發明專利說明書 200301778

（填寫本書件時請先行詳閱申請書後之申請須知，作※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：P113579S2 ※IPC分類：C12N15/18

※ 申請日期：P1.12.10

壹、發明名稱

（中文）治療慢性病活體的質體媒介的補充品

（英文）PLASMID MEDIATED SUPPLEMENTATION FOR TREATING CHRONICALLY ILL SUBJECTS

貳、發明人（共 7 人）

發明人 1 （如發明人超過一人，請填說明書發明人續頁）

姓名：（中文）魯斯安德拉・卓格海亞・艾奇

（英文）Ruxandra Draghia-Akli

住居所地址：（中文）美國德州休斯頓・史塔克瑞基道 5215 號

（英文）

國籍：（中文） 法國 （英文） FR

參、申請人（共 2 人）

申請人 1 （如發明人超過一人，請填說明書申請人續頁）

姓名或名稱：（中文）愛德維西斯股份有限公司 簽章

（英文）ADVISYS, Inc.

住居所或營業所地址：（中文）美國德州渥德蘭・瑞瑟起福雷斯特道 2700 號 180 室

（英文）2700 Research Forest Drive Suite 180, The Woodlands, Texas 77381 U.S.A

國籍：（中文） 美國 （英文） U.S.A.

代表人：（中文）

（英文）

[V] 續發明人或申請人續頁 （發明人或申請人欄位不敷使用時，請註記並使用續頁）

發明人 2

姓名：(中文) 羅伯特・H・卡本特

(英文) Robert H. Carpenter

住居所地址：(中文) 美國德州巴斯洛普・本肯街 1303 號

(英文)

國籍：(中文) 美國 (英文) U.S.A.

發明人 3

姓名：(中文) 道格拉斯・R・克恩

(英文) Douglas R. Kern

住居所地址：(中文) 美國德州渥德蘭・亞湯克雷仙特 64 號

(英文)

國籍：(中文) 美國 (英文) U.S.A.

發明人 4

姓名：(中文) 格倫・金

(英文) Glen King

住居所地址：(中文) 美國德州洛夏隆・麥克思路 5105 號

(英文)

國籍：(中文) 美國 (英文) U.S.A.

發明人 5

姓名：(中文) 凱文・哈恩

(英文) Kevin Hahn

住居所地址：(中文) 美國德州密蘇里市・杜拉哥班德道 4510 號

(英文)

國籍：(中文) 美國 (英文) U.S.A.

發明人 6 ID：

姓名：（中文）羅伯特・J・士瓦特

（英文）Robert J. Schwartz

住居所地址：（中文）美國德州休斯頓・馬羅 4019 號

（英文）

國籍：（中文） 美國 （英文） U.S.A.

發明人 7 ID：

姓名：（中文）馬爾肯・K・布里納

（英文）Malcolm K. Brenner

住居所地址：（中文）美國德州貝拉瑞・威羅 4802 號

（英文）

國籍：（中文） 英國 （英文） UK.

說明書申請人續頁

申請人 2

姓名或名稱：(中文) 貝勒醫學院

(英文) Baylor College of Medicine

住居所或營業所地址：(中文) 美國德州休斯頓・貝勒廣場・貝勒醫學院

(英文) Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, Texas U.S.A.

國籍：(中文) 美國 (英文) U.S.A.

代表人：(中文) 湯瑪斯・D・保羅

(英文) Thomas D. Paul

申請人 3

姓名或名稱：(中文)

(英文)

住居所或營業所地址：(中文)

(英文)

國籍：(中文) (英文)

代表人：(中文)

(英文)

申請人 4

姓名或名稱：(中文)

(英文)

住居所或營業所地址：(中文)

(英文)

國籍：(中文) (英文)

代表人：(中文)

(英文)

捌、聲明事項

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間，其日期爲：＿＿＿＿＿＿＿＿

☑ 本案已向下列國家（地區）申請專利，申請日期及案號資料如下：

【格式請依：申請國家（地區）；申請日期；申請案號　順序註記】

1. 美國；2001/12/11；60/339,610
2.
3.

☑ 主張專利法第二十四條第一項優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；日期；案號　順序註記】

1. 美國；2001/12/11；60/339,610
2.
3.
4.
5.
6.
7.
8.
9.
10.

☐ 主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

【格式請依：申請日；申請案號　順序註記】

1.
2.
3.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐國內微生物　【格式請依：寄存機構；日期；號碼　順序註記】

1.
2.
3.

☐國外微生物　【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼　順序註記】

1.
2.
3.

☐熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明

發明所屬之技術領域

本申請要求序號爲 60/339,610 的美國臨時專利的優先權，其名稱爲"質體媒介的療法治療貧血，消瘦(wasting)，免疫功能障礙以及延長慢性疾病活體生命"，申請日爲 2001 年 11 月 12 日(12/11/2001)，在此將其全文併入作爲參考。

本發明涉及用於質體媒介補充的組合物及方法。本發明涉及組合物和方法，可用於延緩異常細胞的生長，減慢腫瘤發展，防止腎衰竭，減少轉移，提高存活率，以及治療其他通常與癌症動物相關的疾病。本發明的一些實施例可通過將有效量的編碼 GHRH 或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送至活體組織，並使編碼基因在活體體內進行表達而完成。例如，當這種核酸序列被遞送到活體組織的特定細胞中時可以得到特定的組成型表達。並且，可通過誘導型啓動子實現 GHRH 或者其功能性生物學等同物基因的外部調控，所述啓動子是由施用給活體的分子開關分子所調控。遞送 GHRH 編碼序列或其功能性生物學等同物質的組成型或誘導型核酸的優選方法是通過體內電穿孔手段直接運送到活體細胞。另外，可通過將重組 GHRH 或其功能性生物學等同物運送到活體體內進行治療從而抑制腫瘤生長，抑制惡液質或通常與腫瘤相關的消瘦。貧血，消瘦，腫瘤生長，免疫功能障礙，腎衰竭，癌症，平均壽命縮短，以及其他情況都可能與特定的癌症，腫瘤，疾病

或疾病治療的作用相關。本發明涉及質體媒介的補充，用於

1） 治療貧血活體；

2） 增加活體體內紅細胞總量；

3） 延緩癌症個體的腫瘤生長；

4） 防止或逆轉活體消瘦；

5） 逆轉活體異常的體重降低；

6） 治療免疫功能障礙；

7） 預防腎衰竭的發病；

8） 預防轉移的發生和/或發展；

9） 逆轉活體體內對淋巴細胞增殖的抑制；和/或

10） 延長慢性病活體的平均壽命以及提高其存活率。

先前技術

本發明涉及組合物和方法，可用於治療來降低癌症活體體內不正常細胞的生長率，抑制腫瘤發展，防止腎衰竭，減少轉移，提高存活率。總之，本發明的實施例可通過將有效量的編碼 GHRH 或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送至活體組織，並使編碼基因在活體體內表達而完成。例如，當這種核酸序列被遞送到活體組織的特定細胞中時可以得到特定的組成型表達。並且，可通過誘導型啓動子實現 GHRH 或者其功能性生物學等同物基因的外部調控，所述啓動子是由施用給活體的分子開關分子所調控。遞送 GHRH 編碼序列或其功能性生物學等同物質的組

成型或誘導型核酸的優選方法是通過體內電穿孔手段直接運送到活體細胞。另外，可通過將重組 GHRH 或其功能性生物學等同物運送到活體體內進行治療從而抑制異常常細胞的生長以及腫瘤的生長。貧血，消瘦，腫瘤生長，免疫功能障礙，腎衰竭，癌症，平均壽命縮短，以及其他情況都可能與特定的癌症，腫瘤，疾病或疾病治療的作用相關。GHRH 也可以以蛋白的形式，通過靜脈，皮下或鼻內給藥或者利用緩釋泵(slow release pump)運送。

貧血：貧血指活體血流中紅血球數目或體積或者血紅蛋白的總量降低，從而導致面色蒼白，全身無力等症狀的疾病。已知哺乳動物中紅細胞的產生即爲紅細胞生成。紅細胞生成主要由一種酸性糖蛋白——促紅細胞生成素("EPO")調控。EPO 能夠促進生成新的紅細胞來替代那些由於衰老過程而喪失的紅細胞。另外，缺氧可以刺激 EPO 的生成，在這種條件下，儘管組織血流灌注正常，但對組織的氧氣供應減少，低於正常的生理水平。能夠導致缺氧的有：出血，輻射誘導的紅細胞降解，各種貧血症，海拔過高，或時間昏迷。作爲組織對缺氧作出的反應，EPO 能通過促進骨髓中原始前體細胞轉換成原紅細胞，促進紅細胞的生成，所述原成紅細胞將隨後成熟，合成血紅蛋白並作爲血細胞被釋放到迴圈中。

EPO 通常以較低濃度存在於血漿中，其在血漿中已足夠維持正常血細胞損失(即，由於衰老而導致)以及血細胞生成之間的平衡。貧血是由紅細胞生成減少或破壞增多導

致的紅細胞總量減少。目前 EPO 補充用於治療各種疾病相關的貧血，以及晚期腎衰竭(Cremagnani 等，1993；Diez 等，1996)和愛滋病("AIDS")(Sowade 等，1998)，特別是接受疊氮胸苷("AZT")治療的活體。EPO 還可用於改善癌症化療相關的貧血(Vansteenkiste 等，2002)。

貧血症的另一組被稱爲血紅蛋白病，其中每一組都由遺傳性球蛋白生成異常引起。血紅蛋白病包括廣泛的疾病譜，大致分爲兩種類型。第一種類型是血紅蛋白的一條鏈上發生了遺傳性結構改變，例如鐮狀細胞貧血。這些病症可產生異常血紅蛋白分子(Papassociriou 等，2000)。第二種血紅蛋白病的主要部分是地中海性貧血，是由於一條或多條血紅蛋白鏈的合成率發生遺傳性缺陷導致。這導致無效紅細胞生成，溶血，以及由於紅細胞合成異常引起的各種程度貧血。相應地，EPO 可用於治療貧血，例如以低紅細胞生成或紅細胞缺陷和/或紅細胞的破壞增加爲特徵的血紅蛋白病(Makis 等，2001；Payen 等，2001)，

其他一些現有技術已經說明：一些垂體功能性減退的貧血症活體，儘管用甲狀腺素和腎上腺素進行了適當的替代治療，但血紅蛋白仍然保持在 11.0g/dl 的低水平，對這些病人用重組人生長激素("GH")治療可以提高其 EPO 水平(Sohmiya 和 Kato，2000)。12 個月皮下注射重組人 GH，會導致血漿促紅細胞生成素("EPO")的水平近乎加倍，且伴隨 Hb 濃度提高。當中斷施用人 GH 時，血漿 EPO 水平和 Hb 濃度都有所降低。在人 GH 給藥之前和給藥過程中，血

漿 GH 和 EPO 水平之間相關性很高。在人 GH 給藥之前和給藥過程中，血漿 GH 水平和 Hb 濃度緊密相關。血漿 IGF-I 水平也與 Hb 濃度相關，但與血漿 EPO 水平不相關。

美國專利 5,846,528 ("'528 專利")和 6,274,158 ("'158 專利")指出貧血可通過主動提高促紅細胞生成素("EPO")來治療。另外，'528 專利還教導了在對貧血症的治療中，使用重組腺伴隨病毒("AAV")病毒粒子將編碼 EPO 的 DNA 分子運送到肌細胞和組織。'528 專利說明了直接體內注射重組 AAV 病毒粒子到肌肉組織(例如通過肌肉注射)和對能夠隨後導入活體的肌細胞進行體外轉導的療法。這樣，可持續表達運送的編碼血紅蛋白的核酸序列，從而從轉導的肌細胞體內分泌，進行系統運送。'159 專利教導了使用皮下、靜脈或口服給予重組人 EPO 作爲止血劑來治療或預防相關的良性或惡性病變，手術創傷，無法治癒或難以治療的病變，或輻射損傷的任何器官或身體部位出血。

簡言之，貧血症可由特定疾病，環境因素，或疾病治療的效果引起。正如所討論的，EPO 迴圈水平可被直接(如注射重組 EPO)或間接提高(如注射重組 GH)。儘管不期望被理論束縛，相關技術說明貧血症可通過成功治療，可通過使用能夠提高 EPO 迴圈水平的方法或組合物成功地治療。但是，本領域技術人員公知生物體系是不能測量的複合體，本領域技術人員不能精確地預測什麼方法或組合物能夠引發特定生物反應。只有通過不斷的實驗才能找到治療貧血症的組合物或方法。

消瘦：活體的消瘦可以定義爲體重至少降低個體最小理想體重的 5-10%，個體顯現出脂肪組織及肌肉質量顯著降低的特徵，這就使得患有進展性疾病(如癌症，AIDS 等)的活體增加體重十分困難。消瘦或惡液質是一類臨床現象，反映了臥床的歷史和活體的"消耗"。在希臘語中，它僅僅意味著"惡劣的條件"。在癌症，AIDS，或肺結核，以及其他慢性疾病中能夠加快骨骼肌的損失(Barber 等，1999；Weinroth 等，1995)。體重降低是癌症相關消瘦的最明顯的表現(Nelson，2000)。其他臨床表現包括厭食，肌肉消耗，和/或脂肪組織減少和疲勞，這就導致身體機能狀況很差(Davis 和 Dickerson，2000)。由於體重降低，腫瘤組織學，和不良的機能狀況會導致預後不良，所以消瘦可成爲死亡的直接因素。與單純性的饑餓相比，用大量進食來治療體重降低是不可取的。所以體重降低還不能夠完全歸因於攝入量少，還是基礎能量消耗提高的結果。

消瘦存在於一多半不臥床的癌症活體中，代表了慢性病活體治療中的一個嚴重問題。儘管不希望被理論束縛，但假定細胞因數的釋放和/或啓動以及幾種腫瘤衍生物質的釋放對消瘦綜合症負責。相關技術說明已有許多物質被嘗試用於治療消瘦並進行評估，但只有孕激素物質獲得了一般效果(Barber 等，1999；Nelson，2001)。相反，重組生長激素("GH")，胰島素樣生長因數 I("IGF-I")和 IGF 結合蛋白 3("IGFBP-3")療法卻在治療癌惡液質中取得了療效(Bartlett 等，1994)。這樣，相關技術說明消瘦可以用能夠

提高 GH, IGF-I 或 IGFBP-3 在迴圈中水平的方法或組合物來治療。但不幸的是，生物系統的複雜性使得不可能精確預測什麼方法或組合物能夠引起特定生物反應。這樣，只有通過細緻的實驗本領域技術人員才能夠識別治療消瘦的有效物質或方法。

癌症和腫瘤生長：癌症在美國和全世界都是導致高發病率和死亡率的最主要因素之一。在過去的 20 年中，癌症的年平均發病率有所提高，在 1999 年達到了 475 人每 100000 人。由於人口增長和衰老，預期從 2000 年到 2050 年，癌症活體的數量會加倍，從一百三十萬增長到二百六十萬。另外，預測患有癌症的老年人的數量和比例將會急劇增加：從 2000 年的新診斷出患有惡性腫瘤 的 389,000 75 歲及更年老人，到 2050 年的 1,102,000 人，癌症活體增加了 30%到 42%(Edwards 等，2002)。老年癌症活體預後不良，其原因是存在並發因素如年紀大而厭食，胃腸系統的改變，瘦素水平增高引起的效應，特別是男性中，中樞神經系統神經傳遞素的各種變化。約 70 歲後體重會有下降。這既包括脂肪組織的減少又包括肌肉質量的減少。老年人的肌肉質量減少稱爲少肌症。疾病導致細胞因數增加，該細胞因數能夠產生厭食以及導致蛋白消耗因素。許多導致老年人惡液質的因素是可以治療的(Morley，2001；Yeh 和 Schuster，1999)。癌症活體體內細胞因數水平增高及其它病理學改變能夠促進腫瘤生長，但糾正惡液質，貧血，改善免疫功能和正氮平衡能夠延緩腫瘤生長並減少並發症發

生(Demetri，2001；Koo 等，2001)。這樣，能有效針對大多數這些並發症的療法對於活體而言極爲有益。

腎衰竭：預計升高的腎衰竭和晚期腎病活體數量給醫療保健保障系統(healthcare providers system)(Hostetter 和 Listing，2002)帶來了極大的負擔。爲減小這個負擔，必須採取措施來改進腎病檢測，還要針對那些風險最高的疾病採取預防手段(Crook 等，2002)。重要的危險因數包括高血壓，糖尿病，肥胖和癌症(Al Suwaidi 等，2002；Nampoory 等，2002)。血肌酐，蛋白尿和微白蛋白尿作爲疾病的早期檢測指標是至關重要的，但能夠延緩或防止腎衰竭的療法對於活體和醫療系統均具有重要意義(LeBrum 等，2002；Sakhuja 等，2000)。

生長激素("GH")以及免疫功能：生長激素控制人類和其他脊椎動物生長的主要功能以及調節垂體分泌 GH 的生理相關途徑都已公知。GH 生成途徑由一系列相互依賴的基因構成，這些基因的產物是正常生長所必需的。GH 途徑基因包括：(1)配體，如 GH 和胰島素樣生長因數-I("IGF-I")；(2)轉錄因數如 priphet of pit 1，或者 prop 1，和 pit 1；(3)激動劑和拮抗劑，分別例如生長激素釋放激素("GHRH")和促生長素抑制素("SS")和(4)受體，例如 GHRH 受體("GHRH-R")。這些基因在不同的組織和器官中表達，包括下丘腦，垂體，肝臟和骨。GH 途徑的有效和可調控的表達對於最優線性生長，以及體內碳水化合物，蛋白質和脂代謝的平衡是必要的。GH 的合成以及從垂體前葉的

分泌是通過 GHRH 刺激，通過促生長素抑制素抑制，這兩種激素都是下丘腦激素。GH 會提高主要在肝臟以及其他靶器官 IGF-I 的產生。IGF-1 和 GH 輪流反饋抑制下丘腦和垂體中 GHRH 和 GH 的釋放。GH 直接以及間接地作用于外周組織，間接作用主要是通過 IGF-I 媒介。

免疫功能由 IGF-I 調節，IGF-I 對 B 細胞發育具有兩個主要作用：增強(potentiation)和成熟，作爲 B 細胞增殖輔助因數與白介素-7("IL-7")共同發揮作用。這些活性通過使用抗 IGF-I 抗體，IGF-I 反義序列以及使用重組 IGF-I 進行活性替換而得到了鑒定。有證據顯示巨噬細胞是 IGF-I 的豐富源泉。用重組 IGF-I 對小鼠的治療證實了這些觀察結果，在小鼠骨髓中前 B 細胞和成熟 B 細胞有所增加(Jardieu 等，1994)。仍保持對 IGF-I 敏感性的成熟 B 細胞，其免疫球蛋白的產量在體外和體內都由於 IGF-I 的刺激而增加(Robbins 等，1994)。

在過去的 20 年中重組蛋白的產生爲多種疾病的治療提供了有效工具。例如，矮小兒童的 GH 缺陷，燒傷，敗血症和 AIDS 活體中的合成代謝物質。但是，有報道在營養不良和感染病人中出現了 GH 抵抗。對轉基因動物和接受 GH 治療的活體進行的長期研究顯示：在 GH 和 IGF-I 治療與癌症發展之間不相關。GH 替代療法在臨床廣泛使用，作用良好，但是該療法具有幾個缺點：GH 必須通過皮下或肌肉給藥，每天一次到一周 3 次，持續數月，通常需要幾年時間；胰島素抵抗和糖耐量低減；兒童活體骨　生長

過快或過早癒合(Blethen 和 MacGillivray，1997；Blethen 和 Rundle，1996)。

相反，有報道說重組 GHRH 療法基本沒有副作用。顱外分泌的 GHRH，作爲成熟肽或截短的分子(如胰島素瘤及各種局部良性腫瘤中見到的)通常是具有生物活性的，甚至能夠造成肢端肥大症(Esch 等，1982；Thomer 等，1984)。對 GH 缺乏兒童或成人施用重組 GHRH 能夠提高 IGF 水平，使 GH 的分泌和 GHRH 的劑量成比例的增加，但仍然引起機體對彈丸劑量的重組 GHRH 產生反應(Bercu 等，1997)。這樣，施用 GHRH 代表著一種更符合生理學的提高低於正常 GH 和 IGF-I 水平的替代療法。

