



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0103483
(43) 공개일자 2007년10월23일

(51) Int. Cl.

C12N 15/86(2006.01) C12N 15/861(2006.01)
C12N 15/861(2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7020673(분할)

(22) 출원일자 2007년09월10일

심사청구일자 2007년09월10일

(62) 원출원 특허 10-2000-7005333

원출원일자 2000년05월16일

심사청구일자 2003년11월17일

번역문제출일자 2007년09월10일

(86) 국제출원번호 PCT/FR1998/002453

국제출원일자 1998년11월17일

(87) 국제공개번호 WO 1999/25861

국제공개일자 1999년05월27일

(30) 우선권주장

97/14,383 1997년11월17일 프랑스(FR)

(71) 출원인

아방티 파르마 소시에테 아노님

프랑스 앙토니 에프-92160 아브뉴 레이몽 아롱 20

(72) 발명자

크루즈, 조엘

프랑스 소 에프-92330 튀 미셀 브와쟁 12

로베르, 장-자크

프랑스 소 에프-92330 불바르 데스그랑쥬 레지당
스 레 페피니에르12

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

차윤근

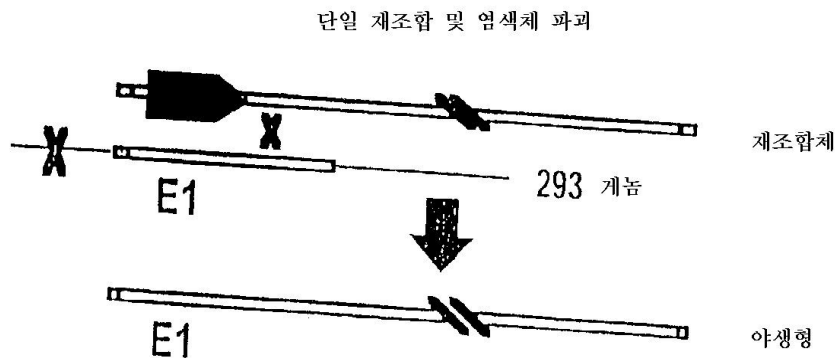
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 아데노바이러스 벡터 및 상동 재조합 현상을 줄이는 방법

(57) 요약

본 발명은 핵산간에 재조합 현상을 줄이는 방법에 관한 것이다. 이는 또한 복제 입자에 의해 오염되지 않은 결손 바이러스를 생성하는 방법의 사용에 관한 것이다. 본 발명은 추가로는 신규 바이러스 작제물에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

빈, 엠마누엘

프랑스 이브리 시르 센 에프-94200 뒤 베르나르 팔
리시 2

예, 파트리스

프랑스 기프 시르 이베트 에프-91190 알레 드 라
푸앵트 제네트48

특허청구의 범위

청구항 1

결손 아데노바이러스의 상보적 기능을 암호화하는 세포의 염색체 핵산과, 결손 아데노바이러스의 게놈을 포함하는 염색체의 핵산간에 분자내- 또는 분자간 상동 재조합의 빈도수를 줄이는 방법에 있어서, 재조합의 파트너 핵산 중 적어도 한 서열이 변형되어 나머지 파트너(들)와의 상동성을 줄이는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 서열이 암호 서열이고 축퇴됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 서열이 적어도 20 염기쌍마다 1 염기쌍의 비율로, 바람직하게는 적어도 10 염기쌍마다 1 염기쌍의 비율로 축퇴됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 서열이 모든 가능한 위치에서 축퇴됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 축퇴가 상보적인 세포의 코돈 사용 함수에 따라 이루어짐을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 염색체 핵산이 아데노바이러스 게놈의 E1 영역과 플랭킹 영역을 포함하고, 염색체의 핵산이 E1 영역이 결여된 아데노바이러스 게놈을 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, E1 영역이 결여된 아데노바이러스 게놈 서열이 pIX 유전자에서 축퇴됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, E1 영역이 결여된 아데노바이러스 게놈 서열이 IVa2 유전자에서 추가로 축퇴됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

세포중으로 결손 재조합 아데노바이러스의 게놈을 도입시켜 결손 재조합 아데노바이러스를 제조하는 방법에 있어서, 게놈이

- E1 영역의 결실
- pIX 및/또는 IVa2 유전자에서 축퇴를 운반함을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

게놈이 서열을 변형시켜 상보적인 기능을 암호화하는 염색체 핵산과의 분자간 상동 재조합 빈도수를 줄이는 적어도 한 영역을 포함하는 결손 재조합 아데노바이러스에 있어서, 서열이 변형되어 기타 파트너(들)와의 상동성을 줄이는 것을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 변형된 영역이 암호 영역이고 축퇴 영역이 pIX 유전자를 포함함을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 12

제 11 항에 있어서, pIX 유전자를 포함하는 축퇴 서열이 서열 번호 1임을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 13

제 11 항에 있어서, 부가적으로, IVa2 유전자가 본래 위치 이외의 게놈 위치에 존재함을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 14

제 13 항에 있어서, IVa2 유전자가 E4 영역에 위치됨을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 15

제 10 항에 있어서, 축퇴 영역이 pIX와 IVa2 유전자를 포함함을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 축퇴 영역이 서열 번호 3임을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 17

제 10 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, E1 영역의 결실을 포함함을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 18

제 11 항 또는 제 12 항에 있어서, pIX 유전자의 축퇴 서열이 서열 번호 1임을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 19

결손 아데노바이러스의 상보적 기능을 암호화하는 세포의 염색체 핵산 서열, 또는 상기 아데노바이러스의 게놈을 포함하는 염색체의 핵산 서열이 변형되어 두 핵산간의 상동성을 감소시킴을 특징으로 하는 결손 아데노바이러스를 포함하는 세포.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 핵산간의 재조합 현상을 줄이는 방법에 관한 것이다. 이는 또한 플라스미드와 같은 핵산 또는 바이러스 벡터의 제조 공정에서 본 방법의 사용에 관한 것이다. 본 발명은 또한 신규 바이러스 작제물에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 핵산간의 재조합은 분자 생물학에서 익히 알려진 현상이다. 재조합은 유전 물질의 신규 조합이 일어나는 분자 메카니즘으로서, 자연 도태를 위한 원천을 제공함으로써 다윈의 진화에 기여한다. 관여 핵산간의 강한 서열 상동성을 요구하는 유전자 재조합은 일반적으로 상동 재조합으로 불린다. 상동 재조합이 일어나는 동안, 유전 정보 교환이 핵산의 두 영역간에 일어나며, 이러한 교환은 교환(교차)적 또는 비교환적(전환)일 수 있다.

<3> 감수 분열동안, 상동 재조합은 유전 정보의 재배열을 담당하고 염색체의 정확한 분리에 중요한 역할을 한다. 유사 분열동안, 상동 재조합은 DNA 수선에 관여한다. 이는 산재된 상동 영역을 수반할 경우의 결실 및 중복, 또는 직렬 반복 서열을 수반할 경우의 수축 또는 팽창과 같은 게놈 재배열을 도입할 수 있다.

<4> 상동 재조합이 일어나는 메카니즘은 부분적으로 밝혀져 있다. 따라서, 박테리아에서, 상동 재조합은 일본쇄 말단을 수반한 스텝에서 개시된다(Holliday, 1964; Meselson, 1975). 한편, 진핵생물에서, 대부분의 결과는 일본쇄 파괴(DSB) 메카니즘을 암시한다(Szostak et al., 1983). DSB는 상동 재조합의 기본적인 두 메카니즘의 기원에서 나타나는 것 같다: 일 보존 프로세스, 이에 따라 재조합에 관여하는 모든 핵산 서열은 재조합 산물에 존재하고(Szostak et al.), 다른 비보존 프로세스, 이 과정에서 특정 서열이 소실된다. 포유류 체세포에서 DSB에 의한 대다수의 상동 재조합은 비보존 프로세스에 따라 일어나는 것 같다(Lin et al., 1990, Jeong-Yu, 1992).

- <5> 꾸준한 생물공학의 발달과 함께, DNA의 영구-연속 탐험이 수행되고 있다: 재조합 단백질의 생성, 트랜스유전자 동물의 창조, 유전자 요법 및 세포 요법 등. 이들 상이한 도메인에서, 특정 경우, 조절되지 않는 재조합 현상이 불리하게 작용할 수 있다.
- <6> 따라서, 재조합 단백질의 생성동안, 발현 플라스미드에서의 재조합(분자내 재조합)은 예를 들면 트랜스유전자를 위한 발현 카세트의 절개를 야기하여 발현을 상실시킨다. 재조합은 또한 숙주 프로듀서 세포의 계놈으로 안정하게 통합된 발현 카세트의 절개의 기원에서 일어나 안정성을 상실시킬 수도 있다.
- <7> 상동 재조합의 발생과 연관된 역 효과의 또다른 예는 벡터, 특히 바이러스 벡터의 작제 및 생성동안 일어나기 쉬운 경향이다. 바이러스 벡터(아데노바이러스, 레트로바이러스, 아데노-관련 바이러스, 허프스 바이러스 등)는 특히 시험관내, 생체외 또는 생체내 세포로 핵산을 전달하는데 효과적인 수단을 구성한다. 결손 바이러스 벡터를 작제하는 동안 야생형 바이러스의 복제에 필수적인 영역이 일반적으로 계놈에서 삭제되고 관련 핵산으로 대체된다. 이들 바이러스를 생성 및 증폭시키기 위해 트랜스에서 상보적 기능(플라스미드, 또는 프로듀서 세포의 계놈으로 통합된 형태로, 또는 헬퍼 바이러스에 의해)을 제공할 필요가 있다. 그러나, 특정 경우, 상동 재조합은 결손 바이러스 계놈과, 복제 바이러스 입자를 재구성하는 상보적 기능간에 일어난다. 따라서, 아데노바이러스에서 유도된 벡터는 일반적으로 아데노바이러스 계놈의 일부가 통합되는 상보적인 계통(293 계통 또는 유도체)에서 생성된다. 좀더 구체적으로 말하면, 293 계통은 왼쪽 ITR, 캡시드화 영역 및 E1 영역(E1a, E1b 및 단백질 pIX와 IVa2를 암호화하는 영역의 일부 포함)을 포함하는 아데노바이러스 혈청형 5 (Ad5)의 계놈의 왼쪽 말단(약 11-12%)을 함유한다. 이 계통은 복제에 필요한 E1 영역이 결핍, 즉, E1 영역 전부 또는 일부가 결핍된 재조합 아데노바이러스를 상호보완할 수 있다. 그러나, 생성이 원해지는 계통의 계놈 및 재조합 바이러스의 DNA로 통합된 아데노바이러스 영역간에 상동성 영역이 존재한다. 이러한 이유로 인해, 각종 재조합이 복제 바이러스 입자, 특히 E1+형 아데노바이러스의 생성동안 일어날 수 있다. 도 1에서 지적하고 있듯이, 이는 단일 재조합에 이은 염색체의 파괴(도 1a), 또는 이중 재조합(도 1b)일 수 있다. 이들 두가지 타입의 변형은 기능성 E1 영역이 결여된 재조합 DNA의 왼쪽 부위를 E1 영역의 기능성 사본을 운반하는 세포 계놈에 존재하는 상응하는 부위로 대체할 수 있다. 또한, 293 계통이 생성한 재조합 벡터의 높은 역가를 고려해 볼때, 이들 재조합 확률은 높다. 실제로, 결손 재조합 아데노바이러스 벡터의 다수 배치가 복제 바이러스 입자로 오염됨이 밝혀졌다.
- <8> 바이러스의 배치에서 복제 입자의 존재는 시험관내 또는 생체내에서 유전자 전달의 경우에 상당한 결점을 야기한다(바이러스 전파 및 조절되지 않는 전이의 위험).
- <9> 동일 유형의 문제점이 결손 레트로바이러스를 생성하는 경우에도 존재한다. 따라서, 작제된 결손 레트로바이러스는 일반적으로 트랜스에서 생산 라인에 의해 제공된 바이러스 암호 영역(gag, pol 및 env)이 결핍된다. 또한, 기재된 특정 계통의 경우, 결손 레트로바이러스의 계놈과 세포에 의해 운반된 상보적 기능간에 중복 영역이 존재한다. 이는 특히 세포 PA317, Psi2 등의 경우에 그러하다. 따라서 상동 재조합은 복제 입자를 만드는 이들 영역에서 일어날 수 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <10> 본 발명은 주어진 두 핵산간의 재조합 빈도수를 줄여 생물학적 프로세스에 대한 이러한 현상의 영향력을 최소화하는 방법에 관한 것이다.
- <11> 좀더 구체적으로 말하면, 본 발명은 주어진 두 핵산 또는 핵산의 두 영역간에 일어나는 상동 재조합 빈도수를 감소시키는 방법에 관한 것이다.
- <12> 상동 재조합을 감소시키기 위해서, 선행 기술은 모두 동일한 원리: 상동성 영역의 교체 또는 결실에 기초한 각종 접근법을 교시하고 있다. 따라서, 관련 유전자를 발현시키는 특정 플라스미드는 숙주 세포의 계놈에 상동인 영역을 운반한다. 이는 특히 프로모터 영역, 마커 유전자 또는 복제 기원일 수 있다. 재조합의 위험을 줄이기 위해, 지금까지는 이들 영역을 비상동성(상이한 프로모터 등)인 기타 영역으로 치환할 것을 제안해 왔다. 또한, 바이러스 벡터를 생성하는 프로세스에서 재조합의 위험을 제한하기 위해, 상보적인 유전자와 결손 바이러스 계놈간에 상동성인 서열을 제거할 것을 제안해 왔다.
- <13> 따라서, 특허 출원 WO 97/00326은 E1 영역을 운반하는 아데노바이러스 계놈의 제한 단위를 포함하는 PER로 명명된 아데노바이러스를 생성하는 세포 계통에 관해 기재하고 있다. 이러한 계통을 이용하여, 결손 바이러스의 계놈에 상동성인 플랭킹 서열을 줄여, 이들간의 상동 재조합의 위험을 제한할 수 있다. 마찬가지로, 출원 WO

95/11984는 pIX 유전자 부위에 이르는 E1 영역의 결실을 운반하는 재조합 아데노바이러스의 작제에 관해 기재하고 있다. 이 경우, 변형(감소)된 상보성 영역은 더 이상 존재하지 않지만, 결실 영역이 결손 계놈에서 운반된다. 상동성 영역이 여전히 존재하지만, 결과적으로는 재조합의 위험이 감소된다.

<14> 그러나, 이들 방법들이 세포와 바이러스 계놈간의 재조합 위험을 줄여주기는 하지만, 복제 입자로 오염된 바이러스 배치를 생성하는 위험이 남아있어, 이들을 완전히 제거할 수는 없고/없거나 신규 세포 계통의 작제 및 이로 인한 검증을 요구하게 되어, 매우 고된 작업이다. 또한, 기타 영역으로 이러한 영역의 치환이 특히 효율면에서 반드시 만족스러운 것은 아니다.

