

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 38/25 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580031764.6

[43] 公开日 2007 年 8 月 29 日

[11] 公开号 CN 101027081A

[22] 申请日 2005.7.21

[21] 申请号 200580031764.6

[30] 优先权

[32] 2004.7.23 [33] US [31] 60/590,739

[86] 国际申请 PCT/US2005/025747 2005.7.21

[87] 国际公布 WO2006/014737 英 2006.2.9

[85] 进入国家阶段日期 2007.3.21

[71] 申请人 阿德维希斯公司

地址 美国得克萨斯

[72] 发明人 R·德拉吉亚-阿克里

P·A·布朗 A·S·卡恩

W·C·戴维斯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 胡国群

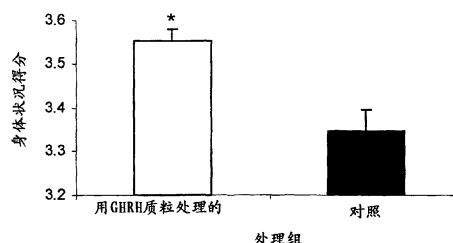
权利要求书 6 页 说明书 86 页 序列表 46 页
附图 17 页

[54] 发明名称

生长激素释放激素增强疫苗接种应答

[57] 摘要

本发明公开了组合物和方法：对受试者进行疫苗接种；增强接种疫苗的效率；在接种疫苗应答前准备受试者；以及改善已接种受试者在感染性攻击后的临床结果。更具体而言，本发明适合在给受试者递送疫苗之前或相伴疫苗递送将编码生长激素释放激素(“GHRH”)的核酸表达构建体递送到受试者的组织中，其中，GHRH 表达在受试者体内，其中受试者包括人、猪、母牛、鸟、马或接受疫苗的任何其他动物种类。



1. 一种准备需要接种疫苗的受试者的方法，其包括：

将编码生长激素释放激素（“GHRH”）的核酸表达构建体递送到受试者的组织中，其中 GHRH 在受试者体内表达。

2. 权利要求 1 的方法，其中核酸表达构建体的递送发生在受试者接种疫苗前最多约 1 年。

3. 权利要求 2 的方法，其中核酸表达构建体的递送发生在受试者接种疫苗前约 0 - 约 14 天。

4. 权利要求 1 的方法，其中将核酸表达构建体递送到受试者的组织包括组织电穿孔。

5. 权利要求 4 的方法，其中组织电穿孔包括：

(a) 用多个针状电极穿透受试者的组织，其中所述多个针状电极以间隔关系排列并且所述受试者的组织包括肌细胞；

(b) 以约 0.01-5 mg 的量将核酸表达构建体导入所述多个针状电极之间的组织中；以及

(c) 对所述多个针状电极施加电脉冲，其中所述电脉冲允许所述核酸表达构建体穿过肌细胞膜。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述核酸表达构建体进一步包括促进转染的多肽或带电荷的多肽。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述促进转染的多肽或带电荷的多肽包括聚 L-谷氨酸。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述核酸表达构建体包括编码多肽的序列，所述多肽具有与 SEQID#14 编码的 GHRH 至少 90% 同一的氨基酸序列。

9. 权利要求 1 的方法，其中所述核酸表达构建体包括与小鼠 pAV0202 (SEQID#23)；大鼠 pAV0203 (SEQID#24)；HV-GHRH pAV0224 (SEQID#25)；猪 -wt-GHRH pAV0225 (SEQID#26)；犬 pAV0235 (SEQID#27)；牛 pAV0236 (SEQID#28)；猫 pAV0238 (SEQID#29)；TI-GHRH

pAV0239 (SEQID#30) ; 羊 pAV0240 (SEQID#31) ; 鸡 pAV0241 (SEQID#32); 马 pAV0249 (SEQID#33); 或人 pAV0226 (SEQID#34) 至少 97% 同一的序列。

10. 权利要求 1 的方法, 其中所述接种疫苗包括微生物、传染剂或类毒素的至少部分。

11. 权利要求 10 的方法, 其中所述微生物包括: 病毒、细菌、支原体或寄生虫。

12. 权利要求 10 的方法, 其中所述微生物包括牛疱疹病毒-1 (“IBR”)、牛病毒性腹泻 (“BVD”) 病毒、副流感病毒 3、呼吸道合胞病毒、犬钩端螺旋体、感冒伤寒型钩端螺旋体、哈德焦钩端螺旋体、出血黄疸钩端螺旋体、波摩那钩端螺旋体 bacterins mycoplasma hyopneumonia、猪肺炎支原体或其组合。

13. 权利要求 1 的方法, 其中所述受试者包括人、反刍动物、食物动物或工作动物。

14. 一种对受试者进行疫苗接种的方法, 其包括:

(a) 将编码生长激素释放激素 (“GHRH”) 的核酸表达构建体递送到受试者的组织中; 以及

(b) 以对于诱导受试者中抗疫苗抗体来说有效的量向受试者提供疫苗;

其中 GHRH 在受试者体内表达, 并且当与没有递送 GHRH 表达构建体的对照受试者相比较时, 疫苗接种应答得到增强。

15. 权利要求 14 的方法, 其中核酸表达构建体的递送与向受试者提供疫苗相伴发生。

16. 权利要求 14 的方法, 其进一步包括: 在将编码 GHRH 的核酸表达构建体递送到受试者中之后, 但在提供疫苗之前等待一段时间。

17. 权利要求 16 的方法, 其中所述时间段为最多约 1 年。

18. 权利要求 17 的方法, 其中所述时间段为约 7 天 - 约 14 天。

19. 权利要求 14 的方法, 其中将核酸表达构建体递送到受试者的组织其中包括组织电穿孔。

20. 权利要求 19 的方法, 其中组织电穿孔包括:

用多个针状电极穿透受试者的组织, 其中所述多个针状电极以间隔关系排列并且所述受试者的组织包括肌细胞;

以约 0.01-5 mg 的量将核酸表达构建体导入所述多个针状电极之间的组织中; 以及

对所述多个针状电极施加电脉冲, 其中所述电脉冲允许所述核酸表达构建体穿过肌细胞膜。

21. 权利要求 20 的方法, 其中所述核酸表达构建体进一步包括促进转染的多肽或带电荷的多肽。

22. 权利要求 21 的方法, 其中所述促进转染的多肽或带电荷的多肽包括聚 L-谷氨酸。

23. 权利要求 14 的方法, 其中所述核酸表达构建体包括编码多肽的序列, 所述多肽具有与 SEQID#14 编码的 GHRH 至少 90% 同一的氨基酸序列。

24. 权利要求 14 的方法, 其中所述核酸表达构建体包括与小鼠 pAV0202 (SEQID#23); 大鼠 pAV0203 (SEQID#24); HV-GHRH pAV0224 (SEQID#25); 猪 -wt-GHRH pAV0225 (SEQID#26); 犬 pAV0235 (SEQID#27); 牛 pAV0236 (SEQID#28); 猫 pAV0238 (SEQID#29); TI-GHRH pAV0239 (SEQID#30); 羊 pAV0240 (SEQID#31); 鸡 pAV0241 (SEQID#32); 马 pAV0249 (SEQID#33); 或人 pAV0226 (SEQID#34) 至少 97% 同一的序列。

25. 权利要求 14 的方法, 其中所述疫苗包括微生物、传染剂或类毒素的至少部分。

26. 权利要求 25 的方法, 其中所述微生物包括: 病毒、细菌、支原体或寄生虫。

27. 权利要求 25 的方法, 其中所述微生物包括牛疱疹病毒-1 (“IBR”)、牛病毒性腹泻 (“BVD”) 病毒、副流感病毒 3、呼吸道合胞病毒、犬钩端螺旋体、感冒伤寒型钩端螺旋体、哈德焦钩端螺旋体、出血黄疸钩端螺旋体、波摩那钩端螺旋体 bacterinsmycoplasma

hyopneumonia、猪肺炎支原体或其组合。

28. 权利要求 14 的方法，其中所述受试者包括人、反刍动物、食物动物或工作动物。

29. 一种改善具有关节炎并接种了疫苗的受试者在感染性攻击后的临床结果的方法，其包括：

(a) 用多个针状电极穿透受试者的肌肉组织，其中所述多个针状电极以间隔关系排列；

(b) 将编码生长激素释放激素（“GHRH”）的核酸表达构建体递送到受试者的肌肉组织中，从而使得表达的 GHRH 的量能有效增强疫苗接种应答；以及

(c) 对所述多个针状电极施加电脉冲，其中所述电脉冲允许所述核酸表达构建体穿过肌细胞膜，

其中，

将 0.01-5 mg 的核酸表达构建体与指定浓度的聚 L-谷氨酸多肽一起递送到受试者的肌肉组织中，并且所述核酸表达构建体包括编码多肽的序列，所述多肽具有与 SEQID#14 编码的 GHRH 至少 90% 同一的氨基酸序列；并且所述受试者包括人、反刍动物、食物动物或工作动物。

30. 权利要求 29 的方法，其中所述核酸表达构建体包括与小鼠 pAV0202 (SEQID#23)；大鼠 pAV0203 (SEQID#24)；HV-GHRH pAV0224 (SEQID#25)；猪 -wt-GHRH pAV0225 (SEQID#26)；犬 pAV0235 (SEQID#27)；牛 pAV0236 (SEQID#28)；猫 pAV0238 (SEQID#29)；TI-GHRH pAV0239 (SEQID#30)；羊 pAV0240 (SEQID#31)；鸡 pAV0241 (SEQID#32)；马 pAV0249 (SEQID#33)；或人 pAV0226 (SEQID#34) 至少 97% 同一的序列。

31. 权利要求 29 的方法，其中所述受试者进行疫苗接种以抗微生物、传染剂或类毒素。

32. 权利要求 31 的方法，其中所述微生物包括：病毒、细菌、支原体或寄生虫。

33. 权利要求 31 的方法，其中所述微生物包括牛疱疹病毒-1

(“IBR”)、牛病毒性腹泻 (“BVD”) 病毒、副流感病毒 3、呼吸道合胞病毒、犬钩端螺旋体、感冒伤寒型钩端螺旋体、哈德焦钩端螺旋体、出血黄疸钩端螺旋体、波摩那钩端螺旋体 bacterinsmycoplasma hyopneumonia、猪肺炎支原体或其组合。

34. 一种组合物，其包含：

(a) 编码生长激素释放激素 (“GHRH”) 的核酸表达构建体；以及

(b) 疫苗；

其中，GHRH 在受试者体内表达。

35. 权利要求 34 的方法，其中所述疫苗包括微生物、传染剂或类毒素的至少部分。

36. 权利要求 35 的方法，其中所述微生物包括：病毒、细菌、支原体或寄生虫。

37. 权利要求 35 的方法，其中所述微生物包括牛疱疹病毒-1 (“IBR”)、牛病毒性腹泻 (“BVD”) 病毒、副流感病毒 3、呼吸道合胞病毒、犬钩端螺旋体、感冒伤寒型钩端螺旋体、哈德焦钩端螺旋体、出血黄疸钩端螺旋体、波摩那钩端螺旋体 bacterinsmycoplasma hyopneumonia、猪肺炎支原体或其组合。

38. 一种对受试者进行疫苗接种的方法，其包括：

(a) 用多个针状电极穿透受试者的组织，其中所述多个针状电极以间隔关系排列并且所述受试者的组织包括肌细胞；

(b) 以约 0.01-5 mg 的量将编码生长激素释放激素 (“GHRH”) 的核酸表达构建体导入所述多个针状电极之间的组织中；以及

(c) 对所述多个针状电极施加电脉冲，其中所述电脉冲允许所述核酸表达构建体穿过肌细胞膜；

(d) 以对于诱导受试者中针对疫苗的抗体来说有效的量向受试者提供疫苗；

其中所述核酸表达构建体包括编码多肽的序列，所述多肽具有与 SEQID#14 编码的 GHRH 至少 90% 同一的氨基酸序列；并且其中所述疫

苗包括牛疱疹病毒-1（“IBR”）、牛病毒性腹泻（“BVD”）病毒、副流感病毒 3、呼吸道合胞病毒、犬钩端螺旋体、感冒伤寒型钩端螺旋体、哈德焦钩端螺旋体、出血黄疸钩端螺旋体、波摩那钩端螺旋体 bacterins mycoplasma hyopneumonia、猪肺炎支原体或其组合的至少部分。

生长激素释放激素增强疫苗接种应答

背景

本申请要求美国临时专利申请序列号 60/590,739 的优先权,所述临时专利申请的标题为“GROWTH HORMONE RELEASING HORMONE ENHANCES VACCINATION RESPONSE”,于 2004 年 7 月 23 日提交,所列出的发明人有 Ruxandra、Draghia-Akli、Patricia A. Brown、Amir S. Khan 和 William C. Davis,其全部内容引入本文作为参考。

本发明涉及下述组合物及方法:对受试者进行疫苗接种;增强疫苗接种的效能;在接种疫苗之前准备受试者;以及改善接种了疫苗的受试者在感染性攻击后的临床结果。更具体而言,本发明涉及在将疫苗递送给受试者之前或与之相伴地将编码生长激素释放激素(“GHRH”)的核酸构建体递送到受试者组织中,其中 GHRH 在受试者体内表达,并且受试者包括人、猪、牛、鸟或接受疫苗的其他任何动物种类。

传染病在人和动物中仍然是一个重大问题。因此,需要适合年龄的抗生素选择,和特异性疫苗以及其他免疫增强疗法的临床效力的评估。大量的努力致力于疾病的预防而不是治疗。每年对于疫苗接种的市场超过 200 亿美元。众多报道指出神经内分泌和免疫系统之间相互依赖的关系。下丘脑的 GHRH 刺激垂体前叶分泌生长激素(“GH”),但近期研究也已证实这种肽的免疫调节特性(Siejka 等人,2004)。GHRH 在生理和病理条件下调节免疫状态的重要性(Marshall 等人,2001)已得到描述,通过刺激 GH/胰岛素样生长因子-I(“IGF-I”)轴和直接作为免疫调节剂(Dialynas 等人,1999;Khorram 等人,2001)。GHRH 在免疫系统的发育和调节中是必需的。然而,关于 GHRH 究竟真正如何介导那些作用或 GHRH 治疗对疫苗接种和病原体攻击的影响,仍然还缺乏细节。

生长激素释放激素（“GHRH”）和生长激素（“GH”）轴：为了更好地理解利用 GHRH 质粒介导的补充给药法作为增强特异性疫苗接种应答和改善感染性攻击后的临床结果的方法，将提及关于 GHRH/GH 轴的机制和目前的了解。尽管不希望被理论束缚，但 GH 的中心作用是控制人和其他脊椎动物的躯体生长。调节垂体分泌 GH 的生理学相关途径完全是本领域众所周知的。GH 途径基因包括：（1）配体，例如 GH 和 IGF-I；（2）转录因子，例如 pit 1 的前体（prophet），或 prop 1，和 pit 1；（3）激动剂和拮抗剂，例如分别为 GHRH 和生长激素释放抑制激素（“SS”）；以及（4）受体，例如 GHRH 受体（“GHRH-R”）和 GH 受体（“GH-R”）。这些基因在不同的器官和组织中表达，包括下丘脑、垂体、肝脏和骨骼。GH 途径的有效且受调节的表达是最佳线性生长，以及碳水化合物、蛋白质和脂肪代谢的体内稳态所必需的。GH 从垂体前叶的合成及分泌受到 GHRH 的刺激并受到生长激素释放抑制激素的抑制，这两种均为下丘脑激素。GH 增加了 IGF-I 的产生，主要在肝脏以及其他靶器官中。反过来，IGF-I 和 GH 反馈作用于下丘脑和垂体以抑制 GHRH 和 GH 释放。GH 引发了对外周组织的直接和间接作用，间接效应主要由 IGF-I 介导。

GHRH 和免疫功能：质粒介导的 GHRH 补充给药法在由于疾病或各种治疗方案而免疫系统低下的动物中已显示出具有各种免疫刺激作用（Dorshkind 和 Horseman, 2001）。研究表明，免疫系统细胞产生 GHRH、GH 和 IGF-I（Burgess 等人，1999），这提示免疫功能可能被自分泌和旁分泌机制调节。这还提示，在老年人中发病率增加例如呼吸系统疾病可能归因于伴随衰老而发生的改变：GH/IGF-I 产生减少、IGF-I 可用性减少以及免疫监视特别是 T 细胞介导的免疫监视减少（Gelato, 1996；Krishnaraj 等人，1998）。相反地，在老年人中施用 GHRH 或其类似物，在治疗后短期和长期均导致显著的免疫增强效应。这些效应包括淋巴细胞、单核细胞、B 细胞以及表达 T 细胞受体 $\alpha\beta$ 和 T 细胞

受体 $\gamma\delta$ 的细胞的数目增加 (Khorram 等人, 1997)。在无免疫应答的患者中, 例如在骨髓移植后, IGF-I 的施用可以增强淋巴和骨髓的重建 (Alpdogan 等人, 2003)。同样地, 疾病和疫苗接种的动物模型研究显示出, GH 的体内施用可以有效地准备好巨噬细胞并增加对病原体的抵抗力 (Sakai 等人, 1997)。

在不同动物模型和人中的几项研究已显示, GHRH 具有免疫刺激作用, 其是通过刺激 GH 轴和直接作为免疫调节剂 (Dialynas 等人, 1999; Khorram 等人, 2001)。已知 GH 直接地或通过由 GH 诱导的 IGF-I 而增强免疫应答。近来, 发现 GH 促分泌素 (“GHS”) 诱导了通过垂体腺产生 GH, 还决定了年老小鼠中胸腺细胞构成 (cellularity) 以及分化的统计学上显著的增加。当接种可移植的淋巴瘤细胞系 EL4 时, 经处理的年老小鼠对肿瘤发生和后续的转移显示出统计学上显著的抵抗力。在经处理的小鼠中对于 EL4 细胞的 CTL 的产生也是增强的, 这提示 GHS 具有相当大的免疫增强作用 (Koo 等人, 2001)。免疫功能还由 IGF-I 调节, 它对 B 细胞发育具有两个主要作用: 增强和成熟, 以及作为与白介素-7 一起工作的 B 细胞增殖辅助因子。这些活性通过使用抗 IGF-I 抗体、针对 IGF-I 的反义序列以及使用重组 IGF-I 以替代活性来鉴别。用重组 IGF-I 处理小鼠证实了这些观察, 因为它增加了骨髓中 pre-B 和成熟 B 细胞的数目 (Jardieu 等人, 1994)。成熟 B 细胞保留了对 IGF-I 的敏感性, 因为免疫球蛋白的产生在体外和体内也受 IGF-I 刺激 (Robbins 等人, 1994)。

在衰老的哺乳动物中, GHRH-GH-IGF-I 轴经历相当大的减退, 与骨骼肌质量损失 (肌肉减少 (sarcopenia))、骨质疏松症、关节炎、脂肪沉淀增加和瘦体重减少相关的 GH 分泌和 IGF-I 产生减少 (Caroni 和 Schneider, 1994; Veldhuis 等人, 1997)。已证实这些改变的形成可以通过重组 GH 疗法来抵消。致力于感染风险增加和消瘦的治疗在患者健康和生活质量中将会是一个主要的前进步骤。

在最近 20 年中重组蛋白质的产生提供了治疗许多不同病状的有用工具。例如, 在身材矮小症儿童中的 GH 缺乏, 在烧伤、败血病和

AIDS 患者中的同化激素类药。然而，对 GH 作用的抗性已在营养不良和感染中得到报道。然而，当前的 GH 疗法具有几个缺点，包括频繁的皮下或静脉内注射、胰岛素耐受性和葡萄糖耐量降低（Rabinovsky 等人，1992）；儿童还易遭受骺过早闭合以及首股骨骺滑脱（Liu 和 LeRoith，1999）。已开发出只需要每 14 天注射一次的“缓慢释放”形式的 GH（来自 Genentech）。然而，这种 GH 产品似乎扰乱了正常生理学脉动的 GH 特性，并且还与时常发生的副作用相关。

生长激素释放激素对生长激素或生长激素释放肽（“GHRP”）：

GH 和 GHRH 目前在治疗上作为重组蛋白质施用。关于 GH 及其受体之间的相互作用的当前认识提示，循环性 GH 的分子异质性可能具有重要的体内稳态关联。已提出，包括胰岛素抗性在内的不良反应可能起因于外源性 GH 提高了基础 GH 血清水平并且消除了自然的 GH 偶发性脉动。研究已显示，GHRH 的连续输注恢复了正常的 GH 脉动模式，而不会使 GHRH 受体脱敏或损耗人、绵羊或猪中的 GH 供应（Dubreuil 等人，1990；Vance 等人，1989；Vance 等人，1985）。同时，这个系统能够反馈，这在 GH 疗法中被完全消除。事实上没有关于 GHRH 疗法的副作用的报道（Thorner 等人，1986a）。因此，GHRH 疗法可能比 GH 疗法更符合生理学。

GHRP 在临床中用于在人类中短期刺激 GH 和 IGF-I。海沙瑞林（hexarelin），一种有效且充分研究的 GHRP，能够在正常个体中引起明显的 GH 释放。在人类中 GH 对海沙瑞林的应答在长期施用后变得具有较为明显的减弱。尽管这种减弱是局部的且可逆的，但它可以严重限制海沙瑞林和类似药剂潜在的长期治疗用途（Rahim 和 Shalet，1998）。与疫苗相结合的使用海沙瑞林的长期治疗是刺激免疫功能所必需的。随着 GH 释放药剂的开发及其在人受试者中的应用，很明显这些药剂对于 GH 释放不是特异的。在人中更近来的研究已证实，在施用 GHRP（海沙瑞林，MK-0677）后（Schleim 等人，1999）发生了促肾上腺皮质激素（ACTH）（Ghigo 等人，1999）、皮质醇和催乳素（PRL）

(Svensson 和 Bengtsson, 1999) 的急剧增加。在使用 GHRP 和类似药剂的长期治疗过程中, 短暂的 (甚至轻微的) 高催乳素血症和高皮质醇血症的反复发作的潜在不良反应引起了关注, 需要进一步的研究, 并且在面对感染性攻击的患者中是不希望的 (Rahim 等人, 1999)。

相反地, 基本上没有关于重组 GHRH 疗法的副作用的报道。额外分泌的 GHRH, 作为成熟肽或截短分子 (如具有胰岛细胞瘤和各种定位的类癌时可见), 通常是具有生物学活性的并且甚至可以产生肢端肥大症 (Esch 等人, 1982; Thorner 等人, 1984)。对缺乏 GH 的儿童或成人施用重组 GHRH 增加了 IGF-I 的水平, 与 GHRH 剂量成比例地增加了 GH 分泌, 还引起了对大剂量重组 GHRH 的应答 (Bercu 和 Walker, 1997)。因此, 施用 GHRH 代表了用于增加低于正常的 GH 和 IGF-I 水平的更符合生理学的选择方案 (Corpas 等人, 1993)。

尽管重组 GHRH 蛋白疗法产生并刺激基本上没有副作用的正常的周期性 GH 分泌, 但 GHRH 在体内短暂的半衰期要求频繁的 (一天 1-3 次) 静脉内、皮下或鼻内 (要求高 300 倍的剂量) 施用。因此, 作为长期治疗, 施用 GHRH 不可行。

野生型 GHRH 在人 (Frohman 等人, 1984) 和家畜的循环系统中具有相对短暂的半衰期。在血浆中孵育 60 分钟后, 95% 的 GHRH (1-44) NH₂ 被降解, 而该激素的更短的 (1-40) OH 形式在类似条件下孵育时, 在孵育 60 分钟后只显示出 77% 的肽降解 (Frohman 等人, 1989)。在治疗性核酸载体中整合入编码特定蛋白酶抗性 GHRH 类似物的 cDNA, 产生了在血清中具有更长半衰期并且效力增加的分子, 并在注射了质粒的动物中提供了更大的 GH 释放 (Draghia-Akli 等人, 1999), 此处引用作为参考。通过蛋白酶敏感性氨基酸的氨基酸替代进行诱变延长了 GHRH 分子的血清半衰期。此外, GHRH 的生物学活性的增强通过使用可以增加其与特异性受体的结合亲和力的强效类似物来达到 (Draghia-Akli 等人, 1999)。

家畜中的生长激素 (“GH”) 和生长激素释放激素 (“GHRH”) :

重组 GH 或重组 GHRH 的施用已在受试者中使用多年，但不是作为用于刺激疫苗接种后的应答或改善感染性攻击后的临床结果的途径。更具体而言，家畜中的重组 GH 治疗已显示出可增强无脂肪组织沉积和/或乳汁产生，同时增加饲料转化效率（Etherton 等人，1986；Klindt 等人，1998）。众多研究已显示，重组 GH 显著减少屠体的脂肪量；并且因此增加了产品的品质。然而，长期的 GH 施用具有实践、经济和生理学的局限性，这潜在地减少弱了其有用性和功效（Chung 等人，1985；Gopinath 和 Etherton，1989b）。在实验中，重组 GH 释放激素（“GHRH”）已被用作更符合生理学的替代方案。GHRH 在大的动物种类（例如猪或牛）中的使用不仅增强了生长表现和乳汁产生，而且更重要地，从实践和代谢的观点来看增强了生产效率（Dubreuil 等人，1990；Farmer 等人，1992）。例如，在泌乳母猪中使用重组 GHRH 对于刚断奶的小猪的生长具有有利的影响，然而 GHRH 发挥其全部潜力还需要最佳营养和激素条件（Farmer 等人，1996）。GHRH 和 GH 的施用刺激乳汁产生，伴随着饲料向乳汁转化的增加。这种疗法主要通过增加瘦体重（Lapierre 等人，1991；van Rooij 等人，2000）并同时全面改进饲料转化效率来增加生长。通过施用 GHRH 和 GH，热和冷的屠体重量增加并且屠体脂质（软组织质量的百分比）减少（Etherton 等人，1986）。

转基因递送和体内表达： 尽管不希望被理论束缚，但向躯体组织递送特定转基因以校正先天或后天的缺乏和不平衡是可能的。此类基于转基因的递送提供了许多超过施用重组蛋白质的优点。这些优点包括：保持天然蛋白质结构；改进生物学活性；避免全身毒性；以及避免有传染性和毒性的杂质。因为蛋白质被连续合成并分泌到循环中，所以质粒介导的疗法允许在治疗范围内的蛋白质的延长产生。相反，使用重组蛋白质的首要局限是在每次施用后蛋白质的有限的生物利用率。

在基于质粒的表达系统中，除编码治疗性基因产物的核酸之外，非病毒载体可以包含合成的转基因递送系统。这样，可以避免与大多

数病毒载体使用相关的风险，包括能够诱导针对靶组织或病毒载体的免疫应答的病毒蛋白质表达，以及 DNA 突变或激活癌基因的可能性。由于使用“物种特异性”组分用于基因递送，因而非病毒表达载体产物一般具有低毒性，这将由质粒所靶向的免疫原性和表达丧失的风险降至最低。另外，迄今为止在体内没有报道质粒序列以超过自发突变速度而明显整合入宿主染色体中，因此这种类型的治疗应当不会激活癌基因也不会失活肿瘤抑制基因。因为附加型系统存在于染色体外，所以质粒具有指定的药物动力学和清除特性，导致基因表达在靶组织中的持续时间有限。利用良好的制造实践技术易于制造质粒载体。与病毒载体相比较它们具有低的风险/利益比，如于 2003 年 3 月 13-14 日在由 American Society of Gene Therapy (ASGT) 和 Food and Drug Administration's Center for Biologics Evaluation and Research (FDA/CBER) 发起的研讨会上所提出的 (Frederickson 等人, 2003)。

当前，直接的质粒 DNA 基因转移是许多涌现的核酸疗法策略的基础并且不需要病毒组分或脂质颗粒 (Aihara 和 Miyazaki, 1998; Muramatsu 等人, 2001)。骨骼肌是靶组织，因为肌纤维具有长的寿命并且可以由在免疫活性宿主中表达的环状 DNA 质粒来转导 (Davis 等人, 1993; Tripathy 等人, 1996)。质粒 DNA 构建体对于进入受试者骨骼肌中的直接治疗来说是有吸引力的候选物，因为构建体是非常明确的实体，其是生物化学稳定的并且已成功使用了很多年 (Acsadi 等人, 1991; Wolff 等人, 1990)。在直接质粒 DNA 注射后编码产物的相对低的表达水平有时足以表明被分泌的肽的生物活性 (Danko 和 Wolff, 1994; Tsurumi 等人, 1996)。以前的报道显示，在小鼠中通过质粒可以将人 GHRH cDNA 递送至肌肉，在那里它短暂地刺激 GH 分泌至适当的程度超过 2 周的时间 (Draghia-Akli 等人, 1997)。

质粒介导的 GHRH 补充给药法刺激免疫功能: 在健康犬中的初步研究提示，单次施用 GHRH 质粒到骨骼肌中将确保生理学 GHRH 表达数月 (Draghia-Akli 等人, 2003a)。设计了一项初期研究以评估基于质

粒的 GHRH 治疗在年老的或受癌症折磨的伴侣犬中产生有利效果的能力,以及评估治疗方案的长期安全性。对 16 只受癌症折磨的犬施用了肌肉特异性的 GHRH 表达质粒。最初的 56 天评价(Draghia-Akli 等人, 2002a)证实 GHRH 生物活性指示剂即 IGF-I 的血清浓度增加。在经处理的动物中发现循环淋巴细胞水平显著增加。在极度衰弱的年老犬和具有自发产生的肿瘤的伴侣犬中进行了进一步的先导研究。在这种情况下,发现 IGF-I 水平在治疗后升高了超过 365 天。为了这项研究的纵向继续,包括了可以在治疗后被分析至少 180 天的犬。除了血液学参数的改善和维持之外,还观察了体重、活跃水平和运动耐力的增加。经处理的犬的全面长期评估显示出生活质量的改善,这种改善在研究期间自始至终都保持。这些结果暗示了质粒介导的 GHRH 治疗在逆转与衰老和癌性贫血和/或恶病质相关的分解代谢过程中的作用,并且暗示了被改善的健康状态可能与刺激了免疫功能相关。

质粒递送和电穿孔: 已付出努力以便通过物理方法(包括电穿孔、声波穿孔和压力)来增强质粒 DNA 向细胞的递送。尽管不希望被理论束缚,但通过电穿孔施用核酸构建体包括施加脉冲电场以在细胞膜中产生瞬时的孔而不会导致细胞的永久性损伤,这允许外源性分子进入细胞(Smith 和 Nordstrom, 2000)。通过调整由电穿孔系统产生的电脉冲,核酸分子可以穿过在操作过程中产生的细胞中的通道或孔。于 1998 年 1 月 6 日颁发、标题为“Electroporation and iontophoresis catheter with porous balloon”、Hofmann 等人列为发明人的美国专利 5,704,908 描述了用于在患者身体内的腔中于选定位置处将分子递送给细胞的电穿孔设备。类似的脉冲电压注射装置还在下述专利文献中得到描述:于 1997 年 12 月 30 日颁发、标题为“Needle electrodes for mediated delivery of drugs and genes”、Hofmann 等人列为发明人的美国专利 5,702,359; 于 1995 年 8 月 8 日颁发、标题为“Electroporation system with voltage control feedback for clinical applications”、Hofmann 列为发明人的美国专利

5,439,440; 于1996年5月5日公开、标题为“Electroporetic Gene and Drug Therapy by Induced Electric Fields”、Hofmann等人列为发明人的PCT申请W0/96/12520; 于1996年4月25日公开、标题为“Flow Through Electroporation Apparatus and Method”、Hofmann等人列为发明人的PCT申请W0/96/12006; 1995年7月27日公开、标题为“Electroporation and Iontophoresis Apparatus and Method For insertion of Drugs and genes into Cells”、Hofmann列为发明人的PCT申请W0/95/19805; 以及于1997年3月6日公开、标题为“In Vivo Electroporation of Cells”、Nicolau等人列为发明人的PCT申请W0/97/07826, 上文列举的每一篇参考文献的整体内容引入本文作为参考。

近来, 利用电穿孔技术获得了增强质粒体内递送以及随后达到分泌型蛋白质的生理学水平的重要进展。电穿孔已成功用于在注射质粒后转染肿瘤细胞 (Lucas 等人, 2002; Matsubara 等人, 2001) 或在人中将抗肿瘤药物博来霉素递送给皮肤和皮下肿瘤 (Gehl 等人, 1998; Heller 等人, 1996)。电穿孔还在小鼠 (Lesbordes 等人, 2002; Lucas 等人, 2001; Vilquin 等人, 2001)、大鼠 (Terada 等人, 2001; Yasui 等人, 2001) 和犬 (Fewell 等人, 2001) 中广泛用于递送编码各种激素、细胞因子或酶的治疗性基因。利用 GHRH 的先前研究显示, 使用电穿孔的质粒疗法是可扩缩的并且代表了在大型动物和人中诱导蛋白质的产生和受调节的分泌的有希望的方法 (Draghia-Akli 等人, 1999; Draghia-Akli 等人, 2002c)。电穿孔还已经广泛用于啮齿动物和其他小型动物中 (Bettan 等人, 2000; Yin 和 Tang, 2001)。肌肉内注射质粒后进行电穿孔已在反刍动物中成功用于接种疫苗的目的 (Babiuk 等人, 2003; Tollefsen 等人, 2003)。已观察到, 电极构造影响电场分布以及后续结果 (Gehl 等人, 1999; Miklavcic 等人, 1998)。尽管不希望被理论束缚, 但在大型动物模型中与外部钳状电极相比, 针状电极一致地产生更好的结果并且可以用于人类。

电穿孔增强将质粒摄入骨骼肌内的能力已被充分证明。类似地,

观察到用聚 L-谷氨酸 (“PLG”) 或聚乙烯吡咯烷酮 (“PVP”) 配制的质粒具有增加的质粒转染, 这从而增加了所需转基因的表达。例如, 观察到用 PLG 或 PVP 配制的质粒使小鼠、大鼠和犬的骨骼肌中的基因表达增至高达 10 倍 (Fewell 等人, 2001; Mumper 等人, 1998)。尽管不希望被理论束缚, 但阴离子聚合物 PLG 钠增强了在低质粒浓度下的质粒摄取并减少了由该操作引起的任何可能的组织损伤。PLG 是稳定的化合物并且它对相对较高的温度有抵抗力 (Dolnik 等人, 1993)。PLG 已用于增加抗癌药物的稳定性 (Li 等人, 2000), 并且在受伤和组织修复过程中作为 “胶” 使伤口闭合或阻止组织出血 (Otani 等人, 1996; Otani 等人, 1998)。PLG 已用于增加疫苗制剂的稳定性 (Matsuo 等人, 1994) 而不增加其免疫原性。PLG 还已经在抗原吸入或暴露于臭氧后用作抗毒素 (Fryer 和 Jacoby, 1993)。

尽管不希望被理论束缚, 但 PLG 增加了电穿孔过程中的质粒转染, 不仅通过稳定质粒 DNA 以及促进经过膜孔的胞内运输, 还通过活性机制。例如, 细胞上带正电荷的表面蛋白质可以通过蛋白质 - 蛋白质相互作用而与连接至质粒 DNA 的带负电荷的 PLG 复合。当施加电场时, 表面蛋白质倒转方向并且活跃地内在化 DNA 分子, 这个过程实质上增加了转染效率。此外, PLG 还将会防止与体内质粒递送相关的肌肉损伤 (Draghia-Akli 等人, 2002b), 并且将会增加注射前质粒的体外稳定性。存在旨在用线性 DNA 对真核细胞进行电穿孔的研究 (McNally 等人, 1988; Neumann 等人, 1982) (Toneguzzo 等人, 1988) (Aratani 等人, 1992; Nairn 等人, 1993; Xie 和 Tsong, 1993; Yorifuji 和 Mikawa, 1990), 但这些例子只举例说明了转染入细胞悬液、细胞培养物等之中, 而此类经转染的细胞不存在于躯体组织中。

美国专利号 4,956,288 旨在用于制备包含高拷贝数的外源 DNA 的重组宿主细胞的方法, 该方法包括在外源 DNA 存在下对一群细胞进行电穿孔, 培养所述细胞, 和杀死具有低拷贝数的外源 DNA 的细胞。

