



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년01월07일
(11) 등록번호 10-1006594
(24) 등록일자 2010년12월30일

(51) Int. Cl.

C12N 15/861 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2004-7016964

(22) 출원일자(국제출원일자) 2003년04월24일

심사청구일자 2008년04월02일

(85) 번역문제출일자 2004년10월21일

(65) 공개번호 10-2004-0106365

(43) 공개일자 2004년12월17일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2003/050126

(87) 국제공개번호 WO 2004/001032

국제공개일자 2003년12월31일

(30) 우선권주장

PCT/NL02/00281 2002년04월25일 네덜란드(NL)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

WO2000070071 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

크루셀 홀란드 비.브이.

네덜란드 엔엘-2333 씨엔 레이텐 아르키메데스웨그 4

(72) 발명자

포헬스, 로날드

네덜란드 엔엘-3461 하베 린스호텐 판 리이트라안 하펜하, 멘조, 얀스, 엠코

네덜란드 엔엘-2401 까헤 알펜 아안 덴 레인 빌헬미나 드루크케르스트라아트 66

자위듀헤이스트, 다비드, 아드리아누스, 테오도루스

네덜란드 엔엘-2565 페하 덴 하아흐 클리몹스트라아트 85

(74) 대리인

김윤배, 조영신, 이범일

전체 청구항 수 : 총 15 항

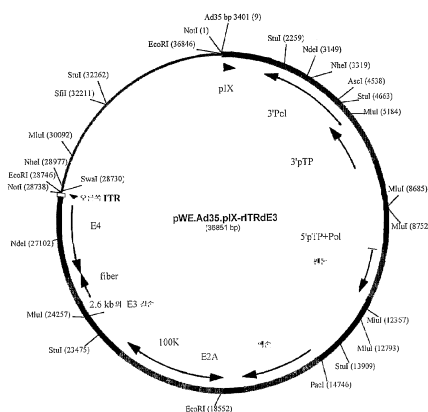
심사관 : 조정환

(54) 안정한 아데노바이러스 벡터 및 그 증식 방법

(57) 요약

본 발명은 아데노바이러스 패키징 세포에서 pIX의 과잉발현으로, 재조합 아데노바이러스 벡터에서 E1B 55K 영역의 적어도 일부를 유지하는 것으로 또는 이중성 프로모터를 가진 pIX를 조정하는 것으로, 재조합 아데노 바이러스의 안정성 및/또는 패키징 수용량을 증가시키는 방법 및 수단을 제공한다. 본 발명은 추가로 보충 세포주에서 이러한 아데노바이러스의 생산을 위한 방법 및 수단을 제공하고, 여기서, 초기 영역 4 개방 해석 프레임 6(E4-orf6) 코딩 핵산은 아데노바이러스에서 존재하고, E4-orf6 유전자 생성물은 보충 세포에서 E1 유전자 생성물의 하나 이상의 생성물에 적절하여, 아데노바이러스 벡터는 보충 세포에 의해 효율적으로 생산될 수 있다.

대표도 - 도1



(30) 우선권주장

PCT/NL02/00656 2002년10월15일 네덜란드(NL)

02102631.5 2002년11월25일

유럽특허청(EPO)(EP)

특허청구의 범위

청구항 1

아데노바이러스 게놈을 포함하는 재조합 서브그룹 B 아데노바이러스 입자로, 여기서 상기 게놈은 E1-영역에 결실을 포함하고, 그 아데노바이러스 게놈은 기능성 E1B 55K 유전자 생성물을 코딩하지 않고, 상기 아데노바이러스 게놈은 발현 서열의 조절하에 기능성 pIX 코딩 서열을 포함하고, E1B 55K 코딩 서열의 3'말단의 일부를 포함하는 상기 발현 서열은 야생형 서브그룹 B 아데노바이러스의 pIX 개방해독 프레임의 바로 상류에 있는 아데노바이러스의 150 내지 600 뉴클레오티드를 함유하고, 그리고 상기 발현 서열은, E1B 55K 정지 코돈과 pIX의 개시 코돈 사이의 서열이 앞에 있고 E1B 55K 코딩 서열의 3'말단으로부터의 뉴클레오티드가 없을 때, 상기 pIX 코딩 서열의 발현에 비해 패키징 세포의 pIX 코딩 서열의 발현을 증가시킬 수 있는 것인 재조합 아데노바이러스 입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 발현 서열은 야생형 서브그룹 B 아데노바이러스의 pIX 개방 해독 프레임의 바로 상류에 있는 아데노바이러스 서열의 150 내지 250 뉴클레오티드를 함유하는 것인 재조합 아데노바이러스 입자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 발현 서열은 E1B 55K 개방 해독 프레임 서열의 3' 말단의 166 염기쌍을 함유하는 것인 재조합 아데노바이러스 입자.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 발현 서열은 야생형 서브그룹 B 아데노바이러스의 pIX 개방 해독 프레임의 바로 상류에 있는 아데노바이러스 서열의 150 내지 200 뉴클레오티드를 함유하는 것인 재조합 아데노바이러스 입자.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 35 입자 또는 아데노바이러스 혈청형 11 입자인 재조합 아데노바이러스 입자.

청구항 6

제1항에 있어서, 추가로 아데노바이러스 서브그룹 C 기원의 기능성 E4-orf6 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 재조합 아데노바이러스 입자.

청구항 7

제1항의 재조합 아데노바이러스 입자의 게놈을 포함하는 단리된 핵산.

청구항 8

제1항의 재조합 아데노바이러스 입자 및 적합한 담체 또는 보조제를 포함하는 백신.

청구항 9

제1항의 재조합 아데노바이러스 입자를 포함하는 재조합 아데노바이러스 패키징 세포.

청구항 10

pIX 코딩 서열을 포함하고 E1-영역에 결실을 갖는 아데노바이러스 게놈을 포함하는 재조합 서브그룹 B 아데노바이러스 입자로, 상기 아데노바이러스 입자는 기능성 E1B 55K 유전자 생성물을 코딩하지 않고, 여기서 상기 pIX 코딩 서열은 이중성 프로모터의 조절하에 있고, 여기서 상기 이중성 프로모터는 E1B 55K 정지 코돈과 pIX의 개시 코돈 사이의 서열이 앞에 있고 E1B 55K 코딩 서열로부터의 뉴클레오티드가 없을 때, 상기 pIX 코딩 서열의 발현에 비해, 패키징 세포에서 pIX 코딩 서열의 발현을 증가시킬 수 있는 것인 재조합 아데노바이러스 입자.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 이중성 프로모터는 비-내인성 아데노바이러스 근접의 pIX 프로모터, 비-아데노바이러스 바이러스성 프로모터, 세포성 프로모터, 합성 프로모터 및 하이브리드 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는 것인 재조합 아데노바이러스 입자.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 이중성 프로모터는 Ad5 근접 pIX 프로모터 또는 라우스 사르코마 바이러스(Rous Sarcoma Virus) 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 재조합 아데노바이러스 입자.

청구항 13

아데노바이러스 게놈이 E1-영역에 결실을 갖고 그리고 상기 게놈은 기능성 E1B 55K 유전자 생성물을 코딩하지 않는, 아데노바이러스 게놈을 포함하는 재조합 서브그룹 B 아데노바이러스 입자의 안정성 또는 패키징 수용량을 증가시키는 방법으로, 상기 방법은

아데노바이러스 게놈 내 pIX 코딩 서열은 E1B 55K 정지 코돈과 pIX의 개시 코돈 사이의 서열이 앞에 있고 E1B 55K 코딩 서열의 3'말단으로부터의 뉴클레오티드가 없을 때 얻어진 pIX 유전자 생성물의 수준에 비해, 상기 패키징 세포에서 pIX 유전자 생성물의 상승된 수준의 존재하에 패키징 세포 중에 재조합 아데노바이러스 입자로 상기 아데노바이러스 게놈의 생산 및 조립에 필요한 성분들을 발현시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 pIX 유전자 생성물의 상승된 수준은 아데노바이러스 게놈 중의 야생형 서브그룹 B 아데노바이러스의 pIX 개방 해독 프레임의 바로 상류에 있는 아데노바이러스 서열의 150 내지 600 뉴클레오티드를 함유하는 E1B 55K 코딩 서열의 3'말단의 일부를 유지하거나 또는 재도입하여 생산되는 것인 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 pIX 유전자 생성물의 상승된 수준은 이중성 프로모터의 조절하에 pIX 코딩 서열의 발현에 의해 생산되는 것인 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 의학분야에 관한 것이며, 더욱 특별히는 본 발명은 재조합 아데노바이러스 벡터 및 그것의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인간 아데노바이러스는 60 ~ 90 nM 크기의 외막이 없는 20면체 입자이다. 지금까지 51개의 혈청형이 동정되었고 이들은 혈구응집 특성 및 서열 상동관계를 기준으로 6개의 서브그룹(A,B,C,D,E 및 F)으로 세분된다(Francki et al. 1991). 게놈은 34 ~ 36kb의 길이를 가지며 역방향 말단반복서열(ITR)에 의해 양쪽 부위에서 축화된다. 바이러스 감염 사이클은 초기 및 후기로 나누어진다. 초기상(감염 6~8 시간 후)에서 바이러스는 비코딩되어 있으며 게놈은 핵으로 운반되고 그 후 초기 유전자 영역(region) E1~E4가 전사적으로 활성화 된다.

[0003] 초기 영역(early region)-1(E1)은 E1A 및 E1B로 명명된 2개의 전사 영역을 함유한다. E1A 영역은 숙주세포 사이클의 변형과 다른 바이러스성 전사 영역의 활성화에 관여하는 두 개의 주요 단백질을 암호화한다(reviewed by Russell. 2000). E1B 영역은 두개의 주요 단백질, E1A 단백질의 활성화에 의한 세포자멸사 유도를 다른 경로를 통해 예방하는, 19K 및 55K를 암호화한다(Rao et al, 1992; Yew and Berk 1992; Shenk 1996). 그 밖에, E1B-55K 단백질은 선택적 바이러스 mRNA 운반 및 숙주 단백질 발현의 억제를 위해 후기에 요구된다(Pilder et al. 1986). 초기 영역-2(E2)도 또한, 바이러스성 게놈의 복제에 포함되는 3개의 단백질, DNA 결합 단백질, 바이러스 폴리머라제 및 전-말단 단백질을 함께 암호화하는 E2A 및 E2B 영역으로 나뉜다(reviewed by Van der Bilet 1995). E3 영역은 인 비트로에서의 복제에 필수적이지 않고 바이러스 감염에 대한 숙주 방어 메커니즘을 전복시키는 여러 단백질을 암호화한다(reviewed by Horwitz 2001). E4 영역은 바이러스 mRNA 접합 및 운반, 숙주 세포 mRNA 운반, 바이러스 및 세포 전사 및 형질변환에 관련되는 여러 구별되는 작용에 관여하는 적어도 6개의 단백질을 암호화한다(reviewed by Leppard 1997).

[0004] 바이러스 캡시드의 형성과 바이러스 게놈의 패키징(packaging)에 필요한 후기 단백질들은 모두, 복제 개시 후 완전한 활성화 되는, 주요 최종 전사 유닛(mTU)로부터 발생된다. 특징적인 접합 및 다중-아데닐화반응의 복잡한 과정은 3부분으로 이루어진 리더(leader) 서열을 공유하는 15개 이상의 mRNA 종들을 야기한다. 초기 단백질 E1B-55K와 E4 Orf3 및 Orf6 단백질은 후 바이러스 mRNA 과정의 조절 및 핵으로부터의 운반에 중추적 역할을 한다(reviewed by Leppard, 1998).

[0005] 미리-형성된 캡시드에서 새롭게 형성된 바이러스의 패키징은 적어도 2개의 아데노바이러스 단백질, 마지막 단백질 52/55K 및 중간체 단백질 IVa2에 의해, 게놈의 왼쪽 말단에 위치한 패키징 서열과의 상호작용을 통해 중재된

다(Grable and Hearing, 1990; Gustin and Imperiale, 1998; Zang et al., 2001). 두 번째 중간체 단백질 pIX는 캡시드의 일부이고 핵소-핵소 상호작용을 안정화시킨다고 알려져 있다(Furcinitti et al., 1989). 그 외에, pIX는 E1a 프로모터와 mIP와 같은 TATA 함유 프로모터를 전이활성하는 것으로 기재되어있다(Luta et al., 1997).

[0006] 바이러스 생물학에 대한 광범위한 지식 및 세포로의 도입 후 핵 전달의 고효율로 인해, 아데노바이러스는 인간 세포에 유전자를 전달하기 위한 인기있는 도구가 되고 있다. 더욱이, 아데노바이러스 벡터는 안정하고 대규모로 비교적 쉽게 생산될 수 있다. 대부분의 경우, 벡터들은 적어도 E1 영역에서 결실(deletion)되고, 이것은 이들은 불충분하게 복제되도록 한다. 서브그룹 C 혈청형 Ad5 또는 Ad2를 기초로 한 E1-결실 벡터의 생산은 293(Graham et al. 1970), 911(Fallaux et al. 1996) 및 REP.C6™(Fallaux et al. 1998; ECACC 수탁번호 96022940)과 같은 E1 보충(complementing) 세포계에서 이루어진다. 미국 특허 5,994,128에 기재된 바와 같이, 벡터와 세포계는 세포계와 벡터에서의 아데노바이러스 서열 간의 동종성 재조합을 통한 복제 적합 아데노바이러스의 발생을 막기 위해 조화될 수 있다. 그러므로, PER.C6™ 세포와 맞춰진 아데노바이러스 벡터는 그룹 C 아데노바이러스 벡터의 생성을 위한 바람직한 시스템을 제공한다(Fallaux et al., 1998). E1 서열의 결실은 바이러스 벡터에 이중 유전자의 도입을 위한 공간을 제공한다. 바이러스에 도입될 수 있는 Ad5 게놈의 최대 크기는 길이의 약 105wt%로 제한되기 때문에, E1-결실 바이러스는 이중 DNA의 약 4.8kb를 공급할 수 있다.

[0007] pIX 결손 비리온에서 최대 패키징 수용량은 정상 게놈 길이의 약 95%까지 감소된다(Ghosh-Choudhury et al., 1987). 이것은 대부분 pIX-("pIX-마이너스") 비리온의 감소된 안정성에 기인하는 것 같다. pIX-마이너스 돌연변이 Ad5에서의 결핍은 바이러스를 생성하기 위해 사용되는 패키징 세포계에서 pIX의 에피솜성(episomal) 발현에 의해 보충될 수 있다(Caravokyri te al., 1995).

[0008] 유전자 전이 벡터로서 비록 혈청형 Ad5와 Ad2가 가장 많이 사용되지만, 다른 혈청형들도 그들을 치료적 또는 예방적 도구로서 유용하게 하는 바람직한 특성을 가질 수 있다. 예를 들면, 서브그룹 B 바이러스 Ad35와 Ad11은 Ad5 및 Ad2 바이러스보다 인간 혈청에 의해 중화되는 경향이 훨씬 덜하다(WO 00/70071). 아데노바이러스 전이 벡터의 중화는 인비오에서 형질전환 효율을 감소시킨다. 더욱이, Ad35 섬유를 전달하는 재조합 바이러스에 의한, 수지상 세포와 같은 항원 표시 세포의 감염 효율성은 Ad5 바이러스와 비교하여 크게 강화되었다는 것이 발견되었다(WO 00/70071, WO 02/24730). 그러므로, Ad35-기재 벡터는 인간 혈청에서 매우 개선된 감염 효율과 낮은 중화를 견뎌낸다.

[0009] 완전히 E1-결실된 Ad35-기재 벡터의 생성 및 증식은 하기 기술을 사용하여 가능하다. 그러나, 여러 가지 재조합 Ad35-기재 벡터를 조심스럽게 분석한 결과는 이와 같은 벡터들이 Ad5-기재 벡터와 비교하여 덜 안정, 즉 이중 DNA를 덜 함유하게 된다는 것이 발견되었다. 본 특허 출원의 수단 및 방법은 이 문제를 극복하기 위해 제공되었다.

[0010] 그 밖에, 확장된 혈청형 유용성을 갖는 아데노바이러스에 대한 현재 이용가능한 기술을 개발할 필요성이 있다. 통상적으로 존재하는 패키징 세포계는 아데노바이러스 혈청형 5로부터 유도된 E1 암호화 단백질을 포함한다. 이와 같은 '표준' 패키징 세포계의 예는 293, 911 및 PER.C6™이다. 이들 표준 패키징 세포계에서 다른 혈청형으로부터 유도된 벡터들을 생성하려는 시도는, 실패하지 않는다 하더라도 어렵다고 판명되었다. 가끔, 사용된 특정 혈청형에 따라, 몇몇 생성물을 볼 수 있다. 그러나, 형질변환되고 Ad5로부터의 E1에 의해 불멸화된 세포계에서 생산된, 서브그룹 C와 다른 아데노바이러스 서브그룹으로부터 유도된 재조합 아데노바이러스 벡터의 수득량은 불충분하다. Abrahamsen et al의 논문에서(1997), E1A-결실된 아데노바이러스 혈청형 7 벡터(서브그룹 B)의 개선된 플라크 정제는, Ad5로부터의 E4-orf6 서열 결손 293 세포와 비교하여, 아데노바이러스 혈청형 5로부터 유도된 E4-orf6를 포함한다. 그러나, 문제는 예상하지 않은 재조합이 플라크-정제된 스톡에서 관찰됨에 따라 벡터의 안정성에서 마주쳤다. 추가의 문제는 생산 도중 야생형 아데노바이러스 바이러스 오염에서 마주쳤다. 더욱이, 아데노바이러스의 대규모 생산의 경우, 이것은 적용을 위해 충분히 높은 역가를 얻기 위한 공동-트랜스펙션 E4-orf6에 유용하지 않다. 이와 같은 아데노바이러스를 성장시키기 위한 하나의 선택은, 세포에 보조/ 패키징 세포계의 게놈으로 안정하게 통합된 E4-orf6 유전자를 제공하는 것이다. 이와 같은 세포들은 선행기술에 기재되어 있다(예를 들면, WO 96/22378). 이 시스템의 단점은 새로운 안정한 세포계가 생성되어야 한다는 것이며, 안정하고 알맞은 세포들이 생성되기 전에 수많은 선택의 되풀이가 행해져야 하는 것이다. 이 과정은 노동집약적이며 시간을 소모하는 일이다. 일반적으로, 예를 들면 서브그룹 B 바이러스와 같은, 혈청형 5(서브그룹 C) 이외의 혈청형으로부터 아데노바이러스의 생성 및 증식은 Ad5 보충 세포에서 어렵다고 알려져 있다고 말할 수 있다. WO 00/70071에 출원인에 의해 기재된 바와 같이, 서브그룹B 바이러스 Ad35를 기재로 한 재조합 바이러스는 Ad5 초

기 영역-1 서열(Ad35-E1)을 함유하는 발현 구축물(construct)의 공동-트랜스펙션에 의해 제조될 수 있다. 더우기, E1A 서열만이 결실되고 E1B의 경우는 결실되지 않은 Ad35-기재 바이러스는 PER.C6 세포에서 효과적으로 복제되는 것으로 보여지며, 이것은 Ad5의 E1a 단백질이 Ad35-E1A 기능을 보충할 수 있다는 것을 제안한다(본 출원인의 출원 WO 02/40665). 더우기, 실험은 Ad35-E1B의 결손이 Ad5 보조 세포에 대한 불량한 수득물을 가져온다는 것을 나타낸다. WO 00/70071은 또한 E1 영역 결손 재조합 아데노바이러스 혈청형 35 벡터의 보충을 위해 Ad35-E1 서열을 정착시키는 새로운 세포계를 설립해야만 한다는 것을 제안한다(WO 02/40665 참조). 그러나, 상기 논의와 같이, 특정 요구에 대해 특정의 혈청형을 적용하기 위한다면, 모든 특정 혈청형에 대해 새로운 세포계를 설립하거나 또는 아데노바이러스 혈청형 5의 보충은 이용가능한 세포계를 관심있는 혈청형의 보충에 대해 변형시켜야 한다. 이 분야에서 이용가능한 설립된 세포계를 사용하고, 이들을 변형시키지 않고 설립되고 본 분야에 알려진 방법을 적용하는 다른 모든, 비-Ad5 혈청형의 생산에 이들을 사용하는 것이 분명히 유리하다.

[0011] 서브그룹 C의 혈청형과 다른 아데노바이러스의 유용한 수득물을 생산할 수 있는 생산 시스템에 대한 요구가 여전히 존재한다고 결론지어진다.

또한, 편리한 패키징 세포와 이와 같은 패키징 세포에서 증식할 수 있고 안정한 재조합 서브그룹 B 아데노바이러스를 포함하는 적합한 패키징 시스템에 대한 요구가 여전히 존재한다.

발명의 상세한 설명

[0012] 본 발명은 E1 영역에서 최대 E1B 55K의 정지 코돈까지 결실을 갖는 재조합 그룹B 아데노바이러스가 유사한 Ad5 재조합 아데노바이러스 보다 덜 외인성 서열을 축적할 수 있다는 것을 보여준다. 이것은 pIX 코딩 영역이 E1B 55K 정지 코돈과 pIX 개시 코돈 사이의 서열에 의해서만 안내될 때, 주어진 패키징 세포에서 상기 그룹 B중의 pIX 유전자의 비교적 저발현 때문인 것으로 보인다. 이와 같은 바이러스는 더욱 안정할 수 있고 및/또는 pIX 프로모터가 E1B 55K 코딩 영역에서 이와 같은 바이러스로 서열이 포함됨에 의해 적어도 부분적으로 저장되거나, 또는 pIX를 조절하기 위한 이형성 프로모터를 사용함에 의해, pIX의 정상 또는 비교적 과발현이 주어진 패키징 세포에서 얻어질 때 더욱 외인성 서열을 축적할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0013] 본 발명은 E1 영역에서 적어도 하나의 결실을 갖는 재조합 아데노바이러스를 제공하고, 이것은 pIX 유전자의 발현을 증가시키는 E1B 55K 유전자 생성물을 암호화하는 서열의 적어도 일부가 상기 아데노바이러스에 존재하는 것을 특징으로 하고, 상기 재조합 아데노바이러스는 기능성 E1B 55K 유전자 생성물을 발현하지 않는 것을 조건으로 한다. 상기 아데노바이러스는 모든 E1B 코딩 서열이 결손한 대응하는 아데노바이러스보다 더욱 안정하고 및/또는 더 많은 외인성 DNA를 숨긴다. 바람직하기는, 상기 아데노바이러스는 pIX 코딩 서열의 직접 상류인 서열의 약 700 염기쌍 이하를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 상기 아데노바이러스는 그룹 B 아데노바이러스이고, 더욱 바람직하기는 Ad35 또는 Ad11로부터 유도된 또는 기재로 하는 아데노바이러스이다. 본 발명은 E1-영역에서 적어도 하나의 결실을 갖는 재조합 아데노바이러스의 안정성 및/또는 패키징 수용량을 증가시키는 방법을 추가로 제공하고, 상기 방법은 E1B 55K 유전자 생성물을 암호화하고 상기 아데노바이러스에서 pIX 유전자의 발현을 증가시키는 서열의 적어도 일부를 유지 또는 재도입하는 것을 포함한다. pIX 유전자의 발현을 증가시키는 E1B 55K 서열 대신 또는 그에 더하여, pIX의 발현을 증가시켜 재조합 아데노바이러스의 안정성을 증가시키고 및/또는 본 발명의 방법으로 생산된 아데노바이러스의 패키징 수용량을 증가시키기 위해, 서열이 더 강한 프로모터에 pIX 코딩 서열을 진행시키도록 변화시키는 것이 가능하다.

[0014] 그러므로, 본 발명은 적어도 E1-영역 결손 및 외인성 유전 정보를 갖는 재조합 아데노바이러스의 안정성 및/또는 패키징 수용량을 증가시키기 위한 방법 및 수단을 추가로 제공하고, 상기 방법은 상기 패키징 세포에서 pIX 유전자 생성물의 증가된 수준이 존재하는 패키징 세포 중의 바이러스 입자에 상기 재조합 아데노바이러스 벡터를 생산하고 조립하는데 필요한 요소들을 발현시키는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 pIX 유전자 생성물의 증가된 수준은 상기 벡터에서 변형된 pIX 유전자의 사용에 의해, pIX 단백질을 암호화하는 유전 정보의 과발현에 의해 일어나며, 상기 변형은 pIX 유전자 생성물의 과발현을 야기한다. 바람직한 구현예에서 상기 변형된 pIX 유전자는 pIX를 암호화하는 유전 정보의 발현을 가져오는 이형 프로모터를 포함하고, 상기 이형 프로모터는 프로모터가 pIX를 암호화하는 상기 유전 정보를 상기 패키징 세포에서 과발현되도록 한다. 한 구현예에서, 상기 이형 프로모터는 적어도 부분적으로 상기 재조합 벡터의 외인성 기부 pIX 상류 서열보다 pIX 발현의 더 높은 수준을 가져오는 아데노바이러스 혈청형의 pIX 프로모터로부터 유도되거나 또는 기재로 한다. 한 구현예에서, 상기 이형성 프로모터는 적어도 부분적으로 Ad5의 pIX 프로모터로부터 형성되거나 또는 기재로 한다. 한 면에서, 본 발명은 적어도 E1-영역이 결손하고 관심있는 유전자를 포함하는 재조합 아데노바이러스를 제공하고, 여기서 pIX 유전자는 변형되며, 상기 재조합 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 5로부터 유도되지 않는다. 또

다른 면에서, 본 발명은 변형된 아데노바이러스 pIX 유전자를 포함하는 재조합 핵산 서열을 제공하며, 여기서 pIX 단백질을 암호화하는 유전성 정보는 아데노바이러스 혈청형 5 또는 아데노바이러스 혈청형 7 pIX 암호화 서열로부터 유도되지 않는다. 바람직한 구현예에서, 상기 변형된 pIX 유전자는 pIX를 암호화하는 유전성 정보의 발현을 구동하는 이형성 프로모터를 포함한다.

[0015] 본 발명은 또한 제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함하는 재조합 아데노바이러스를 제공하며, 여기서 상기 벡터는 E4-orf6 단백질을 암호화하는 서열을 포함하고, 여기서 상기 서열은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: a) 상기 제1 혈청형과 다른 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; b) 하나 이상의 코돈에서 결실, 돌연변이, 첨가 및/또는 치환의 방법으로 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; 및 c) 상기 제1 혈청형과 다른 제2 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부와 제3 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부 사이에 융해물을 포함하는 E4-orf6 암호화 서열. 여기서 상기 제3 혈청형은 상기 제1 혈청형과 동일하거나 또는 다를 수 있다.

[0016] 본 발명은 제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터의 생산방법을 또한 제공하며, 상기 방법은 a) 발현형태로 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E1b-55K 암호화 서열을 정착시키는 보충 세포에, 재조합 바이러스 벡터의 조립이 상기 보충 세포에 의해 허용되도록 아데노바이러스의 필수 요소를 제공하는 단계, 여기서 상기 요소들은 상기 제2 혈청형 및 기능성 E4-orf6 단백질을 암호화하는 서열과 다른 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터의 적어도 몇몇의 구조적 및 비-구조적 요소, 또는 그들의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체를 포함하고, 이것은 상기 보충 세포에서 상기 발현가능한 E1b-55k 단백질과 양립할 수 있고; b) 상기 보충 세포를 아데노바이러스 벡터의 생산 및 조립이 일어나도록 허용할 수 있는 조건하에서 배지중에 배양시키는 단계; 및 c) 배지 및/또는 보충 세포에서 생산된 재조합 아데노바이러스 벡터를 수확하는 단계를 포함하고, 여기서 양립가능한 E4-orf6 단백질을 암호화하는 서열은 이렇게 생산된 재조합 아데노바이러스에 존재한다.

[0017] 본 발명은 추가로 아데노바이러스로부터 유도된 재조합 핵산 분자를 포함하는 재조합 아데노바이러스를 제공하고, 상기 재조합 핵산 분자는 E1 영역에서 적어도 하나의 결실을 가지며, E1B 55K 유전자 생성물을 암호화하는 서열의 적어도 일부는 상기 재조합 핵산 분자에 존재하고 및/또는 pIX 코딩 서열은 이형성 프로모터의 조절하에 있고, 상기 재조합 아데노바이러스는 추가로 제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함하는 것을 특징으로하고, 여기서 상기 재조합 아데노바이러스는 기능성 E4-orf6 단백질, 또는 그의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체를 암호화하는 서열을 더욱 포함하고, 여기서 상기 서열은 다음 군으로부터 선택된다: a) 상기 제1 혈청형과 다른 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 코딩 서열; b) 하나 이상의 코돈에서 결실, 돌연변이, 첨가 및/또는 치환을 포함하는 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; 및 c) 제2 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부와 제3 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부 사이에 융해물을 갖는 E4-orf6 암호화 서열, 여기서 상기 제3 혈청형은 상기 제1 혈청형과 같거나 다를 수 있다.

[0018] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스와 패키징 세포를 포함하는 패키징 시스템을 제공하며, 여기서 상기 패키징 세포 및 패키징 재조합 아데노바이러스는 함께 상기 패키징 세포에서 상기 재조합 아데노바이러스의 생산 및 조립을 허용하는 모든 필요한 요소들을 포함하고, 여기서 상기 패키징 세포는 적어도 아데노바이러스 E1B-55K 단백질, 그의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체를 암호화하는 핵산을 발현하고, 이것은 상기 재조합 아데노바이러스의 E4-orf6 단백질, 그의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체와 양립할 수 있다.

[0019] 본 발명은 또한, 본 발명은 제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함하는 안정한 아데노바이러스의 생산방법을 제공하고, 여기서 상기 재조합 아데노바이러스는, 그의 핵산 분자가 E1 영역에서 결실을 갖고 상기 핵산 분자로부터 기능성 E1B 55K 단백질의 발현을 야기하지 않는 pIX 단백질의 발현을 증가시키는 E1B-55K 유전자 생성물을 암호화하는 서열의 적어도 일부를 포함하고 및/또는 이형성 프로모터의 조절하에 pIX 코딩 서열을 갖는 아데노바이러스로부터 유도된 재조합 핵산 분자를 포함하며, 상기 방법은 a) 발현가능한 형태로 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E1B-55K 암호화서열을 발현하는 보충 세포, 그의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체에, 상기 보충세포에 의해 상기 재조합 아데노바이러스 벡터의 조립을 허용하도록 아데노바이러스의 필요 요소들을 제공하는 단계, 여기서 상기 요소들은 상기 제2 혈청형과 다른 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 적어도 약간의 구조적 및 비-구조적 요소들과 기능성 E4-orf6 단백질, 또는 기능성 부분, 유도체 및/또는 그들의 동족체를 암호화하는 서열을 포함하고, 이것은 상기 보충 세포 중의 상기 발현가능한 E1B-55K 단백질과 양립할 수 있고; 그리고 b) 상기 보충세포를 재조합 아데노바이러스의 생산 및 조립이 일어나도록 허용하는 조건하의 배지에서 배양하는 단계; 및 c) 이와 같이 생산된 재조합 아데노바이러스를 배지 및/

또는 보충세포에서 수확하는 단계를 포함한다.

[0020] 본 발명은 또한, 복제 적합 아데노바이러스의 생성 없이 외인성 유전 정보를 함유하는 안정한 아데노바이러스의 생산방법을 제공하고, 여기서 상기 벡터는 아데노바이러스 5 이외의 혈청형으로, 아데노바이러스 벡터 생산에 도움이 되는 조건하에서 세포를 성장시키는 단계를 포함하고, 상기 세포, 또는 그의 전구체는 아데노바이러스 벡터 생산과 패키징에 필수적인 모든 요소들에 대해 코딩하는 핵산을 제공하고 발현하고, 적어도 두 개의 분리된 핵산에 존재하고 있는 재조합 적합 아데노바이러스 벡터의 발생에 필수적인 요소는 분자내 재조합을 일으키지 않고, Ad5 이외의 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 구조적 및 하나의 비-구조적 요소를 결정하는 적어도 하나의 혈청형을 포함하는 필수 요소들, 및 제1 혈청형 및 상기 E1B 55K 유전자 생성물과 양립가능한 E4 orf6 유전자 생성물과 다른 제2 혈청형으로부터의 E1B 55K 유전자 생성물을 포함한다. 특정 구현예에서, 아데노바이러스 벡터 생산과 패키징에 필수적인 모든 필수 요소들에 대한 핵산 암호화는 재조합 pIX 유전자를 포함한다. 한 구현예에서, 재조합 pIX 유전자는 이형성 프로모터의 조절하의 pIX 암호화 서열이다.

[0021] 또 다른 면에서, 본 발명은 인간 또는 동물 개체에서 질병 또는 병을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스 벡터를 인간 또는 동물 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 다른 면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 아데노바이러스 벡터를 포함하는 백신 및 약제학적 조성물을 제공한다. 또 다른 면에서, 본 발명은 인간 또는 동물 개체의 질병 및 병의 예방 또는 치료를 위한 의학의 제조를 위한 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스 벡터의 용도를 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명에 의해 제공되는 방법을 실행하기 위해 본 발명에 의해 제공되는 세포제와 아데노바이러스 벡터를 포함하는 부분들의 키트에 관한 것이다.

실시예

[0057] 본 발명의 한 면은, E1-영역에 적어도 하나의 결실을 갖는 재조합 아데노바이러스의 안정성 및/또는 패키징 수용량을 증가시키는 방법으로, pIX 코딩 서열이 E1B 55K 서열 없이 그의 외인성 중앙 상류 서열 뒤에 있을 때 얻어지는 pIX 유전자 생성물의 수준과 비교하여, 상기 패키징 세포에서 pIX 유전자 생성물의 증가된 수준의 존재하에 패키징 세포의 바이러스 입자에 상기 재조합 아데노바이러스 입자의 생산 및 조립에 요구되는 효소들을 발현시키는 단계를 포함한다. 본 발명의 방법의 특정 구현예에서, 상기 pIX 유전자 생성물의 증가된 수준은 상기 아데노바이러스에서 E1B 55K의 보유 또는 재도입 일부에 의해 가져오게 된다. 다른 구현예에서, 상기 pIX 유전자 생성물의 증가된 수준은 이형성 프로모터의 조절하에 pIX 코딩 서열의 발현에 의해 가져온다. 본 발명은 발현 서열의 조절하에 기능성 pIX 코딩 서열을 포함하는 재조합 아데노바이러스를 더욱 제공하고, 상기 발현 서열은 상기 E1B 55K 서열의 일부가 없는 그의 외인성 근위 pIX 상류 서열 뒤의 상기 pIX 코딩 서열의 발현과 비교하여, 주어진 패키징 세포에서 pIX 코딩 서열의 발현을 증가시킬 수 있는 E1B 55K 서열의 일부를 포함하고 상기 E1B 55K 서열의 상기 일부는 기능성 E1B 55K 유전자 생성물을 암호화하지 않는 것을 조건으로 한다. 본 발명에서, pIX 프로모터 서열은 상기 E1B 55K 서열에 존재할 수 있고, 상기 발현 서열 중의 이들 서열은, 그러므로 pIX 발현을 증가시킬 수 있다. 상기 E1B 55K 서열의 존재는, 상기 pIX 코딩 서열이 상기 E1B 55K 서열의 일부 없이 그의 외인성 근위 pIX 상류 서열 뒤에 있는 상황과 비교하여, 상기 재조합 아데노바이러스의 안정성 및/또는 패키징 수용량을 증가시킨다.

[0058] E1 영역에 결실이 있고 완전한 E1B 55K 코딩 영역을 갖는 혈청형 35의 아데노바이러스(pBr.Ad35.left ITR.△E1A△21K)가 WO 02/40665에 기재되어 있다. 그러나, 기재된 벡터에 존재하는 바와 같은 기능성 55K 유전자 생성물은 세포자멸사를 억제하며, 그러므로 E1B 55K 유전자의 돌연변이에 의해 또는 바람직하기는 E1B 55K 서열의 한 일부만을 포함함에 의해, 더욱 바람직하기는 E1B 55K 개시 코돈의 하부흐름 서열만을 포함함에 의해 기능적 E1B 55K 발현 결손 재조합 아데노바이러스를 얻는 것이 바람직하다. 더욱 이형의 핵산을 축적하도록 최대 E1 결실을 갖는 바이러스를 발생시키기 위해, 상기 벡터에서 재조합 아데노바이러스 내의 증가된 안정성 및/또는 증가된 패키징 수용량의 본 발명에 따른 이점을 갖는 충분한 E1B 55K 서열을 유지하는 동시에 E1B 55K 서열의 양을 최소화하는 것이 유리하다는 것이 당업자들에게는 분명할 것이다. 본 발명의 가르침에 의해, 예를 들면 포함된 벡터(pBr.Ad35.left ITR.△E1A△21K)로부터 개시되는 E1B 55K 영역내의 일련의 결실을 얻고 안정성 또는 패키징 수용량을 결정하기 위한 표준 분자 클로닝 기술을 사용함에 의해, 당업자는 재조합 아데노바이러스의 안정성 및/또는 패키징 수용량의 증가를 가져오는 E1B 55K 내의 최소로 요구되는 서열을 찾을 수 있다. 그러므로, 본 발명의 목적은 본 발명에 따른 아데노바이러스를 제공하는 것으로, 여기서 E1B 55K 유전자 생성물을 암호화하는 상기 서열은 pIX 개방형 해독 프레임의 직접 상류인, 약 0.7kb 이하의 아데노바이러스 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 서열은 pIX 개방형 해독 프레임의 직접 상류인 아데노바이러스의 680, 600, 550, 500, 450,

400, 350, 300, 250, 200, 150 또는 100 nt를 포함한다. 다른 구현예에서, 이와같은 재조합 아데노바이러스 벡터는 55K 암호화 서열의 3' 말단의 166bp를 유지한다. 당업자들에게 분명하듯이, 본 발명은 천연 아데노바이러스에서 pIX 코딩 서열의 직접 상류의 연속적인 연장에서 발견되는 서열의 존재로 한정되는 것은 아니다. 그 대신, 본 발명에 따르면, 더욱 전위 pIX 조절 서열에 융합된, E1B 55K 영역(예를 들면, 제한 또는 PCR 단편, 예를 들면, 실시예 10 및 도9를 참조)으로부터 더 상류인 서열을 갖는 것이 가능하고, 그것에 의해 어느 E1B 55K 서열이 없는 것과 비교했을 때, 주어진 패키징 세포에서 증가된 pIX 발현을 가져오는 한, 조절 서열의 인공적 결합을 만든다. 바람직한 구현예에서, 상기 아데노바이러스는 서브그룹 B 아데노바이러스이고, 더욱 바람직하기는 Ad35 또는 Ad11 아데노바이러스이다. 혈청형 35 또는 11의 아데노바이러스는, 훨씬 더 적은 개체들이 가장 많이 사용되는 혈청형 5보다 이들 혈청형에 대한 중화 항체를 갖기 때문에, 인간에 투여하기에 특히 유용한 것으로 나타났다(WO 00/70071). 본 발명의 또 다른 관점은 본 발명에 따른 아데노바이러스의 게놈으로 작용할 수 있는 핵산을 제공하는 것이다.

[0059] pIX 유전자의 발현을 증가시키는 E1B 55K 서열의 존재 대신 또는 그에 더하여, 재조합 아데노바이러스의 안정성 및/또는 패키징 수용량을 증가시키기 위해, pIX 유전자를 돌연변이화하여 pIX 자체가 과발현되도록 하는 것이 가능하다. 변형된 pIX 유전자는 다른 프로모터 및/또는 전사 터미네이터, 및/또는 예를 들면 코돈 최적화, RNA 등을 안정화시키는 인트론의 도입에 의해 얻어지는 돌연변이 프로모터 서열을 갖는 pIX 유전자이다. 본 발명에 따른 pIX 유전자는 pIX를 암호화하는 유전성 정보를 포함하고, 천연 아데노바이러스에서 발견되는 것과 같은 pIX 유전자와 같은 핵산, cDNA 및 대립형질 변종 형태의 돌연변이 pIX를 암호화하는 정보 또는 돌연변이, 결실, 첨가, 또는 아미노산의 전위 또는 그들의 조합에 의해 pIX로부터 유도된 또는 pIX를 기재로 하는 정량적 또는 정성적 면에서 정상 pIX와 다를 수 있는 pIX의 작용의 적어도 일부를 갖는 돌연변이 pIX를 암호화 핵산을 포함한다.

[0060] 재조합 아데노바이러스가 최대 E1B 55K 유전자 생성의 정지 코돈까지를 포함하여 적어도 E1B 55K 영역의 결실을 갖는다면, pIX 개방형 해독 프레임은 E1B 55K 정지 코돈과 pIX의 개시 코돈 사이의 서열에 의해 선행될 것이다. 이들 서열은 여기서 "내인성 근접 pIX 상류 서열"로 명명될 것이다(예를 들면, Ad35 기재 재조합 아데노바이러스 벡터에서의 Ad35 pIX 상류 서열, Ad11 기재 재조합 아데노바이러스 벡터에서 Ad11 pIX 상류 서열 등은 이 관점에서 내인성으로 언급된다: 정의는 천연에서 발견될 수 있고 실험실에서 생성되지 않는 대립형질 변종을 포함한다; 몇몇 전위 pIX 상류 서열의 도 3 참조).

[0061] 본 명세서의 "이종성 프로모터" 는, pIX 유전자의 상류가 천연적으로 발견되는 서열과 다르고, E1B 55K 영역의 서열 및 내인성 근접 pIX 상류 서열을 포함하고, 프로모터로 작용할 수 있으며 따라서 pIX 코딩 서열의 전사를 조절할 수 있는 어느 서열을 정의한다. 한 면에서, 이종성 프로모터는 적어도 부분적으로, 재조합 아데노 바이러스 벡터가 유도되는(예를 들면 Ad35 재조합 아데노바이러스 벡터에서 Ad pIX 상류 서열) 혈청형과 다른 혈청형으로부터 아데노바이러스의 근위 pIX 상류 서열(즉, E1B 55K 정지 코돈과 pIX 개시 코돈 사이의 서열)로부터 유도된 또는 기재로하는 서열일 수 있다. 이것은 본 명세서에서 "비-내인성 근접 pIX 프로모터"로 언급된다.

[0062] 본 발명의 한 구현예에서, Ad35 유도 pIX 발현은 Ad5 비-내인성 근접 pIX 프로모터에 의해 구동된다. 아데노 바이러스 벡터의 내인성 pIX 근위 서열보다 더 높은 pIX 발현수준을 제공하는 혈청형의 근위 pIX 상부 서열로부터 유도되거나 기재로 하는 어느 비-내인성 근접 pIX 프로모터가 사용될 수 있다. 이와 같은 비-내인성 근접 pIX 프로모터의 동정은, 실시예 4에서 당업자에게 증명되듯이 서열 정보를 기재로 할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 서브그룹 E 혈청형, 또는 바람직하기는 서브그룹 B 혈청형을 기재로 하거나 또는 유도된다. 특정 구현예에서, 상기 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 35(Ad35), Ad11, Ad7 또는 Ad4를 기재로 하거나 또는 유도된다. 선택적 구현예에서, 상기 비-내인성 근접 pIX 프로모터는 적어도 부분적으로 서브그룹 C, A, D, 또는 F로 분류된 아데노바이러스의 근위 pIX 상류 서열을 기재로 하거나 또는 유도된다. 특별한 구현예에서, 상기 비-내인성 근접 프로모터는 적어도 부분적으로 아데노 바이러스 혈청형 12(Ad12), Ad9, 또는 Ad40 또는 더욱 바람직하기는 Ad5 또는 Ad2의 근위 pIX 상류 서열을 기재로 또는 유도된다. 선택적으로, 비-내인성 근접 pIX 프로모터로 작용할 수 있는 서열은, 프로모터를 강도에 대해 반복적으로 시험할 수 있는 전사방법에 의해서와 같은, 당업자들이 알고 있는 일반적인 분자 생물학적 방법에 의해 실험적으로 발견될 수 있다. 프로모터의 요소들은 전체 프로모터를 교체없이 교환될 수 있고, 예를 들면 서열을 프로모터에 결합시키는 전사 인자의 첨가, 결실 또는 돌연변이는 그의 길이에 영향을 줄 수 있다. 프로모터 서열의 적어도 일부의 돌연변이화는 공지의 기능을 갖는 뉴클레오타이드의 신장을 포함하여, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 첨가, 결실 또는 교체와 같은 돌연변이에 의한 서열의 변화에 의해 행해질 수 있다. 프로모터 서열의 치환은 이들 서열의 일부 또는 모두의 다른 프로모터에 의한 대체에 의해 행해진다. 이와 같은 대체는 당

업자들에 의해 잘 알려져 있는 표준 분자 생물학 방법에 따라 행해질 수 있다. 어떠한 프로모터도 pIX 유전자의 선택과 관련하여 구성되고, 그 효과를 시험할 수 있다.