과제 해결수단

<15> 본 출원은 분자간- 또는 분자내 상동 재조합을 감소시키는 신규 방법에 관해 기재하고 있다. 본 발명은 또한 복제 입자로 오염되지 않는 결손 바이러스를 생성하는 본 방법의 적용에 관해서도 기재하고 있다. 본 발명은 또한 복제 입자의 생성 위험을 상당한 정도로 감소시켜 역가면에서 가장 효과적인 생산 라인에서 증폭될 수 있는 신규 바이러스 작제물에 관해서도 기재하고 있다.

<16> 상동 재조합의 초기 및 중요 단계는 두 파트너 핵산(분자간 재조합) 또는 핵산의 두 영역(분자내 재조합)간의 인식이다. 이 단계는 두 상동 영역간의 직접 상호작용의 결과이다. 두 핵산간의 상동 재조합은 이들 핵산의 두 영역간의 서열 일치 또는 강한 서열 상동성의 존재에 기초하며 일반적으로는 두가지 인자: (즉, 핵산 또는 두 핵산에 의해 운반된 상동 영역)의 상동성 정도와 상동성 길이에 좌우된다. 또한, 상동 재조합의 빈도는 핵산의 특정 영역에 의해 영향을 받을 수도 있다. 따라서, 특정 영역은 평균 빈도보다 높은 빈도로 재조합될 수 있음이 관찰되었다. 또한 이는 빈도수에서 이들 국한된 변형이 이. 콜라이(E. coli)에서의 CHI 부위 또는 에스. 폼베(S. pombe)의 M26 부위와 같은 특정 서열에 기인할 수 있음이 알려졌다(Gangloff et al., 1994).

<17> 선행 기술에서 제안된 방법과는 달리, 본 발명의 방법은 파트너 핵산간의 상동성 영역의 결실을 수반하지 않는다. 본 발명의 방법은 기본적인 방법으로 재조합의 두 파트너 핵산 중 적어도 한 서열의 변형에 기초하며, 이러한 방법에 의해 이들 핵산 사이에 존재하는 상동성을 감소시킨다.

<18> 본 발명의 제 1 주제는 핵산간의 분자내- 또는 분자간 상동 재조합 빈도수를 감소시키는 방법에 관한 것으로, 재조합의 파트너 핵산 중 최소 한 서열이 축퇴되어 기타 파트너(들)와의 상동성을 감소시킴을 특징으로 한다.

<19> 본 발명의 목적상, 핵산간의 "상동 재조합 빈도수의 감소"는 변형되지 않은 상응하는 핵산의 경우에 관찰된 빈도수에 비해 빈도수가 낮음을 의미한다. 이러한 감소는 당해 분야의 숙련인에게 알려진 통상적인 시험에 의해 쉽게 알 수 있다(특히 "마커 구조" 시험 또는 복제 바이러스 입자 생성 시험에 의해). 편의상, 용어 "감소"는 상동 재조합 빈도의 상당한 하강, 바람직하게는 로그 단위로 최소한 1 정도의 하강으로 이해한다.

<20> "분자간 상동 재조합"은 두개의 상이한 핵산간 (또는 두개의 상이한 핵산의 두 영역간)의 상동 재조합을 의미하는 것으로 한다. "분자내 상동 재조합"은 동일한 핵산의 두 영역간의 상동 재조합을 의미하는 것으로 한다. 또한, 상동 재조합의 파트너 핵산은 염색체외 핵산, 염색체 핵산 또는 둘(즉, 염색체 핵산과 염색체외 핵산)간의 조합물일 수 있다. 염색체외 핵산은 플라스미드, 벡터, 에피솜, 바이러스 계놈 등일 수 있다.

<21> 본 발명의 방법은 특히 염색체 핵산과 염색체외 핵산간의 분자간 상동 재조합의 빈도수를 감소시키는데 적합하다.

<22> 본 발명의 방법은 일반적으로 하기 단계를 수반한다:

<23> (i) 상동 재조합을 담당하는 영역(들)의 확인

<24> (ii) 이 또는 이들 영역의 변형

<25> (iii) 서열의 검증

<26> (iv) 변형된 서열(syngen으로 불림)의 합성

<27> (v) syngen으로 본래 서열 교체

<28> (i) 핵산간의 상동 재조합을 담당하는 영역의 확인은 공지방법으로 수행된다. 특히, 재조합이 관찰됨과 동시에, 이를 담당하는 영역이 서열 분석에 의해 조사될 수 있다: 핵산간(분자간) 또는 핵산내(분자내) 상동 영역의 조사.

- <29> 재조합과 관련된 서열이 확인되면, 하기 단계 (ii), 즉 변형에 사용되는 이들 서열 전부 또는 일부를 포함하는 영역을 한정한다.
- <30> (ii) 서열의 변형
- <31> 재조합이 상당한 빈도로 일어나기 위해서는 상동성이 충분히 긴 영역에 걸쳐 매우 강해야 함이 일반적으로 받아들여지고 있다. 특히, 문헌의 데이터는 최소한 길이의 약 200 pb가 일치하는 완벽한 상동성 영역이 이러한 현상에 요구됨을 제시하고 있다. 실제로, 재조합이 보다짧은 영역에 걸쳐 일어날 수 있더라도, 이들 빈도는 매우 낮고 불규칙적이다. 또한, 상동성이 19%로 감소되는 이러한 영역에서는, 재조합 빈도가 인자 1000으로 감소되는 것 같다(Waldman and Liskay, 1987).
- <32> 서열은 여러 방법으로 변형될 수 있다. 암호 서열의 경우, 유전자 코드의 축퇴에 기초한 변형이 도입될 수 있다. 이러한 방법으로 서열은 방해되어, 상동성이 감소되지만, 발현 산물은 동일하다.
- <33> 따라서 본 발명은 특히 두 상동성 영역간의 접합을 방해하는 서열의 변형에 있다. 변형은 길이와, 관련 두 영역간의 상동성 정도를 감소시킬 수 있다.
- <34> 유리하게도, 본 발명의 방법에서, 핵산 서열은 상동 재조합과 관련된 영역에서 적어도 20 염기쌍당 1 염기쌍의 비율로 축퇴된다. 좀더 바람직하게는, 이는 적어도 10 염기쌍당 1 염기쌍의 비율로 축퇴된다.
- <35> 본 발명의 일 특정 변형에 따르면, 서열은 모든 가능한 위치에 축퇴된다.
- <36> 본 발명에 따른 서열의 축퇴는 유리하게는 핵산이 사용되어야 하는 세포 또는 유기체의 코돈 사용의 함수에 따라 생성된다. 인간 세포 계통에서 생성되는 바이러스 벡터의 경우, 이러한 선택이 가능한 경우 인간에게서 바람직한 코돈 사용을 선호함으로써 서열을 축퇴시킴이 특히 유리하다(실시에 참조).
- <37> 또한, 추가 변형이 핵산 서열에 도입될 수 있다. 따라서, 비암호 영역에서 특정 요소(발현을 위한 조절 서열, 프로모터)의 크기를 감소시키거나 이들 요소를 변형시키거나 특정 기타 요소를 이중 영역으로 치환할 수 있다.
- <38> 본 발명의 일 특정 변형에 따라, 상동성 영역이 다수의 유전자에 걸쳐 있을 때, 한편으로는 1 이상의 유전자의 서열을 축퇴시키고, 다른 한편으로는 상동성 영역에 존재하는 특정 유전자의 게놈 위치를 변형, 즉, 아데노바이러스 게놈, 및 본래 위치를 제외한 게놈 위치에 이들 유전자를 위치시킴으로써 상동성 영역을 감소시킬 수 있다. 게놈 위치가 변형되는 유전자 서열도 축퇴될 수 있다. 바람직하게는, 이동되지 않는 유전자 서열만이 축퇴된다.
- <39> (iii) 서열 검증
- <40> syngen의 활성을 방해하는 경향이 있는 조절 요소, 2차 구조 등의 존재를 검출할 수 있는 데이터-프로세싱법에 의해 검증을 수행한다. 실시에 참조.
- <41> (iv) syngen 합성
- <42> syngen을 당해 분야의 숙련인에게 공지된 기술, 특히 핵산 합성기를 사용하여 합성할 수 있다.
- <43> (v) 본래 서열을 syngen으로 대체
- <44> 일단 합성된 syngen은 본래 서열에 대한 대체물인 핵산으로 도입된다. 이 단계도 당해 분야에 숙련인에게 공지된 통상적인 분자 생물학 기술에 따라 수행될 수 있다.
- <45> 본 발명의 방법의 일 적용은 복제-캡피드 바이러스 입자(RCV)없이, 벡터, 특히 바이러스 벡터를 생성하는데 있다. 이러한 측면에서, 본 발명의 방법은 좀더 구체적으로는 결손 바이러스에 대한 상보적 기능을 암호화하는 염색체 핵산과 결손 바이러스의 게놈을 포함하는 염색체의 핵산간의 상동 재조합 빈도수를 감소시키는데 있다.
- <46> 관련 바이러스는 유리하게는 아데노바이러스, 레트로바이러스, 아데노-관련 바이러스(AAV) 또는 허프스 바이러스일 수 있다. 이는 좀더 바람직하게는 아데노바이러스이다.
- <47> 따라서, 본 발명의 일 특정 양태는 아데노바이러스 게놈의 E1 영역과 플랭킹 영역을 포함하는 염색체 핵산과 E1 영역이 결핍된 아데노바이러스 게놈을 포함하는 염색체의 핵산간의 상동 재조합 빈도수를 감소시키는 방법으로 구성된다.
- <48> 유리하게는, 이러한 특정 방법에서, 본 발명에 따른 축퇴 서열은 E1 영역이 결핍된 아데노바이러스 게놈의 pIX

유전자를 포함한다. 더욱더 바람직하게는, 축퇴 서열은 아데노바이러스 게놈의 pIX와 IVa2 유전자를 포함한다.

- <49> 또다른 양태에 따르면, 축퇴 서열은 아데노바이러스 게놈의 pIX 유전자를 포함하고, IVa2 유전자 서열은 본래 위치에서 E4 영역으로 이동한다.
- <50> 본 발명의 방법은 293 세포 계통 또는 유도 세포 계통에서 E1 영역이 결핍된 재조합 아데노바이러스를 생성하는데 특히 적합하다.
- <51> 앞서 지적했듯이, 293 세포 계통은 게놈에서 특히 E1 영역 및, E1 영역의 하류(3')에 위치되고 특히 pIX 유전자와 IVa2 유전자의 일부를 운반하는 플랭킹 영역을 포함하는 아데노바이러스 게놈의 왼쪽 부위를 함유한다. 이는 정확하게는 복제-캡시드 아데노바이러스(RCA)를 만드는 상동 재조합이 일어나는 플랭킹 영역에 있다. 본 발명을 위해, "유도 세포 계통"은 아데노바이러스의 E1 영역과, 결손 바이러스와 재조합되기 쉬운 플랭킹 영역을 운반하는 세포 계통을 의미하는 것으로 한다. 이는 293(예를 들면 pIX)에 존재하는 것보다 짧은 영역이거나 긴 영역일 수 있다. 유도 계통은 추가 상보적 서열(예, E4)을 도입함으로써 293-계통 세포로부터 작제된 계통일 수도 있다.
- <52> 이러한 관점에서, 본 발명은 293 계통의 세포 또는 유도 세포로 결손 재조합 아데노바이러스의 게놈을 도입함으로써 결손 재조합 아데노바이러스를 제조하는 방법에 관한 것으로, 상기 계통은
- <53> - E1 영역의 결실
- <54> - pIX 및/또는 IVa2 유전자의 축퇴를 운반함이 특징적이다.
- <55> 본 발명은 또한 서열이 축퇴되는 적어도 하나의 영역을 포함하는 게놈의 바이러스 벡터에 관한 것이다. 이는 특히 레트로바이러스(gag, pol 및/또는 env 유전자에서 축퇴 서열 운반), AAV(rep 및/또는 cap 유전자에서 축퇴 서열 운반) 또는 아데노바이러스일 수 있다.
- <56> 이는 유리하게는 게놈이 축퇴 pIX 유전자를 운반하는 아데노바이러스이다. 바람직하게는, pIX 유전자의 축퇴 서열은 서열 번호 1 또는 서열 번호 4이다. 좀더 바람직하게는, 아데노바이러스는 추가로 IVa2 유전자의 게놈 위치의 변형을 운반한다. 이러한 유전자는 유리하게는 E4 영역에 위치한다.
- <57> 또다른 양태에 따르면, 이는 pIX와 IVa2 유전자가 축퇴되는 아데노바이러스이다. 바람직하게는, pIX 유전자의 본래 서열은 서열 번호 1 또는 서열 번호 4로 대체되고 IVa2 유전자의 축퇴 서열은 서열 번호 2 또는 서열 번호 5이다. 바람직하게는, pIX와 IVa2의 본래 서열은 서열 번호 3으로 대체된다.
- <58> 또다른 양태에 따르면, 이는 pIX와 IVa2 유전자가 축퇴되고 추가로 pIX 유전자의 프로모터 서열의 변형 및/또는 이들 유전자의 폴리아데닐화 서열의 교체를 포함하는 아데노바이러스이다. 바람직하게는, 이는 서열 번호 8을 포함하는 아데노바이러스이다.
- <59> 아데노바이러스는 또한 유리하게도 E1 영역에 적어도 하나의 결실을 운반한다. 좀더 바람직하게는, 아데노바이러스는 적어도 E1 및 E3 영역 전부 또는 일부가 결핍되어있다. 이는 또한 E1과 E4영역, 임의로는 E3 영역이 부분 또는 전부 결핍된 재조합 아데노바이러스일 수 있다. 또한, 이 아데노바이러스는 각종 혈청형일 수 있다. 인간 기원의 아데노바이러스가 고려되는 경우, 바람직하게는 그룹 C로 분류된 것들이 언급될 수 있다.
- <60> 더욱더 바람직하게는, 인간 아데노바이러스의 여러 혈청형 중, 본 발명의 문맥에서는 타입 2 또는 5의 아데노바이러스(Ad2 또는 Ad5)가 바람직하다. 동물 기원의 여러 아데노바이러스 중, 본 발명에서는 개 기원의 아데노바이러스, 특히 CAV2 아데노바이러스의 모든 균주[예를 들면 Manhattan 균주 또는 A26/61 균주(ATCC VR-800)]가 바람직하게 사용된다. 동물 기원의 기타 아데노바이러스가 특히 본원에서 참조 문헌으로 인용된 출원 WO 94/26914에서 인용된다. 아데노바이러스 작제법 및 이들 벡터로 관련 유전자를 도입하는데 사용될 수 있는 부위에 관해서는 선행 기술, 특히 WO 95/02697, WO 96/10088, WO 96/13596 또는 WO 96/22378에 상세히 기재되어있다.
- <61> 일 특정 유리한 양태에 따르면, 본 발명의 재조합 아데노바이러스에서 E1 영역은 Ad5 아데노바이러스 서열에서 뉴클레오타이드 454에서 뉴클레오타이드 3328에 이르는 PvuII-BglII 단편의 결실에 의해 불활성화된다. 이 서열은 문헌 및 데이터베이스(특히 Genbank No. M73260 참조)에서 입수될 수 있다. 또다른 바람직한 양태에서, E1 영역은 뉴클레오타이드 382에서 뉴클레오타이드 3446에 이르는 HinfII-Sau3A 단편의 결실에 의해 불활성화된다.
- <62> 유리하게도, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 세포, 기관 또는 유기체에서 전달 및/또는 발현되길 원하는 핵산의 이중 서열을 추가로 포함한다.