尽管不希望被理论束缚, 但 GHRH cDNA 可以与可注射的肌源性表达载体一起递送给小鼠肌肉, 其中它可以短暂地刺激 GH 分泌超过 2

周的时间 (Draghia-Akli 等人, 1997)。这种可注射的载体系统通过整合入与新型蛋白酶抗性 GHRH 分子 (pSP-HV-GHRH) (Draghia-Akli 等人, 1999) 偶联的强有力的合成肌肉启动子 (Li 等人, 1999) 而得到优化, 所述 GHRH 分子具有实质上更长的半衰期和更大的 GH 分泌活性。优化高效的电穿孔技术以将核酸构建体递送给动物的骨骼肌 (Draghia-Akli 等人, 2002b)。利用载体设计和电脉冲质粒递送方法的这种组合, 发明人能够在猪中显示出生长加速以及经有利修饰的机体组成 (Draghia-Akli 等人, 1999; Draghia-Akli 等人, 2003b)。经修饰的 GHRH 核酸构建体在患有癌症和与癌症治疗相关的贫血的伴侣动物中增加了红细胞的产生 (Draghia-Akli 等人, 2002a)。在猪中, 可获得的数据提示, 经修饰的猪 HV-GHRH 类似物 (SEQID#1) 在促进生长和积极的机体组成改变方面比野生型的猪 GHRH 更有效 (Draghia-Akli 等人, 1999)。

已经报道了, 为了增加生长激素释放的目的而施用新型 GHRH 类似物蛋白 (美国专利号 5,847,066; 5,846,936; 5,792,747; 5,776,901; 5,696,089; 5,486,505; 5,137,872; 5,084,442, 5,036,045; 5,023,322; 4,839,344; 4,410,512, RE33,699) 或者合成或天然发生的 GHRH 肽片段。已经报道了包含下述突变的 GHRH 类似物 (美国专利号 5,846,936): 第 1 位的 Tyr 突变为 His; 第 2 位的 Ala 突变为 Val、Leu 或其他; 第 8 位的 Asn 突变为 Gln、Ser 或 Thr; 第 15 位的 Gly 突变为 Ala 或 Leu; 第 27 位的 Met 突变为 Nle 或 Leu; 以及第 28 位的 Ser 突变为 Asn。该 GHRH 类似物是于 2003 年 4 月 22 日颁发、标题为 “Super-active porcine growth hormone releasing hormone analog”、Schwartz 等人列为发明人的美国专利 6,551,996 (“‘996 专利”) 的主题, 它教导了包含突变的 GHRH 类似物的应用, 所述突变能改善引起生长激素释放的能力。此外, ‘996 专利申请涉及利用施用生长激素释放激素类似物来治疗生长不足; 改善生长表现; 在动物中刺激以比与正常生长相关的水平更高的水平来产生生长激素; 以及增强生长, 该专利引入本文作为参考。

总之，增强疫苗接种应答和效力并改善受试者在感染性攻击后的临床结果在以前是不经济的而且在范围上受到限制。相关技术已显示，利用重组蛋白技术可以以有限的容量改善这些不同的病状，但这些治疗具有一些明显缺陷。已教导编码重组蛋白的核酸表达构建体是频繁注射和传统重组疗法的高成本这些问题的可行的解决方法。本领域需要通过利用核酸表达构建体来扩展对患有疾病的受试者的治疗，所述核酸表达构建体递送到受试者中并在体内表达稳定的治疗性蛋白质。

发明概述

本发明涉及对受试者进行疫苗接种的组合物和方法；在接种疫苗前准备受试者的方法；以及在已接种疫苗的受试者中改善感染性攻击后的临床结果的方法。本发明的具体实施方案涉及在向需要疫苗接种的受试者递送疫苗之前或与之相伴地将编码生长激素释放激素（“GHRH”）的核酸表达构建体递送到受试者的组织中，其中 GHRH 在受试者体内表达并且受试者包括人、猪、牛、鸟或接受疫苗的其他任何动物种类。

本发明的一个方面包括准备需要接种疫苗的受试者的方法。这个方法包括将编码体内表达的 GHRH 的核酸表达构建体递送到受试者的组织中。本发明的优选 GHRH 包括与 SEQID#14 编码的 GHRH 至少 90% 同一的序列，并且优选的核酸表达构建体包括与小鼠 pAV0202 (SEQID#23)；大鼠 pAV0203 (SEQID#24)；HV-GHRH pAV0224 (SEQID#25)；猪-wt-GHRH pAV0225 (SEQID#26)；犬 pAV0235 (SEQID#27)；牛 pAV0236 (SEQID#28)；猫 pAV0238 (SEQID#29)；TI-GHRH pAV0239 (SEQID#30)；羊 pAV0240 (SEQID#31)；鸡 pAV0241 (SEQID#32)；马 pAV0249 (SEQID#33)；或人 pAV0226 (SEQID#34) 至少 97% 同一的序列。本发明涵盖的疫苗包括：被杀死的微生物；活的减弱的生物；亚基抗原；类毒素抗原；缀合物抗原或当导入受试者体内时通过引起免疫系统的激活、抗体形成和/或造成 T-细胞和/或 B-细胞应答而产生对于特定疾

病的免疫性的其他类型疫苗。然而，本发明的优选实施方案包括的疫苗接种包含：牛疱疹病毒-1（“IBR”）、牛病毒性腹泻（“BVD”）病毒、副流感病毒 3、呼吸道合胞病毒、犬钩端螺旋体（*Leptospira canicola*）、感冒伤寒型钩端螺旋体（*Leptospira grippotyphosa*）、哈德焦钩端螺旋体（*Leptospira hardjo*）、出血黄疸钩端螺旋体（*Leptospira icterohaemorrhagiae*）、波摩那钩端螺旋体（*Leptospira Pomona*）bacterinsmycoplasma hyopneumonia、猪肺炎支原体（*Mycoplasma hyopneumonia*）或其组合。

一般地，核酸表达构建体可以在受试者进行疫苗接种前最多 1 年递送到受试者中，然而，这个时间可以改变。例如，在一个优选实施方案中，核酸表达构建体在受试者进行疫苗接种前约 0 - 约 14 天递送。将核酸表达构建体递送到受试者组织中的一个优选方法包括组织电穿孔。组织电穿孔的许多方法在以前已得到描述，然而，一个优选的组织电穿孔方法包括：用多个针状电极穿透受试者的组织，其中所述多个针状电极以间隔关系排列并且所述受试者的组织包括肌细胞；以约 0.01-5 mg 的量将核酸表达构建体导入所述多个针状电极之间的组织中；以及对所述多个针状电极施加电脉冲，其中所述电脉冲允许所述核酸表达构建体穿过肌细胞膜。另外，核酸表达构建体还可包括促进转染的多肽或带电荷的多肽（例如，聚 L-谷氨酸）。

本发明的第二个方面是对受试者进行疫苗接种的方法。这个方法包括：将编码生长激素释放激素（“GHRH”）的核酸表达构建体递送到受试者的组织中；并随后以对于诱导受试者中抗疫苗抗体来说有效的量向受试者提供疫苗。优选的 GHRH 表达构建体如上所述。疫苗可以与将 GHRH 核酸表达构建体递送给受试者相伴地提供或者在构建体递送后一段时间之后提供。在优选实施方案中，疫苗在递送 GHRH 核酸表达构建体后最多 1 年递送。本发明涵盖的疫苗包括：被杀死的微生物；活的减弱的生物；亚基抗原；类毒素抗原；缀合物抗原或当导入受试者体内时通过引起免疫系统的激活、抗体形成和/或造成 T-细胞和/或 B-细胞应答而产生对于特定疾病的免疫性的其他类型疫苗。然而，本

发明的优选实施方案包括上述疫苗接种。在更优选的实施方案中，疫苗在递送 GHRH 核酸表达构建体后约 7 天 - 约 14 天递送。在另一优选实施方案中，利用组织电穿孔将 GHRH 核酸表达构建体与促进转染的多肽一起递送。

本发明的第三个方面包括改善具有关节炎并接种了疫苗的受试者在感染性攻击后的临床结果的方法。该方法包括：用多个针状电极穿透受试者的肌肉组织，其中所述多个针状电极以间隔关系排列；将编码生长激素释放激素（“GHRH”）的核酸表达构建体递送到受试者的肌肉组织中，从而使得表达的 GHRH 的量能有效增强疫苗接种应答；以及对所述多个针状电极施加电脉冲，其中所述电脉冲允许所述核酸表达构建体穿过肌细胞膜。将优选范围的 0.01-5 mg 的核酸表达构建体与指定浓度的聚 L-谷氨酸多肽一起递送到受试者的肌肉组织中，并且所述核酸表达构建体包括编码多肽的序列，所述多肽具有与 SEQID#14 编码的 GHRH 至少 90% 同一的氨基酸序列。优选的核酸表达构建体包括与小鼠 pAV0202 (SEQID#23)；大鼠 pAV0203 (SEQID#24)；HV-GHRH pAV0224 (SEQID#25)；猪-wt-GHRH pAV0225 (SEQID#26)；犬 pAV0235 (SEQID#27)；牛 pAV0236 (SEQID#28)；猫 pAV0238 (SEQID#29)；TI-GHRH pAV0239 (SEQID#30)；羊 pAV0240 (SEQID#31)；鸡 pAV0241 (SEQID#32)；马 pAV0249 (SEQID#33)；或人 pAV0226 (SEQID#34) 至少 97% 同一的序列。优选的疫苗包括：被杀死的微生物；活的减弱的生物；亚基抗原；类毒素抗原；缀合物抗原或当导入受试者体内时通过引起免疫系统的激活、抗体形成和/或造成 T-细胞和/或 B-细胞应答而产生对于特定疾病的免疫性的其他类型疫苗。

本发明的第四个方面包括含有编码生长激素释放激素（“GHRH”）的核酸表达构建体和疫苗的组合物。优选的核酸表达构建体包括与小鼠 pAV0202 (SEQID#23)；大鼠 pAV0203 (SEQID#24)；HV-GHRH pAV0224 (SEQID#25)；猪 -wt-GHRH pAV0225 (SEQID#26)；犬 pAV0235 (SEQID#27)；牛 pAV0236 (SEQID#28)；猫 pAV0238 (SEQID#29)；TI-GHRH pAV0239 (SEQID#30)；羊 pAV0240 (SEQID#31)；鸡 pAV0241

(SEQID#32); 马 pAV0249 (SEQID#33); 或人 pAV0226 (SEQID#34) 至少 97% 同一的序列。优选的疫苗包括: 被杀死的微生物; 活的减弱的生物; 亚基抗原; 类毒素抗原; 缀合物抗原或当导入受试者体内时通过引起免疫系统的激活、抗体形成和/或造成 T-细胞和/或 B-细胞应答而产生对于特定疾病的免疫性的其他类型疫苗。

附图简述:

图 1 显示了用不同浓度的表达 SEAP 的质粒注射猪后分泌型碱性磷酸酶 (“SEAP”) 蛋白质的血浆水平。

图 2 显示了在对照和经 pSP-HV-GHRH 处理的动物中的葡萄糖和胰岛素水平。

图 3 的图版 A 和图版 B 显示了处理后第 0 和 18 天时 $CD2^+$ 细胞和 $CD4^+CD45R^+$ 幼稚 T 细胞的百分比, 图版 C 显示了在处理 300 天时 $CD45R^+/CD45R^-$ 幼稚 T 细胞的比率, 其中值以平均值 $\pm$ SEM 表示, * $P < 0.001$ 。

图 4 显示在接受了 GHRH 质粒的牛中用 Surround-9 way 疫苗 (Biocor) 进行疫苗接种 14 天后, 与对照动物相比, $CD4^+/CD8^+$ 比率显著增加, 所述对照动物在相同时间段中 $CD4^+/CD8^+$ 比率下降, $P < 0.05$ 。

图 5 显示在接受了 GHRH 质粒的动物中于 Surround 9-way (Biocor) 疫苗接种 14 天后, 与对照动物相比, 幼稚 T 细胞的相对比例增加, $P < 0.05$ 。

图 6 显示了在 60 至 80 DIM 时用 pSP-HV-GHRH 处理的小母牛与对照比较的身体状况得分。身体状况得分在处理组之间不同, $P < 0.0001$ 。

图 7 显示了用表达 pSP-HV-GHRH 的质粒处理的动物在注射后不同时间点上与对照比较的体重。

图 8 显示了 pAV0224 表达质粒的限制性图谱。

图 9 显示了 pAV0225 表达质粒的限制性图谱。

图 10 显示了 pAV0235 表达质粒的限制性图谱。

图 11 显示了 pAV0236 表达质粒的限制性图谱。

图 12 显示了 pAV0238 表达质粒的限制性图谱。

图 13 显示了 pAV0239 表达质粒的限制性图谱。

图 14 显示了 pAV0240 表达质粒的限制性图谱。

图 15 显示了 pAV0241 表达质粒的限制性图谱。

图 16 显示了 pAV0249 表达质粒的限制性图谱。

图 17 显示了 pAV0226 表达质粒的限制性图谱。

优选实施方案的详述

对于本领域技术人员而言，显而易见的是，可以对此处所公开的本发明进行各种替代和修改而不背离本发明的范围和精神。

如本文说明书中所使用的，术语“a”或“an”可以指一个或多个。如本文权利要求中所使用的，当与词语“包括或者包含”结合使用时，词语“a”或“an”可以指一个或超过一个。如本文所使用的，“另一个”可以指至少第二个或更多。

如本文所使用的，术语“类似物”包括 GHRH 的任何突变体，或者合成的或天然发生的 GHRH 肽片段，例如 HV-GHRH (SEQID#1)、猪-GHRH (SEQID#2)、牛-GHRH (SEQID#3)、犬-GHRH (SEQID#4)、猫-GHRH (SEQID#5)、TI-GHRH (SEQID#6)、羊-GHRH (SEQID#7)、鸡-GHRH (SEQID#8)、马-GHRH (SEQID#9)、TV-GHRH (SEQID#11)、15/27/28-GHRH (SEQID#12)、人 GHRH (1-44)NH₂ (SEQID#13)、人 GHRH(1-40)OH (SEQID#10)形式，或不少于(1-29)个氨基酸的任何更短的形式。

如本文所使用的，术语“体脂肪比例”被定义为躯体脂肪质量除以总体重。

如本文所使用的，术语“身体状况得分”(BCS)被定义为评估马或任何其他家畜的总体营养和管理的方法。

如本文所使用的，术语“盒”被定义为一个或多个转基因表达载

体。

如本文所使用的，术语“细胞转染脉冲”被定义为导致载体例如线性 DNA 片段转染入细胞中的力量传输。在一些实施方案中，力量来自电，如在电穿孔中，或者力量来自血管压力。

如本文所使用的，术语“编码区”指被转录为信使 RNA (mRNA) 并随后被翻译为具有特定多肽特征的氨基酸序列的 DNA 序列的任何部分。

如本文所使用的，术语“递送”被定义为在有压力下或无压力的情况下通过化学或生物方法、注射、混合、电穿孔、声波穿孔或其组合，将材料导入组织、受试者、细胞或任何受者中的手段。

如本文所使用的，术语“患有慢性疾病的”被定义为具有下述病状的患者：例如慢性阻塞性肺病、慢性心力衰竭、中风、痴呆、髋骨骨折后的恢复、慢性肾衰竭、关节炎、类风湿性关节炎、以及老年人中的多重病症，所述病状一个月一次由医生出诊和/或住院治疗，持续至少 2 年。

如本文所使用的，术语“供体受试者”指动物界中的任何物种，其中细胞被取出并且在受试者体外以有生活力的状态维持任何一段时间。

如本文所使用的，术语“供体细胞”指被取出并在供体受试者体外以有生活力的状态维持任何一段时间的细胞。

如本文所使用的，术语“电穿孔”指利用电脉冲将核酸序列递送入细胞内的方法。

如本文所使用的，术语“电脉冲”和“电穿孔”指对组织或细胞施加电流以便将核酸分子摄入细胞内。技术人员将认识到，这些术语与术语“脉冲电场”、“脉冲电流装置”和“脉冲电压装置”相关。技术人员将认识到，电脉冲的量和持续时间取决于受者受试者的组织、大小和总体健康状态，并且进一步知道如何凭经验确定此类参数。

如本文所使用的，术语“编码的 GHRH”是生长激素释放激素的有生物学活性的多肽。

如本文所使用的，术语“增强的疫苗接种应答”包括通过允许免疫系统的更快激活、抗体的更快形成、更高的抗体滴度、T-细胞应答增强和/或 B-细胞应答增强而获得的增强了的对于特定疾病的免疫力。

如本文所使用的，术语 GHRH 的“功能性生物学等价物”是这样的多肽，其具有与野生型 GHRH 多肽不同的氨基酸序列，而同时具有当与 GHRH 多肽相比较时类似或改进的生物学活性。功能性生物学等价物可以是天然发生的或者它可以是被个别修饰的。技术人员将认识到，如本文所使用的，类似或改进的生物学活性指促进和/或释放生长激素或其他垂体激素。技术人员将认识到，在一些实施方案中，编码的 GHRH 功能性生物学等价物是这样的多肽，其已被改造为含有不同的氨基酸序列，而同时具有当与 GHRH 多肽相比较时类似或改进的生物学活性。本领域已知的用于改造此类序列的方法包括定点诱变。

如本文所使用的，术语“生长激素”（“GH”）被定义为与生长相关并且作为化学信使以对靶细胞发挥其作用的激素。在一个具体的实施方案中，生长激素通过生长激素释放激素的作用而得到释放。

如本文所使用的，术语“生长激素释放激素”（“GHRH”）被定义为促进或刺激生长激素释放的激素，并且以小得多的范围来说为其他垂体激素例如催乳素。

如本文所使用的，术语“异源核酸序列”被定义为包括不同调节和表达元件的 DNA 序列。

如本文所使用的，术语“免疫疗法”指促进或增强机体免疫系统以形成保护性抗体的任何治疗，它将减少医学病状的症状、阻止感染性病状在受试者中的发展和/或减少对于药物治疗的需要。

如本文所使用的，术语“修饰的细胞”被定义为来自受试者且含有导入细胞内的另外核酸序列的细胞。

如本文所使用的，术语“修饰的供体细胞”指已具有被递送的编码 GHRH 的核酸序列的任何供体细胞。

如本文所使用的，术语“分子开关”指可以调节基因转录的被递

送到受试者中的分子。

如本文所使用的，术语“核酸表达构建体”指任何类型的分离的基因构建体，其包含编码能够被转录的 RNA 的核酸。术语“表达载体”在本文还可以互换使用。在具体实施方案中，分离的核酸表达构建体包含：启动子；目的核苷酸序列；以及 3'非翻译区；其中启动子、目的核苷酸序列和 3'非翻译区是有效连接的；并且目的核苷酸序列的体内表达由启动子调节。如本文所使用的，术语“DNA 片段”指基本上为双链的 DNA 分子。尽管片段可以通过本领域已知的任何标准分子生物学手段来产生，但在一些实施方案中，DNA 片段或表达构建体通过亲本 DNA 分子的限制性消化来产生。术语“表达载体”、“表达盒”或“表达质粒”也可互换使用。尽管亲本分子可以是任何标准的分子生物学 DNA 试剂，但在一些实施方案中，亲本 DNA 分子是质粒。

如本文所使用的，术语“有效连接的”指核酸序列中的元件或结构通过操作能力而不是物理位置进行连接。元件或结构能够完成所需操作或以完成所需操作为特征。本领域普通技术人员将认识到，核酸序列中的元件或结构不必以串连或邻接顺序来有效连接。

如本文所使用的，术语“聚 L-谷氨酸（“PLG”）指 L-谷氨酸的生物可降解聚合物，其适合用作通过利用或不利用电穿孔将 DNA 转移到细胞内的载体或佐剂。

如本文所使用的，术语“注射后”指这样的时间段，其位于将包含编码 GHRH 或其生物学等价物的异源核酸序列的核酸盒导入受试者细胞内之后，并允许编码的基因进行表达而修饰的细胞仍在活生物体内。

如本文所使用的，术语“质粒”一般指可以不依赖染色体 DNA 进行复制的包含染色体外遗传物质（通常为 DNA 环状双链体）的构建物。质粒或其片段可以用作载体。质粒是存在于或来源于细菌以及（罕有地）其他微生物的双链 DNA 分子。然而，线粒体和叶绿体 DNA、酵母杀手（yeast killer）以及其他情况通常被排除在外。

如本文所使用的，术语“质粒介导的基因补充给药法”指在体内

通过利用核酸表达构建体而允许受试者延长暴露于治疗范围的治疗蛋白质的方法。

如本文所使用的，术语“脉冲电压装置”或“脉冲电压注射装置”涉及通过向细胞发射局部化的电脉冲而能够导致或导致核酸分子摄入生物体细胞内的设备。随后，细胞膜变得不稳定，形成通道或孔。这种类型的常规装置被标准化以允许人们选择或调整所需的电压幅度和脉冲电压的持续时间。脉冲电压装置的主要作用是该装置促进将本发明的组合物特别是线性 DNA 片段递送到生物体细胞内的能力。

如本文所使用的，术语“质粒骨架”指通常包含细菌复制起点和细菌抗生素选择基因（其是只有转化了适当质粒的细菌的特异生长所必需的）的 DNA 序列。然而，存在被称为小环（mini-circle）的质粒，其缺少抗生素抗性基因和复制起点（Darquet 等人，1997；Darquet 等人，1999；Soubrier 等人，1999）。体外扩增的表达质粒 DNA（即非病毒表达系统）的使用避免了与病毒载体相关的风险。由于使用“物种特异性”组分用于基因递送，所以非病毒表达系统产物一般具有低毒性，这使得通常与病毒载体相关的免疫原性风险降至最低。本发明的一个方面是质粒骨架不包含病毒核苷酸序列。

如本文所使用的，术语“启动子”指指导基因转录的 DNA 序列。启动子可以指导原核或真核基因的转录。启动子可以是“诱导型的”，其对于诱导剂作出响应而起始转录，或者，相反地，启动子可以是“组成型的”，由此诱导剂无法调节转录速度。启动子可以以组织特异性或组织优先的方式进行调节，从而使得它只在转录特定组织类型中的有效连接的编码区时才是有活性的。

如本文所使用的，术语“生活质量”或“健康相关的生活质量”指被患者及其监护者重视的那些性质，包括：他们综合的舒适和安康；他们能够维持适当的身体、感情和智力功能的程度；他们保持其参与家庭内、工作场所中以及社区中价值活动的能力的程度。

如本文所使用的，术语受试者的“幸福”指成为或做得很好，在功能水平执行任务和活动的状态；健康、快乐和舒适的情况；安康；

顺利。

如本文所使用的，术语“复制元件”包含将会导致质粒在特定宿主中复制的核酸序列。分子生物学领域的技术人员将认识到，复制元件可以包括，但不限于，选择性标记基因启动子、核糖体结合位点、选择性标记基因序列和复制起点。

如本文所使用的，术语“残留的线性质粒骨架”包括在使得核酸表达质粒变成线性的过程结束时留下的质粒骨架的任何片段。

如本文所使用的，术语“受者受试者”指可以从供体受试者将修饰的供体细胞导入其中的动物界的任何物种。

如本文所使用的，术语“调节蛋白质”指可以用于控制基因表达并且对于诱导剂作出响应而增加转录速度的任何蛋白质。

如本文所使用的，术语“促分泌素”指刺激分泌的药剂。例如，生长激素促分泌素是当递送到动物内时刺激垂体释放生长激素的任何分子。生长激素释放激素是生长激素促分泌素。

如本文所使用的，术语“受试者”或“动物”指动物界中的任何物种。在优选实施方案中，它更具体地指人和驯养动物，所述驯养动物用于：宠物（例如猫、犬等）；工作（例如马等）；食物（牛、鸡、鱼、羊、猪等）；以及本领域已知的所有其他用途。

如本文所使用的，术语“组织”指类似细胞和它们周围的细胞间物质的集合。技术人员将认识到，组织是用于执行特殊功能的类似地特化的细胞的聚集体。对于本发明的范围，术语组织不指细胞系、细胞悬浮液或细胞培养物。在一个具体的实施方案中，组织在体内进行电穿孔。在另一实施方案中，组织不是植物组织。技术人员将认识到，机体内存在4种基本组织：1）上皮组织；2）结缔组织，包括血液、骨和软骨；3）肌肉组织；以及4）神经组织。在一个具体的实施方案中，方法和组合物旨在通过电穿孔将线性DNA转移到肌肉组织中。

如本文所使用的，术语“治疗元件”包括将会导致所编码的基因产物的体内表达的核酸序列。分子生物学领域的技术人员将认识到，治疗元件可以包括，但不限于，启动子序列、转基因、poly A序列或

者 3'或 5' UTR。

如本文所使用的，术语“转染”指将核酸导入真核细胞内。在一些实施方案中，细胞不是植物组织或者酵母细胞。

如本文所使用的，术语“载体”指将核酸递送到细胞或生物体中的任何媒介物。实例包括质粒载体、病毒载体、脂质体或阳离子脂质。该术语还指包括遗传物质的构建物，其设计为通过将核酸序列递送到细胞内来直接转化靶细胞。载体可以包含与其他必需元件在位置上和顺序上定向的多个基因元件，从而使得内含的核酸盒可以在转染的细胞中进行转录并且当需要时进行翻译。这些元件是有效连接的。术语“表达载体”指包含对于在异源细胞中产生重组蛋白质所需的所有信息的 DNA 质粒。

如本文所使用的，术语“病毒性骨架”指不包含启动子、基因和 3' poly A 信号或非翻译区，但包含下述元件的核酸序列，所述元件包括但不限于，位点特异性基因组整合 Rep 和反向末端重复 (“ITRs”) 或用于逆转录的 tRNA 引物的结合位点，或当在体内插入时诱导病毒免疫原性应答、允许整合、影响组织特异型启动子的特异性和活性、导致转录沉默或对受试者造成安全风险的核酸序列组分。

术语“血管压力脉冲”指来自大容积液体的压力脉冲以促进载体摄入细胞内。技术人员将认识到，血管压力脉冲的量 and 持续时间取决于受者动物的组织、大小和总体健康状态，并且进一步知道如何凭经验确定此类参数。

如本文所使用的，术语“疫苗”指被杀死的微生物，活的减弱的生物，亚基抗原，类毒素抗原，缀合物抗原或当导入受试者体内时通过引起免疫系统的激活、抗体形成和/或造成 T-细胞和/或 B-细胞应答而产生对于特定疾病的免疫性的其他类型抗原分子的任何制剂。一般地，针对微生物的疫苗指向病毒、细菌、寄生虫、支原体或其他传染剂的至少一部分。

对于特定病原体的疫苗接种或免疫接种的功效以及在感染性攻击后的临床结果对于人和动物医学具有特别的重要性。本发明的一个具

体实施方案是增强对于疫苗接种的应答的方法。该方法包括：用多个针状电极穿透受试者的肌肉组织，其中所述多个针状电极以间隔关系排列；将编码生长激素释放激素（“GHRH”）的核酸表达构建体递送到受试者的肌肉组织中，从而使得表达的 GHRH 的量能有效增强对于特定疫苗接种的应答；以及对所述多个针状电极施加电脉冲，其中所述电脉冲允许所述核酸表达构建体穿过肌细胞膜。将 0.01-5 mg 的核酸表达构建体与指定浓度的聚 L-谷氨酸多肽一起递送到受试者的肌肉组织中，并且所述核酸表达构建体包括编码多肽的序列，所述多肽具有与 SEQID#14 编码的 GHRH 至少 90% 同一的氨基酸序列。优选的受试者包括人、反刍动物、食物动物、马或工作动物。虽然存在对于疫苗接种的应答得到增强的许多指标，但少数实例包括：特异性抗体滴度增加、在感染性攻击后应答更快速、临床结果改善或其组合。本发明的其他具体实施方案涵盖了将核酸表达构建体递送到受试者组织中的各种方式（例如，电穿孔法，病毒载体，与承载体（carrier）相结合，通过肠胃外途径，或其组合）。

第二个优选的实施方案包括以单剂量递送核酸表达构建体，并且所述单剂量包含总量约 0.01-5 mg 的核酸表达构建体。一般地，将核酸表达构建体递送到受试者的组织中，包括二倍体细胞（例如肌细胞）。

在第三个具体实施方案中，用于转染的核酸表达构建体包括 wt-猪-GHRH 质粒（SEQID#26）。其他具体实施方案利用其他核酸表达构建体（例如，优化的牛 GHRH 质粒，pAV0236（SEQID#28）；TI-GHRH 质粒，pAV0239（SEQID#30）；HV-GHRH 质粒，pAV0224（SEQID#25）；羊 GHRH 质粒，pAV0240（SEQID#31）；鸡 GHRH 质粒，pAV0241（SEQID#32）；犬 GHRH 质粒，pAV0235（SEQID#27）；猫 GHRH 质粒，pAV0238（SEQID#29）；马 GHRH 质粒，pAV0249（SEQID#33）；人 GHRH 质粒，pAV0226（SEQID#34）。

在第四个具体实施方案中，核酸表达构建体进一步包括促进转染的多肽（例如带电荷的多肽，或聚 L-谷氨酸）。将核酸表达构建体递送到受试者组织中后，编码的 GHRH 或其功能性生物学等价物开始进行

表达。编码的 GHRH 包括生物学活性多肽；并且编码的 GHRH 功能性生物学等价物是这样的多肽，其已被改造为含有不同的氨基酸序列，而同时具有当与 GHRH 多肽相比较时类似或改进的生物学活性。具体的编码的 GHRH 或其功能性生物学等价物的一个实施方案具有式 (SEQID#14)。动物包括人、食物动物、工作动物（例如猪、牛、绵羊、山羊或鸡）、或宠物（例如犬、猫、马）。

本发明还涉及用于改善患者在感染性攻击后的临床结果的方法。本发明的一般方法包括用质粒介导的基因补充给药法治疗受试者。该方法包括将编码生长激素释放激素（“GHRH”）或其功能性生物学等价物的核酸表达构建体递送到受试者的组织例如肌肉中。本发明的具体实施方案旨在通过质粒介导的 GHRH 补充给药法来改善被治疗的受试者中的疫苗接种应答。质粒注射可以在特定疫苗接种之前进行或与其相伴进行。GHRH 或其生物学等价物随后在受试者中的体内表达足以改善疫苗接种应答。因此，如果感染性攻击发生在较后的日期，那么临床结果明显得到改善。通过将多个电极放置在所选择的组织中，随后将核酸表达构建体在介于所述多个电极之间的区域中递送给所选组织，并在其中递送了核酸表达构建体的所选组织的区域中向所选组织施加细胞转染脉冲（例如电脉冲），还可以增强这种方法。但是，细胞转染脉冲不必是电脉冲，也可利用一种不同的方法例如血管压力脉冲。电穿孔、直接注射、基因枪或金颗粒轰击也可在具体实施方案中用于将编码 GHRH 或生物学等价物的核酸表达构建体递送到受试者中。在本发明中的受试者包括动物（例如，人、猪、马、牛、小鼠、大鼠、猴、绵羊、山羊、犬或猫）。

重组 GH 替代疗法广泛用于农业和临床中，具有有利的作用，但一般而言，剂量是超生理学的。此类剂量提高的重组 GH 与有害的副作用相关，例如，高达 30% 的经重组 GH 治疗的患者以较高频率形成了胰岛素耐受性（Gopinath 和 Etherton, 1989a; Gopinath 和 Etherton, 1989b; Verhelst 等人, 1997）或在儿科患者中加速的骨骼生长和闭合（Blethen 和 Rundle, 1996）。此外，循环性 GH 的分子异质性在生

长和体内稳态中可能具有重要的关联 (Satozawa 等人, 2000; Tsunekawa 等人, 1999; Wada 等人, 1998)。不希望的副作用是由于用重组外源性 GH 蛋白质进行治疗提高了 GH 的基础水平并且消除了自然的 GH 偶发性脉动。与此相反, 没有关于重组 GHRH 疗法的副作用的报道。垂体门脉循环中的 GHRH 的正常水平为约 150 - 800 pg/ml, 而该激素的全身性循环值最多为约 100 - 500 pg/ml。具有由颅外肿瘤引起的肢端肥大症的一些患者具有将近高 100 倍的水平 (例如 50 ng/ml 的免疫反应性 GHRH) (Thorner 等人, 1984)。在儿童和老年人中使用重组 GHRH 疗法的长期研究 (1 - 5 年) 已显示没有传统的 GH 副作用, 例如空腹葡萄糖浓度的改变, 或者在儿科患者中加速的骨骼生长和闭合或首股骨骼滑脱 (Chevalier 等人, 2000) (Duck 等人, 1992; Vittone 等人, 1997)。

人、绵羊或猪中的研究显示, 重组 GHRH 蛋白质的连续输注恢复了正常 GH 模式, 而不会使 GHRH 受体脱敏或消耗 GH 供应 (Dubreuil 等人, 1990)。因为这个系统具有一定程度的反馈, 这在 GH 疗法中被消除, 所以 GHRH 重组蛋白质疗法可能比 GH 疗法更符合生理学。可是, 由于 GHRH 在体内短暂的半衰期, 频繁的 (一天 1 - 3 次) 静脉内、皮下或鼻内 (要求高 300 倍的剂量) 施用是必需的 (Evans 等人, 1985; Thorner 等人, 1986b)。因此, 作为长期疗法, 重组 GHRH 蛋白质施用不可行。然而, 质粒介导的补充给药法可以克服这种对于 GHRH 使用的局限。选择 GHRH 用于基因治疗应用由下述事实支持: 对于人、猪、牛和其他物种已表征了该基因、cDNA 以及天然的和几种突变的分子 (Bohlen 等人, 1983; Guillemin 等人, 1982); 猫、犬和马特异性 GHRH 的 cDNA 已被分离。治疗效果的测量是简单明了且明确的。

在用于体内基因转移的非病毒技术中, 将质粒 DNA 直接注射到肌肉中是简单、价廉且安全的。在简单的直接注射后低效的 DNA 摄入肌纤维中导致相对低的表达水平 (Prentice 等人, 1994; Wells 等人, 1997)。此外, 转基因表达的持续时间是短暂的 (Wolff 等人, 1990)。以前最成功的临床应用被限制于疫苗 (Danko 和 Wolff, 1994; Tsurumi

等人, 1996)。近来, 利用电穿孔技术获得了增强质粒体内递送并随后达到分泌型蛋白的生理学水平的重要进展。电穿孔已非常成功地用于在质粒注射后转染肿瘤细胞 (Lucas 等人, 2002; Matsubara 等人, 2001) 或用于在人中将抗肿瘤药物博来霉素递送给皮肤和皮下肿瘤 (Gehl 等人, 1998; Heller 等人, 1996)。电穿孔还在小鼠 (Lesbordes 等人, 2002; Lucas 等人, 2001; Vilquin 等人, 2001)、大鼠 (Terada 等人, 2001; Yasui 等人, 2001) 和犬 (Fewell 等人, 2001) 中广泛用于递送编码各种激素、细胞因子或酶的治疗性基因。我们利用生长激素释放激素 (GHRH) 所进行的先前研究显示, 使用电穿孔的质粒疗法是可扩缩的并且代表了在大型动物和人中诱导蛋白质的产生和受调节的分泌的有希望的方法 (Draghia-Akli 等人, 1999; Draghia-Akli 等人, 2002c)。电穿孔还已经广泛用于啮齿动物和其他小型动物中 (Bettan 等人, 2000; Yin 和 Tang, 2001)。已观察到电极构造影响电场分布以及后续结果 (Gehl 等人, 1999; Miklavcic 等人, 1998)。初步实验指出, 对于大型动物或人, 针状电极一致地产生比外部钳状电极更好的可重复的结果。

如上所述, 电穿孔增强质粒摄入骨骼肌的能力已被充分证明。此外, 已观察到用 PLG 或聚乙烯吡咯烷酮 (“PVP”) 配制的质粒在小鼠、大鼠和犬的骨骼肌中使基因转染并从而使基因表达增至高达 10 倍 (Fewell 等人, 2001; Mumper 等人, 1998)。尽管不希望被理论束缚, 但 PLG 将会增加电穿孔过程中的质粒转染, 不仅通过稳定质粒 DNA 以及促进经过膜孔的胞内运输, 还通过活性机制。例如, 细胞上带正电荷的表面蛋白质可以通过蛋白质-蛋白质相互作用而与连接至质粒 DNA 的带负电荷的 PLG 复合。当施加电场时, 表面蛋白质倒转方向并且活跃地内在化 DNA 分子, 这个过程实质上增加了转染效率。

尽管不希望被理论束缚, 但本文所描述的用于增强疫苗接种应答并且改善患者在感染性攻击后的临床结果的质粒补充给药法提供了超越直接注射重组 GH 或 GHRH 蛋白质的局限的优点。GHRH 或 GHRH 的新型生物学等价物的表达可以通过由合成的肌肉特异性启动子控制的表

