



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **334299**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 15/861 (2006.01)

A61K 39/235 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20045131	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2003.04.24 PCT/EP2003/50126
(22)	Inng.dag	2004.11.24	(85)	Videreføringsdag	2004.11.24
(24)	Løpedag	2003.04.24	(30)	Prioritet	2002.11.25, EP, 02102631 2002.04.25, WO, PCT/NL2002/00281 2002.10.15, WO, PCT/NL2002/00656
(41)	Alm.tilgj	2005.01.21			
(45)	Meddelt	2014.02.03			
(83)	Biol.mat. dep	ECACC P97082116, ECACC 02041226, ECACC 02041227, ECACC 02041228, ECACC 02041229			
(73)	Innehaver	Crucell Holland BV, Archimedesweg 4, NL-2333CN LEIDEN, Nederland			
(72)	Oppfinner	Ronald Vogels, Van Rietlaan 4, NL-3461HW LINSCHOTEN, Nederland Menzo Jans Emco Havenga, Wilhelmina Druckerstraat 66, NL-2401KG ALPHEN AAN DEN RIJN, Nederland David Adrianus Theodorus Maria Zuidgeest, Klimopstraat 85, NL-2565VH HAAG, Nederland			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Stabile adenovirale vektorer samt fremgangsmåter ved formering derav
(56)	Anførte publikasjoner	Babiss L.E. et al. Promoter of the adenovirus polypeptide IX gene: similarity to E1B and inactivation by substitution of the simian virus TATA element. J. Virol. 1991, Vol. 65, No. 2, side 598-605. WO 0070071 A1 Caravokyri C. and Leppart K. Constitutive episomal expression of polypeptide IX (pIX) in a 293-based cell line complements the deficiency of pIX mutant adenovirus type 5. J. Virol. 1995, Vol. 69, No. 11, side 6627-2233.
(57)	Sammendrag	

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer fremgangsmåter og midler for å øke stabiliteten og/eller pakkingskapasiteten for rekombinante adenoviruser ved overekspresjon av pIX i en adenoviral pakkingscelle ved å bibeholde i det minste en del av E1B 55K-regionen i den rekombinante adenovirale vektor eller ved å regulere pIX med en heterolog promoter. Oppfinnelsen vedrører videre fremgangsmåter og midler for produksjon av slike adenoviruser på kompletterende cellelinjer, hvori den kodende nukleinsyre fra den tidlige region 4's åpne leseramme 6 (E4-orf6) er nærværende i adenoviruset, og hvori E4-orf6-genproduktet er kompatibelt med et eller flere produkter av E1-genproduktene i den kompletterende celle slik at den adenovirale vektor kan produseres effektivt av den kompletterende celle.

Foreliggende oppfinnelse vedrører rekombinante undergruppe B adenovirale vektorer som har en delesjon i E1-området, og som ikke koder for et funksjonelt E1B K55 genprodukt og som omfatter de trekk som er angitt i krav 1. Oppfinnelsen
 5 angår også en fremgangsmåte for økning av stabiliteten og/eller pakkekapasiteten av et undergruppe B adenovirus som angitt i krav 11.

BAKGRUNNEN FOR OPPFINNELSEN

Menneskelige adenoviruser er ikke-innhyllede icosahedrale
 10 partikler med en størrelse på 60-90 nM. Til dags dato er 51 serotyper blitt identifisert, og de er delt opp i 6 undergrupper basert på hemagglutineringssegenskaper og sekvens-homologi (Francki et al., 1991). Genomet har en lengde på 34 til 36 kb og er flankert på begge seter av inverterte
 15 terminale gjentakelsessekvenser (ITR). Virusets smittsomme syklus er inndelt i en tidlig og en sen fase. I den tidlige fase (6-8 timer etter infeksjon) avdekkes viruset, og genomet transporteres til kjernen hvoretter de tidlige gen-regioner E1-E4 blir transkripsjonelt aktive.

20 Den tidlige region-1 (E1) inneholder to transkripsjons-regioner kalt E1A og E1B. E1A-regionen koder to store proteiner som er involvert i modifikasjon av vertscellens syklus og aktivering av de andre virale transkripsjons-regioner (oversikt av Russell, 2000). E1B-regionen koder
 25 to større proteiner, 19K og 55K, som forhindrer, via forskjellige ruter, induksjon av apoptose som er et resultat av aktiviteten av E1A-proteinene (Rao et al., 1992; Yew og Berk, 1992; oversikt i Shenk, 1996). I tillegg er E1B-55K-proteinet nødvendig i den sene fase for
 30 selektiv viral mRNA-transport og inhibisjon av vertsproteinekspresjon (Pilder et al., 1986). Den tidlige region-2 (E2) er også inndelt i en E2A- og E2B-region som sammen koder tre proteiner, DNA-bindende protein, viral polymerase og pre-terminalt protein, alle involvert i
 35 replikasjon av det virale genom (oversikt av van der

Vliet, 1995). E3-regionen er ikke nødvendig for replikasjon in vitro, men koder flere proteiner som underminerer vertens forsvarsmekanisme overfor viral infeksjon (oversikt av Horwitz, 2001). E4-regionen koder
 5 minst 6 proteiner involvert i flere tydelige funksjoner beslektet med viral mRNA-spleising og transport, vertscellens mRNA-transport, viral og cellulær transkripsjon og transformasjon (oversikt av Leppard, 1997).

10 De sene proteiner, som er nødvendige for dannelsen av de virale kapsider og pakking av virale genomer, genereres alle fra den store sene transkripsjonsenhet (MLTU) som blir fullstendig aktiv etter inntreden av replikasjon. En kompleks prosess med differensiell spleising og poly-
 15 adenylering fremkaller mer enn 15 mRNA-arter som deler en tresidet ledersekvens. De tidlige proteiner E1B 55K og E4 Orf 3 og Orf6 spiller en vesentlig rolle i reguleringen av den virale mRNA-bearbeidelse og transport fra kjernen (oversikt i Leppard, 1998).

20 Pakking av nylig dannede virale genomer i på forhånd dannede kapsider medieres av minst to adenovirale proteiner, det sene protein 52/55K og et intermediært protein IVa2, ved interaksjon med den pakkende sekvens lokalisert på den venstre ende av genomet (Grable and Hearing, 1990;
 25 Gustin and Imperiale, 1998; Zang et al., 2001). Et annet intermediært protein, pIX, er en del av kapsidet og er kjent for å stabilisere hexon-hexon-interaksjoner (Furcinitti et al., 1989). I tillegg er det blitt beskrevet at pIX transaktiverer TATA-inneholdende promotere så
 30 som E1A-promoteren og MLP (Lutz et al., 1997).

På grunn av den utstrakte kunnskap om viral biologi og den høye effektivitet av nukleær overlevering etter inntreden i cellene er adenoviruser blitt populære verktøy for genavlevering inn i menneskelige celler. I tillegg er
 35 adenovirale vektorer stabile og kan produseres relativt

lett i stor skala. I de fleste tilfeller er vektorene blottet for minst E1-regionen, hvilket gjør dem replikasjonsudugelige. Produksjon av E1-slettede vektorer basert på serotypene Ad5 eller Ad2 av undergruppe C oppnås i E1-komplementerende cellelinjer så som 293 (Graham et al., 1970), 911 (Fallaux et al., 1996) og PER.C6TM (Fallaux et al., 1998). Som beskrevet i US patent 5,994,128, må vektorer og cellelinje omhyggelig tilpasses for å unngå generering av replikasjonsdyktige adenoviruser via homolog rekombinasjon mellom adenovirussekvenser i cellelinjen og vektoren. Således tilveiebringer PER.C6TM-celler og tilpassede adenovirale vektorer et foretrukket system for produksjon av adenovirale vektorer av gruppe C (Fallaux et al., 1998). Slettingen av E1-sekvenser tilveiebringer plass for innføring av fremmede gener i den virale vektor. Siden den maksimale størrelse på Ad5-genomer som kan innlemmes i virioner er begrenset til omkring 105% av vektallengden, kan E1-slettede virusser ta imot tilnærmet 4,8 kb av fremmed DNA (Bett et al., 1993).

Den maksimale pakkekapasitet i virioner, som mangler pIX, er redusert til tilnærmet 95% av den normale genomlengde (Ghosh-Choudhury et al., 1987). Dette skyldes mest sannsynlig den reduserte stabilitet hos pIX-("pIX-minus")-virioner. Mangelen på pIX-minus-mutant Ad5 kan komplementeres ved episomal ekspresjon av pIX i en pakkende cellelinje som anvendes for å produsere virusser (Caravokyri et al., 1995).

Selv om serotypene Ad5 og Ad2 er mest vanlig brukt som genoverføringsvektorer, kan andre serotyper ha foretrukne karakteristikk som gjør dem nyttigere som et terapeutisk eller profylaktisk verktøy. Undergruppen B's virusser Ad35 og Ad11 er for eksempel meget mindre tilbøyelige til nøytralisering av menneskelige sera enn Ad5- og Ad2-virusser (beskrevet i WO 00/70071). Nøytralisering av adenovirale overføringsvektorer minsker

transduksjonseffektiviteten in vivo. Videre ble infeksjonseffektiviteten av antigen-presenterende celler, så som dendrittiske celler, av rekombinante viruser som bærer fiberen Ad35, funnet å bli meget forsterket in vitro sammenlignet med Ad5-viruser (WO 00/70071, WO 02/24730). Således kombinerer Ad35-baserte vektorer sterkt forbedret infeksjonseffektivitet med lav nøytralisering i menneskelige sera og gjør slike vektorer egnet for vaksinasjonsformål.

Generering og propagering av fullstendig E1-slettede Ad35-baserte vektorer er mulig under anvendelse av teknologi omtalt nedenfor. Imidlertid har omhyggelig analyse mange forskjellige rekombinante Ad35-baserte vektorer vist at slike vektorer er mindre stabile, dvs. kan inneholde mindre fremmed DNA sammenlignet med de Ad5-baserte vektorer. I foreliggende patentsøknad er midler og metoder angitt for å overvinne dette problem.

I tillegg er der et behov for videre å utvikle den for tiden tilgjengelige teknologi for adenoviruser som har større serotypisk anvendelighet. Eksisterende pakkende cellelinjer omfatter normalt E1-kodede proteiner avledet fra adenovirus serotype 5. Eksempler på slike "standardiserte" pakkende cellelinjer er 293, 911 og PER.C6™. Forsøk på å produsere vektorer avledet fra andre serotyper på disse standardiserte pakkende cellelinjer har vist seg å være besværlig, om ikke mislykket. Innimellom forekommer litt produksjon, avhengig av den spesielle serotype som anvendes. Imidlertid er utbyttet av rekombinante adenovirusvektorer avledet fra adenovirus-undergrupper utenom undergruppe C, fremstilt på cellelinjer som er transformert og immortalisert av E1 fra Ad5, dårlig. I en publikasjon av Abrahamsen et al. (1997) ble det iakttatt forbedret plakkrensing av en E1A-slettet adenoviral serotype 7-vektor (undergruppe B) på 293-celler omfattende E4-orf6 avledet fra adenovirus av serotype 5, sammenlignet med 293-celler som mangler E4-

orf6-sekvensen fra Ad5. Imidlertid støtte man på et problem med stabiliteten hos vektoren, idet uventede rekombinasjoner ble iakttatt i plakk-rensede stammer. Et ytterligere problem ble påtruffet med vilt forekommende

5 adenoviruskontaminasjon under produksjonen. Dessuten, for produksjon av adenoviruser i stor skala, er det ikke nyttig å ko-transfisere E4-orf6 for å oppnå titere som er høye nok for anvendelse. Et alternativ for å dyrke slike adenoviruser er å tilveiebringe celler med E4-

10 orf6-genet stabilt integrert i genomet i den kompletterende/pakkende cellelinje. Slike celler er blitt beskrevet i faget (f.eks. WO 96/22378). En ulempe med det systemet er det faktum at nye stabile cellelinjer må genereres, og tallrike utvelgelsesrunder må utføres før

15 stabile og passende celler er blitt generert. Denne prosess er arbeidskrevende og tidkrevende. Vanligvis kan det fastslås at generering og propagering av adenoviruser fra serotyper utenom serotype 5 (undergruppe C), så som virusser av undergruppe B, har vist seg å være

20 vanskelig på kompletterende Ad5-celler. Som beskrevet av søkerne i WO 00/70071, kan rekombinante virusser basert på virus Ad35 av undergruppe B fremstilles ved ko-transfeksjon av et ekspresjonskonstrukt inneholdende Ad35's tidlige region-1-sekvenser (Ad35-E1). Videre ble det

25 påvist at Ad35-baserte virusser som er slettet bare for E1A sekvenser og ikke for E1B, reproduserte effektivt på PER.C6-celler, hvilket antydte at E1A-proteinene av Ad5 er i stand til å komplettere Ad35-E1A-funksjonene (søkerens ansøking WO 02/40665). Dessuten viser eksperimentene at mangel på Ad35-E1B resulterer i lavt utbytte på kompletterende Ad5-celler. WO 00/70071 beskriver også cellelinjer for produksjon av E1-slettede ikke-

30 adenovirale vektorer av gruppe C ved videre å modifisere cellelinjer som er i stand til å komplettere adenovirus av serotype 5. WO 00/70071 antyder videre at man bør etablere nye cellelinjer som har Ad35-E1-sekvenser for komplementering av rekombinant adenoviral serotype 35-vektorer som mangler E1-regionen (se også WO 02/40665).

Imidlertid, som også omtalt ovenfor, er det slik at hvis man ønsker å anvende en spesifikk serotype for et spesifikt behov, vil man måtte etablere en ny cellelinje for hver spesifikke serotype, eller man må modifisere de
 5 tilgjengelige cellelinjer som kan komplettere adenovirus av serotype 5 for å komplettere serotypen av interesse. Det vil klart være fordelaktig å anvende de etablerte cellelinjer som er tilgjengelige i faget, og ikke modifisere disse og anvende dem for produksjon av alle
 10 andre, ikke-Ad5-serotyper, idet man anvender de etablerte og virkningsfulle metoder som er kjent i faget.

Det konkluderes med at det fremdeles foreligger et behov for et produksjonssystem for å produsere nyttig utbytte av adenovirus-serotyper som er forskjellige fra serotypene av undergruppe C. Videre er det fremdeles et
 15 behov for passende pakkende systemer omfattende lett tilgjengelige pakkingsceller og rekombinante undergruppe B-adenoviruser som er stabile og kan propageres på slike pakkingsceller.

20 BESKRIVELSE AV FIGURENE

- Fig. 1. Avbildning av pWE.Ad35.pIX-rITRAE3
- Fig. 2. Gelanalyse av PCR-fragmenter generert på Ad35-E1-slettede virusser med og uten E3-regionen. P1 = plasmid-kontroll; M = markør: 1 kb pluss stige
 25 (Invitrogen); mQ H₂O. De angitte genomlengder er i kb.
- Fig. 3A. Sekvenslinjestillinger av de proksimale oppstrøms pIX-sekvensregioner av forskjellige adenoviruser generert med MEGalign-programvare (DNASTar)
 30 under anvendelse av Clustals metode. Sekvenskilden er indikert i teksten. Sp1-setet og TATA-innrammingen i Ad5 og Ad2 (som i Babiss og Vales, 1991) er innrutet.

- Fig. 3B. Skjematisk sammenligning av antatte Spl- og TATA-innramminger i proksimale pIX-regioner fra sekvenser angitt i 3A.
- Fig. 4. Avbildning av pAdApt535.Luc
- 5 Fig. 5. Avbildning av pAdApt535
- Fig. 6A. Gelanalyse av PCR-fragmenter generert på DNA isolert fra Ad35.AdApt.Luc- og Ad35.AdApt535.Luc-viruser eller generert på plasmidkontroller. M = Markør (1 kb pluss stige, Invitrogen). Hvert
- 10 viruspreparat eller plasmidkontroll analyseres med to spesifikke PCR-amplifikasjoner.
- Fig. 6B. Gelanalyse av PCR-fragmenter generert på Ad35.AdApt.LacZΔE3 (35LacZ) og Ad35.AdApt535.LacZΔE3 (535LacZ) virusser eller generert på
- 15 plasmidkontroller.
- Fig. 7. Avbildning av pBr.Ad35.ΔSM.AdApt.LacZ
- Fig. 8. Skjematisk fremstilling av de formentlige promotere i ElB-promoteren og 55K-kodingsregionen.
- Fig. 9. Skjematisk fremstilling av restriksjonssetene i
- 20 55K-regionen som kan anvendes til å generere tydelige fragmenter for identifikasjon av en formentlig promoter. Nummereringen av setene er i henhold til deres posisjon i naturlig ("wild type) Ad35.
- Fig. 10. Sekvenslinjestilling av regionen mellom polyA-signalene i ElA-regionen og i ElB/pIX-regionen i tre forskjellige serotyper av undergruppe B.
- 25 Fig. 11. Skjematisk fremstilling av plasmidisk pΔMT.Orf6.Hygro (ECACC-deponering nr. 202041226).
- Fig. 12. Skjematisk fremstilling av plasmidisk
- 30 pAd35.ΔMT.Orf6.
- Fig. 13. Skjematisk fremstilling av pUC.35-5E4.
- Fig. 14. Kloningstrinn som fører til pUC.35-5E4.
- Fig. 15. Skjematisk fremstilling av pBr.Ad35.PRn.
- Fig. 16. Skjematisk fremstilling av pBr.Ad35.PR5E4 (ECACC-
- 35 deponering nr. P02041229).
- Fig. 17. Skjematisk fremstilling av pWE.Ad35.pIX-rITR5E4.
- Fig. 18. Skjematisk fremstilling av pCRscriptAmp.NFI-NcoIR.

Fig. 19. Skjematisk fremstilling av pCRscriptAmp.NcoIF-NR2.

Fig. 20. Skjematisk fremstilling av pCR.NF1-NR2.

Fig. 21. Linjestilling mellom E4-orf6 fra Ad5 (øvre
5 sekvens) med E4-orf6 fra Ad5 klonet inn i Ad35-
rygggraden (midtre sekvens) og Ad35 E4-orf6-sekvensen
(lavere sekvens), hvilket viser at hele fragmentet
er blitt erstattet.

Fig. 22. Linjestilling mellom E4-orf6/7 fra Ad5 (øvre
10 sekvens) med den delen av Ad5 E4-orf6/7 klonet inn i
Ad35-rygggraden (midtre sekvens) og Ad35 E4-orf6/7-
sekvensen (lavere sekvens), hvilket viser at orf6/7-
sekvensen er delvis kimær, og fusjonen er tilnærmet
ved lysin-resten (K) ved posisjon 138.

15 Fig. 23. Skjematisk fremstilling av pBr.Ad35.PR.5Orf6
(ECACC-deponering nr. P02041227).

Fig. 24. Skjematisk fremstilling av
pWE.Ad35.pIX-rITR.5Orf6.

Fig. 25. Skjematisk fremstilling av pBr.Ad35.PRNΔE3.

20 Fig. 26. Skjematisk fremstilling av pBr.Ad35.ΔE3.PR5E4.

Fig. 27. Skjematisk fremstilling av pBr.Ad35.ΔE3.PR5Orf6.

Fig. 28. Skjematisk fremstilling av systemet for å frem-
stille rekombinante adenovirale partikler i celler
så som PER.C6 via en dobbelt homolog
25 rekombinasjonsforeteelse.

Fig. 29. Skjematisk fremstilling av pWE.Ad35.pIX-EcoRV.

Fig. 30. Linjestilling av Ad35 og Ad11 pIX-cDNA-sekvenser
med wt Ad35-sekvens.

Sekvensene oppnådd fra klonede cDNA-fragmenter som
30 beskrevet i eksempel 18 ble linjestilt under
anvendelse av SeqMan-programvare fra DNASTAR. Ad35
cDNA-sekvenser ble avledet fra RNA'er isolert fra
wtAd35- eller Ad35E1B+Luc-infiserte kulturer
(sekvensen for én av syv kloner er vist), Ad11 cDNA-
35 sekvensen fra RNA isolert fra en wtAd11-infisert
kultur. Sekvensnummereringen er villkårlig. For Ad35
wt-sekvensen er nukleotid 3339 til nukleotid 3628 av
wt Ad35-sekvensen vist. Intron-sekvensen (vist som

et brudd i cDNA-sekvensene) er flankert av spleisedonor(SD)-og spleiseakseptor(SA)-seter som nært stemmer overens med de kjente konsensus-sekvenser. SeqMan-programvaren har plassert de første to nukleotider fra SD (AG) i cDNA-sekvensene ved 3'-enden av intron-sekvensen istedenfor 5'-enden.

Fig. 31. Lokalisering av pIX cap-setet i Ad35-viruser. Skjematisk fremstilling av genom-organiseringen rundt ElB-genet og pIX-sekvensene i Ad35; avbilder transkripsjonens startsete og intronavgrensningen i pIX mRNA. Nukleotidsekvensene er i henhold til wt Ad35 DNA (WO 00/70071). M= MunI, B=Bsu361, SD= spleisedonor og SA= spleiseakseptor.

Transkripsjonens startsete (nukleotid 3339, cap-sete), stoppkodonet for 55K (TAA) og startkodonet for pIX (nukleotid 3484, ATG) er med fete typer. En stiplet linje indikerer at sekvenser ikke er vist.

Fig. 32. Transgenet PCR er et resultat av Ad35-viruser med en 166 bp lang 3'-ElB-sekvens bibeholdt. Et representativt eksempel på resultatene av de transgene PCR-undersøkelser på Ad35.AdAptBsuLuc5Orf6 (bane 1-9) og Ad35.AdAptBsuLuc viruser (banene 10-14). M= 1kb+ markør (Invitrogen), P= pAdAptBsuLuc-kontrollplasmid.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Det blir vist i foreliggende oppfinnelse at et rekombinant adenovirus av gruppe B som har en sletting i El-regionen opp til stoppkodonet for ElB 55K, kan ta imot færre eksogene sekvenser enn et lignende Ad5-rekombinant adenovirus. Det synes som om dette er på grunn av en relativ underekspresjon av pIX-genet i nevnte virus av gruppe B i en gitt pakkende celle, når den kodende pIX-region har sekvenser foran seg bare mellom ElB 55K-stoppkodonet og pIX-startkodonet. Det blir vist at slike virus kan gjøres mer stabile og/eller i stand til å ta imot flere eksogene sekvenser når enten pIX-promoter

er minst delvis restituert ved å innlemme sekvenser fra den kodende E1B 55K-region i et slikt virus, eller ved å anvende en heterolog promoter til å regulere pIX, slik at en normal, eller til og med en relativ overekspressjon, av pIX oppnås i en gitt pakkende celle.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et rekombinant adenovirus som angitt i krav 1 med minst en sletting i E1-regionen, hvor minst en del av sekvensene som koder E1B 55K-genets produkt, som øker ekspresjonen av pIX-genet, er nærværende i nevnte adenovirus, med det forbehold at nevnte rekombinante adenovirus ikke uttrykker et funksjonelt E1B 55K-genprodukt. Slike adenoviruser er mer stabile og/eller kan ta imot mer eksogent DNA enn det tilsvarende adenovirus som mangler alle kodende E1B-sekvenser. Fortinnnsvis omfatter nevnte adenovirus omkring 700 basepar eller mindre av sekvensene som er direkte oppstrøms for pIX-kodingssekvensen. I foretrukne utførelsesformer er nevnte adenovirus et adenovirus av gruppe B, mer foretrukket et adenovirus avledet fra eller basert på Ad35 eller Ad11. Oppfinnelsen tilveiebringer videre en fremgangsmåte for å øke stabiliteten og/eller pakningskapasiteten hos et rekombinant undergruppe B adenovirus som har minst en sletting i E1-regionen, idet nevnte fremgangsmåte omfatter de trinn som er angitt i krav 11 hvor det ønskes å bibeholde eller gjeninnføre minst en del av sekvensene som koder E1B 55K-genproduktet og øke ekspresjonen av pIX-genet i nevnte adenovirus. Istedenfor, eller i tillegg til, nærvær av E1B 55K-sekvenser som øker ekspresjonen av pIX-genet, er det også mulig å forandre sekvensene som er foran pIX-kodingssekvensen, til en sterkere promoter for å øke ekspresjonen av pIX, hvilket resulterer i en økning av stabiliteten av et rekombinant adenovirus og/eller en økning av pakningskapasiteten i den adenovirale partikkel fremstilt ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Følgelig tilveiebringer foreliggende oppfinnelse videre fremgangsmåter og midler

for å øke stabiliteten og/eller pakkingskapasiteten i en rekombinant adenoviral vektor som mangler minst E1-regionen og omfatter eksogen genetisk informasjon, hvilken fremgangsmåte omfatter trinnet å uttrykke

5 elementene som er nødvendige for å fremstille og sette sammen nevnte rekombinante adenovirale vektor inn i viruspartikler i en pakkende celle i nærvær av et forhøyet nivå av pIX-genprodukt i nevnte pakkende celle, hvori nevnte forhøyde nivå av pIX-genprodukt fremkalles

10 ved overekspresjon av genetisk informasjon som koder pIX-proteinet, ved å anvende et modifisert pIX-gen i nevnte vektor, idet nevnte modifikasjon gjør at pIX-genproduktet blir overuttrykt. I en foretrukken utførelsesform omfatter nevnte modifiserte pIX-gen en

15 heterolog promoter som driver ekspresjonen av genetiske informasjon som koder pIX, idet nevnte heterologe promoter er en promoter som får nevnte genetiske informasjon som koder pIX, til å bli overuttrykt i nevnte pakkende celle. I en utførelsesform er nevnte

20 heterologe promoter minst delvis avledet fra eller basert på pIX-promoterens av et adenoviral serotype som gir høyere nivåer av pIX-ekspresjon enn den endogene proksimale pIX oppstrøms-sekvens av nevnte rekombinante adenovirale vektor. I en utførelsesform er nevnte

25 heterologe promoter minst delvis avledet fra eller basert på pIX-promoterens av Ad5. I et aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en rekombinant adenoviral vektor som mangler minst E1-regionen og omfatter et gen av interesse, hvori pIX-genet er modifisert, og hvori

30 nevnte rekombinante adenovirale vektor ikke er avledet fra et adenovirus av serotype 5. Basert på foreliggende oppfinnelse er det mulig å tilveiebringe en rekombinant nukleinsyresekvens omfattende et modifisert adenoviralt pIX-gen, hvori den genetiske informasjon som koder pIX-

35 proteinet, ikke er avledet fra en pIX-kodende sekvens av et adenovirus av serotype 5 eller adenovirus av serotype 7. I en foretrukken utførelsesform omfatter nevnte

modifiserte pIX-gen en heterolog promoter som driver ekspresjonen av den genetiske informasjon som koder pIX.

Ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan det dannes rekombinante adenovirusvektorer omfattende strukturelle og ikke-strukturelle elementer av et adenovirus av en første serotype, hvor fremgangsmåten omfatter trinnene:

5 a) å tilveiebringe en kompletterende celle som har en E1B-55K-kodende sekvens, avledet fra et adenovirus av en andre serotype i en form som kan uttrykkes, med de

10 nødvendige elementer av et adenovirus for å muliggjøre sammenstilling av nevnte rekombinante adenovirus-vektor ved nevnte kompletterende celle, hvori nevnte elementer omfatter minst noen strukturelle og ikke-strukturelle elementer fra et adenovirus av nevnte første serotype

15 forskjellig fra nevnte andre serotype og en sekvens som koder et funksjonelt E4-orf6-protein, eller en funksjonell del, derivat og/eller analog derav, hvilket er kompatibelt med nevnte uttrykkbare E1B-55K-protein i nevnte kompletterende celle; b) å dyrke nevnte

20 kompletterende celle i et medium under betingelser som gjør det mulig for fremstillingen og sammensetningen av adenovirus-vektoren å finne sted; og c) å høste den rekombinante adenovirale vektor fremstilt på denne måte fra mediet og/eller den kompletterende celle, hvori

25 sekvensen som koder det kompatible E4-orf6-protein, er nærværende i den rekombinante adenovirale vektor fremstilt på denne måte.

Oppfinnelsen tilveiebringer videre et rekombinant undergruppe B adenovirus omfattende et rekombinant

30 nukleinsyremolekyl avledet fra et adenovirus, idet nevnte rekombinante nukleinsyremolekyl har minst en sletting i E1-regionen, og hvor minst en del av sekvensen som koder E1B-55K-genproduktet er nærværende i nevnte rekombinante nukleinsyremolekyl og/eller at pIX-kodingssekvensen er

35 under kontroll av en heterolog promoter, idet nevnte rekombinante adenovirus videre omfatter strukturelle og

ikke-strukturelle elementer av et adenovirus av en første serotype, hvori nevnte rekombinante adenovirus videre omfatter en sekvens som koder et funksjonelt E4-orf6-protein, eller en funksjonell del, derivat og/eller analog derav, hvori nevnte sekvens er valgt fra gruppen bestående av: a) en E4-orf6-kodende sekvens avledet fra et adenovirus av en andre serotype forskjellig fra nevnte første serotype; b) en E4-orf6-kodende sekvens avledet fra et adenovirus av nevnte første serotype omfattende en sletting, mutasjon, addisjon og/eller substitusjon i et eller flere kodoner; og c) en E4-orf6-kodende sekvens omfattende en fusjon mellom en del av en E4-orf6-kodende sekvens avledet fra en andre serotype og en del av en E4-orf6-kodende sekvens avledet fra en tredje serotype, hvori nevnte tredje serotype kan være identisk med, eller forskjellig fra, nevnte første serotype. Oppfinnelsen tilveiebringer også en pakkecelle omfattende et rekombinant adenovirus i henhold til oppfinnelsen som angitt i krav 19, hvori nevnte pakkende celle og nevnte rekombinante adenovirus sammen omfatter alle nødvendige elementer for å muliggjøre produksjon og sammenstilling av nevnte rekombinante adenovirus i nevnte pakkende celle.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Det er ett aspekt av oppfinnelsen å tilveiebringe en metode for å øke stabiliteten og/eller pakningskapasiteten av et rekombinant undergruppe B adenovirus som har minst en sletting i E1-regionen, omfattende trinnet å uttrykke elementene som er nødvendige for å fremstille og sette sammen nevnte rekombinante adenovirus i viruspartikler i en pakkende celle i nærvær av et forhøyet nivå av pIX-genprodukt i nevnte pakkende celle, i relasjon til nivået av pIX-genprodukt oppnådd når pIX-kodingssekvensen er bak dets endogene proksimale oppstrøms sekvens uten E1B 55K-sekvenser. I visse utførelsesformer av metoden ifølge oppfinnelsen

fremkalles nevnte forhøyde nivå av pIX-genprodukt ved å bibeholde eller gjeninnføre en del av E1B 55K-sekvensene i nevnte adenovirus. I andre utførelsesformer fremkalles nevnte forhøyde nivå av pIX-genprodukt ved ekspresjon av pIX-kodingssekvensene under kontroll av en heterolog promoter. Oppfinnelsen tilveiebringer videre et rekombinant undergruppe B adenovirus omfattende en funksjonell pIX-kodingssekvens under kontroll av en ekspresjonssekvens, idet nevnte ekspresjonssekvens omfatter en del av en E1B 55K-sekvens som er i stand til å øke ekspresjonen av pIX-kodingssekvensen i en gitt pakkende celle, i relasjon til ekspresjonen av nevnte pIX-kodingssekvens bak dens endogene proksimale pIX-oppstrømssekvens uten den delen av nevnte E1B 55K-sekvens, med det forbehold at nevnte del av en E1B 55K-sekvens ikke koder for et funksjonelt E1B 55K-genprodukt. Det er vist i foreliggende oppfinnelse at pIX-promotersekvenser kan være nærværende i nevnte E1B 55K-sekvenser, og å innlemme disse sekvenser i nevnte ekspresjonssekvens kan derfor øke pIX-ekspresjonen. Nærvær av nevnte E1B 55K-sekvenser øker stabiliteten og/eller pakkekapasiteten av nevnte rekombinante adenovirus, sammenlignet med den situasjon hvor nevnte pIX-kodingssekvens er bak dens endogene proksimale pIX-oppstrømssekvens uten den delen av nevnte E1B 55K-sekvens.

Et adenovirus av serotype 35 med en sletting i E1-regionen, men med en intakt E1B 55K-kodingsregion (pBr.Ad35.leftITR. Δ E1A Δ 21K) er blitt beskrevet i WO 02/40665. Imidlertid inhiberer et funksjonelt 55K-genprodukt, så som det er nærværende i den beskrevne vektor, apoptose, og følgelig er det ønskelig å oppnå rekombinant adenovirus som mangler funksjonell E1B 55K-ekspresjon, f.eks. ved å mutere E1B 55K-genet eller fortinnssvis ved å innlemme bare en del av E1B 55K-sekvensene, mer foretrukket å innlemme bare sekvenser nedstrøms for E1B 55K-startkodonet. Det vil være åpenbart for fag-

mannen at det er gunstig å minimere mengden av ElB 55K-sekvenser i nevnte vektor for å generere virusser med en maksimal El-sletting for å motta mer fremmed nukleinsyre, mens på samme tid å bibeholde tilstrekkelig med ElB 55K-sekvenser til å ha fordelene med en øket stabilitet og/eller øket pakkekapasitet innen det rekombinante adenovirus. Fagmannen vil være i stand til å finne det lavest nødvendige antall sekvenser innen ElB 55K som fører til stabiliseringen og/eller økningen i pakkekapasitet i det rekombinante adenovirus, f.eks. ved å anvende standardiserte molekylære kloningsteknikker for å oppnå serielle slettinger innen ElB 55K-regionen utgående fra den beskrevne vektor (pBr.Ad35.leftITR.ΔElAΔ21K) og å bestemme stabiliteten eller pakkekapasiteten. Det er derfor en gjenstand for foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en slik rekombinant adenoviral vektor hvori nevnte sekvenser som koder ElB 55K-genproduktet omfatter omkring 0,7 kb eller mindre av adenovirus-sekvensene som er direkte oppstrøms for pIX'ets åpne leseramme. I andre utførelsesformer omfatter nevnte sekvenser ikke mer enn omkring 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, eller 100 nt av adenovirus-sekvensene som er direkte oppstrøms for pIX'ets åpne leseramme. I en utførelsesform bibeholder en slik rekombinant adenoviral vektor 166 bp av 3'-enden av 55K-kodingssekvensen. Som åpenbart for fagmannen, er oppfinnelsen ikke begrenset til nærvær av en sekvens som forekommer i en tilgrensende strekning direkte oppstrøms for pIX-kodingssekvensene i det naturlige adenovirus. I stedet vil det også være mulig i henhold til oppfinnelsen å ha sekvenser som er mer oppstrøms, dvs. fra ElB 55K-regionen (f.eks. en restriksjon eller et PCR-fragment, se f.eks. eksempel 10 og fig. 9), kondensert til de mer proksimale regulerende pIX-sekvenser, for derved å fremkalle en kunstig kombinasjon av regulerende sekvenser, forutsatt at dette resulterer i øket pIX-ekspresjon i en gitt pakkende celle, sammenlignet med fravær av enhver ElB 55K-sekvens. Nevnte adenovirus er

et adenovirus av undergruppe B, mer foretrukket et Ad35- eller Ad11-adenovirus. Adenoviruser av serotypene 35 eller 11 har vist seg å være spesielt nyttige for administrasjon til mennesker, idet det er meget færre
 5 individer som har nøytraliserende antistoffer for disse serotyper enn for serotypen 5 som hittil er blitt mest anvendt (WO 00/70071).

Som et alternativ eller i tillegg til nærvær av E1B 55K-sekvenser som øker ekspresjonen av pIX-genet, er det også
 10 mulig å overuttrykke pIX i seg selv ved å mutere pIX-genet, fortrinnsvis dens promoter, å øke stabiliteten og/eller pakkekapasiteten av et rekombinant adenovirus. Et modifisert pIX-gen er et pIX-gen som har en forskjellig promoter og/eller transkripsjonsterminator, og/eller
 15 muterte kodende sekvenser, f.eks. oppnådd ved kodon-optimering, innføring av introner som stabiliserer RNA og lignende. Et pIX-gen i henhold til oppfinnelsen omfatter genetisk informasjon som koder pIX, og inkluderer nukleinsyre så som pIX-genet som fins i naturlige adenoviruser, cDNA og informasjon som koder mutant pIX i form
 20 av alleliske varianter eller nukleinsyre som koder mutant pIX som har minst en del av funksjonen hos pIX som kan avvike fra normalt pIX i kvantitative eller kvalitative henseender, avledet fra eller basert på pIX ved mutasjon, sletting, addisjon eller translokasjon av aminosyrer eller kombinasjoner derav.
 25

Hvis et rekombinant adenovirus har en sletting av minst E1B 55K-regionen opp til og inkluderende stoppkodonet i E1B 55K-genproduktet, vil pIX'ets åpne leseramme være
 30 forutgått av sekvenser mellom E1B 55K-stoppkodonet og startkodonet i pIX. Disse sekvenser omtales heri som de "endogene proksimale pIX-oppstrømssekvenser" (f.eks. Ad35 pIX-oppstrømssekvensen i Ad35-baserte rekombinante adenovirale vektorer, Ad11 pIX-oppstrømssekvensen i Ad11-baserte rekombinante adenovirale vektorer, etc. er omtalt
 35 som endogene i denne henseende; definisjonen inkluderer

alleliske varianter som kan forekomme i naturen, og som ikke er skapt i laboratoriet; se Fig. 3A for noen proksimale pIX-oppstrømssekvenser).

En "heterolog promoter", som er anvendt heri, er definert
 5 som enhver sekvens forskjellig fra sekvensene som naturlig forekommer oppstrøms for pIX-genet, inklusive sekvensene i ElB 55K-regionen og de endogene proksimale pIX-oppstrømssekvenser, og som er i stand til å virke som en promoter og derved regulere transkripsjon av pIX-kodings-
 10 sekvenser. I et aspekt kan en heterolog promoter være en sekvens som er minst delvis avledet fra eller basert på en proksimal pIX-oppstrømssekvens (dvs. sekvensene mellom ElB 55K-stoppkodonet og startkodonet i pIX) fra et adenovirus fra en annen serotype enn serotypen fra hvilken den
 15 rekombinante adenovirale vektor er avledet (f.eks. en Ad5 pIX-oppstrømssekvens i en Ad35-rekombinant adenoviral vektor). Denne omtales heri som en "ikke-endogen proksimal pIX-promoter".