- <63> 특히, 이중 DNA 서열은 1 이상의 치료 유전자 및/또는 1 이상의 유전자 암호 항원성 펩티드를 포함할 수 있다.
- <64> 이렇게 형질감염될 수 있는 치료 유전자는 표적 세포에서 전사 및 가능한 해독이 치료 효과를 지닌 산물을 생성하는 유전자이다.
- <65> 이들은 특히 치료 효과를 지닌 단백질 산물을 암호화 하는 유전자일 수 있다. 이렇게 암호화된 단백질 산물은 단백질, 펩티드, 아미노산 등일 수 있다. 이 단백질 산물은 표적 세포에 대해 상동성일 수 있다(즉, 이 세포가 병리 조건을 가지지 않는 경우 표적 세포에서 보통 발현되는 산물). 이 경우, 단백질의 발현은 예를 들면 변형으로 인해 불활성 또는 약하게 활성인 세포에서의 불충분한 발현 또는 단백질의 발현을 오프셋하거나 단백질을 과발현시킬 수 있다. 치료 유전자는 또한 증가된 안정성, 변형된 활성 등을 지닌 세포 단백질의 돌연변이체를 암호화할 수도 있다. 단백질 산물은 표적 세포에 대해 이중일 수 있다. 이 경우, 발현된 단백질은 예를 들면 세포에서 결여된 활성을 보충하거나 제공할 수 있어, 병리 조건과 싸우도록 해준다.
- <66> 본 발명의 치료 산물 중, 좀더 구체적으로는 효소, 혈액 유도체, 호르몬, 림포카인: 인터루킨, 인터페론, TNF 등(FR 9203120), 성장 인자, 신경전달물질 또는 이의 전구체 또는 합성 효소, 트로픽 인자: BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, VEGF, aFGF, bFGF, NT3, NT5 등; 아포리포프로테인: ApoAI, ApoAIV, ApoE, 등(FR 93 05125), 디스트로핀 또는 미니디스트로핀(FR 9111947), 종양 억제 유전자: p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, 등(FR 93 04745), 응고와 관련된 인자: 인자 VII, VIII, IX 등을 암호화 하는 유전자, 단백질 GAX를 암호화 하는 유전자, 자살 유전자: 티미딘 키나제, 사이토신 데아미나제 등, 단일-쇄 (scFv) 항체를 암호화 하는 유전자가 언급될 수 있다.
- <67> 치료 유전자는 유전자 또는 안티센스 서열일 수 있고, 표적 세포에서 이의 발현은 유전자의 발현 또는 세포 mRNA의 전사를 조절할 수 있다. 특히 EP 140 308에 기재된 기술에 따르면, 이러한 서열은 예를 들면 표적 세포에서 세포 mRNA에 상보적인 RNA로 전사될 수 있어 단백질로의 해독을 차단할 수 있다.
- <68> 앞서 지적했듯이, 이중 DNA 서열은 인간에서 면역 반응을 일으킬 수 있는 항원성 펩티드를 암호화 하는 1 이상의 유전자를 포함할 수도 있다. 이러한 특정 양태에서, 본 발명은 특히 미생물 또는 바이러스로부터 인간을 면역화시킬 수 있는 백신의 생성을 가능케한다. 이들은 특히 엡스타인-바 바이러스, HIV 바이러스, 간염 B 바이러스(EP 185 573), 공수병 바이러스에 특이하거나, 종양(EP 259 212)에 특이한 항원성 펩티드일 수 있다.
- <69> 일반적으로, 이중 핵산 서열은 감염된 세포에서 기능성 전사를 위해 프로모터 영역을 포함한다. 이는 이러한 영역이 감염된 세포에서 기능화될 수 있을 때 본래 관련 유전자의 발현을 담당하는 프로모터 영역일 수 있다. 이는 또한 상이한 기원(기타 단백질의 발현을 담당하거나 합성함)의 영역일 수도 있다. 특히, 이는 진핵생물 또는 바이러스 유전자의 프로모터 서열일 수 있다. 예를 들어, 이는 감염이 원해지는 세포의 게놈에서 유도된 프로모터 서열일 수 있다. 마찬가지로, 이는 사용된 아데노바이러스를 포함한 바이러스의 게놈에서 유도된 프로모터 서열일 수 있다. 이러한 관점에서, 예를 들면 E1A, MLP, CMV, RSV 등 유전자의 프로모터가 언급될 수 있다. 추가로, 이들 프로모터 영역은 활성화 또는 조절, 또는 조직-특이 또는 조직-우세 발현을 가능케하는 서열의 첨가에 의해 변형될 수 있다. 또한, 이중 핵산이 프로모터 서열을 포함하지 않을 경우, 이는 이러한 서열의 하류의 결손 바이러스 게놈에 삽입될 수 있다.
- <70> 또한, 이중 핵산 서열은 특히 치료 유전자의 상류에 표적 세포의 분비 경로에서 합성된 치료 산물을 지시하는 시그널 서열을 포함할 수도 있다. 이 시그널 서열은 치료 산물의 본래 시그널 서열일 수 있지만, 기타 기능성 시그널 서열 또는 인공 시그널 서열일 수도 있다.
- <71> 특히 유리한 양태에서, 본 발명의 벡터는 이중 프로모터의 조절하에 기능성 E3 유전자를 추가로 포함한다. 좀더 바람직하게는, 벡터는 단백질 gp19K를 발현시키는 E3 유전자의 일부를 소유한다. 이 단백질은 실제로 아데노바이러스 벡터가 (i) 작용을 제한하고 (ii) 불리한 부작용을 가지는 면역 반응의 대상이 되지 못하도록 할 수 있다.
- <72> 이들 재조합 벡터는 시험관내, 생체외 또는 생체내 세포로 핵산을 전달하는 데 사용될 수 있다.
- <73> 본 발명은 또한 상술된 1 이상의 재조합 아데노바이러스를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 약학 조성물은 국소, 경구, 비경구, 비내, 정맥내, 근육내, 피하, 안내, 경피 등 경로로 투여되도록 제형될 수 있다.
- <74> 바람직하게는, 약학 조성물은 주사성 제형을 위한 약학적으로 허용가능한 비히클을 함유한다. 이는 구체적으로는 등장액, 멸균 식염액 (모노나트륨 포스페이트, 디나트륨 포스페이트, 나트륨 클로라이드, 칼륨 클로라이드, 칼슘 클로라이드 또는 마그네슘 클로라이드 등, 또는 이러한 염의 혼합물) 또는 건조 조성물, 특히 동결건조 조

성물일 수 있고, 경우에 따라서는 멸균수 또는 생리 식염수가 첨가되어 주사액을 제조할 수 있다.

<75> 주사에 사용되는 바이러스 투여량은 각종 파라미터의 함수, 특히 사용된 투여방법, 관련 병리, 발현될 유전자, 또는 원하는 치료 기간의 함수에 따라 조절될 수 있다. 일반적으로, 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스는 10^4 내지 10^{14} pfu/ml, 바람직하게는 10^6 내지 10^{10} pfu/ml의 투여량 형태로 제형 및 투여된다. 용어 pfu ("플라크-형성 단위")는 바이러스 용액의 감염도에 상응하고, 적절한 세포 배양물을 감염시켜 보통 5일 후, 감염 세포의 플라크 수를 측정하여 계산된다. 바이러스 용액의 pfu 역가를 측정하는 기술은 문헌에 상세히 기재되어있다.

효 과

<76> 본 발명의 방법은 염색체 핵산과 염색체외 핵산간의 분자간 상동 재조합의 빈도수를 감소시켜 상동 재조합으로부터 오는 위험을 제한한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<77> 본 발명은 하기 실시예에 의해 좀더 상세히 기재될 것이고, 이는 설명적이면서 비제한적인 것으로 간주되어야 한다.

<78> 일반 분자 생물학 기술

<79> 분자 생물학에서 일반적으로 사용되는 방법, 예를 들면 플라스미드 DNA의 예비 추출, 세슘 클로라이드 구배에서 플라스미드 DNA의 원심분리, 아가로스 또는 아크릴아미드 겔 전기영동, 전기용출에 의한 DNA 단편의 정제, 페놀 또는 페놀/클로로포름을 이용한 단백질의 추출, 식염수 매질에서 DNA의 에탄올 또는 이소프로판올 침전, 이.콜라이에서 형질 전환 등이 당해 분야의 숙련인에게 널리 알려져 있고 문헌[참조: Maniatis T., et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M., et al., (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987]에 광범위하게 기재되어있다.

<80> 플라스미드 pIC-20R (Invitrogen)과 pBS (Stratagen)는 공업용 기원이다.

<81> 연결을 위해, DNA 단편은 아가로스 또는 아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 크기별로 분리되고, 페놀 또는 페놀/클로로포름 혼합물로 추출되어, 에탄올로 침전된 다음 공급자의 추천에 따라 T4 파아지 DNA 리가제(Biolab)의 존재하에 배양될 수 있다.

<82> 공급자의 설명에 따라 이.콜라이 DNA 폴리머라제 I(Biolab)의 클레노우 단편을 이용하여 돌출 5' 말단을 메울 수 있다. 돌출 3' 말단의 파괴는 제조자의 추천에 따라 사용된 T4 파아지 DNA 폴리머라제(Biolab)의 존재하에 수행된다. 돌출 5' 말단의 파괴는 S1 뉴클레아제의 조절된 처리에 의해 수행된다.

<83> 합성 올리고데옥시뉴클레오티드에 의한 시험관내 자리-지정 돌연변이는 Amersham이 배포한 키트를 사용하여 Taylor 등이 개발한 방법에 따라 수행될 수 있다[Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764].

<84> 소위 PCR 기술[Polymerase-catalysed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. and Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350]에 의한 DNA 단편의 효소 증폭은 제조자의 설명에 따라 DNA 열 사이클러(Perkin Elmer Cetus)를 이용하여 수행될 수 있다.

<85> 뉴클레오티드 서열의 검증은 Amersham이 배급한 키트를 사용하여 Sanger 등이 개발한 방법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74(1977) 5463-5467]에 의해 수행될 수 있다.

<86> 사용된 세포 계통

<87> - 293 인간 배 신장 계통 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59). 이 계통은 특히 게놈에 통합되어 Ad5 인간 아데노바이러스의 게놈의 왼쪽 부위(12%)를 함유한다.

<88> 실시예

<89> 실시예 1: 아데노바이러스에서 상동 재조합

<90> 25년 훨씬 전에, 아데노바이러스 게놈이 유전자 재조합을 일으킬 수 있다는 관측이 보고되었다(Williams and Ustacelibi, 1971). 그러나, 이들 재조합을 일으키는 메카니즘은 상대적으로 알려져 있지 않다. 재조합과 복제는 밀접히 연관될 수 있고, 특정 데이터는 복제가 아데노바이러스에 의한 감염동안 관찰되는 빈번한 재조합에

필요한 특정 기질을 생성하는 재조합 모델을 선호하는 것으로 제안되었다. 한가지 의문점은 바이러스 또는 세포 단백질이 재조합 중간산물의 형성에 관여하고 최종 재조합 산물로의 분해에 관여하느냐 하는 것이다. 이러한 관점에서, 시험된 바이러스 유전자 어느 것도 재조합과는 관련이 없음을 보여주었다: E1b, E4, E1a, E3 (Epstein, 1991; Weinberg et al., 1986; Young, 1995). 마찬가지로, 세포 단백질 어느 것도 관련이 있는 것으로 입증되지는 않았다. 두가지 모델은 둘 모두 광범위한 이중중복체의 형성을 예상하는 바이러스 게놈에서의 재조합 메카니즘의 경우에 최종적으로 제안되었다(Ahern et al., 1991; Young, 1995).

<91> 결손 게놈과 세포 계통간의 상동 재조합을 담당하는 영역은 아데노바이러스 게놈의 pIX와 IVa2 유전자에 위치된다. 결손 게놈에 존재하는 이러한 영역의 구조는 도 2에 도시되어있다.

<92> 세포 게놈과의 재조합에 관련된 아데노바이러스 게놈 서열의 변형이 수행된다. 좀더 상세히 말하면, pIX와 IVa2 유전자의 본래 서열은 이들 유전자의 발현 산물의 구조에 영향을 미침이 없이 본래 서열과의 상동성을 감소시킬 수 있는 침묵 돌연변이를 도입함으로써 변형된다.

<93> 얻어진, syngen으로 불리는 서열은 결손 벡터를 작제하기 위한 아데노바이러스의 상응하는 본래 서열에 대한 대체물로서 이용된다.

<94> 1. 재조합을 담당하는 영역의 동정

<95> 유전자 지도 연구는 293 세포의 게놈에 존재하는 아데노바이러스 게놈 부위가 아데노바이러스 게놈의 왼쪽 부위에 상응하고 이의 약 12%, 즉, 약 4300 pb를 나타냄을 보여준다(Aiello et al., 1979; Spector et al., 1983). 본 출원인은 PCR에 의한 추가 유전자 지도 실험을 수행하여 위치 4420이 293의 게놈에 존재함을 보여주었다. 이 위치 4420은 상동성 영역의 오른쪽 한계 및 syngen의 오른쪽 한계로서 하기 실험의 경우에 선택된다. 기술적 클로닝을 이유로 변형된 단편은 클로닝 부위가 도입되는 위치 4445만큼 길게 신장될 것이다.

<96> syngen의 왼쪽 말단은 pIX 유전자의 발현을 위한 조절 요소내, 좀더 상세하게는 pIX 유전자의 위치 -56에서 선택된다. 실제로 pIX 유전자 프로모터는 56-뉴클레오티드 영역으로 감소될 수 있음을 알 수 있다. SP1 결합 부위와 TATA 박스를 함유하는 이 영역의 활성화는 250-뉴클레오티드 단편의 것에 필적할 만하다(Babiss et al., 1991; Matsu et al., 1989).