[0063] 다른 면에서, 이형성 프로모터는 아데노바이러스 비-내인성 근접 pIX 프로모터와 관련이 없다. 그러므로, 이중성 프로모터는 바이러스성 프로모터일 수 있고, 시토크로마바이러스(CMV, 예를 들면 인간 CMV 직접 초기 유전자 프로모터, 더욱 여기서는 CMV 프로모터로 언급됨), 라우스 사르코마 바이러스(Rous sarcoma Virus)(RSV, 예를 들면 RSV 긴 말단 반복 프로모터, 여기서 RSV 프로모터로 언급됨), TK, HBV, SV40 등으로부터 유도되거나 기재로 하는 프로모터를 포함하지만, 이것으로 한정되는 것은 아니다. 한 구현예에서, 아데노바이러스 E1B 프로모터는 이중성 프로모터로 사용된다. 세포형 프로모터는 또한 이중성 프로모터로 사용될 수 있고, 이들은 PGK, 메탈로티오네인, EF1- α , β -액틴 등의 프로모터를 포함하지만 이것으로 한정되는 것은 아니다. 하나 이상의 요소들을 포함하는 합성 또는 하이브리드(hybrid) 프로모터들도 본 발명에 사용할 수 있고, 그들 모두는 이중성 프로모터 용어의 범위에 포함된다. 사용된 프로모터는 성분을 이루거나 유도가능하다. 유도가능 프로모터의 정황에서, 프로모터는 그의 유도된 상태에서 과발현을 제공한다면 본 발명에 알맞다고 간주된다. 본 발명에 따른 pIX의 과발현을 가져오는 어느 프로모터 서열은 본 발명에 따른 이중성 프로모터로서 사용될 수 있다. 프로모터 강도 이외에, 재조합 아데노바이러스 벡터 자체에 존재할 때 특정 프로모터의 유용성을 결정하는 또 다른 면은 그의 크기로, 프로모터가 길수록 트랜스진에 사용할 수 있는 공간을 갖는다. 당업자는 본 발명을 더욱 안정한 재조합 벡터를 찾기위해, 크기를 삽입하는 것과 관련된 프로모터 길이와 강도에 관하여 벡터를 실험적으로 최적화하도록 사용할 수 있다.

[0064] 이중성 프로모터는 여전히 내인성 근접 pIX 상류 서열 전체 또는 일부를 함유하거나 포함할 수 있고, 또는 선택적으로 본 발명에 따른 이중성 프로모터가 선택물의 패키징 세포에서 유전성 정보 암호화 pIX의 과발현을 일으킬 수 있는 한, 이들 서열 전체를 대신할 수 있다는 것이 명백할 것이다. 또한, 당업자에게 있어서, 내인성 비-pIX 아데노바이러스 프로모터(예를 들면, E1A, E2A 등 프로모터) 또는 예를 들면 트랜스진을 조절하는 이동성 프로모터가 비-pIX 아데노바이러스 유전자 또는 트랜스진과 pIX 코딩 서열(어느 순서로도) 사이의 내부 리보솜 엔트리 부위(IRES)의 사용에 의해 pIX의 발현을 구동하는데 사용될 수 있고, 이것은 본 발명에 따른 "이중성 프로모터"의 용어 범위라고 간주된다.

[0065] 본 발명에서 pIX 유전자 생성물의 향상된 또는 증가된 수준은 선택물의 패키징 세포에서 pIX 유전자의 과발현을 가져온다. 여기서 사용되는 pIX 유전자의 과발현은 RNA 또는 단백질 수준 또는 둘다에서 pIX의 발현정도로 정의되며, 이것은 pIX의 코딩 영역이 여기서 정의되는 바와 같은 "내인성 근접 pIX 상류 서열" 다음일 때 얻어지는 pIX 발현 수준보다 높다. "과발현"은 선택물의 특정 패키징 세포와 결합된 아데노바이러스의 특정 이중성 프로모터-pIX 결합에 대한 본 발명의 내용에서 의미있다. 발현 수준을 측정하는 방법은 일반적으로 당업자들에게 잘 알려져 있으며, RT-PCR, 노던 블롯팅, 웨스턴 블롯팅 등이 포함되지만 이것으로 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 과발현은, 선택물의 주어진 패키징 세포에서, 주어진 삽입체(예를 들면 루시페라제)를 갖는 재조합 아데노바이러스에서 발현수준을 결정하는 것으로 측정될 수 있고, 여기서 pIX를 암호화하는 유전적 정보는 E1B 55K 서열없이 내인성 근접 pIX 상류 서열의 다음이고, 이들 발현 수준은 pIX 코딩 영역이 이중성 프로모터에 의해 또는 (그의 '천연' 프로모터가 적어도 부분적으로 재구성된) 내인성 E1B 55K 유전자로부터의 서열에 의해 조절되는 것 이외에는 동일한 재조합 아데노바이러스에서의 발현수준과 비교된다. pIX의 과발현은 E1B 55K 서열이 없는 내인성 근접 pIX 상류 서열에 의해 얻어진 것에 대한 이중성 또는 '천연' 프로모터에 의해 얻어진 발현 수준에 대해 1 보다 높은 비율로 표시된다. 패키징 세포의 선택은 패키징 세포에서 보충 아데노바이러스 작용과 상호작용하는 재조합 아데노바이러스의 요소들의 혈청형, (발생된 배치로부터 복제 적합 아데노바이러스의 부재와 같은)생산물의 순도, 사용의 용이함, 성장 특성 등과 같은 인자들에 의해 결정된다. 패키징 세포의 예는 당업자들에게 알려져 있으며, 293 세포, 911 세포, 및 PER.C6™ 세포들을 포함하며, PER 55K와 같은, 특정 혈청형의 아데노바이러스 벡터의 보충에 대해 변형된 그들의 유도체를 포함한다.

[0066] 본 발명의 모든 구현예에서, pIX 코딩 서열과 pIX의 발현을 구동하는 조절 서열이 아데노바이러스 게놈내의 그들의 천연 위치 뿐만 아니라 아데노바이러스 게놈의 다양한 위치, 예를 들면 E3 서열을 근본적으로 포함하는 영역에 위치될 수 있다는 것은 분명하다.

[0067] 증가된 안정성을 갖는 재조합 아데노바이러스는 바이러스 입자(비리온)에 더 큰 게놈을 병합시킬 수 있다. 그러므로, 본 발명에서 사용된 재조합 아데노바이러스의 안정성의 증가는, 관심있는 유전자와 비교하여, 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스가 더 많은 지형 유전성 정보를 포함하도록 허용한다. 더욱이, 본 발명에 따른 증가된 안정성을 갖는 재조합 아데노바이러스는 불안정성 신호없이 더 많은 계대 증식이 가능하다. 안정성은 당업자

들에게 알려진 몇몇 방법으로 측정될 수 있고, 원하는 재조합 아데노바이러스 벡터의 존재를 설명하기 위한 재조합 바이러스에 대한 PCR을 포함하지만 이것으로 제한하는 것은 아니다. 불안정성은 부산물을 가져오고, 이것은 또한 PCR 법에 의해 가시화된다. 바이러스 DNA에 대한 제한 분석, 바이러스 입자들의 상대적 전염성의 측정, 아데노바이러스 입자의 열안정성의 측정은 재조합 아데노바이러스 벡터의 안정성을 측정하는데 사용될 수 있다 (Caravokyri and Leppard, 1995). 재조합 아데노바이러스 벡터의 안정성/불안정성을 측정하는 방법은 본 발명의 실시예 3에도 주어지고 있다. 본 발명에 사용되는, 재조합 아데노바이러스 벡터 또는 아데노바이러스 벡터라고도 불리는, 재조합 아데노바이러스는 아데노바이러스의 (E1A 및 E1B 유전자를 포함하여) E1 영역의 적어도 일부가 결손한 아데노바이러스로부터 유도되거나 또는 기재로 하며, 상기 벡터에 의해 전달 및/또는 발현이 요구되는 이형 유전자 정보를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 외인성(또는 이형) 유전 정보는 아데노바이러스에 천연적으로 존재하지 않는 어느 유전 정보일 수 있고, 또한 트랜스진로도 언급된다. 이것은 관심있는 유전자, 발현 카세트 등을 포함하지만 이것으로 제한되는 것은 아니다. 이와 같은 외인성 유전 정보는 아데노바이러스 E1 서열의 결실에 의해 이용가능하게 된 계놈에서의 공간을 채울 수 있다. 재조합 아데노바이러스 벡터는 유전자 치료 적용, 백신 제조등, 여러 목적에 유용하다. E1 영역 결실에 더하여, 특정의 바람직한 구현예에서 이형 유전 정보에 대한 수용량을 증가시키기 위해, 이와같은 벡터에서 E3 서열이 결실될 수 있다. 아데노바이러스 벡터의 복제가 요구될 때 아데노바이러스 벡터에서 결손한 유전 정보를 포함하는 패키징 세포와 결합하여 필요하다면, 다른 결실 및 E1 결실과 결합된 E2, E3, 및 E4 영역의 일부 또는 완전결실의 여러 결합이 사용될 수 있다. 아데노바이러스 계놈에서 임의로 다른 결실과 결합된 E1-영역의 결실을 갖는 모든 재조합 아데노바이러스는 본 발명의 범위내에 포함된다. 본 발명의 아데노바이러스는 유전자 치료법 또는, 종양 백신화와 항-바이러스 백신화를 포함하여 예방 및/또는 치료 백신과 같은 여러 가지 상황에서 사용될 수 있다. 이것을 위해, 아데노바이러스 벡터는 유전자 전달 배지로 작용하고, 여기서 비-천연 유전자는 아데노바이러스 계놈으로 병합된다. 아데노바이러스 입자는 실제적으로 관심있는 표적세포에 특이적으로 표적화될 수 있다; 아데노바이러스는 캡시드 수용체 결합 또는 다른 수단에 의해 특정 세포에 결합되고 트랜스진을 전달할 수 있다. 아데노바이러스의 표적화는 여러 방법으로 실행될 수 있다. 아데노바이러스 벡터 표적화 분야의 당업자는 관심있는 세포에 아데노바이러스 벡터를 전달하는데 사용되는 모든 여러 가능성을 알 것이다. 이와 같은 가능성은 캡시드 변경(결실, 다른 혈청형 섬유간의 스왑, 및 펩티드 및/또는 다른 결합 일부 등의 첨가와 같은, 섬유, 핵소 및/또는 펜톤 변형)을 포함하지만, 이것으로 제한되는 것은 아니며 여기서 키메릭 섬유가 생성되어 관심있는 세포 상에 존재하는 수용체를 인식하거나, 또는 펜톤-기재의 결합이 이용된다. 다른 가능성은 캡시드 단백질에 표적화 부분들이 연결되는 것이고, 여기서 예를 들면 결합 펩티드, 공지의 강력한 결합 단백질, 또는 항체 또는 그들의 일부가 특정 표적화를 이루도록 캡시드 단백질에 연결된다. 이와 같은 벡터는 본 발명의 방법 및 제공되는 수단에 의해 달성될 수 있다. 그러므로, 본 발명은 또한 비-아데노바이러스 단백질을 암호화하는 서열을 추가로 포함하는 본 발명에 따른 재조합 아데노 바이러스 벡터를 기재한다. 이와 같은 서열은 아데노 바이러스 골격 내의 다양한 위치에 존재할 수 있지만, 바람직하기는 E1 영역에 위치하고, 이것은 본 발명의 재조합 아데노바이러스 벡터에서 결손된다. E1 영역은 보충 세포내에 존재하는 상보성 요소들에 의해 보충된다. 프로모터, 트랜스진 및 다른 조절 서열들의 방향은 오른쪽 뿐만 아니라 왼쪽 전화 터미널 반복을 향하여 지시될 수 있다.

[0068] 본 발명은 또한 아데노바이러스 및/또는 아데노-관련 바이러스(AAV)와 같은 다른 바이러스를 기재로하는 바이러스 벡터의 생산에 사용될 수 있고, 여기서 Ad-AAV 키메릭 바이러스와 같은 결합은 숙주 세포 계놈으로 통합될 수 있다. 몇몇 방법이 통합 아데노바이러스의 발생에 대해 알려져 있다. 일반적으로, 본 발명은 (특이적으로, 또는 비특이적으로) 통합될 수 있는 아데노바이러스 형태의 생산에 유용하다.

[0069] 상기와 같이, 몇몇 비-아데노바이러스 트랜스진은 본 발명의 재조합 아데노바이러스 벡터로 클론될 수 있다. 이들은 인헨서, 프로모터(예를 들면, 시토크롬 b235 바이러스 프로모터, SV40 프로모터와 RSV 프로모터와 같은 강한 비-아데노바이러스 벡터) 및 폴리아데닐화 시그널과 같은 조절 핵산 서열을 포함할 뿐만 아니라, 치료적 목적을 위한 이종성 유전자들도 포함한다.

[0070] 그러므로, 본 발명의 한 면은, 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스 벡터가 제공되는 것이며, 여기서, 상기 비-아데노바이러스 단백질은: 세포-치사 유도 폴리펩티드, 종양 특이 항원, 바이러스성 단백질, 호르몬 및 사이토카인으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 비-아데노바이러스 인자, 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드의 비-제한적 예는 전사 인자, 세포내 시그널 단백질, 포스포타제, 키나아제, 세포자멸사 억제 인자, 수용체 안타고니스트, 세포막-결합 수용체의 수용성 형태, RNA 억제제, 항-센스 RNA's, 유인 인자, 리보자임 및 더욱 특별하기는 티미딘 키나아제, 에리트로포이에틴, 신규한-에리트로포이에시스-자극 단백질(NESP), IL3, ceNOS, 감마-인터페론 및 gp100이다. 비-아데노바이러스 바이러스성 단백질은 백신화 목적을 위한 본 발명의 방법 및 수단에 의해 제공된 재조합 아데노바이러스로 클론될 수 있다. 이와 같은 바이러스성 단백질은, HIV 백신용 gag, pol, env, nef 등,

인간 파필로마 바이러스 백신용 E6와 E7 단백질, 말라리아 백신용 플라스모뎀속 프로토조아의 서큘스포르조아이트(circumsporozoite) 단백질, 로타바이러스 백신용 로타바이러스 성분, 에볼라바이러스용 에볼라 단백질, 호흡 신시티알(Syncytial) 바이러스 백신용 호흡 신시티알 바이러스의 F 와 G 유전자 생성물, 인플루엔자 백신용 HA 및 NA 등을 포함하지만, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

[0071] 본 발명에 따른 아데노바이러스는 바람직하기는 인간 세포를 감염시킬 수 있는 아데노바이러스로부터 유도되거나 기재로 하는 인간 아데노바이러스가 바람직하지만, 본 발명은 비-인간 아데노바이러스에 대해서도 동일하게 유용하다. 당업자는 모든 인간 아데노바이러스에 대하여 수많은 비-인간 아데노바이러스가 본 분야에서 동일하다는 것을 이해할 것이다. 당연히, 또한 비-인간 아데노바이러스는 본 발명에 기재된 바와 같은 동일한 결과를 얻기 위해 적용될 수 있다. 본 발명의 방법 및 수단을 사용하여 생산될 수 있는 비-인간 아데노바이러스의 비-제한적 예는 개-, 소-, 원숭이-, 그리고 조류 아데노바이러스이다. 그러므로, 본 명세서에 사용된 혈청형은 종-제한적 혈청형의 범위를 넘는다.

[0072] 본 명세서에 사용되는 "-로부터 유도된"은 일반적으로 아데노바이러스에서 발견되는 핵산 서열, 유전자 또는 단백질이 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스의 생산에 사용되는 것을 의미한다. 이와 같은 재조합 아데노바이러스를 발생시키기 위한 방법은 제한 효소의 사용에 의한 원하는 집합체에 유전적 정보를 클로닝하는 것과 같은 일반적인 분자 생물학적 방법을 포함하지만, 이것으로 제한되는 것은 아니다. 재조합 아데노바이러스는 아데노바이러스 서열을 기재로 할 수 있다. 여기서 "기재로 하는"은 이와 같은 유전적 정보의 지식을 기준으로 하는 유전적 정보의 합성적 구성을 포함하는 의미이다. 이와 같은 방법은 주형 아데노바이러스의 서열을 기준으로 하는 새로운 아데노바이러스 구축물을 구성하기 위한 PCR용 주형으로서 아데노바이러스 유전물질의 사용, 예를 들면, 원하는 구성물에 합성 올리고뉴클레오타이드를 연결함에 의해, 원하는 서열을 갖는 완전한 합성 유전 정보의 구성등을 포함하지만, 이것으로 제한되는 것은 아니다. '로부터 유도된'은 야생형 DNA의 직접 클로닝의 필수 수단이 아니라는 것을 이해할 수 있다. 또한, 당업자는 핵산의 특정 조각의 돌연변이 형태를 얻기 위한 분자 생물학적 가능성에 대해 깨달을 것이다. 이들 돌연변이들은 다른 기능성을 갖게 되지만, 이들은 또한 DAN와 그의 암호화된 단백질의 특정 조각의 기능성을 변화시키지 않는 방법으로 목살될 수 있다. 그러므로, '그들의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체'는 그들이 관련된 핵산의 등가체로 이해될 수 있다. 당업자는 특정 결실, 스왑, (포인트)돌연변이, 첨가 등이 원 핵산과 유사한 기능을 갖는 핵산을 가져올 수 있다는 사실을 이해하여야 한다. 그러므로, pIX 단백질, E4-orf6 및 E1B-55K 유전자 단백질과 같은 단백질의 기능성을 상당히 변형시키지 않는 변경은 본 발명의 범위 내라는 것을 이해할 수 있다. 당업자에게 재조합 아데노바이러스를 안정화 하는 유전적 정보를 얻는 방법은 본 발명의 범위를 벗어남 없이 변경될 수 있다.

[0073] 인간 아데노바이러스는 51 혈청형을 둘러싸는 서브그룹 A-Z로 분류될 수 있다(예를 들면, EP 0978566 참조). 몇몇 적용을 위해, 특정 서브그룹 또는 원하는 세포 타입의 조직 트로피즘, 예를 들면 수지상 세포를 갖는 특정 혈청형으로부터 유도되거나 또는 기재로 하는 아데노바이러스 벡터를 사용하는 것이 유리하다(WO 02/24730). 특정 서브그룹 또는 특정 혈청형의 아데노바이러스에 대한 개체군에서 항체의 중화의 일반적인 부대는 선택물의 혈청형을 결정하는 중요한 파라미터이다(WO 00/70071). 서브그룹 B 바이러스들 간의 유사성 때문에(예를 들면 실시예4 및 11 참조), 본 발명은 특히 서브그룹 B의 아데노바이러스에 대해 안정하다고 기대된다. 그러므로, 본 발명의 바람직한 구현에는 서브그룹 B로 분류되는 아데노바이러스로부터 유도되거나 또는 기재로 하는 아데노바이러스 벡터에 관한 것이다. 인간 아데노바이러스 서브그룹 B는 Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad 34, Ad35 및 Ad50를 포함한다. 본 발명의 바람직한 구현에는 Ad35 또는 Ad11 혈청형으로부터 유도되거나 또는 기재로 하는 재조합 아데노바이러스 벡터에 관한 것이다. 특정 적용을 위한 혈청형의 선택 이외에, 소위 키메릭 아데노바이러스를 사용할 수 있다. 이들은 섬유, 펜톤, 또는 핵소와 같은, 다른 혈청형으로부터 남은 유전 정보('주' 아데노바이러스 벡터 일부)에 링크된 하나 이상의 아데노바이러스 혈청형의 코트 단백질을 코딩하는 유전 서열의 모두 또는 일부를 포함하고, 이들은 '주' 아데노바이러스 벡터의 면역 유전성을 감소시키거나 조직 트로피즘을 변화시키는데 사용될 수 있다(EP 0978566). 여기서 사용되는 '주'부분은 상기 키메릭 바이러스에 대한 유전 정보의 대부분에 기여하고, 키메릭 아데노바이러스는 그러므로 이와 같은 바이러스의 '주'부분의 혈청형 군에 포함될 것이다. 본 발명이 유사한 불안정성 문제에 직면할 때 이와 같은 키메릭 아데노바이러스를 사용할 수 있다는 것이 당업자들에게는 분명할 것이다. 예를 들면, 주 부분으로서 Ad35 서열을 포함하고 예를 들어 Ad11로부터 유도되거나 또는 기재로하는 섬유를 포함하는 키메릭 아데노바이러스는 여기에 기재된 Ad35 재조합 아데노바이러스 벡터에 대해 보고된 바와 같이 증식 후 유사한 불안정성을 갖는다는 것을 예상할 수 있다. 그러므로, 본 명세서에서 재조합 아데노바이러스가 언급될 때, 키메릭 아데노바이러스 벡터가 본 발명에 포함되어진다는 의미이다.

[0074] 재조합 아데노바이러스 벡터의 생산 및 조립에 필수적인 요소들은 본 분야에 잘 알려져 있다(US 특허 5,994,128; Russell, 2000). 비리온의 형태로 E1 결실된 재조합 아데노바이러스의 생산은 패키징 세포, 소위 보충 세포에서 행해진다. 이와 같은 세포는 재조합 바이러스(재조합 비리온)의 생산에 필수적인, 상기 재조합 아데노바이러스에 결손한 아데노바이러스의 유전 정보를 인 트랜스 제공한다. 잘 알려진 패키징 세포는 293 세포, 911 세포 및 PER.C6TM 세포(supra)이다. 대부분의 목적을 위해, 오버래핑 서열이 결손한, 그렇지 않으면 적합한 아데노바이러스를 복제하는 동족체 재조합을 가져오는 패키징 세포와 재조합 아데노바이러스 벡터를 사용하는 것이 바람직하다(미국 특허 제5,994,128호). 응용 미생물학 및 연구 센터에 있는 동물 세포 배양의 유럽 콜렉션에서 수탁번호 제 96022940으로 기탁된 PER.C6TM은 그러므로 재조합 아데노바이러스의 증식을 위한 매우 알맞은 패키징 세포이다. 복제 적합 아데노바이러스의 발생을 감소시키기 위한 다른 방법이 조사되었고, 예를 들면 패키징 세포와 벡터에 존재하는 서열간의 동족성을 감소시키기 위해 아데노바이러스 서열의 조작에 관한 것이다(예를 들면, Hehir et al., 1996; Robert et al., 2001). 패키징 세포는 의무적인 E1 결실 이외에, 예를 들면 E2, E4 등의 일부 또는 전부와 같은, 사용된 재조합 아데노바이러스에 기능성인 결핍이 있을 때, 다른 아데노바이러스 기능을 보충하기 위한 다른 아데노바이러스 서열을 포함한다. 패키징 세포의 상보적 정보는 게놈에 통합되어 있거나 또는 예를 들면 플라스미드, 벡터, 코스미드 등의 비염색체 카피들에 존재할 수 있다. 다른 방법은 소위 헬퍼(helper) 바이러스의 사용인데, 이것은 재조합 아데노바이러스에 결손한 유전정보를 포함한다. 재조합 아데노바이러스 벡터는 또한 대부분 또는 모든 아데노바이러스 유전자(거트리스(gutless) 벡터 또는 헬퍼 의존 아데노바이러스)에 대해 결실된 게놈을 함유하는 재조합 아데노바이러스의 생산에 사용되는 헬퍼 바이러스로서 사용될 수 있다. 이와같은 거트리스 아데노바이러스의 최종 생산에서, 헬퍼 아데노바이러스의 패키징을 피하는 것이 필요하다. 당업자는, 예를 들면 이 패키징 시그널을 결실하기 위해 패키징 시그널의 조작된 부위에 부위-특이 컴비나제를 사용하여 이것을 얻는 방법에 친숙할 것이다. CsCl-기울기 분리법을 사용하여 원하는 거트리스 바이러스로부터 남아있는 헬퍼 바이러스를 분리하는 것이 종종 필요하다. 헬퍼와 거트리스 바이러스의 게놈 길이가 최대로 다를 때, 이것을 얻는 것이 더욱 용이하다. 그러므로, 큰 헬퍼 바이러스가 작은 것 보다 바람직하다. 당업자에게 있어서, 본 발명이 증가된 pIX 발현을 갖는 재조합 헬퍼 바이러스의 사용에 의해 재조합 아데노바이러스의 안정성을 증가시키는데 동등하게 적용될 수 있다는 것이 분명할 것이며, 이것은 본 발명에 기재된 방법에 의해 성취될 수 있다. 재조합 바이러스 입자를 발생시키기 위해, 재조합 아데노바이러스를 보충하는데 사용될 수 있는 유전 정보를 갖는 어느 세포는 패키징 세포 의미 범위에 포함된다. 당업자에게 있어서, 본 발명에 의해 얻어진 이점은 사용된 패키징 세포에 의존하지 않는다는 것이 명백할 것이다.

[0075] pIX를 암호화하는 유전적 정보는 재조합 아데노바이러스 벡터에 존재할 수 있을 뿐 아니라 상기 재조합 아데노바이러스 벡터와 독립적으로 존재할 수 있고, 이와 같은 바이러스의 유전적 정보는 게놈에 통합되어 또는 비염색체 카피, 예를 들면 플라스미드, 벡터, 코스미드 등에 존재할 수 있다. 유전 정보를 패키징 세포에 도입하는 것은 리포펙타민, 인산화칼슘 침전, 바이러스 감염등과 같은 여러 방법으로 행해질 수 있다. 이와 같은 방법은 일반적으로 당업자에게 잘 알려져 있고 유전 정보의 도입을 위해 사용되는 방법은 본 발명의 범위에 결정적이지 않다. 여기서 사용되는 발현가능한 포맷의 기능성 pIX는 패키징 세포에서 pIX를 암호화하는 상기 유전적 정보의 발현을 구동할 수 있는 프로모터 또는 다른 조절 서열에 대한 사용가능한 연결에서 pIX를 암호화하는 유전적 정보를 의미한다. 패키징 세포에 유전적 정보를 도입하는 것은 재조합 아데노바이러스 벡터의 도입 전, 도입을 수반하면서, 또는 도입 후 실시될 수 있다. 293-기재 패키징 세포계에서 pIX의 구성적인 에피소말 발현은 pIX 돌연변이 아데노바이러스 타입 5의 결핍을 보충한다는 것이 발견되었다(Caravokyri and Leppard, 1995). 그러나, 이와 같은 적용을 위해, EBNA1 발현 카세트를 함유하는 특이 에피소말 플라스미드가 요구되고, 이와 같은 세포계에서 아데노바이러스 벡터의 증식은 에피소말의 일부가 재조합 아데노바이러스 벡터의 일부가 될 것 같은 손해를 본다. 그러므로, 본 발명의 바람직한 구현예에서 기능성 pIX를 암호화하는 유전적 정보는 아데노바이러스 벡터에 존재한다.

[0076] 복제 적합 아데노바이러스를 가져오는 재조합의 양을 감소시키기 위한 시도에서, 몇몇 저자는 패키징 세포(를 함유하는 Ad5-유도 서열)의 핵산과 재조합 아데노바이러스 벡터 사이의 오버랩을 감소시키기 위해, Ad5의 돌연변이된 pIX 프로모터에 의해 구동되는 Ad7 -그룹 B 바이러스-로부터 유도된 pIX 유전자를 사용한다(Robert et al., 2001). 그러나, 이들 실험은 바이러스 벡터의 안정성을 증가시키지 않았고 이 안정성은 이들 실험에서 측정되지 않았다. 현 적용에서, 아데노바이러스 벡터에서 pIX의 전사 조절 서열은 바이러스의 안정성 증가 및/또는 비리온에서 이중 유전 물질에 대한 수용량 증가 목적에 의해 변화된다. 본 발명은 Ad5로부터 유도된 Ad5-유도 근위 pIX 프로모터의 조절하에 pIX 유전자를 함유하는 Ad35로부터 유도된 재조합 아데노바이러스가 내인성(즉, Ad35 유도된) 근접 pIX 상류 서열을 갖는 대응 바이러스보다 더욱 안정하고/더 이중 유전 정보를 정착시킬

수 있다는 것을 설명한다. 그러므로, 본 발명은 또한 기능성 pIX 코딩 서열을 포함하고 적어도 E1- 영역에서 결실을 갖는 재조합 아데노바이러스를 제공하며, 여기서 pIX 코딩 서열은 이형성 프로모터의 조절하에 있고, 여기서 상기 재조합 아데노바이러스는 아데노바이러스 혈청형 5 이외의 아데노바이러스를 기재로 하거나 유도된다. 특정 구현예에서, 상기 이형성 프로모터는 비-내인성 근접 pIX- 프로모터이다. 바람직한 구현예에서, pIX 암호화 유전 정보는 Ad35 또는 Ad11로부터 유도되거나 또는 기재로 한다. 이와같은 구현예에서, 바람직한 비-내인성 pIX 프로모터는 Ad5 프로모터이다.

[0077] 다른 면에서, 본 발명은 본 발명에 의해 얻을 수 있는 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공한다. 이와같은 재조합 아데노바이러스 벡터는 유전자 전달 배지등으로서, 예를 들면 백신의 제조에 있어서 유용하다(WO 00/70071; WO 01/38362; WO 02/24730). 이와같은 재조합 아데노바이러스 벡터에 원하는 주 혈청형의 선택은 더 많이 사용되는 Ad5 아데노바이러스 벡터와 비교하여 변형된 조직 골성을 갖는 벡터를 얻는데 사용될 수 있고 및/또는 이들이 Ad5 유도 벡터보다 덜 면역성이므로 사용될 수 있다(WO 00/70071). 재조합 아데노바이러스 벡터의 발생을 위해, 트랜스진클, E1 서열 결손 아데노바이러스의 왼쪽 일부를 함유하고 클로닝을 위한 제한 효소를 갖는 플라스미드(적응체(adapter) 플라스미드)로 클론하는 것이 유리하다. 재조합 아데노바이러스 벡터는 그리고 나서 5' 말단에서 적응체 플라스미드의 3' 말단을 갖는 오버래핑 서열을 갖는 아데노바이러스의 오른쪽 일부를 포함하는 코스미드와의 동종 재조합에 의해 발생된다(본 발명의 실시예; WO 99/38362에 기재된 방법 참조). 그러므로, 본 발명의 또 다른 관점은 아데노바이러스 왼쪽 ITR, 패키징 시그널, E1 영역에서 결실을 갖는 다른 아데노바이러스 서열, E1B 55K 개방형 해독 프레임 및 pIX 암호화 서열을 포함하는 재조합 핵산 서열을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 면은 변형된 아데노바이러스성 pIX 유전자를 제공하며, 여기서, pIX 단백질을 암호화하는 유전적 정보는 아데노바이러스 혈청형 5 또는 아데노바이러스 혈청형 7 pIX 암호화 서열로부터 유도되지 않는다. 바람직한 구현예에서, 상기 변형된 pIX 유전자는 이형 프로모터를 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명에 따른, 또는 본 발명에 의해 제공되는 방법에 의해 얻을 수 있는 재조합 아데노바이러스 벡터를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 약제학적 조성물은 약제학적 제제 분야에서 당업자들에 의해 일반적으로 적용되는 허용가능한 약제학적 담체를 더욱 포함할 수 있다. 더욱이, 본 발명은 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스 벡터, 또는 본 발명에 의해 제공되는 약제학적 조성물을 인체에 투여하는 것을 포함하는 인체의 치료방법에 관한 것이다.

[0078] 본 발명은 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스를 포함하는 재조합 아데노바이러스 패키징 세포를 더욱 제공한다. 한 구현예에서, 상기 재조합 아데노바이러스 패키징 세포는 상기 재조합 아데노바이러스의 E1B 55K 결손을 보충할 수 있는 핵산을 포함하고 여기서 상기 재조합 아데노바이러스는 후자 재조합 핵산 분자가 기능성 E1B 55K 유전자 생성물을 암호화하지 않는 조건으로, pIX 유전자의 발현을 증가시키는 E1B 55K 유전자 생성물을 암호화하는 서열의 일부를 포함하는 핵산 분자를 포함하고, 그리고 여기서 상기 세포 및 상기 재조합 아데노바이러스는 기능성 E1B 55K 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노바이러스의 형성을 야기하는 서열 오버래핑을 포함하지 않는다. 이 구현예는 추가의 아데노바이러스 기능을 포함하는 재조합 아데노바이러스의 형성을 막는데 특히 유용하다.

[0079] 본 발명은 추가로 Ad35 패키징/보충 세포에서 비-그룹 C 아데노바이러스의 상보성을 감소시키기는 것과 관련된 어려움을 해결하는 방법 및 수단을 제공한다. 비록 Ad5 보충 세포계에서 작용성 Ad5 E1B-55K 발현이 존재하지만, 아데노바이러스 골격이 비-그룹 C 아데노바이러스 기원일 때 매우 적은 역가의 아데노바이러스만이 생성될 수 있다는 것이 발견되었고; 이 발견은 E1B-55K와 다른 (바이러스성) 단백질의 상호작용에서의 혈청형-특이성을 의미한다. 이 혈청형-의존성은 보충 세포계에 의해 제공되는 E1B-55k 단백질과 양립할 수 있는 E4-orf6 단백질을 제공함에 의해 회피될 수 있다. 여기서 논의된 바와 같이, E1B-55K와 E4-orf6는 핵에서 세포질로의 세포형 mRNA/s의 이동을 억제하는데 관여하는 복합체를 형성한다(reviewed in Leppard 1997 and 1998). 패키징 세포에서 바이러스 벡터의 적당한 상보성이 양립할 수 있는 E1B-55K와 E4-orf6 유전자 생성물의 존재를 요구한다는 것이 본 발명자들에 의해 발견되었다. 세포가 상보적 기능이 패키징되어야 하는 벡터에 의해 제공되지 않는 단백질을 암호화하는 특정 서열을 포함하는 경우, 패키징 세포는 보충 세포라고도 불린다.

[0080] 그러므로, 본 명세서에서 사용되는 '양립가능한'은, 단백질 복합체는 야생형 상황과 양립할 수 있는 또는 재조합 아데노바이러스 혈청형 5 벡터가 293 또는 PER.C6TM 과 같은 Ad5 보충 세포계에서 생산될 때의 상황과 양립할 수 있는 수준으로 바이러스 복제, 증식 및/또는 패키징을 지지하는 의미에서, 이용가능한 E1B-55K 유전자 생성물간의 복합체가 이용가능한 E4-orf6 유전자 생성물과 기능성 복합체를 형성할 수 있다는 것을 의미한다. 패키징 세포에서 벡터 복제는, 바이러스가 형성되는 기간동안 세포가 적어도 양립할 수 있는 E1B-55K 단백질과 E4-orf6 단백질을 포함한다면 효율적이다. 바람직하기는, E1B-55K 와 E4-orf6 서열은 동일한 아데노바이러스 서브

그룹(A, B, C, D, E 또는 F)내에서의 아데노바이러스로 부터이다. 더욱 바람직하기는, E1B-55K 및 E4-orf6 서열은 동일한 혈청형으로 부터이다. 확립된 세포계는 혈청형 5와 같은 서브그룹 C의 아데노바이러스 성장을 지지할 수 있는 본 분야에서 이용가능하므로, E1B-55K 및 E4-orf6 유전자는 아데노바이러스 혈청형5로부터 유도되는 것이 더욱 바람직하다. 당업자에게 이해되는 바와 같이, 양립성은 아데노바이러스 벡터 생산분야의 당업자의 범위에서 따라 상보적 시험 또는 조사로 결정될 수 있다. 당업자는 또한, 본 발명이 E1B-55K 및 E4-orf6 단백질이 양립할 수 있는 한, 어느 보충 세포상의 어느 아데노바이러스 혈청형의 생산에도 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0081] 보충 세포계에서 E1B 와 '매치'되는 E4-orf6 유전자 생성물은, 선택물의 아데노바이러스 벡터에서 E4-orf6를 패키징 세포계 내에 존재하는 E1B 유전자와 양립할 수 있는 E4-orf6 암호화 서열로 대체함에 의해, 아데노바이러스 벡터에 의해 제공될 수 있다. 이 변형은 벡터의 안정성, 복제, 패키징, 조립 및 생산에 대해 심각한 영향을 갖지 않는다는 것이 발견되었다.

[0082] 본 발명의 특정 면은 아데노바이러스 혈청형 5 또는 혈청형 1, 2, 및 6과 같은 서브그룹 C와 다른 혈청형의 생산에 일반적으로 적용되는 세포계에서 서브그룹 C와 다른 아데노바이러스 혈청형을 효과적으로 생산할 수 있다는 것이다. 본 발명은, 보충 E1B-55K 서열과 양립할 수 있는, E4-orf6 서열이 아데노바이러스 골격에 병합되기 때문에 E4-orf6를 갖는 보충(패키징) 세포를 독립적으로 제공할 필요성 없이 비-그룹C 아데노바이러스의 생산법을 제공한다.

[0083] 본 발명은 제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소들을 함유하는 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공하며, 여기서 상기 벡터는 기능성 E4-orf6 단백질, 또는 그의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체를 암호화하는 서열을 더욱 포함하며, 여기서 상기 서열은 a)상기 제1 혈청형과 다른 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 서열 암호화 서열; b) 하나 이상의 코돈에서 결실, 돌연변이, 첨가 및/또는 치환을 포함하는 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; 및 c)상기 제1 혈청형과 다른 제2 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부와 제3 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부 사이의 융합물을 포함하는 E4-orf6 암호화 서열로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 제4 혈청형은 상기 제1 혈청형과 동일하거나 또는 다르다. 한 구현예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스 벡터를 제공하고, 여기서 상기 제1 혈청형 및 제2 혈청형은 아데노바이러스 서브그룹이 다르다. 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스 벡터가 제공되고, 여기서 상기 제1 혈청형은 서브그룹 C 이외의 서브그룹이며 여기서 상기 E4-orf6 암호화 서열은 서브그룹 C의 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도된다. 더욱 바람직하기는 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스이며, 여기서 상기 제1 혈청형은 서브그룹 B로부터이고 상기 제2 혈청형은 서브그룹 C로 부터이다. 더욱 바람직하기는, 상기 E4-orf6 암호화 서열은 아데노바이러스 혈청형 5로부터 유도된다. 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함한다. 구조적 요소들의 예는, 섬유, 핵소, 및 펜톤 단백질과 같은 캡시드 단백질을 암호화하는 유전자 뿐만 아니라 유전자 생성물 자체이다. 비-구조적 요소의 예는 세포에 감염된 후 발현되고 감염 사이클이 진행될 때 하향 조절되는 초기 유전자이다. 비-구조적 요소의 다른 예는 pol과 pTP와 같은, 복제 동안 단백질 활성을 암호화하는 유전자이다.

[0084] 핵산에서의 몇몇 변화, 예를 들면, 하나 이상의 코돈에서의 결실, 돌연변이, 첨가 및/또는 치환은 암호화된 유전자 생성물의 구조 및/또는 기능성에 상당한 변화를 가져온다. 그러므로, 본 발명은 예를 들면 구조적 및 비-구조적 요소인 유전자를 정착시키는 골격과 같은 동일한 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열에 관한 것이나, 여기서 E4-orf6 암호화 서열은 아데노바이러스 벡터가 생산되어질 보충 세포에 존재하는 E1 단백질(예를 들면 E1B-55K 유전자 생성물)과 양립할 수 있도록 돌연변이되었다. 코돈은 암호화된 아미노산을 변화시키기 위해 완전히 변경될 수 있지만, 암호화된 아미노산을 변화시키기 위해 부분적으로 돌연변이화될 수 있다. 핵산의 결실은 하나 이상의 암호화된 아미노산의 결실을 가져온다; 그 동안 이것은 또한 틀-이동을 가져올 수 있다.

[0085] 본 발명은 또한 다른 혈청형으로부터 유도된 다른 부분들을 포함하는 아데노바이러스 핵산에 존재하는 E4-orf6 서열에 관한 것으로, 여기서 단백질 기능에 양립성을 제공하는 영역은 하나의 혈청형으로부터 사용될 수 있고, 반면, E4-orf6 서열의 나머지 또는 그것의 일부는 또 다른 (비)관련된 혈청형(예를 들면, 동일한 서브그룹, 다른 서브그룹, 또는 그들의 결합물)로부터 유도될 수 있다. 그러므로 양립할 수 있는 E4-orf6 융합 단백질을 적용하는 것은 본 발명의 범위 내이다. 이와같은 융합 단백질은 핵산의 여러 조각의 생성물일 수 있다.

[0086] 당업자는 모든 인간 아데노바이러스 이외에 수 많은 비-인간 아데노바이러스가 본 분야에서 동정되었다는 사실을 알 것이다. 당연하기는, 또한 비-인간 아데노바이러스는 본 발명에 의해 기재된 것과 동일한 결과에 도달하

기 위해 사용될 수 있다. 당업자에게 E1B-55K와 E4-orf6 사이의 양립성은 인간 아데노바이러스에 제한되는 것이 아니라 다른 종들에 대한 아데노바이러스로부터의 요소들도 양립할 수 있다는 것이 분명할 것이다. 그러므로, 본 발명의 또 다른 면에서, 비-인간 아데노바이러스는 E1B-55K 및 E4-orf6 유전자 생성물이 양립할 수 있는 한, 본 분야에서 적용할 수 있다고 알려진 패키징 세포에서 고역가를 생산할 수 있다. 본 발명의 방법 및 수단을 이용하여 생산될 수 있는 비-인간 아데노바이러스의 비-제한적인 예는 개-, 소-, 양-, 개구리-, 돼지-, 말-, 원숭이- 및 조류 아데노바이러스이다. 그러므로 여기서 사용된 혈청형은 중-한정 혈청형 범위를 극복한다. 예를 들면, 원숭이 아데노바이러스 E4-orf6 유전자 생성물은 패키징 세포에 의해 생산된 E1B-55K와 양립할 수 있고, 그리고 나서 이 결합은 본 발명의 범위 내이다. 또한, 본 융합물은 다른 혈청형 사이, 또는 패키징 세포의 E1B 유전자와 양립할 수 있는 인간과 조류 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 서열 사이에 적용될 때, 이와 같은 특이 결합은 또한 본 발명의 범위이다.

[0087] 본 발명은 제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소를 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은:

[0088] a) 발현 가능 형태로 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도되고, 보충 세포에 의해 상기 재조합 아데노바이러스 벡터의 조립을 허용하도록 아데노바이러스의 필수 요소를 갖는, E1B-55K 암호화 서열, 그의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체를 정작시키는 보충 세포를 제공하는 단계, 여기서 상기 요소는 상기 제2 혈청형과 기능성 E4-orf6 단백질, 또는 그의 기능성 부분, 유도체 및/또는 동족체를 암호화하고, 상기 보충 세포에서 상기 발현 가능한 E1B-55K 단백질과 양립할 수 있는서열과 다른 상기 제2 혈청형의 아데노바이러스의 적어도 몇몇 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함하고; b) 아데노바이러스 벡터의 생산 및 조립이 일어나도록 허용하는 조건하의 배지에서 상기 보충 세포를 배양하는 단계; c) 배지 및/또는 보충 세포로부터 이와같이 생산된 재조합 아데노바이러스 벡터를 수확하는 단계를 포함하고, 여기서 E4-orf6 단백질을 암호화하는 서열은 이와 같이 생산된 재조합 아데노바이러스에 존재한다.

