



(10) 授权公告号 CN 111133102 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 16

(21) 申请号 201880038591.8
(22) 申请日 2018.04.10
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111133102 A
(43) 申请公布日 2020.05.08
(30) 优先权数据
 62/483,837 2017.04.10 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2019.12.10
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2018/026977 2018.04.10
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02018/191313 EN 2018.10.18
(73) 专利权人 埃皮辛特瑞柯斯公司
 地址 美国加利福尼亚州
(72) 发明人 托尼·R·雷德
 布莱恩·T·奥兰斯基
 克里斯托弗·拉森
(74) 专利代理机构 北京市立方律师事务所
 11330
 专利代理师 杨剑
(51) Int.Cl.
 C12N 7/02 (2006.01)
 C12N 15/861 (2006.01)
 C12N 15/85 (2006.01)
(56) 对比文件
 W0 0032754 A1,2000.06.08
 US 6113913 A,2000.09.05

WO W02010101921 Y,2010.09.10
WO 2005063970 A1,2005.07.14
US US6113913 Y,2000.09.05
RENALO GILBERT ET AL.Establishment
and validation of new complementing cells
for production of E1-deleted adenovirus
vectors in serum-free suspension culture.
《RENALO GILBERT ET AL》.2014,第208卷摘要、
图1,第179 页左栏第2段,右栏第2段及最后1段、
第 183 页左栏最后1段-右栏最后1段,第184页
右栏第1段、图2、7,第178页左栏倒数第二段,182
页右栏第1段,第185页左栏第2段,第186页右栏
倒数第2段、第180页左栏第1段。
HEDJARAN, F ET AL.Deletion analysis of
Ad5 E1a transcriptional control region:
impact on tumor-selective expression of E
1a and E1b.《CANCER GENE THERAPY》.2011,第
18卷标题,摘要、第719页。
LONGLEY.Development of a serum-free
suspension process for the production of
a conditionally replicating adenovirus
using A549 cells.CYTOTECHNOLOGY.2005,第49
卷第161 - 171页。
LONGLEY.Development of a serum-free
suspension process for the production of
a conditionally replicating adenovirus
using A549 cells.CYTOTECHNOLOGY.2005,第49
卷第161 - 171页。
审查员 张谨
权利要求书2页 说明书19页
序列表32页 附图2页

(54) 发明名称
 生产重组病毒的方法
(57) 摘要
 本发明涉及一种使用A549宿主细胞生产重
 组病毒例如重组溶瘤腺病毒的方法。

CN 111133102 B

1. 一种生产溶瘤腺病毒的方法,所述方法包括:

(a) 用溶瘤腺病毒感染A549宿主细胞,以产生感染的A549宿主细胞,或将包含编码溶瘤腺病毒的核苷酸序列的核酸引入到A549宿主细胞中,以产生核酸引入的A549宿主细胞;和

(b) 将所述感染的A549宿主细胞或所述核酸引入的A549宿主细胞在无血清培养基中,在允许所述溶瘤腺病毒复制的条件下悬浮培养,由此生产所述溶瘤腺病毒,其中所述溶瘤腺病毒包含具有与E1a蛋白编码区可操作连接的修饰的调控序列的E1a基因,并且所述修饰的调控序列选自:(i) 对应于如SEQ ID NO:1所示的5型腺病毒(Ad5)基因组的第195-244位的核苷酸的缺失,或(ii) 对应于如SEQ ID NO:1所示的Ad5基因组的第195-244位的氨基酸的缺失和第1714-1916位的核苷酸的缺失。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述A549宿主细胞是SF-BMAdR 281A549细胞。

3. 如权利要求1所述的方法,其中将所述感染的A549宿主细胞或所述核酸引入的A549宿主细胞培养至少3天。

4. 如权利要求1所述的方法,其在步骤(b)之后还包括纯化所述溶瘤腺病毒的步骤。

5. 如权利要求4所述的方法,其中所述纯化所述溶瘤腺病毒的步骤包括裂解所述感染的A549宿主细胞或所述核酸引入的A549宿主细胞。

6. 如权利要求4所述的方法,其中所述纯化所述溶瘤腺病毒的步骤包括核酸酶处理。

7. 如权利要求4所述的方法,其中所述纯化所述溶瘤腺病毒的步骤包括离子交换层析。

8. 如权利要求7所述的方法,其中所述纯化所述溶瘤腺病毒的步骤包括:

(i) 裂解所述感染的A549宿主细胞或所述核酸引入的A549宿主细胞以产生细胞裂解物;

(ii) 用核酸酶处理所述细胞裂解物以产生处理过的细胞裂解物;和

(iii) 通过离子交换层析从所述处理过的细胞裂解物纯化所述溶瘤腺病毒。

9. 如权利要求1所述的方法,其中所述E1a启动子包含序列GGTGT TTTTGG (SEQ ID NO:2)。

10. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述溶瘤腺病毒包含编码转入基因的核苷酸序列。

11. 如权利要求10所述的方法,其中所述核苷酸序列被插入到E1b-19K插入位点中,其中所述E1b-19K插入位点位于E1b-19K的起始位点与E1b-19K的终止位点之间。

12. 如权利要求11所述的方法,其中所述E1b-19K插入位点包含对应于如SEQ ID NO:1所示的Ad5基因组的第1714-1917位核苷酸的缺失。

13. 如权利要求11所述的方法,其中所述E1b-19K插入位点包含对应于如SEQ ID NO:1所示的Ad5基因组的第1714-1916位核苷酸的缺失。

14. 如权利要求11所述的方法,其中所述转入基因被插入到对应于如SEQ ID NO:1所示的Ad5基因组的第1714和1917位的核苷酸之间。

15. 如权利要求11所述的方法,其中所述转入基因被插入到对应于如SEQ ID NO:1所示的Ad5基因组的第1714和1916位的核苷酸之间。

16. 如权利要求11所述的方法,其中所述转入基因被插入到CTGACCTC (SEQ ID NO:4) 和TCACCAGG (SEQ ID NO:5) 之间。

17. 如权利要求11所述的方法,其中所述溶瘤腺病毒以5' 至3' 方向包含CTGACCTC (SEQ ID NO:4)、所述转入基因和TCACCAGG (SEQ ID NO:5)。

18. 如权利要求10所述的方法,其中所述转入基因不被可操作连接到外源启动子序列。

19. 如权利要求10所述的方法,其中所述转入基因编码选自CD80、CD137L、IL-23、IL-23A/p19、p40、IL-27、IL-27A/p28、IL-27B/EBI3、ICAM-1、TGF- β 1、TGF- β 、CD19、CD20、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、CD154、CD86、BORIS/CTCF、FGF、IL-24、MAGE、NY-ESO-1、乙酰胆碱、干扰素- γ 、DKK1/Wnt、p53、胸苷激酶、抗PD-1抗体重链或轻链和抗PD-L1抗体重链或轻链的多肽。

20. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述溶瘤腺病毒选择性地在过度增殖性细胞中复制。

21. 如权利要求10所述的方法,其中所述溶瘤腺病毒选择性地在过度增殖性细胞中表达所述转入基因。

生产重组病毒的方法

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年4月10日提交的美国临时专利申请系列号62/483,837的利益和优先权,所述临时申请在此整体通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明的领域涉及生产重组病毒例如重组溶瘤腺病毒的方法。

背景技术

[0004] 尽管对引起癌症的基础分子机制已有广泛了解,但大多数晚期癌症仍然不能使用当前的化疗和放疗方案治愈。溶瘤病毒作为有潜力显著增强当前用于各种不同恶性肿瘤的标准治疗的平台技术而出现 (Kumar, S. 等, (2008) CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS 10(4):371-379; Kim, D. (2001) EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY 1(3):525-538; Kim D. (2000) ONCOGENE 19(56):6660-6669)。这些病毒有希望成为溶瘤剂,它们不仅可以通过感染-繁殖-裂解的链式反应直接破坏恶性细胞,还可以间接地诱导抗肿瘤免疫。这些免疫刺激性质通过每当病毒复制时复制并表达的治疗性转入基因的插入而被增强。

[0005] 以前开发的溶瘤病毒包括被称为TAV-255的溶瘤5血清型腺病毒(Ad5),其在正常细胞中转录弱化,但在癌细胞中活跃转录(参见PCT公开号W02010/101921)。据信,所述TAV-255载体实现这种肿瘤选择性的机制是通过转录因子Pea3和E2F的三个转录因子(TF)结合位点的定向缺失,这些转录因子是通过结合到特定DNA序列来调控病毒进入宿主细胞后最早转录的基因E1a的腺病毒表达的蛋白质。

[0006] 尽管迄今为止已做出种种努力,我们仍然需要更好的病毒用以治疗人类癌症和各类高增生性疾病,以及改良的生产重组病毒的方法。

发明内容

[0007] 本发明部分是基于A549宿主细胞例如SF-BMAdR 281 A549宿主细胞可用于生产大量重组病毒例如溶瘤腺病毒这一发现。惊奇地地发现了某些重组病毒例如重组溶瘤腺病毒在容许复制的环境中,在无血清和适应悬浮的A549细胞中比在广泛用于病毒载体生产的HEK293细胞中生长至更高密度。

[0008] 因此,一方面,本发明提供了一种生产重组病毒的方法,所述方法包括:(a)用重组病毒感染A549宿主细胞以产生感染的A549宿主细胞;和(b)将所述感染的A549宿主细胞在无血清培养基中,在允许所述重组病毒复制的条件下(例如在容许复制的环境中)悬浮培养,由此生产所述重组病毒。在某些实施方式中,所述A549宿主细胞是SF-BMAdR 281 A549宿主细胞。在某些实施方式中,将所述感染的A549宿主细胞培养至少3天。

[0009] 所述方法还可以包括在步骤(b)后的纯化所述重组病毒的步骤。所述纯化所述重组病毒的步骤可以包括裂解感染的A549宿主细胞、核酸酶处理和离子交换层析例如阴离子

交换层析中的一者或多者。在某些实施方式中,所述纯化所述重组病毒的步骤包括:(i)裂解所述感染的A549宿主细胞以产生细胞裂解物;(ii)用核酸酶处理所述细胞裂解物以产生处理过的细胞裂解物;和(iii)通过离子交换层析例如阴离子交换层析从处理过的细胞裂解物中纯化出所述的重组病毒。

[0010] 相比于同类的生产重组病毒的方法,所述方法的重组病毒得率更高。例如,在某些实施方式中,所述方法与类似方法(例如其他方面一致的方法)相比会产生多至少5倍、10倍或20倍的重组病毒,所述类似方法包括在步骤(a)中用重组病毒感染HEK293宿主细胞以产生感染的HEK293宿主细胞,并且在步骤(b)中将所述感染的HEK293宿主细胞在无血清培养基中,在允许所述重组病毒复制的条件下(例如在容许复制的环境中)悬浮培养。在某些实施方式中,所述方法与类似方法(例如其他方面一致的方法)相比产生多至少5倍、10倍或20倍的重组病毒,所述类似方法包括在步骤(b)中,将所述感染的A549宿主细胞在无血清培养基中,在允许所述重组病毒复制的条件下(例如在容许复制的环境中)贴壁培养。在某些实施方式中,所述方法与类似方法(例如其他方面一致的方法)相比产生多至少5倍、10倍或20倍的重组病毒,所述类似方法包括在步骤(b)中,将所述感染的A549宿主细胞在含血清培养基中,在允许所述重组病毒复制的条件(例如容许复制的环境)下悬浮培养。

[0011] 在某些实施方式中,所述重组病毒是腺病毒例如5型腺病毒或腺相关病毒。在某些实施方式中,所述重组病毒是重组溶瘤病毒。在某些实施方式中,所述重组病毒是重组溶瘤腺病毒。

[0012] 另一方面,本发明提供了一种生产重组溶瘤腺病毒的方法,所述方法包括:(a)用重组溶瘤腺病毒感染A549宿主细胞,以产生感染的A549宿主细胞;和(b)将所述感染的A549宿主细胞在无血清培养基中,在允许所述重组溶瘤腺病毒复制的条件下(例如在容许复制的环境中)悬浮培养,由此生产所述重组溶瘤腺病毒。在某些实施方式中,所述A549宿主细胞是SF-BMAdR 281 A549宿主细胞。在某些实施方式中,将所述感染的A549宿主细胞培养至少3天。

[0013] 所述方法还可以在步骤(b)后包括纯化所述重组溶瘤腺病毒的步骤。所述纯化所述重组溶瘤腺病毒的步骤可以包括裂解所述感染的A549宿主细胞、核酸酶处理和离子交换层析例如阴离子交换层析中的一者或多者。在某些实施方式中,所述纯化重组溶瘤腺病毒的步骤包括:(i)裂解所述感染的A549宿主细胞以产生细胞裂解物;(ii)用核酸酶处理所述细胞裂解物以产生处理过的细胞裂解物;和(iii)通过离子交换层析例如阴离子交换层析从所述处理过的细胞裂解物纯化所述重组病毒。

[0014] 所述方法与用于生产重组溶瘤腺病毒的类似方法相比,可以产生更高的重组溶瘤腺病毒得率。例如,在某些实施方式中,所述方法与类似方法(例如其他方面一致的方法)相比产生多至少5倍、10倍或20倍的重组溶瘤腺病毒,所述类似方法包括在步骤(a)中用重组溶瘤腺病毒感染HEK293宿主细胞以产生感染的HEK293宿主细胞,并且在步骤(b)中将所述感染的HEK293宿主细胞在无血清培养基中,在允许所述重组溶瘤腺病毒复制的条件下(例如在容许复制的环境中)悬浮培养。在某些实施方式中,所述方法与类似方法(例如其他方面一致的方法)相比产生多至少5倍、10倍或20倍的重组溶瘤腺病毒,所述类似方法包括在步骤(b)中将所述感染的A549宿主细胞在无血清培养基中,在允许所述重组溶瘤腺病毒复制的条件下(例如在容许复制的环境中)贴壁培养。在某些实施方式中,所述方法与类似方

法(例如其他方面一致的方法)相比产生多至少5倍、10倍或20倍的重组溶瘤腺病毒,所述类似方法包括在步骤(b)中将所述感染的A549宿主细胞在含血清培养基中,在允许所述重组溶瘤腺病毒复制的条件下(例如在容许复制的环境中)悬浮培养。

[0015] 另一方面,本发明提供了一种生产重组溶瘤腺病毒的方法,所述方法包括:(a)将包含编码重组溶瘤腺病毒的核苷酸序列的核酸引入到A549宿主细胞中;和(b)将所述A549宿主细胞在无血清培养基中,在允许所述重组溶瘤腺病毒生产的条件下(例如在容许复制的环境中)悬浮培养,由此生产所述重组溶瘤腺病毒。在某些实施方式中,所述A549宿主细胞是SF-BMAdR 281 A549宿主细胞。在某些实施方式中,将所述A549宿主细胞培养至少3天。

[0016] 所述方法还可以在步骤(b)后包括纯化所述重组溶瘤腺病毒的步骤。所述纯化所述重组溶瘤腺病毒的步骤可以包括裂解所述A549宿主细胞、核酸酶处理和离子交换层析例如阴离子交换层析中的一者或多者。在某些实施方式中,所述纯化所述重组溶瘤腺病毒的步骤包括:(i)裂解所述A549宿主细胞以产生细胞裂解物;(ii)用核酸酶处理所述细胞裂解物以产生处理过的细胞裂解物;和(iii)通过离子交换层析例如阴离子交换层析从所述处理过的细胞裂解物纯化所述重组病毒。

[0017] 所述方法与用于生产重组溶瘤腺病毒的可比方法相比可以产生更高的重组溶瘤腺病毒得率。例如,在某些实施方式中,所述方法与类似方法(例如其他方面一致的方法)相比产生多至少5倍、10倍或20倍的重组溶瘤腺病毒,所述类似方法包括在步骤(a)中将包含编码重组溶瘤病毒的核苷酸序列的核酸引入到HEK293宿主中,并且在步骤(b)中将所述HEK293宿主细胞在无血清培养基中,在允许所述重组溶瘤腺病毒生产的条件下(例如在容许复制的环境中)悬浮培养。在某些实施方式中,所述方法与类似方法(例如其他方面一致的方法)相比产生多至少5倍、10倍或20倍的重组溶瘤腺病毒,所述类似方法包括在步骤(b)中将所述A549宿主细胞在无血清培养基中,在允许所述重组溶瘤腺病毒复制的条件下(例如在容许复制的环境中)贴壁培养。在某些实施方式中,所述方法与类似方法(例如其他方面一致的方法)相比产生多至少5倍、10倍或20倍的重组溶瘤腺病毒,所述类似方法包括在步骤(b)中将所述A549宿主细胞在含血清培养基中,在允许所述重组溶瘤腺病毒复制的条件下(例如在容许复制的环境中)悬浮培养。

[0018] 在某些实施方式中,所述重组溶瘤腺病毒包含具有功能性Pea3结合位点缺失的E1a启动子。例如,所述病毒可以包含对应于E1a的起始位点上游约-300至约-250位的核苷酸的缺失,例如对应于E1a的起始位点上游-305至-255或-304至-255位的核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述缺失包含对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第195-244位的核苷酸的缺失,和/或所述E1a启动子包含序列GGTGTTTTGG(SEQ ID NO:2)。

[0019] 在某些实施方式中,所述重组溶瘤腺病毒包含具有功能性TATA盒缺失(例如整个TATA盒的缺失)的E1a启动子。例如,在某些实施方式中,所述病毒包含对应于5型腺病毒E1a启动子的-27至-24、-31至-24、-44至+54或-146至+54位的核苷酸的缺失,所述核苷酸分别对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第472至475、468至475、455至552和353至552位的核苷酸。在某些实施方式中,所述病毒包含产生包含序列CTAGGACTG(SEQ ID NO:3)、AGTGCCCG(SEQ ID NO:8)或TATTCCCG(SEQ ID NO:9)的病毒的多核苷酸缺失,所述序列由原本在所述缺失的多核苷酸序列侧翼的两个多核苷酸序列的联结产生。

[0020] 在某些实施方式中,所述重组溶瘤腺病毒包含对应于5型腺病毒E1a启动子的-29

至-26、-33至-26、-44至+52或-148至+52位的核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述病毒包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第353至552位的核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述病毒包含产生包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO:3) 的病毒的多核苷酸缺失,所述序列由原本在所述缺失的多核苷酸序列侧翼的两个多核苷酸序列的联结产生。

[0021] 在某些实施方式中,所述重组溶瘤腺病毒包含具有功能性CAAT盒缺失 (例如整个CAAT盒缺失) 的E1a启动子。例如,在某些实施方式中,所述病毒包含对应于5型腺病毒E1a启动子的-76至-68位的核苷酸的缺失,所述核苷酸对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第423至431位的核苷酸。在某些实施方式中,所述病毒包含产生包含序列TTCCGTGGCG (SEQ ID NO:10) 的病毒的多核苷酸缺失,所述序列由原本在所述缺失的多核苷酸序列侧翼的两个多核苷酸序列的联结产生。