<97> 상동성 영역은 결손 바이러스의 게놈의 위치 3520에서 위치 4445에 걸쳐 있는 것으로 나타났다(도 2 참조).

<98> 2. 변형된 서열의 디자인

<99> Ad5 아데노바이러스의 게놈에서 코돈 사용표를 본 출원인이 제조했고 이를 바이러스 단백질 발현을 위한 최적 코돈 사용을 결정하는데 사용했다. 이 표는 아데노바이러스의 10 단백질: pIX, Hexon, pIII, pVII, 52-55k, pPol, pTP, DBP, 23K 및 19k(표 참조)을 분석한 후에 얻어진 자료를 종합하여 만들어진 것이다. 얻어진 결과를 GCG 프로그램을 사용하는 Genbank 염기에 존재하는 1952 유전자의 분석에 의해 얻어진 인간 코돈 사용표와 비교했다.

<100> 코돈 사용에 대한 선호 순서는 pIX 및 IVa2 유전자의 코돈 서열을 변형시켜 보면 알 수 있다:

<101> · 본래 서열에 사용된 코돈이 바람직한 코돈이 아니면, 이는 syngen에 사용됨.

<102> · 본래 서열에 사용된 코돈이 바람직한 코돈인 경우, 사용에 있어 두번째로 선호되는 코돈임.

<103> · 특정 경우, 예를 들어 제한 부위를 도입하는 경우에는 세번째로 선호되는 코돈이 사용될 수 있으며, 특히 이 경우의 빈도수는 두번째로 바람직한 코돈의 것에 충분히 근접함.

<104> 하기 표는 인간과 아데노바이러스 (ADV5)에서의 코돈 사용 빈도를 나타낸다(인간에서 선호 순서(컬럼 A), 아데노바이러스의 경우 선호 순서(컬럼 B) 및 syngen의 합성을 위해 보유된 선택(컬럼 C))

표 1: 코돈 사용 빈도

			ADV5		인간		A	H	C
F	TTT	Phe	2.3	54.2%	1.5	43.0%	1	2	-
F	TTC		1.9	45.8%	2.1	57.0%	2	1	-
L	TTA	Leu	0.1	1.4%	0.6	6.0%	6	6	6
L	TTG		1.2	14.2%	1.1	12.0%	4	4	4
L	CTT	Leu	1.3	15.6%	1.1	12.0%	3	3	3
L	CTC		1.7	20.5%	1.9	20.0%	2	2	2
L	CTA		1.1	12.6%	0.6	7.0%	5	5	5
L	CTG		3	35.6%	4	43.0%	1	1	1
I	ATT	Ile	1.3	34.6%	1.5	35.0%	2	2	2
I	ATC		1.6	43.8%	2.3	52.0%	1	1	1
I	ATA		0.8	21.6%	0.7	14.0%	3	3	3
M	ATG	Met	2.6	100.0%	2.2	100.0%			
V	GTT	Val	0.8	13.1%	1	17.0%	3	3	3
V	GTC		1.4	22.2%	1.5	25.0%	2	2	2
V	GTA		0.8	12.5%	0.6	10.0%	4	4	4
V	GTG		3.3	52.5%	2.9	48.0%	1	1	1
Y	TAT	Tyr	0.8	21.6%	1.2	41.7%	2	2	2

Y	TAC		3	78.4%	1.7	58.3%	1	1	1
*	TAA	end			0.1	23.8%			
*	TAG				0.1	16.7%			
H	CAT	His	0.5	21.3%	1.4	59.3%	2	1	-
H	CAC		1.7	78.7%	1	40.7%	1	2	-
Q	CAA	Gln	1.1	27.4%	1.2	26.7%	2	2	2
Q	CAG		3	72.6%	3.3	73.3%	1	1	1
N	AAT	Asn	1.2	24.5%	1.6	43.5%	2	2	2
N	AAC		3.6	75.5%	2.1	56.5%	1	1	1
K	AAA	Lys	1.4	35.2%	2.2	39.8%	2	2	2
K	AAG		2.5	64.8%	3.4	60.2%	1	1	1
D	GAT	Asp	1.6	29.2%	2.1	44.2%	2	2	2
D	GAC		3.9	70.8%	2.7	55.8%	1	1	1
E	GAA	Glu	2.4	37.0%	2.8	41.5%	2	2	2
E	GAG		4.1	63.0%	3.9	58.5%	1	1	1
S	TCT	Ser	0.8	11.7%	1.4	18.0%	4	3	3
S	TCC		1.7	25.9%	1.7	23.2%	2	2	2
S	TCA		0.6	9.6%	1.1	14.7%	5	4	4
S	TCG		0.9	13.6%	0.4	5.9%	3	6	5
P	CCT	Pro	1.2	18.4%	1.8	29.0%	4	2	2
P	CCC		2.7	39.9%	2.1	33.0%	1	1	1
P	CCA		1.3	18.7%	1.7	27.0%	3	3	3

P	CCG		1.5	23.0%	0.1	11.0%	2	4	4
T	ACT	Thr	1.1	17.7%	1.3	23.0%	2	3	2
T	ACC		3.3	55.0%	2.2	38.0%	1	1	1
T	ACA		0.8	12.8%	1.5	27.0%	4	2	4
T	ACG		0.9	14.5%	0.1	12.0%	3	4	3
A	GCT	Ala	1.2	13.7%	2	28.0%	3	2	2
A	GCC		4	45.7%	2.8	40.0%	1	1	1
A	GCA		1.1	12.6%	1.6	22.0%	4	3	3
A	GCG		2.4	27.9%	0.7	10.0%	2	4	4
C	Cys	TGT	0.3	21.5%	1	41.8%	2	2	2
C		TGC	1.1	78.5%	1.4	58.2%	1	1	1
*	end	TGA			0.3	61.9%			
W	Trp	TGG	1.3	100.0%	1.5	100.0%			
R	Arg	CGT	0.8	10.4%	0.5	9.3%	3	6	6
R		CGC	4.1	52.4%	1.1	19.4%	1	3	1
R		CGA	0.6	7.0%	0.6	10.0%	5	5	5
R		CGG	1.1	13.9%	1	18.6%	2	4	2
S	Ser	AGT	0.4	6.6%	1	13.6%	6	5	6
S		AGC	2.1	32.6%	1.9	24.7%	1	1	1
R	Arg	AGA	0.5	6.2%	1.2	21.0%	6	2	4
R		AGG	0.8	10.2%	1.2	21.7%	4	1	3

<106>

G	Gly	GGT	1	17.7%	1.4	18.3%	4	4	4
G		GGC	2.4	41.3%	2.5	33.2%	1	1	1
G		GGA	1.3	21.5%	1.9	25.7%	2	2	2
G		GGG	1.1	19.4%	1.7	22.8%	3	3	3

<107>

첫번째 특정 syngen 예(syngen # 1)에서는, 하기 변형이 도입된다:

<108>

- pIX 프로모터에서: 서열은 가능한 많이 감소된다: 보유된 단편은 본래 벡터에서 135 뉴클레오티드 대신 단지 56 뉴클레오티드만을 함유한다. 추가 변형이 SP1 결합 부위와 TATA 박스 사이에 위치한 9 뉴클레오티드의 변형에 의해 도입될 수 있다.

- <109> - pIX 유전자에서: 모든 위치는 가능하다면 앞서 정의된 법칙에 따라 생성된 아미노산 서열(서열 번호 1)의 변형없이 축퇴된다. 본래 서열과 축퇴 서열의 비교, 및 이들 서열의 발현 산물의 구조는 도 8에 제시되어있다. 또 다른 방법에 따르면, 10에서 단지 1 위치(bp)만이 축퇴된다. 또다른 방법에 따르면, 20중 단지 1 위치만이 축퇴된다[lacuna].
- <110> - pIX와 IVa2 사이 영역에서: 59 뉴클레오타이드의 이 영역의 서열은 이러한 예로 변형되지 않는다.
- <111> - IVa2 유전자에서: IVa2 유전자의 암호 서열은 앞서 정의된 법칙에 따라 20 bp마다 생성된 아미노산 서열의 변형없이 축퇴된다(서열 번호 2 참조). 본래 서열, 축퇴 서열 및 생성된 아미노산 서열은 도 9에 제시된다. 또다른 방법에 따르면, 10에서 1 위치(bp) 또는 심지어 모든 위치는 생성된 아미노산 서열의 변형없이 축퇴된다.
- <112> syngen # 1의 구조는 도 2에 개략적으로 기재되어있다. syngen # 1 서열은 도 10 및 서열 번호 3으로 나타나 있다.
- <113> 또다른 syngen의 예가 syngen # 2에 의해 제공된다:
- <114> - pIX 유전자 프로모터 서열은 서열 번호 6에 기재된 변형된 서열로 대체됨.
- <115> - pIX 유전자 서열은 생성된 아미노산 서열의 변형없이 서열 번호 4에 기재된 서열에 따라 대체됨.
- <116> - IVa2의 서열은 생성된 아미노산 서열의 변형없이 서열 번호 5에 기재된 서열에 따라 대체됨.
- <117> *- 폴리아데닐화 영역은 아데노바이러스 타입 7(Ad7)에서 동일한 기능을 수행하는 영역으로 대체됨; 유전자 전달을 위한 벡터로 사용된 서브그룹 B의 아데노바이러스(Abrahamsen et al., 1997, J. Virol. 71, 8946-8951). 이 서열은 서열 번호 7로 기재된다.
- <118> 전체 변형 서열은 syngen # 2로 불리고 서열 번호 8로 표시된다.
- <119> 3. syngen 서열의 검증
- <120> 본래 서열과 syngen 서열의 기본적인 특성을 데이터-프로세싱 분석에 의해 검증한다. 이러한 검증의 목적은 syngen에서 특정 구조, 특히
- <121> · 공여체 또는 수용체 스플라이스 부위(SpliceView 및/또는 Splice Net 프로그램)
- <122> · 폴리아데닐화 부위 (Hcpolya 프로그램)
- <123> · 전사 인자 결합을 위한 잠재 부위 (Transfac 프로그램)
- <124> · 상응하는 RNA를 포함(RNA 폴딩)한 직접 반복, 헤어핀 (Sigscan 프로그램, BNL)과 같은 특정 2차 구조를 형성할 수 있는 영역
- <125> · CHI 또는 M26과 같은 컨센서스 부위의 가능한 존재를 조사하는데 있다.
- <126> 이러한 서열이 확인되면, 상응하는 염기는 상기 2에 정의된 방법에 따라 임의로 교체될 수 있다.
- <127> 4. 상응하는 본래 영역에 대한 대체물로서 syngen #을 운반하는 결손 바이러스의 작제
- <128> 1. 출발 물질:
- <129> · syngen #1 (서열 번호 3)
- <130> · syngen # 1의 5'와 3' 말단에 각각 대응되는 올리고뉴클레오타이드 Syngen I과 Syngen II가 도 7에 제공됨.
- <131> · 플라스미드 pJJ105 (도 3)
- <132> · 플라스미드 pJJ110 (도 4)
- <133> · 플라스미드 pIC-20R (Invitrogen)
- <134> · 플라스미드 pSyngen: pBS(Stratagene) 중으로 클로닝된 syngen
- <135> 2. 결손 바이러스 게놈의 작제
- <136> 작제 방법은 도 6에 기재되어있다.
- <137> 플라스미드 pJJ110을 XbaI으로 절단하고, 생성된 4.8 및 5.0 kb XbaI 단편을 연결하여 플라스미드 pJJ201을 만

든다. 플라스미드 pJJ201을 BstEII과 XmaI으로 절단하고, 증만시킨 다음 연결하여 플라스미드 pJJ202를 만든다. 두 부위 BstEII과 XmaI가 보존된다.

<138> 올리고 syngen I과 올리고 syngen II 및 매트릭스로서 플라스미드 pJJ105를 이용하여 IVa2 유전자의 단편 1(IVa2의 경우 Fgt1, 도 6)에 상응하는 PCR 증폭 산물을 생성한다. 올리고 syngen I 서열 (서열 번호 9)

<139> AACTGCAGGCCGCCACTAGTCGCGATGTTCCAGCCATATCCC

<140> 올리고 syngen II 서열(서열 번호 10)

<141> CCGCTCGAGGTGACCGCTAGCCATTATGGACGAATGC

<142> 증폭된 단편을 pIC-20R의 SmaI 부위에 삽입시켜 pJJ203을 제조한다. 플라스미드 pJJ105의 IVa2 유전자의 인접 단편(단편 2, 도 6에서 확인된 Fgt2 Iva2)을 NsiI/BstEII로 절개한 다음 pJJ203의 상응하는 부위에 삽입시켜 pJJ204를 제조한다. syngen을 FseI/NruI로 절단하고(도 6) pJJ204의 상응하는 부위 사이에 삽입시켜 pJJ205를 제조한다.

<143> 완전한 pJJ205 단편(syngen#1-Fgt1+2 IVa2)을 Sse 8387I/BstEII로 절단하고 pJJ202의 상응하는 부위에 삽입시켜 pJJ206을 제조한다(도 5).

<144> 이 단편을 사용하여 문헌[참조: Crouzet et al., (PNAS (94) 1414-1419 (1997))]에 기재된 방법에 따라 syngen #1을 함유한 변형된(E1, 임의적인 E3가 결핍된) 아데노바이러스 계통을 포함하는 원핵생물 플라스미드를 제조한다. 얻어진 플라스미드를 293-계통 세포로 형질감염시켜 상응하는 바이러스를 생산한다.

<145> 293 세포를 이용하여, 두 바이러스 AV1.7#1CMVp53과 Ad5CMVp53의 증식동안 나타나는 RCA(복제-캄피턴트 아데노 바이러스)의 수용능력을 비교하는 실험을 수행한다.

<146> 서열 번호 3(syngen # 1)가 갖춰지고 p53 발현 카세트(CMV-p53-polyASV40)가 실린 벡터(AV1.7#1CMVp53)를 문헌 [참조: Crouzet et al., (PNAS (94) 1414-1419(1997))]에 따라 작제한다.

<147> Ad5CMVp53은 (변형되지 않은) Ad5의 pIX-IVa2 영역을 함유한다. p53 발현 카세트는 두 바이러스의 경우에 같은 계통이다. 두 바이러스 AV1.7#1CMVp53과 Ad5CMVp53은 293 세포에서 유사한 생산성을 가진다. 각각의 바이러스의 경우, 5 플라크를 293 세포에서 정제한다. 2x5 플라크를 7회 연속 계대로 증폭시킨다. 이러한 증폭 완료 후, 계대 7의 2x5 샘플을 RCA 검출 실험에서 분석한다. 실험을 세 개조로 수행한다. 결과는 도 12에 나타나 있다.