GH 以獨特的脈衝模式釋放，該模式對其生物活性相當重要(Argente 等，1996)。GHRH 可以促進 GH 的分泌，而促生長素抑制素(somatostatin)以及兩種下丘腦激素則抑制 GH 的分泌(Thorner 等，1990)。GH 脈衝分泌由 GHRH 的分泌引起，而 GHRH 的分泌與促生長素抑制素分泌的減少和消退相關。另外，脈衝發生器的機制由 GH-負反饋調控。GH 分泌的內源性節律會追隨外源性 GH 給藥的強制節律。有效且受調節的 GH 表達和胰島素樣生長因數 I("IGF-I)途徑對於最優化線性生長，碳水化合物、蛋白質和脂代謝的恒定性，以及提供正氮平衡(positive nitrogen balance)都非常必要(Murray 和 Shalet，2000)。許多關於人、綿羊或豬的研究都顯示持續的注射重組 GHRH 蛋白能夠恢復正常的 GH 模式，而不會使 GHRH 受體敏感性降低或耗盡 GH 供

應，因爲該系統能夠進行反饋調節，而在 GH 治療中該反饋調節被消除(Dubreuil 等，1990a; Vance 等，1985b; Vance, 1990; Vance 等， 1985)。儘管重組 GHRH 蛋白療法引發並刺激正常迴圈 GH 分泌而基本沒有副作用，但是由於 GHRH 在體內半衰期很短，必須進行頻繁的靜脈，皮下或鼻內(劑量需要提高 300 倍)給藥(每天 1 到 3 次)(Evans 等, 2001; Thorner 等， 1986)。這樣，作爲一種慢性治療，施用重組 GHRH 蛋白並不實用。

在人(Frohman 等，1984)和家畜中，野生型 GHRH 在循環系統中具有相對較短的半衰期。在血漿中孵育 60 分鐘後，95%的 GHRH(1-44)NH2 被降解，而在類似的條件下孵育該激素更短的形式(1-40)OH，經過 60 分鐘的孵育後，只顯示出有 77%的多肽被降解(Frohman 等，1989)。在治療性核酸載體中併入編碼特定蛋白酶抗性 GHRH 類似物的 cDNA，可以產生在血清中具有更長半衰期，效力更強的分子，並且引起質體注射動物體內更多數量的 GH 釋放(Draghia-Akli 等，1999，在此，將其併入作爲參考)。蛋白酶敏感的胺基酸取代突變延長了 GHRH 分子的血清半衰期。並且，通過使用超級-活性類似物可以提高 GHRH 的生物活性，該類似物可以提高其與特異性受體的結合親合性(Draghia-Akli 等，1999)。

顱外分泌的 GHRH，作爲經過加工的蛋白種類 GHRH (1-40)羥基或 GHRH (1-44)醯胺，甚至作爲更短的截短分子，都具有生物活性(Thorner 等，1984)。有報道稱：在血

液中提供低水平的 GHRH (100pg/ml)可以促進 GH 的分泌(Corpas 等，1993)。直接的質體 DNA 基因轉移是目前許多新興的核酸治療方法的基礎，這樣就不需要病毒基因或脂顆粒(Aihara 和 Miyazaki，1998； Muramatsu 等，1998)。骨骼肌是靶組織，因爲肌纖維具有很長壽命，並且能夠用環狀 DNA 質體轉導，其中該質體即使經過幾個月或幾年也能夠在免疫活性宿主中表達(Davis 等，1993；Tripathy 等，1996)。前期的報道說明，在小鼠中，人 GHRH 可以通過可注射的生肌表達載體輸送到肌肉，在肌肉中該 cDNA 可暫時性刺激 GH 分泌，持續超過兩個星期的時間(Draghia-Akli 等，1997)。

已經報道，施用新型 GHRH 類似物蛋白(美國專利 5,847,066; 5846,936; 5,792,747; 5,776,901; 5,696,089; 5,137,872; 5,084,442; 5,036,045; 5,023,322; 4,839,344; 4,410,512; RE33,699)或者合成的或天然存在的 GHRH 多肽片段(美國專利 4,833,166; 4,228,158; 4,228,156; 4,226,857; 4,224,316; 4,223,021; 4,223,020; 4,223,019)來達到提高生長激素的釋放目的。已經報道了含有下述突變的 GHRH 類似物(美國專利 5,846,936)：位置 1 Tyr 變爲 His; 位置 2 Ala 變爲 Val 或其他胺基酸; 位置 8 Asn 變爲 Gln, Ser 或 Thr; 位置 15 Gly 變爲 Ala 或 Leu; 位置 27 Met 變爲 Nle 或 Leu; 位置 28 Ser 變爲 Asn。GHRH 類似物是美國專利申請號 09/624,268 (“‘268 專利申請”)的主題，該申請說明了突變的 GHRH 類似物的應用，其中所述突變可提高引發生長激

素釋放的能力。另外，該'268專利申請涉及生長缺陷的治療，生長性能的改善；在動物體內以高於正常生長相關的水平促進生長激素產生；以及通過施用生長激素釋放激素類似物提高生長，在此將該申請併入作爲參考。

美國專利5,061,690涉及通過提供給受孕母性哺乳動物一定有效量的人GHRH或其類似物10-20天，來提高出生體重和乳汁產量。類似物的應用僅在哺乳期持續。但是，也存在複合給藥方式，並沒有報道關於將生長激素釋放激素(或因數)作爲DNA分子來施用，例如用質體媒介的治療方法。

美國專利5,134,120("'120專利")和5,292,721("'721專利")指出在妊娠期的最後兩個星期至哺乳期頭3星期內提高豬體內的生長激素，可以使新生小豬在出生後禁食時，維持乳糖和游離脂肪酸的血漿濃度的能力顯著增強。另外，該'120專利和'721專利指出在哺乳期內治療母豬導致初乳的乳脂增多並且乳汁產量也有所提高。這些效果對於提高新生小豬的存活力和斷乳前體重的增加很重要。但是'120專利和'721專利都沒有提供關於以DNA形式施用生長激素釋放激素的報道。

基因運輸和體內表達：最近，將特定基因運送到體細胞組織，以糾正先天性或獲得性缺陷及失調的方式已被證明具有可能性(Herzog等，2001；Song等，2001；Vilquin等，2001)。基因基礎的藥物運輸相較於施用重組蛋白具有很多優點。這些優點包括天然蛋白結構的保守性，改進的

生物活性，避免了系統毒性，避免了感染和有毒雜質。另外，核酸載體療法延長了治療範圍內蛋白的存在，因爲新分泌的蛋白在血液迴圈中持續地存在。在一些情況下，在簡單的質體注射後獲得的相對較低的表達水平已足夠達到分泌多肽生物活性的生理可接受水平(Danko 和 Wolff，1994；Tsurumi 等，1996)。

施用重組蛋白的首要限制是在施用後蛋白有限的利用率。使用可注射 DNA 質體載體進行的核酸載體療法克服了這個缺陷，因爲向活體骨骼肌注射一次就允許長時期的生理表達(WO99/05300 和 WO01/06988)。載體的注射以更近似于天然過程的方式，促進動物中酶和激素的産量。並且，在體內基因轉移的非病毒技術中，直接將質體 DNA 注射到肌肉組織中更加簡單，經濟且安全。

在質體媒介的表達系統中，非病毒核酸載體除了包含編碼治療性基因産物的核酸外，還可以包含合成的核酸運送系統。通過這種方式，可以避免使用多數病毒載體而帶來的風險。由於使用"種特異"組份進行核酸運送，非病毒表達載體通常會産生較低的毒性，這樣將通常病毒載體相關的免疫原性風險降到最低。另外，目前還沒有在體內將質體序列整合到宿主細胞的報道，所以這種類型的核酸載體療法應該既不會啓動致癌基因也不會消除腫瘤抑制基因的活性。由於游離基因體系存在於染色體外，質體具有確定的藥代動力學和消除曲線，導致基因在靶組織中進行表達的時間有限。

爲提高質體 DNA 到達細胞的運輸，已通過物理方法做了多種努力，包括電穿孔，聲穿孔(sonoporation)和壓力。電穿孔法涉及脈衝電場的應用以在細胞膜上產生瞬間的小孔而不會給細胞帶來永久損害。因此可以導入外源分子(Smith 和 Nordstrom，2000)。通過調整電穿孔體系產生的電脈衝，核酸分子可以通過由該方法在細胞上產生的通道或小孔。美國專利 5,704,908 描述了用於在活體體腔的選定位置運送分子到達細胞的電穿孔儀。這些脈衝電壓注射設備在美國專利 5,439,440 和 5,702,304 以及 WO96/12520, 96/12006, 和 97/07826 中也有描述。

最近，使用電穿孔來提高質體的體內運送獲得了令人矚目的進展。電穿孔已成功地用於在注射質體後轉染腫瘤細胞(Lucas 等，2002; Matsubara 等，2001)或者在人體內運送抗腫瘤藥物博萊黴素到皮膚或皮下腫瘤(Gehl 等，1998；Heller 等，1996)。電穿孔還被廣泛的應用於小鼠(Lesbordes 等，2002； Lecas 等，2001； Vilquin 等，2001)，大鼠(Terada 等，2001； Yasui 等，2001)和狗(Fewell 等，2001)中，以運輸編碼各種激素，細胞因數或酶的治療性基因。我們使用生長激素釋放激素("GHRH")進行的前期研究顯示用電穿孔進行的質體治療頗具潛力並且提出了一種有希望的方法來誘導大動物和人類體內蛋白的產生及受調節地分泌(Draghia-Akli 等，1999；Draghia-Akli 等，2002)。

如上所述，電穿孔提高骨骼肌攝取質體的能力已被完全證實。 另外，已觀察到用聚-L-麩胺酸("PLG")或聚乙烯吡

咯烷酮(PVP)合成的質體能提高質體轉染並由此表達期望的轉基因。陰離子聚合物 PLG 鈉能夠增強低質體濃度下質體的攝入，同時減少該方法可能帶來的任何組織損傷。如前所述，電穿孔提高骨骼肌攝取質體的能力已被完全證實。PLG 是種穩定的化合物，可抵抗相對較高的溫度(Dolnik 等，1993)。以前 PLG 用於在疫苗的製備中提高穩定性(Matsuo 等，1994)而不增加其免疫原性。其還用作抗原攝入後(post-antigen inhalation)或暴露在臭氧下的抗-毒素(Fryer 和 Jacoby, 1993)。另外，用 PLG 或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)合成的質體能提高質體轉染並由此在小鼠，大鼠和豬骨骼肌中將期望轉基因的表達提高 10 倍(Fewell 等，2001；Mumper 等，1998)。PLG 已經用於提高抗癌藥物的穩定性(Li 等，2000)並且作爲"膠"封閉傷口或者在傷口和組織修復過程中防止從組織流血(Otani 等，1996；Otani 等，1998)。

儘管不希望被理論束縛，但是 PLG 會在電穿孔過程中增強質體的轉染，不僅通過穩定質體 DNA，促進通過細胞膜上的孔進行的細胞內轉運，還通過一種活性機制。例如，細胞上帶正電的表面蛋白可以結合帶負電的 PLG，該 PLG 通過蛋白-蛋白相互作用與質體 DNA 相連。當使用電場時，蛋白的表面翻轉方向然後積極地將該 DNA 分子包容于其內，該方法能夠顯著地提高轉染效率。而且，PLG 可以預防體內質體運輸相關的肌肉損傷(Draghia-Akli 等，2002a)並能夠在注射前提高質體體外穩定性

可直接注射的 DNA 質體載體的應用在過去是有限的。在簡易地直接注射後，肌肉纖維對於 DNA 攝入效率低，導致相對較低的表達水平(Prentice 等，1994；Wells 等，1997)。另外，轉基因表達的持續時期很短(Wolff 等，1990)。以前最成功的臨床應用是在疫苗領域(Danko 和 Wolff，1994；Tsurumi 等，1996)。

儘管本領域有針對線性 DNA 電穿孔真核細胞的參考文獻(McNally 等，1988；Neumann 等，1982) (Toneguzzo 等，1988)(Aratani 等，1992；Nairn 等，1993；Xie 和 Tsong，1993；Yorifuji 和 Mikawa, 1990)，這些實例說明轉染到細胞懸浮液，細胞培養物及類似情況，而且轉染細胞在體細胞組織中並不存在。

美國專利 4,956,288 涉及製備重組宿主細胞的方法，該宿主細胞含有大量外源 DNA 的拷貝，該方法是在外源 DNA 的存在下，電穿孔細胞群，培養細胞，然後破壞這些含有較低外源 DNA 拷貝數目的細胞。

美國專利 5,874,534 ("'534 專利")和美國專利 5,935,934 ("'934 專利")描述了突變的類固醇受體，其應用方法和一種核酸載體療法的分子開關，將這兩篇文獻併入本文作爲參考。用於在核酸載體療法中調節表達的分子開關以及在人，動物，轉基因動物及植物中利用該分子的方法在'534 專利和'934 專利中描述。該分子開關描述爲一種調節核酸載體療法的異源核酸序列盒表達的方法，其由修飾的類固醇受體構成，該修飾的類固醇受體包含一個天然

類固醇受體 DNA 結合域，該結合域與修飾的配體結合域相連。修飾的結合域通常只結合非天然的配體、抗-激素或非自然的配體。本領域技術人員公知：天然配體並不輕易地結合修飾的配體-結合域，所以對核酸序列盒含有的基因的調節和/或表達幾乎沒有影響。

總之，對於像貧血，消瘦和免疫功能障礙這類疾病的治療不經濟且在範圍上有所限制。相關技術已顯示可以使用重組蛋白技術在有限的條件下(capacity)治療那些不同的疾病，但是這些治療具有一些顯著的缺陷。編碼重組蛋白的核酸表達構建體是解決頻繁注射和傳統重組治療高昂費用的一種可行的解決方法。向編碼的重組蛋白中導入突變位點對於生產和野生型對應物相比在體內穩定性更好的蛋白而言是前進了一步。不幸的是，在指定重組蛋白中每個胺基酸的改變必須獨立地評價，因爲相關的技術並沒有教導本領域技術人員精確地預測如何在結構(如胺基酸序列)上進行改變將會導致重組蛋白的功能(如提高或降低的穩定性)發生改變。所以，編碼表達蛋白的核酸表達構建體的有益效果只有通過直接的實驗才能確定。需要一種擴展療法，該療法將核酸表達構體運送到活體體內，並能夠使體內治療性蛋白穩定表達。

發明內容

本發明涉及用於延緩異常細胞生長，抑制腫瘤發展，預防腎衰竭，減少轉移，以及提高癌症動物存活率的組合

物和方法。本發明的方法包括用質體媒介的基因補充方法治療活體。本方法包括將有效量的編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送到活體組織，如肌肉組織。本發明的具體實施例針對各種類型的腫瘤，例如腺瘤；癌；白血病；淋巴瘤；肺腫瘤；巨細胞瘤；黑素瘤；肉瘤；和實性腫瘤。GHRH 或其功能性生物學等同物在活體體內的表達足以延緩腫瘤生長，預防腎衰竭，和提高癌症動物存活率。還可以如下增強本方法：在選定組織中安置一對電極，然後在插入電極的區域將核酸表達構建體運送到選定的組織中，在選定組織的選定區域對選定組織施加細胞轉染脈衝，所述選定組織的選定區域是核酸表達構建體被運送的區域。在具體實施裏中也使用了電穿孔，直接注射，基因槍，或金顆粒轟擊來運送編碼 GHRH 或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體到活體體內。本發明所述的物件包括哺乳動物，例如人，和家畜。

本發明的組合物包括有效量的編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體，其中向活體組織中運送並隨後表達的 GHRH 或其功能性生物學等同物足以延緩腫瘤生長並延遲惡液質或通常與腫瘤生長相關的消瘦作用。還描述了本發明核酸表達構建體的具體元件。例如，該構建體含有組織特異性啓動子；GHRH 或其功能性生物學等同物；和操縱性連接的 3'未翻譯區("3'UTR")。本發明核酸表達構建體包括一個基本上不含病

毒骨架的構建體。還提供了本發明所用的核酸表達構建體的具體實例。編碼的 GHRH 功能性生物學等同物包含一種多肽，它相較於 GHRH 多肽而言，具有類似的或改進的生物活性。本發明應用的由核酸表達構建體編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包含具有下述通用序列的胺基酸結構：

-X_1-X_2-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQG ERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：X_1 是酪胺酸("Y")或織胺酸("H")的 D-或 L-異構體，； X_2 是丙胺酸("A")，纈胺酸("V")，或異白胺酸("I")的 D-或 L-異構體； X_3 是丙胺酸("A")或甘胺酸("G")的 D-或 L-異構體； X_4 是甲硫胺酸("M")或白胺酸("L")的 D-或 L-異構體； X_5 是絲胺酸("S")或天冬醯胺酸("N")的 D-或 L-異構體，或以上組合。列出了可用于本發明的 GHRH 或其功能性生物學等同物胺基酸序列的具體實例。在一個具體實施例中，編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物在接受核酸表達構建體的活體中促進生長激素("GH")分泌。在本發明的具體實施例中，提高組織吸收核酸表達構建體能力的轉染-促進多肽包含一個帶電荷的多肽，例如聚-L-麩胺酸。

本發明的一個實施例涉及質體媒介的補充方法來治療貧血；提高活體體內總紅細胞數量；逆轉消瘦；逆轉異常

體重降低；治療免疫功能障礙；逆轉淋巴細胞增殖抑制；或者延長慢性病活體的平均壽命。這可利用有效量的含有組成型啓動子和生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物編碼序列的核酸表達構建體來完成。當該核酸序列被運送到活體的特定細胞(如體細胞，幹細胞，或生殖細胞)中時，可獲得 GHRH 的組織特異性和組成型表達。將組成型啓動子和編碼 GHRH 或其功能性生物學等同物序列直接運送到活體細胞的優選方法是體內電穿孔法。當細胞是在活體組織中時，電穿孔法可使用外部電極，或當使用探針時的內部電極，以使目標核苷酸序列進入活體細胞。

本發明的另一實施例涉及通過調節 GHRH 或其功能性生物學等同物表達的能力，以質體媒介的方法來治療貧血；消瘦；免疫功能障礙；延長慢性病活體的平均壽命。調節可通過如下方式實現：將第一段核酸序列和第二段核酸序列運送到活體細胞，然後再將分子開關運送到活體細胞；其中第一段核酸序列含有誘導型啓動子和生長激素釋放激素或其類似物的編碼區域("誘導型-GHRH")，第二段核酸序列具有組成型啓動子和無活性調節蛋白的編碼區域。通過將分子開關分子(如 mifepistone)運送到活體體內，無活性的調節蛋白轉變爲活性蛋白並在活體體內起始誘導型-GHRH 的轉錄。通過活體體內修飾細胞，能夠實現 GHRH 或其功能性生物學等同物的外部調節，表達和隨後的釋放，從而能治療貧血症，消瘦，免疫功能障礙並延長慢性疾病活體的平均壽命。可通過體內電穿孔方法將能夠

對 GHRH 或其功能性生物學等同物類似物進行外部調節的核酸序列直接運送到活體細胞。

本發明的另一實施例涉及通過將特定重組 GHRH 生物功能等同蛋白導入活體體內的療法來治療貧血，消瘦，免疫功能障礙和延長慢性疾病活體的平均壽命。

以下附圖構成本說明書的一部分，從某些方面進一步說明本發明。可以結合這些附圖和本說明書具體實施例的詳細描述來更好地理解本發明。

實施方式

定義

術語"一個"或"一"在本說明書中可以指一個或多個。當用於如申請專利範圍第項中時，當與"包含"相連使用時，"一個"或"一"表示一個或不止一個。這裏所用的"另一個"可以指至少第二個或更多。

這裏所用術語"異常體重降低"指體重至少降低個體最小理想體重的 5-10%，個體顯現出脂肪組織及肌肉質量顯著降低的特徵。

這裏所用的術語"AIDS 治療"指治療愛滋病("AIDS")，可用任何醫學或物理方法，這些方法包括但不限於：抗逆轉錄病毒劑，核苷類似物，非核苷逆轉錄酶抑制物(NNRTIs)，蛋白酶抑制劑，和/或其他用於提高免疫系統的藥物。

