

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 15/861 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03809208.5

[45] 授权公告日 2008 年 3 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 100374574C

[22] 申请日 2003.4.24 [21] 申请号 03809208.5

[30] 优先权

[32] 2002.4.25 [33] NL [31] PCT/NL02/00281

[32] 2002.10.15 [33] NL [31] PCT/NL02/00656

[32] 2002.11.25 [33] EP [31] 02102631.5

[86] 国际申请 PCT/EP2003/050126 2003.4.24

[87] 国际公布 WO2004/001032 英 2003.12.31

[85] 进入国家阶段日期 2004.10.25

[73] 专利权人 克鲁塞尔荷兰公司

地址 荷兰莱顿

[72] 发明人 罗纳德·福格尔斯

曼佐·扬斯·埃姆柯·海文加

戴维·阿德里亚努斯·特奥多鲁斯·

祖伊德吉斯特

[56] 参考文献

WO0070071A1 2000.11.23

EP1149916A2 2001.10.31

Promoter of the adenovirus polypeptide IX gene; Similarity to E1B and Inactivation by Substitution of the simian virus 40TATA Element. Lee et al. Journal of Virology, Vol. 65 No. 2. 1991

审查员 王大鹏

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 3 页 说明书 108 页 附图 38 页

[54] 发明名称

稳定的腺病毒载体及其增殖方法

[57] 摘要

本发明提供了通过在腺病毒包装细胞中 pIX 的过表达而增加重组腺病毒稳定性和/或包装能力的方法和手段, 这通过在重组腺病毒载体中保留至少一部分 E1B55K 区或者通过用异源启动子调节 pIX 而进行。本发明进一步涉及在互补细胞系上生产这种腺病毒的方法和手段, 其中早期区域 4 可读框 6 (E4-orf6) 编码核酸存在于所述腺病毒中, 而且其中 E4-orf6 基因产物与互补细胞中 E1 基因产物的一或多个产物相容, 由此腺病毒载体可以由互补细胞有效产生。

1. 一种衍生自或基于腺病毒血清型 35 或腺病毒血清型 11 的重组亚群 B 腺病毒, 其在 E1-区中有一个缺失且该腺病毒不编码功能性 E1B 55K 基因产物, 所述腺病毒包含在具有启动子活性的序列控制下的一个功能性 pIX 编码序列, 所述具有启动子活性的序列包含部分 E1B 55K 编码序列并相对于当所述 pIX 编码序列位于没有 E1B 55K 编码序列的 E1B 55K 终止密码子和 pIX 起始密码子之间的序列之后的表达而言, 其能在给定的包装细胞中增加 pIX 编码序列的表达。

2. 权利要求 1 的重组亚群 B 腺病毒, 其中所述具有启动子活性的序列包含 0.7 kb 或更少的腺病毒序列, 该腺病毒序列位于 pIX 可读框的直接上游。

3. 权利要求 1 的重组亚群 B 腺病毒, 其中所述具有启动子活性的序列含有 500 个核苷酸或更少的腺病毒序列, 该腺病毒序列位于 pIX 可读框的直接上游。

4. 权利要求 1 的重组亚群 B 腺病毒, 其中所述具有启动子活性的序列含有 300 个核苷酸或更少的腺病毒序列, 该腺病毒序列位于 pIX 可读框的直接上游。

5. 权利要求 1 的重组亚群 B 腺病毒, 其中所述具有启动子活性的序列含有 200 个核苷酸或更少的腺病毒序列, 该腺病毒序列位于 pIX 可读框的直接上游。

6. 权利要求 1 的重组亚群 B 腺病毒, 其中所述具有启动子活性的序列含有 150 个核苷酸或更少的腺病毒序列, 该腺病毒序列位于 pIX 可读框的直接上游。

7. 一种衍生自或基于腺病毒血清型 35 或腺病毒血清型 11 的重组亚群 B 腺病毒, 其包含功能性 pIX 编码序列并在 E1 区中具有一个缺失, 其中所述 pIX 编码序列在一异源启动子的控制下, 相对于当所述 pIX 编码序列位于没有 E1B 55K 编码序列的 E1B 55K 终止密码子

和 pIX 起始密码子之间的序列之后时的表达而言,所述启动子能够在给定的包装细胞中增加 pIX 编码序列的表达。

8. 权利要求 7 的重组亚群 B 腺病毒,其中所述异源启动子包含一种选自由非内源近端 pIX 启动子、病毒启动子、细胞启动子、合成启动子和杂合启动子组成的一组中的核酸序列。

9. 权利要求 8 的重组亚群 B 腺病毒,其中所述异源启动子选自由如下序列组成的一组:所述序列至少部分衍生自或基于 Ad5 近端 pIX 启动子、劳斯肉瘤病毒启动子和腺病毒 E1B 启动子。

10. 权利要求 1—9 任一项的重组亚群 B 腺病毒,特征在于其进一步包含编码亚群 C 腺病毒的功能性 E4-orf6 蛋白的一个序列。

11. 一种分离的核酸,其在导入合适的包装细胞时组成权利要求 1—10 中任一项的重组亚群 B 腺病毒的基因组。

12. 一种增加衍生自或基于腺病毒血清型 35 或腺病毒血清型 11 的重组亚群 B 腺病毒的稳定性和/或包装能力的方法,所述重组亚群 B 腺病毒在 E1 区有一个缺失,所述方法包括在包装细胞中表达将所述重组腺病毒生产和装配为病毒颗粒所需的元件的步骤,其特征在于相对于当 pIX 编码序列位于没有 E1B 55K 编码序列的 E1B 55K 终止密码子和 pIX 起始密码子之间的序列之后时获得的 pIX 基因产物的水平而言,在所述包装细胞中 pIX 基因产物水平是升高的条件下进行所述步骤。

13. 权利要求 12 的方法,其中所述 pIX 基因产物的水平升高是通过在所述腺病毒中保留或再导入部分 E1B 55K 编码序列而实现的。

14. 权利要求 13 的方法,其中所述 pIX 基因产物的水平升高是通过在所述腺病毒中保留或再导入部分 E1B 55K 编码序列以便所述腺病毒含有 0.7kb 或更少的腺病毒序列而实现的,所述腺病毒序列位于 pIX 可读框的直接上游。

15. 权利要求 13 的方法,其中所述 pIX 基因产物的水平升高是通过在所述腺病毒中保留或再导入部分 E1B 55K 编码序列以便所述腺病毒含有 500 个核苷酸或更少的腺病毒序列而实现的,所述腺病毒

序列位于 pIX 可读框的直接上游。

16. 权利要求 13 的方法，其中所述 pIX 基因产物的水平升高是通过在所述腺病毒中保留或再导入部分 E1B 55K 编码序列以便所述腺病毒含有 300 个核苷酸或更少的腺病毒序列而实现的，所述腺病毒序列位于 pIX 可读框的直接上游。

17. 权利要求 13 的方法，其中所述 pIX 基因产物的水平升高是通过在所述腺病毒中保留或再导入部分 E1B 55K 编码序列以便所述腺病毒含有 200 个核苷酸或更少的腺病毒序列而实现的，所述腺病毒序列位于 pIX 可读框的直接上游。

18. 权利要求 13 的方法，其中所述 pIX 基因产物的水平升高是通过在所述腺病毒中保留或再导入部分 E1B 55K 编码序列以便所述腺病毒含有 150 个核苷酸或更少的腺病毒序列而实现的，所述腺病毒序列位于 pIX 可读框的直接上游。

19. 权利要求 12 的方法，其中所述 pIX 基因产物的水平升高是通过在一异源启动子控制下表达 pIX 编码序列而实现的。

20. 权利要求 19 的方法，其中所述异源启动子选自由非内源近端 pIX 启动子、病毒启动子、细胞启动子、合成启动子和杂合启动子组成的组中。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述异源启动子选自由 Ad5 近端 pIX 启动子、劳斯肉瘤病毒启动子及腺病毒 E1B 启动子组成的组中。

22. 一种重组腺病毒包装细胞，其包含权利要求 1—10 中任一项的重组亚群 B 腺病毒。

稳定的腺病毒载体及其增殖方法

发明领域

本发明涉及医药学领域，尤其涉及重组腺病毒载体及其应用。

发明背景

人腺病毒是大小为 60-90 nm 的无包膜二十面体颗粒。迄今为止已经鉴别了 51 种血清型，基于血细胞凝集性质及序列同源性将它们再分为 6 个亚群 (Francki et al. 1991)。基因组长度为 34—36 kb，其两侧是末端反向重复序列(ITR)。病毒感染周期分为早期和晚期阶段。在早期阶段(感染后 6—8 小时)，病毒被脱壳且基因组转运进细胞核，之后早期基因区 E1—E4 成为转录活性的。

早期区-1(E1)含有称为 E1A 和 E1B 的两个转录区。E1A 区编码参与宿主细胞周期修饰及其它病毒转录区激活的两个主要蛋白质(参见 Russell, 2000)。E1B 区编码两个主要蛋白质，19K 和 55K，其通过不同途径阻止得自 E1A 蛋白活性的凋亡的诱导(Rao et al., 1992; Yew and Berk, 1992; 参见 Shenk, 1996)。另外，E1B-55K 蛋白是在晚期阶段选择性病毒 mRNA 转运及抑制宿主蛋白质表达所需要的(Pilder et al., 1986)。早期区-2 (E2)也分为 E2A 和 E2B 区，其一起编码三种蛋白质，DNA 结合蛋白、病毒聚合酶和终端前蛋白质，这 3 种蛋白质均参与病毒基因组的复制(参见 van der Vliet, 1995 所述)。E3 区不是体外复制所必需的，但编码一些破坏宿主的病毒感染防御机制的蛋白质(参见 Horwitz, 2001 所述)。E4 区编码至少 6 种蛋白质，所述蛋白质参与与病毒 mRNA 剪接和转运、宿主细胞 mRNA 转运、病毒和细胞转录及转化相关的一些独特功能 (参见 Leppard, 1997 所

述)。

病毒壳体的形成及病毒基因组的包装所需的晚期蛋白均产生自主要晚期转录单位(MLTU)，其在复制开始后成为充分活性的。差别剪接和聚腺苷酸化的复杂过程产生 15 个以上共有一个三联前导序列的 mRNA 物种。早期蛋白 E1B 55K 和 E4 Orf 3 及 Orf6 在调节晚期病毒 mRNA 加工和从核中的转运中起关键作用(参见 Leppard, 1998 所述)。

新形成的病毒基因组在先成的壳体中的包装由至少两种腺病毒蛋白质即晚期蛋白 52/55K 和中期蛋白 IVa2 介导，这通过与位于基因组左侧末端的包装序列的相互作用而进行(Grable and Hearing, 1990; Gustin and Imperiale, 1998; Zang et al., 2001)。另一种中期蛋白 pIX 是壳体的一部分而且已知其稳定六邻体-六邻体之间的相互作用(Furcinitti et al., 1989)。另外，已经将 pIX 描述为反式激活含有 TATA 的启动子如 E1A 启动子和 MLP (Lutz et al., 1997)。

由于对病毒生物学的广泛了解及在进入细胞之后的高效核输送，因此腺病毒已经成为将基因输送进人体细胞的常用工具。另外，腺病毒载体是稳定的并可以相对简易地大规模生产。在大多数情况中，载体缺失至少 E1 区，这使所述载体产生复制缺陷。E1 缺失的基于亚群 C 血清型 Ad5 或 Ad2 的载体的生产在 E1 互补细胞系如 293 (Graham et al., 1970), 911 (Fallaux et al., 1996)和 PER.C6TM (Fallaux et al., 1998)中完成。正如美国专利 5994128 所揭示的，载体和细胞系需要仔细匹配以避免通过在所述细胞系和载体中腺病毒序列之间的同源重组而产生有复制能力的腺病毒。因此，PER.C6TM 细胞及匹配的腺病毒载体提供了生产 C 群腺病毒载体的一种优选的系统(Fallaux et al., 1998)。E1 序列的缺失提供了将外源基因导入病毒载体中的空间。由于可以掺入病毒体的 Ad5 基因组的最大大小限于大约 wt 长度的 105%，因此 E1 缺失的病毒可以容纳大约 4.8 kb 的外源 DNA (Bett et

al., 1993)。

缺少 pIX 的病毒体中最大包装能力降低至正常基因组长度的大约 95% (Ghosh-Choudhury et al., 1987)。这最可能是由 pIX-(pIX-minus) 病毒体的稳定性降低所致。pIX-minus 突变体 Ad5 中的缺乏可以由 pIX 在用于生产病毒的包装细胞系中的附加型表达而补足 (Caravokyri et al., 1995)。

尽管血清型 Ad5 和 Ad2 最常用作基因转移载体, 但其它血清型也可以具有优选的特性使其更适用作治疗或预防工具。例如亚群 B 病毒 Ad35 和 Ad11 与 Ad5 和 Ad2 病毒相比不易于被人血清中和(见 WO 00/70071 所揭示)。

腺病毒转移载体的中和使体内转导效力降低。另外, 发现与 Ad5 病毒相比, 携带 Ad35 的尾丝的重组病毒对抗原呈递细胞如树突细胞的感染效力在体外显著增强(WO 00/70071, WO 02/24730)。因此, 基于 Ad35 的载体组合了在人血清中低中和度的高度改良的感染效力, 使这种载体适于进行免疫接种。

使用下文揭示的技术可以产生和增殖完全 E1 缺失的基于 Ad35 的载体。然而, 对多种重组基于 Ad35 的载体进行仔细分析表明这种载体的稳定性较差, 即与基于 Ad5 的载体相比可容纳较少量的外源 DNA。本发明的手段和方法解决了这个问题。

另外, 需要进一步揭示针对具有更广泛血清型用途的腺病毒的可利用的技术。现有的包装细胞系典型地包含衍生自腺病毒血清型 5 的 E1 编码的蛋白质。这种‘标准’包装细胞系例如是 293、911 和 PER.C6TM。在这些标准包装细胞系上生产衍生自其它血清型的载体的尝试不是不成功就是很费力。根据所用的特殊血清型偶尔见到一些产品。然而, 衍生自除了亚群 C 之外的腺病毒亚群的, 由 Ad5 的 E1 转化和无限增殖化的细胞系上生产的重组腺病毒载体的产量很低。在 Abrahamsen 等(1997)的论文中, 揭示了与缺乏 Ad5 的 E4-orf6 序列的

293 细胞相比, 在包含衍生自腺病毒血清型 5 的 E4-orf6 的 293 细胞上观测到 E1A 缺失的腺病毒血清型 7 载体(亚群 B)的改进的噬斑纯化。然而, 由于在噬斑纯化的原种中观测到不希望的重组而遇到载体稳定性的问题。另一个问题是在生产期间野生型腺病毒污染问题。另外, 就腺病毒的大规模生产而言, 共同转染 E4-orf6 以获得足够高到可以应用的滴度是无用的。生长这种腺病毒的一个选则是提供具有稳定整合进互补/包装细胞系的基因组中的 E4-orf6 基因的细胞。这种细胞在本领域已经加以描述(例如 WO 96/22378 所述)。这个系统的缺点是必须产生新的稳定细胞系, 而且在产生稳定及正确的细胞之前必须进行许多次选择循环。这个过程费力又费时。通常地, 可以确定来自除了血清型 5(亚群 C)之外的血清型的腺病毒如亚群 B 病毒的产生和增殖在 Ad5 互补细胞上难以进行。正如 WO 00/70071 所揭示的, 基于亚群 B 病毒 Ad35 的重组病毒可以通过含有 Ad35 早期区-1 序列(Ad35-E1)的一表达构建体的共转染而产生。另外, 仅缺失 E1A 序列而未缺失 E1B 序列的基于 Ad35 的病毒示出在 PER.C6 细胞上有效复制, 提示 Ad5 的 E1A 蛋白能互补 Ad35-E1A 功能(WO 02/40665)。此外, 该实验示出缺少 Ad35-E1B 导致在 Ad5 互补细胞上产量较少。WO 00/70071 还揭示了生产 E1 缺失的非 C 群腺病毒载体的细胞系, 通过进一步修饰能互补腺病毒血清型 5 的细胞系进行。WO 00/70071 进一步提示应确立携带 Ad35-E1 序列的新的细胞系以互补缺少 E1 区的重组腺病毒血清型 35 载体(见 WO 02/40665 所述)。然而, 正如上所述, 如果针对特别需要而应用一种特异的血清型, 不得不针对每一种特异的血清型确立一种新的细胞系, 或者不得不修饰能互补腺病毒血清型 5 的可利用的细胞系以互补感兴趣的血清型。这对于应用本领域已知的确立并有效的方法, 应用本领域可利用的确立细胞系而不经修饰应用这些细胞系生产所有其它的非 Ad5 血清型显然是有利的。

可以推断仍需要一种生产系统以生产与亚群 C 血清型不同的有

用产量的腺病毒血清型。另外，仍需要包含常规包装细胞及稳定的并可以在这种包装细胞上增殖的重组亚群 B 腺病毒的合适的包装系统。

附图简述

图 1: pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3 的图谱。

图 2: 在有和无 E3 区的 Ad35 E1 缺失的病毒上产生的 PCR 片段的凝胶分析。Pl = 质粒对照; M = 标记: 1 kb plus ladder(Invitrogen); mQ = H₂O。基因组长度以 kb 标示。

图 3A: 用 MEGalign 软件(DNAstar)使用 Clustal 方法产生的多种腺病毒的近端 pIX 上游序列区的序列对比。序列来源在文中指明。方框内的是 Ad5 和 Ad2 中的 Spl 位点和 TATA 框(见 Babiss 和 Vales, 1991 所述)。

图 3B: 图 3A 中给出的序列的近端 pIX 区中推定的 Spl 和 TATA 框的示意性对比。

图 4: pAdApt535. Luc 的图谱。

图 5: pAdApt535 的图谱。

图 6A: 在分离自 Ad35.AdApt.Luc 和 Ad35.AdApt535.Luc 病毒的 DNA 上产生的或者在对照质粒上产生的 PCR 片段的凝胶分析。M = 标记 (1 kb plus ladder, Invitrogen)。使用两个特异性 PCR 扩增分析每个病毒制备物或对照质粒。

图 6B : 在 Ad35.AdApt.LacZ Δ E3 (35LacZ) 和 Ad35.AdApt535.LacZ Δ E3 (535LacZ)病毒上或者在对照质粒上产生的 PCR 片段的凝胶分析。

图 7: pBr. Ad35. Δ SM. AdApt. LacZ 的图谱。

图 8: E1B 启动子和 55K 编码区中推定的启动子的示意图。

图 9: 可用于产生独特片段以鉴别推定的启动子的 55K 区域中限制位点的示意图。位置编号根据其在野生型 Ad35 中的位置而定。

图 10: 三种不同的亚群 B 血清型中 E1A 区和 E1B/pIX 区的 polyA 信号之间的区域的序列对比。

图 11: 质粒 p Δ MT.Orf6. Hygro (ECACC 保藏号 P02041226)的示意图。

图 12: 质粒 pAd35. Δ MT. Orf6 的示意图。

图 13: pUC.35-5E4 的示意图。

图 14: 产生 pUC.35-5E4 的克隆步骤。

图 15: pBr. Ad35. PRn 的示意图。

图 16: pBr. Ad35. PR5E4 (ECACC 保藏号 P02041229)的示意图。

图 17: pWE.Ad35.pIX-rITR5E4 的示意图。

图 18: pCRscriptAmp.NFI-NcoIR 的示意图。

图 19: pCRscriptAmp.NcoIF-NR2 的示意图。

图 20: pCR.NF1-NR2 的示意图。

图 21: Ad5 的 E4-orf6(上方序列)与克隆进 Ad35 主链中的 Ad5 的 E4-orf6 (中间序列) 及 Ad35 E4-orf6 序列 (下方序列) 之间的序列对比, 示出所述完整片段已经被置换。

图 22: Ad5 的 E4-orf6/7 (上方序列)与克隆进 Ad35 主链中部分 Ad5 E4-orf6/7 (中间序列) 及 Ad35 E4-orf6/7 序列 (下方序列) 之间的序列对比, 示出 orf6/7 序列是部分嵌合的, 大约在第 138 位的赖氨酸(K)残基融合。

图 23: pBr. Ad35. PR. 5Orf6 (ECACC 保藏号 P02041227)的示意图。

图 24: pWE. Ad35. pIX-rITR. 5Orf6 的示意图。

图 25: pBr. Ad35.PRn Δ E3 的示意图。

图 26: pBr. Ad35. Δ E3. PR5E4 的示意图。

图 27: pBr. Ad35. Δ E3. PR5Orf6 的示意图。

图 28: 在如 PER.C6 的细胞中通过双同源重组(double homologous

recombination) 生产重组腺病毒颗粒的系统的示意图。

图 29: pWE. Ad35. pIX-EcoRV 的示意图。

图 30: Ad35 及 Ad11 pIX-cDNA 序列和 wt Ad35 序列的对比。

使用来自 DNASTAR 的 SeqMan 软件对比得自实施例 18 中所述的克隆的 cDNA 片段的序列。Ad35 cDNA 序列衍生自分离自 wtAd35 或 Ad35E1B+Luc 感染的培养物(示出 7 个克隆中的 1 个克隆的序列)的 RNA, Ad11 cDNA 序列衍生自分离自 wtAd11 感染的培养物的 RNA。序列编号是任意的。就 Ad35 wt 序列而言, 示出了 wt Ad35 序列的第 3339 至 3628 位核苷酸。内含子序列(在 cDNA 序列中见到的一缺口)的两侧有剪接供体(SD)和剪接受体(SA)位点, 与已知共有序列密切匹配。SeqMan 软件将来自 SD 的前两个核苷酸(AG)放置在 cDNA 序列中的内含子序列的 3'端而不是 5'端。

图 31: Ad35 病毒中 pIX 加帽位点的位置。

Ad35 中 E1B 基因和 pIX 序列附近的基因组组构的示意图; 描述了 pIX mRNA 中转录起始位点和内含子边界。核苷酸序列为 wt Ad35 DNA (WO 00/70071)。M= MunI, B=Bsu36I, SD=剪接供体, SA=剪接受体。转录起始位点(第 3339 位核苷酸, 加帽位点), 55K 的终止密码子(TAA) 及 pIX 的起始密码子 (第 3484 位核苷酸, ATG)以黑体字标示。虚线标示未示出的序列。

图 32: 来自保留 166 bp 的 3' E1B 序列的 Ad35 病毒的转基因 PCR 结果。

对 Ad35.AdAptBsuLuc5Orf6 (泳道 1—9)和 Ad35.AdAptBsuLuc 病毒(泳道 10—14)进行转基因 PCR 分析的结果示意图。M= 1kb+标记 (Invitrogen), P=pAdAptBsuLuc 对照质粒。

发明概述

本发明揭示了一种重组 B 群腺病毒, 其在接近 E1B 55K 的终止

密码子的 E1 区中有一个缺失，与相似的 Ad5 重组腺病毒相比可以容纳较少的外源性序列。看起来当 pIX 编码区在 E1B 55K 终止密码子和 pIX 起始密码子之间的序列之后时，这是由于在给定的包装细胞中所述 B 群病毒中 pIX 基因的相对低表达所致。这示出当 pIX 启动子通过在这种病毒中包含 E1B 55K 编码区的序列或者通过使用一异源启动子以调节 pIX 而至少部分恢复时，可以使这种病毒更稳定和/或能容纳更多的外源性序列，由此在给定的包装细胞中达到正常表达或者甚至相对过表达。

本发明提供了一种重组腺病毒，其在 E1 区内具有至少一个缺失，所述重组腺病毒的特征在于在所述腺病毒中存在编码提高 pIX 基因表达的 E1B 55K 基因产物的序列的至少一部分，附带条件是所述重组腺病毒不表达功能性 E1B 55K 基因产物。这种腺病毒与缺少全部 E1B 编码序列的相应腺病毒相比更稳定和/或能携带更多的外源 DNA。优选地，所述腺病毒包含位于 pIX 编码序列直接上游的大约 700 个或更少碱基对的序列。在优选的实施方案中，所述腺病毒是 B 群腺病毒，更优选的是衍生自或基于 Ad35 或 Ad11 的腺病毒。本发明进一步提供了提高在 E1 区中有至少一个缺失的重组腺病毒的稳定性和/或包装能力的方法，所述方法包括保留或再导入编码 E1B 55K 基因产物并提高 pIX 基因在所述腺病毒中表达的序列的至少一部分。除了存在提高 pIX 基因表达的 E1B 55K 序列之外，将 pIX 编码序列之前的序列改变为一更强的启动子也是可能的，从而提高 pIX 的表达，使得重组腺病毒稳定性提高和/或通过本发明方法生产的腺病毒颗粒的包装能力提高。因此本发明进一步提供了提高缺少至少 E1 区及包含外源遗传信息的重组腺病毒载体的稳定性和/或包装能力的方法和手段，所述方法包括当一种包装细胞中存在升高水平的 pIX 基因产物时在所述包装细胞中表达生产并装配所述重组腺病毒载体成病毒颗粒所需的元件的步骤，其中所述 pIX 基因产物的水平升高通过使

用在所述载体中的一个修饰的 pIX 基因而过表达编码 pIX 蛋白的遗传信息而达到,所述修饰使 pIX 基因产物过表达。在一个优选的实施方案中,所述修饰的 pIX 基因包含一个异源启动子,其驱动编码 pIX 的遗传信息的表达,所述异源启动子是使所述编码 pIX 的遗传信息在所述包装细胞中过表达的一个启动子。在一个实施方案中,所述异源启动子至少部分衍生自或基于一种腺病毒血清型的 pIX 启动子,所述腺病毒血清型与所述重组腺病毒载体的内源近端 pIX 上游序列相比授予较高水平的 pIX 表达。在一个实施方案中,所述异源启动子至少部分衍生自或基于 Ad5 的 pIX 启动子。在一个方面,本发明提供了缺少至少 E1 区并包含感兴趣的基因的一种重组腺病毒载体,其中 pIX 基因被修饰,而且其中所述重组腺病毒载体不是衍生自腺病毒血清型 5。本发明再一方面提供了包含一个修饰的腺病毒 pIX 基因的一种重组核酸序列,其中编码 pIX 蛋白的遗传信息不是衍生自腺病毒血清型 5 或腺病毒血清型 7 pIX 编码序列。在一个优选的实施方案中,所述修饰的 pIX 基因包含驱动编码 pIX 的遗传信息表达的一个异源启动子。

本发明进一步提供了包含第一种血清型的腺病毒的结构和非结构元件的重组腺病毒载体,其中所述载体进一步包含编码 E4-orf6 蛋白的一个序列,其中所述序列选自以下一组中: a) 衍生自与所述第一种血清型不同的第二种血清型的腺病毒的 E4-orf6 编码序列; b) 通过一或多个密码子的缺失、突变、添加和/或取代衍生自所述第一种血清型的腺病毒的 E4-orf6 编码序列;和 c) 包含一种融合体的 E4-orf6 编码序列,所述融合体是衍生自与所述第一种血清型不同的第二种血清型的 E4-orf6 编码序列的一部分与衍生自第三种血清型的 E4-orf6 编码序列的一部分的融合体,其中所述第三种血清型与所述第一种血清型可以相同或不同。

本发明进一步提供了生产包含第一种血清型腺病毒的结构和非

结构元件的这种重组腺病毒载体的方法，所述方法包括如下步骤：a) 将腺病毒的必需元件提供给包含可表达形式的衍生自第二种血清型腺病毒的 E1B-55K 编码序列的互补细胞，以使得可以通过所述互补细胞装配所述重组腺病毒载体，其中所述元件包含与所述第二种血清型不同的所述第一种血清型腺病毒的至少一些结构和非结构元件及编码与所述互补细胞中所述可表达的 E1B-55K 蛋白相容的功能性 E4-orf6 蛋白或其功能部分、衍生物和/或类似物的一个序列；b) 在生产和装配腺病毒载体的条件下在培养基中培养所述互补细胞；及 c) 从所述培养基和/或互补细胞中收获如此生产的重组腺病毒载体，其中编码相容的 E4-orf6 蛋白的序列存在于如此生产的重组腺病毒载体中。

本发明进一步提供了包含衍生自一种腺病毒的重组核酸分子的一种重组腺病毒，所述重组核酸分子在 E1 区有至少一个缺失，特征在于在所述重组核酸分子中存在编码 E1B-55K 基因产物的序列的至少一部分和/或 pIX 编码序列在一个异源启动子的控制之下，所述重组腺病毒进一步包含第一种血清型腺病毒的结构和非结构元件，其中所述重组腺病毒进一步包含编码功能性 E4-orf6 蛋白或其功能部分、衍生物和/或类似物的序列，其中所述序列选自以下一组：a) 衍生自与所述第一种血清型不同的第二种血清型腺病毒的 E4-orf6 编码序列；b) 衍生自包含一或多个密码子缺失、突变、添加和/或取代的所述第一种血清型腺病毒的 E4-orf6 编码序列；及 c) 包含一个融合体的 E4-orf6 编码序列，所述融合体是衍生自第二种血清型的 E4-orf6 编码序列的一部分与衍生自第三种血清型的 E4-orf6 编码序列的一部分的融合体，其中所述第三种血清型与所述第一种血清型可以相同或不同。

本发明还提供了一种包装系统，其包含本发明的一种重组腺病毒及一种包装细胞，其中所述包装细胞及所述重组腺病毒共同包含在所

述包装细胞中生产和装配所述重组腺病毒的所有必需元件,其中所述包装细胞表达编码与所述重组腺病毒的 E4-orf6 蛋白或其功能部分、衍生物和/或类似物相容的至少一种腺病毒 E1B-55K 蛋白或其功能部分、衍生物和/或类似物的核酸。

本发明还提供了生产一种包含第一种血清型腺病毒的结构和非结构元件的稳定重组腺病毒的方法,其中所述重组腺病毒包含衍生自一种腺病毒的重组核酸分子,所述核酸分子在 E1 区中有一个缺失,并且所述重组腺病毒包含衍生自编码 E1B-55K 基因产物的序列的至少一部分的核酸,所述基因产物提高 pIX 蛋白的表达,但不引起来自所述核酸分子的功能性 E1B-55K 蛋白的表达和/或具有在一个异源启动子控制下的 pIX 编码序列,所述方法包括如下步骤: a)将腺病毒的必需元件提供给表达可表达形式的衍生自第二种血清型腺病毒的 E1B-55K 编码序列或其功能部分、衍生物和/或类似物的互补细胞,以使得可以通过所述互补细胞装配所述重组腺病毒载体,其中所述元件包含与所述第二种血清型不同的所述第一种血清型腺病毒的至少一些结构和非结构元件及一种编码与所述互补细胞中所述可表达的 E1B-55K 蛋白相容的功能性 E4-orf6 蛋白或其功能部分、衍生物和/或类似物的序列;及 b)在可以生产和装配重组腺病毒的情况下在培养基中培养所述互补细胞;及 c)从所述培养基和/或互补细胞中收获如此生产的重组腺病毒。

本发明进一步提供了生产含有外源遗传信息的稳定腺病毒载体而不产生可复制的腺病毒的方法,其中所述载体是除了腺病毒 5 之外的血清型,所述方法包括如下步骤:在适于腺病毒载体生产的条件下培养细胞,所述细胞或其祖细胞已经被提供并表达编码腺病毒载体生产和包装所必需的所有元件的核酸,生产可复制的腺病毒载体所必需的元件存在于至少两个独立的核酸分子上而不导致分子间重组,所述必需元件包含来自除了 Ad5 之外的第一种血清型的腺病毒的至少一

种决定血清型的结构元件和非结构元件，并包含来自与第一种血清型不同的第二种血清型的 E1B 55K 基因产物和与所述 E1B 55K 基因产物相容的 E4 orf6 基因产物。在某些实施方案中，编码腺病毒载体生产和包装所必需的所有必需元件的核酸包含一个重组 pIX 基因。在一个实施方案中，重组 pIX 基因是在一个异源启动子控制下的 pIX 编码序列。

另一方面，本发明提供了治疗或预防人体或动物疾病或失调的方法，所述方法包括为人或动物施用本发明的重组腺病毒载体。在其它方面，本发明提供了包含本发明腺病毒载体的疫苗和药物组合物。另一方面，本发明提供了本发明的重组腺病毒载体在制备预防或治疗人或动物疾病或失调的药物中的应用。本发明还涉及一种试剂盒，其包含本发明提供的细胞系和腺病毒载体以实践本发明提供的方法。

发明详述

本发明的一方面提供了提高在 E1 区有至少一个缺失的重组腺病毒的稳定性和/或包装能力的方法，所述方法包括以下步骤：相对于当 pIX 编码序列位于其没有 E1B 55K 序列的内源近端上游序列之后时含有的 pIX 基因产物的水平，当包装细胞中存在升高水平的 pIX 基因产物时，在所述包装细胞中表达生产及装配所述重组腺病毒成病毒颗粒所需的元件。在本发明方法的一些实施方案中，所述 pIX 基因产物的升高水平是通过在所述腺病毒中保留或再导入部分 E1B 55K 序列而带来的。在其它一些实施方案中，所述 pIX 基因产物的升高水平是通过在一种异源启动子控制下表达的 pIX 编码序列而带来的。本发明进一步提供了一种重组腺病毒，其包含在一种表达序列控制下的功能性 pIX 编码序列，所述表达序列包含能在给定包装细胞中增加 pIX 编码序列表达的部分 E1B 55K 序列，所述表达增加是相对于位于其没有所述部分 E1B 55K 序列的内源近端 pIX 上游序列之后的所述 pIX

编码序列的表达而言，条件是所述部分 E1B 55K 序列不编码功能性 E1B 55K 基因产物。本发明示出 pIX 启动子序列可以存在于所述 E1B 55K 序列中，以及在所述表达序列中包括这些序列可以因此增加 pIX 表达。相对于所述 pIX 编码序列在其没有所述部分 E1B 55K 序列的内源近端上游序列之后时，所述 E1B 55K 序列的存在增加了所述重组腺病毒的稳定性和/或包装能力。

WO 02/40665 中描述了 E1 区具有缺失但具有完整 E1B 55K 编码区的血清型 35 腺病毒 (pBr. Ad35. leftITR.ΔE1AΔ21K)。然而，一种功能性 55K 基因产物如存在于所揭示的载体中的产物抑制凋亡，因此希望的是获得缺少功能性 E1B 55K 表达的重组腺病毒，例如通过突变 E1B 55K 基因或优选地通过包括仅仅部分 E1B 55K 序列，更优选包括仅仅 E1B 55K 起始密码子下游序列。本领域技术人员清楚使所述载体中的 E1B 55K 序列的量最小化对产生具有最大 E1 缺失的病毒以容纳更多的外源核酸是有益的，同时保留足够的 E1B 55K 序列以具有提高重组腺病毒的稳定性和/或提高包装能力的益处。根据本发明的教导，本领域技术人员能发现 E1B 55K 内使重组腺病毒稳定和/或提高包装能力的最低限度需要的序列，例如通过使用标准分子克隆技术以获得从揭示的载体(pBr.Ad35. leftITR.ΔE1AΔ21K)开始的 E1B 55K 区域内的连续缺失，并确定稳定性和包装能力而进行。因此本发明的一个目的是提供一种重组腺病毒载体，其中所述编码 E1B 55K 基因产物的序列包含正好位于 pIX 可读框直接上游的大约 0.7kb 或更少的腺病毒序列。在其它实施方案中，所述序列包含正好位于 pIX 可读框直接上游的腺病毒序列的不超过大约 680、600、550、500、450、400、350、300、250、200、150 或 100 个核苷酸。在一个实施方案中，这种重组腺病毒载体保留 166 bp 的 55K 编码序列的 3'端。本领域技术人员将清楚本发明非限于存在在天然腺病毒中 pIX 编码序列的直接上游邻近序列中发现的一个序列。根据本发明其也可以具

有更上游的即来自 E1B 55K 区域的序列(例如一个限制或 PCR 片段, 见例如实施例 10 和图 9)与更近端的 pIX 调节序列融合, 从而产生调节序列的一个人工组合, 只要当与不存在任何 E1B 55K 序列时相对比时导致 pIX 在给定的包装细胞中表达提高即可。在一个优选的实施方案中, 所述腺病毒是 B 亚群腺病毒, 更优选是 Ad35 或 Ad11 腺病毒。血清型 35 或 11 的腺病毒已经示出特别适于施用给人体, 因为与目前使用最多的血清型 5 相比其有少得多的个体具有这些血清型的中和抗体(WO 00/70071)。本发明的另一方面提供了可作为本发明的腺病毒的基因组的核酸。

另外或者除了存在提高 pIX 基因表达的 E1B 55K 序列之外, 也可以通过突变 pIX 基因, 优选其启动子而过表达 pIX 自身, 以提高重组腺病毒的稳定性和/或包装能力。一种修饰的 pIX 基因是具有不同启动子和/或转录终止子, 和/或突变的编码序列例如通过密码子优化、导入稳定 RNA 的内含子等获得的突变序列的 pIX 基因。本发明的 pIX 基因包含编码 pIX 的遗传信息, 并包括核酸如在天然腺病毒中发现的 pIX 基因、等位基因变体形式的编码突变 pIX 的 cDNA 及信息或者编码突变 pIX 的核酸, 所述突变 pIX 具有至少部分 pIX 功能, 其与正常 pIX 可以在定量或定性程度上不同, 其衍生自或基于通过氨基酸突变、缺失、添加或移位或其组合而产生的 pIX。

如果一种重组腺病毒缺失至少 E1B 55K 区域直至包括 E1B 55K 基因产物的终止密码子, pIX 可读框将位于 E1B 55K 终止密码子和 pIX 的起始密码子之间的序列之后。这些序列在此称为“内源近端 pIX 上游序列”(例如基于 Ad35 的重组腺病毒载体中的 Ad35 pIX 上游序列、基于 Ad11 的重组腺病毒载体中的 Ad11 pIX 上游序列等在此方面称为内源性的; 所述定义包括在天然发现的及不是在实验室中产生的等位基因变体; 针对一些近端 pIX 上游序列见图 3A 所示)。

在此所用术语“异源启动子”是指与天然发现的 pIX 基因上游的

序列, 包括 E1B 55K 区域的序列及内源近端 pIX 上游序列不同的任何序列, 并能作为启动子从而调节 pIX 编码序列的转录。一方面, 异源启动子可以是至少部分衍生自或基于来自与重组腺病毒载体衍生自其中的血清型不同的另一种血清型腺病毒的近端 pIX 上游序列(即 E1B 55K 终止密码子与 pIX 的起始密码子之间的序列)的一个序列(例如 Ad35 重组腺病毒载体中 Ad5 pIX 上游序列)。在此将其称为“非内源性近端 pIX 启动子”。

在本发明的一个实施方案中, Ad35 衍生的 pIX 表达由 Ad5 非内源性近端 pIX 启动子驱动。可以使用衍生自或基于来自与腺病毒载体的内源性 pIX 近端序列相比授予较高水平 pIX 表达的血清型的近端 pIX 上游序列的任何非内源性近端 pIX 启动子。这种非内源性近端 pIX 启动子的鉴别可以基于序列信息, 如本领域技术人员从实施例 4 中显而易见的信息。在特殊的实施方案中, 本发明的腺病毒载体衍生自或基于腺病毒亚群 E 血清型, 或者优选亚群 B 血清型。在特异的实施方案中, 所述腺病毒载体衍生自或基于腺病毒血清型 35 (Ad35)、Ad11、Ad7 或 Ad4。在另外的实施方案中, 所述非内源性近端 pIX 启动子是至少部分衍生自或基于亚群 C、A、D 或 F 的腺病毒的近端 pIX 上游序列。在特殊的实施方案中, 所述非内源性近端 pIX 启动子至少部分衍生自或基于腺病毒血清型 12 (Ad12)、Ad9 或 Ad40, 或者更优选 Ad5 或 Ad2 的近端 pIX 上游序列。或者, 作为非内源近端 pIX 启动子的序列可以通过本领域技术人员已知的普通分子学方法根据经验发现, 如通过转录分析进行, 其中可以常规测试启动子强度。本领域技术人员清楚来自启动子的元件可以交换而不用交换整个启动子, 例如添加、缺失或突变已知的启动子的转录因子结合序列可以影响其强度。突变至少一部分启动子序列可以通过突变对序列加以改变而进行, 如通过添加、缺失或交换一或多个核苷酸, 包括具有已知功能的核苷酸序列而进行。取代启动子序列通过一个不同的启动子置换

部分或全部这些序列而进行。这种置换可以根据本领域技术人员熟知的标准分子生物学技术进行。可以构建与选择的 pIX 基因可操纵相关的任何启动子并测试其作用。

另一方面,一种异源启动子与腺病毒非内源近端 pIX 启动子不相关。因此,异源启动子也可以是病毒启动子,包括但不限于基于或衍生自巨细胞病毒(CMV,例如人 CMV 立即早期基因启动子,在此称作 CMV 启动子)、劳斯肉瘤病毒(RSV,例如 RSV 长末端重复启动子,在此称作 RSV 启动子)、TK、HBV、SV40 等的启动子。在一个实施方案中,一种腺病毒 E1B 启动子用作异源启动子。细胞启动子也可以用作异源启动子,这些启动子包括但不限于来自 PGK、金属硫蛋白、EF1- α 、 β -肌动蛋白等的启动子。本发明也可以使用包含来自一个以上启动子的元件的合成的或杂合启动子,这些启动子均包含在称为异源启动子的范围内。所用的启动子可以是组成型或可诱导启动子。就可诱导启动子而言,如果一种启动子在其被诱导状态提供过表达则认为其适于本发明。导致本发明的 pIX 过表达的任何启动子序列均可用作本发明的异源启动子。除了启动子强度之外,另一方面确定一特殊启动子当存在于重组腺病毒载体中时的效力是其大小,较长的启动子将占据转基因可利用的空间。本领域技术人员能使用本发明针对启动子长度和强度考虑到插入体大小而用实验方法优化载体,以发现最稳定的重组载体。

显而易见异源启动子仍可以含有或包括部分或全部内源近端 pIX 上游序列,或者全部置换这些序列,只要根据本发明的异源启动子可以引起编码 pIX 的遗传信息在选择包装细胞中过表达即可。本领域技术人员也清楚当一内源非 pIX 腺病毒启动子(例如 E1A、E2A、等启动子)或例如调节转基因的一异源启动子通过使用非 pIX 腺病毒基因或转基因与 pIX 编码序列(以任一顺序)之间的内部核糖体进入位点(IRES)用于驱动 pIX 表达时,根据本发明认为该启动子包含在称

为“异源启动子”的范围内。

本发明中 pIX 基因产物水平的升高或增加是 pIX 基因在选择的包装细胞中过表达的结果。在此所述 pIX 基因的过表达是指在给定的包装细胞中 pIX 的表达水平在 RNA 或蛋白质水平或这两个水平上均高于当 pIX 的编码区位于内源近端 pIX 上游序列之后时获得的 pIX 表达水平。在本发明中“过表达”是指一腺病毒的特定异源启动子-pIX 组合与选择的特定包装细胞的组合的过表达。确定表达水平的方法是本领域技术人员熟知的，包括但不限于 RT-PCR、Northern 印迹、Western 印迹等。就本发明而言，测定过表达通过确定在选择的给定包装细胞中具有给定的插入体（例如荧光素酶）的重组腺病毒中的表达水平，其中编码 pIX 的遗传信息在没有 E1B 55K 序列的内源近端 pIX 上游序列之后，并将这些表达水平与在重组腺病毒中的那些表达水平相对比，其除了 pIX 编码区由异源启动子或来自内源 E1B 55K 基因的序列(其天然启动子已经至少部分被重构)调节外其它都一样。pIX 的过表达是以高于 1 的比率表示的，所述比率是通过异源或天然启动子获得的表达水平与通过无 E1B 55K 序列的内源近端 pIX 上游序列获得的表达水平的比率。包装细胞的选择通过如与包装细胞中与互补腺病毒功能相互作用的重组腺病毒的元件的血清型、产物纯度（如没有来自产生的批次物中的能复制的腺病毒）、使用便利性、生长特性等因素加以确定。本领域技术人员已知包装细胞的实例，包括在此使用的 293 细胞、911 细胞和 PER.C6TM 细胞以及其适于互补特异血清型的腺病毒载体的衍生物如 PER55K。

