



(12) 发明专利

(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

专利代理人 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

WO 0032754 A1, 2000.06.08

US 6113913 A, 2000.09.05

WO WO2010101921 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.

HEDJIRAN, F ET AL. Deletion analysis of Ad5 E1a transcriptional control region: impact on tumor-selective expression of E1a 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。

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GGTGTTTGG(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 阱、TGF- β 、CD19、CD20、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、CD154、CD86、BORIS/CTCFL、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者两者。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GGTGTTTGG(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)、AGTGCCCC(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 阱、TGF- β 、CD19、CD20、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、CD154、CD86、BORIS/CTCFL、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方面的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 200mm^3 。

[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、免疫细胞化学或萤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在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GGTGTTTGG (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。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 \div 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 阱、TGF- β 、CD19、CD20、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、CD154、CD86、BORIS/CTCFL、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。当在本文中使用时,“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成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，抗细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 EL™(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、急性能淋巴细胞白血病(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、心脏病、唇癌、脑膜癌、口癌、神经癌、腭癌、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和/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：

ATCTTGTTACATCTGACCTCGAGTCACCAGGCGCTTT

[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：

[0105]

ATGGGTGGGGCTGCTCCGGGCCTGTGGCCGCTGCATAT
 CGTCCTGTGGACGCGCATGCCAGCACGATCCCGCCGACGTTCC
 CAAGTCGGTTAACAGTGATGTCATGCCAGCGACAATGGCGGTG
 CGGTCAAGCTTCCACAGCTGTGCAAGTTGCGATGTGAGACTGT
 CCACTTGCACAAACCAGAAGTCCTGCATGAGCAACTGCAGCATT
 ACGGCCATCTGTGAGAAGCCGCATGAAGTCTGCGTGGCCGTG
 GAGGAAGAACGACAAGAACATTACTCTGGAGACGGTTGCCACG
 ACCCCAAGCTCACCTACCACGGCTCACTCTGGAAGATGCCGCTT
 CTCCCAAGTGTGTCATGAAGGAAAAGAAAAGGGCGGGCGAGACT
 TTCTTCATGTGTGCCTGTAACATGGAAGAGTGCAACGATTACATC
 ATCTTTCGGAAGAACATACACCACCAAGCAGTCCCACAGCACCAA
 GGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTT
 GCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTCCCCC
 CAAAGCCAAGGATGTGCTACCATTACTCTGACTCCTAACGGTCA
 CGTGTGTTGTTAGACATCAGCAAGGATGATCCGAGGTCCAGT
 TCAGCTGGTTGTTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGC
 AACCCCGGGAGGGAGCAGTTAACACAGCACTTCCGCTCAGTCAGT
 GAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTC
 AAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTCCCTGCCCATCGAGAA
 AACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAACGGCTCCGCAGGTGT
 ACACCATTCCACCTCCAAGGAGCAGATGCCAAGGATAAGTC
 AGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTCCCTGAAGACATTACT
 GTGGAGTGGCAGTGGATGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGA
 ACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTCGTCTACA
 [0106] GCAAGCTCAATGTGCAGAACAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACT
 TTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCAACT
 GAGAAGAGCCTCTCCACTCTCCTGGTAAATGA (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 -阱腺病毒感染。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1x10⁹IU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:

ATCTTGGTTACATCTGACCTCGTCGAGTCACCAGGCGCTTT

[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整个公开内容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

范围之内的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 aataaacctt atttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt	60
	tttgtacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt	120
	gatgttgc aa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgttttg	180
	gtgtgcgccc gtgtacacag gaagtgacaa tttcgcgcg gttttaggcg gatgtttag	240
	taaaatttggg cgttaaccgag taagatttgg ccatttcgc gggaaaactg aataagagga	300
	agtgaaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tatttgtcta gggccgcggg	360
	gactttgacc gtttacgtgg agactcgccc aggtgtttt ctcagggttt ttccgcgttc	420
	cgggtcaaag ttggcggttt attattatag tcagctgacg tgttagtgtat ttataccgg	480
	ttagttccctc aagaggccac tcttgagtgc cagcgagtag agtttictcc tccgagccgc	540
	tccgacaccc ggactgaaaa tgagacatat tatctgccac ggaggtgtta ttaccgaaga	600
	aatggccgcc agtcctttgg accagctgat cgaagaggta ctggctgata atcttccacc	660
	tccttagccat tttgaaccac ctacccttca cgaactgtat gattttagacg tgacggcccc	720

cgaagatccc aacgaggagg cggttcgca gattttccc gactctgtaa tggcggtt	780
gcaggaaggg attgacttac tcactttcc gccggcgccc gttctccgg agccgccta	840
ccttccgg cagcccgagc agccggagca gagagccitg ggccgggtt ctatccaaa	900
ccttgtaccg gaggtgatcg atcttacctg ccacgaggct ggcttccac ccagtacga	960
cgaggatgaa gagggtgagg agtttgttt agattatgtg gagcaccccg ggcacggtt	1020
caggtcttgt cattatcacc ggaggaatac gggggaccca gatattatgt gttcgcttg	1080
ctatatgagg acctgtggca tgtttgtcta cagtaagtga aaattatggg cagtgggtga	1140
tagagtggtg gttttggtgt gttaatttt tttaatttt ttacagttt gtggttaaa	1200
gaattttgta ttgtgattt tttaaaaggt cctgtgtctg aacctgagcc tgagcccgag	1260
ccagaaccgg agcctgcaag acctacccgc cgtcctaaaa tggcgctgc tatcctgaga	1320
[0002] cccccgacat cacctgtgtc tagagaatgc aatagtagta cggatagctg tgactccggt	1380
ccttctaaca cacctctgta gatacacccg gtggtcccgctgtccat taaaccagtt	1440
gccgtgagag ttggggcg tcgcccggct gtggaatgta tcgaggactt gcttaacgag	1500
cctggcaac ctttggactt gagctgtaaa cggcccgaggc cataagggt aaacctgtga	1560
ttgcgtgtgt gtttaacgcc ttgtttgct gaatgagttt atgtaagttt aataaaagggt	1620
gagataatgt ttaacttgca tggcggtta aatggggcgg ggcttaaagg gtatataatg	1680
cggcggtggc taatcttgt tacatctgac ctcatggagg cttggaggtt ttggaaagat	1740
ttttctgctg tgcgtaaactt gctggAACAG agctctaaca gtacctttt gttttggagg	1800
tttctgtgg gctcatccca ggcaaagtta gtctgcagaa ttaaggagga ttacaagtgg	1860
gaatttgaag agctttgaa atcctgtggt gagctgtttt attcttgaa tctgggtcac	1920
caggcgctt tccaagagaa ggtcatcaag actttggatt ttccacacc gggcgcgct	1980
gcggctgctg ttgtttttt gagtttata aaggataaat ggagcgaaga aacccatctg	2040

	agcgggggtt acctgctgga ttttctggcc atgcacatgt ggagagcggt tgtgagacac	2100
	aagaatcgcc tgctactgtt gtcttccgtc cgcccggcga taataccgac ggaggagcag	2160
	cagcagcagc aggaggaagc caggcggcgg cggcaggagc agagcccatg gaacccgaga	2220
	gccggcctgg accctcggga atgaatgtt tacaggtggc tgaactgtat ccagaactga	2280
	gacgcatttt gacaattaca gaggatggc aggggctaaa ggggttaaag agggagcggg	2340
	ggccttgta ggctacagag gaggcttagga atctagctt tagcttaatg accagacacc	2400
	gtcctgagt tattacttt caacagatca aggataattg cgctaattgag ctgtatctgc	2460
	tggcgcagaa gtattccata gagcagctga ccacttactg gctgcagcca gggatgatt	2520
	ttgaggaggc tattaggta tatgcaaagg tggcacttag gccagattgc aagtacaaga	2580
	ttagccaaact tgtaaatatc aggaattgtt gctacatttc tggAACGGG gccgagggtgg	2640
	agatagatac ggaggatagg gtggcTTTA gatgttagcat gataaatatg tggCCGGGG	2700
[0003]	tgcttggcat ggacgggtg gttattatga atgtaagggt tactggcccc aatttttagcg	2760
	gtacggTTTT cctggccaaat accaacCTTA tcctacacgg tgtaagCTTC tatggTTTA	2820
	acaataacctg tgtggAAAGCC tggaccgatg taagggttcg gggctgtGCC ttttactgct	2880
	gctggaaagg ggtggTGTGT cgcCcAAAGA gcaggGCTTC aattaAGAAA tgcCTTTG	2940
	aaagggtac ctgggtatC ctgtctgagg gtaactCCAG ggtgcGCCAC aatgtggcCT	3000
	ccgactgtgg ttgCTTCatG ctgtgaaaa gcgtggcgtg gattaAGCAT aacatggtat	3060
	gtggcaactg cgaggacagg gcctctcaga tgctgacCTG ctggacGGC aactgtcacc	3120
	tgctgaagac cattcacGTA gccagCCACT ctcgcaaggc ctggccAGTG tttgAGCATA	3180
	acataactgac ccgctgttcc ttgcATTGG gtaACAGGAG gggggTGTTC ctacCTTAC	3240
	aatgcaattt gagtcacact aagatattgc ttgagCCGA gagcatgtCC aaggTGAACC	3300
	tgaacgggtt gtttgacatG accatGAAGA tctggAAAGT gctgaggTAC gatgagacCC	3360