這裏所用的術語"類似物"指 GHRH 的任何突變型，或

合成的或天然存在的 GHRH 多肽片段，例如 HV-GHRH (SEQID #1), TI-GHRH (SEQID #2), TV-GHRH (SEQID #3), 15/27/28-GHRH (SEQID #4), (1-44)NH_2 (SEQID #5),或 (1-40)OH (SEQID #6)形式,或更短的但不少於(1-29)胺基酸的形式。

這裏所用的術語"貧血症"指血流中紅血球數目或體積或者血紅蛋白的總量降低，從而導致活體面色蒼白，全身無力等症狀的疾病。

這裏所用的術語"非病毒治療"指一組藥物，其可分爲 3 種主要類型，包括：核苷類似物藥物，蛋白酶(protease) (proteinase)抑制劑藥物，和非核苷逆轉錄酶抑制劑藥物 (NNRTIs)。

這裏所用的術語"身體脂肪比例"指身體脂肪質量除以總體重。

這裏所用的術語"癌症治療"指治療癌症，可用任何醫學或物理方法，這些方法包括但不限於：外科手術，免疫療法，化學療法，放射療法，熱療和/或光療。

這裏所用的術語"惡液質"指骨骼肌的喪失加快。

這裏所用的術語"序列盒"指一個或多個轉基因表達載體。

這裏所用的術語"細胞-轉染脈衝"指力量的傳送，該力量可引起載體，例如線性 DNA 片段，轉染到細胞。在一些實施例中，該力量是來自電力，如在電穿孔中，或者該力量來自血管壓力。

這裏所用的術語"慢性病活體"指患有慢性阻塞性肺病，慢性心力衰竭，中風，癡呆，髖部骨折後復原，慢性腎衰竭，風濕性關節炎，和老年多發性紊亂，且在至少2年時間內，每個月要看醫生和/或住院的活體。

這裏所用的術語"編碼區"指DNA序列的任何部分，該DNA序列能夠轉錄成信使RNA(mRNA)然後翻譯成特定肽特徵的胺基酸序列。

這裏所用的術語"編碼區"指DNA序列的任何部分，該DNA序列能夠轉錄成信使RNA(mRNA)然後翻譯成特定肽特徵的胺基酸序列。

這裏所用的術語"運送"或"運輸"指將材料導入組織，活體，細胞或任何受體的方法，該方法是在有或沒有壓力的情況下，利用化學或生物方法，注射，混合，電穿孔，聲納穿孔，或其組合。

這裏所用的術語"DNA片段"或"核酸表達構建體"指實質上雙鏈的DNA分子。儘管可用本領域公知的常規分子生物學方法產生片段，但是在一些實施例中，該DNA片段或表達構建體是通過對親代DNA分子進行限制性酶消化而得到。術語"表達載體"，"表達序列盒"或"表達質體"在此可以互換使用。儘管親代分子可以是任何常規分子生物學DNA物質，但在一些實施例中親代DNA分子是質體。

這裏所用的術語"供體-活體"指動物界的任何物種，其中細胞已被取出置於體外，在任意長時期內維持可存活狀態。

這裏所用的術語"供體-細胞"指任何被取出的細胞，並且其在供體活體體外，在任意長時期內維持可存活狀態。

這裏所用的術語"有效量"指施用給人，動物或組織培養物中的足夠量的核酸表達構建體或編碼蛋白，以生成足夠水平的蛋白，RNA，或激素。本領域技術人員公知足夠水平的蛋白或 RNA 依賴於特定核酸表達構建體的應用。這些水平可根據給藥和治療或接種的類型而不同

這裏所用的術語"電穿孔"指應用電脈衝將核酸序列運送到細胞的方法。

這裏所用的術語"電脈衝"和"電穿孔"指對組織或細胞施加電流來達到吸收核酸分子到細胞內的目的。本領域技術人員公知這些術語是與術語"脈衝的電場""脈衝的電流設備"和"脈衝的電壓設備"相聯繫的。本領域技術人員公知電脈衝的量和時間是依賴於組織，大小和受體活體的總體健康狀況，並且可進一步知道憑經驗確定這些參數。

這裏所用的術語"編碼的 GHRH"是生物學活性的生長激素釋放激素多肽。

這裏所用的術語 GHRH"功能性生物學等同物"是一種多肽，該多肽胺基酸序列不同於野生型 GHRH 多肽，並且相較於 GHRH 多肽還具有類似的或改進的生物學活性。功能性生物學等同物可以天然存在或經人工修飾而來。本領域技術人員公知這裏所說的類似的或改進的生物學活性指促進和/或釋放生長激素或其他垂體激素。本領域技術人員公知在一些實施例中，GHRH 的編碼的功能性生物學等同

物是被基因工程處理後含有獨特胺基酸序列並且還具有和GHRH多肽類似的或改進的生物學活性的多肽。本領域公知的處理這種序列的基因工程方法包括定點突變。

這裏所用的術語"生長激素釋放激素"("GHRH")指一種激素，其能夠促進或刺激釋放生長激素，以及較小程度的刺激其他垂體激素，如泌乳素。

這裏所用的術語"生長激素"("GH")指與生長相關，並作爲化學信使在靶細胞上行使功能的激素。

這裏所用的術語"GeneSwitch®" (Valentis的注冊商標，Inc. (Burlingame, CA))指米非司酮-誘導型異源核酸序列編碼調節蛋白，GHRH, 功能性生物學等同物或其組合的技術。這種技術在圖1和圖9中用流程圖表示。本領域技術人員公知米非司酮的替代物抗黃體酮物質是可獲得的，包括奧納司酮，ZK112993, ZK98734和5α-孕烷-3,2-二酮。

這裏所用的術語"生長激素"("GH")指與生長相關，作爲化學信使在靶細胞上行使功能的激素。在一個具體實施例中，該生長激素是通過生長激素釋放激素的作用而被釋放的。

這裏所用的術語"生長激素釋放激素"("GHRH")指一種激素，其能夠促進或刺激釋放生長激素，以及較小程度的刺激其他垂體激素的分泌，如泌乳素。

這裏所用的術語"異源核酸序列"指含有不同調節和表達元件的DNA序列。

這裏所用的術語"免疫功能障礙"指活體免疫系統功能異常、削弱或不完全，如通過免疫特異性標記(如 IGF-I，或%淋巴細胞)間接或直接側定的。

這裏所用的術語"免疫療法"指促進或提高機體免疫系統的治療，來生成保護性抗體，該抗體可減少醫療處理的負效應和/或減少對醫療的需要。

這裏所用的術語"去脂體重"("LBM")指動物體中非脂肪組織如肌肉的質量。

這裏所用的術語"慢性病活體的平均壽命"指與未接受治療的活體相比，接受了治療的活體的實際平均壽命有所增加。

這裏所用的術語"淋巴細胞增殖"指淋巴細胞的產生。

這裏所用的術語"腎衰竭"指腎臟缺血性或毒性損傷而導致的腎小球濾過率急性或慢性降低，包括腎小球毛細管通透性降低，腎小球濾過液的反滲，腎小管梗塞，和腎內血管收縮。

這裏所用的術語"修飾的細胞"指來自活體的細胞，該細胞已導入額外的核酸序列。

這裏所用的術語"修飾的供體細胞"指任何含有 GHRH 編碼核酸序列的供體細胞。

這裏所用的術語"分子開關"指被運輸到活體中的能夠調節基因轉錄的分子。

這裏所用的術語"核酸表達構建體"指任何類型的含有編碼可轉錄 RNA 的核酸的遺傳性構建體。術語"表達載體"

可在此與之互換使用。在具體實施例中，核酸表達構建體包含：啓動子；目的核苷酸序列；3'未翻譯區域；其中啓動子，目的核苷酸序列和3'未翻譯區域是操縱性連接；並且目的核苷酸序列的體內表達由啓動子調節。

這裏所用的術語"操縱性連接"指核酸序列中的元件或構建體，其連接是通過可操作的能力而不是物理位置。該元件或構建體能夠或者其特徵在於完成期望的操作。本領域技術人員公知核酸序列中各元件或構建體的操縱性連接不一定必須是串聯或鄰近的順序。

這裏所用的術語"聚-L-麩胺酸"("PLG")指生物可降解的L-麩胺酸，其適於在電穿孔或無電穿孔情況下DNA到細胞的轉移中用作載體或輔劑。

這裏所用的術語"注射後"指將含有編碼GHRH或其功能性生物學等同物的異源核酸序列的核酸序列盒導入活體細胞之後，且當修飾的細胞在活有機體內時允許該編碼基因表達的時期。

這裏所用的術語"質體"通常指含有染色體外遺傳物質——通常是環狀DNA複製子，該DNA能夠在染色體外獨立複製。質體或其片段可用作載體。質體是存在於或可衍生自細菌和其他微生物(較少)的雙鏈DNA分子。但是通常排除粒線體和葉綠體DNA，酵母殺手(yeast killer)或其他情況。

這裏所用的術語"質體媒介的基因補充"指在體內利用有效量的核酸表達構建體使活體延長暴露在治療性蛋白中

的時間。

這裏所用的術語"脈衝電壓設備"或"脈衝電壓注射設備"指通過對細胞發射定位脈衝，能夠導致核酸分子被吸收到有機體細胞中的儀器。然後細胞膜變得不穩定，會形成通道或孔。這種類型的常規設備都可以選擇或調整期望脈衝電壓振幅以及脈衝電壓的時間。脈衝電壓設備最基本的意義是能夠促進本發明組合物的運送，特別是將線性 DNA 片段運送到有機體細胞。

這裏所用的術語"質體骨架"一般指含有細菌起始複製位點和細菌抗生素選擇基因的 DNA 序列，該選擇基因只允許那些被適當質體轉化的細菌特異性的生長。但是，還有一些質體，稱爲迷你環，缺少抗生素抗性基因和複製起始位點(Darquet 等，1997；Darquet 等，1999；Soubrier 等，1999)。體內擴增表達質體 DNA(即非病毒表達體系)的應用避免了病毒載體相關的風險。由於應用了"種-特異性"成分進行基因運輸，將病毒載體相關的風險最小化，所以非病毒表達體系產物通常具有低毒性。本發明的一個特點是質體骨架不含有病毒核苷酸序列。

這裏所用的術語"啓動子"指能夠指導基因轉錄的 DNA 序列。啓動子可以指導原核或真核基因的轉錄。啓動子可以是"誘導型"，回應誘導物質而起始轉錄，或者，相反，啓動子可以是"組成型"，由此誘導物質並不能調節轉錄速度。啓動子可以組織特異性或組織優選性的方式被調節，這樣只在特定組織類型中的操作性連接編碼區域的轉錄中

具有活性。

這裏所用的術語"放射療法"指對癌症活體進行的放射治療，能夠損傷癌症細胞中的 DNA，其通常導致癌症細胞死亡。

這裏所用的術語"複製元件"包括能夠在特定宿主中引起質體複製的核酸序列。分子生物學領域技術人員公知這種複製元件可以包括但不限於：選擇性標記基因啓動子，核糖體結合位點，選擇性基因序列，和複製起始位點。

這裏所用的術語"殘餘線性質體骨架"包括製作線性核酸表達質體過程末期所殘留的任何質體骨架片段。

這裏所用的術語"受體-活體"指可以導入來自供體活體的修飾供體細胞的動物界中任何動物品種。

這裏所用的術語活體"紅細胞總量"("RBC-總量")用下述 3 種測試之一來進行測定：1)紅細胞壓積：血漿中紅細胞的百分比；2)紅細胞("RBC")計數：血漿中紅細胞的數目；和 3)血紅蛋白：活體紅細胞中攜氧蛋白的水平。

這裏所用的術語"調節蛋白"指任何可用于調控基因表達的蛋白。

這裏所用的術語"調節蛋白"指對誘導物產生反應從而提高轉錄率的蛋白。

這裏所用的術語"活體"或"動物"指動物界的任何動物品種。在優選實施例中，更具體指人和家畜：寵物(如貓，狗等)；牲口(如馬等)；食物(奶牛，雞，魚，羊，豬等)；以及本領域公知的所有其他動物。

這裏所用的術語"組織"指類似細胞以及環繞其周圍的細胞內物質的集合。技術人員公知組織是行使特定功能的特徵類似細胞的集合。在本發明的範圍內，該術語組織並不指細胞系，細胞懸浮液或細胞培養物。在一個具體實施例中，組織在體內被電穿孔。在另一實施例中，該組織不是植物組織。技術人員公知在體內有四種基本組織：1)上皮 2)結締組織；包括血液，骨和軟骨；3)肌肉組織；以及4)神經組織。在一個具體實施例中，該方法和組合物涉及通過電穿孔將線性 DNA 轉移到肌肉組織。

這裏所用的術語"治療元件"包括可導致編碼基因產物體內表達的核酸序列。分子生物學領域技術人員公知治療元件可以包括但不限於，啓動子序列，轉基因，多聚 A 序列，或者 3'或 5'UTR。

這裏所用的術語"轉染"指將核酸導入真核細胞。在一些實施例中，該細胞不是植物組織或酵母細胞。

這裏所用的術語"載體"指任何能夠將核酸運送到細胞或有機體的媒介。包括質體載體，病毒載體，脂質體，或陽離子脂類。

這裏所用的術語"病毒骨架"指核酸序列，該序列不含有啓動子，基因，3'多聚 A 信號，或未翻譯序列，但含有一些元件，該元件包括但不限於點特異性染色體組整合 Rep 和反向末端重復序列("ITRs")或 tRNA 引物逆轉錄的結合位點，或核苷酸序列組份，該組份在體內被插入時，可誘導病毒免疫原性，允許整合，影響組織特異性啓動子的

特異性和活性，引起沈默轉錄或給活體帶來安全性風險。

這裏所用的術語"血管壓力脈衝"指用大量液體的壓力來促進細胞吸收載體。本領域技術人員公知血管壓力脈衝的大小和時間依賴於組織，大小和受體活體的總體健康狀況，並且可進一步知道憑經驗如何確定這些參數。

這裏所用的術語"載體"指含有遺傳材料的構建體，該遺傳材料被設計成可通過將核酸序列運輸到靶細胞而指導靶細胞的轉化。載體可以含有多元遺傳元件，這些元件在位置上和序列上與其他必要的元件相關，這樣，誘導的核酸序列盒可被轉錄，且如果有必要，在轉染細胞中可被翻譯。這些元件是操作性連接在一起的。術語"表達載體"指含有資訊的 DNA 質體，該資訊指在異源細胞內產生重組蛋白所必需的所有資訊。

這裏所用的術語"消瘦"指體重降低，特點是脂肪組織及肌肉質量顯著降低，這就使得患有進行性疾病如癌症，AIDS 等的活體增加體重十分困難。消瘦可與疾病本身或針對疾病的治療相關，或者與這二者都相關。

本發明一方面涉及用於延緩癌症活體中異常細胞生長，促進對腫瘤進展進行抑制的方法。本發明方法包括用質體媒介的基因補充來治療活體。本發明包括將有效量的編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送到活體組織中，如肌肉組織。本發明的具體實施例是針對各種類型的腫瘤(例如腺瘤；癌；白血病；淋巴瘤；肺腫瘤；巨細胞瘤；黑素瘤；肉瘤；和

實體腫瘤)。在活體體內 GHRH 或其功能性生物學等同物的表達足以延緩腫瘤生長，預防腎衰竭，延遲惡液質或通常與腫瘤生長相關的消瘦作用。還可以如下增強本方法：在選定組織中安置一對電極，然後在插入電極的區域將核酸表達構建體運送到選定的組織中，對選定組織的選定區域對選定組織施加細胞轉染脈衝(如電脈衝)，所述選定組織的選定區域是核酸表達構建體被運送的區域。但是，細胞轉染脈衝不一定必須爲電脈衝，還可使用血管壓力脈衝。在一些具體實施例中使用電穿孔，直接注射，基因槍，或金顆粒轟擊來運送編碼 GHRH 或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體到活體體內。本發明所述的活體包括哺乳動物(例如人，豬，馬，母牛，小鼠，大鼠，猴，綿羊，山羊，狗或貓)。

還描述了本發明核酸表達構建體的具體元件。例如，該構建體含有組織特異性啓動子；GHRH 或其功能性生物學等同物；和操縱性連接的 3'未翻譯區("3'UTR")。本發明核酸表達構建體包括一個基本上不含病毒骨架的構建體。在一些具體實施例中，組織特異性啓動子包括肌特異性啓動子(如 SPc-12 (SeqID#7))，核酸構建體的 3'UTR 包含人生長激素 3'UTR (SeqID#8)，牛生長激素 3'UTR，骨骼 α 肌動蛋白 3'UTR，或 SV-40 多聚腺苷酸化信號。本發明核酸表達構建體包括一個基本上不含病毒骨架的構建體。本發明所用的核酸表達構建體的具體實例包括具有 SeqID#11，SeqID#12，SeqID#13，和 SeqID#14 的質體。

GHRH 功能性生物學等同物相較於 GHRH 多肽而言，含有類似的或改進的生物活性的多肽。本發明應用的由核酸表達構建體編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包含具有下述通用序列的胺基酸結構(SeqID#6):

-X_1-X_2-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQG ERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：X_1 是酪胺酸("Y")，或織胺酸("H")的 D-或 L-異構體胺基酸； X_2 是丙胺酸("A")，纈胺酸("V")，或異白胺酸("I")的 D-或 L-異構體胺基酸；X_3 是丙胺酸("A")或甘胺酸("G")的 D-或 L-異構體胺基酸；X_4 是甲硫胺酸("M")或白胺酸("L")的 D-或 L-異構體胺基酸；X_5 是絲胺酸("S")或天冬醯胺酸("N")的 D-或 L-異構體胺基酸；或其組合。可用于本發明的 GHRH 或其功能性生物學等同物胺基酸序列的具體實例如 SeqID#2；SeqID#3；SeqID#4；和 SeqID#10 所示。在一個具體實施例中，編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物在接受核酸表達構建體的活體中促進生長激素("GH")分泌。

儘管不希望被理論束縛，但是可以用轉染-促進多肽來提高組織細胞吸收核酸表達構建體能力的。在本發明的具體實施例中，轉染-促進多肽包含一個帶電荷的多肽，例如聚-L-麩胺酸。

本發明另一方面涉及組合物和方法，可用於延緩癌症

動物中異常細胞的生長，抑制腫瘤發展，防止腎衰竭，減少轉移，提高存活率。本發明的組合物包括有效量的編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體，其中 GHRH 或其功能性生物學等同物在活體體內的的運送和隨後的表達足夠延遲異常細胞的生長，促進對腫瘤發展的抑制作用，預防腎衰竭，提高癌症動物的存活率。本發明的具體實施例是針對特定類型的癌症和腫瘤(例如腺瘤；癌；白血病；淋巴瘤；肺腫瘤；巨細胞瘤；黑素瘤；肉瘤；和實性腫瘤)

GHRH 或其功能性生物學等同物的隨後表達足夠延緩異常細胞的生長，促進對腫瘤發展的抑制作用，預防腎衰竭，提高癌症動物的存活率。還可以如下增強本發明組合物(即核酸表達構建體)的吸收：在選定組織中安置一對電極，然後在插入電極的區域將核酸表達構建體運送到選定的組織中，對選定組織的選定區域對選定組織施加細胞轉染脈衝(如電脈衝)，所述選定組織的選定區域是核酸表達構建體被運送的區域。但是，細胞轉染脈衝不一定必須爲電脈衝，還可使用血管壓力脈衝。在一些具體實施例中使用電穿孔，直接注射，基因槍，或金顆粒轟擊來運送編碼 GHRH 或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體到活體體內。本發明所述的活體包括哺乳動物(例如人，豬，馬，母牛，小鼠，大鼠，猴，綿羊，山羊，狗或貓)。