I en utførelsesform av oppfinnelsen drives Ad35-avledet
 20 pIX-ekspresjon av en Ad5 ikke-endogen proksimal pIX-promoter. Enhver ikke-endogen proksimal pIX-promoter avledet fra eller basert på den proksimale pIX-oppstrømssekvens fra en serotype som gir høyere nivåer av pIX-ekspresjon enn de endogene pIX-proksimale sekvenser i den
 25 adenovirale vektor, kan anvendes. Identifikasjon av slike ikke-endogene proksimale pIX-promotere kan være basert på sekvensinformasjon, som vil være åpenbar for fagmannen fra Eksempel 4. Den adenovirale vektor i henhold til oppfinnelsen er avledet fra eller basert på et adenovirus
 30 av undergruppe B-serotype. I spesifikke utførelsesformer er nevnte adenovirale vektor avledet fra eller basert på en adenovirus av serotype 35 (Ad35), Ad11, Ad2 eller Ado. I alternative utførelsesformer er nevnte ikke-endogene proksimale pIX-promoter minst delvis avledet
 35 fra eller basert på en proksimal pIX-oppstrømssekvens av et adenovirus klassifisert i undergruppe C, A, D eller

F. I spesielle utførelsesformer er nevnte ikke-endogene proksimale pIX-promoter minst delvis avledet fra eller basert på en proksimal pIX-oppstrømssekvens av et adenovirus av serotype 12 (Ad12), Ad9 eller Ad40, eller mer foretrukket av Ad5 eller Ad2. Alternativt kan sekvenser som virker som en ikke-endogen proksimal pIX-promoter, finnes empirisk ved generelle molekylærbiologiske metoder kjent for fagkyndige personer, så som ved transkripsjonsanalyser hvori promotere kan testes rutinemessig med hensyn til styrke. Det vil være åpenbart for fagmannen at elementer fra en promoter kan være utvekslet uten å bytte ut hele promoteren, f.eks. kan å tillegge, slette eller mutere kjente transkripsjonsfaktorbindende sekvenser til en promoter ha innflytelse på dens styrke. Mutasjon av minst en del av promotersekvensene kan gjøres ved å forandre sekvensen ved mutasjoner, så som ved addisjoner, slettinger eller utbytting av et eller flere nukleotider, og å innlemme strekninger av nukleotider med en kjent funksjon. Utbytting av promotersekvenser gjøres ved å erstatte en del av eller alle disse sekvenser med en forskjellig promoter. Slik erstatning kan gjøres i henhold til standardiserte molekylærbiologiske teknikker som alle er velkjent for fagmannen. Enhver promoter kan konstrueres i opererbar forbindelse med pIX-genet som velges, og testes med hensyn til dens virkning.

I et annet aspekt er en heterolog promoter ikke beslektet med adenovirale ikke-endogene proksimale pIX-promotere. Derfor kan heterologe promotere også være virale promotere, inklusive, promotere basert på eller avledet fra Cytomegalovirus (CMV, f.eks. den humane umiddelbare tidlige CMV-genpromoter, i det følgende heri omtalt som CMV-promoteren), Rous Sarcoma Virus (RSV, f.eks. den lange terminale gjentakende RSV-promoter, i det følgende omtalt heri som RSV-promoteren), TK, HBV, SV40 og lignende. I en utførelsesform anvendes en adenoviral ElB-promoter som en heterolog promoter.

Cellularpromotere kan også anvendes som heterologe promoter, og disse omfatter, promoter fra PGK, metallotionein, EF1- α , β -aktin og lignende. Syntetiske eller hybridiserte promoter omfattende elementer fra

5 mer enn en promoter, kan også anvendes for oppfinnelsen, og alle er innbefattet innenfor omfanget av uttrykket heterolog promoter. Promotere som anvendes, kan være grunnleggende eller induserende. I forbindelse med en

10 induserende promoter anses en promoter passende for oppfinnelsen hvis den gir overekspresjon i sin induserte tilstand. Enhver promotersekvens som resulterer i overekspresjon av pIX i henhold til oppfinnelsen, kan anvendes som en heterolog promoter i henhold til oppfinnelsen. Foruten promoterstyrke, er et andre aspekt

15 som bestemmer nytten av en spesielt promoter, når den er nærværende i den rekombinante adenovirale vektor i seg selv, dens størrelse, idet lengre promoter vil oppta plass som er tilgjengelig for transgenet. En fagkyndig person vil være i stand til å anvende foreliggende

20 oppfinnelse for å optimere vektoren eksperimentelt vedrørende promoterens lengde og styrke med hensyn til innføyningens størrelse, for å finne den mest stabile rekombinante vektor.

Det vil være klart at en heterolog promoter kan frem-

25 deles innholde eller omfatte deler av eller alle de endogene proksimale pIX-oppstrømssekvenser, eller alternativt helt erstatte disse sekvenser, forutsatt at den heterologe promoter i henhold til oppfinnelsen kan forårsake overekspresjon av genetisk informasjon som

30 koder pIX i en pakkende celle som er valgt. Det vil også være klart for fagmannen at når en endogen ikke-pIX adenoviral promoter (f.eks. E1A-, E2A- etc. promoteren) eller en heterolog promoter som for eksempel regulerer transgenet, anvendes for å drive ekspresjonen av pIX ved

35 å anvende et indre ribosomisk inngangssete (IRES) mellom det ikke-pIX-adenovirale gen eller transgenet og pIX-kodingssekvensen (i en hvilken som helst rekkefølge), må

denne betraktes som innenfor omfanget av uttrykket "heterolog promoter" i henhold til oppfinnelsen.

Et forhøyd eller øket nivå av pIX-genprodukt er resultatet av overekspresjon av pIX-genet i en pakkende
 5 celle som er valgt. Overekspresjon av pIX-genet anvendt heri er definert som et ekspresjonsnivå av pIX, enten på RNA- eller proteinnivå eller begge deler, hvilket er høyere enn pIX-ekspresjonsnivået oppnådd når den kodende region av pIX er bak de "endogene proksimale pIX-
 10 oppstrømssekvenser" som definert heri, i en gitt pakkende celle. "Overekspresjon" er meningsfullt i forbindelse med foreliggende oppfinnelse for en spesielt heterolog promoter-pIX-kombinasjon av et adenovirus i kombinasjon med en spesielt pakkende celle som er valgt.
 15 Metoder for å bestemme ekspresjonsnivåer er generelt velkjent for fagkyndige personer, og omfatter RT-PCR, "Northern blotting", "Western blotting" og lignende. For foreliggende oppfinnelse, vil overekspresjon kunne måles ved å bestemme ekspresjonsnivåene i et rekombinant
 20 adenovirus med en gitt innføyning (f.eks. luciferase) i en gitt pakkende celle som er valgt, hvori den genetiske informasjon som koder pIX, er bak de endogene proksimale pIX-oppstrømssekvenser uten E1B 55K-sekvenser, og sammenligne disse ekspresjonsnivåer med nivåene i et
 25 rekombinant adenovirus som er det samme unntatt at pIX-kodingsregionen reguleres av en heterolog promoter eller av sekvenser fra det endogene E1E 55K-gen (dets "naturlige" promoter som er blitt minst delvis rekonstituert). Overekspresjon av pIX er indikert av et
 30 forholdstall høyere enn 1 for ekspresjonsnivået oppnådd ved den heterologe eller "naturlige" promoter i forhold til det som er oppnådd ved de endogene proksimale pIX-oppstrømssekvenser uten E1B 55K-sekvenser. Valget av en pakkende celle bestemmes av faktorer så som serotypen av
 35 elementene i det rekombinante adenovirus som samhandler med de kompletterende adenovirale funksjoner i den pakkende celle, produktrenhet (så som fravær av

replikasjonsdyktig adenovirus fra den genererte sats),
letthet å anvende, vekstkarakteristikker og lignende.
Eksempler på pakningsceller er kjent for fagmannen og
omfatter 293-celler, 911-celler og PER.C6TM-celler som er
5 anvendt heri, samt derivater derav tilpasset for
komplementering av adenovirale vektorer av spesifikke
serotyper, så som PER55K.

Det vil være klart at i alle utførelsesformer av oppfin-
nelsen kan pIX-kodingssekvensene og de regulerende
10 sekvenser som driver ekspresjonen av pIX, posisjoneres
på deres naturlige lokalisering innen adenovirusgenomet,
samt i forskjellige deler av adenovirusgenomet, f.eks. i
regionen som opprinnelig inneholdt E3-sekvensene.

Rekombinante adenoviruser med øket stabilitet er i stand
15 til å innlemme større genomer i viruspartikler (viri-
oner). Følgelig vil å øke stabiliteten av rekombinante
adenoviruser anvendt heri gjøre det mulig for rekombi-
nante adenoviruser i henhold til oppfinnelsen å omfatte
mer fremmed genetisk informasjon, omfattende et gen av
20 interesse. Videre kan rekombinante adenoviruser med øket
stabilitet i henhold til oppfinnelsen være i stand til å
propageres for mer spredning uten tegn på ustabilitet.
Stabiliteten kan måles ved hjelp flere metoder som er
kjent for fagkyndige personer, inklusive PCR på
25 rekombinant virus for å vise nærvær av ønskede
rekombinante adenovirale vektorer. Ustabilitet vil føre
til biprodukter, som også kan synliggjøres ved PCR-
metoder og lignende. Restriksjonsanalyse av viralt DNA,
bestemmelse av den relative smittsomhet av
30 viruspartikler, bestemmelse av termostabiliteten av
adenovirale partikler også kan anvendes til å bestemme
stabiliteten av rekombinante adenovirale vektorer
(Caravokyri og Leppard, 1995). Metoder for å bestemme
stabilitet/ustabilitet av rekombinante adenovirale
35 vektorer er også angitt i Eksempel 3 i denne ansøking.
Et rekombinant adenovirus, også kalt en rekombinant

adenoviral vektor, eller adenoviral vektor, anvendt heri er avledet fra eller basert på et undergruppe B adenovirus, mangler minst en del av E1-regionen (omfattende E1A- og E1B-genene) av et adenovirus og kan
5 omfatte fremmed genetisk informasjon, av hvilken leveranse og/eller ekspresjon av nevnte vektor er ønskelig. Eksogen (eller fremmed) genetisk informasjon som er anvendt heri, er enhver genetisk informasjon som ikke er naturlig nærværende i et adenovirus, og er også
10 omtalt som transgen. Dette omfatter gener av interesse, ekspresjonskassetter og lignende. Slik eksogen genetisk informasjon kan fylle rommet i genomet som er blitt tilgjengelig ved slettingen av adenovirale E1-sekvenser. Rekombinante adenovirale vektorer er nyttige for
15 forskjellige formål, så som ved genterapeutiske anvendelser, vaksinefremstilling og lignende. I tillegg til E1-regionslettingen kan også E3-sekvenser være slettet fra slike adenovirale vektorer, for å øke kapasiteten for fremmed genetisk informasjon i visse
20 foretrukne utførelsesformer. Andre slettinger og forskjellige kombinasjoner av en del av eller fullstendige slettinger av E2-, E3- og E4-regioner kombinert med E1-slettingen kan anvendes, hvis nødvendig i kombinasjon med en pakkende celle omfattende genetisk
25 informasjon som mangler i den adenovirale vektor, når det er nødvendig for replikasjon av den adenovirale vektor. Alle rekombinante adenoviruser som har en sletting i E1-regionen kombinert med eventuelt enhver annen sletting i adenovirusgenomet, er ment å være
30 innbefattet innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse. Adenovirusene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes i forskjellige innrettinger så som genterapi eller profylaktisk og/eller terapeutisk vaksinasjon, inklusive tumorvaksinasjon og anti-viral
35 vaksinasjon. For dette virker den adenovirale vektor som et genleverende middel, hvori et ikke-naturlig gen er innlemmet i det adenovirale genom. Den adenovirale partikkel kan deretter innsiktes spesifikt på målceller

av interesse; adenoviruset bindes til den spesifikke celle enten via capsid-reseptorbinding eller via andre midler, og leverer transgenet. Innsikting av adenoviruser kan utføres på mange forskjellige måter.

- 5 Personer med utdannelse i faget adenoviral vektor-målretting vil kjenne til alle de forskjellige muligheter som anvendes for å levere de adenovirale vektorer til cellene av interesse. Slike muligheter omfatter capsid-endringer (fiber-, hexon- og/eller
- 10 pentonmodifikasjoner, så som slettinger, utvekslinger mellom fibre av forskjellige serotyper, og addisjoner av peptider og/eller andre bindingsgrupper), hvori chimeriske fibre produseres som gjenkjenner en reseptor som er nærværende på cellen av interesse, eller hvori
- 15 bindingen av penton-basen utnyttes. Andre muligheter er å binde målrettende grupper til kapsid-proteinene, hvori for eksempel bindende peptider, kjente og sterke bindende proteiner, eller antistoffer eller deler derav er bundet til kapsid-proteinene for å oppnå spesifikk målretting.
- 20 Slike vektorer kan alle produseres under anvendelse av metodene og midlene tilveiebragt ved foreliggende oppfinnelse. Derfor beskriver foreliggende oppfinnelse også rekombinante adenovirusvektorer i henhold til oppfinnelsen, hvilke videre omfatter en sekvens som koder
- 25 et ikke-adenoviralt protein. Slike sekvenser kan være nærværende på forskjellige lokaliseringer innen den adenovirale ryggrad, men fortinnsvis er de lokalisert i El-regionen, som mangler i de rekombinante adenovirale vektorer ifølge oppfinnelsen. El-regionen er komplettert
- 30 ved de kompletterende elementer nærværende i de kompletterende celler. Retningen for promoteren, transgenet og andre regulerende sekvenser kan være mot den venstre, samt til den høyre inverterte terminale gjentakelse.
- 35 Foreliggende oppfinnelse kan også anvendes for produksjon av virale vektorer basert på adenovirus og/eller på andre viruser så som det adeno-forbundet virus (AAV), hvori

kombinasjonen, så som et chimerisk Ad-AAV-virus, kan integreres i vertscellegenomet. Flere metoder er kjent i faget for å generere integrerende adenoviruser. Generelt er oppfinnelsen også nyttig for produksjon av adenovirus-
5 former som (spesifikt, eller ikke-spesifikt) kan integreres.

Som nevnt kan flere ikke-adenovirale transgener klones inn i de rekombinante adenovirale vektorer ifølge foreliggende oppfinnelse. Disse omfatter ikke bare
10 regulerende nukleinsyresekvenser så som forsterkere, promotere (f.eks. sterke ikke-adenovirale promotere så som cytomegalovirus-promoteren, SV40-promoteren og RSV-promoteren) og polyadenyleringssignaler, men også heterologe gener for terapeutiske formål.

15 Derfor tilveiebringes, i et aspekt av oppfinnelsen, rekombinante adenovirusvektorer i henhold til oppfinnelsen, hvori nevnte ikke-adenovirale protein er valgt fra gruppen bestående av: et celledødinduserende polypeptid, et tumor-spesifikt antigen, et viralt
20 protein, et hormon og et cytokin. Ikke-begrensede eksempler på ikke-adenovirale faktorer, proteiner, polypeptider og peptider er transkripsjonsfaktorer, intracellulære signaliserende proteiner, fosfataser, kinaser, apoptose-inhiberende faktorer,
25 reseptorantagonister, løselige former av membran-bundne reseptorer, RNA-inhibitorer, anti-sense-RNA'er, narrefaktorer, ribozymmer, og mer spesifikt tymidinkinase, erythropoietin, nytt erytropoese-stimulerende protein (NESP), IL3, ceNOS, gamma-interferon og gp100. Ikke-
30 adenovirale virale proteiner kan klones inn i de rekombinante adenovirale vektorer tilveiebragt ved fremgangsmåtene og midlene ifølge foreliggende oppfinnelse for vaksinasjonsformål. Slike virale proteiner omfatter gag, pol, env, nef, etc. for HIV-vaksiner, E6-og
35 E7-proteiner for menneskelig papillom-virus-vaksiner, circumsporozoit-proteiner fra Plasmodium protozoa for

malariavaksiner, rotaviruskomponenter for rotavirus-
vaksiner, ebola-proteiner for ebola-vaksiner, F- og G-
genprodukter fra respiratorisk syncytialvirus for
respiratoriske syncytialvirus-vaksiner, HA og NA for
5 influensa-vaksiner, etc.

Adenoviruser i henhold til oppfinnelsen er fortinnnsvis
humane adenoviruser, dvs. avledet fra eller basert på
adenovirus som er i stand til å infisere menneskelige
celler, men oppfinnelsen er like nyttig for ikke-humane
10 adenoviruser. En fagkyndig person vil kjenne til det
faktum at i tillegg til alle menneskelige adenoviruser er
tallrike ikke-menneskelige adenoviruser blitt identifi-
sert i faget. Det er åpenbart at også ikke-menneskelige
adenoviruser kan anvendes for å oppnå de samme resultater
15 som beskrevet i foreliggende oppfinnelse. Eksempler på
ikke-menneskelige adenoviruser som kan produseres under
anvendelse av fremgangsmåtene og midlene ifølge
foreliggende oppfinnelse, er hunde-, okse-, ape - og
fugle-adenoviruser. Serotyper anvendt heri går derfor
20 utover artsbegrensede serotyper.

"Avledet fra" som er anvendt heri, betyr at nukleinsyre-
sekvenser, gener eller proteiner som normalt forekommer
i et adenovirus, anvendes for generering av rekombinante
adenoviruser i henhold til oppfinnelsen. Metoder for å
25 generere slike rekombinante adenoviruser er velkjent for
fagkyndige personer, og omfatter, men er ikke begrenset
til, generelle molekylærbiologiske metoder så som
kloning av genetisk informasjon inn i ønskelige
konstellasjoner ved bruk av restriksjonsenzymes og
30 lignende. Rekombinante adenoviruser kan også baseres på
adenovirale sekvenser. "Basert på" som er anvendt heri,
er ment å skulle omfatte syntetisk konstruksjon av
genetisk informasjon basert på kunnskap om slik genetisk
informasjon. Slike metoder omfatter anvendelse av
35 adenoviralt genetisk material som modell for PCR for å
konstruere et nytt adenoviralt konstrukt som er basert

på sekvensen i modellens adenovirus, konstruksjon av fullstendig syntetisk genetisk informasjon med en ønskelig sekvens f.eks. ved å binde syntetiske oligonukleotider til et ønskelig konstrukt, og lignende. Det
5 bør være underforstått at "avledet fra" ikke nødvendigvis betyr en direkte kloning av det naturlig forekommende DNA. En fagkyndig person vil også være klar over mulighetene innen molekylær biologi for å oppnå mutante former av en viss del av en nukleinsyre. Disse
10 mutasjoner kan gi en forskjellig funksjonalitet, men de kan også være stille på den måte at visse mutasjoner ikke endrer funksjonaliteten av denne spesielle del av DNA'et og dets kodede protein. Derfor må uttrykkene "funksjonell part, derivat og/eller analog derav" for-
15 stås som ekvivalenter av nukleinsyren de er beslektet med. En fagkyndig person vil forstå det faktum at visse slettinger, utvekslinger, (punkt)mutasjoner, addisjoner etc. likevel kan resultere i en nukleinsyre som har en lignende funksjon som den opprinnelige nukleinsyre. Det
20 må derfor være underforstått at slike endringer som ikke signifikant endrer funksjonaliteten av proteinene, så som pIX-proteinet, E4-orf6 og E1B-55K-genproduktet, er innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse. Det vil være åpenbart for fagkyndige personer at metoden for å
25 oppnå genetisk informasjon som koder det rekombinante adenovirus, kan varierer uten å avvike fra omfanget av foreliggende oppfinnelse.

Menneskelige adenoviruser er blitt klassifisert i undergruppene A-F, som omfatter 51 serotyper (se f.eks. EP
30 0978566). For noen bruksområder kan det være gunstig å anvende adenovirale vektorer avledet fra eller basert på adenoviruser fra spesifikke undergrupper eller fra visse serotyper som har en vevstropisme for en ønskelig cellype, f.eks. dendrittiske celler (WO 02./24730).

35 Generelt fravær av nøytraliserende antistoffer i populasjonen mot adenovirus fra visse undergrupper eller fra en spesifikk serotype er også en viktig parameter for å

bestemme serotypen som er valgt (WO 00/70071). På grunn av likheten mellom virusene av undergruppe B (se f.eks. Eksempelene 4 og 11) er det forventet at oppfinnelsen er spesielt passende for adenovirusene av undergruppe B.

5 Følgelig relaterer foreliggende oppfinnelse til adenovirale vektorer avledet fra eller basert på et adenovirus klassifisert i undergruppe B. Undergruppe B av menneskelige adenoviruser omfatter Ad5, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35 og Ad50. Foretrukne

10 utførelsesformer av foreliggende søknad relaterer til rekombinante adenovirale vektorer avledet fra eller basert på Ad35- eller Ad11-serotyper. Foruten å lete etter en serotype for spesifikke bruksområder, kan såkalte chimeriske adenoviruser anvendes. Disse omfatter

15 deler av eller alle genetiske sekvenser som koder for kappeproteiner, så som fiber, penton eller hexon, fra en eller flere adenovirale serotyper bundet til den gjenværende genetiske informasjon (den "hovedsakelige" adenovirale vektordel) fra andre serotyper, som kan anvendes til å minske immunogenisiteten eller forandre

20 vevstropismen for den "hovedsakelige" adenovirale vektor (EP 0978566). Den "hovedsakelige" del anvendt heri betyr at den bidrar mest av genetisk informasjon til nevnte chimeriske virus, og et chimerisk adenovirus vil derfor

25 være innbefattet i serotypegruppen for den "hovedsakelige" del av et slikt virus. Det vil være åpenbart for fagkyndige personer at foreliggende oppfinnelse også kan anvendes for slike chimeriske adenoviruser når disse vil kunne stilles overfor

30 lignende ustabilitetsproblemer. Det kan for eksempel forventes at et chimerisk adenovirus omfattende Ad35 sekvenser som den hovedsakelige del og omfattende en fiber som er avledet fra eller basert på f.eks. et Ad11-adenovirus, kan ha lignende ustabilitet ved propagering

35 som rapportert for Ad35's rekombinante adenovirale vektorer beskrevet her. Følgelig, når rekombinante adenoviruser er nevnt i denne søknad, er chimeriske

adenovirale vektorer ment å være innbefattet i foreliggende oppfinnelse.

Elementene som er nødvendige for å fremstille og sette sammen rekombinante adenovirale vektorer, er velkjent
5 for fagmannen (beskrevet ovenfor; US patent 5,994,128; Russell, 2000). Produksjon av E1-slettede rekombinante adenoviruser i form av virioner gjøres i pakkende celler, også kalt kompletterende celler. Slike celler tilveiebringer *in trans* den genetiske informasjon om
10 adenoviruset som mangler i nevnte rekombinante adenoviruser, og som er nødvendig for å produsere rekombinant virus (rekombinante virioner). Velkjente pakkende celler er 293-celler, 911-celler og PER.C6TM-celler (ovenfor). For de fleste formål er det fordelaktig å anvende en
15 pakkende celle og en rekombinant adenoviral vektor som mangler overlappende sekvenser som ellers ville kunne føre til homolog rekombinasjon, hvilket resulterer i replikasjonsdyktig adenovirus (US patent 5,994,128). PER.C6TM, som deponert er under nr. 96022940 ved den
20 europeiske samling av cellekulturer fra dyr ved "the Center for Applied Microbiologi and Research, er derfor en meget passende pakkende celle for propagering av rekombinante adenoviruser. Andre metoder for å minske genereringen av replikasjonsdyktig adenovirus er også
25 blitt planlagt og angår for eksempel manipulering av adenovirale sekvenser for å redusere homologien mellom sekvenser nærværende i den pakkende celle og vektoren (f.eks. Hehir et al., 1996; Robert et al., 2001). Pakkende celler kan, foruten den obligatoriske E1-
30 region, omfatte andre adenovirale sekvenser for å komplettere andre adenovirale funksjoner når disse er funksjonelt manglende i det rekombinante adenovirus som anvendes, så som f.eks. deler av eller hele E2, E4 og lignende. Den kompletterende informasjon i pakkende
35 celler kan være nærværende enten integrert i genomet, eller som ekstrakromosomale kopier, f.eks. på plasmider, vektorer, kosmider og lignende. Andre metoder anvender

såkalte hjelpevirus, hvilke omfatter genetisk informasjon som mangler i det rekombinante adenovirus. Rekombinante adenovirale vektorer anvendes også som såkalte hjelpevirus for produksjon av rekombinante

5 adenoviruser som inneholder et genom slettet for de fleste eller alle adenovirale gener (feige vektorer eller hjelperavhengige adenoviruser). I de endelige produksjoner av slike feige adenoviruser er det nødvendig å unngå pakking av hjelpeadenoviruset. En

10 fagkyndig person er kjent med metodene for å oppnå dette, for eksempel ved å anvende en sete-spesifikk rekombinase på et konstruert sete i det pakkende signal for å slette dette pakkende signal. Ofte er det nødvendig å separere gjenværende hjelpevirus fra det ønskelige virus under

15 anvendelse av CsCl-gradient separering. Dette er lettere å oppnå når genomlengdene av hjelpende og annet virus avviker maksimalt. Derfor er et stort hjelpevirus foretrukket ovenfor et mindre. Som åpenbart for fagmannen, kan foreliggende oppfinnelse likeledes

20 anvendes for å øke stabiliteten av det rekombinante adenovirus ved bruk av et rekombinant hjelpevirus med den økte pIX-ekspresjon, hvilket kan oppnås ved hjelp av metodene beskrevet i foreliggende oppfinnelse. Enhver celle inneholdende genetisk informasjon som kan anvendes

25 til å komplettere det rekombinante adenovirus for å generere rekombinante viruspartikler, er ment å være innbefattet i omfanget av betydningen av pakkende celle. Det vil være åpenbart for fagmannen at fordelene vunnet ved foreliggende oppfinnelse ikke er avhengig av den

30 pakkende celle som anvendes.

Den genetiske informasjon som koder pIX, kan enten være nærværende på den rekombinante adenovirale vektor, men kan også være nærværende uavhengig av nevnte rekombinante adenovirale vektor, og slik ekstraviral genetisk

35 informasjon kan være nærværende enten integrert i genomet, eller som ekstrakromosomale kopier, f.eks. på plasmider, vektorer, kosmider og lignende. Innføring av

genetisk informasjon i en pakkende celle kan gjøres i henhold til mange forskjellige metoder, så som transfeksjon ved lipofektamin, kalsiumfosfat-utfelling, viral infeksjon og lignende. Slike metoder er generelt velkjent for fagmannen, og metoden som anvendes for innføring av genetisk informasjon, er ikke kritisk for omfanget av oppfinnelsen. Funksjonelt pIX i en form som kan uttrykkes og er anvendt heri, betyr genetisk informasjon som koder pIX i opererbar binding til en promoter eller en annen regulerende sekvens som er i stand til å styre ekspresjon av nevnte genetiske informasjon som koder pIX i den pakkende celle. Innføring av genetisk informasjon i den pakkende celle kan gjøres enten før, samtidig med eller etter innføringen av den rekombinante adenovirale vektor. Det ble funnet at essensiell episomal ekspresjon av pIX i en 293-basert pakkende cellelinje kompletterer mangelen på pIX-mutant adenovirus av type 5 (Caravokyri og Leppard, 1995). Imidlertid er for slike bruksområder spesielle episomale plasmider inneholdende en EBNA1-ekspresjonskassetten nødvendig, og propagering av adenovirale vektorer i slike cellelinjer lider av den ulempe at deler av episomet sannsynligvis vil bli en del av den rekombinante adenovirale vektor. Følgelig er genetisk informasjon som koder funksjonelt pIX, nærværende på den adenovirale vektor.

I forsøk på å minske mengden av rekombinasjon som fører til replikasjonsdyktig adenovirus, har noen forfattere anvendt et pIX-gen avledet fra Ad7 - et virus av gruppe B - som ble drevet av en mutert pIX-promoter av Ad5, for å minske overlappingen mellom nukleinsyrene i den (Ad5-avledede sekvensholdige) pakkende celle og den rekombinante adenovirale vektor (Robert et al., 2001). Imidlertid ble disse eksperimenter ikke gjort for å øke stabiliteten av den virale vektor, og denne stabilitet ble ikke målt i disse eksperimenter. I foreliggende ansøking er de transkripsjonsregulerende sekvenser i pIX i den adenovirale vektor forandret med det formål å

øke stabiliteten av viruset og/eller øke kapasiteten for fremmed genetisk materiale i virioner. Oppfinnelsen viser at en rekombinant adenoviral vektor avledet fra Ad35 omfattende et pIX-gen under kontroll av en Ad5-
 5 avledet proksimal pIX-promoter avledet fra Ad5 er mer stabil/kan ha mer fremmed genetisk informasjon enn det tilsvarende virus med de endogene (dvs. Ad35-avlede) proksimale pIX-oppstrømssekvenser. Derfor tilveiebringer foreliggende oppfinnelse også et rekombinant adenovirus
 10 omfattende en funksjonell pIX-kodingssekvens og med minst en sletting i E1-regionen, hvori pIX-kodingssekvensen er under kontroll av en heterolog promoter, og hvori nevnte rekombinante adenovirus er avledet fra eller basert på et adenovirus unntatt et adenovirus av serotype 5. I visse
 15 utførelsesformer er nevnte heterologe promoter en ikke-endogen proksimal pIX-promoter. I foretrukne utførelsesformer er genetisk informasjon som koder pIX, avledet fra eller basert på Ad35 eller Ad11. I slike utførelsesformer er en foretrukken ikke-endogen pIX-promoter en Ad5-
 20 promoter.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en rekombinant undergruppe B adenoviral vektor oppnåelig ved hjelp av en metode i henhold til oppfinnelsen. Slike rekombinante adenovirale vektorer er nyttige, f.eks. ved
 25 femstilling av vaksiner (WO 00/70071; WO 01/38362; WO 02/24730), som genleverende midler og lignende. Valg av en ønskelig hovedsakelige serotype for slike rekombinante adenovirale vektorer kan anvendes for å oppnå vektorer med en endret vevstropisme sammenlignet med de meget
 30 anvendte adenovirale Ad5-vektorer, og/eller kan anvendes fordi de er mindre immunogene enn slike Ad5-avlede vektorer (WO 00/70071). For generering av rekombinante adenovirale vektorer er det bekvemt å klonere transgenet i et plasmid (adapter-plasmid), inneholdende den venstre
 35 del av et adenovirus som mangler E1-sekvenser, og som har restriksjonsenzymseter for kloning. Den rekombinante adenovirale vektor genereres deretter ved homolog

rekombinasjon med et kosmid omfattende den høyre del av adenoviruset som har ved 5'-enden overlappende sekvenser med 3'-enden av adapterplasmidet (se eksemplene i foreliggende ansøknings; metoden beskrevet i WO 99/38362).

5 Således kan det tilveiebringes en rekombinant nukleinsyresekvens omfattende et adenoviralt venstre ITR, et pakkende signal, andre adenovirale sekvenser med en sletting i E1-regionen, minst en del av E1B 55K'ets åpne leseramme og pIX-kodingssekvenser. I enda et annet aspekt

10 tilveiebringer oppfinnelsen et modifisert adenoviralt pIX-gen, hvori den genetiske informasjon som koder pIX-proteinet, ikke er avledet fra en pIX-kodende sekvens i et adenovirus av serotype 5 eller et adenovirus av serotype 7. I foretrukne utførelsesformer omfatter nevnte

15 modifiserte pIX-gen en heterolog promoter.

Oppfinnelsen tilveiebringer videre en rekombinant adenoviral pakkende celle omfattende et rekombinant adenovirus i henhold til oppfinnelsen. I en utførelsesform omfatter nevnte rekombinante adenovirale pakkende celle en

20 nukleinsyre som er i stand til å komplettere en E1B 55K-mangel i nevnte rekombinante adenovirus, og hvori nevnte rekombinante adenovirus omfatter et nukleinsyremolekyl omfattende en del av sekvensen som koder et E1B 55K-genprodukt og øker ekspresjonen av pIX-genet, med det forbe-

25 hold at sistnevnte rekombinante nukleinsyremolekyl ikke koder et funksjonelt E1B 55K-genprodukt, og hvori nevnte celle og nevnte rekombinante adenovirus ikke omfatter sekvensoverlapping som fører til dannelsen av et rekombinant adenovirus omfattende en nukleinsyre som koder et

30 funksjonelt E1B 55K-protein. Denne utførelsesform er spesielt nyttig for å forhindre dannelsen av rekombinante adenoviruser omfattende ytterligere en adenovirus-funksjon.

"Kompatibel" anvendt heri betyr derfor at et kompleks

35 mellom det tilgjengelige E1B-55K-genprodukt er i stand til å danne et funksjonelt kompleks med det tilgjenge-

lige E4-orf6-genprodukt på en slik måte at dette proteinkompleks støtter viral replikasjon, propagering og/eller pakking til et nivå som kan sammenlignes med den naturlig forekommende situasjon eller som kan sammen-

5 lignes med situasjonen man finner når en rekombinant adenoviral vektor av serotype 5 fremstilles på en Ad5-kompletterende cellelinje så som 293 eller PER.C6™. Vektorreplikasjonen i pakkende celler er effektivt hvis cellen, under produksjonsperioden hvori viruset dannes,

10 omfatter minst E1B-55K-protein og E4-orf6-protein som er kompatibelt. Fortinnnsvis er E1B-55K- og E4-orf6-sekvensene fra adenoviruser innen den samme adenovirale undergruppe (så som A, B, C, D, E eller F). Mer foretrukket er E1B-55K- og E4-orf6-sekvensene fra den samme sero-

15 type. Siden etablerte cellelinjer er tilgjengelige i faget, hvilke er i stand til å støtte veksten av adenoviruser av undergruppe C, så som serotype 5, er det enda mer foretrukket at E1B-55K- og E4-orf6-genene er avledet fra adenovirus-serotype 5. Som fagmannen vil forstå, kan

20 kompatibilitet bestemmes i kompletteringstester eller undersøkelser da slike er innenfor kunnskapen hos fagkyndige personer vedrørende adenoviral vektorproduksjon. Fagmannen vil også forstå at foreliggende oppfinnelse også kan anvendes for produksjon av enhver adenoviral

25 serotype på enhver kompletterende cellelinje forutsatt at E1B-55K- og E4-orf6-proteinene er compatible.

Det er videre blitt iaktatt at E4-orf6-genproduktet, som "matcher" med E1B'et i den kompletterende celle-

linje, kan tilveiebringes ved den adenovirale vektor,

30 ved å erstatte E4-orf6 i den adenovirale vektor som er valgt med en E4-orf6-kodende sekvens som er kompatibelt med E1B-genet nærværende innen den pakkende cellelinje. Denne modifikasjon ble overraskende funnet å ikke ha en alvorlig virkning på stabiliteten, replikasjonen, pakkin-

35 gen, sammenstillingen og produksjonen av vektoren.

Det er et spesifikt aspekt av oppfinnelsen at man nå er i stand til effektivt å produsere adenovirale serotyper, som er forskjellige fra typene fra undergruppe C, på cellelinjer som normalt anvendes for produksjon av adenovirus av serotype 5 eller en annen serotype fra undergruppe C, så som serotype 1, 2 og 6. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer metoder for fremstilling av undergruppe B adenoviruser uten at det er nødvendig å tilveiebringe den kompletterende (pakkende) celle med E4-orf6, fordi E4-orf6-sekvensen, som er kompatibelt med den kompletterende E1B-55K sekvens, er innlemmet i den adenovirale ryggrad.

En fagkyndig person vil kjenne til det faktum at foruten alle menneskelige adenoviruser er tallrike ikke-menneskelige adenoviruser blitt identifisert i faget. Det er åpenbart at også ikke-menneskelige adenoviruser kan anvendes for å oppnå de samme resultater som beskrevet i foreliggende oppfinnelse. Det vil være åpenbart for fagmannen at kompatibiliteten mellom E1B-55K og E4-orf6 ikke kan være begrenset til menneskelige adenoviruser, men at også elementer fra adenoviruser som er spesifikke for forskjellige arter, kan være kompatible. Således er det også et annet aspekt av oppfinnelsen at ikke-menneskelige adenoviruser kan produseres til høye titere på kjente pakkende cellelinjer tilgjengelige i faget, forutsatt at E1B-55K- og E4-orf6-genproduktene er kompatible. Eksempler på ikke-menneskelige adenoviruser som kan produseres under anvendelse av fremgangsmåtene og midlene ifølge foreliggende oppfinnelse, er hunde-, okse-, saue-, froske-, svine-, heste-, ape- og fugleadenoviruser. Serotyper anvendt heri går derfor utover artsbegrensede serotyper.

Det er flere pakkende celler kjent i faget som anvendes for kompletterende rekombinante adenovirale vektorer og til å produsere, sette sammen og pakke de adenovirale partikler. Ikke-begrensede eksempler på slike celle-

linjer er HEK-293, 911 og PER.C6TM-celler. Det er foretrukket å anvende cellelinjer som allerede har vist seg å gi høye titere av adenovirale stammer. Mer foretrukket er kompletterende celler som er avledet fra en primær, 5 diploid menneskelig celle, eller en progenitorcelle derav. Enda mer foretrukket er nevnte kompletterende celle avledet fra en primær human retinoblastcelle, en primær menneskelig embryonisk nyrecelle, en primær menneskelig nervecelle eller en primær menneskelig 10 amniocyt. Høyst foretrukket er å anvende en kompletterende celle i fremgangsmåtene tilveiebragt ved foreliggende oppfinnelse, hvori nevnte kompletterende celle er en PER.C6TM-celle eller et derivat derav. PER.C6TM-celler er kjent i faget for ikke å gi opphav til 15 replikasjonsdyktig adenovirus når adenoviralt DNA anvendes som ikke har noen overlapping med nukleinsyren tilveiebragt ved cellene. Mange av de adenovirale vektorer som anvendes i faget, mangler El-regionen, og derfor omfatter, i et aspekt av oppfinnelsen, nevnte 20 kompletterende celle, integrert i sitt genom, en nukleinsyre som koder minst ett adenoviralt ElA-protein. Fortinnnsvis er nevnte nukleinsyre, som koder minst ett adenoviralt ElA-protein, avledet fra en adenoviral serotype av en undergruppe forskjellige fra undergruppe B. 25 Mer foretrukket er nevnte nukleinsyre som koder minst ett adenoviralt ElA-protein, avledet fra en adenoviral serotype av undergruppe C. Høyst foretrukne er utførelsesformer, hvori nevnte nukleinsyre som koder minst ett adenoviralt ElA-protein, er avledet fra et adenovirus av 30 serotype 5. I en annen utførelsesform av oppfinnelsen, tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte, hvori nevnte E4-orf6-kodende sekvens og nevnte ElB-55K-kodende sekvens er avledet fra forskjellige adenovirale serotyper, og hvori nevnte forskjellige adenovirale serotyper er medlemmer av den samme adenovirale undergruppe. 35 Fortinnnsvis er nevnte E4-orf6-kodende sekvens og nevnte ElB-55K-kodende sekvens avledet fra forskjellige adenovirale serotyper, og hvori nevnte forskjellige adeno-

virale serotyper er begge medlemmer av undergruppe C. Mer foretrukket er nevnte E4-orf6-kodende sekvens og nevnte E1B-55K-kodende sekvens avledet fra den samme adenovirale serotype. Meget foretrukne er metoder, hvori
5 nevnte E4-orf6-kodende sekvens og nevnte E1B-55K-kodende sekvens er avledet fra den adenovirale serotype 5.