<148> RCA의 검출 방법은 플라크 수를 헤아릴 수 있는 정량법이고, 이의 수는 시험 샘플 도스에서 RCA의 수에 상응한다. 주어진 양의 바이러스 샘플(통상적으로 3×10^{10} vp)을 사용하여 아가충이 놓이는 비-상호보충 세포(즉, A549 세포에서 E1을 발현시키지 않음)의 세포 론(lawn)을 감염시킨다. 14일 후, 출발 감염 도스가 RCA를 함유하는 경우 플라크 형성이 론에서 관찰된다.

<149> 세 개조로 수행된 RCA 검출 실험 결과는 AV1.7#1CMVp53의 경우 0 RCA이고 Ad5CMVp53의 경우는 6 RCA이다. 이 결과는 관찰 결과의 조건부 확률과 관련된 통계학적 비교법이 사용되는 경우에 통계학적으로 중요하다. 통상적인 벡터와 비교해 이 벡터의 293 세포에서의 증식동안 RCA 출현의 감소 측면에서 볼 때, 벡터 AV1.7#1CMVp53을 선호하는 통계학적으로 중요한 개선점이 관찰된다. 이러한 일련의 결과는 syngen의 존재가 생성된 바이러스의 역가에 영향을 미치지 않고, syngen # 1을 포함하는 바이러스의 배치에 RCA에 의한 오염이 없음을 보여줄 수 있다.

<150> 5. 상응하는 본래 영역에 대한 대체물로서 syngen # 2를 운반하는 결손 바이러스의 기능

<151> 동일한 방법으로, 유사 벡터를 syngen #2로 작제하고 이에 LacZ 발현 카세트(CMV-LacZ)를 제공한다: AV1.7#2CMVlacZ. 이 벡터의 생산성을 LacZ 카세트가 제공된 벡터(RSV LacZ)와 비교하며, 이의 pIX 및 Iva2 영역은 변형되지 않는다(야생형 Ad5 서열): AV1.0RSVlacZ. 두 벡터 AV1.7#2CMVlacZ와 AV1.0RSVlacZ의 생산성을 293-계통 세포에서 동시에 시험하다. 결과는 하기 표에 제시된다.

<152>

	AV1.7#2CMVlacZ	AV1.0RSVlacZ
역가 스톡 1 (vp/ml)	1.12×10^{12}	1.50×10^{12}
역가 스톡 2 (vp/ml)	1.52×10^{12}	1.82×10^{12}

스톡 2에서 시험된 생산성 (vp/세포)	10133	12133
스톡 2에서 시험된 생산성 (tdu/세포)	203	207

- <153> 이들 결과는 syngen # 1보다 좀더 감소되고 pIX와 Iva2 유전자에서의 침묵 돌연변이 이외에, 아데노바이러스 타입 5의 야생형 서열에 대한 대체물로서 도입될 경우, syngen과 같은 비암호화 영역(즉, pIX 유전자 프로모터 및 pIX와 Iva2의 중복 폴리아데닐화 서열에서)에서의 변형을 함유한 상동성을 지닌 syngen # 2가 살아있는 것으로 판명되어 높은 생산성을 제공함을 보여준다.
- <154> 6. pIX 유전자의 본래 서열만이 서열 번호 1로 기재된 축퇴 서열로 대체되고 IVa2 유전자에 상응하는 상동 영역 부위가 E4 영역으로 이동하는 결손 바이러스의 작제
- <155> 또다른 변형 양태에 따르면, pIX 유전자의 본래 서열만이 서열 번호 1에 기재된 축퇴 서열로 대체되고 IVa2 유전자에 상응하는 상동 영역 부위가 E4 영역으로 이동한다. Iva2 유전자의 클로닝은 본원에서 참조문헌으로 인용된 출원 WO 96/10088에 기재되어있다.
- <156> 첫번째 플라스미드, 즉 pIE11이 작제되며 이는 유전자 KanR과 SacB를 운반하는 플라스미드 coIE1 중으로 클로닝된 하기 3 영역을 함유한다:
- <157> - 프라이머를 이용하여 Ad5상에 제조된 PCR 산물:
- <158> 5' atcgatcgATAACAGTCAGCCTTACC-3' 및
- <159> 5'-agctgaatttcCATCATCAATAATATACC-3';
- <160> 이 PCR 산물은 orf1의 ATG에 이르는(뉴클레오타이드 35525에서 35937은 제외) 오른쪽 ITR과 E4 프로모터를 함유함
- <161> - 특허 출원 WO/9610088에 기재된 IVa2 유전자의 cDNA.
- <162> - E4의 orf6의 스플라이싱에 필요한 서열과 EcoRV 부위에 이르는 orf6의 암호 서열을 함유하는 Ad5의 XcmI-EcoRV 단편.
- <163> 플라스미드 pIE11에서 IVa2 cDNA 앞쪽에 과량의 ATG가 존재한다. 이 부위는 Clontech의 Transformer Site-directed mutagenesis kit를 이용하여 자리-지정 돌연변이에 의해 플라스미드 pIE11에서 파괴되어, 이 ATG가 파괴되는 플라스미드 pIE12를 형성한다.
- <164> 플라스미드 pIE12에서 유도된 플라스미드 pIE12c는 하기 방법으로 변형된 아데노바이러스 5 게놈을 함유한다: 본래 자리에서 E4 영역으로 IVa2 유전자의 이동, IVa2 cDNA의 이점을 위해 E4의 orf 1-4의 교체, E3 제거, E1 대신 RSV-lacZ 카세트 삽입. 플라스미드 pIE12c를 문헌[참조: Crouzet et al., (PNAS(94) 1414-1419 (1997))]에 기재된 기술을 이용하여, 출원 WO 96/10088에 기재된 바와 같이 플라스미드 pXL2788βGal를 이용한 재조합에 의해 얻는다.
- <165> PacI을 이용한 효소 절단 후, 플라스미드 pIE12c를 293으로 형질감염시키고 얻어진 바이러스를 증폭시킨다. 바이러스 AdIE12의 제한 프로파일 예상했던 것임이 관찰된다.
- <166> 생성된 바이러스의 배치상에서 수행된 분석은 본래 서열대신 pIX 유전자의 축퇴 서열의 존재 및 E4 영역으로 IVa2 유전자의 이동이 생성된 바이러스의 역가에 영향을 미치지 않고 바이러스 배치가 상술된 조건하에 시험될 경우 이들 배치가 RCA에 오염되지 않는다는 사실을 보여줄 수 있다.

참고 문헌

Ahern et al. (1991) PNAS 88: 105

Aiello et al. (1979) Virol. 94: 460

Babiss and Vales (1991) J. Virol. 65: 598

Epstein (1991) J. Virol. 65: 4475

Gangloff et al. (1994) Experientia 50: 261

Holliday (1964) Genet. Res. 5: 282-304

Jeong-Yu and Carroll (1992) Mol. Cell. Biol. 12(1):
112-9

Lin et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10(1): 103-12

Matsui (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 4265

Meselson M., Radding C. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, 80: 358-361

Spector (1983) Virol. 130: 533

Szostak et al. (1983) Cell 33: 25-35

Waldman and Liskay (1987) PNAS 84(15) 5340-4

Weinberg (1986) J. Virol. 57: 833

Williams and Ustacelibi (1971) J. Gen. Virol. 13: 345

Young (1995) Current Topics in Microbiol. And Immunol.
199: 89

서열 목록

- <170> (1) 일반 정보:
- <171> (i) 출원인:
- <172> (A) 명칭: 롱프랑 로라
- <173> (B) 거리: 아브뉴 레이몽 아롱 20
- <174> (C) 시: 앙토니
- <175> (E) 국가: 프랑스
- <176> * (F) 우편 번호: 92165
- <177> (H) 팩스: 01.55.71.72.91
- <178> (ii) 발명의 명칭: 상동 재조합 현상을 줄이는 방법
- <179> (iii) 서열 수:
- <180> (iv) 컴퓨터 판독형:
- <181> (A) 매체형: 플로피 디스크
- <182> (B) 컴퓨터: IBM PC 호환형
- <183> (C) 운영 체제: PC-DOS/MS-DOS
- <184> (D) 소프트웨어: PatentIn Release # 1.0, Version # 1.30(EPO)
- <185> (2) 서열 번호 1에 대한 정보:
- <186> (i) 서열 특성:
- <187> (A) 길이: 424 염기쌍
- <188> * (B) 타입: 뉴클레오티드
- <189> (C) 본쇄형: 일본쇄
- <190> (D) 토폴로지: 선형
- <191> (ii) 분자형: cDNA
- <192> (iii) 가정: 없음
- <193> (iv) 안티센스: 없음
- <194> (ix) 특징:
- <195> (A) 명칭/키: CDS
- <196> (B) 위치: 1..424

<197>

(xi) 서열 배열: 서열 번호:1:

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

<198>

<199>

(2) 서열 번호 2에 대한 정보:

<200>

(1) 서열 특성:

<201>

(A) 길이: 357 염기쌍

<202>

(B) 타입: 뉴클레오티드

<203>

(C) 본쇄형: 일본쇄

<204>

(D) 토폴로지: 선형

<205>

(ii) 분자형: cDNA

<206>

(iii) 가정: 없음

<207>

(iv) 안티센스: 없음

<208>

(ix) 특성:

<209>

(A) 명칭/키: CDS

<210>

(B) 위치: 1..354

<211> (xi) 서열 배열: 서열 번호:2:

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

<212>

<213> (2) 서열 번호 3에 대한 정보:

<214> (i) 서열 특성:

<215> (A) 길이: 91 염기쌍

<216> (B) 타입: 뉴클레오티드

<217> (C) 본쇄형: 일본쇄

<218> (D) 토폴로지: 선형

<219> (ii) 분자형: cDNA

<220> (iii) 가정: 없음

<221> (iv) 안티센스: 없음

<222> (ix) 특징:

<223> (A) 명칭/키: exon

<224> (B) 위치: 1..941

<225> (xi) 서열 배열: 서열 번호:3:

```

GGCCGGCCGT CGACTGTGTG GCGGTGGCTT AACGGTGGGA AAGAATATAT AAGGTGGGGG 60
TCTTATGTAG TTTTGTATCT GTTTTGCAGC AGCCGCCGCC GCCATGTCCA CGAATTCCTT 120
TGACGGCTCC ATCGTCTCCA GCTACCTGAC CACCCGGATG CCTCCCTGGG CTGGCGTCCG 180
CCAAAACGTC ATGGGAAGCT CCATCGACGG CAGGCCTGTG CTCCCTGCCA ATAGCACCAC 240
TCTGACTTAT GAAACTGTCA GCGGCACCCC ACTGGAACC GCCGCAAGCG CTGCAGCCAG 300
CGCTGCCGCC GCTACTGCTC GCGGCATCGT CACCGATTTC GCCTTTCTCT CCCCCTCTGGC 360
CTCCAGCGCT GCCAGCCGCA GCTCTGCTCG GGACGATAAA CTGACCGCCC TGCTGGCTCA 420
GCTGGACACC CTCACTAGGG AGCTGAACST GGTGAGCCAA CAACTCCTGG ACCTCCGGCA 480
ACAAAGTGAGC GCTCTCAAAG CCTCTAGCCC ACCTAACGCC GTTTAAAACA TAAATAAAAA 540
ACCAGACTCT GTTTGGATTT GGATCAAGCA AGTGTCTTGC TGICTTTACT TAGGAGTTTT 600
CCGCGCGCGG TAGGCCCGAG ACCAGCGGTC TCGGTCGTC AGGGTCCTGT GTATTTTTTC 660
GAGGACGTGG TAAAGGTGGC TCTGGATGTT CAGATACATA GGCATAAGCC CGTCTCTGGG 720
ATGGAGGTAG CACCACTGGA GAGCTTCATG CTGCGGAGTG GTGTTGTAGA TAATCCAGTC 780
GTAGCAGGAC CGCTGGGCGT GGTGCCTGAA AATGTCTTTC AGTAGCAGCC TGATTGCCAG 840
GGGCAGTCCC TTGGTGTAAG TGTTTACGAA GCGGTTAAGC TGGGAGGGGT GCATACGTGG 900
GGATATGAGA TGCATCTTGG ACTGTATTTT TAGGTTCGCG A 941

```

<226>

<227> (2) 서열 번호 4에 대한 정보:

<228> (i) 서열 특성:

<229> (A) 길이: 423 염기쌍

<230> (B) 타입: 뉴클레오티드

<231> (C) 본쇄형: 일본쇄

<232> (D) 토폴로지: 선형

<233> (ii) 분자형: cDNA

<234> (iii) 가정: 없음

<235> (iv) 안티센스: 없음

<236> (ix) 특징:

<237> (A) 명칭/키: CDS

<238> (B) 위치: 1..423

<239>

(xi) 서열 배열: 서열 번호:4:

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

<240>

<241>

(2) 서열 번호 4에 대한 정보:

<242>

(i) 서열 특성:

<243>

(A) 길이: 141 아미노산

<244>

(B) 타입: 아미노산

<245>

(D) 토폴로지: 선형

<246>

(ii) 분자형: 단백질

<247> (xi) 서열 배열: 서열 번호:4:

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

<248>

<249> (2) 서열 번호 5에 대한 정보:

<250> (i) 서열 특성:

<251> (A) 길이: 270 염기쌍

<252> (B) 타입: 뉴클레오티드

<253> (C) 본쇄형: 일본쇄

<254> (D) 토폴로지: 선형

<255> (ii) 분자형: cDNA

<256> (iii) 가정: 없음

<257> (iv) 안티센스: 없음

<258> (ix) 특징:

<259> (A) 명칭/키: CDS

<260> (B) 위치: 1..270

<261> (xi) 서열 배열: 서열 번호: 5

```

ACC AAG GGC CTG CCC CTC GCA ATC AGC TTG CTA CTC AAA GAC ATT TTT      48
Thr Lys Gly Leu Pro Leu Ala Ile Ser Leu Leu Leu Lys Asp Ile Phe
  1              5              10              15

AGG CAT CAC GCC CAG CGC TCC TGT TAC GAC TGG ATC ATC TAC AAT ACC      96
Arg His His Ala Gln Arg Ser Cys Tyr Asp Trp Ile Ile Tyr Asn Thr
              20              25              30

ACC CCG CAG CAT GAA GCC CTC CAG TGG TGC TAC CTG CAC CCC AGA GAC     144
Thr Pro Gln His Glu Ala Leu Gln Trp Cys Tyr Leu His Pro Arg Asp
              35              40              45

GGG CTG ATG CCC ATG TAT CTG AAT ATC CAG AGT CAC CTT TAT CAC GTC     192
Gly Leu Met Pro Met Tyr Leu Asn Ile Gln Ser His Leu Tyr His Val
              50              55              60

CTG GAA AAA ATA CAT AGC ACC CTC AAC GAC CGA GAT CGC TGG TCC CGG     240
Leu Glu Lys Ile His Arg Thr Leu Asn Asp Arg Asp Arg Trp Ser Arg
              65              70              75              80

GCC TAT CGC GCG CGC AAA ACC CCT AAA TAA                               270
Ala Tyr Arg Ala Arg Lys Thr Pro Lys *
              85              90

