



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I582108 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 05 月 11 日

(21)申請案號：101107160

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 03 日

(51)Int. Cl. : C07K14/505 (2006.01)

C12N15/861 (2006.01)

A61K35/76 (2015.01)

C12N15/86 (2006.01)

(30)優先權：2011/03/04 美國

61/449,536

2011/04/25 美國

61/478,881

2011/05/26 美國

61/490,535

2011/11/21 美國

61/562,342

(71)申請人：英翠克頌公司(美國) INTREXON CORPORATION (US)

美國

(72)發明人：羅斯 傑瑞明 ROETH, JEREMIAH F. (US)；瑞德 查理斯 REED, CHARLES C.

(US)；卡斯柏森 布蘭登 CUTHBERTSON, BRANDON (US)；查達 桑尼爾

CHADA, SUNIL (US)；佛克勒 威廉 FOGLER, WILLIAM E. (US)；哈理 法雅

茲 KHAZI, FAYAZ (IN)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

US 2004/0096942A1

Rivera VM et al., "Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer", Blood, vol.105, no.4, p.1424-1430, 2005/02/15

Chenuaud P et al., "Optimal Design of a Single Recombinant Adeno-associated Virus Derived from Serotypes 1 and 2 to Achieve More Tightly Regulated Transgene Expression from Nonhuman Primate Muscle", Molecular Therapy, vol.9, no.3, p.410-418, 2004/03

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：15 共 275 頁

(54)名稱

條件性表現蛋白質之載體類

VECTORS CONDITIONALLY EXPRESSING PROTEIN

(57)摘要

本發明關於治療劑之領域。最特別地，本發明提供條件性表現產製一或多種蛋白質之方法及在動物體內供治療目的之用途，該一或多種蛋白質之條件性表現係在活化配體存在下受基因表現調節系統之控制。該載體可被提供以治療或預防疾病。

This invention relates to the field of therapeutics. Most specifically, the invention provides methods of generating conditionally expressing one or more proteins under the control of a gene expression modulation system in the presence of activating ligand and uses for therapeutic purposes in animals. The vector may be provided to treat or prevent disease.

指定代表圖：

圖 1A

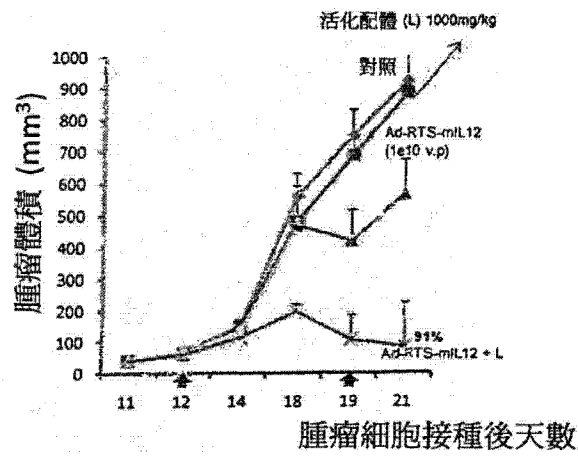
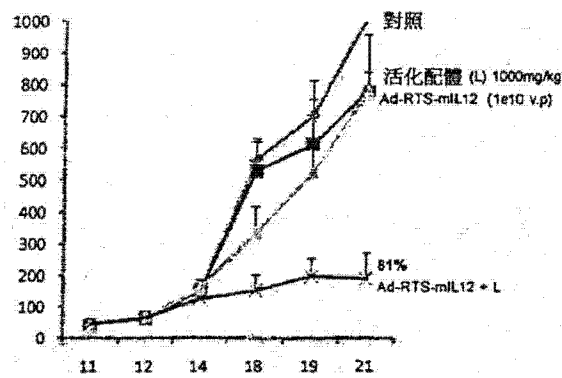
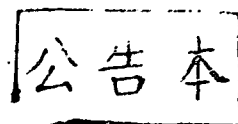


圖 1B





發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101107160

※申請日：101 年 03 月 03 日

※IPC 分類：

C07K14/505 (2006.01)

C12N15/861 (2006.01)

A61K35/76 (2006.01)

C12N15/86 (2006.01)

一、發明名稱：(中文／英文)

條件性表現蛋白質之載體類

Vectors conditionally expressing protein

二、中文發明摘要：

本發明關於治療劑之領域。最特別地，本發明提供條件性表現產製一或多種蛋白質之方法及在動物體內供治療目的之用途，該一或多種蛋白質之條件性表現係在活化配體存在下受基因表現調節系統之控制。該載體可被提供以治療或預防疾病。

三、英文發明摘要：

This invention relates to the field of therapeutics. Most specifically, the invention provides methods of generating conditionally expressing one or more proteins under the control of a gene expression modulation system in the presence of activating ligand and uses for therapeutic purposes in animals. The vector may be provided to treat or prevent disease.

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

六、發明說明：

參照經電子申請系統（EFS-WEB）提交之序列表

與本申請案一起提出之電子檔序列表的內容（檔名：SequenceListing.ascii.txt，大小：153,629 位元組，建立日期：2012 年 3 月 2 日）係以參照方式整體納入本文。

【發明所屬之技術領域】

本發明關於條件性表現蛋白質之載體類。

【先前技術】

介白素-12（IL-12）係第一型細胞介素家族之成員，其涉及造成多種生物程序，其包括但不限於保護性免疫反應及抑制腫瘤發生（Abdi et al., 2006; Adorini, 1999; Adorini, 2001; Adorini et al., 2002; Adorini et al., 1996; Akhtar et al., 2004; Akiyama et al., 2000; Al-Mohanna et al., 2002; Aliberti et al., 1996; Allavena et al., 1994; Alli and Khar, 2004; Alzona et al., 1996; Amemiya et al., 2006; Araujo et al., 2001; Arulanandam et al., 1999; Athie et al., 2000; Athie-Morales et al., 2004; Bertagnolli et al., 1992; Bhardwaj et al., 1996; Biedermann et al., 2006; Brunda and Gately, 1994; Buchanan et al., 1995; Romani et al., 1997; Rothe et al., 1996; Satoskar et al., 2000; Schopf et al., 1999; Thomas et al., 2000; Tsung et al., 1997; Wolf et al., 1994; Yuminamochi et al., 2007）。越

來越多證據顯示 IL-12 可能是控制人疾病（例如癌）之有效目標。

雖然 IL-12 可能是有效之癌治療劑（基於對第 1 型抗腫瘤 NK 細胞、 $CD4^+$ T 細胞及 $CD8^+$ T 細胞具有強效之支持活性（Trinchieri, 2003）），但是重組人 IL-12（rhIL-12）在病患之報告毒性（Atkins et al., 1997），連同供臨床應用之 GMP 級 rhIL-12 之有限來源使得以 IL-12 為基底之治療方法無法成功。因此認為基因療法代表更安全、更可行之治療選擇似乎是合理的。事實上，在腫瘤內或腫瘤周圍遞送以病毒（Sangro et al., 2004; Triozzi et al., 2005）或質體為基底之重組 IL-12 cDNA（Heinzerling et al., 2005）或經 IL-12 基因改質之自體纖維母細胞（Kang et al., 2001）之第一期臨床試驗已被認為係安全的且耐受性佳。

然而，在接受這些基因療法之黑色素瘤病患或罹患不同癌之病患中很少出現客觀之臨床反應，或臨床反應不一致或為短暫的，且大部分之臨床反應侷限於治療部位（Heinzerling et al., 2005; Kang et al., 2001; Sangro et al., 2004; Triozzi et al., 2005）。在疾病部分或完全緩解之病例中，注意到腫瘤浸潤性淋巴細胞之數量增加（Heinzerling et al., 2005; Sangro et al., 2004）及循環中腫瘤特異性 $CD8^+$ T 細胞之量增加（Heinzerling et al., 2005），這些發現與病患體內之抗原特異性 T 細胞之交叉敏化增加一致。

由於作為 IL-12 之天然但經調節之來源的樹突細胞 (DC) 最能交叉敏化特異性 T 細胞 (Berard et al., 2000) , 因此最近以 DC 為基底之 IL-12 基因療法之優異的臨床前療效之報告已引起高度關注 (Sato et al., 2002; Tatsumi et al., 2003; Yamanaka et al., 2002) 。舉例來說 , 研究顯示在鼠模型中經腫瘤內 (i.t.) 注射經工程化以產製 IL-12p70 之 DC (經由重組腺病毒感染) 導致顯著增加廣泛反應性、腫瘤特異性 CD8⁺ T 細胞貯庫之交叉敏化與腫瘤排斥 (Tatsumi et al., 2003) 。考慮先前使用在 CMV 啟動子之控制下編碼 mIL-12 之重組腺病毒 (rAd.cIL12, (Tatsumi et al., 2003)) , 經工程化之 DC 所產製之 IL-12 係組成性的, 因此就治療結果而言, 此細胞介素在腫瘤病灶內之早期免疫影響及在腫瘤引流淋巴結內之晚期免疫影響問題無法被解決。因此, 我們需要經工程化以條件性表現 IL-12 之 DC, 以達調節轉基因表現之量及適時活化轉基因之目的。本發明提供使用該等細胞之有希望之治療結果。

有鑑於與透過包含由感興趣之核酸序列所編碼之蛋白質的載體組成物進行基因之基因表現有關之問題, 仍然需要經改善之轉運載體組成物以用於直接注射或用於細胞基底療法。

紅血球生成素 (EPO) 藉由控制在骨髓中之紅血球祖細胞之增生、分化及存活, 在調節紅血球產製上扮演關鍵角色。缺乏 EPO 蛋白導致貧血。以重組人 EPO (huEPO)

治療有效且安全地改善與慢性疾病有關之貧血的處理。雖然蛋白質療法能成功治療，但有多種不良反應之報告出現。舉例來說，病患可能對 EPO 具抗藥性，亦可能對該生物製劑具低反應性。另外，在因為化學療法導致貧血之病患的臨床試驗中觀察到 rHuEPO 蛋白質增加致死性。因此，在此領域中仍需要 EPO 遞送方法以治療貧血並防止目前可用之遞送方法的缺點。

多發性硬化症係一種發炎性疾病，其中腦及脊髓之軸突周圍的脂肪髓鞘受損，導致脫髓鞘、形成疤痕以及廣泛之徵候及症狀。雖然已知許多此疾病過程涉及之機轉，但其原因仍然未知。多發性硬化症仍無已知解藥。治療企圖在發作後恢復功能、防止新的發作或預防不能（disability）。多發性硬化症藥物可具有不良反應或耐受性不佳，許多病患尋求另類治療，雖然缺乏科學實驗支持。

血管性水腫係真皮、皮下組織、黏膜及黏膜下組織之快速腫脹（水腫）。血管性水腫被分成後天性或遺傳性。後天性血管性水腫通常由過敏造成，且與其他過敏性症狀及蕁麻疹一起發生。此亦可能是某些藥物之不良反應，特別是 ACE 抑制劑。遺傳性血管性水腫（HAE）具有三種形式，所有形式皆由以體染色體顯性形式遺傳之基因突變造成。這些形式係由潛在性基因異常區別。所有形式之 HAE 導致補體系統之異常活化，且所有形式皆可造成身體他處諸如消化道之腫脹。若 HAE 涉及咽部，可造成威脅生命之窒息。

肺高血壓係一種肺動脈（從心至肺之血管）之壓力超過正常值之肺疾病。肺動脈性高血壓（PAH）係一種肺動脈壓力及肺血管阻力增加之疾病。Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th ed., pp. 1506-1507 (McGraw-Hill, 2001)。若不加治療，肺動脈性高血壓「通常具有不良預後，最後導致右心室衰竭及死亡」。Ulrich, S., et al., Swiss Med. Wkly 137:73-82, 73 (2007)。

克隆（Crohn）氏病係一種胃腸道（GI）慢性發炎性疾病，其特徵為症狀復發及緩解，且隨時間進展成狹窄、癰管或膿瘍之併發症。在美國，克隆氏病發生於大約一百萬人，預估每年因為IBD（發炎性腸疾病）造成之直接花費據估為\$63億美金，其中克隆氏病據估造成其中的36億。硫唑嘌呤（azathioprine）及6-巰基嘌呤（mercaptopurine）係經常用於第一線治療失敗之病患的處方用藥，特別是依賴或對系統性皮質類固醇無反應之病患。大約40%接受硫唑嘌呤治療之病患維持緩解1年。英利昔單抗（infliximab）及其他以腫瘤壞死因子（TNF）為目標之單株抗體已顯示誘導及維持克隆氏病病患緩解之療效，然而在大多數指南及共識性文章中，英利昔單抗被認為是在將腸疾病（luminal disease）病患轉介至外科醫師之前的最後藥物選項。因此，仍然需要能改善IBD及克隆氏病之治療的治療方法。

IL-10係由經活化之Th2細胞、B細胞、角質細胞、單核球及巨噬細胞所產生之細胞介素。IL-10抑制多種細

胞介素之合成，包括由經活化之巨噬細胞及 T 輔助細胞產生之 IFN- γ 、IL-2、IL-3、TNF 及 GM-CSF。IL-10 可用於促進經活化之人 B 細胞之生長及分化、抑制 Th1 反應以防止移植排斥及 T 細胞媒介性自體免疫疾病。

IL-10（介白素 10）係一種強烈下調促發炎細胞介素之產製的免疫調節細胞介素，其係與調節腸道發炎有關。重組人 IL-10（rhIL-10）之臨床發展顯示狹窄之治療窗，且其藥物動力學特性導致 GI 組織有限之生物可利用性。然而，若 IL-10 可經由活體內細胞表現而局部增加，則系統性不良反應可能不會發生。

囊腫性纖維化（CF）係一種由囊腫性纖維化跨膜傳導調節蛋白（CFTR）之基因缺陷造成之體染色體隱性疾病，此病會造成氯化物轉運通過黏膜表面之上皮細胞之異常，因為 CFTR 蛋白質之功能係作為產生黏液、汗液、唾液、淚液及消化酶之細胞的跨越細胞膜之氯離子通道。氯離子之運輸有助於控制水在組織中之移動，此係產生稀薄、自由流動之黏膜所需（正常量之黏膜係保護呼吸道、消化道、生殖系統及其他器官及組織內襯所需）。該 CFTR 蛋白質亦調節其他通道之功能，諸如該些運輸稱為鈉離子之正電粒子通過細胞膜之通道。這些通道係器官維持正常功能所需，諸如肺及胰。因此，CF 影響外分泌腺體功能，造成黏膜聚積於肺、胰及其他器官。此黏膜阻塞除了造成胰外分泌不足及消化困難以外，還會導致肺之感染及發炎。

大約 30,000 名美國人罹患 CF，此病為美國最常見之壽命縮短遺傳性疾病之一，每位 CF 病患之平均壽命為 37 歲。CF 之治療中最一致的部分是維持生命品質及治療因濃稠黏液及感染造成之肺部損傷。在囊腫性纖維化病患之 CFTR 基因中已經識別超過 1,000 個突變。這些突變大多改變 CFTR 蛋白質中之單一胺基酸或自該 CFTR 基因中刪除少量 DNA。最常見之突變稱為 δ F508，係刪除在 CFTR 蛋白質之位置 508 的一個胺基酸。該導致之異常通道在形成後快速分解，因此從未到達細胞膜以運輸氯離子。在 CFTR 基因中之致病性突變改變氯通道之產生、結構或穩定性。所有這些改變使通道無法正常功能，因而損害氯離子之傳送及將水自細胞移入或移出。因此，在肺、胰及其他器官之通道內襯的細胞產生異常黏稠之黏液。該異常黏液阻塞呼吸道及腺體，導致囊腫性纖維化之特徵徵候及症狀。最近，KALYDECO™ 已被美國食品藥物管理局（FDA）核准作為 CF 之潛在病因的第一治療（在該 CFTR 基因中之 G551D 突變）。然而，KALYDECO™ 對於治療具有最常見之 CFTR 突變之病患並無療效。於是，仍然需要經改良之 CF 治療。

糖尿病（英文 Diabetes mellitus 通常簡稱為 diabetes）係一群代謝性疾病，其中病患具有高血糖，因為身體無法產生足夠的胰島素或因為細胞無法對身體產生之胰島素有所反應。此高血糖產生尿多（頻繁排尿）、喝多（渴感增加）及吃多（餓感增加）之典型症狀。代謝性症候群係

多種醫學疾病之組合，當這些醫學疾病一起發生時增加發生心血管疾病及糖尿病之風險。在美國每五人即有一人罹患此病，且盛行率隨年齡增加。有些試驗顯示在美國之盛行率預估為總人口之 25%。於是，仍然需要經改良之糖尿病治療。

升糖素樣肽 1 (GLP-1) 係有效之抗高血糖荷爾蒙，其誘導胰島素分泌之葡萄糖依賴性刺激同時抑制升糖素之分泌。GLP-1 似乎能恢復胰 β 細胞之葡萄糖敏感性，其機轉可能涉及 GLUT2 及葡萄糖激酶之增加表現。GLP-1 亦以抑制胰 β 細胞之細胞凋亡及刺激胰島素分泌性 β 細胞之增生及分化見長。此外，GLP-1 抑制胃分泌及運動。此延緩及延長碳水化合物之吸收及造成飽足效應。

升糖素樣肽 2 (GLP-2) 係由小腸內分泌 L 細胞及中樞神經系統中之多種神經元產生。小腸 GLP-2 係在營養攝取時隨著 GLP-1 一起分泌。當經外部投予時，GLP-2 產生多種效應，包括小腸生長、增進小腸功能、減少骨分解及神經保護作用。

脂聯素 (adiponectin) 係調節多種代謝過程之蛋白質荷爾蒙，包括葡萄糖調節及脂肪酸分解代謝。脂聯素僅由脂肪組織 (及懷孕時之胚胎) 分泌至血流，在血漿中之含量相對於許多荷爾蒙極高。該荷爾蒙之量與成人之體脂肪百分比成反比。

人瘦體素主要由白色脂肪組織中之脂肪細胞製造，循環瘦體素之量係與身體脂肪總量成正比。瘦體素作用於腦

下視丘之受體，其藉由下列機轉抑制食慾：（1）抵消神經肽 Y（由腸及下視丘之細胞分泌之強力攝食刺激劑）之效應，（2）抵消大麻素之效應（與 THC 相同受體結合之另一強力攝食刺激劑），及（3）促進食慾抑制劑 α -MSH 之合成。

【發明內容】

本發明提供一種重組載體，該載體在一或多個啟動子之控制下編碼具有一或多種治療性蛋白質（例如免疫調節劑）之功能的蛋白質。在一實施態樣中，該一或多個啟動子係條件性啟動子。在另一實施態樣中，該一或多個啟動子係組成性啟動子。在另一實施態樣中，該載體係編碼關閉啟動子之蛋白質的腺病毒載體，該啟動子可藉由提供可溶性小分子配體如二醯基胍（例如 RG-115819、RG-115830 或 RG-115932）加以條件性活化。

本發明亦提供一種誘導、調節或增強哺乳動物之紅血球生成素（EPO）表現之方法，其中該方法包含：

（a）經肌肉內投予腺病毒相關病毒至該哺乳動物，其中該病毒包含編碼 EPO 之多核苷酸；及

（b）投予活化配體，

其中該腺病毒相關病毒另包含基因開關，其中該基因開關包含與啟動子可操作性連接之至少一個轉錄因子序列

其中由該至少一個轉錄因子序列編碼之至少一個轉錄

因子係配體依賴性轉錄因子，

其中該腺病毒相關病毒另包含與該編碼 EPO 之多核苷酸可操作性連接之第二啟動子，且其中該第二啟動子係於投予活化配體之後由該至少一個配體依賴性轉錄因子活化。

本發明亦提供一種包含編碼基因開關之多核苷酸的載體，其中該多核苷酸包含（1）至少一個與啟動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及（2）編碼一或多種蛋白質之多核苷酸，該編碼一或多種蛋白質之多核苷酸係與啟動子可操作性連接，該啟動子係由該配體依賴性轉錄因子活化，其中該一或多種蛋白質係選自 C1 酯酶抑制劑、激肽釋放素（kallikrein）抑制劑、緩激肽（bradykinin）B2 受體抑制劑、前列腺素合成酶、升糖素樣肽 1（GLP-1）、升糖素樣肽 2（GLP-2）、脂聯素（adiponectin）、瘦體素（leptin）或囊腫性纖維化跨膜傳導調節蛋白（CFTR）。

本發明亦提供一種產製表現一或多種蛋白質之細胞群之方法，其中該方法包含使用條件性表現一或多種蛋白質之重組載體改質該等細胞，其中該載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中該多核苷酸包含（1）至少一個與啟動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及（2）與啟動子連接之編碼一或多種蛋白質之多核苷酸，該啟動子係由該配體依賴性轉錄因子活化，其中該一或多種蛋白質係選自 C1

酯酶抑制劑、激肽釋放素 (kallikrein) 抑制劑、緩激肽 (bradykinin) B2 受體抑制劑、前列腺素合成酶、升糖素樣肽 1 (GLP-1)、升糖素樣肽 2 (GLP-2)、脂聯素 (adiponectin)、瘦體素 (leptin) 或囊腫性纖維化跨膜傳導調節蛋白 (CFTR)。

本發明亦提供一種經條件性表現一或多種蛋白質之重組載體改質之細胞群，其中該載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中該多核苷酸包含 (1) 至少一個與啟動子可操作連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及 (2) 編碼一或多種選自 C1 酯酶抑制劑、激肽釋放素 (kallikrein) 抑制劑、緩激肽 (bradykinin) B2 受體抑制劑、前列腺素合成酶、升糖素樣肽 1 (GLP-1)、升糖素樣肽 2 (GLP-2)、脂聯素 (adiponectin)、瘦體素 (leptin) 或囊腫性纖維化跨膜傳導調節蛋白 (CFTR) 之蛋白質之多核苷酸。

本發明亦提供一種試管內經工程化之細胞，該細胞包含編碼基因開關之重組多核苷酸，其中該編碼基因開關之多核苷酸包含： (1) 至少一個轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼與啟動子可操作連接之配體依賴性轉錄因子，及 (2) 編碼一或多種蛋白質之多核苷酸，該編碼一或多種蛋白質之多核苷酸係與啟動子連接，該啟動子係由該配體依賴性轉錄因子活化，其中該一或多種蛋白質係選自 C1 酯酶抑制劑、激肽釋放素 (kallikrein) 抑制劑、緩激肽 (bradykinin) B2 受體抑制劑、前列腺素

合成酶、升糖素樣肽 1 (GLP-1)、升糖素樣肽 2 (GLP-2)、脂聯素 (adiponectin)、瘦體素 (leptin) 或囊腫性纖維化跨膜傳導調節蛋白 (CFTR)。

本發明亦提供治療哺乳動物的疾病之方法，該方法包含：

(a) 投予經試管內工程化以條件性表現一或多種蛋白質之細胞群；及

(b) 對該哺乳動物投予治療有效量之一或多種活化配體；

藉此誘導該一或多種蛋白質之表現，其中該一或多種蛋白質係選自 C1 酯酶抑制劑、激肽釋放素 (kallikrein) 抑制劑、緩激肽 (bradykinin) B2 受體抑制劑、前列腺素合成酶、升糖素樣肽 1 (GLP-1)、升糖素樣肽 2 (GLP-2)、脂聯素 (adiponectin)、瘦體素 (leptin) 或囊腫性纖維化跨膜傳導調節蛋白 (CFTR)。

本發明亦提供治療哺乳動物的疾病之方法，該方法包含：

(a) 對該哺乳動物投予條件性表現一或多種蛋白質之載體，該載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中該多核苷酸包含

(1) 至少一個與啟動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及

(2) 與啟動子可操作性連接之編碼一或多種蛋白質

之多核苷酸，該啓動子係經由該配體依賴性轉錄因子活化

其中該載體不包含於細胞內；及

(b) 對該哺乳動物投予治療有效量之一或多種活化配體，藉此誘導該一或多種蛋白質之表現及治療該疾病，

其中該一或多種蛋白質係選自 C1 酯酶抑制劑、激肽釋放素 (kallikrein) 抑制劑、緩激肽 (bradykinin) B2 受體抑制劑、前列腺素合成酶、升糖素樣肽 1 (GLP-1)、升糖素樣肽 2 (GLP-2)、脂聯素 (adiponectin)、瘦體素 (leptin) 或囊腫性纖維化跨膜傳導調節蛋白 (CFTR)。

本發明亦提供治療哺乳動物的多發性硬化症之方法，該方法包含：

(a) 對該哺乳動物投予條件性表現一或多種蛋白質之載體，該載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中該多核苷酸包含

(1) 至少一個與啓動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及

(2) 與啓動子可操作性連接之編碼一或多種蛋白質之多核苷酸，該啓動子係經由該配體依賴性轉錄因子活化

其中該載體不包含於細胞內；及

(b) 對該哺乳動物投予治療有效量之一或多種活化

配體，藉此誘導該一或多種蛋白質之表現及治療該疾病，

其中該一或多種蛋白質係選自髓磷脂鹼性蛋白（MBP）或干擾素 β （IFN- β ）。

一種治療哺乳動物之發炎性腸疾病或克隆氏病之方法，該方法包含：

（a）對該哺乳動物投予條件性表現一或多種蛋白質之載體，該載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中該多核苷酸包含

（1）至少一個與啟動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及

（2）與啟動子可操作性連接之編碼一或多種蛋白質之多核苷酸，該啟動子係經由該配體依賴性轉錄因子活化，

（b）對該哺乳動物投予治療有效量之一或多種活化配體，藉此誘導該一或多種蛋白質之表現及治療該疾病，

其中該一或多種蛋白質之一者係介白素 10（IL-10）。

序列表說明

SEQ ID NO: 1 係於果蠅（*Drosophila*）中發現之蛻皮激素反應元件之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 2 係於黑腹果蠅（*Drosophila melanogaster*）中發現之蛻皮激素反應元件之核酸序列。

SEQ ID NO: 3 係於黑腹果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 中發現之蛻皮激素反應元件之核酸序列。

SEQ ID NO: 4 係包含人 IL-12 編碼序列: Ad-RTS-hIL-12 (SP1-RheoIL-12) 之腺病毒載體之 DNA 序列。

SEQ ID NO: 5 係載體 (Ad-RTS-mIL-12) 之核酸序列。

SEQ ID NO: 6 係人紅血球生成素之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 7 係雲杉芽捲蛾 (*Choristoneura fumiferana*) 蛻皮激素受體配體結合結構域之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 8 係信號肽序列、人紅血球生成素序列及終止密碼子之核酸序列。

SEQ ID NO: 9 係人髓磷脂鹼性蛋白之核酸序列。

SEQ ID NO: 10 係人 C1 酯酶抑制劑之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 11 係艾卡拉肽 (ecallantide) 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 12 係人前列腺素合成酶 2 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 13 係人前列腺素合成酶 1 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 14 係人前列腺素合成酶 2 之核酸序列。

SEQ ID NO: 15 係人前列腺素合成酶 1 之核酸序列。

SEQ ID NO: 16 係人干擾素 β 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 17 係人 GLP-1 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 18 係人 GLP-2 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 19 係人脂聯素 (adiponectin) 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 20 係人瘦體素 (leptin) 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 21 係人 CFTR 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 22 係人 IL-10 之胺基酸序列。

本發明之詳細說明

定義

除非另外定義，此處所使用之所有技術用語、說明及其他科學用語或詞彙係意圖具有本發明之相關領域之技藝人士所通常了解之意義。在許多情況下，具有通常了解之意義之用語係於此處定義以供清楚及/或輕易地參照及了解，且在此處納入該等定義不應被視為代表與該領域所通常瞭解者之實質差異。分子生物學之用語及/或方法及/或方案之通常了解之定義可見 Rieger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991、Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3d ed. 2001) 及 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1994)。當適當時，涉及使用自商業途徑獲得之套組及/或試劑之方法通常根據廠商說明及/或方案及/或參數進行，除非另外說明。

本發明提供在一或多個啟動子之控制下編碼蛋白質之

重組載體。在一實施態樣中，該一或多個啓動子係條件性啓動子。在另一實施態樣中，該一或多個啓動子係組成性啓動子。在另一實施態樣中，該載體係編碼關閉啓動子之蛋白質的腺病毒載體，該啓動子可藉由提供可溶性小分子配體如二噻基胍（例如 RG-115819、RG-115830 或 RG-115932）加以條件性活化。此載體允許控制該（些）蛋白質於細胞中之表現。

在一實施態樣中，該編碼一或多種具有免疫調節劑之功能的蛋白質之多核苷酸係在基因開關之啓動子的控制下且該編碼具有 IL-12 之功能的蛋白質之多核苷酸係在組成性啓動子之控制下。在另一實施態樣中，編碼具有治療性蛋白質（例如免疫調節劑）之功能的蛋白質之多核苷酸及編碼具有 IL-12 之功能的蛋白質之多核苷酸皆在該基因開關之多順反子啓動子之控制下。在另一實施態樣中，該編碼具有治療性蛋白質（例如免疫調節劑）之功能的蛋白質之多核苷酸係由基因開關之啓動子控制且該編碼具有 IL-12 之功能的蛋白質之多核苷酸係由與基因開關啓動子不同之條件性啓動子控制。在其他實施態樣中，該編碼具有治療性蛋白質（例如免疫調節劑）之功能的蛋白質之多核苷酸的基因調節系統與具有 IL-12 之功能之多核苷酸的基因調節系統係正交的。在其他實施態樣中，編碼各蛋白質之各個多核苷酸的基因調節系統係正交的。

在一實施態樣中，本發明亦提供癌之治療，諸如但不限於黑色素瘤、神經膠質瘤、腎癌、前列腺癌及表 1 所列

之癌。IL-12 基因療法已在動物模型試驗中證實當以重組 cDNA 載體施予時之抗腫瘤療效 (Faure et al., 1998; Sangro et al., 2005)，更尤甚者當以經基因改質之 DC 施予時之抗腫瘤療效 (Sato et al., 2002; Svane et al., 1999; Tatsumi et al., 2003; Yamanaka et al., 2002)。然而到目前為止，使用質體或病毒性載體之 IL-12 基因療法的第一期人臨床試驗無法在癌環境中達成持久、客觀之臨床反應 (Heinzerling et al., 2005; Kang et al., 2001; Sangro et al., 2004; Trionzi et al., 2005)，此處描述之基因療法提供有希望之治療方式。

在一實施態樣中，本發明提供治療哺乳動物之腫瘤之方法，該方法包含下列步驟：

(a) 經腫瘤內投予至腫瘤微環境、腫瘤周圍之區域或系統性投予本發明之免疫細胞群、TSC 群或載體 (或彼等之組合)，該等細胞或載體係經試管內工程化以條件性表現一或多種具有治療性蛋白質 (例如免疫調節劑) 之功能的蛋白質；及

(b) 對該哺乳動物投予治療有效量之活化配體；

藉此誘發具有治療性蛋白質 (例如免疫調節劑) 之功能的蛋白質表現以治療該腫瘤。

在另一實施態樣中，本發明提供治療哺乳動物之疾病或疾患之方法，該方法包含下列步驟：

(a) 對該哺乳動物投予經改質之細胞群，該細胞群係經改質以條件性表現一或多種具有治療性蛋白質 (例如

免疫調節劑)之功能的蛋白質;及

(b)對該哺乳動物投予治療有效量之活化配體;

藉此誘發具有治療性蛋白質(例如免疫調節劑)之功能的蛋白質表現以治療該疾病或病狀。

在另一實施態樣中,本發明提供治療哺乳動物之疾病或病狀之方法,該方法包含下列步驟:

(a)對該哺乳動物投予二或多種經改質之細胞群,該等細胞群係經改質以條件性表現一或多種具有治療性蛋白質(例如免疫調節劑)之功能的蛋白質,其中各種經改質之細胞群表現不同組之一或多種治療性蛋白質(例如免疫調節劑);及

(b)對該哺乳動物投予治療有效量之一或多種活化配體;

藉此誘發具有治療性蛋白質(例如免疫調節劑)之功能的蛋白質表現以治療該疾病或病狀。

在另一實施態樣中,本發明提供治療哺乳動物之疾病或病狀之方法,該方法包含下列步驟:

(a)對該哺乳動物投予經改質之細胞群,該細胞群係經改質以條件性表現一或多種具有治療性蛋白質(例如免疫調節劑)之功能的蛋白質及具有 IL-12 之功能的蛋白質,其中至少一種具有治療性蛋白質(例如免疫調節劑)或 IL-12 之功能的蛋白質受到經配體活化之條件性啟動子之控制;及

(b)對該哺乳動物投予治療有效量之活化配體;

藉此誘發具有該治療性蛋白質（例如免疫調節劑）之功能的蛋白質及/或具有 IL-12 之功能的蛋白質表現以治療該疾病或疾患。

在另一實施態樣中，本發明提供治療哺乳動物之疾病或疾患之方法，該方法包含下列步驟：

（a）對該哺乳動物投予二或多種經改質之細胞群，該等細胞群係經改質以條件性表現一或多種具有治療性蛋白質（例如免疫調節劑）之功能的蛋白質及具有 IL-12 之功能的蛋白質，其中各種經改質之細胞群表現不同組之一或多種具有治療性蛋白質（例如免疫調節劑）之功能的蛋白質，其中至少一種具有治療性蛋白質（例如免疫調節劑）或 IL-12 之功能的蛋白質受到經配體活化之條件性啟動子之控制；及

（b）對該哺乳動物投予治療有效量之一或多種活化配體；

藉此誘發具有該治療性蛋白質（例如免疫調節劑）之功能的蛋白質及/或具有 IL-12 之功能的蛋白質表現以治療該疾病或疾患。

在一實施態樣中，本發明提供一種條件性表現蛋白質之載體，該載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中該編碼基因開關之多核苷酸包含（1）至少一個與啟動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及（2）編碼一或多種蛋白質之多核苷酸，該多核苷酸與經由該配體依賴性轉錄因子活

化之啓動子連接。

在一實施態樣中，本發明之載體條件性表現該蛋白質。在另一實施態樣中，該條件性表現一或多種蛋白質之載體（例如腺病毒載體）另包含編碼信號肽之核酸序列。該信號肽可經密碼子最佳化。在其他實施態樣中，該載體另包含 5'非轉譯區（UTR）、3'調節區或該 5'非轉譯區（UTR）及 3'調節區，且增進蛋白質表現及/或整體產量。

本發明另提供一種產製表現蛋白質之細胞群之方法，該方法藉由使用條件性表現蛋白質之重組載體改質（例如轉染、電穿孔等）該等細胞，其中該載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中該多核苷酸包含（1）至少一個與啓動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及（2）編碼一或多種蛋白質之多核苷酸，該多核苷酸與經由該配體依賴性轉錄因子活化之啓動子連接。

在一些實施態樣中，本發明提供一種增加蛋白質表現之方法，該方法包含產製條件性表現一或多種蛋白質及一或多個調節序列之載體，其中該一或多個調節序列增進該蛋白質之表現。

本發明另提供表現蛋白質之細胞群，該細胞群係經條件性表現該蛋白質之重組載體改質（例如轉染、電穿孔等），其中該載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中該多核苷酸包含（1）至少一個與啓動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性

轉錄因子，及（2）編碼一或多種蛋白質之多核苷酸，該多核苷酸與經由該配體依賴性轉錄因子活化之啟動子連接。

在另一實施態樣中，本發明提供一種包含本發明之二或多種細胞群之組成物，其中該組成物中之各細胞群表現一或多種與該組成物中之其他細胞群所表現之一或多種蛋白質不同之蛋白質。在一實施態樣中，該組成物包含二種細胞群。在另一實施態樣中，該組成物包含超過二種細胞群。在另一實施態樣中，該組成物包含三種細胞群。在另一實施態樣中，該組成物包含四種細胞群。

在另一實施態樣中，本發明提供一種包含載體之經試管內工程化之細胞，該載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中該多核苷酸包含（1）至少一個與啟動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及（2）編碼蛋白質之多核苷酸，該多核苷酸與經由該配體依賴性轉錄因子活化之啟動子連接。

在另一實施態樣中，本發明提供一種包含本發明之二或多種經試管內工程化之細胞群之組成物，其中該組成物中之各種經試管內工程化之細胞群包含載體，該載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中該多核苷酸包含（1）至少一個與啟動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及（2）編碼蛋白質之多核苷酸，該多核苷酸與經由該配體依賴性

轉錄因子活化之啟動子連接，且其中該組成物中之各種經試管內工程化之細胞群表現一或多種與該組成物中之其他經試管內工程化之細胞群所表現之一或多種蛋白質不同之蛋白質。

在另一實施態樣中，本發明之載體及方法被用於治療糖尿病、代謝性疾病、代謝性疾患及代謝性症候群。在一實施態樣中，該載體包含編碼 GLP-1、GLP-2、脂聯素或瘦體素、或 GLP-1、GLP-2、脂聯素或瘦體素之片段的多核苷酸序列。在另一實施態樣中，該載體包含編碼人 GLP-1、GLP-2、脂聯素或瘦體素、或人 GLP-1、GLP-2、脂聯素或瘦體素之片段的多核苷酸序列。

在另一實施態樣中，本發明之載體及方法被用於治療發炎性腸疾病（IBD）及/或克隆氏病。在一實施態樣中，該載體包含編碼 IL-10 或彼之片段之多核苷酸序列。在另一實施態樣中，該載體包含編碼人 IL-10 或彼之片段之多核苷酸序列。

在一實施態樣中，本發明包含具有組成性、誘導性或組織特異性啟動子之載體，該啟動子允許活體內產製囊腫性纖維化跨膜傳導調節蛋白（CFTR）以取代或補充該缺陷性或突變之 CFTR 蛋白質。因此，在一實施態樣中，本發明之載體及方法係用於治療囊腫性纖維化（CF）。在一實施態樣中，該載體包含編碼正常（非突變性）CFTR 或彼之功能性（生物活性/可離子運輸）片段之多核苷酸序列。在另一實施態樣中，該載體包含編碼正常人 CFTR（

非突變性 CFTR) 或彼之功能性 (生物活性/可離子運輸) 片段之多核苷酸序列。

本發明亦提供一種包含如此處所述之細胞群之醫藥組成物，或一種適用於直接注射無細胞群之表現載體即經直接注射之組成物。

本發明亦提供用於條件性表現前列腺素合成酶之載體，該載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中多核苷酸包含 (1) 至少一個與啟動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及 (2) 編碼前列腺素合成酶之多核苷酸。本發明亦提供治療肺高血壓之方法，該方法包含投予該載體。

IL-12 係一種細胞介素，其可作為經活化之 T 及 NK 細胞之生長因子，增進 NK/經淋巴介素活化之殺手細胞之溶解活性及刺激休止週邊血液單核細胞 (PBMC) 產製 IFN- γ 。IL-12 之多核苷酸序列可得自公眾資料庫，如編號 NM_000882 (人 IL12A)、NM_002187 (人 IL12B)、NM_008351 (小鼠 IL12a)、NM_008352 (小鼠 IL12b)、NM_213588 (雞 IL12A)、NM_213571 (雞 IL12B)、NM_053390 (大鼠 IL12a) 及 NM_022611 (大鼠 IL12b)，彼等之序列以參照方式納入此處。

介白素 12 (IL-12) 之胺基酸序列可得自公眾資料庫，如編號 NP_000873 (人 IL12A)、NP_002178 (人 IL12B)、NP_032377 (小鼠 IL12a)、NP_032378 (小鼠 IL12b)、NP_998753 (雞 IL12A)、NP_998736 (雞

IL12B)、NP_445842(大鼠 IL12a)及 NP_072133(大鼠 IL12b),彼等之序列以參照方式納入此處。

在一實施態樣中,該 IL-12 基因係野生型小鼠 IL-12 序列。在另一實施態樣中,該序列係與野生型小鼠 IL-12 具有至少 85%之一致性,例如與野生型小鼠 IL-12 具有至少 90%、95%或 99%之一致性。在其他實施態樣中,該 IL-12 基因序列編碼小鼠 IL-12 多肽。在另一實施態樣中,該基因編碼與野生型小鼠 IL-12 具有至少 85%一致性之多肽,例如與野生型小鼠 IL-12 具有至少 90%、95%或 99%之一致性。

髓磷脂鹼性蛋白(MBP)被認為係一種對於中樞神經系統之神經的髓鞘形成過程重要之蛋白質。由該典型 MBP 基因編碼之蛋白質係神經系統之寡突細胞及施旺氏(Schwann)細胞之髓鞘的主要組分。MBP 相關性轉錄物亦存在於骨髓及免疫系統中。MBP 之胺基酸及多核苷酸序列已可獲得,如編號 NM_001025081 及 NP_001020252(人)及 NM_001025245 及 NP_001020416(小鼠)。

在一實施態樣中,該 MBP 係野生型人 MBP 序列。在另一實施態樣中,該序列係與野生型人 MBP 具有至少 85%之一致性,例如與野生型人 MBP 具有至少 90%、95%或 99%之一致性。

C1 酯酶抑制劑(C1-抑制劑, C1-inh)係屬於絲胺酸蛋白酶抑制劑(serpin)超家族之蛋白酶抑制劑。彼之主要功能係抑制補體系統以防止自發性活化。C1 酯酶抑制

劑係急性期蛋白質，其在血液循環中之量約為 0.25 g/L，在發炎期間該量增加約 2 倍。C1 酯酶抑制劑不可逆地結合及不活化補體之經典途徑的 C1 複合物中之 C1r 及 C1s 蛋白酶。凝集素途徑之 MBL 複合物中之 MASP-1 及 MASP-2 蛋白酶亦經不活化。C1 酯酶抑制劑防止之後的補體成分 C4 及 C2 被 C1 及 MBL 蛋白水解切割。C1 酯酶抑制劑亦抑制纖維蛋白溶解、凝結及激肽途徑之蛋白酶。C1 酯酶抑制劑係血漿激肽釋放素之抑制劑。人 C1 酯酶抑制劑之胺基酸序列係見於 GenBank ADU87625.1，編號 GU727623.1。

在一實施態樣中，該 C1 酯酶抑制劑係野生型人 C1 酯酶抑制劑序列。在另一實施態樣中，該序列係與野生型人 MBP 具有至少 85%之一致性，例如與野生型人 C1 酯酶抑制劑具有至少 90%、95%或 99%之一致性。

艾卡拉肽（ecallantide）（商品名 Kalbitor，試驗藥物名稱 DX-88）係蛋白質激肽釋放素之抑制劑，可用於治療遺傳性血管性水腫（HAE）及預防心胸手術之失血。艾卡拉肽之胺基酸序列係見於美國專利公開號 2007/0213275，其以參照方式整體納入此處。

在一實施態樣中，該艾卡拉肽係野生型人艾卡拉肽序列。在另一實施態樣中，該序列係與野生型人 MBP 具有至少 85%之一致性，例如與野生型人艾卡拉肽具有至少 90%、95%或 99%之一致性。

在一實施態樣中，該 GLP-1 係野生型人 GLP-1 序列

。在另一實施態樣中，該序列係與野生型人 GLP-1 具有至少 85%之一致性，例如與野生型人 GLP-1 具有至少 90%、95%或 99%之一致性。

在一實施態樣中，該 GLP-2 係野生型人 GLP-2 序列。
。在另一實施態樣中，該序列係與野生型人 GLP-2 具有至少 85%之一致性，例如與野生型人 GLP-2 具有至少 90%、95%或 99%之一致性。

在一實施態樣中，該脂聯素係野生型人脂聯素序列。
在另一實施態樣中，該序列係與野生型人脂聯素具有至少 85%之一致性，例如與野生型人脂聯素具有至少 90%、95%或 99%之一致性。

在一實施態樣中，該瘦體素係野生型人瘦體素序列。
在另一實施態樣中，該序列係與野生型人瘦體素具有至少 85%之一致性，例如與野生型人瘦體素具有至少 90%、95%或 99%之一致性。

在一實施態樣中，該 IL-10 係野生型人 IL-10 序列。
在另一實施態樣中，該序列係與野生型人 IL-10 具有至少 85%之一致性，例如與野生型人 IL-10 具有至少 90%、95%或 99%之一致性。

以本發明之目的而言，用語「經分離」代表已自生物性物質（細胞、核酸或蛋白質）之原始環境（在該環境中該物質係天然存在）移除之物質。舉例來說，以天然狀態存在於植物或動物體內之多核苷酸係未經分離，然而與該多核苷酸天然存在之環境中的鄰近核酸分開之相同多核苷酸

被認為是「經分離」的。

當用於指稱生物性物質時，用語「經純化」不要求該物質以展現絕對純粹、排除其他化合物存在之形式存在。其反而為相對性定義。

「核酸」、「核酸分子」、「寡核苷酸」、「核苷酸」及「多核苷酸」可交換使用，這些用語係指呈單股形式或雙股螺旋之核糖核苷（腺苷、鳥苷、尿苷或胞苷；「RNA 分子」）或去氧核糖核苷（去氧腺苷、去氧鳥苷、去氧尿苷或去氧胞苷；「DNA 分子」）之磷酸酯聚合形式，或彼等之任何磷酸酯類似物，諸如磷硫代酯及硫酯。雙股 DNA-DNA、DNA-RNA 及 RNA-RNA 螺旋均有可能。用語核酸分子特別是 DNA 或 RNA 分子僅指該分子之一級和二級結構，並不限制彼呈任何特定之三級形式。因此，此用語包括特別是在線性或環狀 DNA 分子（例如限制片段）、質體、超螺旋 DNA 及染色體內被發現之雙股 DNA。在討論特定雙股 DNA 分子之結構時，可能根據通常習慣之僅給予該 DNA 之非轉錄股之 5'至 3'方向之序列（即具有和 mRNA 同源之序列之股）以描述此處之序列。「重組 DNA 分子」係指遭受分子生物操縱之 DNA 分子。DNA 包括但不限於 cDNA、基因組 DNA、質體 DNA、合成性 DNA 及半合成性 DNA。

用語「片段」當用於指稱多核苷酸序列時，係指相對於參照核酸長度經減少之核苷酸序列，且除共同部分以外包含與該參照核酸一致之核苷酸序列。就本發明而言，當適

當時，該核酸片段可能為更大之多核苷酸之組分而被包括於該更大之多核苷酸以內。該等片段包含本發明之核酸之至少 6、8、9、10、12、15、18、20、21、22、23、24、25、30、39、40、42、45、48、50、51、54、57、60、63、66、70、75、78、80、90、100、105、120、135、150、200、300、500、720、900、1000、1500、2000、3000、4000、5000 或更多個連續核苷酸長度之寡核苷酸，或由該等寡核苷酸組成。

此處所使用之「經分離之核酸片段」係指單股或雙股 RNA 或 DNA 之聚合物，該聚合物可任意選擇地包含合成性、非天然或經改變之核苷酸鹼基。呈 DNA 聚合物形式之經分離之核酸片段可能包含一或多個 cDNA、基因組 DNA 或合成性 DNA 之區段。

「基因」係指包含編碼功能性分子之核苷酸之多核苷酸，該功能性分子包括僅由轉錄產生者（例如生物活性 RNA 物種）或由轉錄及轉譯產生者（例如多肽）。用語「基因」包含 cDNA 及基因組 DNA 核酸。「基因」亦指表現特定 RNA、蛋白質或多肽之核酸片段，包括在該編碼序列之前（5'非編碼序列）及之後（3'非編碼序列）之調節序列。「天然基因」係指在天然中發現具有其本身之調節序列之基因。「嵌合基因」係指非天然基因之任何基因，其包含不在天然中一起發現之調節及/或編碼序列。因此，嵌合基因可能包含源自不同來源之調節序列及編碼序列，或源自相同來源但以不同於在天然中發現之方式排列之調節序列及

編碼序列。嵌合基因可能包含源自不同來源之編碼序列及/或源自不同來源之調節序列。「內源性基因」係指彼之天然位置係位於有機體之基因組內之天然基因。「外來」基因或「異源性」基因係指正常不在宿主有機體內發現，但藉由基因轉移被導入宿主有機體內之基因。外來基因可包含被插入非天然有機體內之天然基因，或嵌合基因。「轉基因」係經由轉形程序被導入基因組內之基因。舉例來說，介白素-12 (IL-12) 基因編碼 IL-12 蛋白質。IL-12 係由 35 千道爾頓 (kD) 次單位 (p35) 及 40 千道爾頓次單位 (p40) 組成之異二聚體，該二個次單位經由雙硫鍵連接以形成完整功能性 IL-12p70。IL-12 基因編碼 p35 及 p40 二個次單位。

「異源性 DNA」係指非天然存在於細胞內或細胞內之染色體部位之 DNA。異源性 DNA 可能包含對細胞而言為外來之基因。

用語「基因組」不只包括染色體 DNA 或 RNA，還包括粒線體、葉綠體及病毒 DNA 或 RNA。

當單股形式之核酸分子諸如 cDNA、基因組 DNA 或 RNA 可在適當之溫度及溶液離子強度之條件下與其他核酸分子黏合時，該核酸分子可與另一核酸分子「雜交」。雜交及清洗條件係廣為周知，並於 Sambrook et al. in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989) 中舉例說明，特別是其中的第 11 章及表 11.1。溫

度及離子強度之條件決定雜交之「嚴謹度」。

嚴謹度條件可經調整以篩選類似程度不同之片段，自勉強類似之片段（諸如源自相關性遙遠之有機體之同源性序列）至高度類似之片段（諸如源自密切相關之有機體複製功能性酶之基因）。以同源性核酸之初步篩選而言，可使用對應 T_m 55℃ 之低嚴謹度雜交條件，例如 5 倍 SSC、0.1% SDS、0.25% 乳及不含甲醯胺；或 30% 甲醯胺、5 倍 SSC、0.5% SDS。中度嚴謹度雜交條件對應更高之 T_m ，例如 40% 甲醯胺及 5 倍或 6 倍 SSC。高度嚴謹度雜交條件對應最高之 T_m ，例如 50% 甲醯胺及 5 倍或 6 倍 SSC。

雜交要求二個核酸必須包含互補序列，但是依雜交之嚴謹度不同，鹼基之間可能有錯誤配對之情形。用語「互補」係用來描述核苷酸鹼基之間能彼此雜交之關係。舉例來說，以 DNA 而言，腺嘌呤係與胸腺嘧啶互補，胞嘧啶係與鳥嘌呤互補。因此，本發明亦包括與此處所揭示或使用之完整序列互補之經分離之核酸片段，以及該些實質上類似之核酸序列。

在本發明之一個實施態樣中，多核苷酸係藉由採用雜交條件加以檢測，該等雜交條件包含於 T_m 55℃ 之雜交步驟及利用如上述之條件。在其他實施態樣中，該 T_m 係 60℃、63℃、或 65℃。

雜交後之清洗亦決定嚴謹度之條件。一組條件使用一系列清洗步驟，一開始在室溫下以 6 倍 SSC、0.5% SDS 清洗 15 分鐘（min），接著在 45℃ 下以 2 倍 SSC、0.5%

SDS 重複清洗 30 分鐘，再於 50℃ 下以 0.2 倍 SSC、0.5% SDS 重複清洗 30 分鐘二次。一組嚴謹度條件使用較高之溫度，其中各個清洗步驟與上述相同，除了最後二次以 0.2 倍 SSC、0.5% SDS 清洗 30 分鐘之溫度增加至 60℃。另一組高度嚴謹度條件的最後二次清洗於 65℃ 下以 0.1 倍 SSC、0.1% SDS 清洗。

另外，技藝人士知道本發明所包含之實質上類似之序列亦可由彼等在嚴謹度條件下（0.1 倍 SSC、0.1% SDS、65℃ 及以 2 倍 SSC、0.1% SDS 清洗然後以 0.1 倍 SSC、0.1% SDS 清洗）與此處示例之序列雜交之能力加以定義。本發明之實質上類似之核酸片段係該些 DNA 序列與此處所報告之核酸片段的 DNA 序列有至少約 70%、80%、90% 或 95% 一致性的核酸片段。

核酸雜交之適當嚴謹度取決於該等核酸之長度及互補之程度，這些是該領域眾所周知之變異。二個核苷酸序列之間的類似性或同源性程度越高，具有該些序列之核酸的雜交物具有越高之 T_m 值。核酸雜交之相對穩定性（對應較高之 T_m ）依下列順序遞減：RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNA。以長度超過 100 個核苷酸之雜交物而言，計算 T_m 之方程式已被發展（見 Sambrook et al., 同上，9.50-0.51）。以較短核酸（即寡核苷酸）之雜交而言，錯誤配對之位置更顯重要，且寡核苷酸之長度決定彼之特異性（見 Sambrook et al., 同上，11.7-11.8）。

在本發明之一個實施態樣中，多核苷酸係藉由採用雜

交條件加以檢測，該等條件包含在低於 500 毫莫耳鹽濃度及至少 37°C 下之雜交步驟，及在至少 63°C 之溫度下使用 2 倍 SSPE 之清洗步驟。在另一實施態樣中，該等雜交條件包含低於 200 毫莫耳鹽濃度及至少 37°C 下之雜交步驟。在其他實施態樣中，該等雜交條件包含 2 倍 SSPE 及在 63°C 下之雜交及清洗步驟。

在另一實施態樣中，可雜交之核酸之長度係至少約 10 個核苷酸。較佳地，可雜交之核酸之最短長度係至少約 15 個核苷酸，例如至少約 20 個核苷酸，例如至少 30 個核苷酸。另外，該領域之技藝人士將瞭解該溫度及清洗溶液鹽濃度可根據各種因素諸如探針長度而視需要調整。

用語「探針」係指可與互補性單股標靶核酸鹼基配對以形成雙股分子之單股核酸分子。

此處所使用之用語「寡核苷酸」係指可與基因組 DNA 分子、cDNA 分子、質體 DNA 或 mRNA 分子雜交之短核酸。寡核苷酸可利用例如 ^{32}P -核苷酸或經標記（諸如生物素）共價共軛之核苷酸加以標示。經標示之寡核苷酸可被用來作為探針以檢測核酸之存在。寡核苷酸（其一或二者可經標示）可被用來作為 PCR 引子，以用於克隆（clone）核酸之全長或片段以供 DNA 定序，或用於檢測核酸之存在。寡核苷酸亦可被用來與 DNA 分子形成三螺旋體。通常，寡核苷酸係經合成製備，較佳地在核酸合成儀上合成。因此，經製備之寡核苷酸可具有非天然發生之磷酸鍵類似物，諸如硫酯鍵等。

「引子」係指與標靶核酸序列雜交以產生雙股核酸區之寡核苷酸，該雙股核酸區可在適當之條件下作為 DNA 合成之起始點。該等引子可被用於聚合酶連鎖反應或 DNA 定序。

「聚合酶連鎖反應」之縮寫為 PCR，係指經酶之作用擴增特定核酸序列之試管內方法。PCR 涉及溫度週期之重複循環，每個週期包含三個階段：使模板核酸變性以分開標靶分子之股、使單股 PCR 寡核苷酸引子與模板核酸黏合及藉由 DNA 聚合酶使黏合引子延伸。PCR 提供檢測標靶分子存在與否，以及在定量或半定量條件下測定該標靶分子在核酸起始池內之相對量之方法。

「逆轉錄聚合酶連鎖反應」之縮寫為 RT-PCR，係指經酶之作用自 RNA 分子產製標靶 cDNA 分子，接著如上所述經酶之作用擴增在該標靶 cDNA 分子內之特定核酸序列之試管內方法。RT-PCR 亦提供檢測標靶分子存在與否，及在定量或半定量條件下測定該標靶分子在核酸起始池內之相對量之方法。

DNA「編碼序列」或「編碼區」係指編碼多肽之雙股 DNA 序列，且當「編碼序列」被置於適當調節序列之控制下，其可在細胞內、活體外（*ex vivo*）、試管內（*in vitro*）或活體內（*in vivo*）被轉錄及轉譯成多肽。「適當之調節序列」係指位於編碼序列上游（5'非編碼序列）、編碼序列之內或編碼序列下游（3'非編碼序列）之核苷酸序列，該序列影響該相關編碼序列之轉錄、RNA 處理或穩定性或轉譯

。調節序列可包括啟動子、轉譯前導序列、內含子、聚腺苷酸化辨識序列、RNA 處理位點、效應子結合位點及莖環結構。編碼序列之邊界定義為在 5'（胺基）端之起始密碼子及在 3'（羧基）端之轉譯終止密碼子。編碼序列可包括但不限於原核序列、來自 mRNA 之 cDNA、基因組 DNA 序列及甚至合成性 DNA 序列。若該編碼序列係意圖用於真核細胞內表現，通常在該編碼序列之 3'端將有聚腺苷酸化信號及轉錄終止序列。

「開放閱讀框」之縮寫為 ORF，係指一段核酸序列（不論是 DNA、cDNA 或 RNA），其包含轉譯起始信號或起始密碼子（諸如 ATG 或 AUG）及終止密碼子，且可能可被轉譯成多肽序列。

此處使用之用語「頭對頭」描述二個多核苷酸序列彼此之關係的方向性。當一個多核苷酸之編碼股的 5'端係與另一多核苷酸之編碼股的 5'端相鄰，該二個多核苷酸係以頭對頭之方向性排列，藉以使各多核苷酸之轉錄方向朝著遠離另一多核苷酸之 5'端前進。用語「頭對頭」可簡寫為（5'）-對-（5'），亦可以符號（ $\leftarrow \rightarrow$ ）或（ $3' \leftarrow 5' 5' \rightarrow 3'$ ）表示。

此處使用之用語「尾對尾」描述二個多核苷酸序列彼此之關係的方向性。當一個多核苷酸之編碼股的 3'端係與另一多核苷酸之編碼股的 3'端相鄰，該二個多核苷酸係以尾對尾之方向性排列，藉以使各多核苷酸之轉錄方向朝著另一多核苷酸前進。用語「尾對尾」可簡寫為（3'）-對-（3'）。

），亦可以符號（ $\rightarrow \leftarrow$ ）或（ $5' \rightarrow 3' 3' \leftarrow 5'$ ）表示。

此處使用之用語「頭對尾」描述二個多核苷酸序列彼此之關係的方向性。當一個多核苷酸之編碼股的 5'端係與另一多核苷酸之編碼股的 3'端相鄰，該二個多核苷酸係以頭對尾之方向性排列，藉以使各多核苷酸之轉錄方向朝著與另一多核苷酸相同之方向前進。用語「頭對尾」可簡寫為（5'）-對-（3'），亦可以符號（ $\rightarrow \rightarrow$ ）或（ $5' \rightarrow 3' 5' \rightarrow 3'$ ）表示。

用語「下游」係指位於參考核苷酸序列 3'之核苷酸序列。特別是，下游核苷酸序列通常與在轉錄起始點之後的序列相關。舉例來說，基因之轉譯起始密碼子係位於轉錄起始位點之下游。

用語「上游」係指位於參考核苷酸序列 5'之核苷酸序列。特別是，上游核苷酸序列通常與位於編碼序列之 5'側或轉錄起始點之序列相關。舉例來說，大部分啟動子係位於轉錄起始點之上游。

用語「限制內核酸酶」及「限制酶」可交換使用，係指在雙股 DNA 之內與特定核苷酸序列結合且在該特定核苷酸序列之內切割之酶。

「同源性重組」係指將外來 DNA 序列插入另一 DNA 分子內，例如將載體插入染色體內。較佳地，該載體以特定染色體位點為標靶以進行同源性重組。以特定同源性重組而言，該載體將包含足夠長度之與染色體序列同源之區，以允許互補結合及使載體納入染色體內。同源性之區域越

長及序列類似性之程度越高可增加同源重組之效率。

該領域中已知之一些方法可被用於增殖本發明之多核苷酸。一旦適當之宿主系統及生長條件被建立後，重組表現載體可被大量增殖及製備。如此處所述，可使用之表現載體包括但不限於下列載體或彼等之衍生物：人或動物病毒諸如牛痘病毒或腺病毒；昆蟲病毒諸如桿狀病毒；酵母菌載體；噬菌體載體（例如 λ ）及質體及黏質體 DNA 載體等。

「載體」係指任何用於克隆及/或轉移核酸至宿主細胞內之載具。載體可為複製子，該複製子可與另一 DNA 片段附著以促成該附著區段之複製。「複製子」係指任何功能為活體內 DNA 複製之自主單位（即可自行控制複製）之基因元件（例如質體、噬菌體、黏質體、染色體、病毒）。用語「載體」包括在試管內、活體外或活體內用於將核酸導入細胞內之病毒及非病毒載具。許多該領域中已知之載體可被用於操縱核酸、將反應元件及啟動子納入基因內等。可能的載體包括例如質體或經改質之病毒包括例如噬菌體諸如 λ 衍生物，或質體諸如 pBR322 或 pUC 質體衍生物，或 Bluescript 載體。另一可用於本發明之載體實例係如 WO 2007/038276 及 US 2004/185556 中所述之 UltraVector™ 產製系統（維吉尼亞州布萊克斯堡（Blacksburg, VA）英創松（Intrexon）公司）。舉例來說，欲將對應反應元件及啟動子之 DNA 片段插入適當之載體中，可藉由使適當之 DNA 片段與具有互補黏性端之選擇載體連接加以完成

。另外，該等 DNA 分子之末端可能經酶修飾或可能藉由連接核苷酸序列（連接子）至該 DNA 末端以產生任何位點。該等載體可能經工程化以包含可選擇之標誌基因，藉此篩選已將該標誌納入細胞基因組內之細胞。該等標誌允許辨識及/或篩選該納入及表現由該標誌所編碼之蛋白質之宿主細胞。

病毒載體（特別是反轉錄病毒載體）已被用於各種細胞內之基因遞送應用，另外也被用於活動物個體。可被使用之病毒載體包括但不限於反轉錄病毒、腺病毒相關病毒、痘病毒、桿狀病毒、牛痘病毒、單純皰疹病毒、EB（Epstein-Barr）病毒、腺病毒、雙生病毒及花椰菜花葉病毒載體。非病毒載體包括質體、脂質體、帶電脂質（細胞轉染素）、DNA-蛋白質複合物及生物聚合物。除了核酸之外，載體亦可包含一或多個調節區，及/或可用於選擇、測量及監測核酸轉移結果（轉移至何種組織、表現期間等）之可選擇標誌。

用語「質體」係指通常攜帶並非細胞中心代謝之部分的基因之染色體外元件，且通常呈環狀雙股 DNA 分子之形式。該等元件可自主性地複製源自任何來源之序列、基因組嵌入序列、噬菌體或核苷酸序列、線性、環狀或超螺旋之單股或雙股 DNA 或 RNA，其中許多核苷酸序列已被接合或重組成獨特之建構體，該建構體能將經選擇之基因產物的啟動子片段及 DNA 序列與適當之 3'非轉譯序列導入細胞內。

「克隆 (cloning) 載體」係指「複製子」，其為依序複製且包含複製起點之單位長度之核酸（較佳為 DNA），諸如質體、噬菌體或黏質體，克隆載體可與另一核酸區段附著以促成該附著區段之複製。克隆載體可於一種細胞類型中複製，並於另一種細胞類型中表現（「穿梭載體」）。克隆載體可包含一或多個可被用於篩選包含該載體之細胞之序列，及/或一或多個供插入受關注之序列之多重克隆位點。