[0089] 본 발명의 한 예에서, 본 발명에 따른 방법이 제공되고, 여기서 상기 E4-orf6 암호화 서열은 i) 상기 제2 혈청형으로부터 유도된 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; ii) 상기 제1 및 제2 혈청형과 다른 제3 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; iii) 하나 이상의 코돈에서 결실, 돌연변이, 첨가 및/또는 치환을 포함하는 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; 및 iv) 제3 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부와 상기 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부를 융합물을 포함하는 E4-orf6 암호화 서열로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서, 상기 제3 혈청형은 상기 제1 혈청형과 동일하거나 또는 다를 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 제1 및 제2 혈청형은 다른 서브그룹이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 상기 제2 혈청형은 서브그룹 C의 아데노바이러스 혈청형이다. 더욱 바람직하기는, 상기 제2 혈청형은 아데노바이러스 혈청형 5이다. 본 발명의 다른 특정한 면에서, 상기 제1 혈청형은 서브그룹 B의 아데노바이러스 혈청형이다. 바람직하기는 상기 제1 혈청형은 아데노바이러스 혈청형 11, 14, 16, 21, 34, 35 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0090] 재조합 아데노바이러스 벡터를 보충하기 위한 및 아데노바이러스 입자를 생산하고, 조립하고 그리고 패키징하는 데 사용되는 몇몇 패키징 세포가 본 분야에 알려져 있다. 이와 같은 세포계의 비-제한적인 예는 HEK-293, 911 및 PER.C6TM 세포이다. 아데노바이러스 스톡의 고역가를 전달한다고 이미 증명된 세포계를 사용하는 것이 바람직하다. 이와 같은 세포계는 안정한 방법으로 E1 단백질을 발현하고, 그러므로 세포계와 방법을 사용하는 것은 본 발명의 바람직한 면이고, 여기서 상기 E1B-55K 암호화 서열은 상기 보충 세포의 게놈으로 통합된다. 더욱 바람직하기는 1차 복상 인간 세포, 또는 그의 자손 세포로부터 유도되는 보충세포이다. 더욱 바람직하기는, 상기 보충 세포는 1차 인간 망막아세포, 1차 인간 배아 신장 세포, 1차 인간 신경세포 또는 1차 인간 양수아세포로부터 유도된다. 매우 바람직하기는 본 발명에 의해 제공된 방법에서 보충 세포를 사용하는 것이며, 여기서 상기 보충세포는 PER.C6TM 세포 또는 그의 유도체이다. PER.C6TM 세포는 아데노바이러스 DNA가 세포에 의해 제공되는 핵산으로 오버래피되지 않고 사용될 때 복제 적합 아데노바이러스를 야기하지 않는다고 당 분야에 잘 알려져 있다. 본 분야에 사용된 많은 아데노바이러스는 E1 영역이 결손하고, 그러므로 본 발명의 한 면에서, 상기 보충 세포는 바이러스의 게놈에 통합된, 적어도 하나의 아데노바이러스 E1A 단백질을 암호화하는 핵산을 포함한다. 바람직하기는, 적어도 하나의 아데노바이러스 E1A 단백질을 암호화하는 상기 핵산은 서브그룹 B와 다른 서브그룹의 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도된다. 더욱 바람직하기는, 상기 적어도 하나의 아데노바이러스 E1A 단백질을 암호화하는 핵산은 서브그룹 C의 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도된다. 매우 바람직하기는 적어도 하나의 아데노바이러스 E1A 단백질을 암호화하는 상기 핵산이 아데노바이러스 혈청형 5로부터 유도되는 구현예이다.

본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 방법을 제공하고, 여기서 상기 E4-orf6 암호화 서열 및 상기 E1B-55K 암호화 서열은 다른 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도되고 여기서 상기 다른 아데노바이러스 혈청형은 동일한 아데노바이러스 서브그룹의 멤버이다. 바람직하기는, 상기 E4-orf6 암호화 서열 및 상기 E1B-55K 암호화 서열은 다른 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도되고, 여기서 상기 다른 아데노바이러스 혈청형은 둘 다 서브그룹 C의 멤버이다. 더욱 바람직하기는, 상기 E4-orf6 암호화 서열 및 상기 E1B-55K 암호화 서열은 동일한 아데노바이러스 혈청형으로부터 유도된다. 가장 바람직하기는 상기 E4-orf6 암호화 서열과 상기 E1B-55K 암호화 서열이 아데노바이러스 혈청형 5로부터 유도되는 방법이다.

[0091] 본 발명은 또한 아데노바이러스가 알맞는 보충/패키징 세포 및 관심있는 아데노바이러스 벡터를 사용하여 생산될 수 있는 방법에 관한 것이다. 효율적인 생산 방법을 위해, 알맞는 아데노바이러스 벡터를 갖는 정확한 세포를 적용하는 것이 유용하다. 그러므로, 본 발명은 또한 패키징 시스템으로 불리는 부분들의 키트에 관한 것으로, 이것은 a) 제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소들을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터를 생산하기 위한 보충 세포, 여기서 상기 세포는 발현가능한 형태로 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E1B-55K 암호화 서열, 또는 그의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체를 정착시키고; 및 b) 하나 이상의 복제 가능 핵산 벡터 상의 상기 보충 세포에 의해 상기 재조합 아데노바이러스 벡터의 조립을 허용하도록 하는 모든 필요한 아데노바이러스 요소들을 포함하고, 여기서 상기 요소들은 적어도 몇몇 상기 제2 혈청형과 다른 제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소들 및 기능성 E4-orf6 단백질, 그들의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체를 암호화하는 서열로 상기 보충 세포에서 상기 발현가능한 E1B-55K 단백질과 양립할 수 있는 것을 포함한다. 바람직하기는, 부분들의 키트가 사용되고, 여기서 상기 E4-orf6 암호화 서열은 a) 상기 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; b) 상기 제1 및 제2 혈청형과 다른 제3 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열; c) 하나 이상의 코돈에서 결실, 돌연변이, 첨가 및/또는 치환을 포함하는 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도되는 E4-orf6 암호화 서열; 및 d) 제3 혈청형으로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부와 상기 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E4-orf6 암호화 서열의 일부의 융합물을 포함하는 E4-orf6 암호화 서열로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 제3 혈청형은 상기 제1 혈청형과 동일하거나 또는 다를 수 있다.

[0092] 본 발명은 아데노바이러스 5와 다른 혈청형으로부터 거의 전적으로 유도된 E1 결실된 키메라 아데노바이러스의 복제에 특히 유용하다. 이와 같은 벡터는 아데노바이러스 5 E4-orf6 또는 그의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체를 암호화하는 핵산이 제공되는 것만을 필요로 한다. 일단 제공되면, 그 외에 벡터는 정상 아데노바이러스 5 E1-보충 패키징 세포계상에서 효율적으로 복제될 수 있다. 벡터의 안정성은 증가되고, 벡터는 E1A와 E1B 모두에서 결실에 대해 보충될 수 있다. 이와같은 벡터에 아데노바이러스 E4-orf6를 암호화하는 핵산을 제공함으로써, 293 또는 911 세포에서 성장할 때, 효율적인 플라크 정제 및 추가의 야생형 오염물 문제없이 양호한 수득률이 가능하다. 물론, PER.C6에서, 야생형 아데노바이러스 오염물은 다른 방법으로 예방될 수 있다.

[0093] 본 발명의 재조합 벡터의 다른 이점은 계놈에 통합된 핵산으로부터 특정 세포계 아데노바이러스 E4-orf6가 발생되어야 할 필요가 없는 것이다. 비록 이와 같은 세포계가 존재해도 확대 등과 같은 생산 계수, 및/또는 조절 문제는 PER.C6TM과 같은 세포계와 동일한 정도까지 해결되지 않을 수 있다. 이것은 부분적으로 점점 더 많은 이중 유전자가 세포계의 계놈으로 삽입됨에 따라 모든 이중 서열의 안정성(또는 그의 발현)을 유지하는 것이 어렵기 때문일 수 있다. 본 발명에서, 비-아데노바이러스 혈청형 5 기제 벡터의 낮은 수득률과 아데노바이러스 혈청형 5 패키징 세포계 상의 아데노바이러스 혈청형 7, 11 및 35와 같은 서브그룹 B의 아데노바이러스 혈청형 벡터의 안정성과 관련된 문제중 적어도 몇몇은 본 발명의 재조합 아데노바이러스로 극복될 수 있다는 것이 발견되었다.

[0094] 본 발명의 두 주요 면은 쉽게 이용할 수 있는 편리한 패키징 세포에서 성장할 수 있는 안전한 재조합 아데노바이러스를 제공하기 위해 결합될 수 있다. 그러므로, 본 발명은 적어도 E1 영역에서 결실을 갖는 재조합 핵산 분자를 포함하는 재조합 아데노바이러스를 제공하며, 이것은 pIX 유전자의 발현을 증가시키는 E1b 55K 유전자 생성물을 암호화하는 서열의 적어도 일부가 상기 재조합 핵산 분자이고, 상기 재조합 핵산 분자는 E1B 55K 유전자 생성물을 암호화하지 않는 것을 조건으로 하고; 상기 재조합 아데노바이러스는 제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소들을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하며, 여기서 상기 아데노바이러스는 E4-orf6 단백질, 그의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체를 암호화하는 서열을 추가로 포함하고, 여기서 상기 서열은 상기 제1 혈청형과 다른 제2 혈청형의 아데노바이러스와 다른 E4-orf6 코딩 서열이다. 선택적으로 또는 E1B 55K 서열의 적어도 일부를 갖는 것 이외에, 상기 핵산 서열은 이형 프로모터에 의해 조절되는 pIX 유전자 생성물을 가질 수 있다. 바람직하기는, 상기 제2 혈청형 및 E4-orf6 서열은 아데노바이러스 C로부터 유도되고, 더욱 바

람직하기는 아데노바이러스 혈청형 5로부터 유도된다. 바람직하기는, 상기 제1 혈청형은 서브그룹 C 이외의 서브그룹으로부터 유도되고, 바람직하기는 Ad 11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35 또는 Ad50과 같은 서브그룹 B 혈청형으로부터 유도된다. 한 구현예에서, 재조합 아데노바이러스는 비-아데노바이러스 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 암호화하는 서열을 추가로 포함한다. 이와 같은 재조합 아데노바이러스는 안정하며, 재조합 아데노바이러스중의 E4-orf6가 Ad5 E1 유전자 생성물과 양립할 수 있을 때, 예를 들면, 상기 아데노바이러스에서 E4-orf6가 Ad5로부터 유도될 때, Ad5 e1-함유 패키징 세포와 같은 쉽게 이용할 수 있는 패키징 세포, 바람직하기는 PER.C6™ 세포에서 성장할 수 있다. 복제 적합 아데노바이러스 또는 아데노바이러스 입자 함유 기능성 E1 단백질의 발생을 막는 것은 본 분야의 인식된 문제이고, 패키징 세포에서 이들을 갖는 아데노바이러스에 존재하는 E1 서열들 간의 오버랩을 막음으로써 해결하여 왔다(미국특허 제 5,994,128호). 본 발명의 구현예에서, 예를 들면 Ad5로부터의 E1 영역을 포함하는 패키징 세포를 갖는, pIX 발현의 영향에 의한 바이러스의 안정성이 증가한 E1B 55K 서열을 포함하는 Ad35 유도 아데노바이러스는 기능성 E1B 55K 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노바이러스의 부수적인 형성을 갖는 동종 재조합을 일으키지 않는다. 그러므로, 본 발명의 또 다른 면은 패키징 세포와, 제1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소를 포함하는 재조합 아데노바이러스를 포함하는 패키징 시스템을 제공하며, 여기서 상기 패키징 세포는 적어도 E1B-55K 단백질 또는 그의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체를 암호화하는 핵산을 발현하고, 여기서 상기 재조합 아데노바이러스는 안정한 재조합 아데노바이러스를 발생시키기 위해 상기 패키징 세포에서 복제될 수 있고, 상기 아데노바이러스는 E1-영역에서 결실을 갖는 핵산 분자를 포함하고 E1B-55K 유전자 생성물을 암호화하는 서열의 일부를 추가로 포함하고, 상기 핵산은 기능성 E4-orf6 단백질, 또는 그의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체를 추가로 포함하며, 이것은 상기 패키징 세포에서 상기 발현가능한 E1B-55K 단백질과 양립할 수 있다. 바람직하기는, 상기 제1 혈청형은 Ad35 또는 Ad11이다. 바람직하기는 상기 제2 혈청형은 Ad5이다. 더욱 바람직하기는, 상기 패키징 세포는 PER.C6™ 이다. 바람직하기는, 상기 기능성 E4-orf6 단백질, 또는 그의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체를 암호화하는 서열은 제1 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된다. 이 시스템은 기능성 E1 단백질-함유 아데노바이러스의 부수적인 발생없이 재조합 아데노바이러스의 복제를 허용할 것이다. 선택적으로, 또는 부가적으로, 상기 핵산은 외인성 프로모터의 조절하에서 pIX 코딩 서열을 함유할 수 있다.

[0095] 본 발명의 또 다른 면은 제 1 혈청형의 아데노바이러스의 구조적 및 비-구조적 요소를 포함하는 안정한 재조합 아데노바이러스를 생산하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 재조합 아데노바이러스는 핵산 분자가 E1 영역에서 결실을 갖는 아데노바이러스로부터 유도된 재조합 핵산 분자를 포함하고, 상기 핵산분자로부터 기능성 E1B-55K 단백질의 발현을 야기하지 않는 pIX 단백질의 발현을 증가시키는 E1B-55K 유전자 단백질을 암호화하는 서열의 적어도 일부로부터 유도된 핵산 및/또는 이형 프로모터의 조절하에서 pIX 코딩 서열을 가지며, 상기 방법은 a) 보충 세포에 의해 재조합 아데노바이러스 벡터의 조립을 허용하도록 아데노바이러스의 필수요소를 갖는, 발현가능 형태의 제2 혈청형의 아데노바이러스로부터 유도된 E1B-55K 암호화 서열, 그의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체를 발현하는 보충세포를 제공하는 단계, 여기서 상기 요소들은 상기 제2 혈청형과 다른 상기 제1 혈청형의 아데노바이러스의 적어도 몇몇 구조적 및 비-구조적 요소들과 기능성 E4-orf6 단백질 또는 그의 기능성 일부, 유도체 및/또는 동족체를 암호화하는 서열을 포함하고 이것은 상기 보충 세포에서 상기 발현 가능한 E1B-55K 단백질과 양립가능하고; b) 재조합 단백질의 생산 및 조립이 일어나도록 허용하는 조건하의 배지에서 상기 보충 세포를 배양하는 단계; 및 c) 배지 및/또는 보충 세포로부터 생산된 재조합 아데노바이러스를 수확하는 단계로 이루어진다. 본 발명은 추가로 인간 또는 동물의 치료를 위해, 백신화, 유전자 치료법 및 질병 및 병의 치료용 의약의 제조를 위해 본 발명의 재조합 아데노바이러스를 사용하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명에 따른 아데노바이러스를 포함하는 약제학적 제제를 제공한다.

[0096] 본 발명은 몇몇 실시예에 의해 설명될 것이지만, 이것으로 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0097] 실시예

[0098] 다른 설명이 없는 한, 표준 분자생물학 방법이 사용되었다(예를 들면, Sambrook and Russel, 2001). 프라이머 서열을 표 IV에 나타내었다.

[0099] 실시예 1. E1 결실된 Ad35 바이러스용 PER.C6™-기재 보충 세포계

[0100] PER.C6 세포를 10cm 배양 접시에 최대 10%의 FBS(Gibco BRL)과 10mM MgCl₂(4.9M 스톡 용액, Sigma)으로 보충된 PER.C6 배양 배지(DMEM, Gibco BRL)에서 3×10^6 세포/접시의 밀도로 접종하였다. 이를 후, 트랜스펙션 효율성을 관찰하기 위해, 9개 접시는 1 μ g ScaI 선형화된 pIG35.55K DNA(infra 기재)로 트랜스펙션시키고, 9개 접시는

1.5 μ g ScaI 선형화된 pIG35.55K DNA로 트랜스펙션시켰다. 개별적인 대조 접시들을 1 또는 1.5 μ g ScaI 선형화된 pAdApt35.LacZ로 감염시켰고(WO 00/70071에 기재).

[0101] pcDNA.nlsLacZ(WO99/55132 기재)는 CMV 프로모터로 구동되는 nlsLacZ 유전자를 갖는 pcDNA3-기재 플라스미드(Invitrogen)이다. pcDNA.nlsLacZ는 또한 neo^r 발현 카세트를 함유한다.

[0102] 음성대조로서, 하나의 여분의 접시를 선형화된 pAdApt35.LacZ, neo^r 선택 유전자가 결손한 구축물로 트랜스펙션시켰다. 모든 트랜스펙션은 제조사 지침에 따라 5ml 리포펙트아민 시약/ μ g DNA를 사용하여 리포펙트아민 트랜스펙션 키트로 실행하였다(Invitrogen/Life Technologies). 세포를 4시간동안 트랜스펙션 혼합물로 배양시키고 그 후 배지를 PER.C6 배양 배지로 대체시켰다. 다음날, 1 또는 1.5 μ g pAdApt35.LacZ로 트랜스펙션시킨 2개의 접시를 제외하고, 배지를 0.5mg/ml G418 (Gibco BRL)을 함유하는 배양 배지로 대체시켰다. 이들 마지막 접시들은 트랜스펙션 2일 후 LacZ 발현을 관찰하는데 사용하였다. 이들 배양물을 X-gal 염색한 후, 트랜스펙션 효율은 1.5 μ g DNA로 트랜스펙션된 접시에서 약간 더 과란색 세포를 가지며 약 40%로 평가되었다. 선택 배지는 남은 트랜스펙션된 접시에서 매주 2회 신선한 것으로 교환되었다. 선택 배지를 처음 첨가한 후 2주 내에 (1.5 μ g pAdApt35.LacZ 트랜스펙션된) 음성 대조 접시 중의 대부분의 세포는 치사하였다. pcDNA.nlsLacZ 세포로 트랜스펙션된 접시에서 클론들이 보이기 시작했다. pIG35.55K 로 트랜스펙션된 세포들은 G418에 대해 더 내성을 갖는 것으로 보이기 때문에, 농도는 트랜스펙션 3주 후, 0.75mg/ml로 상승하였다. 3일 및 7일 후, pIG35.55K로 트랜스펙션된 접시로부터 총 196개의 세포 클론이 검출되었고 별개의 96-웰 플레이트에 접종되었다.

[0103] 1 μ g pIG35.55K DNA로 트랜스펙션된 2개의 10cm 접시의 클로니를 채집 한 후 남은 세포들을 트립신화하고 풀(pool) PER55K(1.0)을 얻기 위해 풀화시키고 팽창시켰다. 1.5 μ g 트랜스펙션된 2개의 접시에 대해 동일한 것을 행하였다. PER55K (1.0) 세포 풀을 팽창시키고, 바이러스 발생을 시험하기 위해 트랜스펙션을 위해 3.5×10^6 세포/플라스크의 밀도로 T25 플라스크 4개중에 접종시켰다. 추가로, 모체 PER.C6 세포를 갖는 3개의 T25 플라스크를 동일한 밀도로 접종시켰다. pAdApt35.eGFP (pAdApt35IP1(WO 00/70071에 기재)을 기재로 하지만, 또한 마커 유전자로서 청색 형광 단백질을 함유하는 적응체 플라스미드로, 이것은 pIPspAdapt. eGFP (WO 02/24933에 기재)로부터 유도된 HindIII-BamHI 단편으로 pAdApt35IP1으로 클론된다)를 PacI로 소화시켜 플라스미드 골격에서 아데노바이러스 서열을 유리시켰다. pWE.Ad35.pIX-rITR (WO 00/70071에 기재)은 NotI로 소화시켜 코스미드 골격으로부터 아데노바이러스 서열을 유리시켰다. PER.C6 세포를 갖는 2개의 플라스크와 PER55K(1.0)세포를 갖는 2개의 플라스크를 각각 2 μ g 소화된 pAdApt35.eGFP와 6 μ g 소화된 pWE.Ad35.pIX-rITR로 트랜스펙션시켰다. 각 세포계의 하나의 플라스크를 8 μ g pAdApt35.LacZ로 트랜스펙션시켜 트랜스펙션 효율을 관찰하였다. PER55K(1.0) 세포를 갖는 남은 플라스크는 음성 대조로서 작용하였고 다른 것과 같이, 그러나 트랜스펙션 혼합물은 받지 않고 처리하였다.

[0104] 모든 트랜스펙션은 각 트랜스펙션에 총 8 μ g DNA와 40 μ g 리포펙트아민 시약을 사용하여 제조사의 지침에 따라 리포펙트아민(Invitroegn/Life Techn.)으로 실행되었다. 트랜스펙션 혼합물을 배양 4시간 후 제거시키고 신선한 배양 배지를 첨가하였다. 트랜스펙션은 세포의 접종 다음날 실시되었고 다시 2일 후 T25 플라스크에서 나머지 세포를 LacZ 대조 트랜스펙션의 경우를 제외하고 T80 플라스크에 트랜스펙션시켰다. 이들을 온순하게 고정시킨 후 X-gal 용액으로 염색하였다. 염색용액을 5시간 배양 후, 푸른색 세포의 백분율은 두 플라스크에서 약 90%로 평가되었고 이것은 트랜스펙션이 두 세포계에서 잘 이루어진 것을 보여준다. T80 플라스크로 계대배양하고 4시간 후, 트랜스펙션된 PER55K(1.0) 배양물은 약 100 사건/플라스크로 CPE(바이러스 복제를 표시하는 세포병리적 효과)의 개시를 나타냈다. 비-트랜스펙션된 PER55K(1.0) 세포는 CPE의 증거없이 성장하였다. 트랜스펙션된 PER.C6 배양물에 있어서, 오직 3개의 CPE 사건만이 세포의 합류 단일층을 보여주었다. 다시 3일 후, 트랜스펙션된 PER55K(1.0) 배양물은 완전한 CPE를 나타냈고, 모든 세포는 둥글었고 덩어리로 떨어져 있었다. 반대로, PER.C6 배양물에서, CPE의 사건은 진행되지 않았고 세포들은 여전히 단일층이었다. 이것은 PER.C6 상의 E1-결실 Ad35-기재 바이러스가 매우 비효율적이라는 초기 관찰을 확인시킨다. 또한 비-트랜스펙션된 PER55K(1.0) 배양물은 예상한 바와 같이 CPE가 없는 합류 단일층을 나타내었다. 완전한 CPE를 갖는 PER55K(1.0) 플라스크중의 세포와 배지를 수확하고 2회 냉동/해동 순환을 시킨 후 세포 부스러기를 탁상 분리기로 3000rpm에서 10분동안 원심 분리하여 제거하였다. 생성된 조 용해질 중 하나를 사용하여 T175 플라스크에서 PER55K(1.0) 세포의 신선한 배양물을 감염시켰다(1.5 ml/플라스크). 4일 후, 완전한 CPE에서 세포와 배지를 수확하였다. 이것은 감염성 바이러스가 초기 트랜스펙션에서 형성된다는 것을 나타낸다. GFP 발현은 조 용해질로 감염된 A549 세포의 형광미세 분석으로 확인하였다. 조 용해질은 그리고 나서 하기와 같이 개개의 클론에서 E1-결실 Ad35.AdApt.eGFP 바이러스의 상보성을 분석하는데 사용되었다.

- [0105] pIG35.55K 트랜스펙션된 PER.C6 세포로부터 선택된 상기 클론을 팽창시키고 Ad35.AdApt.eGFP의 복제를 지탱할 수 있는 능력에 대해 기능성으로 시험하였다. 여기서, 클론을 6-웰 플레이트에 2개의 밀도로 접종시키고 1일 후 상기 조 용해될 15ml로 감염시켰다. CPE를 이후 관찰하였다. 이 방법으로 시험한 146 클론 중 19개는 2일 또는 3일에 완전한 CPE를 가져왔고 68개는 5일 또는 6일에 완전한 CPE를 가져왔다. 남은 클론들은 오직 부분적 CPE를 가지거나 약간의 비-진행 사건을 나타내었다. 마지막 것은 음성 대조로서 취해졌던 PER.C6 세포와 구별할 수 없었다.
- [0106] 이들 결과를 기준으로, 24개의 클론을 선택하여 pAdApt35.GFP 어댑터 플라스미드와 큰 pWE.Ad35.pIX-rITR 코스미드 클론의 트랜스펙션 후 재조합 E1-결실 바이러스를 발생시키는 능력에 대해 더욱 스크린하였다. 여기서, 클론을 T25 플라스크에 놓고 상기와 같이 리포펙타민을 사용하여 적응체 2 μ g와 골격 플라스미드 6 μ g으로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 2일 후, 세포들을 T80 플라스크로 이동시켜 배양물의 과합류를 막았다. 24 클론은 계대배양 3일 후 T80에 대한 완전한 CPE를 제공하였고 또 다른 13 클론은 그 다음날 완전한 CPE로의 진보를 나타내었다. 비교: PER.C6 세포상의 E1-결실된 Ad5 벡터의 일상적인 발생은 일반적으로 T80 플라스크로의 전이 후 4 ~ 6일까지 완전한 CPE를 가져왔다.
- [0107] 이것은 새로운 클론이 E1 결실된 아데노바이러스 벡터를 효과적으로 보충한다는 것을 나타낸다. 상기 클론중 하나(클론 #16)를 다른 트랜스젠을 함유하는 E1 및 E1/E3 결실 Ad35 바이러스의 복수의 배치를 발생시키고 생산하기 위해 사용하였다. 여기서, 상기와 같은 트랜스펙션으로부터 생성되고, 다른 적응체 플라스미드를 사용한, 조 용해될 중의 바이러스를 새로운 세포계에서 플라크 정제하였다. 단일 플라크를 트랜스젠 활성화에 대해 조사하였고, 그리고 나서 4-8 삼층 플라스크(3 \times 175cm/플라스크)에서 배지 규모 생산을 위해 증폭시켰다. 세포를 완전한 CPE에서 수확하고 바이러스를 방출시키고 아데노바이러스에 대해 일상적으로 행하여지는 바와 같이 정제하였다. 바이러스 입자의 양은 HPLC로 측정하였다(Shabram et al., 1997). 표 1은 PER55K 클론 #16 세포를 갖는 3층 플라스크에서 E1 및 E1/E3 결실된 Ad35 바이러스의 배지 규모 생산의 하부흐름 방향 진행 후의 수득물을 나타낸다. 정제된 바이러스 입자의 양은 PER.C6 세포상의 Ad5-기재 벡터의 수득물과 비교하였다.
- [0108] 본 발명자들은 본 발명자들이 완전히 E1-결실된 Ad35-기재 벡터를 완전히 보충하는 다중 세포계를 발생시켰다고 결론지었다. 그러므로, Ad5 보충 세포에서의 Ad35 E1B 55K 발현은 Ad35 벡터의 복제를 용이하게 한다.
- [0109] 실시예 2. pWE.Ad.pIX-rITR Δ E3의 생성.
- [0110] 사람 아데노바이러스의 초기 영역-3은 아데노바이러스성 감염에 감응하는 숙주 면역체(immune)에 방해하는 단백질에 대한 다중 코딩 영역을 함유한다. 아데노바이러스성 벡터가 백신 담체로 사용되는 경우에 이러한 방해는 원하여지지 않는다. 그러므로, 본 발명자들은 E3 영역을 결손한 Ad 35 골격 코스미드를 구축하였다.
- [0111] 여기에서, 구축물 pBr.Ad35.PRn(도 15; 공개공보 EP1054064에서 실시예 13에서 기재된)는 StuI 및 mluI로 소화되고, 17.3kb 벡터 단편은 제조업체 지침서에 따라서 아가로스 효소(Roche)를 사용하여 낮은 녹는점(LMP) 젤에서 정제하였다. 다음, PCR 단편은 프라이머 35E3for 및 35E3rev를 사용하여 pBr.Ad35.PRn에서 생성하였다. 증폭을 위하여, Pwo DNA 폴리머라제(Roche)를 제조업체 지침서에 따라 사용하고, 프로그램은 하기와 같이 정하였다: 94 $^{\circ}$ C에서 2분, (94 $^{\circ}$ C에서 30초, 58 $^{\circ}$ C에서 30초 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1분)의 30 사이클 및 68 $^{\circ}$ C에서 8분동안의 최종 인큐베이션. 833bp PCR 생성물을 QIAquick PCR purification kit(Qiagen)을 사용하여 정제하고 mluI 및 StuI로 소화시켰다. 소화된 DNA는 QIAquick gel extraction kit(Qiagen)를 사용하여 젤에서 정제하였다. 양쪽 단리된 단편을 결합하고 DH5a 적격(competent) 세포(Invitrogen/Life Technologies)로 형질변환하여 pBr.Ad35.PRn Δ E3을 얻었다(도 25). 플라스미드를 제한 분석 및 PCR 증폭된 삽입체의 서열화로 확인하였다. 그 다음, E3 결실은 pWE.Ad35.pIX-rITR 코스미드 골격으로 클로닝하였다. 여기서, pWE.Ad35.pIX-rITR은 PacI로 소화되고, DNA는 이소프로판올로 침전하고 70% EtOH로 세척하여 정제하였다. 이어서 MiliQ 물에서 재현탁에서, DNA는 SmaI로 소화되고, 단편을포함하는 22.8kb 벡터는 상기와 같이 아가로스 효소를 사용하여 LMP 젤로부터 정제되었다. 구축물 pBr.Ad35.PRn Δ E3은 동일한 방법에서 PacI 및 SmaI로 소화되고, 16.6kb 단편은 또한 아가로스 젤을 사용하여 단리하였다. 양쪽 단리된 단편은 0.5-0.6 μ g을 사용하여 결합되었다. 그 다음, 결합된 단편은 제조업체 지침서에 따라서 λ -phage packing extracts(Stratagene)를 사용하여 패키징되고 STBL-2 세포와 혼합되었다. 박테리아는 LB+Amp 플레이트에서 플레이트화되었고, 생성된 콜로니는 올바른 구축물의 존재에 대하여 분석되었다. 이것은 구축물 pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3을 나타내었다(도 1). E3 결실은 Ad35 서열(WO 00/70071에서 기재된)의 nucl. 27648부터 30320까지 확장하므로 2.6kb 영역을 확대된다.
- [0112] PER55-클론 #16 세포(상기와 같은)상에서 NotI 소화된 pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3 및 pIPsp-1(New England Biolabs) 소화된 pAdApt35.eGFP의 코트랜스펙션은 GFP 발현하는 Ad35-기재 바이러스를 발생한다. 이들 바이러스

로부터 바이러스 DNA의 단리에서, E3 영역의 PCR 증폭은 바이러스가 예상한 바와 같이 E3 서열의 2.6kb을 위해 삭제되었다는 것을 보여준다.

[0113] 실시예 3. E1-결실된 Ad35-기저 벡터의 크기를 꾸미는 데에서의 제한

[0114] 다른 삽입체를 함유하는 Ad35-기저 E1-결실된 및 E1/E3-결실된 벡터는 플라스미드 벡터 서열로부터 아데노바이러스 삽입체를 해방시키기 위하여 PacI 또는 pIPsp-1 효소로 소화된 특이 트랜스진을 수행하는 Ad35 적응체 플라스미드 1.5 μ g, 및 NotI로 소화된 pWE.Ad35.pIX-rITR 또는 NotI 효소로 소화된 pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3 중 하나의 4.5 μ g으로 PER55K-클론#16 세포의 트랜스펙션(실시예 1 참조)으로 생성되었다.

[0115] 적응체 플라스미드의 오른쪽 측면 및 골격 플라스미드의 왼쪽 말단은 완전한 E1-결실된 바이러스 게놈을 이끄는 재조합 사건을 중재(mediate)하는 균질한 서열을 함유한다(WO 00/70071에서 기재된 바와 같은).

[0116] 트랜스펙션은 제조업체의 지침서를 따라서 구축물의 각 세트에 대하여 30 μ l의 Lipofectamine 시약(Invitrogen/Life Technologies)으로 이루어졌다. 트랜스펙션 혼합물을 T25 플라스크에 70% 컨플루언시(confluency)에서 PER55K 클론 16 세포에 첨가되었다. 하기 조합으로 트랜스펙션되었다:

[0117] 1. pAdApt35IP1 + pWE.Ad35.pIX-rITR

[0118] 2. pAdApt35IP1 + pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3

[0119] 3. pAdApt35eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITR

[0120] 4. pAdApt35eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3

[0121] 5. pAdApt35Luc + pWE.Ad35.pIX-rITR

[0122] 6. pAdApt35Luc + pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3

[0123] 7. pAdApt35eLacZ + pWE.Ad35.pIX-rITR

[0124] 8. pAdApt35eLacZ + pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3

[0125] 적응체 플라스미드는 플라스미드 벡터 골격으로부터 아데노바이러스 서열을 해방시키기 위하여 pIPsp-1 효소로 소화되었다. pWE.Ad35.pIX-rITR 및 pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3은 동일한 이유로 트랜스펙션 이전에 NotI로 소화되었다. 적응체 플라스미드의 그리고 pWE.Ad35.pIX-rITR 골격 코스미드의 생성은 이전에 WO 00/70071에서 개시되었다. pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3의 생성은 상기와 같다.

[0126] 트랜스펙션 세포에 이은 2일동안 T80에 계대배양되고, 전체 CPE가 얻어질 때까지 추가로 인큐베이션되었다. 세포 및 배지는 전체 CPE가 알려진 후 1-2일에 채취되었다. 혼합물은 하나의 동결/해빙 사이클에 도입되고, 15분 동안 1500rpm에서 회전되어 세포 잔해는 펠렛화된 후, 상정액은 수집되었다. 이 방법에서 얻어진 조 용해질은 바이러스 DNA를 단리하는 데에 사용되었다. 여기에, 조 용해물 물질 275 μ l은 37 $^{\circ}$ C에서 30분동안 10mg/ml DNaseI 10 μ l으로 인큐베이션되었다. 이어서, 0.5M EDTA(pH 8.0) 6.0 μ l, 20% SDS 7.5 μ l 및 20mg/ml 프로테이나제 K 1.5 μ l을 첨가하고 와동시켜서 혼합하였다. 그 다음, 혼합물은 50 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 인큐베이션되었다. 마침내, 바이러스 DNA는 GeneClean Spin Kit(Bio 101, Inc.)를 사용하여 단리하였다. 이어진 20 μ l의 milliQ H₂O에서 바이러스 DNA의 용출에서, 트랜스진 영역은 PCR 증폭으로 분석되었다. 여기에, 프라이머 AdApt35CMVF 및 35pIXR이 사용되었다. 상기 증폭은 Taq DNA 폴리머라제(Invitrogen)를 사용하여 단리된 바이러스 DNA 2 μ l로 이루어졌다. 반응 혼합물은 총 용량 50 μ l에서 10x 완충용액(Invitrogen) 5 μ l, 50mM MCl₂ 2 μ l, 2mM dNTPs 5 μ l, 각 프라이머 (10 μ M stock)의 3 μ l 및 Taq 효소 2.5 유닛을 함유하였다. 프로그램은 94 $^{\circ}$ C에서 2분, 이어서 (94 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 30초 및 72 $^{\circ}$ C에서 4분)의 30 사이클로 정하였다. 대조군 반응은 적응체 플라스미드 5ng에서 이루어졌다. PCR 완료 후, 반응의 5 μ l은 분석을 위해 젤에 도입되었다. 도 2는 상기 트랜스펙션에 대한 결과를 나타낸다. 프라이머는 CMV 프로모터의 5' 말단로부터 pIX 코딩 영역의 5' 말단까지의 서열을 증폭한다. 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 트랜스진이 없는 또는 GFP 삽입체를 가진 바이러스는 예상된 띠(band)를 보여준다(플라스미드 대조군과 비교; 각 바이러스에 대한 레인(lane) PL). 더 작은 단편은 더 큰 삽입체, 루시페라제 및 LacZ에서 보여주고, 이들 결실은 바이러스의 더 큰 총 길이로 더욱 현저하게 된다(E3이 없거나 있는 상태에서 LacZ 또는 Luc 바이러스와 비교). 그러므로, 증가한 게놈 길이는 트랜스진 영역에서 결실의 발생과 상응한다. 각각 33.7 및 33.4kb의 Ad35.AdApt.eGFP 및 Ad35.AdApt.LacZ Δ E3가 결실이 LacZ 바이러스 샘플에서만 발견되는 경우에 비교할만하다는 사실은(역시 도 2에 나타난 바와 같이) 이전의 E1 영역에서 삽입체의 서열 또는 크기 중

하나가 결실의 발생에 영향을 줄 수도 있다는 것을 나타낸다.

[0127] 실시예 4. 아데노바이러스 혈청형 5 및 35의 pIX 유전자 영역의 서열 비교.

[0128] 제조합 Ad35 바이러스의 증가된 게놈 길이에서, 결실이 트랜스진 영역에서 발생한다는 발견은 pIX-결핍한 (deficient) Ad5 바이러스(Ghosh-Choudhury et al., 1987)의 유추에서, 캡시드의 안정성에 문제가 있다는 것을 제안할 수 있다. 총 길이 36.7kb를 갖는, Ad35.E1B+.AdApt.Luc 바이러스(E1A 서열이 AdApt.Luc 카세트에 대체되는)가 만들어질 수 있다는 사실은 E1B의 결실이 역할을 수행한다는 것을 나타낸다. 이것은 E1B 단백질 자체의 하나의 기능 또는 다른 아데노바이러스 단백질의 발현에 영향을 주는 이 영역에서의 알려지지 않는 조절 (regulatory) 서열의 기능 중 하나를 통해서 가능할 것이다. 본 발명자들이 아는 한, E1B 단백질 자체가 아데노 바이러스의 패키징하는 수용량에 영향을 준다고 기재되어 있지 않다. 하지만, E1B-21K 단백질은 비-특이적으로 트랜스팩션된 DNA를 안정화시킨다는 것(Herman and Mathews, 1989) 그리고 21K 단백질에서의 돌연변이가 감염 중 세포의 및 바이러스 DNA의 감성(degradation)을 일으킨다는 것(Pilder et al., 1984; White et al., 1984) 이 기재되어 있다. Ad5 E1B-21K 단백질이 PER.C6 세포에서 발현되므로, 이들 발견은 본 발명자들의 관찰에 대한 설명을 제공하지는 않는다. pIX 유전자는 E1B-55K 코딩 영역의 3'에 직접적으로 위치된다. Ad5의 경우에, pIX 및 E1B가 다중-아데닐화 신호를 분담하므로 pIX 프로모터 및 코딩 서열이 E1B 전사 영역 안에 위치된다는 것은 알려져 있다. pIX 발현에 필요한 최소 프로모터 서열은 Ad5의 경우에서 연구되고 있다(Babiss and Vales, 1991). 그것은 상류 Sp1 부위 및 TATA-박스 서열을 함유하는 프로모터 단편이 pIX 발현에 충분했다는 것을 보여 준다. Sp1 부위 및 TATA-박스 뿐만 아니라 TATA-박스 자체의 서열 사이의 공간화(spacing)는 pIX 발현의 수준에 영향을 주는 것으로 나타났다. Ad35에서 상응하는 영역이 또한 안정한 바이러스에 충분히 높은 수준으로 pIX 발현을 유도하기에 충분한가는 알려져 있지 않다. 서열 비교는 Sp1 부위 및 TATA 서열 모두가 Ad5 pIX 프로모터에서 발견된 것들과는 다르다는 것이 밝혀졌다. Genbank로부터 이용가능한 서열 정보를 사용하여, 비교는 별개의 서브그룹으로부터 혈청형의 인접 pIX 상류 서열(즉, E1B-55K의 정지 코돈 및 pIX 유전자의 개시 코돈 사이)에 의해 이루어졌다. SEQ.ID. NOs. 및 Genbank 참조 서열을 가진 하기의 아데노바이러스는 비교를 위해 사용되었다: Ad2 (SEQ. ID. NO. 45; Genbank NC_001405), Ad5 (SEQ. ID. NO. 46; Genbank M73260), Ad12 (SEQ. ID. NO. 47; Genbank NC_001460), Ad9 (SEQ. ID. NO. 48; Genbank AF099665), Ad40 (SEQ. ID. NO. 49; Genbank L19443), Ad4 (SEQ. ID. NO. 50; NC_003266), Simian 25 (SEQ. ID. NO. 51; Genbank AF394196), Ad7 (SEQ. ID. NO. 54; Genbank AD7001). Ad35 서열(SEQ. ID. NO. 52)은 WO 00/70071에 발표된 바와 같다. Ad11 서열 (SEQ. ID. NO.53)은 전에 발표된 것이 아니고 여기서 제공된 것이다. 도 3A는 E1B-55K 단백질의 중지 코돈(모든 서열에서 처음 3개의 뉴클레오티드) 및 pIX 단백질의 개시 코돈(마지막 3개의 뉴클레오티드) 사이에서 상기 서열의 정렬(alignment)을 보여준다. Ad2 및 Ad5에서 Sp1 부위 및 TATA서열은 박스화되었다. 대부분의 경우에 다른 서열에서의 Sp1 및 TATA 박스에 직접적으로 지적하기에 불충분한 상동성(homology)가 있다. 그러므로, Bucher, P (1990)가 발표한 바와 같은 GC- 및 TATA-박스에 대한 공통 서열은 다양한 서열에서 추정 (putative) Sp1 및 TATA-박스를 동정화하는 데에 사용되었다. 도 3b는 추정의 Sp1 및 TATA-박스 서열 그리고 그들 사이의 공간화를 나타낸다. 개별적으로 서브그룹 A, D 및 F에 속하는, Ad12, Ad9 및 Ad40은 공정하게 공통 서열에 대조하는 Sp1 및 TATA-박스 서열을 가진다. 하지만, 두 박스 사이에서의 거리는 Ad5 및 Ad2에 대한 것보다 더 작다. 이것은 Ad5 E1B 프로모터가 또한 11개의 뉴클레오티드의 공간화를 갖는 Sp1 박스 및 TATA 박스를 함유하므로 일반적이지 않다. 하지만, Sp1- 및 TATA-박스 사이의 Ad5 pIX 프로모터에서 9개의 뉴클레오티드(20 의)의 결실은 감소된 pIX 수준을 주었다(Babiss and Vales, 1991). 서브그룹 B 혈청형 Ad35, Ad11 및 Ad7 뿐만 아니라 서브그룹 E 바이러스 Ad4은 발산하는(divergent) TATA-박스 서열 및 추정의 Sp1 서열 및 TATA-박스 사이의 다른 공간화를 갖는다. 인간 아데노바이러스 유형 4에서 인접 pIX 영역은 simian 아데노바이러스 25 (CV68), 최근에 치료학적인 벡터로서 제안된 혈청형(Farina et al., 2001)에서의 것과 동일하다. 그러므로, 비-인간 아데노바이러스-기저 복제-결핍 벡터의 경우에서 pIX 발현은 또한 안정한 캡시드에 불충분할 것이다.

[0129] pIX 발현은 Ad35 바이러스 및 다른 인간 및 비-인간 아데노바이러스에서 다르게 조절된다는 것 그리고 조절 서열, 또는 프로모터 서열 자체조차도 E1B 서열에서의 추가의 상류에 또는 더욱 더 상류에 위치된다는 것은 당연하다. 대체가능하게는, pIX 발현이 E1A 단백질에 의해 활성화되므로 고수준의 pIX 발현은 동일한 혈청형 또는 서브그룹에 속하는 E1A 단백질의 존재하에서 얻어진다는 것 또한 가능하다.

[0130] 본 발명자들은 벡터에서 pIX 발현을 증가시키기 위하여 이중성 프로모터로 인접 pIX 상류 서열을 변화시키는 것이 더욱 안정한 바이러스 및 더욱 패키징 수용량을 유도하는 지를 시험하였다(하기 참조). 대체가능하게는, pIX 기능은 패키징 세포주를 경유하여 역으로(in trans) 이동될 수 있다. 비-제한하는 실시예와 같이, 본 발명자들은 Ad5 바이러스에서 발견된 바와 같은 비-내성적인 인접 pIX 프로모터를 가진 제조합 Ad35-기저 바이러스를 기

재하고, 이들 바이러스가 변하지 않은 재조합 벡터보다 더욱 안정성을 가진다는 것을 나타낸다.

[0131] 실시예 5. Ad5 pIX 프로모터를 가진 적응체 플라스미드의 생성

[0132] pAdApt535는 Ad5 pIX 프로모터 서열의 일부를 가진 Ad35 적응체 플라스미드이지만, Ad35 적응체 플라스미드 pAdApt35IP1에 다르게 동일하다(WO 00/70071 참조). 그것의 구축은 하기와 같다:

[0133] 첫 번째 PCR 단편은 프라이머 SV40for 및 pIX5Rmfe로 생성되었다. 반응은 최종 혼합액(mix)에서 3% DMSO를 가진 것을 제외하고는 제조업체의 지침서에 따라서 Pwo DNA 폴리머라제(Roche)로 이루어졌다. pAdApt, Ad5 E1-결실된 바이러스용 적응체 플라스미드(100ng; WO 00/70071 참조)는 주형(template)로 사용되었다. 프로그램은 하기와 같이 정하였다: 94℃에서 2분, 그 다음 (94℃에서 30초(녹임), 52℃에서 30초(어닐링(annealing)) 및 72℃ 30초(연장(elongation))의 30 사이클, 이어서 72℃에서 8분. 생성된 PCR 단편은 pAdApt으로부터의 SV40 다중아테닐화의 3' 말단 및 뉴클레오티드 3511로부터 뉴클레오티드 3586까지의 Genbank 수탁번호 M73260에 나타난 바와 같은 Ad5 pIX 프로모터 영역 및 3' 말단에서 MfeI 부위를 함유한다.