另外，本發明涉及用質體媒介的補充方法來治療慢性疾病活體貧血，消瘦，腫瘤生長，免疫功能障礙，腎衰竭

和/或延長平均壽命。貧血指血流中紅血球數目，體積或二者都減少，或血紅蛋白的總量降低，從而導致面色蒼白，全身無力等症狀的疾病。活體的消瘦可定義爲體重降低，特點是脂肪組織及肌肉質量顯著降低，這就使得患有進行性疾病(如癌症，AIDS 等)的活體增加體重十分困難。貧血，消瘦，腫瘤生長，免疫功能障礙，腎衰竭和平均壽命降低可與特定疾病或疾病的治療相關。更具體地，本發明涉及將編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物的異源核酸序列運送到活體細胞中(如體細胞，幹細胞，或生殖細胞)，並當修飾的細胞在活體體內時，使編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物基因表達。GHRH 或其功能性生物學等同物的隨後表達由組織特異性啓動子(如肌肉)，和/或含有修飾配體結合域(如分子開關)的調節蛋白進行調控，所述調節蛋白只有當正確修飾的配體(如 mifepistone)被外部施用給活體時，才具有活性。修飾細胞中 GHRH 或其功能性生物學等同物的顱外表達和隨後的釋放可治療慢性疾病活體的貧血症，消瘦，免疫功能障礙和延長平均壽命。將 GHRH 或其功能性生物學等同物運送到活體細胞的優選方法是電穿孔。

重組 GH 替代療法在臨床廣泛應用，具有良好效果，但是其用量通常超過生理範圍。重組 GH 的這種高劑量與有害的副作用相關，例如，30%接受該重組 GHRH 治療的活體會顯示出更高頻率的胰島素抗性(Blethen, 1995; Verhelst 等，1997)，或者在兒科活體中出現骨　生長加速

以及過早癒合現象(Blethen 和 Rundle，1996)。另外，迴圈中 GH 的分子異質性還與生長和動態平衡非常相關，其可導致 GH 的潛能降低，這樣該 GH 刺激泌乳素受體的能力就會降低(Satozawa 等，2000；Tsunekawa 等，1999；Wada 等，1998)。這些副作用的出現是因爲如下原因：用重組的外源 GH 蛋白進行的治療會提高 GH 的基礎水平並消除 GH 的陣髮式脈衝。相反，重組 GHRH 治療則未見有副作用的報道。在垂體門靜脈迴圈中，正常 GHRH 水平約爲 150-800 pg/ml，而在體循環中該激素的值約爲 100-500 pg/ml。顱外腫瘤所引起的肢端肥大症活體體內具有將近 10 倍的水平(如 50 ng/ml 免疫反應性 GHRH) (Thorner 等，1984)。使用重組 GHRH 治療兒童和成人的長期研究(1-5 年)表明不存在經典的 GH 副作用，例如空腹血糖濃度的改變，或在兒科活體中的骨　的生長加速以及過早癒合現象或股骨頭骨　分離(Chevalier 等，2000) (Duck 等，1992；Vittone 等，1997)。對人，綿羊或豬的大量研究顯示，持續地注入重組 GHRH 蛋白可恢復正常的 GH 方式而無需脫敏 GHRH 受體或減少 GH 供給(Dubreuil 等，1990)。由於該系統能夠引起一定程度的反饋抑制，而這些反饋抑制在 GH 治療中是被消除的，所以 GHRH 重組蛋白治療可能比 GH 治療更符合生理學。但是，由於 GHRH 在體內半衰期很短，必須進行頻繁的靜脈，皮下或鼻內(劑量需要提高 300 倍)給藥(每天 1 到 3 次) (Evans 等, 2001; Thorner 等，1986)。這樣，作爲一種慢性治療，施用重組 GHRH 蛋白並不實用。但是

基因轉移技術可以克服 GHRH 應用的這個缺陷。而且，很寬範圍內的劑量都可用於治療。選擇 GHRH 用於基因治療應用是順應以下事實：豬和其他物種的基因，cDNA 以及天然和幾種突變分子已被鑒定(Bohlen 等，1983；Guillemin 等，1982)，並且療效的測定簡單明確。

在體內基因轉移的非病毒技術中，直接將質體 DNA 注射到肌肉組織十分簡單，價格低廉且安全。在簡易直接注射後，肌纖維對 DNA 的低吸收率導致相對較低的表達水平(Prentice 等，1994；Wells 等，1997)。另外，轉基因表達的持續時間很短(Wolff 等，1990)。以前最成功的臨床應用是在疫苗領域(Danko 和 Wolff，1994；Tsurumi 等，1996)。最近，利用電穿孔技術獲得了提高質體體內運送率以及隨後獲得生理水平的分泌蛋白的顯著進步。最近，使用電穿孔來提高質體體內運送率已取得巨大進步。已經成功地應用電穿孔在注射質體後轉染腫瘤細胞(Lucas 等，2002；Matsubara 等，2001)或在人體內運送抗腫瘤藥物博萊黴素到皮膚和皮下腫瘤(Gehl 等，1998；Heller 等，1996)。電穿孔還被廣泛用於小鼠(Lesbordes 等，2002；Lucas 等，2001；Vilquin 等，2001)，大鼠(Terada 等，2001；Yasui 等，2001)，和狗(Fewell 等，2001)來運送編碼各種激素，細胞因數或酶的治療性基因。我們使用生長激素釋放激素("GHRH")進行的前期研究顯示用電穿孔進行的質體治療頗具潛力並且提出了一種有希望的方法來誘導大動物和人類體內蛋白的產生及受調節地分泌(Draghia-Akli 等，

1999；Draghia-Akli 等，2002)。電穿孔還廣泛用於嚙齒動物和其他小動物(Bettan 等，2000；Yin 和 Tang，2001)。觀察到電極的構造能夠影響電場分佈以及隨後的結果(Gehl 等，1999；Miklavcic 等，1998)。初級實驗顯示，對於大動物模型，針式電極比外部卡尺電極更能持續產生重復性好的結果。

如上所述，電穿孔提高骨骼肌攝取質體的能力已被完全證實。另外，已觀察到用聚-L-麩胺酸("PLG")或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)合成的質體能提高質體轉染，並且由此期望轉基因在小鼠，大鼠，和狗骨骼肌中的表達可提高 10 倍(Fewell 等，2001；Mumper 等，1998)。儘管不希望被理論束縛，但是 PLG 會在電穿孔過程中增強質體的轉染，不僅通過穩定質體 DNA，促進通過細胞膜上的孔進行的細胞內轉運，還通過一種活性機制。例如，細胞上帶正電的表面蛋白可以結合帶負電的 PLG，該 PLG 通過蛋白-蛋白相互作用與質體 DNA 相連。當使用電場時，表面蛋白翻轉方向然後積極地將該 DNA 分子包容于其內，該方法能夠顯著地提高轉染效率。

這裏所述的用質體媒介的補充方法來治療貧血，消瘦，腫瘤生長，免疫功能障礙，腎衰竭和延長慢性病活體的壽命，與直接注射重組 GH 或 GHRH 的局限性相比，具有幾個優點。血清蛋白酶抗性的新型 GHRH 功能性生物學等同物的表達可由表達質體來指導，該質體由合成的肌特異性啓動子調節。通過肌肉注射以及體內電穿孔將編碼序

列運送到活體細胞內之後，這種 GHRH 或其功能性生物學等同物的表達會引發活體體內高水準的 GH 和 IGF-I。儘管體內電穿孔是將異源核酸編碼體系運送到活體細胞內的優選方法，但還存在本領域技術人員公知的其他方法(如電穿孔，脂質體，磷酸鈣，體外轉化，直接注射，DEAE 葡聚糖，超聲處理，受體媒介的轉染，顯微投影轟擊(microprojectile bombardment)等)。例如，可通過如下步驟直接向活體細胞導入編碼 GHRH 或其功能性生物學等同物的核酸序列：首先從活體或供體體內取出該細胞，在培養基中維持該細胞，然後通過各種方法(如電穿孔，脂質體，磷酸鈣，體外轉化，直接注射，DEAE 葡聚糖，超聲處理將該核酸編碼體系導入，最後將該修飾細胞再導入原始活體或其他活體(體外方法)。GHRH 序列可克隆到腺病毒載體或腺病毒載體相關載體中，並通過簡單的肌肉注射或者靜脈或動脈注射來運送。攜帶 GHRH 序列的質體可與陽離子脂類或脂質體複合，然後肌肉內，靜脈內或皮下運送。

這裏所用的給藥是指將載體或 DNA 攜帶體導入體內的路徑。給藥可以直接運送到靶組織或在系統地給藥後靶向運送到靶組織。特別地，本發明可通過對身體施用載體來進行疾病的治療，使組織內任何特定核酸序列以一定水平受控表達，以用於質體媒介的補充治療法。施用載體的優選方法和運送方法如上所述。

在簡單地以溶液，懸浮液或膠體形式將 DNA 顆粒注射到肌肉中後，肌細胞具有獨特的從細胞外間隙吸收 DNA 的

能力。通過這種方法實現的 DNA 表達可以維持幾個月。可應用體內電穿孔進一步提高肌肉細胞對 DNA 的吸收。

合成的 DNA 載體的運送涉及將 DNA 併入大分子複合物，該複合物會經歷靶細胞的內吞作用。這種複合物可包括脂類，蛋白，碳水化合物，合成的有機化合物，或無機化合物。這些用載體組成的化合物的特徵(大小，電荷，表面特徵，組分)決定了該載體在體內的生物利用率。合成的其他元件作爲能夠與細胞表面或內部特異性受體反應的配體來發揮作用。合成的其他元件的功能在於助其進入細胞，從核內體釋放以及進入核。

運送還可以通過應用 DNA 轉運子(transporter)。DNA 轉運子指可以結合 DNA 載體並能夠被表皮細胞吸收的分子。DNA 轉運子包含能夠非共價地結合到 DNA 上並有效運送該 DNA 通過細胞膜的分子複合物。更有優勢的是該轉運子還可以運送 DNA 通過核膜。例如參見下述申請，將這些申情(包括附圖)併入本文作爲參考：(1)Woo 等，美國專利 6,150,168，標題："DNA 轉運系統及應用方法；"(2)Woo 等，PCT/US93/02725，標題："核酸轉運系統及應用方法"，申請日 1993 年 5 月 19 日；(3) Woo 等，美國專利 6,177,554" 核酸轉運系統及應用方法；"(4)Szoka 等，美國專利 5,955,365，標題"自我組裝的多核苷酸運送系統；"和 (5)Szoka 等，PCT/US93/03406，標題"自我組裝的多核苷酸運送系統"，申請日 1993 年 4 月 5 日。

另一種運送方法涉及 DNA 轉運系統。該 DNA 轉運系

統由各微粒構成，這些微粒含有幾種獨立地且非共價連接到 DNA 上的元件。每種元件由配體構成，該配體能夠識別與陽離子基團複合的特異性受體或其他功能基團，例如蛋白，所述陽離子基團能夠與 DNA 結合。可使用的陽離子實例爲精胺，精胺衍生物，組蛋白，陽離子多肽和/或聚賴胺酸。第一個元件既能與 DNA 載體結合又能與靶細胞上的細胞表面受體結合。這些元件可以是能夠與去唾液酸糖蛋白受體，葉酸受體，甘露糖-6-磷酸受體，或肉毒鹼受體反應的有機化合物。另一元件既能與 DNA 載體結合又能與核膜上的受體結合。核配體能夠識別並運送轉運系統通過核膜。這種配體可以是例如來自 SV40 的大 T 抗原或組蛋白的核靶向序列。第三個元件既能結合 DNA 載體又能結合可誘導游離基因溶解的元件。實例包括無活性的病毒顆粒，例如腺病毒，流感病毒血球凝集素相關多肽，或上面引用的 Skoka 專利中描述的 GALA 多肽。

給藥還可以涉及脂類。該脂類可形成脂質體，其爲中空的球形囊，由單層，雙層或多層形式排列的脂質和內部的水性空間構成，該水性空間用於捕獲水溶性化合物，例如 DNA，所述化合物直徑範圍 0.05 到幾微米。具體實例包括陽離子脂質和含有 DOPE 的複合物的應用，該 DOPE 與 DNA 和靶細胞膜反應來促進 DNA 進入細胞。

基因運送還可以通過移植基因工程處理後的細胞來完成。例如，可使用稱爲成肌細胞的未成熟肌細胞將基因運送到肌肉纖維。被基因工程處理後來表達重組人生長激素

的成肌細胞可以向動物血液中分泌生長激素。被插入基因的分泌可維持 3 個月以上。

成肌細胞最終分化併合並到現有的肌肉組織。由於該細胞被併入到已存在的組織，其不僅具有耐受性而且還被提供營養。成肌細胞可通過從需要補充 GHRH 的個體中分離肌肉組織而簡易獲取，基因工程處理的細胞還可以被簡易地放回原處而不對活體產生任何損傷。類似的，角化細胞也可用于向組織中運送基因。大量的角化細胞可通過培養少量活組織而獲得。該培養物可被製備成層疊的細胞層，當其被移植到人體，會產生表皮，該表皮在許多年內會繼續改善組織型性質。培養該角化細胞時，用適當的載體轉染角化細胞，所以該角化細胞是經過基因工程處理的。儘管角化細胞通過分隔表皮和真皮的基膜而從迴圈中分離，人角化細胞仍將產生的蛋白分泌到迴圈中。

運送還可涉及病毒載體的應用。例如，可構建腺病毒載體：用本發明所述載體元件，包括啓動子，5'UTR, 3'UTR 和核酸序列盒，替換腺病毒基因組的 E1 區域，並將該重組基因組導入 293 細胞，該細胞會將該基因包裝爲有傳染性的病毒顆粒。然後來自該細胞的病毒就可用於體外或體內感染組織從而將載體導入組織，致使核酸序列盒中的基因表達。

儘管不希望被理論束縛，但爲了提供在人體內應用這些異源核酸序列的可接受安全係數，我們相信調節基因表達體系應該具有低水平的 GHRH 表達基礎，並且仍保持高

度的可誘導性。這樣，可通過分子開關的技術來調節靶基因的表達，該技術如圖 9 的流程圖解並在實施例 1 進一步討論。相較於半衰期只有 6-12 分鐘的天然 GHRH，HV-GHRH 或其功能性生物學等同物分子顯示出高度血漿穩定性，其半衰期爲 6 小時。這樣，通過將強有力的電穿孔 DNA 運送法和穩定的可調節 GHRH 或其功能性生物學等同物的編碼核酸序列相結合，可進行治療來逆轉慢性消瘦，使活體體重增加，並延長活體的平均壽命。

I.載體

這裏所用的術語"載體"指導入細胞的核酸分子載體，該核酸分子中可插入核酸序列，其中，在一些實施例中，該載體可複製。核酸序列可以是動物自身的，或者可以是"外源的"，這是指該核酸序列對載體被導入的細胞而言是外來的，或該序列與該細胞中的序列同源，但該序列通常未發現存在於宿主細胞核酸中。儘管在一個優選實施例中，載體基本不含有病毒序列，但載體包括質體，粘粒，病毒(噬菌體，動物病毒和植物病毒)，線性 DNA 片段，以及人工染色體(如 YACs)。本領域技術人員能夠通過常規重裝技術構建載體(例如參見 Maniatis 等，1988 和 Ausubel 等，1994，均併入作爲參考)。

這裏所用術語"表達載體"指含有編碼能夠被轉錄 RNA 的核酸的任何類型遺傳性構建體。有時，RNA 分子被翻譯成蛋白，多肽或肽。而在另外一些情況下，這些序列並不

被翻譯，而是例如產生反義分子或核糖酶。表達載體可含有各種"調控序列"，其指操縱性連接的編碼序列在特定宿主細胞中轉錄或可能的翻譯所必需的核酸序列。除控制轉錄和翻譯的調控序列外，載體和表達載體還可包含下述的起其他作用的核酸序列。

II.質體載體

在一些實施例中，來自質體載體的線性 DNA 是期望用於轉染真核細胞，特別是哺乳動物細胞。含有複製子和來源於宿主細胞相似物種的調控序列的質體載體通常與這些宿主聯合使用。該載體通常帶有複製位點，和能夠在被轉染細胞中產生表型選擇的標記序列。在一個非限制性實施例中，通常用 pBR322 衍生物轉化大腸桿菌，該 pBR322 是來源於大腸桿菌物種的質體。pBR322 含有氨卞青黴素和四環素抗性基因，這樣就提供了鑒定轉化細胞的簡易方法。該 pBR 質體，或其他微生物的質體或噬菌體必須含有，或經過修飾後含有，例如能夠被微生物應用的啓動子，來表達其特有的蛋白。本領域技術人員公知本領域的任何質體都可以被修飾而應用于本發明方法；例如，在一個具體實施例中，用於治療應用的 GHRH 載體來自 pBlueScript KS+，並且具有卡那黴素抗性基因。

另外，含有複製子和來源於宿主微生物相似物種的調控序列的噬菌體載體可作爲轉化載體與這些宿主結合使用。例如，λ 噬菌體 GEM^{TM}-11 可用於製備重組噬菌體載

體，該載體可用於轉化宿主細胞，例如 *E. coli* LE392。

更多的有用質體載體包括 pIN 載體(Inouye 等，1985)；pGEX 載體，用於產生谷胱甘肽 S-轉移酶("GST")可溶性融合蛋白進行隨後分裂片段的純化和分離。其他適當的融合蛋白是 β-半乳糖苷酶，泛素等等。

含有表達載體的細菌宿主細胞，例如大腸桿菌，可在任何適當的培養基例如，LB 中生長。如本領域技術人員公知的，可通過將宿主細胞與特定啓動子特異性的試劑接觸，例如向培養基中加入 IPTG，或將培養轉換到更高溫度而誘導某些載體中重組蛋白進行表達。繼續培養細菌一段時間後，通常在 2 到 24 小時之間，離心收集細胞，然後清洗去除殘留的培養基。

III.啓動子和增強子

啓動子是控制基因產物轉錄起始和轉錄速度的一段核酸序列。其含有遺傳元件，調節蛋白和分子例如 RNA 聚合酶和其他轉錄因數能夠與該遺傳元件結合，來起始核酸序列的特異性轉錄。 短語"操縱性定位"，"操縱性連接"，"受控"，和"受轉錄調控"指啓動子相對於一段核酸序列而言，位於正確的功能性位點和/或定位，能夠調控該序列的轉錄起始和/或表達。

啓動子通常含有定位 RNA 合成起始位點功能的序列。最著名的例子是 TATA 序列盒，但是在一些缺乏 TATA 盒的啓動子中，例如，哺乳動物末端脫氧核苷酸轉移酶基

因的啓動子，以及 SV40 晚期基因的啓動子，自身覆蓋起始位點的不連續的元件能夠幫助固定起始位點。額外的啓動子元件調節轉錄起始的頻率。典型地，這些元件位於距起始位點 30-110 bp 的上游區域，儘管許多啓動子已顯示在起始位元點的下游含有功能性元件。爲使編碼序列處於啓動子的"調控下"，這些序列應該定位於所選啓動子的轉錄閱讀框"下游"(即，在所選啓動子的 3'端方向)的轉錄起始位點 5'末端。"上游"啓動子促進 DNA 的轉錄並促進編碼的 RNA 進行表達。

啓動子元件之間的距離常常是可變的，這樣，當元件被相對翻轉或移動時，仍可保留啓動子的功能。在 tk 啓動子中，啓動子元件之間的距離可增加到 50bp 而啓動子的活性才開始降低。單獨的元件可以聯合地，也可以獨立地啓動轉錄，這要視不同的啓動子而定。啓動子可以與"增強子"聯合使用，也可以不與其聯合使用，增強子是指與核酸序列的轉錄啓動相關的順式作用調控序列。

啓動子可以天然地與核酸序列相連，可通過分離位於編碼區域上游的 5'非編碼序列和/或外顯子而獲得。這種啓動子可稱爲"內源的"。類似地，增強子可以天然地與核酸序列相連，位於該序列的上游或下游；或者，有利的做法是定位編碼核酸序列使其處於重組的，合成的或異源啓動子的調控之下，其中重組的，合成的或異源啓動子是指在該啓動子的天然環境中，正常情況下不與核酸序列相連的啓動子。重組的，合成的或異源增強子也指在其天然環境