达质粒来指导。此类 GHRH 或其生物学等价物的表达引发了受试者中的高 GH 和 IGF-I 水平,所述受试者已通过肌肉注射或体内电穿孔而将编码序列递送到细胞中。尽管体内电穿孔是将异源核酸编码系统导入受试者细胞内的优选方法,但存在其他方法且应当被本领域技术人员了解(例如电穿孔、lipofectamine、磷酸钙、离体转化、直接注射、DEAE 葡聚糖、超声处理加载、受体介导的转染、微粒轰击等)。例如,还可以通过下列步骤将编码 GHRH 或其功能性生物学等价物的核酸序列直接导入受试者的细胞中:首先从受试者或供体的机体取出细胞,将细胞维持在培养物中,随后通过各种方法(例如电穿孔、lipofectamine、磷酸钙、离体转化、直接注射、DEAE 葡聚糖、超声处理加载、受体介导的转染、微粒轰击等)导入该核酸编码系统,最后将修饰的细胞再次导入最初的受试者或其他宿主受试者中(离体方法)。GHRH 序列可以被克隆到腺病毒载体或腺相关载体中,并通过简单的肌肉注射或经静脉内或动脉内递送。携带 GHRH 序列的质粒 DNA 可以与阳离子脂质或脂质体复合,并经肌肉内、静脉内或皮下递送。

如本文所使用的,施用指将 DNA 的载体或承载体导入机体内的途径。施用可以直接至靶组织或在全身施用后通过对靶组织的靶向递送而至靶组织。特别地,本发明可以用于通过将载体施用于机体来改善受试者中的疫苗接种应答,所述载体的施用是为了建立对于质粒介导的补充给药法有用的任何特定核酸序列在组织中在一定水平上的受控表达。用于施用载体的优选手段和用于递送的制剂的应用在上文中得到描述。

在以溶液、悬浮液或胶体形式简单注射 DNA 颗粒到肌肉内后,肌细胞具有从细胞外间隙摄入 DNA 的独特能力。通过这种方法表达 DNA 可以持续数月。DNA 摄入肌细胞内可通过利用体内电穿孔而被进一步增强。

所配制的 DNA 载体的递送包括将 DNA 整合到大分子复合物中,所述大分子复合物经历靶细胞的胞吞作用。此类复合物可以包括脂质、蛋白质、碳水化合物、合成的有机化合物或无机化合物。用载体形成

的复合物的特征（大小、电荷、表面特征、组成）决定了载体在机体内的生物利用率。制剂的其他成份用作与细胞表面上或内部的特异性受体相互作用的配体。制剂的其他成份用于增强进入细胞、从内体中释放和进入细胞核。

递送还可以通过 DNA 转运体的使用。DNA 转运体指与 DNA 载体结合并能够被表皮细胞吸收的分子。DNA 转运体包含能够与 DNA 非共价结合且有效将 DNA 转运通过细胞膜的分子复合物。优选地，转运体还将 DNA 转运通过核膜。参见，例如，下述申请，所有这些申请（包括附图）引入本文作为参考：（1）Woo 等人，标题为 "A DNA Transporter System and Method of Use" 的美国专利号 6,150,168；（2）Woo 等人，于 1993 年 3 月 19 日提交、标题为 "A DNA Transporter System and method of Use" 的 PCT/US93/02725；（3）Woo 等人，美国专利号 6,177,554，"Nucleic Acid Transporter Systems and Methods of Use"；（4）Szoka 等人，标题为 "Self-Assembling Polynucleotide Delivery System" 的美国专利号 5,955,365；以及（5）Szoka 等人，于 1993 年 4 月 5 日提交、标题为 "Self-Assembling Polynucleotide Delivery System" 的 PCT/US93/03406。

另一种递送方法牵涉 DNA 转运体系统。DNA 转运体系统由包含几种成份的颗粒组成，所述成份独立地且非共价地与 DNA 结合。每个成份由识别特异性受体的配体或其他功能性基团例如与结合 DNA 的阳离子基团复合的蛋白质组成。可以使用的阳离子的例子有精胺、精胺衍生物、组蛋白、阳离子肽和/或聚赖氨酸；一个成份能够与 DNA 载体以及靶细胞上的细胞表面受体结合。此类成份的例子是与脱唾液酸糖蛋白受体、叶酸受体、甘露糖-6-磷酸受体或肉碱受体相互作用的有机化合物。第二个成份能够与 DNA 载体以及核膜上的受体结合。核配体能够识别并将转运体系统运输通过核膜。此类配体的一个例子是来自 SV40 大 T 抗原或组蛋白的核靶向序列。第三个成份能够与 DNA 载体以及诱导游离体裂解的成份结合。实例包括灭活的病毒颗粒例如腺病毒、与流感病毒血凝素相关的肽、或上文引用的 Skoka 专利中描述的 GALA

肽。

施用还可涉及脂质。脂质可以形成脂质体，它是中空球状囊泡，由以单层、双层或多层形式排列的脂质以及用于捕获水溶性化合物例如 DNA 的内部含水空间组成，直径大小为 0.05 微米至数微米。脂质不形成脂质体也可以是有用的。具体例子包括阳离子脂质和包含 DOPE 的复合物的使用，其与 DNA 以及与靶细胞的膜相互作用以促进 DNA 进入细胞内。

基因递送还可通过移植经基因改造的细胞来完成。例如，被称为成肌细胞的未成熟的肌细胞可以用于携带基因进入肌纤维。经基因改造为表达重组人生长激素的成肌细胞可以将生长激素分泌到动物血液中。整合的基因的分泌可以持续高达 3 个月的时间段。

成肌细胞最终分化并融合为现有的肌肉组织。因为细胞被整合入现有结构中，所以它不仅是被耐受的而且是被培养的。通过提取来自需要质粒介导的补充给药法的个体的肌肉组织可以容易地获得成肌细胞，并且经基因改造的细胞还可以容易地放回去而不引起患者肌肉损伤。类似地，角质形成细胞可以用于将基因递送给组织。大量的角质形成细胞可以通过小活组织检查物的培养来产生。培养物可以制备为成层的薄片，并且当移植给人时产生表皮，所述表皮持续改善组织质量许多年。在培养时通过用合适的载体转染角质形成细胞而对角质形成细胞进行基因改造。尽管角质形成细胞通过将表皮与真皮分开的基底膜而与循环分隔开，但人角质形成细胞将产生的蛋白质分泌到循环中。

递送还可涉及病毒载体的使用。例如，通过用本发明中所述的载体元件（包括启动子、5'UTR，3'UTR 和核酸盒）替代病毒基因组的 E1 和 E3 区，并将这个重组基因组导入 293 细胞中，可以构建腺病毒载体，所述 293 细胞将把这个基因包装入感染性病毒颗粒。来自这种细胞的病毒随后可以用于感染离体或体内组织以将该载体导入组织中，导致核酸盒中的基因的表达。

载体

术语“载体”用于指可以向其中插入核酸序列以导入细胞内的承载体核酸分子，在一些实施方案中，它可以在所述细胞中进行复制。核酸序列对于动物可以是天然的，或者它可以是“外源的”，这表示它对于将向其中导入载体的细胞来说是外来的，或者表示该序列与细胞中的序列是同源的，但位于在那里通常找不到该序列的宿主细胞核酸内位置处。载体包括质粒、粘粒、病毒（噬菌体、动物病毒和植物病毒）、线性 DNA 片段以及人工染色体（例如，YACs、BACs），尽管在一个优选实施方案中，载体基本上不包含病毒序列。本领域技术人员将会是经良好训练的，以通过标准重组技术来构建载体。

术语“表达载体”指任何类型的基因构建体，它包括编码能够被转录的 RNA 的核酸。在某些情况下，RNA 分子随后被翻译成蛋白质、多肽或肽。在其他情况下，这些序列是不翻译的，例如在产生反义分子或核酶的情况下。表达载体可以包含各种“控制序列”，这指对于有效连接的编码序列在特定宿主细胞中的转录和可能的翻译所必需的核酸序列。除了管理转录和翻译的控制序列外，载体和表达载体还可包含也用作其他功能的核酸序列，其在下文中进行描述。

质粒载体

在某些实施方案中，考虑将来自质粒载体的线性 DNA 片段用于转染真核细胞，特别是哺乳动物细胞。一般而言，包含复制子和来源于与宿主细胞相容的物种的控制序列的质粒载体与这些宿主结合使用。载体通常携带复制位点以及标记序列，所述标记序列在经转化的细胞中能够提供表型选择。在非限制性例子中，大肠杆菌（*E. coli*）通常利用 pBR322 或 pUC（来源于大肠杆菌物种的质粒）的衍生物进行转化。pBR322 包含氨苄青霉素和四环素抗性的基因，因此提供了用于鉴别经转化的细胞的简便手段。其他质粒包含卡那霉素或新霉素基因，或具有非抗生素选择机制。pBR 质粒或其他微生物质粒或噬菌体还应当包含，或经修饰而包含，例如可以被微生物体用于表达其自身蛋白质的

启动子。技术人员将认识到，本领域的任何质粒均可进行修饰以用于本发明的方法中。在一个具体实施方案中，例如，用于治疗应用的 GHRH 载体是合成产生的并且具有卡那霉素抗性基因。

此外，包含复制子和与宿主微生物相容的控制序列的噬菌体载体可以用作与这些宿主相关的转化载体。例如，噬菌体 λ GEMTM-11 可以用于制备能够用于转化宿主细胞例如大肠杆菌 LE392 的重组噬菌体载体。

其他有用的质粒载体包括 pIN 载体(Inouye 等人, 1985); 和 pGEX 载体，其用于产生谷胱甘肽 S-转移酶可溶性融合蛋白以用于随后的纯化和分离或切割。其他合适的融合蛋白是具有 β -半乳糖苷酶、泛素等的那些。

包含表达载体的细菌宿主细胞例如大肠杆菌生长在许多种合适的培养基中的任何一种之中，例如 LB。如本领域技术人员将会理解的，某些载体中的重组蛋白质的表达可以如此进行诱导，即通过将宿主细胞与对某些启动子特异的试剂接触，例如向培养基中加入 IPTG，或将孵育转为更高的温度。将细菌进一步培养一段时间（一般为 2-24 小时）后，通过离心收集细胞并进行洗涤以去除残留的培养基。

启动子和增强子

启动子是控制序列，所述控制序列是在此处控制基因产物转录的起始和速度的核酸序列区域。它可以包含这样的基因元件，在所述基因元件处调节蛋白和分子可以结合例如 RNA 聚合酶及其他转录因子以起始核酸序列的特异性转录。短语“有效定位”、“有效连接”、“在控制下”以及“在转录控制下”表示，启动子处于对于核酸序列来说正确的功能位置和/或定位中以控制那个序列的转录起始和/或表达。

启动子一般包括用于定位关于 RNA 合成的起始位点的序列。启动子最有名的例子是 TATA 框，但在某些启动子中缺少 TATA 框，例如哺乳动物末端脱氧核苷酸转移酶基因的启动子以及 SV40 晚期基因的启动子，覆盖起始位点本身的分立元件帮助固定起始位置。另外的启动

子元件调节转录起始的频率。通常,这些定位在起始位点上游 30 - 110 bp 区域内, 尽管已显示许多启动子在起始位点下游也包含功能性元件。为了产生在启动子控制下的编码序列, 将转录阅读框的转录起始位点的 5'端定位在所选启动子的下游(即 3'端)。“上游”启动子刺激 DNA 的转录并且促进编码的 RNA 的表达。

启动子元件之间的间隔常常是可变的, 因此当元件相对于彼此倒置或进行移动时启动子功能被保留。在胸苷激酶(timidine kinase)(tk)启动子中, 在活性开始减退前启动子元件之间的间隔可以增至相距 50 bp。取决于启动子, 看起来单个元件可以合作或独立地发挥作用以激活转录。启动子可以与“增强子”结合或不结合使用, 增强子指参与核酸序列的转录激活的顺式作用调节序列。

启动子可以是与核酸序列天然联合的, 如可以通过分离位于编码区段和/或外显子上游的 5'非编码序列而获得。此类启动子可以被称为“内源的”。类似地, 增强子可以是与核酸序列天然联合的, 位于那个序列的下游或上游。可替代地, 通过将编码性核酸区段置于重组、合成或异源启动子的控制下将得到一定的好处, 所述重组、合成或异源启动子指在其自然环境中通常不与核酸序列联合的启动子。重组、合成或异源增强子同样也指在其自然环境中通常不与核酸序列联合的增强子。这样的启动子或增强子可以包括其他基因的启动子或增强子, 以及从任何其他病毒或者原核或真核细胞分离出的启动子或增强子, 以及非“天然发生的”启动子或增强子(即包含不同转录调节区的不同元件和/或改变表达的突变)。例如, 在重组 DNA 构建中最常使用的启动子包括 β -内酰胺酶(青霉素酶)、乳糖和色氨酸(trp)启动子系统。除了合成产生启动子和增强子的核酸序列外, 与本文所公开的组合物有关地, 利用重组克隆和/或核酸扩增技术包括 PCRTM也可以产生序列(参见美国专利号 4,683,202 和 5,928,906, 每一个均引入本文作为参考)。此外, 考虑了还可采用在非核细胞器例如线粒体、叶绿体等内指导序列的转录和/或表达的控制序列。

自然, 采用有效指导 DNA 片段在选择用于表达的细胞器、细胞类

型、组织、器官或生物体中的表达的启动子和/或增强子将是重要的。分子生物学领域的技术人员通常知道用于蛋白质表达的启动子、增强子和细胞类型组合的使用。所采用的启动子可以是组成型的、组织特异性的、诱导型的和/或在适当条件下可用于指导所导入的 DNA 区段高水平表达的，例如在重组蛋白质和/或肽的大规模生产中是有利的。启动子可以是异源的或内源的。

另外，任何启动子/增强子组合（按照例如 Eukaryotic Promoter Data Base, EPDB, <http://www.epd.isb-sib.ch/>）也可以用于驱动表达。使用 T3、T7 或 SP6 胞质表达系统是另一种可能的实施方案。如果合适的细菌聚合酶作为递送复合物的一部分或作为另外的基因表达构建体来提供，则真核细胞可以支持从某些细菌启动子的胞质转录。

表 1 和 2 列出了在本发明范围内可以用于调节 RNA 表达的元件/启动子的非限制性例子。表 2 提供了诱导型元件的非限制性例子，所述诱导型元件是可以响应特定刺激而被激活的核酸序列的区域。

表 1	
启动子和/或增强子	
启动子/增强子	相关参考文献
β -肌动蛋白	(Kawamoto 等人, 1988; Kawamoto 等人, 1989)
肌肉肌酸激酶 (MCK)	(Horlick 和 Benfield, 1989; Jaynes 等人, 1988)
金属硫蛋白 (MTII)	(Inouye 等人, 1994; Narum 等人, 2001; Skroch 等人, 1993)
白蛋白	(Pinkert 等人, 1987; Tronche 等人, 1989)
β -珠蛋白	(Tronche 等人, 1990; Trudel 和 Costantini, 1987)
胰岛素	(German 等人, 1995; Ohlsson 等人, 1991)
大鼠生长激素	(Larsen 等人, 1986)
肌钙蛋白 I (TN I)	(Lin 等人, 1991; Yutzey 和 Konieczny, 1992)
血小板衍生生长因子	(Pech 等人, 1989)
杜兴肌营养不良	(Klamut 等人, 1990; Klamut 等人, 1996)

巨细胞病毒 (CMV)	(Boshart 等人, 1985; Dorsch-Hasler 等人, 1985)
合成的肌肉特异性启动子	(Draghia-Akli 等人, 1999; Draghia-Akli 等人, 2002c; Li 等人, 1999)

表 2	
元件/诱导物	
元件	诱导物
MT II	佛波酯 (TFA) 重金属
MMTV (小鼠乳腺肿瘤病毒)	糖皮质激素
β -干扰素	Poly (rI) x / Poly (rc)
腺病毒 5 E2	E1A
胶原酶	佛波酯 (TPA)
溶基质素	佛波酯 (TPA)
SV40	佛波酯 (TPA)
鼠 MX 基因	干扰素, 新城疫病毒
GRP78 基因	A23187
α -2-巨球蛋白	IL-6
波形蛋白	血清
I 类 MHC 基因 H-2 κ b	干扰素
HSP70	E1A, SV40 大 T 抗原
增殖蛋白	佛波酯-TPA
肿瘤坏死因子 α	PMA
促甲状腺激素 α 基因	甲状腺激素

组织特异性启动子或元件的鉴定, 以及表征其活性的测定法是本领域技术人员众所周知的。此类区域的非限制性例子包括人 LIMK2 基因 (Nomoto 等人, 1999)、促生长激抑制素受体 2 基因 (Kraus 等人, 1998)、鼠附睾视黄酸结合基因 (Lareyre 等人, 1999)、人 CD4 (Zhao-Emonet 等人, 1998)、小鼠 α 2 (XI) 胶原 (Liu 等人, 2000;

Tsumaki 等人, 1998)、D1A 多巴胺受体基因 (Lee 等人, 1997)、胰岛素样生长因子 II (Dai 等人, 2001; Wu 等人, 1997)、以及人血小板内皮细胞粘附分子-1 (Almendo 等人, 1996)。

在一个优选实施方案中, 利用合成的肌启动子, 例如 SPc5-12 (Li 等人, 1999), 它包含来自邻近的自骨骼 α -肌动蛋白的血清效应元件 (“SRE”)、多个 MEF-2 位点、MEF-1 位点和 TEF-1 结合位点, 并且极大地超过了天然肌原性启动子的转录能力。此类合成启动子的独特性是超过例如下列所颁发的专利的重要改进, 涉及肌原性启动子及其用途的专利 (例如, 美国专利号 5,374,544) 或涉及用于核酸序列的肌原性表达的系统的专利 (例如, 美国专利号 5,298,422)。在一个优选实施方案中, 本发明中采用的启动子不通过内源性细胞机制或因素而明显关闭或降低活性。依照本发明的这个实施方案可以使用其他元件, 包括反式作用因子结合位点和增强子。在一个可选择的实施方案中, 采用天然的肌原性启动子, 并且技术人员知道如何从数据库中获得这样的启动子序列, 所述数据库包括 National Center for Biotechnology Information (“NCBI”) GenBank 数据库或 NCBI PubMed 网站。技术人员知道这些数据库可以用于获得与本发明有关的序列或相关文献。

起始信号和内部核糖体结合位点

特异性的起始信号也可以是编码序列的有效翻译所必需的。这些信号包括 ATG 起始密码子或邻接序列。可能需要提供外源性翻译控制信号, 包括 ATG 起始密码子。本领域普通技术人员将能够容易地确定这一点并提供必需的信号。众所周知, 起始密码子应当是在所需编码序列的阅读框的“框内的”, 以确保整个插入片段的翻译。外源性翻译控制信号和起始密码子可以是天然的或合成的。通过包含合适的转录增强子元件可以增强表达的效率。

在本发明的某些实施方案中, 内部核糖体进入位点 (“IRES”) 元件的用途是用于形成多基因或多顺反子信息。IRES 元件能够绕过 5'

甲基化帽依赖性翻译的核糖体扫描模式并且在内部位点上开始翻译 (Pelletier 和 Sonenberg, 1988)。已经描述了来自小 RNA 病毒科的两个成员 (脊髓灰质炎和脑心肌炎病毒) 的 IRES 元件 (Pelletier 和 Sonenberg, 1988) 以及来自哺乳动物信息的 IRES (Macejak 和 Sarnow, 1991)。IRES 元件可以与异源的开放阅读框连接。多个开放阅读框可以一起转录, 每个由 IRES 隔开, 产生多顺反子信息。借助于 IRES 元件, 每个开放阅读框对于核糖体来说是可接近的以有效翻译。多基因可以利用单个启动子/增强子来有效表达以转录单个信息(参见美国专利号 5,925,565 和 5,935,819, 每个引入本文作为参考)。

多克隆位点

载体可以包括 MCS, 这是包含多个限制性内切酶位点的核酸区域, 它们中的任何一个均可与标准重组技术结合使用以消化载体 (参见, 例如 (Carbonelli 等人, 1999; Cocea, 1997; Levenson 等人, 1998), 引入本文作为参考)。“限制性内切酶消化”指用只在核酸分子的特定位置处起作用的酶来催化切割核酸分子。这些限制性内切酶中的许多是市售的。此类酶的用途被本领域技术人员广泛了解。通常, 利用在 MCS 内切割的限制性内切酶将载体线性化或片段化, 以使得外源序列能够与载体连接。“连接 (ligation)”指在两个核酸片段之间形成磷酸二酯键的过程, 所述核酸片段可以是或不是互相邻近的。涉及限制性内切酶和连接反应的技术是重组技术领域技术人员众所周知的。

剪接位点

大多数转录出的真核 RNA 分子将经历 RNA 剪接以从初级转录物中去除内含子。包含基因组真核序列的载体可能需要供体和/或接受体剪接位点以确保用于蛋白质表达的转录物的正确加工 (参见, 例如 (Chandler 等人, 1997))。

终止信号

本发明的载体或构建体将一般包括至少一个终止信号。“终止信号”或“终止子”包括在 RNA 转录物被 RNA 聚合酶特异性终止中所牵涉的 DNA 序列。因此，在某些实施方案中，考虑了结束 RNA 转录物的产生的终止信号。终止子在体内可能是必需的以达到所需的信息水平。

在真核系统中，终止子区域还可包括特定的 DNA 序列，其允许新转录物进行位点特异性切割以便暴露多腺苷酸化位点。这用信号告知专有的内源性聚合酶将约 200 个 A 残基（“polyA”）的延伸片段加到转录物的 3' 末端。用这种 polyA 尾修饰的 RNA 分子表现得更稳定且更有效地进行翻译。因此，在涉及真核生物的其他实施方案中，优选地，终止子包括用于 RNA 的切割的信号，并且更优选地，终止子信号促进信息的多腺苷酸化。终止子和/或多腺苷酸化位点元件可以用于增强信息水平并且使从盒阅读到其他序列的情况减到最小。

考虑用于本发明的终止子包括本文所描述的或本领域普通技术人员已知的任何已知转录终止子，包括但不限于，例如，基因的终止序列，例如牛生长激素终止子或病毒的终止序列，例如 SV40 终止子。在某些实施方案中，终止信号可以缺少可转录的或可翻译的序列，例如由于序列截短。

多腺苷酸化信号

在表达中，特别是在真核生物表达中，一般将包括多腺苷酸化信号以实现转录物的正确多腺苷酸化。不认为多腺苷酸化信号的性质是成功实践本发明的关键，并且可以采用任何这样的序列。优选的实施方案包括方便且已知在各种靶细胞中作用良好的 SV40 多腺苷酸化信号、骨骼 α 肌动蛋白 3'UTR、或者人或牛生长激素多腺苷酸化信号。多腺苷酸化可以增加转录物的稳定性或可以促进胞质运输。

复制起点

为了在宿主细胞中繁殖载体，它可以包含一个或多个复制起始位

点（通常称为“ori”），这是于此处起始复制的特定核酸序列。可替代地，如果宿主细胞是酵母，则可以采用自主复制序列（“ARS”）。

可选择的和可筛选的标记

在本发明的某些实施方案中，包含本发明的核酸构建体的细胞通过在表达载体中包含标记而可以在体外或体内进行鉴定。此类标记将赋予细胞可鉴定的改变，允许容易地鉴定包含该表达载体的细胞。一般地，选择标记是赋予允许进行选择的特性的标记。正选择标记是其中标记的存在允许它的选择的标记，而负选择标记是其中它的存在妨碍它的选择的标记。正选择标记的例子是药物抗性标记，例如卡那霉素。

通常，包含药物选择标记可帮助克隆和鉴定转化体，例如，赋予新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、zeocin 和组氨醇抗性的基因是有用的选择标记。除了赋予允许基于条件的实现来区分转化体的表型的标记之外，还考虑了其他类型的标记，包括可筛选标记例如 GFP，GFP 的基础是比色分析。可替代地，可以采用可筛选的酶例如单纯疱疹病毒胸苷激酶（“tk”）或氯霉素乙酰转移酶（“CAT”）。本领域技术人员还将知道如何采用免疫学标记，其可能与 FACS 分析相结合。不认为所用的标记是重要的，只要它能够与编码基因产物的核酸同时表达。可选择的和可筛选的标记的进一步例子是本领域技术人员众所周知的。

诱变

当采用时，通过各种标准的导致诱变的操作过程来完成诱变。突变是这样的过程，即通过此过程在生物体的量或结构方面发生改变。突变可以包括单基因、基因群或整条染色体的核苷酸序列的修饰。单基因中的改变可以是点突变的结果，所述点突变包括 DNA 序列中的单个核苷酸碱基的去除、添加或置换，或者它们可以是涉及大量核苷酸插入或删除的改变的结果。

突变可以作为事件的结果而自发地发生，所述事件例如为在 DNA 复制保真度或转座遗传因子（转座子）于基因组内移动方面的错误。它们还在暴露于化学或物理诱变因素之后而被诱导。此类诱导突变的因素包括电离辐射、紫外线以及各种系列的化学制品，例如烷化剂和多环芳烃，所有这些均能够与核酸直接地或间接地（一般通过某些代谢性生物转化）相互作用。当受影响的 DNA 进行复制或修复时，由这样的环境因素诱导的 DNA 损伤可以导致碱基序列的修饰，并因此导致突变。通过使用特殊的靶向方法，突变还可以是定点的。

定点诱变

结构指导的位点特异性诱变代表了用于剖析和改造蛋白质-配体相互作用的有力工具 (Wells, 1996, Braisted 等人, 1996)。该技术为通过将一个或多个核苷酸序列改变导入所选 DNA 中来制备和测试序列变体作好了准备。

位点特异性诱变使用特异的寡核苷酸序列，它编码具有所需突变以及足够数量的邻近且未修饰的核苷酸的 DNA 序列。以这种方式，提供了具有足够大小和复杂性的引物序列以在被横跨的缺失接点两侧形成稳定的双链体。长度为约 17 - 25 个核苷酸的引物是优选的，在被改变的序列的接点两侧有约 5 - 10 个残基。

该技术一般采用以单链和双链形式存在的噬菌体载体。在定点诱变中有用的载体包括诸如 M13 噬菌体的载体。这些噬菌体载体是市售的，并且它们的使用一般是本领域技术人员众所周知的。双链质粒也经常用于定点诱变，它消除了将目的基因从噬菌体转移到质粒的步骤。

一般而言，首先获得单链载体，或将双链载体的两条链解开，它在其序列中包括编码所需蛋白质或基因元件的 DNA 序列。随后将合成制备的且具有所需突变序列的寡核苷酸引物与单链 DNA 制备物一起进行退火，当选择杂交条件时考虑错配程度。对杂交产物施用 DNA 聚合酶例如大肠杆菌聚合酶 I (Klenow 片段) 以便完成具有突变的链的合成。因此，形成了异源双链体，其中一条链编码原始的无突变的序列，

和第二条链具有所需突变。这个异源双链载体随后用于转化合适的宿主细胞，例如大肠杆菌细胞，并且选择出包括具有突变的序列排列的重组载体的克隆。

通过其中检查所有 19 种氨基酸置换的饱和诱变可以最好地获得关于蛋白质给定残基的功能重要性和信息含量的全面信息。这种方法的缺点是多残基饱和诱变的逻辑是使人畏缩的 (Warren 等人, 1996, Brown 等人, 1996; Zeng 等人, 1996; Burton 和 Barbas, 1994; Yelton 等人, 1995; Jackson 等人, 1995; Short 等人, 1995; Wong 等人, 1996; Hilton 等人, 1996)。应当要研究成百个并且可能甚至是上千个位点特异性突变体。然而，改进的技术使得突变体的产生和快速筛选要简单得多。还可参见，美国专利号 5,798,208 和 5,830,650，关于“模糊 (walk-through)”诱变的描述。定点诱变的其他方法公开于美国专利 5,220,007; 5,284,760; 5,354,670; 5,366,878; 5,389,514; 5,635,377; 和 5,789,166。

电穿孔

在本发明的某些实施方案中，通过电穿孔将核酸导入细胞器、细胞、组织或生物体内。电穿孔涉及使细胞和 DNA 的悬浮液暴露于高电压放电。在这个方法的某些变化形式中，采用某些降解细胞壁的酶例如降解果胶的酶以使靶受者细胞比未经处理的细胞更易通过电穿孔而进行转化 (美国专利号 5,384,253，引入本文作为参考)。可替代地，通过机械创伤及本领域已知的其他方法可以使受者细胞变得更易转化。

利用电穿孔转染真核细胞已经相当成功。通过这种方式已用人 κ -免疫球蛋白基因转染了小鼠前 B 淋巴细胞 (Potter 等人, 1984)，和已用氯霉素乙酰转移酶基因转染了大鼠肝细胞 (Tur-Kaspa 等人, 1986)。

认为电穿孔的基础现象在所有情况下都是相同的，但造成所观察到的效应的确切机制仍未阐明。尽管不希望被理论束缚，但电穿孔效

应的明显表现是，在细胞暴露于电脉冲后细胞膜变得暂时能透过大分子。存在穿过细胞壁的管道，它在正常情况下通过允许双向离子迁移而维持大约 90 mV 的静息跨膜电位。

尽管不希望被理论束缚，但电穿孔利用相同的结构，通过强迫高离子通量穿过这些结构并打开或扩大这些管道。在现有技术中，将金属电极与组织接触放置，并且将与电极之间的距离成比例的预定电压施加在它们上。根据公式 $E = V/d$ ，其中（“ E ”）为电场、（“ V ”）为所施加的电压和（“ d ”）为电极之间的距离，用于电穿孔的方案在所得到的场强方面被限定。

当制定用于将药物或大分子递送到受试者细胞内的电穿孔方案时，在现有技术中电场强度 E 是非常重要的值。因此，通过施加与电极之间的距离成比例的预定电压的脉冲可以计算出用于各种方案的任何电场强度。然而，要注意的是电场可以用绝缘电极在组织中产生（即离子流不是产生电场所必需的）。尽管不希望被理论束缚，但正是电流而不是电场本身是成功的电穿孔所必需的。

在电穿孔过程中，所产生的热量是电极间阻抗、电流的平方和脉冲持续时间的乘积。热量是在电穿孔的过程中在组织中产生的，并且可以作为电极间电流、电压和脉冲持续时间的乘积而获得。目前描述的关于电穿孔的方案在所得到的场强 E 方面是被限定的， E 取决于未知电流的短电压脉冲。因此，无法确定组织中产生的电阻或热量，这导致用预定电压的不同脉冲电压电穿孔方案的不同成果。限制越过电极对细胞进行加热的能力可以增加任何给定电穿孔电压脉冲方案的有效性。例如，现有技术教导了 6 个针状电极的阵列的使用，其利用越过相对电极对的预定电压脉冲。这种情况在电穿孔事件过程中在形成适当且相互交错的重叠点的区域中建立了集中模式。沿着电穿孔途径的细胞和组织的过度发热将杀死细胞，并限制方案的有效性。然而，没有相对的对的对称排列的针状电极在电穿孔事件中在不能形成适当电穿孔重叠点的区域中可以产生分散模式。

对电极间电流的控制允许确定细胞的相对发热。因此，正是电流

而不是越过电极的电压决定了任何给定脉冲方案的后续有效性。预定电压不产生预定电流，并且现有技术没有提供确定电流的确切量的方法，这限制了该技术的有用性。因此，与预定电压脉冲相比较时，将组织中两个电极间的电流控制和维持在阈值之下将允许改变脉冲条件，减少细胞发热，产生更少的细胞死亡，和更有效地将大分子整合入细胞中。

通过提供有效控制递送给电极间空间中的细胞的电量的手段可以克服上述问题，所述手段通过精确控制冲击细胞膜中的管道的离子通量。给组织的精确电量可以作为电流水平、脉冲长度和所递送的脉冲数目的乘积而计算出来。因此，本发明的一个具体实施方案可以沿着多个途径将电穿孔电流递送给一定体积的组织而不会在任何一个位置引起过量浓度的累积电流，从而避免了由于组织过热而引起的细胞死亡。

尽管不希望被理论束缚，但待产生的电压脉冲的性质由组织的性质、所选组织的大小以及电极间的距离决定。希望电压脉冲尽可能是同质的并且具有正确的振幅。过量的场强导致细胞裂解，而较低的场强导致电穿孔效率降低。一些电穿孔装置利用电极间的距离来计算用于电穿孔的电场强度和预定电压脉冲。对于知晓电极间距离的这种依赖是电极设计的限制。因为可编程的电流脉冲控制器将决定在电极间一定体积的组织的阻抗，所以电极间的距离不是决定合适电流脉冲的关键因素。因此，针状电极阵列设计的可选择的实施方案将是不对称的实施方案。此外，在不背离本发明的精神和范围的情况下，本领域技术人员可以设想出任何数量的合适的对称和不对称的针状电极阵列。阵列中每个单个电极在所需组织中的深度可以随相当的结果而改变。此外，大分子的多个注射位点可以加到针状电极阵列中。

可以用于有效促进大分子导入所选受试者组织的细胞中的电穿孔装置的一个实例描述于美国专利申请 10/657,725 中，所述专利申请于 2003 年 9 月 8 日提交，标题为 “Constant Current Electroporation Device And Methods Of Use”，Smith 等人列为发明人，其整体引入

本文作为参考。电穿孔装置包括电动装置（“EKD”），其操作由软件或固件来具体制定。EKD 基于脉冲参数的用户控制和输入在阵列中的电极之间产生一系列可编程的恒流脉冲模式，并允许储存和获得电流波形数据。电穿孔装置还包括具有针状电极阵列的可替换的电极盘、用于注射针的中心注射通道以及可移动的导向盘。

限制性内切酶

在本发明的一些实施方案中，通过限制性内切酶消化亲本 DNA 分子而产生线性 DNA 片段。下文提供了限制性内切酶的例子。

名称	识别序列
AatII	GACGTC
Acc65 I	GGTACC
Acc I	GTMKAC
Aci I	CCGC
AcI I	AACGTT
Afe I	AGCGCT
Afl II	CTTAAG
Afl III	ACRYGT
Age I	ACCGGT
Alu I	AGCT
Alw I	GGATC
AlwN I	CAGNNNCTG
Apa I	GGGCCC
ApaL I	GTGCAC
Apo I	RAATTY
Asc I	GGCGCGCC
Ase I	ATTAAT
Ava I	CYCGRG
Ava II	GGWCC
Avr II	CCTAGG
BamH I	GGATCC
Ban I	GGYRCC

Ban II	GRGCYC
Bbs I	GAAGAC
Bbv I	GCAGC
BbvC I	CCTCAGC
BciV I	GTATCC
Bcl I	TGATCA
Bfa I	CTAG
Bgl I	CCN>NNNNGGC
Bgl II	AGATCT
Blp I	GCTNAGC
Bmr I	ACTGGG
Bpm I	CTGGAG
BsaA I	YACGTR
BsaB I	GATNNNNATC
BsaH I	GRCGYC
Bsa I	GGTCTC
BsaJ I	CCNNGG
BsaW I	WCCGGW
BseR I	GAGGAG
Bsg I	GTGCAG
BsiE I	CGRYCG
BsiHKA I	GWGCWC
BsiW I	CGTACG
BsmA I	GTCTC
BsmB I	CGTCTC
BsmF I	GGGAC
Bsm I	GAATGC
BsoB I	CYCGRG
Bsp1286 I	GDGCHC
BspD I	ATCGAT
BspE I	TCCGGA
BspH I	TCATGA
BspM I	ACCTGC
BsrB I	CCGCTC
BsrD I	GCAATG

BsrF I	RCCGGY
BsrG I	TGTACA
Bsr I	ACTGG
BssH II	GCGCGC
BssK I	CCNGG
Bst4C I	ACNGT
BssS I	CACGAG
BstB I	TTCGAA
BstE II	GGTNACC
BstF5 I	GGATGNN
BstN I	CCWGG
BstU I	CGCG
BstY I	RGATCY
BstZ17 I	GTATAC
Bsu36 I	CCTNAGG
Btg I	CCPuPyGG
Btr I	CACGTG
Cac8 I	GCNNGC
Cla I	ATCGAT
Dde I	CTNAG
Dpn I	GATC
Dpn II	GATC
Dra I	TTTAAA
Eae I	YGGCCR
Eag I	CGGCCG
Ear I	CTCTTC
Eci I	GGCGGA
Eco0109 I	RGGNCCY
EcoR I	GAATTC
EcoR V	GATATC
Fau I	CCCGCNNNN
Fnu4H I	GCNGC
Fok I	GGATG
Fse I	GGCCGGCC
Fsp I	TGCGCA

Hae II	RGCGCY
Hae III	GGCC
Hga I	GACGC
Hha I	GCGC
Hinc II	GTYRAC
Hind III	AAGCTT
Hinf I	GANTC
HinP1 I	GCGC
Hpa I	GTTAAC
Hpa II	CCGG
Hph I	GGTGA
Kas I	GGCGCC
Kpn I	GGTACC
Mbo I	GATC
Mbo II	GAAGA
Mfe I	CAATTG
Mlu I	ACGCGT
Mnl I	CCTC
Msc I	TGGCCA
Mse I	TTAA
MspA1 I	CMGCKG
Msp I	CCGG
Nae I	GCCGGC
Nar I	GGCGCC
Nci I	CCSGG
Nco I	CCATGG
Nde I	CATATG
NgoMI V	GCCGGC
Nhe I	GCTAGC
Nla III	CATG
Nla IV	GGNNCC
Not I	GCGGCCGC
Nru I	TCGCGA
Nsi I	ATGCAT
Nsp I	RCATGY