[0134] 두 번째 PCR 단편은 프라이머 pIX35Fmfe 및 35R4를 가진 것을 제외하고는 상기와 같이 생성되었다. 100ng의 pAdApt35IP1는 주형으로 사용되고, 어닐링은 58℃에서 30초로 정해졌고, PCR 프로그램의 연장은 72℃에서 90초로 정해졌다. 이 PCR은 뉴클레오티드 3467로부터 뉴클레오티드 4669까지의 Ad35 서열(WO 00/70071에서와 같은 서열번호)을 증폭하고, MfeI 부위를 5' 말단에 첨가하였다.

[0135] 그 다음, PCR 단편 모두는 MfeI로 소화되고, 제조업체의 지침서에 따라서 Qiagen PCR purification kit(Qiagen)를 사용하여 정제되었다. 정제된 단편의 농도는 아가로스 젤에서 샘플을 이동시키는 것으로 평가하고, 두 단편의 대략의 등몰량은 용량 40μl에서 DNA 5μg, 10x 리가제 완충용액 4μl 및 리가제 효소(New England Biolabs) 2μl를 함유하는 결찰 반응에서 혼합되었다. 이어진 RT에서 >2 시간의 인큐베이션 후, 혼합물은 TAE에서 1.2% 아가로스 젤에서 적재되고, 1.4kb 길이의 DNA 단편은 제조업체의 지침서에 따라서 GeneClean II kit(Bio10, Inc.)으로 분리되었다.

[0136] DNA는 살균 H₂O 30μl에서 용출되었고, 1μl은 상기와 같이, 프라이머 SV40for 및 35R4로 PCR 증폭 반응에 사용되었다. PCR은 52℃의 어닐링 온도 및 90초의 연장 시간과 함께 상기와 같게 이루어졌다. 생성된 생성물은 Qiagen gel extraction kit를 사용하여 젤로부터 분리되고, AgeI 및 Bgl II으로 소화되었다. 생성된 0.86kb 띠를 제조업체의 지침서에 따라서 GeneClean II kit를 사용하여 젤로부터 분리하였다.

[0137] pAdApt35.Luc(WO 00/70071에서 기재된 바와 같이)는 또한 Bgl II 및 AgeI로 소화되고 5.8kb 벡터 단편은 상기와 같이 GeneClean II kit를 사용하여 젤로부터 분리하였다. 이 단편은 Ad5-Ad35 키메라 pIX 프로모터를 함유하는 상기와 같이 분리된 Bgl II-AgeI 단편과 결찰되어 pAdApt535.Luc가 생성되었다(도 4).

[0138] Ad5 pIX 프로모터를 함유하는 다른 적응체 플라스미드는 하기와 같이 만들어졌다:

[0139] pAdApt535.Luc는 Bgl II 및 ApaI로 소화되고, 1.2kb 삽입체는 제조업체의 지침서에 따라서 GeneClean II kit를 사용하여 젤로부터 정제되었다. pAdApt35IP1는 또한 Bgl II 및 ApaI와 소화되고 3.6kb 벡터 단편은 상기와 같이 분리되었다. 모든 분리된 단편의 결찰은 pAdApt535를 야기하였다(도 5). 그 다음, pAdApt535는 표준 클로닝 기술을 사용하여 다중 클로닝 부위로 eGFP(pAdApt35.eGFP로부터 유도된) 및 LacZ(pAdApt35.LacZ로부터 유도된)와 같은 다른 마커 유전자를 클로닝하기 위해 사용되어, pAdApt535.eGFP 및 pAdApt535.LacZ이 생성되었다.

[0140] 실시예 6. Ad5 pIX 프로모터를 함유하는 적응체 플라스미드를 가진 E1-결실된 Ad35-기저 벡터의 생성.

[0141] 재조합 바이러스는 상기와 같이 PER55K 클론 16 세포에서 적응체 플라스미드 및 Ad35 벡터 골격 코스미드의 트랜스팩션으로 생성되었다. 여기에, 하기의 플라스미드 세트가 사용되었다:

[0142] T1. pAdApt535eGFP + pWE.Ad35.pIX-r ITR

[0143] T2. pAdApt535eGFP + pWE.Ad35.pIX-r ITR ΔE3

[0144] T3. pAdApt35Luc + pWE.Ad35.pIX-r ITR

[0145] T4. pAdApt535Luc + pWE.Ad35.pIX-r ITR

[0146] T5. pAdApt35Luc + pWE.Ad35.pIX-r ITR ΔE3

[0147] T6. pAdApt535LacZ + pWE.Ad35.pIX-r ITR

- [0148] T7. pAdApt535LacZ + pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3
- [0149] T8. pAdApt35LacZ + pWE.Ad35.pIX-rITR
- [0150] T9. pAdApt35LacZ + pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3
- [0151] 적응체 플라스미드는 pIPsp-1 효소로 소화되는 pAdApt535.Luc 및 pAdApt35.Luc를 제외하고는 PacI로 소화되고, pWE.Ad35.pIX-rITR 및 pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3는 트랜스팩션 이전에 NotI으로 소화되었다. 각 적응체 플라스미드 2μg 및 골격 DNA 6μg은 제조업체의 지침서에 따라서 Lipofectamine(Invitrogen/Life Technologies) 40μl로 혼합되고 70% 컨플루언스에서 T25 플라스크에서 PER55K 클론 16 세포로 인큐베이션하였다. 트랜스팩션 배지는 4시간 후에 제거되고, 세포는 추가로 37℃/10% CO₂에서 인큐베이션하였다. 트랜스팩션 2일 후, 세포는 T80 플라스크에 계대배양되었고, 그 다음 날에 세포병원성 효과(CPE)의 발생에 대해 점수화하였다. 5일 후, 모든 배양은 증대 또는 T6(무 CRE) 및 T8(CPE 사건)을 제외한 전체 CPE를 나타낸다. 다시 2일 후, T6 및 T8은 개시 CPE 및 다른 전체 CPE 모두를 나타내었다. 모든 배양은 배지 및 세포를 수집하는 것으로 채취되었다. 혼합물은 -20℃에서 저장되었다. 샘플의 해동에서, 혼합물은 15분동안 1500 rpm에서 회전되어 세포 용해물을 펠렛화하고, 상정액을 수집하였다. 샘플의 일부(네 개의 LacZ 발현하는 바이러스, T6-T9)의 2ml은 T80 플라스크에서 80% 컨플루언스에서 PER55K 클론 16 세포를 다시 감염시키는 데에 사용되어 바이러스 역가를 추가로 증폭시켰다. 세포 및 배지는 (T6+T8) 또는 전체 CPE (T7+T9)를 증대하면서 채취하고, 조 용해질은 상기와 같이 제조되었다.
- [0152] 이 방법으로 얻어진 조 용해질은 바이러스 DNA를 분리하는 데에 사용되었다. 여기에, 조 용해질 재료 275μl은 37℃에서 30분동안 10mg/ml DNaseI 10μl으로 인큐베이션하였다. 이어서, 0.5M EDTA(pH 8.0) 0.6μl, 20% SDS 7.5μl 및 20mg/ml 프로테이나제 K 1.5μl은 첨가되고 와동으로 혼합되었다. 그 다음, 혼합물은 50℃에서 1시간동안 인큐베이션되었다. 최종적으로, 바이러스 DNA는 GeneClean Spin Kit(Bio 101, Inc.)를 사용하여 분리하였다. 바이러스 DNA는 50μl의 MilliQ H₂O에서 용출하고, 샘플의 5μl은 트랜스진 영역을 분석하기 위해 사용되었다. pWE.Ad35.pIX-rITR+/-E3 골격 코스미드는 변화하지 않으므로 아직 Ad35 pIX 프로모터를 함유한다는 것을 주목해야 한다. 이 프로모터가 코스미드의 바로 5' 말단에 위치되므로, wt Ad35 프로모터를 야기하는 재조합 사건에 대한 기회는 매우 작을 것으로 고려된다. 하지만, 바이러스가 Ad35 pIX 프로모터를 아직 함유한 상태로 생성된다는 것이 이 설치에서 제외하지 않을 수 있었다. 그러므로, 두 개의 특이 PCR 증폭은 각각의 바이러스 제조법으로 수행되었다: 첫 번째 것은 프라이머 세트 1(Ad35 특이): AdApt35CMVF 및 AdApt35pIXrev로 이루어졌다. 이 PCR은 Ad35 pIX 프로모터를 함유하는 바이러스에서 트랜스진 영역을 특이적으로 증폭하였다. PCR 반응은 반응에서 4mM MgCl₂ 및 Taq 효소 4유니트를 사용하는 것을 제외하고는 제조업체 지침서에 따라서 재조합 Taq 폴리머라제(Invitrogen)와 분리된 바이러스 DNA 샘플 5μl로 이루어졌다. PCR 프로그램은 94℃에서 2분, 이어서 (94℃에서 30초, 60℃에서 30초 및 72℃에서 5분)의 30사이클로 정해졌고, 68℃에서 8분의 최종 단계로 끝맺는다.
- [0153] 두 번째 것은 프라이머 AdApt35CMVF 및 pIX5Rmfe로 이루어졌고, Ad5 pIX 프로모터를 함유하는 바이러스에서 트랜스진 영역을 특이적으로 증폭하였다(프라이머 세트 2).
- [0154] PCR 증폭은 각각의 프라이머(100 μM stock) 0.3μl, 2mM dNTP 혼합물 5μl, 10x 완결한 완충용액(Mg²⁺ 함유) 5μl, DMSO 1.5μl 및 Pwo 효소 0.8μl를 함유하는 용량 50μl에서의 Pwo DNA 폴리머라제(2.5 유니트/μl Genaxis)와 분리된 바이러스 DNA 5μl로 이루어졌다. PCR 프로그램은 94℃에서 2분, 이어서 (94℃에서 30초, 60℃에서 30초 및 72℃에서 5분)의 30사이클로 정해졌고, 68℃에서 8분의 최종 단계로 끝맺는다. PCR 중에 가열 및 냉각 램프는 2℃/초로 정하였다. 그 다음, 5μl의 적재 완충용액을 샘플에 첨가하고, 혼합물 8μl을 분석용 젤에 적재하였다.
- [0155] Ad5 pIX 프로모터 서열 및 eGFP 트랜스진 (트랜스팩션 T1 및 T2)을 함유하는 E1 및 E1/E3 결실 Ad35 바이러스는 더 짧은 단편을 갖지 않고 예상된 높이에서 PCR 증폭된 띠를 가졌다. 도 6a는 바이러스(트랜스팩션 T3 및 T4)를 수행하는 E1-결실된 루시페라제에서의 PCR 증폭에 대한 결과를 나타낸다. 라인 5-8은 프라이머 세트 모두를 가진 AdApt535Luc(라인 5 및 6) 및 AdApt35Luc 플라스미드(라인 7 및 8)에서 대조군 PCR이다. 라인 1-4는 바이러스 DNA 분리물에서의 PCR이다. 프라이머 세트 1(Ad35 pIX 영역에 특이적인)는 예상된 길이의 띠를 증폭하고, 추가로 Ad35.AdApt35.Luc 바이러스에서 더 짧은 단편을 나타낸다(라인 4; 또한 도 2 루시페라제 +E3과 비교). 대조적으로, 프라이머 세트 2(Ad5 pIX 프로모터에 특이적인)는 바이러스가 AdApt535.Luc 플라스미드로 이루어진 경우에 어떠한 결실 단편도 없는 예상된 길이의 띠를 나타낸다(라인 1). 이것으로부터, 본 발명자들은 Ad5 pIX 프로모터 서열의 삽입이 Ad35-E1 결실된 바이러스의 패키징 수용량 및 안정성을 증가시킨다고 결론내었다. 도 6b는 트랜스진으로서 LacZ를 수행하는 Ad35 E1/E3 결실된 바이러스에 대한 이들 결과를 입증한다. 라인 1-4는

각각의 프라이머 세트를 가진 AdApt535.LacZ 및 AdApt35.LacZ 플라스미드에서의 대조군 PCR이다. 일부 배경 때는 특히 프라이머 세트 1(레인 2 및 4)를 가지는 것으로 보여지지만, 강한 특이적인 때는 또한 동종성의 샘플(레인 1 및 4)에서 각 프라이머 세트에 대한 예상된 높이에서 보여진다. 바이러스 DNA는 상기한 바와 같이 하나의 증폭 라운드 후에 및 트랜스팩션 후에 단리되었다. 놀랍게도, 프라이머 세트 2는 어떠한 결실 단편을 갖지 않고 Ad35.AdApt535.LacZ 바이러스에서의 예상된 단편을 생성하는(레인 5 및 9) 반면에 Ad35 pIX 프로모터 서열을 함유하는 바이러스를 가진 샘플은 올바른 길이의 단편(증폭 후 가시적인)에 더하여 결실된 단편을 명백하게 나타낸다(레인 11).

[0156] 대체로, 이들 결과는 Ad5-pIX 프로모터 서열에 대한 Ad35-pIX 프로모터 서열의 치환이 더 큰 계능을 가진 바이러스에서 트랜스진 영역의 안정성을 증가시킨다는 것을 보여준다. 더 강한 프로모터 또는 추가적인 프로모터 성분은 이 효과를 높일 수 있다.

[0157] 실시예 7. pWE.Ad35-3481의 생성.

[0158] 상기와 같이, 코스미드 pWE.Ad35.pIX-rITR에서 아데노바이러스 삽입체는 그것의 5' 말단에서 Ad35 pIX 프로모터를 함유한다. 이것은 pAdApt535-기저 적응체 플라스미드로 생성된 바이러스로 Ad35 pIX 프로모터의 재삽입을 이끌 수 있다. 그러므로, Ad35 골격 코스미드의 새로운 형태는 pIX 프로모터 서열을 결손하는 것으로 만들어진다. 여기에, PCR 단편은 pIXcosF-2 및 Adapt35-3 프라이머로 생성되었다. 증폭은 각 프라이머(10 μM stock) 3 μL, 2mM dNTP 혼합물 5 μL, 10x 완결한 완충용액(Mg²⁺를 포함하는) 5 μL, DMSO 1.5 μL, Pwo 효소 0.5 μL 및 pAdApt35IP1 주형 10ng을 함유하는 용량 50 μL에서 Pwo DNA 폴리머라제(2.5 유닛/μL; Genaxis)로 이루어졌다. PCR 프로그램은 94℃에서 2분, 이어서 (94℃에서 30초, 60℃에서 30초 및 72℃에서 1.5분)의 5사이클로 정해졌고, 68℃에서 8분의 최종 단계로 끝맺는다. 생성된 1.2kb PCR 생성물은 5' 말단에 부착된 Aat II 및 NotI 부위를 가진 뉴클레오타이드 3481부터 뉴클레오타이드 4663(WO 00/7071에서 발표된 바와 같은 Ad35 서열에 따른 번호화)까지의 Ad35 서열을 함유한다. PCR 생성물은 제조업체의 지침서에 따라서 PCR purification kit(Qiagen)을 사용하여 정제하고, 제조업체의 지침서에 따라서 pPCR-Script Amp 벡터(Stratagene)로 클로닝하였다. 그 다음, 클로닝된 단편의 서열은 서열화에 의해 밝혀졌고, 이어서 Aat II 및 AgeI로의 소화로 구축물로부터 제거되었다. 생성된 780bp 단편은 제조업체의 지침서에 따라서 GeneClean spin kit (Bio101, Inc.)를 사용하여 젤로부터 정제되었다.

[0159] 구축물 pWE.Ad35 ΔNdeI(하기와 같은)은 또한 Aat II 및 AgeI로 소화되었고, 생성된 12kb 벡터 단편은 제조업체의 지침서에 따라서 GeneClean spin kit (Bio101, Inc.)을 사용하여 젤로부터 단리되었다. 양쪽 단리된 단편의 결합은 구축물 pWE.Ad35-3481 ΔNdeI을 생성한다.

[0160] 구축물 pWE.Ad35 ΔNdeI의 구축은 WO 00/70071에서 기재되었고, 뉴클레오타이드 3401로부터 뉴클레오타이드 6541에서의 NdeI 부위까지의 Ad35 서열 및 뉴클레오타이드 33167에서의 NdeI 부위에서부터 오른쪽 ITR의 말단까지의 Ad35 서열을 함유하고, 여기서 양쪽 Ad35 단편 모두는 NdeI 부위를 공유하여 연결된다(또한 WO 00/70071에서의 도 13 참조).

[0161] 그 다음, pWE.Ad35-3481 ΔNdeI은 NdeI로 선형화되고, CIP 효소(New England Biolabs)로 탈인산화되고, 제조업체 지침서에 따라서 GeneClean spin kit (Bio101, Inc.)를 사용하여 젤로부터 정제되었다. 그 다음, 이 벡터 단편은 Ad35 wt DNA로부터 단리된 26.6kb NdeI 단편에 결합된 후, 혼합물은 제조업체의 지침서에 따라서 λ-phage packaging extracts (stratagene)을 사용하여 코스미드를 패키징하는 데에 사용되었다. 생성된 혼합물은 STBL-2 bacteria (Invitrogen)을 형질변환하는 데에 사용되어, pWE.Ad35-3481을 발생하였다.

[0162] 실시예 8. pIG35.55K의 구축

[0163] 구축물 pIG35.44K는 인간 포스포글리세라이트 키나제 프로모터(hPGK) 및 HBV폴리아데닐화 서열에 작용하게 연결된 Ad35 E1B-55K 유전자의 코딩 서열을 함유한다. 게다가, 그것은 RSV 프로모터 및 HBV pA에 작용하게 연결된 네오마이신 내성 유전자를 함유한다. pIG35.55K의 구축은 하기와 같다.

[0164] 구축물 pIG270(WO 00/70071에서 기재된 바와 같이)은 EcoRI로 소화되고, Klnow 효소로 처리되고, 제조업체의 지침서에 따라서 PCR purification kit (Qiagen)을 사용하여 정제된다. 그 다음, 회복된 DNA는 AgeI로 소화되고, ~5kb 벡터 단편은 제조업체의 지침서에 따라서 GeneClean kit (Bio101, Inc.)을 사용하여 젤로부터 단리되었다. 다음은, Ad35 E1B-55K 서열은 35D21 및 35B3 프라이머를 사용하여 pIG270 주형 DNA에서 PCR로 증폭되었다. PCR 증폭은 PCR 혼합물에서 3%의 최종 농도에서의 DMSO를 사용하는 것을 제외하고는 제조업체의 지침서에 따라 2 ng 주형 DNA에서 Pwo DNA 폴리머라제 (Roche)으로 이루어졌다. 프로그램은 94℃에서 2분, 이어서 (94℃에서 30초, 56℃에서 30초 및 72℃에서 30초)의 25사이클로 정해졌고, 72℃에서 10분의 최종 단계로 끝맺는다.

생성된 PCR 단편은 PCR purification kit(Qiagen)를 사용하여 정제되고 그리고 NcoI로 소화되었다. 튀어나온 (protrude) 말단에서 채우기 위하여 이어진 Klenow 처리에서, DNA는 AgeI로 추가 소화되고 다시 컬럼은 정제된다. 그렇게 처리된 PCR 단편은 상기 제조된 EcoRI/AgeI 소화된 벡터 단편으로 클로닝되어 pIG270.ΔE1AΔ21K를 생성한다. pIG270.ΔE1AΔ21K는 Avr II 및 XbrI로 소화되고, 튀어나온 말단은 Klenow 효소를 사용하여 채웠다. PGK 프로모터 및 Ad35 E1B-55K 서열을 함유하는 2.9kb 단편은 상기와 같이 젤로부터 단리되었다. 다음, pRSVneo4(하기와 같은 구조)은 Bgl II으로 소화되고, Klenow 효소로 블런트(blunt)되고, 탈인산되고 젤로부터 단리되었다. 그 다음, pIG270.ΔE1AΔ21K로부터의 블런트된 Avr II/XbaI 단편은 상기 제조된 pRSVneo4 벡터 단편으로 결합되어 pIG35.55K를 얻었다.

[0165] pRSVneo4는 하기와 같이 제조되었다: 구축물 pRSVhvbvNeo(WO 00/70071에서 기재된)은 ScaI 및 BamHI으로 소화되고, 튀어나온 말단은 Klenow 효소를 사용하여 채워졌다. Ampicilin 유전자 및 RSV 프로모터의 일부를 함유하는 1070bp 단편은 GeneClean kit(Bio101, Inc.)를 사용하여 젤로부터 단리되었다. 다음, pRSVhvbvNeo는 ScaI 및 EcoRI로 소화되고 Klenow 및 neo 유전자, HBVpA, 벡터를 포함하는 3.2kb 단편으로 블런트되었고, Ampicilin 유전자의 일부는 상기와 같이 단리되었다. 그 다음, 두 개의 단편은 결합되어 pRSVneo4를 얻었다.

[0166] 실시예 9. RSV 프로모터로 중재된 증가된 pIX 발현이 Ad35 바이러스의 안정성을 증가시킨다.

[0167] pIX 유전자의 발현을 유도하는 이중성 프로모터의 예로서, RSV 프로모터는 LacZ 또는 루시페라제 리포터 유전자를 함유하는 Ad35 적응체 플라스미드로 삽입되었다. RSV 프로모터는 pRc-RSV(Invitrogen)로부터 얻어질 수 있는 NruI/ApaI 단편에 상응한다. 튀어나온 말단은 제조업체의 지침서를 따라서 Klenow 효소(New England Biolabs)를 사용하여 채워졌다. RSV 프로모터를 함유하는 388bp 단편은 QIAquick Gel Extraction kit(Qiagen)를 사용하여 아가로스 젤로부터 단리되었다. 적응체 플라스미드 pAdApt35.Luc 및 pAdApt35.LacZ은 Bgl II로 선형화되고 Klenow 처리로 말단을 블런트하였다. Bgl II는 트랜스진 발현 카세트의 SV40 다중-아데닐화 서열 뒤에서 소화한다. pAdApt35-기저 적응체 플라스미드의 개시에 대해서는 WO 00/70071를 참조한다. 그 다음, 처리된 적응체 플라스미드는 제조업체(Roche)의 지침서에 따라서 Shrink Alkaline Phosphatase(SAP)를 사용하여 탈인산화되었다. 그 다음, 단리된 RSV 프로모터 단편은 처리된 벡터의 각각으로 결합되고 DH5α 적격 박테리아(Invitrogen)으로 형질변환되었다. 콜로니는 pAdApt35.Luc.rsv 및 pAdApt35.LacZ.rsv를 야기하는 pIX 유전자에 대응하는 RSV 프로모터 전방(forward)-배향된(oriented) 삽입에 대하여 분석되었다.

[0168] 게다가, 적응체 플라스미드는 트랜스진 영역의 결실 후에 생성된 Ad35 재조합 바이러스로부터 PCR에 의해 단리되었다. pAdApt35.LacZ 및 pWE.Ad35.pIX-rITR Ad35 골격 구축물의 트랜스팩션 및 이어진 플라크 정제로부터 생성된 조 용해질 제조의 분석은 바이러스가 대략 2.8kb의 트랜스진 영역에서의 결실을 가진다는 것을 보여준다. 이 바이러스로부터의 5' 서열은 프라이머 35F1 및 35R4를 사용하여 단리된 DNA로부터 증폭된 PCR이었다. 반응은 제조업체의 지침서에 따라서 Pwo 폴리머라제(Roche)로 수행되었다. 프로그램 세팅은 하기와 같다: 94℃에서 2분, 이어서 (94℃에서 30초; 48℃에서 30초; 72℃에서 2.5분)의 5 사이클, 이어서 (94℃에서 30초; 56℃에서 30초; 72℃에서 2.5분)의 25 사이클, 그리고 68℃에서 8분의 끝맺음.

[0169] 생성된 2kb 단편은 PCR purification kit(Qiagen)으로 정제되고, pCR.Ad35Δ2.8kb를 생성하는 제조업체의 지침서에 따라서 pCR-Script-Amp으로 클로닝되었다. 이 플라스미드는 결실의 한도를 결정하기 위해 서열화되었다. 결실은 CMV 프로모터, 트랜스진 및 SV40 polyA의 대부분에 영향을 주었다. 이것은 pIX 유전자의 Ad35 서열 상류에 대한 CMV 프로모터의 5' 317bp의 연결을 나타낸다. 이 CMV 단편은 세 개의 GC-박스 및 21-bp 복제품을 함유한다(Boshart et al., 1985). 가능하게는, CMV 프로모터의 잔류된 서열은 더욱 안정한 바이러스를 생성하는 pIX 발현을 증대할 수 있다. 대체적인 가능성은 그 자체에서 더 작은 바이러스는 증가된 안정성을 나타낸다는 것이다. 이것을 조사하기 위하여, 완전한 발현 카세트는 하기 방법으로 클로닝되었고, 이 신규 적응체 플라스미드를 가진 바이러스가 생성되었다. 증폭된 서열(pCR.C4 재-명명된)을 함유하는 pCR-Script-기저 벡터는 유일한 Avr II 부위 전의(preceding) ΔCMV-pIX 서열을 갖는다. 벡터는 Avr II로 소화되고, Klenow 효소로 블런트되고, 상기와 같이 SAP 효소(Roche)를 사용하여 탈인산화하였다. 적응체 플라스미드 pAdApt535.LacZ(실시예 5) 및 pAdApt.Luc(WO 00/70071)은 Avr II 및 Bgl II로 소화되고, DNA는 Klenow로 처리되어 튀어나온 말단을 채웠다. LacZ 및 루시페라제 발현 카세트에 상응하는 단편(CMV-TG-pA)은 상기와 같은 젤로부터 단리되고, Avr II 선형화된 pCR.C4 벡터로 결합되었다. 왼쪽 ITR에 상응하는 전방 배향에서의 카세트를 가진, 상기와 같이 적격세포에서의 형질변환 및 클로니의 선별은 pCR.C4.LacZ 및 pCR.C4.Luc를 생성했다.

[0170] Ad35 바이러스는 신규 적응체 바이러스: PacI로 소화된 pCR.C4.LacZ, ApaI로 소화된 pCR.C4.Luc 및 PI-PspI로 소화된 각각의 pAdApt35.LacZ.rsv 및 pAdApt35.Luc.rsv를 사용하여 실시예 6에서 기재된 바와 같이

생성되었다.

- [0171] 적응체 플라스미드는 pWE.Ad35.pIX-rITR 또는 NotI로 소화된 pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3를 가진 PER55K 세포(WO 02/40665)에서 코트랜스펙션되었다. 게다가, 적응체 플라스미드 pBr. Ad35. Δ E1A Δ 21K.Luc(하기와 같이 구축)은 PI-PspI로 소화되고, NotI로 소화된 pWE.Ad35.pIX-rITR로 코트랜스펙션되었다. 전체 세포병원성 효과(CPE)에서, 배양은 하나의 동결/해동 사이클로 채취되고, 원심분리되어 세포 용해물을 분리하였다. 그 다음, 생성된 맑아진 용해질 300 μ l은 T80 플라스크에 하루 전에 살포된(seeded) PER55K 세포를 재-감염하는 데에 사용되었다. 전체 CPE에서, 조 용해질은 제조되고, 트랜스진 발현에 대하여 시험하고 PER55K 세포에서 플라크 평가를 수행하기 위하여 A549 세포를 감염시키는 데에 사용되었다.
- [0172] A549 세포는 5×10^5 세포/웰에서 6-웰 플레이트에 살포되고, 5시간 후에 LacZ 바이러스 저장물(stock) 중 하나의 10, 1 또는 0.1 μ l로 감염되고, 2일동안 인큐베이션되었다. 그 다음, A549 세포는 LacZ 활성을 위해 염색되었고, 파란색 세포는 계측되었다. 파란색 세포의 퍼센트는 표 2에 나타내었다.
- [0173] LacZ 발현 바이러스는 RSV 프로모터가 결실된 CMV 프로모터에 비교된 바와 같이 pIX 유전자의 발현을 유도하는 경우에 명백하게 더욱 안정하다. 이들 결과는 루시페라제 바이러스로 확인되었다. 루시페라제 바이러스의 활성을 측정하기 위하여, A549 세포는 1×10^5 세포/웰에서 24-웰 플레이트에 살포되었고, 바이러스 저장물의 10, 1, 0.1 또는 0.01 μ l로 감염되었고, 인큐베이션되었다. 2일 후, 세포는 PBS로 두 번 세척되었고, 용해 완충용액(Promega) 100 μ l에 재현탁되었고, 사용될 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 저장되었다. 루시페라제는 제조업체의 지침서에 따라서 Steady-Glo luciferase assay system(Promega)을 사용하여 측정되었다. 결과는 표 3에 나타내었다.
- [0174] 실시예 3에서, 본 발명자들은 E3 영역 및 AdApt.Luc 또는 AdApt.LacZ 발현 카세트를 함유하는 완전히 E1-결실된 Ad35 바이러스는 안정하지 않다고 기재하였다. 분명하게는, 새로이 기재된 구축물에서, pIX에 앞서는 결실된 CMV 프로모터는 트랜스진 영역의 결실을 막지는 못했다. 하지만, pIX 유전자를 유도하는 RSV 프로모터로, 본 발명자들은 현재에는 야생형 길이보다 더 긴 바이러스를 생성할 수 있다. Ad35.AdApt.Luc.rsv 및 Ad35.AdApt.LacZ.rsv는 각각 35kb 및 36.5kb이다(또한 도 2 참조). Ad35. Δ E1A Δ 21K.Luc(36.4kb)는 또한 높은 트랜스진 활성을 나타냈다.
- [0175] 다음, 본 발명자들은 바이러스가 플라크 정제 후 손상되지 않았는지를 시험하였다. 여기에, PER55K 세포는 0.9×10^6 세포/웰에서 6-웰 플레이트에 살포되었고, Ad35.AdApt.LacZ 조 용해질의 다른 10배 희석물로 감염되었다. 10^{-5} 내지 10^{-8} 의 희석물로 플레이트화되었고, 다음날 아가 오버레이(overlay)를 첨가하였다. 여기에, 세포는 처음에 PBS로 세척된 다음, 아가로스(SeaPlaque GTG; H₂O 중 2.5%, 7.2ml)와 함께 2xMEM(GibcoBRL; 9.14ml), FBS(Gibco; 0.36ml), MgCl(4.9M; 0.037ml)를 혼합하여 제조된 예비-상온된(pre-warmed) 아가 용액 3ml을 첨가하였다. 고체화 후, 플레이트는 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂에서 추가로 인큐베이션되었다. 4일 후, 플라크는 가시적이고 LacZ 염색 용액이 아가의 상부에 웰에 첨가되고, 서서히 배출되었다. 모든 바이러스는 명백하게, 10^{-7} 내지 10^{-9} 의 범위에서의 분리된 플라크를 나타내지만, RSV 프로모터를 유도하는 pIX 유전자와 바이러스의 경우에서만, 모든 플라크는 푸르게 염색되었다. 양 쪽 경우에, 결실된 CMV 프로모터가 플라크의 일부 이상에 pIX를 유도하는 곳은 염색되지 않았다. 이것은 패키징가능한 게놈 크기/안정성이 pIX를 조절하는 RSV 프로모터를 가진 바이러스에서 증가된다는 것을 보여준다.
- [0176] 본 발명은 처음으로 기능성인 E1B 유전자의 아데노바이러스 혈청형 35 결핍한 발현으로부터 유도된 또는 기초한 안정한 재조합 아데노바이러스를 제공한다. 이러한 아데노바이러스는 E1-영역에서 적어도 결실을 갖는다. 특히 본 발명에 의해 제공된 구현예에서, 상기 안정한 재조합 아데노바이러스는 4.2kb 이상의 외래 삽입 서열 및, 본 발명에 따른 방법을 사용하여, 33.4kb 이상의 패키징된 게놈 크기를 갖는다. 그러므로, 본 발명의 목적은 a) 4.2kb 이상의 외래 핵산 서열을 내포하는, 및/또는 b) 33.4kb 이상의 패키징된 게놈 크기를 갖는, 안정한 재조합 아데노바이러스를 제공하는 것이다. 특히 구현예에서, 본 발명은 a) 적어도 4.6kb의 외래 핵산 서열을 내포하는, 및/또는 b) 33.8kb 이상의 패키징된 게놈 크기를 갖는, Ad35 또는 Ad11 기저 재조합 아데노바이러스를 제공하는 것이다. 대체가능하게는 또는 여기에 추가로, 상기 패키징된 게놈 크기는 적어도 개별적으로 34.6, 35.0, 36.1 및 36.5kb이다. 이들 구현예에서의 외래 서열은 pIX의 발현을 유도하는 이중성 프로모터를 포함할 수 있다. 또 다른 관점에서, 상기 안정한 재조합 아데노바이러스는 혈청형 11의 것이다. 본 발명의 이 관점에 따른 안정한 아데노바이러스는 패키징하는 아데노바이러스에 계대배양되어, 10% 미만의, 바람직하게는 5% 미만의, 바람직하게는, 예를 들어, 실시예 3에서 예시된 PCR 방법에 의해 측정될 수 있는 바와 같이, 재조합 아데노

바이러스에서 외래 서열에서 결실이 발생하는 분리된 클론이 하나도 없는, 재조합 아데노바이러스의 일단 (batch)을 제공할 수 있다.

[0177] pBr.Ad35.ΔE1AΔ21K.Luc(상기와 같은)은 하기와 같이 제조되었다. 구축물 pBr.Ad35.ΔE1AΔ21K(WO 02/40665)은 HpaI로 소화되었고, CIP(New England Biolabs)로 탈인산화되었고, 5kb 벡터 단편은 젤로부터 분리되었다. 구축물 pBr.Ad35.ΔE1A.Luc은 또한 HpaI로 소화되었고, 3.3kb 삽입체는 젤로부터 분리되었고, 분리된 벡터 단편과 결합되었다. 이어진 STBL-2 적격세포(Invitrogen)로의 형질변환에서, 콜로니는 올바른 배향에서 삽입체와 함께 선별되었다. 이것은 구축물 pBr.Ad35.ΔE1AΔ21K.Luc를 생성했다. pBr.Ad35.ΔE1A.Luc(또한, 그것이 아직 E1B 영역을 함유하기 때문에 pBr.Ad35.E1B+.Luc로 불리우는)는, Avr II 및 Bgl II 소화 및 Klenow 효소로 블런트된 후 pAdApt.Luc로부터 얻어진, AdApt.Luc 카세트를 SnaBI 및 HindIII로 소화되고 Klenow로 블런트된 벡터 단편 pBr.Ad35.left ITR-pIX(WO 02/40665)로 삽입하는 것으로 만들어졌다. 전방 배향에서 발현 카세트와의 콜로니는 선별되어 pBr.Ad35.ΔE1A.Luc를 얻었다.

[0178] 실시예 10. pIX 조절(regulatory) 서열의 동정화

[0179] 이전의 실시예는 E1A 및 E1B에 대한 코딩 서열이 완전히 제거되는 Ad35 재조합 바이러스는 게놈 크기가 증가된 다면 점증적으로 더욱 불안정하게 된다. 본 발명자들은 이 응용에서 pIX 발현을 유도하는 이중성 프로모터가 상기 불안정성을 극복할 수 있다는 것을 보여 준다. WO 02/40665 및 상기에서, 본 발명자들은 완전한 E1B-55K 코딩 서열을 유지하는 Ad35 바이러스가 PER.C6에서 생산되고 안정할 수 있다. 전체 E1B 코딩 서열을 유지하는 바이러스에 대해서도 사실이다(WO 00/70071; Abrahamsen et al., 1997). 이들 결과들은 pIX 유전자의 발현이 서브그룹 C에서 pIX 유전자에 비교된 바와 같이 서브그룹 B 바이러스에서 다르게 조절된다. E1B 프로모터에 의해 유도된 E1B-55K 유전자를 유지하는 바이러스가 안정하므로(상기와 같이), pIX 조절 서열은 아마도 이 영역에서 위치될 것이다. 이것을 조사하기 위하여, 본 발명자들은 55K 서열의 3' 말단의 다른 길이를 유지하는 일련의 구축물을 생성하였다. 여기에, pB4.Ad35ΔSM.AdAptLacZ는 우선 하기와 같이 생성되었다. 구축물 pBr.Ad35.l ITR-pIX(WO 00/70071에서 개시된)는 SnaBI 및 MfeI로 소화되었고, Klenow로 블런트되고, SAP 효소(Roche)로 탈인산화되었다. 그 다음, 4.4kb 벡터 단편은 아가로스 젤로부터 분리되었다. 구축물 pAdApt.LacZ(LacZ 트랜스진 삽입체를 가진 Ad5-기저 적응체 플라스미드 pAdApt; WO 99/55132)는 Avr II 및 Bgl II (그리고, 임의로 단편 크기에서 차이를 증가시키기 위하여 SalI)로 소화되고, Klenow 효소로 블런트되었다. 4.2kb CMV.LacZ.pA 삽입체는 결합되어 pBr.Ad35ΔSM.AdAptLacZ를 생성했다(도 7). 배향은 올바른 배향에서의 결합이 Avr II 부위 및 MfeI 부위 모두를 복구(restore)하므로, 제한 효소로 확인되었다. 구축물 pBr.Ad35ΔSM.AdAptLacZ는 pIX 유전자에 개별적인 wt 위치에서 0.6kb 3' E1B-55K 서열(wt Ad35 nucl 2804-3400)을 유지한다. 이전에, 본 발명자들은 PER.C6 세포에서 증식이 불가능한 것으로 나타났으므로(pBr.Ad35ΔSM; WO 02/40665), 이들 55K 서열이 기능성인 E1B-55K 단백질의 발현을 유도하지는 않는 것을 나타내었다. pBr.Ad35ΔSM.AdAptLacZ로부터 시작하여, 다른 결실은 MfeI(MunI의 이소슈조머(isoschizomer)) 및 StuI, NsiI 중 하나로 소화되고 개별적으로 5' 또는 3' 오버행의 경우에 T4 DNA 폴리머라제 또는 Klenow를 사용하여 내밀은 말단을 블런트하는 것으로 680bp(0.7kb) E1B-55K로 만들어질 수 있다. 소화된 DNA의 재결합은 상기와 같이 pWE.Ad35.pIX-r ITR로 코트랜스팩션하는 것으로 PER55K 세포에서 재조합 바이러스를 생성하도록 사용될 수 있는 기능성인 적응체 플라스미드를 생성한다. 추가적인 구축물은 효소 DraIII, Bsu36I, BssHII를 사용하여 제조되고, 당업자들에게 잘 알려진 방법을 사용하여 부분적으로 벡터(LacZ 유전자 또한 이들 효소에 대한 인식 부위를 함유한다)를 소화하고, 올바른 클론의 선별로 이어진다. 안정성은 상기와 같이 Ad35.AdApt.LacZ.rsv 구축물에 대하여 시험된다. 안정한(즉, 트랜스진 영역에서 결실을 얻지 못하는) 구축물은 pIX 발현에 대한 알맞은 조절 영역을 함유한다. 추가로, 리포터 유전자의 서열 상류를 삽입하는 것으로 주어진 서열에서 직접적으로 프로모터 활성을 시험하는 것이 가능하다. pGL3basic(Promega)는 이러한 리포터 유전자 구축물이다. MunI 및 pIX 유전자의 개시 사이의 영역은 프라이머 세트 Ad3555KmfeF 및 Ad35pIXNcoR를 사용하여 증폭되었다. 이 PCR(94℃에서 2분; 이어서, [94℃에서 30초, 59℃에서 30초, 72℃에서 60초의 30 사이클; 이어진 68℃에서 8분; 추가의 3% DMSO를 갖고 제조업체의 지침서에 따른 효소: Pwo(Genexis))는 2804로부터 3491까지의(wt Ad35에서와 같은 번호화) Ad35 서열을 증폭하고, 그것으로 인하여 NcoI 부위로 pIX의 개시 코돈 주위의 서열을 변화하고, 5' 말단에서 HindIII 부위를 도입하였다. 이 증폭된 단편은 HindIII 및 NcoI로 소화되고 pGL3basic으로 클로닝되고 동일한 효소로 소화되어 pGL3-MN를 생성하였다. 그 다음, pGL3-MN은 예를 들어, PacI, NsiI, StuI, Bsu36I, BssHII 또는 Bgl II로 소화된 HindIII와 화합하는 것으로 루시페라제 코딩 영역의 서열 상류를 결손하는 데에 사용되고, 튀어나온 말단의 블런트화 및 재결합이 이어졌다. 프로모터 활성은 제조업체의 지침서에 따라서 리포펩타민 시약을 사용하여 PER.C6 세포로 얻어진 구축물의 일시적인 트랜스팩션으로 시험되었다. 루시페라제 활성은 제조업체 지침서에 따라서 Steady-Glo lusiferase assay system (Promega)를 사용하여 트랜스팩션의 2일 후에 분석된다. 대체가능하게는, pGL3basic

벡터로, 다른 영역은 삽입되고, 영역은 Ad35 E1B-55K 영역에서 특이 서열에 직접하는 5'(전방) 프라이머를 사용하는 PCR 증폭으로 생성되고 그리고 Nco-pIXrev 프라이머와 화합된 5' 말단에 부착된 HindIII 부위를 갖는다. 이 방법에서 크로닝을 위한 유일한 제한 부위의 존재에 한정되지는 않는다.

[0180] pIX 프로모터의 위치화는 추가로 추정된 프로모터 서열을 찾기 위한 소프트웨어를 사용하여 추가 조사되었다 (Reese and Eeckman, 1995). 도 8은 55K 코딩 서열에 직접적으로 연결된 E1B 프로모터에 대한 프라이머 점수 (0.65에서 최소값 세트)를 나타낸다(pBr.Ad35.ΔE1AΔ21K에서처럼). 영역 A는 E1A 프로모터에 상응하고, 영역 B 및 C는 55K 코딩 영역 안에 위치한다. pIX 상류 영역은 프로모터 서열로서 인식되지 않는다. 영역 C는 세 가지 중 가장 높은 점수(0.96)를 갖고(알려진 E1B 프로모터보다도 더 높은), 그러므로 pIX 발현에 영향을 주는 서열을 포함할 수 있다.

[0181] 실험적으로 가능한 pIX 프로모터를 위치화하고 동정화하기 위하여, 55K 코딩 서열의 3'-말단의 다른(겹쳐지는) 일부에 상응하는 일련의 작은 단편이 생성된다. 도 9는 도식적으로 추정된 프로모터 영역 및 pIX 유전자에 상대적인 이들 단편 및 그것들의 위치를 나타낸다. 단편은 나타내어진 효소를 사용하여 제한 소화로 생성된다. 단편은 Klenow(5' 튀어나온 말단) 또는 T4 DNA 폴리머라제(3' 튀어나온 말단)로 블런트되고 또한 Klenow 처리로 블런트된 pGL3basic vector(Promega)의 NcoI 부위로 클로닝되고 SAP 처리(Roche)로 탈인산화된다. 이어진 적격 박테리아로 형질변환에서, 얻어진 플라스미드는 제한 소화로 삽입체의 배향에 대하여 확인된다. 그 다음, 프로모터 활성은 제조업체의 지침서에 따라서 리포펙타민 시약을 사용하여 PER.C6 세포로 얻어진 루시페라제 구축물의 일시적인 트랜스펙션으로 분석된다. 빈(empty) pGLbasic 플라스미드는 음성적인 대조군으로서 제공한다. 추가적인 조절은 상기와 같이 pGL3basic의 블런트된 NcoI 부위로, i) Ad35 pIX 프로모터를 함유하는 pAdApt535로부터의 Bgl II-MfeI 단편, ii) 388bp NruI-ApaLI RSV 프로모터 단편(상기와 같은), 또는 iii) PCR 단편으로서의 Ad35 pIX 상류 영역을 클로닝하는 것으로 만들어진다. Ad35 상류 pIX 영역은 프라이머 SV40-for 및 5'-인산화된 Ad35pIXrev를 사용하여 pAdApt35IP1에서 증폭된다. 이어진 증폭에서 DNA는 Bgl II로 소화되고 Klenow로 처리된다.

[0182] 또한, 구축물은 E1A 발현에서 의존도를 조사하기 위하여 아데노바이러스 E1(예를 들어, A549, HeLa)를 함유하지 않는 인간 세포로부터 트랜스펙션된다.