```

<262>

<263> (2) 서열 번호 5에 대한 정보:

<264> (i) 서열 특성:

<265> (A) 길이: 90 아미노산

<266> (B) 타입: 아미노산

<267> (D) 토폴로지: 선형

<268> (ii) 분자형: 단백질

<269> (xi) 서열 배열: 서열 번호:5:

```

Thr Lys Gly Leu Pro Leu Ala Ile Ser Leu Leu Leu Lys Asp Ile Phe
  1              5              10              15

Arg His His Ala Gln Arg Ser Cys Tyr Asp Trp Ile Ile Tyr Asn Thr
              20              25              30

Thr Pro Gln His Glu Ala Leu Gln Trp Cys Tyr Leu His Pro Arg Asp
              35              40              45

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

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

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

```

<270>

<271> (2) 서열 번호 6에 대한 정보:

<272> (i) 서열 특성:

<273> (A) 길이: 103 염기쌍

<274> (B) 타입: 뉴클레오티드

<275> (C) 본쇄형: 일본쇄

<276> (D) 토폴로지: 선형

<277> (ii) 분자형: 기타 핵산

<278> (iii) 가정: 없음

- <279> (iv) 안티센스: 없음
- <280> (ix) 특징:
- <281> (A) 명칭/키: -
- <282> (B) 위치: 1..103
- <283> (xi) 서열 배열: 서열 번호:6:
- GGCCGGCCGT CGACTGTGTG GCGGTGGCAT AAGGGTGGGA AAGAATATAT AAGGTCGGGG 60
- TCTCATCTAG TCTTGATCTT GATTTCAGT AGCCGCCGCC ACC 103
- <284>
- <285> (2) 서열 번호 7에 대한 정보:
- <286> (i) 서열 특성:
- <287> (A) 길이: 52 염기쌍
- <288> (B) 타입: 뉴클레오티드
- <289> (C) 본쇄형: 일본쇄
- <290> (D) 토폴로지: 선형
- <291> (ii) 분자형: cDNA
- <292> (iii) 가정: 없음
- <293> (iv) 안티센스: 없음
- <294> (ix) 특징:
- <295> (A) 명칭/키: -
- <296> (B) 위치: 1..52
- <297> (xi) 서열 배열: 서열 번호:7:
- AGATCTCAAA TCAATAAATA AAGAAATACT TGTATATAAA ACAATGAAT GT 52
- <298>
- <299> (2) 서열 번호 8에 대한 정보:
- <300> (i) 서열 특성:
- <301> (A) 길이: 847 염기쌍
- <302> (B) 타입: 뉴클레오티드
- <303> (C) 본쇄형: 일본쇄
- <304> (D) 토폴로지: 선형
- <305> * (ii) 분자형: 기타 핵산
- <306> (iii) 가정: 없음
- <307> (iv) 안티센스: 없음
- <308> (ix) 특징:
- <309> (A) 명칭/키: -
- <310> (B) 위치: 1..847

<311> (xi) 서열 배열: 서열 번호:8:

```

GCCCCGCCGT CGACTGTGTG GGCCTGGCAT AAGGCTGGGA AAGAATATAT AAGGTCGGGG 60
TCTCATCTAG TCTTGTATCT GATTTCAGT AGCCCCGCC ACCATGAGCA CGAATTCGTT 120
TGACGGAAGC ATCGTCAGCT CATACTTGAC CACGCCCATG CCTCCCTGGG CCGGGGTGCG 180
CCAGAATGTC ATGGGCTCCA GCATTGACGG TCGCCCTGTC CTGCCTGCAA ACTCTACCAC 240
TTTGACCTAC GAAACCGTGT CTGGCAGGCC GTTGGAACCT GCAGCATCCG CCGCCGCTAG 300
CGCCGCTGCA GCTACCGCCC GCGGGATCGT GACTGATTTT GCTTTTCTGA GCCCGCTTGC 360
CAGCAGTGCA GCCTCCCGTT CATCTGCCCG CGATGACAAA TTGACGGCTC TTCCTGGCTCA 420
GCTGGATTCT TTGACTCGGG AACTTAACGT CGTTTCTCAG CAACTGTTGG ACCTGCGCCA 480
GCAAGTTTCT CCCCICAAGG CTTCTTCCCC TCCCAATGCC GTTTAAAGAT CTCAAATCAA 540
TAAATAAAGA AATACTTGT ATAAAAACAA ATGAATGTTT ATTTAGGGST TTTGCGCGCG 600
CGATAGGCCG GGGACCAGCG ATCTCGGTCG TTGAGGGTCC TATGTATTTT TTCCAGGACG 660
TGATAAAGGT GACTCTGGAT ATTCAGATAC ATGGGCATCA GCCCGTCTCT GGGGTGCAGG 720
TAGCACCACT GCACGGCTTC ATGCTGCGGG GTGGIATTGT AGATGATCCA GTCGTAACAG 780
GAGCGCTGGG CGTGATCCCT AAAAATCTCT TTGAGTAGCA AGCTGATTGC GAGGGGCAGG 840
CCCTTGG 847

```

<312>

<313> (2) 서열 번호 9에 대한 정보:

<314> (i) 서열 특성:

<315> (A) 길이: 44 염기쌍

<316> (B) 타입: 뉴클레오티드

<317> (C) 본쇄형: 일본쇄

<318> (D) 토폴로지: 선형

<319> (ii) 분자형: 기타 핵산

<320> (iii) 가정: 없음

<321> (iv) 안티센스: 없음

<322> (ix) 특징:

<323> (A) 명칭/키: -

<324> (B) 위치: 1..44

<325> (xi) 서열 배열: 서열 번호:9:

<326> AACTGCAGGCCGGCCACTAGTCGCGATGTTCCAGCCATATCCC

<327> (2) 서열 번호 10에 대한 정보:

<328> (i) 서열 특성:

<329> (A) 길이: 37 염기쌍

<330> (B) 타입: 뉴클레오티드

<331> (C) 본쇄형: 일본쇄

<332> (D) 토폴로지: 선형

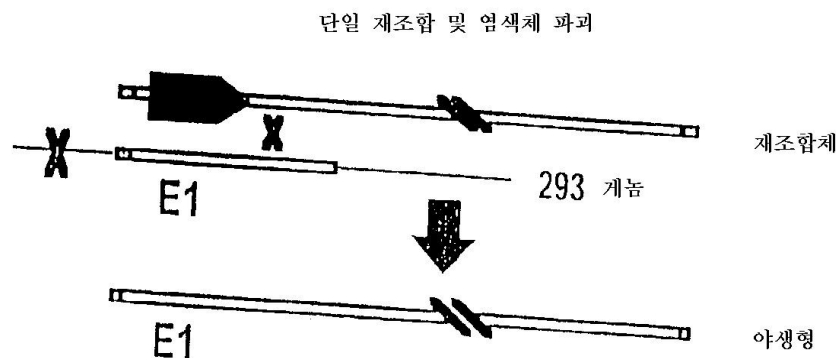
- <333> (ii) 분자형: 기타 핵산
- <334> (iii) 가정: 없음
- <335> (iv) 안티센스: 없음
- <336> (ix) 특징:
- <337> (A) 명칭/키: -
- <338> (B) 위치: 1..37
- <339> (xi) 서열 배열: 서열 번호:10:
- <340> CCGCTCGAGGTGACCGCTAGCCATTATSGACCAATGC

도면의 간단한 설명

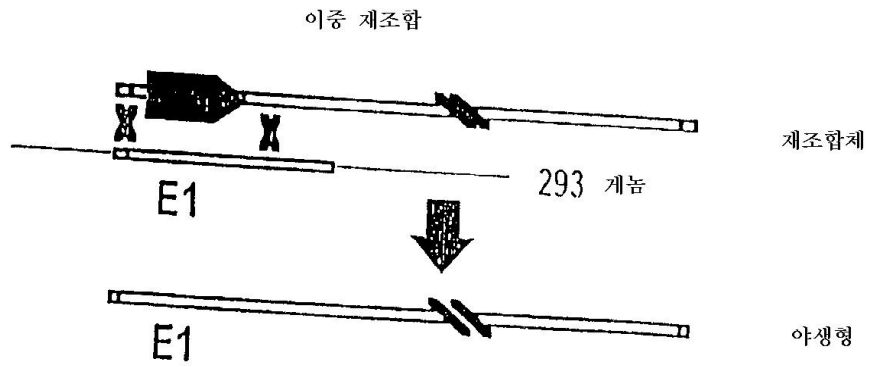
- <341> 도 1: 아데노바이러스와 293 계통간의 재조합
- <342> 도 2: syngen의 개략적인 구조
- <343> 도 3: 플라스미드 pJJ 105의 제한 유전자 지도
- <344> 도 4: 플라스미드 pJJ 110의 제한 유전자 지도
- <345> 도 5: 플라스미드 pJJ 206의 제한 유전자 지도
- <346> 도 6: 본래 영역의 대체물로서 syngen을 운반하는 결손 바이러스의 작제.
- <347> 도 7: 올리고뉴클레오티드 Oligosyngen I과 Oligosyngen II의 구조 및 제한 유전자 지도.
- <348> 도 8: pIX 유전자의 본래 뉴클레오티드 서열과 축퇴 서열(서열 번호 1), 및 상응하는 아미노산 서열
- <349> 도 9: Iva2 유전자의 본래 뉴클레오티드 서열과 축퇴 서열(서열 번호 2), 및 상응하는 아미노산 서열.
- <350> 도 10: syngen #1의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 3)
- <351> 도 11: 293 세포의 계놈과 재조합 Ad5 벡터간의 상동성의 개략적인 설명. 벡터 Ad5p53은 E1 영역의 하류의 293 세포의 계놈과 함께 898 뉴클레오티드의 연속 서열 상동성을 가진다. 점 돌연변이의 도입은 syngen #1(AV 1.7 # 1 CMV p53)의 경우 92 뉴클레오티드 및 syngen #2(AV 1.7 #2 CMV lac Z)의 경우 29 뉴클레오티드에 연속 상동성의 최대 길이를 감소시킨다.
- <352> 도 12: 293-계통 세포에서 7회 연속 증폭 후 벡터 ad5p53과 AV 1.7 # 1 p53에 대한 RCA 검출.

