 片段整合在紧邻另一个 E1A 片段,则得自 EcoRV 消化的条带不被 E1B 探针识别。单一的整合子(integrand)或末端片段也产生不被这两种探针识别的条带。

[0148] 总之,这个实施例中的实验明显显示出原代人细胞与单独的质粒的共同转染产生转化的细胞系,所述原代人细胞和单独的质粒一个包含侧翼为大的填充片段区域的 E1A,一个包含侧翼为主链序列的 E1B。另外,这些细胞系足以有效互补 E1 缺失的 Ad5 载体的数量表达 E1 蛋白。

[0149] 在另一个实施方案中,将 E1A 和 E1B 序列克隆进一个单一的构建体中,这些序列之间具有填充片段,之后使用该单一的构建体产生细胞系。

[0150] 显而易见,如果 E1A 和 E1B 之间需要更大的距离,则所述 E1B 编码序列侧翼也可以是更长的填充片段核酸,和/或 E1A 和 E1B 编码序列侧翼的填充片段的长度可以增加,通过标准的常规分子生物学技术根据本发明揭示的教导进行。因此,这个实施例显然不应理解为将本发明的范围限制在实际进行的实验范围内,而是本发明的概念的示例。

[0151] 表 2:用 Ad5-E1 表达构建体对原代 HER 细胞的转化

[0152]

构建体	用量	培养皿数	转化灶 / 培养皿
pIG. E1A. E1B	20 μ gr	2	31
pIG. E1A	20 μ gr	2	0
pIG. E1A+pE1B	每个 10 μ gr	4	15
pIG. E1AB21	20 μ gr	2	11.5
pIG. E1A B21+pE1B	每个 10 μ gr	4	10
AdApt. eGFP	20 μ gr	1	0

[0153] [0153] 参考文献:

[0154] Byrd P, Brown KW, Gallimore PH. 1982. Malignant transformation of human embryo retinoblasts by cloned adenovirus 12DNA. Nature298 :69-71。

[0155] Byrd PJ, Grand RJA, Gallimore PH. 1988. Differential transformation of primary human embryo retinal cells by adenovirus E1regions and combinations of

E1A+ras. Oncogene 2 :477-484。

[0156] Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJM, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb A, Valerio D, Hoeben RC. 1998. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. Hum Gene Ther 9 :1909-1917。

[0157] Farkas G, Udvardy A. 1992. Sequence of scs and scs ' Drosophila DNA fragments with boundary function in the control of gene expression. Nucleic Acids Res. 20 :2604。

[0158] Gallimore, P. H. , Byrd, P. J. , Whittaker, J. L. and Grand, R. J. A. (1985). Properties of rat cells transformed by DNA plasmids containing adenovirus type 12 E1 DNA or specific fragments of the E1 region: comparison of transforming frequencies. Cancer Res. ,45, p2670-2680。

[0159] Gallimore, P. H. , Grand, R. J. A. and Byrd, P. J. (1986). Transformation of human embryo retinoblasts with simian virus 40, adenovirus and ras oncogenes. AntiCancer Res. 6, p499-508。

[0160] Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol 36 :59-72。

[0161] Jochemsen AG, Peltenburg LTC, te Pas MFW, de Wit CM, Bos JL, van der Eb AJ. 1997. Activation of adenovirus 5E1A transcription by region E1B in transformed primary rat cells. EMBO J. 6 :3399-3405。

[0162] Kwaks TH, Barnett P, Hemrika W, Siersma T, Sewalt RG, Satijn DP, Brons JF, Van Blokland R, Kwakman P, Kruckeberg AL, Kelder A, Otte AP. 2003. Identification of anti-repressor elements that confer high and stable protein production in mammalian cells. Nature Biotech 21 :553-558(+corrigendum volume 21 number 7, july 2003, p. 822)。

[0163] Kellum R, Schedl P. 1991. A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. Cell 64 :941-950。

[0164] Lochmuller, H. , Jani, A. , Huard, J. , Prescott, M. , Simoneau, M. , Massie, B. , Karpath, G. and Acsadi, G. (1994) Emergence of early region1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants(dE1+dE3) during multiple passages in 293 cells。

[0165] Human Gene Therapy, 5, 1485-149。

[0166] Louis N, Eveleigh C, Graham FL. 1997. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. Virol. 233 :423-429。

[0167] Murakami P, Pungor E, Files J, Do L, van Rijnsoever R, Vogels R, Bout A, McCaman M. 2002. A single short stretch of homology between adenoviral vector and packaging cell line can give rise to cytopathic effect-inducing, helper-dependent E1-positive particles. Hum Gene Ther 13 :909-920。

- [0168] Murakami P, Havenga M, Fawaz F, Vogels R, Marzio G, Pungor E, Files J, Do L, Goudsmit J, McCaman M. 2004. Common structure of rare replication-deficient E1-positive particles in adenoviral vector batches. *J Virol* 78 :6200-6208.
- [0169] Nevels M, Tauber B, Spruss T, Wolf H, Dobner T. 2001. "Hit-and-Run" transformation by adenovirus oncogenes. *J Virol*. 75 :3089-3094.
- [0170] Nichols WW, Lardenoije R, Ledwith BJ, Brouwer K, Manam S, Vogels R, Kaslow D, Zuidgeest D, Bett AJ, Chen L, van der Kaaden M, Galloway SM, Hill RB, Machotka SV, Anderson CA, Lewis J, Martinez D, Lebron J, Russo C, Valerio D, Bout A.
- [0171] Propagation of adenoviral vectors :use of PER.C6 cells. In *Adenoviral vectors for gene therapy*, (Ed. Curiel D. T. and Douglas, J. T.). Pub. Academic Press, 2002.
- [0172] Rao, L., Debbas, M., Sabbatini, P., Hockenbery, D., Korsmeyer, S. and White, E. (1992). The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, p7742-7746.
- [0173] Steinwaerder DS, Carlson CA, Lieber A. 1999. Generation of adenovirus vectors devoid of all viral genes by recombination between inverted repeats. *J. Virol*. 73 :9303-9313.
- [0174] Van den Elsen P, de Pater S, Houweling A, van der Veer J, van der Eb A. 1982. The relationship between region E1A and E1B of human adenoviruses in cell transformation. *Gene* 18 :175-185.
- [0175] White, E. (1995). Regulation of p53-dependent apoptosis by E1A and E1B. In : *The molecular repertoire of adenoviruses III*. Eds. Doerfler, W. and Bohm, P.. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1995, p33-58.
- [0176] White, E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* 10(1), p1-15.
- [0177] Zantema, A. and van der Eb, A. J. (1995). Modulation of gene expression by adenovirus transformation. In : *The molecular repertoire of adenoviruses III*. Eds. Doerfler, W. and Bohm, P. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1995, p1-23.

[0001]

序列表

<110> 克鲁塞尔荷兰公司

<120> 用于重组腺病毒的包装细胞

<130> 0095 WO 00 ORD

<160> 18

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 7315

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> plasmid pIG.E1A.E1B

<220>

<221> human phosphoglycerate kinase promoter

<222> (17)..(504)

<220>

<221> E1 region of human adenovirus type 5 genome

<222> (513)..(3564)

<220>

<221> hepatitis B virus polyadenylation sequence

<222> (3588)..(4205)

<400> 1

gaattcgata attccacggg gttgggggttg cgccttttcc aaggcagccc tgggtttgcg	60
cagggacgcg gctgctctgg gcgtggttcc gggaaacgca gcggcgccga ccctgggtct	120
cgcacattct tcacgtccgt tcgcagcgtc acccgatct tcgccgtac ccttgtgggc	180
cccccggcga cgcttctgc tccgcccta agtcgggaag gttccttgcg gttcgcggcg	240
tgccggacgt gacaaacgga agccgcacgt ctactagta ccctcgcaga cggacagcgc	300
cagggagcaa tggcagcgcg ccgaccgcga tgggctgtgg ccaatagcgg ctgctcagca	360
gggcgcgcgc agagcagcgc ccgggaagg gcggtgcggg aggcggggtg tggggcggtg	420
gtgtggggcc tgttcttgc cgcgcggtgt tccgattct gcaagcctcc ggagcgcacg	480
tcggcagtcg gtcctctgt tccgaattcg atcgtgtagt gtatttatac ccggtgagtt	540
cctcaagagg ccactcttga gtgccagcga gtagagtttt ctctccgag ccgctccgac	600
accgggactg aaaatgagac atattatctg ccacggaggt gttattaccg aagaaatggc	660
cgccagtctt ttggaccagc tgatcgaaga ggtactggct gataatcttc cacctcctag	720

[0002]

ccattttgaa ccacctaccc ttcacgaact gtatgattta gacgtgacgg cccccgaaga	780
tcccaacgag gaggcgggtt cgcagatttt tcccgactct gtaatgttgg cgggtgcagga	840
agggattgac ttactcactt ttccgcccgc gcccggttct cgggagccgc ctcacctttc	900
ccggcagccc gagcagccgg agcagagagc cttgggtccg gtttctatgc caaaccttgt	960
accggagggtg atcgatctta cctgccacga ggctggcttt ccacccagtg acgacgagga	1020
tgaagagggt gaggagtttg tgtagatta tgtggagcac cccgggcacg gttgcaggtc	1080
ttgtcattat caccggagga atacggggga cccagatatt atgtgttcgc tttgctatat	1140
gaggacctgt ggcatgtttg tctacagtaa gtgaaaatta tgggcagtgg gtgatagagt	1200
ggtgggtttg gtgtggtaat ttttttttta atttttacag ttttgtggtt taaagaattt	1260
tgtattgtga tttttttaaa aggtcctgtg tctgaacctg agcctgagcc cgagccagaa	1320
ccggagcctg caagacctac ccgccgtcct aaaatggcgc ctgctatcct gagacgcccg	1380
acatcacctg tgtctagaga atgcaatagt agtacggata gctgtgactc cggctcctct	1440
aacacacctc ctgagataca cccggtggtc ccgctgtgcc ccattaaacc agttgccgtg	1500
agagttggtg ggcgtcgcca ggctgtggaa tgtatcgagg acttgcttaa cgagcctggg	1560
caacctttgg acttgagctg taaacgcccc aggccataag gtgtaaacct gtgattgcgt	1620
gtgtggttaa cgcctttgtt tgctgaatga gttgatgtaa gtttaataaa gggtgagata	1680
atgtttaact tgcatggcgt gttaaatggg gcggggctta aagggtatat aatgcgccgt	1740
gggctaactt tggttacatc tgacctcatg gaggcctggg agtgtttgga agatttttct	1800
gctgtgcgta acttgctgga acagagctct aacagtacct cttgggttttg gaggtttctg	1860
tggggctcat cccaggcaaa gttagtctgc agaattaagg aggattacaa gtgggaattt	1920
gaagagcttt tgaaatcctg tggtagctg tttgattctt tgaatctggg tcaccaggcg	1980
cttttccaag agaaggcat caagactttg gatttttcca caccggggcg cgctgcggct	2040
gctgttgctt ttttgagttt tataaaggat aaatggagcg aagaaacca tctgagcggg	2100
gggtacctgc tggattttct ggccatgcat ctgtggagag cggttgtgag acacaagaat	2160
cgctgctac tgttgcttc cgtccgcccg gcgataatac cgacggagga gcagcagcag	2220
cagcaggagg aagccaggcg gcggcgccag gagcagagcc catggaacct gagagccggc	2280
ctggaccctc gggaatgaat gttgtacagg tggctgaact gtatccagaa ctgagacgca	2340
ttttgacaat tacagaggat gggcaggggc taaagggggg aaagaggag cgggggggctt	2400