中正常情況下不與核酸序列相連的增強子。這種啓動子或增強子可包括其他基因的啓動子或增強子，以及分離自任何其他病毒，原核或真核細胞的啓動子或增強子，以及"天然"不存在的啓動子或增強子，即，含有不同轉錄調控區域的不同元件，和/或改變表達的突變型。例如，最通常用於重組 DNA 構建的啓動子包括 β-內醯胺酶(青黴素酶)，乳糖和色胺酸(trp)啓動子體系。除合成產生啓動子和增強子的核酸序列外，還可使用重組克隆和/或核酸擴增技術，包括 PCR™，與這裏提及的化合物(參見美國專利 4,683,202 和 5,928,906，將這兩篇申請併入本文作爲參考)結合，來產生序列。而且，可以預期，還可以應用那些指導序列在如粒線體，葉綠體等非核酸細胞器內轉錄和/或表達的調控序列。

顯而易見地，使用能有效地指導 DNA 序列在被選擇用於表達的細胞器，細胞類型，組織，器官或有機體中表達的啓動子和/或增強子非常重要。分子生物學領域技術人員公知啓動子，增強子和細胞類型結合用於蛋白表達(例如，參見 Sambrook 等，1989，併入作爲參考)。所用的啓動子可以是組成型的，組織特異性的，誘導型的，和/或在適當條件下有用的，來指導導入 DNA 序列高水準表達，這對大規模生產重組蛋白和/或多肽非常有利。該啓動子可以是異源或同源。

另外，任何啓動子/增強子的組合(例如，按照真核啓動子資料庫(the Eukaryotic Promoter Data Base) EPDB,

http://www.epd.isb-sib.ch/)也可用於驅動表達。T3, T7 或 SP6 細胞質表達體系的應用是另一可能的實施方式。如果提供適當的細菌聚合酶，真核細胞能夠支援從特定細菌的啓動子進行細胞質轉錄， 作爲運送複合物的一部分或者作爲額外的遺傳表達構建體。

表 1 和 2 列出了可應用于本發明來調節 RNA 表達的元件/啓動子非限制性實例。表 2 列出了誘導型元件的非限制性實例，該誘導型元件是能夠被特定刺激物啓動的核酸序列。

表 1
啓動子和/或增強子

啓動子/增強子	相關參考
免疫球蛋白重鏈	
免疫球蛋白輕鏈	
T-細胞受體	
HLA DQ a 和/或 DQ β	
β-干擾素	
白介素-2	
白介素-2 受體	
II 型 MHC 5	
II 型 MHC HLA-Dra	
β-肌動蛋白	(Kawamoto 等，1988；Kawamoto 等，1989)
肌肉肌酸激酶(MCK)	(Horlick 和 Benfield,1989; Jaynes 等，1988)
前白蛋白(轉甲狀腺素)	
彈性蛋白酶 I	
金屬硫因(MTII)	(Inouye 等，1994；Narum 等，2001；Skroch 等，1993)
膠原酶	
白蛋白	(Pinkert 等，1987；Tronche 等，1989)
α-胎蛋白	
γ-球蛋白	
β-球蛋白	(Tronche 等，1990；Trudel 和 Costantini, 1987)
c-fos	

c-HA-ras	
胰島素	(German 等，1995；Ohlsson 等，1991)
神經細胞粘著分子 (NCAM)	
α_1-抗胰蛋白酶	
H2B(TH2B)組蛋白	
小鼠和/或 I 型膠原	
葡萄糖調節的蛋白 (GRP94 和 GRP78)	
大鼠生長激素	(Larsen 等，1986)
人血清澱粉樣蛋白 A(SAA)	
肌鈣蛋白 I(TN I)	(Lin 等，1991；Yutzey 和 Konieczny，1992)
血小板衍生生長因數 (PDGF)	(Pech 等，1989)
杜興肌營養不良	(Klamut 等，1990；Klamut 等, 1996)
SV40	
多瘤病毒	
逆轉錄病毒	
乳頭瘤病毒	
B 型肝炎病毒	
人體免疫缺陷病毒	
巨細胞病毒(CMV)	(Boshart 等，1985；Dorsch-Hasler 等，1985)
長臂猿白血病病毒	
合成肌特異性啓動子 (c5-12,c1-28)	(Draghia-Akli 等，1999；Draghia-Akli 等，2002；Li 等，1999)

表 2 元件/誘導物	
元件	誘導物
MT II	佛波醇酯 重金屬
MMTV(小鼠乳腺腫瘤病毒)	糖皮質激素
B-干擾素	聚(rI)x/聚(rc)
腺病毒 5 E2	EIA
膠原酶	佛波醇酯(TPA)
基質裂解	佛波醇酯(TPA)
6	佛波醇酯(TPA)
鼠 MX 基因	干擾素，紐卡斯爾疾病病毒(Newcastle Disease Virus)
GRP78 基因	A23187
A-2-巨球蛋白	IL-6
波形蛋白	血清
MHC I 型基因 H-2κ b	干擾素
HSP70	EIA, SV40 大 T 抗原
多育麴菌素	佛波醇酯-TPA
A腫瘤壞死因數	PMA
促甲狀腺激素α基因	甲狀腺激素

組織特異性啓動子或元件的鑒定，以及檢定其活性的試驗是本領域技術人員公知的。這些序列的非限制性實例包括人 LIMK2 基因(Nomoto 等，1999)，生長激素抑制素受體 2 基因(Kraus 等，1998)，鼠附睪視黃酸結合基因(Lareyre 等，1999)，人 CD4(Zhao-Emonet 等，1998)，鼠α2(XI)膠原(Liu 等，2000；Tsumaki 等，1998)，D1A 多巴胺受體基因(Lee 等，1997)，胰島素樣生長因數 II(Dai 等，2001；Wu 等，1997)，和人血小板內皮細胞粘附分子

-1(Almendro 等，1996)。

在一個優選的實施例中，採用合成的肌啓動子，例如SPc5-12(Li 等，1999)，其含有鄰近的來自骨骼 α -肌動蛋白的血清反應元件("SRE")，多元 MEF-2 位點，MEF-1 位點和 TEF-1 結合位點，並極大地提高了天然生肌啓動子的轉錄潛能。這種合成啓動子的唯一性是一個巨大的改進，例如相較於已發表的關於生肌啓動子及其應用(如美國專利 5,374,544)或核酸序列的成肌表達體系(如美國專利 5,298,422)的專利。在一個優選的實施例中，本發明使用的啓動子的生物活性並不會因爲內源細胞器或因數而失去或減少。可根據本發明的該實施例應用其他元件，包括轉-作用(trans-acting)因數結合位點和增強子。在另一實施例中應用了天然生肌啓動子，本領域技術人員公知如何從資料庫中獲取這種啓動子序列，所述資料庫包括生物技術資訊國家中心 National Center for Biotechnology Information("NCBI") 基因資料庫或者 the NCBI PubMed 站點。本領域技術人員公知可利用這些資料庫來獲取與本發明相關的序列或相關文獻。

IV.起始信號和內部核糖體結合位元點

爲有效翻譯編碼序列可能還需要一個特殊的起始信號。這些信號包括 ATG 起始密碼子或鄰近的序列。可能需要提供外源翻譯調控信號，包括 ATG 起始密碼子。本領域技術人員能夠很容易地確定並提供必要的信號。公知起始

密碼子必須是在編碼序列的閱讀框"框內"來確保整個插入序列的翻譯。外源翻譯調控信號和起始密碼子可以是天然或合成的。表達的效率可通過加入合適的轉錄增強子元件而提高。

在本發明的一些實施例中，內部核糖體進入位點("IRES")元件被用於產生多基因或多順反子信使。IRES能夠繞過5'甲基化帽子依賴性翻譯的核糖體掃描模型並在內部位點開始翻譯(Pelletier和Sonenberg，1988)。來自細小核糖核酸病毒科(脊髓灰質炎和腦心肌炎)的IRES元件已被描述(Pelletier和Sonenberg，1988)，還有來自哺乳動物信使的IRES(Macejak和Sarnow，1991)。IRES元件可與異源開放閱讀框相連。多元開放閱讀框可被一起轉錄，由一個IRES彼此分隔，產生多順反子資訊。通過IRES元件，每個開放閱讀框可以接近核糖體進行有效翻譯。可使用單獨的啓動子/增強子有效表達多元基因來轉錄單一的資訊(參見U.S.Patent Nos. 5,925,565和5,935,819，在此將其併入本文作爲參考)。

V.多克隆位點

載體可包括MCS，MCS是含有多限制性酶切位點的核酸序列，其中的限制性酶可與常規重組技術結合用於酶切載體(例如，參見(Carbonelli等，1999；Cocea, 1997; Levenson等，1998)，併入本文作爲參考)。"限制性酶切"指僅在核酸分子特定位置起作用的酶對核酸分子的催化分

裂。許多限制性酶都可購得。本領域技術人員公知這種酶的應用。通常，使用在 MCS 內部切割的限制性酶使載體呈線狀或片段，這樣確保外源序列能夠連接到載體上。"連接"指在兩個核酸片段之間形成磷酸二酯鍵的過程，其中這兩個核酸片段可以是互相連續的也可以不連續。

VI.剪接位點

多數被轉錄的真核 RNA 分子都會經歷 RNA 剪接而從初級轉錄產物中去除內含子。含有真核基因組序列的載體可能需要供體和/或受體剪接位點來確保蛋白表達所需要的正確轉錄過程(參見，例如(Chandler 等，1997)，將其併入本文作爲參考。)。

VII.終止信號

本發明的載體或構建體通常包括至少一個終止信號。一個"終止信號"或"終止子"包含一個 DNA 序列，該 DNA 序列與 RNA 聚合酶催化的 RNA 轉錄的特定終止子相關。這樣，在一些實施例中，終止信號能夠終止 RNA 轉錄產物生成。爲獲取期望的資訊水平，終止子可能有必要在體內。

在真核體系中，終止子區還可包含能夠使新轉錄產物在特定位點分裂的特定 DNA 序列，這樣就使得多聚腺苷位點暴露出來。這給一種專門的內源聚合酶傳遞一種信號，使該酶給轉錄產物的 3'末端加上一個約 200 個 A 殘基("多聚 A")的延長序列。用該多聚 A 尾巴修飾的 RNA 分子似乎

更穩定，且能更有效地翻譯。這樣，在另一些涉及真核生物的實施例中，優選終止子含有使 RNA 分裂的信號，更優選終止子信號能促進信使的多聚腺苷化。終止子和/或多聚腺苷化位點元件能夠提高信使水平並能最小化讀通該序列盒並閱讀其他序列。

可用于本發明的終止子包括這裏描述的任何已知終止子或本領域技術人員公知的終止子，包括但不限於，例如，基因的終止序列如牛生長激素終止子，或病毒終止子序列如 SV40 終止子。在一些實施例中，例如由於序列截短，該終止信號可能缺少可轉錄或可翻譯的序列。

VIII.多聚腺苷化信號

在表達體系特別是真核表達體系中，典型地可以包括一個多聚腺苷化信號來實現適當的轉錄產物多聚腺苷化。並不認爲多聚腺苷化信號的種類對於本發明的成功實施至關重要，可以使用任何這類序列。優選的實施例包括 SV40 多聚腺苷化信號，骨骼 α 肌動蛋白 3'UTR 或人或牛生長激素多聚腺苷化信號，他們使用方便且已知能夠在各種靶細胞中很好的發揮作用。多聚腺苷化可以提高轉錄產物的穩定性或促進細胞質內的運輸。

IX.複製起始位點

爲使載體在宿主細胞內增殖，它可以包含一個或多個複製起始位點(通常稱爲"ori")，其爲起始複製的特定核酸

序列。或者，如果宿主細胞是酵母，也可以使用自主複製的複製序列("ARS")。

X.可選擇的或可篩選的標記

在本發明一些實施例中，含有本發明核酸構建體的細胞可以通過將一個標記包含在病毒載體中而進行體外或體內鑒定。這種標記能夠賦予細胞可鑒別的改變從而能簡易地鑒別出含有表達載體的細胞。通常，可選擇標記是能夠給出可選擇特性的物質。陽性選擇標記是該標記存在時，可以將其選出的標記，而陰性選擇標記是該標記存在時，不能將其選出的標記。陽性選擇標記的一個例子是藥物抗性標記。

通常，包含藥物選擇標記可以幫助克隆和鑒定轉化細胞，例如，能夠賦予新黴素，嘌呤黴素，潮黴素，DHFR，GPT，zeocin和組氨醇抗性的基因都可以用作選擇標記。除應用在某些條件下可以提供區分轉化細胞的表型的標記外，還可以使用其他的標記類型，包括可篩選標記如GFP，其依據是比色分析。或者，可以使用可篩選的酶，例如單純皰疹病毒胸苷激酶("tk")或氯黴素乙醯轉移酶("CAT")。本領域技術人員公知如何使用免疫標記，也可以與FACS分析結合。所用的標記並不關鍵，只要其能夠與編碼核酸產物的核酸同時表達。其他的可選擇標記和可篩選標記是本領域技術人員公知的。

XI.電穿孔

在本發明的一些實施例中，核酸是通過電穿孔被導入細胞器，細胞，組織或有機體內。電穿孔涉及使細胞懸浮液和 DNA 接受高電壓的放電。在本方法的一些改變中，可應用某些細胞壁降解酶，例如果膠降解酶，使靶受體細胞比未處理的細胞更加容易受到電穿孔轉化的作用(美國專利 5,384,253，併入本文作爲參考)。或者，可通過機械損傷和本領域公知的其他方法而使受體細胞更易受到電穿孔轉化的作用。

使用電穿孔進行的真核細胞轉染已獲巨大成功。已經用人 κ 免疫球蛋白基因轉染了小鼠前-B 淋巴細胞(Potter 等，1984)，還以該方法用氯黴素乙醯轉移酶基因轉染了大鼠肝細胞(Tur-Kaspa 等，1986)。

下面的電穿孔現象被認爲在所有情況下都相同，但是引起所觀察效果的精確機制還未闡明。儘管不希望被理論束縛，電穿孔作用的明顯表現爲：細胞接受電脈衝後，細胞膜瞬間地變爲大分子通透性的。存在通過細胞壁的通道，該通道在正常情況下，維持約 90mV 的轉膜電位，允許離子雙向移動。

儘管不希望被理論束縛，電穿孔利用相同的結構，通過迫使高離子流通過這些結構而開啓或擴大通道。現有技術中，金屬電極被設置成與組織接觸，並對其施加預定的電壓，所述電壓與電極之間的距離成比例。電穿孔的方案依據最後得到的電場強度而定，根據公式 E=V/d，其中("E")

是電場，("V")是施加的電壓，("d")是電極之間的距離。

現有技術中，設置用於運送藥物或大分子到活體細胞的電穿孔工具時，電場強度是一個很重要的值。相應地，通過施加預定電壓的脈衝，可以計算多種方案的任何電場強度，所述電壓是與電極之間距離成比例的。但應注意：可以使用絕緣電極(即，並不一定需要離子流來產生電場)在組織中產生電場。儘管不希望被理論束縛，但電流是成功電穿孔的必要條件，而不是電場本身。

在電穿孔中，產生的熱量是內部電極阻抗，電流的平方，和脈衝時間的產物。熱量是在組織電穿孔過程中產生的，並且可以作爲內部電極電流、電壓和脈衝時間的產物而推導出。目前所述用於電穿孔的方案是依據最後得到的電場強度 E 而定義的，E 值依賴於不確定電流的短電壓脈衝。相應地，電阻或組織中產生的熱量是無法測定的，這就導致用不同的脈衝電壓電穿孔方案得到不同的成功。限制對跨越電極細胞的加熱作用可以提高任何指定電穿孔電壓脈衝方案的效率。例如，現有技術教導了 6 針電極矩陣的應用，該 6 針電極矩陣使用了跨越反向電極對的預定電壓脈衝。這種狀況在電穿孔過程中，不能夠形成一致且交叉的重疊點的區域，導致集中的模式。在電穿孔過程中，過度地加熱細胞和組織會殺死細胞，並降低該方案的效率。但是，沒有反向對的對稱設置的針式電極可以在電穿孔過程中，在不能形成一致的電穿孔重疊點的區域，產生分散的模式。

控制電極之間的電流可以決定細胞的相對供熱。這樣，任何指定方案決定效率的因素是電流，而不是跨越電極的電壓。預定的電壓不產生預定的電流，並且現有技術並沒有提供一種方法來精確地測定電流，這就限制了該技術的應用。這樣，將兩個電極間在組織中維持的電流控制在一定限度內就可以改變脈衝條件，減少細胞發熱，降低細胞死亡率，並相較於預定的電壓脈衝，能更有效地將大分子合併到細胞內。

本發明的一個實施例通過精確地控制衝擊細胞膜上通道的離子流，提供了一種有效地控制運送到內部電極空間細胞的電流量的方法，從而克服了上述問題。施加給組織的精確電流量可以作爲電流水平，脈衝強度和被傳遞的脈衝數目的產物而計算。這樣，本發明的具體實施例可通過多元途徑，將導致電穿孔的電流傳遞給一定體積的組織，而不會在任何位點導致過量濃度的累積電流，從而避免了由於過度加熱組織而引起的細胞死亡。

儘管不希望被理論束縛，待生成的電壓脈衝的特性由組織的特性，所選組織的大小以及電極之間的距離決定。期望電壓脈衝是盡可能同質且具有適當振幅。過量的電場強度會導致細胞裂解，而過低的電場強度會導致電穿孔效率降低。一些電穿孔設備利用電極之間的距離來計算電穿孔的電場強度和預定的電壓脈衝。必需知道電極之間的距離是設計電極的限制因素。因爲所設計的電流脈衝控制器決定著兩個電極之間一定體積組織的阻抗，所以電極之間

的距離對於確定合適的電流脈衝而言，不是至關重要的因素。因此，供選的另一實施例中的針式電極矩陣的設計可以是非對稱的。另外，本領域技術人員在不背離本發明精神和範圍情況下，可使用任何數目的適當的對稱和非對稱的針式電極矩陣。在矩陣中以及期望的組織中，每個獨立電極的深度可隨可比較的結果而變化。另外，大分子的多元注射位點可被加入到針式電極矩陣中。

XII.限制性酶

在本發明的一些實施例中，線性 DNA 片段是通過用限制性酶切親代 DNA 分子而得到。以下提供了限制性酶的實例。

名稱	識別位點
AatII	GACGTC
Acc65 I	GGTACC
Acc I	GTMKAC
Aci I	CCGC
Acl I	AACGTT
Afe I	AGCGCT
Afl II	CTTAAG
Afl III	ACRYGT
Age I	ACCGGT
Ahd I	GACNNNNNGTC
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
Bae I	NACNNNNGTAPyCN
BamH I	GGATCC
Ban I	GGYRCC
Ban II	GRGCYC
Bbs I	GAAGAC
Bbv I	GCAGC
BbvC I	CCTCAGC
Bcg I	CGANNNNNNTGC
BciV I	GTATCC
Bcl I	TGATCA
Bfa I	CTAG
Bgl I	GCCNNNNNGGC
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
Bsl I	CCNNNNNNNGG
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
BstAP I	GCANNNNNTGC
BstB I	TTCGAA
BstE II	GGTNACC
BstF5 I	GGATGNN
BstN I	CCWGG
BstU I	CGCG
BstX I	CCANNNNNNTGG
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
Dra III	CACNNNGTG
Drd I	GACNNNNNNGTC
Eae I	YGGCCR
Eag I	CGGCCG
Ear I	CTCTTC
Eci I	GGCGGA
EcoN I	CCTNNNNNAGG
EcoO109 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
Mly I	GAGTCNNNNN
Mnl I	CCTC
Msc I	TGGCCA
Mse I	TTAA
Msl I	CAYNNNNRTG
MspA1 I	CMGCKG
Msp I	CCGG
Mwo I	GCNNNNNNNGC
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
PflF I	GACNNNGTC
PflM I	CCANNNNNTGG
PleI	GAGTC
Pme I	GTTTAAAC
Pml I	CACGTG
PpuM I	RGGWCCY
PshA I	GACNNNNGTC
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
Mfe I	CAATTG
Mlu I	ACGCGT
Mly I	GAGTCNNNNN
Mnl I	CCTC
Msc I	TGGCCA

