



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101906418 B

(45) 授权公告日 2013.06.12

(21) 申请号 201010226760.6

A61P 43/00(2006.01)

(22) 申请日 2006.09.05

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

2005-261366 2005.09.08 JP

CN 1136277 A, 1996.11.20, 全文.

CN 1242236 A, 2000.01.26, 全文.

(62) 分案原申请数据

200680041278.7 2006.09.05

Takemoto M. et al. The R3 Region,

One of Three Major Repetitive Regions

of Human Herpesvirus 6, Is a Strong

Enhancer of Immediate-Early Gene U95.

《Journal of Virology》. American Society for

Microbiology, 2001, 第75卷(第21期), 10149 -

10160.

(73) 专利权人 财团法人阪大微生物病研究会

地址 日本大阪府吹田市山田丘3番1号大阪
大学内

Singer O. 等. Human herpesvirus 7

(HHV-7) DNA: analyses of clones spanning the

entire genome. 《Archives of Virology》. 1997,

第142卷(第2期), 第287-303页.

(72) 发明人 武本真清 森康子 山西弘一

福家功 五味康行 高桥理明

Nicholas J. et al. Determination and

Analysis of the Complete Nucleotide

Sequence of Human Herpesvirus 7. 《Journal

of Virology》. American Society for

Microbiology, 1996, 第70卷(第9

期), 5975-5989.

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 郭文洁

审查员 蔡苗

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2010.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12P 21/00(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

A61P 31/18(2006.01)

权利要求书2页 说明书46页

序列表31页 附图11页

(54) 发明名称

用于将基因导入淋巴细胞或血细胞中的启动
子及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种启动子,其在免疫系统细胞
和/或血细胞,如淋巴细胞中选择性地有效诱导
基因表达。在本发明中,通过发现在免疫系统细
胞和/或血细胞,如T淋巴细胞中,HHV6 MIE启动
子、HHV7 MIE启动子和HHV7 U95启动子出乎意外
地诱导特性的基因表达,从而实现发明目的。利用
这些启动子,能够实现选择性地递送DNA疫苗等。

CN 101906418 B

1. 一种包含 HHV7 的 U95 启动子的经分离的核酸, 其由 SEQ ID NO :12 所示的序列组成, 其中所述的核酸具有启动子活性。
2. 一种包含按照权利要求 1 的经分离核酸的核酸构建体。
3. 按照权利要求 2 的核酸构建体, 其包含编码外源基因的序列, 其与该启动子不相关但是被可操作地连接到所述启动子序列上。
4. 按照权利要求 3 的核酸构建体, 其中所述外源基因编码药物、将被删除的隐性基因或者选择性标记。
5. 按照权利要求 4 的核酸构建体, 其中选择性标记允许在培养基中选择其中导入了该核酸构建体的宿主。
6. 按照权利要求 4 的核酸构建体, 其中选择性标记允许从视觉上选择其中导入了该核酸构建体的宿主。
7. 按照权利要求 4 的核酸构建体, 其中选择性标记包含次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶或者一种选自绿色荧光蛋白、兰绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白和红色荧光蛋白组成的组的荧光标记。
8. 按照权利要求 4 的核酸构建体, 其中选择性标记对其中导入了核酸构建体的宿主不具有毒性。
9. 按照权利要求 4 的核酸构建体, 其中将被删除的隐性基因选自 ADA 基因、PNP 基因、 γ c 链基因、TAP 基因、MHC II 基因、X-连接的 WASP、CD40 配体、PI3 κ 样基因和 DNA 解旋酶组成的组。
10. 按照权利要求 4 的核酸构建体, 其中药物选自 RNAi 分子、细胞因子、蛋白激素和肽激素组成的组。
11. 按照权利要求 10 的核酸构建体, 其中所述细胞因子是趋化因子。
12. 按照权利要求 10 的核酸构建体, 其中所述细胞因子是生长因子。
13. 按照权利要求 3 的核酸构建体, 其中所述启动子在血细胞系细胞中诱导外源基因的特异性表达。
14. 按照权利要求 13 的核酸构建体, 其中所述血细胞系细胞是 T 细胞。
15. 一种包含按照权利要求 2 的核酸构建体的表达载体。
16. 一种包含按照权利要求 2 的核酸构建体的细胞。
17. 按照权利要求 16 的细胞, 其中所述细胞对于所述启动子序列来说是异源的。
18. 一种包含按照权利要求 2 的核酸构建体的组织。
19. 一种包含按照权利要求 2 的核酸构建体的器官。
20. 一种药物组合物, 其包含按照权利要求 1 的经分离的核酸和编码一种抗原的序列。
21. 按照权利要求 20 的药物组合物, 其是 DNA 疫苗。
22. 一种用于治疗期望通过淋巴细胞特异性治疗的疾病、异常或症状的药物组合物, 其包含按照权利要求 1 的经分离的核酸以及用于所述治疗的核酸序列。
23. 按照权利要求 21 的药物组合物, 其中用于所述治疗的核酸序列包含选自编码细胞因子、蛋白激素、肽激素、核酶和 RNAi 的序列组成的组的序列。
24. 按照权利要求 23 的药物组合物, 其中所述细胞因子是趋化因子。
25. 按照权利要求 23 的药物组合物, 其中所述细胞因子是生长因子。

26. 用于以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白质的体外方法,包括步骤:

A) 制备一种核酸构建体,其中按照权利要求 1 的经分离的核酸被可操作地连接到编码蛋白质的核酸序列上;和

B) 使该核酸构建体处于其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下。

27. 用于以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白质的试剂盒,包含:

A) 一种核酸构建体,其中按照权利要求 1 的经分离的核酸被可操作地连接到编码蛋白质的核酸序列上;和

B) 用于使核酸构建体处于其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下的工具。

28. 用于以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白质的试剂盒,包含:

A) 按照权利要求 1 的经分离的核酸;和

B) 用于制备其中所述启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体的工具。

29. 用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白的疾病、异常或症状的试剂盒,包含:

A) 其中按照权利要求 1 的经分离的核酸被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体;和

B) 用于使该核酸构建体处于其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下的工具。

30. 用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白的疾病、异常或症状的试剂盒,包含:

A) 按照权利要求 1 的经分离的核酸;和

B) 用于制备其中所述启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体的工具。

31. 一种制备蛋白质的方法,包括步骤:

A) 制备其中按照权利要求 1 的经分离的核酸被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体;和

B) 使该核酸构建体处于其中该启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下。

32. 用于制备蛋白质的试剂盒,包含:

A) 其中按照权利要求 1 的经分离的核酸被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体;和

B) 用于使该核酸构建体处于其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下的工具。

33. 用于制备蛋白质的试剂盒,包含:

A) 按照权利要求 1 的经分离的核酸;和

B) 用于制备其中所述启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体的工具。

34. 按照权利要求 1 的经分离的核酸在制造一种用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白的疾病、异常或症状的药物组合物中的用途。

用于将基因导入淋巴细胞或血细胞中的启动子及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及用于将基因导入淋巴细胞或血细胞中的启动子以及其应用

[0002] 本申请是申请日为 2006 年 9 月 5 日, 申请号为 200680041278.7 的、发明名称和本发明相同的发明专利申请的分案申请。

背景技术

[0003] 为了治疗以淋巴细胞为靶的各种疾病, 例如人免疫缺陷病毒 (HIV) 感染, 亟待建立针对淋巴细胞实施基因治疗的技术。但是, 迄今尚未开发出令人满意的、向淋巴细胞导入所需基因的载体系统。

[0004] 疱疹病毒 (HHV) 是属于疱疹病毒属的病毒的总称。人疱疹病毒 6 和 7 (HHV-6 和 HHV-7) 均是属于疱疹病毒属 β 疱疹病毒亚属的双链 DNA 病毒, 是引发幼儿急诊的病毒 (Yamanishi K. 等人, "Identification of human herpesvirus 6 as a casual agent for exanthem subitum", Lancet 1988 ; i :1065-1067 以及 Tanaka K. 等人, "Human herpesvirus 7 :Another casual agent for roseola(exanthem subitum)", J. pediatr. , 1994 ;125 :1-5)。HHV-6 包括 HHV-6A 和 HHV-6B 两株。它多在幼儿期患病, 引起以突发高热以及在退热前后发疹子为特征的病毒感染症, 一般预后良好。由于 HHV-7 感染具有比 HHV-6 感染迟的倾向 (Tanaka K. 等人, "Seroepidemiological study of human herpesvirus-6 and -7 in children of different ages and detection of those two viruses in throat swabs by polymerase chain reaction", Journal of Medical Virology, 1996 ; 48 :88-94), 故从临床经验来看, 由 HHV-7 引起的幼儿急诊多为第二次幼儿急诊。有报道称, 血清流行病学检查发现, 几乎所有儿童在 2-3 岁前均表现为 HHV-6 和 HHV-7 抗体阳性, 隐性感染率为 20-40%。

[0005] HHV-7 是 1990 年 Frenkel 等人在培养健康正常人末梢血的 CD4⁺T 淋巴细胞过程中发生了细胞病理效应而发现的疱疹病毒 (Frankel N. 等人, "Isolation of a new herpesvirus from human CD4⁺T cells", ProNAS USA, 87 :749-752, ProNAS USA, 87 : 749-752, 1990)。它是从人末梢血单核细胞中分离出来的病毒。HHV-6、HHV-7 均为嗜 CD4⁺T 淋巴细胞的病毒。HHV-7 通过细胞表面的 CD4 受体进行感染, 它只能在人 T 淋巴细胞中增殖。因此, HHV-7 是可用来对人 T 淋巴细胞进行基因修饰的病毒。

[0006] HHV-7 的基因组为双链 DNA, 约 145kbp。Nicholas 等人已测定出了其全部的碱基序列, 已知其基因组中至少存在 101 个基因 (John N. 等人, Journal of Virology, Sep. 1996, 5975-5989)。

[0007] 然而, 对于这些 HHV 来说, 目前还没有对它们的启动子活性进行详细分析。此外, 淋巴细胞对这些病毒具有特异性, 这是由于这些病毒与细胞中的受体相互作用, 以及这些病毒仅能够在人 T 淋巴细胞中增殖的生活周期。

[0008] 此外, 一般认为这些病毒对健康的正常人几乎没有危害, 特别是 HHV-7。将含有各种病毒 (如腮腺炎病毒) 的抗原决定簇的基因整合到 HHV-7 病毒基因组中并在 HHV-7 中进

行表达,则 HHV-7 可用作疫苗。但是,当 HHV-7 作为疫苗时,其在传代培养的同时基因型会发生变化,从品质管理和品质保证的角度考虑,这是不优选的。因此,将重组病毒作为疫苗使用时,需要稳定地提供源于单一的重组基因型的病毒。为此,需要开发出制备具有单一基因型的 HHV-7 重组病毒的方法。

[0009] 再有,人们研究了 T 淋巴细胞株 SupT1 细胞中 HIV 感染和亲 T 淋巴细胞的人疱疹病毒 (HHV-6A (U1102 株)、HHV-7 (MRK, MSO 株)) 之间的关系。HHV-7 株结合细胞表面的 CD4 受体,能在 SupT1 细胞中很好地增殖,但其不能感染 SupT1/HIV 细胞。相反地,已经认识到 HHV-6A 株可感染经 HIV 持续感染的 SupT1 细胞 (SupT1/HIV) 并呈现出明显的 CPE (Masao Yamada 等人,“HIV Jizokukansen SupT1 Saibo heno HHV-6 oyobi-7 Choufukukanssen no Kokoromi (Attempt for HHV-6and -7 Superinfection to HIV Persistent Infection Sup-T1 Cell)”, Title No.122, Titles and Abstracts of the 7th Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research,1993, Tokyo)。

[0010] 理想的 HIV 疫苗能够产生针对所有类型 HIV 的优良而持久的保护作用。另一方面,传统的灭活 HIV 疫苗有优势也有缺陷,下文将进行部分说明。一种制备重组疫苗的方法采用常规技术。然而,由于其难以维持免疫原性 (immunogenicity) (免疫原性低),需要使用佐剂进行大剂量的抗原负载和频繁地接种。安全性是最值得关注的。含有裸露的或重组的亚单位的亚单位疫苗是安全的。然而,由于使用亚单位并且免疫原性低,该疫苗需要用佐剂进行大剂量的抗原负载以及频繁地接种。而且,安全性是最重要的问题。此外,含有裸露的或重组的亚单位的亚单位疫苗可能是安全的,但是由于这些亚单位的选择性差以及免疫原性低而受到限制,因此,需要开发用于处理免疫应答细胞的有用疫苗,如 HIV 疫苗等等。

[0011] [非专利文献 1] Yamanishi K 等人,“Identification of human herpesvirus 6 as a casual agent for exanthem subitum.”, Lancet 1988 ;i :pp.1065-1067

[0012] [非专利文献 2] Tanaka K 等人,“Human herpesvirus 7 :Another casual agent for roseola(exanthem subitum)”, J pediatr.1994 ;125 :pp.1-5

[0013] [非专利文献 3] Tanaka-Taya K 等人,“Seroepidemiological study of human herpesvirus-6 and -7 in children of different ages and detection of those two viruses in throat swabs by polymerase chain reaction”, Journal of Medical Virology. 1996 ;48 :pp.88-94

[0014] [非专利文献 4] Frankel N 等人,“Isolation of a new herpesvirus from human CD4+T cells.”, ProNAS USA 87 :749-752, ProNAS USA 87 :749-752,1990

[0015] [非专利文献 5] John N. 等人, Journal of Virology, Sep. 1996, pp.5975-5989

[0016] [非专利文献 6] Masao Yamada 等人,“HIV Jizokukansen SupT1 Saibo heno HHV-6 oyobi-7 Choufukukanssen no Kokoromi (Attempt for HHV-6and -7 Superinfection to HIV Persistent Infection Sup-T1 Cell)”, Title No.122, Titles and Abstracts of the 7th Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research,1993, Tokyo

发明内容

[0017] 发明要解决的技术问题

[0018] 本发明的目的在于提供一种启动子,其在免疫系统细胞或血细胞中,如在淋巴细

胞中选择性地有效诱导基因表达。

[0019] 解决技术问题的手段

[0020] 本发明发现 HHV6 的 MIE 启动子、HHV67 的 MIE 启动子以及 HHV7 的 U95 启动子令人惊奇地在免疫应答细胞如 T 淋巴细胞或血细胞系细胞中诱导特异性表达,已经解决了上述问题。

[0021] DNA 疫苗是一种诱人的新技术,在其开发过程中,有效表达的启动子是关键。迄今,人巨细胞病毒 (HCMV) 立即早期 (IE) 启动子被广泛地用于 DNA 疫苗。这是由于一般认为总体上 HCMV IE 启动子在各种细胞中具备有效活性。然而,据报道,HCMV IE 启动子在淋巴细胞系细胞中的表达效率低,并且出现由甲基化等原因而引起的灭活现象。而且,还存在与多种限制相关的问题,这阻碍 HHV IE 启动子在 DNA 疫苗中的应用。

[0022] 已知 HCMV 能够感染有限数量的细胞,其能够感染成纤维细胞和血液内皮细胞等。另一方面,HHV-6 感染婴儿,并引起幼儿急诊或者幼儿玫瑰疹 (roseola infantum),并且已知在人淋巴细胞特别是 T 细胞中,HHV-6 能够很好地增殖。本发明人已经在本发明中阐明了 HHV-6 的主要立即早期基因 (MIE) 与 HCMV 一样,具有强大的启动子活性,HHV-6 属于人疱疹病毒属 β 疱疹病毒亚属。本发明人还阐明 MIE 基因启动子可用于 DNA 疫苗。HHV-7 也是定向 CD4⁺T 淋巴细胞的病毒,并且它的启动子可用于开发 DNA 疫苗,例如该疫苗用于阻止或治疗与 CD4⁺T 淋巴细胞相关的疾病。本发明人在本发明中还阐明 HHV 7 MIE 启动子和 HHV 7 U95 启动子的效用,因此也阐明了这些启动子可被用于制备 DNA 疫苗。

[0023] 因此,本发明提供了如下内容:

[0024] (1)HHV6B 的 MIE 启动子。

[0025] (2) 如 1 项的启动子,其至少包含 SEQ ID NO :1 所示的序列中的 8 个毗邻的核苷酸。

[0026] (3) 如 1 项的启动子,其至少包含 SEQ ID NO :1 中所示的序列中的 R3 区或其功能性变体。

[0027] (4) 如 1 项的启动子,其至少包含距离 SEQ ID NO :1 的转录起始点 -574 到 -427 的序列 (SEQ ID NO :13)。

[0028] (5) 如 1 项的启动子,其至少包含距离 SEQ ID NO :1 的转录起始点 -1051 到 -427 的序列 (SEQ ID NO :14)。

[0029] (6) 如 1 项的启动子,其包含 NF- κ B 的基序和 AP-1 的基序。

[0030] (7) 如 1 项的启动子,其包含 SEQ ID NO :1 中所示的序列。

[0031] (8) 如 1 项的启动子,其中所述启动子包含:(a) 具有 SEQ ID NO :1 中所示的碱基序列或者与之对应的碱基序列或其序列片段的多核苷酸;(b) SEQ ID NO :1 中所示的碱基序列或者与之对应的碱基序列的等位基因变体或其序列片段的多核苷酸;(c) 与 (a) 或 (b) 的任何一种的多核苷酸杂交并且具有其一种生物活性的多核苷酸;或者 (d) 由 (a)-(c) 中的任何一种的碱基序列或者具有至少 70% 同一性的互补序列组成并且具有其一种生物活性的多核苷酸。

[0032] (9) 如 1 项的启动子,其长度至少为 10 个毗邻的核苷酸

[0033] (10) 如 8 项的启动子,其中所述生物活性是启动子活性。

[0034] (11) 一种包含如 1 项的启动子的核酸构建体。

[0035] (12) 如 11 项的核酸构建体,其包含编码外源基因的序列,其与该启动子不相关但是被可操作地连接到启动子序列上。

[0036] (13) 如 12 项的核酸构建体,其中所述外源基因编码 RNAi 分子、药物、将被删除的隐性基因或者选择性标记。

[0037] (14) 如 13 项的核酸构建体,其中选择性标记允许在培养基中选择其中导入了该核酸构建体的宿主。

[0038] (15) 如 13 项的核酸构建体,其中选择性标记允许从视觉上选择其中导入了该核酸构建体的宿主。

[0039] (16) 如 13 项的核酸构建体,其中选择性标记包含次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (hpert) 或者一种选自绿色荧光蛋白 (GFP)、兰绿色荧光蛋白 (CFP)、黄色荧光蛋白 (YFP) 和红色荧光蛋白 (dsRed 组成的组的荧光标记。

[0040] (17) 如 13 项的核酸构建体,其中选择性标记对其中导入了核酸构建体的宿主基本上不具有毒性。

[0041] (18) 如 13 项的核酸构建体,其中将被删除的隐性基因选自 ADA 基因、PNP 基因、 γ c 链基因、TAP 基因、MHC II 基因、X- 连接 WASP、CD40 配体、PI3K 样基因和 DNA 解旋酶组成的组。

[0042] (19) 如 13 项的核酸构建体,其中药物选自细胞因子、趋化因子、生长因子、蛋白激素和肽激素 (如干扰素 (IFN)- α 、IFN- γ 、白介素 [IL]-2、IL-12、粒细胞集落刺激因子 [G-CSF]、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 [GM-CSF]) 组成的组。

[0043] (20) 如 12 项的核酸构建体,其中所述启动子在血细胞系细胞,特别是 T 细胞中诱导外源基因的特异性表达。

[0044] (21) 一种包含如 11 项的核酸构建体的表达载体。

[0045] (22) 一种包含如 11 项的核酸构建体的细胞。

[0046] (23) 如 22 项的细胞,其中所述细胞对于所述启动子序列来说是异源的。

[0047] (24) 一种包含如 11 项的核酸构建体的组织。

[0048] (25) 一种包含如 11 项的核酸构建体的器官。

[0049] (26) 一种包含如 11 项的核酸构建体的生物体。

[0050] (27) 一种药物组合物,其包含如 1 项的启动子和编码一种抗原的序列。

[0051] (28) 如 27 项的药物组合物,其是 DNA 疫苗。

[0052] (29) 一种用于治疗其中期望进行淋巴细胞特异性治疗的疾病、异常或症状的药物组合物,其包含如 1 项的启动子以及用于所述治疗的核酸序列。

[0053] (30) 如 29 项的药物组合物,其中用于所述治疗的核酸序列包含选自编码细胞因子、趋化因子、生长因子、蛋白激素、肽激素、核酶和 RNAi (HIV-1gp41 :AATAAGACAGGGCTTG GAAAGACACTTTCCAAGCCCTGTCTTATTTTT (SEQ ID NO :33)/HIV-1 tat :AAGCATCCAGGAAGTCAGCC TACAAGGCTGACTTCCTGGATGCTTTTT (SEQ ID NO :34)/HTLV-1 tax :GAACATTGGTGAGGAAGGCACAG CCTTCCTCACCAATGTTCTTTTT (SEQ ID NO :35)) 的那些序列组成的组的序列。

[0054] (31) 用于以淋巴细胞特异性方式地表达一种蛋白质的方法,包括步骤 :

[0055] A) 制备一种核酸构建体,其中如 1 项的启动子被可操作地连接到编码蛋白质的核酸序列上 ;和

[0056] B) 将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下。

[0057] (32) 用于以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白质的试剂盒, 包含:

[0058] A) 一种核酸构建体, 其中如 1 项的启动子被可操作地连接到编码蛋白质的核酸序列上; 和

[0059] B) 用于将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下的工具。

[0060] (33) 用于以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白质的试剂盒, 包含:

[0061] A) 如 1 项的启动子; 和

[0062] B) 用于制备其中所述启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体的工具。

[0063] (34) 用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白质的疾病、异常或症状的方法, 包括步骤:

[0064] A) 制备其中如 1 项的启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体; 和

[0065] B) 将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下。

[0066] (35) 用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白质的疾病、异常或症状的试剂盒, 包含:

[0067] A) 其中如 1 项的启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体; 和

[0068] B) 用于将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下的工具。

[0069] (36) 用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白质的疾病、异常或症状的试剂盒, 包含:

[0070] A) 如 1 项的启动子; 和

[0071] B) 用于制备其中所述启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体的工具。

[0072] (37) 一种制备蛋白质的方法, 包括步骤:

[0073] A) 制备其中如 1 项的启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体; 和

[0074] B) 将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下。

[0075] (38) 用于制备蛋白质的试剂盒, 包含:

[0076] A) 其中如 1 项的启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体; 和

[0077] B) 用于将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下的工具。

[0078] (39) 用于制备蛋白质的试剂盒, 包含:

[0079] A) 如 1 项的启动子; 和

[0080] B) 用于制备其中所述启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体的工具。

[0081] (40) 如 1 项的启动子的用途, 用于制造一种用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞

特异性方式表达一种蛋白的疾病、异常或症状的药物组合物。

[0082] (41) HHV7 的 MIE 启动子。

[0083] (42) 如 41 项的启动子,其至少包含 SEQ ID NO:2 中所示的序列中的 8 个毗邻的核苷酸。

[0084] (43) 如 41 项的启动子,其至少包含 SEQ ID NO:2 中所示的序列中的 R2 区或其功能性变体。

[0085] (44) 如 41 项的启动子,其至少包含 SEQ ID NO:2 的 +22 到 -233 的序列。

[0086] (45) 如 41 项的启动子,其至少包含 SEQ ID NO:2 的 +22 到 -388 的序列。

[0087] (46) 如 41 项的启动子,其包含存在于 R2 区中的 NF- κ B 的基序。

[0088] (47) 如 41 项的启动子,其包含 SEQ ID NO:15 中所示的序列。

[0089] (48) 如 41 项的启动子,其中所述启动子包含:

[0090] (a) 具有 SEQ ID NO:2 中所示的碱基序列或者与之对应的碱基序列或其序列片段的多核苷酸;(b) SEQ ID NO:2 中所示的碱基序列或者与之对应的碱基序列的等位基因变体或其序列片段的多核苷酸;(c) 与 (a) 或 (b) 中的任何一种的多核苷酸杂交并且具有其一种生物活性的多核苷酸;或者 (d) 由 (a)-(c) 中的任何一种的碱基序列或者具有至少 70% 同一性的互补序列组成并且具有其一种生物活性的多核苷酸。

[0091] (49) 如 41 项的启动子,其长度至少为 10 个毗邻的核苷酸。

[0092] (50) 如 48 项的启动子,其中所述生物活性是启动子活性。

[0093] (51) 一种包含如 41 项的启动子的核酸构建体。

[0094] (52) 如 51 项的核酸构建体,其包含编码外源基因的序列,其与该启动子不相关但是被可操作地连接到启动子序列上。

[0095] (53) 如 52 项的核酸构建体,其中所述外源基因编码 RNAi 分子、药物、将被删除的隐性基因或者选择性标记。

[0096] (54) 如 53 项的核酸构建体,其中选择性标记允许在培养基中选择其中导入了该核酸构建体的宿主。

[0097] (55) 如 53 项的核酸构建体,其中选择性标记允许从视觉上选择其中导入了该核酸构建体的宿主。

[0098] (56) 如 53 项的核酸构建体,其中选择性标记包含次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (hpert) 或者一种选自由绿色荧光蛋白 (GFP)、兰绿色荧光蛋白 (CFP)、黄色荧光蛋白 (YFP) 和红色荧光蛋白 (dsRed) 组成的组的荧光标记。

[0099] (57) 如 53 项的核酸构建体,其中选择性标记对其中导入了核酸构建体的宿主基本上不具有毒性。

[0100] (58) 如 53 项的核酸构建体,其中将被删除的隐性基因选自由 ADA 基因、PNP 基因、 γ c 链基因、TAP 基因、MHC II 基因、X-连接 WASP、CD40 配体、PI3K 样基因和 DNA 解放酶组成的组。

[0101] (59) 如 53 项的核酸构建体,其中药物选自由细胞因子、趋化因子、生长因子、蛋白激素和肽激素(如干扰素 (IFN)- α 、IFN- γ 、白介素 [IL]-2、IL-12、粒细胞集落刺激因子 [G-CSF]、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 [GM-CSF]) 组成的组。

[0102] (60) 如 52 项的核酸构建体,其中所述启动子在血细胞系细胞,特别是 T 细胞中诱

导外源基因的特异性表达。

[0103] (61) 一种包含如 51 项的核酸构建体的表达载体。

[0104] (62) 一种包含如 51 项的核酸构建体的细胞。

[0105] (63) 如 62 项的细胞,其中所述细胞对于所述启动子序列来说是异源的。

[0106] (64) 一种包含如 51 项的核酸构建体的组织。

[0107] (65) 一种包含如 51 项的核酸构建体的器官。

[0108] (66) 一种包含如 51 项的核酸构建体的生物体。

[0109] (67) 一种药物组合物,其包含如 41 项的启动子和编码一种抗原的序列。

[0110] (68) 如 67 项的药物组合物,其是 DNA 疫苗。

[0111] (69) 一种用于治疗其中期望进行淋巴细胞特异性治疗的疾病、异常或症状的药物组合物,其包含如 41 项的启动子以及用于所述治疗的核酸序列。

[0112] (70) 如 69 项的药物组合物,其中用于所述治疗的核酸序列包含选自自由编码细胞因子、趋化因子、生长因子、蛋白激素、肽激素、核酶和 RNAi (HIV-1gp41 :AATAAGACAGGGCTTG GAAAGACACTTCCAAGCCCTGTCTTATTTTT (SEQ ID NO :33)/HIV-1tat :AAGCATCCAGGAAGTCAGCCT ACAAGGCTGACTTCTGGATGCTTTTT (SEQ ID NO :34)/HTLV-1tax :GAACATTGGTGAGGAAGGCACAGCC TTCCTACCAATGTTCTTTTT (SEQ ID NO :35)) 的那些序列组成的组的序列。

[0113] (71) 用于以淋巴细胞特异性方式地表达一种蛋白质的方法,包括步骤:

[0114] A) 制备一种核酸构建体,其中如 41 项的启动子被可操作地连接到编码蛋白质的核酸序列上;和

[0115] B) 将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下。

[0116] (72) 用于以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白质的试剂盒,包含:

[0117] A) 一种核酸构建体,其中如 41 项的启动子被可操作地连接到编码蛋白质的核酸序列上;和

[0118] B) 用于将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下的工具。

[0119] (73) 用于以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白质的试剂盒,包含:

[0120] A) 如 41 项的启动子;和

[0121] B) 用于制备其中所述启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体的工具。

[0122] (74) 用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白的疾病、异常或症状的方法,包括步骤:

[0123] A) 制备其中如 41 项的启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的序列表达的条件下。

[0124] (75) 用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白的疾病、异常或症状的试剂盒,包含:

[0125] A) 其中如 41 项的启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体;和

[0126] B) 用于将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下的工具。

[0127] (76) 用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白的疾病、异常或症状的试剂盒,包含:

[0128] A) 如 41 项的启动子;和

[0129] B) 用于制备其中所述启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体的工具。

[0130] (77) 一种制备蛋白质的方法,包括步骤:

[0131] A) 制备其中如 41 项的启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体;和

[0132] B) 将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下。

[0133] (78) 用于制备蛋白质的试剂盒,包含:

[0134] A) 其中如 41 项的启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体;和

[0135] B) 用于将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下的工具。

[0136] (79) 用于制备蛋白质的试剂盒,包含:

[0137] A) 如 41 项的启动子;和

[0138] B) 用于制备其中所述启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体的工具。

[0139] (80) 如 41 项的启动子的用途,用于制造一种用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白的疾病、异常或症状的药物组合物。

[0140] (81)HHV7 的 U95 启动子。

[0141] (82) 如 81 项的启动子,其至少包含 SEQ ID NO:12 中所示的序列中的 8 个毗邻的核苷酸。

[0142] (83) 如 81 项的启动子,其至少包含 SEQ ID NO:12 所示的序列中的 R2 区或其功能性变体。

[0143] (84) 如 81 项的启动子,其至少包含 SEQ ID NO:12 的 +16 到 -233 的序列。

[0144] (85) 如 81 项的启动子,其至少包含 SEQ ID NO:12 的 +16 到 -379 的序列。

[0145] (86) 如 81 项的启动子,其包含存在于 R2 区中的 NF- κ B 的基序。

[0146] (87) 如 81 项的启动子,其包含 SEQ ID NO:16 中所示的序列。

[0147] (88) 如 81 项的启动子,其中所述启动子包含:(a) 具有 SEQ IDNO:12 中所示的碱基序列或者与之对应的碱基序列或其序列片段的多核苷酸;(b)SEQ ID NO:12 中所示的碱基序列或者与之对应的碱基序列的等位基因变体或其序列片段的多核苷酸;(c) 与 (a) 或 (b) 中的任何一种的多核苷酸杂交并且具有其一种生物活性的多核苷酸;或者 (d) 由 (a)-(c) 中的任何一种的碱基序列或者具有至少 70% 同一性的互补序列组成并且具有其一种生物活性的多核苷酸。