[0003]

gtgaggctac agaggaggct aggaatctag ctttttagctt aatgaccaga caccgtcctg	2460
agtgtattac ttttcaacag atcaaggata attgcgctaa tgagcttgat ctgctggcgc	2520
agaagtattc catagagcag ctgaccactt actggctgca gccaggggat gatthttgagg	2580
aggctattag ggtatatgca aagggtggcac ttaggccaga ttgcaagtac aagatcagca	2640
aacttgtaaa tatcaggaat tggttgctaca tttctgggaa cggggccgag gtggagatag	2700
atacggagga tagggtggcc tttagatgta gcatgataaa tatgtggccg ggggtgcttg	2760
gcatggacgg ggtggttatt atgaatgtaa ggtttactgg cccaatttt agcgggtacg	2820
ttttcctggc caataccaac cttatcctac acggtgtaag cttctatggg tttacaata	2880
cctgtgtgga agcctggacc gatgtaaggg ttcggggctg tgcccttttac tgctgctgga	2940
agggggtggt gtgtcgcccc aaaagcaggg cttcaattaa gaaatgcctc tttgaaaggt	3000
gtaccttggg tatcctgtct gagggtaact ccagggtgcg ccacaatgtg gcctccgact	3060
gtggttgctt catgctagtg aaaagcgtgg ctgtgattaa gcataacatg gtatgtggca	3120
actgcgagga cagggcctct cagatgctga cctgctcgga cggcaactgt cacctgctga	3180
agaccattca cgtagccagc cactctcgca aggcctggcc agtgtttgag cataacatac	3240
tgaccgcgtg ttccttgcac ttgggtaaca ggaggggggt gttcctacct taccaatgca	3300
atthtgagtca cactaagata ttgcttgagc ccgagagcat gtccaagggtg aacctgaacg	3360
gggtgthttga catgaccatg aagatctgga aggtgctgag gtacgatgag accgcacca	3420
ggtgcagacc ctgcgagtgt ggcggtaaac atattaggaa ccagcctgtg atgctggatg	3480
tgaccgagga gctgaggccc gatcacttgg tgctggcctg caccgcgct gagthttggct	3540
ctagcgatga agatacagat tgagctcgac ctgcaggcat gcaagctgat ccttcgcggg	3600
acgtcctttg tttacgtccc gtcggcgctg aatccgcgg acgaccctc gcggggccgc	3660
ttgggactct ctgctccct tctcgtctg ccgttcacgc cgaccacggg gcgcacctct	3720
ctttacgcgg tctccccgtc tgtgccttct catctgccg tccgtgtgca cttcgttca	3780
cctctgcacg ttgcatggag accaccgtga acgcccata gatcctgccc aaggctttac	3840
ataagaggac tcttgactc ccagcaatgt caacgaccga ccttgaggcc tacttcaaag	3900
actgtgtgtt taaggactgg gaggagctgg gggaggagat taggttaaag gtctttgtat	3960
taggaggctg taggcataaa ttggtctgcg caccagcact atgcaacttt ttcacctctg	4020
cctaatacat tcttgatcat gtcccactgt tcaagcctcc aagctgtgcc ttgggtggct	4080
ttggggcatg gacattgacc cttataaaga atthggagct actgtggagt tactctcgtt	4140

[0004]

tttgcccttct gacttctttc cttccgtcag agatcctgca gagcttggtg gaaggcagtg	4200
gaattagctt ggcgtaatca tggcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca	4260
caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaataag	4320
tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt	4380
cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc	4440
gctcttccgc ttctcgcctc actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg	4500
tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa	4560
agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg	4620
cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga	4680
ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg	4740
tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgtta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg	4800
gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc	4860
gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg	4920
gtaactatcg tcttgagtc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca	4980
ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtg tacagagttc ttgaagtggg	5040
ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag	5100
ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg	5160
gtgggttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc	5220
ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacg aaactcacgt taagggtatt	5280
tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt	5340
ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa tgcttaatca	5400
gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac catagttgcc tgactccccg	5460
tcgtgtagat aactacgata cgggagggt taccatctgg cccagtgct gcaatgatac	5520
cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaagg	5580
ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc	5640
gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta	5700
caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac	5760
gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc	5820

[0005]

```

ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttata actcatgggt atggcagcac 5880
tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact 5940
caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtaa 6000
tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gtcatacatt ggaaaacgtt 6060
cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca 6120
ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtagcaa 6180
aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac 6240
tcataactct cttttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg 6300
gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttcgcgc acatttccc 6360
gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaata 6420
ggcgtatcac gaggccctt cgtctcgcgc gtttcgggtga tgacggtgaa aacctctgac 6480
acatgcagct ccgggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag 6540
cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttgccg ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat 6600
cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata aaattgtaaa cgtaataatt ttgttaaaat 6660
tcgcgttaaa tttttgttaa atcagctcat tttttaacca ataggccgaa atcggcaaaa 6720
tcccttataa atcaaaagaa tagcccgaga taggggtgag tgttggtcca gtttgaaca 6780
agagtccact attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg 6840
gcgatggccc actacgtgaa ccatcaccca aatcaagttt tttggggtcg aggtgccgta 6900
aagcactaaa tcggaaccct aaaggagacc ccgatttag agcttgacgg ggaaagccgg 6960
cgaacgtggc gagaaaggaa gggaagaaag cgaaaggagc gggcgctagg gcgctggcaa 7020
gtgtagcggc cacgctgcgc gtaaccacca caccgcccgc gcttaatgcg ccgctacagg 7080
gcgcgtacta tggttgctt gacgtatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag 7140
aaaataccgc atcaggcgcc attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc 7200
ggtgcgggcc tcttcgctat tacgccagct ggcgaaagg ggatgtgctg caaggcgatt 7260
aagttgggta acgccagggt tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagt 7315

```

<210> 2
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

[0006]

<223> primer 5E1Bfor-1

<400> 2
cggaattcgg cgtgttaaat ggggcg

26

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

<220>
<223> primer 5E1B-rev

<400> 3
tagcaggcga ttcttgtgtc

20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer 5E1A-For

<400> 4
ccgaattcga tcgtgtagtg

20

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer 5E1A-rev

<400> 5
cgggatccat ttaacacgcc atgcaag

27

<210> 6
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer 5E1AB21-rev

<400> 6
cgggatacctc attcccgagg gtccag

26

<210> 7
<211> 16
<212> DNA

[0007]

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotide X-SM-1

<400> 7
ctaggtcgac caattg 16

<210> 8
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotide X-SM-2

<400> 8
ctagcaattg gtcgac 16

<210> 9
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotide EcoPst-3

<400> 9
aattgatatc gaattcgccg agctcgtaag cttggatccc tgca 44

<210> 10
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotide EcoPst-4

<400> 10
gggatccaag cttacgagct cggcgaattc gatatc 36

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> primer COL1A2F

<400> 11
cagctagcct gcaggaagta tgcagattat ttg 33

[0008]

<210>	12	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer COL1A2R-sal	
<400>	12	
	acacgtcgac ggctggtaga gatgc	25
<210>	13	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer 55KforE	
<400>	13	
	ggaattcgcc accatggagc gaagaaaccc atctga	36
<210>	14	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer 55KrevB	
<400>	14	
	ggatcctcaa tctgtatctt catcgctaga gcc	33
<210>	15	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer 5E1Bstart	
<400>	15	
	ggaattcctc atggaggctt ggg	23
<210>	16	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer 5E1Brev2	
<400>	16	
[0009]		