gcaccagggtc cagaccctgc gagtgtggcg gtaaacatata taggaaccag cctgtgatgc	3420
tggatgtgac cgaggagctg aggcccgatc acttggtgct ggcctgcacc cgcgctgagt	3480
ttggctctag cgatgaagat acagatttagt gtactgaaat gtgtggcggt ggcttaaggg	3540
tggaaagaa tatataaggt ggggtctta ttagttttg tatactgtttt gcagcagccg	3600
ccggcccat gagcaccaac tcgttgatg gaagcattgt gagctcatat ttgacaacgc	3660
gcatcccccc atggggccggg gtgcgtcaga atgtgatggg ctccagcatt gatggtcgcc	3720
ccgtcctgcc cgcaaactct actaccitga cctacgagac cgtgtctgga acgcccgttgg	3780
agactgcagc ctccggccgc gcttcagccg ctgcagccac cgcccgccggg attgtgactg	3840
actttgcttt cctgagcccg cttgcaagca gtgcagctc ccgttcatcc gcccgcgatg	3900
acaagttgac ggcttttg gcacaattgg attcttgac ccgggaacctt aatgtcgaaa	3960
ctcagcagct gttggatctg cggcagcagg tttctgcctt gaaggcttcc tccccctccca	4020
[0004] atgcggttta aaacataaaat aaaaaaccag actctgtttt gatttggatc aagcaagtgt	4080
cttgctgtct ttattttaggg gttttgcgcg cgcggtaggc ccgggaccag cggctcggt	4140
cgttgggggt cctgtgtatt tttccagga cgtggtaaag gtgactctgg atgttcagat	4200
acatgggcat aagccgtct ctgggttgga ggttagcacca ctgcagagct tcatactgcg	4260
gggtgggttt gtagatgatc cagtcgtgc aggagcgctg ggcgtgggtc ctaaaaatgt	4320
ctttcagtag caagctgatt gccaggggca gccccttgggt gtaagtgtt acaaagcggt	4380
taagctggga tgggtgcata cgtggggata tgagatgcat cttggactgt atttttaggt	4440
tggctatgtt cccagccata tccctccggg gattcatgtt gtgcagaacc accagcacag	4500
tgtatccggc gcacttggga aatttgcatt gttagcttgcg aggaaatgcg tggaaagaact	4560
tggagacgccc cttgtgaccc ccaagatttt ccatgcattc gtccataatg atggcaatgg	4620
gcccacgggc ggcggcctgg gcgaagatata ttctggatc actaacgtca tagttgttt	4680

ccaggatgag atcgtcatag gccattttt caaagcgccgg gcggagggtg ccagactgcg	4740
gtataatggt tccatccggc ccagggcgt agttaccctc acagattgc atttcccacg	4800
cttgagttc agatgggggg atcatgtcta cctgcggggc gatgaagaaa acggttccg	4860
ggtagggga gatcagctgg gaagaaagca gttcctgag cagctgcac ttaccgcagc	4920
cgggtggccccc gttaatcaca cctattaccg ggtgcaactg gtagttaaga gagctgcagc	4980
tgccgtcatac cctgagcagg gggccactt cgtaagcat gtcctgact cgcatgttt	5040
ccctgaccaa atccgcaga aggcgctcgc cgcccagcga tagcagtct tgcaaggaag	5100
caaagttttt caacggttt agaccgtccg ccgtaggcat gctttgagc gtttacccaa	5160
gcagttccag gcggtccac agctcggtca cctgctctac ggcatctcga tccagcatat	5220
ctccctcggtt cgcggtttgg ggcggcttgc gctgtacggc agtagtcggt gctcgccag	5280
acgggccagg gtcatgtctt tccacggcgc cagggcctc gtcagcgtac tctgggtcac	5340
[0005] ggtgaagggg tgcgctccgg gctgcgcgt gcccagggtg cgcttgaggc tggccctgct	5400
ggtgctgaag cgctgcccgt ctgcgcctg cgctgcggcc aggttagcatt tgaccatgg	5460
gtcatagtc agccccctccg cggcggtggc ctggcgccgc agcttgcctt tggaggaggc	5520
gccgcacgag gggcagtgcgac gacttttag ggcgttagagc ttggcgccgaa gaaataccga	5580
ttccggggag taggcattccg cgccgcaggc cccgcagacg gtctcgcat ccacgagcca	5640
ggtagctct ggccgttcgg ggtcaaaaac caggttccc ccatgtttt tgatcggtt	5700
cttacctctg gttccatga gccgggtgtcc acgctcggtg acgaaaaggc tgtccgtgtc	5760
cccgatataca gacttgagag gcctgcctc gagcggtgtt ccgcggtcct cctcgatag	5820
aaactcggac cactctgaga caaaggctcg cgtccaggcc agcacgaagg aggctaaatgt	5880
ggaggggttag cggcggttgtt ccactagggg gtccactcgc tccagggtgt gaagacacat	5940
gtcgccctct tcggcatcaa ggaagggtat tggttgttag gtgtaggcca cgtgaccggg	6000

tgttcctgaa	ggggggctat	aaaagggggt	gggggcgcgt	tcgtcctcac	tctttccgc	6060	
atcgctgtct	gcgagggccca	gctgttgggg	ttagtactcc	ctctaaaaag	cggcatgac	6120	
ttctgcgcta	agattgtca	tttccaaaaa	cgaggaggat	ttgatattca	cctggcccgc	6180	
ggtgatgcct	ttgagggtgg	ccgcatccat	ctggtcagaa	aagacaatct	tttttgtc	6240	
aagcttggtg	gcaaacgacc	cgttagggc	gttggacagc	aacttggcga	tggagcgcag	6300	
ggtttggttt	ttgtcgcat	cggcgcgctc	cttggccgcg	atgtttagct	gcacgtattc	6360	
gchgcaacg	caccgcatt	cggaaagac	ggtggtgcbc	tcgtcggca	ccaggtgcac	6420	
cgcccaaccg	cggtgtgca	gggtgacaag	gtcaacgctg	gtggctacct	ctccgcgtag	6480	
gcgctcggt	gtccagcaga	ggcgccgccc	cttgcgcgag	cagaatggcg	gtaggggtc	6540	
tagctcgctc	tcgtccgggg	ggtctcgctc	cacggtaaag	accccgggca	gcaggcgcgc	6600	
gtcgaagtag	tctatcttc	atcctgcaa	gtctagcgcc	tgctgccatg	cgcggcgcc	6660	
[0006]	aagcgcgcbc	tcgtatgggt	tgagtgggg	acccatggc	atgggtggg	tgagcgcgga	6720
ggcgtacatg	ccgcaaatgt	cgtaaacgta	gagggctct	ctgagtattc	caagatatgt	6780	
aggtagcat	cttccaccgc	ggatgctggc	gcmcacgtaa	tcgtatagtt	cgtgcgaggg	6840	
agcgaggagg	tcgggaccga	ggttgctacg	ggcggcgtgc	tctgctcgga	agactatctg	6900	
cctgaagatg	gcatgtgagt	tggatgatat	ggttgacgc	tggaagacgt	tgaagctggc	6960	
gtctgtgaga	cctaccgcgt	cacgcacgaa	ggaggcgtag	gagtgcgcga	gcttggatgc	7020	
cagctcgccg	gtgacctgca	cgtctaggc	gcagtagtcc	agggttcct	tgtatgtc	7080	
atacttatcc	tgtccctttt	ttttccacag	ctcgccgtt	aggacaaact	cttcgcggtc	7140	
tttccagtac	tcttggatcg	gaaaccgc	ggcctccgaa	cggtaagagc	ctagcatgta	7200	
gaactggttg	acggcctgg	aggcgcagca	tccctttct	acggtagcgc	cgtatgcctg	7260	
cgcggcccttc	cggagcggagg	tgtgggtgag	cgcaaagg	tccctgacca	tgactttgag	7320	

gtactggtat ttgaagttag tgcgtcgca tccgcccgc tcccagagca aaaagtccgt	7380
gcgcgttttg gaacgcggat ttggcaggc gaaggtgaca tcgttgaaga gtatcttcc	7440
cgcgcgaggc ataaaaggcgtc gtgtgtatgcg gaagggtccc ggcaccccg aacgggttt	7500
aattacctgg gcggcgagca cgatctcgca aaagccgtt atgttgtggc ccacaatgtt	7560
aagttccaag aagcgcggga tgcccttgat ggaaggcaat ttttaagtt cctcgtaggt	7620
gagctcttca ggggagactga gcccgctgctc taaaagggcc cagtcgtcaa gatgagggtt	7680
ggaagcgacg aatgagctcc acaggtcacg ggcatttagc atttgcaggt ggtcgcaaa	7740
ggtcctaaac tggcgaccata tggccatttt ttctgggtt atgcagtata aggttaagcgg	7800
gtcttgttcc cagcggtccc atccaaagggtt cgccggctagg tctcgccgg cagtcactag	7860
aggctcatct ccgcgcgaact tcatgaccag catgaaggc acgagctgtc tcccaaaggc	7920
ccccatccaa gtataggctt ctacatcgta ggtgacaaag agacgctcg tgcgaggatg	7980
[0007] cgagccgatc gggaaagaact ggatctcccg ccaccaattt gaggagtggc tattgatgtt	8040
gtgaaagtag aagtccctgc gacggccgaa acactcgatc tggctttgt aaaaacgtgc	8100
gcagttactgg cagcggtgca cgggtgtac atccctgcacg agtttgcacct gacgaccg	8160
cacaaggaag cagagtggaa attttagcccc ctcgcctggc gggtttggct ggtggcttc	8220
tacttcggct gcttgcctt gaccgtctgg ctgctcgagg ggagttacgg tggatggac	8280
caccacgccc cgcgcggccca aagtccagat gtccgcgcgc ggccgtcgga gcttgcgtac	8340
aacatcgccg agatgggagc tgtccatggt ctggagctcc cgcggcgatca ggtcaggcgg	8400
gagctcctgc agtttaccc cgcatacgacg ggtcaggcgc cggctagat ccaggtgata	8460
cctaatttcc aggggctgggt tgggtggcggc gtcgtggct tgcaagaggc cgcattcccg	8520
cggcgact acggtaaccgc gcggcgccgc gtggccgcg ggggtgtcct tggatgtgc	8580
atctaaaagc ggtgacgcgg gcgcggcccc ggaggttaggg ggggtccgg acccgccggg	8640