[0183] 또한, 단편 적응체 플라스미드 pBr.Ad35ΔSM.AdAptLacZ로 클로닝되어(상기와 같이) 재조합 바이러스를 생성하고 바이러스 계승 안정성을 연구할 수 있다. 여기에, 구축물 pBr.Ad35ΔSM.AdAptLacZ은 MfeI 및 Bgl II로 소화되고, Klenow 효소로 블런트되고, 탈인산화된다. 벡터 단편의 젤 단리 후, DNA는 상기(도 9 참조)와 같이 단편으로 걸찰되어 pIX 유전자의 55K 단편 상류의 길이를 다양하게 하는 적응체 플라스미드의 세트를 발생시킨다. 바이러스는 상기와 같이 구축물 pWE.Ad35.pIX-r ITR로 생성될 수 있다. 대조군 트랜스펙션은 pBr.Ad35ΔSM.AdAptLacZ, pAdApt35.LacZ 및 pAdApt35.LacZ.rsv 구축물로 이루어졌다. 전체 CPE의 출현(appearance)에서, 세포 및 배지는 하나의 동결/해동 사이클에 의해 채취되고, 새로운 PER55K 세포를 재감염하는 데에 사용된다. 세포 및 배지는 다시 전체 CPE에서 채취되고, 조 용해질는 제조되고 플라크 평가를 수행하는 데에 사용된다. 플라크의 출현 후, X-gal 염색 용액은 LacZ 발현을 확인하기 위해 첨가된다.

[0184] 상기 실험의 결과는 Ad35 E1b-55K 영역에서 pIX 조절 서열의 위치를 찾는 것을 목표로 한다.

[0185] 또 다른 대체로서, pIX 발현은 재조합 바이러스의 생성을 위한 이중성 프라이머로서 E1B 프로모터에 의해 유도될 수 있다. 여기에, pAdApt535.LacZ는 MfeI 및 Bgl II로 소화되고, 이어서 블런트 말단에 Klenow 효소 처리되고, 탈인산화된다. 그 다음, 이렇게 처리된 4.8kb 벡터 단편은 젤로부터 단리된다. E1B 프로모터 영역은 표적 DNA로서 pBr.Ad35.left ITR-pIX 및 Epr-F 및 Epr-R 프라이머를 사용하여 PCR 단편으로서 단리되는 것으로, 양쪽 프라이머는 인산화된다. PCR은 제조업체의 지침서에 따라서 Pwo DNA 폴리머라제(Genexis/Inno-train Diagnostik GmbH)로 이루어진다. 그 다음, 생성된 151bp 단편은 단리된 벡터에 클로닝되어 pAdApt35Epr.LacZ를 생성한다.

[0186] 그 다음, 이 플라스미드는 Ad35-기저 바이러스를 생성하고 상기와 같이 안정성을 시험하기 위하여 사용된다.

[0187] pIX 서열을 함유하는 다른 전사물을 동정화하기 위하여, RNA는 감염된 세포로부터 단리되고, RNA를 함유하는 pIX는 표지화된 특이 프로브와의 하이브리드화로 동정화된다. 여기서, PER55K 세포는 하기 바이러스로 10 및 50의 다수의 간염에서 감염된다: wtAd35, Ad35.E1B.AdApt.Luc, Ad35ΔE3.AdApt.Luc, Ad35ΔE3.AdApt535.Luc, Ad35.AdApt.Luc.rsv. 감염된 세포는 8시간 후에 채취되고(wtAd35 또한 2 및 18시간 후), RNA는 TRIzol Reagent(Invitrogen)를 사용하여 단리된다. 이 RNA는 1.5% 아가로스 겔에서 크기 분류되고, Northern 블로트에

이동되고, pIX 코딩 영역으로부터 유도된 ³²P-표지화된 프로브에 하이브리드화된다. 공정은 당업자들에게 잘 알려져 있다(Molecular Cloning: A laboratory manual, by Sambrook and Russell, 2001 또는 이전 버전에 기재된). RNA의 길이는 알려진 RNA 크기 마커가 포함되는 지를 결정될 수 있고, pIX 서열을 함유하는 RNA 종의 표시를 나타낼 것이다. E1B 프로모터에서 개시하는 mRNA를 동정화하기 위하여, 블로트는 벗겨지고, 5' 21K 프로브로 재하이브리드화될 수 있다. E1B-21K 프로브에 하이브리드화되지 않는 pIX-함유 전사물은 E1B 프로모터와는 다른 프로모터에 의해 생성될 가능성이 있다.

[0188] 가능한(및 예상되는) 접합 사건에 기인하여, 이 방법을 통해 전사 개시 부위를 정확하게 결정하는 것은 아직 어렵다. 이것은 하기와 같이 이루어질 수 있다. 단리된 RNA는 cDNA로 역 전사되고, cDNA는 pIX 코딩 서열: pIXrev 및 네스티드(nested) 프라이머 pIXrev-N2에 직접적인 역 프라이머를 갖고 제조업체의 지침서에 따라 GeneRacer System(Invitrogen)를 사용하여 RNA를 함유하는 pIX의 5' 말단을 특이적으로 증폭하는 데에 사용된다. 증폭된 단편의 클로닝 및 서열화는 전사 개시 부위의 그리고 pIX 서열을 함유하는 mRNA의 5' 서열의 위치를 나타낸다. 이 방법에서, 가능한 pIX 코딩 mRNA는 동정화된다. 상응하는 재조합 아데노바이러스의 pIX 표현 및 안정성 사이의 상호관계는 또한 결정될 수 있다.

[0189] 실시예 11. 군 B 아데노바이러스로부터의 E1B 및 pIX 서열

[0190] 상기 실시예는 실시예로서 Ad35 바이러스를 사용한다. 서로에게 적절한 동종성을 갖는 서브그룹 B의 다른 일원(member)은 비교할 수 있는 pIX 조절을 가질 수 있다.

[0191] 이것을 조사하기 위하여, 본 발명자들은 서브그룹 B 일원의 E1B 및 pIX 서열을 정렬하였다. Ad7의 서열(SEQ. ID. NO. 57)은 Genbank 수탁 번호 X03000을 통해서 이용가능하다. Ad11의 서열(SEQ. ID. NO. 56)은 Ad35 서열(SEQ. ID. NO. 55)에 대하여 상기(WO 00/70071)와 유사한 Lark Technologies (UK)에 의해 수행된 Ad11p wt 바이러스로부터 단리된다. Ad11 및 Ad35는 서로에게 매우 동종성을 갖고(전체 98.1% 유사성), 중심의 차이는 핵소 및 화이버 knob(fiber knob)에 위치된다. Ad11 서열은 또한 WO 02/053759에서 기재된다. E1A의 다중-아테닐화 부위(pA) 및 pIX 유전자의 pA 하류 사이의 서열은 정렬에서 사용된다(도 10). Ad35는 Ad11에 98.4% 그리고 Ad7에 82.9%의 전체 유사성(이 영역에서)을 갖는다. 이것은 pIX 발현이 이들 바이러스에서 동일한 방법에서 조절되는 것이 매우 가능성있게 한다.

[0192] 그러므로, 이전의 실시예에서 예증된 바와 같이 본 발명에 따른 방법 및 수단은 안정성 및/또는 여기에서 Ad11 및 Ad7로 예증된, 서브그룹 B의 다른 재조합 아데노바이러스의 삽입 용량을 증가시키는 것에 사용될 수 있다.

[0193] 실시예 12. Ad5 보충 세포주에서 Ad5-E4/Orf6를 발현하는 E1-결실된 Ad35 바이러스의 생성.

[0194] 아데노바이러스 혈청형 35 계통의 서열화뿐만 아니라 플라스미드-기저 벡터 시스템의 구축 및 재조합 Ad35-기저 바이러스의 생성은 WO 00/70071에서 자세하게 기재되고 있다.

[0195] pAdApt35IP1(ECACC 수탁번호 P02041228, 이 플라스미드의 클로닝 세부사항은 WO 00/70071를 참조)로 Ad5-E4-orf6의 클로닝은 하기와 같이 수행되었다. 플라스미드는 NheI 및 Avr II로 소화되었고, Calf Intestine Phosphatase(New England Biolabs)로 탈인산화되었다. 소화된 DNA는 GeneClean kit를 사용하여 젤에서 단리되었다. 플라스미드 pΔMT.Orf6.Hygro(도 11, ECACC 수탁번호 P02041226)는 NheI로 소화되었고, 이어서 XbaI로 부분적으로 소화되었다. 젤에서 생성된 띠의 분리 후, E4-orf6 서열에 연결된 ΔMT 프로모터에 상응하는 1350bp 단편은 젤에서 정제되었다. 다음은, 양쪽 단리된 단편은 결합되었고, 전자적격 DH10B 세포(Invitrogen/LifeTechnologies)로 형질변환된 후, SV40 폴리(A) 신호에 관하여 올바른 배향에서 삽입체와의 콜로니는 큰 규모 DNA 제조를 위해 선별되었다. 이것은 돌연변이된 메탈로티오네인 프로모터(ΔMT)에 기능성으로 연결된 Ad5 E4-orf6 코딩 서열을 함유하는, 구축물 pAd35.ΔMT.Orf6(도 12)를 나타냈다. ΔMT 프로모터는 Hagmeyer et al. (1996)에 의해 개시되어 있다. Ad5 E4-orf6 서열은 Ad5 서열에서 뉴클레오타이드 33193 내지 뉴클레오타이드 34077에 상응한다(Genbank 수탁 번호 M73260). Ad5 E4-orf6 단백질의 발현이 Ad5 보충 세포에 가능한 전체로 E1-결실된 Ad35 벡터를 생산하게 하는 가를 확인하기 위하여, pAd35.ΔMT.Orf6는 PER.C6 세포로 Ad35 골격 구축물 pWE.Ad35.pIX-rITR과 함께 코-트랜스펙션되었다. 여기에, pAd35ΔMT.orf6는 PI-Psp-1로 소화되었고, pWE.Ad35.pIX-rITR은 NotI로 소화되어 골격으로부터 아데노바이러스 삽입체를 해방시켰다. 2μg의 소화된 pAd35.ΔMT.Orf6 및 6μg의 소화된 pWE.Ad35.pIX-rITR은 LipofecAmine을 사용하여 트랜스펙션되었다. 트랜스펙션 혼합물은 T25 플라스크 당 3.5×10⁶ 세포의 밀도로 하루 전에 살포된 PER.C6 세포에 첨가되었다. 다음날 배지는 PER.C6 배양 배지(10% FBS를 가진 DMEM 및 10mM MgCl₂)로 교환되었고, 세포는 37℃/10% CO₂에서 추가로 인

큐베이션되었다. 대조군 트랜스펙션은 pAdApt35.Luc로 코-트랜스펙션된 pWE.Ad35.pIX-rITR 및 pWE.Ad35.pIX-rITR 단독으로 수행되었다. 트랜스펙션 2일 후, 세포는 T25에서 T80 플라스크로 이동되었고, 상기와 인큐베이션 되었다. 다시 3일 후, Ad35 골격과 함께 pAd35.ΔMT.orf6으로 트랜스펙션된 배양은 바이러스 복제를 나타내는 세포병원성 효과(CPE)를 나타냈고, 추가의 인큐베이션 2일 후 (세포 및 배지를 포함하여) 채취되었다. 세포 현탁액은 2 라운드의 동결/해동 사이클에 도입되고, 생성된 재료(조 용해질)는 추가로 사용될 때까지 -20℃에서 유지되었다. 다른 플라스크는 CPE를 나타내지 않았고, T80로 이동 후 6일동안 T80 플라스크에서 1:3 계대배양되었다. 5일 후에 다시 pAdApt35.Luc + pWE.Ad35.pIX-rITR 트랜스펙션된 플라스크는 몇 개의 CPE-유사 사건을 보였지만, 이것은 추가로 진행되지 않았다. pAd35.ΔMT.Orf6 트랜스펙션으로부터 생성된 조 용해질의 0.2 및 0.5 ml은 T80 플라스크에서 대략 85% 컨플루언스에서 PER.C6 세포를 재감염시키는 데에 사용되었다. 이것은 인큐베이션 1일 후 전체 CPE에서 감염성 바이러스가 조 용해물에서 존재되었다고 나타내는 것을 보여준다. 이들 배양은 또한 두 번의 동결/해동 사이클에 의해 채취되었다. PER.C6에서 구축물 pAd35.ΔMT.Orf6 단독으로의 추가적인 대조군 트랜스펙션은 orf6 발현 자체가 세포 독성 및 CPE-유사 세포 죽음을 나타내지 않는다는 것을 확인하기 위하여 수행되었다. 결론적으로, pWE.Ad35.pIX-rITR과 함께 pAd35.ΔMT.Orf6과의 트랜스펙션만이 CPE 및 바이러스 복제를 나타냈다.

[0196] PCR 분석은 이전 E1 영역을 대체하는 Ad5-E4-Orf6를 가진 Ad35-기저 바이러스 게놈의 존재를 확인하기 위하여 수행되었다. 여기에, 바이러스 DNA는 하기와 같이 조 용해질 샘플로부터 단리되었다. 조 용해질 재료 275 μ l은 37℃에서 30분동안 DNaseI(10mg/ml) 10 μ l로 인큐베이션되었다. 이어서, 0.5 M EDTA(pH 8.0) 6.0 μ l, 20 % SDS 7.5 μ l 및 20 mg/ml 프로테이나제 K 1.5 μ l은 첨가되었고, 교란되어 혼합되었다. 그 다음, 혼합물은 1시간동안 50℃에서 인큐베이션되었다. 최종적으로, 바이러스 DNA는 GeneClean Spin Kit(Bio 101, Inc.)를 사용하여 단리되었다. 단리된 DNA 2 μ l는 프라이머 35psi-For 및 35R4를 사용하여 PCR 증폭하였다. 프로그램은 94 °C에서 2분, 이어서 94 °C에서 30 초, 58 °C에서 30 초 및 72 °C에서 5 분의 30 사이클로 정해졌고, 72℃에서 10분동안 인큐베이션되는 것으로 종결되었다. 프라이머는 Ad35 서열에 특이적이고, 패키징 서열로부터 nt 4669 (wt Ad35 서열에서와 같은 번호화)까지의 범위의 2.9kb의 단편을 생성하고, Ad5 orf6 트랜스진 카세트를 포함한다. 얻어진 PCR 단편의 전기영동(electrophoresis)은 단편이 적응체 플라스미드 pAd35.ΔMT.Orf6에서 생성된 대조군 PCR 단편과 부합되는(match) 예상된 길이를 갖는다는 것을 나타낸다. 그러므로, 전체로 E1-결실된 Ad35-기저 벡터는 바이러스가 또한 Ad5-E4orf6를 발현한다면 Ad5 보충 세포에서 만들어질 수 있다.

[0197] 실시예 13. pWE.Ad35.pIX-rITR5E4의 구축물

[0198] 처음 PCR 단편은 프라이머 DF35-1 및 35FR를 사용하여 증폭되었다. 증폭은 추가적인 DMSO(Sigma, 최종 농도 3 %)를 가진 Pwo DNA 폴리머라제(Roche)를 사용하여 주형 DNA로서 pWE.Ad35.pIX-rITR(WO 00/70071 참조)을 가지고 이루어졌다. 프로그램은 하기와 같다: 94 °C에서 2분, 이어서 (94 °C에서 30 초, 52 °C에서 30 초, 72 °C에서 3분)의 30 사이클, 그리고 완전한 단편이도록 하기 위한 72 °C에서 8분동안의 최종 단계. 증폭은 Ad35 서열의 nt 30224 내지 31805에 상응하는 1.6kb 단편을 나타냈다. BamHI 부위는 3' 말단에 도입되었다. 증폭된 DNA는 GeneClean Kit를 사용하여 겔에서 정제되었고, pCRScript/Amp cloning vector kit(Stratagene)에 결합되었다. 이어진 전자적격 DH10B 세포로의 형질변환에서, 백색 콜로니는 추가의 분석을 위해 선별되었다. 이것은 구축물 pCR-fiber35를 나타냈다. 블런트 클로닝에 기인하여, PCR 단편은 2 배향에 삽입될 수 있었다. 5' 말단에서 pCRScript/Amp 벡터의 다중연결체에서 BamHI 부위와 삽입체를 갖는 클론은 선별되었다. 그러므로, BamHI와의 소화는 1.6kb 단편을 나타낸다. 서열화는 PCR 단편의 올바른 증폭을 확인하였다. 두 번째 PCR 단편은 프라이머: 5E4F 및 5E4R를 사용하여 증폭되었다. 증폭은 pWE.Ad5.Afl II-rITR(WO 02/40665에서 기재된 ECACC 수탁 번호 P97082116)에서 여분의 PacI 부위를 함유하는 코스미드 벡터인, pWE.Ad5.Afl II-rITRsp과 이루어졌다. pWE.Ad5.Afl II-rITRsp는 상기와 같이 Pwo DNA 폴리머라제를 사용하는 주형으로 제공될 지라도, pWE.Ad5Afl II-rITR은 또한 동일한 목적을 위해 사용될 수 있다. 겔에서의 정제 후, DNA는 SstI 및 BamHI(양쪽 부위는 PCR 중에 도입되었다)로 소화되었고, 3kb 단편은 GeneClean kit를 사용하여 아가로스 겔로부터 정제되었다. 증폭된 Ad5 E4 영역은 Ad5 서열의bp 32794 내지bp 35828에 상응한다. 세 번째 PCR 단편은 프라이머: 355ITR 및 353ITR을 사용하여 pWE.Ad35.pIX-rITR에서 생성되었다. PCR 증폭은 상기와 같이 수행되었다. 생성된 160bp 단편은 SstI 부위 (5' 말단) 및 EcoRI 부위 (3' 말단)에 의해 측면화(flank)되었다. 상기와 같이 겔로부터의 정제 후, DNA는 SstI EcoRI로 소화되었다. 그 다음, Ad35의 오른쪽 ITR에 상응하는 160bp 단편은 낮은 녹는점 아가로스 겔에서 소화된 말단으로부터 분리되었고, 겔에서 수집되었다. 다음은, pUC119는 BamHI 및 EcoRI로 소화되었고, 3.1kb 단편은 GeneClean kit를 사용하여 겔로부터 정제되었다. 그 다음, 상기 처리된 두 번째 및 세 번째 PCR 단편은 BamHI/EcoRI 소화된 pUC119로 결합되어 pUC.Ad5E4-35ITR을 생성하였다. 클로닝된 PCR 유도 삽입체는 올바른 증폭을 증명하기 위하여 서열화되었다. 다음은, pCR-fiber35에서 1.6kb 삽입체는 BamHI로 절개되었고, 단

편은 상기와 같이 젤로부터 정제되었다. pUC.Ad5E4-35ITR은 또한 BamHI으로 소화되었고, 선형 단편은 젤로부터 정제되었다. 서로에 대하여 올바른 배향을 가진, 양쪽 단편의 결합 및 클론의 선택은 pUC.35-5E4를 생성했다(도 14). pUC.35-5E4의 구축을 이끄는 단계는 개략적으로 도 13에서 나타난다. pUC.35-5E4에서 아데노바이러스 삽입체는 pBr.Ad35.PRn(도 15; WO 00/70071 참조), Ad35 3' 서열과의 구축물로 하위-클로닝되었다. 여기에, 구축물 pUC.35-5E4는 *m*luI 및 *Not*I로 소화되었고, 4.7kb 단편은 GeneClean kit를 사용하여 젤에서 정제된다. 그 다음, 이 단편은 구축물 pBr.Ad35.PRn의 *m*luI 및 *Not*I 소화로부터 생성된 벡터 단편으로 결합된다. 이 16.3kb 단편은 agarose engyme(Roche)를 사용하여 젤로부터 정제되었다. 그 다음, 결합은 DH10B 적격세포로 형질변환되었다. 생성된 구축물은 pBR.Ad35.PR5E4로 명명되었다(도 16, ECACC 수탁 번호 P02041229). 마지막 단계는 바이러스 코스미드 클론 pWE.Ad35.pIX-rITR로 Ad35 서열의 변형된 3' 서열의 클로닝을 일으킨다. 여기에, 두 단편은 제조업체 지침서에 따라서 람다 파지 패키징 반응(Stratagene)에서 결합되었다. 첫 번째는 *Pac*I 및 *Swa*I로 소화되어 얻어진 pBr.Ad35.PR5E4로부터의 16.8kb 변형된 Ad35 삽입체이고, 두 번째는 *Pac*I 및 *Swa*I로 pWE.Ad35.pIX-rITR를 소화하여 얻어진 22.8kb 단편이다. 두 단편의 올바른 결합은 pWE.Ad35.pIX-rITR5E4를 산출한다(도 17). 그러므로, 이 구축물에서, Ad35 골격에서 E4 영역은 Ad5로부터 유도된 상응하는 영역으로 대체된다.

[0199] 실시예 14. pWE.Ad35.pIX-rITR50rf6의 구축

[0200] Ad5의 상응하는 서열을 위해 교환된 E4-orf6 및 -orf6/7을 위한 서열만을 가진 오른쪽 ITR의 말단에 pIX 유전자로부터 ad35 서열(Ad35 서열에서 nt 3401)을 함유하는 아데노바이러스 골격 구축물을 얻기 위하여, Ad35 및 Ad5 서열은 PCR 증폭되었고, 하기와 같이 결합되었다. PCR 단편은 최대 3%의 첨가물가진 *Pwo* DNA 폴리머라제로 생성되었다. 첫 번째 PCR은 주형으로서의 pBr.Ad35.PRn(도 15; WO 00/70071 참조) 및 프라이머 E4-F1 및 E4-R2로 이루어졌다. 프로그램은 하기와 같이 정해졌다: 94℃에서 2 분, (94℃에서 30 초, 50℃에서 30 초 및 72℃에서 1 분)의 5 사이클, 이어서 (94℃에서 30 초, 50℃에서 30 초 및 72℃에서 1분)의 30 사이클, 그리고 68℃에서 8 분에서 마지막 단계로 종결되었다. 생성된 1.8kb 단편은 GeneClean kit를 사용하여 정제되었다. 두 번째 PCR은 주형으로서 pWE.Ad5.AflII-rITR(ECACC 수탁번호 P9708116, WO 02/40665에서 기재된)에서 *Pac*I 부위를 함유하는 코스미드 벡터인, pWE.Ad6.AflII-rITRsp 및 프라이머 E4-F3 및 E4-R4로 이루어졌다. 프로그램은 하기와 같이 정해졌다: 94℃에서 2 분, 이어서 (94℃에서 30 초, 62℃에서 30 초 및 72℃에서 1분)의 30 사이클, 그리고 68℃에서 8 분에서 마지막 단계로 종결되었다. 1.1kb 단편은 상기와 같이 정제되었다. 세 번째 PCR은 주형으로서 pBr.Ad35.PRn 및 프라이머 E4-F5 및 E4-R6으로 이루어졌다. 프로그램은 하기와 같이 정해졌다: 94℃에서 2 분, (94℃에서 30 초, 48℃에서 30 초 및 72℃에서 45 초)의 5 사이클, 이어서 (94℃에서 30 초, 56℃에서 30 초 및 72℃에서 45 초)의 30 사이클, 그리고 68℃에서 8 분에서 마지막 단계로 종결되었다. 366bp 단편은 상기와 같이 정제되었다. 정제된 단편의 샘플은 농도를 측정하기 위하여 젤에 적재된 다음, 단편은 총 30μl에서 PCR-1의 700 ng, PCR-2의 650 ng 및 PCR-3의 430 ng을 함유하도록 함께 혼합되었다. 이 혼합물에 *Eco*Pol 완충용액(New England Biolabs) 3 μl, 2mM dNTP 용액 3 μl 및 milliQ H₂O 3 μl을 첨가하였다. 생성된 혼합물은 94℃에서 3 분동안 인큐베이션된 다음, 0.5℃/초의 속도로 PCR기기에서 65℃까지 냉온되었다. 이어진 65℃에서 10 분동안의 인큐베이션에서, 혼합물은 초 당 0.05℃의 속도로 20℃로 냉온되었고, 20℃에서 10 분동안 인큐베이션되었다. 그 다음, Klenow 효소(New England Biolabs) 1 μl (5 유닛)은 첨가되었고 37℃에서 60분동안 인큐베이션되었다. 이 Klenow 혼합물 5 μl은 하기와 같이 두 개의 단편을 개별적으로 증폭하기 위하여 주형으로 사용되었다. 프라이머 세트 1: NF-1 및 *Nco*I-R는 최종 농도가 3%이도록 DMSO의 첨가를 가진 *Pwo* DNA 폴리머라제 (Roche)를 사용하여 그리고 PCR 기기의 하기 세팅을 사용하여 반응에 사용되었다: 94℃에서 2 분, 이어서 (94℃에서 30 초, 66℃에서 30 초 및 72℃에서 3 분)의 30 사이클, 이어진 68℃에서 8 분의 최종 인큐베이션. 프라이머 세트 2: *Nco*I-F 및 NR-2는 최종 농도가 3%이도록 DMSO의 첨가를 가진 *Pwo* DNA 폴리머라제 (Roche)를 사용하여 그리고 PCR 기기의 하기 세팅을 사용하여 반응에 사용되었다: 94℃에서 2 분, 이어서 (94℃에서 30 초, 62℃에서 30 초 및 72℃에서 90 초)의 30 사이클, 이어진 68℃에서 8 분의 최종 인큐베이션. 2.7kb (프라이머 세트 1) 및 1.1kb (프라이머 세트 2)의 생성된 단편은 GeneClean kit를 사용하여 젤로부터 정제되었고, 각각은 pCRscriptAmp 벡터(Stratagene)에 결합되었고, DH10B 전자적격(electrocompetent) 세포로 형질변환되었다. 이것은 구축물 pCRscriptAmp.NFI-NcoIR (도 18) 및 구축물 pCRscriptAmp.NcoIF-NR2 (도 19)을 생성했다. 삽입체가 블런드 말단을 함유하므로, 두 개의 배향은 각각의 클로닝으로 얻어졌다. *Kpn*I 소화를 사용하여, 추가의 클로닝에 필요한 배향을 가진 구축물은 선별되었다(도 18 및 도 19 참조). 그 다음, 삽입체는 올바른 증폭을 증명하기 위하여 서열화되었다. 다음은, pCRscriptAmp-NcoIF-NR2로부터의 삽입체의 일부는 *Bam*HI 및 *Nco*I를 사용하여 절개되고, 상기와 같이 젤로부터 정제되었다. pCRscriptAmp-NFI-NcoIR은 동일한 효소로 소화되었고, 단편을 함유하는 벡터는 또한 젤로부터 정제되었다. 이들 단편의 결합은 pCR.NF1-NR2를 생성했

다(도 20). pCR.NF1-NR2는 Genebank(수납 번호 M73260)에서 발표된 Ad5 서열로부터의 32968 및 34077 사이에 위치한 Ad5 유도 서열에 대하여 대체된 nt 31879 및 32974 사이의 E4-orf6 및 E4-orf6/7를 가진 Ad35 서열의 nt 30162 및 33234사이의 Ad35 서열을 함유한다. 그러므로, 도 21 및 도 22에서 나타난 아미노산 정렬에서 보여 질 수 있는 바와 같이, 클로닝된 E4-orf6 단백질의 아미노산 서열은 Ad5에서 밝혀진 E4-orf6 서열과 동일하고 (SEQ. ID. NO.61; Ad35의 E4-orf6의 아미노산 서열은 SEQ. ID. NO. 62), E4-orf6/7 아미노산 서열은 Ad5에서 나타난 E4-orf6/7에 매우 많이 동일하다(E4-orf6/7 서열은 SEQ. ID. NO. 63로서 E4-orf6/7 서열에 대하여, SEQ. ID. NO. 64로서 Ad35에 대하여, SEQ. ID. NO. 65로서 클로닝된 융합 단백질에 대하여 주어졌다). 명백하게, 다른 하이브리드(hybrid) Ad35-Ad5 E4 구축물은 본 발명으로부터 분리되는 것 없이 상기와 같은 일반적인 방법을 사용하여 고안될 수 있다. 그 다음, pCR.NF1-NR2로부터의 이 키메릭 삽입체는 pWE.Ad35.pIX-rITR로 클로닝되었다: pCR.NF1-NR-2은 *m*luI 및 *Nde*I로 소화되었고, 생성된 2.8kb 단편은 GeneClean kit를 사용하여 젤로부터 정제되었다. 구축물 pBr.Ad35.PRn은 또한 *m*luI 및 *Nde*I로 소화되었고, 18kb 벡터 단편은 아가로스 효소 (Roche)를 사용하여 젤에서 단리되었다. 양 쪽 단편의 결합은 구축물 pBr.Ad35.PR.5orf6(도 23, ECACC 수탁번호 P0241227)을 생성했다. 그 다음, 이 구축물에서 키메릭 E4 영역을 함유하는 *Pac*I 및 *Swa*I 사이의 Ad35 서열은 상기와 같이 람다-파지 패키징을 사용하여 구축물 pWE.Ad35.pIX-rITR으로 클로닝된다. 그 다음, 생성된 pWE.Ad35pIX-rITR.5orf6 (도 24)는 Ad35 적응체 플라스미드로 PER.C6 패키징 세포에 코-트랜스펙션에 의해 제조함 Ad35-기저 바이러스를 생성하는 데 사용된다.

[0201] 실시예 15. pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3.5E4 및 pWE.Ad35.pIX-rITRΔE35orf6의 구축물.

[0202] Ad35 골격은 E3 서열의 결실으로 추가 변형되었다. E3 단백질은 아데노바이러스 감염에 숙주 면역 감응을 조절하는 것으로 알려져 있고, 그러므로 제조함 바이러스의 생체 외에서 증식에 필수적이지는 않다. 더구나, E3 서열의 결실은 패키징 효율성을 절충하는 것 없이 벡터에서 더 큰 이종성 서열의 삽입을 가능하게 한다. 또한, 백신화 수송체로서 아데노바이러스 벡터의 응용인 경우에, E3 영역에 의해 암호화된 면역조절성 유전자의 발현은 바람직하지 않다.

[0203] pWE.Ad35.pIX-rITRΔE4의 구축물(도 1)은 상기와 같았다. 상기와 같은 E4-변형된 골격 구축물의 E3-결실된 형태를 구축하기 위하여, E4 변형은 하기와 같이 pBR.Ad35.PRnΔE3(도 25) 구축물로 도입되었다. 또한, 구축물 pUC.35-5E4(도 13)은 *m*luI 및 *Not*I로 소화되었고, 4.7kb 단편은 GeneClean II kit를 사용하여 젤로부터 단리되었다. 구축물 pBr.Ad35.PRnΔE3은 또한 *M*luI 및 *Not*I로 소화되었고, 13.6kb 벡터 단편은 GeneClean spin kit를 사용하여 젤로부터 단리되었다. 이들 단편의 결합은 구축물 pBr.Ad35.ΔE3.PR5E4(도 26)을 생성했다. 구축물 pCR.NF1-NR2(도 20)은 *M*luI, *Nde*I 및 *Bgl*II로 소화되었고(더 작은 단편으로 벡터 단편을 소화시키기 위한 후자), 2.8kb 단편은 GeneClean spin kit를 사용하여 젤로부터 단리되었다. 구축물 pBr.Ad35.PRnΔE3은 *M*luI 및 *Nde*I로 소화되었고, CIP 효소(New England Biolabs)를 사용하여 탈인산화되었고, 15.2kb 벡터 단편은 또한 GeneClean spin kit를 사용하여 단리되었다. 이들 단편의 결합은 구축물 pBr.Ad35.ΔE3.PR5orf6(도 27)을 생성했다.

[0204] 그 다음, pBr.Ad35.ΔE3.PR5E4 및 pBr.Ad35.ΔE3.PR5orf6은 하기와 같이 pBr.Ad35.ΔE3.PR5E4 및 pBr.Ad35.ΔE3.PR5orf6로부터의 상응하는 영역을 위하여 pWE.Ad35.pIX-rITR에서 3' *Pac*I-*Swa*I를 맞바꾸는 데에 사용된다. 이것은 구축물 pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3.5E4 및 pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3.5orf6로 이끈다. 이들 큰 코스미드를 생성하기 위한 대체가능한 방법은 패키징을 위한 결합 반응에서 세 개의 단편을 사용하는 것이다:pWE.Ad35.pIX-rITR로부터의 14.7kb *Not*I-*Pac*I 단편, ΔE3.PR5E4 pBr.Ad35.ΔE3.PR5E4 또는 pBr.Ad35.ΔE3.PR5orf6로부터의 *Pac*I-*Not*I 삽입체 및 *Not*I 소화된 pWE15 코스미드 벡터 단편(Stratagene). 이 후자 단편은 또한 pWE.Ad35.pIX-rITR의 *Not*I/*Pac*I 소화로부터 단리될 수 있다. PER.C6™ 세포로 예를 들어, *PI*-*Psp*I 소화된 pAdApt35.LacZ.rsv와 예를 들어, *Not*I-소화된 pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3.5orf6의 코-트랜스펙션(실시예 9)은 Ad35로부터 유도된 제조함 아데노바이러스를 생성할 것이고, 제조함 아데노바이러스는 Ad5로부터 유도된 E4-orf6를 포함하고(PER.C6에서 증식의 능력을 수여하는), 상기 제조함 바이러스는 증가된 pIX 발현 수준 및 안정한 비리온을 생성하는 이종성 pIX 프로모터를 가진다.

[0205] 실시예 16. PER.C6 세포에서 E1- 및 E1/E3-결실된 Ad35-기저 벡터의 생성.

[0206] pBR.Ad35.PRn-기저 구축물을 사용하여 보충 세포주 PER.C6에서 제조함 Ad35 바이러스의 생성을 가능하게 하기 위하여, 본 발명자들은 우선 Ad35 서열의bp 3401로부터bp 24650까지의 Ad35 서열을 함유하는 새로운 구축물을 생성하고(WO 00/70071), 적응체 플라스미드 및 pBr.Ad35.PRn-기저 구축물 모두로 겹쳤다. PER.C6로 이들 세 개의 플라스미드의 트랜스펙션 및 이종의 동종성 제조함화 사건은 완전한 바이러스 게놈 및 도 18에서 개요된 바

와 같이 재조합 바이러스의 복제를 이끈다. 요구되는 플라스미드는 pWE.Ad35.pIX-rITR에서 Ad35 서열의 많은 부분의 결실으로 이루어졌다. 여기에, pWE.Ad35.pIX-rITR은 EcoRV로 소화되었고, 29kb 벡터를 포함하는 단편은 GeneClean spin kit를 사용하여 낮은 녹는점 젤로부터 정제되었다. 정제된 DNA는 자체-결찰되었고, DH10B 전자적 박테리아(Invitrogen/LTI)를 형질변환하는 데에 사용되어 pWE.Ad35.pIX-EcoRV를 생성한다(도 29). 트랜스펙션을 위해 사용된 모든 DNA는 표 V에서 나타낸 바와 같이 소화되었고, 65 °C에서 15 분동안 열-비활성화되었고, 트랜스펙션에서 추가의 처리 없이 사용되었다. PER.C6 세포는 3×10^6 세포/플라스크의 밀도에서 T25 플라스크에서 트랜스펙션되기 하루 전에 살포되었고, 혈청이 없는 DMEM 배지(Gibco/BRI)에서의 트랜스펙션 혼합물이 5 일 후, PER.C6 배양 배지(DMEM, 10% FBS 및 10 mM $MgCl_2$)로 대체된 것을 제외하고는, 제조업체의 지침서에 따라서 LipofectAmine (Invitrogen/LTI)를 사용하여 표 V에서 나타낸 바와 같이 트랜스펙션되었다. 다음 날에, 트랜스펙션 효율성은 형광 현미경 검사로 50%에서 측정되었다. 2일 후, 세포는 트립신화되었고, T80 플라스크에서 재살포되었고, 37°C/10% CO_2 에서 추가로 인큐베이션되었다. 트랜스펙션 6일 후 모든 배양은 Ad35.AdApt.eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITR로 트랜스펙션된 PER.C6 배양을 제외하고는 완전한 세포병원성 효과(CPE, 바이러스 증식을 나타내는)를 나타냈다. 1 일 후, CPE를 가진 플라스크에서의 세포 및 배지는 채취되었고, 두 번의 동결/해동 사이클에 직면하게 되고, 원심분리(1500 rpm에서의 10 분)으로 세포 용해질로부터 명백히 되고, 이들 조 용해질 100 μ l은 T80 플라스크에서 85% 컨플루언스에서 신선한 PER.C6세포로 재-감염하는 데에 사용되었다. CPE의 징후를 나타내지 않는, Ad35.AdApt.eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITR의 트랜스펙션은 트립신화로 채취되었고, 또한 상기와 같이 처리되었다. 신선한 PER.C6 세포의 감염 2 일 후, 모든 플라스크는 초기 채취에서 CPE의 징후를 보이지 않는 하나를 제외하고는 전체의 CPE를 나타냈다. 이것은, Ad5 E4-orf6 유전자 생성물이 Ad35 골격으로부터 발현되는 경우에, 전체로 E1-결실된 Ad35-기저 바이러스가 PER.C6 세포에서 만들어질 수 있다는 것을 명백하게 보여준다.

[0207] 실시예 17. pIX 발현을 유도하는 이중성 프로모터를 가진 E1-결실된 Ad35 바이러스.

[0208] 전체 E1-결실된 바이러스에서 pIX 유전자를 활성화하는 이중성 프로모터 서열의 효과를 조사하기 위하여, 일련의 적응체 플라스미드는 재조합 Ad35 바이러스를 생성하기 위하여 사용되었다. 여기에, pAdApt35LacZ, pAdApt35BLacZ(실시예 9), pAdApt535.LacZ(실시예 5) 및 pAdApt35BLacZ(pIX 앞에서 Ad35 E1B 프로모터 서열을 함유하는; 하기와 같은)은 pIPsp-1로 소화되었고, 실시예 2에(및 WO 00/70071에서) 기재된 바와 같이 NotI 소화된 코스미드 pWE/Ad35-3481 및 pWE/Ad35-3481 Δ E3(실시예 7)를 가진 바이러스를 생성하는 데 사용되었다. 게다가, 바이러스는 적응체 플라스미드 pBr.Ad35 Δ SM.AdAptLacZ로 생성되었다(도 7; 실시예 10). 이 적응체 플라스미드는 E1A 및 E1B 서열의 많은 부분을 대하여 결실된다. 그것은 3' E1B-55K 서열의 0.6kb를 유지하고, 또한 55K의 정지 코돈 및 pIX의 개시 코돈 사이의 wt 서열을 갖는다.

[0209] 전체 CPE에서, 세포 및 배지는 채취되었고, 해동/동결되었고, 원심분리하여 세포 잔해를 제거하였다. 그 다음, 각각의 트랜스펙션의 상정액(맑아진 용해질)은 실시예 9에서 기재된 바와 같이 플라크 평가를 수행하는 데에 사용되었다. 맑아진 용해질은 일련적으로 10배씩 희석되었고, 10^{-5} 내지 10^{-9} 희석물은 플레이트화되었다.

[0210] 아가 오버레이의 첨가 1 주일 후, 플라크는 가시적이게 되었고, X-gal로 염색되어 LacZ 활성을 관측하게 되었다. 표 VI는 이들 실험의 결과를 요약한다. pIX를 조절하는 내인성 근접한 pIX 상류 서열보다는 추가적인 또는 다른 서열을 갖는, 모든 Ad35 바이러스는 더 좋게 수행하고, E1-결실된 Ad35.AdApt.LacZ 바이러스에 비교된 바와 같이, 본 발명의 평가에서 더 높은 플라크의 발현 횟수를 가진다. Ad35 Δ SM.LacZ 바이러스의 총 게놈 길이(wt Ad35에 비교하여 106%)는 Ad5 바이러스에 대하여 결정된 바와 같이 최대 패키징가능한 길이를 넘는다(105%). 이것은 이 바이러스에 대하여 얻어진 결과에 영향을 줄 것이다. Ad35.AdApt.LacZ.rsv(105%)은 또한 이론적인 패키징가능한 크기의 한계이다. 전적으로 결과는 pIX 발현을 유도하는 이중성 프로모터가 최대 용인된 패키징 크기 및 E1-결실된 Ad35 바이러스의 안정성을 향상시킨다는 것을 보여준다. 더 긴 내인성 근접한 서열(Ad35 Δ SM.LacZ)를 갖는 바이러스가 여기의 추가적인(E1B 55K) 서열이 pIX 발현에 대한 조절 성분을 함유한다는 것을 제안한다는 사실과 동일하다.

[0211] pAdapt35BLacZ는 pIX 유전자를 조절하는 Ad35 E1B 프로모터 서열을 가진 Ad35 적응체 플라스미드이다. 적응체 플라스미드 pAdapt35BLacZ는 하기와 같이 생성되었다: E1B 프로모터 단편은 프라이머 35E1Blong 및 Ad35E1bpromrev를 사용하여 증폭되었다. 양쪽 프라이머는 탈인산화되었다. 반응은 제조업체 지침서에 따라서 Pwo DNA 폴리머라제 (Inno-train, Diagnostic GmbH)로 이루어졌다. pBr.Ad35.leftITR-pIX는 주형 DNA(25 ng, WO 02/40665에서 기재된)로서 사용되었다. 프로그램은 하기와 같이 정해졌다: 94 °C에서 2 분, 그 다음 (94 °C에서 30 초, 60 °C에서 30 초 및 72 °C에서 1 분)의 30 사이클 및 72 °C에서 10 분으로의 종결. 냉온/가열 기울

기는 2 °C/초로 정해졌다. 이 PCR은 125 뉴클레오타이드의 Ad35의 잠재적인 E1B 프로모터의 증폭을 나타낸다. 그 다음, 구축물 pAdapt535.LacZ(실시예 5)는 MfeI 및 Bgl II로 처리되었다. 소화 후, 벡터는 Klenow 효소로 처리되어 블런트 말단을 생성하였다. 탈인산화 단계는 SAP(Roche)를 사용하여 이루어졌다. 그 다음, 이렇게 처리된 8kb 벡터 단편은 젤로부터 단리되었다. E1B 프로모터 영역은 또한 젤로부터 단리되었다. 이들 두 개의 단편은 결합되었고, DH5 α -T1r 적적세포(Invitrogen)로 형질변환되었다. 생성된 플라스미드에서 E1B 프로모터의 올바른 배향은 HpaI 및 ApaI로 소화되는 것으로 확인되었다. 올바른 클론의 선별 후, 삽입된 E1B 프로모터 서열은 또한 서열화로 입증되었다.

[0212] 실시예 18. pIX 유전자의 프로모터가 Ad35 및 Ad11 바이러스에서 E1B-55K 코딩 서열의 3' 말단에 위치되다.