用語「表現載體」係指經設計而能夠表現被插入之核酸序列之載體、質體或載具。經克隆之基因即經插入之核酸序列通常被置於控制元件之控制下，諸如啟動子、最小啟動子、增強子或該類似元件。可用於驅動核酸於所欲宿主細胞內之表現之起始控制區或啟動子為數眾多，且為該領域之技藝人士所熟悉。幾乎任何能驅動這些基因表現之啟動子可被用於表現載體，包括但不限於病毒啟動子、細菌啟動子、動物啟動子、哺乳動物啟動子、合成性啟動子、組成性啟動子、組織特異性啟動子、致病機轉或疾病相關啟動子、發展特異性啟動子、誘導性啟動子、光調節性啟動子；*CYC1*、*HIS3*、*GAL1*、*GAL4*、*GAL10*、*ADH1*、*PGK*、*PHO5*、*GAPDH*、*ADC1*、*TRP1*、*URA3*、*LEU2*、*ENO*、*TPI*、鹼性磷酸酶啟動子（可用於啤酒釀母菌內表現）；*AOX1* 啟動子（可用於畢赤酵母內表現）； β -內醯胺酶、*lac*、*ara*、*tet*、*trp*、*lP_L*、*lP_R*、*T7*、*tac* 及 *trc* 啟動子（可用於在大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 內表現）；光調節

性 -、種子特異性 -、花粉特異性 -、卵巢特異性 -、花菜嵌紋病毒 (cauliflower mosaic virus) 35S、最小 CMV 35S、木薯葉脈嵌紋病毒 (cassava vein mosaic virus) (CsVMV)、葉綠素 a/b 結合蛋白、核酮糖 1,5-雙磷酸羧化酶、莖特異性、根特異性、幾丁質酶、壓力誘導性、水稻東格魯 (tungro) 桿狀病毒、植物超啟動子、馬鈴薯白胺酸胺肽酶、硝酸還原酶、甘露鹼合成酶、胭脂胺酸合成酶、泛素、玉米蛋白及花青素啟動子 (可用於在植物細胞內表現) ; 該領域已知之動物及哺乳動物啟動子包括但不限於 SV40 早期 (SV40e) 啟動子區、勞斯肉瘤病毒 (RSV) 之 3'長終端重複 (LTR) 所包含之啟動子、腺病毒 (Ad) 之 E1A 或主要晚期啟動子 (MLP) 基因之啟動子、巨細胞病毒 (CMV) 早期啟動子、單純皰疹病毒 (HSV) 胸苷激酶 (TK) 啟動子、桿狀病毒 IE1 啟動子、延長因子 1 α (EF1) 啟動子、磷酸甘油酸激酶 (PGK) 啟動子、泛素 (Ubc) 啟動子、白蛋白啟動子、鼠啟動子之調節序列及轉錄控制區、金屬硫蛋白-L 啟動子及轉錄控制區、普遍型啟動子 (HPRT、波形蛋白、 α -肌動蛋白、微管蛋白及該類似物)、中間絲 (肌間線蛋白、神經絲、角質素、GFAP 及該類似物) 之啟動子、(MDR、CFTR 或因子 VIII 型及該類似物) 之治療基因之啟動子、致病機轉或疾病相關啟動子, 及展現組織特異性且已被用於基因轉殖動物之啟動子, 諸如在胰腺泡細胞內具活性之彈性蛋白酶 I 基因控制區; 在胰 β 細胞內具活性之胰島素基因控制區、在淋巴樣

細胞內具活性之免疫球蛋白基因控制區、在睪丸、乳房、淋巴樣及肥胖細胞內具活性之小鼠乳房腫瘤病毒控制區；在肝臟中具活性之白蛋白基因、Apo AI 及 Apo AII 控制區、在肝臟中具活性之 α -胎兒蛋白基因控制區、在肝臟中具活性之 α 1-抗胰蛋白酶基因控制區、在骨髓細胞內具活性之 β -球蛋白基因控制區、在腦之寡突細胞內具活性之髓鞘鹼性蛋白基因控制區、在骨骼肌中具活性之肌球蛋白輕鏈-2 基因控制區及在下視丘中具活性之促性腺釋放激素基因控制區、丙酮酸激酶啟動子、絨毛蛋白啟動子、脂肪酸結合小腸蛋白之啟動子、平滑肌細胞 α -肌動蛋白之啟動子及該類似物。此外，這些表現序列可能藉由加入增強子或調節序列及該類似物加以修飾。

載體可經由該領域已知之方法導入所欲之宿主細胞內，例如轉染、電穿孔、顯微注射、轉導、細胞融合、DEAE 葡聚糖、磷酸鈣沉澱、脂質體轉染（溶酶體融合）、使用基因槍或 DNA 載體轉運蛋白（見例如 Wu et al., J Biol. Chem. 267:963 (1992)、Wu et al., J Biol. Chem. 263:14621 (1988) 及 Hartmut et al., 加拿大第 2,012,311 號專利申請案）。

本發明之載體亦可經任何投予途徑投予至個體，包括但不限於肌肉內投予。

本發明之多核苷酸亦可經由脂質體轉染被導入活體內。在過去十年內，越來越常使用脂質體於試管內包封及轉染核酸。經過設計以減少脂質體媒介性轉染所遭遇之困難

及危險的合成性陽離子脂質可被用於製備脂質體，以供活體內轉染編碼標誌之基因（Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:7413 (1987)、Mackey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8027 (1988) 及 Ulmer et al., Science 259:1745 (1993)）。使用陽離子脂質可增進帶負電核酸之包封，亦可促進與帶負電細胞膜之融合（Felgner et al., Science 337:387 (1989)）。特別適用於轉移核酸之脂質化合物及組成物係描述於 WO95/18863、WO96/17823 及美國專利第 5,459,127 號。利用脂質體轉染以導入外源性基因至活體內之特定器官具有某些實際好處。一部分之優點在於脂質體對於特定細胞之分子靶向性。很明顯的，引導對特定細胞類型之轉染將特別適用於具有細胞異質性之組織，諸如胰、肝、腎及腦。脂質可與其他分子化學偶合以達標靶之目的（Mackey et al. 1988，同上）。經標靶之肽（例如荷爾蒙或神經傳遞物）及蛋白質諸如抗體或非肽分子可與脂質體化學偶合。

其他分子亦可用於促進核酸於活體內之轉染，諸如陽離子寡肽（例如 WO95/21931）、衍生自 DNA 結合蛋白之肽（例如 WO96/25508）或陽離子聚合物（例如 WO95/21931）。

也可能於活體內導入呈裸 DNA 質體之載體（見美國專利第 5,693,622、5,589,466 及 5,580,859 號）。受體媒介性 DNA 遞送方法亦可被使用（Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3:147 (1992) 及 Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429 (1987)）。

用語「轉染」係指細胞之攝取外源性或異源性 RNA 或 DNA。當外源性或異源性 RNA 或 DNA 被導入細胞內時，該細胞係經該等 RNA 或 DNA 之「轉染」。當該經轉染之 RNA 或 DNA 導致細胞之表型改變，該細胞被外源性或異源性 RNA 或 DNA「轉形」。轉形 RNA 或 DNA 可被整合（共價連接）至組成細胞之基因組之染色體 DNA。

「轉形」係指將核酸片段轉移至宿主有機體之基因組內，導致基因穩定性繼承。包含該轉形核酸片段之宿主有機體被稱為「基因轉殖」或「重組」或「轉形」有機體。

此外，包含本發明之多核苷酸之重組載體可包括一個或多個在細胞性宿主內擴增或表現時所尋找之複製起點、標誌或可選擇之標誌。

用語「可選擇之標誌」係指識別因子，通常為抗生素或化學抗藥性基因，該標誌能根據該標誌基因之效應被選擇，即對抗生素之抗藥性、對除草劑之抗藥性、比色標誌、酶、螢光標誌及該類似物，其中該效應係用於追蹤感興趣之核酸的繼承性及/或識別已繼承感興趣之核酸的細胞或有機體。該領域已知及使用之可選擇之標誌基因實例包括：提供對安比西林、鏈黴素、健他黴素、卡那黴素、潮黴素、雙丙氨磷除草劑、磺醯胺及該類似物之抗藥性的基因；及用來作為表型標誌之基因，即花青素調節基因、異戊烯轉移酶基因及該類似物。

用語「報告基因」係指編碼識別因子之核酸，該識別因子能根據該報告基因之效應被識別，其中該效應係用於追

蹤感興趣之核酸的繼承性、識別已繼承感興趣之核酸的細胞或有機體，及/或測量基因表現誘導或轉錄。該領域已知及使用之報告基因實例包括：螢光素酶（Luc）、綠色螢光蛋白（GFP）、氯黴素乙醯轉移酶（CAT）、 β -半乳糖苷酶（LacZ）、 β -尿苷酸酶（Gus）及該類似物。可選擇之標誌基因亦可被認為是報告基因。

「啓動子」及「啓動子序列」可交換使用，係指能控制編碼序列或功能性 RNA 之表現的 DNA 序列。一般來說，編碼序列係位於啓動子序列之 3'端。啓動子可整體衍生自天然基因，或可由源自天然中所發現之不同啓動子的不同元件所組成，或甚至包含合成性 DNA 區段。該領域之技藝人士了解，不同的啓動子可能引導基因在不同的組織或細胞類型中表現，或在不同的發展階段表現，或因應不同的環境或生理條件表現。造成基因在大部分時間及大部分細胞類型中表現之啓動子通常被稱為「組成性啓動子」。造成基因在特定細胞類型中表現之啓動子通常被稱為「細胞特異性啓動子」或「組織特異性啓動子」。造成基因在特定發展或細胞分化階段表現之啓動子通常被稱為「發展特異性啓動子」或「細胞分化特異性啓動子」。在以劑、生物性分子、化學物、配體、光線或可誘導啓動子之類似物暴露或處理細胞之後被誘導且造成基因表現之啓動子通常被稱為「誘導性啓動子」或「調節性啓動子」。另外知道的是，由於在大部分情況中，調節序列之確切邊界並未被完全定義，因此不同長度之 DNA 片段可能具有相同之啓動子活性。

在本發明之任何載體中，該載體可任意選擇地包含此處所揭示之啓動子。在一實施態樣中，該啓動子係列示於此處之表 1 之啓動子。

在本發明之任何載體中，該載體可任意選擇地包含組織特異性啓動子。在一實施態樣中，該組織特異性啓動子係此處所揭示之組織特異性啓動子。在另一實施態樣中，該組織特異性啓動子係列示於此處之表 2 之組織特異性啓動子。

啓動子序列通常以彼之 3'端的轉錄起始位點爲界，延伸至上游（5'方向）以包括啓動在背景值以上可偵測之量之轉錄所需之最小數量之鹼基或元件。在該啓動子序列之內可發現轉錄起始位點（方便地以例如核酸酶 S1 之定位定義），和負責與 RNA 聚合酶結合之蛋白質結合結構域（一致序列）。

「治療性開關啓動子」（「TSP」）係指控制基因開關成份之表現的啓動子。見例如 US 2009/0098055，其現以參照方式整體納入此處。基因開關及彼等之各種成份係詳細描述於本說明書之其他地方。在某些實施態樣中，TSP 係組成性的，即具連續活性。組成性 TSP 可能爲全面組成性（即在任何組織或細胞中不需額外之因子或調節物而普遍地具有功能）或組織或細胞特異性組成性（即在特定組織類型或細胞類型中不需額外之因子或調節物而普遍地具有功能）。在某些實施態樣中，本發明之 TSP 在與疾病、疾患或狀況相關之條件下被活化。在本發明之某些涉及二或

多種 TSP 之實施態樣中，該等啓動子可爲組成性及活化性啓動子之組合。如此處所使用，「在疾病、疾患或狀況相關性條件下被活化之啓動子」包括但不限於疾病特異性啓動子、對特定生理性、發展性、分化性或病理性條件有反應之啓動子、對特定生物性分子有反應之啓動子，及對特定疾病、疾患或狀況相關性組織或細胞類型（例如腫瘤組織或惡性細胞）具特異性之啓動子。TSP 可包含天然發生之啓動子之序列、衍生自天然發生之啓動子的經修飾之序列，或合成性序列（例如將反應元件插入最小啓動子序列以改變該啓動子之反應性）。

當 RNA 聚合酶將細胞內之編碼序列轉錄成 mRNA 時，該編碼序列係在轉錄及轉譯控制序列之「控制下」，該 mRNA 接著經 RNA 反式剪切（若該編碼序列包含內含子）及轉譯成爲由該編碼序列所編碼之蛋白質。

「轉錄及轉譯控制序列」係指 DNA 調節序列，諸如啓動子、增強子、終止子及該類似序列，其用以在宿主細胞內表現編碼序列。在真核細胞中，聚腺苷酸化信號係控制序列。

用語「反應元件」係指一或多種順式作用之 DNA 元件，該元件授予經由與轉錄因子之 DNA-結合結構域交互作用所媒介之啓動子的反應性。此 DNA 元件在彼之序列中可爲迴文（完美或不完美）或由序列模體或被不等數量之核苷酸分開之半位點組成。該等半位點可爲類似或相同的，經排列爲正向或反向重複，或爲單一半位點或串聯鄰近

半位點之多聚體。依將納入反應元件之細胞或有機體之性質而定，該反應元件可包含分離自不同有機體之最小啟動子。在配體存在或不存在下，轉錄因子之 DNA 結合結構域與反應元件之 DNA 序列結合，以在此反應元件之調節下啟動或抑制下游基因之轉錄。天然蛻皮激素受體之反應元件的 DNA 序列實例包括：RRGG/TTCANTGAC/ACY Y (SEQ ID NO: 1) (見 Cherbas et. al., Genes Dev. 5:120 (1991))；AGGTCAN_(n)AGGTCA (SEQ ID NO: 2)，其中 N_(n)可為一或多種間隔子核苷酸 (見 D'Avino et al., Mol. Cell. Endocrinol. 113:1 (1995))；及 GGGTTGAATGAATTT (SEQ ID NO: 3) (見 Antoniewski et al., Mol. Cell Biol. 14:4465 (1994))。

用語「可操作性連接」係指核酸序列與單一核酸片段相連以致使一者之功能受到另一者之影響。舉例來說，當啟動子能影響編碼序列之表現時 (即編碼序列係在啟動子之轉錄控之下)，該啟動子係與該編碼序列可操作性連接。編碼序列可與調節序列以同義或反義之方向可操作性連接。

此處所使用之用語「表現」係指轉錄及穩定累積源自核酸或多核苷酸之同義 (mRNA) 或反義 RNA。表現亦可指將 mRNA 轉譯成蛋白質或多肽。

用語「卡匣」、「表現卡匣」及「基因表現卡匣」係指可在特定限制位點或藉由同源重組被插入核酸或多核苷酸之內的 DNA 區段。該 DNA 區段包含編碼感興趣多肽之多核苷

酸，且該卡匣及限制位點係經設計以確保該卡匣被插入適當之閱讀框以供轉錄及轉譯。「轉形卡匣」係指特定載體，其包含編碼感興趣之多肽的多核苷酸，且除了該多核苷酸以外還具有促進特定宿主細胞轉形之元件。本發明之卡匣、表現卡匣、基因表現卡匣及轉形卡匣亦可包含允許編碼感興趣之多肽的多核苷酸於宿主細胞內增進表現之元件。這些元件包括但不限於：啟動子、最小啟動子、增強子、反應元件、終止子序列、聚腺苷酸化序列及該類似序列。

為達本發明之目的，用語「基因開關」係指與啟動子相關之反應元件與以配體依賴性轉錄因子為基底之系統的組合，該以配體依賴性轉錄因子為基底之系統在一或多種配體存在下，可調控基因表現為該反應元件及啟動子係經納入。用語「編碼基因開關之多核苷酸」係指與啟動子相關之反應元件與編碼以配體依賴性轉錄因子為基底之系統的多核苷酸之組合，該以配體依賴性轉錄因子為基底之系統在一或多種配體存在下，可調控基因表現為該反應元件及啟動子係經納入。

本發明之治療性開關啟動子可為任何可用於治療、改善或預防特定疾病、疾患或狀況之啟動子。實例包括但不限於只在特定疾病、疾患或狀況期間展現增加表現之基因的啟動子及在特定細胞狀況下（例如增生、細胞凋亡、pH值改變、氧化狀態改變、氧氣量改變）展現增加表現之基因的啟動子。在基因開關包含超過一種轉錄因子序列之一些實施態樣中，該治療性方法之特異性可藉由組合疾病或

狀況特異性啓動子與組織或細胞類型特異性啓動子而增加，藉以限制該治療性產物在其中表現之組織。因此，組織或細胞類型特異性啓動子係包含於治療性開關啓動子之定義內。

以疾病特異性啓動子爲例，可用於治療癌之啓動子包括致癌基因之啓動子，包括用於治療貧血之啓動子。致癌基因之類別實例包括但不限於生長因子、生長因子受體、蛋白質激酶、計畫性細胞死亡調節物及轉錄因子。致癌基因之特定實例包括但不限於 *sis*、*erb B*、*erb B-2*、*ras*、*abl*、*myc* 及 *bcl-2* 及 *TERT*。其他癌相關基因之實例包括腫瘤相關性抗原基因及在腫瘤細胞中過度表現之基因（例如 *MAGE-1*、癌胚胎抗原、酪胺酸酶、前列腺特異性抗原、前列腺特異性膜抗原、*p53*、*MUC-1*、*MUC-2*、*MUC-4*、*HER-2/neu*、*T/Tn*、*MART-1*、*gp100*、*GM2*、*Tn*、*sTn* 及湯姆森-佛登斯列（*Thompson-Friedenreich*）抗原（*TF*））。

該領域已知且可用來作爲本發明之治療性開關啓動子之啓動子序列及其他調節元件（例如增強子）之實例係揭示於表 1 及 2 所揭示之參考文獻，同時列出與各啓動子相關之疾病/疾患（表 1）或組織特異性（表 2）。在表中引述之美國專利及經公開之美國申請案中所揭示之啓動子序列及其中所揭示之序列係以參照方式整體納入此處。

編碼表 1 所列之任何蛋白質之多核苷酸亦可利用本發明之具有非治療性啓動子之啓動子的載體表現。

表 1

啓動子序列	疾病/疾患	專利/公開申請案
Her-2/neu (ERBB2/c-erbB-2)	癌	5,518,885
骨鈣化素 (Osteocalcin)	鈣化腫瘤	5,772,993
溶基質素-1	癌	5,824,794
前列腺特異性抗原	前列腺癌	5,919,652
人鈉-碘共同轉運體	甲狀腺癌	6,015,376
H19、IF-1、IGF-2	癌	6,306,833
胸腺素 β 15	乳癌、胰癌、前列腺癌	6,489,463
T 細胞因子	癌	6,608,037
軟骨衍生性視黃酸敏感性蛋白質	軟骨肉瘤、乳房腫瘤	6,610,509
胰島素	胰臟癌	6,716,824
PEG-3	癌	6,737,523
端粒酶反轉錄酶	癌	6,777,203
黑色素瘤分化相關性基因-7	癌	6,841,362
前列腺蛋白	癌	6,864,093
端粒酶催化次單位；週期蛋白-A	癌	6,936,595
中期因子蛋白；c-erbB-2	癌	7,030,099
前列腺特異性膜抗原	前列腺癌	7,037,647
p51	癌	7,038,028
端粒酶 RNA	癌	7,084,267
前列腺酸性磷酸酶	前列腺癌	7,094,533
PCA3 _{dd3}	前列腺癌	7,138,235
DF3/MUC1	癌	7,247,297
hex II	癌	2001/0011128
環氧化酶-2	癌	2002/0107219
超 PSA	前列腺癌	2003/0078224
skp2	癌	2003/0109481
PRL-3	轉移性結腸癌	2004/0126785
CA125/M17S2	卵巢癌	2004/0126824
IAI.3B	卵巢癌	2005/0031591
CRG-L2	肝癌	2005/0124068
TRPM4	前列腺癌	2006/0188990
RTVP	神經膠質瘤	2006/0216731

啟動子序列	疾病/疾患	專利/公開申請案
TARP	前列腺癌、乳癌	2007/0032439
端粒反轉錄酶	癌	2007/0059287
A4 澱粉樣蛋白質	阿茲海默 (Alzheimer) 氏症	5,151,508
澱粉樣 β -蛋白前體	阿茲海默 (Alzheimer) 氏症	5,643,726
阿茲海默氏症 A4 澱粉樣蛋白質之前體	阿茲海默氏症	5,853,985
神經肽 FF	CNS 疾病	6,320,038
內質網壓力元件	壓力	7,049,132
尿皮質素 II	精神病理疾病	7,087,385
酪胺酸羥化酶	神經性疾病	7,195,910
補體因子 3；血清澱粉樣蛋白 A3	發炎	5,851,822
金屬蛋白酶 3 (TIMP-3) 之組織抑制劑	風濕症、癌、自體免疫疾病、發炎	5,854,019
p75 腫瘤壞死因子受體	自體免疫疾病	5,959,094
腫瘤壞死因子- α	發炎	6,537,784
過氧化物酶體增生物活化受體 /IIA-1 非胰分泌性磷脂酶 A2	發炎	6,870,044
SOCS-3	生長疾病、自體免疫疾病、發炎	2002/0174448
SR-BI	脂質疾病	5,965,790
Ob	肥胖	5,698,389
位點-1 蛋白酶	肥胖、糖尿病	7,045,294
TIGR	青光眼	7,138,511
VL30	缺氧症	5,681,706
興奮型胺基酸轉運蛋白-2	神經系統缺血	2004/0171108
MDTS9	腎衰竭	2006/0014931
LIM、吡咯啉 5-羧酸鹽還原酶、SIM2	前列腺疾病	2006/0134688
Bax	細胞凋亡	5,744,310
Fas	細胞凋亡	5,888,764
bbc3	細胞凋亡	7,202,024
PINK-1	PI-3 激酶/Akt 途徑疾患	2006/0228776

表 2

啟動子序列	組織特異性	專利/公開申請案
肌鈣蛋白 T	骨骼肌	5,266,488
myoD	肌肉	5,352,595
肌動蛋白	肌肉	5,374,544
平滑肌 22 α	動脈平滑肌	5,837,534
抗肌萎縮蛋白相關蛋白	肌肉	5,972,609
肌肉抑制素	肌肉	6,284,882
平滑肌肌球蛋白重鏈	平滑肌	6,780,610
心臟錨蛋白重複蛋白	心肌	7,193,075
MLP	肌肉	2002/0042057
平滑肌蛋白	平滑肌	2003/0157494
MYBPC3	心肌細胞	2004/0175699
T α 1 α 微管蛋白	神經元	5,661,032
細胞間黏附分子-4 (ICAM-4)	神經元	5,753,502
γ -胺基丁酸 A 型受體 β 1 次單位	海馬迴	6,066,726
神經元菸鹼性乙醯膽鹼受體 β 2 次單位	神經元	6,177,242
早老蛋白-1	神經元	6,255,473
鈣-鈣調蛋白依賴性激酶 II α	前腦	6,509,190
CRF _{2α} 受體	腦	7,071,323
神經生長因子	神經元	2003/159159
GLP-2 受體	腸、腦	2002/0045173
第 I 型轉羧醯胺酶	角質細胞	5,643,746
K14	角質細胞	6,596,515
硬脂醯輔酶 A 去飽和酶	皮膚	2002/0151018
Megsin 蛋白	腎細胞	6,790,617
泌乳素	腦下垂體	5,082,779
GDF-9	卵巢、睪丸、下視丘、 腦下垂體、胎盤	7,227,013
PSP94	前列腺	2003/0110522
NRL、NGAL	乳腺	5,773,290
長乳清酸蛋白	乳腺	5,831,141
乳房相關性澱粉樣蛋白 A	乳管上皮細胞	2005/0107315

啟動子序列	組織特異性	專利/公開申請案
內皮素-1	內皮細胞	5,288,846
絲甘蛋白	造血細胞	5,340,739
血小板-內皮細胞黏附分子-1 (PECAM-1)	血小板、白血球、內皮細胞	5,668,012
Tie 受體酪胺酸激酶	內皮細胞、骨髓	5,877,020
KDR/flk-1	內皮細胞	5,888,765
內皮糖蛋白	內皮細胞	6,103,527
CCR5	骨髓細胞及淋巴樣細胞	6,383,746
CD11d	骨髓細胞	6,881,834
血小板糖蛋白 IIb	造血細胞	6,884,616
前內皮素原-1	內皮細胞	7,067,649
介白素-18 結合蛋白	單核細胞	2006/0239984
CD34	造血幹細胞	5,556,954
Tec 酪胺酸激酶	造血幹細胞、肝臟	6,225,459

在特定疾病或疾患期間展現改變之表現量且因此可提供可用於本發明之啟動子的其他基因包括但不限於表 3 所列之基因（亦列出相關疾病/疾患）。

表 3

基因	疾病/疾患	專利/公開申請案
MLH1、MSH2、MSH6、PMS1、APC	結直腸癌	7,148,016
LEF-1	結腸癌	2002/0169300
F ₂ 受體	結腸癌	2002/0187502
TGF- β 第 II 型受體	結腸癌	2004/0038284
EYA4	結腸癌	2005/0003463
PCA3	前列腺癌	7,138,235
K2	前列腺癌	6,303,361
PROST 03	前列腺癌轉移	2002/0009455
PCAM-1	前列腺癌	2002/0042062

基因	疾病/疾患	專利/公開申請案
PCADM-1	前列腺癌	2003/0100033
PCA3 _{dd3}	前列腺癌	2003/0165850
PCAV	前列腺癌	2006/0275747
PAcP	雄性素不敏感性前列腺癌	2006/0294615
專利 5,866,329 之 SEQ ID NO: 1 ，以參照方式納入此處	肝癌	5,866,329
美國專利申請公開案 2002/0115094 之 SEQ ID NO: 1、 3，以參照方式納入此處	肝細胞癌	2002/0115094
美國專利申請公開案 2005/0037372 之 SEQ ID NO: 1， 以參照方式納入此處	肝細胞癌	2005/0037372
ATB ₀	肝細胞癌	2006/0280725
美國專利申請公開案 2007/0042420 之 SEQ ID NO: 1、 3	肝癌	2007/0042420
CSA-1	軟骨肉瘤	2001/0016649
美國專利申請公開案 2001/0016651 之 SEQ ID NO: 1-15 ，以參照方式納入此處	胰臟癌	2001/0016651
美國專利申請公開案 2003/0212264 之 SEQ ID NO: 1-15 ，以參照方式納入此處	胰臟癌	2003/0212264
SYG972	乳癌	2002/0055107
Urb-ctf	乳癌	2003/0143546
BCU399	乳癌	2003/0180728
TBX2	乳癌	2004/0029185
Cyr61	乳癌	2004/0086504
DIAPH3	乳癌	2005/0054826
美國專利申請公開案 2007/0134669 之 SEQ ID NO: 1-24 ，以參照方式納入此處	乳癌	2007/0134669

基因	疾病/疾患	專利/公開申請案
人天冬胺醯（天冬醯胺醯） β -羧化酶	CNS 癌	2002/0102263
BEHAB	CNS 癌	2003/0068661
IL-8	卡波西氏肉瘤	2003/0096781
美國專利申請公開案 2002/0198362 之 SEQ ID NO: 1-278，以參照方式納入此處	血液性癌症	2002/0198362
BLSA	B 細胞癌	2003/0147887
BP1	白血病	2003/0171273
DAP-激酶、HOXA9	非小細胞肺癌	2003/0224509
ARP	腎透明細胞癌、發炎性疾患	2004/0010119
Nbk	腎癌	2005/0053931
CD43	卵巢癌	2006/0216231
美國專利申請公開案 2007/0054268 之 SEQ ID NO: 1-84，以參照方式納入此處	卵巢癌	2007/0054268
β 7-hcG、 β 6-hCG、 β 6e-hCG、 β 5-hCG、 β 8-hcG、 β 3-hCG	子宮腫瘤	2006/0292567
MTA1s	荷爾蒙不敏感性癌	2006/0204957
Old-35、Old-64	腫瘤增生	2003/0099660
LAGE-1	癌	6,794,131
CIF150/hTAF _{II} 150	癌	6,174,679
P65 瘤胎蛋白	癌	5,773,215
端粒酶	癌	2002/0025518
CYP1B1	癌	2002/0052013
14-3-3 σ	癌	2002/0102245
NES1	癌	2002/0106367
CAR-1	癌	2002/0119541
HMG1、MAG	癌	2002/0120120
ELL2	癌	2002/0132329
Eph 受體配體（Ephrin）B2	癌	2002/0136726
WAF1	癌	2002/0142442
CIF130	癌	2002/0143154

基因	疾病/疾患	專利/公開申請案
C35	癌	2002/0155447
BMP2	癌	2002/0159986
BUB3	癌	2002/0160403
聚合酶 κ	癌	2003/0017573
EAG1、EAG2	癌	2003/0040476
美國專利申請公開案 2003/0044813 之 SEQ ID NO: 18 、20、22，以參照方式納入此處	癌	2003/0044813
HMG I	癌	2003/0051260
HLTF	癌	2003/0082526
Barx2	癌	2003/0087243
美國專利申請公開案 2003/0108920 之 SEQ ID NO: 18 、20、22、32、34、36，以參照 方式納入此處	癌	2003/0108920
Cables	癌	2003/0109443
Pp 32r1	癌	2003/0129631
BMP4	癌	2003/0134790
TS10q23.3	癌	2003/0139324
核紡錘體相關蛋白	癌	2003/0157072
PFTAIRE	癌	2003/0166217
SEMA3B	癌	2003/0166557
MOGp	癌、多發性硬化症、發 炎性疾病	2003/0166898
Fortilin	癌	2003/0172388
美國專利申請公開案 2003/0215833 之 SEQ ID NO: 1， 以參照方式納入此處	癌	2003/0215833
IGFBP-3	癌	2004/0005294
多均勻性 2 (Polyhomeotic 2)	癌	2004/0006210
PNQALRE	癌	2004/0077009
美國專利申請公開案 2004/0086916 之 SEQ ID NO: 1、 3，以參照方式納入此處	癌	2004/0086916

基因	疾病/疾患	專利/公開申請案
SCN5A	癌	2004/0146877
miR15、miR16	癌	2004/0152112
頭頸部絲胺酸蛋白酶抑制劑 (Headpin)	癌	2004/0180371
PAOh1/SMO	癌	2004/0229241
Hippo、Mst2	癌	2005/0053592
PSMA 樣	癌、神經性疾患	2005/0064504
JAB1	癌	2005/0069918
NF-AT	癌	2005/0079496
P28ING5	癌	2005/0097626
MTG16	癌	2005/0107313
ErbB-2	癌	2005/0123538
HDAC9	癌	2005/0130146
GPBP	癌	2005/0130227
MG20	癌	2005/0153352
KLF6	癌	2005/0181374
ARTS1	癌	2005/0266443
Dock 3	癌	2006/0041111
膜聯蛋白 8	癌	2006/0052320
MH15	癌	2006/0068411
DELTA-N p73	癌	2006/0088825
RapR6	癌	2006/099676
StarD10	癌	2006/0148032
Ciz1	癌	2006/0155113
HLJ1	癌	2006/0194235
RapR7	癌	2006/0240021
A34	癌	2006/0292154
Sef	癌	2006/0293240
Killin	癌	2007/0072218
SGA-1M	癌	2007/0128593
TGF- β 第 II 型受體	癌	2002/0064786
GCA-相關基因	巨大細胞動脈炎	6,743,903
PRV-1	真性紅血球增多症	6,686,153

基因	疾病/疾患	專利/公開申請案
美國專利第 5,948,637 號之 SEQ ID NO: 2、4，以參照方式納入此處	缺血	5,948,637
Vezfl	血管性疾患	2002/0023277
MLP	擴張性心肌病	2002/0042057
VEGI	病理性血管生成	2002/0111325
PRO256	心血管疾患	2002/0123091
AOP2	動脈粥樣硬化	2002/0142417
重塑蛋白	動脈再狹窄、纖維化	2002/0161211
磷酸二酯酶 4D	中風	2003/0054531
前列腺素受體亞型 EP3	週邊動脈阻塞性疾病	2003/0157599
CARP	心臟疾患	2004/0014706
HOP	先天性心臟病	2004/0029158
美國專利申請公開案 2004/0087784 之 SEQ ID NO: 1-4 ，以參照方式納入此處	中風（Apoplexy）	2004/0087784
PLTP	動脈粥樣硬化、血管性 疾病、高膽固醇血症、 丹吉爾（Tangier）氏症 、家族性 HDL 缺陷性疾 病	2006/0252787
美國專利申請公開案 2007/0160996 之 SEQ ID NO: 1、 3 至 8、15、16，以參照方式納入 此處	血栓形成	2007/0160996
UCP-2	中風	2002/0172958
FLJ11011	范康尼（Fanconi）氏貧 血	2006/0070134
Codanin-1	貧血	2006/0154331
美國專利第 5,763,591 號之 SEQ ID NO: 1、6、8，以參照方式納 入此處	胰島素依賴性糖尿病	5,763,591
抵抗素	第二型糖尿病	2002/0161210
Archipelin	糖尿病	2003/0202976

基因	疾病/疾患	專利/公開申請案
美國專利申請公開案 2004/0053397 之 SEQ ID NO: 2、 7、16、27，以參照方式納入此處	糖尿病、高脂血症	2004/0053397
Neuronatin	代謝性疾患	2004/0259777
Ncb5or	糖尿病	2005/0031605
7B2	內分泌性疾患	2005/0086709
PTHrP、PEX	代謝性骨疾病	2005/0113303
KChIP1	第二型糖尿病	2005/0196784
SLIT-3	第二型糖尿病	2006/0141462
CX3CR1	第二型糖尿病	2006/0160076
SMAP-2	糖尿病	2006/0210974
美國專利申請公開案 2006/0228706 之 SEQ ID NO: 2、 8、12、16、22、26、28、32，以 參照方式納入此處	第二型糖尿病	2006/0228706
IC-RFX	糖尿病	2006/0264611
E2IG4	糖尿病、胰島素抗藥性 、肥胖	2007/0036787
美國專利申請公開案 2007/0122802 之 SEQ ID NO: 2、8 、10、14、18、24、26、30、34 、38、44、50、54、60、62、68 、74、80、86、92、98、104、 110，以參照方式納入此處	糖尿病	2007/0122802
UCP2	體重疾病	2002/0127600
Ob 受體	體重疾病	2002/0182676
Ob	體重疾病	2004/0214214
Dp1	神經變性疾患	2001/0021771
NRG-1	精神分裂症	2002/0045577
突觸蛋白 III	精神分裂症	2002/0064811
NRG1AG1	精神分裂症	2002/0094954
AL-2	神經元性疾患	2002/0142444
脯胺酸去氫酶	雙極性疾病、重鬱症、 精神分裂症、強迫症	2002/0193581

基因	疾病/疾患	專利/公開申請案
MNR2	慢性神經變性疾病	2002/0197678
ATM	共濟失調微血管擴張症候群	2004/0029198
Ho-1	失智症	2004/0033563
CON202	精神分裂症	2004/0091928
Ataxin-1	神經變性疾患	2004/0177388
NR3B	運動性神經元疾患	2005/0153287
NIPA-1	遺傳性痙攣性截癱	2005/0164228
DEPP、腎上腺髓質素、csdA	精神分裂症	2005/0227233
Inf-20	神經變性疾病	2006/0079675
EOPA	腦發展及變性疾患	2007/0031830
SERT	自閉症	2007/0037194
FRP-1	青光眼	2002/0049177
血清澱粉樣蛋白 A	青光眼	2005/0153927
BMP2	骨質疏鬆症	2002/0072066
BMPR1A	幼年型息肉症	2003/0072758
ACLP	腹裂畸形	2003/0084464
抗胰島素激素 (Resistin) 樣分子 β	家族性腺瘤性瘻肉症、糖尿病、胰島素抗性、結腸癌、發炎性腸疾病	2003/0138826
Dlg5	發炎性腸疾病	2006/0100132
美國專利申請公開案 2002/0119452 之 SEQ ID NO: 1-82 ，以參照方式納入此處	骨關節炎	2002/0119452
TRANCE	免疫系統疾患	2003/0185820
基質蛋白-3	骨關節炎	2003/0203380
滑膜蛋白	類風濕性關節炎	2004/0152871
美國專利申請公開案 2007/0028314 之 SEQ ID NO: 9、35，以參照方式納入此處	骨關節炎	2007/0028314
HIV LTR	HIV 感染	5,627,023
SHIVA	HIV 感染	2004/0197770
EBI 1、EBI 2、EBI 3	EB 病毒感染	2002/0040133
NM23 家族	皮膚/小腸疾患	2002/0034741

基因	疾病/疾患	專利/公開申請案
美國專利申請公開案 2002/0169127 之 SEQ ID NO: 1 , 以參照方式納入此處	牛皮癬	2002/0169127
Eps8	皮膚疾患、傷口癒合	2003/0180302
β -10	甲狀腺病理學	2002/0015981
美國專利申請公開案 2003/0207403 之 SEQ ID NO: 2 , 以參照方式納入此處	甲狀腺狀況	2003/0207403
美國專利申請公開案 2007/0020275 之 SEQ ID NO: 3 , 以參照方式納入此處	甲狀腺疾患	2007/0020275
毛囊生長因子	脫髮	2003/0036174
角質鎖鏈素 (Corneodesmosin)	脫髮	2003/0211065
GCR9	氣喘、淋巴瘤、白血病	2003/0166150
美國專利申請公開案 2004/0002084 之 SEQ ID NO: 1-71 ，以參照方式納入此處	氣喘	2004/0002084
Bg	薛迪克-東氏 (Chediak-Higashi) 症候群	2002/0115144
美國專利申請公開案 2002/0127555 之 SEQ ID NO: 1-16 ，以參照方式納入此處	子宮內膜異位症	2002/0127555
FGF23	低血磷性疾患	2005/0156014
BBSR	巴德-畢德 (Bardet-Biedl)) 氏症候群	2003/0152963
MIC-1	胎兒異常、癌、發炎性 疾患、流產、早產	2004/0053325
MIA-2	肝傷害	2004/0076965
IL-17B	軟骨退行性疾患	2004/0171109
甲醯甘胺酸產生酶	多發性硫酸脂酶缺陷症	2004/0229250
LPLA2	肺泡蛋白沉著症	2006/0008455
CXCL10	呼吸疾病	2006/0040329

基因	疾病/疾患	專利/公開申請案
美國專利申請公開案 2006/0140945 之 SEQ ID NO: 1、 2，以參照方式納入此處	腎病	2006/0140945
HFE2A	鐵代謝性疾病	2007/0166711

一旦辨識出在疾病、疾患或狀況過程中經調節之具表現模式之基因，該基因之啟動子可被用於本發明之基因開關。許多基因之序列（包括啟動子區域）係該領域所知，且可自公眾資料庫例如 GenBank 取得。因此，一旦識別出適當基因，該啟動子序列可被輕易地識別及取得。本發明之另一態樣關於識別適當基因，該適當基因之啟動子可被分離及放置於基因開關之中。因此，該基因之特性對本發明之特定實施態樣無關重要，只要該啟動子可被分離以用於後續設定或環境。本發明因此包括使用來自尚未被識別之基因的啟動子。一旦找出適當之基因，測定啟動子功能所需之基因序列係屬例行技藝或實驗。事實上，有多種商用程序可用於協助測定感興趣之基因的啟動子區域。舉例來說，丁（Ding）等人最近藉由逐步刪除人 Sprouty4 基因之 5'-側翼序列以闡明新穎之 Sprouty4 基因的啟動子序列（Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 287: L52（2004），以參照方式納入此處）。簡言之，當決定轉錄起始位點後，利用共同 PCR 引子產生 PCR 片段以在單一方向選殖 5'-側翼區段之區段。該產生之區段被選殖至螢光素酶受體載體，測量螢光素酶之活性以決定人 Sprouty4 基因之啟動子區域。

另一獲得及驗證基因啟動子之程序實例包括下列步驟：
（1）取得類似/相同組織類型之疾病及非疾病細胞/組織樣本；（2）自該等樣本分離全 RNA 或 mRNA；（3）進行疾病及非疾病 RNA 之差異微陣列分析；（4）找出候選疾病特異性轉錄物；（5）找出與疾病特異性轉錄物有關之基因組序列；（6）取得或合成該疾病特異性轉錄物之預測轉錄起始位點上游及下游的 DNA 序列；（7）利用得自步驟 6 之不同長度之 DNA 設計及產製啟動子報告子載體；及（8）在疾病及非疾病細胞/組織及不相關細胞/組織中測試啟動子報告子載體。

被插入基因開關中之啟動子的來源可為天然或合成性，該啟動子之來源不應限制此處所述之本發明之範圍。換言之，該啟動子可能直接自細胞選殖，或該啟動子可能自不同來源選殖，或該啟動子可能為合成性。

在另一實施態樣中，編碼表 1 至 3 中之任一基因產物之多核苷酸可被用於本發明之載體及方法以用於治療用途及診斷目的。

基因開關系統

基因開關可能為藉由添加或移除特定配體以調節基因表現之任何基因開關。在一實施態樣中，該基因開關係一種其中基因表現之量取決於配體之存在量的基因開關。可用於本發明之基因開關之配體依賴性轉錄因子複合物之實例包括但不限於由彼等之個別配體（例如糖皮質素、雌激

素、黃體激素、類視色素、蛻皮激素及彼等之類似物或擬似物) 所活化之核受體超家族之成員及由四環素活化之 rTTA。在本發明之一態樣中，該基因開關係 EcR-基底基因開關。該等系統之實例包括但不限於美國專利第 6,258,603 號、美國專利第 7,045,315 號、美國公開專利申請案第 2006/0014711、2007/0161086 號及國際公開申請案第 WO 01/70816 號中所述之系統。嵌合性蛻皮激素受體系統之實例係描述於美國專利第 7,091,038 號、美國公開專利申請案第 2002/0110861、2004/0033600、2004/0096942、2005/0266457 及 2006/0100416 號及國際公開申請案第 WO 01/70816、WO 02/066612、WO 02/066613、WO 02/066614、WO 02/066615、WO 02/29075 及 WO 2005/108617 號，以上各以參照方式整體納入此處。非固醇性蛻皮激素促效劑調節系統之實例係 RheoSwitch[®] 哺乳動物誘導性表現系統 (麻州伊普斯維奇 (Ipswich, MA) 新英格蘭生物實驗室 (New England Biolabs) 公司)。在本發明之另一態樣中，該基因開關係以 FK506 結合蛋白 (FKBP) 與 FKBP 雷帕黴素相關蛋白 (FRAP) 之異二聚化為基底，且由雷帕黴素或彼之非免疫抑制性類似物調節。該等系統之實例包括但不限於 ARGENT[™] 轉錄技術 (麻州劍橋市 ARIAD 藥廠) 及美國專利第 6,015,709、6,117,680、6,479,653、6,187,757 及 6,649,595 號所描述之系統。

在一實施態樣中，該基因開關包含在治療性開關啟動子之控制下編碼配體依賴性轉錄因子複合物之單一轉錄因

子序列。該轉錄因子序列可能編碼天然發生之配體依賴性轉錄因子複合物或人工配體依賴性轉錄因子複合物。人工轉錄因子係其中該轉錄因子之天然序列已被改變之轉錄因子，例如藉由序列突變或藉由組合來自不同轉錄因子之結構域。在一實施態樣中，該轉錄因子包含 H 組核受體配體結合結構域。在一實施態樣中，H 組核受體配體結合結構域係來自蛻皮激素受體、遍在受體（UR）、孤兒受體 1（OR-1）、類固醇激素核受體 1（NER-1）、類視色素 X 受體交互作用蛋白-15（RIP-15）、肝 X 受體 β （LXR β ）、類固醇激素受體樣蛋白（RLD-1）、肝 X 受體（LXR）、肝 X 受體 α （LXR α ）、類法尼醇 X 受體（FXR）、受體交互作用蛋白 14（RIP-14）或法尼醇受體（HRR-1）。在另一實施態樣中，H 組核受體 LBD 係源自蛻皮激素受體。

A. 蛻皮激素基底基因開關

EcR 及其他 H 組核受體係核受體超家族之成員，其中所有成員之一般特徵為具備可任意選擇地與異二聚體伴（HP）融合以形成共活化蛋白（CAP）之胺基端反式活化結構域（AD，亦可互換地稱為「TA」或「TD」）、DNA 結合結構域（DBD）及經由鉸鏈區與 DBD 融合之 LBD 以形成配體依賴性轉錄因子（LTF）。此處所使用之用語「DNA 結合結構域」包含自最小多肽序列之 DNA 結合蛋白至全長 DNA 結合蛋白，只要該 DNA 結合結構域之功能為與特定

反應元件相連。核受體超家族成員之特徵亦包括具備四或五個結構域：A/B、C、D、E，有些成員具備 F 結構域（見美國專利第 4,981,784 號及 Evans, Science 240:889 (1988)）。該「A/B」結構域對應反式活化結構域，「C」對應 DNA 結合結構域，「D」對應鉸鏈區，及「E」對應配體結合結構域。有些家族成員亦在對應「F」之 LBD 的羧基端側具有另一反式活化結構域。

下列多肽序列係經報告為蛻皮激素受體（蛻皮類固醇受體）之多肽序列（20-羥基-蛻皮激素受體）（20E 受體）（EcRH）（核受體子家族 1 之 H 組成員 1），Genbank 編號為 P34021。

源自黑腹果蠅（*Drosophila melanogaster*）之蛻皮激素受體（878 個胺基酸）（SEQ ID NO:5）

```

1 mkrrwsnngg fmrlpeesss evtsssnnglv lpsgvnmssp sldshdycdq dlwlcgnesg
61 sfggsnghgl sqqqqsvitl amhgcsstlp aqttiiping nangnggstn gqyvp gatnl
121 galangmlng gfngmqqqiq nghglinstt pstpttplhl qqnlggaggg giggmgilhh
181 angtpnglig vvgggggvvl gvvgggvggl gmqhtprsdv vnsissgrdd lspssslngy
241 sanescdakk skkgpaprvq eelclvcgdr asgyhynalt cegckgffrr svtksavyc
301 kfgracemdm ymrrkcqecr lkkclavgmr pecvvpengc amkrrekkaq kekdkmttsp
361 ssqhgngsl asgggqdfvk keildlmtce ppqhatipll pdeilakcqa rnipsltynq
421 laviykliwy qdgyeqpsee dlrrimsqpd enesqtdvsf rhiteitilt vqlivefakg
481 lpaftkipqe dqitllkacs sevmmrlmar rydhssdsif fannrsytrd sykmagmadn
541 iedllhfcrcq mfsmkvdnve yalltaivif sdrpglekaq lveaiqsyyi dtlriyilnr
601 hcgdmsmlvf yakllsilte lrtlgngnae mcfslklknr klpkfleew dvhaippsvq
661 shlqitqeen erleraermr asvggaitag idcdsasts aaaaqhqpq pqpqpqpsl
721 tqndsqhqtq pqlqpqlppq lqqqlqpqlq pqlqtqlqpq iqppqqlpv sapvpasvta
781 pgslsavsts seymggsaai gpitpattss itaavtasst tsavpmgngv gvgvgvggnv
841 smyanaqtam almgvalhsh qeqliggvav ksehstta

```

在一實施態樣中，該蛻皮激素受體配體結合結構域係選自無脊椎動物蛻皮激素受體配體結合結構域、節肢動物門蛻皮激素受體配體結合結構域、鱗翅類昆蟲（Lepidopteran）蛻皮激素受體配體結合結構域、雙翅類昆蟲（Dipteran）蛻皮激素受體配體結合結構域、直翅類昆

蟲 (Orthopteran) 蛻皮激素受體配體結合結構域、同翅類
 昆蟲 (Homopteran) 蛻皮激素受體配體結合結構域、半翅
 類昆蟲 (Hemipteran) 蛻皮激素受體配體結合結構域、雲
 杉芽捲蛾 (Choristoneura fumiferana) EcR 蛻皮激素受體
 配體結合結構域、黃粉蟲 (Tenebrio molitor) 蛻皮激素受
 體配體結合結構域、天蛾 (Manduca sexta) 蛻皮激素受體
 配體結合結構域、綠棉夜蛾 (Heliothis virescens) 蛻皮激
 素受體配體結合結構域、搖蚊 (Chironomus tentans) 蛻
 皮激素受體配體結合結構域、桑蠶 (Bombyx mori) 蛻皮
 激素受體配體結合結構域、叢林斜眼褐蝶 (Bicyclus
 anynana) 蛻皮激素受體配體結合結構域、鹿眼蝶 (Junonia coenia)
 蛻皮激素受體配體結合結構域、黑腹果
 蠅 (Drosophila melanogaster) 蛻皮激素受體配體結合結
 構域、埃及斑蚊 (Aedes aegypti) 蛻皮激素受體配體結合
 結構域、綠頭蒼蠅 (Lucilia capitata) 蛻皮激素受體配體
 結合結構域、銅綠蠅 (Lucilia cuprina) 蛻皮激素受體配
 體結合結構域、紅頭麗蠅 (Calliphora vicina) 蛻皮激素
 受體配體結合結構域、地中海果實蠅 (Ceratitis capitata)
) 蛻皮激素受體配體結合結構域、飛蝗 (Locusta
 migratoria) 蛻皮激素受體配體結合結構域、桃蚜 (Myzus
 persicae) 蛻皮激素受體配體結合結構域、大西洋砂招潮
 蟹 (Celuca pugilator) 蛻皮激素受體配體結合結構域、美
 洲鈍眼蜉 (Amblyomma americanum) 蛻皮激素受體配體
 結合結構域、銀葉粉蝨 (Bamecia argentifoli) 蛻皮激素

受體配體結合結構域、或偽黑尾葉蟬（*Nephotetix cincticeps*）蛻皮激素受體配體結合結構域。

在另一實施態樣中，該蛻皮激素受體配體結合結構域係雲杉芽捲蛾（*Choristoneura fumiferana*）蛻皮激素受體配體結合結構域，其胺基酸序列係如 SEQ ID NO:1 所示。

在另一實施態樣中，該蛻皮激素受體配體結合結構域係雲杉芽捲蛾蛻皮激素受體配體結合結構域之類似物，其保留雲杉芽捲蛾蛻皮激素受體配體結合結構域之試管內雲杉芽捲蛾蛻皮激素受體配體結合活性的至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%。試管內蛻皮激素受體配體結合試驗係該領域之一般技藝人士所廣為周知。見例如 WO 02/066612。

在另一實施態樣中，該蛻皮激素受體配體結合結構域類似物係於 WO 02/066612、US 2006/0100416、WO 05/108617 及 2005/0266457 揭示之蛻皮激素受體配體結合結構域。在另一實施態樣中，該蛻皮激素受體配體結合結構域類似物係 SEQ ID NO:7 之 V107I/Y127E 取代突變。

DBD 之特徵為具備二個半胱胺酸鋅手指，在其間為二個胺基酸模體 P 盒及 D 盒，該二模體授予反應元件特異性。這些結構域可為天然結構域、經改質之結構域或異源性受體蛋白質之不同結構域之嵌合體。EcR 如同核受體家族之亞群，亦具備定義較不明確之造成異二聚化性質之區域。由於核受體之結構域在天然中係經模塊化，因此 LBD、DBD 及 AD 可能可互相交換。

在另一實施態樣中，該轉錄因子包含 AD、DBD 及 H 組核受體 LBD，該 DBD 辨識與治療性蛋白質或治療性多核苷酸相連之反應元件以調節該治療性蛋白質或治療性多核苷酸之表現。在某些實施態樣中，該 H 組核受體 LBD 包含取代突變。

該 DNA 結合結構域可為任何具有已知反應元件之 DNA 結合結構域（DBD），包括合成性及嵌合性 DNA 結合結構域或彼等之類似物、組合或修飾物。在一實施態樣中，該 DNA 結合結構域係選自 GAL4 DBD、LexA DBD、轉錄因子 DBD、H 組核受體成員 DBD、類固醇/甲狀腺素核受體超家族成員 DBD、細菌性 LacZ DBD、EcR DBD、GAL4 DBD 或 LexA DBD。

該反式活化結構域（縮寫為"AD"或"TA"）可為任何 H 組核受體成員 AD、類固醇/甲狀腺素核受體 AD、合成性或嵌合性 AD、聚麩醯胺 AD、鹼性或酸性胺基酸 AD、VP16 AD、GAL4 AD、NF- κ B AD、BP64 AD、B42 酸活化結構域（B42AD）、p65 反式活化結構域（p65AD）、或彼等之類似物、組合或改質物。

在另一實施態樣中，基因開關包含在第一治療性開關啟動子（TSP-1）控制下之第一轉錄因子序列（例如 CAP），及在第二治療性開關啟動子（TSP-2）控制下之第二轉錄因子序列（例如 LTF），其中由該第一轉錄因子序列及該第二轉錄因子序列編碼之蛋白質交互作用以形成蛋白質複合物（LDTFC），即以「雙重開關」或「雙雜交物」為基

底之基因開關。第一及第二 TSP 可為相同或不同。在此實施態樣中，在表現治療性分子所需之基因開關中存在之二種不同的 TSP 增進治療性方法之特異性（見 WO 2011/119773 之圖 2）。WO 2011/119773 之圖 2 亦顯示藉由單純地插入適當之 TSP 以改質治療性基因開關以治療任何疾病、疾患或狀況之能力。

在另一實施態樣中，該第一及第二轉錄因子序列（例如 CAP 或 LTF）皆在單一治療性開關啟動子之控制下（例如 WO 2011/119773 之圖 1 中之 TSP-1）。此啟動子之活化將在單一開放閱讀框內產製 CAP 及 LTF。此可藉由使用轉錄連接子諸如 IRES（內部核糖體進入位點）達成。在此實施態樣中，該配體依賴性轉錄因子複合物之兩部分在 TSP-1 活化時合成。TSP-1 可為組成性啟動子或僅在與疾病、疾患或狀況相關之條件下被活化。

在另一實施態樣中，一轉錄因子序列（例如 LTF）係在治療性開關啟動子之控制下，該啟動子僅在與疾病、疾患或狀況相關之條件下被活化（例如 WO 2011/119773 之圖 4 中之 TSP-2 或 TSP-3），另一轉錄因子序列（例如 CAP）係在組成性治療性開關啟動子（例如 WO 2011/119773 之圖 4 中之 TSP-1）之控制下。在此實施態樣中，該配體依賴性轉錄因子複合物之一部分係組成性存在，然而該第二部分將僅在與疾病、疾患或狀況相關之條件下被合成。

在另一實施態樣中，一轉錄因子序列（例如 CAP）係在第一 TSP（例如 WO 2011/119773 之圖 3 中之 TSP-1）

之控制下，而二或多種不同的第二轉錄因子序列（例如 LTF-1 及 LTF-2）係在不同的 TSP（例如 WO 2011/119773 之圖 3 中之 TSP-2 及 TSP-3）之控制下。在此實施態樣中，各種 LTF 可能具有辨識不同因子調節性啟動子序列之不同 DBD，例如 DBD-A 與因子調節性啟動子-1（FRP-1）相關性反應元件結合，DBD-B 與因子調節性啟動子-2（FRP-2）相關性反應元件結合。各種因子調節性啟動子可與不同的治療性基因可操作性連接。以此方式，可同時提供多重治療。

在一實施態樣中，第一轉錄因子序列編碼包含 AD、DBD 及 H 組核受體 LBD 之多肽，該 DBD 辨識與治療性產物序列相連之反應元件以調節該治療性產物序列之表現，第二轉錄因子序列編碼包含核受體 LBD 之轉錄因子，該 LBD 選自脊椎動物類視色素 X 受體（RXR）、無脊椎動物 RXR、超氣門蛋白（USP）或包含至少二種不同之選自脊椎動物 RXR、無脊椎動物 RXR 或 USP 之核受體配體結合結構域多肽片段之嵌合性核受體（見 WO 01/70816 A2 及 US 2004/0096942 A1）。「伴」核受體配體結合結構域可另包含截短突變、刪除突變、取代突變或其他修飾。

在另一實施態樣中，基因開關包含編碼第一多肽之第一轉錄因子序列及編碼第二多肽之第二轉錄因子序列，該第一多肽包含核受體 LBD 及 DBD，該 DBD 辨識與治療性產物序列相連之反應元件以調節該治療性產物序列之表現，該第二多肽包含 AD 及核受體 LBD，其中核受體 LBD 之

一係 H 組核受體 LBD。在一實施態樣中，該第一多肽係實質上不含 AD，該第二多肽係實質上不含 DBD。就本發明之目的而言，「實質上不含」係指有問題之蛋白質不包含有問題之結構域的足夠序列來提供活化或結合活性。

在本發明之另一態樣中，該第一轉錄因子序列編碼包含異二聚體伴及 AD 之蛋白質（「CAP」），該第二轉錄因子序列編碼包含 DBD 及 LBD 之蛋白質（「LTF」）。

當只有一個核受體 LBD 係 H 組 LBD 時，另一核受體 LBD 可能來自任何其他核受體以與 H 組 LBD 形成二聚體。舉例來說，當 H 組核受體 LBD 係 EcR LBD 時，其他核受體 LBD「伴」可能來自 EcR、脊椎動物 RXR、無脊椎動物 RXR、超氣門蛋白（USP）或包含至少二種不同之選自脊椎動物 RXR、無脊椎動物 RXR 或 USP 之核受體 LBD 多肽片段之嵌合性核受體（見 WO 01/70816 A2、國際專利申請案 PCT/US02/05235、US 2004/0096942 A1 及美國專利第 7,531,326 號，以參照方式整體納入此處）。「伴」核受體配體結合結構域可另包含截短突變、刪除突變、取代突變或其他修飾。

在一實施態樣中，脊椎動物 RXR LBD 係來自人智人（*Homo sapiens*）、小鼠家鼯鼠（*Mus musculus*）、大鼠溝鼠（*Rattus norvegicus*）、雞原雞（*Gallus gallus*）、豬家豬（*Sus scrofa domestica*）、青蛙非洲爪蟾（*Xenopus laevis*）、斑馬魚斑馬魚（*Danio rerio*）、被囊動物三崎海鞘（*Polyandrocarpa misakiensis*）或水母箱型水母（

Tripedalia cysophora) 之 RXR。

在一實施態樣中，無脊椎動物 RXR 配體結合結構域係來自蝗蟲飛蝗 (*Locusta migratoria*) 之超氣門多肽 (「LmUSP」)、硬蜱美洲鈍眼蜱 (*Amblyomma americanum*) 之 RXR 同源物 1 (「AmaRXR1」)、硬蜱美洲鈍眼蜱之 RXR 同源物 2 (「AmaRXR2」)、招潮蟹大西洋砂招潮蟹 (*Celuca pugilator*) 之 RXR 同源物 (「CpRXR」)、甲蟲黃粉蟲 (*Tenebrio molitor*) 之 RXR 同源物 (「TmRXR」)、蜜蜂義大利蜂 (*Apis mellifera*) 之 RXR 同源物 (「AmRXR」)、蚜蟲桃蚜 (*Myzus persicae*) 之 RXR 同源物 (「MpRXR」) 或非雙翅類昆蟲/非鱗翅類昆蟲之 RXR 同源物。

在一實施態樣中，嵌合性 RXR LBD 包含至少二種選自脊椎動物物種 RXR 多肽片段、非脊椎動物物種 RXR 多肽片段或非雙翅類昆蟲/非鱗翅類昆蟲之無脊椎動物物種 RXR 同源物多肽片段之多肽片段。用於本發明之嵌合性 RXR 配體結合結構域可能包含至少二種不同物種之 RXR 多肽片段，或當物種係相同時，該二或多種多肽片段可來自該物種 RXR 多肽片段之二或多種不同的異構體。該等嵌合性 RXR LBD 係揭示於例如 WO 2002/066614。

在一實施態樣中，嵌合性 RXR 配體結合結構域包含至少一種脊椎動物物種 RXR 多肽片段及一種無脊椎動物物種 RXR 多肽片段。

在另一實施態樣中，嵌合性 RXR 配體結合結構域包

含至少一種脊椎動物物種 RXR 多肽片段及一種非雙翅類昆蟲/非鱗翅類昆蟲無脊椎動物物種 RXR 同源物多肽片段。

當配體與核受體之 LBD 組合且轉而與治療性產物序列相關性 FRP 之反應元件結合時，該配體提供外部時態調控治療性產物序列之表現。本發明之各種成份間互相結合即例如配體與 LBD 結合、DBD 與反應元件結合、AD 與啟動子結合等之結合機轉或順序並不重要。

在特定實施例中，配體與 H 組核受體之 LBD 及彼之核受體 LBD 伴結合使治療性產物序列得以表現。此機轉不排除配體與 H 組核受體（GHNR）或彼之伴結合且導致形成活性同型二聚體複合物（例如 GHNR+GHNR 或伴+伴）之可能性。較佳地，以一或多種不同的受體結構域產生雜交基因開關。通常，該三種結構域 DBD、LBD 及 AD 中之一或多種可自不同於其他結構域來源之來源選擇，以使該雜交基因及該形成之雜交蛋白質在經選擇之宿主細胞或有機體內之反式活化活性、與配體之互補結合及對特定反應元件之辨識係經最佳化。此外，該反應元件本身可經其他 DNA 結合蛋白質結構域之反應元件改質或取代，諸如來自酵母菌之 GAL-4 蛋白質（見 Sadowski et al., Nature 335:563 (1988)）或來自大腸桿菌之 LexA 蛋白質（見 Brent et al., Cell 43:729 (1985)），或專門與經設計、改質及選擇以進行特定交互作用之蛋白質進行該等標靶交互作用之合成性反應元件（見例如 Kim et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 94:3616 (1997)) , 以適應雜交受體。雙雜交系統之另一好處在於它們能夠根據所欲之終結果選擇用於驅使基因表現之啟動子。該等雙重控制在基因治療之領域中特別重要，尤其是當細胞毒性蛋白質被產生時，因為表現時機及表現發生之細胞皆可被控制。當與適當之啟動子可操作性連接之基因被導入個體之細胞內時，該等外源性基因之表現係受到本發明之系統的存在所控制。啟動子可能經組成性或誘導性調節，或可能具組織特異性（即僅在特定細胞類型中表現）或對有機體之某些發展階段具特異性。

在配體存在或不存在下，該第一雜交蛋白質之 DNA 結合結構域與反應元件之 DNA 序列結合，以在此反應元件之調節下啟動或抑制下游基因之轉錄。

功能性 LDTFC，例如 EcR 複合物，亦可能包含額外之蛋白質諸如免疫親合素。已知為轉錄因子（諸如 DHR38 或 β FTZ-1）之蛋白質核受體家族之額外成員亦可為 EcR、USP 及/或 RXR 之配體依賴性伴或非配體依賴性伴。此外，可能需要其他輔因子，諸如通常被稱為輔活化子（亦稱為適應子或媒介子）之蛋白質。這些蛋白質不與 DNA 序列特異性結合，且不參與基礎轉錄。它們可能經由各種機轉展現它們對轉錄活化之影響，包括刺激與活化子之 DNA 結合、影響染色質結構，或媒介活化子起始複合物交互作用。該等輔活化子之實例包括 RIP140、TIF1、RAP46/Bag-1、ARA70、SRC-1/NCoA-1、TIF2/GRIP/NCoA-

2、ACTR/AIB1/RAC3/pCIP 以及混雜輔活化子 C 反應元件 B 結合蛋白 CBP/p300 (見回顧文獻 Glass et al., Curr. Opin. Cell Biol. 9:222 (1997)) 。另外，通常被稱為輔抑制子 (又名抑制子、靜默子或靜默媒介子) 之蛋白質輔因子可能為缺乏配體時有效抑制轉錄活化所需。這些輔抑制子可與無配體之 EcR 交互作用以靜默反應元件之活性。目前的證據顯示，配體結合改變受體之構型，導致釋放輔抑制子及吸引上述輔活化子，藉此取消彼等之靜默活性。輔抑制子之實例包括 N-CoR 及 SMRT (見回顧文獻 Horwitz et al., Mol Endocrinol. 10: 1167 (1996)) 。這些輔因子可能為在細胞或有機體內之內源性因子，或可能為外源性添加之轉基因以經調節或未調節之方式表現。