应清楚在本发明的所有实施方案中，pIX 编码序列及驱动 pIX 表达的调节序列可以位于腺病毒基因组中其天然位置上，以及在腺病毒基因组的不同部分中，例如在最初含有 E3 序列的区域中。

稳定性提高的重组腺病毒能将较大的基因组掺入病毒颗粒中（病毒体）。因此，提高在此使用的重组腺病毒的稳定性使得本发明的重

组腺病毒可以包括更多的外源遗传信息，包括感兴趣的基因。另外，根据本发明的稳定提高的重组腺病毒能增殖更多代而无不稳定的迹象。稳定性可以通过本领域技术人员已知的一些方法测定，包括但不限于对重组病毒进行 PCR 以证明希望的重组腺病毒载体的存在。不稳定将产生副产物，其也可以通过 PCR 等方法观测到。也可以使用病毒 DNA 的限制分析、确定病毒颗粒的相对感染性、确定腺病毒颗粒的热稳定性等确定重组腺病毒载体的稳定性 (Caravokyri and Leppard, 1995)。确定重组腺病毒载体的稳定性/不稳定性的方法见本申请的实施例 3 所述。在此使用的一种重组腺病毒，也称作重组腺病毒载体或腺病毒载体，衍生自或基于一种腺病毒，缺少腺病毒的至少部分 E1 区（包含 E1A 和 E1B 基因）并可以包含希望通过所述载体输送和/或表达的外源遗传信息。在此所用的外源遗传信息是非天然存在于腺病毒中的任何遗传信息，也称作转基因。这包括但不限于感兴趣的基因、表达盒等。这种外源遗传信息可以充填基因组中已经通过腺病毒 E1 序列的缺失而可利用的空间。重组腺病毒载体用于多种目的，如在基因治疗、疫苗制备等应用中。除了 E1 区缺失之外，E3 序列也从这种腺病毒载体中缺失，以在某些优选的实施方案中提高对外源遗传信息的容量。当需要复制腺病毒载体时，如果需要与包含腺病毒载体中缺少的遗传信息的包装细胞组合，可以使用组合 E1 缺失的其它缺失及 E2、E3 和 E4 区的部分或完全缺失的多种组合。具有组合了腺病毒基因组中任选任何其它缺失的 E1 区缺失的所有重组腺病毒包括在本发明范围内。本发明的腺病毒可以用于不同方案中，如基因治疗或预防和/或治疗性免疫接种，包括肿瘤免疫接种和抗病毒免疫接种。为此，腺病毒载体作为基因输送载体，其中将一种非天然基因掺入腺病毒基因组中。该腺病毒颗粒随后可特异性定向于感兴趣的靶细胞；腺病毒通过壳体-受体结合或者通过其它方式与特异细胞结合，并输送转基因。腺病毒的定向可以以许多不同方式进行。腺病

毒载体定向领域的技术人员知道用于将腺病毒载体输送于感兴趣的细胞的所有不同的可能性。这种可能性包括但非限于壳体改变(尾丝、六邻体和/或五邻体修饰,如缺失,不同血清型的尾丝之间的交换,及添加肽和/或其它结合组分),其中产生了识别感兴趣的细胞上存在的受体的嵌合尾丝,或者其中利用了基于五邻体的结合。其它可能性是将定向组分与壳体蛋白连接,其中例如将结合肽、已知的强结合蛋白或者抗体或其一部分与壳体蛋白连接以实现特异性定向。这种载体均可使用本发明提供的方法和手段生产。

因此,本发明还揭示了根据本发明的重组腺病毒载体,其进一步包含编码非腺病毒蛋白的一个序列。这种序列可以存在于腺病毒主链内的不同位置上,但优选位于本发明的重组腺病毒载体中缺少的 E1 区中。E1 区由互补细胞中存在的互补元件互补。启动子、转基因及其它调节序列的方向可以朝向左侧以及右侧反向末端重复。

本发明还用于生产基于腺病毒和/或其它病毒如腺伴随病毒(AAV)的病毒载体,其中如 Ad-AAV 嵌合病毒的组合可以整合进宿主细胞基因组中。本领域已知产生整合的腺病毒的一些方法。通常地,本发明也用于生产可(特异性或非特异性)整合的腺病毒形式。

正如所提及的,一些非腺病毒转基因可以克隆进本发明的重组腺病毒载体中。这些不仅包括调节性核酸序列如增强子、启动子(例如强非腺病毒启动子如巨细胞病毒启动子、SV40 启动子及 RSV 启动子)及聚腺苷酸化信号,也包括针对治疗目的的异源基因。因此,在本发明的一个方面中,提供了本发明的重组腺病毒载体,其中所述非腺病毒蛋白选自以下一组:细胞死亡诱导多肽、肿瘤特异性抗原、病毒蛋白、激素和细胞因子。非腺病毒因子、蛋白质、多肽和肽的非限制性实例是转录因子、细胞内信号化蛋白、磷酸酶、激酶、凋亡抑制因子、受体拮抗剂、可溶形式的膜结合受体、RNA 抑制剂、反义 RNA's、诱饵因子(decoy factors)、核酶,及更特异性地,胸苷激酶、促红细

胞生成素、新红细胞生成刺激蛋白(NESP)、IL3、ceNOS、 γ -干扰素和 gp100。就免疫接种目的而言,非腺病毒病毒蛋白可以克隆进通过本发明的方法和手段提供的重组腺病毒载体中。这种病毒蛋白包括但不限于针对 HIV 疫苗的 gag、pol、env、nef 等,针对人乳头状瘤病毒疫苗的 E6 和 E7 蛋白,针对疟疾疫苗的来自疟原虫(Plasmodium protozoa)的环孢子蛋白,针对轮状病毒疫苗的轮状病毒成分,针对埃博拉病毒(ebolavirus)疫苗的埃博拉病毒蛋白,针对呼吸道合胞病毒疫苗的来自呼吸道合胞病毒的 F 和 G 基因产物,针对流感疫苗的 HA 和 NA 等。

根据本发明的腺病毒优选是人腺病毒,即衍生自或基于能感染人细胞的腺病毒,但本发明同样用于非人腺病毒。本领域技术人员知道除了所有人腺病毒之外,本领域已经鉴别了许多非人腺病毒。明显地,非人腺病毒也可以用于达到本发明揭示的相同结果。使用本发明的方法和手段可以生产的非人腺病毒的非限制性实例是狗、牛、猴和鸟腺病毒。在此所用的血清型因此超出物种限制性血清型。

在此所用术语“衍生自”是指在腺病毒中正常发现的核酸序列、基因或蛋白质用于产生根据本发明的重组腺病毒。本领域技术人员熟知产生这种重组腺病毒的方法,包括但不限于普通分子生物学方法如利用限制酶将遗传信息克隆进希望的 constellations 中的方法等。重组腺病毒也可以基于腺病毒序列。“基于”是指包括基于对这种遗传信息的了解合成构建遗传信息。这种方法包括但不限于使用腺病毒遗传物质作为 PCR 模板以构建一种基于所述模板腺病毒的序列的新的腺病毒构建体,构建具有希望序列的完全合成的遗传信息,例如通过将合成的寡核苷酸与希望的构建体连接而进行等。应理解“衍生自”非必需意味着野生型 DNA 的直接克隆。本领域技术人员也知道获得某一核酸的突变形式的分子生物学可能性。这些突变可以导致不同的功能性,但它们在一种方式中也可以是沉默的,即在某些突变不改变特

定 DNA 及其编码的蛋白质的功能性的方式中。因此，术语“其功能部分、衍生物和/类似物”应理解为与其相关的核酸的等同物。本领域技术人员意识到某些缺失、交换、（点）突变、添加等也可以产生与原始核酸具有相似功能的核酸。因此应理解不显著改变蛋白质如 pIX 蛋白、E4-orf6 和 E1B-55K 基因产物的功能这种变化在本发明的范围内。本领域技术人员清楚获得编码重组腺病毒的遗传信息的方法在不偏离本发明的范围内可以变化。

人腺病毒分为 A—F 亚群，其涵盖了 51 个血清型（见例如 EP 0978566 所述）。就一些应用而言，使用衍生自或基于来自特异亚群或来自针对希望的细胞类型例如树突细胞具有组织向性的某些血清型的腺病毒的腺病毒载体可以是有益的(WO02/24730)。在种群中一般没有抗来自某些亚群或来自一特异性血清型的腺病毒的中和抗体对决定选择的血清型也是一个重要参数(WO 00/70071)。由于亚群 B 病毒之间的相似性(见例如实施例 4 和 11)，期望本发明特别适用于亚群 B 的腺病毒。因此，本发明优选的实施方案涉及衍生自或基于亚群 B 中分类的腺病毒的腺病毒载体。人腺病毒的亚群 B 包含 Ad3、Ad7、Ad11、Ad14、Ad16、Ad21、Ad34、Ad35 和 Ad50。本发明优选的实施方案涉及衍生自或基于 Ad35 或 Ad11 血清型的重组腺病毒载体。除了针对特异性应用而选择血清型之外，可以使用所谓的嵌合腺病毒。这些嵌合腺病毒包含来自一或多个腺病毒血清型的编码包被蛋白如尾丝、五邻体或六邻体的部分或全部遗传序列，与来自其它血清型的剩余遗传信息（主要腺病毒载体部分）连接，其可用于降低主要腺病毒载体的免疫原性或改变主要腺病毒载体的组织向性(EP 0978566)。在此所用术语“主要”是指其为所述嵌合病毒提供大多数遗传信息，嵌合腺病毒因此包含在这种病毒的主要部分的血清型组中。本领域技术人员清楚当这些嵌合病毒面临相似的不稳定性问题时，本发明也可以用于这种嵌合腺病毒。可以例如期望包含 Ad35 序

列作为主要部分并包含衍生自或基于例如 Ad11 腺病毒的尾丝的嵌合腺病毒在增殖方面与针对 Ad35 重组腺病毒载体所报道的具有相似的不稳定性。因此，当在本申请中提及重组腺病毒时，嵌合腺病毒载体包含在本发明范围内。

本领域技术人员熟知生产和装配重组腺病毒载体所必需的元件(如前述; US patent 5,994, 128; Russell, 2000)。以病毒体形式生产 E1 缺失的重组腺病毒是在包装细胞中进行的, 该细胞也称作互补细胞。这种细胞反式 (in trans) 提供在所述重组腺病毒中缺少的生产重组病毒 (重组病毒体) 所必需的腺病毒的遗传信息。熟知的包装细胞是 293 细胞、911 细胞和 PER.C6TM 细胞(如前)。就大多数目的而言, 优选使用一种包装细胞和缺少引起同源重组而产生能复制的腺病毒的重叠序列的一种重组腺病毒载体(US patent 5,994,128)。在 Center for Applied Microbiology and Research 的 European Collection of Animal Cell Cultures 以保藏号 96022940 保藏的 PER.C6TM 因此是增殖重组腺病毒的一种非常合适的包装细胞。也已经设想减少产生能复制的腺病毒的其它方法, 涉及例如操纵腺病毒序列以降低包装细胞和载体中存在的序列之间的同源性(例如 Hehir et al., 1996; Robert et al., 2001 所述)。除了必需的 E1 区之外, 包装细胞还可包含其它腺病毒序列以在当在所用的重组腺病毒中功能性缺少例如部分或全部 E2、E4 等时互补其它腺病毒功能。包装细胞中的互补信息可以整合在基因组中, 或者作为染色体外拷贝存在于例如质粒、载体、粘粒等上。其它方法利用所谓的辅助病毒, 其包含在重组腺病毒中缺少的遗传信息。重组腺病毒载体也用作所谓的辅助病毒, 用于生产含有缺失大部分或全部腺病毒基因的基因组的重组腺病毒(gutless 载体或辅助依赖性腺病毒)。在这种 gutless 腺病毒的最后生产中, 需要避免辅助腺病毒的包装。本领域技术人员熟知实现这种方法, 例如在包装信号中遗传工程化的位点上使用位点特异性重组酶以缺失这种包

装信号。通常必需使用 CsCl 梯度分离从希望的 gutless 病毒中分离剩余的辅助病毒。当辅助和 gutless 病毒的基因组长度最大程度不同时，易于达到这个目的。因此，优选使用大的而不是小的辅助病毒。本领域技术人员清楚本发明可同样用于提高重组腺病毒的稳定性，通过使用具有升高的 pIX 表达的重组辅助病毒进行，这可以通过本发明中所述的方法实现。含有可用于互补重组腺病毒的遗传信息以产生重组病毒颗粒的任何细胞，包含在包装细胞的范围内。本领域技术人员清楚通过本发明获得的优势非依赖于所用的包装细胞。

编码 pIX 的遗传信息可以存在于重组腺病毒载体上，也可以不依赖于所述重组腺病毒载体而存在，这种病毒外遗传信息（extraviral genetic information）可以整合进基因组中或者作为染色体外拷贝存在于例如质粒、载体、粘粒等之上。将遗传信息导入包装细胞中可以根据多种方法进行，如通过 lipofectamin 转染、磷酸钙沉淀、病毒感染等方法进行。本领域技术人员熟知这种方法，而且用于导入遗传信息的方法就本发明范围不是关键的。本文所用的可表达形式的功能性 pIX 是指编码 pIX 的遗传信息，其与能驱动所述编码 pIX 的遗传信息在包装细胞中表达的启动子或其它调节序列可操纵地连接。将遗传信息导入包装细胞可以在导入重组腺病毒载体之前、同时或之后进行。发现 pIX 在基于 293 的包装细胞系中的组成型附加型表达互补 pIX 突变体腺病毒类型 5 的缺乏 (Caravokyri and Leppard, 1995)。然而，就这种应用而言，需要含有 EBNA1 表达盒的特殊附加型质粒，而且这种细胞系中腺病毒载体的增殖经受部分附加体非常可能成为重组腺病毒载体一部分的不利状况。因此，在本发明优选的实施方案中，编码功能性 pIX 的遗传信息存在于腺病毒载体上。

在减少产生能复制的腺病毒的重组量的尝试中，一些作者使用衍生自 Ad5 的突变的 pIX 启动子驱动的 B 群病毒 Ad7 的 pIX 基因以消除（含有 Ad5 衍生的序列）包装细胞与重组腺病毒载体的核酸之

间的重叠(Robert et al., 2001)。然而, 那些实验未提高病毒载体的稳定性, 而且在那些实验中未测定这种稳定性。在本发明中, 腺病毒载体中 pIX 的转录调节序列根据提高病毒的稳定性和/或提高病毒体外源遗传物质的容量的目的而加以改变。本发明证明了衍生自 Ad35 的重组腺病毒载体与具有内源(即 Ad35 衍生的)近端 pIX 上游序列的相应病毒相比更稳定/可携带更多外源遗传信息, 所述 Ad35 包含在衍生自 Ad5 的 Ad5 衍生近端 pIX 启动子控制下的 pIX 基因。因此, 本发明还提供了包含功能性 pIX 编码序列并在 E1 区中有至少一个缺失的一种重组腺病毒, 其中 pIX 编码序列在异源启动子的控制下, 而且其中所述重组腺病毒衍生自或基于除了腺病毒血清型 5 之外的腺病毒。在某些实施方案中, 所述异源启动子是一种非内源近端 pIX 启动子。在优选的实施方案中, 编码 pIX 的遗传信息衍生自或基于 Ad35 或 Ad11。在这种实施方案中, 优选的非内源 pIX 启动子是 Ad5 启动子。

另一方面, 本发明提供了可通过本发明的方法获得的一种重组腺病毒载体。这种重组腺病毒载体用于例如制备疫苗(WO 00/70071; WO 01/38362; WO 02/24730), 作为基因输送载体等。

针对这种重组腺病毒载体选择一种希望的主要血清型可以用于获得与常用的 Ad5 腺病毒载体相比组织向性改变的载体, 和/或比这种 Ad5 衍生的载体免疫原性低而可以被使用(WO 00/70071)。为产生重组腺病毒载体, 将转基因克隆进含有缺少缺失 E1 序列的腺病毒左侧部分和具有进行克隆的限制酶位点的一个质粒(衔接质粒(adapter plasmid))中。然后通过包含具有 5'端重叠序列的腺病毒右侧部分的粘粒与衔接质粒的 3'端同源重组而产生重组腺病毒载体(见本申请的实施例; WO 99/38362 中所述方法)。因此本发明的另一方面提供了一种重组核酸序列, 其包含腺病毒左侧 ITR, 包装信号、E1 区缺失的其它腺病毒序列、至少部分 E1B 55K 可读框及 pIX 编码序列。本

发明的再一方面提供了一种修饰的腺病毒 pIX 基因,其中编码 pIX 蛋白的遗传信息不是衍生自腺病毒血清型 5 或腺病毒血清型 7 pIX 编码序列。在优选的实施方案中,所述修饰的 pIX 基因包含一个异源启动子。本发明还涉及一种药物组合物,其包含根据本发明的或通过本发明的方法获得的一种重组腺病毒载体。所述药物组合物进一步包含一种可接受的药物载体,通常由制备药物领域的技术人员所应用。另外,本发明涉及一种治疗人体的方法,包括为人体施用本发明的重组腺病毒载体或者施用由本发明提供的一种药物组合物。

本发明进一步提供了一种重组腺病毒包装细胞,其包含根据本发明的一种重组腺病毒。在一个实施方案中,所述重组腺病毒包装细胞包含能互补所述重组腺病毒的 E1B 55K 缺乏的核酸,其中所述重组腺病毒包含的核酸分子包含编码提高 pIX 基因表达的 E1B 55K 基因产物的序列的一部分,附带条件是后者重组核酸分子不编码功能性 E1B 55K 基因产物,其中所述细胞和所述重组腺病毒不包含导致包含编码功能性 E1B 55K 蛋白的核酸的重组腺病毒形成的序列重叠。这个实施方案特别适用于防止包含额外的腺病毒功能的重组腺病毒的形成。

本发明进一步揭示解决与在 Ad 包装/互补细胞中减少非 C 群腺病毒载体的互补相关的某些难题的方法和手段。尽管在 Ad5 互补细胞系中存在功能性 Ad5 E1B-55K 表达,但发现当腺病毒主链是非 C 群腺病毒来源时仅可以产生非常低滴度的腺病毒载体;这个发现意味着 E1B-55K 与另一种(病毒)蛋白的相互作用中的血清型特异性。本发明揭示了这种血清型依赖性可以通过提供与互补细胞系提供的 E1B-55K 蛋白相容的 E4-orf6 蛋白而避免。正如本发明所揭示的, E1B-55K 和 E4-orf6 形成参与抑制将细胞 mRNA 从核转运至胞质的一种复合物,该复合物也参与刺激病毒 mRNA 从核转运至胞质(参见 Leppard 1997 和 1998 所述)。本发明人已经观测到包装细胞中病毒载

体的适当互补需要存在相容的 E1B-55K 和 E4-orf6 基因产物。如果包装细胞包含编码互补应包装的载体未提供的功能的蛋白质的某些序列,则包装细胞也称作互补细胞。在此所用术语“相容”是指可利用的 E1B-55K 基因产物之间的一种复合物能与可利用的 E4-orf6 基因产物形成一种功能性复合物,在某种意义上这种蛋白复合物支持病毒复制、增殖和/或包装为与野生型情况相似或者与当重组腺病毒血清型 5 载体在 Ad5 互补细胞系如 293 或 PER.C6TM 上生产时发现的情况相似的水平。如果在其中病毒形成的生产期间包装细胞包含相容的至少 E1B-55K 蛋白和 E4-orf6 蛋白,则在包装细胞中的载体复制是有效的。优选地, E1B-55K 和 E4-orf6 序列来自相同腺病毒亚群(如 A、B、C、D、E 或 F)内的腺病毒。更优选地, E1B-55K 和 E4-orf6 序列来自相同血清型。由于本领域可利用能支持亚群 C 如血清型 5 的腺病毒生长的确立细胞系,甚至更优选 E1B-55K 和 E4-orf6 基因衍生自腺病毒血清型 5。本领域技术人员知道相容性可以在腺病毒载体生产领域的技术人员已知的互补测试或分析中确定。本领域技术人员也知道本发明也可用于在任何互补细胞系上生产任何腺病毒血清型,只要 E1B-55K 和 E4-orf6 蛋白是相容的即可。

进一步观测到与互补细胞系中 E1B “匹配”的 E4-orf6 基因产物可以由腺病毒载体提供,通过将选择的腺病毒载体中的 E4-orf6 用与包装细胞系中存在的 E1B 基因相容的 E4-orf6 编码序列置换而进行。令人惊奇地发现这种修饰对载体的稳定性、复制、包装、装配和生产无不利作用。

本发明的一特异方面是现在能在通常用于生产腺病毒血清型 5 或者亚群 C 的其它血清型如血清型 1、2 和 6 的细胞系上有效生产与亚群 C 的那些血清型不同的腺病毒血清型。本发明提供了生产非 C 群腺病毒而不需要单独提供具有 E4-orf6 的互补(包装)细胞的方法,因为与互补 E1B-55K 序列相容的 E4-orf6 序列掺入腺病毒主链中。

本发明提供了包含第一种血清型的腺病毒的结构和非结构元件的一种重组腺病毒载体，其中所述载体进一步包含编码功能性 E4-orf6 蛋白的一个序列或其功能部分、衍生物和/或类似物，其中所述序列选自以下一组：a)衍生自与所述第一种血清型不同的第二种血清型的腺病毒的 E4-orf6 编码序列；b)衍生自包含一或多个密码子的缺失、突变、添加和/或取代的所述第一种血清型的腺病毒的 E4-orf6 编码序列；及 c)包含一个融合体的 E4-orf6 编码序列，所述融合体是衍生自与所述第一种血清型不同的第二种血清型的 E4-orf6 编码序列的一部分与衍生自第三种血清型的 E4-orf6 编码序列的一部分的融合体，其中所述第三种血清型与所述第一种血清型可以相同或不同。在一个实施方案中，本发明提供了一种重组腺病毒载体，其中所述第一种血清型与所述第二种血清型来自不同的腺病毒亚群。在一个优选的实施方案中，提供了一种本发明的重组腺病毒载体，其中所述第一种血清型来自除了亚群 C 之外的一个亚群，而且其中所述 E4-orf6 编码序列衍生自亚群 C 的腺病毒血清型。更优选本发明的重组腺病毒，其中所述第一种血清型来自亚群 B，所述第二种血清型来自亚群 C。甚至更优选地，所述 E4-orf6 编码序列衍生自腺病毒血清型 5。本发明的重组腺病毒包含结构和非结构元件。结构元件的实例是编码壳体蛋白如尾丝、六邻体和五邻体蛋白的基因以及其自身基因产物。非结构元件的实例是早期基因，其在感染细胞时表达而且当感染周期进行时被下调。非结构元件的其它实例是编码在复制期间活性蛋白质的基因，如 pol 和 pTP。

核酸中的一些变化如缺失、突变、添加和/或取代一或多个密码子可以显著改变编码的基因产物的结构和/或功能性。本发明因此还涉及 E4-orf6 编码序列，其衍生自与携带例如结构和非结构元件的基因的主链相同的腺病毒血清型，但其中 E4-orf6 编码序列已经突变由此其变得与生产腺病毒载体的互补细胞中存在的 E1 蛋白（如

E1B-55K 基因产物) 相容。可以将密码子完全改变以改变编码的氨基酸, 但其也可以部分突变以改变编码的氨基酸。核酸的缺失可以导致丧失一或多个编码的氨基酸, 同时这也可以导致移码。本发明还涉及腺病毒核酸中存在的 E4-orf6 序列, 其包含衍生自不同血清型的不同部分, 其中可以使用来自一个血清型的使蛋白质在相容性中起作用的结构域, 而 E4-orf6 序列的剩余部分或其一部分衍生自另一种 (不) 相关的血清型 (例如来自相同亚群, 来自不同亚群或者来自不同物种或其组合)。因此应用相容的 E4-orf6 融合蛋白也在本发明的范围内。这种融合蛋白可以是一些核酸的产物。

本领域技术人员意识到除了所有人腺病毒之外, 本领域还鉴别许多非人腺病毒。显然也可以应用非人腺病毒以达到与本发明揭示的相同结果。技术人员清楚 E1B-55K 与 E4-orf6 之间的相容性可以非限于人腺病毒, 而且来自特异于不同物种的腺病毒的元件也可以是相容的。因此, 本发明的另一方面是可以在本领域可利用的已知包装细胞系上生产高滴度的非人腺病毒, 只要 E1B-55K 与 E4-orf6 基因产物是相容的即可。使用本发明的方法和手段可以生产的非人腺病毒的非限制性实例是狗、牛、绵羊、青蛙、猪、马、猴和鸟类腺病毒。因此在此所用的血清型超出物种限制性血清型。如果例如一种猴腺病毒 E4-orf6 基因产物与包装细胞提供的 E1B-55K 相容, 则这种组合包含在本发明范围内。同样, 当不同的血清型或者衍生自例如与包装细胞的 E1B 基因相容的人和鸟类腺病毒的 E4-orf6 序列之间的融合体应用时, 则这种特殊组合也包含在本发明范围内。

本发明提供了一种生产包含第一种血清型的腺病毒的结构和非结构元件的重组腺病毒载体的方法, 所述方法包括如下步骤: a) 将腺病毒的必需元件提供给携带可表达形式的衍生自第二种血清型腺病毒的 E1B-55K 编码序列或其功能部分、衍生物和/或类似物的互补细胞, 以使得可以通过所述互补细胞装配所述重组腺病毒载体, 其中所

述元件包含与所述第二种血清型不同的所述第一种血清型的至少一些结构和非结构元件及编码功能性 E4-orf6 蛋白的一个序列或其功能部分、衍生物和/或类似物，其与所述互补细胞中所述可表达的 E1B-55K 蛋白相容；b)在生产和装配腺病毒载体的条件下在培养基中培养所述互补细胞；及 c)从所述培养基和/或互补细胞中收获如此生产的重组腺病毒载体，其中编码相容的 E4-orf6 蛋白的序列存在于如此生产的重组腺病毒载体中。

在本发明的一个方面，提供了一种根据本发明的方法，其中所述 E4-orf6 编码序列选自以下一组：i) 衍生自所述第二种血清型的腺病毒的 E4-orf6 编码序列；ii)衍生自与所述第一种和第二种血清型不同的第三种血清型的腺病毒的 E4-orf6 编码序列；iii)衍生自包含缺失、突变、添加和/或取代一或多个密码子的所述第一种血清型的腺病毒的 E4-orf6 编码序列；及 iv)包含一个融合体的 E4-orf6 编码序列，所述融合体是衍生自第三种血清型的 E4-orf6 编码序列的一部分与衍生自所述第二种血清型腺病毒的 E4-orf6 编码序列的一部分的融合体，其中所述第三种血清型与所述第一种血清型可以相同或不同。在一个优选的实施方案中，所述第一种和所述第二种血清型来自不同的亚群。在一个更优选的实施方案中，所述第二种血清型是亚群 C 的腺病毒血清型。在一个更优选的实施方案中，所述第二种血清型是腺病毒血清型 5。在本发明的其它特殊方面中，所述第一种血清型是亚群 B 的腺病毒血清型。优选地，所述第一种血清型选自由腺病毒血清型 11、14、16、21、34、35 和 50 组成的组中。

本领域已知用于互补重组腺病毒载体的一些包装细胞以生产、装配和包装腺病毒颗粒。这种细胞系的非限制性实例是 HEK-293、911 和 PER.C6TM 细胞。优选使用经证实输送高滴度腺病毒原种的细胞系。这种细胞系以稳定形式表达 E1 蛋白，这因此是本发明使用细胞系和方法的一个优选方面，其中所述 E1B-55K 编码序列整合进所述互补

细胞的基因组中。更优选的是衍生自原代二倍体人体细胞或其祖细胞的互补细胞。甚至更优选地，所述互补细胞衍生自原代人成视网膜细胞、原代人胚胎肾细胞、原代人神经元细胞或者原代人羊膜细胞（primary human amniocyte）。特别优选的是互补细胞在本发明的方法中的应用，其中所述互补细胞是 PER.C6TM 细胞或其衍生物。本领域熟知当使用与 PER.C6TM 细胞提供的核酸不重叠的腺病毒 DNA 时，PER.C6TM 细胞不产生能复制的腺病毒。本领域使用的许多腺病毒载体缺少 E1 区，因此在本发明的一个方面中，所述互补细胞包含整合进其基因组的编码至少一种腺病毒 E1A 蛋白的核酸。优选地，所述编码至少一种腺病毒 E1A 蛋白的核酸衍生自与亚群 B 不同的亚群的腺病毒血清型。更优选地，所述编码至少一种腺病毒 E1A 蛋白的核酸衍生自亚群 C 的腺病毒血清型。特别优选的实施方案是其中所述编码至少一种腺病毒 E1A 蛋白的核酸衍生自腺病毒血清型 5。在本发明的另一个实施方案中，提供了一种方法，其中所述 E4-orf6 编码序列及所述 E1B-55K 编码序列衍生自不同的腺病毒血清型，其中所述不同的腺病毒血清型是相同腺病毒亚群的成员。优选地，所述 E4-orf6 编码序列和所述 E1B-55K 编码序列衍生自不同的腺病毒血清型，其中所述不同的腺病毒血清型均是亚群 C 的成员。更优选地，所述 E4-orf6 编码序列和所述 E1B-55K 编码序列衍生自相同的腺病毒血清型。特别优选这样的方法，其中所述 E4-orf6 编码序列和所述 E1B-55K 编码序列衍生自腺病毒血清型 5。

本发明还涉及这样的方法，其中腺病毒载体可以使用适当的互补/包装细胞和感兴趣的腺病毒载体生产。为进行一种有效的生产程序，应用具有适当腺病毒载体的正确细胞是有益的。因此，本发明还涉及一种试剂盒（kit of parts）（也称为包装系统），其包含：a) 生产包含第一种血清型腺病毒的结构和非结构元件的重组腺病毒载体的互补细胞，所述细胞携带可表达形式的衍生自第二种血清型腺病毒的

E1B-55K 编码序列或其功能部分、衍生物和/或类似物；及 b)一或多个可复制的核酸载体，所有必需的腺病毒元件如可以通过所述互补细胞装配所述重组腺病毒载体，其中所述元件包含来自与所述第二种血清型不同的所述第一种血清型的腺病毒的至少一些结构和非结构元件及一个编码与所述互补细胞中所述可表达的 E1B-55K 蛋白相容的功能性 E4-orf6 蛋白或其功能部分、衍生物和/或类似物的序列。优选地，使用一种试剂盒，其中所述 E4-orf6 编码序列选自以下一组：a) 衍生自所述第二种血清型的腺病毒的 E4-orf6 编码序列；b)衍生自与所述第一种和第二种血清型不同的第三种血清型的腺病毒的 E4-orf6 编码序列；c) 衍生自包含一或多个密码子的缺失、突变、添加和/或取代的所述第一种血清型的腺病毒的 E4-orf6 编码序列；及 d)包含一个融合体的 E4-orf6 编码序列，所述融合体是衍生自第三种血清型的 E4-orf6 编码序列的一部分与衍生自所述第二种血清型腺病毒的 E4-orf6 编码序列的一部分的融合体，其中所述第三种血清型与所述第一种血清型可以相同或不同。

本发明特别用于复制 E1 缺失的嵌合腺病毒，其几乎全部衍生自除了腺病毒 5 之外的血清型。这种载体仅需要为其提供编码腺病毒 5 E4orf6 或其功能部分、衍生物和/或类似物的核酸。一旦如此，该载体可以在正常腺病毒 5 E1 互补包装细胞系上有效复制。该载体的稳定性得以改良，而且该载体可以互补 E1A 和 E1B 中的缺失。通过为这种载体提供编码腺病毒 E4orf6 的核酸，当在 293 或 911 细胞上生长时，在不存在额外的野生型污染问题的情况中，可以有效进行噬斑纯化及良好生产。当然，在 PER.C6 中也可以通过其它方式防止野生型腺病毒污染。

本发明的重组载体的另一个优点是不需要从整合进基因组的核酸中产生特殊的细胞系腺病毒 E4-orf6。尽管存在这类细胞系，但如扩大生产等生产参数和/或调节问题的解决还未达到如 PER.C6TM 细

胞系相同的程度。这至少部分是由于越来越多的外源基因插入细胞系的基因组中，难以保持所有外源序列的稳定性（或其表达）所致。在本发明中，发现至少一些与基于非腺病毒血清型 5 的载体的低产量及来自亚群 B 如腺病毒血清型 7、11 和 35 的腺病毒血清型的载体在腺病毒血清型 5 包装细胞上的稳定性相关的问题可以用本发明的重组腺病毒载体克服。

应清楚本发明的两个主要方面可以组合以提供可在易于利用的常规包装细胞上生长的稳定的重组腺病毒。本发明因此提供了包含 E1 区中有至少一个缺失的重组核酸分子的一种重组腺病毒，特征在于所述重组核酸分子中存在编码提高 pIX 基因表达的 E1B 55K 基因产物的序列的至少一部分，附带条件是所述重组核酸分子不编码功能性 E1B 55K 基因产物；所述重组腺病毒进一步包含第一种血清型腺病毒的结构和非结构元件，其中所述腺病毒进一步包含编码功能性 E4-orf6 蛋白或其功能部分、衍生物和/或类似物的一个序列，其中所述序列是衍生自与所述第一种血清型不同的第二种血清型的腺病毒的 E4-orf6 编码序列。另外或者除了具有至少一部分 E1B 55K 序列之外，所述核酸可具有由一个异源启动子调节的一个 pIX 基因产物。优选地，所述第二种血清型及因此的 E4-orf6 序列衍生自 C 群腺病毒，更优选衍生自腺病毒血清型 5。优选地，所述第一种血清型来自 C 群之外的一个亚群，优选亚群 B 血清型如 Ad11、Ad14、Ad16、Ad21、Ad34、Ad35 或 Ad50。在一个实施方案中，重组腺病毒进一步包含编码非腺病毒蛋白、多肽或肽的一个序列。当重组腺病毒中的 E4-orf6 与 Ad5 E1 基因产物相容时，例如当所述腺病毒中的 E4-orf6 衍生自 Ad5 时，这种重组腺病毒是稳定的并可以在易于利用的包装细胞上生长，所述包装细胞如含有 Ad5 E1 的包装细胞，优选 PER.C6TM 细胞。防止能复制的腺病毒或含有功能性 E1 蛋白的腺病毒颗粒产生是本领域中意识到的一个问题，并且已经通过防止腺病毒中存在的 E1 序列

与包装细胞中存在的序列重叠而解决(US patent 5,994,128)。在本发明的实施方案中,例如包含通过影响 pIX 表达而提高病毒稳定性的 E1B 55K 序列的 Ad35 衍生的腺病毒,组合包含来自 Ad5 的 E1 区的包装细胞,不导致伴随包含编码功能性 E1B 55K 蛋白的核酸的重组腺病毒伴随形成的同源重组。因此本发明的另一方面提供了一种包装系统,其包含一种包装细胞和一种包含第一种血清型的腺病毒的结构和非结构元件的重组腺病毒,其中所述包装细胞表达衍生自第二种血清型的腺病毒的编码至少 E1B-55K 蛋白或其功能部分、衍生物和/或类似物的核酸,其中所述重组腺病毒可以在所述包装细胞中复制以产生稳定的重组腺病毒,所述腺病毒包含在 E1 区有一个缺失的核酸分子并进一步包含一部分编码 E1B-55K 基因产物的序列,所述核酸进一步包含编码与所述包装细胞中的所述可表达的 E1B-55K 蛋白相容的功能性 E4-orf6 蛋白或其功能部分、衍生物和/或类似物的序列。优选所述第一种血清型是 Ad 35 或 Ad11。优选所述第二种血清型是 Ad5。更优选地,所述包装细胞是 PER.C6TM。优选地,编码功能性 E4-orf6 蛋白或其功能部分、衍生物和/或类似物的所述序列衍生自第一种血清型的腺病毒。这个系统可以使重组腺病毒复制而不伴随含有功能性 E1 蛋白的腺病毒产生。或者,所述核酸可以含有在外源启动子控制下的 pIX 编码序列。本发明的另一方面是提供一种生产稳定的包含第一种血清型腺病毒的结构和非结构元件的重组腺病毒的方法,其中所述重组腺病毒包含衍生自其核酸分子在 E1 区具有缺失的腺病毒的重组核酸分子,并包含衍生自至少一部分编码提高 pIX 蛋白表达但不引起来自所述核酸分子的功能性 E1B-55K 蛋白表达的 E1B-55K 基因产物的序列和/或具有在异源启动子控制下的 pIX 编码序列,所述方法包含如下步骤: a) 将腺病毒的必需元件提供给可表达形式的衍生自第二种血清型腺病毒的 E1B-55K 编码序列或其功能部分、衍生物和/或类似物的互补细胞,以使得可以通过所述互补细胞装配所述重组腺

病毒载体,其中所述元件包含与所述第二种血清型不同的第一种血清型腺病毒的至少一些结构和非结构元件及编码与所述互补细胞中所述可表达的 E1B-55K 蛋白相容的功能性 E4-orf6 蛋白或其功能部分、衍生物和/或类似物的一个序列; b)在生产和装配重组腺病毒的情况下在培养基中培养所述互补细胞; 及 c)从所述培养基和/或互补细胞中收获如此生产的重组腺病毒。本发明进一步提供了本发明的重组腺病毒在治疗人或动物、免疫接种、基因治疗方面及制备治疗疾病或失调的药物中的应用方法。本发明还提供了包含本发明的腺病毒的药物制品。

现在通过一些实施例例证本发明,这些实施例非限制本发明的范围。

实施例

除非特别说明均使用标准分子生物学方法(例如 Sambrook and Russel, 2001)。引物序列在表 IV 中提供。

实施例 1: 针对 E1 缺失的 Ad35 病毒的基于 PER.C6TM 的互补细胞系

在补加最多 10% 的 FBS (Gibco BRL) 和 10mM MgCl₂ (4.9 M 原液, Sigma) 的 PER.C6 培养基(DMEM) (Gibco BRL) 中, 将 PER.C6 细胞以 3×10^6 个细胞/皿的密度接种于 10cm 培养皿中。两天后, 将 9 个培养皿用 1 μ g ScaI 线性化的 pIG35.55K DNA (如前述) 转染及将 9 个培养皿用 1.5 μ g ScaI 线性化的 pIG35.55K DNA 转染。单独的对照培养皿用 1 或 1.5 μ g ScaI 线性化的 pAdApt35.LacZ (WO 00/70071 所述) 转染以监测转染效力并用 1 或 1.5 μ g ScaI 线性化的 pcDNA.nlsLacZ 转染。pcDNA.nlsLacZ (W099/55132 所述) 是一种基于 pcDNA3 的质粒(Invitrogen), 具有由 CMV 启动子驱动的 nlsLacZ 基因。pcDNA.nlsLacZ 还含有一个 neo^r 表达盒。作为阴性对照, 将一个

额外的培养皿用线性化的 pAdApt35.LacZ 转染,这是缺少 neo^r 选择基因的一种构建体。所有转染均用 LipofectAmine 转染试剂盒 (Invitrogen/Life Technologies) 根据厂商说明书使用 5 ml LipofectAmine 试剂/ μ g DNA 进行。将细胞用所述转染混合物温育 4 小时,之后将该培养基用 PER.C6 培养基更换。第 2 天,除了用 1 或 1.5 μ g pAdApt35.LacZ 转染的两个培养皿之外,将培养基用含有 0.5 mg/ml G418 (Gibco BRL) 的培养基更换。前者用于监测在转染两天后的 LacZ 表达。在将这些培养物经 X-gal 染色后,在用 1.5 μ g DNA 转染的培养皿中在略微更蓝的细胞为大约 40% 时评估转染效率。在剩余的转染的培养皿中每周更新两次选择培养基。在第一次加入选择培养基之后的两周内,阴性对照培养皿(用 1.5 μ g pAdApt35.LacZ 转染)中大多数细胞死亡。在用 pcDNA. nlsLacZ 转染的培养皿中,可见明显的细胞克隆。由于用 pIG35.55K 转染的细胞似乎对 G418 更具抗性,因此在转染后 3 周将浓度提升至 0.75 mg/ml。在 3 和 7 天后,从用 pIG35.55K 转染的培养皿中挑取共 196 个细胞克隆并接种于 96 孔平板的各个孔中。

将从两个用 1 μ g pIG35.55K DNA 转染的 10cm 培养皿中挑取集落后剩余的细胞经胰蛋白酶消化,集合 (pooled) 并扩展以提供集合 (pool) PER55K(1.0)。对用 1.5 μ g 转染的两个培养皿同样处理。将 PER55K(1.0) 细胞集合扩展并以 3.5×10^6 个细胞/瓶的密度接种于 4 个 T25 培养瓶中,进行转染以测试病毒产生。另外,以相同密度将亲代 PER.C6 细胞接种于 3 个 T25 培养瓶中。将 pAdApt35.eGFP (一种基于 pAdApt35IP1 (WO 00/70071 中所述) 的衔接质粒,但也含有作为衍生自 pIPspAdapt.eGFP 的 HindIII-BamHI 片段克隆进 pAdApt35IP1 中的绿色荧光蛋白作为标记基因(WO 02/24933 中所述)) 用 PacI 消化以从质粒主链中释放腺病毒序列。将 pWE.Ad35.pIX-rITR (WO 00/70071 中所述) 用 NotI 消化以从粘粒主链中释放腺病毒序列。将具有 PER.C6

细胞的 2 个培养瓶和具有 PER55K(1.0)细胞的 2 个培养瓶均用 2 μ g 消化的 pAdApt35.eGFP 和 6 μ g 消化的 pWE.Ad35.pIX-rITR 转染。将每种细胞系的 1 个培养瓶用 8 μ g pAdApt35.LacZ 转染以监测转染效力。具有 PER55K(1.0)细胞的剩余的培养瓶作为阴性对照并如其它培养瓶同样处理，但不接受转染混合物。所有转染均用 LipofectAmine(Invitrogen/Life Techn.)根据厂商说明书使用针对每次转染的共 8 μ g DNA 和 40 μ l LipofectAmine 试剂。在温育 4 小时后将转染混合物除去并加入新鲜培养基。在接种细胞后一天进行转染，再两天后将 T25 培养瓶中的细胞移至一个 T80 培养瓶中，LacZ 对照转染除外。在温和固定 (mild fixation) 之后用 X-gal 溶液染色。用染色溶液温育 5 小时后，在这两个培养瓶中估计蓝色细胞的百分比为大约 90%，示出这两种细胞系均良好转染。在移至 T80 培养瓶中 4 天后，转染的 PER55K (1.0)培养物示出起始 CPE (致细胞病变作用，表明病毒复制)为接近 100 事件 (events) /培养瓶。将未转染的 PER55K(1.0)细胞生长至铺满，无 CPE 迹象。在转染的 PER.C6 培养物中，在铺满的细胞单层中仅观测到三个 CPE 事件。再三天后，转染的 PER55K (1.0)培养物示出完全的 CPF，所有细胞均是圆形的并成块分散。相反，在 PER.C6 培养物中，很少量 CPE 不进展，所有细胞仍是单层。这证实了早期的观测结果，即 E1 缺失的基于 Ad35 的病毒的产生对 PER.C6 非常无效。正如所期望的，未转染的 PER55K(1.0)培养物示出无 CPE 的一铺满单层。收获具有完全 CPE 的 PER55K(1.0)培养瓶中的细胞和培养基并进行两次冷冻/解冻循环，之后在台式离心机中在 3000 rpm 离心 10 分钟除去细胞碎片。所得粗制裂解物之一用于感染 T175 培养瓶中 PER55K(1.0)细胞的新鲜培养物(1.5 ml/瓶)。4 天后在完全 CPE 时收获细胞和培养基。这示出感染的病毒已经在初始转染中形成。GFP 表达通过荧光显微镜检测粗制裂解物感染的 A549 细胞而证实。然后如下所述使用该粗制裂解物分析各个克隆中 E1 缺失的