gtgtctcaca accgctctc

19

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer SV40.forS

<400> 17

caactagtagt atgtggaatg tgtgtcagtt agg

33

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer SV40.RevERI

<400> 18

ggaattcagc tttttgcaaa agcctagg

28

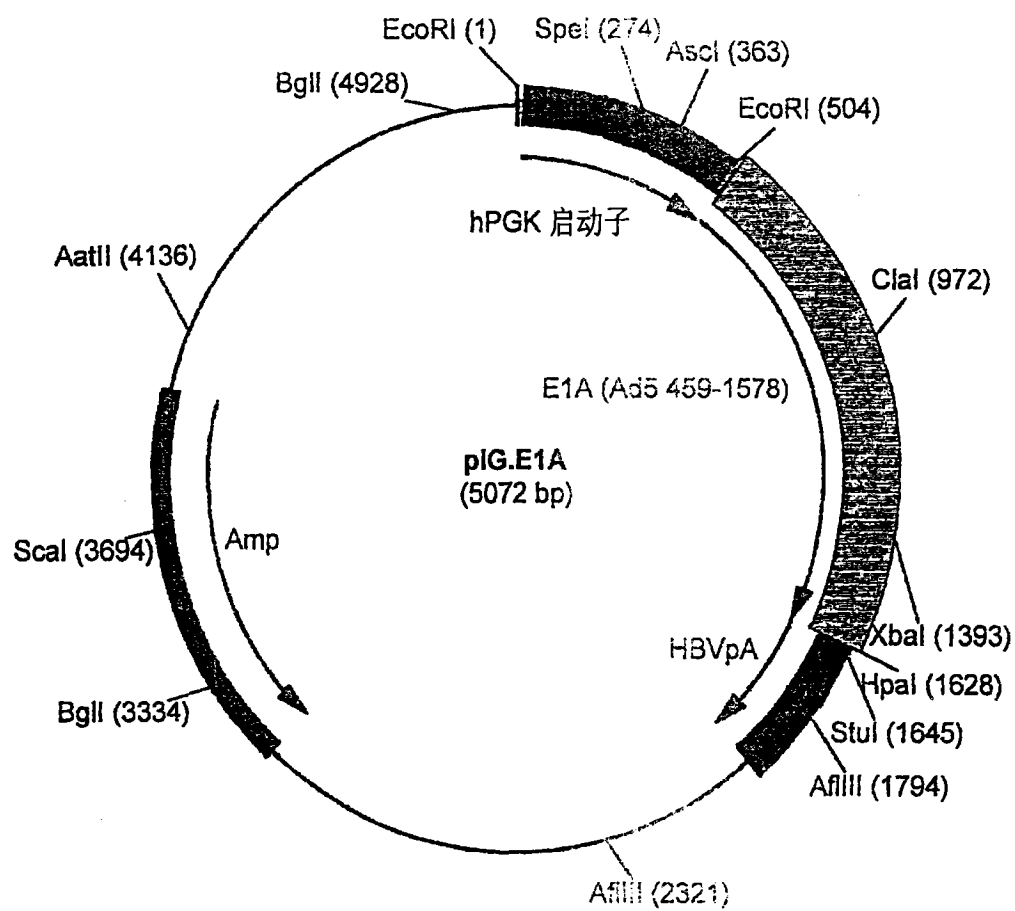


图 1

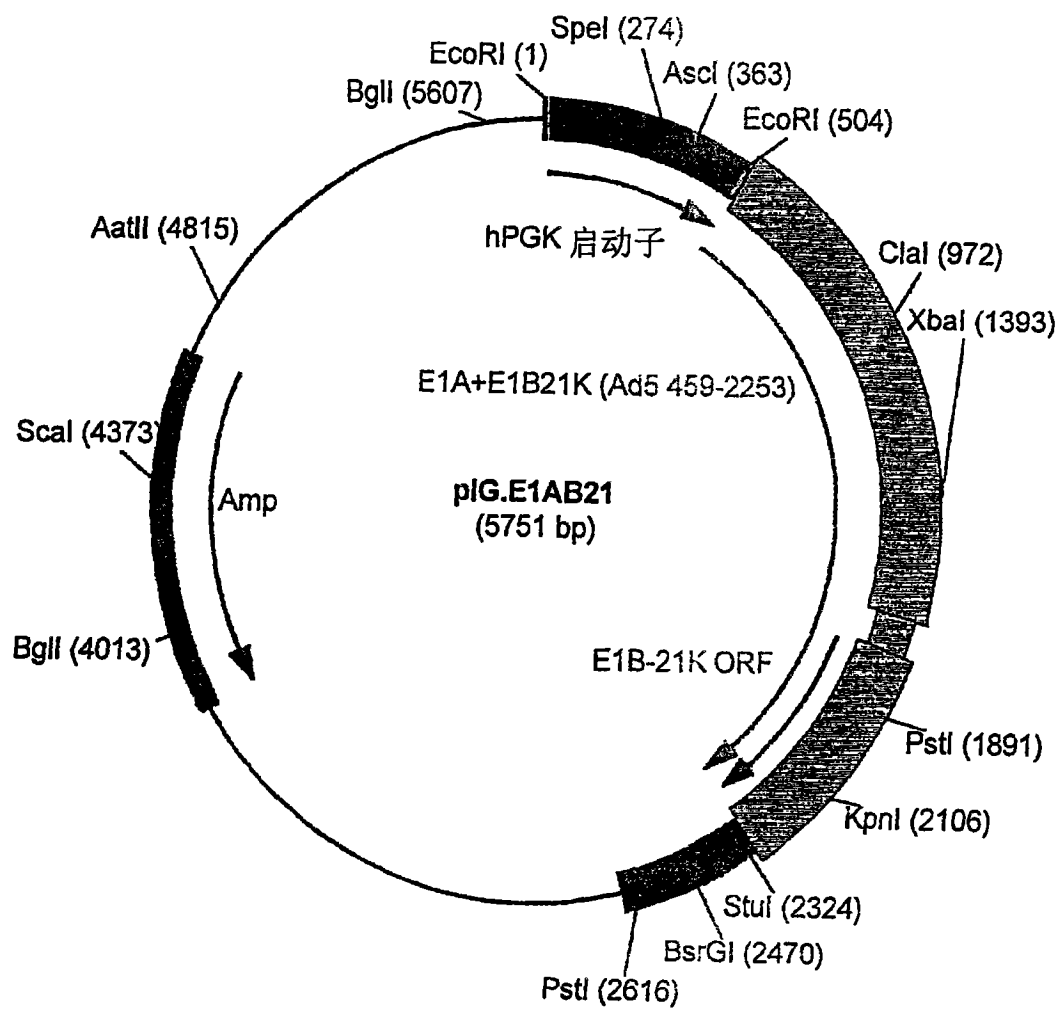


图 2

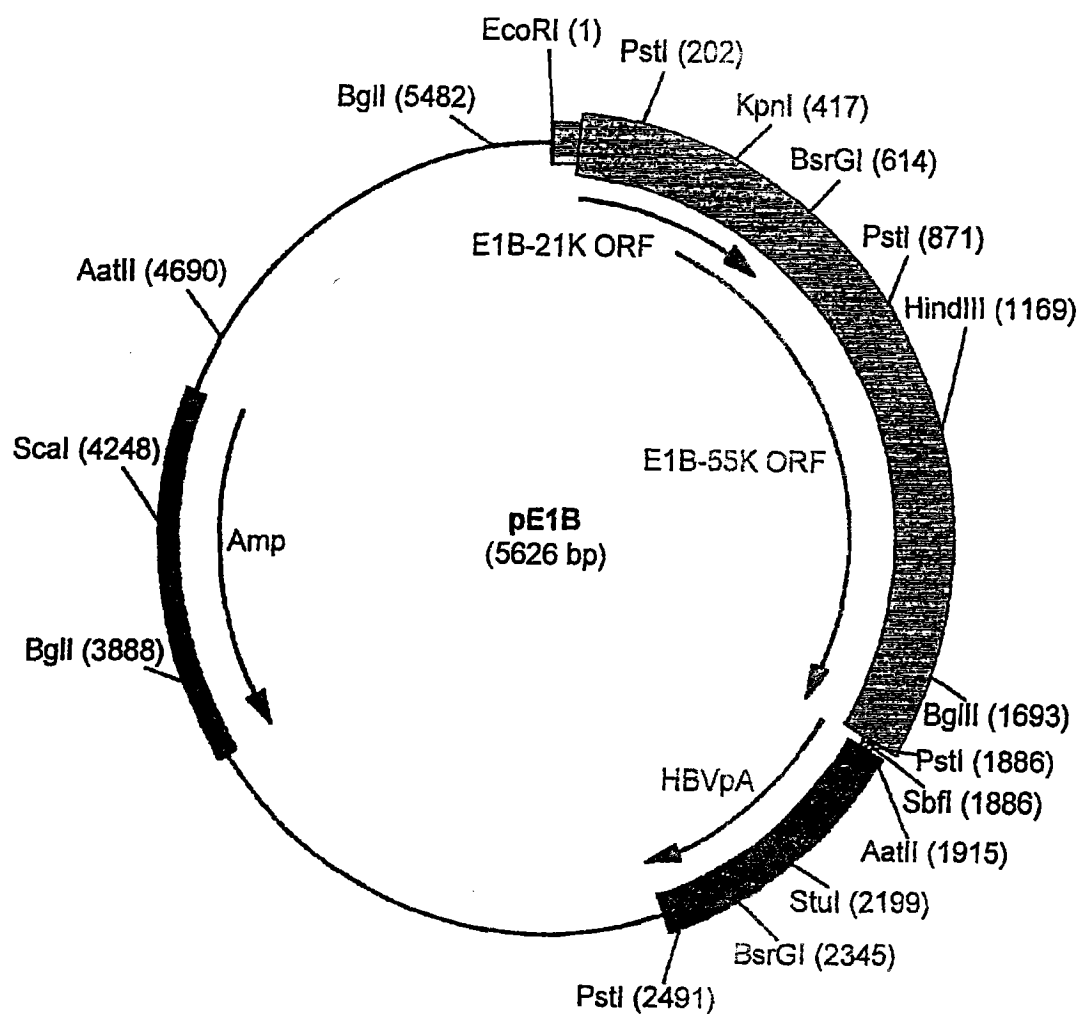


图 3

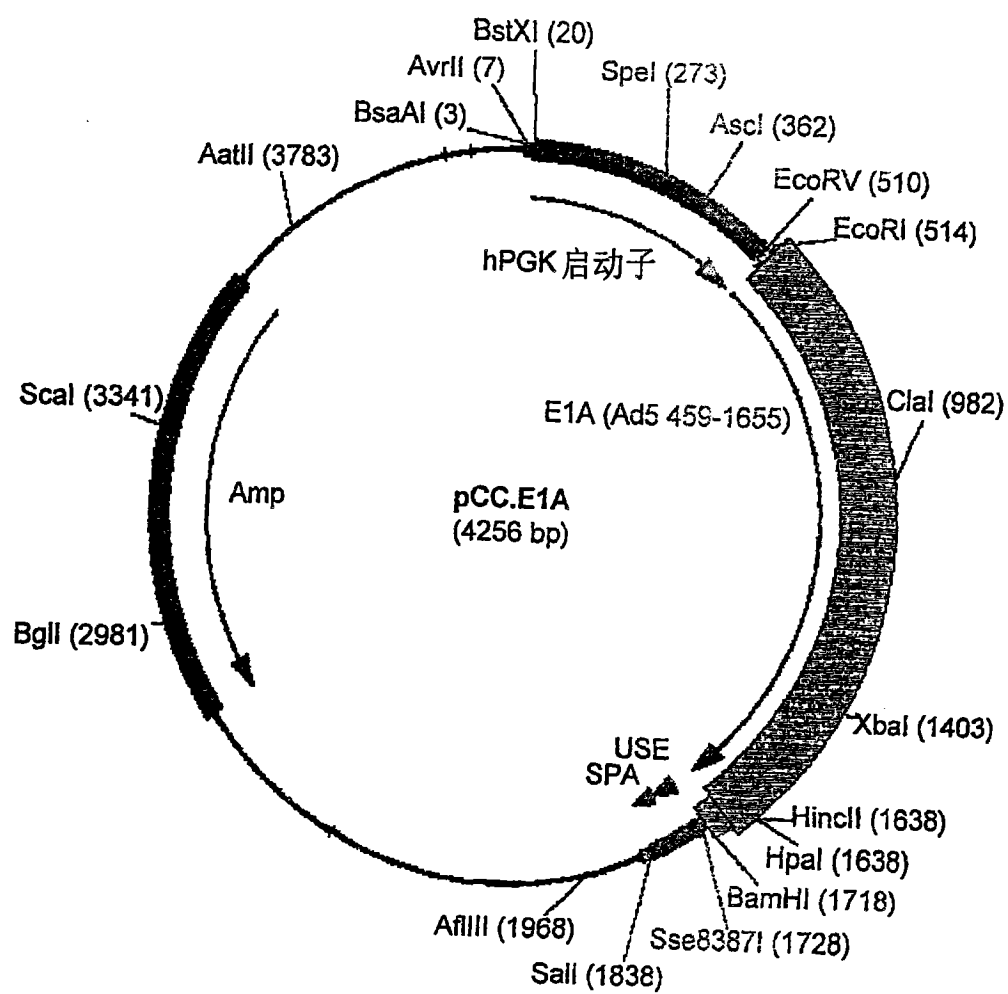