[0022] 在某些实施方式中,所述重组溶瘤腺病毒包含编码转入基因的核苷酸序列,这个序列可以被插入到E1b-19K插入位点中,所述E1b-19K插入位点位于E1b-19K起始位点与E1b-55K起始位点之间。在某些实施方式中,所述E1b-19K插入位点位于E1b-19K的起始位点与E1b-19K的终止位点之间。在某些实施方式中,所述E1b-19K插入位点包含所述E1b-19K起始位点附近约100至约305、约100至约300、约100至约250、约100至约200、约100至约150、约150至约305、约150至约300、约150至约250或约150至约200个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E1b-19K插入位点包含所述E1b-19K起始位点附近约200个核苷酸例如202或203个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E1b-19K插入位点包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第1714-1917或1714-1916位核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述编码转入基因的核苷酸序列被插入到对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第1714和1917位的核苷酸之间或对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第1714和1916位的核苷酸之间。在某些实施方式中,所述编码转入基因的核苷酸序列被插入到CTGACCTC (SEQ ID NO:4) 和TCACCAGG (SEQ ID NO:5) 之间,例如所述病毒以5' 至3' 方向包含CTGACCTC (SEQ ID NO:4),所述编码转入基因的核苷酸序列,和TCACCAGG (SEQ ID NO:5)。

[0023] 在某些实施方式中,所述编码转入基因的核苷酸序列不被可操作连接到外源启动子序列。

[0024] 在某些实施方式中,所述转入基因编码一条选自CD80、CD137L、IL-23、IL-23A/p19、p40、IL-27、IL-27A/p28、IL-27B/EBI3、ICAM-1、TGF- β 1、TGF- β 2、CD19、CD20、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、CD154、CD86、BORIS/CTCF、FGF、IL-24、MAGE、NY-ESO-1、乙酰胆碱、干扰素- γ 、DKK1/Wnt、p53、胸苷激酶、抗PD-1抗体重链或轻链和抗PD-L1抗体重链或轻链中的多肽

[0025] 在某些实施方式中,所述重组病毒例如所述重组溶瘤腺病毒可以在过度增殖性细胞中选择性复制和/或在过度增殖性细胞中选择性表达所述转入基因。所述过度增殖性细胞可以是癌细胞。

[0026] 另一方面,本发明提供了一种重组病毒例如重组溶瘤腺病毒,其通过本文中描述的方法来生产。

[0027] 另一方面,本发明提供了一种在需要的对象中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述对象提供有效剂量的通过本文公开的方法生产的重组病毒例如重组溶瘤腺病毒。

[0028] 本发明的这些以及其他的方面和优点将通过下面的附图、详细描述和权利要求书

来说明。

附图说明

[0029] 参考下面的附图可以更完全地理解本发明。

[0030] 图1是描绘在用所指示的病毒治疗后小鼠中的平均肿瘤体积的线形图。

[0031] 图2是描绘用所指示的病毒治疗的小鼠的无恶化生存率的线形图。恶化被定义为肿瘤体积超过200mm³。

[0032] 图3描绘了来自于HEK-293衍生细胞系和SF-BMAdR 281 (A549衍生) 细胞系的病毒生产。对于未修饰的A549细胞无结果可用,因为它们不能适应于无血清悬浮培养。

[0033] 详细描述

[0034] 本发明部分是基于A549宿主细胞例如SF-BMAdR 281 A549宿主细胞可用于生产大量重组病毒例如溶瘤腺病毒这一发现。已令人吃惊地发现,某些重组病毒例如重组溶瘤腺病毒在容许复制的环境中,在无血清和适应悬浮的A549细胞中比在广泛用于病毒载体生产的HEK293细胞中生长至更高密度。

[0035] 因此,一方面,本发明提供了一种生产重组病毒的方法,所述方法包括:(a) 用重组病毒感染A549宿主细胞以产生感染的A549宿主细胞;和(b) 将所述感染的A549宿主细胞在无血清培养基中,在允许所述重组病毒复制的条件下(例如在容许复制的环境中) 悬浮培养,由此生产所述重组病毒。在某些实施方式中,所述重组病毒是腺病毒例如5型腺病毒或腺相关病毒。在某些实施方式中,所述重组病毒是重组溶瘤病毒。在某些实施方式中,所述重组病毒是重组溶瘤腺病毒。

[0036] 另一方面,本发明提供了一种生产重组溶瘤腺病毒的方法,所述方法包括:(a) 用重组溶瘤腺病毒感染A549宿主细胞,以产生感染的A549宿主细胞;和(b) 将所述感染的A549宿主细胞在无血清培养基中,在允许所述重组溶瘤腺病毒复制的条件下(例如在容许复制的环境中) 悬浮培养,由此生产所述重组溶瘤腺病毒。

[0037] 另一方面,本发明提供了一种生产重组溶瘤腺病毒的方法,所述方法包括:(a) 将包含编码重组溶瘤腺病毒的核苷酸序列的核酸引入到A549宿主细胞中;和(b) 将所述A549宿主细胞在无血清培养基中,在允许所述重组溶瘤腺病毒生产的条件下(例如在容许复制的环境中) 悬浮培养,由此生产所述重组溶瘤腺病毒。所述核酸可以使用本领域中已知的任何方法引入到所述细胞中,例如基于脂质体的转染、基于化学物质的转染(例如利用磷酸钙、阳离子聚合物、DEAE-5葡聚糖或活化的树枝状聚合物)、微注射、电穿孔、纳米粒子或细胞挤压。所述核酸可以是例如质粒的一部分,或者可以是例如超过一个质粒的一部分。

[0038] 在任何前述方法的某些实施方式中,所述A549宿主细胞是SF-BMAdR 281 A549宿主细胞。

[0039] A549宿主细胞例如感染的A549宿主细胞,可以被培养至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天或至少7天。

[0040] 在生产后,病毒粒子将被从所述培养物回收以及选择性地纯化。典型的纯化步骤可以包括离心例如氯化铯梯度离心、澄清、酶处理例如核酸酶或蛋白酶处理、层析步骤例如离子交换层析(例如阴离子交换层析) 或过滤步骤。因此,在某些实施方式中,任何前述方法在步骤(b) 后还包括纯化重组病毒例如重组溶瘤腺病毒的步骤。所述纯化所述重组病毒例

如重组溶瘤腺病毒的步骤可以包括裂解A549宿主细胞例如感染的A549宿主细胞、核酸酶处理和/或离子交换层析例如阴离子交换层析。在某些实施方式中,所述纯化所述重组病毒例如重组溶瘤腺病毒的步骤包括:(i)裂解A549宿主细胞例如感染的A549宿主细胞以产生细胞裂解物;(ii)用核酸酶处理所述细胞裂解物以产生处理过的细胞裂解物;和(iii)通过离子交换层析例如阴离子交换层析从所述处理过的细胞裂解物纯化所述重组病毒。

[0041] 在某些实施方式中,任何前述方法与用于生产重组病毒的可比方法相比可以产生更高的重组病毒例如重组溶瘤腺病毒得率。例如,在某些实施方式中,所述方法与方法相同但使用不同宿主细胞类型的类似方法相比,可以产生更高的重组病毒例如重组溶瘤腺病毒得率。病毒得率可以通过本领域中已知的任何方法来测定,包括例如qPCR、免疫细胞化学或荧光素酶报告物测定法。

[0042] 例如,在某些实施方式中,一种方法与类似方法(例如其他方面一致的方法)相比产生多至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍或至少30倍的重组病毒例如重组溶瘤腺病毒,所述类似方法包括在步骤(a)中用重组病毒感染HEK293宿主细胞以产生感染的HEK293宿主细胞,并且在步骤(b)中将所述感染的HEK293宿主细胞在无血清培养基中,在允许所述重组病毒复制的条件下(例如在容许复制的环境中)悬浮培养。在某些实施方式中,一种方法与类似方法(例如其他方面一致的方法)相比产生多至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍或至少30倍的重组病毒例如重组溶瘤腺病毒,所述类似方法包括在步骤(a)中将包含编码重组溶瘤腺病毒的核苷酸序列的核酸引入到HEK293宿主细胞中,并且在步骤(b)中将所述HEK293宿主细胞在无血清培养基中,在允许所述重组病毒复制的条件下(例如在容许复制的环境中)悬浮培养。

[0043] 在某些实施方式中,所述方法与方法相同但使用贴壁培养代替悬浮培养的类似方法相比,可以产生更高的重组病毒例如重组溶瘤腺病毒得率。例如,在某些实施方式中,所述方法与类似方法(例如其他方面一致的方法)相比产生多至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍或至少30倍的重组病毒例如重组溶瘤腺病毒,所述类似方法包括在步骤(b)中将A549宿主细胞例如感染的A549宿主细胞在无血清培养基中,在允许所述重组病毒复制的条件下(例如在容许复制的环境中)贴壁培养。在某些实施方式中,所述方法与方法相同但使用含血清培养基代替无血清培养基的类似方法相比,可以产生更高的重组病毒例如重组溶瘤腺病毒得率。例如,在某些实施方式中,所述方法与类似方法(例如其他方面一致的方法)相比产生多至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍或至少30倍的重组病毒例如重组溶瘤腺病毒,所述类似方法包括在步骤(b)中将A549宿主细胞例如感染的A549宿主细胞在含血清培养基中,在允许所述重组病毒复制的条件下(例如在容许复制的环境中)悬浮培养。

[0044] 在某些实施方式中,一种方法进一步包括将A549宿主细胞与表观遗传学药剂例如DNMT、HDAC和/或酪氨酸激酶抑制剂相接触。示例性的表观遗传学药剂包括伏立诺他、罗米地辛、阿扎胞苷、地西他滨、RRx-001和CUDC-101。在某些实施方式中,一种方法还包括将A549宿主细胞与干扰素相接触。在某些实施方式中,一种方法还包括将A549宿主细胞与抗氧化剂例如维生素C、维生素E、谷胱甘肽或N-乙酰半胱氨酸相接触。

[0045] 本发明的各种不同特点和方面将在下文中更详细讨论。

[0046] I. 病毒

[0047] 术语“病毒”在本文中用于指称不具有蛋白质合成或能量产生机制的任何专性细胞内寄生物。病毒基因组可以是RNA或DNA。重组修饰的病毒在本文中被称为“重组病毒”。重组病毒可以例如通过重组DNA技术被修饰成复制缺陷型、条件复制型或复制型,和/或通过重组DNA技术被修饰成包含外源转入基因的表达。利用每种亲本载体性质的有利要素的嵌合病毒载体(参见例如Feng等, (1997) NATURE BIOTECHNOLOGY 15:866-870), 在本发明的实践中也可能是有用的。尽管使用来自于待治疗物种的病毒通常更偏向于被选中, 在某些情况下使用源自于具有理想的致病特点的不同物种的载体也可能是有利的。

[0048] 在某些实施方式中, 所述重组病毒是溶瘤病毒, 例如表现出肿瘤选择性复制和/或病毒介导的裂解的病毒。在某些实施方式中, 所述溶瘤病毒允许基因例如转入基因的选择性表达。例如, 在某些实施方式中, 所述病毒允许所述基因在赘生性细胞中表达, 但在正常细胞中减弱表达。在某些实施方式中, 所述基因在非过度增殖性细胞中的表达为在过度增殖性细胞中的表达的约90%、约80%、约70%、约60%、约50%、约40%、约30%、约20%、约10%或约5%。在某些实施方式中, 所述病毒在非过度增殖性细胞中不表现出所述基因的可检测的表达。基因表达可以通过本领域中已知的任何适合方法来确定, 例如免疫印迹或ELISA。所述过度增殖性细胞可以是癌细胞例如上皮癌、肉瘤、白血病、淋巴瘤、前列腺癌、肺癌、胃肠道癌、结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃癌、甲状腺癌、间皮瘤、肝癌、肾癌、皮肤癌、头颈癌或脑癌细胞。

[0049] 在某些实施方式中, 所述重组病毒是腺病毒或腺相关病毒。在某些实施方式中, 所述重组病毒是腺病毒。腺病毒是中等尺寸(90-100nm)、无包膜的(裸露的)二十面体病毒, 由核衣壳和双链线性DNA基因组构成。腺病毒在哺乳动物的核中使用宿主的复制机器复制。术语“腺病毒”是指腺病毒属包括但不限于人、牛、绵羊、马、犬、猪、鼠和猿猴腺病毒亚属中的任何病毒。具体来说, 人类腺病毒包括A-F亚属及其各个血清型, 所述各个血清型和A-F亚属包括但不限于人类腺病毒1、2、3、4、4a、5、6、7、8、9、10、11 (Ad11a和Ad11p)、12、13、14、15、16、17、18、19、19a、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、34a、35、35p、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48和91型。优选的是源自于人类腺病毒2和5型的重组病毒。除非另有陈述, 否则所有5型腺病毒的核苷酸编号是相对于NCBI参考序列AC_000008.1, 其在本文中被描绘在SEQ ID NO:1中。

[0050] 腺病毒的复制周期具有两个阶段: 早期阶段, 在此期间4个转录单位E1、E2、E3和E4被表达, 以及晚期阶段, 其在病毒DNA合成开始后发生, 此时主要从主要晚期启动子(MLP)表达晚期转录物。所述晚期信使编码病毒的大多数结构蛋白。E1、E2和E4的基因产物负责转录激活、细胞转化、病毒DNA复制以及其他病毒功能, 并且对于病毒生长来说是必需的。

[0051] 术语“可操作连接”是指功能性关系中的多核苷酸元件的连接。一个核酸序列, 当它被放置成与另一个核酸序列有功能性关系时, 就被称作被“可操作连接”。例如, 启动子或增强子如果影响基因的转录, 则它被可操作连接到所述基因。可操作连接的核苷酸序列通常是毗邻的。然而, 由于增强子通常在与启动子相隔几千碱基时起作用并且内含子序列可能具有不同的长度, 因此某些多核苷酸元件可能是可操作连接的但不直接位于侧翼, 并且可能甚至从不同的等位基因或染色体反式起作用。

[0052] 在某些实施方式中, 所述重组病毒具有对调控序列或启动子的一个或多个修饰。

对调控序列或启动子的修饰包括与所述调控序列或启动子的野生型序列相比一个或多个核苷酸的缺失、替换或添加。

[0053] 在某些实施方式中,所述调控序列或启动子的修饰包括转录因子结合位点序列的修饰,以例如通过缺失其一部分或通过所述结合位点中插入单一点突变来降低其对转录因子的亲和性。在某些实施方式中,所述额外修饰过的调控序列增强其在赘生性细胞中的表达但减弱在正常细胞中的表达。

[0054] 在某些实施方式中,所述修饰的调控序列被可操作连接到编码蛋白质的序列。在某些实施方式中,腺病毒E1a和E1b基因(编码区)中的至少一个被可操作连接到被修饰的调控序列。在某些实施方式中,所述E1a基因被可操作连接到所述修饰的调控序列。

[0055] 所述E1a调控序列含有用于转录因子Pea3的5个结合位点,被称为Pea3 I、Pea3 II、Pea3 III、Pea3 IV和Pea3 V,其中Pea3 I是最接近于E1a起始位点的Pea3结合位点,并且Pea3 V是最远离的。所述E1a调控序列还含有用于转录因子E2F的结合位点,因此被称为E2F I和E2F II,其中E2F I是最接近于E1a起始位点的E2F结合位点,E2F II是最远离的。从E1a起始位点起,所述结合位点如下排列:Pea3 I,E2F I,Pea3 II,E2F II,Pea3 III,Pea3 IV和Pea3 V。

[0056] 在某些实施方式中,这七个结合位点中的一个,或一个功能性结合位点被缺失。当在本文中使用时,“功能性结合位点”是指能够结合到相应的结合配偶体例如转录因子的结合位点,例如具有相应野生型结合位点序列的至少100%、至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%或至少40%的结合活性的结合位点。当在本文中使用时,“非功能性结合位点”是指例如具有相应野生型结合位点序列的低于30%、低于20%、低于10%或0%的结合活性的结合位点。

[0057] 在某些实施方式中,重组腺病毒例如重组溶瘤腺病毒包含具有功能性Pea3结合位点缺失例如整个Pea3结合位点缺失的E1a启动子。当在本文中使用时,“功能性Pea3结合位点”是指能够结合到它的相应转录因子(例如Pea3)的Pea3结合位点,例如具有相应野生型Pea3结合位点序列的至少100%、至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%或至少40%的结合活性的Pea3结合位点。当在本文中使用时,“非功能性Pea3结合位点”是指例如具有相应野生型Pea3结合位点序列的低于30%、低于20%、低于10%或0%的结合活性的Pea3结合位点。用于确定Pea3结合位点是否结合到Pea3的测定法在本领域中是已知的。示例性的结合测定法包括电泳迁移率变动测定法、染色质免疫沉淀测定法和DNA酶足迹测定法。

[0058] 在某些实施方式中,至少一个Pea3结合位点或功能性Pea3结合位点被敲除。所述缺失的Pea3结合位点可以是Pea3 I、Pea3 II、Pea3 III、Pea3 IV和/或Pea3 V。在某些实施方式中,所述缺失的Pea3结合位点是Pea3 II、Pea3 III、Pea3 IV和/或Pea3 V。在某些实施方式中,所述缺失的Pea3结合位点是Pea3 IV和/或Pea3 V。在某些实施方式中,所述缺失的Pea3结合位点是Pea3 II和/或Pea3 III。在某些实施方式中,所述缺失的Pea3结合位点是Pea3 II和Pea3 III两者。在某些实施方式中,所述Pea3 I结合位点或功能性Pea3 I结合位点被保留。

[0059] 在某些实施方式中,至少一个E2F结合位点或功能性E2F结合位点被缺失。在某些实施方式中,至少一个E2F结合位点或功能性E2F结合位点被保留。在某些实施方式中,所述

保留的E2F结合位点是E2F I和/或E2F II。在某些实施方式中,所述保留的E2F结合位点是E2F II。在某些实施方式中,所述重组腺病毒例如重组溶瘤腺病毒可以包含至少一个E2F结合位点或其功能性部分的缺失,但不包含Pea3结合位点的缺失。在某些实施方式中,全部缺失基本上由Pea3 II、Pea3 III、Pea3 IV和/或Pea3 V中的一者或多者构成。在某些实施方式中,所述病毒具有位于E1a起始位点上游-304至-255位,例如对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第195-244位的50个碱基对区域的缺失,其在后文中被称为TAV-255缺失。在某些实施方式中,所述TAV-255缺失产生包含序列GGTGT TTTGG (SEQ ID NO:2) 的E1a启动子。

