



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110914440 A

(43)申请公布日 2020.03.24

(21)申请号 201880038592.2

(22)申请日 2018.04.12

(30)优先权数据

62/484,841 2017.04.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/027375 2018.04.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/191545 EN 2018.10.18

(71)申请人 埃皮辛特瑞柯斯公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 托尼·R·雷德

克里斯托弗·拉森

布莱恩·T·奥兰斯基

(74)专利代理机构 北京安杰律师事务所 11627

代理人 杨剑 吴立

(51)Int.Cl.

C12N 15/861(2006.01)

A61K 35/761(2006.01)

权利要求书6页 说明书42页

序列表47页 附图5页

(54)发明名称

多转入基因重组腺病毒

(57)摘要

本发明涉及包含被可切割连接物隔开的两个或更多个治疗性转入基因例如异二聚体细胞因子的两种组分的重组病毒。

1. 一种重组腺病毒,其包含编码第一治疗性转入基因的第一核苷酸序列、编码第二治疗性转入基因的第二核苷酸序列和配置在所述第一核苷酸序列与第二核苷酸序列之间编码可切割位点的第三核苷酸序列。

2. 权利要求1的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含以5' 至3' 方向包含所述第一核苷酸序列、第三核苷酸序列和第二核苷酸序列的多核苷酸序列。

3. 权利要求1或2的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含以5' 至3' 方向连续包含所述第一核苷酸序列、第三核苷酸序列和第二核苷酸序列的多核苷酸序列。

4. 权利要求1-3中任一项的重组腺病毒,其中所述第一核苷酸序列、第三核苷酸序列和第二核苷酸序列被可操作地连接到任选地位于所述第一核苷酸序列的第一核苷酸的5' 的单一启动子。

5. 权利要求1-4中任一项的重组腺病毒,其中所述第一核苷酸序列、第三核苷酸序列和第二核苷酸序列被表达为单一多肽链。

6. 权利要求1-5中任一项的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒是5型腺病毒(Ad5)或2型腺病毒(Ad2)。

7. 权利要求6的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒是5型腺病毒(Ad5)。

8. 权利要求1-7中任一项的重组腺病毒,其中所述可切割位点是可蛋白水解切割位点。

9. 权利要求8的重组腺病毒,其中所述可蛋白水解切割位点被存在于真核细胞的内质网或高尔基体中的蛋白酶切割。

10. 权利要求8或9的重组腺病毒,其中所述可蛋白水解切割位点是弗林蛋白酶可切割位点。

11. 权利要求10的重组腺病毒,其中所述弗林蛋白酶可切割位点包含RX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>R (SEQ ID NO:6),其中X<sub>1</sub>是任何氨基酸,并且X<sub>2</sub>是Lys或Arg。

12. 权利要求11的重组腺病毒,其中所述弗林蛋白酶可切割位点包含RAKR (SEQ ID NO:7)。

13. 权利要求1-12中任一项的重组腺病毒,其中所述第一、第二和第三核苷酸序列被插入到位于E1b-19K的起始位点与E1b-19K的终止位点之间的E1b-19k插入位点中。

14. 权利要求13的重组腺病毒,其中所述E1b-19K插入位点位于E1b-19K的起始位点与E1b-55K的起始位点之间。

15. 权利要求13或14的重组腺病毒,其中所述E1b-19K插入位点包含在E1b-19K的起始位点附近约200个核苷酸的缺失。

16. 权利要求15的重组腺病毒,其中所述E1b-19K插入位点包含在E1b-19K的起始位点附近202个核苷酸的缺失。

17. 权利要求15的重组腺病毒,其中所述E1b-19K插入位点包含在E1b-19K的起始位点附近203个核苷酸的缺失。

18. 权利要求13-17中任一项的重组腺病毒,其中所述E1b-19K插入位点包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第1714-1916位核苷酸的缺失。

19. 权利要求13-17中任一项的重组腺病毒,其中所述E1b-19K插入位点包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第1714-1917位核苷酸的缺失。

20. 权利要求13-19中任一项的重组腺病毒,其中所述第一核苷酸序列、第三核苷酸序

列和第二核苷酸序列被插入到CTGACCTC (SEQ ID NO:2) 和TCACCAGG (SEQ ID NO:3) 之间。

21. 权利要求13-20中任一项的重组腺病毒, 其中所述重组腺病毒以5' 至3' 方向包含CTGACCTC (SEQ ID NO:2)、第一核苷酸序列、第三核苷酸序列、第二核苷酸序列和TCACCAGG (SEQ ID NO:3)。

22. 权利要求1-21中任一项的重组腺病毒, 其中所述重组腺病毒包含具有功能性Pea3结合位点的缺失的E1a启动子。

23. 权利要求22的重组腺病毒, 其中所述缺失包含对应于E1a的起始位点上游约-300至约-250位的核苷酸的缺失。

24. 权利要求22或23的重组腺病毒, 其中所述缺失包含对应于E1a的起始位点上游-304至-255位的核苷酸的缺失。

25. 权利要求22或23的重组腺病毒, 其中所述缺失包含对应于E1a的起始位点上游-305至-255位的核苷酸的缺失。

26. 权利要求22-25中任一项的重组腺病毒, 其中所述缺失包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第195-244位的核苷酸的缺失。

27. 权利要求22-26中任一项的重组腺病毒, 其中所述E1a启动子包含序列GGTGT TTTGG (SEQ ID NO:4)。

28. 权利要求1-27中任一项的重组腺病毒, 其中所述重组腺病毒包含具有功能性TATA盒的缺失的E1a启动子。

29. 权利要求28的重组腺病毒, 其中所述缺失包含整个TATA盒的缺失。

30. 权利要求28或29的重组腺病毒, 其中所述缺失包含对应于E1a启动子的-27至-24位的核苷酸的缺失。

31. 权利要求28-30中任一项的重组腺病毒, 其中所述缺失包含对应于E1a启动子的-31至-24位的核苷酸的缺失。

32. 权利要求28-31中任一项的重组腺病毒, 其中所述缺失包含对应于E1a启动子的44至+54位的核苷酸的缺失。

33. 权利要求28-32中任一项的重组腺病毒, 其中所述缺失包含对应于E1a启动子的-146至+54位的核苷酸的缺失。

34. 权利要求28-33中任一项的重组腺病毒, 其中所述缺失包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第472至475位的核苷酸的缺失。

35. 权利要求28-34中任一项的重组腺病毒, 其中所述缺失包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第468至475位的核苷酸的缺失。

36. 权利要求28-35中任一项的重组腺病毒, 其中所述缺失包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第455至552位的核苷酸的缺失。

37. 权利要求28-36中任一项的重组腺病毒, 其中所述缺失包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第353至552位的核苷酸的缺失。

38. 权利要求28-37中任一项的重组腺病毒, 其中所述重组腺病毒包含产生包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO:5)、AGTGCCCG (SEQ ID NO:16) 和/或TATTCCCG (SEQ ID NO:17) 的病毒的多核苷酸缺失。

39. 权利要求38的重组腺病毒, 其中所述重组腺病毒包含产生包含序列CTAGGACTG (SEQ

ID NO:5)的病毒的多核苷酸缺失。

40. 权利要求1-39中任一项的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含具有功能性CAAT盒的缺失的E1a启动子。

41. 权利要求40的重组腺病毒,其中所述缺失包含整个CAAT盒的缺失。

42. 权利要求40或41的重组腺病毒,其中所述缺失包含对应于E1a启动子的-76至-68位的核苷酸的缺失。

43. 权利要求40-42中任一项的重组腺病毒,其中所述缺失包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第423至431位的核苷酸的缺失。

44. 权利要求40-43中任一项的重组腺病毒,其中所述E1a启动子包含序列TTCCGTGGCG (SEQ ID NO:18)。

45. 权利要求1-44中任一项的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒还包含E3缺失,其中所述E3缺失位于pVIII的终止位点与Fiber的起始位点之间。

46. 权利要求45的重组腺病毒,其中所述E3缺失位于E3-10.5K的终止位点与E3-14.7K的终止位点之间。

47. 权利要求45或46的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含约500至约3185、约500至约3000、约500至约2500、约500至约2000、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约3185、约1000至约3000、约1000至约2500、约1000至约2000、约1000至约1500、约1500至约3185、约1500至约3000、约1500至约2000、约2000至约3185、约2000至约3000、约2000至约2500、约2500至约3185、约2500至约3000或约3000至约3185个核苷酸的缺失。

48. 权利要求45-47中任一项的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含在E3-10.5K的终止位点附近约500至约1551、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约1551、约1000至约1500或约1500至约1551个核苷酸的缺失。

49. 权利要求45-48中任一项的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含在E3-10.5K的终止位点附近约1050个核苷酸的缺失。

50. 权利要求45-49中任一项的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含在E3-10.5K的终止位点附近1063个核苷酸的缺失。

51. 权利要求45-49中任一项的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含在E3-10.5K的终止位点附近1064个核苷酸的缺失。

52. 权利要求45-51中任一项的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含对应于Ad5 d1309 E3缺失的缺失。

53. 权利要求45-52中任一项的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第29773-30836位核苷酸的缺失。

54. 权利要求45的重组腺病毒,其中所述E3缺失位于E3-gp19K的终止位点与E3-14.7K的终止位点之间。

55. 权利要求54的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含在E3-gp19K的终止位点附近约500至约1824、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约1824、约1000至约1500或约1500至约1824个核苷酸的缺失。

56. 权利要求54或55的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含在E3-gp19K的终止位点附近约1600个核苷酸的缺失。



57. 权利要求54-56中任一项的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含在E3-gp19K的终止位点附近1622个核苷酸的缺失。

58. 权利要求54-58中任一项的重组腺病毒,其中所述E3缺失包含对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第29218-30839位核苷酸的缺失。

59. 权利要求1-58中任一项的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒还包含E4缺失,其中所述E4缺失位于E4-ORF6/7的起始位点与右侧末端反向重复序列(ITR)之间。

60. 权利要求59的重组腺病毒,其中所述E4缺失位于E4-ORF6/7的起始位点与E4-ORF1的起始位点之间。

61. 权利要求59或60的重组腺病毒,其中所述E4缺失包含约500至约2500、约500至约2000、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约2500、约1000至约2000、约1000至约1500、约1500至约2500、约1500至约2000或约2000至约2500个核苷酸的缺失。

62. 权利要求59-61中任一项的重组腺病毒,其中所述E4缺失包含在E4-ORF6/7的起始位点附近约250至约1500、约250至约1250、约250至约1000、约250至约750、约250至约500、500至约1500、约500至约1250、约500至约1000、约500至约750、750至约1500、约750至约1250、约750至约1000、约1000至约1500、约1000至约1250或约1250至约1500个核苷酸的缺失。

63. 权利要求59-62中任一项的重组腺病毒,其中所述E4缺失包含在E4-ORF6/7的起始位点附近约1450个核苷酸的缺失。

64. 权利要求59-63中任一项的重组腺病毒,其中所述E4缺失包含在E4-ORF6/7的起始位点附近1449个核苷酸的缺失。

65. 权利要求59-64中任一项的重组腺病毒,其中所述E4缺失包含对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第34078-35526位核苷酸的缺失。

66. 权利要求1-65中任一项的重组腺病毒,其中所述第一和/或第二治疗性转入基因编码选自乙酰胆碱、抗PD-1抗体重链或轻链、抗PD-L1抗体重链或轻链、BORIS/CTCFL、CD19、CD20、CD80、CD86、CD137、CD137L、CD154、DKK1/Wnt、FGF、ICAM、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-17、IL-23、IL-23A/p19、p40、IL-24、IL-27、IL-27A/p28、IL-27B/EBI3、IL-35、干扰素- $\gamma$ 、MAGE、NY-ESO-1、p53、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$ 拮抗剂和胸苷激酶的多肽。

67. 权利要求1-65中任一项的重组腺病毒,其中所述第一和/或第二治疗性转入基因编码选自乙酰胆碱、抗PD-1抗体重链或轻链、抗PD-L1抗体重链或轻链、BORIS/CTCFL、CD19、CD20、CD80、CD86、CD137、CD137L、CD154、DKK1/Wnt、FGF、ICAM、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-23A/p19、p40、干扰素- $\gamma$ 、MAGE、NY-ESO-1、p53、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$ 拮抗剂和胸苷激酶的多肽。

68. 权利要求1-67中任一项的重组腺病毒,其中所述第一和第二治疗性转入基因分别编码异二聚体细胞因子的第一和第二亚基。

69. 权利要求68的重组腺病毒,其中所述第一和/或第二治疗性转入基因选自IL-23A/p19和p40。

70. 权利要求69的重组腺病毒,其中所述第一治疗性转入基因编码p40。

71. 权利要求69或70的重组腺病毒,其中所述第二治疗性转入基因编码IL-23A/p19。

72. 权利要求69-71中任一项的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含编码由SEQ ID

N0:9的第17-1000位核苷酸编码的氨基酸序列的核苷酸序列。

73. 权利要求69-72中任一项的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含编码由SEQ ID N0:9的第1013-1582位核苷酸编码的氨基酸序列的核苷酸序列。

74. 权利要求69-73中任一项的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含编码由SEQ ID N0:9的第17-1582位核苷酸编码的氨基酸序列的核苷酸序列。

75. 权利要求69-74中任一项的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒包含SEQ ID N0:9的核苷酸序列,或包含与SEQ ID N0:9具有80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

76. 权利要求1-75中任一项的重组腺病毒,其中所述第一和/或第二治疗性转入基因不被可操作连接到外源启动子序列。

77. 权利要求1-76中任一项的重组腺病毒,其中所述第一和第二治疗性转入基因的合并尺寸为约500至约5000、约500至约4000、约500至约3000、约500至约2000、约500至约1000、约1000至约5000、约1000至约4000、约1000至约3000、约1000至约2000、约2000至约5000、约2000至约4000、约2000至约3000、约3000至约5000、约3000至约4000或约4000至5000个核苷酸。

78. 权利要求1-76中任一项的重组腺病毒,其中所述第一和第二治疗性转入基因的合并尺寸为约500至约7000、约500至约6000、约500至约5000、约500至约4000、约500至约3000、约500至约2000、约500至约1000、约1000至约7000、约1000至约6000、约1000至约5000、约1000至约4000、约1000至约3000、约1000至约2000、约2000至约7000、约2000至约6000、约2000至约5000、约2000至约4000、约2000至约3000、约3000至约7000、约3000至约6000、约3000至约5000、约3000至约4000、约4000至约7000、约4000至约6000、约4000至约5000、约5000至约7000、约5000至约6000或约6000至约7000个核苷酸。

79. 权利要求1-78中任一项的重组腺病毒,其中所述第一和第二治疗性转入基因的合并尺寸至少为约500至约5000、约500至约4000、约500至约3000、约500至约2000、约500至约1000、约1000至约5000、约1000至约4000、约1000至约3000、约1000至约2000、约2000至约5000、约2000至约4000、约2000至约3000、约3000至约5000、约3000至约4000或约4000至5000个核苷酸。

80. 权利要求1-78中任一项的重组腺病毒,其中所述第一和第二治疗性转入基因的合并尺寸至少为约500至约7000、约500至约6000、约500至约5000、约500至约4000、约500至约3000、约500至约2000、约500至约1000、约1000至约7000、约1000至约6000、约1000至约5000、约1000至约4000、约1000至约3000、约1000至约2000、约2000至约7000、约2000至约6000、约2000至约5000、约2000至约4000、约2000至约3000、约3000至约7000、约3000至约6000、约3000至约5000、约3000至约4000、约4000至约7000、约4000至约6000、约4000至约5000、约5000至约7000、约5000至约6000或约6000至约7000个核苷酸。

81. 权利要求1-80中任一项的重组腺病毒,其中所述第一和第二治疗性转入基因的合并尺寸为至少约500、约1000、约2000、约3000、约4000或约5000个核苷酸。

82. 权利要求1-80中任一项的重组腺病毒,其中所述第一和第二治疗性转入基因的合并尺寸为至少约500、约1000、约2000、约3000、约4000、约5000、约6000或约7000个核苷酸。

83. 权利要求1-82中任一项的重组腺病毒,其中所述第一和第二治疗性转入基因的合

并尺寸为约1600个核苷酸。

84. 权利要求1-83中任一项的重组腺病毒,其中所述第一和第二治疗性转入基因的合并尺寸为约1650个核苷酸。

85. 权利要求1-82中任一项的重组腺病毒,其中所述第一和第二治疗性转入基因的合并尺寸为约3100个核苷酸。

86. 权利要求1-85中任一项的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒在过度增殖性细胞中选择性复制。

87. 权利要求1-86中任一项的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒在过度增殖性细胞中选择性表达所述第一和/或第二治疗性转入基因。

88. 权利要求86或87的重组腺病毒,其中所述过度增殖性细胞是癌细胞。

89. 权利要求1-88中任一项的重组腺病毒,其中所述重组腺病毒是溶瘤病毒。

90. 一种药物组合物,其包含权利要求1-89中任一项的重组腺病毒和至少一种可药用载体或稀释剂。

91. 一种在靶细胞中表达两个治疗性转入基因的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于有效量的权利要求1-89中任一项的重组腺病毒,以表达所述两个治疗性转入基因。

92. 权利要求91的方法,其中所述两个治疗性转入基因在表达时产生单一多肽链。

93. 权利要求92的方法,其中所述单一多肽链被翻译后切割成两条多肽链。

94. 一种抑制肿瘤细胞增殖的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于有效量的权利要求1-89中任一项的重组腺病毒,以抑制所述肿瘤细胞的增殖。

95. 一种在需要的对象中抑制肿瘤生长的方法,所述方法包括向所述对象给药有效量的权利要求1-89中任一项的重组腺病毒,以抑制所述肿瘤的生长。

96. 一种在需要的对象中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述对象给药有效量的权利要求1-89中任一项的重组腺病毒,以在所述对象中治疗所述癌症。

97. 权利要求96的方法,其中所述癌症选自肛门癌、基底细胞癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、上皮癌、胆管癌、宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、胃食管癌、胃肠(GI)癌、胃肠间质瘤、肝细胞癌、妇科癌症、头颈癌、血液癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、间皮瘤、神经内分泌癌症、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、儿科癌症、前列腺癌、肾细胞癌、肉瘤、皮肤癌、小细胞肺癌、皮肤的鳞状细胞癌、胃癌、睾丸癌和甲状腺癌。

98. 权利要求96的方法,其中所述癌症选自黑色素瘤、皮肤的鳞状细胞癌、基底细胞癌、头颈癌、乳腺癌、肛门癌、宫颈癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、小细胞肺癌、肾细胞癌、前列腺癌、胃食管癌、结肠直肠癌、睾丸癌、膀胱癌、卵巢癌、肝细胞癌、胆管癌、脑癌、子宫内膜癌、神经内分泌癌症、梅克尔细胞癌、胃肠间质瘤、肉瘤和胰腺癌。

99. 权利要求95-98的方法,其中所述重组腺病毒与选自手术、辐射、化疗、免疫疗法、激素疗法和病毒疗法的一种或多种疗法相组合给药。

100. 权利要求94-99中任一项的方法,其中所述重组腺病毒的有效量是 $10^2$ - $10^{15}$ 噬斑形成单位(pfus)。

101. 权利要求95-100中任一项的方法,其中所述对象是人类。

102. 权利要求101的方法,其中所述对象是人类幼儿。

## 多转入基因重组腺病毒

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年4月12日提交的美国临时专利申请系列号62/484,841的利益和优先权,所述临时申请在此整体通过引用并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明的领域是分子生物学和病毒学,具体来说是表达两个或更多个治疗性转入基因的重组病毒。

### 背景技术

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

[0005] 以前开发的溶瘤病毒包括被称为TAV-255的溶瘤5血清型腺病毒(Ad5),其在正常细胞中转录弱化,但在癌细胞中活跃转录(参见PCT公开号W02010101921)。据信,所述TAV-255载体实现这种肿瘤选择性的机制是通过转录因子Pea3和E2F的三个转录因子(TF)结合位点的定向缺失,这些转录因子是通过结合到特定DNA序列来调控病毒进入宿主细胞后最早转录的基因E1a的腺病毒表达的蛋白质。

[0006] 尽管迄今为止已做出种种努力,但对用于在人类患者中治疗癌症和过度增殖性障碍的改进的重组病毒例如重组溶瘤病毒,仍存在着需求。

### 发明内容

[0007] 本发明部分是基于下述发现,即对于表达两个治疗性转入基因的某些重组腺病毒例如重组溶瘤腺病毒来说,当所述两个治疗性转入基因被表达为具有居间的可切割位点例如可蛋白水解切割位点的单一多肽链时,每个治疗性转入基因的表达可以被大大提高。所述可切割位点随后可以用一种或多种切割试剂例如内源或外源切割试剂进行翻译后切割,以产生由每个治疗性转入基因编码的成熟蛋白产物。这种方法具有确保每个治疗性转入基因的化学计量表达和同时递送的额外优点。

[0008] 一方面,本发明提供了一种重组腺病毒,其包含编码第一治疗性转入基因的第一核苷酸序列、编码第二治疗性转入基因的第二核苷酸序列和配置在所述第一核苷酸序列与第二核苷酸序列之间编码可切割位点的第三核苷酸序列。在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含以5'至3'方向包含所述第一核苷酸序列、第三核苷酸序列和第二核苷酸序列的重

组多核苷酸序列。在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含以5'至3'方向连续包含所述第一核苷酸序列、第三核苷酸序列和第二核苷酸序列的重组多核苷酸序列,例如不存在配置在所述第一核苷酸序列与第三核苷酸序列之间和/或所述第三核苷酸序列与第二核苷酸序列之间的居间核苷酸序列(例如含有另一个转入基因的序列或调控序列)。在某些实施方式中,所述第一核苷酸序列、第三核苷酸序列和第二核苷酸序列被可操作地连接到单一启动子(任选地位于所述第一核苷酸序列的第一核苷酸的5')并被表达为单一多肽链。

[0009] 所述可切割位点可以是可蛋白水解切割位点,例如被存在于真核细胞的内质网或高尔基体中的蛋白酶切割的可蛋白水解切割位点。在某些实施方式中,所述可蛋白水解切割位点是弗林蛋白酶可切割位点,例如包含序列RX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>R (SEQ ID NO:6)的弗林蛋白酶可切割位点,其中X<sub>1</sub>是任何氨基酸,并且X<sub>2</sub>是Lys或Arg,例如包含序列RAKR (SEQ ID NO:7)的弗林蛋白酶可切割位点。

[0010] 在某些实施方式中,所述重组腺病毒是5型腺病毒(Ad5)或2型腺病毒(Ad2)。

[0011] 在某些实施方式中,所述第一、第二和第三核苷酸序列被插入到位于E1b-19K的起始位点与E1b-19K的终止位点之间的E1b-19k插入位点中。在某些实施方式中,所述E1b-19K插入位点位于E1b-19K的起始位点与E1b-55K的起始位点之间。在某些实施方式中,所述E1b-19K插入位点包含在E1b-19K的起始位点附近约100至约305、约100至约300、约100至约250、约100至约200、约100至约150、约150至约305、约150至约300、约150至约250或约150至约200个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E1b-19K插入位点包含在E1b-19K的起始位点附近约200个核苷酸、例如202或203个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E1b-19K插入位点包含对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第1714-1917或1714-1916位核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述第一、第二和第三核苷酸序列被插入到对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第1714和1917位的核苷酸之间或对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第1714和1916位的核苷酸之间。在某些实施方式中,第一、第二和第三核苷酸序列被插入到CTGACCTC (SEQ ID NO:2)和TCACCAGG (SEQ ID NO:3)之间,例如所述重组腺病毒以5'至3'方向包含CTGACCTC (SEQ ID NO:2)、第一核苷酸序列、第三核苷酸序列、第二核苷酸序列和TCACCAGG (SEQ ID NO:3)。

[0012] 在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含具有功能性Pea3结合位点的缺失的E1a启动子。例如,所述病毒可以包含对应于E1a的起始位点上游约-300至约-250位的核苷酸的缺失,例如对应于E1a的起始位点上游-305至-255或-304至-255位的核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述缺失包含对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第195-244位的核苷酸的缺失,和/或所述E1a启动子包含序列GGTGTTTTGG (SEQ ID NO:4)。

[0013] 在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含具有功能性TATA盒的缺失,例如整个TATA盒的缺失的E1a启动子。例如,在某些实施方式中,所述病毒包含对应于5型腺病毒E1a启动子的-27至-24、-31至-24、-44至+54或-146至+54位的核苷酸的缺失,所述核苷酸分别对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第472至475、468至475、455至552和353至552位核苷酸。在某些实施方式中,所述病毒包含产生包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO:5)、AGTGCCCG (SEQ ID NO:16)或TATTCCCG (SEQ ID NO:17)的病毒的多核苷酸缺失,所述序列由原本在所述缺失的多核苷酸序列侧翼的两个多核苷酸序列的联结产生。

[0014] 在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含对应于5型腺病毒E1a启动子的-29至-

26、-33至-26、-44至+52或-148至+52位的核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述病毒包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第353至552位的核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述病毒包含产生包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO:5) 的病毒的多核苷酸缺失,所述序列由原本在所述缺失的多核苷酸序列侧翼的两个多核苷酸序列的联结产生。

[0015] 在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含具有功能性CAAT盒的缺失,例如整个CAAT盒的缺失的E1a启动子。例如,在某些实施方式中,所述病毒包含对应于5型腺病毒E1a启动子的-76至-68位的核苷酸的缺失,所述核苷酸对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第423至431位核苷酸。在某些实施方式中,所述病毒包含产生包含序列TTCCGTGGCG (SEQ ID NO:18) 的病毒的多核苷酸缺失,所述序列由原本在所述缺失的多核苷酸序列侧翼的两个多核苷酸序列的联结产生。

[0016] 在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含E3缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失包含约500至约3185、约500至约3000、约500至约2500、约500至约2000、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约3185、约1000至约3000、约1000至约2500、约1000至约2000、约1000至约1500、约1500至约3185、约1500至约3000、约1500至约2000、约2000至约3185、约2000至约3000、约2000至约2500、约2500至约3185、约2500至约3000或约3000至约3185个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失位点位于pVIII的终止位点与Fiber的起始位点之间。在某些实施方式中,所述E3缺失位点位于E3-10.5K的终止位点与E3-14.7K的终止位点之间。在某些实施方式中,所述E3缺失包含在E3-10.5K的终止位点附近约500至约1551、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约1551、约1000至约1500或约1500至约1551个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失包含在E3-10.5K的终止位点附近约1050个核苷酸的缺失,例如所述E3缺失包含在E3-10.5K的终止位点附近1063或1064个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失包含对应于Ad5d1309E3缺失的缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第29773-30836位核苷酸的缺失。

[0017] 在某些实施方式中,所述E3缺失位于E3-gp19K的终止位点与E3-14.7K的终止位点之间。在某些实施方式中,所述E3缺失包含在E3-gp19K的终止位点附近约500至约1824、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约1824、约1000至约1500或约1500至约1824个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失包含在E3-gp19K的终止位点附近约1600个核苷酸的缺失,例如所述E3缺失包含在E3-gp19K的终止位点附近1622个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第29218-30839位核苷酸的缺失。

[0018] 在某些实施方式中,所述重组腺病毒还包含E4缺失。在某些实施方式中,所述E4缺失位于E4-ORF6/7的起始位点与右侧末端反向重复序列 (ITR) 之间。在某些实施方式中,所述E4缺失位于E4-ORF6/7的起始位点与E4-ORF1的起始位点之间。在某些实施方式中,所述E4缺失包含约500至约2500、约500至约2000、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约2500、约1000至约2000、约1000至约1500、约1500至约2500、约1500至约2000或约2000至约2500个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E4缺失包含在E4-ORF6/7的起始位点附近约250至约1500、约250至约1250、约250至约1000、约250至约750、约250至约500、500至约1500、约500至约1250、约500至约1000、约500至约750、750至约1500、约750至约1250、约750

至约1000、约1000至约1500或约1000至约1250个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E4缺失包含在E4-ORF6/7的起始位点附近约1450个核苷酸的缺失,例如,所述E4缺失包含在E4-ORF6/7的起始位点附近1449个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E4缺失包含对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第34078-35526位核苷酸的缺失。