agaggggca gggcacgtc ggccgcgc gcggcagga gctggtgctg cgcgtagg	8700
ttgctggcga acgcgacgac gcggcggtt attcctgaa tctggcgct ctgcgtgaag	8760
acgacggcc cggtagc ttgacatcaat ttcgggtcg	8820
ttgacggcgg cctggcgcaa aatctcctgc acgtctcctg agttgtctt ataggcgatc	8880
tcggccatga actgctcgat ctcttcctcc tggagatctc cgcgtccggc tcgctccacg	8940
gtggcggcga ggtcggttga aatgcggcc atgagctgcg agaaggcgaa gaggccccc	9000
tgtttccaga cggcgctgtta gaccacgccc cttcgccat cgcggcgcg catgaccacc	9060
tgcgcgagat tgagctccac gtgccggcg aagacggcgt agtttcgcag ggcgtgaaag	9120
aggtagttga gggtggttgc ggtgtgttct gccacgaaga agtacataac ccagcgtcgc	9180
aacgtggatt cggtgatatac ccccaaggcc tcaaggcgct ccatggcctc gttagaagtcc	9240
acggcgaagt tgaaaaactg ggagttgcgc gccgacacgg ttaactcctc ctccagaaga	9300
[0008] cggatgagct cggcgacagt gtcgcgcacc tcgcgtcaa aggctacagg ggcctttct	9360
tcttcttcaa tctcctcttc cataagggcc tccccttctt cttttctgg cggcggtggg	9420
ggagggggga cacggcgccg acgacggcgc accgggaggc ggtcgacaaa ggcgtcgatc	9480
atctccccgc ggcgacggcg catggtctcg gtgacggcgc ggccgttctc gcggggcgc	9540
agtttgaaga cgccgcccgt catgtccgg ttatgggttgc gggggggct gccatcgcc	9600
aggatacgg cgctaacgt gcatctcaac aattgttgtg taggtactcc ggcggcgagg	9660
gacctgagcg agtccgcata gaccggatcg gaaaacctct cgagaaaggc gtctaacca	9720
tcacagtgcg aaggtaggtt gggccgtg gcccggca gcccggcg gtcgggttg	9780
tttctggcgg aggtgctgtt gatgtatgtaa taaaaggtagg cggctttagt acggcgatg	9840
gtcgacagaa gcaccatgtc cttgggtccg gcctgctgaa tgcgcaggcg gtcggccatg	9900
ccccaggctt cgtttgaca tcggcgccagg tctttgttagt agtcttgcatt gagccttct	9960

acccggcactt cttcttctcc ttccctttgt cctgcacatc ttgcacatctat cgctgcccgc	10020
gcggcggagt ttggccgtag gtggccccc ttcctccca tgcgtgtac cccgaagccc	10080
ctcatcggt gaaggcaggc taggtcggcg acaaaccgcgt cggtaataat ggcctgctgc	10140
acctgcgtga ggtagactg gaagtcatcc atgtccacaa agcggtggtt tgcgccgtg	10200
ttgatgggt aagtgcagtt gccataacg gaccagttaa cggctgttgc accccggctgc	10260
gagagctcgg tgtacctgag acgcgagtaa gccctcgagt caaatacgtt gtcgttgaa	10320
gtccgcacca ggtactggta tccccacaaa aagtgcggcg gcggctggcg gtagagggc	10380
cagcgtaggg tggccggggc tccggggcg agatcttcca acataaggcg atgatatccg	10440
tagatgtacc tggacatcca ggtgatgccc gcggcggtgg tggaggcgcg cgaaaagtgc	10500
cggacgcggc tccagatgtt gcgcagcggc aaaaagtgc tccatggtcgg gacgcgtcg	10560
ccggtcaggc gcgcgcaatc gttgacgcgc tagaccgtgc aaaaggagag cctgtaaagcg	10620
[0009] ggcactcttc cgtggctcg tggataaatt cgcaggta tcatggcgga cgaccgggt	10680
tcgagccccg tatccggccg tccgcgtga tccatgcggc taccggccgc gtgtcgacc	10740
caggtgtgcg acgtcagaca acgggggagt gtccttttgc ttcccttcc aggccggcg	10800
gctgctgcgc tagtttttggccactggc cgcgcgcagc gtaagcggtt aggctggaaa	10860
gcgaaagcat taagtggctc gtcctgtt gccggagggt tattttccaa gggttgagtc	10920
gcgggacccc cggtcgagt ctggaccgg ccggactgcg gcgaacgggg gtttgcctcc	10980
ccgtcatgca agaccccgct tgcaaattcc tccggaaaca gggacgagcc cttttttgc	11040
ttttcccaga tgcacatccgt gtcggcggcgt atgcggccccc ctccctcagca gcccggcag	11100
caagagcagc ggcagacatg cagggcaccc tcccctcctc ctaccgcgtc aggagggcg	11160
acatcccggtt tgacgcggc agcagatggt gattacgaac ccccgccggcg ccggggccgg	11220
cactacctgg acitggagga gggcgaggc ctggcgccgc taggagcgcc ctctcgttgc	11280

cgttacccaa gggtcagct gaagcgtat acgcgtagg cgtacgtcc gcggcagaac	11340
ctgtttcgcg accgcgagg agaggagccc gaggagatgc gggatcgaaa gttccacgca	11400
ggcgcgagc tgccatgg cctgaatcg cagcggtgc tgccgagga ggacttttag	11460
cccgacgcgc gaaccggat tagtcccgcg cgccacacg tggccgcgc cgacctggta	11520
accgcatacg agcagacggt gaaccaggag attaacttc aaaaaagctt taacaaccac	11580
gtgcgtacgc ttgtggcgcg cgaggagggtg gctataggac tgcgtacatct gtggacttt	11640
gtaaagcgcg tggagcaaaa cccaaatagc aagccgctca tggccgagct gttccittata	11700
gtgcagcaca gcagggacaa cgaggcattc agggatgcgc tgctaaacat agtagagccc	11760
gagggccgct ggctgctcgat ttgtataaac atcctgcaga gcatagtggt gcaggagcgc	11820
agcttgagcc tggctgacaa ggtggccgcc atcaactatt ccatgcttag cctggcaag	11880
[0010] ttttacgccc gcaagatata ccataccct tacgttccca tagacaagga ggtaaagatc	11940
gaggggttct acatgcgcacat ggcgtgaag gtgttacat tgcgtacgc cctggcggtt	12000
tatgcacacg agcgcatcca caaggccgtg agcgtgagcc ggccgcgcga gtcagcgcac	12060
cgcgagctga tgcacagcct gcaaaggcc ctggctggca cggcagcgg cgatagagag	12120
gccgagtccct acttigacgc gggcgctgac ctgcgtggg ccccaagccg acgcgcctg	12180
gaggcagctg gggccggacc tggctggcg gtggcaccccg cgccgcgtgg caacgtcgcc	12240
ggcgtggagg aatatgacga ggacgatgag tacgagccag aggacggcga gtactaagcg	12300
gtgatgtttc tgatcagatg atgcaagacg caacggaccc ggccgtgcgg gcggcgctgc	12360
agagccagcc gtccggcatt aactccacgg acgactggcg ccaggtcatg gaccgcacatca	12420
tgtcgctgac tgcgcgcaat cctgacgcgt tccggcagca gccgcaggcc aaccggctct	12480
ccgcaattct ggaagcggtg gtccggcgc ggcggaaaccc cacgcacgag aagggtgtgg	12540
cgatcgtaaa cgcgctggcc gaaaacaggg ccatccggcc cgacgaggcc ggcctggct	12600

acgacgcgct gttcagcgcc tggctcggtt acaacagcgg caacgtgcagg accaacctgg	12660
accggctgggtt gggggatgtg cgcgaggccg tggcgacgc tgagcgcgcg cagcagcagg	12720
gcaacacctggg ctccatgggtt gcactaaacg ctttccttag tacacagccc gccaaacgtgc	12780
cgcggggaca ggaggactac accaactttg tgagcgcact gcggctaatt gtgactgaga	12840
caccgcaaag tgaggtgtac cagtctggc cagactattt ttccagacc agtagacaag	12900
gcctgcagac cgtaaacctg agccaggcatt tcaaaaactt gcaggggctg tgggggtgc	12960
gggctccac aggcgaccgc gcgaccgtgt cttagttgt gacgccccac tcgcgcctgt	13020
tgctgctgct aatagcgccc ttacggaca gtggcagcgt gtcccgac acataacctag	13080
gtcacttgct gacactgtac cgcgaggcca taggtcaggc gcatgtggac gagcatactt	13140
tccaggagat tacaagtgtc agccgcgcgc tggggcagga ggacacgggc agcctggagg	13200
caaccctaaa ctacctgctg accaaccggc ggcagaagat cccctcggtt cacagttaa [0011]	13260
acagcgagga ggagcgcatt ttgcgtacg tgcagcagag cgtgagcctt aacctgatgc	13320
gcgacggggt aacgcccagc gtggcgctgg acatgaccgc gcgcaacatg gaaccggca	13380
tgtatgcctc aaaccggccg ttatcaacc gcctaattggc ctacttgcat cgcgccggcg	13440
ccgtgaaccc cgagtatttc accaatgcca tcttgaaccc gcactggcta ccgccccctg	13500
gtttctacac cgggggattc gaggtgcccg agggtaacga tggattcctc tggacgaca	13560
tagacgacag cgtgtttcc ccgcaaccgc agaccctgtt agagttgcaa cagcgcgagc	13620
aggcagaggc ggcgctgcga aaggaaagct tccgcaggcc aagcagctt tccgatctag	13680
gcgcgtcgcc cccgcggtca gatgttagta gccatttcc aagttgata gggctctta	13740
ccagcactcg caccacccgc ccgcgcctgc tggcgagga ggagttaccta aacaactcgc	13800
tgctgcagcc gcagcgcgaa aaaaacctgc ctccggcatt tcccaacaac gggatagaga	13860
gcctagtggc caagatgagt agatggaaga cgtacgcga ggagcacagg gacgtgccag	13920