Ad35.AdApt.eGFP 病毒的互补。

将从 pIG35.55K 转染的 PER.C6 细胞中挑取的前述克隆扩展并测试其维持 Ad35.AdApt.eGFP 复制的能力。为此将所述克隆以两种密度接种于 6 孔平板中，1 天后用 15 ml 上述粗制裂解物感染。随后监测 CPE。以此方式测试的 146 个克隆中，19 个克隆在第 2 或 3 天出现完全 CPE，68 个克隆在第 5 或 6 天出现完全 CPE。剩余的克隆仅呈现部分 CPE 或者示出少量非进展性事件。后者从作为阴性对照的 PER.C6 细胞中不能辨别。

基于这些结果，选择 24 个克隆，在用 pAdApt35.GFP 衔接质粒和大 pWE.Ad35.pIX-rITR 粘粒克隆转染后对其进一步筛选产生重组 E1 缺失的病毒的能力。为此将克隆铺板于 T25 培养瓶中并用 2 μ g 的衔接质粒和 6 μ g 的主链质粒使用上述 LipofectAmine 进行转染。在转染 2 天后，将细胞移至 T80 培养瓶中以防止培养物过度铺满。在 24 个克隆中，在经过移至 T80 后 3 天有 5 个克隆出现完全 CPE，另有 13 个克隆随后出现完全 CPE。剩余的 6 个克隆示出无 CPE 或者仅开始 CPE。对比之下，在移至 T80 培养瓶之后 4—6 天，PER.C6 细胞上的 E1 缺失的 Ad5 载体的常规产生通常导致完全 CPE。

这示出新克隆有效互补 E1 缺失的腺病毒载体。上述克隆（16 个克隆）之一用于产生及生产多批次的含有不同转基因的 E1 和 E1/E3 缺失的 Ad35 病毒。为此，将得自如上述转染但使用不同衔接质粒的粗制裂解物中的病毒在新细胞系中进行噬斑纯化。对单一噬斑测试转基因活性，然后在 4—8 个三层培养瓶(3 $\times$ 175cm/瓶)中扩大培养规模生产。在完全 CPE 时收获细胞并如针对腺病毒同样常规将病毒释放并纯化。病毒颗粒的量通过 HPLC(Shabram et al., 1997)确定。表 I 示出在具有 PER55K 克隆 # 16 细胞的三层培养瓶上 E1 和 E1/E3 缺失的 Ad35 病毒的中等规模生产的下游处理 (downstream processing) 后的产量。纯化的病毒颗粒的量与在 PER.C6 细胞上基于 Ad5 的载体的

产量相似。

我们推断已经产生了有效互补完全 E1 缺失的基于 Ad35 的载体的多个细胞系。因此，Ad5 互补细胞系中 Ad35 E1B-55K 表达促进 Ad35 载体的复制。

实施例 2: pWE. Ad. pIX-rITR Δ E3 的产生

人腺病毒的早期区-3 含有干扰宿主对腺病毒感染的免疫应答的蛋白质的多个编码区。当腺病毒载体用作疫苗载体时，这种干扰是不希望的。因此，我们构建了一种缺少 E3 区的 Ad35 主链粘粒。

为此，将构建体 pBr. Ad35. PRn (图 15; EP1054064 中实施例 13 所述)用 *Stu*I 和 *Mlu*I 消化并使用琼脂糖酶(Roche)根据厂商说明书将 17.3 kb 载体片段从低解链点(LMP)凝胶中纯化。接着，使用引物 35E3for 和 35E3rev 在 pBr. Ad35. PRn 上产生 PCR 片段。为进行扩增，根据厂商说明书使用 *Pwo* DNA 聚合酶(Roche)进行，程序设定为：94 °C 2 分钟，30 次循环(94 °C 30 秒，58 °C 30 秒及 72 °C 1 分钟)及最后在 68 °C 温育 8 分钟。将 833 bp PCR 产物使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(Qiagen)纯化并用 *Mlu*I 和 *Stu*I 消化。消化的 DNA 使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒(Qiagen)从凝胶中纯化。连接这两个分离的片段并转化进 DH5 α 感受态细胞(Invitrogen/Life Technologies)中以产生 pBr.Ad35.PRn Δ E3 (图 25)。该质粒通过限制分析进行检测并对 PCR 扩增的插入体进行测序。然后将 E3 缺失克隆进 pWE.Ad35.pIX-rITR 粘粒主链中。

为此，将 pWE.Ad35.pIX-rITR 用 *Pac*I 消化并将 DNA 通过用异丙醇沉淀而纯化并用 70% EtOH 洗涤。在 milliQ 水中再悬浮之后，将该 DNA 用 *Swa*I 消化并将含有 22.8 kb 载体的片段使用上述琼脂糖酶从 LMP 凝胶中纯化。将构建体 pBr.Ad35.PRn Δ E3 以相同方式用 *Pac*I 和 *Swa*I 消化并也使用琼脂糖酶分离 16.6 kb 片段。将这两个分离的片

段连接, 每个片段使用 0.5-0.6 μ g。然后将连接的片段使用 λ -噬菌体包装提取物(Stratagene)根据厂商说明书进行包装并与 STBL-2 细胞混合。将细菌铺板于 LB+Amp 平板上并分析所得菌落中正确构建体的存在情况。这样提供了构建体 pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3 (图 1)。E3 缺失从 Ad35 序列的第 27648 位核苷酸延伸至第 30320 位核苷酸 (WO 00/70071 中所述) 并因此跨越 2.6 kb 的区域。

NotI 消化的 pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3 和 pIPsp-1 (New England Biolabs)消化的 pAdApt35.eGFP 在 PER55-克隆 #16 细胞 (如前述) 上的共转染产生表达 GFP 的基于 Ad35 的病毒。在从这些病毒中分离病毒 DNA, E3 区的 PCR 扩增示出正如所期望的该病毒缺失 E3 序列的 2.6 kb。

实施例 3: 包装 E1 缺失的基于 Ad35 的载体大小的限制

含有不同插入体的基于 Ad35 的 E1 缺失的和 E1/E3 缺失的载体通过用以下转染的 PER55K-克隆 #16 细胞产生(见实施例 1 所述)

1.5 μ g 的携带用 PacI 或 pIPsp-1 酶消化的特异性转基因的 Ad35 衔接质粒转染以从所述质粒载体序列中释放腺病毒插入体及,

4.5 μ g 经 NotI 消化的 pWE. Ad35.pIX-rITR 或者用 NotI 酶消化的 pWE. Ad35.pIX-rITR Δ E3 进行转染。

衔接质粒的右侧和主链质粒的左侧末端含有介导重组事件的同源序列, 其产生完整的 E1 缺失的病毒基因组(如 WO 00/70071 所述)。

针对每组构建体使用 30 μ l Lipofectamine 试剂(Invitrogen/Life Technologies)根据厂商说明书进行转染。将转染混合物加入于 T25 培养瓶中 70%铺满的 PER55K 克隆 16 细胞中。对以下组合进行转染:

- 1.pAdApt35IP1 + pWE. Ad35. pIX-rITR
- 2.pAdApt35IP1 + pWE. Ad35.pIX-rITR Δ E3
3. pAdApt35eGFP + pWE. Ad35. pIX-rITR

4. pAdApt35eGFP + pWE. Ad35.pIX-rITR Δ E3

5.pAdApt35Luc + pWE. Ad35. pIX-rITR

6.pAdApt35Luc + pWE. Ad35.pIX-rITR Δ E3

7.pAdApt35LacZ + pWE. Ad35. pIX-rITR

8.pAdApt35LacZ + pWE. Ad35.pIX-rITR Δ E3

将衔接质粒用 pIPsp-1 酶消化以从质粒载体主链中释放腺病毒序列。将 pWE.Ad35.pIX-rITR 和 pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3 用 NotI 消化之后出于同样原因进行转染。衔接质粒及 pWE.Ad35.pIX-rITR 主链粘粒的产生如先前 WO 00/70071 所述。pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3 的产生如前文所述。

在转染两天后, 将细胞传代至 T80 并进一步温育直至获得完全 CPE。在观测到完全 CPE 后收获细胞和培养基。将该混合物进行一次冷冻/解冻循环并在 1500 rpm 旋转 15 分钟以沉淀细胞碎片, 之后收集上清。将以此方式获得的粗制裂解物用于分离病毒 DNA。为此, 将 275 μ l 粗制裂解物与 10 μ l 的 10mg/ml DNaseI 在 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。随后加入 6.0 μ l 0.5 M EDTA (pH 8.0), 7.5 μ l 20% SDS 和 1.5 μ l 20 mg/ml 蛋白酶 K 并涡旋混合。然后将此混合物在 50 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。最后, 使用 GeneClean Spin 试剂盒(Bio 101, Inc.)分离病毒 DNA。在 20 μ l milliQ H₂O 中洗脱病毒 DNA 之后, 转基因区域通过 PCR 扩增进行分析。为此, 使用引物 AdApt35CMVF 和 35pIXR。使用 Taq DNA 聚合酶(Invitrogen)用 2 μ l 分离的病毒 DNA 进行扩增。反应混合物含有 5 μ l 10 $\times$ 缓冲液(Invitrogen), 2 μ l 50mM MgCl₂, 5 μ l 2mM dNTPs, 3 μ l 每种引物(10 μ M 原液)及 2.5 单位的 Taq 酶, 总体积为 50 μ l。程序设定为 94 $^{\circ}$ C 2 分钟, 随后 30 次 (94 $^{\circ}$ C 30 秒, 60 $^{\circ}$ C 30 秒及 72 $^{\circ}$ C 4 分钟)循环。对照反应是对 5ng 衔接质粒进行。在完成 PCR 之后, 将 5 μ l 反应物加样于凝胶上进行分析。图 2 示出了上述转染的结果。引物从 CMV 启动子的 5'端至 pIX 编码区的 5'端扩增序列。从图 2 中可以看

出, 没有转基因或具有 GFP 插入体的病毒示出期望的条带 (与对照质粒相对比; 针对每个病毒的泳道 PL)。可见较小片段具有较大插入体, 荧光素酶和 LacZ, 这些缺失在总长度较大的病毒中更明显 (与有或无 E3 的 LacZ 或 Luc 病毒相对比)。因此, 基因组长度的增加与转基因区域中缺失的出现相关。Ad35.AdApt.eGFP 和 Ad35.AdApt.LacZ Δ E3 的总基因组长度分别为 33.7 和 33.4 kb (如图 2 所示), 这个事实与缺失仅发现在 LacZ 病毒样品中的结果相似, 表明前者 E1 区的序列或插入体的大小也可以影响缺失的出现。

实施例 4: 腺病毒血清型 5 和 35 的 pIX 基因区的序列对比

重组 Ad35 病毒的基因组长度增加在转基因区域中出现缺失的发现可以提示, 依此类推在 pIX-缺陷的 Ad5 病毒中(Ghosh-Choudhury et al., 1987), 存在壳体稳定性的问题。可以产生总长度为 36.7 kb 的 Ad35.E1B+.AdApt.Luc 病毒(其中 E1A 序列由 AdApt. Luc 盒置换)的事实表明 E1B 的缺失起作用。这也许是通过 E1B 蛋白之一的自身功能或者通过这个区域中未知的影响其它腺病毒蛋白表达的调节序列的功能所致。我们的知识还未描述 E1B 蛋白自身影响腺病毒的包装能力。然而, 已经描述了 E1B-21K 蛋白非特异性使转染的 DNA 稳定(Herrman and Mathews, 1989)及 21K 蛋白中的突变在感染期间导致细胞和病毒 DNA 降解(Pilder et al., 1984; White et al., 1984)。由于 Ad5 E1B-21K 蛋白在 PER.C6 细胞中表达, 因此这些发现就我们的观测结果未提供解释。

PIX 基因就位于 E1B-55K 编码区的 3'端。就 Ad5 而言, 已知 pIX 启动子和编码序列位于 E1B 转录区内, 因为 pIX 和 E1B 共有聚腺苷酸化信号。pIX 表达所必需的最小启动子序列已经在 Ad5 的情况中加以研究(Babiss and Vales, 1991)。示出含有上游 Sp1 位点和 TATA 框序列的启动子片段就 pIX 表达是足够的。Sp1 位点与 TATA 框以及

TATA 框自身的序列之间的间隔示出影响 pIX 表达水平。Ad35 中的相应区域是否对稳定病毒而言也足以驱动 pIX 表达至足够高的水平还未知。序列对比表明 Sp1 位点和 TATA 序列均与在 Ad5 pIX 启动子中发现的那些序列不同。使用可从 Genbank 中获得的序列信息,对来自不同亚群的血清型的近端 pIX 上游序列(即 E1B-55K 的终止密码子与 pIX 基因的起始密码子之间)进行对比。以下具有 SEQ ID NO:和 Genbank 参考序列的腺病毒用于进行对比: Ad2 (SEQ ID NO:45; Genbank NC_001405), Ad5 (SEQ ID NO:46; Genbank M73260), Ad12(SEQ ID NO:47; Genbank NC_001460), Ad9(SEQ ID NO:48; Genbank AF099665), Ad40 (SEQ ID NO:49; Genbank L19443), Ad4 (SEQ ID NO:50; NC_003266), Simian 25 (SEQ ID NO:51; Genbank AF394196), Ad7 (SEQ ID NO:54; Genbank AD7001)。Ad35 序列(SEQ ID NO:52)在 WO00/70071 中公布。Ad11 序列(SEQ ID NO:53)在先前未公布,在此提供。图 3A 示出上述序列在 E1B-55K 蛋白的终止密码子(全部序列中的前 3 个核苷酸)与 pIX 蛋白的起始密码子(最后 3 个核苷酸)之间的序列对比。Ad2 和 Ad5 中的 Sp1 位点和 TATA 序列在方框中标示。在大多数情况中,在其它序列中针对 Sp1 和 TATA 框没有足够的同源性。因此,由 Bucher, P (1990)公布的 GC 和 TATA 框的共有序列用于鉴别多种序列中推定的 Sp1 和 TATA 框。图 3b 示出推定的 Sp1 和 TATA 框序列及它们之间的间隔。分别属于亚群 A、D 和 F 的 Ad12、Ad9 和 Ad40 具有 Sp1 和 TATA 序列,其与共有序列相当匹配。然而,两个框之间的距离小于 Ad5 和 Ad2 之间的距离。这不是不同寻常的,因为 Ad5 E1B 启动子也含有间隔 11 个核苷酸的 Sp1 框和 TATA 序列。然而,Sp1 与 TATA 框之间的 Ad5 pIX 启动子序列缺失(20 个核苷酸中的)9 个核苷酸降低 pIX 水平(Babiss and Vales, 1991)。亚群 B 血清型 Ad35、Ad11 和 Ad7 以及亚群 E 病毒 Ad4 具有不同的 TATA 框序列及在推定的 Sp1 序列与 TATA 框之间具有不

同间隔。人腺病毒 4 型中近端 pIX 区与猿猴腺病毒 25(CV68)中该区域相同，这是最近提议作为治疗性载体的一种血清型(Farina et al., 2001)。因此，对于稳定的壳体，基于非人腺病毒 pIX 表达的复制缺陷的载体也不是足够的。

有充分理由相信 pIX 表达在 Ad35 病毒和其它人及非人腺病毒中是以不同方式调节的，调节序列或者甚至启动子序列自身位于 E1B 序列的上游或者甚至更上游。或者，由于 pIX 表达是由 E1A 蛋白激活的，因此在存在属于相同血清型或亚群的 E1A 蛋白的情况下获得高水平的 pIX 表达是可能的。

我们测试了将内源近端 pIX 上游序列改变为异源启动子以提高载体中 pIX 表达是否产生更稳定的病毒及更好的包装能力(如前述)。或者，pIX 功能也许通过包装细胞系反式 (in trans) 递送。作为一个非限制性实施例，我们描述了具有与在 Ad5 病毒中发现的相同的非内源近端 pIX 启动子的重组的基于 Ad35 的病毒，并示出这些病毒与未改变的重组载体相比具有更好的稳定性。

实施例 5：具有 Ad5 pIX 启动子的衔接质粒的产生

pAdApt535 是一种 Ad35 衔接质粒，其具有部分 Ad5 pIX 启动子序列但其它部分与 Ad35 衔接质粒 pAdApt35IP1 (见 WO 00/70071 所述)相同。其构建如下所述：

用引物 SV40for 和 pIX5Rmfe 产生第一个 PCR 片段。该反应使用 Pwo DNA 聚合酶(Roche)根据厂商说明书进行，但最终混合物中具有 3% DMSO。取 pAdApt 作为模板，这是 Ad5 E1 缺失的病毒的一种衔接质粒 (100ng；见 WO 00/70071 所述)。程序设定如下：94℃ 2 分钟，然后进行 30 次(94℃ 30 秒(解链)，52℃ 30 秒(退火)及 72℃ 30 秒(延伸))循环，随后 72℃ 8 分钟。所得 PCR 片段含有来自 pAdApt 的 SV40 聚腺苷酸化信号的 3'端和 Genbank 登记号 M73260 所示从 3511

至 3586 位核苷酸的 Ad5 pIX 启动子区域及在 3'端的一个 MfeI 位点。

如上述产生第二个 PCR 片段，但使用引物 pIX35Fmfe 和 35R4 进行。取 100ng pAdApt35IP1 作为模板，PCR 程序的退火设定在 58℃ 30 秒，延伸设定在 72℃ 90 秒。这个 PCR 扩增了从 3467 至 4669 位核苷酸的 Ad35 序列(序列编号如 WO 00/70071 所述)并在 5'端加入了一个 MfeI 位点。

然后将这两个 PCR 片段用 MfeI 消化并使用 Qiagen PCR 纯化试剂盒(Qiagen)根据厂商说明书进行纯化。纯化的片段的浓度通过将样品在琼脂糖凝胶上运行而评估，并将接近等摩尔量的两个片段混合于 40μl 体积的含有 5μg DNA, 4 μl 10×连接酶缓冲液和 2 μl 连接酶(New England Biolabs) 的连接反应物中。在室温温育 2 小时以上的时间后，将该混合物加样于 TAE 中的 1.2%琼脂糖凝胶上，使用 GeneClean II 试剂盒(Bio101, Inc.)根据厂商说明书分离长度为 1.4 kb 的 DNA 片段。

将该 DNA 在 30μl 无菌水中洗脱并将 1μl 用于 PCR 扩增反应中，使用如上述引物 SV40for 和 35R4 进行。如上述进行 PCR，退火温度为 52℃，延伸时间为 90 秒。所得产物使用 Qiagen 凝胶提取试剂盒从凝胶中分离并用 AgeI 和 BglII 消化。所得 0.86 kb 条带使用 GeneClean II 试剂盒根据厂商说明书从凝胶中分离。

将 pAdApt35.Luc (见 WO 00/70071 所述)也用 BglII 和 AgeI 消化并将 5.8 kb 载体片段使用 GeneClean II 试剂盒如上述从凝胶中分离。将这个片段如前述含有 Ad5-Ad35 嵌合 pIX 启动子的分离的 BglII-AgeI 片段连接，产生 pAdApt535.Luc (图 4)。

然后如下产生含有 Ad5 pIX 启动子的其它衔接质粒：

将 pAdApt535.Luc 用 BglII 和 ApaI 消化并使用 GeneClean II 试剂盒根据厂商说明书从凝胶中纯化 1.2 kb 的插入体。将 pAdApt35IP1 也用 BglII 和 ApaI 消化并如上述分离 3.6 kb 的载体片段。将这两个分离的片段连接产生 pAdApt535 (图 5)。接着，使用标准克隆技术使用

pAdApt535 将其它标记基因如 eGFP (衍生自 pAdApt35.eGFP)和 LacZ (衍生自 pAdApt35.LacZ)克隆进多克隆位点,产生 pAdApt535.eGFP 和 pAdApt535.LacZ。

实施例 6: 具有含有 Ad5 pIX 启动子的衔接质粒的 E1 缺失的基于 Ad35 的载体的产生

重组病毒如上述通过在 PER55K 克隆 16 细胞上转染衔接质粒和 Ad35 载体主链粘粒而产生。为此,使用如下质粒:

- T1. pAdApt535eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITR
- T2. pAdApt535eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3
- T3. pAdApt35Luc + pWE.Ad35.pIX-rITR
- T4. pAdApt535Luc + pWE.Ad35.pIX-rITR
- T5. pAdApt535Luc + pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3
- T6. pAdApt535LacZ + pWE.Ad35.pIX-rITR
- T7. pAdApt535LacZ + pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3
- T8. pAdApt35LacZ + pWE.Ad35.pIX-rITR
- T9. pAdApt35LacZ + pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3

将衔接质粒在转染之前用 PacI 消化,除了 pAdApt535.Luc 和 pAdApt35.Luc 用 pIPsp-1 酶消化及 pWE.Ad35.pIX-rITR 和 pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3 用 NotI 消化。将 2 μ g 每种衔接质粒和 6 μ g 的主链 DNA 与 40 μ l Lipofectamine (Invitrogen/Life Technologies)根据厂商说明书混合并与 T25 培养瓶中 70%铺满的 PER55K 克隆 16 细胞温育。4 小时后除去转染培养基并将细胞在 37 $^{\circ}$ C/10% CO₂ 中进一步温育。在转染两天后,将细胞传代至 T80 培养瓶并对致细胞病变作用 (CPE)的出现情况评分。5 天后所有培养物均示出进展中的或完全的 CPE, T6 (无 CPE) 和 T8 (CPE 事件)除外。再两天后, T6 和 T8 示出开始 CPE, 所有其它培养物均呈现完全 CPE。通过收集培养基和细

胞收获所有培养物。将该混合物在 -20°C 贮存。将样品解冻，将该混合物在 1500 rpm 旋动 15 分钟以沉淀细胞碎片，收集上清。在一些样品中(4 种 LacZ 表达病毒，T6—T9)，取 2 ml 用于再次感染于 T80 培养瓶中 80%铺满的 PER55K 克隆 16 细胞以进一步扩增病毒滴度。在进展的(T6+T8)或完全(T7+T9) CPE 中收获细胞和培养基并如上述制备粗制裂解物。

以此方式获得的粗制裂解物用于分离病毒 DNA。为此，将 275 μl 粗制裂解物与 10 μl 的 10mg/ml DNaseI 在 37°C 温育 30 分钟。随后加入 6.0 μl 0.5M EDTA (pH 8.0)，7.5 μl 20% SDS 和 1.5 μl 20mg/ml 蛋白酶 K 并涡旋混合。然后将该混合物在 50°C 温育 1 小时。最后，使用 GeneClean Spin 试剂盒(Bio 101, Inc.)分离病毒 DNA。将病毒 DNA 在 50 μl milliQ 水中洗脱并将 5 μl 样品用于分析转基因区域。应注意 pWE.Ad35.pIX-rITR+/-E3 主链粘粒不改变并因此仍含有 Ad35 pIX 启动子。由于该启动子位于粘粒的 5'端，因此认为重组事件产生野生型 Ad35 启动子的机会很少。然而，不排除产生仍含有 Ad35 pIX 启动子的病毒。因此，针对每个病毒制备物进行两次特异性 PCR 扩增：第一次用引物组 1 (Ad35 特异的)进行：AdApt35CMVF 和 AdApt35pIXrev。这个 PCR 特异性扩增含有 Ad35 pIX 启动子的病毒中的转基因区域。对 5 μl 分离的病毒 DNA 样品用重组 Taq 聚合酶 (Invitrogen)根据厂商说明书进行 PCR 反应，但反应中使用 4mM MgCl_2 和 4 单位的 Taq 酶。PCR 程序设定为在 94°C 2 分钟，随后进行 30 次(94°C 30 秒、 60°C 30 秒及 72°C 5 分钟)循环，最后以 68°C 8 分钟结束。

第 2 次用引物 AdApt35CMVF 和 pIX5Rmfe 进行并因此特异性扩增含有 Ad5 pIX 启动子的病毒中的转基因区域(引物组 2)。

对 5 μl 分离的病毒 DNA 使用 Pwo DNA 聚合酶(2.5 单位/ μl ，Genaxis)于含有 0.3 μl 每种引物(100 μM 原液)、5 μl 2mM dNTP 混合物、

5 μ l 10 $\times$ 完全缓冲液(包含 Mg^{2+}), 1.5 μ l DMSO 和 0.8 μ l Pwo 酶的 50 μ l 体积反应液中进行 PCR 扩增。PCR 程序设定如下: 94 $^{\circ}$ C 2 分钟, 随后进行 30 次(94 $^{\circ}$ C 30 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒及 72 $^{\circ}$ C 5 分钟)循环, 最后以 68 $^{\circ}$ C 8 分钟结束。在 PCR 期间, 加热和冷却坡度设为 2 $^{\circ}$ C/秒。然后, 将 5 μ l 加样缓冲液加入样品中并将 8 μ l 混合物加样于凝胶上进行分析。

含有 Ad5 pIX 启动子序列和 eGFP 转基因(转染 T1 和 T2)的 E1 和 E1/E3 缺失的 Ad35 病毒具有期望高度的 PCR 扩增条带而无较短的片段。图 6a 示出对携带 E1 缺失的荧光素酶的病毒(转染 T3 和 T4)进行 PCR 扩增的结果。泳道 5—8 是用这两个引物组对 AdApt535Luc (泳道 5 和 6)和 AdApt35Luc 质粒(泳道 7 和 8)进行的对照 PCR。泳道 1—4 是对病毒 DNA 分离物进行的 PCR。引物组 1 (特异于 Ad35 pIX 区域)扩增期望长度的一个条带并示出 Ad35.AdApt35.Luc 病毒上另外的较短片段(泳道 4; 与图 2 荧光素酶+E3 相对比)。相反, 当用 AdApt535. Luc 质粒产生病毒时, 引物组 2(特异于 Ad5 pIX 启动子)仅示出无缺失片段的期望长度的一个条带(泳道 1)。由此推断 Ad5 pIX 启动子序列的插入提高了 Ad35-E1 缺失的病毒的稳定性和包装能力。图 6b 证实了携带 LacZ 作为转基因的 Ad35 E 1/E3 缺失的病毒的这些结果。泳道 1—4 是对 AdApt535.LacZ 和 AdApt35.LacZ 质粒使用每个引物组进行的对照 PCR。尤其使用引物组 1 见到一些背景条带 1 (泳道 2 和 4), 但对同源样品就每个引物组也见到期望高度的强特异性条带(泳道 1 和 4)。在转染及如上述一次扩增循环之后分离病毒 DNA。引人瞩目地, 引物组 2 在 Ad35.AdApt535.LacZ 病毒上产生期望的片段而无缺失片段(泳道 5 和 9), 而含有 Ad35 pIX 启动子序列的病毒样品明显显示出除了正确长度的片段之外缺失的片段(在扩增后可见(泳道 11))。

总而言之, 这些结果示出将 Ad35-pIX 启动子序列取代为 Ad5-pIX 启动子序列提高了具有较大基因组的病毒中转基因区域的稳定。较强

的启动子或者额外的启动子元件甚至可以增强这种作用。

实施例 7: pWE.Ad35-3481 的产生

如上所示, 粘粒 pWE.Ad35.pIX-rITR 中的腺病毒插入体在其 5' 端含有 Ad35 pIX 启动子。这可以导致 Ad35 pIX 启动子再次插入用基于 pAdApt535 的衔接质粒产生的病毒中。因此, 产生一种新的 Ad35 主链粘粒, 其缺少 pIX 启动子序列。为此, 使用 pIXcosF-2 和 Adapt35-3 引物产生一个 PCR 片段。使用 Pwo DNA 聚合酶(2.5 单位/ μ l, Genaxis) 在含有 3 μ l 每种引物(10 μ M 原液), 5 μ l 2mM dNTP 混合物, 5 μ l 10 $\times$ 完全缓冲液(包含 Mg^{2+}), 1.5 μ l DMSO, 0.5 μ l Pwo 酶和 10ng pAdApt35IP1 模板的 50 μ l 体积反应液中进行扩增。PCR 程序设定为 94 $^{\circ}$ C 2 分钟, 随后进行 5 次(94 $^{\circ}$ C 30 秒, 58 $^{\circ}$ C 30 秒及 72 $^{\circ}$ C 1.5 分钟)循环, 然后进行 25 次(94 $^{\circ}$ C 30 秒, 60 $^{\circ}$ C 30 秒及 72 $^{\circ}$ C 1.5 分钟)循环, 最后在 68 $^{\circ}$ C 8 分钟结束。所得 1.2 kb PCR 产物含有从第 3481—4663 位核苷酸的 Ad35 序列(根据 WO 00/70071 公布的 Ad35 序列编号), AatII 和 NotI 位点附于 5' 端。将 PCR 产物使用 PCR 纯化试剂盒(Qiagen) 根据厂商说明书进行纯化并根据厂商说明书克隆进 pPCR-Script Amp 载体(Stratagene)中。然后将克隆的片段的序列通过测序证实, 随后通过用 AatII 和 AgeI 消化从该构建体中除去。所得 780 bp 片段使用 GeneClean spin 试剂盒(Bio101, Inc.) 根据厂商说明书从凝胶中纯化。

将构建体 pWE.Ad35 Δ NdeI (如前所述)也用 AatII 和 AgeI 消化, 所得 12 kb 载体片段使用 GeneClean spin 试剂盒(Bio101, Inc.) 根据厂商说明书从凝胶中分离。将这两个分离的片段连接产生构建体 pWE.Ad35-3481 Δ N deI。

构建体 pWE.Ad35 Δ NdeI 的构建如 WO 00/70071 所述, 其含有从第 3401 位核苷酸至在第 6541 位核苷酸的 NdeI 位点的 Ad35 序列及从在第 33167 位核苷酸的 NdeI 位点至右侧 ITR 末端的 Ad35 序列,

这两个 Ad35 片段通过 NdeI 位点连接(也见 WO 00/70071 中图 13 所示)。

然后将 pWE.Ad35-3481 Δ NdeI 用 NdeI 线性化, 用 CIP 酶(New England Biolabs)去磷酸化及使用 Geneclean spin 试剂盒(Bio101, Inc.) 根据厂商说明书从凝胶中纯化。然后将这个载体片段与分离自 Ad35 wt DNA 的 26.6 kb NdeI 片段连接, 之后将该混合物使用 λ 噬菌体包装提取物(Stratagene)根据厂商说明书用于包装粘粒。所得混合物用于转化 STBL-2 细菌 (Invitrogen), 产生 pWE.Ad35-3481。

实施例 8: pIG35.55K 的构建

构建体 pIG35.55K 含有可操纵地与人磷酸甘油酸激酶启动子(hPGK)连接的 Ad35 E1B-55K 基因的编码序列和 HBV 聚腺苷酸化序列。另外, 其含有可操纵地与 RSV 启动子连接的新霉素抗性基因和 HBVpA。pIG35.55K 的构建如下所述。

将构建体 pIG270 (WO 00/70071 所述)用 EcoRI 消化, 用 Klenow 酶处理并使用 PCR 纯化试剂盒 (Qiagen)根据厂商说明书进行纯化。然后将回收的 DNA 用 AgeI 消化并将 ~ 5 kb 的载体片段使用 Geneclean 试剂盒(Bio101, Inc.)根据厂商说明书从凝胶中分离。接着, 将 Ad35 E1B-55K 序列使用 35D21 和 35B3 引物在 pIG270 模板 DNA 上通过 PCR 扩增。使用 Pwo DNA 聚合酶(Roche)根据厂商说明书对 2ng 模板 DNA 进行 PCR 扩增, 但使用于 PCR 混合物中终浓度为 3 %的 DMSO。程序设定为: 94 $^{\circ}$ C 2 分钟, 随后进行 25 次(94 $^{\circ}$ C 30 秒, 56 $^{\circ}$ C 30 秒及 72 $^{\circ}$ C 30 秒)循环, 最后在 72 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟结束。所得 PCR 片段使用 PCR 纯化试剂盒 (Qiagen)纯化并用 NcoI 消化。在经 Klenow 处理以补平突出端之后, 将 DNA 用 AgeI 进一步消化并再次柱纯化。然后将如此处理的 PCR 片段克隆进上述制备的 EcoRI/AgeI 消化的载体片段中以产生 pIG270. Δ E1A Δ 21K。将 pIG270. Δ E1A Δ 21K

用 *AvrII* 和 *XbaI* 消化并使用 Klenow 酶补平突出端。如上述将含有 PGK 启动子和 Ad35 E1B-55K 的 2.9 kb 片段从凝胶中分离。接着, 将 pRSVneo4 (如前述构建)用 *BglIII* 消化, 用 Klenow 酶产生平端, 去磷酸化并从凝胶中分离。然后将来自 pIG270.ΔE1AΔ21K 的平端的 *AvrII/XbaI* 片段与上述制备的 pRSVneo4 载体片段连接以产生 pIG35.55K。

pRSVneo4 如下产生: 将构建体 pRSVhbvNeo (WO 00/70071 所述) 用 *ScaI* 和 *BamHI* 消化并将突出端用 Klenow 酶补平。将含有部分氨苄青霉素基因和 RSV 启动子的 1070bp 片段使用 GeneClean 试剂盒 (BIO 101, Inc.)从凝胶中分离。接着, 将 pRSVhbvNeo 用 *ScaI* 和 *EcoRI* 消化, 用 Klenow 产生平端并如上述分离含有 neo 基因、HBVpA、载体和部分氨苄青霉素基因的 3.2 kb 片段。然后将这两个片段连接产生 pRSVneo4。

实施例 9: 由 RSV 启动子介导的提高了 pIX 表达增加 Ad35 病毒的稳定性

作为驱动 pIX 基因表达的一个异源启动子的实例, 将 RSV 启动子插入含有 LacZ 或荧光素酶报道基因的 Ad35 衔接质粒中。RSV 启动子相应于得自 pRc-RSV (Invitrogen)的 *NruI/ApaI* 片段。突出端使用 Klenow 酶(New England Biolabs)根据厂商说明书补平。将含有 RSV 启动子的 388 bp 片段使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen)从琼脂糖凝胶中分离。将衔接质粒 pAdApt35.Luc 和 pAdApt35.LacZ 用 *BglIII* 线性化, 随后经 Klenow 处理以产生平端。*BglIII* 消化正好在转基因表达盒的 SV40 聚腺苷酸化序列之后。关于基于 pAdApt35 的衔接质粒的描述见 WO 00/70071 所述。然后将处理的衔接质粒使用虾碱性磷酸酶(SAP)根据厂商(Roche)说明书去磷酸化。分离的 RSV 启动子片段然后与每种处理的载体连接并转化入 DH5α 感受态细菌(Invitrogen)

中。对菌落分析相对于 pIX 基因 RSV 启动子正向插入产生的 pAdApt35.Luc.rsv 和 pAdApt35.LacZ.rsv。

另外,从通过 PCR 从缺失转基因区域的 Ad35 重组病毒中分离的序列中产生一个衔接质粒。对得自 pAdApt35.LacZ 和 pWE.Ad35.pIX-rITR Ad35 主链构建体的转染的粗制裂解物进行分析及随后的噬斑纯化示出该病毒在大约 2.8kb 的转基因区域中有一个缺失。将这个病毒的 5'序列使用引物 35F1 和 35R4 从分离的 DNA 中经 PCR 扩增。该反应使用 Pwo 聚合酶(Roche)根据厂商说明书进行。程序设定如下: 94℃ 2 分钟, 然后进行 5 次(94℃ 30 秒; 48 °C 30 秒; 72℃ 2.5 分钟)循环, 随后进行 25 次(94℃ 30 秒; 56℃ 30 秒; 72℃ 2.5 分钟)循环, 最后在 68℃ 8 分钟结束。

所得 2 kb 片段通过 PCR 纯化试剂盒 (Qiagen)纯化并根据厂商说明书克隆进 pCR-Script-Amp 载体 (Stratagene)中, 产生 pCR.Ad35Δ2.8kb。对这个质粒进行测序以确定缺失程度。这种缺失影响大多数 CMV 启动子、转基因和 SV40 polyA。这导致 CMV 启动子 5' 的 317 bp 与 pIX 基因上游的 Ad35 序列连接。这个 CMV 片段含有 3 个 GC-框和 21-bp 重复 (Boshart et al., 1985)。可能, CMV 启动子的剩余序列可以增加 pIX 表达, 产生更稳定的病毒。另一种可能性是病毒较小则导致稳定性增加。为对此进行研究, 将一个完整表达盒以如下方式克隆回来, 产生具有这个新的衔接质粒的病毒。含有扩增的序列的 pCR-Script-based 载体(更名为 pCR.C4)在ΔCMV-pIX 序列之前有一个唯一的 AvrII 位点。如上述将该载体用 AvrII 线性化, 用 Klenow 酶产生平端并使用 SAP 酶(Roche)去磷酸化。将衔接质粒 pAdApt535.LacZ (实施例 5)和 pAdApt.Luc (WO 00/70071)用 AvrII 和 BglIII 消化并将 DNA 用 Klenow 处理以补平突出端。将相应于 LacZ 和荧光素酶表达盒(CMV-TG-pA)的片段如上述从凝胶中分离并与 AvrII 线性化的 pCR.C4 载体连接。如上述转化感受态细胞并选择所述表达盒与左侧

ITR 正向的菌落，产生 pCR.C4.LacZ 和 pCR.C4.Luc。

使用以下新的衔接质粒如实施例 6 所述产生 Ad35 病毒：用 PacI 消化的 pCR.C4.LacZ，用 ApaI 消化的 pCR.C4.Luc 及用 PI-PspI 消化的 pAdApt35.LacZ.rsv 和 pAdApt35.Luc.Rsv。

将该衔接质粒在 PER55K 细胞(WO 02/40665)上与用 NotI 消化的 pWE.Ad35.pIX-rITR 或 pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3 共转染。另外，将衔接质粒 pBr.Ad35. Δ E1A Δ 21K.Luc (如下述构建)用 PI-PspI 消化并与 NotI 消化的 pWE.Ad35.pIX-rITR 共转染。在完全致细胞病变作用(CPE)时，通过一次冷冻/解冻循环收获培养物并离心以除去细胞碎片。然后在将 PER55K 细胞接种于 T80 培养瓶中的前一天将 300 μ l 的所得澄清的裂解物用于再次感染 PER55K 细胞。在完全 CPE 时，制备粗制裂解物并用于感染 A549 细胞以测试转基因表达并对 PER55K 细胞进行噬斑分析。

将 A549 细胞以 5×10^5 个细胞/孔的密度接种于 6 孔平板中，5 小时后用 10、1 或 0.1 μ l 每种 LacZ 病毒原液感染并温育两天。然后将 A549 细胞针对 LacZ 活性进行染色并计数蓝色细胞。蓝色细胞的百分比示于表 II。

当 RSV 启动子驱动 pIX 基因表达时，与缺失的 CMV 启动子相比 LacZ 表达病毒显然更稳定。这些结果使用荧光素酶病毒证实。为测定荧光素酶病毒活性，将 A549 细胞以 1×10^5 个细胞/孔的密度接种于 24 孔平板中，并用 10、1、0.1 或 0.01 μ l 的病毒原液感染并温育。在两天后，将细胞用 PBS 洗涤两次及再悬浮于 100 μ l 裂解缓冲液(Promega)中，在 -20°C 贮存直至使用。使用 Steady-Glo 荧光素酶分析系统(Promega)根据厂商说明书测定荧光素酶。结果示于表 III。

在实施例 3 中我们描述了含有 E3 区和 AdApt.Luc 或 AdApt.LacZ 表达盒的完全缺失 E1 的 Ad35 病毒是不稳定的。显然，在新描述的构建体中，在 pIX 前面的缺失的 CMV 启动子不阻止转基因区域的缺

失。然而，使用驱动 pIX 基因的 RSV 启动子，我们现在能产生比野生型更长的病毒。Ad35.AdApt.Luc.rsv 和 Ad35.AdApt.LacZ.rsv 分别为 35 kb 和 36.5 kb (也见图 2)。Ad35.ΔE1AΔ21K.Luc (36.4 kb) 也示出高度转基因活性。

我们接着测试了在噬斑纯化之后病毒是否是完整的。为此，将 PER55K 细胞以 0.9×10^6 个细胞/孔的密度接种于 6 孔平板中并用 Ad35.AdApt.LacZ 粗制裂解物的不同的 10 倍稀释液感染。将从 10^{-5} 至 10^{-8} 的稀释液铺板并在第 2 天加入一层琼脂覆盖。为此，将细胞首先用 PBS 洗涤，然后加入 3ml 预热的琼脂溶液，该溶液通过将 $2 \times \text{MEM}$ (GibcoBRL; 9.14 ml), FBS (Gibco; 0.36 ml), MgCl_2 (4.9 M; 0.037 ml) 与琼脂糖 (SeaPlaque GTG; 于水中 2.5%, 7.2 ml) 混合而制备。在凝固之后，将平板在 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 中进一步温育。4 天后见到噬斑并将 LacZ 染色溶液加入孔中琼脂之上并使其排干。所有病毒均示出范围在 10^{-7} 至 10^{-9} 的清晰的单独的噬斑，但仅在具有驱动 pIX 基因的 RSV 启动子病毒的情况中，所有噬斑均染成蓝色。在缺失的 CMV 启动子驱动 pIX 的两种情况中，至少部分噬斑不染色。这清晰地示出可包装的基因组大小/稳定在具有调节 pIX 的 RSV 启动子的病毒中增加。

本发明首次提供了衍生自或基于腺病毒血清型 5 的缺少功能性 E1B 基因表达的一种稳定的重组腺病毒。这种腺病毒在 E1 区有至少一个缺失。在本发明提供的特殊实施方案中，使用本发明的方法，所述稳定的重组腺病毒具有 4.2kb 以上的外源插入序列及 33.4kb 以上的一个包装的基因组。因此本发明的一个方面是提供了一种稳定的重组腺病毒，其：a) 携带 4.2kb 以上的一个外源核酸序列，和/或 b) 具有 33.4kb 以上的一个包装的基因组。在特殊的实施方案中，本发明提供了基于 Ad35 或 Ad11 的重组腺病毒，其：a) 携带至少 4.6kb 的一个外源核酸序列，和/或 b) 具有 33.8 kb 以上的一个包装的基因组。或者，

所述包装的基因组大小分别为至少 34.6、35.0、36.1 和 36.5 kb。这些实施方案中的外源序列可包括驱动 pIX 表达的一个异源启动子。另一方面，所述稳定的重组腺病毒是血清型 11。根据本发明这个方面的稳定的腺病毒可以在包装细胞上传代以提供一批重组腺病毒，10%以下，优选 5%以下，优选无一单独的克隆在所述重组腺病毒中的外源序列中产生缺失，这例如可以通过实施例 3 中例证的 PCR 方法测定。

pBr.Ad35. Δ E1A Δ 21K.Luc(见上文)如下产生。将构建体 pBr.Ad35. Δ E1A Δ 21K(WO 02/40665)用 HpaI 消化，用 CIP (New England Biolabs)去磷酸化并从凝胶中分离 5kb 的载体片段。将构建体 pBr.Ad35. Δ E1A.Luc 也用 HpaI 消化并从凝胶中分离 3.3 kb 的插入体，并与分离的载体片段连接。在转化入感受态 STBL-2 细胞(Invitrogen)之后，选择具有正确方向的插入体的菌落。这样产生了构建体 pBr.Ad35. Δ E1A Δ 21K.Luc。pBr.Ad35. Δ E1A.Luc(也称为 pBr.Ad35.E1B+.Luc，因为其仍含有 E1B 区)通过将取自经 AvrII 和 BglII 消化及用 Klenow 酶产生平端的 pAdApt.Luc 的 AdApt.Luc 盒插入经 SnaBI 和 HindIII 消化及用 Klenow 产生平端的载体片段 pBr.Ad35.leftITR-pIX(WO 02/40665)中而产生。选择具有正向表达盒的集落，产生 pBr.Ad35. Δ E1A.Luc。

实施例 10: pIX 调节序列的鉴别

先前的实施例示出其中 E1A 和 E1B 的编码区完全除去的 Ad35 重组病毒如果基因组大小增加则逐渐变得不稳定。我们在本申请中示出了加入驱动 pIX 表达的一个异源启动子可以克服这种不稳定性。在 WO 02/40665 和前文中，我们揭示了保留完整 E1B-55K 编码序列的 Ad35 病毒可以在 PER.C6 上产生而且是稳定的。对保留全部 E1B 编码序列的病毒也同样(WO00/70071; Abrahamsen et al., 1997)。结合这些结果产生这样的可能性，即在亚群 B 病毒中 pIX 基因的表达与