[0060] 在某些实施方式中,重组腺病毒例如重组溶瘤腺病毒包含具有功能性TATA盒的缺失例如整个TATA盒的缺失的E1a启动子。当在本文中使用时,“功能性TATA盒”是指能够结合到TATA盒结合蛋白 (TBP) 的TATA盒,例如具有相应野生型TATA盒序列的至少100%、至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%或至少40%的TBP结合活性的TATA盒。当在本文中使用时,“非功能性TATA盒”是指例如具有相应野生型TATA盒序列的低于30%、低于20%、低于10%或0%的TBP结合活性的TATA盒。用于确定TBP是否结合到TATA盒的测定法在本领域中是已知的。示例性的结合测定法包括电泳迁移率变动测定法、染色质免疫沉淀测定法和DNA酶足迹测定法。

[0061] 例如,在某些实施方式中,重组腺病毒例如重组溶瘤腺病毒包含对应于5型腺病毒E1a启动子的-27至-24、-31至-24、-44至+54或-146至+54位的核苷酸的缺失,所述核苷酸分别对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第472至475、468至475、455至552和353至552位核苷酸。在某些实施方式中,所述病毒包含对应于5型腺病毒E1a启动子的-29至-26、-33至-26、-44至+52或-148至+52位的核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述病毒包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第353至552位的核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述病毒包含产生包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO:3)、AGTGCCCG (SEQ ID NO:8) 或TATTC CCG (SEQ ID NO:9) 的病毒的多核苷酸缺失,所述序列由原本在所述缺失的多核苷酸序列侧翼的两个多核苷酸序列的联结产生。在某些实施方式中,所述病毒包含产生包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO:3) 的病毒的多核苷酸缺失。

[0062] 在某些实施方式中,重组腺病毒例如重组溶瘤腺病毒包含具有功能性CAAT盒的缺失例如整个CAAT盒的缺失的E1a启动子。当在本文中使用时,“功能性CAAT盒”是指能够结合到C/EBP或NF-Y蛋白的CAAT盒,例如具有相应野生型CAAT盒序列的至少100%、至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%或至少40%的C/EBP或NF-Y结合活性的CAAT盒。当在本文中使用时,“非功能性CAAT盒”是指例如具有相应野生型CAAT盒序列的低于30%、低于20%、低于10%或0%的C/EBP或NF-Y结合活性的CAAT盒。用于确定C/EBP或NF-Y蛋白是否结合到CAAT盒的测定法在本领域中是已知的。示例性的结合测定法包括电泳迁移率变动测定法、染色质免疫沉淀测定法和DNA酶足迹测定法。

[0063] 例如,在某些实施方式中,重组腺病毒例如重组溶瘤腺病毒包含对应于5型腺病毒E1a启动子的-76至-68位的核苷酸的缺失,所述核苷酸对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第423至431位的核苷酸。在某些实施方式中,所述病毒包含产生包含序列TTCCGTGGCG (SEQ ID NO:10) 的病毒的多核苷酸缺失,所述序列由原本在所述缺失的多核苷酸序列侧翼的两个多核苷酸序列的联结产生。

[0064] 腺病毒E1b-19k基因主要起到抗凋亡基因的作用,并且是细胞抗凋亡基因BCL-2的

同源物。由于宿主细胞在子代病毒粒子成熟之前死亡将限制病毒复制,因此E1b-19k将作为所述E1盒的一部分得以表达以防止过早细胞死亡,从而允许感染继续并产生成熟病毒粒子。因此,在某些实施方式中,提供了包括E1b-19K插入位点的重组腺病毒例如重组溶瘤腺病毒,所述重组腺病毒具有能编码插入到E1b-19K插入位点中的转入基因的核苷酸序列。在某些实施方式中,所述插入位点位于E1b-19K的起始位点(即编码E1b-19k的起始密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第1714-1716位核苷酸)和E1b-55K的起始位点(即编码E1b-55k的起始密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第2019-2021位核苷酸)之间。在某些实施方式中,所述E1b-19K插入位点位于E1b-19K的起始位点(即编码E1b-19k的起始密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第1714-1716位核苷酸)和E1b-19K的终止位点(即编码E1b-19k的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的2242-2244位核苷酸)之间。

[0065] 在整个本说明书和权利要求书中,两个位点之间的插入,例如(i)第一基因(例如E1b-19k)的起始位点与第二基因(例如E1b-55K)的起始位点之间,(ii)第一基因的起始位点与第二基因的终止位点之间,(iii)第一基因的终止位点与第二基因的起始位点之间,或(iv)第一基因的终止位点与第二基因的终止位点之间的插入,被理解为意味着在所述插入周围构成给定起始位点或终止位点的核苷酸的全部或一部分可能存在或不存在于所述最终病毒中。同样地,两个核苷酸之间的插入被理解为意味着在所述插入周围的核苷酸可能存在或不存在于所述最终病毒中。

[0066] 在某些实施方式中,所述E1b-19K插入位点包含所述E1b-19K的起始位点附近约100至约305、约100至约300、约100至约250、约100至约200、约100至约150、约150至约305、约150至约300、约150至约250或约150至约200个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E1b-19K插入位点包含所述E1b-19K的起始位点附近约200个核苷酸例如202或203个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E1b-19K插入位点包含对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第1714-1917或1714-1916位核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述编码转入基因的核苷酸序列被插入到对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第1714和1917位的核苷酸之间或对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第1714和1916位的核苷酸之间。在某些实施方式中,编码转入基因的核苷酸序列被插入到CTGACCTC(SEQ ID NO:4)和TCACCAGG(SEQ ID NO:5)之间,例如所述重组腺病毒以5'至3'方向包含CTGACCTC(SEQ ID NO:4)、编码转入基因的核苷酸序列和TCACCAGG(SEQ ID NO:5)。CTGACCTC(SEQ ID NO:4)和TCACCAGG(SEQ ID NO:5)为Ad5基因组(SEQ ID NO:1)内的E1b-19K插入位点定义了独特的边界序列。在整个本说明书和权利要求书中,位点附近的缺失例如基因的起始位点附近的缺失或基因的终止位点附近的缺失,被理解为意味着所述缺失可能包括构成给定起始位点或终止位点的核苷酸的全部、一部分或不包括所述核苷酸的缺失。

[0067] 在某些实施方式中,提供了包括E3插入位点的重组腺病毒例如重组溶瘤腺病毒,例如所述重组腺病毒具有插入到E3插入位点中的编码转入基因的核苷酸序列。在某些实施方式中,所述插入位点位于pVIII的终止位点(即编码pVIII的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第27855-27857位核苷酸)和Fiber的起始位点(即编码Fiber的起始密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第31042-31044位核苷酸)之间。在某些实施方式中,所述E3插入位点包含约500至约3185、约500至约3000、约500至约2500、约500

至约2000、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约3185、约1000至约3000、约1000至约2500、约1000至约2000、约1000至约1500、约1500至约3185、约1500至约3000、约1500至约2000、约2000至约3185、约2000至约3000、约2000至约2500、约2500至约3185、约2500至约3000或约3000至约3185个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3插入位点位于E3-10.5K的终止位点(即编码E3-10.5K的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第29770-29772位核苷酸)和E3-14.7K的终止位点(即编码E3-14.7K的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第30837-30839位核苷酸)之间。在某些实施方式中,所述E3插入位点包含所述E3-10.5K的终止位点附近约500至约1551、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约1551、约1000至约1500或约1500至约1551个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3插入位点包含所述E3-10.5K的终止位点附近约1050个核苷酸的缺失,例如所述E3插入位点包含所述E3-10.5K的终止位点附近1063或1064个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3插入位点包含对应于Ad5 d1309 E3缺失的缺失。在某些实施方式中,所述E3插入位点包含对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第29773-30836位核苷酸的缺失,或者编码转入基因的核苷酸序列被插入到对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第29773和30836位的核苷酸之间。在某些实施方式中,编码转入基因的核苷酸序列被插入到CAGTATGA(SEQ ID NO:11)和TAATAAAAAA(SEQ ID NO:12)之间,例如所述重组腺病毒以5'至3'方向包含CAGTATGA(SEQ ID NO:11)、编码转入基因的核苷酸序列和TAATAAAAAA(SEQ ID NO:12)。CAGTATGA(SEQ ID NO:11)和TAATAAAAAA(SEQ ID NO:12)为Ad5基因组(SEQ ID NO:1)内的E3插入位点定义了独特的边界序列。

[0068] 在某些实施方式中,所述E3插入位点位于E3-gp19K的终止位点(即编码E3-gp19K的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的29215-29217位核苷酸)和E3-14.7K的终止位点(即编码E3-14.7K的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的30837-30839位核苷酸)之间。在某些实施方式中,所述E3插入位点包含所述E3-gp19K的终止位点附近约500至约1824、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约1824、约1000至约1500或约1500至约1824个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3插入位点包含所述E3-gp19K的终止位点附近约1600个核苷酸的缺失,例如所述E3插入位点包含所述E3-gp19K的终止位点附近1622个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3插入位点包含对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第29218-30839位核苷酸的缺失。在某些实施方式中,编码转入基因的核苷酸序列被插入到对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第29218和30839位核苷酸之间。在某些实施方式中,编码转入基因的核苷酸序列被插入到TGCCTTAA(SEQ ID NO:13)和TAAAAAAAAT(SEQ ID NO:14)之间,例如所述重组腺病毒以5'至3'方向包含TGCCTTAA(SEQ ID NO:13)、编码转入基因的核苷酸序列和TAAAAAAAAT(SEQ ID NO:14)。TGCCTTAA(SEQ ID NO:13)和TAAAAAAAAT(SEQ ID NO:14)为Ad5基因组(SEQ ID NO:1)内的E3插入位点定义了独特的边界序列。

[0069] 在某些实施方式中,重组腺病毒例如重组溶瘤腺病毒包含E4缺失。在某些实施方式中,所述E4缺失位于E4-ORF6/7的起始位点(即编码E4-ORF6/7的起始密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的34075-34077位核苷酸)和右侧末端反向重复序列(ITR;例如对应于SEQ ID NO:1的第35836-35938位核苷酸)之间。在某些实施方式中,所述E4缺失位于E4-ORF6/7的起始位点和E4-ORF1的起始位点(即编码E4-ORF1的起始密码子的核苷酸序列,

例如对应于SEQ ID NO:1的35524-35526位核苷酸)之间。在某些实施方式中,所述E4缺失包含E4-ORF6/7的起始位点和E4-ORF1的起始位点之间的核苷酸序列的缺失。在某些实施方式中,所述E4缺失包含约500至约2500、约500至约2000、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约2500、约1000至约2000、约1000至约1500、约1500至约2500、约1500至约2000或约2000至约2500个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E4缺失包含所述E4-ORF6/7的起始位点附近约250至约1500、约250至约1250、约250至约1000、约250至约750、约250至约500、500至约1500、约500至约1250、约500至约1000、约500至约750、750至约1500、约750至约1250、约750至约1000、约1000至约1500或约1000至约1250个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E4缺失包含所述E4-ORF6/7的起始位点附近约1450个核苷酸的缺失,例如所述E4缺失包含所述E4-ORF6/7的起始位点附近约1449个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E4缺失包含对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第34078-35526位核苷酸的缺失。

[0070] 编码病毒基因的核酸可通过常规的转染或转化技术被并入到质粒中以及被引入到宿主细胞中。具体的生产和纯化条件将随着所使用的病毒和生产系统而变。对于腺病毒来说,用于产生病毒粒子的传统方法是共转染以及随后的穿梭质粒(通常含有一小部分腺病毒基因组并任选地含有潜在的转入基因表达盒)和腺病毒辅助质粒(含有完整腺病毒基因组的大部分)体内重组。其它用于产生腺病毒的可代替技术包括利用细菌人工合成染色体(BAC)系统、在recA⁺细菌菌株中利用含有互补的腺病毒序列的两个质粒的体内细菌重组,以及酵母人工合成染色体(YAC)系统。

[0071] II. 治疗性转入基因

[0072] 使用本文中公开的方法生产的重组病毒例如重组溶瘤腺病毒可以包含编码治疗性转入基因的外源核苷酸序列。术语“转入基因”是指外源基因或多核苷酸序列。术语“治疗性转入基因”是指当在病毒中或被病毒复制和/或表达时在靶细胞、体液、组织、器官、生理系统或对象中提供治疗效果的转入基因。

[0073] 所述治疗性转入基因可以编码治疗性核酸例如反义RNA或核酶RNA。所述治疗性转入基因可以编码治疗性肽或多肽,例如凋亡剂、抗体、CTL响应性肽、细胞因子、细胞裂解剂、细胞毒性剂、酶、在肿瘤细胞的表面上表达以引发免疫应答的异源抗原、免疫刺激剂或免疫调节剂、干扰素、裂解肽、癌蛋白、催化引起细胞死亡的过程的多肽、补足体细胞中的遗传缺陷的多肽、肿瘤抑制蛋白、疫苗抗原或其任何组合。

[0074] 在某些实施方式中,所述治疗性转入基因编码选自CD80、CD137L、IL-23、IL-23A/p19、p40、IL-27、IL-27A/p28、IL-27B/EBI3、ICAM-1、TGF- β 1、TGF- β 、CD19、CD20、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、CD154、CD86、BORIS/CTCF、FGF、IL-24、MAGE、NY-ESO-1、乙酰胆碱、干扰素- γ 、DKK1/Wnt、p53、胸苷激酶、抗PD-1抗体重链或轻链和抗PD-L1抗体重链或轻链的治疗性多肽。

[0075] III. 药物组合物

[0076] 对于治疗使用来说,使用本文公开的方法生产的重组病毒例如重组溶瘤腺病毒最好与可药用载体组合。当在本文中使用,“可药用载体”意味着适合与人类和动物的组织相接触使用而没有过量毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的利益/风险比相称的缓冲剂、载体和赋形剂。所述载体在与配方的其他成分相容并且对接受者无害的意义上是“可接受的”。可药用载体包括与药物给药相容的缓冲剂、溶剂、分散介质、包衣、等

渗和吸收延迟剂等。这些介质和药剂用于制药活性物质的用途,在本领域中是已知的。

[0077] 含有重组病毒的药物组合物可以以剂量单元形式存在,并且可以通过任何合适的方法制备。药物组合物应该被配制与它计划的给药途径相容。给药途径的实例是静脉内(IV)、动脉内、真皮内、吸入、透皮、局部、透粘膜和直肠给药。优选的给药途径是IV输注。有用的配方可以通过制药领域中已知的方法来制备。例如参见《Remington制药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第18版(Mack Publishing Company,1990)。适合于肠胃外给药的配方成分包括无菌稀释剂例如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂,抗菌剂例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯,抗氧化剂例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠,螯合剂例如EDTA,缓冲剂例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调节渗透压的药剂例如氯化钠或右旋糖。

[0078] 对于静脉内给药来说,适合的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor ELTM(BASF, Parsippany, NJ)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。所述载体应该在制造和储存的条件下稳定,并且应该被防腐以对抗微生物。所述载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)及其适合的混合物。

[0079] 药物配方优选是无菌的。灭菌可以通过任何合适的方法来实现,例如通过无菌过滤膜过滤。在所述组合物被冷冻干燥的情况下,过滤除菌可以在冷冻干燥和重构之前或之后进行。

[0080] 当在本文中使用时,术语“有效量”是指足以实现有益或所需结果的活性组分的数量(例如重组病毒的量)。有效量可以在一次或多次给药、施用或剂量中给药,并且不打算限于特定配方或给药途径。

[0081] 在某些实施方式中,活性成分的治疗有效量在0.1mg/kg至100mg/kg的范围内,例如1mg/kg至100mg/kg、1mg/kg至10mg/kg。在某些实施方式中,所述重组病毒的治疗有效量在 10^2 至 10^{15} 噬斑形成单位(pfus)的范围内,例如 10^2 至 10^{10} 、 10^2 至 10^5 、 10^5 至 10^{15} 、 10^5 至 10^{10} 或 10^{10} 至 10^{15} 噬斑形成单位。给药的量取决于多种变量,例如待治疗的疾病类型和程度,待治疗的指征、患者的总体健康、所述病毒的体内效能、药物配方和给药途径。初始剂量可以提高到超过上限水平,以便快速获得所需的血液水平或组织水平。或者,初始剂量可以低于最适值,并且可以在治疗过程中逐步提高每日剂量。人类剂量可以例如在被设计从0.5mg/kg运行到20mg/kg的常规I期剂量递增研究中进行优化。给药频率可以随着多种因素而变,例如给药途径、剂量、病毒的血清半衰期和待治疗的疾病。示例性的给药频率是每日一次、每周一次和每两周一次。优选的给药途径是肠胃外,例如静脉内输注。

[0082] IV. 治疗性用途

[0083] 使用本文中公开的方法生产的重组病毒例如重组溶瘤腺病毒可用于治疗各种不同的医学指征,例如癌症。当在本文中使用时,“治疗”意味着在对象中,例如在人类中治疗疾病。这包括:(a)抑制所述疾病,即制止它的发展;和(b)减轻所述疾病,即引起所述疾病状态的减退。当在本文中使用时,术语“对象”和“患者”是指将要通过本文描述的方法和组合物治疗的生物体。这些生物体优选地包括但不限于哺乳动物(例如鼠类、猿猴、马科动物、牛科动物、猪科动物、犬科动物、猫科动物等),更优选地包括人类。

[0084] 癌症的实例包括实体肿瘤、软组织肿瘤、造血系肿瘤和转移病变。造血系肿瘤的实例包括白血病、急性白血病、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、B-细胞、T-细胞或FAB ALL、急性

髓性白血病 (AML)、慢性髓细胞性白血病 (CML)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 例如转化的 CLL、弥漫性大B-细胞淋巴瘤 (DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、骨髓增生异常综合征 (MDS)、淋巴瘤、霍奇金病、恶性淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、多发性骨髓瘤或莱特尔综合征 (莱特尔转化)。实体肿瘤的实例包括各种不同器官系统的恶性肿瘤例如肉瘤、腺癌和上皮癌,例如影响头颈部 (包括咽)、甲状腺、肺 (小细胞或非小细胞肺癌 (NSCLC))、乳腺、淋巴、胃肠 (例如口腔、食道、胃、肝、胰腺、小肠、结肠和直肠、肛管)、生殖器和泌尿生殖道 (例如肾、尿道上皮、膀胱、卵巢、子宫、宫颈、子宫内膜、前列腺、睾丸)、CNS (例如神经或神经胶质细胞例如成神经细胞瘤或神经胶质瘤) 或皮肤 (例如黑素瘤) 的恶性肿瘤。

