

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 15/86
C12N 5/10



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98810749. X

[45] 授权公告日 2005 年 5 月 11 日 [11] 授权公告号 CN 1201013C

[22] 申请日 1998. 11. 17 [21] 申请号 98810749. X [30] 优先权 [32] 1997. 11. 17 [33] FR [31] 97/14383 [86] 国际申请 PCT/FR1998/002453 1998. 11. 17 [87] 国际公布 WO1999/025861 法 1999. 5. 27 [85] 进入国家阶段日期 2000. 5. 11 [71] 专利权人 森泰莱昂公司 地址 法国安东尼 [72] 发明人 J·克鲁采特 J-J·罗伯特 E·维格尼 P·耶 审查员 郝建欣	[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利 商标事务所 代理人 陈文平
权利要求书 2 页 说明书 33 页 附图 16 页	

[54] 发明名称 用于减少同源重组现象的腺病毒载体及方法

[57] 摘要

本发明涉及减少核酸间重组现象的方法，还涉及该方法在生产无复制性粒子污染之缺陷病毒中的应用，还涉及新的病毒构建体。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 用于减小细胞染色体核酸和染色体外核酸之间的分子内或分子间同源重组现象的频率的方法，其中所述的方法包含在包含编码缺陷腺病毒补充功能的染色体核酸的细胞中引入含所述缺陷腺病毒基因组的染色体外核酸，其中简并所述腺病毒基因组的序列的 pIX 和/或 IVa2 基因修饰所述核酸，以减小其与另外一个核酸的同源性。

2. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于所述序列以至少每 20 个碱基对中 1 个碱基对的比例简并化。

3. 根据权利要求 2 的方法，其特征在于所述序列以至少每 10 个碱基对中 1 个碱基对的比例简并化。

4. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于在所有可能的位点上对序列简并化。

5. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于根据补充细胞中的密码子进行所述简并化。

6. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于染色体核酸包含腺病毒基因组的 E1 区以及一个侧翼序列，染色体外核酸包含 E1 区缺陷的腺病毒基因组。

7. 根据权利要求 6 的方法，其特征在于 E1 区缺陷的腺病毒基因组的序列在 pIX 基因中简并化。

8. 根据权利要求 7 的方法，其特征在于 E1 区缺陷的腺病毒基因组的序列在 IVa2 基因中简并化。

9. 通过在 293 细胞系中引入缺陷重组腺病毒的基因组制备所述缺陷重组腺病毒的方法，其特征在于所述基因组中含：

- E1 区的缺失
- pIX 和/或 IVa2 基因中的简并化。

10. 一种缺陷重组腺病毒，其基因组包含至少一个序列被修饰的区域，所述修饰减小了与编码其补充功能的染色体核酸间分子间同源重组现象的频率，其特征在于修饰所述序列是指简并 pIX 和/或 Iva2 基因，以

减小与其他配偶体的同源性。

11. 根据权利要求 10 的腺病毒,其特征在於修饰的是一个编码区 pIX 基因。

12. 根据权利要求 11 的腺病毒,其特征在於简并化后序列包括 pIX 基因,其为序列 SEQ ID No.1。

13. 根据权利要求 11 或 12 的腺病毒,其特征在於 IVa2 基因处于不同于其原始位置的基因组位置中。

14. 根据权利要求 13 的腺病毒,其特征在於 IVa2 基因位于 E4 区中。

15. 根据权利要求 10 的腺病毒,其特征在於被修饰的区域为 pIX 和 IVa2 基因。

16. 根据权利要求 15 的腺病毒,其特征在於被修饰后的区域是 SEQ ID No.3 的序列。

17. 根据权利要求 10 的腺病毒,其特征在於它包含 E1 区的缺失。

18. 包含权利要求 10 所述的缺陷腺病毒的细胞。

用于减少同源重组现象的腺病毒载体及方法

本发明涉及用于减少核酸间重组现象的方法，还涉及该方法在制备诸如质粒或病毒载体等核酸过程中的应用。本发明还涉及新的病毒构建体。

核酸间的重组是分子生物学领域熟知的现象。重组是产生遗传物质新组合的分子机制，为自然选择提供物质基础，从而支持达尔文的进化论。遗传重组需要所参与的核酸间有强序列同源性，一般称为同源重组。在同源重组时，在核酸的两个区域间发生遗传信息的交换，交换可以是相互的（“交换”）或不是相互的（转换）。

在减数分裂时，同源重组产生遗传信息的重新分配，并在染色体的正确分离中起重要作用。在有丝分裂中，同源重组参与 DNA 的修复。它可以导致基因组重排，如当涉及分散的重组区域时产生缺失和重复，或在涉及串联重复序列时产生收缩或扩张。

已部分阐明了产生同源重组的机理。例如在细菌中，从干预一个单链末端阶段开始同源重组过程(Holliday, 1964; Meselson, 1975)。而在真核细胞中，大部分的结果提示为一种双链断裂机制(DSB “double-stand break”)(Szostak 等, 1983)。DSB 似乎是同源重组两个主要机制的起源：一种是保守性的，所有参与重组的核酸序列均可见于重组产物中(Szostak 等)，另一种是非保守性的，在此过程中某些序列丢失。在哺乳动物体细胞中，大部分经 DSB 的同源重组看来是以非保守机制进行的(Lin 等, 1990, Jeong - Yu, 1992)。

随着生物技术的不断发展，要使用越来越大的 DNA：制备重组蛋白，创制转基因动物，基因和细胞治疗等。在这些不同的领域中，不加控制的重组现象有时可能构成一种缺点。

例如，在制备重组蛋白时，表达质粒中的重组现象(分子内重组)可以导致例如转基因表达盒被切割，从而丧失表达能力。重组现象还可能

导致稳定整合在生产宿主细胞基因组中的表达盒被切割，从而导致失去稳定性。

另一个例子是，在构建和生产载体(尤其是病毒载体)时易发生与同源重组现象有关的不利影响。病毒载体(腺病毒、逆转录病毒、腺相关病毒、疱疹病毒等)是在体外、离体或体内向细胞中转移核酸的特别有效的工具。为了构建缺陷病毒载体，一般从基因组中删除野生病毒复制所必需的区域，代之以目的核酸。为了产生和扩增这些病毒，需要反式提供这些功能(在质粒中，或以整合在生产细胞基因组中的形式，或用辅助病毒)。然而在某些情况下，在缺陷病毒基因组和补充功能间仍存在同源重组现象，可重建复制性病毒粒子。例如，来自腺病毒的载体一般在补充细胞系(293 细胞系或其衍生系列)中生产，其该细胞系中整合了腺病毒基因组的一部分。更准确地讲，293 细胞系包含血清型 5 腺病毒(Ad5)基因组的左侧末端(约 11-12%)，包括左侧 ITR、包壳化区域和 E1 区(包括 E1a 和 E1b)、及编码蛋白 pIX 和 IVa2 之区域的一部分。该细胞系能反式补充 E1 区缺陷的重组腺病毒，即失去复制所需 E1 区全部或部分的重组腺病毒。然而，在该细胞系基因组中整合的该腺病毒区域与所希望产生的重组病毒的 DNA 间存在同源性区域。因此，在病毒生产过程中，会发生各种重组现象，生成复制性病毒粒子，特别是 E1+型腺病毒。如图 1 所示，这可能涉及简单的重组事件，然后是染色体断裂(图 1A)，或涉及双重重组(图 1B)。这两种类型的修饰都致使重组 DNA 的左侧部分(不含功能性 E1 区)被存在于细胞基因组中的相应部分所代替，而后者带有一个 E1 区的功能性拷贝。另外，考虑到 293 细胞系产生的重组载体的滴度高，这些重组现象的概率也应高。事实上，已证明多批缺陷重组腺病毒载体被复制性病毒粒子所污染。

在病毒样品中存在复制性粒子对于体外或体内转移基因的应用是严重的缺点(病毒繁殖和扩散失控的危险)。

在生产缺陷性逆转录病毒中存在同样的问题。例如，缺陷逆转录病毒构建体一般缺失了编码性病毒区域(gag, pol 和 env)，这些区域由生产细胞系反式补充。同样，对于已报道的一些细胞系中，在缺陷逆转录

病毒基因组与该细胞所带互补功能间存在重叠区域。PA317、Psi2等细胞尤其如此。因而在这些区域中易产生同源重组现象，产生复制性粒子。

本发明涉及一种用于减少给定核酸间重组现象，从而减小这些现象对生物过程之影响的方法。

更具体地讲，本发明涉及用于减小两给定核酸或两核酸区域间同源重组事件之频率的方法。

为了减少同源重组现象，现有技术教导了多种方法，它们都基于相同的原理：替代或消除同源区域。例如，一些用于表达目的基因的质粒带有与宿主细胞基因组同源的区域，特别是启动子区、标志基因或复制起始区。为了减小重组危险，迄今已提出用其他非同源性区域(不同启动子等)代替这些区域。另外，为了限制在病毒载体生产过程中的重组危险性，已提出消除补充基因与缺陷病毒基因组间的同源性序列。

例如，专利申请 W097/00326 描述了一种腺病毒生产细胞系，称为 PER，其含有腺病毒基因组的一个有限单元，包含 E1 区。在该细胞系中，减少了与缺陷病毒基因组同源的侧翼序列，这可以限制它们之间同源重组的危险。同样，专利申请 W095/11984 描述了一种重组腺病毒的构建，其带有延伸至 pIX 基因一部分的 E1 区缺失。在此情况下，不再是修饰(减少)补充区域，而是修饰缺陷基因组中的缺失，即缺失被扩张。结果也减小了重组危险，即使仍存在同源性区域。

但即使这些方法能减小细胞和病毒基因组间的重组危险，从而减小产生有复制性粒子污染的病毒的危险，它们不能完全消除这些危险及/或需要构建新的细胞系并证明其有效，这种工作很繁重。另外，一些区域用其他区域替代并不令人完全满意，尤其是效率方面。

本申请公开了一种用于减少分子间或分子内同源重组现象的新方法。本发明还公开了该方法在生产无复制性粒子污染之缺陷病毒中的应用。本发明还公开了新的病毒构建体，其能够在现有的生产细胞系中就滴度而言最有效地扩增，而产生复制性粒子的危险大大减小。

同源重组的第一步也最重要的一步是两个配对核酸间(分子间重组)或核酸的两个区域间(分子内重组)的识别。该步是两个同源区域间直接

相互作用的结果。两个核酸间的同源重组因而基于相同性的存在、或这些核酸的两区域间强序列同源性的存在，这一般取决于两个因素：同源性程序和同源性长度(即核酸或两个核酸所携带同源性区域)。另外，同源重组的频率还受核酸某些特定区域的影响。例如，已观察到某些区域能够以高于平均频率的频率重组。另外还确定，这些区域化的频率差异可能起因于特定的序列，如大肠杆菌中的 CHI 位点或 *S. pombe* 中的 M26 位点(Gangloff 等, 1994)。

与现有技术提出的策略不同，本发明的方法不靠消除配对核酸间的同源性区域。本发明的方法以新颖的方式基于修饰重组的两配对核酸中至少一个的序列，从而减小这些核酸间存在的同源性。

本发明的第一个主题涉及一种用于减小分子内或两核酸分子间同源重组现象之频率的方法，其特征在于简并化重组配对核酸中至少一个的序列，减小与其它配偶体的同源性。

本发明中“减小同源重组现象的频率”指与未修饰的相应核酸相比，该频率的任何降低。这种降低易于通过本领域技术人员已知的常规试验测定(特别是“标志拯救”试验或复制性病毒粒子的生成试验)。有利的是，术语“减小”指同源重组频率的显著性降低，优选至少一个对数单位。

分子间同源重组指两个不同的核酸(或两个核酸的两个区域)间的同源重组。分子内同源重组指同一核酸的两个区域间的同源重组。另外，同源重组的配对核酸可以是染色体外核酸，染色体核酸或两者的组合(即染色体核酸和染色体外核酸)。染色体外核酸可以是质粒、载体、附加体、病毒基因组等。

本发明的方法特别适用于减小染色体核酸与染色体外核酸间分子间同源重组现象的频率。

本发明的方法一般包括以下步骤：

- (i) 鉴别出同源重组区域，
- (ii) 修饰这种区域，
- (iii) 核验序列，

(iv)合成修饰的序列(称为同质基因)

(v)用同质基因替代原序列。

(i)按任何已知方法进行核酸间同源重组区域的鉴别。具体地讲,一旦发现重组现象,经序列分析就可以找到相关的区域:寻找核酸间(分子间)或核酸内(分子内)的同源性区域。

当鉴别出重组所涉及序列时,就可以确定用于第(ii)步即修饰的区域,包括所述序列的全部或一部分。

(ii)序列的修饰

一般认为,在足够长的区域有很高的同源性时才能发生显著频率的重组现象。具体地讲,文献数据显示,发生这样的现象需要至少约200bp长度上的完全同源的区域。实际上,即使在更短的区域上可以发生重组,其频率也低得多,而且不规律。另外,在同源性被降低19%的这种区域上,重组频率看来降低约1000倍(Waldman和Liskay, 1987)。