Pac I	TTAATTAA
Paer7 I	CTCGAG
Pci I	ACATGT
PleI	GAGTC
Pme I	GTTTAAAC
Pml I	CACGTG
PpuM I	RGWCCY
Psi I	TTATAA
PspG I	CCWGG
PspOM I	GGGCCC
Pst I	CTGCAG
Pvu I	CGATCG
Pvu II	CAGCTG
Rsa I	GTAC
Rsr II	CGGWCCG
Sac I	GAGCTC
Sac II	CCGCGG
Sal I	GTCGAC
Sap I	GCTCTTC
Sau3A I	GATC
Sau96 I	GGNCC
Sbf I	CCTGCAGG
Sca I	AGTACT
ScrF I	CCNGG
SexA I	ACCWGGT
SfaN I	GCATC
Sfc I	CTRYAG
Sfo I	GGCGCC
SgrA I	CRCCGGYG
Sma I	CCCGGG
Sml I	CTYRAG
SnaB I	TACGTA
Spe I	ACTAGT
Sph I	GCATGC
Ssp I	AATATT

Stu I	AGGCCT
Sty I	CCWWGG
Swa I	ATTTAAAT
Taq I	TCGA
Tfi I	GAWTC
Tli I	CTCGAG
Tse I	GCWGC
Tsp45 I	GTSAC
Tsp509 I	AATT
TspR I	CAGTG
Tth111 I	GACNNNGTC
Xba I	TCTAGA
Xho I	CTCGAG
Xma I	CCCGGG
Xmn I	GAANNNTTC

如本文所使用的，术语 DNA 的“限制性内切酶消化”指用只在 DNA 的某些位置处起作用的酶来催化切割 DNA。这样的酶被称为限制性内切核酸酶，并且每一种酶所特异性针对的位点被称为限制性位点。本文所使用的各种限制性内切酶都是市售的，并且使用由酶供应商所制定的其反应条件、辅助因子及其他要求。限制性内切酶通常由缩写来标示，所述缩写的组成为：一个大写字母，随后为代表每种限制性内切酶最初从其中获得的微生物的其他字母，以及随后为指明特定酶的数字。一般而言，在约 20 μ l 缓冲液中使用约 1 μ g 的质粒或 DNA 片段和约 1-2 个单位的酶。厂商详细说明了对于特定的限制性内切酶来说合适的缓冲液和底物量。使用限制性内切酶以确保质粒的完整性和正确性。

实施例

包括了下述实施例以证明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解，下文实施例中所公开的技术代表本发明人发现的在本发

明实践中作用良好的技术，因而可以被视为构成其实践的优选模式。然而，本领域技术人员根据本公开内容应当理解，在公开的具体实施方案中可以进行许多改变并且仍获得同样或相似的结果，而不背离本发明的精神和范围。

实施例 1

DNA 载体的构建和在动物受试者中的方法

DNA 构建体：为了增强疫苗接种应答并改善受试者在感染性攻击后的临床结果，首先必需设计几种 GHRH 构建体。简言之，质粒载体包含连接在野生型物种特异性或类似的 GHRH 上的肌肉特异性合成启动子 SPc5-12 (SEQID#15) (Li 等人, 1999)。一些野生型 GHRH 序列在我们实验室中进行克隆 (犬、猫和马)；其他的 (鸡、羊、牛、猪、人) 根据专门的文献进行合成。如所描述的 (Draghia-Akli 等人, 1999)，通过定点诱变产生类似的 GHRH 序列。简言之，通过 GHRH cDNA 的定点诱变产生哺乳动物 GHRH 类似物 cDNA (SEQID#18) (Altered Sites II *in vitro* Mutagenesis System, Promega, Madison, WI)，并将其克隆到 pSPc5-12 的 BamHI/Hind III 位点内，以产生特异的 GHRH 构建体。将生长激素的 3' 非翻译区 (3'UTR) 克隆到 GHRH cDNA 的下游。所得到的质粒包含类似的哺乳动物 GHRH 编码序列，并且所得到的氨基酸序列在哺乳动物中不是天然存在的。尽管不希望被理论束缚，但增强疫苗接种应答并改善受试者在感染性攻击后的临床结果最终由 GHRH 激素的循环水平决定。几种不同的质粒编码 GHRH 或其功能性生物学等价物的不同的突变型或野生型氨基酸序列，例如：

质粒

编码的氨基酸序列

HV-GHRH (SEQID#1) :

HVDAIFTNSYRKVL**A**QLSARKLLQDI**LN**RQQGERN**QE**QGA-OH

猪-GHRH (SEQID#2) :

YADAIIFTNSYRKVL**G**QLSARKLLQDI**MS**RQQGERN**QE**QGA-OH

牛-GHRH (SEQID#3) :

YADAIIFTNSYRKVL**G**QLSARKLLQDI**MN**RQQGERN**QE**QGA-OH

犬-GHRH (SEQID#4) :

YADAI FTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGERNREQGA-OH

猫-GHRH (SEQID#5) :

YADAI FTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGERNREQGA-OH

TI-GHRH (SEQID#6) :

YIDAI FTNSYRKVLAQLSARKLLQDILNRQQGERNREQGA-OH

羊-GHRH (SEQID#7) :

YADAI FTNSYRKILGQLSARKLLQDIMNRQQGERNREQGA-OH

鸡-GHRH (SEQID#8) :

HADGIFSKAYRKLLGQLSARNYLHSLMAKRVGSGLGDEAEPLS-OH

马-GHRH (部分的) (SEQID#9) :

-ADAI FTNNYRKVLGQLSARKILQDIMSR-----OH

人-GHRH (SEQID#10) :

YADAI FTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESNQERGA-OH

TV-GHRH (SEQID#11) :

YVDAI FTNSYRKVLAQLSARKLLQDILNRQQGERNREQGA-OH

TA-15/27/28-GHRH (SEQID#12) :

YADAI FTNSYRKVLAQLSARKLLQDILNRQQGERNREQGA-OH .

一般而言, 编码的 GHRH 或其功能性生物学等价物的通式为:

-X₁-X₂-DAIFTNSYRKVL-X₃-QLSARKLLQDI-X₄-X₅-RQQGE-X₆-N-X₇-E-X₈-GA-OH (SEQID#14),

其中: X₁是选自酪氨酸(“Y”)或组氨酸(“H”)的氨基酸的 D-或 L-异构体; X₂是选自丙氨酸(“A”)、缬氨酸(“V”)或异亮氨酸(“I”)的氨基酸的 D-或 L-异构体; X₃是选自丙氨酸(“A”)或甘氨酸(“G”)的氨基酸的 D-或 L-异构体; X₄是选自甲硫氨酸(“M”)或亮氨酸(“L”)的氨基酸的 D-或 L-异构体; X₅是选自丝氨酸(“S”)或天冬酰胺(“N”)的氨基酸的 D-或 L-异构体; X₆是选自精氨酸(“R”)或丝氨酸(“S”)的氨基酸的 D-或 L-异构体; X₇是选自精氨酸(“R”)或谷氨酰胺(“Q”)的氨基酸的 D-或 L-异构体; 和 X₈是选自精氨酸(“R”)或谷氨酰胺(“Q”)的氨基酸的 D-或 L-异构体。

上述质粒不包含多位点接头、IGF-I 基因、骨骼 α-肌动蛋白启动子或骨骼 α 肌动蛋白 3' UTR /NCR。此外, 如下所述通过肌肉注射以

及随后体内电穿孔来导入这些质粒。

关于“功能性生物学等价物”，技术人员会很好地理解，对于改变数目具有限制这一观念为“生物学上功能等价的”蛋白质和/或多核苷酸的定义所固有，所述改变可以在分子的指定部分内进行而同时保留具有可接受水平的等价生物学活性的分子。因此，功能性生物学等价物在本文中被定义为所选氨基酸（或密码子）可以被置换的那些蛋白质（和多核苷酸）。包含 GHRH 的功能性生物学等价物的肽是这样的多肽，其已被改造为含有不同的氨基酸序列，而同时具有当与 GHRH 相比较时类似或改进的生物学活性。例如，GHRH 的一种生物学活性是促进受试者中的 GH 分泌。

优化的质粒骨架。本发明的一个方面是优化的质粒骨架。下文提出的合成的质粒包含被对于物种特异性哺乳动物转录来说经合成优化的真核序列。合成优化现有的 pSP-HV-GHRH 质粒（“pAV0125”）（SEQID#22）以形成新质粒（SEQID#25）。质粒 pAV0125 描述于美国专利 6,551,996，所述专利于 2003 年 4 月 22 日颁发，标题为“Super-active porcine growth hormone releasing hormone analog”，Schwartz 等人列为发明人（“the Schwartz ‘996 Patent”），它教导了包含突变的 GHRH 类似物的应用，所述突变提高引起生长激素释放的能力。这种 3,534 bp 的质粒 pAV0125（SEQID #22）包含具有来自不同市售质粒的各种组分的质粒骨架，例如，合成启动子 SPc5-12（SEQID#15）、经修饰的猪 GHRH 序列（SEQID#18）和人生长激素的 3' 末端（SEQID#38）。优化的合成质粒的其他具体例子包括优化的 wt-猪 GHRH 质粒，pAV0225（SEQID#26），图 8；犬 GHRH 质粒，pAV0235（SEQID#27），图 9；牛 GHRH 质粒，pAV0236（SEQID#28），图 10；猫 GHRH 质粒，pAV0238（SEQID#29），图 11；TI-GHRH 质粒，pAV0239（SEQID#30），图 12；羊 GHRH 质粒，pAV0240（SEQID#31），图 13；鸡 GHRH 质粒，pAV0241（SEQID#32），图 14；马 GHRH 质粒，pAV0249（SEQID#33），图 15；人 GHRH 质粒（SEQID#34）。对于此类优化质粒的治疗性编码基因还可包括编码经修饰的 GHRH 分子或其功能性生物学等价物的优化的核酸序列。

实施例 2

质粒注射和电穿孔可以用于向大型动物递送抗原

使用混合性别、年龄为 3-6 周、体重为 15-40 kg 的年幼杂种猪 ($n = 6-7$ /组/实验)。将动物成组养在围栏里, 随意获取 24% 蛋白质饮食 (Producers Cooperative Association, Bryan, TX) 和水。利用市售试剂盒 (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) 获得质粒。如由 Kinetic Chromagenic LAL (Endosafe, Charleston, SC) 所测量的, 内毒素水平低于 $0.01 \text{ EU}/\mu\text{g}$ 。质粒制剂在无菌水中进行稀释, 并用聚 L-谷氨酸钠盐 ($\text{MW} = 10.5 \text{ kDa}$, 平均值) (Sigma, St. Louis, MO) 配制为 1% 重量/重量。在实验的第 0 天, 用手制住动物, 并在 5 针电极阵列的中心利用 21 号针将表达分泌型碱性磷酸酶 (SEAP) 的质粒溶液通过完整无损的皮肤直接注射到半膜肌内。在寻找合适的注射位点时避开所有主要的表面血管。在质粒注射后以预定的时间间隔, 在我们的情况下为 80 毫秒, 开始电穿孔: 5 次脉冲, 长度为 52 毫秒, 电场强度为 0.4-1 Amp, 脉冲间隔为 1 秒。根据 NIH、USDA 和 Animal Welfare Act 指导方针来饲养动物。

血液收集: 在每次实验的第 0、3、7 和 10 天, 在 8:30 AM 对动物进行称重并且通过颈静脉穿刺将血液收集到 MICROTAINER 血清分离管中。允许血液在室温下凝结 10-15 分钟并随后于 $3000 \times g$ 离心 10 分钟, 并将血清储存在 -80°C 直至进一步分析。

分泌型胚胎碱性磷酸酶测定法: 将血清样品解冻, 并利用 Phospha-Light Chemiluminescent Reporter Assay Kit (Applied Biosystems, Bedford, MA) 根据厂商说明分析 $50 \mu\text{L}$ 血清样品的 SEAP 活性。该测定法的检测下限是 3 pg/mL 。在 SEAP 活性测定前将较浓的血清样品在小鼠血清中进行 1:10 稀释。所有样品利用 LUMIstar Galaxy luminometer (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany) 进行读数。

SEAP 蛋白在猪中是具有免疫原性的, 并且当使用直接肌肉注射并

随后电穿孔时,在质粒递送后 10-14 天内发生免疫介导的对该蛋白质的清除(图 1)。因此,SEAP 的表达水平只能在 2 周的时间段内进行研究,并被认为是肌肉质粒转移后基因表达的可靠量度。然而,该技术可以用于递送特异性增强受试者中的免疫功能的其他类型分子。因为可测量的疫苗接种应答通常发生在疫苗接种后大约 14 天,所以合理的是,使用免疫调节剂如 GHRH 的处理可以在疫苗接种前或与疫苗接种操作相伴发生。

实施例 3

在牛中的 GHRH 施用

年龄为 18-20 个月、平均体重为 547 ± 43 kg 的 32 头初产 Holstein 牛在妊娠期的最后三个月期间用 2.5 mg pSP-HV-GHRH 处理一次,并被标示为处理组。类似地,来自相同来源、具有相同品种和年龄的 20 头怀孕小母牛不接受质粒处理而作为对照。动物在年龄为 23 个月 $\pm$ 24 天时产下小牛。牛养在自由的畜棚中并暴露在天然日光中,所述畜棚安装有配备了水雾器(water mister)的鼓风机用于蒸发冷却。每天两次用基于青贮饲料的总混合配给量随意喂养牛群。每头牛配备有转发器/计步器,这允许在进入畜栏时进行自动识别。在这次实验结束时,以它们的组织不进入食物链的方式处理所有用质粒处理的动物。由处理动物产生的所有奶品和组织被销毁并且不进入人类的食物链。根据 National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 来施行动物方案。

肌肉注射质粒 DNA。将 pSPc5-12-HV-GHRH 的不含内毒素的质粒(Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA)制剂在水中稀释为 5 mg/mL,并用聚 L-谷氨酸配制为 1% wt/wt。利用 21G 针(Becton-Dickinson, Franklin Lacks, NJ)在斜方肌中肌肉给予牛总量为 2.5 mg 的 pSP-HV-GHRH。注射 2 分钟后,如所描述的(Draghia-Akli 等人, 2002b),利用 Advisys's EKD 装置并采用下述条件对经注射的肌肉进行电穿孔: 5 次脉冲, 1 Amp, 52 毫秒/脉冲。在电穿孔过程中电压随

组织电阻的改变而改变(以维持恒定电流),并且它被记录为 80-120 V/cm。对于所有注射,将 2cm 的针头通过皮肤插入肌肉中。在注射后立即和 24 小时之后观察动物在电穿孔位点处的任何不良作用。

体重、身体状况和蹄的得分。在处理前,小母牛在相同的经校准的称(与 Weigh Tronix 915A 指示器和 WP233 打印机连接的 Priefert 牛挤压滑运道(squeeze-chute), Central City Scale, Central City, NE)上进行称重并随机进行分组。由对处理组不知情的 2 名独立的乳品动物科学家(Texas A&M University)在处理前、60-80 DIM 以及 100-120 DIM 评估身体状况得分。通过观察和触摸脊椎、腰部和臀部区域来对牛进行评分(Rodenburg, 1996),可能的 BCS 为 1(非常瘦的牛)-5(极其超健壮的牛)。在质粒-GHRH 处理前和 60 DIM 测量蹄得分。蹄得分包括每只足的 0(没有蹄问题)-4(严重的蹄问题)评价。每只蹄给予额外的 2 分,用于评估最终出现的脓肿(1 分)和在任何给定时间的必需治疗(1 分)。可能的蹄得分为 0(没有问题)-24(所有 4 只足上有严重的蹄问题,脓肿,并且每只蹄需要深切治疗)。

全血细胞计数和免疫标记物。在处理前,和在处理 18 和 300 天时,以及在疫苗接种攻击后,将来自所有小母牛的全血收集在 EDTA 中并且进行全血细胞计数分析(Texas Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, College Station, TX)。血液学参数包括:红细胞计数、血细胞比容、血红蛋白、总白细胞计数和不同的淋巴细胞计数(嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞)、血小板计数、平均红细胞容量、平均红细胞血红蛋白、平均红细胞血红蛋白浓度和纤维蛋白原。

在第 0 和 18 天对所有经处理的牛和对照,并在处理后 300 天和在 Biocor-9 疫苗接种攻击后对 20 头经处理的和 10 头对照的牛,测定免疫标记物。利用 Dr. Davis' 实验室(Department of Veterinary Microbiology/Pathology, CVM, Washington State University, Pullman, Washington)开发的单克隆抗体(mAb)通过流式细胞术(FC)

进行分析。在 3-色 FC 中使用 mAb 的组合来确定外周血中外周血单核细胞(PBMC)的不同群体的组成和频率以及 CD4 和 CD8 alpha beta ($\alpha\beta$) T 细胞和 gamma delta ($\gamma\delta$) T 细胞的功能状态。在一些组合中使用特异性相同的两种 mAb 以增加在 CD4 和 CD8 T 细胞上的荧光信号的强度。在所示时间处获得 10 mL 血液并进行处理以用于 FC (Davis 等人, 1995)。血液在 Tris 缓冲的 NH_4Cl 中进行裂解, 在含有酸性柠檬酸葡萄糖的磷酸盐缓冲盐水 (PBS/ACD) 中进行洗涤, 并随后分配在包含不同 mAb 组合的 96 孔圆锥形底部的组织培养板中。细胞在冰上孵育 15 分钟, 在 PBS/ACD 中洗涤 3 次, 并与缀合有荧光素、藻红蛋白或藻红蛋白-Cy5 的同种型特异性山羊抗-小鼠抗体 (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, Caltag Laboratories, Burlingame, CA) 的不同组合一起再孵育 15 分钟。然后, 将细胞洗涤 2 次并在 PBS 缓冲的 2% 甲醛中固定。将细胞保存在冰箱中直至检查。在配备有 Cell Quest 软件的 Becton Dickinson FACSort 上检查细胞。在 Flow Jo (Tree Star, Inc., San Carlos, CA) 和 FCS Express (De Novo software, Thornton, Ontario, Ca) 软件上分析数据。除非另有说明, 数据表示为用特定的单克隆抗体或其组合测定的总群体的百分比 (例如, 总 CD4⁺和 CD4⁻细胞代表 100% 的被测定的细胞; 总 CD2⁻CD3⁻、CD2⁻CD3⁺、CD2⁺CD3⁻或 CD2⁺CD3⁺代表 100% 的用 CD2 和 CD3 抗体测定的细胞, 等)。

生物化学和胰岛素测量。在 60 和 100 DIM 时收集血清样品。将血清进行等分用于 RIA 和生物化学分析, 并在分析之前保存在 -80°C 。生物化学分析在血清收集后 48 小时内发生 (Texas Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, College Station, TX)。血清生物化学终点包括丙氨酸转氨酶、 γ 谷氨酰转移酶、肌酸磷酸激酶、总胆红素、总蛋白、白蛋白、球蛋白、血液尿素氮、肌酸酐、磷、钙和葡萄糖。在血清收集后 90 天内进行胰岛素和 IGF-1 测定。由一个独立的实验室分析样品的葡萄糖和胰岛素水平 (Texas Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, College Station, TX)。所有样品在同一测定中进行分析。胰岛素测定的测定可变性为 3.6%, 而葡萄糖测定

的测定可变性为 4.4%。利用 Bio-Rad 蛋白质测定试剂盒测量血清样品的总蛋白 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。

*IGF-I 的放射免疫测定。*利用异源的人免疫放射分析试剂盒根据厂商的方案 (Diagnostic System Labs, Webster, TX) 来测量血清 IGF-1。该试剂盒采用了提取步骤以消除结合蛋白的干扰。所有样品在同一测定中进行。测定内可变性为 4%。人 IGF-I 抗体对于牛 IGF-1 的交叉反应性为 100%。

*Surround™ 9 疫苗接种：*在研究开始后的 300 天，利用被称为 Surround™ 9 (Biocor) 的 9-way 疫苗对参与本研究（用 GHRH 处理的和对照）的所有动物进行疫苗接种。Surround™ 9 是包含灭活、加以佐剂的、高抗原性的下述微生物株系的多价疫苗：IBR（牛疱疹病毒-1）、BVD（牛病毒性腹泻病毒）、副流感病毒 3、呼吸道合胞病毒（作为被杀死的病毒）、犬钩端螺旋体、感冒伤寒型钩端螺旋体、哈德焦钩端螺旋体、出血黄疸钩端螺旋体和波摩那钩端螺旋体菌苗。所有级分都是灭活的并加以佐剂以维持最大的病毒抗原性。钩端螺旋体血清变型在设计为确保最大生长和抗原性的培养基中产生。这种疫苗接种在牛中引起从腹泻以及乳腺炎病因中所牵涉的病原体到呼吸系统疾病的大量致病状况。在 5 mL 溶液的一次注射中经皮下或肌肉施用该疫苗。

*统计分析。*数据由对处理组（经处理的 $n = 32$ ，对照的 $n = 20$ ）采用不等的实验单位配置在不同时间点进行重复测量而得到的结果组成。当检测到显著的 ($P < 0.05$) 处理-x-天相互作用时，进行额外的比较。使用采用 SAS（简单主要作用的分析）的混合模型来检查在不同时间点上每个变量的组之间是否存在任何显著的差异。通过 ANOVA 分析分类的数据，例如发病率和死亡率、淘汰率和蹄问题。数据用数值编码从而使得可以执行 ANOVA。在这个参数的分析中使用每个动物的总蹄得分。对于死亡率，使用相当的评分系统：活的 = 1，死的 = 0。对于重复测量，用 ANOVA 分析血清 IGF-I。结果中呈现了用 Students t-检验、ANOVA 或线性回归进行比较的值，将 $P < 0.05$ 视为具有统计学

显著性的水平。

实施例 4

用 GHRH 质粒疗法处理并用多价疫苗进行疫苗接种的牛的临床应答

生物化学和 CBC 值：总白细胞计数在组间是相似的。然而，在 300 天时循环淋巴细胞的百分比在用 GHRH 处理的动物中是增加的 ($47.4 \pm 3.3\%$ ，对照为 $37.8 \pm 5.3\%$ ， $P < 0.06$)。在这个时间点上还观察到血红蛋白(用 GHRH 处理的为 $11.55 \pm 0.15\text{g/dL}$ ，对照为 $10.9 \pm 0.15\text{g/dL}$ ， $P < 0.02$)和红细胞(7.65 ± 0.1 百万/mL， 7.3 ± 0.2 百万/mL， $P < 0.07$)的生理学增加。在任何测试时间点上，在其他 CBC 或血清生物化学项目方面，组之间没有发现差异。这些在对于牛来说的值的正常范围内。葡萄糖和胰岛素水平在组间没有不同(图 2)。

免疫标记物：在第 0 天，白细胞总数、分类计数和流式细胞术(FC)特性图在组间是相似的。在处理后的第 18 天时， $\text{CD}2^+$ 值在经处理的动物中增加了 14%，但在对照中与基线值相比较时没有改变：用 GHRH 处理的牛中， $43.4 \pm 1.7\%$ 对 $37.9 \pm 1.4\%$ ， $P < 0.004$ ，和对照中， $37.3 \pm 2.1\%$ 对 $38.8 \pm 1.8\%$)(图 3A)。 $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ 比率在经处理的动物中增加(第 18 天 - 第 0 天 = $8 \pm 0.6\%$ ， $P < 0.04$)，主要是由于 $\text{CD}4^+$ 细胞的增加(第 18 天， $29.1 \pm 0.7\%$ ，第 0 天， $24.5 \pm 0.8\%$)。在相同时间段中， $\text{CD}4^+\text{CD}45\text{R}^+$ 幼稚淋巴细胞通过用 GHRH 处理增加了 53%：在用 GHRH 处理的动物中，第 18 天， $11.1 \pm 0.4\%$ ，第 0 天， $7.4 \pm 0.4\%$ ， $P < 0.016$ ；以及在对照动物中，第 18 天， $8 \pm 0.7\%$ ，第 0 天， $7.2 \pm 0.8\%$)(图 3B)。 $\text{CD}25^+\text{CD}4^+$ 细胞通过处理也明显增加了：在用 GHRH 处理的动物中，第 18 天， $4.3 \pm 0.3\%$ ，第 0 天， 1 ± 0.1 ， $P < 0.001$ ；以及在对照中，第 18 天， $3.8 \pm 0.2\%$ ，第 0 天， 1.7 ± 0.2 。

在处理后的第 300 天，当执行更全面的项目时， $\text{CD}45\text{R}^+/\text{CD}45\text{R}0^-$ 幼稚淋巴细胞在经处理的动物中(0.98 ± 0.08)比在对照中(0.91 ± 0.08)显著($P < 0.05$)更多(图 3C)。 $\text{CD}2^+\text{CD}3^+ \gamma\delta$ -细胞由于处理而变得更多：所有 $\text{CD}2^+$ 细胞的 $68.5 \pm 1.4\%$ ，对照为 $60 \pm 5.6\%$ ， $P < 0.02$ 。

Surround™ 9-way 疫苗接种 (Biocor) 后 2 周, 当执行更全面的项目时, $CD4^+/CD8^+$ 比率在用 GHRH 处理的动物中显著增加, 而它在对照中是减少的: 在用 GHRH 处理的动物中, 0.23 ± 0.07 ; 在对照中, -0.09 ± 0.01 , $P < 0.05$ (图 4)。

Surround™ 9-way 疫苗接种后 2 周, 当执行更全面的项目时, 与对照相比, $CD25^+CD4^+CD45RO$ 幼稚 T 淋巴细胞在用 GHRH 处理的动物中显著增加, $P < 0.05$ (图 5)。

经处理的动物中的死亡率: 小母牛的死亡率 (不自主淘汰率 (involuntary cull rate)) 在用 GHRH 处理的动物和对照之间是不同的。在 360 天的研究过程中, 没有一头经处理的小母牛死亡, 而 20% 的对照小母牛不得被淘汰 ($P < 0.003$)。死亡原因如下: 一头为约内病, 一头为由于蹄病状和受感染的切口而引起的全身感染, 一头具有并发后腿麻痹的严重蹄问题, 和一头为严重的乳腺炎病例。一头经处理的动物由于意外被淘汰。在 120 天的泌乳天数 (DIM) 前的总不自主淘汰率通过处理而增加了 40%。通过 GHRH-质粒介导的处理增加了疫苗接种后针对环境病原体的保护。

体重和身体状况得分: 在应激和负能量平衡时、在 60–80 DIM 时, 小母牛的身体状况得分 (BCS) 在组间是不同的。在 60–80 DIM, 用 pSP-HV-GHRH 处理的小母牛显示出 BCS 的改善 ($P < 0.0001$, 图 6)。在第一个 100 DIM 期间, 经处理的动物损失了 3.5 kg 的平均重量 (总体重的 0.06%) ($P < 0.02$, 图 7), 而对照牛损失了 26.4 kg 的平均重量 (4.6% 的在 60 DIM 时的总体重)。较佳的 BCS 与血清 IGF-I 水平增加相关: 对于用 GHRH 处理的小母牛, 第 100 天–第 60 天 = 22.4 ± 4 ng/mL (第 100 天为 119.7 ± 6.9 ng/mL, 第 60 天为 97.3 ± 6.6 ng/mL); 对于对照, -8 ± 7.4 ng/mL (第 100 天为 99.8 ± 3.9 ng/mL, 第 60 天为 91.8 ± 6.8 ng/mL) ($P < 0.04$)。

发病率: 在质粒施用前在研究开始时牛群具有明显的蹄病理状态。足部问题, 最可能是细菌起因的 (Murray 等人, 1996), 在本研究的整个过程中也是这些动物发病的主要原因之一。构成主要蹄病理状态

的趾部皮炎损伤通过 GHRH 处理而减弱。研究已显示, 多达 29% 的乳牛和 4% 的肉牛具有十分明显的趾部皮炎损伤, 并且在超过 60% 的情况下涉及螺旋体 (Brown 等人, 2000)。对螺旋体的免疫应答具有较短的持续时间 (Trott 等人, 2003), 因此为了减少感染负荷, 稳定的长期治疗将是优选的。疫苗接种和 GHRH 处理的组合经证明对于被处理的动物是有利的。与经处理的动物相比较时, 对于对照来说在本研究的过程中自始至终具有恶化的足部问题的动物的比例高 40%: 32 只用 GHRH 处理的动物中的 7 只; 20 只对照中的 7 只。由于对照组中动物间的高可变性, 总蹄得分的改善没有达到统计学显著性 ($P < 0.4$)。

与用可以产生不希望的副作用 (例如, 出血性溃疡、肝和肾的液泡化或甚至是动物死亡 (Smith 等人, 1991)) 的猪重组促生长素 (rpST) 或 bST 进行注射相反, 质粒介导的 GHRH 基因补充给药法是被良好耐受的, 在动物中没有观察到副作用。包含受调节的组织/纤维型特异性 hGH 的质粒先前已在家畜和 GH 缺乏宿主中用于 GH 的递送和稳定生产。用于递送包含 hGH 的质粒的方法包括基因转移、成肌细胞转移或脂质体介导的静脉内注射 (Barr 和 Leiden, 1991; Dahler 等人, 1994; Pursel 等人, 1990)。然而, 这些技术具有明显的缺点, 即要将它们从以大规模运作进行使用和/或用于食物动物中排除, 包括: 1) 与脂质体递送相关的可能的毒性或免疫应答; 2) 在经转染的成肌细胞方法中需要大量离体操作; 和/或 3) 在基因转移中重大副作用或无效的风险 (Dhawan 等人, 1991; Miller 等人, 1989)。与这些技术相比, 质粒介导的基因补充给药法和 DNA 注射是简单且有效的, 没有与递送系统或过量表达相关的并发症。

本文所提供的实施方案举例说明了, 在注射有 GHRH 质粒的哺乳动物中产生了增强的疫苗接种应答和改善的临床结果。经处理的受试者在受试者对于感染性攻击的应答能力方面显示出明显的改善。经处理的受试者没有经历来自该疗法的任何副作用, 包括相关的病理状态或死亡。尽管不希望被理论束缚, 但疫苗接种应答的增强表明, 肌源性 GHRH 载体的异位表达将可能以生理学上更合适的方式刺激 GH 轴。

本领域技术人员会容易意识到，本发明非常适合于实现这些目的并获得所提到的以及那些其中所固有的目标和优点。本文所描述的生长激素、生长激素释放激素、类似物、质粒、载体、药物组合物、治疗、方法、操作过程和技术目前代表了优选的实施方案，并且希望是示例性的而不希望作为范围的限制。另外，包括牛疱疹病毒-1(“IBR”)、牛病毒性腹泻(“BVD”)病毒、副流感病毒3、呼吸道合胞病毒、犬钩端螺旋体、感冒伤寒型钩端螺旋体、哈德焦钩端螺旋体、出血黄疸钩端螺旋体、波摩那钩端螺旋体 bacterins mycoplasma hyopneumonia、猪肺炎支原体或其组合的疫苗希望是示例性的而不希望作为范围的限制。因此，对于本领域技术人员而言，将会存在其改变和其他用途，它们包括在本发明的精神之内或由未决的权利要求的范围所限定。

所引用的参考文献

下述美国专利文件和公开的参考文献中每一个的完整内容引入本文作为参考。

美国专利文件

于 1998 年 12 月 8 日颁发、Coy 等人列为发明人的美国专利号 5,847,066。

于 1998 年 12 月 8 日颁发、Felix 等人列为发明人的美国专利号 5,846,936。

于 1998 年 8 月 11 日颁发、Schally 等人列为发明人的美国专利号 5,792,747。

于 1998 年 7 月 7 日颁发、Bowers 等人列为发明人的美国专利号 5,776,901。

于 1998 年 5 月 26 日颁发、Schwartz 等人列为发明人的美国专利号 5,756,264。

于 1997 年 12 月 9 日颁发、Felix 等人列为发明人的美国专利号 5,696,089。

于 1996 年 1 月 23 日颁发、Bowers 等人列为发明人的美国专利号 5,486,505。

于 1994 年 3 月 8 日颁发、Boyd 等人列为发明人的美国专利号 5,292,721。

于 1992 年 8 月 11 日颁发、Seely 等人列为发明人的美国专利号 5,137,872。

于 1992 年 7 月 28 日颁发、Boyd 等人列为发明人的美国专利号 5,134,210。

于 1992 年 1 月 28 日颁发、Felix 等人列为发明人的美国专利号 5,084,442。

于 1991 年 10 月 29 日颁发、Kann 等人列为发明人的美国专利号 5,061,690。

于 1991 年 7 月 30 日颁发、Thorner 列为发明人的美国专利号 5,036,045。

于 1991 年 6 月 11 日颁发、Kovacs 等人列为发明人的美国专利号 5,023,322。

于 1989 年 6 月 13 日颁发、Bowers 等人列为发明人的美国专利号 4,839,344。

于 1983 年 10 月 18 日颁发、Bowers 等人列为发明人的美国专利号 4,410,512。

于 1991 年 9 月 24 日颁发、Drengler 列为发明人的美国专利号 RE33,699。

于 1989 年 5 月 23 日颁发、Grosvenor 等人列为发明人的美国专利号 4,833,166。

于 1980 年 10 月 14 日颁发、Momany 等人列为发明人的美国专利号 4,228,158。

于 1980 年 10 月 14 日颁发、Momany 等人列为发明人的美国专利号 4,228,156。

于 1980 年 10 月 7 日颁发、Momany 等人列为发明人的美国专利号 4,226,857。

于 1980 年 9 月 23 日颁发、Momany 等人列为发明人的美国专利号 4,224,316。

于 1980 年 9 月 16 日颁发、Momany 等人列为发明人的美国专利号 4,223,021。

于 1980 年 9 月 16 日颁发、Momany 等人列为发明人的美国专利号 4,223,020。

于 1980 年 9 月 16 日颁发、Momany 等人列为发明人的美国专利号 4,223,019。

于 1997 年 12 月 30 日颁发、标题为 “Needle electrodes for

mediated delivery of drugs and genes”、Hofmann 等人列为发明人的美国专利号 5,702,359。

于 1995 年 8 月 8 日颁发、标题为 “Electroporation system with voltage control feedback for clinical applications”、Hofmann 列为发明人的美国专利号 5,439,440。

于 1996 年 5 月 5 日公开、标题为 “Electroporetic Gene and Drug Therapy by Induced Electric Fields”、Hofmann 等人列为发明人的 PCT 申请 WO/96/12520。

于 1996 年 4 月 25 日公开、标题为 “Flow Through Electroporation Apparatus and Method”、Hofmann 等人列为发明人的 PCT 申请 WO/96/12006。

于 1995 年 7 月 27 日公开、标题为 “Electroporation and Iontophoresis Apparatus and Method For insertion of Drugs and genes into Cells”、Hofmann 列为发明人的 PCT 申请 WO/95/19805。

于 1997 年 3 月 6 日公开、标题为 “In Vivo Electroporation of Cells”、Nicolau 等人列为发明人的 PCT 申请 WO/97/07826。

参考文献列表

Acsadi, G., G. Dickson, D. R. Love, A. Jani, F. S. Walsh, A. Gurusinghe, Wolff, JA, and K. E. Davies. 1991. Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 352:815-818.

Aihara, H. and J. Miyazaki. 1998. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat. Biotechnol.* 16:867-870.

Almendro, N., T. Bellon, C. Rius, P. Lastres, C. Langa, A. Corbi, and C. Bernabeu. 1996. Cloning of the human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 promoter and its tissue-specific expression. Structural and functional characterization. *J. Immunol.* 157:5411-5421.

Alpdogan, O., S. J. Muriglan, B. J. Kappel, E. Doubrovina, C. Schmaltz, R. Schiro, J. M. Eng, A. S. Greenberg, L. M. Willis, J. A. Rotolo, R. J. O'Reilly, and M. R. van den Brink. 2003. Insulin-like growth factor-I enhances lymphoid and myeloid reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 75:1977-1983.

Aratani, Y., R. Okazaki, and H. Koyama. 1992. End extension repair of introduced targeting vectors mediated by homologous recombination in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 20:4795-4801.

Babiuk, L. A., R. Pontarollo, S. Babiuk, B. Loehr, and van Drunen Littel-van den Hurk. 2003. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. *Vaccine* 21:649-658.

Barr, E. and J. M. Leiden. 1991. Systemic delivery of recombinant proteins by genetically modified myoblasts. *Science* 254:1507-1509.