Mse I	TTAA
Msl I	CAYNNNNRTG
MspA1 I	CMGCKG
Msp I	CCGG
Mwo I	GCNNNNNNNGC
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
PflF I	GACNNNGTC
PflM I	CCANNNNNTGG
PleI	GAGTC
Pme I	GTTTAAAC
Pml I	CACGTG
PpuM I	RGGWCCY
PshA I	GACNNNNGTC
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
Sfi I	GGCCNNNNNGGCC
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
Xcm I	CCANNNNNNNNNTGG
Xho I	CTCGAG
Xma I	CCCGGG
Xmn I	GAANNNNTTC

這裏所用的術語 DNA 的"限制性酶切"指只在 DNA 特

定位點起作用的酶催化的 DNA 分裂。這種酶稱爲限制性內切酶，每種酶特異性的位點稱爲限制性位點。這裏所用的各種限制性酶都可購得，並且其反應條件，輔助因數，和其他要求按酶提供商的描述使用。通常限制性酶是利用縮寫命名，縮寫是由大寫字母和命名該特定酶的數位構成，其中大寫字母后接代表每種限制性酶最初獲取自的微生物的其他字母。通常，在約 20μl 緩衝液中使用約 1μg 質體或 DNA 片段與約 1-2 單位酶。特定限制性酶的適當緩衝液和底物數量由製造商指定。通常是在 37°C 孵育 1 小時，但可以根據供應商的說明而有所改變。孵育後，用苯酚和氯仿抽提去除蛋白或多肽，然後用乙醇沈澱從上清收集酶切的核酸。用限制性酶消化後，可用細菌鹼性磷酸酶水解 5' 末端的磷酸化，來防止 DNA 片段的兩個限制性酶切分裂的末端"成環"或形成閉合環而阻礙另外的 DNA 片段在限制性酶切位點插入。除非另有說明，質體酶切後，不進行 5' 末端脫磷酸化。脫磷酸作用所用的方法和試劑是本領域公知的常規方法和試劑。

實施例

以下實施例是爲說明本發明優選實施例。本領域技術人員應能理解以下這些實施例中所提及的技術表示本發明者發明的技術在本發明的實踐中作用良好，所以可以認爲構成了實踐中的優選模式。但是在本發明前提下，本領域技術人員應該理解：在不背離本發明的精神和範圍情況

下，在所提及的具體實施例中可以有許多改變，仍可獲得同樣或類似的結果。

實施例 1

DNA 載體的構建和動物活體中的方法

爲治療貧血；提高總紅細胞量；逆轉消瘦；逆轉異常體重降低；治療免疫功能障礙；逆轉淋巴細胞增殖的抑制作用；或者延長慢性病活體的平均壽命，首先應設計幾種 GHRH 表達構建體。大體上，這些質體載體包含與豬野生型 GHRH 或類似物相連的肌特異性合成啓動子 SPc5-12 (Li 等，1999)。GHRH 類似物序列是按方法部分中所述，通過定點突變獲得的。將編碼 GHRH 或類似物的核酸序列克隆到 pSPc5-12 質體的 BamHI/HindIII 位點，來產生 pSP-GHRH。質體中包含的其他元件包括如方法部分中所述的生長激素 3'未翻譯區域和來自 pSEAP-2 Basic Vector 的 SV40 3'UTR。圖 1 顯示了構建體所應用的獨特核酸分子。

DNA 構建體：含有肌特異性合成啓動子 SPc5-12(SeqID# 7)的質體載體已在前面描述(Li 等，1999)。野生型和通過對 GHRH cDNA(SeqID#9)進行定點突變(改變的位元點 II 體外突變體系(Altered Site II in vitro Mutangenesis System)，Promega, Madison, WI)而產生的突變豬 GHRH cDNA，被克隆到 pSPc5-12 的 BamHI/HindIII 位點，分別產生 pSP-wt GHRH (SeqID#15)，或

pSP-HV-GHRH(SeqID#11)。生長激素的 3'未翻譯區域("3'UTR")被克隆到 GHRH cDNA 的下游。所獲的質體含有突變的 GHRH 編碼序列，所獲的胺基酸序列並非天然地存在於哺乳動物中。儘管不希望被理論束縛，其治療貧血；抑制腫瘤生長；預防腎衰竭；治療免疫功能障礙；逆轉淋巴細胞增殖的抑制作用；或者延長慢性病活體的平均壽命的效果通過突變激素的迴圈水平最終決定。編碼不同突變的 GHRH 或其功能性生物學等同物的胺基酸序列如下所示：

質體	的胺基酸序列
wt-GHRH	**YA**DAIFTNSYRKVL**G**QLSARKLLQDI**MS**RQQGERNQEQGA-OH (SEQID#10)
HV-GHRH	**HV**DAIFTNSYRKVL**A**QLSARKLLQDI**LN**RQQGERNQEQGA-OH (SEQID#1)
TI-GHRH	**YI**DAIFTNSYRKVL**A**QLSARKLLQDI**LN**RQQGERNQEQGA-OH (SEQID#2)
TV-GHRH	**YV**DAIFTNSYRKVL**A**QLSARKLLQDI**LN**RQQGERNQEQGA-OH (SEQID#3)
15/27/28-**GHRH**	**YA**DAIFTNSYRKVL**A**QLSARKLLQDI**LN**RQQGERNQEQGA-OH (SEQID#4)

通常，編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物如下式所示：

-X_1-X_2-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH (SeqID# 6)

其中：X_1 是胺基酸 D-或 L-異構體，該胺基酸選自：酪胺酸("Y")，或織胺酸("H")； X_2 是胺基酸 D-或 L-異構體，該胺基酸選自：丙胺酸("A")，纈胺酸("V")，或異白胺酸

("I")； X_3是胺基酸 D-或 L-異構體，該胺基酸選自：丙胺酸("A")或甘胺酸("G")； X_4是胺基酸 D-或 L-異構體，該胺基酸選自：甲硫胺酸("M")或白胺酸("L")； X_4是胺基酸 D-或 L-異構體，該胺基酸選自絲胺酸("S")或天冬醯胺酸("N")。

使用的另一質體包括 pSP-SEAP 構建體(SeqID#16)，其含有 SacI/HindIII SPc5-12片段，SEAP基因和來自 pSEAP-2 Basic Vector 的 SV40 3'UTR (Clontech Laboratories, Inc.; Palo Alto, CA)。

上面描述的質體並不含有多位點接頭，IGF-I 基因，骨骼 α 肌動蛋白啓動子或骨骼 α 肌動蛋白 3'UTR/NCR。而且，這些質體是如下面所述，在體內電穿孔之後，通過肌肉注射被導入。

至於"功能性生物學等同物"，本領域技術人員公知，"功能性生物學等同物" 蛋白和/或多核苷酸的定義中固有的概念是：在維持分子具有可接受水平的同等生物學活性情況下，在分子的規定部分可進行的改變是有數目限制的。這樣功能性生物學等同物在此就定義爲具有可被替換的所選胺基酸的那些蛋白(和多肽)。含有 GHRH 功能性生物學等同物的多肽就是被基因工程處理從而含有獨特胺基酸序列，但相較於 GHRH，同時還具有類似或改善生物學活性的多肽。例如，GHRH 的一個生物學活性是促進活體體內分泌生長激素("GH")。

大動物研究：健康狗：將 4 隻狗的組作爲對照(2 公 2

母)，用 pSP-HV-GHRH 體系注射 3 組 8 隻狗的組(4 公 4 母)。在卡式電極電穿孔之後，單用載體(對照)，或用 200mcg，或 600mcg 或 1000mcg pSP-HV-GHRH 注射狗。

癌症狗：15 隻患有自發性惡性腫瘤的狗用於 GHRH 研究。用 100mcg/kg 到總量不超過 1000mcg 的 pSP-HV-GHRH 注射狗。質體注射後最初三天內，有四隻狗死於和他們疾病進展不相關的並發症，或者應所有者的要求被安樂死。我們的研究的入組條件是在注射後至少存活 14 天(爲啓動質體以及使 GHRH 從骨骼肌中表達)，可以進行第二次抽血。該項研究分析了 11 隻狗。動物是使用化學療法，或放射療法或組合療法進行特定治療(參見圖 18)。在治療前和注射後 9-27 及 28-56 天對動物稱重，抽血。每一時間點都用相同的獨立實驗室(Antech Diagnostics, Irvine, CA)來評估血常規和代謝情況。每一次訪問都由所有者填寫規整的表格。19 隻患有自發性惡性腫瘤的未注射狗在診所中以相同的時間窗口(window)接受治療，將其用作同時期的對照。接受治療的動物生命質量有所提高。所有者沒有觀察到該治療帶來的反作用。3 個所有者觀察到與注射前的狀況相比，接受治療的狗通常保持良好的狀態。

電穿孔設備：在所有實驗中都使用 BTX T820 發電機(BTX, Genetronics Inc. 分公司, CA)運送方形波脈衝。使用 100-200V/cm 的電壓條件，6 次脈衝，60 毫秒每次脈衝。使用兩針電極(BTX, Genetronics Inc. 分公司, CA)傳遞體內電脈衝。在所有的注射中，針都是完全插入到肌肉中。

肌肉注射質體 DNA 到患病犬中：四組健康受試犬("狗")，體重爲 8-12kg，用於研究生物分解毒理學。3 組 8 隻狗的組(4 公 4 母)分別用 200mcg，600mcg 或 1000mcg pSP-HV-GHRH 注射。將 4 隻狗的組作爲對照(2 公 2 母)。持續地監測動物以觀察副作用。另外，使用兩組患癌症(自發性惡性腫瘤)的狗。根據 NIH 指南，USDA 和 Animal Welfare Act 方針養狗，並經 Baylor College of Medicine IACUC 批准。

不含內毒素的 pSPc5 12-HV-GHRH 質體(Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA)製劑在 pH 7.4 的 PBS 或水中稀釋到 5mg/ml。在常規治療給藥之前注射狗。對於進行化療的狗，在藥療前/後不少於 5 天時注射。用 4-8mg/kg 2.3 丙泊酚(Abbott Laboratories)將狗安樂死。安樂死後，使用 3/10 cc 的胰島素注射器和 29G1/2 針(Becton-Dickinson, Franklin Lacks, NJ)將 100g/kg 到最多 1mg 的質體直接注射到狗半肌腱中。注射後 2 分鐘，如所述，使用 BTX T820 電穿孔儀和兩針電極(BTX, Genetronics Inc. 分公司, CA)對注射的肌肉電穿孔，6 次脈衝，200V/cm，60 毫秒/脈衝。在所有的注射中，針都是完全插入到肌肉中。在動物與所有者重新在一起之前，使動物復原。

儘管體內電穿孔是將核酸構建體運送到活體細胞的優選方法，但是可用于本發明來轉化細胞器，細胞，組織或有機體的適當核酸運送方法實際上包括任何能夠將核酸(例如 DNA)導入細胞器，細胞，組織或有機體的方法，如

本文所述或是本領域技術人員公知的。這些方法包括，但不限於，直接運送 DNA，例如通過體外轉染(Nabel 等，1989；Wilson 等，1989)，通過注射(美國專利 5,994,624, 5,981,274, 5,945,100, 5,780,448, 5,736,524, 5,702,032, 5656,610, 5,589,466 和 5,580,859，將每篇併入本文作爲參考)，包括顯微注射(Harland 和 Weintraub, 1985) (美國專利 5,789，215，併入本文作爲參考)；通過電穿孔(美國專利 5,384,253, 併入本文作爲參考)；(Potter 等，1984；Tur-Kaspa 等，1986)；通過磷酸鈣沈澱(Chen 和 Okayama, 1987; Graham 和 van der Eb, 1973; Rippe 等，1990)；通過使用 DEAE-葡聚糖然後再使用聚乙二醇(Gopal, 1985)；通過直接聲波負荷(Fechheimer 等，1987)；通過脂質體媒介的轉染(Hafez 等，2001；Hamm 等，2002；Madry 等，2001；Raghavachari 和 Fahl，2002；Wiethoff 等，2001)和受體媒介的轉染(Wu 和 Wu, 1988a; Wu 和 Wu, 1988b)；通過顯微投影轟擊(microprojectile bombardment) (PCT 申請案號 WO 94/09699 和 95/06128; 美國專利 5,610,042; 5,322,783 5,563,055, 5,550,318, 5,538,877 和 5,538,880，並且每篇都被併入本文作爲參考)；通過與碳化矽纖維一起攪動((Johnson 等，1992)；美國專利 5,302.523 和 5,464,765，均併入作爲參考)；通過農桿菌(Agrobacterium)媒介的轉染(美國專利 5,591,616 和 5,563,055，將每篇併入本文作爲參考)；通過 PEG 媒介的原生質體轉染(Omirulleh 等，1993)；(美國專利 4,684,611 和 4,952,500，將每篇併入本文作爲參

考)；通過乾燥/抑制媒介的 DNA 吸收(Potrykus 等，1985)，以及這些方法的任何組合。通過應用這些技術，細胞器，組織或有機體可被穩定地或暫態地轉染。

體重資料：使用相同的校準的秤在質體注射前和注射後第 14，28 和 56 天稱重動物。

蛋白代謝，骨代謝和血液值：在質體注射前和注射後第 14，28 和 56 天收集血液和尿樣，並進行生化，代謝和激素分析。每一時間點都由相同的獨立實驗室(Antech Diagnostics, Irvine, CA)來評估血常規和代謝情況。

質體 IGF-I：通過放免法(radioimmunometric assay)(Diagnostics System Lab., Webster, TX)測定 IGF-I 水平。試驗的靈敏度爲 0.8ng/ml；內部試驗和交互試驗(inter-assay)的變差分別爲 3.4%和 4.5%。

統計：用 STATISTICA 分析插件(StatSoft, Inc. Tulsa, OK)分析資料。圖中顯示的資料是平均值±s.e.m。使用 ANOVA 進行對比獲得了具體的 P 值。設置 $P<0.05$ 即達到統計顯著性水平。

實施例 2

低電壓電穿孔用於 DNA 吸收及受試動物中的表達

直接肌肉內注射質體 DNA 然後再電穿孔是局部且受控運送質體 DNA 到骨骼肌的方法。其優點是使用較低的質體數量(低至 0.1mg)，而不是被動運輸形式典型使用的較高的質體數量。儘管不希望被理論束縛，但電穿孔引起質體吸收率提高的機制很可能是在有或沒有蛋白活性運輸情況

下，通過新產生的膜孔發生。已經顯示：肌細胞滲透性程度依賴於電場強度、脈衝長度、電極的形狀和類型(Bureau等，2000；Gilbert等，1997)，以及細胞大小(Somiari等，2000)。經典的電極結構——盤式或成對電線電極被設置成相距4mm——已顯示對嚙齒動物有效，但在大動物如豬或人中，皮膚阻抗增大，皮下脂肪組織加厚，並且如果電場強度按比例增加則關係到組織損傷，使得這些類型的電極不可用。豬或狗的肌纖維很大所以比嚙齒動物肌肉更加適用於電通透性研究。這裏，我們想說明的是：用肌肉內給藥器單獨注射各種劑量的GHRH或核酸序列類似物，然後再電穿孔，足以在大動物中產生治療性血漿激素水平，對治療貧血，逆轉消瘦，使活體體重增加，並延長慢性病活體的平均壽命具有顯著生物學效果。

通過體內電穿孔將pSP-HV-GHRH體系運送到左脛骨前肌中。將4隻狗的組作爲對照(2公2母)，用pSP-HV-GHRH體系注射3組8隻狗的組(4公4母)。單獨用載體(對照)，或用200 mcg，600 mcg或1000 mcg pSP-HV-GHRH注射狗，然後電穿孔。GHRH和GH的系統水平有所提高的指標是血清IGF-I濃度提高。所以，在注射後28天，收集單獨用載體(對照)，或用200 mcg，600 mcg或1000 mcg pSP-HV-GHRH注射的狗的血清，測定IGF-I水平。注射了600 mcg pSP-HV-GHRHX的狗的IGF-I水平比對照(載體單獨)治療動物高出3倍(圖2)。IGF-I水平的提高具統計學顯著差異($p<0.046$)。儘管用200mcg和

1000mcg 質體注射的動物比對照 IGF-I 水平高，但其 IGF-I 水平低於用 600mcg 注射的動物。IGF-I 增長水平與 GHRH 水平相關這一結果和其他應用重組的豬 GH("pGH")在狗體內進行的研究相一致。例如，在 pGH-治療的狗中存在劑量相關的 IGF-I 水平增長(約 2-10 倍)，這與血清 GH 水平的提高相關。

儘管不希望被理論束縛，生長激素釋放激素(GHHR)能刺激垂體前葉產生並釋放生長激素(GH)，生長激素依次刺激肝臟或其他靶器官產生 IGF-I。這樣， GHRH 和 GH 系統水平增高的指標是血清 IGF-I 濃度的提高。注射後 28 天，在用 200 mcg，600 mcg 或 1000 mcg pSP-HV-GHRH 注射的健康狗體內血清 IGF-I 水平都高於注射前的值。注射了 600mcg pSP-HV-GHRHX 的狗的 IGF-I 水平具有最高的統計學顯著增長(如高於 90%，$p<0.046$)，這說明 600 mcg 可能是健康狗的最優濃度。

實施例 3

提高癌症動物的存活率

11 隻接受注射的癌症狗在注射後三少存活了 56 天，在所有的病例中收集全部資料。研究中入選的狗都相對處於其疾病的進展階段(從治療開始 206 天)。注射後的平均存活率如圖 18 所示。當準備本申請時，這 11 隻狗中的 8 隻仍存活著(平均存活注射後 150.6 天)。19 隻對照狗處於疾病的較輕進展階段，在最初確診後平均存活 56 天。相反，

入選本研究後，入選後平均存活 162.5 天。有 5 隻對照動物在此期間死亡。接受治療者的生活質量有所提高。所有者沒有觀察到該治療帶來的副作用。3 個所有者觀察到與注射前的狀況相比，接受治療的狗通常保持良好的狀態。

實施例 4

提高健康動物物件的體重

爲說明提高 GHRH 或其生物學等同物水平能夠改變大型健康動物體內的代謝，測定體重。如圖 4 所示，與注射後 56 天的對照相比，接受治療的狗體重有所增長。儘管用 200 mcg 和 1000 mcg 質體注射的動物體重大於對照，但低於用 600mcg 注射的動物。這些結果有力地說明用 pSP-HV-GHRH 注射的狗體內的代謝有所改變，這種改變是劑量依賴性的。另外，與 GHRH 產量提高相關的額外體重增加也指示 GH 的水平有所提高。這個觀察與其他應用重組的豬 GH ("pGH")在狗體內進行的研究相一致。在這些研究之一，對狗施用重組 pGH 14 周。與分別爲 0.4kg 和 0.8kg 的對照和低劑量組相比，豬 GH 導致中和高劑量組(分別爲 2.8kg 和 4.7kg)體重增加。

實施例 5

GHRH 或生物學等同物療法能夠改善健康狗體內的蛋白利用

圖 15 顯示用各種濃度 pSP-HV-GHRH 注射的健康狗體

內與蛋白代謝相關的各個數值的變化。在 56 天內監測指示蛋白代謝的多個指標，這些指標包括：穀草轉氨酶，穀丙轉氨酶，總膽紅素，鹼性磷酸酶，穀醯轉肽酶，總蛋白，白蛋白，球蛋白，白球比，膽固醇，尿素氮和肌酐。用 200 mcg，600 mcg 或 1000 mcg pSP-HV-GHRH 注射 8 隻狗的組(4 公 4 母)。將 4 隻狗的組作爲對照(2 公 2 母)。用 200 mcg 和 600 mcg 質體注射的動物體內總蛋白水平有所提高。與對照相比，所有接受了注射的組尿素都稍有降低，這是蛋白利用有所改善的信號。