[0085] 在某些实施方式中,所述癌症选自黑素瘤、皮肤的鳞状细胞癌、基底细胞癌、头颈癌、乳腺癌、肛门癌、宫颈癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、小细胞肺癌、肾细胞癌、前列腺癌、胃食管癌、结肠直肠癌、睾丸癌、膀胱癌、卵巢癌、肝细胞癌、胆管癌、脑癌、子宫内膜癌、神经内分泌癌和胰腺癌。

[0086] 在某些实施方式中,所述癌症选自鼻咽癌、基底细胞癌、滑膜癌、肝细胞癌、肾癌、结缔组织的癌症、黑素瘤、肺癌、肠癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、脑癌、喉癌、口腔癌、肝癌、骨癌、胰腺癌、绒膜癌、胃泌素瘤、神经内分泌癌、嗜铬细胞瘤、泌乳素瘤、T-细胞白血病/淋巴瘤、神经瘤、von Hippel-Lindau病、Zollinger-Ellison综合征、肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、输尿管癌、脑癌、少突神经胶质瘤、成神经细胞瘤、脑膜瘤、脊髓肿瘤、骨癌、骨软骨瘤、软骨肉瘤、尤文氏肉瘤、原发位点未知的癌症、类癌、胃肠道的类癌、纤维肉瘤、乳腺癌、佩吉特病、宫颈癌、结肠直肠癌、直肠癌、食管癌、胆囊癌、头癌、眼癌、颈癌、肾癌、维尔姆斯瘤、肝癌、卡波斯肉瘤、前列腺癌、肺癌、睾丸癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、皮肤癌、间皮瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、内分泌胰腺癌、胰高血糖素瘤、胰腺癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、垂体癌、软组织肉瘤、成视网膜细胞瘤、小肠癌、胃癌、胸腺癌、甲状腺癌、滋养层癌、葡萄胎、子宫癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、听神经瘤、蕈样肉芽肿、胰岛素瘤、类癌综合征、生长抑素瘤、牙龈癌、心脏癌、唇癌、脑膜癌、口癌、神经癌、腮腺癌、腹膜癌、咽癌、胸膜癌、唾液腺癌、舌癌和扁桃腺癌。

[0087] 在某些实施方式中,重组病毒例如重组溶瘤腺病毒与一种或多种疗法例如手术、放疗、化疗、免疫疗法、激素疗法或病毒疗法相组合给药到所述对象。在某些实施方式中,重组病毒与酪氨酸激酶抑制剂例如埃罗替尼相组合给药。在某些实施方式中,本发明的重组病毒与检查点抑制剂例如抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体相组合给药。示例性的抗PD-1抗体包括例如纳武单抗 (**Opdivo®**, Bristol-Myers Squibb Co.)、pembrolizumab (**Keytruda®**, Merck Sharp&Dohme Corp.)、PDR001 (Novartis Pharmaceuticals) 和 pidilizumab (CT-011, Cure Tech)。示例性的抗PD-L1抗体包括例如阿特珠单抗 (**Tecentriq®**, Genentech)、duvalumab (AstraZeneca)、MEDI4736、avelumab (**Bavencio®**, EMD Serono) 和 BMS 936559 (Bristol Myers Squibb Co.)。

[0088] 当在本文中使用时,术语“相组合”给药被理解为意味着在对象被所述障碍困扰的过程中将两种 (或更多种) 不同治疗递送到所述对象,使得在某个时间点所述治疗对所述对象的效果重叠。在某些实施方式中,一种治疗的递送在第二种治疗的递送开始时仍在进行,使得在给药方面存在交叠。这在本文中有时被称为“同时”或“并行递送”。在其他实施方式中,一种治疗的递送在另一种治疗的递送开始之前结束。在任一种情况的某些实施方式中,

治疗由于组合给药而更加有效。例如,所述第二种治疗更加有效,例如使用更少的第二种治疗观察到等同的效果,或者与第二种治疗在不存在第一种治疗的情况下给药的情形中看到的相比,所述第二种治疗以更大的程度减轻症状,或者在使用所述第一种治疗时观察到类似的情况。在某些实施方式中,递送使得症状或与所述障碍相关的其他参数的降低超过在递送一种治疗而不存在另一种治疗的情况下所观察到的。所述两种治疗的效果可以是部分累加、完全累加或高于累加的。所述递送可以使得当第二种治疗被递送时所递送的第一种治疗的效果仍然可检测。

[0089] 在整个本说明书中,在病毒、组合物和系统被描述为具有、包括或包含特定组分的情况下,或者在过程和方法被描述为具有、包括或包含特定步骤的情况下,设想了此外还存在基本上由所叙述的组分构成或由所叙述的组分构成的本发明的组合物、装置和系统,并且存在基本上由所叙述的过程步骤构成或由所叙述的过程步骤构成的符合本发明的过程和方法。

[0090] 在本申请中,在要素或组分被称为是包含在所叙述的要素或组分的名单中和/或选自所述名单的情况下,应该理解所述要素或组分可以是所叙述的要素或组分中的任一者,或者所述要素或组分可以选自所叙述的要素或组分中的两者或更多者。

[0091] 此外,应该理解,本文中描述的病毒、组合物、系统、方法或过程的要素和/或特点可以以各种不同的方式组合而不背离本发明的精神和范围,不论在本文中是明确说明还是暗示的。例如,在指称特定病毒的情况下,该病毒可用于本发明的组合物的各种不同实施方式 and/或本发明的方法中,除非从上下文另有理解。换句话说,在本申请中,实施方式以能够书写并绘制出清楚且简明的申请的方式进行描述和描绘,但计划并且应该认识到实施方式可以进行各种不同的组合或拆分,而不背离本文的教授和发明。例如,应该认识到本文描述和描绘的所有特点可以适用于本文描述和描绘的本发明的所有方面。

[0092] 应该理解,表述“中的至少一者”各个地包括在所述表述后叙述的每个物体和所叙述的物体中的两者或更多者的各种不同组合,除非从上下文和使用中另有理解。与三个或更多个叙述物体相结合的表述“和/或”应该被理解为具有相同的意义,除非从上下文另有理解。

[0093] 术语“包括”、“具有”或“含有”、包括其语法等同语的使用,通常应该被理解为开放式和非限制性的,例如不排除另外的未叙述的要素或步骤,除非从上下文另有具体陈述或理解。

[0094] 在本说明书中的各个不同位置处,病毒、组合物、系统、过程和方法或其特点被成组或在范围内公开。它具体来说意指所述描述包括这些组和范围的成员的每一个单个的子组合。作为其他实例,在1至20的范围内的整数具体来说打算单个地公开1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20。

[0095] 当在数量值之前使用术语“约”时,本发明还包括所述特定数量值本身,除非另有具体陈述。当在本文中使用时,术语“约”是指距标称值 $\pm 10\%$ 的变动,除非另有指示或推断。

[0096] 应该理解,步骤的顺序或执行某些行动的顺序是不重要的,只要本发明仍然可行即可。此外,两个或更多个步骤或行动可以同时进行。

[0097] 本文中的任何和所有实例或示例性语言如“例如”或“包括”的使用,仅仅旨在更好

地说明本发明,并且除非声明,否则不对本发明的范围构成限制。本说明书中的所有语言都不应该被解释为指示任何未提出权利要求的要素对于本发明的实践来说是必不可少的。

实施例

[0098] 下面的实施例仅仅是说明性的,并且不打算以任何方式限制本发明的范围或内容。

[0099] 实施例1:溶瘤腺病毒的生产

[0100] 本实施例描述了在A549细胞中生产重组溶瘤腺病毒。

[0101] 构建了一种带有位于E1a起始位点上游-304至-255位的核苷酸区域的缺失的腺病毒5型病毒,所述缺失使得E1a表达成为癌症选择性的(如以前在美国专利号9,073,980中所描述)。所述得到的病毒在后文中被称为TAV。

[0102] 将TAV进一步修饰使其在E1b-19k区中带有大约200个碱基对的缺失。得到的病毒在后文中被称为TAV- Δ 19k。所述修饰的E1b-19k区的核苷酸序列如下,其中来自于融合的SalI和XhoI位点的残留碱基被下划线:

ATCTTGGTTACATCTGACCTCGTCGAGTCACCAGGCGCTTTT

[0103]

CCAA (SEQ ID NO: 6)

[0104] 对TAV- Δ 19k进行修饰以在所述修饰的E1b-19k区中包含编码小鼠TGF- β 阱(小鼠TGF β II型受体和小鼠IgG1的融合蛋白)的核苷酸序列。所述得到的病毒在后文中被称为TAV-mTGF β -阱。编码所述TGF- β 阱的核苷酸序列如下:

ATGGGTCTGGGGGCTGCTCCGGGGCCTGTGGCCGCTGCATAT
CGTCCTGTGGACGCGCATCGCCAGCACGATCCCGCCGCACGTTCC
CAAGTCGGTTAACAGTGATGTCATGGCCAGCGACAATGGCGGTG
CGGTCAAGCTTCCACAGCTGTGCAAGTTTTGCGATGTGAGACTGT
CCACTTGCGACAACCAGAAGTCCTGCATGAGCAACTGCAGCATC
ACGGCCATCTGTGAGAAGCCGCATGAAGTCTGCGTGGCCGTGTG
GAGGAAGAACGACAAGAACATTACTCTGGAGACGGTTTGCCACG
ACCCCAAGCTCACCTACCACGGCTTCACTCTGGAAGATGCCGCTT
CTCCCAAGTGTGTCATGAAGGAAAAGAAAAGGGCGGGCGAGACT
TTCTTCATGTGTGCCTGTAACATGGAAGAGTGCAACGATTACATC
[0105] ATCTTTTCGGAAGAATACACCACCAGCAGTCCCGACAGCACCAA
GGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTT
GCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCC
CAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCA
CGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGT
TCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGC
AACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCGCTCAGTCAGT
GAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTC
AAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCTGCCCCCATCGAGAA
AACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCGCAGGTGT
ACACCATTCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTC
AGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACT
GTGGAGTGGCAGTGGAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGA
ACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACA
[0106] GCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACT
TTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACATACT
GAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGA (SEQ ID NO: 7)

[0107] 将SF-BMAdR 281 A549细胞(购自National Research Council of Canada)在无血清培养基(Hyclone SFM4Transfx-293)中,在摇瓶中以悬浮培养方式培养。在100mL的总体积中生长至 2×10^6 个细胞/mL的密度后,将细胞离心并重悬浮在100mL新鲜SFM4Transfx-293培养基中。将50mL重悬浮的培养物用TAV- Δ 19k腺病毒感染,并将50mL重悬浮的培养物用TAV-mTGF β - Δ 19k腺病毒感染。将所述细胞以悬浮培养方式在摇瓶中维持3天以允许病毒复制,然后将培养物用冻融循环裂解,以产生细胞裂解物。

[0108] 然后通过离心、核酸酶处理、阴离子交换层析和在适合于体内给药的缓冲液(10mM Tris, 1mM MgCl₂, 3%蔗糖, pH 8)中的透析,从所述细胞裂解物纯化病毒。

[0109] 然后试验所述病毒的体内效能。在成年129S4小鼠皮下注射1x10⁶个肺癌细胞系ADS-12细胞,并允许形成皮下肿瘤。在肿瘤生长到大得足以治疗之后,在各10只小鼠的肿瘤内注射入TAV-Δ19k腺病毒或TAV-mTGFβ-阱腺病毒进行治疗。每4天给三剂1x10⁹ IU的每种病毒。用每种病毒治疗的小鼠中的平均肿瘤体积描绘在图1中,用每种病毒治疗的小鼠的无恶化生存率描绘在图2中。

[0110] 实施例2:溶瘤腺病毒的生产

[0111] 本实施例描述了在A549衍生细胞中相对于HEK-293衍生细胞中重组溶瘤腺病毒的生产。

[0112] 构建了一种带有位于E1a起始位点上游-304至-255位的核苷酸区域的缺失的腺病毒5型病毒,所述缺失使得E1a表达成为癌症选择性的(如以前在美国专利号9,073,980中所描述)。所述得到的病毒在后文中被称为TAV。

[0113] 将TAV进一步修饰以在E1b-19k区中带有大约200个碱基对的缺失。得到的病毒在后文中被称为TAV-Δ19k。所述修饰的E1b-19k区的核苷酸序列如下,其中来自于融合的SalI和XhoI位点的残留碱基被下划线:

ATCTTGGTTACATCTGACCTCGTCTCGAGTCACCAGGCGCTTTT

[0114]

CCAA (SEQ ID NO: 6)

[0115] 对TAV-Δ19k进行修饰以在所述修饰的E1b-19k区中包含编码人类TGF-β阱(人类TGFβ II型受体和人类IgG1的融合蛋白)的核苷酸序列。所述得到的病毒在后文中被称为TAV-hTGFβ-阱。

[0116] 在HEK-293细胞(293-3F6)和A549细胞(SF-BMAdR)两者中生产TAV-hTGFβ-阱腺病毒。将在无血清培养基(SFM4Transfx-293)中培养的HEK-293细胞以5x10⁵个细胞/mL的密度用TAV-hTGFβ-阱以3的感染复数(MOI)感染。在感染后4天,产率为42PFU/细胞。在分开的实验中,将在无血清培养基(SFM4Transfx-293)中培养的HEK-293细胞以1x10⁶个细胞/mL的密度用TAV-hTGFβ-阱以3的MOI感染。在感染后4天,产率低于10PFU/细胞。将在无血清培养基(SFM4Transfx-293)中培养的A549细胞以1x10⁶个细胞/mL的密度用TAV-hTGFβ-阱以3的MOI感染。在感染后4天,产率为1100PFU/细胞。未修饰的A549细胞不能适应于在相同的无血清培养基(SFM4Transfx-293)中以悬浮培养方式生长。来自于这些细胞系的病毒生产描绘在图3中。

[0117] 合在一起,这些结果显示A549衍生的宿主细胞例如SF-BMAdR A549宿主细胞生产更高产率的某些溶瘤病毒例如TAV-hTGFβ-阱腺病毒。

[0118] 通过引用并入

[0119] 本文中提到的每个专利文献和科学论文的全部内容均为所有目的通过引用并入本文。

[0120] 等同性

[0121] 本发明可以以其他特定形式体现而不背离其精神或本质特征。因此,前述实施方式应该在所有情况下被认为是说明性的而不是限制本文描述的发明。因此,本发明的范围由随附的权利要求书而不是上面的描述指明,并且打算将进入权利要求书的意义和等同性

范围之内所有变化涵盖在其中。

序列表

<110>	埃皮辛特瑞柯斯公司	
<120>	生产重组病毒的方法	
<130>	AJ4309PT1913	
<150>	US 62/483,837	
<151>	2017-04-10	
<160>	14	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	35938	
<212>	DNA	
<213>	5 型腺病毒 (Adenovirus type 5)	
<400>	1	
[0001]	catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt	60
	ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt	120
	gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg	180
	gtgtgcgccg gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgcg gtttaggcg gatgtttag	240
	taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga	300
	agtgaaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tatttgtcta gggccgcggg	360
	gactttgacc gtttacgtgg agactcgccc aggtgttttt ctcagggtgtt ttccgcgttc	420
	cgggtcaaag ttggcgtttt attattatag tcagctgacg ttagtgttat ttatacccg	480
	tgagtctctc aagaggccac tcttgagtgc cagcgagtag agttttctcc tccgagccgc	540
	tccgacaccg ggactgaaaa tgagacatat tatctgccac ggaggtgtta ttaccgaaga	600
	aatggccgcc agtcttttgg accagctgat cgaagaggta ctggctgata atcttcacc	660
	tcttagccat ttggaaccac ctacccttca cgaactgtat gatttagacg tgacggcccc	720

	cgaagatccc aacgaggagg cggtttcgca gatttttccc gactctgtaa tgttggcggg	780
	gcaggaaggg attgacttac tcacttttcc gccggcgccc ggttctccgg agccgcctca	840
	cctttcccgg cagcccgagc agccggagca gagagccttg ggtccggttt ctatgccaaa	900
	ccttgtaccg gaggtgatcg atcttacctg ccacgaggct ggctttccac ccagtgcga	960
	cgaggatgaa gagggtaggg agtttgtgtt agattatgtg gagcaccocg ggcacggttg	1020
	caggctctgt cattatcacc ggaggaatac gggggaccca gatattatgt gttcgctttg	1080
	ctatatgagg acctgtggca tgittgtcta cagtaagtga aaattatggg cagtgggtga	1140
	tagagtgggt ggtttgggtt ggtaattttt ttttaattt ttacagttt gtggtttaaa	1200
	gaattttgta ttgtgattt tttaaaaggt cctgtgtctg aacctgagcc tgagcccag	1260
	ccagaaccgg agcctgcaag acctaccgc cgtcctaaaa tggcgccctgc tatcctgaga	1320
	cgcccacat cacctgtgtc tagagaatgc aatagtagta cggatagctg tgactccgt	1380
[0002]	ccttctaaca cacctcctga gataccocg gtggccccgc tgtgccccat taaaccagtt	1440
	gccgtgagag ttggtgggcg tcgccaggct gtggaatgta tcgaggactt gcttaacgag	1500
	cctgggcaac ctttgactt gagctgtaaa cgcocaggc cataagggtt aaacctgtga	1560
	ttgcgtgtgt ggtaacgcc ttgtttgtc gaatgagttg atgtaagttt aataaagggt	1620
	gagataatgt ttaacttga tggcgtgtta aatggggcgg ggcttaaagg gtatataatg	1680
	cgcctgggc taatcttgggt tacatctgac ctcatggagg cttgggagtg tttggaagat	1740
	ttttctgtg tgcgtaactt gctggaacag agctctaaca gtacctctg gttttggagg	1800
	tttctgtgg gctcatccca ggcaaagtta gtctgcagaa ttaaggagga ttacaagtgg	1860
	gaatttgaag agcttttgaa atcctgtggt gagctgtttg attctttgaa tctgggtcac	1920
	caggcgcttt tccaagagaa ggtcatcaag actttggatt tttccacacc ggggcgcgt	1980
	gcggctgtg ttgctttttt gatttttata aaggataaat ggagcgaaga aacctatctg	2040