[0019] 在某些实施方式中,所述第一和/或第二治疗性转入基因编码选自乙酰胆碱、抗CTLA-4抗体重链或轻链、抗PD-1抗体重链或轻链、抗PD-L1抗体重链或轻链、BORIS/CTCFL、CD19、CD20、CD40L、CD70、CD80、CD86、CD137、CD137L、CD154、DKK1/Wnt、FGF、GITRL、GM-CSF、ICAM、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-15、IL-15IL-15受体融合蛋白、IL-17、IL-23、IL-23A/p19、IL-12B/p40、IL-24、IL-27、IL-27A/p28、IL-27B/EBI3、IL-35、干扰素- $\gamma$ 、MAGE、NY-ESO-1、Ox40L、p53、分泌的鞭毛蛋白、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$ 、胸苷激酶和TNF- $\alpha$ 的多肽。

[0020] 在某些实施方式中,所述第一和/或第二治疗性转入基因编码选自乙酰胆碱、抗CTLA-4抗体重链或轻链、抗PD-1抗体重链或轻链、抗PD-L1抗体重链或轻链、BORIS/CTCFL、CD19、CD20、CD40L、CD70、CD80、CD86、CD137、CD137L、CD154、DKK1/Wnt、FGF、GITRL、GM-CSF、ICAM、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-12A/p35、IL-12B/p40、IL-15、IL-15IL-15受体融合蛋白、IL-23A/p19、干扰素- $\gamma$ 、MAGE、NY-ESO-1、Ox40L、p53、分泌的鞭毛蛋白、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$ 、胸苷激酶和TNF- $\alpha$ 的多肽。

[0021] 在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基因分别编码异二聚体蛋白例如异二聚体细胞因子的第一和第二亚基。例如,在某些实施方式中,在任何上述重组腺病毒中,所述第一和/或第二治疗性转入基因选自IL-12A/p35和IL-12B/p40,例如所述第一治疗性转入基因编码IL-12B/p40并且所述第二治疗性转入基因编码IL-12A/p35。在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含编码由SEQ ID NO:8的第17-1000位核苷酸、SEQ ID NO:8的第1013-1606位核苷酸和/或SEQ ID NO:8的第17-1606位核苷酸编码的氨基酸序列的核苷酸序列。在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列,或者包含与SEQ ID NO:8具有80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0022] 在某些实施方式中,在任何上述重组腺病毒中,所述第一和/或第二治疗性转入基因选自IL-23A/p19和IL-12B/p40,例如所述第一治疗性转入基因编码IL-12B/p40并且所述第二治疗性转入基因编码IL-23A/p19。在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含编码由SEQ ID NO:9的第17-1000位核苷酸、SEQ ID NO:9的第1013-1582位核苷酸和/或SEQ ID NO:9的第17-1582位核苷酸编码的氨基酸序列的核苷酸序列。在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列,或者包含与SEQ ID NO:9具有80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0023] 在某些实施方式中,任何上述重组病毒可以在过度增殖性细胞中选择性复制。在某些实施方式中,任何上述重组病毒可以在过度增殖性细胞中选择性表达两个或更多个治疗性转入基因。所述过度增殖性细胞可以是癌细胞例如肺癌细胞、结肠癌细胞和胰腺癌细胞。在某些实施方式中,任何上述重组病毒可以是溶瘤病毒。

[0024] 在某些实施方式中,在任何上述重组腺病毒中,所述第一和/或第二治疗性转入基因不被可操作连接到外源启动子序列。在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基

因的尺寸在合并时为约500至约5000、约500至约4000、约500至约3000、约500至约2000、约500至约1000、约1000至约5000、约1000至约4000、约1000至约3000、约1000至约2000、约2000至约5000、约2000至约4000、约2000至约3000、约3000至约5000、约3000至约4000或约4000至5000个核苷酸。在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基因的尺寸在合并时为约500至约7000、约500至约6000、约500至约5000、约500至约4000、约500至约3000、约500至约2000、约500至约1000、约1000至约7000、约1000至约6000、约1000至约5000、约1000至约4000、约1000至约3000、约1000至约2000、约2000至约7000、约2000至约6000、约2000至约5000、约2000至约4000、约2000至约3000、约3000至约7000、约3000至约6000、约3000至约5000、约3000至约4000、约4000至约7000、约4000至约6000、约4000至约5000、约5000至约7000、约5000至约6000或约6000至约7000个核苷酸。

[0025] 在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基因的尺寸在合并时至少为约500至约5000、约500至约4000、约500至约3000、约500至约2000、约500至约1000、约1000至约5000、约1000至约4000、约1000至约3000、约1000至约2000、约2000至约5000、约2000至约4000、约2000至约3000、约3000至约5000、约3000至约4000或约4000至5000个核苷酸。在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基因的尺寸在合并时至少为约500至约7000、约500至约6000、约500至约5000、约500至约4000、约500至约3000、约500至约2000、约500至约1000、约1000至约7000、约1000至约6000、约1000至约5000、约1000至约4000、约1000至约3000、约1000至约2000、约2000至约7000、约2000至约6000、约2000至约5000、约2000至约4000、约2000至约3000、约3000至约7000、约3000至约6000、约3000至约5000、约3000至约4000、约4000至约7000、约4000至约6000、约4000至约5000、约5000至约7000、约5000至约6000或约6000至约7000个核苷酸。

[0026] 在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基因的尺寸在合并时为至少约500、约1000、约2000、约3000、约4000或约5000个核苷酸。在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基因的尺寸在合并时为至少约500、约1000、约2000、约3000、约4000、约5000、约6000或约7000个核苷酸。在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基因的尺寸在合并时为约1600个核苷酸、约1650个核苷酸或约3100个核苷酸。

[0027] 另一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含每种上述重组腺病毒和至少一种可药用载体或稀释剂。

[0028] 另一方面,本发明提供了一种在对象中治疗癌症的方法。所述方法包括向所述对象给药有效量的本文中描述的重组腺病毒,以在所述对象中治疗所述癌症疾病。在某些实施方式中,所述癌症选自肛门癌、基底细胞癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、上皮癌、胆管癌、宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、胃食管癌、胃肠(GI)癌、胃肠间质瘤、肝细胞癌、妇科癌症、头颈癌、血液癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑素瘤、梅克尔细胞癌、间皮瘤、神经内分泌癌症、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、儿科癌症、前列腺癌、肾细胞癌、肉瘤、皮肤癌、小细胞肺癌、皮肤的鳞状细胞癌、胃癌、睾丸癌和甲状腺癌。

[0029] 另一方面,本发明提供了一种在对象中抑制肿瘤细胞增殖的方法。所述方法包括向所述对象给有效量的本文中描述的重组腺病毒,以抑制所述肿瘤细胞的增殖。

[0030] 另一方面,本发明提供了一种在对象中抑制肿瘤生长的方法。所述方法包括向所述对象给有效量的本文中描述的重组腺病毒,以抑制所述肿瘤细胞的增殖。



[0031] 在每一种上述方法中,所述重组腺病毒可以例如与选自手术、辐射、化疗、免疫疗法、激素疗法和病毒疗法的一种或多种疗法相组合给药。在每一种上述方法中,所述重组腺病毒的有效量可以是例如 $10^2$ - $10^{15}$ 噬斑形成单位(pfus)。在任何上述方法的某些实施方式中,所述对象可以是人类例如人类幼儿。

[0032] 另一方面,本发明提供了一种在靶细胞中表达两个或更多个治疗性转入基因的方法。所述方法包括向所述细胞递送例如将所述细胞暴露于有效量的本文中描述的重组腺病毒,以表达所述靶转入基因。在某些实施方式中,所述两个治疗性转入基因在表达时产生单一多肽链,其可以被翻译后切割成两条多肽链。

[0033] 本发明的这些以及其他的方面和优点将通过下面的附图、详细描述和权利要求书来说明。

## 附图说明

[0034] 参考下面的附图可以更完全地理解本发明。

[0035] 图1是描绘了通过ELISA确定的用编码具有不同连接物的IL-12的质粒瞬时转染的HEK-293细胞的IL-12表达的图。点表示一式三份测量的浓度,深色条表示平均值,误差条表示标准偏差。

[0036] 图2是来自于TAV-hIL-12-furin腺病毒(标注为“furin”)、TAV-hIL-12-Separate腺病毒(标注为“separate”)和对照d1309腺病毒的DNA的PCR产物的凝胶,证实了预期尺寸的产物。

[0037] 图3描绘了在用所指示的病毒感染后的指示时间点时ADS-12细胞的结晶紫染色。结晶紫将活细胞染成紫色。

[0038] 图4是描绘了通过ELISA确定的用TAV- $\Delta$  19k和TAV-mIL12-IRES感染的ADS-12细胞的IL-12表达的条形图。误差条表示标准偏差。

[0039] 图5是描绘了TAV- $\Delta$  19k和TAV-mIL-12-IRES在ADS-12细胞中的病毒复制的条形图。误差条表示标准偏差。

[0040] 图6是描绘了通过ELISA确定的用TAV- $\Delta$  19k、TAV-hIL-12-IRES、TAV-hIL-12-furin感染或不用病毒感染的A549细胞的IL-12表达的条形图。

[0041] 图7描绘了在用所指示的病毒感染后的指示时间点时A549细胞的结晶紫染色。结晶紫将活细胞染成紫色。

[0042] 图8是描绘了TAV- $\Delta$  19k、TAV-hIL-12-IRES和TAV-hIL-12-furin在A549细胞中的病毒复制的条形图。

[0043] 图9是描绘了来自于病毒TAV-mIL-12-furin的IL-12表达的线形图。将A549细胞以所指示的MOI感染,并通过ELISA在所指示的时间点测量调制培养基中的IL-12浓度。CT指示未感染的对照细胞。

[0044] 图10是描绘了来自于病毒TAV-mIL-23-furin的IL-23和来自于病毒TAV-mIL-27-furin的IL-27的表达的条形图。将A549细胞以MOI值为5进行感染,并在感染后4天通过ELISA测量每种病毒在调制培养基中的相应细胞因子的浓度。

[0045] 详细描述

[0046] 本发明部分是基于下述发现,即对于表达两个治疗性转入基因的某些重组腺病毒

例如重组溶瘤腺病毒来说,当所述两个治疗性转入基因被表达为具有居间的可切割位点例如可蛋白水解切割位点的单一多肽链时,每个治疗性转入基因的表达可以被大大提高。所述可切割位点随后可以用一种或多种切割试剂例如内源或外源切割试剂进行翻译后切割,以产生由每个治疗性转入基因编码的成熟蛋白产物。这种方法具有确保每个治疗性转入基因的化学计量表达和同时递送的额外优点。

[0047] 因此,一方面,本发明提供了一种重组腺病毒,其包含编码第一治疗性转入基因的第一核苷酸序列、编码第二治疗性转入基因的第二核苷酸序列和配置在所述第一核苷酸序列与第二核苷酸序列之间编码可切割位点的第三核苷酸序列。在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含以5'至3'方向包含所述第一核苷酸序列、第三核苷酸序列和第二核苷酸序列的重组多核苷酸序列。在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含以5'至3'方向连续包含所述第一核苷酸序列、第三核苷酸序列和第二核苷酸序列的重组多核苷酸序列,例如不存在配置在所述第一核苷酸序列与第三核苷酸序列之间和/或所述第三核苷酸序列与第二核苷酸序列之间的居间核苷酸序列(例如含有另一个转入基因的序列或调控序列)。在某些实施方式中,所述第一核苷酸序列、第三核苷酸序列和第二核苷酸序列被可操作地连接到单一启动子(任选地位于所述第一核苷酸序列的第一核苷酸的5')并被表达为单一多肽链。

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

#### [0049] I. 病毒

[0050] 术语“病毒”在本文中用于指称不具有蛋白质合成或能量产生机制的任何专性细胞内寄生物。病毒基因组可以是RNA或DNA。在本发明的实践中有用的病毒包括重组修饰的包膜或无包膜DNA和RNA病毒,优选地选自杆状病毒科、细小病毒科、小核糖核酸病毒科、疱疹病毒科、痘病毒科或腺病毒科。重组修饰的病毒在本文中被称作“重组病毒”。重组病毒可以例如通过重组DNA技术被修饰成复制缺陷型、条件复制型或复制型,和/或通过重组DNA技术被修饰成包含外源转入基因的表达。利用每种亲本载体性质的有利要素的嵌合病毒载体(参见例如Feng等,(1997)NATURE BIOTECHNOLOGY 15:866-870),在本发明的实践中也可能是有用的。尽管使用来自于待治疗物种的病毒通常是有利的,但在某些情况下使用源自于具有有利致病特点的不同物种的载体也可能是有利的。例如,用于人类基因疗法的马痘疹病毒载体被描述在PCT公开号W0 98/27216中。所述载体被描述为可用于人类治疗,因为所述马病毒对人类无致病性。同样地,绵羊腺病毒载体可用于人类基因疗法,因为它们据称避免了针对人类腺病毒载体的抗体。这些载体被描述在PCT公开号W0 97/06826中。

[0051] 优选地,所述重组病毒是腺病毒。腺病毒是中等尺寸(90-100nm)、无包膜的(裸露

的)二十面体病毒,由核衣壳和双链线性DNA基因组构成。腺病毒在哺乳动物的核中使用宿主的复制机器复制。术语“腺病毒”是指腺病毒属包括但不限于人、牛、绵羊、马、犬、猪、鼠和猿猴腺病毒亚属中的任何病毒。具体来说,人类腺病毒包括A-F亚属及其各个血清型,所述各个血清型和A-F亚属包括但不限于人类腺病毒1、2、3、4、4a、5、6、7、8、9、10、11 (Ad11a和Ad11p)、12、13、14、15、16、17、18、19、19a、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、34a、35、35p、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48和91型。优选的是源自于人类腺病毒2和5型的重组病毒。除非另有陈述,否则所有5型腺病毒的核苷酸编号是相对于NCBI参考序列AC\_000008.1,其在本文中被描绘在SEQ ID NO:1中。

[0052] 腺病毒的复制周期具有两个阶段:早期阶段,在此期间4个转录单位E1、E2、E3和E4被表达,以及晚期阶段,其在病毒DNA合成开始后发生,此时主要从主要晚期启动子(MLP)表达晚期转录本。所述晚期信使编码病毒的大多数结构蛋白。E1、E2和E4的基因产物负责转录激活、细胞转化、病毒DNA复制以及其他病毒功能,并且对于病毒生长来说是必需的。

[0053] 术语“可操作连接”是指多核苷酸元件以功能性关系的连接。当一个核酸序列与另一个核酸序列形成功能性关系时,核酸序列是“可操作连接”的。例如,启动子或增强子如果影响基因的转录,则它被可操作连接到所述基因。可操作连接的核苷酸序列通常是毗邻的。然而,由于增强子通常在与启动子相隔几千碱基时起作用并且内含子序列可能具有可变的长度,因此某些多核苷酸元件可能是可操作连接的但不直接位于侧翼,并且可以甚至从不同的等位基因或染色体反式起作用。

[0054] 在某些实施方式中,所述重组腺病毒具有对调控序列或启动子的一个或多个修饰。对调控序列或启动子的修饰包括与所述调控序列或启动子的野生型序列相比一个或多个核苷酸的缺失、替换或添加。

[0055] 在某些实施方式中,所述调控序列或启动子的修饰包括转录因子结合位点序列的修饰,以例如通过缺失其一部分或通过所述结合位点中插入单一点突变来降低其对转录因子的亲和性。在某些实施方式中,所述修饰的调控序列增强在赘生性细胞中的表达和/或减弱在正常细胞中的表达。

[0056] 在某些实施方式中,所述修饰的调控序列被可操作连接到编码蛋白质的序列。在某些实施方式中,腺病毒E1a和E1b基因(编码区)中的至少一个被可操作连接到修饰的调控序列。在某些实施方式中,所述E1a基因被可操作连接到修饰的调控序列。

[0057] 所述E1a调控序列含有用于转录因子Pea3的5个结合位点,被称为Pea3 I、Pea3 II、Pea3 III、Pea3 IV和Pea3 V,其中Pea3 I是最接近于E1a起始位点的Pea3结合位点,并且Pea3 V是最远离的。所述E1a调控序列还含有用于转录因子E2F的结合位点,因此被称为E2F I和E2F II,其中E2F I是最接近于E1a起始位点的E2F结合位点,E2F II是最远离的。从E1a起始位点起,所述结合位点如下排列:Pea3 I,E2F I,Pea3 II,E2F II,Pea3 III,Pea3 IV和Pea3 V。

[0058] 在某些实施方式中,这七个结合位点中的至少一者或七个功能性结合位点中的至少一者被缺失。当在本文中使用“功能性结合位点”是指能够结合到相应的结合配偶体例如转录因子的结合位点,例如具有相应野生型结合位点序列的至少100%、至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%或至少40%的结合活性的结合位点。当在本文中使用“非功能性结合位点”是指例如具有相应野生型结合位点序列的低于30%、低于20%、

低于10%或0%的结合活性的结合位点。

[0059] 在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含具有功能性Pea3结合位点的缺失例如整个Pea3结合位点的缺失的E1a启动子。当在本文中使用,“功能性Pea3结合位点”是指能够结合到它的相应转录因子(例如Pea3)的Pea3结合位点,例如具有相应的野生型Pea3结合位点序列的至少100%、至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%或至少40%的Pea3结合活性的Pea3结合位点。当在本文中使用,“非功能性Pea3结合位点”是指例如具有相应野生型Pea3结合位点序列的低于30%、低于20%、低于10%或0%的Pea3结合活性的Pea3结合位点。用于确定Pea3结合位点是否结合到Pea3的测定法在本领域中是已知的。示例性的结合测定法包括电泳迁移率变动测定法、染色质免疫沉淀测定法和DNA酶足迹测定法。

[0060] 在某些实施方式中,至少一个Pea3结合位点或功能性Pea3结合位点被缺失。所述缺失的Pea3结合位点可以是Pea3 I、Pea3 II、Pea3 III、Pea3 IV和/或Pea3 V。在某些实施方式中,所述缺失的Pea3结合位点是Pea3 II、Pea3 III、Pea3 IV和/或Pea3 V。在某些实施方式中,所述缺失的Pea3结合位点是Pea3 IV和/或Pea3 V。在某些实施方式中,所述缺失的Pea3结合位点是Pea3 II和/或Pea3 III。在某些实施方式中,所述缺失的Pea3结合位点是Pea3 II和Pea3 III两者。在某些实施方式中,所述Pea3 I结合位点或功能性Pea3 I结合位点被保留。

[0061] 在某些实施方式中,至少一个E2F结合位点或功能性E2F结合位点被缺失。在某些实施方式中,至少一个E2F结合位点或功能性E2F结合位点被保留。在某些实施方式中,所述保留的E2F结合位点是E2F I和/或E2F II。在某些实施方式中,所述保留的E2F结合位点是E2F II。在某些实施方式中,全部缺失基本上由Pea3 II、Pea3 III、Pea3 IV和/或Pea3 V中的一者或多者构成。

[0062] 在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含至少一个E2F结合位点或其功能性部分的缺失。在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含至少一个E2F结合位点或其功能性部分的缺失,并且不包含Pea3结合位点的缺失。

[0063] 在某些实施方式中,所述病毒具有位于E1a起始位点上游-304至-255位,例如对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第195-244位的50个碱基对区域的缺失,其在后文中被称为TAV-255缺失。在某些实施方式中,所述TAV-255缺失产生包含序列GGTGT TTTGG(SEQ ID NO:4)的E1a启动子。

[0064] 在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含具有功能性TATA盒的缺失例如整个TATA盒的缺失的E1a启动子。当在本文中使用,“功能性TATA盒”是指能够结合到TATA盒结合蛋白(TBP)的TATA盒,例如具有相应野生型TATA盒序列的至少100%、至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%或至少40%的TBP结合活性的TATA盒。当在本文中使用,“非功能性TATA盒”是指例如具有相应野生型TATA盒序列的低于30%、低于20%、低于10%或0%的TBP结合活性的TATA盒。用于确定TBP是否结合到TATA盒的测定法在本领域中是已知的。示例性的结合测定法包括电泳迁移率变动测定法、染色质免疫沉淀测定法和DNA酶足迹测定法。

[0065] 例如,在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含对应于5型腺病毒E1a启动子的-27至-24、-31至-24、-44至+54或-146至+54位的核苷酸的缺失,所述核苷酸分别对应于Ad5基

因组 (SEQ ID NO:1) 的第472至475、468至475、455至552和353至552位核苷酸。在某些实施方式中,所述病毒包含对应于5型腺病毒E1a启动子的-29至-26、-33至-26、-44至+52或-148至+52位的核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述病毒包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第353至552位的核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述病毒包含产生包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO:5)、AGTGCCCG (SEQ ID NO:16) 或TATTCCCG (SEQ ID NO:17) 的病毒的多核苷酸缺失,所述序列由原本在所述缺失的多核苷酸序列侧翼的两个多核苷酸序列的联结产生。在某些实施方式中,所述病毒包含产生包含序列CTAGGACTG (SEQ ID NO:5) 的病毒的多核苷酸缺失。

[0066] 在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含具有功能性CAAT盒的缺失例如整个CAAT盒的缺失的E1a启动子。当在本文中使用时,“功能性CAAT盒”是指能够结合到C/EBP或NF-Y蛋白的CAAT盒,例如具有相应野生型CAAT盒序列的至少100%、至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%或至少40%的C/EBP或NF-Y结合活性的CAAT盒。当在本文中使用时,“非功能性CAAT盒”是指例如具有相应野生型CAAT盒序列的低于30%、低于20%、低于10%或0%的C/EBP或NF-Y结合活性的CAAT盒。用于确定C/EBP或NF-Y蛋白是否结合到CAAT盒的测定法在本领域中是已知的。示例性的结合测定法包括电泳迁移率变动测定法、染色质免疫沉淀测定法和DNA酶足迹测定法。

[0067] 例如,在某些实施方式中,重组腺病毒包含对应于5型腺病毒E1a启动子的-76至-68位的核苷酸的缺失,所述核苷酸对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第423至431位的核苷酸。在某些实施方式中,所述病毒包含产生包含序列TTCCGTGGCG (SEQ ID NO:18) 的病毒的多核苷酸缺失,所述序列由原本在所述缺失的多核苷酸序列侧翼的两个多核苷酸序列的联结产生。

[0068] 腺病毒E1b-19k基因主要起到抗凋亡基因的作用,并且是细胞抗凋亡基因BCL-2的同源物。由于宿主细胞在子代病毒粒子成熟之前死亡将限制病毒复制,因此将E1b-19k表达为所述E1盒的一部分以防止过早细胞死亡,从而允许感染继续并产生成熟病毒粒子。因此,在某些实施方式中,提供了包括E1b-19K插入位点的重组腺病毒,例如所述重组腺病毒具有插入到E1b-19K插入位点中的编码转入基因的核苷酸序列。在某些实施方式中,所述插入位点位于E1b-19K的起始位点(即编码E1b-19k的起始密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第1714-1716位核苷酸)和E1b-55K的起始位点(即编码E1b-55k的起始密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第2019-2021位核苷酸)之间。在某些实施方式中,所述E1b-19K插入位点位于E1b-19K的起始位点(即编码E1b-19k的起始密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第1714-1716位核苷酸)和E1b-19K的终止位点(即编码E1b-19k的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的2242-2244位核苷酸)之间。

[0069] 在整个本说明书和权利要求书中,两个位点之间的插入,例如(i)第一基因(例如E1b-19k)的起始位点与第二基因(例如E1b-55K)的起始位点之间,(ii)第一基因的起始位点与第二基因的终止位点之间,(iii)第一基因的终止位点与第二基因的起始位点之间,或(iv)第一基因的终止位点与第二基因的终止位点之间的插入,被理解为意味着在所述插入周围构成给定起始位点或终止位点的核苷酸的全部或一部分可能存在或不存在于所述最终病毒中。同样地,两个核苷酸之间的插入被理解为意味着在所述插入周围的核苷酸可能存在或不存在于所述最终病毒中。

[0070] 在某些实施方式中,所述E1b-19K插入位点包含在E1b-19K的起始位点附近约100至约305、约100至约300、约100至约250、约100至约200、约100至约150、约150至约305、约150至约300、约150至约250或约150至约200个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E1b-19K插入位点包含在E1b-19K的起始位点附近约200个核苷酸、例如202或203个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E1b-19K插入位点包含对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第1714-1917或1714-1916位核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述第一核苷酸序列、第三核苷酸序列和第二核苷酸序列被插入到对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第1714和1917位的核苷酸之间或对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第1714和1916位的核苷酸之间。在某些实施方式中,所述第一核苷酸序列、第三核苷酸序列和第二核苷酸序列被插入到CTGACCTC(SEQ ID NO:2)和TCACCAGG(SEQ ID NO:3)之间,例如所述重组腺病毒以5'至3'方向包含CTGACCTC(SEQ ID NO:2)、第一核苷酸序列、第三核苷酸序列、第二核苷酸序列和TCACCAGG(SEQ ID NO:3)。CTGACCTC(SEQ ID NO:2)和TCACCAGG(SEQ ID NO:3)为Ad5基因组(SEQ ID NO:1)内的E1b-19K插入位点定义了独特的边界序列。在整个本说明书和权利要求书中,位点附近的缺失例如基因的起始位点附近的缺失或基因的终止位点附近的缺失,被理解为意味着所述缺失可能包括构成给定起始位点或终止位点的核苷酸的全部、一部分的缺失或不包括所述核苷酸的缺失。

[0071] 在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含E3缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失包含约500至约3185、约500至约3000、约500至约2500、约500至约2000、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约3185、约1000至约3000、约1000至约2500、约1000至约2000、约1000至约1500、约1500至约3185、约1500至约3000、约1500至约2000、约2000至约3185、约2000至约3000、约2000至约2500、约2500至约3185、约2500至约3000或约3000至约3185个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失位点位于pVIII的终止位点(即编码pVIII的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第27855-27857位核苷酸)与Fiber的起始位点(即编码Fiber的起始密码子的核苷酸序,例如对应于SEQ ID NO:1的第31042-31044位核苷酸)之间。在某些实施方式中,所述E3缺失位点位于E3-10.5K的终止位点(即编码E3-10.5K的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第29770-29772位核苷酸)与E3-14.7K的终止位点(即编码E3-14.7K的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第30837-30839位核苷酸)之间。在某些实施方式中,所述E3缺失包含在E3-10.5K的终止位点附近约500至约1551、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约1551、约1000至约1500或约1500至约1551个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失包含在E3-10.5K的终止位点附近约1050个核苷酸的缺失,例如所述E3缺失包含在E3-10.5K的终止位点附近1063或1064个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失包含对应于Ad5 d1309 E3缺失的缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失包含对应于Ad5基因组(SEQ ID NO:1)的第29773-30836位核苷酸的缺失。

[0072] 在某些实施方式中,所述E3缺失位于E3-gp19K的终止位点(即编码E3-gp19K的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第29215-29217位核苷酸)与E3-14.7K的终止位点(即编码E3-14.7K的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第30837-30839位核苷酸)之间。在某些实施方式中,所述E3缺失包含在E3-gp19K的终止位点附近约500至约1824、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约1824、约1000至约1500或

约1500至约1824个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失包含在E3-gp19K的终止位点附近约1600个核苷酸的缺失,例如所述E3缺失包含在E3-gp19K的终止位点附近1622个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第29218-30839位核苷酸的缺失。