在亚群 C 中 pIX 基因的表达相比以不同方式调节。因为保留由 E1B 启动子驱动 E1B-55K 基因的病毒是稳定的（见上文），因此 pIX 调节序列可能位于这个区域中。为对此进行研究，我们产生了保留不同长度的 55K 序列的 3' 端的一系列构建体。为此，首先如下产生 pBr.Ad35 Δ SM.AdAptLacZ。将构建体 pBr.Ad35.IITR-pIX(见 WO 00/70071 中所述)用 SnaBI 和 MfeI 消化，用 Klenow 产生平端及用 SAP 酶(Roche)去磷酸化。然后将 4.4 kb 的载体片段从琼脂糖凝胶中分离。将构建体 pAdApt.LacZ (一种具有 LacZ 转基因插入体的基于 Ad5 的衔接质粒 pAdApt; WO 99/55132)用 AvrII 和 BglII 消化(及任选用 SalI 消化以增加片段大小的差别)及用 Klenow 酶产生平端。然后将 4.2 kb CMV.LacZ.pA 插入体从凝胶中分离。然后将这两个分离的片段连接以产生 pBr.Ad35. Δ SM.AdAptLacZ (图 7)。方向可以通过限制性消化检测，因为以正确方向连接可恢复 AvrII 位点和 MfeI 位点。构建体 pBr.Ad35 Δ SM.AdAptLacZ 在相对于 pIX 基因的野生型位置中保留 0.6 kb 的 3' E1B-55K 序列(野生型 Ad35 第 2804—3400 位核苷酸)。先前我们已经示出这些 55K 序列不引起功能性 E1B-55K 蛋白的表达，因为在 PER.C6 细胞上增殖是不可能的(pBr.Ad35 Δ SM; WO 02/40665)。从 pBr.Ad35 Δ SM.AdAptLacZ 开始，可以通过用 MfeI (MunI 的同切点酶)和或者 StuI、NsiI 或 BglII 消化，随后在 5'或 3'突出端分别使用 Klenow 或 T4 DNA 聚合酶平端化突出末端而产生 680bp(0.7 kb)的 E1B-55K 区域的不同缺失。将消化的 DNA 再次连接产生功能性衔接质粒，其然后用于在 PER55K 细胞上通过与如上述 pWE.Ad35.pIX-rITR 共转染而产生重组病毒。通过使用酶 DraIII、Bsu36I、BssHII 或 BamHI，通过本领域已知的方法对所述载体进行部分消化(LacZ 基因也含有这些酶的一个识别位点)，随后通过选择正确的克隆而产生另外的构建体。如上述针对 Ad35.AdApt.LacZ.rsv 构建体测试稳定性。稳定的构建体(即在转基因区域中不获得缺失)含有

pIX 表达的适当调节区域。另外，可以通过插入报道基因上游序列而直接测试给定序列中的启动子活性。pGL3basic (Promega)是这样的一种报道基因构建体。使用引物组 Ad3555KmfeF 和 Ad35pIXNcoR 扩增 MunI 与 pIX 基因起始处之间的区域。这个 PCR (94°C 2 分钟；然后进行 30 次 (94°C 30 秒, 59°C 30 秒, 72°C 60 秒) 循环；随后 68°C 8 分钟；根据厂商说明书使用 Pwo (Genexis)，另外具有 3% DMSO)扩增了从 2804 至 3491 位的 Ad35 序列(编号如在野生型 Ad35 中)，从而将 pIX 的起始密码子周围的序列改变为 NcoI 位点并在 5' 端导入一个 HindIII 位点。将这个扩增的片段用 HindIII 和 NcoI 消化并克隆进用相同的酶消化的 pGL3basic 中，产生 pGL3-MN。然后 pGL3-MN 用于通过组合 HindIII 与例如 PacI、NsiI、StuI、Bsu36I、BssHII 或 BglII 消化，随后通过平端化突出末端和再连接而缺失荧光素酶编码区上游的序列。启动子活性通过使用 lipofectamine 试剂根据厂商说明书将获得的构建体瞬时转染进 PER.C6 细胞中而测试。在转染两天后，使用 Steady-Glo 荧光素酶分析系统(Promega)根据厂商说明书分析荧光素酶活性。或者，在 pGL3basic 载体中插入不同的区域，该区域是通过使用 Ad35 E1B-55K 区域中一特异性序列的 5' (正向) 引物并组合了 Nco-pIXrev 引物使一个 HindIII 位点附于 5' 端的 PCR 扩增而产生的。在此方式中，非限于存在进行克隆的一个唯一的限制位点。

PIX 启动子的位置通过使用软件进一步研究以发现推定的启动子序列(Reese and Eeckman, 1995)。图 8 示出了与 55K 编码序列(如在 pBr.Ad35.ΔE1AΔ21K 中)直接关联的 E1B 启动子的启动子分值(最小值设定为 0.65)。标记为 A 的区域相应于 E1B 启动子，区域 B 和 C 位于 55K 编码区内。pIX 上游区域不认为是启动子序列。在这三个区域中，区域 C 具有最高分值(0.96) (甚至高于已知的 E1B 启动子)因而可能包含影响 pIX 表达的序列。

为通过实验定位和鉴别一个可能的 pIX 启动子,产生一系列相应于 55K 编码序列的 3'端的不同(重叠)部分的小片段。图 9 示出了这些片段及其相对于推定的启动子区域和 pIX 基因的位置。所述片段通过使用指定的酶进行限制性消化而产生。片段用 Klenow (5'突出端)或 T4 DNA 聚合酶(3'突出端)平端化并克隆进也经 Klenow 处理而平端化并经 SAP 处理(Roche)而去磷酸化的 pGL3basic 载体(Promega)的 NcoI 位点中。在转化感受态细菌中之后,通过限制性消化对获得的质粒检测插入体的方向。然后通过使用 lipofectamine 试剂根据厂商说明书将获得的荧光素酶构建体瞬时转染进 PER.C6 细胞中而分析启动子活性。空的 pGL3basic 质粒作为阴性对照。另外的对照通过将 i) 来自含有 Ad5 pIX 启动子的 pAdApt535 的 BglII-MfeI 片段, ii) 一个 388bp 的 NruI-ApaLI RSV 启动子片段(如上述), 或者 iii) Ad35 pIX 上游区域作为 PCR 片段克隆进上述 pGL3basic 的平端 NcoI 位点而产生。使用引物 SV40-for 及 5'-磷酸化的 Ad35pIXrev 在 pAdApt35IP1 上扩增 Ad35 上游 pIX 区域。在扩增之后,将该 DNA 用 BglII 消化并用 Klenow 处理。

将构建体也转染进不含有腺病毒 E1 的人细胞(例如 A549, Hela)中以研究 E1A 表达的依赖性。

将片段也克隆进衔接质粒 pBr.Ad35ΔSM.AdAptLacZ(见上述)中以能产生重组病毒并研究病毒基因组的稳定性。为此,将构建体 pBr.Ad35ΔSM.AdAptLacZ 用 MfeI 和 BglII 消化,用 Klenow 酶平端化并去磷酸化。在从凝胶中分离所述载体片段后,可将 DNA 与上述片段连接(见图 9)以产生具有不同长度的 pIX 基因上游 55K 片段的一组衔接质粒。病毒可以用上述构建体 pWE.Ad35.pIX-rITR 产生。用 pBr.Ad35ΔSM.AdAptLacZ, pAdApt35.LacZ 和 pAdApt35.LacZ.rsv 构建体进行对照转染。在出现完全 CPE 之时,通过一次冷冻/解冻循环收获细胞和培养基并用于再次感染新鲜的 PER55K 细胞。在完全 CPE

时再次收获细胞和培养基，制备粗制裂解物并用于进行噬斑分析。在出现噬斑后，加入 X-gal 染色溶液以检测 LacZ 表达。

上述实验的结果有助于发现 Ad35 E1B-55K 区域中 pIX 调节序列的位置。

或者，pIX 基因表达可以通过作为异源启动子的 E1B 启动子驱动以产生重组病毒。为此，将 pAdApt535.LacZ 用 BglII 和 MfeI 消化，随后经 Klenow 处理而平端化末端及去磷酸化。然后将如此处理的 4.8kb 载体片段从凝胶中分离。E1B 启动子区域使用 pBr.Ad35.leftITR-pIX 作为靶 DNA 及 Epr-F 和 Epr-R 引物作为 PCR 片段而分离，而这两个引物均磷酸化。使用 Pwo DNA 聚合酶 (Genaxis/Inno-train Diagnostik GmbH) 根据厂商说明书进行 PCR。然后将所得 151 bp 片段克隆进分离的载体中以产生 pAdApt35Epr.LacZ。

该质粒然后用于产生基于 Ad35 的病毒并如前述测试稳定性。

为鉴别含有 pIX 序列的不同转录物，从感染的细胞中分离 RNA 并将含有 pIX 的 RNA 通过与标记的特异性探针杂交而鉴别。为此，将 PER55K 细胞用如下病毒以感染复数为 10 和 50 感染：wtAd35、Ad35.E1B.AdApt.Luc、Ad35 Δ E3.AdApt.Luc、Ad35 Δ E3.AdApt535.Luc、Ad35.AdApt.Luc.rsv。8 小时后(wtAd35 在 2 和 18 小时后)收获感染的细胞，使用 TRIzol 试剂(Invitrogen)分离 RNA。将该 RNA 在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行大小分级分离，移至 Northern 印迹并与衍生自 pIX 编码区的 ³²P 标记的探针杂交。本领域已知该程序(见 Molecular Cloning: A laboratory manual, by Sambrook and Russell, 2001 或较早的版本)。如果包含已知 RNA 大小标记并给出含有 pIX 序列的 RNA 物种的指示，则 RNA 的长度可以确定。为鉴别在 E1B 启动子中开始的 mRNA，可以将印迹剥离并再与 5' 21K 探针杂交。不与 E1B-21K 探针杂交的含有 pIX 的转录物可能通过与 E1B 启动子不同的启动子产生。

由于可能的（及期望的）剪接事件，仍难以通过这种方法准确确定转录起始位点。这可如下实现。将分离的 RNA 逆转录为 cDNA 并使用 GeneRacer 系统(Invitrogen)根据厂商说明书使用 pIX 编码序列的反向引物将该 cDNA 用于特异性扩增含有 pIX 的 RNA 的 5'端，所述引物是 pIXrev 和嵌套引物 pIXrev-N2。对扩增的片段进行克隆和测序提供了转录起始位点的位置及含有 pIX 序列的 mRNA 的 5'序列。在这种方式中，鉴别了可能的 pIX 编码 mRNA。pIX 表达水平与相应的重组腺病毒的稳定性之间的关系因此也可以确定。

实施例 11：来自 B 群腺病毒的 E1B 和 pIX 序列

上述实施例使用 Ad35 病毒作为实例。彼此相当同源的 B 亚群的其它成员可能具有相似的 pIX 调节。

为对此进行研究，我们将 B 亚群成员的 E1B 和 pIX 序列进行序列对比。Ad7 的序列(SEQ ID NO:57)通过 Genbank 登记号 X03000 获得。Ad11 的序列(SEQ ID NO:56)通过与针对 Ad35 序列(SEQ ID NO:55)所述(WO 00/70071)相似的 Lark 技术(UK)，对分离自 Ad11p 野生型病毒的 DNA 序列进行鸟枪法（shotgun）测序而揭示。Ad11 和 Ad35 是彼此高度同源的(整体 98.1%相似性)，主要差别位于六邻体和尾丝结（knob）中。Ad11 序列也在 WO 02/053759 中揭示。E1A 的聚腺苷酸化位点(pA)与 pIX 基因的 pA 下游之间的序列用于序列对比(图 10)。Ad35 与 Ad11 的整体相似性（在这个区域中）为 98.4%，与 Ad7 的整体相似性为 82.9%。这使得在这些病毒中 pIX 的表达是以相同方式调节是非常可能的。

因此，在先前的实施例中例证的本发明的方法和手段可以用于增加亚群 B 的其它重组腺病毒的稳定性和/或插入容量，在此通过 Ad11 和 Ad7 例证。

实施例 12: 在 Ad5 互补细胞系上表达 Ad5-E4/Orf6 的缺失 E1 的 Ad35 病毒的产生

腺病毒血清型 35 基因组的测序以及基于质粒的载体系统的构建和重组的基于 Ad35 的病毒的产生已经在 WO 00/70071 中详细描述。

如下将 Ad5-E4-orf6 编码序列克隆进 pAdApt35IP1 (ECACC 保藏号 P02041228, 关于这个质粒的克隆详见于 WO 00/70071) 中。将该质粒用 NheI 和 AvrII 消化并用牛小肠磷酸酶(New England Biolabs)去磷酸化。消化的 DNA 使用 GeneClean 试剂盒从凝胶中分离。将质粒 pΔMT.Orf6.Hygro (图 11, ECACC 保藏号 P02041226) 用 NheI 消化, 随后用 XbaI 部分消化。在凝胶上分离所得条带后, 将与 E4-orf6 序列连接的 ΔMT 启动子相应的 1350bp 片段从凝胶中纯化。接着, 将这两个分离的片段连接并转化进电感受态 DH10B 细胞 (Invitrogen/Life Technologies), 之后, 选择具有与 SV40 poly (A) 信号方向正确的插入体的一个集落进行大规模 DNA 制备。这样产生了构建体 pAd35.ΔMT.Orf6 (图 12), 其含有与突变的金属硫蛋白(ΔMT)启动子功能性连接的 Ad5 E4-orf6 编码序列。ΔMT 启动子已经由 Hagmeyer et al. (1996) 描述。Ad5 E4-orf6 序列相应于 Ad5 序列中的第 33193—34077 位核苷酸(Genbank 登记号 M73260)。为测试 Ad5 E4-orf6 蛋白的表达是否使得完全缺失 E1 的 Ad35 载体可能在 Ad5 互补细胞上生产, 将 pAd35.ΔMT.Orf6 与 Ad35 主链构建体 pWE.Ad35.pIX-rITR 在 PER.C6 细胞上共转染。为此, 将 pAd35.ΔMT.Orf6 用 PI-Psp-1 消化并将 pWE.Ad35.pIX-rITR 用 NotI 消化以从主链中释放腺病毒插入体。将 2μg 消化的 pAd35.ΔMT.Orf6 和 6μg 消化的 pWE.Ad35.pIX-rITR 使用 LipofectAmine 转染。将该转染混合物加入在前一天以 3.5×10^6 个细胞/T25 培养瓶的密度接种的 PER.C6 中。第二天, 将培养基更换为 PER.C6 培养基(具有 10% FBS 和 10 mM MgCl₂ 的 DMEM)并将细胞在 37°C/10%CO₂ 中进一步温育。对照转染使用 pAdApt35.Luc 与

pWE.Ad35.pIX-rITR 共转染及单独的 pWE.Ad35.pIX-rITR 进行。在转染两天后, 将细胞从 T25 传递至 T80 培养瓶并入上述温育。再三天后, 用 pAd35.ΔMT.Orf6 与 Ad35 主链一起转染的培养物示出表示病毒复制的致细胞病变作用 (CPE), 在进一步温育 2 天后收获 (包括细胞和培养基)。将细胞悬浮液进行 2 次冷冻/解冻循环, 并将所得材料 (粗制裂解物) 在 -20°C 保存直至进一步使用。其它培养瓶未示出 CPE, 在移至 T80 中 6 天后在 T80 培养瓶中以 1:3 传代。再过 5 天后, pAdApt35.Luc + pWE.Ad35.pIX-rITR 转染的培养瓶示出少量的类 CPE 事件, 但不进一步进展。将得自 pAd35.ΔMT.Orf6 转染的 0.2 和 0.5ml 的粗制裂解物用于再次感染于 T80 培养瓶中大约 85% 铺满的 PER.C6 细胞。这样在温育一天后产生完全 CPE, 表明所述粗制裂解物中存在感染性病毒。这些培养物也通过两次冷冻/解冻循环收获。单独用构建体 pAd35.ΔMT.Orf6 在 PER.C6 细胞上进行另外的对照转染, 以证实 orf6 自身的表达不产生细胞毒性及类 CPE 细胞死亡。总之, 只有用 pAd35.ΔMT.Orf6 与 pWE.Ad35.pIX-rITR 一起转染才产生 CPE 及病毒复制。

进行 PCR 分析以证实 Ad5-E4-orf6 置换从前的 E1 区的基于 Ad35 的病毒基因组的存在。为此, 将病毒 DNA 如下从粗制裂解物中分离。将 275 μl 的粗制裂解物与 10 μl DNaseI (10 mg/ml) 在 37°C 温育 30 分钟。随后, 加入 6.0 μl 0.5M EDTA (pH8.0)、7.5 μl 20% SDS 和 1.5 μl 20mg/ml 蛋白酶 K 并涡旋混合。然后将该混合物在 50°C 温育 1 小时。最后, 使用 GeneClean Spin 试剂盒 (Bio 101, Inc.) 分离病毒 DNA。将 2 μl 分离的 DNA 使用引物 35psi-For 和 35R4 进行 PCR 扩增。程序设定为 94°C 2 分钟, 随后进行 30 次 (94°C 30 秒, 58°C 30 秒及 72°C 5 分钟) 循环, 最后在 72°C 10 分钟结束反应。所述引物特异于 Ad35 序列并产生一个 2.9 kb 的片段, 范围从包装序列至第 4669 位核苷酸 (编号如野生型 Ad35 序列), 其因此包括 Ad5 orf6 转基因盒。对获得

的 PCR 片段进行电泳示出该片段具有期望的长度，与在衔接质粒 pAd35.ΔMT.Orf6 上产生的对照 PCR 片段匹配。因此，如果病毒也表达 Ad5-E4orf6，则可以在 Ad5 互补细胞上产生完全缺失 E1 的基于 Ad35 的载体。

实施例 13：pWE.Ad35.pIX-rITR5E4 的构建

将第一个 PCR 片段使用引物 DF35-1 和 35FR 扩增。扩增使用 pWE.Ad35.pIX-rITR (见 WO 00/70071)作为模板 DNA，使用 Pwo DNA 聚合酶(Roche)及另外的 DMSO (Sigma，终浓度 3%)进行。程序如下：94℃ 2 分钟，随后进行 30 次(94℃ 30 秒，52℃ 30 秒及 72℃ 3 分钟)循环，最后的步骤是 72℃ 8 分钟以保证完整的片段。扩增产生相应于 Ad35 序列的第 30224—31805 位核苷酸的 1.6 kb 的片段。将 BamHI 位点导入 3'端。将扩增的 DNA 使用 GeneClean 试剂盒从凝胶中纯化并与 pCRScript/Amp 克隆载体试剂盒 (Stratagene)连接。在转化入电感受态 DH10B 细胞中后，选择白色集落进行进一步分析。这样产生构建体 pCR-fiber35。由于平端克隆，该 PCR 片段可以 2 个方向插入。选择在 5'端 pCRScript/Amp 载体多接头中具有 BamHI 位点的插入体的克隆。用 BamHI 消化因此产生一个 1.6 kb 的片段。测序证实 PCR 片段的正确扩增。将第二个 PCR 片段使用引物 5E4F 和 5E4R 扩增。用 pWE.Ad5.AflII-rITRsp 进行扩增，其是含有 pWE.Ad5.AflII-rITR (ECACC 保藏号 P97082116, WO 02/40665 所述)中的一个额外的 PacI 位点的一种粘粒载体。pWE.Ad5.AflII-rITRsp 作为模板，使用上述 Pwo DNA 聚合酶，尽管 pWE.Ad5.AflII-rITR 也可以用于相同目的。在从凝胶中纯化后，将该 DNA 用 SstI 和 BamHI (在 PCR 期间导入的两个位点)消化并将 3 kb 的片段使用 GeneClean 试剂盒从琼脂糖凝胶中纯化。扩增的 Ad5 E4 区域相应于 Ad5 序列的第 32794 至 35828 碱基对。第三个 PCR 片段使用引物 355ITR 和 353ITR 在 pWE.Ad35.pIX-rITR

上产生。如上所述进行 PCR 扩增。SstI 位点(5'端) 和 EcoRI 位点(3'端) 位于所得 160 bp 片段两侧。在如上述从凝胶中纯化后, 将 DNA 用 SstI 和 EcoRI 消化。然后将相应于 Ad35 的右侧 ITR 的 160bp 的片段在低熔点的琼脂糖凝胶上从消化的末端中分离并在凝胶中收集。接着, 将 pUC119 用 BamHI 和 EcoRI 消化并将 3.1 kb 的片段使用 GeneClean 试剂盒从凝胶中分离。然后将上述处理的第二个和第三个 PCR 片段与 BamHI/EcoRI 消化的 pUC119 连接, 产生 pUC.Ad5E4-35ITR。对克隆的 PCR 衍生的插入体进行测序以核实正确的扩增。接着, 将 pCR-fiber35 中的 1.6 kb 插入体用 BamHI 切除并将该片段如上述从凝胶中纯化。将 pUC.Ad5E4-35ITR 也用 BamHI 消化并将该线性片段从凝胶中纯化。将这两个片段连接并选择具有相互正确方向的克隆, 产生 pUC.35-5E4 (图 14)。pUC.35-5E4 的构建步骤示于图 13。将 pUC.35-5E4 中的腺病毒插入体亚克隆进 pBr.Ad35.PRn 中(图 15; 见 WO 00/70071), 这是具有 Ad35 3'序列的一种构建体。为此, 将构建体 pUC.35-5E4 用 MluI 和 NotI 消化并使用 GeneClean 试剂盒将 4.7 kb 片段从凝胶中纯化。然后将这个片段与得自经 MluI 和 NotI 消化的构建体 pBr.Ad35.PRn 的载体片段连接。将这个 16.3 kb 的片段使用琼脂糖酶(Roche)从凝胶中纯化。然后将该连接物转化进感受态 DH10B 细胞中。所得构建体称为 pBr.Ad35.PR5E4 (图 16, ECACC 保藏号 P02041229)。最后的步骤是需将修饰的 Ad35 序列的 3'末端克隆进病毒粘粒克隆 pWE.Ad35.pIX-rITR 中。为此, 将两个片段在 λ 噬菌体包装反应(Stratagene)中根据厂商说明书组合。第一个片段是通过用 PacI 和 SmaI 消化的得自 pBr.Ad35.PR5E4 的 16.8 kb 的修饰的 Ad35 插入体, 第二个片段是通过用 PacI 和 SmaI 消化 pWE.Ad35.pIX-rITR 获得的 22.8kb 的片段。这两个片段的正确组合产生 pWE.Ad35.pIX-rITR5E4 (图 17)。因此在这个构建体中, Ad35 主链中的 E4 区由衍生自 Ad5 的相应区域置换。

实施例 14: pWE.Ad35.pIX-rITR5Orf6 的构建

为获得含有从 pIX 基因 (Ad35 序列中的第 3401 位核苷酸) 至右侧 ITR 的末端的 Ad35 序列, 而且 E4-orf6 和 -orf6/7 的序列交换为 Ad5 的相应序列的一种腺病毒主链构建体, 将 Ad35 和 Ad5 序列经 PCR 扩增并如下述组合。PCR 片段使用添加直至 3% 的 DMSO 的 Pwo DNA 聚合酶产生。第一个 PCR 使用 pBr.Ad35.PRn (图 15; 见 WO 00/70071) 作为模板及使用引物 E4-F1 和 E4-R2。其程序设定为: 94°C 2 分钟, 随后进行 5 次 (94°C 30 秒, 50°C 30 秒及 72°C 1 分钟) 循环, 接着进行 30 次 (94°C 30 秒, 60°C 30 秒及 72°C 1 分钟) 循环, 最后在 68°C 8 分钟结束反应。将所得 1.8 kb 的片段使用 GeneClean 试剂盒纯化。第二个 PCR 使用 pWE.Ad5.AflIII-rITRsp 作为模板, 其是含有 pWE.Ad5.AflIII-rITR (ECACC 保藏号 P97082116, 见 WO 02/40665 所述) 中一个 PacI 位点的粘粒载体, 并使用引物 E4-F3 和 E4-R4 进行。其程序设定如下: 94°C 2 分钟, 随后进行 30 次 (94°C 30 秒, 62°C 30 秒及 72°C 1 分钟) 循环, 最后在 68°C 8 分钟结束。将 1.1 kb 片段如上纯化。第三个 PCR 用 pBr.Ad35.PRn 作为模板及使用引物 E4-F5 和 E4-R6 进行。其程序设定如下: 94°C 2 分钟, 随后进行 5 次 (94°C 30 秒, 48°C 30 秒及 72°C 45 秒) 循环, 接着进行 30 次 (94°C 30 秒, 56°C 30 秒及 72°C 45 秒) 循环, 最后在 68°C 8 分钟结束。将 366 bp 片段如上述纯化。将纯化的片段的样品加样于凝胶上以估计浓度, 然后将该片段混合在一起, 含有 700ng PCR-1、650ng PCR-2 和 430ng PCR-3, 共 30 μ l。向此混合物中加入 3 μ l EcoPol 缓冲液 (New England Biolabs), 3 μ l 2mM dNTP 溶液及 3 μ l milliQ H₂O。将所得混合物在 94°C 温育 3 分钟, 然后在一个 PCR 设备中以 0.5°C/秒的速度冷却至 65°C。在 65°C 温育 10 分钟后, 将该混合物以 0.05°C/秒的速度进一步冷却至 20°C 并在 20°C 温育 10 分钟。然后加入 1 μ l (5 单位) Klenow 酶 (New

England Biolabs), 随后在 37℃温育 60 分钟。将 5μl 的这种 Klenow 混合物用作模板以如下单独扩增两个片段。在一个反应中使用引物组 1: NF-1 和 NcoI-R, 使用 Pwo DNA 聚合酶(Roche), 加入 DMSO 至终浓度为 3%并使用如下 PCR 程序: 94℃ 2 分钟, 随后进行 30 次(94℃ 30 秒, 66℃ 30 秒及 72℃ 3 分钟)循环, 最后在 68℃ 8 分钟结束。在一个反应中使用引物组 2: NcoI-F 和 NR-2, 使用 Pwo DNA 聚合酶(Roche), 加入 DMSO 至终浓度为 3%并使用如下 PCR 程序: 94℃ 2 分钟, 随后进行 30 次(94℃ 30 秒, 62℃ 30 秒及 72℃ 90 秒)循环, 最后在 68℃ 8 分钟结束。将所得 2.7 kb 片段(引物组 1)和 1.1 kb 片段(引物组 2)使用 GeneClean 试剂盒从凝胶中纯化, 并均与 pCRscriptAmp 载体(Stratagene)连接及转化进 DH10B 电感受态细胞中。这样产生构建体 pCRscriptAmp.NFI-NcoIR(图 18) 和 构建体 pCRscriptAmp.NcoIF-NR2(图 19)。由于插入体含有平端, 因此每个克隆获得两个方向。使用 KpnI 消化, 选择具有进一步克隆所需方向的构建体(见图 18 和 19)。然后对插入体进行测序以核实正确的扩增。接着, 将来自 pCRscriptAmp-NcoIF-NR2 的部分插入体使用 BamHI 和 NcoI 切除, 并如上述从凝胶中纯化。将 pCRscriptAmp-NFI-NcoIR 用相同的酶消化并将含有载体的片段也从凝胶中纯化。将这些片段连接产生 pCR.NF1-NR2 (图 20)。pCR.NF1-NR2 含有 Ad35 序列的第 30162—33234 位核苷酸之间的 Ad35 序列及第 31879—32974 位核苷酸之间的 E4-orf6 和 E4-orf6/7 序列置换为位于 Genbank 中公布的 Ad5 序列(登记号 M73260)第 32968 至 34077 位之间的 Ad5 衍生序列。因此, 正如从图 21 和 22 所示氨基酸序列对比中可见, 克隆的 E4-orf6 蛋白的氨基酸序列与在 Ad5(SEQ ID NO:61; Ad35 的 E4-orf6 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:62)中发现的 E4-orf6 序列相同, 而且 E4-orf6/7 氨基酸序列与 Ad5 中存在的 E4-orf6/7 序列绝大部分相同(Ad 5 的 E4-orf6/7 序列为 SEQ ID NO:63, Ad35 的 E4-orf6/7 序列为 SEQ ID

NO:64, 克隆的融合蛋白为 SEQ. ID. NO.65)。显然, 使用不偏离本发明的上述一般方法可以设计不同的杂合 Ad35-Ad5 E4 构建体。然后将来自 pCR.NF1-NR2 的这种嵌合插入体克隆进 pWE.Ad35.pIX-rITR: 将 pCR.NF1-NR-2 用 MluI 和 NdeI 消化并将所得 2.8kb 片段使用 GeneClean 试剂盒从凝胶中纯化。将构建体 pBr.Ad35.PRn 也用 MluI 和 NdeI 消化并将 18 kb 载体片段使用琼脂糖酶(Roche)从凝胶中分离。将这两个片段连接产生构建体 pBr.Ad35.PR.5Orf6 (图 23, ECACC 保藏号 P02041227)。将这个构建体中含有嵌合 E4 区域的 PacI 和 SmaI 之间的 Ad35 序列使用上述 λ 噬菌体包装克隆进构建体 pWE.Ad35.pIX-rITR 中。所得 pWE.Ad35pIX-rITR.5Orf6 (图 24)通过在 PER.C6 包装细胞上与 Ad35 衔接质粒共转染用于产生重组的基于 Ad35 的病毒。

实施例 15 : 构建 pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3.5E4 和 pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3.5Orf6

将 Ad35 主链通过缺失 E3 序列而进一步修饰。已知 E3 蛋白调节宿主对腺病毒感染的免疫应答并因此对重组病毒的体外增殖是非必需的。另外, E3 序列的缺失使得可以在载体中插入一个更大的异源序列而不损害包装效力。同样, 就腺病毒载体用作免疫接种的载体而言, 由 E3 区编码的免疫调节基因不是优选的。

如前述构建 pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3 (图 1)。为构建上述 E3 缺失形式的 E4 修饰的主链构建体, 如下在 pBr.Ad35.PRn Δ E3 (图 25) 构建体中导入 E4 修饰。将构建体 pUC.35-5E4 (图 13)用 MluI 和 NotI 消化并将 4.7kb 片段使用 GeneCleanII 试剂盒从凝胶中分离。将构建体 pBr.Ad35.PRn Δ E3 也用 MluI 和 NotI 消化并将 13.6kb 载体片段使用 GeneClean spin 试剂盒从凝胶中分离。将这些片段连接产生构建体 pBr.Ad35. Δ E3.PR5E4 (图 26)。将构建体 pCR.NF1-NR2(图 20)用 MluI、

NdeI 和 BglII 消化(后者将载体片段消化为较小片段), 并将 2.8kb 片段使用 GeneClean spin 试剂盒从凝胶中分离。将构建体 pBr.Ad35.PRnΔE3 用 MluI 和 NdeI 消化, 使用 CIP 酶(New England Biolabs)去磷酸化并将 15.2 kb 载体片段使用 GeneClean spin 试剂盒从凝胶中分离。将这些片段连接产生构建体 pBr.Ad35. ΔE3.PR5Orf6 (图 27)。

然后将 pBr.Ad35.ΔE3.PR5E4 和 pBr.Ad35.ΔE3.PR5Orf6 用于将 pWE.Ad35.pIX-rITR 中的 3' PacI-SwaI 片段交换为 pBr.Ad35.ΔE3.PR5E4 和 pBr.Ad35.ΔE3.PR5Orf6 中的相应区域。这样产生构建体 pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3.5E4 和 pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3.5Orf6。产生这些大粘粒的另一种方法是在连接反应中使用三个片段包装: 一个来自 pWE.Ad35.pIX-rITR 的 14.7 kb 的 NotI-PacI 片段、来自 pBr.Ad35.ΔE3.PR5E4 或 pBr.Ad35.ΔE3.PR5Orf6 的 PacI-NotI 插入体及 NotI 消化的 pWE15 粘粒载体片段(Stratagene)。后一片段也可以分离自 NotI/PacI 消化的 pWE.Ad35.pIX-rITR。例如 NotI-消化的 pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3.5Orf6 与例如 PI-PspI 消化的 pAdApt35.LacZ.rsv (实施例 9)共转染进 PER.C6TM 细胞中将产生衍生自 Ad35 的重组腺病毒, 该重组腺病毒包含衍生自 Ad5 的 E4-orf6(授予在 PER.C6 上增殖的能力), 所述重组腺病毒进一步具有一个异源 pIX 启动子, 导致 pIX 表达水平升高及产生稳定的病毒体。

实施例 16: 在 PER.C6 细胞上产生 E1 和 E1/E3 缺失的基于 Ad35 的载体

为使用基于 pBr.Ad35.PRn 的构建体能在互补细胞系 PER.C6 上产生重组 Ad35 病毒, 我们首先产生含有 Ad35 序列(WO 00/70071)的第 3401 至 24650 碱基对的 Ad35 序列的一种新的构建体, 并因此与衔接

质粒和基于 pBr.Ad35.PRn 的构建体重叠。将这三个质粒转染进 PER.C6 细胞中, 进行双同源重组产生一个完整的病毒基因组, 重组病毒的复制如图 18 所示。需要的质粒通过缺失 pWE.Ad35.pIX-rITR 中的大部分 Ad35 序列而产生。为此, 将 pWE.Ad35.pIX-rITR 用 EcoRV 消化并将含有 29 kb 载体的片段使用 GeneClean spin 试剂盒从低熔点凝胶中纯化。将纯化的 DNA 自身连接并用于转化 DH10B 电感受态细菌 (Invitrogen/LTI) 产生 pWE.Ad35.pIX-EcoRV (图 29)。

用于转染的所有 DNA 均如表 V 所示消化, 在 65℃ 热失活 15 分钟, 用于转染中时不用进一步处理。将 PER.C6 细胞在转染前一天以 3×10^6 个细胞/培养瓶的密度接种于 T25 培养瓶中并如表 V 所示使用 LipofectAmine (Invitrogen/LTI) 根据厂商说明书进行转染, 除了在 5 小时后将无血清 DMEM 培养基 (Gibco/BRL) 中转染混合物用 PER.C6 培养基 (DMEM, 10% FBS 和 10mM $MgCl_2$) 置换。第 2 天, 通过荧光显微镜估计转染效力为 50%。两天后, 将细胞经胰蛋白酶消化并再接种于 T80 培养瓶中并在 37℃/10%CO₂ 中进一步温育。在转染 6 天后, 所有培养物均示出完全致细胞病变作用 (CPE, 表示病毒增殖), 除了用 Ad35.AdApt.eGFP+ pWE.Ad35.pIX-rITR 转染的 PER.C6 培养物。一天后, 收获具有 CPE 的培养瓶中的细胞和培养基并进行两次冷冻/解冻循环, 通过离心 (10 分钟, 1500 rpm) 从细胞碎片中澄清, 并将 100μl 这些粗制裂解物用于再次感染于 T80 培养瓶中 85% 铺满的新鲜 PER.C6 细胞。通过胰蛋白酶消化收获没有示出 CPE 迹象的 Ad35.AdApt.eGFP+pWE.Ad35.pIX-rITR 转染物。感染新鲜 PER.C6 细胞 2 天后, 所有培养瓶均示出了完全 CPE, 除了一个在开始收获时没有示出 CPE 迹象。这清楚示出当 Ad5 E4-orf6 基因产物从 Ad35 主链中表达时, 完全缺失 E1 的基于 Ad35 的病毒可以在 PER.C6 细胞上生产。

实施例 17: 具有驱动 pIX 表达的异源启动子的缺失 E1 的 Ad35 病毒

为研究在完全缺失 E1 的病毒中异源启动子序列激活 pIX 基因的作用，使用一系列衔接质粒产生重组 Ad35 病毒。为此，将 pAdApt35LacZ、pAdApt35.LacZ.rsv (实施例 9)、pAdApt535.LacZ (实施例 5)和 pAdApt35BLacZ (在 pIX 基因的前面含有 Ad35 E1B 启动子序列；见下述)用 pIPsp-1 消化并如实施例 2(及 WO 00/70071)所述用于产生具有 NotI 消化的粘粒 pWE/Ad35-3481 和 pWE/Ad35-3481ΔE3 (实施例 7) 的病毒。另外，产生具有衔接质粒 pBr.Ad35.ΔSM.AdAptLacZ (图 7；实施例 10)的病毒。这个衔接质粒缺失 E1A 和大部分 E1B 序列。其保留 0.6kb 的 3' E1B-55K 序列及还具有 55K 的终止密码子与 pIX 的起始密码子之间的 wt 序列。

在完全 CPE 时，收获细胞和培养基，冷冻/解冻并离心以除去细胞碎片。然后将每个转染物的上清（澄清的裂解物）用于进行如实施例 9 所述的噬斑分析。将澄清的裂解物系列稀释 10 倍并将 10^{-5} 至 10^{-9} 的稀释液铺板。

在加入琼脂覆层后一周，噬斑变得可见并将其用 X-gal 染色以监测 LacZ 活性。表 VI 概括示出了这些实验的结果。具有除了调节 pIX 的内源近端 pIX 上游序列的额外或其它序列所有 Ad35 病毒进行的更好，在我们的分析中与 E1 缺失的 Ad35.AdApt.LacZ 病毒相比具有较高数目的表达噬斑。注意 Ad35.ΔSM.LacZ 病毒的基因组总长度(是野生型 Ad35 的 106%)超过针对 Ad5 病毒(105%)测定的最大可包装长度。这也许影响针对这个病毒获得的结果。Ad35.AdApt.LacZ.rsv(105%)也在理论上可包装大小的边界。综合这些结果示出驱动 pIX 表达的一个异源启动子改善最大耐受的包装大小及 E1 缺失的 Ad35 病毒的稳定性。针对具有较长内源近端序列的病毒(Ad35.ΔSM.LacZ)也同样，这提示在此额外的(E1B 55K)序列含有 pIX 表达的调节序列。

pAdapt35BLacZ 是具有调节 pIX 基因的 Ad35 E1B 启动子序列的

一个 Ad35 衔接质粒。

衔接质粒 pAdApt35BLacZ 如下产生。将 E1B 启动子片段使用引物 35E1Blong 和 Ad35E1Bpromrev 扩增。这两个引物均被磷酸化。使用 Pwo DNA 聚合酶(Inno-train, Diagnostic GmbH)根据厂商说明书进行反应。pBr.Ad35.leftITR-pIX 用作模板 DNA (25 ng, 见 WO 02/40665 所述)。该程序设定如下: 94℃ 2 分钟, 然后进行 30 次(94℃ 30 秒, 60℃ 30 秒及 72℃ 1 分钟)循环, 最后在 72℃ 10 分钟结束。冷却/加热坡度设定为 2℃/秒。这个 PCR 导致 125 个核苷酸的 Ad35 的潜在的 E1B 启动子扩增。然后将构建体 pAdapt535.LacZ (实施例 5)用 MfeI 和 BglII 消化。在消化后, 将该载体用 Klenow 酶处理以产生平端。去磷酸化步骤使用 SAP (Roche)进行。然后将如此处理的 8kb 载体片段从凝胶中分离。将 E1B 启动子区域也从凝胶中分离。连接这两个片段并转化进 DH5 α -T1r 感受态细胞中(Invitrogen)。所得质粒中 E1B 启动子的正确方向通过用 HpaI 和 ApaLI 消化而证实。在选择正确的克隆后, 插入的 E1B 启动子序列也通过测序加以核实。

实施例 18: pIX 基因的启动子位于 Ad35 和 Ad11 病毒中 E1B-55K 编码序列的 3'端。

基于上述结果, 我们期望亚群 B 病毒中的 pIX 启动子位于 E1B-55K 编码区。为对此加以研究, 我们如实施例 10 所述开始鉴别 pIX mRNA 加帽位点。为此, 使用 wtAd35、wtAd11 和 Ad35.E1B⁺.AdApt.Luc 病毒以 50 VP/细胞的 MOI 感染 PER55K 克隆 16 细胞。取 wtAd5 作为对照, 因为这个病毒的启动子和 mRNA 起始位点已知。在感染后 16—18 小时, 使用 TRIzol 试剂(Invitrogen)根据厂商说明从感染的培养物中分离 RNA。在该程序结束时, 将分离的 RNA 贮存在 100% 甲酰胺中。使用 GeneRacer 试剂盒 (Invitrogen) 扩增 pIX 转录物的 5'末端, 以确定转录起始的位置。在开始 GeneRacer

方案之前, 如 GeneRacer 方案所述将 5 μ g RNA 通过乙酸钠沉淀从甲酰胺中纯化。将纯化的 RNA 根据厂商方案进行处理以扩增 pIX mRNA 的 5'末端。在磷酸酶处理和随后用烟草酸焦磷酸酶除去帽结构及与 Generacer RNA oligo 连接后, 使用来自该试剂盒的 SuperScript™ II 反转录酶合成 cDNA。CDNA 通过使用 pIX 的一个基因特异性(反向)引物的反转录合成。就 Ad35 (wt 及 E1B+.Luc 病毒)和 wtAd11 而言, 使用引物 pIXrev, 就 Ad5 而言, 使用引物 pIXrev-Ad5。所得 cDNA(1 μ l, 未知浓度)用作 PCR 模板以产生 dsDNA。这个 PCR 使用 Pwo DNA 聚合酶(Roche)根据厂商说明书进行, 并添加 DMSO (Sigma; 3% v/v)。所述扩增使用来自该试剂盒的特异于与所述 mRNA 的 5'端连接的寡核苷酸的 GeneRacer 5'引物, 及如上述基因特异性反向引物进行。反应条件如下: 在 94 $^{\circ}$ C 变性 2 分钟, 随后进行 30 次(94 $^{\circ}$ C 30 秒, 60 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 2 分钟)循环, 最后在 68 $^{\circ}$ C 延长 8 分钟。所得 DNA 片段通过在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳而按大小分离。就 Ad5 而言, 获得一个 480bp 的片段, 就 Ad35 (两个病毒)和 Ad11 而言, 获得一个 200bp 的片段。Ad11 还示出一个 2kb 片段。切下所有片段并从琼脂糖凝胶中纯化。将纯化的 DNA 片段克隆进 pCR4Blunt-TOPO® 载体(Invitrogen)中。对此载体使用商业 M13 正向和反向引物进行测序。将所得序列与野生型序列相对比以确定 pIX 转录起始的位置。从 Ad35 和 Ad11 cDNA 制品中分离的 200bp 条带组成真正的 pIX mRNA, 分离自 Ad11 的 2kb 片段源于 E1B 启动子。图 30 示出 Ad35 (SEQ ID NO:59)和 Ad11(SEQ ID NO:58)cDNA 序列与 wt Ad35 序列 (SEQ. ID.NO. 60)的对比。该对比揭示了 pIX mRNA 中剪接的内含子序列的位置。图 31 示出 Ad35 的 E1B-pIX 区域中鉴别的加帽位点和剪接位点的位置。就 Ad5 而言, 鉴别了期望的 pIX mRNA (Babiss and Vales, 1991)的加帽位点位于第 3580 位(未示出, 编号如 Genbank 登记号 M73260)。就 Ad35 而言, 所述加帽位点位于 E1B-55K 基因 3'

末端第 3339 位的 A 残基上(Ad35 序列, WO 00/70071)。在 Ad11 中, 所述加帽位点相似地在 T 残基上发现(Genbank 登记号 AY163756 第 3339 位)。令人感兴趣地, 在 pIX 的启动子位于在 Ad5 病毒中之处, 55K 基因的终止密码子和 pIX 的起始密码子之间的序列在 Ad35 和 Ad11 病毒中被从 mRNA 中剪接掉。这些结果提供了有利证据表明在 Ad35 和 Ad11 中, pIX 基因表达是由位于 55K 基因的 3'末端的一个启动子调节的。

实施例 19: 保留 3' E1B-55K 序列的一段短序列的 E1 缺失的 Ad35 病毒具有较大的包装能力

随着 pIX mRNA 加帽位点的鉴别, 在病毒载体中包含天然的 Ad35 启动子以正确表达 pIX 以及尽可能多地限制 E1B-55K 序列成为可能。在此作为一个非限制性实例, 我们揭示了保留 166 bp 的 55K 编码序列的 3'末端的 Ad35 衔接质粒的构建(pAdApt35Bsu.Luc)及稳定性和/或包装能力增加的 E1 缺失的 Ad35Luc 病毒的产生。这个 166bp 的序列不编码一个功能性 55K 基因产物, 但在其相对于 pIX 编码序列的天然位置中含有在前述实施例中鉴别的 pIX mRNA 加帽位点。