도면

도면1a

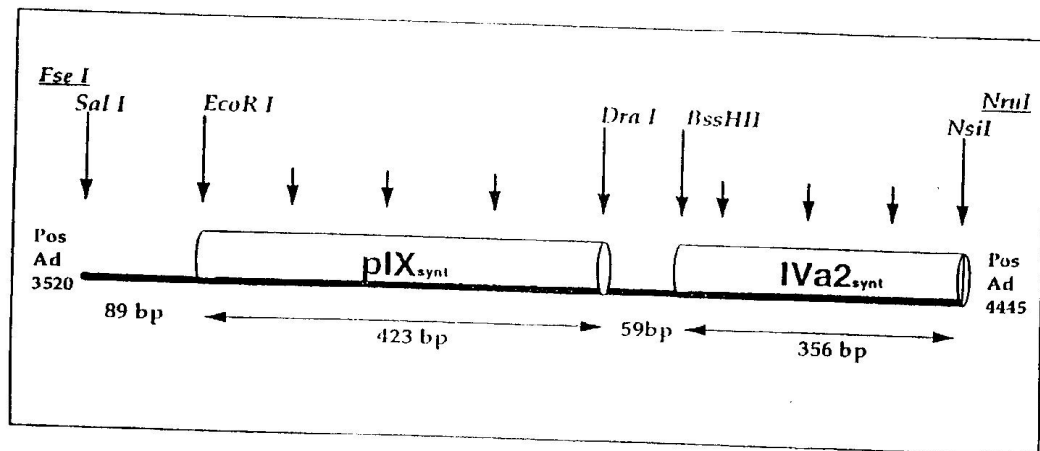


도면1b

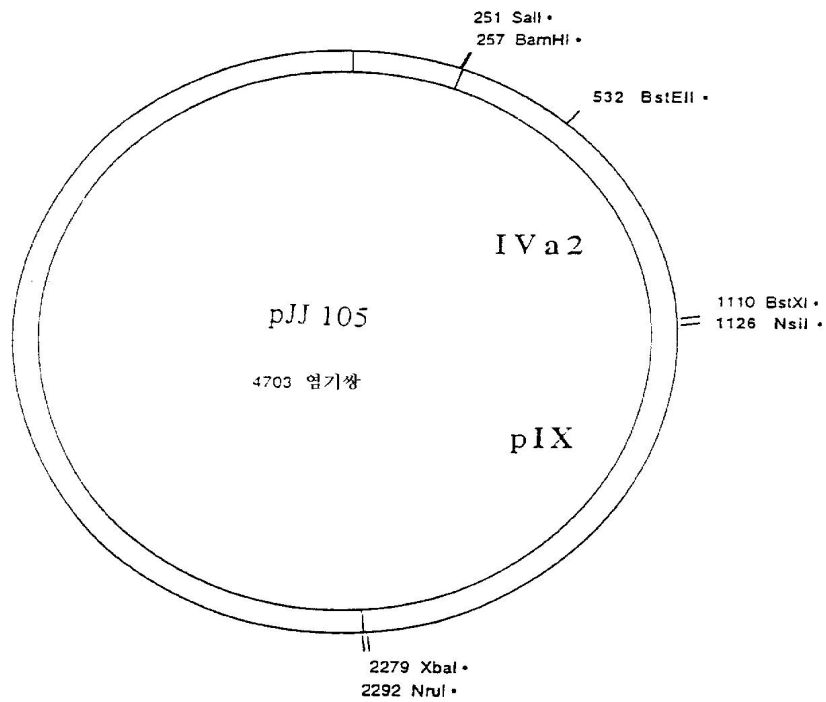


도면2

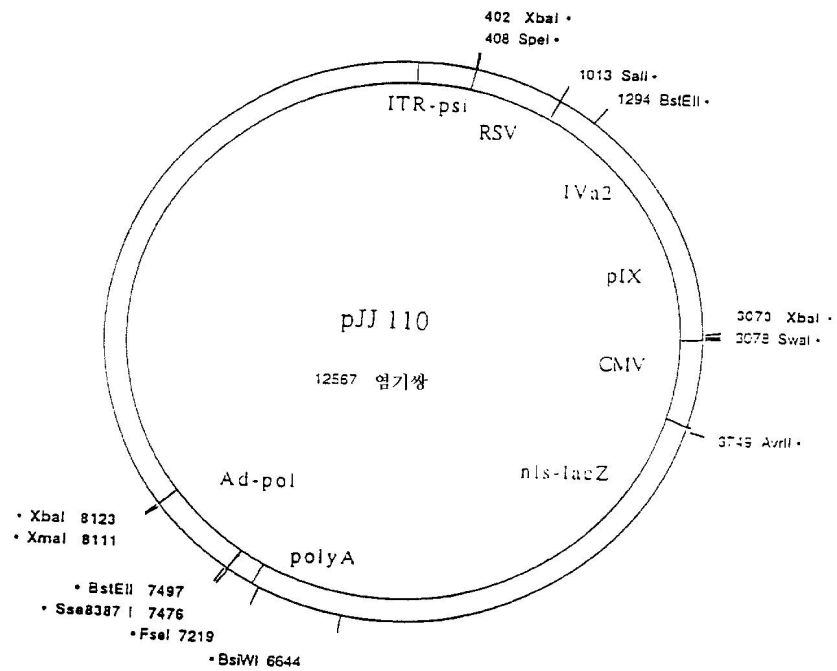
SYNGENE



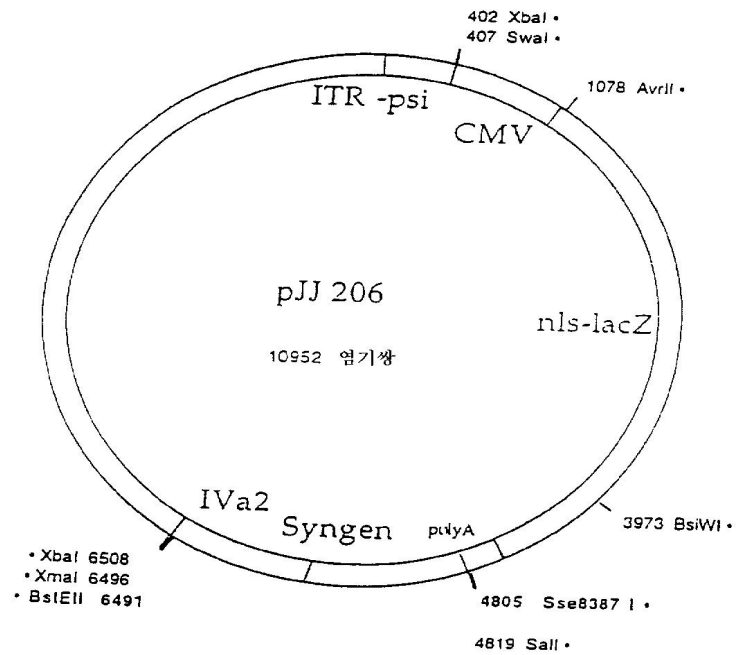
도면3



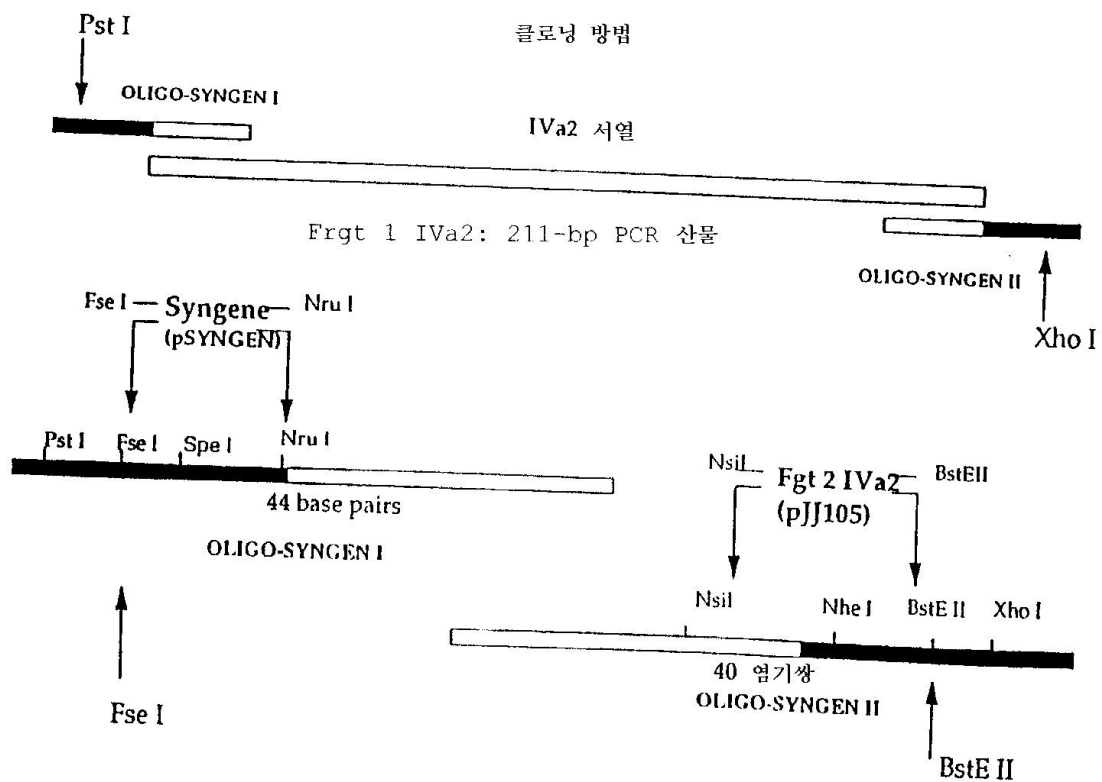
도면4



도면5



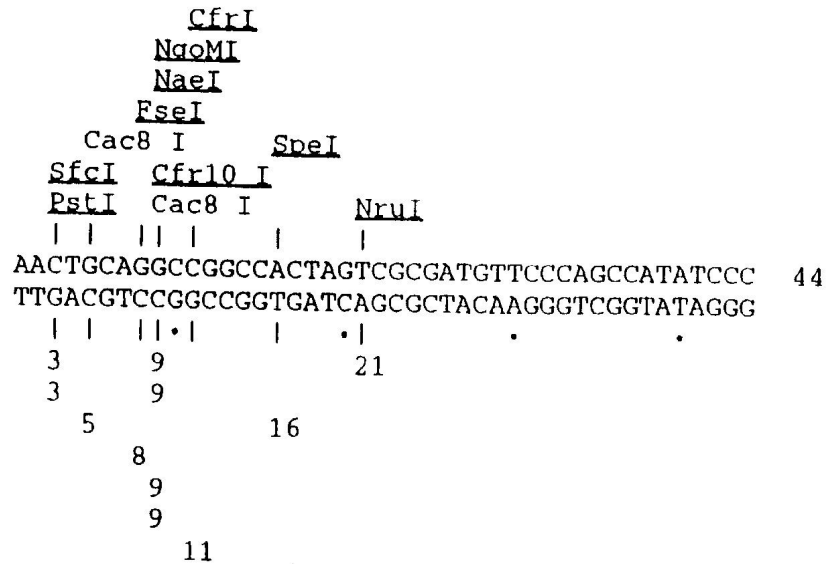
도면6



도면7a

OLIGO-SYNGEN I -> 제한 유전자 지도

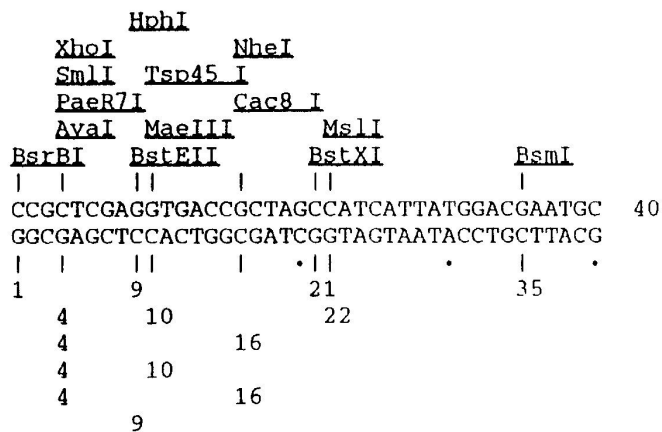
DNA 서열 44 b.p. AACTGCAGGCCG ... CAGCCATATCCC 선형



도면7b

OLIGO-SYNGEN II -> 제한 유전자 지도

DNA 서열 40 b.p. CCGCTCGAGGTG ... ATGGACGAATGC 선형



도면8a

pIX 에서 축퇴

1/1

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

31/11

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

61/21

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

91/31

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

121/41

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

151/51

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

181/61

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

도면8b

211/71

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

241/81

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

271/91

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

301/101

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

331/111

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

361/121

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

391/131

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

421/141

TAA

TAA

도면9a

IVa2 에서 축퇴

1/1

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

31/11

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

61/21

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

91/31

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

121/41

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

151/51

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

181/61

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

도면9b

211/71

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

241/81

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

271/91

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

301/101

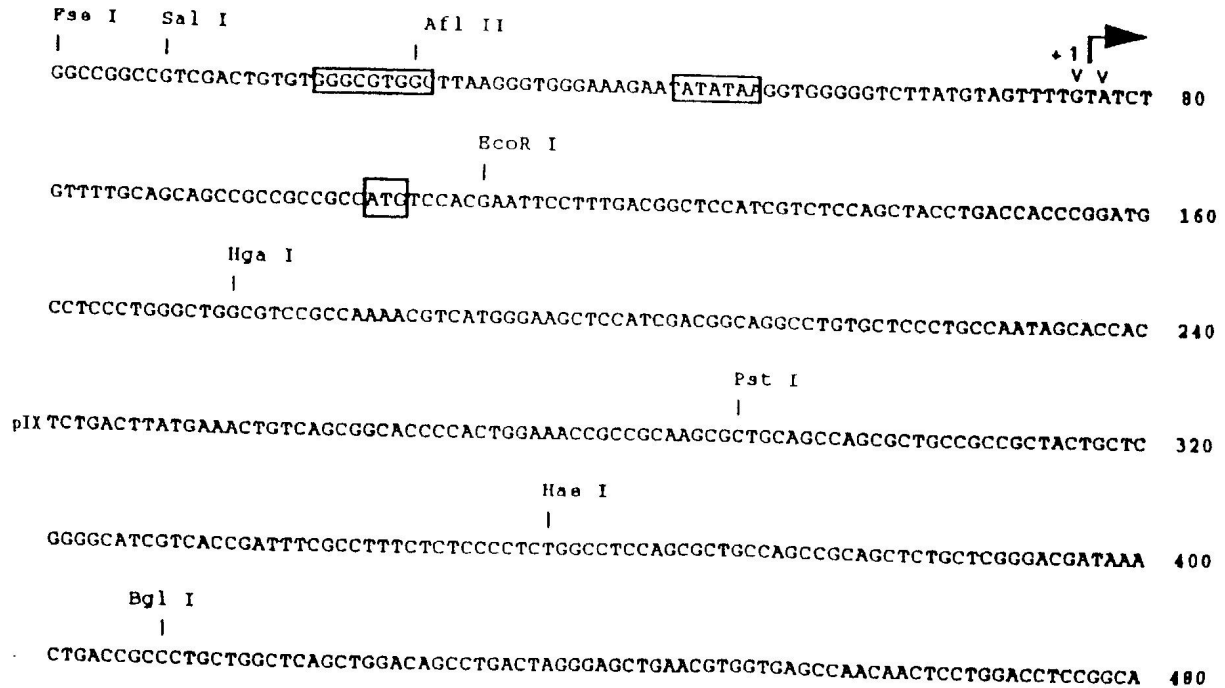
CTG AAC GAC CGA GAC CGC TGG TCT CGG GCC
CTC AAC GAC CGA GAC CGC TGG TCC CGG GCC
leu asn asp arg asp arg trp ser arg ala

331/111

TAC CGC GCG CGG AAA ACC CCT AAA TAA
TAC CGC GCG CGC AAA ACC CCT AAA TAA
tyr arg ala arg lys thr pro lys OCH

도면10a

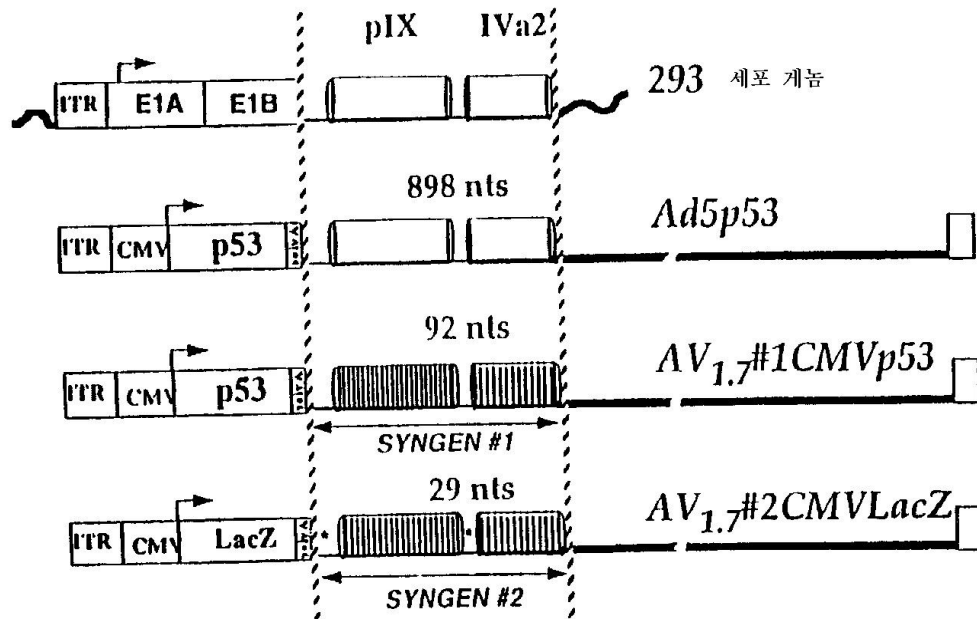
SYNGENE



도면10b



도면11



도면12

벡터 ad5p53 과 AV1.7p53 에서 유도된 5 상이한 플라크의
7회 연속 증폭 후의 RCA 검출

● 세 개조의 증폭 7회 실험에서 유도된 샘플에서 RCA 를 검출한 실험 결과

	ad5CMVp53					x	AV1.7CMVp53				
Exp 1	0	1	0	1	0		0	0	0	0	0
Exp 2	0	0	0	2	0		0	0	0	0	0
Exp 3	0	2	0	0	0		0	0	0	0	0
시험된 입자	4.5E+11						4.5E+11				
RCA 수	6*						0				

● 통계학적 분석 : 관찰 결과의 조건부 확률 연구

*: 얻어진 결과는 상이함 ; $p < 5\%$ -

신뢰 구간 = 98.5%

서열목록

<110> BOUVET Philippe;AVENTIS PHARMA S.A.