	agcggggggt acctgctgga ttttctggcc atgcatctgt ggagagcggg tgtgagacac	2100
	aagaatcgcc tgctactgtt gtcttccgtc cgcccggcga taataccgac ggaggagcag	2160
	cagcagcagc aggaggaagc caggcggcgg cggcaggagc agagcccatg gaacccgaga	2220
	gccggcctgg accctcggga atgaatgttg tacagggtggc tgaactgtat ccagaactga	2280
	gacgcatttt gacaattaca gaggatgggc aggggctaaa gggggtaaag agggagcggg	2340
	gggcttgtga ggctacagag gaggctagga atctagcttt tagcttaatg accagacacc	2400
	gtcctgagtg tattactttt caacagatca aggataattg cgctaagtag cttgatctgc	2460
	tggcgagaa gtattccata gagcagctga ccacttactg gctgcagcca ggggatgatt	2520
	ttgaggaggc tattagggtat tatgcaaagg tggcacttag gccagattgc aagtacaaga	2580
	tcagcaaact tgtaaataac aggaattgtt gctacatttc tgggaacggg gccgaggtgg	2640
	agatagatac ggaggatagg gtggccttta gatgtagcat gataaatatg tggccggggg	2700
[0003]	tgcttggcat ggacggggtg gttattatga atgtaagggt tactggcccc aattttagcg	2760
	gtacggtttt cctggccaat accaacctta tectacacgg tgtaagcttc tatgggttta	2820
	acaataacctg tgtggaagcc tggaccgatg taagggttcg gggctgtgcc ttttactgct	2880
	gctggaaggg ggtggtgtgt cgccccaaaa gcagggttc aattaagaaa tgcctctttg	2940
	aaaggtgtac cttgggtatc ctgtctgagg gtaactccag ggtgcgccac aatgtggcct	3000
	ccgactgtgg ttgcttcatg ctagtgaaaa gcgtggctgt gattaagcat aacatggtat	3060
	gtggcaactg cgaggacagg gcctctcaga tgctgacctg ctcgacggc aactgtcacc	3120
	tgctgaagac cattcacgta gccagccact ctgcaaggc ctggccagtg tttgagcata	3180
	acatactgac ccgctgttcc ttgcatttgg gtaacaggag gggggtgttc ctaccttacc	3240
	aatgcaattt gagtcacact aagatattgc ttgagcccga gagcatgtcc aaggtgaacc	3300
	tgaacggggt gtttgacatg accatgaaga tctggaaggt gctgaggtag gatgagaccc	3360

	gcaccaggtg cagaccctgc gagtgtggcg gtaaacatat taggaaccag cctgtgatgc	3420
	tggatgtgac cgaggagctg aggcccgatc acttgggtgct ggccctgcacc cgcgctgagt	3480
	ttggctctag cgatgaagat acagattgag gtactgaaat gtgtgggcgt ggcttaaggg	3540
	tgggaaagaa tatataaggt ggggggtctta tgtagttttg tatctgtttt gcagcagccg	3600
	ccgccgcat gagcaccaac tcgtttgatg gaagcattgt gagctcatat ttgacaacgc	3660
	gcatgcccc atgggccggg gtgcgtcaga atgtgatggg ctccagcatt gatggtcgcc	3720
	ccgtcctgcc cgcaactct actacctga cctacgagac cgtgtctgga acgccgttgg	3780
	agactgcagc ctccgccgcc gcttcagccg ctgcagccac cgcccgcggg attgtgactg	3840
	actttgcttt cctgagcccg cttgcaagca gtgcagcttc ccgttcatcc gcccgcgatg	3900
	acaagttgac ggctcttttg gcacaattgg attctttgac ccgggaactt aatgtcgttt	3960
	ctcagcagct gttgatctg cgccagcagg tttctgccct gaaggcttcc tccccccca	4020
[0004]	atgcggttta aaacataaat aaaaaaccag actctgtttg gatttggatc aagcaagtgt	4080
	cttgcgtctt ttatttaggg gttttgcgcg cgcggtaggc ccgggaccag cggctcgggt	4140
	cgttgagggt cctgtgtatt tttccagga cgtggtaaag gtgactctgg atgttcagat	4200
	acatgggcat aagcccgtct ctgggggtgga ggtagcacca ctgcagagct tcatgctgcg	4260
	gggtgggtgt gtagatgac cagtcgtagc aggagcgcgt ggctgtgtgc ctaaaaatgt	4320
	cittcagtag caagctgatt gccaggggca ggcccttggg gtaagtgttt acaaagcgtt	4380
	taagctggga tgggtgcata cgtggggata tgagatgcat cttggactgt atttttaggt	4440
	tggctatgtt ccagccata tccctccggg gattcatgtt gtgcagaacc accagcacag	4500
	tgtatccggt gcacttgga aatttgtcat gtagcttaga aggaaatgcg tggaagaact	4560
	tggagacgcc cttgtgacct ccaagatttt ccatgcattc gtccataatg atggcaatgg	4620
	gccacgggc ggccggcctgg gcgaagatat ttctgggatc actaacgtca tagttgtgtt	4680

	ccaggatgag atcgatcatag gccatthttta caaagcgcgg gcggagggtg ccagactgcg	4740
	gtataatggt tccatccggc ccaggggcgt agttaccctc acagatttgc atttcccacg	4800
	ctttgagttc agatgggggg atcatgtcta cctgcggggc gatgaagaaa acggtttccg	4860
	gggtagggga gatcagctgg gaagaaagca ggttcctgag cagctgcgac ttaccgcagc	4920
	cggtagggccc gtaaatacaca cctattaccg ggtgcaactg gtagttaaga gagctgcagc	4980
	tgccgtcatc cctgagcagg ggggccactt cgtaagcat gtcctgact cgcattgttt	5040
	ccctgaccaa atccgccaga aggcgctcgc cgccagcga tagcagttct tgcaaggaag	5100
	caaagthttt caacggtttg agaccgtccg ccgtaggcat gctthtgagc gtttgaccaa	5160
	gcagttccag gcggtccac agctcgtca cctgctctac ggcatctcga tccagcatat	5220
	ctcctcgttt cgcgggttg ggcggctttc gctgtacggc agtagtcggt gctcgtccag	5280
	acgggccagg gtcattgttt tccacgggcg cagggtctc gtcagcgtag tctgggtcac	5340
[0005]	ggtgaagggg tgcgctccgg gctgcgcgt gccagggtg cgcttgaggc tggctctgt	5400
	ggtgctgaag cgctgccgt cttcgccctg cgcgtcggc aggtagcatt tgaccatggt	5460
	gtcatagtcc agccctccg cggcgtggc cttggcgcgc agcttgccct tggaggaggc	5520
	gccgcacgag gggcagtgca gactthtgag ggcgtagagc ttgggcgcga gaaataccga	5580
	ttccggggag taggcatccg cgccgcaggc cccgcagacg gtctcgcat ccacagacca	5640
	ggtgagctct ggccgttcgg ggtcaaaaac caggtttccc ccatgctttt tgatgcgttt	5700
	cttacctctg gtttccatga gccggtgtcc acgctcggg acgaaaaggc tgtccgtgtc	5760
	cccgtataca gacttgagag gcctgtctc gagcgggtt ccgcggtcct cctcgtatag	5820
	aaactcggac cactctgaga caaaggctcg cgtccaggcc agcacgaagg aggctaagt	5880
	ggaggggtag cggctgttgt ccactagggg gtccactcgc tccagggtgt gaagacacat	5940
	gtcgcctct tggcatcaa ggaagggtgat tggthtgtag gtgtaggcca cgtgaccggg	6000

	tgttcctgaa ggggggctat aaaaggggggt gggggcgcggt tcgtcctcac tctcttccgc	6060
	atcgctgtct gcgagggcca gctgttgggg tgagtactcc ctctgaaaag cgggcatgac	6120
	ttctgcgcta agattgtcag ttccaaaaa cgaggaggat ttgatatca cctggcccgc	6180
	ggtgatgcct ttgagggtgg ccgcatccat ctggtcagaa aagacaatct tttgttgtc	6240
	aagcttggtg gcaaacgacc cgtagagggc gttggacagc aacttggcga tggagcgag	6300
	ggtttggttt ttgtcggat cggcgcgctc cttggccgcg atgttttagct gcacgtattc	6360
	gcgcgcaacg caccgccatt cgggaaagac ggtggtgcgc tcgtcgggca ccaggtgcac	6420
	gcgccaaccg cggtttgtca ggttgacaag gtcaacgctg gtggctacct ctccgctag	6480
	gcgctcgttg gtccagcaga ggcggccgcc cttgcgcgag cagaatggcg gtagggggtc	6540
	tagctgcgtc tcgtccgggg ggtctgcgtc cacggtaaag accccgggca gcaggcgcg	6600
	gtcgaagtag tctatcttgc atccttgcaa gtctagcgcc tgctgccatg cgcgggcggc	6660
[0006]	aagcgcgcgc tcgtatgggt tgagtggggg accccatggc atggggtggg tgagcgcgga	6720
	ggcgtacatg ccgcaaagt cgtaaacgta gaggggctct ctgagtattc caagatatgt	6780
	agggtagcat cttccaccgc ggatgctggc gcgcacgtaa tcgtatagtt cgtgcgagg	6840
	agcgaggagg tcgggaccga ggttgctacg ggcgggctgc tctgctcgga agactatctg	6900
	cctgaagatg gcatgtgagt tggatgatat ggttgacgc tggaagacgt tgaagctggc	6960
	gtctgtgaga cctaccgct cacgcacgaa ggaggcgtag gagtcgcgca gcttgttgac	7020
	cagctcggcg gtgacctgca cgtctagggc gcagtagtcc agggtttcct tgatgatgtc	7080
	atacttatcc tgtccctttt tttccacag ctccgggttg aggacaaact cttcgcggtc	7140
	tttccagtac tcttggatcg gaaaccgct ggctccgaa cggtaagagc ctagcatgta	7200
	gaactggttg acggcctggt aggcgcagca tcccttttct acgggtagcg cgtatgcctg	7260
	cgcggccttc cggagcgagg tgtgggtgag cgcaaagggt tccctgacca tgactttgag	7320

	gtactggtat ttgaagtcag tgcgtcgcga tccgccctgc tcccagagca aaaagtccgt	7380
	gcgccttttg gaacgcggat ttggcagggc gaaggtgaca tcgttgaaga gtatctttcc	7440
	cgcgcgaggc ataaagttgc gtgtgatgcg gaagggtccc ggcacctcgg aacggttggt	7500
	aattacctgg gcggcgagca cgatctcgtc aaagccgttg atgttggtgc ccacaatgta	7560
	aagttccaag aagcgcggga tgcccttgat ggaaggcaat tttttaagtt cctcgtaggt	7620
	gagctcttca ggggagctga gcccgctgc tgaaagggcc cagtctgcaa gatgagggtt	7680
	ggaagcgacg aatgagctcc acaggtcacg ggccattagc atttgcaggt ggtcgcgaaa	7740
	ggtcctaaac tggcgacctg tgccatttt ttctggggtg atgcagtaga aggtaagcgg	7800
	gtcttgttcc cagcggctcc atccaaggtt cgcggctagg tctcgcgcgg cagtcactag	7860
	aggctcatct ccgccgaact tcatgaccag catgaagggc acgagctgct tcccaaaggc	7920
	ccccatccaa gtataggtct ctacatcgta ggtgacaaag agacgctcgg tgcgaggatg	7980
[0007]	cgagccgacg gggaagaact ggatctcccg ccaccaattg gaggagtggc tattgatgtg	8040
	gtgaaagtag aagtccttgc gacgggccga acactcgtgc tggcttttgt aaaaacgtgc	8100
	gcagtactgg cagcggtgca cgggctgtac atcctgcacg aggttgacct gacgaccgcg	8160
	cacaaggaag cagagtggga atttgagccc ctgcctggc gggtttggt ggtggtcttc	8220
	tacttcggct gcttgtcctt gaccgtctgg ctgctcgagg ggagttacgg tggatcggac	8280
	caccacgccg cgcgagccca aagtcagat gtccgcgcgc ggcggtcgga gcttgatgac	8340
	aacatcgcgc agatgggagc tgtccatggt ctggagctcc cgcggcgtca ggtcaggcgg	8400
	gagctcctgc aggtttacct cgcatagacg ggtcagggcg cgggctagat ccaggtgata	8460
	cctaatttcc aggggctggt tgggtggcgc gtcgatggct tgcaagaggc cgcacccccg	8520
	cggcgcgact acggtaccgc gcggcgggcg gtgggccgcg ggggtgtcct tggatgatgc	8580
	atctaaaagc ggtgacgcgg gcgagccccc ggaggtaggg ggggctccgg acccgccggg	8640

	agagggggca ggggcacgtc ggccgcccgc gcgggcagga gctggtgctg cgcgcgtagg	8700
	ttgctggcga acgcgacgac gcggcggttg atctcctgaa tctggcgctt ctgcgtgaag	8760
	acgacgggcc cggtagctt gagcctgaaa gagagtcca cagaatcaat ttcggtgtcg	8820
	ttgacggcgg cctggcgcaa aatctcctgc acgtctcctg agttgtcttg ataggcgatc	8880
	tcggccatga actgctcgat ctcttctctc tggagatctc cgcgtccggc tcgctccacg	8940
	gtggcggcga ggtcggttga aatgcgggcc atgagctgcg agaaggcgtt gaggcctccc	9000
	tcgttcaga cgcggctgta gaccacgccc ctttcggcat cgcgggcgcg catgaccacc	9060
	tgcgcgagat tgagctccac gtgccgggcg aagacggcgt agtttcgcag gcgctgaaag	9120
	aggtagtga ggggtgtggc ggtgtgttct gccacgaaga agtacataac ccagcgtcgc	9180
	aacgtggatt cgttgatata cccaaggcc tcaaggcgtt ccatggcctc gtagaagtcc	9240
[0008]	acggcgaagt tgaaaaactg ggagttgcgc gccgacacgg ttaactcctc ctccagaaga	9300
	cggatgagct cggcgacagt gtcgcgcacc tcgcgtcaa aggctacagg ggcctcttct	9360
	tcttctcaa tctctcttc cataaggcc tccccctctt ctcttcttg cggcggtggg	9420
	ggagggggga cacggcgcg acgacggcg accgggaggc ggtcgacaaa gcgctcgatc	9480
	atctccccgc ggcgacggcg catggtctcg gtgacggcg gcccgttctc gcggggcgcg	9540
	agttggaaga cgcgcccgt catgtcccgg ttatgggttg gcggggggct gccatgcggc	9600
	agggatacgg cgtaacgat gcctctcaac aattgtgtg taggtactcc gccgccagg	9660
	gacctgagcg agtccgcatc gaccggatcg gaaaacctct cgagaaaggc gtctaaccag	9720
	tcacagtgc aaggtaggct gagcaccgtg gcggcgccga gcggcgcg gtcggggttg	9780
	tttctggcgg aggtgctgct gatgatgtaa ttaaagtagg cggctcttgag acggcggatg	9840
	gtcgacagaa gcaccatgtc cttgggtccg gcctgtgaa tgcgcaggcg gtcggccatg	9900
	ccccaggett cgttttgaca tcggcgagg tctttgtagt agtcttgcag gacctttct	9960

	accggcactt cttcttctcc ttctctttgt cctgcatctc ttgcatctat cgctgcggcg	10020
	gcggcggagt ttggccgtag gtggcgccct ctctctccca tgcgtgtgac cccgaagccc	10080
	ctcatcggct gaagcagggc taggtcggcg acaacgcgct cggctaatat ggcctgtgc	10140
	acctgcgtga gggtagactg gaagtcattc atgtccacaa agcgggtgga tgcgccgtg	10200
	ttgatgggtg aagtgcagtt ggccataacg gaccagttaa cggctctggg acccggtgc	10260
	gagagctcgg tgtacctgag acgcgagtaa gccctcgagt caaatacgtg gtcgttgcaa	10320
	gtccgcacca ggtactgga tcccacaaa aagtgcggcg gcggctggcg gtagaggggc	10380
	cagcgtaggg tggccggggc tccggggcg agatcttcca acataaggcg atgatatccg	10440
	tagatgtacc tggacatcca ggtgatgccg gcggcgggtg tggaggcgcg cggaaagtcg	10500
	cggacgcggt tccagatgtt gcgcagcggc aaaaagtgt ccatggtcgg gacgctctgg	10560
	ccggtcaggc gcgcgaatc gttgacgtc tagaccgtgc aaaaggagag cctgtaagcg	10620
[0009]	ggcactcttc cgtggctcgg tggataaatt cgcaagggtg tcatggcgga cgaccggggt	10680
	tcgagccccg tatccggccg tccgccgtga tccatgcggt taccgccccg gtgtcgaacc	10740
	caggtgtgcg acgtcagaca acgggggagt gtccttttg gcttcttcc aggcgcggcg	10800
	gctgtcgcg tagctttttt ggccactggc cgcgcgcagc gtaagcggtt aggctggaaa	10860
	gcgaaagcat taagtggctc gtcacctgta gccggagggt tattttccaa gggttgagtc	10920
	gcgggacccc cggttcgagt ctccgaccgg ccgactgcg gcgaacgggg gtttgcctcc	10980
	ccgtcatgca agaccccgt tgcaaattcc tccggaaaca gggacgagcc cttttttgc	11040
	ttttccaga tgcattccgt gctgcggcag atgcgcccc ctcctcagca gcggcaagag	11100
	caagagcagc ggcagacatg cagggcaccc tcccctctc ctaccgcgtc aggagggcg	11160
	acatccgcgg ttgacgcggc agcagatggt gattacgaac ccccgcgcg ccgggcccgg	11220
	cactacctgg acttgagga gggcgagggc ctggcgcggc taggagcgcc ctctctgag	11280

	cggtacccaa ggggtgcagct gaagcgtgat acgcgtgagg cgtacgtgcc gcggcagaac	11340
	ctgttttcgcg accgcgaggg agaggagccc gaggagatgc gggatcgaaa gttccacgca	11400
	ggcgcgagc tgcggcatgg cctgaatcgc gagcggttgc tgcgcgagga ggactttgag	11460
	cccgcgcgc gaaccgggat tagtcccgcg cgcgcacacg tggcggccgc cgacctggt	11520
	accgcatacg agcagacggt gaaccaggag attaactttc aaaaaagctt taacaaccac	11580
	gtgcgtacgc ttgtggcgcg cgaggagggtg gctataggac tgatgcatct gtgggacttt	11640
	gtaagcgcgc tggagcaaaa cccaaatagc aagccgctca tggcgagct gttccttata	11700
	gtgcagcaca gcagggacaa cgaggcattc agggatgcgc tgctaaacat agtagagccc	11760
	gagggccgct ggctgctcga ttgataaac atcctgcaga gcatagtgtt gcaggagcgc	11820
	agcttgagcc tggctgacaa ggtggccgcc atcaactatt ccatgcttag cctgggcaag	11880
[0010]	ttttacgcc gcaagatata ccatacccct tacgttccca tagacaagga ggtaaagatc	11940
	gaggggttct acatgcgcgt ggcgctgaag gtgcttacct tgagcgacga cctgggcgtt	12000
	tatcgcaacg agcgcatcca caaggccgtg agcgtgagcc ggccggcgga gctcagcgac	12060
	cgcgagctga tgcacagcct gcaaagggcc ctggctggca cgggcagcgg cgatagagag	12120
	gccgagtcct actttgacgc ggcgctgac ctgcgtggg cccaagccg acgcgccctg	12180
	gaggcagctg gggccggacc tgggctggcg gtggcaccg cgcgcgctgg caacgtcggc	12240
	ggcgtggagg aatatgacga ggacgatgag tacgagccag aggacggcga gtactaagcg	12300
	gtgatgtttc tgatcagatg atgcaagacg caacggaccc ggcggtgcgg gcggcgctgc	12360
	agagccagcc gtccggcctt aactccacgg acgactggcg ccaggtcatg gaccgcatca	12420
	tgctgctgac tgcgcgcaat cctgacgcgt tccggcagca gccgcaggcc aaccggctct	12480
	ccgcaattct ggaagcgtg gtcccggcgc gcgcaaacc cagcacgag aaggtgctgg	12540
	cgatcgtaaa cgcgctggcc gaaaacagg ccacccggcc cgacgaggcc ggcctggtct	12600