[0213] 상기한 바와 같은 결과에 기초하여, 본 발명자들은 서브그룹 B 바이러스에서 pIX 프로모터가 E1B-55K 코딩 영역에 위치될 것이라고 예상하였다. 이것을 직접적으로 조사하기 위하여, 본 발명자들은 실시예 10에서 기재된 바와 같이 pIX mRNA 캡 부위를 동정화하도록 설치하였다. 여기에, wtAd35, wtAd11 및 Ad35.E1B⁺.AdApt.Luc 바이러스는 50 VP/세포의 MOI에서 PER55K 클론 16 세포를 감염하도록 사용되었다. 대조군으로 wtAd5는 이 바이러스의 프로모터 및 mRNA 개시 부위가 알려져 있으므로 사용되었다. RNA는 제조업체에서 나타낸 바와 같이 TRIzol 시약(Invitrogen)을 사용하여 감염 후 16-18시간에 감염된 배양액으로부터 단리되었다. 공정의 끝에서, 단리된 RNA는 100% 포름아미드에서 저장되었다. GeneRacer Kit(Invitrogen)는 전사의 개시를 위치화하기 위하여, pIX 전사체의 5' 말단을 증폭하기 위하여 사용되었다. GeneRacer 프로토콜을 개시하기 전에, RNA 5 μ g은 GeneRacer 프로토콜에서 기재된 바와 같이 아세트산나트륨 침전으로 포름아미드로부터 정제되었다. 정제된 RNA는 pIX mRNA의 5' 말단의 증폭을 위하여 제조업체의 프로토콜에 따라서 처리되었다. 포스파타제 처리 및 이어진 타바코산 피로포스파타제로 캡 구조의 제거 및 Generacer RNA oligo의 결합 후, kit로부터의 SuperScript™II Reverse Transcriptase는 cDNA 합성을 위해 사용되었다. cDNA는 pIX에 대한 유전자 특이 (역향(reverse)) 프라이머를 사용하여 역전사로 합성되었다. Ad35(wt 및 E1B⁺.Luc 바이러스) 및 wtAd11의 경우에 프라이머 pIXrev가 사용되었고, Ad5의 경우에 프라이머 pIXrev-Ad5r가 사용되었다. 생성된 cDNA(알려지지 않은 농도 1 μ l)는 dsDNA를 생성하기 위하여 PCR을 위한 주형으로서 사용되었다. 이 PCR은 DMSO(Sigma; 3% v/v)의 첨가를 가진, 제조업체의 지침서에 따라서 Pwo DNA 폴리머라제(Roche)를 사용하여 이루어졌다. 증폭은 mRNA의 5' 말단에 결합된 올리고뉴클레오타이드에 특이적인, kit 및 상기와 같은 유전자 특이 역향 프라이머로부터 GeneRacer 5' 프라이머로 이루어졌다. 반응 조건은 하기와 같다: 94°C에서 2분동안의 탈천연화, 이어진 (94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 2분)의 30사이클 및 68°C에서 8분의 신장화로 종결되었다. 생성된 DNA 단편은 1.0% 아가로스 젤에서 전기연동으로 크기 분리화되었다. Ad5의 경우에 480bp 단편 및 Ad35(양쪽 바이러스) 및 Ad11의 경우에 200bp 단편이 얻어졌다. Ad11는 또한 2kb 단편을 나타냈다. 모든 단편은 절개되고, 아가로스 젤로부터 정제되었다. 정제된 DNA 단편은 pCR4Blunt-TOPO® 벡터(Invitrogen)으로 클로닝되었다. 벡터는 시판중인 M13 전향 및 역향 프라이머를 사용하여 서열화되었다. 생성된 서열은 야생형 서열에 대항하여 정렬되어 pIX 전사의 개시에 위치화되었다. Ad35로부터 단리된 200bp 띠 및 Ad11로부터 단리된 2kb 단편은 E1B 프로모터로부터 기원하는 것으로 판명됐다. 도 30은 wt Ad35 서열을 가진 Ad35(SEQ. ID. NO. 59) 및 Ad11(SEQ. ID. NO. 58) cDNA 서열의 정렬을 나타낸다. 정렬은 pIX mRNA에서 조각된(sliced) 인트론 서열의 위치화를 드러낸다. 도 31에서, 동정화된 캡 부위 및 조각 부위의 위치화는 Ad35의 E1B-pIX 영역에서 도식적으로 나타났다. Ad5의 경우에, 예상된 pIX mRNA(Babiss and Vales, 1991)는 3580 에서 위치화된 캡 부위와 함께 동정화되었다(나타내지 않음; Genbank 수납번호 M73260으로 번호화). Ad35의 경우에, 캡 부위는 A 잔기에서 3339 위치에서 E1B-55K 유전자의 3' 말단에서 위치화되었다(Ad35 서열 WO 00/70071). Ad11에서, 캡 부위는 유사하게 T 잔기에서 발견되었다(Genbank 수납번호 AY163756에서 3339 위치). 흥미롭게도, Ad5에서 pIX에 대한 프로모터가 위치된, 55K 유전자의 정지 코돈 및 pIX의 개시 코돈 사이의 서열은 Ad35 및 Ad11 바이러스의 mRNA의 조각된 절편(cut)이다. 이들 결과는 Ad35 및 Ad11에서 pIX 유전자 발현은 55K 유전자의 3' 말단에 위치된 프로모터로부터 조절된다는 것의 강력한 증거를 제공한다.

[0214] 실시예 19: 3' E1B-55K 서열의 짧은 스트레치(stretch)를 유지하는 E1-결실된 Ad35 바이러스가 더 큰 패키징 수용량을 가진다.

[0215] pIX mRNA 캡 부위의 동정화에서, 올바른 pIX 발현을 위한 천연의 Ad35 프로모터를 포함하는 것 그리고 가능한 많이 바이러스 벡터에서 E1B-55K 서열을 제한하는 것이 가능하게 된다. 여기서 본 발명자들은 비-제한적인 실시예로서, 55K 코딩 서열(pAdApt35Bsu.Luc)의 3' 말단의 166bp를 유지하는 Ad35 적응체 플라스미드의 구축 및 증가된 안정성 및/또는 패키징 수용량을 가진 E1-결실된 Ad35Luc 바이러스의 생성을 나타낸다. 이 166bp 서열은

기능성인 55K 유전자 생성물을 코드화하는 것이 아니라, pIX 코딩 서열에 상대적인 그것의 천연의 위치에서 이전의 실시예에서 동정화된 pIX mRNA 캡 부위를 함유한다. 구축물 pAdApt35Bsu.Luc은 하기와 같이 생성되었다: 우선 PCR 단편은 표적 DNA(WO 02/40665에서 기재된 바와 같이)로서 40ng의 pBr.Ad35.leftITR-pIX 및 프라이머 Bsu55KF 및 Age-pIXR을 사용하여 생성되었다. PCR은 제조업체의 지침서에 따라서 Pwo DNA 폴리머라제(Genaxi s)로 수행되었다. 게다가, 3% v/v DMSO(Sigma)가 사용되었다. 프로그램은 하기와 같이 정해졌다. 94℃에서 2분, 그 다음 (94℃에서 30초, 60℃에서 30초 및 72℃에서 1.5분)의 30사이클 및 68℃에서 8분으로 종결. 생성된 1.2kb 프로모터는 제조업체의 지침서에 따라서 pCR4Blunt-TOPO 벡터(Invitrogen)로 직접적으로 클로닝되어 pCR4Blunt-TOPO.Bsu-Age를 생성하였다. 구축물은 PvuII(New England Biolabs)로 소화되어 확인되었다. Bsu-Age 단편은 Bsu36I(New England Biolabs)로 소화되어 pCR4Blunt-TOPO.Bsu-Age 플라스미드로부터 단리되었고, 블런트 말단에 Klenow 효소(New England Biolabs)로 처리되었다. 그 다음, DNA는 PCR 정제 키트(Qiagen)를 사용하여 정제되었고, AgeI(New England Biolabs)로 소화되었다. 1kb 단편은 Gene clean II kit(Bio101, Inc.)를 사용하여 젤로부터 단리되었다. 동시에, 구축물 pAdApt35.Luc(WO 00/70071에서 기재된 바와 같이)은 Bgl II로 소화되었고, Klenow 효소로 처리되었다. DNA는 PCR 정제 키트(Qiagen)를 사용하여 정제되었다. 정제된 DNA는 AgeI(New England Biolabs)로 소화되었고, SAP(Roche)로 탈인산화되었다. 5.8-kb 단편은 Gene clean II kit(Bio101)로 젤에서 단리되었다. 두 개의 단편은 결찰 반응에서 등몰의(equimolar) 양에서 혼합되었고, T1 내성의 EM DH10B 세포(Invitrogen)로 형질변환되었다. 이것은 플라스미드 pAdApt35Bsu.Luc를 생성했다.

[0216] E1-결실된 바이러스를 생성하기 위하여, pAdApt35Bsu.Luc는 pIPsp-I로 소화되었고, 상기와 같이 NotI 소화된 pWE.Ad35-3481(실시예 7)로 그리고 pWE.Ad35-3481ΔE3로 PER55K 클론 16 세포에서 코-트랜스펙션되었다. pWE.Ad35-3481ΔE3은 pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3에서 기재된 바(실시예 2)와 같이 동일한 E3 결실을 함유하고, pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3으로부터의 구축물 pWE.Ad35-3481ΔNdeI 및 26.6kb NdeI 단편을 사용하여 실시예 7에서 기재된 방법에 따라서 생성되었다. 게다가, E1-결실된 Ad35 바이러스는 선천적인 Ad35 서열을 대체하는 바이러스 골격에서 Ad5로부터 E4-Orf6 및 E4-Orf6/7 서열을 함유한 채 생성되었다(비-변형된 PER.C6 세포에서 이러한 바이러스의 생성을 위한 실시예 16 참조). 이 실시예에서, pIPsp-I로 소화된 pAdApt35Bsu.Luc는 NotI/EcoRV 소화된 pWE.Ad35.pIX-EcoRV로 그리고 PacI/NotI 소화된 pBr.Ad35.PR5Orf6로(E3 영역을 갖거나 또는 갖지 않은) 코트랜스펙션되었다. 모든 트랜스펙션은 트랜스펙션 일주일 안에 전체 CPE를 발생했고, 세포 및 배지는 상기와 같이 채취되었다. 그 다음, 바이러스는 플라크-정제되었고, 바이러스 저장물은 적절한 보충 세포에서 증폭되었고, 단일 플라크로부터의 기원은 트랜스진 영역의 보전(integrity)에 대하여 PCR로 분석되었다. 트랜스진 PCR은 프라이머 AdApt35CMVF 및 pIXrevN2를 사용하여 실시예 3에서 기재된 바와 같이 이루어졌다. 도 32는 PCR의 실시예가 Ad35Bsu.Luc 및 Ad35Bsu.Luc.50rf6 바이러스로부터 기원된 플라크에서 생성된다는 것을 나타낸다.

[0217] 바이러스 골격에서 E3 영역 또는 E4-Orf6 서열의 존재에 관계없이, 모든 시험된 플라크(각 바이러스 당 5-10)은 손상되지 않은 트랜스진을 함유하였다. 하나의 예외는 아마도 결실을 가진 소량의 바이러스를 기원하는 대략 1.6kb에서 미약한(faint) 띠(도 32; 레인 12)를 보여주는, Ad35Bsu.Luc 바이러스로부터의 플라크 중 하나에서 발생한다.

[0218] 모든 바이러스 샘플에서 발생하는 대략 500bp에서의 미약한 띠는 바이러스 골격에서 프라이머의 배경 띠이다. 루시페라제 발현 카세트를 가진 E3-함유 Ad35 바이러스는 안정한 다음의 플라크 정제를 증명한다는 관찰은 전체로 E1-결실되고 166bp 3' 55K 코딩 서열을 함유하지 않는 Ad35.AdApt.Luc 바이러스를 가진 이전의 결과와 대조적이다. 표준 pAdApt35.Luc 플라스미드를 사용하여, 본 발명자들은 E3 영역을 함유하는 플라크-정제된 바이러스를 생성할 수 없었다. 그러므로, 골격에서 여분의 55K 서열과 혼입하여, 본 발명자들은 현재는 심각한 불안정성을 갖지 않은 채 34.6kb 총 길이 이상의 바이러스를 만들 수 있다. 이것은 wt Ad35 바이러스의 길이에 근접하게 부합된다. E3-결실된 골격이 사용되었다면, 외래 서열에 대한 수용량은 이론적으로 5kb 이상일 것이다. 명백하게, 현재의 샘플에서보다 더 E1B-55K 서열을 혼입하고 그리고/또는 여기서 개시된 발명에서 벗어나는 것 없이 이중성 인핸서 서열과 3' 55K 서열을 결합하는 것은 가능하다.

[0219] 표 1. 삼중 증 플라스크에서 생산된 클론 #16에서 E1- 및 E1/E3-결실 Ad35 바이러스의 수율.

바이러스	크기 (T175 ^{III} 플라스크)	DSP 후 바이러스 입자의 총 #	VP/ 세포
Ad35.AdApt.eGFP	4	7.5×10^{11}	2500
Ad35.ΔE3.AdApt.empty	8	2×10^{12}	3300
Ad35.ΔE3.AdApt.LacZ	8	3.8×10^{11}	600
Ad35.ΔE3.AdApt.MV-F	4	8.8×10^{11}	2900
Ad35.ΔE3.AdApt.MV-H	8	2.6×10^{12}	4250

[0220]

[0221] 표 2. 이차 계대배양 바이러스로부터의 조 용해질을 사용하여 A549에서 트랜스진(LacZ) 활성 시험. % 파란색 세포는 감염을 위해 사용된 바이러스의 각각의 양으로 주어진다.

바이러스	10 μl	1 μl	0.1 μl
Ad35.AdApt.LacZ.rsv	95	15	<1
Ad35.ΔE3.AdApt.LacZ.rsv	90	10	<1
Ad35.AdApt.LacZ.C4	2	<0.1	0
Ad35.ΔE3.AdApt.LacZ.C4	15	<1	<0.1

[0222]

[0223] 표 3. 이차 계대배양 바이러스로부터의 조 용해질을 사용하여 A549에서 트랜스진(루시페라제) 활성 시험. 활성은 개별적인 밝기 유니트(RLU)로 표현한다.

바이러스	10 μl	1 μl	0.1 μl	0.01 μl
Ad35.AdApt.Luc.rsv	845453	27940	178	26
Ad35.ΔE3.AdApt.Luc.rsv	258269	2217	46	6
Ad35.AdApt.Luc.C4	6130	175	18	33
Ad35.ΔE3.AdApt.Luc.C4	814642	6278	147	23
Ad35.ΔE1AΔ21K.Luc	1514698	50196	503	57

[0224]

[0225] 표 4. 프라이머 서열

명칭	서열	SEQ. ID. NO.
35FR	5'-CGGGATCCACTTATTTTAGTTGTCTCTTC-3'	1
35R4	5'-CCGAATTCTTAATTAGGGAAATGCAAACTGTGAGG-3'	2
35psi-For	5'-GTGGTATTTATGGCAGGGTG-3'	3
DF35-1	5'-CACTCACCACCTCCAATTCC-3'	4
5E4F	5'-CGGCAACCGTTTGTGTATGTTTCAACGTG-3'	5
5E4R	5'-GCTGGCGAGCTCGGGCGGACTAACTTGTATGTG-3'	6
3551FR	5'-GATCCGGAGCTCACAACGTCATTETCCCACG-3'	7
3531FR	5'-AGGAATTCGCGGCCGCATTAAATC-3'	8
E4-F1	5'-AGAGGAACACATTCCCCC-3'	9
E4-R2	5'-GGGGAGAAAGGACTGTGTATTCTGTCAAATCG-3'	10
E4-F3	5'-TTTGACAGAATACACAGTCCCTTCTCCCCGGCTGG-3'	11
E4-R4	5'-ACAAAATACGAGAATGACTACGTCGGGCTTCC-3'	12
E4-F5	5'-GGACGTAGTCATTCTCGTATTTGTATAGC-3'	13
E4-R6	5'-TCACCAACACAGTGGGGG-3'	14
NF-1	5'-CCACAACCCCACTACTCCC-3'	15
NR-2	5'-CGTCTCTTCCCTCTCCTCTCC-3'	16
NcoI-R	5'-AGGATCATCCGCTGCTGCC-3'	17
NcoI-F	5'-CATCAGGATAGGCCCTGG-3'	18
35E3for	5'-AATGACTAATGCAGGTGCCG-3'	19
35E3rev	5'-CGACGCGTTGTAGTCGTTGAGCTTCTAG-3'	20
AdApt35CMVF	5'-GTACGTCGTCAGCCTAGGTGGTC-3'	21
35pIXR	5'-TCATGTCAGCTGCAAGACAG-3'	22
SV40for	5'-CAATGTATCTTATCATGTCIAG-3'	23
pIX5Rmfe	5'-CTCTCTCAATTGCAGATACAAAACACATAAGACC-3'	24
pIX35Fmfe	5'-CTCTCTCAATTGCTCTGCTTCAGCTGACATG-3'	25

[0226]

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

[0227]

[0228]

표 5. 실시예에서 개시된 바와 같이 PER.C6 세포에서 E1-결실 Ad35 기저 바이러스의 생산에 사용되는 구축물 명단. 적응체 구축물은 PacI로 소화되고, pWE.Ad35.pIX-EcoRV는 NotI 및 EcoRV로 소화되고, E4-변형된 pBr-기저 구축물은 PacI 및 NotI로 소화되었다.

No.	구축물			CPE
1	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-EcoRV	pBr.Ad35.PR5E4	있음
2	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-EcoRV	pBr.Ad35.PR5Orf6	있음
3	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-EcoRV	pBr.Ad35.ΔE3PR5E4	있음
4	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-EcoRV	pBr.Ad35.ΔE3.PR5Orf6	있음
5	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-rITRxNotI		없음
6	pAdApt5.eGFP	pWE.Ad5.AflIII-rITRxPacI		있음

[0229]

[0230] 표 6. pIX 발현을 유도하는 별개의 프로모터 서열을 가진 Ad35 바이러스의 LacZ 양성 플라크의 퍼센트.

바이러스 명칭	파란색 플라크의 %		바이러스 길이 (E3 영역 포함)
	E3 영역을 가짐	E3 영역을 갖지 않음	
Ad35.AdApt.LacZ	0%	50%	36,1 kb
Ad535.AdApt.LacZ	NP	100%	36,1 kb
Ad35.AdAptB.LacZ	5%	80%	36,2 kb
Ad35.AdApt.LacZ.rsv	90%	100%	36,5 kb
Ad35ΔSM.LacZ	50%	100%	36,7 kb

[0231]

[0232]

참고문헌

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

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

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

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

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

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

Fallaux, F.J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D.J., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S.J., van Ormondt, H., van der Eb, A.J., Valerio, D. and Hoebe, R.C. (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication competent adenoviruses. Hum. Gene Ther. 9, p 1909-1917.

Farina, S.F., Cao, G.P., Xiang, Z.Q., Rux, J.J., Burnett, R.M., Alvira, M.R., Marsh, J., Ertl, H.C. and Wilson, J.M.

[0233]

(2001). Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J. Virol.* 75(23), p11603-11613.

Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, L. and Brown, F. (1991). Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 2, p 140-144.

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

Grable, M. and Hearing, P. (1990). Adenovirus type 5 packaging domain is composed of a repeated element that is functionally redundant. *J. Virol.* Vol.64, No. 5, p 2047-2056.

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

Gustin, K.E. and Imperiale, M.J. (1998). Encapsidation of viral DNA requires the adenovirus L1 52/55-kilodalton protein. *J. Virol.* Vol 72, No. 10, p 7860-7870.

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

Hagmeyer BM, Duyndam MC, Angel P, De Groot RP, Verlaan M, Elfferich P, Van der Eb AJ and Zantema A. (1996) *Oncogene* 12:1025-1032.

Hehir, K.M., Armentano, D., Cardoza, L.M., Choquette, T.L., Berthelette, P.B., White, G.A., Couture, L.A., Everton, M.B., Keegan, J., Martin, J.M., Pratt, D.A., Smith, M.P., Smith, A.E. and Wadsworth, S.C. (1996). Molecular characterization of replication-competent variants of

[0234]

adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence. J. Virol. 70(12), p8459-8467.

Herrman, C.H. and Mathews, M.B. (1989). The adenovirus E1B 19-kilodalton protein stimulates gene expression by increasing DNA levels. Mol. Cell. Biol. 9, p5412-5423.

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

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

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

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

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

Pilder, S., Moore, M., Logan, J. and Shenk, T. (1986). The adenovirus E1B 55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. Mol. Cell. Biol. 6, p470-476.

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

Reese, M.C. and Eckman, F.H. (1995). Novel neural network algorithms for improved eukaryotic promoter site recognition. Talk and Abstract from The seventh international genome

[0235]

sequencing and analysis conference. Hyatt Regency, Hilton Head Island, South Carolina, Sept 16-20, 1995.

(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).

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

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

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

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

Shenk, T. (1996). Adenoviridae: The viruses and their replication. In Virology, eds. Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (Lippincott-Raven, New York), Vol. 2, pp 2111-2148.

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

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

[0236]

Yew, P.R. and Berk, A.J. (1992). Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early region 1B protein. Nature 357, pp 82-85.

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

[0237]

도면의 간단한 설명

[0022]

도 1은 pWE.Ad35.pIX-rITR△E3의 지도이다.

[0023]

도 2는 E3 영역이 있는 그리고 없는 Ad35 E1-결실된 바이러스 상에 생성된 PCR 단편의 겔 분석이다. P1=플라스미드 대조; M=마커: 1kb 플러스 래더(Invitrogen); mQ=H2O. 나타낸 계놈의 길이는kb 단위이다.

- [0024] 도 3A는 Clustal법을 이용한 MEGAlign software(DNASTAR)로 발생된 여러 가지 아데노바이러스의 중앙 PIX 상류 서열 영역의 서열 배열이다. Ad5와 Ad2의 Sp1 부위와 TATA-box는 상자에 넣었다.
- [0025] 도 3B는 3A에서 제공된 서열로부터 중앙 pIX 영역에서 추정된 Sp1- 및 TATA-boxes의 개략적인 비교를 나타낸다.
- [0026] 도 4는 pAdApt535.Lus의 지도이다.
- [0027] 도 5는 pAdApt535의 지도이다.
- [0028] 도 6A는 Ad35.AdApt.Luc 및 Ad35.AdApt535.Luc 바이러스로부터 분리된 DNA에서 발생된 또는 플라스미드 대조군에서 발생된 PCR 단편의 겔 분석이다. M=마커(1kb 플러스 래더, Invitrogen). 각 바이러스 제제 또는 플라스미드 대조는 2개의 특정 PCR 증폭으로 분석되었다.
- [0029] 도 6B는 Ad35.AdApt.LacZ△E3(35LacZ) 및 Ad35.AdApt535.LacZ△E3 상에서 발생된 또는 플라스미드 대조에서 발생된 PCR 단편의 겔 분석이다.
- [0030] 도 7은 pBr.Ad35.△SM.AdApt.LacZ의 지도이다.
- [0031] 도 8은 E1B 프로모터와 55K 코딩 영역에서 추상의 프로모터의 개략적인 표현이다.
- [0032] 도 9는 추상의 프로모터의 동정을 위한 구별되는 단편을 발생하는데 사용될 수 있는 55K 영역에서 제한 부위의 개략적인 표현이다. 부위의 번호매김은 야생형 Ad35에서의 그들의 위치에 따른다.
- [0033] 도 10a 내지 도 10e는 3가지 다른 서브그룹 b 혈청형에서 E1A 영역 및 E1B/pIX 영역의 폴리A 시그널 사이의 영역의 서열 배열이다.
- [0034] 도 11은 플라스미드 p△MT.Orf6.Hydro(ECACC 수탁번호 P02041226)의 개략적인 표현이다.
- [0035] 도 12는 플라스미드 pAd35.△MT.Orf6의 개략적인 표현이다.
- [0036] 도 13은 pUC.35-5E4의 개략적인 표현이다.
- [0037] 도 14는 pUC.35-5E4를 해독하는 클로닝 단계이다.
- [0038] 도 15는 pBr.Ad35.PRn의 개략적인 표현이다.
- [0039] 도 16은 pBr.Ad35.PR5E4(ECACC 수탁번호 P02041229)의 개략적인 표현이다.
- [0040] 도 17은 pWE.Ad35.pIX-rITR5E4의 개략적인 표현이다.
- [0041] 도 18은 pCRscriptAmp.NFI-NcoIR의 개략적인 표현이다.
- [0042] 도 19는 pCRscriptAmp.NcoIF-NR2의 개략적인 표현이다.
- [0043] 도 20은 pCR.NF1-NR2의 개략적인 표현이다.
- [0044] 도 21은 Ad35 골격(backbone)(중간 서열)으로 클로닝된 Ad5로부터 E4-orf6를 갖는 Ad5(상부 서열)의 E4-orf6와 Ad35 E4-orf 서열(하부 서열)사이의 전체 단편이 대체된 것을 나타내는 배열이다.
- [0045] 도 22는 Ad35 골격(중간 서열)으로 클로닝된 Ad5 E4-orf6/7의 일부를 갖는 Ad5의 E4-orf6/7(상부 서열)과 Ad35 E4-orf6/7 서열(하부 서열) 사이의 배열로, orf6/7 서열이 부분적으로 키메라이고 138 위치에서의 라이신(K) 잔기에서 거의 융해됨을 보여준다.
- [0046] 도 23은 pBr.Ad35.PR.5orf6(ECACC 수탁번호 P02041227)의 개략적인 표현이다.
- [0047] 도 24는 pWE.Ad35.pIX-rITR.5orf6의 개략적 표현이다.
- [0048] 도 25는 pBr.Ad35.PRn△E3의 개략적인 표현이다.
- [0049] 도 26은 pBr.Ad35.△E3.PR5E4의 개략적인 표현이다.
- [0050] 도 27은 pBr.Ad35.△E.PR5orf6의 개략적인 표현이다.
- [0051] 도 28은 이중 상동성 재조합 사건을 통해 PER.6와 같은 세포중에서 재조합 아데노바이러스 입자를 생성하기 위한 시스템의 개략도이다.
- [0052] 도 29는 pWE.Ad35.pIX-EcoRV의 개략도이다.

[0053] 도 30은 wt Ad35 서열을 갖는 Ad35 및 Ad11 pIX-cDNA 서열의 배열이다.

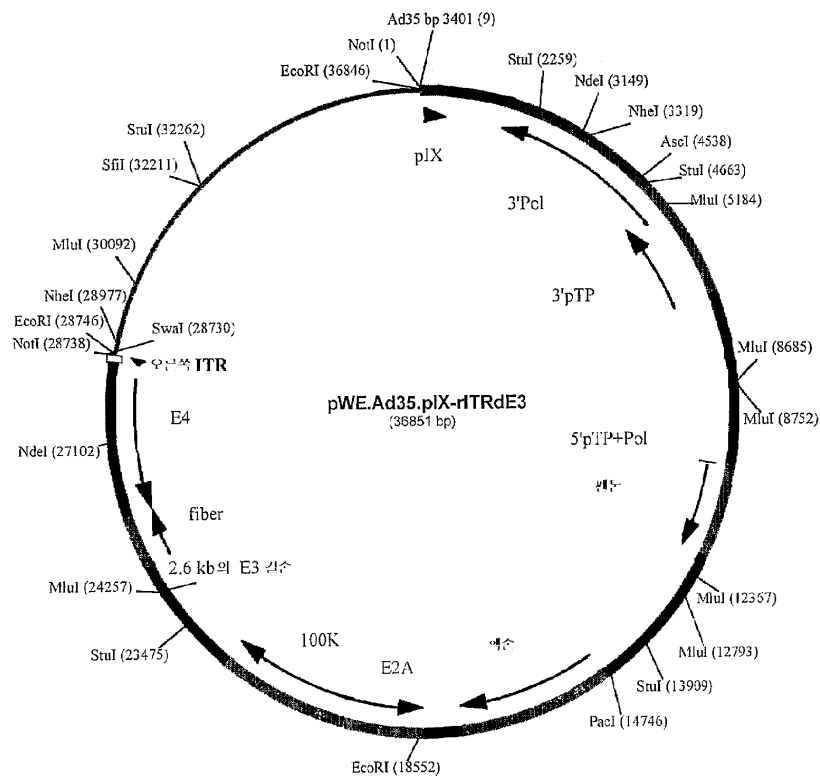
[0054] 실시예 18에 기재한 바와 같이 클론된 cDNA 단편으로부터 얻은 서열은 DNASTAR 사의 SeqMan 소프트웨어를 이용하여 배열하였다. Ad35 cDNA 서열은 wtAd35- 또는 Ad35E1B+Luc-감염된 배양물(7개 클론의 한개가 없는 서열), wtAd11-감염된 배양물로부터 분리된 RNA로부터의 Ad11 cDNA 서열로부터 분리된 RNAs로부터 유도되었다. 서열의 번호는 임의로 매겼다. Ad35 wt 서열의 경우, wt Ad35 서열의 뉴클레오티드 3339에서 뉴클레오티드 3628까지를 나타내었다. 인트론 서열(cDNA 서열중의 갭으로 나타남)은 공지의 공통 서열(consensus sequence)과 거의 일치하는 슬라이스 도너(SD)와 슬라이스 억셉터(SA) 위치에 의해 측화된다. SeqMan 소프트웨어는 cDNA 서열중의 SD(AG)로부터 처음 두개의 뉴클레오티드를 5'말단 대신 인트론 서열의 3'말단에 놓았다.

[0055] 도 31은 Ad35 바이러스의 pIX 캡 부위의 위치이다. Ad35에서 E1B와 pIX 서열 주변의 게놈 조직의 개략도이다. pIX mRNA의 전사 개시 부위와 인트론 경계를 나타낸다. 뉴클레오티드 서열은 wt Ad35 DNA(WO 00/70071)에 따른다. M=MunI, B=Bsu36I, SD= 슬라이스 도너, 그리고 SA=슬라이스 억셉터. 전사 개시 부위(뉴클레오티드 3339, 캡 부위), 55K의 정지 코돈(TAA) 및 pIX의 개시 코돈(뉴클레오티드 3484, ATG)은 볼드체로 나타내었다. 점선은 서열이 나타나지 않음을 표시한다.

[0056] 도 32는 166bp 3/ E1B 서열을 갖는 Ad35 바이러스로부터 얻은 트랜스진 RNA이다. Ad35.AdAptBsuLuc5orf6(라인 1-9)과 Ad35.AdAptBsuLuc 바이러스(라인 10-14)에 대한 트랜스진 PCR 분석의 결과를 나타낸 도면이다. M=1kb+마터(Invitrogen), p=AdAptBsuLuc 대조 플라스미드.

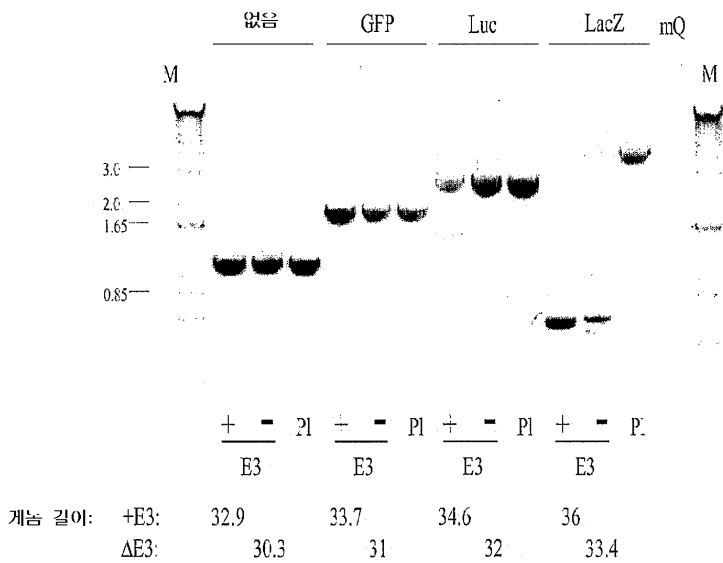
도면

도면1



도면2

Ad35 E1- 및 E1/E3-결손 바이러스에서의 트랜스진 PCR



도면3a

pIX 근접 영역의 정렬

```
1  TGAAGTACTGAAATGCTGTCGGCGTGGCTTAAGGGTGGCAAGAAATATAATAAGCTGGGGG Ad2.SEQ
1  TGAAGTACTGAAATGCTGTCGGCGTGGCTTAAGGGTGGCAAGAAATATAATAAGCTGGGGG Ad5.SEQ
1  TGAAGTACTGAAATGCTGTCGGCGTGGCTTAAGGGTGGCAAGAAATATAATAAGCTGGGGG Ad12.SEQ
1  TAGAGG--TAGCTCGACTGAGTACTGGGCTGGCTAAGGT-GACTATA-AAGGCGGGTGT Ad9.SEQ
1  TAAGGG--TAAG--GGGCGGAGCTATAC--AGGTATAAAGCTGGGGT-AGAGT Ad40.SEQ
1  TAGAG--TAGTAGTG-----TTCTG-GGGCGGGGGA--GGACCTGCATGAGGGC Ad4.SEQ
1  TAGAG--TAGTAGTG-----TTCTG-GGGCGGGGGA--GGACCTGCATGAGGGC Ad5.SEQ
1  TAAGC--TAGCTATTCGCA--AAACTTTG-GGGTGGCAATTTTCAGAT-----GGA Ad55.SEQ
1  TAAGC--TAGCTATTCGCA--AAACTTTG-GGGTGGCAATTTTCAGAT-----GGA Ad11.SEQ
1  TAAGC--TAGCTATTCGCA--AAACTTTG-GGGTGGCAATTTTCAGAT-----GGA Ad7.SEQ

51  CTCACCTAGTTTGTATCTTTTTCAGCA-GCCGCCGCC---AIG Ad2.SEQ
51  CTCACCTAGTTTGTATCTTTTTCAGCA-GCCGCCGCCCGCCATG Ad5.SEQ
47  CA-----ACTAAAAATTC-TTCTCTCT-TTAAACAGC-ACGATG Ad12.SEQ
57  CTCACGAGGCTCTT-TTGTCTTTTTCAGCA-GA-----CATCATG Ad9.SEQ
50  AAAAAAAGGGAAG-----TTACAA---AATG Ad40.SEQ
46  CAGAAIAACTGAAATCTGTGCTTTTCTGTGTGTCAGCAG-CATG Ad4.SEQ
46  CAGAAIAACTGAAATCTGTGCTTTTCTGTGTGTCAGCAG-CATG Ad5.SEQ
46  CAGATIGAGTAAAAAT-TGTTT-TTCTGTCTTGCAGCTGACATG Ad11.SEQ
46  CAGATIGAGTAAAAAT-TGTTT-TTCTGTCTTGCAGCTGACATG Ad7.SEQ
57  CAAATIGGTAAT-TT-TGTTAATTTCTGTCTTGCAGCTGACATG
```

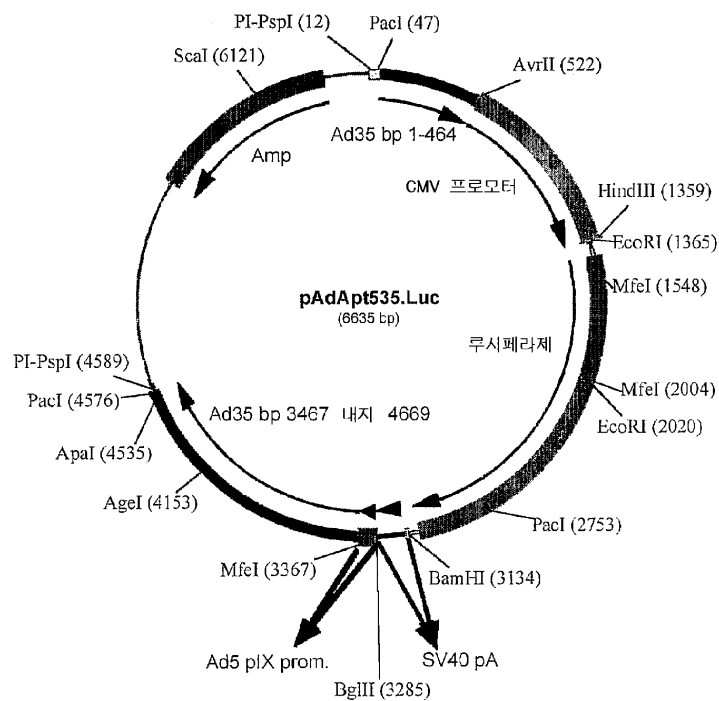
도면3b

: 추정 pIX 프로모터 영역의 대조

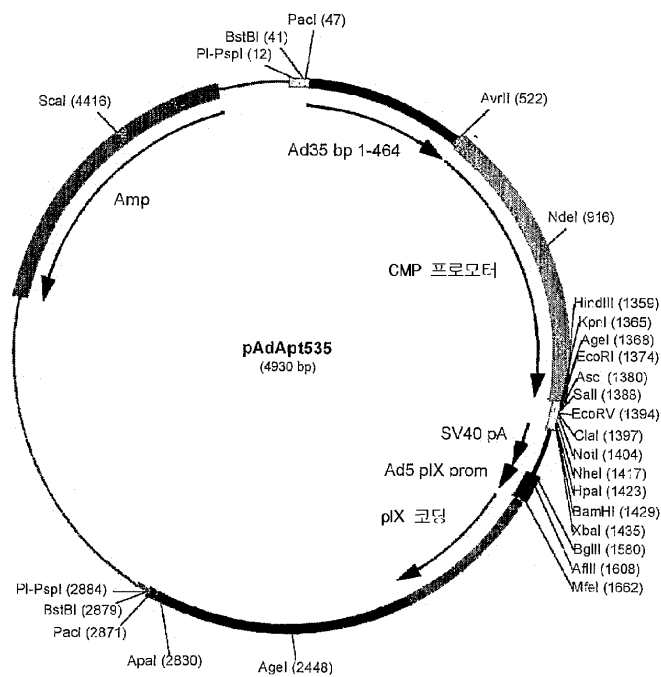
	정지 55k		개시 pIX 코딩
Ad5:	3509	GGGCGT 20 nucl.....	TATATAA 3609
Ad12:	3295	GGGTGG 11 nucl	ATTATAA 3374
Ad9:	3361	GGGCGT 12 nucl	TATAAAG 3449
Ad40:	3149	GGGCGG 13 nucl	TATAAAG 3217
Ad4:	3404	GGGCGG 23 nucl	AATAACT 3489
		GGGAGG 17 nucl	AATAACT
Ad35:	3400	GGGTGG 27 nucl	AATTTGT 3484
Ad11:	3399	GGGTGG 27 nucl	AATTTGT 3483
Ad7:	3385	GGGACT 30 nucl	AATTTTG 3480

컨센서스 SP1 부위 G/a G G C/t/a G/a G/t

도면4

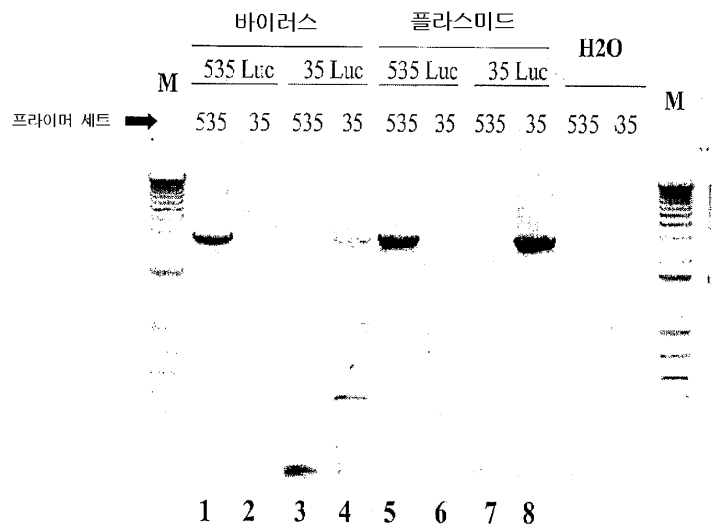


도면5



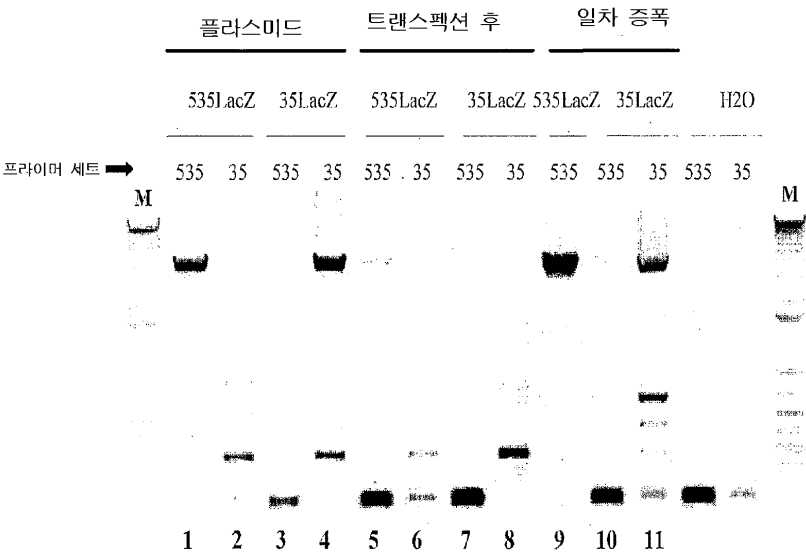
도면6a

Ad35 E1 결손 바이러스에서의 트랜스진 PCR

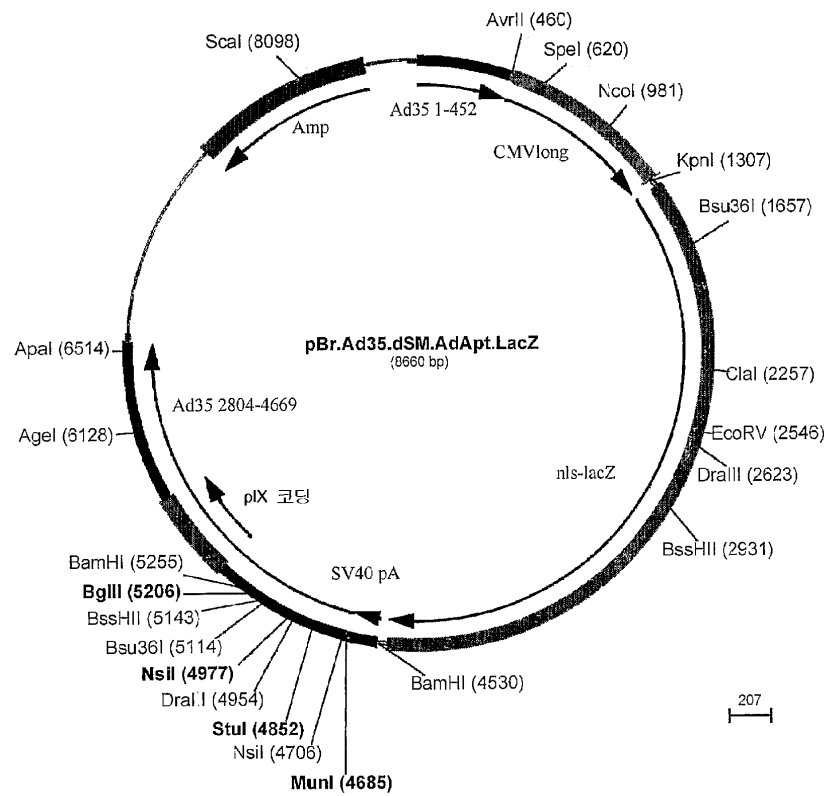


도면6b

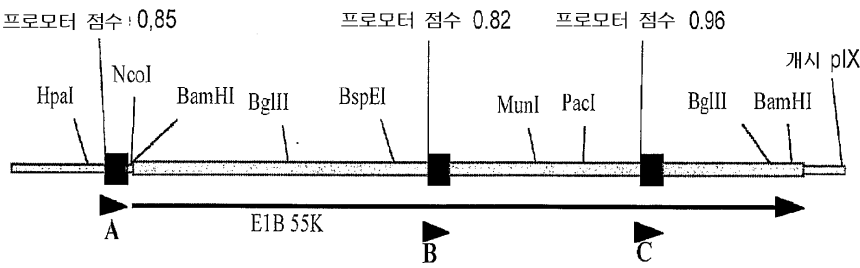
Ad35 E1/E3 결손 바이러스에서의 트랜스진 PCR



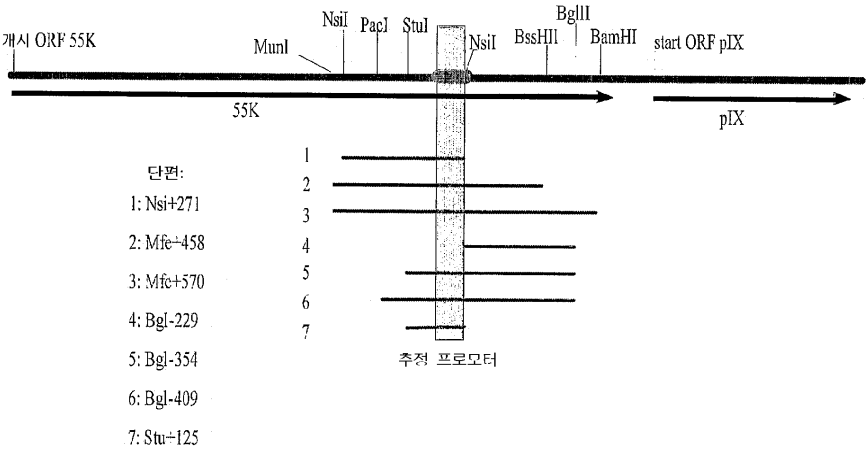
도면7



도면8



도면9



도면10a

가중된 잔기 가중표를 이용하는 Clustal법을 사용하여, Align.E1B-pIX.35-11.7.MEG의 정렬

Friday 4 October 2002 9:32

```

1  AATAAAAATATGTTAACTGTCTCACTGGTFTTTATTTGCTTTTGGGGCGGGG Ad35.E1B-pIX.SEQ
1  AATAAAAATATGTTAACTGTCTCACTGGTFTTTATTTGCTTTTGGGGCGGGG Ad11.E1B-pIX.SEQ
1  AATAAAAATTATGTTCTAGCTGCTGAGTGTTTATTTATTTATTTCTTTGGGGTTGGGG Ad7.E1B-pIX.SEQ

51  ACTCAGCTATATAAGTACAGCAGACCTGTGTGGTTAGCTCATAGGAGCT Ad35.E1B-pIX.SEQ
51  ACTCAGCTATATAAGTACAGCAGACCTGTGTGGTTAGCTCATAGGAGCT Ad11.E1B-pIX.SEQ
49  CTCTGCTGATATATAAGTACGAGCAGATTCTGTGTGGTTAGCTCATAGGAGCT Ad7.E1B-pIX.SEQ

101 GCGTTTTCATCCATGGAGGTTTGGGGCCATTTTGGGAAGACCTTAGSAAAGCT Ad35.E1B-pIX.SEQ
101 GCGTTTTCATCCATGGAGGTTTGGGGCCATTTTGGGAAGACCTTAGSAAAGCT Ad11.E1B-pIX.SEQ
99  TGTCTGCTCATCCATGGAGGTTTGGGGCTTATCTTGGGAAGACCTTAGSAAAGCT Ad7.E1B-pIX.SEQ

151 AGGCAACTGTATAGAGAGCGCTTCGGACCGAGTCTCCGGTTTGTGSAAGATT Ad35.E1B-pIX.SEQ
151 AGGCAACTGTATAGAGAGCGCTTCGGACCGAGTCTCCGGTTTGTGSAAGATT Ad11.E1B-pIX.SEQ
149 AGGCTACTTACTTAGAGAAAGCGCTTCGGACCGAGTCTCTGGCTCTTGTGSAAGATT Ad7.E1B-pIX.SEQ

201 CTGTTTCGCTAGTGAATTAGCTAGGCTAGTTTATAGGATAAAACAGGACT Ad35.E1B-pIX.SEQ
201 CTGTTTCGCTAGTGAATTAGCTAGGCTAGTTTATAGGATAAAACAGGACT Ad11.E1B-pIX.SEQ
199 CTGTTTCGCTAGTGAATTAGCTAGCTAGCTAGTTTATAGGATAAAACAGGACT Ad7.E1B-pIX.SEQ

251 AATAACAAGAAATTTGAAAAGTTGTGGTAGACTTCCAGGACTTTTGTGAA Ad35.E1B-pIX.SEQ
251 AATAACAAGAAATTTGAAAAGTTGTGGTAGACTTCCAGGACTTTTGTGAA Ad11.E1B-pIX.SEQ
249 ATCTAGGAGAAAGAAATTTGAAAAGTTGTGGTAGACTTCCAGGACTTTTGTGAA Ad7.E1B-pIX.SEQ

301 GCTCTTAATTTTGGGCCATTCAGGTTCACTTTAAGAGAAAAGTTTATCAGT Ad35.E1B-pIX.SEQ
301 GCTCTTAATTTTGGGCCATTCAGGTTCACTTTAAGAGAAAAGTTTATCAGT Ad11.E1B-pIX.SEQ
299 GCTCTTAATTTTGGGCCATTCAGGTTCACTTTAAGAGAAAAGTTTATCAGT Ad7.E1B-pIX.SEQ

351 TTTAGACTTTTCAACCCAGGTAGAACTGCTGCTGCTGTGGCTTTTCTTA Ad35.E1B-pIX.SEQ
351 TTTAGACTTTTCAACCCAGGTAGAACTGCTGCTGCTGTGGCTTTTCTTA Ad11.E1B-pIX.SEQ
349 TTTAGACTTTTCAACCCAGGTAGAACTGCTGCTGCTGTGGCTTTTCTTA Ad7.E1B-pIX.SEQ

401 CTCTTATATTTAGATAAAAGGATCCCGCAGACTCATTTTCAACAGGGGATAC Ad35.E1B-pIX.SEQ
401 CTCTTATATTTAGATAAAAGGATCCCGCAGACTCATTTTCAACAGGGGATAC Ad11.E1B-pIX.SEQ
399 CTCTTATATTTAGATAAAAGGATCCCGCAGACTCATTTTCAACAGGGGATAC Ad7.E1B-pIX.SEQ

451 GTTTTGGATTTTCATAGCCACAGCATTTGTGGAGAACATGGAAAGGTTTGTGAA Ad35.E1B-pIX.SEQ
451 GTTTTGGATTTTCATAGCCACAGCATTTGTGGAGAACATGGAAAGGTTTGTGAA Ad11.E1B-pIX.SEQ
449 GTTTTGGATTTTCATAGCCACAGCATTTGTGGAGAACATGGAAAGGTTTGTGAA Ad7.E1B-pIX.SEQ

501 GATGAGGACAAATCTTAGGTTACTGGCCAGTGCAGCCCTTTGGGTGTAGCGG Ad35.E1B-pIX.SEQ
501 GATGAGGACAAATCTTAGGTTACTGGCCAGTGCAGCCCTTTGGGTGTAGCGG Ad11.E1B-pIX.SEQ
499 GATGAGGACAAATCTTAGGTTACTGGCCAGTGCAGCCCTTTGGGTGTAGCGG Ad7.E1B-pIX.SEQ