图 4

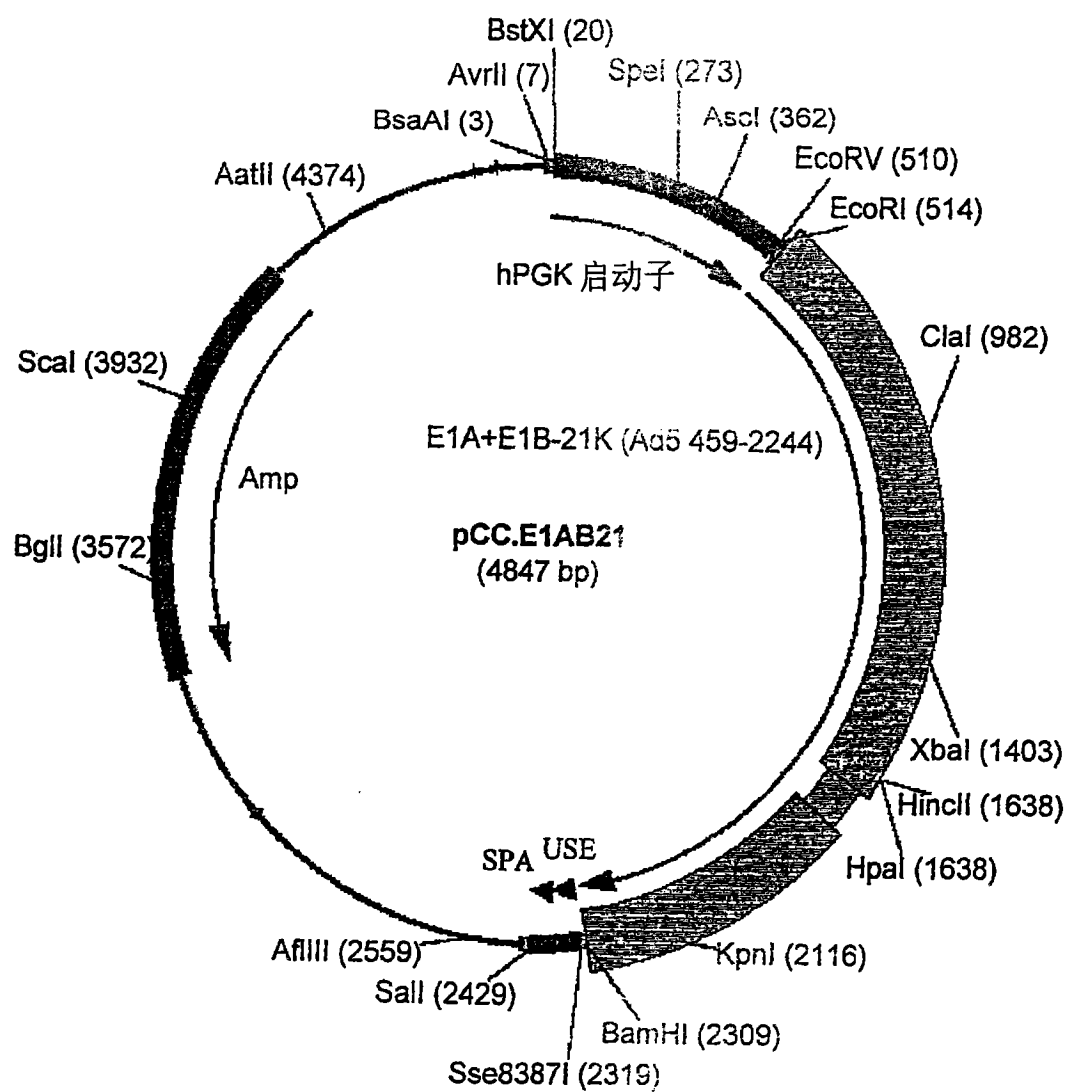


图 5

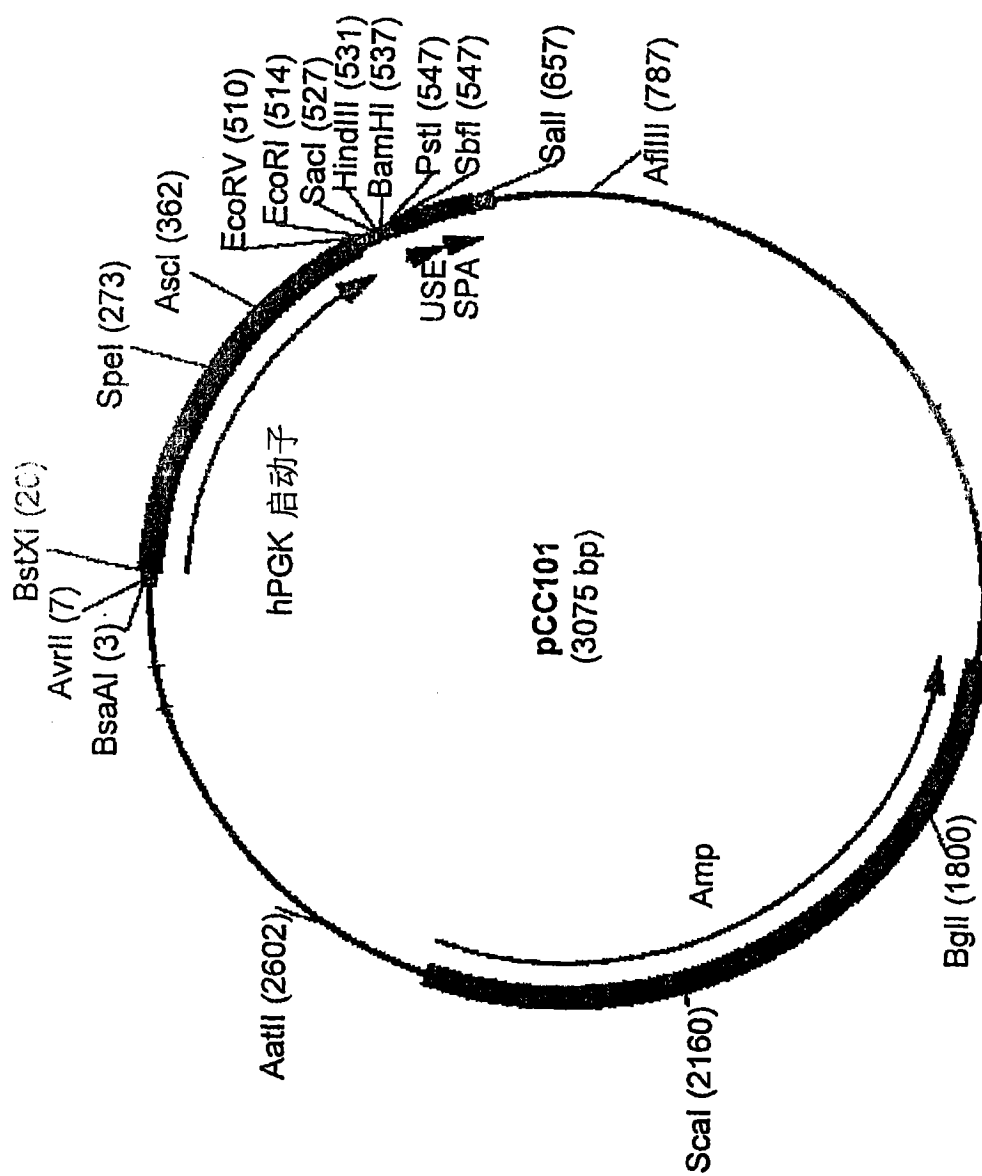


图 6

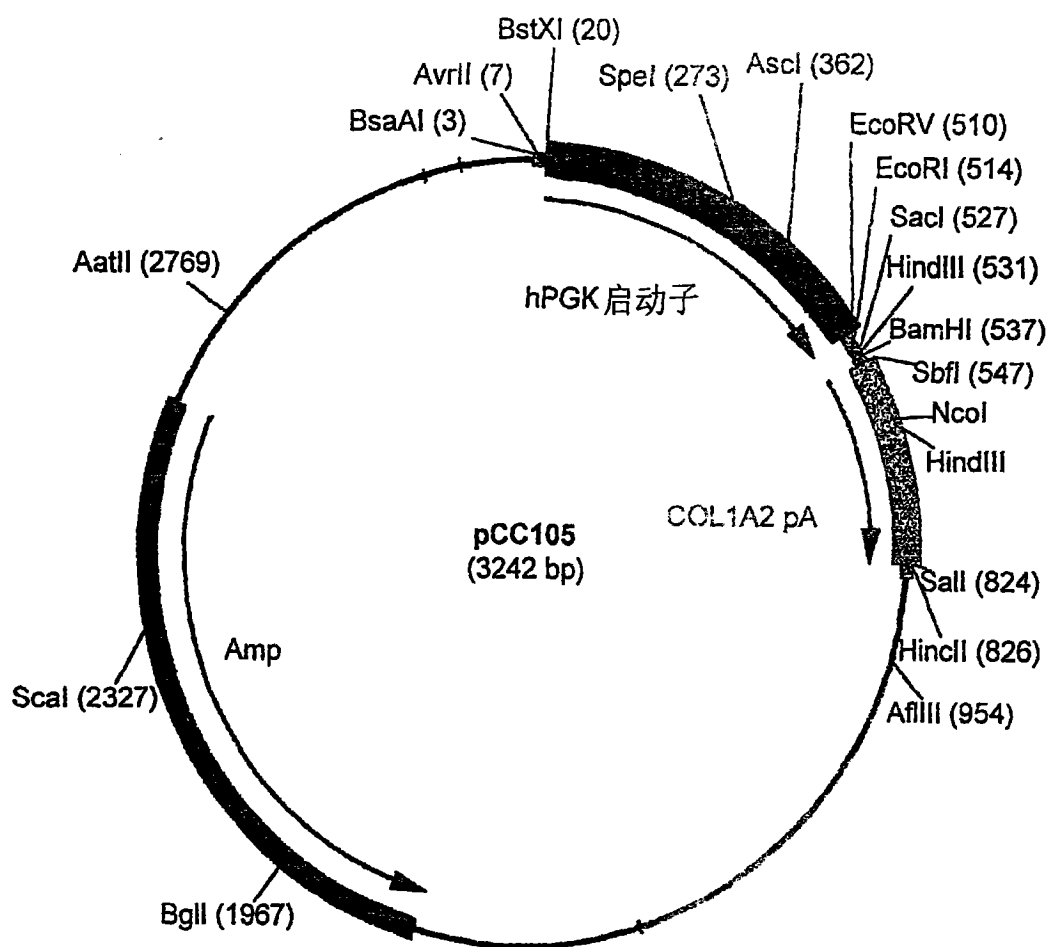


图 7

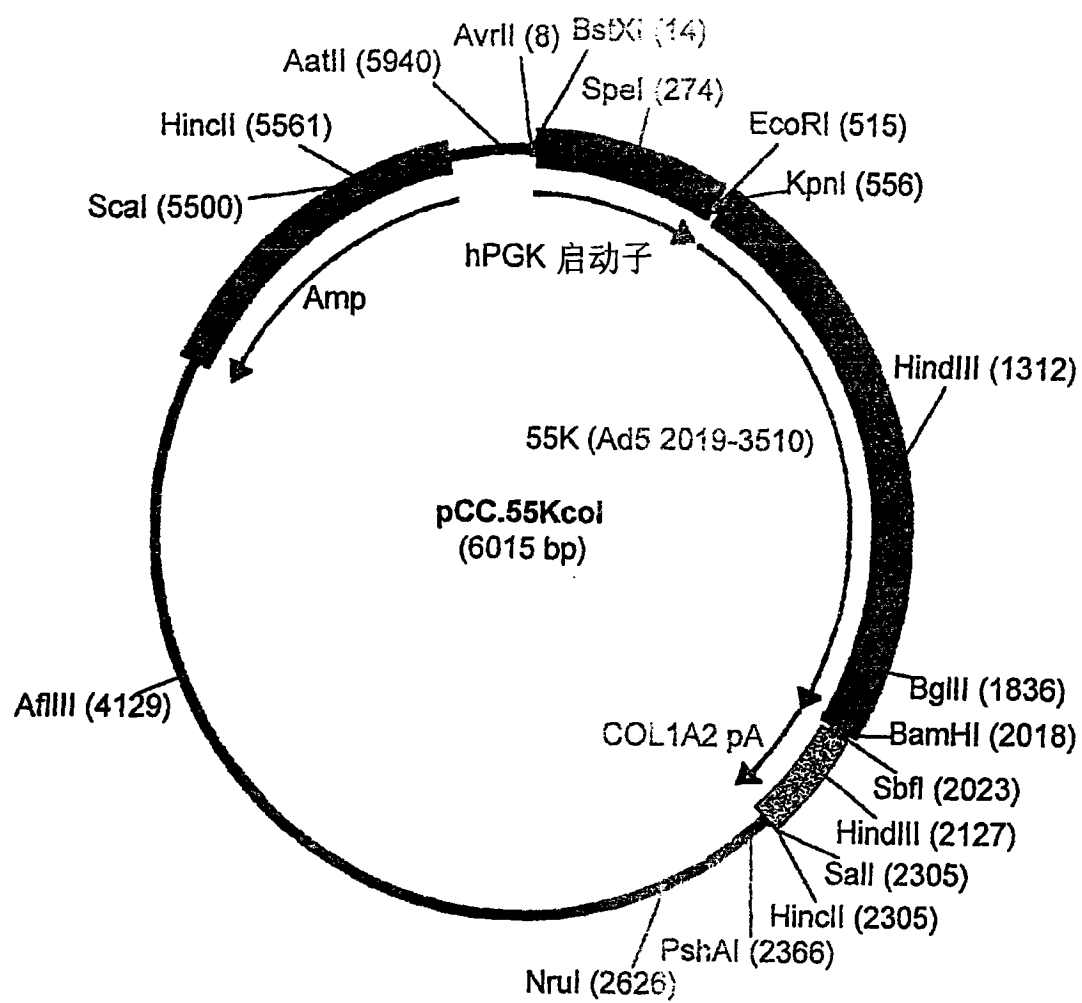


图 8