gcccgcgccc	gcccacccgt	cgtcaaaggc	acgaccgtca	gcggggctcg	gtgtggagg	13980
acgatgactc	ggcagacgac	agcagcgtcc	tggatttggg	agggagtggc	aaccctttg	14040
cgcacccitcg	ccccaggctg	gggagaatgt	tttaaaaaaa	aaaaagcatg	atgcaaata	14100
aaaaactcac	caaggccatg	gcaccgagcg	ttggtttct	tgtattcccc	ttagtatgcg	14160
gcgcgccg	atgtatgagg	aaggtcctcc	tccctcctac	gagagtgtgg	tgagcgcggc	14220
gccagtggcg	gccccgcgtgg	gttctccctt	cgatgctccc	ctggacccgc	cgtttgtgcc	14280
tcccggtac	ctgcggcccta	ccggggggag	aaacagcatc	cgttactctg	agttggcacc	14340
cctattcgac	accacccgtg	tgtacctggt	ggacaacaag	tcaacggatg	tggcatccct	14400
gaactaccag	aacgaccaca	gcaactttct	gaccacggtc	attcaaaaca	atgactacag	14460
cccgaaaaag	gcaagcacac	agaccatcaa	tcttgacgac	cggtcgcact	ggggcggcga	14520
cctgaaaacc	atccctgcata	ccaacatgcc	aaatgtgaac	gagttcatgt	ttaccaataa	14580
[0012]	gtttaaggcg	cgggtgatgg	tgtcgcgctt	gcctactaag	gacaatcagg	14640
atacgagtgg	gtggagttca	cgctgcccga	ggcaactac	tccgagacca	tgaccataga	14700
ccttatgaac	aacgcgatcg	tggagacta	ctgaaagtg	ggcagacaga	acgggttct	14760
ggaaagcgac	atcggggtaa	agttgacac	ccgcaacttc	agactgggt	ttgacccgt	14820
cactggtctt	gtcatgcctg	gggtatatac	aaacgaagcc	ttccatccag	acatcatttt	14880
gctgccagga	tgccgggtgg	acttcaccca	cagccgcctg	agcaacttgt	tggcatccg	14940
caagcggcaa	cccttccagg	agggctttag	gatcacctac	gatgatctgg	agggtggtaa	15000
cattcccgca	ctgttggatg	tggacgccta	ccaggcgcagc	ttgaaagatg	acaccgaaca	15060
gggcgggggt	ggcgcaggcg	gcagcaacag	cagtggcagc	ggcgcggaaag	agaactccaa	15120
cgcggcagcc	gcccgaatgc	agccggtgga	ggacatgaac	gatcatgcca	ttcgccggcga	15180
caccttgc	acacggcgtg	aggagaagcg	cgctgaggcc	gaagcagcgg	ccgaagctgc	15240

cgcccccgct ggcgaacccg aggtcgagaa gcctcagaag aaaccggta tcaaaccct	15300
gacagaggac agcaagaaac gcagttacaa cctaataagc aatgacagca cttcaccca	15360
gtaccgcagc tgg taccttg catacaacta cggc gaccc cagaccgaa tccgctcatg	15420
gaccctgctt tgcactcctg acgtAACCTG cggtcgagg caggtctact ggtcggtgcc	15480
agacatgatg caagaccccg tgacccctcg ctccacgcgc cagatcagca actttccggt	15540
ggtgtggcgcc gagctgttgc ccgtgcactc caagagcttc tacaacgacc aggccgtcta	15600
ctcccaactc atccgcccagt ttacctctt gacccacgtt ttcaatcgct ttcccgagaa	15660
ccagattttg ggcgcggcc cagccccac catcaccacc gtcagtaaaa acgttcctgc	15720
tctcacagat cacgggacgc taccgctgctt caacagcatc ggaggagtcc agcgagtgac	15780
cattactgac gccagacgcc gcacccgtccc ctacgtttac aaggccctgg gcatagtctc	15840
gccgcgcgtc ctatcgagcc gcacttttg agcaagcatg tccatcctta tatcgccag	15900
[0013] caataacaca ggctggggcc tgcgtttccc aagcaagatg tttggcgcccc ccaagaagcg	15960
ctccgaccaa cacccagtcgc gcgtgcgcgg gcactaccgc ggcgcctgg ggcgcacaa	16020
acgcggccgc actgggcgca ccaccgtcga tgacgccatc gacgcggtgg tggaggaggc	16080
gcgcaactac acgccccacgc cgccaccagt gtccacagt gacgcggcca ttcaagaccgt	16140
ggtgcgccga gcccggcgct atgctaaaat gaagagacgg cggaggcgcg tagcacgtc	16200
ccaccgcgcgc cgaccggca ctgcccggca acgcgcggcg gggccctgc ttaaccgcgc	16260
acgtcgacc ggccgacggg cggccatgcg ggccgctcga aggctggccg cgggtattgt	16320
cactgtgccc cccaggtcca ggacgcgagc ggcgcggca gcagccgcgg ccattagtgc	16380
tatgactcag ggtcgccagg gcaacgtgta ttgggtgcgc gactcggtta ggcgcctgc	16440
cgtggccgtg cgccacccggcc ccccgcgcaa cttagattgca agaaaaaaact acttagactc	16500
gtactgttgt atgtatccag cggcgccggc ggcgaacgaa gctatgtcca agcgaaaaat	16560

caaagaagag atgctccagg tcatcgccc ggagatctat ggccccccga agaaggaaaga	16620
gcaggattac aagccccaa agctaaagcg ggtcaaaaag aaaaagaaaag atgatgatga	16680
tgaacttgcac gacgagggtgg aactgctgca cgctaccgcg cccaggcgac gggtacagtg	16740
gaaaggtcga cgcgtaaaaac gtgtttgcg acccggcacc accgtagtc ttaccccg	16800
tgagcgctcc acccgcacct acaagcgcgt gtatgatgag gtgtacggcg acgaggac	16860
gctttagcag gccaacgagc gcctcgggga gtttgctac ggaaagcgac ataaggacat	16920
gctggcgttt ccgcgtggacg agggcaaccc aacaccttagc ctaaagcccg taacactgca	16980
gcaggtgctg cccgcgttg caccgtccga agaaaaagcgc ggcctaaagc gcgagtcgt	17040
tgacttggca cccaccgtgc agctgatggt acccaagcgc cagcgactgg aagatgtctt	17100
ggaaaaaaatg accgttggaaac ctgggcttggaa gcccggggc cgctgcggc caatcaagca	17160
ggtgtggccg ggacttggcg tgcagaccgt ggacgttcag atacccacta ccagtagcac	17220
[0014] cagtattgcc accggccacag agggcatggaa gacacaaacg tccccgggtt cctcagcggt	17280
ggcggatgcc gcggtgcagg cggtcgctgc gcccgcgtcc aagacctcta cggagggtca	17340
aacggaccccg tggatgtttc gcgttgcagc ccccccggcgc ccgcgcgggtt cgaggaagta	17400
cggcgccgcc agcgcgtac tgccgaata tgccctacat cttccatttgc cgcctacccc	17460
cggctatcggt ggctacacccctt accggcccg aagacgagca actacccgac gccgaaccac	17520
cacttggaaacc cgcgcgcgc gtcgcgtcg ccagccgtg ctggcccgatgg tttccgtgc	17580
cagggtggct cgcgaaggag gcaggaccctt ggtgctgcca acagcgcgtt accaccccg	17640
catcgtttaa aagccggctt ttgtggtttgc tgcagatatgc gcccgtacccctt gccgcctccg	17700
tttcccggttgc cggggattcc gaggaagaat gcaccgtagg aggggcattgg ccggccacgg	17760
cctgacgggc ggcgtgcgtc gtgcgcacca cccggcggcgg cgccgcgtcgc accgtcgcat	17820
gcgcggcggtt atccgtcccccc tccttatttcc actgatgcgc ggcgcgttgc ggcgcgtgc	17880

cggaaattgca tccgtggcct tgcaggcgca gagacactga taaaaaacaa gttgcatgtg	17940
gaaaaatcaa aataaaaagt ctggactctc acgctcgctt ggtcctgtaa ctatttgtta	18000
aatggaga aatcaacttt gcgtctctgg ccccgcgaca cggctcgcbc cggttcatgg	18060
gaaactggca agatatcgcc accagcaata tgagcggtgg cgccttcagc tggggctcgc	18120
tgtggagcgg cattaaaaat ttcggttcca ccgttaagaa ctatggcagc aaggcctgga	18180
acagcagcac aggccagatg ctgagggata agttgaaaga gcaaaatttc caacaaaagg	18240
tgttagatgg cctggcctct ggcatagcg ggggtggtgg cctggccaaac caggcagtgc	18300
aaaataagat taacagtaag cttgatcccc gccctccgt agaggagcct ccaccggccg	18360
tggagacagt gtctccagag gggcgtggcg aaaagcgtcc gcgcggcggc agggaaagaaa	18420
ctctggtgac gcaaatagac gagcctccct cgtacgagga ggcactaaag caaggcctgc	18480
ccaccacccg tcccatcgcg cccatggcta ccggagtgtc gggccagcac acaccgtaa	18540
[0015] cgctggacct gcctcccccc gccgacaccc agcagaaacc tgtgctgcca ggcccgaccg	18600
ccgttgttgt aaccctgtcct agccgcgcgt ccctgcgcgg cgccgccagc ggtccgcgat	18660
cgttgcggcc ctagccagt ggcaactggc aaagcacact gaacagcatc gtgggtctgg	18720
gggtgcaatc cctgaagcgc cgacgatgtc tctgaatagc taacgtgtcg tatgtgtgtc	18780
atgtatgcgt ccatgtcgcc gccagaggag ctgctgagcc gccgcgcgccc cgcttccaa	18840
gatggctacc cttcgatga tgccgcagtgt ctgttacatg cacatctgg gccaggacgc	18900
ctcgaggatc ctgagccccc ggctggtgca gtttgcgcgc gccaccgaga cgtacttcag	18960
cctgaataac aagtttagaa accccacggt ggcgcctacg cacgacgtga ccacagaccg	19020
gtcccgacgt ttgacgctgc ggttcatccc tgtggaccgt gaggatactg cgtactcgta	19080
caaggcgcgg ttacccctag ctgtgggtga taaccgtgtc ctggacatgg cttccacgtta	19140
ctttgacatc cgcggcgtgc tggacagggg ccctacttt aagccctact ctggcactgc	19200