B. 雷帕黴素基底基因開關

本發明另提供利用 FK506 結合蛋白作為配體依賴性轉錄因子複合物及雷帕黴素作為配體之基因開關系統。在一實施態樣中，該編碼基因開關之建構體包含

(a) 編碼第一嵌合性蛋白質之第一多核苷酸，該第一多核苷酸與雷帕黴素或彼之類似物結合且包含至少一個 FK506-結合蛋白 (FKBP) 結構域及至少一個與 FKBP 結構域異源之蛋白質結構域，其中該 FKBP 結構域包含選自下列之肽序列：

(1) 天然發生之 FKBP，

(2) 天然發生之 FKBP 之變異體，其中最多 10

個胺基酸殘基被刪除、插入或被取代胺基酸取代，或

(3) 由與編碼(1)或(2)之FKBP的DNA序列選擇性雜交之DNA序列所編碼之FKBP；

(b) 編碼第二嵌合性蛋白質之第二多核苷酸，該第二多核苷酸與(a)雷帕黴素或雷帕黴素類似物及(b)第一嵌合性蛋白質形成複合物，且包含至少一個FKBP：雷帕黴素結合(FRB)結構域及至少一個與FRB結構域異源之蛋白質結構域，其中該FRB結構域包含選自下列之肽序列：

(4) 天然發生之FRB結構域，

(5) 天然發生之FRB結構域之變異體，其中最多10個胺基酸殘基被刪除、插入或被取代胺基酸取代，或

(6) 由與編碼(4)或(5)之FRB的DNA序列選擇性雜交之DNA序列所編碼之FRB結構域。

在此基因開關系統中，該第一多核苷酸及該第二多核苷酸各在本說明書他處所述之一或多種治療性開關啟動子之控制下。另外，在某些實施態樣中，至少一種與該第一及第二嵌合性蛋白質中之FKBP及/或FRB結構域異源之蛋白質結構域可為一或多種「活性」或「效應」結構域。效應結構域可選自各式各樣之蛋白質結構域，包括DNA結合結構域、轉錄活化結構域、細胞定位結構域及傳訊結構域（即當群集或多聚化時可引發細胞生長、增生、分化、細

胞凋亡、基因轉錄等之結構域）。

在某些實施態樣中，一種融合蛋白質包含至少一種 DNA 結合結構域（例如 GAL4 或 ZFHD1 DNA 結合結構域），另一種融合蛋白質包含至少一種轉錄活化結構域（例如 VP16 或 p65 轉錄活化結構域）。融合蛋白質之配體媒介性連接代表形成轉錄因子複合體及導致開始轉錄與由該融合蛋白質之一的 DNA 結合結構域所辨識（即能夠結合）之 DNA 序列連接之標靶基因。有關基因表現系統及配體之資訊係揭示於美國專利第 6,187,757 B1、6,649,595 B1、6,509,152 B1、6,479,653 B1 及 6,117,680 B1 號。

在其他實施態樣中，本發明提供包含編碼二種融合蛋白之多核苷酸的基因開關系統，該二種融合蛋白在無配體存在下會自行聚集，其中（a）該第一融合蛋白包含條件性聚集結構域，該結構域與經選擇之配體及轉錄活化結構域結合，及（b）該第二融合蛋白包含條件性聚集結構域，該結構域與經選擇之配體及 DNA 結合結構域結合，及（c）在無配體存在下，該等細胞表現與該 DNA 結合結構域結合之調節性 DNA 所可操作性連接之基因。包含該基因開關系統之經改質之細胞在足以抑制該基因之量的配體存在下擴增。配體移除誘發造成細胞死亡之編碼蛋白之表現。編碼該二種融合蛋白之核酸係在至少一個條件性啟動子之控制下。利用條件性聚集結構域之基因表現系統係揭示於美國專利公開號 2002/0048792。

C. 原核性抑制子/操作子基底基因開關系統

在一實施態樣中，本發明提供基因開關系統，該系統包含（a）編碼反式活化融合蛋白之第一多核苷酸，該反式活化融合蛋白包含原核性四環素（「tet」）抑制子及真核性轉錄活化子蛋白結構域；及（b）編碼治療性蛋白質或治療性多肽之第二多核苷酸，其中該第二多核苷酸係與最小啟動子及至少一種 tet 操作子序列可操作性連接。該編碼反式活化子融合蛋白之第一多核苷酸可包含如本發明他處所述之治療性開關啟動子。該致死蛋白質之表現在四環素不存在時係經上調（見例如 Gossen et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 5547-5551、Gossen et al. (1993) *TIBS* 18: 471-475、Furth et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 9302-9306 及 Shockett et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 6522-6526）。TetO 表現系統係揭示於美國專利第 5,464,758 B1 號。

在另一實施態樣中，基因開關系統包含來自細菌大腸桿菌之乳糖（「Lac」）抑制子-操作子系統。本發明之基因開關系統亦可包含（a）編碼反式活化融合蛋白之第一多核苷酸，該反式活化融合蛋白包含原核 lac I 抑制子及真核轉錄活化子蛋白結構域；及（b）編碼治療性蛋白質或治療性多肽之第二多核苷酸，其中該第二多核苷酸係與治療性開關啟動子可操作性連接。在 Lac 系統中，當無乳糖或合成性類似物諸如異丙基-b-D-硫代半乳糖苷存在時，lac 操縱子被不活化。

其他基因開關系統包括該些於下列描述者：US 7,091,038、WO2004078924、EP1266015、US20010044151、US20020110861、US20020119521、US20040033600、US20040197861、US20040235097、US20060020146、US20040049437、US20040096942、US20050228016、US20050266457、US20060100416、WO2001/70816、WO2002/29075、WO2002/066612、WO2002/066613、WO2002/066614、WO2002/066615、WO2005/108617、US 6,258,603、US20050209283、US20050228016、US20060020146、EP0965644、US 7,304,162、US 7,304,161、MX234742、KR10-0563143、AU765306、AU2002-248500 及 AU2002-306550。

D. 基因開關系統之組合

本發明提供包含二或多種基因開關系統之核酸組成物、經改質之細胞及生物反應器，該等基因開關系統包含可被有效量之一或多種配體活化之不同的配體依賴性轉錄因子複合物，其中該二或多種基因開關系統包含第一基因開關及第二基因開關，當與一或多種配體結合時，二者皆選擇性誘發一或多種治療性多肽或治療性多核苷酸之表現。本發明之範圍包含任何數量及/或組合之基因開關系統。

在一實施態樣中，本發明提供核酸組成物，其包含：

a. 第一基因開關系統，其包含：

i. 第一基因表現卡匣，該卡匣包含編碼第一雜交多

肽之多核苷酸，該第一雜交多肽包含：

1. 反式活化結構域，其活化與編碼治療性多肽或治療性多核苷酸之多核苷酸可操作性連接之因子調節性啟動子；及
2. 異二聚體伴結構域，

ii. 第二基因表現卡匣，該卡匣包含編碼第二雜交多肽之多核苷酸，該第二雜交多肽包含：

1. DNA 結合結構域，其辨識與編碼治療性多肽或治療性多核苷酸之多核苷酸可操作性連接之因子調節性啟動子；及
2. 配體結合結構域；及

iii. 第三基因表現卡匣，該卡匣包含編碼治療性多肽或治療性多核苷酸之多核苷酸，該多核苷酸包含：

1. 因子調節性啟動子，其經由第二雜交多肽之反式活化結構域活化；及
2. 編碼治療性多肽或治療性多核苷酸之多核苷酸，及

b. 第二基因表現系統，其包含：

i. 第一基因表現卡匣，該卡匣包含編碼第一雜交多肽之多核苷酸，該第一雜交多肽包含：

1. 反式活化結構域，其活化與編碼治療性多肽或治療性多核苷酸之多核苷酸可操作性連接之因子調節性啟動子；及
2. 異二聚體伴結構域，

ii. 第二基因表現卡匣，該卡匣包含編碼第二雜交多肽之多核苷酸，該第二雜交多肽包含：

1. DNA 結合結構域，其辨識與編碼治療性多肽或治療性多核苷酸之多核苷酸可操作性連接之因子調節性啟動子；及
2. 配體結合結構域；及

iii. 第三基因表現卡匣，該卡匣包含編碼治療性多肽或治療性多核苷酸之多核苷酸，該多核苷酸包含：

1. 因子調節性啟動子，其經由第二雜交多肽之反式活化結構域活化；及
2. 編碼治療性多肽或治療性多核苷酸之多核苷酸。

多重誘導性基因表現系統提供給定治療性多核苷酸或治療性多肽在與不同疾病、疾患或狀況相關之條件下表現，或在與相同疾病、疾患或狀況相關之相同條件下，或在與不同疾病、疾患或狀況相關之不同條件下表現多種治療性多肽或治療性多核苷酸。

在某些實施態樣中，該二或多種基因開關系統之組合可為（1）雙重開關蛻皮激素受體基底基因表現系統，及（2）單一開關蛻皮激素受體基底基因開關。在其他實施態樣中，該組合可為（1）單一或雙重開關蛻皮激素受體基底基因開關及（2）雷帕黴素基底基因開關。另外，基因開關系統之組合可為二個相同之上述揭示之雷帕黴素基底基因開關系統。任何可能之基因開關系統之組合均在本

發明之範圍內。雙重開關蛻皮激素系統之實例可見於例如 WO 2002/29075 及 US 2002/0110861。

配體

此處之用語「配體」當應用於 LDTFC-基底基因開關，例如 EcD 複合物基底基因開關時，描述能活化基因開關以刺激其中編碼之多肽之表現的小型及可溶性分子。本發明之配體依賴性轉錄因子複合物之配體與包含一或多個配體結合結構域、異二聚體伴結構域、DNA 結合結構域及反式活化結構域之蛋白質複合物結合。活化配體依賴性轉錄因子複合物之配體的選擇依所利用之基因開關的類型決定。

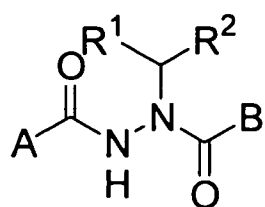
配體之實例包括但不限於蛻皮類固醇，諸如蛻皮激素、20-羥基蛻皮激素、松甾酮 A、米樂甾酮 A 及該類似物、9-順-視黃酸、視黃酸之合成性類似物、N,N'-二醯基肼諸如該些於美國專利第 6,013,836、5,117,057、5,530,028 及 5,378,726 號及美國公開申請案 2005/0209283 及 2006/0020146 號中所揭示者；美國專利公開申請案 2004/0171651 所描述之噁二唑啉；二苯甲醯基烷基氨基肼，諸如歐洲專利申請案 461,809 所揭示者；N-烷基-N,N'-二芳醯基肼，諸如美國專利第 5,225,443 號所揭示者；N-醯基-N-烷基羧基肼，諸如歐洲專利申請案第 234,994 號所揭示者；N-芳醯基-N-烷基-N'-芳醯基肼，諸如美國專利第 4,985,461 號所描述者；醯胺基酮，諸如美國專利公開申請案 2004/0049037 所描述者；各以參照方式納入此處，

其他類似物質包括 3,5-二-三級丁基-4-羥基-N-異丁基-苯甲醯胺、8-O-乙醯哈帕甙、氧基固醇、22(R)羥基膽固醇、24(S)羥基膽固醇、25-環氧基膽固醇、T0901317、5- α -6- α -環氧基膽固醇-3-硫酸鹽(ECHS)、7-酮膽固醇-3-硫酸鹽、法尼醇、膽汁酸、1,1-雙膦酸酯、青春激素III及該類似物。可用於本發明之二醯基肼配體之實例包括RG-115819(3,5-二甲基-苯甲酸N-(1-乙基-2,2-二甲基-丙基)-N'-(2-甲基-3-甲氧基-苯甲醯基)-醯肼)、RG-115932((R)-3,5-二甲基-苯甲酸N-(1-三級丁基-丁基)-N'-(2-乙基-3-甲氧基-苯甲醯基)-醯肼)及RG-115830(3,5-二甲基-苯甲酸N-(1-三級丁基-丁基)-N'-(2-乙基-3-甲氧基-苯甲醯基)-醯肼)。見例如美國專利申請案系列號12/155,111(經公開為US 2009/0163592)及PCT申請案PCT/US2008/006757,二案皆以參照方式整體納入此處。

舉例來說,蛻皮激素受體基底基因開關之配體可能選自任何適當之配體。天然發生之蛻皮激素或蛻皮激素類似物(例如20-羥基蛻皮激素、米樂甾酮A、松甾酮A、松甾酮B、松甾酮C、26-碘松甾酮A、牛膝甾酮或26-甲基磺醯牛膝甾酮)及非固醇類誘導物二者均可被用來作為本發明之基因開關之配體。美國專利第6,379,945 B1號描述自綠棉夜蛾(*Heliothis virescens*)分離之昆蟲類固醇受體(「HEcR」),該受體能作為對類固醇及某些非固醇類誘導物有反應之基因開關。在本系統及許多其他對類固醇及

非固醇類誘導物均有反應之系統中，非固醇類誘導物相較於類固醇具有明顯之優勢，原因包括例如：較低之製造成本、代謝穩定性、不存在於昆蟲、植物或哺乳動物及環境接受性。美國專利第 6,379,945 B1 號描述使用二種二苯甲醯基肼即 1,2-二苯甲醯基-1-三級丁基-肼及得芬諾 (tebufenozide) (N-(4-乙基苯甲醯基)-N'-(3,5-二甲基苯甲醯基)-N'-三級丁基-肼) 作為蛻皮激素基底基因開關之配體。本發明之配體亦包括其他二苯甲醯基肼，諸如該些於美國專利第 5,117,057 B1 號所揭示者。使用得芬諾 (tebufenozide) 作為黑腹果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 之蛻皮激素受體之化學配體亦揭示於美國專利第 6,147,282 號。此外，蛻皮激素配體之非限制性實例係 3,5-二-三級丁基-4-羥基-N-異丁基-苯甲醯胺、8-O-乙醯基哈帕忒、1,2-二醯基肼、N'-取代-N,N'-二取代肼、二苯甲醯基烷基氨基肼、N-取代-N-烷基-N,N-二芳醯基肼、N-取代-N-醯基-N-烷基羰基肼或 N-芳醯基-N'-烷基-N'-芳醯基肼。(見美國專利第 6,723,531 號。)

在一實施態樣中，蛻皮激素基底基因開關系統之配體係二醯基肼配體或手性二醯基肼配體。用於基因開關系統之配體可為式 I 之化合物



式 I

其中

A 係烷氧基、芳基烷基氧基或芳基氧基；

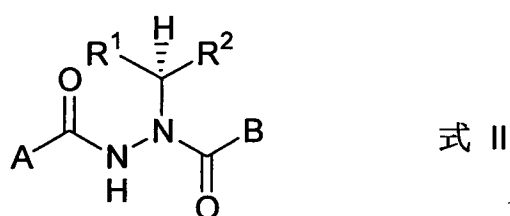
B 係可經任意取代之芳基或可經任意取代之雜芳基；

且

R^1 及 R^2 各為可經任意取代之烷基、芳基烷基、羥基烷基、鹵代烷基、可經任意取代之環烷基、可經任意取代之烯基、可經任意取代之炔基、可經任意取代之雜環基、可經任意取代之芳基或可經任意取代之雜芳基；

或彼之醫藥上可接受之鹽、水合物、結晶形式或非晶形式。

在另一實施態樣中，該配體可為鏡像異構性富集之式 II 化合物



其中

A 係烷氧基、芳基烷基氧基、芳基氧基、芳基烷基、可經任意取代之芳基或可經任意取代之雜芳基；

B 係可經任意取代之芳基或可經任意取代之雜芳基；

且

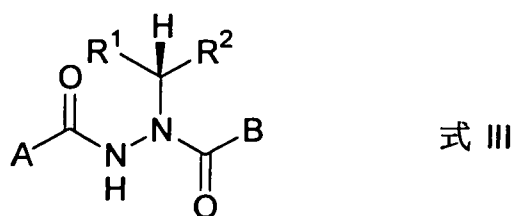
R^1 及 R^2 各為可經任意取代之烷基、芳基烷基、羥基烷基、鹵代烷基、可經任意取代之環烷基、可經任意取代之烯基、可經任意取代之炔基、可經任意取代之雜環基、可經任意取代之芳基或可經任意取代之雜芳基；

唯該 R^1 不等於 R^2 ；

其中攜帶 R^1 及 R^2 之不對稱碳原子的絕對構型主要為 S 型；

或彼之醫藥上可接受之鹽、水合物、結晶形式或非晶形式。

在某些實施態樣中，該配體可為鏡像異構性富集之式 III 化合物



其中

A 係烷氧基、芳基烷基氧基、芳基氧基、芳基烷基、可經任意取代之芳基或可經任意取代之雜芳基；

B 係可經任意取代之芳基或可經任意取代之雜芳基；
且

R^1 及 R^2 各為可經任意取代之烷基、芳基烷基、羥基烷基、鹵代烷基、可經任意取代之環烷基、可經任意取代之烯基、可經任意取代之炔基、可經任意取代之雜環基、可經任意取代之芳基或可經任意取代之雜芳基；

唯該 R^1 不等於 R^2 ；

其中攜帶 R^1 及 R^2 之不對稱碳原子的絕對構型主要為 R 型；

或彼之醫藥上可接受之鹽、水合物、結晶形式或非晶形式。

在一實施態樣中，配體可為鏡像過量值至少 95% 之（

R) -3,5-二甲基-苯甲酸 N-(1-三級丁基-丁基)-N'-(2-乙基-3-甲氧基-苯甲醯基)-醯肼，或彼之醫藥上可接受之鹽、水合物、結晶形式或非晶形式。

式 I 之二醯基肼配體及式 II 或 III 之手性二醯基肼配體用於蛻皮激素基底基因開關系統時，提供自外部時態調控本發明之治療性多肽或治療性多核苷酸之表現的方式。見 2008 年 5 月 29 日提出之美國專利申請案 12/155,111（經公開為 US 2009/0163592），其以參照方式完全納入此處。

本發明使用之配體可形成鹽。此處所使用之用語「鹽」表示與無機及/或有機酸及鹼形成之酸性及/或鹼性鹽。此外，當式 I、II 或 III 之化合物同時包含鹼性基團及酸性基團時可能形成兩性離子（「內鹽」），其仍被包含於此處所使用之用語「鹽」。醫藥上可接受（即無毒性、生理上可接受）之鹽被用於例如在製備時會採用之分離或純化步驟，不過其他鹽亦可被使用。式 I、II 或 III 之化合物的鹽可藉由例如使化合物與一定量諸如等量之酸或鹼反應形成，該反應在鹽可在其中沉澱之介質或於水性介質中進行，然後冷凍乾燥。

包含鹼性基團之配體可與各種有機及無機酸形成鹽。示範性酸添加鹽包括醋酸鹽（諸如該些與醋酸或三鹵乙酸例如三氟乙酸形成者）、己二酸鹽、藻酸鹽、抗壞血酸鹽、天冬胺酸鹽、苯甲酸鹽、苯磺酸鹽、硫酸氫鹽、硼酸鹽、丁酸鹽、檸檬酸鹽、樟腦酸鹽、樟腦磺酸鹽、環戊丙酸

鹽、二葡萄糖酸鹽、十二烷基硫酸鹽、乙磺酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡庚糖酸鹽、甘油磷酸鹽、半硫酸鹽、庚酸鹽、己酸鹽、鹽酸鹽（與鹽酸形成）、氫溴酸鹽（與溴化氫形成）、氫碘酸鹽、2-羥基乙磺酸鹽、乳酸鹽、順丁烯二酸鹽（與順丁烯二酸形成）、甲烷磺酸鹽（與甲磺酸形成）、2-萘磺酸鹽、菸鹼酸鹽、硝酸鹽、草酸鹽、果凍酸鹽、過氧硫酸鹽、3-苯基丙酸鹽、磷酸鹽、苦味酸鹽、特戊酸鹽、丙酸鹽、水楊酸鹽、琥珀酸鹽、硫酸鹽（諸如該些與硫酸形成者）、磺酸鹽（諸如該些此處提及者）、酒石酸鹽、硫氰酸鹽、甲苯磺酸鹽諸如甲苯磺酸鹽（tosylate）、十一酸鹽及該類似物。

包含酸性基團之配體可與各種有機及無機鹼形成鹽。示範性鹼性鹽包括銨鹽、鹼金屬鹽諸如鈉鹽、鋰鹽及鉀鹽、鹼土金屬鹽諸如鈣鹽及鎂鹽、含有機鹼（例如有機胺）之鹽諸如苺星（benzathine）、二環己基胺、海巴明（與N,N-雙（去氫橿酸基）乙二胺形成）、N-甲基-D-葡萄糖胺、N-甲基-D-葡萄糖醯胺、三級丁基胺及含胺基酸諸如精胺酸、離胺酸及該類似物之鹽。

利用FK506結合結構域之誘導性基因表現系統的配體之非限制性實例為FK506、環孢素A或雷帕黴素。FK506、雷帕黴素及彼等之類似物係揭示於美國專利第6,649,595 B2及6,187,757號。亦見美國專利第7,276,498及7,273,874號。

此處所描述之配體可經單獨投予或成為包含醫藥上可

接受之載劑的醫藥組成物之一部分投予。在一實施態樣中，該醫藥組成物係呈溶液、懸浮液、錠劑、膠囊、軟膏、酏劑或注射型組成物之形式。

在一實施態樣中，編碼抗體之多核苷酸編碼單株抗體

。在另一實施態樣中，本發明之載體及方法可被用於表現核酸以作為疫苗。本發明亦提供包含本發明之載體或表現系統之疫苗組成物。在另一實施態樣中，該疫苗組成物包含佐劑。

「紅血球生成素或彼之促效劑」係指紅血球生成素多肽、與紅血球生成素具有至少約 85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性之多肽、或保留至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之紅血球生成素之試管內紅血球生成素受體結合活性的紅血球生成素之片段。

任何紅血球生成素多核苷酸序列可被用於本發明之方法。在一實施態樣中，該紅血球生成素多核苷酸序列編碼人紅血球生成素，彼之胺基酸序列係如編號 AAF23134 (SEQ ID NO:6) 所示。編碼紅血球生成素之胺基酸序列亦可得自公眾資料庫，如編號 AAH93628 (人)、AA119266 (小鼠)、及 BAA01593 (大鼠)，彼等之序列以參照方式納入此處。編碼紅血球生成素之多核苷酸序列可得自公眾資料庫，如編號 BC093628 (人)、BC119265 (小鼠)、及 D10763 (大鼠)，彼等之序列以參照方式納入此處

在另一實施態樣中，該紅血球生成素多核苷酸序列編碼人紅血球生成素之類似物，該人紅血球生成素之類似物保留至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 之人紅血球生成素之試管內紅血球生成素受體結合活性。試管內紅血球生成素受體結合試驗係該領域之一般技藝人士所廣為周知。舉例來說，見 Harris, K.W. et al., J. Biol. Chem. 25: 15205-9 (1992)、Wrighton, N.C. et al., Science 273: 458-463 (1996)、及 Jarsch, M. et al., Pharmacology 81: 63-69 (2008)。

紅血球生成素之非限制性實例包括阿法達貝泊汀 (darbepoietin alfa)、阿法依泊汀 (epoetin alfa)、阿法依泊汀 (epoetin alfa)、貝他依泊汀 (epoetin beta) 及卡帕依泊汀 (epoetin kappa)。

紅血球生成素促效劑之非限制性實例包括該些於美國專利第 7,767,643、7,786,163、7,674,913、7,553,861、7,410,941、7,345,019、7,309,687、6,531,121、5,858,670、5,650,489 及 5,510,240 號中揭示之促效劑。其他紅血球生成素促效劑之非限制性實例包括該些於美國專利公開號 2011/0027890、2010/0305002、2010/297117、2010/0297106、2010/0190692、2010/0145006、2010/136015、2010/0120661、2010/093608、2010/0028331、2010/016218、2010/0009961、2009/0233844、2009/0022734、2009/0004202、2008/0213277、2008/0014193、2007/0298031、2007/0293421、2007/0060547

、2006/027071、2006/0009518、2003/0134798、2003/0104988 及 2002/008616 中揭示之促效劑。其他紅血球生成素促效劑之非限制性實例包括該些於 MacDougall, I.C. et al., N. Engl. J. Med. 361: 1848-55 (2009)、Pankratova, S. et al., Brain 133 (Pt. 8): 2281-94 (2010)、及 Zarychanski, R. et al., Canadian Medical Association Journal 177: 725-34 (2007) 中揭示之促效劑。

就基因開關而言，用語「蛻皮激素受體基底」係指包含至少一功能性部分之天然發生或合成性蛻皮激素受體配體結合結構域之基因開關，當配體與蛻皮激素受體配體結合結構域結合時該基因開關調節基因表現。蛻皮激素反應性系統之實例係描述於美國專利第 7,091,038 及 6,258,603 號。在一實施態樣中，該系統為 RheoSwitch®治療性系統 (RTS)，該系統包含二種融合蛋白，即與 Gal4 DNA 結合結構域融合之經突變之蛻皮激素受體 (EcR) 之 DEF 結構域和與 VP16 轉錄活化結構域融合之嵌合性 RXR 之 EF 結構域，如圖 1 所示在組成性啟動子之控制下表現。

用語「調控」係指誘發、減少或抑制核酸或基因表現，分別導致誘發、減少或抑制蛋白質或多肽之產製。

本發明之多核苷酸或載體可另包含至少一種適合用於驅使基因於宿主細胞內表現之啟動子。

可用於本發明之實施態樣中之增強子包括但不限於：SV40 增強子、巨細胞病毒 (CMV) 增強子、延長因子 1 (EF1) 增強子、酵母菌增強子、病毒基因增強子及該類似

物。

終止控制區（即終止子或聚腺苷酸化序列）亦可衍生自各種對優先宿主為天然之基因。可任意選擇地，終止位點不是必要但是最好包含。在本發明之一實施態樣中，該終止控制區可包含或衍生自合成性序列、合成性聚腺苷酸化信號、SV40 晚期聚腺苷酸化信號、SV40 聚腺苷酸化信號、牛生長激素（BGH）聚腺苷酸化信號、病毒終止序列或該類似物。

用語「3'非編碼序列」或「3'非轉譯區（UTR）」係指位於編碼序列下游（3'）之 DNA 序列，可包含聚腺苷酸化 [poly (A)] 辨認序列及其他編碼調節信號以影響 mRNA 處理或基因表現之序列。聚腺苷酸化信號之特徵通常為影響聚腺苷酸序列添加至 mRNA 前體之 3'端。

「調節區」係指調節第二核酸序列表現之核酸序列。調節區可包括本來就負責表現特定核酸（同源區）之序列，或包括不同來源但負責表現不同蛋白質或甚至合成性蛋白質（異源區）之序列。特別是，該等序列可為原核性、真核性或病毒性基因之序列或衍生序列，其以特定或非特定方式及誘導性或非誘導性方式刺激或抑制基因之轉錄。調節區包括複製起點、RNA 剪切位點、啟動子、增強子、轉錄終止序列及引導該多肽進入標靶細胞之分泌途徑之信號序列。

「異源性來源」之調節區係指不是與經表現之核酸天然相連之調節區。異源性調節區包含來自不同物種之調節區

、來自不同基因之調節區、雜交調節序列及不發生於天然中但由該領域之一般技藝人士所設計之調節序列。

「RNA 轉錄物」係指由 RNA 聚合酶酶催化轉錄 DNA 序列所產生之產物。當 RNA 轉錄物係 DNA 序列之完美互補套時，較佳者為初級轉錄物或其可能為源自轉錄後處理該初級轉錄物之 RNA 序列，被稱為成熟 RNA。「信使 RNA (mRNA)」係指沒有內含子且可被細胞轉譯成蛋白質之 RNA。「cDNA」係指與 mRNA 互補且源自該 mRNA 之雙股 DNA。「同義 RNA」係指包括 mRNA 因此可被細胞轉譯成蛋白質之 RNA 轉錄物。「反義 RNA」係指與所有或部分之標靶原發轉錄物或 mRNA 互補且阻斷標靶基因之表現之 RNA 轉錄物。反義 RNA 可能與特定基因轉錄物之任何部分互補，例如 5'非編碼序列、3'非編碼序列或編碼序列。「功能性 RNA」係指反義 RNA、核糖酵素 RNA 或其他不被轉譯但對細胞程序有所影響之 RNA。

「多肽」、「肽」及「蛋白質」可交換使用，係指由共價連接之胺基酸殘基組成之聚合性化合物。

「經分離之多肽」、「經分離之肽」或「經分離之蛋白質」係指實質上不含該些在彼之天然狀態下與之正常相關之化合物（例如其他蛋白質或多肽、核酸、碳水化合物、脂質）之多肽或蛋白質。「經分離」不代表排除與其他化合物之人工或合成性混合物，或不影響生物活性之雜質存在，這可能是因為例如純化不完全、添加穩定劑或化合成為醫藥上可接受之製劑。

「取代突變多肽」或「取代突變」將被了解為表示包含至少一個野生型或天然發生之胺基酸取代的突變多肽，該胺基酸與野生型或天然發生之多肽的胺基酸不同。取代突變多肽可僅包含一個野生型或天然發生之胺基酸取代，被稱為「點突變」或「單點突變」多肽。或者，取代突變多肽可包含以二或多個與野生型或天然發生多肽不同之胺基酸取代二或多個野生型或天然發生之胺基酸。根據本發明，包含取代突變之 H 組核受體配體結合結構域多肽包含以相較於野生型或天然發生之 H 組核受體配體結合結構域多肽不同之胺基酸取代至少一個野生型或天然發生之胺基酸。取代突變之 H 組核受體配體結合結構域多肽之非限制性實例可見於 WO 2002/066612 及 US 2006/0100416。

當取代突變多肽包含二或多個野生型或天然發生之胺基酸的取代，該取代可包含相等數量之野生型或天然發生之胺基酸刪除以供取代，即 2 個野生型或天然發生之胺基酸被 2 個非野生型或非天然發生之胺基酸取代，或該取代可包含不等數量之野生型胺基酸刪除以供取代，即 2 個野生型胺基酸被 1 個非野生型胺基酸取代（取代+刪除突變）或 2 個野生型胺基酸被 3 個非野生型胺基酸取代（取代+插入突變）。

取代突變可利用縮寫命名系統描述，以表示在參照多肽序列中被取代之胺基酸殘基及號碼及經取代之新的胺基酸殘基。舉例來說，多肽之第 20 個胺基酸殘基被取代之取代突變可被縮寫為「x20z」，其中「x」係將被取代之胺基

酸，「20」係該胺基酸殘基在該多肽中之位置或號碼，及「z」係經取代之新的胺基酸。因此，可互換縮寫為「E20A」或「Glu20Ala」之取代突變表示該突變包含以丙胺酸殘基（通常縮寫為「A」或「Ala」）取代在多肽位置 20 之麩胺酸（通常縮寫為「E」或「Glu」）。

取代突變可利用該領域已知之任何突變形成技術進行，包括但不限於試管內定點突變形成（Hutchinson et al., J. Biol. Chem. 253:6551 (1978); Zoller et al., DNA 3:479 (1984); Oliphant et al., Gene 44:177 (1986); Hutchinson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:710 (1986)）、使用 TAB® 連接子（法瑪西亞（Pharmacia）公司）、限制內核核酸酶消化/片段刪除及取代、PCR 媒介性/寡核苷酸引導性突變形成及該類似技術。以 PCR 為基底之技術較適合定點突變形成（見 Higuchi, 1989, "Using PCR to Engineer DNA", in PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stockton Press, 第 6 章 61 至 70 頁）。

應用於多肽之用語「片段」係指胺基酸序列相較於參照多肽之胺基酸序列為短之多肽，且該多肽相較於這些參照多肽之所有部分包含完全相同之胺基酸序列。當適當時，該等片段可能被包括於更大多肽之內以形成更大多肽之一部分。本發明之多肽之該等片段的長度可能為至少 2、3、4、5、6、8、10、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、25、26、30、35、40、45、50、100、200、240 或

300 或更多個胺基酸。

多肽或蛋白質之「變異體」係指源自多肽或蛋白質且保留該多肽或蛋白質之至少一個生物性質之任何類似物、片段、衍生物或突變。不同的多肽或蛋白質變異體可能存在於天然中。這些變異體可能是特徵為編碼蛋白質之結構基因的核苷酸序列不同之等位變異體，或可能涉及差異剪切或轉譯後修飾。技藝人士可產製具有單一或多重胺基酸取代、刪除、添加或替換之變異體。這些變異體可包括特別是：（a）其中一或多個胺基酸殘基被保守性或非保守性胺基酸取代之變異體，（b）其中一或多個胺基酸被加入該多肽或蛋白質之變異體，（c）其中一或多個胺基酸包括取代基之變異體，及（d）其中該多肽或蛋白質與另一多肽諸如血清白蛋白融合之變異體。獲得這些變異體之技術包括基因性（抑制、刪除、突變等）、化學性及酶技術係該領域之一般技藝人士所知。在一實施態樣中，變異體多肽包含至少約 14 個胺基酸。

用語「同源性」係指二個多核苷酸或二個多肽基團之間一致性之百分比。來自一基團之序列與另一序列之間的對應性可由該領域已知之技術測定。舉例來說，同源性可藉由直接比較二個多肽分子間之序列資訊加以決定，例如排比該序列資訊並利用易於使用之電腦程式進行。或者，可藉由在同源區之間形成穩定雙股之條件下使多核苷酸雜交，然後經單股特異性核酸酶消化後測定該經消化之片段的大小加以決定同源性。

此處所使用之所有文法形式及拼寫差異之用語「同源」係指具有「共同演化來源」之蛋白質之間的關係，包括來自超家族（例如免疫球蛋白超家族）之蛋白質及來自不同物種之同源蛋白（例如肌球蛋白輕鏈等）（Reeck et al., Cell 50:667 (1987)）。該等蛋白質（及彼等之編碼基因）具有序列同源性，因為彼等具有高度序列相似性。然而，在一般用法及本申請案中，當以諸如「高度地」之副詞修飾用語「同源」時，用語「同源」可指序列相似性而非共同演化來源。

因此，所有文法形式之用語「序列相似性」係指可能分享或不分享共同演化來源之蛋白質的核酸或胺基酸序列之間的一致性或對應性程度（見 Reeck et al., Cell 50:667 (1987)）。在一實施態樣中，當二個 DNA 序列之定義長度中至少約 50%（例如至少約 75%、90%或 95%）的核苷酸匹配，該等 DNA 序列係「實質上同源」或「實質上類似」。實質上同源之序列可利用序列資料庫中可用之標準軟體比較序列加以識別，或在例如特定系統所定義之嚴謹度條件下進行南方雜交實驗加以識別。定義適當之雜交條件係屬該領域之技藝（見例如 Sambrook et al., 1989，同上）。

此處所使用之「實質上類似」係指其中一或多個核苷酸鹼基之改變導致取代一或多個胺基酸，但不影響由該 DNA 序列所編碼之蛋白質的功能特性之核酸片段。「實質上類似」亦指其中一或多個核苷酸鹼基之改變不影響該核酸片

段藉由反義或共同抑制技術以媒介基因表現改變之能力的核酸片段。「實質上類似」亦指本發明之核酸片段之修飾，諸如刪除或插入一或多個不實質影響該形成之轉錄物之功能特性的核苷酸鹼基。因此應了解本發明不只包含該特定示範性序列。每種提議之修飾及測定該編碼產物是否保留生物活性皆在該領域之例行技藝範圍內。

當二個胺基酸序列有超過約 40%之胺基酸相同，或超過 60%之胺基酸類似（功能一致），該二個胺基酸序列係「實質上同源」或「實質上類似」。較佳地，該類似或同源之序列係藉由使用例如 GCG（基因學電腦集團（Genetics Computer Group）公司，GCG 套組程式手冊第 7 版，威斯康辛州麥德遜市）排列（pileup）程式加以排比鑑識。

此處所使用之用語「對應」係指類似或同源性序列，不論確切位置是否與測量類似性或同源性之分子相同或不同。核酸或胺基酸序列排比可能包括間隔子。因此，用語「對應」係指序列類似性，而非胺基酸殘基或核苷酸鹼基之編號。

「顯著部分」之胺基酸或核苷酸序列包含足夠之多肽之胺基酸序列或基因之核苷酸序列，得以由該領域之技藝人士手動評估該序列，或藉由使用演算法諸如 BLAST（基礎局部排比搜尋工具；Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403（1993），得自 ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）進行電腦自動化序列比較及識別以推定辨識該多肽或基因。一般來說，需要 10 個或超過 10 個連續胺基酸或 30 個或超過 30 個核

核苷酸之序列以推定辨識一多肽或核酸序列與已知蛋白質或基因之同源性。另外就核苷酸序列而言，包含 20 至 30 個連續核苷酸之基因特異性寡核苷酸探針可被用於基因辨識（例如南方雜交）及分離（例如細菌菌落或噬菌體噬斑之原位雜交）之序列依賴性方法。此外，含 12 至 15 個鹼基之短寡核苷酸可被用來作為 PCR 中之擴增引子，以獲得包含該引子之特定核酸片段。因此，「顯著部分」之核苷酸序列包含足夠序列以特異性辨識及/或分離包含該序列之核酸片段。

該領域已知之用語「一致性百分比」係指二或多個多肽序列或二或多個多核苷酸序列之間之關係，其係藉由比較序列決定。在該領域中，「一致性」亦指多肽或多核苷酸序列之間序列相關性之程度，視情況亦可由該等序列之間的匹配狀況決定。「一致性」及「相似性」可輕易地由已知之方法計算，包括但不限於下列描述者：Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, New York (1988)；Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, New York (1993)；Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.) Humana Press, New Jersey (1994)；Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987)；及 Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.) Stockton Press, New York (1991)。測定一致性

之較佳方法係經設計以給予測試序列間之最佳匹配。測定一致性及相似性之方法被編纂於公眾可用之電腦程式中。序列排比及一致性百分比計算可利用序列分析軟體進行，諸如雷斯基（Lasergene）生物資訊電腦套組之邁佳來（Megalign）程式（DNASTAR 公司，威斯康辛州麥迪遜市）。序列之多重排比可利用 Clustal 排比方法及預設參數（缺口罰分=10，缺口長度罰分=10）進行（Higgins et al., CABIOS. 5:151（1989））。使用 Clustal 方法進行兩兩排比之預設參數可選自：KTUPLE 1、GAP PENALTY=3、WINDOW=5 及 DIAGONALS SAVED=5。

用語「序列分析軟體」係指任何可用於分析核苷酸或胺基酸序列之電腦演算法或軟體程式。「序列分析軟體」可自商業途徑獲得或自行發展。典型的序列分析軟體包括但不限於 GCG 程式套組（威斯康辛套組 9.0 版，基因學電腦集團（Genetics Computer Group）公司（GCG），威斯康辛州麥迪遜市）、BLASTP、BLASTN、BLASTX（Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403（1990））及 DNASTAR（DNASTAR 公司，美國 53715 威斯康辛州麥迪遜市公園南街 1228 號）。在本案之上下文中，應了解當使用序列分析軟體進行分析時，該分析之結果將基於該參照程式之「預設數值」，除非另外說明。此處所使用之「預設數值」將代表在首次啓用該軟體時原本內建之任何數值或參數組。

就 DNA 之序列而言，「化學合成」指該等成份核苷酸係於試管內組成。DNA 之手動化學合成可利用發展成熟之

方法完成，或利用多種商用機器之一進行自動化化學合成。因此，基因可根據最佳化之核苷酸序列修剪以達最佳基因表現，以反應宿主細胞之密碼子偏性。技藝人士了解若密碼子之使用偏向宿主喜好之密碼子，將可能成功地表現基因。較佳密碼子之決定可根據可取得序列資訊之宿主細胞來源之基因調查。

此處所使用之二或多種各自可操作之基因調節系統被稱為「正交」，當 a) 各給定系統由彼之選擇濃度之個別配體之調控導致該系統之基因表現幅度可測量的改變，及 b) 該改變係統計上顯著地異於所有其他於細胞、組織或有機體中同時可操作性系統之表現的改變，不論該實際調控為同時或依序發生。較佳地，每種各自可操作性基因調節系統之調控導致基因表現之改變相較於細胞、組織或有機體中之所有其他可操作性系統高出至少 2 倍，例如至少高出 5 倍、10 倍、100 倍或 500 倍。理想地，藉由彼之選擇濃度之個別配體調控各給定系統導致該系統之基因表現幅度可測量的改變，且該細胞、組織或有機體中之所有其他可操作性系統之表現無可測量的改變。在這種情況下，該多重誘導性基因調節系統被稱為「完全正交」。有用之正交配體及正交受體基底基因表現系統係描述於 US 2002/0110861 A1。

用語「外源性基因」係指對個體為外來之基因，即經由轉形過程被導入個體體內之基因、非突變版本之內源性突變基因或突變版本之內源性非突變基因。轉形方法並不是

本發明之關鍵，可為該領域人士已知之適合該個體之任何方法。外源性基因可為以 DNA 或 RNA 形式導入個體體內之天然或合成性基因，該 RNA 形式可經由諸如藉由反轉錄酶產生之 DNA 中間物作用。該等基因可被導入標靶細胞內、直接導入個體體內或藉由轉移經轉形之細胞至個體體內以間接導入。

用語「治療性產物」係指治療性多肽或治療性多核苷酸，該等產物授予有益功能至表現該等產物之宿主細胞。治療性多肽可包含但不限於長度僅三個胺基酸之肽、單鏈或多鏈蛋白質及融合蛋白質。治療性多核苷酸可包括但不限於反義寡核苷酸、小型干擾 RNA、核糖酵素及 RNA 外部引導序列。該治療性產物可包含天然發生之序列、合成性序列或天然及合成性序列之組合。

用語「配體依賴性轉錄因子複合物」或「LDTFC」係指包含一或多個蛋白質次單位之轉錄因子，該複合物可調節由此處所定義之「因子調節性啟動子」驅使之基因表現。LDTFC 模型「蛻皮激素受體複合物」通常係指具有至少二個核受體家族成員之異二聚體蛋白質複合物，即蛻皮激素受體（「EcR」）及超氣門蛋白（「USP」）（見 Yao et al., Nature 366:476 (1993)）；Yao et al., Cell 71:63 (1992)）。功能性 LDTFC 諸如 EcR 複合物亦可能包含額外之蛋白質諸如免疫親合素。已知為轉錄因子（諸如 DHR38、 β FTZ-1 或其他昆蟲同源物）之蛋白質核受體家族之額外成員亦可為 EcR 及 / 或 USP 之配體依賴性伴或非配體依賴

性伴。LDTFC 諸如 EcR 複合物亦可為 EcR 蛋白與超氣門蛋白之脊椎動物同源物、視黃酸-X-受體（「RXR」）蛋白或 USP 及 RXR 之嵌合物之異二聚體。用語「LDTFC」及「EcR 複合物」亦包含 EcR 蛋白或 USP 之同型二聚體複合物，以及具有相同功能之單一多肽或三聚體、四聚體及其他多聚體。

LDTFC 諸如 EcR 複合物可被活性蛻皮類固醇或與該複合物中之一種蛋白質結合的非固醇類配體活化，該種蛋白質包含 EcR 但不排除該複合物之其他蛋白質。LDTFC 諸如 EcR 複合物包括屬於核受體超家族之成員的蛋白質，其中所有成員之特徵為存在一或多種多肽次單位，包含胺基端反式活化結構域（在此處可交換使用之「AD」、「TD」或「TA」）、DNA 結合結構域（「DBD」）及配體結合結構域（「LBD」）。該 AD 可為與「異二聚體伴」或「HP」融合之形式存在。包含本發明之 AD 及 HP 之融合蛋白在此處被稱為「輔活化蛋白」或「CAP」。DBD 及 LBD 可以融合蛋白之形式表現，在此處被稱為「配體誘導性轉錄因子（「LTF」）。該等融合伴可被連接子例如鉸鏈區分開。LTF 家族之有些成員亦在 LBD 之羧基端側具有另一反式活化結構域。該 DBD 之特徵為具備二個半胱氨酸鋅手指，在其間為二個胺基酸模體 P 盒及 D 盒，該二模體授予蛻皮激素反應元件特異性。這些結構域可為天然結構域、經改質之結構域或異源性受體蛋白質之不同結構域之嵌合體。

組成外源性基因、反應元件及 LDTFC 例如 EcR 複合

物之 DNA 序列可能被納入古細菌 (archaebacteria)、原核細胞諸如大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 或其他腸內細菌，或真核細胞諸如植物或動物細胞。然而，由於許多由基因表現之蛋白質在細菌中被不正確地處理，因此真核細胞係為較佳。該等細胞可能呈單細胞或多細胞有機體之形式。外源性基因、反應元件及受體複合物之核苷酸序列亦可以 RNA 分子被納入，較佳地呈功能性病毒性 RNA 之形式，諸如菸草嵌紋病毒 (tobacco mosaic virus)。以真核細胞來說，脊椎動物細胞係較佳，因為它們天然地缺乏授予反應至本發明之 EcR 的配體之分子。因此，它們對本發明之配體為「實質上不敏感」。因此，可用於本發明之配體對經轉形之細胞或整個有機體之生理或其他效應將可被忽略。因此，細胞可生長且表現該所欲之產物，實質上不受配體本身之存在的影響。

用語「蛻皮激素受體複合物」通常係指具有至少二個核受體家族成員之異二聚體蛋白質複合物，即蛻皮激素受體 (「EcR」) 及超氣門蛋白 (「USP」) (見 Yao et al., *Nature* 366:476 (1993)) ; Yao et al., *Cell* 71:63 (1992))。功能性 EcR 複合物亦可能包含額外之蛋白質諸如免疫親合素。已知為轉錄因子 (諸如 DHR38、 β FTZ-1 或其他昆蟲同源物) 之蛋白質核受體家族之額外成員亦可為 EcR 及 / 或 USP 之配體依賴性伴或非配體依賴性伴。該 EcR 複合物亦可為 EcR 蛋白與超氣門蛋白之脊椎動物同源

物、視黃酸-X-受體（「RXR」）蛋白或 USP 及 RXR 之嵌合物之異二聚體。用語 EcR 複合物亦包含 EcR 蛋白或 USP 之同型二聚體複合物。

EcR 複合物可被活性蛻皮類固醇或與該複合物中之一種蛋白質結合的非固醇類配體活化，該種蛋白質包含 EcR 但不排除該複合物之其他蛋白質。此處之用語「配體」當應用於 EcR-基底基因開關時，描述能活化基因開關以刺激其中編碼之多肽之表現的小型及可溶性分子。配體之實例包括但不限於蛻皮類固醇，諸如蛻皮激素、20-羥基蛻皮激素、松甾酮 A、米樂甾酮 A 及該類似物、9-順-視黃酸、視黃酸之合成性類似物、N,N'-二醯基肼諸如該些於美國專利第 6,013,836、5,117,057、5,530,028 及 5,378,726 號及美國公開申請案 2005/0209283 及 2006/0020146 號中所揭示者；美國專利公開申請案 2004/0171651 所描述之噁二唑啉；二苯甲醯基烷基氰基肼，諸如歐洲專利申請案 461,809 所揭示者；N-烷基-N,N'-二芳醯基肼，諸如美國專利第 5,225,443 號所揭示者；N-醯基-N-烷基羰基肼，諸如歐洲專利申請案第 234,994 號所揭示者；N-芳醯基-N-烷基-N'-芳醯基肼，諸如美國專利第 4,985,461 號所描述者；醯胺基酮，諸如美國專利公開申請案 2004/0049037 所描述者；及其他類似物質包括 3,5-二-三級丁基-4-羥基-N-異丁基-苯甲醯胺、8-O-乙醯哈帕甾、氧基固醇、22（R）羥基膽固醇、24（S）羥基膽固醇、25-環氧基膽固醇、T0901317、5- α -6- α -環氧基膽固醇-3-硫酸鹽（ECHS）、

7-酮膽固醇-3-硫酸鹽、法尼醇、膽汁酸、1,1-雙膦酸酯、青春激素 III 及該類似物。可用於本發明之二醯基肼配體之實例包括 RG-115819 (3,5-二甲基-苯甲酸 N-(1-乙基-2,2-二甲基-丙基)-N'-(2-甲基-3-甲氧基-苯甲醯基)-醯肼)、RG-115932 ((R)-3,5-二甲基-苯甲酸 N-(1-三級丁基-丁基)-N'-(2-乙基-3-甲氧基-苯甲醯基)-醯肼) 及 RG-115830 (3,5-二甲基-苯甲酸 N-(1-三級丁基-丁基)-N'-(2-乙基-3-甲氧基-苯甲醯基)-醯肼)。其他可用於實施本發明之二醯基肼見美國專利申請案 12/155,111 (2008 年 5 月 29 日提出) 及 PCT/US2008/006757 (2008 年 5 月 29 日提出)。

EcR 複合物包括屬於核受體超家族之成員的蛋白質，其中所有成員之特徵為具備胺基端反式活化結構域 (「TA」)、DNA 結合結構域 (DBD) 及被鉸鏈區分開之配體結合結構域 (LBD)。有些家族成員亦在 LBD 之羧基端側具有另一反式活化結構域。該 DBD 之特徵為具備二個半胱胺酸鋅手指，在其間為二個胺基酸模體 P 盒及 D 盒，該二模體授予蛻皮激素反應元件特異性。這些結構域可為天然結構域、經改質之結構域或異源性受體蛋白質之不同結構域之嵌合體。

組成外源性基因、反應元件及 EcR 複合物之 DNA 序列可能被納入古細菌 (archaeobacteria)、原核細胞諸如大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 或其他腸內細菌，或真核細胞諸如植物或動物細胞。然

而，由於許多由基因表現之蛋白質在細菌中被不正確地處理，因此真核細胞係為較佳。該等細胞可能呈單細胞或多細胞有機體之形式。外源性基因、反應元件及受體複合物之核苷酸序列亦可以 RNA 分子被納入，較佳地呈功能性病毒性 RNA 之形式，諸如菸草嵌紋病毒 (tobacco mosaic virus)。以真核細胞來說，脊椎動物細胞係較佳，因為它們天然地缺乏授予反應至本發明之 EcR 的配體之分子。因此，它們對本發明之配體為「實質上不敏感」。因此，可用於本發明之配體對經轉形之細胞或整個有機體之生理或其他效應將可被忽略。因此，細胞可生長且表現該所欲之產物，實質上不受配體本身之存在的影響。

當 EcR 配體與 EcR 複合物一起使用且轉而與連接外源性基因之反應元件結合時，該 EcR 配體提供外部時態調節該外源性基因之表現。各種成份彼此之間的結合順序，即配體與受體複合物及受體複合物與反應元件之結合順序並不重要。通常，外源性基因之表現調控係因應 EcR 複合物與特定控制或調節性 DNA 元件之結合。該 EcR 蛋白質如同核受體家族之其他成員具有至少三個結構域，即反式活化結構域、DNA 結合結構域及配體結合結構域。此受體如同核受體家族之亞群，亦具備定義較不明確之造成異二聚化性質之區域。在 EcR 蛋白質之配體結合結構域與 USP 或 RXR 蛋白質異二聚化之後，配體與該配體結合結構域之結合，使該呈活化形式之異二聚化蛋白質之 DNA 結合結構域得以與反應元件結合，因此導致外源性基因之表現

或抑制。此機轉不排除配體與 EcR 或 USP 結合且導致形成活性同型二聚體複合物（例如 EcR+EcR 或 USP+USP）之可能性。在一實施態樣中，該一或多種受體結構域可為不同以產生嵌合性基因開關。通常，該三種結構域中之一或多種可自不同於其他結構域來源之來源選擇，以使該嵌合性受體在經選擇之宿主細胞或有機體內之反式活化活性、與配體之互補結合及對特定反應元件之辨識係經最佳化。此外，該反應元件本身可經其他 DNA 結合蛋白質結構域之反應元件改質或取代，諸如來自酵母菌之 GAL-4 蛋白質（見 Sadowski et al., Nature 335:563 (1988)）或來自大腸桿菌之 LexA 蛋白質（見 Brent et al., Cell 43:729 (1985)）以適應嵌合性 EcR 複合物。嵌合性系統之另一好處在於它們能夠根據所欲之終結果選擇用於驅使外源性基因之啟動子。該等雙重控制在基因治療之領域中特別重要，尤其是當細胞毒性蛋白質被產生時，因為表現時機及表現發生之細胞皆可被控制。當與適當之啟動子可操作性連接之外源性基因被導入個體之細胞內時，該等外源性基因之表現係受到本發明之配體的存在所控制。啟動子可能經組成性或誘導性調節，或可能具組織特異性（即僅在特定細胞類型中表現）或對有機體之某些發展階段具特異性。

在某些實施態樣中，本方法所描述之治療性開關啟動子係組成性。在某些實施態樣中，該治療性開關啟動子係在與疾病、疾患或狀況相關之條件下被活化，例如該啟動子會被疾病、被特定生理性、發展性、分化性或病理性條

件、及/或被一或多種特定生物性分子所活化；及/或該啟動子在特定組織或細胞類型中被活化。在某些實施態樣中，該疾病、疾患或狀況對治療性多肽或多核苷酸有反應。舉例來說在某些非限制性實施態樣中，該治療性多核苷酸或多肽可用於治療、預防、改善、減少症狀、預防疾病進展或治癒該疾病、疾患或狀況，但不一定需要完成任何或所有之上述功效。在某些實施態樣中，該第一及第二多核苷酸被導入以允許該配體依賴性轉錄因子複合物在與疾病、疾患或狀況有關之條件下之表現。在一實施態樣中，該治療性方法被進行以使該治療性多肽或治療性多核苷酸以足以治療、改善或預防該疾病、疾患或狀況之量被表現及散播於個體體內。此處所使用之「散播」表示該多肽係自經改質之細胞足夠地表現及釋放以在個體體內具有效應或活性。散播可為系統性、局部性或介於系統性或局部性之任何散播。舉例來說，該治療性多肽或治療性多核苷酸可經血流或淋巴系統系統性散播。或者，該治療性多肽或治療性多核苷酸可在欲治療之組織或器官中局部性散播。

編碼各種多肽諸如轉錄因子及報告蛋白之許多基因組及 cDNA 核酸序列係該領域所廣為周知。該領域之技藝人士可取得幾乎所有已知基因之核酸序列資訊，且可直接自公眾存庫、發表該序列之機構獲得該核酸分子，或可實施例行方法以製備該分子。見例如以下所述之序列登記號之說明。

基因開關可能為藉由添加或移除特定配體以調節基因

表現之任何基因開關系統。在一實施態樣中，該基因開關係一種其中基因表現之量取決於配體之存在量的基因開關。可用於本發明之基因開關之配體依賴性轉錄因子之實例包括但不限於由彼等之個別配體（例如糖皮質素、雌激素、黃體激素、類視色素、蛻皮激素及彼等之類似物或擬似物）所活化之核受體超家族之成員及由四環素活化之 rTTA。在本發明之一態樣中，該基因開關係 EcR-基底基因開關。該等系統之實例包括但不限於美國專利第 6,258,603 號、美國專利第 7,045,315 號、美國公開專利申請案第 2006/0014711、2007/0161086 號及國際公開申請案第 WO 01/70816 號中所述之系統。嵌合性蛻皮激素受體系統之實例係描述於美國專利第 7,091,038 號、美國公開專利申請案第 2002/0110861、2004/0033600、2004/0096942、2005/0266457 及 2006/0100416 號及國際公開申請案第 WO 01/70816、WO 02/066612、WO 02/066613、WO 02/066614、WO 02/066615、WO 02/29075 及 WO 2005/108617 號。非固醇性蛻皮激素促效劑調節系統之實例係 RheoSwitch[®] 哺乳動物誘導性表現系統（麻州伊普斯維奇（Ipswich, MA）新英格蘭生物實驗室（New England Biolabs）公司）。

在一實施態樣中，編碼該基因開關之多核苷酸包含在啓動子之控制下編碼配體依賴性轉錄因子之單一轉錄因子序列。該轉錄因子序列可能編碼天然發生或人工轉錄因子之配體依賴性轉錄因子。人工轉錄因子係其中該轉錄因子

之天然序列已被改變之轉錄因子，例如藉由序列突變或藉由組合來自不同轉錄因子之結構域。在一實施態樣中，該轉錄因子包含 H 組核受體配體結合結構域（LBD）。在一實施態樣中，H 組核受體 LBD 係來自 EcR、遍在受體、孤兒受體 1、NER-1、類固醇激素核受體 1、類視色素 X 受體交互作用蛋白-15、肝 X 受體 β 、類固醇激素受體樣蛋白、肝 X 受體、肝 X 受體 α 、類法尼醇 X 受體、受體交互作用蛋白 14 或法尼醇受體。在另一實施態樣中，H 組核受體 LBD 係源自蛻皮激素受體。

在一實施態樣中，編碼該基因開關之多核苷酸包含在啓動子之控制下編碼配體依賴性轉錄因子之單一轉錄因子序列。該轉錄因子序列可能編碼天然發生或人工轉錄因子之配體依賴性轉錄因子。人工轉錄因子係其中該轉錄因子之天然序列已被改變之轉錄因子，例如藉由序列突變或藉由組合來自不同轉錄因子之結構域。在一實施態樣中，該轉錄因子包含 H 組核受體配體結合結構域（LBD）。在一實施態樣中，H 組核受體 LBD 係來自 EcR、遍在受體、孤兒受體 1、NER-1、類固醇激素核受體 1、類視色素 X 受體交互作用蛋白-15、肝 X 受體 β 、類固醇激素受體樣蛋白、肝 X 受體、肝 X 受體 α 、類法尼醇 X 受體、受體交互作用蛋白 14 或法尼醇受體。在另一實施態樣中，H 組核受體 LBD 係源自蛻皮激素受體。

EcR 及其他 H 組核受體係核受體超家族之成員，其中所有成員之一般特徵為具備胺基端反式活化結構域（TD）

、DNA 結合結構域 (DBD) 及與 DBD 藉由鉸鏈區分開之 LBD。此處所使用之用語「DNA 結合結構域」包含自最小多肽序列之 DNA 結合蛋白至全長 DNA 結合蛋白，只要該 DNA 結合結構域之功能為與特定反應元件相連。核受體超家族成員之特徵亦包括具備四或五個結構域：A/B、C、D、E，有些成員具備 F 結構域（見美國專利第 4,981,784 號及 Evans, Science 240:889 (1988)）。該「A/B」結構域對應反式活化結構域，「C」對應 DNA 結合結構域，「D」對應鉸鏈區，及「E」對應配體結合結構域。有些家族成員亦在對應「F」之 LBD 的羧基端側具有另一反式活化結構域。

DBD 之特徵為具備二個半胱胺酸鋅手指，在其間為二個胺基酸模體 P 盒及 D 盒，該二模體授予反應元件特異性。這些結構域可為天然結構域、經改質之結構域或異源性受體蛋白質之不同結構域之嵌合體。EcR 如同核受體家族之亞群，亦具備定義較不明確之造成異二聚化性質之區域。由於核受體之結構域在天然中係經模塊化，因此 LBD、DBD 及 TD 可能可互相交換。

在另一實施態樣中，該轉錄因子包含 TD、DBD 及 H 組核受體 LBD，該 DBD 辨識與外源性基因相連之反應元件以調控該外源性基因之表現。在某些實施態樣中，該 H 組核受體 LBD 包含取代突變。

在另一實施態樣中，編碼基因開關之多核苷酸包含在第一啓動子控制下之第一轉錄因子序列及在第二啓動子控制下之第二轉錄因子序列，其中由該第一轉錄因子序列及

該第二轉錄因子序列編碼之蛋白質交互作用以形成功能為配體依賴性轉錄因子之蛋白質複合物，即「雙重開關」或「雙雜交物」基底基因開關。該第一及第二啟動子可為相同或不同。

在某些實施態樣中，編碼基因開關之多核苷酸包含在啟動子控制下之第一轉錄因子序列及第二轉錄因子序列，其中由該第一轉錄因子序列及該第二轉錄因子序列編碼之蛋白質交互作用以形成功能為配體依賴性轉錄因子之蛋白質複合物，即「單一基因開關」。該第一轉錄因子序列及第二轉錄因子序列可由內部核糖體進入位點（IRES）連接。該 IRES 可能是 EMCV IRES。

在一實施態樣中，該第一轉錄因子序列編碼包含 TD、DBD 及 H 組核受體 LBD 之多肽，該 DBD 辨識與外源性基因相連之反應元件以調節該外源性基因之表現，該第二轉錄因子序列編碼包含核受體 LBD 之轉錄因子，該 LBD 選自脊椎動物 RXR LBD、無脊椎動物 RXR LBD、超氣門蛋白 LBD 或包含二個多肽片段之嵌合性 LBD，其中該第一多肽片段係來自脊椎動物 RXR LBD、無脊椎動物 RXR LBD 或超氣門蛋白 LBD，且該第二多肽片段係來自不同的脊椎動物 RXR LBD、無脊椎動物 RXR LBD 或超氣門蛋白 LBD。

在另一實施態樣中，基因開關包含編碼第一多肽之第一轉錄因子序列及編碼第二多肽之第二轉錄因子序列，該第一多肽包含核受體 LBD 及 DBD，該 DBD 辨識與外源性

基因相連之反應元件以調節該外源性基因之表現，該第二多肽包含 TD 及核受體 LBD，其中核受體 LBD 之一係 H 組核受體 LBD。在一實施態樣中，該第一多肽係實質上不含 TD，該第二多肽係實質上不含 DBD。就本發明之目的而言，「實質上不含」係指有問題之蛋白質不包含有問題之結構域的足夠序列來提供活化或結合活性。

在本發明之另一態樣中，該第一轉錄因子序列編碼包含異二聚體伴及 TD 之蛋白質，該第二轉錄因子序列編碼包含 DBD 及 LBD 之蛋白質。

當只有一個核受體 LBD 係 H 組 LBD 時，另一核受體 LBD 可能來自任何其他核受體以與 H 組 LBD 形成二聚體。舉例來說，當 H 組核受體 LBD 係 EcR LBD 時，其他核受體 LBD「伴」可能來自 EcR、脊椎動物 RXR、無脊椎動物 RXR、超氣門蛋白（USP）或包含至少二種不同之選自脊椎動物 RXR、無脊椎動物 RXR 或 USP 之核受體 LBD 多肽片段之嵌合性核受體（見 WO 01/70816 A2、國際專利申請案 PCT/US02/05235 及 US 2004/0096942 A1）。「伴」核受體配體結合結構域可另包含截短突變、刪除突變、取代突變或其他修飾。

在一實施態樣中，脊椎動物 RXR LBD 係來自人智人（Homo sapiens）、小鼠家鼯鼠（Mus musculus）、大鼠溝鼠（Rattus norvegicus）、雞原雞（Gallus gallus）、豬家豬（Sus scrofa domestica）、青蛙非洲爪蟾（Xenopus laevis）、斑馬魚斑馬魚（Danio rerio）、被囊動物三崎