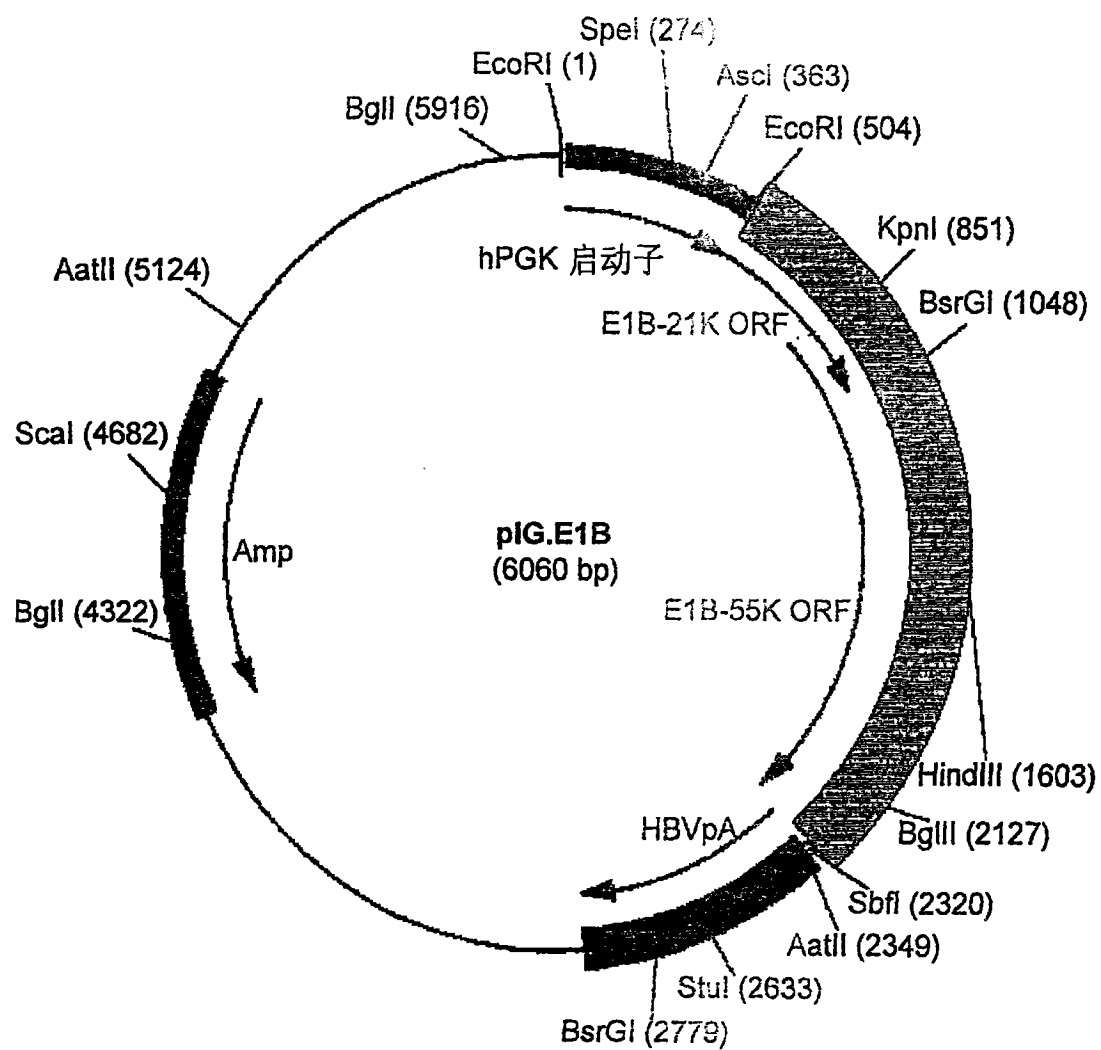


图 9

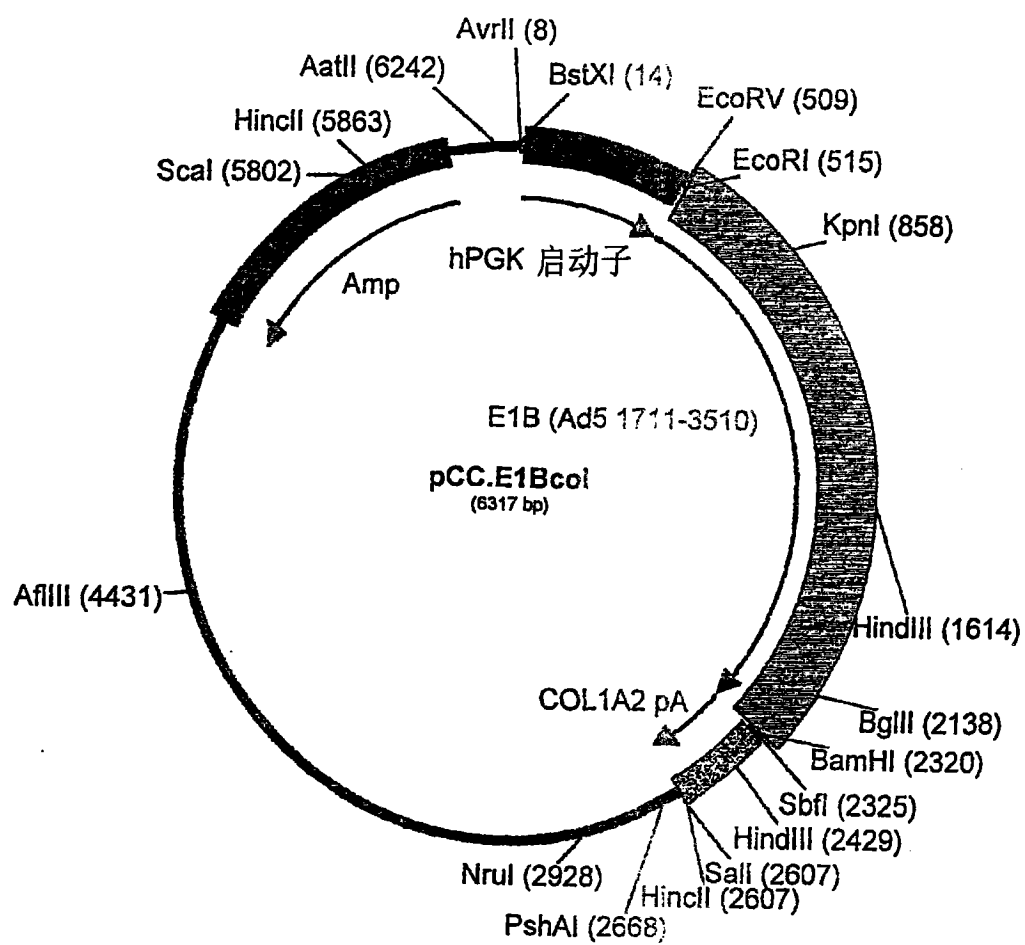


图 10

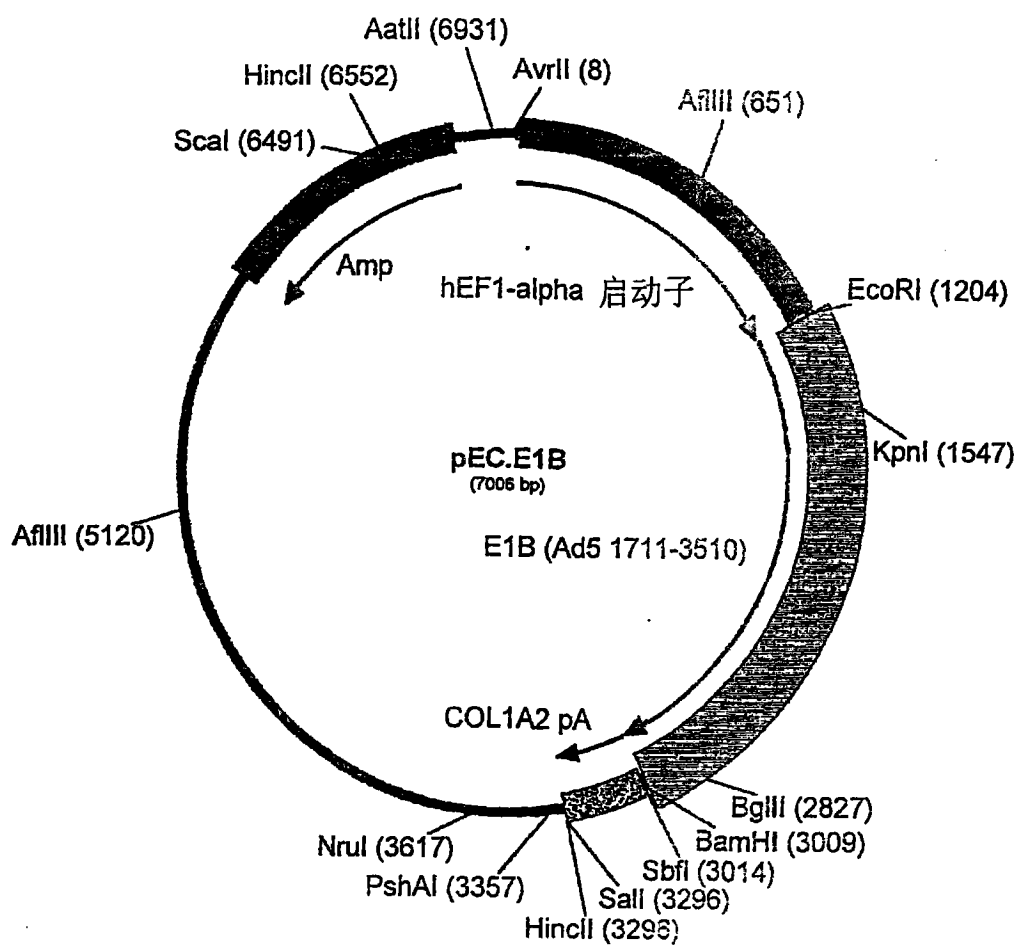


图 11

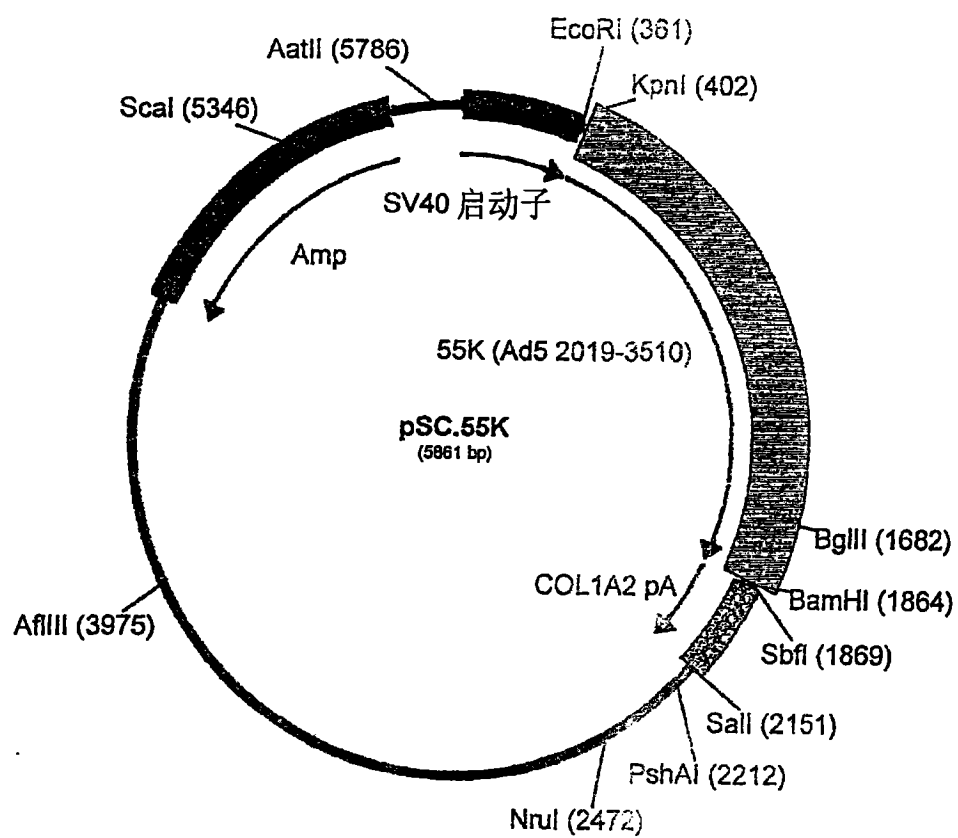


图 12

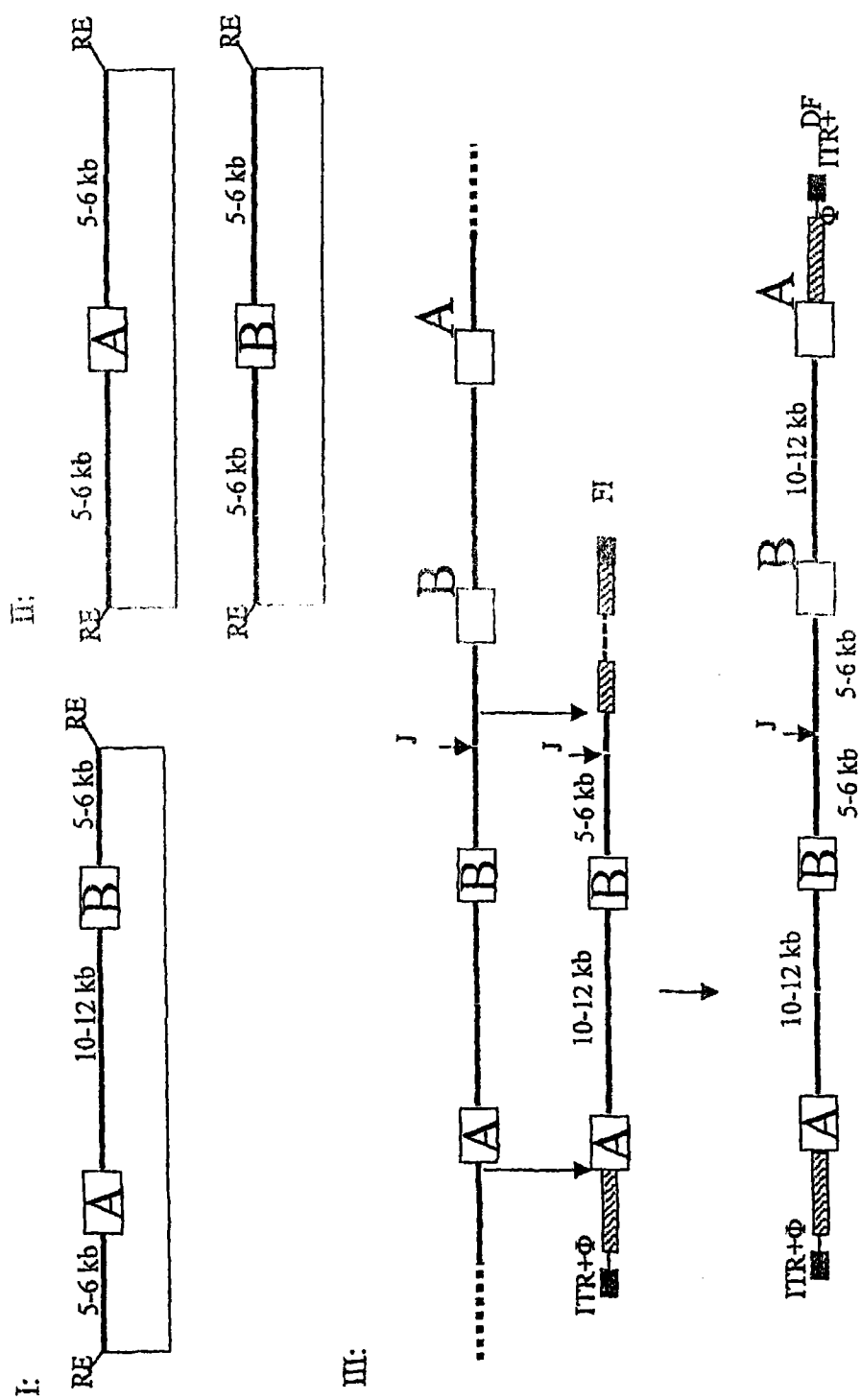