[0148] (89) 如 81 项的启动子,其长度至少为 10 个毗邻的核苷酸。

[0149] (90) 如 88 项的启动子,其中所述生物活性是启动子活性。

[0150] (91) 一种包含如 81 项的启动子的核酸构建体。

[0151] (92) 如 91 项的核酸构建体,其包含编码外源基因的序列,其与该启动子不相关但

是被可操作地连接到启动子序列上。

[0152] (93) 如 92 项的核酸构建体,其中所述外源基因编码 RNAi 分子、药物、将被删除的隐性基因或者选择性标记。

[0153] (94) 如 93 项的核酸构建体,其中选择性标记允许在培养基中选择其中导入了该核酸构建体的宿主。

[0154] (95) 如 93 项的核酸构建体,其中选择性标记允许从视觉上选择其中导入了该核酸构建体的宿主。

[0155] (96) 如 93 项的核酸构建体,其中选择性标记包含次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (hprt) 或者一种选自绿色荧光蛋白 (GFP)、兰绿色荧光蛋白 (CFP)、黄色荧光蛋白 (YFP) 和红色荧光蛋白 (dsRed) 组成的组的荧光标记

[0156] (97) 如 93 项的核酸构建体,其中选择性标记对其中导入了核酸构建体的宿主基本上不具有毒性。

[0157] (98) 如 93 项的核酸构建体,其中将被删除的隐性基因选自 ADA 基因、PNP 基因、 γ c 链基因、TAP 基因、MHC II 基因、X- 连接 WASP、CD40 配体、PI3K 样基因和 DNA 解放酶组成的组。

[0158] (99) 如 93 项的核酸构建体,其中药物选自细胞因子、趋化因子、生长因子、蛋白激素和肽激素 (如干扰素 (IFN)- α 、IFN- γ 、白介素 [IL]-2、IL-12、粒细胞集落刺激因子 [G-CSF]、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 [GM-CSF]) 组成的组。

[0159] (100) 如 92 项的核酸构建体,其中所述启动子在血细胞系细胞,特别是 T 细胞中诱导外源基因特异性表达。

[0160] (101) 一种包含如 91 项的核酸构建体的表达载体。

[0161] (102) 一种包含如 91 项的核酸构建体的细胞。

[0162] (103) 如 102 项的细胞,其中所述细胞对于所述启动子序列来说是异源的。

[0163] (104) 一种包含如 91 项的核酸构建体的组织。

[0164] (105) 一种包含如 91 项的核酸构建体的器官。

[0165] (106) 一种包含如 91 项的核酸构建体的生物体。

[0166] (107) 一种药物组合物,其包含如 81 项的启动子和编码一种抗原的序列。

[0167] (108) 如 107 项的药物组合物,其是 DNA 疫苗。

[0168] (109) 一种用于治疗其中期望进行淋巴细胞特异性治疗的疾病、异常或症状的药物组合物,其包含如 81 项的启动子以及用于所述治疗的核酸序列。

[0169] (110) 如 109 项的药物组合物,其中用于所述治疗的核酸序列包含选自编码细胞因子、趋化因子、生长因子、蛋白激素、肽激素、解旋酶和 RNAi (HIV-1gp41 :AATAAGACAGGG CTTGGAAAGACACTTTCCAAGCCCTGTCTTATTTTT (SEQ ID NO :33)/HIV-1tat :AAGCATCCAGGAAGTCA GCCTACAAGGCTGACTTCTGGATGCTTTTT (SEQ ID NO :34)/HTLV-1tax :GAACATTGGTGAGGAAGGCAC AGCCTTCTCACC AATGTTCTTTTT (SEQ ID NO :35)) 的那些序列组成的组的序列。

[0170] (111) 用于以淋巴细胞特异性方式地表达一种蛋白质的方法,包括步骤:

[0171] A) 制备一种核酸构建体,其中如 81 项的启动子被可操作地连接到编码蛋白质的核酸序列上;和

[0172] B) 将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条

件下。

[0173] (112) 用于以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白质的试剂盒,包含:

[0174] A) 一种核酸构建体,其中如 81 项的启动子被可操作地连接到编码蛋白质的核酸序列上;和

[0175] B) 用于将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下的工具。

[0176] (113) 用于以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白质的试剂盒,包含:

[0177] A) 如 81 项的启动子;和

[0178] B) 用于制备其中所述启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体的工具。

[0179] (114) 用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白的疾病、异常或症状的方法,包括步骤:

[0180] A) 制备其中如 81 项的启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体;和

[0181] B) 将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下。

[0182] (115) 用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白的疾病、异常或症状的试剂盒,包含:

[0183] A) 如 81 项的启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体;和

[0184] B) 用于将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下的工具。

[0185] (116) 用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白的疾病、异常或症状的试剂盒,包含:

[0186] A) 如 81 项的启动子;和

[0187] B) 用于制备其中所述启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体的工具。

[0188] (117) 一种制备蛋白质的方法,包括步骤:

[0189] A) 制备其中如 81 项的启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体;和

[0190] B) 将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下。

[0191] (118) 用于制备蛋白质的试剂盒,包含:

[0192] A) 其中如 81 项的启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体;和

[0193] B) 用于将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下的工具。

[0194] (119) 用于制备蛋白质的试剂盒,包含:

[0195] A) 如 81 项的启动子;和

[0196] B) 用于制备其中所述启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体的工具。

[0197] (120) 如 81 项的启动子的用途,用于制造一种用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白的疾病、异常或症状的药物组合物。

[0198] 在下文中,提供本发明的优选实施方案。应当理解,考虑到本领域熟知和常规使用的技术,本领域技术人员基于本发明的说明,显然能够实施这些技术方案,本发明所达到的功能和效果也是容易理解的。

[0199] 本发明的技术效果

[0200] 本发明提供启动子,该启动子在免疫系统细胞如淋巴细胞中选择性地诱导蛋白质表达。本发明的启动子可以用于提供方法和药物,有效地预防或治疗免疫疾病,如先天性免疫缺陷综合症等。本发明还提供用于有效地实施基因治疗的技术。

附图简介

[0201] [图 1] 图 1 描述了在黏着细胞中启动子活性的比较。X 轴排列多种启动子,并且 Vero 细胞、HEL 细胞、L929 细胞、293 细胞和 373 细胞中的启动子活性采用对数计数方式用 $\text{Log}(\text{RLU})/\beta\text{-gal}$ 表示。

[0202] [图 2] 图 2 描述了在淋巴细胞中启动子活性的比较。X 轴排列多种启动子,并且 THP-1 细胞、SupT1 细胞和 U937 细胞中的启动子活性采用对数计数方式用 $\text{Log}(\text{RLU})/\beta\text{-gal}$ 表示。

[0203] [图 3] 图 3 描述了在用 TPA 刺激细胞 (Vero 细胞) 时 HHV-6MIE 区的启动子活性。在 X 轴上排列多种启动子,并且以对数方式用 $\text{Log}(\text{RLU})/\beta\text{-gal}$ 显示有或无 TPA 时的启动子活性。

[0204] [图 4] 图 4 描述了当用 TPO 刺激细胞时 HHV-6MIE 区 (L929 细胞) 的启动子活性。在 X 轴上排列多种启动子,并且以对数方式用 $\text{Log}(\text{RLU})/\beta\text{-gal}$ 表示当有或无 TPA 时针对相应的启动子的启动子活性。

[0205] [图 5] 图 5 描述了 HHV6B 的启动子区中的各种缺失突变体的图解。上一组显示启动子区以及该启动子区中的各种基序。

[0206] [图 6] 图 6 描述了启动子活性的测定系统。

[0207] [图 7] 图 7 用 HHV6B 中的启动子区的各种缺失突变体的图解描述启动子活性 (相对的荧光素酶活性)。

[0208] [图 8] 图 8 描述与 HHV7 的启动子区相关的立即早期 (IE) 基因及其启动子的图解。左列从上到下显示 7MIE 启动子 (-493)、7MIE 启动子 (-388) 和 7MIE 启动子 (-233),以及右列从上到下显示 7U95 启动子 (-484)、7U95 启动子 (-379) 和 7U95 启动子 (-304)。

[0209] [图 9] 图 9 描述 HHV7 的 IE 启动子在淋巴细胞系中的活性。左上图显示 Jurkat 细胞,右上图显示 MolT-3 细胞,左下图显示 SupT1 细胞,以及右下图显示 SAS-413 细胞。各张图表从左到右分别显示 CMVP、6MIEP、6U95P、7MIE(-493)、7U95 和 P(-484)。

[0210] [图 10] 图 10 描述 R2 缺失对启动子活性的影响。左上图显示 Jurkat 细胞,右上图显示 MolT-3 细胞,左下图显示 SupT1 细胞,以及右下图显示 SAS-413 细胞。各张图表从左到右显示 7MIE 启动子 (-493)、7MIE 启动子 (-388)、7MIE 启动子 (-233)、7U95 启动子 (-484)、7U95 启动子 (-379) 和 7U95 启动子 (-304)。

[0211] [图 11] 图 11 描述在外周血单核细胞 (PBMC) 中的启动子活性。在左上图、右上图

和下图分别显示细胞系 1、细胞系 2 和细胞系 3。

[0212] 序列表简介

[0213] SEQ ID NO :1 是 HHV6B MIE 启动子的序列。

[0214] SEQ ID NO :2 是 HHV7 MIE 启动子的序列。

[0215] SEQ ID NO :3 是 HHV6A MIE 启动子的序列。

[0216] SEQ ID NO :4 是 HHV6B R3 区的序列。

[0217] SEQ ID NO :5 是实施例 1 中所用的 20u 的序列。

[0218] SEQ ID NO :6 是实施例 1 中所用的 9u 的序列。

[0219] SEQ ID NO :7 是实施例 1 中所用的 MIE 的序列。

[0220] SEQ ID NO :8 是实施例 1 中所用的 U95 的序列。

[0221] SEQ ID NO :9 是实施例 1 中所用的 CMV 的序列。

[0222] SEQ ID NO :10 是实施例 1 中所用的 MIE/3K 的序列。

[0223] SEQ ID NO :11 是实施例 1 中所用的 U95/3K 的序列。

[0224] SEQ ID NO :12 是 HHV7 U95 启动子

[0225] SEQ ID NO :13 是距离 HHV6B MIE 的转录起始点 -574 到 -427 的序列。

[0226] SEQ ID NO :14 是距离 HHV6B MIE 的转录起始点 -1051 到 -427 的序列。

[0227] SEQ ID NO :15 是距离 HHV7 MIE 的转录起始点 +22 到 -493 的序列。

[0228] SEQ ID NO :16 是距离 HHV7 MIE 的转录起始点 +16 到 -484 的序列。

[0229] SEQ ID NO :17 是实施例 1 中所用的 9u-d2-7 的序列。

[0230] SEQ ID NO :18 是实施例 1 中所用的 9u-d1-4 的序列。

[0231] SEQ ID NO :19 是实施例 1 中所用的 9u-d1-5 的序列。

[0232] SEQ ID NO :20 是实施例 1 中所用的 9u-d1-7 的序列。

[0233] SEQ ID NO :21 是实施例 1 中所用的 9u-d3-7 的序列。

[0234] SEQ ID NO :22 是实施例 1 中所用的 9u-d5 的序列。

[0235] SEQ ID NO :23 是实施例 1 中所用的 9u-d6 的序列。

[0236] SEQ ID NO :24 是实施例 1 中所用的 9u-d7 的序列。

[0237] SEQ ID NO :25 是实施例 1 中所用的 9u-d8 的序列。

[0238] SEQ ID NO :26 是实施例 2 中所用的 7MIEP(-493) 的序列。

[0239] SEQ ID NO :27 是实施例 2 中所用的 7MIEP(-388) 的序列。

[0240] SEQ ID NO :28 是实施例 2 中所用的 7MIEP(-233) 的序列。

[0241] SEQ ID NO :29 是实施例 2 中所用的 7U95P(-484) 的序列。

[0242] SEQ ID NO :30 是实施例 2 中所用的 7U95P(-379) 的序列。

[0243] SEQ ID NO :31 是实施例 2 中所用的 7U95P(-304) 的序列。

[0244] SEQ ID NO :32 是实施例 2 中所用的 pGL3 Basic 的序列。

[0245] SEQ ID NO :33 是 HIV-1 gp41 的 RNAi 的一个例子。

[0246] SEQ ID NO :34 是 HIV-1 tat 的 RNAi 的一个例子。

[0247] SEQ ID NO :35 是 HIV-1 tax 的 RNAi 的一个例子。

[0248] 实施本发明的最佳方式

[0249] 以下,对本发明进行说明。在整个说明书中,除非另外明确地说明,单数表达形式

(例如英语中的“一个”，“一种”，“该”以及其语言中的冠词、形容词)应当理解为也包含其复数形式的概念范畴。除非另外指出，本文所使用的术语应具有本领域通常所指的含意。因而，除非另外定义，本文中所使用的全部专业术语和科技用语，应理解为具有本发明所属技术领域的普通技术人员通常所理解的含意。当发生矛盾时，首先依照本说明书(包括定义)。

[0250] (术语的定义)

[0251] 下文描述本文所用术语的定义。

[0252] 本文所用的术语“HHV”是指人疱疹病毒，有1型、2型、3型、4型、5型、6型、7型和8型等类型。

[0253] 除非另外指出，如本文所用，术语“疱疹病毒”包括所有的HHV-6A、HHV-6B和HHV-7，包括它们的野生型和重组型。除非另外指出，本文中所用的术语“HHV-6(人疱疹病毒6)”包括HHV-6A和HHV-6B，以及它们的野生型和重组型。如细胞巨化病毒HHV-5，HHV6属于 β 亚属，HHV6B是诱发幼儿急诊的病毒，一般认为，大部分日本人会在2周岁时感染HHV6B。本文所用的术语“HHV-7(人疱疹病毒7)”是指属于该型的任何疱疹病毒。HHV7也被认为是诱发幼儿急诊的病毒，但是与HHV6B相比，其发生的概率较低，并且被感染的患者的年龄较大。与HHV6一样，HHV7属于 β 亚属，并且它被认为是感染CD4⁺细胞，从而引起吉贝特玫瑰糠疹(pityriasis rosea Gibert)发生，而且一般认为，大部分日本人会在2周岁时感染HHV7。

[0254] 如本文所用，涉及疱疹病毒的术语“野生株”是指未经人工修饰，从自然界中分离的疱疹病毒株。野生株的例子包括但不限于J1株。

[0255] 如本文所用，涉及HHV-6A的术语“野生株”是指未经人工修饰，从自然界中分离的HHV-6A株。野生株的例子包括但不限于U1102株。

[0256] 如本文所用的术语“突变株”是指由于诱变、多次传代培养等而发生突变的疱疹病毒株。疱疹病毒株的诱发突变既可以是随机突变，也可以是位点特异性突变。

[0257] 如本文所用，涉及HHV-6B的术语“野生株”是指未经人工修饰，从自然界中分离的HHV-6B株。野生株的例子包括但不限于HST株。

[0258] 本文所用的术语“蛋白质”、“多肽”、“寡肽”和“肽”具有相同的含意，均指具有任意长度的氨基酸聚合物。

[0259] 本文所用的术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”具有相同的含意，指具有任意长度的核苷酸聚合物。除非另外指出，特定的核酸序列还隐含明确说明的序列，以及其经保守修饰的突变体(例如简并密码子取代)及其互补序列。特别地，简并密码子取代可以通过制备一个或多个(或全部)所选择密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧次黄嘌呤核苷残基取代的序列而完成(Batzer等人，Nucleic Acid Res. 19:5081(1991); Ohtsuka等人，J. Biol. Chem. 260:2605-2608(1985); Rossolini等人，Mol. Cell. Probes 8:91-98(1994))。

[0260] 本文所用的术语“基因”是指确定一种遗传性状的元件。基因通常在染色体上以一定的顺序排列。把确定蛋白质一级结构的基因称为结构基因。调节结构基因表达的基因称为调控基因。本文所用的“基因”是指“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“核酸”、和/或“蛋白质”“多肽”“寡肽”和“肽”。如本文所用的，基因的“开放阅读框”或“ORF”是指将基因的

碱基序列以每 3 个碱基为一组进行分割时所得的三种读框中的一个,其具有起始密码子以及由终止密码子出现而确定的一定长度,并且可能实际上编码一种蛋白质。疱疹病毒基因组的全序列已经得到鉴定,其中至少鉴定了 101 个基因,已知各基因分别具有开放阅读框(ORF)。

[0261] 本文所用的术语“RNAi”是 RNA 干扰的缩写,是指将引起 RNAi 的试剂例如双链 RNA(也称作为 dsRNA)导入细胞中,特异性地降解与之同源的 mRNA,从而抑制基因产物的合成的现象以及利用这种现象的技术。如本文所用的, RNAi 具有与引起 RNAi 的试剂相同的含义。

[0262] 本文所用的术语“引起 RNAi 的试剂”是指能够引起 RNAi 的任何试剂。如本文所用,“试剂引起基因 RNAi”是指用试剂引起与基因有关的 RNAi,并且成功地达到 RNAi 的效果(例如抑制基因的表达等)。这种引起 RNAi 的试剂的例子包括但不限于与目标基因的核酸序列具有至少约 70%同源性的序列或者在严谨条件下与之杂交的序列以及含有至少长 10 个核苷酸的双链部分的 RNA 或它们的变体。在此,该试剂优选为含有 3' 突出端的 DNA,更加优选地该 3' 突出端长度为 2 个或更多个核苷酸(例如,长度为 2-4 个核苷酸)。

[0263] 虽然不期望受任何理论的约束,引起 RNAi 的机理被认为如下。当将引起 RNAi 的分子,例如 dsRNA 导入细胞,在 RNA 相对较长的情况下(例如 40 个或更多个碱基对),在存在 ATP 时,具有解旋酶结构域的 RNA 酶 III 样的核酸酶(所谓的切酶)从 3' 端以约 20 个碱基对的间隔切割该分子。本文所用的术语“siRNA”是短的干扰 RNA 的缩写,是指具有 10 个或更多个碱基对的短双链 RNA,通过人工化学合成或生物合成,由生物体合成或者在生物体内降解 40 个或更多个碱基对的双链 RNA 来制备。SiRNA 通常具有包含 5' - 磷酸盐和 3' -OH 的结构,其中 3' 末端突出长度约 2 个碱基。一种特定蛋白结合到 siRNA 上,形成 RISC(RNA 诱导的沉默复合物)。该复合物识别并结合具有与 siRNA 相同序列的 mRNA,并由于 RNA 酶 III 样酶促活性,在 siRNA 的中间切割 mRNA。优选的是,siRNA 的序列与作为靶点将被切割的 mRNA 的序列之间是 100%匹配的。然而,在远离 siRNA 中间的位点上发生的碱基突变不能完全排除 RNAi 的切割活性,保留部分活性,而 siRNA 中间发生的碱基突变影响很大,并且 RNAi 切割 mRNA 的活性相当低。利用这种特征,仅具有突变的 mRNA 被特异性地降解。特别地,合成中间有突变的 siRNA,并导入到细胞中。因此,在本发明中,将 siRNA 本身以及能够制备 siRNA 的试剂(例如,代表性的约 40 个或更多个碱基对的 dsRNA)被用作能够引起 RNAi 的试剂。

[0264] 此外,虽然不期望受任何理论的约束,除了上述方式,siRNA 的反义链结合 mRNA,而 siRNA 作为 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRP)的引物,从而合成 dsRNA。该 dsRNA 再次作为切酶的底物,生成新的 siRNA。可以预期这种反应被增强。因此,在本发明中,siRNA 本身以及能够制备 siRNA 的试剂是有用的。事实上,在昆虫等中,如 35dsRNA 分子基本上或完全地降解 1,000 个或更多个拷贝的细胞内 mRNA,因此,应当理解,siRNA 本身以及能够制备 siRNA 的试剂是有用的。

[0265] 在本发明中,可以使用长度约 20 个碱基的(例如,代表性的约 21-23 个碱基)或者约少于 20 个碱基的双链 RNA,称作为 siRNA。在细胞中 siRNA 的表达能够抑制 siRNA 所靶向的病源性基因的表达。因此,siRNA 可用于疾病的治疗、预防、预后等

[0266] 本发明的 siRNA 可以是任何形式的,只要其能够引起 RNAi。

[0267] 在另一个实施方案中,能够引起 RNAi 的试剂具有一个短的发夹结构,在 3' 末端有个粘性部分 (shRNA ;短发夹 RNA)。本文所用的术语“shRNA”是一个约 20 个或更多个碱基对的分子,其中单链 RNA 特别地含有一个回文碱基序列,在那里形成双链结构 (即,发夹结构)。可以人工合成 shRNA。可替代地,以相反方向连接 DNA 序列的有义链和反义链,并在体外用该 DNA 作为模板,用 T7RNA 聚合酶合成 RNA,制备 shRNA。虽然不期望受任何理论的约束,应当理解,在将 shRNA 导入细胞后,shRNA 在细胞中被降解成约 20 个碱基的长度 (例如,代表性为 21 个、22 个、23 个碱基),用 siRNA 引起 RNAi,产生本发明的处理效果。应当理解,这种效果在广泛的生物体中实现,例如,昆虫、植物、动物 (包括哺乳动物) 等。因此,当与 siRNA 在一起时,shRNA 引出 RNAi,并因此可被用作本发明的有效成分。ShRNA 优选具有一个 3' 突出端。双链部分的长度不是特别地受到限制,但是优选为约 10 个或更多个核苷酸,更优选约 20 个或更多个核苷酸。在此,3' 突出端优选为 DNA,DNA 的长度更优选为至少 2 个核苷酸,甚至更加优选地,DNA 的长度为 2-4 个核苷酸。

[0268] 本发明所用的引起 RNAi 的试剂是人工合成的 (化学合成或生物化学合成) 或天然存在的。对于本发明的效果来说,这两者之间基本上没有区别。化学合成的试剂优选是用液相层析等纯化的。

[0269] 可以在体外制备在本发明中所用的能够引起 RNAi 的试剂。在该合成系统中,用 T7RNA 聚合酶和 T7 启动子,从模板 DNA 上合成反义 RNA 和有义 RNA。这些 RNA 被退火,然后被导入细胞中。在这种情况下,通过上述机理引起 RNAi,从而达到本发明的技术效果。在此,例如采用磷酸钙方法,将 RNA 导入细胞中。

[0270] 按照本发明的引起 RNAi 的试剂的另一个例子是与 mRNA 杂交的单链核酸或其所有核酸类似物。这种试剂可用于本发明的方法和组合物中。

[0271] 本文中所述的术语“相应的”氨基酸或核酸是指在给定的多肽或多核苷酸分子中的氨基酸或核苷酸,其具有或被期望具有与作为用于比较的参照多肽或多核苷酸中预先确定的氨基酸或核苷酸相似的功能。例如,在遍在蛋白的情况下,是指以相似方式对催化活性起作用并且在序列中的类似位置上存在的氨基酸 (例如,C- 末端上的甘氨酸),其对赖氨酸起作用。例如,在为核酸序列的情形下,该术语是指对其所编码的特定部分起类似作用的相似部分。

[0272] 本文所用的术语“相应的”基因 (例如,多肽或多核苷酸分子) 是指特定物种中的基因,其具有或被期望具有与作为用于比较的对照的物种中的预先确定的基因相似的功能。有大量具有这种功能的基因,该术语是指具有相同进化起源的基因。因此,相应于特定基因的基因是给定基因的直向同源物。因此,在其他生物体中 (如 7 型疱疹病毒),能够找到相应于那些如 6B 型疱疹病毒和肿瘤的抗原等的基因。这种相应的基因可通过本领域熟知的技术来鉴定。因此,例如使用对照基因的序列 (例如小鼠细胞周期蛋白基因等) 作为比较 (query) 序列,通过检索生物体 (如 6B 型疱疹病毒) 的序列数据库,可以找到特定生物体中的相应基因。可替代地,通过试验筛选文库来找出相同的基因。

[0273] 本文所用的术语“被分离的”是指在正常环境下的天然伴随的物质至少被降低,或者优选基本上或完全被除去。因此,术语“分离的细胞”是指基本上不含有天然环境下的其他伴随物质 (例如,其他细胞、蛋白质、核酸等) 的细胞。术语“被分离的”涉及核酸或多肽时是指,如通过 DNA 重组技术制备时,核酸或多肽基本上不含有细胞物质或培养液;或者通

过化学合成时不含有前体化学物质或其他化学物质。

[0274] 本文所用的术语“被纯化的”生物制剂（例如，核酸、蛋白质等）是指其中至少一部分天然伴随的物质被除去的制剂。因此，被纯化的生物制剂的纯度通常高于该生物物质在正常状态下的纯度（即被浓缩）。

[0275] 如本文所用，术语“被纯化的”和“被分离的”是指相同类型的生物制剂优选以至少 70% 重量存在，更优选以至少 85% 重量存在，甚至更优选以至少 95% 重量存在，最优选以至少 98% 重量存在。

[0276] 如本文所用的，涉及序列（例如，核酸序列、氨基酸序列等）的术语“同源性”是指两个或两个以上的基因序列之间的同一性程度。因此，两个序列的同源性越高，则其序列的同一性或相似性越高。两种基因是否具有同源性可以通过将两个序列进行直接比较来判断，也可以通过在严格条件下的杂交方法进行判定。将两个基因序列直接进行比较时，如果所述基因的 DNA 序列典型地具有至少 50% 的同一性，优选具有至少 70% 的同一性，更优选具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性时，认为这些基因具有同源性。

[0277] 如在此所用的，“多核苷酸在严谨条件下杂交”是指本领域通常使用和熟知的条件。使用选自本发明的多核苷酸，通过菌落杂交、噬菌斑杂交、DNA 印记杂交来获得这种多核苷酸。特别地，在 65°C 下，在存在 0.7–1.0M NaCl 时，用固定了来源于菌落或噬菌斑的 DNA 的滤器实施杂交。接着，在 65°C 下，用 0.1–2 倍浓度的 SSC（柠檬酸钠）溶液（1 倍浓度 SSC 溶液由 150mM 氯化钠和 15mM 柠檬酸钠组成）洗涤滤器。通过这种方法鉴定的多核苷酸被称作“在严谨条件下杂交的多核苷酸”。可以按照如 *Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1–38, DNA Cloning 1:Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)* 等方法来实施杂交。在此，在严谨条件下杂交的序列优选排除仅含 A 或 T 的序列。“能够杂交的多核苷酸”是指在上述杂交条件下能够与其他多核苷酸杂交的多核苷酸。特别地，能够杂交的多核苷酸至少包括与编码具有本文特别公开的氨基酸序列的多肽的 DNA 的碱基序列具有至少 60% 同源性的多核苷酸，优选是具有至少 80% 同源性的多核苷酸，以及更优选是具有至少 95% 同源性的多核苷酸。

[0278] 氨基酸序列和碱基序列的相似性、同一性和同源性在此用默认参数下的 FASTA 比较。可替代地，例如，使用 NCBI 的 BLAST 2.2.9 (2004 年 5 月 12 日公开) 进行同一性检索。如在此所用，同一性大小通常是指采用上述 BLAST 在默认参数下进行比对而获得的数值。如果改变参数能够获得更大的数值，那么本文中最大数值作为同一性的数值。当要对多个区域进行同一性的评价时，那么本文中最大数值作为同一性的数值。

[0279] 本文所用的术语“搜索”是指利用特定的核酸序列或者使用其他方法，找出其他具有特定的电子的或生物学的功能和 / 或特性的核酸碱基序列。电子搜索的例子包括但是不限于 BLAST (Altschul 等人, *J. Mol. Biol.* 215 :403–410 (1990))、FASTA (Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85 :2444–2448 (1988))、Smith 和 Waterman 的方法 (Smith 和 Waterman, *J. Mol. Biol.* 147 :195–197 (1981)) 以及 Needleman 和 Wunsch 的方法 (Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48 :443–453 (1970)) 等。生物学搜索的例子包括但是不限于在进行严谨杂交条件下，PCR 和原位杂交等时，基因组 DNA 附着到尼龙膜等上的大型阵列，或者基因组 DNA 附着到玻璃平板上的微阵列。如在此所用，本发明所用的启动子包含通过这种电

子搜索或生物学搜索的那些序列的启动子是期望的。

[0280] 本文所用的术语基因产物例如基因、多核苷酸、多肽等的“表达”，是指基因等受预先确定的行为的影响，在体内变成另一种形式。优选地，术语“表达”是指基因、多核苷酸等发生转录并翻译成多肽。在本发明的一个实施方案中，基因被转录成 mRNA。更优选地，这些多肽发生翻译后的加工修饰。

[0281] 如在此所用的，氨基酸可以通过一般已知的三字符形式表示，也可以以 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会所推荐的单字符形式表示。核苷酸也用通常所接受的公知的单字符缩写形式表示。

[0282] 字符代码如下：

[0283] 氨基酸：

[0284]	三字符	单字符	参考
[0285]	Ala	A	丙氨酸
[0286]	Cys	C	半胱氨酸
[0287]	Asp	D	天冬氨酸
[0288]	Glu	E	谷氨酸
[0289]	Phe	F	苯丙氨酸
[0290]	Gly	G	甘氨酸
[0291]	His	H	组氨酸
[0292]	Ile	I	异亮氨酸
[0293]	Lys	K	赖氨酸
[0294]	Leu	L	亮氨酸
[0295]	Met	M	甲硫氨酸
[0296]	Asn	N	天冬酰胺
[0297]	Pro	P	脯氨酸
[0298]	Gln	Q	谷氨酰胺
[0299]	Arg	R	精氨酸
[0300]	Ser	S	氨酸
[0301]	Thr	T	苏氨酸
[0302]	Val	V	缬氨酸
[0303]	Trp	W	色氨酸
[0304]	Tyr	Y	酪氨酸
[0305]	Asx		冬氨酸或天冬酰胺
[0306]	Glx		谷氨酸或谷氨酰胺
[0307]	Xaa		未知的或其他的氨基酸
[0308]	碱基（核苷酸）		
[0309]	缩写	参考	
[0310]	a		腺嘌呤
[0311]	g		鸟嘌呤
[0312]	c		胞嘧啶

[0313]	t	胸腺嘧啶
[0314]	u	尿嘧啶
[0315]	r	鸟嘌呤或腺嘌呤
[0316]	y	胸腺嘧啶 / 尿嘧啶或胞嘧啶
[0317]	m	腺嘌呤或胞嘧啶氨基基团
[0318]	k	鸟嘌呤或胸腺嘧啶尿嘧啶酮基团
[0319]	s	鸟嘌呤或胞嘧啶
[0320]	w	腺嘌呤或胸腺嘧啶 / 尿嘧啶
[0321]	b	鸟嘌呤或胞嘧啶或胸腺嘧啶 / 尿嘧啶
[0322]	d	腺嘌呤或鸟嘌呤或胸腺嘧啶 / 尿嘧啶
[0323]	h	腺嘌呤或胞嘧啶或胸腺嘧啶 / 尿嘧啶
[0324]	v	腺嘌呤或鸟嘌呤或胞嘧啶
[0325]	n	腺嘌呤或鸟嘌呤或胞嘧啶或胸腺嘧啶 / 尿嘧啶, 未知的
[0326]		或其他的碱基