ctacaacgcc ctggctccca agggtgcccc aaatccttgc gaatggatg aagctgctac	19260
tgctcttcaa ataaacctag aagaagagga cgatgacaac gaagacgaag tagacgagca	19320
agctgagcag caaaaaactc acgtatttgg gcaggcgct tattctggta taaatattac	19380
aaaggagggt attcaaatacg gtgtcgaagg tcaaacacct aaatatgccg ataaaacatt	19440
tcaacacctgaa cctcaaatacg gagaatctca gtggtagcaa actgaaatta atcatgcagc	19500
tgggagagtc cttaaaaaga ctacccaaat gaaaccatgt tacggttcat atgcaaaacc	19560
cacaaatgaa aatggagggc aaggcattct tgtaaagcaa caaatggaa agctagaaag	19620
tcaagtggaa atgcaatttt tctcaactac tgaggcgacc gcaggcaatg gtgataactt	19680
gactcctaaa gtggatttgt acagtgaaga tgttagatata gaaaccccag acactcatat	19740
ttcttacatg cccactattt aggaaggtaa ctcacgagaa ctaatggcc aacaatctat	19800
gcccaacagg cctaattaca ttgcttttag ggacaatttt attggctaa tgtattacaa	19860
[0016] cagcacgggt aatatgggt ttctggcgcc ccaagcatcg cagttgaatg ctgttgtaga	19920
tttgcaagac agaaacacag agctttcata ccagttttg ctgttccca ttgggtatag	19980
aaccaggtag ttttctatgt ggaatcaggc tggacagc tatgtatccag atgttagaat	20040
tattgaaaat catggaactg aagatgaact tccaaattac tgcttccac tggaggtgt	20100
gattaataca gagactctt ccaaggtaaa acctaaaaca ggtcaggaaa atggatggaa	20160
aaaagatgct acagaatttt cagataaaaa tggaaataaga gttggaaata attttgcatt	20220
ggaaatcaat ctaaatgcca acctgtggag aaatttcctg tactccaaca tagcgctgt	20280
tttgcggac aagctaaagt acagtccttc caacgtaaaa atttctgata acccaaacac	20340
ctacgactac atgaacaagc gagtggtggc tcccggtta gtggactgct acattaacct	20400
tggagcacgc tggcccctt actatatgga caacgtcaac ccatttaacc accaccgcaa	20460
tgctggcctg cgctaccgct caatgttgct gggcaatggt cgctatgtgc cttccacat	20520

ccaggtgcct cagaagttct ttgccattaa aaacccctt ctccgtccgg gtcatacac	20580
ctacgagtgg aacttcagga aggatgttaa catggttctg cagagctccc taggaaatga	20640
cctaagggtt gacggagcca gcattaagtt tgatagcatt tgccttacg ccacccctt	20700
ccccatggcc cacaacacccg cctccacgct tgaggccatg cttagaaaacg acaccaacga	20760
ccagtcctt aacgactatc tctccgcgc caacatgctc taccctatac ccgccaacgc	20820
taccaacgtg cccatatcca tcccctcccg caactggcgc gctttccgcg gctggccctt	20880
cacgcgcctt aagactaagg aaaccccatc actgggctcg ggctacgacc cttattacac	20940
ctactctggc tctataccct acctagatgg aacctttac ctcaaccaca ccttaagaa	21000
ggtggccatt acctttgact cttctgtcag ctggcctggc aatgaccgcc tgcttacccc	21060
caacgagttt gaaattaagc gtcagttga cggggagggt tacaacgttg cccagtgtaa	21120
[0017] catgaccaaaa gactggttcc tggtacaaat gctagctaac tacaacattt gctaccagg	21180
cttctatatac ccagagagct acaaggaccg catgtactcc ttcttagaa acttccagcc	21240
catgagccgt caggtggtgg atgatactaa atacaaggac taccaacagg tggcattcct	21300
acaccaaacac aacaactctg gatttttgg ctacccctt cccaccatgc gcgaaggaca	21360
ggcctaccct gctaacttcc cctatccgct tataggcaag accgcagttg acagcattac	21420
ccagaaaaag tttctttcg atgcaccct ttggcgcate ccattctcca gtaactttat	21480
gtccatggc gcactcacag acctggccca aaaccccttc tacgccaact ccgcacgc	21540
gctagacatg acttttgggg tggatcccat ggacgagccc acccttctt atgttttgtt	21600
tgaagtcttt gacgtggtcc gtgtgcaccg gccgcaccgc ggcgtcatcg aaaccgtgt	21660
cctgcccacg cccttctcg ccggcaacgc cacaacataa agaagcaagc aacatcaaca	21720
acagctgccc ccatgggctc cagtgaggcag gaactgaaag ccattgtcaa agatcttgg	21780
tgtggccat attttttggg cacctatgac aagcgcttc caggcttgc ttctccacac	21840

aagctcgctt ggcggccatgt caatacggcc ggtcgcgaga ctggggcggt acactggatg	21900
gcctttgcctt ggaacccgca ctcaaaaaca tgctacctct ttgagccctt tggctttct	21960
gaccagcgac tcaaggcagg ttaaccagg tggatcgggt cactcctgctt ccgttagcgcc	22020
attgcttctt cccccgaccg ctgtataacg ctggaaaagt ccacccaaag cgtacagggg	22080
cccaactcggtt ccgcctgtgg actattctgc tgcattgtttc tccacgcctt tgccaactgg	22140
ccccaaactc ccatggatca caaccccacc atgaacctta ttaccgggtt acccaactcc	22200
atgctcaaca gtccccagg tttttttttt acagcccacc ctgcgtcgca accaggaaca gctctacagc	22260
ttcctggagc gccactcgcc ctacttccgc agccacagt gtcggccactt gagcggccact	22320
tcttttgc tttttttttt catgtaaaaa taatgtacta gagacacttt caataaaggc	22380
aaatgctttt atttgtacac ttcgggttga ttatccccc ccacccttgc cgtctgcgc	22440
gtttaaaaat caaaggggtt ctgcgcgcga tcgctatgcg ccactggcag ggacacgttgc	22500
[0018] cgatactggt gtttagtgct ccactaaac tcaggcacaa ccatccgcgg cagctcggtt	22560
aagttttcac tccacaggct gcgcaccatc accaacgcgt ttagcaggctt gggcgccat	22620
atcttgaagt cgcagggtt ggctccgcgc tgcgcgcg agttgcgata cacagggttgc	22680
cagcactgga acactatcag cggccgggtgg tgcacgctgg ccagcacgctt cttgtcgag	22740
atcagatccg cgtccaggctt ctccgcgtt ctcaggcga acggagtcaa ctttggtagc	22800
tgccttccca aaaagggcgc gtgcccgatc tttgagttgc actcgacccg tagtggcatc	22860
aaaaggtgac cgtgccccgtt ctggcggtt ggatacagcg cctgcataaa agccttgatc	22920
tgcttaaaag ccacccgtt ctttgcgcct tcagagaaga acatgcgcga agacttgcgg	22980
gaaaactgat tggccggaca ggccgcgtcg tgcacgcgc accttgcgtc ggtgttggag	23040
atctgcacca catttcggcc ccaccgggttc ttcacgatct tggccttgc agactgctcc	23100
ttcagcgccgc gctgccccgtt ttgcgtcgatc acatccattt caatcacgtt ctccttattt	23160

atcataaatgc ttccgtgtag acacttaagc tcgccttcga tctcagcgca gcgggtgcagc	23220
cacaacgcgc agcccgtggg ctcgtatgc ttgttaggtca cctctgcaaa cgactgcagg	23280
tacgcctgca ggaatcgccc catcatcgtc acaaaggctt ttttgtgtt gaaggtcagc	23340
tgcaaccgcg ggtgctccctc gttcagccag gtcttcata cgccgcagg agcttccact	23400
tggtcaggca gtagttgaa gttcccttt agatcgttt ccacgtggta cttgtccatc	23460
agcgcgcgcg cagcctccat gcccttctcc cacgcagaca cgatcggcac actcagcggg	23520
ttcatcaccg taatttcaact ttccgttgc ctgggtctt cctttccctc ttgcgtccgc	23580
ataccacgcg ccactgggtc gtcttcattc agccgcgcgca ctgtgcgcctt acctccctt	23640
ccatgcttga ttagcaccgg tgggttgctg aaacccacca tttgtagcgc cacatcttct	23700
ctttcttccct cgctgtccac gattacctct ggtgatggcg ggccgtcggtt cttggagaa	23760
ggcgcttct ttttcttctt gggcgcaatg gccaaatccg ccggcgaggt cgatggccgc	23820
[0019] gggctgggtg tgcgcggcac cagcgcgtct tgtgtatgagt ctgcgttcgc ctggactcg	23880
atacgccgcc tcatccgctt ttttggggc gcccggggag gcccggcgca cggggacggg	23940
gacgacacgt cctccatggt tggggacgt cgccgcgcac cgctccgcg ctcgggggtg	24000
gttgcgcgt gtcctcttc ccgactggcc atttccttct cctataggca gaaaaagatc	24060
atggagtcag tcgagaagaa ggacagccta accggccctt ctgagttcgc caccaccgc	24120
tccaccgatg ccgccaacgc gcctaccacc ttccccgtcg aggccacccc gcttggaggag	24180
gaggaagtga ttatcgagca ggaccagggt ttgttaagcg aagacgacga ggaccgctca	24240
gtaccaacag aggataaaaaa gcaagaccag gacaacgcag aggcaaacga ggaacaagtc	24300
ggcgccccggg acgaaaggca tggcgactac ctagatgtgg gagacgacgt gctgttgaag	24360
catctgcagc gccagtgcgc cattatctgc gacgcgttgc aagagcgacag cgatgtgc	24420
ctcgccatag cggatgtcag cttgcctac gaacgccacc tattctcacc ggcgtaccc	24480