Oppfinnelsen vedrører også metoder hvori adenovirale vektorer kan produseres under anvendelse av de passende kompletterende/pakkende celler og den adenovirale vektor
10 av interesse. For en effektiv produksjonsprosess er det nyttig å anvende de riktige celler med den passende adenovirale vektor.

Oppfinnelsen er spesielt nyttig for replikasjon av E1-slettede chimeriske adenoviruser som er avledet nesten
15 fullstendig fra en serotype bortsett fra adenovirus 5. Slike vektorer trenger bare å være utstyrt med en nukleinsyre som koder adenovirus 5 E4orf6 eller en funksjonell del, derivat og/eller analog derav. Straks den er utstyrt med dette, kan vektoren effektivt
20 repliseres på normal adenovirus 5 E1-kompletterende pakkende cellelinjer. Stabiliteten av vektorene er forbedret, og vektorene kan være komplettert med hensyn til slettinger i både E1A og E1B. Ved å tilveiebringe slike vektorer med en nukleinsyre som koder adenovirus
25 E4orf6, er det mulig å oppnå effektiv plakkrensing og gode utbytter og fravær av et ytterligere forurensningsproblem som forekommer med naturlig forekommende substans, når de dyrkes på 293- eller 911-celler. I PER.C6 kan naturligvis naturlig forekommende adenovirus-
30 kontaminering også forhindres på andre måter.

En ytterligere fordel med en rekombinant vektor ifølge oppfinnelsen er at det ikke er behov for å generere spesielle cellelinjers adenovirale E4-orf6 fra en nukleinsyre integrert inn i genomet. Selv om slike
35 cellelinjer eksisterer, er kanskje produksjonsparametre

så som oppskalering og lignende, og/eller reguleringsproblemer ikke blitt løst i samme grad som for cellelinjer så som PER.C6™. Dette kan minst delvis være på grunn av det faktum at med flere og flere fremmede gener innsatt i genomet i cellelinjen er det vanskelig å bibeholde stabiliteten i alle fremmede sekvenser (eller ekspresjonen derav). I foreliggende oppfinnelse ble det funnet at minst noen av problemene forbundet med lavt utbytte av vektorer basert på ikke-adenoviral serotype 5 og stabiliteten av adenovirale serotypiske vektorer fra undergruppe B, så som adenovirus-serotype 7, 11 og 35 på adenovirus-serotype 5-pakkende cellelinjer, kan overvinnes med en rekombinant adenoviral vektor ifølge oppfinnelsen.

Det vil være klart at også de to hovedsakelige aspekter av oppfinnelsen kan kombineres for å sørge for stabile rekombinante adenoviruser som kan vokse på bekveme pakkende celler som er lett tilgjengelig. Oppfinnelsen tilveiebringer således et rekombinant undergruppe B adenovirus omfattende et rekombinant nukleinsyremolekyl som har minst en sletting i E1-regionen, hvor minst en del av sekvensen som koder E1B 55K-genproduktet og øker ekspresjonen av pIX-genet, er nærværende i nevnte rekombinante nukleinsyremolekyl, med det forbehold at nevnte rekombinante nukleinsyremolekyl ikke koder et funksjonelt E1B 55K-genprodukt; idet nevnte rekombinante adenovirus videre omfatter strukturelle og ikke-strukturelle elementer av et adenovirus av en første serotype, hvori nevnte adenovirus videre omfatter en sekvens som koder et funksjonelt E4-orf6-protein, eller en funksjonell del, derivat og/eller analog derav, hvori nevnte sekvens er en E4-orf6-kodende sekvens avledet fra et adenovirus av en andre serotype forskjellig fra nevnte første serotype. Alternativt eller i tillegg til å ha minst en del av E1B 55K-sekvenser, kan nevnte nukleinsyre ha et pIX-genprodukt som reguleres av en heterolog promoter. Fortinnssvis er nevnte første

serotype fra undergruppe B så som Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35 eller Ad50. I en utførelsesform omfatter det rekombinante adenovirus videre en sekvens som koder et ikke-adenoviralt protein, polypeptid eller

5 peptid. Slike rekombinante adenoviruser er stabile og kan vokse på lett tilgjengelige pakkende celler, så som Ad5 E1-holdige pakkende celler, fortinnssvis PER.C6™-celler, når E4-orf6 i det rekombinante adenovirus er kompatibelt med Ad5 E1-genprodukter, for eksempel når

10 E4-orf6 i nevnte adenovirus er avledet fra Ad5. Forhindringen av generering av replikasjonsdyktig adenovirus eller funksjonelt E1-protein inneholdende adenovirale partikler er et kjent problem i faget og er blitt løst ved å forhindre overlapping mellom E1-

15 sekvensene nærværende i adenoviruset med sekvensene i den pakkende celle (US patent 5,994,128). I utførelsesformer av oppfinnelsen vil kombinasjon av f.eks. et Ad35-avledet adenovirus omfattende E1B 55K-sekvenser som øker stabiliteten av viruset ved å innvirke på pIX-

20 ekspresjon, med en pakkende celle omfattende E1-regioner fra Ad5, ikke føre til homolog rekombinasjon med samtidig dannelse av et rekombinant adenovirus omfattende en nukleinsyre som koder et funksjonelt E1B 55K-protein.

Oppfinnelsen vil nå bli illustrert med noen eksempler.

25

EKSEMPLER

Standardiserte molekylærbiologiske metoder ble anvendt (f.eks. Sambrook og Russel, 2001), med mindre noe annet er sagt. Primersekvenser er angitt i tabell IV.

30 Eksempel 1. PER.C6™-baserte kompletterende cellelinjer for E1-slettede Ad35-viruser.

PER.C6-celler ble utsådd i 10 cm kulturskåler i en tetthet av 3x10⁶ celler/skål i PER.C6 kulturmedium (DMEM (Gibco BRL) komplettert med FBS (Gibco BRL) opp til 10%

og 10mM MgCl₂ (4,9 M stamløsning, Sigma)). To dager senere ble 9 skåler transfisert med 1 µg ScaI linearisert pIG35.55K DNA (beskrevet nedenfor), og 9 skåler ble transfisert med 1,5 µg ScaI linearisert pIG35.55K DNA.

5 Separate kontrollskåler ble transfisert med 1 eller 1,5 µg ScaI linearisert pAdApt35.LacZ (beskrevet i WO 00/70071) for å overvåke transfeksjonseffektiviteten og med 1 eller 1,5 µg ScaI linearisert pcDNA.nlsLacZ. pcDNA.nlsLacZ (beskrevet i WO99/55132) er et pcDNA3-

10 basert plasmid (Invitrogen) og nlsLacZ-genet drives av CMV-promoteren. pcDNA.nlsLacZ inneholder også en neo^r-ekspresjonskassett. Som negativ kontroll ble én ekstra skål transfisert med linearisert pAdApt35.LacZ, et konstrukt som mangler det neo^r-utvelgende gen. Alle

15 transfeksjoner ble utført med LipofektAmine-transfeksjonssettet (Invitrogen/Life Technologies) i henhold til fabrikantens instruksjoner under anvendelse av 5 ml LipofektAmine-reagens/µg DNA. Cellene ble inkubert i 4 timer med transfeksjonsblandingen, hvorefter mediet ble erstattet med PER.C6-kulturmedium. Neste dag ble medium erstattet med kulturmedium inneholdende 0,5 mg/ml G418 (Gibco BRL) unntatt i de to skåler som var transfisert med 1 eller 1,5 µg pAdApt35.LacZ. Disse senere skåler ble

20 anvendt for å overvåke LacZ-ekspresjon to dager etter transfeksjon. Etter X-gal-farving av disse kulturer ble transfeksjonseffektiviteten verdsatt til tilnærmet 40% med ubetydelig flere blå celler i skålen transfisert med 1,5 µg DNA. Utvelgelsesmediet ble oppfrisket to ganger ukentlig i de gjenværende transfiserte skåler. Innen to

25 uker etter første tilsetning av utvelgelsesmedium var de fleste celler i den negative kontrollskål (transfisert med 1,5 µg pAdApt35.LacZ) døde. I skålene transfisert med pcDNA.nlsLacZ var cellekloner blitt synlige. Siden cellene transfisert med pIG35.55K syntes å være mer

30 resistente mot G418, ble konsentrasjonen hevet til 0,75 mg/ml 3 uker etter transfeksjon. Tre dager og syv dager senere ble sammenlagt 196 cellekloner plukket ut fra

skålene transfisert med pIG35.55K og utsådd i separate brønner i 96-brønners plater.

Celler som var igjen etter koloniutplukkingen i to 10 cm skåler av transfeksjonen med 1 µg pIG35.55K DNA, ble
5 trypsinisert, slått sammen og ekspandert for å oppnå sammenslåing PER55K(1.0) Det samme ble gjort med to skåler av 1,5 µg transfeksjonen. PER55K(1.0)-celle-sammenslåingen ble ekspandert og utsådd i 4 T25-kolber i en tetthet av $3,5 \times 10^6$ celler/kolbe for transfeksjon til
10 testvirusgenerering. I tillegg ble 3 T25-kolber med parentale PER.C6-celler utsådd i den samme tetthet. pAdApt35.eGFP (et adapterplasmid basert på pAdApt35IP1 (beskrevet i WO 00/70071), men også inneholdende det grønt fluorescerende protein som markør-gen, som var
15 klonet inn i pAdApt35IP1 som HindIII-BamHI-fragment avledet fra pIPspAdapt.eGFP (beskrevet i WO 02/24933)) ble spaltet med PacI for å frigjøre de adenovirale sekvenser fra plasmid-rygggraden. pWE.Ad35.pIX-rITR (beskrevet i WO 00/70071) ble spaltet med NotI for å
20 frigjøre de adenovirale sekvenser fra kosmid-rygggraden. 2 kolber med PER.C6-celler og 2 kolber med PER55K(1.0) celler ble transfisert med 2 µg spaltet pAdApt35.eGFP og 6 µg spaltet pWE.Ad35.pIX-rITR hver. En kolbe fra hver cellelinje ble transfisert med 8 µg pAdApt35.LacZ for å
25 overvåke transfeksjonseffektiviteten. Den gjenværende kolbe med PER55K(1.0)-celler tjente som negativ kontroll og ble behandlet som de andre, men fikk ikke motta transfeksjonsblandingen. Alle transfeksjoner ble utført med LipofectAmine (Invitrogen/ Life Techn.) i henhold
30 til fabrikantens instruksjoner under anvendelse av for hver transfeksjon sammenlagt 8 µg DNA og 40 µl LipofectAmine-reagens. Transfeksjonsblandingen ble fjernet etter 4 timers inkubasjon, og friskt kulturmedium ble tilsatt. Transfeksjonene ble gjort
35 dagen etter utsåingen av cellene, og igjen to dager senere ble celler overført til T25-kolbene til en T80-kolbe med unntagelse av LacZ-kontrolltransfeksjonene.

Disse ble farvet med X-gal-løsning etter mild fiksering. Etter fem timers inkubering med farvende løsning, ble prosentandelen av blå celler vurdert til å være tilnærmet 90% i begge kolber, hvilket viser at transfeksjonen gikk fint for begge cellelinjer. Fire dager etter overføringen til T80-kolbene viste de transfiserte PER55K(1.0)-kulturer begynnende CPE (cytopatogen virkning, hvilket indikerer virusreplikasjon) med tilnærmet 100 foreteelser/kolbe. De utransfiserte PER55K(1.0)-celler ble dyrket sammenløpende uten noen påvisning av CPE. I de transfiserte PER.C6-kulturer var bare tre CPE-foreteelser synlige i det sammenløpende monoskikt av celler. Igjen tre dager senere viste de transfiserte PER55K(1.0)-kulturer full CPE, med alle celler avrundet og atskilt i klumper. Derimot hadde i PER.C6-kulturene de få foreteelser av CPE ikke utviklet seg, og cellene var fremdeles i monoskikt. Dette bekrefter tidligere observasjoner at generering av El-slettede Ad35-baserte viruser på PER.C6 er meget ineffektiv. Også de utransfiserte PER55K(1.0)-kulturer viste, som forventet, et sammenløpende monoskikt uten CPE. Cellene og mediet i PER55K(1.0)-kolbene med full CPE ble høstet og utsatt for fryse/tine-sykluser, hvoretter celleavfallet ble fjernet ved sentrifugering ved 3000 rpm i 10 minutter i en bordsentrifuge. Et av de resulterende rålysater ble anvendt til å infisere en frisk kultur av PER55K(1.0)-celler i en T175-kolbe (1,5 ml/kolbe). Cellene og mediet ble høstet ved full CPE fire dager senere. Dette viser at smittsom virus var dannet i de initielle transfeksjoner. GFP-ekspressjon ble bekreftet ved fluorescerende mikroskopi av A549-celler infisert med rålysattet. Rålysattet ble deretter anvendt til å analysere komplettering av denne El-slettede Ad35.AdApt.eGFP-virus i de individuelle kloner som beskrevet nedenfor.

De ovenfor beskrevne kloner som ble plukket ut fra de pIG35.55K-transfiserte PER.C6-celler, ble utvidet og ble

funksjonelt testet med hensyn til evnen til å opprettholde replikasjon av Ad35.AdApt.eGFP. For dette ble klonene utsådd i to tettheter i 6-brønners plater, og en dag senere ble de infisert med 15 ml av det ovenfor
5 beskrevne rålysat. CPE ble overvåket dagen etter. Av de 146 kloner testet på denne måte gav 19 full CPE på dag 2 eller 3, og 68 gav full CPE på dag 5 eller 6. De gjenværende kloner hadde bare partiell CPE eller viste noen få ikke-utviklende foreteelser. Sistnevnte var umulig å
10 skjelne fra PER.C6-celler som ble tatt med som negativ kontroll.

Basert på disse resultater ble en utvelgelse av 24 kloner gjort, og de ble videre utsilt med hensyn til evnen til å generere rekombinante E1-slettede viruser
15 etter transfeksjon av pAdApt35.GFP-adapterplasmidet og den store pWE.Ad35.pIX-rITR-kosmidklon. For dette ble kloner utsådd i T25-kolber og transfisert med 2 µg av adapteren og 6 µg av ryggradplasmidet under anvendelse av LipofectAmine som beskrevet ovenfor. To dager etter
20 transfeksjonen ble cellene overført til T80-kolber for å forhindre overkonfluens av kulturene. Av de 24 kloner gav 5 full CPE tre dager etter overføring til T80, og ytterligere 13 kloner gav utvikling til full CPE dagen etter. De gjenværende 6 kloner viste ingen CPE eller
25 bare begynnende. Som sammenligning: rutinemessig generering av E1-slettede Ad5 vektorer på PER.C6-celler resulterer generelt i full CPE fire til seks dager etter overføring til T80-kolber.

Dette viser at de nye kloner effektivt kompletterer E1-slettede adenovirusvektorer. En av klonene (klon #16)
30 beskrevet ovenfor ble anvendt til å generere og produsere multiple satser av E1 og E1/E3-slettede Ad35-viruser inneholdende forskjellige transgener. For dette ble virus i rålysater resulterende fra transfeksjoner
35 som beskrevet ovenfor, men under anvendelse av forskjellige adapterplasmider, plakkrenset på den nye celle-

linje. Enkeltvis plakker ble testet med hensyn til transgen aktivitet og deretter amplifisert for produksjon i middels stor skala i 4-8 trippelskikts kolber (3x175 cm/kolbe). Cellene ble høstet ved full CPE, og viruset ble frigjort og rensset som det rutinemessig gjøres for adenoviruser. Mengden av viruspartikler ble bestemt ved HPLC (Shabram et al., 1997). Tabell I viser utbyttet etter nedstrøms bearbeiding av produksjon i middels stor skala av E1- og E1/E3-slettede Ad35-viruser på trippelskiktskolber med PER55K-klon #16-celler. Mengden av rensede viruspartikler kan sammenlignes med utbyttet av Ad5-baserte vektorer på PER.C6-celler.

Vi konkluderer med at vi har generert multiple cellelinjer som effektivt kompletterer fullstendig E1-slettede Ad35-baserte vektorer. Således underletter Ad35 E1B-55K-ekspresjon i en Ad5-kompletterende cellelinje replikasjonen av Ad35-vektorer.

Eksempel 2. Generering av pWE.Ad.pIX-rITRAE3.

Den tidlige region-3 av menneskelige adenoviruser inneholder multiple kodende regioner for proteiner som interfererer med vertens immunrespons på adenoviral infeksjon. Når adenovirale vektorer anvendes som vaksinebærere, er slik interferens uønsket. Derfor konstruerte vi et Ad35-rygggradkosmid som mangler E3-regionen.

For dette ble konstruert pBr.Ad35.PRn (Fig. 15; beskrevet i eksempel 13 i publikasjon EP1054064) spaltet med StuI og MluI, og det 17,3 kb lange vektorfragment ble rensset fra lavtsmeltende (LMP) gel under anvendelse av agarase-enzym (Roche) i henhold til fabrikantens instruksjoner. Deretter ble et PCR-fragment generert på pBr.Ad35.PRn under anvendelse av primerne 35E3for og 35E3rev. For amplifikasjonen ble Pwo DNA-polymerase (Roche) anvendt i henhold til fabrikantens instruksjoner, og programmet

ble satt til: 94°C i 2 minutter, 30 sykluser på (94°C i 30 sekunder, 58°C i 30 sekunder og 72°C i 1 minutt) og en avsluttende inkubering ved 68°C i 8 minutter. Det 833 bp lange PCR-produkt ble renset under anvendelse av

5 QIAquick PCR-rensesettet (Qiagen) og spaltet med MluI og StuI. Det spaltede DNA ble renset fra gelen under anvendelse av QIAquick-gelekstraksjonssettet (Qiagen). Begge isolerte fragmenter ble ligert og transformert til DH5a-kompetente celler (Invitrogen/Life Technologies)

10 for å oppnå pBr.Ad35.PRnΔE3 (Fig. 25). Plasmidet ble kontrollert ved restriksjonsanalyse og sekvensialisering av den PCR-amplifiserte innsetning. E3-slettingen ble deretter klonet inn i pWE.Ad35.pIX-rITR-kosmid-rygg-raden. For dette ble pWE.Ad35.pIX-rITR spaltet med PacI,

15 og DNA'et ble renset ved utfelling med isopropanol og vasking med 70% EtOH. Etter suspensjon på nytt i milliQ vann, ble DNA'et spaltet med SwaI, og det 22,8 kb vektor-holdige fragment ble renset fra LMP-gel under anvendelse av agarase-enzym som ovenfor. Konstrukt

20 pBr.Ad35.PRnΔE3 ble spaltet med PacI og SwaI på samme måte, og det 16,6 kb lange fragment ble også isolert under anvendelse av agarase-enzym. Begge isolerte fragmenter ble ligert under anvendelse av 0,5-0,6 µg av hvert fragment. Ligerte fragmenter ble deretter pakket under

25 anvendelse av λ-bakteriofag-pakkende ekstrakter (Stratagene) i henhold til fabrikantens instruksjoner og blandet med STBL-2-celler. Bakterier ble utsådd på LB+Amp-plater, og resulterende kolonier ble analysert med hensyn til nærvær av det korrekte konstrukt. Dette

30 gav konstrukt pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3 (Fig. 1). E3-slettingen strekker seg fra nukleotid 27648 til 30320 i Ad35-sekvensen (beskrevet i WO 00/70071) og spanner således over en 2,6 kb lang region.

Kotransfeksjon av NotI-spaltet pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3 og

35 pIPsp-1-spaltet (New England Biolabs) pAdApt35.eGFP over på PER55-klon #16-celler (beskrevet ovenfor) forårsaket GFP-uttrykkende Ad35-baserte virus. Ved isolering av

viralt DNA fra disse viruser viste PCR-amplifikasjon av E3-regionen at virusene var slettet for 2,6 kb av E3-sekvensene, som forventet.

5 Eksempel 3. Begrensninger i pakningsstørrelse på E1-slettede Ad35-baserte vektorer.

Ad35-baserte E1-slettede og E1/E3-slettede vektorer inneholdende forskjellige innsetninger ble generert ved transfeksjon av PER55K-klon#16-celler (se eksempel 1) med

- 10 1,5 µg av et Ad35-adapterplasmid som bærer et spesifikt transgen spaltet med PacI eller pIPsp-1-enzym for å frigjøre adenovirusinnføyningen fra plasmidvektorsekvensene og,
 4,5 µg av enten pWE.Ad35.pIX-rITR spaltet med NotI eller
 15 med pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3 spaltet med NotI-enzym.

Den høyre flanke av adapterplasmidene og den venstre ende av ryggradplasmidet inneholder homologe sekvenser som medierer rekombinasjonsforeteelser som fører til et
 20 komplett E1-slettet viralt genom (som beskrevet i WO 00/70071).

Transfeksjoner ble gjort med 30 µl LipofectAmine-reagens (Invitrogen/Life Technologies) for hvert sett av konstrukter i henhold til fabrikantens instruksjoner.
 25 Transfeksjonsblandinger ble tilsatt til PER55K-klon 16-celler ved 70% konfluens i T25-kolber. Følgende kombinasjoner ble transfisert:

1. pAdApt35IP1 + pWE.Ad35.pIX-rITR
 2. pAdApt35IP1 + pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3
 30 3. pAdApt35eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITR
 4. pAdApt35eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3
 5. pAdApt35Luc + pWE.Ad35.pIX-rITR
 6. pAdApt35Luc + pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3

7. pAdApt35LacZ + pWE.Ad35.pIX-rITR

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

Adapterplasmider ble spaltet med pIPsp-1 enzym for å
 5 frigjøre adenovirus-sekvensene fra plasmidvektor-
 ryggraden. pWE.Ad35.pIX-rITR og pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3 ble
 spaltet med NotI før transfeksjonen av samme grunn.
 Generering av adapterplasmidene og av pWE.Ad35.pIX-rITR-
 ryggradkosmidet er beskrevet tidligere i WO 00/70071.
 10 Generering av pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3 er beskrevet ovenfor.

To dager etter transfeksjonen ble cellene overført til
 T80 og videre inkubert inntil full CPE var oppnådd.
 Celler og medium ble høstet 1-2 dager etter at full CPE
 var iakttatt. Blandingene ble utsatt for en fryse/tine-
 15 syklus og sentrifugert ned ved 1500 rpm i 15 minutter
 til pelletisert celleavfall, hvorefter supernatanter ble
 samlet opp. Rålysatenes oppnådd på denne måte ble anvendt
 til å isolere viralt DNA. For dette ble 275 μ l av rå-
 lysatmaterialet inkubert med 10 μ l 10mg/ml DNaseI ved 37°C
 20 i 30 minutter. Deretter ble 6,0 μ l 0,5 M EDTA (pH 8,0),
 7,5 μ l 20% SDS og 1,5 μ l 20 mg/ml Proteinase K tilsatt
 og blandet ved hvirvling. Blandingen ble deretter inku-
 bert ved 50°C i 1 time. Til slutt ble det virale DNA
 isolert under anvendelse av GeneClean Spin Kit (Bio 101,
 25 Inc.). Etter eluering av det virale DNA i 20 μ l milliQ
 H₂O ble transgenregionen analysert ved hjelp av PCR-
 amplifikasjon. For dette ble primerne AdApt35CMVF og
 35pIXR anvendt. Amplifikasjonene ble gjort med 2 μ l av
 det isolerte virale DNA under anvendelse av Taq DNA-
 30 polymerase (Invitrogen). Reaksjonsblandingen inneholdt
 5 μ l 10x buffer (Invitrogen), 2 μ l 50mM MgCl₂, 5 μ l 2mM
 dNTPs, 3 μ l av hver primer (10 μ l stammløsning) og 2,5
 enheter Taq-enzym i et totalt volum av 50 μ l. Programmet
 ble satt til 94°C i 2 minutter etterfulgt av 30 sykluser
 35 på (94°C i 30 sekunder, 60°C i 30 sekunder og 72°C i 4
 minutter). Kontrollreaksjoner ble gjort på 5 ng adapter-
 plasmid. Etter avslutning av PCR ble 5 μ l av reaksjons-

blandingen satt på gel for analyse. Figur 2 viser resultatene for de ovenfor nevnte transfeksjoner. Primerne amplifiserer sekvenser fra 5'-enden av CMV-promoterens til 5'-enden av pIX-kodingsregionen. Som man kan se av Figur 2, viser viruset uten transgen eller med GFP-innføying det forventede bånd (sammenlign med plasmidkontrollene; banene PL for hvert virus). Mindre fragmenter ses med de større innføyninger, luciferase og LacZ, og disse slettinger blir mer fremtredende med større total lengde av viruset (sammenlign LacZ- eller Luc-viruset med og uten E3). Således samsvarer økende genomlengde med at det opptrer slettinger i transgenregionen. Det faktum at den totale genomlengde (også indikert i Fig. 2) av Ad35.AdApt.eGFP og Ad35.AdApt.LacZΔE3, 33,7 og 33,4 kb lange respektive, er sammenlignbar, mens slettinger bare fins i LacZ-virusprøven, indikerer at enten sekvensen eller størrelsen på innføyningen i den tidligere E1-region kan også ha innflytelse på at slettingene opptrer.

Eksempel 4. Sekvenssammenligning av pIX-genregionen av adenovirus av serotype 5 og 35.

Funnet at det med økende genomlengde på rekombinante Ad35-viruset opptrer slettinger i transgenregionen, vil kunne antyde, i analogi med de pIX-manglende Ad5-viruset (Ghosh-Choudhury et al., 1987), at det er et problem med stabiliteten av kapsidene. Det faktum at Ad35.E1B+.AdApt.Luc-viruset (hvor E1A-sekvenser er erstattet med AdApt.Luc-kassetten) med en total lengde på 36,7 kb kan lages, indikerer at slettingen av E1B spiller en rolle. Dette vil kunne være enten via en funksjon i en av E1B-proteinene i seg selv eller via en funksjon av ukjente regulerende sekvenser i denne region som har innflytelse på ekspresjon av andre adenovirale proteiner. Det har, såvidt vi vet, ikke vært beskrevet at E1B-proteiner i seg selv har innflytelse på pakningskapasiteten av adenoviruset. Imidlertid er det blitt beskrevet at E1B-

21K-proteinet ikke-spesifikt stabiliserer transfisert DNA (Herrman og Mathews, 1989) og at mutasjoner i 21K-proteinet resulterer i degradering av cellulært og viralt DNA under infeksjon (Pilder et al., 1984; White et al., 1984). Siden Ad5 E1B-21K-proteinet uttrykkes i PER.C6-celler, gir disse funn ikke en forklaring på våre observasjoner. PIX-genet er lokalisert direkte 3' for E1B-55K-kodingsregionen. For Ad5 er det kjent at pIX-promoter og kodende sekvenser er lokalisert innen E1B-transkripsjonsregionen, siden pIX og E1B deler polyadenyleringssignalet. De minste promotersekvenser som er nødvendig for pIX-ekspressjon, er blitt studert vedrørende Ad5 (Babiss og Vales, 1991). Det ble vist at et promoterfragment inneholdende Spl-setet oppstrøms og den innrammede TATA-sekvens var tilstrekkelig for pIX-ekspressjon. Avstanden mellom Spl-setet og TATA-innrammingen samt sekvensen for TATA-ruten i seg selv, ble påvist å ha innflytelse på nivået av pIX-ekspressjon. Hvorvidt den tilsvarende region i Ad35 også er tilstrekkelig til å drive pIX-ekspressjon til et nivå som er høyt nok for stabile virus, er ikke kjent. Sekvenssammenligning viste at både Spl-setet og TATA-sekvensen er forskjellig fra dem som fins i Ad5 pIX-promoter. Under anvendelse av sekvensinformasjon tilgjengelig fra Genbank ble en sammenligning gjort mellom de proksimale pIX-oppstrømssekvenser (dvs. mellom stoppkodonet for E1E-55K og startkodonet for pIX-genet) av serotyper fra forskjellige undergrupper. Følgende adenovirus med SEQ. ID. NO og Genbank-referansesekvenser ble anvendt for sammenligningen: Ad2 (SEQ. ID. NO. 45; Genbank NC 001405), Ad5 (SEQ. ID. NO. 46; Genbank M73260), Ad12 (SEQ. ID. NO. 47; Genbank NO 001460), Ad9 (SEQ. ID. NC. 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-sekvensen (SEQ. ID. NO. 52) var som publisert i WO 00/70071. Ad11-sekvensen (SEQ. ID. NO. 53) var ikke publisert før og tilveiebringes heri. Fig. 3A viser en

linjestilling av de ovenfor nevnte sekvenser mellom stoppkodonet for ElB-55K-proteinet (første 3 nukleotider i alle sekvenser) og startkodonet for pIX-proteinet (siste 3 nukleotider). Spl-setet og TATA-sekvensen i Ad2 og Ad5 er innrutet. I de fleste tilfeller er det til-
 5 strekkelig med homologi til direkte å peke på Spl- og TATA-boksene i de andre sekvenser. Derfor ble konsensus-sekvensene for GC- og TATA-rutene som publisert av Bucher, P (1990) anvendt til å identifisere den forment-
 10 lige Spl- og TATA-innramming i de forskjellige sekvenser. Fig. 3b viser de formentlige Spl- og TATA-ramme-sekvenser og avstanden mellom dem. Ad12, Ad9 og Ad40, som tilhører henholdsvis undergruppe A, D og F, har Spl-og TATA-sekvenser som tilbørlig passer sammen med konsensus-
 15 sekvensen. Imidlertid er avstanden mellom de to rammer mindre enn for Ad5 og Ad2. Dette er ikke uvanlig siden Ad5 ElB-promoterer også inneholder en Spl-ramme og en TATA-sekvens med en avstand på 11 nukleotider. Imidlertid gav en sletting av 9 nukleotider (av de 20) i Ad5 pIX-promotersekvensen mellom Spl- og TATA-rammene reduserte pIX-nivåer (Babiss og Vales, 1991). Undergruppe B's serotyper Ad35, Ad11 og Ad7 samt undergruppe E's virus Ad4, har divergerende TATA-ramme-sekvenser og forskjellig avstand mellom den formentlige Spl-sekvens og TATA-
 20 rammen. Den proksimale pIX-region i menneskelig adenovirus av type 4 er identisk med regionen i ape-adenovirus 25 (CV68), en serotype som nylig ble foreslått som terapeutisk vektor (Farina et al., 2001). Således kan, også for replikasjonsudyktige vektorer basert på ikke-menneskelige adenoviruser, pIX-ekspressjonen være util-
 30 strekkelig for stabile kapsider.

Det kan godt være at pIX-ekspressjon reguleres forskjellig i Ad35-viruser og andre menneskelige og ikke-menneskelige adenoviruser og at regulerende sekvenser, eller til og med promoterensekvenser i seg selv, er
 35 lokalisert videre oppstrøms i ElB-sekvensene eller enda mer oppstrøms. Alternativt er det også mulig, siden pIX-

ekspressjon aktiveres av ElA-proteiner, at det oppnås høye nivåer av pIX-ekspressjon i nærvær av ElA-proteiner tilhørende den samme serotype eller undergruppe.

Vi undersøkte hvorvidt å forandre de endogene proksimale pIX-oppstrømssekvenser til en heterolog promoter for å øke pIX-ekspressjon i vektoren, fører til mer stabile virusser og en bedre pakkekapasitet (nedenfor). Alternativt kan pIX-funksjonen leveres in trans via den pakken- de cellelinje. Som et ikke-begrensende eksempel beskri- ver vi rekombinante Ad35-baserte virusser som har en ikke-endogen proksimal pIX-promoter som i Ad5-virusser, og vi viser at disse virusser har en bedre stabilitet enn de uforandrede rekombinante vektorer.

Eksempel 5. Generering av adapterplasmider med en Ad5 pIX-promoter

pAdApt535 er et Ad35-adapterplasmid som har en del av Ad5 pIX-promotersekvensene, men er ellers identisk med Ad35-adapterplasmid pAdApt35IP1 (se WO 00/70071). Dets konstruksjon er beskrevet nedenfor:

Et første PCR-fragment ble generert med primerne SV40for og pIXSRmfe. Reaksjonen ble gjort med Pwo DNA-polymerase (Roche) i henhold til fabrikantens instruksjoner, men med 3% DMSO i den endelige blanding. pAdApt, et adapter- plasmid for Ad5 El-slettede virusser (100 ng; se WO 00/70071) ble tatt som modell. Programmet ble satt som følger: 2 minutter ved 94°C og deretter 30 sykluser på (94°C i 30 sekunder (smelting), 52°C i 30 sekunder (temperering) og 72°C i 30 sekunder (forlengelse)) etterfulgt av 8 minutter ved 72°C. De resulterende PCR- fragmenter inneholder 3'-enden av SV40-polyadenylerings- signalet fra pAdApt og Ad5 pIX-promoterregionen som de forekommer i Genbank-aksesjonsnr. M73260 fra nukleotid 3511 til nukleotid 3586 og et MfeI-sete ved 3'-enden.

Et andre PCR-fragment ble generert som beskrevet ovenfor, men med primerne pIX35Fmfe og 35R4. 100 ng pAdApt35IP1 ble tatt som modell, tempereringen ble satt til 58°C i 30 sekunder og forlengelsen i PCR-programmet ble satt
5 til 72°C i 90 sekunder. Denne PCR amplifiserer Ad35-sekvenser fra nukleotid 3467 til nukleotid 4669 (sekvens nummerering som i WO 00/70071) og adderer et MfeI-sete til 5'-enden.

Begge PCR-fragmenter ble deretter spaltet med MteI og
10 rensset under anvendelse av Qiagen PCR-rensesettet (Qiagen) i henhold til fabrikantens instruksjoner. Konsentrasjonen av de rensede fragmenter ble bestemt ved å kjøre en prøve på agarosegel, og tilnærmet ekvimolare mengder av de to fragmenter ble blandet i en ligasjons-
15 reaksjon inneholdende 5 µg DNA, 4 µl 10x ligasebuffer og 2 µl ligaseenzym (New England Biolabs) i et 40 µl volum. Etter en inkubering på > 2 timer ved RT, ble blandingen satt på en 1,2% agarosegel i TAE, og DNA-fragmentene med 1,4 kb lengde ble isolert med Geneclean II-utstyrsettet
20 (Bio101, Inc.) i henhold til fabrikantens instruksjoner.

DNA'et ble eluert i 30 µl sterilt H₂O, og 1 µl ble anvendt i en PCR-amplifikasjonsreaksjon med primerne SV40for og 35R4 som beskrevet ovenfor. PCR ble gjort som beskrevet ovenfor med en tempereringstemperatur på 52°C
25 og en forlengelsestid på 90 sekunder. Det resulterende produkt ble isolert fra gel under anvendelse av Qiagen gel-ekstraksjonssettet og spaltet med AgeI og BglII. Det resulterende 0,86 kb lange bånd ble isolert fra gel under anvendelse av Geneclean II-settet i henhold til
30 fabrikantens instruksjoner.

pAdApt35.Luc (beskrevet i WO 00/70071) ble også spaltet med BglII og AgeI, og 5,8 kb vektorfragmentet ble isolert fra gel under anvendelse av Geneclean II-settet som ovenfor. Dette fragment ble ligert med det isolerte
35 BglII-AgeI-fragment beskrevet ovenfor inneholdende den

Ad5-Ad35-chimeriske pIX-promoter, for å oppnå pAdApt535.Luc (Fig. 4).

Andre adapterplasmider inneholdende Ad5 pIX-promoter ble deretter fremstilt som følger:

5 pAdApt535.Luc ble spaltet med BglII og ApaI og den 1,2 kb lange innføyning ble rensset fra gel under anvendelse av Geneclean II-settet i henhold til fabrikantens instruksjoner. pAdApt35IP1 ble også spaltet med BglII og ApaI, og det 3,6 kb lange vektorfragment ble isolert som
10 ovenfor. Ligasjon av begge isolerte fragmenter resulterte i pAdApt535 (Figur 5). Deretter ble pAdApt535 anvendt til å klonere andre markørgener så som eGFP (avledet fra pAdApt35.eGFP) og LacZ (avledet fra pAdApt35.LacZ) inn i det multiple kloningssete under
15 anvendelse av standardiserte kloningsteknikker som gir opphav til pAdApt535.eGFP og pAdApt535.LacZ.

Eksempel 6. Generering av El-slettede Ad35-baserte vektorer med adapterplasmider inneholdende Ad5 pIX-promoter.