```


도면10b

551 G A A T C C T G A G G C A T C C A C C G G T C A T E C C A G C G G T T C T G G A G G A G G A A C A G Ad35.E1B-pIX.SEQ
551 G A A T C C T G A G G C A T C C A C C G G T C A T E C C A G C G G T T C T G G A G G A G G A A C A G Ad11.E1B-pIX.SEQ
549 G G A T A C T G A G A C A C A C C C A C C G A C A T E C C A G C G G T T C T G A G G A G G A C A G Ad7.E1B-pIX.SEQ

601 C A A G A G G A C A A C C C G A G A G C C G G C C T G G A C C C T C C A G T G G A G G A G G C C G A Ad35.E1B-pIX.SEQ
601 C A A G A G G A C A A C C C G A G A G C C G G C C T G G A C C C T C C A G T G G A G G A G G C C G A Ad11.E1B-pIX.SEQ
599 C A G A G G A C A A T C C G A G A G C C G G C C T G G A C C C T C C G T G G A G G A G - - - - Ad7.E1B-pIX.SEQ

651 G T A G C T G A C T T G T C T C C T G A A C T G C A A C G G T G C T T A C T G G A T C T A C G T C Ad35.E1B-pIX.SEQ
651 G T A G C T G A C T T G T C T C C T G A A C T G C A A C G G T G C T T A C T G G A T C T A C G T C Ad11.E1B-pIX.SEQ
644 - T A G C T G A C C T G T T T C C T G A A C T G C A C G G T G C T T A C T A G G T C T A C G A C Ad7.E1B-pIX.SEQ

701 C A C T G G A C G G G A T A G G G C C T T A A G A C G G A G A G G C A T C C A G T G G T A C T G Ad35.E1B-pIX.SEQ
701 C A C T G G A C G G G A T A G G G C C T T A A G A C G G A G A G G C A T C C A G T G G T A C T G Ad11.E1B-pIX.SEQ
693 C A G T G G A C A G A C A C A G G G C A A T T A A G A C G G A G A G A A T C C A G T G G A A A T A Ad7.E1B-pIX.SEQ

751 A T G C T A G A T C T G A G T T G C T T T A A G T T T A A T G A G T C C C A G A C G T C C T G A A Ad35.E1B-pIX.SEQ
751 A T G C T A G A T C T G A G T T G C T T T A A G T T T A A T G A G T C C C A G A C G T C C T G A A Ad11.E1B-pIX.SEQ
743 A T T C A A G A A C C G A G T T G C T T T A A G T T T A A T G A G C C C A G A C G T C C T G A A Ad7.E1B-pIX.SEQ

801 A C C A T T T G G T G G C A T G A G G T T C A G A A A G A G G G A A G G G A T G A A G T T T C T G T Ad35.E1B-pIX.SEQ
801 A C C A T T T G G T G G C A T G A G G T T C A G A A A G A G G G A A G G G A T G A A G T T T C T G T Ad11.E1B-pIX.SEQ
793 A C T T T T G G T G G C A T G A G G T T C A G A G C G A A G G C A G G G A T G A A G T T T C A A T Ad7.E1B-pIX.SEQ

851 A T I G C A G G A G A A A T A T T C A C T G G A A C A G G T G A A A A C A T G T T G G T T G G A G C Ad35.E1B-pIX.SEQ
851 A T I G C A G G A G A A A T A T T C A C T G G A A C A G G T G A A A A C A T G T T G G T T G G A G C Ad11.E1B-pIX.SEQ
843 A T T G C A G G A G A A A T A T T C A C T A G A A C A A C T T A A G A C C T G T T G G T T G G A A C Ad7.E1B-pIX.SEQ

901 C A G A G G A T G A T T G G G C G G T G G C C A T T A A A A A T A T G C C A A G A T A G C T T T G Ad35.E1B-pIX.SEQ
901 C T G A G G A T G A T T G G G A G G T G G C C A T T A A A A A T A T G C C A A G A T A G C T T T G Ad11.E1B-pIX.SEQ
893 C T G A G G A T G A T T G G G A G G T G G C C A T T A G G A A T A T G C T A A G A T A T C T C T G Ad7.E1B-pIX.SEQ

951 A G G C C T G A T A A A C A G T A T A A G A T C A C T A G A C G G A T T A A T A T C C G G A A T G C Ad35.E1B-pIX.SEQ
951 A G G C C T G A T A A A C A G T A T A A G A T T A C T A G A C G G A T T A A T A T C C G G A A T G C Ad11.E1B-pIX.SEQ
943 A G G C C T G A T A A A C A A T A T A G A T T A C T A G A A G A T T A A T A T T A G A A A T G C Ad7.E1B-pIX.SEQ

1001 T T G T T A C A T A T C T G S A A A T G G G C T G A G G T G G T A A T A G A T A C T C A A G A C A Ad35.E1B-pIX.SEQ
1001 T T G T T A C A T A T C T G S A A A T G G G C T G A G G T G G T A A T A G A T A C T C A A G A C A Ad11.E1B-pIX.SEQ
953 A T G C T A C A T A T C A G S G A A T G G G C A G A G G T T A T A A T A C A T A C A A G A T A Ad7.E1B-pIX.SEQ

1051 A G A C A G T T A T T A G A T G C T G C A T G A T G G A T A T G T G C C T G G A G T A G T C G G T Ad35.E1B-pIX.SEQ
1051 A C C C A G T T A T T A G A T G C T G C A T G A T G G A T A T G T G C C T G G G G T A G T C G G T Ad11.E1B-pIX.SEQ
1043 A A G C A G C T T T T A G A T G T G T A T G A T G G T A T G T G C C A G G C T G T C G G C Ad7.E1B-pIX.SEQ

도면10c

551 G A A T C C T G A G G C A T C C A C C G G T C A T E C C A G C G G T T C T G C A G G A G G A A C A G Ad35.E1B-pIX.SEQ
551 G A A T C C T G A G G C A T C C A C C G G T C A T E C C A G C G G T T C T G C A G G A G G A A C A G Ad11.E1B-pIX.SEQ
549 G G A T A C T G A G A C A C C C A C C G A C A T E C C A G C G G T T C T G C A G G A G G A G C A G Ad7.E1B-pIX.SEQ

601 C A A G A G G A C A A C C C G A G A G C C G G C C T G G A C C C T C C A G T G G A G G A G G C C G A Ad35.E1B-pIX.SEQ
601 C A A G A G G A C A A C C C G A G A G C C G G C C T G G A C C C T C C A G T G G A G G A G G C C G A Ad11.E1B-pIX.SEQ
599 C A G A G G A C A A T C C G A G A G C C G G C C T G G A C C C T C C G T G G A G G A G - - - - Ad7.E1B-pIX.SEQ

651 G T A G C T G A C T T G T C T C C T G A A C T G C A A C G G T G C T T A C T G G A T C T A C G T C Ad35.E1B-pIX.SEQ
651 G T A G C T G A C T T G T C T C C T G A A C T G C A A C G G T G C T T A C T G G A T C T A C G T C Ad11.E1B-pIX.SEQ
644 - T A G C T G A C C T G T T C C T G A A C T G C A C G G T G C T T A C T A G G T C T A C G A C Ad7.E1B-pIX.SEQ

701 C A C T G G A C G G G A T A G G G C C T T A A G A G G G A G A G G G C A T C C A G T G G T A C T G Ad35.E1B-pIX.SEQ
701 C A C T G G A C G G G A T A G G G C C T T A A G A G G G A G A G G G C A T C C A G T G G T A C T G Ad11.E1B-pIX.SEQ
693 C A G T G G A C A G A C A C A G G G C A A T T A A G A C G G A G A G A A T C C A G T G G A A A T A Ad7.E1B-pIX.SEQ

751 A T C C T A G A T C T G A G T T G C C T T T A A G T T T A A T G A G T C C C A G A C C T C C T G A A Ad35.E1B-pIX.SEQ
751 A T C C T A G A T C T G A G T T G C C T T T A A G T T T A A T G A G T C C C A G A C C T C C T G A A Ad11.E1B-pIX.SEQ
743 A T T C A G A A C C G A G T T G C C T T T A A G T T T A A T G A G C C C A G C C G T C C T G A A Ad7.E1B-pIX.SEQ

801 A C C A T T T G G T G G C A T G A G G T T C A G A A A G A G G G A A G G G A T G A A G T T T C T C T Ad35.E1B-pIX.SEQ
801 A C C A T T T G G T G G C A T G A G G T T C A G A A A G A G G G A A G G G A T G A A G T T T C T C T Ad11.E1B-pIX.SEQ
793 A C T T T T G G T G G C A T G A G G T T C A G A G C G A A G G C A G G G A T G A A G T T T C A A T Ad7.E1B-pIX.SEQ

851 A T I G C A G G A G A A A P A T T C A C T G G A A C A G G T G A A A A C A T G T T G G T T G G A G C Ad35.E1B-pIX.SEQ
851 A T I G C A G G A G A A A P A T T C A C T G G A A C A G G T G A A A A C A T G T T G G T T G G A G C Ad11.E1B-pIX.SEQ
843 A T T G C A G G A G A A A P A T T C A C T A G A A C A G C T T A A G A C C T G T T G G T T G G A A C Ad7.E1B-pIX.SEQ

901 C A G A G G A T G A T T G G G C G G T G G C C A T T T A A A A T T A T G C C A A G A T A G C T T T G Ad35.E1B-pIX.SEQ
901 C T G A G G A T G A T T G G G A G G T G G C C A T T A A A A T T A T G C C A A G A T A G C T T T G Ad11.E1B-pIX.SEQ
893 C T G A G G A T G A T T G G G A G G T G G C C A T T A G G A A T T A T G C A A G A T A T C T C T G Ad7.E1B-pIX.SEQ

951 A G G C C T G A T A A A C A G T A T A A G A T C A C T A G A C G G A T T A A T A T C C G G A A T G C Ad35.E1B-pIX.SEQ
951 A G G C C T G A T A A A C A G T A T A A G A T T A C T A G A C G G A T T A A T A T C C G G A A T G C Ad11.E1B-pIX.SEQ
943 A G G C C T G A T A A A C A T A T A G A T T A C T A G A A G A T T A A T A T T A G A A A T G C Ad7.E1B-pIX.SEQ

1001 T T G T T A C A T A T C T G G A A A T G G G C C T G A G G T G G T A A T A G A T A C T C A A G A C A Ad35.E1B-pIX.SEQ
1001 T T G T T A C A T A T C T G G A A A T G G G C C T G A G G T G G T A A T A G A T A C T C A A G A C A Ad11.E1B-pIX.SEQ
953 A T G C T A C A T A T C A G G G A A T G G G C A G A G G T T A T A A T A C A T A C A A G A T A Ad7.E1B-pIX.SEQ

1051 A G A C A G T T A T T A G A T G C T G C A T G A T G G A T A T G T G C C T G G A G T A G T C G G T Ad35.E1B-pIX.SEQ
1051 A C C A G T T A T T A G A T G C T G C A T G A T G G A T A T G T G C C T G G G G T A G T C G G T Ad11.E1B-pIX.SEQ
1043 A A G C A G C T T T T A G A T G T G T A T G A T G G T A T G T G C C A G G C G T T G T C G G C Ad7.E1B-pIX.SEQ

도면10d

1651 T G A A A G T G T T G T T G G A A C C A G A T G C C T T T T C C A G A A T G A G C C T A A C A G G A Ad35.E1B-pIX.SEQ
1651 T G A A A G T G T T G T T G G A A C C A G A T G C C T T T T C C A G A A T G A G C C T A A C A G G A Ad11.E1B-pIX.SEQ
1643 T G A A G G T A A T G T T G G A A C C A G A T G C C T T T T C C A G A G T G A G C G T A A C A G G A Ac7.E1B-pIX.SEQ

1701 A T C T T T T G A C A T G A A C A C G C A A A T C T G G A A G A T C C T G A G G T A T G A T G A T A C Ad35.E1B-pIX.SEQ
1721 A T T T T T T G A C A T G A A C A T G C A A A T C T G G A A G A T C C T G A G G T A T G A T G A T A C Ad11.E1B-pIX.SEQ
1693 A T C T T T G A T A T G A A T A T T C A A C T A T G G A A G A T C C T G A G A T A T A T G A T G A C A C Ac7.E1B-pIX.SEQ

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

1301 A G C C G G T G T G T T A G A T G T G A C C G A A G A T C T C A G A C C G G A T C A T T T G G T T Ad35.E1B-pIX.SEQ
1301 A G C C G G T G T G T T A G A T G T G A C C G A A G A T C T C A G A C C G G A T C A T T T G G T T Ad11.E1B-pIX.SEQ
1793 A G C C G G T G T G C G T G A T G T G A C C G A A G A C C T C A G C C G C C G A T C A T T T G T G Ad7.E1B-pIX.SEQ

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

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

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

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

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

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

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

도면10e

```

2190 TGGCCGCTAACACCTGCTTGGAAATGGGCTTACTATGGGAAGCATCGTGGCT Ad35.E1B-pIX.SEQ
2190 TTGGCCGCTAACACCTGCTTGGAAATGGGCTTACTATGGGAAGCATCATGGGCT Ad11.E1B-pIX.SEQ
2190 CTGGCCGCACACCTCTTGGAAATGGGCTATTATCGGAAGCATGTGTGGCT Ad7.E1B-pIX.SEQ

2240 AATTCACCTTCTCTAATAACCCCTCTACACCTGACTCAGGACAAAGTTACT Ad35.E1B-pIX.SEQ
2240 AATTCACCTTCTCTAATAACCCCTCTACCTCTGACTCAGGACAAAGTTACT Ad11.E1B-pIX.SEQ
2240 AATTCACCTTCTCTAATAACCCCTCTACCTCTGACTCAGGACAAAGTTACT Ad7.E1B-pIX.SEQ

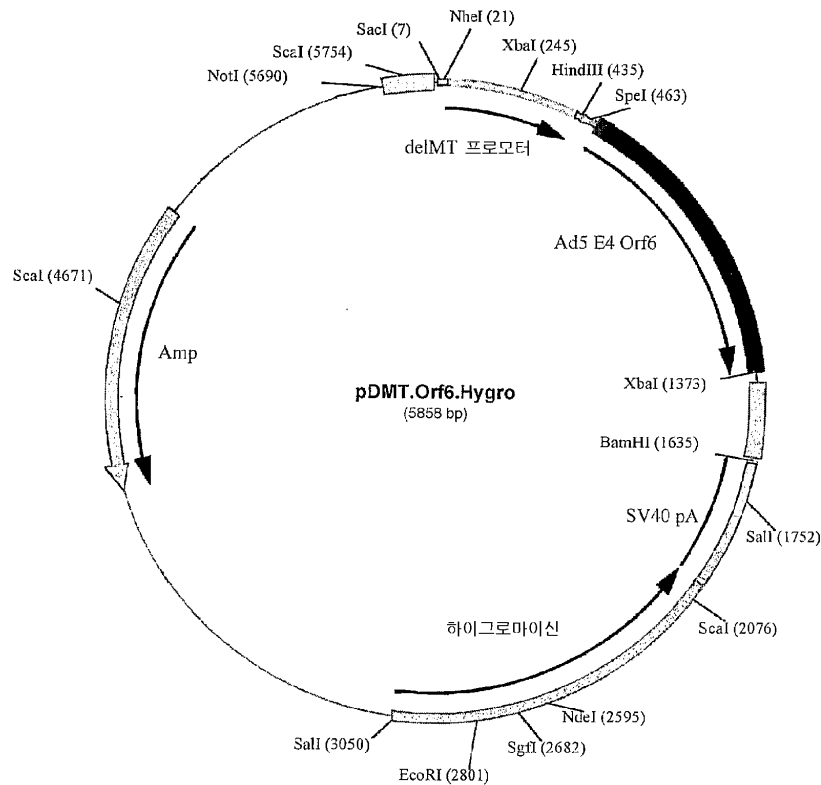
2290 TGTCTTTTGGCCAGCTGGAGGCTTTTACCCCAACGCTCTGGGTGAACCTCT Ad35.E1B-pIX.SEQ
2290 TGTCTTTTGGCCAGCTGGAGGCTTTTACCCCAACGCTCTGGGTGAACCTCT Ad11.E1B-pIX.SEQ
2290 TGTCTTTTGGCTCAGCTGGAGGCTTTTACCCCAACGCTCTGGGTGAACCTCT Ad7.E1B-pIX.SEQ

2340 CTCAGCAGGTGGCCGAGTTCGCAAGTACAAACTGAGTCTGCTGTCTGGCCAG Ad35.E1B-pIX.SEQ
2340 CTCAGCAGGTGGCTCGAGTTCGCAAGTACAAACTGAGTCTGCTGTCTGGCCAG Ad11.E1B-pIX.SEQ
2340 CTCAGCAGGTGGCCGAGTTCGCGTGAAGCAAACTGAGTCTGCTGTCTGGCCAG Ad7.E1B-pIX.SEQ

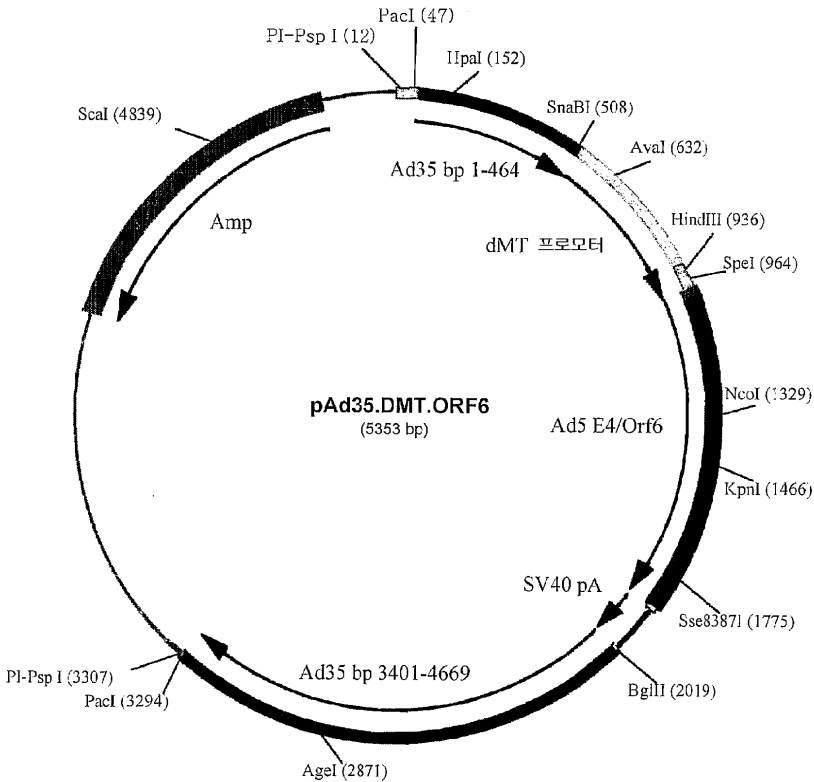
2390 GCAAAAGTCTAAATAAAAAAAATTCAGGAATCAATGAATATAA Ad35.E1B-pIX.SEQ
2390 GCAAAAGTCTAAATAAAAAAAATTCAGGAATCAATGAATATAA Ad11.E1B-pIX.SEQ
2390 GCAAAAGTCTAAATAAAAGTTCCTCAATAATCAATGAATATAA Ad7.E1B-pIX.SEQ
  
```

주 '주 #1' : Ad35.E1B-pIX.SEQ과 구별되는 박스 잔기

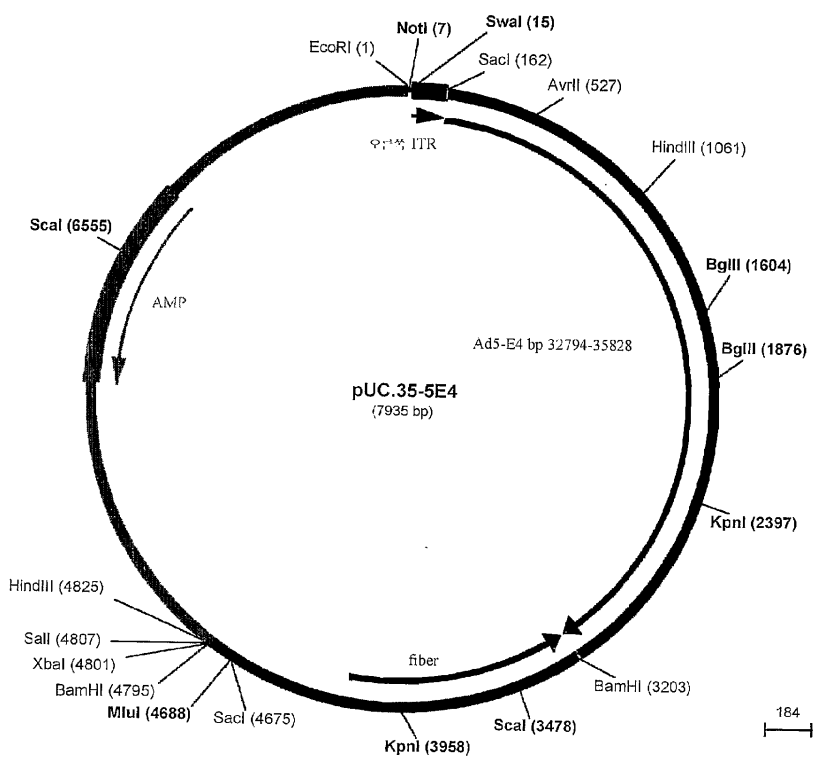
도면11



도면12

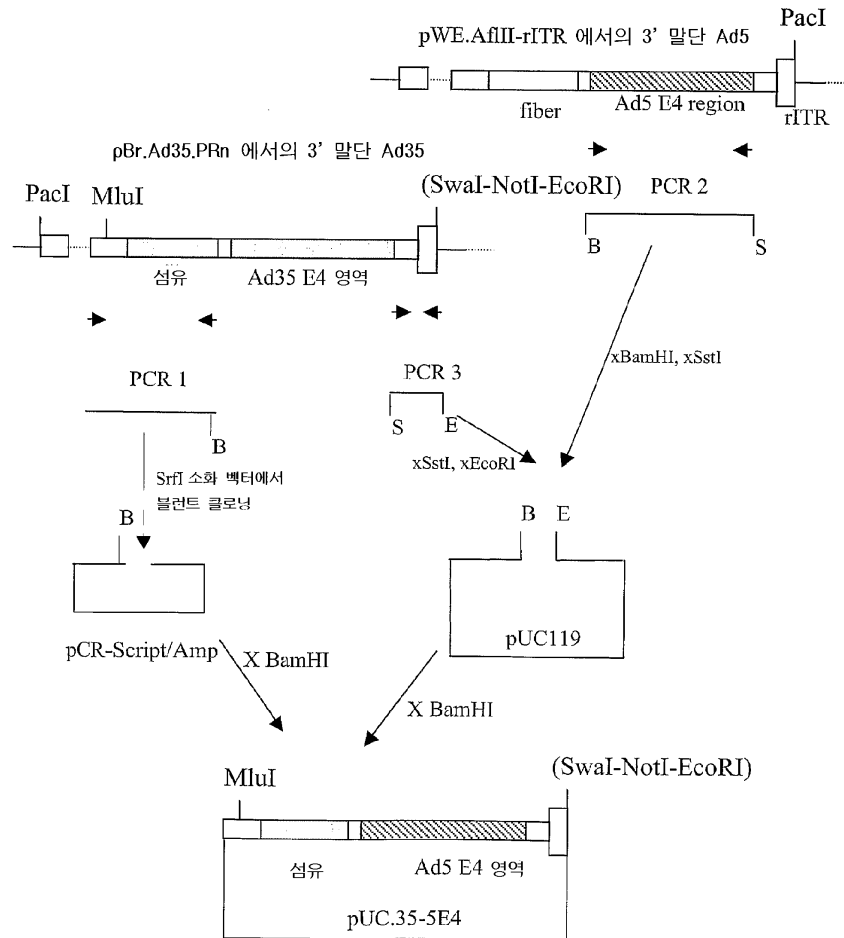


도면13

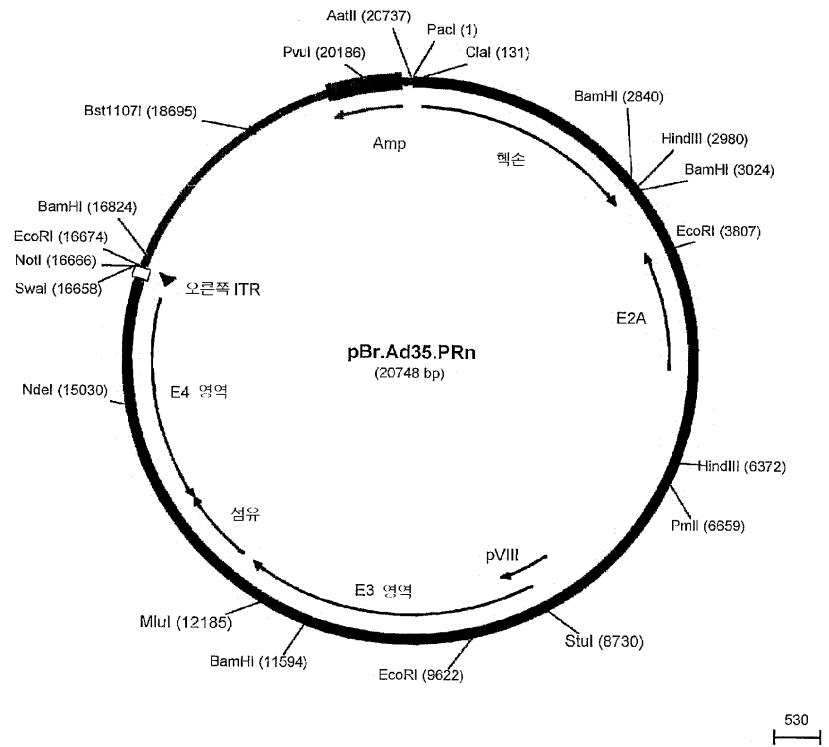


도면14

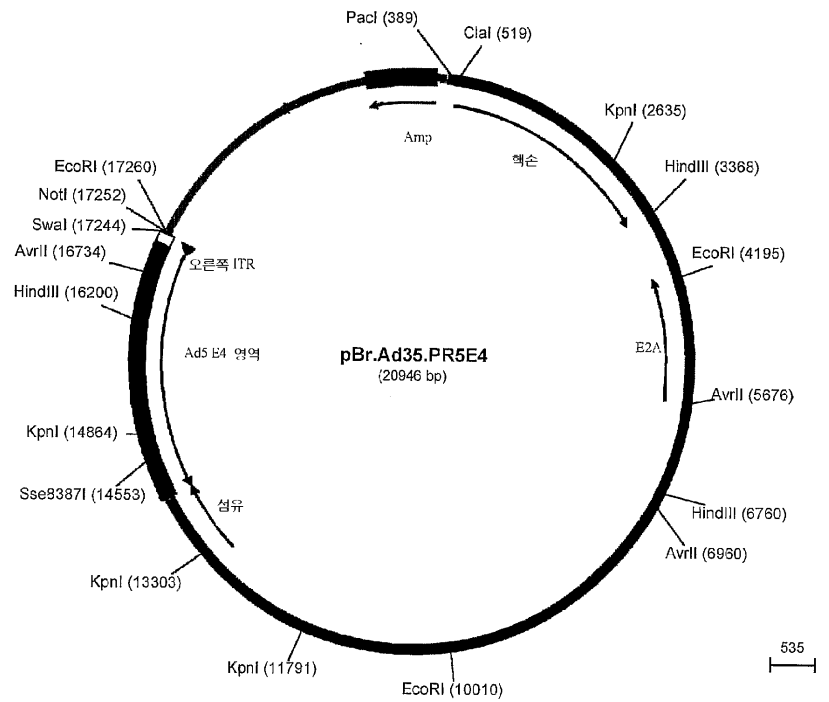
pUC.35-5E4에 대한 클로닝 단계



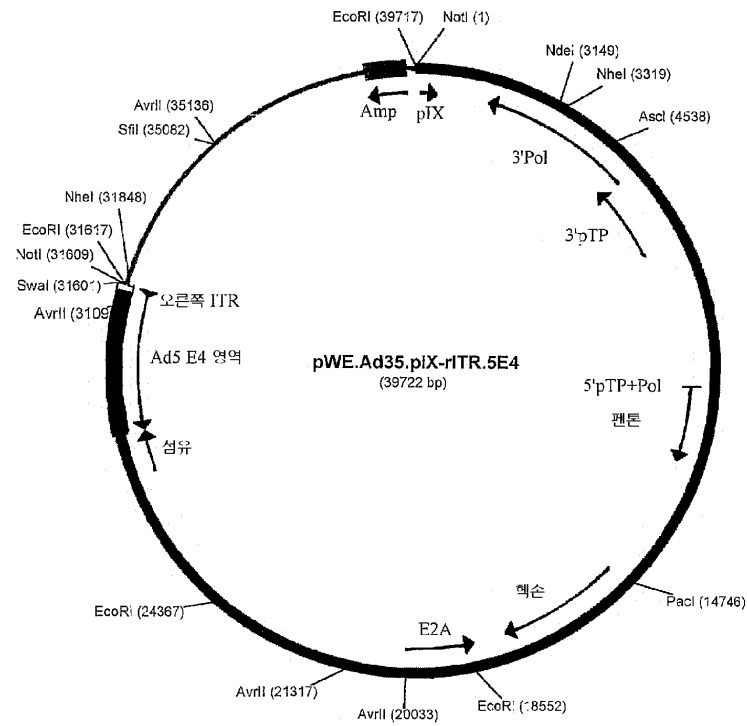
도면15



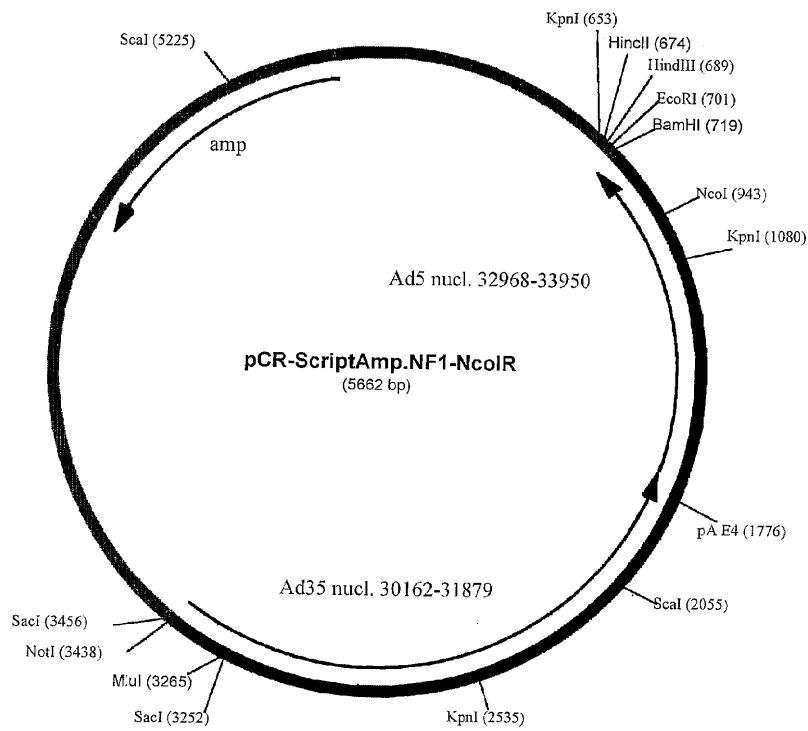
도면16



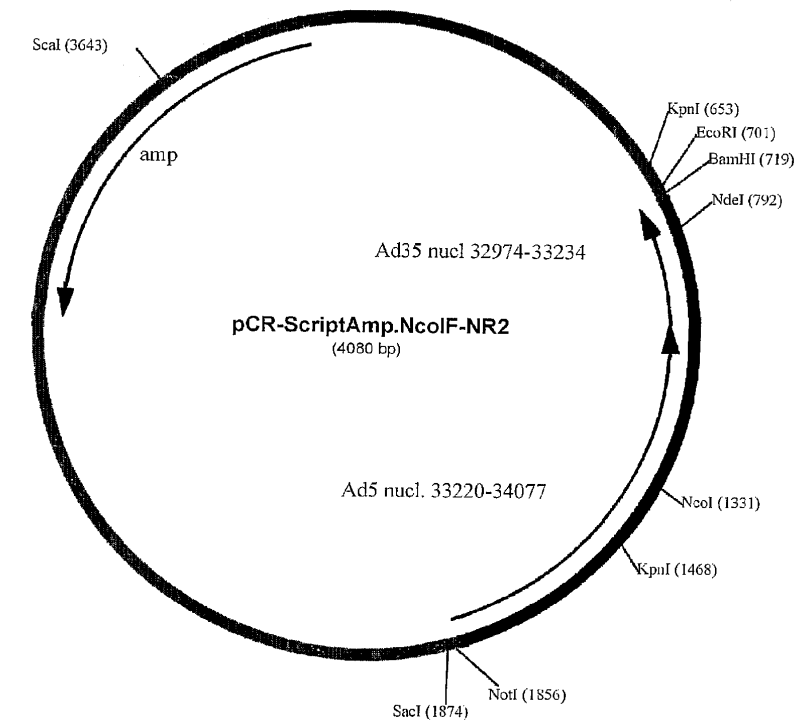
도면17



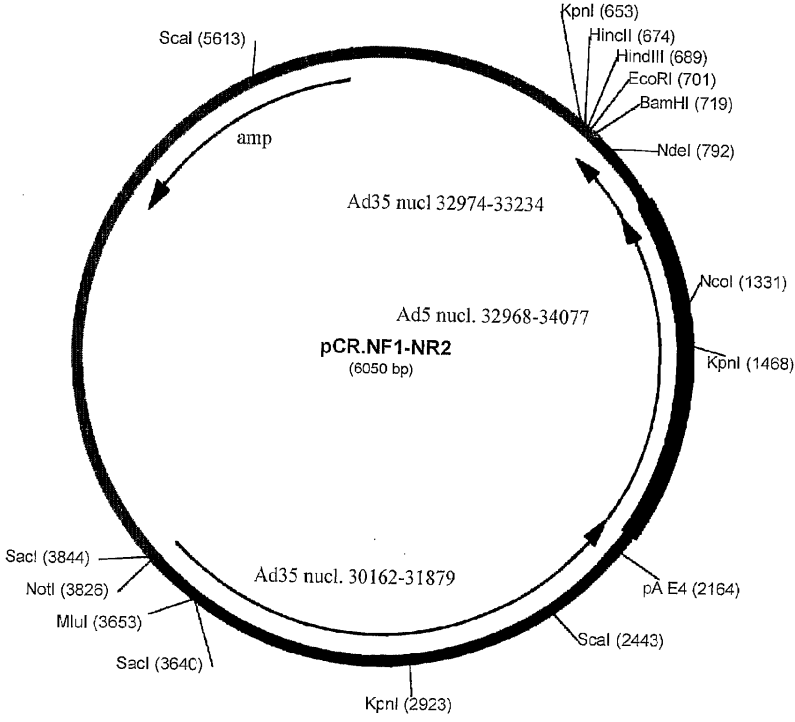
도면18



도면19



도면20



도면21

```

1  MTTSGVFPFGMTLRPTSRRLSRRTPYSRDLRPPFET-ETRAFILEDHPLELP Ad5.E4-ORF6.PRO
1  MTTSGVFPFGMTLRPTSRRLSRRTPYSRDLRPPFET-ETRAFILEDHPLELP Orf6 aaseq in Ad35.PR.50orf6.PRO
1  MTS[S]SIMTR-LR[ARSTSCA]RHHPY[TE]QLP[EC]ENETRA[SMTE]DHPLELP Ad35.E4-ORF6.PRO

50  ECNTITMENVSYYRGLPCSVGFITLIQEWVVPWDMVLTRBELVILRKCMHV Ad5.E4-ORF6.PRO
50  ECNTITMENVSYYRGLPCSVGFITLIQEWVVPWDMVLTRBELVILRKCMHV Orf6 aaseq in Ad35.PR.50orf6.PRO
50  [D][D][T]MTH[S]YS[C]VRGLPC[S][AS]FT[V]I[Q]E[L]P[I]PWDM[F]L[N]EEL[R]I[M]R[CMH] Ad35.E4-ORF6.PRO

100  CLCCANIDIAHSMNIEGYESWALHCHCSPGSSQCIAGGQVLASWFRMVV Ad5.E4-ORF6.PRO
100  CLCCANIDIAHSMNIEGYESWALHCHCSPGSLQCCAGGQVLASWFRMVV Orf6 aaseq in Ad35.PR.50orf6.PRO
100  CLCCA[T]ID-[F]H[S]Q[V]I[H]G[E][N]X[V]LHCHC[N]Q[Q]GSSQ[C]IAGG[A]VLAV[W]FR[R]V[I] Ad35.E4-ORF6.PRO

150  DGAWPNQR7IYREVVVYNMFKEVMPVSSVFNHGRHLIYLRLNYCGHVG Ad5.E4-ORF6.PRO
150  DGAWPNQR7IYREVVVYNMFKEVMPVSSVFNHGRHLIYLRLNYCGHVG Orf6 aaseq in Ad35.PR.50orf6.PRO
150  [L][G][M]NQR[C]WYR[Q]V[N]M[H]M>3FE[T]M[V]S[V]F[H]R[HLIY]I[R]L[Y]CGH[A] Ad35.E4-ORF6.PRO

210  VVFANSFGYSALHCGILNNIVVLCCSYCADISEIRVRCARRTRRLMLRA Ad5.E4-ORF6.PRO
260  VVFANSFGYSALHCGILNNIVVLCCSYCADISEIRVRCARRTRRLMLRA Orf6 aaseq in Ad35.PR.50orf6.PRO
260  [I-S]DMSFG[MSA][FN]G[S]LNNIV[IMC][CYC]DISRI[R]RCCAH[TRR]LMLRA Ad35.E4-ORF6.PRO

250  VRTIAEETTA--KLYSCRIERRRQQFIRAILCHEHRPILMEDYDS--TDM Ad5.E4-ORF6.PRO
250  VRTIAEETTA--KLYSCRIERRRQQFIRAILCHEHRPILMEDYDS--TDM Orf6 aaseq in Ad35.PR.50orf6.PRO
250  [I]K[I]LQZEVDPDZIN[S]RIERRRQ[R]L[L]V[G]L[H]H[V]R[P]I[P]S[D]YDS[H]R[S]S[E] Ad35.E4-ORF6.PRO