[0327] 如本文所用,术语多肽或多核苷酸的“片段”是指相对于全长的多核苷酸或多肽(其长度为n),序列长度为1到n-1的多肽或多核苷酸。根据目的不同,片段的长度可以适当地变化,例如在为多肽的情形下,片段长度的下限包括3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个、25个、30个、40个、50个或更多个氨基酸。用这里没有列举的整数表示的长度(例如,11个等)作为下限也是适宜的。当指多核苷酸时,片段长度的下限包括5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个、25个、30个、40个、50个、75个、100个、200个、300个、400个、500个、600个、700个、800个、900个、1000个或更多个核苷酸。用这里没有具体列举的整数表示的长度(例如,11个等)作为下限也是适宜的。

[0328] 本发明中所用的多肽在其氨基酸序列中具有至少一个(例如1个或多个或者更多个)氨基酸取代、添加和/或缺失,只要其具有与野生型多肽基本上相同的功能。

[0329] 特定氨基酸被具有同样疏水性指数的其它氨基酸替代,生成的蛋白质具有与起始蛋白质类似生物学功能(例如具有等价的酶活性的蛋白质),这在本领域是众所周知的。在这种氨基酸替代中,优选疏水性指数在 ± 2 以内,进一步优选在 ± 1 以内,更优选在 ± 0.5 以内。在本领域中一般理解,在对蛋白质进行修饰时会考虑亲水性问题。如US4,554,101中公开的,氨基酸残基被赋予如下的亲水性指数:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0 ± 1);谷氨酸(+3.0 ± 1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5 ± 1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);和色氨酸(-3.4)。可以理解的是某种氨基酸可以被具有相同亲水性指数的其它氨基酸替代而提供生物学等价体。在这种氨基酸替代中,亲水性指数优选在 ± 2 以内,更优选在 ± 1 以内,进一步优选在 ± 0.5 以内。亲水性指数也可以用于本发明的氨基酸序列的修饰中。如US4,554,101中公开,氨基酸残基被赋予如下的亲水性指数:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0 ± 1);谷氨酸(+3.0 ± 1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5 ± 1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸

(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);和色氨酸(-3.4)。可以理解的是某种氨基酸可以被具有相同亲水性指数的其它氨基酸替代而提供生物学等价体。在这种氨基酸替代中,亲水性指数优选在 ± 2 以内,更优选在 ± 1 以内,进一步优选在 ± 0.5 以内。

[0330] 术语“保守性替代”用于此是指一种氨基酸替代,其中被替代的氨基酸和替代后的氨基酸具有类似的亲水性指数和/或疏水性指数。例如,保守性替代是亲水性指数或疏水性指数在 ± 2 之内的氨基酸之间进行的替代,优选在 ± 1 以内,更优选在 ± 0.5 以内。保守性替代的例子包括但是不限于在各个如下残基对之间进行的替代:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸,这都是本领域技术人员熟知的。

[0331] 如本文所用,术语“变体”是指部分区别于起始物质的一种物质,例如多肽或多核苷酸等。这种变体的例子包括替代变体、添加变体、缺失变体、截短变体、等位基因变体等。这种变体的例子包括但是不限于,具有一个或几个替代、添加和/或缺失的核苷或多肽,或者具有至少一个替代、添加和/或缺失的核苷或多肽。术语“等位基因(allele)”用于此是指与相应的基因位于同一基因座上但相互之间存在差异的基因变体。因此,术语“等位基因变异体”用于此是指与特定基因具有等位基因关系的变体。这种等位基因变体通常具有与相应的等位基因相同或高度相似的序列,并且通常具有几乎相同的生物学活性,极少具有不同的生物学活性。术语“物种同源物”或“物种同系物”用于此是指具有与特定物种中的某种基因在氨基酸水平或核苷酸水平上同源的物质(优选至少60%同源,更优选至少80%,至少85%,至少90%,至少95%的同源性)。从本说明书的描述中,可以清楚地知晓获得这种物种同源物的方法。术语“直向同源物”(也称作直向同源基因)是指存在于来自共同祖先(经过物种分化)的不同物种中的基因。例如,以具有多种基因结构的血红蛋白基因家族为例,人和小鼠的 α -血红蛋白基因是直向同源物,而人 α -血红蛋白基因和人 β -血红蛋白基因是种内同源物(由于基因复制所产生的基因)。直向同源物对于分子系统树的推定是有用的。通常,不同物种中的直向同源物与起始物种具有类似的功能。因此,本发明的直向同源物在本发明中也是有用的。

[0332] 如本文所用,术语“功能性变体”是指保留了生物学活性的变体(特别是启动子活性),标准物的序列产生该活性。

[0333] 如在此所用,术语“保守的(或保守修饰的)变体”适用于氨基酸序列和核酸序列。对于特定的核酸序列,经保守修饰所得的变体是可以编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸。由于遗传密码子的简并性,许多功能相同的核酸编码任何特定的蛋白质。例如,密码子GCA,GCC,GCG和GCU都编码丙氨酸。因而在所有通过所述密码子表示丙氨酸的位置,该密码子可替换成任何所述的相应密码子,而不改变所编码的多肽。这种核酸变化是保守性变异的一种,即“沉默改变”。对于一种核酸来说,可以通过如测定启动子活性来确定一种保守性替代。

[0334] 为了制备功能相同的多肽,除了氨基酸替代外,可以进行氨基酸添加、缺失或修饰。氨基酸替代是指用不同的氨基酸替换起始肽的至少一个氨基酸,例如,不同的氨基酸替换1-10个氨基酸,优选1-5个氨基酸,更优选1-3个氨基酸。氨基酸添加是指将至少一个氨基酸添加到起始肽链上,例如将1-10个氨基酸,优选1-5个氨基酸以及更优选1-3个氨基酸添加到起始肽链上。氨基酸缺失是指缺失至少一个氨基酸,例如缺失1-10个氨基酸,优

选 1-5 个氨基酸,更优选 1-3 个氨基酸。氨基酸修饰包括但不限于,酰胺化、羧化、硫酸化(sulfation)、卤化、平截、脂质化、烷基化、糖基化、磷酸化、羟基化、酰基化(例如乙酰化)等。被取代或所添加的氨基酸是天然存在或非天然存在的氨基酸,或者氨基酸类似物。优选是天然存在的氨基酸。

[0335] 表达多肽的核酸例子用于此是指能够表达本发明多肽的蛋白质实例的核酸。这种核酸包括如上所述的部分序列缺失或被其他碱基替代的核酸,或者插入其他核酸序列的核酸,只要该核酸所表达的多肽基本上具有与天然存在的多肽相同的活性。可替代地,将其他核酸连接到核酸的 5' 端和 / 或 3' 端上。核酸分子包括在严谨条件下能够与编码多肽的基因杂交的核酸,并且编码的多肽与所述基因编码的多肽基本上具有相同的功能。这种基因是本领域知晓的并且可被用于本发明中。

[0336] 通过熟知的 PCR 方法,即化学合成方法,能够获得上述核酸。该方法可以与如位点特异性诱变、杂交等组合起来。

[0337] 如本文所用,术语对多肽或多核苷酸进行的“替代、添加或缺失”是指相对于起始的多肽或多核苷酸,发生氨基酸或其替代物或者核苷或其替代物的替代、添加或删除。这可以通过本领域熟知的方法实现,包括位点特异性诱变方法等。多肽或多核苷酸具有任意数量 (> 0) 的替代、添加或缺失。该数量最大可以达到具有该数量替代、添加或缺失的变体能够保持特定功能(例如,激素和细胞因子的信息传导功能等)。例如,该数量可以是 1 个或数个,优选在全长序列的 20% 或 10% 以内,或者不超过 100 个,不超过 50 个,不超过 25 个等。

[0338] (启动子)

[0339] 如本文所用,术语“启动子(或启动子序列)”是指决定基因转录起始点的碱基序列,是直接调控转录频率的 DNA 区域。RNA 聚合酶结合到启动子上,启动转录。因此,如在此所用,具有基因的启动子功能的部分是“启动子部分”。可以用 DNA 分析软件预测基因组碱基序列中的蛋白质编码区来推导出启动子区。推导得出的启动子区是变化的,通常位于结构基因的上游,但是不仅限于在结构基因的上游,也可能位于结构基因的下游。

[0340] 如本文所用,术语“MIE 启动子”是主要立即早期启动子,它是一种基因的启动子,该基因的转录是在病毒感染后被来自宿主或病毒粒子的转录因子立即启动的。用放线菌酮处理的被感染细胞,提取 RNA,使用该 RNA 通过 RT-PCR 鉴定 MIE 基因。

[0341] 本文所用的术语“U95 启动子”是指立即早期基因 U95 的启动子。U95 也是一种立即早期基因,其转录也是在病毒感染后被来自宿主或病毒粒子的转录因子立即启动的。

[0342] 如本文所用的,鉴定启动子的方法如下:对位于结构基因附近的一些序列进行筛选(例如使用实施例中描述的表达盒),并对具有启动基因表达活性的序列进行作图。如此,可以鉴定具有显著启动子活性的序列。通常,这些序列位于结构基因的上游,但是不限于此。

[0343] 如本文所用,术语“HHV6B MIE 启动子”或“HHV6B 的 MIE 启动子”是指 SEQ ID NO: 1 中的任何具有启动子活性的序列。优选地,启动子在距离 SEQ ID NO: 1 中的转录起始点 -814 到 0 的位置。这种序列包括但是不限于 SEQ ID NO: 1 或与之相应的序列。在 HHV6B 基因的表达控制中,启动子优选位于上游的 -574 到 -427 区域,优选在 -1051 到 -427 区域,其碱基序列包括 SEQ ID NO: 15、16 等中所示的序列。其中,本文已经阐明, NF- κ B 和 AP-1

基序（距离转录起始点 -603 至 -594 对应于 NF- κ B 基序，而 -488 到 -478 和 -249 到 -239 对应于 AP-1 基序）是来自碱基序列替代试验的基序。因此，优选地，本发明的 HHV6B MIE 启动子包括：(a) 具有 SEQ ID NO:1 所示的碱基序列的，或者与之对应的碱基序列或其序列片段的多核苷酸；(b) SEQ ID NO:1 所示的碱基序列的，或者与之对应的碱基序列的等位基因变体或其序列片段的多核苷酸；(c) 与 (a) 或 (b) 中的任何一种的多核苷酸杂交并且具有其一种生物活性的多核苷酸；或者 (d) 由 (a)-(c) 中的任何一种的碱基序列或者具有至少 70% 同一性的互补序列组成并且具有其一种生物活性的多核苷酸。

[0344] 如本文所用，术语“HHV7MIE 启动子”或“HHV7 的 MIE 启动子”是指 SEQ ID NO:2 中的任何具有启动子活性的序列。优选地，启动子在距离 SEQ ID NO:2 中的转录起始点 -493 到 +22 的位置。这种序列包括但是不限于 SEQ ID NO:2 或与之相应的序列。在 HHV7 基因的表达控制中，启动子优选位于上游的 -427 区域，优选在 -493 区域，其碱基序列包括 SEQ ID NO:2 等中所示的序列。其中，本文已经阐明，NF- κ B（距离转录起始点 -464 到 -478 和 -359 到 -350 对应于 NF- κ B 基序）是来自碱基序列替代试验的基序。因此，优选地，本发明的 HHV7 MIE 启动子包括：(a) 具有 SEQ ID NO:2 中所示的碱基序列或者与之对应的碱基序列或其序列片段的多核苷酸；(b) SEQ ID NO:2 中所示的碱基序列或者与之对应的碱基序列的等位基因变体或其序列片段的多核苷酸；(c) 与 (a) 或 (b) 中的任何一种的多核苷酸杂交并且具有其一种生物活性的多核苷酸；或者 (d) 由 (a)-(c) 中的任何一种的碱基序列或者具有至少 70% 同一性的互补序列组成并且具有其一种生物活性的多核苷酸。

[0345] 如本文所用，术语“HHV7U95 启动子”或“HHV7 的 U95 启动子”是指 SEQ ID NO:12 中的任何具有启动子活性的序列。优选地，启动子在距离 SEQ ID NO:12 中的转录起始点 -484 到 +16 的位置。在 HHV7 基因的表达控制中，启动子优选位于上游的 -379 区域，优选在 -484 区域，其碱基序列包括 SEQ ID NO:2 等中所示的序列。其中，本文已经阐明，NF- κ B（距离转录起始点 -478 到 -469 和 -373 到 -364 对应于 NF- κ B 基序）是来自碱基序列替代试验的基序。因此，优选地，本发明的 HHV7 U95 启动子包括：(a) 具有 SEQ ID NO:12 所示的碱基序列或者与之对应的碱基序列或其序列片段的多核苷酸；(b) SEQ ID NO:12 所示的碱基序列或者与之对应的碱基序列的等位基因变体或其序列片段的多核苷酸；(c) 与 (a) 或 (b) 中的任何一种的多核苷酸杂交并且具有其一种生物活性的多核苷酸；或者 (d) 由 (a)-(c) 中的任何一种的碱基序列或者具有至少 70% 同一性的互补序列组成并且具有其一种生物活性的多核苷酸。

[0346] 如本文所用，本发明的启动子“组成型”表达基因是指在生物生长的任意阶段，在生物的所有组织中，均以大致一定而不改变的量表达的性质。特别地，在与本说明书实施例同样的条件下，利用 RNA 印迹分析时，例如在任意时间点（例如两个或两个以上的时间点，例如第 5 天和第 15 天）在同一或相应部位均可以观察到几乎相同的表达量时，则在本发明意义上，表达是组成型表达。一般认为组成型表达的启动子对正常生长环境下维持生物体的恒定性起作用。这些特性可以通过下述方式确定，由生物的任何部位提取 RNA，利用 RNA 印迹分析表达量。

[0347] “增强子”可以用于提高目的基因的表达效率。作为增强子，优选包含 CaMV35S 启动子内上游序列的增强子区域。增强子，可以使用多个，也可以使用 1 个，还可以不使用。在启动子中增强启动子活性的区域也可以称作为增强子。

[0348] 如本文所用,“被可操作地连接”或“可操作地连接”指将目的序列的表达(起作用)置于某些转录翻译调节序列(例如启动子,增强子等)或翻译调节序列的控制之下。为了将启动子可操作地连接到基因上,启动子通常位于该基因的上游,但启动子无需紧邻该基因。

[0349] (核酸构建体)

[0350] 本文所用的术语“核酸构建体”或“基因表达盒”可以互换使用,是指包含编码基因的核酸(例如,DNA,RNA)的核酸序列,包含可操作地连接了启动子基因(启动子控制该核酸的表达)、启动子和可选择地可操作地连接了异源基因(即在读框内)的核酸序列。可以预期,本发明包括这些表达盒或构建体选择性地与其他调控元件组合的用途。优选地,表达盒或核酸构建体适合于被特定的限制性酶消化并且可以被回收。

[0351] 当本文提及基因时,术语“重组的载体”是指将感兴趣的多核苷酸序列导入目的细胞的载体。这种载体能够在宿主(例如,原核生物细胞、酵母、动物细胞、植物细胞、昆虫细胞、动物个体和植物个体等)中自我复制,或者可以被整合到染色体中,并且在适合本发明的多核酸转录的位置包含启动子。在本申请中,可以使用BAC载体。BAC载体是一种以大肠杆菌的F质粒为基础而制备的质粒,其能够在细菌如大肠杆菌等中增殖和稳定地维持约300kb或更长的DNA片段。BAC载体至少包含BAC载体复制所需的区域。这种复制所需的区域包括,如F质粒的复制起点oriS或其变体。

[0352] 如本文所用,“选择性标记”是指起筛选含有核酸构建体或载体的宿主细胞的作用的基因。选择性标记包括,但不限于:荧光标记、发光标记和药物选择标记。“荧光标记”包括但是不限于编码荧光蛋白的基因,如绿色荧光蛋白(GFP)、蓝绿荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)和红色荧光蛋白(dsRFP)。“发光基因”包括但是不限于,编码如荧光素的荧光蛋白的基因。“药物选择性标记”包括但是不限于:次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(hprt)、二氢叶酸还原酶基因、谷氨酰胺合酶基因、天冬氨酸转氨酶、金属硫蛋白(MT)、腺苷脱氨酶(ADA)、腺苷脱氨酶(AMPD1,2)、黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶、UMP合酶、P-糖蛋白、天冬酰胺合酶以及鸟氨酸脱羧酶。一种药物与药物筛选标记包括编码蛋白质的组合:例如二氢叶酸还原酶基因(DHFR)和氨甲蝶呤(MTX)的组合;谷氨酰胺合酶(GS)基因与甲硫氨酸磺基肟(Msx)的组合;天冬氨酸转氨酶(AST)基因与N-磷酸乙酰-L-天冬氨酸(PALA)的组合;MT基因和镉(Cd²⁺)的组合;腺苷脱氨酶(ADA)基因和腺苷、亚硝基羟基丙氨酸、或2'-脱氧柯福霉素的组合;腺苷脱氨酶(AMPD1,2)基因和腺嘌呤、重氮乙酰丝氨酸、或助间型霉素的组合;黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶基因和霉酚酸的组合;UMP合酶基因和6-氮尿苷或吡唑呋喃菌素的组合;P-糖蛋白(P-gp,MDR)基因和多种药物的组合;天冬酰胺合酶(AS)基因和β-天冬氨酸异羟肟酸或合欢氨酸的组合;以及鸟氨酸脱羧酶(ODC)基因和-α-二氟甲基-鸟氨酸(DFMO)的组合。

[0353] 如本文所用,术语“表达载体”是指包含结构基因和用于调控结构基因表达的启动子的核酸序列,在某些情况下还包含各种调节元件,使得它们可以在宿主细胞中进行操作。调节元件优选包含终止子、耐药性基因(例如卡那霉素抗性基因、潮霉素抗性基因等)之类的选择性标记以及增强子等。生物体(例如动物)的表达载体的类型和所使用的调节元件的种类根据所用的宿主细胞而变化,这是本领域技术人员已知的。

[0354] 如本文所用的,术语“重组载体”是指可以将感兴趣的多核苷酸序列导入目的细胞

的载体。这种载体在宿主（原核生物细胞、酵母、动物细胞、植物细胞、昆虫细胞、动物个体和植物个体等）细胞中能够自我复制或者整合到染色体中，并且在适合本发明的多核酸转录的位置包含启动子。

[0355] 如本文所用的，术语“终止子”是指位于基因中编码蛋白质的区域的下流的序列，其与 DNA 转录为 mRNA 时的转录终止以及 poly A 序列的添加相关。已知终止子增加 mRNA 的稳定性，并影响基因的表达量。终止子包括但不限于包括 AATAAA 的序列。

[0356] 如本文所用的，术语“外源基因”是指在天然情形下不存在于特定生物体中的基因。这种外源基因可以是通过修饰天然存在于特定生物体中的基因而获得的基因，或者天然存在于特定生物体之外的另一种生物体中的基因（例如 AD 基因），或者人工合成的基因，或者它们的复合物，如融合物。包含这种外源基因的生物体能够表达实际上不被表达的基因产物。例如，将被删除的隐性基因（例如，AD 基因、PNP 基因、 γ c 链基因、TAP 基因、MHC II 基因、X- 连接的 WASP、CD40 配体、PI3K 样基因、DNA 解旋酶）可被用作一种外源基因。

[0357] 如本文所用的，外源基因是一种细胞因子的基因。如本文所用的，术语“细胞因子”以本领域中最宽广的意思定义，是由一种细胞生成的具有生理活性的物质，作用于相同或不同的细胞。细胞因子通常是一种蛋白质或多肽，对免疫反应、内分泌系统的调控、神经系统的调控、抗肿瘤活性、抗病毒活性、细胞增殖的调控、细胞分化的调控等具有控制作用。如本文所用的，细胞因子以蛋白质或核酸的形式存在，在真正起作用时，细胞因子通常呈蛋白质形式。如本文所用，术语“生长因子”是指能够启动或控制细胞生长的物质。在细胞培养或组织培养时，将生长因子添加到培养基中，替代血清大分子物质的作用。已经发现，许多生长因子作为细胞分化状态而不是细胞生长的调控因子。细胞因子通常包括白介素、趋化因子、如集落刺激因子的造血因子、肿瘤坏死因子、干扰素。生长因子通常包括源自血小板的生长因子 (PDGF)、表皮生长因子 (EGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、肝细胞生长因子 (HGF)、血管内皮生长因子 (VEGF) 等，它们具有生长活性。

[0358] 在本发明中，用那些与上述具有天然形式的外源基因具有同一性的基因作为将被表达的外源基因。具有这种同源性的外源基因包括但不限于：例如，当用 Blast 的默认参数与用于比较的参照外源基因进行比较时，核苷酸具有同一性或相似性至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 30%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 99% 的序列，或者多肽具有同一性或相似性至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 30%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 99% 的氨基酸序列。

[0359] 如本文所用的，术语如基因、多核苷酸、多肽等的基因产物的“表达”是指基因等在体内受到预先确定的活动的作用而改变为另一种形式。优选地，术语“表达”是指基因、多核苷酸等被转录和翻译成多肽。在本发明的一个实施方案中，基因被转录为 mRNA。更优选地，这些多肽发生翻译后的加工修饰。

[0360] 因此，如本文所用的，基因、多核苷酸、多肽等的“表达下降”是指当本发明的一种制剂受到一定作用时，使得与该物质未受到一定作用时相比，表达量显著下降。优选地，表达量降低包括多肽表达水平下降。如本文所用的，基因、多核苷酸、多肽等的“表达增加”是

指当本发明的一种制剂受到一定作用（或者与基因表达相关的物质进入细胞，例如，将被表达的基因或者用于调控基因表达的物质）时，使得与该物质未受到一定作用时相比，表达量显著增加。优选地，表达量增加包括多肽表达水平升高。如本文所用的，术语“诱导”基因的“表达”是指用一种物质作用于细胞使得基因的表达水平升高。因此，诱导表达包括当观察到基因的表达水平从未表达的观察水平升高到明显的表达水平时。

[0361] 如本文所用的，术语基因的“特异性表达”是指不同于其他部位或时期的特定部位或时期中以不同的水平（优选为较高水平）表达。特异性表达是指在某些部位（特定部位）表达或者也指在另一个部位上表达。优选地，特异性表达是指仅在某些部位表达。

[0362] 导入重组载体的方法也可以用上述将 DNA 导入细胞的方法来实现，包括如转染、转导、转化等，例如磷酸钙法、脂质体法、DEAE 葡聚糖法、电穿孔法、粒子枪法（基因枪）等，脂质转染法、原生质球法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、醋酸锂法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]、以及 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)] 中描述的方法等。

[0363] 本文所用的用于除去基因组或基因座的 Cre 酶的过渡表达、染色体的 DNA 作图等是本领域技术人员熟知的，在 Saibo Kogaku Bessatsu Jikken Purotokooru siriizu (Cell Engineering, Special Edition, Experimental Protocol Series), Ken' ichi Matsubara, Hiroshi Yoshikawa, Shujunsha 编辑 (Tokyo) 的一部分，“FISH jikken purotokooru hito/genomu kaiseki kara senshokutai/idenshi shindan made (FISH Experimental Protocol: from human/genomic analysis to chromosomal./genetic diagnosis)” 等中有描述。

[0364] 如本文所用的，基因表达（例如，mRNA 表达、多肽表达）可以用合适的方法“检测”或“量化”，包括 mRNA 测定和免疫学测定。分子生物学测定方法的例子包括 RNA 印记方法、点印记方法、PCR 方法等。免疫学测定方法的例子包括 ELISA 法、RIA 法、荧光抗体法、蛋白质印记法、免疫组织染色法等，其中使用微量滴定平板。量化方法的例子包括 ELISA 法、RIA 法等。采用使用阵列（例如，DNA 阵列、蛋白质阵列）的基因分析方法。在 Saibo-Kogaku [Cell Engineering], special issue, “DNA Microarray and Up-to-date PCR Method”, Shujun-sha 编辑，对 DNA 阵列进行了广泛的综述。Natgenet. 2002 Dec ;32 Suppl :526-32 对蛋白质阵列进行了详细描述。基因表达分析方法的例子包括，但是不限于除了上述方法外的 RT-PCR 法、RACE 法、SSCP 法、免疫沉淀法、双杂交系统、体外翻译法等。其他分析方法被描述在例如，“Genome Analysis Experimental Method”, Yusuke Nakamura's Lab-Manual, Yusuke Nakamura 编辑, Yodo-sha (2002) 等中。所有上述出版物在此被引入作为参考。

[0365] 如本文所用的，术语“表达水平（或量）”是指在一个细胞中表达的多肽或 mRNA 的量。术语“表达水平”包括多肽表达的蛋白质水平，其是通过使用抗体的任何合适方法进行评价的，包括免疫测定方法（例如，ELISA 法、RIA 法、荧光抗体法、蛋白质印记法、免疫组织染色法等），也包括多肽表达的 mRNA 水平，其通过合适的方法评价，包括分子生物学测定法（例如，RNA 印记法、点印记法、PCR 法等）。术语“表达水平的变化”是指多肽表达的蛋白质水平或 mRNA 水平的升高或降低，通过适当方法评价，包括上述的免疫测定法或分子生物学测定法。

[0366] 如本文所用的,除非另外指出,术语“转化”、“转导”和“转染”互换使用,是指将核酸导入宿主细胞中。作为一种转化方法,任何将 DNA 导入宿主细胞的方法都是可用的,包括各种已知方法,例如电穿孔方法、粒子枪法(基因枪)、磷酸钙法等。

[0367] 如本文所用的,术语“转化体”是指通过转化生产的生物体的整体或者部分,如细胞。转化体的例子包括原核生物细胞、酵母、动物细胞、植物细胞、昆虫细胞等。根据对象的不同,转化体是指转化细胞、转化组织、转化宿主等。如本文所用的,包括所有转化形式,但是在具体上下文中特指某种特定的形式。

[0368] 原核生物细胞的例子包括,大肠杆菌属、沙雷氏菌属(*Serratia*)、芽胞杆菌属(*Bacillus*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)等的原核细胞,例如大肠杆菌 XL1-Blue,大肠杆菌 XL2-Blue,大肠杆菌 DH1,大肠杆菌 MC1000,大肠杆菌 KY3276,大肠杆菌 W1485,大肠杆菌 JM109,大肠杆菌 HB101,大肠杆菌 No. 49,大肠杆菌 W3110,大肠杆菌 NY49,大肠杆菌 BL21(DE3),大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS,大肠杆菌 HMS174(DE3),大肠杆菌 HMS174(DE3)pLysS,无花果沙雷氏菌(*Serratia ficaria*),居泉沙雷氏菌(*Serratia fonticola*),液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*),粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*),枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),产氨短杆菌(*Brevibacterium ammoniagenes*),*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068,解糖短杆菌(*Brevibacterium saccharolyticum*)ATCC14066,谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)ATCC13032,谷氨酸棒杆菌 ATCC14067,谷氨酸棒杆菌 ATCC13869,嗜乙酰乙酸棒杆菌(*Corynebacterium acetoacidophilum*)ATCC13870,嗜氨微杆菌(*Microbacterium ammoniophilum*)ATCC15354,假单胞菌某种(*Pseudomonas* sp.)D-0110,等等。

[0369] 动物细胞的例子包括脐带血单核细胞、外周血单核细胞、Sup-T1 细胞,等等。

[0370] 术语“动物”以其最广的含义用于本文中,是指脊椎动物和无脊椎动物(例如节肢动物)。动物的例子包括但不限于哺乳动物纲、鸟纲、爬行纲、两栖纲、鱼纲、昆虫纲、蠕虫纲等的任何动物。

[0371] 如本文所用的,所谓生物体的“组织”是基本上具有相同功能的细胞的集合。因此,组织可以是器官的一部分。器官通常具有功能相同的细胞,并且同时存在功能略微不同的细胞。因此,如本文所用的,组织具有各种类型的细胞,只要这些细胞共同具有一定特性。

[0372] 如本文所用,术语“器官”是指具有一种独立的形态,其中一种或一种以上的组织配合行使特定功能的结构体。对于植物,器官的例子包括但不限于愈伤组织、根、茎、植干、叶、花、种子、胚芽、胚、果实等。对于动物,器官的例子包括但不限于胃、肝脏、肠、胰腺、肺、气管、鼻、心脏、动脉、静脉、淋巴结(淋巴系统)、胸腺、卵巢、眼、耳、舌、皮肤等等。

[0373] 如本文所用的,术语“转基因的”是指将特定基因整合到某生物体(例如,植物或动物(小鼠等))中或整合了这类基因的生物体。

[0374] 当本发明的生物体是动物时,转基因生物体可以利用微注射法(微量注射法)、病毒载体法、胚胎干细胞(ES)法、精子载体法、染色体片段导入法(体细胞转染法(transsomic method))、附加体法等来制备。这些转基因动物的制备技术在本领域中是已知的。

[0375] 如本文所用的,术语“筛选”是指使用特定操作/评价方法,从大量候选者中选择

具有感兴趣特性的物质、宿主细胞、病毒等。应当理解,本发明包括通过筛选获得的具有期望活性的病毒。

[0376] 如本文所用的,术语“芯片”或“微芯片”可以互换使用,是指具有多种功能的、构成系统的一部分的微型集成电路。芯片的例子包括但不限于 DNA 芯片、蛋白质芯片等。

[0377] 本发明的疱疹病毒启动子用作一种药物组合物的成分,该药物用于处理、防止和/或治疗淋巴细胞系的或血细胞系的、免疫的和感染的疾病。

[0378] 如本文所用,与药物相关的术语“有效量”是指使得所述药物具有实现目的药效的含量。如本文所用的,对应于最小浓度的有效量将称为最小有效量。这种最小有效量是本领域所公知的。通常,药物的最小有效量由本领域的技术人员确定,或可由本领域的技术人员适宜地确定。要确定有效量除了实际施用以外,还可以使用动物模型来确定。在本发明中在确定此种有效量时是有用的。

[0379] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”是指用于制造医药或农药(如动物药)时所使用的物质,并且该物质对有效成分不产生不良影响。这种药学上可接受的载体的例子包括但不限于:抗氧化剂、防腐剂、着色剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、悬浮剂、溶剂、填料、填充剂、缓冲液、呈递载体、赋形剂、和/或农业的或药学的佐剂。

[0380] 基于通过本发明方法所获得的信息(例如与疾病相关的信息),考虑使用目的、对象疾病(种类,严重程度等)、患者的年龄、体重、性别、既往病史、施用部位的形态或种类等,本领域的技术人员可以容易地确定本发明的处置方法中所使用的药剂的种类和用量。鉴于使用目的、对象疾病(种类、严重程度等)、患者的年龄、体重、性别、既往病史和治疗过程等,本行业从业人员可以很容易决定对受试者(患者)施用本发明的监测方法的频率。作为监测疾病状态的频率包括每日一次到数月一次(例如一周一次到1个月一次)。优选地,基于治疗进程,每周一次到每月一次地进行监测。

[0381] 如本文所用的,术语“指导说明书”针对实施本发明方法的医生、患者等所作的对本发明方法的描述。该指导说明书指明了施用本发明的药剂的时间,例如在放射性治疗之前或之后(例如24小时之内等)。所述的说明书按照实施本发明的国家监督管理部门(例如,日本的厚生劳动省、美国食品药品监督管理局(FDA)等)所规定的样式编写,并标明已得到所述监督管理部门的认可。该指导说明书即所谓的包装说明书,通常以纸为介质提供,但也并不局限于此,也可以通过例如电子媒体(例如通过互联网提供的主页或电子邮件)的形式提供。