	acgacgcgct gcttcagcgc gtggctcgtt acaacagcgg caacgtgcag accaacctgg	12660
	accggctggt gggggatgtg cgcgaggccg tggcgagcgc tgagcgcgcg cagcagcagg	12720
	gcaacctggg ctccatggtt gcactaaacg ccttcctgag tacacagccc gccaacgtgc	12780
	cgcggggaca ggaggactac accaactttg tgagcgcaact gcggctaata gtgactgaga	12840
	caccgcaaag tgagggtgtac cagtctgggc cagactatit tttccagacc agtagacaag	12900
	gcctgcagac cgtaaacctg agccaggctt tcaaaaactt gcaggggctg tgggggggtgc	12960
	gggctccac aggcgaccgc gcgaccgtgt ctagcttgct gacgcccac tcgcgcctgt	13020
	tgctgctgct aatagcgcgc ttcacggaca gtggcagcgt gtcccgggac acatacctag	13080
	gtcacttgct gacactgtac cgcgaggcca taggtcaggc gcatgtggac gagcatactt	13140
	tccaggagat tacaagtgtc agccgcgcgc tggggcagga ggacacgggc agcctggagg	13200
	caaccctaaa ctacctgtg accaaccggc ggcagaagat cccctcgttg cacagtttaa	13260
[0011]	acagcgagga ggagcgcat ttcgctacg tgcagcagag cgtgagcctt aacctgatgc	13320
	gcgacgggggt aacgcccagc gtggcgctgg acatgaccgc gcgcaacatg gaaccgggca	13380
	tgtatgcctc aaaccggccg tttatcaacc gcctaataga ctacttgcat cgcgcggccg	13440
	ccgtgaacct cgagtatttc accaatgcca tcttgaacct gcaactggta ccgccccctg	13500
	gtttctacac cgggggattc gaggtgcccg agggtaacga tggattcctc tgggacgaca	13560
	tagacgacag cgtgttttcc ccgcaaccgc agaccctgct agagttgcaa cagcgcgagc	13620
	aggcagaggc ggcgctgcga aaggaaagct tccgcaggcc aagcagcttg tccgatctag	13680
	gcgctgcggc cccgcggcca gatgctagta gccatttcc aagcttgata gggctcttta	13740
	ccagcactcg caccaccgc ccgcgcctgc tgggcgagga ggagtaccta aacaactcgc	13800
	tgctgcagcc gcagcgcgaa aaaaacctgc ctccggcatt tcccaacaac gggatagaga	13860
	gcctagtgga caagatgagt agatggaaga cgtacgcgca ggagcacagg gacgtgccag	13920

	gcccgcgccc gccacccgt cgtcaaaggc acgaccgtca gcggggtctg gtgtgggagg	13980
	acgatgactc ggcagacgac agcagcgtcc tggatttggg agggagtggc aaccggttg	14040
	cgcaccttcg ccccaggctg gggagaatgt tttaaaaaaa aaaaagcatg atgcaaaata	14100
	aaaaactcac caaggccatg gcaccgagcg ttggttttct tgtattcccc ttagtatgcg	14160
	gcgcgcggcg atgtatgagg aaggctctcc tccctcctac gagagtgtgg tgagcgcggc	14220
	gccagtggcg gcggcgctgg gttctccctt cgatgctccc ctggacccgc cgtttgtgcc	14280
	tccgcggtac ctgcggccta ccggggggag aaacagcatc cgttactctg agttggcacc	14340
	cctattcgac accaccgtg tgtacctggt ggacaacaag tcaacggatg tggcatccct	14400
	gaactaccag aacgaccaca gcaactttct gaccacggtc attcaaaaca atgactacag	14460
	ccggggggag gcaagcacac agaccatcaa tcttgacgac cggtcgcact ggggcggcga	14520
	cctgaaaacc atcctgcata ccaacatgcc aaatgtgaac gagttcatgt ttaccaataa	14580
[0012]	gtttaaggcg cgggtgatgg tgcgcgctt gcctactaag gacaatcagg tggagctgaa	14640
	atacagatgg gtggagtcca cgctgcccga gggcaactac tccgagacca tgaccataga	14700
	ccttatgaac aacgcgatcg tggagcacta cttgaaagtg ggcagacaga acggggttct	14760
	ggaaagcgac atcggggtaa agtttgacac ccgcaacttc agactggggt ttgacccgt	14820
	cactggtctt gtcatgcctg gggatatatac aaacgaagcc ttccatccag acatcathtt	14880
	gctgccagga tgcggggtgg acttcacca cagccgctg agcaacttgt tggcatccg	14940
	caagcggcaa cccttcagg agggctttag gatcacctac gatgatctgg agggtggtaa	15000
	cattcccga ctgttgatg tggacgccta ccaggcgagc ttgaaagatg acaccgaaca	15060
	gggcgggggt ggcgaggcg gcagcaacag cagtggcagc ggcgcggaag agaactcaa	15120
	cgcggcagcc gcggcaatgc agccggtgga ggacatgaac gatcatgcca ttcgcggcga	15180
	cacctttgcc acacgggctg aggagaagcg cgctgaggcc gaagcagcgg ccgaagctgc	15240

	cgcccccgct gcgcaacccg aggtcgagaa gcctcagaag aaaccggtga tcaaaccctt	15300
	gacagaggac agcaagaaac gcagttacaa cctaataagc aatgacagca ccttcaccca	15360
	gtaccgcagc tggtagcttg catacaacta cggcgaccct cagaccggaa tccgtcatg	15420
	gacctgctt tgcactcctg acgtaacctg cggctcggag caggtctact ggtcgttgcc	15480
	agacatgatg caagaccccg tgaccttccg ctccacgcgc cagatcagca actttccggt	15540
	ggtgggcgcc gagctgttgc ccgtgcactc caagagcttc tacaacgacc aggccgtcta	15600
	ctcccaactc atccgccagt ttacctctct gaccacgtg ttcaatcgtt ttcccagaaa	15660
	ccagattttg gcgcgcccgc cagccccac catcaccacc gtcagtgaac acgttctgc	15720
	tctcacagat cacgggacgc taccgtgcg caacagcatc ggaggagtcc agcgagtgc	15780
	cattactgac gccagacgcc gcacctgcc ctacgtttac aaggccctgg gcatagtctc	15840
	gccgcgcgtc ctatcgagcc gcactttttg agcaagcatg tccatcctta tatcgccag	15900
[0013]	caataacaca ggctggggcc tgcgttccc aagcaagatg ttggcgggg ccaagaagcg	15960
	ctccgaccaa caccagtg gcgtgcgcgg gcactaccgc gcgccctggg gcgcgcacaa	16020
	acgcggccgc actgggcgca ccaccgtcga tgacgccatc gacgcggtgg tggaggaggc	16080
	gcgcaactac acgcccacgc cgcaccagt gtccacagtg gacgcggcca ttcagaccgt	16140
	ggtgcgcgga gcccgcgct atgctaaaat gaagagacgg cggaggcgcg tagcacgtcg	16200
	ccaccgccc gcacccggca ctgccgcca acgcgcggcg gcggccctgc ttaaccgcgc	16260
	acgtcgcacc ggccgacggg cggccatgcg ggccgctcga aggctggccg cgggtattgt	16320
	cactgtgcc cccaggcca ggcgacgagc ggccgccga gcagccgagg ccattagtgc	16380
	tatgactcag ggtcgcagg gcaacgtgta ttgggtgcgc gactcggta gcggcctgcg	16440
	cgtgcccggt gcacccgcc ccccgcgcaa ctagattgca agaaaaact acttagactc	16500
	gtactgttgt atgtatccag cggcggcggc gcgcaacgaa gctatgtcca agcgcaaat	16560

	caaagaagag atgctccagg tcatcgcgcc ggagatctat ggccccccga agaaggaaga	16620
	gcaggattac aagccccgaa agctaaagcg ggtcaaaaag aaaaagaaag atgatgatga	16680
	tgaacttgac gacgaggtgg aactgctgca cgctaccgcg cccaggcgac gggtagagt	16740
	gaaaggctga cgcgtaaaac gtgttttgcg acccggcacc accgtagtct ttacgcccg	16800
	tgagcgctcc acccgcacct acaagcgct gtatgatgag gtgtacggcg acgaggacct	16860
	gcttgagcag gccaacgagc gcctcgggga gtttcctac ggaaagcggc ataaggacat	16920
	gctggcggtg ccgctggacg agggcaaccc aacacctagc ctaaagcccg taacactgca	16980
	gcaggtgctg cccgcgctg caccgtccga agaaaagcgc ggcctaaagc gcgagtctgg	17040
	tgacttgca cccaccgtgc agctgatggt acccaagcgc cagcgactgg aagatgtctt	17100
	ggaaaaaatg accgtggaac ctgggctgga gcccagagtc cgcgtgcggc caatcaagca	17160
[0014]	ggtggcgccg ggactgggcg tgcagaccgt ggacgttcag ataccacta ccagtagcac	17220
	cagtattgcc accgccacag agggcatgga gacacaaacg tccccggtg cctcagcgtt	17280
	ggcggatgcc gcggtgcagg cggtcgctgc ggccgcgtcc aagacctcta cggaggtgca	17340
	aacggacccg tggatgtttc gcgtttcagc cccccggcgc ccgcgcggtt cgaggaagta	17400
	cggcggccgc agcgcgtac tgcccgaata tgccctacat ccttccattg cgcctacccc	17460
	cggctatcgt ggctacacct accgccccag aagacgagca actaccgac gccgaaccac	17520
	cactggaacc cgccggccgc gtcgccgtcg ccagcccgtg ctggccccga tttccgtgcg	17580
	caggttggtc cgcgaaggag gcaggacct ggtgctgcca acagcgcgt accaccccag	17640
	catcgtttaa aagccgtct tttgtgttct tgcagatatg gccctacct gccgcctccg	17700
	tttcccggtg ccgggattcc gaggaagaat gcaccgtagg aggggcatgg ccggccacgg	17760
	cctgacgggc ggcatgcgtc gtgcgcacca ccggcggcgg cgcgcgtcgc accgtcgc	17820
	gcgcggcggt atcctgcccc tccttattcc actgatcgcc gcggcgattg gcgccgtgcc	17880

	cggaattgca tccgtggcct tgcaggcgca gagacactga ttaaaaacaa gttgcatgtg	17940
	gaaaaatcaa aataaaaagt ctggactctc acgctcgett ggtcctgtaa ctattttgta	18000
	gaatggaaga catcaacttt gcgctctctgg ccccgcgaca cggtcgcgc ccgttcatgg	18060
	gaaactggca agatatcggc accagcaata tgagcgggtg gccttcagc tggggctcgc	18120
	tgtggagcgg cattaaaaat ttcggttcca ccgttaagaa ctatggcagc aaggcctgga	18180
	acagcagcac aggccagatg ctgagggata agttgaaaga gcaaaatttc caacaaaagg	18240
	tggtagatgg cctggcctct ggcattagcg ggggtgtgga cctggccaac caggcagtgc	18300
	aaaataagat taacagtaag cttgatcccc gccctcccgt agaggagcct ccaccggccg	18360
	tggagacagt gtctccagag gggcgtggcg aaaagcgtcc gcgccccgac agggaagaaa	18420
	ctctggtgac gcaaatagac gagcctccct cgtacgagga ggcactaaag caaggcctgc	18480
	ccaccacccg tcccatcgcg cccatggcta ccggagtgtt gggccagcac acaccgtaa	18540
[0015]	cgctggacct gcctcccccc gccgacaccc agcagaaacc tgtgtgtcca ggcccgaccg	18600
	ccgttgttgt aaccgcctct agccgcgcgt cctgcgccg cgccgccagc ggtccgcgat	18660
	cgttgcggcc cgtagccagt ggcaactggc aaagcacact gaacagcatc gtgggtctgg	18720
	gggtgcaatc cctgaagcgc cgacgatgct tctgaatagc taacgtgtcg tatgtgtgc	18780
	atgtatgcgt ccatgtcgcc gccagaggag ctgctgagcc gccgcgcgcc cgctttccaa	18840
	gatggctacc ccttcgatga tgccgcagtg gtcttacatg cacatctcgg gccaggacgc	18900
	ctcggagtac ctgagccccg ggttggtgca gtttgccgc gccaccgaga cgtacttcag	18960
	cctgaataac aagtttagaa accccacggt ggcgcctacg cacgacgtga ccacagaccg	19020
	gtcccagcgt ttgacgtgc ggttcacccc tgtggaccgt gaggatactg cgtactcgta	19080
	caaggcgcgg ttcaccctag ctgtgggtga taaccgtgtg ctggacatgg cttccacgta	19140
	ctttgacatc cgcggcgtgc tggacagggg ccctactttt aagccctact ctggcactgc	19200

	ctacaacgcc ctggctccca aggggtgcccc aaatccttgc gaatgggatg aagctgctac	19260
	tgctcttgaa ataaacctag aagaagagga cgatgacaac gaagacgaag tagacgagca	19320
	agctgagcag caaaaaactc acgtatttgg gcaggcgcct tattctggta taaatattac	19380
	aaaggagggt attcaaatag gtgtcgaagg tcaaacacct aaatatgccg ataaaacatt	19440
	tcaacctgaa cctcaaatag gagaatctca gtggtacgaa actgaaatta atcatgcagc	19500
	tgggagagtc cttaaaaaga ctaccccaat gaaacatgt tacggttcat atgcaaaacc	19560
	cacaaatgaa aatggagggc aaggcattct tgtaaagcaa caaatggaa agctagaaag	19620
	tcaagtggaa atgcaatfff tctcaactac tgaggcgacc gcaggcaatg gtgataactt	19680
	gactcctaaa gtggtattgt acagtgaaga tgtagatata gaaacccag acactcatat	19740
	ttcttacatg cccactatta aggaaggtaa ctcacgagaa ctaatgggcc aacaatctat	19800
	gccaacagg cctaattaca ttgcttttag ggacaatfff attggtctaa tgtattacaa	19860
[0016]	cagcacgggt aatatgggtg ttctggcggg ccaagcatcg cagttgaatg ctgttgtaga	19920
	tttgcaagac agaaacacag agctttcata ccagcttttg cttgattcca ttggtgatag	19980
	aaccaggtag ttttctatgt ggaatcaggc tgttgacagc tatgatccag atgttagaat	20040
	tattgaaat catggaactg aagatgaact tccaaattac tgctttccac tgggagggtg	20100
	gattaataca gagactcita ccaaggtaaa acctaaaaca ggtcaggaaa atggatggga	20160
	aaaagatgct acagaatfff cagataaaaa tgaaataaga gttggaaata attttgcct	20220
	ggaaatcaat ctaaagcca acctgtggag aaatttctg tactccaaca tagcgctgta	20280
	tttgcccgac aagctaaagt acagtccttc caacgtaaaa atttctgata acccaaacac	20340
	ctacgactac atgaacaagc gagtgggtgc tcccgggtta gtggactgct acattaacct	20400
	tggagcacgc tgggtccctg actatatgga caacgtcaac ccatttaacc accaccgcaa	20460
	tgctggcctg cgctaccgct caatgttgcg gggcaatggg cgctatgtgc ccttccacat	20520

	ccaggtgcct cagaagtctt ttgccattaa aaacctcctt ctctgccgg gctcatacac	20580
	ctacgagtgg aacttcagga aggatgttaa catggttctg cagagctccc taggaaatga	20640
	cctaagggtt gacggagcca gcattaagtt tgatagcatt tgcctttacg ccaccttctt	20700
	ccccatggcc cacaacaccg cctccacgct tgaggccatg cttagaaacg acaccaacga	20760
	ccagtccttt aacgactatc tctccgccg caacatgctc taccctatac ccgccaacgc	20820
	taccaacgtg cccatatcca tcccctcccg caactgggcg gctttccgcg gctgggcctt	20880
	cacgcgcctt aagactaagg aaaccccatc actgggctcg ggctacgacc cttattacac	20940
	ctactctggc tctataccct acctagatgg aaccttttac ctcaaccaca cctttaagaa	21000
	ggtggccatt acctttgact cttctgtcag ctggcctggc aatgaccgcc tgcttacctc	21060
	caacgagttt gaaattaagc gctcagttga cggggagggt tacaacgttg ccagtgtaa	21120
	catgacaaa gactggttcc tggtaaaaat gctagctaac tacaacattg gctaccaggg	21180
[0017]	cttctatata ccagagagct acaaggaccg catgtactcc ttcttttagaa acttcagcc	21240
	catgagccgt caggtggtgg atgatactaa atacaaggac taccaacagg tgggcatcct	21300
	acaccaacac aacaactctg gatttggttg ctaccttgcc cccaccatgc gcgaaggaca	21360
	ggcctaccct gctaacttcc cctatccgct tataggcaag accgcagttg acagcattac	21420
	ccagaaaaag tttctttgcg atcgaccct ttggcgcatc ccattctcca gtaactttat	21480
	gtccatgggc gcactcacag acctgggcca aaaccttctc tacgccaact ccgccacgc	21540
	gctagacatg acttttgagg tggatcccat ggacgagccc acccttcttt atgttttgtt	21600
	tgaagtcttt gacgtgttcc gtgtgcaccg gccgcaccgc ggcgatcatg aaaccgtgta	21660
	cctgcgcacg cccttctcgg ccggcaacgc cacaacataa agaagcaagc aacatcaaca	21720
	acagctgccg ccatgggctc cagtgagcag gaactgaaag ccattgtcaa agatcttggc	21780
	tgtgggcat attttttggg cacctatgac aagcgtttc caggctttgt ttctccacac	21840