[0073] 在某些实施方式中,提供了包括E3插入位点的重组腺病毒,例如所述重组腺病毒具有插入到E3插入位点中的编码治疗性转入基因的核苷酸序列。在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含E3缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失包含约500至约3185、约500至约3000、约500至约2500、约500至约2000、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约3185、约1000至约3000、约1000至约2500、约1000至约2000、约1000至约1500、约1500至约3185、约1500至约3000、约1500至约2000、约2000至约3185、约2000至约3000、约2000至约2500、约2500至约3185、约2500至约3000或约3000至约3185个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失位于pVIII的终止位点(即编码pVIII的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第27855-27857位核苷酸)与Fiber的起始位点(即编码Fiber的起始密码子的核苷酸序,例如对应于SEQ ID NO:1的第31042-31044位核苷酸)之间。在某些实施方式中,所述E3缺失位于E3-10.5K的终止位点(即编码E3-10.5K的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第29770-29772位核苷酸)与E3-14.7K的终止位点(即编码E3-14.7K的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第30837-30839位核苷酸)之间。在某些实施方式中,所述E3缺失包含在E3-10.5K的终止位点附近约500至约1551、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约1551、约1000至约1500或约1500至约1551个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失包含在E3-10.5K的终止位点附近约1050个核苷酸的缺失,例如所述E3缺失包含在E3-10.5K的终止位点附近1063或1064个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失包含对应于Ad5d1309E3缺失的缺失。在某些实施方式中,所述E3缺失包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第29773-30836位核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述第一核苷酸序列、第三核苷酸序列和第二核苷酸序列被插入到对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第29773和30836位的核苷酸之间。在某些实施方式中,所述第一核苷酸序列、第三核苷酸序列和第二核苷酸序列被插入到CAGTATGA (SEQ ID NO:19) 和TAATAAAAAA (SEQ ID NO:20) 之间,例如所述重组腺病毒以5' 至3' 方向包含CAGTATGA (SEQ ID NO:19)、第一核苷酸序列、第三核苷酸序列、第二核苷酸序列和TAATAAAAAA (SEQ ID NO:20)。CAGTATGA (SEQ ID NO:19) 和TAATAAAAAA (SEQ ID NO:20) 为Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 内的E3插入位点定义了独特的边界序列。

[0074] 在某些实施方式中,所述E3插入位点位于E3-gp19K的终止位点(即编码E3-gp19K的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第29215-29217位核苷酸)与E3-14.7K的终止位点(即编码E3-14.7K的终止密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第30837-30839位核苷酸)之间。在某些实施方式中,所述E3插入位点包含在E3-gp19K的终止位点附近约500至约1824、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约1824、约1000至约1500或约1500至约1824个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3插入位点包含在E3-gp19K的终止位点附近约1600个核苷酸的缺失,例如所述E3插入位点包含在E3-gp19K的终止位点附近1622个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E3插入位点包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第29218-30839位核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述第一核苷酸

序列、第三核苷酸序列和第二核苷酸序列被插入到对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第29218和30839位的核苷酸之间。在某些实施方式中,所述第一核苷酸序列、第三核苷酸序列和第二核苷酸序列被插入到TGCCTTAA (SEQ ID NO:21) 和TAAAAAAAAAAT (SEQ ID NO:22) 之间,例如所述重组腺病毒以5'至3'方向包含TGCCTTAA (SEQ ID NO:21)、第一核苷酸序列、第三核苷酸序列、第二核苷酸序列和TAAAAAAAAAAT (SEQ ID NO:22)。TGCCTTAA (SEQ ID NO:21) 和TAAAAAAAAAAT (SEQ ID NO:22) 为Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 内的E3插入位点定义了独特的边界序列。

[0075] 在某些实施方式中,重组腺病毒包含E4缺失。在某些实施方式中,所述E4缺失位于E4-ORF6/7的起始位点(即编码E4-ORF6/7的起始密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第34075-34077位核苷酸)与右侧末端反向重复序列(ITR;例如对应于SEQ ID NO:1的第35836-35938位核苷酸)之间。在某些实施方式中,所述E4缺失位于E4-ORF6/7的起始位点与E4-ORF1的起始位点(即编码E4-ORF1的起始密码子的核苷酸序列,例如对应于SEQ ID NO:1的第35524-35526位核苷酸)之间。在某些实施方式中,所述E4缺失包含E4-ORF6/7的起始位点与E4-ORF1的起始位点之间的核苷酸序列的缺失。在某些实施方式中,所述E4缺失包含约500至约2500、约500至约2000、约500至约1500、约500至约1000、约1000至约2500、约1000至约2000、约1000至约1500、约1500至约2500、约1500至约2000或约2000至约2500个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E4缺失包含在E4-ORF6/7的起始位点附近约250至约1500、约250至约1250、约250至约1000、约250至约750、约250至约500、500至约1500、约500至约1250、约500至约1000、约500至约750、750至约1500、约750至约1250、约750至约1000、约1000至约1500或约1000至约1250个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E4缺失包含在E4-ORF6/7的起始位点附近约1450个核苷酸的缺失,例如,所述E4缺失包含在E4-ORF6/7的起始位点附近1449个核苷酸的缺失。在某些实施方式中,所述E4缺失包含对应于Ad5基因组 (SEQ ID NO:1) 的第34078-35526位核苷酸的缺失。

## [0076] II. 病毒生产方法

[0077] 用于生产本发明的重组病毒的方法在本领域中是已知的。通常,所公开的病毒在适合的宿主细胞系中使用常规技术来生产,所述常规技术包括将转染或感染的宿主细胞在适合的条件下培养,以便允许感染性病毒粒子的生产。编码病毒基因的核酸可以被并入到质粒中,并通过常规的转染或转化技术引入到宿主细胞中。用于生产本公开的病毒的示例性的适合宿主细胞包括人类细胞系例如HeLa、HeLa-S3、HEK293、911、A549、HER96或PER-C6细胞。具体的生产和纯化条件将随着所使用的病毒和生产系统而变。对于腺病毒来说,用于产生病毒粒子的传统方法是穿梭质粒(通常含有一小部分腺病毒基因组子集并任选地含有潜在的转入基因表达盒)和腺病毒辅助质粒(含有完整腺病毒基因组的大部分)的共转染,随后进行后续体内重组。

[0078] 用于产生腺病毒的可选技术包括利用细菌人工染色体(BAC)系统、在recA+细菌菌株中利用含有互补的腺病毒序列的两个质粒的体内细菌重组和酵母人工染色体(YAC)系统。

[0079] 在生产后,从所述培养物回收感染性病毒粒子并任选地纯化。典型的纯化步骤可以包括噬斑纯化、离心例如氯化铯梯度离心、澄清、酶处理例如全能核酸酶或蛋白酶处理、层析步骤例如离子交换层析或过滤步骤。



### [0080] III. 治疗性转入基因

[0081] 所公开的重组腺病毒可以包含为治疗性转入基因编码的核苷酸序列。在某些实施方式中,所公开的重组腺病毒可以包含分别编码第一和第二治疗性转入基因的第一核苷酸序列和第二核苷酸序列。

[0082] 治疗性转入基因可以编码治疗性核酸例如反义RNA或核酶RNA。所述治疗性转入基因可以编码治疗性肽或多肽,例如凋亡剂、抗体、CTL响应性肽、细胞因子、细胞裂解剂、细胞毒性剂、酶、在肿瘤细胞的表面上表达以引发免疫应答的异源抗原、免疫刺激剂或免疫调节剂、干扰素、裂解肽、癌蛋白、催化引起细胞死亡的过程的多肽、补足体细胞中的遗传缺陷的多肽、肿瘤抑制蛋白、疫苗抗原或其任何组合。

[0083] 在某些实施方式中,所述第一和/或第二治疗性转入基因编码选自乙酰胆碱、抗CTLA-4抗体重链或轻链、抗PD-1抗体重链或轻链、抗PD-L1抗体重链或轻链、BORIS/CTCFL、CD19、CD20、CD40L、CD70、CD80、CD86、CD137、CD137L、CD154、DKK1/Wnt、FGF、GITRL、GM-CSF、ICAM、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-15、IL-15受体融合蛋白、IL-17、IL-23、IL-23A/p19、IL-12B/p40、IL-24、IL-27、IL-27A/p28、IL-27B/EBI3、IL-35、干扰素- $\gamma$ 、MAGE、NY-ESO-1、Ox40L、p53、分泌的鞭毛蛋白、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$ 、胸苷激酶和TNF- $\alpha$ 的多肽。

[0084] 在某些实施方式中,所述第一和/或第二治疗性转入基因编码选自乙酰胆碱、抗CTLA-4抗体重链或轻链、抗PD-1抗体重链或轻链、抗PD-L1抗体重链或轻链、BORIS/CTCFL、CD19、CD20、CD40L、CD70、CD80、CD86、CD137、CD137L、CD154、DKK1/Wnt、FGF、GITRL、GM-CSF、ICAM、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-12A/p35、IL-12B/p40、IL-15、IL-15受体融合蛋白、IL-23A/p19、干扰素- $\gamma$ 、MAGE、NY-ESO-1、Ox40L、p53、分泌的鞭毛蛋白、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$ 、胸苷激酶和TNF- $\alpha$ 的多肽。

[0085] 在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基因分别编码异二聚体蛋白例如异二聚体细胞因子的第一和第二亚基。例如,在某些实施方式中,所述第一和/或第二治疗性转入基因选自IL-12A/p35和IL-12B/p40,它们构成异二聚体细胞因子IL-12。例如,所述第一治疗性转入基因可以编码IL-12B/p40,并且所述第二治疗性转入基因可以编码IL-12A/p35。在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含编码由SEQ ID NO:8的第17-1000位核苷酸、SEQ ID NO:8的第1013-1606位核苷酸和/或SEQ ID NO:8的第17-1606位核苷酸编码的氨基酸序列的核苷酸序列。在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列,或者包含与SEQ ID NO:8具有80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0086] 此外,在某些实施方式中,所述第一和/或第二治疗性转入基因选自IL-23A/p19和IL-12B/p40,它们构成异二聚体细胞因子IL-23。例如,所述第一治疗性转入基因可以编码IL-12B/p40,并且所述第二治疗性转入基因可以编码IL-23A/p19。在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含编码由SEQ ID NO:9的第17-1000位核苷酸、SEQ ID NO:9的第1013-1582位核苷酸和/或SEQ ID NO:9的第17-1582位核苷酸编码的氨基酸序列的核苷酸序列。在某些实施方式中,所述重组腺病毒包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列,或者包含与SEQ ID NO:9具有80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0087] 此外,在某些实施方式中,所述第一和/或第二治疗性转入基因选自IL-27A/p28和IL-27B/EBI3,它们构成异二聚体细胞因子IL-23。

[0088] 序列同一性可以以本领域技术范围之内的各种不同方式来确定,例如使用可公开获得的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。使用被程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx利用的算法的BLAST(基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool)) 分析(Karlin等,(1990) PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 87:2264-2268;Altschul,(1993) J.MOL.EVOL.36,290-300; Altschul等,(1997) NUCLEIC ACIDS RES.25:3389-3402,通过引用并入),被定制用于序列相似性搜索。对于搜索序列数据库中的基本问题的讨论,参见Altschul等,(1994) NATURE GENETICS 6:119-129,其全部通过引用并入。本领域技术人员可以为测量比对,包括为了在待比较的序列的全长上获得最大对齐所需的任何算法,确定适合的参数。用于直方图、描述、比对、期望值(即用于针对数据库序列报告匹配的统计学显著性阈值)、截止值、矩阵和筛选器的搜索参数在缺省设置处。被blastp、blastx、tblastn和tblastx使用的缺省评分矩阵是BLOSUM62矩阵(Henikoff等,(1992) PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 89:10915-10919,全部通过引用并入)。四个blastn参数可以如下调整:Q=10(空隙生成罚分);R=10(空隙扩展罚分);wink=1(在沿着查询的每个wink.sup.th位置处产生词命中率);和gapw=16(设置在其中产生带有空隙的比对的窗口宽度)。等效的Blastp参数设置可以是Q=9;R=2;wink=1;和gapw=32。搜索也可以使用NCBI(National Center for Biotechnology Information)BLAST高级选项参数来进行(例如:-G,开启空隙的成本[Integer]:default=5(对于核苷酸来说)/11(对于蛋白质来说);-E,扩展空隙的成本[Integer]:default=2(对于核苷酸来说)/1(对于蛋白质来说);-q,核苷酸错配的罚分[Integer]:default=-3;-r,核苷酸匹配的奖励[Integer]:default=1;-e,期望值[Real]:default=10;-W,词长[Integer]:default=11(对于核苷酸来说)/28(对于megablast来说)/3(对于蛋白质来说);-y,以比特为单位的blast延长的衰减(X):default=20(对于blastn来说)/7(对于其他来说);-X,带有空隙的比对(以比特为单位)的X衰减值:default=15(对于所有程序来说),不适用于blastn;和-Z,带有空隙的比对(以比特为单位)的最终X衰减值:50(对于blastn来说),25(对于其他来说)。也可以使用用于成对蛋白质比对的ClustalW(缺省参数可以包括例如Blosum62矩阵和空隙开启罚分=10和空隙扩展罚分=0.1)。可以在GCG软件包10.0版中获得的序列之间的Bestfit比较使用DNA参数GAP=50(空隙生成罚分)和LEN=3(空隙扩展罚分),并且在蛋白质比较中的等效设置是GAP=8和LEN=2。

[0089] 在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基因的尺寸在合并时为约500至约5000、约500至约4000、约500至约3000、约500至约2000、约500至约1000、约1000至约5000、约1000至约4000、约1000至约3000、约1000至约2000、约2000至约5000、约2000至约4000、约2000至约3000、约3000至约5000、约3000至约4000或约4000至5000个核苷酸。在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基因的尺寸在合并时为约500至约7000、约500至约6000、约500至约5000、约500至约4000、约500至约3000、约500至约2000、约500至约1000、约1000至约7000、约1000至约6000、约1000至约5000、约1000至约4000、约1000至约3000、约1000至约2000、约2000至约7000、约2000至约6000、约2000至约5000、约2000至约4000、约2000至约3000、约3000至约7000、约3000至约6000、约3000至约5000、约3000至约

4000、约4000至约7000、约4000至约6000、约4000至约5000、约5000至约7000、约5000至约6000或约6000至约7000个核苷酸。

[0090] 在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基因的尺寸在合并时至少为约500至约5000、约500至约4000、约500至约3000、约500至约2000、约500至约1000、约1000至约5000、约1000至约4000、约1000至约3000、约1000至约2000、约2000至约5000、约2000至约4000、约2000至约3000、约3000至约5000、约3000至约4000或约4000至5000个核苷酸。在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基因的尺寸在合并时至少为约500至约7000、约500至约6000、约500至约5000、约500至约4000、约500至约3000、约500至约2000、约500至约1000、约1000至约7000、约1000至约6000、约1000至约5000、约1000至约4000、约1000至约3000、约1000至约2000、约2000至约7000、约2000至约6000、约2000至约5000、约2000至约4000、约2000至约3000、约3000至约7000、约3000至约6000、约3000至约5000、约3000至约4000、约4000至约7000、约4000至约6000、约4000至约5000、约5000至约7000、约5000至约6000或约6000至约7000个核苷酸。

[0091] 在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基因的尺寸在合并时为至少约500、约1000、约2000、约3000、约4000或约5000个核苷酸。在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基因的尺寸在合并时为至少约500、约1000、约2000、约3000、约4000、约5000、约6000或约7000个核苷酸。在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基因的尺寸在合并时为约1600个核苷酸、约1650个核苷酸或约3100个核苷酸。

[0092] 在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入被连接物隔开。所述连接物可以包含可切割位点例如可蛋白水解或不可蛋白水解切割位点或核糖体跳跃序列例如T2A序列。在某些实施方式中,所述第一和第二治疗性转入基因被可蛋白水解切割位点隔开。在某些实施方式中,所述可蛋白水解切割位点被存在于特定组织、细胞器或细胞内区室中的蛋白酶切割。在某些实施方式中,所述连接物包含可蛋白水解切割位点和两个半胱氨酸残基,其在蛋白水解切割后产生二硫键连接。在某些实施方式中,所述可蛋白水解切割位点被选自基质金属蛋白酶(MMP)、弗林蛋白酶、PC1、PC2、PC3、组织蛋白酶B、蛋白酶3和半胱天冬酶3的蛋白酶切割。

[0093] 在某些实施方式中,所述可切割位点是被存在于真核细胞的内质网或高尔基体中的蛋白酶切割的可蛋白水解切割位点。在某些实施方式中,所述可蛋白水解切割位点是弗林蛋白酶可切割位点。弗林蛋白酶是一种广泛表达并集中于高尔基体中的蛋白酶,在高尔基体中它识别共有序列RX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>R (SEQ ID NO:6),其中X<sub>1</sub>是任何氨基酸并且X<sub>2</sub>是Lys或Arg,并在最后一个Arg之后切割。弗林蛋白酶在切割通过高尔基体转运的蛋白质的前肽中发挥生物学作用。因此,在某些实施方式中,所述可蛋白水解切割位点是包含序列RX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>R (SEQ ID NO:6)的弗林蛋白酶可切割位点,其中X<sub>1</sub>是任何氨基酸并且X<sub>2</sub>是Lys或Arg,例如包含序列RAKR (SEQ ID NO:7)的弗林蛋白酶可切割位点。

### [0094] III. 药物组合物

[0095] 对于治疗使用来说,优选地将本文公开的重组腺病毒与可药用载体组合。当在本文中使用,“可药用载体”意味着适合与人类和动物的组织相接触使用而没有过量毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的利益/风险比相称的缓冲剂、载体和赋形剂。所述载体在与配方的其他成分相容并且对接受者无害的意义上是“可接受的”。可药用

载体包括与药物给药相容的缓冲剂、溶剂、分散介质、包衣、等渗和吸收延迟剂等。这些介质和药剂用于制药活性物质的用途，在本领域中是已知的。

[0096] 含有重组腺病毒的药物组合物可以以剂量单元形式存在，并且可以通过任何适合的方法制备。药物组合物应该被配制与它计划的给药途径相容。给药途径的实例是静脉内 (IV)、真皮内、吸入、透皮、局部、透粘膜和直肠给药。有用的配方可以通过制药领域中已知的方法来制备。例如参见《Remington 制药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)，第18版 (Mack Publishing Company, 1990)。适合于肠胃外给药的配方组分包括无菌稀释剂例如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂，抗菌剂例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯，抗氧化剂例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠，螯合剂例如EDTA，缓冲剂例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐，以及用于调节渗透压的药剂例如氯化钠或右旋糖。

[0097] 对于静脉内给药来说，适合的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。所述载体应该在制造和储存的条件下稳定，并且应该被防腐以对抗微生物。所述载体可以是溶剂或分散介质，其含有例如水、乙醇、多元醇 (例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇) 及其适合的混合物。

[0098] 药物配方优选是无菌的。灭菌可以通过任何适合的方法来实现，例如通过无菌过滤膜过滤。在所述组合物被冷冻干燥的情况下，过滤除菌可以在冷冻干燥和重构之前或之后进行。

[0099] 当在本文中使用时，术语“有效量”是指足以实现有益或所需结果的活性组分的量 (例如重组腺病毒的量)。有效量可以在一次或多次给药、施用或剂量中给药，并且不打算限于特定配方或给药途径。

[0100] 在某些实施方式中，活性成分的治疗有效量在0.1mg/kg至100mg/kg的范围内，例如1mg/kg至100mg/kg、1mg/kg至10mg/kg。在某些实施方式中，所述重组腺病毒的治疗有效量在 $10^2$ 至 $10^{15}$ 噬斑形成单位 (pfus) 的范围内，例如 $10^2$ 至 $10^{10}$ 、 $10^2$ 至 $10^5$ 、 $10^5$ 至 $10^{15}$ 、 $10^5$ 至 $10^{10}$ 或 $10^{10}$ 至 $10^{15}$ 噬斑形成单位。给药的量取决于多种变量，例如待治疗的疾病或指征的类型和程度、患者的总体健康、所述活性成分的体内效能、药物配方和给药途径。初始剂量可以提高到超过上限水平，以便快速获得所需的血液水平或组织水平。或者，初始剂量可以低于最适值，并且可以在治疗过程中逐步提高每日剂量。人类剂量可以例如在被设计从0.5mg/kg运行到20mg/kg的常规I期剂量递增研究中进行优化。给药频率可以随着多种因素而变，例如给药途径、剂量、重组腺病毒的血清半衰期和待治疗的疾病。示例性的给药频率是每日一次、每周一次和每两周一次。

#### [0101] IV. 治疗性用途

[0102] 本文中公开的重组腺病毒可用于治疗各种不同的医学指征，例如癌症。当在本文中使用时，“治疗”意味着在对象中，例如在人类中治疗疾病。这包括：(a) 抑制所述疾病，即制止它的发展；和 (b) 减轻所述疾病，即引起所述疾病状态的减退。当在本文中使用时，术语“对象”和“患者”是指将要通过本文描述的方法和组合物治疗的生物体。这些生物体优选地包括但不限于哺乳动物 (例如鼠类、猿猴、马科动物、牛科动物、猪科动物、犬科动物、猫科动物等)，更优选地包括人类。

[0103] 癌症的实例包括实体肿瘤、软组织肿瘤、造血系肿瘤和转移病变。造血系肿瘤的实

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

[0104] 在某些实施方式中,所述癌症选自肛门癌、基底细胞癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、上皮癌、胆管癌、宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、胃食管癌、胃肠 (GI) 癌、胃肠间质瘤、肝细胞癌、妇科癌症、头颈癌、血液癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑素瘤、梅克尔细胞癌、间皮瘤、神经内分泌癌症、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、儿科癌症、前列腺癌、肾细胞癌、肉瘤、皮肤癌、小细胞肺癌、皮肤的鳞状细胞癌、胃癌、睾丸癌和甲状腺癌。

[0105] 在某些实施方式中,所述癌症选自鼻咽癌、基底细胞癌、滑膜癌、肝细胞癌、肾癌、结缔组织的癌症、黑素瘤、肺癌、肠癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、脑癌、喉癌、口腔癌、肝癌、骨癌、胰腺癌、绒膜癌、胃泌素瘤、神经内分泌癌、嗜铬细胞瘤、泌乳素瘤、T-细胞白血病/淋巴瘤、神经瘤、von Hippel-Lindau病、Zollinger-Ellison综合征、肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、输尿管癌、脑癌、少突神经胶质瘤、成神经细胞瘤、脑膜瘤、脊髓肿瘤、骨癌、骨软骨瘤、软骨肉瘤、尤文氏肉瘤、原发位点未知的癌症、类癌、胃肠道的类癌、纤维肉瘤、乳腺癌、佩吉特病、宫颈癌、结肠直肠癌、直肠癌、食管癌、胆囊癌、头癌、眼癌、颈癌、肾癌、维尔姆斯瘤、肝癌、卡波斯肉瘤、前列腺癌、肺癌、睾丸癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、皮肤癌、间皮瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、内分泌胰腺癌、胰高血糖素瘤、胰腺癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、垂体癌、软组织肉瘤、成视网膜细胞瘤、小肠癌、胃癌、胸腺癌、甲状腺癌、滋养层癌、葡萄胎、子宫癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、听神经瘤、蕈样肉芽肿、胰岛素瘤、类癌综合征、生长抑素瘤、牙龈癌、心脏癌、唇癌、脑膜癌、口癌、神经癌、腮腺癌、腹膜癌、咽癌、胸膜癌、唾液腺癌、舌癌和扁桃腺癌。

[0106] 在某些实施方式中,重组腺病毒与一种或多种疗法例如手术、放疗、化疗、免疫疗法、激素疗法或病毒疗法相组合给药到所述对象。在某些实施方式中,重组腺病毒与酪氨酸激酶抑制剂例如埃罗替尼相组合给药。在某些实施方式中,重组腺病毒与检查点抑制剂例如抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体相组合给药。示例性的抗PD-1抗体包括例如纳武单抗 (**Opdivo®**, Bristol-Myers Squibb Co.)、pembrolizumab (**Keytruda®**, Merck Sharp&Dohme Corp.)、PDR001 (Novartis Pharmaceuticals) 和pidilizumab (CT-011, Cure Tech)。示例性的抗PD-L1抗体包括例如阿特珠单抗 (**Tecentriq®**, Genentech)、duvalumab (AstraZeneca)、MEDI4736、avelumab和BMS 936559 (Bristol Myers Squibb Co.)。

[0107] 当在本文中使用时,术语“相组合”给药被理解为意味着在对象被所述障碍困扰的过程中将两种 (或更多种) 不同治疗递送到所述对象,使得在某个时间点所述治疗对所述对象的效果重叠。在某些实施方式中,一种治疗的递送在第二种治疗的递送开始时仍在进行,使得在给药方面存在交叠。这在本文中有时被称为“同时”或“并行递送”。在其他实施方式

中,一种治疗的递送在另一种治疗的递送开始之前结束。在任一种情况的某些实施方式中,治疗由于组合给药而更加有效。例如,所述第二种治疗更加有效,例如使用更少的第二种治疗观察到等同的效果,或者与第二种治疗在不存在第一种治疗的情况下给药的情形中看到的相比,所述第二种治疗以更大的程度减轻症状,或者在使用所述第一种治疗时观察到类似的情况。在某些实施方式中,递送使得症状或与所述障碍相关的其他参数的降低超过在递送一种治疗而不存在另一种治疗的情况下所观察到的。所述两种治疗的效果可以是部分累加、完全累加或高于累加的。所述递送可以使得当第二种治疗被递送时所递送的第一种治疗的效果仍然可被检测到。

[0108] 在某些实施方式中,所述重组病毒的有效量通过在所述对象中测量针对抗原的免疫应答来确定,和/或治疗所述对象的方法还包括在所述对象中测量针对抗原的免疫应答。癌症可能以免疫抑制为特征,并且在所述对象中测量针对抗原的免疫应答可以指示所述对象中免疫抑制的水平。因此,在所述对象中测量针对抗原的免疫应答可以指示装置治疗的效能和/或所述重组病毒的有效量。所述对象中针对所述抗原的免疫应答可以通过本领域中已知的任何方法来测量。在某些实施方式中,针对所述抗原的免疫应答是通过在所述对象的皮肤上的注射位点处注射所述抗原,并在所述注射位点处测量硬结的尺寸或炎症的量来测量的。在某些实施方式中,针对所述抗原的免疫应答是通过所述对象的细胞在暴露到所述抗原后,测量细胞释放的细胞因子(例如干扰素 $\gamma$ 、IL-4和/或IL-5)来测量的。

[0109] 在整个本说明书中,当病毒、组合物和系统被描述为具有、包括或包含特定组分的情况下,或者当过程和方法被描述为具有、包括或包含特定步骤的情况下,可以预期的是,除此之外还存在基本上由所叙述的组分构成或由所叙述的组分构成的本发明的组合物、装置和系统,并且存在基本上由所叙述的过程步骤构成或由所叙述的过程步骤构成的符合本发明的过程和方法。

[0110] 在本申请中,在要素或组分被称为是包含在所叙述的要素或组分的名单中和/或选自所述名单的情况下,应该理解所述要素或组分可以是所叙述的要素或组分中的任一者,或者所述要素或组分可以选自所叙述的要素或组分中的两者或更多者。

[0111] 此外,应该理解,本文中描述的病毒、组合物、系统、方法或过程的要素和/或特点可以以各种不同的方式组合而不背离本发明的精神和范围,不论在本文中是明确说明还是暗示的。例如,在指称特定病毒的情况下,该病毒可用于本发明的组合物的各种不同实施方式和/或本发明的方法中,除非从上下文另有理解。换句话说,在本申请中,实施方式以能够书写并绘制出清楚且简明的申请的方式进行描述和描绘,但计划并且应该认识到实施方式可以进行各种不同的组合或拆分,而不背离本文的教授和发明。例如,应该认识到本文描述和描绘的所有特点可以适用于本文描述和描绘的本发明的所有方面。

[0112] 应该理解,表述“.....中的至少一者”包括在该表述后的每一个所叙述的物体和所叙述的物体中的两者或更多者的各种组合,除非从上下文和使用中另有理解。与三个或更多个叙述物体相结合的表述“和/或”应该被理解为具有相同的意义,除非从上下文另有理解。

[0113] 术语“包括”、“具有”或“含有”、包括其语法等同语的使用,通常应该被理解为开放式和非限制性的,例如不排除另外的未叙述的要素或步骤,除非从上下文另有具体陈述或理解。

[0114] 在本说明书中的各个不同位置处,病毒、组合物、系统、过程和方法或其特点被成组或在范围内公开。它具体来说意指所述描述包括这些组和范围的成员的每一个单个的子组合。作为其他实例,在1至20的范围内的整数具体来说打算单个地公开1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20。

[0115] 当在数量值之前使用术语“约”时,本发明还包括所述特定数量值本身,除非另有具体陈述。当在本文中使用时,术语“约”是指距标称值 $\pm 10\%$ 的变动,除非另有指示或推断。