如下产生构建体 pAdApt35Bsu.Luc:

首先使用 40ng pBr.Ad35.leftITR-pIX 作为靶 DNA (见 WO 02/40665 所述)及使用引物 Bsu55KF 和 Age-pIXR 产生一个 PCR 片段。该 PCR 使用 Pwo DNA 聚合酶(Genaxis)根据厂商说明书进行。另外, 使用 3% v/v DMSO (Sigma)。程序设定如下: 94°C 2 分钟, 然后进行 30 次(94°C 30 秒, 60°C 30 秒及 72°C 1.5 分钟)循环, 最后在 68°C 8 分钟结束。将所得 1.2 kb 产物根据厂商的方案直接克隆进 pCR4Blunt-TOPO 载体 (Invitrogen) 中, 产生 pCR4Blunt-TOPO.Bsu-Age。将该构建体通过用 PvuII(New England

Biolabs)消化进行检测。将 Bsu-Age 片段从用 Bsu36I(New England Biolabs)消化及用 Klenow 酶(New England Biolabs)处理以产生平端的 pCR4Blunt-TOPO.Bsu-Age 质粒中分离。然后将该 DNA 使用 PCR 纯化试剂盒 (Qiagen)纯化及用 AgeI (New England Biolabs)消化。将 1 kb 的片段使用 Gene clean II 试剂盒(BiolOI, Inc.)从凝胶中分离。平行地, 将构建体 pAdApt35.Luc(见 WO 00/70071 所述)用 BglIII 消化并用 Klenow 酶处理。将该 DNA 使用 PCR 纯化试剂盒 (Qiagen)纯化。纯化的DNA用 AgeI (New England Biolabs)消化及用 SAP (Roche)去磷酸化。将 5.8-Kb 片段使用 Gene clean II 试剂盒(Bio101)从凝胶中分离。将这两个片段在连接反应中以等摩尔量混合并转化进 T1 抗性 EM DH10B 细胞(Invitrogen)中。这样产生了质粒 pAdApt35Bsu.Luc。

为产生 E1-缺失的病毒, 将 pAdApt35Bsu.Luc 用 pIPsp-I 消化并与 NotI 消化的 pWE.Ad35-3481(实施例 7)及前述的 pWE.Ad35-3481ΔE3 在 PER55K 克隆 16 细胞上共转化。pWE.Ad35-3481ΔE3 含有与 pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3 (实施例 2)相同的 E3 缺失, 根据实施例 7 所述方法使用构建体 pWE.Ad35-3481ΔNdeI 和一个来自 pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3 的 26.6 kb 的 NdeI 片段产生。

另外, 产生 E1-缺失的 Ad35 病毒, 其在病毒主链中含有来自 Ad5 的 E4-Orf6 和 E4-Orf6/7 序列代替天然的 Ad35 序列 (见实施例 16 在未修饰的 PER.C6 细胞上产生这种病毒)。在本实施例中, 将用 pIPsp-I 消化的 pAdApt35Bsu.Luc 与 NotI/EcoRV 消化的 pWE.Ad35.pIX-EcoRV 及与 PacI/NotI 消化的 pBr.Ad35.PR5Orf6 (有或无 E3 区)共转染。所有转染在转染后一周内均产生完全 CPE, 如上述收获细胞和培养基。然后将病毒进行噬斑纯化, 并针对转基因区域的完整性通过 PCR 分析在合适的互补细胞上扩增的及源自单个噬斑的病毒原种 (viral stocks)。如实施例 3 所述使用引物 AdApt35CMVF 和 pIXrevN2 进行转基因 PCR。图 32 示出了对源自 Ad35Bsu.Luc 及

源自 Ad35Bsu.Luc.5Orf6 病毒的噬斑进行 PCR 的结果实例。

尽管在病毒主链中存在 E3 区或 E4- Orf6 序列，但所有测试的噬斑(每个病毒 5—10 个)均含有一个完整的转基因。一个例外出现在来自 Ad35Bsu.Luc 病毒的一个噬斑，其示出可能源自具有少量缺失的病毒的大约 1.6kb 的一个模糊条带(图 32；泳道 12)。在所有病毒样品中均出现的大约 500bp 的模糊条带是引物在病毒主链上的背景条带。具有荧光素酶表达盒的含有 E3 的 Ad35 病毒在噬斑纯化后被证实是稳定的，这个观测结果与先前用 Ad35.AdApt.Luc 病毒获得的结果相反，该病毒完全缺失 E1 而且不含有所述 166 bp 的 3' 55K 编码序列。使用标准 pAdApt35.Luc 质粒，我们不能产生含有 E3 区的噬斑纯化的病毒。因此随着在主链中掺入额外的 55K 序列，我们现在可以产生总长度超过 34.6 kb 但无明显的不稳定性的病毒。这与 wt Ad35 病毒的长度密切匹配。如果使用 E3-缺失的主链，外源序列的容量理论上超过 5 kb。显然，在不偏离本发明范围内，可以比在现有的实施例中掺入更多的 E1B-55K 序列和/或将 3' 55K 序列与异源增强子序列组合。

表 I: 在三层培养瓶中的克隆 #16 细胞上 E1-和 E1/E3-缺失的 Ad35 病毒的产量。

病毒	Scale (T175 ^{III} 培养瓶)	Total # of Virus DSP后病毒颗粒总数	VP/细胞
Ad35.AdApt.eGFP	4	7.5×10^{11}	2500
Ad35. Δ E3.AdApt.empty	8	2×10^{12}	3300
Ad35. Δ E3.AdApt.LacZ	8	3.8×10^{11}	600
Ad35. Δ E3.AdApt.MV-F	4	8.8×10^{11}	2900
Ad35. Δ E3.AdApt.MV-H	8	2.6×10^{12}	4250

表 II: 对 A549 使用第二代病毒的粗制裂解物的转基因 (LacZ) 活性测试。%蓝色细胞代表用于感染的每种病毒的量。

病毒	10 μ l	1 μ l	0.1 μ l
Ad35.AdApt.LacZ.rsv	95	15	<1
Ad35. Δ E3.AdApt.LacZ.rsv	90	10	<1
Ad35.AdApt.LacZ.C4	2	<0.1	0
Ad35. Δ E3.AdApt.LacZ.C4	15	<1	<0.1

表 III: 对 A549 使用第二代病毒的粗制裂解物的转基因 (荧光素酶) 活性测试。活性表示为相对光单位 (RLU)。

病毒	10 μ l	1 μ l	0.1 μ l	0.01 μ l
Ad35.AdApt.Luc.rsv	845453	27940	178	26
Ad35. Δ E3.AdApt.Luc.rsv	258269	2217	46	6
Ad35.AdApt.Luc.C4	6130	175	18	33
Ad35. Δ E3.AdApt.Luc.C4	814642	6278	147	23
Ad35. Δ E1A Δ 21K.Luc	1514698	50196	503	57

表 IV: 引物序列。

名称	序列	SEQ. ID. NO.
35FR	5'-CGGGATCCACTTTATTTTAGTTGTCGTCTTC-3'	1
35R4	5'-CGGAATTCTTAATTAAGGGAAATGCAAATCTGTGAGG-3'	2
35psi-For	5'-GTGGTATTTATGGCAGGGTG-3'	3
DF35-1	5'-CACTCACCACCTCCAATTCC-3'	4
5E4F	5'-CGGGATCCGTTTGTGTTATGTTTCAACGTG-3'	5
5E4R	5'-GCTGGCGAGCTCGGCGGAGTAACTTGTATGTG-3'	6
355ITR	5'-GATCCGGAGCTCACAACGTCATTTTCCCACG-3'	7
353ITR	5'-AGGAATTCGCGGCCGCATTTAAATC-3'	8
E4-F1	5'-AGAGGAACACATTCCCCC-3'	9
E4-R2	5'-GGGGAGAAAGGACTGTGTATTCTGTCAAATCG-3'	10
E4-F3	5'-TTTGACAGANTACACAGTCCTTTCTCCCGGCTGG-3'	11
E4-R4	5'-ACAAAATACGAGAATGACTACGTCCGGCGTTCC-3'	12
E4-F5	5'-GGACGTAGTCATTCTCGTATTTGTATAGC-3'	13
E4-R6	5'-TCACCAACACAGTGGGGG-3'	14
NF-1	5'-CCACAACCCCCACTACTCCC-3'	15
NR-2	5'-CGTCTCTTCCCTCTCCTCTCC-3'	16
NcoI-R	5'-AGGATCATCCGCTGCTGCCC-3'	17
NcoI-F	5'-CATCAGGATAGGGCGGTGG-3'	18
35E3for	5'-AATGACTAATGCAGGTGCGC-3'	19
35E3rev	5'-CGACGCGTTGTAGTCGTTGAGCTTCTAG-3'	20
AdApt35CMVF	5'-GTAGGTGTCAGCCTAGGTGGTC-3'	21
35pIXR	5'-TCATGTCAGCTGCAAGACAG-3'	22
SV40for	5'-CAATGTATCTTATCATGTCTAG-3'	23
pIX5Rmfe	5'-CTCTCTCAATTGCAGATACAAAACATACATAAGACC-3'	24
pIX35Fmfe	5'-CTCTCTCAATTGTCTGTCTTGCAGCTGACATG-3'	25

AdApt35pIXrev	5'-CAATCTGTCCATCTGAAAATCC-3'	26
pIXcosF-2	5'-CTGCTGGACGTCGCGGCCGCGACATGAGTGGAAATGCTTC-3'	27
Adapt35-3	5'-TGCAAACTGTGAGGGGAAC-3'	28
35D21	5'-TTA GAT CCA TGG ATC CCG CAG ACT C-3'	29
35B3	5'-CCT CAG CCC CAT TTC CAG-3'	30
35F1	5'- CGGAATTCTTAATTAATCGACATCATCAATAATATACCTTATAG -3'	31
35R4	5'-CGGAATTCTTCTTAATTAAGGGAAATGCAAATCTGTGAGG-3'	32
Ad3555KMfeF	5'-AACCAAGCTTCAATTGTCTCTGAA-3'	33
Ad35pIXNcoR	5'-CCACCCATGGCAGCTGCAAGACAG-3'	34
Ad35pIXrev	5'-TCAGCTGCAAGACAGAAAAAAC-3'	35
Epr-F	5'-GTGTTTACTTAAGGTGACGTC-3'	36
Epr-R	5'-GAAAGCCAGCTCCTATGAGC-3'	37
pIXrev	5'-GGCGGGTTGAACGGGTCTTCCA-3'	38
pIXrev-N2	5'-GATGGGAGACGCCCTGTGAGATAAGG-3'	39
35E1Blong	5'-AAGGTGACGTCAATATTTCTGTG-3'	40
Ad35E1bpromrev	5'-ATGAAAGCCAGCTCCTATGAG-3'	41
pIXrev-Ad5	5'-AGGGGAGGAAGCCTTCAGG-3'	42
Bsu55KF	5'-AGG TGG GCG TAG AGG AAT G-3'	43
Age-pIXR	5'-CAA GAC GGG ATC TTG GCG G-3'	44

表 V: 实施例所述用于在 PER.C6 细胞上产生 E1 缺失的基于 Ad35 的病毒的构建体列表。衔接构建体用 PacI 消化, pWE.Ad35.pIX-EcoRV 用 NotI 和 EcoRV 消化, E4-修饰的基于 pBR 的构建体用 PacI 和 NotI 消化。

No.	构建体			CPE
1	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-EcoRV	pBr.Ad35.PR5E4	有
2	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-EcoRV	pBr.Ad35.PR5Orf6	有
3	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-EcoRV	pBr.Ad35.ΔE3PR5E4	有
4	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-EcoRV	pBr.Ad35.ΔE3.PR5Orf6	有
5	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-rITRxNotI		无
6	pAdApt5.eGFP	pWE.Ad5.AflII-rITRxPacI		有

表 VI: 具有不同的驱动 pIX 表达的启动子序列的 Ad35 病毒的 LacZ 阳性噬斑的百分比。(NP=无可见噬斑)

病毒名称	蓝色噬斑%		病毒长度 (包括E3区)
	有E3区	无E3区	
Ad35.AdApt.LacZ	0%	50%	36,1 kb
Ad535.AdApt.LacZ	NP	100%	36,1 kb
Ad35.AdAptB.LacZ	5%	80%	36,2 kb
Ad35.AdApt.LacZ.rsv	90%	100%	36,5 kb
Ad35ΔSM.LacZ	50%	100%	36,7 kb

参考文献

Abrahamsen K, Kong H-L, Mastrangeli A, Brough D, Lizonova A, Crystal R and Falck-Pedersen E. (1997) Construction of an adenovirus type 7a E1A⁻ vector. J Virol 11: 8946-8951。

Babiss, L. E. and Vales, L. D. (1991). Promoter of the adenoviral polypeptide IX gene: Similarity to E1B and inactivation by substitution of the simian virus TATA element. J. Virol. 65 (2), p598-605。

Bett, A. J., Prevec, L. and Graham, F.L. (1993). Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. J. Virol. 67 (10), p5911-5921。

Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein B. and Schaffner W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. Cell 41, 521-530。

Caravokyri, C. and Leppard, K. N. (1995). Constitutive episomal expression of polypeptide IX (pIX) in a 293-based cell line complements the deficiency of pIX mutant adenovirus type 5. J. Virol. 69 (11), p6627-6633。

Fallaux, F. J., Kranenburg, O., Cramer, S. J., Houweling, A., van Ormondt, H., Hoeben, R. C. and van der Eb, A. J. (1996). Characterization of 911: A new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. Hum. Gene Ther. 7, p 215-222。

Fallaux, F. J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D. J., Hehir, K. M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S. J., van Ormondt, H., van der Eb, A. J., Valerio, D. and Hoeben, R. C. (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication competent adenoviruses. Hum. Gene Ther. 9, p

1909-1917。

Farina, S. F., Gao, G. P., Xiang, Z. Q., Rux, J. J., Burnett, R. M., Alvira, M. R., Marsh, J., Ertl, H. C. and Wilson, J. M. (2001). Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J. Virol.* 75 (23), p11603-11613。

Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, L. and Brown, F. (1991). Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch.Virol.Suppl.*2, p140-144。

Furcinitti, P. S., vanOostrom, J. and Burnett R.M.(1989). Adenovirus polypeptide IX revealed as capsid cement by difference images from electron microscopy and crystallography. *EMBO J.* 8 (12), p3563-3570。

Grable, M. and Hearing, P.(1990). Adenovirus type 5 packaging domain is composed of a repeated element that is functionally redundant. *J. Virol.* Vol.64, No.5, p2047-2056。

Graham, F.O., Smiley, J., Russell, W. and Nairn, R.(1970). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen.Virol.*36, p59-72。

Gustin, K.E. and Imperiale, M.J.(1998). Encapsidation of viral DNA requires the adenovirus LI 52/55-kilodalton protein. *J.Virol.* Vol 72, No.10, p7860-7870。

Ghosh-Choudhury, G., Haj-Ahmad, Y. and Graham, F.L. (1987). Protein IX, a minor component of the human adenovirus capsid, is essential for the packaging of full length genomes. *EMBO J.* 6 (6), p1733-1739。

Hagmeyer BM, Duyndam MC, Angel P, De Groom RP, Verlaan M, Elfferich P, Van der Eb AJ and Zantema A. (1996) *Oncogene* 12 :

1025-1032。

Hehir, K.M., Armentano, D., Cardoza, L.M., Chouette, T.L., Berthelette, P.B., White, G.A., Couture, L.A., Everton, M.B., Keegan, J., Martin, J.M., Pratt, D.A., Smith, M.P., Smith, A.E. and Wadsworth, S.C. (1996). Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence. *J.Virol.* 70 (12), p8459-8467。

Herrman, C. H. and Mathews, M. B. (1989). The adenovirus E1B19-kilodalton protein stimulates gene expression by increasing DNA levels. *Mol. Cell. Biol.* 9, p5412-5423。

Horwitz, M. S. (2001). Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. *Virology* 279(1), p 1-8。

Leppard, K. N. (1997). E4 gene function in adenovirus, adenovirus vector and adeno-associated virus infections. *J.Gen.Virol.* 78 , p 2131-2138。

Leppard, K. N. (1998). Regulated RNA processing and RNA transport during adenovirus infection. *Seminars in Virology* 8, p 301-307。

Lutz, P., Rosa-Calatrava, M. and Keding, C. (1997). The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator. *J. Virol.* 71 (7), p5102-5109。

Pilder, S., Logan, J. and Shenk, T. (1984). Deletion of the gene encoding the adenovirus type 5 early region 1B 21,000-molecular-weight polypeptide leads to degradation of viral and host cell DNA. *J.Virol.* 52 (2), p664-671。

Pilder, S., Moore, M., Logan, J. and Shenk, T. (1986). The adenovirus E1B 55K transforming polypeptide modulates transport or

cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 6, p470-476。

Rao, L., Debbas, M., Sabbatini, P., Hockenbery, D., Korsmeyer, S. and White, E. (1992). The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19- kDa and Bcl-2 proteins. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA* Vol. 89, pp 7742-7746。

Reese, M. G. and Eeckman, F. H. (1995). Novel neural network algorithms for improved eukaryotic promoter site recognition. Talk and Abstract from The seventh international genome sequencing and analysis conference. Hyatt Regency, Hilton Head Island, South Carolina, Sept 16-20, 1995。 (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)。

Robert, J. -J., Gauffeny, I., Maccario, J., Jullien, C., Benoit, P., Vigne, E., Crouzet, J., Perricaudet, M. and Yeh, P. (2001). Degenerated pIX-IVa2 adenoviral vector sequences lowers reacquisition of the E1 genes during virus amplification in 293 cells. *Gene Ther.* 8, p1713-1720。

Russell, W. C. (2000). Update on adenoviruses and its vectors. *J.Gen.Virol.* 81, pp 2573-2604。

Sambrook, J. and Russell, D. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Press (2001). ISBN 0-87969-576-5。

Shabram, P. W., Giroux, D. D., Goudreau, A. M., Gregory, R. J., Horn, M. T., Huyghe, B. G., Liu, X., Nunnally, M. H., Sugarman, B. J. and Sutjipto, S. (1997) Analytical anion-exchange HPLC of recombinant type-5 adenoviral particles. *Hum.Gene Ther.* 8 (4): 453-465。

Shenk, T. (1996). *Adenoviridae: The viruses and their replication*. In *Virology*, eds. Fields, B. N., Knipe, D. M. and Howley, P. M.

(Lippincott-Raven, New York), Vol. 2, pp 2111- 2148。

Van der Vliet, P. C. (1995). Adenovirus DNA replication. In The molecular repertoire of adenoviruses II, eds. Doerfler, W. and Bohm, P. (Springer-Verlag , Berlin). Current Topics in Microbiology and Immunology 199/II, pp 1-30。

White, E., Grodzicker, T. and Stillman, B. W. (1984). Mutations in the gene encoding the adenovirus early region 1B 19,000 molecular-weight tumor antigen cause degradation of chromosomal DNA. J. Virol. 52 (2), p410-419。

Yew, P. R. and Berk, A. J. (1992). Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early region 1B protein. Nature 357, pp82-85。

Zhang, W., Low, J. A., Christensen, J. B. and Imperiale, M. I. (2001). Role for the adenovirus IVa2 protein in packaging of viral DNA. J. Virol. Vol. 75 No. 21, pp10446-10454。

序列表

<110> 克鲁塞尔荷兰公司
 <120> 稳定的腺病毒载体及其增殖方法
 <130> 0076WO00ORD
 <150> EP02102631.5
 <151> 2002-11-25
 <150> PCT/NL02/00281
 <151> 2002-04-25
 <150> PCT/NL02/00656
 <151> 2002-10-15
 <160> 65
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer 35FR
 <400> 1
 cgggatccac tttatttttag ttgtcgtcctt c 31
 <210> 2
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer 35R4
 <400> 2
 cggaattcctt aattaaggga aatgcaaatac tgtgagg 37
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer 35psi-For
 <400> 3
 gtggtattta tggcagggtg 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> primer DF35-1
 <400> 4
 cactcaccac ctccaattcc 20

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer 5E4F
 <400> 5
 cgggatccgt ttgtgttatg tttcaacgtg 30

<210> 6
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer 5E4R
 <400> 6
 gctggcgagc tcggcggagt aacttgtatg tg 32

<210> 7
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer 355ITR
 <400> 7
 gatccggagc tcacaacgtc attttcccac g 31

<210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer 353ITR
 <400> 8
 aggaattcgc ggccgcattt aaatc 25

<210> 9
 <211> 18
 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer E4-F1

<400> 9

agaggaacac attcccc

18

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer E4-R2

<400> 10

ggggagaaaag gactgtgtat tctgtcaaat gg

32

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer E4-F3

<400> 11

tttgacagaa tacacagtcc tttctccccg gctgg

35

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer E4-R4

<400> 12

acaaaatacag agaatgacta cgtccggcgt tcc

33

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer E4-F5

<400> 13

ggacgtagtc attctcgtat tttgtatagc

30

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer E4-R6

<400> 14
tcaccaacac agtggggg 18

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> primer NF-1

<400> 15
ccacaacccc cactactccc 20

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> primer NR-2

<400> 16
cgtctcttcc ctctcctctc c 21

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> primer NcoI-R

<400> 17
aggatcatcc gctgctgccc 20

<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> primer NcoI-F

<400> 18
catcaggata gggcggtgg 19

<210> 19
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> primer 35E3for
 <400> 19
 aatgactaat gcaggtgcgc 20
 <210> 20
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer 35E3rev
 <400> 20
 cgacgcgttg tagtcgttga gcttctag 28
 <210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer AdApt35CMVF
 <400> 21
 gtaggtgtca gcctaggtgg tc 22
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer 35pIXR
 <400> 22
 tcatgtcagc tgcaagacag 20
 <210> 23
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer SV40for
 <400> 23
 caatgtatct tatcatgtct ag 22
 <210> 24
 <211> 35
 <212> DNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> primer pIX5Rmfe
 <400> 24
 ctctctcaat tgcagataca aaactacata agacc 35

<210> 25
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer pIX35Fmfe
 <400> 25
 ctctctcaat tgtctgtctt gcagctgaca tg 32

<210> 26
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer AdApt35pIXr
 <400> 26
 caatctgtcc atctgaaaat cc 22

<210> 27
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer pIXcosF-2
 <400> 27
 ctgctggacg tcgcggccgc gacatgagtg gaaatgcttc 40

<210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer Adapt35-3
 <400> 28
 tgcaaactctg tgaggggaac 20

<210> 29
 <211> 25
 <212> DNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> primer 35D21
 <400> 29
 ttagatccat ggatcccgca gactc 25

<210> 30
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer 35B3
 <400> 30
 cctcagcccc atttcag 18

<210> 31
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer 35F1
 <400> 31
 cggaattctt aattaatcga catcatcaat aatatacctt atag 44

<210> 32
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer 35R4
 <400> 32
 cggaattctt ctttaattaag ggaaatgcaa atctgtgagg 40

<210> 33
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer Ad3555KMfeF
 <400> 33
 aaccaagctt caattgtctc tgaa 24

<210> 34
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer Ad35pIXNcoR

<400> 34
ccacccatgg cagctgcaag acag 24

<210> 35
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> primer Ad35pIXrev

<400> 35
tcagctgcaa gacagaaaaa ac 22

<210> 36
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> primer Epr-F

<400> 36
gtgtttactt aaggtgacgt c 21

<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> primer Epr-R

<400> 37
gaaagccagc tcctatgagc 20

<210> 38
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> primer pIXrev

<400> 38
ggcgggttga acgggtcttc ca 22

<210> 39
<211> 26
<212> DNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> primer pIXrev-N2
 <400> 39
 gatgggagac gccctgtcag ataagg 26

<210> 40
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer 35E1Blong
 <400> 40
 aaggtgacgt caatatttgt gtg 23

<210> 41
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer Ad35E1bpromrev
 <400> 41
 atgaaagcca gtcctatga g 21

<210> 42
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer pIXrev-Ad5
 <400> 42
 aggggaggaa gccttcagg 19

<210> 43
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer Bsu55KF
 <400> 43
 aggtgggcgt agaggaatg 19

<210> 44
 <211> 19
 <212> DNA

```

<213> Artificial

<220>
<223> primer Age-pIXR

<400> 44
caagacggga tcttggcgg                                     19

<210> 45
<211> 102
<212> DNA
<213> Adenovirus type 2

<220>
<221> misc_feature
<223> Ad2 proximal pIX upstream sequence

<220>
<221> E1B 55K stopcodon
<222> (1)..(3)

<220>
<221> Sp1 site
<222> (18)..(24)

<220>
<221> TATA_signal
<222> (45)..(51)

<220>
<221> pIX startcodon
<222> (99)..(102)

<400> 45
tgagggtactg aaatgtgtgg gcgtggctta aggggtgggaa agaatatata aggtgggggt      60

ctcatgtagt tttgtatctg ttttgcagca gccgccgcca tg                             102

<210> 46
<211> 105
<212> DNA
<213> Adenovirus type 5

<220>
<221> misc_feature
<223> Ad5 proximal pIX upstream sequence

<220>
<221> E1B 55K stopcodon
<222> (1)..(3)

<220>
<221> Sp1 site
<222> (18)..(24)

<220>

```

```

<221> TATA_signal
<222> (45)..(51)

<220>
<221> pIX startcodon
<222> (103)..(105)

<400> 46
tgagggtactg aaatgtgtgg gcgtggctta aggggtgggaa agaatatata aggtgggggt      60
cttatgtagt tttgtatctg ttttgcagca gccgccgccg ccatg                          105

<210> 47
<211> 84
<212> DNA
<213> Adenovirus type 12

<220>
<221> misc_feature
<223> Ad12 proximal pIX upstream sequence

<220>
<221> E1B 55K stopcodon
<222> (1)..(3)

<220>
<221> pIX startcodon
<222> (81)..(84)

<400> 47
tgaggtaagt ggggtggagct aggtgggatt ataaaaggct ggaagtcaac taaaaattgt      60
ttttgttctt ttaacagcac gatg                                                84

<210> 48
<211> 93
<212> DNA
<213> Adenovirus type 9

<220>
<221> misc_feature
<223> Ad9 proximal pIX upstream sequence

<220>
<221> E1B 55K stopcodon
<222> (1)..(3)

<220>
<221> pIX startcodon
<222> (91)..(93)

<400> 48
tagaggtagg tcgagtgagt agtgggcgtg gctaaggatga ctataaaggc ggggtgtctta      60
cgagggtctt tttgcttttc tgcagacatc atg                                      93

```

<210> 49
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Adenovirus type 40

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Ad40 proximal pIX upstream sequence

<220>
 <221> E1B 55K stopcodon
 <222> (1)..(3)

<220>
 <221> pIX startcodon
 <222> (71)..(73)

<400> 49
 taagggttaag gggcggagcc tattacaggt ataaagggtg gggtagagta aaaaaaaggg 60
 aagttacaaa atg 73

<210> 50
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Adenovirus type 4

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Ad4 proximal pIX upstream sequence

<220>
 <221> E1B 55K stopcodon
 <222> (1)..(3)

<220>
 <221> pIX startcodon
 <222> (88)..(90)

<400> 50
 tagagtgagt agtgttcttg ggcgggggag gacctgcatg agggccagaa taactgaaat 60
 ctgtgctttt ctgtgtgttg cagcagcatg 90

<210> 51
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> simian Adenovirus type 25

<220>
 <221> misc_feature
 <223> sAd25 proximal pIX upstream sequence

<220>

```

<221> E1B 55K stopcodon
<222> (1)..(3)

<220>
<221> pIX startcodon
<222> (88)..(90)

<400> 51
tagagtgtagt agtgttctgg ggcgggggag gacctgcatg agggccagaa taactgaaat      60
ctgtgctttt ctgtgtgttg cagcagcatg                                          90

<210> 52
<211> 89
<212> DNA
<213> Adenovirus type 35

<220>
<221> misc_feature
<223> Ad35 proximal pIX upstream sequence

<220>
<221> E1B 55K stopcodon
<222> (1)..(3)

<220>
<221> pIX startcodon
<222> (87)..(89)

<400> 52
taaggtgagt attgggaaaa ctttggggtg ggattttcag atggacagat tgagtaaaaa      60
tttgtttttt ctgtcttgca gctgacatg                                          89

<210> 53
<211> 89
<212> DNA
<213> Adenovirus type 11

<220>
<221> misc_feature
<223> Ad11 proximal pIX upstream sequence

<220>
<221> E1B 55K stopcodon
<222> (1)..(3)

<220>
<221> pIX stopcodon
<222> (87)..(89)

<400> 53
taaggtgagt attgggaaaa ctttggggtg ggattttcag atggacagat tgagtaaaaa      60
tttgtttttt ctgtcttgca gctgtcatg                                          89

```

<210> 54
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Adenovirus type 7

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Ad7 proximal pIX upstream sequence

<220>
 <221> E1B 55K stopcodon
 <222> (1)..(3)

<220>
 <221> pIX startcodon
 <222> (98)..(100)

<400> 54
 taaagtaagt agtgggggca aaatgtggat ggggactttc aggttggttaa ggtggacaaa 60
 ttgggtaaat tttgttaatt tctgtcttgc agctgccatg 100

<210> 55
 <211> 2430
 <212> DNA
 <213> Adenovirus type 35

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Ad35 E1B-pIX region

<400> 55
 aataaaaata tgttaactgt tcaactggtt ttattgcttt ttgggcgggg actcaggtat 60
 ataagtagaa gcagacctgt gtggttagct cataggagct ggctttcatc catggagggt 120
 tgggccatth ttggaagacct taggaagact aggcaactgt tagagagcgc ttcggacgga 180
 gtctccggtt tttggagatt ctggttcgct agtgaattag ctagggtagt ttttaggata 240
 aaacaggact ataaacaaga atttgaaaag ttgttggttag attgcccagg actttttgaa 300
 gctcttaatt tgggccatca gggtcacttt aaagaaaaag ttttatcagt ttttagacttt 360
 tcaaccccag gtagaactgc tgctgctgtg gcttttctta cttttatatt agataaatgg 420
 atcccgcaga ctcatthcag caggggatac gttttggatt tcatagccac agcattgtgg 480
 agaacatgga aggttcgcaa gatgaggaca atcttaggtt actggccagt gcagcctttg 540
 ggtgtagcgg gaatcctgag gcatccaccg gtcattgccag cggttctgga ggaggaaacag 600
 caagaggaca acccgagagc cggcctggac cctccagtgg aggaggcgga gtagctgact 660
 tgtctcctga actgcaacgg gtgcttactg gatctacgtc cactggacgg gataggggag 720

ttaagagggga gagggcatcc agtgggtactg atgctagatc tgagttggct ttaagtttaa	780
tgagtcgcag acgtcctgaa accatttggt ggcatgaggt tcagaaagag ggaagggatg	840
aagtttctgt attgcaggag aaatattcac tggaacaggt gaaaacatgt tggttggagc	900
cagaggatga ttgggcggtg gccattaaaa attatgccaa gatagctttg aggcctgata	960
aacagtataa gatcagtaga cggattaata tccggaatgc ttgttacata tctggaaatg	1020
gggctgaggt ggtaatagat actcaagaca agacagttat tagatgctgc atgatggata	1080
tgtggcctgg agtagtcggt atggaagcag tcaactttgt aaatgttaag tttaggggag	1140
atggttataa tggaatagtg tttatggcca ataccaaact tatattgcat ggttgtagct	1200
tttttggttt caacaatacc tgtgtagatg cctggggaca ggtagtgta cgggggtgta	1260
gtttctatgc gtgttggtt gccacagctg gcagaaccaa gagtcaattg tctctgaaga	1320
aatgcatatt ccaaagatgt aacctgggca ttctgaatga aggcaagca agggccgctc	1380
actgcgcttc tacagatact ggatgtttta ttttaattaa gggaaatgcc agcgtaaagc	1440
ataacatgat ttgtggtgct tccgatgaga ggccttatca aatgctcact tgtgctggtg	1500
ggcattgtaa tatgctggct actgtgcata ttgtttccca tcaacgcaa aaatggcctg	1560
tttttgatca caatgtgttg accaagtgc ccatgcatgc aggtgggctg agaggaatgt	1620
ttatgcctta ccagtgtaac atgaatcatg tgaaagtgtt gttggaacca gatgcctttt	1680
ccagaatgag cctaacagga atctttgaca tgaacacgca aatctggaag atcctgaggt	1740
atgatgatac gagatcgagg gtgcgcgcat gcgaatgcgg aggcaagcat gccaggttc	1800
agccggtgtg tgtagatgtg accgaagatc tcagaccgga tcatttggtt attgcccgca	1860
ctggagcaga gttcggatcc agtggagaag aaactgacta aggtgagtat tgggaaaact	1920
ttgggggtggg attttcagat ggacagattg agtaaaaatt tgttttttct gtcttgcagc	1980
tgacatgagt ggaaatgctt cttttaaggg gggagtcttc agcccttatc tgacagggcg	2040
tctcccatcc tgggcaggag ttcgtcagaa tgttatggga tctactgtgg atggaagacc	2100
cgttcaaccc gccaatctt caacgctgac ctatgctact ttaagttctt cacctttgga	2160
cgcagctgca gccgctgccg ccgcctctgt cgcgcctaac actgtgcttg gaatgggtta	2220
ctatggaagc atcgtggcta attccacttc ctctaataac ccttctacac tgactcagga	2280
caagttactt gtctttttgg ccagctgga ggctttgacc caacgtctgg gtgaactttc	2340
tcagcaggtg gccgagttgc gagtacaac tgagtctgct gtcggcacgg caaagtctaa	2400
ataaaaaaaaa ttccagaatc aatgaataaa	2430

<210> 56

<211> 2429
 <212> DNA
 <213> Adenovirus type 11

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Ad11 ElB-pIX region

<400> 56
 aataaaaata tgttaactgt tcactggttt ttattgcttt ttgggcgggg actcagggtat 60
 ataagtagaa gcagacctgt gtggttagct cataggagct ggctttcatc catggagggtt 120
 tgggccattht tggagacct taggaagact aggcaactgt tagagaacgc ttcggacgga 180
 gtctccggtt tttggagatt ctggttcgct agtgaattag ctagggtagt ttttaggata 240
 aaacaggact ataaacaaga atttgaaaag ttgttggttag attgcccagg actttttgaa 300
 gctcttaatt tgggccatca ggttcacttt aaagaaaaag ttttatcagt tttagacttt 360
 tcaaccccag gtagaactgc tgctgctgtg gcttttctta cttttatatt agataaatgg 420
 atcccgca ga ctcatthtcag caggggatac gttttggatt tcatagccac agcattgtgg 480
 agaacatgga aggttcgcaa gatgaggaca atcttaggtt actggccagt gcagccttht 540
 ggtgtagcgg gaatcctgag gcatccaccg gtcatgccag cggttctgga ggaggaacag 600
 caagaggaca acccgagagc cggcctggac cctccagtgg aggaggcgga gtagctgact 660
 tgtctcctga actgcaacgg gtgcttactg gatctacgtc cactggacgg gataggggag 720
 ttaagaggga gagggcatct agtggtagct atgctagatc tgagttggct ttaagtttaa 780
 tgagtcgcag acgtcctgaa accatthtggg ggcatgaggt tcagaaagag ggaagggatg 840
 aagtttctgt attgcaggag aaatattcac tggaacaggt gaaaacatgt tggttggagc 900
 ctgaggatga ttgggagggt gccattaaaa attatgccaa gatagcttht aggcctgata 960
 aacagtataa gattactaga cggattaata tccggaatgc ttgttacata tctggaaatg 1020
 gggctgaggt ggtaatagat actcaagaca aggcagttat tagatgctgc atgatggata 1080
 tgtggcctgg gtagtcggt atggaagcag taactthtgt aaatgttaag tttaggggag 1140
 atggttataa tggaaatagt tttatggcca ataccaaact tatattgcat ggttgtagct 1200
 tttttggtht caacaatacc tgtgtagatg cctggggaca ggttagtgta cggggatgta 1260
 gtttctatgc gtgttggtt gccacagctg gcagaaccaa gagtcaattg tctctgaaga 1320
 aatgcatatt tcaaagatgt aacctgggca ttctgaatga aggcgaagca agggtcggcc 1380
 actgcgcttc tacagatact ggatgttht ttttgattaa gggaaatgcc agcgtaaagc 1440
 ataacatgat ttgcggtgct tccgatgaga ggccttatca aatgctcact tgtgctggtg 1500

```

ggcattgtaa tatgctggct actgtgcata ttgtttccca tcaacgcaaa aaatggcctg 1560
tttttgatca caatgtgatg acgaagtgtg ccatgcatgc aggtgggctg agaggaatgt 1620
ttatgcctta ccagtgtaac atgaatcatg tgaaagtgtt gttggaacca gatgcctttt 1680
ccagaatgag cctaacagga atttttgaca tgaacatgca aatctggaag atcctgaggt 1740
atgatgatac gagatcgagg gtacgcgcat gcgaatgcgg aggcaagcat gccaggttcc 1800
agccggtgtg tgtagatgtg actgaagatc tcagaccgga tcatttggtt attgcccgcga 1860
ctggagcaga gttcggatcc agtggagaag aaactgacta aggtgagtat tgggaaaact 1920
ttggggtggg attttcagat ggacagattg agtaaaaatt tgttttttct gtcttcagc 1980
tgtcatgagt ggaaacgctt cttttaaggg gggagtcttc agcccttatac tgacagggcg 2040
tctcccatcc tgggcaggag ttcgtcagaa tgttatggga tctactgtgg atggaagacc 2100
cgtccaaccc gccaatctt caacgctgac ctatgctact ttaagttctt cacctttgga 2160
cgcagctgca gctgccgccg ccgcttctgt tgccgtaac actgtgcttg gaatgggtta 2220
ctatggaagc atcatggcta attccacttc ctctaataac cttctaccc tgactcagga 2280
caagttactt gtccttttgg ccagctgga ggctttgacc caacgtctgg gtgaactttc 2340
tcagcagggtg gtcgagttgc gagtacaaac tgagtctgct gtcggcacgg caaagtctaa 2400
ataaaaaaat ccagaatca atgaataaa 2429

```

```

<210> 57
<211> 2426
<212> DNA
<213> Adenovirus type 7

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Ad7 E1B-pIX region

```

```

<400> 57
aataaaatta tgtcagctgc tgagtgtttt attacttctt ggggtggggtc ttggatatat 60
aagtaggagc agatctgtgt ggttagctca cagcaacttg ctgccatcca tggaggtttg 120
ggctatcttg gaagacctca gacagactag gctactacta gaaaacgcct cggacggagt 180
ctctggcctt tggagattct ggttcgggtg tgatctagct aggctagtgt ttaggataaa 240
acaggactac agggaagaat ttgaaaagtt attggacgac attccaggac tttttgaagc 300
tottaacttg ggocatcagg ctcatthtaa ggagaagggt ttatcagttt tagatthttc 360
tactctgggt agaactgctg ctgctgtagc ttttcttact tttatattgg ataaatggat 420
ccgccaaact cacttcagca agggatacgt tttggatttc atagcagcag ctttgtggag 480

```

aacatggaag gctcgcagga tgaggacaat cttagattac tggccagtgc agcctctggg	540
agtagcaggg atactgagac acccaccgac catgccagcg gttctgcagg aggagcagca	600
ggaggacaat ccgagagccg gcctggaccc tccggtggag gagtagctga cctgtttcct	660
gaactgcgac gggtgcttac taggtctacg accagtggac agaacagggg aattaagagg	720
gagaggaatc ctagtgggaa taattcaaga accgagttgg ctttaagttt aatgagccgc	780
aggcgtcctg aaactgtttg gtggcatgag gttcagagcg aaggcagggg tgaagtttca	840
atattgcagg agaaatattc actagaacaa ctttaagacct gttggttga acctgaggat	900
gattgggagg tggccattag gaattatgct aagatatctc tgaggcctga taaacaatat	960
agaattacta agaagattaa tattagaaat gcatgctaca tatcaggga tggggcagag	1020
gttataatag atacacaaga taaagcagct tttagatgtt gtatgatggg tatgtggcca	1080
ggggttgctg gcatggaagc aataacactt atgaatatta ggtttagagg ggatgggtat	1140
aatggcattg tatttatggc taacactaag ctgattctac atggttgtag cttttttggg	1200
tttaataata cgtgtgtaga agcttggggg caagttagtg tgaggggttg tagtttttat	1260
gcatgctgga ttgcaacatc aggtaggggtg aagagtcagt tgtctgtgaa gaaatgcatg	1320
tttgagagat gtaatcttgg catactgaat gaagggtgaag caagggtccg ccatgcgca	1380
gctacagaaa ctgcctgctt cattctaata aagggaatg ccagtgtgaa gcataatatg	1440
atctgtggac attcggatga gaggccttat cagatgctaa cctgcgctgg tggacattgc	1500
aatattcttg ctaccgtgca tatcgtttca catgcacgca agaaatggcc tgtatttgaa	1560
cataatgtga ttaccaagtg caccatgcat ataggtggtc gcaggggaat gtttatgcct	1620
taccagtgtg acatgaatca tgtgaaggta atgttggaac cagatgcctt ttccagagtg	1680
agcgtaacag gaatctttga tatgaatatt caactatgga agatcctgag atatgatgac	1740
actaaaccaa gggtgcgcg atgcgaatgc ggaggcaagc atgctagatt ccagccggtg	1800
tgcgtaggatg tgactgaaga cctgaggccc gatcatttgg tgcttgctg cactggagcg	1860
gagttcgggt ctagtggtga agaaactgac taaagtaagt agtgggggca aatgtggat	1920
ggggactttc aggttggtta ggtggacaaa ttgggtaaat tttgttaatt tctgtcttgc	1980
agctgccatg agtggaagcg cttcttttga ggggggagta tttagccctt atctgacggg	2040
caggctccca ccatgggcag gagttcgtca gaatgtcatg ggatccactg tggatgggag	2100
accgtccag ccgccaatt cctcaacgct gacctatgcc actttgagtt cgtcaccatt	2160
ggatgcagct gcagccgccc ccgctactgc tgccgccaac accatccttg gaatgggcta	2220
ttacggaagc attgttgcca attccagttc ctctaataat ctttcaaccc tggctgagga	2280

```

caagctactt gttctcttgg ctcagctcga ggccttaacc caacgcttag gcgaactgtc 2340
taagcaggtg gccagttgc gtgagcaaac tgagtctgct gttgccacag caaagtctaa 2400
ataaagatct caaatcaata aataaaa 2426

```

```

<210> 58
<211> 240
<212> DNA
<213> Adenovirus type 11

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Ad11 pIX cDNA sequence

```

```

<400> 58
cgactggagc acgaggacac tgacatggac tgaaggagta gaaatcattt ggttattgcc 60
cgcactggag cagagttcgg atccagtgga gaagaaactg actaagctgt catgagtgga 120
aacgcttctt ttaagggggg agtcttcagc ccttatctga cagggcgtct cccatcctgg 180
gcaggagttc gtcagaatgt tatgggatct actgtggatg gaacacccgt tcaacccgcc 240

```

```

<210> 59
<211> 227
<212> DNA
<213> Adenovirus type 35

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Ad35 pIX cDNA sequence

```

```

<400> 59
ggacactgac atggactgaa ggagtagaaa atcatttggg tattgcccgc actggagcag 60
agttcggatc cagtggagaa gaaactgact aagctgacat gagtggaaat gcttctttta 120
agggggggagt cttcagccct tatctgacag ggcgtctccc atcctgggca ggagttcgtc 180
agaatgttat gggatctact gtggatggaa gaccggttca acccgcc 227

```

```

<210> 60
<211> 289
<212> DNA
<213> Adenovirus type 35

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> wild-type Ad35 sequence nt 3339-3628

```

```

<220>
<221> Intron
<222> (62)..(138)