海鞘 (*Polyandrocarpa misakiensis*) 或水母箱型水母 (*Tripedalia cysophora*) 之 RXR。

在一實施態樣中，無脊椎動物 RXR 配體結合結構域係來自蝗蟲飛蝗 (*Locusta migratoria*) 之超氣門多肽 (「LmUSP」)、硬蜱美洲鈍眼蜱 (*Amblyomma americanum*) 之 RXR 同源物 1 (「AmaRXR1」)、硬蜱美洲鈍眼蜱之 RXR 同源物 2 (「AmaRXR2」)、招潮蟹大西洋砂招潮蟹 (*Celuca pugilator*) 之 RXR 同源物 (「CpRXR」)、甲蟲黃粉蟲 (*Tenebrio molitor*) 之 RXR 同源物 (「TmRXR」)、蜜蜂義大利蜂 (*Apis mellifera*) 之 RXR 同源物 (「AmRXR」)、蚜蟲桃蚜 (*Myzus persicae*) 之 RXR 同源物 (「MpRXR」) 或非雙翅類昆蟲/非鱗翅類昆蟲之 RXR 同源物。

在一實施態樣中，嵌合性 RXR LBD 包含至少二種選自脊椎動物物種 RXR 多肽片段、非脊椎動物物種 RXR 多肽片段或非雙翅類昆蟲/非鱗翅類昆蟲之無脊椎動物物種 RXR 同源物多肽片段之多肽片段。用於本發明之嵌合性 RXR 配體結合結構域可能包含至少二種不同物種之 RXR 多肽片段，或當物種係相同時，該二或多種多肽片段可來自該物種 RXR 多肽片段之二或多種不同的異構體。

在一實施態樣中，嵌合性 RXR 配體結合結構域包含至少一種脊椎動物物種 RXR 多肽片段及一種無脊椎動物物種 RXR 多肽片段。

在另一實施態樣中，嵌合性 RXR 配體結合結構域包

含至少一種脊椎動物物種 RXR 多肽片段及一種非雙翅類昆蟲/非鱗翅類昆蟲無脊椎動物物種 RXR 同源物多肽片段。

當配體與核受體之 LBD 組合且轉而與和外源性基因連接之反應元件結合時，該配體提供外部時態調控外源性基因之表現。本發明之各種成份間互相結合即例如配體與 LBD 結合、DBD 與反應元件結合、TD 與啓動子結合等之結合機轉或順序並不重要。

在特定實施例中，配體與 H 組核受體之 LBD 及彼之核受體 LBD 伴結合使外源性基因得以表現。此機轉不排除配體與 H 組核受體 (GHNR) 或彼之伴結合且導致形成活性同型二聚體複合物 (例如 GHNR+GHNR 或伴+伴) 之可能性。較佳地，以一或多種不同的受體結構域產生雜交基因開關。通常，該三種結構域 DBD、LBD 及 TD 中之一或多種可自不同於其他結構域來源之來源選擇，以使該雜交基因及該形成之雜交蛋白質在經選擇之宿主細胞或有機體內之反式活化活性、與配體之互補結合及對特定反應元件之辨識係經最佳化。此外，該反應元件本身可經其他 DNA 結合蛋白質結構域之反應元件改質或取代，諸如來自酵母菌之 GAL-4 蛋白質 (見 Sadowski et al., Nature 335:563 (1988)) 或來自大腸桿菌之 LexA 蛋白質 (見 Brent et al., Cell 43:729 (1985))，或專門與經設計、改質及選擇以進行特定交互作用之蛋白質進行該等標靶交互作用之合成性反應元件 (見例如 Kim et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 94:3616 (1997)) , 以適應雜交受體。

功能性 EcR 複合物亦可能包含額外之蛋白質諸如免疫親合素。已知為轉錄因子 (諸如 DHR38 或 β FTZ-1) 之蛋白質核受體家族之額外成員亦可為 EcR、USP 及 / 或 RXR 之配體依賴性伴或非配體依賴性伴。此外，可能需要其他輔因子，諸如通常被稱為輔活化子 (亦稱為適應子或媒介子) 之蛋白質。這些蛋白質不與 DNA 序列特異性結合，且不參與基礎轉錄。它們可能經由各種機轉展現它們對轉錄活化之影響，包括刺激與活化子之 DNA 結合、影響染色質結構，或媒介活化子起始複合物交互作用。該等輔活化子之實例包括 RIP140、TIF1、RAP46/Bag-1、ARA70、SRC-1/NCoA-1、TIF2/GRIP/NCoA-2、ACTR/AIB1/RAC3/pCIP 以及混雜輔活化子 C 反應元件 B 結合蛋白 CBP/p300 (見回顧文獻 Glass et al., Curr. Opin. Cell Biol. 9:222 (1997)) 。另外，通常被稱為輔抑制子 (又名抑制子、靜默子或靜默媒介子) 之蛋白質輔因子可能為缺乏配體時有效抑制轉錄活化所需。這些輔抑制子可與無配體之 EcR 交互作用以靜默反應元件之活性。目前的證據顯示，配體結合改變受體之構型，導致釋放輔抑制子及吸引上述輔活化子，藉此取消彼等之靜默活性。輔抑制子之實例包括 N-CoR 及 SMRT (見回顧文獻 Horwitz et al., Mol Endocrinol. 10: 1167 (1996)) 。這些輔因子可能為在細胞或有機體內之內源性因子，或可能為外源性添加之轉基因以經調節或未調節之方式表現。

該外源性基因係與啓動子可操作性連接，該啓動子包含至少一個由該基因開關所編碼之配體依賴性轉錄因子之 DBD 所辨識之反應元件。在一實施態樣中，該啓動子包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或超過 10 套反應元件。包含該所欲之反應元件之啓動子可爲天然發生之啓動子或利用該領域廣爲周知之技術產生之人工啓動子，例如一或多個反應元件與最小啓動子可操作性連接。

編碼蛋白質之基因亦可經密碼子最佳化。在一實施態樣中，蛋白質之編碼區係經密碼子最佳化以於人表現。如該領域之技藝人士所了解的，不同的核酸編碼區將編碼相同多肽，因爲基因密碼具有多餘性。在包含編碼任何多肽鏈之胺基酸的密碼子之核苷酸序列中的偏差允許編碼該基因之序列的變異。由於每個密碼子係由三個核苷酸組成，且組成 DNA 之核苷酸限制於四個特定鹼基，因此有 64 種可能的核苷酸組合，其中的 61 種編碼胺基酸（其餘 3 個密碼子編碼終止轉譯之信號）。顯示何種密碼子編碼何種胺基酸之「基因密碼」複製於此處表 4。如表中所示，許多胺基酸由超過一種密碼子指定。舉例來說，胺基酸丙胺酸及脯胺酸係由四種三聯體密碼編碼，絲胺酸及精胺酸係由六種三聯體編碼，然而色胺酸及甲硫胺酸則僅由一種三聯體編碼。此簡併性允許 DNA 鹼基組成物有廣泛差異，但不至於改變由該 DNA 所編碼之多肽的胺基酸序列。

表 4：標準基因密碼

	T	C	A	G
T	TTT 苯丙胺酸(F) TTC “ TTA 白胺酸(L) TTG “	TCT 絲胺酸(S) TCC “ TCA “ TCG “	TAT 酪胺酸(Y) TAC “ TAA 終止密碼子 TAG 終止密碼子	TGT 半胱胺酸(C) TGC TGA 終止密碼子 TGG 色胺酸(W)
C	CTT 白胺酸(L) CTC “ CTA “ CTG “	CCT 脯胺酸(P) CCC “ CCA “ CCG “	CAT 組胺酸(H) CAC “ CAA 麩醯胺酸(Q) CAG “	CGT 精胺酸(R) CGC “ CGA “ CGG “
A	ATT 異白胺酸(I) ATC “ ATA “ ATG 甲硫胺酸(M)	ACT 蘇胺酸(T) ACC “ ACA “ ACG “	AAT 天冬醯胺酸(N) AAC “ AAA 離胺酸(K) AAG “	AGT 絲胺酸(S) AGC “ AGA 精胺酸(R) AGG “
G	GTT 纈胺酸(V) GTC “ GTA “ GTG “	GCT 丙胺酸(A) GCC “ GCA “ GCG “	GAT 天冬胺酸(D) GAC “ GAA 麩胺酸(E) GAG “	GGT 甘胺酸(G) GGC “ GGA “ GGG “

應了解任何依照本發明所述編碼多肽之多核苷酸均屬於本發明之範圍，不論其所使用之密碼子為何。

許多有機體展現使用特定密碼子之偏性，以在成長中之多肽鏈編碼插入特定胺基酸。密碼子偏好或密碼子偏性即有機體間密碼子之使用差異係由基因密碼之簡併性提供，在許多有機體間有廣泛文獻記錄。密碼子偏性通常與信使 RNA (mRNA) 之轉譯效率有關，接著被認為尤其取決於被轉譯之密碼子的特性及特定轉移 RNA (tRNA) 分子

之可得性。細胞內經選擇之 tRNA 之優勢通常反映在肽合成中最常所使用之密碼子。因此，基因可經修剪以在給定有機體內基於密碼子最佳化達到最佳基因表現。

多核苷酸係藉由將給定物種之基因中偏好使用之密碼子納入 DNA 序列加以製備。

由於可自廣泛種類之動物、植物及微生物物種取得大量之基因序列，因此有可能計算密碼子使用之相對頻率。密碼子使用表可被輕易地取得，例如在網站 <http://www.kazusa.or.jp/codon/>（於 2006 年 5 月 30 日造訪）提供之「密碼子使用資料庫」，這些表格可經多種方式調整。見 Nakamura, Y., et al., "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000" Nucl. Acids Res. 28:292 (2000)。自 GenBank Release 151.0 計算得到之人密碼子使用表被複製為下列表 5（來自同上之 <http://www.kazusa.or.jp/codon/>）。這些表格使用 mRNA 命名法，因此該等表格不使用在 DNA 中發現之胸腺嘧啶（T），而是使用在 RNA 中發現之尿嘧啶（U）。該等表格係經調整，因此頻率係根據各氨基酸計算，而非根據所有 64 個密碼子計算。

表 5：人基因（智人（Homo sapiens））之密碼子使用表

胺基酸	密碼子	使用頻率
苯丙胺酸（Phe）	UUU	0.4525
	UUC	0.5475
白胺酸（Leu）	UUA	0.0728
	UUG	0.1266
	CUU	0.1287
	CUC	0.1956
	CUA	0.0700
	CUG	0.4062
異白胺酸（Ile）	AUU	0.3554
	AUC	0.4850
	AUA	0.1596
甲硫胺酸（Met）	AUG	1.0000
纈胺酸（Val）	GUU	0.1773
	GUC	0.2380
	GUA	0.1137
	GUG	0.4710
絲胺酸（Ser）	UCU	0.1840
	UCC	0.2191
	UCA	0.1472
	UCG	0.0565
	AGU	0.1499
	AGC	0.2433
脯胺酸（Pro）	CCU	0.2834
	CCC	0.3281
	CCA	0.2736
	CCG	0.1149
蘇胺酸（Thr）	ACU	0.2419
	ACC	0.3624
	ACA	0.2787
	ACG	0.1171

胺基酸	密碼子	使用頻率
丙胺酸 (Ala)	GCU	0.2637
	GCC	0.4037
	GCA	0.2255
	GCG	0.1071
酪胺酸 (Tyr)	UAU	0.4347
	UAC	0.5653
組胺酸 (His)	CAU	0.4113
	CAC	0.5887
麩醯胺酸 (Gln)	CAA	0.2541
	CAG	0.7459
天冬醯胺酸 (Asn)	AAU	0.4614
	AAC	0.5386
離胺酸 (Lys)	AAA	0.4212
	AAG	0.5788
天冬胺酸 (Asp)	GAU	0.4613
	GAC	0.5387
麩胺酸 (Glu)	GAA	0.4161
	GAG	0.5839
半胱胺酸 (Cys)	UGU	0.4468
	UGC	0.5532
色胺酸 (Trp)	UGG	1.0000
精胺酸 (Arg)	CGU	0.0830
	CGC	0.1927
	CGA	0.1120
	CGG	0.2092
	AGA	0.2021
	AGG	0.2011
甘胺酸 (Gly)	GGU	0.1632
	GGC	0.3438
	GGA	0.2459
	GGG	0.2471

藉由使用這些或類似之表格，該領域之一般技藝人士可應用這些頻率至任何給定之多肽序列，以產生經密碼子最佳化之編碼區之核酸片段，該核酸片段使用對給定物種最佳化之密碼子以編碼該多肽。

有多種方法可被用於合成由上述任何方法所設計之經密碼子最佳化之編碼區，包括該領域之一般技藝人士所廣為周知之標準及例行分子生物操作。

在一實施態樣中，本發明之載體中編碼該蛋白質之編碼區係經密碼子最佳化。在另一實施態樣中，該編碼區係經密碼子最佳化以於人表現。在特定實施態樣中，該序列係由經密碼子最佳化之核酸序列編碼。

為了將多核苷酸導入活體內或活體外之細胞內，可使用載體。該載體可為例如質體載體或單股或雙股 RNA 或 DNA 病毒載體。藉由廣為周知之導入 DNA 及 RNA 至細胞內之技術，該等載體可被導入需要該載體之個體例如哺乳動物的細胞內。病毒載體可為複製型或複製缺陷型。就複製缺陷型病毒載體而言，病毒增殖通常將僅發生於互補宿主細胞。此處所使用之用語「宿主細胞」或「宿主」係指本發明中包含本發明之一或多種多核苷酸之細胞。

因此，該載體至少必須包含本發明之多核苷酸。載體之其他成份可包括但不限於選擇性標誌、染色質修飾結構域、驅使其他亦可能存在載體中之多肽（例如致死多肽）表現之額外啟動子、基因組嵌入位點、重組位點及分子插入支點。載體可能包含任何數量之該些額外元件，不論是

否位於該等多核苷酸之內，因此該載體可經剪裁以符合所欲治療性方法之特定目標。

在本發明之一實施態樣中，被導入細胞內之該等載體另包含「選擇性標誌基因」，當選擇性標誌基因表現時表示本發明之基因開關建構體已被嵌入宿主細胞之基因組內。因此，該選擇性基因可作為基因組嵌入之陽性標誌。選擇性標誌基因雖然不是本發明之方法所必須，但其存在允許實施者得以選擇載體建構體已被嵌入細胞之基因組中之活細胞群。因此，本發明之某些實施態樣包含選擇已成功嵌入載體之細胞。此處所使用之用語「選擇」或彼之變異詞當與細胞一起使用時，係意圖表示標準、廣為周知之選擇具有特定基因組成或表型之細胞之方法。典型方法包括但不限於在抗生素諸如 G418、新黴素及安比西林（ampicillin）存在時培養細胞。其他選擇性標誌基因之實例包括但不限於授予二氫葉酸還原酶、潮黴素或黴酚酸抗藥性之基因。其他選擇方法包括但不限於允許使用胸苷激酶、次黃嘌呤-鳥嘌呤轉磷酸糖激酶或腺嘌呤轉磷酸糖激酶作為選擇劑之選擇性標誌基因。包含抗生素抗藥性基因之載體建構體的細胞將可耐受在培養中之抗生素。反之，不含抗生素抗藥性基因之載體建構體的細胞將無法耐受在培養中之抗生素。

此處所使用之「染色質修飾結構域」（CMD）係指與各種與維持及/或改變染色質結構有關之蛋白質（諸如但不限於 DNA 絕緣子）交互作用之核苷酸序列。見 Ciavatta

et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A., 103:9958 (2006)。

CMD 之實例包括但不限於雞 β 球蛋白絕緣子及雞高敏感位點 4 (cHS4)。舉例來說，在一或多種基因計畫（即啟動子、編碼序列及 3'調節區）之間使用不同的 CMD 序列有利於使用差別 CMD DNA 序列作為「最小同源臂」與各種微生物或試管內重組工程技術之組合，以「交換」在現存多重基因及單基因穿梭載體之間的基因計畫。其他染色質修飾結構域之實例係該領域已知或可被輕易識別。

在本發明之載體中之多核苷酸及核酸編碼區可與額外之編碼區相連，該額外之編碼區編碼分泌或信號肽，以引導蛋白質之分泌。根據信號假設，由哺乳動物細胞分泌之蛋白質具有信號肽或分泌前導序列，一旦生長蛋白質鏈開始被輸出通過粗糙內質網，該信號肽或分泌前導序列會自成熟蛋白質切除。由脊椎動物細胞分泌之多肽通常具有與該多肽之 N 端融合之信號肽，該信號肽將自完整或「全長」多肽切除以產生分泌或「成熟」型多肽。

在一實施態樣中，本發明之載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中該多核苷酸包含（1）至少一個與啟動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及（2）編碼一或多種蛋白質之多核苷酸，其與經由該配體依賴性轉錄因子活化之啟動子可操作性連接，其中該編碼一或多種蛋白質之多核苷酸另包含編碼信號肽之核酸序列。在另一實施態樣中，該信號肽增加由該載體所編碼之蛋白質之分泌，相較於包

含該蛋白質之天然信號肽基因之載體。特別是，本發明所使用之信號肽係經密碼子最佳化。

本發明之載體可包含各種調節區，例如 5'非轉譯區（5'UTR）、3' UTR 或二者。本發明亦關於使用各種調節區以誘發增進之分泌、蛋白質轉譯、轉譯後、mRNA 轉錄或轉錄後處理。此處所使用之基因之「5'非轉譯區」或「5'UTR」被瞭解為基因經轉錄為初級 RNA 轉錄物（前-mRNA）之部分且該部分係位於編碼序列之上游。初級轉錄物係由 DNA 轉錄所產生之起始 RNA 產物，其包含內含子及外顯子。許多初級轉錄物必須經過 RNA 處理以形成具有生理活性之 RNA 物種。要成為成熟 mRNA 之處理可能包含修剪末端、移除內含子、加蓋及/或自彼等之 RNA 前體切除個別核糖體 RNA（rRNA）分子。mRNA 之 5'UTR 因此係為不經轉譯成為蛋白質之 mRNA 部分，且該部分係位於編碼序列之上游。在基因組序列中，5'UTR 通常被定義為介於轉錄起始位點及起始密碼子之間的區域。脊椎動物 mRNA 之 5'非轉譯區（5'UTR）的長度可自數十個鹼基至數百個鹼基（Crowe et al., 2006 BMC Genomics 7:16）。此處所使用之 5'UTR 可為天然發生或經修飾以包含一或多個在天然中不連續之核酸序列（嵌合性序列），及/或可包含取代、插入及刪除及彼等之組合。在一實施態樣中，該 5'UTR 序列係源自野生型 TNF- α 序列或 5U2 序列。在另一實施態樣中，該 5'UTR 序列係 5U2 之 5'UTR。在一些實施態樣中，該 5'UTR 誘發增進之蛋白質表現，例如

mRNA 轉錄、轉錄前或轉錄後。

本發明所使用之 3'非轉譯區 (UTR) 係指位於編碼序列下游 (3') 之 DNA 序列，可包含聚腺苷酸化 [poly (A)] 辨認序列及其他編碼調節信號以影響 mRNA 處理或基因表現之序列。聚腺苷酸化信號之特徵通常為影響聚腺苷酸序列添加至 mRNA 前體之 3'端。任何適當之聚腺苷酸化序列皆可被使用，包括合成性最佳化序列，以及 BGH (牛生長激素)、多瘤病毒、TK (胸苷激酶)、EBV (EB 病毒) 及乳頭狀瘤病毒之聚腺苷酸化序列，包括人乳頭狀瘤病毒及 BPV (牛乳頭狀瘤病毒)。在特定實施態樣中，3'調節區係 SV40e (人肉瘤病毒-40) 聚腺苷酸化序列。在另一特定實施態樣中，3'調節區係人生長激素之聚腺苷酸化序列。

在某些實施態樣中，相較於不含信號肽及/或調節區之對照物，單獨或經組合之信號肽及/或調節區可增進至少 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、50 倍、100 倍、200 倍、300 倍、400 倍或 500 倍之蛋白質分泌、轉錄或轉譯。蛋白質例如 TNF- α 之分泌量可經正常化至由具有野生型基因之載體所編碼之蛋白質表現。在本發明之另一特定實施態樣中，該單獨或經組合之信號肽及/或調節區增加約 5%至約 10%、約 11%至約 20%、約 21%至約 30%、約 31%至約 40%、約 41%至約 50%、約 51%至約 60%、約 61%至約 70%、約 71%至約 80%、約 81%至約 90%、約 91%至約 100%、約 101%至約 149%、約

150%至約 199%、約 200%至約 299%、約 300%至約 499%或約 500%至約 1000%之蛋白質之產量。在特定實施態樣中，本發明包含條件性表現蛋白質之載體，其中該載體包含源自 5U2 之 5'UTR、編碼 IL-2 信號肽之經密碼子最佳化之核酸序列、編碼蛋白質之經密碼子最佳化之編碼區及 SV40e 或人生長激素之聚腺苷酸化信號。

用於本發明之特定載體係編碼蛋白質或多核苷酸之表現載體。通常，該等載體包含與所欲表現之多核苷酸可操作性連接以供宿主內之有效表現之順式作用控制區。適當之反式作用因子係由宿主提供、由互補載體提供或當導入宿主內時由載體本身提供。

多種表現載體可被用於表現蛋白質或多核苷酸。該等載體包括染色體、附加型及病毒衍生性載體，例如源自細菌性質體、噬菌體、酵母菌附加體、酵母菌染色體元件、病毒諸如腺病毒相關病毒、慢病毒、桿狀病毒、乳多泡病毒諸如 SV40、牛痘病毒、腺病毒、禽痘病毒、假狂犬病毒及反轉錄病毒之載體及源自彼等之組合之載體，諸如該些源自質體及噬菌體基因元件（如黏質體及噬菌體）之載體。所有皆可被用於本發明此態樣中之表現。一般來說，任何適合在宿主內維持、增殖或表現多核苷酸或蛋白質之載體可被用於這方面之表現。

用於本發明之適當病毒載體包括但不限於腺病毒基底載體、反轉錄病毒載體、單純疱疹病毒（HSV）基底載體、小病毒基底載體，例如腺病毒相關病毒（AAV）基底載

體及 AAV-腺病毒嵌合性載體。這些病毒載體可利用標準重組 DNA 技術製備，例如於 Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2d edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 及 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994) 中所述之技術。

在一實施態樣中，本發明之病毒載體係腺病毒載體。腺病毒 (Ad) 係 36 kb 之雙股 DNA 病毒，其於活體內有效地轉移 DNA 至各種不同之標靶細胞類型。腺病毒載體可以高力價產生，且可有效地轉移 DNA 至複製及非複製細胞。腺病毒載體基因組可利用任何種、系、亞型、多種種 (species) 之混合物、多種系之混合物、多種亞型之混合物或嵌合性腺病毒作為載體 DNA 之來源加以產製。可被用來作為腺病毒來源之腺病毒保存液可自腺病毒血清型 1 至 51 擴增，這些血清型目前可得自美國菌種保存中心 (American Type Culture Collection) (ATCC, 維吉尼亞州馬納薩斯市)，或自任何其他來源所提供之任何其他腺病毒血清型擴增。舉例來說，腺病毒可為 A 亞群 (例如血清型 12、18 及 31)、B 亞群 (例如血清型 3、7、11、14、16、21、34 及 35)、C 亞群 (例如血清型 1、2、5 及 6)、D 亞群 (例如血清型 8、9、10、13、15、17、19、20、22 至 30、32、33、36 至 39 及 42 至 47)、E 亞群 (血清型 4)、F 亞群 (血清型 40 及 41) 或任何其他腺病毒血

清型。由於人腺病毒血清型 5 (Ad5) 基因組已被完全定序，此處所描述之本發明之腺病毒載體係關於 Ad5 血清型。該腺病毒載體可為任何能在細胞內生長之腺病毒載體，該載體之某些顯著部分（雖然不見得實質上）係衍生自或基於腺病毒之基因組。該腺病毒載體可基於任何適當之野生型腺病毒之基因組。在某些實施態樣中，腺病毒載體係源自 C 群野生型腺病毒之基因組，尤其是血清型 2 或 5。腺病毒載體係該領域所廣為周知，已被描述於例如美國專利第 5,559,099、5,712,136、5,731,190、5,837,511、5,846,782、5,851,806、5,962,311、5,965,541、5,981,225、5,994,106、6,020,191 及 6,113,913 號、國際專利申請案 WO 95/34671、WO 97/21826 及 WO 00/00628 及 *Virology*, B. N. Fields et al., eds., 3d ed., Raven Press, Ltd., New York (1996) 之 Thomas Shenk 所著之第 67 章 "Adenoviridae and their Replication" 及 M. S. Horwitz 所著之第 68 章 "Adenoviruses"。

在其他實施態樣中，該腺病毒載體係複製缺陷型載體。此處所使用之用語「複製缺陷型」係指該腺病毒載體包含缺乏至少一種複製必要基因功能之基因組。此處所使用之基因缺陷、基因功能缺陷、基因區缺陷或基因組區缺陷係定義為刪除病毒基因組中足夠之基因材料以破壞或抹煞該核酸序列被整體或部分刪除之基因的功能。複製必要之基因功能係複製缺陷型腺病毒載體複製（即增殖）所需之這些基因功能。複製必要之基因功能係由例如腺病毒早期區

(例如 E1、E2 及 E4 區)、晚期區(例如 L1 至 L5 區)、與病毒包裝有關之基因(例如 IVa2 基因)及病毒相關性 RNA(例如 VA-RNA I 及/或 VA-RNA II)所編碼。在其他實施態樣中,該複製缺陷型腺病毒載體包含缺乏腺病毒基因組之一或多區之至少一種複製必要性基因功能之腺病毒基因組(例如缺乏腺病毒基因組之二或多區以導致多重複製缺陷型腺病毒載體)。該腺病毒基因組之一或多區係選自 E1、E2 或 E4 區。複製缺陷型腺病毒載體可包含 E1 區之至少一種複製必要性基因功能之缺陷(即為 E1-缺陷型腺病毒載體),特別是腺病毒 E1A 區及腺病毒 E1B 區各區中複製必要性基因功能之缺陷。除了該種 E1 區之缺陷以外,該重組腺病毒亦可在主要晚期啟動子(MLP)中具有突變,如國際專利申請案 WO 00/00628 中之討論。在特定實施態樣中,該載體缺乏 E1 區之至少一種複製必要性基因功能及至少部分之非必要性 E3 區(例如 E3 區之 Xba I 刪除)(即為 E1/E3-缺陷型腺病毒載體)。

在某些實施態樣中,該腺病毒載體係「多重缺陷」,表示該腺病毒載體缺乏腺病毒基因組之二或多區之各區中的一或多種病毒複製所需之基因功能。舉例來說,前述之 E1-缺陷型或 E1/E3-缺陷型腺病毒載體可另缺乏至少一種 E4 區之複製必要性基因功能(即為 E1/E4-缺陷型腺病毒載體)。刪除整個 E4 區之腺病毒載體可誘發較低之宿主免疫反應。

或者,該腺病毒載體缺乏所有或部分之 E1 區及所有

或部分之 E2 區的複製必要性基因功能（即為 E1/E2-缺陷型腺病毒載體）。缺乏所有或部分之 E1 區、所有或部分之 E2 區及所有或部分之 E3 區之複製必要性基因功能之腺病毒載體亦於此處考慮。若本發明之腺病毒載體缺乏 E2A 區之複製必要性基因功能，則該載體不包含完整刪除之 E2A 區，其長度少於約 230 個鹼基對。通常，腺病毒之 E2A 區編碼 DBP（DNA 結合結構域），其為 DNA 複製所需之多肽。依病毒血清型而定，DBP 係由 473 至 529 個胺基酸組成。一般認為 DBP 是呈長橢球形狀之非對稱性蛋白質，其由球狀 Ct 與延伸之 Nt 結構域組成。研究顯示，該 Ct 結構域負責 DBP 與核酸結合、與鋅結合及在 DNA 合成中作用於 DNA 鏈延長階段之能力。然而，該 Nt 結構域被認為作用於轉錄及轉錄後二個階段之晚期基因表現，負責蛋白質之有效核定位，且亦可能與增強彼自身之表現有關。刪除在胺基酸 2 至 38 之間的 Nt 結構域顯示此區是 DBP 功能之重要部分（Brough et al., *Virology*, 196, 269-281 (1993)）。雖然刪除編碼 DBP 之 Ct 區的 E2A 區對病毒複製沒有影響，但刪除編碼 DBP 之 Nt 結構域的胺基酸 2 至 38 之 E2A 區妨礙病毒複製。在一實施態樣中，多重複製缺陷型腺病毒載體包含腺病毒基因組之此部分之 E2A 區。特別是，舉例來說，該所欲保留之 E2A 區部分係由該 E2A 區之 5'端所定義之腺病毒基因組之 E2A 區部分，特別是腺病毒血清型 Ad5 基因組之 E2A 區的位置 Ad5 (23816) 至 Ad5 (24032)。

該腺病毒載體可為缺乏僅腺病毒基因組早期區之複製必要性基因功能、僅腺病毒基因組晚期區之複製必要性基因功能及腺病毒基因組早期及晚期兩區之複製必要性基因功能。腺病毒載體亦可實質上移除完整之腺病毒基因組，在此情況中至少維持完整之病毒反向末端重複（ITR）及一或多種啟動子或病毒 ITR 及包裝信號（即腺病毒增殖子）。被移除之腺病毒基因組區域越大，可被插入基因組之外源性核酸序列之片段越大。舉例來說，如果腺病毒基因組為 36 kb，保留完整之病毒 ITR 及一或多種啟動子，該腺病毒之外源性插入能力係約 35 kb。或者，僅包含 ITR 及包裝信號之多重缺陷腺病毒載體有效地允許插入約 37 至 38 kb 之外源性核酸序列。當然，在任何或所有的缺陷型腺病毒區中包含間隔子元件將降低腺病毒載體容納大型插入序列之能力。適當之複製缺陷型腺病毒載體包括多重缺陷型腺病毒載體係揭示於美國專利第 5,851,806 及 5,994,106 號及國際專利申請案 WO 95/34671 及 WO 97/21826。在一實施態樣中，本發明方法所使用之載體係描述於國際專利申請案 PCT/US01/20536。

應了解的是，刪除腺病毒載體之不同區域可改變哺乳動物之免疫反應。特別是，刪除不同區域可減少腺病毒載體所產生之發炎反應。另外，腺病毒載體外套蛋白可經修飾以降低腺病毒載體可被或不可被針對野生型外套蛋白之中和抗體辨識之能力，如國際專利申請案 WO 98/40509 中所述。

當該腺病毒載體具多重複製缺陷特別是 E1 及 E4 區之複製必要性基因功能時，該載體可包括間隔子元件以提供病毒在互補細胞系中生長，類似單一複製缺陷型腺病毒載體特別是包含 E1 區缺陷之腺病毒載體所達成之病毒生長。該間隔子元件可包含任何所欲長度之序列。間隔子元件序列可為腺病毒基因組之編碼或非編碼及天然或非天然序列，但不恢復該缺陷區之複製必要性功能。在缺乏間隔子的情況下，多重複製缺陷型腺病毒載體之纖維蛋白產製及/或病毒生長相較於單一複製缺陷型腺病毒載體係經減少。然而，在缺陷型腺病毒區之至少一區較佳地 E4 區中包含間隔子可彌補此纖維蛋白產製及病毒生長之降低。間隔子於在腺病毒載體中之用途係描述於美國專利第 5,851,806 號。

腺病毒載體之建構係該領域所廣泛了解。腺病毒載體可利用前述方法建構及/或純化，例如美國專利第 5,965,358 號及國際專利申請案 WO 98/56937、WO 99/15686 及 WO 99/54441 中所述。腺病毒基因轉移載體之產製係該領域所廣為周知，涉及使用標準分子生物技術諸如該些於例如 Sambrook et al. (同上)、Watson et al. (同上)、Ausubel et al. (同上) 及此處提及之數篇其他文獻中所描述者。

複製缺陷型腺病毒載體通常在互補細胞系中產製，該細胞系提供不存在於複製缺陷型腺病毒載體但為病毒增殖所需之適當量之基因功能，以產製高力價之病毒載體保存

液。在一實施態樣中，細胞系互補至少一種及/或所有不存在於複製缺陷型腺病毒之複製必要性基因功能。該互補細胞系可互補至少一種由早期區、晚期區、病毒包裝區、病毒相關性 RNA 區或彼等之組合所編碼之複製必要性基因功能之缺陷，包括所有腺病毒功能（例如使包含最小腺病毒序列，諸如僅反向末端重複（ITR）及包裝信號或僅 ITR 及腺病毒啟動子之腺病毒增殖子得以增殖）。在另一實施態樣中，該互補細胞系互補腺病毒基因組之 E1 區的至少一種複製必要性基因功能之缺陷（例如二或多種複製必要性基因功能），特別是在各 E1A 及 E1B 區之複製必要性基因功能之缺陷。此外，該互補細胞系可互補腺病毒基因組之 E2（特別是腺病毒 DNA 聚合酶及末端蛋白質）及/或 E4 區之至少一種複製必要性基因功能之缺陷。刻意地，互補 E4 區之缺陷的細胞包含 E4-ORF6 基因序列及產製 E4-ORF6 蛋白。該細胞刻意地至少包含 ORF6，但不含腺病毒基因組之 E4 區之其他 ORF。該細胞系之較佳其他特徵為包含不與腺病毒載體重複之互補基因，如此能最小化且幾乎消除載體基因組與細胞性 DNA 重組之可能性。因此可將複製型腺病毒（RCA）存在之機率降到最低即使無法在載體保存液中避免，使該載體保存液得以適合某些治療性目的特別是基因療法之目的。不含 RCA 之載體保存液可避免腺病毒載體在非互補細胞中複製。互補細胞系之建構涉及標準分子生物學及細胞培養技術，諸如該些由 Sambrook et al.（同上）及 Ausubel et al.（同上）所述者

。用於產製基因轉移載體（例如腺病毒載體）之互補細胞系包括但不限於 293 細胞（例如 Graham et al., J. Gen. Virol., 36, 59-72 (1977) 所述）、PER.C6 細胞（例如國際專利申請案 WO 97/00326 及美國專利第 5,994,128 及 6,033,908 號所述）及 293-ORF6 細胞（例如國際專利申請案 WO 95/34671 及 Brough et al., J. Virol., 71, 9206-9213 (1997) 所述）。核酸序列插入腺病毒基因組內（例如腺病毒基因組之 E1 區）可由已知方法達成，例如藉由在腺病毒基因組之給定位置導入獨特之限制位點。

反轉錄病毒係能感染多種宿主細胞之 RNA 病毒。當感染時，反轉錄病毒基因組嵌入彼之宿主細胞的基因組內，並隨宿主細胞之 DNA 複製，藉以持續產製病毒 RNA 及任何納入反轉錄病毒基因組內之核酸序列。藉此方式，當使用反轉錄病毒時可達成長期表現治療性因子。考慮用於基因療法之反轉錄病毒相對不具致病性，雖然有致病性反轉錄病毒存在。當採用致病性反轉錄病毒例如人免疫缺陷病毒（HIV）或人嗜 T 細胞病毒（HTLV）時，必須小心地改變病毒基因組以消除對宿主之毒性。反轉錄病毒載體可經其他改變以使該病毒成為複製缺陷。因此反轉錄病毒載體被認為特別適用於活體內穩定之基因轉移。慢病毒載體諸如 HIV-基底載體係用於基因傳送之示範性反轉錄病毒。不像其他的反轉錄病毒，已知 HIV-基底載體會將彼等之乘客基因納入非分裂細胞，因此可被用於治療持續性疾病。

HSV-基底病毒載體適合用來作為基因轉移載體以導入核酸至各種細胞類型。成熟 HSV 病毒粒子之結構為有套膜之二十面體核殼以及由 152 kb 之線性雙股 DNA 分子組成之病毒基因組。大部分複製缺陷型 HSV 載體包含刪除以移除一或多種立即早期基因以避免複製。HSV 載體之優點在於彼進入可導致長期 DNA 表現之潛伏階段之能力，及彼之可容納至 25 kb 之外源性 DNA 插入之大型病毒 DNA 基因組。當然，HSV 啟動長期產製外源性蛋白質之能力就短期治療計劃而言可能是一項缺點。然而，該領域之一般技藝人士具備判斷特定情況下之適當載體之必備了解。HSV-基底載體係描述於例如美國專利第 5,837,532、5,846,782、5,849,572 及 5,804,413 號及國際專利申請案 WO 91/02788、WO 96/04394、WO 98/15637 及 WO 99/06583。

AAV 載體係特別受到關注地被用於基因療法計畫中之病毒性載體。AAV 係 DNA 病毒，其未被發現會造成人之疾病。AAV 基因組係由二個基因 *rep* 及 *cap* 組成，其兩側為包含 DNA 複製及病毒包裝之辨識信號之反向末端重複（ITR）。AAV 需要與輔助病毒（即腺病毒或單純皰疹病毒）共感染或表現輔助基因以有效地複製。AAV 可在各種宿主細胞中增殖，包括人細胞、類人猿細胞及齧齒動物細胞，依所採用之輔助病毒而定。用於投予核酸序列之 AAV 載體通常被刪掉大約 96% 之親代基因組，僅剩 ITR 被保留。如此可消除因為表現病毒基因所造成之免疫或毒性不良。

反應。若有需要，AAV rep 蛋白可與 AAV 載體共投以使 AAV 載體能夠被嵌入宿主細胞之基因組內。包含經嵌入之 AAV 基因組的宿主細胞在細胞生長或細胞形態上沒有變化（見例如美國專利第 4,797,368 號）。因此，長期表現來自 AAV 載體之治療性因子可被用於治療持續性及慢性疾病。

表現載體中之多核苷酸序列係與適當之表現控制序列可操作性連接，包括例如引導 mRNA 轉錄之啟動子。其他啟動子之代表包括但不限於組成性啟動子及組織特異性或誘導性啟動子。組成性真核啟動子之實例包括但不限於小鼠金屬硫蛋白 I 基因（Hamer et al., J. Mol. Appl. Gen. 1:273 (1982)）、疱疹病毒之 TK 啟動子（McKnight, Cell 31:355 (1982)）、SV40 早期啟動子（Benoist et al., Nature 290:304 (1981)）及牛痘病毒啟動子。可用於驅使蛋白質或多核苷酸表現之啟動子的其他實例包括但不限於組織特異性啟動子及其他特定蛋白質之內源性啟動子，諸如白蛋白啟動子（肝細胞）、前胰島素啟動子（胰臟 β 細胞）及該類似物。一般來說，表現建構體將包含供轉錄之起始及終止位點，及在經轉錄區中供轉譯之核糖體結合位點。由建構體表現之成熟轉錄物的編碼部分可包括在所欲轉譯之多肽開始處之轉譯起始密碼子 AUG 及大約位於尾端之終止密碼子（UAA、UGA 或 UAG）。

此外，該建構體可包含調節及引起表現之控制區。一般來說，這些區將藉由控制轉錄之方式操作，其中包括諸

如抑制子結合位點及增強子。

真核載體之實例包括但不限於斯壯特基 (Stratagene) 公司之 pW-LNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1 及 pSG；法瑪西亞 (Amersham Pharmacia Biotech) 公司之 pSVK3、pBPV、pMSG 及 pSVL；及克隆技術 (Clontech) 公司之 pCMVDsRed2-express、pIRES2-DsRed2、pDsRed2-Mito 及 pCMV-EGFP。許多其他載體係廣為周知且可自商業途徑獲得。

特別有用之載體包含分子插入支點以供快速插入及移除基因計畫之元件，該等載體係描述於美國公開專利申請案 2004/0185556、美國專利申請案 11/233,246 及國際公開申請案 WO 2005/040336 及 WO 2005/116231。該載體實例係如 WO 2007/038276 中所述之 UltraVector™ 產製系統 (維吉尼亞州布萊克斯堡 (Blacksburg, VA) 英創松 (Intrexon) 公司)。此處所使用之「基因計畫」係基因元件之組合，包含啟動子 (P)、表現序列 (E) 及 3'調節序列 (3)，因此「PE3」即一基因計畫。在此基因計畫中之元件可被輕易地在基因計畫之各元件側翼之分子支點之間交換。此處所使用之分子支點係定義為包含至少二個以線性方式排列之非變動性罕見或少見之限制位點之多核苷酸。在一實施態樣中，該分子支點包含至少三個以線性方式排列之非變動性罕見或少見之限制位點。通常任一分子支點不包括在相同基因計畫內之任何其他分子支點之罕見或少見之限制位點。給定限制酶作用於其上之超過 6 個核苷酸之

同源序列被稱為「罕見」限制位點。然而有些 6 bp 之限制位點的發生頻率不如統計預期的高，這些位點及切割彼等之內核酸酶被稱為「少見」限制位點。罕見或少見限制酶之實例包括但不限於 AsiS I、Pac I、Sbf I、Fse I、Asc I、Mlu I、SnaB I、Not I、Sal I、Swa I、Rsr II、BSiW I、Sfo I、Sgr AI、AflIII、Pvu I、Ngo MIV、Ase I、Flp I、Pme I、Sda I、Sgf I、Srf I、Nru I、Acl I、Cla I、Csp45 I、Age I、Bst1107 I、BstB I、Hpa I、Aat II、EcoR V、Nhe I、Spe I、Avi II、Avr II、Mfe I、Afe I、Fsp I、Kpn I、Sca I、BspE I、Nde I、Bfr I、Xho I、Pml I、ApaL I、Kas I、Xma I、BsrB I、Nsi I、Sac II、Sac I、Blp I、PspoM I、Pci I、Stu I、Sph I、BamH I、Bsu36 I、Xba I、BbvC I、Bgl II、Nco I、Hind III、EcoR I、BsrG I 及 Sse8781 I。

載體亦可包含第二類限制酶稱為歸巢內核酸酶（HE）之限制位點。HE 酶具有大型、非對稱性限制位點（12 至 40 個鹼基對），彼等之限制位點在天然中並不常見。舉例來說，被稱為 I-SceI 之 HE 具有 18 bp 之限制位點（5'TAGGGATAACAGGGTAAT3'），預計每 7×10^{10} 鹼基對之隨機序列中僅出現一次。此出現頻率相當於在大小為哺乳動物基因組之 20 倍的基因組中僅一個位點。HE 位點之罕見性大幅提高基因工程師切割基因計畫而不破壞該基因計畫之完整性的可能，若 HE 位點被包括於選殖載體質體之適當位置。

選擇適當載體及啓動子以於宿主細胞中表現係廣爲周知之程序，而載體建構及導入宿主之必要技術以及彼於宿主中之表現係該領域之例行技藝。

導入多核苷酸至細胞內可爲過渡性轉染、穩定性轉染或可爲基因座特異性插入載體。過渡性及穩定性轉染載體至宿主細胞內可由磷酸鈣轉染、DEAE-葡聚糖媒介性轉染、陽離子脂質媒介性轉染、電穿孔、轉導、感染或其他方法達成。該等方法係描述於許多標準實驗室手冊，諸如 Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986)、Keown et al., 1990, Methods Enzymol. 185: 527-37、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.。這些穩定轉染方法導致隨機插入載體至細胞之基因組內。另外，載體之複製數及方向性通常來說亦爲隨機。

在本發明之一實施態樣中，載體被插入基因組之生物中性位點。生物中性位點係指在基因組內插入多核苷酸而極少干擾（若有的話）該細胞之正常功能的位點。生物中性位點可利用可取得之生物資訊加以分析。許多生物中性位點係該領域已知，例如 ROSA-相等基因座。其他生物中性位點可利用該領域廣爲周知之例行技術加以辨識。基因組插入位點之特徵描述係利用該領域已知之方法進行。當導入載體至細胞內時，爲了控制多核苷酸之位置、複製數及/或方向性，可使用基因座特異性插入之方法。基因座

特異性插入之方法係該領域所廣為周知，包括但不限於同源性重組及重組酶媒介性基因組插入。當然，若要在本發明之方法中使用基因座特異性插入方法，該等載體可包含輔助此基因座特異性插入之元件，諸如但不限於同源性重組。舉例來說，該等載體可能包含一、二、三、四或四個以上之基因組整合位點（GIS）。此處所使用之「基因組整合位點」被定義為載體序列之核苷酸序列與細胞內之基因組部分序列一致或幾乎一致之部分，該部分允許載體插入基因組。特別是，該載體可包含在至少多核苷酸兩側之二個基因組整合位點。當然，GIS可在其他元件或甚至存在載體上之所有元件之旁側。

在另一實施態樣中，基因座特異性插入可藉由重組酶位點特異性基因插入進行。簡言之，細菌性重組酶諸如但不限於 PhiC31 整合酶可作用於人基因組內之「假性」重組位點。這些假性重組位點可成為使用重組酶之基因座特異性插入之目標。重組酶位點特異性基因插入係描述於 Thyagarajan et al., Mol. Cell Biol. 21: 3926 (2001)。可用於重組酶位點特異性基因插入之重組酶及彼等之個別位點之其他實例包括但不限於絲胺酸重組酶諸如 R4 及 TP901-1 和 WO 2006/083253 所描述之重組酶。

在另一實施態樣中，該載體可包含化學抗藥性基因，例如多重藥物抗藥性基因 *mdr1*、二氫葉酸還原酶或 O⁶-烷基鳥嘌呤-DNA 烷基轉移酶。化學抗藥性基因可在組成性（例如 CMV）或誘導性（例如 RheoSwitch[®]）啟動子之控

制下。在此實施態樣中，若想要治療個體之疾病同時維持該個體體內經改質之細胞，臨床醫師可使用化學治療劑以殺死疾病細胞，但該經改質之細胞將不受該劑之影響因為適當化學抗藥性基因之表現，且可被持續使用以治療、改善或預防疾病或疾患。藉由將化學抗藥性基因置於誘導性啟動子之控制下，可避免非必要之化學抗藥性基因表現，但若須持續治療該基因仍將可用。若經改質之細胞本身變成疾病細胞，它們仍可藉由誘導如下所述之致死性多肽之表現而被摧毀。

本發明之方法可藉由導入編碼基因開關及外源性基因之多核苷酸至個體之細胞內加以實現。可使用任何已知之用於導入多核苷酸至該領域已知之細胞內之方法，諸如上述之該些方法。

當多核苷酸是要導入活體外之細胞內時，該等細胞可藉由任何該領域已知之技術取自個體，包括但不限於生檢、刮削及手術組織移除。該經分離之細胞可經足以允許多核苷酸導入細胞內之時間的培養，例如 2、4、6、8、10、12、18、24、36、48 小時或更久。短時間內培養初代細胞之方法係該領域所廣為周知。舉例來說，細胞可於培養盤（例如微量孔盤）中附著或懸浮培養。

以活體外治療性方法而言，細胞係自個體分離，並在適用於導入多核苷酸至細胞內之條件下培養。一旦多核苷酸被導入細胞內，該等細胞係經足夠時間之培養以允許配體依賴性轉錄因子之表現，例如 0.5、1、2、3、4、5、6

、7、8、9、10、12、18 或 24 小時或更久。在多核苷酸被導入細胞後的某些時間點（不論是在顯著量之配體依賴性轉錄因子被表現之前或之後），該等細胞被導入回該個體體內。導回可藉由該領域已知之任何方法進行，例如靜脈輸注或直接注入組織或腔內。在一實施態樣中，在將細胞導回個體之前，會先測定細胞內有多核苷酸存在。在另一實施態樣中，包含多核苷酸之細胞係經篩選（例如根據多核苷酸之選擇性標誌之存在與否），只有該些包含多核苷酸之細胞會被導回個體。在細胞被導回個體之後，配體被投予至個體以誘發該治療性多肽或治療性多核苷酸之表現。在選擇性實施態樣中，該配體甚至可在細胞被導回個體之前被加至該細胞，以使該治療性多肽或治療性多核苷酸在細胞被導回之前開始表現。該配體可經任何適當之方法投予，不論是系統性投予（例如經口、經靜脈）或局部性投予（例如腹膜內、脊椎鞘內、腦室內、直接注射至細胞被導回之組織或器官內）。每種細胞類型及疾病或疾患之理想配體投予時間可利用例行技術決定。

本發明之活體內治療性方法涉及直接活體內導入多核苷酸例如腺病毒載體至個體之細胞內。多核苷酸可經系統性或局部性（例如疾病或疾患之部位）導入個體體內。一旦多核苷酸被導入個體體內，配體可被投予以誘發該治療性多肽或治療性多核苷酸之表現。該配體可經任何適當之方法投予，不論是系統性投予（例如經口、經靜脈）或局部性投予（例如腹膜內、脊椎鞘內、腦室內、直接注射至

發生疾病或疾患之組織或器官內)。每種細胞類型及疾病或疾患之理想配體投予時間可利用例行技術決定。

以活體內用途而言，此處描述之配體可包含於醫藥上可接受之載劑中，諸如溶液、懸浮液、錠劑、膠囊、軟膏、酏劑及注射型組成物。醫藥組成物可包含自 0.01 重量%至 99 重量%之配體。組成物可為單一或多重劑量形式。在任何特定醫藥組成物中之配體量將依有效劑量而定，即誘發該所欲之基因表現或抑制所需之劑量。

此處所使用之用語「rAD.RheoIL12」係指腺病毒多核苷酸載體，其包含在 RheoSwitch®治療系統(RTS)之基因開關的控制下之 IL-12 基因，該載體能在活化配體存在下產製 IL-12 蛋白。此處所使用之用語「rAd.cIL12」係指包含在組成性啟動子控制下之 IL-12 基因的腺病毒多核苷酸控制載體。

此處所使用之用語「IL-12p70」係指 IL-12 蛋白，其天然地具有二個通常被稱為 p40 及 p35 之次單位。用語 IL-12p70 包含由 IL-12 之二個次單位(p40 及 p35)組成之融合蛋白，其中該融合蛋白可包含在次單位之間的連接子胺基酸。

投予該醫藥製劑之適當途徑包括經口、經直腸、局部(包括經皮、經頰及舌下)、經陰道、非經腸(包括皮下、肌肉內、靜脈內、腫瘤內、皮內、脊椎鞘內及硬膜外)及經鼻胃管。該領域之技藝人士將了解到，投予途徑將依所欲治療之情況而定，且可能隨不同因素例如接受者之狀

況而異。

此處所使用之用語「活化（activating 或 activate）」係指基因開關之細胞活性的任何可測量之增加，導致受到關注之基因之表現。

此處所使用之用語疾病「治療（treating 或 treatment）」疾病係指爲了緩和疾病之徵候或症狀而執行計畫，該計畫可能包括投予一或多種藥物或經試管內工程化之細胞至哺乳動物（人或非人）。因此，「治療」不應一定被視爲需要完全緩和徵候或症狀，不要求治癒，且特別包括僅對個體具邊際效應之計畫。

此處所使用之用語「經試管內工程化之細胞」或「經試管內工程化之細胞群」或「經工程化之細胞群」或「表現蛋白質之細胞」係指在基因開關之控制下條件性表現蛋白質之細胞，該基因開關可由活化配體活化。

此處之用語「經改質之細胞」係指經一程序改變之細胞，該程序包括但不限於轉染、電穿孔、顯微注射、轉導、細胞融合、DEAE 葡聚糖、磷酸鈣沉澱及脂質體轉染（溶酶體融合）。

此處之用語「MOI」或「感染複數」係指在特定實驗中感染單一細胞之腺病毒顆粒平均數量（例如重組腺病毒或對照腺病毒）。

在另一實施態樣中，本發明之載體及方法可被用於治療疾病。

在另一實施態樣中，本發明之載體及方法可被用於治

療腎病。在一實施態樣中，該腎病係腎衰竭。在另一實施態樣中，該腎病係慢性腎衰竭。

在另一實施態樣中，本發明之載體及方法可被用於治療貧血。在一實施態樣中，該貧血係腎病相關性貧血，例如腎衰竭或慢性腎衰竭相關性貧血。在另一實施態樣中，該貧血係與癌治療有關，例如與一或多種化學治療劑有關。在另一實施態樣中，該貧血係與高齡有關。在另一實施態樣中，該貧血係與肺功能受損有關。在另一實施態樣中，該貧血係與骨髓異常增生有關。在另一實施態樣中，該貧血係與放射治療有關。在另一實施態樣中，該貧血係與重大疾病有關。

在一實施態樣中，該貧血係與心臟病無關。在另一實施態樣中，該對紅血球生成素之治療有反應之疾病、疾患或狀況不是心臟病。非限制性類型之「心臟病」係鬱積性心衰竭、缺氧、缺血性心臟病、高血壓性心臟病、冠狀動脈疾病、週邊血管性疾病及缺血性心臟事件，例如心肌梗塞、心臟病發作、心衰竭、心律不整、心肌破裂、心包炎、心因性休克、血栓形成、栓塞、動脈粥樣硬化及動脈狹窄。

在另一實施態樣中，該包含編碼紅血球生成素或彼之促效劑之多核苷酸的多核苷酸不同時編碼依那西普（etanercept），依那西普係 TNF 受體-Fc 融合體。在另一實施態樣中，該包含編碼紅血球生成素或彼之促效劑之多核苷酸的多核苷酸不被投予至個體，該個體亦經包含編碼

依那西普之多核苷酸的多核苷酸之投予。

在一實施態樣中，本發明之載體及方法可被用於治療多發性硬化症。在一實施態樣中，該載體包含編碼干擾素之多核苷酸序列或彼之片段。在另一實施態樣中，該載體包含編碼干擾素 β 之多核苷酸序列或彼之片段。在另一實施態樣中，該載體包含編碼髓磷脂鹼性蛋白（MBP）之多核苷酸序列或彼之片段。在一實施態樣中，該載體包含編碼干擾素（例如干擾素 β ）之多核苷酸序列或彼之片段及編碼髓磷脂鹼性蛋白之多核苷酸序列或彼之片段。

在另一實施態樣中，本發明之載體及方法可被用於治療血管性水腫。在另一實施態樣中，該血管性水腫係遺傳性血管性水腫。在一實施態樣中，該載體包含編碼選自C1酯酶抑制劑（例如人C1酯酶抑制劑）、激肽釋放素（kallikrein）抑制劑或緩激肽（bradykinin）B2受體拮抗劑之分子的多核苷酸序列。

在另一實施態樣中，本發明之載體及方法係用於治療疾病、狀況或病狀，其中C1酯酶之抑制提供治療好處效應。在此實施態樣中，該載體包含編碼C1酯酶抑制劑之多核苷酸序列，以治療例如選自敗毒症、血凝過快、肺功能障礙、低血氧症、出血性胰炎、心肌梗塞、肺移植、外傷、燒燙傷或血管滲漏之疾病、狀況或病狀。

在另一實施態樣中，本發明之載體及方法係用於治療疾病、疾患或狀況，其中激肽釋放素之抑制提供治療好處效應。該等疾病、狀況或病狀之實例包括但不限於接觸系

統之疾病、狀況或病狀。見例如 Shariat-Madar et al., *Innate Immunity*, vol. 10, no. 1, 3-13 (2004) 及 Frick, et al., *EMBO J.*, (2006) 25, 5569-5578 (2006)。在此實施態樣中，該載體包含編碼激肽釋放素抑制劑之多核苷酸序列，以治療例如選自動脈粥狀栓塞症、冠狀動脈疾病、阿茲海默 (Alzheimer) 氏症、發炎性腸疾病 (例如克隆 (Crohn) 氏病)、血管滲漏、急性呼吸窘迫症候群或緩激肽媒介性發炎之疾病、狀況或病狀。在一實施態樣中，該載體包含編碼激肽釋放素抑制劑之多核苷酸序列。激肽釋放素抑制劑之實例包括但不限於艾卡拉肽 (ecallantide) 及該些如美國專利公開號 2010/0034805、2009/0264350、2009/0234009、2008/0221031、2007/0213275、2006/0264603 及 2005/0089515 中所示之激肽釋放素抑制劑，這些專利各以參照方式整體納入此處。

在另一實施態樣中，本發明之載體及方法可被用於治療肺高血壓。在一實施態樣中，該肺高血壓係肺動脈性高血壓。在另一實施態樣中，該肺動脈性高血壓係自發性肺動脈性高血壓。在另一實施態樣中，該肺動脈性高血壓係家族性肺動脈性高血壓。在另一實施態樣中，該肺動脈性高血壓係與其他疾病或狀況有關之肺動脈性高血壓。在另一實施態樣中，該肺動脈性高血壓係繼發於其他狀況之肺動脈性高血壓。在另一實施態樣中，該肺動脈性高血壓係繼發性肺動脈性高血壓。在另一實施態樣中，該肺動脈性高血壓造成顯著靜脈或微血管牽連，例如肺靜脈閉鎖症及

肺微血管血管瘤病。在另一實施態樣中，該肺動脈性高血壓係新生兒之持續性肺高血壓。在一實施態樣中，該載體係經肌肉內投予。

在一實施態樣中，用語「前列腺素合酶」係選自前列腺素合酶、前列腺素合成酶、前列腺素合成酶 1、前列腺素合成酶 2、前列腺素內過氧化物合成酶、前列腺素 E 合成酶、前列腺素 H₂ 合成酶、前列腺素 G/H 合成酶 1、前列腺素 G/H 合成酶 2、PG 合成酶、環氧合酶（COX）、COX-1、COX-2 或 COX-3 之多肽。

人前列腺素 G/H 合酶 1 核苷酸序列之編號係 NC_000009，人前列腺素 G/H 合酶 1 胺基酸序列之編號係 NP_000953。見例如 Lander et al., Nature 429: 369-374 (2004)。

人前列腺素 G/H 合酶 2 核苷酸序列之編號係 NC_000001，人前列腺素 G/H 合酶 2 胺基酸序列之編號係 NP_000954.1。見例如 Lander et al., Nature 431: 931-945 (2004)。

人干擾素 β 之編號係 NP_002167.1。

人 GLP-1 之編號係 RP_12738。

人 GLP-2 之編號係 RP_10769。

人脂聯素之編號係 ABZ10942.1。

人瘦體素之編號係 AAH69323.1。

人 CFTR 之編號係 ABD72213.1。

人 IL-10 之編號係 NP_000563。

在另一實施態樣中，本發明之載體及方法係用於治療疾病、狀況或病狀，其中緩激肽 B2 受體之抑制提供治療好處效應。在此實施態樣中，該載體包含編碼緩激肽 B2 受體抑制劑之多核苷酸序列，以治療例如選自腎小球硬化、阿茲海默（Alzheimer）氏症、腦水腫、血管滲漏、急性呼吸窘迫症候群、疼痛、發炎、創傷、燒傷、休克、過敏或心血管疾病之疾病、狀況或病狀。緩激肽 B2 受體抑制劑之實例包括但不限於哈羅基那他汀（helokinstatin）及抗緩激肽 B2 受體抗體。哈羅基那他汀之胺基酸序列係 Gly-Pro-Pro-Tyr-Gln-Pro-Leu-Val-Pro-Arg（Kwok, H.F. et al., *Peptides* 29: 65-72（2008），其係以參照方式整體納入此處）。抗緩激肽 B2 受體抗體之非限制性實例係如 Alla, S.A. et al., *J. Biol. Chem.* 271: 1748-1755（1996）所示。

在一實施態樣中，投予至罹患一或多種該揭示疾病之哺乳動物之載體係腺病毒載體。在一實施態樣中，該載體包含編碼基因開關之多核苷酸。在一態樣中，該基因開關係 EcR-基底基因開關。在另一實施態樣中，編碼基因開關之多核苷酸包含在第一啟動子控制下之第一轉錄因子序列及在第二啟動子控制下之第二轉錄因子序列，其中由該第一轉錄因子序列及該第二轉錄因子序列編碼之蛋白質交互作用以形成功能為配體依賴性轉錄因子之蛋白質複合物。在一態樣中，該配體係二醯基肼。在另一態樣中，該配體係選自 RG-115819、RG-115932 或 RG-115830。在又一

態樣中，該配體係醯胺基酮或噁二唑啉。

在一實施態樣中，本發明提供包含基因開關之核酸腺病毒載體，其中由 EMCV 內部核糖體進入位點（IRES）序列分開之 VP16-RXR 及 Gal4-EcR 編碼序列被插入由人泛素 C 啟動子控制之腺病毒穿梭載體。舉例來說，被 IRES 序列分開且置於合成性誘導性啟動子控制下之 IL12 的次單位 p40 及 p35 之編碼序列被插入泛素 C 啟動子之上游。在另一實例中，置於合成性誘導性啟動子控制下之 TNF- α 之編碼序列被插入泛素 C 啟動子之上游。

純化載體以提高濃度可藉由任何適當之方法完成，諸如藉由密度梯度純化（例如氯化銫（CsCl））或藉由層析技術（例如管柱或分批層析）。舉例來說，本發明之載體可進行二或三個 CsCl 密度梯度純化步驟。載體例如複製缺陷型腺病毒載體係刻意地自受到該複製缺陷型腺病毒載體感染之細胞純化，所採用之方法包含溶解經腺病毒感染之細胞，將溶解物加至層析樹脂，自該層析樹脂洗脫腺病毒，及收集包含腺病毒之組分。

在特定實施態樣中，該形成之原始病毒保存液係藉由再感染 HEK 293 細胞或 CHO 細胞加以擴增，及藉由 CsCl 密度梯度離心加以純化。

蛋白質基底標籤減少或消除高度特異性轉譯後修飾以供有效標靶之需要。可用之蛋白質基底標籤包括但不限於 IGF2R 標靶（IGF2（GILT）/IGF2 工程化）、運鐵蛋白受體標靶（運鐵蛋白、TfR-標靶肽）、及 Tat 蛋白（其中細

胞表面硫酸乙醯肝素蛋白多糖（HSPG）媒介 Tat 之內化）

其他以溶酶體為標靶而可被用來作為標籤之蛋白質包括但不限於維生素 D 結合蛋白、葉酸鹽結合蛋白、乳運鐵蛋白、性激素結合球蛋白、運甲狀腺素蛋白、鞘脂激活蛋白原、視網醇結合蛋白、載脂蛋白 B、載脂蛋白 E、泌乳素、受體相關蛋白（在一實施態樣中不含 HNEL 序列）、天然運鐵蛋白及突變轉移（例如 K225E/R651A 突變或 K225E/K553A 突變）。

在一態樣中，本發明提供一種適合用於投予至人或非人之醫藥組成物，該醫藥組成物包含經試管內工程化以表現蛋白質之細胞群或載體例如腺病毒載體，其中該調製劑係適合腫瘤內投予。在另一實施態樣中，組成物例如醫藥組成物包含條件性表現蛋白質之載體。在一些實施態樣中，該組成物包含大約 1×10^5 或更多粒子單位（pu）之基因轉移載體。「粒子單位」係單一載體顆粒。在某些實施態樣中，該組成物包含約 1×10^6 粒子單位之基因轉移載體（例如約 1×10^7 或更多粒子單位、約 1×10^8 或更多粒子單位，或約 1×10^9 或更多粒子單位）。在其他實施態樣中，該組成物包含約 1×10^{10} 或更多 pu、 1×10^{11} 或更多 pu、 1×10^{12} 或更多 pu、 1×10^{13} 或更多 pu、 1×10^{14} 或更多 pu、或 1×10^{15} 或更多 pu 之基因轉移載體，特別是病毒載體，諸如複製缺陷型腺病毒載體。組成物中所包含之基因轉移載體之粒子單位數可利用任何已知之適當方法測定，諸如此

處進一步描述之比較組成物之吸光度與基因轉移載體之標準溶液（即已知基因轉移載體濃度之溶液）的吸光度。

在一實施態樣中，該活化配體係選自 RG-115819、RG-115830 或 RG-115932。

本發明另提供包含活化配體諸如 RG-115819、RG-115830 或 RG-115932 之醫藥組成物，其中該組成物係適合腹膜內、經口或皮下投予。

在一實施態樣中，該活化配體係經口投予。在另一實施態樣中，該活化配體係非經腸投予。在另一實施態樣中，該活化配體係經腹膜內、皮下或肌肉內投予。

本發明之組成物可另包含醫藥上可接受之載劑。該載劑可為對於經工程化之樹突細胞、基因轉移載體或活化配體而言為適當之任何載劑。組成物之適當載劑係描述於美國專利第 6,225,289 號。該載劑通常為液體，但亦可為固體，或液體與固體成份之組合。該載劑係刻意地為醫藥上可接受（例如生理或藥學上可接受）之載劑（例如賦形劑或稀釋劑）。醫藥上可接受之載劑係廣為周知且易於使用。載劑之選擇將（至少部份）由該組成物中之特定成份及用於投予該組成物之特定方法決定。該組成物可另包含任何其他適當之成份，特別是為了增強該組成物之穩定性及/或彼之終用途。因此，本發明之組成物有各式各樣之適當調製劑。