[0382] 必要时,在本发明的治疗中,可以使用两种或两种以上的药剂。在使用两种以上的药剂时,这些药剂具有类似性质或类似的来源,也可以具有不同性质或不同的来源。可以通过本发明的方法获得有关使用两种以上药剂的方法中药物抗性水平的相关信息。

[0383] 本发明中所用的培养方法在如“Doubutsu Baiyosaibo Manual (Animal Culture Cell Manual), Seno 等人编, Kyoritsu shuppan, 1993 中有描述并得到其支持,所述文献在此全文引入作为参考。

[0384] (制备多肽的方法)

[0385] 通过如下方法制备本发明的多肽,包括以标准的培养方式,培养来自具有重组载体的微生物或动物细胞的转化体,该重组载体中插入了编码本发明多肽的 DNA,生产并沉淀本发明的多肽,从本发明的培养物中回收本发明的多肽。

[0386] 在培养基中培养本发明的转化体的方法按照培养宿主的常规方法来实施。用于培养以原核生物细胞如大肠杆菌等或者真核细胞如酵母作为宿主而获得的转化体的培养液包括那些包括碳源、氮源、无机盐等能够被本发明的生物体吸收的物质的培养液,这些培养液能够有效地培养转化体,它们可以是天然的或合成的。

[0387] 可以使用能够被微生物吸收的碳源,包括如葡萄糖、果糖、蔗糖、食糖或含有糖的蜂蜜、淀粉、淀粉水解产物、有机酸如醋酸和丙酸、醇如乙醇和丙醇等。

[0388] 例如,可以使用如下的氮源:氨,无机酸或有机酸的各种铵盐,例如氯化铵、硫酸铵、醋酸铵、磷酸铵,其他含氮物质等,肽,肉提取物,酵母提取物,玉米浸泡液,酪蛋白水解产物,大豆粉,大豆粉水解产物,各种发酵的细菌体,以及它们的消化产物等。

[0389] 例如,可以使用如下的无机盐:磷酸氢钾,磷酸二氢钾,磷酸镁,硫酸镁,氯化钠,磷酸铁,硫酸锰,硫酸铜,碳酸钙等。在有氧条件下进行培养,例如摇床或者强通风搅动培养。

[0390] 培养温度优选在 15 ~ 40℃ 之间。培养时间通常从 5 小时到 7 天之间,但是不受此限制。培养过程中的 pH 值保持在 3.0 ~ 9.0。通过添加无机酸或有机酸或者碱性溶液、尿素、碳酸钙氨水等来调节 pH 值。在培养过程中,按需要添加抗生素,如氨基青霉素或四环素等。

[0391] 当对用含有诱导型启动子的表达载体转化的微生物进行培养时,可选择地往培养液中添加诱导剂。例如,当对用含有 lac 启动子的表达载体转化的微生物进行培养时,往培养液中添加异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷等。当对用含有 trp 启动子的表达载体转化的微生物进行培养时,往培养液中添加吲哚丙烯酸等。使用发酵罐,大规模地培养导入基因的细胞或器官。本文使用通常使用的培养液,例如 Murashige 和 Skoog (MS) 液、White 氏培养液或者那些添加了茁长素、细胞因子或植物激素等的培养液。

[0392] 例如,当使用动物细胞时,用于培养本发明的细胞的培养基包括,例如通常使用的那些培养基,例如 RMP11640 培养基 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、Eagle 氏 MEM 培养基 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM 培养基 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培养基 [Proceedings of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] 或者添加了胎儿牛血清等的培养基。

[0393] 通常在如 pH 6-8、25-40℃、5% CO₂ 的条件下培养 1-7 天。在培养过程中,可选择地往培养基中添加抗生素,如卡纳霉素、青霉素、链霉素等。

[0394] 使用本领域熟知和通常使用的分离或纯化酶的常规方法,从用编码多肽核酸序列转化的转化体培养物中分离或纯化本发明的多肽。例如,本发明的多肽被分泌到用于生产多肽的转化体外部对该培养物进行离心等操作,获得可溶的部分。通过溶剂提取,用硫酸铵等进行盐析/脱盐,用有机溶剂进行沉淀,使用树脂(例如二乙基氨基乙基 (DEAE)-琼脂糖、DIAION HPA-75 (Mitsubishi Chemical Corporation) 等)进行阴离子交换层析,使用树脂(例如 S-琼脂糖 FF (Pharmacia) 等)进行阳离子交换层析,用树脂(如丁基琼脂糖、苯基琼脂糖等)进行疏水性层析,用分子筛进行凝胶过滤,亲和层析,层析聚焦,电泳(例如等电子聚焦电泳等)等方法,从可溶部分中获得被纯化的样本。

[0395] 当本发明的多肽被表达并在细胞内形成不溶的实体时,收集细胞,研磨成粉末并离心。使用常用方法,从生成的沉淀中收集本发明的多肽。用多肽变性剂溶解不溶的多肽。当多肽变性剂的浓度太低而不能使多肽变性时,将得到的溶液进行稀释,或者用无变性剂

的溶液或稀溶液进行透析。使本发明的多肽形成正常的三维结构,通过上述的分离和纯化方法获得被纯化的样本。

[0396] 用常用的蛋白质纯化方法(J.Evan.Sadler 等人:Methods in Enzymology,83,458)进行纯化。可替代地,本发明的多肽与其他蛋白质融合,生成一种融合蛋白,用与该融合蛋白具有亲合性的物质,通过亲合层析来纯化融合蛋白(Akio Yamakawa, Experimental Medicine,13,469-474(1995))。例如,按照 Lowe 等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,86,8227-8231(1989)Genes Develop.,4,1288(1990))中描述的方法,生成本发明的多肽与蛋白质 A 的融合蛋白,接着用免疫球蛋白 G 进行亲合层析来纯化。

[0397] 制备本发明的多肽与 FLAG 肽的融合蛋白,接着用 FLAG 抗体进行亲合层析来进行纯化(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,86,8227(1989),Genes Develop.,4,1288(1990))。

[0398] 用结合多肽的抗体进行亲合层析来纯化本发明的多肽。按照已知方法(J.Biomolecular NMR,6,129-134;Science,242,1162-1164;J.Biochem.,110,166-168(1991)),用体外转录/翻译系统来制备本发明的多肽。

[0399] 根据多肽的氨基酸信息,通过化学合成方法来制备本发明的多肽,例如 Fmoc 法(氟基甲氧基羰基法)、tBoc 法(t-丁氧基羰基法)等。使用肽合成法,化学合成该肽(可由 Advanced ChemTech, Applied Biosystems, Pharmacia Biotech, Protein Technology Instrument, Synthecell-Vega, PerSeptive, Shimadzu 等公司合成)。

[0400] 被纯化的本发明的多肽的结构可通过蛋白质化学工业中常用的方法来确定(参见,例如 Hisashi Hirano. "Protein Structure Analysis for Gene Cloning", Tokyo Kagaku Dojin 出版,1993)。按照已知的测定方法来测量本发明的多肽的生理学活性。

[0401] (制备多肽变体的方法)

[0402] 通过本申请之前熟知的定点诱变方法,对本发明的多肽的氨基酸进行缺失、替代或添加。按照 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989), Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons(1987-1997)、Nucleic Acids Research,10,6487(1982)、Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,79,6409(1982),Gene,34,315(1985)、Nucleic Acids Research,13,4431(1985),Proc.Natl.Acad.Sci USA,82,488(1985)、Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,81,5662(1984)、Science,224,1431(1984)、PCTW085/00817(1985)、Nature,316,601(1985) 等中描述的方法,制备缺失、替代或添加了一个或多个氨基酸的那些多肽。

[0403] (基因治疗)

[0404] 在某些具体实施方式中,施用包含编码抗体或其功能性衍生物的序列的核酸来进行基因治疗、处理、抑制或阻止与本发明中所用多肽的异常表达和/或活性相关的疾病或异常。基因治疗是指通过施用在受试者中已经被表达或者能够被表达的核酸而进行的治疗。在本发明的具体实施方式中,核酸生成其所编码的蛋白质,而该蛋白质产生一种治疗效果。

[0405] 任何本领域可获得的用于基因治疗的方法被用于本发明中。下文将描述示例性的方法。

[0406] 参见如下关于基因治疗的综述文章:Goldspiel 等人,Clinical Pharmacy 12:488-505(1993);Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95(1991);Tolstoshev, Ann. Rev.

Pharmacol. Toxicol. 32 :573-596 (1993) ;Mulligan, Science 260 :926-932 (1993) ;and Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62 :191-217 (1993) ;以及 May, TIBTECH 11 (5) : 155-215 (1993)。通常所知的用于基因治疗的 DNA 重组法被描述在 Ausubel 等人 (编辑), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993) ; 以及 Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990) 中。

[0407] (治疗活性或预防活性的证实)

[0408] 在应用于人之前,优选在体外,然后在体内检测本发明的化合物或药物组合物的期望治疗活性或者预防活性。用于证实化合物或药物组合物的治疗或预防效用的体外分析包括化合物对细胞系或患者组织样本的作用。使用本领域技术人员知晓的方法(包括但不限于细胞溶解分析),确定化合物或组合物对细胞系和/或组织样本的作用。按照本发明,用于确定是否需要施用特定化合物的体外分析方法包括体外细胞培养分析,在该分析中,患者组织样本在培养基中培养,暴露于一种化合物中或者给予一种化合物,并观察该化合物对组织样本的作用。

[0409] (治疗性的/预防性的给药和组合物)

[0410] 本发明提供一种治疗、阻止和预防方法,通过给受试者施用有效量的一种成分或药物组合物,其中包含本发明的启动子。在一个优选方面,包含启动子的成分基本上是纯化的(例如,包括其作用被降低或者基本上不含引起不期望的副作用的物质)。受试者优选是动物,包括但不限于:牛、猪、马、鸡、猫、狗等,并且优选灵长类,最优选是人。

[0411] 当将本发明的核酸分子或多肽用作药剂时,该药剂进一步包含药学上可接受到载体。任何本领域已知的药学上可接受到载体可被用于本发明的药剂中。

[0412] 药学上可接受的载体或合适的制剂物质包括但不限于,抗氧化剂、防腐剂、着色剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、悬浮剂、溶剂、填料、填充剂、缓冲液、运载工具、和/或药学佐剂。通常,本发明的药剂以包含多肽或多核苷酸或其变体或片段,或其变体或衍生物,或者能够调节这些物质的任何一种的试剂,以及至少一种生理学上可接受到载体、赋形剂或稀释剂的形式给药。例如,合适载体是注射溶液、生理溶液或者人工脑积水液,其中可添加通常用于胃肠外呈递组合物中的其他物质。

[0413] 本发明所用的可接受到载体、赋形剂或稳定剂优选对接受者没有毒性,优选这里所用的剂量和浓度下是惰性的,优选包括磷酸、柠檬酸或者其他有机酸;抗坏血酸, α -生育酚;小分子量的多肽;蛋白质(例如血清白蛋白、白明胶或者免疫球蛋白);亲水性聚合物(例如,聚乙烯吡咯烷酮);氨基酸(例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);单糖、二糖,以及其他碳水化合物(葡萄糖、甘露糖或者糊精);螯合剂(例如,EDTA);糖醇(例如甘露醇或山梨糖醇);成盐抗衡离子(例如钠);和/或非离子型表面活性剂(例如 Tween, 聚丙二醇或聚乙二醇(PEG))。

[0414] 合适载体的例子包括中性缓冲盐水溶液或者与血清白蛋白混合的盐水溶液。优选地,该产品用合适赋形剂(如蔗糖)配制成冻干品。按需要还包括其他的标准载体、稀释剂和赋形剂。其他示例性组合物包含 pH 7.0-8.5 的 Tris 缓冲液,或者 pH 4.0-5.5 的醋酸缓冲液,其中还包括山梨糖醇或者其合适的替代品。

[0415] 本发明的药剂通过口服或者胃肠外给药。可替代地,本发明的药剂通过静脉内或

皮下给药。当全身给药时,用于本发明中的药剂可以是无热原的药学上可接受的水溶液。在制备这些药学上可接受的组合物时,对于 pH、渗透压、稳定性等方面的调节是本领域内的技术。给药的方式可以是口服、胃肠外施用(例如,静脉内、肌肉内、皮下、皮内、应用到粘膜、直肠内、阴道内、局部应用于作用部位,应用于皮肤等)。以任何制剂形式指示这种给药方式。这种制剂形式包括液体制剂、注射剂、稳定的制备物等等。

[0416] 将具有期望纯度的糖链组合物与可选择的生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合(Japanese Pharmacopeia ver.14,或其增刊或者最新版本;Remington's Pharmaceutical Sciences,第十八版,A.R.Gennaro 编辑,Mack Publishing Company,1990;等等),将本发明的药剂制备成冻干块或者水溶液形式,便于保存。

[0417] 基于通过本发明方法所获得的信息(例如与疾病相关的信息),考虑使用目的、对象疾病(种类,严重程度等)、患者的年龄、体重、性别、既往病史、施用部位的形态或种类等,本领域的技术人员可以容易地确定本发明的处置方法中所使用的药剂的种类和用量。鉴于使用目的、对象疾病(种类,严重程度等)、患者的年龄、体重、性别、既往病史和治疗过程等,本行业从业人员可以很容易决定对受试者(患者)施用本发明的监测方法的频率。作为监测疾病状态的频率包括每日一次到数月一次(例如一周一次到1个月一次)。优选地,基于治疗进程,每周一次到每月一次地进行监测。

[0418] (免疫治疗)

[0419] 如本文所用的,术语“疫苗”是指一种组合物(例如悬浮液或者溶液),其包含一种通常具有感染性的制剂或者感染性制剂的一部分,能够产生这种制剂或其部分的物质(如基因序列),以引发有效的免疫反应。含有抗原部分的疫苗可以是一种微生物(例如病毒或者细菌等),从这种微生物中纯化得到的天然产物、合成产物或遗传工程化的蛋白质、肽、多糖或者类似产物以及包含编码这种蛋白质的核酸序列的核酸分子。疫苗通过导致中和抗体的生成来发挥作用。

[0420] 如本文所用的,术语“基因疫苗”是指一种组合物(例如悬浮液或溶液等),其包含一种物质(通常为核酸分子),其在被施用的受试者中表达,并且该表达产物具有疫苗作用。典型的遗传疫苗是核酸分子(例如,载体、质粒、裸 DNA 等),其包含编码具有抗原性的基因产物的核酸序列。

[0421] 如本文所用的,本发明的疫苗的作用可用任何本领域已知的方法来证实。这种方法包括但是不限于:如 CTL 前体细胞频率分析法、ELISPOT 法、四聚物法、实时 PCR 法等。作为对 CTL 前体细胞频率分析法的示例性说明,在存在 IL-2 时培养外周淋巴细胞或者抗原性肽与淋巴细胞,进行限制性稀释,将 IL-2 和饲养细胞进行共培养,用疫苗或其候选物刺激包含子代的孔,用 ELISA 检测是否生成 IFN- γ 。按照 Poisson 分析法,用作为阳性的孔计算前体细胞的频率,以评价该疫苗效用。如本文所用的,阳性细胞的数目是抗原特异性 CTL 的数目,该数目越大,该疫苗的效用越高。

[0422] 本发明可用作一种癌症疫苗。在这种情形下,包含作为外源基因的癌症抗原。

[0423] 如本文所用的,术语“癌症抗原”是指一种在正常细胞的癌化过程中被重新表达的抗原分子。这种癌症抗原包括但是不限于例如:

[0424] (1) 肿瘤病毒来源的抗原(例如,T 抗原等,来自 DNA 型肿瘤病毒,如腺病毒、多瘤病毒、SV40 等)。在人或小鼠的 RNA 型肿瘤病毒中,病毒来源的衣壳蛋白在细胞表面表达;

[0425] (2) 肿瘤特异性移植抗原 (TSTA) ;该抗原是指当癌症细胞由于产生特异性免疫反应而被排斥时,相同细胞系的癌症细胞的目标抗原。遗传突变导致在癌症细胞中生成变异蛋白质,使得其在癌症细胞表面上表达,与其他细胞内正常蛋白质一样,主要组织相容性 (MHC) 抗原基因复合物分子作为肽片段 ;

[0426] (3) 与肿瘤相关的抗原 (TAA) :虽然该抗原对于癌症细胞来说并非必然特异性的,但是其在癌化过程中特异性表达。例如,其对应于肝癌中的 α -胎蛋白、肠癌中的癌胚抗原 (CEA) 等。这些蛋白质最初仅存在于正常胎儿中,而不存在于成人组织中。然而,这些蛋白质在癌化过程中会再表达,也被称作为癌胚 (oncofetal) 抗原。

[0427] 如本文所用,可以使用任何形式的癌症抗原,特别地,优选使用与癌症相关的抗原。这是因为其在与 MHC 相关的癌症细胞的表面表达。

[0428] 如本文所用,术语“佐剂”是指与免疫原混合而被施用增加或改变免疫反应的物质。佐剂分为矿物质、细菌、植物、合成的或者宿主的产物。

[0429] 如本文所用,术语“病原体”是指一种能够使得宿主开始患病或者出现异常的生物体或试剂。

[0430] 如本文所用,术语“预防”和“阻止”是指对一种疾病或异常进行的处理,使得该疾病或异常在其真正发作之前不被引发。

[0431] 如本文所用,术语“治疗”和“处置”是指一种处置,但进行该处置时,能够防止一种疾病或异常的恶化,优选地,至少保持该状态,更优选地,缓和疾病或异常,更优选地消除该疾病或异常。

[0432] 在应用于人之前,优选在体外,然后在体内检测本发明的疫苗是否具有期望的治疗或预防活性。例如,体外分析本发明的疫苗的治疗效用或预防效用的方法包括检测疫苗对细胞系或者患者组织样本的作用。疫苗对细胞系和 / 或组织样本的作用可用本领域技术人员知晓的方法 (例如,免疫分析如 ELISA) 来确定。体内检测方法包括但是不限于 :如检测是否生成中和抗体的方法。

[0433] 如本文所用。术语“患者”或“受试者”是指本发明的处置或组合物所应用的生物体。优选地,患者是人。

[0434] 本发明给受试者施用有效量的本发明的基因疫苗,提供处置、抑制和预防方法。在一个优选方面,该化合物基本上是纯的 (例如,基本上不含有限制其效用或者产生不期望的副作用的物质)。

[0435] 如本文所用,术语“施用”是指单独地或者与其他治疗剂组合,将本发明的多肽、多核苷酸等或者含有它们的药物组合物掺入到生物体的细胞、组织或机体中。组合施用是伴随进行 (例如,化合物),分开但是同时或者一起地施用 ;或者顺序地施用。这包括组合试剂作为一种治疗混合物共同施用的方式,也包括组合试剂分别但是同时地施用的程序 (例如通过不同的或相同的粘膜进入同一个体)。“组合”施用还包括分别施用化合物或试剂之一,首先给予第一种,接着给予第二种。

[0436] 可通过任何方式施用本发明的疫苗,而优选是使用无针头的注射器。这是因为其可以被施用而不会给患者带来不当的负担。

[0437] 如本文所用的,术语“无针头的注射器”是指一种医疗装置,其通过气压或者弹性元件的弹性移动活塞,将药液转移到皮肤中,从而将药物成分施用到皮下或者优选施用到

细胞的皮下部位。

[0438] 特别地,例如,Shimajet™(由 Shimadzu 公司加工)、Medi-Jector Vision™(由 Elitemedica 加工)、PenJet™(由 PenJet 加工),它们都可以购买得到。基因枪(粒子枪)是指一种医学装置和实验装置,其利用氦的气压等,使高密度粒子如包被了 DNA 的金或钨加速,将基因导入体内。基因枪的优点包括有效地往细胞内导入低含量的 DNA,由不同的操作人员能够获得稳定结果。

[0439] 分别地,例如,美国 Bio-Rad 的 Helios 基因枪可以购买得到。

[0440] 如本文所用,术语“指导说明书”是针对实施给药的医生、患者等而对本发明的方法的描述。该指导说明书指明了施用本发明的药剂的时间,例如在放射性治疗之前或之后(例如 24 小时之内等)。所述的说明书按照实施本发明的国家监督管理部门(例如,日本的厚生劳动省、美国的食品药品监督管理局(FDA)等)所规定的样式编写,并标明已得到所述监督管理部门的认可。该指导说明书即所谓的包装说明书,通常以纸为介质提供,但也并不局限于此,也可以通过例如电子媒体(例如通过互联网提供的主页或电子邮件)的形式提供。

[0441] 借助用商业上购买得到的分析或装置检测抗体生成的结果,可判断何时可终止用本发明的方法进行处置或阻止。

[0442] 本发明还提供一种药物包装或试剂盒,其包含装有一种或多种本发明的药物组合物的容器。将按照监控药物产品或生物产品的生产、使用和销售政府部门所确定形式的告示任意地粘贴到该容器上,表示得到有关政府机关对于施用于人的制造、使用或销售予以认可。

[0443] (本文所用的常规技术)

[0444] 除非另外指出,本文所用的技术都在本发明的技术领域内。这些技术通常被用于糖链科学、应用流体学、微型加工、有机化学、生物化学、遗传工程学、分子生物学、微生物学、遗传学领域以及它们的相关领域。这些技术在下文引证的文件和本文提及的其他文件中被充分地描述。

[0445] 微型加工在如 Campbell, S. A. (1996), *The Science and Engineering of Microelectronic Fabrication*, Oxford University Press; Zaut, P. V. (1996), *Micromicroarray Fabrication: a Practical Guide to Semiconductor Processing*, Semiconductor Services; Madou, M. J. (1997), *Fundamentals of Microfabrication*, CRC15 Press; Rai-Choudhury, P. (1997), *Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication: Microlithography* 等中已经有描述,这些文献中的相关部分在此被引入作为参考。

[0446] 本文所用的分子生物学技术、生物化学技术和微生物学技术是本领域熟知和通常使用的,在如 Maniatis, T. 等人 (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor and its 3rd Ed. (2001); Ausubel, F. M. 等人 eds, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc., NY, 10158 (2000); Innis, M. A. (1990), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press; Innis, M. A. 等人 (1995), *PCR Strategies*, Academic Press; Sninsky, J. J. 等人 (1999), *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics*, Academic Press; Gait, M. J. (1985), *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Gait,

M. J. (1990), *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein, F. (1991), *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Adams, R. L. 等人 (1992), *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, Chapman & Hall; Shabarova, Z. 等人 (1994), *Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids*, Weinheim; Blackburn, G. M. 等人 (1996), *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996), *Bioconjugate Techniques*, Academic Press; *Method in Enzymology* 230, 242, 247, Academic Press, 1994; Special issue, Jikken Igaku (Experimental Medicine) "Idenshi Donyu & Hatsugenkaiseki Jikkenho (Experimental Method for Gene introduction & Expression Analysis)", Yodo-sha, 1997 等中有描述。这些出版物的相关部分 (或可能是全部) 在此被引入作为参考。

[0447] (优选具体实施方式的描述)

[0448] 下文将通过具体实施方式来描述本发明。下文描述的具体实施方式仅用于说明目的。因此,本发明的保护范围不限于具体实施方式,而是限于附随的权利要求书。本领域技术人员将清楚认识到,在不背离本发明的保护范围时,可参照本说明书进行各种变化和改进。

[0449] 一个方面,本发明提供 HHV (包括 HHV6A 和 HHV6B,特别是 HHV6B) 和 HHV7 的 MIE 启动子,和 / 或 HHV7 的 U95 启动子。特别地,已经发现,与 HCMV 的 IE 启动子相比,HHV6B 的 MIE 启动子、HHV7 的 MIE 启动子以及 HHV7 的 U95 启动子对淋巴细胞的选择性令人惊奇地增强。特别地,在黏着细胞 (293 细胞、Vero 细胞等) 中仅表现出 HCMV IE 启动子活性的百分之一,而在淋巴细胞例如 SupT1、U937 等中,表达效率增加了数倍。如此高水平的选择性或特异性说明该启动子可被用于开发一种药物,该药物作为 DNA 疫苗,用于基因治疗,特别是针对淋巴细胞的治疗。而且在体内表达系统中,即使在使用活性强大的 CMV 启动子的情况下,由于甲基化酶的作用,启动子的活性被降低,应当理解本发明的启动子可用于保护血细胞或淋巴细胞的体内表达量。在遗传疾病中,通常使用逆转录病毒对癌症进行基因治疗,然而,作为一种启动子,LTR 的活性并非如此有效,将本发明的启动子导入将被表达的基因的上游,可以在血细胞系细胞中实现有效表达。本发明还可以用于靶向血细胞疾病如白血病等的基因治疗。此外, RNAi 被用作去除基因表达的方法,而本发明的启动子被用作发夹型 RNA 表达载体的启动子,能够更为有效地抑制血细胞系细胞中的表达。用流式细胞仪,从天然外周血中纯化得到巨噬细胞或树突细胞等等,用所构建的质粒转染这些细胞,所述质粒在本发明的启动子控制下表达癌症特异性抗原或者肿瘤坏死因子 (TNF) 等,在被证实能够表达癌症抗原后,将这些细胞重新导入到起始的机体中,由于肿瘤抗原特异性 CTL 通过 I-HLA 型产生的有效作用,来对癌症进行基因治疗。

[0450] 在一个具体实施方式中,本发明的启动子长度为至少 8 个毗邻的核苷酸。优选地,本发明的启动子至少包括 SEQ ID NO:1 中所示的序列的 R3 区或其功能性变体。本发明的启动子至少包含距离 SEQ ID NO:1 的转录起始点 -574 到 -427 的序列;更优选地,至少包含距离 SEQ ID NO:1 的转录起始点 -1051 到 -427 的序列。这是因为可以预期这些区域包括具有增强子活性的区域。

[0451] 在一个具体实施方式中,本发明的启动子包括 NF- κ B 的基序和 AP-1 的基序。

[0452] 在一个优选的具体实施方式中,本发明的启动子包括 SEQ ID NO:1 中所示的序列,

更优选地基本上由 SEQ ID NO :1 中所示的序列组成。

[0453] 在一个具体实施方式中,本发明的启动子包括:(a) 具有 SEQ IDNO :1 中所示的碱基序列或者与之对应的碱基序列或其序列片段的多核苷酸;(b) SEQ ID NO :1 所示的碱基序列的,或者与之对应的碱基序列的等位基因变体或其序列片段的多核苷酸;(c) 与 (a) 或 (b) 中的任何一种的多核苷酸杂交并且具有其一种生物活性的多核苷酸;或者 (d) 由 (a)-(c) 中的任何一种的碱基序列或者具有至少 70% 同一性的互补序列组成并且具有其一种生物活性的多核苷酸。如本文所用,生物活性是启动子活性和 / 或增强子活性,但是不限于此。启动子活性和增强子活性可以用本领域熟知的方法来测定,本文中描述了这种方法,并在实施例列举。

[0454] 在一个优选的具体实施方式中,在上述 (a)-(d) 中所述的替代、添加和缺失的数量限于,例如,优选地 50 个或更少个、40 个或更少个、30 个或更少个、20 个或更少个、15 个或更少个、10 个或更少个、9 个或更少个、8 个或更少个、7 个或更少个、6 个或更少个、5 个或更少个、4 个或更少个、3 个或更少个、或者 2 个或更少个。替代、添加和缺失的数量优选较小,但是只要能够保持生物活性也可以较大(优选地,其活性与 HHV6B MIE 启动子的活性相似或者基本上相同)。

[0455] 在一个具体实施方式中,与上述 (a)-(d) 中所述的多核苷酸的任何一种或其互补序列的同一性至少约 80%,更优选至少约 90%,甚至更优选至少约 98%,最优选至少约 99%。

[0456] 在一个优选的具体实施方式中,本发明的核酸分子的长度至少为 8 个毗邻的核苷酸。根据使用本发明的目的,本发明的核酸分子的合适长度可能是变化的。更优选地,本发明的核酸分子的长度至少为 10 个毗邻的核苷酸,甚至更优选为至少 15 个毗邻的核苷酸,而更优选为至少 20 个毗邻的核苷酸。核苷酸长度的下限在上面特别指定的数量之间(例如,9 个、11 个、12 个、13 个、14 个、16 个等)或者大于上面特别指定的数量(例如,21 个、22 个、... 30 个等)。本发明多肽的长度的上限不受限制,只要其可被用于特定目的(例如启动子)。严谨性可以是高的、中度的或低的,并且可根据情况适当地确定严谨性水平。

[0457] 在不同的具体实施方式中,本发明的启动子的长度为至少 8 毗邻的核苷酸。优选地,本发明的启动子至少包括 SEQ ID NO :2 中所示序列中的 R2 区或其功能性变体。更优选地,本发明的启动子至少包括距离 SEQ ID NO :2 的转录起始位点 -388 到 +22 的序列;更优选地,至少包括距离 SEQ ID NO :2 的转录起始位点 -493 到 +22 的序列。这是因为可以预期这些区域包括具有增强子活性的区域。

[0458] 在一个实施方式中,本发明的启动子包括 NF- κ B 基序 (SEQ ID NO :2 中的 -464 到 -478 以及 -359 到 -350)。

[0459] 在一个优选的实施方式中,本发明的启动子包括, SEQ ID NO :2 中所示的序列,更优选地,基本上由 SEQ ID NO :2 中所示序列组成。

[0460] 在一个实施方式中,本发明的启动子包括:(a) 具有 SEQ ID NO :2 中所示的碱基序列或者与之对应的碱基序列或其序列片段的多核苷酸;(b) SEQ ID NO :2 中所示的碱基序列或者与之对应的碱基序列的等位基因变体或其序列片段的多核苷酸;(c) 与 (a) 或 (b) 中的任何一种的多核苷酸杂交并且具有其一种生物活性的多核苷酸;或者 (d) 由 (a)-(c) 中的任何一种的碱基序列或者具有至少 70% 同一性的互补序列组成并且具有其一种生物活

性的多核苷酸。如本文所用的,生物活性是启动子活性和 / 或增强子活性,但是不限于此。启动子活性和增强子活性可以用本领域熟知的方法来测定,本文中描述了这种方法,并在实施例中列举。

[0461] 在一个优选的实施方式中,在上述 (a)-(d) 中所述的替代、添加和缺失的数量限于,例如,优选地 50 个或更少个、40 个或更少个、30 个或更少个、20 个或更少个、15 个或更少个、10 个或更少个、9 个或更少个、8 个或更少个、7 个或更少个、6 个或更少个、5 个或更少个、4 个或更少个、3 个或更少个、或者 2 个或更少个。替代、添加和缺失的数量优选较小,但是只要能够保持生物活性也可以较大(优选地,其活性与 HHV7MIE 启动子的活性相似或者基本上相同)。

[0462] 在一个优选的实施方式中,与上述 (a)-(d) 中所述的多核苷酸的任何一种或其互补序列的同一性至少约 80%,更优选至少约 90%,甚至更优选至少约 98%,最优选至少约 99%。

[0463] 在一个优选的实施方式中,本发明的核酸分子的长度至少为 8 个毗邻的核苷酸。根据使用本发明的目的,本发明的核酸分子的合适长度可能是变化的。更优选地,本发明的核酸分子的长度至少为 10 个毗邻的核苷酸,甚至更优选为至少 15 个毗邻的核苷酸,而更优选为至少 20 个毗邻的核苷酸。核苷酸长度的下限在上面特别指定的数量之间(例如,9 个、11 个、12 个、13 个、14 个、16 个等)或者大于上面特别指定的数量(例如,21 个、22 个、... 30 个等)。本发明多肽的长度的上限不受限制,只要其可被用于特定目的(例如启动子)。严谨度可以是高的、中度的或低的,并且可根据具体情况适当地确定严谨度水平。