[0116] 应该理解,步骤的顺序或执行某些行动的顺序是不重要的,只要本发明仍然可行即可。此外,两个或更多个步骤或行动可以同时进行。

[0117] 本文中的任何和所有实例或示例性语言如“例如”或“包括”的使用,仅仅旨在更好地说明本发明,并且除非声明,否则不对本发明的范围构成限制。本说明书中的所有语言都不应该被解释为指示任何未提出权利要求的要素对于本发明的实践来说是必不可少的。

## 实施例

[0118] 下面的实施例仅仅是说明性的,并且不打算以任何方式限制本发明的范围或内容。

[0119] 实施例1:异二聚体IL-12的表达

[0120] 白介素12(IL-12)是一种促进细胞介导的免疫的细胞因子。IL-12含有两条分开的蛋白质链IL-12A/p35和IL-12B/p40,它们组合形成被称为IL-12p70的有活性的异二聚体。本实施例描述了包括IL-12亚基IL-12A/p35和IL-12B/p40两者的人类IL-12异二聚体的表达。

[0121] 对带有一部分5型腺病毒基因组的质粒pAd1进行修饰,以在E1b-19k区的起始位点处带有SalI位点并在所述SalI位点的3'方向200碱基对处带有XhoI位点,以便于治疗性转入基因的插入。所述得到的质粒在后文中被称为pAd1- $\Delta$ 19k。

[0122] 所述修饰的E1b-19k区的核苷酸序列如下,其中来自于融合的SalI和XhoI位点的残留碱基被下划线:

[0123] **ATCTTGGTTACATCTGACCTCGTCGAGTCACCAGGCGCTTTT  
CCAA (SEQ ID NO: 10)。**

[0124] 将编码人类IL-12A/p35的核苷酸序列、然后是脑心肌炎病毒(EMCV)IRES、然后是编码人类IL-12B/p40的核苷酸序列克隆到pAd1- $\Delta$ 19k的修饰的E1b-19k区中。所述得到的质粒在后文中被称为pAd1-hIL-12-IRES。所述插入到E1b-19k区中的编码人类IL-12A/p35的核苷酸序列、然后是EMCV IRES、然后是编码人类IL-12B/p40的核苷酸序列如下所述,其中IL-12A/p35和IL-12B/p40编码区被大写,所述IRES是小写字母,并且包括SalI和XhoI限制性位点的侧翼E1b-19k序列被下划线:

ATCTGACCTCGTCGACATGTGGCCCCCTGGGTCAGCCTCCCA  
GCCACCGCCCTCACCTGCCGCGGCCACAGGTCTGCATCCAGCGGC  
TCGCCCTGTGTCCCTGCAGTGCCGGCTCAGCATGTGTCCAGCGCG  
CAGCCTCCTCCTTGTGGCTACCCTGGTCCTCCTGGACCACCTCAG  
TTTGGCCAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTT  
CCCATGCCTTCACCACTCCCAAAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAA  
CATGCTCCAGAAGGCCAGACAAACTCTAGAATTTTACCCTTGCAC  
TTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCACAAAAGATAAAACCA  
GCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAG  
AGTTGCCTAAATTCCAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGT  
TGCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTT  
AGTAGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAA  
GACCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTT  
TCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAGGC  
[0125] CCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAAATCCTCCCTTGA  
AGAACCGGATTTTTATAAACTAAAATCAAGCTCTGCATACTTCT  
TCATGCTTTCAGAATTCGGGCAGTGACTATTGATAGAGTGATGAG  
CTATCTGAATGCTTCCTAATAAtaacgttactggccgaagccgcttgaataaggccg  
gtgtgcgtttgtctatatgttattttccaccatattgccgtcttttggcaatgtgagggcccgaaacctggccc  
tgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtga  
aggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaaacaacgtctgtagcgacccttgcaggcagcgga  
ccccccacctggcgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggc  
acaaccccagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaa  
caaggggctgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgcacatgc  
tttacatgtgttagtcgaggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtggttttcctttgaaa  
aacacgatgataatATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTTTCCC  
TGGTTTTTCTGGCATCTCCCCTCGTGGCCATATGGGAACTGAAGA  
AAGATGTTTATGTCGTAGAATTGGATTGGTATCCGGATGCCCCTG  
GAGAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGT



ATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGC  
AAAACCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCA  
GTACACCTGTCACAAAGGAGGCGAGGTTCTAAGCCATTCGCTCCT  
GCTGCTTCACAAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATTTT  
AAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTTCTAAGATGCG  
AGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTTCACCTGCTGGTGGCTGACGA  
CAATCAGTACTGATTTGACATTCAGTGTCAAAGCAGCAGAGGCT  
CTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCGGAGCTGCTACACTCTCTG  
CAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTG  
[0126] GAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCAGCTGCTGAGGAGAGTCT  
GCCCATTTGAGGTCATGGTGGATGCCGTTTACAAGCTCAAGTATGA  
AACTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCAAACCTGA  
CCCACCCAAGAACTTGCAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTCGGC  
AGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCA  
CATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGCAAG  
AGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCACGGACAAGACCTC  
AGCCACGGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCATTAGCGTGCGGG  
CCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCGAATGGGCATCTG  
TGCCCTGCAGTTAGTAACTCGAGTCACCAGGCG (SEQ ID NO: 11)。

[0127] 此外,将编码人类IL-12B/p40的核苷酸序列、然后是编码弗林蛋白酶可切割位点(RAKR)的核苷酸序列、然后是编码人类IL-12A/p35的核苷酸序列克隆到pAd1-Δ19k的修饰的E1b-19k区中。所述得到的质粒在后文中被称为pAd1-hIL-12-furin。所述插入到E1b-19k区中的编码人类IL-12B/p40的核苷酸序列、然后是编码弗林蛋白酶可切割位点(RAKR)的核苷酸序列、然后是编码人类IL-12A/p35的核苷酸序列如下所述,其中IL-12B/p40和IL-12A/p35编码区被大写,所述弗林蛋白酶可切割位点编码区是小写字母,并且包括SalI和XhoI限制性位点的侧翼E1b-19k序列被下划线:

[0128] ATCTGACCTCGTCGACATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTC  
TTGGTTTTCCCTGGTTTTTCTGGCATCTCCCCTCGTGGCCATATGG

[0129]

GAAGTGAAGAAAGATGTTTATGTCGTAGAATTGGATTGGTATCCG  
GATGCCCCCTGGAGAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACACCCCTGAA  
GAAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTT  
AGGCTCTGGCAAAACCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAG  
ATGCTGGCCAGTACACCTGTCACAAAGGAGGCGAGGTTCTAAGC  
CATTCGCTCCTGCTGCTTCACAAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCC  
ACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTT  
TCTAAGATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTTCACCTGCTG  
GTGGCTGACGACAATCAGTACTGATTTGACATTCAGTGTCAAAAG  
CAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCGGAGCTG  
CTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGGAGTAT  
GAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCCAGCTGC  
TGAGGAGAGTCTGCCCATGAGGTCATGGTGGATGCCGTTACAA  
GCTCAAGTATGAAAACCTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACAT  
CATCAAACCTGACCCACCCAAGAACTTGCAGCTGAAGCCATTAA  
AGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACACC  
TGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGG  
TCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCAC  
GGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCA  
TTAGCGTGCGGGCCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCG  
AATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTcgtgctaagcgaAGAAACCTCCCCGT  
GGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTCACCACTCCCA  
AAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAGAC  
AAACTCTAGAATTTTACCCTTGCACTTCTGAAGAGATTGATCATG  
AAGATATCACAAAAGATAAAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTA  
CCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCCTAAATTCCAGAGA  
GACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGGCCTCCAGAAAGAC  
CTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTTATGAAGACTTG  
AAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAATGCAAAGCTTCT  
GATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTTCTAGATCAAAACATGCTGGC

AGTTATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAATTTCAACAGTGAGAC  
TGTGCCACAAAAATCCTCCCTTGAAGAACCGGATTTTTATAAAAC  
[0130] TAAAATCAAGCTCTGCATACTTCTTCATGCTTTCAGAATTCGGGC  
AGTGACTATTGATAGAGTGATGAGCTATCTGAATGCTTCCTAACT  
CGAGTCACCAGGCG (SEQ ID NO: 8)。

[0131] 此外,将编码人类IL-12B/p40的核苷酸序列、然后是编码2A肽的核苷酸序列、然后是编码人类IL-12A/p35的核苷酸序列克隆到pAd1-A19k的修饰的E1b-19k区中。所述得到的质粒在后文中被称为pAd1-hIL-12-2A。所述插入到E1b-19k区中的编码人类IL-12B/p40的核苷酸序列、然后是编码2A肽的核苷酸序列、然后是编码人类IL-12A/p35的核苷酸序列如下所述,其中IL-12B/p40和IL-12A/p35编码区被大写,所述2A编码区是小写字母,并且包括SalI和XhoI限制性位点的侧翼E1b-19k序列被下划线:

ATCTGACCTCGTCGACATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTC  
TTGGTTTTCCCTGGTTTTTCTGGCATCTCCCCTCGTGGCCATATGG  
GAACTGAAGAAAGATGTTTATGTCGTAGAATTGGATTGGTATCCG  
GATGCCCCTGGAGAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACACCCCTGAA  
GAAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTT  
AGGCTCTGGCAAAACCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAG  
ATGCTGGCCAGTACACCTGTCAAAAGGAGGCGAGGTTCTAAGC  
CATTCGCTCCTGCTGCTTCACAAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCC  
[0132] ACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTT  
TCTAAGATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTTCACCTGCTG  
GTGGCTGACGACAATCAGTACTGATTTGACATTCAGTGTCAAAAG  
CAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCGGAGCTG  
CTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGGAGTAT  
GAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCAGCTGC  
TGAGGAGAGTCTGCCATTGAGGTCATGGTGGATGCCGTTCAAA  
GCTCAAGTATGAAAACCTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACAT  
CATCAAACCTGACCCACCCAAGAACTTGCAGCTGAAGCCATTAA

AGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACACC  
TGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGG  
TCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCAC  
GGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCA  
TTAGCGTGCGGGCCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCG  
AATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTctttctgaacttcgacctcctcaagttggcgggaga  
cgttgagtccaaccccgggcccAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCA  
GGAATGTTCCCATGCCTTCACCACTCCCAAAACCTGCTGAGGGCC  
GTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAGACAAACTCTAGAATTTTA  
CCCTTGCACTTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCACAAAAGA  
[0133] TAAAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCA  
AGAATGAGAGTTGCCTAAATTCCAGAGAGACCTCTTTCATAACTA  
ATGGGAGTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCC  
TGTGCCTTAGTAGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGG  
AGTTCAAGACCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGG  
CAGATCTTTCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTG  
ATGCAGGCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAAATC  
CTCCCTTGAAGAACCGGATTTTTATAAACTAAAATCAAGCTCTG  
CATACTTCTTCATGCTTTCAGAATTCGGGCAGTGACTATTGATAG  
AGTGATGAGCTATCTGAATGCTTCCTAACTCGAGTCACCAGGCG  
（SEQ ID NO: 12）。

[0134] 所试验的质粒的详细情况示出在表1中。

[0135] 表1

[0136]	质粒	E1b-19k
	pAd1-Δ19k	缺失
	pAd1-hIL-12-IRES	缺失并用IL-12A/p35-IRES-IL-12B/p40代替
	pAd1-hIL-12-furin	缺失并用IL-12B/p40-furin-IL-12A/p35代替
	pAd1-hIL-12-2A	缺失并用IL-12B/p40-2A-IL-12A/p35代替

[0137] 将质粒瞬时转染到HEK-293细胞中。在转染后4天收集调制培养基，并在特异性检测IL-12A/p35和IL-12B/p40亚基的异二聚体的ELISA (Biologend 431704) 中测量IL-12浓度。如图1中所示，所述带有弗林蛋白酶可切割位点的质粒 (pAd1-hIL-12-furin) 与利用IRES (pAd1-hIL-12-IRES) 或2A肽 (pAd1-hIL-12-2A) 的质粒相比引发明显更高的异二聚体IL-12表达。

[0138] 实施例2: 表达IL-12的腺病毒

[0139] 本实施例描述了表达人类IL-12亚基IL-12A/p35和IL-12B/p40的重组5型(Ad5)腺病毒。

[0140] 构建了带有位于E1a起始位点上游-304至-255位置处的核苷酸区的缺失的腺病毒5型病毒,所述缺失使E1a表达成为癌症选择性的(如以前在美国专利号9,073,980中所描述)。所述得到的病毒在后文中被称为TAV。

[0141] 将TAV进一步修饰以在E1b-19k区的起始位点处带有SalI位点并在所述SalI位点的3'方向200碱基对处带有XhoI位点,以便于治疗性转入基因的插入。所述得到的病毒在后文中被称为TAV-Δ19k。所述修饰的E1b-19k区的核苷酸序列如下,其中来自于融合的SalI和XhoI位点的残留碱基被下划线:

**ATCTTGGTTACATCTGACCTCGCTCGAGTCACCAGGCGCTTTT**

[0142]

**CCAA (SEQ ID NO: 10)。**

[0143] TAV-Δ19k在E3区中带有d1309破坏。为了产生带有原本使病毒基因组过大而不能被包装在病毒衣壳中的治疗性转入基因的病毒,将TAV-Δ19k进一步修饰以缺失E3区的完整RIDα、RIDβ和14.7k基因。所述得到的病毒在后文中被称为TAV-Δ19k-ΔE3。所述修饰的E3区的核苷酸序列如下,其中连字符指示缺失的点:

**TCTTTTCTCTTACAGTATGA-TAATAAAAAAAAAATAATAAAG**

[0144]

**CATCACTTA (SEQ ID NO: 13)。**

[0145] 将编码人类IL-12B/p40的核苷酸序列、然后是编码弗林蛋白酶可切割位点(RAKR)的核苷酸序列、然后是编码人类IL-12A/p35的核苷酸序列克隆到TAV-Δ19k-ΔE3的修饰的E1b-19k区中。所述得到的质粒在后文中被称为TAV-hIL-12-furin。所述插入到E1b-19k区中的编码人类IL-12B/p40的核苷酸序列、然后是编码弗林蛋白酶可切割位点的核苷酸序列、然后是编码人类IL-12A/p35的核苷酸序列如下所述,其中IL-12B/p40和IL-12A/p35编码区被大写,所述弗林蛋白酶可切割位点编码区是小写字母,并且包括SalI和XhoI限制性位点的侧翼E1b-19k序列被下划线:

[0146]

ATCTGACCTCGTCGACATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTC  
TTGGTTTTCCCTGGTTTTTCTGGCATCTCCCCTCGTGGCCATATGG  
GAACTGAAGAAAGATGTTTATGTCGTAGAATTGGATTGGTATCCG  
GATGCCCCTGGAGAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACACCCCTGAA  
GAAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTT  
AGGCTCTGGCAAAACCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAG  
ATGCTGGCCAGTACACCTGTCACAAAGGAGGCGAGGTTCTAAGC  
CATTCGCTCCTGCTGCTTCACAAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCC  
ACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTT  
TCTAAGATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTTCACCTGCTG  
GTGGCTGACGACAATCAGTACTGATTTGACATTCAGTGTCAAAAG  
CAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCGGAGCTG  
CTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGGAGTAT  
GAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCCAGCTGC  
TGAGGAGAGTCTGCCCATTGAGGTCATGGTGGATGCCGTTCAAA  
GCTCAAGTATGAAAACCTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACAT  
CATCAAACCTGACCCACCCAAGAACTTGCAGCTGAAGCCATTAA  
AGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACACC  
TGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGG  
TCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCAC  
GGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCA  
TTAGCGTGCGGGCCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCG  
AATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTcggtgctaagcgaAGAAACCTCCCCGT  
GGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTCACCACTCCCA

AAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAGAC  
AAACTCTAGAATTTTACCCTTGCCTTCTGAAGAGATTGATCATG  
AAGATATCACAAAAGATAAAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTA  
CCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCCTAAATTCCAGAGA  
GACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGGCCTCCAGAAAGAC  
CTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTTATGAAGACTTG  
[0147] AAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAATGCAAAGCTTCT  
GATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTTCTAGATCAAAACATGCTGGC  
AGTTATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAATTTCAACAGTGAGAC  
TGTGCCACAAAAATCCTCCCTTGAAGAACCGGATTTTTATAAAAC  
TAAATCAAGCTCTGCATACTTCTTCATGCTTTCAGAATTCGGGC  
AGTGACTATTGATAGAGTGATGAGCTATCTGAATGCTTCCTAACT  
CGAGTCACCAGGCG (SEQ ID NO: 8)。

[0148] 此外,将编码人类IL-12B/p40的核苷酸序列克隆到的TAV- $\Delta$ 19k- $\Delta$ E3的修饰的E1b-19k区中,并将编码人类IL-12A/p35的核苷酸序列克隆到TAV- $\Delta$ 19k- $\Delta$ E3的修饰的E3区中。所述得到的病毒在后文中被称为TAV-hIL-12-Separate。所述插入到E1b-19k区中的编码人类IL-12B/p40的核苷酸序列如下,其中包括SalI和XhoI限制性位点的侧翼E1b-19k序列被下划线:

ATCTGACCTCGTCGACATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTC  
TTGGTTTTCCCTGGTTTTTCTGGCATCTCCCCCTCGTGGCCATATGG  
GAACTGAAGAAAGATGTTTATGTTCGTAGAATTGGATTGGTATCCG  
GATGCCCCTGGAGAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACACCCCTGAA  
GAAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTT  
[0149] AGGCTCTGGCAAAACCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAG  
ATGCTGGCCAGTACACCTGTCACAAAGGAGGCGAGGTTCTAAGC  
CATTCGCTCCTGCTGCTTCACAAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCC  
ACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTT  
TCTAAGATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTTCACCTGCTG  
GTGGCTGACGACAATCAGTACTGATTTGACATTCAAGTGTCAAAAG

CAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCGGAGCTG  
CTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGGAGTAT  
GAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCCAGCTGC  
TGAGGAGAGTCTGCCCATTGAGGTCATGGTGGATGCCGTTACAA  
GCTCAAGTATGAAAACCTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACAT  
CATCAAACCTGACCCACCCAAGAACTTGCAGCTGAAGCCATTAA  
[0150] AGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACACC  
TGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGG  
TCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCAC  
GGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCA  
TTAGCGTGCGGGCCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCG  
AATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTTAGTAACTCGAGTCACCAGGCG  
(SEQ ID NO: 14)。

[0151] 所述插入到E3区中的编码人类IL-12A/p35的核苷酸序列如下,其中侧翼腺病毒序列被下划线:

ATGTTCTTTTCTCTTACAGTATGATTAAATGAGACATGTGGC  
CCCCTGGGTCTGCCTCCCAACCAACCGCCCTCACCTGCCGCGGCCA  
CTGGTCTGCATCCTGCGGCTCGCCCTGTGTCCCTGCAATGCCGGC  
TCTCCATGTGTCCTGCGCGCTCCCTCCTCCTTGTGGCTACCCTGGT  
CCTCCTGGACCACCTCTCTTTGGCCCGAAACCTCCCCGTGGCCAC  
TCCTGACCCTGGAATGTTCCCATGCCTTCACCACTCCCAAAACCT  
GCTGCGGGCCGTCTCCAACATGCTCCAAAAAGCCCGACAAACTCT  
[0152] TGAATTTTACCCTTGCACTTCTGAAGAAATTGATCATGAAGATAT  
CACAAAAGATAAAACCTCCACTGTGGAAGCCTGTTTACCATTGGA  
ATTAACCAAAAATGAATCTTGCCTAAATTCCCGAGAAACCTCTTT  
CATAACTAATGGGTCTTGCCTGGCCTCCCGAAAAACCTCTTTTAT  
GATGGCCCTGTGCCTTTCTTCTATTTATGAAGACTTGAAAATGTA  
CCAAGTGGAATTCAAAACCATGAATGCAAAACTTCTGATGGATC  
CTAAACGGCAAATCTTTCTTGATCAAAACATGCTGGCTGTTATTG  
ATGAACTGATGCAAGCCCTGAATTTCAACTCTGAAACTGTGCCAC



AAAAATCCTCCCTTGAAGAACCGGATTTTTATAAACTAAAATCA  
 AACTCTGCATACTTCTTCATGCTTTCCGAATTCGGGCTGTGACTAT  
 [0153] TGATCGAGTGATGTCCTATCTGAATGCTTCCTAATGAGGTCTCAA  
AGATCTTATTCCCTTTAACTAATAAA (SEQ ID NO: 15)。

[0154] 所试验的质粒的详细情况示出在表2中。

[0155] 表2

病毒	E1A 启动子	E1b-19k 修饰	E3 (RID $\alpha$ 、RID $\beta$ 和 14.7k) 修饰
TAV- $\Delta$ 19k	TAV-255	缺失	破坏(含有 d1309 序列)
[0156] TAV-hIL-12-Separate	TAV-255	缺失并用 IL-12B/p40 代替	缺失并用 IL-12A/p35 代替
TAV -hIL-12-furin	TAV-255	缺失并用 IL-12B/p40-furin-IL-12A/p35 代替	缺失

[0157] 将来自于那些病毒以及对照病毒(d1309)的裂解物的病毒基因组DNA,使用在E1A启动子侧翼的引物、在E1b-19k区侧翼的引物和E3 RID $\alpha$ 、RID $\beta$ 和14.7k区侧翼的引物进行PCR扩增,以确认所需元件的存在。正如在图2中看到的,所述病毒具有所需的特点,即预期尺寸的PCR产物。两种病毒中的IL-12编码区被测序确认。

[0158] 实施例3:表达IL-23的腺病毒

[0159] 本实施例描述了表达人类IL-23亚基IL-23A/p19和IL-12B/p40的重组5型腺病毒(Ad5)。

[0160] 如实施例2中所述产生TAV- $\Delta$ 19k- $\Delta$ E3病毒。将编码人类IL-12B/p40的核苷酸序列、然后是编码弗林蛋白酶可切割位点(RAKR)的核苷酸序列、然后是编码人类IL-23A/p19的核苷酸序列克隆到TAV- $\Delta$ 19k- $\Delta$ E3的修饰的E1b-19k区中。所述得到的病毒在后文中被称为TAV-hIL-23-furin。所述插入到E1b-19k区中的编码人类IL-12B/p40的核苷酸序列、然后是编码弗林蛋白酶可切割位点的核苷酸序列、然后是编码人类IL-23A/p19的核苷酸序列如下所述,其中所述IL-12B/p40和IL-23A/p19编码区被大写,所述弗林蛋白酶可切割位点编码区是小写字母,并且包括SalI和XhoI限制性位点的侧翼E1b-19k序列被下划线:

[0161]

ATCTGACCTCGTCGACATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTC  
TTGGTTTTCCCTGGTTTTTCTGGCATCTCCCCTCGTGGCCATATGG  
GAACTGAAGAAAGATGTTTATGTCGTAGAATTGGATTGGTATCCG  
GATGCCCCTGGAGAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACACCCCTGAA  
GAAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTT  
AGGCTCTGGCAAAACCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAG  
ATGCTGGCCAGTACACCTGTCACAAAGGAGGCGAGGTTCTAAGC  
CATTCGCTCCTGCTGCTTCACAAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCC  
ACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTT  
TCTAAGATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTTCACCTGCTG  
GTGGCTGACGACAATCAGTACTGATTTGACATTCAGTGTCAAAAG  
CAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCGGAGCTG  
CTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGGAGTAT  
GAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCCAGCTGC  
TGAGGAGAGTCTGCCCATTGAGGTCATGGTGGATGCCGTTCAAA  
GCTCAAGTATGAAAACCTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACAT  
CATCAAACCTGACCCACCCAAGAACTTGCAGCTGAAGCCATTAA  
AGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACACC  
TGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGG  
TCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCAC  
GGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCA  
TTAGCGTGCGGGCCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCG  
AATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTcgtgctaagcgaATGCTGGGGAGCAG  
AGCTGTAATGCTGCTGTTGCTGCTGCCCTGGACAGCTCAGGGCAG  
AGCTGTGCCTGGGGGCAGCAGCCCTGCCTGGACTCAGTGCCAGC  
AGCTTTCACAGAAGCTCTGCACACTGGCCTGGAGTGCACATCCAC

TAGTGGGACACATGGATCTAAGAGAAGAGGGAGATGAAGAGACT  
ACAAATGATGTTCCCCATATCCAGTGTGGAGATGGCTGTGACCCC  
CAAGGACTCAGGGACAACAGTCAGTTCTGCTTGCAAAGGATCCA  
CCAGGGTCTGATTTTTTATGAGAAGCTGCTAGGATCGGATATTTT  
CACAGGGGAGCCTTCTCTGCTCCCTGATAGCCCTGTGGGCCAGCT  
[0162] TCATGCCTCCCTACTGGGCCTCAGCCAACTCCTGCAGCCTGAGGG  
TCACCACTGGGAGACTCAGCAGATTCCAAGCCTCAGTCCCAGCCA  
GCCATGGCAGCGTCTCCTTCTCCGCTTCAAATCCTTCGCAGCCT  
CCAGGCCTTTGTGGCTGTAGCCGCCCGGGTCTTTGCCCATGGAGC  
AGCAACCCTGAGTCCCTAACTCGAGTCACCAGGCG (SEQ ID NO:  
9)。

[0163] 实施例4:表达IL-12的腺病毒

[0164] 本实施例描述了使用IRES表达小鼠IL-12亚基IL-12A和IL-12B的重组5型腺病毒(Ad5)。

[0165] 如实施例2中所述产生TAV、TAV- $\Delta$  19k和TAV- $\Delta$  19k- $\Delta$  E3病毒。将编码小鼠IL-12A的核苷酸序列、然后是EMCV IRES、然后是编码小鼠IL-12B的核苷酸序列克隆到TAV- $\Delta$  19k- $\Delta$  E3的修饰的E1b-19k区中。所述得到的病毒在后文中被称为TAV-mIL-12-IRES。所述插入到E1b-19k区中的编码小鼠IL-12A的核苷酸序列、然后是EMCV IRES、然后是编码小鼠IL-12B的核苷酸序列如下所述,其中所述小鼠IL-12B和IL-12A编码区被大写,所述IRES是小写字母,并且侧翼限制性位点和腺病毒序列被下划线:

CTGACCTCGTCGACATGTGTCAATCACGCTACCTCCTCTTTT  
TGGCCACCCTTGCCCTCCTAAACCACCTCAGTTTGGCCAGAGTGA  
TCCCTGTGTCCGGCCCTGCCAGATGCCTGAGCCAGAGCAGAAACC  
[0166] TGCTGAAAACCAACGACGACATGGTGAAAACCGCCAGAGAGAAG  
CTGAAGCACTACAGCTGCACAGCCGAGGACATCGACCACGAGGA  
CATCACCCGGGACCAGACCTCCACCCTGAAAACCTGCCTGCCCCCT  
GGAAGTGCATAAGAACGAGAGCTGCCTGGCCACCCGCGAGACAA

[0167]