	aagctcgctt gcgccatagt caatacggcc ggtcgcgaga ctgggggctt acactggatg	21900
	gcctttgcct ggaacccgca ctcaaaaaca tgctacctct ttgagccctt tggcttttct	21960
	gaccagcgac tcaagcaggt ttaccagttt gagtacgagt cactcctgcg ccgtagcgcc	22020
	attgcttctt ccccgaccg ctgtataacg ctggaaaagt ccacccaaag cgtacagggg	22080
	cccaactcgg ccgcctgtgg actattctgc tgcatgtttc tccacgcctt tgccaactgg	22140
	ccccaaactc ccatggatca caaccccacc atgaacctta ttaccggggt acccaactcc	22200
	atgctcaaca gtccccaggt acagcccacc ctgcgtcgca accaggaaca gctctacagc	22260
	ttcctggagc gccactcgcc ctacttccgc agccacagtg cgcagattag gagcgccact	22320
	tctttttgtc acttgaaaaa catgtaaaaa taatgtacta gagacacttt caataaaggc	22380
	aaatgctttt atttgtacac tctcgggtga ttatttacc ccacccttgc cgtctgcgcc	22440
	gtttaaaaat caaaggggtt ctgccgcgca tcgctatgcg ccaactggcag ggacacgttg	22500
[0018]	cgatactggt gtttagtgct ccacttaaac tcaggcaciaa ccatccgcgg cagctcggtg	22560
	aagtittcac tccacaggct gcgcaccatc accaacgcgt ttagcaggtc gggcgccgat	22620
	atcttgaagt cgcagttggg gcctccgccc tgcgcgcgcg agttgcgata cacagggttg	22680
	cagcactgga acactatcag cgccgggttg tgcacgctgg ccagcacgct cttgtcggag	22740
	atcagatccg cgtccaggct ctccgcgttg ctgaggcgga acggagtcaa ctttggtagc	22800
	tgccttccca aaaagggcgc gtgcccaggc tttgagttgc actcgcaccg tagtggcatc	22860
	aaaaggtgac cgtgcccgtt ctgggcgtta ggatacagcg cctgcataaa agccttgatc	22920
	tgcttaaaag ccacctgagc ctttgcgcct tcagagaaga acatgccgca agacttgccg	22980
	gaaaactgat tggccggaca ggccgcgtcg tgcacgcagc accttgctgc ggtgttgag	23040
	atctgcacca catitcgcc ccaccggttc ttacagatct tggccttgct agactgctcc	23100
	ttcagcgcgc gctgcccgtt ttcgtcgtc acatccattt caatcacgtg ctcttattt	23160

	atcataatgc ttccgtgtag acacttaagc tcgccttcga tctcagcgca gcggtgcagc	23220
	cacaacgcgc agcccggtggg ctctgtgatgc ttgtaggtca cctctgcaa cgactgcagg	23280
	tacgcctgca ggaatgccc catcatcgtc acaaaggtct tgttgctggt gaaggtcagc	23340
	tgcaaccgcg ggtgctcctc gttcagccag gtcttgcata cggccgccag agcttcact	23400
	tggtcaggca gtagtttgaa gttcgcttt agatcgttat ccacgtggta cttgtccatc	23460
	agcgcgcgcg cagcctccat gcccttctcc cacgcagaca cgatcggcac actcagcggg	23520
	ttcatcaccg taatttcact ttccgcttcg ctgggctctt cctcttcctc ttgcgtccgc	23580
	ataccacgcg ccaactgggtc gtcttcattc agccgccgca ctgtgcgctt acctccttg	23640
	ccatgcttga ttagcaccgg tgggttgctg aaaccaccca tttgtagcgc cacatcttct	23700
	ctttcttctc cgctgtccac gattacctct ggtgatggcg ggcgctcggg cttgggagaa	23760
	gggcgcttct ttttcttctt gggcgcaatg gccaaatccg ccgccgaggt cgatggccgc	23820
[0019]	gggctgggtg tgcgcggcac cagcgcgtct tgtgatgagt ctctctcgtc ctcggactcg	23880
	atacgccgcc tcatccgctt ttttgggggc gcccggggag gcggcggcga cggggacggg	23940
	gacgacacgt cctccatggt tgggggacgt cgcgccgcac cgcgtccgcg ctcgggggtg	24000
	gtttcgcgt gctcctcttc ccgactggcc atttcttct cctataggca gaaaaagatc	24060
	atggagtcag tcgagaagaa ggacagccta accgccccct ctgagttcgc caccaccgcc	24120
	tccaccgatg ccgccaacgc gcctaccacc ttccccgtcg aggcaccccc gcttgaggag	24180
	gaggaagtga ttatcgagca ggacccaggt tttgtaagcg aagacgacga ggaccgctca	24240
	gtaccaacag aggataaaaa gcaagaccag gacaacgcag aggcaaacga ggaacaagtc	24300
	gggcgggggg acgaaaggca tggcgactac ctagatgtgg gagacgacgt gctgttgaag	24360
	catctgcagc gccagtgcgc cattatctgc gacgcgttgc aagagcgag cgatgtgccc	24420
	ctcgccatag cggatgtcag ccttgcctac gaacgccacc tattctcacc gcgcgtaccc	24480

	cccaaacgcc aagaaaacgg cacatgcgag cccaacccgc gcctcaactt ctaccccgtg	24540
	tttgccgtgc cagaggtgct tgccacctat cacatctttt tccaaaactg caagataccc	24600
	ctatcctgcc gtgccaaccg cagccgagcg gacaagcagc tggccttgcg gcagggcgct	24660
	gtcatacctg atatcgctc gctcaacgaa gtgccaaaaa tctttgaggg tcttgacgc	24720
	gacgagaagc gcgcggcaaa cgctctgcaa caggaaaaca gcgaaaatga aagtcactct	24780
	ggagtgttgg tggaactcga gggtgacaac gcgcgcctag ccgtactaaa acgcagcatc	24840
	gaggtcaccc actttgccta cccggcactt aacctacccc ccaaggtcac gagcacagtc	24900
	atgagtgagc tgatcgtgcg ccgtgcgcag cccctggaga gggatgcaaa ttgcaagaa	24960
	caaacagagg agggcctacc cgcagttggc gacgagcagc tagcgcgctg gcttcaaacg	25020
	cgcgagcctg ccgacttga ggagcgacgc aaactaatga tggccgcagt gctcgttacc	25080
	gtggagcttg agtgcacgca gcggttcttt gctgaccgag agatgcagcg caagctagag	25140
[0020]	gaaacattgc actacacctt tcgacagggc tacgtacgcc aggcctgcaa gatctccaac	25200
	gtggagctct gcaacctggc ctccctacctt ggaattttgc acgaaaaccg ccttgggcaa	25260
	aacgtgcttc attccacgct caagggcgag gcgcgccgcg actacgtccg cgactgcgtt	25320
	tacttatttc tatgctacac ctggcagacg gccatgggagc tttggcagca gtgcttgag	25380
	gagtgaacc tcaaggagct gcagaaactg ctaaagcaaa acttgaagga cctatggacg	25440
	gccttcaacg agcgtccgt ggccgcgcac ctggcggaca tcattttccc cgaacgcctg	25500
	cttaaaaccc tgcaacaggc tctgccagac ttaccagtc aaagcatgtt gcagaacttt	25560
	aggaacttta tctagagcg ctcaggaatc ttgcccgcca cctgctgtgc acttctagc	25620
	gactttgtgc ccattaagta ccgcgaatgc cctccgccgc tttggggcca ctgctacctt	25680
	ctgcagctag ccaactacct tgcctaccac tctgacataa tggaagacgt gagcggtagc	25740
	ggctctactg agtgtcactg tcgctgcaac ctatgcaccc cgcaccgctc cctggtttgc	25800

	aattcgcagc tgcttaacga aagtcaaatt atcggtacct ttgagctgca gggtcacctc	25860
	cctgacgaaa agtccgcggc tccgggggtg aaactcactc cggggctgtg gacgtcggct	25920
	taccttcgca aatttgtacc tgaggactac cagcccacg agattaggtt ctacgaagac	25980
	caatcccgcc cgccaaatgc ggagcttacc gcctgcgtca ttaccagggt ccacattctt	26040
	ggccaattgc aagccatcaa caaagccgc caagagtttc tgctacgaaa gggacggggg	26100
	gtttacttgg acccccagtc cggcgaggag ctcaacccaa tcccccgcc gccgcagccc	26160
	tatcagcagc agccgcgggc ccttgcttcc caggatggca cccaaaaaga agctgcagct	26220
	gccgccgcca cccacggacg aggaggaata ctgggacagt caggcagagg aggttttgga	26280
	cgaggaggag gaggacatga tggaagactg ggagagccta gacgaggaag cttccgaggt	26340
	cgaagaggtg tcagacgaaa caccgtcacc ctcggtcgca ttccctcgc cggcgcccca	26400
	gaaatcggca accggttcca gcatggctac aacctccgt cctcaggcgc cgcggcact	26460
[0021]	gcccgttcgc cgaccaacc gtagatggga caccactgga accagggccg gtaagtcaa	26520
	gcagccgccg ccgttagccc aagagcaaca acagcgccaa ggctaccgt catggcgcgg	26580
	gcacaagaac gccatagttg ctgcttgca agactgtggg ggcaacatct ccttcgccc	26640
	ccgctttctt ctctaccatc acggcgtggc cttccccgt aacatcctgc attactaccg	26700
	tcctctctac agccatact gcaccggcgg cagcggcagc ggcaacaaca gcagcggcca	26760
	cacagaagca aaggcgaccg gatagcaaga ctctgacaaa gcccaagaaa tccacagcgg	26820
	cggcagcagc aggaggagga gcgctgcgtc tggcgcccaa cgaaccgta tcgaccgcg	26880
	agcttagaaa caggattttt cccactctgt atgctatatt tcaacagagc aggggccaag	26940
	aacaagagct gaaaataaaa aacaggtctc tgcgatccct caccgcagc tgctgtatc	27000
	acaaaagcga agatcagctt cggcgcacgc tggaagacgc ggaggctctc ttcagtaaat	27060
	actgcgcgct gactcttaag gactagtctc gcgcccttc tcaaatttaa gcgcgaaaac	27120

	tacgtcatct ccagcggcca caccggcgc cagcacctgt cgtcagcgcc attatgagca	27180
	aggaaattcc cagccctac atgtggagtt accagccaca aatgggactt gcggctggag	27240
	ctgccaaga ctactcaacc cgaataaact acatgagcgc gggacccac atgatatccc	27300
	gggtcaacgg aatccgcgc caccgaaacc gaattctctt ggaacaggcg gctattacca	27360
	ccacacctcg taataacctt aatccccgta gttggccgc tgcctgggtg taccaggaaa	27420
	gtcccgtcc caccactgtg gtacttccca gagacgcca ggccgaagtt cagatgacta	27480
	actcaggggc gcagcttgcg ggcggctttc gtcacagggt gcggtcgccc gggcagggtg	27540
	taactcacct gacaatcaga gggcgaggta ttcagctcaa cgacgagtcg gtgagctcct	27600
	cgttgggtct ccgtccggac gggacatttc agatcggcgg cgccggccgt ccttcattca	27660
	cgccctgtca ggcaatccta actctgcaga cctcgtctc tgagccgcgc tctggaggca	27720
	ttggaactct gcaatttatt gaggagtttg tgccatcggt ctactttaac ccttctcgg	27780
[0022]	gacctcccg ccactatccg gatcaattta ttcctaactt tgacgcggtg aaggactcgg	27840
	cggacggcta cgactgaatg ttaagtggag aggacagca actgcgcctg aaacacctgg	27900
	tccactgtcg ccgccacaag tgctttgccc gcgactccgg tgagttttgc tactttgaat	27960
	tgcccgagga tcatatcgag ggcccggcgc acggcgtcg gcttaccgcc caggagagc	28020
	ttgcccgtag cctgattcgg gagtttacc agcggcccct gctagttgag cgggacagg	28080
	gacctgtgt tctactgtg atttgcaact gtcctaact tggattacat caagatcttt	28140
	gttgccatct ctgtgctgag tataataaat acagaaatta aaatatactg gggtcctat	28200
	cgccatcctg taaacgccac cgtcttcacc cgccaagca aaccaaggcg aaccttacct	28260
	ggtactttta acatctctcc ctctgtgatt tacaacagtt tcaaccaga cggagtgagt	28320
	ctacgagaga acctctccga gtcagctac tccatcagaa aaaacaccac cctccttacc	28380
	tgccgggaac gtacgagtgc gtcaccggcc gctgcaccac acctaccgcc tgaccgtaaa	28440

	ccagactttt tccggacaga cctcaataac tctgtttacc agaacaggag gtgagcttag	28500
	aaaaccctta ggggtattagg ccaaaggcgc agctactgtg gggtttaiga acaattcaag	28560
	caactctacg ggctattcta attcaggttt ctctagaatc ggggttgggg ttattctctg	28620
	tcttgtagatt ctctttatc ttatactaac gcttctctgc ctaaggctcg ccgctgctg	28680
	tgtgcacatt tgcatttatt gtcagctttt taaacgctgg ggtcgccacc caagatgatt	28740
	aggtacataa tcctaggttt actcaccctt gcgtcagccc acggtaccac caaaaggtg	28800
	gattttaagg agccagcctg taatgttaca ttgcagctg aagctaataa gtgcaccact	28860
	cttataaaat gcaccacaga acatgaaaag ctgcttattc gccacaaaaa caaatgtgc	28920
	aagtatgctg tttatgctat ttggcagcca ggtgacacta cagagtataa tgttacagtt	28980
	ttccagggtg aaagtcataa aacttttatg tatacttttc cattttatga aatgtgcgac	29040
	attaccatgt acatgagcaa acagtataag ttgtggcccc cacaaaattg tgtggaaaac	29100
[0023]	actggcactt tctgctgcac tgctatgcta attacagtgc tcgctttggt ctgtacccta	29160
	ctctatatta aatacaaaag cagacgcagc ttatttgagg aaaagaaaat gccttaattt	29220
	actaagttac aaagctaata tcaccactaa ctgctttact cgctgcttgc aaaacaaatt	29280
	caaaaagtta gcattataat tagaatagga tttaaaccce ccggtcattt cctgctcaat	29340
	accattcccc tgaacaattg actctatgtg ggatatgtc cagcgtaca acctgaagt	29400
	caggttcctt ggatgtcagc atctgacttt ggccagcacc tgtccgcggg atttgttcca	29460
	gtccaactac agcgaccac cctaacagag atgaccaaca caaccaacgc ggccgccgt	29520
	accggactta catctaccac aaatacacc caagtttctg cttttgtcaa taactgggat	29580
	aacttgggca tgtggtggtt ctccatagcg cttatgtttg tatgccttat tattatgttg	29640
	ctcatctgct gcctaaagcg caaacgcgcc cgaccacca tctatagtcc catcattgtg	29700
	ctacacccaa acaatgatgg aatccataga ttggacggac tgaaacacat gttcttttct	29760

	cttacagtat gattaaatga gacatgattc ctcgagtttt tatattactg acccttgttg	29820
	cgcttttttg tgcgtgctcc acattggctg cggtttctca catcgaagta gactgcattc	29880
	cagccttcac agtctatttg ctttacggat ttgtcacct cagctcatc tgcagcctca	29940
	tcactgtggt catcgcttt atccagtga ttgactgggt ctgtgtgcgc ttgcatatc	30000
	tcagacacca tccccagtac agggacagga ctatagctga gcttcttaga attctttaat	30060
	tatgaaattt actgtgactt ttctgtgat tatttgacc ctatctgcgt ttgttcccc	30120
	gacctccaag cctcaaagac atatatcatg cagattcact cgtatatgga atattccaag	30180
	ttgctacaat gaaaaaagcg atctttccga agcctggta tatgcaatca tctctgttat	30240
	gggtgtctgc agtaccatct tagccctagc tatatatccc taccttgaca ttggctggaa	30300
	acgaatagat gccatgaacc acccaacttt ccccgcgccc gctatgctc cactgcaaca	30360
	agttgttgcc ggcggtttg tcccagccaa tcagcctgc cccacttctc ccacccccac	30420
[0024]	tgaaatcagc tactttaatc taacaggagg agatgactga caccctagat ctagaaatgg	30480
	acggaattat tacagagcag cgctgctag aaagacgcag ggcagcggcc gagcaacagc	30540
	gcatgaatca agagctcaa gacatggta acttgacca gtgcaaaagg ggtatctttt	30600
	gtctggtaaa gcaggccaaa gtcacctacg acagtaatac caccggacac cgccttagct	30660
	acaagttgcc aaccaagcgt cagaaattgg tggatcatgtt gggagaaaag cccattacca	30720
	taactcagca ctcggtagaa accgaaggt gcattcactc accttgtaa ggacctgagg	30780
	atctctgcac ccttattaag accctgtgcg gtctcaaaga tcttattccc tttaactaat	30840
	aaaaaaaaat aataaagcat cacttactta aaatcagtta gcaaatttct gtccagtta	30900
	ttcagcagca cctccttgcc ctctcccag ctctggtatt gcagcttcct cctggetgca	30960
	aactttctcc acaatctaaa tggaatgtca gtttctctt gtctctgtcc atccgcacc	31020
	actatcttca tgttgttgca gatgaagcgc gcaagaccgt ctgaagatac cttaacccc	31080

	gtgtatccat atgacacgga aaccggtcct ccaactgtgc cttttcttac tctcccttt	31140
	gtatcccca atgggtttca agagagtccc cctggggtac tctctttgcg cctatccgaa	31200
	cctctagtta cctccaatgg catgcttgcg ctcaaatgg gcaacggcct ctctctggac	31260
	gaggccggca accttacctc ccaaatgta accactgtga gccacctct caaaaaacc	31320
	aagtcaaaca taaacctgga aatatctgca cccctcacag ttacctcaga agccctaact	31380
	gtggctgccg ccgcacctct aatggctgcg ggcaacacac tcaccatgca atcacaggcc	31440
	ccgctaaccg tgcacgactc caaacctagc attgccaccc aaggaccctt cacagtgtca	31500
	gaaggaaagc tagccctgca aacatcaggc cccctcacca ccaccgatag cagtaccctt	31560
	actatcactg cctcaccccc tctaactact gccactggta gcttgggcat tgacttgaaa	31620
	gagcccattt atacacaaaa tggaaaacta ggactaaagt acggggctcc tttgcatgta	31680
	acagacgacc taaacacttt gaccgtagca actgggtccag gtgtgactat taataatact	31740
[0025]	tccttgcaaa ctaaagttagc tggagccttg ggttttgatt cacaaggcaa tatgcaactt	31800
	aatgtagcag gaggactaag gattgattct caaacagac gccttatact tgatgttagt	31860
	tatccgtttg atgctcaaaa ccaactaaat ctaagactag gacagggccc tctttttata	31920
	aactcagccc acaacttgga tattactac aacaaaggcc tttacttgtt tacagcttca	31980
	aacaattcca aaaagcttga ggtaacctc agcactgcc aagggttgat gttgacgct	32040
	acagccatag ccattaatgc aggagatggg cttgaatttg gttcacctaa tgcaccaaac	32100
	acaaatcccc tcaaaacaaa aattggccat ggcctagaat ttgattcaaa caaggctatg	32160
	gttcctaaac taggaactgg ccttagtttt gacagcacag gtgccattac agtaggaaac	32220
	aaaaataatg ataagctaac tttgtggacc acaccagctc catctcctaa ctgtagacta	32280
	aatgcagaga aagatgctaa actcactttg gtcttaacaa aatgtggcag tcaaatactt	32340
	gctacagttt cagttttggc tgttaaaggc agtttggtc caatatctgg aacagttcaa	32400