[0464] 在另一个实施方式中,本发明的启动子的长度为至少 8 毗邻的核苷酸。优选地,本发明的启动子至少包括 SEQ ID NO:12 所示序列中的 R2 区域或其功能性变体。更优选地,本发明的启动子至少包括距离 SEQ ID NO:12 的转录起始位点 -3798 到 +16 的序列;更优选地,至少包括距离 SEQ ID NO:2 的转录起始位点 -484 到 +16 的序列。这是因为可以预期这些区域包括具有增强子活性的区域。

[0465] 在一个实施方式中,本发明的启动子包括 NF- κ B 的基序 (SEQ IDNO:12 中的 -478 到 -469 以及 -373 到 -364)。

[0466] 在一个优选的实施方式中,本发明的启动子包括,SEQ ID NO:12 中所示的序列,更优选地,基本上由 SEQ ID NO:12 中所示序列组成。

[0467] 在一个实施方式中,本发明的启动子包括:(a) 具有 SEQ ID NO:12 中所示的碱基序列或者与之对应的碱基序列或其序列片段的多核苷酸;(b) SEQ ID NO:12 中所示的碱基序列或者与之对应的碱基序列的等位基因变体或其序列片段的多核苷酸;(c) 与 (a) 或 (b) 中的任何一种的多核苷酸杂交并且具有其一种生物活性的多核苷酸;或者 (d) 由 (a)-(c) 中的任何一种的碱基序列或者具有至少 70% 同一性的互补序列组成并且具有其一种生物活性的多核苷酸。如本文所用的,生物活性是启动子活性和 / 或增强子活性,但是不限于此。启动子活性和增强子活性可以用本领域熟知的方法来测定,本文中描述了这种方法,并在实施例中列举。

[0468] 在一个优选的具体实施方式中,在上述 (a)-(d) 中所述的替代、添加和缺失的数量限于,例如,优选地 50 个或更少个、40 个或更少个、30 个或更少个、20 个或更少个、15 个或更少个、10 个或更少个、9 个或更少个、8 个或更少个、7 个或更少个、6 个或更少个、5 个或

更少个、4 个或更少个、3 个或更少个、或者 2 个或更少个。替代、添加和缺失的数量优选较小,但是只要能够保持生物活性也可以较大(优选地,其活性与 HHV7U95 启动子的活性相似或者基本上相同)。

[0469] 在一个优选的实施方式中,与上述 (a)-(d) 中所述的多核苷酸的任何一种或其互补序列的同一性至少约 80%,更优选至少约 90%,甚至更优选至少约 98%,最优选至少约 99%。

[0470] 在一个优选的具体实施方式中,本发明的核酸分子的长度至少为 8 个毗邻的核苷酸。根据使用本发明的目的,本发明的核酸分子的合适长度可能是变化的。更优选地,本发明的核酸分子的长度至少为 10 个毗邻的核苷酸,甚至更优选为至少 15 个毗邻的核苷酸,而更优选为至少 20 个毗邻的核苷酸。核苷酸长度的下限在上面特别指定的数量之间(例如,9 个、11 个、12 个、13 个、14 个、16 个等)或者大于上面特别指定的数量(例如,21 个、22 个、... 30 个等)。本发明多肽的长度的上限不受限制,只要其可被用于特定目的(例如启动子)。严谨度可以是高的、中度的或低的,并且可根据具体情况适当地确定严谨度水平。

[0471] 在另一个方面,本发明提供包括本发明的启动子(HHV6 的 MIE 启动子、HHV7 的 MIE 启动子、HHV7 的 U95 启动子等)的核酸构建体。这种核酸构建体具有在淋巴细胞中特异诱导表达的性能,其有效性高,与人巨细胞病毒(HCMV) IE 启动子相比,具有出乎意料的高特异性。

[0472] 因此,在一个具体实施方式中,本发明的核酸构建体包括编码外源基因的序列,该序列与本发明的启动子具有不同来源,并且与本发明的序列可操作地连接。

[0473] 这种外源基因包括,但是不限于例如,编码 RNAi 分子、药物抗性、将被删除的隐性基因、选择性标记等的那些基因。

[0474] 优选地,用于本发明中的选择性标记是能够在培养基中选择导入了该核酸构建体的宿主的那些标记,并且例如这些选择性标记是能够从视觉上选择导入了该核酸构建体的宿主的那些标记,例如次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(hprt)或者一种选自绿色荧光蛋白(GFP)、兰绿色荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)和红色荧光蛋白(dsRed)组成的组的荧光标记。

[0475] 优选地,本发明的核酸构建体中所包括的选择性标记有利地是对其中按照本发明导入了核酸构建体的宿主基本上不具有毒性的那些标记。这是因为当本发明用于治疗或预防目的时,优选不产生副作用。

[0476] 本发明的核酸构建体中包括的选择性标记包括例如,将被删除的隐性基因。如本文所用的,将被删除的隐性基因是指被删除时会造成患病状况的任何隐性基因,包括但不限于,例如:ADA 基因(与严重的联合免疫缺陷(SCID)相关)、PNP 基因(严重的联合免疫缺陷(SCID))、 γ c 链基因(与严重的联合免疫缺陷(SCID)相关)、TAP 基因(与 MHC I 缺陷相关)、MHC II 基因(与 MHC II 缺陷相关)、X-连接的 WASP(与 Wiskott-Aldrich 综合征相关)、CD40 配体(与 X-连接高 IgM 综合征相关)、PI3K-样基因(与肉芽瘤毛细血管扩张相关)和 DNA 解旋酶(与 Bloom 氏综合征相关)等。

[0477] 在一个优选的具体实施方式中,本发明核酸构建体所包括的药物是蛋白质试剂,例如细胞因子、趋化因子、生长因子、蛋白激素和肽激素,如 IFN- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-12、G-CSF、GM-CSF 等。

[0478] 在一个具体实施方式中,在本发明的核酸构建体中,启动子在血细胞系细胞,特别是 T 细胞中诱导外源基因的特异性表达。

[0479] 在另一个方面,本发明提供一种包含本发明的核酸构建体的表达载体。这种表达载体可以以可操作的连接方式包括表达所需的元件,这些元件不存在于本发明的核酸构建体中,例如,终止子、增强子序列,允许在宿主中进行表达。

[0480] 在另一个优选的具体实施方式中,选择性标记是无限增殖基因(例如 bcl-2)。可替代地,根据条件不同,选择性标记是次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(hprt)、编码毒性产物的基因、毒性基因产物与自杀性底物的组合(例如,单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)与无环鸟苷的组合)。

[0481] 另一个方面,本发明提供包含本发明的核酸构建体的细胞。当这种细胞为淋巴细胞时,能够促进编码蛋白质的外源基因的表达。

[0482] 优选地,当本发明的细胞与本发明的启动子序列是异源的时是有利的。即使该细胞为异源的也能够实现启动子活性,这是令人惊奇的效果之一。将核酸导入本发明所用的细胞中的方法在本领域是熟知的,这在上文中已有详细描述。可替代地,通过从包含细胞的样本中筛选包含核酸分子的细胞来鉴定这种细胞。包含本发明的核酸分子的细胞优选处于未分化的状态。表达本发明的核酸分子的细胞通常处于未分化的状态。由于处在未分化的状态下,因此导入这种核酸分子的细胞能够以可调控的方式表达。可替代地,用这种细胞来大量制备本发明的核酸。这种制备方法在本领域是熟知的,并在本文描述的文献中有记载。

[0483] 另一个方面,本发明提供包含本发明的核酸构建体的组织。这种核酸序列优选被可操作地连接到控制序列上。这种器官是动物组织或者其他生物体如植物的组织。可替代地,用这种组织大量地制备本发明的核酸分子。这种制备方法在本领域是熟知的,并在本文描述的参考文献中有记载。

[0484] 另一个方面,本发明提供包含本发明的核酸构建体的器官。这种核酸序列优选被可操作地连接到控制序列上。这种器官是动物组织或者其他生物体如植物的组织。可替代地,用这种器官大量地制备本发明的核酸分子。这种制备方法在本领域是熟知的,并在本文描述的参考文献中有记载。

[0485] 另一个方面,本发明提供包含本发明的核酸构建体的生物体。用这种生物体大量地制备本发明的核酸分子。这种制备方法在本领域是熟知的,并在本文描述的参考文献中有记载。

[0486] 另一个方面,本发明提供包含本发明的启动子的药物组合物。如本文所用的,所用的抗原是被期望能够在宿主中引发免疫反应的任何蛋白质。这种抗原包括但是不限于,例如,癌症抗原等。因此,本发明的药物组合物优选是 DNA 疫苗。

[0487] 另一个方面,本发明提供治疗其中期望进行淋巴细胞特异性治疗的疾病、异常或症状的药物组合物,其包括本发明的启动子以及用于所述处理的核酸序列。如本文所用的,药物组合物的靶点合适地是期望进行淋巴细胞特异性治疗的任何疾病、异常或症状,例如是获得性免疫缺陷综合征。获得性免疫缺陷综合征包括,严重的联合免疫缺陷(SCID)、MHC I 缺陷、MHC II 缺陷、威斯科特-奥尔德里奇综合征、X-连接的高 IgM 综合征、肉芽瘤毛细血管扩张、Bloom 氏综合征等。尽管不期望受任何理论的约束,获得性免疫缺陷综合征是由隐性基因(在此也被称作为要被删除的隐性基因)的某些缺陷引起的。因此,有可能实施

体细胞基因治疗,其中将要被删除的基因导入到从患者获得的骨髓细胞中,然后将这些细胞重新导入到患者中。在这方面,本发明的 HHV6B MIE 启动子可能被用于提高将分化为 T 细胞巨噬细胞等的细胞中的基因表达效率。例如,可能用逆转录病毒等来导入这种基因构建体。

[0488] 在一个优选的实施方式中,用于所述治疗的核酸序列包括选自自由编码细胞因子、趋化因子、生长因子、蛋白激素、肽激素、核酶和 siRNA (HIV-1gp41 :AATAAGACAGGGCTTGGAAAGACTTTCCAAGCCCTGTCTTATTTTT (SEQ ID NO :33)/HIV-1tat :AAGCATCCAGGAAGTCAGCCTACAA GGCTGACTTCTGGATGCTTTTT (SEQ ID NO :34)/HTLV-1tax :GAACATTGGTGAGGAAGGCACAGCCTTCC TCACCAATGTTCTTTTT (SEQ ID NO :35)) 的那些序列组成的组的序列。

[0489] 另一个方面,本发明提供以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白质的方法,包括步骤 :A) 制备一种核酸构建体,其中本发明的启动子被可操作地连接到编码蛋白质的核酸序列上 ;和 B) 将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下。

[0490] 另一个方面,本发明提供用于以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白质的试剂盒,包含 :A) 一种核酸构建体,其中本发明的启动子被可操作地连接到编码蛋白质的核酸序列上 ;和 B) 用于将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下的工具。

[0491] 另一个方面,本发明还提供用于以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白质的试剂盒,包含 :A) 本发明的启动子 ;和 B) 用于制备其中所述启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体的工具。

[0492] 另一个方面,本发明还提供用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白的疾病、异常或症状的方法,包括步骤 :A) 制备其中根据本发明的启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体 ;和 B) 将该核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下。

[0493] 另一个方面,本发明还提供用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白的疾病、异常或症状的试剂盒,包含 :A) 其中根据本发明的启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体 ;和 B) 用于在该启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下放置核酸构建体的工具。

[0494] 另一个方面,本发明还提供用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白的疾病、异常或症状的试剂盒,包含 :A) 本发明的启动子 ;和 B) 用于制备其中所述启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体的工具。

[0495] 另一个方面,本发明还提供一种制备蛋白质的方法,包括步骤 :A) 制备其中根据本发明的启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体 ;和 B) 在该启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下放置该核酸构建体。

[0496] 另一个方面,本发明还提供用于制备蛋白质的试剂盒,包含 :A) 本发明的启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体 ;和 B) 用于将核酸构建体放置在其中所述启动子诱导编码蛋白质的核酸序列表达的条件下的工具。

[0497] 另一个方面,本发明还提供用于制备蛋白质的试剂盒,包含 :A) 本发明的启动子 ;和 B) 用于制备其中所述启动子被连接到编码蛋白质的核酸序列上的核酸构建体的工具。

[0498] 另一个方面,本发明还提供本发明的启动子的用途,用于制造一种用于治疗或预防一种需要以淋巴细胞特异性方式表达一种蛋白的疾病、异常或症状的药物组合物。

[0499] 本文引用的所有科技文献、专利、公开的专利申请以及出版物在此引入作为参考,如同其在本文中完全列出一样。

[0500] 至此已经描述了本发明的优选具体实施方式,其用于更好地理解本发明。下面将通过实施例来描述本发明。下文描述的实施例仅用于说明目的,因此,本发明的保护范围仅受附随权利要求书的限制。

实施例

[0501] 对如下实施例中所用的动物的处理遵照 Osaka 大学的规定。

[0502] (实施例 1:搜索 HHV6B 启动子以及开发 DNA 疫苗)

[0503] 对于 HHV-6 立即早期蛋白质的启动子 (9U、20U、MIE、U95、MIE/3K、U95/3K,在大小上存在差别)来说,将它们的活性与巨细胞病毒 (CMV) 启动子的活性进行比较。在方法方面,将各个启动子区插入到 pGL3-Basic 载体 (Promega) 的荧光素酶的上游,然后用其转染各个细胞,并用荧光素酶活性作为参考来比较启动子的活性。下文将对材料和方法进行详细描述。

[0504] (材料与方法)

[0505] (概略)

[0506] 克隆 HHV-6B 的 MIE 基因的启动子区 (约 1.2kbp),将其连接到日本脑炎病毒北京 -1 株 cDNA 下游的外膜糖蛋白,来构建体质粒 p9u/JEVenv。所用的绿色荧光蛋白质表达质粒 pEGFP-N1 可购买得到 (从 Clontech 获得)。

[0507] 用质粒 (pcDNA3.1/JEVenv) 作为参照,其中 JEVenv 被连接到 pcDNA3.1Zeo+ 载体的 HCMV-IE 启动子的下游。所用的绿色荧光蛋白质表达质粒 pEGFP-N1 可购买得到 (从 BD Biosciences 获得)。此外,本文所用的荧光素酶表达质粒是已经构建的质粒 (pGL3-Basic; 从 Promega 获得)。

[0508] 将这些质粒导入到如下细胞中:293 细胞 (来自人肾脏)、Vero 细胞 (来自猿猴肾脏)、SupT1 细胞 (来自人 T 淋巴细胞)、U937 细胞 (来自人单核细胞) 等 (这些细胞可从美国典型培养物保藏中心 (ATCC)、RIKEN 细胞库、基因库等获得)。使用抗 JEV 的多克隆抗体,通过间接荧光抗体法,对细胞提取物进行蛋白质印迹分析,分析外膜糖蛋白在细胞中的表达情况。

[0509] 将 HHV-6MIE 的启动子区插入到荧光素酶载体 pGL3-Basic (Promega) 的萤火虫荧光素酶基因的上游而形成 p9u,通过绿豆核酸外切酶从 MIE 启动子的上游除去碱基,用 p9u 制备截断的突变体。

[0510] 通过脂质转染法,用这些截断的突变体和海鳃荧光素酶表达质粒转染 Vero 细胞,进行转染效率修正 (phRL-SV40)。转染 24 小时后收集细胞,加入细胞溶解液。接着,测定溶解产物中萤火虫荧光素酶和海鳃荧光素酶的发光水平。为了修正转染效率,用萤火虫荧光素酶的发光水平除以海鳃荧光素酶的发光水平。

[0511] 1) 细胞

[0512] 用如下 8 种细胞系测定启动子活性。

- [0513] (1)Vero 细胞 (来自猿猴肾脏)
- [0514] (2)HEL 细胞 (来自人胚胎成纤维细胞)
- [0515] (3)L929 细胞 (来自鼠科成纤维细胞)
- [0516] (4)293 细胞 (来自人肾脏)
- [0517] (5)U373 细胞 (来自人神经胶质瘤)
- [0518] (6)THP-1 细胞 (来自人单核细胞)
- [0519] (7)SupT1 细胞 (来自人 T 细胞)
- [0520] (8)U937 细胞 (来自人单核细胞)
- [0521] (这些细胞可从美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 购买)。
- [0522] 2) 用于测定启动子活性的质粒
- [0523] 为了测定启动子的活性,使用具有萤火虫荧光素酶基因的 pGL3-Basic(Promega)。该质粒不具有来自真核生物细胞的启动子序列或增强子序列,将各种碱基序列导入到荧光素酶基因的上游,测定荧光素酶的表达量,以测定所插入序列的启动子活性。
- [0524] 3) 插入到 pGL3-Basic 中的启动子序列
- [0525] 如下文所述,为了进行测定,使用 HHV-6MIE 的启动子区、HHV-6 的 U95 基因的启动子区和 HHV-6 的立即早期基因启动子区以及 HCMV MIE 的启动子区域,它们存在于可购买得到的表达载体中。
- [0526] HHV-6 的启动子区在进行 PCR 扩增并插入到 pGL3-Basic 中后被使用。
- [0527] (1)20u[其中插入 HHV-6MIE 的启动子区 (139381 ← 140624 :1243bp)](SEQ ID NO :5)
- [0528] (2)9u[其中插入 HHV-6MIE 的启动子区 (139381 ← 140427 :1046bp)](SEQ ID NO :6)
- [0529] (3)MIE[其中插入 HHV-6MIE 的启动子区 (139457 ← 140211 :754bp)](SEQ ID NO :7)
- [0530] (4)U95[其中插入 HHV-6U95 基因的启动子区 (141823 → 142578 :756bp)](SEQ ID NO :8)
- [0531] (5)CMV[其中插入从购买得到的表达载体 (pcDNA3.1) 中切出的 HCMV MIE 启动子 :750bp](SEQ ID NO :9)
- [0532] (6)MIE/3K[其中插入 HHV-6MIE 的启动子区 (139443 ← 142578 :3136bp)](SEQ ID NO :10)
- [0533] (7)U95/3K[其中插入 HHV-6MIE 的启动子区 (139443 → 142578 :3136bp)](SEQ ID NO :11),用未插入碱基序列的 pGL3-Basic 作为对照。
- [0534] 此外,制备多种缺失变体。这些示意图在图 5 中给出。作为变体,如图 5 制备如下产物。(1)9u :-1051 到 +1(SEQ ID NO :5)
- [0535] (2)9u-d2-7 :-814 到 +1(SEQ ID NO :17)
- [0536] (3)9u-d1-4 :-574 到 +1(SEQ ID NO :18)
- [0537] (4)9u-d1-5 :-427 到 +1(SEQ ID NO :19)
- [0538] (5)9u-d1-7 :-350 到 +1(SEQ ID NO :20)
- [0539] (6)9u-d3-7 :-276 到 +1(SEQ ID NO :21)

[0540] (7) 9u-d5 : -240 到 +1 (SEQ ID NO :22)

[0541] (8) 9u-d6 : -212 to +1 (SEQ ID NO :23)

[0542] (9) 9u-d7 : -116 到 +1 (SEQ ID NO :24)

[0543] (10) 9u-d8 : -77 到 +1 (SEQ ID NO :25)

[0544] 4) 用质粒转染细胞

[0545] 采用脂质转染方法,用 SuperFect (QIAGEN) 进行转染。

[0546] 为了修正转染效率,同时将 β -半乳糖苷酶表达质粒 (pCH110, Pharmacia) 导入到细胞中,并测定 β -半乳糖苷酶活性。pCH110 在 SV40 早期启动子控制下表达 β -半乳糖苷酶。

[0547] 将 pGL3 构建体 ($8 \mu\text{l}$) 和 pCH110 ($0.2 \mu\text{l}$) 混合在一起,并往其中加入 Superfect 试剂 ($8 \mu\text{l}$) 来进行转染。

[0548] 5) 测量荧光素酶活性

[0549] 用荧光素酶分析系统 (Promega) 分析荧光素酶活性。

[0550] 对 pGL3 构建体和 pCH110 进行共转染,48 小时后收集细胞。用 PBS 洗涤两次后,将细胞溶解在 $150 \mu\text{L}$ 细胞溶解液中。往细胞溶解液上清液 ($20 \mu\text{L}$) 中加入 $100 \mu\text{L}$ 荧光素酶底物溶液,30 秒后,用照度计测量发光度。

[0551] 6) 测量 β -半乳糖苷酶活性

[0552] 用 β -gal 报道系统 (Clontech) 测量 β -半乳糖苷酶活性。以与在荧光素酶活性测量中相似的方式制备细胞溶解液,并往 $20 \mu\text{L}$ 细胞溶解液中添加 $100 \mu\text{L}$ 发光底物溶液,1 小时后,用照度计测量发光度。

[0553] 7) 在用 TPA 激活细胞的条件下测量启动子活性

[0554] 用质粒转染 Vero 细胞和 L929 细胞,在 24 小时后,在 TPA (25ng/ml) 存在和不存在的条件下再培养 24 小时。此后,收集细胞,测量荧光素酶活性和 β -半乳糖苷酶活性。

[0555] (结果)

[0556] 1) HHV-6MIE 区的启动子活性:

[0557] HHV-6MIE 区的启动子活性以及 HCMV MIE 的启动子活性在上皮黏着细胞和淋巴细胞中具有不同表现。

[0558] (1) 在黏着细胞中的启动子活性的比较 (图 1)

[0559] 在黏着细胞中,HHV-6MIE 的启动子序列的活性低于 HCMV,具有一些启动子活性。U95 启动子和 HHV-6 立即早期基因的启动子的活性很低。另一方面,在黏着细胞中,HCMV MIE 启动子的活性比 HHV-6MIE 启动子的活性约高 $10 \sim 50$ 倍。特别地,在 HEL 细胞和 U373 细胞,HCMV 能够繁殖的细胞中,它显示了强有力的活性。

[0560] 至于 HHV-6MIE 区的启动子活性,那些长 $0.7\text{kb} \sim 1.2\text{kb}$ 的启动子区域的活性基本上相同,但是一般认为 3kb 序列的活性有所下降。

[0561] (2) 在淋巴细胞中的启动子活性的比较 (图 2)

[0562] HHV-6 能够在淋巴细胞中繁殖,在淋巴细胞中,HHV-6MIE 区的启动子活性比 HCMV 约高 10 倍。特别地,HHV-6MIE 区在 THP-1 和 U937 中具有强有力的活性,这些细胞属于单核的巨噬细胞系。HCMVMIE 启动子在淋巴细胞中不具有如此强大的活性。

[0563] 当启动子区长 $0.7\text{kb} \sim 1.2\text{kb}$ 时,HHV-6MIE 区的启动子活性升高,然而,当长度为

3kb 时,其启动子活性降低。

[0564] 2) 当采用具有 TPA 的细胞激发时,HHV-6MIE 区的启动子活性(图 3 和 4)

[0565] 采用 12-O-十四酰佛波醇 13-醋酸盐(TPA)激活 Vero 细胞,来测量 HHV-6MIE 的启动子活性,所有的启动子活性升高,并且显示出与 HCMV MIE 启动子基本上相同的活性(图 3)。

[0566] 然而,在 L929 细胞中,用 TPA 激活细胞也没有观察到启动子活性升高(图 4)。一般认为这是由于不同类型细胞对 TPA 的反应存在差别。

[0567] 在 Vero 细胞中,一般认为 TPA 通过诱导产生大量不同的转录活化因子,从而提高 HHV-6MIE 启动子活性。也就是说,HHV-6MIE 启动子的最大活性与 HCMV MIE 启动子一样。因此,已经证明了本发明的启动子的特异性和选择性。

[0568] 如此,在本发明中,在黏着细胞如 Vero 细胞、HEL 细胞、L929 细胞、293 细胞、U373 细胞中,CMV 启动子的活性比 HHV-6 高 10 倍(图 1)。然而,在来自人淋巴细胞的细胞,例如 THP-1 细胞、SupT1 细胞、U938 细胞中,HHV-6 启动子的活性是 CMV 启动子活性的数倍,并且还发现,启动子越短活性越大。

[0569] 已经证明了 HHV-6 的启动子是有前景的,并且根据这些结果,可以理解,这些启动子可被用于 DNA 疫苗中(腮腺炎疫苗),并且极具前景。

[0570] 用 HCMV IE 启动子作为对照,在荧光素酶表达系统中比较研究本发明人克隆的 HHV-6B MIE 启动子的活性。结果,在黏着细胞如 293 细胞、Vero 细胞等中,HHV-6MIE 启动子的活性约为 HCMV IE 启动子活性的十分之一。然而,在淋巴细胞例如 SupT1 和 U937 等中,HHV-6MIE 启动子的表达效率高数倍。采用将 JEV cDNA 连接到本发明启动子下游的 p9u/JEVenv,来分析 JEV 的外膜糖蛋白的表达,在转染 48 小时后在任何黏着细胞或者平滑的淋巴细胞中未检测到 JEV 蛋白质的表达。

[0571] 另一方面,在使用 HCMV 的 IE 启动子的 pCDNA3.1/JEVenv 中,证实了存在 JEV 蛋白质的表达。

[0572] 而且在 JEV 感染的 Vero 细胞中,其作为阳性对照,很容易地检测到外膜糖蛋白。为了分析其中原因,用 GFP 蛋白质表达质粒来验证转染效率。结果,其在 SupT1 细胞中的导入效率低至 0.1% 或更低,然而,293 细胞和 Vero 细胞分别具有 45% 和 20% 的较高的导入效率。在淋巴细胞中,所克隆的 HHV-6MIE 启动子的表达活性比 HCMV MIE 启动子高数倍。然而,被表达的基因转化为 JEV 的外膜糖蛋白时,不能检测到其活性。

[0573] 有意思的是,在淋巴细胞中,本发明克隆的 HHV-6MIE 启动子的表达活性比 HCMV-IE 启动子高数倍。然而,当将被表达的基因从报道基因转化为 JEV 的外膜糖蛋白时,未检测到活性,这是不可预期的。因此,其中原因可能是所表达的 JEV 蛋白质以反馈的方式起作用,从而以相反的方式抑制该启动子活性,或者可能是所表达的抗原在这些细胞中不稳定。

[0574] 本实施例被总结如下:

[0575] 1) 在淋巴细胞中,特别是在单核细胞/巨噬细胞中,HHV-6MIE 启动子活性比 HCMV MIE 启动子约高 10 倍。

[0576] 2) 在上皮黏着细胞,HHV6MIE 启动子活性约为 HCMV MIE 启动子活性的十分之一。

[0577] 3) 在诱导产生大量不同的转录因子的情况下,HHV-6MIE 启动子具有与 HCMV MIE

启动子相同的活性。

[0578] 如上所述,在本实施例中,那些在 HHV-6B 的主要立即早期 (MIE) 基因上游插入约 12kbp(6MIEP) 和在 pGL3Basic 载体 (Promega) 的荧光素酶基因插入约 700 bp U95 基因 (6U95) 的构建体被使用。与常规启动子比较,为了研究这些 IE 启动子应用于 DNA 疫苗中的可能性,使用血细胞系细胞,与人细胞巨化病毒 (HCMV) IE 增强子-启动子 (CMVP) 进行活性比较。在本实施例中,证明了人疱疹病毒 6B(HHV-6B) 所编码的立即早期 (IE) 启动子在血细胞系细胞中具有极高度的活性。

[0579] 4) 此外,如图 7 中所描述的,研究了各个片段的活性,并且至少起始位点上游的 -572 到 -427,特别是 -1051 到 -427 具有启动子活性,并优选具有增强子活性。-417 到 +1 部分对于启动子活性来说似乎是必需的,而增强子活性对于保证特异性似乎是必需的。发挥增强子活性的部分包括 NF- κ B 和 AP-1 基序。因此,具有这些基序是重要的,以在淋巴细胞中体现出特异性。

[0580] (实施例 2:HHV-7 的 MIE 启动子和 U95 启动子)

[0581] 接着,实施涉及来自 HHV-7 的启动子的实验。

[0582] 对 HHV-7 的两种立即早期启动子 (7MIEP、7U95P) 的活性与细胞巨化病毒 (CMV) 启动子以及 HHV-6IE 启动子 (9U 和 U95) 的活性进行比较。比较方法如下:将各个启动子区插入到 pGL3-Basic 载体 (Promega) 的荧光素酶基因的上游,用该载体转染各个细胞,以荧光素酶活性作为参照,比较启动子的活性。为了研究各个启动子上游的 R2 区的作用,制备了多种缺失变体以测量启动子活性。

[0583] (概述)

[0584] 作为一种报道质粒,将分别来自 HHV-7 的 MIE 和 u95 基因的约 500bp 片段 (7MIEP 和 7U95P) 插入到 pGL3Basic 载体 (Promega) 的荧光素酶基因的上游,用于本实施例中。

[0585] 用脂质转染法,将报道质粒导入到 T 细胞系 (Jurkat、Molt-3、SupT-1)、骨髓细胞系 (SAS-413) 中,用电穿孔法将报道质粒导入到外周血单核细胞 (PBMC) 中,来测量荧光素酶活性。结果,与 HCMVMIE 启动子相比,在 T 细胞系中,HHV-7MIE 启动子和 HHV-7U95 启动子的活性比 HCMV MIE 启动子高数倍,而在 SAS-413 细胞中,HHVMIE 启动子的活性高十倍以上。在对三批 PBMC 实施导入的实验中,HHV-7MIE 启动子和 HHV-7U95 启动子的活性较低。与 HHV-6IE 启动子 (9U 和 U95) 相比,HHV-7 的两种启动子在任何细胞种类中的活性都较低。此外,在使用 HHV7MIE 启动子和 HHV7U95 启动子的缺失变体的实验中,尽管在不同细胞类型之间存在差别,R2 对这两种启动子起主要的增强子活性。在本实施例中,已经证明,人疱疹病毒 7(HHV-7) 所编码的立即早期 (IE) 启动子在血细胞系细胞中具有极高度活性。

[0586] 下文将详细描述材料与方法。

[0587] (材料与方法)

[0588] 1) 细胞

[0589] 如下五种细胞用于测定启动子活性。

[0590] (1) Jurkat 细胞 (来自人 T 细胞)

[0591] (2) Molt-3 细胞 (来自人 T 细胞)

[0592] (3) SupT1 细胞 (来自人 T 细胞)

[0593] (4) SAS-413 细胞 (来自人骨髓细胞)