GCAGCACCACCAGAGGCAGCTGTCTGCCCCCCCAGAAAACCAGC  
CTGATGATGACCCTGTGCCTGGGCAGCATCTACGAGGACCTGAA  
GATGTACCAGACCGAGTTCCAGGCCATCAACGCCGCCCTGCAGA  
ACCACAACCACCAGCAGATCATCCTGGACAAGGGCATGCTGGTG  
GCCATCGACGAGCTGATGCAGAGCCTGAACCACAACGGCGAAAC  
CCTGAGACAGAAACCCCCCGTGGGCGAGGCCGACCCCTACAGAG  
TGAAGATGAAGCTGTGCATCCTGCTGCACGCCTTCAGCACCAGAG  
TGGTGACAATCAACAGAGTGATGGGCTACCTGAGCAGCGCCTGAt  
aacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgttatttccaccatattgcc  
gtcttttggcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtcttctgacgagcattcctaggggtctttccct  
ctcgccaaaggaatgcaaggtctgtgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttctgaagaca  
aacaacgtctgtagcgaccttgcaggcagcggaacccccacctggcgacaggtgcctctgcggcca  
aaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaacccagtgccacgttgtgagttggatagtt  
gtggaaagagtcaaattggctctcctcaagcgtattcaacaaggggtgaaggatgccagaaggtacccc  
attgtatgggatctgatctggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgttagtcgaggttaaaaaacgtctag  
gccccccgaaccacggggacgtggtttccittgaaaaacacgatgataatATGTGCCCCCAG  
AAGCTGACCATCAGTTGGTTCGCCATCGTGCTGCTGGTGTCCCCC  
CTGATGGCCATGTGGGAGCTGGAAAAGGACGTGTACGTGGTGGA  
AGTGGACTGGACCCCCGACGCCCTGGCGAGACAGTGAACCTGA  
CCTGCGACACCCCCGAAGAGGACGACATCACCTGGACCAGCGAC  
CAGAGACACGGCGTGATCGGCAGCGGCAAGACCCTGACAATCAC  
CGTGAAAGAGTTTCTGGACGCCGGCCAGTACACCTGTCACAAGG  
GCGGCGAGACACTGAGCCACTCCCATCTGCTGCTGCACAAGAAA  
GAGAACGGCATCTGGTCCACCGAGATCCTGAAGAACTTCAAGAA  
CAAGACCTTCCTGAAGTGCGAGGCCCCCAACTACAGCGGCAGAT  
TCACCTGTAGCTGGCTGGTGCAGAGAAACATGGACCTGAAGTTC  
AACATCAAGAGCAGCAGCAGCTCCCCGACAGCAGAGCCGTGAC  
CTGTGGCATGGCCAGCCTGAGCGCCGAGAAAGTGACCCTGGACC  
AGAGAGACTACGAGAAGTACAGCGTGTCTGCTGCCAGGAAGATGTC  
ACCTGCCCCACCGCCGAGGAAACCCTGCCTATCGAGCTGGCCCTG

[0168]

GAAGCCAGACAGCAGAACAATACGAGAACTACTCTACCAGCTT  
CTTCATCCGGGACATCATCAAGCCCGACCCCCCAAGAACCTGCA  
GATGAAGCCCCTGAAGAACAGCCAGGTGGAAGTGTCCTGGGAGT  
ACCCCGACAGCTGGTCCACCCCCACAGCTACTTCAGCCTGAAGT  
TCTTCGTGCGGATCCAGCGCAAGAAAGAAAAGATGAAGGAAACC  
GAGGAAGGCTGCAACCAGAAAGGCGCTTTCCTGGTGGAAAAGAC  
CAGCACCGAGGTGCAGTGCAAGGGCGGCAACGTGTGCGTGCAAGG  
CCCAGGACCGGTACTACAACAGCAGCTGCAGCAAGTGGGCCTGC  
GTGCCCTGTAGAGTGCGCTCTTGACTCGAGTCACCAGGCGCTT

(SEQ ID NO: 23)。

[0169] 试验了TAV-mIL-12-IRES的细胞毒性活性。将ADS-12(小鼠肺癌)细胞用TAV-mIL12-IRES、TAV-Δ19k病毒以10的感染复数(MOI)感染或不用病毒感染,并用结晶紫染色,其将活细胞染成紫色。如图3中所示,TAV-mIL12-IRES保留了细胞毒性活性,尽管与对照TAV-Δ19k病毒相比水平更低。

[0170] 试验了来自于TAV-mIL-12-IRES的IL-12表达。将ADS-12细胞用TAV-Δ19k或TAV-mIL-12-IRES以5的MOI感染。在感染后5天收集调制培养基,并使用特异性针对IL-12异二聚体的ELISA测量IL-12浓度。如图4中所示,用TAV-Δ19k感染的细胞没有可检测的表达,而用TAV-mIL-12-IRES感染的细胞表达67ng/ml的IL-12异二聚体。

[0171] 试验了TAV-mIL-12-IRES的病毒复制。将ADS-12细胞用TAV-mIL12-IRES或TAV-Δ19k以5的MOI感染。在感染后5天收获培养基和细胞裂解物并滴定。病毒复制通过测量每个被感染的ADS-12细胞的噬斑形成单位(PFU)的数目来测定。如图5中所示,与TAV-Δ19k相比,TAV-mIL-12-IRES在ADS-12细胞中以较低水平复制。

[0172] 实施例5:表达IL-12的腺病毒

[0173] 本实施例描述了使用IRES表达人类IL-12亚基IL-12A和IL-12B的重组腺病毒和使用弗林蛋白酶可切割位点表达人类IL-12亚基IL-12A和IL-12B的重组腺病毒。

[0174] 如实施例2中所述产生TAV、TAV-Δ19k、TAV-Δ19k-ΔE3和TAV-hIL-12-furin病毒。此外,将编码人类IL-12A/p35的核苷酸序列、然后是EMCV IRES、然后是编码人类IL-12B/p40的核苷酸序列克隆到TAV-Δ19k-ΔE3的修饰的E1b-19k区中。所述得到的腺病毒在后文中被称为TAV-hIL-12-IRES。所述插入到E1b-19k区中的编码人类IL-12A/p35的核苷酸序列、然后是EMCV IRES、然后是编码人类IL-12B/p40的核苷酸序列如下所述,其中所述IL-12A/p35和IL-12B/p40编码区被大写,所述IRES是小写字母,并且包括SalI和XhoI限制性位点的侧翼E1b-19k序列被下划线:

ATCTGACCTCGTCGACATGTGGCCCCCTGGGTCAGCCTCCCA  
GCCACCGCCCTCACCTGCCGCGGCCACAGGTCTGCATCCAGCGGC  
TCGCCCTGTGTCCCTGCAGTGCCGGCTCAGCATGTGTCCAGCGCG  
CAGCCTCCTCCTTGTGGCTACCCTGGTCCTCCTGGACCACCTCAG  
TTTGGCCAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTT  
CCCATGCCTTCACCACTCCCAAAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAA  
CATGCTCCAGAAGGCCAGACAAACTCTAGAATTTTACCCTTGCAC  
TTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCACAAAAGATAAAACCA  
GCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAG  
AGTTGCCTAAATTCCAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGT  
[0175] TGCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTT  
AGTAGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAA  
GACCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTT  
TCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAGGC  
CCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAAATCCTCCCTTGA  
AGAACCGGATTTTTATAAACTAAAATCAAGCTCTGCATACTTCT  
TCATGCTTTCAGAATTCGGGCAGTGACTATTGATAGAGTGATGAG  
CTATCTGAATGCTTCCTAATAAtaacgttactggccgaagccgcttgaataaggccg  
gtgtgcgtttgtctatatgttattttccaccatattgccgtctttggcaatgtgagggcccgaaacctggccc  
tgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtga  
aggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaaacaacgtctgtagcgacccttgcaggcagcgga

ccccccacctggcgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggc  
acaaccccagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaaattggctctcctcaagcgattcaa  
caaggggctgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgcacatgc  
ttacatgtgttagtcgaggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtgggttttcctttgaaa  
aacacgatgataatATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTTTCCC  
TGGTTTTTCTGGCATCTCCCCTCGTGGCCATATGGGAACTGAAGA  
AAGATGTTTATGTCGTAGAATTGGATTGGTATCCGGATGCCCCTG  
GAGAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGT  
ATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGC  
AAAACCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCA  
GTACACCTGTCACAAAGGAGGCGAGGTTCTAAGCCATTCGCTCCT  
GCTGCTTCACAAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATTTT  
AAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTTCTAAGATGCG  
[0176] AGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTTCACCTGCTGGTGGCTGACGA  
CAATCAGTACTGATTTGACATTCAAGTGTCAAAGCAGCAGAGGCT  
CTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCGGAGCTGCTACACTCTCTG  
CAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTG  
GAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCAGCTGCTGAGGAGAGTCT  
GCCCATGAGGTCATGGTGGATGCCGTTCAAGCTCAAGTATGA  
AACTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCAAACCTGA  
CCCACCCAAGAAGCTTGCAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTCGGC  
AGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCA  
CATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGCAAG  
AGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCACGGACAAGACCTC  
AGCCACGGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCATTAGCGTGCGGG  
CCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCGAATGGGCATCTG  
TGCCCTGCAGTTAGTAACTCGAGTCACCAGGCG (SEQ ID NO: 11)。

[0177] 试验了从TAV-hIL-12-furin和TAV-hIL-12-IRES的IL-12表达。将A549细胞用TAV- $\Delta$  19k、TAV-hIL-12-IRES、TAV-hIL-12-furin以5的MOI感染或不用病毒感染。在感染后4天收集调制培养基,并通过ELISA (Biolegend 431704) 测量IL-12浓度。如图6中所示,从TAV-hIL-12-furin的表达(170ng/ml) 高于从TAV-hIL-12-IRES的表达(23ng/ml)。

[0178] 试验了TAV-hIL-12-furin的细胞毒性活性。将A549细胞用TAV- $\Delta$  19k、TAV-hIL12-

furin以5的MOI感染或不用病毒感染,并用结晶紫染色,其将活细胞染成紫色。如图7中所示,TAV-hIL12-furin保留了与对照TAV- $\Delta$  19k病毒相近水平的细胞毒性活性。

[0179] 试验了TAV-hIL-12-furin和TAV-hIL-12-IRES的病毒复制。将A549细胞用TAV-hIL-12-furin、TAV-hIL-12-IRES或TAV- $\Delta$  19k以5的MOI感染。在感染后6天收获培养基和细胞裂解物并滴定。病毒复制通过测量每个被感染的A549细胞的噬斑形成单位(PFU)的数目来测定。如图8中所示,与TAV-hIL-12-IRES相比,TAV-hIL-12-furin更加高效地复制。

[0180] 实施例6:表达IL-12、IL-23和IL-27的腺病毒

[0181] 本实施例描述了使用弗林蛋白酶可切割位点表达小鼠IL-12、IL-23和IL-27的两个亚基的重组腺病毒。

[0182] 如实施例2中所述产生TAV、TAV- $\Delta$  19k和TAV- $\Delta$  19k- $\Delta$  E3病毒。将编码小鼠IL-12B的核苷酸序列、然后是编码弗林蛋白酶可切割位点(RAKR)的核苷酸序列、然后是编码小鼠IL-12A的核苷酸序列克隆到TAV- $\Delta$  19k- $\Delta$  E3的修饰的E1b-19k区中。所述得到的病毒在后文中被称为TAV-mIL-12-furin。所述插入到E1b-19k区中的编码小鼠IL-12B的核苷酸序列、然后是编码弗林蛋白酶可切割位点的核苷酸序列、然后是编码小鼠IL-12A的核苷酸序列如下所述,其中所述IL-12B和IL-12A编码区被大写,所述弗林蛋白酶可切割位点编码区是小写字母,并且包括SalI和XhoI限制性位点的侧翼E1b-19k序列被下划线:

[0183] **ATCTGACCTCGTCGACATGTGTCCTCAGAAGCTAACCATCTC**  
**CTGTTTGGCCATCGTTTTGCTGGTGTCTCCACTCATGGCCATGTGG**  
**GAGCTGGAGAAAGACGTTTATGTTGTAGAGGTGGACTGGACTCC**  
**CGATGCCCCTGGAGAAACAGTGAACCTCACCTGTGACACGCCTG**



[0184]

AAGAAGATGACATCACCTGGACCTCAGACCAGAGACATGGAGTC  
ATAGGCTCTGGAAAGACCCTGACCATCACTGTCAAAGAGTTTCTA  
GATGCTGGCCAGTACACCTGCCACAAAGGAGGCGAGACTCTGAG  
CCACTCACATCTGCTGCTCCACAAGAAGGAAAATGGAATTTGGTC  
CACTGAAATTTTAAAAAATTTCAAAAACAAGACTTTCCTGAAGTG  
TGAAGCACCAAATTACTCCGGACGGTTCACGTGCTCATGGCTGGT  
GCAAAGAAACATGGACTTGAAGTTCAACATCAAGAGCAGTAGCA  
GTTCCCCTGACTCTCGGGCAGTGACATGTGGAATGGCGTCTCTGT  
CTGCAGAGAAGGTCACACTGGACCAAAGGGACTATGAGAAGTAT  
TCAGTGTCTGCCAGGAGGATGTACCTGCCCAACTGCCGAGGA  
GACCCTGCCCATTGAACTGGCGTTGGAAGCACGGCAGCAGAATA  
AATATGAGAACTACAGCACCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCA  
AACCAGACCCGCCCAAGAACTTGCAGATGAAGCCTTTGAAGAAC  
TCACAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACTCCTGGAGCAC  
TCCCCATTCTACTTCTCCCTCAAGTTCTTTGTTTGAATCCAGCGC  
AAGAAAGAAAAGATGAAGGAGACAGAGGAGGGGTGTAACCAGA  
AAGGTGCGTTCCTCGTAGAGAAGACATCTACCGAAGTCCAATGC  
AAAGGCGGGAATGTCTGCGTGCAAGCTCAGGATCGCTATTACAA  
TTCCTCATGCAGCAAGTGGGCATGTGTTCCCTGCAGGGTCCGATC  
CcggtgctaagcgaAGGGTCATTCCAGTCTCTGGACCTGCCAGGTGTCTT  
AGCCAGTCCCGAAACCTGCTGAAGACCACAGATGACATGGTGAA  
GACGGCCAGAGAAAACTGAAACATTATTCCTGCACTGCTGAAG  
ACATCGATCATGAAGACATCACACGGGACCAAACCAGCACATTG  
AAGACCTGTTTACCACTGGAACCTACACAAGAACGAGAGTTGCCT  
GGCTACTAGAGAGACTTCTTCCACAACAAGAGGGAGCTGCCTGC  
CCCCACAGAAGACGTCTTTGATGATGACCCTGTGCCTTGGTAGCA  
TCTATGAGGACTTGAAGATGTACCAGACAGAGTTCCAGGCCATC  
AACGCAGCACTTCAGAATCACAACCATCAGCAGATCATTCTAGA  
CAAGGGCATGCTGGTGGCCATCGATGAGCTGATGCAGTCTCTGA  
ATCATAATGGCGAGACTCTGCGCCAGAAACCTCCTGTGGGAGAA

GCAGACCCTTACAGAGTGAAAATGAAGCTCTGCATCCTGCTTCAC

[0185] GCCTTCAGCACCCGCGTCGTGACCATCAACAGGGTGATGGGCTAT  
CTGAGCTCCGCTGACTCGAGTCACCAGGCG (SEQ ID NO: 24)。

[0186] 另外,将编码小鼠IL-12B的核苷酸序列、然后是编码弗林蛋白酶可切割位点(RAKR)的核苷酸序列、然后是编码小鼠IL-23A的核苷酸序列克隆到TAV-Δ19k-ΔE3的修饰的E1b-19k区中。所述得到的病毒在后文中被称为TAV-mIL-23-furin。所述插入到E1b-19k区中的编码小鼠IL-12B的核苷酸序列、然后是编码弗林蛋白酶可切割位点的核苷酸序列、然后是编码小鼠IL-23A的核苷酸序列如下所述,其中所述IL-12B和IL-23A编码区被大写,所述弗林蛋白酶可切割位点编码区是小写字母,并且包括SalI和XhoI限制性位点的侧翼E1b-19k序列被下划线:

ATCTGACCTCGTCGACATGTGTCCTCAGAAGCTAACCATCTC  
CTGGTTTGCCATCGTTTTGCTGGTGTCTCCACTCATGGCCATGTGG  
GAGCTGGAGAAAGACGTTTATGTTGTAGAGGTGGACTGGACTCC  
CGATGCCCCTGGAGAAACAGTGAACCTCACCTGTGACACGCCTG  
AAGAAGATGACATCACCTGGACCTCAGACCAGAGACATGGAGTC  
ATAGGCTCTGGAAAGACCCTGACCATCACTGTCAAAGAGTTTCTA  
GATGCTGGCCAGTACACCTGCCACAAAGGAGGCGAGACTCTGAG  
CCACTCACATCTGCTGCTCCACAAGAAGGAAAATGGAATTTGGTC  
CACTGAAATTTTAAAAAATTTCAAAAACAAGACTTTCCTGAAGTG  
[0187] TGAAGCACCAAATTACTCCGGACGGTTCACGTGCTCATGGCTGGT  
GCAAAGAAACATGGACTTGAAGTTCAACATCAAGAGCAGTAGCA  
GTTCCCCTGACTCTCGGGCAGTGACATGTGGAATGGCGTCTCTGT  
CTGCAGAGAAGGTCACACTGGACCAAAGGGACTATGAGAAGTAT  
TCAGTGTCTGCCAGGAGGATGTACCTGCCCAACTGCCGAGGA  
GACCCTGCCCATTGAACTGGCGTTGGAAGCACGGCAGCAGAATA  
AATATGAGAACTACAGCACCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCA  
AACCAGACCCGCCCAAGAACTTGCAGATGAAGCCTTTGAAGAAC  
TCACAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACTCCTGGAGCAC

TCCCCATTCCTACTTCTCCCTCAAGTTCTTTGTTTGAATCCAGCGC  
AAGAAAGAAAAGATGAAGGAGACAGAGGAGGGGTGTAACCAGA  
AAGGTGCGTTCCTCGTAGAGAAGACATCTACCGAAGTCCAATGC  
AAAGGCGGGAATGTCTGCGTGCAAGCTCAGGATCGCTATTACAA  
TTCCTCATGCAGCAAGTGGGCATGTGTTCCCTGCAGGGTCCGATC  
CcgtgctaagcgaGTGCCTAGGAGTAGCAGTCCTGACTGGGCTCAGTGC  
CAGCAGCTCTCTCGGAATCTCTGCATGCTAGCCTGGAACGCACAT  
GCACCAGCGGGACATATGAATCTACTAAGAGAAGAAGAGGATGA  
AGAGACTAAAAATAATGTGCCCGTATCCAGTGTGAAGATGGTT  
[0188] GTGACCCACAAGGACTCAAGGACAACAGCCAGTTCTGCTTGCAA  
AGGATCCGCCAAGGTCTGGCTTTTTATAAGCACCTGCTTGACTCT  
GACATCTTCAAAGGGGAGCCTGCTCTACTCCCTGATAGCCCCATG  
GAGCAACTTCACACCTCCCTACTAGGACTCAGCCAACTCCTCCAG  
CCAGAGGATCACCCCCGGGAGACCCAACAGATGCCCAGCCTGAG  
TTCTAGTCAGCAGTGGCAGCGCCCCCTTCTCCGTTCCAAGATCCT  
TCGAAGCCTCCAGGCCTTTTTGGCCATAGCTGCCCGGGTCTTTGC  
CCACGGAGCAGCAACTCTGACTGAGCCCTTAGTGCCAACAGCTTA  
ACTCGAGTCACCAGGCG (SEQ ID NO: 25)。

[0189] 另外,将编码小鼠IL-27B的核苷酸序列、然后是编码弗林蛋白酶可切割位点(RAKR)的核苷酸序列、然后是编码小鼠IL-27A的核苷酸序列克隆到TAV-Δ19k-ΔE3的修饰的E1b-19k区中。所述得到的病毒在后文中被称为TAV-mIL-27-furin。所述插入到E1b-19k区中的编码小鼠IL-27B的核苷酸序列、然后是编码弗林蛋白酶可切割位点的核苷酸序列、然后是编码小鼠IL-27A的核苷酸序列如下所述,其中所述IL-27B和IL-27A编码区被大写,所述弗林蛋白酶可切割位点编码区是小写字母,并且包括SalI和XhoI限制性位点的侧翼E1b-19k序列被下划线:

ATCTGACCTCGTCGACATGTCCAAGCTGCTCTTCCTGTCACT  
[0190] TGCCCTCTGGGCCAGCCGCTCCCCTGGTTACACTGAAACAGCTCT  
CGTGGCTCTAAGCCAGCCCAGAGTGCAATGCCATGCTTCTCGGTA

[0191]

TCCCGTGGCCGTGGACTGCTCCTGGACTCCTCTCCAGGCTCCCAA  
CTCCACCAGATCCACGTCCTTCATTGCCACTTACAGGCTCGGTGT  
GGCCACCCAGCAGCAGAGCCAGCCCTGCCTACAACGGAGCCCC  
AGGCCTCCCGATGCACCATCCCCGACGTGCACCTGTTCTCCACGG  
TGCCCTACATGCTAAATGTCACTGCAGTGCACCCAGGCGGCGCCA  
GCAGCAGCCTCCTAGCCTTTGTGGCTGAGCGAATCATCAAGCCGG  
ACCCTCCGGAAGGCGTGCGCCTGCGCACAGCGGGACAGCGCCTG  
CAGGTGCTCTGGCATCCCCCTGCTTCCTGGCCCTTCCCGGACATC  
TTCTCTCTCAAGTACCGACTCCGCTACCGGCGCCGAGGAGCCTCT  
CACTTCCGCCAGGTGGGACCCATTGAAGCCACGACTTTCACCCTC  
AGGAACTCGAAACCCCATGCCAAGTATTGCATCCAGGTGTCAGCT  
CAGGACCTCACAGATTATGGGAAACCAAGTGACTGGAGCCTCCC  
TGGGCAAGTAGAAAGTGACCCCCATAAGCCCcgtgctaagcgaTTCCCA  
ACAGACCCCCTGAGCCTTCAAGAGCTGCGCAGGGAATTCACAGT  
CAGCCTGTACCTTGCCAGGAAGCTGCTCTCTGAGGTTTCAGGGCTA  
TGTCACAGCTTTGCTGAATCTCGATTGCCAGGAGTGAACCTGGA  
CCTCCTGCCCCTGGGATACCATCTTCCCAATGTTTCCCTGACTTTC  
CAGGCATGGCATCACCTCTCTGACTCTGAGAGACTCTGCTTCCTC  
GCTACCACACTTCGGCCCTTCCCTGCCATGCTGGGAGGGCTGGGG  
ACCCAGGGGACCTGGACCAGCTCAGAGAGGGAGCAGCTGTGGGC  
CATGAGGCTGGATCTCCGGGACCTGCACAGGCACCTCCGCTTTCA  
GGTGCTGGCTGCAGGATTCAAATGTTCAAAGGAAGAGGAAGACA  
AGGAGGAAGAGGAAGAGGAGGAAGAAGAAGAAAAGAAGCTGCC  
CCTAGGGGCTCTGGGTGGCCCCAATCAGGTGTCATCCCAAGTGTC  
CTGGCCCCAGCTGCTCTATACCTACCAGCTCCTTCACTCCCTGGA  
GCTTGTCCTGTCTCGGGCTGTTTCGGGACCTGCTGCTGCTGTCCCTG  
CCCAGGCGCCCAGGCTCAGCCTGGGATTCTAACTCGAGTCACCA  
GGCG (SEQ ID NO: 26)。

[0192] 试验了从TAV-mIL-12-furin的IL-12表达。将A549细胞用TAV-mIL-12-furin以1、5或10的MOI感染或者不用病毒感染。在感染后的各个不同时间收集调制培养基,并通过ELISA测量IL-12浓度。如图9中所示,IL-12以剂量依赖性和时间依赖性方式表达。

[0193] 试验了从TAV-mIL-23-furin和TAV-mIL-27-furin的IL-23和IL-27表达。将A549细

胞用TAV-mIL-23-furin、TAV-mIL-27-furin以MOI 5感染或不用病毒感染。在感染后4天收集调制培养基,并通过ELISA测量IL-23和IL-27浓度。正如在图10中所示,两种病毒表达相应的异二聚体细胞因子。

[0194] 通过引用并入

[0195] 本文中提到的每个专利文献和科学论文的整个公开内容为所有目的通过引用并入本文。

[0196] 等同性

[0197] 本发明可以以其他特定形式体现而不背离其精神或本质特征。因此,前述实施方式应该在所有情况下被认为是说明性的而不是限制本文描述的发明。因此,本发明的范围由随附的权利要求书而不是上面的描述指明,并且打算将进入权利要求书的意义和等同性范围内的所有变化涵盖在其中。

## 序列表

&lt;110&gt; 埃皮辛特瑞柯斯公司

&lt;120&gt; 多转入基因重组腺病毒

&lt;130&gt; AJ4309PT1914

&lt;150&gt; US 62/484, 841

&lt;151&gt; 2017-04-12

&lt;160&gt; 26

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 35938

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 5 型腺病毒 (Adenovirus type 5)

&lt;400&gt; 1

[0001] catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt 60

ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt 120

gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg 180

gtgtgcgccg gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgcg gttttaggcg gatgtttag 240

taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga 300

agtgaaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tatttgtcta gggccgcggg 360

gactttgacc gtttacgtgg agactcgccc aggtgttttt ctcaggtgtt ttccgcgttc 420

cgggtcaaag ttggcgtttt attattatag tcagctgacg tgtagtgtat ttatacccg 480

tgagttcctc aagaggccac tcttgagtgc cagcgagtag agttttctcc tccgagccgc 540

tccgacaccg ggactgaaaa tgagacatat tatctgccac ggaggtgtta ttaccgaaga 600

aatggccgcc agtcttttgg accagctgat cgaagaggta ctggctgata atcttccacc 660

tcctagccat ttigaaccac ctacccttca cgaactgtat gatttagacg tgacggcccc 720

	cgaagatccc aacgaggagg cggtttcgca gatttttccc gactctgtaa tgttggcggt	780
	gcaggaaggg attgacttac tcacttttcc gccggcgccc ggttctccgg agccgcctca	840
	cctttcccgg cagcccagagc agccggagca gagagccttg ggtccggttt ctatgccaaa	900
	ccttgtaccg gaggtgatcg atcttacctg ccacgaggct ggctttccac ccagtgcga	960
	cgaggatgaa gagggtaggg agtttgtgtt agattatgtg gagcaccgcc ggacacggtg	1020
	caggctctgt cattatcacc ggaggaatac gggggaccca gatattatgt gttcgctttg	1080
	ctatatgagg acctgtggca tgtttgtcta cagtaagtga aaattatggg cagtgggtga	1140
	tagagtgggt ggtttggtgt ggtaattttt ttttaattt ttacagttt gtggtttaaa	1200
	gaattttgta ttgtgatttt tttaaaaggt cctgtgtctg aacctgagcc tgagcccag	1260
	ccagaaccgg agcctgcaag acctaccgc cgtcctaaaa tggcgccctgc tatcctgaga	1320
	cgcccacat cacctgtgtc tagagaatgc aatagtagta cggatagctg tgactccgt	1380
[0002]	ccttctaaca cacctcctga gataccccc gtggccccgc tgtgccccat taaaccagtt	1440
	gccgtgagag ttggtgggcg tcgccaggct gtggaatgta tcgaggactt gcttaacgag	1500
	cctgggcaac ctttgactt gagctgtaaa cgccccaggc cataagggtg aaacctgtga	1560
	ttgcgtgtgt ggtaacgcc ttgtttgtc gaatgagttg atgtaagttt aataaagggt	1620
	gagataatgt ttaacttgca tggcgtgtta aatggggcgg ggcttaaagg gtatataatg	1680
	cgccgtgggc taatcttgggt tacatctgac ctcatggagg cttgggagtg tttggaagat	1740
	ttttctgctg tgcgtaactt gctggaacag agctctaaca gtacctcttg gttttggagg	1800
	tttctgtggg gctcatccca ggcaaagtta gtctgcagaa ttaaggagga ttacaagtgg	1860
	gaatttgaag agcttttgaa atcctgtggt gagctgtttg attctttgaa tctgggtcac	1920
	caggcgcttt tccaagagaa ggtcatcaag actttggatt ttccacacc ggggcgcgct	1980
	gcggctgctg ttgctttttt gagttttata aaggataaat ggagcgaaga aacccatctg	2040