實施例 6

GHRH 或生物學等同物療法不影響健康動物體內的葡萄糖代謝

圖 16 顯示用各種濃度 pSP-HV-GHRH 注射的健康狗體內與血液組份相關的各個指標的變化。簡寫如下：WBC-白細胞；RBC-紅細胞；HGB-血紅蛋白；PCV-紅細胞比積，或紅細胞壓積；MCV-平均紅細胞容積；MCH-平均紅細胞血紅蛋白量；MCHC-平均紅細胞血紅蛋白濃度；n%-嗜中性粒細胞的%；lym%-淋巴細胞的%；momo%-單核細胞的%；eos%-嗜酸細胞的%；Bas%-嗜鹼細胞的%；LDH-乳酸脫氫酶；Prothom-凝血酶原；Qnt-定量；Plat-血小板；BUN-尿素氮/尿素。

在 56 天內監測血液組份的多個指標，包括：WBC, RBC, HGB, PCV, MCV, MCH, MCHC, n%, lym%, mono%, eos%,

Bas%, LDH, Prothom，Qnt. Plat。用 200 mcg，600 mcg 或 1000 mcg pSP-HV-GHRH 注射 8 隻狗的組(4 公 4 母)。將 4 隻狗的組作爲對照(2 公 2 母)。在實驗組和對照組之間沒有顯著差異。但是，隨著質體劑量的增加迴圈淋巴細胞有所減少，標誌在淋巴器官中的淋巴細胞的多價螯合作用。重要的是，葡萄糖水平在所有的實驗組以及對照中都處於正常範圍，這說明我們的治療並不損害葡萄糖代謝。

實施例 7

GHRH 或生物學等同物療法能夠影響骨重構(bone remodeling)

圖 17 顯示用各種濃度 pSP-HV-GHRH 注射的健康狗體內與骨代謝相關的各個指標的變化。在注射後 56 天內監測磷，鈣和鈣/磷比率。用 200 mcg，600 mcg 或 1000 mcg pSP-HV-GHRH 注射 8 隻狗的組(4 公 4 母)。將 4 隻狗的組作爲對照(2 公 2 母)。接受了質體注射的狗 Ca/PO_4 比率隨治療劑量成比例地提高，即代表著骨重構。

實施例 8

GHRH 或生物學等同物療法能夠延長慢性病活體的平均壽命

圖 18 顯示注射了各種濃度 pSP-HV-GHRH 質體的患有自發性惡性腫瘤的狗的診斷，特定治療圖表，以及存活。表明了研究專案，組，治療，劑量，狗的編號，癌症類型，

和注射後存活天數。向各組患有自發性惡性腫瘤的狗注射100mcg/Kg體重到總量不超過1000mcg的pSP-HV-GHRH。另外，用pSP-HV-GHRH治療的狗生活質量有所改善。

實施例 9

GHRH或生物學等同物療法能夠正面影響癌症活體的免疫功能

圖19顯示用各種濃度pSP-HV-GHRH質體注射的自發性癌症狗體內與血液組分相關的各個指標的變化。在56天內監測血液組分的多個值，包括：WBC, RBC, HGB, lym%, 總蛋白，白蛋白，球蛋白，膽固醇，尿素氮，肌酐，磷，鈣，葡萄糖。對老年狗進行pSP-HV-GHRH質體療法，在注射後2周RBC血紅蛋白和紅細胞比積水平都高於注射前。另外，接受治療的狗的尿素水平顯著降低，總蛋白水平提高，葡萄糖水平正常。Ca/P比率的提高指示著骨重構。

實施例 10

GHRH或生物學等同物療法對老年健康狗顯示出良好療效

圖20顯示用1000mcg pSP-HV-GHRH質體注射的老年健康狗體內與血液組分相關的各個指標變化。在2周內監測血液組分的多個值，包括：WBC/HPF, RBC, HGB, %PCV, MCV, MCH, MCHC, n%, lym%, mono%, eos%, Bas%。

實施例 11

貧血症的治療

公知紅細胞的數目基本上由促紅細胞生成素("EPO")調節，但是受多種生長因數的影響。例如，垂體切除的大鼠紅系，髓系以及淋巴系細胞數目較低，有大量的文獻顯示 GH 和 IGF-I 都對各造血系有作用(Kurtz 等，1990；Kurtz 等，1982；Claustres 等，1987)。在真性紅細胞增多症中，活體表現出紅細胞系遠祖細胞對 IGF-I 的靈敏度提高，IGFBP-1 水平增強，並由此過量產生紅細胞(Mirza 等，1997；Cokrrea 等，1994)。有證據證明是 IGF-I 而不是 EPO 在加速生長或分解代謝過程中調節紅細胞生成，並由此控制體重和氧運輸能力成比例增長(Kurtz 等，1990)。IGF-I 是調節尿毒癥活體體內紅細胞生成的重要因數(Urena 等，1992)。而且，已知重組人 GH 治療垂體功能減退的貧血活體的療效。用人 GH 治療後，血漿 EPO 水平加倍，伴隨 Hb 濃度增長到正常水平。當人 GH 給藥被中斷時，血漿 EPO 和 Hb 濃度都有所降低。

在接受注射的狗中，早在質體注射後 2 星期，就獲得了貧血的快速校正。9-27 天紅細胞(RBC)增長了 8.9%，與注射前("pri")的值相比(6.27±0.33，對 5.75±0.39，$p<0.027$)，正常的值一直維持到注射後("pti")56 天，而對照組在相同時期內 RBC 水平降低了 6% (6.00±0.2 對 5.5±0.2) ($p<0.006$，與注射後對照相比) (圖 5)。血紅蛋白水平(圖 6)提高了 6.8% (14.68±0.78 對 13.74±0.97g/l pti/pri)，而對照組在相同時期內降低了 5.7% (12.9±0.4 對 13.7±0.4

g/l)，與注射後對照相比 $p<0.01$。紅細胞比積水平(圖 7)顯著提高了 8.26% (42.22±2.16 對 39±2.62，$p<0.032$ pst/pri)。在相同時期，對照值降低了 7.6% (36.9±1.4 對 39.9±1.6，與 pst 相比 $p<0.012$)。

在對癌症狗的臨床前研究中，早在質體注射後 2 星期，就獲得了貧血的快速校正。在研究初期，活體處於分解代謝狀態，其血紅蛋白(Hb)，紅細胞壓積("PVC")和紅細胞("RBC")值都顯著低於正常的狗。質體注射後，狗進入了快速逆轉階段，轉變爲生化合成代謝，呈現快速生長過程，如同前面所述的對幼大鼠在生長階段進行的研究("生長激素軸和免疫功能")。Hb, PVC 和 RBC 值增長了 10-25%，具統計學顯著意義，並在治療開始後兩周轉爲正常。整個實驗所有的值都在正常界限內。儘管不希望被理論束縛，我們的假設是 GHRH-GH-IGF-I 軸在分解代謝狀態下的促進作用很可能是通過刺激促紅細胞生成素而促進了紅細胞的生成。當活體逆轉到正常的合成代謝狀態，天然 GH 的作用是誘導輕微程度的貧血。但是，這些活體患有癌症，而該疾病的天然過程是朝向分解代謝的，通過這些對立的機制來維持活體的平衡，這樣，Hb, PVC 和 RBC 值就可校正到正常水平，但是不可能超越正常水平的上限，如同我們研究所展現的。

靶基因的表達還可通過結合分子開關技術進行調節，該技術如圖 9 流程圖解。用於配體-依賴性轉基因表達誘導的可商業獲得體系具有已註冊的 GeneSwitch®商標名稱。

GeneSwitch®技術是基於合成的 C 末端截短的黃體酮受體不能結合其天然激動劑，黃體酮。該截短的黃體酮受體只能被抗黃體酮物質啓動，例如米非司酮(mifepristone)("MFP")(Vegeto 等，1992；Xu 等，1996)。類似的體系用於 GeneSwitch®體系的嵌合調節蛋白，其由截短的人黃體酮受體的配體結合域和來自人 NF-kB p65 亞基的轉錄啓動域(Abruzzese 等，1999；Abruzzese 等，2000)構成，其中黃體酮受體的配體結合域已經併入了酵母 GAL4 蛋白的 DNA 結合域(其結合特定的 17bp 識別序列)。GeneSwitch 調節蛋白的基因被插入到生肌表達載體，命名爲 pGS1633，其在肌特異性骨骼 α-肌動蛋白("SK")啓動子的控制下組成型表達。GHRH 質體，命名爲 p6xGal4/TATA-GHRH，或 pGHRH1633，含有誘導型啓動子，該啓動子由合併到最小 TATA 盒啓動子中的 17-單體 Gal4 結合位元點的 6 個拷貝構成。GHRH 編碼序列是超級豬突變 GHRH cDNA 的 228-bp 片段，稱爲 HV-GHRH (Draghia-Akli 等，1999)。相較於半衰期只有 6-12 分鐘的天然 GHRH，該 HV-GHRH 分子顯示出高度血漿穩定性，其半衰期爲 6 小時。該肌特異性 GeneSwitch 和誘導型 GHRH 質體都具有含有合成內含子的 5'未翻譯區域以及來自人 GH 基因的 3'未翻譯區域/聚(A)位點。

實施例 **12**

對正常動物施用外源 **GH** 的藥理學和毒理學作用

由於豬 GH(pGH)與犬 GH 結構一致，使用 pGH 對狗進行各種研究。在其中一項研究中，對狗施用 pGH 14 周。與分別爲 0.4kg 和 0.8kg 的對照和低劑量組相比，豬 GH 導致中和高劑量組(分別爲 2.8kg 和 4.7kg)體重增加。在 pGH 治療的狗中，皮毛厚度的增加在組織學上與皮膚膠原的增多密切相關。沒有肥大或水腫的組織形態學迹象。在 pGH-治療的狗中存在劑量相關的 IGF-I 水平增長(約 2-10 倍)，這與血清 GH 水平的提高相關。另外，在整個研究中可觀察到中劑量組的血清胰島素水平提高。在高劑量組的狗中，胰島素水平在注射後 24 小時持續上升。在禁食狗中的血清葡萄糖水平維持在對照範圍內，沒有糖化血紅蛋白水平基礎上的慢性高血糖症。腎小球的改變，明顯的多尿症且伴隨尿比重降低，以及血清胰島素水平升高都說明狗已患有早期胰島素抵抗糖尿病。pGH 對狗體內的血清 T3, T4 和氫化可的松水平有很小或沒有生物學顯著效果。pGH 治療的狗體內其他血清生化改變包括尿素氮和白蛋白降低，鉀，膽固醇和甘油三酯提高。血清鈣和磷水平以及鹼性磷酸酶活性(骨同功酶)的顯著提高與骨的組織學變化相關。在 pGH 治療的狗中，存在劑量相關的正常色素性的，正常細胞性的，不能再生性的貧血。以上所述的變化都與高劑量 GH 的分解代謝作用相關，貧血除外(Prahalada 等，1998)

實施例 13

質體媒介的 GHRH 運輸減緩腫瘤生長，預防腎衰竭以及提

高癌症動物的存活力

用腫瘤細胞系注射免疫活性的 C57/B16 或無免疫應答的裸鼠(C57/B16 移植 Lewis 肺大鼠腺癌細胞系，而裸鼠移植人肺小細胞腺癌細胞系)。腫瘤移植後 1 天，用組成型活性 GHRH 構建體或誘導型 GHRH 構建體治療小鼠，或用 β 半乳糖苷酶表達構建體治療(作爲陰性對照)。在 GHRH 治療的動物中腫瘤的產生更緩慢(圖 10 和圖 14)，發展也較慢。由此，GHRH 治療的動物比對照存活更長(圖 11)，產生腎衰竭的可能更小(圖 12)。產生轉移的可能也較小(圖 13)。

這裏描述的本發明涉及幾種獨特 GHRH 或其生物學等同物核酸序列的應用。基於目前對蛋白-蛋白相互作用的理解，精確地推測含有一個點突變的 GHRH 序列在體內的參數(如半衰期，療效，翻譯後修飾等)既非顯而易見也不可能，其中所述點突變是指多肽鏈中單一胺基酸有所改變。但是，在現有技術和本說明書的基礎上，本領域技術人員可以知道在特定組織中如何進行質體媒介補充實驗，明確任何獨特核酸序列的變型和改變，來準確地評價在正常或慢性疾病個體體內的效果。所以，應用編碼 GHRH 或其功能性生物學等同物或相應重組蛋白的獨特核酸序列作爲質體媒介的方法來治療貧血；提高總紅細胞量；逆轉消瘦；逆轉異常體重降低；治療免疫功能障礙；逆轉淋巴細胞增殖的抑制作用；和/或延長慢性病活體的平均壽命，是不能基於推測而預知的。

儘管不希望被理論束縛，但相信提高 GHRH 可以提高 GH 水平，這個提高的 GH 水平足以治療貧血；提高總紅細胞量；逆轉消瘦；逆轉異常體重降低；或延長慢性病活體的平均壽命。激素(如 GHRH 和 GH)通常含有複雜的反饋調節途徑，在慢性疾病如腫瘤和 AIDS 的情況下，這種調節將變的更複雜。在沒有將 GHRH 或生物學等同物應用於質體媒介的補充的直接實驗或本發明所提供的教導情況下，本領域技術人員不能預測何種濃度的非天然編碼序列會產生期望的效果。對編碼 GHRH 或其功能性生物學等同物的核酸序列的理想調節由於質體媒介組織的存在而進一步複雜化，如果沒有用獨特序列在特定組織中進行確實的實驗，那麼對本領域技術人員而言則不是顯而易見的。這裏所述的本發明含有說明書和必要的實驗結果，這些實驗研究了編碼 GHRH 或其生物學等同物的獨特核酸序列的組織特異性和誘導型調節，這在現有技術基礎上並非顯而易見。本發明大大向前發展了大動物包括人的非病毒治療方法。爲使基因治療從嚙齒動物轉向大哺乳動物，並最終用於人類，令人震驚的是極低數量的質體就可生效。這裏顯示在合適電穿孔條件下，運送低至 0.2mg 的質體就可在活體中產生重要的生物效果：逆轉消瘦；提高體重，延長慢性病活體的平均壽命。該質體數量比理論值低 100 倍，並且不能從嚙齒動物中使用的相關劑量(平均 1mg/kg)預測。

對貧血症，消瘦或免疫功能障礙的治療；總紅細胞量的提高；異常體重降低的逆轉；淋巴細胞增殖抑制作用的

逆轉；和/或慢性病活體平均壽命的延長都是活體體內迴圈中存在的 GHRH 分子帶來的效果，與運送的方式無關。例如，可以通過經典重組蛋白治療或核酸轉移來運送合適數量的 GHRH 或其類似物，而獲得相同的效果。因此，成功的質體媒介補充需要精確地將編碼序列運送到活體細胞，使基因產物表達到適於產生生物效果的水平。治療的過程可延長到貫穿疾病症狀的病程，並可持續下去。由於運送核酸序列到活體細胞的方法高度依賴於特定疾病和編碼基因，所以本領域技術人員未經本說明書的教導，不能預測何種方法和條件適用。

本領域技術人員顯而易見地意識到：本發明可進行改變，仍然能夠實現發明目的，獲得這裏提及的結果和優點。這裏所述的方法，過程，技術和試劑盒是優選實施方式的體現，僅爲示範性的，而不是限制本發明的範圍。本領域技術人員可在不背離本發明的精神或不超出本發明限定的範圍情況下，對其進行一些改變和其他應用。

參 考 文 獻

下列參考文獻，其提供示範性方法或其他補充本文的細節，都具體列入本文作爲參考。

美國專利文獻

U.S. Patent No. 5, 847, 066 issued on December 8, 1998 with Coy *et al.* listed as inventors.

U.S. Patent No. 5, 846, 936 issued on December 8, 1998 with Felix *et al.* listed as inventors.

U.S. Patent No. 5, 792, 747 issued on August 11, 1998 with Schally *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 5, 776, 901 issued on July 7, 1998 with Bowers *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 5, 756, 264 issued on May 26, 1998 with Schwartz *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 5, 696, 089 issued on December 9, 1997 with Felix *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 5, 486, 505 issued on January 23, 1996 with Bowers *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 5, 292, 721 issued on March 8, 1994 with Boyd *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 5, 137, 872 issued on August 11, 1992 with Seely *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 5, 134.120 issued on July 28, 1992 with Boyd *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 5, 084, 442 issued on January 28, 1992 with Felix *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 5, 061, 690 issued on October 29, 1991 with Kann *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 5, 036, 045 issued on July 30, 1991 with Thorner listed as the inventor.
U.S. Patent No. 5, 023, 322 issued on June 11, 1991 with Kovacs *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 4, 839, 344 issued on June 13, 1989 with Bowers *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 4, 410, 512 issued on October 18, 1983 with Bowers *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. RE33, 699 issued on September 24, 1991 with Drengler listed as the inventor.
U.S. Patent No. 4, 833, 166 issued on May 23, 1989 with Grosvenor *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 4, 228, 158 issued on October 14, 1980 with Momany *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 4, 228, 156 issued on October 14, 1980 with Momany *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 4, 226, 857 issued on October 7, 1980 with Momany *et al.* listed as inventors.

U.S. Patent No. 4, 224, 316 issued on September 23, 1980 with Momany *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 4, 223, 021 issued on September 16, 1980 with Momany *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 4, 223, 020 issued on September 16, 1980 with Momany *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 4, 223, 019 issued on September 16, 1980 with Momany *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 4, 956, 288 issued on September 11, 1990 with Barsoum listed as inventor.
U.S. Patent No. 5, 704, 908 issued on January 6, 1998 with Hofmann, *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 5, 702, 384 issued on December 30, 1997 with Umeyama, *et al.* listed as inventors.
U.S. Patent No. 5, 439, 440 issued on August 8, 1995 with Hofmann listed as inventor.
U.S. Patent No. 5, 874, 534 issued on February 23, 1999 with Vegeto, *et al* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 935, 934 issued on August 10, 1999 with Vegeto, *et al* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 789, 215 issued on August 4, 1998 with Berns , *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 384, 253 issued on January 24, 1995 with Krzyzek , *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 994, 624 issued on November 30, 1999 with Trolinder, *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 981, 274 issued on November 9, 1999 with Tyrrell , *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 945, 100 issued on August 31, 1999 with Fick as inventor.
U.S. Patent No. 5, 780, 448 issued on July 14, 1998 with Davis as inventor.
U.S. Patent No. 5, 736, 524 issued on April 7, 1998 with Content , *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 702, 932 issued on December 30, 1997 with Hoy, *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 656, 610 issued on August 12, 1997 with Shuler , *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 589, 466 issued on December 31, 1996 with Felgner , *et al.* as inventors.

U.S. Patent No. 5, 580, 859 issued on December 3, 1996 with Felgner , *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 610, 042 issued on March 11, 1997 with Chang, *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 322, 783 issued on June 21, 1994 with Tomes, *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 563, 055 issued on October 8, 1996 with Townsend, *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 550, 318 issued on August 27, 1996 with Adams, *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 538, 877 issued on July 23, 1996 with Lundquist, *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 538, 880 issued on July 23, 1996 with Lundquist, *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 302, 523 issued on April 12, 1994 with Coffee, *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 464, 765 issued on November 7, 1995 with Coffee , *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 5, 591, 616 issued on January 7, 1997 with Hiei, *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 4, 684, 611 issued on August 4, 1987 with Schilperoort, *et al.* as inventors.
U.S. Patent No. 4, 952, 500 issued on August 28, 1990 with Finnerty , *et al.* as inventors.
PCT Patent No. WO 94/09699 published on May 11, 1994 with Brown, et al. listed as inventors.
PCT Patent WO 95/06128 published on August 24, 1995 with Dams, et al. listed as inventors.

文獻

Abruzzese, R.V., Godin, D., Burcin, M., Mehta, V., French, M., Li, Y., O'Malley, B.W., and Nordstrom, J.L. (1999).Ligand-dependent regulation of plasmid-based transgene expression in vivo. Hum.Gene Ther. *10*, 1499-1507.

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

Al Suwaidi, J., Reddan, D.N., Williams, K., Pieper, K.S., Harrington, R.A., Califf, R.M., Granger, C.B., Ohman, E.M., and Holmes, D.R., Jr. (2002). Prognostic implications of abnormalities in renal function in patients with acute coronary syndromes. Circulation *106*, 974-980.

Almendro, N., Bellon, T., Rius, C., Lastres, P., Langa, C., Corbi, A., and Bernabeu, C. (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.