Bercu, B. B. and R. F. Walker. 1997. Growth Hormone Secretagogues In Children With Altered Growth. *Acta Paediatrica* 86:102-106.

Bettan, M., F. Emmanuel, R. Darteil, J. M. Caillaud, F. Soubrier, P. Delaere, D. Branelec, A. Mahfoudi, N. Duverger, and D. Scherman. 2000. High-level protein secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *Mol. Ther.* 2:204-210.

Blethen, S. L. and A. C. Rundle. 1996. Slipped capital femoral epiphysis in children treated with growth hormone. A summary of the National Cooperative Growth Study experience. *Horm. Res.* 46:113-116.

Bohlen, P., F. Esch, P. Brazeau, N. Ling, and R. Guillemin. 1983. Isolation and characterization of the porcine hypothalamic growth hormone releasing factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116:726-734.

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

Brown, C. C., P. D. Kilgo, and K. L. Jacobsen. 2000. Prevalence of papillomatous digital dermatitis among culled adult cattle in the southeastern United States. *Am. J. Vet. Res.* 61:928-930.

Burgess, W., Q. Liu, J. Zhou, Q. Tang, A. Ozawa, R. VanHoy, S. Arkins, R. Dantzer, and K. W. Kelley. 1999. The immune-endocrine loop during aging: role of growth hormone and insulin-like growth factor-I. *Neuroimmunomodulation.* 6:56-68.

Carbonelli, D. L., E. Corley, M. Seigelchifer, and J.

Zorzopulos. 1999. A plasmid vector for isolation of strong promoters in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 177:75-82.

Caroni, P. and C. Schneider. 1994. Signaling by insulin-like growth factors in paralyzed skeletal muscle: rapid induction of IGF1 expression in muscle fibers and prevention of interstitial cell proliferation by IGF-BP5 and IGF-BP4. J. Neurosci. 14:3378-3388.

Chandler, S. D., A. Mayeda, J. M. Yeakley, A. R. Krainer, and X. D. Fu. 1997. RNA splicing specificity determined by the coordinated action of RNA recognition motifs in SR proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94:3596-3601.

Chevalier, R. L., S. Goyal, A. Kim, A. Y. Chang, D. Landau, and D. LeRoith. 2000. Renal tubulointerstitial injury from ureteral obstruction in the neonatal rat is attenuated by IGF-I. Kidney Int. 57:882-890.

Chung, C. S., T. D. Etherton, and J. P. Wiggins. 1985. Stimulation of swine growth by porcine growth hormone. J. Anim Sci. 60:118-130.

Cocca, L. 1997. Duplication of a region in the multiple cloning site of a plasmid vector to enhance cloning-mediated addition of restriction sites to a DNA fragment. Biotechniques 23:814-816.

Corpas, E., S. M. Harman, M. A. Pineyro, R. Roberson, and M. R. Blackman. 1993. Continuous subcutaneous infusions of growth hormone (GH) releasing hormone 1-44 for 14 days increase GH and insulin-like growth factor-I levels in old men. J Clin Endocrinol Metab 76:134-138.

Dahler, A., R. P. Wade, G. E. Muscat, and M. J. Waters. 1994. Expression vectors encoding human growth hormone (hGH)

controlled by human muscle-specific promoters: prospects for regulated production of hGH delivered by myoblast transfer or intravenous injection. *Gene* 145:305-310.

Dai, B., H. Wu, E. Holthuizen, and P. Singh. 2001. Identification of a novel cis element required for cell density-dependent down-regulation of insulin-like growth factor-2 P3 promoter activity in Caco2 cells. *J. Biol. Chem.* 276:6937-6944.

Danko, I. and J. A. Wolff. 1994. Direct gene transfer into muscle. *Vaccine* 12:1499-1502.

Darquet, A. M., B. Cameron, P. Wils, D. Scherman, and J. Crouzet. 1997. A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Ther.* 4:1341-1349.

Darquet, A. M., R. Rangara, P. Kreiss, B. Schwartz, S. Naimi, P. Delaere, J. Crouzet, and D. Scherman. 1999. Minicircle: an improved DNA molecule for in vitro and in vivo gene transfer. *Gene Ther.* 6:209-218.

Davis, H. L., R. G. Whalen, and B. A. Demeneix. 1993. Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Human Gene Therapy* 4:151-159.

Davis, W. C., J. E. Davis, and M. J. Hamilton. 1995. Use of monoclonal antibodies and flow cytometry to cluster and analyze leukocyte differentiation molecules. *Methods Mol. Biol.* 45:149-67.:149-167.

Dhawan, J., L. C. Pan, G. K. Pavlath, M. A. Travis, A. M. Lanctot, and H. M. Blau. 1991. Systemic delivery of human growth hormone by injection of genetically engineered myoblasts. *Science* 254:1509-1512.

Dialynas, E., H. Brown-Borg, and A. Bartke. 1999. Immune function in transgenic mice overexpressing growth hormone (GH) releasing hormone, GH or GH antagonist. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 221:178-183.

Dolnik, V., M. Novotny, and J. Chmelik. 1993. Electromigration behavior of poly-(L-glutamate) conformers in concentrated polyacrylamide gels. *Biopolymers* 33:1299-1306.

Dorsch-Hasler, K., G. M. Keil, F. Weber, M. Jasin, W. Schaffner, and U. H. Koszinowski. 1985. A long and complex enhancer activates transcription of the gene coding for the highly abundant immediate early mRNA in murine cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82:8325-8329.

Dorshkind, K. and N. D. Horseman. 2001. Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. *Bioessays* 23:288-294.

Draghia-Akli, R., K. K. Cummings, A. S. Khan, P. A. Brown, and R. H. Carpenter. 2003a. Effects of plasmid-mediated growth hormone releasing hormone supplementation in young healthy Beagle dogs. *Journal of Animal Science* 81:2301-2310.

Draghia-Akli, R., K. M. Ellis, L. A. Hill, P. B. Malone, and M. L. Fiorotto. 2003b. High-efficiency growth hormone releasing hormone plasmid vector administration into skeletal muscle mediated by electroporation in pigs. *FASEB J* 17:526-528.

Draghia-Akli, R., M. L. Fiorotto, L. A. Hill, P. B. Malone, D. R. Deaver, and R. J. Schwartz. 1999. Myogenic expression of an injectable protease-resistant growth hormone-releasing hormone augments long-term growth in pigs. *Nat. Biotechnol.* 17:1179-1183.

Draghia-Akli, R., K. A. Hahn, G. K. King, K. Cummings, and

R. H. Carpenter. 2002a. Effects Of Plasmid Mediated Growth Hormone Releasing Hormone In Severely Debilitated Dogs With Cancer. *Molecular Therapy* 6:830-836.

Draghia-Akli, R., A. S. Khan, K. K. Cummings, D. Parghi, R. H. Carpenter, and P. A. Brown. 2002b. Electrical Enhancement of Formulated Plasmid Delivery in Animals. *Technology in Cancer Research & Treatment* 1:365-371.

Draghia-Akli, R., X. G. Li, and R. J. Schwartz. 1997. Enhanced growth by ectopic expression of growth hormone releasing hormone using an injectable myogenic vector. *Nat. Biotechnol.* 15:1285-1289.

Draghia-Akli, R., P. B. Malone, L. A. Hill, K. M. Ellis, R. J. Schwartz, and J. L. Nordstrom. 2002c. Enhanced animal growth via ligand-regulated GHRH myogenic-injectable vectors. *FASEB J.* 16:426-428.

Dubreuil, P., D. Petitclerc, G. Pelletier, P. Gaudreau, C. Farmer, Mowles, TF, and P. Brazeau. 1990. Effect of dose and frequency of administration of a potent analog of human growth hormone-releasing factor on hormone secretion and growth in pigs. *J Anim Sci* 68:1254-1268.

Duck, S. C., H. P. Schwarz, G. Costin, R. Rapaport, S. Arslanian, A. Hayek, M. Connors, and J. Jaramillo. 1992. Subcutaneous growth hormone-releasing hormone therapy in growth hormone-deficient children: first year of therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 75:1115-1120.

Esch, F. S., P. Bohlen, N. C. Ling, P. E. Brazeau, W. B. Wehrenberg, M. O. Thorner, M. J. Cronin, and R. Guillemin. 1982. Characterization of a 40 residue peptide from a human pancreatic tumor with growth hormone releasing activity. *BBRC* 109:152-158.

Etherton, T. D., J. P. Wiggins, C. S. Chung, C. M. Evock, J. F. Rebhun, and P. E. Walton. 1986. Stimulation of pig growth performance by porcine growth hormone and growth hormone-releasing factor. *Journal of Animal Science* 63:1389-1399.

Evans, W. S., M. L. Vance, D. L. Kaiser, R. P. Sellers, J. L. Borges, T. R. Downs, L. A. Frohman, J. Rivier, W. Vale, and M. O. Thorner. 1985. Effects of intravenous, subcutaneous, and intranasal administration of growth hormone (GH)-releasing hormone-40 on serum GH concentrations in normal men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 61:846-850.

Farmer, C., D. Petitclerc, G. Pelletier, and P. Brazeau. 1992. Lactation performance of sows injected with growth hormone-releasing factor during gestation and(or) lactation. *Journal of Animal Science* 70:2636-2642.

Farmer, C., S. Robert, and J. J. Matte. 1996. Lactation performance of sows fed a bulky diet during gestation and receiving growth hormone-releasing factor during lactation. *J. Anim Sci.* 74:1298-1306.

Fewell, J. G., F. MacLaughlin, V. Mehta, M. Gondo, F. Nicol, E. Wilson, and L. C. Smith. 2001. Gene therapy for the treatment of hemophilia B using PINC-formulated plasmid delivered to muscle with electroporation. *Mol. Ther.* 3:574-583.

Frederickson, R. M., B. J. Carter, and A. M. Pilaro. 2003. Nonclinical Toxicology in Support of Licensure of Gene Therapies. *Mol. Ther.* 8:8-10.

Frohman, L. A., T. R. Downs, E. P. Heimer, and A. M. Felix. 1989. Dipeptidylpeptidase IV and trypsin-like enzymatic degradation of human growth hormone-releasing hormone in plasma.

J. Clin. Invest. 83:1533-1540.

Frohman, L. A., J. L. Thominet, C. B. Webb, M. L. Vance, H. Uderman, J. Rivier, W. Vale, and M. O. Thorner. 1984. Metabolic clearance and plasma disappearance rates of human pancreatic tumor growth hormone releasing factor in man. J. Clin. Invest. 73:1304-1311.

Fryer, A. D. and D. B. Jacoby. 1993. Effect of inflammatory cell mediators on M2 muscarinic receptors in the lungs. Life Sci. 52:529-536.

Gehl, J., T. Skovsgaard, and L. M. Mir. 1998. Enhancement of cytotoxicity by electroporabilization: an improved method for screening drugs. Anticancer Drugs 9:319-325.

Gehl, J., T. H. Sorensen, K. Nielsen, P. Raskmark, S. L. Nielsen, T. Skovsgaard, and L. M. Mir. 1999. In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution. Biochim. Biophys. Acta 1428:233-240.

Gelato, M. C. 1996. Aging and immune function: a possible role for growth hormone. Horm. Res. 45:46-49.

German, M., S. Ashcroft, K. Docherty, H. Edlund, T. Edlund, S. Goodison, H. Imura, G. Kennedy, O. Madsen, D. Melloul, and . 1995. The insulin gene promoter. A simplified nomenclature. Diabetes 44:1002-1004.

Ghigo, E., E. Arvat, F. Broglio, R. Giordano, L. Gianotti, G. Muccioli, M. Papotti, A. Graziani, G. Bisi, R. Deghenghi, and F. Camanni. 1999. Endocrine and non-endocrine activities of growth hormone secretagogues in humans. Horm. Res. 51 Suppl 3:9-15.

Gopinath, R. and T. D. Etherton. 1989a. Effects of porcine

growth hormone on glucose metabolism of pigs: I. Acute and chronic effects on plasma glucose and insulin status. *J. Anim Sci.* 67:682-688.

Gopinath, R. and T. D. Etherton. 1989b. Effects of porcine growth hormone on glucose metabolism of pigs: II. Glucose tolerance, peripheral tissue insulin sensitivity and glucose kinetics. *J. Anim Sci.* 67:689-697.

Guillemin, R., P. Brazeau, P. Bohlen, F. Esch, N. Ling, and W. B. Wehrenberg. 1982. Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* 218:585-587.

Heller, R., M. J. Jaroszeski, L. F. Glass, J. L. Messina, D. P. Rapaport, R. C. DeConti, N. A. Fenske, R. A. Gilbert, L. M. Mir, and D. S. Reintgen. 1996. Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy. *Cancer* 77:964-971.

Horlick, R. A. and P. A. Benfield. 1989. The upstream muscle-specific enhancer of the rat muscle creatine kinase gene is composed of multiple elements. *Mol. Cell Biol.* 9:2396-2413.

Inouye, C., P. Remondelli, M. Karin, and S. Elledge. 1994. Isolation of a cDNA encoding a metal response element binding protein using a novel expression cloning procedure: the one hybrid system. *DNA Cell Biol.* 13:731-742.

Inouye, S., A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1985. Determination of the transcription initiation site and identification of the protein product of the regulatory gene *xylR* for *xyl* operons on the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 163:863-869.

Jardieu, P., R. Clark, D. Mortensen, and K. Dorshkind. 1994.

In vivo administration of insulin-like growth factor-I stimulates primary B lymphopoiesis and enhances lymphocyte recovery after bone marrow transplantation. *J Immunol.* 152:4320-4327.

Jaynes, J. B., J. E. Johnson, J. N. Buskin, C. L. Gartside, and S. D. Hauschka. 1988. The muscle creatine kinase gene is regulated by multiple upstream elements, including a muscle-specific enhancer. *Mol. Cell Biol.* 8:62-70.

Kawamoto, T., K. Makino, H. Niwa, H. Sugiyama, S. Kimura, M. Amemura, A. Nakata, and T. Kakunaga. 1988. Identification of the human beta-actin enhancer and its binding factor. *Mol. Cell Biol.* 8:267-272.

Kawamoto, T., K. Makino, S. Orita, A. Nakata, and T. Kakunaga. 1989. DNA bending and binding factors of the human beta-actin promoter. *Nucleic Acids Res.* 17:523-537.

Khorram, O., M. Garthwaite, and T. Golos. 2001. The influence of aging and sex hormones on expression of growth hormone-releasing hormone in the human immune system. *J Clin. Endocrinol. Metab* 86:3157-3161.

Khorram, O., M. Yeung, L. Vu, and S. S. Yen. 1997. Effects of [norleucine27]growth hormone-releasing hormone (GHRH) (1-29)-NH₂ administration on the immune system of aging men and women. *J Clin. Endocrinol. Metab* 82:3590-3596.

Klamut, H. J., L. O. Bosnoyan-Collins, R. G. Worton, P. N. Ray, and H. L. Davis. 1996. Identification of a transcriptional enhancer within muscle intron 1 of the human dystrophin gene. *Hum. Mol. Genet.* 5:1599-1606.

Klamut, H. J., S. B. Gangopadhyay, R. G. Worton, and P. N. Ray. 1990. Molecular and functional analysis of the

muscle-specific promoter region of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol. Cell Biol.* 10:193-205.

Klindt, J., J. T. Yen, F. C. Buonomo, A. J. Roberts, and T. Wise. 1998. Growth, body composition, and endocrine responses to chronic administration of insulin-like growth factor I and(or) porcine growth hormone in pigs. *J. Anim Sci.* 76:2368-2381.

Koo, G. C., C. Huang, R. Camacho, C. Trainor, J. T. Blake, A. Sirotina-Meisher, K. D. Schleim, T. J. Wu, K. Cheng, R. Nargund, and G. McKissick. 2001. Immune enhancing effect of a growth hormone secretagogue. *J Immunol.* 166:4195-4201.

Kraus, J., M. Woltje, N. Schonwetter, and V. Holtt. 1998. Alternative promoter usage and tissue specific expression of the mouse somatostatin receptor 2 gene. *FEBS Lett.* 428:165-170.

Krishnaraj, R., A. Zaks, and T. Unterman. 1998. Relationship between plasma IGF-I levels, in vitro correlates of immunity, and human senescence. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 88:264-270.

Lapierre, H., G. Pelletier, D. Petitclerc, P. Dubreuil, J. Morisset, P. Gaudreau, Y. Couture, and P. Brazeau. 1991. Effect of human growth hormone-releasing factor and(or) thyrotropin-releasing factor on growth, carcass composition, diet digestibility, nutrient balance, and plasma constituents in dairy calves. *Journal of Animal Science* 69:587-598.

Lareyre, J. J., T. Z. Thomas, W. L. Zheng, S. Kasper, D. E. Ong, M. C. Orgebin-Crist, and R. J. Matusik. 1999. A 5-kilobase pair promoter fragment of the murine epididymal retinoic acid-binding protein gene drives the tissue-specific, cell-specific, and androgen-regulated expression of a foreign

gene in the epididymis of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 274: 8282-8290.

Larsen, P. R., J. W. Harney, and D. D. Moore. 1986. Sequences required for cell-type specific thyroid hormone regulation of rat growth hormone promoter activity. *J. Biol. Chem.* 261: 14373-14376.

Lee, S. H., W. Wang, S. Yajima, P. A. Jose, and M. M. Mouradian. 1997. Tissue-specific promoter usage in the D1A dopamine receptor gene in brain and kidney. *DNA Cell Biol.* 16: 1267-1275.

Lesbordes, J. C., T. Bordet, G. Haase, L. Castelnau-Ptakhine, S. Rouhani, H. Gilgenkrantz, and A. Kahn. 2002. In vivo electrotransfer of the cardiotrophin-1 gene into skeletal muscle slows down progression of motor neuron degeneration in pmn mice. *Hum. Mol. Genet.* 11: 1615-1625.

Levenson, V. V., E. D. Transue, and I. B. Roninson. 1998. Internal ribosomal entry site-containing retroviral vectors with green fluorescent protein and drug resistance markers. *Hum. Gene Ther.* 9: 1233-1236.

Li, C., S. Ke, Q. P. Wu, W. Tansey, N. Hunter, L. M. Buchmiller, L. Milas, C. Charnsangavej, and S. Wallace. 2000. Tumor irradiation enhances the tumor-specific distribution of poly(L-glutamic acid)-conjugated paclitaxel and its antitumor efficacy. *Clin. Cancer Res.* 6: 2829-2834.

Li, X., E. M. Eastman, R. J. Schwartz, and R. Draghia-Akli. 1999. Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. *Nat. Biotechnol.* 17: 241-245.

Lin, H., K. E. Yutzey, and S. F. Konieczny. 1991.

Muscle-specific expression of the troponin I gene requires interactions between helix-loop-helix muscle regulatory factors and ubiquitous transcription factors. *Mol. Cell Biol.* 11:267-280.

Liu, J. L. and D. LeRoith. 1999. Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. *Endocrinology* 140:5178-5184.

Liu, Y., H. Li, K. Tanaka, N. Tsumaki, and Y. Yamada. 2000. Identification of an enhancer sequence within the first intron required for cartilage-specific transcription of the alpha2(XI) collagen gene. *J. Biol. Chem.* 275:12712-12718.

Lucas, M. L., L. Heller, D. Coppola, and R. Heller. 2002. IL-12 plasmid delivery by in vivo electroporation for the successful treatment of established subcutaneous B16.F10 melanoma. *Mol. Ther.* 5:668-675.

Lucas, M. L., M. J. Jaroszeski, R. Gilbert, and R. Heller. 2001. In vivo electroporation using an exponentially enhanced pulse: a new waveform. *DNA Cell Biol.* 20:183-188.

Macejak, D. G. and P. Sarnow. 1991. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* 353:90-94.

Marshall, L., B. Perras, H. L. Fehm, and J. Born. 2001. Changes in immune cell counts and interleukin (IL)-1beta production in humans after a somnogenically active growth hormone-releasing hormone (GHRH) administration. *Brain Behav. Immun.* 15:227-234.

Matsubara, H., Y. Gunji, T. Maeda, K. Tasaki, Y. Koide, T. Asano, T. Ochiai, S. Sakiyama, and M. Tagawa. 2001. Electroporation-mediated transfer of cytokine genes into human

esophageal tumors produces anti-tumor effects in mice. *Anticancer Res.* 21:2501-2503.

Matsuo, A., I. Tooyama, S. Isobe, Y. Oomura, I. Akiguchi, K. Hanai, J. Kimura, and H. Kimura. 1994. Immunohistochemical localization in the rat brain of an epitope corresponding to the fibroblast growth factor receptor-1. *Neuroscience* 60:49-66.

McNally, M. A., J. S. Lebkowski, T. B. Okarma, and L. B. Lerch. 1988. Optimizing electroporation parameters for a variety of human hematopoietic cell lines. *Biotechniques* 6:882-886.

Miklavcic, D., K. Beravs, D. Semrov, M. Cemazar, F. Demsar, and G. Sersa. 1998. The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues. *Biophys. J* 74:2152-2158.

Miller, K. F., D. J. Bolt, V. G. Pursel, R. E. Hammer, C. A. Pinkert, R. D. Palmiter, and R. L. Brinster. 1989. Expression of human or bovine growth hormone gene with a mouse metallothionein-1 promoter in transgenic swine alters the secretion of porcine growth hormone and insulin-like growth factor-I. *J. Endocrinol.* 120:481-488.

Mumper, R. J., J. Wang, S. L. Klakamp, H. Nitta, K. Anwer, F. Tagliaferri, and A. P. Rolland. 1998. Protective interactive noncondensing (PINC) polymers for enhanced plasmid distribution and expression in rat skeletal muscle. *J. Control Release* 52:191-203.

Muramatsu, T., S. Arakawa, K. Fukazawa, Y. Fujiwara, T. Yoshida, R. Sasaki, S. Masuda, and H. M. Park. 2001. In vivo gene electroporation in skeletal muscle with special reference

to the duration of gene expression. *Int. J Mol. Med.* 7:37-42.

Murray, R. D., D. Y. Downham, M. J. Clarkson, W. B. Faul1, J. W. Hughes, F. J. Manson, J. B. Merritt, W. B. Russell, J. E. Sutherst, and W. R. Ward. 1996. Epidemiology of lameness in dairy cattle: description and analysis of foot lesions. *Vet. Rec.* 138:586-591.

Nairn, R. S., G. M. Adair, T. Porter, S. L. Pennington, D. G. Smith, J. H. Wilson, and M. M. Seidman. 1993. Targeting vector configuration and method of gene transfer influence targeted correction of the APRT gene in Chinese hamster ovary cells. *Somat. Cell Mol. Genet.* 19:363-375.

Narum, D. L., S. Kumar, W. O. Rogers, S. R. Fuhrmann, H. Liang, M. Oakley, A. Taye, B. K. Sim, and S. L. Hoffman. 2001. Codon optimization of gene fragments encoding *Plasmodium falciparum* merzoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice. *Infect. Immun.* 69:7250-7253.

Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P. H. Hofschneider. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1:841-845.

Nomoto, S., Y. Tatematsu, T. Takahashi, and H. Osada. 1999. Cloning and characterization of the alternative promoter regions of the human LIMK2 gene responsible for alternative transcripts with tissue-specific expression. *Gene* 236:259-271.

Ohlsson, H., S. Thor, and T. Edlund. 1991. Novel insulin promoter- and enhancer-binding proteins that discriminate between pancreatic alpha- and beta-cells. *Mol. Endocrinol.* 5:897-904.

Otani, Y., Y. Tabata, and Y. Ikada. 1996. Rapidly curable

biological glue composed of gelatin and poly(L-glutamic acid). *Biomaterials* 17:1387-1391.

Otani, Y., Y. Tabata, and Y. Ikada. 1998. Hemostatic capability of rapidly curable glues from gelatin, poly(L-glutamic acid), and carbodiimide. *Biomaterials* 19:2091-2098.

Pech, M., C. D. Rao, K. C. Robbins, and S. A. Aaronson. 1989. Functional identification of regulatory elements within the promoter region of platelet-derived growth factor 2. *Mol. Cell Biol.* 9:396-405.

Pelletier, J. and N. Sonenberg. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334:320-325.

Pinkert, C. A., D. M. Ornitz, R. L. Brinster, and R. D. Palmiter. 1987. An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice. *Genes Dev.* 1:268-276.

Potter, H., L. Weir, and P. Leder. 1984. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81:7161-7165.

Prentice, H., R. A. Kloner, T. Prigozy, T. Christensen, L. Newman, Y. Li, and L. Kedes. 1994. Tissue restricted gene expression assayed by direct DNA injection into cardiac and skeletal muscle. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* 26:1393-1401.

Pursel, V. G., D. J. Bolt, K. F. Miller, C. A. Pinkert, R. E. Hammer, R. D. Palmiter, and R. L. Brinster. 1990. Expression

and performance in transgenic pigs. J. Reprod. Fertil. Suppl 40: 235-45: 235-245.

Rabinovsky, E. D., G. M. Smith, D. P. Browder, H. D. Shine, and J. L. McManaman. 1992. Peripheral nerve injury down-regulates CNTF expression in adult rat sciatic nerves. J. Neurosci. Res. 31:188-192.

Rahim, A., P. A. O'Neill, and S. M. Shalet. 1999. The effect of chronic hexarelin administration on the pituitary-adrenal axis and prolactin. Clin. Endocrinol. (Oxf) 50:77-84.

Rahim, A. and S. M. Shalet. 1998. Does desensitization to hexarelin occur? Growth Horm. IGF. Res. 8 Suppl B:141-143.

Robbins, K., S. McCabe, T. Scheiner, J. Strasser, R. Clark, and P. Jardieu. 1994. Immunological effects of insulin-like growth factor-I--enhancement of immunoglobulin synthesis. Clin. Exp. Immunol. 95:337-342.

Rodenburg, J. Body Condition Scoring of Cattle. Ontario Ministry of Agriculture and Food Fact Sheet # 92-122. 1996.

Ref Type: Bill/Resolution

Sakai, M., Y. Kajita, M. Kobayashi, and H. Kawauchi. 1997. Immunostimulating effect of growth hormone: in-vivo administration of growth hormone in rainbow trout enhances resistance to *Vibrio anguillarum* infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 57:147-152.

Satozawa, N., K. Takezawa, T. Miwa, S. Takahashi, M. Hayakawa, and H. Ooka. 2000. Differences in the effects of 20 K- and 22 K-hGH on water retention in rats. Growth Horm. IGF. Res. 10:187-192.

Schleim, K. D., T. Jacks, P. Cunningham, W. Feeney, E. G. Frazier, G. W. Niebauer, D. Zhang, H. Chen, R. G. Smith, and

G. Hickey. 1999. Increases in circulating insulin-like growth factor I levels by the oral growth hormone secretagogue MK-0677 in the beagle are dependent upon pituitary mediation. *Endocrinology* 140:1552-1558.

Siejka, A., H. Lawnicka, J. Komorowski, T. Stepień, R. Krupinski, and H. Stepień. 2004. Effect of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and GHRH antagonist (MZ-4-71) on interferon-gamma secretion from human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Neuropeptides* 38:35-39.

Skroch, P., C. Buchman, and M. Karin. 1993. Regulation of human and yeast metallothionein gene transcription by heavy metal ions. *Prog. Clin. Biol. Res.* 380:113-28.:113-128.

Smith, L. C. and J. L. Nordstrom. 2000. Advances in plasmid gene delivery and expression in skeletal muscle. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2:150-154.

Smith, V. G., A. D. Leman, W. J. Seaman, and F. VanRavenswaay. 1991. Pig weaning weight and changes in hematology and blood chemistry of sows injected with recombinant porcine somatotropin during lactation. *J. Anim Sci.* 69:3501-3510.

Soubrier, F., B. Cameron, B. Manse, S. Somarriba, C. Dubertret, G. Jaslin, G. Jung, C. L. Caer, D. Dang, J. M. Mouvault, D. Scherman, J. F. Mayaux, and J. Crouzet. 1999. pCOR: a new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy. *Gene Ther.* 6:1482-1488.

Svensson, J. A. and B. Bengtsson. 1999. Clinical and experimental effects of growth hormone secretagogues on various organ systems. *Horm. Res.* 51 Suppl 3:16-20.

Terada, Y., H. Tanaka, T. Okado, S. Inoshita, M. Kuwahara, T. Akiba, S. Sasaki, and F. Marumo. 2001. Efficient and

ligand-dependent regulated erythropoietin production by naked dna injection and in vivo electroporation. *Am. J Kidney Dis.* 38:S50-S53.

Thorner, M. O., L. A. Frohman, D. A. Leong, J. Thominet, T. Downs, P. Hellmann, J. Chitwood, J. M. Vaughan, and W. Vale. 1984. Extrahypothalamic growth-hormone-releasing factor (GRF) secretion is a rare cause of acromegaly: plasma GRF levels in 177 acromegalic patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 59:846-849.

Thorner, M. O., M. L. Vance, W. S. Evans, R. M. Blizzard, A. D. Rogol, K. Ho, Leong, DA, J. L. Borges, M. J. Cronin, R. M. MacLeod, and et al. 1986a. Physiological and clinical studies of GRF and GH. *Recent Progress in Hormone Research* 42:589-640.

Thorner, M. O., M. L. Vance, W. S. Evans, A. D. Rogol, J. Rivier, W. Vale, Blizzard, and RM. 1986b. Clinical studies with GHRH in man. *Hormone Research* 24:91-98.

Tollefsen, S., M. Vordermeier, I. Olsen, A. K. Storset, L. J. Reitan, D. Clifford, D. B. Lowrie, H. G. Wiker, K. Huygen, G. Hewinson, I. Mathiesen, and T. E. Tjelle. 2003. DNA injection in combination with electroporation: a novel method for vaccination of farmed ruminants. *Scand. J Immunol.* 57:229-238.

Toneguzzo, F., A. Keating, S. Glynn, and K. McDonald. 1988. Electric field-mediated gene transfer: characterization of DNA transfer and patterns of integration in lymphoid cells. *Nucleic Acids Res.* 16:5515-5532.

Tripathy, S. K., E. C. Svensson, H. B. Black, E. Goldwasser, M. Margalith, Hobart, PM, and J. M. Leiden. 1996. Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 93:10876-10880.

Tronche, F., A. Rollier, I. Bach, M. C. Weiss, and M. Yaniv. 1989. The rat albumin promoter: cooperation with upstream elements is required when binding of APF/HNF1 to the proximal element is partially impaired by mutation or bacterial methylation. Mol. Cell Biol. 9:4759-4766.

Tronche, F., A. Rollier, P. Herbomel, I. Bach, S. Cereghini, M. Weiss, and M. Yaniv. 1990. Anatomy of the rat albumin promoter. Mol. Biol. Med. 7:173-185.

Trott, D. J., M. R. Moeller, R. L. Zuerner, J. P. Goff, W. R. Waters, D. P. Alt, R. L. Walker, and M. J. Wannemuehler. 2003. Characterization of Treponema phagedenis-like spirochetes isolated from papillomatous digital dermatitis lesions in dairy cattle. J. Clin. Microbiol. 41:2522-2529.

Trudel, M. and F. Costantini. 1987. A 3' enhancer contributes to the stage-specific expression of the human beta-globin gene. Genes Dev. 1:954-961.

Tsumaki, N., T. Kimura, K. Tanaka, J. H. Kimura, T. Ochi, and Y. Yamada. 1998. Modular arrangement of cartilage- and neural tissue-specific cis-elements in the mouse alpha2(XI) collagen promoter. J. Biol. Chem. 273:22861-22864.

Tsunekawa, B., M. Wada, M. Ikeda, H. Uchida, N. Naito, and M. Honjo. 1999. The 20-kilodalton (kDa) human growth hormone (hGH) differs from the 22-kDa hGH in the effect on the human prolactin receptor. Endocrinology 140:3909-3918.

Tsurumi, Y., S. Takeshita, D. Chen, M. Kearney, S. T. Rossow, J. Passeri, J. R. Horowitz, J. F. Symes, and J. M. Isner. 1996. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral

development and tissue perfusion [see comments]. *Circulation* 94: 3281-3290.

Tur-Kaspa, R., L. Teicher, B. J. Levine, A. I. Skoultchi, and D. A. Shafritz. 1986. Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes. *Mol. Cell Biol.* 6:716-718.

van Rooij, E. M., B. L. Haagmans, H. L. Glansbeek, Y. E. de Visser, M. G. de Bruin, W. Boersma, and A. T. Bianchi. 2000. A DNA vaccine coding for glycoprotein B of pseudorabies virus induces cell-mediated immunity in pigs and reduces virus excretion early after infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 74:121-136.

Vance, M. L., D. L. Kaiser, W. S. Evans, R. Furlanetto, W. Vale, J. Rivier, and M. O. Thorner. 1985. Pulsatile growth hormone secretion in normal man during a continuous 24-hour infusion of human growth hormone releasing factor (1-40). Evidence for intermittent somatostatin secretion. *J. Clin. Invest.* 75:1584-1590.

Vance, M. L., D. L. Kaiser, P. M. Martha, Jr., R. Furlanetto, J. Rivier, W. Vale, and M. O. Thorner. 1989. Lack of in vivo somatotroph desensitization or depletion after 14 days of continuous growth hormone (GH)-releasing hormone administration in normal men and a GH-deficient boy. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 68:22-28.

Veldhuis, J. D., A. Iranmanesh, and A. Weltman. 1997. Elements in the pathophysiology of diminished growth hormone (GH) secretion in aging humans. *Endocrine* 7:41-48.

Verhelst, J., R. Abs, M. Vandeweghe, J. Mockel, J. J. Legros, G. Copinschi, C. Mahler, B. Velkeniers, L. Vanhaelst, A. Van

Aelst, D. De Rijdt, A. Stevenaert, and A. Beckers. 1997. Two years of replacement therapy in adults with growth hormone deficiency. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 47:485-494.

Vilquin, J. T., P. F. Kennel, M. Paturneau-Jouas, P. Chapdelaine, N. Boissel, P. Delaere, J. P. Tremblay, D. Scherman, M. Y. Fiszman, and K. Schwartz. 2001. Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther.* 8:1097-1107.

Vittone, J., M. R. Blackman, J. Busby-Whitehead, C. Tsiao, K. J. Stewart, J. Tobin, T. Stevens, M. F. Bellantoni, M. A. Rogers, G. Baumann, J. Roth, S. M. Harman, and R. G. S. Spencer. 1997. Effects of single nightly injections of growth hormone-releasing hormone (GHRH 1-29) in healthy elderly men. *Metabolism: Clinical and Experimental* 46:89-96.

Wada, M., H. Uchida, M. Ikeda, B. Tsunekawa, N. Naito, S. Banba, E. Tanaka, Y. Hashimoto, and M. Honjo. 1998. The 20-kilodalton (kDa) human growth hormone (hGH) differs from the 22-kDa hGH in the complex formation with cell surface hGH receptor and hGH-binding protein circulating in human plasma. *Mol. Endocrinol.* 12:146-156.

Wells, K. E., J. Maule, R. Kingston, K. Foster, J. McMahon, E. Damien, A. Poole, and D. J. Wells. 1997. Immune responses, not promoter inactivation, are responsible for decreased long-term expression following plasmid gene transfer into skeletal muscle. *FEBS Lett.* 407:164-168.

Wolff, J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, Felgner, and PL. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247:1465-1468.

Wu, H. K., J. A. Squire, Q. Song, and R. Weksberg. 1997.

Promoter-dependent tissue-specific expressive nature of imprinting gene, insulin-like growth factor II, in human tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233:221-226.

Xie, T. D. and T. Y. Tsong. 1993. Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection. V. Effects of DNA topology on surface binding, cell uptake, expression, and integration into host chromosomes of DNA in the mammalian cell. *Biophys. J.* 65:1684-1689.

Yasui, A., K. Oda, H. Usunomiya, K. Kakudo, T. Suzuki, T. Yoshida, H. M. Park, K. Fukazawa, and T. Muramatsu. 2001. Elevated gastrin secretion by in vivo gene electroporation in skeletal muscle. *Int. J Mol. Med.* 8:489-494.

Yin, D. and J. G. Tang. 2001. Gene therapy for streptozotocin-induced diabetic mice by electroporational transfer of naked human insulin precursor DNA into skeletal muscle in vivo. *FEBS Lett.* 495:16-20.

Yorifuji, T. and H. Mikawa. 1990. Co-transfer of restriction endonucleases and plasmid DNA into mammalian cells by electroporation: effects on stable transformation. *Mutat. Res.* 243:121-126.

Yutzey, K. E. and S. F. Konieczny. 1992. Different E-box regulatory sequences are functionally distinct when placed within the context of the troponin I enhancer. *Nucleic Acids Res.* 20:5105-5113.