ccccaaacgcc aagaaaaacgg cacatgcgag cccaaacccgc gcctcaactt ctaccccgta	24540
tttgcgtgc cagaggtgct tgccacctat cacatcttt tccaaaactg caagataccc	24600
ctatcctgcc gtgccaaccg cagccgagcg gacaaggcgc tggccttgcg gcagggcgct	24660
gtcataacctg atatcgccctc gctcaacgaa gtgccaaaaa tctttgaggg tcttggacgc	24720
gacgagaagc gcgcggcaaa cgctctgcaa caggaaaaca gcgaaaatga aagtcaactt	24780
ggagtgttgg tggaaactcga gggtgacaac gcgcgcctag ccgtactaaa acgcagcatc	24840
gaggtcaccc actttgccta cccggcactt aacctacccc ccaaggatcat gagcacagtc	24900
atgagtgagc ttagtgcgtgc ccgtgcgcag cccctggaga gggatgcaaa ttgcagaa	24960
caaacagagg agggcctacc cgcaattggc gacgagcagc tagcgcgtg gcttcaaacg	25020
cgcgagcctg ccgacttgga ggagcgacgc aaactaatga tggccgcagt gctcggtacc	25080
gtggagcttgc agtgcacatgca gcgggttctt gctgacccgg agatgcagcg caagcttagag	25140
[0020] gaaacattgc actacaccctt tcgacaggc tacgtacgccc aggctgcaa gatctccaac	25200
gtggagcttgc gcaacacttgtt ctcctacctt ggaattttgc acgaaaaccc cttggcCAA	25260
aacgtgcttc attccacgct caagggcgag ggcgcgcgcg actacgtccg cgactgcgtt	25320
tacttatttc tatgctacac ctggcagacg gccatggcgc tttggcagca gtgcttggag	25380
gagtgcacc acc tcaaggagct gcagaaactg ctaaagcaaa acttgaagga cctatggacg	25440
gccttcaacg agcgctccgt ggccgcgcac ctggcggaca tcattttccc cgaacgcctg	25500
ctaaaaaccc tgcaacaggc tctgcacac ttcaccagtc aaagcatgtt gcagaacttt	25560
aggaacttta tccttagagcg ctcaggaatc ttgcccgcac cctgctgtgc acttcctagc	25620
gactttgtgc ccattaagta ccgcgaatgc cctccgcgc tttggggcca ctgctaccctt	25680
ctgcagctag ccaactacct tgcctaccac tctgacataa tggaaagacgt gagcggtgac	25740
ggtctactgg agtgcactg tcgctgcaac ctatgcaccc cgccaccgcctc cctggtttgc	25800

aattcgcagc tgcttaacga aagtcaaatt atcggtacct ttgagctgca gggccctcg	25860
cctgacgaaa agtccgcggc tccgggttg aaactcactc cggggctgtg gacgtcggct	25920
taccccgca aatttgtacc tgaggactac cacgcccacg agattagtt ctacgaagac	25980
caatcccgcc cgccaaatgc ggagcttacc gcctgcgtca ttacccaggg ccacattctt	26040
ggccaattgc aagccatcaa caaagccgc caagagttc tgctacgaaa gggacggggg	26100
gtttacttgg acccccagtc cggcgaggag ctcaacccaa tccccccgcc gccgcagccc	26160
tatcagcagc agccgcgggc ccttgcttcc caggtatggca cccaaaaaga agctgcagct	26220
gccgcccaca cccacggacg aggaggaata ctgggacagt caggcagagg aggttttgg	26280
cgaggaggag gaggacatga tggaagactg ggagagccta gacgaggaag cttccgaggt	26340
cgaagaggtg tcagacgaaa caccgtcacc ctcggtcgca ttccccctcg cggcgcggcc	26400
[0021] gaaatcgca accggttcca gcatggctac aacctccgt cctcaggcgc cgccggcact	26460
gcccgttcgc cgacccaacc gtagatggga caccactgga accagggccg gtaagtccaa	26520
gcagccgcgc ccgttagccc aagagcaaca acagcgccaa ggctaccgct catggcgcgg	26580
gcacaagaac gccatagttg cttgcttgca agactgtggg ggcaacatct cttcgcccg	26640
ccgctttctt ctctaccatc acggcgtggc ctccccgt aacatcctgc attactaccg	26700
tcatctctac agcccatact gcacccggcgg cagcggcagc ggcagcaaca gcagcggcca	26760
cacagaagca aaggcgaccc gatagcaaga ctctgacaaa gcccaagaaaa tccacagcgg	26820
cggcagcagc aggaggagga gcgctgcgtc tggcgcccaa cgaacccgta tcgacccgcg	26880
agcttagaaaa caggattttt cccactctgt atgctatatt tcaacagagc agggccaag	26940
aacaagagct gaaaataaaa aacaggtctc tgcgatccct cacccgcagc tgcctgtatc	27000
acaaaagcga agatcagctt cggcgcacgc tggaaagacgc ggaggctctc ttcagtaaat	27060
actgcgcgct gactcttaag gacttagttc gcgccttcc tcaaattaa gcgcgaaaac	27120

tacgtcatct ccagcggcca cacccggcgc cagcacctgt cgtcagcgcc attatgagca	27180
aggaaattcc cacgcctac atgtggagtt accagccaca aatgggactt gcggtggag	27240
ctgccccaga ctactcaacc cgaataaaact acatgagcgc gggaccccac atgatatccc	27300
gggtcaacgg aatccgcgc caccgaaacc gaattctttt ggaacaggcg gctattacca	27360
ccacacctcg taataaccctt aatcccgta gttggccgc tgccctggtg taccaggaaa	27420
gtcccgctcc caccactgtg gtacttccca gagacgcccga ggccgaagtt cagatgacta	27480
actcaggggc gcagcttgcg ggccgtttc gtcacagggt gcggtcgccc gggcaggta	27540
taactcacct gacaatcaga gggcgaggta tttagtcaaa cgacgagtcg gtgagtcct	27600
cgcttggtct ccgtccggac gggacatttc agatcggcgg cgccggccgt cttcattca	27660
cgcctcgta ggcaatccata actctgcaga cctcgccctc tgagccgcgc tctggaggca	27720
ttggaaactct gcaatttattt gaggagtttgc tgccatcggt ctacttaac cccttcgg	27780
[0022] gacctccgg ccactatccg gatcaattta ttccctaactt tgacgcggta aaggactcgg	27840
cggtacggcta cgactgaatg ttaagtggag aggccagagca actgcgcctg aaacacctgg	27900
tccactgtcg ccggcacaag tgcttgcgc gcgactccgg tgagtttgc tactttaat	27960
tgcccgagga tcatatcgag ggccggcgc acggcgtccg gcttaccgcc cagggagagc	28020
ttggccgttag cctgattcgg gagtttaccc agcgcccccct gctagttgag cgggacaggg	28080
gaccctgtgt tctactgtg atttgcact gtcctaacctt tggattacat caagatctt	28140
gttgcctatct ctgtgctgag tataataat acagaaatta aaatataactg gggctcttat	28200
cggccatccctg taaacgcccac cgtcttcacc cgcccaagca aaccaaggcg aacccatct	28260
ggtactttta acatctctcc ctctgtgatt tacaacagtt tcaacccaga cggagtgagt	28320
ctacgagaga acctctccga gtcagctac tccatcagaa aaaacaccac cctccattacc	28380
tgccggaaac gtacgagtgc gtcaccggcc gctgcaccac acctaccgcc tgaccgtaaa	28440

ccagactttt tccggacaga cctcaataac tctgtttacc agaacaggag gtgagcttag	28500
aaaaccctta gggattttagg ccaaaggcgc agctactgtg gggtttatga acaattcaag	28560
caactctacg ggctattcta attcaggttt ctctagaatc ggggttgggg ttattctcg	28620
tcttgtgatt ctctttatcc ttatactaac gcttctctgc ctaaggctcg ccgcctgctg	28680
tgtgcacatt tgcatttatt gtcagcttt taaacgctgg ggtcgccacc caagatgatt	28740
aggtacataa tcctagggtt actcaccctt gcgtcagccc acggtaccac ccaaaaggtg	28800
gatttaagg agccagcctg taatgttaca ttgcagctg aagctaataa gtgcaccact	28860
cttataaaat gcaccacaga acatgaaaag ctgcttattc gccacaaaaa caaaattggc	28920
aagtatgctg tttatgctat ttggcagcca ggtgacacta cagagtataa tgttacagtt	28980
ttccagggtt aaagtataa aactttatg tatacttttcatttatga aatgtgcgac	29040
attaccatgt acatgagcaa acagtataag ttgtggcccc cacaaaattt tgtggaaaac [0023]	29100
actggcactt tctgctgcac tgctatgcta attacagtgc tcgcttttgt ctgtacccta	29160
ctctatatta aataaaaaaag cagacgcagc tttattgagg aaaagaaaaat gccttaattt	29220
actaagttac aaagctaataa tcaccactaa ctgctttact cgctgttgc aaaacaattt	29280
caaaaaagtta gcattataat tagaatagga tttaaaccctt ccggtcattt cctgctcaat	29340
accattcccc tgaacaattt actctatgtg ggatatgctc cagcgctaca accttgaagt	29400
caggcttcctt ggatgtcagc atctgacttt ggcgcgcacc tgccggccgg attttttcca	29460
gtccaaactac agcgaccac cctaacaagag atgaccaaca caaccaacgc ggccggccgt	29520
accggactta catctaccac aaatacaccc caagtttctg ctttgcattaa taactggat	29580
aacttggca tgtggtggtt ctccatagcg ctatgttttgc tatgccttat tattatgtgg	29640
ctcatctgct gcctaaagcg caaacgcgc cggaccacca tctatagtc catcattgtg	29700
ctacacccaa acaatgatgg aatccataga ttggacggac tgaaacacat gttctttct	29760