```

주 '주 #1' : Ad5.E4-ORF6.PRO과 구별되는 박스 잔기

도면22

```

1  MTTSGVFPFGMTLRPTSRRLSRRTPYSRDLRPPFET-ETRA Ad5.E4-ORF6+7.PRO
1  MTTSGVFPFGMTLRPTSRRLSRRTPYSRDLRPPFET-ETRA Orf6+7 aaseq in Ad35.PR50orf6.PRO
1  MTS[G]N-SIMTRLR[ARSTSCA]RHHPY[TE]QLP[EC]ENETRA Ad35.E4-ORF6+7.PRO

40  FILEDHPLELPECNCLIMHNAWTSESEPPVKQPQVGQQEVAAQ Ad5.E4-ORF6+7.PRO
40  FILEDHPLELPECNCLIMHNAWTSESEPPVKQPQVGQQEVAAQ Orf6+7 aaseq in Ad35.PR50orf6.PRO
40  [SM]TEDHPLELP[D][D][T]MTH[SMTE]QT[P]-----ESH[P]Q Ad35.E4-ORF6+7.PRO

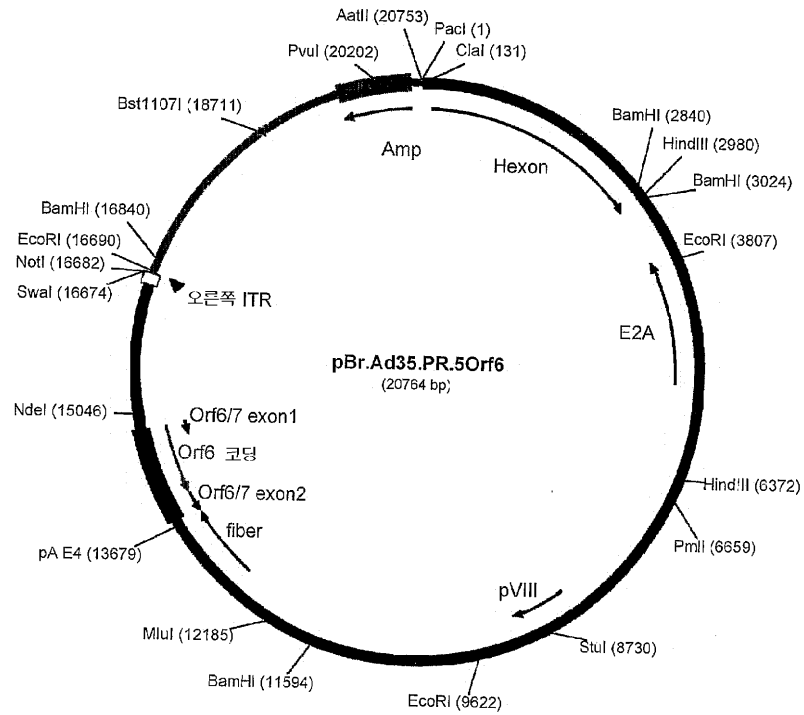
80  QLDSDMNLSELPGEFINITDEELARQETVWNITPKNMSVT Ad5.E4-ORF6+7.PRO
80  QLDSDMNLSELPGEFINITDEELARQETVWNITPKNMSVT Orf6+7 aaseq in Ad35.PR50orf6.PRO
71  QLD[CESA]L[KLYRDC]F[S]ITD[P]RLAR[SE]TVWN[VES]K[T]MS[IS] Ad35.E4-ORF6+7.PRO

120  HDMMPKASRGERTVYSVVWEGGGRLNTRVI Ad5.E4-ORF6+7.PRO
120  HDMMPKASRGERTVYSVVWEGGGKITTRIL Orf6+7 aaseq in Ad35.PR50orf6.PRO
111  [NGI]QWPKA[V]RGER[V]YSVVWEGGGKILQTRIL Ad35.E4-ORF6+7.PRO

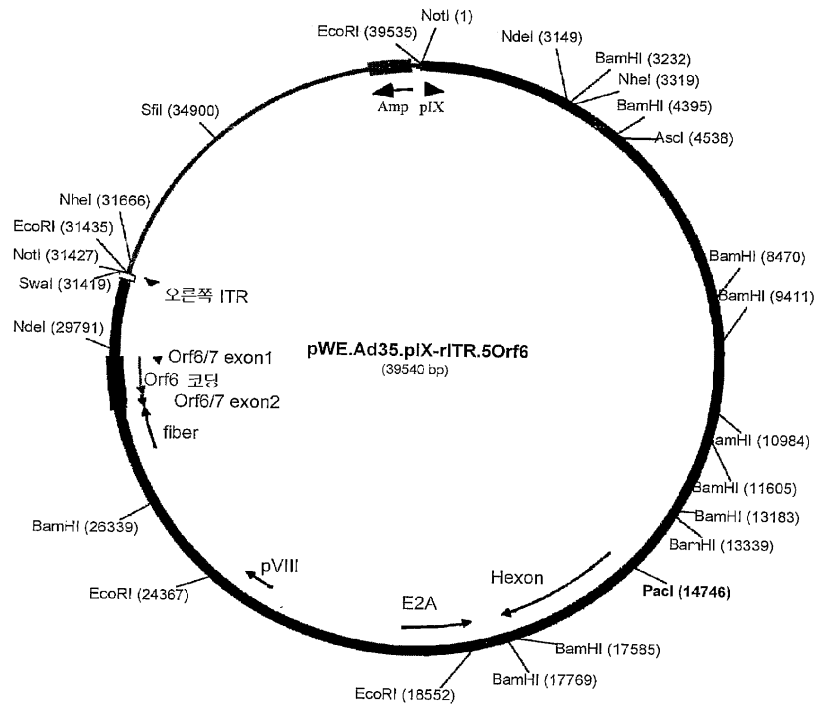
```

주 '주 #1' : Ad5.E4-ORF6+7.PRO과 구별되는 박스 잔기

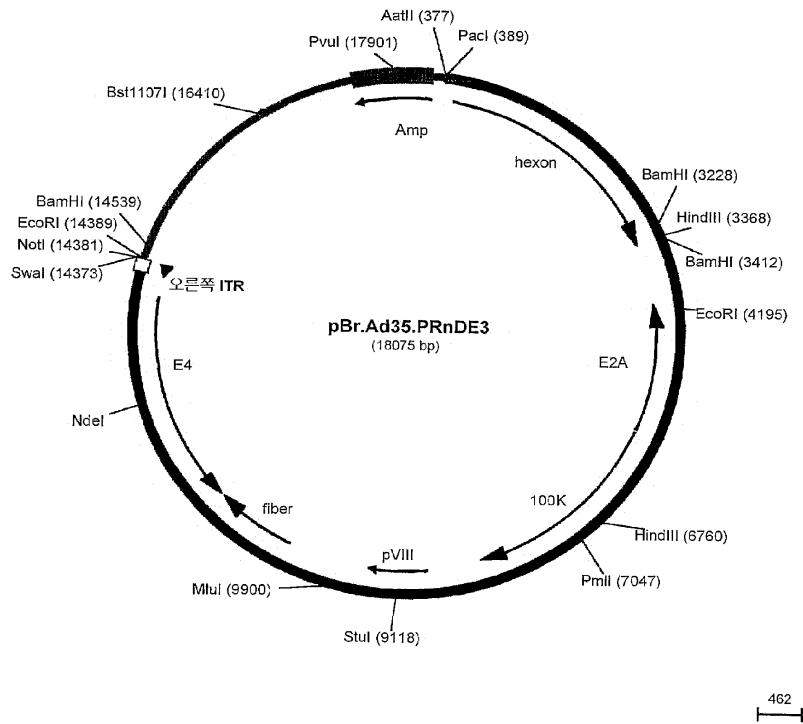
도면23



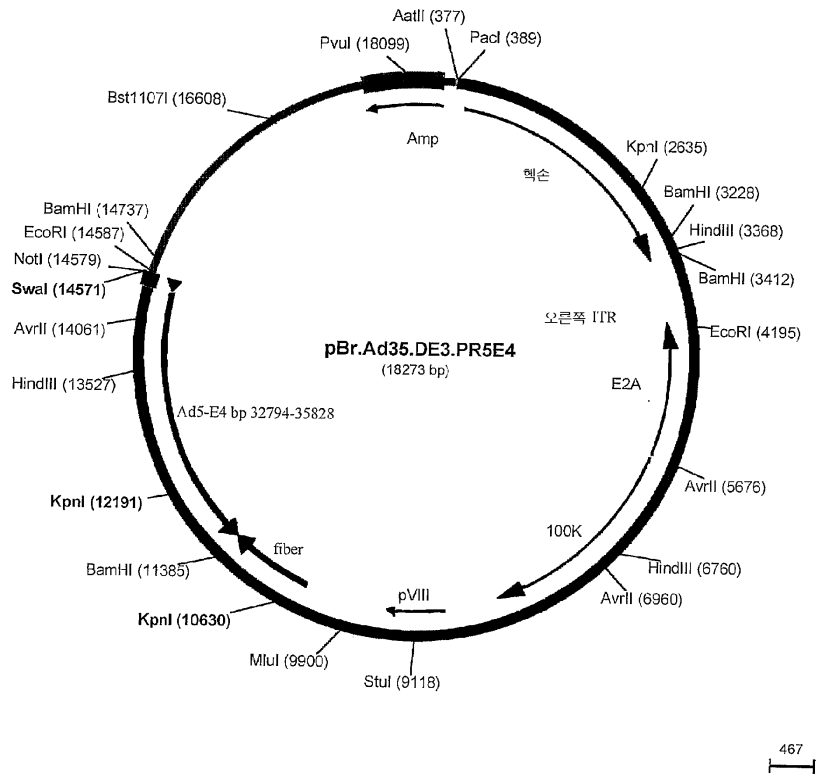
도면24



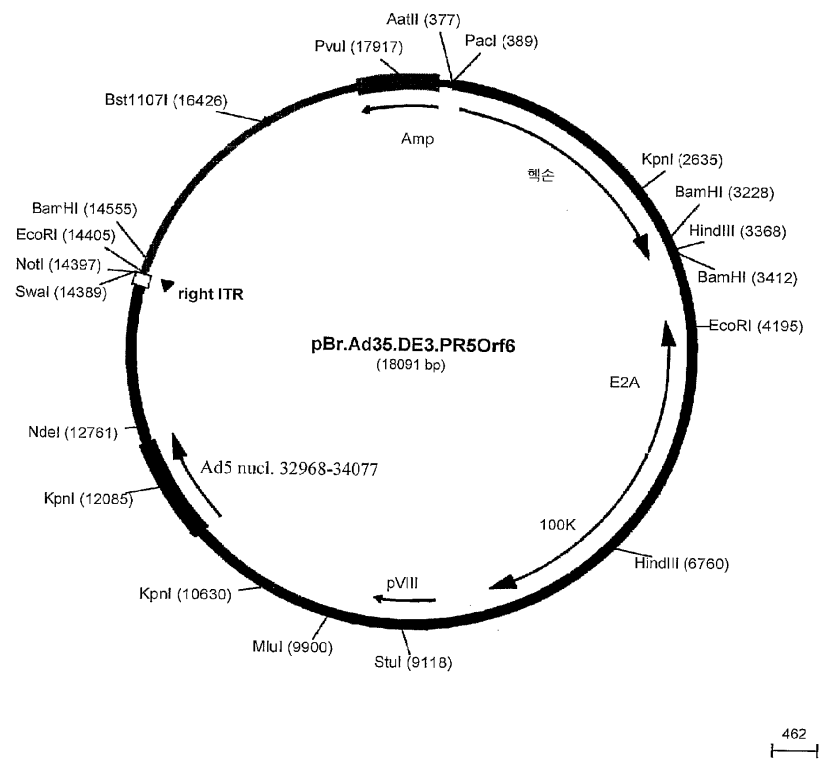
도면25



도면26

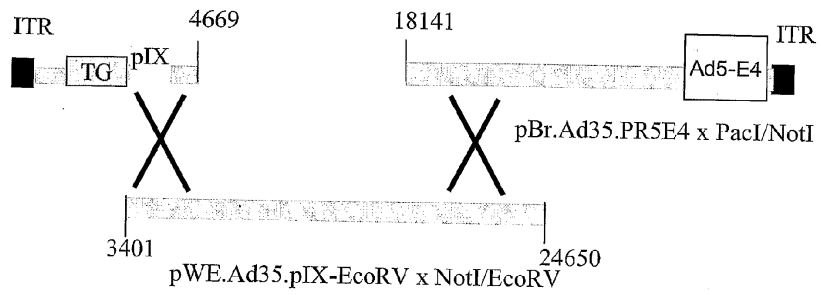


도면27

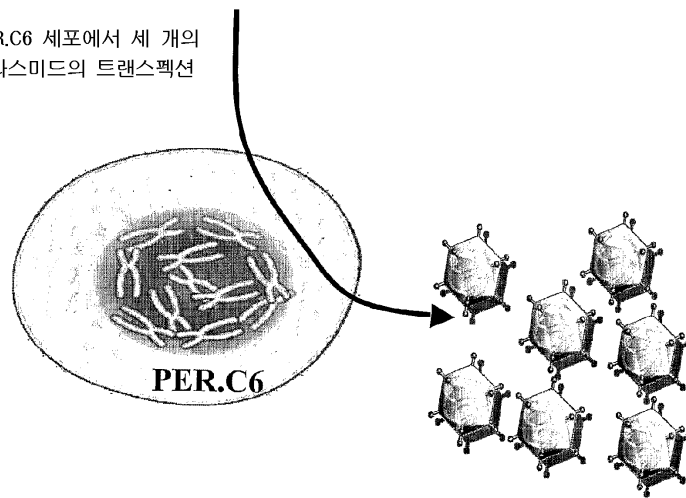


도면28

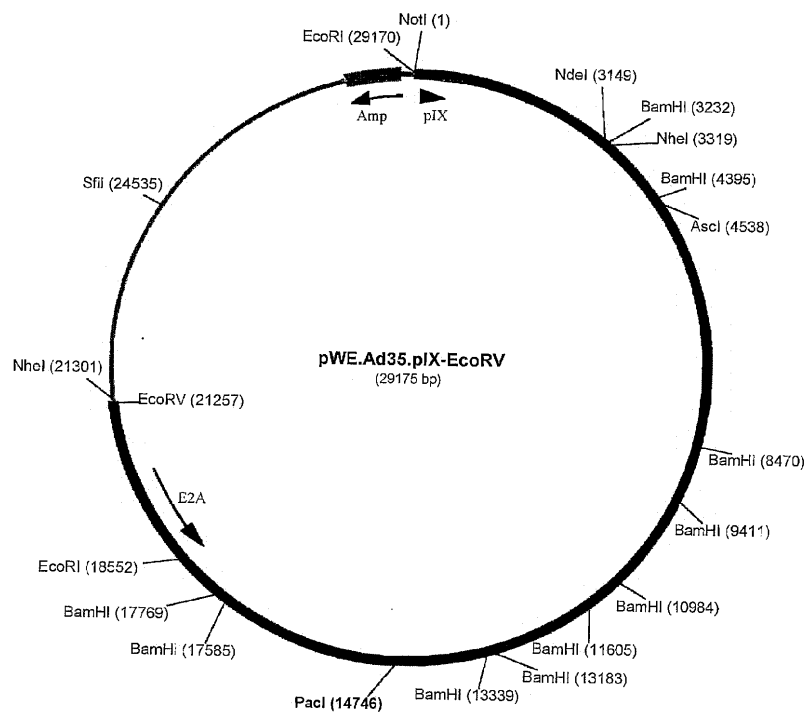
PER.C6 세포에서 이중의 이중성 재조합에 의한
E1-결손 Ad35 벡터의 생성



PER.C6 세포에서 세 개의
플라스미드의 트랜스팩션

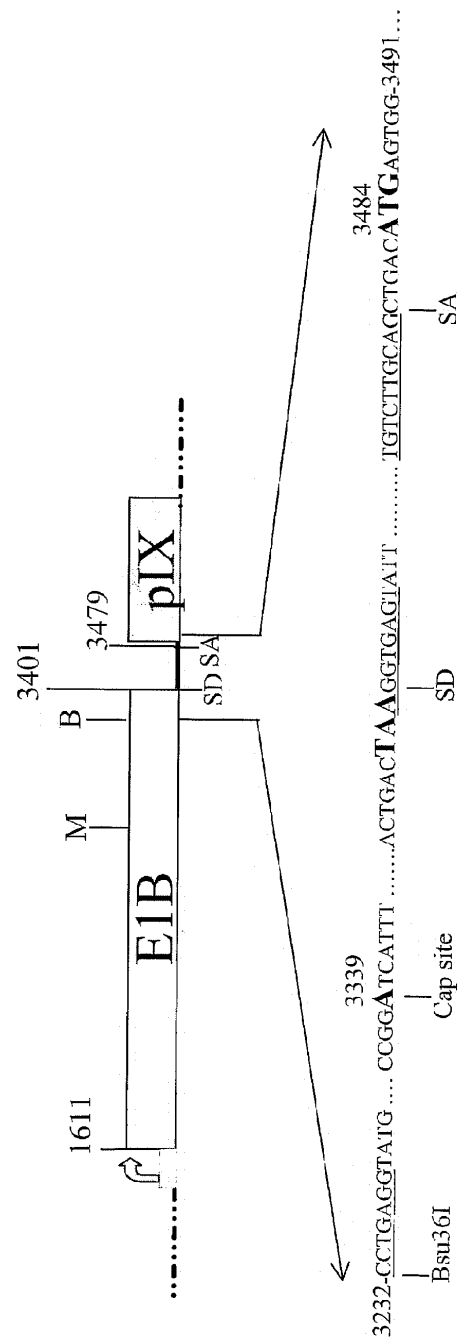


도면29

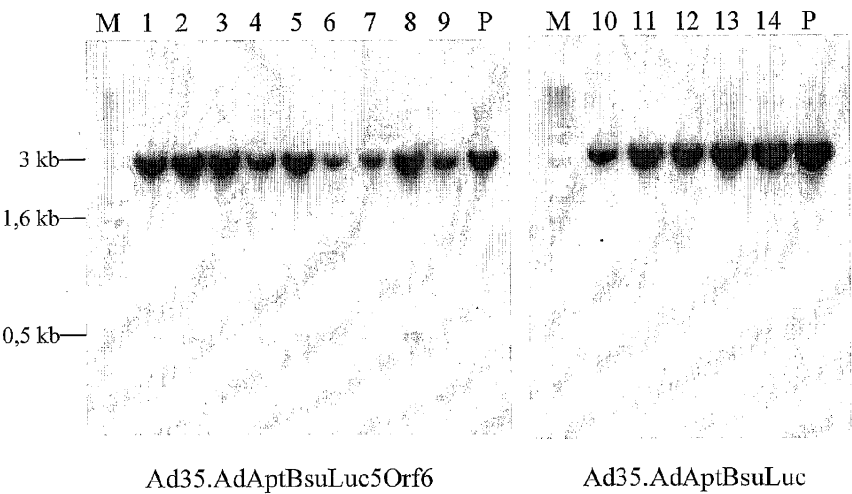


	10	20	30	40	50	60	70
Ad11.p1X cDNA.SEQ	CGACTCAGACACAGACACTGACATGACATCAACAGCTACGAAATCACTTGGTTATTCGCGACATGGACACAGCTT						
Ad35.c1one 3-4.SEQ	CGACTCAGACACAGACACTGACATGACATCAACAGCTACGAAATCACTTGGTTATTCGCGACATGGACACAGCTT						
Ad35 wt 3339-3628.SEQ	CGACTCAGACACAGACACTGACATGACATCAACAGCTACGAAATCACTTGGTTATTCGCGACATGGACACAGCTT						
Ad11.p1X cDNA.SEQ	CGACTCAGACACAGACACTGACATGACATCAACAGCTACGAAATCACTTGGTTATTCGCGACATGGACACAGCTT						
Ad35.c1one 3-4.SEQ	CGACTCAGACACAGACACTGACATGACATCAACAGCTACGAAATCACTTGGTTATTCGCGACATGGACACAGCTT						
Ad35 wt 3339-3628.SEQ	CGACTCAGACACAGACACTGACATGACATCAACAGCTACGAAATCACTTGGTTATTCGCGACATGGACACAGCTT						
Ad11.p1X cDNA.SEQ	CGACTCAGACACAGACACTGACATGACATCAACAGCTACGAAATCACTTGGTTATTCGCGACATGGACACAGCTT						
Ad35.c1one 3-4.SEQ	CGACTCAGACACAGACACTGACATGACATCAACAGCTACGAAATCACTTGGTTATTCGCGACATGGACACAGCTT						
Ad35 wt 3339-3628.SEQ	CGACTCAGACACAGACACTGACATGACATCAACAGCTACGAAATCACTTGGTTATTCGCGACATGGACACAGCTT						
Ad11.p1X cDNA.SEQ	CGACTCAGACACAGACACTGACATGACATCAACAGCTACGAAATCACTTGGTTATTCGCGACATGGACACAGCTT						
Ad35.c1one 3-4.SEQ	CGACTCAGACACAGACACTGACATGACATCAACAGCTACGAAATCACTTGGTTATTCGCGACATGGACACAGCTT						
Ad35 wt 3339-3628.SEQ	CGACTCAGACACAGACACTGACATGACATCAACAGCTACGAAATCACTTGGTTATTCGCGACATGGACACAGCTT						

도면31



도면32



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Crucell Holland B.V.
Vogels, Ronald
Havenga, Menzo J.E.
Zuijdgeest, David A.T.M.
- <120> Stable adenoviral vectors and methods for propagation thereof
- <130> 0076W0000RD
- <150> EP02102631.5
<151> 2002-11-25
- <150> PCT/NL02/00281
<151> 2002-04-25
- <150> PCT/NL02/00656
<151> 2002-10-15
- <160> 65
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
<211> 31
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer 35FR

<400> 1

cgggatccac tttatttttag ttgtcgtctt c

31

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer 35R4

<400> 2

cggaattctt aattaaggga aatgcaaatc tgtgagg

37

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer 35psi-For

<400> 3

gtggtattta tggcagggtg

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer DF35-1

<400> 4

cactcaccac ctccaattcc

20

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer 5E4F

<400> 5
 cgggatccgt ttgtgttatg tttcaacgtg 30

<210> 6
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer 5E4R

<400> 6
 gctggcgagc tcggcggagt aacttgtag tg 32

<210> 7
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer 355ITR

<400> 7
 gatccggagc tcacaacgtc attttccac g 31

<210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer 353ITR

<400> 8

aggaattcgc ggccgcattt aaatc 25

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer E4-F1

<400> 9
agaggaaacac attcccc 18

<210> 10
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer E4-R2

<400> 10
ggggagaaag gactgtgtat tctgtcaaat gg 32

<210> 11
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer E4-F3

<400> 11
tttgacagaa tacacagtcc tttctccccg gctgg 35

<210> 12
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> primer E4-R4

<400> 12

acaaaatacg agaatagacta cgtccggcgt tcc

33

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer E4-F5

<400> 13

ggacgtagtc attctcgat tttgtatagc

30

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer E4-R6

<400> 14

tcaccaacac agtggggg

18

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer NF-1

<400> 15

ccacaacccc cactactccc

20

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer NR-2

<400> 16

cgtctcttcc ctctctctc c

21

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer NcoI-R

<400> 17

aggatcatcc gctgctgcc

20

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer NcoI-F

<400> 18

catcaggata gggcgggtgg

19

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer 35E3for

<400> 19

aatgactaat gcaggtgcgc

20

<210> 20
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer 35E3rev

<400> 20
 cgacgcgttg tagtcgttga gcttctag 28

<210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer AdApt35CMVF

<400> 21
 gtaggtgtca gcctaggtgg tc 22

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer 35pIXR

<400> 22
 tcatgtcagc tgcaagacag 20

<210> 23
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer SV40for

<400> 23

caatgtatct tatcatgtct ag 22

<210> 24
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer pIX5Rmfe

<400> 24
ctctctcaat tgcagataca aaactacata agacc 35

<210> 25
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer pIX35Fmfe

<400> 25
ctctctcaat tgcctgtctt gcagctgaca tg 32

<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer AdApt35pIXr

<400> 26
caatctgtcc atctgaaaat cc 22

<210> 27
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> primer pIXcosF-2

<400> 27

ctgctggacg tcgcgccgc gacatgagtg gaaatgcttc

40

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer Adapt35-3

<400> 28

tgcaaactg tgaggggaac

20

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer 35D21

<400> 29

ttagatccat ggatcccgca gactc

25

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer 35B3

<400> 30

cctcagcccc atttcag

18

<210> 31

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer 35F1

<400> 31

cggaattctt aattaatcga catcatcaat aatatacctt atag

44

<210> 32

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer 35R4

<400> 32

cggaattctt cttaattaag ggaaatgcaa atctgtgagg

40

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer Ad3555KMfeF

<400> 33

aaccaagctt caattgtctc tgaa

24

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer Ad35pIXNcoR

<400> 34

ccacccatgg cagctgcaag acag

24

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

<220>
 <223> primer Ad35pIXrev

<400> 35
 tcagctgcaa gacagaaaaa ac 22

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

<220>
 <223> primer Epr-F

<400> 36
 gtgtttactt aagtgacgt c 21

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

<220>
 <223> primer Epr-R

<400> 37
 gaaagccagc tcctatgagc 20

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

<220>
 <223> primer pIXrev

<400> 38

ggcgggttga acgggtcttc ca 22

<210> 39
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer pIXrev-N2

<400> 39
gatgggagac gccctgtcag ataagg 26

<210> 40
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer 35E1Blong

<400> 40
aaggtgacgt caatatttgt gtg 23

<210> 41
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer Ad35E1bpromrev

<400> 41
atgaaagcca gctcctatga g 21

<210> 42
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> primer pIXrev-Ad5

<400> 42

aggggaggaa gccttcagg

19

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer Bsu55KF

<400> 43

aggtgggcgt agaggaatg

19

<210> 44

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer Age-pIXR

<400> 44

caagacggga tcttggcgg

19

<210> 45

<211> 102

<212> DNA

<213> Adenovirus type 2

<220>

<221> misc_feature

<223> Ad2 proximal pIX upstream sequence

<220>

<221> E1B 55K stopcodon

<222> (1)..(3)

<220>

<221> Spl site

<222> (18)..(24)

<220>

<221> TATA_signal

<222> (45)..(51)

<220>

<221> pIX startcodon

<222> (99)..(102)

<400> 45

tgaggtactg aaatgtgtgg gcgtggctta aggggtgggaa agaatatata aggtgggggt 60

ctcatgtagt ttgtatctg ttttcagca gccgccgcca tg 102

<210> 46

<211> 105

<212> DNA

<213> Adenovirus type 5

<220>

<221> misc_feature

<223> Ad5 proximal pIX upstream sequence

<220>

<221> E1B 55K stopcodon

<222> (1)..(3)

<220>

<221> Spl site

<222> (18)..(24)

<220>

<221> TATA_signal

<222> (45)..(51)

<220>

<221> pIX startcodon

<222> (103)..(105)

<400> 46

tgaggtactg aaatgtgtgg gcgtggctta aggggtgggaa agaatatata aggtgggggt 60

cttatgtagt ttgtatctg ttttgcagca gccgccgccg ccatg 105

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

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

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

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

<400> 47
 tgaggtaagt ggggtggagct aggtgggatt ataaaaggct ggaagtcaac taaaaattgt 60

ttttgttctt ttaacagcac gatg 84

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

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

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

<220>
 <221> pIX startcodon

<222> (91)..(93)

<400> 48

tagaggtagg tcgagtgagt agtgggcgtg gctaaggtga ctataaaggc ggggtgtctta 60

cgagggtctt ttigtctttc tgcagacatc atg 93

<210> 49

<211> 73

<212> DNA

<213> Adenovirus type 40

<220>

<221> misc_feature

<223> Ad40 proximal pIX upstream sequence

<220>

<221> E1B 55K stopcodon

<222> (1)..(3)

<220>

<221> pIX startcodon

<222> (71)..(73)

<400> 49

taagggtaaag gggcggagcc tattacaggt ataaaggttg gggtagagta aaaaaaagg 60

aagttacaaa atg 73

<210> 50

<211> 90

<212> DNA

<213> Adenovirus type 4

<220>

<221> misc_feature

<223> Ad4 proximal pIX upstream sequence

<220>

<221> E1B 55K stopcodon

<222> (1)..(3)

<220>

<221> pIX startcodon

<222> (88)..(90)

<400> 50

tagagtgagt agtgttctgg ggcgggggag gacctgcatg agggccagaa taactgaaat 60

ctgtgctttt ctgtgtgttg cagcagcatg 90

<210> 51

<211> 90

<212> DNA

<213> simian Adenovirus type 25

<220>

<221> misc_feature

<223> sAd25 proximal pIX upstream sequence

<220>

<221> E1B 55K stopcodon

<222> (1)..(3)

<220>

<221> pIX startcodon

<222> (88)..(90)

<400> 51

tagagtgagt agtgttctgg ggcgggggag gacctgcatg agggccagaa taactgaaat 60

ctgtgctttt ctgtgtgttg cagcagcatg 90

<210> 52

<211> 89

<212> DNA

<213> Adenovirus type 35

<220>

<221> misc_feature

<223> Ad35 proximal pIX upstream sequence

<220>

<221> E1B 55K stopcodon

<222> (1)..(3)

<220>

<221> pIX startcodon

<222> (87)..(89)

<400> 52

taaggtgagt attgggaaaa ctttgggggtg ggattttcag atggacagat tgagtaaaaa 60

tttgtttttt ctgtcttgca gctgacatg 89

<210> 53

<211> 89

<212> DNA

<213> Adenovirus type 11

<220>

<221> misc_feature

<223> Ad11 proximal pIX upstream sequence

<220>

<221> E1B 55K stopcodon

<222> (1)..(3)

<220>

<221> pIX stopcodon

<222> (87)..(89)

<400> 53

taaggtgagt attgggaaaa ctttgggggtg ggattttcag atggacagat tgagtaaaaa 60

tttgtttttt ctgtcttgca gctgtcatg 89

<210> 54

<211> 100

<212> DNA

<213> Adenovirus type 7

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

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

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

<400> 54
 taaagtaagt agtgggggca aaatgtggat ggggactttc aggttggtaa ggtggacaaa 60

 ttgggtaaat ttgtttaatt tctgtcttgc agctgccatg 100

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

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

<400> 55
 aataaaaata tgtaaactgt tcaactggttt ttattgcttt ttgggcgggg actcaggtat 60

 ataagtagaa gcagacctgt gtggtagct cataggagct ggctttcatc catggaggtt 120

 tgggccattt tggaagacct taggaagact aggcaactgt tagagagcgc ttcggacgga 180

 gtctccggtt ttiggagatt ctggttcgct agtgaattag ctagggtagt ttttaggata 240

 aaacaggact ataaacaaga atttgaaaag ttgttggttag attgccagg actttttgaa 300

 gctcttaatt tgggccatca ggttcacttt aaagaaaaag ttttatcagt tttagacttt 360

tcaacccag gtagaactgc tgctgctgtg gcttttctta cttttatatt agataaatgg	420
atcccgaga ctcatctcag caggggatac gttttggatt tcatagccac agcattgtgg	480
agaacatgga aggttcgcaa gatgaggaca atcttaggtt actggccagt gcagcctttg	540
ggtgtagcgg gaatcctgag gcatccaccg gtcattgccag cgtttctgga ggaggaacag	600
caagaggaca acccgagagc cggcctggac cctccagtgg aggaggcgga gtagctgact	660
tgtctcctga actgcaacgg gtgcttactg gatctacgtc cactggacgg gataggggag	720
ttaagaggga gagggcatcc agtggctactg atgctagatc tgagttggct ttaagtttaa	780
tgagtgcag acgtcctgaa accatttggg ggcattgaggt tcagaaagag ggaagggatg	840
aagtttctgt attgcaggag aaatattcac tggaacaggt gaaaacatgt tggttggagc	900
cagaggatga ttgggcggtg gccattaaaa attatgcaa gatagctttg aggcctgata	960
aacagtataa gatcagtaga cggattaata tccggaatgc ttgttacata tctggaaatg	1020
gggctgaggt ggtaatatag actcaagaca agacagtat tagatgctgc atgatggata	1080
tgtggcctgg agtagtcggt atggaagcag tcacttttgt aaatgttaag tttaggggag	1140
atggttataa tggaatatgt tttatggcca ataccaaact tatattgcat ggtttgtagt	1200
tttttggtt caacaatacc tgtgtagatg cctggggaca ggtagtgta cgggggtgta	1260
gtttctatgc gtgttggtt gccacagctg gcagaaccaa gactcaattg tctctgaaga	1320
aatgcatatt ccaagatgt aacctgggca ttctgaatga aggcgaagca aggtccgtc	1380
actgcgttc tacagatact ggatgtttta ttttaattaa gggaaatgcc agcgtaaagc	1440
ataacatgat ttgtggtgct tccgatgaga ggccttatca aatgctcact tgtgctggtg	1500
ggcattgtaa tatgctggct actgtgcata ttgtttccca tcaacgaaa aaatggcctg	1560

tttttgatca caatgtgttg accaagtgc ccatgcatgc aggtgggct agaggaatgt 1620
 ttatgcctta ccagtgtaac atgaatcatg tgaaagtgtt gttggaacca gatgcctttt 1680
 ccagaatgag cctaacagga atctttgaca tgaacacgca aatctggaag atcctgaggt 1740
 atgatgatac gagatcgagg gtgcgcgcat gcgaatgcgg aggcaagcat gccaggttcc 1800
 agccggtgtg tgiagatgtg accgaagatc tcagaccgga tcatttggtt attgcccga 1860
 ctggagcaga gttcggatcc agtggagaag aaactgacta aggtgagtat tgggaaaact 1920
 ttggggtggg attttcagat ggacagattg agtaaaaatt tgttttttct gtcttcgacg 1980
 tgacatgagt ggaaatgctt cttttaaggg gggagtcttc agcccttacc tgacagggcg 2040
 tctcccatcc tgggcaggag ttctgcagaa tgttatggga tctactgtgg atggaagacc 2100
 cgttcaacce gccaatcttt caacgtgac ctatgtact ttaagttctt cacctttgga 2160
 cgcagctgca gccgctgccg ccgctctgt cgccgtaac actgtgcttg gaatgggtta 2220
 ctatggaagc atcgtggcta attccacttc ctctaataac cttctacac tgactcagga 2280
 caagttactt gtccttttgg cccagctgga ggctttgacc caacgtctgg gtgaactttc 2340
 tcagcaggtg gccgagtgc gagtacaaac tgagtctgct gtcggcacgg caaagtctaa 2400
 ataaaaaaaa ttccagaatc aatgaataaa 2430

<210> 56
 <211> 2429
 <212> DNA
 <213> Adenovirus type 11

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Ad11 E1B-pIX region

<400> 56
aataaaaata tgtaactgt tcaactggttt ttattgcttt ttgggcgggg actcaggtat 60

ataagtagaa gcagacctgt gtggttagct cataggagct ggctttcatc catggaggtt 120

tgggccattt tggaagacct taggaagact aggcaactgt tagagaacgc ttcggacgga 180

gtctccggtt ttggagatt ctggttcgct agtgaattag ctagggtagt ttttaggata 240

aaacaggact ataaacaaga atttgaaaag ttgttggtag attgccagg actttttgaa 300

gctcttaatt tgggccatca ggttcacttt aaagaaaaag ttttatcagt tttagacttt 360

tcaacccag gtagaactgc tgctgctgtg gcttttctta cttttatatt agataaatgg 420

atcccgaga ctcatctcag caggggatac gttttggatt tcatagccac agcattgttg 480

agaacatgga aggttcgcaa gatgaggaca atcttaggtt actggccagt gcagcctttg 540

ggtgtagcgg gaatcctgag gcatccaccg gtcattgccag cggttctgga ggaggaacag 600

caagaggaca acccgagagc cggcctggac cctccagtgg aggaggcgga gtagctgact 660

tgtctctga actgcaacgg gtgcttactg gatctacgtc cactggacgg gataggggcg 720

ttaagaggga gagggcatct agtggtagct atgctagatc tgagttggct ttaagttaa 780

tgagtgcag acgtcctgaa accatttggg ggcattaggt tcagaaagag ggaagggatg 840

aagtttctgt attgcaggag aaatattcac tggaacaggt gaaaacatgt tggttggagc 900

ctgaggatga ttgggaggtg gccattaaaa attatgcaa gatagctttg aggcctgata 960

aacagtataa gattactaga cggattaata tccggaatgc ttgttacata tctggaaatg 1020

gggctgaggt ggtaatagat actcaagaca aggcagttat tagatgctgc atgatggata 1080

tgtggcctgg ggtagtcggt atggaagcag taacttttgt aaatgttaag tttaggggag 1140
 atggttataa tggaatagtg tttatggcca ataccaaact tataatgcat ggtttagct 1200
 tttttggttt caacaatacc tgtgtagatg cctggggaca ggtagtgta cggggatgta 1260
 gtttctatgc gtgttgatt gccacagctg gcagaaccaa gagtcaattg tctctgaaga 1320
 aatgcatatt tcaaagatgt aacctgggca tttgaaatga aggcgaagca aggtccgcc 1380
 actgcgttc tacagatact ggatgtttta tttgattaa gggaaatgcc agcgtaaagc 1440
 ataacatgat ttgcggtgct tccgatgaga ggccttatca aatgctcact tgtgctggtg 1500
 ggcatgttaa tatgctggct actgtgcata ttgtttccca tcaacgcaa aaatggcctg 1560
 tttttgatca caatgtgatg acgaagtgt ccatgcatgc aggtgggct agaggaaatg 1620
 ttatgcctta ccagtgtaac atgaatcatg tgaagtgtt gttggaacca gatgccttt 1680
 ccagaatgag cctaacagga atttttgaca tgaacatgca aatctggaag atcctgaggt 1740
 atgatgatac gagatcgagg gtacgcgcat gcgaatcggg aggcaagcat gccaggttc 1800
 agccggtgtg tgiagatgtg actgaagatc tcagaccgga tcatttggtt attgcccga 1860
 ctggagcaga gticggatcc agtggagaag aaactgacta agtgagtat tgggaaaact 1920
 ttgggtggg attttcagat ggacagattg agtaaaaatt tgtttttct gtcttcagc 1980
 tgtcatgagt ggaaacgctt cttttaaggg gggagtcttc agcccttctc tgacaggcg 2040
 tctccatcc tgggcaggag ttctgcagaa tgttatggga tctactgtg atggaagacc 2100
 cgtccaacc gccaatctt caacgtgac ctatgtact ttaagttctt cacctttgga 2160
 cgcagctgca gctgccgccc ccgttctgt tgcgctaac actgtgctt gaatgggtta 2220
 ctatggaagc atcatggeta attccattc ctctaataac cttctaccc tgactcagga 2280

caagttactt gtccttttgg ccagctgga ggctttgacc caacgtctgg gtgaactttc 2340

tcagcagggtg gtcgagttgc gagtacaaac tgagtctgct gtcggcacgg caaagtcctaa 2400

ataaaaaaat ccagaaatca atgaataaa 2429

<210> 57

<211> 2426

<212> DNA

<213> Adenovirus type 7

<220>

<221> misc_feature

<223> Ad7 E1B-pIX region

<400> 57

aataaaaatta tgcagctgc tgagtgtttt attacttctt ggggtggggtc ttggatatat 60

aagtaggagc agatctgtgt ggtagctca cagcaacttg ctgccatcca tggaggtttg 120

ggctatcttg gaagacctca gacagactag gctactacta gaaaacgcct cggacggagt 180

ctctggcctt tggagattct gggtcgggtg tgatctagct aggctagtgt ttaggataaa 240

acaggactac agggaagaat ttgaaaagt attggacgac attccaggac tttttgaagc 300

tcctaaacttg ggccatcagg ctcatittta ggagaagggt ttatcagttt tagatttttc 360

tactctggt agaactgctg ctgctgtagc ttttcttact tttatattgg ataaatggat 420

ccgccaaact cacttcagca agggatacgt ttggatttc atagcagcag ctttgtggag 480

aacatggaag gctcgcagga tgaggacaat cttagattac tggccagtgc agcctctggg 540

agtagcagg atactgagac acccaccgac catgccagcg gttctgcagg aggagcagca 600

ggaggacaat ccgagagccg gcctggacc tccggtggag gagtagctga cctgtttcct 660

gaactgcgac gggtgcttac taggtctacg accagtggac agaacagggg aattaagagg 720

gagaggaatc ctagtgggaa taattcaaga accgagttgg ctttaagttt aatgagccgc 780

aggcgtcctg aaactgtttg gtggcatgag gttcagagcg aaggcagggg tgaagtttca 840

atattgcagg agaaatattc actagaacaa ctttaagacct gttggttgga acctgaggat 900

gattgggagg tggccattag gaattatgct aagatatctc tgaggcctga taaacaatat 960

agaattacta agaagattaa tattagaaat gcatgctaca tatcaggga tggggcagag 1020

gttataatag atacacaaga taaagcagct tttagatgtt gtatgatggg tatgtggcca 1080

ggggttgtcg gcatggaagc aataacactt atgaatatta ggttttagagg gcatgggtat 1140

aatggcattg tatttatggc taacactaag ctgattctac atggtttag cttttttggg 1200

tttaataata cgtgtgtaga agcttggggg caagttagtg tgagggttg tagtttttat 1260

gcatgctgga ttgcaacatc aggtaggggtg aagagtcagt tgtctgtgaa gaaatgcatg 1320

tttgagagat gtaatcttgg catactgaat gaaggtgaag caagggtccg ccactgcgca 1380

gctacagaaa ctgcctgctt cattctaata aagggaatg ccagtgtgaa gcataatatg 1440

atctgtggac attcggatga gaggccttat cagatgctaa cctgcgctgg tggacattgc 1500

aatattcttg ctaccgtgca tatcgtttca catgcacgca agaaatggcc tgtatttgaa 1560

cataatgtga ttaccaagtg caccatgcat ataggtggtc gcagggaat gtttatgcct 1620

taccagtgtg acatgaatca tgtgaaggta atgttggaac cagatgcctt ttccagagtg 1680

agcgtaacag gaatctttga tatgaatatt caactatgga agatcctgag atatgatgac 1740

actaaaccaa gggtagcgcg atgcgaatgc ggaggcaagc atgctagatt ccagccggtg 1800

tgctgggatg tgactgaaga cctgaggccc gatcatttgg tgcttgctg cactggagcg 1860

gagttcgggt ctagtggtga agaaactgac taaagtaagt agtgggggca aaatgtggat 1920

ggggactttc aggttggtaa ggtggacaaa ttgggtaaat tttgttaatt tctgtcttgc 1980

agctgccatg agtgggaagcg cttcttttga ggggggagta tttagccctt atctgacggg 2040

caggctccca ccatgggcag gagttcgtca gaatgtcatg ggatccactg tggatgggag 2100

accgtccag cccgccaatt cctcaacgct gacctatgcc actttgagtt cgtcaccatt 2160

ggatgcagct gcagccgccc cgcctactgc tgccgccaac accatccttg gaatgggcta 2220

ttacggaagc attgttgcca attccagttc ctctaataat ccttcaacce tggctgagga 2280

caagctactt gttctcttgg ctcagctcga ggccttaacc caacgcttag gcgaactgtc 2340

taagcaggtg gccagttgc gtgagcaaac tgagtctgct gttgccacag caaagtctaa 2400

ataaagatct caaatcaata aataaa 2426

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

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

<400> 58
 cgactggagc acgaggacac tgacatggac tgaaggagta gaaatcattt ggttattgcc 60

cgcactggag cagagttcgg atccagtgga gaagaaactg actaagctgt catgagtgga 120

aacgcttctt ttaagggggg agtcttcagc ccttatctga cagggcgtct cccatcctgg 180

gcaggagtgc gtcagaatgt tatgggatct actgtggatg gaacaccgct tcaaccgcgc 240

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

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

<400> 59
 ggacactgac atggactgaa ggagtagaaa atcatttgggt tattgcccgc actggagcag 60

 agttcggatc cagtggagaa gaaactgact aagctgacat gattggaaat gcttctttta 120

 aggggggagt cttcagccct tatctgacag ggcgtctccc atcctgggca ggagtctgctc 180

 agaatgttat gggatctact gtggatggaa gacccgttca acccgcc 227

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

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

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

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

<400> 60
 atcatttgggt tattgcccgc actggagcag agttcggatc cagtggagaa gaaactgact 60

 aaggtgagta ttgggaaaac tttggggtgg gattttcaga tggacagatt gagtaaaaat 120

ttgttttttc tgtcttgcag ctgacatgag tggaaatgct tcttttaagg ggggagtctt 180
cagcccttat ctgacagggc gtctcccatc ctgggcagga gttcgtcaga atgttatggg 240
atctactgtg gatggaagac ccgttcaacc cgccaattct tcaacgctg 289

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

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

<400> 61

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Asp Ser Thr Pro Met
290

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

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

<400> 62

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 63

<211> 150

<212> PRT

<213> Adenovirus type 5

<220>

<221> misc_feature

<223> amino acid sequence of the E4-orf6+7 protein of Ad5

<400> 63

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Asn Thr Arg Val Leu
145 150

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

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

<400> 64

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Trp Glu Gly Gly Gly Lys Ile Thr Thr Arg Ile Leu

130

135

140

<210> 65

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequence of the E4-orf6+7 fusion protein from Ad5 and Ad35

<400> 65

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Gly Glu Arg Thr Val Tyr Ser Val Lys Trp Glu Gly Gly Gly Lys

130

135

140

Ile Thr Thr Arg Ile Leu
145 150