Zhao-Emonet, J. C., O. Boyer, J. L. Cohen, and D. Klatzmann. 1998. Deletional and mutational analyses of the human CD4 gene promoter: characterization of a minimal tissue-specific promoter. *Biochim. Biophys. Acta* 1442:109-119.

- <110> Advisys, Inc.
- <120> 生长激素释放激素增强疫苗接种应答
- <130> 108328.000265 AVSI-0042
- <160> 41
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 40
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 这是 HV-生长激素释放激素 (“GHRH”) 类似物
- <400> 1

His Val Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Ala Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Leu Asn Arg Gln Gln Gly
 20 25 30

Glu Arg Asn Gln Glu Gln Gly Ala
 35 40

- <210> 2
- <211> 40
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 这是猪 GHRH 的氨基酸序列
- <400> 2

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
20 25 30

Glu Arg Asn Gln Glu Gln Gly Ala
35 40

<210> 3
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 这是牛 GHRH 的氨基酸序列

<400> 3

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Asn Arg Gln Gln Gly
20 25 30

Glu Arg Asn Gln Glu Gln Gly Ala
35 40

<210> 4
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 这是犬 GHRH 的氨基酸序列

<400> 4

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
20 25 30

Glu Arg Asn Arg Glu Gln Gly Ala
35 40

<210> 5

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 这是猫 GHRH 的氨基酸序列

<400> 5

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
20 25 30

Glu Arg Asn Gln Glu Gln Gly Ala
35 40

<210> 6

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 这是 TI-生长激素释放激素 (“GHRH”) 类似物

<400> 6

Tyr Ile Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Ala Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Leu Asn Arg Gln Gln Gly
20 25 30

Glu Arg Asn Gln Glu Gln Gly Ala
35 40

<210> 7

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 这是羊 GHRH 的氨基酸序列

<400> 7

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Ile Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Asn Arg Gln Gln Gly
20 25 30

Glu Arg Asn Gln Glu Gln Gly Ala
35 40

<210> 8

<211> 43

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 这是鸡 GHRH 的氨基酸序列

<400> 8

His Ala Asp Gly Ile Phe Ser Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Asn Tyr Leu His Ser Leu Met Ala Lys Arg Val Gly
 20 25 30

Ser Gly Leu Gly Asp Glu Ala Glu Pro Leu Ser
 35 40

<210> 9

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 这是马 GHRH 的氨基酸序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> "X" 可以是任何 AA 序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(40)

<223> "X" 可以是任何 AA 序列

<400> 9

Xaa Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Asn Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Ile Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Xaa Xaa Xaa

	20	25	30
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa			
35	40		
<210> 10			
<211> 40			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 这是人（1-40）-GHRH 的氨基酸序列			
<400> 10			
Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln			
1 5 10 15			
Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly			
20 25 30			
Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala			
35 40			
<210> 11			
<211> 40			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 这是 TV-生长激素释放激素（“GHRH”）类似物			
<400> 11			
Tyr Val Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Ala Gln			
1 5 10 15			

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Leu Asn Arg Gln Gln Gly
20 25 30

Glu Arg Asn Gln Glu Gln Gly Ala
35 40

<210> 12
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 这是 TA-生长激素释放激素 (“GHRH”) 类似物

<400> 12

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Ala Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Leu Asn Arg Gln Gln Gly
20 25 30

Glu Arg Asn Gln Glu Gln Gly Ala
35 40

<210> 13
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 这是人 (1-44) 生长激素释放激素 (“GHRH”)

<400> 13

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
20 25 30

Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu
35 40

<210> 14
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 这是 GHRH (1-40)OH 的人工序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 第 1 位的 Xaa 可以是酪氨酸或组氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 第 2 位的 Xaa 可以是丙氨酸、缬氨酸或异亮氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> 第 15 位的 Xaa 可以是丙氨酸、缬氨酸或异亮氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)..(27)
<223> 第 27 位的 Xaa 可以是甲硫氨酸或亮氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> 第 28 位的 Xaa 可以是丝氨酸或天冬酰胺

$\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle \quad (34) \dots (34)$

<223> 第 34 位的 Xaa 可以是精氨酸或丝氨酸

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle \quad (36) \dots (36)$

<223> 第 36 位的 Xaa 可以是精氨酸或谷氨酰胺

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle \quad (38) \dots (38)$

<223> 第 38 位的 Xaa 可以是精氨酸或谷氨酰胺

<400> 14

Xaa Xaa Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Xaa Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Xaa Xaa Arg Gln Gln Gly
20 25 30

Glu Xaa Asn Xaa Glu Xaa Gly Ala
35 40

<210> 15

323

<212> DNA

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

<223> 这是真核启动子 c5-12 的核酸序列

<400> 15

cggccgtccg ccctcggcac catcctcacg acacccaaat atggcgacgg gtgaggaatg 60

gtggggagtt atttttagag cggtagaggaa ggtgggcagg cagcaggtgt tggcgctcta	120
aaaataactc ccgggagtta ttttttagagc ggaggaatgg tggacacca aatatggcga	180
cggttcctca cccgtcgcca tatttgggtg tccgccctcg gccggggccg cattcctggg	240
ggccgggcgg tgctcccgcc cgcctcgata aaaggctccg gggccggcgg cggcccacga	300
gctacccgga ggagcgggag gcg	323

<210> 16

<211> 190

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人生长激素 poly A 尾的核酸序列

<400> 16

gggtggcatc cctgtgacct ctccccagtg cctctcctgg ccctggaagt tgccactcca	60
gtgcccacca gccttgtcct aataaaatta agttgcatca ttttgtctga ctaggtgtcc	120
ttctataata ttatggggtg gaggggggtg gtatggagca aggggcaagt tgggaagaca	180
acctgtaggg	190

<210> 17

<211> 795

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗生素抗性基因卡那霉素的核酸序列

<400> 17

atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggtatttc	60
ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca	120
gcgcaggggc gcccgttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg	180

caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg	240
ctcgacgttg tcactgaagc gggaagggac tggttgctat tgggcgaagt gccggggcag	300
gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg	360
cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc	420
atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa	480
gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgc	540
ggcgaggatc tcgtcgtgac tcatggcgat gctgtcttgc cgaatatcat ggtggaaaat	600
ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac	660
atagcgttgg ctaccctga tattgtgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc	720
ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt	780
gacgagttct tctga	795

<210> 18

<211> 219

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 类似的猪 GHRH 序列的序列

<400> 18

atggtgctct gggigtctt ctttgtgatc ctcacctca gcaacagctc cactgctcc	60
ccacctcccc ctttgacct caggatgcgg cggcacgtag atgcatctt caccaacagc	120
taccggaagg tgctggccca gctgtccgcc cgcaagctgc tccaggacat cctgaacagg	180
cagcagggag agaggaacca agagcaagga gcataatga	219

<210> 19

<211> 246

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 类似的小鼠 GHRH 序列的序列

<400> 19

gccatggtgc tctgggtgct ctttgtgac ctcacctca ccagcggcag ccactgcagc 60

ctgcctccca gccctccctt caggatgcag aggcacgtgg acgccatctt caccaccaac 120

tacaggaagc tgctgagcca gctgtacgcc aggaaggtga tccaggacat catgaacaag 180

cagggcgaga ggatccagga gcagagggcc aggctgagct gataagcttg cgatgagttc 240

ttctaa 246

<210> 20

<211> 234

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 类似的大鼠 GHRH 序列的序列

<400> 20

gccatggccc tgtgggtgtt cttcgtgctg ctgaccctga ccagcggag ccactgcagc 60

ctgcctccca gccctccctt caggggtgcgc cggcacgccg acgccatctt caccagcagc 120

tacaggagga tcttgggcca gctgtacgct aggaagctcc tgcacgagat catgaacagg 180

cagcagggcg agaggaacca ggagcagagg agcaggttca actgataagc ttgc 234

<210> 21

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 原核 PNEO 启动子的核酸序列

<400> 21

accttaccag agggcgcccc agctggcaa

29

<210> 22

<211> 3534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有类似的 GHRH 序列的质粒载体

<400> 22

gttgtaaaac gacggccagt gaattgtaat acgactcact atagggcgaa ttggagctcc 60

accgcggtgg cgcccgctcg ccctcggcac cactctcag acacccaaat atggcgacgg 120

gtgaggaatg gtggggagtt atttttagag cggtagaggaa ggtgggcagg cagcaggtgt 180

tggcgctcta aaaataactc ccgggagtta tttttagagc ggaggaatgg tggacacca 240

aatatggcga cggttcctca ccgctcgcca tatttgggtg tccgccctcg gccggggccg 300

cattcctggg ggccggggcg tgctcccgcc cgcctcgata aaaggctccg gggccggcgg 360

cgggccacga gctacccgga ggagcgggag gcgccaagct ctagaactag tggatcccaa 420

ggcccaactc ccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatggtgct 480

ctgggtgttc ttctttgtga tcctcaccct cagcaacagc tcccactgct cccacctcc 540

cccttgacc ctcaggatgc ggcggcacgt agatgccatc ttcaccaaca gctaccggaa 600

ggtgctggcc cagctgtccg cccgcaagct gctccaggac atcctgaaca ggcagcaggg 660

agagaggaac caagagcaag gagcataatg actgcaggaa ttcgatatca agcttatcgg 720

ggtggcatcc ctgtgacccc tccccagtgc ctctcctggc cctggaagtt gccactccag 780

tgcccaccag ccttgctcta ataaaattaa gttgcatcat ttgtctgac taggtgtcct 840

tctataatat tatgggggtg aggggggtg tatggagcaa ggggcaagtt gggaagacaa 900

cctgtagggc ctgcggggtc tattgggaac caagctggag tgcagtggca caatcttggc 960

tcactgcaat ctcgcctcc tgggttcaag cgattctcct gcctcagcct cccgagttgt	1020
tgggattcca ggcatgcatg accaggtca gctaattttt gtttttttg tagagacggg	1080
gtttcaccat attggccagg ctggtctcca actcctaata tcaggtgatc taccacctt	1140
ggcctcccaa attgctggga ttacaggcgt gaaccactgc tcccttcct gtccttctga	1200
ttttaaaata actataccag caggaggacg tccagacaca gcataggcta cctggccatg	1260
cccaaccggt gggacatttg agttgcttgc ttggcactgt cctctcatgc gttgggtcca	1320
ctcagtagat gcctgttgaa ttcgataccg tcgacctga gggggggccc ggtaccagct	1380
ttgttccct ttagtgaggg ttaatttca gcttggcgta atcatggtca tagctgttc	1440
ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt	1500
gtaaagcctg gggcgcctaa tgagttagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc	1560
ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcg	1620
ggagaggcgg ttgctgattt gggcgtctt ccgcttctc gctcactgac tcgtgcgct	1680
cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtataa cggttatcca	1740
cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtagcaaa aggccagcaa aaggccagga	1800
accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc	1860
acaaaaatcg acgtcaagt cagagggtgc gaaacccgac aggactataa agataccagg	1920
cgtttcccc tggaagctcc ctctgcgct ctctgttcc gacctgccg cttaccgat	1980
acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca cgctgtaggt	2040
atctcagttc ggtgtaggtc gtctgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc	2100
agccccaccg ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg	2160
acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg	2220
gtgctacaga gttcttgaag tggcgccta actacggcta cactagaaga acagtatttg	2280

gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg	2340
gcaaacaac caccgctggt agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca	2400
gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagaaga	2460
actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc gggagcggcg ataccgtaaa	2520
gcacgaggaa ggggtcagcc cattcgccgc caagctcttc agcaatatca cgggtagcca	2580
acgctatgtc ctgatagcgg tccgccacac ccagccggcc acagtcgatg aatccagaaa	2640
agcggccatt ttccaccatg atattcggca agcaggcatc gccatgggtc acgacgagat	2700
cctcgccgtc gggcatgcgc gccttgagcc tggcgaacag ttcggctggc gcgagcccct	2760
gatgtctttc gtccagatca tcctgatcga caagaccggc ttccatccga gtacgtgtc	2820
gctcgatgcg atgtttcgt tgggtggcga atgggcaggt agccggatca agcgtatgca	2880
gccgccgat tgcacagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg tgagatgaca	2940
ggagatcctg ccccgccact tcgcccaata gcagccagtc ctttcccgt tcagtacaa	3000
cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgccc tcgtggccag ccacgatagc cgcgtgcct	3060
cgtcctgcag ttcatcagg gcaccggaca ggtcggctt gacaaaaaga accgggcgcc	3120
cctgcgtga cagccgaac acggcggcat cagagcagcc gattgtctgt tgtgccagt	3180
catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat ccatcttgtt	3240
caatcatgcg aaacgatcct catcctgtct ctgatcaga tcttgatccc ctgcgccatc	3300
agatccttgg cggcaagaaa gccatccagt ttactttgca gggcttccca acctaccag	3360
agggcgcccc agctggcaat tccggttcgc ttgctgtcca taaaaccgcc cagtctagca	3420
actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttegtatt acgccagctg gcgaaagggg	3480
gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtea cgac	3534

<210> 23
 <211> 2722
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 具有经密码子优化的小鼠 GHRH 序列的质粒载体

<400> 23

```
ccaccgcggt ggcgccgctc cgccctcggc accatcctca cgacacccaa atatggcgac      60
gggtgaggaa tggtagggag ttatttttag agcggtagag aagtagggca ggcagcaggt      120
gttgcgctc taaaaataac tcccgggagt tatttttaga gcggaggaat ggtggacacc      180
caaatatggc gacggttcct caccgctgc catatttggg tgtccgcctt cggccggggc      240
cgcatctctg ggggcccggc ggtgctcccg cccgcctcga taaaaggctc cggggcccgc      300
ggcgcccccac gagctaccg gaggagcggg aggcgccaag cggatcccaa ggcccaactc      360
cccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatgggtgct ctgggtgctc      420
tttgtgatcc tcatcctcac cagcggcagc cactgcagcc tgctcccag ccctcccttc      480
aggatgcaga ggcacgtgga cgccatcttc accaccaact acaggaagct gctgagccag      540
ctgtacgcca ggaagtgat ccaggacatc atgaacaagc agggcgagag gatccaggag      600
cagagggcca ggctgagctg ataagcttat cggggtggca tccctgtgac ccctcccag      660
tgctctcctt ggccctggaa gttgccactc cagtgccac cagccttgct ctaataaaat      720
taagttgcat cattttgtct gactaggtgt cctctataa tattatgggg tggagggggg      780
tggtatggag caaggggcaa gttggaaga caacctgtag ggctcgaggg ggggcccggg      840
accagctttt gttcccttta gtgagggtta atttcagctt tggctctccg ctctctcgt      900
cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc      960
ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg     1020
ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggtccg      1080
```

ccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg	1140
actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac	1200
cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca	1260
tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg taggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt	1320
gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc	1380
caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggttaaca ggattagcag	1440
agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac	1500
tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt	1560
tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa	1620
gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg	1680
gtctgacgct cagctagcgc tcagaagaac tcgtcaagaa ggcgatagaa ggcgatgcgc	1740
tgccaatcgg gagcggcgat accgtaaagc acgaggaagc ggtcagccca ttgcccgcca	1800
agctcttcag caatatcacg ggtagccaac gctatgtcct gatagcggtc cgccacaccc	1860
agccggccac agtcgatgaa tccagaaaag cggccatitt ccaccatgat attcggcaag	1920
caggcatcgc catgagtcac gacgagatcc tcgccgtcgg gcatgcgcgc cttagacctg	1980
gcgaacagtt cggttggcgc gagcccciga tgctcttcgt ccagatcatc ctgatcgaca	2040
agaccggctt ccatccgagt acgtgctcgc tcgatcgat gtttcgcttg gtggtcgaat	2100
gggcaggtag ccgatcaag cgtatgcagc cgccgcatg catcagccat gatggatact	2160
ttctcggcag gagcaagggt agatgacagg agatcctgcc ccggcacitc gcccaatagc	2220
agccagtcce ttcccgcttc agtgacaacg tcgagcacag ctgcgcaagg aacgcccgtc	2280
gtggccagcc acgatagccg cgctgcctcg tcttcagtt cattcagggc accggacagg	2340
tcggtcttga caaaaagaac cgggcgcccc tgcgtgaca gccggaacac ggcggcatca	2400

gagcagccga ttgtctgttg tgcccagtca tagccgaata gcctctccac ccaagcggcc	2460
ggagaacctg cgtgcaatcc atcttggtca atcatgcgaa acgatacctca tcctgtctct	2520
tgatcagatc ttgatccctt gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt	2580
actttgcagg gcttcccaac cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt	2640
gctgtccata aaaccgcca gtctagcaac tgttgggaag ggcgatcgtg taatacgact	2700
cactataggg cgaattggag ct	2722

<210> 24

<211> 2725

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有经密码子优化的大鼠 GHRH 序列的质粒载体

<400> 24

ccaccgcggt ggcgccgctc cgccctcggc accatcctca cgacacccaa atatggcgac	60
gggtgaggaa tgggtgggag ttatttttag agcggtgagg aaggtgggca ggcagcaggt	120
gttggcgctc taaaaataac tcccgggagt tatttttaga gcggaggaaat ggtggacacc	180
caaatatggc gacggttcct caccgcgcgc catatttggg tgcgcgcct cgcccggggc	240
cgcattcctg ggggcccggc ggtgctcccg cccgcctcga taaaaggctc cggggccggc	300
ggcgggccac gagctaccg gaggagcggg aggcgccaag cggatcccaa ggcccaactc	360
cccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatggccct gtgggtgttc	420
ttcgtgctgc tgaccctgac cagcggaagc cactgcagcc tgcctcccag ccctcccttc	480
agggtgcgcc ggcacgccga cgccatcttc accagcagct acaggaggat cctgggccag	540
ctgtacgcta ggaagctcct gcacgagatc atgaacaggc agcagggcga gaggaaccag	600
gagcagagga gcaggttcaa ctgataagct tatcgggggt gcatccctgt gacccctccc	660

cagtgcctct cctggccctg gaagttgcca ctccagtgcc caccagcctt gtcctaataa	720
aattaagttg catcattttg tctgactagg tgtccttcta taatattatg ggggtggagg	780
gggtggtatg gagcaagggg caagttggga agacaacctg tagggctcga gggggggccc	840
ggtaccagct ttgtttccct ttagtgaggg ttaatttcga gcttggtctt ccgcttcctc	900
gctcactgac tcgtgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa	960
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa	1020
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct	1080
ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac	1140
aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctcgtgcgt ctcctgttcc	1200
gaccctgccg cttaccgat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc	1260
tcatagetca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg	1320
tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga	1380
gtccaaccog gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag	1440
cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtgccta actacggcta	1500
cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag	1560
agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac caccgtggt agcggtggtt tttttgtttg	1620
caagcagcag attacgcga gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac	1680
ggggtctgac gtcagctag cgctcagaag aactcgtaa gaaggcgata gaaggcgatg	1740
cgctgcgaat cgggagcggc gataccgtaa agcacgagga agcggtcagc ccattcgccg	1800
ccaagctctt cagcaatatc acgggtagcc aacgctatgt cctgatagcg gtccgccaca	1860
cccagccggc cacagtcgat gaatccagaa aagcggccat tttccacat gatattcggc	1920
aagcaggcat cgccatgagt cagcacgaga tctcgcctg cgggcatgcg cgccttgagc	1980

ctggcgaaca gttcggctgg cgcgagcccc tgatgctctt cgtccagatc atcctgatcg 2040
 acaagaccgg ctccatccg agtacgtgct cgctcgatgc gatgtttcgc ttggtggtcg 2100
 aatgggcagg tagccggatc aagcgtatgc agccgccgca ttgcatcagc catgatggat 2160
 actttctcgg caggagcaag gtgagatgac aggagatcct gccccggcac ttgcccgaat 2220
 agcagccagt cccttcccgc ttcagtgaca acgtcgagca cagctgcgca aggaacgccc 2280
 gtcgtggcca gccacgatag ccgcgtgcc tcgtcctgca gttcattcag ggcaccggac 2340
 aggtcgggtct tgacaaaaag aaccgggccc ccctgcgctg acagccggaa cacggcggca 2400
 tcagagcagc cgattgtctg ttgtgcccag tcatagccga atagcctctc cacccaagcg 2460
 gccggagaac ctgctgcaa tccatcttgt tcaatcatgc gaaacgatcc tcctcctgtc 2520
 tcttgatcag atcttgatcc cctgcgcat cagatccttg gcgcaagaa agccatccag 2580
 tttactttgc agggcttccc aaccttacca gagggcgccc cagctggcaa ttccgggtcg 2640
 cttgctgtcc ataaaaccgc ccagtctagc aactgttggg aaggcgatc gtgtaatacg 2700
 actcactata gggcgaattg gagct 2725

<210> 25

<211> 2725

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 这是经密码子优化的 HV-GHRH 表达质粒

<400> 25

ccaccgcggt ggcggccgct cgcctcggc accatcctca cgacaccaa atatggcgac 60
 ggggtgaggaa tgggtggggag ttatttttag agcggtagg aaggtgggca ggcagcaggt 120
 gttggcgctc taaaaataac tcccgggagt tatttttaga gcggaggaat ggtggacacc 180
 caaatatggc gacggttcct caccgctgc catatttggg tgtccgcct cggccggggc 240

cgcattcctg ggggccgggc ggtgctcccg cccgcctcga taaaaggctc cggggccggc	300
ggcggccac gagctacccg gaggagcggg aggcgccaag cggatcccaa ggcccaactc	360
cccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatgggtgct ctgggtgttc	420
ttctttgtga tcctcaccct cagcaacagc tcccactgct cccacctcc ccctttgacc	480
ctcaggatgc ggcggcacgt agatgccatc ttcaccaaca gctaccggaa ggtgctggcc	540
cagctgtccg cccgcaagct gctccaggac atcctgaaca ggcagcaggg agagaggaac	600
caagagcaag gagcataatg acatcaagct tatcggggtg gcatccctgt gacccctccc	660
cagtgcctct cctggccctg gaagttgcca ctccagtgcc caccagcctt gtcctaataa	720
aattaagttg catcattttg tctgactagg tgtccttcta taatattatg gggtaggagg	780
gggtggtatg gagcaagggg caagttggga agacaacctg tagggctcga gggggggccc	840
ggtaccagct tttgttcct ttagtgaggg ttaatttcga gcttggtctt ccgcttcctc	900
gctcactgac tcgtgcgt cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa	960
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa	1020
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct	1080
ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac	1140
aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgcgt ctctgttcc	1200
gacctgcg cttaccgat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc	1260
tcatagctca cgtgtagggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg	1320
tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga	1380
gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag	1440
cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtagccta actacggcta	1500
cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag	1560

agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac caccgctggt agcggtggtt tttttgttta	1620
caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac	1680
ggggtctgac gctcagctag cgctcagaag aactcgtcaa gaaggcgata gaaggcgatg	1740
cgctgcgaat cgggagcggc gataccgtaa agcacgagga agcggtcagc ccattcgccg	1800
ccaagctctt cagcaatatc acgggtagcc aacgctatgt cctgatagcg gtccgccaca	1860
cccagccggc cacagtcgat gaatccagaa aagcggccat tttccacat gatattcggc	1920
aagcaggcat cgccatgagt cacgacgaga tcctcgccgt cgggcatgcg cgccttgagc	1980
ctggcgaaca gttcggctgg cgcgagcccc tgatgctctt cgtccagatc atcctgatcg	2040
acaagaccgg cttccatccg agtacgtgct cgctcgatgc gatgtttcgc ttggtggtcg	2100
aatgggcagg tagccggatc aagcgtatgc agccgccgca ttgcatcagc catgatggat	2160
actttctcgg caggagcaag gtgagatgac aggagatcct gccccggcac ttcgccaat	2220
agcagccagt ccttccccgc ttcagtgaca acgtcgagca cagctgcgca aggaacgccc	2280
gtcgtggcca gccacgatag ccgcgtgcc tcgtcctgca gttcattcag ggcaccggac	2340
aggtcggctt tgacaaaaag aaccggggcg ccctgcgtg acagccggaa cacggcggca	2400
tcagagcagc cgattgtctg ttgtgccag tcatagccga atagcctctc cacccaagcg	2460
gccggagaac ctgctgcaa tccatcttgt tcaatcatgc gaaacgatcc tcacctgtc	2520
tcttgatcag atcttgatcc cctgcgcat cagatccttg gcggcaagaa agccatccag	2580
tttactttgc agggttccc aaccttacca gagggcgccc cagctggcaa ttccggttcg	2640
cttgcgtgcc ataaaaccgc ccagtctagc aactgttggg aaggcgatc gtgtaatacg	2700
actcactata gggcgaattg gagct	2725

<210> 26

<211> 2721

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 这是经密码子优化的猪 GHRH 表达质粒

<400> 26

ccaccgcggt ggcgggcgtc cgccctcggc accatcctca cgacacccaa atatggcgac	60
gggtgaggaa tggtagggag ttatitttag agcggtagg aaggtgggca ggcagcaggt	120
gttggcgctc taaaaataac tcccgggagt tatttttaga gcggaggaaat ggtggacacc	180
caaatatggc gacggttcct caccgctcgc cataattggg tgtccgccct cggccggggc	240
cgcattcctg ggggccgggc ggtgctcccg cccgcctcga taaaaggctc cggggccggc	300
ggcgggccac gagctaccg gaggagcggg aggcgccaag cggatcccaa ggcccaactc	360
ccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatggtgct ctgggtgttc	420
ttctttgtga tcctcacct cagcaacagc tcccactgct cccacctcc ccctttgacc	480
ctcaggatgc ggcggtatgc agatgccatc ttcaccaaca gctaccggaa ggtgctgggc	540
cagctgtccg ccgcaagct gctccaggac atcatgagca ggcagcaggg agagaggaa	600
caagagcaag gagcataatg aaagcttacc ggggtggcat ccctgtgacc cctccccagt	660
gcctctcctg gccctggaag ttgccactcc agtgcacc acccttgctc taataaaatt	720
aagttgcatc attttgtctg actaggtgtc cttctataat attatggggt ggaggggggt	780
ggtatggagc aaggggcaag ttgggaagac aacctgtagg gctcgagggg gggcccggta	840
ccagcttttg ttcccttttag tgagggttaa ttctgagctt ggtcttccgc ttcctcgtc	900
actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg	960
gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacaatgtg agcaaaaggc	1020
cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggtccgc	1080
ccccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga	1140

ctataaagat accaggegtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc	1200
ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat	1260
agctcacgct gtaggtatct cagttcgggt taggtcggtc gtcceaagct gggctgtgtg	1320
cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc	1380
aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctgtaacag gattagcaga	1440
gcgaggtatg taggcgggtc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact	1500
agaagaacag tatttggat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt	1560
ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgittacaag	1620
cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg	1680
tctgacgctc agctagcgct cagaagaact cgtcaagaag gcgatagaag gcgatgcgct	1740
gcgaatcggg agcggcgata ccgtaaagca cgaggaagcg gtcagcccat tcgccgcaa	1800
gctcttcagc aatatcacgg gtagccaacg ctatgtcctg atagcggtec gccacacca	1860
gccggccaca gtcgatgaat ccagaaaagc ggccattttc caccatgata ttcggaagc	1920
aggcatcgcc atgagtcacg acgagatcct cgccgtcggg catgcgcgcc ttgagcctgg	1980
cgaacagttc ggctggcgcg agccccgat gctcttcgtc cagatcatcc tgatcgaaa	2040
gaccggcttc catccgagta cgtgctcgct cgatgcgatg tttcgcttgg tggcgaatg	2100
ggcaggtagc cggatcaagc gtatgcagcc gccgcattgc atcagccatg atggatactt	2160
tctcggcagg agcaaggtga gatgacagga gatcctgcc cggcacttcg cccaatagca	2220
gccagtcctt tcccgttca gtgacaacgt cgagcacagc tgcgcaagga acgcccgtcg	2280
tggccagcca cgatagccgc gctgcctcgt cctgcagttc attcaggga ccggacaggt	2340
cggctcttgac aaaaagaacc gggcgcccct gcgctgacag ccggaacacg gcggcatcag	2400
agcagccgat tgtctgttgt gccagtcct agccgaatag cctctccacc caagcgccg	2460

gagaacctgc gtgcaatcca tcttggtcaa tcatgcgaaa cgatcctcat cctgtctctt 2520
gatcagatct tgatccccctg cgccatcaga tccttggcgg caagaaagcc atccagttta 2580
ctttgcaggg cttcccaacc ttaccagagg gcgccccagc tggcaattcc ggttcgcttg 2640
ctgtccataa aaccgcccag tctagcaact gttgggaagg gcgatcgtgt aatacgactc 2700
actatagggc gaattggagc t 2721

<210> 27

<211> 2716

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 这是经密码子优化的犬 GHRH 表达质粒

<400> 27

ccaccgcggg ggccggccgtc cgccctcggc accatcctca cgacacccaa atatggcgac 60
gggtgaggaa tgggtggggag ttatttttag agcggtgagg aaggtgggca ggcagcaggt 120
gttggcgctc taaaaataac tcccgggagt tatttttaga gcggaggaat ggtggacacc 180
caaatatggc gacggttcct caccgcgcgc catatttggt tgtccgccct cgcccggggc 240
cgcatctctg ggggccgggc ggtgctcccg ccgcctcga taaaaggctc cggggccggc 300
ggcgcccccac gagctacccg gaggagcggg aggcgccaag cggateccaa ggcccaactc 360
cccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatggtgct ctgggtgttc 420
ttcctggtga tcctaccct cagcagtggg tccactctt ccccgccatc cctgcccac 480
agaatccctc ggtatgcaga cgccatcttc accaacagct accggaaggt gctgggccag 540
ctgtccgccc gcaagctcct scaggacatc atgagccggc agcagggaga gagaaaccgg 600
gagcaaggag catagtaagc ttatcggggg ggcacccctg tgaccctcc ccagtgcctc 660
tcctggccct ggaagttgcc actccagtgc ccaccagcct tgcctaata aaattaagtt 720

gcatcatttt gtctgactag gtgtccttct ataataattat ggggtggagg ggggtggtat	780
ggagcaaggg gcaagttggg aagacaacct gtagggctcg agggggggcc cggtaccagc	840
ttttgttccc tttagtgagg gttaatttcg agcttggtct tccgcttcct cgctcactga	900
ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgeggcg agcggatatca gctcactcaa aggcggtaat	960
acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca	1020
aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc	1080
tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtagg cgaaaccga caggactata	1140
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc ctcgctgcgc tctcctgttc cgacctgcc	1200
gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcatagctc	1260
acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga	1320
acccccgtt cagcccgacc gctgcgctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc	1380
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag	1440
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct aactagaag	1500
aacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gaggtagtag	1560
ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcggtagt tttttgttt acaagcagca	1620
gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatccttg atcttttcta cggggtctga	1680
cgctcagcta gcgctcagaa gaactcgta agaaggcgat agaaggcgat gcgctcgaa	1740
tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtagc ccattcgcc gccaaagctct	1800
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccggcac acccagccgg	1860
ccacagtga tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatatcgg caagcaggca	1920
tcgcatgag tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac	1980
agttcggtg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgac gacaagaccg	2040

```

gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag 2100
gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 2160
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 2220
tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc 2280
agccacgata gccgcgtgc ctcgtcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc 2340
ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 2400
ccgattgtct gttgtgcca gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 2460
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatcatg cgaaacgatc ctcatcctgt ctcttgatca 2520
gatcttgatc ccctgcgcca tcagatcctt ggcggaaga aagccatcca gtttactttg 2580
cagggttcc caaccttacc agaggcgcc ccagctggca attccggttc gcttctgtc 2640
cataaaaccg cccagtctag caactgttgg gaaggcgat cgtgtaatac gactcactat 2700
agggcgaatt ggagct 2716

```

<210> 28

<211> 2716

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 这是经密码子优化的牛 GHRH 表达质粒.