cttacagtat gattaaatga gacatgattc ctcgagttt tatattactg acccttggtg	29820
cgcgtttttg tgcgtgctcc acattggctg cggtttctca catcgaagta gactgcattc	29880
cagccttcac agtctatttg ctittacggat ttgtcacccct cacgctcatc tgcaaggctca	29940
tcactgtggt catcgccctt atccagtgca ttgactgggt ctgtgtgcgc tttgcataatc	30000
tcagacacca tccccagtagc agggacagga ctatagctga gcttcttaga attcttaat	30060
tatgaaattt actgtgactt ttctgctgat tatttgcacc ctatctgcgt tttgttcccc	30120
gacctccaag cctcaaagac atatatcatg cagattcaact cgtatatgga atattccaag	30180
ttgctacaat gaaaaaaagcg atcttccga agcctggta tatgcaatca tctctgttat	30240
ggtgttctgc agtaccatct tagccctagc tataatccc tacattgaca ttggctggaa	30300
acgaatagat gccatgaacc acccaacttt ccccgccccc gctatgctc cactgcaaca	30360
agttgttgcc ggccggcttg tcccagccaa tcagcctcgc cccacttctc ccaccccccac	30420
[0024] taaaatcgc tacttaatc taacaggagg agatgactga caccctagat cttagaaatgg	30480
acggaattat tacagagcag cgcctgctag aaagacgcag ggcagcggcc gagcaacagc	30540
gcatgaatca agagctccaa gacatggta acttgcacca gtgaaaagg ggtatcttt	30600
gtctggtaaa gcaggccaaa gtcacctacg acagtaatac caccggacac cgccttagct	30660
acaagttgcc aaccaagcgt cagaaattgg tggcatggt gggagaaaag cccattacca	30720
taactcagca ctccgtagaa accgaaggct gcattcaactc accttgtcaa ggacctgagg	30780
atctctgcac ctttattaag accctgtcgc gtctcaaaga tcttattccc tttaactaat	30840
aaaaaaaaat aataaagcat cacttactta aaatcgtta gcaaatttct gtccagttt	30900
ttcagcagca ctccttgcct ctcctccag ctctggattt gcagcttcct cctggctgca	30960
aactttctcc acaatctaaa tgaaatgtca gttcctcct gttectgtcc atccgcaccc	31020
actatcttca tgggttgca gatgaagcgc gcaagaccgt ctgaagatac cttcaacccc	31080

gtgttatccat atgacacgga aaccggtcct ccaactgtgc ctttcttac tcctccctt	31140
gtatccccca atgggtttca agagagtccc cctggggta ctccttgcg cctatccgaa	31200
cctctagttt cctccaatgg catgcttgcg ctcaaaaatgg gcaacggcct ctctctggac	31260
gaggccggca accttaccc ccaaaatgtt accactgtga gcccacctt caaaaaaacc	31320
aagtcaaaca taaacctgga aatatctgca cccctcacag ttacctcaga agccctaact	31380
gtggctgccc ccgcacccct aatggtcgcg ggcaacacac tcaccatgca atcacaggcc	31440
ccgctaaccg tgcacgactc caaacttagc attgccaccc aaggaccctt cacagtgtca	31500
gaaggaaagc tagccctgca aacatcaggc cccctcacca ccaccgatag cagtaccctt	31560
actatcactg cctcaccctt tctaactact gccactggta gcttggcat tgacttgaaa	31620
gagcccattt atacacaaaaa tggaaaacta ggactaaagt acggggctcc tttgcatgtt	31680
acagacgacc taaacacttt gaccgttagca actggtccag gtgtgactat taataactt	31740
[0025] tccttgcaaa ctaaagttac tggagccttgg gttttgatt cacaaggcaa tatgcaactt	31800
aatgttagcag gaggactaag gattgattct caaaacagac gccttatact tgatgttagt	31860
tatccgtttt atgctcaaaa ccaactaaat ctaagactag gacagggccc tcttttata	31920
aactcagccc acaacttgga tattaactac aacaaaggcc tttacttgaa tacagcttca	31980
aacaattcca aaaagcttga ggttaaccta agcactgcc aaggggtttagt gtttgacgct	32040
acagccatag ccattaatgc aggagatggg ctgtttttt gttcacctaa tgcaccaaac	32100
acaaaatcccc tcaaaaacaaa aattggccat ggcctagaat ttgattcaaa caaggctatg	32160
gttcctaaac taggaactgg cttttttt gacagcacag gtgcattttt acgttagaaac	32220
aaaaataatg ataagctaac ttgtggacc acaccagctc catctcctaa ctgttagacta	32280
aatgcagaga aagatgctaa actcactttt gttttttt gttttttt aatgtggcag tcaaatactt	32340
gctacagttt cagttttggc tttttttttt gttttttttt gttttttttt aatgtggcag tcaaatactt	32400

agtgcctatc ttattataag atttgacgaa aatggagtgc tactaaacaa ttccttcgt	32460
gaccagaat attggaactt tagaaatgga gatcttactg aaggcacagc ctatacaaac	32520
gctgttggat ttatgcctaa cctatcagct tatccaaaat ctcacggtaa aactgccaaa	32580
agtaaacattt tcagtcaagt ttacttaaac ggagacaaaa ctaaacctgt aacactaacc	32640
attacactaa acggtacaca ggaaacagga gacacaactc caagtgcata ctctatgtca	32700
ttttcatggg actggctcg ccacaactac attaatgaaa tatttgcac atcctttac	32760
actttttcat acattgcca agaataaaga atcggttg ttagtttca acgtgtttat	32820
ttttcaattt cagaaaattt caagtcattt ttcattcagt agtataccc caccaccaca	32880
tagcttatac agatcaccgt accttaatca aactcacaga accctagttat tcaacctgcc	32940
acctccctcc caacacacag agtacacagt ccttctccc cggtggcct taaaaagcat	33000
catatcatgg gtaacagaca tattcttagg tgttatattc cacacggttt cctgtcgagc	33060
[0026] caaacgctca tcagtatat taataaactc cccggcagc tcacttaagt tcatgtcgct	33120
gtccagctgc tgagccacag gctgctgtcc aacttgcggt tgcttaacgg gcggcgaagg	33180
agaagtccac gcctacatgg gggtagagtc ataatcgtgc atcaggatag ggcggtggtg	33240
ctgcagcagc gcgcgaataa actgctgccg ccggctcc gtcctgcagg aataacaacat	33300
ggcagtggtc tcctcagcga tgattgcac cgccgcagc ataaggcgcc ttgtccctcg	33360
ggcacagcag cgccacccgtga tctcacttaa atcagcacag taactgcagc acagcaccac	33420
aatattgttc aaaatccac agtgcagtc gctgttatcca aagctcatgg cggggaccac	33480
agaacccacg tggccatcat accacaagcg caggttagatt aagtggcgac ccctcataaa	33540
cacgctggac ataaacatta cctctttgg catgttgtaa ttcaccaccc cccggatcca	33600
tataaacctc tgattaaaca tggccatc caccaccatc ctaaacccagc tggccaaaac	33660
ctgccccccg gctatacact gcagggacc gggactggaa caatgacagt ggagagccca	33720

ggactcgtaa ccatggatca tcgtgcgt catgatatac atgttggcac aacacaggca	33780
cacgtgcata cacttcctca ggattacaag ctcccccgc gttagaacca tatccagg	33840
aacaacccat tcctgaatca gcgtaaatcc cacactgcag ggaagaccc gcacgtaact	33900
cacgttgc attgtcaaag tgttacattc gggcagcagc ggatgtatcc ctatgttgt	33960
agcgcgggtt tctgtctcaa aaggaggtt acgatcccta ctgtacggag tgcccgaga	34020
caaccgagat cgtgtggtc gtagtgtcat gccaaatgga acgcggacg tagtcatatt	34080
tctcgaagca aaaccagggtg cggcgtgac aaacagatct gcgtctccgg tctcgccgct	34140
tagatcgctc tgtgttagtag ttgttagtata tccactctct caaagcatcc aggcgcccc	34200
tggcttcggg ttctatgtaa actccatcat gcgcgcgtgc cctgataaca tccaccaccg	34260
cagaataagc cacacccagc caacctacac attcggtctg cgagtcacac acgggaggag	34320
[0027] cggaagagc tggaaagaacc atgtttttt ttttattcca aaagattatc caaaacctca	34380
aaatgaagat ctattaagt aacgcgtcc cctccgggtt cgtggtaaaa ctctacagcc	34440
aaagaacaga taatggcatt tgtaagatgt tgccaaatgg cttccaaaag gcaaacggcc	34500
ctcacgtcca agtggacgta aaggctaaac cttcagggtt gaatctccctc tataaacatt	34560
ccagcacctt caaccatgcc caaataattc tcacatcgcc accttctcaa tataatctct	34620
agcaaatccc gaatattaag tccggccatt gtaaaaatct gctccagagc gccctccacc	34680
ttcagcctca agcagcgaat catgattgca aaaattcagg ttectcacag acctgtataa	34740
gattcaaaaag cgaaacattt aaaaaatac cgcgatcccg taggtccctt cgcaaggcca	34800
gctgaacata atcggtcagg tctgcacgga ccagcgcggc cacttcccg ccaggaacca	34860
tgacaaaaga acccacactg attatgacac gcatactcgg agctatgcta accagcgtag	34920
ccccgatgtt aaccttttgc atggcggcg atataaaaatg caaggtgctg ctcaaaaaat	34980
caggcaaagc ctcgcgcaaa aaagaaagca catcgtagtc atgctcatgc agataaaggc	35040

aggttaagctc cggaaccacc acagaaaaag acaccattt tctctcaaac atgtctgcgg	35100
gtttctgcat aaacacaaaa taaaataaca aaaaaacatt taaacattag aagcctgtct	35160
tacaacagga aaaacaaccc ttataagcat aagacggact acggccatgc cggcgtgacc	35220
gtaaaaaaaaac tggtcaccgt gattaaaaag caccaccgac agctcctcgg tcatgtccgg	35280
agtcatatatg taagactcg taaacacatc aggttgattc acatcggtca gtgctaaaaa	35340
gcgaccgaaa tagcccgggg gaatacatac ccgcaggcgt agagacaaca ttacagcccc	35400
cataggaggt ataacaaaaat taataggaga gaaaaacaca taaacacctg aaaaaccctc	35460
ctgcctaggc aaaatagcac cctccgctc cagaacaaca tacagcgctt ccacagcggc	35520
agccataaca gtcagccta ccagtaaaaa agaaaaaccta taaaaaaaaa accactcgac	35580
acggcaccag ctcaatcagt cacagtgtaa aaaagggcca agtgcagagc gagtatatat	35640
[0028] aggactaaaa aatgacgtaa cggttaaagt ccacaaaaaa cacccagaaa accgcacgct	35700
aacctacgcc cagaaacgaa agccaaaaaa cccacaactt cctcaaatcg tcacttccgt	35760
tttcccacgt tacgttaactt cccatttaa gaaaactaca attccaaaca catacaagtt	35820
actccgcccct aaaacctacg tcacccgccc cggtccacg ccccgccca cgtcacaaac	35880
tccacccctt 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	
	ctgacccctc	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	
	atcttggta catctgacct cgtcgagtca ccaggcgctt ttccaa	46
<210>	7	
<211>	1185	