图 13

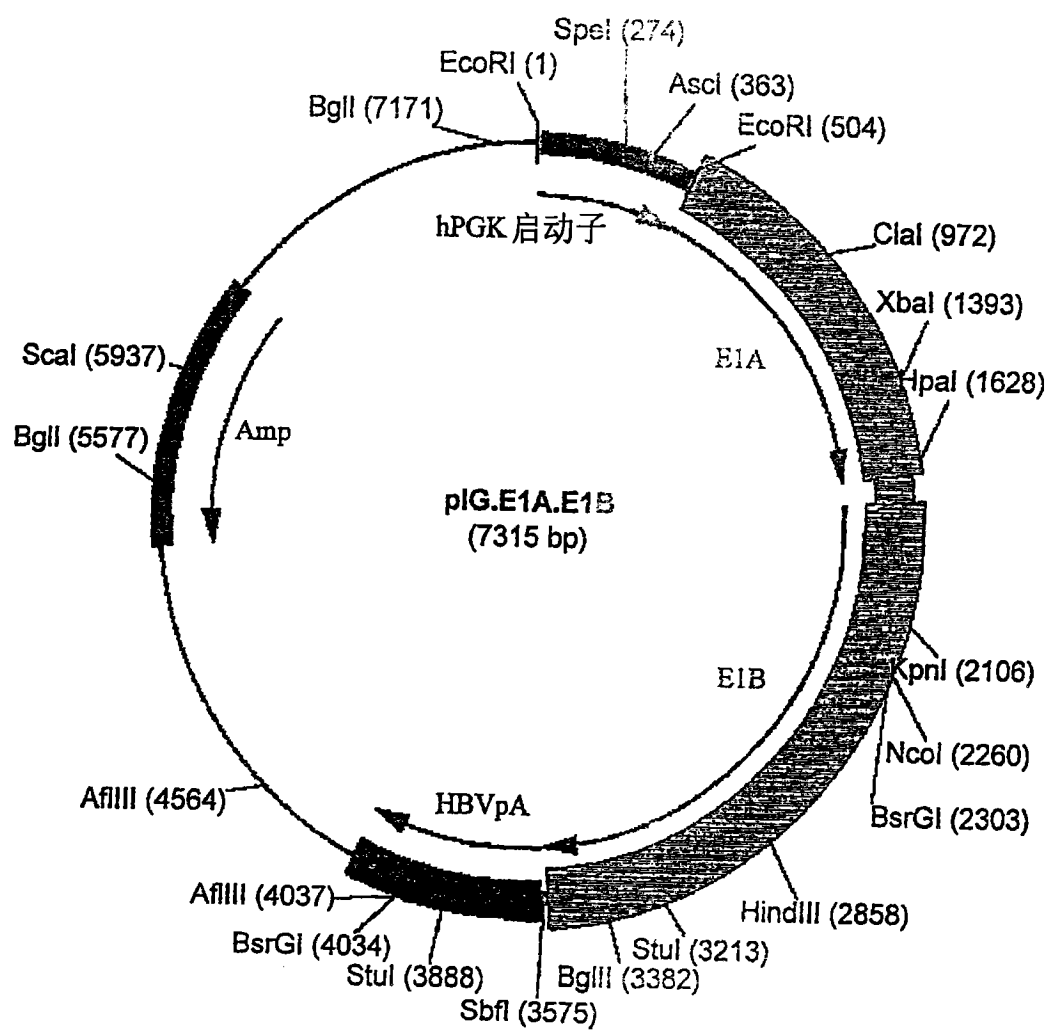


图 14

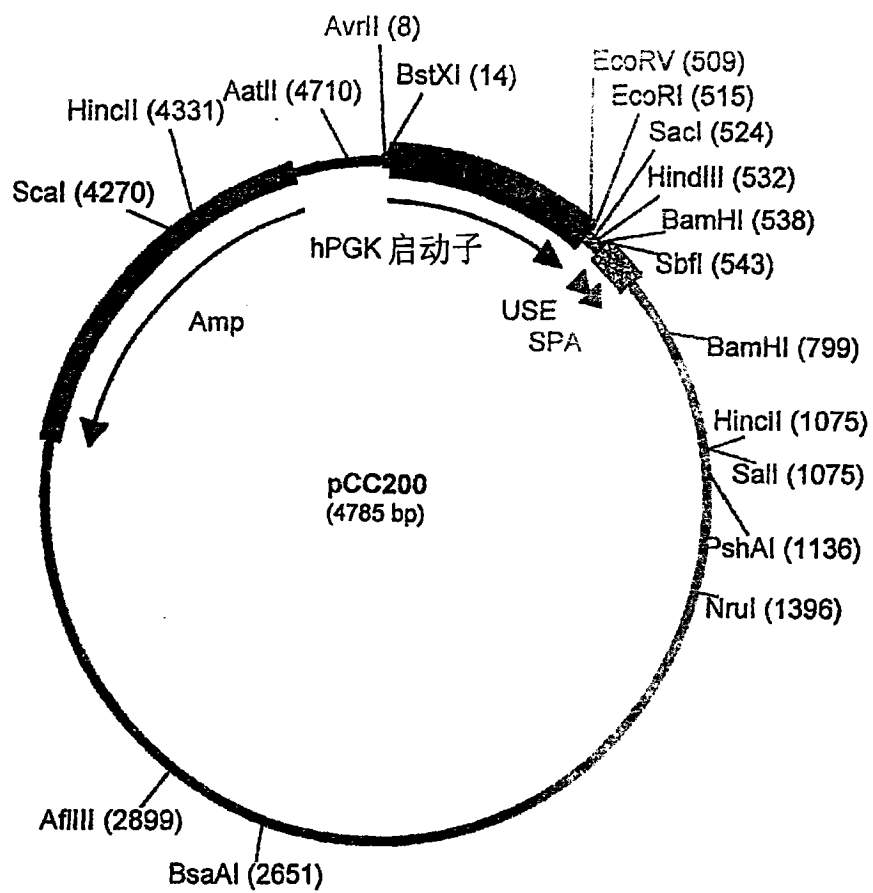


图 15

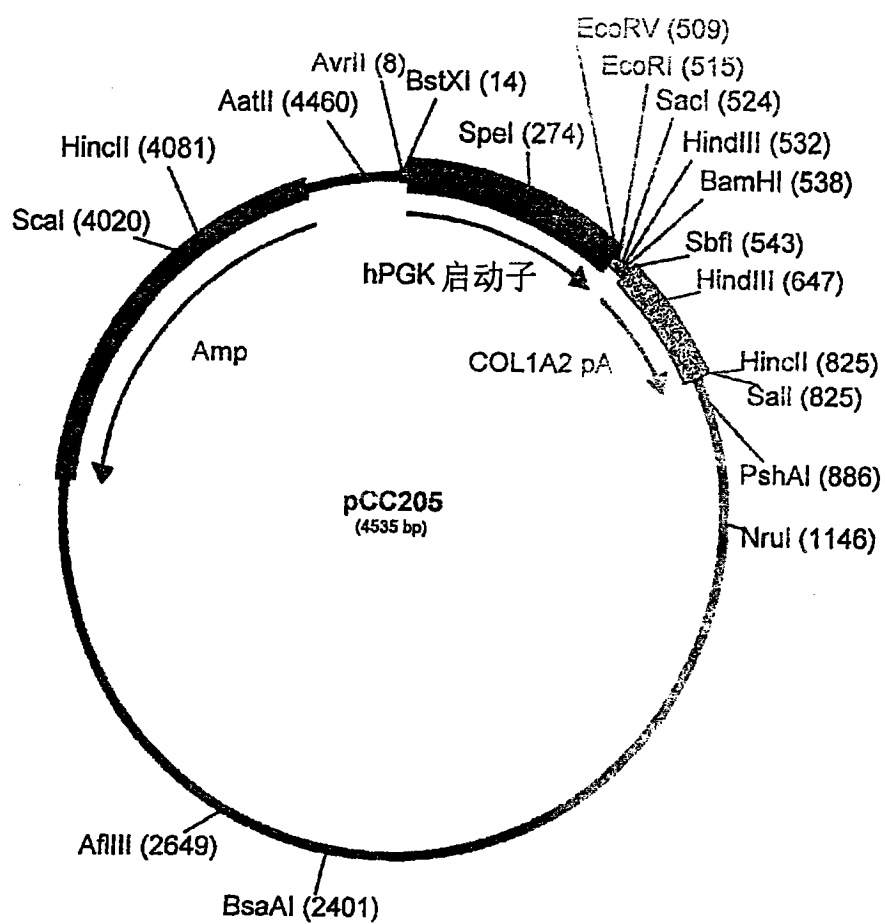


图 16

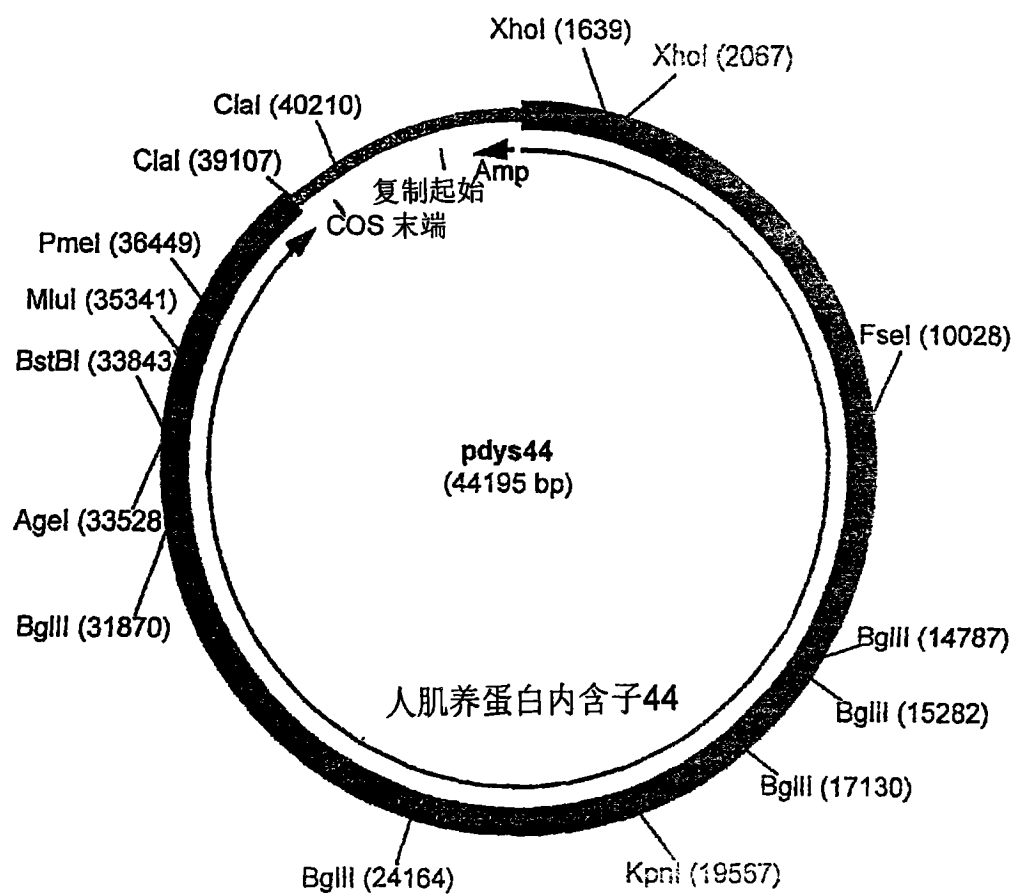


图 17

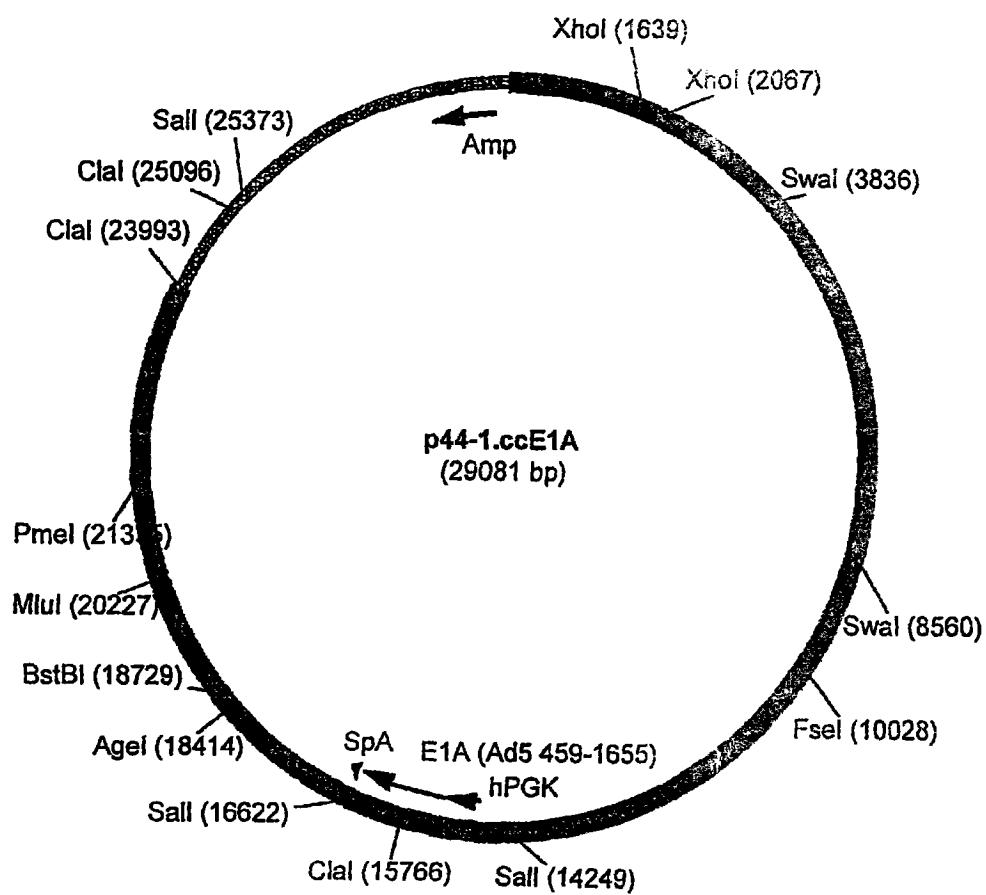