可以用不同的方式修饰该序列。对于编码性序列,这种修饰可建立在遗传密码的简并性上。这样,虽然序列改变,因而同源性降低,但表达产物仍相同。

因而本发明的要点特别在于修饰序列,防止两同源区域间的配对。这种修饰可以减小两相关区域间同源性的长度和程序。

有利的是,在本发明方法中以至少每20个碱基对中一个碱基对的比例对核酸序列的同源重组相关区域进行简并化。更优选以至少每10个碱基对中一个碱基对的比例进行简并化。

按照本发明的一个特定实施方案,在所有可能的位点上进行序列的简并化。

本发明序列的简并化最好根据将使用该核酸的细胞或生物体的密码子使用情况进行。对于在人类细胞系中进行生产的病毒载体而言,尽可能选择人体中密码子的优先使用习惯进行序列的简并化是特别有意义的(见实施例)。

另外,可以对核酸序列进行补充修饰。例如,在非编码性区域中,

可以减小某些元件的长度(表达调节序列、启动子)或修饰这些元件或用外源区域代替一些其他元件。

按照本发明的一种具体实施方案,当同源性区域跨越多个基因时,一方面可以通过对一个或多个基因进行简并化来减小同源区域,另一方面可以通过改变同源区域中存在的某些基因的基因组位置来达到这一目的,即在腺病毒基因组内在不同于其原位置的基因组位点上安排这些基因。改变了基因组位点的基因序列也可以被简并化。优选只对没有移位的基因序列进行简并化。

(iii)序列的核验

按信息论的方法进行核验,检查可能影响同质基因活性的调节元件、次级结构等的存在。见实施例。

(iv)同质基因的合成

同质基因可以按本领域技术人员已知的任何技术合成,尤其是利用核酸合成仪。

(v)用同质基因替代原序列

一旦合成了同质基因,将其引入核酸中以替代原序列。该步骤同样可以按本领域技术人员熟知的常规分子生物学技术完成。

本发明方法的应用之一是生产不含具复制能力之病毒粒子(RCV)的载体,特别是病毒载体。对此,本发明方法更具体地用于减小编码补充缺陷病毒功能之染色体核酸与含所述缺陷病毒基因组之染色体外核酸间同源重组现象的频率。

相关的病毒最好是腺病毒、逆转录病毒、腺相关病毒(AAV)或疱疹病毒,尤其是腺病毒。

这样,本发明的一个具体实施方案为减小含腺病毒基因组E1区和侧翼序列的染色体核酸与含E1区缺陷之腺病毒基因组的染色体外核酸间同源重组现象频率的方法。

有利的是,在该具体方法中,本发明的简并化序列包括E1区缺陷之腺病毒基因组的pIX基因。更优选地,简并化序列包括腺病毒基因组的pIX

和 IVa2 基因。

根据另一实施方案, 简并化序列包括腺病毒基因组的 pIX 基因, 而 Iva2 基因序列从其天然基因座位移向 E4 区。

本发明的方法特别适用于在 293 细胞系或一个衍生细胞系中生产 E1 区缺陷的重组腺病毒。

如上文所述, 293 细胞系在其基因组中含有腺病毒基因组的左侧部分, 特别包括 E1 区和位于 E1 区下游(3')的一个侧翼区, 后者特别包括 pIX 基因和 IVa2 基因的一部分。正是在该侧翼区发生同源重组, 产生复制活性腺病毒(RCA)。“衍生细胞系”指带有腺病毒 E1 区和易于引起与缺陷病毒重组的侧翼区的细胞系。这可以是比 293 中短的区域(例如限于 pIX)或比 293 中的更长的区域。衍生细胞系还可以是通过引入另外的补充序列(如 E4)从 293 细胞构建的细胞系。

因此, 本发明还涉及一种通过在 293 细胞系或衍生细胞中引入缺陷重组腺病毒基因组而制备缺陷重组腺病毒的方法, 其特征在于所述基因组包括:

- E1 区的缺失,
- pIX 和/或 IVa2 基因的简并化。

本发明还涉及基因组中含有至少一个序列简并化的区域的任何病毒载体, 特别是逆转录病毒(在 gag、pol 和/或 env 基因中含简并化序列)、腺相关病毒(在 rep 和/或 cap 基因中带有简并化序列)或腺病毒。

特别有利的是基因组中含简并化 pIX 基因的腺病毒。优选 pIX 基因的简并化序列是 SEQ ID No. 1 或 SEQ ID No. 4 的序列。更优选, 这种腺病毒还在 Iva2 基因的基因组位置含有修饰。该基因最好被放置在 E4 区。

根据另一实施方案, 涉及 pIX 和 IVa2 基因均简并化的腺病毒。优选, pIX 基因的天然序列被 SEQ ID No. 1 的序列或 SEQ ID No. 4 的序列取代, 而 IVa2 基因的简并化序列是序列 SEQ ID No. 2 或 SEQ ID No. 5。优选, 基因 pIX 和 IVa2 的天然序列被序列 SEQ ID No. 3 取代。

根据另一实施方案, 所述腺病毒的 pIX 和 IVa2 基因被简并化, 并在 pIX 基因的启动子序列中有修饰和/或改换了这些基因的多聚腺苷酸化序

列。优选，所述腺病毒含有 SEQ ID No. 8 的序列。

所述腺病毒最好另外含有 E1 区的至少一种缺失。更优选，这些腺病毒中至少 E1 和 E3 区的全部或部分缺陷。还可以是 E1 和 E4 区的全部或部分以及可能的 E3 区缺陷的重组腺病毒。另外，这些腺病毒可以是不同血清型的。对于人源的腺病毒，优选分类至 C 组的那些。

在人腺病毒的不同血清型中，本发明更优选使用 2 型或 5 型腺病毒 (Ad2 或 Ad5)。在源自动物的不同腺病毒中，本发明中优选使用源自狗的腺病毒，特别是腺病毒 CAV2 的任何毒株 [如 manhattan 株或 A26/61 (ATCC VR - 800)]。其他动物腺病毒尤其记载在专利申请 W094/26914 中，后者引入本文作为参考。腺病毒的构建策略以及这些载体中可用于引入目的基因的位点在现有技术中有详细描述，特别是 W095/02697、W096/10088、W096/13596 或 W096/22378。

根据一种特别有利的方案，在本发明的重组腺病毒中，在 Ad5 腺病毒的序列上 E1 区通过缺失从 454 位至 3328 位核苷酸的 PvuII - BglIII 片段而失活。该序列可在文献中及数据库 (特别见 Genebank No. M73260) 中找到。根据另一优选的实施方案，E1 区通过缺失 382 - 3446 位核苷酸的 HinfII - Sau3A 片段而失活。

有利的是，本发明的重组腺病毒另外还含有欲在细胞、器官或机体中转移和/或表达的外源核酸序列。

具体地讲，外源 DNA 序列可以包含一个或多个治疗基因和/或一个或多个编码抗原性多肽的基因。

可以被如此转移的治疗基因是在靶细胞中转录和有时翻译产生有治疗效果之产物的任何基因。

特别涉及编码有治疗效果之蛋白产物的基因。所编码的蛋白产物可以是蛋白质、肽、氨基酸等。该蛋白产物可以与靶细胞同源 (即在任何疾病时靶细胞中正常表达的产物)。这种情况下，蛋白的表达例如可以缓解细胞中表达不足或由于变异引起的表达蛋白无活性或活性弱的问题，或可以超量表达所述蛋白。治疗基因还可以编码稳定性提高、活性改变等的细胞蛋白的变异体。这种蛋白产物还可以与靶细胞异源。在这种情

况下，所表达的蛋白例如可以补充或带来细胞中所缺陷的活性，从而可以与疾病作斗争。

在本发明的治疗产物中，更具体地可以举出酶，血液衍生物，激素，淋巴因子：白介素、干扰素、TNF等(FR9203120)，生长因子，神经递质或其前体或合成酶，营养因子：BDNF、CNTF、NGF、IGF、GMF、VEGF、aFGF、bFGF、NT3、NT5等；载脂蛋白：ApoAI、ApoAIV、ApoE等(FR9305125)，肌营养不良蛋白或小营养不良蛋白(FR9111947)，肿瘤抑制基因：p53、Rb、RaplA、DCC、k-rev等(FR9304745)，编码凝血因子的基因：因子VII、VIII、IX等，编码GAX蛋白的基因，自杀基因：胸苷激酶、胞苷脱氨酶等，编码单链抗体(scFV)的基因。

治疗基因还可以是反义基因或序列，其在靶细胞中的表达可以控制细胞基因的表达或mRNA的转录。这种序列例如可以在靶细胞中被转录成与细胞mRNA互补的RNA，从而阻断其翻译或蛋白质，按专利EP 140308中记载的技术进行。

如上文所述，外源DNA序列还可以包含编码能在人体中产生免疫答应之抗原肽的一个或多个基因。在一个具体实施方案中，利用本发明可以制备用于免疫人的疫苗，特别是对抗微生物或病毒。特别涉及EB病毒、HIV病毒、乙型肝炎病毒(EP 185573)、伪狂犬病病毒的特异性抗原肽，或肿瘤的特异性抗原肽(EP 259212)。

一般而言，外源核酸序列还含有一个在所感染的细胞中有功能的转录启动区。当在所感染细胞中起作用时，特别可以是天然负责目标基因表达的启动子区。也可以是不同来源的区域(负责其他蛋白的表达，甚至是合成的)。尤其可以是真核或病毒基因的启动子序列。例如，可以是来自欲感染细胞之基因组的启动子序列。同样，可以是来自病毒基因组(包括所用的腺病毒)的启动子序列。对此，例如可以举出E1A、MLP、CMV、RSV等基因的启动子。另外，这些启动子区可以通过添加活化序列、调节序列、或允许组织特异性或集中表达的序列而被修饰。另外，当外源核酸不含启动子序列时，可以在所述缺陷病毒基因组中这种序列的下游插入所述核酸。

另外，外源核酸序列还可以含有 - 特别是在治疗基因的上游 - 引导所合成治疗产物进入靶细胞分泌道的信号序列。这种信号序列可以是治疗产物的天然信号序列，但也可以是任何其他功能性信号序列或人工信号序列。

在一有利的具体实施方案中，本发明的载体另外还具有在外源启动子控制下的功能性 E3 基因。更优选地，这些载体具有能表达 gp19K 蛋白的 E3 基因的一部分。该蛋白具有避免腺病毒载体成为免疫反应靶子的作用，所述免疫反应 (i) 可能限制载体的作用，及 (ii) 可以有不利的付作用。

这些重组载体可用于核酸向细胞中的体外、离体或体内转移。

本发明还涉及含有一种或多种上述重组腺病毒的任何药物组合物。可配制本发明的药物组合物，用于通过局部、口服、胃肠外、鼻内、静脉内、肌内、皮下、眼内、透皮途径给药。

优选本发明的药物组合物含有适于注射制剂的药物载体，特别是无菌等渗盐水溶液 (磷酸单钠盐、二钠盐、氯化钠、钾、钙或镁，等等，或这些盐的混合物)；或为干组合物，特别是冻干品，根据情况加入无菌水或生理盐水后可构成注射溶液。

用于注射的病毒剂量可根据不同的参数调节，特别是根据所用的给药方法、所涉及的疾病、待表达的基因、或寻求治疗的时期。一般而言，本发明的重组腺病毒可以按 $10^4 - 10^{14}$ pfu/ml、优选 $10^6 - 10^{10}$ pfu/ml 的剂量配制和给药。术语 pfu (“噬斑形成单位”) 相当于病毒溶液的感染能力，通过感染适当的细胞培养物并一般在 5 天后测定被感染细胞的空斑数目来测定。测定病毒溶液 pfu 滴度的技术在文献中有大量记载。

借助于下列实施例将更详细地描述本发明，这些实施例应视为说明性的而非限制性的。

附图说明

图 1: 腺病毒和 293 细胞系间的重组现象。

图 2: 同质基因的图示结构。

图 3: 质粒 pJJ105 的限制图谱。

图 4: 质粒 pJJ110 的限制图谱。

图 5: 质粒 pJJ206 的限制图谱。

图 6: 用同质基因代替天然区段的缺陷病毒的构建。

图 7: 寡核苷酸 Oigosyngen I 和 OligosyngenII 的限制性图谱。

图 8: pIX 基因的天然核苷酸序列和简并化序列 (SEQ ID No. 1) 及相应的氨基酸序列。

图 9: Iva2 基因的天然核苷酸序列和简并化序列 (SEQ ID No. 2) 及相应的氨基酸序列。

图 10: 同质基因#1 的核苷酸序列 (SEQ ID No. 3)。

图 11: 293 细胞基因组与重组 Ad5 载体间同源性的示意图。载体 Ad5 p53 在 E1 区下游具有连续 898 个核苷酸的与 293 细胞基因组的同源序列。引入点突变将同源性的最大长度减至同质基因#1 (AV 1.7 #1 CMV p53) 中的连续 92 个核苷酸和同质基因#2 (AV1.7 #2 CMV lacZ) 中的 29 个核苷酸。