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> mTGF β -肽

<400> 7

atgggtcggg ggctgctccg gggcctgtgg ccgcgtgcata tcgtcctgtg gacgcgcac 60

gccagcacga tcccggcgca cggtccaaag tcggtaaca gtgatgtcat gccaggcgac 120

aatggcggtg cggtaagct tccacagctg tgcaagtttt gcgtatgttag actgtccact 180

tgcgacaacc agaagtccctg catgagcaac tgcagcatca cggccatctg tgagaagccg 240

catgaagtct gcgtggccgt gtggaggaag aacgacaaga acattactt ggagacggtt 300

tgccacgacc ccaagctcac ctaccacggc ttcaactctgg aagatgccgc ttctccaaag 360

tgtgtcatga aggaaaagaa aaggcgggc gagactttct tcatgtgtgc ctgttaacatg 420

[0030] gaagagtgc acgattacat catctttcg gaagaataca ccaccagcag tcccgcacagc 480

accaagggtgg acaagaaaat tgtgcccagg gattgtggtt gtaaggcttg catagtaca 540

gtccccagaag tatcatctgt cttcatcttc ccccaaagc ccaaggatgt gtcaccatt 600

actctgactc ctaagggtcac gtgtgtgtg gtagacatca gcaaggatga tcccgggtc 660

cagttcagct ggtttgtaga tgatgtggag gtgcacacag ctcagacgca accccgggag 720

gagcagttca acagcacttt ccgctcagtc agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg 780

ctcaatggca aggagttcaa atgcagggtc aacagtgcag cttccctgc ccccatcgag 840

aaaaccatct ccaaaaccaa aggcaagaccg aaggctccgc aggtgtacac cattccacct 900

cccaaggagc agatggccaa ggataaaagtc agtctgacct gcatgataac agacttcttc 960

cctgaagaca ttactgtgga gtggcagtgg aatgggcagc cagcggagaa ctacaagaac 1020

actcagccca tcatggacac agatggctct tacttcgtct acagcaagct caatgtgcag 1080

aagagcaact gggaggcagg aaatacttcc acctgctctg tgttacatga gggcctgcac 1140

aaccaccata ctgagaagag cctctccac ttcgtggta 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	
agtgcggcg	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	
taataaaaaaa		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	
taaaaaaaaaaa t		11

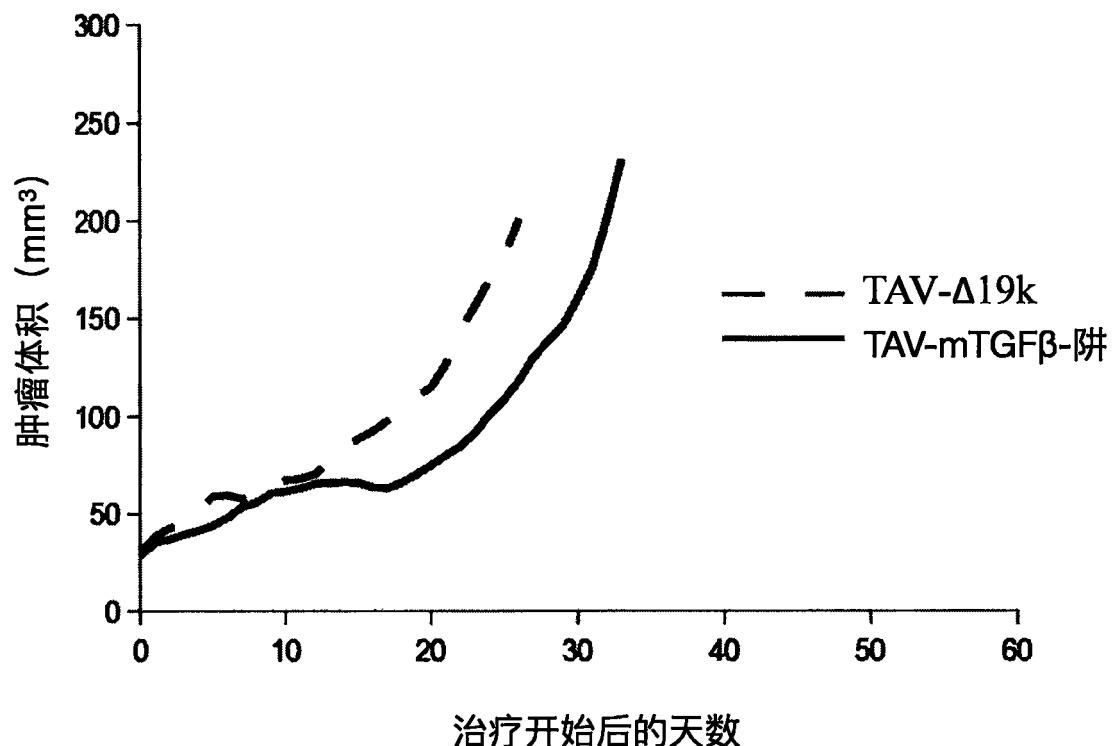


图1

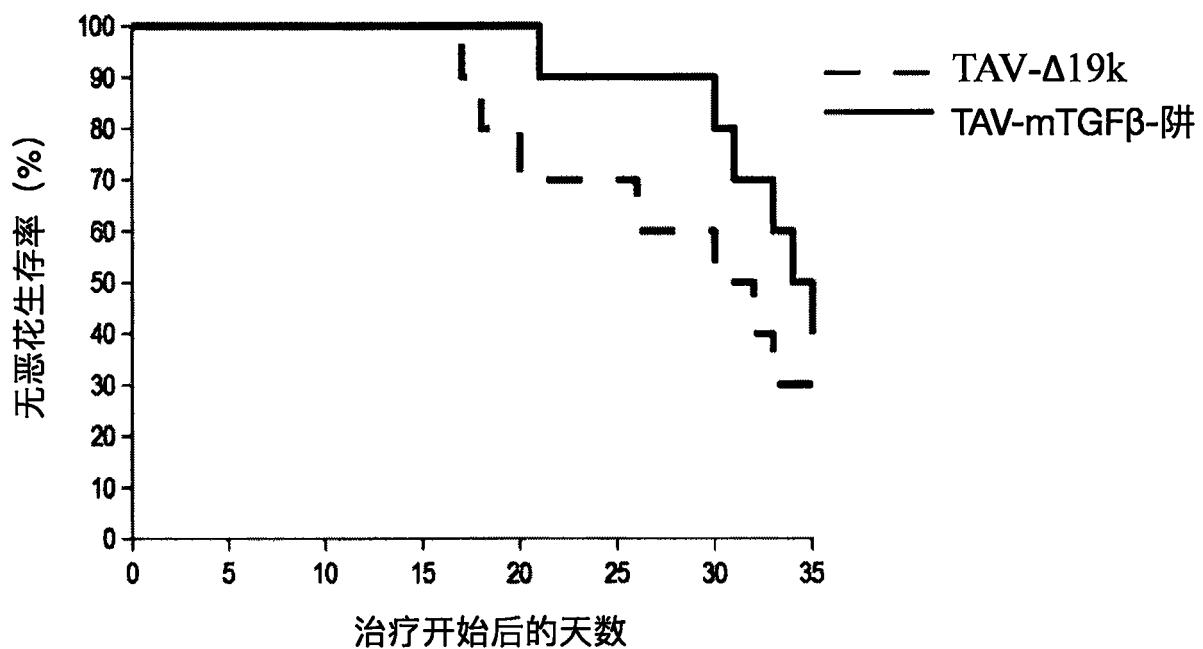


图2

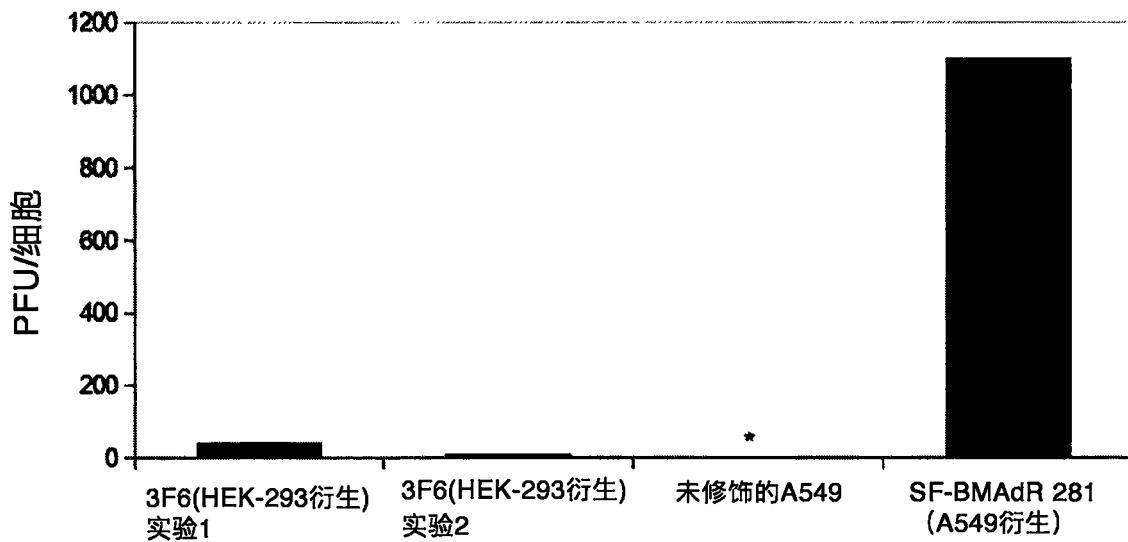


图3