	agtgctcatc ttattataag atttgacgaa aatggagtg cactaaacaa ttccttcctg	32460
	gaccagaat attggaactt tagaaatgga gatcttactg aaggcacagc ctatacaaac	32520
	gctgttgat ttatgcctaa cctatcagct tatccaaaat ctcacggtaa aactgccaaa	32580
	agtaacattg tcagtcaagt ttacttaaac ggagacaaaa ctaaacctgt aacactaacc	32640
	attacactaa acggtacaca ggaaacagga gacacaactc caagtgcata ctctatgtca	32700
	ttttcatggg actggctcgg ccacaactac attaataaaa tatttgccac atcctcttac	32760
	actttttcat acattgccca agaataaaga atcgtttggt ttatgtttca acgtgtttat	32820
	ttttcaattg cagaaaattt caagtcattt ttcatcagc agtatagccc caccaccaca	32880
	tagcttatac agatcacctg accttaatca aactcacaga accctagtat tcaacctgcc	32940
	acctccctcc caacacacag agtacacagt cttttctccc cggttggcct taaaaagcat	33000
	catacatggt gtaacagaca tattcttagg tggttatattc cacacggttt cctgtcagc	33060
[0026]	caaacgctca tcagtgatat taataaactc cccgggcagc tcacttaagt tcattgtcgt	33120
	gtccagctgc tgagccacag gctgctgtcc aacttgcggt tgcttaacgg gcggcgaagg	33180
	agaagtccac gcctacatgg gggtagagtc ataactgtgc atcaggatag ggcggtggtg	33240
	ctgcagcagc gcgcgaataa actgctgccg ccgccgctcc gtcttcagc aatacaacat	33300
	ggcagtggtc tcttcagcga tgattcgac cgccgcagc ataaggcgcc ttgtcctccg	33360
	ggcacagcag cgcacctga tctcacttaa atcagcacag taactgcagc acagcaccac	33420
	aataattgtc aaaatccac agtgcaaggc gctgtatcca aagctcatgg cggggaccac	33480
	agaaccacg tggccatcat accacaagc caggtagatt aagtggcgac cctcataaa	33540
	cacgttgac ataaacatta cctcttttgg catgttgtaa ttcaccacct cccggtacca	33600
	tataaacctc tgattaaaca tggcgccatc caccaccatc ctaaaccagc tggccaaaac	33660
	ctgcccgcg gctatacact gcagggaacc gggactggaa caatgacagt ggagagccca	33720

	ggactcgtaa ccatggatca tcatgctcgt catgatatca atgttggcac aacacaggca	33780
	cacgtgcata cacttctca ggattacaag ctctcccgc gttagaacca tatcccagg	33840
	aacaacccat tcctgaatca gcgtaaatcc cacttgcag ggaagacctc gcacgtaact	33900
	cacgttgtgc attgtcaaag tgttacattc gggcagcagc ggatgatcct ccagtatggt	33960
	agcgcgggtt tctgtctcaa aaggaggtag acgatcccta ctgtacggag tgcgccgaga	34020
	caaccgagat cgtgttggtc gtagtgtcat gccaaatgga acgccggacg tagtcatatt	34080
	tcctgaagca aaaccagggt cgggcgtgac aaacagatct gcgtctccgg tctcgccgt	34140
	tagatcgctc tgtgtagtag ttgtagtata tccactctct caaagcatcc aggcgcccc	34200
	tggcttcggg ttctatgtaa actccttcat gcgccgtgc cctgataaca tccaccaccg	34260
	cagaataagc cacaccagc caacctacac attcgttctg cgagtcacac acgggaggag	34320
	cgggaagagc tggaagaacc atgtttttt ttttattcca aaagattatc caaaacctca	34380
[0027]	aatgaagat ctattaagt aacgcgtcc cctccggtgg cgtgggtcaa ctctacagcc	34440
	aaagaacaga taatggcatt tgtaagatgt tgcacaatgg ctccaaaag gcaaacggcc	34500
	ctcacgtcca agtggacgta aaggctaac cttcagggt gaatctctc tataaacatt	34560
	ccagcacctt caaccatgcc caaataattc tcctctgcc accttctca tatatctcta	34620
	agcaaatccc gaatattaag tccggccatt gtaaaaatct gctccagagc gccctcacc	34680
	ttcagcctca agcagcgaat catgattgca aaaattcagg ttcctcacag acctgtataa	34740
	gattcaaaag cggaacatta acaaaaatac cgcgatcccg taggtccctt cgcagggcc	34800
	gctgaacata atcgtgcagg tctgcacgga ccagcgcggc cacttccccg ccaggaacca	34860
	tgacaaaaga acccactg attatgacac gcatactcg agctatgcta accagcgtag	34920
	ccccgatgta agcttgtgc atgggcggcg atataaaatg caaggtgctg ctcaaaaaat	34980
	caggcaaagc ctgcgcaaa aaagaaagca catcgtagtc atgctcatgc agataaaggc	35040

	aggtaagctc cggaaccacc acagaaaaag acaccatitt tctctcaa acgtctgcgg	35100
	gtttctgcat aaacacaaaa taaaataaca aaaaaacatt taaacattag aagcctgtct	35160
	tacaacagga aaaacaaccc ttataagcat aagacggact acggccatgc cggcgtgacc	35220
	gtaaaaaac tggtcaccgt gattaaaaag caccaccgac agctcctcgg tcatgtccgg	35280
	agtcataatg taagactcgg taaacacatc aggttgattc acatcgggtca gtgctaaaaa	35340
	gcgaccgaaa tagcccgagg gaatacatac ccgaggcgt agagacaaca ttacagcccc	35400
	cataggaggt ataacaaaat taataggaga gaaaaacaca taaacacctg aaaaaccctc	35460
	ctgcctaggc aaaatagcac cctcccgctc cagaacaaca tacagcgctt ccacagcggc	35520
	agccataaca gtcagcctta ccagtaaaaa agaaaaccta ttaaaaaaac accactcgac	35580
	acggcaccag ctcaatcagt cacagtgtaa aaaaggcca agtgcagagc gagtatatat	35640
[0028]	aggactaaaa aatgacgtaa cggttaaagt ccacaaaaaa caccagaaa accgcacgcg	35700
	aacctacgcc cagaaacgaa agccaaaaaa ccacaactt cctcaaatcg tcacttccgt	35760
	tttccacgt tacgtaactt cccattttaa gaaaactaca attccaaca catacaagtt	35820
	actccgccct aaaacctacg tcaccgccc cgttcccacg ccccgcgcca cgtcacaac	35880
	tccaccccct cattatcata ttggcttcaa tccaaaataa ggtatattat tgatgatg	35938
	<210> 2	
	<211> 10	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> TAV-255 缺失产生的序列	
	<400> 2	
	ggtgttttgg	10

	<210> 3	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 示例性 E1A 启动子 TATA 框缺失产生的序列	
	<400> 3	
	ctaggactg	9
	<210> 4	
	<211> 8	
	<212> DNA	
	<213> 5 型腺病毒 (Adenovirus type 5)	
	<400> 4	
	ctgacctc	8
[0029]	<210> 5	
	<211> 8	
	<212> DNA	
	<213> 5 型腺病毒 (Adenovirus type 5)	
	<400> 5	
	tcaccagg	8
	<210> 6	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 示例修饰的 E1b-19k 区域	
	<400> 6	
	atcttggtta catctgacct cgtcgagtca ccaggcgctt ttccaa	46
	<210> 7	
	<211> 1185	

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> mTGFB-胍

<400> 7

atgggtcggg ggctgctccg gggcctgtgg ccgctgcata tcgtcctgtg gacgcgcac	60
gccagcacga tcccgcgcga cgttcccaag tcggttaaca gtgatgtcat ggccagcgac	120
aatggcggtg cggtaagct tccacagctg tgcaagtttt gcgatgtgag actgtccact	180
tgcgacaacc agaagtcctg catgagcaac tgcagcatca cggccatctg tgagaagccg	240
catgaagtct gcgtggccgt gtggaggaag aacgacaaga acattactct ggagacggtt	300
tgccacgacc ccaagctcac ctaccacggc ttactctgg aagatgccgc ttctcccaag	360
tgtgtcatga aggaaaagaa aagggcgggc gagactttct tcatgtgtgc ctgtaacatg	420
gaagagtgca acgattacat catcttttcg gaagaataca ccaccagcag tcccgacagc	480
accaaggtgg acaagaaaat tgtgcccagg gattgtggtt gtaagccttg catatgtaca	540
gtcccagaag tatcatctgt ctcatcttc ccccaaagc ccaaggatgt gctcaccatt	600
actctgactc ctaaggtcac gtgtgttgtg gtagacatca gcaaggatga tcccgaggtc	660
cagttcagct ggttttaga tgatgtggag gtgcacacag ctgagacgca accccgggag	720
gagcagttca acagcacttt ccgctcagtc agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg	780
ctcaatggca aggagttcaa atgcagggtc aacagtgcag ctttccctgc ccccatcgag	840
aaaaccatct ccaaaaccaa aggcagaccg aaggctccgc aggtgtacac cattccacct	900
cccaaggagc agatggccaa ggataaagtc agtctgacct gcatgataac agacttcttc	960
cctgaagaca ttactgtgga gtggcagtgg aatgggcagc cagcggagaa ctacaagaac	1020
actcagccca tcatggacac agatggctct tacttcgtct acagcaagct caatgtgcag	1080
aagagcaact gggaggcagg aaatacttct acctgctctg tgttacatga gggcctgcac	1140

	aaccaccata ctgagaagag cctctccac tctcctggta aatga	1185
	<210> 8	
	<211> 8	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 示例性 E1A 启动子 TATA 框缺失产生的序列	
	<400> 8	
	agtgcccg	8
	<210> 9	
	<211> 8	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
[0031]	<223> 示例性 E1A 启动子 TATA 框缺失产生的序列	
	<400> 9	
	tattcccg	8
	<210> 10	
	<211> 10	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 示例性 E1A 启动子 CAAT 框缺失产生的序列	
	<400> 10	
	ttccgtggcg	10
	<210> 11	
	<211> 8	
	<212> DNA	
	<213> 5 型腺病毒 (Adenovirus type 5)	

	<400> 11 cagtatga	8
	<210> 12 <211> 10 <212> DNA <213> 5 型腺病毒 (Adenovirus type 5)	
	<400> 12 taataaaaaa	10
[0032]	<210> 13 <211> 8 <212> DNA <213> 5 型腺病毒 (Adenovirus type 5)	
	<400> 13 tgccttaa	8
	<210> 14 <211> 11 <212> DNA <213> 5 型腺病毒 (Adenovirus type 5)	
	<400> 14 taaaaaaaaaa t	11

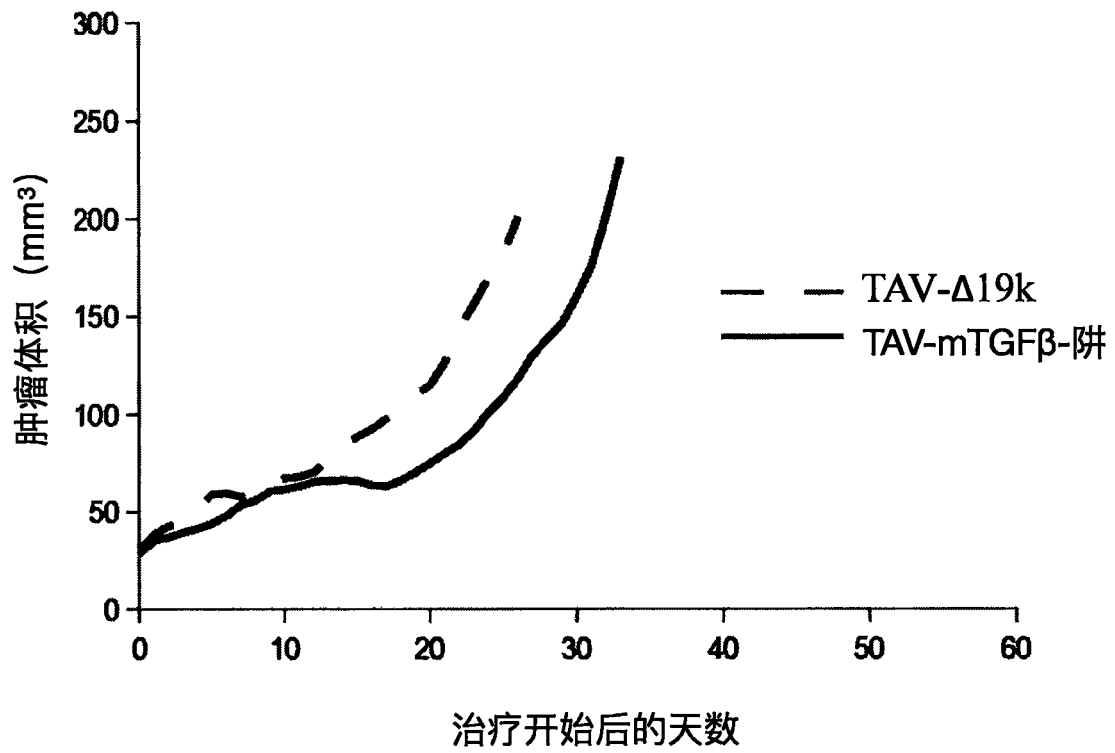


图1

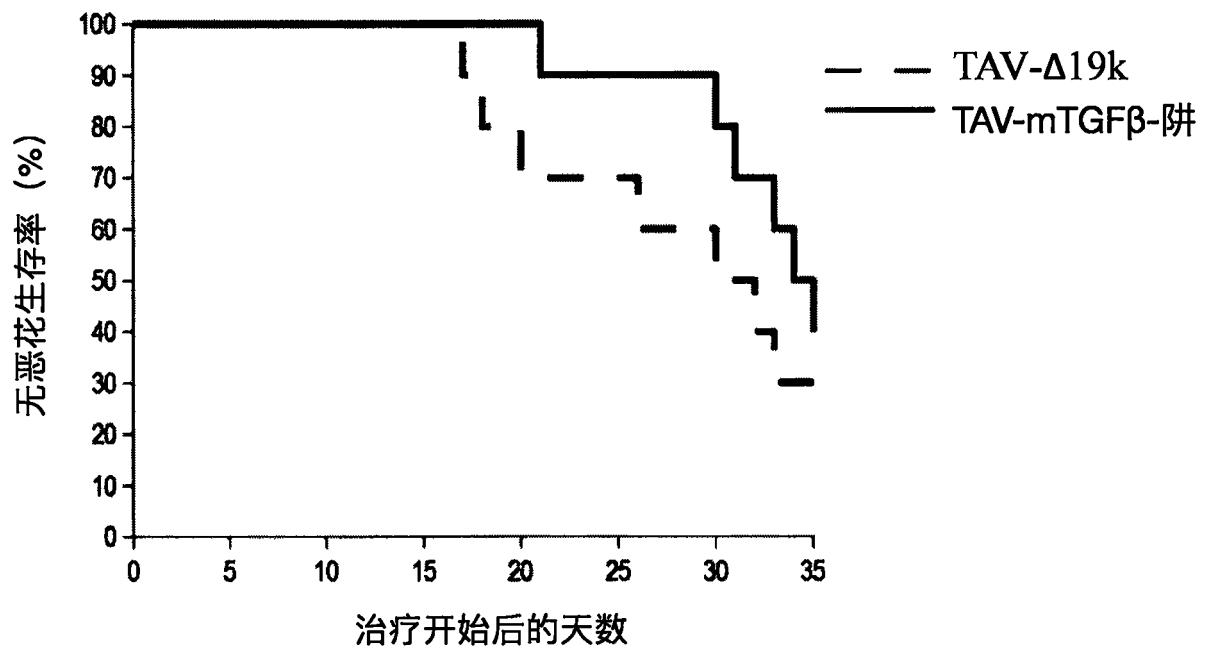


图2

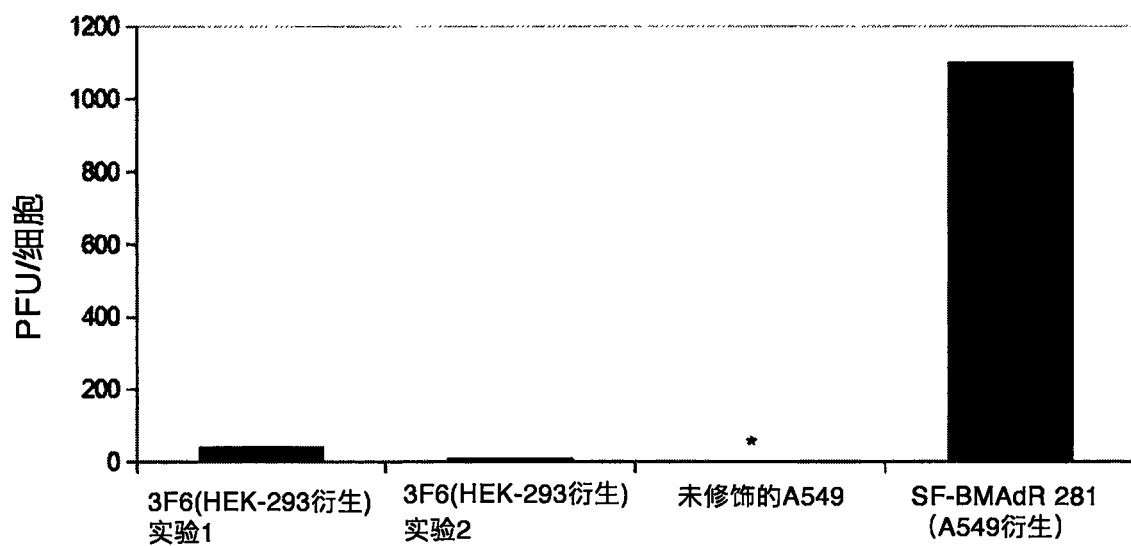


图3