20 Rekombinante virus ble generert ved transfeksjon av adapterplasmider og Ad35-vektoriske ryggradkosmider på PER55K-klon 16-celler som beskrevet ovenfor. For dette ble følgende sett av plasmider anvendt:

T1. pAdApt535eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITR
25 T2. pAdApt535eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3
T3. pAdApt35Luc + pWE.Ad35.pIX-rITR
T4. pAdApt535Luc + pWE.Ad35.pIX-rITR
T5. pAdApt535Luc + pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3
T6. pAdApt535LacZ + pWE.Ad35.pIX-rITR
30 T7. pAdApt535LacZ + pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3
T8 pAdApt35LacZ + pWE.Ad35.pIX-rITR
T9. pAdApt35LacZ + pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3

Adapterplasmider ble spaltet med PacI, unntatt pAdApt535.Luc og pAdApt35.Luc som ble spaltet med pIPsp-1-enzym, og pWE.Ad35.pIX-rITR og pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3 ble spaltet med NotI før transfeksjon. 2 µg av hvert adapterplasmid og 6 µg av ryggrad-DNA ble blandet med 40 µl LipofectAmine (Invitrogen/Life Technologies) i henhold til fabrikantens instruksjoner og inkubert med PER55K-klon 16-celler i T25-kolber ved 70% konfluens. Transfeksjonsmediet ble fjernet etter 4 timer, og cellene ble videre inkubert ved 37°C/10% CO₂. To dager etter transfeksjonen ble cellene overført til en T80-kolbe og undersøkt med hensyn til opptreden av cytopatogen virkning (CPE) i dagene etter. Fem dager senere viste alle kulturer fremskridende eller full CPE unntatt T6 (ingen CPE) og T8 (CPE-opptreden). Igjen to dager senere viste T6 og T8 begynnende CPE og alle andre full CPE. Alle kulturer ble høstet ved oppsamling av medium og celler. Blandingene ble lagret ved -20°C. Ved opptining av cellene ble blandningene sentrifugert ned ved 1500 rpm i 15 minutter til pelletisert celleavfall, og supernatanten ble samlet opp. Blant noen av cellene (de fire LacZ-uttrykkende virusser, T6-T9) ble 2 ml anvendt til å infisere igjen PER55K-klon 16-celler ved 80% konfluens i en T80-kolbe for videre å amplifisere virustiteren. Celler og medium ble høstet ved fremskridende (T6+T8) eller full CPE (T7+T9), og rålysater ble fremstilt som beskrevet ovenfor.

Rålysatene oppnådd på denne måte ble anvendt til å isolere viralt DNA. For dette ble 275 µl rålysat-materialet inkubert med 10 µl 10mg/ml DNaseI ved 37°C i 30 minutter. Deretter ble 6,0 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0), 7,5 µl 20% SDS og 1,5 µl 20 mg/ml Proteinase K tilsatt og blandet ved omhvirvling.

Blandingen ble deretter inkubert ved 50°C i 1 time. Til slutt ble det virale DNA isolert under anvendelse av "GeneClean Spin Kit" (Bio 101, Inc.). Viralt DNA ble

eluert i 50 µl milliQ H₂O, og 5 µl samples ble anvendt
 til å analysere transgenregionen. Det bør bemerkes at
 pWE.Ad35.pIX-rITR+/-E3-rygggradkosmidene var uforandret og
 derfor fremdeles inneholder Ad35 pIX-promoteren. Siden
 5 denne promoter er lokalisert ved nettopp 5'-enden av
 kosmidet, ble sjansene for en rekombinasjonsforeteelse
 som resulterer i wt Ad35-promoteren, ansett å være
 liten. Imidlertid kunne det ikke utelukkes i dette opp-
 sett at virusser ville genereres, hvilke fremdeles inne-
 10 holder Ad35 pIX-promoteren. Derfor ble to spesifikke
 PCR-amplifikasjoner utført på hvert viruspreparat: Den
 første ble gjort med primersett 1 (Ad35-spesifikk):
 AdApt35CMVF og AdApt35pIXrev. Denne PCR amplifiserer
 spesifikt transgenregionen i virusser inneholdende Ad35
 15 pIX-promoteren. PCR-reaksjonen ble gjort på 5 µl av de
 isolerte virale DNA-prøver med rekombinant Taq-polymerase
 (Invitrogen) i henhold til fabrikantens instruksjoner,
 men med anvendelse av 4mM MgCl₂ og 4 enheter Taq-enzym i
 reaksjonene. PCR-programmet ble satt til 94°C i 2 minut-
 20 ter etterfulgt av 30 sykluser på (94°C i 30 sekunder,
 60°C i 30 sekunder og 72°C i 5 minutter) og endte med et
 avsluttende trinn på 8 minutter ved 68°C.

Den andre ble gjort med primerne AdApt35CMVF og pIXSRmfe
 og amplifiserer således spesifikt transgenregionen i
 25 virusser inneholdende Ad5 pIX-promoteren (primersett 2).

PCR-amplifikasjon ble gjort på 5 µl av det isolerte
 virale DNA under anvendelse av Pwo DNA-polymerase (2,5
 enheter/µl Genaxis) i et 50 µl volum inneholdende 0,3 µl
 av hver primer (100 pM stamløsning), 5 µl 2mM dNTP-
 30 blanding, 5 µl 10x komplett buffer (inneholdende Mg²⁺, 1,5 µl
 DMSO og 0,8 µl Pwo-enzym. PCR-programmet ble satt til
 94°C i 2 minutter etterfulgt av 30 sykluser på (94°C i
 30 sekunder, 60°C i 30 sekunder og 72°C i 5 minutter) og
 endte med et avsluttende trinn på 8 minutter ved 68°C.
 35 Under PCR ble oppvarmingen og kjølerampene satt til
 2°C/second. Deretter ble 5 µl lastebuffer tilsatt til

cellene, og 8 µl av blandingen ble overført på gel for analyse.

De E1- og E2/E3-slettede Ad35-viruser inneholdende Ad5 pIX-promotersekvensene og eGFP-transgenet (transfeksjonene T1 og T2) hadde PCR-amplifiserte bånd ved den forventede høyde uten kortere fragmenter. Fig. 6a viser resultatene for PCR-amplifikasjonene på den E1-slettede Luciferase som bærer viruset (transfeksjonene T3 og T4). Banene 5-8 er kontroll-PCR'ene på AdApt535Luc (banene 5 og 6) og AdApt35Luc-plasmider (banene 7 og 8) med begge primer-settene. Banene 1-4 er PCR'er på de virale DNA-isolater. Primersett 1 (spesifikt for Ad35 pIX-regionen) amplifiserer et bånd med den forventede lengde og viser i tillegg kortere fragmenter på Ad35.AdApt35.Luc-viruser (bane 4; sammenlign også Fig. 2 Luciferase +E3). Derimot viser primersett 2 (spesifikt for Ad5 pIX-promoteren) bare et bånd med den forventede lengde uten slettingsfragmenter når viruset fremstilles med AdApt535.Luc-plasmidet (bane 1). Fra dette konkluderer vi med at innføyningen av Ad5 pIX-promotersekvenser øker stabiliteten og pakningskapasiteten av Ad35-E1-slettede viruset. Figur 6b bekrefter disse resultater for Ad35 E1/E3-slettede viruset som bærer LacZ som transgen. Banene 1-4 er kontroll-PCR'ene på AdApt535.LacZ- og AdApt35.LacZ-plasmider med hvert primersett. Noen bakgrunnsbånd ses særlig med primersett 1 (banene 2 og 4), men et meget spesifikt bånd ses også ved den forventede høyde for hvert primersett på de homologe prøver (banene 1 og 4). Viralt DNA ble isolert etter transfeksjon og etter én amplifikasjonsrunde som beskrevet ovenfor. Det er påfallende at primersett 2 genererer det forventede fragment på Ad35.AdApt535.LacZ viruset uten slettingsfragmenter (banene 5 og 9) mens prøven med viruset inneholdende Ad35 pIX-promotersekvensen klart viser slettede fragmenter i tillegg til et fragment med den korrekte lengde (synlig etter amplifikasjon (bane 11)).

Alt i alt viser disse resultater at innsetting av Ad35-pIX-promotersekvensene istedenfor Ad5-pIX-promotersekvenser øker stabiliteten av transgenregionen i virus med større genomer. Sterkere promotere eller ytterligere promoterelementer kan til og med forsterke denne virkning.

Eksempel 7. Generering av pWE.Ad35-3481.

Som indikert ovenfor, inneholder adenovirusinnføyningen i kosmidet pWE.Ad35.pIX-rITR Ad35 pIX-promoterens 5'-ende. Dette vil kunne føre til gjeninnsetting av Ad35 pIX-promoterens inn i virus generert med de pAdApt535-baserte adapterplasmider. Derfor fremstilles en ny versjon av Ad35-rygggradkosmidet som mangler pIX-promotersekvenser. For dette ble et PCR-fragment generert med pIXcosF-2- og Adapt35-3-primerne. Amplifikasjonen ble gjort med Pwo DNA-polymerase (2,5 enheter/ μ l; Genaxis) i et 50 μ l volum inneholdende 3 μ l av hver primer (10 μ M stamløsning), 5 μ l 2mM dNTP-blanding, 5 μ l 10x komplett buffer (inneholdende Mg^{2+}), 1,5 μ l DMSO, 0,5 μ l Pwo-enzym og 10 ng pAdApt35IP1-modell. PCR-programmet ble satt til 94°C i 2 minutter etterfulgt av 5 sykluser på (94°C i 30 sekunder, 58°C i 30 sekunder og 72°C i 1,5 minutter) og deretter 25 sykluser på (94°C i 30 sekunder, 60°C i 30 sekunder og 72°C i 1,5 minutter) og til slutt et avsluttende trinn på 8 minutter ved 68°C. Det resulterende 1,2 kb lange PCR-produkt inneholder Ad35-sekvenser fra nukleotid 3481 til nukleotid 4663 (nummerering i henhold til Ad35-sekvensen publisert i WO 00/70071) med et AatII- og NotI-sete bundet til 5'-enden. PCR-produktet ble rensset under anvendelse av PCR-rensesettet (Qiagen) i henhold til fabrikantens instruksjoner og klonet inn i pPCR-Script Amp-vektoren (Stratagene) i henhold til fabrikantens instruksjoner. Sekvensen i det klonede fragment bekreftes deretter ved sekvensialisering og fjernes deretter fra konstruktet ved spaltning med AatII og AgeI. Det resulterende 780 bp lange fragment renses

fra gel under anvendelse av "the Geneclean spin kit" (Biol01, Inc.) i henhold til fabrikantens instruksjoner.

Konstrukt pWE.Ad35ΔNdeI (beskrevet nedenfor) spaltes også med AatII og AgeI, og det resulterende 12 kb lange
 5 vektorfragment isoleres fra gel under anvendelse av "the Geneclean spin kit" (Biol01, Inc.) i henhold til fabrikantens instruksjoner. Ligasjon av begge isolerte fragmenter resulterer i konstrukt pWE.Ad35-348ΔNdeI.

Konstruksjonen av konstrukt pWE.Ad35LNdeI er beskrevet i
 10 WO 00/70071 og inneholder Ad35-sekvenser fra nukleotid 3401 til NdeI-setet ved nukleotid 6541 og Ad35-sekvenser fra NdeI-setet ved nukleotid 33167 til enden av den høyre ITR, hvorved begge Ad35-fragmenter er bundet via NdeI-setet (se også Figur 13 i WO 00/70071).

15 pWE.Ad35-3481ΔNdeI lineariseres deretter med NdeI, defosforyleres med CIP-enzym (New England Biolabs) og renses fra gel under anvendelse av "the Geneclean spin kit" (Biol01, Inc.) i henhold til fabrikantens instruksjoner. Dette vektorfragment ligeres deretter til et 26,6
 20 kb langt NdeI-fragment isolert fra Ad35 wt DNA, hvoretter blandingen anvendes til å pakke kosmidet under anvendelse av λ-bakteriofag-pakkende ekstrakter (Stratagene) i henhold til fabrikantens instruksjoner. Den resulterende blanding anvendes til å omdanne STBL-2-bakterier
 25 (Invitrogen), og gir opphav til pWE.Ad35-3481.

Eksempel 8. Konstruksjon av pIG35.55K.

Konstrukt pIG35.55K inneholder de kodende sekvenser av Ad35 EIB-55K-genet funksjonsdyktig bundet til den humane fosfoglyceratkinasepromoter (hPGK) og HBV-polyadenyle-
 30 ringssekvensen. I tillegg inneholder det det neomycin-resistente gen funksjonsdyktig bundet til RSV-promoteren og HBV pA. Konstruksjonen av pIG35.55K er beskrevet nedenfor.

Konstrukt pIG270 (beskrevet i WO 00/70071) ble spaltet med EcoRI, behandlet med Klenow enzym og renset under anvendelse av et PCR-rensesett (Qiagen) i henhold til fabrikantens instruksjoner. Det gjenvundne DNA ble der-

5 etter spaltet med AgeI, og det -5 kb lange vektorfragment ble isolert fra gel under anvendelse av Geneclean-settet (Bio101, Inc.) i henhold til fabrikantens instruksjoner. Deretter ble Ad35 E1B-55K-sekvenser amplifisert ved PCR på pIG270-modell-DNA under anvendelse av 35D21- og 35B3-

10 primerne. PCR-amplifikasjonen ble gjort med Pwo DNA-polymerase (Roche) på 2 ng modell-DNA i henhold til fabrikantens instruksjoner, men under anvendelse av DMSO i en avsluttende konsentrasjon av 3% i PCR-blandingen. Programmet ble satt til: 94°C i 2 minutter etterfulgt av

15 25 sykluser på (94°C i 30 sekunder, 56°C i 30 sekunder og 72°C i 30 sekunder) og endte med en avsluttende inkubering ved 72°C i 10 minutter. Det resulterende PCR-fragment ble renset under anvendelse av PCR-rensesettet (Qiagen) og spaltet med NcoI. Etter Klenow-behandling

20 for å fylle de fremspringende ender, ble DNA'et videre spaltet med AgeI og igjen kolonnerenset. Det således behandlede PCR-fragment ble deretter klonet inn i det ovenfor fremstilte EcoRI/AgeI-spaltede vektorfragment for å oppnå pIG270.ΔE1AΔ21K. pIG270.ΔE1AΔ21K ble spaltet

25 med AvrII og XbaI, og fremspringende ender ble fylt under anvendelse av Klenow-enzym. Det 2,9 kb lange fragment inneholdende PGK-promoter og Ad35 E1B-55K-sekvensene ble isolert fra gel som beskrevet ovenfor. Deretter ble pRSVneo4 (konstruksjonen beskrevet

30 nedenfor) spaltet med BglII, avstumpet med Klenow-enzym, defosforylert og isolert fra gel. Det avstumpede AvrII/XbaI-fragment fra pIG270.ΔE1AΔ21K ble deretter ligert inn i det ovenfor fremstilte pRSVneo4-vektorfragment for å oppnå pIG35.55K.

35 pRSVneo4 ble generert som følger: Konstrukt pRSVhvbvNeo (beskrevet i WO 00/70071) ble spaltet med ScaI og BamHI, og fremstående ender ble fylt i under anvendelse av

Klenow-enzym. Det 1070 bp lange fragment inneholdende en del av Ampicilin-genet og RSV-promoteren ble isolert fra gel under anvendelse av Geneclean-settet (BIO 101, Inc.). Deretter ble pRSVhvbvNeo spaltet med ScaI og EcoRI, avstumpet med Klenow, og det 3,2 kb lange fragment inneholdende neo-genet, HBVpA, vektoren og delen av Ampicilin-genet ble isolert som ovenfor. De to fragmenter ble deretter ligert for å oppnå pRSVneo4.

Eksempel 9. Øket pIX-ekspressjon mediert av RSV-promoterens øker stabiliteten av Ad35-viruser.

Som eksempel på en heterolog promoter-drivende ekspressjon av pIX-genet ble RSV-promoteren innføyd i Ad35-adapterplasmidene inneholdende LacZ- eller Luciferase-reportergenet. RSV-promoterens motsvarer et NruI/ApaLI-fragment som kan oppnås fra pRc-RSV (Invitrogen). Fremstående ender ble fylt i under anvendelse av Klenow-enzym (New England Biolabs) i henhold til fabrikantens instruksjoner. Det 388 bp lange fragment inneholdende RSV-promoterens ble isolert fra agarosegel under anvendelse av "the QIAquick Gel Extraction kit" (Qiagen). Adapterplasmidene pAdApt35.Luc og pAdApt35.LacZ ble linearisert med BglII etterfulgt av Klenow-behandling for å avstumpe endene. BglII spalter akkurat bak den SV40 poly-adenylerende sekvens i transgenekspressjonskassetten. For en beskrivelse av pAdApt35-baserte adapterplasmider se WO 00/70071. De behandlede adapterplasmider ble deretter defosforylert under anvendelse av "Shrink Alkaline Phosphatase" (SAP) i henhold til fabrikantens (Roche) instruksjoner. Det isolerte RSV-promoterfragment ble deretter ligert med hver de behandlede vektorer og transformert inn i DH5 α -kompetente bakterier (Invitrogen). Kolonier ble analysert med hensyn til fremover orientert innføring av RSV-promoterens i relasjon til pIX-genet resulterende i pAdApt35.Luc.rsv og pAdApt35.LacZ.rsv.

I tillegg ble et adapterplasmid generert fra sekvenser som var isolert ved PCR fra et rekombinant Ad35-virus som var et resultat etter sletting av transgenregionen. Analyse av et rålysatpreparat resulterende fra en trans-

5 feksjon av pAdApt35.LacZ og pWE.Ad35.pIX-rITR Ad35-rygggradkonstruktene og påfølgende plakkrensing viste at viruset hadde en sletting i transgenregionen på tilnærmet 2,8 kb. 5'-sekvensene fra dette virus ble PCR-amplifisert fra isolert DNA under anvendelse av primerne

10 35F1 og 35R4. Reaksjonen ble utført med Pwo-polymerase (Roche) i henhold til fabrikantens instruksjoner. Programsettingen var som følger: 94°C i 2' deretter 5 sykluser på (94°C i 30 sekunder; 48°C i 30 sekunder; 72°C i 2,5 min.) etterfulgt av 25 sykluser på (94°C i 30

15 sekunder; 56°C i 30 sekunder; 72°C i 2,5 min.) og sluttet med 8 min. ved 68°C.

Det resulterende 2 kb lange fragment ble rensset ved PCR-rensesettet (Qiagen) og klonet inn i pCR-Script-Amp-vektoren (Stratagene) i henhold til fabrikantens instruks-

20 sjoner, hvilket resulterte i pCR.Ad35Δ2.8kb. Dette plasmid ble sekvensert for å bestemme graden av sletting. Slettingen påvirket det meste av CMV-promoteren, transgenet og SV40 polyA. Dette resulterte i binding av 5' 317 bp av CMV-promoteren til Ad35-sekvensene oppstrøms for

25 pIX-genet. Dette CMV-fragment inneholder tre GC-innramminger og en 21-bp gjentakelse (Boshart et al., 1985). Muligens vil de gjenværende sekvenser av CMV-promoteren kunne øke pIX-ekspresjonen, hvilket resulterer i et mer stabilt virus. En alternativ mulighet var at

30 viruset som er mindre, av seg selv resulterte i øket stabilitet. For å undersøke dette ble en komplett ekspressjonskassetten klonet bakover på følgende måte, og viruset med dette nye adapterplasmid ble generert. Den pCR-Script-baserte vektor inneholdende de amplifiserte

35 sekvenser (ombenevnt til pCR.C4) hadde et unikt AvrII-sete forut for ΔCMV-pIX-sekvensene. Vektoren ble lineariisert med AvrII, avstumpet med Klenow-enzym og defosfor-

ylert under anvendelse av SAP-enzym (Roche) som beskrevet ovenfor. Adapterplasmidene pAdApt535.LacZ (Eksempel 5) og pAdApt.Luc (WO 00/70071) ble spaltet med AvrII og BglII, og DNA ble behandlet med Klenow for å fylle fremstående
5 ender. Fragmentene motsvarende LacZ- og Luciferase-ekspressjonskassetter (CMV-TG-pA) ble isolert fra gel som ovenfor og ligert med den AvrII-lineariserte pCR.C4-vektor. Transformasjon til kompetente celler som ovenfor og utvelgelse av kolonier som hadde kassetten i frem-
10 overorientering i relasjon til det venstre ITR, resulterte i pCR.C4.LacZ og pCR.C4.Luc.

Ad35-viruser ble generert som beskrevet i eksempel 6 under anvendelse av de nye adapterplasmider: pCR.C4.LacZ spaltet med PacI, pCR.C4.Luc spaltet med ApaI og
15 pAdApt35.LacZ.rsv og pAdApt35.Luc.rsv hver spaltet med PI-Pspl.

Adapterplasmidene ble kotransfisert på PER55K-celler (WO 02/40665) med pWE.Ad35.pIX-rITR eller pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3 spaltet med NotI. I tillegg ble adapterplasmidet
20 pBr.Ad35.DElAA21K.Luc (konstruksjonen beskrevet nedenfor) spaltet med PI-PspI og kotransfisert med pWE.Ad35.pIX-rITR spaltet med NotI. Ved full cytopatogen virkning (CPE) ble kulturer høstet ved en fryse/ tine-syklus og sentrifugert for å fjerne celleavfall. 300 µl
25 av de resulterende klarede lysater ble deretter anvendt for å infisere på nytt PER55K-celler utsådd dagen før i T80-kolber. Ved full CPE ble rålysater fremstilt og anvendt for å infisere A549-celler for å teste vedrørende transgenekspressjon og for å utføre en plakk-undersøkelse på PER55K-celler.
30

A549-celler ble utsådd i 6-brønners plater med 5x10⁵ celler/brønn og etter 5 timer infisert med 10, 1 eller 0,1 µl av hver av LacZ-virusstamløsningene og inkubert i to dager. A549-celler ble deretter farvet med hensyn til

LacZ-aktivitet, og blå celler ble talt. Prosentandelen av blå celler er angitt i Tabell II.

LacZ-uttrykkende virus er klart mer stabile når RSV-promoter driver ekspresjonen av pIX-genet sammenlignet med den slettede CMV-promoter. Disse resultater bekref-
tes med Luciferase-virusene. Til å måle aktiviteten av
Luciferase-virusene ble A549-celler utsådd i 24-brønners
plater med 1×10^5 celler/brønn og infisert med 10, 1, 0,1
eller 0,01 μ l av virusets stamløsninger og inkubert.
Etter to dager ble cellene vasket med PBS to ganger og
suspendert på nytt i 100 μ l lysebuffer (Promega) og
lagret ved -20°C inntil bruk. Luciferasen ble målt under
anvendelse av "the Steady-Glo luciferase assay system"
(Promega) i henhold til fabrikantens instruksjoner.
Resultatene er vist i tabell III.

I eksempel 3 beskrev vi at fullstendig E1-slettede Ad35-viruser inneholdende E3-regionen og en AdApt.Luc- eller AdApt.LacZ-ekspresjonskassetten ikke var stabile. Tilsynelatende hindret den slettede CMV-promoter foran pIX i de nye beskrevne konstruksjoner ikke slettingen av transgen-regionen. Med RSV-promoter til å drive pIX-genet er vi nå imidlertid i stand til generere virus med mer enn naturlig forekommende lengde. Ad35.AdApt.Luc.rsv og Ad35.AdApt.LacZ.rsv er 35 kb og 36,5 kb lange respektive (se også figur 2). Ad35. Δ E1A Δ 21K.Luc (36,4 kb) viste også høy transgen aktivitet.

Vi testet deretter hvorvidt virus ville være intakte etter en plakkrensing. For dette ble PER55K-celler utsådd i 6-brønners plater med $0,9 \times 10^6$ celler/brønn og infisert med forskjellige 10-foldige fortynninger av Ad35.AdApt.LacZ-rålysaterne. Fortynninger fra 10^{-5} til 10^{-8} ble utsådd, og neste dag ble et agarlag tilsatt. For dette ble cellene først vasket med PBS, og deretter ble 3 ml av en på forhånd oppvarmet agarløsning fremstilt ved å blande 2xMEM (GibcoBRL; 9,14 ml), FBS

(Gibco; 0,36 ml), $MgCl_2$ (4,9 M; 0,037 ml) med agarose, (SeaPlaque GTG; 2,5% i H_2O , 7,2 ml), tilsatt. Etter størkning ble platene videre inkubert ved $37^\circ C/5\% CO_2$. Fire dager senere var plakker synlige, og LacZ-farvende
 5 løsning ble tilsatt til brønnene på toppen av agaren og og fikk tørke. All viruser viste klare, separate plakker i området 10-7 til 10-9, men bare når det gjaldt virusene hvor RSV-promoterer drev pIX-genet, var alle plakker farvet blå. I begge tilfeller, hvor den slettede
 10 CMV-promoter driver pIX, ble minst en del av plakkene ikke farvet. Dette viser klart at det pakkbare genoms størrelse/stabilitet økes i viruser som har RSV-promoterer til å regulere pIX.

Denne oppfinnelse tilveiebringer for den første gang et
 15 stabilt rekombinant adenovirus avledet fra eller basert på et adenovirus av serotype 35 som mangler ekspresjon av et funksjonelt ElB-gen. Et slikt adenovirus har minst en sletting i El-regionen. I spesielle utførelsesformer tilveiebragt ved oppfinnelsen har nevnte stabile rekom-
 20 binante adenoviruser fremmede innføyingssekvenser på mer enn 4,2 kb, og en pakket genomstørrelse på mer enn 33,4 kb, ved å anvende metoder i henhold til oppfinnelsen. Det er derfor et formål med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe et stabilt rekombinant adenovirus
 25 som: a) har en fremmed nukleinsyresekvens på mer enn 4,2 kb, og/eller b) har en pakket genomstørrelse på mer enn 33,4 kb. I spesielle utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen et Ad35- eller Ad11-basert rekombinant undergruppe B adenovirus ifølge krav 1 som: a) har en
 30 fremmed nukleinsyresekvens på minst 4,6 kb, og/eller b) har en pakket genomstørrelse på mer enn 33,8 kb. Alternativt eller i tillegg til dette er nevnte pakke-
 35 de fremmede sekvenser i disse utførelsesformer kan omfatte en heterolog promoter-drivende ekspresjon av pIX. I et annet aspekt er nevnte stabile rekombinante adenovirus av serotype 11. Et stabilt adenovirus i

henhold til dette aspekt av oppfinnelsen kan overføres på en pakkende celle for å tilveiebringe en sats av de rekombinante adenoviruser, med mindre enn 10%, fortinnsvis mindre enn 5%, hvor fortinnsvis ingen av de
 5 separate kloner fremkaller slettinger i de fremmede sekvenser i det rekombinante adenovirus, hvilket kan måles f.eks. ved PCR-metoden eksemplifisert i Eksempel 3.

pBr.Ad35.ΔE1AΔ21K.Luc (se ovenfor) ble fremstilt som
 10 følger. Konstrukt pBr.Ad35.ΔE1AΔ21K (WO 02/40665) ble spaltet med HpaI, defosforylert med CIP (New England Biolabs) og det 5 kb lange vektorfragment ble isolert fra gel. Konstrukt pBr.Ad35.ΔE1A.Luc ble også spaltet med HpaI og den 3,3 kb lange innføyning ble isolert fra gel
 15 og ligert med det isolerte vektorfragment. Etter transformasjon til kompetente STBL-2-celler (Invitrogen), ble en koloni valgt med innføyningen i den korrekte orientering. Dette gav konstrukt pBr.Ad35.ΔE1AΔ21K.Luc. pBr.Ad35.ΔE1A.Luc (også kalt pBr.Ad35.E1B+.Luc, fordi det
 20 fremdeles inneholder E1B-regionen) ble fremstilt ved å innføre AdApt.Luc-kassetten, tatt fra pAdApt.Luc etter AvrII- og BglII-spaltning og avstumpning med Klenow-enzym, inn i vektorfragmentet pBr.Ad35.leftITR-pIX (WO 02/40665) spalte med SnaBI og HindIII og avstumpe med Klenow.
 25 Kolonier med ekspresjonskassetten i fremoverorientering ble valgt, hvilket gav pBr.Ad35.ΔE1A.Luc.

Eksempel 10. Identifikasjon av pIX-regulerende sekvenser.

De tidligere eksempler viser at Ad35 rekombinante virus i hvilke de kodende regioner for E1A og E1B er fullstendig fjernet, blir progressivt mer ustabile hvis genomstørrelsen økes. Vi viser i denne ansøking at addisjon
 30 av en heterolog promoter-drivende pIX-ekspresjon kan overvinne ustabiliteten. I WO 02/40665 og ovenfor beskrev vi at Ad35-virus som bibeholder den komplette E1B-55K-kodingssekvens, kan produseres på PER.C6 og er stabile.
 35

Den samme er tilfelle for viruser som bibeholder den fulle ElB-kodingssekvens (WO 00/70071; Abrahamsen et al., 1997). Sammen fremhever disse resultater den mulighet at ekspresjon av pIX-genet reguleres forskjellig i viruser
 5 av undergruppe B sammenlignet med pIX-genet i undergruppe C. Siden virusene som bibeholder ElB-55K-genet drevet av ElB-promoterer, er stabile (se ovenfor), vil pIX-regulerende sekvenser sannsynligvis være lokalisert i denne region. For å undersøke dette genererte vi en serie av
 10 konstrukter som bibeholder forskjellige lengder av 3'-enden av 55K-sekvensen.

For dette genereres først pBr.Ad35ΔSM.AdAptLacZ som følger. Konstrukt pBr.Ad35.1ITR-pIX (beskrevet i WO 00/70071) spaltes med SnaBI og MfeI, avstumpes med Klenow
 15 og defosforyleres med SAP-enzym (Roche). Det 4,4 kb lange vektorfragment isoleres deretter fra agarosegel. Konstrukt pAdApt.LacZ (et Ad5-basert adapterplasmid pAdApt med LacZ-transgen-innføying; WO 99/55132) spaltes med AvrII og BglII (og eventuelt SalI for å øke
 20 forskjellen i fragmentstørrelse) og avstumpes med Klenow-enzym. Det 4,2 kb lange CMV.LacZ.pA-innføying isoleres deretter fra gel. Begge isolerte fragmenter liggeres deretter for å oppnå pBr.Ad35zSM.AdAptLacZ (Figur 7). Orienteringen kan kontrolleres ved restriksjonsspaltning
 25 siden ligasjon i den korrekte orientering gjenoppretter både AvrII-setet og MfeI-setet. Konstrukt pBr.Ad35ΔSM.AdAptLacZ bibeholder de 0,6 kb lange 3'-ElB-55K-sekvenser (wt Ad35 nukleotid 2804-3400) i wt-posisjonen i relasjon til pIX-genet. Tidligere har vi
 30 vist at disse 55K-sekvenser ikke fører til ekspresjon av et funksjonelt ElB-55K-protein siden propagering på PER.C6-celler ikke synes å være mulig (pBr.Ad35ΔSM; WO 02/40665). Utgående fra pBr.Ad35ΔSM.AdAptLacZ kan forskjellige slettinger gjøres i den 680 bp (0,7 kb)
 35 lange ElB-55K-region ved spaltning med MfeI (isoschizomer av MunI) og enten StuI, NsiI eller BglII, etterfulgt av avstumpning av de fremskytende ender under anvendelse av

Klenow eller T4 DNA-polymerase vedrørende 5- eller 3-fremspring respektive. Religasjon av det spaltede DNA gir funksjonelle adapterplasmider som anvendes deretter for å generere rekombinante virusser på PER55K-celler ved ko-

5 transfeksjon med pWE.Ad35.pIX-rITR som beskrevet ovenfor. Ytterligere konstrukter fremstilles ved å anvende enzymene DraIII, Bsu36I, BssHII eller BamHI og spalte vektoren partielt (LacZ-genet inneholder også et gjenkjennelsessete for disse enzymer) under anvendelse av

10 metoder som er kjent i faget, etterfulgt av utvelgelse av den korrekte klon. Stabiliteten testes som beskrevet ovenfor for Ad35.AdApt.LacZ.rsv-konstruktet. Konstrukter som er stabile (dvs. ikke krever slettinger i transgenregionen) inneholder passende regulerende

15 regioner for pIX-ekspresjon. I tillegg er det mulig å direkte teste promoteraktivitet i en gitt sekvens ved å sette inn sekvensen oppstrøms for et reportergen. pGL3basic (Promega) er et slikt reportergenkonstrukt. Regionen mellom MunI og begynnelsen på pIX-genet ble

20 amplifisert under anvendelse av primersett Ad3555KmfeF og Ad35pIXNcoR. Dette PCR (2 minutter 94°C; deretter 30 sykluser på [30 sekunder 94°C, 30 sekunder 59°C, 60 sekunder 72°C]; etterfulgt av 8 minutter 68°C; enzym: Pwo (Genexis) i henhold til fabrikantens instruksjoner, med

25 ytterligere 3% DMSO) amplifiserte Ad35-sekvenser fra 2804 til 3491 (nummerering som i wt Ad35) og endret derved sekvensen rundt startkodonet for pIX til et NcoI-sete og innførte et HindIII-sete ved 5'-enden. Dette amplifiserte fragment spaltes med HindIII og NcoI og klones inn i

30 pGL3basic spaltet med de samme enzymer og genererer pGL3-MN. pGL3-MN anvendes deretter for å slette sekvenser oppstrøms for den luciferasekodende region ved å kombinere HindIII-spaltning med f.eks. PacI, NsiI, StuI, Bsu36I, BssHII eller BglII, etterfulgt av avstumpning av

35 de fremstående ender og religasjon. Promoteraktivitet testes ved transient transfeksjon av de oppnådde konstrukter inn i PER.C6-celler under anvendelse av Lipo-fectAmine-reagens i henhold til fabrikantens instruk-

sjoner. Luciferaseaktivitet analyseres to dager etter transfeksjon under anvendelse av "Steady-Glo luciferase assay system" (Promega) i henhold til fabrikantens instruksjoner. Alternativt innføres i pGL3basic-vektoren
 5 forskjellige regioner, hvilke regioner er generert ved PCR-amplifikasjon under anvendelse av en 5' (fremover)-primer rettet mot en spesifikk sekvens i Ad35 E1B-55K-regionen og som har HindIII-setet bundet ved 5'-enden kombinert med Nco-pIXrev-primeren. På denne måte er man
 10 ikke begrenset til nærvær av et unikt restriksjonssete for kloning.

Lokaliseringen av pIX-promoterene ble videre undersøkt ved å anvende programvare til å finne formentlige promoter-sekvenser (Reese og Eeckman, 1995). Figur 8 viser pro-
 15 motertallene (minimum satt til 0,65) for E1B-promoterene direkte bundet til 55K-kodingssekvensen (som i pBr.Ad35.ΔE1AΔ21K). Regionene merket A motsvarer E1B-promoterene, og regionene B og C er lokalisert innen 55K-kodingsregionen. PIX-oppstrømsregion er ikke gjenkjent
 20 som en promotersekvens. Region C har det høyeste tall (0,96) av de tre (til og med høyere enn den kjente E1B-promoter) og kan derfor omfatte sekvenser som har innflytelse på PIX-ekspressjon.

For å lokalisere og identifisere en mulig pIX-promoter eksperimentelt genereres en serie av små fragmenter mot-
 25 svarende forskjellige (overlappende) deler av 3'-enden av 55K-kodingssekvensen. Figur 9 avbilder skjematisk disse fragmenter og deres lokalisering i relasjon til den formentlige promoterregion og pIX-genet. Fragmentene genereres ved restriksjonsspaltning under anvendelse av
 30 de angitte enzymer. Fragmentene avstumpes med Klenow (fremstående 5'-ender) eller T4 DNA-polymerase (fremstående 3'-ender) og klones inn i NcoI-setet i pGL3basic-vektoren (Promega) også avstumpet ved Klenow-behandling og defosforyleres ved SAP-behandling (Roche).
 35 Etter transformasjon til kompetente bakterier kontrol-

leres oppnådde plasmider med hensyn til orienteringen av innføyningen ved restriksjonsspaltning. Promoter-aktiviteten analyseres deretter ved hjelp av transient transfeksjon av de oppnådde luciferasekonstrukter inn i
 5 PER.C6-celler under anvendelse av LipofectAmine-reagens i henhold til fabrikantens instruksjoner. Tomt pGL3basic-plasmid tjener som negativ kontroll. Ytterligere kontroller fremstilles ved kloning i) et BglIIMfeI-fragment fra pAdApt535 inneholdende Ad5 pIX-promoteren, ii) et 388 bp langt NruI-ApaLI RSV-
 10 promoterfragment (beskrevet ovenfor), eller iii) Ad35 pIX-oppstrømsregionen som et PCR-fragment inn i det avstumpede NcoI-sete i pGL3basic som beskrevet ovenfor. Ad35 pIX-region oppstrøms amplifiseres på pAdApt35IP1
 15 under anvendelse av primerne SV40-for og 5'-fosforylert Ad35pIXrev. Etter amplifikasjon spaltes DNA'et med BglII og behandles med Klenow.

Konstrukter transfiseres også inn i menneskelige celler som ikke inneholder adenovirus E1 (f.eks. A549, Hela) for
 20 å undersøke avhengigheten av E1A-ekspressjon.

Fragmentene klones også inn i et adapterplasmid pBr.Ad35ΔSM.AdAptLacZ (se ovenfor) for å være i stand til å generere rekombinante virus og studere viral genom-stabilitet. For dette spaltes konstrukt
 25 pBr.Ad35ΔSM.AdAptLacZ med MfeI og BglII, avstumpes med Klenow-enzym og defosforyleres. Etter gelisolering av vektorfragmentet kan DNA bli ligert med fragmentene beskrevet ovenfor (se Fig. 9) for å oppnå et sett av adapterplasmider som har varierende lengder av 55K-
 30 fragmenter oppstrøms for pIX-genet. Virus kan genereres med konstruktet pWE.Ad35.pIX-rITR som beskrevet ovenfor.

Kontrolltransfeksjoner gjøres med pBr.Ad35ΔSM.AdAptLacZ-, pAdApt35.LacZ- og pAdApt35.LacZ.rsv-konstruktene. Etter
 35 opptreden av full CPE høstes celler og medium ved en

fryse/tine-syklus og anvendes for å infisere på nytt friske PER55K-celler. Celler og medium høstes igjen ved full CPE, rålysater fremstilles og anvendes for å utføre en plakkundersøkelse. Etter opptreden av plakker, til-
 5 settes farvende X-gal-løsning for å undersøke vedrørende LacZ-ekspressjon.

Resultatene av ovennevnte eksperimenter hjelper til med å finne posisjonen for pIX-regulasjonssekvenser i Ad35 E1B-55K-regionen.

10 Som enda et annet alternativ kan pIX-genekspresjon drives av E1B-promoterer som en heterolog promoter for generering av rekombinante virus. For dette spaltes pAdApt535.LacZ med BglII og MfeI etterfulgt av Klenow-behandling, for å avstumpe endene, og defosforylering.
 15 Det således behandlede 4,8 kb vektorfragment isoleres deretter fra gel. E1B-promoterregionen isoleres som et PCR-fragment under anvendelse av pBr.Ad35.leftITR-pIX som mål-DNA og Epr-F- og Epr-R-primerne, hvorved begge primere fosforyleres. PCR gjøres med Pwo DNA-polymerase
 20 (Genaxis/Inno-train Diagnostik GmbH) i henhold til fabrikantens instruksjoner. Det resulterende 151 bp lange fragment klones deretter inn i den isolerte vektor for å oppnå pAdApt35Epr.LacZ

Dette plasmid anvendes deretter for å generere Ad35-baserte virus og teststabilitet som beskrevet
 25 tidligere.