```

```

<220>
<221> startcodon pIX
<222> (146)..(148)

<400> 60
atcatttgggt tattgcccgc actggagcag agttcggatc cagtggagaa gaaactgact 60
aaggtgagta ttgggaaaac tttgggggtgg gattttcaga tggacagatt gagtaaaaaat 120
ttgttttttc tgtcttgcag ctgacatgag tggaaatgct tcttttaagg ggggagtctt 180
cagcccttat ctgacagggc gtctcccatc ctgggcagga gttcgtcaga atgttatggg 240
atctactgtg gatggaagac ccgttcaacc cgccaattct tcaacgctg 289

```

```

<210> 61
<211> 294
<212> PRT
<213> Adenovirus type 5

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> amino acid sequence of the E4-orf6 protein of Ad5

```

```

<400> 61

Met Thr Thr Ser Gly Val Pro Phe Gly Met Thr Leu Arg Pro Thr Arg
1          5          10          15

Ser Arg Leu Ser Arg Arg Thr Pro Tyr Ser Arg Asp Arg Leu Pro Pro
          20          25          30

Phe Glu Thr Glu Thr Arg Ala Thr Ile Leu Glu Asp His Pro Leu Leu
          35          40          45

Pro Glu Cys Asn Thr Leu Thr Met His Asn Val Ser Tyr Val Arg Gly
          50          55          60

Leu Pro Cys Ser Val Gly Phe Thr Leu Ile Gln Glu Trp Val Val Pro
65          70          75          80

Trp Asp Met Val Leu Thr Arg Glu Glu Leu Val Ile Leu Arg Lys Cys
          85          90          95

Met His Val Cys Leu Cys Cys Ala Asn Ile Asp Ile Met Thr Ser Met
          100          105          110

Met Ile His Gly Tyr Glu Ser Trp Ala Leu His Cys His Cys Ser Ser
          115          120          125

```

Pro Gly Ser Leu Gln Cys Ile Ala Gly Gly Gln Val Leu Ala Ser Trp
130 135 140

Phe Arg Met Val Val Asp Gly Ala Met Phe Asn Gln Arg Phe Ile Trp
145 150 155 160

Tyr Arg Glu Val Val Asn Tyr Asn Met Pro Lys Glu Val Met Phe Met
165 170 175

Ser Ser Val Phe Met Arg Gly Arg His Leu Ile Tyr Leu Arg Leu Trp
180 185 190

Tyr Asp Gly His Val Gly Ser Val Val Pro Ala Met Ser Phe Gly Tyr
195 200 205

Ser Ala Leu His Cys Gly Ile Leu Asn Asn Ile Val Val Leu Cys Cys
210 215 220

Ser Tyr Cys Ala Asp Leu Ser Glu Ile Arg Val Arg Cys Cys Ala Arg
225 230 235 240

Arg Thr Arg Arg Leu Met Leu Arg Ala Val Arg Ile Ile Ala Glu Glu
245 250 255

Thr Thr Ala Met Leu Tyr Ser Cys Arg Thr Glu Arg Arg Arg Gln Gln
260 265 270

Phe Ile Arg Ala Leu Leu Gln His His Arg Pro Ile Leu Met His Asp
275 280 285

Tyr Asp Ser Thr Pro Met
290

<210> 62
<211> 299
<212> PRT
<213> Adenovirus type 35

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> amino acid sequence of the E4-orf6 protein of Ad35

<400> 62

Met Ser Gly Ser Asn Ser Ile Met Thr Arg Leu Arg Ala Arg Ser Thr
1 5 10 15

Ser Cys Ala Arg His His Pro Tyr Thr Arg Ala Gln Leu Pro Arg Cys
20 25 30

Glu Glu Asn Glu Thr Arg Ala Ser Met Thr Glu Asp His Pro Leu Leu
35 40 45

Pro Asp Cys Asp Thr Met Thr Met His Ser Val Ser Cys Val Arg Gly
50 55 60

Leu Pro Cys Ser Ala Ser Phe Thr Val Leu Gln Glu Leu Pro Ile Pro
65 70 75 80

Trp Asp Met Phe Leu Asn Pro Glu Glu Leu Lys Ile Met Arg Arg Cys
85 90 95

Met His Leu Cys Leu Cys Cys Ala Thr Ile Asp Ile Phe His Ser Gln
100 105 110

Val Ile His Gly Arg Glu Asn Trp Val Leu His Cys His Cys Asn Gln
115 120 125

Gln Gly Ser Leu Gln Cys Met Ala Gly Gly Ala Val Leu Ala Val Trp
130 135 140

Phe Arg Lys Val Ile Leu Gly Cys Met Ile Asn Gln Arg Cys Pro Trp
145 150 155 160

Tyr Arg Gln Ile Val Asn Met His Met Pro Lys Glu Ile Met Tyr Val
165 170 175

Gly Ser Val Phe Leu Arg Glu Arg His Leu Ile Tyr Ile Lys Leu Trp
180 185 190

Tyr Asp Gly His Ala Gly Ala Ile Ile Ser Asp Met Ser Phe Gly Trp
195 200 205

Ser Ala Phe Asn Tyr Gly Leu Leu Asn Asn Ile Val Ile Met Cys Cys
210 215 220

Thr Tyr Cys Lys Asp Leu Ser Glu Ile Arg Met Arg Cys Cys Ala His
225 230 235 240

Arg Thr Arg Lys Leu Met Leu Arg Ala Ile Lys Ile Met Leu Gln Glu
245 250 255

Thr Val Asp Pro Asp Pro Ile Asn Ser Ser Arg Thr Glu Arg Arg Arg
260 265 270

Gln Arg Leu Leu Val Gly Leu Met Arg His Asn Arg Pro Ile Pro Phe
275 280 285

Ser Asp Tyr Asp Ser His Arg Ser Ser Ser Arg
290 295

<210> 63
<211> 150
<212> PRT
<213> Adenovirus type 5

<220>
<221> misc_feature
<223> amino acid sequence of the E4-orf6+7 protein of Ad5
<400> 63

Met Thr Thr Ser Gly Val Pro Phe Gly Met Thr Leu Arg Pro Thr Arg
1 5 10 15

Ser Arg Leu Ser Arg Arg Thr Pro Tyr Ser Arg Asp Arg Leu Pro Pro
20 25 30

Phe Glu Thr Glu Thr Arg Ala Thr Ile Leu Glu Asp His Pro Leu Leu
35 40 45

Pro Glu Cys Asn Thr Leu Thr Met His Asn Ala Trp Thr Ser Pro Ser
50 55 60

Pro Pro Val Lys Gln Pro Gln Val Gly Gln Gln Pro Val Ala Gln Gln
65 70 75 80

Leu Asp Ser Asp Met Asn Leu Ser Glu Leu Pro Gly Glu Phe Ile Asn
85 90 95

Ile Thr Asp Glu Arg Leu Ala Arg Gln Glu Thr Val Trp Asn Ile Thr
100 105 110

Pro Lys Asn Met Ser Val Thr His Asp Met Met Leu Phe Lys Ala Ser
115 120 125

Arg Gly Glu Arg Thr Val Tyr Ser Val Cys Trp Glu Gly Gly Gly Arg
130 135 140

Leu Asn Thr Arg Val Leu
145 150

<210> 64
<211> 141
<212> PRT
<213> Adenovirus type 35

<220>
<221> misc_feature
<223> amino acid sequence of the E4-orf6+7 protein of Ad35

<400> 64

Met Ser Gly Ser Asn Ser Ile Met Thr Arg Leu Arg Ala Arg Ser Thr
1 5 10 15

Ser Cys Ala Arg His His Pro Tyr Thr Arg Ala Gln Leu Pro Arg Cys
20 25 30

Glu Glu Asn Glu Thr Arg Ala Ser Met Thr Glu Asp His Pro Leu Leu
35 40 45

Pro Asp Cys Asp Thr Met Thr Met His Ser Met Thr Val Ile Gln Thr
50 55 60

Pro Glu Ser His Pro Gln Gln Leu Asp Cys Glu Ser Ala Leu Lys Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Asp Gly Phe Leu Ser Ile Thr Asp Pro Arg Leu Ala Arg Ser
85 90 95

Glu Thr Val Trp Asn Val Glu Ser Lys Thr Met Ser Ile Ser Asn Gly
100 105 110

Ile Gln Met Phe Lys Ala Val Arg Gly Glu Arg Leu Val Tyr Ser Val
115 120 125

Lys Trp Glu Gly Gly Gly Lys Ile Thr Thr Arg Ile Leu
130 135 140

<210> 65
<211> 150
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> amino acid sequence of the E4-orf6+7 fusion protein from Ad5 and

Ad35

<400> 65

Met Thr Thr Ser Gly Val Pro Phe Gly Met Thr Leu Arg Pro Thr Arg
1 5 10 15

Ser Arg Leu Ser Arg Arg Thr Pro Tyr Ser Arg Asp Arg Leu Pro Pro
20 25 30

Phe Glu Thr Glu Thr Arg Ala Thr Ile Leu Glu Asp His Pro Leu Leu
35 40 45

Pro Glu Cys Asn Thr Leu Thr Met His Asn Ala Trp Thr Ser Pro Ser
50 55 60

Pro Pro Val Lys Gln Pro Gln Val Gly Gln Gln Pro Val Ala Gln Gln
65 70 75 80

Leu Asp Ser Asp Met Asn Leu Ser Glu Leu Pro Gly Glu Phe Ile Asn
85 90 95

Ile Thr Asp Glu Arg Leu Ala Arg Gln Glu Thr Val Trp Asn Ile Thr
100 105 110

Pro Lys Asn Met Ser Val Thr His Asp Met Met Leu Phe Lys Ala Ser
115 120 125

Arg Gly Glu Arg Thr Val Tyr Ser Val Lys Trp Glu Gly Gly Gly Lys
130 135 140

Ile Thr Thr Arg Ile Leu
145 150

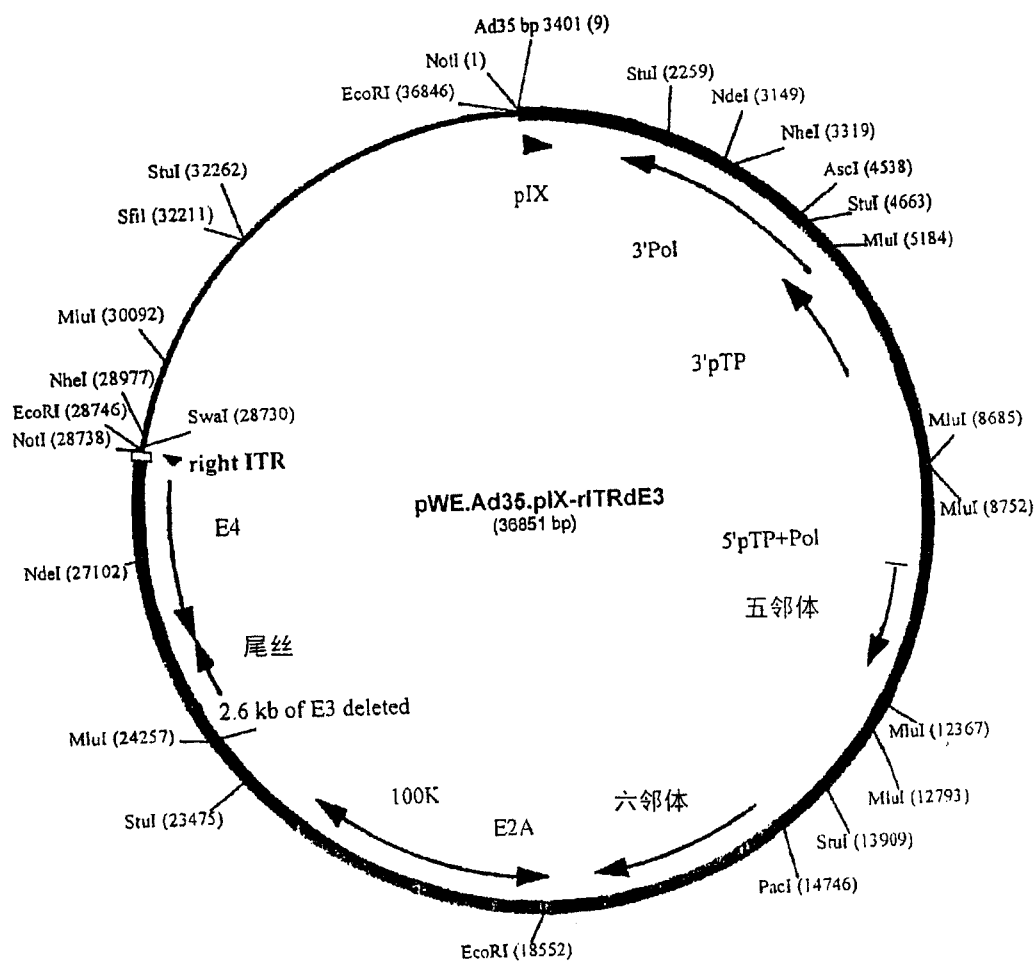


图1

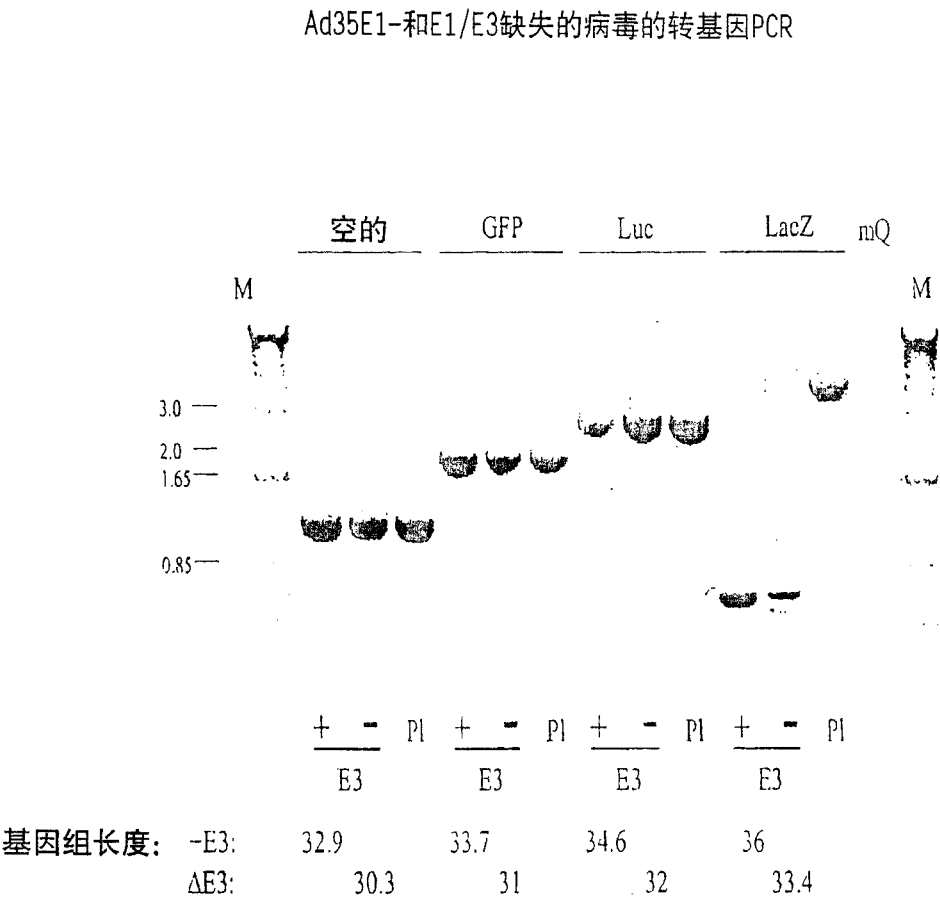


图2

pIX近端区的对比

```

1  TGAGGTACTGAAATGTGTGGGCGTGGCTTAAGGGTGGGAAAGAAATATATAAGGTGGGGGT Ad2.SEQ
1  TGAGGTACTGAAATGTGTGGGCGTGGCTTAAGGGTGGGAAAGAAATATATAAGGTGGGGGT Ad5.SEQ
1  TGAGG--TAAGTGGGTGCAGCTA-----GGTGGGATTATAAAA--GGC-TGGAAGT Ad12.SEQ
1  TAGAGG--TAGGTCGAGTCAGTAGTGGGCGTGGCTAAGGT-GACTATA-AAGGCGGGTGT Ad9.SEQ
1  TAAGGG--TAAG-----GGGCGGAGCCTATTAC--AGGTATAAAGGTTGGGGT-AGAGT Ad40.SEQ
1  TAGAG--TGAGTAGTG-----TTCTG-GGGCGGGGGA--GGACCTGCATGAGGG Ad4.SEQ
1  TAGAG--TGAGTAGTG-----TTCTG-GGGCGGGGGA--GGACCTGCATGAGGG S25.SEQ
1  TAAGG--TGACTATTGGGA--AAACTTTG-GGGTGGGATTTTCAGAT-----GCA Ad35.SEQ
1  TAAGG--TGAGTAGTGGGA--AAACTTTG-GGGTGGGATTTTCAGAT-----GGA Ad11.SEQ
1  TAAAG--TAAGTAGTGGGGGCAAAATGTG-GATCGGGACTTTCAGGTTGGTAAGGTGGA Ad7.SEQ

51  CTCATCTAGTTTGTATCTGTTTTGCAGCA-GCCGCCCECC--ATG Ad2.SEQ
51  CTTATCTAGTTTGTATCTGTTTTGCAGCA-GCCGCCGCGCCCATG Ad5.SEQ
47  CA----ACTAAAAATTGT-TTTTGTCT-TTTAACAGC-ACGATG Ad12.SEQ
57  CTTACGAGCGTCTT-TTTGCTTTTCTGCA-GA-----CATCATG Ad9.SEQ
30  AAAAAAAGGGAAG-----TTACAA--AATG Ad40.SEQ
46  CAGAATAACTGAAATCTGTGCTTTTCTGTGTGTTGCAGCAG-CATG Ad4.SEQ
46  CAGAATAACTGAAATCTGTGCTTTTCTGTGTGTTGCAGCAG-CATG S25.SEQ
46  CAGATTGAGTAAAAATT-TGTTT-TTCTGTCTTGCAGCTGACATG Ad35.SEQ
46  CAGATTGAGTAAAAATT-TGTTT-TTCTGTCTTGCAGCTGTGATG Ad11.SEQ
57  CAAATTGGGTAAAT-TT-TGTTAATTTCTGTCTTGCAGCTGCCATG Ad7.SEQ

```

图3A

推定的pIX启动子区的比较

	终止55k		开始pIX编码
Ad5:	3509	GGGCGT 20 nucl.....	TATATAA 3609
Ad12:	3295	GGGTGG 11 nucl	ATTATAA 3374
Ad9:	3361	GGGCGT 12 nucl	TATAAAG 3449
Ad40:	3149	GGGCGG 13 nucl	TATAAAG 3217
Ad4:	3404	GGGCGG23 nucl	AATAACT 3489
		GGGAGG17 nucl	AATAACT
Ad35:	3400	GGGTGG27 nucl	AATTTGT 3484
Ad11:	3399	GGGTGG 27 nucl	AATTTGT 3483
Ad7:	3385	GGGACT 30 nucl	AATTTTG 3480
共有SP1位点 G/a G G C/t/a G/a G/t			

图3B

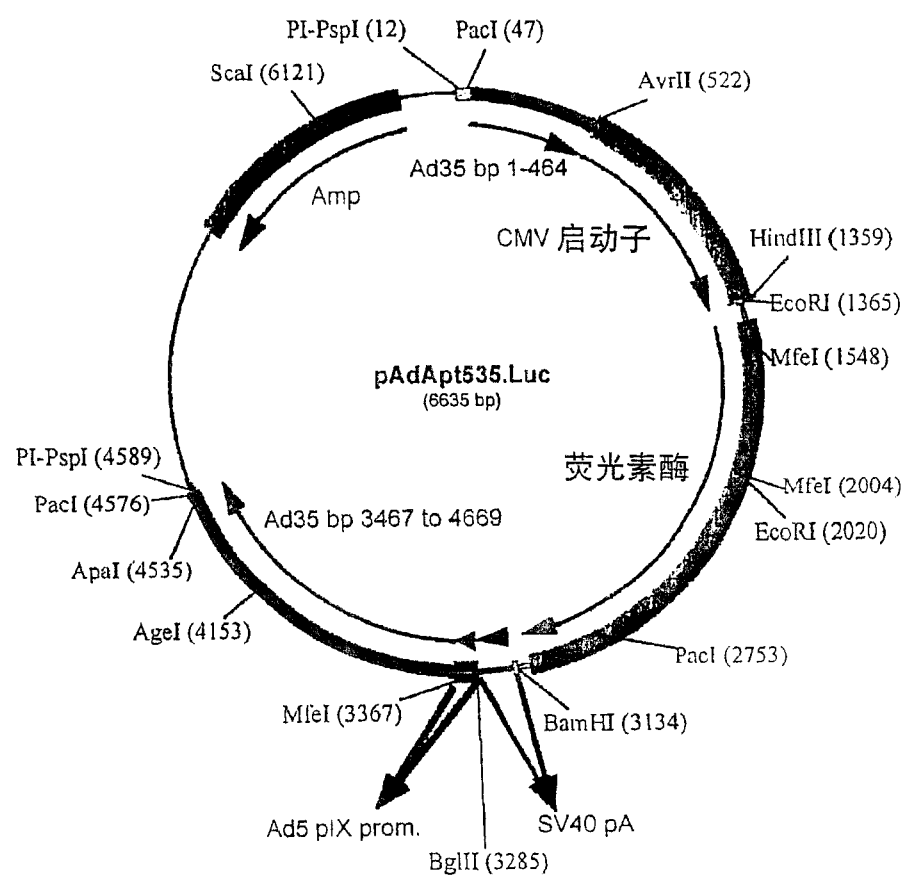


图4

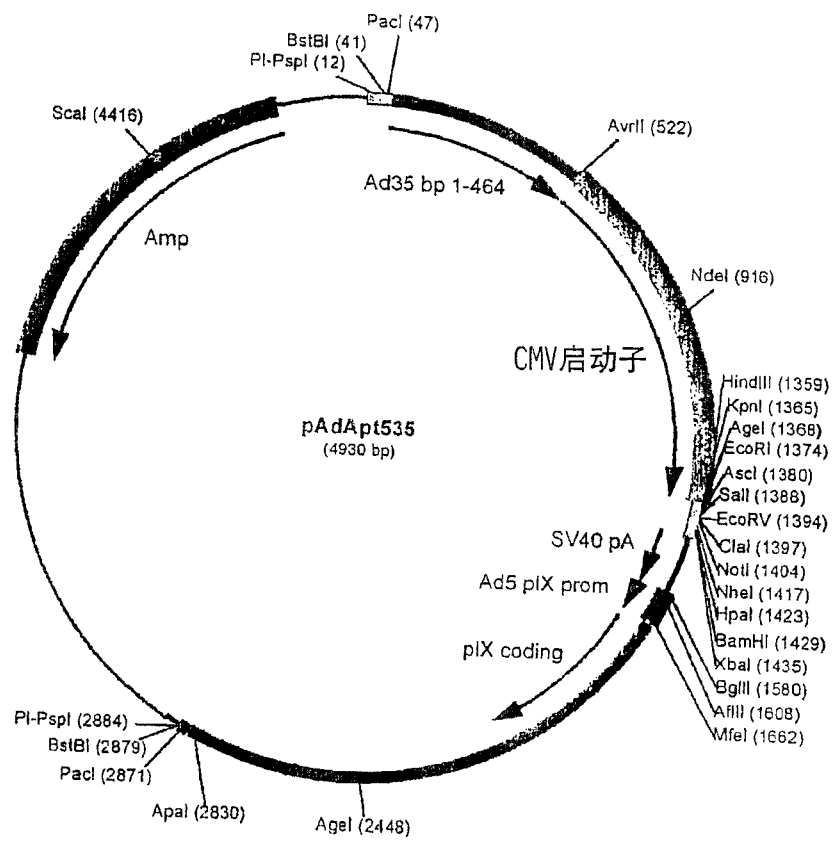


图5

Ad35 E1缺失的病毒的转基因PCR

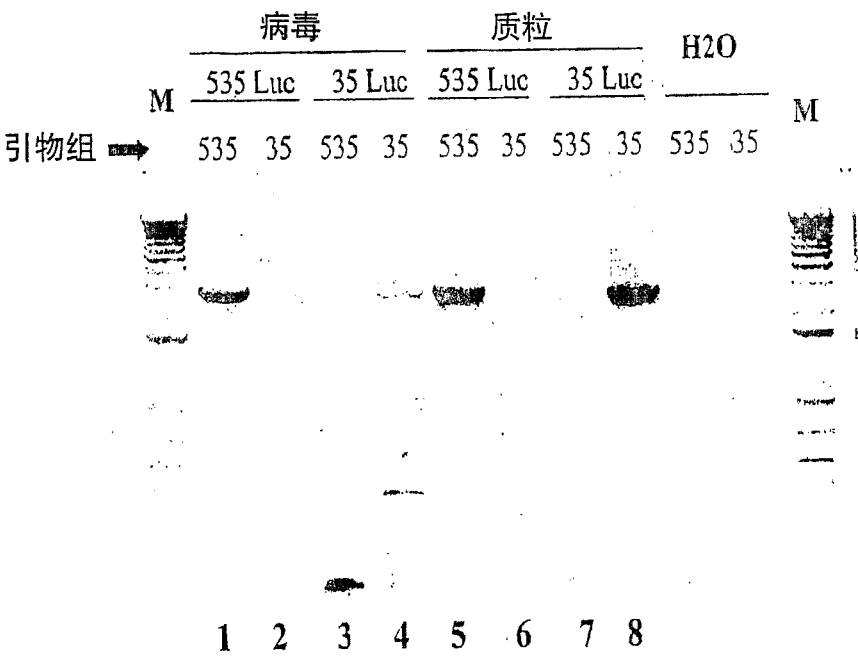


图6A

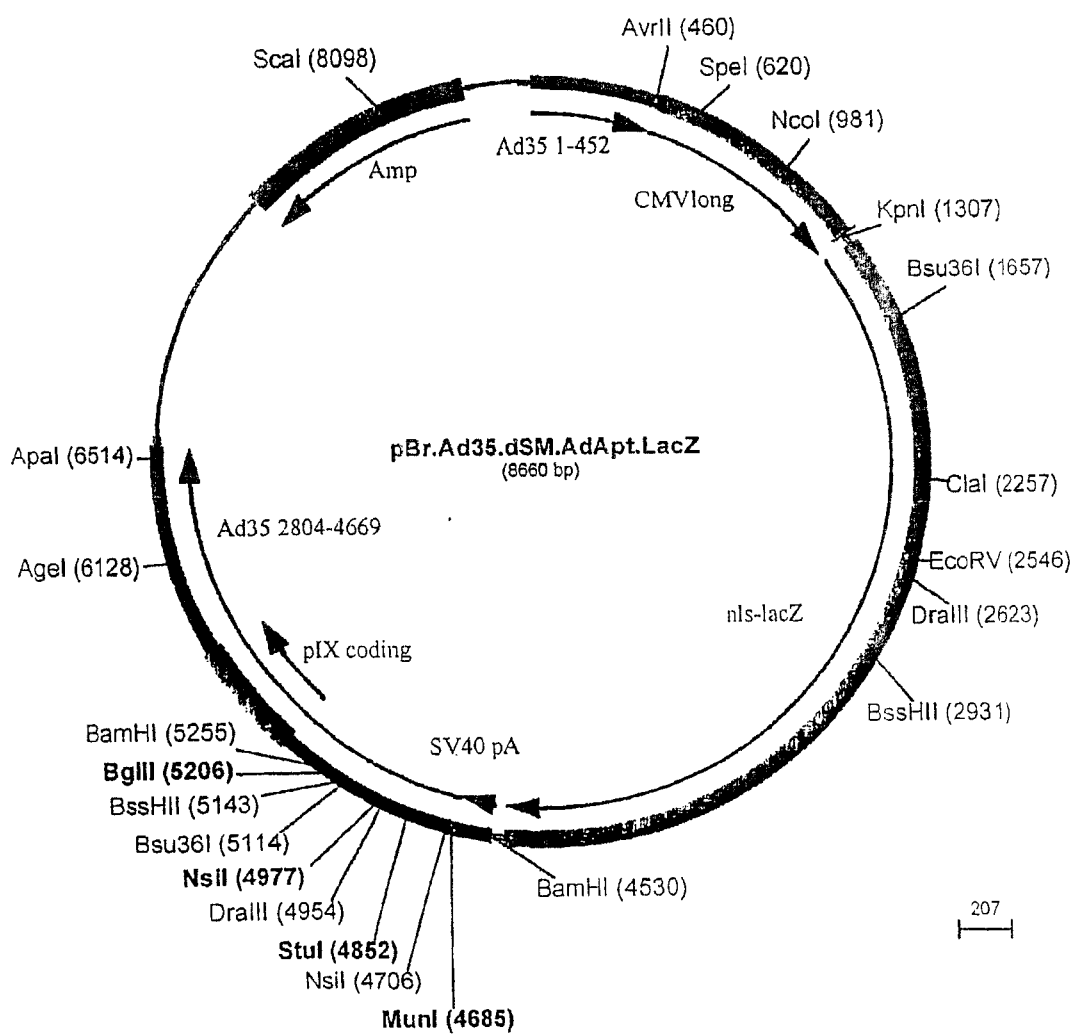


图7

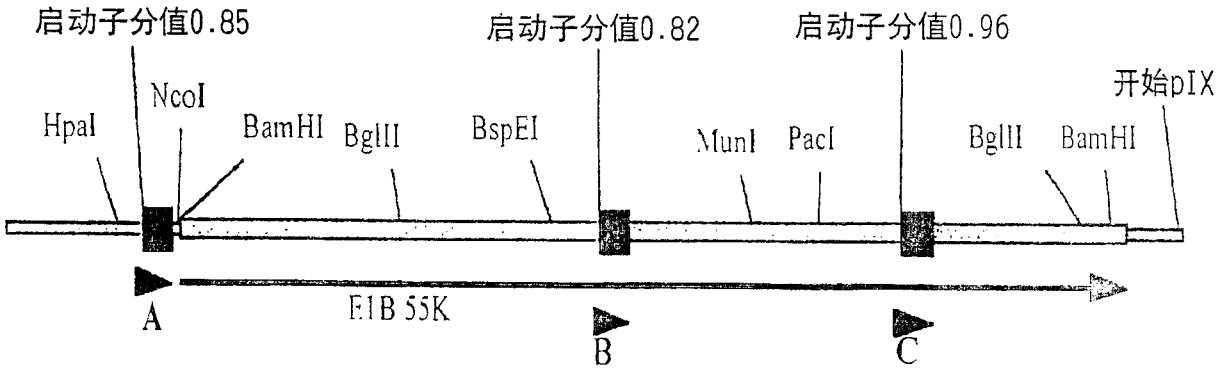


图8

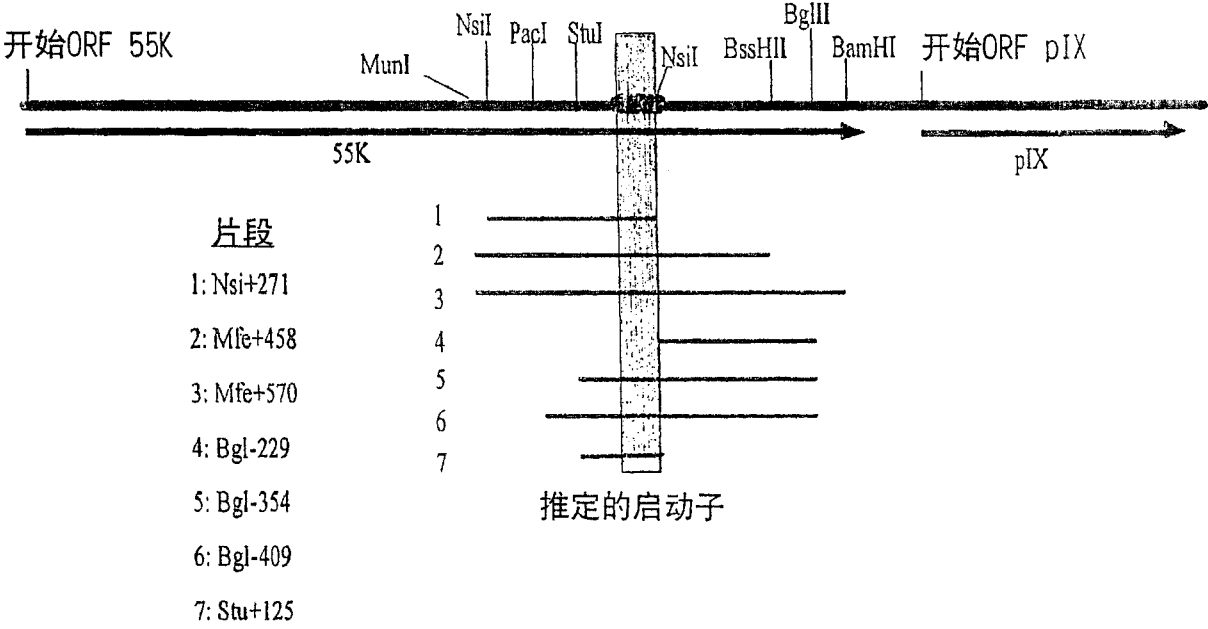


图9

使用用Weighted residue weight table的Clustal方法的E1B-pIX. 35-11-7. MEG的序列对比
星期五, 2002年10月4日, 9: 32

```

1  AATAAAAATATGTTAACTGTTCACTGGTTTTTATTGCTTTTTTGGGCGGGG Ad35.E1B-pIX.SEQ
1  AATAAAAATATGTTAACTGTTCACTGGTTTTTATTGCTTTTTTGGGCGGGG Ad11.E1B-pIX.SEQ
1  AATAAAA[T]ATGT[C]A[G]CTG[C]T[G]A[G]T[G]-TTTTATT[A]CTT[C]TTGGG[T]GGGG Ad7.E1B-pIX.SEQ

51  ACTCAGGTATATAAGTAGAAGCAGACCTGTGTGGTTAGCTCATAGGAGCT Ad35.E1B-pIX.SEQ
51  ACTCAGGTATATAAGTAGAAGCAGACCTGTGTGGTTAGCTCATAGGAGCT Ad11.E1B-pIX.SEQ
49  [T]C[T]G[G]A[T]ATATAAGTAG[G]AGCAGA[T]CTGTGTGGTTAGCTCA[C]AG[C]A[A]CT Ad7.E1B-pIX.SEQ

101  GGCTTTTCATCCATGGAGGTTTGGGCCATTTTGGGAAGACCTTAGGAAGACT Ad35.E1B-pIX.SEQ
101  GGCTTTTCATCCATGGAGGTTTGGGCCATTTTGGGAAGACCTTAGGAAGACT Ad11.E1B-pIX.SEQ
99  [T]GCT[G]CATCCATGGAGGTTTGGGC[T]AT[C]TTGGGAAGACCT[C]AG[A]AGACT Ad7.E1B-pIX.SEQ

151  AGGCAACTGTTAGAGAGCGCTTCGGACGGAGTCTCCGGTTTTTGGAGATT Ad35.E1B-pIX.SEQ
151  AGGCAACTGTTAGAGAG[A]CGCTTCGGACGGAGTCTCCGGTTTTTGGAGATT Ad11.E1B-pIX.SEQ
149  AGGC[T]ACT[A]CTAGA[A]A[A]CGC[C]TCGGACGGAGTCTC[T]G[G]C[T]TTTGGAGATT Ad7.E1B-pIX.SEQ

201  CTGGTTCGCTAGTGAAATTAGCTAGGGTAGTTTTTGGGATAAAACAGGACT Ad35.E1B-pIX.SEQ
201  CTGGTTCGCTAGTGAAATTAGCTAGGGTAGTTTTTGGGATAAAACAGGACT Ad11.E1B-pIX.SEQ
199  CTGGTTCG[G]T[G]GTGA[T]CTAGCTAGG[C]TAGT[G]TTTGGGATAAAACAGGACT Ad7.E1B-pIX.SEQ

251  ATAAACAAGAATTTGAAAAGTTGTTGGTAGATTGCCCAGGACTTTTTGAA Ad35.E1B-pIX.SEQ
251  ATAAACAAGAATTTGAAAAGTTGTTGGTAGATTGCCCAGGACTTTTTGAA Ad11.E1B-pIX.SEQ
249  A[C]A[G]GGAAGAATTTGAAAAGTT[A]TTGG[A]GA[C]A[T]TCCAGGACTTTTTGAA Ad7.E1B-pIX.SEQ

301  GCTCTTAATTTGGGCCATCAGGTTCACTTTAAAGAAAAAGTTTTATCAGT Ad35.E1B-pIX.SEQ
301  GCTCTTAATTTGGGCCATCAGGTTCACTTTAAAGAAAAAGTTTTATCAGT Ad11.E1B-pIX.SEQ
299  GCTCTTA[A]TTGGGCCATCAGG[C]TCA[T]TTTAA[G]GA[G]AA[G]GTTTTATCAGT Ad7.E1B-pIX.SEQ

351  TTTAGACTTTTTCAACCCAGGTAGAACTGCTGCTGCTGTGGCTTTTCTTA Ad35.E1B-pIX.SEQ
351  TTTAGACTTTTTCAACCCAGGTAGAACTGCTGCTGCTGTGGCTTTTCTTA Ad11.E1B-pIX.SEQ
349  TTTAG[A]TTTTTCT[A]C[T]C[C]TGGTAGAACTGCTGCTGCTGT[A]GCTTTTCTTA Ad7.E1B-pIX.SEQ

401  CTTTTATATTAGATAAATGGATCCCGCAGACTCATTTTCAGCAGGGGATAC Ad35.E1B-pIX.SEQ
401  CTTTTATATTAGATAAATGGATCCCGCAGACTCATTTTCAGCAGGGGATAC Ad11.E1B-pIX.SEQ
399  CTTTTATATT[G]GATAAATGGATCC[G]C[A]A[ACT]CA[C]TTTCAGCA[A]GGGATAC Ad7.E1B-pIX.SEQ

451  GTTTTGGATTTTCATAGCCACAGCATTTGTGGAGAACATGGAAGGTTTCGCAA Ad35.E1B-pIX.SEQ
451  GTTTTGGATTTTCATAGCCACAGCATTTGTGGAGAACATGGAAGGTTTCGCAA Ad11.E1B-pIX.SEQ
449  GTTTTGGATTTTCATAGC[A]G[C]AGC[T]TTGTGGAGAACATGGAAG[G]TCGC[A]G Ad7.E1B-pIX.SEQ

501  GATGAGGACAATCTTAGGTTACTGGCCAGTGCAGCCTTTGGGTGTAGCGG Ad35.E1B-pIX.SEQ
501  GATGAGGACAATCTTAGGTTACTGGCCAGTGCAGCCTTTGGGTGTAGCGG Ad11.E1B-pIX.SEQ
499  GATGAGGACAATCTTAG[A]TTACTGGCCAGTGCAGCCT[C]TGGG[A]GTAGC[A]G Ad7.E1B-pIX.SEQ

```

图10

551 GAATCCTGAGGCAATCCACCGGTCATGCCAGCGGTTCTGGAGGAGGAACAG Ad35.E1B-pIX.SEQ
551 GAATCCTGAGGCAATCCACCGGTCATGCCAGCGGTTCTGGAGGAGGAACAG Ad11.E1B-pIX.SEQ
549 G[G]AT[A]CTGAG[A]CA[C]CCACCG[A]C CATGCCAGCGGTTCTG[C]AGGAGGA[G]CAG Ad7.E1B-pIX.SEQ

601 CAAGAGGACAACCCGAGAGCCGGCCTGGACCTCCAGTGGAGGAGGCGGA Ad35.E1B-pIX.SEQ
601 CAAGAGGACAACCCGAGAGCCGGCCTGGACCTCCAGTGGAGGAGGCGGA Ad11.E1B-pIX.SEQ
599 CA[G]GAGGACA[A]T[C]CGAGAGCCGGCCTGGACCTCC[G]GTGGAGGA[G] - - - - Ad7.E1B-pIX.SEQ

651 GTAGCTGACTTGTCTCCTGAACTGCAACGGGTGCTTACTGGATCTACGTC Ad35.E1B-pIX.SEQ
651 GTAGCTGACTTGTCTCCTGAACTGCAACGGGTGCTTACTGGATCTACGTC Ad11.E1B-pIX.SEQ
644 [-]TAGCTGAC[C]TGT[T]TCCTGAACTGC[G]ACGGGTGCTTACT[A]G[G]TCTACG[A]C Ad7.E1B-pIX.SEQ

701 CACTGGACGGGATAGGGGCGTTAAGAGGGAGAGGGCATCCAGTGGTACTG Ad35.E1B-pIX.SEQ
701 CACTGGACGGGATAGGGGCGTTAAGAGGGAGAGGGCATC[T]AGTGGTACTG Ad11.E1B-pIX.SEQ
693 CA[G]TGGAC[A]G[A]A[C]AGGGG[A]TAAAGAGGGAGAGG[AATC]C[T]AGTGG[G]A[A]T[A] Ad7.E1B-pIX.SEQ

751 ATGCTAGATCTGAGTTGGCTTTAAGTTTAAATGAGTCCGACAGCTCCTGAA Ad35.E1B-pIX.SEQ
751 ATGCTAGATCTGAGTTGGCTTTAAGTTTAAATGAGTCCGACAGCTCCTGAA Ad11.E1B-pIX.SEQ
743 AT[T]C[A]AGA[A]C[C]GAGTTGGCTTTAAGTTTAAATGAG[C]CGCAG[G]CGTCTCTGAA Ad7.E1B-pIX.SEQ

801 ACCATTTGGTGGCATGAGGTTTCAGAAAGAGGGAAGGGATGAAGTTTCTGT Ad35.E1B-pIX.SEQ
801 ACCATTTGGTGGCATGAGGTTTCAGAAAGAGGGAAGGGATGAAGTTTCTGT Ad11.E1B-pIX.SEQ
793 AC[T]GTTTGGTGGCATGAGGTTTCAGA[G]C[G]A[A]G[G]CAGGGATGAAGTTTCT[A]T Ad7.E1B-pIX.SEQ

851 ATTGCAGGAGAAATATTTCACTGGAACAGGTGAAAACATGTTGGTTGGAGC Ad35.E1B-pIX.SEQ
851 ATTGCAGGAGAAATATTTCACTGGAACAGGTGAAAACATGTTGGTTGGAGC Ad11.E1B-pIX.SEQ
843 ATTGCAGGAGAAATATTTCACT[A]GAACA[A]C[T]TAA[G]AC[C]TGTGGTTGGAG[A]C Ad7.E1B-pIX.SEQ

901 CAGAGGATGATTGGGCGGTGGCCATTAAAAATTATGCCAAGATAGCTTTG Ad35.E1B-pIX.SEQ
901 C[T]GAGGATGATTGGG[A]GGTGGCCATTAAAAATTATGCCAAGATAGCTTTG Ad11.E1B-pIX.SEQ
893 C[T]GAGGATGATTGGG[A]GGTGGCCATT[A]G[G]AATTATGC[T]AAGATA[T]C[T]TG Ad7.E1B-pIX.SEQ

951 AGGCCTGATAAACAGTATAAGATCAGTAGACGGATTAAATATCCGGAAATGC Ad35.E1B-pIX.SEQ
951 AGGCCTGATAAACAGTATAAGAT[T]A[C]TAGACGGATTAAATATCCGGAAATGC Ad11.E1B-pIX.SEQ
943 AGGCCTGATAAAC[A]TATA[G]AAT[T]A[C]TA[A]GA[A]GATTAAATAT[T]A[G]A[A]ATGC Ad7.E1B-pIX.SEQ

1001 TTGTTACATATCTGGAAATGGGGCTGAGGTGGTAATAGATACTCAAGACA Ad35.E1B-pIX.SEQ
1001 TTGTTACATATCTGGAAATGGGGCTGAGGTGGTAATAGATACTCAAGACA Ad11.E1B-pIX.SEQ
993 [A]TG[C]TACATATC[A]GG[G]AATGGGGC[A]GAGGT[T]A]TAAATAGATAC[A]CAAGA[T]A Ad7.E1B-pIX.SEQ