图 12: 在 293 细胞中连续 7 次扩增后检测载体 Ad5 p53 和 AV1.7 #1 p53 的 RCA。

分子生物学的一般技术

分子生物学中使用的常规方法是本领域技术人员熟知的并在文献中有充分记载, 如质粒 DNA 的制备性提取、质粒 DNA 的氯化铯梯度离心、琼脂糖或丙烯酰胺凝胶上的电泳、DNA 片段的电洗脱纯化、蛋白质的苯酚或苯酚-氯仿提取, 盐水介质中 DNA 的乙醇或异丙醇沉淀、大肠杆菌中的转化等等 [Maniatis T. 等, 分子克隆实验室指南 (Molecular Cloning, a Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1982; Ausubel F.M. 等 (编), 分子生物学的现代方法 (Current Protocols in Molecular Biology), John Wiley & Sons, 纽约, 1987]。

质粒 pIC-20R (Invitrogen) 和 pBS (Stratagen) 是从市场上购得的。

为了进行连接, DNA 片段可在琼脂糖或丙烯酰胺凝胶上电泳按大小分离、用苯酚氯仿混合物提取、用乙醇沉淀, 然后在 T4 噬菌体 DNA 连接酶 (Biolabs) 存在下按供应商的说明进行保温。

可按供应商的说明用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段(Biolabs)进行 5' 突出末端的补平。按制造商的说明使用 T4 噬菌体 DNA 聚合酶(Biolabs)进行 3' 突出末端的破坏。用核酶 S1 处理进行 5' 突出末端的破坏。

利用合成寡核苷酸的体外定向诱变可按 Taylor 等研制的方法[核酸研究(Nucleic Acid Res. 13 (1985) 8749 - 8764]利用 Amersham 销售的试剂盒进行。

通过所谓的 PCR 技术[聚合酶链式反应, Saiki R. K. 等, 科学(Science) 230 (1985) 1350 - 1354; Mullis K. B. 和 Faloona F. A., 酶学方法(Meth. Enzym.) 155(1987) 335 - 350]对 DNA 片段的酶扩增可按制造商的说明用“DNA 热循环仪”(Perkin Elmer Cetus)进行。

核苷酸序列的验证按 Sanger 等研制的方法[美国国家科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 74(1977) 5463 - 5467]利用 Amersham 销售的试剂盒进行。

所用的细胞系

- 人胎肾细胞系 293(Graham 等, 普通病毒学杂志(J. Gen. Virol.) 36(1977) 59)。该细胞系含表整合在其基因组中的人腺病毒 Ad5 基因组的左侧部分(12%)。

实施例 1: 腺病毒中的同源重组

腺病毒基因组可遭受遗传重组的报道已有 25 年以上(Williams 和 Ustacelibi, 1971)。但支持这些现象的机制仍远未被阐明。有人提出重组和复制可能紧密相关, 一些资料支持这样的重组模型, 其中复制会产生腺病毒感染时常观察到的重组所需的特异性底物。问题之一是要知道病毒或细胞蛋白是否参与重组中间体的形成和中间体向最终重组产生的转化。对此, 所试验的病毒基因无一被表明参与了重组现象: E1b、E4、E1a、E3(Epstein, 1991; Weinberg 等, 1986; Young, 1995)。同样, 没能证明任何细胞蛋白的参与。最后提出了腺病毒基因组中重组机制的两种模型, 两者都预言伸展杂合双链的形成(Ahern 等, 1991; Young, 1995)。

负责缺陷基因组和细胞系间同源重组的区域已被特别定位于腺病毒基因组的 pIX 和 IVa2 基因。缺陷基因组中该区域的结构示于图 2 中。

进行了参与与细胞基因组重组之腺病毒基因组的序列修饰。更具体地讲，通过引入沉默突变修饰了 pIX 和 IVa2 基因的天然序列，减小了与天然序列的同源性，而不影响这些基因的表达产物的结构。

所得序列(称为同质基因)用于替换腺病毒的相应天然序列，以构建缺陷载体。

1. 鉴别重组相关区域

基因作图研究表明存在于 293 细胞基因组中的腺病毒基因组部分相应于腺病毒基因组的左侧部分，占基因组的约 12%，即约 4300bp(Aiello 等，1979; Spector 等，1983)。申请人用 PCR 法进行了补充性基因作图实验，表明 4420 位存在于 293 的基因组中。选择该 4420 位作为以下实验中同源区域的右边界，从而作为同质基因的右边界。出于克隆的技术原因，被修饰的片段延伸至 4445 位，在此引入了克隆位点。

在 pIX 基因的表达调节元件中选择同质基因的左末端，特别是在 pIX 基因的 - 56 位。实际上已证明 pIX 基因的启动子可被减至 56 个核苷酸的区域。含 SP1 连接位点和 TATA 盒的该区域的活性与 250 个核苷酸片段的相当(Babiss 等，1991; Matsui 等，1989)。

因而同源性区域被确定为从缺陷病毒基因组的第 3520 位延伸至 4445 位(见图 2)。

2. 设计修饰序列

申请人制作了 Ad5 腺病毒基因组中的密码子使用情况表，用于确定表达病毒蛋白的最佳密码子使用。该表是综合分析 10 种腺病毒蛋白后所得数据而获得的：pIX、Hexon、pIII、pVII、52 - 55k、pPol、pTP、DBP、23K 和 19K(见表)。所得结果然后与人的密码子使用情况表进行比较，后者是利用 GCG 程序分析 Genbank 中 1952 个基因获得的。

从而确定了密码子使用的优先顺序，用于修饰 pIX 和 IVa2 基因的编码序列：

· 当天然序列中使用的密码子不是优选的密码子时，在同质基因中

使用该优选的密码子。

· 当天然序列中使用的密码子是优选的密码子时，使用第二优选的密码子。

· 在某些情况下，如为了引入限制性位点，可以使用第三优选的密码子，特别是当其频率与第二优选的密码子足够接近时。

下表表示在人和腺病毒(ADV5)中的密码子使用频率，在A列中显示人中的优先顺序，在B列中显示腺病毒中的优先顺序，C列中为同质基因合成中采用的选择。

表 1: 密码子的使用频率

			ADV5		人		A	H	C
F	TTT	Phe	2,3	54,2%	1,5	43,0%	1	2	-
F	TTC		1,9	45,8%	2,1	57,0%	2	1	-
L	TTA	Leu	0,1	1,4%	0,6	6,0%	6	6	6
L	TTG		1,2	14,2%	1,1	12,0%	4	4	4
L	CTT	Leu	1,3	15,6%	1,1	12,0%	3	3	3
L	CTC		1,7	20,5%	1,9	20,0%	2	2	2
L	CTA		1,1	12,6%	0,6	7,0%	5	5	5
L	CTG		3	35,6%	4	43,0%	1	1	1
I	ATT	Ile	1,3	34,6%	1,5	35,0%	2	2	2
I	ATC		1,6	43,8%	2,3	52,0%	1	1	1
I	ATA		0,8	21,6%	0,7	14,0%	3	3	3
M	ATG	Met	2,6	100,0%	2,2	100,0%			
V	GTT	Val	0,8	13,1%	1	17,0%	3	3	3

V	GTC		1,4	22,2%	1,5	25,0%	2	2	2
V	GTA		0,8	12,5%	0,6	10,0%	4	4	4
V	GTG		3,3	52,2%	2,9	48,0%	1	1	1
Y	TAT	Tyr	0,8	21,6%	1,2	41,7%	2	2	2
Y	TAC		3	78,4%	1,7	58,3%	1	1	1
*	TAA	end			0,1	23,8%			
*	TAG				0,1	16,7%			
H	CAT	His	0,5	21,3%	1,4	59,3%	2	1	-
H	CAC		1,7	78,7%	1	40,7%	1	2	-
Q	CAA	Gln	1,1	27,4%	1,2	26,7%	2	2	2
Q	CAG		3	72,6%	3,3	73,3%	1	1	1
N	AAT	Asn	1,2	24,5%	1,6	43,5%	2	2	2
N	AAC		3,6	75,5%	2,1	56,5%	1	1	1
K	AAA	Lys	1,4	35,2%	2,2	39,8%	2	2	2
K	AAG		2,5	64,8%	3,4	60,2%	1	1	1
D	GAT	Asp	1,6	29,2%	2,1	44,2%	2	2	2
D	GAC		3,9	70,8%	2,7	55,8%	1	1	1
E	GAA	Glu	2,4	37,0%	2,8	41,5%	2	2	2
E	GAG		4,1	63,0%	3,9	58,5%	1	1	1
S	TCT	Ser	0,8	11,7%	1,4	18,0%	4	3	3
S	TCC		1,7	25,9%	1,7	23,2%	2	2	2
S	TCA		0,6	9,6%	1,1	14,7%	5	4	4
S	TCG		0,9	13,6%	0,4	5,9%	3	6	5
P	CCT	Pro	1,2	18,4%	1,8	29,0%	4	2	2

P	CCC		2,7	39,9%	2,1	33,0%	1	1	1
P	CCA		1,3	18,7%	1,7	27,0%	3	3	3
P	CCG		1,5	23,0%	0,1	11,0%	2	4	4
T	ACT	Thr	1,1	17,7%	1,3	23,0%	2	3	2
T	ACC		3,3	55,0%	2,2	38,0%	1	1	1
T	ACA		0,8	12,8%	1,5	27,0%	4	2	4
T	ACG		0,9	14,5%	0,1	12,0%	3	4	3
A	GCT	Ala	1,2	13,7%	2	28,0%	3	2	2
A	GCC		4	45,7%	2,8	40,0%	1	1	1
A	GCA		1,1	12,6%	1,6	22,0%	4	3	3
A	GCG		2,4	27,9%	0,7	10,0%	2	4	4
C	Cys	TGT	0,3	21,5%	1	41,8%	2	2	2
C		TGC	1,1	78,5%	1,4	58,2%	1	1	1
*	end	TGA			0,3	61,9%			
W	Trp	TGG	1,3	100,0%	1,5	100,0%			
R	Arg	CGT	0,8	10,4%	0,5	9,3%	3	6	6
R		CGC	4,1	52,4%	1,1	19,4%	1	3	1
R		CGA	0,6	7,0%	0,6	10,0%	5	5	5
R		CGG	1,1	13,9%	1	18,6%	2	4	2
S	Ser	AGT	0,4	6,6%	1	13,6%	6	5	6
S		AGC	2,1	32,6%	1,9	24,7%	1	1	1
R	Arg	AGA	0,5	6,2%	1,2	21,0%	6	2	4
R		AGG	0,8	10,2%	1,2	21,7%	4	1	3
G	Gly	GGT	1	17,7%	1,4	18,3%	4	4	4

G	GGC	2,4	41,3%	2,5	33,2%	1	1	1
G	GGA	1,3	21,5%	1,9	25,7%	2	2	2
G	GGG	1,1	19,4%	1,7	22,8%	3	3	3

在同质基因的第一个具体实例(同质基因#1)中,进行了如下修饰:

- 在 pIX 启动子中: 尽可能缩短该序列: 保留的片段只含 56 个核苷酸, 而不是该载体中的 135 个核苷酸。还可以对 SP1 连接位点和 TATA 盒之间的 9 个核苷酸进行额外修饰。

- 在 pIX 基因中: 按上述原则对可能位点都进行了简并化, 而不改变产生的氨基酸序列 (SEQ ID No. 1)。天然序列和简并化序列的比较以及这些序列表达产物的结构示于图 8 中。根据另一策略, 只在每 10 个核苷酸中的一个位点上简并化。在另一策略中, 仅在每 20 个中简并化一个位点。

- 在 pIX 和 IVa2 间隔区中: 在此例中不修饰该 59 个核苷酸区域的序列。

- 在 IVa2 基因中: 按上述原则, 对 IVa2 基因的编码序列中每 20bp 中的一个进行简并化, 而不改变产生的氨基酸的序列 (见 SEQ ID No. 2)。天然序列、简并化序列和生成的氨基酸序列示于图 9 中。根据另一策略, 对每 10bp 中的一个、甚至所有位点进行简并化, 均不改变所产生的氨基酸序列。

同质基因#1 的结构示于图 2 中。同质基因#1 的序列示于图 2 和 SEQ ID No. 3 中。

同质基因的另一实例为同质基因#2, 其中:

- pIX 基因的启动子序列用如 SEQ ID No. 6 中所示修饰的序列代替。

- pIX 基因的序列由 SEQ ID No. 4 中所示序列代替, 而不改变生成的氨基酸序列。

- IVa2 基因的序列由 SEQ ID No. 5 中所示序列代替, 而不改变生成的氨基酸序列。

- 多聚腺苷酸化区域用 7 型腺病毒 (Ad7) 中产生相同功能的区域代

替: Ad7 是用作基因转移载体的 B 亚组的一种腺病毒 (Abrahamsen 等, 1997, 病毒学杂志 (J. Virol.), 71, 8946 - 8951)。该序列示于 SEQ ID No. 7 中。

修饰序列的全部称为同质基因#2, 示于 SEQ ID No. 8 中。

3. 同质基因序列的核验

通过信息分析核验天然序列和同质基因的碱基特征。这种核验的目的是研究同质基因中特定结构的存在与否, 特别是:

- 绞接的供者或受者位点 (SpliceView 和/或 Splice Net 程序),
- 多聚腺苷酸化位点 (Hcpolya 程序),
- 转录因子的潜在连接位点 (Transfac 程序),
- 易于形成直接重复、别针型特定二级结构的区域 (Sigscan 程序, BNL), 包括相应的 sRNA 中的 (RNA 折叠),
- CHI 或 M26 型保守位点。

当鉴别出这种序列时, 相应的碱基可任选性地按上述第 2 点中的策略进行替换。

4. 用同质基因#1 取代相应天然区域的缺陷病毒的构建

1) 起始材料:

- 同质基因#1 (SEQ ID No. 3)
- 分别相应于同质基因#1 5' 和 3' 末端的寡核苷酸 SyngenI 和 syngenII 示于图 7 中。

- 质粒 pJJ105 (图 3)
- 质粒 pJJ110 (图 4)
- 质粒 pIC - 20R (Invitrogen)
- 质粒 pSyngen: 同质基因克隆在 pBS (Stratagen) 中。

2) 缺陷病毒基因组的构建

构建策略示于图 6 中。

质粒 pJJ110 用 XbaI 消化, 生成的 4.8 和 5.0kb 的 XbaI 片段互相结合形成质粒 pJJ201。质粒 pJJ201 然后用 BstEII 和 XmaI 消化、填平并连接, 形成质粒 pJJ202。BstEII 和 XmaI 两个位点被保留。

利用寡核苷酸 syngenI 和 syngenII 及作为模板的质粒 pJJ105 制备

相应于 IVa2 基因片段(Fgt IVa2, 图 6)的 PCR 扩增产物。

寡核苷酸 syngen I 的序列 (SEQ ID No. 9)

AACTGCAGGCCGGCCACTAGTCGCGATGTTCCCAGCCATATCCC

寡核苷酸 syngenII 的序列 (SEQ ID No. 10)

CCGCTCGAGGTGACCGCTAGCCATTATGGACGAATGC

将扩增的片段插入在 pIC-20R 的 SamI 位点, 生成 pJJ203。用 NsiI/BstEII 切下质粒 pJJ105 中 IVa2 基因的邻接片段(片段 2, 在图 6 中称为 Fgt2 Iva2), 然后插入在 pJJ203 的相应位点上, 生成 pJJ204。然后用 FseI/NruI 消化同质基因(图 6), 插入在 pJJ204 的相应位点间, 生成 pJJ205。

pJJ205 的完整片段(同质基因#1 - Fgt 1+2 IVa2)用 Sse8387I/BstEII 消化, 并插入在 pJJ202 的相应位点, 生成 pJJ206(图 5)。

该片段然后用于按 Crouzet 等(PNAS (94) 1414 - 1419(1997))描述的方法制备含腺病毒修饰基因组(E1 及可能的 E3 缺陷, 含同质基因#1)的原核质粒。然后将所得的质粒转染在 293 细胞中, 以产生相应的病毒。

进行了一项实验, 比较两病毒 AV. 17#1CMVp53 和 Ad5CMVp53 借助于 293 细胞繁殖时, RCA(复制活性腺病毒)出现的能力。

含有序列 SEQ ID No. 3(同质基因#1)并带有 p53 表达盒(CMV - p53 - polyASV40)的载体(AV1.7 #1CMVp53)按 Crouzet 等(PNAS (94) 1414 - 1419(1997))的方法构建。

Ad5CMVp53 含有 Ad5(未修饰)的 pIX - IVa2 区。两种病毒的 p53 表达盒是同源的。两种病毒 AV1.7#1CMVp53 和 Ad5CMVp53 在 293 细胞中有相似的生产能力。对于每种病毒, 在 293 细胞上纯化到 5 个噬斑。在 7 次连续转代中, 扩增了 2x5 个噬斑。该扩增后, 在 RCA 检测试验中分析了第 7 次传代的 2x5 个样品。该试验以 3 份平行进行。结果示于图 12 中。

RCA 的检测方法是一种定量方法, 可计算所测样品剂量中的噬斑, 其数目相应于 RCA 的数目。给定剂量的样品病毒(一般 3×10^{10} pv)用于感染一层非补充性细胞(即不表达 E1, 如 A549 细胞), 在其上铺一层琼脂。14 天后, 当起始的感染病毒中含 RCV 时在细胞层中可观察到噬斑的形成。

以三份重复进行的 RCA 检测实验的结果为：AV1.7#1CMVp53 的 0 RCA 和 Ad5CMVp53 的 6 RCA。当使用一种利用观察条件概率的比较统计方法时，该结果是相当显著的。与常规载体相比，载体 AV1.7#1CMVp53 在 293 细胞中繁殖时 RCA 出现频率的降低有统计学显著的改善。这些结果一起证明同质基因的存在不影响所产生病毒的滴度，以及含同质基因#1 的病毒产品没有 RCA 的污染。

5. 用同质基因#2 替代相应天然区域的缺陷病毒的功能性

以同样方式构建了具有同质基因#2、带有 LacZ 表达盒 (CMV - LacZ) 的相似载体：AV1.7#2CMV lacZ。该载体的生产能力与带有 LacZ 表达盒 (RSV LacZ) 但 pIX 和 IvaZ 区未修饰 (野生 Ad5 的序列) 的载体 AV1.0RSV lacZ 进行了比较。在 293 细胞中平行测试了两种载体 AV1.7#2 CMV lacZ 和 AV1.0RSV lacZ 的生产能力。结果示于下表中。

	AV1.7#2CMV lacZ	AV1.0RSV lacZ
储液 1 的滴度 (pv/ml)	1.12x10 ¹²	1.50x10 ¹²
储液 2 的滴度 (pv/ml)	1.52x10 ¹²	1.82x10 ¹²
对储液 2 测得的 生产能力 (pv/细胞)	10133	12133
对储液 2 测得的 生产能力 (tdu/细胞)	203	207

这些结果表明象同质基因#2 这样的同质基因在被引入代替 5 型腺病毒的野生序列时，不仅是有效的而且使生产能力提高；同质基因#2 具有比同质基因#1 更低的同源性，除 pIX 和 Iva2 基因中的沉默突变外还含有非编码区中的修饰 (即 pIX 基因的启动子和 pIX 和 Iva2 的交错多聚腺苷酸化序列中)。

6. 构建其中仅 pIX 基因的天然序列用 SEQ ID No. 1 中的简并化序列代替而 IVa2 基因相应的同源区域转移到 E4 区中的缺陷病毒

根据另一实施方式, 只有 pIX 基因的天然序列用示于 SEQ ID No. 1 中的简并化序列取代, 而 Iva2 基因的相应同源区域被转移到 E4 区中。Iva2 基因的克隆记载于专利申请 W096/10088 中, 后者引入本文作为参考。

构建的第一个称为 pIE11 的质粒含有如下 3 个区域, 克隆在带 KanR 和 SacB 基因的质粒 colE1 中:

- 用下列引物从 Ad5 产生的 PCR 产物:

5'-atcgatcgATAACAGTCAGCCTTACC-3' 和

5'-agctgaattcCATCATCAATAATATACC-3';

该 PCR 产物含有右侧 ITR 和直到 orf1 之 ATG (不包括) 的 E4 启动子 (35525 - 35937 核苷酸)。

- 记载于专利申请 W096/10088 中的 IVa2 基因的 cDNA。

- 含有 E4 orf6 绞接所需序列和直到 EcoRV 位点的 orf6 编码序列的 Ad5 XcmI - EcoRV 片段。

质粒 pIE11 中 IVa2 的 cDNA 之前有一个多余的 ATG。用 Clontech 的 Transformer 定点诱变试剂盒进行定向诱变, 破坏质粒 pIE11 上的该位点, 形成其中该 ATG 已被破坏的质粒 pIE12。

衍生自质粒 pIE12 的质粒 pIE12c 含有按如下修饰的 5 型腺病毒基因组: IVa2 基因从其天然座位转移到 E4 区中, E4 的 orf1 - 4 用 IVa2 的 cDNA 取代, 缺失 E3, 在 E1 的位置上插入表达盒 RSV - lacZ。通过如专利申请 W096/10088 中所述利用 Crouzet 等 (PNAS (94) 1414 - 1419 (1997), 引入本文作为参考) 所述技术与质粒 pXL2788 β Gal 重组获得质粒 pIE12c。

用 PacI 酶消化后, 质粒 pIE12c 被感染在 293 细胞中, 获得扩增的病毒。发现病毒 AdIE12 的限制性图谱与预期的一致。

对所产生的病毒产品的分析表明用 pIX 基因的简并化序列代替天然序列而 IVa2 基因转移到 E4 区中不影响所产生病毒的滴度, 在上文所述条件下试验时发现病毒产品无 RCA 污染。

参考文献

- Abern 等(1991) PNAS 88:105
- Aiello 等(1979)病毒学(Virol.) 94:460
- Babiss 和 Vales(1991)病毒学杂志(J. Virol.)65:598
- Epstein(1991)病毒学杂志 65:4475
- Gangloff 等(1994) Experientia 50:261
- Holliday(1964)遗传学研究(Genet. Res.)5:282 - 304
- Jeong-Yu 和 Carroll(1992)分子细胞生物学(Mol. Cell Biol.) 12 (1):112 - 9.
- Lin 等(1991)分子细胞生物学 10(1):103 - 12
- Matsui(1989)分子细胞生物学 9:4265
- Meselson M. Radding C. (1975) 美国国家科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 80:358 - 361.
- Spector (1983) 病毒学 130:533
- Szostak 等(1983)细胞(Cell) 33:25 - 35.
- Waldman 和 Liskay(1987) PNAS 84(15) 5340 - 4
- Weinberg(1986) 病毒学杂志 57:833
- Williams 和 Ustacelibi(1971)普通病毒学杂志(J. Gen. Virol.) 13:345
- Young(1995)微生物学和免疫学的现代话题(Current Topics in Microbiol. and Immunol.)199:89.

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请人:

- (A) 名称: RHONE - POULENC RORER
- (B) 街道: Raymond Aron 大街 20 号
- (C) 城市: Antony
- (E) 国家: 法国
- (F) 邮编: 92165
- (H) 传真: 0155717291

(ii) 发明名称: 用于减少同源重组现象的方法

(iii) 序列数目:

(iv) 计算机可读形式:

- (A) 载体类型: 软盘
- (B) 计算机: IBM PC 兼容机
- (C) 操作系统: PC - DOS/MS - DOS
- (D) 软件: PatentIn Release #1.0, #1.30 版 (EPO)

(2) SEQ ID No. 1 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 424 碱基对
- (B) 类型: 核苷酸
- (C) 链数: 单链
- (D) 构型: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 假拟: 否

(iv) 反义: 否

(ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: CDS
- (B) 位置: 1..424

(xi) SEQ ID No. 1 的序列描述:

```

ATG TCC ACG AAT TCC TTT GAC GGC TCC ATC GTC TCC AGC TAC CTG ACC      48
Met Ser Thr Asn Ser Phe Asp Gly Ser Ile Val Ser Ser Tyr Leu Thr
   1               5               10               15

ACC CGG ATG CCT CCC TGG GCT GGC GTC CGC CAA AAC GTC ATG GGA AGC      96
Thr Arg Met Pro Pro Trp Ala Gly Val Arg Gln Asn Val Met Gly Ser
                20               25               30

TCC ATC GAC GGC AGG CCT GTG CTC CCT GCC AAT AGC ACC ACT CTG ACT      144
Ser Ile Asp Gly Arg Pro Val Leu Pro Ala Asn Ser Thr Thr Leu Thr
                35               40               45

TAT GAA ACT GTC AGC GGC ACC CCA CTG GAA ACC GCC GCA AGC GCT GCA      192
Tyr Glu Thr Val Ser Gly Thr Pro Leu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Ala
   50               55               60

GCC AGC GCT GCC GCC GCT ACT GCT CGG GGC ATC GTC ACC GAT TTC GCC      240
Ala Ser Ala Ala Ala Ala Thr Ala Arg Gly Ile Val Thr Asp Phe Ala
   65               70               75               80

TTT CTC TCC CCT CTG GCC TCC AGC GCT GCC AGC CGC AGC TCT GCT CGG      288
Phe Leu Ser Pro Leu Ala Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ala Arg
                85               90               95

GAC GAT AAA CTG ACC GCC CTG CTG GCT CAG CTG GAC AGC CTG ACT AGG      336
Asp Asp Lys Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gln Leu Asp Ser Leu Thr Arg
                100              105              110

GAG CTG AAC GTG GTG AGC CAA CAA CTC CTG GAC CTC CGG CAA CAA GTG      384
Glu Leu Asn Val Val Ser Gln Gln Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gln Val
                115              120              125

AGC GCT CTC AAA GCC TCT AGC CCA CCT AAC GCC GTT TAA  A      424
Ser Ala Leu Lys Ala Ser Ser Pro Pro Asn Ala Val  *
   130              135              140