適合用於經口投予之調製劑包括（a）液體溶液，諸如有效量之活性成分溶解於稀釋劑中，諸如水、鹽水或柳

橙汁，（b）膠囊、小袋或錠劑，各包含呈固體或顆粒形式之預先決定量之活性成分，（c）在適當液體中之懸浮液，及（d）適當之乳液。錠劑形式可包括一或多種乳糖、甘露醇、玉米澱粉、馬鈴薯澱粉、微晶纖維素、阿拉伯膠、明膠、膠體二氧化矽、交聯羧甲基纖維素鈉、滑石、硬脂酸鎂、硬脂酸及其他賦形劑、色素、稀釋劑、緩衝劑、潤濕劑、保存劑、添味劑及藥學上相容之賦形劑。含錠形式可包含有味道之活性成分，通常為蔗糖及阿拉伯膠或黃蓍，以及包含該活性成分於惰性基質（諸如明膠及甘油或蔗糖及阿拉伯膠）之錠劑，及除活性成分之外包含該領域已知之賦形劑的乳液、膠及該類似物。

適合經吸入投予之調製劑包括氣霧調製劑。該氣霧調製劑可被置於加壓可接受之推進劑中，諸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮及該類似物。它們亦可被調製成未經加壓之製劑，以自噴霧器或霧化器投藥。

適合非經腸投予之調製劑包括水性及非水性之等張無菌注射溶液，該溶液可包含抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑及使該調製劑與目標接受者之血液等張之溶質，及可包括懸浮劑、助溶劑、增稠劑、穩定劑及保存劑之水性及非水性無菌懸浮液。該調製劑可存在於單位劑量或多劑量密封容器中，諸如安瓿及小瓶，且可被儲存於僅需在立即使用前加入無菌液體賦形劑例如水以供注射之冷凍乾燥（凍乾）狀態。臨時性之注射溶液及懸浮液可自無菌粉末、顆粒及先前描述之錠劑種類製備。

適合肛門投予之調製劑可藉由混合該活性成分與各種基質諸如乳化基質或水溶性基質以製備為栓劑。適合陰道投予之調製劑可呈現陰道栓（pessaries）、棉條、乳膏、凝膠、糊料、泡沫或噴霧製劑，該製劑除活性成分以外還包含該領域已知為適當之載劑。

此外，該組成物可包含額外之治療性或生物活性劑。舉例來說，可包含用於治療特定適應症之治療因子。控制發炎之因子諸如異丁苯乙酸（ibuprofen）或類固醇可為該組成物之一部分，以減少與活體內投予該基因轉移載體及生理緊迫相關之腫脹及發炎。免疫系統抑制劑可與該組成物方法一起投予以減少對該基因轉移載體本身或與疾病相關之任何免疫反應。或者，免疫增強劑可被包含於該組成物中以上調身體對抗疾病之自然防禦。另外，細胞介素可與該組成物一起投予以吸引免疫效應細胞至腫瘤部位。

在此處描述之特定實施態樣中，本發明提供一種治療腫瘤之方法，該方法包含下列按順序之步驟：

- a. 經腫瘤內投予經試管內工程化之免疫細胞或 TSC 群至哺乳動物，及
- b. 對該哺乳動物投予治療有效量之活化配體。

在一實施態樣中，該活化配體係在與包含經試管內工程化之細胞或載體例如腺病毒載體之組成物實質上相同的時間投予，例如在投予該細胞或載體組成物之前或之後的 1 小時內。在另一實施態樣中，該活化配體係在投予該試管內細胞或載體之後大約 24 小時或不到 24 小時之內投予

。在又一實施態樣中，該活化配體係在投予該經試管內工程化之細胞或載體之後大約 48 小時或不到 48 小時之內投予。在另一實施態樣中，該配體係 RG-115932。在另一實施態樣中，該配體係以大約 1 至 50 毫克/公斤/天之劑量投予。在另一實施態樣中，該配體係以大約 30 毫克/公斤/天之劑量投予。在另一實施態樣中，該配體係每天投予共 7 至 28 天。在另一實施態樣中，該配體係每天投予共 14 天。在另一實施態樣中，大約 1×10^6 至 1×10^8 細胞係經投予。在另一實施態樣中，大約 1×10^7 細胞係經投予。

用語「個體」係指哺乳動物。哺乳動物包括人、齧齒動物、猴及其他動物，其中以人或小鼠為較佳。其他哺乳動物包括獸醫動物，諸如犬、貓、馬、牛、綿羊、山羊、豬及該類似動物。

此處之用語「蛋白質表現」包括但不限於轉錄、轉錄後、轉譯及/或轉譯後。

本發明亦包括一種增加蛋白質之 mRNA 或蛋白質表現之方法，該方法包含產製條件性表現該蛋白質之載體，及添加活化配體，藉此誘發該蛋白質之表現，其中該載體另包含一或多個與編碼該蛋白質之多核苷酸序列連接之調節序列，其中該一或多個調節序列及/或信號肽增進該蛋白質之表現。本發明之各種調節區包括但不限於 5'非轉譯區 (5'UTR)、3' UTR 或二者皆已被描述。在一實施態樣中，該 5' UTR 係 5U2。5U2 係融合犬 SERCA2 內含子 2，其具有突變假定一致之 poly-A 位點，位於 5'端側之外顯子 2

剪接供點及位於 3'端側之外顯子 3 剪接受點，接著一部分之牛酪蛋白 5'UTR 之部分。在另一實施態樣中，該 3'調節區係 SV40 或 hGH 之聚腺苷酸化信號。

本發明另支持以條件性表現受到關注之基因的經活體外工程化之細胞作為創新方式以有用且高效地治療人疾病之治療性應用。

在此實施態樣中，該載體係以未包裝於細胞中之形式被投予至個體。

在一實施態樣中，細胞非與該載體經腫瘤內投予。

在另一實施態樣中，本發明之不包含於細胞內之載體係於細胞投予之同時、之前或之後投予。

在一實施態樣中，每次投予載體週期之劑量係至少約 1.0×10^9 病毒粒子。在另一實施態樣中，每次投予載體週期之劑量係至少約 1.0×10^{10} 病毒粒子。在另一實施態樣中，每次投予載體週期之劑量係約 1.0×10^9 至約 1.0×10^{13} 病毒粒子。在另一實施態樣中，每次投予載體週期之劑量係約 1.0×10^{10} 至約 1.0×10^{13} 病毒粒子。在另一實施態樣中，每次投予載體週期之劑量係約 1.0×10^{10} 、約 1.0×10^{11} 、約 1.0×10^{12} 或約 1.0×10^{13} 病毒粒子。

活化配體之劑量係約 5 至 100 毫克/天，例如約 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100 毫克/天。在一實施態樣中，該活化配體係以每天至少一次投予。在另一實施態樣中，該活化配體係以每天一次投予約 14 天。

在一實施態樣中，至少二種載體劑量（例如約 1×10^{11} 及 1×10^{12} ）係與至少三種不同的活化配體劑量（例如約 5 毫克/天至約 100 毫克/天）組合使用。

該領域之一般技藝人士將能最佳化劑量以在各種活化配體活化之程度下，提供有效之載體血漿量之範圍。

在一實施態樣中，投予至個體之活化配體之劑量係隨著腫瘤內載體投予週期內之活化配體的投予時間而改變。在另一實施態樣中，投予至個體之活化配體之劑量係隨著腫瘤內載體投予週期內之活化配體的投予時間而減少。在另一實施態樣中，投予至個體之活化配體之劑量係隨著腫瘤內載體投予週期內之活化配體的投予時間而增加（逐步增加）。

在一實施態樣中，個體係經 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 次載體投予周期之治療。在另一實施態樣中，個體係經 3 至 7 次載體投予周期之治療。在另一實施態樣中，個體係經 4 至 6 次載體投予周期之治療。在另一實施態樣中，個體係經 5 或 6 次載體投予周期之治療。在另一實施態樣中，個體係經 6 次載體投予周期之治療。

在一實施態樣中，每次載體投予周期之間係相隔 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 周。在另一實施態樣中，每次載體投予週期之間係相隔 4 周。

在一實施態樣中，每個隨後之載體投予周期的載體劑量係經改變。在另一實施態樣中，每個隨後之載體投予周期的載體劑量係經減少。在另一實施態樣中，每個隨後之

載體投予周期的載體劑量係經增加。

在一實施態樣中，本發明亦提供包含醫藥上可接受之載劑及本發明之不包含於細胞內之載體之醫藥組成物。適當載劑包括但不限於鹽水、蒸餾水、氯化鈉溶液、氯化鈉及無機鹽之混合物或彼等之類似混合物、物質溶液諸如甘露醇、乳糖、葡聚糖及葡萄糖之溶液、胺基酸溶液諸如甘胺酸及精胺酸之溶液、有機酸溶液或鹽溶液與葡萄糖溶液之混合物、水性及非水性之等張無菌注射溶液，其可包含抗氧化劑、螯合劑、緩衝劑、抑菌劑及使該調製劑呈等張性之溶質，及可包括懸浮劑、助溶劑、增稠劑、穩定劑及保存劑之水性及非水性之無菌懸浮液。該調製劑可存在於單位劑量或多劑量密封容器中，諸如安瓿及小瓶，且可被儲存於僅需在立即使用前加入無菌液體載劑例如水以供注射之冷凍乾燥（凍乾）狀態。

在一實施態樣中，本發明之多核苷酸係包含於宿主細胞內。在一實施態樣中，該宿主細胞係選自哺乳動物細胞、原核細胞、細菌細胞、真菌細胞、線蟲細胞、昆蟲細胞、魚細胞、植物細胞、禽細胞、真核細胞、動物細胞、哺乳動物細胞、無脊椎動物宿主細胞、脊椎動物宿主細胞、酵母菌細胞、斑馬魚細胞、雞細胞、天竺鼠細胞、小鼠細胞、大鼠細胞、兔細胞、貓細胞、犬細胞、牛細胞、山羊細胞、乳牛細胞、豬細胞、馬細胞、綿羊細胞、類人猿細胞、猴細胞、黑猩猩細胞或人細胞。

在一實施態樣中，該宿主細胞不是心肌細胞或肌細胞

。

宿主細胞轉形係該領域所廣為周知，可利用多種方式達成，包括但不限於電穿孔、病毒感染、質體/載體轉染、非病毒載體媒介性轉染、土壤桿菌（*Agrobacterium*）媒介性轉形、微粒撞擊及該類似方法。所欲基因產物之表現涉及在適當條件下培養該經轉形之宿主細胞及誘導該經轉形之基因的表現。原核及真核細胞之培養條件及基因表現程序係該領域所廣為周知。收集細胞，根據基因產物特定程序分離該基因產物。

若此處所引用之任何參考文獻與本說明書之任何揭示或建議之間有所衝突，就本發明之目的而言應以後者為主。

此處引用之所有專利、專利申請案及公開資料係以參照方式整體完整納入此處。

應了解前面描述之實施態樣及範例並非意圖在任何方面限制本發明之範圍，而且此處所提之權利要求範圍係意圖包含不論是否在此處明白提出之所有實施態樣及範例。

2008年10月8日提出之美國專利申請案 12/247,738（標題為「經工程化之樹突細胞及治療癌之用途」）現以參照方式整體納入此處。2008年9月29日提出之美國專利申請案 12/241,018（標題為「供生物治療性分子表現之治療性基因開關建構體及生物反應體及彼等之用途」）亦以參照方式整體納入此處。

本發明之實施態樣亦包括下列（其中“E”代表「實施

態樣」)：

E1. 一種誘導、調節或增強哺乳動物之紅血球生成素 (EPO) 表現之方法，其中該方法包含

(a) 投予腺病毒相關病毒至該哺乳動物，其中該病毒包含編碼 EPO 之多核苷酸；及

(b) 投予活化配體，該活化配體誘導該編碼 EPO 之病毒多核苷酸表現 EPO，

其中該腺病毒相關病毒係經肌肉內投予，

其中該腺病毒相關病毒另包含基因開關，其中該基因開關包含與啟動子可操作性連接之至少一個轉錄因子序列，其中由該至少一個轉錄因子序列編碼之至少一個轉錄因子係配體依賴性轉錄因子，

其中該腺病毒相關病毒另包含與該編碼 EPO 之多核苷酸可操作性連接之第二啟動子，其中該第二啟動子係於投予活化配體之後由該至少一個配體依賴性轉錄因子活化。

E2. 如實施態樣 E1 之方法，其中該哺乳動物係人。

E3. 如實施態樣 E1 或 E2 之方法，其中 EPO 之表現係藉由控制該經投予之活化配體之劑量加以誘導、調節或增強。

E4. 如實施態樣 E1 至 E3 之任一者之方法，其中活化配體係以足以誘導或維持正常生理範圍內之 EPO 表現量的劑量投予。

E5. 如實施態樣 E1 至 E4 之任一者之方法，其中編碼

EPO 之多核苷酸包含與 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 (人 EPO) 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 一致性之胺基酸序列。

E6. 如實施態樣 E1 至 E5 之任一者之方法，其中該哺乳動物之血容比或血中紅血球的體積百分比增加。

E7. 一種包含編碼基因開關之多核苷酸之載體，其中該多核苷酸包含 (1) 至少一個與啓動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及 (2) 編碼一或多種蛋白質之多核苷酸，該編碼一或多種蛋白質之多核苷酸係與啓動子可操作性連接，該啓動子係由該配體依賴性轉錄因子活化，其中該一或多種蛋白質係選自 C1 酯酶抑制劑、激肽釋放素 (kallikrein) 抑制劑、緩激肽 (bradykinin) B2 受體抑制劑、前列腺素合成酶、升糖素樣肽 1 (GLP-1)、升糖素樣肽 2 (GLP-2)、脂聯素 (adiponectin)、瘦體素 (leptin) 或囊腫性纖維化跨膜傳導調節蛋白 (CFTR)。

E8. 如實施態樣 E7 之之載體，其中該一或多種蛋白質係人蛋白質。

E9. 如實施態樣 E7 或 E8 之載體，其中該載體係病毒載體。

E10. 如實施態樣 E9 之載體，其中該病毒載體係選自腺病毒、腺病毒相關病毒、反轉錄病毒、痘病毒、桿狀病毒 (baculovirus)、牛痘病毒、單純胞疹病毒、EB (Epstein-Barr) 病毒、雙生病毒、偽狂犬病病毒、小病毒

或花椰菜花葉病毒載體。

E11. 如實施態樣 E7 至 E10 之任一者之載體，其中該基因開關係以蛻皮激素受體（EcR）為基底之基因開關。

E12. 如實施態樣 E7 至 E11 之任一者之載體，其中該編碼基因開關之多核苷酸包含在第一啟動子控制下之第一轉錄因子序列及在第二啟動子控制下之第二轉錄因子序列，其中由該第一轉錄因子序列編碼之第一轉錄因子與由該第二轉錄因子序列編碼之第二轉錄因子交互作用以形成功能為配體依賴性轉錄因子之複合物。

E13. 如實施態樣 E7 至 E11 之任一者之載體，其中該編碼基因開關之多核苷酸包含在啟動子控制下之第一轉錄因子序列及第二轉錄因子序列，其中由該第一轉錄因子序列編碼之第一轉錄因子與由該第二轉錄因子序列編碼之第二轉錄因子交互作用以形成功能為配體依賴性轉錄因子之複合物。

E14. 如實施態樣 E7 至 E13 之任一者之載體，其中該第一轉錄因子序列與該第二轉錄因子序列係由 EMCV 內部核糖體進入位點（IRES）連接。

E15. 如實施態樣 E7 至 E14 之任一者之載體，其中該一或多種蛋白質之一者包含與 SEQ ID NO: 9（人髓磷脂鹼性蛋白）所編碼之胺基酸具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性之胺基酸序列。

E16. 如實施態樣 E7 至 E15 之任一者之載體，其中該一或多種蛋白質之一者包含與 SEQ ID NO: 10（人 C1 酯

酶抑制劑) 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性之胺基酸序列。

E17. 如實施態樣 E7 至 E16 之任一者之載體，其中該一或多種蛋白質之一者包含與 SEQ ID NO: 11 (艾卡拉肽 (ecallantide)) 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性之胺基酸序列。

E18. 如實施態樣 E7 至 E17 之任一者之載體，其中該一或多種蛋白質之一者包含與 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 (前列腺素合成酶) 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性之胺基酸序列。

E19. 如實施態樣 E7 至 E17 之任一者之載體，其中該一或多種蛋白質之一者包含與 SEQ ID NO: 17 (GLP-1) 或 SEQ ID NO: 18 (GLP-2) 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性之胺基酸序列。

E20. 如實施態樣 E7 至 E17 之任一者之載體，其中該一或多種蛋白質之一者包含與 SEQ ID NO: 19 (脂聯素 (adiponectin)) 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性之胺基酸序列。

E21. 如實施態樣 E7 至 E17 之任一者之載體，其中該一或多種蛋白質之一者包含與 SEQ ID NO: 20 (瘦體素 (leptin)) 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性之胺基酸序列。

E22. 如實施態樣 E7 至 E17 之任一者之載體，其中該一或多種蛋白質之一者包含與 SEQ ID NO: 21 (CFTR) 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 一致性之胺基酸序列。

E23. 一種產製表現一或多種蛋白質之細胞群之方法，其中該方法包含使用條件性表現一或多種蛋白質之重組載體改質該等細胞，其中該載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中該多核苷酸包含 (1) 至少一個與啟動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及 (2) 與啟動子連接之編碼一或多種蛋白質之多核苷酸，該啟動子係由該配體依賴性轉錄因子活化，其中該一或多種蛋白質係選自 C1 酯酶抑制劑、激肽釋放素 (kallikrein) 抑制劑、緩激肽 (bradykinin) B2 受體抑制劑、前列腺素合成酶、升糖素樣肽 1 (GLP-1)、升糖素樣肽 2 (GLP-2)、脂聯素 (adiponectin)、瘦體素 (leptin) 或囊腫性纖維化跨膜傳導調節蛋白 (CFTR)。

E24. 如實施態樣 E23 之方法，其中該一或多種蛋白質係人蛋白質。

E25. 如實施態樣 E23 或 E24 之方法，其中該載體係病毒載體。

E26. 如實施態樣 E25 之方法，其中該病毒載體係選自腺病毒、腺病毒相關病毒、反轉錄病毒、痘病毒、桿狀病毒 (baculovirus)、牛痘病毒、單純皰疹病毒、EB (

Epstein-Barr) 病毒、雙生病毒、偽狂犬病病毒、小病毒或花椰菜花葉病毒載體。

E27. 如實施態樣 E23 至 E26 之任一者之方法，其中該基因開關係以蛻皮激素受體 (EcR) 為基底之基因開關。

E28. 如實施態樣 E23 至 E27 之任一者之方法，其中該編碼基因開關之多核苷酸包含在第一啟動子控制下之第一轉錄因子序列及在第二啟動子控制下之第二轉錄因子序列，其中由該第一轉錄因子序列編碼之第一轉錄因子與由該第二轉錄因子序列編碼之第二轉錄因子交互作用以形成功能為配體依賴性轉錄因子之複合物。

E29. 如實施態樣 E23 至 E27 之任一者之方法，其中該編碼基因開關之多核苷酸包含在啟動子控制下之第一轉錄因子序列及第二轉錄因子序列，其中由該第一轉錄因子序列編碼之第一轉錄因子與由該第二轉錄因子序列編碼之第二轉錄因子交互作用以形成功能為配體依賴性轉錄因子之複合物。

E30. 如實施態樣 E29 之方法，其中該第一轉錄因子序列與該第二轉錄因子序列係由 EMCV 內部核糖體進入位點 (IRES) 連接。

E31. 一種經條件性表現一或多種蛋白質之重組載體改質之細胞群，其中該載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中該多核苷酸包含 (1) 至少一個與啟動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及 (2) 編碼一或多種選自 C1 酯酶抑

制劑、激肽釋放素 (kallikrein) 抑制劑、緩激肽 (bradykinin) B2 受體抑制劑、前列腺素合成酶、升糖素樣肽 1 (GLP-1)、升糖素樣肽 2 (GLP-2)、脂聯素 (adiponectin)、瘦體素 (leptin) 或囊腫性纖維化跨膜傳導調節蛋白 (CFTR) 之蛋白質之多核苷酸。

E32. 如實施態樣 E31 之細胞群，其中該一或多種蛋白質係人蛋白質。

E33. 如實施態樣 E31 或 E32 之細胞群，其中該載體係病毒載體。

E34. 如實施態樣 E33 之細胞群，其中該病毒載體係選自腺病毒、腺病毒相關病毒、反轉錄病毒、痘病毒、桿狀病毒 (baculovirus)、牛痘病毒、單純皰疹病毒、EB (Epstein-Barr) 病毒、雙生病毒、偽狂犬病病毒、小病毒或花椰菜花葉病毒載體。

E35. 如實施態樣 E31 至 E34 之任一者之細胞群，其中該基因開關係以蛻皮激素受體 (EcR) 為基底之基因開關。

E36. 如實施態樣 E31 至 E35 之任一者之細胞群，其中該編碼基因開關之多核苷酸包含在第一啟動子控制下之第一轉錄因子序列及在第二啟動子控制下之第二轉錄因子序列，其中由該第一轉錄因子序列編碼之第一轉錄因子與由該第二轉錄因子序列編碼之第二轉錄因子交互作用以形成功能為配體依賴性轉錄因子之複合物。

E37. 如實施態樣 E31 至 E35 之任一者之細胞群，其中

該編碼基因開關之多核苷酸包含在啓動子控制下之第一轉錄因子序列及第二轉錄因子序列，其中由該第一轉錄因子序列編碼之第一轉錄因子與由該第二轉錄因子序列編碼之第二轉錄因子交互作用以形成功能爲配體依賴性轉錄因子之複合物。

E38. 如實施態樣 E37 之細胞群，其中該第一轉錄因子序列與該第二轉錄因子序列係由 EMCV 內部核糖體進入位點（IRES）連接。

E39. 一種治療哺乳動物之疾病之方法，該方法包含：

- （a）投予條件性表現一或多種蛋白質之細胞群及
- （b）對該哺乳動物投予治療有效量之一或多種活化配體；

藉此誘導該一或多種蛋白質之表現，其中該一或多種蛋白質係選自 C1 酯酶抑制劑、激肽釋放素（kallikrein）抑制劑、緩激肽（bradykinin）B2 受體抑制劑、前列腺素合成酶、升糖素樣肽 1（GLP-1）、升糖素樣肽 2（GLP-2）、脂聯素（adiponectin）、瘦體素（leptin）或囊腫性纖維化跨膜傳導調節蛋白（CFTR）。

E40. 一種治療哺乳動物之疾病之方法，該方法包含：

- （a）對該哺乳動物投予條件性表現一或多種蛋白質之載體，該載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中該多核苷酸包含

- （1）至少一個與啓動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因

子，及

(2) 與啓動子可操作性連接之編碼一或多種蛋白質之多核苷酸，該啓動子係經由該配體依賴性轉錄因子活化，

(b) 對該哺乳動物投予治療有效量之一或多種活化配體，藉此誘導該一或多種蛋白質之表現及治療該疾病，

其中該一或多種蛋白質係選自 C1 酯酶抑制劑、激肽釋放素 (kallikrein) 抑制劑、緩激肽 (bradykinin) B2 受體抑制劑、前列腺素合成酶、升糖素樣肽 1 (GLP-1)、升糖素樣肽 2 (GLP-2)、脂聯素 (adiponectin)、瘦體素 (leptin) 或囊腫性纖維化跨膜傳導調節蛋白 (CFTR)。

E41. 如實施態樣 E39 或 E40 之方法，其中至少一種該蛋白質係 C1 酯酶抑制劑且該疾病係選自血管性水腫、遺傳性血管性水腫、敗毒症、血凝過快、肺功能障礙、低血氧症、出血性胰炎、心肌梗塞、肺移植、創傷、燒傷或血管滲漏。

E42. 如實施態樣 E39 或 E40 之方法，其中至少一種該蛋白質係激肽釋放素抑制劑且該疾病係選自血管性水腫、遺傳性血管性水腫、動脈粥狀栓塞症、冠狀動脈疾病、阿茲海默 (Alzheimer) 氏症、發炎性腸疾病、克隆 (Crohn) 氏病、血管滲漏、急性呼吸窘迫症候群、緩激肽媒介性發炎、或該接觸系統之疾病、狀況或病狀。

E43. 如實施態樣 E39 或 E40 之方法，其中至少一種該

蛋白質係緩激肽 B2 受體抑制劑且該疾病係選自血管性水腫、遺傳性血管性水腫、緩激肽媒介性發炎、腎小球硬化、阿茲海默 (Alzheimer) 氏症、腦水腫、血管滲漏、急性呼吸窘迫症候群、疼痛、發炎、創傷、燒傷、休克、過敏或心血管疾病。

E44. 如實施態樣 E39 或 E40 之方法，其中至少一種該蛋白質係前列腺素合成酶且該疾病係選自肺高血壓、肺動脈高血壓 (PAH)、自發性肺動脈高血壓、家族性肺動脈高血壓、繼發性肺動脈高血壓、肺靜脈閉鎖症、肺毛細血管瘤、或新生兒持續性肺高血壓。

E45. 如實施態樣 E39 或 E40 之方法，其中至少一種該蛋白質係升糖素樣肽 1 (GLP-1) 且該疾病係糖尿病或其他代謝性疾病或病狀。

E46. 如實施態樣 E39 或 E40 之方法，其中至少一種該蛋白質係升糖素樣肽 2 (GLP-2) 且該疾病係糖尿病或其他代謝性疾病或病狀。

E47. 如實施態樣 E39 或 E40 之方法，其中至少一種該蛋白質係脂聯素 (adiponectin) 且該疾病係糖尿病或其他代謝性疾病或病狀。

E48. 如實施態樣 E39 或 E40 之方法，其中至少一種該蛋白質係瘦體素 (leptin) 且該疾病係糖尿病或其他代謝性疾病或病狀。

E49. 如實施態樣 E39 或 E40 之方法，其中至少一種該蛋白質係囊腫性纖維化跨膜傳導調節蛋白 (CFTR) 且該

疾病係囊腫性纖維化。

E50. 一種治療哺乳動物之多發性硬化症之方法，該方法包含：

(a) 對該哺乳動物投予條件性表現一或多種蛋白質之載體，該載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中該多核苷酸包含

(1) 至少一個與啟動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及

(2) 與啟動子可操作性連接之編碼一或多種蛋白質之多核苷酸，該啟動子係經由該配體依賴性轉錄因子活化，

(b) 對該哺乳動物投予治療有效量之一或多種活化配體，藉此誘導該一或多種蛋白質之表現及治療該疾病，

其中該一或多種蛋白質係選自髓磷脂鹼性蛋白 (MBP) 或干擾素 β (IFN- β)。

E51. 如實施態樣 E50 之方法，其中該一或多種蛋白質之一者包含與 SEQ ID NO: 9 (人髓磷脂鹼性蛋白) 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 一致性之胺基酸序列。

E52. 如實施態樣 E50 之方法，其中該一或多種蛋白質之一者包含與 SEQ ID NO: 17 (干擾素 β) 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 一致性之胺基酸序列。

E53. 如實施態樣 E50 之方法，其中該一或多種蛋白質包含髓磷脂鹼性蛋白（MBP）及干擾素 β （IFN-B）二者。

E54. 如實施態樣 E50 至 E53 之任一者之方法，其中該一或多種蛋白質係人蛋白質。

E55. 如實施態樣 E50 至 E54 之任一者之方法，其中該載體係病毒載體。

E56. 如實施態樣 E55 之方法，其中該病毒載體係選自腺病毒、腺病毒相關病毒、反轉錄病毒、痘病毒、桿狀病毒（baculovirus）、牛痘病毒、單純皰疹病毒、EB（Epstein-Barr）病毒、雙生病毒、偽狂犬病病毒、小病毒或花椰菜花葉病毒載體。

E57. 如實施態樣 E50 至 E56 之任一者之方法，其中該基因開關係以蛻皮激素受體（EcR）為基底之基因開關。

E58. 如實施態樣 E50 至 E57 之任一者之方法，其中該編碼基因開關之多核苷酸包含在第一啟動子控制下之第一轉錄因子序列及在第二啟動子控制下之第二轉錄因子序列，其中由該第一轉錄因子序列編碼之第一轉錄因子與由該第二轉錄因子序列編碼之第二轉錄因子交互作用以形成功能為配體依賴性轉錄因子之複合物。

E59. 如實施態樣 E50 至 E57 之任一者之方法，其中該編碼基因開關之多核苷酸包含在啟動子控制下之第一轉錄因子序列及第二轉錄因子序列，其中由該第一轉錄因子序列編碼之第一轉錄因子與由該第二轉錄因子序列編碼之第

二轉錄因子交互作用以形成功能為配體依賴性轉錄因子之複合物。

E60. 如實施態樣 E59 之方法，其中該第一轉錄因子序列與該第二轉錄因子序列係由 EMCV 內部核糖體進入位點（IRES）連接。

E61. 一種治療哺乳動物之發炎性腸疾病或克隆氏病之方法，該方法包含：

（a）對該哺乳動物投予條件性表現一或多種蛋白質之載體，該載體包含編碼基因開關之多核苷酸，其中該多核苷酸包含

（1）至少一個與啟動子可操作性連接之轉錄因子序列，其中該至少一個轉錄因子序列編碼配體依賴性轉錄因子，及

（2）與啟動子可操作性連接之編碼一或多種蛋白質之多核苷酸，該啟動子係經由該配體依賴性轉錄因子活化，

（b）對該哺乳動物投予治療有效量之一或多種活化配體，藉此誘導該一或多種蛋白質之表現及治療該疾病，

其中該一或多種蛋白質之一者係介白素 10（IL-10）。

E62. 如實施態樣 E61 之方法，其中該一或多種蛋白質之一者包含與 SEQ ID NO: 22（介白素 10）具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 一致性之胺基酸序列。

E63. 如實施態樣 E61 或 E62 之方法，其中該介白素 10 係人 IL-10 蛋白質。

E64. 如實施態樣 E61 至 E63 之任一者之方法，其中該載體係病毒載體。

E65. 如實施態樣 E64 之方法，其中該病毒載體係選自腺病毒、腺病毒相關病毒、反轉錄病毒、痘病毒、桿狀病毒（baculovirus）、牛痘病毒、單純皰疹病毒、EB（Epstein-Barr）病毒、雙生病毒、偽狂犬病病毒、小病毒或花椰菜花葉病毒載體。

E66. 如實施態樣 E61 至 E65 之任一者之方法，其中該基因開關係以蛻皮激素受體（EcR）為基底之基因開關。

E67. 如實施態樣 E61 至 E66 之任一者之方法，其中該編碼基因開關之多核苷酸包含在第一啟動子控制下之第一轉錄因子序列及在第二啟動子控制下之第二轉錄因子序列，其中由該第一轉錄因子序列編碼之第一轉錄因子與由該第二轉錄因子序列編碼之第二轉錄因子交互作用以形成功能為配體依賴性轉錄因子之複合物。

E68. 如實施態樣 E61 至 E66 之任一者之方法，其中該編碼基因開關之多核苷酸包含在啟動子控制下之第一轉錄因子序列及第二轉錄因子序列，其中由該第一轉錄因子序列編碼之第一轉錄因子與由該第二轉錄因子序列編碼之第二轉錄因子交互作用以形成功能為配體依賴性轉錄因子之複合物。

E69. 如實施態樣 E68 之方法，其中該第一轉錄因子序

列與該第二轉錄因子序列係由 EMCV 內部核糖體進入位點 (IRES) 連接。

E70. 一種組成物，其包含如實施態樣 E7 至 E22 之任一者之載體或如實施態樣 E31 至 E38 之任一者之細胞群及醫藥上可接受之載劑。

E71. 如實施態樣 E70 之組成物，其係經系統性、靜脈內、腫瘤內、經口、腹腔內、肌肉內、脊柱內、腦內、脊椎鞘內、皮內或皮下投予。

E72. 一種藥物，其包含如實施態樣 E7 至 E22 之任一者之載體或如實施態樣 E31 至 E38 之任一者之細胞群及醫藥上可接受之載劑。

E73. 如實施態樣 E72 之藥物，其係經系統性、靜脈內、腫瘤內、經口、腹腔內、肌肉內、脊柱內、腦內、脊椎鞘內、皮內或皮下投予。

E74. 一種套組，其包含如實施態樣 E7 至 E22 之任一者之載體或如實施態樣 E31 至 E38 之任一者之細胞群。

E75. 如實施態樣 E7 至 E22 之任一者之載體或如實施態樣 E31 至 E38 之任一者之細胞群及活化該基因開關之配體。

E76. 如實施態樣 E75 之載體或細胞群及配體，其中該配體係二醯基胂。

E77. 如實施態樣 E76 之載體或細胞群及二醯基胂配體，其中該二醯基胂係 RG-115819、RG-115830 或 RG-115932。

E78. 如實施態樣 E75 之載體或細胞群及配體，其中該配體係醯胺基酮或噁二唑啉。

E79. 如實施態樣 E7 至 E22 之任一者之載體、如實施態樣 E23 至 E30 及實施態樣 E39 至 E69 之任一者之方法、如實施態樣 E31 至 E38 之任一者之細胞群，其中活化配體依賴性轉錄之配體係二醯基胼。

E80. 如實施態樣 E79 之載體、方法或細胞群，其中該二醯基胼係 RG-115819、RG-115830 或 RG-115932。

E81. 如實施態樣 E7 至 E22 之任一者之載體、如實施態樣 E23 至 E30 及 E39 至 E69 之任一者之方法、如實施態樣 E31 至 E38 之任一者之細胞群，其中活化配體依賴性轉錄之配體係醯胺基酮或噁二唑啉。

E82. 一種套組，其包含如實施態樣 E7 至 E22 之任一者之載體或如實施態樣 E31 至 E38 之任一者之細胞群及配體。

E83. 如實施態樣 E82 之套組，其中該配體係二醯基胼。

E84. 如實施態樣 E83 之套組，其中該二醯基胼係 RG-115819、RG-115830 或 RG-115932。

E85. 如實施態樣 E82 之套組及配體，其中該配體係醯胺基酮或噁二唑啉。

【實施方式】

實施例 1

局部注射 Ad-RTS-mIL12 對於 B16F0 黑色素瘤模型中之局部及對側腫瘤之效果

我們探討以 Ad-RTS-mIL12 治療局部腫瘤（導致局部腫瘤生長消退）是否亦能在遠處腫瘤導致抗腫瘤活性。為達成此目的，我們在具有免疫活性小鼠（C57BL/6）之雙側腹區域發展黑色素腫瘤，並在活化配體存在下以 Ad-RTS-mIL12 治療右側腹之腫瘤。

六至八周齡之母鼠 C57BL/6 係購自美國哈倫實驗室（Harlan Laboratories）。動物照顧及實驗程序係根據英創松（Intrexon）公司之機構動物照顧及使用委員會準則進行。

小鼠黑色素瘤（B16F0）細胞係購自美國菌種保存中心（ATCC）（維吉尼亞州馬納薩斯市（Manassas, VA））。B16F0 細胞係生長於達爾柏克（Dulbecco）氏經改良之伊格爾（Eagle）式培養基（ATCC, Manassas, VA）。該 DMEM 添加熱不活化之胎牛血清（FCS）10%體積/體積、2 毫莫耳 L-麩醯胺酸（亞特蘭大生物（Atlanta Biologicals）公司，喬治亞州羅倫斯維爾市）、100 IU/毫升青黴素 G 及 100 微克/毫升鏈黴素。細胞於 37°C、5% CO₂ 中生長。所有細胞系接受例行檢測，並無發現黴漿菌污染。

總共 45 隻 C57BL/6 動物係於右側及左側後腹經皮下接種小鼠黑色素瘤 B16F0（ATCC） 1×10^5 細胞/50 μ l。12 天之後，當巨觀腫瘤可見時，該些動物經隨機分成四組各十

隻動物，如下表所示：無治療（第 1 組）、僅活化配體（第 2 組）、僅 Ad-RTS-mIL12（ 1×10^{10} vp 劑量，第 3 組）、及 Ad-RTS-mIL12（ 1×10^{10} vp 劑量）與存在於飼料中之活化配體（1000 mg/kg 飼料，第 4 組）。

接受活化配體之世代係餵飼自由採食之與該活化配體 RG-115932 混合之小鼠飼料直到試驗結束。不接受活化配體之世代持續餵飼一般飼料。

載體係於腫瘤細胞接種後第 12 及 19 天經腫瘤內投予。每周測量三次每隻小鼠的腫瘤體積及體重直到試驗結束。當動物的累積腫瘤大小超過 1000 mm^3 或顯示體重減輕 $>15\%$ 超過 3 天時，該動物被犧牲。在完成試驗時，所有剩餘之動物皆被安樂死。

腫瘤體積係利用公式 $L \times W^2 / 2$ 計算。腫瘤大小係以平均值 $\pm$ SE 顯示。統計分析利用雙尾 t 檢定實施。當 $p < 0.05$ 時，不同組別之間的差異被認為具有顯著性。

組別	N	飼料	治療 (1×10^{10} vp)	細胞接種後 之治療天數	腫瘤體積 ，體重
1	10	正常 客製			星期一、 三及五
2	10	(1000mg/kg)			星期一、 三及五
3	10	正常 客製	Ad-RTS-mIL-12	第 12、19 天	星期一、 三及五
4	10	(1000mg/kg)	Ad-RTS-mIL-12	第 12、19 天	星期一、 三及五

當右側腹之腫瘤達到平均體積 44 mm^3 時，開始進行治療。以局部遞送而言，給予右側腫瘤二次相隔 7 天 1×10^9 vp 之 Ad-RTS-mIL12 腫瘤內注射。這些動物接受活化配體飼料 (1000 mg/kg)。對照動物接受無任何處理或僅活化配體 (1000 mg/kg) 或僅 Ad-RTS-mIL12 不加活化配體。在投予載體之前的 24 小時，該所示之世代接受活化配體 (1000 mg/kg)。每周評估三次這些動物的腫瘤變大或消退之任何徵候。如圖 1A 所示，僅接受活化配體處理或無處理之對照動物在細胞接種後 21 天的平均腫瘤體積分別為 $924 \pm 80 \text{ mm}^3$ 及 $884 \pm 142 \text{ mm}^3$ 。

相對地，經 Ad-RTS-mIL12+活化配體治療之腫瘤的腫瘤體積為 $86 \pm 138 \text{ mm}^3$ ，顯示相較於無治療之動物具有統計顯著性 ($p < 0.0001$) 之 ~91% 之腫瘤生長抑制。僅 Ad-RTS-mIL12 不加活化配體之腫瘤體積為 $565 \pm 305 \text{ mm}^3$ ，與對照動物之間並無顯著差異 ($p < 0.07$)。這些資料顯示 Ad-RTS-mIL12 不加活化配體對腫瘤生長之影響很小，然而 Ad-RTS-mIL12 加上活化配體則具有顯著之抗腫瘤活性。

重要的是，右側腹腫瘤接受 Ad-RTS-mIL12 加上活化配體之動物顯示統計顯著性 ($p < 0.005$) 抑制 81% 之未經注射之左側腹腫瘤之腫瘤生長 ($189 \pm 231 \text{ mm}^3$)，相較於無治療對照組之未經注射之對側腫瘤 ($1019 \pm 233 \text{ mm}^3$) (圖 1B)。然而，以 Ad-RTS-mIL12 不加配體治療之腫瘤而言，對側未經治療之腫瘤體積並無顯著減少。在僅接受

Ad-RTS-mIL12 或僅活化配體治療之對照組中，經治療之腫瘤以及對側未經注射之腫瘤在腫瘤植入後 21 天持續加快生長。這些資料顯示，在以 Ad-RTS-mIL12 加配體治療原發性腫瘤後所發展出之對抗腫瘤細胞之系統性免疫反應可能是在遠處未經治療之腫瘤觀察到抗腫瘤效應之原因。

體重係作為本試驗之毒性指標測量。每周測量三次動物的體重直到試驗結束。經常觀測小鼠以得知有無任何不良反應及治療相關不良反應之明顯徵候。可接受之毒性係經定義為在試驗期間之平均體重減輕不到 15%。此試驗中之所有治療皆耐受良好。最大平均體重減輕係在可接受之範圍內 (<15%) (圖 2)，沒有發現治療相關之死亡。然而，我們發現在所有組別均有散發性死亡。

已清楚確定的是，免疫系統能辨識腫瘤特異性抗原及清除惡性細胞 (Brunda, M.J. et al., J. Exp. Med. 178: 1223-1230 (1993)、Brunda, M.J. et al., Cancer Chemother. Pharmacol. 38 (Suppl) : S16-S21 (1996)、及 Golab J. et al., Int. J. Mol. Med. 3 (5) : 537-44 (1999))。然而，仍然難以駕馭免疫系統以用於癌治療之治療性目的。此策略涉及使用腫瘤內注射能調節 IL-12 表現之複製缺陷病毒載體 (即 Ad-RTS-mIL12)，以在不誘導系統性毒性之情況下減少腫瘤生長 (Komita, H. et al, Cancer Gene Ther. 16: 883-91 (2009)) 及活化免疫系統以殺滅遠處和轉移性癌。

在此試驗中，在已建立之腫瘤內注射之 Ad-RTS-

mIL12 在活化配體存在下抑制 B16F0 模型中之腫瘤生長。在此處，使用雙側建立之皮下 B16F0 腫瘤 C57BL/6 小鼠模型顯示，單側腫瘤內注射 Ad-RTS-mIL12 造成該經注射之腫瘤及對側未經注射之腫瘤二者的生長顯著減少。此抗腫瘤效應顯著高於僅以活化配體治療或僅以 Ad-RTS-mIL12 治療不加活化配體之動物。這些結果顯示直接遞送 Ad-RTS-mIL12 至腫瘤微環境提供治療性好處，且產生對抗轉移性癌細胞之保護性抗腫瘤免疫作用。

實施例 2

IL-12 與 IFN α 之組合治療

目前的癌免疫療法在臨床上提供有限之成功，因此需要創新策略以進一步增進抗腫瘤免疫反應之有效性。此試驗評估腫瘤內 (i.t.) 投予具有新穎之 Rheoswitch Therapeutic System[®] (RTS[®]) 以調節性表現小鼠 IL-12 或 IFN α 的腺病毒 (Ad) 之抗腫瘤活性，該 RTS 系統係可誘導之啓動子系統。經口投予小分子活化配體 (AL) INXN-1001 調節 IL-12 於 Ad-RTS-mIL-12 及 IFN α 於 Ad-RTS-mIFN α 之表現。該單獨或經組合腫瘤內投予之 Ad-RTS-mIL-12 及 Ad-RTS-mIFN α 的 IL-12 及 IFN α 之調節性表現及治療效益係於同源 Lewis 肺癌 (LLC) 及同源乳癌 (4T1) 模型中評估。

在 LLC 模型中，相較於對照未經治療之腫瘤，每日僅給予經口 AL 治療（於飼料中投予 1000 ppm，代表每日劑

量 $\sim 225 \text{ mg/kg/day}$) 或僅經腫瘤內給予細胞介素基因療法但無 AL 存在不導致顯著抑制腫瘤生長。相反地，腫瘤內注射 10^{10} vp Ad-RTS-mIL-12 或 Ad-RTS-mIFNa 及每日口服 AL 到第 25 天導致顯著之腫瘤生長抑制 (分別為 72 及 71%, $p < 0.05$)。值得注意的是，以 Ad-RTS-mIL-12 與 Ad-RTS-mIFNa 之組合和口服 AL 治療 LLC 腫瘤相較於各單獨治療導致顯著之抗腫瘤效應 (97% 生長抑制, $p < 0.05$)，而無觀察到體重變化之明顯毒性。在 4T1 模型中，腫瘤內投予 10^{10} vp 之 Ad-RTS-mIL-12 加 AL 或 Ad-RTS-mIFNa 加 AL 相較於對照未治療之腫瘤到第 34 天導致 58 及 53% 之腫瘤生長抑制 ($p < 0.05$)。值得注意的是，以 Ad-RTS-mIL-12 加 AL 與 Ad-RTS-mIFNa 加 AL 二者之合併治療導致增強之抗腫瘤活性，即 80% 之生長抑制。這些資料顯示利用於 Ad 載體中經 RTS 調節之 IL-12 及 IFNa 併用 AL 之組合治療策略誘導對抗侵略性小鼠腫瘤之有效治療活性。未來試驗將探討 IL-12 及 IFN α 二者在上述之腫瘤模型中展現彼等之抗腫瘤效應之機轉。

介白素 12 (IL-12) 是一種用來治療多種感染性及惡性疾病之強力多效性細胞介素。IL-12 抗腫瘤活性係由直接腫瘤細胞細胞毒性、抗血管生成特性及增進免疫調節活性包括活化自然殺手細胞、 $CD4^+$ T 細胞及 $CD8^+$ T 細胞所媒介。雖然具備這些抗腫瘤效應，系統性輸注重組 IL-12 於人導致嚴重之系統性毒性，因此大幅限制彼之臨床用途。

干擾素 α (IFN α) 是一種具有強效之抗病毒及抗腫瘤效應之細胞介素。投予 IFN α 刺激 T 細胞及自然殺手細胞增生，導致腫瘤細胞細胞毒性、抗血管生成及增加主要組織相容性複合體 (MHC)、腫瘤抗原及黏附分子之表現。與 IL-12 類似的是，高量之 IFN α 亦顯示嚴重之不良反應，包括類流感症候群、嚴重噁心、疲倦及沮喪。

因此，很明顯地需要控制這些細胞介素之表現量。RTSTM (Rheoswitch Therapeutic System) 是一種新穎之調節系統，其利用活化配體 INXN-1001 來控制基因表現，該活化配體係口服生物可利用之小分子藥物。在利用 RTS 技術以控制細胞介素表現方面，我們先前已在許多臨床前動物模型中利用經 Ad-RTS-IL-12 轉導之樹突細胞證實腫瘤生長減少，最近更直接在腫瘤內 (IT) 注射 Ad-RTS-IL-12。此導致開始進行直接注射 Ad-RTS-IL-12 至第 III/IV 期惡性黑色素瘤病患之腫瘤病灶的第一期臨床試驗。

組合療法在臨床前模型及臨床上顯示很高之潛力。因此在本試驗中，我們探討 Ad-RTS-IL-12 與 Ad-RTS-IFN α 於二種不同的同源腫瘤模型 (Lewis 肺癌 (LLC) 及 4T1 乳癌) 中經腫瘤內共投之協同效應。

RheoSwitch Therapeutic System (RTS) 包含三種基本成份：(1) 誘導性啟動子、(2) 配體誘導性轉錄因子及共活化伴、(3) RheoSwitch 活化配體 (AL)。

在無配體存在下，該開關蛋白質複合物提供「關閉」信號。相反地，當配體存在時，該複合物改變構形及提供使

標靶基因表現之劑量依賴性「開啓」信號。在活體內，該經口投予之 AL 在 24 小時內啟動基因表現，當停止投予 AL 時，基因表現在約 24 小時內回復至基準量。

LLC 及 4T1 細胞係經感染複數為 100 之 Ad-RTS-murine IL12 或 Ad-RTS-murine IFNa 過渡性轉導。為了誘導基因表現，活化配體 INXN-1001 係以 75nM 之濃度添加於培養基或以 0.1% DMSO 處理以作為對照。於 48 小時收集上清液，細胞介素之量由 ELISA 檢測。n=3，平均值±標準差 (s.d.)。結果顯示於圖 3。

LLC 及 4T1 細胞係經感染複數為 100 之 Ad-RTS-murine IL12 或 Ad-RTS-murine IFNa 過渡性轉導。為了誘導基因表現，活化配體 INXN-1001 係以 75nM 之濃度添加於培養基或以 0.1% DMSO 處理以作為對照。於 48 小時收集上清液，細胞介素之量由 ELISA 檢測。n=3，平均值±標準差 (s.d.)。結果顯示於圖。於圖 4 箭頭標示之特定天數經腫瘤內投予腺病毒。對照組包括經活化配體 (INXN-1001) 處理或不處理之 PBS 及 Ad-RTS-Luc 注射小鼠，這些被當作對照組因為對腫瘤大小無影響。腫瘤抑制之百分比係如圖所示，其顯著低於對照組及單一細胞介素治療組 ($p < 0.01$)。n=5，平均值±標準誤 (s.e.m.)。

在分開之試驗中，我們經皮下途徑注射 1×10^5 4T1 癌細胞至小鼠。當腫瘤達到可觸知之大小時，小鼠經隨機分組至單獨或組合腫瘤內投予 Ad-RTS-IL-12 及/或 Ad-RTS-IFNa (10^{10} vp/小鼠/載體) 之治療組。在腫瘤內注射後 48

小時收集血清及腫瘤。對照組包括經 INXN-1001 活化配體處理或不處理之 PBS 及 Ad-RTS-Luc 注射小鼠，這些被當作對照組因為對腫瘤大小無影響。INXN-1001 係經調製於辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯 (Labrasol) 並藉由經口餵食管每天遞送。在循環及腫瘤內之細胞介素量係利用血清及腫瘤均質液以 ELISA 檢測。n=4，平均值±標準誤 (s.e.m.)。結果顯示於圖 5。

LLC 及 4T1 (此週稍晚之結果) 細胞係經各載體濃度 500 MOI 之 Ad-RTS-IL-12 及 Ad-RTS-IFNa 單獨或組合轉導。經轉導之細胞在 75 nm INXN-1001 或 0.1% DMSO 存在時培養 48 小時。細胞培養上清液係經收集以用於細胞介素分析。亦收集細胞以利用流式細胞分析 MHC 第一型分子之表現。n=2 至 3，平均值±標準差 (s.d.)。結果顯示於圖 6。

資料顯示 IL12 與 IFNa 細胞介素抑制腫瘤生長之協同效應。雖然 IL-12 先前已經顯示可減少腫瘤生長，但其與 Ad-RTS-IFNa 之組合顯著增進療效，如在 LLC 及 4T1 模型中腫瘤生長減緩所示。值得注意的是，在細胞介素表現後並未觀察到毒性，顯示 IL12 及 IFNa 之表現受到 Rheoswitch 系統之調節。在機轉方面，IFNa 引發 MHC-I 表現於腫瘤細胞上，因此導致加劇之細胞死亡。額外之 MOA 試驗目前正在進行。

整體來說，以安全、受控制及可誘導之方式遞送細胞介素之組合代表治療常見於人族群之侵略性腫瘤的新穎策

略。

實施例 3

方法

下列實施例 4 至 8 中之試驗係如下述實施。

動物

六至八週齡之 C3H/H 及 Balb/c 母鼠係購自哈倫實驗室 (Harlan Laboratories)。動物係依據英創松 (Intrexon) 公司之實驗動物照顧及使用委員會之規定照顧及處理。動物係經餵飼水及購自哈倫實驗室之不含紫花苜蓿之 18% 蛋白質飼料。

所有程序係於麻醉動物進行。在注射 DNA 前 1 小時，於股四頭肌周圍之區域預先注射 50 U (終體積 50 μ l) 之 Hylanex (rHuPH20, Halozyme)。切開一小切口以暴露股四頭肌，利用裝有 29G 針頭之結核菌素針筒注射終體積 100 微升之 250 微克之臨床前等級 RTS-hEPO 質體。儘快將切口縫合。DNA 係藉由插入肌肉中之 2 針頭電極 (5mm) 之協助被電穿孔，針頭被插入 DNA 注射位置之兩側。八次 50V/cm (20 ms, 1Hz) 之脈衝被遞送以增進基因轉移。

配體

RG-115932 配體係經調製於動物飲食中，並以

1000mg/kg 之濃度給予。至於 OG 配體則以 10mg/ml 被調製於辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯 (Labrasol)。

肌肉內投予 AAV-HuEPO (0034A、0034B)

動物係經麻醉，彼等之股四頭肌係經可視化且注射部位經無菌處理。利用 0.5 毫升之胰島素針筒及 29.5G 之針頭注射小鼠。每隻動物係經注射 100 微升體積中共 10^{11} 病毒基因組。在此步驟後，動物被安置於籠中，觀察到牠們能正常行走。

蛋白質分析

血漿樣本係利用酶連接免疫吸附測定 (ELISA) (StemCell Technologies, #01630) 測試人紅血球生成素之存在。

血容比測量

小鼠經眼窩採血，樣本經 Heska CBC 血液分析儀測量。

實施例 4

在單次肌肉內投予 AAV-RTS-HuEpo 後評估人紅血球生成素於小鼠之療效

「AAV-RTS-HuEPO」係指腺病毒相關病毒載體 - RheoSwitch®治療系統 - 人 EPO。該信號肽序列、人紅血球

生成素序列及終止密碼子之核酸序列係如 SEQ ID NO:8 所示。

此試驗之目的在於測定由 AAV 媒介之肌肉內 (IM) 遞送 HuEPO 轉基因至小鼠是否能導致可測量之 huEPO 表現及血容比 (HCT) 之同時增加。二個 AAV-huEPO 載體 0034A 及 0034B (圖 7A 及 7B) 係利用二個小鼠品系 C3H/H 及 BALB/c 測試。二個 AAV 載體中之 huEPO 表現卡匣皆在誘導性啟動子之控制下。血漿之 HuEpo 量及 HCT 係於每週測量。

在試驗開始時，小鼠經採血以得到基準血容比，然後每隻動物經肌肉內投予 10^{11} AAV-HuEPO 病毒基因組。從投予 AAV 當天開始，動物接受含活化配體之飼料 (18-1000)。對照動物接受載體投予及正常飼料 (不含活化配體)，或接受單獨載具之 IM 投予 (食鹽水) 及有或無活化配體。所有組別每 7 天測量一次 HCT。二個接受 HuEPO 載體及有活化配體存在之組別皆顯示上升之血容比。

如圖 8 所示，相較於對照組，0034A 顯示 40% HCT 增加及 0034B 顯示 25% HCT 增加。在試驗第 29 天時，活化配體被移除，所有組別皆接受正常飼料。重要的是，在移除該活化配體之後二星期，血容比之量下降至正常範圍。在第 50 天再度給予含配體之飼料又導致 HCT 增加，在第 64 天再度移除導致 HCT 下降。

這些資料顯示，在單次 IM 投予 AAV-huEPO 載體後經調節之 HuEPO 表現媒介生理變化。在活化配體存在下，

105年11月4日修(正)換頁

高量之 HuEPO 係經表現而導致 HCT 增加。當活化配體被移除時，HCT 下降至正常範圍之內。HuEPO 表現及後續之 HCT 增加可藉由導入該活化配體被誘導至少二次。

實施例 5

HuEPO 於 C3H/H 及 Balb/c 小鼠之調節表現

經治療之 C3H/H 小鼠的血漿中有無 HuEPO 存在係由 ELISA 檢測。檢測二種 AAV-huEPO 載體之 HuEPO 表現。如圖 9 所示，HuEPO 表現量高於正常人生理量之四倍（正常人 EPO 量為 4 至 24 mU/ml）。經 0034A 處理之動物的血漿 HuEPO 量相較於經 0034B 載體處理之動物的血漿 HuEPO 量高出十倍。在對照動物未檢測到 HuEPO 之表現。HuEPO 表現量在第 7 及 14 天之間達到高峰，並自第 14 至 28 天維持穩定。

重要的是，HuEPO 之表現與 HCT 之增加成正比，並在誘導 huEPO 表現及可測量之 HCT 改變之間展現預期之延遲時間（即紅血球細胞反應 EPO 而增生所需之時間）。配體於第 29 天移除。第 35、42 及 50 天皆未檢測到血漿中之 HuEPO（載體處理組及對照組）。第 50 天時，相關動物回復含有活化配體之飼料。HuEPO 表現又再度被檢測到類似第一次誘導週期時觀察到之量。配體於第 64 天移除。HuEPO 表現在第 71 天無法被檢測到，在第 85 天僅 0034A 載體處理組無法檢測到。第 85 天之 0034B 載體處理組檢測到低量之 HuEPO 表現。

如圖 9 所示之相同試驗係於正常 Balb/c 小鼠平行實施 (圖 10)。

實施例 6

HuEPO 在單次 IM 注射 AAV-HuEPO 後經調節之表現

動物在第 0 天經 IM 注射投予 10^{11} vp 之 AAV-HuEPO (0034B)。在試驗的頭 21 天，以經口餵食管 (OG) 每天遞送配體。經治療小鼠之血漿中有無 HuEPO 存在係以 ELISA 檢測，HuEPO 表現和 HCT 變化成正比。如圖 11 所示，HCT 量及 HuEPO 表現在第 21 天達到高峰。第 21 天停止遞送配體，huEPO 表現及 HCT 在無配體存在時展現急遽下降。第 35 天樣本之 HuEPO ELISA 資料在製作圖 11 時尚未取得。

每個時間點之各動物及組別之平均 HCT 係與基準值 (時間 0，投藥前) 比較。如圖 12A 及 12B 所示，經 0034A 治療之 C3H/H 小鼠在第 14 天及 Balb/c 小鼠在第 28 天之 HCT 增加 1.7 倍。在投予 0034B 後，C3H/H 小鼠之 HCT 增加 1.4 倍，Balb/c 小鼠增加 1.6 倍。在活化配體移除後，HCT 下降至正常範圍之內。

實施例 7

由活化配體劑量調節 HuEPO 之表現

動物經採血以測量基準期 HCT 量，之後每隻動物經 IM 投予 10^{11} AAV-HuEPO 病毒基因組 (0034A)。動物自

投予 AAV 當天開始接受含活化配體之飼料，其中活化配體之濃度為 1000 mg/kg (18-1000)、250 mg/kg (18-250)、100 mg/kg (18-100)、50 mg/kg (18-50)、或 0 mg/kg (18-0)。對照動物接受載體投予及正常飼料（不含活化配體，18-0），或接受單獨載具之 IM 投予（食鹽水）及有（18-1000）或無（18-0）活化配體。每 7 天測量一次所有組之 HCT 及 HuEPO 表現量。

如圖 13 所示，在基準期投藥前之樣本中未檢測到 HuEPO。在第 7 至 21 天檢測 HuEPO 之表現。在最低濃度之活化配體組（18-50）中，HuEPO 表現在第 7 天無法被檢測到（該測試之敏感性限值為 8 mU/ml），但在第 14 及 21 天可被檢測到，雖然其量低於接受較高活化配體劑量之動物。在接受二個最高濃度之活化配體（18-1000 及 18-250）之世代中，HuEPO 達到類似之高峰表現量。接受中間濃度之活化配體（18-100）的動物血漿之 HuEPO 量在第 7 天顯示較低之 HuEPO 表現，但在第 14 及 21 天達到和 18-1000 及 18-250 動物類似之量。HCT 之變化與 HuEPO 之表現量呈正比。在第 21 天移除配體後，HCT 量下降至正常範圍之內。

這些資料顯示 HuEPO 之表現在單次肌肉內投予 AAV 載體後受到調節。重要的是，HuEPO 之表現量係由活化配體之劑量調節。這些資料顯示 HuEPO 之表現可藉由調整活化配體之濃度而維持在正常生理範圍之內，此具有臨床應用性。

實施例 8

HuEPO 在單次 IM 注射 AAV-HuEPO 後經調節之表現

共 25 隻 $\frac{3}{4}$ 腎切除之 C3H/H 小鼠係購自塔可尼克 (Taconic) 公司。動物經採血以測量基準期 HuEPO 量及 HCT。該所示世代在試驗期間接受含 RG-115932 活化配體之飼料 (18-1000, 1000 mg/kg 飼料)。在第 0 天, RTS-HuEPO 質體 DNA (0034D) 係經由預先經透明質酸酶 (Hyase) (購自 Halozyme 公司之 50 U rHUPH20) 處理一小時後之開放肌肉 IM 注射加上電穿孔 (EP) 投予。動物世代包括 1) HuEPO DNA+EP+Hyase+配體、2) HuEPO DNA+EP+Hyase 不加配體、3) HuEPO DNA+EP 不加 Hyase+配體、4) 食鹽水+EP+Hyase+配體、及 5) 每周經 IP 注射二次重組人 EPO 蛋白質治療之動物。

如圖 14 所示, 高 HuEPO 表現係於第 8 天之血漿中檢測到, 並在第 22 天下降至較低之正常範圍。HCT 之變化與血漿之 HuEPO 量呈正比。在第 30 天再投予該載體後, 並未在血漿中檢測到 HCT 之變化。

HuEPO 質體 DNA (0034C, RTS-hEpo-IRES-fLuc) 係經遞送至 Balb/c 小鼠 (股四頭肌, 每隻動物 200 微克之 DNA), 之後實施電穿孔。在 DNA 遞送及電穿孔之前一小時, 動物亦經玻璃酸酶 (購自 Halozyme 公司之 50 U rHUPH20) 或僅食鹽水處理。所有動物在此試驗期間經由飼料接受活化配體。

於 DNA 遞送前及遞送後第 4 天及第 7 天測量小鼠之 HCT。如圖 15 所示，接受 huEPO 質體加玻璃酸酶前處理之動物在第 7 天檢測到 HCT 增加 40%，然而接受 huEPO 但無玻璃酸酶前處理之動物在第 7 天顯示 HCT 增加 25%。

應了解前面描述之實施態樣及範例並非意圖在任何方面限制本發明之範圍，而且此處所提之權利要求範圍係意圖包含不論是否在此處明白提出之所有實施態樣及範例。

參考文獻

Abdalla, 2007.