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



	gcaccaggtg cagaccctgc gagtgtggcg gtaaacadat taggaaccag cctgtgatgc	3420
	tggatgtgac cgaggagctg aggcccgatc acttgggtgct ggccctgcacc cgcgctgagt	3480
	ttggctctag cgatgaagat acagattgag gtactgaaat gtgtgggcgt ggcttaaggg	3540
	tgggaaagaa tatataaggt gggggctcta ttagtctttg tatctgtttt gcagcagccg	3600
	ccgccgccat gagcaccaac tcgtttgatg gaagcattgt gagctcatat ttgacaacgc	3660
	gcattgcccc atgggccggg gtgcgtcaga atgtgatggg ctccagcatt gatggtcgcc	3720
	ccgtcctgcc cgcaactct actacctga cctacgagac cgtgtctgga acgccgttgg	3780
	agactgcagc ctccgccgcc gcttcagccg ctgcagccac cgcccgccgg attgtgactg	3840
	actttgcttt cctgagcccg ctgcaagca gtgcagcttc ccgttcaccc gcccgcatg	3900
	acaagttgac ggctcttttg gcacaattgg attctttgac ccgggaactt aatgtcgttt	3960
	ctcagcagct gttggatctg cgccagcagg tttctgccct gaagccttc tcccccca	4020
[0004]	atgcggttta aacataaat aaaaaaccag actctgtttg gatttggatc aagcaagtgt	4080
	cttgcgtctt ttatttaggg gttttgcgcg cgcggtaggc ccgggaccag cggctcgggt	4140
	cgttgagggt cctgtgtatt tttccagga cgtggtaaag gtgactctgg atgttcagat	4200
	acatgggcat aagcccgctt ctgggggtgga ggtagcacca ctgcagagct tcatgctgcg	4260
	gggtgggtgt gtagatgac cagtcgtagc aggagcgtg ggctgtgtgc ctaaaaatgt	4320
	ctttcagtag caagctgatt gccaggggca ggcccttggg gtaagtgttt acaaagcgg	4380
	taagctggga tgggtgcata cgtggggata tgagatgcat cttggactgt atttttaggt	4440
	tggctatgtt ccagccata tccctccggg gattcatgtt gtgcagaacc accagcacag	4500
	tgtatccggt gcacttggga aatttgtcat gtagcttaga aggaaatgcg tggaagaact	4560
	tggagacgcc cttgtgacct ccaagatttt ccatgcattc gtccataatg atggcaatgg	4620
	gccacgggc ggccgctgg gcgaagatat ttctgggatc actaacgtca tagttgtgtt	4680

	ccaggatgag atcgtcatag gccattttta caaagcgcgg gcggagggtg ccagactgcg	4740
	gtataatggt tccatccggc ccaggggcgt agttaccctc acagatttgc atttcccacg	4800
	ctttgagttc agatgggggg atcatgtcta cctgcggggc gatgaagaaa acggtttccg	4860
	gggtagggga gatcagctgg gaagaaagca ggttcctgag cagctgcgac ttaccgcagc	4920
	cggtagggccc gtaaatacaca cctattaccg ggtgcaactg gtagttaaga gagctgcagc	4980
	tgccgtcatc cctgagcagg ggggccactt cgttaagcat gtcctgact cgcatgtttt	5040
	ccctgaccaa atccgccaga aggcgctcgc cgcccagcga tagcagttct tgcaaggaag	5100
	caaagttttt caacggtttg agaccgtccg ccgtaggcat gcttttgagc gtttgaccaa	5160
	gcagttccag gcggtccac agctcggta cctgctctac ggcatctcga tccagcatat	5220
	ctcctcgttt cgcgggttg ggcggctttc gctgtacggc agtagtcggt gctcgtccag	5280
	acgggccagg gtcattgttt tccacgggcg cagggtcctc gtcagcgtag tctgggtcac	5340
[0005]	ggtgaagggg tgcgtccgg gctgcgcgt gccagggtg cgcttgaggc tggctctgct	5400
	ggtgctgaag cgctgccgt cttcgccctg cgcgtcggcc aggtagcatt tgaccatggt	5460
	gtcatagtcc agcccctccg cggcgtggcc cttggcgcgc agcttgccct tggaggaggc	5520
	gccgcacgag gggcagtgca gacttttgag ggcgtagagc ttgggcgcga gaaataccga	5580
	ttccggggag taggcatccg cgccgcaggc cccgcagacg gtctcgcatt ccacgagcca	5640
	ggtgagctct ggccgttcgg ggtcaaaaac caggtttccc ccatgctttt tgatgcgttt	5700
	cttacctctg gtttccatga gccggtgtcc acgctcgggt acgaaaaggc tgtccgtgtc	5760
	cccgtataca gacttgagag gccgtcctc gagcgggtgt ccgcggtcct cctcgtatag	5820
	aaactcggac cactctgaga caaaggctcg cgtccaggcc agcacgaagg aggctaagt	5880
	ggaggggtag cggctgttgt ccactagggg gtccactcgc tccagggtgt gaagacacat	5940
	gtcgccctct tcggcatcaa ggaaggtgat tggttttag gtgtaggcca cgtgaccggg	6000

	tgttcctgaa ggggggctat aaaaggggggt gggggcgctg tcgtcctcac tctcttccgc	6060
	atcgctgtct gcgaggcca gctgttgggg tgagtactcc ctctgaaaag cgggcatgac	6120
	ttctgcgcta agattgtcag ttccaaaaa cgaggaggat ttgatattca cctggcccgc	6180
	ggtgatgcct ttgagggtgg ccgcatccat ctggtcagaa aagacaatct tttgtttgtc	6240
	aagcttggtg gcaaacgacc cgtagagggc gttggacagc aacttggcga tggagcgcag	6300
	ggtttggttt ttgtcgcgat cggcgcgctc cttggccgcg atgttttagct gcacgtattc	6360
	gcgcgcaacg caccgccatt cgggaaagac ggtggtgcgc tcgtcgggca ccaggtgcac	6420
	gcgccaaccg cggttgtgca gggtgacaag gtcaacgctg gtggctacct ctccgcgtag	6480
	gcgctcgttg gtccagcaga ggccggccgc cttgcgcgag cagaatggcg gtagggggtc	6540
	tagctgcgtc tcgtccgggg ggtctgcgtc cacggtaaag accccgggca gcaggcgcgc	6600
[0006]	gtcgaagtag tctatcttgc atccttgcaa gtctagcgcc tgctgccatg cgcgggcggc	6660
	aagcgcgcgc tcgtatgggt tgagtggggg accccatggc atggggtggg tgagcgcgga	6720
	ggcgtacatg ccgcaaatgt cgtaaacgta gaggggctct ctgagtattc caagatatgt	6780
	agggtagcat cttccaccgc ggatgctggc gcgcacgtaa tcgtatagtt cgtgcgaggg	6840
	agcgaggagg tcgggaccga ggttgctacg ggccggctgc tctgctcgga agactatctg	6900
	cctgaagatg gcatgtgagt tggatgatat ggttggacgc tggaagacgt tgaagctggc	6960
	gtctgtgaga cctaccgct caccacgaa ggaggcgtag gagtcgcgca gcttgttgac	7020
	cagctcggcg gtgacctgca cgtctagggc gcagtagtcc agggtttccct tgatgatgtc	7080
	atacttatcc tgtccctttt ttctccacag ctccggttg aggacaaact cttcgcggtc	7140
	ttccagtac tcttggatcg gaaaccgctc ggcctccgaa cggtaagagc ctagcatgta	7200
	gaactggttg acggcctggt aggcgcagca tcccttttct acgggtagcg cgtatgcctg	7260
	cgcggccttc cggagcgagg tgtgggtgag cgcaaagggt tccctgacca tgactttgag	7320

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

	agagggggca ggggcacgtc ggccgcccgc gcgggcagga gctggtgctg cgcgcgtagg	8700
	ttgctggcga acgcgacgac gcggcggttg atctcctgaa tctggcgctt ctgcgtgaag	8760
	acgacggggc cggtagcctt gaggctgaaa gagagtcca cagaatcaat ttcggtgtcg	8820
	ttgacggcgg cctggcgcaa aatctcctgc acgtctcctg agttgtcttg ataggcgatc	8880
	tcggccatga actgctcgat ctcttcctcc tggagatctc cgcgtccggc tcgctccacg	8940
	gtggcgcgga ggtcgttga aatgcgggcc atgagctgcg agaaggcgtt gaggcctccc	9000
	tcgttccaga cgcggctgta gaccacgccc ctttcggcat cgcgggcgcg catgaccacc	9060
	tgcgcgagat tgagctccac gtgccgggcg aagacggcgt agtttcgcag gcgctgaaag	9120
	aggtagttag ggggtgtggc ggtgtgttct gccacgaaga agtacataac ccagcgtcgc	9180
	aacgtggatt cgttgatata cccaaggcc tcaaggcgtt ccatggcctc gtagaagtcc	9240
[0008]	acggcgaagt tgaaaaactg ggagttgcgc gccgacacgg ttaactcctc ctccagaaga	9300
	cggatgagct cggcgacagt gtcgcgcacc tcgcgtcaa aggctacagg ggcctcttct	9360
	tcttcttcaa tctcctcttc cataagggcc tccccttctt cttcttcttg cggcggtggg	9420
	ggagggggga cacggcggcg acgacggcgc accgggaggc ggtcgacaaa gcgctcgatc	9480
	atctccccgc ggcgacggcg catggtctcg gtgacggcgc ggccgttctc gcgggggcgc	9540
	agttggaaga cgccgccgt catgtcccgg ttatgggttg gcggggggct gccatgcggc	9600
	agggatacgg cgctaacgat gcactcaac aattgttgtg taggtactcc gccgccgagg	9660
	gacctgagcg agtccgcac gaccggatcg gaaaacctct cgagaaaggc gtctaaccag	9720
	tcacagtgc aaggtaggct gaggaccgtg gcggcgcgca gcgggcggcg gtcggggttg	9780
	tttctggcgg aggtgctgct gatgatgtaa ttaaagtagg cggctcttgag acggcggatg	9840
	gtcgacagaa gcaccatgtc cttgggtccg gcctgtgtaa tgcgcaggcg gtcggccatg	9900
	cccaggctt cgttttgaca tcggcgcagg tctttgtagt agtcttgcac gaggcttctt	9960

	accggcactt cttcttctcc ttctctttgt cctgcatctc ttgcatctat cgctgcggcg	10020
	gcggcggagt ttggccgtag gtggcgccct cttctctcca tgcgtgtgac cccgaagccc	10080
	ctcatcggt gaagcagggc taggtcggcg acaacgcgct cggctaatat ggcctgtctgc	10140
	acctgcgtga gggtagactg gaagtcattc atgtccacaa agcgggtgta tgcgcccgtg	10200
	ttgatgggtg aagtgcagtt ggccataacg gaccagttaa cggctctggtg acccggtctgc	10260
	gagagctcgg tgtacctgag acgcgagtaa gccctcgagt caaataccta gtcgttgcaa	10320
	gtccgcacca ggtactggta tcccacaaaa aagtgcggcg gcggctggcg gtagaggggc	10380
	cagcgtaggg tggccggggc tccgggggcg agatcttcca acataaggcg atgatatccg	10440
	tagatgtacc tggacatcca ggtgatgccg gcggcgggtg tggaggcgcg cggaaagtcg	10500
	cggacgcggt tccagatgtt gcgcagcggc aaaaagtgtt ccatggtcgg gacgctctgg	10560
	ccggtcaggc gcgcgaatc gttgacgtc tagaccgtgc aaaaggagag cctgtaagcg	10620
[0009]	ggcactcttc cgtggctctg tggataaatt cgcaagggtg tcatggcgga cgaccggggt	10680
	tcgagccccg tatccggccg tccgccgtga tccatgcggt taccgccccg gtgtcgaacc	10740
	caggtgtgcg acgtcagaca acgggggagt gtcctttttg gcttctctcc aggcgcggcg	10800
	gctgctgcgc tagctttttt ggccactggc cgcgcgcagc gtaagcggtt aggctggaaa	10860
	gcgaaagcat taagtggctc gtcacctgta gccggagggt tattttccaa gggttgagtc	10920
	gcgggacccc cggttcgagt ctccgaccgg ccggactgcg gcgaacgggg gtttgctcc	10980
	ccgtcatgca agaccccgt tgcaaattcc tccggaaaca gggacgagcc cttttttgc	11040
	ttttccaga tgcattcgggt gctgcggcag atgcgcccc ctcctcagca gcggcaagag	11100
	caagagcagc ggcagacatg cagggcaccc tcccctctc ctaccgcgtc aggagggcg	11160
	acatccgcgg ttgacgcggc agcagatggt gattacgaac ccccgcgcg ccgggcccgg	11220
	cactacctgg acttgagga gggcgagggc ctggcgcggc taggagcgcc ctctcctgag	11280

	cggtacccaa ggggtgcagct gaagcgtgat acgcgtgagg cgtacgtgcc gcggcagaac	11340
	ctgttttcgcg accgcgaggg agaggagccc gaggagatgc gggatcgaaa gttccacgca	11400
	gggcgcgagc tgcggcatgg cctgaatcgc gagcggttgc tgcgcgagga ggactttgag	11460
	cccgcgcgc gaaccgggat tagtcccgcg cgcgcacacg tggcggccgc cgacctggtg	11520
	accgcatacg agcagacggt gaaccaggag attaaccttc aaaaaagctt taacaaccac	11580
	gtgcgtacgc ttgtggcgcg cgaggagggtg gctataggac tgatgcatct gtgggacttt	11640
	gtaagcgcgc tggagcaaaa cccaaatagc aagccgctca tggcgcagct gttccttata	11700
	gtgcagcaca gcagggacaa cgaggcattc agggatgcgc tgctaaacat agtagagccc	11760
	gagggccgct ggctgctcga ttgataaac atcctgcaga gcatagtggg gcaggagcgc	11820
	agcttgagcc tggctgacaa ggtggccgcc atcaactatt ccatgcttag cctgggcaag	11880
	ttttacgccc gcaagatata ccataccctt tacgttcca tagacaagga ggtaaagatc	11940
[0010]	gaggggttct acatgcgcgcat ggcgctgaag gtgcttacct tgagcgacga cctgggcgtt	12000
	tatcgcaacg agcgcaccca caaggccgtg agcgtgagcc ggccggcgca gctcagcgac	12060
	cgcgagctga tgcacagcct gcaaagggcc ctggctggca cgggcagcgg cgatagagag	12120
	gccgagtcct actttgacgc gggcgctgac ctgcgctggg cccaagccg acgcgccctg	12180
	gaggcagctg gggccggacc tgggctggcg gtggcaccgc cgcgcgctgg caacgtcggc	12240
	ggcgtggagg aatatgacga ggacgatgag tacgagccag aggacggcga gtactaagcg	12300
	gtgatgtttc tgatcagatg atgcaagacg caacggaccc ggcggtgcgg gcggcgctgc	12360
	agagccagcc gtccggcctt aactccacgg acgactggcg ccaggtcatg gaccgcatca	12420
	tgtcgtgac tgcgcgcaat cctgacgcgt tccggcagca gccgcaggcc aaccggctct	12480
	ccgcaattct ggaagcgggtg gtcccggcgc gcgcaaacc caccgacgag aagggtctgg	12540
	cgatcgtaaa cgcgctggcc gaaaacaggg ccattccggc cgacgaggcc ggccctgtct	12600

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



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

	cgcccccgct gcgcaacccg aggtcgagaa gcctcagaag aaaccggtga tcaaaccctt	15300
	gacagaggac agcaagaaac gcagttacaa cctaataagc aatgacagca ccttcaccca	15360
	gtaccgcagc tggtagcttg catacaacta cggcgaccct cagaccggaa tccgtcatg	15420
	gacctgctt tgcactcctg acgtaacctg cggctcggag caggtctact ggtcgttgcc	15480
	agacatgatg caagaccccg tgaccttccg ctccacgcgc cagatcagca actttccgtt	15540
	ggtgggcgcc gagctgttgc ccgtgcactc caagagcttc tacaacgacc aggccgtcta	15600
	ctcccaactc atccgccagt ttacctctct gaccacgtg ttcaatcgtt tccccagaa	15660
	ccagattttg gcgcgcccgc cagccccac catcaccacc gtcagtgaac acgttcctgc	15720
	tctcacagat cacgggacgc taccgtgcgc caacagcacc ggaggagtcc agcagtgac	15780
	cattactgac gccagacgcc gcacctgccc ctacgtttac aaggccctgg gcatagtctc	15840
	gccgcgcgtc ctatcgagcc gcactttttg agcaagcatg tccatcctta tatcgcccag	15900
[0013]	caataacaca ggctggggcc tgcgcttccc aagcaagatg ttggcgggg ccaagaagcg	15960
	ctccgaccaa caccagtgcc gcgtgcgcgg gcactaccgc gcgccctggg gcgcgcacaa	16020
	acgcggccgc actgggcgca ccaccgtcga tgacgccacc gacgcggtgg tggaggaggc	16080
	gcgcaactac acgccacgc cgccaccagt gtccacagtg gacgcggcca ttcagaccgt	16140
	ggtgcgcgga gcccggcgt atgctaaaat gaagagacgg cggaggcgcg tagcacgtcg	16200
	ccaccgccgc cgaccggcga ctgccgcca acgcgcggcg gcggccctgc ttaaccgcgc	16260
	acgtcgcacc ggccgacggg cggccatgcg ggccgctcga aggttgccg cggtattgt	16320
	cactgtgccc ccaggtcca ggcgacgagc ggccgccga gcagccgagg ccattagtgc	16380
	tatgactcag ggtcgcaggg gcaacgtgta ttgggtgcgc gactcgttta gcggcctgcg	16440
	cgtgcccgtg cgcacccgcc ccccgcgcaa ctagattgca agaaaaact acttagactc	16500
	gtactgttgt atgtatccag cggcggcggc gcgcaacgaa gctatgtcca agcgcaaat	16560

	caaagaagag atgctccagg tcatcgcgcc ggagatctat ggcccccgga agaaggaaga	16620
	gcaggattac aagccccgaa agctaaagcg ggtcaaaaag aaaaagaaag atgatgatga	16680
	tgaacttgac gacgaggtgg aactgctgca cgctaccgcg cccaggcgac gggtagctg	16740
	gaaaggctga cgcgtaaaac gtgttttgcg acccggcacc accgtagtct ttacgcccgg	16800
	tgagcgctcc acccgcacct acaagcgct gtatgatgag gtgtacggcg acgaggacct	16860
	gcttgagcag gccaacgagc gcctcgggga gtttgcctac ggaaagcggc ataaggacat	16920
	gctggcggtg ccgctggacg agggcaaccc aacacctagc ctaaagcccg taacttgca	16980
	gcagggtctg cccgcgcttg caccgtccga agaaaagcgc ggccctaaagc gcgagtctgg	17040
	tgacttggca cccaccgtgc agctgatggt acccaagcgc cagcgactgg aagatgtctt	17100
	ggaaaaaatg accgtggaac ctgggctgga gcccaggtc cgcgtgcggc caatcaagca	17160
[0014]	ggtggcgccg ggactgggcg tgcagaccgt ggacgttcag ataccacta ccagtagcac	17220
	cagtattgcc accgccacag agggcatgga gacacaaacg tccccggtg cctcagcgg	17280
	ggcggatgcc gcggtgcagg cggtcgctgc ggccgcgtcc aagacctcta cggaggtgca	17340
	aacggacccg tggatgtttc gcgtttcagc cccccggcg cgcgcggtt cgaggaagta	17400
	cggcgccgcc agcgcgtac tgcccgaata tgccctacat ccttccattg cgcctacccc	17460
	cggctatcgt ggctacacct accgccccag aagacgagca actaccgac gccgaaccac	17520
	cactggaacc cgcgccgcc gtcgccgtc ccagcccgtg ctggccccga ttccgtgcg	17580
	cagggtggct cgcgaaggag gcaggacct ggtgctgcca acagcgcgt accaccccag	17640
	catcgtttaa aagccggtct ttgtggttct tgcagatatg gccctacct gccgcctccg	17700
	tttcccggtg ccgggattcc gaggaagaat gcaccgtagg aggggcatgg ccggccacgg	17760
	cctgacgggc ggcatgcgtc gtgcgcacca ccggcggcgg cgcgcgtcgc accgtcgc	17820
	gcgcggcggt atcctgcccc tccttattcc actgatcgcc gcggcgattg gcgccgtgcc	17880

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

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

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

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

	atcataatgc ttccgtgtag acacttaagc tcgccttcga tctcagcgca gcggtgcagc	23220
	cacaacgcgc agcccgtagg ctcgtgatgc ttgtaggtca cctctgcaa cgactgcagg	23280
	tacgcctgca ggaatcgccc cafcacgtgc acaaaggtct tgttgctggt gaaggtcagc	23340
	tgcaaccgcg ggtgctctc gttcagccag gtcttgcata cggccgccag agcttcact	23400
	tggtcaggca gtagtttgaa gttgccttt agatcgttat ccacgtggta cttgtccatc	23460
	agcgcgcgcg cagcctccat gcccttctcc cacgcagaca cgatcggcac actcagcggg	23520
	ttcatcaccg taatttcaact ttccgcttcg ctgggctctt cctcttcctc ttgcgtccgc	23580
	ataccacgcg ccaactgggtc gtcttcattc agccgccgca ctgtgcgctt acctccttg	23640
	ccatgcttga ttagcaccgg tgggttgctg aaaccaccca tttgtagcgc cacatcttct	23700
	ctttcttct cgtgtccac gattacctct ggtgatggcg ggcgctcggg cttgggagaa	23760
	ggcgcttct ttttcttctt gggcgcaatg gccaaatccg ccgccgaggt cgatggccgc	23820
[0019]	gggctgggtg tgcgcggcac cagcgctct tgtgatgagt cttctcgtc ctcggactcg	23880
	atacgccgcc tcatccgctt ttttgggggc gccggggag gcggcggcga cggggacggg	23940
	gacgacacgt cctccatggt tgggggacgt cgcgccgcac cgcgtccgc ctcgggggtg	24000
	gtttcgcgt gctcctctc ccgactggcc atttcttct cctataggca gaaaaagatc	24060
	atggagtcag tcgagaagaa ggacagccta accgccccct ctgagttcgc caccaccgcc	24120
	tccaccgatg ccgccaacgc gcctaccacc ttccccgtc aggcaccccc gcttgaggag	24180
	gaggaagtga ttatcgagca ggaccaggt tttgtaagcg aagacgacga ggaccgtca	24240
	gtaccaacag aggataaaaa gcaagaccag gacaacgcag aggcaaacga ggaacaagtc	24300
	ggcgggggg acgaaaggca tggcgactac ctagatgtgg gagacgacgt gctgttgaag	24360
	catctgcagc gccagtgcg cattatctgc gacgcgttgc aagagcgag cgatgtgccc	24420
	ctcgccatag cggatgtcag ccttgcctac gaacgccacc tattctcacc gcgcgtaccc	24480



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

	aattcgcagc tgcttaacga aagtcaaatt atcggtagct ttgagctgca gggtcctcgc	25860
	cctgacgaaa agtccgcggc tccgggggtg aaactcactc cggggctgtg gacgtcggct	25920
	taccttcgca aatttgtacc tgaggactac cagccccacg agattaggtt ctacgaagac	25980
	caatcccgcc cgccaaatgc ggagcttacc gcctgcgtca ttaccagagg ccacattctt	26040
	ggccaattgc aagccatcaa caaagccccg caagagtctc tgctacgaaa gggacggggg	26100
	gtttacttgg acccccagtc cggcgaggag ctcaacccaa tcccccgcc gccgcagccc	26160
	tatcagcagc agccgcgggc ccttgcttcc caggatggca cccaaaaaga agctgcagct	26220
	gccgccgcca cccacggacg aggaggaata ctgggacagt caggcagagg aggttttggg	26280
	cgaggaggag gaggacatga tgaagactg ggagagccta gacgaggag cttccgaggt	26340
	cgaagaggtg tcagacgaaa caccgtcacc ctgggtcgca ttccctcgc cggcgcccca	26400
	gaaatcggca accggttcca gcatggctac aacctccgt cctcaggcgc cgccggcact	26460
[0021]	gcccgttcgc cgacccaacc gtagatggga caccactgga accagggccg gtaagtcaa	26520
	gcagccgccg ccgttagccc aagagcaaca acagcgccaa ggctaccgt catggcgcg	26580
	gcacaagaac gccatagttg cttgcttgca agactgtggg ggcaacatct ccttcgccc	26640
	ccgctttctt ctctaccatc acggcgtggc cttccccgt aacatcctgc attactaccg	26700
	tcctctctac agccatact gcaccggcgg cagcggcagc ggcagcaaca gcagcgcca	26760
	cacagaagca aaggcgaccg gatagcaaga ctctgacaaa gccaagaaa tccacagcg	26820
	cggcagcagc aggaggagga gcgtgcgtc tggcgcccaa cgaaccgta tcgaccgcg	26880
	agcttagaaa caggattttt cccactctgt atgtatatatt tcaacagagc aggggccaag	26940
	aacaagagct gaaaataaaa aacaggtctc tgcgctccct caccgcagc tgcctgtatc	27000
	acaaaagcga agatcagctt cggcgcacgc tggaagacgc ggaggctctc ttcagtaaat	27060
	actgcgcgct gactcttaag gactagtctc gcgcccttct tcaaatttaa gcgcgaaaac	27120

	tacgtcatct ccagcggcca caccggcg cagcacctgt cgtcagcgcc attatgagca	27180
	aggaaattcc cagccctac atgtggagt accagccaca aatgggactt gcggctggag	27240
	ctgccaaga ctactcaacc cgaataaact acatgagcgc gggacccac atgatatccc	27300
	gggtcaacgg aatccgcgc caccgaaacc gaattctctt ggaacaggcg gctattacca	27360
	ccacacctcg taataacctt aatccccgta gttggccgc tgcctgggtg taccaggaaa	27420
	gtcccgtcc caccactgtg gtacttccca gagacgcca ggccgaagt cagatgacta	27480
	actcaggggc gcagcttgcg ggcggcttgc gtcacagggt gcggtcgccc gggcagggtg	27540
	taactcacct gacaatcaga gggcgaggta ttacagctca cgacgagtcg gtgagctcct	27600
	cgcttgggtc cgtccggac gggacatttc agatcgccgg cgccggccgt ccttcattca	27660
	cgccctgta ggcaatccta actctgcaga cctcgtctc tgagccgcgc tctggaggca	27720
	ttggaactct gcaatttatt gaggagtttg tgccatcggt ctactttaac ccttctcgg	27780
[0022]	gacctcccg ccactatccg gatcaattta ttccctaact tgacgcggtg aaggactcgg	27840
	cggacggcta cgactgaatg ttaagtggag aggacagca actgcgcctg aaacacctgg	27900
	tccactgtcg ccgccacaag tgctttgccc gcgactccgg tgagttttgc tactttgaat	27960
	tgcccgagga tcatatcgag gggccggcg acggcgccg gcttaccgcc caggagagc	28020
	ttgcccgtag cctgattcgg gattttacc agcggccct gctagttgag cgggacagg	28080
	gacctgtgt tctactgtg atttgcaact gtcctaact tggattacat caagatctt	28140
	gttgccatct ctgtgctgag tataataaat acagaaatta aaatatactg gggtcctat	28200
	cgccatcctg taaacgccac cgtcttcacc cgccaagca aaccaaggcg aaccttacct	28260
	ggtactttta acatctctcc ctctgtgatt tacaacagtt tcaaccaga cggagtgagt	28320
	ctacgagaga acctctccga gctcagctac tccatcagaa aaaacaccac cctccttacc	28380
	tgccgggaac gtacagtg ctcaccggcc gctgcaccac acctaccgcc tgaccgtaaa	28440