1051 AGACAGTTATTAGATGCTGCATGATGGATATGTGGCCCTGGAGTAGTCGGT Ad35.E1B-pIX.SEQ
1051 AG[G]CAGTTATTAGATGCTGCATGATGGATATGTGGCCCTGG[G]GTAGTCGGT Ad11.E1B-pIX.SEQ
1043 A[A]GCAG[C]T[T]TTAGATG[T]T[G]ATGATGG[G]TATGTGGCC[A]GG[G]GT[T]GTGCG[C] Ad7.E1B-pIX.SEQ

图10续

1101 ATGGAAGCAGTCACTTTTGTAAATGTTAAGTTTAGGGGAGATGGTTATAA Ad35.E1B-pIX.SEQ
1101 ATGGAAGCAGTACCTTTTGTAAATGTTAAGTTTAGGGGAGATGGTTATAA Ad11.E1B-pIX.SEQ
1093 ATGGAAGCAATAACACTTATGAATTTAGGTTTAGAGGGGATGGTTATAA Ad7.E1B-pIX.SEQ

1151 TGGAAATAGTGTTTATGGCCAATACCAAACCTTATATTGCATGGTTGTAGCT Ad35.E1B-pIX.SEQ
1151 TGGAAATAGTGTTTATGGCCAATACCAAACCTTATATTGCATGGTTGTAGCT Ad11.E1B-pIX.SEQ
1143 TGGCATGTATTTTATGGCTAAACATTAAGCTGATCTTACATGGTTGTAGCT Ad7.E1B-pIX.SEQ

1201 TTTTTGGTTTCAACAATACCTGTGTAGATGCCTGGGGACAGGTTAGTGTA Ad35.E1B-pIX.SEQ
1201 TTTTTGGTTTCAACAATACCTGTGTAGATGCCTGGGGACAGGTTAGTGTA Ad11.E1B-pIX.SEQ
1193 TTTTTGGGTTTAAATAATACGTGTGTAGAAGCTTGGGGGCAAGTTAGTGTTG Ad7.E1B-pIX.SEQ

1251 CGGGGGTGTTAGTTTCTATGCGTGTTGGATTGCCACAGCTGGCAGAACCA Ad35.E1B-pIX.SEQ
1251 CGGGGAATGTAGTTTCTATGCGTGTTGGATTGCCACAGCTGGCAGAACCA Ad11.E1B-pIX.SEQ
1243 AGGGGTGTAGTTTCTATGCAATGCTGGATTGCAACATCAGGTAGGGTGA Ad7.E1B-pIX.SEQ

1301 GAGTCAATTGTCTCTGAAGAAATGCATATTCCAAAGATGTAACCTGGGCA Ad35.E1B-pIX.SEQ
1301 GAGTCAATTGTCTCTGAAGAAATGCATATTTCAAAGATGTAACCTGGGCA Ad11.E1B-pIX.SEQ
1293 GAGTCAATTGTCTCTGAAGAAATGCATGTTTGAAGAGATGTAATCTTGGCA Ad7.E1B-pIX.SEQ

1351 TTCTGAATGAAGGCGAAGCAAGGGTCCGTCACTGCGCTTCTACAGATACT Ad35.E1B-pIX.SEQ
1351 TTCTGAATGAAGGCGAAGCAAGGGTCCGTCACCTGCGCTTCTACAGATACT Ad11.E1B-pIX.SEQ
1343 TACTGAATGAAGGTGAAGCAAGGGTCCGTCACCTGCGCAAGCTACAGAACT Ad7.E1B-pIX.SEQ

1401 GGATGTTTTATTTTAATTAAGGGAATGCCAGCGTAAAGCATAAACATGAT Ad35.E1B-pIX.SEQ
1401 GGATGTTTTATTTTGAATTAAGGGAATGCCAGCGTAAAGCATAAACATGAT Ad11.E1B-pIX.SEQ
1393 GCGTGCTTCTATTCTAATAAAGGGAATGCCAGTGTTGAAGCATAAATATGAT Ad7.E1B-pIX.SEQ

1451 TTGTGGTGCTTCCGATGAGAGGCCCTTATCAAATGCTCACTTGTGCTGGTG Ad35.E1B-pIX.SEQ
1451 TTGGGTGCTTCCGATGAGAGGCCCTTATCAAATGCTCACTTGTGCTGGTG Ad11.E1B-pIX.SEQ
1443 CTGTGGACAAATTCGATGAGAGGCCCTTATCAAGATGCTAACCTGCTGGTG Ad7.E1B-pIX.SEQ

1501 GGCATTGTAATATGCTGGCTACTGTGCATATTGTTTCCCATCAACGCCAAA Ad35.E1B-pIX.SEQ
1501 GGCATTGTAATATGCTGGCTACTGTGCATATTGTTTCCCATCAACGCCAAA Ad11.E1B-pIX.SEQ
1493 GACATTGCAATATCTTGCTACCGTGTCATATCGTTTCACATGCAAGCAAG Ad7.E1B-pIX.SEQ

1551 AAATGGCCTGTTTTTGTATCACAATGTGTTGACCAAGTGCAACCATGCATGC Ad35.E1B-pIX.SEQ
1551 AAATGGCCTGTTTTTGTATCACAATGTGATGACGAAGTGACCATGCATGC Ad11.E1B-pIX.SEQ
1543 AAATGGCCTGTATTTGAACAATAATGTGATTAACCAAGTGCAACCATGCATAT Ad7.E1B-pIX.SEQ

1601 AGGTGGGCGTAGAGGAATGTTTATGCCTTACCAGTGTAACATGAATCATG Ad35.E1B-pIX.SEQ
1601 AGGTGGGCGTAGAGGAATGTTTATGCCTTACCAGTGTAACATGAATCATG Ad11.E1B-pIX.SEQ
1593 AGGTGGTCGAGGGGAATGTTTATGCCTTACCAGTGTAACATGAATCATG Ad7.E1B-pIX.SEQ

图10续

```

1651 T G A A A G T G T T G T T G G A A C C A G A T G C C T T T T C C A G A A T G A G C C T A A C A G G A Ad35.E1B-pIX.SEQ
1651 T G A A A G T G T T G T T G G A A C C A G A T G C C T T T T C C A G A A T G A G C C T A A C A G G A Ad11.E1B-pIX.SEQ
1643 T G A A G G T A A T G T T G G A A C C A G A T G C C T T T T C C A G A G T G A G C G T A A C A G G A Ad7.E1B-pIX.SEQ

1701 A T C T T T G A C A T G A A C A C G C A A A T C T G G A A G A T C C T G A G G T A T G A T G A T A C Ad35.E1B-pIX.SEQ
1701 A T T T T T G A C A T G A A C A T G C A A A T C T G G A A G A T C C T G A G G T A T G A T G A T A C Ad11.E1B-pIX.SEQ
1693 A T C T T T G A T A T G A A T A T T C A A C T A T G G A A G A T C C T G A G A T A T G A T G A C A C Ad7.E1B-pIX.SEQ

1751 G A G A T C G A G G G T G C G C G C A T G C G A A T G C G G A G G C A A G C A T G C C A G G T T C C Ad35.E1B-pIX.SEQ
1751 G A G A T C G A G G G T A C G C G C A T G C G A A T G C G G A G G C A A G C A T G C C A G G T T C C Ad11.E1B-pIX.SEQ
1743 T A A A C C A A G G G T G C G C G C A T G C G A A T G C G G A G G C A A G C A T G C T A G A T T C C Ad7.E1B-pIX.SEQ

1801 A G C C G G T G T G T G T A G A T G T G A C C G A A G A T C T C A G A C C G G A T C A T T T G G T T Ad35.E1B-pIX.SEQ
1801 A G C C G G T G T G T G T A G A T G T G A C T G A A G A T C T C A G A C C G G A T C A T T T G G T T Ad11.E1B-pIX.SEQ
1793 A G C C G G T G T G C G T G G A T G T G A C T G A A G A C C T G A G G C C G A T C A T T T G G T G Ad7.E1B-pIX.SEQ

1851 A T T G C C C G C A C T G G A G C A G A G T T C G G A T C C A G T G G A G A A G A A A C T G A C T A Ad35.E1B-pIX.SEQ
1851 A T T G C C C G C A C T G G A G C A G A G T T C G G A T C C A G T G G A G A A G A A A C T G A C T A Ad11.E1B-pIX.SEQ
1843 C T T G C C T G C A C T G G A G C G G A G T T C G G T T C T A G T G G T G A A G A A A C T G A C T A Ad7.E1B-pIX.SEQ

1901 A G G T G A G T A T T G G G A - - A A A C T T T G G G G T G G G A T T T T C A G - - - - - A Ad35.E1B-pIX.SEQ
1901 A G G T G A G T A T T G G G A - - A A A C T T T G G G G T G G G A T T T T C A G - - - - - A Ad11.E1B-pIX.SEQ
1893 A A G T A A G T A G T G G G G G C A A A A T G T G G A T G G G G A C T T T C A G G T T G G T A A G G Ad7.E1B-pIX.SEQ

1940 T G G A C A G A T T G A G T A A A A A T T T G T T T T T C T G T C T T G C A G C T G A C A T G A G Ad35.E1B-pIX.SEQ
1940 T G G A C A G A T T G A G T A A A A A T T T G T T T T T C T G T C T T G C A G C T G T C A T G A G Ad11.E1B-pIX.SEQ
1943 T G G A C A A A T T G G T A A A T T T G T T A A T T T C T G T C T T G C A G C T G C A T G A G Ad7.E1B-pIX.SEQ

1990 T G G A A A T G C T T C T T T A A G G G G G G A G T C T T C A G C C C T T A T C T G A C A G G G C Ad35.E1B-pIX.SEQ
1990 T G G A A A C G C T T C T T T T A A G G G G G G A G T C T T C A G C C C T T A T C T G A C A G G G C Ad11.E1B-pIX.SEQ
1993 T G G A A G C G C T T C T T T T A G G G G G G A G T A T T A G C C C T T A T C T G A C G G G C A Ad7.E1B-pIX.SEQ

2040 G T C T C C C A T C C T G G G C A G G A G T T C G T C A G A A T G T T A T G G G A T C T A C T G T G Ad35.E1B-pIX.SEQ
2040 G T C T C C C A T C C T G G G C A G G A G T T C G T C A G A A T G T T A T G G G A T C T A C T G T G Ad11.E1B-pIX.SEQ
2043 G G C T C C C A C C A T G G G C A G G A G T T C G T C A G A A T G T A T G G G A T C C A C T G T G Ad7.E1B-pIX.SEQ

2090 G A T G G A A G A C C C G T T C A A C C C G C C A A T T C T T C A A C G C T G A C C T A T G C T A C Ad35.E1B-pIX.SEQ
2090 G A T G G A A G A C C C G T C C A A C C C G C C A A T T C T T C A A C G C T G A C C T A T G C T A C Ad11.E1B-pIX.SEQ
2093 G A T G G G A G A C C C G T C C A G C C C G C C A A T T C C T C A A C G C T G A C C T A T G C C A C Ad7.E1B-pIX.SEQ

2140 T T T A A G T T C T T C A C C T T T G G A C G C A G C T G C A G C C G C T G C C G C C G C C T C T G Ad35.E1B-pIX.SEQ
2140 T T T A A G T T C T T C A C C T T T G G A C G C A G C T G C A G C T G C C G C C G C C T T C T G Ad11.E1B-pIX.SEQ
2143 T T T G A G T T C G T C A C C A T T G G A T G C A G C T G C A G C C G C C G C C G C T A C - - - T G Ad7.E1B-pIX.SEQ

```

图10续

```

2190 TCGCCGCTAACACTGTGCTTGGAAATGGGTTACTATGGAAAGCATCGTGGCT Ad35.E1B-pIX.SEQ
2190 TTGCCGCTAACACTGTGCTTGGAAATGGGTTACTATGGAAAGCATATGGCT Ad11.E1B-pIX.SEQ
2190 CTGCCGCTCAACACCATCCTTGGAAATGGGCTATTACGGAAAGCATTGTTGC Ad7.E1B-pIX.SEQ

2240 AATTCCACTTCCTCTAATAAACCTTCTACACTGACTCAGGACAAAGTTACT Ad35.E1B-pIX.SEQ
2240 AATTCCACTTCCTCTAATAAACCTTCTACCCTGACTCAGGACAAAGTTACT Ad11.E1B-pIX.SEQ
2240 AATTCCAGTTCTCTAATAATCTTTCAACCCTGGCTGAGGACAAAGCTACT Ad7.E1B-pIX.SEQ

2290 TGTCTTTTGGCCAGCTGGAGGCTTTGACCCAAAGTCTGGGTGAACTTT Ad35.E1B-pIX.SEQ
2290 TGTCTTTTGGCCAGCTGGAGGCTTTGACCCAAAGTCTGGGTGAACTTT Ad11.E1B-pIX.SEQ
2290 TGTTCTCTTGGCTCAGCTCGAGGCCTTAACCCAAAGCTTAGCGAACTGT Ad7.E1B-pIX.SEQ

2340 CTCAGCAGGTGGCCGAGTTGCGAGTACAAACTGAGTCTGCTGTGGGCACG Ad35.E1B-pIX.SEQ
2340 CTCAGCAGGTGGTCGAGTTGCGAGTACAAACTGAGTCTGCTGTGGGCACG Ad11.E1B-pIX.SEQ
2340 CTAAGCAGGTGGCCCAGTTGCGTGAGCAAACCTGAGTCTGCTGTTGCACA Ad7.E1B-pIX.SEQ

2390 GC AAAGTCTAAATAAAAAAAATTCAGAAATCAATGAATAAA Ad35.E1B-pIX.SEQ
2390 GC AAAGTCTAAATAAAAAAATTCCCAGAAATCAATGAATAAA Ad11.E1B-pIX.SEQ
2390 GC AAAGTCTAAATAAAGA--TCTCA-AAATCAATAAAATAAA Ad7.E1B-pIX.SEQ