【圖式簡單說明】

圖 1A 及 1B 之折線圖說明 Ad-RTS-mIL12 與活化配體對 C57B16 小鼠之對側黑色素瘤（B16F0）腫瘤之療效。圖 1A 顯示在動物右側腹之經治療之腫瘤的體積。圖 1B 顯示在動物左側腹之未經治療之腫瘤的體積。腫瘤大小係以平均值 $\pm$ SE 顯示。

圖 2 之折線圖說明雙側腹荷黑色素瘤之小鼠的體重變化，包括經 Ad-RTS-mIL 12 及活化配體之治療後。

圖 3 之柱狀圖說明 mIL12 及 mIFN α 於 LLC 及 4T1 細胞系中經試管內調節之表現。

圖 4A 及 4B 之折線圖說明 mIL12 及 mIFN α 於 LLC 及 4T1 細胞系中之效應。

圖 5 之柱狀圖說明 IL12 及 IFN α 於小鼠體內之系統性及腫瘤內效應。

圖 6 之組合折線及柱狀圖說明 IL12 及 IFN α 之共表現增強 4T1 及 LLC 癌細胞中 MHC 第一型分子之表現。

圖 7A、7B、7C 及 7D 分別說明載體 0034A、0034B、0034CB 及 0034D 之載體圖。0034A 攜帶標準開關系統元件。0034B 攜帶經改質之調節啟動子。

圖 8 之折線圖說明 C3H/H 小鼠在經肌肉內 (IM) 投予 AAV-HuEPO 後之生理反應。

圖 9 之組合折線圖及柱狀圖顯示經調節之 HuEPO 表現對 C3H/H 小鼠血容比之影響。

圖 10 之組合折線圖及柱狀圖顯示經調節之 HuEPO 表現對 Balb/c 小鼠血容比之影響。

圖 11 之組合折線圖及柱狀圖顯示在單次 IM 注射 AAV-HuEPO 後，經調節之 HuEPO 表現對血容比之影響。

圖 12A 及 12B 之折線圖顯示在經 IM 投予 AAV-HuEPO 後血容比之絕對值變化。

圖 13 之組合折線圖及柱狀圖顯示經活化配體劑量調節之 HuEPO 表現對血容比之影響。

圖 14 之組合折線圖及柱狀圖顯示 HuEPO 之表現對 3/4 腎切除 C3H/H 小鼠血容比之影響。

圖 15 之柱狀圖顯示經 IM 投予至 Balb/c 小鼠之 RTS-HuEPO 的表現對血容比之影響。

序列表

<110> 英翠克頌(INTREXON)公司
<120> 條件性表現蛋白質之載體類
<140> TW 101107160
<141> 2012-03-03
<150> US 61/449,536
<151> 2011-03-04
<150> US 61/490,535
<151> 2011-05-26
<150> US 61/478,881
<151> 2011-04-25
<150> US 61/562,342
<151> 2011-11-21
<160> 22
<170> PatentIn 版本 3.5
<210> 1
<211> 17
<212> PRT
<213> 黑腹果蠅(Drosophila melanogaster)
<400> 1
Arg Arg Gly Gly Thr Thr Cys Ala Asn Thr Gly Ala Cys Ala Cys Tyr
1 5 10 15

Tyr

<210> 2
<211> 13
<212> DNA
<213> 黑腹果蠅(Drosophila melanogaster)

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> n係a、c、g、或t

<400> 2
aggtcnagg tca 13

<210> 3
<211> 15
<212> DNA
<213> 黑腹果蠅(Drosophila melanogaster)

<400> 3
gggttgatg aattt 15

<210> 4
<211> 37323
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成性Ad-RTS-hIL-12 (SP1-RheoIL-12)

<400> 4
catcatcaat aatataccitt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt 60

ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt	120
gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg	180
gtgtgcgccc gtgtacacag gaagtgtcaa ttttcgcgcg gttttaggcg gatgttgtag	240
taaaatttggg cgtaacccag taagatttgg ccatcttcgc gggaaaactg aataagagga	300
agtgaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tatttgtcta gggagatccg	360
gtaccggcgc gcgcgccgtt tggccgcctc gagtctagag atccggtgag tattaggcgc	420
gcaccagggtg ccgcaataaa atatctttat ttctattaca tctgtgtgtt ggttttttgt	480
gtgaatcgat agtactaaca tacgctctcc atcaaaacaa aacgaaacaa aacaaactag	540
caaaataggc tgtccccagt gcaagtgcag gtgccagaac atttctctat cgataatgca	600
ggtcggagta ctgtctccg agcggagtag gtctctccga gcggagtact gtctccgag	660
cggagtactg tctccgagc ggagtactgt cctccgagcg gagtactgtc ctccgagcgg	720
agactcttcg aagggaagg ggccgggtcg atcgacccc cccctcttc ttcgaaggaa	780
gaggggcggg gtcgaagacc tagagggtag ataatgggtg ccttagctgg tgtgtgagct	840
catcttctg tagatcacgc gtgccacat gggtcaccag cagttagtca tctcttggtt	900
ttccctggtt tttctggcat ctccctcgt ggccatattg gaactgaaga aagatgttta	960
tgtcgtagaa ttggatttgt atccggatgc ccctggagaa atggtggtcc tcacctgtga	1020
caccttgaa gaagatggtc tcacctggac ctgggaccag agcagttagg tcttaggtc	1080
tggcaaaacc ctgaccatcc aagtcaaaga gtttggagat gctggccagt acacctgtca	1140
caaaggaggc gaggttctaa gccattcgt cctgctgctt cacaaaaagg aagatggaat	1200
ttggtccact gatattttaa aggaccagaa agaaccctaa aataagacct ttctaagatg	1260
cgaggccaag aattattctg gacgtttcac ctgctggtgg ctgacgacaa tcagtactga	1320
tttgacattc agtgcacaaa gcagcagagg ctctctgac cccaagggg tgacgtgcgg	1380
agctgtctca ctctctgcag agagagtcag aggggacaa aaggagtatg agtactcagt	1440
ggagtgccag gaggacagt cctgcccagc tgcgtaggag agtctgcca ttgaggtcat	1500
ggtggatgcc gttcacaagc tcaagtatga aaactacacc agcagcttct tcatcaggga	1560
catcatcaaa cctgaccac ccaagaactt gcagctgaag ccattaaaga attctcgga	1620
ggtggaggtc agctgggagt accctgacac ctggagtact ccacattcct acttctccct	1680
gacattctgc gttcagggtc agggcaagag caagagagaa aagaaagata gagtcttcac	1740
ggacaagacc tcagccacgg tcatctgccg caaaaatgcc agcattagcg tgcgggcca	1800
ggaccgctac tatagctcat ctggagcga atgggcatct gtgccctgca gttagggttg	1860
gcgagctcga attcattgat ccccgggct gcaggaattc gatatcaagc tgcggatccg	1920
aattccgcc ccccccccc ccccccccta acgttactgg ccgaagccgc ttggaataag	1980
gccggtgtgc gtttgtctat atgtatttt ccaccatatt gccgtctttt ggcaatgtga	2040
gggcccggaa acctggccct gtcttcttga cgagcattcc taggggtctt tcccctctc	2100
ccaaaggaat gcaaggctct ttgaatgtcg tgaaggaagc agttcctctg gaagcttctt	2160
gaagacaaac aacgtctgta gcgaccttt gcaggcagcg gaacccccca cctggcgaca	2220
ggtgccctct cggccaaaag ccacgtgtat aagatacacc tgcaaaggcg gcacaacccc	2280
agtgccacgt tgtgagttgg atagttgtgg aaagagtcaa atggctctcc tcaagcgtat	2340

tcaacaaggg gctgaaggat gcccagaagg taccccatig tatgggatct gatctggggc	2400
ctcgggtgcac atgctttaca tgtgtttagt cgagggtaaa aaaacgtcta ggccccccga	2460
accacgggga cgtgggtttc ctttgaaaaa cacgatgata atatggccac aacctgggt	2520
ccagcgcgca gcctcctcct tgtggctacc ctggtcctcc tggaccacct cagtttggcc	2580
agaaacctcc ccgtggccac tccagaccca ggaatgttcc catgccttca ccactccaa	2640
aacctgctga gggccgtcag caacatgctc cagaaggcca gacaaactct agaattttac	2700
ccttgcaactt cigaagagat tgalcatgaa gatatacaa aagataaaac cagcacagtg	2760
gaggccigtgt taccattgga attaaccaag aatgagagtt gcctaaattc cagagagacc	2820
tccttcataa ctaatgggag ttgcctggcc tccagaaaga cctcttttat gatggccctg	2880
tgccttagta gtatttatga agacttgaag atgtaccagg tggagttaa gacctgaat	2940
gcaaagcttc tgatggatcc taagaggcag atctttctag atcaaaacat gctggcagtt	3000
attgatgagc tgatgcaggc cctgaatttc aacagtga cgtgtccaca aaaatcctcc	3060
cctgaagaac cggattttta taaaactaaa atcaagctct gcatacttct tcatgcttc	3120
agaaticggg cagtgaactat tgatagagtg atgagctatc tgaatgcttc ctaacgtacg	3180
tcgacatcga gaacttggtt attgcagctt ataatggta caaataaagc aatagcatca	3240
caaatttcac aaataaagca ttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca	3300
tcaatgtatc ttatcatgtc tgggcgcgcc ggccctccgc cggggttttg gcgcctcccg	3360
cgggcgcccc cctcctcagc gcgagcgcig ccacgtcaga cgaaggcgcc agcgagcgtc	3420
ctgatccttc cgcgccgacg ctccaggacag cggcccgctg ctcataagac tcggccttag	3480
aaccccagta tcagcagaag gacattttag gacgggactt gggtagctct agggcactgg	3540
ttttctttcc agagagcggg acaggcgagg aaaagtagtc ccttctcggc gattctgcgg	3600
agggatctcc gtggggcggg gaacgccgat gattatataa ggacgcgccg ggtgtggcac	3660
agctagtctc gtcgcagccg ggatttgggt cgcggttctt gtttgtggat cgtgtgatc	3720
gtcacttggg gtagtagcgg ctgctgggct gggtagctgc gctcgggggt ggcgagtgtg	3780
ttttgtgaag ttttttaggc accttttgaa atgtaatcat ttgggtcaat atgtaatttt	3840
cagtgttaga ctagttaaatt gtccgctaaa ttctggccgt ttttggcttt tttgttagac	3900
gagctagcgc cgccaccatg ggccttaaaa agaagcgtaa agtcgcccc ccgaccgatg	3960
tcagcctggg ggacgagctc cacittagacg gcgaggacgt ggcgatggcg catgccgacg	4020
cgctagacga ttctgatctg gacatgttgg gggacgggga ttccccgggt ccgggattta	4080
ccccccacga ctccgcccc tacggcgctc tggataatggc cgacttcgag tttagacaga	4140
tgtttaccga tgcctttgga attgacgagt acggtgggga attcgagatg cctgtggaca	4200
ggatccttga ggcagagctt gctgtggaac agaagagtga ccagggcgtt gagggtcctg	4260
ggggaaccgg gggtagcggc agcagcccaa atgacctgt gactaacatc tgcaggcag	4320
ctgacaaaca gctattcacg cttgttagt gggcgaagag gatcccacac ttttctcct	4380
tgcctctgga tgatcaggtc atattgctgc gggcaggctg gaatgaactc ctattgcct	4440
ccttttcaca ccgatccatt gatgttcgag atggcatcct ccttgccaca ggtcttcacg	4500
tgcaccgcaa ctgagcccat tcagcaggag taggagccat ctttgatcgg gtgctgacag	4560

agctagtgtc caaaatgcgt gacatgagga tggacaagac agagcttggc tgcctgaggg	4620
caatcattct gtttaatcca gaggtgaggg gtttgaatc cgcccaggaa gttgaacttc	4680
tacgtgaaaa agtatatgcc gctttggaag aatatactag aacaacacat cccgatgaac	4740
caggaagatt tgcaaaactt ttgcttcgtc tgccttcttt acgttccata ggccttaagt	4800
gtttggagca tttgtttttc ttctgcctta ttggagatgt tccaattgat acgttcctga	4860
tggagatgct tgaatcacct tctgattcat aatctagcct agccccctc tccctcccc	4920
ccccctaacg ttactggccg aagccgcttg gaataaggcc ggtgtgcgtt tgtctatatg	4980
ttattttcca ccatatigcc gtcctttggc aatgtgaggg cccggaaacc tggccctgtc	5040
ttcttgacga gcattcctag gggctctttc cctctcgcca aaggaatgca aggtctgttg	5100
aatgtcgtga aggaagcagt tcctctggaa gcttcttgaa gacaaacaac gtctgtagcg	5160
accctttgca ggcagcggaa cccccacct ggcgacaggt gcctctgcgg ccaaaagcca	5220
cgtgtataag atacacctgc aaaggcggca caacccaggt gccacgttgt gagttggata	5280
gttgtgaaa gagtcaaatg gctctcctca agcgtattca acaaggggct gaaggatgcc	5340
cagaaggtag ccatttgtat gggatctgat ctggggcctc ggtgcacatg cttfacatgt	5400
gtttagtcca ggttaaaaaa cgtctaggcc ccccgaaacca cggggacgtg gttttcctt	5460
gaaaaacacg atctctaggc gccacatga agctactgtc ttctatcgaa caagcatgcg	5520
atatttgccg acttaaaaag ctcaagtgtc ccaaagaaaa accgaagtgc gccaaagtgc	5580
tgaagaacaa ctgggagtgt cgctactctc caaaaccaa aaggctctccg ctgactaggg	5640
cacatctgac agaagtggaa tcaaggctag aaagactgga acagctatct ctactgattt	5700
ttcctcgaga agacctgac atgattttga aaatggattc ttacaggat ataaaagcat	5760
tgttaacagg attatttga caagataatg tgaataaaga tgccgtcaca gatagattgg	5820
cttcagtgga gactgatatg cctctaacat tgagacagca tagaataagt gcgacatcat	5880
catcggaaga gagtagtaac aaaggtaaaa gacagttgac tgtatcgccg gaattcccgg	5940
ggatccggcc tgagtgcgta gtaccgaga ctgagtcgcg catgaagcgg aaagagaaga	6000
aagcacagaa ggagaaggac aaactgcctg tcagcacgac gacggtggac gaccacatgc	6060
cgcccattat gcagtgtgaa cctccacctc ctgaagcagc aaggattcac gaagtggctc	6120
caaggtttct ctccgacaag ctgttgggtga caaacgggca gaaaaacatc cccagttga	6180
cagccaacca gcagttcctt atcgccaggc tcatctggta ccaggacggg tacgagcagc	6240
cttctgatga agatttgaag aggattacgc agacgtggca gcaagcggac gatgaaaacg	6300
aagagtcgga cactcccttc cgccagatca cagagatgac tctctcagc gtccaactta	6360
tcgtggagtt cgcgaaggga ttgccagggt tcgccaagat ctgcgagcct gatcaaatta	6420
cgctgcttaa ggcttgctca agtgaggtaa tgatgtccg agtcgcgca cgatacgatg	6480
cggcctcaga cagtattctg ttcgcaaca accaagcgtg cactcgcgac aactaccgca	6540
aggctggcat ggccgaggtc atcgaggatc tactgcactt ctgccggtgc atgtactcta	6600
tggcgttga caacatccat tacgcgctgc tcacggctgt cgtcatcttt tctgaccggc	6660
cagggttga gcagccgcaa ctggtggaag agatccagcg gtactacctg aatacgtcc	6720
gcattctatat cctgaaccag ctgagcgggt cggcgcgttc gtccgtcata tacggcaaga	6780
tcctctcaat cctctctgag ctacgcacgc tcggcatgca aaactccaac atgtgcatct	6840

ccctcaagct caagaacaga aagctgccgc ctttcctcga ggagatctgg gatgtggcgg	6900
acatgtcgca caccaaccg ccgcctatcc tcgagtcgcc caccgaatctc taggcggcct	6960
ctagagcggc cgccaccgcg gggagatcca gacatgataa gatacattga tgagtittga	7020
caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaaa tgcittattt gigaattttg tgatgctatt	7080
gcittatttg taaccattat aagctgcaat aaacaagtta acaacaacaa ttgcattcat	7140
tttatgtttc aggttcaggg ggagggtgtg gaggtttttt aaagcaagta aaacctctac	7200
aaatgtggta tggctgatta tgaiccggt gccicgcgcg tttcggtgat gacggtgaaa	7260
acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga	7320
gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttggcgg gtgtcggggc gcagccaiga	7380
ggtcgactct agtccccgcg gtggcagatc tggaagggtc tgaggtagca tgagaccgc	7440
accagggtga gacctgcga gtgtggcggg aaacataatta ggaaccagcc tgtgatgctg	7500
gatgtgaccg aggagctgag gcccgatcac ttgggtctgg cctgcacccg cgtgagttt	7560
ggctctagcg atgaagatac agattgaggt actgaaatgt gtgggcgtgg ctttaagggtg	7620
ggaaaagaata tataagggtg gggctttatg tagttttgta tctgttttgc agcagccgcc	7680
gccgccatga gcaccaactc gtttgatgga agcatttga gctcatattt gacaacgcgc	7740
atgccccat gggccggggg gcgtcagaat gtgatgggt ccagcattga tggtcgcccc	7800
gtcctgcccc caaactctac taccttgacc tacgagaccg tgtctggaac gccgttggag	7860
actgcagcct ccgcccgccg ttcagccgct gcagccaccg cccgcgggat tgtgactgac	7920
tttgccttcc tgagcccgct tgcaagcagt gcagcttccc gtcatccgc ccgcgatgac	7980
aagttgacgg ctcttttggc acaattggat tctttgacct gggaacttaa tgtcgtttct	8040
cagcagctgt tggatctcg ccagcagggt tctgccctga aggttctct ccttcccaat	8100
gcggtttaaa acataaataa aaaaccagac tctgtttgga tttggatcaa gcaagtgtct	8160
tgtctgtctt atttaggggt ttgtgcgcgc cggtagggcc gggaccagcg gtctcggtcg	8220
ttgagggtcc tgtgtatttt ttccaggacg tggtaaagg gactctggat gttcagatac	8280
atgggcataa gcccgtctct ggggtggagg tagcaccact gcagagcttc atgctcgggg	8340
gtggtgttgt agatgatcca gtcttagcag gagcgtggg cgtgggtgctt aaaaatgtct	8400
ttcagtagca agctgattgc caggggcagg cccttggtgt aagtgtttac aaagcggtta	8460
agctgggatg ggtgcatacg tggggatatg agatgcatct tggactgtat ttttaggttg	8520
gctatgttcc cagccataac cctccgggga ttcattgtgt gcagaaccac cagcacagt	8580
tatccggtgc acttgggaaa ttigtcatgt agcttagaag gaaatgcgtg gaagaacttg	8640
gagacgccct tgtgacctcc aagattttcc atgcattcgt ccataatgat ggcaatgggc	8700
ccacgggcgg cggcctgggc gaagataatt ctaggatcac taacgtcata gttgtgttcc	8760
aggatgagat cgtcataggc catttttaca aagcgcgggc ggagggtgcc agactgcggt	8820
ataatgggtc catccggccc aggggcgtag ttacctcac agatttgcat tccccagct	8880
ttgagttcag atggggggat catgtctacc tgcggggcga tgaagaaaac ggtttccggg	8940
gtaggggaga tcagctggga agaaagcagg ttcctgagca gctgcgactt accgcagccg	9000
gtgggcccgt aaatcacacc tattaccggc tgcaactggt agttaagaga gctgcagctg	9060

ccgtcatccc tgagcagggg ggccacttcg ttaagcatgt ccttgactcg catgttttcc	9120
ctgaccaaatt cgcgcagaag gcgctcgccg cccagcgata gcagttcttg caaggaagca	9180
aagtttttca acggttttag accgtccgcc gtaggcatgc ttttagcggt ttgaccaagc	9240
agttccaggc ggtccacacg ctcggtcacc tgctctacgg catctcgatc cagcatatct	9300
cctcgtttcg cgggtttggg cggcttttcg tglacggcag tagtcggtcg tcgtccagac	9360
gggccagggt catgtcttcc caccgggcga gggtcctcgt cagcgtagtc tgggtcacgg	9420
tgaaggggig cgtccggggc tgcgcgctgg ccagggtgag cttgaggctg gtcctgctgg	9480
tgctgaagcg ctgccggtct tcgcccctcg cgctggccag gtagcatttg accatgggtg	9540
catagtccag cccctccgag gcgtggccct tggcgcgag cttgcccttg gaggaggcgc	9600
cgcacgaggg gcagtgacga cttttgaggg cgtagagctt gggcgcgaga aataccgatt	9660
ccggggagta ggcatccgag ccgcaggccc cgcagacggt ctgcatttcc acgagccagg	9720
tgagctctgg ccgttcgggg tcaaaaacca ggtttccccc atgctttttg atgcgtttct	9780
tacctctggt ttccatgagc cgggtgtccac gcctgggtgac gaaaaggctg tccgtgtccc	9840
cgtatacaga cttgagaggc ctgtcctcga gcggtgttcc gcggtcctcc tcgtatagaa	9900
actcggacca ctctgagaca aaggctcgag tccaggccag cacgaaggag gctaagtggg	9960
aggggtagcg gtcgtgttcc actagggggg ccactcgctc cagggtgtga agacacatgt	10020
cgccctcttc ggcatcaagg aagggtgattg gttttaggt gtaggccacg tgaccgggtg	10080
ttcctgaagg ggggctataa aaggggggtg gggcgcgttc gtcctcactc tcttccgcat	10140
cgtgtctgag gaggggcagc tgttgggggt agtactccct ctgaaaagcg ggcatgactt	10200
ctgcgcctaa attgtcagtt tccaaaaacg aggaggattt gatattcacc tggcccgcgg	10260
tgatgccttt gagggtggcc gcatccatct ggtcagaaaa gacaatcttt ttgttgtcaa	10320
gcttgggtgc aaacgacccg tagaggcggt tggacagcaa cttggcgatg gagcgaggg	10380
tttggttttt gtcgcgatcg gcgcgctcct tggccgcgat gtttagctgc acgtattcgc	10440
gcgaacgca ccgccattcg ggaaagacgg tgggtcgctc gtcgggcacc aggtgcacgc	10500
gccaaccgag gttgtgcagg gtgacaaggt caacgttgtt ggctacctct ccgcgtaggc	10560
gctcgttgtt ccagcagagg cggccgccct tgcgcgagca gaatggcggt agggggtcta	10620
gctcgtctc gtcggggggg tctgcgtcca cggtaaagac cccgggcagc aggcgcgct	10680
cgaagtagtc tatcttgcat ccttgcaagt ctacgcctg ctgccatgag cgggcggcaa	10740
gcgcgcgctc gtatgggttg agtgggggac cccatggcat ggggtgggtg agcgcgagg	10800
cgtacatgcc gcaaatgtcg taaacgtaga ggggctctct gattattcca agatatgtag	10860
ggtagcatct tccaccgagg atgtggcg gcacgtaatc gtatagttcg tgcgaggag	10920
caggagggtc gggaccgagg ttgctacggg cgggctgctc tgcctggaag actatctgcc	10980
tgaagatggc atgtgagttg gatgatattg ttggacgctg gaagacgttg aagctggcgt	11040
ctgtgagacc taccggttca cgcacgaagg aggcgtagga gtcgcgcagc ttgttgacca	11100
gctcggcggt gacctgcacg tctagggcgc agtagtccag ggtttccttg atgatgtcat	11160
acttatcctg tccctttttt ttccacagct cgcggttag gacaaactct tcgcggtctt	11220
tccagtactc ttggatcgga aaccgctcgg cctccgaacg gtaagagcct agcatgtaga	11280
actgggtgac ggctggtag gcgcagcatc cttttctac gggtagcgcg tatgcctgag	11340

cgcccttccg gagcgaggtg tgggtgagcg caaagggtgc cctgaccatg actttgaggt	11400
actggtatit gaagtcagtg tcgtcgcacg cgccctgctc ccagagcaaa aagtcctgctc	11460
gctttttgga acgcggattt ggccagggcgga aggtgacatc gttgaagagt atctttcccg	11520
cgcgaggcat aaagttgcgt gtgatgcgga aggggtcccg cacctcgga cggttgttaa	11580
ttacctgggc ggcgagcacg atctcgtcaa agccgttgat gttgtggccc acaatgtaaa	11640
gttccaagaa gcgcgggatg cccttgatgg aaggcaatit ttttaagttcc tcgtaggatga	11700
gctcttcagg ggagctgagc ccgtgctcgt aaaggggcca gtctgcaaga tgagggttgg	11760
aagcgacgaa tgagctccac aggtcacggg ccattagcat ttgcagggtg tcgcgaaagg	11820
tcctaaactg gcgacctatg gccatttttt ctggggtgat gcagtagaag gtaagcgggt	11880
cttgttccca gcggtcccat ccaagggttcg cggctagggtc tcgcgcggca gtcactagag	11940
gctcatctcc gccgaacttc atgaccagca tgaaggcgac gagctgcttc ccaaaggccc	12000
ccatccaagt ataggctctt acatcgtagg tgacaaagag acgctcgggt cgaggatgctg	12060
agccgatcgg gaagaactgg atctcccgcc accaatggga ggagtggcta ttgatgtggt	12120
gaaagtagaa gtccctgcga cgggccgaac actcgtgctg gcctttgtaa aaacgtgcgc	12180
agtactggca gcggtgcacg ggctgtacat cctgcacgag gttgacctga cgaccgcgca	12240
caaggaagca gagtgggaat ttgagccctt cgccctggcg gtttggctgg tggctttcta	12300
cttcggctgc ttgtccttga ccgtctggct gctcagggg agttacgggt gatcggacca	12360
ccacgccgct cgagcccaaa gtccagatgt ccgcgcgcgg cggtcggagc ttgatgacaa	12420
catcgcgcag atgggagctg tccatggtct ggagctcccg cggcgtcagg tcaggcggga	12480
gctcctgcag gtttacctcg catagacggg tcagggcgcg ggctagatcc aggtgatacc	12540
taatttccag gggctgggtg gtggcgcgct cgatggcttg caagaggccg catccccgcg	12600
gcgcgactac ggtaccgcgc ggccggcggt gggccgcggg ggtgtccttg gatgatgat	12660
ctaaaagcgg tgacgcgggc gagcccccg aggtaggggg ggctccggac ccgccgggag	12720
agggggcagg ggcacgtcgg cggcgcgcg gggcaggagc tgggtgctcg cgcgtagggt	12780
gctggcgaac gcgacgacg gcggtgtgat ctctgaatc tggcgctctt gcgtgaagac	12840
gacgggcccc gtgagcttga acctgaaaga gagttcgaca gaatcaattt cgggtgtcgtt	12900
gacggcgccc tggcgcaaaa tctcctgcac gtctcctgag ttgtcttgat aggcgatctc	12960
ggccatgaac tgcctgatct ctctctctcg gagatctccg cgtccggctc gctccacggt	13020
ggcgccgagg tcgttggaaa tgcgggccat gagctgcgag aaggcggtga ggccctccctc	13080
gttccagacg cggctgtaga ccacgcccc ttcggcatcg cgggcgcgca tgaccacctg	13140
cgcgagattg agctccacgt gccgggcgaa gacggcgtag tttcgcaggc gctgaaagag	13200
gtagttaggg gtgggtggcg tgtgttctgc cacgaagaag tacataaccc agcgtcgcaa	13260
cgtggattcg ttgatatccc ccaaggccct aaggcgctcc atggcctcgt agaagtccac	13320
ggcgaagtig aaaaactggg agttgcgcgc cgacacgggt aactcctcct ccagaagacg	13380
gatgagctcg gcgacagtgt cgcgcacctc gcgctcaaag gctacagggg cctcttcttc	13440
ttcttcaatc tctcttcca taaggccctc cccttcttct tcttctggcg gcggtggggg	13500
aggggggaca cggcgcgac gacggcgac cgggaggcgg tcgacaaagc gctcgatcat	13560

ctccccgcgg cgacggcgca tggctctcgt gacggcgcgg ccgttctcgc gggggcgag	13620
ttggaagacg ccgccgtca tgtcccggtt atgggttggc ggggggctgc catgcggcag	13680
ggatacggcg ctaacgatgc atctcaaca ttgttgtta ggtactccgc cgccgaggga	13740
cctgagcgag tccgcatcga ccggatcgga aaacctctcg agaaaggcgt ctaaccagtc	13800
acagtgcga ggtaggctga gcaccgtggc gggcggcagc gggcggcggt cggggttgtt	13860
tctggcggag gtgctgctga tgatgtaatt aaagtaggcg gtcttgagac ggcggatggt	13920
cgacagaagc accatgtcct tgggtccggc ctgctgaatg cgcaggcggt cggccatgcc	13980
ccaggcttcg ttttgacatc ggcgagggtc ttigtatgag tcttgcatga gcctttctac	14040
cggcacttct tcttctcctt cctctgtcc tgcctctctt gcctctatcg ctggcgggc	14100
ggcggagitt ggccgtaggt ggcgccctct tcctcccatg cgtgtgaccc cgaagcccct	14160
catcggtga agcagggtca ggtcggcgac aacgcgctcg gctaatatgg cctgctgcac	14220
ctgcgtgagg gtagactgga agtcatccat gtccacaaag cgggtggtatg cgcccggtt	14280
gatggtgtaa gtgcagtgg ccataacgga ccagttaacg gtctggtagc ccggtcgga	14340
gagctcgggtg tacctgagac gcgagtaagc cctcgagtca aatacgtagt cgttgcaagt	14400
ccgcaccagg tacttggtatc ccacaaaaa gtgcggcggc ggctggcggt agaggggcca	14460
gcgtagggtg gccggggctc cggggcgag atcttccaac ataaggcgat gatatccgta	14520
gatgtacctg gacatccagg tgatgccggc ggcggtggtg gaggcgcgcg gaaagtgcg	14580
gacgcgggtc cagatgttgc gcagcgga aaagtgtctc atggtcggga cgctctggcc	14640
ggtcaggcgc gcgcaatcgt tgacgtctta gcgtgcaaaa ggagagcctg taagcgggca	14700
ctcttccgtg gtctgggtga taaattcgca aggggtatcat ggcgagacac cggggttga	14760
gccccgtatc cggccgtccg ccgtgatcca tgcggttacc gcccgcgtgt cgaacccagg	14820
tgtgcgacct cagacaacgg gggagtgtc cttttggctt ccttccaggc gcggcggtg	14880
ctgcgctagc ttttttgcc actggccgcg cgcagcgtaa gcggttaggc tggaaagcga	14940
aagcattaag tggctcgtc cctgtagccg gagggttatt ttccaagggt tgagtcgcg	15000
gacccccgtt tcgagictcg gaccggccgg actgcggcga acgggggttt gcctccccgt	15060
catgcaagac cccgcttga aattcctccg gaaacaggga cgagccccct tttgtcttt	15120
cccagatgca tccggtgctg cggcagatgc gccccctcc tcagcagcgg caagagcaag	15180
agcagcgga gacatgcagg gcacccctcc ctctcctac cgcgtcagga gggcgacat	15240
ccgcggttga cgcggcagca gatggtgatt acgaaccccc gcggcgccgg gcccggcact	15300
acctggactt ggaggagggc gagggcctgg cgcggctagg agcgccctct cctgagcggc	15360
acccaagggt gcagctgaag cgtgatacgc gtgaggcgta cgtgccgcgg cagaacctgt	15420
ttcgcgaccg cgaggagag gagccgagg agatgcggga tcgaaagttc cacgcagggc	15480
gcgagctgcg gcatggcctg aatcgcgagc ggttgctgcg cgaggaggac tttagcccg	15540
acgcgcgaac cgggattagt cccgcgcgcg cacacgtggc ggccgcccgc ctggtaacg	15600
catacgagca gacggtgaac caggagattt actttcaaaa aagctttaac aaccacgtgc	15660
gtacgcttgt ggcgcgcgag gaggtggcta taggactgat gcctctgtgg gactttgtaa	15720
gcgcgctgga gcaaaacca aatagcaagc cgctcatggc gcagctgttc cttatagtc	15780
agcacagcag ggacaacgag gcattcaggg atgcgctgct aaacatagta gagcccagg	15840

gccgctggct gctcgatttg ataaacatcc tgcagagcat agtgggtgcag gagcgagct	15900
tgagccctggc tgacaagggt gccgccatca actattccat gccttagcctg ggcaagtttt	15960
acgcccgcaa gataatacat accccttacg ttcccataga caaggaggta aagatcgagg	16020
ggttctacat gcgcatggcg ctgaagggtc ttaccttgag cgacgacctg ggcgtttatc	16080
gcaacgagcg catccacaag gccgtgagcg tgagccggcg gcgcgagctc agcgaccgcg	16140
agctgatgca cagcctgcaa agggccctgg ctggcacggg cagcgcgcat agagaggcgg	16200
agtcctactt tgacgcgggc gctgacctgc gctggggccc aagccgacgc gccctggagg	16260
cagctggggc cggacctggg ctggcgggtg caccgcgcgc cgctggcaac gtcggcgcg	16320
tggaggaata tgacgaggac gatgagtagc agccagagga cggcgagtac taagcggtag	16380
tgtttctgat cagatgatgc aagacgcaac ggaccggcg gtgcggcgcg cgctgcagag	16440
ccagccgtcc ggcttaact ccacggacga ctggcgccag gtcatggacc gcatcatgtc	16500
gctgactgcg cgcaatctg acgcgttccg gcagcagccg caggccaacc ggctctccgc	16560
aattctggaa gcggtgggtc cggcgcgcg aaacccacg cagcagaagg tgctggcgat	16620
cgtaaacgcg ctggccgaaa acagggccat ccggcccgac gaggccggcc tggctacga	16680
cgcgctgctt cagcgcggtg ctcggttaca cagcgcaac gtgcagacca acctggaccg	16740
gctgtgtggg gatgtgcgcg aggccgtggc gcagcgtgag cgcgcgagc agcagggcaa	16800
cctgggctcc atggttgac taaacgcctt cctgagtaca cagcccga acgtgccgcg	16860
gggacaggag gactacacca actttgtgag cgcactgcgg ctaatggtga ctgagacacc	16920
gcaaagttag gtgtaccagt ctgggcccaga ctatttttc cagaccagta gacaaggcct	16980
gcagaccgtg aacctgagcc aggccttcaa aaacttgag gggctgtggg ggtgctgggc	17040
tcccacaggc gaccgcgcga ccgtgtctag ctgtgtgac cccaactcgc gcctgttgct	17100
gctgctaata gcgcccttca cggacagtgg cagcgtgtcc cgggacacat acctaggtca	17160
cttgttgaca ctgtaccgcg aggccatagg tcaggcgcat gtggacgagc atactttcca	17220
ggagattaca agtgtacgcc gcgcgctggg gcaggaggac acgggcagcc tggaggcaac	17280
cctaaactac ctgtgacca accggcgcca gaagatcccc tcgttgaca gtttaaacag	17340
cgaggaggag cgcattttgc gctacgtgca gcagagcgtg agccttaacc tgatgcgcga	17400
cggggtaacg ccagcgtgg cgctggacat gaccgcgcgc aacatggaac cgggcatgta	17460
tgcctcaaac cgccggttta tcaaccgcct aatggactac ttgcatcgcg cggccgcgt	17520
gaaccccgag tatttaccac atgccatctt gaaccgcac tggctaccgc ccctggttt	17580
ctacaccggg ggattcgagg tgcccagggt taacgatgga ttctctggg acgacataga	17640
cgacagcgtg ttttccccgc aaccgcagac cctgctagag ttgcaacagc gcgagcaggc	17700
agaggcgcg ctgcgaaagg aaagcttccg caggccaagc agcttgtccg atctaggcgc	17760
tgcggccccg cggtcagatg ctagtggccc atttccaagc ttgatagggt ctcttaccag	17820
cactcgacac accgcgccgc gcctgtggg cgaggaggag tacctaaaca actcgctgct	17880
gcagccgcag cgcgaaaaa acctgcctcc ggcatttccc aacaacggga tagagagcct	17940
agtggacaag atgagtagat ggaagacgta cgcgcaggag cacagggacg tgccaggccc	18000
gcgccccccc accgctcgtc aaaggcacga ccgtcagcg ggtctggtgt gggaggacga	18060

tgactcggca gacgacagca gcgtcctgga tttgggaggg agtggcaacc cgtttgcgca	18120
ccttcgcccc aggcctggga gaattgttta aaaaaaaaaa aagcatgatg caaaataaaa	18180
aactcaccaa ggccatggca ccgagcgttg gttttcttgt attccccita gtatgcggcg	18240
cgcgcgcatg tatgaggaag gtcctcctcc ctccctacgag agtgtggiga gcgcggcgcc	18300
agtggcggcg gcgcctgggt ctcccttcga tgcctccctg gacccgccgt ttgtgcctcc	18360
gcggtacctg cggcctaccg gggggagaaa cagcatccgt tactctgagt tggcaccct	18420
attcgacacc acccgttgt accctgggga caacaagtca acggatgtgg catccctgaa	18480
ctaccagaac gaccacagca actttctgac caccgtcatt caaaacaatg actacagccc	18540
gggggaggca agcacacaga ccatcaatct tgacgaccgg tcgcactggg gcggcgacct	18600
gaaaaccatc ctgcatacca acatgccaaa tgtgaacgag ttcattgtta ccaataagtt	18660
taaggcgcgg gtagtggtgt cgcgcttgcc tactaaggac aatcagggtg agctgaaata	18720
cgagtgggtg gaggttcacgc tgcctgaggg caactactcc gagacatga ccatagacct	18780
tatgaacaac gcgacgttg agcactactt gaaagtgggc agacagaacg gggttctgga	18840
aagcgacatc ggggtaaaagt ttgacacccg caacttcaga ctggggtttg accccgtcac	18900
tggctctgtc atgcctgggg tatatacaaa cgaagccttc catccagaca tcattttgct	18960
gccaggatgc ggggtggact tcaccacag ccgcctgagc aacttggttg gcatccgcaa	19020
gcggcaaccc ttccaggagg gctttaggat cacctacgat gatctggagg gtggtaacat	19080
tcccgactg ttggatgttg acgcctacca ggcgagcttg aaagatgaca ccgaacaggg	19140
cgggggtggc gcaggcggca gcaacagcag tggcagcggc gcggaagaga actccaacgc	19200
ggcagcccg gcgaatgcagc cgggtggagga catgaacgat catgccattc gcggcgacac	19260
ctttgccaca cgggctgagg agaagcgcgc tgaggccgaa gcagcggccg aagctgccgc	19320
ccccgtcgc caaccgagg tcgagaagcc tcagaagaaa ccggtgatca aaccctgac	19380
agaggacagc aagaaacgca gttacaacct aataagcaat gacagcacct tcaccagta	19440
ccgcagctgg tactttgcat acaactacgg cgacctcag accggaatcc gctcatggac	19500
cctgctttgc actcctgacg taacctgcgg ctccggagcag gtctactggt cgttgccaga	19560
catgatgcaa gaccccgta ccttcgctc caccgcgag atcagcaact ttccggtggt	19620
ggcgccgag ctgttgcctg tgactccaa gagcttctac aacgaccagg ccgtctactc	19680
ccaactcacc cgccagtta cctctctgac ccacgtgttc aatcgcttcc ccgagaacca	19740
gattttggcg cggccgagc cccccacct caccaccgtc agtgaaaacg ttctgtctct	19800
cacagatcac gggacgctac cgctgcgcaa cagcatcgga ggagtccagc gagtaccat	19860
tactgacgcc agacgcccga cctgccccta cgtttacaag gccctgggca tagtctcgcc	19920
gcgcgtccta tcgagccgca cttttgagc aagcatgtcc atccttatat cgccagcaa	19980
taacacaggc tggggcctgc gcttcccaag caagatgttt ggcggggcca agaagcgtc	20040
cgaccaacac ccagtgcgcg tgcgcgggca ctaccgcgcg ccttggggcg cgcacaaacg	20100
cggccgcact gggcgacca ccgtcgatga cgccatcgac gcggtggtgg aggaggcgcg	20160
caactacacg cccacgccgc caccagtgtc cacagtggac gcggccattc agaccgtggt	20220
gcgcggagcc cggcgctatg ctaaaatgaa gagacggcgg aggcgcgtag cacgtcgcca	20280
ccgccgccga cccggcactg ccgcccaacg gcgcggcgcg gccctgctta accgcgcacg	20340

tcgcaccggc cgacgggagg ccattgcggc cgctcgaagg ctggccggcg gtattgtcac	20400
tgtgcccccc aggtccaggc gacgagcggc cgccgcagca gccgcggcca ttagtgctat	20460
gactcagggc cgcaggggca acgtgtattg ggtgcgcgac tcggtttagcg gcctgcgcgt	20520
gcccgtgcgc acccgcccc cgcgcaacta gattgcaaga aaaaactact tagactcgta	20580
ctgttgtatg tatccagcgg cggcggcgcg caacgaagct atgtccaagc gcaaaatcaa	20640
agaagagatg ctccagggtca tcgcgccgga gatctatggc cccccgaaga aggaagagca	20700
ggattacaag ccccgaagc taaagcgggt caaaaagaaa aagaaagatg atgatgatga	20760
acttgacgac gagggtggaac tgcctgcacgc taccgcgccc aggcgacggg tacagtggaa	20820
aggtcgacgc gtaaaacgtg ttttgcgacc cggcaccacc gtagtcttta cgcccgggtga	20880
gcgctccacc cgcacctaca agcgcgtgta tgatgagggt tacggcgacg aggacctgct	20940
tgagcaggcc aacgagcgcc tcggggaggt tgcctacgga aagcggcata aggacatgct	21000
ggcgttgccg ctggacgagg gcaaccaaac acctagccta aagcccgtaa cactgcagca	21060
ggtgctgccc gcgcttgac cgctcgaaga aaagcgcggc cttaaagcgcg agtctggga	21120
cttggcacc accgtgcagc tgatgggtacc caagcgcag cgactggaag atgtcttga	21180
aaaaatgacc gtggaacctg ggtcggagcc cgaggccgc gtgcggccaa tcaagcaggt	21240
ggcgcgggga ctgggcgtgc agaccgtgga cgctcagata cccactacca gtagcaccag	21300
tattgccacc gccacagagg gcatggagac aaaaacgtcc ccggttgcct cagcgggtggc	21360
ggatgccgcg gtgcaggcgg tcgctgcggc cgctccaag acctctacgg aggtgcaaac	21420
ggaccctgg atgttctgcg tttcagcccc ccggcgcccc cgccgttcga ggaagtacgg	21480
cgccgccagc gcgctactgc ccgaatatgc cctacatcct tccattgcgc ctacccccgg	21540
ctatcgtggc tacacctacc gcccagaag acgagcaact acccgacgcc gaaccaccac	21600
tggaaaccgc cgccgccgtc gccgtcgcca gcccgctgt gcccagatt ccgtgcgcag	21660
ggtggctcgc gaaggaggca ggaacctggt gctgccaaca gcgcgctacc accccagcat	21720
cgtttaaaag ccggtcttgc tggttcttgc agatatggcc ctacacctgcc gcctccgttt	21780
cccggtgccg ggattccgag gaagaatgca ccgtaggagg ggcatggccg gccacggcct	21840
gacgggaggc atgcgtcgtg cgcaccaccg gcggcgggcg gcgtcgacc gtcgcatgcg	21900
cgcgcggtatc ctgccccctc ttattccact gatcgccgcg gcgattggcg ccgtgcccgg	21960
aattgcatcc gtggccttgc aggcgcagag acactgatta aaaacaagtt gcatgtggaa	22020
aaatcaaaat aaaaagctgc gactctcacg ctgccttggc cctgtaacta tttttagaa	22080
tggaaagacat caactttgcg tctctggccc cgcgacacgg ctgcgccccg ttcattggaa	22140
actggcaaga tatcggcacc agcaatatga gcggtggcg cttcagctgg ggtcgcgtgt	22200
ggagcggcat taaaaatttc ggttccaccg ttaagaacta tggcagcaag gcctggaaca	22260
gcagcacagg ccagatgctg agggataagt tgaagagca aaatttccaa caaaagggtg	22320
tagatggcct ggctctggc attagcgggg tggtagacct ggccaaccag gcagtgcaaa	22380
ataagattaa cagtaagctt gatccccgcc ctcccgtaga ggagcctcca ccggccgtgg	22440
agacagtgtc tccagagggg cgtggcgaaa agcgtccgcg ccccgacagg gaagaaactc	22500
tggtagcgca aatagacgag cctccctcgt acgaggaggc actaaagcaa ggcctgcccc	22560

ccacccgtcc catcgcgccc atggctaccg gaggctggg ccagcacaca cccgtaacgc	22620
tggacctgcc tccccccgcc gacaccagc agaaacctgt gctgccaggc ccgaccgccg	22680
ttgttgtaac ccgtcctagc cgcgcgtccc tgcgccgcgc cgccagcggc ccgcgatcgt	22740
tgcggcccgt agccagtggc aactggcaaa gcacacigaa cagcatcgtg ggtctggggg	22800
tgcaatccct gaagcgccga cgaatgttct gatagctaac gtgtcgtatg tgtgtcatgt	22860
atgcgtccat gtgcgcccca gaggagctgc tgagccgccg cgcgcccgct ttccaagatg	22920
gctacccctt cgaatgatcc gcagtgttct tacatgcaca tctcgggcca ggacgcctcg	22980
gagtacctga gccccgggct ggtgcagttt gcccgcgcca ccgagacgta cttcagcctg	23040
aataacaagt ttgaaacccc caccgtggcg cctacgcacg acgtgaccac agaccgggtcc	23100
cagcgtttga cgctgcgggt catccctgtg gaccgtgagg atactgcgta ctctgtaaac	23160
gcgcggttca ccttagctgt ggggtgataac cgtgtgctgg acatggcttc cactgacttt	23220
gacatccgcg gcgtgctgga caggggccct acttttaagc cctactctgg cactgcctac	23280
aacgcccctg ccccccaagg tgcacaaat ccttgcgaat gggatgaagc tgctactgct	23340
cttgaaataa acctagaaga agaggacgat gacaacgaag acgaagtaga cgagcaagct	23400
gagcagcaaa aaactcacgt atttgggcag gcgccttatt ctggtataaa tattacaaag	23460
gagggatttc aaatagggtg cgaagggtcaa acacctaaat atgccgataa aacatttcaa	23520
cctgaaccct aaataggaga atctcagtgg tacgaaacag aaattaatca tgcagctggg	23580
agagtcctaa aaaagactac cccaatgaaa ccatgttacg gttcatatgc aaaaccaca	23640
aatgaaaatg gagggcaagg cattcttgta aagcaacaaa atggaaagct agaaagtcaa	23700
gtggaaatgc aatttttctc aactactgag gcagccgcag gcaatggtga taacttgact	23760
cctaaagtgg tattgtacag tgaagatgta gatatagaaa cccagacac tcatatttct	23820
tacatgcccc ctattaagga aggttaactca cgagaactaa tgggccaaca atctatgccc	23880
aacaggccct attacattgc ttttagggac aattttattg gtctaattga ttacaacagc	23940
acgggtaata tgggtgttct ggccggccaa gcatcgcatg tgaatgctgt ttagatttg	24000
caagacagaa acacagagct ttcataccag ctttgccttg attccattgg tgatagaacc	24060
aggctacttt ctatgtggaa tcaggctgtt gacagctatg atccagatgt tagaattatt	24120
gaaaatcatg gaactgaaga tgaacttcca aattactgct ttccactggg aggtgtgatt	24180
aatacagaga ctcttaccaa ggtaaaacct aaacaggctc aggaaaatgg atgggaaaaa	24240
gatgctacag aattttcaga taaaaatgaa ataagagttg gaaataattt tgccatggaa	24300
atcaatctaa atgccaacct gtggagaaat ttctgtact ccaacatagc gctgtatttg	24360
cccgacaagc taaagtacag tccttccaac gtaaaaattt ctgataaccc aaacacctac	24420
gactacatga acaagcgagt ggtggctccc gggttagtgg actgctacat taaccttgga	24480
gcacgtggt ccttgacta tatggacaac gtcaacccat ttaaccacca ccgcaatgct	24540
ggcctgcgct accgctcaat gttgctgggc aatggctcgt atgtgccctt ccacatccag	24600
gtgcctcaga agttctttgc cattaaaaac ctcttctcc tgcgggctc atacacctac	24660
gagtggaaat tcaggaagga tgtaaatatg gttctgcaga gctccctagg aaatgacct	24720
agggttgacg gagccagcat taagtttgat agcatttgcc ttacgccac ctcttcccc	24780
atggcccaca acaccgcctc cagcttgag gccatgctta gaaacgacac caacgaccag	24840

tcctttaacg actatctctc cgccgccaac atgctctacc ctatacccg ccaacgctacc	24900
aacgtgcccc tatccatccc ctcccgaac tggcgggctt tccgcggctg ggccttcacg	24960
cgccttaaga ctaaggaaac cccatcactg ggctcgggct acgaccctta ttacacctac	25020
tctggctcta taccctacct agatggaacc ttttacctca accacacctt taagaagggtg	25080
gccattacct ttgactcttc tgtcagctgg cctggcaatg accgcctgct taccaccaac	25140
gagtttgaaa ttaagcgctc agttgacggg gaggggttaca acgttgccca gtgtaacatg	25200
accaaagact gggtcctggt acaaatgcta gctaaactata acattggcta ccagggtctc	25260
tatatcccag agagctacaa ggaccgcatg tactccttct ttagaaactt ccagcccatg	25320
agccgtcagg tgggtgaiga tactaaatac aaggactacc aacagggtggg catctacac	25380
caacacaaca actctggatt tgttggctac ctgtccccc ccatgcgca aggacaggcc	25440
taccctgcta acttccccta tccgcttata ggcaagaccg cagttgacag cattaccag	25500
aaaaagtttc ttgcatcg cacccttgg cgcatcccat tctccagtaa ctttatgtcc	25560
atggcgcac tcacagacct gggccaaaac cttctctac ccaactccgc ccacgcgcta	25620
gacatgactt ttgaggtgga tcccatggac gagccaccc tctttatgt tttgtttgaa	25680
gtctttgacg tgggtccgtgt gcaccagccg caccgcggcg tcatcgaaac cgtgtacctg	25740
cgcacgccct tctcgccgg caacgccaca acataaagaa gcaagcaaca tcaacaacag	25800
ctgccgcat gggtccagt gagcaggaac tgaaagccat tgtcaaagat ctgggttgtg	25860
ggccatatit ttggggcacc tatgacaagc gctttccagg ctttgtttct ccacacaagc	25920
tgcctgctgc catagtcaat acggccggtc gcgagactgg gggcgctacac tggatggcct	25980
ttgcctggaa cccgcactca aaaacatgct accttttga gccctttggc ttttctgacc	26040
agcgactcaa gcaggtttac cagtttagt acgagtcact cctgcgccgt agcgccattg	26100
cttcttcccc cgaccgtgt ataacgttg aaaagtcac ccaaagcgtc caggggcccc	26160
actcgccgc ctgtggacta ttctgtctga tgtttctcca cgcttttgcc aactggcccc	26220
aaactcccat ggatcacaac cccaccatga accttattac cgggggtacc aactccatgc	26280
tcaacagtcc ccaggtacag cccaccctgc gtcgcaacca ggaacagctc tacagcttcc	26340
tggagcgcca ctgcctctac ttccgcagcc acagtgcgca gattaggagc gccacttctt	26400
tttgtcactt gaaaaacatg taaaaataat gtactagaga cactttcaat aaaggcaa	26460
gcttttattt gtacactctc ggggtgattt ttaccccc ccttgccgtc tgcgccgttt	26520
aaaaatcaaa ggggttctgc cgcgcatcgc tatgcgccac tggcagggac acgttgcgat	26580
actgggtgtt agtgctccac ttaactcag gcacaacat ccgcggcagc tcggtgaagt	26640
tttactcca caggctgcgc accatcacca acgcttttag caggctgggc gccgatatct	26700
tgaagtgcga gtgggggcct ccgcccctgc cgcgcgagtt gcgatacaca gggttgcagc	26760
actggaacac talcagcgc ggggtgtgca cgctggccag cagctcttg tcggagatca	26820
gatccgctc caggctctcc gcgttgctca gggcgaacgg agtcaacttt gtagctgcc	26880
ttcccaaaaa gggcgctgc ccaggctttg agttgcactc gcaccgtagt ggcatcaaaa	26940
ggtgaccgtg cccggtctgg gcgttaggat acagcgctg cataaaagcc ttgatctgct	27000
taaaagccac ctgagccitt gcgccttcag agaagaacat gccgcaagac ttgccggaaa	27060

actgattggc cggacaggcc gcgtcgtgca cgcagcacct tgcgtcggtg ttggagatct	27120
gcaccacatt tggccccac cggttcttca cgaicttggc ctigtctagac tgctccttca	27180
gcgcgcgctg cccgttttctg ctctgcacat ccaattcaat cacgtgctcc ttatttatca	27240
taatgtttcc gtgtagacac ttaagctcgc ctctgaltc agcgcagcgg tgcagccaca	27300
acgcgcagcc cgtgggctcg tgatgcttgt aggtcacctc tgcaaacgac tgcaggtagc	27360
cctgcaggaa tcgccccatc atcgtcacia aggtcttgtt gctggtagaag gtcagctgca	27420
accgcgggtg ctctctgttc agccaggctt tgcatagggc cgccagagct tccacttggt	27480
caggcagtag tttagaagtt gcccttagat cgttatccac gtggtagctt tccatcagcg	27540
cgcgcgcagc ctccatgccc ttctcccacg cagacacgat cggcacactc agcgggttca	27600
tcaccgtaat ttcactttcc gcttctgttg gctcttctc ttctcttgc gtccgcatac	27660
cacgcgccac tgggtcgtct tcatcagcc gccgcactgt gcgcttacct cctttgccat	27720
gcttgattag caccgggtgg ttgctgaaac ccaccatttg tagcgccaca tcttctctt	27780
cttctctgct gtccacgatt acctctgggt atggcgggcg ctccggcttg ggagaagggc	27840
gcttcttttt ctcttgggc gcaatggcca aatccgccgc cgaggctgat ggccgcgggc	27900
tgggtgtcgc cggcaccagc gcgtcttgt atgagcttct ctctctctcg gactcgatac	27960
gccgcctcat ccgctttttt gggggcgccc ggggaggcgg cggcgacggg gacggggacg	28020
acacgtctc catggttggg ggacgtcgc ccgcaccgcg tccgcgctcg ggggtggtt	28080
cgcgctgct ctcttccga ctggccattt ccttctctta taggcagaaa aagatcatgg	28140
agtcagtcga gaagaaggac agcctaaccg cccctctga gttcgccacc accgcctcca	28200
ccgatgccg caacgcgctt accaccttcc ccgtcaggc acccccgctt gaggaggagg	28260
aagtgattat cgagcaggac ccaggttttg taagcgaaga cgacgaggac cgctcagtac	28320
caacagagga taaaaagcaa gaccaggaca acgcagaggc aaacgaggaa caagtcgggc	28380
ggggggacga aaggcatggc gactacctag atgtgggaga cgacgtgctg ttgaagcatc	28440
tgcagcgcca gtgcgccatt atctgcgacg cgttgcaaga gcgcagcgat gtccccctcg	28500
ccatagcgga tgtcagcctt gcctacgaac gccacctatt ctaccgcgc gtacccccca	28560
aacgccaaga aaacggcaca tgcgagccca acccgcgctt caacttctac cccgtatttg	28620
ccgtgccaga ggtgcttgcc acctatcaca tctttttcca aaactgcaag ataccctat	28680
cctgccgtgc caaccgcagc cgagcggaca agcagctggc ctgcggcag ggcgctgtca	28740
tacctgatat cgctctgctc aacgaagtgc caaaaatctt tgagggtctt ggacgcgacg	28800
agaagcgcgc ggcaaacgct ctgcaacagg aaaacagcga aatgaaagt cactctggag	28860
tgttgggtga actcgagggt gacaacgcgc gcctagccgt actaaaacgc agcatcgagg	28920
tcaccactt tgccctaccg gcacttaacc taccccccaa ggtcatgagc acagtcatga	28980
gtgagctgat cgtgcgccgt gcgcagcccc tggagaggga tgcaaatitg caagaacaaa	29040
cagaggaggg cctaccgcga gttggcgacg agcagctagc gcgctggctt caaacgcgcg	29100
agcctgccga cttggaggag cgacgcaaac taatgatggc gcagtgctc gttaccgtgg	29160
agcttgagt catgcagcgg ttctttgctg acccgagat gcagcgcaag ctagaggaaa	29220
cattgcacta cacctttcga cagggtacg tacgccaggc ctgcaagatc tccaacgtgg	29280
agctctgcaa cctgtcttcc taccttggaa tttgcacga aaaccgcctt gggcaaaacg	29340

tgcttcattc cacgctcaag ggcgaggcgc gccgcgacta cgtccgcgac tgcgtttact	29400
tattttctatg ctacacctgg cagacggcca tgggcgtttg gcagcagtgc ttggaggagt	29460
gcaacctcaa ggagctgcag aaactgctaa agcaaaactt gaaggacctt tggacggcct	29520
tcaacgagcg ctccgtggcc gcgcacctgg cggacatcat tttccccgaa cgcttgctta	29580
aaaccttgca acagggctcg ccagacttca ccagtcaaag catgttgagc aactttagga	29640
actttatcct agagcgctca ggaatcttgc ccgccacctg ctgtgcactt cctagcgact	29700
ttgtgcccat taagtaccgc gaatgccctc cgccgctttg gggccactgc taccttctgc	29760
agctagccaa ctaccttgcc taccactctg acataatgga agacgtgagc ggtgacggtc	29820
tactggagtg tcactgtcgc tgcaacctat gcaccccgca ccgctccctg gtttgcaatt	29880
cgcagctgct taacgaaagt caaattatcg gtaccttga gctgcagggt ccctcgctg	29940
acgaaaagtc cgcggctccg gggttgaaac tcactccggg gctgtggacg tcggcttacc	30000
ttcgcaaatt tgtacctgag gactaccacg cccacgagat taggttctac gaagaccaat	30060
cccgcccgcc taatgcggag ctaccgcct gcgtcattac ccaggggccac attcttggcc	30120
aattgcaagc catcaacaaa gcccgcgaag agtttctgct acgaaaggga cgggggggtt	30180
acttggaccc ccagtcggc gaggagctca acccaatccc cccgcccgcc cagccctatc	30240
agcagcagcc gcgggccctt gcttcccagg atggcaccca aaaagaagct gcagctgccg	30300
ccgccaccca cggacgagga ggaatactgg gacagtcagg cagaggaggt ttggacgag	30360
gaggaggagg acatgatgga agactgggag agcctagacg aggaagcttc cgaggtcgaa	30420
gagggtgcag acgaaacacc gtcaccctcg gtcgcattcc cctcgccggc gccccagaaa	30480
tcggcaaccg gttccagcat ggctacaacc tccgtcctc aggcgccgcc ggcactgccc	30540
gttcgccgac ccaaccgtag atgggacacc acttgaacca gggccggtaa gtccaagcag	30600
ccgccgccgt tagcccaaga gcaacaacag cgccaaggct accgctcatg gcgcgggcac	30660
aagaacgcca tagttgcttg cttgcaagac tgtgggggca acatctcctt cgcccgcgc	30720
tttcttctct accatcacgg cgtaggcctt ccccgtaaca tcctgcatta ctaccgtcat	30780
ctctacagcc catactgcac cggcggcagc ggcagcaaca gcagcggcca cacagaagca	30840
aaggcgaccg gatagcaaga ctctgacaaa gcccagaaa tccacagcgg cggcagcagc	30900
aggaggagga gcgtgcgtc tggcgcccaa cgaacccgta tcgacccgcg agcttagaaa	30960
caggatTTTT cccactctgt atgctatatt tcaacagagc aggggccaag aacaagagct	31020
gaaaaataaaa aacaggcttc tgcgatccct caccgcgagc tgcctgtatc acaaaagcga	31080
agatcagctt cggcgcacgc tggaagacgc ggaggctctc ttcagtaaat actgcgcgct	31140
gactcttaag gactagtctt gcgcccttcc tcaaatttaa gcgcgaaaac tacgtcatct	31200
ccagcggcca caccgggcgc cagcacctgt tgtcagcgcc attatgagca aggaaattcc	31260
cacgccctac atgtggagtt accagccaca aatgggactt gcggctggag ctgcccaga	31320
ctactcaacc cgaataaact acatgagcgc gggacccac atgatatccc gggtaacgg	31380
aatacgcgcc caccgaaacc gaattctcct ggaacaggcg gctattacca ccacacctcg	31440
taataacctt aatccccgta gtggcccgcc tgccctgggt taccaggaaa gtcccgtcc	31500
caccactgtg gtacttccca gagacgcca ggccgaagtt cagatgacta actcaggggc	31560

gcagcttgcg ggcggctttc gtcacagggg gcggtcgccc gggcagggtg taactcacct	31620
gacaatcaga gggcgagggt ttcagctcaa cgacgagtcg gtgagctcct cgcttgggtct	31680
ccgtccggac gggacatttc agatcgggcg cgccggccgc tcttcattca cgcctcgtca	31740
ggcaatccta actctgcaga cctcgtcctc tgagccgcgc tcigggaggca ttggaactct	31800
gcaatttatt gaggagtttg tgccatcggg ctactttaac cctttctcgg gacctcccgg	31860
ccactatccg gatcaattta ttccctaact tgacgcggta aaggactcgg cggacggcta	31920
cgactgaatg ttaagtggag aggcagagca actgcgcctg aaacacctgg tccactgtcg	31980
ccgccacaag tgctttgccc gcgactccgg tgagtittgc tactttgaat tgcccaggga	32040
tcatatcgag gggccggcgc acggcgctcg gcttaccgcc caggagagagc ttgcccgtag	32100
cctgattcgg gaggtttacc agcgccccct gctagttgag cgggacaggg gacctgtgt	32160
tctcactgtg atttgcaact gtcctaacc tggattacat caagatctta ttcccttta	32220
ctaataaaaa aaaataataa agcatcactt acttaaaatc agttagcaaa tttctgtcca	32280
gtttattcag cagcacctcc ttgccctcct ccagctctg gtattgcagc ttccctcctg	32340
ctgcaaactt tctccacaat ctaaatggaa tgcagtttc ctctgttcc tgtccatccg	32400
caccactat ctcatgttg ttgcagatga agcgcgcaag accgtctgaa gataccttca	32460
accccgta tccatatgac acggaaaccg gtccccaac tgtgcctttt cttactcctc	32520
ccittgtatc cccaatggg ttcaagaga gtccccctgg ggtactctct ttgcgcctat	32580
ccgaacctct agttacctcc aatggcatgc ttgcgctcaa aatgggcaac ggcctctctc	32640
tggacgaggc cggcaacctt acctcccaa atgtaaccac tgtgagccca cctctcaaaa	32700
aaaccaagtc aaacataaac ctggaaatat ctgcaccctt cacagttacc tcagaagccc	32760
taactgtggc tgccgccgca cctctaattg tcgcgggcaa cacactcacc atgcaatcac	32820
aggccccgt aaccgtgcac gactccaaac ttagcatigc cacccaagga cccctcacag	32880
tgtcagaagg aaagctagcc ctgcaaacat caggccccct caccaccacc gatagcagta	32940
cccttactat cactgcctca cccctctaa ctactgccac tggtagcttg ggcatigact	33000
tgaagagcc catttataca caaaatggaa aactaggact aaagtacggg gctcctttgc	33060
atgtaacaga cgacctaac actttgaccg tagcaactgg tccagggtgt actattaata	33120
atacttctt gcaaaactaa gttactggag ccttgggttt tgattcaca ggcaatatgc	33180
aacttaatgt agcaggagga ctaaggattg attctcaaaa cagacgcctt atacttgatg	33240
ttagttatcc gtttgatgct caaaaccaac taaatctaag actaggacag ggcctcttt	33300
ttataaactc agcccacaac ttggatatta actacaaca aggcctttac ttgtttacag	33360
cttcaaaaaa ttcaaaaag cttgagggtta acctaaagc tgccaagggg ttgatgtttg	33420
acgtacagc catagccatt aatgcaggag atgggcttga atttggttca cctaagcac	33480
caaacacaaa tccctcaaa acaaaaattg gccatggcct agaatttgat tcaaacagg	33540
ctatggttcc taaactagga actggcctta gttttgacag cacagggtgcc attacagtag	33600
gaaacaaaaa taatgataag ctaactttgt ggaccacacc agtccatct cctaactgta	33660
gactaaatgc agagaaagat gctaaactca ctttggcttt aacaaaatgt ggcagtcaaa	33720
tacttgctac agtttcagtt ttggctgtta aaggcagttt ggctccaata tctggaacag	33780
ttcaaagtgc tcatcttatt ataagatttg acgaaaatgg agtgctacta aacaattcct	33840

tcctggaccc agaataattgg aacttttagaa atggagatct tactgaaggc acagcctata	33900
caaacgcigt tggatttatg cctaacctat cagcttatcc aaaatctcac ggtaaaactg	33960
ccaaaagtaa cattgtcagt caagtttact taaacggaga caaaactaaa cctgtaacac	34020
taaccattac actaaacggt acacaggaaa caggagacac aactccaagt gcatactcta	34080
tgtcattttc atgggactgg tctggccaca actacattaa tgaaatattt gccacatcct	34140
cttacacitt ttacataatt gcccagaat aaagaatcgt ttgtgttatg tttcaacgtg	34200
ttttttttt aattgcagaa aatttcaagt catttttcat tcagtagtat agccccacca	34260
ccacatagct tatacagatc accgtacctt aatcaaactc acagaaccct agtattcaac	34320
ctgccacctc cctcccaaca cacagagtac acagtccitt ctccccggct ggccttaaaa	34380
agcatcatat catgggtaac agacataatc ttaggtgita tattccacac ggtttcctgt	34440
cgagccaaac gctcatcagt gatattaata aatccccgg gcagctcact taagttcatg	34500
tgcgtgtcca gctgtgagc cacaggctgc tgtccaactt gcggttgctt aacgggcggc	34560
gaaggagaag tccacgccta catgggggta gagtcataat cgtgcatcag gataggcgcg	34620
tgggtgtgca gcagcgcgcg aataaactgc tgcgcggcc gctccgtcct gcaggaatac	34680
aacatggcag tggctctctc agcgtatgatt cgcaccgccc gcagcataag gcgccttgtc	34740
ctccgggcac agcagcgcac cctgatctca cttaaactag cacagtaact gcagcacagc	34800
accacaatat tgttcaaaat cccacagtgc aaggcgctgt atccaaagct catggcgggg	34860
accacagaac ccacgtggcc atcataccac aagcgcaggt agattaagtg gcgaccctc	34920
ataaacacgc tggacataaa cattacctct ttggcatgt tghtaattcac cacctccgg	34980
taccatataa acctctgatt aaacatggcg ccatccacca ccatcctaaa ccagctggcc	35040
aaaacctgcc cgcgggctat acactgcagg gaaccgggac tggacaatg acagtggaga	35100
gcccaggact cgtaacatg gatcatcatg ctgctcatga tatcaatgtt ggcacaacac	35160
aggcacacgt gcatacatt cctcaggatt acaagctcct cccgcgttag aaccatatcc	35220
cagggaacaa cccattcctg aatcagcgta aatccacac tgcagggaag acctcgcacg	35280
taactcacgt tgtgcattgt caaagtgtta cattcgggca gcagcggatg atcctccagt	35340
atggtagcgc gggtttctgt ctcaaaagga ggtagacgat ccctactgta cggagtgcgc	35400
cgagacaacc gagatcgtgt tggctcgtagt gtcatgccaa atggaacgcc ggacgtagtc	35460
atatttcctg aagcaaaacc aggtgcgggc gtgacaaaca gatctgcgtc tccggtctcg	35520
ccgcttagat cgtctgtgt agtagttgta gtatatccac tctctcaaag catccaggcg	35580
ccccctggct tcgggttcta tgtaaactcc ttcatgcgcc gctgccctga taacatccac	35640
caccgcagaa taagccacac ccagccaacc tacacattcg ttctgcgagt cacacacggg	35700
aggagcggga agagctggaa gaaccatgtt tttttttta ttccaaaaga ttatccaaaa	35760
cctcaaaaig aagatctatt aagtgaacgc gctccccctc ggtggcgtgg tcaaaactta	35820
cagccaaaga acagataatg gcatttgtaa gatgtgcac aatggcttcc aaaaggcaaa	35880
cggccctcac gtccaagtgg acgtaaaggc taaaccttc aggggtgaatc tcctctataa	35940
acattccagc accttcaacc atgcccaaat aattctcctc tcgccacctt ctcaatatat	36000
ctctaagcaa atcccgaata ttaagtccgg ccattgtaaa aatctgctcc agagcgcct	36060

```

ccaccttcag cctcaagcag cgaatcatga ttgcaaaaat tcaggttcct cacagacctg 36120
tataagattc aaaagcggaa cattaacaaa aataccgcga tcccgtaggt cccttcgcag 36180
ggccagctga acataatcgt gcaggctcgc acggaccagc gcggccactt ccccgccagg 36240
aaccatgaca aaagaaccca cactgattat gacacgcata ctccggagcta tgctaaccag 36300
cgtagccccg atgtaagcct gtgcatggg cgccgatata aaatgcaagg tgctgctcaa 36360
aaaaatcaggc aaagcctcgc gcaaaaaaga aagcacatcg tagtcatgct catgcagata 36420
aaggcaggta agctccggaa ccaccacaga aaaagacacc atttttctct caaacaigtc 36480
tgccgggttc tgcataaaca caaaataaaa taacaaaaaa acatttaaac attagaagcc 36540
tgtcttaca caggaaaaac aacccttata agcataagac ggactacggc catgccggcg 36600
tgaccgtaaa aaaactggc accgtgatta aaaagcacca ccgacagctc ctccgtcatg 36660
tccggagcta taatgtaaga ctccgtaaac acatcagggt gattcacatc ggctcagtgt 36720
aaaaagcgac cgaatatagc cgggggaata cataccgcga ggctagaga caacattaca 36780
gccccatag gaggtataac aaaattaata ggagagaaaa acacataaac acctgaaaaa 36840
ccctcccgcc taggcaaaat agcacccctc cgctccagaa caacatacag cgcttccaca 36900
gcggcagcca taacagtcag ccttaccagt aaaaaagaaa acctattaaa aaaacaccac 36960
tcgacacggc accagctcaa tcagtcacag tgtaaaaaag ggccaagtgc agagcgagta 37020
tatataggac taaaaaatga cgtaacgggt aaagtcaca aaaaacaccc agaaaaccgc 37080
acgcgaacct acgcccagaa acgaaaagcca aaaaaccac aacttcctca aatcgctact 37140
tccgttttcc caggttacgt cacttcccat ttttaaaaa ctacaattcc caacacatac 37200
aagttactcc gccctaaaac ctacgtcacc cgccccgttc ccacgccccg cgccacgtca 37260
caaaactccac cccctcatta tcatattggc ttcaatccaa aataaggat attattgatg 37320
atg 37323