For å identifisere de forskjellige transkripter som inneholder pIX-sekvenser, isoleres RNA fra infiserte celler, og pIX-holdige RNA-er identifiseres ved hybridisering med en merket spesifikk probe. For dette infiseres
 30 PER55K-celler i en multiplisitetssinfeksjon på 10 og 50 med følgende virus: wtAd35, Ad35.E1B.AdApt.Luc, Ad35ΔE3.AdApt.Luc, Ad35ΔE3.AdApt535.Luc, Ad35.AdApt.Luc.rsv. Infiserte celler høstes etter 8

timer (wtAd35 også etter 2 og 18 timer), og RNA isoleres under anvendelse av TRI-zol-Reagens (Invitrogen). Dette RNA størrelsesfraksjoneres på en 1,5% agarosegel, overføres til et "Northern blot" og hybridiseres til en 32P-merket probe avledet fra pIX-kodingsregionen. Prosedyrene er kjent i faget (beskrevet i Molecular Cloning: A laboratory manual, av Sambrook og Russell, 2001 eller tidligere versjoner). Lengden på RNA'et kan bestemmes hvis kjente RNA-størrelsesmarkører er innbefattet og vil gi en indikasjon på RNA-artene som inneholder pIX-sekvenser. For å identifisere RNA'ene som begynner i ElB-promoteren, kan "blottet" isoleres og hybridiseres på nytt med en 5'-21K-probe. pIX-inneholdende transkripter som ikke hybridiserer til ElB-21K-proben, er sannsynligvis generert av en promoter som er forskjellig fra ElB-promoteren.

På grunn av mulige (og forventede) spleisingforeteelser er det fremdeles vanskelig å nøyaktig bestemme transkripsjonsstartseter via denne metode. Dette kan oppnås som følger. Det isolerte RNA revers-transkriberes til cDNA, og cDNA'et anvendes til spesifikt å amplifisere 5'-ender i pIX-holdige RNA'er under anvendelse av GeneRacer System (Invitrogen) i henhold til fabrikantens instruksjoner med revers-primerne rettet mot pIX-kodingssekvenser: pIXrev og den flettede primer pIXrev-N2. Kloning og sekvensialisering av de amplifiserte fragmenter gir lokaliseringen av transkripsjonsstartsetene og 5'-sekvensene i mRNA'er som inneholder pIX-sekvenser. På denne måte identifiseres de mulige pIX-kodings-mRNA'ene. Korrelasjonen mellom nivåene av pIX-ekspressjon og stabilitet av de tilsvarende rekombinante adenoviruser kan således også bestemmes.

Eksempel 11. E1B- og pIX-sekvenser fra adenovirus av gruppe B.

Ovennevnte eksempler anvender Ad35-viruset som et eksempel. Andre medlemmer av undergruppe B som har
 5 betraktelig homologi med hverandre, vil kunne ha sammenlignbar pIX-regulering.

For å undersøke dette linjestilte vi E1B- og pIX-sekvenser fra medlemmer av undergruppe B. Sekvensen for Ad7 (SEQ. ID. NO. 57) er tilgjengelig via Genbank-
 10 aksesjonsnr. X03000. Sekvensen for Ad11 (SEQ. ID. NO. 56) ble vist ved "shotgun"-sekvensialisering av DNA isolert fra Ad11p wt-viruser utført av Lark Technologies (UK) lignende som beskrevet (WO 00/70071) for Ad35-sekvensen (SEQ. ID. NO. 55). Ad11 og Ad35 er høyst homologe med
 15 hverandre (totalt 98,1% likhet), og de hovedsakelige forskjeller er lokalisert i hexon- og fiber-knappen. Ad11-sekvensen er også beskrevet i WO 02/053759.

Sekvensen mellom poly-adenyleringssettet (pA) i E1A og pA nedstrøms for pIX-genet anvendes i linjestillingen (Fig.
 20 10). Ad35 har en total likhet (i denne region) på 98,4 % med Ad11 og 82,9 % med Ad7. Dette gjør det meget sannsynlig at pIX-ekspressjon reguleres på samme måte i disse virusser.

Følgelig kan metodene og midlene i henhold til oppfinnelsen som eksemplifisert i de tidligere eksempler anvendes
 25 deretter for å øke stabiliteten og/eller innføyningskapasiteten av andre rekombinante adenoviruser av undergruppe B, heri eksemplifisert by Ad11 og Ad7.

Eksempel 12. Generering av E1-slettede Ad35-viruser uttrykkende Ad5-E4/Orf6 på en kompletterende Ad5-cellelinje.

Sekvensialiseringen av det adenovirale genom av serotype
 5 35 samt konstruksjonen av et plasmid-basert vektorsystem og generering av rekombinante Ad35-baserte virus er blitt beskrevet i detalj i WO 00/70071.

Kloningen av Ad5-E4-orf6-kodingssekvensen inn i pAdApt35IP1 (ECACC-deponeringsnr. P02041228, for
 10 kloningsdetaljer for dette plasmid se WO 00/70071) ble utført som følger. Plasmidet ble spaltet med NheI og AvrII og defosforylert med "Calf Intestine Fosfatase" (New England Biolabs). Spaltet DNA ble isolert fra gel under anvendelse av "the GeneClean kit". Plasmidisk
 15 pAMT.Orf6.Hygro (Fig. 11, ECACC-deponeringsnr. P02041226) ble spaltet med NheI og deretter partielt spaltet med XbaI. Etter separering av det resulterende bånd på gel ble det 1350 bp lange fragment motsvarende ΔMT-promoterens bundet til E4-orf6-sekvensen rensset fra gel. Deretter ble
 20 begge isolerte fragmenter ligert og transformert til elektro-kompetente DH10B-celler (Invitrogen/Life Technologies) hvoretter en koloni med innføyningen i den korrekte orientering med hensyn til SV40 poly(A)-signalet ble valgt for DNA-fremstilling i stor skala. Dette
 25 resulterte i konstrukt pAd35.ΔMT.Orf6 (Fig. 12), som inneholder Ad5 E4-orf6-kodingssekvensen funksjonelt bundet til en mutert metallothionein-promoter (ΔMT). ΔMT-promoterens er blitt beskrevet av Hagmeyer et al. (1996). Ad5 E4-orf6-sekvensen motsvarer nukleotid 33193 til
 30 nukleotid 34077 i Ad5-sekvensen (Genbank-aksesjonsnr. M73260). For å teste hvorvidt ekspresjonen av Ad5 E4-orf6-proteiner ville kunne gjøre produksjon av fullstendig E1-slettede Ad35-vektorer mulig på kompletterende Ad5-celler, ble pAd35.ΔMT.Orf6 ko-transfisert med Ad35-rygggradskonstruktet pWE.Ad35.pIX-rITR på PER.C6-celler.
 35 For dette ble pAd35.ΔMT.Orf6 spaltet med PI-Psp-1, og

pWE.Ad35.pIX-rITR ble spaltet med NotI for å frigjøre de adenovirale innsetninger fra ryggraden. 2 ug av spaltet pAd35.ΔMT.Orf6 og 6 μg av spaltet pWE.Ad35.pIX-rITR ble transfisert under anvendelse av Lipofektamine. Trans-

5 feksjonsblandingen ble tilsatt til PER.C6-celler som ble utsådd dagen før i en tetthet av $3,5 \times 10^6$ celler pr. T25-kolbe. Neste dag ble mediet utbyttet med PER.C6-kulturmEDIUM (DMEM med 10% FBS og 10 mM $MgCl_2$), og cellene ble videre inkubert ved 37°C/10% CO_2 . Kontrolltransfeksjoner

10 ble utført med pAdApt35.Luc ko-transfisert med pWE.Ad35.pIX-rITR, og pWE.Ad35.pIX-rITR alene. To dager etter transfeksjonen ble cellene overført fra T25- til T80-kolber og inkubert som beskrevet. Igjen tre dager senere viste kulturen som var transfisert med

15 pAd35.ΔMT.Orf6 sammen med Ad35-ryggraden, cytopatogen virkning (CPE), hvilket indikerer virusreplikasjon, og ble høstet (inklusive celler og medium) etter en videre inkubering på 2 dager. Cellesuspensjonen ble utsatt for 2 runder av fryse/tine-sykluser, og det resulterende

20 material (rålysat) ble holdt ved -20°C inntil videre bruk. De andre kolber viste ikke CPE og ble overført 1:3 til T80-kolber 6 dager etter overføringen til T80. Igjen 5 dager senere viste den pAdApt35.Luc + pWE.Ad35.pIX-rITR-transfiserte kolbe noen få CPE-lignende foreteelser,

25 men disse utviklet seg ikke videre. 0,2 og 0,5 ml av rålysatet som var et resultat av pAd35.ΔMT.Orf6-transfeksjonen ble anvendt til å infisere på nytt PER.C6-celler ved tilnærmet 85% konfluens i T80-kolber. Dette resulterte i full CPE etter en dag med inkubering og

30 antydning at smittefarlig virus var nærværende i rålysaten. Disse kulturer ble også høstet ved to fryse/tine-sykluser. Ytterligere kontrolltransfeksjoner med konstrukt pAd35.ΔMT.Orf6 alene på PER.C6 ble utført for å bekrefte at orf6-ekspressjon i seg selv ikke resulterer i

35 celletoksisitet og CPE-lignende celledød. Konklusjonen er at bare transfeksjonene med pAd35.ΔMT.Orf6 sammen med pWE.Ad35.pIX-rITR resulterte i CPE og virusreplikasjon.

PCR-analyse ble utført for å bekrefte nærvær av Ad35-baserte virale genomer hvor Ad5-E4-orf6 erstatter den tidligere E1-region. For dette ble viralt DNA isolert fra rålysatprøver som følger. 275 µl rålysatmateriale ble

5 inkubert med 10 µl DNaseI (10 mg/ml) ved 37°C i 30 min. Deretter ble 6,0 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0), 7,5 µl 20% SDS og 1,5 µl 20 mg/ml Proteinase K tilsatt og blandet ved omhvirvling. Blandingen ble deretter inkubert ved 50°C i 1 time. Til slutt ble det virale DNA isolert under

10 anvendelse av "the Geneclean spin kit" (Bio 101, Inc.). 2 µl av det isolerte DNA ble deretter PCR-amplifisert under anvendelse av primerne 35psi-For og 35R4. Programmet ble satt til 94°C i 2 min etterfulgt av 30 sykluser på 94°C i 30 sekunder, 58°C i 30 sekunder og 72°C

15 i 5 min, og sluttet med en inkubering ved 72°C i 10 min. Primerne er spesifikke for Ad35-sekvenser og genererer et fragment på 2,9 kb som rekker fra den pakkende sekvens til nt 4669 (nummerering som i wt Ad35-sekvens) og inkluderer således Ad5 orf6-transgenkassetten. Elektro-

20 forese av de oppnådde PCR-fragmenter viste at fragmentene hadde den forventede lengde samsvarende med kontroll-PCR-fragmentene generert på adapterplasmidet-pAd35.ΔMT.Orf6. Således kan fullstendig E1-slettede Ad35-baserte vektorer gjøres på kompletterende Ad5-

25 celler hvis viruset også uttrykker Ad5-E4orf6.

Eksempel 13. Konstruksjon av pWE.Ad35.pIX-rITR5E4.

Et første PCR-fragment ble amplifisert under anvendelse av primerne DF35-1 og 35FR. Amplifikasjon ble gjort med pWE.Ad35.pIX-rITR (se WO 00/70071) som modell-DNA under

30 anvendelse av Pwo DNA-polymerase (Roche) med ytterligere DMSO (Sigma, sluttkonsentrasjon 3%). Programmet var som følger: 94°C i 2 min etterfulgt av 30 sykluser på (94°C i 30 sekunder, 52°C i 30 sekunder, 72°C i 3 min) og et avsluttende trinn på 72°C i 8 min for å sikre komplette

35 fragmenter. Amplifikasjonen resulterte i et 1,6 kb langt fragment motsvarende nt 30224 til 31805 av Ad35-

sekvensen. Et BamHI-sete ble innføyd ved 3'-enden. Det amplifiserte DNA ble rensset fra gel under anvendelse av GeneClean-settet og ligert til pCRScript/Amp-vektor-kloningssettet (Stratagene). Etter transformasjon til

5 elektro-kompetente DH10B-celler ble hvite kolonier valgt for videre analyse. Dette resulterte i konstrukt pCR-fiber35. På grunn av den butte kloning kunne PCR-fragmentet innsettes i 2 orienteringer. En klon som hadde innføyningen med BamHI-setet i polylinkeren av

10 pCRScript/Amp-vektoren ved 5'-enden, ble valgt. Spaltning med BamHI resulterer således i et 1,6 kb langt fragment. Sekvensialisering bekreftet korrekt amplifikasjon av PCR-fragmentet. Et andre PCR-fragment ble amplifisert under anvendelse av primerne: 5E4F og 5E4R.

15 Amplifikasjon ble gjort med pWE.Ad5.AflIII-rITRsp, som er en kosmidvektor inneholdende et ekstra PacI-sete i pWE.Ad5.AflIII-rITR (ECACC-deponeringsnr. P97082116 beskrevet i WO 02/40665). pWE.Ad5.AflIII-rITRsp tjente som modell under anvendelse av Pwo DNA-polymerase som

20 beskrevet ovenfor, selv om pWE.Ad5.AflIII-rITR også kunne anvendes for samme formål. Etter rensing fra gel ble DNA'et spaltet med SstI og BamHI (begge seter innføyd under PCR), og det 3 kb lange fragment ble rensset fra agarosegel under anvendelse av "the GeneClean kit".

25 Ad5 E4-regionen som amplifiseres, motsvarer bp 32794 til bp 35828 av Ad5-sekvensen. Et tredje PCR-fragment ble generert på pWE.Ad35.pIX-rITR under anvendelse av primerne: 355ITR og 353ITR. PCR-amplifikasjon ble utført som beskrevet ovenfor. Det resulterende 160 bp lange

30 fragment er flankert av et SstI-sete (5'-enden) og et EcoRI-sete (3'-enden). Etter rensing fra gel som ovenfor ble DNA'et spaltet med SstI og EcoRI. Det 160 bp lange fragment motsvarende den høyre ITR av Ad35 ble deretter separert fra de spaltede ender på en lavtsmeltende

35 agarosegel og samlet opp i en gel. Deretter ble pUC119 spaltet med BamHI og EcoRI, og det 3,1 kb lange fragment ble rensset fra gel under anvendelse av "the GeneClean kit". De ovenfor behandlede andre og tredje PCR-

fragmenter ble deretter ligert med BamHI/EcoRI-spaltet pUC119 hvilket resulterte i pUC.Ad5E4-35ITR. De klonede PCR-avledede innføyninger ble sekvensialisert for å bekrefte korrekt amplifikasjon. Deretter ble den 1,6 kb lange innføyning i pCR-fiber35 skåret ut med BamHI, og fragmentet ble rensset fra gel som ovenfor. pUC.Ad5E4-35ITR ble også spaltet med BamHI, og det lineære fragment ble rensset fra gel. Ligasjon av begge fragmenter og utvelgelse av klonene som hadde den korrekte orientering i relasjon til hverandre, resulterte i pUC,35-5E4 (Fig. 14). Trinnene som fører til konstruksjonen av pUC.35-5E4, er skjematisk angitt i Fig. 13. Adenovirusinnføyningen i pUC.35-5E4 ble sub-klonet inn i pBr.Ad35.PRn (Fig. 15; se WO 00/70071), et konstrukt med Ad35-3'-sekvenser. For dette spaltes konstrukt pUC,35-5E4 med MluI og NotI og det 4,7 kb lange fragment renses fra gel under anvendelse av "the GeneClean kit". Dette fragment ligeres deretter med vektorfragmentet som var et resultat av MluI- og NotI-spaltning av konstrukt pBr.Ad35.PRn. Dette 16,3 kb lange fragment ble rensset fra gel under anvendelse av agarase-enzym (Roche). Ligasjoner ble deretter transformert til kompetente DH10B-celler. Det resulterende konstrukt ble kalt pBr.Ad35.PR5E4 (Fig. 16, ECACC-deponeringsnr. P02041229). Det siste trinn innebærer kloning av den modifiserte 3'-ende av Ad35-sekvensen inn i den virale kosmidklon pWE.Ad35.pIX-rITR. For dette kombineres to fragmenter i en lambda-bakteriofagisk pakningsreaksjon (Stratagene) i henhold til fabrikantens instruksjoner. Det første er den 16,8 kb lange modifiserte Ad35-innføyning fra pBr.Ad35.PR5E4 oppnådd ved spaltning med PacI og SmaI, og det andre er et 22,8 kb langt fragment oppnådd ved spaltning av pWE.Ad35.pIX-rITR med PacI og SmaI. Korrekt kombinasjon av de to fragmenter gir pWE.Ad35.pIX-rITR5E4 (Fig. 17). Således er, i dette konstrukt, E4-regionen i Ad35-rygggraden erstattet med den tilsvarende region avledet fra Ad5.

Eksempel 14. Konstruksjon av pWE.Ad35.pIX-rITR5Orf6.

For å oppnå et adenoviralt ryggradkonstrukt som inneholder Ad35-sekvensene fra pIX-genet (nt 3401 i Ad35-sekvensen) til enden av den høyre ITR, men med sekvensene for E4-orf6 og -orf6/7 istedenfor de tilsvarende sekvenser Ad5, Ad35 og Ad5, ble sekvenser PCR-amplifisert og kombinert som beskrevet nedenfor. PCR-fragmenter ble generert med Pwo DNA-polymerase med tilsetning av DMSO opp til 3%. Den første PCR ble gjort med pBr.Ad35.PRn (Fig. 15; se WO 00/70071) som modell og primerne E4-F1 og E4-R2. Programmet ble satt som følger: 94°C i 2 min, 5 sykluser på (94°C i 30 sekunder, 50°C i 30 sekunder og 72°C i 1 min) etterfulgt av 30 sykluser på (94°C i 30 sekunder, 60°C i 30 sekunder og 72°C i 1 min) og sluttet med et avsluttende trinn ved 68°C i 8 min. Det resulterende 1,8 kb lange fragment ble rensset under anvendelse av "the GeneClean kit". Den andre PCR ble gjort med pWE.Ad5.AflIII-rITRsp, som er en kosmidvektor inneholdende et PacI-sete i pWE.Ad5.AflIII-rITR (ECACC-deponeringsnr. P97082116, beskrevet i WO 02/40665), som modell og primerne E4-F3 og E4-R4. Programmet ble satt som følger: 94°C i 2 min etterfulgt av 30 sykluser på (94°C i 30 sekunder, 62°C i 30 sekunder og 72°C i 1 min) og sluttet med et avsluttende trinn ved 68°C i 8 min. Det 1,1 kb lange fragment ble rensset som ovenfor. Det tredje PCR ble gjort med pBr.Ad35.PRn som modell og primerne E4-F5 og E4-R6. Programmet ble satt som følger: 94°C i 2 min, 5 sykluser på (94°C i 30 sekunder, 48°C i 30 sekunder og 72°C i 45 sekunder) etterfulgt av 30 sykluser på (94°C i 30 sekunder, 56°C i 30 sekunder og 72°C i 45 sekunder) og sluttet med et avsluttende trinn ved 68°C i 8 min. Det 366 bp lange fragment ble rensset som ovenfor. Prøver av de rensede fragmenter ble overført på en gel for å bestemme konsentrasjonen, og deretter ble fragmentene blandet sammen til å inneholde 700 ng PCR-1, 650 ng PCR-2 og 430 ng PCR-3 i sammenlagt 30 µl. Til denne blanding ble 3 µl EcoPol-buffer (New

England Biolabs), 3 μ l 2 mM dNTP-løsning og 3 μ l milliQ H₂O tilsatt. Den resulterende blanding ble inkubert ved 94°C i 3 min og deretter avkjølt til 65°C i en PCR-maskin ved en hastighet av 0,5°C/sekund. Etter inkubering ved 65°C i 10 min ble blandingen videre avkjølt til 20°C ved en hastighet av 0,05°C pr. sekund og inkubert i 10 min ved 20°C. Deretter ble 1 μ l (5 enheter) Klenow-enzym (New England Biolabs) tilsatt etterfulgt av en inkubering på 60 min ved 37°C. 5 μ l av denne Klenow-blanding ble anvendt som modell for separat å amplifisere to fragmenter som følger. Primersett 1: NF-1 og NcoI-R ble anvendt i en reaksjon under anvendelse av Pwo DNA-polymerase (Roche) med tilsetning av DMSO til en avsluttende konsentrasjon av 3% og under anvendelse av følgende innstillinger av PCR-maskinen: 94°C i 2 min etterfulgt av 30 sykluser på (94°C i 30 sekunder, 66°C i 30 sekunder og 72°C i 3 min) etterfulgt av en avsluttende inkubering ved 68°C i 8 min. Primersett 2: NcoI-F og NR-2 ble anvendt i en reaksjon under anvendelse av Pwo DNA-polymerase (Roche) med tilsetning av DMSO til en avsluttende konsentrasjon av 3% og under anvendelse av følgende innstillinger av PCR-maskinen: 94°C i 2 min etterfulgt av 30 sykluser på (94°C i 30 sekunder, 62°C i 30 sekunder og 72°C i 90 sekunder) etterfulgt av en avsluttende inkubering ved 68°C i 8 min. De resulterende fragmenter på 2,7 kb (primersett 1) og 1,1 kb (primersett 2) ble rensset fra gel under anvendelse av GeneClean-settet, og hvert ble ligert til pCRscriptAmp-vektoren (Stratagene) og transformert til elektrokompetente DH10B-celler. Dette resulterte i konstrukt pCRscriptAmp.NFI-NcoIR (Fig. 18) og konstrukt pCRscriptAmp.NcoIF-NR2 (Fig. 19). Siden innføyningene inneholdt stumpe ender, ble to orienteringer oppnådd av hver kloning. Under anvendelse av KpnI-spaltninger ble konstruktene med orienteringen som var nødvendige for videre kloning, valgt (se Fig. 18 og 19). Innføyningene ble deretter sekvensialisert for å bekrefte korrekt amplifikasjon. Deretter ble en del av innføyningen fra

pCRscriptAmp-NcoIF-NR2 separert under anvendelse av BamHI og NcoI og rensset fra gel som ovenfor.

pCRscriptAmp-NFI-NcoIR ble spaltet med de samme enzymer, og det vektorholdige fragment ble også rensset fra gel.

5 Ligasjon av disse fragmenter resulterte i pCR.NF1-NR2 (Fig. 20). pCR.NF1-NR2 inneholder Ad35-sekvenser mellom nt 30162 og 33234 av Ad35-sekvensen med E4-orf6- og E4-orf6/7-sekvenser mellom nt 31879 og 32974 istedenfor Ad5-avledede sekvenser lokalisert mellom 32968 og 34077

10 fra den publiserte Ad5-sekvens i Genbank (Aksesjonsnummer M73260). Således, som man kan se i aminosyrelinjestillingene angitt i Figur 21 og 22, er aminosyresekvensen i det klonede E4-orf6-protein identisk med E4-orf6-sekvensen som fins i Ad5 (SEQ. ID. NO.

15 61; aminosyresekvensen for E4-orf6 i Ad35 er SEQ. ID. NO. 62) og E4-orf6/7-aminosyresekvensen er til største delen identisk med E4-orf6/7-sekvensen nærværende i Ad5 (E4-orf6/7-sekvens er gitt for Ad5 som SEQ. ID. NO. 63, for Ad35 som SEQ. ID. NO. 64, for det klonede fusjons-

20 protein som SEQ. ID. NO. 65). Det er åpenbart at forskjellige hybrid-Ad35-Ad5 E4-konstrukter kan utformes under anvendelse av den generelle metode fremstilt ovenfor uten å avvike fra oppfinnelsen. Denne chimeriske innføyning fra pCR.NF1-NR2 ble deretter klonet inn i

25 pWE.Ad35.pIX-rITR: pCR.NF1-NR-2 ble spaltet med MluI og NdeI, og det resulterende 2,8 kb lange fragment ble rensset fra gel under anvendelse av "the GeneClean kit". Konstrukt pBr.Ad35.PRn ble også spaltet med MluI og NdeI, og det 18 kb lange vektorfragment ble isolert fra

30 gel under anvendelse av agarase-enzym (Roche). Ligasjon av begge fragmenter resulterte i konstrukt pBr.Ad35.PR,5Orf6 (Fig. 23, ECACC-deponeringsnr. P02041227). Ad35-sekvensener mellom PacI og SmaI inneholdende den chimeriske E4-region i dette konstrukt

35 klones deretter inn i konstrukt pWE.Ad35.pIX-rITR under anvendelse av lambda-bakteriofagpakking som beskrevet ovenfor. Det resulterende pWE.Ad35pIX-rITR,5Orf6 (Fig. 24) anvendes deretter for å generere rekombinante Ad35-

baserte viruser ved ko-transfeksjon på PER.C6-pakkings-celler med et Ad35-adapterplasmid.

Eksempel 15. Konstruksjon av pWE.Ad35.pIX-rITRAE3,5E4 og pWE.Ad35.pIX-rITRAE35Orf6.

5 Ad35-rygggraden ble videre modifisert ved en sletting av E3-sekvenser. E3-proteiner er kjent for å modulere
vertens immunrespons overfor adenovirusinfeksjon og er
derfor ikke nødvendige for *in vitro* propagering av
rekombinante viruser. Videre muliggjør slettingen av E3-
10 sekvenser innføring av større heterologe sekvenser i
vektorene uten å kompromittere pakkingseffektiviteten.
Dessuten er, for anvendelse av adenovirale vektorer som
vaksinasjonsmidler, ekspresjon av immunomodulerende gener
kodet av E3-regionen ikke foretrukket.

15 Konstruksjonen av pWE.Ad35.pIX-rITRAE3 (Fig. 1) ble
beskrevet ovenfor. For å konstruere de E3-slettede ver-
sjoner av de E4-modifiseret rygggradkonstrukt beskrevet
ovenfor, ble E4-modifikasjonem innført i pBr.Ad35.PRnLE3-
konstruktet (Fig. 25) som følger. Konstrukt pUC,35-5E4
20 (Fig. 13) ble spaltet med MluI og NotI, og det 4,7 kb
lange fragment ble isolert fra gel under anvendelse av
"the GeneClean II kit". Konstrukt pBr.Ad35.PRnAE3 ble
også spaltet med MluI og NotI, og det 13,6 kb lange
vektorfragment ble isolert fra gel under anvendelse av
25 "the GeneClean spin kit". Ligasjon av disse fragmenter
resulterte i konstrukt pBr.Ad35.ΔE3.PR5E4 (Fig. 26).
Konstrukt pCR.NF1-NR2 (Fig. 20) ble spaltet med MluI,
NdeI og BglI (sistnevnte for å spalte vektorfragmentet
til mindre fragmenter), og det 2,8 kb lange fragment ble
30 isolert fra gel under anvendelse av "the GeneClean spin
kit". Konstrukt pBr.Ad35.PRnAE3 ble spaltet med MluI og
NdeI, defosforylert under anvendelse av CIP-enzym (New
England Biolabs), og det 15,2 kb lange vektorfragment ble
også isolert under anvendelse av "the GeneClean spin

kit". Ligasjon av disse fragmenter gav konstrukt pBr.Ad35.ΔE3.PR5Orf6 (Fig. 27).

pBr.Ad35.ΔE3.PR5E4 og pBr.Ad35.ΔE3.PR5Orf6 anvendes deretter for å bytte 3' PacI-SwaI-fragmentet i
 5 pWE.Ad35.pIX-rITR med de tilsvarende regioner fra pBr.Ad35.ΔE3.PR5E4 og pBr.Ad35.ΔE3.PR5Orf6 som beskrevet intra. Dette fører til konstruktene pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3.5E4 og pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3.5Orf6. En alternativ metode for å generere disse store kosmider er å anvende
 10 tre fragmenter i ligasjonsreaksjonen for pakking: et 14,7 kb langt NotI-PacI-fragment fra pWE.Ad35.pIX-rITR, PacI-NotI-innføyningen fra pBr.Ad35.ΔE3.PR5E4 eller pBr.Ad35.ΔE3.PR5Orf6 og det NotI-spaltede kosmidiske pWE15-vektorfragment (Stratagene). Dette sistnevnte
 15 fragment kan også isoleres fra NotI/PacI-spaltningen av pWE.Ad35.pIX-rITR. Ko-transfeksjon av f.eks. det NotI-spaltede pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3.5Orf6 med f.eks. PT-PspI-spaltet pAdApt35.LacZ.rsv (eksempel 9) til PER.C6TM-celler vil generere rekombinant adenovirus avledet fra Ad35,
 20 hvilke rekombinante adenovirus omfatter E4-orf6 avledet fra Ad5 (som gir evne til å propagere på PER.C6), idet nevnte rekombinante adenovirus videre har en heterolog pIX-promoter hvilket resulterer i økede pIX-ekspressionsnivåer og stabile virioner.

25 Eksempel 16. Generering av E1- og E1/E3-slettede Ad35-baserte vektorer på PER.C6-celler.

For å muliggjøre generering av rekombinante Ad35-viruser på den kompletterende cellelinje PER.C6 under anvendelse av de pBr.Ad35.PRn-baserte konstrukter, laget vi først
 30 et nytt konstrukt inneholdende Ad35-sekvenser fra bp 3401 til bp 24650 i Ad35-sekvensen (WO 00/70071) og således overlapper med både adapterplasmidene og de pBr.Ad35.PRn-baserte konstrukter. Transfeksjon av disse tre plasmider inn i PER.C6-celler og en dobbelt homolog
 35 rekombinasjon fører til et komplett viralt genom og

replikasjon av rekombinante viruser som fremstilt i Figur 18. Det nødvendige plasmid ble laget ved sletting av en stor del av Ad35-sekvensene i pWE.Ad35.pIX-rITR. For dette ble pWE.Ad35.pIX-rITR spaltet med EcoRV, og
 5 det 29 kb lange vektorholdige fragment ble rensset fra en lavtsmeltende gel under anvendelse av "the Geneclean spin kit". Det rensede DNA ble selv-ligert og anvendt for å transformere DH10B elektro-kompetente bakterier (Invitrogen/LTI), hvilket resulterer i pWE.Ad35.pIX-EcoRV
 10 (Fig. 29).

Alle DNA'er som ble anvendt for transfeksjon, ble spaltet som indikert i tabell V, varme-inaktivert ved 65°C i 15 min og anvendt uten videre behandling i transfeksjonen. PER.C6-celler ble utsådd dagen før transfeksjon i T25-kolber i en
 15 tetthet av 3×10^6 celler/kolbe og transfisert som indikert i tabell V under anvendelse av LipofectAmine (Invitrogen/LTI) i henhold til fabrikantens instruksjoner, unntatt at transfeksjonsblandingen i serum-fritt DMEM-medium (Gibco/BRL) ble erstattet med PER.C6-kulturmedium
 20 (DMEM, 10% FBS og 10 mM $MgCl_2$) etter 5 timer. Dagen etter ble transfeksjonseffektiviteten beregnet til 50% ved fluorescensmikroskopi. To dager senere ble cellene trypsinisert og utsådd på nytt i T80-kolber og videre inkubert ved 37°C/10%CO₂. Seks dager etter transfeksjonen
 25 viste alle kulturer full cytopatogen virkning (CPE, typisk for viruspropagering) med unntagelse av PER.C6-kulturen transfisert med Ad35.AdApt.eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITR. En dag senere ble cellene og mediet i kolbene med CPE høstet og utsatt for fryse/tine-sykluser, klaret fra celleavfall ved
 30 sentrifugering (10 min ved 1500 rpm, og 100 µl av disse rålysater ble anvendt til å infisere på nytt friske PER.C6-celler ved 85% konfluens i T80-kolber. Transfeksjonen av Ad35.AdApt.eGFP + pWE.Ad35.pIX-rITR som ikke viste tegn på CPE, ble høstet ved trypsinisering og
 35 også behandlet som ovenfor. To dager etter infeksjon av friske PER.C6-celler viste alle kolber full CPE med unntagelse av den som ikke viste noe tegn på CPE ved tiden

for den initielle høsting. Dette viser klart at fullstendig E1-slettede Ad35-baserte virusser kan gjøres på PER.C6-celler når Ad5 E4-orf6-genproduktet uttrykkes fra Ad35-rygggraden.

5 Eksempel 17. E1-slettede Ad35-virusser med en heterolog promoter som driver pIX-ekspressjonen.

For å undersøke virkningen av en heterolog promoter-sekvens som aktiverer pIX-genet i fullstendig E1-slettede virusser, ble en serie adapterplasmider anvendt til å
 10 generere rekombinante Ad35-virusser. For dette ble pAdApt35LacZ, pAdApt35.LacZ.rsv (eksempel 9), pAdApt535.LacZ (eksempel 5) og pAdApt35BLacZ (inneholdende Ad35 E1B-promotersekvensen foran pIX-genet; beskrevet nedenfor) spaltet med pIPsp-1 og anvendt for å
 15 generere virusser med NotI-spaltet kosmid pWE/Ad35-3481 og pWE/Ad35-3481ΔE3 (eksempel 7) som beskrevet i eksempel 2 (og i WO 00/70071). I tillegg ble virusser generert med adapterplasmid pBr.Ad35ΔSM.AdAptLacZ (Figur 7; eksempel 10). Dette adapterplasmid er slettet for E1A og en stor
 20 del av E1B-sekvensene. Det bibeholder 0,6 kb av 3' E1B-55K-sekvensen og har også wt-sekvenser mellom stoppkodonet i 55K og startkodonet i pIX.

Ved fullstendig CPE ble cellene og mediet høstet, frosset/tint og sentrifugert for å fjerne celleavfallet.
 25 Supernatanten (klarede lysater) av hver av transfeksjonene ble deretter anvendt til å utføre en plakkundersøkelse som beskrevet i eksempel 9. Klarede lysater ble fortynnet serielt ti ganger, og 10^{-5} til 10^{-9} fortynninger ble utsådd.

30 En uke etter tilsetningen av agarovertrekket ble plakker synlige, og de ble farvet med X-gal for å overvåke LacZ-aktivitet. Tabell VI oppsummerer resultatene av disse eksperimenter. Alle Ad35-virusser som har ytterligere eller andre sekvenser enn akkurat den endogene proksimale

pIX-oppstrømssekvens som regulerer pIX, fungerer bedre og har et høyere antall av uttrykkende plakker i vår undersøkelse sammenlignet med de E1-slettede Ad35.AdApt.LacZ-viruser. Bemerk at den totale genomlengde av Ad35 Δ SM.LacZ-virusene (106% sammenlignet med wt Ad35) overskrider den maksimale pakkbare lengde bestemt for Ad5-viruser (105%). Dette kan ha innflytelse på resultatene oppnådd for dette virus. Ad35.AdApt.LacZ.rsv (105%) er også på grensen av den teoretiske pakkbarehetsstørrelse. Totalt viser resultatene at en heterolog promoter-drivende pIX-ekspressjon forbedrer den maksimalt tolererte pakningsstørrelse og stabiliteten av E1-slettede Ad35-viruser. Det samme er tilfelle for virus som har en lengre endogen proksimal sekvens (Ad35 Δ SM.LacZ), hvilket antyder at de ytterligere (E1B 55K) sekvenser heri inneholder regulerende elementer for pIX-ekspressjon.

pAdapt35BLacZ er et Ad35-adapterplasmid hvor Ad35 E1B-promotersekvensen regulerer pIX-genet. Adapterplasmid pAdApt35BLacZ ble generert som følger: E1B-promoterfragmentet ble amplifisert under anvendelse av primerne 35E1Blong og Ad35E1bpromrev. Begge primere ble fosforylert. Reaksjonen ble gjort med Pwo DNA-polymerase (Innotrain, Diagnostic GmbH) i henhold til fabrikantens instruksjoner. pBr.Ad35.leftITR-pIX ble anvendt som modell-DNA, (25 ng, beskrevet i WO 02/40665). Programmet ble satt som følger: 2 minutter ved 94°C og deretter 30 sykluser på (94°C i 30 sekunder, 60°C i 30 sekunder og 72°C i 1 minutt) og sluttet med 10 minutter ved 72°C. Kjøle/varme-fallet ble satt til 2°C/sekunder Denne PCR resulterer i amplifikasjon av den potensielle E1D-promoter av Ad35 i 125 nukleotider. Konstrukt pAdapt535.LacZ (eksempel 5) ble deretter spaltet med MfeI og BglII. Etter spaltingen ble vektoren behandlet med Klenow-enzym for å fremkalle stumpe ender. Et defosforyleringstrinn ble gjort under anvendelse av SAP (Roche). Det således behandlede 8 kb lange vektorfragment ble deretter isolert fra gel. E1B-

promoterregionen ble også isolert fra gel. Disse to fragmenter ble ligert og transformert til DH5 α -Tlr-kompetente celler (Invitrogen). Den korrekte orientering av ElB-promoteren i det resulterende plasmid ble

5 bekreftet ved å spalte med HpaI og ApaLI. Etter utvelgelse av den korrekte klon ble den innføyde ElB-promotersekvens også bekreftet ved sekvensbestemmelse.

Eksempel 18. Promoteren av pIX-genet er lokalisert i 3'-enden av ElB-55K-kodingssekvensen i Ad35- og Ad11-viruser.