```

(2) SEQ ID No. 2 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 357 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链数: 单链

(D) 构型: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 假拟: 否

- (iv)反义: 否
- (ix)特征:
- (A)名称/关键词: CDS
- (B)位置: 1.354
- (xi)SEQ ID No.2 的序列描述:

ATC GCG AAC CTA AAA ATA CAG TCC AAG ATG CAT CTG ATA TCC CCA CGT	48
Ile Ala Asn Leu Lys Ile Gln Ser lys Met His Leu Ile Ser Pro Arg	
1 5 10 15	
ATG CAC CCC TCC CAG CTT AAC CGC TTC GTA AAC ACT TAC ACC AAG GGA	96
Met His Pro Ser Gln Leu Asn Arg Phe Val Asn Thr Tyr Thr Lys Gly	
20 25 30	
CTG CCC CTG GCA ATC AGC CTG CTA CTG AAA GAC ATT TTC AGG CAC CAC	144
Leu Pro Leu Ala Ile Ser Leu Leu Leu Lys Asp Ile Phe Arg His His	
35 40 45	
GCC CAG CGG TCC TGC TAC GAC TGG ATT ATC TAC AAC ACC ACT CCG CAG	192
Ala Gln Arg Ser Cys Tyr Asp Trp Ile Ile Tyr Asn Thr Thr Pro Gln	
50 55 60	
CAT GAA GCT CTC CAG TGG TGC TAC CTC CAT CCC AGA GAC GGG CTT ATG	240
His Glu Ala Leu Gln Trp Cys Tyr Leu His Pro Arg Asp Gly Leu Met	
65 70 75 80	
CCT ATG TAT CTG AAC ATC CAG AGC CAC CTT TAC CAC GTC CTC GAA AAA	288
Pro Met Tyr Leu Asn Ile Gln Ser His Leu Tyr His Val Leu Glu Lys	
85 90 95	
ATA CAC AGG ACC CTG AAC GAC CGA GAC CGC TGG TCT CGG GCC TAC CGC	336
Ile His Arg Thr Leu Asn Asp Arg Asp Arg Trp Ser Arg Ala Tyr Arg	
100 105 110	
GCG CGG AAA ACC CCT AAA TAA	357
Ala Arg Lys Thr Pro Lys	
115	

- (2)SEQ ID No.3 的信息:
- (i)序列特征:
- (A)长度: 941 碱基对
- (B)类型: 核苷酸
- (C)链数: 单链
- (D)构型: 线性
- (ii)分子类型: cDNA

(iii) 假拟: 否

(iv) 反义: 否

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 外显子

(B) 位置: 1. 941

(xi) SEQ ID No. 3 的序列描述:

```

GGCCGGCCGT CGACTGTGTG GGC GTGGCTT AAGGGTGGGA AAGAATATAT AAGGTGGGGG 60
TCTTATGTAG TTTTGTATCT GTTTG CAGC AGCCGCCGCC GCCATGTCCA CGAATTCCTT 120
TGACGGCTCC ATCGTCTCCA GCTACCTGAC CACCCGGATG CCTCCCTGGG CTGGCGTCCG 180
CCAAAACGTC ATGGGAAGCT CCATCGACGG CAGGCCTGTG CTCCCTGCCA ATAGCACCAC 240
TCTGACTTAT GAAACTGTCA GCGGCACCCC ACTGGAAACC GCCGCAAGCG CTGCAGCCAG 300
CGCTGCCGCC GCTACTGCTC GGGGCATCGT CACCGATTTC GCCTTTCTCT CCCCTCTGGC 360
CTCCAGCGCT GCCAGCCGCA GCTCTGCTCG GGACGATAAA CTGACCGCCC TGCTGGCTCA 420
GCTGGACAGC CTGACTAGGG AGCTGAACGT GGTGAGCCAA CAACTCCTGG ACCTCCGGCA 480
ACAAGTGAGC GCTCTCAAAG CCTCTAGCCC ACCTAACGCC GTTTAAAACA TAAATAAAAA 540
ACCAGACTCT GTTTGGATTT GGATCAAGCA AGTGTCTTGC TGTCTTTATT TAGGAGTTTT 600
CCGCGCGCGG TAGGCCCGAG ACCAGCGGTC TCGGTCGTTC AGGGTCCTGT GTATTTTTTC 660
GAGGACGTGG TAAAGGTGGC TCTGGATGTT CAGATACATA GGCATAAGCC CGTCTCTGGG 720
ATGGAGGTAG CACCACTGGA GAGCTTCATG CTGCGGAGTG GTGTTGTAGA TAATCCAGTC 780
GTAGCAGGAC CGCTGGGCGT GGTGCCTGAA AATGTCTTTC AGTAGCAGGC TGATTGCCAG 840
GGGCAGTCCC TTGGTGTAAG TGTTTACGAA GCGGTTAAGC TGGGAGGGGT GCATACGTGG 900
GGATATGAGA TGCATCTTGG ACTGTATTTT TAGGTTTCGCG A 941

```

(2) SEQ ID No. 4 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 423 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链数: 单链

(D) 构型: 线性

(ii)分子类型: cDNA

(iii)假拟: 否

(iv)反义: 否

(ix)特征:

(A)名称/关键词: CDS

(B)位置: 1.423

(xi)SEQ ID No. 4 的序列描述:

ATG AGC ACG AAT TCG TTT GAC GGA AGC ATC GTC AGC TCA TAC TTG ACC	48
Met Ser Thr Asn Ser Phe Asp Gly Ser Ile Val Ser Ser Tyr Leu Thr	
1 5 10 15	
ACG CGC ATG CCT CCC TGG GCC GGG GTG CGC CAG AAT GTC ATG GGC TCC	96
Thr Arg Met Pro Pro Trp Ala Gly Val Arg Gln Asn Val Met Gly Ser	
20 25 30	
AGC ATT GAC GGT CGC CCT GTC CTG CCT GCA AAC TCT ACC ACT TTG ACC	144
Ser Ile Asp Gly Arg Pro Val Leu Pro Ala Asn Ser Thr Thr Leu Thr	
35 40 45	
TAC GAA ACC GTG TCT GGC ACG CCG TTG GAA ACT GCA GCA TCC GCC GCC	192
Tyr Glu Thr Val Ser Gly Thr Pro Leu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Ala	
50 55 60	
GCT AGC GCC GCT GCA GCT ACC GCC CGC GGG ATC GTG ACT GAT TTT GCT	240
Ala Ser Ala Ala Ala Ala Thr Ala Arg Gly Ile Val Thr Asp Phe Ala	
65 70 75 80	
TTT CTG AGC CCG CTT GCC AGC AGT GCA GCC TCC CGT TCA TCT GCC CGC	288
Phe Leu Ser Pro Leu Ala Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ala Arg	
85 90 95	
GAT GAC AAA TTG ACG GCT CTT CTG GCT CAG CTG GAT TCT TTG ACT CGG	336
Asp Asp Lys Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gln Leu Asp Ser Leu Thr Arg	
100 105 110	
GAA CTT AAC GTC GTT TCT CAG CAA CTG TTG GAC CTG CGC CAG CAA GTT	384
Glu Leu Asn Val Val Ser Gln Gln Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gln Val	
115 120 125	
TCT GCC CTC AAG GCT TCT TCC CCT CCC AAT GCC GTT TAA	423
Ser Ala Leu Lys Ala Ser Ser Pro Pro Asn Ala Val *	
130 135 140	

(2) SEQ ID No. 4 的信息:

(i) 序列特征:

(A)长度: 141 氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)构型: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(xi)SEQ ID No. 4 的序列描述:

```

Met Ser Thr Asn Ser Phe Asp Gly Ser Ile Val Ser Ser Tyr Leu Thr
 1             5             10             15

Thr Arg Met Pro Pro Trp Ala Gly Val Arg Gln Asn Val Met Gly Ser
          20             25             30

Ser Ile Asp Gly Arg Pro Val Leu Pro Ala Asn Ser Thr Thr Leu Thr
          35             40             45

Tyr Glu Thr Val Ser Gly Thr Pro Leu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Ala
 50             55             60

Ala Ser Ala Ala Ala Ala Thr Ala Arg Gly Ile Val Thr Asp Phe Ala
 65             70             75             80

Phe Leu Ser Pro Leu Ala Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ala Arg
          85             90             95

Asp Asp Lys Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gln Leu Asp Ser Leu Thr Arg
          100             105             110

Glu Leu Asn Val Val Ser Gln Gln Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gln Val
          115             120             125

Ser Ala Leu Lys Ala Ser Ser Pro Pro Asn Ala Val *
          130             135             140

```

(2)SEQ ID No. 5 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 270 碱基对

(B)类型: 核苷酸

(C)链数: 单链

(D)构型: 线性

(ii)分子类型: cDNA

(iii)假拟: 否

(iv)反义: 否

(ix)特征:

(A)名称/关键词: CDS

(B)位置: 1.270

(xi)SEQ ID No. 5 的序列描述:

ACC AAG GGC CTG CCC CTC GCA ATC AGC TTG CTA CTC AAA GAC ATT TTT	48
Thr Lys Gly Leu Pro Leu Ala Ile Ser Leu Leu Leu Lys Asp Ile Phe	
1 5 10 15	
AGG CAT CAC GCC CAG CGC TCC TGT TAC GAC TGG ATC ATC TAC AAT ACC	96
Arg His His Ala Gln Arg Ser Cys Tyr Asp Trp Ile Ile Tyr Asn Thr	
20 25 30	
ACC CCG CAG CAT GAA GCC CTG CAG TGG TGC TAC CTG CAC CCC AGA GAC	144
Thr Pro Gln His Glu Ala Leu Gln Trp Cys Tyr Leu His Pro Arg Asp	
35 40 45	
GGG CTG ATG CCC ATG TAT CTG AAT ATC CAG AGT CAC CTT TAT CAC GTC	192
Gly Leu Met Pro Met Tyr Leu Asn Ile Gln Ser His Leu Tyr His Val	
50 55 60	
CTG GAA AAA ATA CAT AGG ACC CTC AAC GAC CGA GAT CGC TGG TCC CGG	240
Leu Glu Lys Ile His Arg Thr Leu Asn Asp Arg Asp Arg Trp Ser Arg	
65 70 75 80	
GCC TAT CGC GCG CGC AAA ACC CCT AAA TAA	270
Ala Tyr Arg Ala Arg Lys Thr Pro Lys *	
85 90	

(2) SEQ ID No. 5 的信息:

(i) 序列特征:

(A)长度: 90 氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)构型: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(xi)SEQ ID No. 5 的序列描述:

Thr Lys Gly Leu Pro Leu Ala Ile Ser Leu Leu Leu Lys Asp Ile Phe	
1 5 10 15	
Arg His His Ala Gln Arg Ser Cys Tyr Asp Trp Ile Ile Tyr Asn Thr	
20 25 30	
Thr Pro Gln His Glu Ala Leu Gln Trp Cys Tyr Leu His Pro Arg Asp	
35 40 45	

```

Gly Leu Met Pro Met Tyr Leu Asn Ile Gln Ser His Leu Tyr His Val
  50                      55                      60

Leu Glu Lys Ile His Arg Thr Leu Asn Asp Arg Asp Arg Trp Ser Arg
  65                      70                      75                      80

Ala Tyr Arg Ala Arg Lys Thr Pro Lys  *
                      85                      90

```

(2) SEQ ID No. 6 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 103 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链数: 单链

(D) 构型: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(iii) 假拟: 否

(iv) 反义: 否

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: -

(B) 位置: 1.103

(xi) SEQ ID No. 6 的序列描述:

```

GGCCGGCCGT CGACTGTGTG GGCGTGGCAT AAGGGTGGGA AAGAATATAT AAGGTCGGGG 60
TCTCATCTAG TCTTGATCTT GATTTCAGT AGCCGCCGCC ACC 103

```

(2) SEQ ID No. 7 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 52 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链数: 单链

(D) 构型: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 假拟: 否

- (iv)反义: 否
- (ix)特征:
 - (A)名称/关键词: -
 - (B)位置: 1..52
- (xi)SEQ ID No. 7 的序列描述:

AGATCTCAAA TCAATAAATA AAGAAATACT TGTTATAAAA ACAAATGAAT GT

52

(2)SEQ ID No. 8 的信息:

- (i)序列特征:
 - (A)长度: 847 碱基对
 - (B)类型: 核苷酸
 - (C)链数: 单链
 - (D)构型: 线性
- (ii)分子类型: 其它核酸
- (iii)假拟: 否
- (iv)反义: 否
- (ix)特征:
 - (A)名称/关键词: -
 - (B)位置: 1.847
- (xi)SEQ ID No. 8 的序列描述:

GGCCGCGCGT CGACTGTGTG GGCGTGGCAT AAGGGTGGGA AAGAATATAT AAGGTCGGGG 60

TCTCATCTAG TCTTGTATCT GATTTGCAGT AGCCGCCGCC ACCATGAGCA CGAATTCGTT 120

TGACGGAAGC ATCGTCAGCT CATACTTGAC CACGCGCATG CCTCCCTGGG CCGGGGTGCG 180

CCAGAATGTC ATGGGCTCCA GCATTGACGG TCGCCCTGTC CTGCCTGCAA ACTCTACCAC 240

TTTGACCTAC GAAACCGTGT CTGGCACGCC GTTGGAAACT GCAGCATCCG CCGCCGCTAG 300

CGCCGCTGCA GCTACCGCCC GCGGGATCGT GACTGATTTT GCTTTTCTGA GCCCGCTTGC 360

CAGCAGTGCA GCCTCCCGTT CATCTGCCCG CGATGACAAA TTGACGGCTC TTCTGGCTCA 420

GCTGGATTCT TTGACTCGGG AACTTAACGT CGTTTCTCAG CAACTGTTGG ACCTGCGCCA 480

GCAAGTTTCT GCCCTCAAGG CTTCTTCCCC TCCAATGCC GTTTAAAGAT CTCAAATCAA 540

```

TAAATAAAGA AATACTTGTT ATAAAAACAA ATGAATGTTT ATTTAGGGGT TTTGCGCGCG 600
CGATAGGCCC GGGACCAGCG ATCTCGGTCG TTGAGGGTCC TATGTATTTT TTCCAGGACG 660
TGATAAAGGT GACTCTGGAT ATTCAGATAC ATGGGCATCA GCCCGTCTCT GGGGTGCAGG 720
TAGCACCACT GCAGGGCTTC ATGCTGCGGG GTGGTATTGT AGATGATCCA GTCGTAACAG 780
GAGCGCTGGG CGTGATGCCT AAAAATGTCT TTGAGTAGCA AGCTGATTGC GAGGGGCAGG 840
CCCTTGG 847

```

(2) SEQ ID No. 9 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 44 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链数: 单链

(D) 构型: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(iii) 假拟: 否

(iv) 反义: 否

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: -

(B) 位置: 1..44

(xi) SEQ ID No. 9 的序列描述:

AACTGCAGGCCGGCCACTAGTCGCGATGTCCCAGCCATATCCC

(2) SEQ ID No. 10 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 37 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链数: 单链

(D) 构型: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(iii) 假拟: 否

(iv)反义: 否

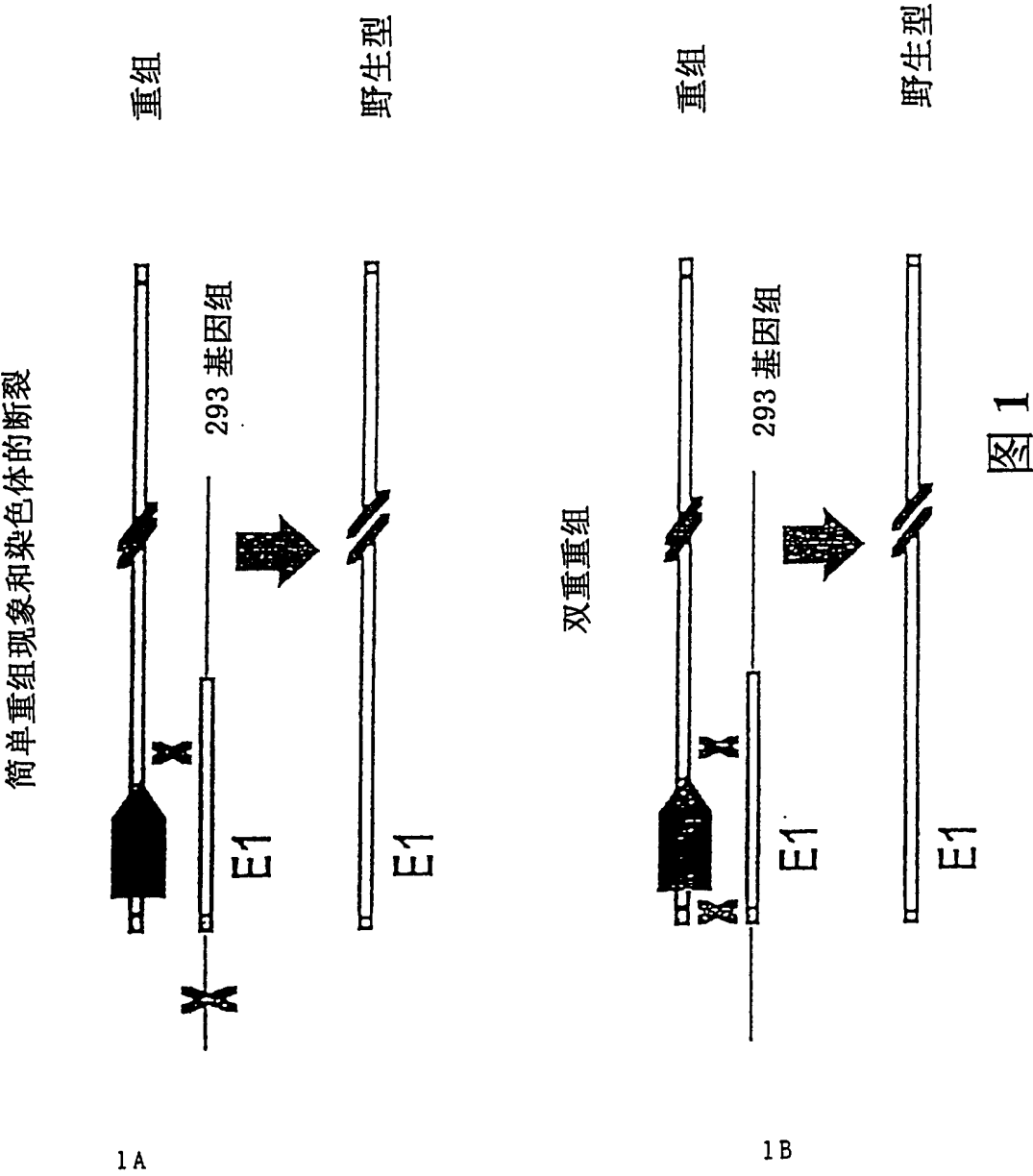
(ix)特征:

(A)名称/关键词: -

(B)位置: 1..37

(xi)SEQ ID No. 10 的序列描述:

CCGCTCGAGGTGACCGCTAGCCATTATGGACGAATGC



同质基因

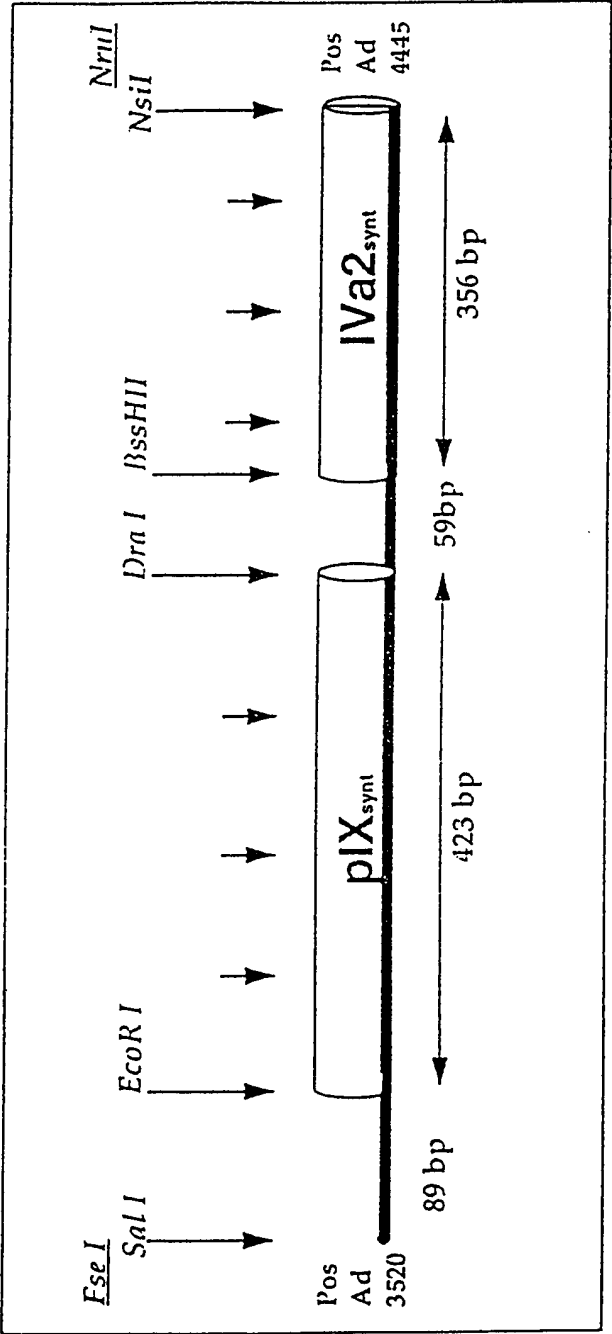


图 2

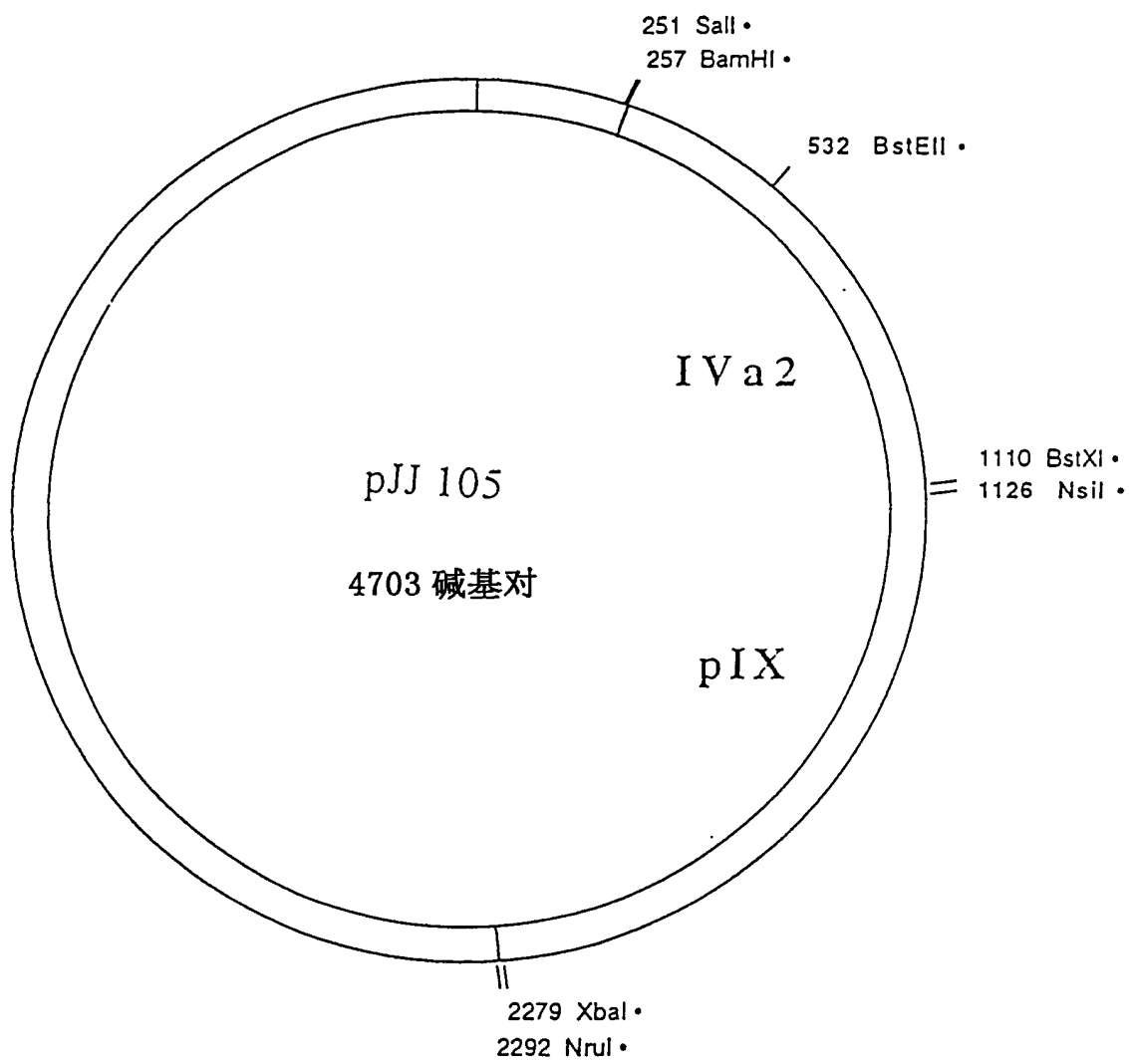


图 3

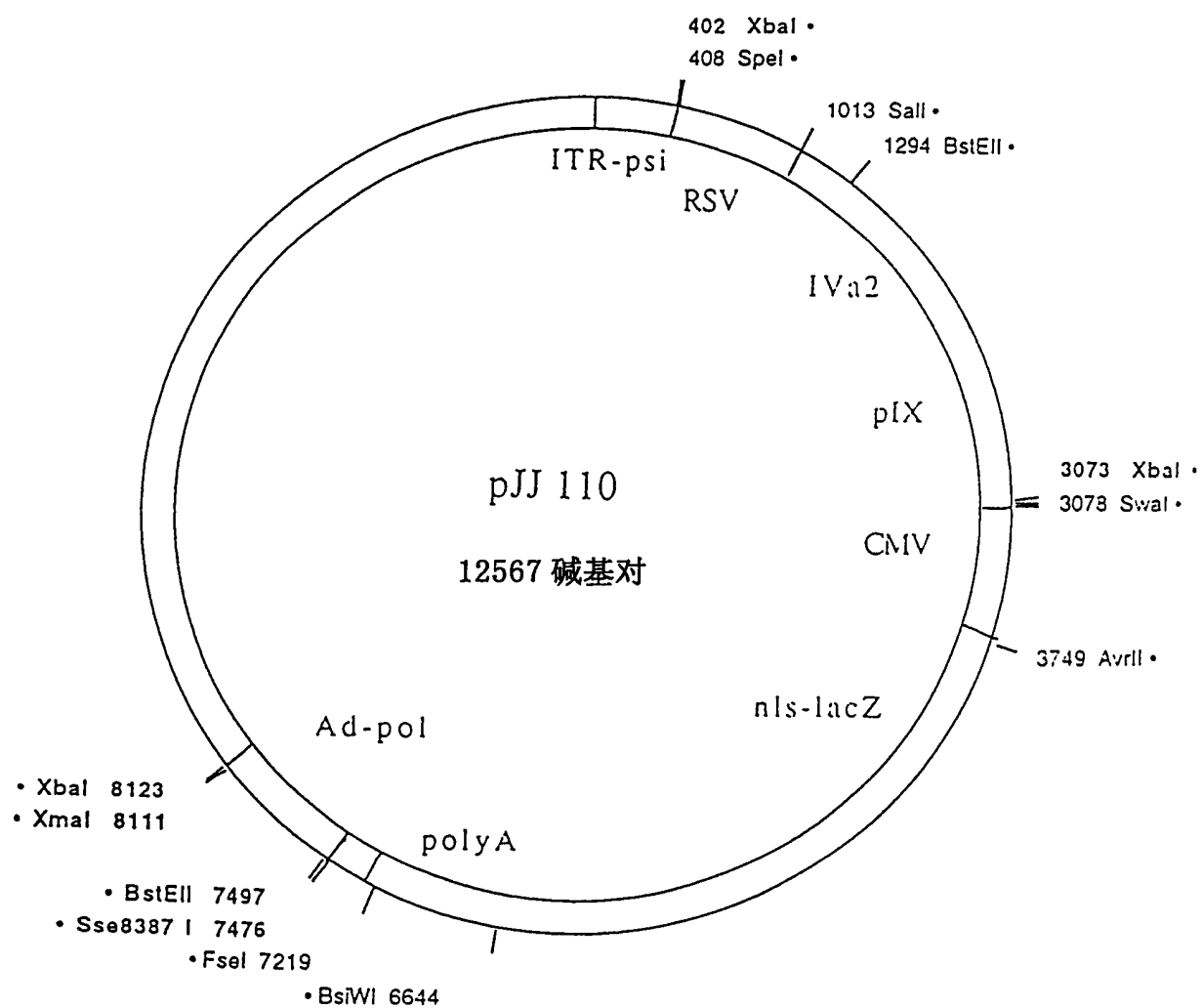


图 4

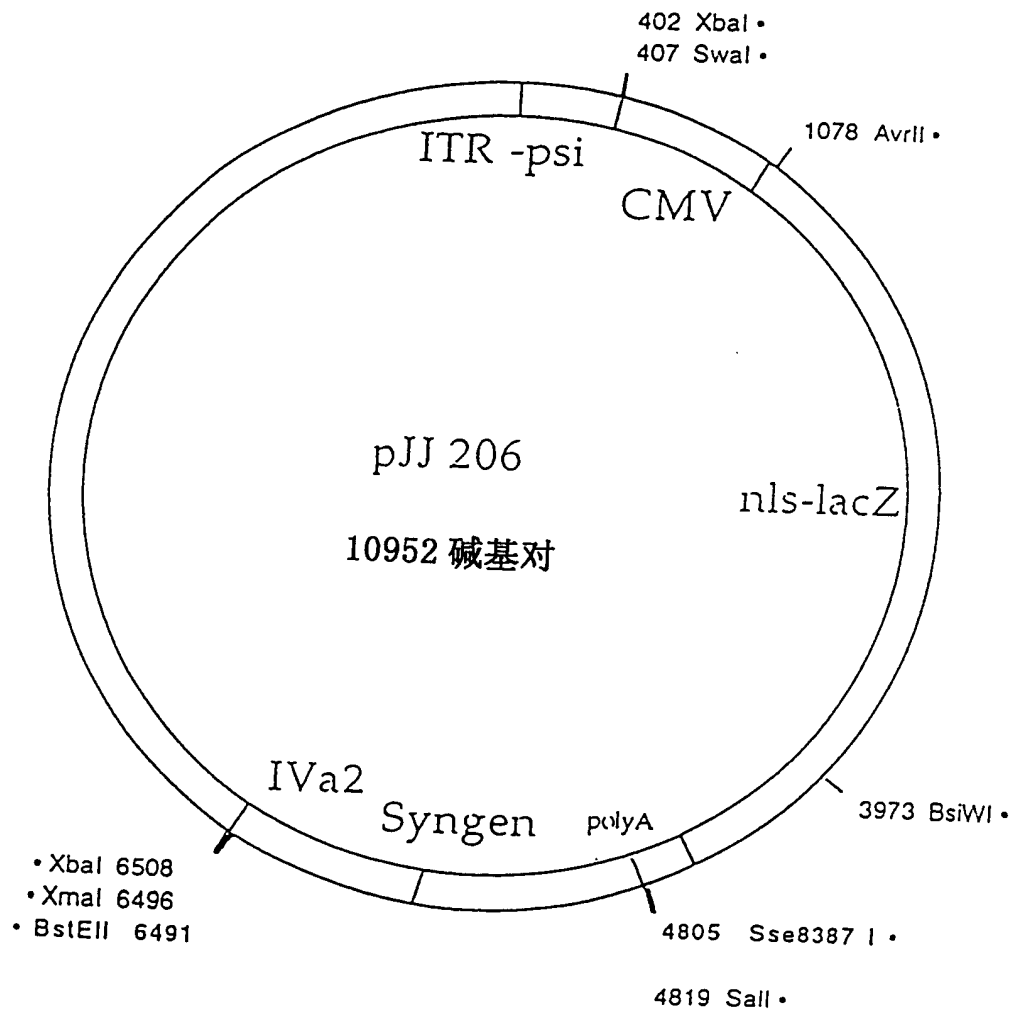


图 5

pIX中的简并化

1/1

ATG TCC ACG AAT TCC TTT GAC GGC TCC ATC
 ATG AGC ACC AAC TCG TTT GAT GGA AGC ATT
 Met ser thr asn ser phe asp gly ser ile

31/11

GTC TCC AGC TAC CTG ACC ACC CGG ATG CCT
 GTG AGC TCA TAT TTG ACA ACG CGC ATG CCC
 val ser ser tyr leu thr thr arg met pro

61/21

CCC TGG GCT GGC GTC CGC CAA AAC GTC ATG
 CCA TGG GCC GGG GTG CGT CAG AAT GTG ATG
 pro trp ala gly val arg gln asn val met

91/31

GGA AGC TCC ATC GAC GGC AGG CCT GTG CTC
 GGC TCC AGC ATT GAT GGT CGC CCC GTC CTG
 gly ser ser ile asp gly arg pro val leu

121/41

CCT GCC AAT AGC ACC ACT CTG ACT TAT GAA
 CCC GCA AAC TCT ACT ACC TTG ACC TAC GAG
 pro ala asn ser thr thr leu thr tyr glu

151/51

ACT GTC AGC GGC ACC CCA CTG GAA ACC GCC
 ACC GTG TCT GGA ACG CCG TTG GAG ACT GCA
 thr val ser gly thr pro leu glu thr ala

181/61

GCA AGC GCT GCA GCC AGC GCT GCC GCC GCT
 GCC TCC GCC GCC GCT TCA GCC GCT GCA GCC
 ala ser ala ala ala ser ala ala ala ala

图 8A

211/71

ACT GCT CGG GGC ATC GTC ACC GAT TTC GCC
 ACC GCC CGC GGG ATT GTG ACT GAC TTT GCT
 thr ala arg gly ile val thr asp phe ala

241/81

TTT CTC TCC CCT CTG GCC TCC AGC GCT GCC
 TTC CTG AGC CCG CTT GCA AGC AGT GCA GCT
 phe leu ser pro leu ala ser ser ala ala

271/91

AGC CGC AGC TCT GCT CGG GAC GAT AAA CTG
 TCC CGT TCA TCC GCC CGC GAT GAC AAG TTG
 ser arg ser ser ala arg asp asp lys leu

301/101

ACC GCC CTG CTG GCT CAG CTG GAC AGC CTG
 ACG GCT CTT TTG GCA CAA TTG GAT TCT TTG
 thr ala leu leu ala gln leu asp ser leu

331/111

ACT AGG GAG CTG AAC GTG GTG AGC CAA CAA
 ACC CGG GAA CTT AAT GTC GTT TCT CAG CAG
 thr arg glu leu asn val val ser gln gln

361/121

CTC CTG GAC CTC CGG CAA CAA GTG AGC GCT
 CTG TTG GAT CTG CGC CAG CAG GTT TCT GCC
 leu leu asp leu arg gln gln val ser ala

391/131

CTC AAA GCC TCT AGC CCA CCT AAC GCC GTT
 CTG AAG GCT TCC TCC CCT CCC AAT GCG GTT
 leu lys ala ser ser pro pro asn ala val

421/141

TAA
 TAA

图 8B

IVa2 中的简并化

1/1

<u>TC</u>	<u>GCG</u>	AAC	CTA	AAA	ATA	CAG	TCC	AAG	ATG
TA	GCC	AAC	CTA	AAA	ATA	CAG	TCC	AAG	ATG
ile	ala	asn	leu	lys	ile	gln	ser	lys	met

31/11

CAT	<u>CTG</u>	ATA	TCC	CCA	CGT	ATG	CAC	<u>CCC</u>	TCC
CAT	CTC	ATA	TCC	CCA	CGT	ATG	CAC	CCA	TCC
his	leu	ile	ser	pro	arg	met	his	pro	ser

61/21

CAG	CTT	AAC	CGC	<u>TTC</u>	GTA	AAC	ACT	TAC	ACC
CAG	CTT	AAC	CGC	TTT	GTA	AAC	ACT	TAC	ACC
gln	leu	asn	arg	phe	val	asn	thr	tyr	thr

91/31

AAG	<u>GGA</u>	CTG	CCC	CTG	GCA	ATC	AGC	<u>CTG</u>	CTA
AAG	GGC	CTG	CCC	CTG	GCA	ATC	AGC	TTG	CTA
lys	gly	leu	pro	leu	ala	ile	ser	leu	leu

121/41

CTG	AAA	GAC	ATT	<u>TTC</u>	AGG	CAC	CAC	GCC	CAG
CTG	AAA	GAC	ATT	TTT	AGG	CAC	CAC	GCC	CAG
leu	lys	asp	ile	phe	arg	his	his	ala	gln

151/51

<u>CGG</u>	TCC	TGC	TAC	GAC	TGG	<u>ATT</u>	ATC	TAC	AAC
CGC	TCC	TGC	TAC	GAC	TGG	ATC	ATC	TAC	AAC
arg	ser	cys	tyr	asp	trp	ile	ile	tyr	asn

181/61

ACC	<u>ACT</u>	CCG	CAG	CAT	GAA	GCT	<u>CTC</u>	CAG	TGG
ACC	ACC	CCG	CAG	CAT	GAA	GCT	CTG	CAG	TGG
thr	thr	pro	gln	his	glu	ala	leu	gln	trp