<120> ADENOVIRUS VECTORS AND METHOD FOR REDUCING HOMOLOGOUS RECOMBINATI
ON PHENOMENA

<130> PCT/FR98/02453

<150> PCT/FR 97/14,383

<151> 1997-11-17

<160> 14

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 424

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> This sequence is the degenerate sequence of the pIX gene

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(420)

<400> 1

atg tcc acg aat tcc ttt gac ggc tcc atc gtc tcc agc tac ctg acc 48
Met Ser Thr Asn Ser Phe Asp Gly Ser Ile Val Ser Ser Tyr Leu Thr
1 5 10 15

acc cgg atg cct ccc tgg gct ggc gtc cgc caa aac gtc atg gga agc 96
Thr Arg Met Pro Pro Trp Ala Gly Val Arg Gln Asn Val Met Gly Ser
20 25 30

tcc atc gac ggc agg cct gtg ctc cct gcc aat agc acc act ctg act 144
Ser Ile Asp Gly Arg Pro Val Leu Pro Ala Asn Ser Thr Thr Leu Thr
35 40 45

tat gaa act gtc agc ggc acc cca ctg gaa acc gcc gca agc gct gca 192
Tyr Glu Thr Val Ser Gly Thr Pro Leu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Ala
50 55 60

gcc agc gct gcc gcc gct act gct cgg ggc atc gtc acc gat ttc gcc 240
Ala Ser Ala Ala Ala Thr Ala Arg Gly Ile Val Thr Asp Phe Ala
65 70 75 80

ttt ctc tcc cct ctg gcc tcc agc gct gcc agc cgc agc tct gct cgg 288
Phe Leu Ser Pro Leu Ala Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ala Arg
85 90 95

gac gat aaa ctg acc gcc ctg ctg gct cag ctg gac agc ctg act agg 336
Asp Asp Lys Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gln Leu Asp Ser Leu Thr Arg
100 105 110

gag ctg aac gtg gtg agc caa caa ctc ctg gac ctc cgg caa caa gtg 384
Glu Leu Asn Val Val Ser Gln Gln Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gln Val
115 120 125

agc gct ctc aaa gcc tct agc cca cct aac gcc gtt taaa 424
Ser Ala Leu Lys Ala Ser Ser Pro Pro Asn Ala Val
130 135 140

<210> 2

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> This sequence is the degenerate sequence of IVa2 genes

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<400> 3

atc gcg aac cta aaa ata cag tcc aag atg cat ctg ata tcc cca cgt 48
Ile Ala Asn Leu Lys Ile Gln Ser Lys Met His Leu Ile Ser Pro Arg
1 5 10 15

atg cac ccc tcc cag ctt aac cgc ttc gta aac act tac acc aag gga 96
Met His Pro Ser Gln Leu Asn Arg Phe Val Asn Thr Tyr Thr Lys Gly
20 25 30

ctg ccc ctg gca atc agc ctg cta ctg aaa gac att ttc agg cac cac 144
Leu Pro Leu Ala Ile Ser Leu Leu Leu Lys Asp Ile Phe Arg His His
35 40 45

gcc cag cgg tcc tgc tac gac tgg att atc tac aac acc act ccg cag 192
Ala Gln Arg Ser Cys Tyr Asp Trp Ile Ile Tyr Asn Thr Thr Pro Gln

50	55	60	
cat gaa gct ctc cag tgg tgc tac ctc cat ccc aga cac ggg ctt atg			240
His Glu Ala Leu Gln Trp Cys Tyr Leu His Pro Arg His Gly Leu Met			
65	70	75	80
cct atg tat ctg aac atc cag agc cac ctt tac cac gtc ctc gaa aaa			288
Pro Met Tyr Leu Asn Ile Gln Ser His Leu Tyr His Val Leu Glu Lys			
85	90		95
ata cac agg acc ctg aac gac cga gac cgc tgg tct cgg gcc tac cgc			336
Ile His Arg Thr Leu Asn Asp Arg Asp Arg Trp Ser Arg Ala Tyr Arg			
100	105		110
gcg cgg aaa acc cct aaa taa			357
Ala Arg Lys Thr Pro Lys			
115			
<210>	4		
<211>	118		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<400>	4		
Ile Ala Asn Leu Lys Ile Gln Ser Lys Met His Leu Ile Ser Pro Arg			
1	5	10	15
Met His Pro Ser Gln Leu Asn Arg Phe Val Asn Thr Tyr Thr Lys Gly			
20	25		30
Leu Pro Leu Ala Ile Ser Leu Leu Leu Lys Asp Ile Phe Arg His His			
35	40		45
Ala Gln Arg Ser Cys Tyr Asp Trp Ile Ile Tyr Asn Thr Thr Pro Gln			
50	55		60
His Glu Ala Leu Gln Trp Cys Tyr Leu His Pro Arg His Gly Leu Met			
65	70	75	80
Pro Met Tyr Leu Asn Ile Gln Ser His Leu Tyr His Val Leu Glu Lys			
85	90		95

Ile His Arg Thr Leu Asn Asp Arg Asp Arg Trp Ser Arg Ala Tyr Arg
100 105 110

Ala Arg Lys Thr Pro Lys
115

<210> 5

<211> 941

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> This sequence is nucleotide sequence of syngen # 1

<220>

<221> exon

<222> (1)..(941)

<400> 5

ggccggccgt cgactgtgtg ggcgtggctt aagggtggga aagaatatat aaggtggggg 60

tcttatgtag ttttgtatct gttttgcagc agccgccgcc gccatgtcca cgaattcctt 120

tgacggctcc atcgtctcca gctacctgac caccggatg cctccctggg ctggcgtccg 180

cctaaacgtc atgggaagct ccatcgacgg caggcctgtg ctccttgcca atagcaccac 240

tctgacttat gaaactgtca gcggcacccc actggaaacc gccgaagcg ctgcagccag 300

cgctgccgcc gctactgtc ggggcatcgt caccgatitc gcctttctct cccctctggc 360

ctccagcgt gccagccgca gctctgctcg ggacgataaa ctgaccgcc tgctggtca 420

gtgggacagc ctgactaggg agctgaacgt ggtgagccaa caactcctgg acctccgca 480

acaagtgagc gctctcaaag cctctagccc acctaacgcc gtttaaaaca taaataaaaa 540

accagactct gtttggattt ggatcaagca agtgtcttgc tgtctttatt taggagtttt 600

ccgcgcgcgg taggcccagag accagcggtc tcggtcgttc agggtcctgt gtattttttc 660

gaggacgtgg taaagggtggc tctggatgtt cagatacata ggcataagcc cgtctctggg 720

atggaggttag caccactgga gagcttcatg ctgcggagtg gtgtttaga taatccagtc 780

glagcaggac cgctgggcgt ggtgcctgaa aatgtctttc agtagcaggc tgattgccag 840

gggcagtcctc ttggtgtaag tgtttacgaa gcggttaagc tgggaggggt gcatacgtgg 900

ggatatgaga tgcattcttg actgtatttt taggttcgcg a 941

<210> 6

<211> 423

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> This sequence is the degenerate sequence of the pIX gene

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(420)

<400> 6

atg agc acg aat tcg ttt gac gga agc atc gtc agc tca tac ttg acc 48
Met Ser Thr Asn Ser Phe Asp Gly Ser Ile Val Ser Ser Tyr Leu Thr
1 5 10 15

acg cgc atg cct ccc tgg gcc ggg gtg cgc cag aat gtc atg ggc tcc 96
Thr Arg Met Pro Pro Trp Ala Gly Val Arg Gln Asn Val Met Gly Ser
20 25 30

agc att gac ggt cgc cct gtc ctg cct gca aac tct acc act ttg acc 144
Ser Ile Asp Gly Arg Pro Val Leu Pro Ala Asn Ser Thr Thr Leu Thr

35	40	45	
tac gaa acc gtg tct ggc acg ccg ttg gaa act gca gca tcc gcc gcc Tyr Glu Thr Val Ser Gly Thr Pro Leu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Ala 50 55 60			192
gct agc gcc gct gca gct acc gcc cgc ggg atc gtg act gat ttt gct Ala Ser Ala Ala Ala Thr Ala Arg Gly Ile Val Thr Asp Phe Ala 65 70 75 80			240
ttt ctg agc ccg ctt gcc agc agt gca gcc tcc cgt tca tct gcc cgc Phe Leu Ser Pro Leu Ala Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ala Arg 85 90 95			288
gat gac aaa ttg acg gct ctt ctg gct cag ctg gat tct ttg act cgg Asp Asp Lys Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gln Leu Asp Ser Leu Thr Arg 100 105 110			336
gaa ctt aac gtc gtt tct cag caa ctg ttg gac ctg cgc cag caa gtt Glu Leu Asn Val Val Ser Gln Gln Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gln Val 115 120 125			384
tct gcc ctc aag gct tct tcc cct ccc aat gcc gtt taa Ser Ala Leu Lys Ala Ser Ser Pro Pro Asn Ala Val 130 135 140			423
<210> 7			
<211> 140			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<400> 7			
Met	Ser	Thr	Asn Ser Phe Asp Gly Ser Ile Val Ser Ser Tyr Leu Thr
1		5	10 15
Thr Arg Met Pro Pro Trp Ala Gly Val Arg Gln Asn Val Met Gly Ser			
	20	25	30
Ser Ile Asp Gly Arg Pro Val Leu Pro Ala Asn Ser Thr Thr Leu Thr			
35	40	45	
Tyr Glu Thr Val Ser Gly Thr Pro Leu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Ala			

50	55	60	
Ala Ser Ala Ala Ala Ala Thr Ala Arg Gly Ile Val Thr Asp Phe Ala			
65	70	75	80
Phe Leu Ser Pro Leu Ala Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ala Arg			
	85	90	95
Asp Asp Lys Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gln Leu Asp Ser Leu Thr Arg			
	100	105	110
Glu Leu Asn Val Val Ser Gln Gln Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gln Val			
	115	120	125
Ser Ala Leu Lys Ala Ser Ser Pro Pro Asn Ala Val			
	130	135	140
<210>	8		
<211>	270		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	This sequence is the degenerate sequence of the IVa2 gene		
<220>			
<221>	CDS		
<222>	(1)..(267)		
<400>	8		
acc aag ggc ctg ccc ctc gca atc agc ttg cta ctc aaa gac att ttt			48
Thr Lys Gly Leu Pro Leu Ala Ile Ser Leu Leu Leu Lys Asp Ile Phe			
1	5	10	15
agg cat cac gcc cag cgc tcc tgt tac gac tgg atc atc tac aat acc			96
Arg His His Ala Gln Arg Ser Cys Tyr Asp Trp Ile Ile Tyr Asn Thr			
	20	25	30
acc ccg cag cat gaa gcc ctg cag tgg tgc tac ctg cac ccc aga gac			144
Thr Pro Gln His Glu Ala Leu Gln Trp Cys Tyr Leu His Pro Arg Asp			

35 40 45

ggg ctg atg ccc atg tat ctg aat atc cag agt cac ctt tat cac gtc 192
Gly Leu Met Pro Met Tyr Leu Asn Ile Gln Ser His Leu Tyr His Val

50 55 60

ctg gaa aaa ata cat agg acc ctc aac gac cga gat cgc tgg tcc cgg 240
Leu Glu Lys Ile His Arg Thr Leu Asn Asp Arg Asp Arg Trp Ser Arg
65 70 75 80

gcc tat cgc gcg cgc aaa acc cct aaa taa 270
Ala Tyr Arg Ala Arg Lys Thr Pro Lys
85

<210> 9

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 9
 Thr Lys Gly Leu Pro Leu Ala Ile Ser Leu Leu Leu Lys Asp Ile Phe
 1 5 10 15

Arg His His Ala Gln Arg Ser Cys Tyr Asp Trp Ile Ile Tyr Asn Thr
20 25 30

Thr Pro Gln His Glu Ala Leu Gln Trp Cys Tyr Leu His Pro Arg Asp
35 40 45

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

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

Ala Tyr Arg Ala Arg Lys Thr Pro Lys
85

<210> 10

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> This sequence is a modified sequence and replaces the sequence of the pIX gene promoter

<400> 10

ggccggccgt cgactgtgtg ggcgtggcat aagggtggga aagaatatat aaggtcgggg 60

tctcatctag tcttgtatct gatttgcagt agccgccgcc acc 103

<210> 11

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> This sequence is a modified sequence and replaces the polyadenylation region of the adenovirus

<400> 11

agatctcaaa tcaataaata aagaaatact tgttataaaa acaaatgaat gt 52

<210> 12

<211> 847

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> This sequence is nucleotide sequence of syngen # 2

<400> 12

ggccggccgt cgactgtgtg ggcgtggcat aagggtggga aagaatatat aaggtcgggg 60

tctcatctag tcttgtatct gatttgcagt agccgccgcc accatgagca cgaattcgtt	120
tgacggaagc atcgtcagct catacttgac cacgcgcatg cctccctggg cgggggtgcg	180
ccagaatgtc atgggctcca gcattgacgg tcgccctgtc ctgcctgcaa actctaccac	240
tttgacctac gaaaccgtgt ctggcacgcc gttggaaact gcagcatccg ccgccgctag	300
cgccgctgca gctaccgccc gcgggatcgt gactgatttt gcttttctga gcccgttgc	360
cagcagtgca gcctcccgtt catctgcccg cgatgacaaa ttgacggctc ttttggtca	420
gctggattct ttgactcggg aacttaacgt cgtttctcag caactgttgg acctgcgcca	480
gcaagtttct gccctcaagg cttcttcccc tccaatgcc gtttaaagat ctcaaataa	540
taaataaaga aatacttgtt ataaaaacaa atgaatgttt atttaggggt tttgcgcgcg	600
cgataggccc gggaccagcg atctcggtcg ttgagggtcc tatgtatttt ttccaggacg	660
tgataaaggt gactctggat attcagatac atgggcatca gcccgctctc ggggtgcagg	720
tagcaccact gcagggttc atgctgcggg gtggtattgt agatgatcca gtcgtaacag	780
gagcgtggg cgtgatgcct aaaaatgtct ttgagtagca agctgattgc gaggggcagg	840
cccttgg	847

<210> 13

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> This is the sequence of the oligo syngen I.

<400> 13
aactgcaggc cggccactag tcgcgatgtt cccagccata tccc 44

<210> 14

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> This is the sequence of the oligo syngen II.

<400> 14
ccgctcgagg tgaccgctag ccattatgga cgaatgc 37