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

	cttacagtat gattaaatga gacatgattc ctcgagtttt tatattactg acccttgttg	29820
	cgcttttttg tgcgtgctcc acattggctg cggtttctca catcgaagta gactgcattc	29880
	cagccttcac agtctatttg ctttacggat ttgtcacct cagctcatc tgcagcctca	29940
	tcactgtggt catcgcttt atccagtga ttgactgggt ctgtgtgccc tttcatatc	30000
	tcagacacca tccccagtac agggacagga ctatagctga gcttcttaga attctttaat	30060
	tatgaaatth actgtgactt ttctgtgat tatttgacc ctatctgctg tttgttcccc	30120
	gacctccaag cctcaaagac atatatcatg cagattcact cgtatatgga atattccaag	30180
	ttgctacaat gaaaaaagcg atctttccga agcctgggta tatgcaatca tctctgttat	30240
	gggtgtctgc agtaccatct tagccctagc tatatatccc taccttgaca ttggctggaa	30300
	acgaatagat gccatgaacc acccaacttt ccccgcccc gctatgcttc cactgcaaca	30360
	agttgttgcc ggcggtttg tcccagccaa tcagcctcgc cccacttctc ccacccccac	30420
[0024]	tgaaatcagc tactttaatc taacaggagg agatgactga caccctagat ctagaaatgg	30480
	acggaattat tacagagcag cgctgctag aaagacgcag ggcagcggcc gagcaacagc	30540
	gcatgaatca agagctccaa gacatgggta acttgacca gtgcaaaagg ggtatctttt	30600
	gtctggtaaa gcaggccaaa gtcacctacg acagtaatac caccggacac cgccttagct	30660
	acaagttgcc aaccaagcgt cagaaattgg tggatcatgtt gggagaaaag cccattacca	30720
	taactcagca ctcggtagaa accgaaggt gcatcactc acctgtgcaa ggacctgagg	30780
	atctctgcac ccttattaag accctgtgcg gtctcaaaga tcttattccc tttactaat	30840
	aaaaaaaaat aataaagcat cacttactta aatcagtta gcaaatttct gtccagttha	30900
	ttcagcagca cctccttgcc ctctcccag ctctggtatt gcagcttctt cctggctgca	30960
	aactttctcc acaatctaaa tggaatgtca gtttctctt gttctgtcc atccgcaccc	31020
	actatcttca tgttgttgca gatgaagcgc gcaagaccgt ctgaagatac cttcaacccc	31080

	gtgtatccat atgacacgga aaccggtcct ccaactgtgc cttttcttac tcctcccttt	31140
	gtatccccca atgggtttca agagagtccc cctggggtac tctctttgcg cctatccgaa	31200
	cctctagtta cctccaatgg catgcttgcg ctcaaatgg gcaacggcct ctctctggac	31260
	gaggccggca accttacctc ccaaatgta accactgtga gccacacctt caaaaaaacc	31320
	aagtcaaaca taaacctgga aatatctgca cccctcacag ttacctcaga agccctaact	31380
	gtggctgceg ccgcacctct aatggctcgc ggcaacacac tcaccatgca atcacaggcc	31440
	ccgctaaccg tgcacgactc caaacttagc attgccaccc aaggaccctt cacagtgtca	31500
	gaaggaaagc tagccctgca aacatcaggc cccctcacca ccaccgatag cagtaccctt	31560
	actatcactg cctcaccccc tctaactact gccactggta gcttgggcat tgacttgaaa	31620
	gagcccattt atacacaaaa tggaaaacta ggactaaagt acggggctcc ttgcatgta	31680
	acagacgacc taaacacttt gaccgtagca actggctcag gtgtgactat taataatact	31740
[0025]	tccttgcaaa ctaaagtac tggagccttg ggttttgatt cacaaggcaa tatgcaactt	31800
	aatgtagcag gaggactaag gattgattct caaacagac gccttatact tgatgttagt	31860
	tatccgtttg atgctcaaaa ccaactaaat ctaagactag gacagggccc tctttttata	31920
	aactcagccc acaacttgga tattaactac acaaaaggcc tttacttgtt tacagcttca	31980
	aacaattcca aaaagcttga ggtaaccta agcactgcca aggggttgat gtttgacgct	32040
	acagccatag ccattaatgc aggagatggg cttgaatttg gttcacctaa tgcaccaaac	32100
	acaaatcccc tcaaaacaaa aattggccat ggcctagaat ttgattcaaa caaggctatg	32160
	gttcctaaac taggaactgg ccttagtttt gacagcacag gtgccattac agtaggaaac	32220
	aaaaataatg ataagctaac ttgtggacc acaccagctc catctcctaa ctgtagacta	32280
	aatgcagaga aagatgctaa actcactttg gtcttaacaa aatgtggcag tcaaatactt	32340
	gctacagttt cagttttggc tgtaaaggc agtttggtc caatatctgg aacagttcaa	32400

	agtgctcatc ttattataag atttgacgaa aatggagtg cactaaacaa ttccttcctg	32460
	gaccagaat attggaactt tagaaatgga gatcttactg aaggcacagc ctatacaaac	32520
	gctgttgat ttatgcctaa cctatcagct tatccaaaat ctcacggtaa aactgccaaa	32580
	agtaacattg tcagtcaagt ttactttaa gggagacaaaa ctaaacctgt aacactaacc	32640
	attacactaa acggtacaca ggaaacagga gacacaactc caagtgcata ctctatgtca	32700
	ttttcatggg actggctctg ccacaactac attaatgaaa tatttgccac atcctcttac	32760
	actttttcat acattgcccc agaataaaga atcgtttgtg ttatgtttca acgtgtttat	32820
	ttttcaattg cagaaaattt caagtcattt ttcatcagc agtatagccc caccaccaca	32880
	tagcttatac agatcacctg accttaatca aactcacaga accctagtat tcaacctgcc	32940
	acctccctcc caacacacag agtacacagt cttttctccc cggttggcct taaaaagcat	33000
	catacatggt gtaacagaca tattcttagg tggttatatt cacacgggtt cctgtcgagc	33060
[0026]	caaacgctca tcagtcatat taataaactc cccgggcagc tcacttaagt tcattgtcgt	33120
	gtccagctgc tgagccacag gctgctgtcc aacttgcggt tgcttaacgg gcggcgaagg	33180
	agaagtcac gcctacatgg gggtagagtc ataatcgtgc atcaggatag ggcggtggtg	33240
	ctgcagcagc gcgcgaataa actgctgccg ccgccgtcc gtctgcagg aatacaacat	33300
	ggcagtggtc tcctcagcga tgattcgac cgccgcagc ataaggcgcc ttgtctccg	33360
	ggcacagcag cgcacctga tctacttaa atcagcacag taactgcagc acagcaccac	33420
	aatattgttc aaaatccac agtgcaaggc gctgtatcca aagctcatgg cggggaccac	33480
	agaaccacg tggccatcat accacaagc caggtagatt aagtggcgac cctcataaa	33540
	cacgtggac ataaacatta cctcttttgg catgttgtaa ttcaccacct cccggtacca	33600
	tataaacctc tgattaaaca tggcgccatc caccaccatc ctaaaccagc tggccaaaac	33660
	ctgcccgcg gtatacact gcaggaacc gggactggaa caatgacagt ggagagccca	33720

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



	aggtaagctc cggaaccacc acagaaaaag acaccatitt tctctcaa acgtctgcgg	35100
	gtttctgcat aaacacaaaa taaaataaca aaaaaacatt taaacattag aagcctgtct	35160
	tacaacagga aaaacaaccc ttataagcat aagacggact acggccatgc cggcgtgacc	35220
	gtaaaaaac tggtcaccgt gattaaaaag caccaccgac agctcctcgg tcatgtccgg	35280
	agtcataatg taagactcgg taaacacatc aggttgattc acatcgggtca gtgctaaaaa	35340
	gcgaccgaaa tagcccgagg gaatacatac ccgcaggcgt agagacaaca ttacagcccc	35400
	cataggaggt ataacaaaat taataggaga gaaaaacaca taaacacctg aaaaaccctc	35460
	ctgcctaggc aaaatagcac cctcccgtc cagaacaaca tacagcgctt ccacagcggc	35520
	agccataaca gtcagcctta ccagtaaaaa agaaaaccta ttaaaaaaac accactcgac	35580
	acggcaccag ctcaatcagt cacagtgtaa aaaaggcca agtgcagagc gagtatatat	35640
	aggactaaaa aatgacgtaa cggttaaagt ccacaaaaa caccagaaa accgcacgcg	35700
[0028]	aacctacgcc cagaaacgaa agccaaaaa cccacaactt cctcaaatcg tcaattccgt	35760
	tttccacgt tacgtaactt cccattttaa gaaaactaca attcccaaca catacaagtt	35820
	actccgccct aaaacctaag tcacccgccc cgttcccacg ccccgcgcca cgtcacaac	35880
	tccacccct cattatcata ttggcttcaa tccaaaataa ggtatattat tgatgatg	35938
	<210> 2	
	<211> 8	
	<212> DNA	
	<213> 5 型腺病毒 (Adenovirus type 5)	
	<400> 2	
	ctgacctc	8
	<210> 3	
	<211> 8	
	<212> DNA	

	<213> 5 型腺病毒 (Adenovirus type 5)	
	<400> 3	
	tcaccagg	8
	<210> 4	
	<211> 10	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> TAV-255 缺失产生的序列	
	<400> 4	
	ggtgttttgg	10
	<210> 5	
	<211> 9	
	<212> DNA	
[0029]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 示例性 E1A 启动子 TATA 框缺失产生的序列	
	<400> 5	
	ctaggactg	9
	<210> 6	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 弗林蛋白酶切割位点 (Furin cleavage site)	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (2).. (2)	
	<223> Xaa 可以是任何天然氨基酸	

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa 可以是 Lys 或 Arg

<400> 6

Arg Xaa Xaa Arg  
1

<210> 7  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
<223> 弗林蛋白酶切割位点 (Furin cleavage site)

<400> 7

[0030] Arg Ala Lys Arg  
1

<210> 8  
<211> 1622  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
<223> IL-12B / p40-弗林蛋白酶-修饰的 E1b-19k 区域中的 IL-12A / p35

<400> 8  
atctgacctc gtcgacatgt gtcaccagca gttggtcatc tcttggtttt ccctggtttt 60  
tctggcatct cccctcgtgg ccatatggga actgaagaaa gatgtttatg tcgtagaatt 120  
ggattggtat ccggatgcc ctggagaaat ggtggtcctc acctgtgaca cccctgaaga 180  
agatggatc acctggacct tggaccagag cagtgaggtc ttaggctctg gcaaaaccct 240  
gaccatccaa gtcaaagagt ttggagatgc tggccagtac acctgtcaca aaggaggcga 300

	ggttctaagc cattcgctcc tgctgcttca caaaaaggaa gatggaattt ggtccactga	360
	tattttaaag gaccagaaag aacccaaaaa taagaccttt ctaagatgcg aggccaagaa	420
	ttattctgga cgtttcacct gctgggtggct gacgacaatc agtactgatt tgacattcag	480
	tgtcaaaagc agcagaggct cttctgaccc ccaaggggtg acgtgcggag ctgctacact	540
	ctctgcagag agagtcagag gggacaacaa ggagtatgag tactcagtgg agtgccagga	600
	ggacagtgcc tgcccagctg ctgaggagag tctgcccatt gaggtcatgg tggatgccgt	660
	tcacaagctc aagtatgaaa actacaccag cagcttcttc atcagggaca tcatcaaacc	720
	tgaccacccc aagaactgc agctgaagcc attaaagaat tctcggcagg tggaggtcag	780
	ctgggagtac cctgacacct ggagtactcc acattcctac ttctccctga cattctgcgt	840
	tcaggtccag ggcaagagca agagagaaaa gaaagataga gtcttcacgg acaagacctc	900
	agccacggtc atctgccgca aaaatgccag cattagcgtg cgggcccagg accgtacta	960
[0031]	tagctcatct tggagcgaat gggcatctgt gccctgcagt cgtgctaagc gaagaaacct	1020
	ccccgtggcc actccagacc caggaatggt cccatgcctt caccactccc aaaacctgct	1080
	gagggccgtc agcaacatgc tccagaaggc cagacaaact ctagaatttt acccttgcac	1140
	ttctgaagag attgatcatg aagatatcac aaaagataaa accagcacag tggaggcctg	1200
	tttaccattg gaattaacca agaatgagag ttgcctaaat tccagagaga cctctttcat	1260
	aactaatggg agttgcctgg cctccagaaa gacctctttt atgatggccc tgtgccttag	1320
	tagtatttat gaagacttga agatgtacca ggtggagtgc aagaccatga atgcaaagct	1380
	tctgatggat cctaagaggc agatctttct agatcaaaac atgctggcag ttattgatga	1440
	gctgatgcag gccctgaatt tcaacagtga gactgtgcca caaaaatcct cccttgaaga	1500
	accggatttt tataaaacta aaatcaagct ctgcatactt ctcatgctt tcagaattcg	1560
	ggcagtgact attgatagag tgatgagcta tctgaatgct tcctaactcg agtcaccagg	1620

cg	1622
<210> 9	
<211> 1598	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> IL-12B / p40-弗林蛋白酶-修饰的 E1b-19k 区域中的 IL-23A / p19	
<400> 9	
atctgacctc gtcgacatgt gtcaccagca gttggtcatc tcttggtttt ccctggtttt	60
tctggcatct cccctcgtgg ccatatggga actgaagaaa gatgtttatg tcgtagaatt	120
ggattggtat ccgatgccc ctggagaaat ggtggtcctc acctgtgaca cccctgaaga	180
agatggtatc acctggacct tggaccagag cagtgaggtc ttaggctctg gcaaaacct	240
gaccatccaa gtcaaagagt ttggagatgc tggccagtac acctgtcaca aaggaggcga	300
[0032] ggttctaagc cattcgtcc tgctgcttca caaaaaggaa gatggaattt ggtccactga	360
tattttaaag gaccagaaag aacccaaaaa taagaccttt ctaagatgcg aggccaagaa	420
ttattctgga cgtttcacct gctggtggct gacgacaatc agtactgatt tgacattcag	480
tgtcaaaagc agcagaggct cttctgacct ccaaggggtg acgtgcggag ctgctacact	540
ctctgcagag agagtcagag gggacaacaa ggagtatgag tactcagtgg agtgccagga	600
ggacagtgcc tgcccagctg ctgaggagag tctgcccatt gaggtcatgg tggatgccgt	660
tcacaagctc aagtatgaaa actacaccag cagcttcttc atcagggaca tcatcaaacc	720
tgaccacccc aagaactgc agctgaagcc attaaagaat tctcggcagg tggaggtcag	780
ctgggagtag cctgacacct ggagtactcc acattcctac ttctccctga cattctgcgt	840
tcaggatccag ggcaagagca agagagaaaa gaaagataga gtcttcacgg acaagacctc	900
agccacggtc atctgccgca aaaatgccag cattagcgtg cggggccagg accgctacta	960

tagctcatct tggagcgaat gggcatctgt gccctgcagt cgtgctaagc gaatgctggg	1020
gagcagagct gtaatgctgc tgttgctgct gccctggaca gctcaggga gagctgtgcc	1080
tgggggcagc agccctgcct ggactcagt ccagcagctt tcacagaagc tctgcacact	1140
ggcctggagt gcacatccac tagtgggaca catggatcta agagaagagg gagatgaaga	1200
gactacaaat gatgttcccc atatccagt tggagatggc tgtgaccccc aaggactcag	1260
ggacaacagt cagtctctgt tgcaaaggat ccaccagggt ctgatttttt atgagaagct	1320
gctaggatcg gatattttca caggggagcc ttctctgctc cctgatagcc ctgtgggcca	1380
gcttcatgcc tccctactgg gccctagcca actcctgcag cctgagggtc accactggga	1440
gactcagcag attccaagcc tcagtcccag ccagccatgg cagcgtctcc ttctccgctt	1500
caaaatcctt cgcagcctcc aggcctttgt ggctgtagcc gcccggtct ttgcccattg	1560
agcagcaacc ctgagtcctt aactcgagtc accaggcg	1598

[0033]

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 46

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 示例性修饰的 E1b-19k 区

&lt;400&gt; 10

atcttggtta catctgacct cgtcgagtca ccaggcgctt ttccaa

46

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 2340

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; IL-12B / p40-修饰的 E1b-19k 区中的 IRES- IL-12A / p35

&lt;400&gt; 11

	atctgacctc gtcgacatgt ggccccctgg gtcagcctcc cagccaccgc cctcacctgc	60
	cgcgccaca ggtctgcatc cagcggctcg ccctgtgtcc ctgcagtgcc ggctcagcat	120
	gtgtccagcg cgcagcctcc tccttgtggc taccctggtc ctcctggacc acctcagttt	180
	ggccagaaac ctccccgtgg ccactccaga ccaggaatg ttcccatgcc ttcaccactc	240
	ccaaaacctg ctgagggccg tcagcaacat gctccagaag gccagacaaa ctctagaatt	300
	ttacccttgc acttctgaag agattgatca tgaagatata acaaaagata aaaccagcac	360
	agtggaggcc tgtttaccat tggaattaac caagaatgag agttgcctaa attccagaga	420
	gacctcttcc ataactaatg ggagttgcct ggcctccaga aagacctctt ttatgatggc	480
	cctgtgcctt agtagtattt atgaagactt gaagatgtac caggtggagt tcaagacat	540
	gaatgcaaag cttctgatgg atcctaagag gcagatcttt ctagatcaaa acatgctggc	600
	agttattgat gagctgatgc aggccctgaa tttcaacagt gagactgtgc cacaaaaatc	660
[0034]	ctcccttgaa gaaccggatt ttataaaac taaatcaag ctctgcatac ttcttcatgc	720
	tttcagaatt cgggcagtga ctattgatag agtgatgagc tatctgaatg cttcctaata	780
	ataacgttac tggccgaagc cgcttggaat aaggccggtg tgcgtttgtc tatatgttat	840
	tttccaccat attgccgtct tttggcaatg tgagggcccg gaaacctggc cctgtcttct	900
	tgacgagcat tcctaggggt ctttccctc tcgccaagg aatgcaagg ctgttgaatg	960
	tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt cttgaagaca aacaacgtct gtagcgacce	1020
	tttgaggca gcggaacccc ccacctggcg acaggtgcct ctgcggccaa aagccacgtg	1080
	tataagatac acctgcaaag gcggcacaac ccagtgcca cgttgtgagt tggatagttg	1140
	tggaaagagt caaatggctc tcctcaagcg tattcaacaa ggggctgaag gatgccaga	1200
	aggtacccca ttgtatggga tctgatctgg ggcctcggtg cacatgcttt acatgtgttt	1260
	agtcgaggtt aaaaaacgtc taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt tcctttgaaa	1320

	aacacgatga taatatgtgt caccagcagt tggcatctc ttggttttcc ctggtttttc	1380
	tggcatctcc cctcgtggcc atatgggaac tgaagaaaga tgtttatgtc gtagaattgg	1440
	attggtatcc ggatgcccct ggagaaatgg tggtcctcac ctgtgacacc cctgaagaag	1500
	atggtatcac ctggaccttg gaccagagca gtgaggctctt aggctctggc aaaacctga	1560
	ccatccaagt caaagagttt ggagatgctg gccagtacac ctgtcacaaa ggaggcgagg	1620
	ttctaagcca ttcgctcctg ctgcttcaca aaaaggaaga tggaatttgg tccactgata	1680
	ttttaaagga ccagaaagaa cccaaaaata agacctttct aagatgcgag gccagaatt	1740
	attctggacg tticacctgc tgggtgctga cgacaatcag tactgatttg acattcagtg	1800
	tcaaaagcag cagaggctct tctgaccccc aaggggtgac gtgcggagct gctacactct	1860
	ctgcagagag agtcagaggg gacaacaagg agtatgagta ctcagtggag tgccaggagg	1920
	acagtgcctg cccagctgct gaggagagtc tgcccattga ggtcatggtg gatgccgttc	1980
[0035]	acaagctcaa gtatgaaaac tacaccagca gcttcttcat caggacatc atcaaacctg	2040
	acccacccaa gaacttgag ctgaagccat taaagaattc tcggcaggtg gaggtcagct	2100
	gggagtaccc tgacacctgg agtactccac attcctactt ctccctgaca ttctgcgttc	2160
	aggtccaggg caagagcaag agagaaaaga aagatagagt cttcacggac aagacctcag	2220
	ccacggtcat ctgccgcaa aatgccagca ttagcgtgcg ggcccaggac cgtactata	2280
	gctcatcttg gagcgaatgg gcattctgtc cctgcagtta gtaactcgag tcaccaggcg	2340
	<210> 12	
	<211> 1667	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> IL-12B / p40-2A-修饰的 E1b-19k 区域中的 IL-12A / p35	
	<400> 12	



	atctgacctc gtcgacatgt gtcaccagca gttggtcac tcttggtttt ccttggtttt	60
	tctggcatct cccctcgtgg ccatatggga actgaagaaa gatgtttatg tcgtagaatt	120
	ggattggtat ccgatgccc ctggagaaat ggtggtcctc acctgtgaca cccctgaaga	180
	agatggtatc acctggacct tggaccagag cagtgaagtc ttaggctctg gcaaaacct	240
	gaccatccaa gtcaaagagt ttggagatgc tggccagtac acctgtcaca aaggaggcga	300
	ggttctaagc cattcgctcc tgctgcttca caaaaaggaa gatggaattt ggtccactga	360
	tattttaaag gaccagaaag aacccaaaaa taagaccttt ctaagatgcg aggccaagaa	420
	ttattctgga cgtttcacct gctgggtggct gacgacaatc agtactgatt tgacattcag	480
	tgtcaaaagc agcagaggct cttctgacct ccaaggggtg acgtgcggag ctgctacact	540
	ctctgcagag agagtcagag gggacaacaa ggagtatgag tactcagtgg agtgccagga	600
	ggacagtgcc tgcccagctg ctgaggagag tctgcccatt gaggtcatgg tggatgccgt	660
[0036]	tcacaagctc aagtatgaaa actacaccag cagcttcttc atcagggaca tcatcaaacc	720
	tgaccacccc aagaactgc agctgaagcc attaaagaat tctcggcagg tggaggtcag	780
	ctgggagtac cctgacacct ggagtactcc acattcctac ttctccctga cattctcgt	840
	tcaggtccag ggcaagagca agagagaaaa gaaagataga gtcttcacgg acaagacctc	900
	agccacggtc atctgccga aaaatgccag cattagcgtg cgggccagg accgtacta	960
	tagtcatct tggagcgaat gggcatctgt gccctgcagt cttctgaact tcgacctct	1020
	caagttggcg ggagacgttg agtccaacct cgggccaga aacctccccg tggccactcc	1080
	agaccagga atgttcccat gccttcacca ctccaaaac ctgctgaggg ccgtcagcaa	1140
	catgtccag aaggccagac aaactctaga atttaccct tgcattctg aagagattga	1200
	tcatgaagat atcacaaaag ataaaaccag cacagtggag gcctgtttac cattggaatt	1260
	aaccaagaat gagagttgcc taaattccag agagacctct ttcataacta atgggagttg	1320

	cctggcctcc agaaagacct cttttatgat ggccctgtgc cttagtagta tttatgaaga	1380
	cttgaagatg taccagggtgg agttcaagac catgaatgca aagcttctga tggatcctaa	1440
	gaggcagatc tttctagatc aaaacatgct ggcagttatt gatgagctga tgcaggccct	1500
	gaatttcaac agtgagactg tgccacaaaa atcctccctt gaagaaccgg attttataa	1560
	aactaaaatc aagctctgca tacttcttca tgctttcaga attcgggcag tgactattga	1620
	tagagtgatg agctatctga atgcttccta actcgagtca ccaggcg	1667
	<210> 13	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 示例性修饰的 E3 区	
[0037]	<400> 13	
	tcttttctct tacagtatga taataaaaaa aaataataaa gcatcactta	50
	<210> 14	
	<211> 1022	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 修饰的 E1b-19k 区的 L-12B/p40	
	<400> 14	
	atctgacctc gtcgacatgt gtcaccagca gttggtcatc tcttggtttt ccctggtttt	60
	tctggcatct cccctcgtgg ccatatggga actgaagaaa gatgtttatg tcgtagaatt	120
	ggattggtat ccgatgccc ctggagaaat ggtggtcctc acctgtgaca cccctgaaga	180
	agatggatc acctggacct tggaccagag cagtgaggtc ttaggctctg gcaaaaccct	240
	gaccatccaa gtcaaagagt ttggagatgc tggccagtac acctgtcaca aaggaggcga	300

	ggttctaagc cattcgctcc tgctgcttca caaaaaggaa gatggaattt ggtccactga	360
	tattttaaag gaccagaaag aacccaaaaa taagaccttt ctaagatgcg aggccaagaa	420
	ttattctgga cgtttcacct gctgggtggct gacgacaatc agtactgatt tgacattcag	480
	tgtcaaaagc agcagaggct ctcttgaccc ccaaggggtg acgtgcggag ctgctacact	540
	ctctgcagag agagtcagag gggacaacaa ggagtatgag tactcagtgg agtgccagga	600
	ggacagtgcc tgcccagctg ctgaggagag tctgcccatt gaggtcatgg tggatgccgt	660
	tcacaagctc aagtatgaaa actacaccag cagcttcttc atcagggaca tcatcaaacc	720
	tgaccacccc aagaactgc agctgaagcc attaaagaat tctcggcagg tggaggtcag	780
	ctgggagtac cctgacacct ggagtactcc acattcctac ttctccctga cattctgcgt	840
	tcaggtccag ggcaagagca agagagaaaa gaaagataga gtcttcacgg acaagacctc	900
	agccacggtc atctgccga aaaatgccag cattagcgtg cgggcccagg accgtacta	960
[0038]	tagctcatct tggagcgaat gggcatctgt gccctgcagt tagtaactcg agtcaccagg	1020
	cg	1022
	<210> 15	
	<211> 834	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 修饰的 E3 区的 IL-12A / p35	
	<400> 15	
	atgttctttt ctcttacagt atgattaaat gagacatgtg gccccctggg tctgcctccc	60
	aaccacgcc ctcacctgcc gcggccactg gtctgcatcc tgcggctcgc cctgtgtccc	120
	tgcaatgccg gctctccatg tgcctgcgc gctccctcct ccttgtggct accctgttcc	180
	tcctggacca cctctctttg gcccgaaacc tcccgtggc cactcctgac cctggaatgt	240

tcccatgcct tcaccactcc caaacctgc tgcgggccgt ctccaacatg ctccaaaaag	300
cccgacaaac tcttgaattt tacccttgca cttctgaaga aattgatcat gaagatatca	360
caaaagataa aacctccact gtggaagcct gtttaccatt ggaattaacc aaaaatgaat	420
cttgccataa ttcccagaaa acctctttca taactaatgg gtcttgctg gcctcccgaa	480
aaacctcttt tatgatggcc ctgtgccttt cttctattta tgaagacttg aaaatgtacc	540
aagtggaatt caaaaccatg aatgcaaaac ttctgatgga tcctaaacgg caaatctttc	600
ttgatcaaaa catgctggct gtatttgatg aactgatgca agccctgaat ttcaactctg	660
aaactgtgcc acaaaaatcc tcccttgaag aaccggattt ttataaaact aaaatcaaac	720
tctgcatact tcttcatgct ttccgaattc gggctgtgac tattgatcga gtgatgtcct	780
atctgaatgc ttccaatga ggtctcaaag atcttattcc cttaactaa taaa	834

[0039]	<210> 16	
	<211> 8	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 示例性 E1A 启动子 TATA 框缺失产生的序列	
	<400> 16	
	agtgcccg	8
	<210> 17	
	<211> 8	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 示例性 E1A 启动子 TATA 框缺失产生的序列	
	<400> 17	
	tattcccg	8

	<210> 18	
	<211> 10	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 示例性 E1A 启动子 CAAT 框缺失产生的序列	
	<400> 18	
	ttccgtggcg	10
	<210> 19	
	<211> 8	
	<212> DNA	
	<213> 5 型腺病毒 (Adenovirus type 5)	
	<400> 19	
	cagtatga	8
[0040]	<210> 20	
	<211> 10	
	<212> DNA	
	<213> 5 型腺病毒 (Adenovirus type 5)	
	<400> 20	
	taataaaaaa	10
	<210> 21	
	<211> 8	
	<212> DNA	
	<213> 5 型腺病毒 (Adenovirus type 5)	
	<400> 21	
	tgcccttaa	8
	<210> 22	
	<211> 11	
	<212> DNA	
	<213> 5 型腺病毒 (Adenovirus type 5)	