<400> 28

```

ccaccgcggt ggcgccgctc cgccctcggc accatcctca cgacacccaa atatggcgac 60
gggtgaggaa tgggtggggag ttatttttag agcggtaggg aagggtggga ggcagcaggt 120
gttggcgctc taaaaataac tcccgaggat tatttttaga gcggaggaat ggtggacacc 180
caaatatggc gacggttcct caccgcgcgc catatttggg tgtccgccct cggccggggc 240
cgcatcctg ggggcccggc ggtgctcccc ccgcctcga taaaaggctc cggggccggc 300

```

ggcggccac gagctacccg gaggagcggg aggcgccaag cggatcccaa ggcccaactc	360
cccgaaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatgggtgct gtgggtgttc	420
ttcctgggtga cctgaccct gagcagcggc tcccacggct ccctgccctc ccagcctctg	480
cgcacccctc gctacgccga cgccatcttc accaacagct accgcaaggt gctcggccag	540
ctcagcggccc gcaagctcct gcaggacatc atgaaccggc agcagggcga gcgcaaccag	600
gagcagggag cctgataagc ttatcggggg ggcacccctg tgacccctcc ccagtgcctc	660
tcctggccct ggaagttgcc actccagtgc ccaccagcct tgtcctaata aaattaagtt	720
gcatcatitt gtctgactag gtgtccttct ataataattat ggggtggagg ggggtggtat	780
ggagcaaggg gcaagttggg aagacaacct gtagggctcg agggggggcc cgttaccagc	840
ttttgttccc tttagttagg gttaatttcg agcttggctt tccgttccct cgtcactga	900
ctcgtgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcgggtatca gctcactcaa aggcggtaat	960
acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca	1020
aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc	1080
tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcaag tcagaggtgg cgaaaccca caggactata	1140
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc	1200
gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcatagctc	1260
acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt cgttcgtcc aagctgggct gtgtgcacga	1320
acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc	1380
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag	1440
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct aactagaag	1500
aacagtatit ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttgtag	1560
ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgtgg tagcgggtgt tttttgttt acaagcagca	1620

gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga	1680
cgctcagcta gcgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa	1740
tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag ccatttcgcc gccaaagtct	1800
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcttgatagc ggtccgccac acccagccgg	1860
ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttcacca tgatattcgg caagcaggca	1920
tcgcatgag tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac	1980
agttcggctg gcgcgagccc ctgatgtctt tcgtccagat catcctgac gacaagaccg	2040
gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag	2100
gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg	2160
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag	2220
tcccttcccc cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc	2280
agccacgata gccgcgtgc ctgctcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc	2340
ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag	2400
ccgattgtct gttgtgcccc gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa	2460
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatcatg cgaaacgac ctcacctgt ctcttgatca	2520
gatcttgatc cctgcgcca tcagatcctt ggcggaaga aagccatcca gtttactttg	2580
cagggttcc caaccttacc agaggcgcc ccagctggca attccggttc gcttctgtc	2640
cataaaaccg cccagtctag caactgttgg gaaggcgat cgtgtaatac gactcactat	2700
agggcgaatt ggagct	2716

<210> 29

<211> 2716

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 这是经密码子优化的猫 GHRH 表达质粒

<400> 29

ccaccgcggt ggcggccgtc cgccctcggc accatcctca cgacacccaa atatggcgac	60
gggtgaggaa tgggtggggag ttattttttag agcggtgagg aaggtgggca ggcagcaggt	120
gttggcgctc taaaaataac tcccgggagt tatttttaga gcggaggaat ggtggacacc	180
caaatatggc gacggttcct caccgcgcgc catatttggg tgtccgccct cggccggggc	240
cgcattcctg ggggccgggc ggtgctcccg ccgcctcga taaaaggctc cggggccggc	300
ggcggcccac gagctacccg gaggagcggg aggcgccaag cgcatcccaa ggcccaactc	360
cccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatgggtgct ctgggtgttc	420
ttcctgggtga tctcaccs ssacagtggc tccactgct cccgccatc cctgcccctc	480
agaatgcctc ggtatgcaga tgccatcttc accaacagct accggaaggt gctgggtcag	540
ctgtctgccc gcaagctact gcaggacatc atgagcagac agcagggaga gagaaaccag	600
gagcaaggag cataataagc ttatcggggt ggcacccctg tgaccctcc ccagtgcctc	660
tcctggccct ggaagttgcc actccagtgc ccaccagcct tgtcctaata aaattaagtt	720
gcatcatttt gtctgactag gtgtccttct ataatattat ggggtggagg ggggtggtat	780
ggagcaaggg gcaagttggg aagacaacct gtagggctcg agggggggcc cggtagcagc	840
ttttgttccc tttagttagg gttaatctcg agcttggctt tccgcttcct cgctcactga	900
ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat	960
acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca	1020
aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc	1080
tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcaag tcagaggtgg cgaaaccga caggactata	1140
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc	1200

gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc	1260
acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cggtcgctcc aagctgggct gtgtgcacga	1320
acccccggt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc	1380
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag	1440
glatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct aactagaag	1500
aacagtatit ggatatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gaggttgtag	1560
ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgtt tttttgttt acaagcagca	1620
gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga	1680
cgtcagcta gcgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa	1740
tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag ccatttcgcc gccaaagctct	1800
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg	1860
ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg caagcaggca	1920
tcgccatgag tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac	1980
agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgac gacaagaccg	2040
gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg ctgggtggtc gaatgggcag	2100
gtagccggat caagcgtatg cagccgcgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg	2160
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccgga cttcgccaa tagcagccag	2220
tcccttccc cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc	2280
agccacgata gccgcgtgc ctgctcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc	2340
ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgt gacagccgga acacggcggc atcagagcag	2400
ccgattgtct gttgtgcccc gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa	2460
ccigcgtgca atccatcttg ttcaatcatg cgaacagatc ctcatcctgt ctcttgatca	2520

gatcttgatc ccctgcgcca tcagatcctt ggcggcaaga aagccatcca gtttactttg 2580
 cagggttcc caaccttacc agaggcgcc ccagctggca attccggttc gcttgctgtc 2640
 cataaaaccg cccagtctag caactgttgg gaaggcgat cgtgtaatac gactcactat 2700
 agggcgaatt ggagct 2716

<210> 30

<211> 2739

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 这是经密码子优化的 TI-GHRH 表达质粒

<400> 30

ccaccgcggt ggcggccgtc cgccctcggc accatcctca cgacacccaa atatggcgac 60
 gggtaggaa tggtagggag ttattttttag agcggtagg aaggtaggca ggcagcaggt 120
 gttggcgctc taaaaataac tcccgggagt tattttttaga gcggaggaaat ggtggacacc 180
 caaatatggc gacggttcct caccgctgc catatttggg tgtccgccct cggccggggc 240
 cgcattcctg ggggccgggc ggtgctcccg ccgcctcga taaaaggctc cggggccggc 300
 ggcggcccac gagctaccg gaggagcggg aggcgccaag cgatcccaa ggcccaactc 360
 cccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatggtgct ctgggtgttc 420
 ttctttgtga tcctaccct cagcaacagc tccactgct cccacctcc ccctttgacc 480
 ctcaggatgc ggcggtatat cgatgccatc ttcaccaaca gctaccgaa ggtgctggcc 540
 cagctgtccg cccgcaagct gctccaggac atcctgaaca ggcagcagg agagaggaac 600
 caagagcaag gagcataatg actgcaggaa ttcgatatca agcttatcgg ggtggcatcc 660
 ctgtgacccc tcccagtgct ctctcctggc cctggaagt gccactccag tgcccaccag 720
 ccttgtccta ataaaattaa gttgcatcat ttgtctgac taggtgtcct tctataatat 780

tatggggtgg aggggggtgg tatggagcaa ggggcaagtt gggaagacaa cctgtagggc	840
tcgagggggg gcccgtacc agcttttggt cccttttagtg agggttaatt tcgagcttgg	900
tcttcgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttccgctgcg gcgagcggta	960
tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaaag	1020
aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg	1080
tttttcata ggctccgcc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg	1140
tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcggttc ccctggaag ctccctcggt	1200
cgctctctg ttccgacct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga	1260
agcgtggcg tttctcatag ctacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcggtcgc	1320
tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt	1380
aactatcgtc ttgagtccaa cccgtaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact	1440
ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg	1500
cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt	1560
accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg	1620
ggtttttttg tttaacaagc gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct	1680
ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag ctacgctca gaagaactcg tcaagaaggc	1740
gatagaaggc gatgcgctgc gaatcgggag cggcgatacc gtaaagcacg aggaagcggg	1800
cagcccattc gccgccaagc tcttcagcaa tatcacgggt agccaacgct atgtcctgat	1860
agcgggtccg cacaccagc cggccacagt cgatgaatcc agaaaagcgg ccattttcca	1920
ccatgatatt cggcaagcag gcatcgccat gagtcacgac gagatcctcg ccgtcgggca	1980
tgcgcgcctt gagcctggcg aacagttcgg ctggcgcgag ccctgatgc tcttcgtcca	2040
gatcactctg atcgacaaga ccggttcca tccgagtacg tgctcgctcg atgcgatgtt	2100

tcgcttggtg gtcgaatggg caggtagccg gatcaagcgt atgcagccgc cgcattgcat 2160
cagccatgat ggatactttc tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tcctgccccg 2220
gcacttcgcc caatagcagc cagtccttc cgccttcagt gacaacgtcg agcacagctg 2280
cgcaaggaac gcccgtcgtg gccagccacg atagccgcgc tgcctcgtcc tgcagttcat 2340
tcagggcacc ggacaggtcg gtcttgacaa aaagaaccgg gcgccccctgc gctgacagcc 2400
ggaacacggc ggcatcagag cagccgattg tctgtttgic ccagtcatag ccgaatagcc 2460
tctccacca agcggccgga gaacctgcgt gcaatccatc ttgttcaatc atgcgaaacg 2520
atcctcatcc tgtctcttga tcagatcttg atcccctgcg ccatcagatc cttggcggca 2580
agaaagccat ccagtttact ttgcagggtc tcccaacctt accagagggc gccccagctg 2640
gcaattccgg ttgccttgct gtccataaaa ccgcccagtc tagcaactgt tgggaagggc 2700
gatcgtgtaa tacgactcac tataggcgga attggagct 2739

<210> 31

<211> 2716

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 这是经密码子优化的羊 GHRH 表达质粒

<400> 31

ccaccgcggt ggcgccgctc cgccctcggc accatcctca cgacacccaa atatggcgac 60
gggtgaggaa tgggtgggag ttatTTTTtag agcggtagg aaggtgggca ggcagcaggt 120
gttggcgctc taaaaataac tcccgggagt tatttttaga gcggaggaat ggtggacacc 180
caaatatggc gacggttcct caccgctgc catatttggg tgtccgccct cggccggggc 240
cgcattcctg ggggcccggc ggtgctcccg ccgcctcga taaaaggctc cggggccggc 300
ggcgcccac gagctaccg gaggagcggg aggcgccaag cggatcccaa ggcccaactc 360

cccgaaccac tcagggctct gtggacagct cacctagctg ccatgggtgct gtgggtgttc	420
ttcctgggtga ccctgaccct gagcagcgga agccacggca gcctgcccag ccagcccctg	480
aggatcccta ggtacgccga cgccatcttc accaacagct acaggaagat cctggggccag	540
ctgagcgcta ggaagctcct gcaggacatc atgaacaggc agcagggcga gaggaaccag	600
gagcagggcg cctgataagc ttatcggggt ggcatccctg tgacctctcc ccagtgcctc	660
tcctggccct ggaagttgcc actccagtgc ccaccagcct tgtcctaata aaattaagtt	720
gcatcatitt gtctgactag gtgtccttct ataatattat ggggtggagg ggggtggtat	780
ggagcaaggg gcaagttggg aagacaacct gtagggctcg agggggggcc cgttaccagc	840
ttttgttccc tttagtgagg gttaatttcg agcttggctt tccgttcct cgtcactga	900
ctcgtgcgc tcggtcggtc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcgtaat	960
acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca	1020
aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcggtt ttccataggc tccgcccc	1080
tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcaag tcagaggtgg cgaaaccga caggactata	1140
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc	1200
gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc	1260
acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt cggtcgtcc aagctgggct gtgtgcacga	1320
acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaacc	1380
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag	1440
gatatgtagc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct acactagaag	1500
aacagtatit ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gatttggtag	1560
ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgtgg tagcgggtgt tttttgttt acaagcagca	1620
gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga	1680

cgctcagcta gcgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa	1740
tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagctct	1800
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg	1860
ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca tgatattcgg caagcaggca	1920
tcgcatgag tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac	1980
agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgac gacaagaccg	2040
gcttccatcc gagiactgac tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag	2100
gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg	2160
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccgca cttcgcccaa tagcagccag	2220
tcctttcccg cttcagtac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc	2280
agccacgata gccgcgtgc ctgctcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc	2340
ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag	2400
ccgattgtct gttgtgcca gtcatacgcc aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa	2460
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatcatg cgaaacgac ctcacctgt ctcttgatca	2520
gatcttgatc cctgcgcca tcagatcctt ggcggaaga aagccatcca gtttactttg	2580
cagggttcc caaccttacc agaggcgcc ccagctggca attccggttc gcttgctgtc	2640
cataaaaccg cccagtctag caactgttgg gaaggcgat cgtgtaatac gactcactat	2700
agggcgaatt ggagct	2716

<210> 32

<211> 2725

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 这是经密码子优化的鸡 GHRH 表达质粒

<400> 32

ccaccgcggt ggcgccgctc cgcctcggc accatcctca cgacacccaa atatggcgac	60
gggtgaggaa tgggtggggag ttatttttag agcggtagg aaggtgggca ggcagcaggt	120
gttggcgctc taaaaataac tcccgggagt tatttttaga gcggaggaat ggtggacacc	180
caaatatggc gacggttcct caccgcgcgc catatttggg tgtccgccct cggccggggc	240
cgcattcctg ggggccgggc ggtgctcccg cccgcctcga taaaaggctc cggggccggc	300
ggcgggccac gagctacccg gaggagcggg aggcgccaa cggatcccaa ggcccaactc	360
cccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatggccct gtgggtgttc	420
tttgtgctgc tgacctgac ctccggaagc cactgcagcc tgccaccag cccacccttc	480
cgcgtcaggc gccacgccga cggcatcttc agcaaggcct accgcaagct cctgggccag	540
ctgagcgcac gcaactacct gcacagcctg atggccaagc gcgtgggcag cggactggga	600
gacgaggccg agcccctgag ctgataagct tatcggggtg gcatecctgt gacccctccc	660
cagtgcctct cctggccctg gaagttgcca ctccagtgc caccagcctt gtcctaataa	720
aattaagttg catcattttg tctgactagg tgtccttcta taatattatg ggggtggaggg	780
gggtggtatg gagcaagggg caagttggga agacaacctg tagggctcga gggggggccc	840
ggtaccagct tttgttcctt ttagtgaggg ttaatttcga gcttggctct ccgcttcctc	900
gtcactgac tcgtgcgct cggtcgttcg gctcggcgca gcggtatcag ctactcaaa	960
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa	1020
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct	1080
ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgtcaagt cagagggtgc gaaacccgac	1140
aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctcgtcgct ctctgttcc	1200
gaccctgccg ctaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc	1260

tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg	1320
tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga	1380
gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag	1440
cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtagccta actacggcta	1500
cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc tctgtgaag ccagttacct tcgaaaaag	1560
agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcggtaggt tttttgtta	1620
caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac	1680
ggggtctgac gctcagctag cgctcagaag aactcgtcaa gaaggcgata gaaggcgatg	1740
cgctgcgaat cgggagcggc gataccgtaa agcacgagga agcggtcagc ccattcgccg	1800
ccaagctctt cagcaatata acgggtagcc aacgctatgt cctgatagcg gtccgccaca	1860
cccagccggc cacagtcgat gaatccagaa aagcggccat tttccaccat gatattcggc	1920
aagcaggcat cgccatgagt cacgacgaga tcctcgccgt cgggcatgcg cgccttgagc	1980
ctggcgaaca gttcggctgg cgcgagcccc tgatgctctt cgtccagatc atcctgatcg	2040
acaagaccgg cttccatccg agtacgtgct cgctcgatgc gatgtttcgc ttggtggctg	2100
aatgggcagg tagccggatc aagcgtatgc agccgccga ttgcatcagc catgatggat	2160
actttctcgg caggagcaag gtgagatgac aggagatcct gccccggcac ttcgccaat	2220
agcagccagt cccttcccgc ttcagtgaca acgtcgagca cagctgcgca aggaacgccc	2280
gtcgtggcca gccacgatag ccgcgctgcc tcgtcctgca gttcattcag ggcaccggac	2340
aggtcggtct tgacaaaaag aaccgggcgc ccttgcgctg acagccggaa cacggcggca	2400
tcagagcagc cgattgtctg ttgtgcccag tcatagccga atagcctctc cacccaagcg	2460
gccggagaac ctgcgtgcaa tccatcttgt tcaatcatgc gaaacgatcc tcatcctgtc	2520
tcttgatcag atcttgatcc cctgcgcat cagatccttg gcggcaagaa agccatccag	2580

tttactttgc agggcttccc aaccttacca gagggcgccc cagctggcaa ttccggttcg 2640

cttgctgtcc ataaaaccgc ccagcttagc aactgttggg aaggcgatc gtgtaatacg 2700

actcactata gggcgaattg gagct 2725

<210> 33

<211> 2700

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 这是对于马 GHRH 来说优化的质粒

<400> 33

ccaccgcggt ggccggccgtc cgccctcggc accatcctca cgacacccaa atatggcgac 60

gggtgaggaa tgggtggggag ttatttttag agcggtagg aaggtaggca ggcagcaggt 120

gttggcgctc taaaaataac tcccgggagt tatttttaga gcggaggaat ggtggacacc 180

caaatatggc gacggttcct caccgcgcgc cataatttggg tgtccgccct cggccggggc 240

cgcattcctg ggggccgggc ggtgctcccg cccgcctcga taaaaggctc cggggccggc 300

ggcgcccccac gagctaccgg gaggagcggg aggcgcgaag cggatcccaa ggcccaactc 360

cccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatggtgct ctgggtgttc 420

ttctttgtga tctcaccct cagcaacagc tcccactgct ccccaactcc ccctttgacc 480

ctcaggatgc ggccggtatgc agatgccatc ttcaccaaca gctaccggaa ggtgctgggc 540

cagctgtccg cccgcaagct gctgcaggac atcatgagca ggcagcaggg agagagcaac 600

caagagcgag gagcataatg aaagcttata ggggtggcat ccctgtgacc cctccccagt 660

gcctctcctg gccctggaag ttgccactcc agtgcccacc agccttgtcc taataaaatt 720

aagtigcatc attttgtctg actagggtgc ctctataat attatggggt ggaggggggt 780

ggtatggagc aaggggcaag ttgggaagac aacctgtagg gctcgagggg gggcccggtg 840

ccagcttttg ttcccttag tgagggttaa ttccgagctt ggtcttccgc ttccctcgctc	900
actgactcgc tgcgctcggc cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg	960
gtaatacggc tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc	1020
cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggtccgc	1080
ccccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga	1140
ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc	1200
ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat	1260
agctcacgct gtaggtatct cagttcggcg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg	1320
cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc	1380
aaccggtaa gacacgactt atgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga	1440
gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggc ggcctaacta cggctacact	1500
agaagaacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt	1560
ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttacaag	1620
cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg	1680
tctgacgctc agctagcgtc cagaagaact cgtcaagaag gcgatagaag gcgatgcgtc	1740
gcgaatcggg agcggcgata ccgtaaagca cgaggaagcg gtcagcccat tcgccgcaa	1800
gctcttcagc aatatcacgg gtagccaacg ctatgtcctg atagcgggtc gccacacca	1860
gccggccaca gtcgatgaat ccagaaaagc ggccattttc caccatgata ttcggcaagc	1920
aggcatcgcc atgagtcacg acgagatcct cgccgtcggg catgcgcgcc ttgagcctgg	1980
cgaacagttc ggctggcgcg agcccctgat gctcttcgtc cagatcatcc tgatcgacaa	2040
gaccggcttc catccagta cgtgctcgtc cgatgcgatg ttccgcttgg tggtcgaatg	2100
ggcaggtagc cggatcaagc gtagtcagcc gccgattgc atcagccatg atggatactt	2160

tctcggcagg agcaaggtga gatgacagga gatcctgccc cggcacttcg cccaatagca 2220

gccagtcctt tcccgtttca gtgacaacgt cgagcacagc tgcgcaagga acgcccgtcg 2280

tggccagcca cgatagccgc gctgcctcgt cctgcagttc attcaggga cggacaggt 2340

cggctcttgac aaaaagaacc gggcgcccct gcgctgacag ccggaacacg gcgcatcag 2400

agcagccgat tgtctgttgt gccagtcac agccgaatag cctctccacc caagcggccg 2460

gagaacctgc gtgcaatcca tcttgttcaa tcatgcgaaa cgatcctcat cctgtctctt 2520

gatcagatct tgatcccttg cgccatcaga tccttggcgg caagaaagcc atccagtta 2580

ctttgcaggg cttcccaacc ttaccagagg gcgccccagc tggcaattcc ggttcgcttg 2640

ctgtccataa aaccgcccag tctagcaact gttgggaagg gcgatcgtgt aatacgactc 2700

<210> 34

<211> 2721

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 这是经密码子优化的人 GHRH 表达质粒

<400> 34

ccaccgcggt ggcggccgtc cgccctcggc accatcctca cgacacccaa atatggcgac 60

gggtgaggaa tgggtggggag ttatttttag agcggtaggg aaggtaggca ggcagcaggt 120

gttggcgctc taaaaataac tcccgggagt tattttttaga gcggaggaat ggtggacacc 180

caaatatggc gacggttcct caccgcgcgc catatttggg tgtccgcctt cggccggggc 240

cgcattcctg ggggcccggc ggtgctcccg ccgcctcga taaaaggctc cggggccggc 300

ggcggcccac gagctacccg gaggagcggg aggcgccaag cggatcccaa ggcccaactc 360

cccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatggtgct ctgggtgttc 420

ttctttgtga tctcaccct cagcaacagc tccactgct cccacctcc cctttgacc 480

ctcaggatgc ggcggtatgc agatgccatc ttcaccaaca gctaccggaa ggtgctgggc	540
cagctgtccg cccgcaagct gctgcaggac atcatgagca ggcagcaggg agagagcaac	600
caagagcgag gagcataatg aaagcttatac ggggtggcat cctgtgacc cctccccagt	660
gcctctcctg gccctggaag ttgccactcc agtcccacc agccttgtcc taataaaatt	720
aagttgcac attttgtctg actaggtgtc cttctataat attatgggtt ggaggggggt	780
ggtatggagc aaggggcaag ttgggaagac aacctgtagg gctcagggg gggcccggta	840
ccagcttttg ttcccttag tgagggttaa ttccagctt ggtcttccgc ttcctcgtc	900
actgactcgc tgcgctcgtt cgctcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg	960
gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc	1020
cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggtccgc	1080
ccccctgacg agcatcacia aatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga	1140
ctataaagat accaggcggt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc	1200
ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat	1260
agctcacgct gtaggtatct cagttcgggt taggtcgtt gctccaagct gggctgtgtg	1320
cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc	1380
aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga	1440
gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtgtt ggcctaacta cggctacact	1500
agaagaacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttacctcgg aaaaagagtt	1560
ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtgggttttt tgtttacaag	1620
cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg	1680
tctgacgtc agctagcgt cagaagaact cgtcaagaag gcgatagaag gcgatgcgct	1740
gcgaatcggg agcggcgata ccgtaaagca cgaggaagcg gtcagcccat tcgccgcaa	1800

gctcttcagc aatatcacgg gtagccaacg ctatgtcctg atagcgggtcc gccacaccca 1860
 gccggccaca gtcgatgaat ccagaaaagc ggccattttc caccatgata ttcggaagc 1920
 aggcatcgcc atgagtcacg acgagatcct cgccgtcggg catgcgcgcc ttgagcctgg 1980
 cgaacagttc ggctggcgcg agcccctgat gctcttcgtc cagatcatcc tgatcgacaa 2040
 gaccggcttc catccgagta cgtgctcgct cgatgcgatg tttcgcttgg tggtcgaatg 2100
 ggcaggtagc cggatcaagc gtatgcagcc gccgcattgc atcagccatg atggatactt 2160
 tctcggcagg agcaaggtga gatgacagga gatcctgccc cggcacttcg cccaatagca 2220
 gccagtcctt tcccgttca gtgacaacgt cgagcacagc tgcgcaagga acgcccgtcg 2280
 tggccagcca cgatagccgc gctgcctcgt cctgcagttc attcagggca ccggacaggt 2340
 cggctcttgac aaaaagaacc gggcgcccct gcgctgacag ccggaacacg gcggcatcag 2400
 agcagccgat tgtctgttgt gcccagtcag agccgaatag cctctccacc caagcgcccg 2460
 gagaacctgc gtgcaatcca tcttgttcaa tcatgcgaaa cgatcctcat cctgtctctt 2520
 gatcagatct tgatcccttg cgccatcaga tccttggcgg caagaaagcc atccagttta 2580
 ctttgcaggg cttcccaacc ttaccagagg gcgccccagc tggcaattcc ggttcgcttg 2640
 ctgtccataa aaccgcccag tctagcaact gttgggaagg gcgatcgtgt aatacgactc 2700
 actatagggc gaattggagc t 2721

<210> 35

<211> 225

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 类似的牛 GHRH 序列的序列

<400> 35

gccatggtgc tgtgggtgtt cttcctggtg accctgacct tgagcagcgg ctcccacggc 60

tccctgccct cccagcctct gcgcatccct cgctacgccg acgccatctt caccaacagc 120

taccgcaagg tgctcggcca gctcagcgcc cgcaagctcc tgcaggacat catgaaccgg 180

cagcagggcg agcgcaacca ggagcaggga gcctgataag cttgc 225

<210> 36

<211> 225

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 类似的羊 GHRH 序列的序列

<400> 36

gccatggtgc tgtgggtgtt cttcctggtg accctgacct tgagcagcgg aagccacggc 60

agcctgcccc gccagcccct gaggatccct aggtacgccg acgccatctt caccaacagc 120

tacaggaaga tcctgggcca gctgagcgct aggaagctcc tgcaggacat catgaacagg 180

cagcagggcg agaggaacca ggagcagggc gcctgataag cttgc 225

<210> 37

<211> 246

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 类似的鸡 GHRH 序列的序列

<400> 37

gccatggtgc tctgggtgct ctttgtgac ctcacctca ccagcggcag cactgcagc 60

ctgcctcccc gccctccctt caggatgcag aggcacgtgg acgccatctt caccaccaac 120

tacaggaagc tgctgagcca gctgtacgcc aggaaggtga tccaggacat catgaacaag 180

cagggcgaga ggatccagga gcagagggcc aggctgagct gataagcttg cgatgagttc 240

ttctaa 246

<210> 38
 <211> 190
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人生长激素 poly A 尾的核酸序列

<400> 38
 ggggtggcatc cctgtgaccc ctccccagtg cctctcctgg ccctggaagt tgccactcca 60
 gtgcccacca gccttgtcct aataaaatta agttgcatca ttttgtctga ctaggtgtcc 120
 ttctataata ttatgggggtg gaggggggtg gtatggagca aggggcaagt tgggaagaca 180
 acctgtaggg 190

<210> 39
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人生长激素 5' UTR 的核酸序列

<400> 39
 caaggcccaa ctccccgaac cactcagggt cctgtggaca gtcacctag ctgcc 55

<210> 40
 <211> 782
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 质粒 pUC-18 复制起点的核酸序列

<400> 40
 tcttcgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta 60
 tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag 120

aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg	180
tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg	240
tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg	300
cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga	360
agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc	420
tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt	480
aactatcgtc ttgagtccaa cccggtgaaga cagcacttat cgccactggc agcagccact	540
ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagtctt gaagtgggtg	600
cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt	660
accttcggaa aaagagtigg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggt	720
ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct	780
tt	782

- <210> 41
- <211> 5
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 这是 NEO 核糖体结合位点

- <400> 41
- tcctc

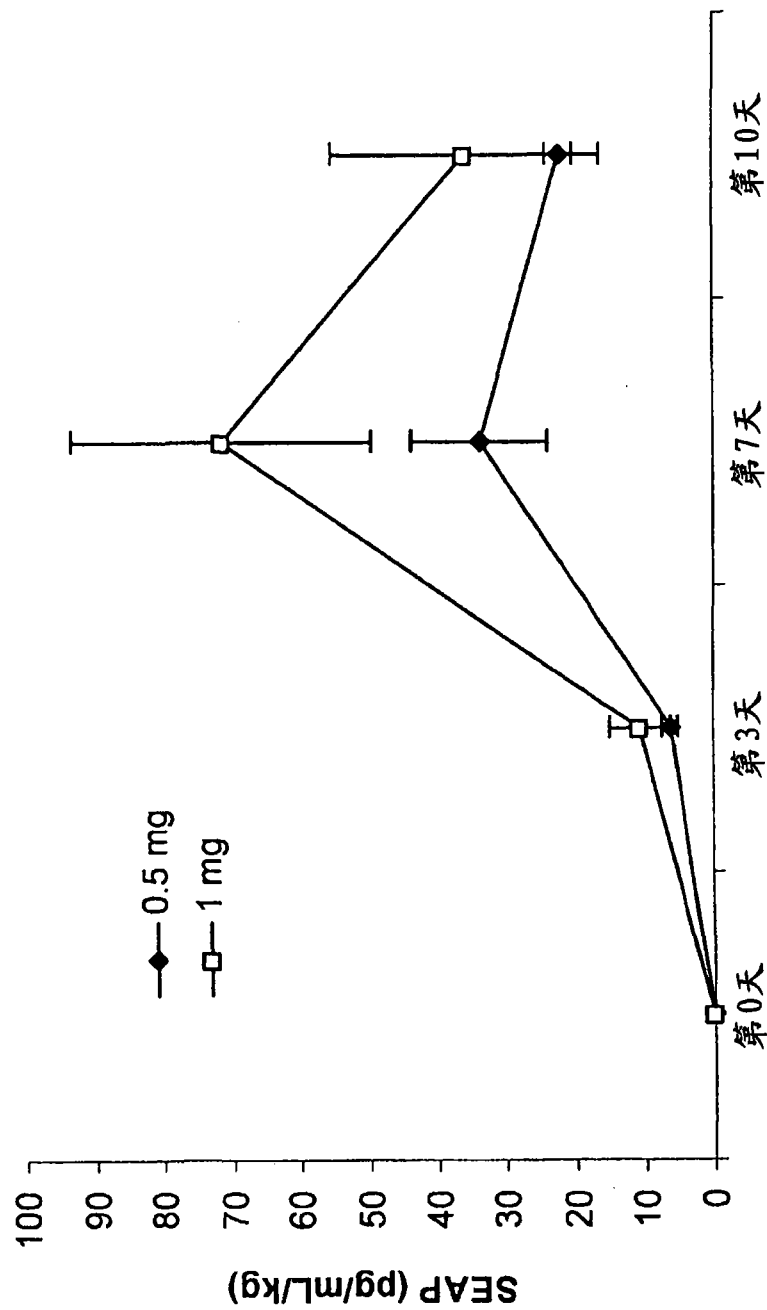


图1

		用GHRH处理的	对照	P值
葡萄糖, mg/dL	60 DIM	43.9 ± 1.4	41.8 ± 4.5	0.67
	100 DIM	72.2 ± 1.4	69.3 ± 3.8	0.5
胰岛素, μ U/mL	60 DIM	11.6 ± 2.5	9.4 ± 3.2	0.59
	100 DIM	7.8 ± 1.5	7.4 ± 0.6	0.8

图2

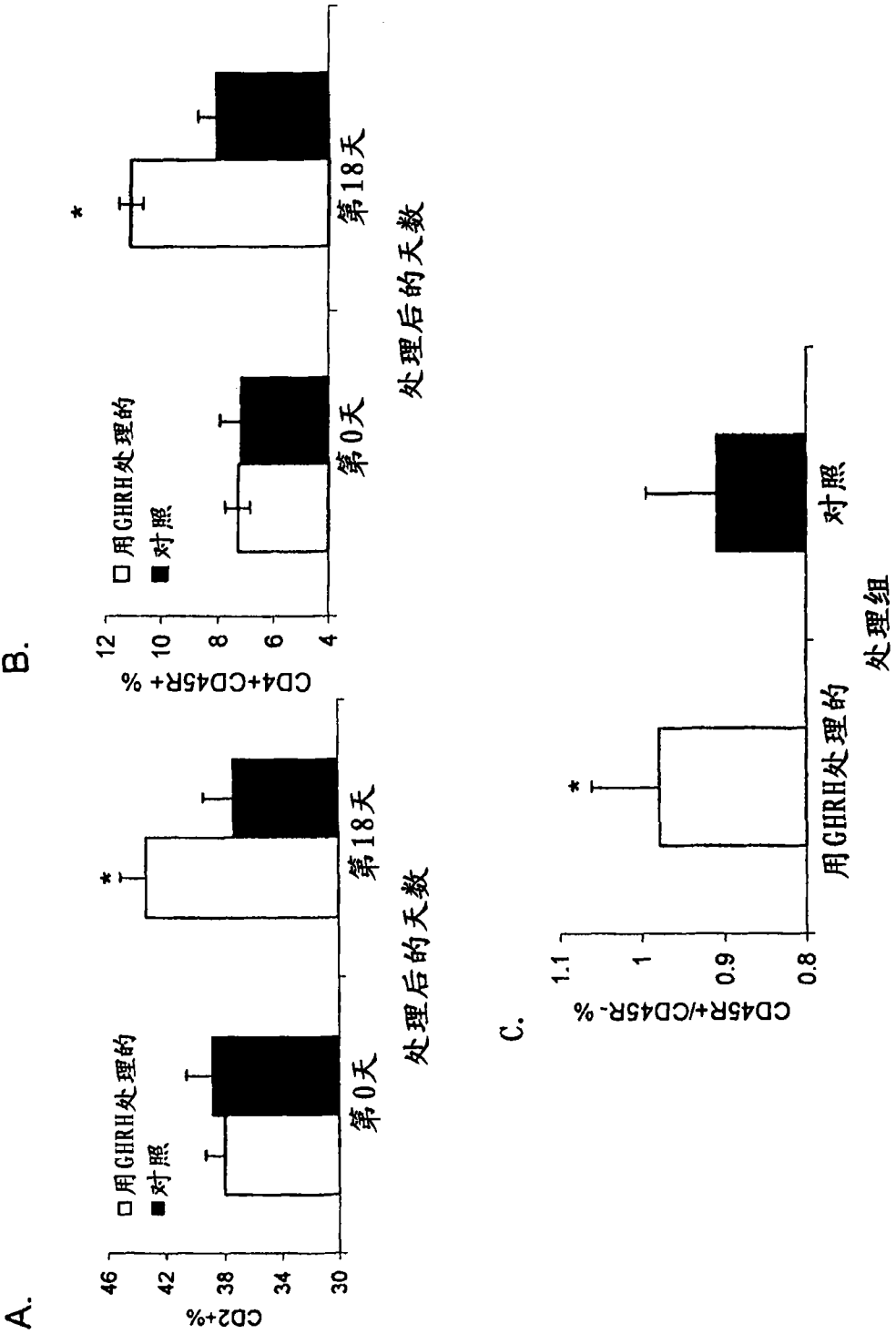


图3

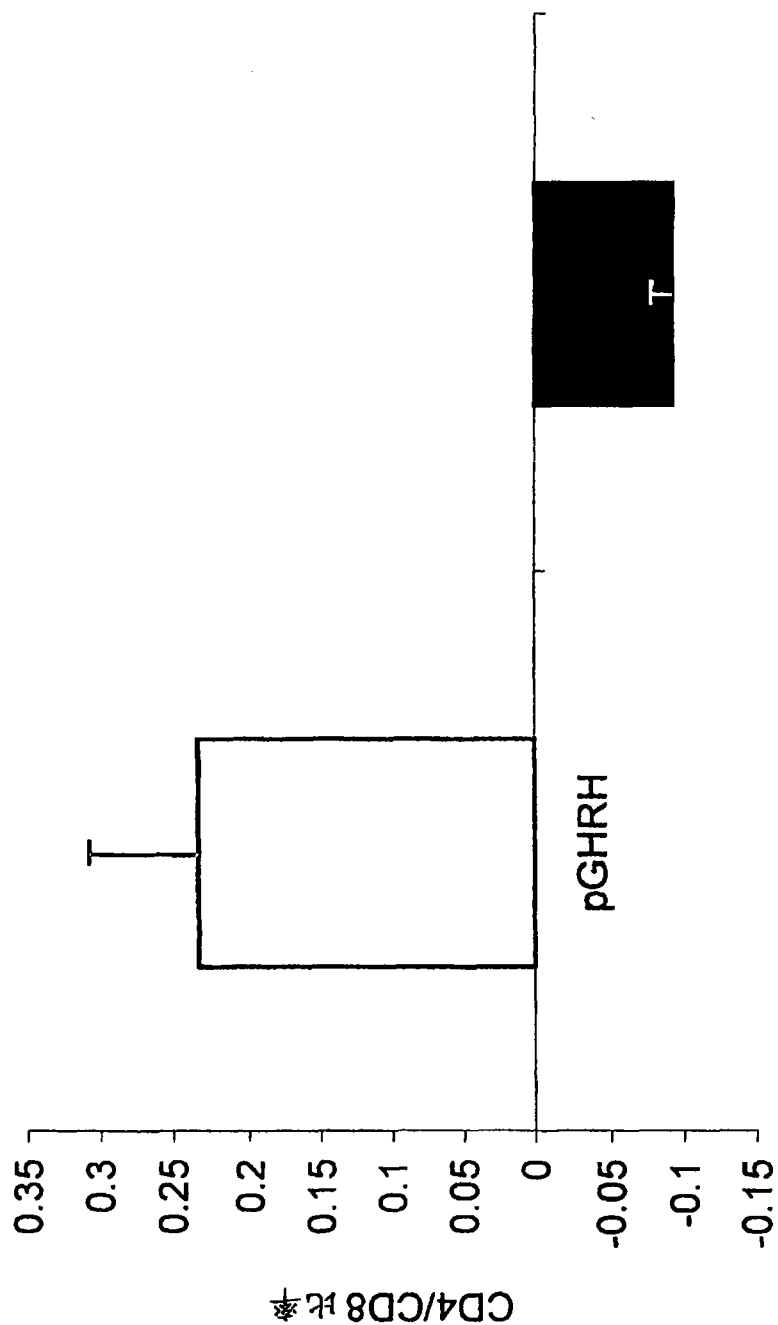


图 4

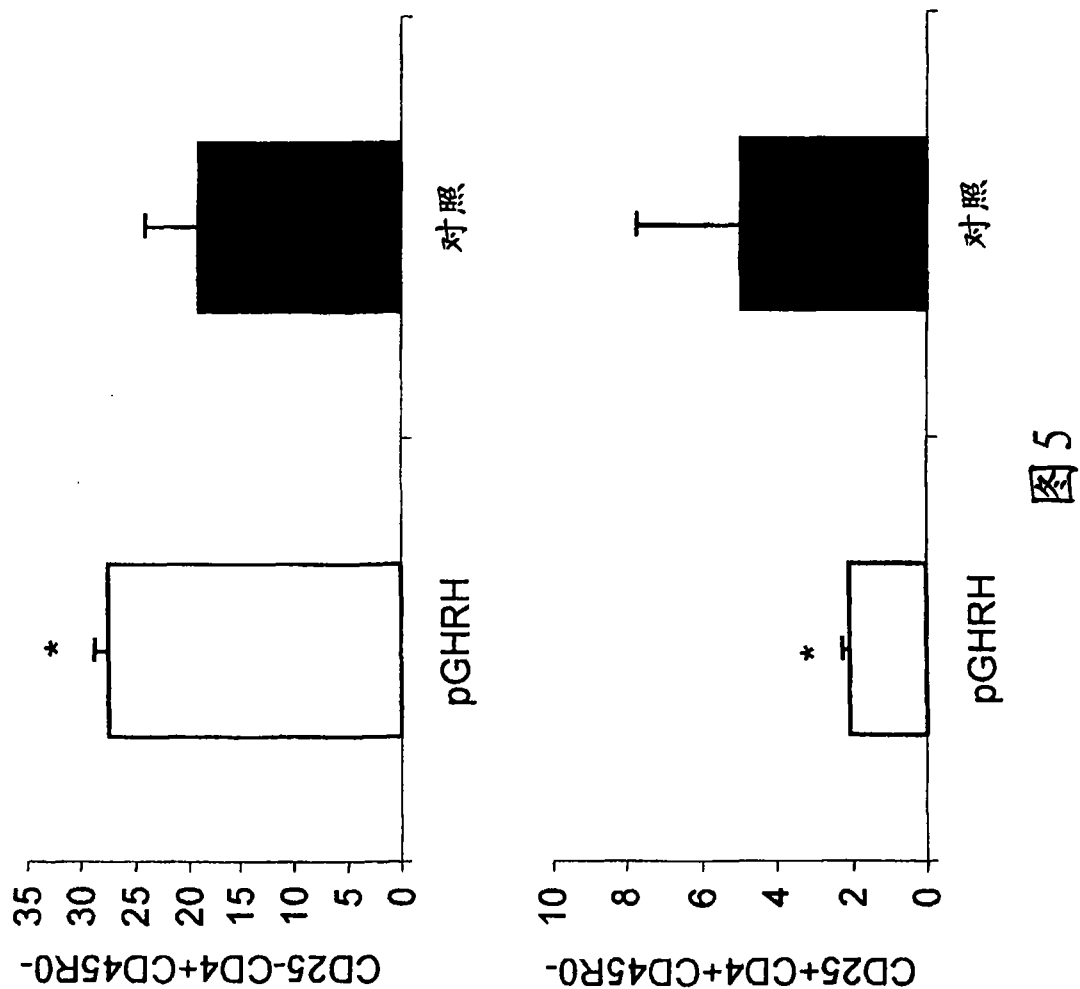


图 5

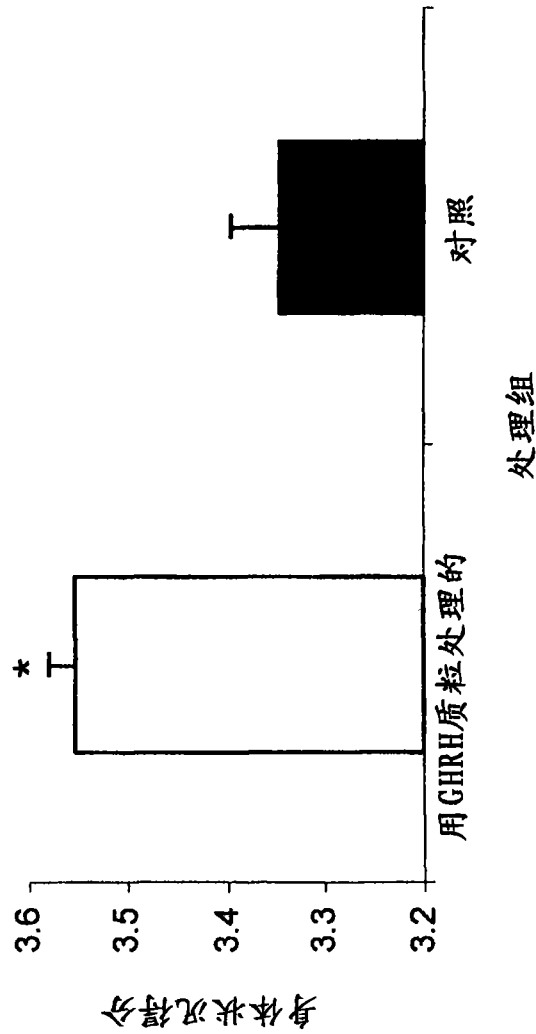


图6

用GHRH处理的			对照	P值
60 DPC (A)			543 ± 42.7	0.38
体重, kg	100 DIM (B)	536.4 ± 32.9	514.2 ± 48	0.04
	135 DIM (C)	544.9 ± 33.1	533.5 ± 44.8	0.17
差异, kg	A-B	- 3.5	- 26.4	0.02
	A-C	4	- 9.1	0.1
差异, %	A-B/A	- 0.5%	- 4.6%	0.02
	A-C/A	0.1%	- 1.4%	0.1