```

<210> 5
 <211> 12166
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Ad-RTS-mIL-12係VVN2539

```

<400> 5
taaacaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac 60
cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca 120
agaaaattaa ttaagctagc atcatcaata atatacctta ttttgattg aagccaatat 180
gataatgagg ggggtggagtt tgtgacgtgg cgcggggcgt gggaacgggg cgggtgacgt 240
agtagtgtag cggaagtgtg atgttgcaag tgtggcggaa cacatgtaag cgacggatgt 300
ggcaaaagtg acgtttttgg tgtgcgccgg tgtacacagg aagtgacaat tttcgcgccg 360
ttttaggcgg atgttgtagt aaatttgggc gtaaccgagt aagatttggc cattttcgcg 420
ggaaaactga ataagaggaa gtgaaatctg aataattttg tgttactcat agcgcgtaat 480
atttgtctag ggagatccgg taccggcgcg cgcgccgttt ggccgcctcg agtctagaga 540
tccggtgagt gattaggcgc gcaccagggt ccgcaataaa atatctttat tttcattaca 600
tctgtgtgtt ggttttttgt gtgaatcgat agtactaaca tacgctctcc atcaaaacaa 660

```

aacgaaacaa aacaaactag caaaataggc tgtcccccagt gcaagtgcag gtgccagaac	720
atttctctat cgataatgca ggtcggagta ctgtcctccg agcggagtac tgtcctccga	780
gcggagtact gtccctccgag cggagtactg tcctccgagc ggagtactgt cctccgagcg	840
gagtactgtc ctccgagcgg agactcttcg aaggaagagg ggccggggtcg atcgaccccg	900
cccctcttcc ttccaaggaa gaggggcggg gtcgaagacc tagagggtat ataatgggtg	960
ccttagctgg tgtgtgagct catcttccig tagatcacgc gtgccacat gtgtcctcag	1020
aagctaacca tctcctgggt tgcctatcgt ttgttgggt ctccactcat ggccatgtgg	1080
gagctggaga aagacgttta tgtttagag gtggactgga ctcccgatgc ccttgagaa	1140
acagtgaacc tcacctgtga cagccctgaa gaagatgaca tcacctggac ctgagaccag	1200
agacatggag tcataggctc tggaaagacc ctgacatca ctgtcaaaga gtttctagat	1260
gttggccagt acacctgcca caaaggaggc gagactctga gccactcaca tctgtgtctc	1320
cacaagaagg aaaatggaat ttggtccact gaaattttaa aaaatttcaa aaacaagact	1380
ttccitgaagt gtgaagcacc aaattactcc ggacgggtca cgtgtctcat gctgggtgaa	1440
agaaacatgg acttgaagtt caacatcaag agcagtagca gtcccccca ctctcgggca	1500
gtgacatgtg gaatggcgtc tctgtctgca gagaaggta cactggacca aagggaactat	1560
gagaagtatt cagtgtctc ccaggaggat gtcacctgcc caactgccga ggagaccctg	1620
cccatgaac tggcgttggg agcacggcag cagaataaat atgagaacta cagcaccagc	1680
ttcttcatca gggacatcat caaaccagac ccgcccaaga acttgcagat gaagcctttg	1740
aagaactcac aggtggaggt cagctgggag taccctgact cctggagcac tccccattcc	1800
tacttctccc tcaagtcttt tgttcgaatc cagcgcaaga aagaaaagat gaaggagaca	1860
gaggagggtt gtaaccagaa aggtgcgttc ctcttagaga agacatctac cgaagtccaa	1920
tgcaaaggcg ggaatgtctg cgtgcaagct caggatcgct attacaattc ctcatgcagc	1980
aagtgggcat gtgttccctg cagggctcca tcctaggatg caacggatcc gaattccgcc	2040
cccctctccc tcccccccc ctacgtttac tggccgaagc cgcttggaa aaggccggtg	2100
tgcgtttgtc tatatgttat ttccacat attgccgtct tttggcaatg tgagggcccg	2160
gaaacctggc cctgtcttct tgacgagcat tcctagggtt ctttcccctc tcgccaaagg	2220
aatgcaaggt ctgttgaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt ctggaagaca	2280
aacaacgtct gtagcgacct ttgacaggca gcggaacccc ccacctggcg acaggtgcct	2340
ctgcggccaa aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaa cccagtacca	2400
cgttgtgagt tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tcctcaagcg tattcaaca	2460
ggggctgaag gatgccaga aggtacccca ttgtatggga tctgatctgg ggcctcgggtg	2520
cacatgcttt acatgtgttt agtcgagggt aaaaaaacgt ctaggccccc cgaaccacgg	2580
ggacgtgggt ttcttttgaa aaacacgatg ataatatggc cacaacctg ggtcaatcac	2640
gctacctctt ctttttggcc acccttggcc tcctaaacca cctcagtttg gccagggtca	2700
ttccagtctc tggacctgcc aggtgtctta gccagtccc aaacctgtg aagaccacag	2760
atgacatggt gaagacggcc agagaaaagc tgaacatta ttctgcact gctgaagaca	2820
tcgatcatga agacatcaca cgggaccaa ccagcacatt gaagacctgt ttaccactgg	2880

aactacacaa gaacgagagt tgccitggcta ctagagagac ttcttccaca acaagaggga	2940
gctgcctgcc cccacagaag acgtctttga tgaigaccct gtgccttggg agcatctatg	3000
aggacitgaa gatgtaccag acagagttcc aggccatcaa cgcagcactt cagaatcaca	3060
accatcagca gatcattcta gacaaggga tgctgggtggc catcgaigag ctgatgcagt	3120
ctctgaatca taatggcgag actctgcgcc agaaacctcc tgtgggagaa gcagaccctt	3180
acagagttaa aatgaagctc tgcattctgc ttacagcctt cagcaccgc gtcgtgacca	3240
tcaacagggt gatgggctat ctgagctccg cctgagtcga catcgagaac ttgtttattg	3300
cagcittataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa ttccacaaat aaagcatttt	3360
tttactgca ttctagtgtt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctggc	3420
gcgccggcct ccgcgccggg ttttggcgcc tcccgcgggc gccccctcc tcacggcgag	3480
cgctgccacg tcagacgaag ggcgaggag cgtcctgac cttccgccc gacgctcagg	3540
acagcgcccc gctgctcata agactcggcc ttagaacccc agtatcagca gaaggacatt	3600
ttaggacggg acttgggtga ctctaggga ctggtttct ttccagagag cggaacaggc	3660
gaggaaaagt agtcccttct cggcgattct gcggagggat ctccgtgggg cggtaacgc	3720
cgatgattat ataaggacgc gccgggtgtg gcacagctag ttccgtcgca gccgggattt	3780
gggtcgcggt tcttgtttgt ggatcgtgt gatcgtcact tggtagtag cgggctgctg	3840
ggctgggtac gtgcgctcgg ggttggcgag tgtgtttgt gaagtttttt aggcaccttt	3900
tgaatgtaa tcatitgggt caatatgtaa ttttcagtgt tagactagta aattgtccgc	3960
taaatcttgg ccgttttttg cttttttgtt agacgagcta gcgccgccac catgggccct	4020
aaaaagaagc gtaaagtcgc cccccgacc gatgtcagcc tgggggacga gctccactta	4080
gacggcgagg acgtggcgat ggcgcatgcc gacgcgctag acgatttcga tctggacatg	4140
ttgggggacg gggattcccc ggggcccggga ttaccctccc acgactccgc ccctacggc	4200
gctctggata tggccgactt cgagtttgag cagatgttta ccgatgccct tggaaattgac	4260
gagtacgggt gggaattcga gatgcctgtg gacaggatcc tggaggcaga gcttgcgtg	4320
gaacagaaga gtgaccaggg cgttgagggt cctgggggaa ccgggggtag cggcagcagc	4380
ccaaatgacc ctgtgactaa catctgtcag gcagctgaca aacagctatt cacgcttgtt	4440
gagtgggcga agaggatccc acacttttcc tcttgcctc tggatgatca ggtcatattg	4500
ctgcgggcag gctggaatga actcctcatt gcctcctttt cacaccgatc cattgatgtt	4560
cgagatggca tctccttgc cacaggctctt cactgcacc gcaactcagc ccattcagca	4620
ggagtaggag ccatctttga tcgggtgctg acagagctag gtccaaaat gcgtgacatg	4680
aggatggaca agacagagct tggctgcctg agggcaatca ttctgtttaa tccagagggtg	4740
aggggtttga aatccgccc ggaagttaa ctctacgtg aaaaagtata tgccgctttg	4800
gaagaatata ctagaacaac acatcccgat gaaccaggaa gatttgcaaa acttttgctt	4860
cgtctgcctt ctttacgttc cataggcctt aagtgtttgg agcatttgtt ttcttttcgc	4920
cttatitggag atgttccaat tgatacgttc ctgatggaga tgcttgaatc accttctgat	4980
tcataatcta gcggccctag ccccccttc cctccccccc ccctaacgtt actggccgaa	5040
gccgcttga ataaggccgg tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt	5100
cttttggcaa tgtgagggcc cggaaacctg gccctgtctt ctgacgagc attcctaggg	5160

gtctttcccc tctcgccaaa ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc	5220
ctctggaagc ttcttgaaga caaacaacgt ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaacc	5280
ccccacctgg cgacaggtgc ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa	5340
aggcggcaca accccagtgc cacgtttgta gttagatagt tgtggaaaga gtcaaatggc	5400
tctcctaag cgtattcaac aaggggctga aggatgcccc gaaggtagcc cattgtatgg	5460
gattctatct ggggcctcgg tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaacg	5520
tctaggcccc ccgaaccacg gggacgtggt ttctcttga aaaacacgat ctctagggcc	5580
gcgccacat gaagctactg tcttctatcg aacaagcatg cgatatitgc cgacttaaaa	5640
agctcaagt ctccaaagaa aaaccgaagt gcgccaagt tctgaagaac aactgggagt	5700
gtcgtactc tcccaaaacc aaaaggctc cgctgactag ggcacatctg acagaagtgg	5760
aatcaaggct agaaagactg gaacagctat ttctactgat tttcctcga gaagacctg	5820
acatgatitg gaaaatggat tctttacagg atataaaagc attgttaaca ggattattg	5880
tacaagataa tgtgaataaa gatgccgtca cagatagatt ggcttcagtg gagactgata	5940
tgcctctaac attgagacag catagaataa gtgcgacatc atcatcgga gagagtagta	6000
acaaaggta aagacagtgc actgtatcgc cggaattccc ggggatccgg cctgagtgcg	6060
tagtaccga gactcagtg gccatgaagc ggaaagagaa gaaagcacag aaggagaagg	6120
acaaactgcc tgcagcacg acgacggtag acgaccacat gccgcccatt atgcagtg	6180
aacctccacc tctgaagca gcaaggattc acgaagtggg cccaagggtt ctctccgaca	6240
agctgttga gacaaaccgg cagaaaaaca tccccagtt gacagccaac cagcagttcc	6300
ttatcgccag gctcatctgg taccaggacg ggtacgagca gccttctgat gaagatttga	6360
agaggattac gcagacgtgg cagcaagcgg acgatgaaaa cgaagagtcg gacactccct	6420
tccgccagat cacagagatg actatcctca cgggtccaact tatcgtggag ttcgcgaagg	6480
gattgccagg gttcgccaag atctcgacg ctgatcaaat tacgtctgtt aaggcttgct	6540
caagtgaggt aatgatgtc cgagtcgcgc gacgatacga tgcggcctca gacagtattc	6600
tgttcgcaa caaccaagc tacactcgcg acaactaccg caaggctggc atggccgagg	6660
tcatcgagga tctactgcac ttctgcgggt gcatgtactc tatggcgttg gacaacatcc	6720
attacgcgt gctcacggct gtcgtcatct ttctgaccg gccagggttg gagcagccgc	6780
aactggttga agagatccag cggfactacc tgaatagct ccgcatctat atcctgaacc	6840
agctgagcgg gtcggcgcgt tcgtccgtca tatacggcaa gatcctctca atcctctctg	6900
agctacgcac gctcggcatg caaaactcca acatgtgcat ctccctcaag ctcaagaaca	6960
gaaagctgcc gcctttcctc gaggagatct gggatgtggc ggacatgtcg cacaccaac	7020
cgccgcctat cctcgagtc cccacgaatc tctaggcggc ctctagagcg gccgccaccg	7080
cggggagatc cagacatgat aagatacatt gatgagttt gacaaaccac aactagaatg	7140
cagtgaataa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt	7200
ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag	7260
ggggaggtgt gggagggttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg tatggctgat	7320
tatgatcccg gctgcctcgc gcgtttcggg gatgacgggtg aaaacctctt gacacatgca	7380

gctcccgag acggtcacag ctgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagcccgta	7440
gggcgcgtca ggggtgttg ggggtgtcg gggcgagcc atgaggatga ctctagtc	7500
cgcgggtgga gatctggaag gtgtgaggt acgatgagac cgcaccagg tgcagacc	7560
gcgagtgtgg cggtaaacat attaggaacc agcctgtgat gctggatgtg accgaggag	7620
tgaggccga tcacttgggt ctggcctgca cccgcgtga gtttggctct agcgatgaag	7680
atacagattg aggtactgaa atgtgtggc gtggcttaag ggtgggaaag aatatataag	7740
gtgggggtct tatgtagttt tgtatctgt ttgcagcagc cggcgccgc atgagacca	7800
actcgtttga tggaaacatt gtgagctcat atttgacaac gcgcatgccc ccatgggccg	7860
gggtgcgtca gaatgtgatg ggctccagca ttgatggtcg ccccgctctg cccgcaact	7920
ctactacctt gacctacgag accgtgtctg gaacgccgtt ggagactgca gcctccgccg	7980
ccgcttcagc cgttcagacc accgcccgcg ggattgtgac tgactttgct ttcttgagcc	8040
cgtttgcaag cagtgcagct tcccgttcat cggccgcga tgacaagttg acggctcttt	8100
tggcacaatt ggattctttg acccggaac ttaatgtctg ttctcagcag ctgttggatc	8160
tgcgccagca gttttctgcc ctgaaggctt cctcccctcc caatgcggtt taaaacataa	8220
ataaaaaacc agactctgtt tggatttggg tcaagcaagt gtcttgcgtg ctttatttag	8280
gggttttgcg cgcgcggtag gccgggacc agcggctctg gtcgttgagg gtcctgtgta	8340
ttttttccag gacgttgtaa aggtgactct ggatgttcag atacatgggc ataagccgt	8400
ctctggggtg gaggtagcac cactgcagag ctcatgctg cggggtgggt ttgtagatga	8460
tccagtcgta gcaggagcgc tggcggtgtt gcctaaaaat gtctttcagt agcaagctga	8520
ttgccagggg caggcccttg gtgtaagtgt ttacaaagcg gttaaagctg gatgggtgca	8580
tacgtgggga tatgagatgc atcttggact gtatttttag gttggctaig ttcccagcca	8640
tatccctccg gggattcatg ttgtgcagaa ccaccagcac agtgtatccg gtgcacttgg	8700
gaaatttgtc atgtagctta gaaggaaatg cgtggaagaa cttggagacg cccttgtgac	8760
ctccaagatt ttccatgcat tcgtccataa tgaiggcaat gggcccacgg gcggcgccct	8820
gggcgaagat atttctggga tactaacgt catagtgtg ttccaggatg agatcgtcat	8880
aggccatttt taaaaagcgc gggcgagggtg tgcagactg cggataaatg gtccatccg	8940
gccaggggc gtagttacc tcacagattt gcatttcca cgctttgagt tcagatgggg	9000
ggatcatgtc tacctgcggg gcgatgaaga aaacggtttc cgggtaggg gagatcagct	9060
gggaagaaag caggttcctg agcagctgcg acttaccgca gccggtgggc ccgtaaatca	9120
cacctattac cgggtgcaac tggtagttaa gagagctgca gctgccgtca tccctgagca	9180
ggggggccac ttcgtaagc atgtccctga ctgcagtgt ttccctgacc aaatccgcca	9240
gaaggcgctc gccgccagc gatagcagtt ctgcaagga agcaaagttt ttcaacggtt	9300
tgagaccgtc cgccgtaggc atgcttttga gcgtttgacc aagcagttcc aggcggtccc	9360
acagctcgtt cactgtctct acggcatctc gatccagcat atctcctcgt ttgcgggtt	9420
ggggcggtt tcgctgtacg gcagtagtcg gtgctcgtcc agacgggcca ggtcatgtc	9480
tttcacggg cgcagggtcc tcgtcagctg agtctgggtc acggtgaagg ggtgcgtcc	9540
gggctgcgcg ctggccagggtg tgcgttgag gctggctctg ctggtgctga agcgtgccg	9600
gtcttcgccc tgcgcgtcgg ccaggtagca tttagcatg gtgtcatagt ccagcccctc	9660

cgcggcgtgg cccittggcg gcagcttgcc ctggaggag gcgccgcacg aggggcagt	9720
cagacttttg agggcgtaga gcttggcgcg gagaaatacc gattccgggg agtaggcac	9780
cgcgccgcag gcccgcaga cggcttcgca ttccacgagc caggtagagct ctggccgttc	9840
ggggtcaaaa accaggtttc ccccatgcit ttgatgcgt ttcttacctc tggtttccat	9900
gagccggigt ccacgctcgg tgacgaaaag gctgtccgtg tccccgtata cagacttgag	9960
aggcctgtcc tgcaccgatg cctitgagag ccttcaaccc agtcagctcc ttccgggtgg	10020
cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt ctttatcatg caactcgtag	10080
gacagggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tggcgagga ccgctttcgc tggagcgca	10140
cgatgatcgg cctgtcgtt gcggtattcg gaatcttgca cgccctcgct caagccttcg	10200
tcactgggcc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc cattatcgcc ggcatggcgg	10260
ccgacgcgtt gggctacgtc ttgctggcgt tgcgcagcg aggcctggatg gccttccca	10320
ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgccgc gttgcaggcc atgctgtcca	10380
ggcaggtaga tgacgacct cagggacagc ttcaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta	10440
aaaaggccgc gttgctggcg tttttcata ggctccgcc cctgacgag catcacaaa	10500
atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc	10560
cccctggaag ctccctcgtg cgctctctg ttccgacct gccgcttacc ggataacctgt	10620
ccgctttct cccctcggga agcgtggcg tttctcatag ctacgcgtg aggtatctca	10680
gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc	10740
accgtcgcgc cttatccgtt aactatcgtc ttgagtcaa cccggtaga cagcactat	10800
cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta	10860
cagagtctct gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct	10920
gcgctctgt gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctctga tccggcaaac	10980
aaaccaccgc tggtagcgtt ggttttttg ttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa	11040
aaggatctca agaagatcct ttgatcttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa	11100
actcagtta agggattttg gtcagtgat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt	11160
taaatataaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaaact tggctgaca	11220
gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcat ctgtctatct cgttcacca	11280
tagttgcctg acitccccgtc gtgtagataa ctacgatac ggagggtta ccatctggcc	11340
ccagtgtcgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa	11400
accagccagc cggaagggcc gagcgagaa gtggctctgc aactttatcc gcctccatcc	11460
agtctattaa ttgttgcgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca	11520
acgttgttgc cattgtcga ggcacgtgg tgcacgctc gtcgtttggt atggcttcat	11580
tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgat ccccatgttg tgcaaaaaag	11640
cggtagctc cttcggctc ccatcgttg tcagaagtaa gtggccgca gtgttatcac	11700
tcatggttat ggcagactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt	11760
ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatcgg cgaccgagtt	11820
gctcttggcc ggcgtcaaca cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc	11880

tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat 11940
ccagttcgat gtaaccctact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca 12000
gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgga 12060
cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 12120
gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaa 12166

<210> 6
<211> 193
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 7
<211> 240
<212> PRT
<213> 雲杉芽捲蛾(Choristoneura fumiferana)

<400> 7

Leu Thr Ala Asn Gln Gln Phe Leu Ile Ala Arg Leu Ile Trp Tyr Gln
1 5 10 15
Asp Gly Tyr Glu Gln Pro Ser Asp Glu Asp Leu Lys Arg Ile Thr Gln
20 25 30
Thr Trp Gln Gln Ala Asp Asp Glu Asn Glu Glu Ser Asp Thr Pro Phe
35 40 45
Arg Gln Ile Thr Glu Met Thr Ile Leu Thr Val Gln Leu Ile Val Glu
50 55 60
Phe Ala Lys Gly Leu Pro Gly Phe Ala Lys Ile Ser Gln Pro Asp Gln
65 70 75 80
Ile Thr Leu Leu Lys Ala Cys Ser Ser Glu Val Met Met Leu Arg Val
85 90 95
Ala Arg Arg Tyr Asp Ala Ala Ser Asp Ser Val Leu Phe Ala Asn Asn
100 105 110
Gln Ala Tyr Thr Arg Asp Asn Tyr Arg Lys Ala Gly Met Ala Tyr Val
115 120 125
Ile Glu Asp Leu Leu His Phe Cys Arg Cys Met Tyr Ser Met Ala Leu
130 135 140
Asp Asn Ile His Tyr Ala Leu Leu Thr Ala Val Val Ile Phe Ser Asp
145 150 155 160
Arg Pro Gly Leu Glu Gln Pro Gln Leu Val Glu Glu Ile Gln Arg Tyr
165 170 175
Tyr Leu Asn Thr Leu Arg Ile Tyr Ile Leu Asn Gln Leu Ser Gly Ser
180 185 190
Ala Arg Ser Ser Val Ile Tyr Gly Lys Ile Leu Ser Ile Leu Ser Glu
195 200 205
Leu Arg Thr Leu Gly Met Gln Asn Ser Asn Met Cys Ile Ser Leu Lys
210 215 220
Leu Lys Asn Arg Lys Leu Pro Pro Phe Leu Glu Glu Ile Trp Asp Val
225 230 235 240

<210> 8
<211> 582
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> misc_feature
<223> 人紅血球生成素表現載體(包含信號肽及終止密碼子)

<400> 8
atgggagtgc atgagtgtcc cgcttggctc tggctcctgc tgcctcctc gtccctgcct 60

```

ctgggactgc ctgtgctcgg agcccccccc agactgaict gcgacagcag agtgctggag      120
agataacctgt tggaggccaa ggaagccgag aacatcacca cggctgcgc cgagcactgc      180
tccctgaacg agaacatcac cgtgcccgcg accaagggtga acttctacgc ctggaagcgc      240
atggagggtgg gccagcaggc cgtggagggtg tggcagggcc tggccctgct gtccgaggcc      300
gtgctgagag gccaggccct gctgggtgaac agcagccagc cctgggagcc cctgcaactg      360
cacgttgaca aggccgtgag cggcctgaga agcctgacca ccctgctgag agccctgggc      420
gctcagaagg aggccatcag cccccccgac gccgccagcg ccgccccctt gagaaccatc      480
accgccgaca ccttcagaaa gctgttcaga gtgtacagca acttcctgag aggcaagctg      540
aagctgtaca ccggcgaggc ttgcagaacc ggcgacagat ga                          582

```

<210> 9
 <211> 2300
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <221> misc feature
 <223> 人髓磷脂碱性蛋白

```

<400> 9
ggacaacacc ttcaaagaca ggccctctga gtccgacgag ctccagacca tccaagaaga      60
cagtgacgcc acctccgaga gcctggatgt gatggcgtca cagaagagac cctcccagag      120
gcacggatcc aagtacctgg ccacagcaag taccatggac catgccaggc atggcttctt      180
cccaaggcac agagacacgg gcatccttga ctccatcggg cgcttctttg gcggtgacag      240
gggtgcgccc aagcgggggt ctggcaaggt accctggcta aagccggggc ggagccctct      300
gccctctcat gcccgagcc agcctggggt gtgcaaatg tacaaggact cacaccacc      360
ggcaagaact gtcactacg gctccctgcc ccagaagtca cacggccgga cccaagatga      420
aaaccccgta gtccacttct tcaagaacat tgtacgcct cgcacaccac cccgctcgca      480
gggaaagggg agaggactgt ccctgagcag atttagctgg ggggccgaag gccagagacc      540
aggatttggc tacggaggca gagcgtccga ctataaatcg gtcacaagg gattcaaggg      600
agtcgatgcc cagggcacgc ttccaaaat ttttaagctg ggaggaagag atagtcgctc      660
tggatcaccg atggctagac gctgaaaacc cacctgggtc cggaatcctg tcctcagctt      720
cttaatataa ctgccttaaa actttaatcc cacttgcccc tgttacctaa ttagagcaga      780
tgacccctcc cctaatacct gcggagtgtg gcacgtagta gggtcaggcc acggcagcct      840
accggcaatt tccggccaac agttaaatga gaacatgaaa acagaaaacg gtaaaaactg      900
tccctttctg tgtgaagatc acgttccttc ccccgcaatg tgccccaga cgcacgtggg      960
tcttcagggg gccagggtgca cagacgtccc tcacgttca cccctccacc ctgggacttt      1020
cttttcgccg tggctgcggc acccttgcg ctttgctggt cactgccatg gaggcacaca      1080
gctgcagaga cagagaggac gtgggcggca gagaggactg ttgacatcca agcttccttt      1140
gtttttttt cctgtccttc tctcacctcc taaagtagac ttcatTTTT ctaacaggat      1200
tagacagtca aggagtggct tactacatgt gggagctttt ggtatgtgac atgcgggctg      1260
ggcagctgtt agagtccaac gtggggcagc acagagaggg gccacctcc ccaggccgtg      1320
gctgcccaca caccccaatt agctgaattc gcgtgtggca gaggaggaggaa aaggaggcaa      1380

```

acgtgggctg ggcaatggcc tcacatagga aacagggtct tcctggagat ttggtgatgg 1440
agatgtcaag cagggtggcct ctggacgtca ccgttgcctt gcatgggtggc cccagagcag 1500
cctctatgaa caacctcggt tccaaaccac agcccacagc cggagagtcc aggaagactt 1560
gcgcactcag agcagaaggg taggagtcct ctgacagacc tcgcagccgc gccagtcgcc 1620
catagacact ggctgtgacc gggcgtgctg gcagcggcag tgcacagtgg ccagcactaa 1680
ccctccctga gaagataacc ggctcattca ctctctccca gaagacgcgt ggtagcgagt 1740
aggcacaggc gtgcacctgc tccgaatta ctaccgaga cacacgggct gagcagacgg 1800
ccccgtggat ggagacaaag agctcttctg accatatect tcttaacacc cgctggcatc 1860
tcctttcgcg cctccctccc taacctactg acccaccitt tgattttagc gcacctgtga 1920
ttgataggcc ttccaaagag tcccacgtg gcatcacctt ccccgaggac ggagatgagg 1980
agtagtcagc gtgatgcaa aacgcgtctt cttaatccaa ttctaattct gaatgtttcg 2040
tgtgggctta ataccatgtc tattaatata tagcctcgat gatgagagag ttacaaagaa 2100
caaaactcca gacacaaacc tccaaatitt tcagcagaag cactctgcgt cgctgagctg 2160
aggtcggctc tgcgatccat acgtggccgc acccacacag cacgtgctgt gacgatggct 2220
gaacggaaag gtacactgt tcctgaatat tgaataaaaa caataaactt ttaatggtaa 2280
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2300

<210> 10
<211> 500
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 10

Met Ala Ser Arg Leu Thr Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Gly Asp Arg Ala Ser Ser Asn Pro Asn Ala Thr Ser Ser Ser Ser Gln
20 25 30

Asp Pro Glu Ser Leu Gln Asp Arg Gly Glu Gly Lys Val Ala Thr Thr
35 40 45

Val Ile Ser Lys Met Leu Phe Val Glu Pro Ile Leu Glu Val Ser Ser
50 55 60

Leu Pro Thr Thr Asn Ser Thr Thr Asn Ser Ala Thr Lys Ile Thr Ala
65 70 75 80

Asn Thr Thr Asp Glu Pro Thr Thr Gln Pro Thr Thr Glu Pro Thr Thr
85 90 95

Gln Pro Thr Ile Gln Pro Thr Gln Pro Thr Thr Gln Leu Pro Thr Asp
100 105 110

Ser Pro Thr Gln Pro Thr Thr Gly Ser Phe Cys Pro Gly Pro Val Thr
115 120 125

Leu Cys Ser Asp Leu Glu Ser His Ser Thr Glu Ala Val Leu Gly Asp
130 135 140

Ala Leu Val Asp Phe Ser Leu Lys Leu Tyr His Ala Phe Ser Ala Met
145 150 155 160

Lys Lys Val Glu Thr Asn Met Ala Phe Ser Pro Phe Ser Ile Ala Ser
165 170 175

Leu Leu Thr Gln Val Leu Leu Gly Ala Gly Glu Asn Thr Lys Thr Asn
180 185 190

Leu Glu Ser Ile Leu Ser Tyr Pro Lys Asp Phe Thr Cys Val His Gln
195 200 205

Ala Leu Lys Gly Phe Thr Thr Lys Gly Val Thr Ser Val Ser Gln Ile
210 215 220

Phe His Ser Pro Asp Leu Ala Ile Arg Asp Thr Phe Val Asn Ala Ser
225 230 235 240

Arg Thr Leu Tyr Ser Ser Ser Pro Arg Val Leu Ser Asn Asn Ser Asp
245 250 255

Ala Asn Leu Glu Leu Ile Asn Thr Trp Val Ala Lys Asn Thr Asn Asn
260 265 270

Lys Ile Ser Arg Leu Leu Asp Ser Leu Pro Ser Asp Thr Arg Leu Val
275 280 285

Leu Leu Asn Ala Ile Tyr Leu Ser Ala Lys Trp Lys Thr Thr Phe Asp
290 295 300

Pro Lys Lys Thr Arg Met Glu Pro Phe His Phe Lys Asn Ser Val Ile
305 310 315 320

Lys Val Pro Met Met Asn Ser Lys Lys Tyr Pro Val Ala His Phe Ile
325 330 335

Asp Gln Thr Leu Lys Ala Lys Val Gly Gln Leu Gln Leu Ser His Asn
340 345 350

Leu Ser Leu Val Ile Leu Val Pro Gln Asn Leu Lys His Arg Leu Glu
355 360 365

Asp Met Glu Gln Ala Leu Ser Pro Ser Val Phe Lys Ala Ile Met Glu
370 375 380

Lys Leu Glu Met Ser Lys Phe Gln Pro Thr Leu Leu Thr Leu Pro Arg
385 390 395 400

Ile Lys Val Thr Thr Ser Gln Asp Met Leu Ser Ile Met Glu Lys Leu
405 410 415

Glu Phe Phe Asp Phe Ser Tyr Asp Leu Asn Leu Cys Gly Leu Thr Glu
420 425 430

Asp Pro Asp Leu Gln Val Ser Ala Met Gln His Gln Thr Val Leu Glu

435 440 445
Leu Thr Glu Thr Gly Val Glu Ala Ala Ala Ala Ser Ala Ile Ser Val
450 455 460
Ala Arg Thr Leu Leu Val Phe Glu Val Gln Gln Pro Phe Leu Phe Val
465 470 475 480
Leu Trp Asp Gln Gln His Lys Phe Pro Val Phe Met Gly Arg Val Tyr
485 490 495
Asp Pro Arg Ala
500

<210> 11
<211> 60
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 艾卡拉肽(Ecallantide)抑制劑序列

<400> 11

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys
1 5 10 15
Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30
Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45
Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

<210> 12
<211> 604
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(601)
<223> 前列腺素合成酶2蛋白質

<400> 12

Met Leu Ala Arg Ala Leu Leu Leu Cys Ala Val Leu Ala Leu Ser His
1 5 10 15
Thr Ala Asn Pro Cys Cys Ser His Pro Cys Gln Asn Arg Gly Val Cys
20 25 30
Met Ser Val Gly Phe Asp Gln Tyr Lys Cys Asp Cys Thr Arg Thr Gly
35 40 45
Phe Tyr Gly Glu Asn Cys Ser Thr Pro Glu Phe Leu Thr Arg Ile Lys
50 55 60
Leu Phe Leu Lys Pro Thr Pro Asn Thr Val His Tyr Ile Leu Thr His

65		70		75		80
Phe Lys Gly Phe Trp Asn Val Val Asn Asn Ile Pro Phe Leu Arg Asn	85		90		95	
Ala Ile Met Ser Tyr Val Leu Thr Ser Arg Ser His Leu Ile Asp Ser	100		105		110	
Pro Pro Thr Tyr Asn Ala Asp Tyr Gly Tyr Lys Ser Trp Glu Ala Phe	115		120		125	
Ser Asn Leu Ser Tyr Tyr Thr Arg Ala Leu Pro Pro Val Pro Asp Asp	130		135		140	
Cys Pro Thr Pro Leu Gly Val Lys Gly Lys Lys Gln Leu Pro Asp Ser	145		150		155	160
Asn Glu Ile Val Glu Lys Leu Leu Leu Arg Arg Lys Phe Ile Pro Asp	165		170		175	
Pro Gln Gly Ser Asn Met Met Phe Ala Phe Phe Ala Gln His Phe Thr	180		185		190	
His Gln Phe Phe Lys Thr Asp His Lys Arg Gly Pro Ala Phe Thr Asn	195		200		205	
Gly Leu Gly His Gly Val Asp Leu Asn His Ile Tyr Gly Glu Thr Leu	210		215		220	
Ala Arg Gln Arg Lys Leu Arg Leu Phe Lys Asp Gly Lys Met Lys Tyr	225		230		235	240
Gln Ile Ile Asp Gly Glu Met Tyr Pro Pro Thr Val Lys Asp Thr Gln	245		250		255	
Ala Glu Met Ile Tyr Pro Pro Gln Val Pro Glu His Leu Arg Phe Ala	260		265		270	
Val Gly Gln Glu Val Phe Gly Leu Val Pro Gly Leu Met Met Tyr Ala	275		280		285	
Thr Ile Trp Leu Arg Glu His Asn Arg Val Cys Asp Val Leu Lys Gln	290		295		300	
Glu His Pro Glu Trp Gly Asp Glu Gln Leu Phe Gln Thr Ser Arg Leu	305		310		315	320
Ile Leu Ile Gly Glu Thr Ile Lys Ile Val Ile Glu Asp Tyr Val Gln	325		330		335	
His Leu Ser Gly Tyr His Phe Lys Leu Lys Phe Asp Pro Glu Leu Leu	340		345		350	
Phe Asn Lys Gln Phe Gln Tyr Gln Asn Arg Ile Ala Ala Glu Phe Asn	355		360		365	

Thr Leu Tyr His Trp His Pro Leu Leu Pro Asp Thr Phe Gln Ile His
370 375 380

Asp Gln Lys Tyr Asn Tyr Gln Gln Phe Ile Tyr Asn Asn Ser Ile Leu
385 390 395 400

Leu Glu His Gly Ile Thr Gln Phe Val Glu Ser Phe Thr Arg Gln Ile
405 410 415

Ala Gly Arg Val Ala Gly Gly Arg Asn Val Pro Pro Ala Val Gln Lys
420 425 430

Val Ser Gln Ala Ser Ile Asp Gln Ser Arg Gln Met Lys Tyr Gln Ser
435 440 445

Phe Asn Glu Tyr Arg Lys Arg Phe Met Leu Lys Pro Tyr Glu Ser Phe
450 455 460

Glu Glu Leu Thr Gly Glu Lys Glu Met Ser Ala Glu Leu Glu Ala Leu
465 470 475 480

Tyr Gly Asp Ile Asp Ala Val Glu Leu Tyr Pro Ala Leu Leu Val Glu
485 490 495

Lys Pro Arg Pro Asp Ala Ile Phe Gly Glu Thr Met Val Glu Val Gly
500 505 510

Ala Pro Phe Ser Leu Lys Gly Leu Met Gly Asn Val Ile Cys Ser Pro
515 520 525

Ala Tyr Trp Lys Pro Ser Thr Phe Gly Gly Glu Val Gly Phe Gln Ile
530 535 540

Ile Asn Thr Ala Ser Ile Gln Ser Leu Ile Cys Asn Asn Val Lys Gly
545 550 555 560

Cys Pro Phe Thr Ser Phe Ser Val Pro Asp Pro Glu Leu Ile Lys Thr
565 570 575

Val Thr Ile Asn Ala Ser Ser Ser Arg Ser Gly Leu Asp Asp Ile Asn
580 585 590

Pro Thr Val Leu Leu Lys Glu Arg Ser Thr Glu Leu
595 600

<210> 13
<211> 599
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(599)
<223> 前列腺素合成酶1蛋白質

<400> 13

Met Ser Arg Ser Leu Leu Leu Trp Phe Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Pro Pro Leu Pro Val Leu Leu Ala Asp Pro Gly Ala Pro Thr Pro Val
 20 25 30
 Asn Pro Cys Cys Tyr Tyr Pro Cys Gln His Gln Gly Ile Cys Val Arg
 35 40 45
 Phe Gly Leu Asp Arg Tyr Gln Cys Asp Cys Thr Arg Thr Gly Tyr Ser
 50 55 60
 Gly Pro Asn Cys Thr Ile Pro Gly Leu Trp Thr Trp Leu Arg Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Pro Ser Pro Ser Phe Thr His Phe Leu Leu Thr His Gly Arg
 85 90 95
 Trp Phe Trp Glu Phe Val Asn Ala Thr Phe Ile Arg Glu Met Leu Met
 100 105 110
 Arg Leu Val Leu Thr Val Arg Ser Asn Leu Ile Pro Ser Pro Pro Thr
 115 120 125
 Tyr Asn Ser Ala His Asp Tyr Ile Ser Trp Glu Ser Phe Ser Asn Val
 130 135 140
 Ser Tyr Tyr Thr Arg Ile Leu Pro Ser Val Pro Lys Asp Cys Pro Thr
 145 150 155 160
 Pro Met Gly Thr Lys Gly Lys Lys Gln Leu Pro Asp Ala Gln Leu Leu
 165 170 175
 Ala Arg Arg Phe Leu Leu Arg Arg Lys Phe Ile Pro Asp Pro Gln Gly
 180 185 190
 Thr Asn Leu Met Phe Ala Phe Phe Ala Gln His Phe Thr His Gln Phe
 195 200 205
 Phe Lys Thr Ser Gly Lys Met Gly Pro Gly Phe Thr Lys Ala Leu Gly
 210 215 220
 His Gly Val Asp Leu Gly His Ile Tyr Gly Asp Asn Leu Glu Arg Gln
 225 230 235 240
 Tyr Gln Leu Arg Leu Phe Lys Asp Gly Lys Leu Lys Tyr Gln Val Leu
 245 250 255
 Asp Gly Glu Met Tyr Pro Pro Ser Val Glu Glu Ala Pro Val Leu Met
 260 265 270
 His Tyr Pro Arg Gly Ile Pro Pro Gln Ser Gln Met Ala Val Gly Gln
 275 280 285
 Glu Val Phe Gly Leu Leu Pro Gly Leu Met Leu Tyr Ala Thr Leu Trp
 290 295 300
 Leu Arg Glu His Asn Arg Val Cys Asp Leu Leu Lys Ala Glu His Pro

305		310		315		320
Thr Trp Gly Asp	Glu Gln Leu Phe Gln	Thr Thr Arg Leu Ile	Leu Ile			
	325	330	335			
Gly Glu Thr	Ile Lys Ile Val Ile	Glu Glu Tyr Val Gln	Gln Leu Ser			
	340	345	350			
Gly Tyr Phe	Leu Gln Leu Lys	Phe Asp Pro Glu Leu	Leu Phe Gly Val			
	355	360	365			
Gln Phe Gln	Tyr Arg Asn Arg	Ile Ala Met Glu	Phe Asn His Leu Tyr			
	370	375	380			
His Trp His	Pro Leu Met	Pro Asp Ser Phe	Lys Val Gly Ser Gln	Glu		
	385	390	395	400		
Tyr Ser Tyr	Glu Gln Phe Leu Phe	Asn Thr Ser Met Leu	Val Asp Tyr			
	405	410	415			
Gly Val Glu	Ala Leu Val Asp	Ala Phe Ser Arg Gln	Ile Ala Gly Arg			
	420	425	430			
Ile Gly Gly	Gly Arg Asn Met	Asp His His Ile Leu	His Val Ala Val			
	435	440	445			
Asp Val Ile	Arg Glu Ser	Arg Glu Met Arg Leu	Gln Pro Phe Asn Glu			
	450	455	460			
Tyr Arg Lys	Arg Phe Gly Met	Lys Pro Tyr Thr Ser Phe	Gln Glu Leu			
	465	470	475	480		
Val Gly Glu	Lys Glu Met Ala Ala	Glu Leu Glu Glu Leu Tyr	Gly Asp			
	485	490	495			
Ile Asp Ala	Leu Glu Phe Tyr	Pro Gly Leu Leu Leu	Glu Lys Cys His			
	500	505	510			
Pro Asn Ser	Ile Phe Gly Glu	Ser Met Ile Glu Ile	Gly Ala Pro Phe			
	515	520	525			
Ser Leu Lys	Gly Leu Leu Gly	Asn Pro Ile Cys Ser	Pro Glu Tyr Trp			
	530	535	540			
Lys Pro Ser	Thr Phe Gly Gly	Glu Val Gly Phe Asn Ile	Val Lys Thr			
	545	550	555	560		
Ala Thr Leu	Lys Lys Leu Val Cys	Leu Asn Thr Lys Thr Cys	Pro Tyr			
	565	570	575			
Val Ser Phe	Arg Val Pro Asp	Ala Ser Gln Asp Asp Gly	Pro Ala Val			
	580	585	590			
Glu Arg Pro	Ser Thr Glu Leu					
	595					

<210> 14
 <211> 24753
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(24753)
 <223> 前列腺素合成酶2核苷酸

```

<400> 14
agggtgacagc tggagggagg agcgggggtg gagccggggg aagggtgggg aggggatggg      60
ctggagctcc gggcagtggt cgaggcgcac gcacaggagc ctgcactctg cgtcccgcac      120
cccagcagcc gcgccatgag ccgtgagtg caccgccgtg cccggtgggg aattttcttg      180
gcctccgtgt ggagccttga atgccaggct cagccctca tctctctctt ctgcaggagg      240
tctcttgctc tggttcttgc tgttctgtc cctgtccccg ccgtctccccg tctgtctgc      300
ggaccagggg gcgcccacgc caggtaggcg gcccacccc tcccaaggga aatccccggt      360
cttgcgcccc tggcctgtgt tcaacccct cctttccct ccagcgggcc cagcttcccc      420
tttctgctcg cgtgtctgag aaagactgag gctgagctt ttggtaggat gggggctccc      480
tgaagcccc ccggcgggtg ggccttggct aatgggctat ctagtctttt caggggaaac      540
agcagactgg gatctgggtg caacttgggg agaagggaca gtccctatcc atccccctca      600
cctgttcttg gcccagatg tctaagcagc ctctgcaccc aacaaccccg ctgtttccta      660
taggggcctc ttggggagga agccgcaggc accaagggaa atgagttccc tttctccagc      720
ctctaaccgt ctgggaaccc atcctgattc ccattgccag tggagaagggt cttccctggt      780
gaagacttcg ggagaacatg ggagatggaa atacatttag gagccgggat gcttcatctg      840
gggtttaaga gatccccatt gagcaaatga ggaaaccgag gctcagtagg tgccatgatt      900
cccaagctc aaaaaataga tggtagggcc aggatctgaa ctcaggtctg tctgcgtcca      960
cacacttcgc aaggcttttc cacagaaagc tgcttctacc cacaatggac ccggagccac     1020
tctgggtttc atgggggagg ttgatgggga aattccgccc ttccctcccc catgcatgtg     1080
ccaggttcca ggtgaaggaa ttcagtcctt cgctcagcca accttctcc cccagctcgc     1140
tgcttgtgtg tgtgcgtgtg tgtgagcatg tgtcccagtt ggatatagtt tctccacca     1200
cctagctgtg taaaatctct aaaatgaggc ccagagaggg caggaggagg cagaggaggat     1260
ccgcactttc tgcgtgtgat ctctaaggat ctggtgcgtg ggggaaagag gaaagatatg     1320
tacatggatt ttggatcaga ccaagtttcc tgaacgggc ttgggtggg tggcatttag     1380
gggacccaaa gagaggacgg aggggtgctct aggaaaggga ttgcgttgaa taaaagtctg     1440
gtttatggga agaggaggag gaagactcat gtggccagca ctttaaagtt taaaagggtt     1500
ggttgtggac atccactctt ttggtgctct caacagccct gccagagaga tgcgttagac     1560
ccagtttaca gaaggggact ctgaggccca gagggagtga agccacttgt ctgaatctc     1620
acagtgagct ggtggtgggg agtagaaggg gctcttcagg ttgcctcgtt gacctctt     1680
gtcagtcctt ggatcagccc agcacttctt ctgaggcccc atciggcctc atccaggcac     1740
tcttggtata caggteccac ccgtctgtat tcttttttag tccattcact aatgcacaat     1800
gagccatggt ctgtgctatt ttgtttttt ccttttctgt ttccttttgt ataataaatg     1860
tttacacgga attgtttttt ttatcccca agggttattt atgccagtct ttggctgggg     1920
    
```

cctggagaca cggagctggg aggagctgac aggctgatgg tggagccaga aatgccaaca	1980
gactgtcatc caaggggacc agggctgtgc ggagctcatg ggaggaagca ggggtatagg	2040
gagcccaggg aagggagcag ggggtgtcgg agctcagggg agggagcagc tgcctctcag	2100
tgcgaagaat tgaggggaggc ttcttggatc tgatgacttt tggactggac ctcgaaggag	2160
gtggcgggtg ggggaaacac taagagactc gaccaggaaa caccgtaagg gtaatgtgga	2220
gcaggaggct gaggttggat gcgtaatgtg gggatgagac tggaggccag aaaacttgta	2280
ccgaggctcc tgcaaggatc taggaaagaa cgaatgactg gtggagtgcg ggggcagaag	2340
gtctgggttg ccctcataat tccaagtctg cgagtaaaact gagggccaag ctacttgggc	2400
atctgcccc ggaagccaaa gccgtgtctt tacctctaga ggcaaaggag atgaagagat	2460
gagggcctgc ctcacctaa ggggcaggcg gagggagaga atgtctcttt tgcctctctg	2520
gtgggtgagg agatggaggc cagcctggag gcaaggctgt gccggggcg ccctgaatgc	2580
tcaagtactt cccctctagt ctctggactt gactcagtc ccatcttcta gatggggata	2640
gggcatgacc tggcaaccag agctgcatgc caggcagagg agccccaggc cagctgaccc	2700
gggcacatgg ggcaagatgc cagctgtgcc aaggctgccc ggggtgcctgc acctgctctc	2760
gccagcacca gttaggtctg tggccggga gagggcttcc ccaccagcag gctcttccag	2820
cigtctggcc cagtgtctg gatctgggtg ggtgtgtctt aggtgtggg actggggccc	2880
aggccaaacc agtcagggtt cccaccttt tttttttt tctctggctg ccaggctccc	2940
agagactctc taaatattac tctttagggg atttgggtcc tgcctcttca ctgggcaatc	3000
ttgcagcctg acacctctg atcctggagg acttgggtgt ccttggctgt gccigtcccc	3060
tagtcacgt cagtccctga cctggagccc tgacttttgg gctaggggtt gtcccttggc	3120
caaacccttg gaaaggtcct ggaaccaggc agttctggac agtcctcatc tgtggggatg	3180
gggactagca gcttggcctt tgggctgcgt gtgtctggca tgcagcgtgg tgtgctgac	3240
atctctgcct ccgctgtct tggggactca gtgagagcaa atgggaagg tctctgctga	3300
tggggcagtt gtgggagggt tgtattgata caaataatgg agagggacag attggctcta	3360
cccagagtag agggccttga cgtcgaaagg aaggcctcct ttagcccgcc tgcataaacc	3420
ccttcattgg atatacagaa aaatgaggct ccagaggtag gagggactca cccaagaatg	3480
cacagccagt aagagcagcc actctcta atcagctctcc caagcaacta ctgggtgcct	3540
ggccccgtgc tgagtatggg ggactcaaag tgaattagac ttggtacctg catctccttg	3600
gttttctttc ttgatgaaca ggggtgtcct ccactgagca tagaactgag ttggcatgaa	3660
aacatgcagg attgaagtta gaccgaagga aggccttcc gtacgaatac ttcctaagaa	3720
tctggttgtg gcaggagatg gtgatcccc tgggttcctg gtttcattcg tcttgattt	3780
tcaaggttca ctltgaagga atgtgacaaa tccaactcaa ctgggtcatc ctcagctgc	3840
atcaaagcga ctctccctt ccatccctc cccaaatcca gtcttgggtt cctccaggag	3900
taggaggagg agggagatta agtcttggct ccgcaactc aaagcagtag ggtctgggca	3960
agcctcctgc ttctcttggg ccctacattc ctcatatgc aatggggagt ctcacctacc	4020
tctcttaggg agtgctgggg agataaatga gcgtgggtgt ggaaggttgt ggacttggtc	4080
ggctggagcc ctggcttctt ggctgggctg tgatggtcag gctgtagtct agtggcacc	4140

agtcctctct cgcgccaccc tgacaccttg gggcaccagc ggcaggccca ctgttgcct	4200
tcctgggaga acctttcctg ccccagagca gtggtgttta tggaaagaac gtggcggggg	4260
aggcgggagg ggggaagctg gatgggccgg actgggaggg aggagccica gctccgcac	4320
agccctctctt ggcaggaggg gtgtgggcag ccgttccagc ttcagcgtct ggagcttgtg	4380
gctcttctgc ctgccgaggc agagctctag ggccatggcg ggaggccctc cggctccacc	4440
tcagacagct gttgagggcc tggaaagatga gggactcctt ttggtcaggc tggaggtgac	4500
caatctcttc acctattttt atttattcca caaacattcg ttaagctctg gctaccacat	4560
ctggatccca gacctggita agccccaact gtgtgcatag cctgtgctgg gggaagagaa	4620
agccttaagg gaagcggggg tcccttctcc tggaaagctta tgggtggagaa gaggcaggtg	4680
aattggaacc cggagccagg gcaagggaga gtgggaggag ggagtgtgga catttgggga	4740
agacttcttg gggaggcaag gcgtgggcctc agctgatitg gaggaaatgt attaaggagg	4800
ctaacagcct ggatgaagga tggagatgct gagggtttgg ggctaaggga ggggctggcg	4860
cagaatgttg gagctgcacg gacctctgga gtcatittg agatccctgc tgtggcaggg	4920
atggggaaat tgagcctagg ggaggcctaa cccctgtgcc citagagtgg tagaactaga	4980
ccgtgagtc tagcggacct tgtgtgccag gggtgggagc tgggcagtgg gtgctacagg	5040
ggctcctggg caggtagagag agccaggcca gcaggagggg caagaagaag agttctagca	5100
gggtgacaag tcctttcttg ggggaaccag acctctgagc cagcacgggg gctgctccag	5160
aggcttcttg gcccttcttg gccctgtgct gggggaggcg ggggctgggg tactgccagg	5220
ccctttccct ggatcctgcc tgccagggtt gcctgtggct gccgataaa gcccttttgt	5280
ccagccttct tcccctgacc cctccctcct acaccctgc tggggccatt gtggggctgt	5340
ggggagtgc cagggcctaa gcaaaactat ttgcatgatt cttgttggtc ttgcttgtgt	5400
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt atttagagggt gtgttgccgt	5460
cttgaagtgt gggaccaaga ggactctgct gcccagggtc agccctgtgc tgtgaagtga	5520
ggagttagga gactgagacc agggcagggg atagggggca ggtcttgccc agggtcatgc	5580
tccttgatcc tagcaccctg agatgacagc attcaccct cagctgctct ggctttcac	5640
tacccttttg acctgcaata accagtigca caaagaatcc atattccctg taacgttggc	5700
cttgagccca gataaggaag tatgtttgca gaaaggagcc cggcgttttc tgtgtaaggt	5760
cagagatgga gcctcctgcc aggcgctagg agtttttgggt ctgccagct ctgttctgtt	5820
tccttgccca agttatcacc tgtccctgaa cctcagtttc cttcactgaa cagggtggig	5880
ggggtgatgg tggatcctac tgaacctgag gactctgtaa ctttgctgct aaagaatcac	5940
tgaggcagat ttagcaagggt ggtgggtggtc tgagggatct gggttagatg ccaagaggga	6000
tttccctata gagtttctcc aggaggcagc agggcggaig ccagagctcc atgcaccctc	6060
ccaggagatt ttctagccct atctctccta ttcccttgggt ctgtgacctt cttctggatc	6120
ctagagccca gacccacccc tgatgtgggc caagtctgat tccatcagga atgggggctg	6180
aggcagctga gaccttgag tccccctcct cctgcacacc caccctctgt ccccagggtt	6240
ctggaaaact tctttcctta gacttggctg ctgaggctgt ggggttgag tggaaagtga	6300
gggatgggca tttggctctg tgagacttgt ggggtgatag gtctggcttt cctttttct	6360
ggcttcaatt tcccactctg caatgtggac attatgatac ctgctcttct ctacctctg	6420

cagaaatgga ggaatggtga gggatctcgt ttctctagtg ttcattgggt ggtggtctgg	6480
gagaagtcgc cgtctctcgc ctctctccct ttctgaccgc cccccaccc cccgccccgg	6540
ctctctcttg ctactgaact ctgactaggc aggaagtga cgctctagaa gcccggtggt	6600
gaggagtitt atcagctctt tcttaacttt cagtgtcaca gccggggaat cttctctgc	6660
cgccgtttgg tggcaatagg gagggaaggg gcgcttcccc tgggggctg atgtgggcta	6720
ggctggagtt ccagagcagg gcctggaaat gtcaggatgg gtggtttatg ttcacagagg	6780
tgggaacagg ggtccccctt ggggaacct gaagccctgg caccagtgat ttcaggacgg	6840
agctgcgact taagtccatg cctctggccc ctcatcccc catcaggggc tagatggggg	6900
tcaggaggcc accctagcat ggtctctgac ctccatttct caccacagat gaatccctgt	6960
tggtactatc catgccagca ccagggaac tgggtccgt tggccctga ccgtaccag	7020
tgtgactgca cccgcacggg ctattccggc cccaactgca ccatccgtga gctgggcctt	7080
cagccctcac tcttccgtc ttgagccctt ctgctcccc ggccctttct cctagaccct	7140
aacttctac cctctctct gaccatggcc ctgttctct tcttgcctg gtctgcccc	7200
tctccctgac ctggcttcag catgagctct cgctcttggt ccacctcac tccctgcttc	7260
tgagtccat ggtgagttt caccacatgc cctggccctt gtcctcacgc ccggttctgt	7320
ctctgtcatg tgcattgtt cccaaggctt catccttacc cacttcccc taggtgtctac	7380
tctgttccac cctggccctt gtcctcagtg ccccatcttc caccctggct acttctggtt	7440
ctggtaggag ggaccaactg agtgactgcc atggccctg cagctggcct gtggacctgg	7500
ctccggaatt cactgcggcc cagccctctt ttcaccaact tctgtctac tcacgggcgc	7560
tggttctggg agtttgtcaa tgccaccttc atccgagaga tgcctatgcg cctggtactc	7620
acagggtggg gtggggcagg gccccctgac ctgggggagc aagcaagcct gctagtctt	7680
tggattctt ggcatctgat aagggtatg gtgggggaga gtctatgat cctgataaaa	7740
taagcccaa cccaggagga ggcaagaact gggaaggagc tgggggtgga aacaccttg	7800
tcaccgttat tttgtcttc tgcagtgcgc tccaacctta tcccagttc cccacctac	7860
aactcagcac atgactacat cagctgggag tctttctcca acgtgagcta ttacactgt	7920
attctgccct ctgtgcctaa agattgccc acaccatgg gaaccaaagg taaaatggg	7980
tgaggagctg ggcttgggga ttacaggagg tgcctagttc ttctctttgg gaaaaatcag	8040
gcgaagaaca attattgacc caattctgca gatggctaga ccaaggcaag acatatgaca	8100
tgtccagagc ctgggtgag aacaggcaag ggcagcagag ggtcttgctt gaggcacct	8160
agagtcagac caatgtttcc atagttccag ggtgctctt tgcctgatcc ttttctaatg	8220
atcagttggg tcttccggg gtggaagtga cttagaagtt gagatgtagg aaagaatagt	8280
gagctattta ttgggtgtg tctctgtgt tgggtcttta cagatgtaa tagttttaca	8340
tgcctcacca gtgtaaggta caaataagcc acatttttt cttcgttac tcaagacttc	8400
acttagccac actggcaggg gtcttctttg taagaccttc ccatgccacc tgaattatc	8460
caaaaacctg ggatattatt catttcagac ccatcagttc agcatcaagt acagagagga	8520
caagagaggc tcatcagtc actgtgcta tactccagtt cctgccacat ggtggcactg	8580
ttgaatgcca gtctgtgca gcctcatggt tatgtgctt tttgggttca aaaccttgca	8640