10 Basert på resultatene beskrevet ovenfor forventet vi at pIX-promoteren i undergruppe B viruser ville være lokalisert i ElB-55K-kodingsregionen. For å undersøke dette direkte, begynte vi å identifisere pIX mRNA cap-setet som beskrevet i eksempel 10. For dette ble wtAd35-,

15 wtAd11- og Ad35.ElB⁺.AdApt.Luc-viruser anvendt for å infisere PER55K-klon 16-celler ved en MOI av 50 VP/celle. Som kontroll ble wtAd5 tatt med, siden promoteren og mRNA-startsetet for dette virus er kjent. RNA ble isolert fra de infiserte kulturer 16-18 timer etter

20 infeksjon under anvendelse av TRIzol-reagens (Invitrogen) som beskrevet av fabrikanten. Ved slutten av prosedyren ble det isolerte RNA lagret i 100% formamid. "The GeneRacer Kit" (Invitrogen) ble anvendt for å amplifisere 5'-enden av pIX-transkripter, for å lokalisere

25 starten av transkripsjon. Før igangsettelsen av GeneRacer-protokollen ble 5 μ g RNA rensset fra formamidet ved hjelp av natriumacetatutfelling som beskrevet i GeneRacer-protokollen. Renset RNA ble behandlet i henhold til fabrikantens protokoll for amplifikasjon av 5'-enden

30 av pIX mRNA-stoffet. Etter fosfatasebehandling og påfølgende fjerning av cap-strukturen med tokakksyrepyrofosfatase og ligasjon av Generacer RNA-oligo, ble SuperScriptTM II Reverse Transcriptase fra settet anvendt for cDNA-syntese. cDNA ble syntetisert ved reverstranskripsjon under anvendelse av en genspesifikk (revers)

35 primer for pIX. For Ad35 (wt og ElB⁺.Luc-virus) og wtAd11

ble primeren pIXrev anvendt, for Ad5 ble primeren pIXrev-Ad5 anvendt. Det resulterende cDNA (1 μ l av ukjent konsentrasjon) ble anvendt som modell for PCR for å generere dsDNA. Denne PCR ble gjort under anvendelse av Pwo DNA-polymerase (Roche) i henhold til fabrikantens instruksjoner, og med tilsetning av DMSO (Sigma; 3% v/v). Amplifikasjonen ble gjort med GeneRacers 5'-primeren fra settet som er spesifikk for oligonukleotidet ligert til 5'-enden av mRNA-stoffet, og de genspesifikke revers-primere, som nevnt ovenfor. Reaksjonsbetingelsene var som følger: Denaturering ved 94°C i 2 minutter, etterfulgt av 30 sykluser på (94°C i 30 sekunder, 60°C i 30 sekunder, 72°C i 2 minutter) og avsluttet ved forlengelse ved 68°C i 8 minutter. De resulterende DNA-fragmenter ble separert ifølge størrelse ved elektroforese på en 1,0% agarosegel. For Ad5 ble et 480 bp fragment og for Ad35 (begge virusser) og Ad11 et 200 bp fragment oppnådd. Ad11 viste også et 2 kb langt fragment. Alle fragmenter ble separert ut og rensset fra agarosegel. De rensede DNA-fragmenter ble klonet inn i pCR4Blunt-TOPO®-vektoren (Invitrogen). Vektorene ble sekvensbestemt under anvendelse av kommersielle M13 Forward- og Reverse-primere. De resulterende sekvenser ble linjestilt mot villtype-sekvenser for å lokalisere starten av pIX-transkripsjon. Det 200 bp lange bånd isolert fra Ad35- og Ad11-cDNA-fremstillinger utgjorde det ekte pIX mRNA, og det 2 kb lange fragment isolert fra Ad11 viste seg å stamme fra E1B-promoterens. Fig. 30 viser en linjestilling for Ad35 (SEQ. ID. NO. 59) og Ad11 (SEQ. ID. NO. 58) cDNA-sekvensene med wt Ad35-sekvensen (SEQ. ID. NO. 60). Linjestillingen viser lokaliseringen av en spleiset intron-sekvens i pIX mRNA-stoffet. I Fig. 31 er lokaliseringen av det identifiserte cap-sete og spleisesetene skjematisk vist i E1B-pIX-regionen av Ad35. For Ad5 ble det forventede pIX mRNA (Babiss og Vales, 1991) identifisert med cap-setet lokalisert ved posisjon 3580 (ikke vist; nummerering som i genbank-aksesjonsnr. M73260). For Ad35 ble cap-setet lokalisert i 3'-enden av E1B-55K-genet ved posisjon 3339

på en A-rest (Ad35-sekvens WO 00/70071). I Ad11 ble cap-setet på lignende måte funnet på en T-rest (posisjon 3339 i Genbank-aksesjonsnr. AY163756). Det var interessant at sekvensen mellom stoppkodonet i 55K-genet og startkodonet i pIX, hvor promoteren for pIX i Ad5-viruser er lokalisert, er spleiset av mRNA'et i Ad35- og Ad11-viruser. Disse resultater tilveiebringer sterkt bevis på at i Ad35 og Ad11 reguleres pIX-genekspresjonen fra en promoter lokalisert i 3'-enden av 55K-genet.

10 Eksempel 19: E1-slettede Ad35-viruser som bibeholder en kort strekning av 3' E1B-55K-sekvens, har en større pakkekapasitet.

Med identifikasjonen av pIX mRNA cap-setet blir det mulig å innlemme den naturlige Ad35-promoter for korrekt pIX-ekspresjon og også begrense så meget som mulig E1B-55K-sekvensene i den virale vektor. Her viser vi, som et eksempel, konstruksjonen av et Ad35-adapterplasmid som bibeholder 166 bp av 3'-enden av 55K-kodingssekvensen (pAdApt35Bsu.Luc) og genereringen av et E1-slettet Ad35Luc-virus med øket stabilitet og/eller pakkekapasitet. Denne 166 bp lange sekvens koder ikke et funksjonelt 55K-genprodukt, men inneholder pIX mRNA cap-setet identifisert i det tidligere eksempel i sin naturlige posisjon i relasjon til pIX-kodingssekvensen.

25 Konstrukt pAdApt35Bsu.Luc ble generert som følger: Først ble et PCR-fragment generert under anvendelse av 40ng pBr.Ad35.leftITR-pIX som mål-DNA (beskrevet i WO 02/40665) og primerne Bsu55KF og Age-pIXR. PCR ble utført med Pwo DNA-polymerase (Genaxis) i henhold til fabrikantens instruksjoner. I tillegg ble 3% v/v DMSO (Sigma) anvendt. 30 Programmet ble satt som følger: 2 minutter ved 94°C, deretter 30 sykluser på (94°C i 30 sekunder, 60°C i 30 sekunder og 72°C i 1,5 minutt) og sluttet med 8 minutter ved 68°C. Det resulterende 1,2 kb lange produkt ble 35 klonet direkte inn i pCR4Blunt-TOPO-vektoren (Invitrogen)

i henhold til fabrikantens protokoll, hvilket resulterer i pCR4Blunt-TOPO.Bsu-Age. Konstruktet ble kontrollert ved spaltning med PvuII (New England Biolabs). Bsu-Age-fragmentet ble isolert fra pCR4Blunt-TOPO.Bsu-Age-plasmidet ved spaltning med Bsu36I (New England Biolabs) og behandlet med Klenow-enzym (New England Biolabs) for å avstumpe endene. DNA'et ble deretter renset under anvendelse av PCR-rensesettet (Qiagen) og ble spaltet med AgeI (New England Biolabs). Det 1 kb lange fragment ble isolert fra gel under anvendelse av "the Gene clean II kit" (Biol01, Inc.). Parallelt ble konstrukt pAdApt35.Luc (beskrevet i WO 00/70071) spaltet med BglII og behandlet med Klenow-enzym. DNA'et ble renset under anvendelse av PCR-rensesettet (Qiagen). Det rensede DNA ble spaltet med AgeI (New England Biolabs) og defosforylert med SAP (Roche). Det 5,8-Kb lange fragment ble isolert fra gel med "the Gene clean II kit" (Biol01). De to fragmenter ble blandet i ekvimolare mengder i en ligasjonsreaksjon og transformert til resistente T1 EM DHIOB-celler (Invitrogen). Dette resulterte i plasmidisk pAdApt35Bsu.Luc.

For å generere E1-slettede viruser ble pAdApt35Bsu.Luc spaltet med pIPsp-I og ko-transfisert over til PER55K-klon 16-celler med NotI-spaltet pWE.Ad35-3481 (eksempel 7) og med pWE.Ad35-3481ΔE3 som beskrevet tidligere. pWE.Ad35-3481ΔE3 inneholder den samme E3-sletting som beskrevet for pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3 (eksempel 2) og ble generert i henhold til metoden beskrevet i eksempel 7 under anvendelse av konstrukt pWE.Ad35-3481ΔNdeI og et 26,6 kb langt NdeI-fragment fra pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3.

I tillegg ble det generert E1-slettede Ad35-viruser som inneholdt E4-orf6- og E4-Orf6/7-sekvenser fra Ad5 i den virale ryggrad som erstatter de naturlige Ad35-sekvenser (se eksempel 16 for generering av slike viruser på umodifiserte PER.C6-celler). I foreliggende eksempel ko-transfiseres pAdApt35Bsu.Luc spaltet med pIPsp-I med

NotI/EcoRV-spaltet pWE.Ad35.pIX-EcoRV og med PacI/NotI-spaltet pBr.Ad35.PR5Orf6 (med og uten E3-region). Alle transfeksjoner gav opphav til full CPE innen en uke etter transfeksjonen, og celler og medium ble høstet som

5 beskrevet tidligere. Viruser ble deretter plakkrenset, og virale stamløsninger ble amplifisert på de passende kompletterende celler, og opprinnelse fra enkeltvis plakker ble analysert ved hjelp av PCR med hensyn til fullstendighet i transgenregionen. Transgene PCR-

10 undersøkelser ble gjort som beskrevet i eksempel 3 under anvendelse av primerne AdApt35CMVF og pIXrevN2. Fig. 32 viser et eksempel på PCR-resultatene på plakker som stammet fra Ad35Bsu.Luc- og fra Ad35Bsu.Luc.5Orf6-viruser.

15 Uten hensyn til nærvær av E3-regionen eller av E4-orf6-sekvensen i den virale ryggrad inneholdt alle testede plakker (5-10 for hvert virus) et intakt transgen. En unntagelse opptrådte i en av plakkene fra Ad35Bsu.Luc-viruser som viste et svakt bånd ved tilnærmet 1,6 kb

20 (Fig. 32; bane 12), hvilket trolig hadde sitt opphav i små mengder av viruser med en sletting. Det svake bånd ved tilnærmet 500 bp som opptrer i alle virusprøver, er et bakgrunnsbånd av primerne på den virale ryggrad. Observasjonen at E3-holdige Ad35-viruser med en

25 luciferase-ekspresjonskassetten viste seg å være stabile etter plakkrensing strider mot tidligere resultater med Ad35.AdApt.Luc-viruser som er fullstendig E1-slettede og ikke inneholder den 166 bp lange 3' 55K-kodingssekvens. Ved å anvende standardiserte pAdApt35.Luc-plasmider, var

30 vi ikke i stand til å generere plakk-rensede viruser inneholdende E3-regionen. Således kan vi med innlemmelse av de ekstra 55K-sekvenser i ryggraden nå lage viruser på mer enn 34,6 kb total lengde uten alvorlig ustabilitet. Dette motsvarer nesten helt lengden av et wt Ad35-

35 virus. Hvis en E3-slettet ryggrad ble anvendt, ville kapasiteten for fremmede sekvenser teoretisk være over 5 kb. Det er åpenbart at det er mulig å innlemme flere

EIB-55K-sekvenser enn i foreliggende eksempel og/eller å kombinere 3' 55K-sekvensene med heterologe forsterker-sekvenser uten å avvike fra oppfinnelsen beskrevet her.

TABELLER

- 5 Tabell I: Utbytter av E1- og E1/E3-slettede Ad35-viruser på klon #16-celler fremstilt på trippelskiktskolber.

Virus	Skala (T175 ^{III} kolber)	Totalt antall av viruspartikler etter DSP	VP/celle
Ad35.AdApt.eGFP	4	$7,5 \times 10^{11}$	2500
Ad35.ΔE3.AdApt.empty	8	2×10^{12}	3300
Ad35.ΔE3.AdApt.LacZ	8	$3,8 \times 10^{11}$	600
Ad35.ΔE3.AdApt.MV-F	4	$8,8 \times 10^{11}$	2900
Ad35.ΔE3.AdApt.MV-H	8	$2,6 \times 10^{12}$	4250

- 10 Tabell II: Transgen (LacZ) aktivitetstest på A549 under anvendelse av rålysater fra den andre passerings virus. % blå celler er angitt for hver mengde av virus anvendt for infeksjon.

Virus	10 µl	1 µl	0.1µl
Ad35.AdApt.LacZ.rsv	95	15	<1
Ad35ΔE3.AdApt.LacZ.rsv	90	10	<1
Ad35.AdApt.LacZ.C4	2	<0,1	0
Ad35.ΔE3.AdApt.LacZ.C4	15	<1	<0,1

Tabell III: Transgen (Luciferase) aktivitetstest på A549 under anvendelse av rålysater fra den andre passerings virus. Aktiviteten uttrykkes i relative lysenheter (RLU).

Virus	10	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

5 Tabell IV: Primersekvenser.

Navn	Sekvens	SEQ ID. NO.
35FR	5'-CGGGATCCACTTTATTTTAGTTGTCGTCTTC-3'	1
35R4	5'-CGGAATTCTTAATTAAGGGAAATGCAAATCTGTGAGG-3'	2
35psi-For	5'-GTGGTATTTATGGCAGGGTG-3'	3
DF35-1	5'-CACTCACCTCCAATTCC-3'	4
5E4F	5'-CGGGATCCGTTTGTGTTATGTTTCAACGTG-3'	5
5E4R	5'-GCTGGCGAGCTCGGCGGAGTAACTTGTATGTG-3'	6
355ITR	5'-GATCCGGAGCTCACAACGTCATTTTCCCACG-3'	7
353ITR	5'-AGGAATTCGCGCCGCATTTAAATC-3'	8
E4-F1	5'-AGAGGAACACATTCCCCC-3'	9
E4-R2	5'-GGGGAGAAAGGACTGTGTATTCTGTCAAAT'GG-3'	10
E4-F3	5'-TTTGACAGAATACACAGTCCTTTCTCCCCGGCTGG-3'	11
E4-R4	5'-ACAAAATACGAGAATGACTACGTCCGGCGTTCC-3'	12
E4-F5	5'-GGACGTAGTCATTCTCGTATTTTGTATAGC-3'	13
E4-R6	5'-TCACCAACACAGTGGGOG-3'	14
NF-1	5'-CCACAACCCCCACTACTCCC-3'	15
NR-2	5'-CGTCTCTTCCCTCTCCTCTCC-3'	16
NcoI-R	5'-AGGATCATCCGCTGCTGCCC-3'	17
NcoI-F	5'-CATCAGGATAGGGCGGTGG-3'	18
35E3for	5'-AATGACTAATGCAGGTGCGC-3'	19
35E3rev	5'-CGACGCGTTGTAGTCGTTGAGCTTCTAG-3'	20

AdApt35CMVF	5'-GTAGGTGTCAGCCTAGGTGGTC-3'	21
35pIXR	5'- TCATGTCAGCTGCAAGACAG-3'	22
SV40for	5'-CAATGTATCTTATCATGTCTAG-3'	23
pIXSRmfe	5'-CTCTCTCAATTGCAGATACAAAACACATAAGACC-3'	24
pIX35Fmfe	5'- CTCTCTCAATTGTCTGTCTTGCAGCTGACATG-3'	25
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'-CGGAATTCTTCTTAATTAA.GGGAAATGCAAATCTGTGAGG-3'	32
Ad3555KNfeF	5'-AACCAAGCTTCAATTGTCTCTGAA -3'	33
Ad35pIXNcoR	5'-CCACCCATGGCAGCTGCAAGACAG -3'	34
Ad35pIXrev	5'-TCAGCTGCAAGACAGAAAAAAC-3'	35
Epr-F	5'- GTGTTTACTTAAGGTGACGTC -3'	36
Epr-R	5'- GAAAGCCAGCTCCTATGAGC -3'	37
pIXrev	5'- GGCGGGTGTAACGGGTCTTCCA-3'	38
pIXrev-N2	5'- GATGGGAGACGCCCTGTCAGATAAGG-3'	39
35ElBlong	5'-AAGGTGACGTCAATATTTGTGTG-3'	40
Ad35Elbprom rev	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

Tabell V: Liste over konstrukter anvendt for å generere E1-slettede Ad35-baserte virusser på PER.C6-celler som beskrevet i eksemplene. Adapterkonstrukter ble spaltet med PacI, pWE.Ad35.pIX-EcoRV ble spaltet med NotI og EcoRV, E4-modifiserte pBr-baserte konstrukter ble spaltet med PacI og NotI.

Nr.	Konstrukter			CPE
1	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-EcoRV	pBr.Ad35.PR5E4	ja
2	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-EcoRV	pBr.Ad35.PR5Orf6	ja
3	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-EcoRV	pBr.Ad35.ΔE3PR5E4	ja
4	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-EcoRV	pBr.Ad35.ΔE3.PR5Orf6	ja
5	pAdApt35.eGFP	pWE.Ad35.pIX-rITRxNotI		Nei
6	pAdApt5.eGFP	pWE.Ad5.AflIII-rITRxPacI		ja

Tabell VI: Prosentandeler av LacZ-positive plakker av Ad35-virusser som har forskjellige promotersekvenser som driver pIX-ekspressjonen. (NP= ingen plakker synlig)

Virusnavn	% av blå plakker		viruslengde (inklusive E3-region)
	med E3-region	w/o E3-region	
Ad35.AdApt.LacZ	0%	50%	36,1 kb
Ad535.AdApt.LacZ	NP	100%	36,1 kb
Ad35.AdAptB_LacZ	5%	30%	36,2 kb
Ad35.AdApt.LacZ.rsv	90%	100%	36,5 kb
Ad35ΔSM.LacZ	50%	100%	36,7 kb

LITTERATURHENVISNINGER

- 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
5 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.
- 10 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
15 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-
20 based cell line complements the deficiency of pIX
mutant adenovirus type 5. J. Virol. 69(11), p6627-
6633.
- Fallaux, F.J., Kranenburg, O., Cramer, S.J., Houweling,
A., van Ormondt, H., Hoeben, R.C. and van der Eb,
25 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
30 Wollenberg, D.J., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C.,
Cramer, S.J., van Ormondt, H., van der Eb, A.J.,
Valerio, D. and Hoeben, R.C. (1998). New helper cells
and matched early region 1-deleted adenovirus vectors
prevent generation of replication competent
35 adenoviruses. Hum. Gene Ther. 9, p 1909-1917.

- Farina, S.F., Gao, G.P., Xiang, Z.Q., Rux, J.J., Burnett, R.M., Alvira, M.R., Marsh, J., Ertl, H.C. and Wilson, J.M. (2001). Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J. Virol.* 75(23), p11603-11613.
- 5
- 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.
- 10
- 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.
- 15
- 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.
- 20
- 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.
- 25
- 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.
- 30

- 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).
5 Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence. *J. Virol.* 70(12), p8459-8467.
- Herrman, C.H. and Mathews, M.B. (1989). The adenovirus E1B
10 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.
- 15 Leppard, K.N. (1997). E4 gene function in adenovirus, adenovirus vector and adeno-associated virus infections. *J. Gen. Viral.* 78, p 2131-2138.
- Leppard, K.N. (1998). Regulated RNA processing and RNA transport during adenovirus infection. *Seminars in*
20 *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. Viral.* 71(7), p5102-5109.
- 25 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. Viral.* 52(2), p664-671.
- 30 Pilder, S. , Moore, M., Logan, J. and Shenk, T. (1986). The adenovirus E1B 55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 6, p470-476.

- Rao, L., Debbas, M., Sabbatini, P., Hockenbery, D., Korsmeyer, S. and White, E. (1992). The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 89, pp 7742-7746.
- Reese, M.G. and Eeckman, F.H. (1995). Novel neural network algorithms for improved eukaryotic promoter site recognition. Talk and Abstract from The seventh international genome sequencing and analysis conference. Hyatt Regency, Hilton Head Island, South Carolina, Sept 16-20, 1995.
(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).
- Robert, J.-J., Gauffeny, I., Maccario, J., Jullien, C., Benoit, P., Vigne, E., Crouzet, J., Perricaudet, M. and Yeh, P. (2001). Degenerated pIX-IVa2 adenoviral vector sequences lowers reacquisition of the E1 genes during virus amplification in 293 cells. *Gene Ther.* 8, p1713-1720.
- Russell, W.C. (2000). Update on adenoviruses and its vectors. *J. Gen. Virol.* 81, pp 2573-2604.
- Sambrook, J. and Russell, D. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Press (2001)_ ISBN 0-87969-576-5.
- Shabram, P.W., Giroux, D.D., Goudreau, A.M., Gregory, R.J., Horn, M.T., Huyghe, B.G., Liu, X., Nunnally, M.H., Sugarman, B.J. and Sutjipto, S. (1997) Analytical anion-exchange HPLC of recombinant type-5 adenoviral particles. *Hum. Gene Ther.* 8 (4) : 453-465.
- Shenk, T. (1996). *Adenoviridae: The viruses and their replication*. In *Virology*, eds. Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (Lippincott-Raven, New York), Vol. 2, pp 2111-2148.
- Van der Vliet, P.C. (1995). Adenovirus DNA replication. In *The molecular repertoire of adenoviruses II*, eds. Doerfler, W. and Bohm, P. (Springer-Verlag, Berlin). *Current Topics in Microbiology and Immunology* 199/II, pp 1-30.

- White, E., Grodzicker, T. and Stillman, B.W. (1984).
Mutations in the gene encoding the adenovirus early
region 1B 19,000 molecular-weight tumor antigen cause
degradation of chromosomal DNA. J.Virol. 52(2), p410-
5 419.
- 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.
- 10 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.

P a t e n t k r a v

1. Rekombinant undergruppe B adenovirus som har en
delesjon i E1-området, og hvilket adenovirus ikke koder
for et funksjonelt E1B K55 genprodukt, hvor nevnte
5 adenovirus omfatter:

(i) adenovirus-sekvensen plassert mellom
stoppkodonet av den E1B 55K-kodende sekvens og
startkodonet av den pIX-kodende sekvens; og

(ii) en funksjonell pIX-kodende sekvens under
10 kontroll av en sekvens som har promoteraktivitet, hvor
nevnte sekvens som har promoteraktivitet består av opp til
0,7 kb av adenovirussekvensene som ligger direkte
oppstrøms for pIX startkodonet, hvor nevnte sekvens
omfatter den minste nødvendige sekvens for
15 promoteraktivitet som er til stede i de siste 166 bp av
den E1B 55K-kodende sekvens.

2. Rekombinant adenovirus ifølge krav 1, hvor nevnte
sekvens med promoteraktivitet inneholder opp til 600
nukleotider av adenovirussekvensene som ligger direkte
20 oppstrøms for den pIX-kodende sekvens.

3. Rekombinant adenovirus ifølge krav 1, hvor nevnte
sekvens med promoteraktivitet inneholder opp til 300
nukleotider av adenovirussekvensene som ligger direkte
oppstrøms for den pIX-kodende sekvens.

25 4. Rekombinant adenovirus ifølge krav 1, hvor nevnte
sekvens med promoteraktivitet inneholder opp til 250
nukleotider av adenovirussekvensene som ligger direkte
oppstrøms for den pIX-kodende sekvens.

5. Rekombinant undergruppe B adenovirus omfattende en
30 funksjonell pIX-kodende sekvens og med en delesjon i E1-
regionen, hvor den pIX-kodende sekvens er under kontroll

av en heterolog promoter for å drive ekspresjon i en gitt pakkecelle.

6. Rekombinant adenovirus ifølge krav 5, hvor nevnte heterologe promoter omfatter en nukleinsyresekvens valgt
5 fra gruppen bestående av en ikke-endogen proksimal pIX-promoter, en viral promoter, en cellulær promoter, en syntetisk promoter og en hybrid promoter.

7. Rekombinant adenovirus ifølge krav 6, hvor nevnte heterologe promoter er valgt fra gruppen bestående av
10 sekvenser som er i det minste delvis avledet fra den Ad5 proksimale pIX-promoter, en Rous sarkomavirus-promoter og en adenovirus ElB-promoter.

8. Rekombinant adenovirus ifølge ethvert av kravene 1 - 7, hvor nevnte adenovirus er avledet fra et adenovirus
15 serotype 35 eller et adenovirus serotype 11.

9. Rekombinant adenovirus ifølge ethvert av kravene 1 - 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det videre omfatter en sekvens som koder for et funksjonelt E4-orf6-protien
20 avledet fra et adenovirus av undergruppe C.

10. Isolert nukleinsyre som ved innføring i en passende pakkecelle, utgjør genomet av et rekombinant adenovirus ifølge ethvert av kravene 2 - 9.

11. Fremgangsmåte ved økning av stabiliteten og/eller
25 pakkekapasiteten av et rekombinant undergruppe B adenovirus som har minst en delesjon i El-området, omfattende trinnet å uttrykke elementene som er nødvendige for produksjon og sammensetning av nevnte rekombinante adenovirus til viruspartikler i en pakkecelle,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at de følgende elementer eksisterer i eller blir innført i nevnte adenovirus:

(i) adenovirus-sekvensen plassert mellom stoppkodonet av den E1B 55K-kodende sekvens og startkodonet av den pIX-kodende sekvens; og

(ii) en funksjonell pIX-kodende sekvens under
5 kontroll av en sekvens som har promoteraktivitet, hvor
nevnte sekvens som har promoteraktivitet består av opp til
0,7 kb av adenovirussekvensene som ligger direkte
oppstrøms for pIX startkodonet, hvor nevnte sekvens
omfatter den minste nødvendige sekvens for
10 promoteraktivitet som er til stede i de siste 166 bp av
den E1B 55K-kodende sekvens.

12. Fremgangsmåte ifølge krav 11, hvor nevnte sekvens med
promoteraktivitet inneholder opp til 600 nukleotider av
adenovirussekvensene som ligger direkte oppstrøms for den
15 pIX-kodende sekvens.

13. Fremgangsmåte ifølge krav 11, hvor nevnte sekvens med
promoteraktivitet inneholder opp til 300 nukleotider av
adenovirussekvensene som ligger direkte oppstrøms for den
pIX-kodende sekvens.

20 14. Fremgangsmåte ifølge krav 11, hvor nevnte sekvens med
promoteraktivitet inneholder opp til 250 nukleotider av
adenovirussekvensene som ligger direkte oppstrøms for den
pIX-kodende sekvens.

15. Fremgangsmåte før å øke stabiliteten og/eller
25 pakkekapasiteten av et rekombinant undergruppe B
adenovirus som har en delesjon i E1-regionen, omfattende
trinnet å uttrykke elementene som er nødvendige for
produksjon og sammensetning av nevnte rekombinante
adenovirus til viruspartikler i en pakkecelle, hvor de
30 pIX-kodende sekvenser står under kontroll av en heterolog
promoter.

16. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 11 - 15, hvor nevnte rekombinante adenovirus er avledet fra et adenovirus serotype 35 eller et adenovirus serotype 11.

17. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 15 - 16, hvor
5 nevnte heterologe promoter er valgt fra gruppen bestående av en ikke-endogen proksimal pIX-promoter, en viral promoter, en cellulær promoter, en syntetisk promoter og en hybrid promoter.

18. Fremgangsmåte ifølge krav 17, hvor nevnte heterologe
10 promoter er valgt fra gruppen bestående av den Ad5 proksimale pIX-promoter, en Rous sarkomavirus-promoter, en adenovirus ElB-promoter.

19. Rekombinant adenovirus pakkecelle omfattende et rekombinant adenovirus ifølge ethvert av kravene 1 - 9.

Fig. 1

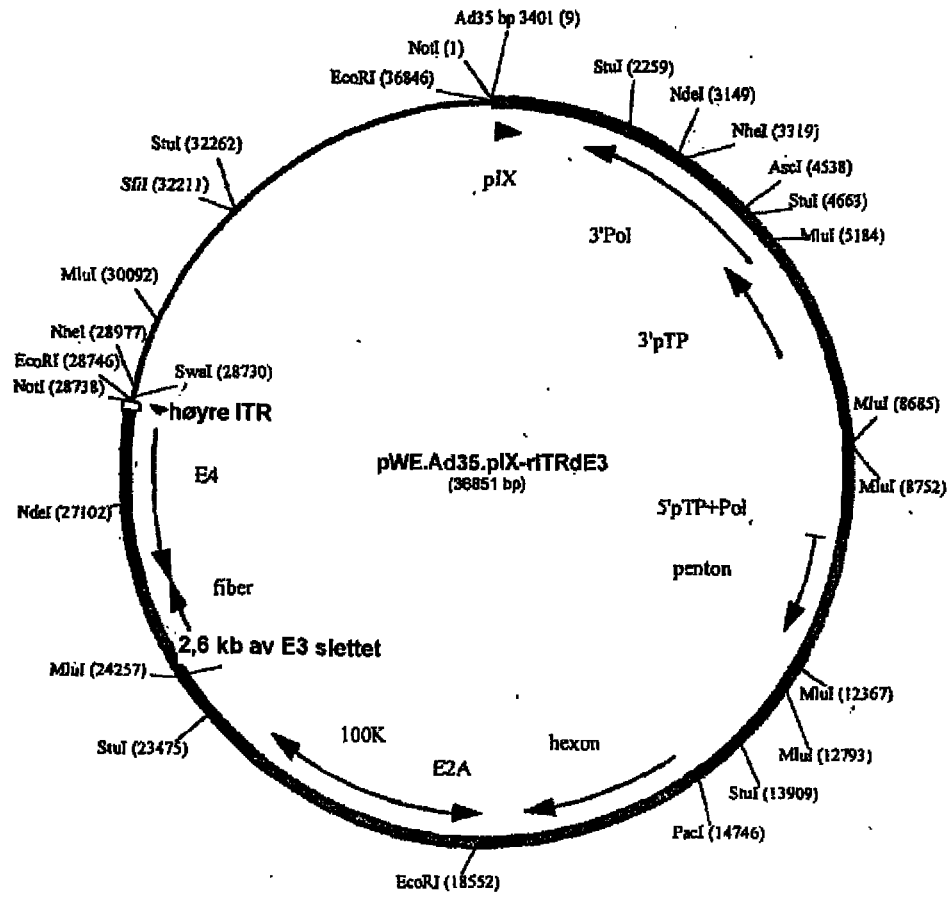
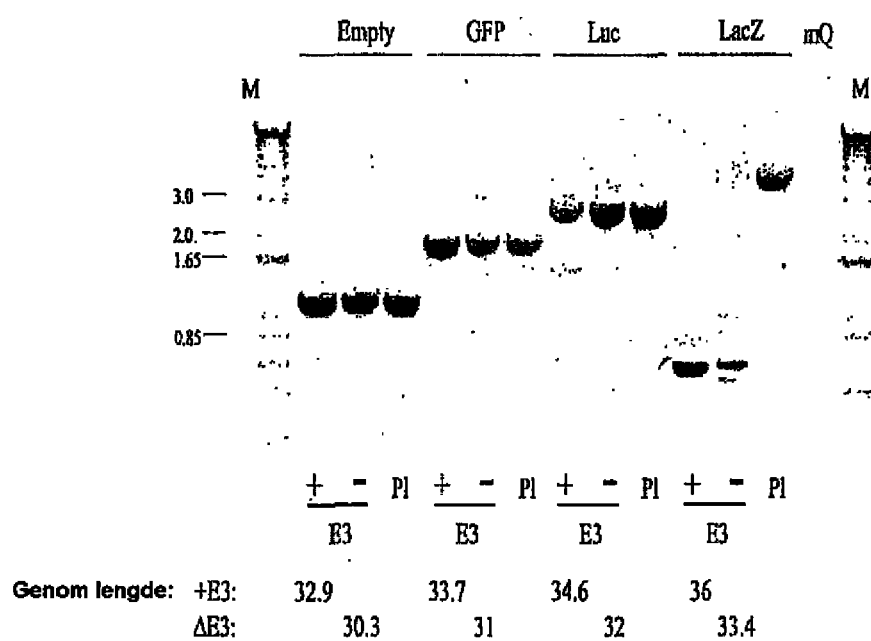


Fig. 2

Transgen PCR på Ad35 E1- og E1/E3-slettede viruser



3/38

Fig. 3A

Linjestilling av proksimale pIX-regioner

```

1  TGAGGTACTGAAATGTGTGGGCGTGGCTTAAGGGTGGGA'AAGAAATATATAAGGTGGGGGT Ad2.SBQ
1  TGAGGTACTGAAATGTGTGGGCGTGGCTTAAGGGTGGGA'AAGAAATATATAAGGTGGGGGT Ad5.SBQ
1  TGAGG---TAAGTGGGTGGAGCTA-----GGTGGGATTATATAA---GGC-TGGAAGT Ad12.SBQ
1  TAGAGG---TAGGTCGAGTGAAGTAGTGGGCGTGGCTAAGGT-GACTATA-AAGGCGGGTGT Ad9.SBQ
1  TAAGGG---TAAG-----GGGCGGAGCCYATAC--AGGTATAAAGGTTGGGCT-AGAGT Ad40.SBQ
1  TAGAG---TGAGTAGTC-----TTCTG-GGGCGGGGGA---GGACCTGCATGAGGGC Ad4.SBQ
1  TAGAG---TGAGTAGTC-----TTCTG-GGGCGGGGGA---GGACCTGCATGAGGGC S25.SBQ
1  TAAGG---TCAGTATTGGGA--AAACTTTG-GGGTGGGATTTTCAGAT-----GGA Ad35.SBQ
1  TAAGG---TCAGTATTGGGA--AAACTTTG-GGGTGGGATTTTCAGAT-----GGA Ad11.SBQ
1  TAAAG---TAAGTAGTGGGGCAAAATGTG-GATGGGGACTTTCAGGTTGGTAAGGTGGA Ad7.SBQ

51  CTCATGTAGTTTTGTATCTGTTTTGCAGCA-GCCGCCGCC---ATG Ad2.SBQ
51  CTTATGTAGTTTTGTATCTGTTTTGCAGCA-GCCGCCGCCGCCATG Ad5.SBQ
47  CA-----ACTAAAAATTGT-TTTTGTCT-TTAAACAGC-ACGATG Ad12.SBQ
57  CTTACGAGGGTCTT-TTTGCTTTTCAGCA-GA-----CATCATG Ad9.SBQ
50  AAAAAAAGGGAG-----TTACAA---AATG Ad40.SBQ
46  CAGAATAACTGAAATCTGTGCTTTCTGTGTGTTCAGCAG-CATG Ad4.SBQ
46  CAGAATAACTGAAATCTGTGCTTTCTGTGTGTTCAGCAG-CATG S25.SBQ
46  CAGATTCAGTAAAAATT-TGTTT-TTCTGTCTTCAGCTGACATG Ad35.SBQ
46  CAGATTCAGTAAAAATT-TGTTT-TTCTGTCTTCAGCTGTCATG Ad11.SBQ
57  CAAATTGGGTAAAT-TT-TGTTAATTTCTGTCTTCAGCTGCCATG Ad7.SBQ

```

Fig. 3B

Sammenligning for formentlige pIX-promoterregioner

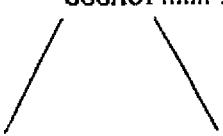
	stopp 55k			Starten for pIX-koding
Ad5:	3509	GGGCGT	20 nucl.....	TATATAA 3609
Ad12:	3295	GGGTGG	11 nucl	ATTATAA 3374
Ad9:	3361	GGGCGT	12 nucl	TATAAAG 3449
Ad40:	3149	GGGCGG	13 nucl	TATAAAG 3217
Ad4:	3404	GGGCGG	23 nucl	AATAACT 3489
		GGGAGG	17 nucl	AATAACT
Ad35:	3400	GGGTGG	27 nucl	AATTTGT 3484
Ad11:	3399	GGGTGG	27 nucl	AATTTGT 3483
Ad7:	3385	GGGACT	30 nucl	AATTTTG 3480
Samsvarende SPI-site  G/a G G C/t/a G/a G/t				

Fig. 4

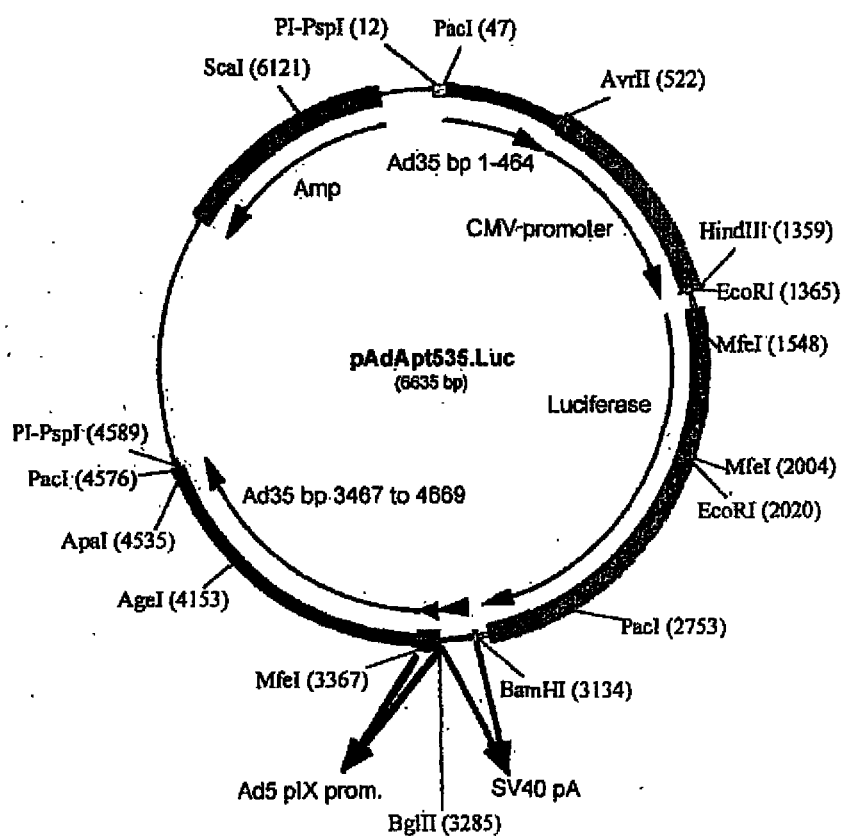
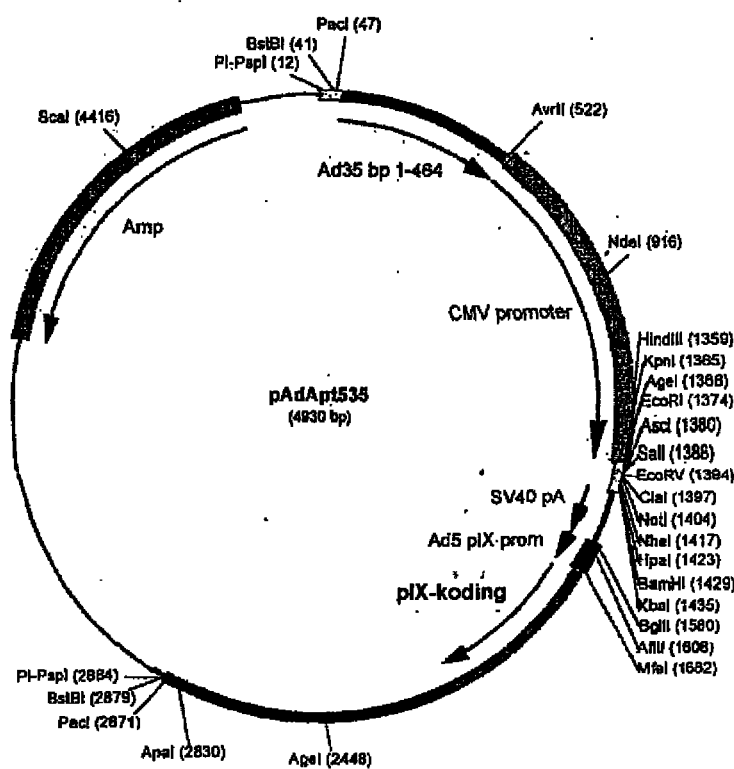