```

Decoration 'Decoration #1': 框内残基与Ad35.E1B-pIX.SEQ不同

图10续

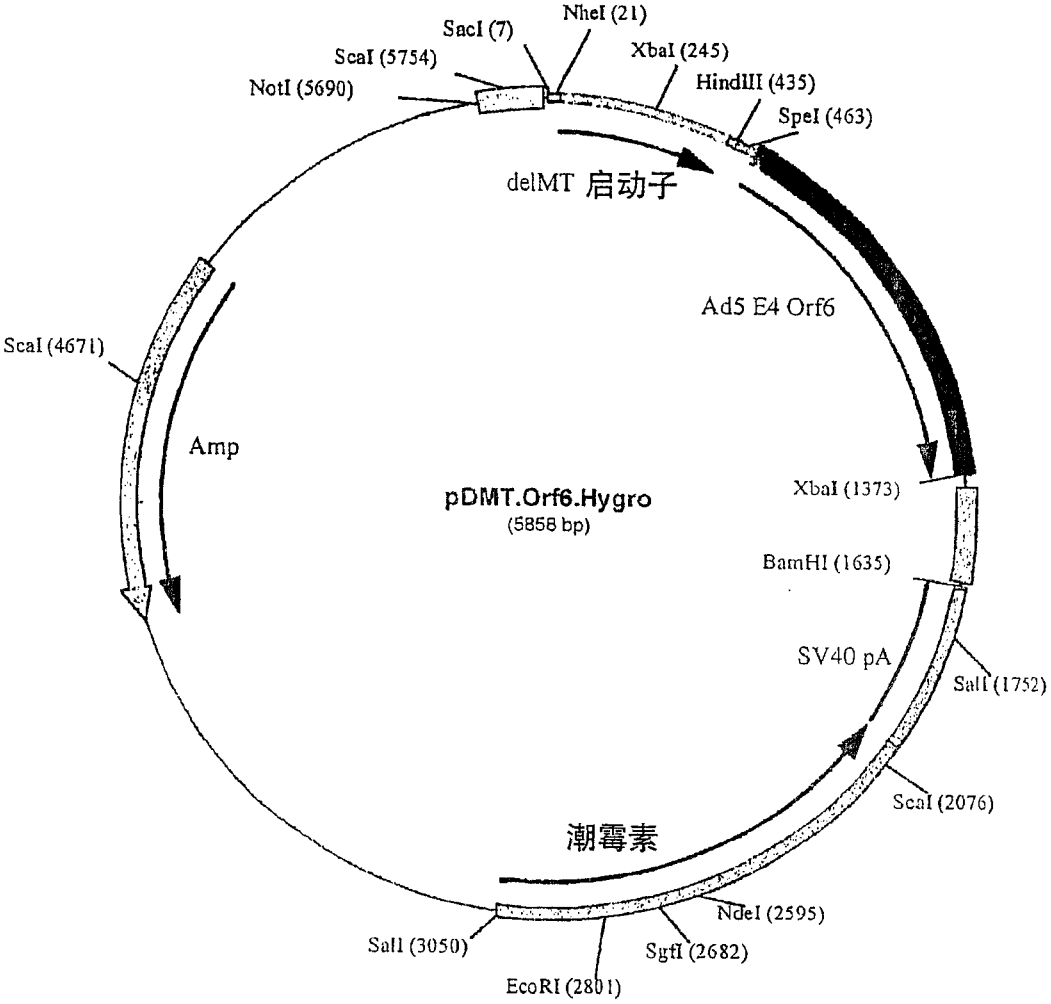


图11

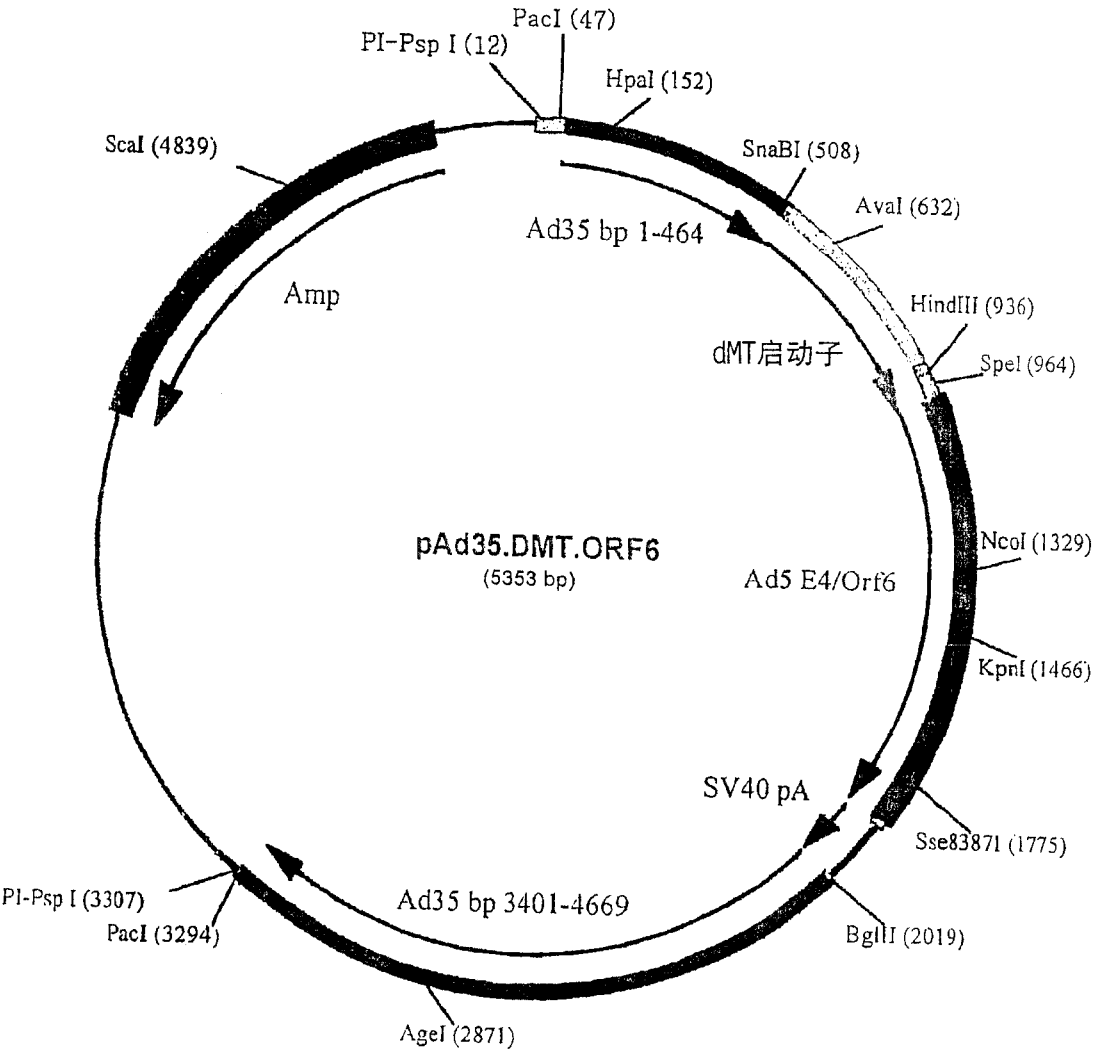


图12

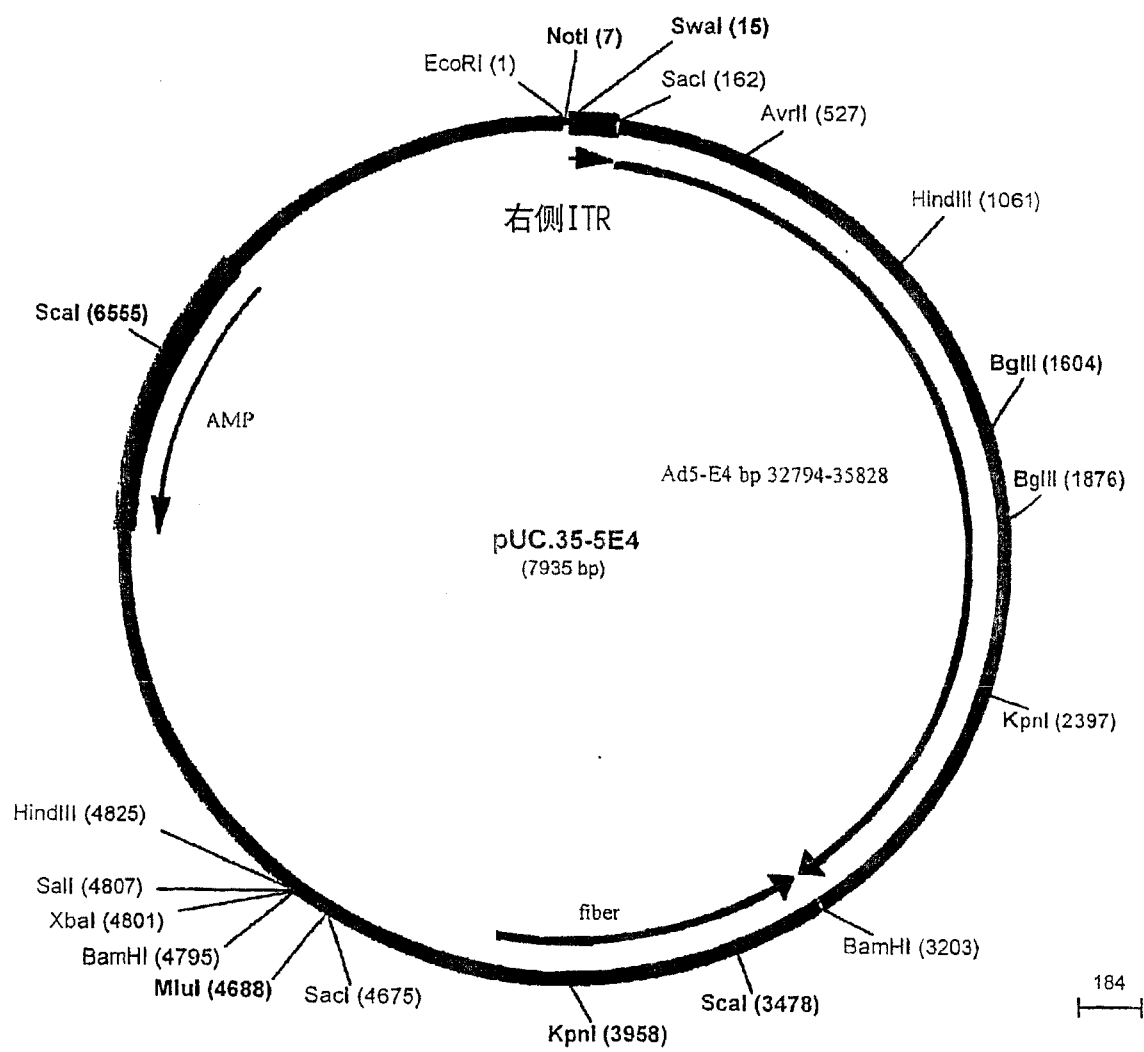


图13

pUC.35-5E4的克隆步骤

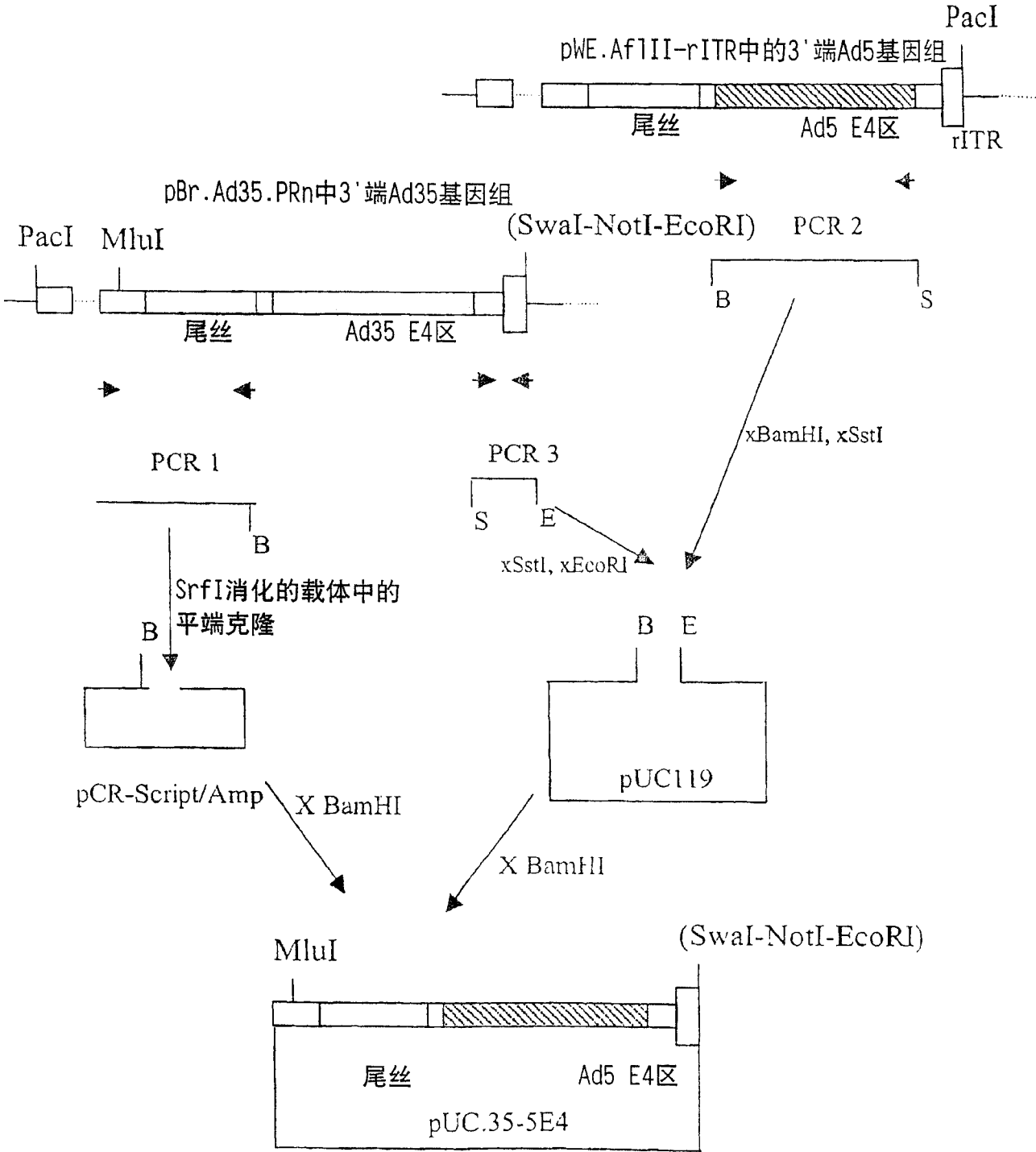


图14

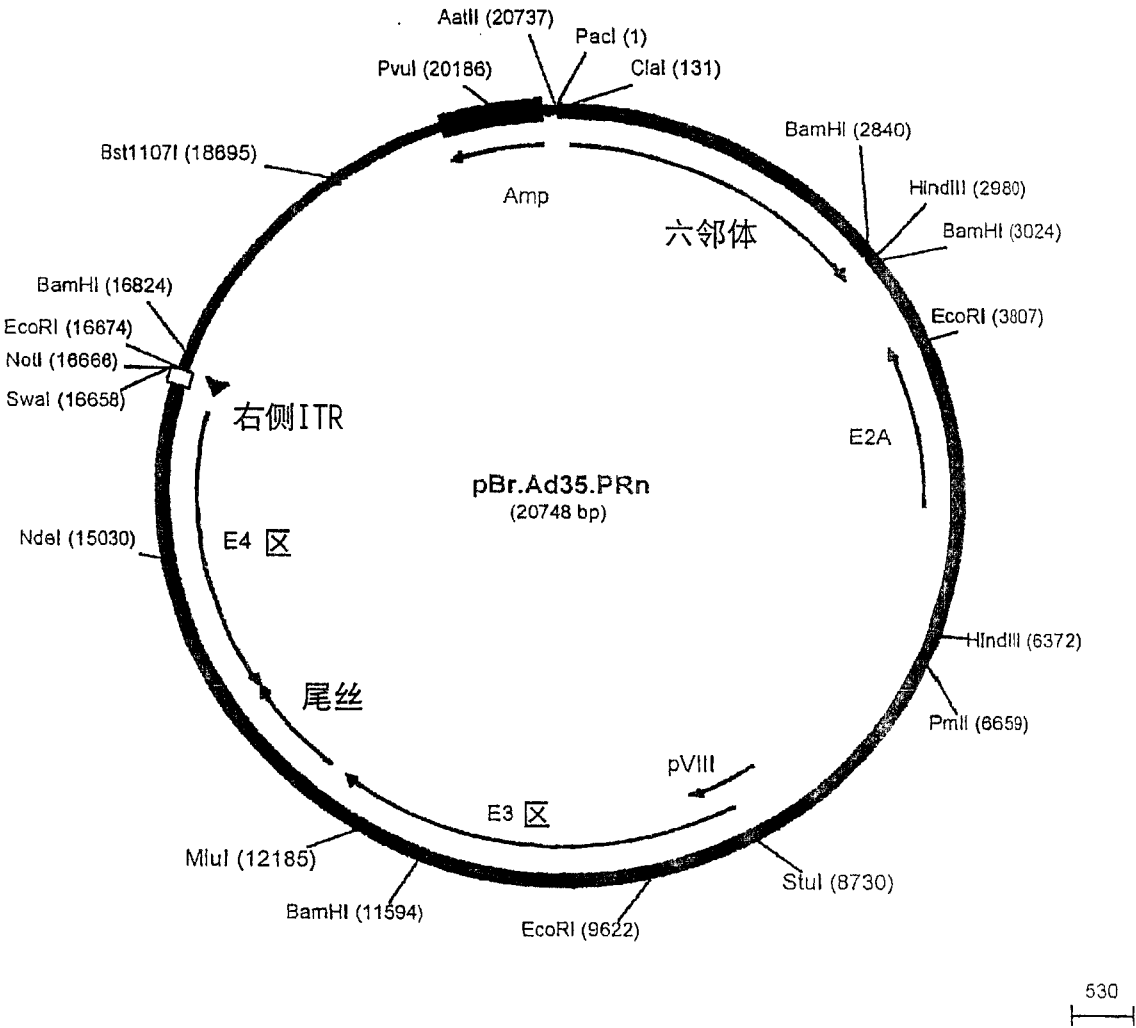


图15

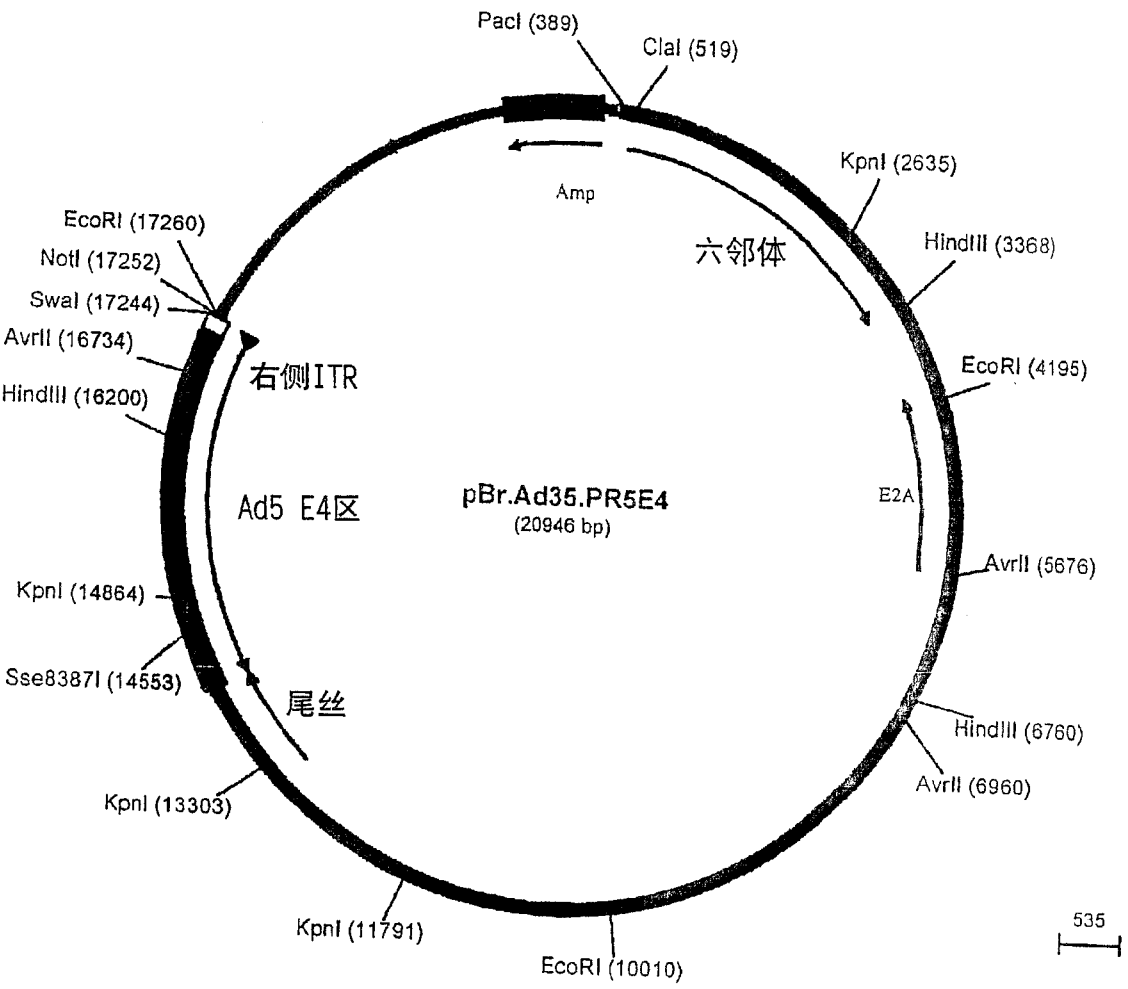


图16

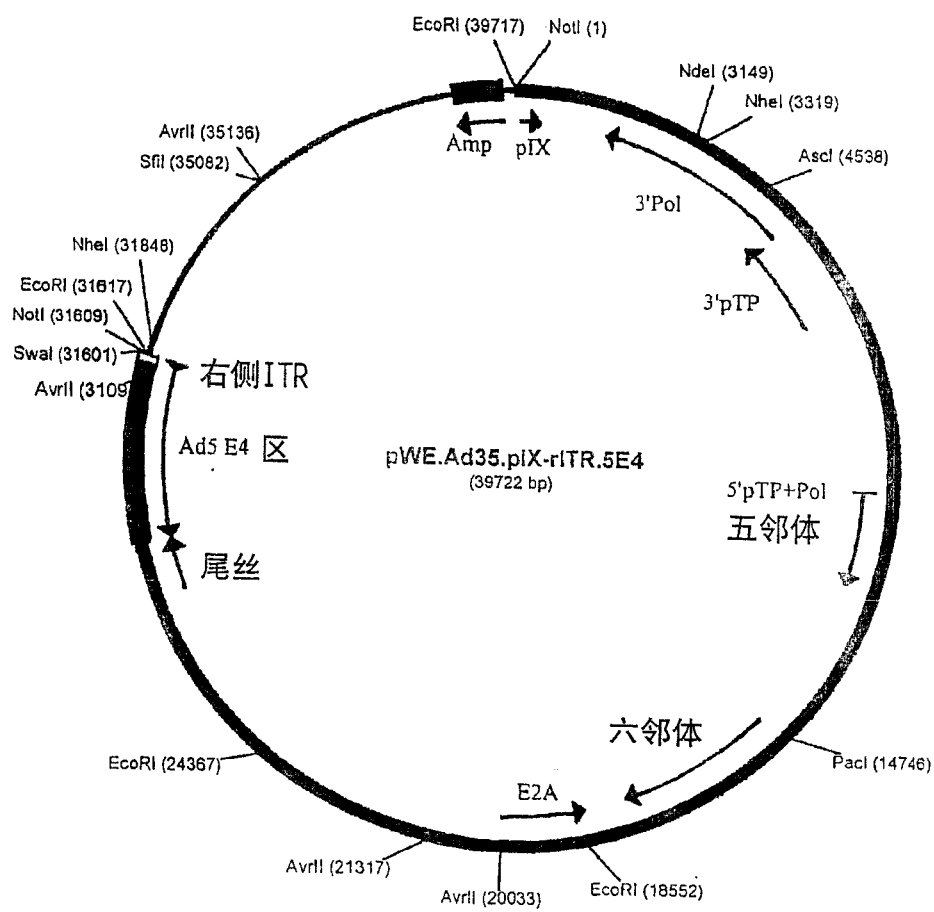


图17

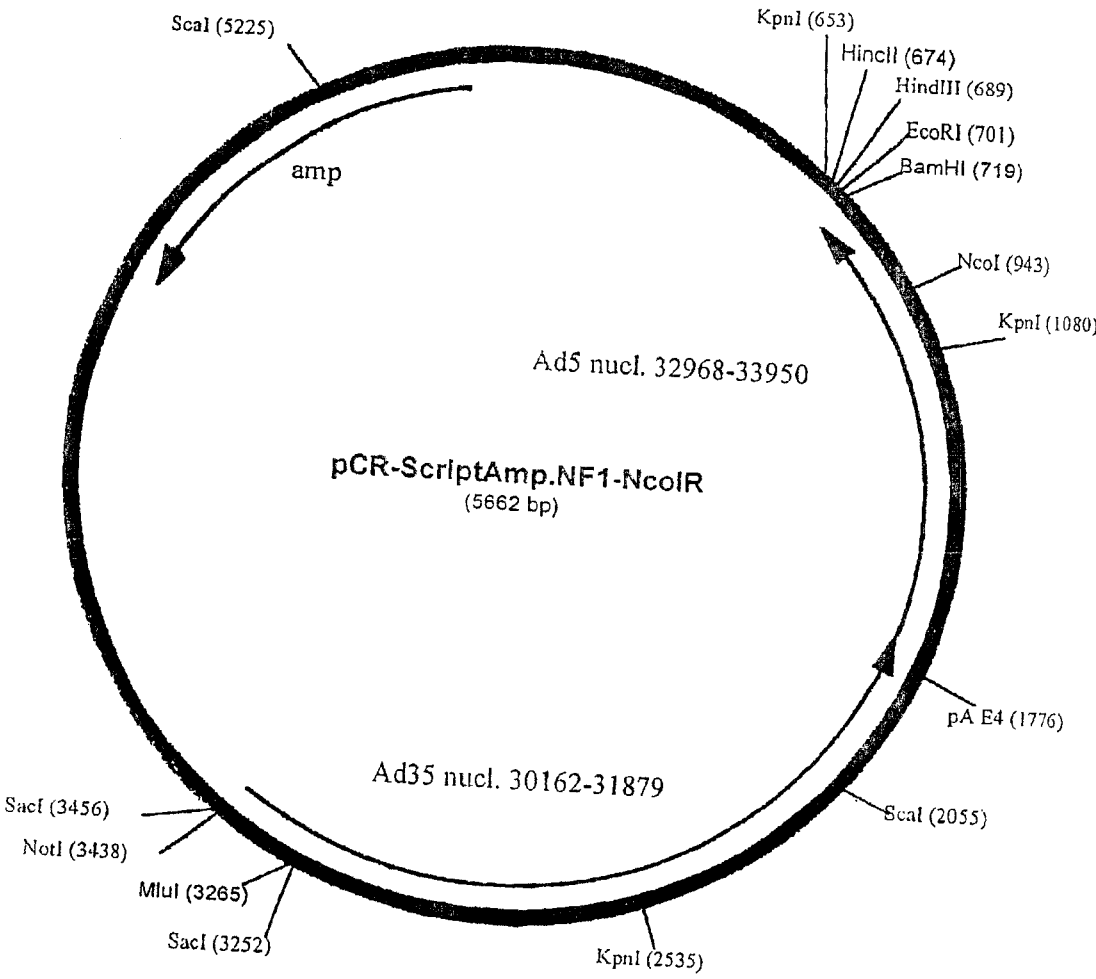


图18

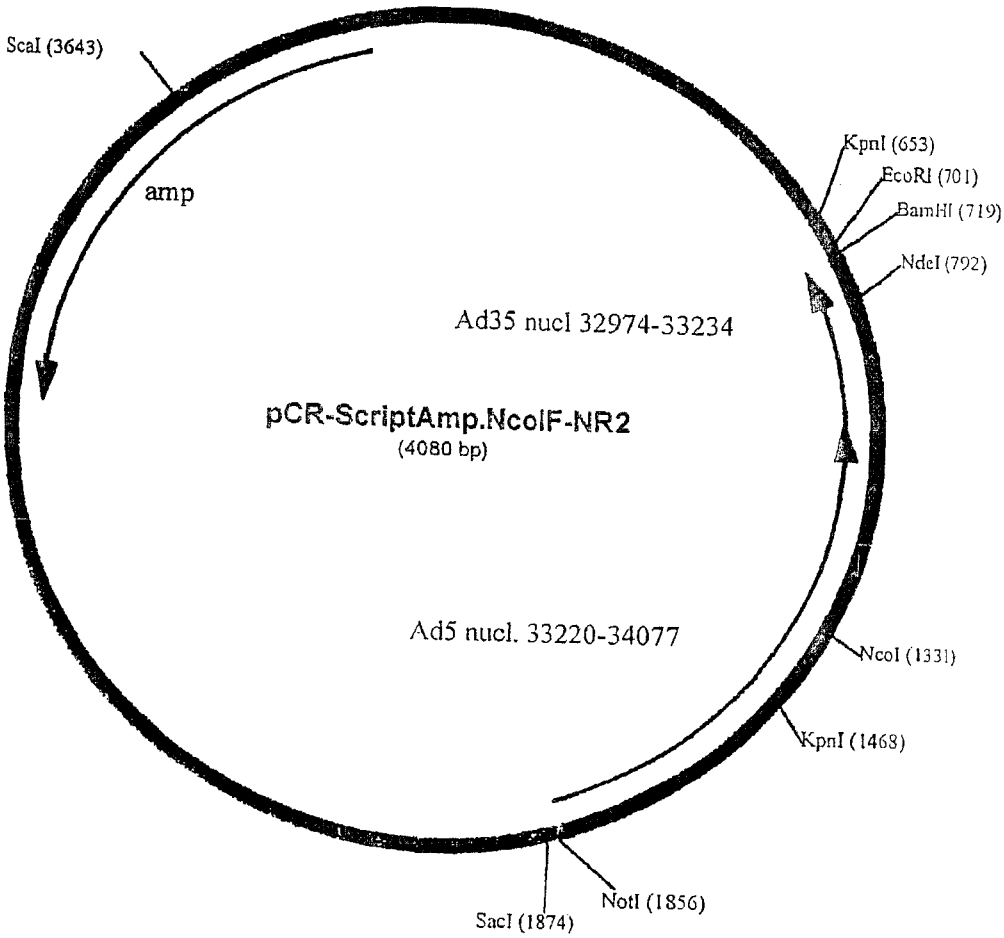


图19

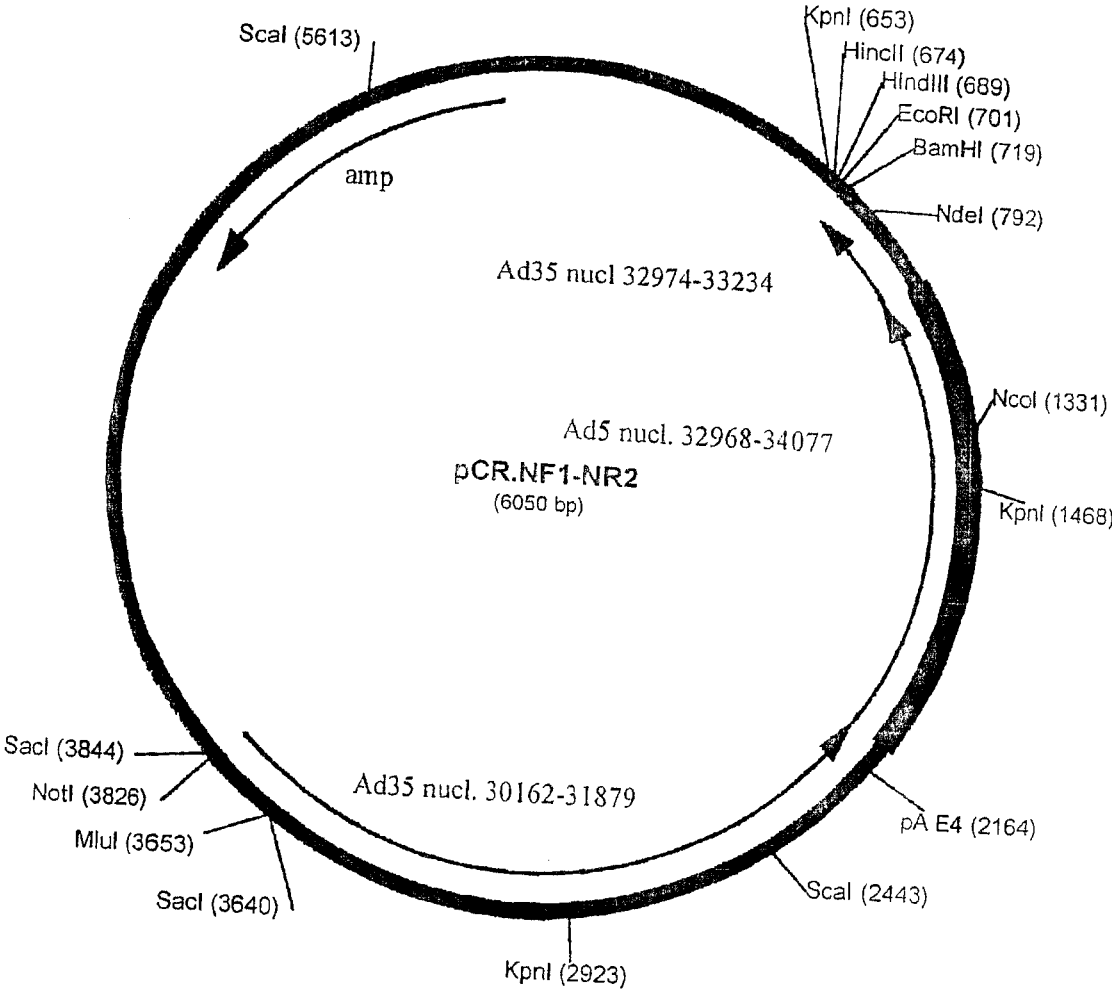


图20

```

1  M T T S G V P F G M T L R P T R S R L S R R T P Y S R D R L P P F E T - E T R A T I L E D H P L L P Ad5.E4-ORF6.PRO
1  M T T S G V P F G M T L R P T R S R L S R R T P Y S R D R L P P F E T - E T R A T I L E D H P L L P Orf6 aaseq in Ad35.PR.5Orf6.PRO
1  M S G S N S I N T R - L E A R S T S C A R H H P Y T R A Q L P R C E E N E T R A S M T E D H P L L P Ad35.E4-ORF6.PRO

50  E C N I L T M H N V S Y V R G L P C S V G F T L I Q E W V P W D M V L T R E E L V I L R K C M H V Ad5.E4-ORF6.PRO
50  E C N I L T M H N V S Y V R G L P C S V G F T L I Q E W V P W D M V L T R E E L V I L R K C M H V Orf6 aaseq in Ad35.PR.5Orf6.PRO
50  D C D T M T M H S V S C V R G L P C S A S F T V L Q E L P I P W D M F L N P E E L K I M R R C M H L Ad35.E4-ORF6.PRO

100 C L C C A N I D I M T S M M I H G Y E S W A L H C H C S S P G S L Q C I A G G Q V L A S W F R M V V Ad5.E4-ORF6.PRO
100 C L C C A N I D I M T S M M I H G Y E S W A L H C H C S S P G S L Q C I A G G Q V L A S W F R M V V Orf6 aaseq in Ad35.PR.5Orf6.PRO
100 C L C C A T I D I F H S Q V I H G R E N V L H C H C H Q Q G S L Q C M A G G A V L A V W F R K V I Ad35.E4-ORF6.PRO

150 D G A M F N Q R F I W Y R E V V N Y N M P K E V M F M S S V F M R G R H L I Y L R L W Y D G H V G S Ad5.E4-ORF6.PRO
150 D G A M F N Q R F I W Y R E V V N Y N M P K E V M F M S S V F M R G R H L I Y L R L W Y D G H V G S Orf6 aaseq in Ad35.PR.5Orf6.PRO
150 L G C M I N Q R C F N Y R Q I V N M H M P K E I M Y V G S V F L R E R H L I Y I K L W Y D G H A G A Ad35.E4-ORF6.PRO

200 V V P A N S F G Y S A L H C G I L N N I V V L C C S Y C A D L S E I R V R C C A R R T R R L M L R A Ad5.E4-ORF6.PRO
200 V V P A N S F G Y S A L H C G I L N N I V V L C C S Y C A D L S E I R V R C C A R R T R R L M L R A Orf6 aaseq in Ad35.PR.5Orf6.PRO
200 I I S D N S F G W S A F N Y G L L N N I V I V C C T Y C K D L S E I R M R C C A H R T R E L M L R A Ad35.E4-ORF6.PRO

250 V R I I A E E T T A - - M L Y S C R T E R R R Q Q F I R A L L Q H H R P I L M H D Y D S - - - T P M Ad5.E4-ORF6.PRO
250 V R I I A E E T T A - - M L Y S C R T E R R R Q Q F I R A L L Q H H R P I L M H D Y D S - - - T P M Orf6 aaseq in Ad35.PR.5Orf6.PRO
250 I K I N L Q E T V D P D P I N S R T E R R R Q R L L V G L M R H N R P I P F S D Y D S H R S S S R Ad35.E4-ORF6.PRO

```

Decoration 'Decoration #1': 框内残基不同于Ad5.E4-ORF6.PRO.

图21

```

1  MTTSGVPFGMTLRPTRSRLSRRTPYSRDRLPPPET-ETRA Ad5.E4-ORF6+7.PRO
1  MTTSGVPFGMTLRPTRSRLSRRTPYSRDRLPPPET-ETRA Orf6+7 aaseq in Ad35.PR5Orf6.PRO
1  MSGSN-SIMTRLRARSTSCARRHHPYTRAQLPRCENEETRA Ad35.E4-ORF6+7.pro

40  TILEDHPLLPECNTLTMHNANTSPSPPVKQPQVGQQPVAQ Ad5.E4-ORF6+7.PRO
40  TILEDHPLLPECNTLTMHNANTSPSPPVKQPQVGQQPVAQ Orf6+7 aaseq in Ad35.PR5Orf6.PRO
40  SMTEDHPLLPLDCDTMTMHSMTVIQTP-----ESHPIQ Ad35.E4-ORF6+7.pro

80  QLDSDMNLSELPGEFINITDERLARQETVWNITPKNMSVT Ad5.E4-ORF6+7.PRO
80  QLDSDMNLSELPGEFINITDERLARQETVWNITPKNMSVT Orf6+7 aaseq in Ad35.PR5Orf6.PRO
71  QLDCESALEKDYRDGFLSITDPRLARSETVWNVESRTMSIS Ad35.E4-ORF6+7.pro

120 HDMMLFKASRGERTVYSVCEWEGGGRNLNTRVL Ad5.E4-ORF6+7.PRO
120 HDMMLFKASRGERTVYSVRWEGGGRKITRIL Orf6+7 aaseq in Ad35.PR5Orf6.PRO
111 NGIQMFKAVRGERLVYSVRWEGGGRKITRIL Ad35.E4-ORF6+7.pro

```

Decoration 'Decoration #1': 柜内残基不同于Ad5. E4-ORF6+7. PRO.

图22

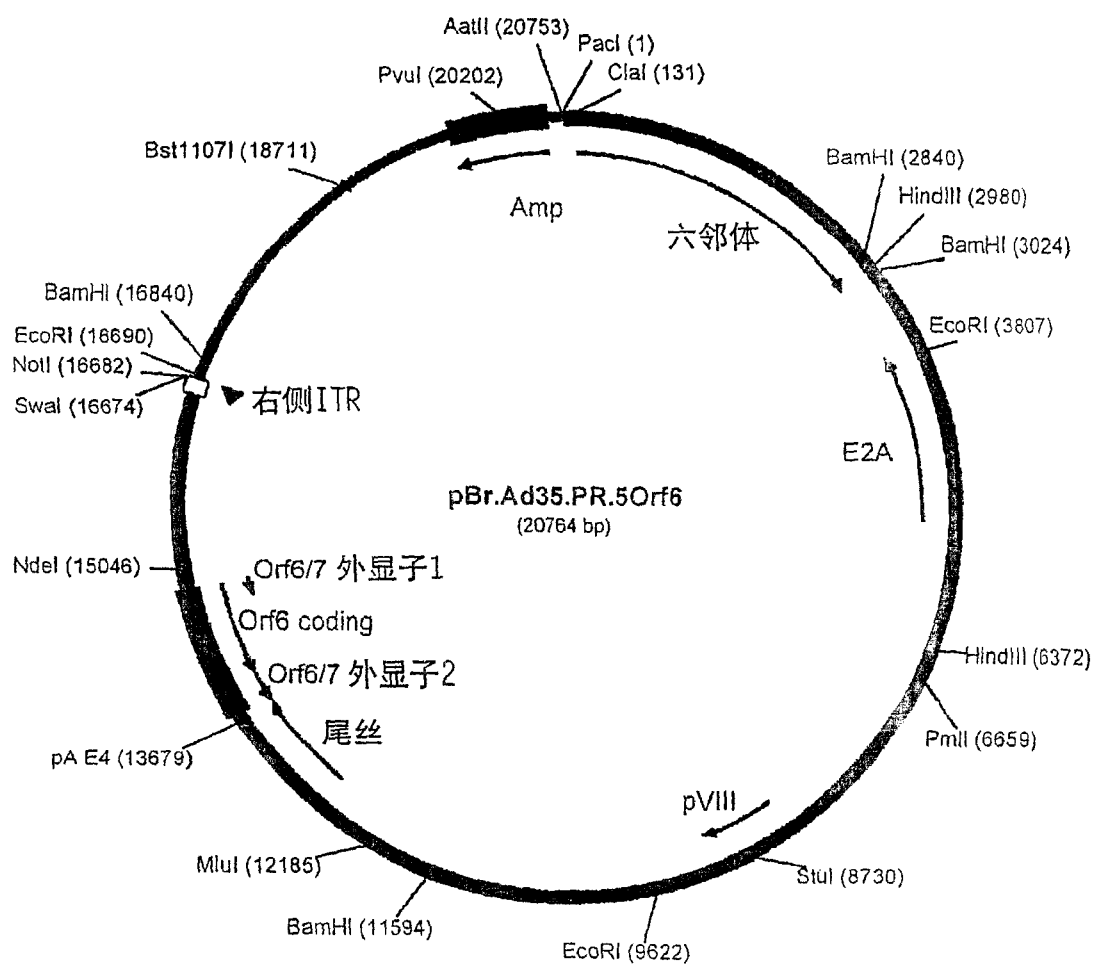


图23

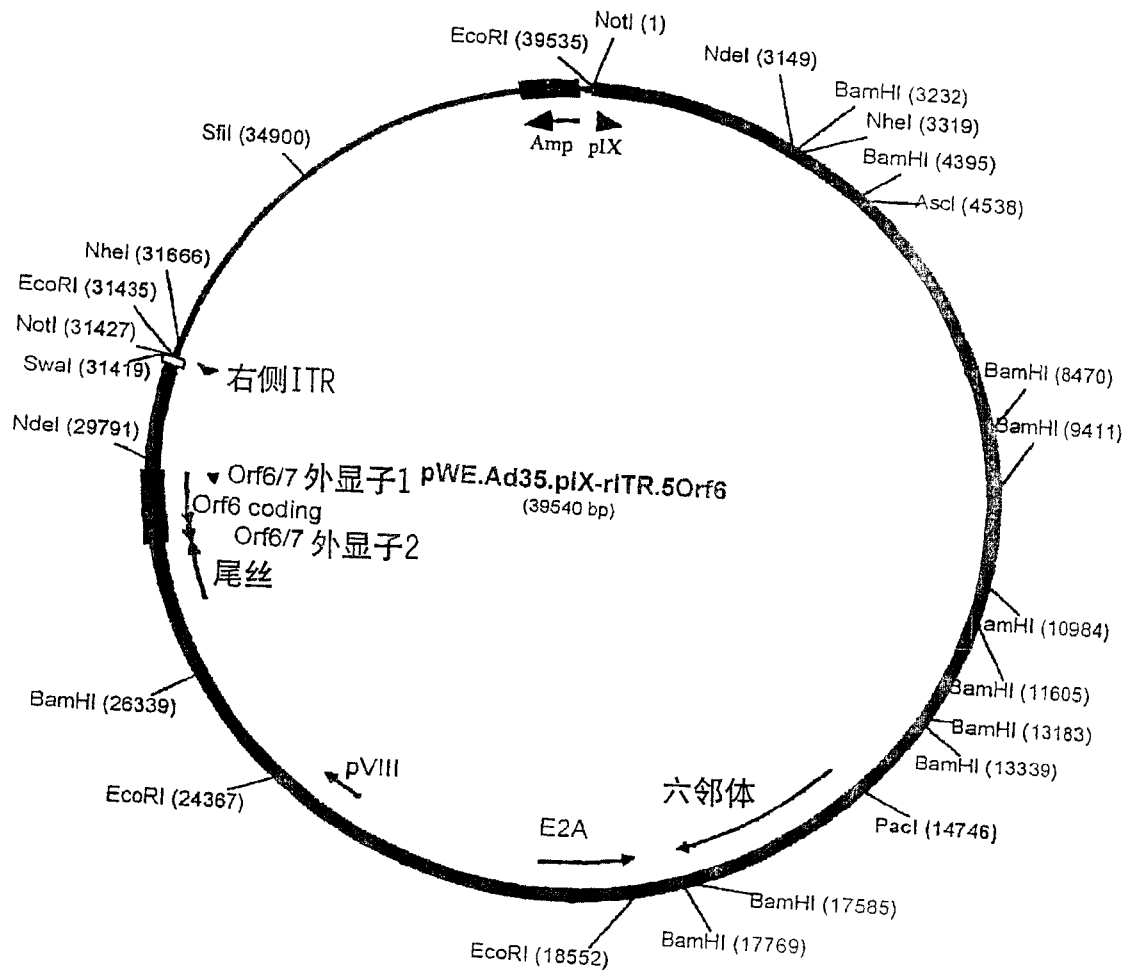


图24

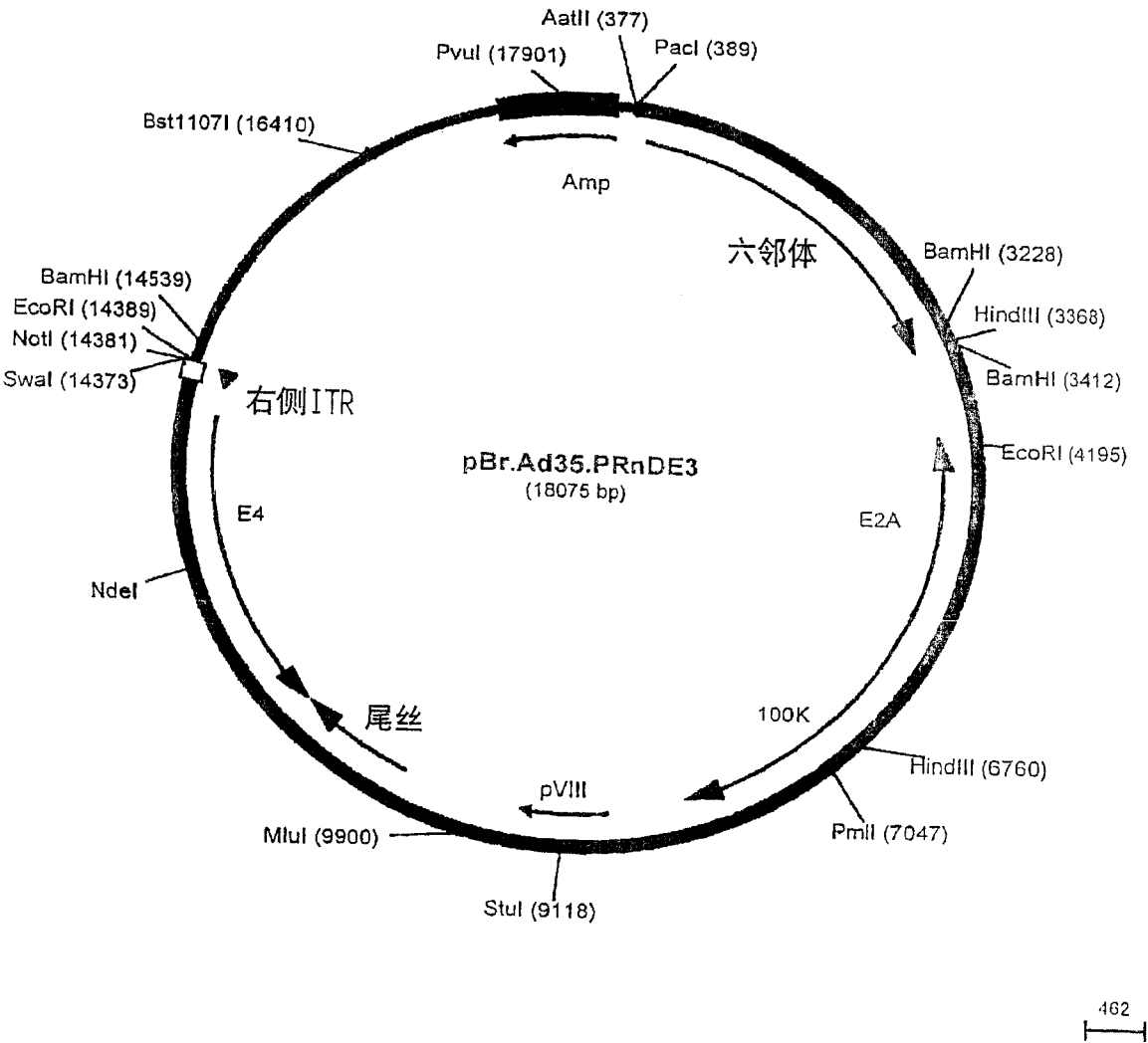


图25

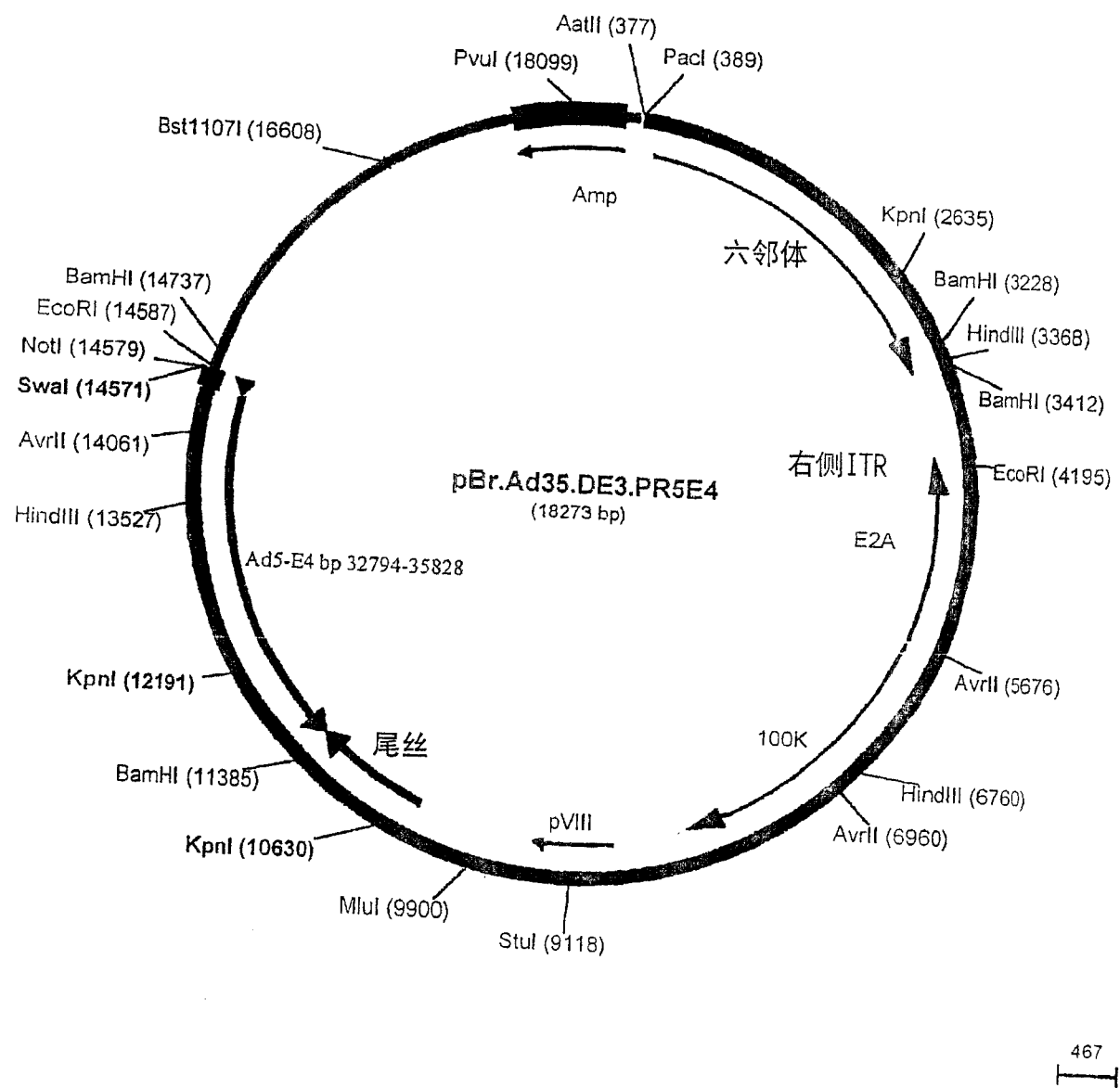


图26

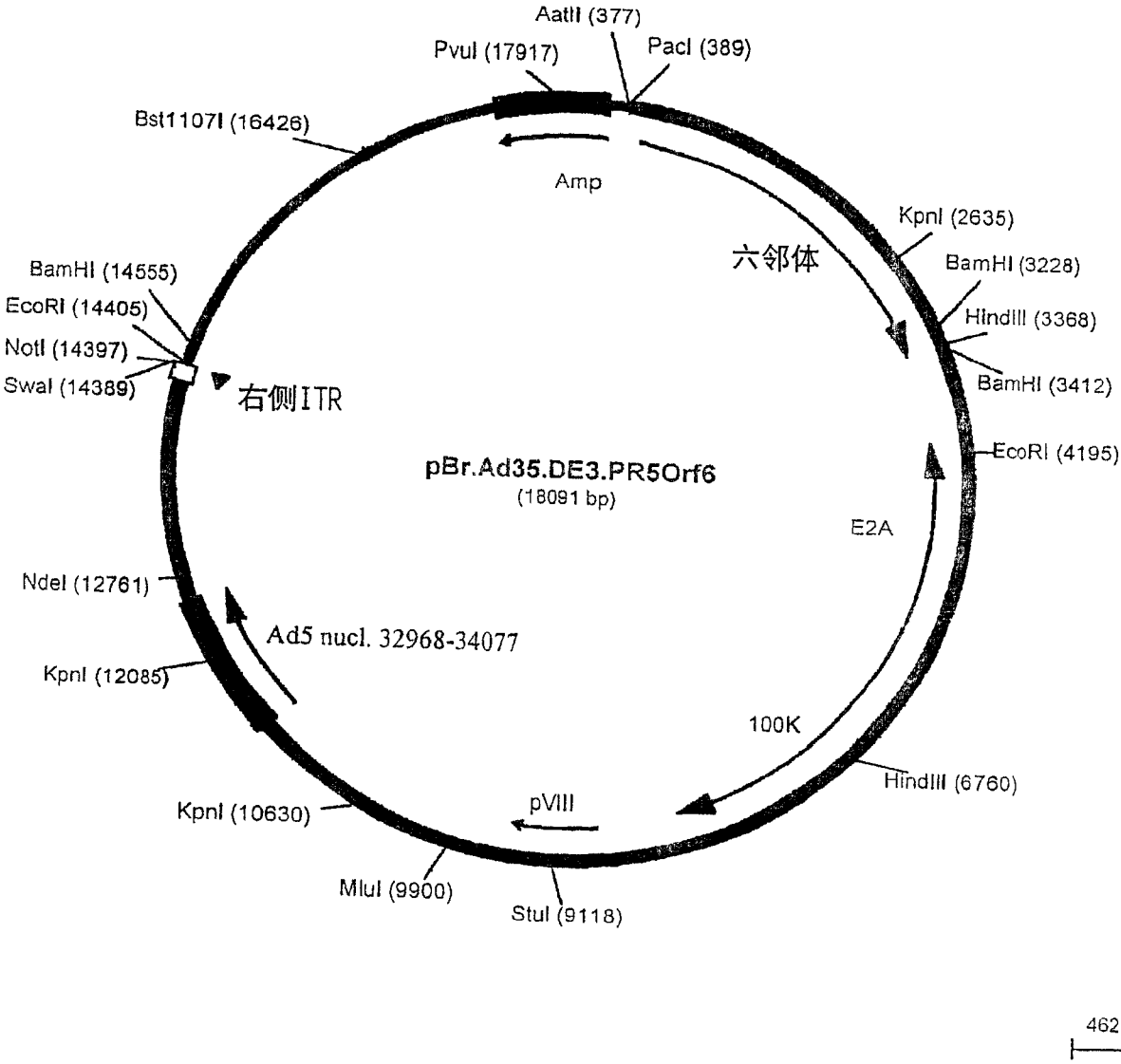


图27

通过在PER.C6细胞中的双同源重组产生E1缺失的Ad35载体

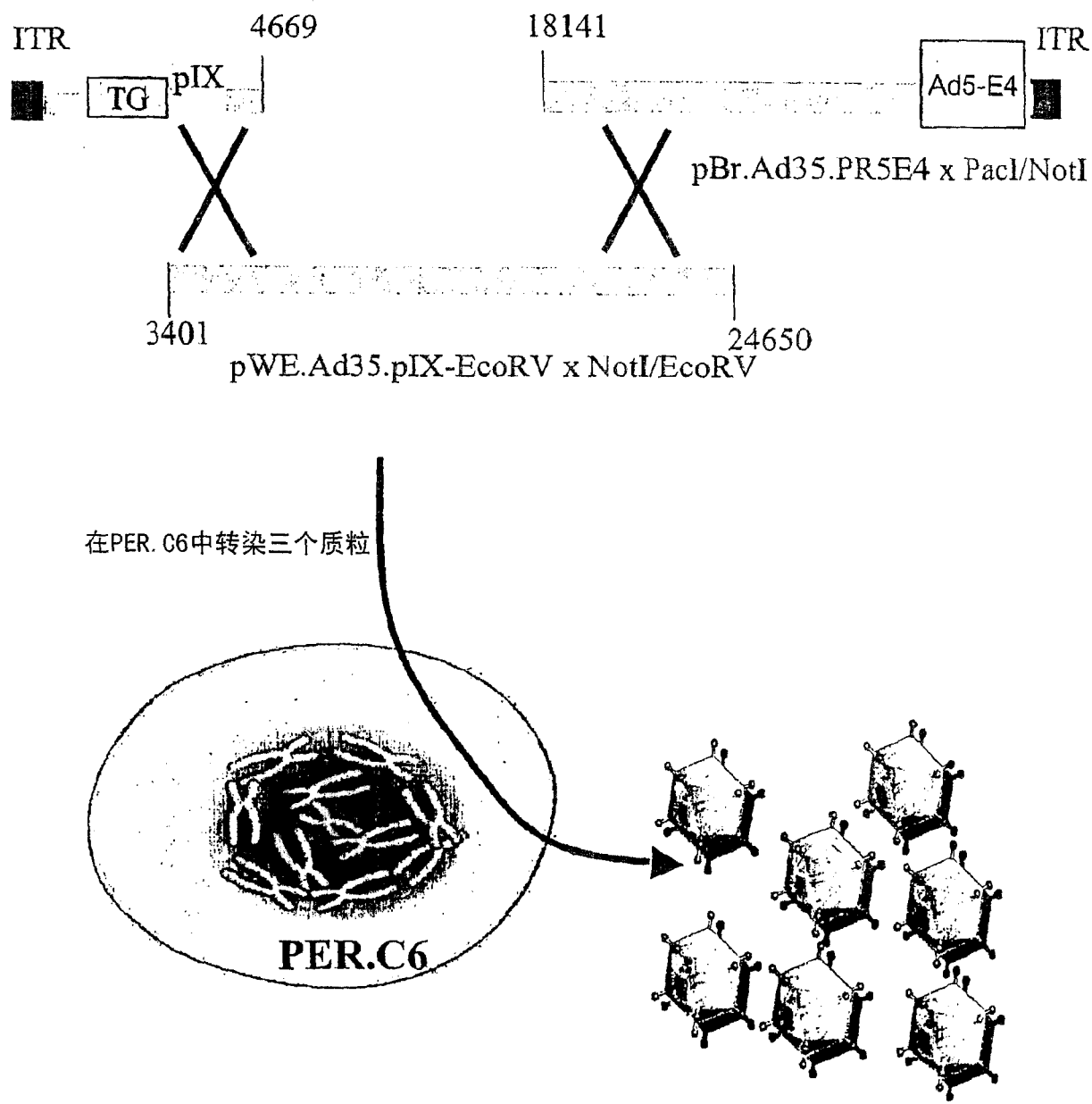


图28

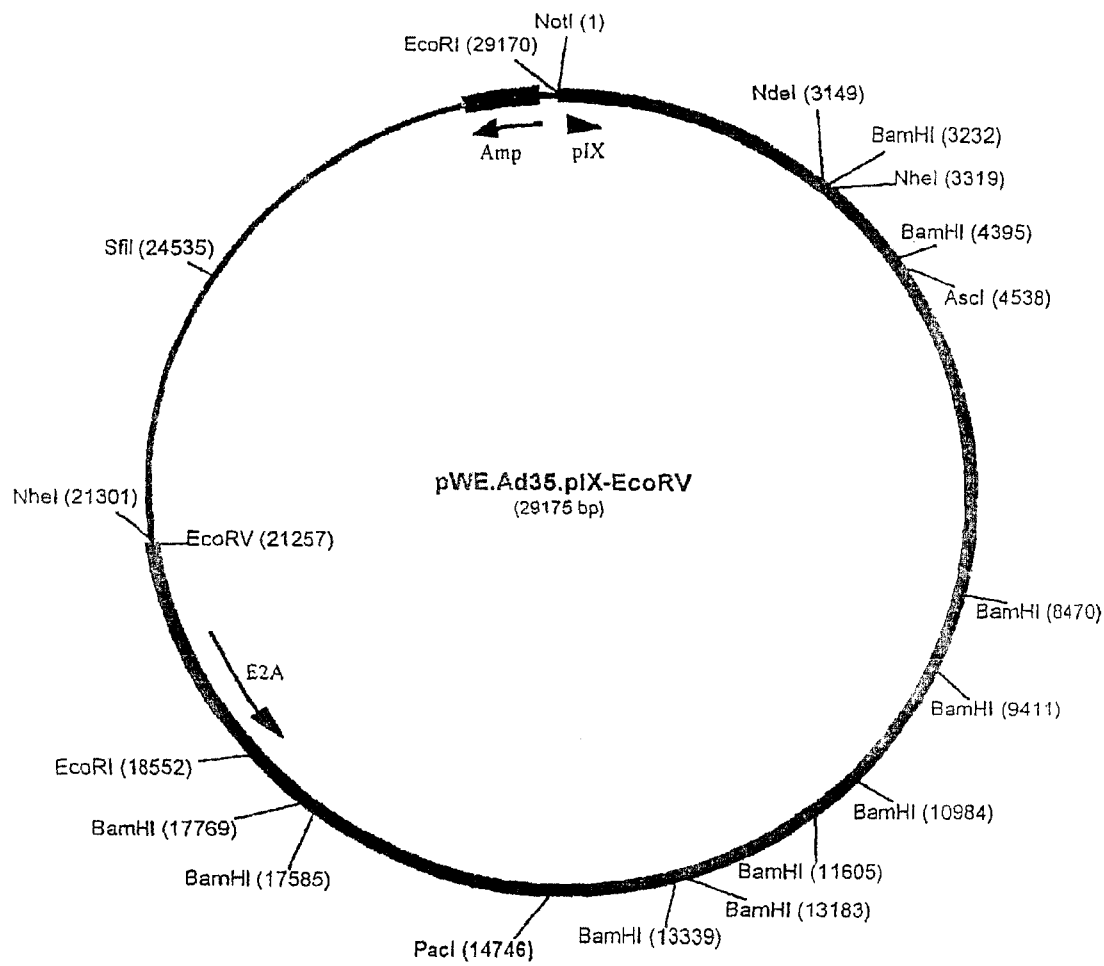


图29

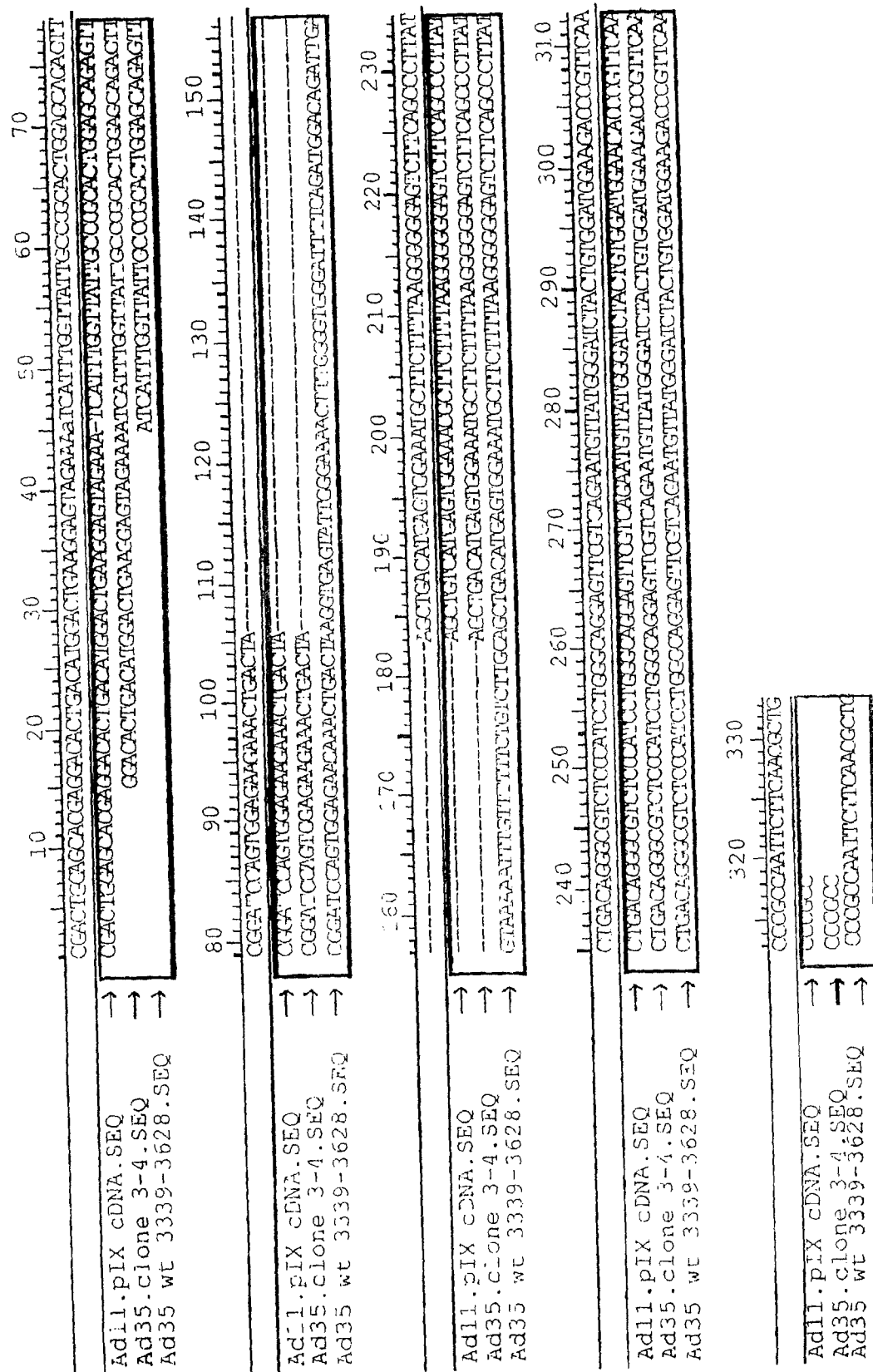
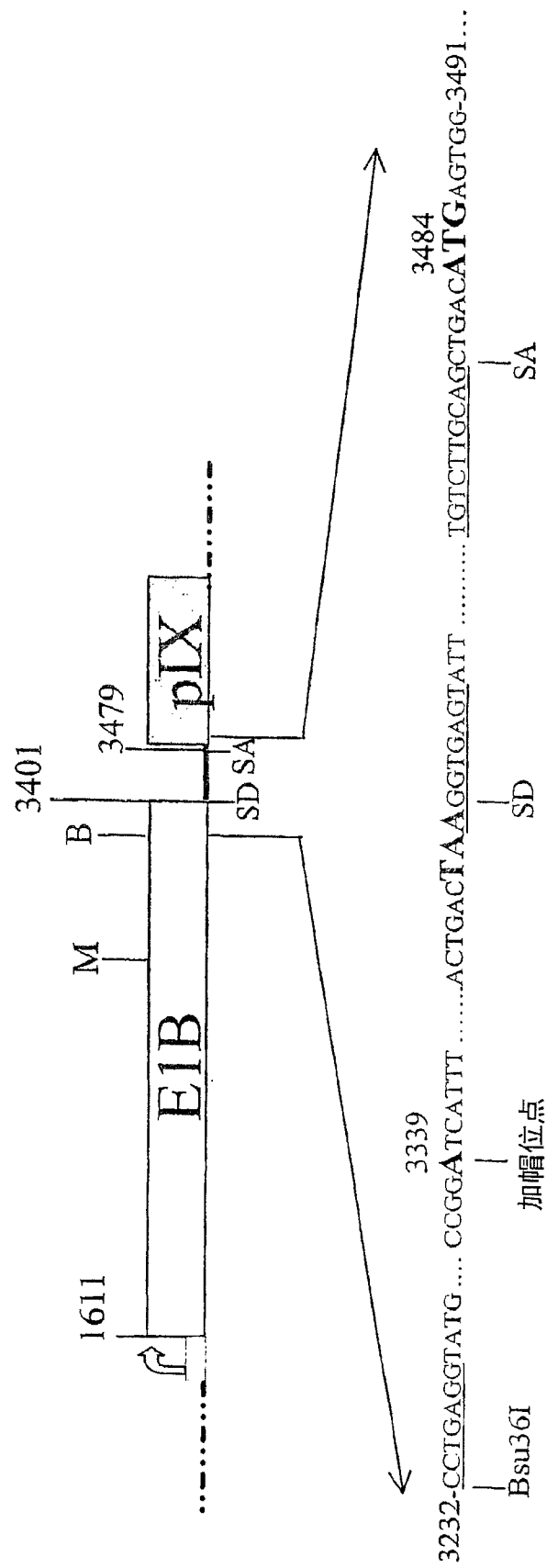


图 30



134

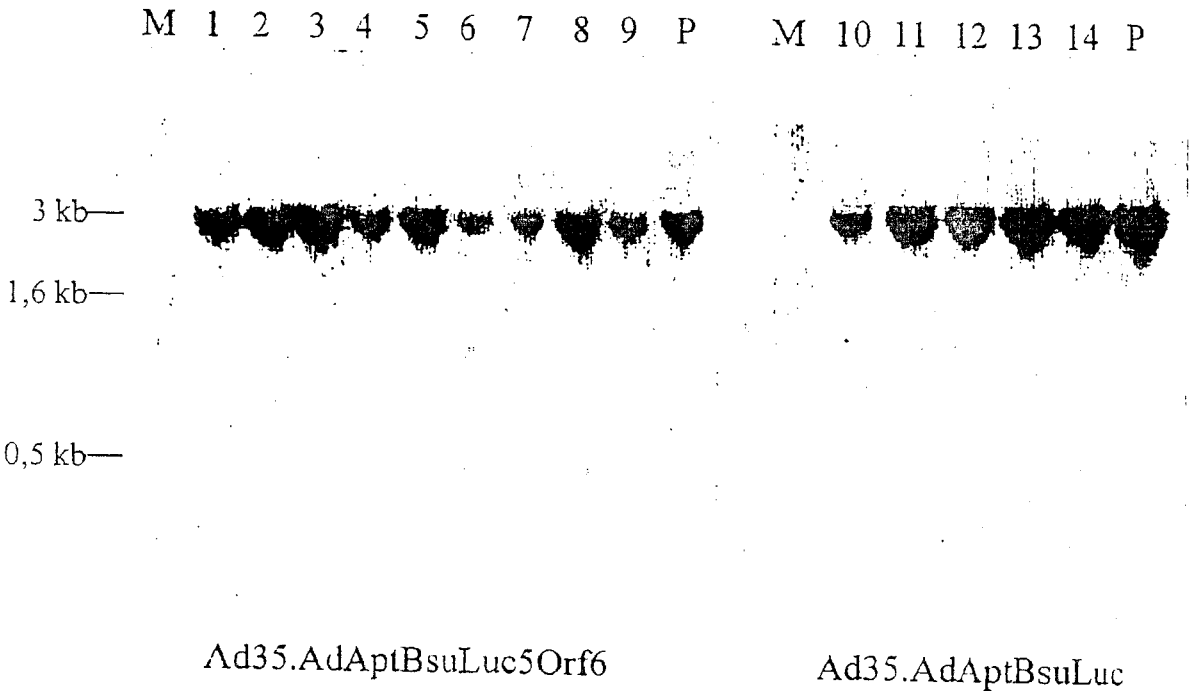


图32