图 9A

211/71

TGC	TAC	CTC	<u>CAT</u>	CCC	AGA	GAC	GGG	CTT	ATG
TGC	TAC	CTC	CAC	CCC	AGA	GAC	GGG	CTT	ATG
cys	tyr	leu	his	pro	arg	asp	gly	leu	met

241/81

<u>CCT</u>	ATG	TAT	CTG	AAC	ATC	CAG	<u>AGC</u>	CAC	CTT
CCC	ATG	TAT	CTG	AAC	ATC	CAG	AGT	CAC	CTT
pro	met	tyr	leu	asn	ile	gln	ser	his	leu

271/91

TAC	CAC	GTC	<u>CTC</u>	GAA	AAA	ATA	CAC	AGG	ACC
TAC	CAC	GTC	CTG	GAA	AAA	ATA	CAC	AGG	ACC
tyr	his	val	leu	glu	lys	ile	his	arg	thr

301/101

<u>CTG</u>	AAC	GAC	CGA	GAC	CGC	TGG	<u>TCT</u>	CGG	GCC
CTC	AAC	GAC	CGA	GAC	CGC	TGG	TCC	CGG	GCC
leu	asn	asp	arg	asp	arg	trp	ser	arg	ala

331/111

TAC	CGC	GCG	<u>CGG</u>	AAA	ACC	CCT	AAA	TAA
TAC	CGC	GCG	CGC	AAA	ACC	CCT	AAA	TAA
tyr	arg	ala	arg	lys	thr	pro	lys	OCH

图 9B

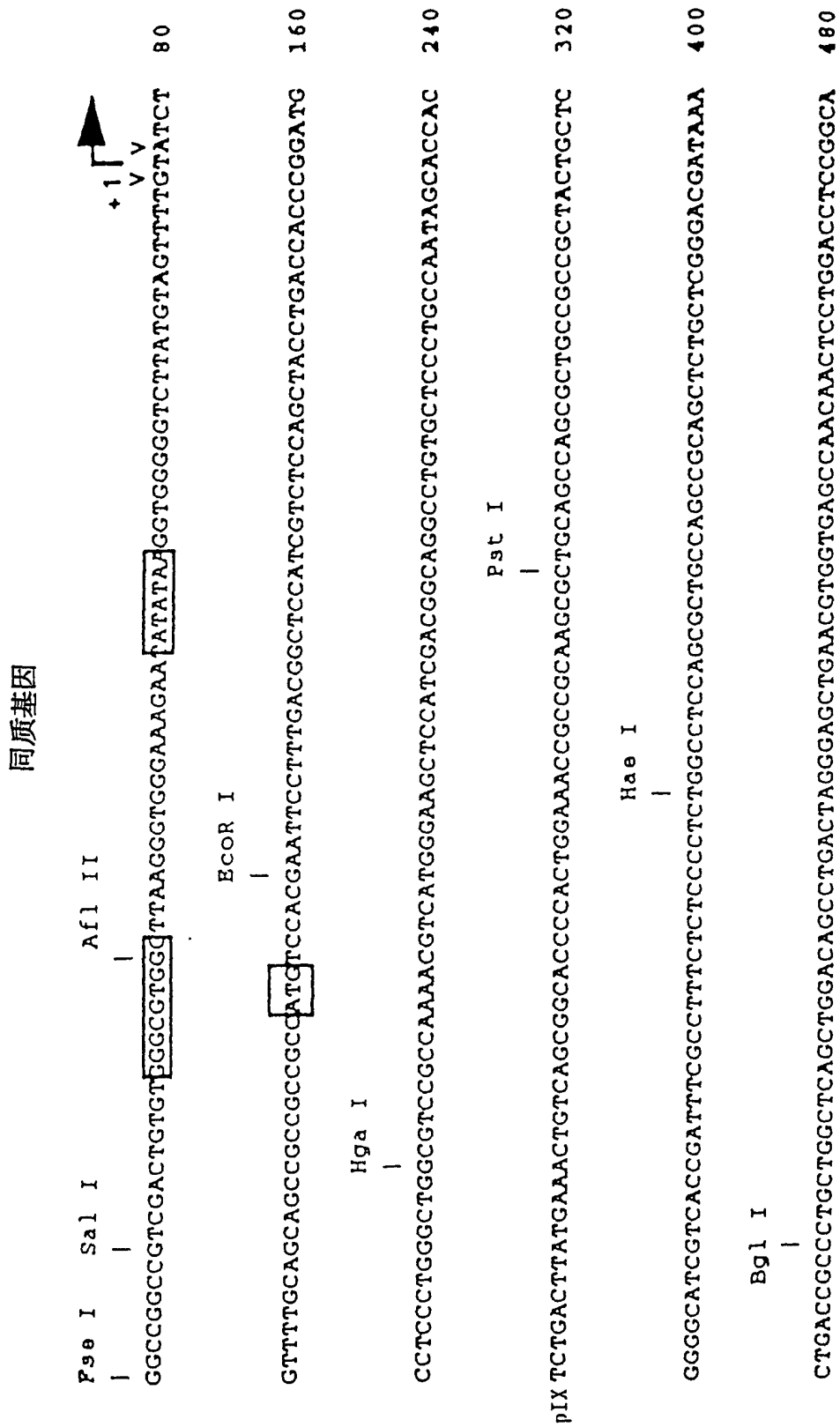


图 10A

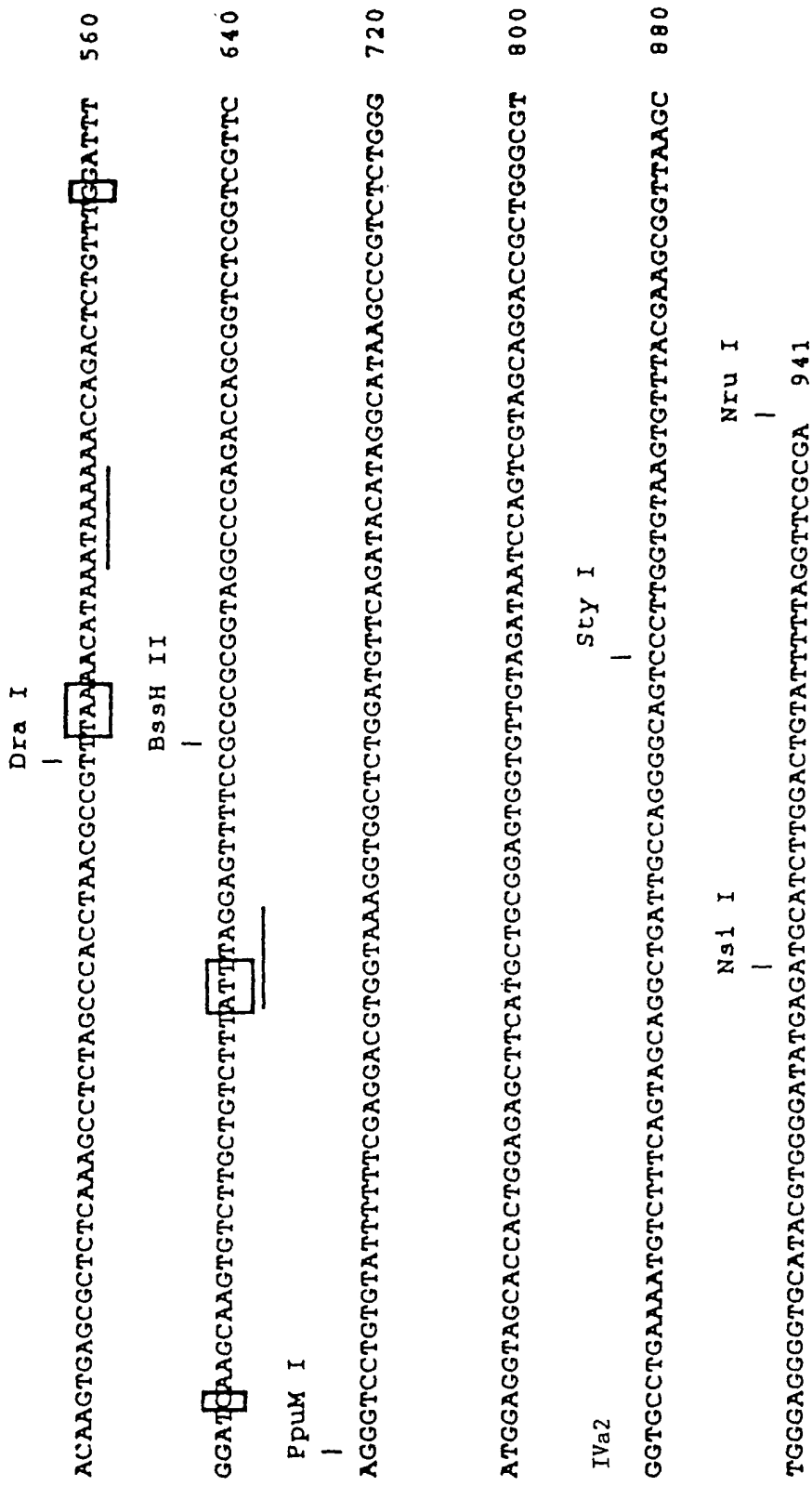


图 10B

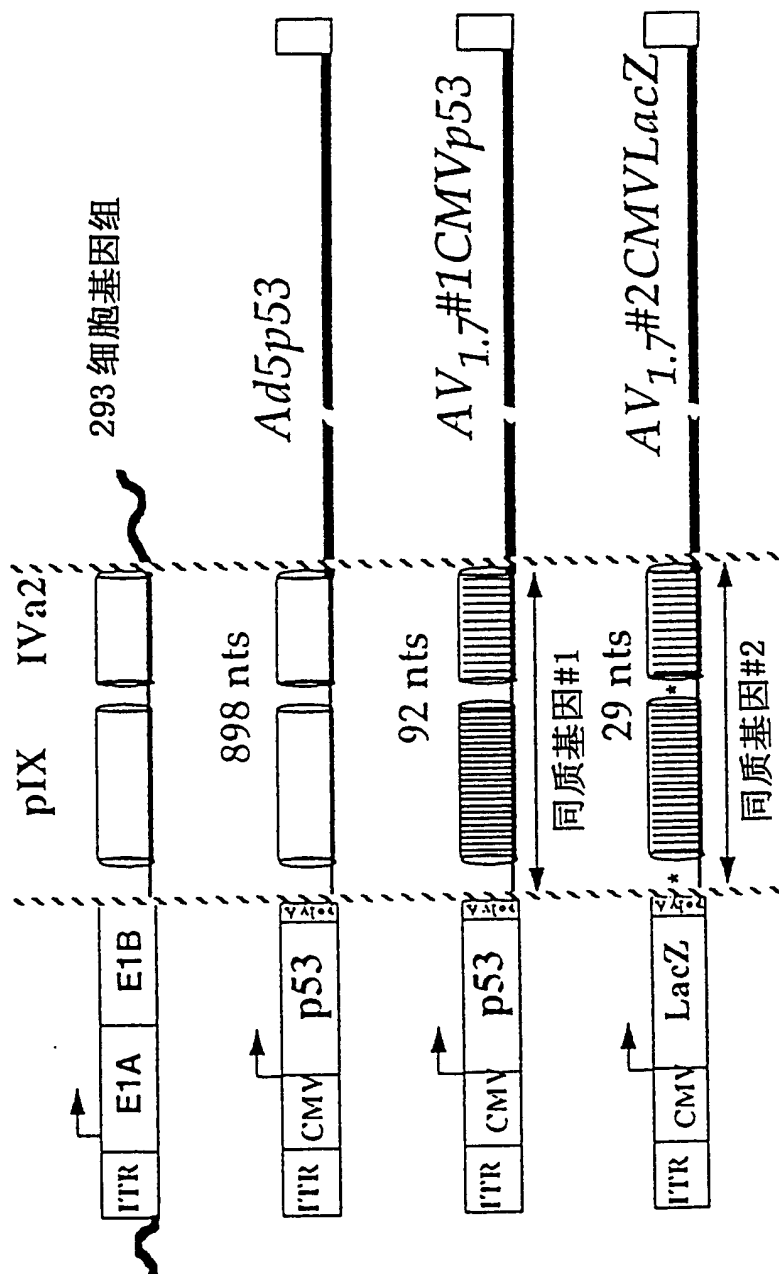


图 11

载体 ad5p53 和 AV1.7p53 的 5 个不同噬斑连续
7 次扩增后的 RCA 检测

- 对第 7 次扩增后样品的 RCA 检测实验结果。三份重复实验

	ad5CMVp53	x	AV1.7CMVp53
实验 1	0 1 0 1 0		0 0 0 0 0
实验 2	0 0 0 2 0		0 0 0 0 0
实验 3	0 2 0 0 0		0 0 0 0 0
试验的颗粒 RCA 数目	4.5E+11 6*		4.5E+11 0

- 统计分析：观察的条件概率研究
*：所得结果不同；p<5%-置信区间=98.5%

图 12