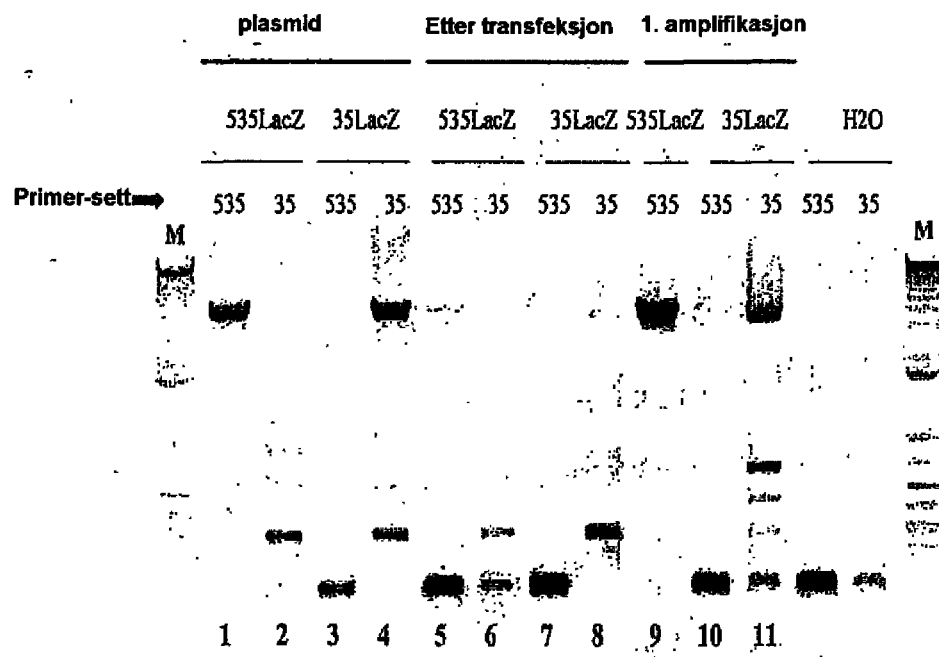
Fig. 5



8/38

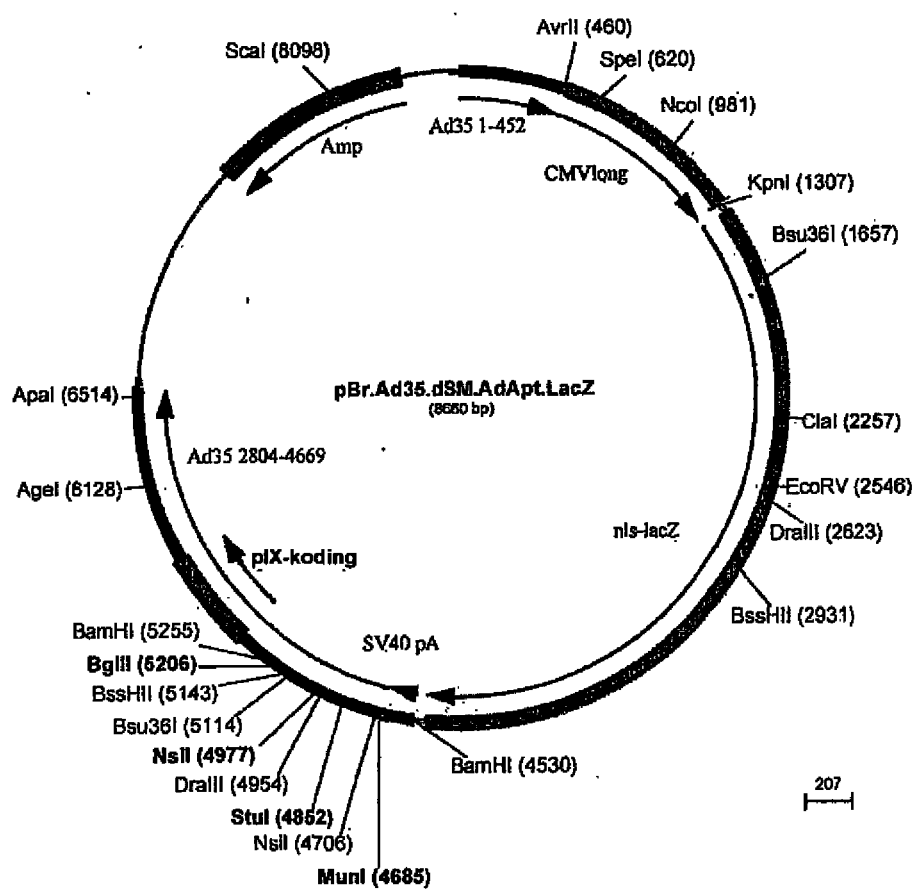
Fig. 6B

Transgen PCR på Ad35 E1/E3-slettede viruser



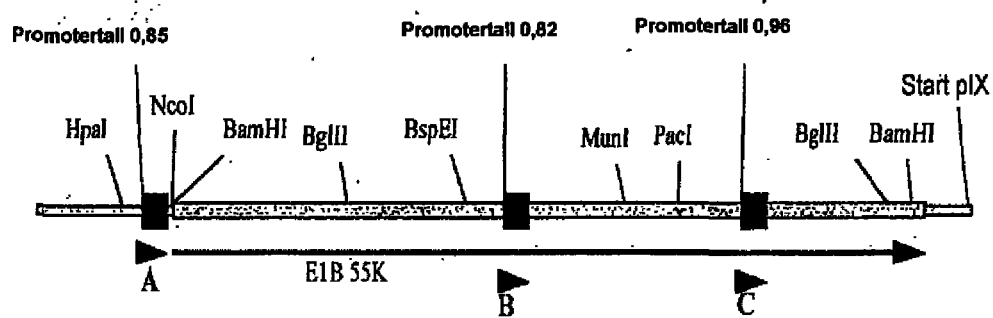
9/38

Fig. 7



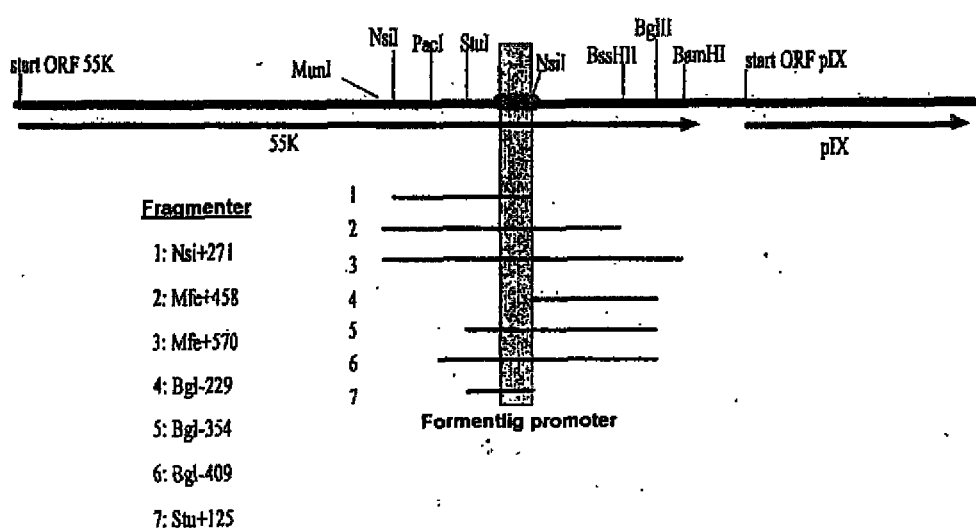
10/38

Fig. 8



11/38

Fig. 9



12/38

Fig. 10

Linjestillingsrapport for Align.E1B-pIX.35-11-7.MEG under anvendelse av Clustals metode med veide resters vektibelli

Fredag 4. oktober 2002 9:32

```

1  AAT'AAAAA-TATGTTAACTGTTCACTGGT'TTTTAT'GCT'TTTTGGGCGGGG Ad35.E1B-pIX.SEQ
1  AATAAAAAATATGTTAACTGTTCACTGGT'TTTTAT'GCT'TTTTGGGCGGGG Ad11.E1B-pIX.SEQ
1  AATAAAAATATGTTAACTGTTCACTGGT'TTTTAT'GCT'TTTTGGGCGGGG Ad7.E1B-pIX.SEQ

51  ACTCAGGTATATAAGTAGAAGCAGACCTGTGTGGTTAGCTCATAGGAGCT Ad35.E1B-pIX.SEQ
51  ACTCAGGTATATAAGTAGAAGCAGACCTGTGTGGTTAGCTCATAGGAGCT Ad11.E1B-pIX.SEQ
49  TCTTGGATATATAAGTAGAAGCAGACCTGTGTGGTTAGCTCATAGGAGCT Ad7.E1B-pIX.SEQ

101 GGCTTTCATCCATGGAGGTTTGGGCCATTTTGGGAAGACCTTAGGAAGACT Ad35.E1B-pIX.SEQ
101 GGCTTTCATCCATGGAGGTTTGGGCCATTTTGGGAAGACCTTAGGAAGACT Ad11.E1B-pIX.SEQ
99  TGGCTTGCATCCATGGAGGTTTGGGCCATTTTGGGAAGACCTTAGGAAGACT Ad7.E1B-pIX.SEQ

151 AGGCAACTGTTAGAGAGCGCTTCGGACGGAGTCTCCGGT'TTTTGGAGATT Ad35.E1B-pIX.SEQ
151 AGGCAACTGTTAGAGAGCGCTTCGGACGGAGTCTCCGGT'TTTTGGAGATT Ad11.E1B-pIX.SEQ
149 AGGCAACTGTTAGAGAGCGCTTCGGACGGAGTCTCCGGT'TTTTGGAGATT Ad7.E1B-pIX.SEQ

201 CTGGTTCGCTAGTGAATTAGCTAGGGTAGT'TTTTAGGATAAAAACAGGACT Ad35.E1B-pIX.SEQ
201 CTGGTTCGCTAGTGAATTAGCTAGGGTAGT'TTTTAGGATAAAAACAGGACT Ad11.E1B-pIX.SEQ
199 CTGGTTCGCTAGTGAATTAGCTAGGGTAGT'TTTTAGGATAAAAACAGGACT Ad7.E1B-pIX.SEQ

251 AATAACAAGAAATTTGAAAAGTTGTTGGTAGATTGCCCAGGACTTTTTGAA Ad35.E1B-pIX.SEQ
251 AATAACAAGAAATTTGAAAAGTTGTTGGTAGATTGCCCAGGACTTTTTGAA Ad11.E1B-pIX.SEQ
243 AATAACAAGAAATTTGAAAAGTTGTTGGTAGATTGCCCAGGACTTTTTGAA Ad7.E1B-pIX.SEQ

301 GCTCTTAATTTGGGCCATCAGGTTCACTTTAAAGAAAAAGT'TTTTATCAGT Ad35.E1B-pIX.SEQ
301 GCTCTTAATTTGGGCCATCAGGTTCACTTTAAAGAAAAAGT'TTTTATCAGT Ad11.E1B-pIX.SEQ
299 GCTCTTAATTTGGGCCATCAGGTTCACTTTAAAGAAAAAGT'TTTTATCAGT Ad7.E1B-pIX.SEQ

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

401 CTTTTATATTAGATAAATGGATCCCGCAGACTCATTT'GAGCAGGGGATAC Ad35.E1B-pIX.SEQ
402 CTTTTATATTAGATAAATGGATCCCGCAGACTCATTT'GAGCAGGGGATAC Ad11.E1B-pIX.SEQ
399 CTTTTATATTAGATAAATGGATCCCGCAGACTCATTT'GAGCAGGGGATAC Ad7.E1B-pIX.SEQ

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

501 GATGAGGACAAATCTTAGGTTACTGGCCAGTGCAGCC'YTTGGGTGTAGCGG Ad35.E1B-pIX.SEQ
501 GATGAGGACAAATCTTAGGTTACTGGCCAGTGCAGCC'YTTGGGTGTAGCGG Ad11.E1B-pIX.SEQ
499 GATGAGGACAAATCTTAGGTTACTGGCCAGTGCAGCC'YTTGGGTGTAGCGG Ad7.E1B-pIX.SEQ

```

13/38

Fig. 10, fortsatt

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

 601 CAAGAGGACAACCCGAGAGCCGGCCCTGGACCCCTCCAGTGGAGGAGGCGGA Ad35.E1B-pIX.SEQ
 601 CAAGAGGACAACCCGAGAGCCGGCCCTGGACCCCTCCAGTGGAGGAGGCGGA Ad11.E1B-pIX.SEQ
 599 CA[G]GAGGACA[A]T[C]CGAGAAGCCGGCCCTGGACCCCTC[C]GTCGAGGAG[C]----- Ad7.E1B-pIX.SEQ

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

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

 751 ATGCTAGATCTGAGTTGGCTTTAAGTTTAAATGAGTCGCAGACGTCCTGAA Ad35.E1B-pIX.SEQ
 751 ATGCTAGATCTGAGTTGGCTTTAAGTTTAAATGAGTCGCAGACGTCCTGAA Ad11.E1B-pIX.SEQ
 743 AT[T]C[A]AGA[A]C[C]GAGTTGGCTTTAAGTTTAAATGAG[C]CGCA[G]CCTCCTGAA Ad7.E1B-pIX.SEQ

 801 ACCATTTGGTGGCATGAGGTTCAGAAAGAGGGAAGGGATGAAGTTTCTGT Ad35.E1B-pIX.SEQ
 801 ACCATTTGGTGGCATGAGGTTCAGAAAGAGGGAAGGGATGAAGTTTCTGT Ad11.E1B-pIX.SEQ
 793 AC[T]GTTTGGTGGCATGAGGTTCAGA[G]CA[A]GG[C]AGGGATGAAGTTT[C]A[A]T Ad7.E1B-pIX.SEQ

 851 ATTGCAGGAGAAATATTCACTGGAAACAGGTGAAAACATGTTGGTTGGAGC Ad35.E1B-pIX.SEQ
 851 ATTGCAGGAGAAATATTCACTGGAAACAGGTGAAAACATGTTGGTTGGAGC Ad11.E1B-pIX.SEQ
 843 ATTGCAGGAGAAATATTCACT[A]GAACA[A]C[T]A[A]G[A]C[C]TGTGGTTGG[A]A[C] Ad7.E1B-pIX.SEQ

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

 951 AGGCCTGATAAACAGTATAAGATCAGTAGACGGATTAATATCCGGAATGC Ad35.E1B-pIX.SEQ
 951 AGGCCTGATAAACAGTATAAGAT[T]A[C]TAGACGGATTAATATCCGGAATGC Ad11.E1B-pIX.SEQ
 943 AGGCCTGATAAAC[A]TATA[G]A[A]T[T]A[C]TA[A]G[A]A]GATTAATAT[T]A[G]AATGC Ad7.E1B-pIX.SEQ

 1001 TTGTTACATATCTGGAAAATGGGGCTGAGGTGGTAAATAGATACTCAAGACA Ad35.E1B-pIX.SEQ
 1001 TTGTTACATATCTGGAAAATGGGGCTGAGGTGGTAAATAGATACTCAAGACA Ad11.E1B-pIX.SEQ
 993 [A]T[G]CTACATATC[A]GG[G]AATGGGGC[A]GAGGT[T]A]TAATAGATAC[A]CAAG[A]T Ad7.E1B-pIX.SEQ

 1051 AGACAGTTATTAGATGCTGCATGATGGATATGTGGCCCTGGAGTAGTCGGT Ad35.E1B-pIX.SEQ
 1051 AG[C]CAGTTATTAGATGCTGCATGATGGATATGTGGCCCTGG[G]GTAGTCGGT Ad11.E1B-pIX.SEQ
 1043 A[A]GCA[G]C[T]T]TTAGATG[T]G[T]ATGATGG[G]TATGTGGC[A]G[G]GT[T]GTCGG[C] Ad7.E1B-pIX.SEQ

14/38

Fig. 10, fortsatt

1101 A T G G A A G C A G T C A C T T T T G T A A A T G T T A A G T T T A G G G G A G A T G G T T A T A A Ad35.E1B-pIX.SEQ
 1101 A T G G A A G C A G T A A C T T T T G T A A A T G T T A A G T T T A G G G G A G A T G G T T A T A A Ad11.E1B-pIX.SEQ
 1093 A T G G A A G C A A T A A C A C T T A T G A A T T T A G G T T T A G A G G C A T G G C T A T A A Ad7.E1B-pIX.SEQ

 1151 T G G A A T A G T G T T T A T G G C C A A T A C C A A C T T A T A T T G C A T G G T T G T A G C T Ad35.E1B-pIX.SEQ
 1151 T G G A A T A G T G T T T A T G G C C A A T A C C A A C T T A T A T T G C A T G G T T G T A G C T Ad11.E1B-pIX.SEQ
 1143 T G G C A T T G T A T T T A T G G C T A A C A C T A A C T G A T T C T A C A T G G T T G T A G C T Ad7.E1B-pIX.SEQ

 1201 T T T T T G G T T T C A A C A A T A C C T G T G T A G A T G C C T G G G G A C A G G T T A G T G T A Ad35.E1B-pIX.SEQ
 1201 T T T T T G G T T T C A A C A A T A C C T G T G T A G A T G C C T G G G G A C A G G T T A G T G T A Ad11.E1B-pIX.SEQ
 1193 T T T T T G G C T T A A A T A A T A C G T G T G T A G A A G C T T G G G G C A A G C T T A G T G T G Ad7.E1B-pIX.SEQ

 1251 C G G G G G T G T A G T T T C T A T G C G T G T T G G A T T G C C A C A G C T G G C A G A A C C A A Ad35.E1B-pIX.SEQ
 1251 C G G G G A T G T A G T T T C T A T G C G T G T T G G A T T G C C A C A G C T G G C A G A A C C A A Ad11.E1B-pIX.SEQ
 1243 A G C G G C T T G T A G T T T T A T G C A T G C T G G A T T G C A A C A T C A G G T A G G T G A A Ad7.E1B-pIX.SEQ

 1301 G A G T C A A T T G T C T C T G A A G A A A T G C A T A T T C C A A G A T G T A A C C T G G G C A Ad35.E1B-pIX.SEQ
 1301 G A G T C A A T T G T C T C T G A A G A A A T G C A T A T T C C A A G A T G T A A C C T G G G C A Ad11.E1B-pIX.SEQ
 1293 G A G T C A G T T G T C T G T G A A G A A A T G C A T G T T T G A G A G A T G T A A C T T G G C A Ad7.E1B-pIX.SEQ

 1351 T T C T G A A T G A A G G C G A A G C A A G G G T C C G T C A C T G C G C T T C T A C A G A T A C T Ad35.E1B-pIX.SEQ
 1351 T T C T G A A T G A A G G C G A A G C A A G G G T C C G C C A C T G C G C T T C T A C A G A T A C T Ad11.E1B-pIX.SEQ
 1343 T A C T G A A T G A A G G T G A A G C A A G G G T C C G C C A C T G C G C A G C T A C A G A A A C T Ad7.E1B-pIX.SEQ

 1401 G G A T G T T T T A T T T T A A T T A A G G G A A A T G C C A G C G T A A A G C A T A A C A T G A T Ad35.E1B-pIX.SEQ
 1401 G G A T G T T T T A T T T T A T T A A G G G A A A T G C C A G C G T A A A G C A T A A C A T G A T Ad11.E1B-pIX.SEQ
 1393 G C C T G C T T G A T T G T A A T A A G G G A A A T G C C A G T G T G A A G C A T A A T A T G A T Ad7.E1B-pIX.SEQ

 1451 T T G T G G T G C T T C C G A T G A G A G G C C T T A T C A A A T G C T C A C T T G T G C T G G T G Ad35.E1B-pIX.SEQ
 1451 T T G C G G T G C T T C C G A T G A G A G G C C T T A T C A A A T G C T C A C T T G T G C T G G T G Ad11.E1B-pIX.SEQ
 1443 C T G T G G A C A T T C G A T G A G A G G C C T T A T C A G A T G C T A A C T G C G C T G G T G Ad7.E1B-pIX.SEQ

 1501 G G C A T T G T A A T A T G C T G G C T A C T G T G C A T A T T G T T C C A T C A A C G C A A A Ad35.E1B-pIX.SEQ
 1501 G G C A T T G T A A T A T G C T G G C T A C T G T G C A T A T T G T T C C A T C A A C G C A A A Ad11.E1B-pIX.SEQ
 1493 G A C A T T G C A A T A T C T T G C T A C G T G C A T A T C G T T T C A C A T G C A C G C A A G Ad7.E1B-pIX.SEQ

 1551 A A A T G G C C T G T T T T T G A T C A C A A T G T G T T G A C C A A G T G C A C C A T G C A T G C Ad35.E1B-pIX.SEQ
 1551 A A A T G G C C T G T T T T T G A T C A C A A T G T G A T G A C G A A G T G A C C A T G C A T G C Ad11.E1B-pIX.SEQ
 1543 A A A T G G C C T G T A T T T G A A C A T A A T G T G A T T A C C A A G T G C A C C A T G C A T A T Ad7.E1B-pIX.SEQ

 1601 A G G T G G G C G T A G A G G A A T G T T T A T G C C T T A C C A G T G T A A C A T G A A T C A T G Ad35.E1B-pIX.SEQ
 1601 A G G T G G G C G T A G A G G A A T G T T T A T G C C T T A C C A G T G T A A C A T G A A T C A T G Ad11.E1B-pIX.SEQ
 1593 A G C T G G C G C A G G G A A T G T T T A T G C C T T A C C A G T G T A A C A T G A A T C A T G Ad7.E1B-pIX.SEQ

15/38

Fig. 10, fortsatt

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 N T G T T G G A A C C A G A T G C C T T T T C C A G A G T G A G C G T A A C A G G A Ad7.E1B-pIX.SEQ

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

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

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

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

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

 1940 T G G A C A G A T T G A G T A A A A A T T T G T T T T T C T G T C T T G C A G C T G A C A T G A G Ad35.E1B-pIX.SEQ
 1940 T G G A C A G A T T G A G T A A A A A T T T G T T T T T C T G T C T T G C A G C T G T C A T G A G Ad11.E1B-pIX.SEQ
 1943 T G G A C A A T T T G G T A A A T 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 G A G T C T T C A G C C C T T A T C T G A C A G G G C Ad35.E1B-pIX.SEQ
 1990 T G G A A A C G C T T C T T T T A A G G G G G G A G T C T T C A G C C C T T A T C T G A C A G G G C Ad11.E1B-pIX.SEQ
 1993 T G G A A C G C G C T T C T T T G A G G G G G G A G T A T T A G C C C T T A T C T G A C G G C A Ad7.E1B-pIX.SEQ

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

 2090 G A T G G A A G A C C C G T T C A A C C C G C C A A T T C T T C A A C G C T G A C C T A T G C T A C Ad35.E1B-pIX.SEQ
 2090 G A T G G A A G A C C C G T C C A A C C C G C C A A T T C T T C A A C G C T G A C C T A T G C T A C Ad11.E1B-pIX.SEQ
 2093 G A T G G 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 C T G Ad35.E1B-pIX.SEQ
 2140 T T T A A G T T C T T C A C C T T T G G A C G C A G C T G C A G C T G C C G C C G C T T C T G Ad11.E1B-pIX.SEQ
 2143 T T T G A G T T C T T C A C C A T T G G A T G C A G C T G C A G C C G C T G C C G C T A C - - T G Ad7.E1B-pIX.SEQ

16/38

Fig. 10, fortsatt

```

2190 TCGCCGCTAACACTGTCCTTGGAAATGGSTTACTATGGAAGCATCGTGGCT Ad35.E1B-p1X.SEQ
2190 TCGCCGCTAACACTGTCCTTGGAAATGGSTTACTATGGAAGCATCA TGGCT Ad11.E1B-p1X.SEQ
2190 TCGCCGCTAACACTGTCCTTGGAAATGGSTTACTATGGAAGCATGCTGCT Ad7.E1B-p1X.SEQ

2240 AATTCCACTTCCCTCTAATAACCCCTTCTACCTGACTCAGGACAAGTTACT Ad35.E1B-p1X.SEQ
2240 AATTCCACTTCCCTCTAATAACCCCTTCTACCTGACTCAGGACAAGTTACT Ad11.E1B-p1X.SEQ
2240 AATTCCACTTCCCTCTAATAACCCCTTCTACCTGACTCAGGACAAGTTACT Ad7.E1B-p1X.SEQ

2290 TGTCTTTTGGCCAGCTGGAGGCTTTGACCCAAACGCTCTGGGTGAACCTT Ad35.E1B-p1X.SEQ
2290 TGTCTTTTGGCCAGCTGGAGGCTTTGACCCAAACGCTCTGGGTGAACCTT Ad11.E1B-p1X.SEQ
2290 TGTCTTTTGGCCAGCTGGAGGCTTTGACCCAAACGCTCTGGGTGAACCTT Ad7.E1B-p1X.SEQ

2340 CTCAGCAGGTGGCCGAGTTGCGAGTACAAACTGAGTCTGCTGTCGGCCACG Ad35.E1B-p1X.SEQ
2340 CTCAGCAGGTGGCCGAGTTGCGAGTACAAACTGAGTCTGCTGTCGGCCACG Ad11.E1B-p1X.SEQ
2340 CTCAGCAGGTGGCCGAGTTGCGAGTACAAACTGAGTCTGCTGTCGGCCACG Ad7.E1B-p1X.SEQ

2390 GCAAACTCTAAATAAAAAAATTCAGAAATCAATGAATAAA Ad35.E1B-p1X.SEQ
2390 GCAAACTCTAAATAAAAAAATTCAGAAATCAATGAATAAA Ad11.E1B-p1X.SEQ
2390 GCAAACTCTAAATAAAAAAATTCAGAAATCAATGAATAAA Ad7.E1B-p1X.SEQ

```

Dekorasjon "Dekorasjon #1": Inrammingsrester som avviker fra Ad35.E1B-p1X.SEQ.

17/38

Fig. 11

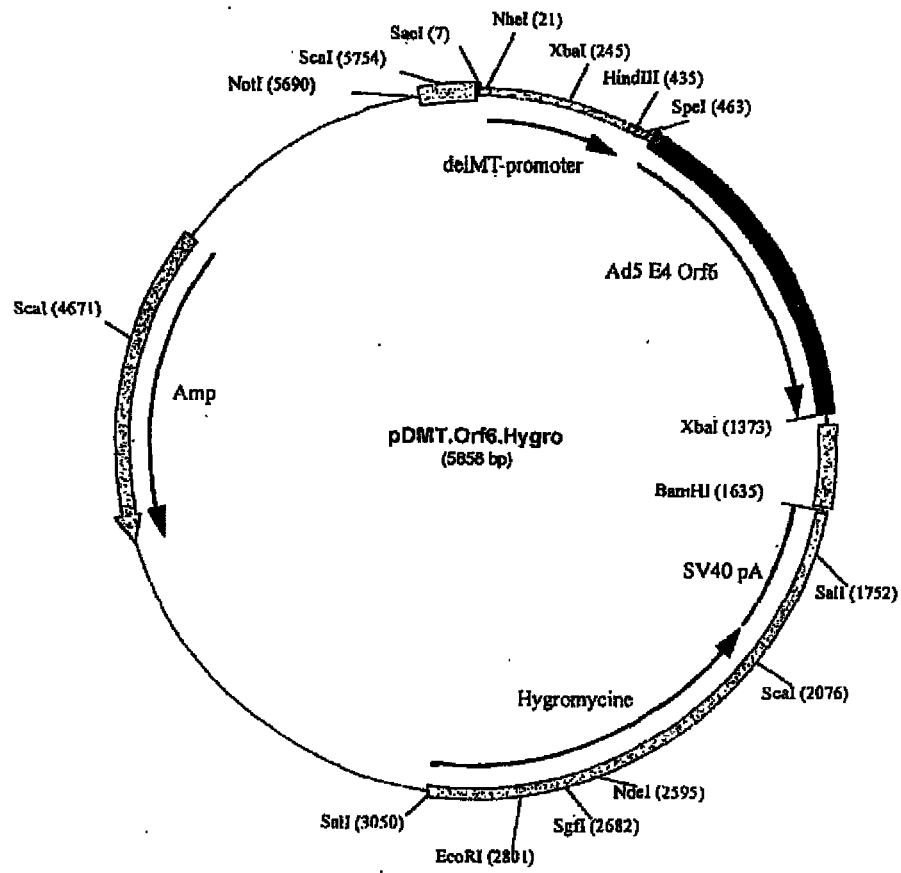
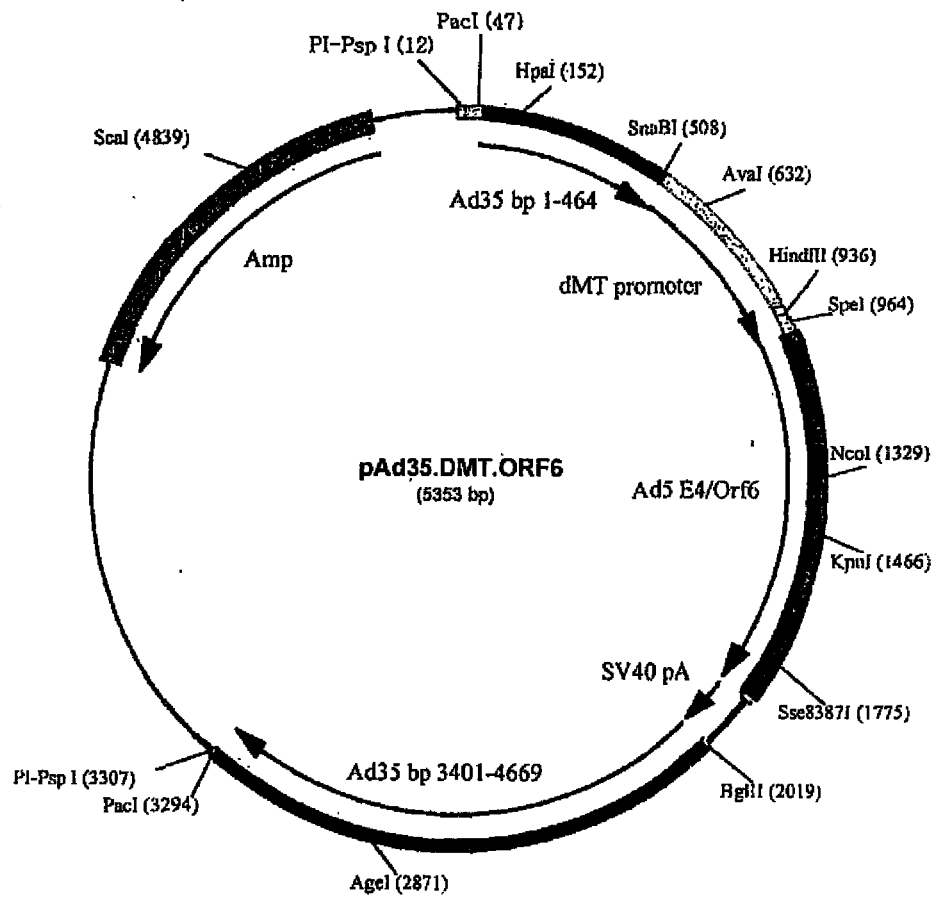
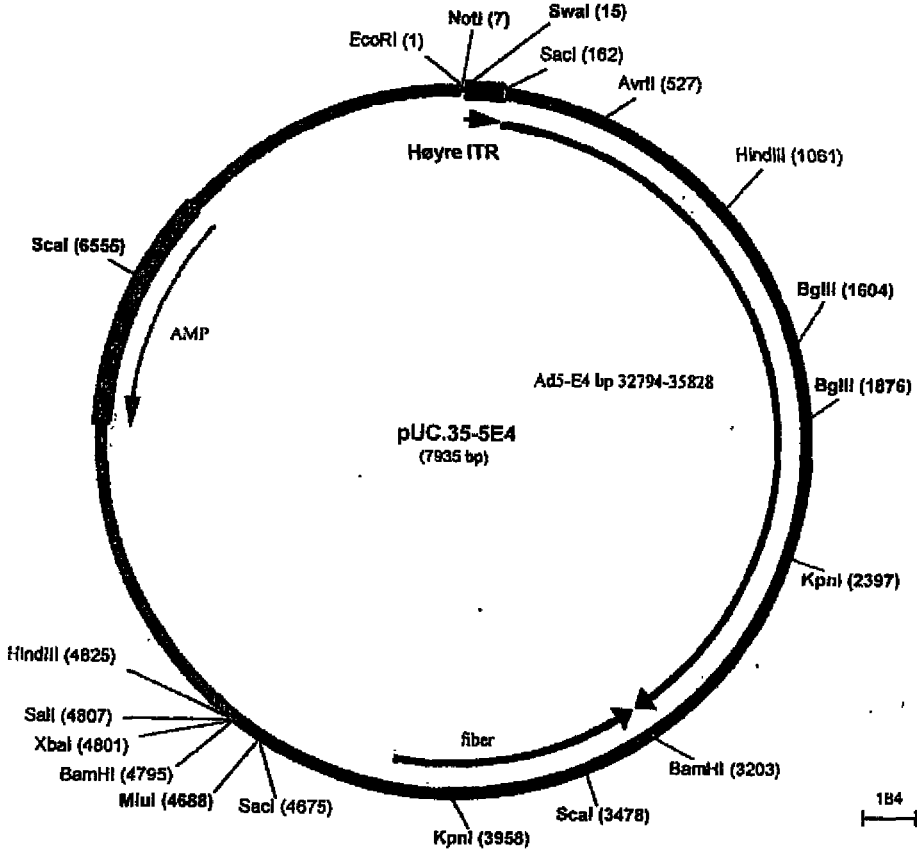