图 18

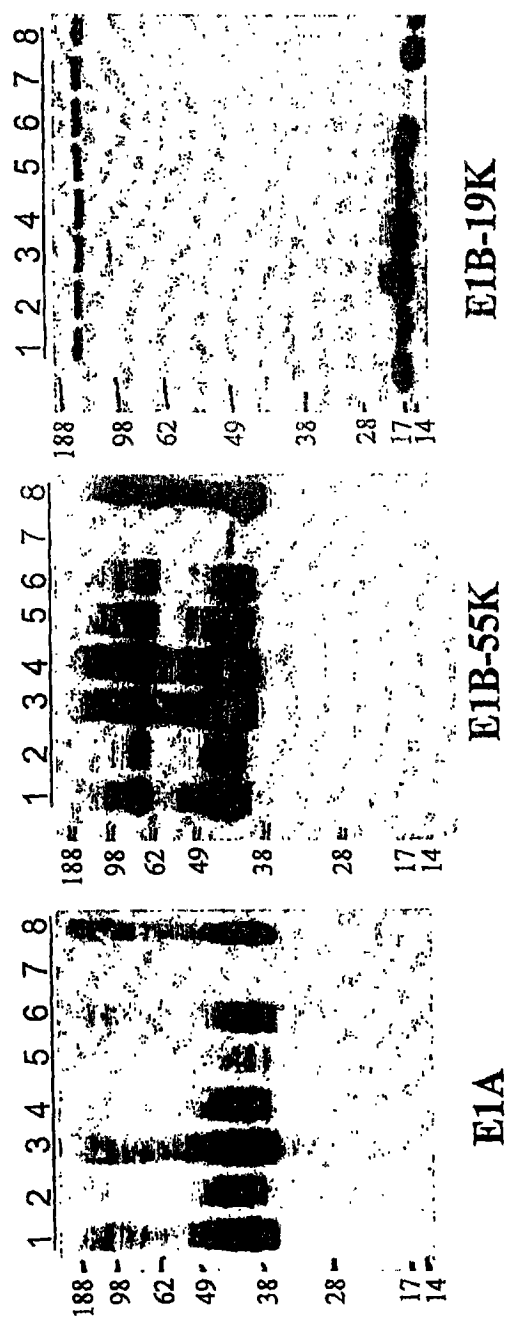


图 19

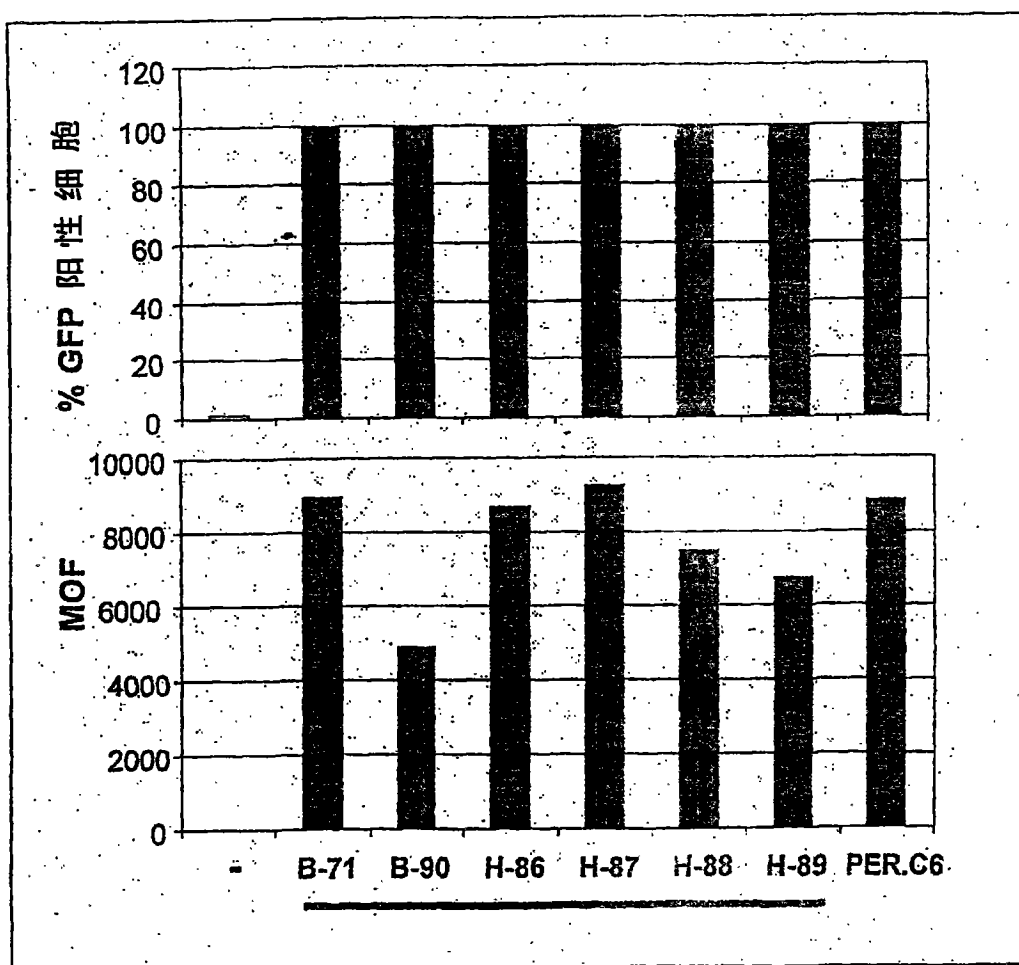


图 20

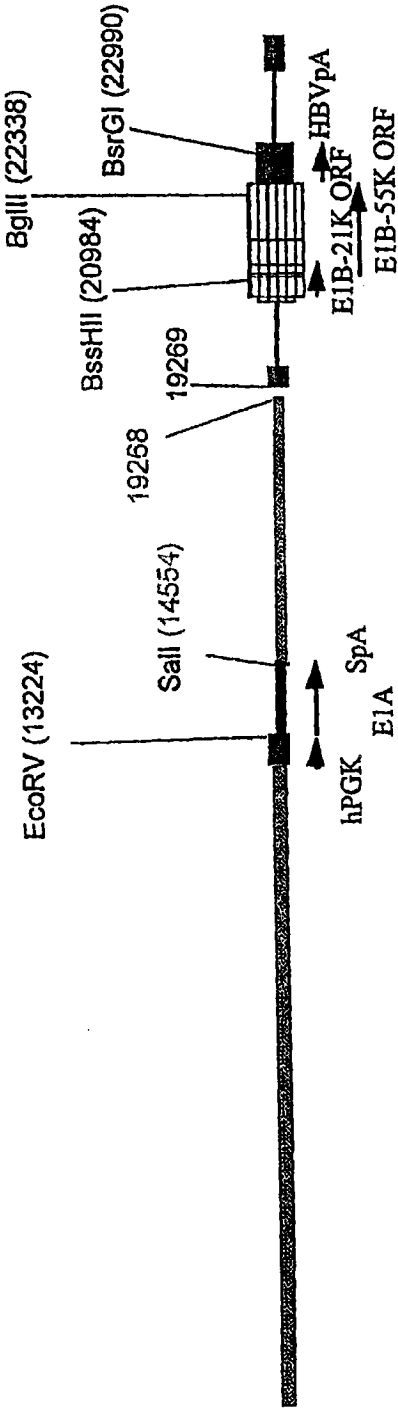


图 21

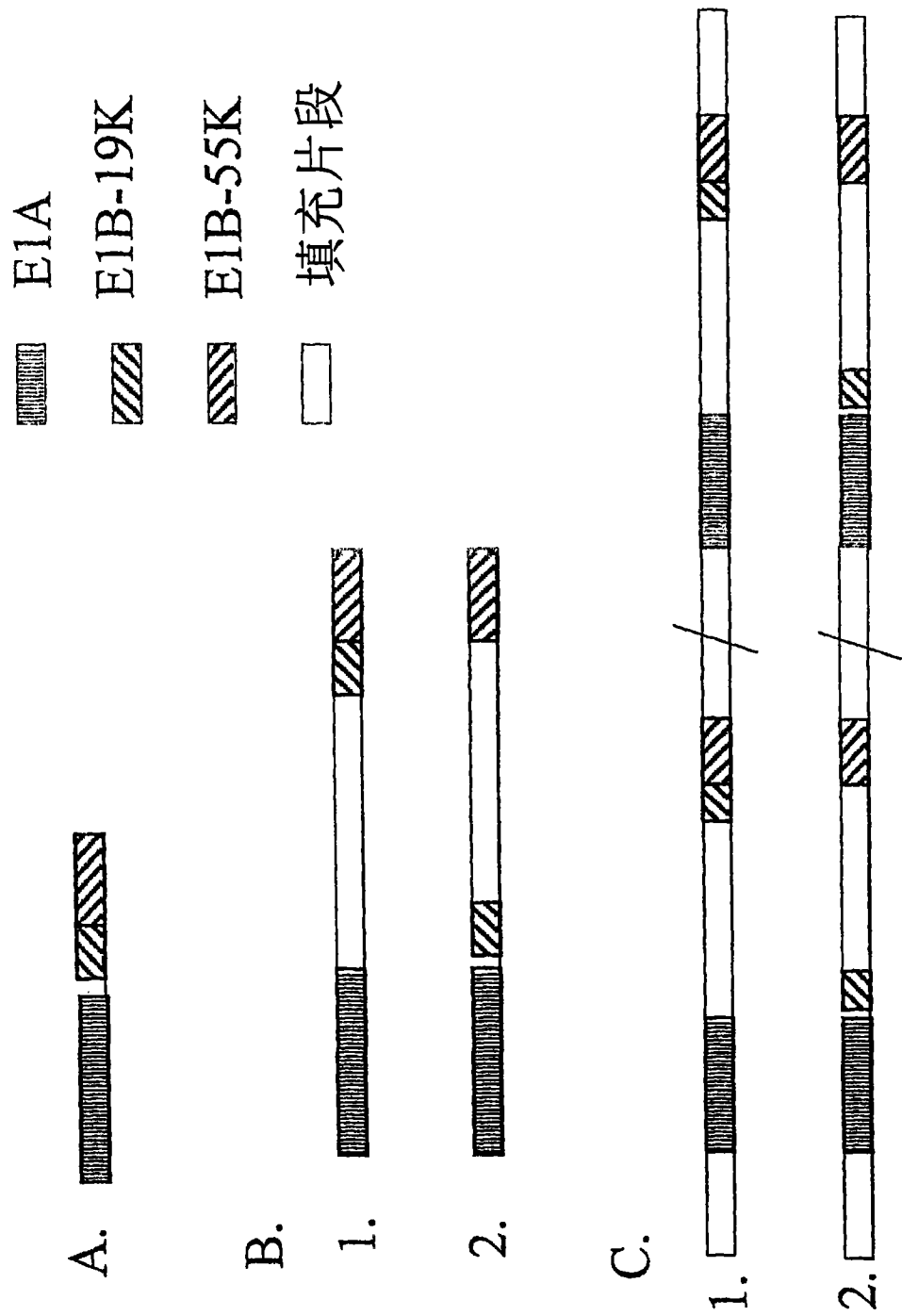


图 22