- [0594] (5) 外周血单核细胞 (PBMC)
- [0595] 2) 用于测定启动子活性的质粒
- [0596] 用具有萤火虫荧光素酶基因的 pGL3 Basic (Promega) 测量启动子活性。
- [0597] 3) 插入 pGL3 Basic 中的启动子序列
- [0598] 通过 PCR 扩增约 500bp 的 HHV-7 的 MIE 基因的启动子区 (7MIEP) 和 HHV-7 的 U95 基因的启动子区 (U95P), 并制备它们的缺失变体。图 8 对这些启动子进行示意性说明。
- [0599] (1) 7MIEP(-493) [插入了距离 HHV-7MIE 基因的转录起始位点上游 493pb 到下游 22bp] (SEQ ID NO :26)
- [0600] (2) 7MIEP(-388) [插入了距离 HHV-7MIE 基因转录起始位点上游 388pb 到下游 22bp] (SEQ ID NO :27)
- [0601] (3) 7MIEP(-233) [插入了距离 HHV-7MIE 基因转录起始位点上游 233pb 到下游 22bp] (SEQ ID NO :28)
- [0602] (4) 7U95P(-484) [插入了距离 HHV-7U95 基因转录起始位点上游 484pb 到下游 16bp] (SEQ ID NO :29)
- [0603] (5) 7U95P(-379) [插入了距离 HHV-7U95 基因转录起始位点上游 379pb 到下游 16bp] (SEQ ID NO :30)
- [0604] (6) 7U95P(-304) [插入了距离 HHV-7U95 基因转录起始位点上游 304pb 到下游 16bp] (SEQ ID NO :31)
- [0605] 用无启动子序列的 pGL3 Basic 作为对照。
- [0606] 4) 用质粒转染细胞
- [0607] 用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen), 对 Jurkat 细胞、Molt-3 细胞、SupT1 细胞和 SAS-413 细胞进行脂质转染, 用 Nucleofector (amaxa) 对 PBMC 进行电穿孔。
- [0608] 为了修正转染效率, 同时将海鳃荧光素酶表达质粒 (pRL-TK, Promega) 导入细胞中, 并测定海鳃荧光素酶活性。pRL-TK 在单纯疱疹病毒胸苷激酶 (TK) 启动子的控制下表达海鳃荧光素酶。
- [0609] pGL3 报道子 (1.2 μ g) 和 pRL-TK (50ng) 混合在一起, 往其中加入 2 μ l Lipofectamine 2000 来实施转染。
- [0610] 5) 测量荧光素酶活性
- [0611] 为了测量荧光素酶活性, 使用双荧光素酶报道分析系统 (Promega)。
- [0612] 转染 16 小时后, 收集细胞, 并溶解在细胞溶解液 (100 μ l) 中。往 5 μ l 细胞溶解液上清液中加入萤火虫荧光素酶底物溶液 (25 μ l), 随后立即用照度计测量发光度。接着, 在测量后往样本中加入海鳃荧光素酶底物溶液 (25 μ l), 随后立即用照度计测量发光度。
- [0613] (结果)
- [0614] 1) HHV-7MIE 启动子区的活性
- [0615] 使用四种细胞系的实验结果表明, 当与 CMV 启动子的活性比较时, 7MIEP(-493) 在 Molt-3 细胞和 SuptT1 细胞中具有约高 6 ~ 7 倍的活性, 在 Jurkat 细胞中具有类似活性, 在 SAS-413 细胞中只有约 1/11 的活性。而且当与 HHV-6IE 启动子 (9U 和 U95) 比较时, 7MIEP(-493) 在所有类型细胞中的活性都较低 (图 9)。
- [0616] 使用三批 PBMC 的实验结果表明, 7MIEP(-493) 的活性与 CMV 启动子和 9U 的活性相

似或者略低,与 HHV-6U95 的活性类似或略高(图 10)。

[0617] 2)HHV-7U95 启动子区的活性

[0618] 使用四种细胞系的实验结果表明,当与 CMV 启动子的活性比较时,7U95P(-484) 的活性在 Jurkat 细胞中约高 2.5 倍,在 Mol1-3 细胞中约高 4 倍,在 SupT 细胞中约高 20 倍,而在 SAS-413 细胞中约为 1/8。而且当与 HHV-6IE 启动子(9U 和 U95)比较时,U95P(-484) 在 SupT1 中的活性略高于 U95,但是约为 9U 活性的 1/2, U95P(-484) 在其他细胞中的活性较低(图 9)。

[0619] 在使用三批 PBMC 的实验中,7U95P(-494) 的活性仅约为其他启动子活性的 1/2 ~ 1/4(图 10)。

[0620] 3)R2 区对启动子活性的影响

[0621] 将 7MIEP 和 7U95P 的各个缺失突变体导入 4 种细胞系的实验结果已经说明,删除 R2 是否会降低启动子活性取决于细胞的类型。特别地,在 Jurkat 细胞中,删除 R2 区对 7MIEP 的活性没有影响,但是在其他细胞系中,删除 R2 区会使 7MIEP 的活性降低约 1/5 ~ 1/2。而且在 SAS-413 细胞中,删除 R2 对 7U95P 的活性没有影响,但是在其他细胞系中,删除 R2 区会使 7U95P 的活性降低约 1/7 ~ 1/2(图 11)。

[0622] (总结)

[0623] 将本实施例总结如下

[0624] 1)7MIEP(-493) 和 7U95P(-494) 在 T 细胞系中通常具有高于 CMV 启动子的活性,但是在骨髓细胞系 SAS-413 细胞中的活性较低。在 PBMC 中,7MIEP(-493) 的活性与 CMV 启动子基本上相同,而 7U95P(-494) 的活性低于 CMV 启动子。

[0625] 2) 与 HHV-6IE 启动子相比,HHV-6 的两种 IE 启动子(9U 和 U95) 在所有类型细胞中的活性高于 7MIEP(-493) 和 7U95(-494)。

[0626] 3) 已经证明,在大量细胞中,R2 区对 7MIEP 和 7U95P 起增强子的作用。与 R2 区结合的转录因子还未被确定,但是鉴于 HHV-6 的 R3 区结合 NF- κ B,其起到 U95 启动子的增强子的作用等事实,以重复方式存在于 R2 区中的 NF- κ B 结合基序极有可能导致 R2 区具有增强子活性(图 8)。

[0627] (实施例 3:特定缺失系统的构建)

[0628] 用 IE 启动子和 RNAi 法,破坏血细胞系细胞中的基因表达。由于 IE 启动子能够在血细胞系细胞中大量表达,这对于分析来说是十分有利的。

[0629] 1) 细胞的准备(在为巨噬细胞的情形下)

[0630] 获取健康人的外周血,并用菲可 / 泛影葡胺,通过密度梯度离心来进行分离和纯化。在添加了 M-CSF(研发系统,100U/ml) 的 AIM V 血清培养基(Life Technologies) 中培养 PBMC。每 3 天换液 1 次,第 6 天或第 7 天的巨噬细胞用于实验。

[0631] 2) 制备 siRNA 表达逆转录病毒载体

[0632] 为了表达发夹型 RNA,制备包含“有义链靶序列”、“环序列”、“反义链靶序列”和“终止子序列”的合成寡-DNA。这种有义链靶序列、环序列、反义链靶序列和终止子序列用本领域熟知的方法来制备。本领域技术人员能够容易地理解,当真正使用这些序列时,能够根据实际情形采用适当的序列。

[0633] 将上述 DNA 插入到质粒载体中,其中寡-DNA 连接到 IE 序列、gag、pol 和 env 的下

游, gag、pol 和 env 是逆转录病毒复制所必需的, 还包括能够利用限制性酶序列的 Neo^R 基因等。将所制备的质粒载体 (10 μ l) 添加到 100 μ l 感受态细胞中, 进行转染, 铺到 LBamp 平板上后, 在 37°C 下培养 16 小时。在 37°C 下, 通过转化获得的克隆在 LBamp 液体培养基中培养 16 小时, 用常规方法从培养液中提取和纯化质粒。

[0634] 将表达 gag、pol 和 env 的逆转录病毒包装细胞铺到直径 10cm 圆盘上, 添加转染试剂来转染质粒 (10 μ g)。24 ~ 48 小时后, 将细胞限制性稀释到含有 G418 的培养基 (500 μ g/ml) 中并传代。

[0635] 每 3 ~ 4 天, 对 G418 培养基进行换液, 总共培养约 2 周。收集克隆, 当在 6 孔平板上生长到汇合水平时, 将培养基换成无 G418 的培养基, 24 小时后收集上清液。将细胞存储。

[0636] 对包含在上清液中的逆转录病毒载体进行限制性稀释, 感染 NIH/3T3 细胞, 计数生长的克隆来计算感染的效价。

[0637] 3) 使用逆转录病毒载体的基因导入实验

[0638] 用逆转录病毒载体来感染血细胞系细胞, 例如 1) 中制备的巨噬细胞。洗涤后立即进行铺板, 在平板上形成 $0.5 \sim 2.5 \times 10^4$ 细胞/cm²。感染后 24 小时, 将培养基换成含有 G418 的培养基, 每 3 ~ 4 天换液一次。约 2 周后, 获得导入基因的细胞。用该细胞来验证期望被敲除的基因的表达水平。

[0639] 实施这些实验, 实际上证明了在导入基因后, 用本发明的启动子能够破坏外源基因在淋巴细胞中的特异性表达。

[0640] (实施例 4: 特异性表达)

[0641] 替代实施例 3 的 RNAi, 导入期望被表达的编码基因的核酸分子 (例如, 细胞因子例如 TGF β)

[0642] 通过实施与实施例 3 相似的实验, 结果证明, 在导入基因后, 本发明的启动子实际上诱导外源基因以淋巴细胞特异性方式地表达。

[0643] 如上所述, 通过优选的具体实施方式对本发明进行阐述。然而, 应当理解, 本发明的保护范围仅由附随的权利要求书来解释。还应当理解, 本文引用的专利、专利申请和文献应当结合进来作为参考, 如同其在本文中完全列出。对于本领域技术人员来说, 在不背离本发明的保护范围和精神的情况下, 各种其他改进是显然的, 也是容易实施的。因此, 附随的权利要求书的保护范围不限于说明书的描述, 权利要求书应被宽泛地解释。

[0644] [工业实用性]

[0645] 本发明提供在免疫反应细胞例如 T 淋巴细胞中选择性地诱导蛋白质表达启动子。本发明的启动子在用于有效阻止或处理免疫疾病如获得性免疫缺陷综合征等的方法和药物中是有用的。本发明在用于有效实施基因治疗的方法中也是有用的。

[0001]

序列表

<110> Research Institute of Microbial Diseases, Osaka University

<120> 用于将基因导入淋巴细胞或血细胞中的启动子及其应用

<130> OBK008PCT

<150> JP 2005-261366

<151> 2005-09-08

<160> 35

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1242

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> HHV6B MIE 启动子序列

<400> 1

agtgggtacc gcggttggg tctttcctac ctaggctaac gagaacccta aaatctgcta 60

acggagcaac cgcagttcca gtttttctca taaaattaaa ggtagtggg taccgcggtt 120

gaaatctttc ctgctaataa ggatgagaac ttcaaatct cgtaacgcgg caaccgcagt 180

tcttgTTTT ctcataaagt taaagatcag cgggtaccgc ggttgaagta tttcctgecc 240

aggcgaatga gaactctaaa agctcgtaac gcggcaaccg agttcctggt tttcccataa 300

agttaaagat cagcgggtac cgcggttgaa gtatttcttg tccaggcgaa tgagaactct 360

aaaagctcgt aacgcggcaa tcgcagttcc tgtttttctc ataaatttaa agatcagcgg 420

gtaccgcggt tgaagtattt cctgcccagg cgaatgagaa ctctaaaagc tcgtaacgcg 480

gcaaccgcag ttctgTTTT tcttataaag ttaaaaatta gcagatattg cggttgaagt 540

ctttcctggt catgcgaatt aaaactctaa aaactgctaa cgaagcaacc gagttcctgt 600

[0002]

ttttctcatt aagttaaagg ttagtgggta ctgtgggttg ggtctttect acccaggcta	660
acgagaaccc taaaatctgc taacagagca accgcagttc ctgtttttct cataaagtta	720
aaggtcagtg tgtaccgcgg ttacaacatt ttccccigac taagtcattt atttcgtgag	780
aagcgctaac accaaaacca cattcctggt tcatgatgtg tagcagatgt ttttaaaaa	840
aaaacatgac aatttatcag taaagtggtc tttattatcc cgcttcaac cgcaaactcc	900
gtctttctca taaaaaata caagtcagcc ataagaagaa aacctcaaaa aatccagacc	960
acaaattcct gtttttgagt aagatatgac aaaaccctaa atttttgtaa gcatcagcta	1020
atttccatte catatttgtc taaaaggggt gtattttctac acttgcgggt taacattata	1080
cagcgattgg ctcttcate ctctcattt tctgtacat cacaccgct atagaattgt	1140
atataagcag aagttacagc cagttcagtg ccacttttct caagaagtgg ctccggagaa	1200
cattctcacc acagagattc tttcttatat cgctgcagtc tg	1242

<210> 2

<211> 515

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> HHV7 MIE 启动子序列

<400> 2

cgcagttcct gttgttttca catattaata tgtagtggg ttatgtggtt ggggtcttc	60
ctgcctaac ggtgagaac ccgtaaac tgctgagaag gcaaccgag ttctgttgt	120
tttcacgggt taaatgtca gtgggttatg tggttgggt ctttctgcc taaagcagt	180
gggaatggt agaactgct gagaagacaa ccgcaattcc tgttgttca aagatttaa	240
taccaattcg aaataaata accgcaaaa tcatgtttac gtaaatata aatccattgt	300
ggtttttatt ggaaaaataa tattttaaaa aaatacatgt acaataagg ttaacccta	360

[0003]

atTTTTtag tattataatt ttttggcttt ttttaattgg ttgatataatt aacgicattt	420
tctgtgcat cacatccgct tcaaaatgta tataataaga agacagatca actatTTTgc	480
cactTTTTct tcaagagctt gaagatacag ttctg	515
<210> 3	
<211> 1243	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> HHV6A MIE 启动子序列	
<400> 3	
tgggtatcgc ggTTTggggg tctttcctgc acaggcgaac gagaactcta aaagctgcta	60
acgcggcaac cgcagtttct gTTTTctcg gaaaattaaa agtcagtggg taccgcggtt	120
tgggggtctt tctgcacag gcgaacgaga actctaaaag ctgctaacgc ggcaaccgca	180
gtttctgttt ttctcggaaa attaaaagtc agtgggtacc gcggttggg gtctttcctg	240
cacaggcgaa cgaaaactct aaaagctgct aacgcggcaa ccgcagtttc tgtttttctc	300
ggaaaactaa aagtcagtgg gtaccgcggt ttgggtctt tctgcacag gcgaacgaga	360
actctaaaag ctgctaacgc ggcaaccgca gttcctgttt ttcttcataa agataaagat	420
cagtgggtac cgcggttggg gtctttcctg cacaggcgaa cgagaactct aaaagctgct	480
aacgcggcaa ccgcagtttc tgtttttctc ggaaaattaa aggtcagtgg gtaccgcggt	540
tgaggTgttt cctaccagg cgaacgagaa ctctaacatc tgctaacgcg gcaaccgcag	600
ttcctgttct tctcagaaaa ataaaggTca gtgggtaccg cggttgaggt gtttctgcc	660
caggcgaacg agaactctaa catctcgtaa cgcggcaacc gcagttcctg tttttctcgg	720
aaaatatttc ctgcccaggc aaacgagaac tctaaaatct cgtaacgcgg caaccgcagt	780
tctgttttt ctcgaaaaat taaaggTcag tgggtatcgc ggttggggTc tttcctgccc	840

[0004]

aagctaacaa gaaccctaaa atttgctaac ggggcaaccg cagttcctgt ttttctcata 900
aaattaaagg ttagtgggga ccgcgattgc aacattttcc tctgactgag tcatttattt 960
attgagaaac gctaacacca aaaccacatg tcttatgatg tgtaacagat gttcttagaa 1020
aaaacatgac aatttatcag taaaatggtg tttattataa aaaacctcaa aaaatccaga 1080
ccacaaattc ctgtttttgt aaaatataac aaaaccctaa atttttgcaa gcattaacta 1140
atltcaattc catatttgtc taaaaggggt gtatttctgc acttgcgggt taacgttatg 1200
cagcgattgg ttccttcate ttcttcattt tctgtacat cac 1243

<210> 4

<211> 2503

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> HHV6B R3 区的序列

<400> 4

atgtggtttt ggtgtagcg cttctcacga aataaatgac ttagtcagg gaaaatggtg 60
taaccgcggt acacactgac cttaacttt atgagaaaa caggaactgc gttgctctg 120
ttagcagatt ttagggttct cgtagcctg gtaggaaag accccaacca cagtaccac 180
taacctttaa cttaatgaga aaaacaggaa ctcggttgc tcttagcag ttttagagt 240
tttaattgc atgaacagga aagacttcaa ccgcaatate tgctaatttt taactttata 300
agaaaaacag gaactgcggt tgccgcgta cgagctttaa gatttctcat tcgcctgggc 360
aggaaatact tcaaccgcgg taccgctga tctttaaatt tatgagaaaa acaggaactg 420
cgattgccgc gttacgagct ttagagttc tcattgcct ggacaggaaa tacttcaacc 480
gcggtaccgc ctgatcttta actttatggg aaaacagga actcggttgc cgcgttacga 540
gcttttagag ttctcattcg cctgggcagg aaatacttca accgcggtac ccgctgatct 600

[0005]

ttaactttat gagaaaaaca ggaactgcfg ttgccgcggt acgagatfff gaagttctca	660
tccttattag caggaaagat ttcaaccgcg gtacccta accittaat ttatgagaaa	720
aactggaact gcggttgctc cgttagcaga ttttagggtt ctcgtagcc taggtaggaa	780
agacccaac cgcgttacc actgatctt aactttatga gaaaaacaga aattgcggtt	840
tccccatta gcagatfff agttctcat ccttattagc aggaaagatt tcaaccgcg	900
taccactaa ctttaactt tatgagaaaa acaggaactg cggttgctc gttagcaggt	960
tttagggtt tcgtagcct ggtaggaaa gacccaacc gcagtacca ctaacctta	1020
actttatgag aaaaacagga actcggttgc tccgtagca ggttttagg ttctcgttag	1080
cctggtaag aaagaccca accgcagtc cactaacct ttaactttat gagaaaaaca	1140
ggaactgcfg ttgctcgtt agcaggtfff agggttctcg ttagcctggg taagaaagac	1200
ccaaccgca gtacccta accittact ttatgagaaa aacaggaact gcggttgctc	1260
cgttagcagg ttttagagt ttaattcga taatcaggaa agacttcaac cgcgttacc	1320
actaacctt aactttatga gaaaaacagg aattgcggtt gctcgttag cagatfff	1380
ggttctcgtt agcctgggta ggaaagacc caaccgcagt acccactaac ctttaactt	1440
atgagaaaa cagaaactgc ggttgctcgg ttagcagctt ttagagfff aattcgcag	1500
aacaggaaag acttcaacc cgttaccgc tgatcttaa cttctgaga aaaacaggaa	1560
ctgcggtgc cgcgttaga gactttgaa gttctatc ttattagcag gaaagatta	1620
aaccgcagta ccactaac ttaagtta tgaggaaaa caggaactgc ggttgcttg	1680
ttagcatctt ttagagttct cttcgtatt ggcaggaaat acttcaacc cgttaccac	1740
tgatcttaa cttatgaag aaaaacagga acttggtgc ttgtagca gattttaag	1800
ttctatcct cattatcagg aaagacttca accgcagtc cactgacct ttaagttat	1860
gaggaaaaac aggaaatgc gttgcttgt taacagctt tagagttct atccgtatg	1920

[0006]

gcaaaaaaaaaa tttcaaccgc ggtaccact gatcttttagc tttatcagaa aaaacagaaa 1980

ctgcggttgc ccattagcg gatttttaggg tctcaccca cttgagtagg aaagacccta 2040

accgcggcac ccaactgacct ttaactgtat gaagagaaac agaaactgcg gttgcccagt 2100

tagcaatfff taaggttctc acccgcttgg gtaggaaaga ccctaaccgc ggcaccact 2160

gacctttaac tttatgagga gaaacagaaa ctgcggttgc cccgtagta atffftaagg 2220

ttctaccccg cttgggtagg aaagacccta accgcggcac ccaactgacct ttaactffff 2280

gatgaaaaac agaagctgcg gttgccccgt tagcaatfff taaggttctc acccgcttgg 2340

gtaggaaaga ccctaaccgc ggcaccact gacctttaac tffffgatga aaaacagaag 2400

ctgcggttgc cccgtagca atffftaagg ttctaccccg cttgggtagg aaagacccta 2460

accgcggcac ccaactgacat ttaaatttat ggaaaaacaa act 2503

<210> 5

<211> 1242

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 实施例 1 中的 20u 的序列

<400> 5

agtgggtacc gcggttgggg tctttcctac ctaggctaac gagaacctta aaatctgcta 60

acggagcaac cgcagttcca gtttttctca taaaattaaa ggtagtggg taccgcggtt 120

gaaatctttc ctgctaataa ggatgagaac ttcaaaact cgtaacgcg caaccgagtt 180

tctgttttt ctcataaagt taaagatcag cgggtaccgc gtttgaagta tttctgccc 240

aggcgaatga gaactctaaa agctcgtaac gcggcaaccg agttcctggt tttcccataa 300

agttaaagat cagcgggtac cgcggttgaa gtatttctg tccaggcgaa tgagaactct 360

aaaagctcgt aacgcggaac tcgcagttcc tgtttttctc ataaatttaa agatcagcgg 420

[0007]

gtaccgCGGT tgaagtattt cctgcccagg cgaatgagaa ctctaaaagc tcgtaacgCG 480
 gcaaccgCAG ttctgtttt tcttataaag ttaaaaatta gcagatattg cggttgaagt 540
 ctttcctgTT catgCGaatt aaaactctaa aaactgctaa cgaagcaacc gagttcctgt 600
 ttttctcatt aagttaaagg ttagtgggta ctgtggttgg ggtctttcct acccaggcta 660
 acgagaacce taaaatctgc taacagagca accgcagttc ctgtttttct cataaagtta 720
 aaggtcagtg tgtaccgCGG ttacaacatt ttcccctgac taagtcattt atttcgtgag 780
 aagcgctaac accaaaacca caticctgTT tcatgatgtg tagcagatgt ttttaaaaaa 840
 aaaacatgac aatttatcag taaagtgtc tttattatcc cgccttcaac cgcaaactcc 900
 gtctttctca taaaaaata caagtcagcc ataagaagaa aacctcaaaa aatccagacc 960
 acaaatcct gttttgagt aagatatgac aaaaccctaa atttttgtaa gcacagcta 1020
 atttccatc catatttgc taaaaggggt gtatttctac actgCGgtt taacattata 1080
 cagcgattgg ctcttctac ctgctcattt tctgtacat cacaccgct atagaattgt 1140
 atatagcag aagttacagc cagttcagtg ccactttct caagaagtgg ctccggagaa 1200
 cattctcacc acagagattc tttcttatat cgctgcagtc tg 1242

<210> 6

<211> 1053

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 实施例 1 中的 9u 的序列

<400> 6

cagactgcag cgatataaga aagaatctct gtgatgagaa tgttctccgg agccattct 60
 tgagaaaagt ggcactgaac tggctgtaac ttctgcttat atacaattct atagcgggtg 120
 tgatgtacag gaaaatgacg aggatgaagg agccaatcgc tgtataatgt taaaccgcaa 180

[0008]

gtgtagaaat acacccttt tagacaaaat iggaatggaa attagctgat gcttacaaaa	240
atntagggtt ttgtcatatc ttactcaaaa acaggaattt gtggcttga tttttgagg	300
ttttcttctt atggctgact tgtatTTTTT tatgagaaa acggagtttg cggttgaagg	360
cgggataata aagaacactt tactgataaa ttgtcatgtt ttttttttaa aaacatctgc	420
tacacatcat gaaacaggaa tgtggTTTTG gtgttagcgc ttctcagaa ataaatgact	480
tagtcagggg aaaatgttgt aaccgcggtt cacactgacc ttttaactta tgagaaaaac	540
aggaactcgc gttgctctgt tagcagattt tagggttctc gttagcctgg gtaggaaaga	600
ccccaaccac agtaccactt aacctttaac ttaatgagaa aaacaggaac tgcggttgc	660
tcgtagcag ttttagagt ttaattcgc atgaacagga aagacttcaa ccgcaatac	720
tgctaatttt taactttata agaaaaacag gaactgcggt tgccgcgta gcagctttta	780
gagttctcat tcgcctgggc aggaaatact tcaaccgcg tacccgctga tctttaaatt	840
tatgagaaaa acaggaactg cgattgccgc gttagcagct tttagagttc tcattgcct	900
ggacagaaa taçttcaacc gcggtaccgc ctgatcttta actttatggg aaaaacagga	960
actgcggtg ccgcgttagc agcttttaga gttctcattc gcctgggcag gaaatacttc	1020
aaccgcggtt cccgctgac ttttaactta tga	1053

<210> 7

<211> 754

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 实施例 1 中的 MIE 的序列

<400> 7

atcagcgggt accgcggttg aagtatttcc tgcccagcgc aatgagaact ctaaaagctc 60

gtaacgcggc aaccgcagtt ccigttttcc ttataaagtt aaaaattagc agatattgcg 120

[0009]

gttgaagtct ttctgttca tgcgaattaa aactctaaaa actgctaacg aagcaaccga	180
gttctgttt ttctcattaa gttaaagggt agtgggtact gtggttgggg tctttcctac	240
ccaggctaac gagaacccta aaatctgcta acagagcaac cgcagttcct gtttttctca	300
taaagttaaa ggtcagtgtg taccgcgggt acaacatttt ccctgacta agtcatttat	360
ttcgtgagaa gcgctaacac caaaaccaca ttctgtttc atgatgtgta gcagatgttt	420
ttaaaaaaaa aacatgacaa tttatcagta aagtgttctt tattatcccg ccttcaaccg	480
caaactccgt ctttctcata aaaaaataca agtcagccat aagaagaaaa cctcaaaaaa	540
tccagaccac aaattcctgt ttttgagtaa gatatgacaa aaccetaaat ttttgaagc	600
atcagcta atccattcca tatttgtcfa aaaggggtgt atttctacac ttgcggttta	660
acattataca gcgattggct ctttcatcct cgtcattttc ctgtacatca cacccgctat	720
agaattgtat ataagcagaa gttacagcca gttc	754

<210> 8

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 实施例 1 中的 U95 的序列

<400> 8

tttaggtcc tcaccactt gtagtagaaa gaccctaacc gcggcaccca ctgacctta	60
actgtatgaa gagaaacaga aactgcgggt gccagttag caatttttaa gtttctcacc	120
cgcttgggta ggaaagacc taaccgcggc acccactgac ctttaacttt atgaggagaa	180
acagaaactg cggttgcccc gttagtaatt tttaaggttc tcaccgctt gggtaggaaa	240
gaccctaacc gcggcaccca ctgacctta actttttgat gaaaaacaga agctgcgggt	300
gccccgtag caatttttaa gtttctcacc cgcttgggta ggaaagacc taaccgcggc	360

[0010]

acccactgac ctttaacttt ttgatgaaaa acagaagctg cggttgcccc gttagcaatt 420
 ttttaaggttc tcacccgctt gggtaggaaa gaccctaacc gcggcaccca ctgacattta 480
 aatttatgga aaaacaaact tttttgttca tcatgcaactt ttttatatat cattatatct 540
 ctatccaate agcactcttg aggggtgcata cattaaggca gtggttgattt tttttcattg 600
 taccactta cgaataacga atcaaaagcc gtgaagtaga atattttaat gatgtattaa 660
 tcatcatttc ctaccagcc tattaacttc agtatttata ggataggcaa tttgccgcta 720
 tacgccatta gcigtcttctc tgctagcttg gacaca 756

<210> 9

<211> 655

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 实施例 1 中的 CMV 的序列

<400> 9

cgatgtacgg gccagatata cgcgttgaca ttgattattg actagttatt aatagtaac 60
 aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt 120
 aaatggcccc cctggctgac cgcccaacga cccccgcca ttgacgtcaa taatgacgta 180
 tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg 240
 gtaaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc ccctattga 300
 cgccaatgac ggtaaatggc cgccttgca ttatgccag tacatgacct tatgggactt 360
 tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga tgcggttttg 420
 gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg ggatttcaa gtcctcaccc 480
 cattgacgtc aatgggagtt tgttttgga ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg 540
 taacaactcc gcccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacggtggg aggtctatat 600

[0011]

aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgcttac tggcttatcg aaatt	655
<210> 10	
<211> 3136	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 实施例 1 中的 MIE/3K 区的序列	
<400> 10	
tgtgtccaag ctagcagaag aacagctaataat ggcgtatagc ggcaaattgc ctatcctata	60
aatactgaag ttaataggcg tggtaggaaa tgatgattaa tacatcatta aaatattcta	120
cttcacggct ttgtattcgt tattcgttaag tgggtacaat gaaaaaaaaat caacactgcc	180
ttaatgtatg caccctcaag agtgctgatt ggatagagat ataatgatataataaaagt	240
gcatgatgaa caaaaaagtt tgtttttcca taaatttaaa tgtcagtggg tgccgcggtt	300
agggtctttc ctaccaage gggtagaac ctaaaaaatt gctaacgggg caaccgcagc	360
ttctgttttt catcaaaaag ttaaaggtea gtgggtgccg cggttagggt ctttctacc	420
caagcgggtg agaaccttaa aaattgctaa cggggcaacc gcagcttctg ttttctca	480
aaaagttaa ggtcagtggg tgccgcggtt agggctttc ctaccaage gggtagaac	540
cttaaaaaatt actaacgggg caaccgcagt ttctgtttct cctcataaag ttaaaggtea	600
gtgggtgccg cggttagggt ctttctacc caagcgggtg agaaccttaa aaattgctaa	660
ctgggcaacc gcagtttctg tttctctca tacagtiaaa ggtcagtggg tgccgcggtt	720
agggtctttc ctactcaagt gggtaggac ctaaaaatcc gctaatgggg caaccgcagt	780
ttctgttttt tctgataaag ctaaagatca gtgggtaccg cggttgaaat ttttttgcc	840
catacggatg agaactctaa aagctgtaa caaagcaacc gcatttctg ttttctca	900
taaacttaa ggtcagtggg aactgcggtt gaagtctttc ctgataatga ggatgagaac	960