ccatgtccct gcttgggtct caagagcact actgtgacgg ttttccatca tatggttagc	8700
tgcttttccc aaagcatgac tattctacca ggatagctga gtcttgccaa ctttgtgaa	8760
atcatgcttg cccagtgtca gtgagtgatg attccaaatt acggttgaca gatcactccc	8820
tctaacttcc cttttgggtg attttcttta ggggtacttg atattttttc ctgccagagg	8880
aaccagtica gccatcttaa tccaagtaat ttccattgat ctggaacctt caacatcagg	8940
gctcacatct tgatgcattg tgaagagatg cctttaccag aactcaaaaa attctattcc	9000
tttctgtgag ggcaattggg tgacaactca ttgacactg acataattaa ggaaggcctc	9060
tcaatactta ttctaaggat gacttgtctt tatgccagac atagaaagat tggcatcatt	9120
taaaataggt tgacacacct attttaaggg gagcaagcaa gcctgctagt cttttggac	9180
tcttggcatc tgataagggt agtgggtggg gagagtctat gatgccgat aggtggtggt	9240
gtgtggcac acgtctgtaa tcccagcact ttgggaggtt ggggtgggtg gattgcttga	9300
gctcaggagt tcaagtccaa cctggatgac atggtgagac accttgtcta caaaagaata	9360
caaaagttag ctgggtgaag ttgtgtgtgc ctgtagtccc agctactcag gaggctaagg	9420
tgggtggatc aattgagccc aggaggtcga ggcigtatg agccataatt gcggcactgc	9480
actctggcct gggcaataga gtgagacct gtctcaaaaa taaataaata aataaataaa	9540
taataaata aataaataaa taggttggca aactacagcc tgcaggccaa attcggccca	9600
cctctccatt ttgttaaata aagttttatt ggaacacagc cacacacatt tgtttatgtg	9660
tcatctgtga ctgctttccc gctacaatag caaaaactga atagatgtga catgtctgta	9720
tggctctgca agcctaaaaat gtttactatc tggctttttc cagaaaaagc ttgtgacct	9780
atgatttaaa aaattctacc cactggttct ctgccatgct tacattatct ctgcagctcc	9840
tcagattcac tgatcaaat ggggtatcatt tgcccccttt taaagatgga gaaattgaca	9900
cccagagaga tgagatgatt tatctgtatt cacacagcta gcaaatagca tagtcagttg	9960
caaacacagg ctaccttgac tcagggcaag ggagttcatg tttgtttttt tctgtttctt	10020
tatttctttt tggtgaaatg ttctattatg gaaaaattgc aaagatacac aaaagttgag	10080
agaaaagcag aatgaactat gtacctatct ttcatgttca acattttccc acagtttctt	10140
catcttattt catttctccc ctctcatatt ttataaagt attttaaatc aaattctaaa	10200
aatcatgcca cttaaaattc taaaaatcat gccacttcac ccataaatac ttctagggtc	10260
ttttggtaga gagtgggtta cttggtgggt gtggggaggt ggtcctgagg aggccactct	10320
gggcttcctg cttgggccag ttgcctggt gagccagat gtccccaggg cagcaagatc	10380
cagataggag aagctactgc tgtttcctac ccccaacca gggaagaagc agttgccaga	10440
tgcccagctc ctggcccgcc gcttcctgct caggaggaag ttcatacctg accccaagg	10500
caccaacctc atgtttgcct tctttgcaca acacttcacc caccagtctt tcaaaacttc	10560
tggcaagatg ggtcctggct tcaccaaggc ctggggccat ggggtgagta cctaggaggg	10620
gctcaggact gctctggacc taatttggca cgcgtatgtc atcgacagtg ggccggcacc	10680
ctggtgacct gaggaacct ctctctgtcc acaggtagac ctggccaca tttatggaga	10740
caatctggag cgtcagtatc aactgcggct cttaaggat gggaaactca agtaccaggt	10800
agtgtctggc cagggggtag ggcagagga ggggtctccc atggtcttcc ctggcaaaga	10860
ctgcttgggg cgggggtctg ggtcatgtcc tgagagggcc aaccacggga gtgggaagct	10920

tggtccagga gcgacagtat acgctgggag gaggcagcag gtatgagaag ccagggagga	10980
gcagacgtgg cctcccatgt cagccagggg ggtggatitt ggagctcaac aggagatgaa	11040
cattttagt ctgcatttat ttatttaatt attccacaat attaatgga cagagaata	11100
tacctggcac aggtgattga gtagtgacca ttatagttaa tgggccctgc cctcaaaaaa	11160
ccacaggcaa actctaggat gttcattcta tgagggttt tgtttaaatc agaacgggcc	11220
aacagaaata taatgtgaac cacatacata gttaaaattt tctaattgcc atattaaaag	11280
agggaaaaag aaacaggga aatgatttta ataatacatt ttacttaatg caatatgtcc	11340
aggtaatag cattttagca tgaatcaat acattattaa taaaatatgt cacattcttt	11400
tttcatgctg aagcttcaaa atctgggtga ttttcacac tcacagggca tctcaatttg	11460
gatgctctat ttccactgga gtgatcta ctgtattaa atttcataaa atgtacagct	11520
gaataagtag agtgacatgt ccgacttgtt ccacgcatac ttaaagggtt tccaatagct	11580
gaagtatcag ttttaaaatt caaatagaaa ttaagataaa cctaaataaa ataaattaag	11640
taacattcag ttcttattc aactagcca aatttctagt gtcagtagc tacacgtggc	11700
tagtggctac catattggat cgtacaaaac ttaggcaagc accaaaacaa agtttgatgc	11760
tgaatcttta gggctaagaa cagtacttgg catgtagtag tctcttggca tgtatttact	11820
gaatgaatga agaagctgcc atataattag gtacacttgt agctgccacc aaggagaagc	11880
tgtagatgcc actagagtgt ttggatgatg ggtaaaactt ccctaggaag ttacaaataa	11940
accagagatt gcataaagga tgaggaggag ttagggatgc taagaatggg agagggttt	12000
ccaggtagag ggtttagcaa gtacaaaagc ttagagggtg agaacagctt ggtgacttgg	12060
agggagtgtg aaaaatgggag cgtttgtctg gcctagtgtg ggagcgtaag aatgacttta	12120
cagggaagggt gagatgtctg tggggaccgt gttaaggaat tctactttct gccaaagaca	12180
gagagagtat ttggaaagggt tttaagtcag ctcatgatgc aagatttgtt gtttttttt	12240
ttttaagtgt ttttttctt ttttttttt ttcttttttg ctgggtgca gtgcagagac	12300
tggcctgtct ggggatagga gtggaaatag ggagccact tagggaaagg agtcagagtg	12360
gaagatgagc ggggtgtgtg tgaggtagtg gtgtagaga tggagagcag gggactgatt	12420
tttaagagaca ttttggagggt ggaatcaaca gccttggctg aggggaactg gcagctggag	12480
gcaggagtgg gagggagtgt gtgtgtggca gctgtgggtg accccaacc ccaggttgcc	12540
aggttgcccc atcccacagg tgctggatgg agaaatgtac ccgccctcgg tagaagaggc	12600
gcctgtgttg atgcactacc cccgaggcat cccgccccag agccagatgg ctgtgggcca	12660
ggagggtgtt gggctgtctc ctgggctcat gctgtatgcc acgctctggc tacgtgagca	12720
caaccgtgtg tgtgacctgc tgaaggctga gcacccacc tggggcgatg agcagctttt	12780
ccagacgacc cgcctcatcc tcataggatg ggactccaga cctgccctgc cctggaagggt	12840
cattccctcc atcctgagaa gttgggggctg ggggggtact tagagggtga ggctgggatt	12900
agaatcctca cccttctgt tagtggctag aagaccttga gcaggccctt caacctctgt	12960
gagcctcgggt ctccaaatct gtacgttggg gtgaacgat attgtaagga tttattgaga	13020
tcatgaatgg gaaggcaact agcacatagc aggccttcag aaaatagatg actgtgatgg	13080
ttgattatta gctgggtgac tcagcacatt tgattagcca ccttagagtct cggtttcccc	13140

tgtgtgctgc gcccgatgc atacttgtgg tccccagcac gtgcagggtc aaactgtaac	13200
ttgcccggcc ttcaggaatc ttcatgttcc ctccctgca tgtatctacc ttcctgcagt	13260
ttggtagctt ctaggtagct caggacagg atatttttgt gtccctatg ggggcgagtc	13320
tgcaacctaa aatgtcagat ggtttcctgc ctgggagctt ggccctgac atccctgtcc	13380
agaccatgtt cgtctgagt caccagtaac tcccttcccc cacctctggc accactgggc	13440
atggctggtc ccaattatag agcctaattc actggagcca tgaagagcca ggcatgtgga	13500
ataggaacag tcattagagg gaagaggggc tggttctgaa gtctcagcgt tgcaaagacc	13560
ttgacctgag agagctggag gctgtccagc acactggctg gagatgaagc tgtgacaaa	13620
ggcaggaccc tagggcacca tttaactccc ctacaacctc atgagccggg tatgattacc	13680
ctgtgaaaaa caagattcag agaggtgaag tgaactctcc agggacactc agcagatgga	13740
gacttgaggt ciggttgcca ccaaaatcta tgcctactcc actccatcac aaagggggct	13800
cttcttgaat gggaaggggt tgcaaacctg agtctgatct gtgacatgtg agtattggaa	13860
agggattccc cctcgcgtct acacttagta ttcctacttt tggctgacat atatggacac	13920
cccgtcttat gccaggcact gtgccagcag ttttgcgtga ttcatgtctt acttctctca	13980
acaaccttaa tatagtattg cattgatgtt attattatta ttatttgaga tggagtcttg	14040
ttctgttgcc cacacagtag tgcaatggcg tgatcttggc tcactgcaac ctctgcctcc	14100
cgggttcgag caattctcgt gtctcagcct ccgagtagc tgggattaca ggtgcccgcc	14160
accatgcctg gctaattttt gtatttttag tagagacagg gttttgccat gttggccagg	14220
atgatcttga actgctgacc tcaggigatc caccgcctt ggcatccaa agttctgggt	14280
ttataggcat gagccacagc gcctggccgc actgatatta ttataacaca cattttacag	14340
ttaaggaaaag tgagattctg agagattaag taactcagcc caagctcagg tggctggaaa	14400
tggtaaagcc aagatttgaa tccaggctctg ctgatccac agtctgtagc tccaggctga	14460
tttccaaaag ccaatttgtc taatggctaa ttggcctgca tatcagtttc tttcaatatc	14520
tagttgcccc gttttaattt tgttacagaa tgttcaattt gcattttccc tggctttttg	14580
ctttctagct ggttatagct acaaatgggg cagaggaaaa acttatttat aagaatcctg	14640
ttatataaga acatatagga aatatgtttt ttgaaatata tttagggtta ggctccccct	14700
ctgtccctcag tattctcttt tgccactgca gcagctctga tgggtctcct tgaagtcccc	14760
ctctatcacc gaggggtgca gcatgatgac agctctcacc agtaaatcct ccacttttcc	14820
atcttttgta gtctctccac ctctctttaa tgggcttcag gagggaggtc ataagaccaa	14880
ttcttggaca cctcctttgc atgtcctgct tagctgggcc tagaacctcc ctctgaaatg	14940
tgggagtagc tgggtctctt gtcttgagac ctcagtcaaa atagaccaa agttctattt	15000
tcacatcctg ttacaaagag acaaatgga agaggccaaa caaaattaaa catcaacagc	15060
aaggccaggt gtgggtggctc acacttgcaa ttccagggtt tttgggaggc tgaggtgaga	15120
gaagtgcttg agacttgag ttcaagacca gcctggataa catagtgaga cccatctct	15180
taaaaaaaaa aaaaaagaaa gaaagaaagc tgggtgtggt ggtacacctg tgggtccagc	15240
tacttgggag gctgaggtgg gaggattgct tgagcccggt aaagttcagg ctgaagtgag	15300
ctgtaattat accattgcgc tccagcttgg gtgacagacc aagacctgt ctgtaaaaat	15360
aaaaataaac atcaacagca acaacaacaa taaagagacc aaaagcaagc acctctcatg	15420

aactggcctg ctttccaagc tgggcatcta aatcactgtg ctggctgac cctatttcca	15480
atcctgccct gcccagggga gaccatcaag attgtcatcg aggagtagct gcagcagctg	15540
agtggctatt tcctgcagct gaaatttgac ccagagctgc tgttcgggtg ccagttccaa	15600
taccgcaacc gcattgccat ggagttcaac catctctacc actggcacc cctcatgcct	15660
gactccttca aggtgggctc ccaggagtag agctacgagc agttcttggt caacacctcc	15720
atgttggtag actatggggt tgaggccctg gtggatgcct tctctcgcca gattgctggc	15780
cgggtaagcc ccagaggagt gctggtaggg gcagggtggc tgagggatcc agcagacctg	15840
ggtccaaatt ccaggttctt cttctgtaaa atggggctga tgtcacttct acagggcagt	15900
tgtaaagcatt cctgtgtgag ttcatgtgtt calttgtcca ttccacaata ccagacatta	15960
ctccaggtag tggagatgta gtgggaacaa gacttttggt gtctctggct catcttttag	16020
tgctcccacc ctagaaagtg atggcagtag tagcacagct gacagcatta gggcccttac	16080
tgcgtgtcag gcactgttct aagagcttct cctatgttat cagaattcta agagtatgtt	16140
ataaaccata gtagaaaagc ccacatgct ctgggagtag ggaagggaca tctgaccag	16200
agttgcgggt tatgggaaaa gaagggaagt ccaagcagaa attggaagga gggatagaga	16260
tttcccaggg taagaggtag tgttagtggc aggggatggc tgtgttccag atagagagga	16320
cggcatgggt gaaaggcatg gaagtcagag gacatggcag tttagaggaa agaaggacat	16380
tcagggcatt gtaagtatg taacagtgcc cgcctatggt gtttattaaa tcataagcct	16440
ccgctctggg ctgaattgtg gctcttttaa agttcgtatg ttgaaatcct aaccgccaga	16500
accttagtat gtgactgcat ttggagacaa ggtctttaaa gaggttaatta agtttaattg	16560
aggtcattag gctgggccct aatccagtgt gacttataag aagaagagat taggtcacac	16620
acacagaggg aaggccacat gaagatgtag ggagaagaaa gccatctaca agccaaggaa	16680
agaggcctca ggagatacca accctgctga caccttgatc ttgaacctct ggtctccaga	16740
cagaggaaat aatttctatt gtttagacca ctcatctgt ggtacattgt catggcagcc	16800
ctagcaaaca aacacattct ctttccctgg aattcccagc caacgccttc ctcaatctcc	16860
ccttctccac attcggaagc tcccatctgc ttcatcgag tctctggctc cctgttgcc	16920
tcacagtctt ctgcttctct ctaatccttg tccctaaacc ctgtcatgaa gctgtggcac	16980
acatggattt ccatttctt ctggtaattt gactgaaatt agcatttgct gccccggtgg	17040
gcagctgctg gctgctttat ggctctttg tcggtttctt tatggttctt tgtggggaca	17100
caagacatga acagagacaa tagcctttgt gtgaggctgg atggttttca gaacgttttc	17160
aaggaatgac catgatgatg tacgtgaaaa gccccggcgt cgtacctggc acaaggcaga	17220
aaggccgcag agatgtatgg actgtcaaga tttttttct ttttctttt tttttaaata	17280
gagatggggt ttgccaatg tggccaggct ggtcttgaac tcctgggctc aagcgatctg	17340
cccgctagg cctctcaagg tgcctggatt ataggcgact ctgaggatat taagaagagt	17400
gagtgatgat aagacagggc tccccctgat aaccttgct catggctacc ctctcagggg	17460
ttcccatgtg accaatactg agataacagc tttagcatagt ttatcccat taaattgacc	17520
acagccatat caggtagatg ctcttccctt ccccatttt acatatgcgg gaactcaaac	17580
ttagcttgaa tagctgccca aggtccctat attagtttcc tcaggctgct gcaacaaagt	17640

accacaaact gggaagctca gagcaacaga tggaggctag aagtctgaat tcaagggtgc	17700
agcagtgccca tgttctctct caaggctcta tgcctccttg gcatctggtg gtggccgaca	17760
gtccctggca ttccctcagct tgcagaggca tgcctctagt ctctgccitt atcatcctgt	17820
ggtagctctcc ctgaacttgt ctttccctcat ttataaaga caccagttaa tggattggag	17880
cccaccctaa tccagtagga tctcatctta acttgattac ttttgcaaag acttcatttc	17940
caaataagga tgcattcacg gatgcagaga gttagggtt caacacatat ttaatatatt	18000
agggaaacaca attcaacct caacagcccc acagcttgta aagctgtaat tggcaccatc	18060
ctctgcttgc ttgctcata ttatttcac caaccatgcc tttcttttt gcccaattat	18120
agttgttgat caaaatgact atctcttaag catgaacgtt attatttcac cctaagcacc	18180
agagctttct tttctttcct ttttttttt ttttttttg agatacaatc ttgctctctt	18240
gcctgggctg gagtgagtg gtgtgatttt ggctcactgt aacctctatc tctgggttc	18300
aagtattca cctgcctcag tctcccaaat agctgggatt actggcacct gccaccacgc	18360
ccagctaatt ttgtatttt tagtagagac gagtctttgc catgttggcc aggtctggtct	18420
tgaactccig gcctcaagtg atcccccgc ctggccctcc taaggctgct ggattacagg	18480
cacaagccac tgtgcctggt cagcaccaga gctttcttta gactaatgcg ccttaactgt	18540
tagtaatcag aatctttttc tgcagctttt ttactttgcc aggttacctg ggctttgagt	18600
tctattttcc ctcccttcac aggggggttac actacctctt ggtgtaattc aacggctcgg	18660
ggagcagtggt gagccacaaa agaggtcctc ttggcccatc ccacacttca aagatgagga	18720
agctgccgga tgtgtgtgtt catgccctga atcccggcag tttgggaggc tgtgtgtgga	18780
ggatcatttg agaccaggag tttagagaca gcctgggcaa tatagtgaga cctcacctct	18840
acaaaaataa aataaaacaa aattagccag gcatgtgtgc acgtgtctgt agtcctagct	18900
acttgagaag ctgagggtggg aggatgtctt gagcctgagg aagttgaggc tacactgagt	18960
caagatcatg ccactgcact ccagccaggg caacagagtg agacagtgtc taaaaaaaaa	19020
cccacaaaaa aaaaatgagg aagctgagac tcagaggggc ttcttgagag agcatgacag	19080
cagcaggccc ggggcaggtc tgcagcatca caactgctag gctgcccac actctccatc	19140
ctagctcaga agggactccc actggaagct cttgtcccag gaacttacc aggtccagg	19200
acagcctggc ctggctccca gaccactgct gtgtctctct ctcggcagat cgggtggggc	19260
aggaacatgg accaccacat cctgcatgtg gcgttgatg tcatcaggga gtctcgggag	19320
atgcggctgc agcccttcaa tgagtaccgc aagaggtttg gcatgaaacc ctacacctcc	19380
ttccaggagc tcttaggtga gcagctgttt cctggatgca gtccctgccc ttgagggact	19440
ggcagcaaag tcagggagac atcaaggaaa tagaacggga caatacatgc ggcaatgtgt	19500
aacaaccaga cttataatgg gcgtggaagt gctgtgccag ggtggtaaat aagcctgctt	19560
ggggagagaa ggtgactttt cagctgggtt tggagaacaa atggcatttt cagtgggaga	19620
agagagggag gagtgtttta ggcagagcaa tagaaagtac aaaggctgcc gggcaagggtg	19680
gctcgcgcct gtaatcctag cactttggga ggctcaggcg ggtggatcac gaggtcagga	19740
aatcgagacc atccctggta acacgatgaa accccgtctc tactaaaaat acaaaaaatt	19800
agccgggcat ggaggcaggc gccgttagtc ccagctactc gggaggctga ggcaggagaa	19860
tggtgtgaac ctgggaggca gagcttcag tgagctgaga ttgcgccact gcactccagc	19920

ctgggcgaca gagcgagaca ccattcctaaa aaaaagaaaag tacaaaggca tagaggctcag	19980
acagcaggia tctagggaaa cagtcataga tgtggctggg gcaaggagct tatgttgttg	20040
gaatgattag tgatgggagg ttggggccaa accgtgtaga atcttgggtt tcatactaaa	20100
tattttgagt tttatttggg ctagtgcctt ctaagtaccc acttacgggc cagctgcata	20160
aaaatcattt agaaagctga ttaagatacc aaatctcaga tgcctctcct acggattctg	20220
attcaaccag cctgggtggg gcccaagaat ctgcgtattc atatgaataa agtatatata	20280
catatataig aatatatata tgaatagagt atatatacat atatatcaat atatacatat	20340
acatatcaat acatatatac atatacacac acatatatat gtgtgtgtat atatatacta	20400
tatatataca tatatatata tacatatata tatatacata tatatatata tatatatata	20460
catatatata tatatataca tatatatata tatatatatt ccccaatata ctcagatgtt	20520
gggcagccaa gtctccagcc ctgttcacat acaatgggga gccactgaag cagggtgtac	20580
atggcccatg agagttccca gtggaggatg gatttgagga actgggcagg gaagcaggga	20640
agctccatat ttgtctcccc ttggccacat gaacatgttg atattgcaga gtggagcaga	20700
ttctgtgcat gagctccttg tgatcctgga acagcatctt attctttact ctcccatgac	20760
aaatggctcc cggggggcaga aggaacactg ccactgaatt tctgtgtgag ctgggacatg	20820
ttacatcttt gagctctagt agtaaaaggg ctggcccgag gctaagggtc tgaatctgt	20880
ctgtgaagga agccagatgg ggagcattct ccttctgtg atgacagggt aattagggcc	20940
cagagtgtgt caaggttata ggctgttttg tggcagatct agggccctga ctttctctt	21000
agtagcattt tccttcccta gaccagtc ccctctaggg gcaatttgtg ctttctctt	21060
tgacctttt cccagtgcc aacctgcca aattctaggg cacatgctca gttgctcaag	21120
ttagtctcct ggagtccta ttatccccag aaaaagggtg acctggaagg gtcccgcctc	21180
aggttgacct taatggcatc atggatctga tgctagcatt tccccttata tcctttagg	21240
agagaaggag atggcagcag agttggagga attgtatgga gacattgatg cgttggagtt	21300
ctacccctgga ctgcttcttg aaaagtcca tccaaactct atctttgggg agagtatgat	21360
agagattggg gctccctttt cctcaagggt tctcctaggg aatcccatct gttctccgga	21420
gtactggaag ccgagcacat ttggcgccga ggtgggcttt aacattgtca agacggccac	21480
actgaagaag ctggcttgcc tcaacaccaa gacctgtccc tacgtttcct tccgtgtgcc	21540
ggatgccagt caggatgatg ggctgtctgt ggagcgacca tccacagagc tctgaggggc	21600
aggaaagcag cattctggag gggagagctt tgtgctgtg attccagagt gctgaggcca	21660
gggctgatgg tcttaaatgc tcatctctg gtttggcatg gtgagtgtg gggttgacat	21720
ttagaacttt aagctccacc cattatctgg aatatgtga ttctgtttat tcttccagaa	21780
tgctgaactc ctgtttagcc cttcagattg ttaggagtggt ttctcatttg gtcgtccaga	21840
atactgggtt cttagttgac aacctagaat gtcagatttc tggttgattt gtaacacagt	21900
cattctagga tgtggagcta ctgatgaat ctgctagaaa gttagggggg tcttattttg	21960
cattccagaa tcttgacttt ctgattgttg attcaaagtg ttgtgttcct ggctgatgat	22020
ccagaacagt ggctcgtatc ccaaatctgt cagcatctgg ctgtctagaa tgtggatttg	22080
attcattttc ctgttcagtg agatatcata gagacggaga tcctaagggt caacaagaat	22140

gcattccctg aatctgtgcc tgcactgaga gggcaaggaa gtggggtgtt ctctctggga	22200
ccccactaa gaccttggtc tgaggatgta gagagaacag gtgggctgta ttcacgccat	22260
tggttggaag ctaccagagc tctatcccca tccaggcttt gactcatggc agctgtttct	22320
catgaagcta ataaaattcg ctttctaaag ttacctgtta tatactcttt ttggtcccat	22380
ccctctaaagc agaggcaaca ctggaacatg gctagccttt cttgtagcca tggctgggcg	22440
tgctagaggt tgtagcatga gactttctgc tgggatcctt gggcccatca ctgtatagac	22500
atgtaccac tggtagctcc tttctccctg cgggccaggc actgcccttt tcaggaagct	22560
ctcttaaaat acccatggcc ccagacctgg aagatataac attcagttcc caccatctga	22620
ttaaaacaac ttccctccctt acagagcata caacagaggg ggcacccggg gaggagagca	22680
catactgigt tccaatttca cgcttttaat tctcatittgt tctcacacca acagtgtgaa	22740
gtgcgtggta taatctccat ttcaaaacca aggaagcagc cttagagttg ttaggtgaca	22800
cacctcacgc aggcctgagc cagagcttgt gctcctcttg attcctggtt tgactcagtt	22860
ccaggcctga tcttgccctg ctggctcagg gtcaaagaca gaatggtgga gtgtagcctc	22920
cacctgatat tcaggctact cattcagttc caaatatgta ttttcctaag tgtttactat	22980
gtgccagttc ctgtaacagg tgtggggaca cagcagtgag taatcaatac agacaagggt	23040
ctgcccttat ggagctcaca ctccagttgc agacaaacag accataaata aggaacgat	23100
gaaataagat atatacaagg tgagtgtgac ttcccttcta accccctctg ctctgtcctc	23160
ccctattgcg ctctcaagac cagagaccca acagcagttg tctcagggca gacagccctc	23220
cactccagct ctgagacctt tttctcagga cctctgtagg cagcagagag agaggacaga	23280
ggggtaagat gagggggtga gggaagggtc ttcatgatcc acactttggg cttagtattt	23340
ctcaggaaga gctatggccc agaaacaaca ggggaaacta gagttcggtc tgacagtcct	23400
tggggttiaa tctcctgtct tatgttcag aaactcctgt tttcctttag ttggctggaa	23460
actgtcctca tcatccttc tggcctctgc tgaatgcagg gaatgcaatc ctccctgtct	23520
cttgagttg ctctgacgta gaaagatcct tcgggtgctg gaagtcctca tgaagagctt	23580
gtgtcctgtc ctttcttgca gattctattt cccctcttct gctaatacct cttactttgc	23640
ttgagaatcc tctcctttct tattaatttc agtcttggtg gttctatcag ggggtcattc	23700
tggccaaggg gtgggcctgt gaatcaatcc tgggcaatca gacaccctct ccttaaaaac	23760
tggcccgtgg agactgagat cactgactct gactcatccc cacagctggc tctgacaaga	23820
tgggtccattt gttcctgctt ccgagatccc cagggcagcc tggatccctg cccttctcaa	23880
gactttagct tttccttcca tccggtggcc tattccagga attcctcttt tgcttaaatc	23940
agttggagtt tgtgtctgtt gcttctaate aagcctttat ggctgctggg ctgagtgaca	24000
caagcacttt aatggcctgg agggactttt aatcagtgaa gatgcaatca gacaagtgtt	24060
ttggaaagag caccctcgag aagggtggat gacagggcag agcaggaagg acaggaagct	24120
ggcagaacgg aggaggtctc agccgtggtc caaccaggag ctgatggcag ctggggctag	24180
gggaagggtc ttgaggttgg aaggatggga tgggttccag aggtattcct ctcttaaatg	24240
caagtgccta gattaggtag actttgctta gtattgacaa ctgcacatga aagttttgca	24300
aagggaacaa ggctaaatgc accaagaaaag cttcttcaga gtgaagaatc ttaatgcttg	24360
taatttaaac atttgttcct ggagttttga ttgggtggat gtgatggttg gttttatttg	24420

tcagtttggg tgggctatag cacacagtta tttaatcaaa cagtaatcta ggtgtggctg	24480
tgaaggtatt ttgtagatgt gattaacatc tacaatcagt tgactttaag tgaaagagat	24540
tacttaata atttgggtga gctgcacctg attagttgaa aggcctcaag aacaaacact	24600
gcagtttcct ggaaaagaag aaactttgcc tcaagactat agccatcgac tcctgcctga	24660
gtttccagcc tgctagtctg ccctatggat ttgaagtttg ccaaccccaa caattgtgtg	24720
aattaatttc taaaaataaa gctatataca gcc	24753

<210> 15
 <211> 8616
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(8616)
 <223> 前列腺素合成酶1核苷酸

<400> 15	
gaccaattgt catacgacit gcagtgagcg tcaggagcac gtccaggaac tcctcagcag	60
cgccctcttc agctccacag ccagacgccc tcagacagca aagcctaccc ccgcgccgcg	120
ccctgcccgc cgcctgcgatg ctgccccgcg ccctgtctgt gtgcgcggtc ctggcgctca	180
gccatacagg tgagtacctg gcgcccgcga ccggggactc cggttcacg caccgggca	240
gagtttccgc tctgacctcc tgggtctatc ccagtactcc gacttctctc cgaatagaga	300
agctacgtga ctgggaaag agcttggacc gctagagttc gaaagaactc cgtggatatt	360
ccagctttcc cacaagcact gatcattatg agccagttac ttaaccgatc tgagacactc	420
tcacctccta aatagggata gatgatacta atttgcaggt tgtcattatg ataagacagg	480
atcigtacaa tatatgtgaa ttgtttatat ttggaacctt tttattgagt ggaagaagtt	540
gttttaata ttctagtcag ttctttcttg ctcccaggaa agcccggatt atgttttaag	600
ataagcaaaa tgccttaaaa gtaagctgtt ttactttgaa tttttcccta aatgttgatt	660
agtgtactag atccatttta atttgaaaag tgaagtgcta cttatttgaa cttcttaaaa	720
atgctaattt taacatctaa agagttaact aagaaaagct tagtaacatg atgtaccaag	780
ttgaatatgc tgttatcctt atttagaata gaaaattggc atttctacgt tttatccatt	840
ctaaggcagg ttaaaaaatt gtatttccat gactacctat atatttcttg aatttattat	900
tgtaaagtig atcatagtc aaacaattaa atgtttaaat taagattaag aactagaga	960
atgatttatt tgctgtcctt taattgcagc aaatccttgc tgttcccacc catgtcaaaa	1020
ccgaggtgta tgtatgagtg tgggatttga ccagtataag tgcgattgta cccggacagg	1080
attctatgga gaaaactgct caacacgtaa gtttgcctt tggttgcctc attaggagtg	1140
gggctggata cagttatcat tgtatagatt tgtgtcttat aatgagtcct attaatctt	1200
ccctcccttt ctctgtcttc ttgcagcgga attttgaca agaataaaat tatttctgaa	1260
acccactcca aacacagtgc actacatact taccacttc aagggaattt ggaacgttgt	1320
gaataacatt cccttcttc gaaatgcaat tatgagttat gtgttgacat gtaagtacaa	1380
gtgtctttct aaggttttta gccttctcaa agaaaaatat gctttataat actgtaagcc	1440
taatctaaaa acatatcttc aagcttatca aaaagacttt aagatagctt ttaagtttgc	1500

cttccatcct aatcgccaaa aatattgaca tttagtccca tccagtttat acagtcctgct	1560
cacaactctg tatacctctt ctaaccttta ctgtttggtc agttttgtga ggtagcatgg	1620
tccagctggt tattgaatgc ccatgggcca cagaattggt ctgaacatgt agcaccatt	1680
aaaataaatt tggatttga tcagcaagaa aataactttc catgattcta aagtgggtgc	1740
catactcagc cattcctttc ataggcctct tggatagtga gcagatggct acctgaaaa	1800
tcaatattgc cagattataa tgtgcagagt atatgtatit tattaaagat gtatttcaag	1860
tggccattag actataaagt gtagttgttt aaaaatagat tttttttatt ttggagttac	1920
attcaacctc aggtgccact ttccacattt tacaataaaa ataatggttg atttacttaa	1980
caaatgagaa taaataaaac attttttct ttgaaaattt cagccagatc acatttgatt	2040
gacagtccac caacttacia tgctgactat ggctacaaaa gctgggaagc cttctctaac	2100
ctctcctatt atactagagc ccttctctct gtgcctgatg attgcccagc tcccttgggt	2160
gtcaaagggt agtaagaaga atccattaga gatgtattaa ctataagacg ggctgcattg	2220
ctgccaaaaa aaaaaattga ccttagacta ccatitattt attaacaaaa gcagttttta	2280
cttttagcat ggttatctat gggtatitit taaagtatga gtctatataa actattatgt	2340
aaaagcaaat gagcgtcttg gtataatgtc ttaatatit taaattattt ctttagaaat	2400
gaaataattc taattaaaat agataaaatc attcagtaag aagtgttcc accatatctt	2460
agaactgttg tttatattat gatcctattc acaattgtaa ttctcatata aatgaagaat	2520
tcttggtaga ttgacagtca ccatctcctt tcttgaatac atagatggat tcttacctta	2580
gctttctcat ttttcaggta aaaagcagct tcttgattca aatgagattg tggaaaaatt	2640
gcttctaaga agaaagtta tccctgatcc ccagggtca aacatgatgt ttgcattctt	2700
tgcccagcac ttcacgcac agtttttcaa gacagatcat aagcgagggc cagctttcac	2760
caacgggctg ggccatgggg taagatagag ttaatatctt agagttagta aaattatacc	2820
aaatcatagt caagggtcaa cattaaagga gatatacaga tagatagatc caaataactt	2880
atccactttt tttaaaaaga agtcttatct ataaaaacct taaaggaatt ttccatttac	2940
ttcactggtc tagtaaaatt atacacacac acagacatgc acacacatat ataaacattc	3000
acacacatac atatgtacag gtattgttat ttgtaatttg acccttgtat ttttagttt	3060
aaaatgttag tactgcaaaa tgttatgtcc tcaaaaacac attgtacat gattatgccg	3120
ctttcaatat tgtaaagtga ggtttttgcc gcattattat tttttggatt tcaatagcat	3180
agcttcaagt tattcgtaag aattttttat aaataatata tttttatact tttttataat	3240
taccataica tcatagtga gtatataata tataigatat aagctcaata tagtatatta	3300
attccgttaa acacaaagac atatcagttt gtagctttgg tggataaaca aattaattta	3360
gcaattcatg gctatgaaaa atgtatatit tatttaaaaa ttttaaagaa agctaaatga	3420
tcaaattatt taatgatga ttatatgata gacactttat ataagaaaaa cttcaacagc	3480
aacaaattaa aattttttca tcattttcta ggtggactta aatcatattt acggtgaaac	3540
tctggctaga cagcgtaaac tgcgcctttt caaggatgga aaaatgaaat atcaggtatg	3600
cttcctttga ctattaagac ttagtattta ccgcttatat ccatatttta aaatccctaa	3660
aaatgtgttc cttaactttt taactgatgt ttattttatt atttattttt ttagataatt	3720

gatggagaga tgtatcctcc cacagtcaaa gatactcagg cagagatgat ctaccctcct	3780
caagtcctctg agcatctacg gtttgctgtg gggcaggagg tctttggctt ggtgcctggt	3840
ctgatgaigt atgccacaat ctggctgcgg gaacacaaca gagtatgcga tgtgcttaaa	3900
caggagcatc ctgaatgggg tgatgagcag ttgttccaga caagcaggct aatactgata	3960
ggtaacaag aaaatgattt atataaaacc ctcttcccca gggaaaatta gttgctatc	4020
tttgttatgt tttagttaa tgacaagatg tggtaaata aaactcacac attctatata	4080
cattaaatat gtaagcatga ctgataaaat agctatcttt tgatactgac aaggaagaaa	4140
acagaaatga aggaatagca aattttaaaa attgcattcc agttgcttga aagcttgtga	4200
tcagatgcaa taaatgtttt tattatttat ttgttgcaa taggagagac tattaagatt	4260
gtgattgaag attatgtgca acacttgagt ggctatcact tcaaactgaa atttgacca	4320
gaactacttt tcaacaaca attccagtac caaaatcgta ttgctgctga atttaacacc	4380
ctctatcact ggcatccct tctgcctgac acctttcaa ttcattgacca gaaatacaac	4440
tatcaacagt ttatctacaa caactctata ttgctggaac atggaattac ccagtttgtt	4500
gaatcattca ccaggcaaat tgctggcagg gtaagcatta ttattgaaaa ccaaaacaaa	4560
agactagtca gtaactttag aatttctgcc acggaaatta tttttcttaa acttactaaa	4620
agagtagtta gttatattgc tagtaaaatt attttattga tataagaagc ctaacttgtt	4680
ttgaaaagtc taaactttta gtctagtcta cagttgtcag acaaatagca aattgtacct	4740
ctaccctaaa aatattttca aaaagtatct ataactttat aggaataaat attttaggct	4800
tgaatactag tgttattttt gaaatgtaa aaggcaaatt agttctaggc tgggtgtcca	4860
ttgaatttta agcagagctc ctgttgaaat gtaggtaagc atctttccag caaataaaaa	4920
ttgtctccgc tgggagtttc agttttacct gatttgtacc taaggcaagc tgaatacaaa	4980
cagtaaatat gcctaaaatt cttgttttac aactaatttt actttccaca ggttgctggt	5040
ggtaggaatg ttccaccgc agtacagaaa gtatcacagg ctccattga ccagagcagg	5100
cagatgaaat accagtcctt taatgagtac cgcaaagctt ttatgctgaa gccctatgaa	5160
tcatittgaag aacttacagg taagaaacag ttctaaact tcttcgtttt ttgtttgttt	5220
gtttgttttt gttgtttttt gttttctttt cgagatggag ccgccctctg tcaccaggc	5280
tggagtgcag tggcgccatc tcggctcact gcaacctccg cctcctgggt tcaagcaatt	5340
ctcctgcctc aacttctga gtagctggga ctacaggctc acgtcgcacg catggataat	5400
tttttgtatt ttcatgtatg acggggtttc accgtgttag ccaggctggt ctcaaactcc	5460
tgacctagtg atccgccgc ttcggcctcc cgaagtgtg ggattacagg cgtgagccac	5520
cgcgcctggc ccctaaactt cttaaaagaa tcagggttca aatggaaaca gagaagtgg	5580
cagcaaatg agcaaaaagaa tcaaaactgtt ttttattttg tgaagtttga cattggttgt	5640
atcictgtct tcatcgctt cacaggagaa aaggaaatgt ctgcagagt ggaagcactc	5700
tatggtgaca togatgtgt ggagctgtat cctgcccttc tggtagaaaa gcctcggcca	5760
gatgccatct ttggtgaaac catggttagaa gttggagcac cattctcctt gaaaggactt	5820
atgggtaatg ttatatgttc tcctgcctac tggaaagcaa gcacttttgg tggagaagtg	5880
ggttttcaaa tcatcaacac tgcccaatt cagtctctca tctgcaataa cgtgaagggc	5940
tgtcccttta ctcatctcag tgttcagat ccagagctca ttaaaacagt caccatcaat	6000

gcaagtcttt cccgctccgg actagatgat atcaatccca cagtactact aaaagaacgt	6060
tcgactgaac tgtagaagtc taatgatcat atttatttat ttatatgaac catgtctatt	6120
aatttaatta ttttaataata tttatattaa actccttatg ttactttaaca tcttctgtaa	6180
cagaagtcag tactcctgtt gcggagaaag gagtcatact tgtgaagact tttatgtcac	6240
tactctaaag attttgctgt tgctgttaag ttgggaaaac agtttttatt ctgttttata	6300
aaccagagag aaatgagitt tgacgtcttt ttacttgaat ttcaacttat attataagaa	6360
cgaaagtaaa gatgtttgaa tacttaaaaca ctgtcacaag atggcaaaat gctgaaagtt	6420
tttactactgt cgatgtttcc aatgcatctt ccatgatgca ttagaagtaa ctaatgtttg	6480
aaattttaaa gtacttttgg ttatttttct gtcacaaac aaaaacaggt atcagtgcat	6540
tattaaatga atatttaaat tagacattac cagtaatttc atgtctactt tttaaaatca	6600
gcaatgaaac aataatttga aattttctaaa ttcatagggt agaatcacct gtaaaagctt	6660
gtttgatttc ttaaagttat taaacttgta catataccaa aaagaagctg tcttggattt	6720
aaatctgtaa aatcagtaga aattttacta caattgcttg ttaaaatatt ttataagtga	6780
tgttcctttt tcaccaagag tataaacctt tttagtgta ctgttaaaac ttccttttaa	6840
atcaaaatgc caaatttatt aagggtgggg agccactgca gtgttatctt aaaataagaa	6900
tattttgttg agatattcca gaatttgitt atatggctgg taacatgtaa aatctatatc	6960
agcaaaaggg tctaccttta aaataagcaa taacaagaa gaaaaccaa ttttgttca	7020
aatttaggtt taaacttttg aagcaaacct tttttatcc ttgtgcactg caggcctggt	7080
actcagattt tgctatgagg ttaatgaagt accaagctgt gcttgaataa tgatatgttt	7140
tctcagattt tctgttgtag agtttaattt agcagtcct atcacattgc aaaagtagca	7200
atgacctcat aaaatacctc ttcaaaatgc ttaaatcat ttcacacatt aattttatct	7260
cagtcttgaa gccaatcag taggtgcatt ggaatcaagc ctggctacct gcatgctgtt	7320
ccttttcttt tcttctttta gccattttgc taagagacac agtcttctca tcacttcgtt	7380
tctcctattt tgttttacta gttttaagat cagagttcac tttctttgga ctctgcctat	7440
attttcttac ctgaactttt gcaagttttc aggtaaacct cagctcagga ctgctattta	7500
gtcctctta agaagattaa aagagaaaaa aaaaggccct tttaaaaata gtatacactt	7560
attttaagtg aaaagcagag aattttattt atagctaatt ttagctatct gtaaccaaga	7620
tggatgcaaa gaggctagt cctcagagag aactgtacgg ggtttgtgac tggaaaaagt	7680
tacgttccca ttctaattaa tgccctttct tatttaaaaa caaaaccaa tgatatctaa	7740
gtagttctca gcaataataa taatgacgat aatacttctt ttccacatct cattgtcact	7800
gacatttaat ggtactgtat attacttaat ttattgaaga ttattattta tgtcttatta	7860
ggacactatg gttataaact gtgtttaagc ctacaatcat tgatttttt ttgttatgtc	7920
acaatcagta tatcttcttt ggggttacct ctctgaatat tatgtaaaca atccaaagaa	7980
atgattgtat taagatttgt gaataaattt ttagaaatct gattggcata ttgagatatt	8040
taaggttgaa tgtttgtcct taggataggc ctatgtgcta gccacaaaag aatattgtct	8100
cattagcctg aatgtgccat aagactgacc ttttaaaatg ttttgaggga tctgtggatg	8160
cttcgttaat ttgttcagcc acaatttatt gagaaaatat tctgtgtcaa gcactgtggg	8220

ttttaatatt ttttaaatcaa acgctgatta cagataatag tatttatata aataattgaa 8280
 aaaaattttc ttttgggaag agggagaaaa tgaaataaat atcattaaag ataactcagg 8340
 agaactcttct ttacaatttt acgttttagaa tgtttaaggt taagaaagaa atagtcaata 8400
 tgcttgtata aaacactggt cactgttttt tttaaaaaaa aaacttgatt tgttattaac 8460
 attgatctgc tgacaaaacc tgggaatttg ggttgtgtat gcgaatgttt cagtgcctca 8520
 gacaaatgtg tatttaactt atgtaaaaga taagtctgga aataaatgtc tgtttatttt 8580
 tgtactattt aaaaattgac agatcttttc tgaaga 8616

<210> 16
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 16

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
 1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 20 25 30

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
 35 40 45

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
 50 55 60

Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
 85 90 95

Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
 100 105 110

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
 115 120 125

Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
 130 135 140

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
 145 150 155 160

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
 165 170 175

Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 180 185

<210> 17
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 17

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 18

<211> 33

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 18

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp

<210> 19

<211> 244

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 19

Met Leu Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Gly His
1 5 10 15

Asp Gln Glu Thr Thr Thr Gln Gly Pro Gly Val Leu Leu Pro Leu Pro
20 25 30

Lys Gly Ala Cys Thr Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly His Pro Gly
35 40 45

His Asn Gly Ala Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr Pro Gly Glu
50 55 60

Lys Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Leu Ile Gly Pro Lys Gly Asp Ile
65 70 75 80

Gly Glu Thr Gly Val Pro Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly
85 90 95

Ile Gln Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Gly Ala Tyr Val Tyr Arg
100 105 110

Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Tyr Val Thr Ile Pro Asn Met
115 120 125

Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn His Tyr Asp
130 135 140

Gly Ser Thr Gly Lys Phe His Cys Asn Ile Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe
145 150 155 160

Ala Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val Ser Leu Phe
165 170 175

Lys Lys Asp Lys Ala Met Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr Gln Glu Asn
180 185 190

Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu Glu Val Gly
195 200 205

Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Glu Gly Glu Arg Asn Gly Leu
210 215 220

Tyr Ala Asp Asn Asp Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe Leu Leu Tyr
225 230 235 240

His Asp Thr Asn

<210> 20
<211> 167
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 20

Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu
1 5 10 15

Phe Tyr Ala Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys
20 25 30

Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
35 40 45

Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro
50 55 60

Gly Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala
65 70 75 80

Val Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln
85 90 95

Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala
100 105 110

Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu
115 120 125

Asp Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val
130 135 140

Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln
145 150 155 160

Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys
165

<210> 21
 <211> 1480
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 21

```

Met Gln Arg Ser Pro Leu Glu Lys Ala Ser Val Val Ser Lys Leu Phe
 1          5          10          15

Phe Ser Trp Thr Arg Pro Ile Leu Arg Lys Gly Tyr Arg Gln Arg Leu
 20          25          30

Glu Leu Ser Asp Ile Tyr Gln Ile Pro Ser Val Asp Ser Ala Asp Asn
 35          40          45

Leu Ser Glu Lys Leu Glu Arg Glu Trp Asp Arg Glu Leu Ala Ser Lys
 50          55          60

Lys Asn Pro Lys Leu Ile Asn Ala Leu Arg Arg Cys Phe Phe Trp Arg
 65          70          75          80

Phe Met Phe Tyr Gly Ile Phe Leu Tyr Leu Gly Glu Val Thr Lys Ala
 85          90          95

Val Gln Pro Leu Leu Leu Gly Arg Ile Ile Ala Ser Tyr Asp Pro Asp
100          105          110

Asn Lys Glu Glu Arg Ser Ile Ala Ile Tyr Leu Gly Ile Gly Leu Cys
115          120          125

Leu Leu Phe Ile Val Arg Thr Leu Leu Leu His Pro Ala Ile Phe Gly
130          135          140

Leu His His Ile Gly Met Gln Met Arg Ile Ala Met Phe Ser Leu Ile
145          150          155          160

Tyr Lys Lys Thr Leu Lys Leu Ser Ser Arg Val Leu Asp Lys Ile Ser
165          170          175

Ile Gly Gln Leu Val Ser Leu Leu Ser Asn Asn Leu Asn Lys Phe Asp
180          185          190

Glu Gly Leu Ala Leu Ala His Phe Val Trp Ile Ala Pro Leu Gln Val
195          200          205

Ala Leu Leu Met Gly Leu Ile Trp Glu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Phe
210          215          220

Cys Gly Leu Gly Phe Leu Ile Val Leu Ala Leu Phe Gln Ala Gly Leu
225          230          235          240

Gly Arg Met Met Met Lys Tyr Arg Asp Gln Arg Ala Gly Lys Ile Ser
245          250          255

Glu Arg Leu Val Ile Thr Ser Glu Met Ile Glu Asn Ile Gln Ser Val
260          265          270
    
```

Lys Ala Tyr Cys Trp Glu Glu Ala Met Glu Lys Met Ile Glu Asn Leu
 275 280 285
 Arg Gln Thr Glu Leu Lys Leu Thr Arg Lys Ala Ala Tyr Val Arg Tyr
 290 295 300
 Phe Asn Ser Ser Ala Phe Phe Phe Ser Gly Phe Phe Val Val Phe Leu
 305 310 315 320
 Ser Val Leu Pro Tyr Ala Leu Ile Lys Gly Ile Ile Leu Arg Lys Ile
 325 330 335
 Phe Thr Thr Ile Ser Phe Cys Ile Val Leu Arg Met Ala Val Thr Arg
 340 345 350
 Gln Phe Pro Trp Ala Val Gln Thr Trp Tyr Asp Ser Leu Gly Ala Ile
 355 360 365
 Asn Lys Ile Gln Asp Phe Leu Gln Lys Gln Glu Tyr Lys Thr Leu Glu
 370 375 380
 Tyr Asn Leu Thr Thr Thr Glu Val Val Met Glu Asn Val Thr Ala Phe
 385 390 395 400
 Trp Glu Glu Gly Phe Gly Glu Leu Phe Glu Lys Ala Lys Gln Asn Asn
 405 410 415
 Asn Asn Arg Lys Thr Ser Asn Gly Asp Asp Ser Leu Phe Phe Ser Asn
 420 425 430
 Phe Ser Leu Leu Gly Thr Pro Val Leu Lys Asp Ile Asn Phe Lys Ile
 435 440 445
 Glu Arg Gly Gln Leu Leu Ala Val Ala Gly Ser Thr Gly Ala Gly Lys
 450 455 460
 Thr Ser Leu Leu Met Val Ile Met Gly Glu Leu Glu Pro Ser Glu Gly
 465 470 475 480
 Lys Ile Lys His Ser Gly Arg Ile Ser Phe Cys Ser Gln Phe Ser Trp
 485 490 495
 Ile Met Pro Gly Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile Phe Gly Val Ser Tyr
 500 505 510
 Asp Glu Tyr Arg Tyr Arg Ser Val Ile Lys Ala Cys Gln Leu Glu Glu
 515 520 525
 Asp Ile Ser Lys Phe Ala Glu Lys Asp Asn Ile Val Leu Gly Glu Gly
 530 535 540
 Gly Ile Thr Leu Ser Gly Gly Gln Arg Ala Arg Ile Ser Leu Ala Arg
 545 550 555 560
 Ala Val Tyr Lys Asp Ala Asp Leu Tyr Leu Leu Asp Ser Pro Phe Gly
 565 570 575

Tyr Leu Asp Val Leu Thr Glu Lys Glu Ile Phe Glu Ser Cys Val Cys
 580 585 590
 Lys Leu Met Ala Asn Lys Thr Arg Ile Leu Val Thr Ser Lys Met Glu
 595 600 605
 His Leu Lys Lys Ala Asp Lys Ile Leu Ile Leu His Glu Gly Ser Ser
 610 615 620
 Tyr Phe Tyr Gly Thr Phe Ser Glu Leu Gln Asn Leu Gln Pro Asp Phe
 625 630 635 640
 Ser Ser Lys Leu Met Gly Cys Asp Ser Phe Asp Gln Phe Ser Ala Glu
 645 650 655
 Arg Arg Asn Ser Ile Leu Thr Glu Thr Leu His Arg Phe Ser Leu Glu
 660 665 670
 Gly Asp Ala Pro Val Ser Trp Thr Glu Thr Lys Lys Gln Ser Phe Lys
 675 680 685
 Gln Thr Gly Glu Phe Gly Glu Lys Arg Lys Asn Ser Ile Leu Asn Pro
 690 695 700
 Ile Asn Ser Ile Arg Lys Phe Ser Ile Val Gln Lys Thr Pro Leu Gln
 705 710 715 720
 Met Asn Gly Ile Glu Glu Asp Ser Asp Glu Pro Leu Glu Arg Arg Leu
 725 730 735
 Ser Leu Val Pro Asp Ser Glu Gln Gly Glu Ala Ile Leu Pro Arg Ile
 740 745 750
 Ser Val Ile Ser Thr Gly Pro Thr Leu Gln Ala Arg Arg Arg Gln Ser
 755 760 765
 Val Leu Asn Leu Met Thr His Ser Val Asn Gln Gly Gln Asn Ile His
 770 775 780
 Arg Lys Thr Thr Ala Ser Thr Arg Lys Val Ser Leu Ala Pro Gln Ala
 785 790 795 800
 Asn Leu Thr Glu Leu Asp Ile Tyr Ser Arg Arg Leu Ser Gln Glu Thr
 805 810 815
 Gly Leu Glu Ile Ser Glu Glu Ile Asn Glu Glu Asp Leu Lys Glu Cys
 820 825 830
 Phe Phe Asp Asp Met Glu Ser Ile Pro Ala Val Thr Thr Trp Asn Thr
 835 840 845
 Tyr Leu Arg Tyr Ile Thr Val His Lys Ser Leu Ile Phe Val Leu Ile
 850 855 860
 Trp Cys Leu Val Ile Phe Leu Ala Glu Val Ala Ala Ser Leu Val Val

865		870		875		880
Leu Trp Leu Leu Gly Asn Thr Pro Leu Gln Asp Lys Gly Asn Ser Thr						
		885		890		895
His Ser Arg Asn Asn Ser Tyr Ala Val Ile Ile Thr Ser Thr Ser Ser						
		900		905		910
Tyr Tyr Val Phe Tyr Ile Tyr Val Gly Val Ala Asp Thr Leu Leu Ala						
		915		920		925
Met Gly Phe Phe Arg Gly Leu Pro Leu Val His Thr Leu Ile Thr Val						
		930		935		940
Ser Lys Ile Leu His His Lys Met Leu His Ser Val Leu Gln Ala Pro						
		945		950		955
Met Ser Thr Leu Asn Thr Leu Lys Ala Gly Gly Ile Leu Asn Arg Phe						
		965		970		975
Ser Lys Asp Ile Ala Ile Leu Asp Asp Leu Leu Pro Leu Thr Ile Phe						
		980		985		990
Asp Phe Ile Gln Leu Leu Leu Ile Val Ile Gly Ala Ile Ala Val Val						
		995		1000		1005
Ala Val Leu Gln Pro Tyr Ile Phe Val Ala Thr Val Pro Val Ile						
		1010		1015		1020
Val Ala Phe Ile Met Leu Arg Ala Tyr Phe Leu Gln Thr Ser Gln						
		1025		1030		1035
Gln Leu Lys Gln Leu Glu Ser Glu Gly Arg Ser Pro Ile Phe Thr						
		1040		1045		1050
His Leu Val Thr Ser Leu Lys Gly Leu Trp Thr Leu Arg Ala Phe						
		1055		1060		1065
Gly Arg Gln Pro Tyr Phe Glu Thr Leu Phe His Lys Ala Leu Asn						
		1070		1075		1080
Leu His Thr Ala Asn Trp Phe Leu Tyr Leu Ser Thr Leu Arg Trp						
		1085		1090		1095
Phe Gln Met Arg Ile Glu Met Ile Phe Val Ile Phe Phe Ile Ala						
		1100		1105		1110
Val Thr Phe Ile Ser Ile Leu Thr Thr Gly Glu Gly Glu Gly Arg						
		1115		1120		1125
Val Gly Ile Ile Leu Thr Leu Ala Met Asn Ile Met Ser Thr Leu						
		1130		1135		1140
Gln Trp Ala Val Asn Ser Ser Ile Asp Val Asp Ser Leu Met Arg						
		1145		1150		1155

Ser Val Ser Arg Val Phe Lys Phe Ile Asp Met Pro Thr Glu Gly
1160 1165 1170

Lys Pro Thr Lys Ser Thr Lys Pro Tyr Lys Asn Gly Gln Leu Ser
1175 1180 1185

Lys Val Met Ile Ile Glu Asn Ser His Val Lys Lys Asp Asp Ile
1190 1195 1200

Trp Pro Ser Gly Gly Gln Met Thr Val Lys Asp Leu Thr Ala Lys
1205 1210 1215

Tyr Thr Glu Gly Gly Asn Ala Ile Leu Glu Asn Ile Ser Phe Ser
1220 1225 1230

Ile Ser Pro Gly Gln Arg Val Gly Leu Leu Gly Arg Thr Gly Ser
1235 1240 1245

Gly Lys Ser Thr Leu Leu Ser Ala Phe Leu Arg Leu Leu Asn Thr
1250 1255 1260

Glu Gly Glu Ile Gln Ile Asp Gly Val Ser Trp Asp Ser Ile Thr
1265 1270 1275

Leu Gln Gln Trp Arg Lys Ala Phe Gly Val Ile Pro Gln Lys Val
1280 1285 1290

Phe Ile Phe Ser Gly Thr Phe Arg Lys Asn Leu Asp Pro Tyr Glu
1295 1300 1305

Gln Trp Ser Asp Gln Glu Ile Trp Lys Val Ala Asp Glu Val Gly
1310 1315 1320

Leu Arg Ser Val Ile Glu Gln Phe Pro Gly Lys Leu Asp Phe Val
1325 1330 1335

Leu Val Asp Gly Gly Cys Val Leu Ser His Gly His Lys Gln Leu
1340 1345 1350

Met Cys Leu Ala Arg Ser Val Leu Ser Lys Ala Lys Ile Leu Leu
1355 1360 1365

Leu Asp Glu Pro Ser Ala His Leu Asp Pro Val Thr Tyr Gln Ile
1370 1375 1380

Ile Arg Arg Thr Leu Lys Gln Ala Phe Ala Asp Cys Thr Val Ile
1385 1390 1395

Leu Cys Glu His Arg Ile Glu Ala Met Leu Glu Cys Gln Gln Phe
1400 1405 1410

Leu Val Ile Glu Glu Asn Lys Val Arg Gln Tyr Asp Ser Ile Gln
1415 1420 1425

Lys Leu Leu Asn Glu Arg Ser Leu Phe Arg Gln Ala Ile Ser Pro
1430 1435 1440

Ser Asp Arg Val Lys Leu Phe Pro His Trp Asn Ser Ser Lys Cys
1445 1450 1455

Lys Ser Lys Pro Gln Ile Ala Ala Leu Lys Glu Glu Thr Glu Glu
1460 1465 1470

Glu Val Gln Asp Thr Arg Leu
1475 1480

<210> 22
<211> 178
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 22

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val
1 5 10 15

Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His
20 25 30

Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe
35 40 45

Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu
50 55 60

Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys
65 70 75 80

Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro
85 90 95

Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu
100 105 110

Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg
115 120 125

Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn
130 135 140

Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu
145 150 155 160

Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile
165 170 175

Arg Asn

七、申請專利範圍：

1. 一種供使用之腺病毒相關病毒 (adeno-associated virus)，該腺病毒相關病毒包含編碼紅血球生成素 (EPO) 之多核苷酸，該供使用之腺病毒相關病毒係用於誘導、調節或增強哺乳動物之 EPO 表現之方法，其中該方法包含

(a) 投予腺病毒相關病毒至該哺乳動物，其中該病毒包含編碼 EPO 之多核苷酸；及

(b) 投予活化配體 (activator ligand)，該活化配體誘導該編碼 EPO 之病毒多核苷酸表現 EPO，

其中該腺病毒相關病毒係經肌肉內投予，

其中該腺病毒相關病毒另包含以蛻皮激素受體 (EcR) 為基底之基因開關，

其中該基因開關包含與第一啟動子可操作性連接之至少一個轉錄因子序列，

其中由該至少一個轉錄因子序列編碼之至少一個轉錄因子係配體依賴性轉錄因子，

其中該腺病毒相關病毒另包含與該編碼 EPO 之多核苷酸可操作性連接之第二啟動子，其中該第二啟動子係於投予活化配體之後由該至少一個配體依賴性轉錄因子活化，及

其中，在投予活化配體之後，相較於投予配體之前的血容比或紅血球體積百分比，該哺乳動物之血容比或血中紅血球的體積百分比增加至少 25%。

2. 如申請專利範圍第 1 項之供使用之腺病毒相關病毒

，其中該哺乳動物係人。

3.如申請專利範圍第 1 項之供使用之腺病毒相關病毒，其中 EPO 之表現係藉由控制該經投予之活化配體之劑量加以誘導、調節或增強。

4.如申請專利範圍第 3 項之供使用之腺病毒相關病毒，其中活化配體係以足以誘導或維持正常生理範圍內之 EPO 表現量的劑量投予。

5.如申請專利範圍第 1 項之供使用之腺病毒相關病毒，其中該編碼 EPO 之多核苷酸包含與 SEQ ID NO: 6 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 一致性之胺基酸序列。

6.如申請專利範圍第 1 項之供使用之腺病毒相關病毒，其中，在投予活化配體之後，相較於投予配體之前的血容比或紅血球體積百分比，該哺乳動物之血容比或血中紅血球的體積百分比增加至少 40%。

7.如申請專利範圍第 1 項之供使用之腺病毒相關病毒，其中該基因開關係 RheoSwitch® 基因開關。

8.如申請專利範圍第 1 項之供使用之腺病毒相關病毒，其中該活化配體係二醯基肼配體。

9.如申請專利範圍第 1 項之供使用之腺病毒相關病毒，其中該活化配體係選自由 RG-115819、RG-115932 及 RG-115830 所組成的群組。

10.如申請專利範圍第 1 項之供使用之腺病毒相關病毒，其中該活化配體係 RG-115932。

11.如申請專利範圍第 1 項之供使用之腺病毒相關病毒，其中該基因開關包含在第一治療性開關啟動子控制下之第一轉錄因子序列及在第二治療性開關啟動子控制下之第二轉錄因子序列，其中由該第一轉錄因子序列及該第二轉錄因子序列所編碼之蛋白質交互作用以形成功能為配體依賴性轉錄因子之蛋白質複合物。

12.如申請專利範圍第 11 項之供使用之腺病毒相關病毒，其中該第一轉錄因子序列包含編碼 VP-16 反式活化結構域(transactivation domain)及類視色素 X 受體(retinoic X receptor) (RXR) 蛋白質之核酸。

13.如申請專利範圍第 12 項之供使用之腺病毒相關病毒，其中該第二轉錄因子序列包含編碼 GAL-4 DNA 結合結構域及蛻皮激素受體 (EcR) 蛋白質之核酸。

14.如申請專利範圍第 11 項之供使用之腺病毒相關病毒，其中該第一轉錄因子序列包含編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含 HSV-VP 16 的轉錄活化結構域及源自人序列及蝗蟲飛蝗超氣門多肽(Locusta migratoria ultraspiracle polypeptide)(Lm USP)的嵌合性 RXR。

15.如申請專利範圍第 14 項之供使用之腺病毒相關病毒，其中該第二轉錄因子序列包含編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含酵母菌 Gal4 的 DNA 結合結構域及來自昆蟲雲杉芽捲蛾 (Choristoneura fumiferana) 之經突變之蛻皮激素受體的 DEF 結構域。

16.一種供使用之腺病毒相關病毒，該腺病毒相關病

毒包含編碼紅血球生成素（EPO）之多核苷酸，該供使用之腺病毒相關病毒係用於誘導、調節或增強哺乳動物之 EPO 表現之方法，其中該方法包含

(a) 投予該腺病毒相關病毒至該哺乳動物；及

(b) 投予活化配體，該活化配體誘導該編碼 EPO 之病毒多核苷酸表現 EPO，

其中該腺病毒相關病毒係經肌肉內投予，其中該腺病毒相關病毒另包含以蛻皮激素受體（EcR）為基底之基因開關，該基因開關包含在第一治療性開關啟動子控制下之第一轉錄因子序列，該第一轉錄因子序列包含編碼 VP-16 反式活化結構域及類視色素 X 受體（RXR）蛋白質之核酸；及在第二治療性開關啟動子控制下之第二轉錄因子序列，該第二轉錄因子序列包含編碼 GAL-4 DNA 結合結構域及蛻皮激素受體蛋白質之核酸，

其中由該第一轉錄因子序列及該第二轉錄因子序列所編碼之蛋白質交互作用以形成功能為配體依賴性轉錄因子之蛋白質複合物，

其中該腺病毒相關病毒另包含與該編碼 EPO 之多核苷酸可操作性連接之第二啟動子，其中該第二啟動子係於投予活化配體之後由該配體依賴性轉錄因子活化。