Fig. 12



19/38

Fig. 13



20/38

Fig. 14: Kloningstrinn for pUC.35-5E4

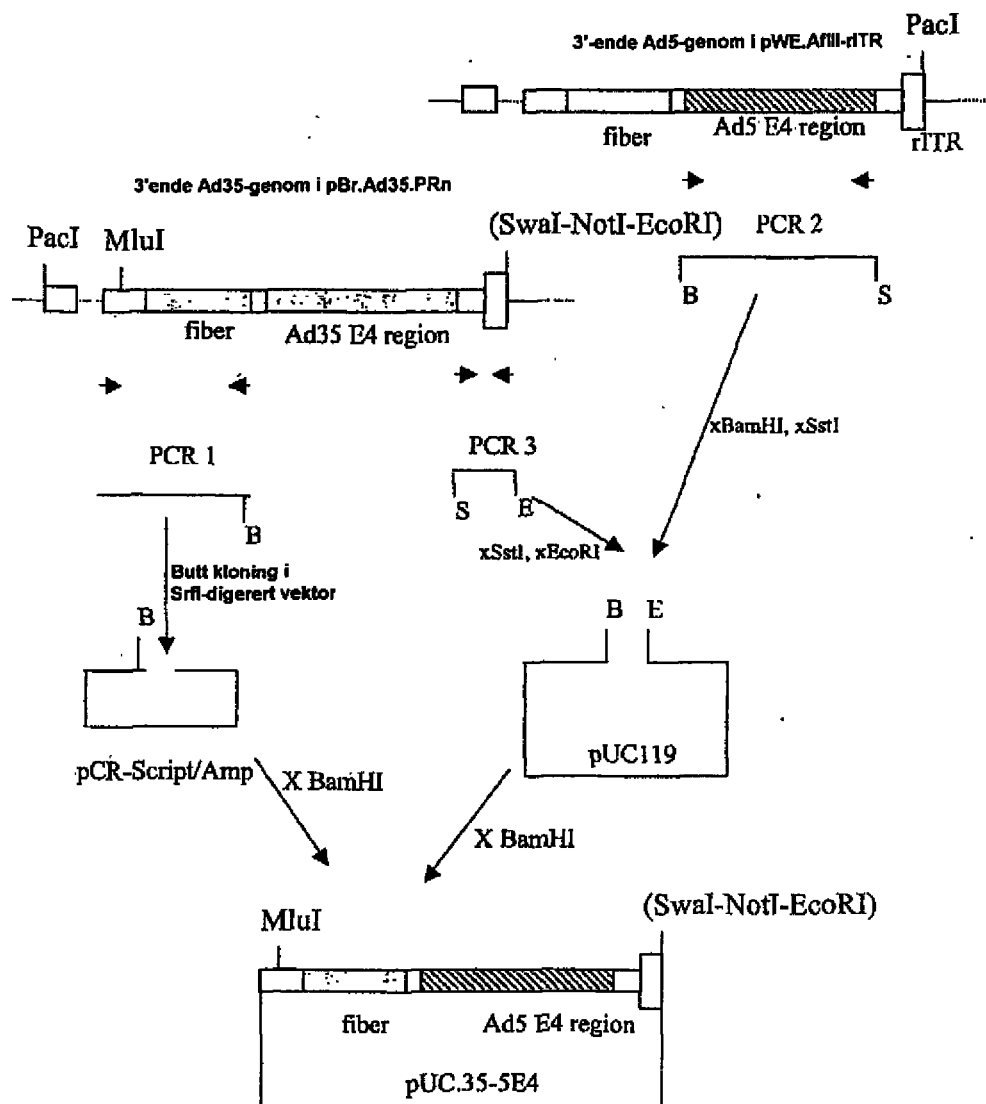


Fig. 16

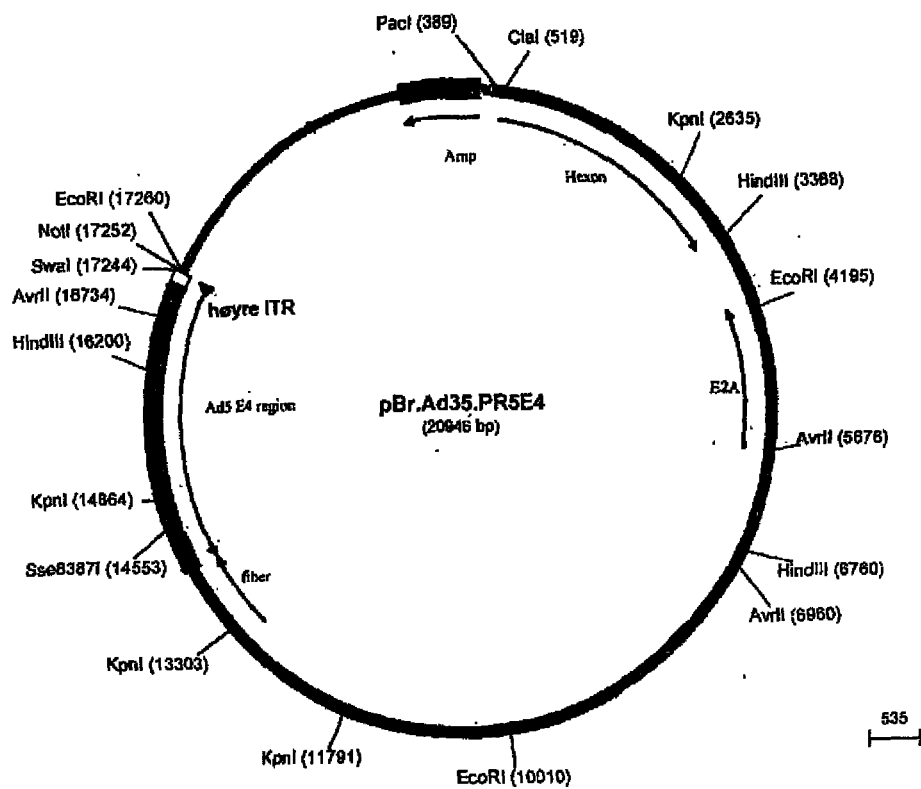
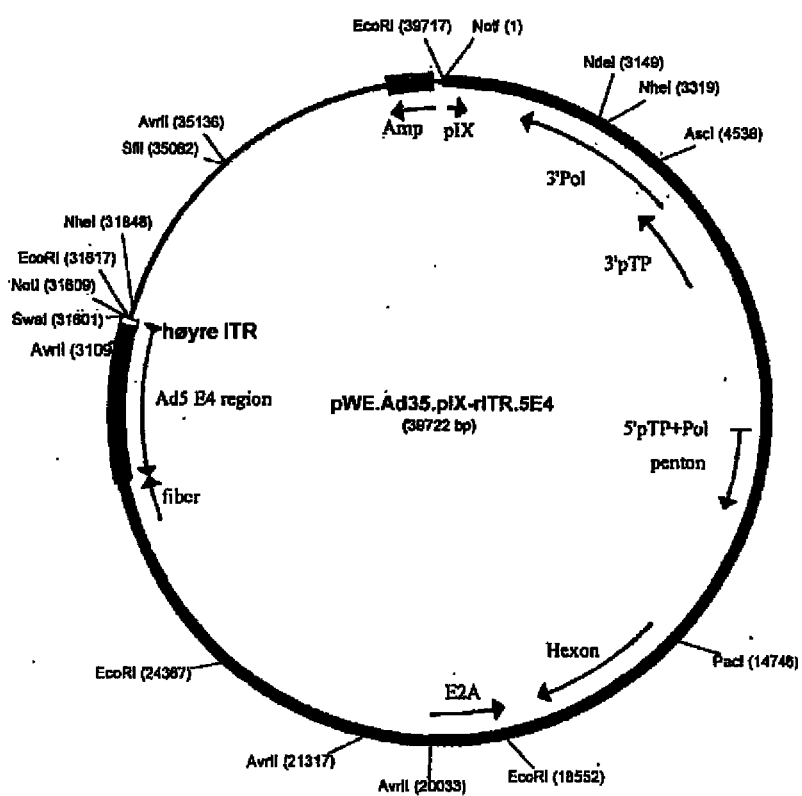
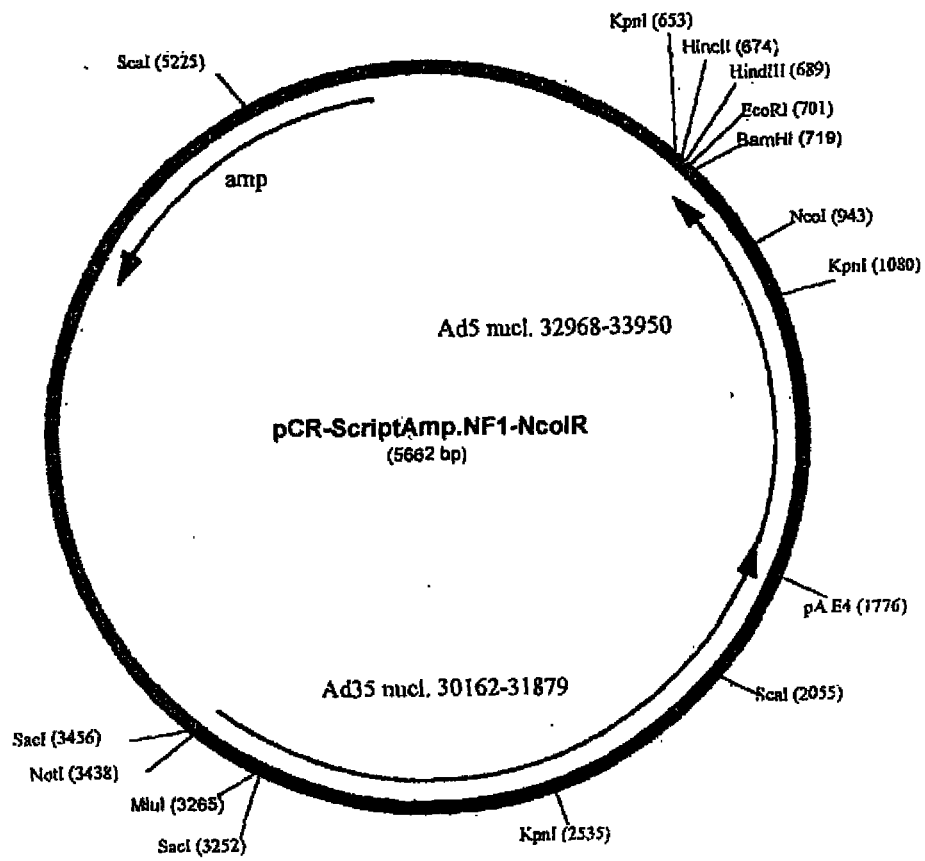


Fig. 17



24/38

Fig. 18



25/38

Fig. 19

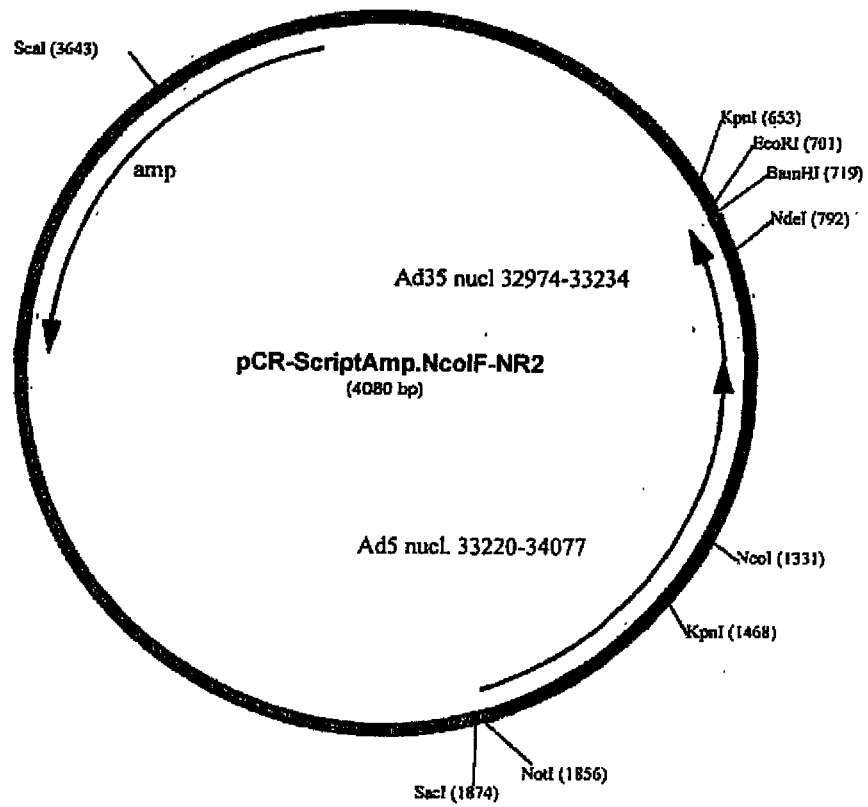
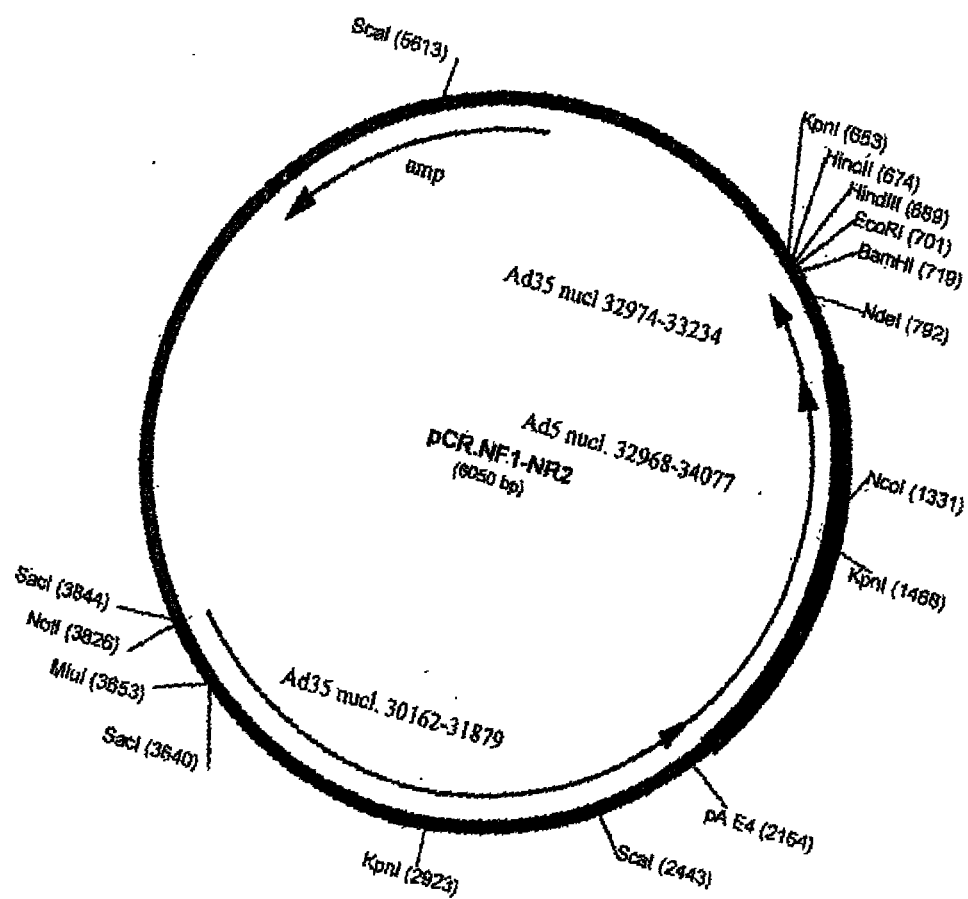


Fig. 20

26/38



27/38

Fig. 21

```

1  M T T S G V P F G N T L R P T R S R L S R R Y P T S A D R L P P F E T - E T R A T I L E D A P L L P Ad5.E4-ORF6.PRO
1  M T T S G V P F G N T L R P T R S R L S R R Y P T S A D R L P P F E T - E T R A T I L E D H P L L P Orf6 aaseq in Ad35.PR.50orf6.PRO
1  M S G S I S I N T R - L A R S T S C A R N H P T T R A Q L P R C S E N E T R A S M T E D P L L P Ad35.E4-ORF6.PRO

50  E C N I L Y N H N V S I Y R G L P C S V G P T L I Q E N V V P N D H V L T R E S L V I L R I C H V Ad5.E4-ORF6.PRO
50  E C N I L Y N H N V S I Y R G L P C S V G P T L I Q E N V V P N D H V L T R E S L V I L R I C H V Orf6 aaseq in Ad35.PR.50orf6.PRO
50  D C D N T M H S V S C V R G L P C S A S P F V Q E L P I P W D N E L N F E L R I N R E C N H A Ad35.E4-ORF6.PRO

100  C L C C A N I D I N T S M N I R G Y E S W A L H C H C S S P G S L Q C I A G G V L A S N F R N V V Ad5.E4-ORF6.PRO
100  C L C C A N I D I N T S M N I R G Y E S W A L H C H C S S P G S L Q C I A G G V L A S N F R N V V Orf6 aaseq in Ad35.PR.50orf6.PRO
100  C L C C A T I D I F S Q V I N G R E N V L E C H C H Q Q G S L Q C N A G G A V L A N T R N V I Ad35.E4-ORF6.PRO

150  D G A N F N Q R F I N T R E V V N Y N N P R E V M F S S V F M A G A B I Y L R L W Y D G H V G S Ad5.E4-ORF6.PRO
150  D G A N F N Q R F I N T R E V V N Y N N P R E V M F S S V F M A G A B I Y L R L W Y D G H V G S Orf6 aaseq in Ad35.PR.50orf6.PRO
150  E G Q N I N Q R C N Y R Q T V N M H N P R E T M T V G S V F D R B A R L I Y I K L W Y D G S A G A Ad35.E4-ORF6.PRO

200  V V P A N S F G Y S A L H C G I L N N I V L C C S Y C A D L S E I B V R C C A R R T R L M L R A Ad5.E4-ORF6.PRO
200  V V P A N S F G Y S A L H C G I L N N I V L C C S Y C A D L S E I B V R C C A R R T R L M L R A Orf6 aaseq in Ad35.PR.50orf6.PRO
200  I I S N S Y F G S A F R T G L N N I V I M C C T Y C D L S E I B V R C C A R R T R L M L R A Ad35.E4-ORF6.PRO

250  V R I A E E T T A - H L Y S C R T E R R R Q Q F I R A L L Q E K R F I L M E Q Y S - - T P N Ad5.E4-ORF6.PRO
250  V R I A E E T T A - H L Y S C R T E R R R Q Q F I R A L L Q E K R F I L M E D Y S - - T P N Orf6 aaseq in Ad35.PR.50orf6.PRO
250  I K I N L Q E T V D P D I N S R T E R R R Q R L L V G L H R N H R P I P F S D T D S H R S S S R Ad35.E4-ORF6.PRO

```

Dekorasjon 'Dekorasjon #1': Innrammingsrester som avviker fra Ad5.E4-ORF6.PRO.:

Fig. 22

```

1  M T T S G V P F G N T L R P T R S R L S R R T P Y S R D R L P P F E T - E T R A Ad5.E4-ORF6+7.PRO
1  M T T S G V P F G N T L R P T R S R L S R R T P Y S R D R L P P F E T - E T R A Orf6+7 aaseq in Ad35.PR5Orf6.PRO
1  M S G S N - S I M T R L R A R S I S C A R H R P Y T R A Q L P R C E R N E T R A Ad35.E4-ORF6+7.pro

40  T I L E O R P L L P E C N T L T M H N A W T S P S F P V K Q P Q V G Q Q P V A Q Ad5.E4-ORF6+7.PRO
40  T I L E D H P L L P E C N T L T M H N A W T S P S P P V K Q P Q V G Q Q P V A Q Orf6+7 aaseq in Ad35.PR5Orf6.PRO
40  S M T E D N P L L P D C D T M R S M T V I Q T P - - - - - E S H P Q Ad35.E4-ORF6+7.pro

80  Q L D S D M H L S E L P G E F I N I T D E R L A R Q E T V W N I T P K N M S V T Ad5.E4-ORF6+7.PRO
80  Q L D S D M H L S E L P G E F I N I T D E R L A R Q E T V W N I T P K N M S V T Orf6+7 aaseq in Ad35.PR5Orf6.PRO
71  Q L O C E S A L R D Y R D G F L S I T D P R L A R S E T V W N V E S X T M S I S Ad35.E4-ORF6+7.pro

120 N D M M L P K A S R G E R T V Y S V C N E G G G R L N T R V L Ad5.E4-ORF6+7.PRO
120 N D M M L P K A S R G E R T V Y S V K N E G G G K I T T R I L Orf6+7 aaseq in Ad35.PR5Orf6.PRO
111 N G I Q M F K A V R G E R L V Y S V K N E G G G K I T T R I L Ad35.E4-ORF6+7.pro

```

Dekorasjon "Dekorasjon #1": Innrammingsrester som avviker fra Ad5.E4-ORF6+7.PRO.:

29/38

Fig. 23

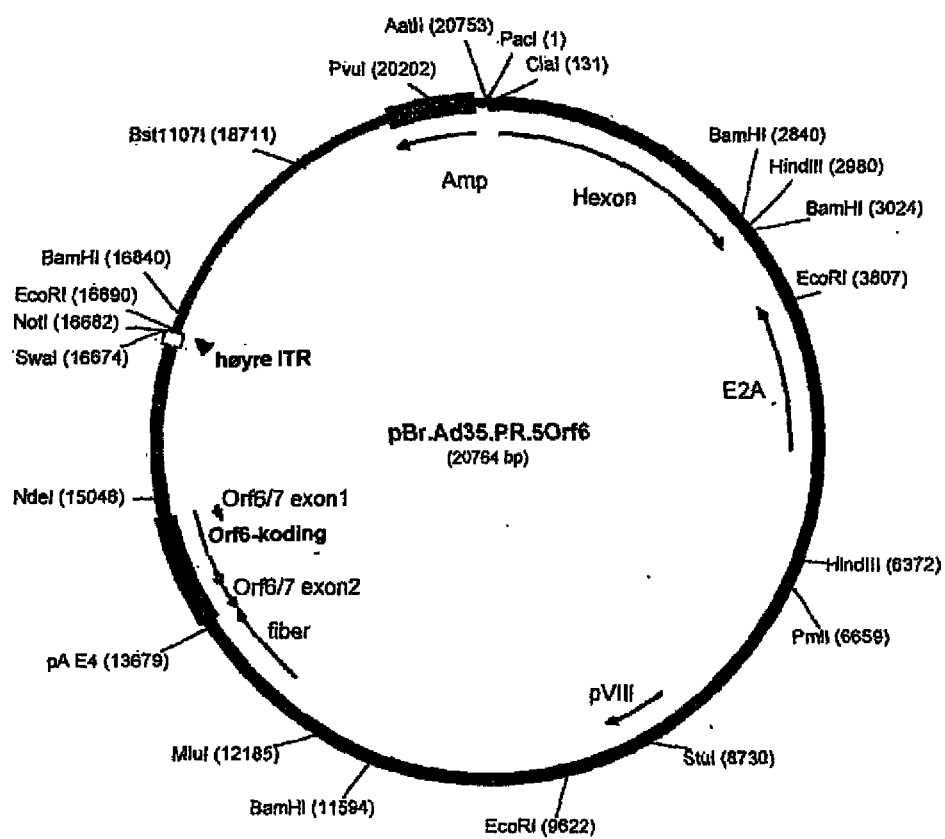


Fig. 24

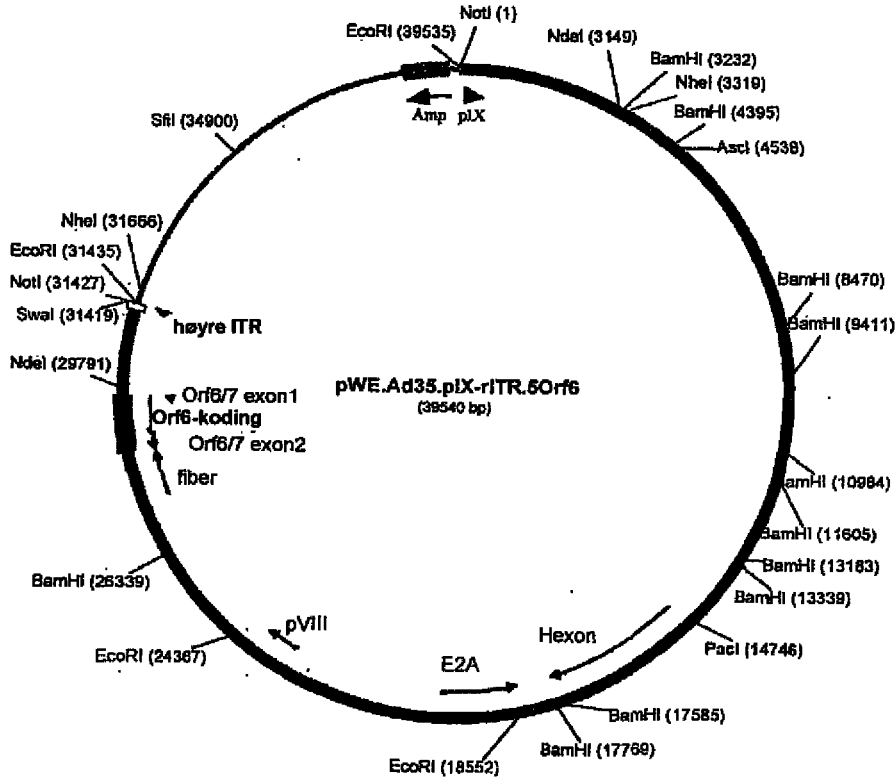
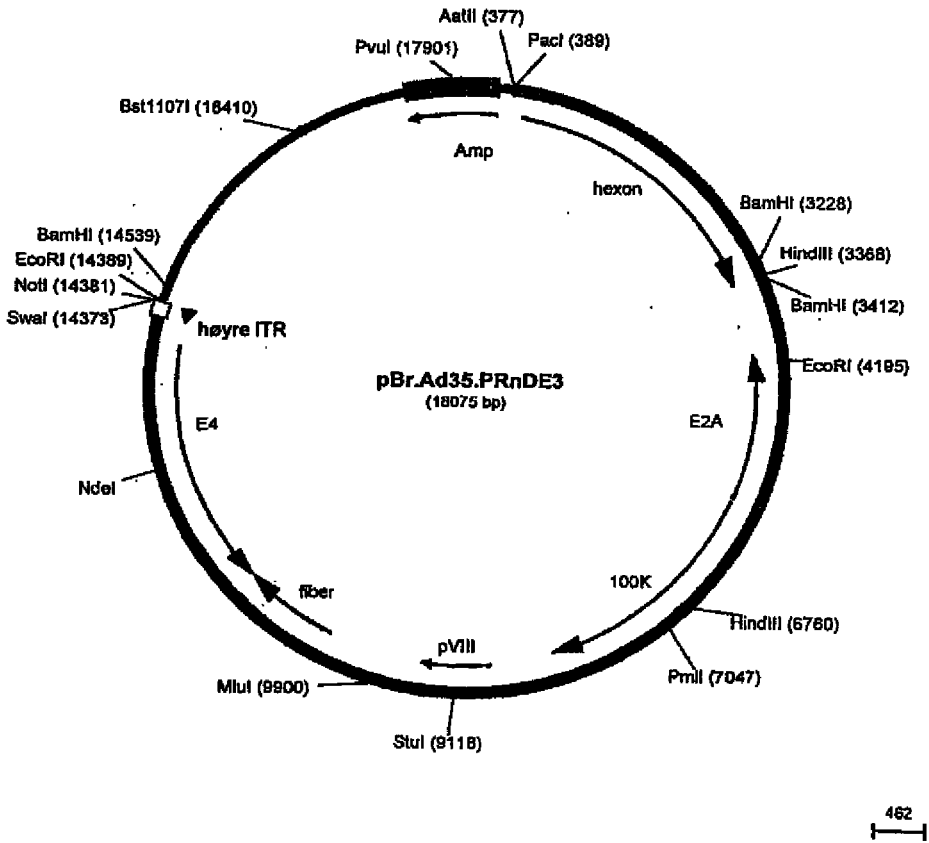


Fig. 25



32/38

Fig. 26

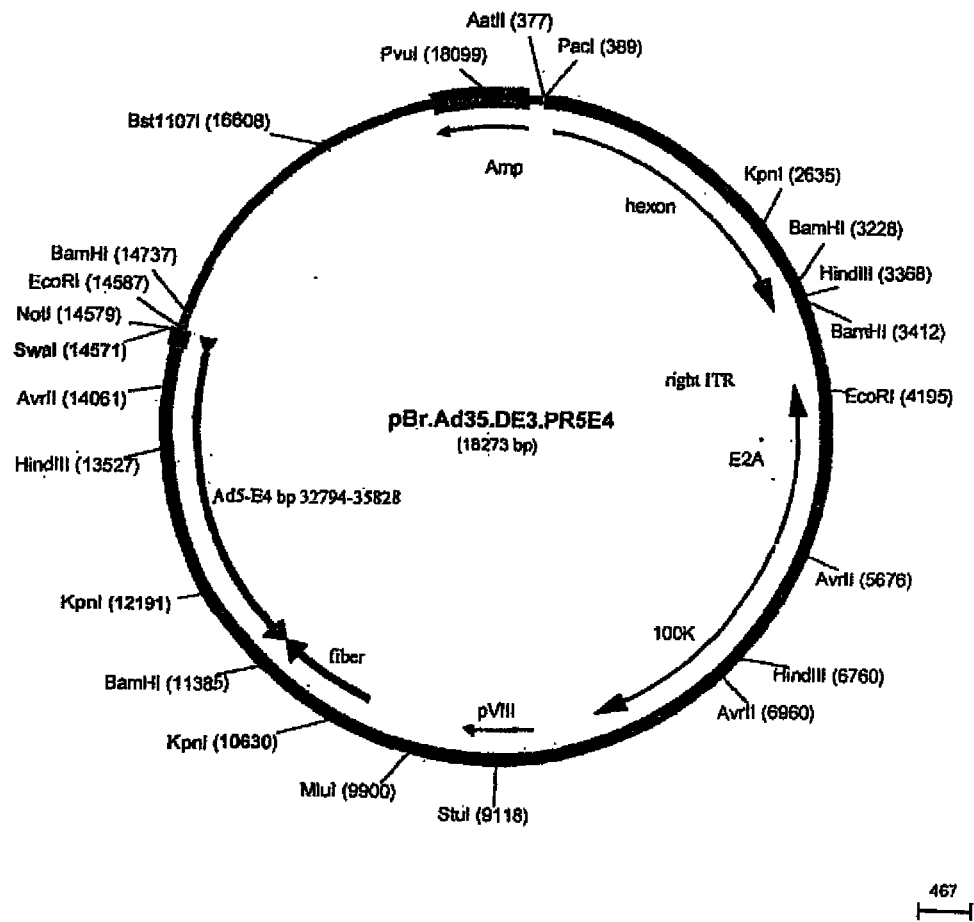


Fig. 27

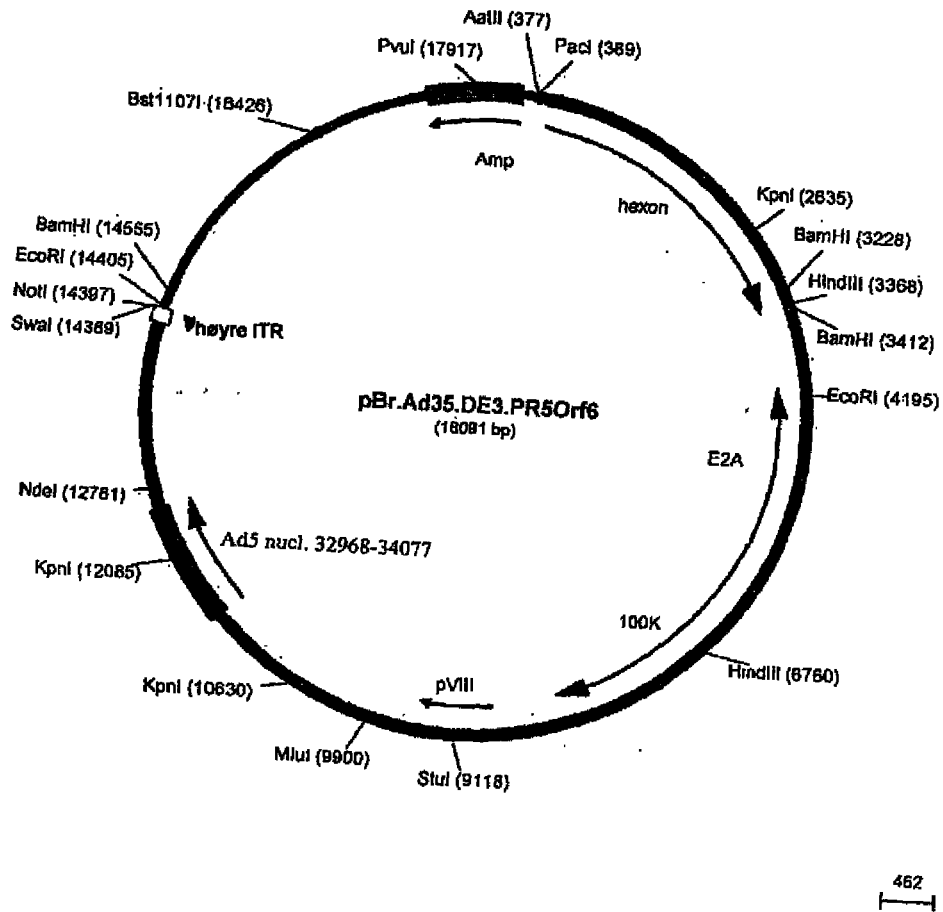


FIG. 28: Generering av E1-slettede Ad35-vektorer via dobbelt homolog rekombinasjon i PER.C6-celler

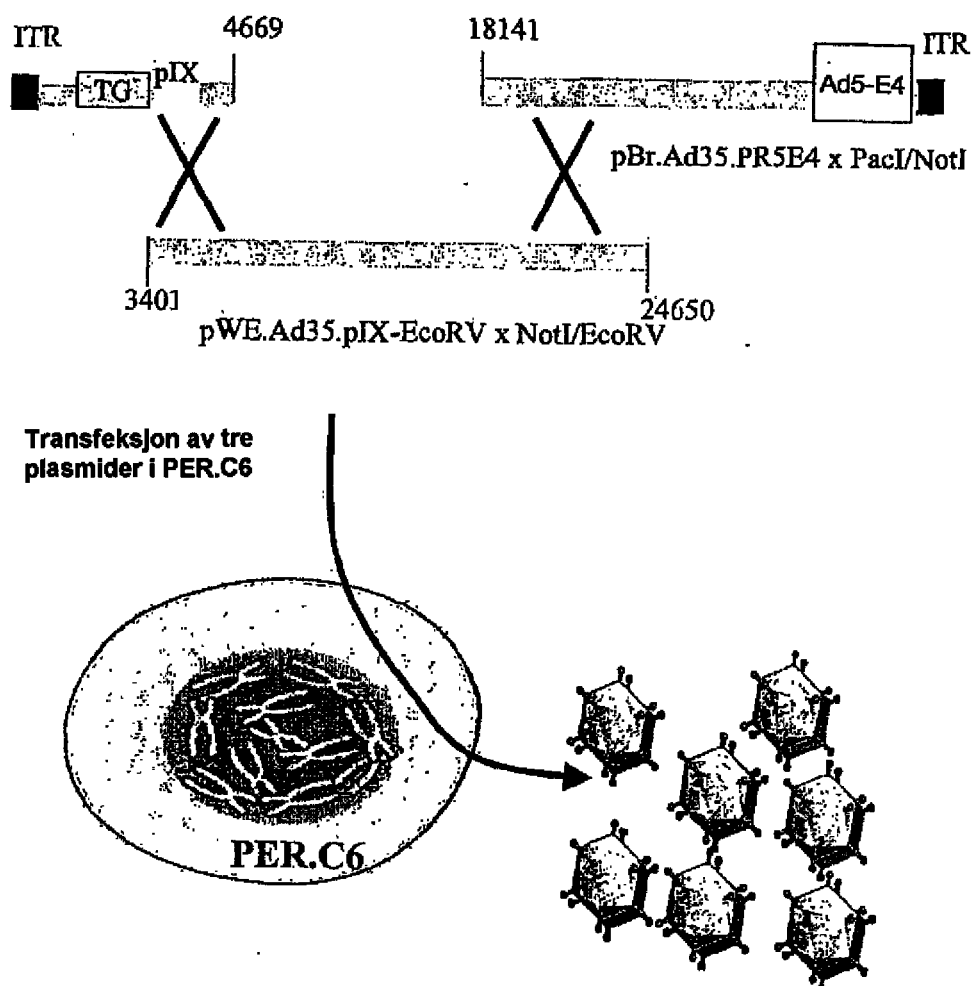


Fig. 29

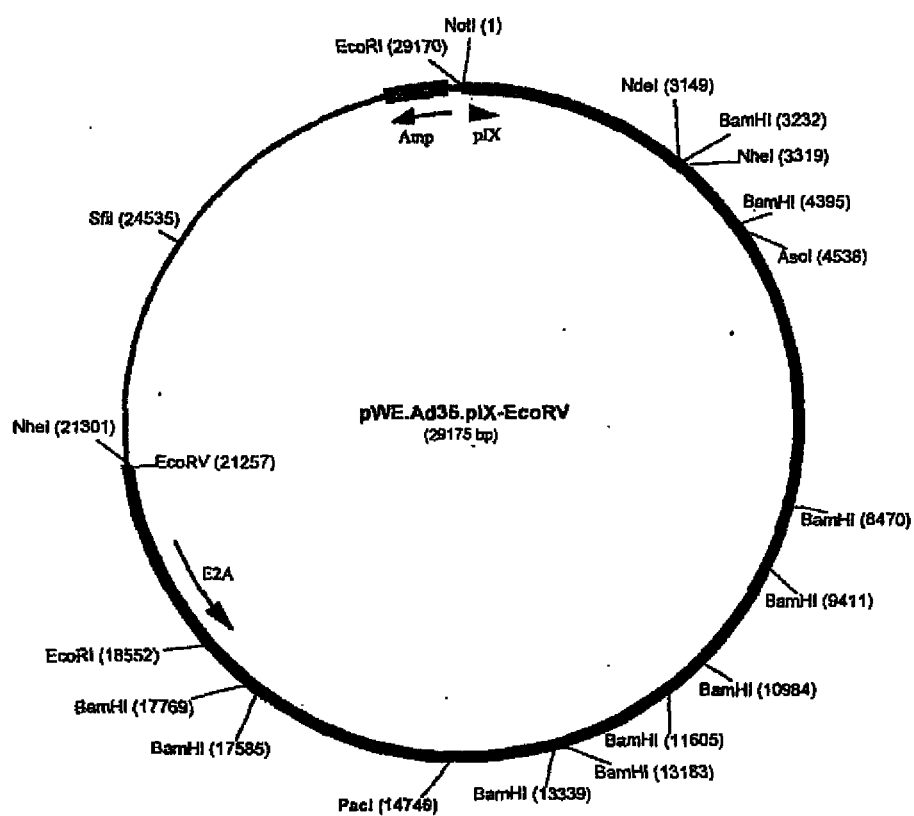
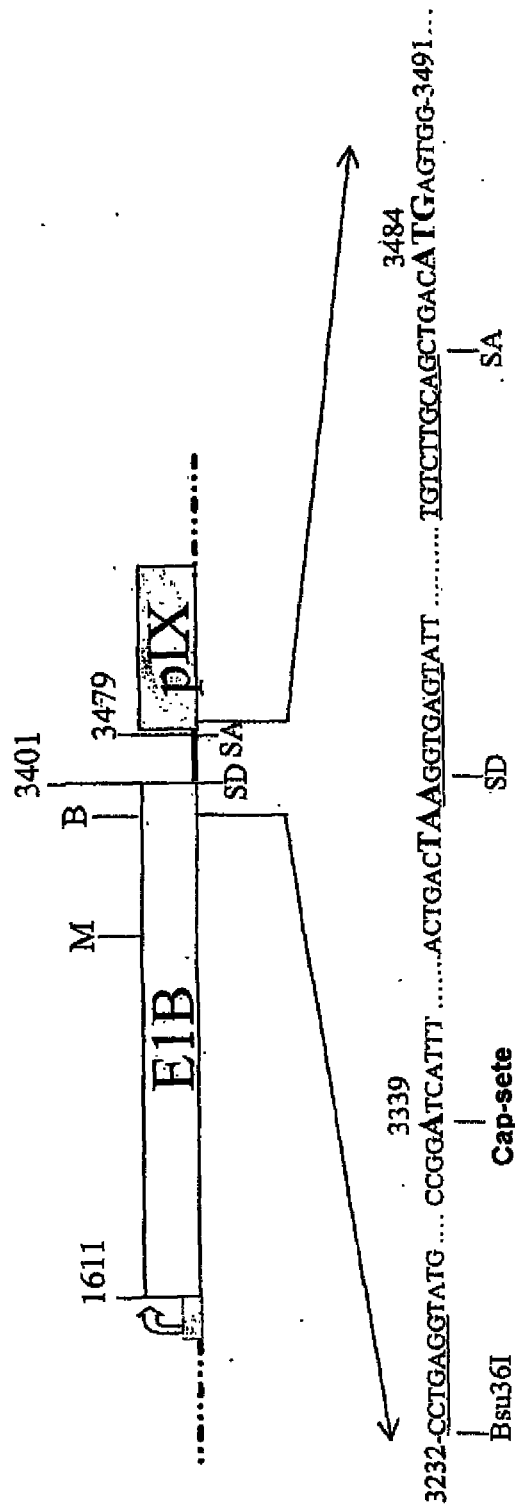


Fig. 30

[illegible]

37/38

Fig. 31.



38/38

Fig. 32.