[0012]

tttaaaatct gctaacaaag caacaaagtt cctgtttttc ttcataaagt taaagatcag 1020
 tgggtaccgc ggttgaagta tttcctgcc aacgaatga gaactctaaa agatgctaac 1080
 aaagcaaccg cagttcctgt ttttctcat aaacttaaag gttagtgggt actgcggttt 1140
 aaatctttcc tgctaataag gatgagaact tcaaaagtct cgtaacgcgg caaccgcagt 1200
 tctgtttttt ctcaaaaagt taaagatcag cgggtaccgc ggttgaagtc tttcctgttc 1260
 atgcgaatta aaactctaaa agctgctaac ggagcaaccg cagtttctgt ttttctcata 1320
 aagttaaagg ttagtgggta ctgcggttgg ggtcttttct acccaggcta acgagaaccc 1380
 taaaatctgc taacggagca accgcaattc ctgtttttct cataaagtta aaggtttagtg 1440
 ggtaccgcgg ttgaagtctt tctgattat gcgaattaaa actctaaaac ctgctaacgg 1500
 agcaaccgca gttcctgttt ttctcataaa gttaaaggtt agtgggtact gcggttgggg 1560
 tttttcttac ccaggctaac gagaacccta aaacctgcta accgagcaac cgcagttcct 1620
 gttttctca taaagttaa ggttagtggg tactgcggtt ggggtctttc ttaccaggc 1680
 taacgagaac cctaaaacct gctaaccgag caaccgagtt cctgtttttc tcataaagtt 1740
 aaaggttagt gggtagctgc gttggggctt ttctacccta ggctaaccgag aaccctaaaa 1800
 cctgctaacg gagcaaccgc agttcctgtt ttctcataa agttaaaggt tagtgggtac 1860
 cgcggttgaa atctttcctg ctaataagga tgagaacttc aaaatctgct aatgggggaa 1920
 accgcaattt ctgtttttct cataaagtta aagatcagtg ggtaccgcgg ttgggtctt 1980
 tctacctag gctaacgaga accctaaaat ctgctaaccg agcaaccgca gttccagttt 2040
 ttctcataaa attaaaggtt agtgggtacc gcggttgaaa tctttcctgc taataaggat 2100
 gagaacttca aaatctgta acgcggcaac cgcagttcct gttttctca taaagttaa 2160
 gatcagcggg taccgcggtt gaagtattc ctgccaggc gaatgagaac tctaaaagct 2220
 cgtaacgcgg caaccgagtt cctgtttttc ccataaagtt aaagatcagc ggttaccgcg 2280

[0013]

gttgaagtat ttcctgtcca ggcgaaatgag aactctaaaa gctcgtaacg cggcaatcgc	2340
agttcctggt tttctcataa atttaaagat cagcgggtac cgcggttgaa gtatttcctg	2400
cccaggcgaa tgagaactct aaaagctcgt aacgcggcaa ccgcagttcc tgtttttctt	2460
ataaagttaa aaattagcag atattgcggt tgaagtcitt cctgttcagc cgaattaaaa	2520
ctctaaaaac tgctaacgaa gcaaccgagt tcctgttttt ctcattaagt taaaggtag	2580
tgggtactgt ggttggggtc tttctaccc aggctaacga gaaccctaaa atctgctaac	2640
agagcaaccg cagttcctgt tttctcataa agttaaagg tcagtgtgta ccgcggttac	2700
aacatthttcc cctgactaag tcatttattt cgtgagaagc gctaacacca aaaccacatt	2760
cctgtttcat gatgtgtagc agatgttttt aaaaaaaaaa catgacaatt tatcagtaaa	2820
gttttcttta ttatcccgcc ttcaaccgca aactccgtct tttctataaa aaaatacaag	2880
tcagccataa gaagaaaacc tcaaaaaatc cagaccacaa attcctgttt ttgagtaaga	2940
tatgacaaaa ccctaaattt ttgtaagcat cagctaattt ccattccata tttgtctaaa	3000
aggggtgtat ttctacactt gcggtttaac attatacagc gattggctcc ttcacctcgc	3060
tcattttcct gtacatcaca cccgctatag aattgtatat aagcagaagt tacagccagt	3120
tcagtgccac ttttct	3136
<210> 11	
<211> 3136	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 实施例 1 中的 U95/3K 区的序列	
<400> 11	
agaaaagtgg cactgaactg gctgtaactt ctgcttatat acaattctat agcgggtgtg	60
atgtacagga aatgacgag gatgaaggag ccaatcgctg tataatgtta aaccgcaagt	120

[0014]

gtagaaatac acccctttta gacaaatag gaatggaat tagctgatgc ttacaaaaat 180
ttagggtttt gtcatatctt actcaaaaac aggaatttgt ggtctggatt tttgaggtt 240
ttcttcttat ggctgacttg tattttttta tgagaaagac ggagtttgcg gttgaaggcg 300
ggataataaa gaacacttta ctgataaatt gtcatgtttt ttttttaaaa acatctgcta 360
cacatcatga aacaggaatg tggttttggt gttagcgtt ctcacgaaat aatgactta 420
gtcaggggaa aatgttgtaa ccgcggtaca cactgacctt taactttatg agaaaaacag 480
gaactgcggt tgctctgtta gcagatttta gggttctcgt tagcctgggt aggaaagacc 540
ccaaccacag taccactaa ctttaactt aatgagaaaa acaggaactc gttgctteg 600
ttagcagttt ttagagtttt aattcgcag aacaggaag acttcaaccg caatatctgc 660
taatttttaa ctttataaga aaaacaggaa ctgcggttgc cgcgttacga gcttttagag 720
ttctcattcg cctgggcagg aaatacttca accgcggtac ccgctgatct ttaaatttat 780
gagaaaaaca ggaactgcga ttgccggtt acgagctttt agagtctca ttcgcctgga 840
caggaaatac ttcaaccgcg gtaccgctg atctttaact ttatgggaaa aacaggaact 900
cggttgccgc gttacgagct ttagagttc tcattcgcct gggcaggaaa tacttcaacc 960
gcggtacccg ctgatcttta actttatgag aaaaacagga actgcggttg ccgcgttacg 1020
agattttgaa gttctcatcc ttattagcag gaaagattc aaccggtta cccactaacc 1080
tttaatttta tgagaaaaac tggactgcg gttgctcgt tagcagattt tagggttctc 1140
gttagcctag gtaggaaaga cccaaccgc ggtaccact gatctttaac tttatgagaa 1200
aaacagaaat tgcggtttcc ccattagca gattttgaag ttctcatcct tattagcagg 1260
aaagatttca accgcggtac ccactaacct ttaactttat gagaaaaaca ggaactgcgg 1320
ttgctcgtt agcaggtttt agggttctcg ttagectggg taggaaagac cccaaccgca 1380
gtaccacta acctttaact ttatgagaaa aacaggaact cggttgctcc gttagcaggt 1440

[0015]

tttagggttc tcgttagcct gggtaagaaa gacccaacc gcagtacca ctaaccttta	1500
actttatgag aaaaacagga actgcggttg ciccgttagc aggttttagg gttctcgta	1560
gcctgggtaa gaaagacccc aaccgcagta cccactaacc tttacttta tgagaaaaac	1620
aggaactgcg gttgctccgt tagcaggttt tagagtttta attcgcataa tcaggaaaga	1680
cttcaaccgc ggtaccact aacctttaac tttatgagaa aacaggaat tgcggtgct	1740
ccgttagcag attttaggt tctcgttagc ctgggtagga aagacccca cgcagtacc	1800
cactaacctt taactttatg agaaaaacag aaactgcggt tgctccgta gcagcttta	1860
gagttttaat tcgcatgaac aggaaagact tcaaccgcg g tacccgtga tctttaactt	1920
tctgagaaaa acaggaactg cggttgccgc gttacgagac tttgaagtt ctatcctta	1980
ttagcaggaa agatttaaac cgcagtacc actaacctt aagtttatga ggaaaaacag	2040
gaactgcggt tgctttgtta gcatcttta gagttctcat tcgtattgc aggaaatact	2100
tcaaccgcg tacccactga tctttaactt tatgaagaaa aacaggaact ttgttgctt	2160
gtagcagat tttaaagttc tcatcctcat tatcaggaaa gacttcaacc gcagttcca	2220
ctgaccttta agtttatgag gaaaaacagg aaatgcggt gctttgtaa cagcttttag	2280
agttctcatc cgtatggca aaaaaattt caaccgcggt acccactgat ctttagctt	2340
atcagaaaa acagaaactg cggttgccc attageggat tttagggtcc tcaccactt	2400
gagtaggaaa gaccctaacc gcggcaccca ctgacctta actgtatgaa gagaaacaga	2460
aactgcggtt gccagttag caatttttaa gttctcacc cgcttggta ggaaagacc	2520
taaccgcgcc acccactgac cttaacttt atgaggagaa acagaaactg cggttgccc	2580
gtagtaatt tttaggttc tcaccgctt ggtaggaaa gaccctaacc gcggcaccca	2640
ctgacctta acttttgat gaaaaacaga agctgcggt gcccgttag caattttta	2700
ggttctcacc cgcttggta ggaaagacc taaccgccc acccactgac cttaacttt	2760

[0016]

ttgatgaaaa acagaagctg cggttgcccc gttagcaatt ttttaaggttc tcacccgctt	2820
gggtaggaaa gaccctaacc gcggcaccca ctgacattta aatztatgga aaaacaaact	2880
tttttggtca tcatgcactt ttttatatat cattatattt ctatccaate agcactcttg	2940
agggtgcata cattaaggca gtgttgattt tttttcattg taccactta cgaataacga	3000
atcaaaagcc gtgaagtaga atattttaat gatgtattaa tcatcatttc ctaccacgcc	3060
tattaacttc agiatattata ggataggcaa tttgccgcta tacgccatta gctgttcttc	3120
tgctagcttg gacaca	3136

<210> 12

<211> 500

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> HHV7 U95 启动子的序列

<400> 12

tgggttctca cccgtttagg caggaaacac ccagaccgca taaccactg acatttaaac	60
ccgtgaaaac aacaggaact gcggttgact tctcagcagg ttttatgggt tctcaccgt	120
ttaggtagga aagaccaga ccgcataacc cactaacatt ttaatattgtg aaaataaaca	180
ggaactgcgg ttatagtctt agtacattct agagattaca tcttgctaag gcgaaaaaca	240
ctttaaccgc aaaagccact gatttttaaa ctigtgaaaa taacaggaaa ccacagaaac	300
gtcaggaaaa aaacgttggt ttataattat gtccataaaa catgcaacat aatccaaacc	360
ggccaatgat tttctgctt aaatgtaatt taaataattt attcalactg aagttgttat	420
agccacgctt acgcagcaat gtatataagc agacaccgtc atttcgcagt tagtctgctg	480
gaaagcttgt gaagactaca	500

<210> 13

[0017]

<211>	148	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	距离 HHV-6B MIE 的转录起始位点-574 到-427	
<400>	13	
	accaggcta acgagaaccc taaaatctgc taacagagca accgcagttc ctgtttttct	60
	cataaagtta aaggtcagtg tgtaccgcgg ttacaacatt ttcccctgac taagtcattt	120
	atttcgtgag aagcgtaac accaaaac	148
<210>	14	
<211>	625	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	距离 HHV-6B MIE 的转录起始位点-1051 到-427	
<400>	14	
	ctagcccggg ctgcagatct tcagttaaag atcagcgggt accgcggttg aagtatttcc	60
	tgcccaggcg aatgagaact ctaaaagctg ctaacgcggc aaccgcagtt cctgtttttc	120
	ccataaagtt aaagatcagc gggtagccgc gtigaagtat ttctgtcca ggcgaatgag	180
	aactctaaaa gctgctaacg cggcaatcgc agttcctggt tttctcataa atttaaagat	240
	cagcgggtac cgcggttgaa gtatttctg cccaggcgaa tgagaactct aaaagctgct	300
	aacgcggcaa ccgcagttcc tgtttttctt ataaagttaa aaattagcag atattgcggt	360
	tgaagtcctt cctgttcatt cgaattaaaa ctctaaaaac tgctaacgaa gcaaccgcag	420
	ttctgtttt tctcattaag ttaaaggta gtgggtactg tggttgggt ctttctacc	480
	caggctaacg agaaccctaa aatctgctaa cagagcaacc gcagttcctg tttttctcat	540
	aaagttaaag gtcagtgtgt accgcggtta caacattttc cctgactaa gicatttatt	600

[0018]

tcgtgagaag cgctaacacc aaaac	625
<210> 15	
<211> 515	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 距离 HHV-7 MIE 的转录起始位点+22 到-493	
<400> 15	
cgcagttcct gttgttttca catattaaaa tgttagtggg ttatgtggtt ggggtctttc	60
ctgcctaaac gggtgagaac ccgtaaaacc tgctgagaag gcaaccgcag ttctgttgt	120
tttcacgggt ttaaatgtca gtgggttatg tggttggggc ctttctgcc taaagcgagt	180
gggaatgtgt agaacttgct gagaagacaa ccgcaattcc tgttgtttca aagatttaaa	240
taccaattcg aaataaaata accgcaaaaa tcatgtttac gtaaaatata aatccattgt	300
ggttttttatt ggaaaaataa tatttttaaaa aaatacatgt acaaataagg ttaaacccta	360
atTTTTtag tattataatt ttttgcttt ttttaattgg ttgatatt aacgtcattt	420
tcctgtgcat cacatccgct tcaaaatgta tataataaga agacagatca actattttgc	480
cactttttct tcaagagctt gaagatacag ttctg	515
<210> 16	
<211> 500	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 距离 HHV-7 U95 的转录起始点+16 到-484	
<400> 16	
tgggttctca cccgtttagg caggaaacac ccagaccgca taaccactg acatttaaac	60
ccgtgaaaac aacaggaact gcggttgact tctcagcagg ttttatgggt tctcaccgt	120

[0019]

ttaggttagga aagacccaga ccgcataacc cactaacatt ttaatatgtg aaaataaaca 180
 ggaactgctg ttatagtttc agtacattct agagattaca tctgctaag gcgaaaaaca 240
 cttaaccgc aaaagccact gatttttaaa ctgtgaaaa taacaggaaa ccacagaaac 300
 gtcaggaaaa aaacgttggt ttataattat gtccataaaa catgcaacat aatccaaacc 360
 ggccaatgat tttctgctt aaatgtaatt taaataattt attcatacgt aagttgttat 420
 agccacgcct acgcagcaat gtatataagc agacaccgtc atttcgcagt tagtctgctg 480
 gaaagcttgt gaagactaca 500

<210> 17
 <211> 816
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 实施例 1 中的 9u-d2-7 的序列

<400> 17
 aaaatttagg gttttgcat atcttactca aaaacaggaa tttgtggtct ggattttttg 60
 aggttttctt cttatggctg acttgtattt tttatgaga aagacggagt ttgcggttga 120
 aggcgggata ataaagaaca ctttactgat aaatgtcat gttttttttt taaaaacatc 180
 tgctacacat catgaaacag gaatgtggtt ttggtgtag cgcttctcac gaaataaatg 240
 acttagtcag gggaaaatgt tgtaaccgcg gtacacactg acctttaact ttatgagaaa 300
 aacaggaact gcggttgctc tgtagcaga ttttagggtt ctcgtagcc tgggtaggaa 360
 agacccaac cacagtacc actaaccttt aacttaatga gaaaaacagg aactgcggtt 420
 gcttcgtag cagtttttag agttttaatt cgcatgaaca ggaaagactt caaccgcaat 480
 atctgctaat ttttaacttt ataagaaaa caggaactgc ggttgccgcg ttagcagctt 540
 ttagagttct cattcgcctg ggcaggaaat acttcaaccg cgttaccgc tgatctttaa 600

[0020]

atttatgaga aaaacaggaa ctgcgattgc cgcgtagca gcttttagag ttctcattcg 660
 cctggacagg aaatacttca accgcggtac ccgctgatct ttaactttat gggaaaaaca 720
 ggaactgcgg ttgccgcggt agcagctttt agagttctca ttcgcctggg caggaaatac 780
 ttcaaccgcg gtaccgctg atctttaact ttatga 816

<210> 18
 <211> 576
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 实施例 1 中的 9u-d1-4 的序列

<400> 18
 acttagtcag gggaaaatgt tgtaaccgcg gtacacactg acctttaact ttatgagaaa 60
 aacaggaact gcggttgctc tgtagcaga ttttagggtt ctgtagcc tgggtaggaa 120
 agaccccaac cacagtacc actaaccttt aacttaatga gaaaaacagg aactgcggtt 180
 gcttcgtag cagtttttag agttttaatt cgcataaca gaaagactt caaccgcaat 240
 atctgctaatt ttttaacttt ataagaaaa caggaactgc ggttgccgcg ttagcagctt 300
 ttagagttct cattcgctg ggcaggaaat actcaaccg cgtaccgc tgatctttaa 360
 atttatgaga aaaacaggaa ctgcgattgc cgcgtagca gcttttagag ttctcattcg 420
 cctggacagg aaatacttca accgcggtac ccgctgatct ttaactttat gggaaaaaca 480
 ggaactgcgg ttgccgcggt agcagctttt agagttctca ttcgcctggg caggaaatac 540
 ttcaaccgcg gtaccgctg atctttaact ttatga 576

<210> 19
 <211> 429
 <212> DNA
 <213> 人工的

[0021]

<220>
 <223> 实施例 1 中的 9u-d1-5 的序列

<400> 19
 tttacttaa tgagaaaaac aggaactgcg gttgcttctg tagcagtttt tagagtttta 60
 attcgcata acaggaaaga cttcaaccgc aatatctgct aatttttaac ttataagaa 120
 aaacaggaac tgcggttgcc gcgtagcag ctttagagt tctcattcgc ctgggcagga 180
 aatacttcaa ccgcggtacc cgtgatctt taaatttat agaaaaacag gaactgcgat 240
 tgccgcgta gcagctttta gatttctcat tcgctggac aggaaatact tcaaccgcg 300
 taccgctga tctttaactt tatgggaaaa acaggaactg cgggtgccgc gtagcagct 360
 ttagagttc tcattgcct ggcaggaat tacttcaacc gcgtaccgc ctgatcttta 420
 actttatga 429

<210> 20
 <211> 352
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 实施例 1 中的 9u-d1-7 的序列

<400> 20
 agacttcaac cgcaatctct gctaattttt aacttiataa gaaaaacagg aactgcggtt 60
 gccgcgtag cagcttttag agttctcatt cgcctgggca ggaaatactt caaccgcggt 120
 acccgctgat ctttaaattt atgagaaaaa caggaactgc gattgccgcg ttagcagctt 180
 ttagagttct cattcgctg gacaggaat acttcaaccg cgtaccgc tgatcttta 240
 ctttatggga aaaacaggaa ctgcggttg cgcgtagca gcttttagag ttctcattc 300
 cctgggcagg aaatacttca acccggttac ccgctgatct ttaactttai ga 352

<210> 21

[0022]

<211>	278	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	实施例 1 中的 9u-d3-7 的序列	
<400>	21	
	ttttagagtt ctcatcgcg tgggcaggaa ataactcaac cgcggtaccc gctgatcttt	60
	aaatztatga gaaaaacagg aactgcgatt gccgcgtag cagcttttag agttctcatt	120
	cgcttgaca ggaaatactt caaccgcggt acccgctgat ctttaacttt atgggaaaaa	180
	caggaactgc ggttgccg ttagcagctt ttagagttct cattcgctg ggcaggaaat	240
	actcaaccg cggtagccgc tgatctttaa ctttatga	278
<210>	22	
<211>	242	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	实施例 1 中的 9u-d5 的序列	
<400>	22	
	caaccgcggt acccgctgat ctttaaattt atgagaaaaa caggaactgc gattgccgcg	60
	ttagcagctt ttagagttct cattcgctg gacaggaaat actcaaccg cggtagccgc	120
	tgatctttaa ctttatggga aaaacaggaa ctgcggttg cgcgtagca gcttttagag	180
	ttctcattcg cctgggcagg aaatacttca accgcggtac ccgctgatct ttaactttat	240
	ga	242
<210>	23	
<211>	214	
<212>	DNA	
<213>	人工的	

[0023]

<220>

<223> 实施例 1 中的 9u-d6 的序列

<400> 23

ttatgagaaa aacaggaact gcgattgccg cgttagcagc ttttagagtt ctcattcgcc 60

tggacaggaa atacttcaac cgcggtaccc gctgatcttt aactttatgg gaaaaacagg 120

aactgcggtt gccgcgtag cagcttttag agttctcatt cgctgggca ggaaatactt 180

caaccgcggt acccgctgat ctttaacttt atga 214

<210> 24

<211> 118

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 实施例 1 中的 9u-d7 的序列

<400> 24

ctttaacttt atgggaaaaa caggaactgc ggttgccgcg ttagcagctt ttagagttct 60

cattgcctg ggcaggaaat acttcaaccg cggtagccgc tgatctttaa ctttatga 118

<210> 25

<211> 79

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 实施例 1 中的 9u-d8 的序列

<400> 25

gttagcagct ttttagagttc tcattgcctt gggcaggaaa tacttcaacc gcggtacccg 60

ctgatcttta actttatga 79

<210> 26

<211> 515

<212> DNA

[0024]

<213> 人工的

<220>

<223> 实施例 2 中的 7MIEP(-493) 的序列

<400> 26

```

cgcagttcct gttgttttca catattaata tgtttagtggg ttatgtgggt ggggtctttc    60
ctgcctaaac gggtgagaac ccgtaaaacc tgctgagaag gcaaccgcag ttctgtttgt    120
tttcacgggt ttaaattgtca gtgggttatg tggttgggggt ctttctgcc taaagcgagt    180
gggaatgtgt agaacttgct gagaagacaa ccgcaattcc tgttgtttca aagatttaaa    240
taccaattcg aaataaaata accgcaaaaa tcattgtttac gtaaaatata aatccattgt    300
ggtttttatt ggaaaaataa tattttaaaa aaatacatgt acaataaagg ttaaacccta    360
atTTTTtag tattataatt ttttgcttt ttttaattgg ttgatattt aacgtcattt    420
tcctgtgcat cacatccgct tcaaaatgta tataataaga agacagatca actatTTTgc    480
cactTTTTct tcaagagctt gaagatacag ttctg                                     515

```

<210> 27

<211> 410

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 实施例 2 中的 7MIEP(-388) 的序列

<400> 27

```

cgcagttcct gttgttttca cgggtttaaa tgcagtgagg ttatgtgggt ggggtctttc    60
ctgcctaaag cgagtgggaa tgtgtagaac ttgctgagaa gacaaccgca attcctgttg    120
tttcaaagat ttaaatacca attcgaata aaataaccgc aaaaatcatg ttacgtaaa    180
atataaatcc attgtggttt ttattgaaa aataatattt taaaaaata catgtacaaa    240
taaggttaaa ccctaatttt ttagtatta taattttttg gcttttttta attggttgat    300

```

[0025]

atattaacgt cattttcctg tgcatacat ccgcttcaaa atgtatataa taagaagaca	360
gatcaactat tttgccactt tttcttcaag agcttgaaga tacagttctg	410
<210> 28	
<211> 255	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 实施例 2 中的 7MIEP(-233)的序列	
<400> 28	
accgcaaaaa tcatgtttac gtaaaatata aatccattgt ggtttttatt ggaaaaataa	60
tattttaaaa aaatacatgt acaataaagg ttaaacccta attttttag tattataatt	120
ttttggcttt ttttaattgg ttgatataatt aacgtcattt tcctgtgcat cacatccgct	180
tcaaaatgta tataataaga agacagatca actattttgc cactttttct tcaagagctt	240
gaagatacag ttctg	255
<210> 29	
<211> 500	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 实施例 2 中的 7U95P(-484)的序列	
<400> 29	
tgggttctca cccgtttagg caggaaacac ccagaccgca taaccactg acatttaaac	60
ccgtgaaaac aacaggaact gcggttgact ttcagcagg ttttatgggt tclcaccctg	120
ttaggttagga aagaccaga ccgcataacc cactaacatt tiaatatgtg aaaataaaca	180
ggaactgcgg ttatagtttc agtacattct agagattaca tcctgctaag gcgaaaaaca	240
ctttaaccgc aaaagccact gatttttaaa ctgtgaaaa taacaggaaa ccacagaaac	300

[0026]

gtcaggaaaa aaacgttggt ttataattat giccataaaa catgcaacat aatccaaacc 360
 ggccaatgat ttttctgctt aaatgtaatt taaataattt attcatacgt aagttggtat 420
 agccacgcct acgcagcaat gtatataagc agacaccgtc atttcgcagt tagtctgctg 480
 gaaagcttgt gaagactaca 500

<210> 30
 <211> 395
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 实施例 2 中的 7U95P(-379) 的序列

<400> 30
 tgggtttctca cccgttttagg taggaaagac ccagaccgca taaccacta acattttaat 60
 atgtgaaaat aaacaggaac tgcggttata gtttcagtac attctagaga ttacatcctg 120
 ctaaggcgaa aaacacttta accgcaaaag ccaactgattt ttaaacttgt gaaaataaca 180
 ggaaaccaca gaaacgtcag gaaaaaacg ttgttttata attatgtcca taaaacatgc 240
 aacataatcc aaaccggcca atgatttttc tgcttaaatg taattttaat aatttattca 300
 tacgtaagtt gttatagcca gccttacgca gcaatgtata taagcagaca ccgtcatttc 360
 gcagttagtc tgctggaaag cttgtgaaga ctaca 395

<210> 31
 <211> 320
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 实施例 2 中的 7U95P(-304) 的序列

<400> 31
 ggaactgcgg ttatagtttc agtacattct agagattaca tcctgctaag gcgaaaaaca 60

[0027]

ctttaaaccgc aaaagccact gattttttaa ctgtgaaaa taacagggaaa ccacagaaac 120
 gtcaggaaaa aaacgttggt ttataattat gtccataaaa catgcaacat aatccaaacc 180
 ggccaatgat ttttctgctt aaatgtaatt taaataattt attcatacgt aagttgttat 240
 agccacgcct acgcagcaat gtatataagc agacaccgtc atttcgcagt tagtctgctg 300
 gaaagcttgt gaagactaca 320

<210> 32

<211> 4818

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 实施例 2 中的 pGL3 碱性的序列

<400> 32

ggtaccgagc tcttacgcgt gctagcccgg gctcgagatc tgcgatctaa gtaagcttgg 60
 cattccggta ctgttggtta agccaccatg gaagacgcca aaaacataaa gaaaggcccc 120
 ggcceattct atccgctgga agatggaacc gctggagagc aactgcataa ggctatgaag 180
 agatacgccc tggttcctgg aacaattgct ttacagatg cacatatcga ggtggacatc 240
 acttacgctg agtacttcga aatgtccgtt cggttggcag aagctatgaa acgatatggg 300
 ctgaatacaa atcacagaat cgtcgtatgc agtgaaaact ctcttcaatt ctttatgccg 360
 gtgttggggc cgttatttat cggagttgca gttgcgcccc cgaacgacat ttataatgaa 420
 cgtgaattgc tcaacagtat gggcatttcg cagcctaccg tgggtttcgt ttccaaaaag 480
 gggttgcaaa aaattttgaa cgtgcaaaaa aagctcccaa tcatccaaaa aattattatc 540
 atggattcta aaacggatta ccagggattt cagtcgatgt acacgttcgt cacatctcat 600
 ctaccicccg gttttaatga atacgatttt gtgccagagt ccttcgatag ggacaagaca 660
 attgcactga tcatgaactc ctctggatct actggtctgc ctaaagggtg cgctctgcct 720

[0028]

catagaactg cctgcgtgag attctcgcac gccagagatc ctatttttgg caatcaaatc	780
attccggata ctgcgatttt aagtgttggt ccattccatc acggttttgg aatgtttact	840
acactcggat atttgataig tggatttcga gtcgtcttaa tgtatagatt tgaagaagag	900
ctgtttctga ggagccttca ggattacaag attcaaagtg cgctgctggt gccaacctca	960
ttctccttct tcgccaaaag cactctgatt gacaaatac gatttatctaa ttacacgaa	1020
attgcttctg gtggcgtcc cctctctaag gaagtcgggg aagcggttgc caagaggttc	1080
catctgccag gtatcaggca aggatatggg ctcaactgaga ctacatcagc tattctgatt	1140
acacccgagg gggatgataa accgggcgcg gtcggtaaag ttgttccatt tttgaaagcg	1200
aaggttgtgg atctggatac cgggaaaacg ctgggcgta atcaaagagg cgaacigtgt	1260
gtgagaggtc ctatgattat gtccggttat gtaaacaatc cggaagcgac caacgccttg	1320
attgacaagg atggatggct acattctgga gacatagctt actgggacga agacgaacac	1380
ttcttcatcg ttgaccgct gaagtctcg attaagtaca aaggctatca ggtggctccc	1440
gctgaattgg aatccatctt gctccaacac cccaacatct tcgacgcagg tgtcgcaggt	1500
cttcccgcag atgacgccg tgaacttccc gccgccgttg ttgttttga gcacggaaag	1560
acgatgacgg aaaaagagat cgtggattac gtcgccagtc aagtaacaac cgcgaaaaag	1620
ttgcgcggag gattgtgtt tgtggacgaa gtaccgaaag gtcttaccgg aaaactcgac	1680
gcaagaaaaa tcagagagat cctcataaag gccaaagaag gcggaaagat cgccgtgtaa	1740
ttctagagtc ggggcggccg gccgcttcga gcagacatga taagatacat tgatgagttt	1800
ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct	1860
attgctttat ttgtaacct tataagctgc aataaacaag ttaacaacaa caattgcatt	1920
cattttatgt ttcaggttca gggggagggtg tgggaggttt tttaaagcaa gtaaacctc	1980
tacaaatgtg gtaaaatcga taaggatccg tcgaccgatg cccttgagag cttcaaccc	2040

[0029]

agtcagctcc ticcggtagg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt	2100
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc ttcogcttcc togtcactg	2160
actcgtcgc ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa	2220
tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc	2280
aaaaggccag gaaccgtaaa aaggcccggt tgctggcggtt ttccatagg ctccgcccc	2340
ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat	2400
aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctctgtt ccgacctgc	2460
cgttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcatagct	2520
cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg	2580
aacccccgt tcagcccgac cgtcgcgct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc	2640
cgtaagaca cgacttatcg cactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga	2700
ggtatgtagg cgggtctaca gattcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa	2760
gaacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac ctccgaaaa agagttgta	2820
gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcggtag ttttttgtt tgcaagcagc	2880
agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatcctt gatctttct acggggtctg	2940
acgtcagtg gaacgaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga	3000
tcttcaccta gatccttta aattaaaaat gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg	3060
agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtg ggcacctatc tcagcgatct	3120
gtctatttcg ttcatccata gttgcctgac tccccgctg gtagataact acgatacggg	3180
agggcttacc atctggcccc agtctgcaa tgataccgag agaccacgc tcaccggctc	3240
cagatttatc agcaataaac cagccagccg gaaggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa	3300
ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccgga agctagagta agtagttcgc	3360

[0030]

cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca tlgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt	3420
cgtttggtat ggcttcattc agctccggti cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc	3480
ccatgltgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggctctcc gatcgttgtc agaagtaagt	3540
tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc	3600
catccgtaag atgcttttct gtgactggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt	3660
gtatgcccgg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatac g gataataacc gcgccacata	3720
gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga	3780
tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg tgcaccaac tgatcttcag	3840
catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa	3900
aaaagggaaat aagggcgaca cggaaatgt gaatactcat actcttcctt tttcaatatt	3960
attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catattgaa tgtatttaga	4020
aaaataaaca aataggggtt ccgcgccat tccccgaaa agtgccacct gacgcgcct	4080
gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg	4140
ccagcgcct agcgcgcct cctttcgtt tcttccttc ctttctgcc acgttcgccg	4200
gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg gttccgattt agtgctttac	4260
ggcacctega cccccaaaaa cttgattagg gtgatggtc acgtagtggg ccacgcct	4320
gatagacggt tttcgcct ttgacgttg agtccagtt ctttaatagt ggactcttgt	4380
tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctcttc ttttgattta taagggattt	4440
tgccgatttc gcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt	4500
ttaacaaaat attaacgctt acaatttgc attcgcatt caggctgcgc aactgttggg	4560
aagggcgatc gtlgcgggc tcttcgctat tacgccagcc caagctacca tgataagtaa	4620
gtaatattaa ggtacgggag gtacttggag cggccgcaat aaaatatctt tattttcatt	4680