图 7

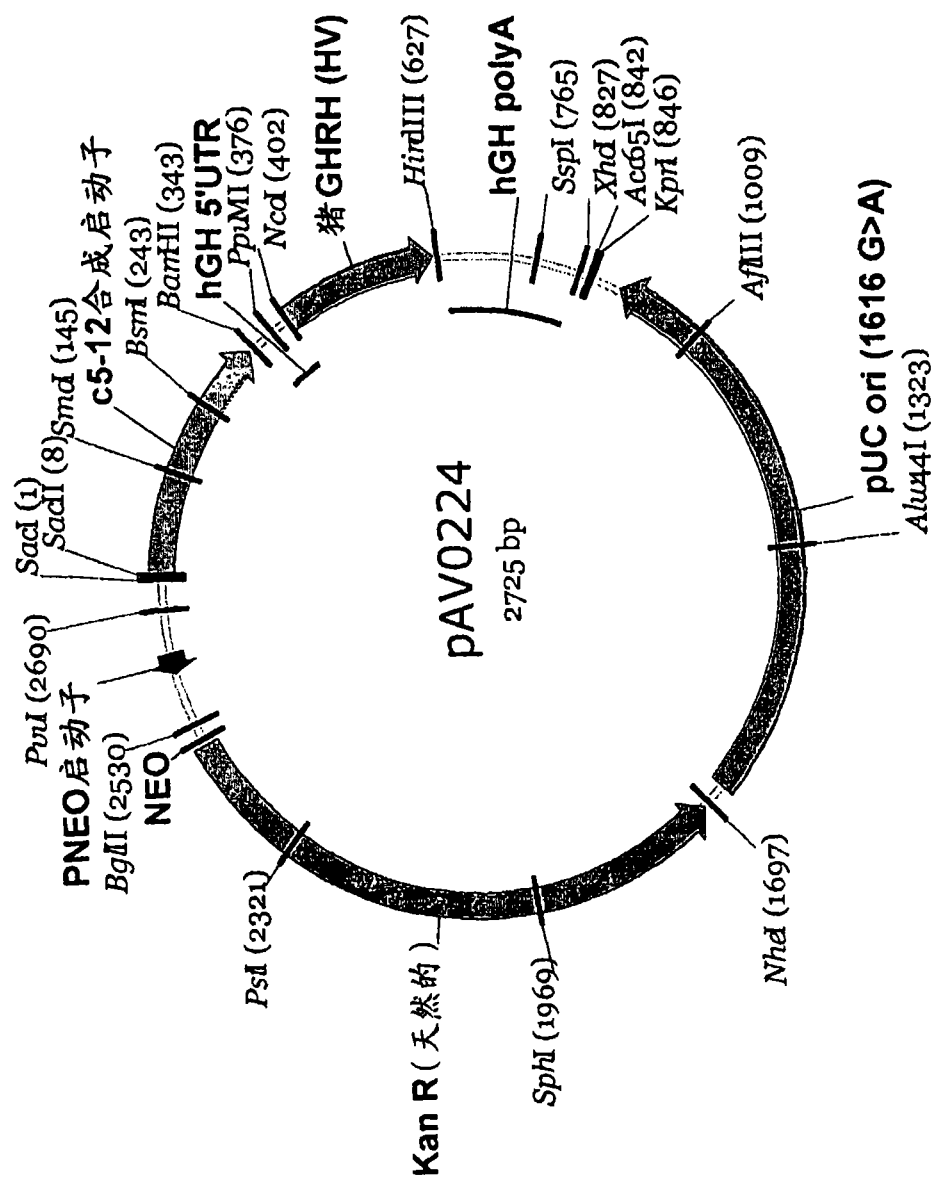


图 8

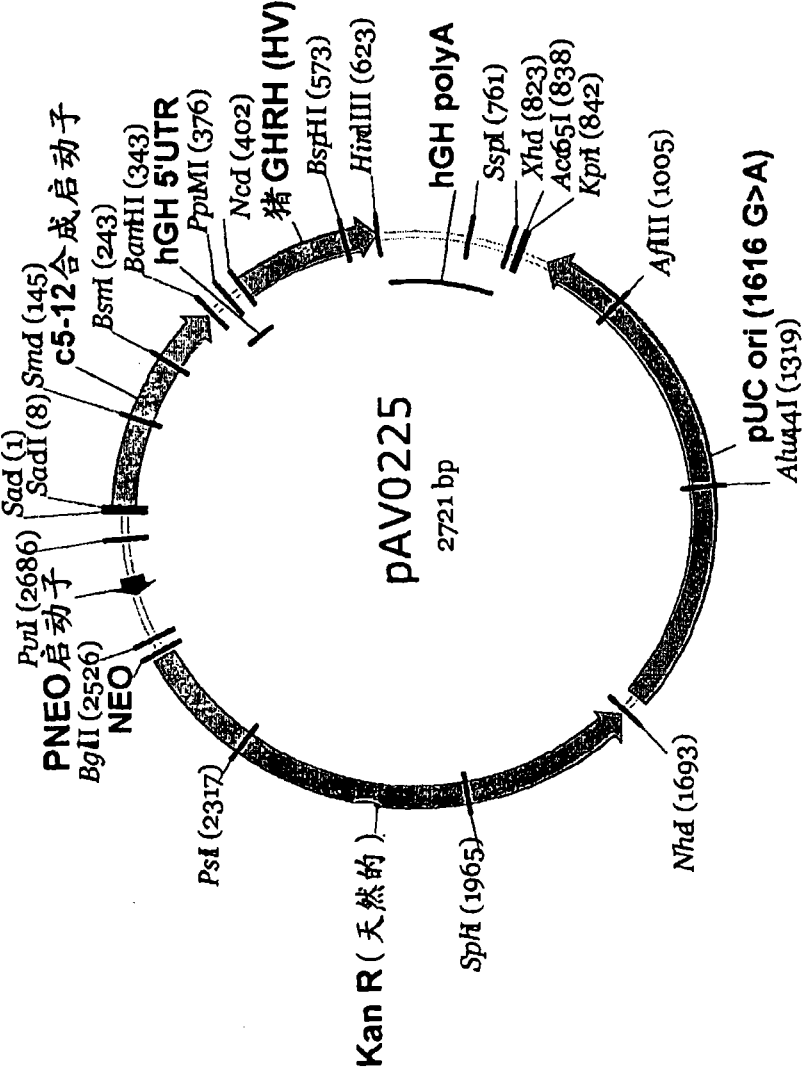


图 9

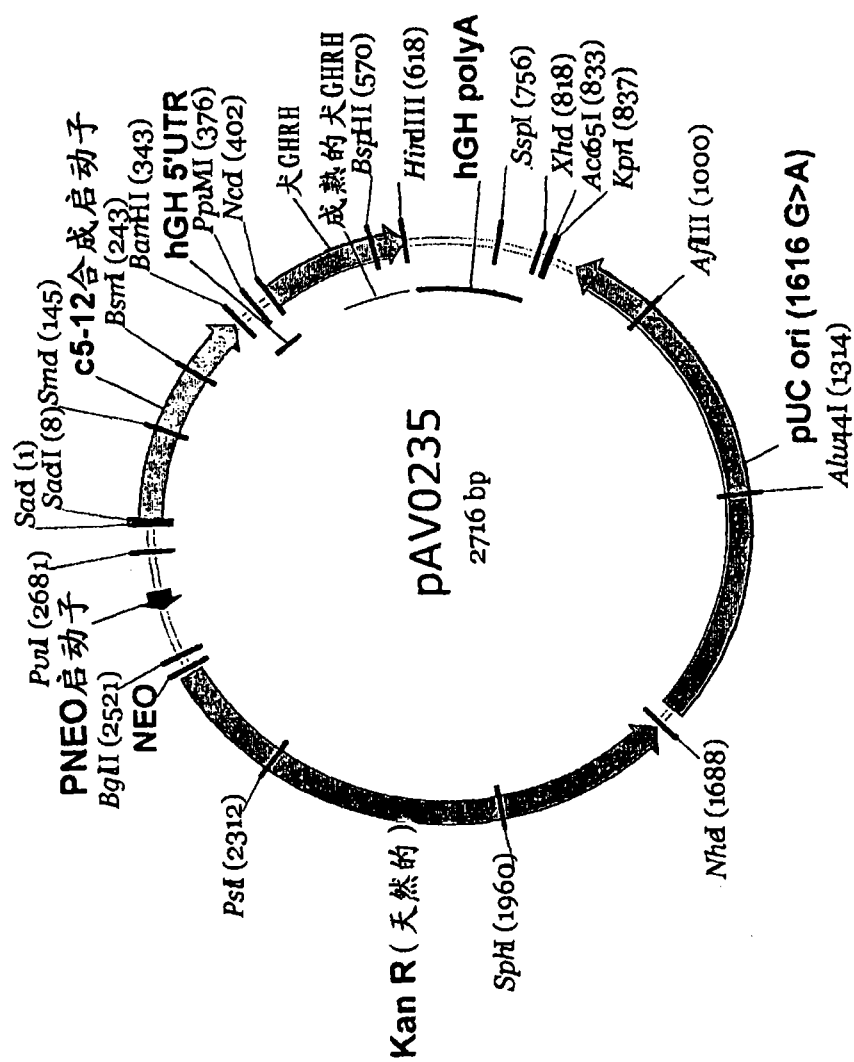


图 10

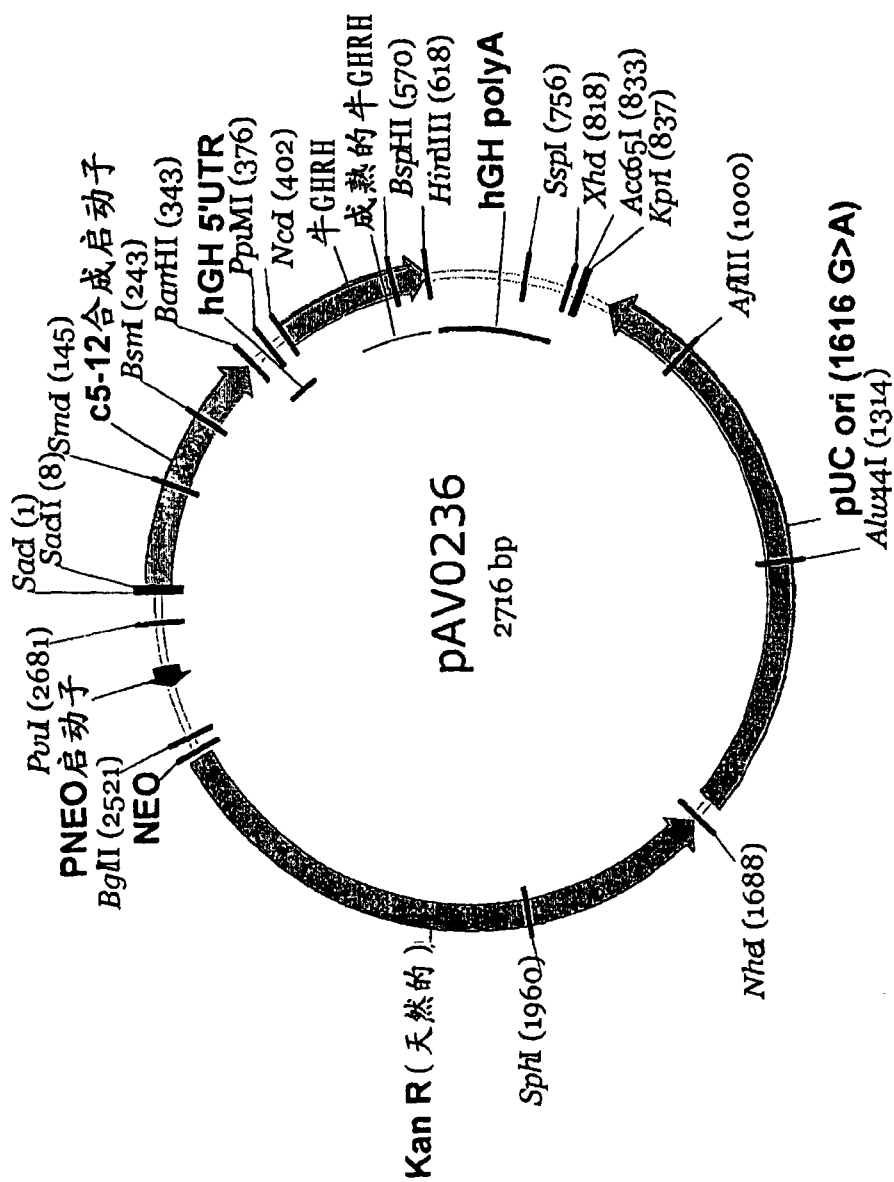


图 11

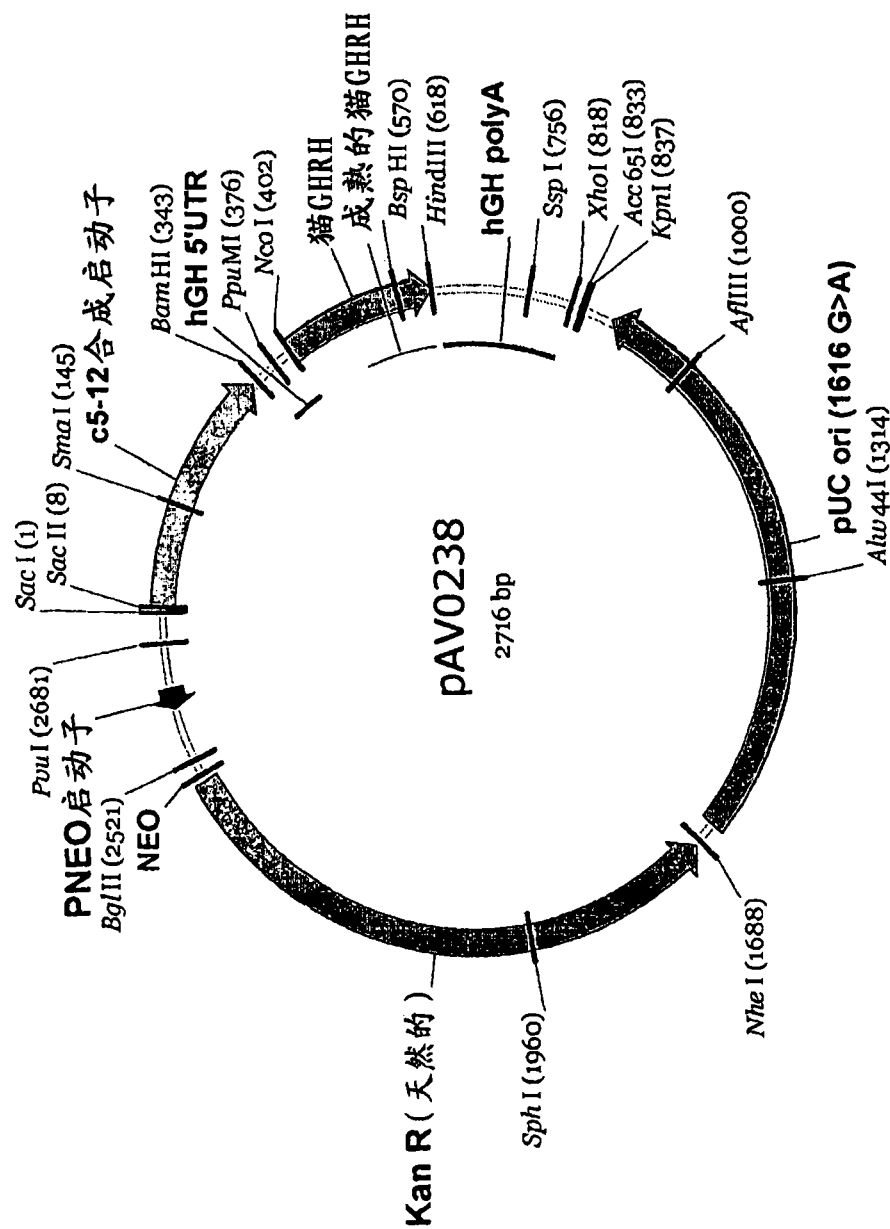


图12

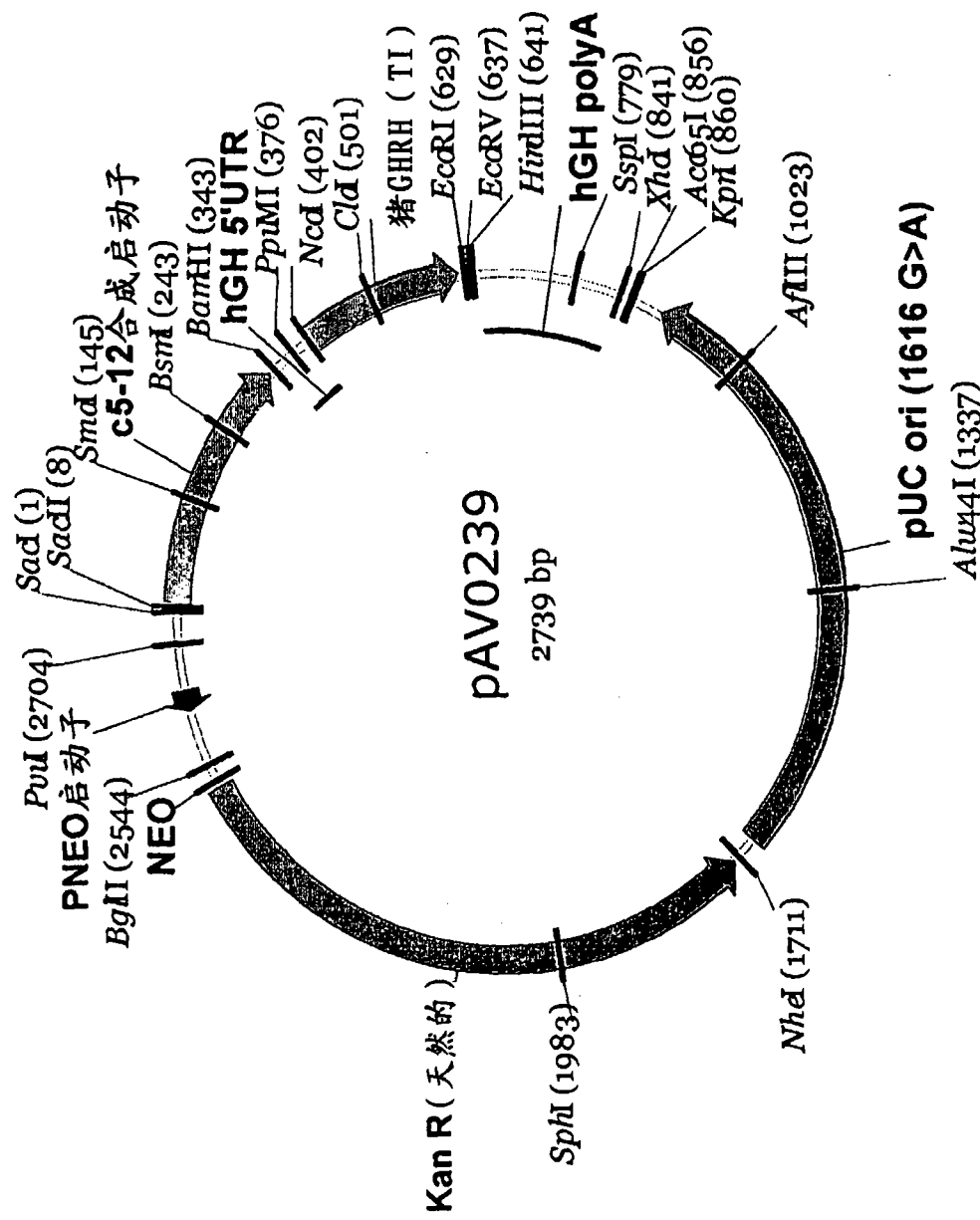


图 13

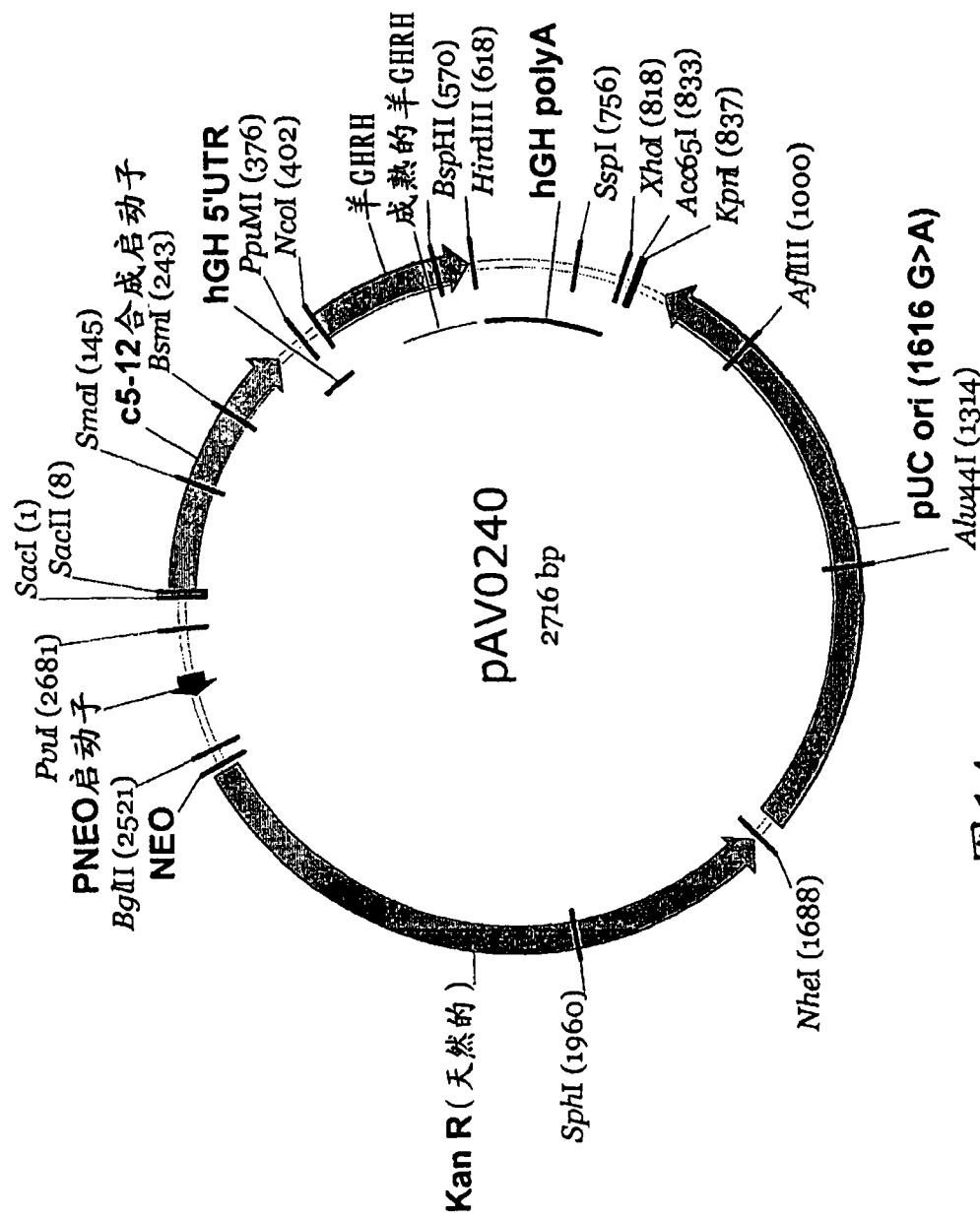


图 14

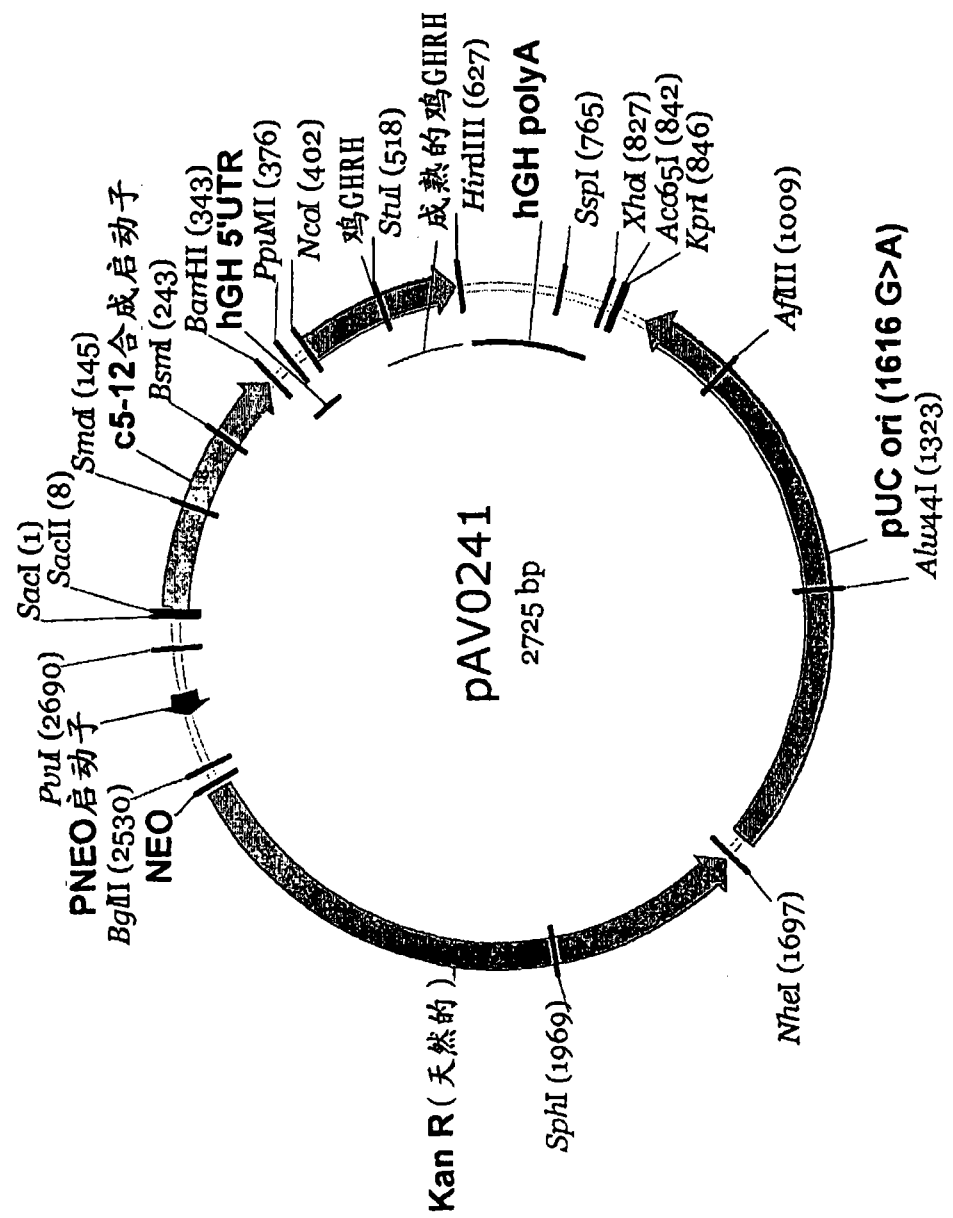


图15

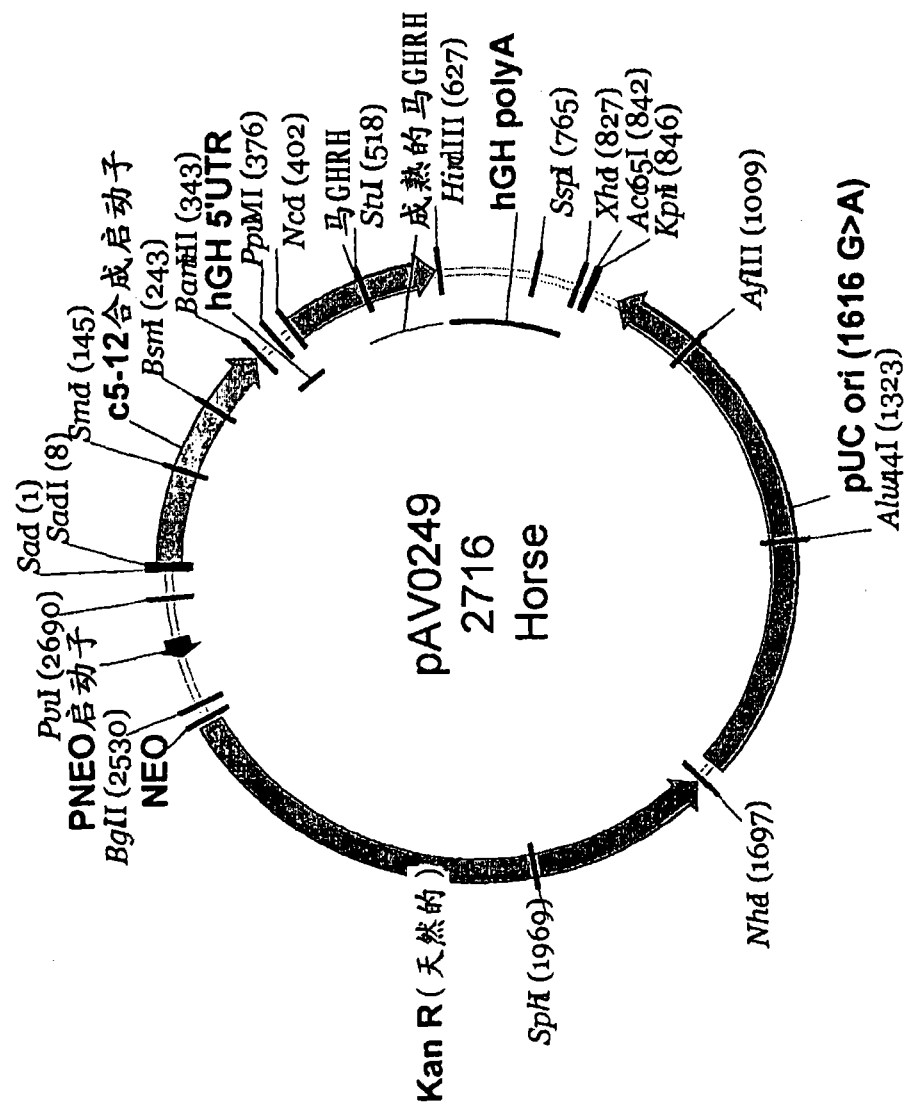


图 16

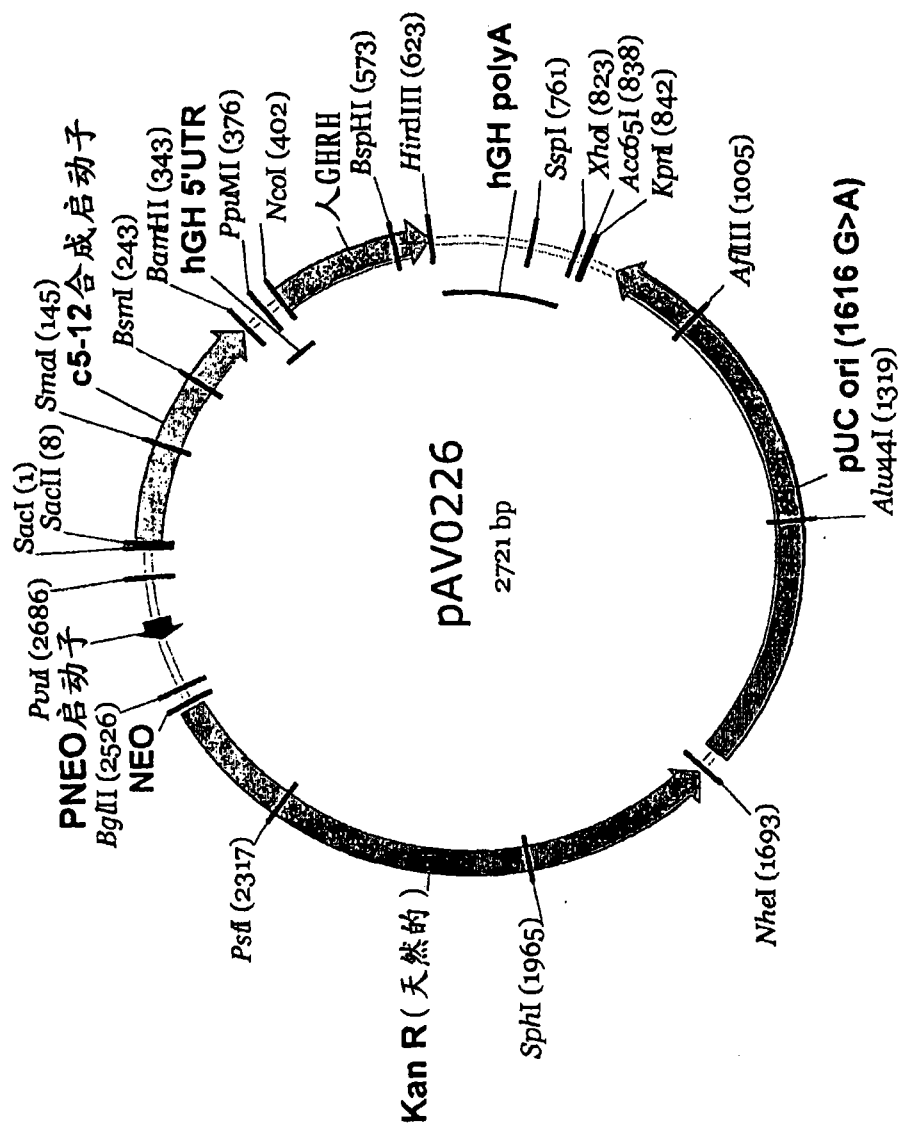


图 17