	<400> 22	
	taaaaaaaaa t	11
	<210> 23	
	<211> 2242	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 小鼠 IL-12A-IRES-修饰的 E1b-19k 区域中的小鼠 IL-12B	
	<400> 23	
[0041]	ctgacctgt cgacatgtgt caatcacgt acctcctctt ttiggccacc ctgcccctcc	60
	taaaccacct cagtttggcc agagtgatcc ctgtgtccgg ccctgccaga tgcctgagcc	120
	agagcagaaa cctgctgaaa accaccgacg acatggtgaa aaccgccaga gagaagctga	180
	agcactacag ctgcacagcc gaggacatcg accacgagga catcacccgg gaccagacct	240
	ccacctgaa aacctgcctg cccctggaac tgcataagaa cgagagctgc ctggccaccc	300
	gcgagacaag cagcaccacc agaggcagct gtctgcccc ccagaaaacc agcctgatga	360
	tgacctgtg cctgggcagc atctacgagg acctgaagat gtaccagacc gagtccagg	420
	ccatcaacgc cgccctgcag aaccacaacc accagcagat catcctggac aagggcatgc	480
	tggtggccat cgacgagctg atgcagagcc tgaaccacaa cggcgaaacc ctgagacaga	540
	aacccccctg gggcgaggcc gaccctaca gagtgaagat gaagctgtgc atcctgtgc	600
	acgccttcag caccagagtg gtgacaatca acagagtgat gggctacctg agcagcgcct	660
	gataacgtta ctggccgaag ccgcttgga taaggccggt gtgcgtttgt ctatatgtta	720
	ttttcacca tattgccgtc ttttgcaat gtgagggcc ggaaacctgg ccctgtcttc	780
	ttgacgagca ttcctagggg tctttccct ctcgcaaag gaatgcaagg tctgttgaat	840
	gtcgtgaagg aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc	900

	ctttgcaggc agcggaaacc cccacctggc gacaggtgcc tctgcggcca aaagccacgt	960
	gtataagata cacctgcaaa ggccgcacaa cccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt	1020
	gtggaaagag tcaaatggct ctctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgccag	1080
	aaggtacccc attgtatggg atctgatctg gggcctcggg gcacatgctt tacatgtgtt	1140
	tagtcgaggt taaaaaacgt ctaggccccc cgaaccacgg ggacgtgggtt ttcctttgaa	1200
	aaacacgatg ataatatgtg cccccagaag ctgaccatca gttggttcgc catcgtgctg	1260
	ctgggtgtccc ccctgatggc catgtgggag ctggaaaagg acgtgtacgt ggtggaagtg	1320
	gactggaccc ccgacgccc tggcgagaca gtgaacctga cctgcgacac ccccgaagag	1380
	gacgacatca cctggaccag cgaccagaga cacggcgtga tcggcagcgg caagaccctg	1440
	acaatcaccg tgaaagagtt tctggacgcc ggccagtaca cctgtcaca gggcggcgag	1500
	acactgagcc actcccatct gctgctgcac aagaaagaga acggcatctg gtccaccgag	1560
[0042]	atcctgaaga acttcaagaa caagaccttc ctgaagtgcg agggccccc aa ctacagcggc	1620
	agattcacct gtagctggct ggtgcagaga aacatggacc tgaagttcaa catcaagagc	1680
	agcagcagct ccccgacag cagagccgtg acctgtggca tggccagcct gagcgccgag	1740
	aaagtgaccc tggaccagag agactacgag aagtacagcg tgtcctgcc ggaagatgtc	1800
	acctgcccc cgcggagga aacctgcct atcgagctgg ccctggaagc cagacagcag	1860
	aacaaatacg agaactactc taccagcttc ttcattccggg acatcatcaa gcccagcccc	1920
	cccaagaacc tgcagatgaa gccctgaag aacagccagg tggaagtgtc ctgggagtac	1980
	cccagacgct ggtccacccc ccacagctac ttcagcctga agttcttcgt gcggatccag	2040
	cgcaagaaag aaaagatgaa ggaaaccgag gaaggctgca accagaaagg cgctttcctg	2100
	gtggaaaaga ccagcaccga ggtgcagtgc aaggcggcga acgtgtgcgt gcaggcccag	2160
	gaccggtact acaacagcag ctgcagcaag tgggcctgcg tgccctgtag agtgcgctct	2220

	tgactcgagt caccaggcgc tt	2242
	<210> 24	
	<211> 1631	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 小鼠 IL-12B-弗林蛋白酶-小鼠 E-12b-19k 区域的 IL-12A	
	<400> 24	
	atctgacctc gtcgacatgt gtcctcagaa gctaaccatc tcctggtttg ccatcgtttt	60
	gctggtgtct ccactcatgg ccatgtggga gctggagaaa gacgtttatg ttgtagaggt	120
	ggactggact cccgatgccc ctggagaaac agtgaacctc acctgtgaca cgcctgaaga	180
	agatgacatc acctggacct cagaccagag acatggagtc ataggctctg gaaagacct	240
	gaccatcact gtcaaagagt ttctagatgc tggccagtac acctgccaca aaggaggcga	300
[0043]	gactctgagc cactcacatc tgcctgtcca caagaaggaa aatggaattt ggtccactga	360
	aattttaaaa aatttcaaaa acaagacttt cctgaagtgt gaagcaccaa attactccgg	420
	acggttcacg tgctcatggc tggtgcaaag aaacatggac ttgaagtca acatcaagag	480
	cagtagcagt tcccctgact ctcgggcagt gacatgtgga atggcgtctc tgtctgcaga	540
	gaaggtcaca ctggacaaa gggactatga gaagtattca gtgtcctgcc aggaggatgt	600
	cacctgcca actgccgagg agaccctgcc cattgaactg gcgttggaag cacggcagca	660
	gaataaatat gagaactaca gcaccagctt cttcatcagg gacatcatca aaccagacct	720
	gccaagaac ttgcagatga agcctttgaa gaactcacag gtggaggatca gctgggagta	780
	ccctgactcc tggagcactc cccattccta cttctccctc aagtctcttg ttcgaatcca	840
	gcgcaagaaa gaaaagatga aggagacaga ggaggggtgt aaccagaaag gtgcgttcct	900
	cgtagagaag acatctaccg aagtccaatg caaaggcggg aatgtctgcg tgcaagctca	960



	ggatcgctat tacaattcct catgcagcaa gtgggcatgt gttccctgca ggggccgatc	1020
	ccgtgctaag cgaaggggtca ttccagtctc tggacctgcc aggtgtctta gccagtcctg	1080
	aaacctgctg aagaccacag atgacatggt gaagacggcc agagaaaaac tgaacatta	1140
	ttcctgcact gctgaagaca tcgatcatga agacatcaca cgggaccaa ccagcacatt	1200
	gaagacctgt ttaccactgg aactacacaa gaacgagagt tgcctggcta ctagagagac	1260
	ttcttcacaca acaagaggga gctgcctgcc cccacagaag acgtctttga tgatgacct	1320
	gtgccttggt agcatctatg aggacttgaa gatgtaccag acagagttcc aggccatcaa	1380
	cgcagcactt cagaatcaca accatcagca gatcattcta gacaaggga tgctgggtggc	1440
	catcgatgag ctgatgcagt ctctgaatca taatggcgag actctgcgcc agaaacctcc	1500
	tgtgggagaa gcagaccctt acagagtga aatgaagctc tgcacacctg ttacgcctt	1560
	cagcaccgc gtcgtgacca tcaacagggt gatgggctat ctgagctccg cctgactga	1620
[0044]	gtcaccaggc g	1631

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 1577

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 小鼠 IL-12B-弗林蛋白酶-修饰的 E1b-19k 区域中的小鼠 IL-23A

&lt;400&gt; 25

atctgacctc gtcgacatgt gtccctcagaa gctaaccatc tccctggttg ccatcgtttt 60

gctgggtgtc cactcatgg ccatgtggga gctggagaaa gacgtttatg ttgtagaggt 120

ggactggact cccgatgcc ctggagaaac agtgaacctc acctgtgaca cgcctgaaga 180

agatgacatc acctggacct cagaccagag acatggagtc ataggctctg gaaagacct 240

gaccatcact gtcaaagagt ttctagatgc tggccagtac acctgccaca aaggaggcga 300

	gactctgagc cactcacatc tgctgctcca caagaaggaa aatggaattt ggtccactga	360
	aattttaaaa aatttcaaaa acaagacttt cctgaagtgt gaagcaccaa attactccgg	420
	acggttcacg tgctcatggc tggtgcaaag aaacatggac ttgaagtcca acatcaagag	480
	cagtagcagt tcccctgact ctcgggcagt gacatgtgga atggcgtctc tgtctgcaga	540
	gaaggtcaca ctggaccaa gggactatga gaagtattca gtgtcctgcc aggaggatgt	600
	cacctgccc actgccgagg agaccctgcc cattgaactg gcgttggaag cacggcagca	660
	gaataaatat gagaactaca gcaccagctt cttcatcagg gacatcatca aaccagaccc	720
	gccaagaac ttgcagatga agcctttgaa gaactcacag gtggaggcca gctgggagta	780
	ccctgactcc tggagcactc cccattccta cttctccctc aagttctttg ttcgaatcca	840
	gcgcaagaaa gaaaagatga aggagacaga ggaggggtgt aaccagaaag gtgcgttcct	900
	cgtagagaag acatctaccg aagtccaatg caaaggcggg aatgtctgcg tgcaagctca	960
[0045]	ggatcgctat tacaattcct catgcagcaa gtgggcatgt gttccctgca gggccgac	1020
	ccgtgctaag cgagtgccta ggagtagcag tcctgactgg gctcagtgcc agcagctctc	1080
	tcggaatctc tgcattgtag cctggaacgc acatgcacca gcgggacata tgaatctact	1140
	aagagaagaa gaggatgaag agactaaaaa taatgtgccc cgtatccagt gtgaagatgg	1200
	ttgtgacca caaggactca aggacaacag ccagttctgc ttgcaaagga tccccaagg	1260
	tctggttttt tataagcacc tgcttgactc tgacatcttc aaaggggagc ctgctctact	1320
	ccctgatagc cccatggagc aacttcacac ctccctacta ggactcagcc aactcctcca	1380
	gccagaggat ccccccgagg agaccaaca gatgccagc ctgagttcta gtcagcagtg	1440
	gcagcgcccc ctctccgtt ccaagatcct tcgaagcctc caggcctttt tggccatagc	1500
	tgccccgggc tttgcccacg gagcagcaac tctgactgag cccttagtgc caacagctta	1560
	actcgagtca ccaggcg	1577

<210> 26  
 <211> 1349  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
  
 <220>  
 <223> 小鼠 IL-27B-弗林蛋白酶-修饰的 Elb-19k 区域中的小鼠 IL-27A

<400> 26  
 atctgacctc gtcgacatgt ccaagctgct cttcctgtca cttgccctct gggccagccg 60  
  
 ctccccctggt tacactgaaa cagctctcgt ggctetaagc cagcccagag tgcaatgcc 120  
  
 tgctttctcgg tatcccgtgg ccgtggactg ctcttgact cctctccagg ctcccaactc 180  
  
 caccagatcc acgtccttca ttgccactta caggtctgggt gtggccaccc agcagcagag 240  
  
 ccagccctgc ctacaacgga gccccaggc ctcccgatgc accatccccg acgtgcacct 300  
  
 gttctccacg gtgcctaca tgctaaatgt cactgcagtg caccagggcg gcgccagcag 360  
 [0046] cagcctccta gcctttgtgg ctgagcgaat catcaagccg gacctccgg aaggcgtgcg 420  
  
 cctgcgcaca gcgggacagc gcctgcaggt gctctggcat cccctgctt cctggccctt 480  
  
 cccggacatc ttctctctca agtaccgact ccgtaccgg cgccgaggag cctctcactt 540  
  
 ccgccaggtg ggaccttg aagccacgac ttaccacctc aggaactcga aaccccatgc 600  
  
 caagtattgc atccaggtgt cagctcagga cctcacagat tatgggaaac caagtgactg 660  
  
 gagectccct gggcaagtag aaagtgcacc ccataagccc cgtgctaagc gattcccaac 720  
  
 agacccccctg agccttcaag agctgcgcag ggaattcaca gtcagcctgt accttgccag 780  
  
 gaagctgctc tctgaggttc agggctatgt ccacagcttt gctgaatctc gattgccagg 840  
  
 agtgaacctg gacctcctgc ccctgggata ccattctccc aatgtttccc tgactttcca 900  
  
 ggcatggcat cacctctctg actctgagag actctgcttc ctgctacca cacttcggcc 960  
  
 cttccctgcc atgctgggag ggctggggac ccaggggacc tggaccagct cagagaggga 1020

---

	gcagctgtgg gccatgaggc tggatctccg ggacctgcac aggcacctcc gctttcaggt	1080
	gctggctgca ggattcaaat gttaaagga agaggaagac aaggaggaag aggaagagga	1140
	ggaagaagaa gaaaagaagc tgcccctagg ggctctgggt ggccccaatc aggtgtcatc	1200
[0047]	ccaagtgtcc tggccccagc tgctctatac ctaccagctc cttcactccc tggagcttgt	1260
	cctgtctcgg gctgttcggg acctgctgct gctgtccctg cccaggcgcc caggctcagc	1320
	ctgggattcc taactcgagt caccaggcg	1349

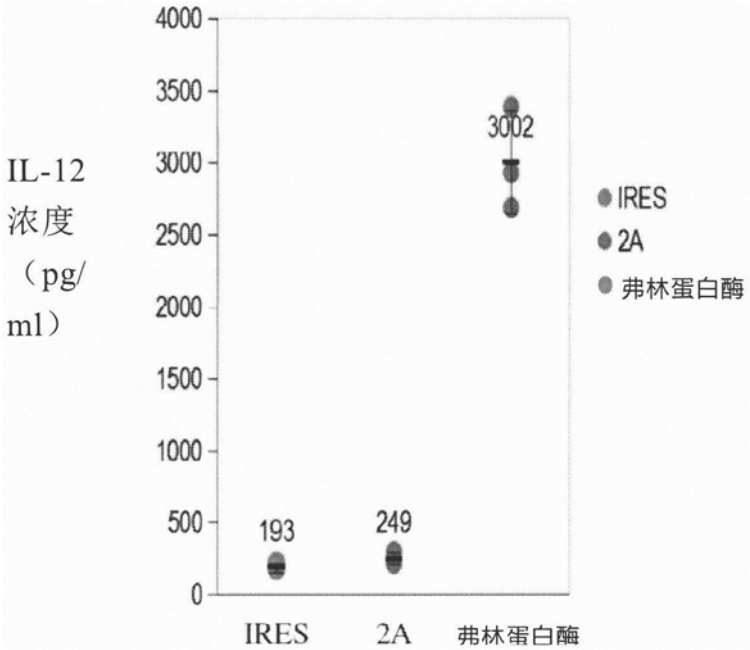


图1

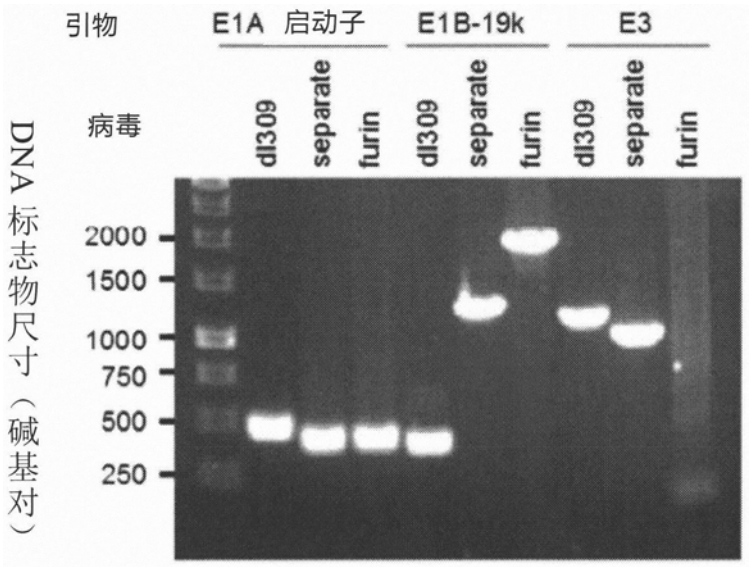


图2

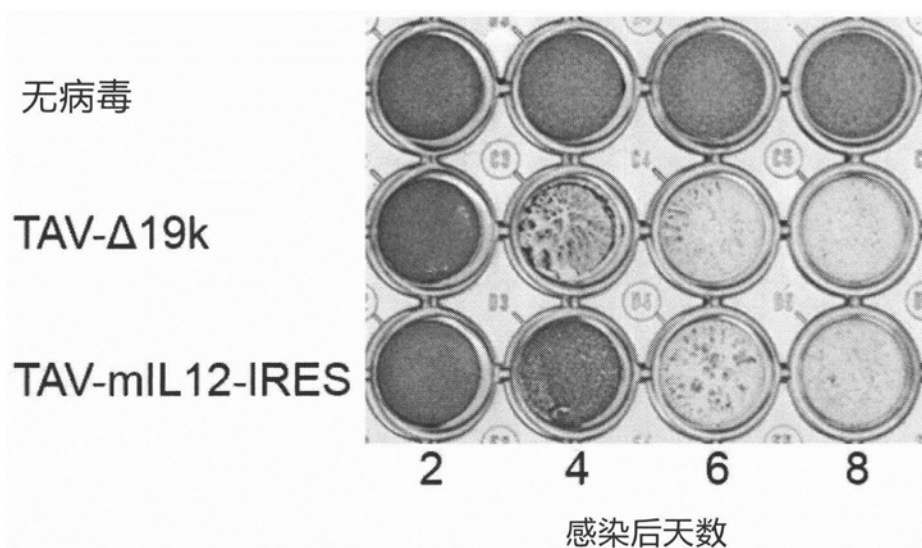


图3

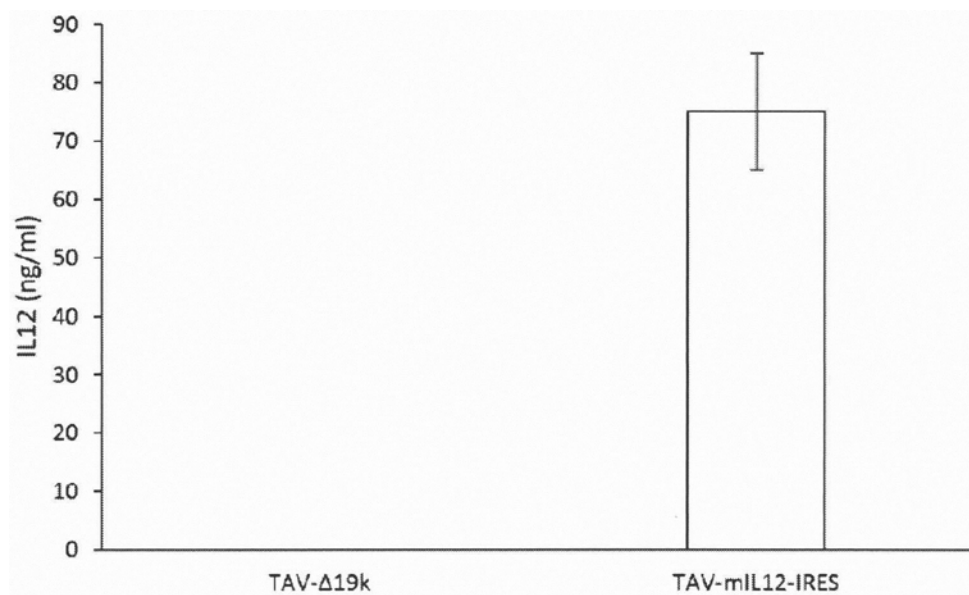


图4

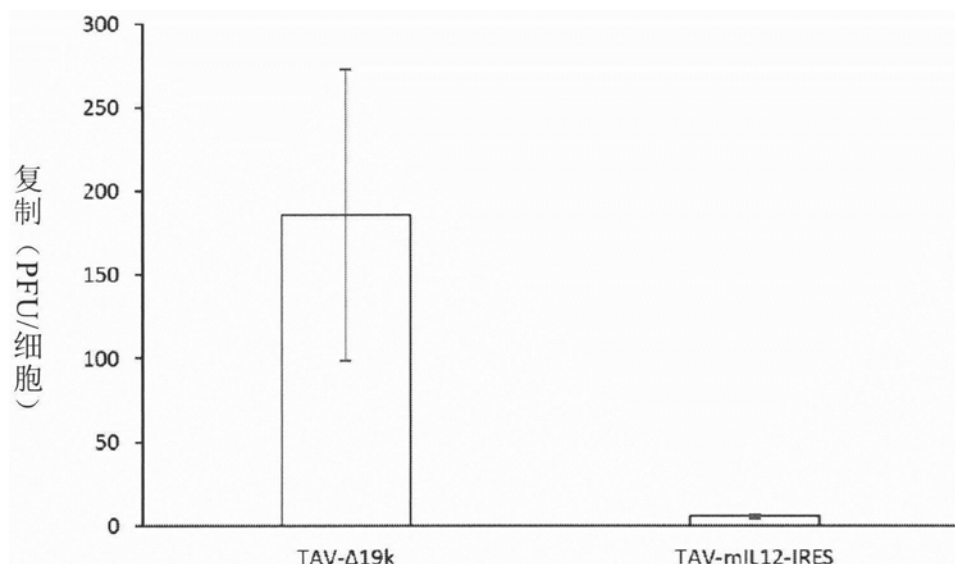


图5

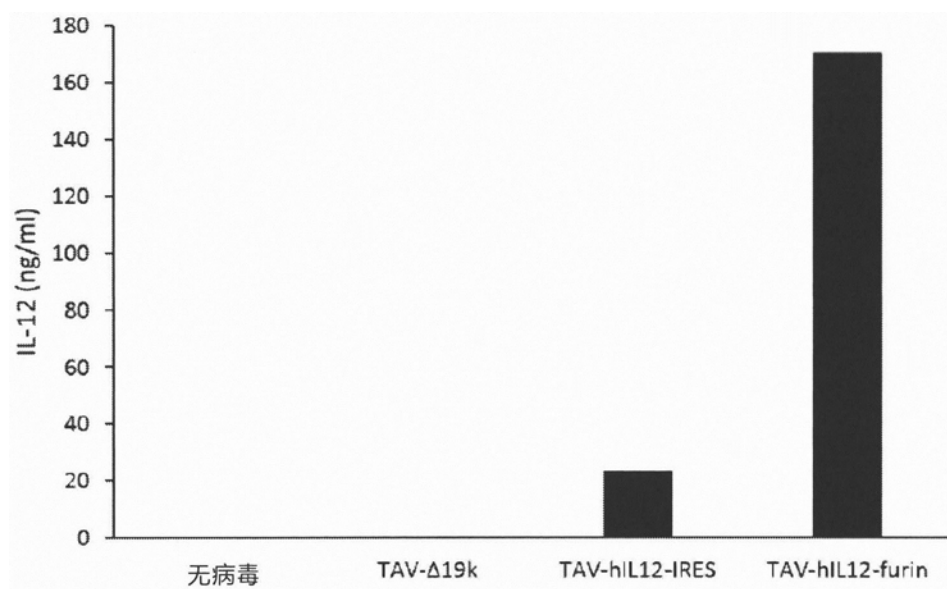


图6

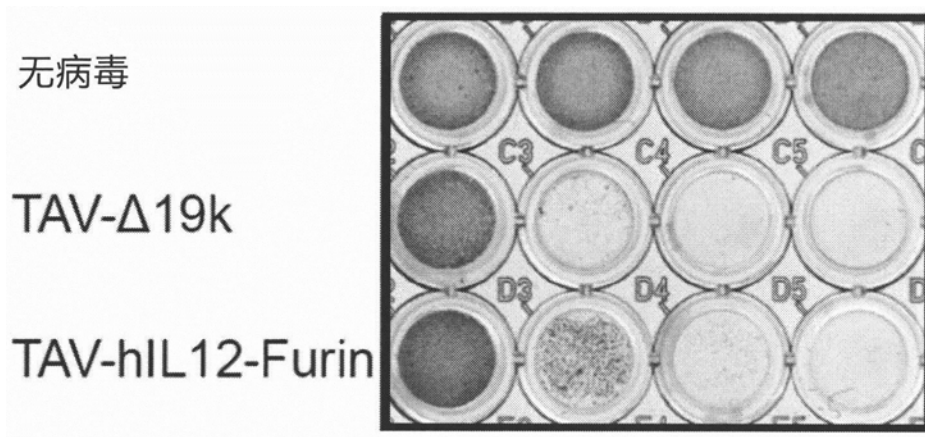


图7

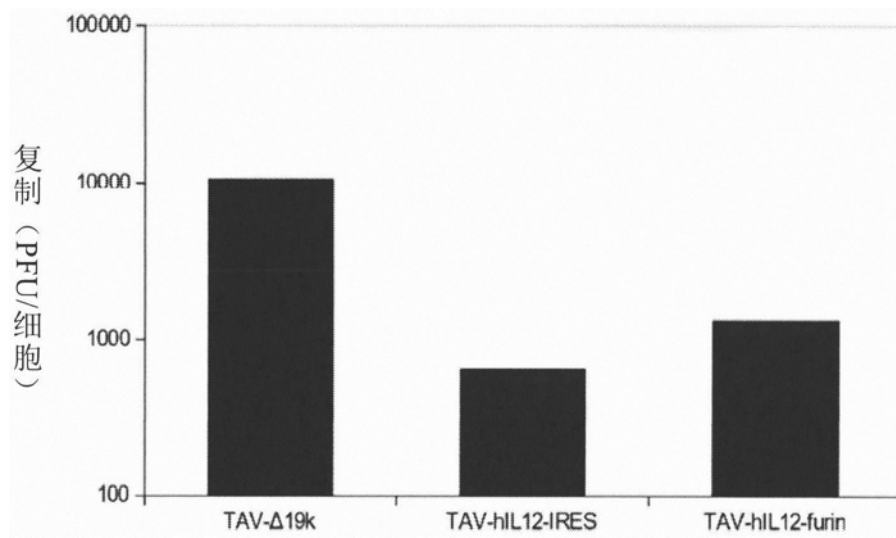


图8



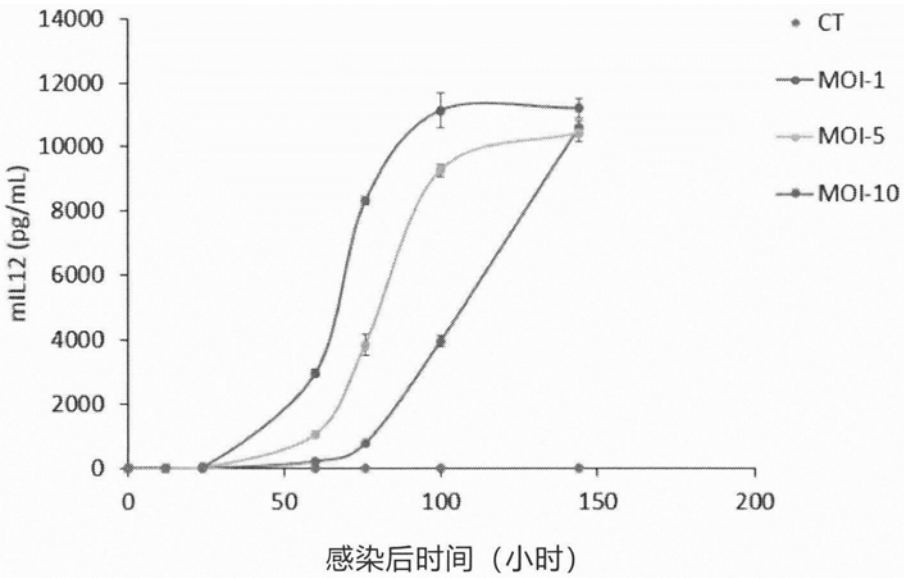


图9

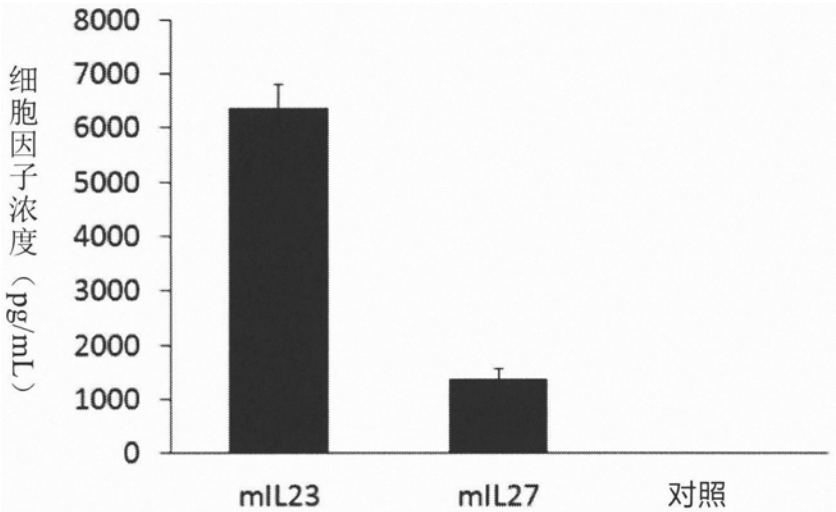


图10