[0031]

acatctgtgt gttggTTTT tgtgtgaatc gatagtacta acatagctc tccatcaaaa 4740

caaaacgaaa caaaacaaac tagcaaaata ggctgtccc agtgcaagtg caggtgccag 4800

aacatttctc tatcgata 4818

<210> 33

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> HIV-1 gp41 的 RNAi

<400> 33

aataagacag ggcttggaaa gacactttcc aagccctgtc ttatTTTT 48

<210> 34

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> HIV-1 tat 的 RNAi

<400> 34

aagcatccag gaagtcagcc tacaagctg acttctctgga tgctTTTT 48

<210> 35

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> HTLV-1 tax 的 RNAi

<400> 35

gaacattggt gaggaaggca cagccttctt caccaatggt cttttt 46

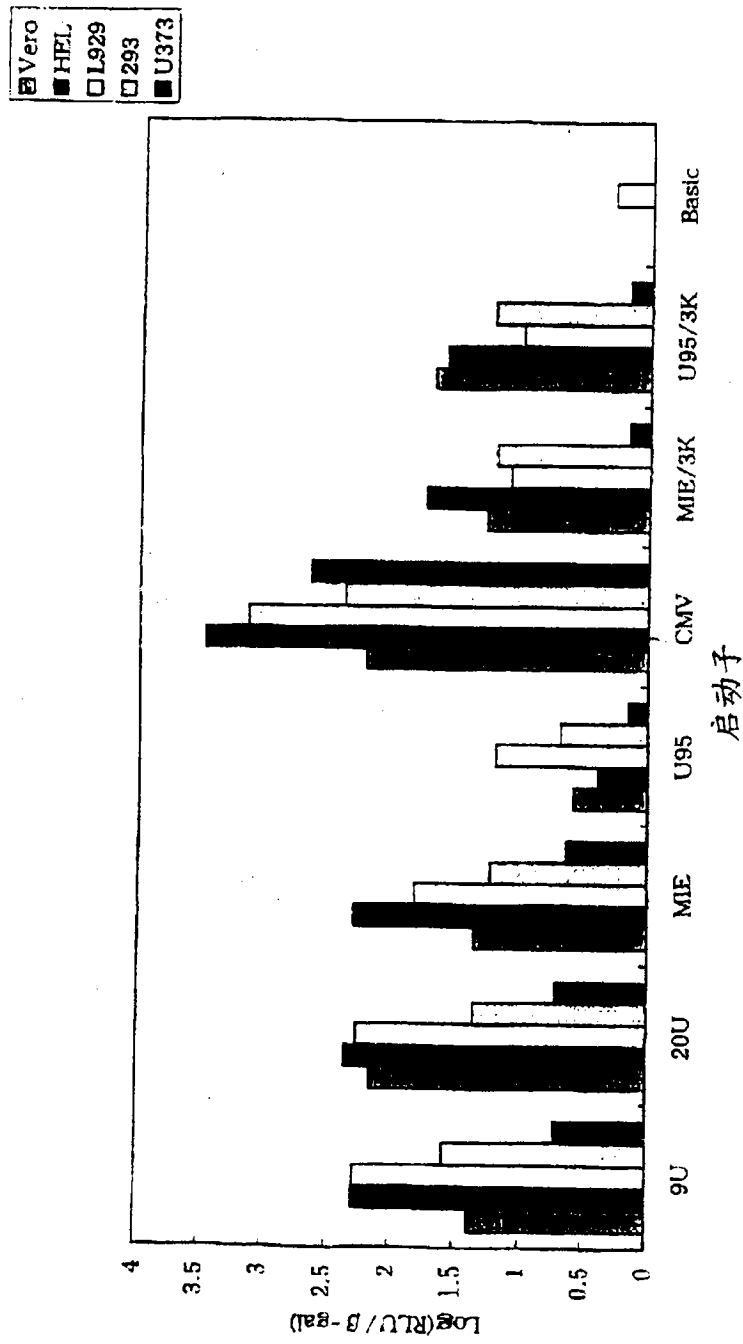


图 1

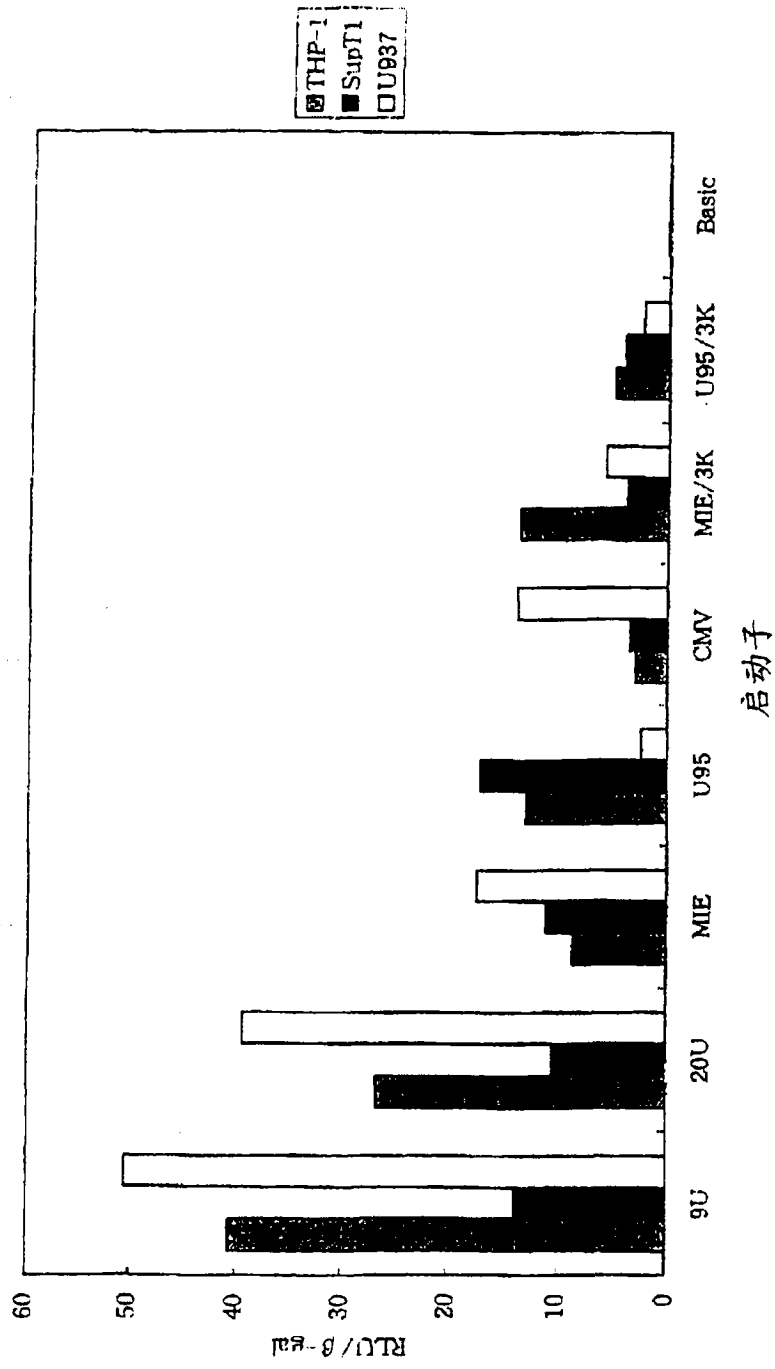


图 2

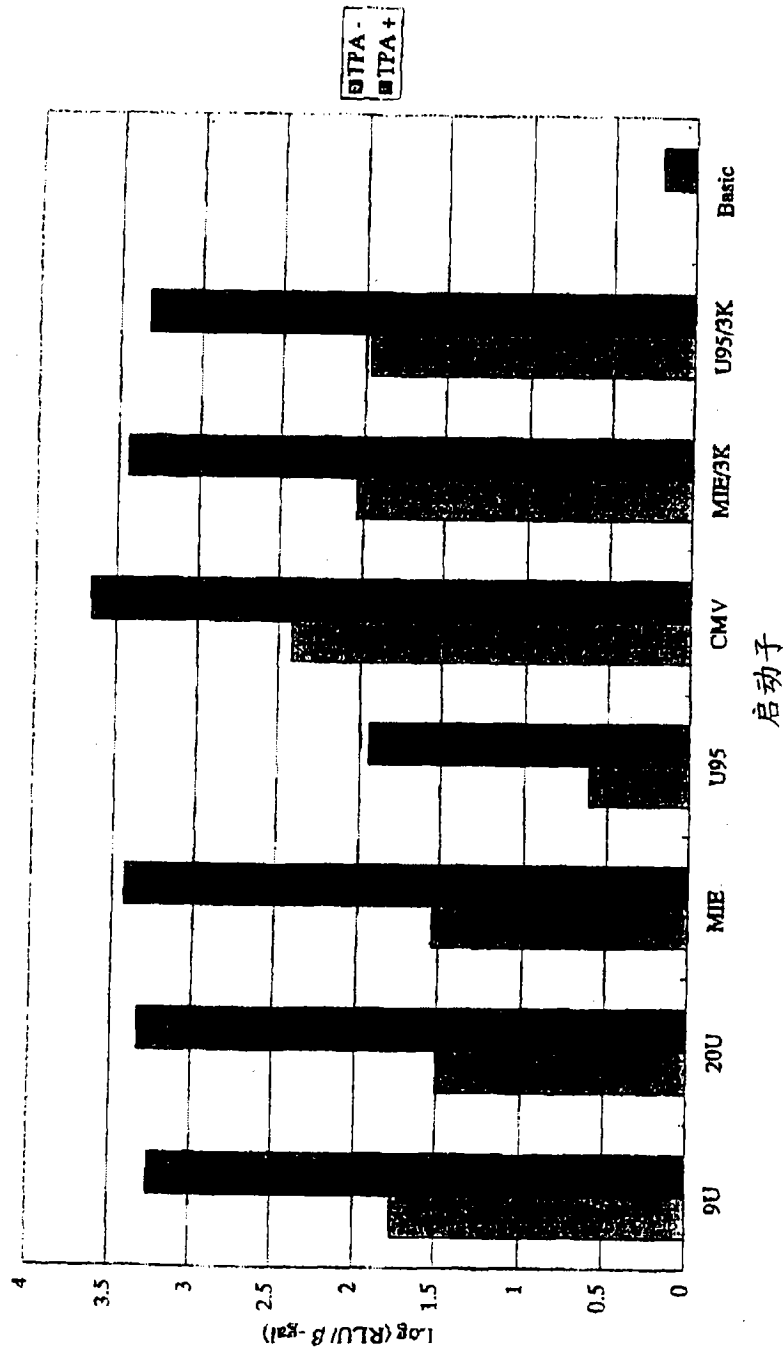


图 3

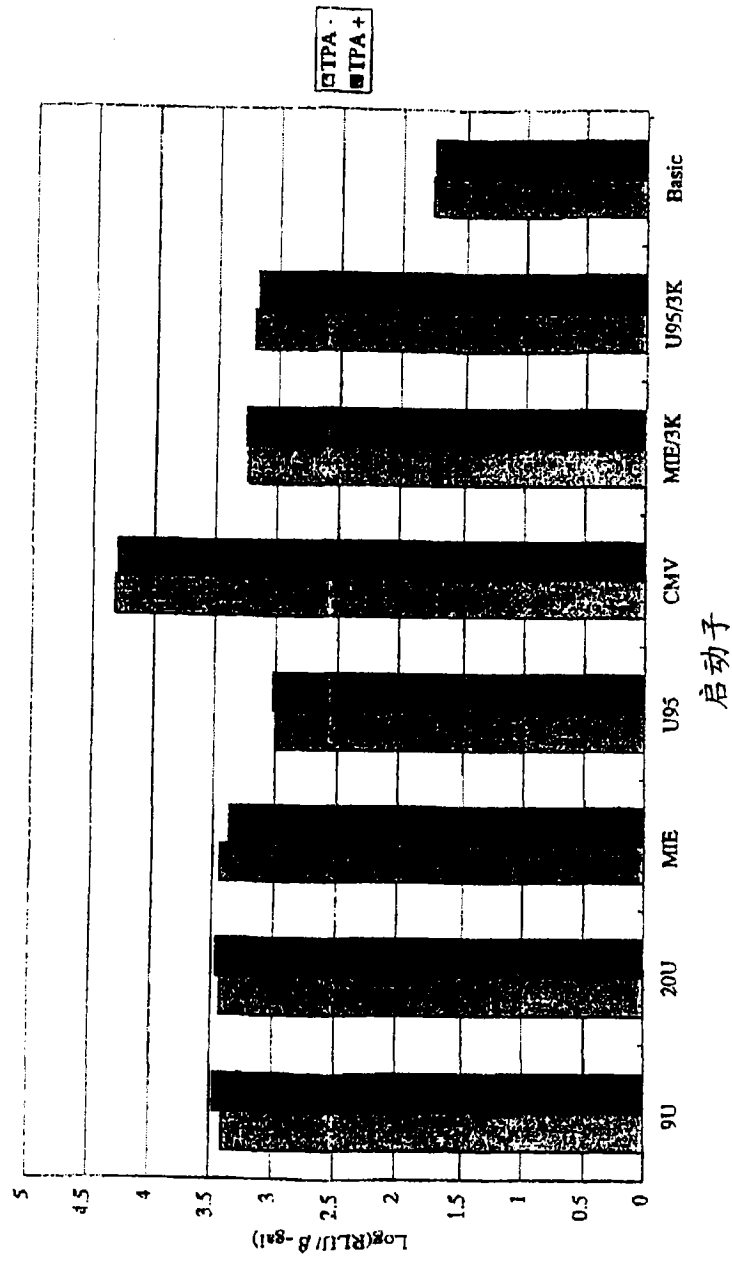


图 4

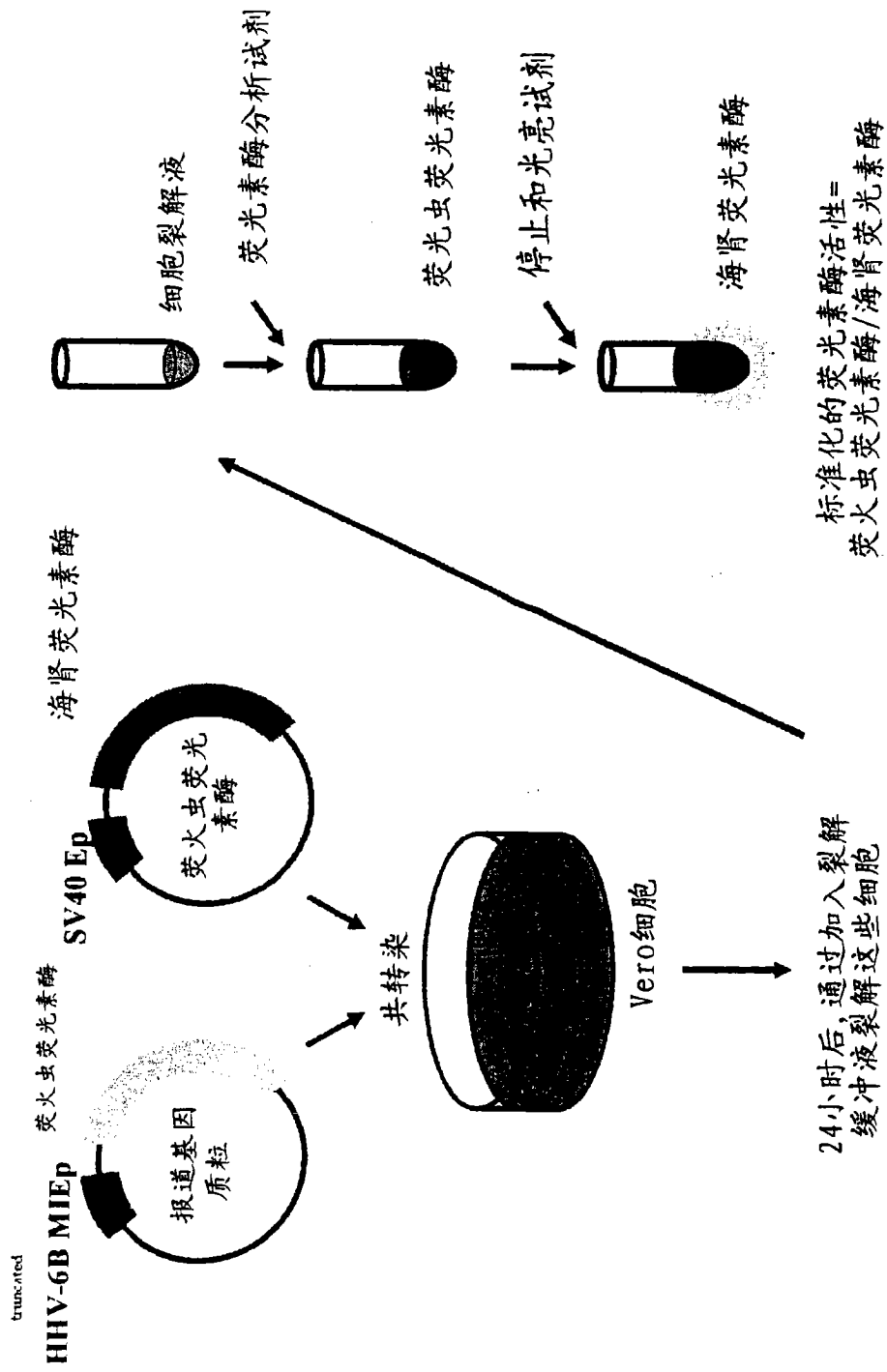


图 6

该R3区不只具有HHV6-U95启动子活性，
而且还具有强有力的对MIB
启动子的增强活性

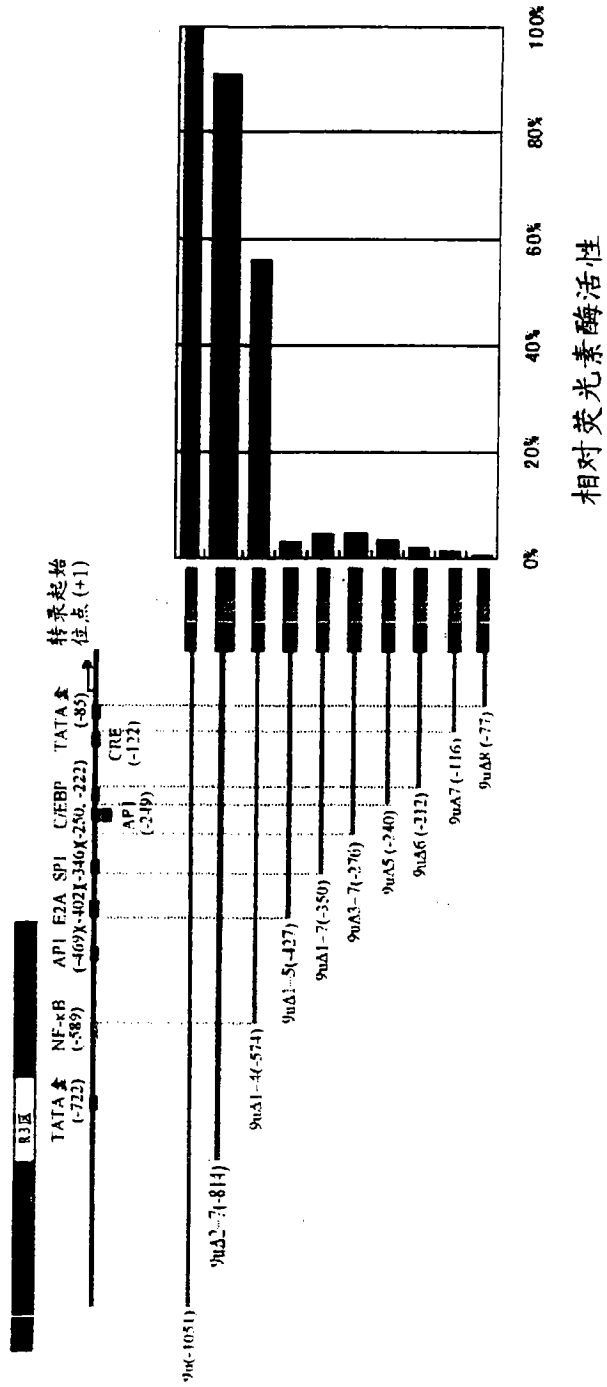


图 7

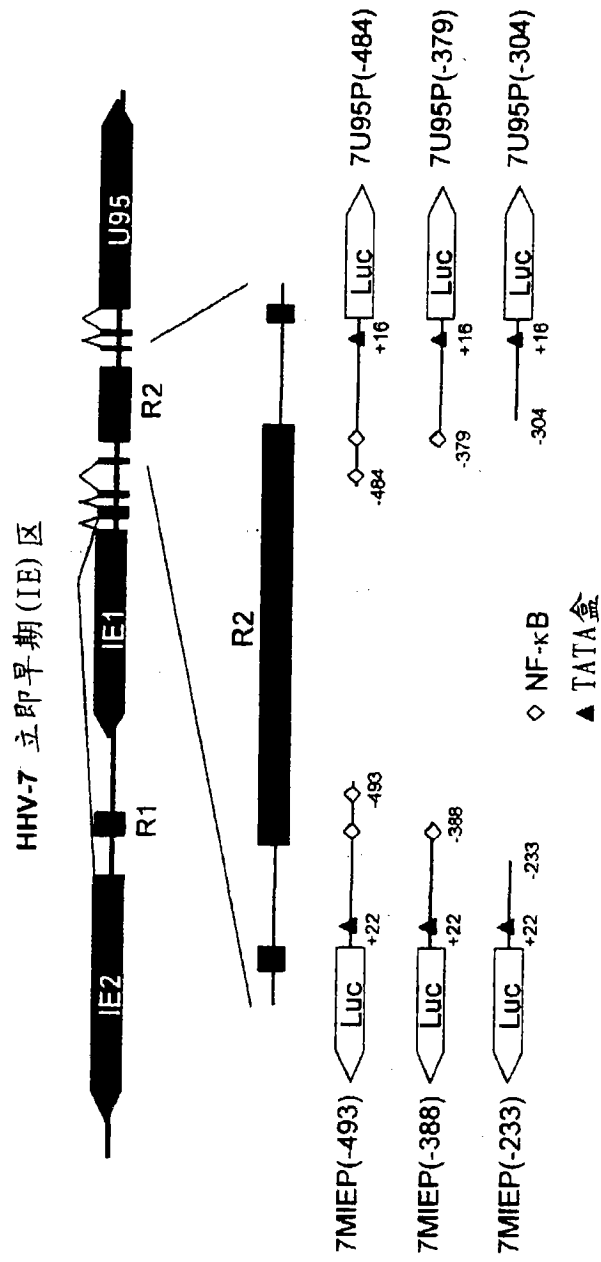


图 8

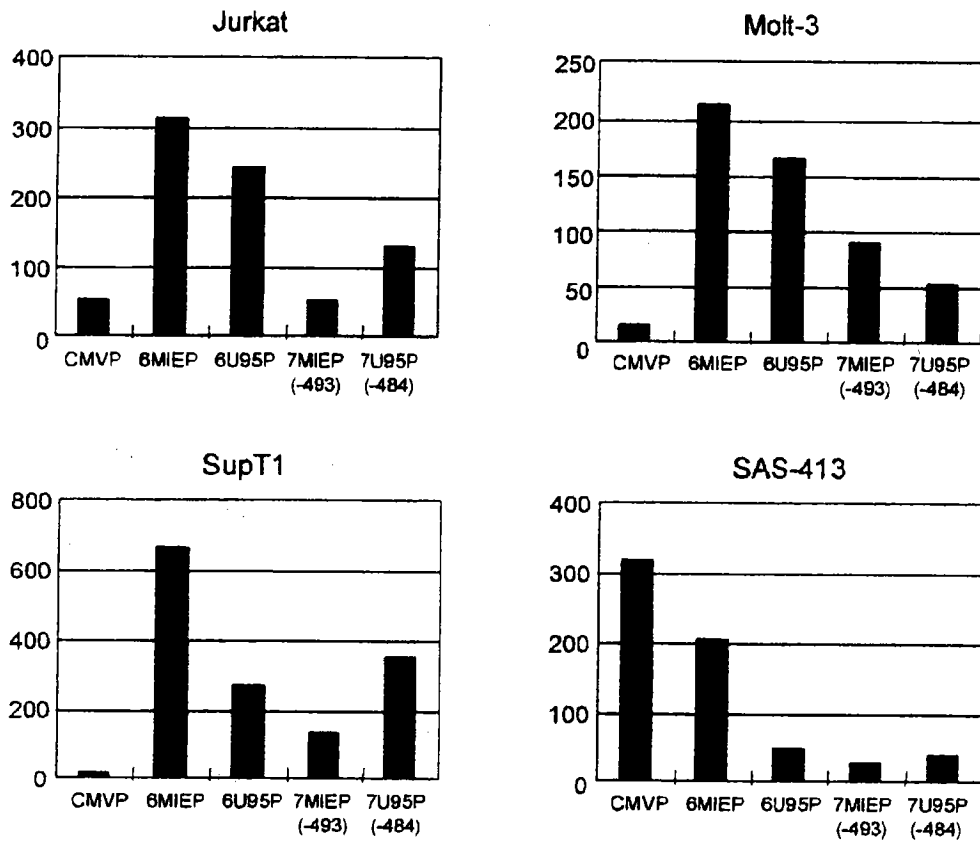


图 9

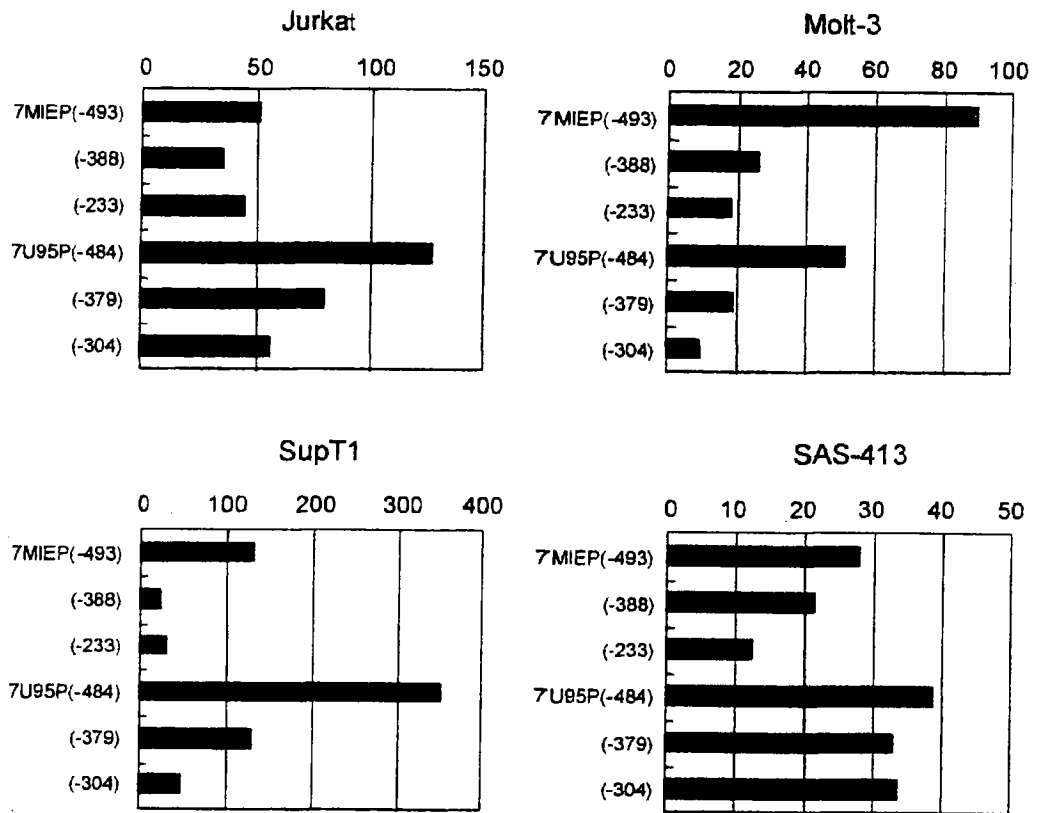


图 10

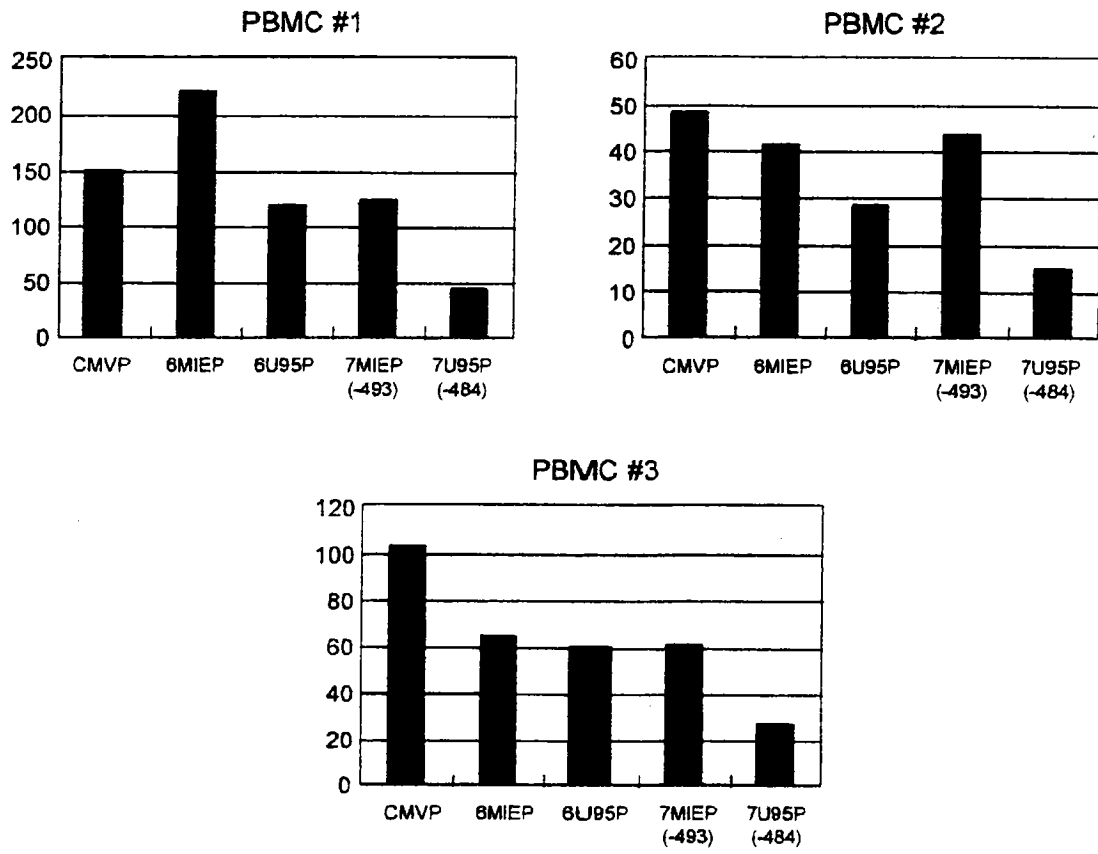


图 11