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

Argente, J., Pozo, J., and Chowen, J.A. (1996). The growth hormone axis: control and effects. Hormone Research *45 Suppl 1*, 9-11.

Barber, M.D., Ross, J.A., and Fearon, K.C. (1999). Cancer cachexia. Surg. Oncol. *8*, 133-141.

Bartlett, D.L., Charland, S., and Torosian, M.H. (1994). Growth hormone, insulin, and somatostatin therapy of cancer cachexia. Cancer *73*, 1499-1504.

Bercu, B.B., Walker, R.F., Diagnostic, t., hormone, G.G., Growth, h., peptide, and Growth, h.s. (1997). GROWTH HORMONE SECRETAGOGUES IN CHILDREN WITH ALTERED GROWTH. Acta Paediatrica *86*, 102-106.

Bettan, M., Emmanuel, F., Darteil, R., Caillaud, J.M., Soubrier, F., Delaere, P., Branelec, D., Mahfoudi, A., Duverger, N., and Scherman, D. (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. (1995). Complications of growth hormone therapy in children.Curr. Opin. Pediatr. *7*, 466-471.

Blethen, S.L. and MacGillivray, M.H. (1997). A risk-benefit assessment of growth hormone use in children. Drug Saf *17*, 303-316.

Blethen, S.L. and Rundle, A.C. (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., Esch, F., Brazeau, P., Ling, N., and Guillemin, R. (1983). Isolation and characterization of the porcine hypothalamic growth hormone releasing factor. Biochem. Biophys. Res. Commun. *116*, 726-734.

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

Bureau, M.F., Gehl, J., Deleuze, V., Mir, L.M., and Scherman, D. (2000). Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. Biochim. Biophys. Acta *1474*, 353-359.

Carbonelli, D.L., Corley, E., Seigelchifer, M., and Zorzopulos, J. (1999). A

plasmid vector for isolation of strong promoters in Escherichia coli. FEMS Microbiol. Lett. *177*, 75-82.

Chandler, S.D., Mayeda, A., Yeakley, J.M., Krainer, A.R., and Fu, X.D. (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.

Chen, C. and Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. Mol. Cell Biol. *7*, 2745-2752.

Chevalier, R.L., Goyal, S., Kim, A., Chang, A.Y., Landau, D., and LeRoith, D. (2000). Renal tubulointerstitial injury from ureteral obstruction in the neonatal rat is attenuated by IGF-1. Kidney Int. *57*, 882-890.

Claustres, M., Chatelain, P., and Sultan, C. (1987). Insulin-like growth factor I stimulates human erythroid colony formation in vitro. J Clin. Endocrinol. Metab *65*, 78-82.

Cocea, 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., Harman, S.M., Pineyro, M.A., Roberson, R., and Blackman, M.R. (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. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism *76*, 134-138.

Correa, P.N., Eskinazi, D., and Axelrad, A.A. (1994).Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. Blood *83*, 99-112.

Cremagnani, L., Cantalamessa, L., Orsatti, A., Vigna, L., Vallino, F., and Buccianti, G. (1993). Recombinant human erythropoietin (rhEPO) treatment potentiates growth hormone (GH) response to growth hormone releasing hormone (GHRH) stimulation in hemodialysis patients. Clin. Nephrol. *39*, 282-286.

Crook, E.D., Washington, D.O., and Flack, J.M. (2002). Screening and prevention of chronic kidney disease. J. Natl. Med. Assoc. *94*, 55S-62S.

Dai, B., Wu, H., Holthuizen, E., and Singh, P. (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 Wolff, J.A. (1994). Direct gene transfer into muscle. [Review]. Vaccine *12*, 1499-1502.

Darquet, A.M., Cameron, B., Wils, P., Scherman, D., and Crouzet, J. (1997). A

new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. Gene Ther. *4*, 1341-1349.

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

Davis, H.L., Whalen, R.G., and Demeneix, B.A. (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, M.P. and Dickerson, D. (2000). Cachexia and anorexia: cancer's covert killer. Support. Care Cancer *8*, 180-187.

Demetri, G.D. (2001). Anaemia and its functional consequences in cancer patients: current challenges in management and prospects for improving therapy. Br. J. Cancer *84 Suppl 1:31-7.*, 31-37.

Diez, J., Iglesias, P., Sastre, J., Mendez, J., Selgas, R., and Gomez-Pan, A. (1996). Growth hormone responses to growth hormone-releasing hormone and clonidine before and after erythropoietin therapy in CAPD patients. Nephron *74*, 548-554.

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

Dorsch-Hasler, K., Keil, G.M., Weber, F., Jasin, M., Schaffner, W., and Koszinowski, U.H. (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.

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

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

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

Draghia-Akli, R., Malone, P.B., Hill, L.A., Ellis, K.M., Schwartz, R.J., and Nordstrom, J.L. (2002b). Enhanced animal growth via ligand-regulated

GHRH myogenicinjectablevectors. FASEB J. *16*, 426-428.

Dubreuil, P., Petitclerc, D., Pelletier, G., Gaudreau, P., Farmer, C., Mowles, TF, and Brazeau, P. (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. Journal of Animal Science *68*, 1254- 1268.

Duck, S.C., Schwarz, H.P., Costin, G., Rapaport, R., Arslanian, S., Hayek, A., Connors, M., and Jaramillo, J. (1992). Subcutaneous growth hormone-releasing hormone therapy in growth hormone-deficient children: first year of therapy. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism *75*, 1115-1120.

Edwards, B.K., Howe, H.L., Ries, L.A., Thun, M.J., Rosenberg, H.M., Yancik, R., Wingo, P.A., Jemal, A., and Feigal, E.G. (2002). Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1999, featuring implications of age and aging on U.S. cancer burden. Cancer *94*, 2766-2792.

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

Evans, W.S., Vance, M.L., Kaiser, D.L., Sellers, R.P., Borges, J.L., Downs, T.R., Frohman, L.A., Rivier, J., Vale, W., and Thorner, M.O. (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.

Fechheimer, M., Boylan, J.F., Parker, S., Sisken, J.E., Patel, G.L., and Zimmer, S.G. (1987). Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *84*, 8463-8467.

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

Frohman, L.A., Downs, T.R., Heimer, E.P., and Felix, A.M. (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., Thominet, J.L., Webb, C.B., Vance, M.L., Uderman, H., Rivier, J., Vale, W., and Thorner, M.O. (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 Jacoby, D.B. (1993). Effect of inflammatory cell mediators on M2

muscarinic receptors in the lungs. Life Sci. *52*, 529-536.

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

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

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

Gilbert, R.A., Jaroszeski, M.J., and Heller, R. (1997). Novel electrode designs for electrochemotherapy. Biochim. Biophys. Acta *1334*, 9-14.

Gopal, T.V. (1985). Gene transfer method for transient gene expression, stable transformation, and cotransformation of suspension cell cultures. Mol. Cell Biol. *5*, 1188-1190.

Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. Virology *54*, 536-539.

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

Hafez, I.M., Maurer, N., and Cullis, P.R. (2001). On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. Gene Ther. *8*, 1188-1196.

Hamm, A., Krott, N., Breibach, I., Blindt, R., and Bosserhoff, A.K. (2002). Efficient transfection method for primary cells.Tissue Eng *8*, 235-245.

Harland, R. and Weintraub, H. (1985).Translation of mRNA injected into Xenopus oocytes is specifically inhibited by antisense RNA. J. Cell Biol. *101*, 1094-1099.

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

Herzog, R.W., Mount, J.D., Arruda, V.R., High, K.A., and Lothrop, C.D., Jr. (2001). Muscledirected gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation. Mol. Ther. *4*, 192-200.

Horlick, R.A. and Benfield, P.A. (1989). The upstream muscle-specific enhancer of

the rat muscle creatine kinase gene is composed of multiple elements. Mol. Cell Biol. *9*, 2396-2413.

Hostetter, T.H. and Lising, M. (2002). National Kidney Disease Education Program. J. Natl. Med. Assoc. *94*, 72S-75S.

Inouye, C., Remondelli, P., Karin, M., and Elledge, S. (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., Nakazawa, A., and Nakazawa, T. (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., Clark, R., Mortensen, D., and Dorshkind, K. (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., Johnson, J.E., Buskin, J.N., Gartside, C.L., and Hauschka, S.D. (1988). The muscle creatine kinase gene is regulated by multiple upstream elements, including a muscle-specific enhancer. Mol. Cell Biol. *8*, 62-70.

Johnson, N.F., Hoover, M.D., Thomassen, D.G., Cheng, Y.S., Dalley, A., and Brooks, A.L. (1992). In vitro activity of silicon carbide whiskers in comparison to other industrial fibers using four cell culture systems. Am. J. Ind. Med. *21*, 807-823.

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

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

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

Klamut, H.J., Gangopadhyay, S.B., Worton, R.G., and Ray, P.N. (1990). Molecular and functional analysis of the muscle-specific promoter region of the Duchenne muscular dystrophy gene. Mol. Cell Biol. *10*, 193-205.

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

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

Kurtz, A., Jelkmann, W., and Bauer, C. (1982). A new candidate for the regulation of erythropoiesis. Insulin-like growth factor I. FEBS Lett. *149*, 105-108. Kurtz, A., Matter, R., Eckardt, K.U., and Zapf, J. (1990). Erythropoiesis, serum erythropoietin, and serum IGF-I in rats during accelerated growth. Acta Endocrinol. (Copenh) *122*, 323-328.

Lareyre, J.J., Thomas, T.Z., Zheng, W.L., Kasper, S., Ong, D.E., Orgebin-Crist, M.C., and Matusik, R.J. (1999). A 5-kilobase pair promoter fragment of the murine epididymal retinoic acid-binding protein gene drives the tissue-specific, cellspecific, and androgen-regulated expression of a foreign gene in the epididymis of transgenic mice. J. Biol. Chem. *274*, 8282-8290.

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

LeBrun, C.J., Diehl, L.F., Abbott, K.C., Welch, P.G., and Yuan, C.M. (2000). Life expectancy benefits of cancer screening in the end-stage renal disease population. Am. J. Kidney Dis. *35*, 237-243.

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

Lesbordes, J.C., Bordet, T., Haase, G., Castelnau-Ptakhine, L., Rouhani, S., Gilgenkrantz, H., and Kahn, A. (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., Transue, E.D., and Roninson, I.B. (1998). Internal ribosomal entry sitecontaining retroviral vectors with green fluorescent protein and drug resistance markers. Hum. Gene Ther. *9*, 1233-1236.

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

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

Lin, H., Yutzey, K.E., and Konieczny, S.F. (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, Y., Li, H., Tanaka, K., Tsumaki, N., and Yamada, Y. (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., Heller, L., Coppola, D., and Heller, R. (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., Jaroszeski, M.J., Gilbert, R., and Heller, R. (2001). In vivo electroporation using an exponentially enhanced pulse: a new waveform. DNA Cell Biol. *20*, 183-188.

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

Madry, H., Reszka, R., Bohlender, J., and Wagner, J. (2001). Efficacy of cationic liposomemediated gene transfer to mesangial cells in vitro and in vivo. J. Mol. Med. *79*, 184-189.

Makis, A.C., Chaliasos, N., Hatzimichael, E.C., and Bourantas, K.L. (2001). Recombinant human erythropoietin therapy in a transfusion-dependent beta-thalassemia major patient. Ann. Hematol. *80*, 492-495.

Matsubara, H., Gunji, Y., Maeda, T., Tasaki, K., Koide, Y., Asano, T., Ochiai, T., Sakiyama, S., and Tagawa, M. (2001). Electroporation-mediated transfer of cytokine genes into human esophageal tumors produces anti-tumor effects in mice. Anticancer Res. *21*, 2501-2503.

Matsuo, A., Tooyama, I., Isobe, S., Oomura, Y., Akiguchi, I., Hanai, K., Kimura, J., and Kimura, H. (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., Lebkowski, J.S., Okarma, T.B., and Lerch, L.B. (1988). Optimizing electroporation parameters for a variety of human hematopoietic cell lines. Biotechniques *6*, 882-886.

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

Miklavcic, D., Semrov, D., Mekid, H., and Mir, L.M. (2000). A validated model of in vivo electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy. Biochim. Biophys. Acta *1523*, 73-83.

Mirza, A.M., Ezzat, S., and Axelrad, A.A. (1997). Insulin-like growth factor

binding protein-1 is elevated in patients with polycythemia vera and stimulates erythroid burst formation in vitro. Blood *89*, 1862-1869.

Morley, J.E. (2001). Anorexia, body composition, and ageing. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care *4*, 9-13.

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

Muramatsu, T., Arakawa, S., Fukazawa, K., Fujiwara, Y., Yoshida, T., Sasaki, R., Masuda, S., and Park, H.M. (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. and Shalet, S.M. (2000). Growth hormone: current and future therapeutic applications. Expert. Opin. Pharmacother. *1*, 975-990.

Nabel, E.G., Plautz, G., Boyce, F.M., Stanley, J.C., and Nabel, G.J. (1989). Recombinant gene expression in vivo within endothelial cells of the arterial wall. Science *244*, 1342-1344.

Nairn, R.S., Adair, G.M., Porter, T., Pennington, S.L., Smith, D.G., Wilson, J.H., and Seidman, M.M. (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.

Nampoory, M.R., Johny, K.V., Costandi, J.N., Gupta, R.K., Nair, M.P., Samhan, M., al Muzairai, I.A., and al Mousawi, M. (2002). Inferior long-term outcome of renal transplantation in patients with diabetes mellitus. Med. Princ. Pract. *11*, 29-34.

Narum, D.L., Kumar, S., Rogers, W.O., Fuhrmann, S.R., Liang, H., Oakley, M., Taye, A., Sim, B.K., and Hoffman, S.L. (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.

Nelson, K.A. (2000). The cancer anorexia-cachexia syndrome. Semin. Oncol. *27*, 64-68.

Nelson, K.A. (2001). Modern management of the cancer anorexia-cachexia syndrome. Curr. Pain Headache Rep. *5*, 250-256.

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

Nomoto, S., Tatematsu, Y., Takahashi, T., and Osada, H. (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., Thor, S., and Edlund, T. (1991). Novel insulin promoter- and enhancer-binding proteins that discriminate between pancreatic alpha- and beta-cells. Mol. Endocrinol. *5*, 897-904.

Omirulleh, S., Abraham, M., Golovkin, M., Stefanov, I., Karabaev, M.K., Mustardy, L., Morocz, S., and Dudits, D. (1993). Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize. Plant Mol. Biol. *21*, 415-428.

Otani, Y., Tabata, Y., and Ikada, Y. (1996). Rapidly curable biological glue composed of gelatin and poly(L-glutamic acid). Biomaterials *17*, 1387-1391.

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

Papassotiriou, I., Voskaridou, E., Stamoulakatou, A., and Loukopoulos, D. (2000). Increased erythropoietin level induced by hydroxyurea treatment of sickle cell patients. Hematol. J. *1*, 295-300.

Payen, E., Bettan, M., Rouyer-Fessard, P., Beuzard, Y., and Scherman, D. (2001). Improvement of mouse beta-thalassemia by electrotransfer of erythropoietin cDNA. Exp. Hematol. *29*, 295-300.

Pech, M., Rao, C.D., Robbins, K.C., and Aaronson, S.A. (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 Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. Nature *334*, 320-325.

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

Potrykus, I., Paszkowski, J., Saul, M.W., Petruska, J., and Shillito, R.D. (1985). Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer. Mol. Gen. Genet. *199*, 169-177.

Potter, H., Weir, L., and Leder, P. (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.

Prahalada, S., Stabinski, L.G., Chen, H.Y., Morrissey, R.E., De Burlet, G., Holder, D., Patrick, D.H., Peter, C.P., and van Zwieten, M.J. (1998). Pharmacological

and toxicological effects of chronic porcine growth hormone administration in dogs [see comments]. Toxicol. Pathol. *26*, 185-200.

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

Raghavachari, N. and Fahl, W.E. (2002). Targeted gene delivery to skin cells in vivo: a comparative study of liposomes and polymers as delivery vehicles. J. Pharm. Sci. *91*, 615-622.

Rippe, R.A., Brenner, D.A., and Leffert, H.L. (1990). DNA-mediated gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture. Mol. Cell Biol. *10*, 689-695.

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

Sakhuja, V., Jha, V., Varma, S., Joshi, K., Gupta, K.L., Sud, K., and Kohli, H.S. (2000). Renal involvement in multiple myeloma: a 10-year study. Ren Fail. *22*, 465-477.

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

Skroch, P., Buchman, C., and Karin, M. (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 Nordstrom, J.L. (2000). Advances in plasmid gene delivery and expression in skeletal muscle. Curr. Opin. Mol. Ther. *2*, 150-154.

Sohmiya, M. and Kato, Y. (2000). Effect of long-term treatment with recombinant human growth hormone on erythropoietin secretion in an anemic patient with panhypopituitarism. J Endocrinol. Invest *23*, 31-36.

Somiari, S., Glasspool-Malone, J., Drabick, J.J., Gilbert, R.A., Heller, R., Jaroszeski, M.J., and Malone, R.W. (2000).Theory and in vivo application of electroporative gene delivery. Mol. Ther. *2*, 178-187.

Song, S., Embury, J., Laipis, P.J., Berns, K.I., Crawford, J.M., and Flotte, T.R. (2001). Stable therapeutic serum levels of human alpha-1 antitrypsin (AAT) after portal vein injection of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. Gene Ther. *8*, 1299-1306.

Soubrier, F., Cameron, B., Manse, B., Somarriba, S., Dubertret, C., Jaslin, G., Jung, G., Caer, C.L., Dang, D., Mouvault, J.M., Scherman, D., Mayaux, J.F., and Crouzet, J. (1999). pCOR: a new design of plasmid vectors for nonviral gene

therapy. Gene Ther. *6*, 1482-1488.

Sowade, B., Sowade, O., Mocks, J., Franke, W., and Warnke, H. (1998). The safety of treatment with recombinant human erythropoietin in clinical use: a review of controlled studies. Int. J. Mol. Med. *1*, 303-314.

Terada, Y., Tanaka, H., Okado, T., Inoshita, S., Kuwahara, M., Akiba, T., Sasaki, S., and Marumo, F. (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., Frohman, L.A., Leong, D.A., Thominet, J., Downs, T., Hellmann, P., Chitwood, J., Vaughan, J.M., and Vale, W. (1984). Extrahypothalamic growthhormone-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., Hartman, M.L., Vance, M.L., Pezzoli, S.S., and Ampleford, E.J. (1995). Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion. [Review]. Neuroscience & Biobehavioral Reviews *19*, 465-468.

Thorner, M.O., Vance, M.L., Evans, W.S., Rogol, A.D., Rivier, J., Vale, W., Blizzard, and RM. (1986).CLINICAL STUDIES WITH GHRH IN MAN. Hormone Research *24*, 91-98.

Toneguzzo, F., Keating, A., Glynn, S., and McDonald, K. (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., Svensson, E.C., Black, H.B., Goldwasser, E., Margalith, M., Hobart, PM, and Leiden, J.M. (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., Rollier, A., Bach, I., Weiss, M.C., and Yaniv, M. (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., Rollier, A., Herbomel, P., Bach, I., Cereghini, S., Weiss, M., and Yaniv, M. (1990). Anatomy of the rat albumin promoter. Mol. Biol. Med. *7*, 173-185.

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

Tsumaki, N., Kimura, T., Tanaka, K., Kimura, J.H., Ochi, T., and Yamada, Y. (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., Wada, M., Ikeda, M., Uchida, H., Naito, N., and Honjo, M. (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., Takeshita, S., Chen, D., Kearney, M., Rossow, S.T., Passeri, J., Horowitz, J.R., Symes, J.F., and Isner, J.M. (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., Teicher, L., Levine, B.J., Skoultchi, A.I., and Shafritz, D.A. (1986). Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes. Mol. Cell Biol. *6*, 716-718.

Urena, P., Bonnardeaux, A., Eckardt, K.U., Kurtz, A., and Drueke, T.B. (1992). Insulin-like growth factor I: a modulator of erythropoiesis in uraemic patients? Nephrol. Dial. Transplant. *7*, 40-44.

Vance, M.L. (1990). Growth-hormone-releasing hormone. [Review] [52 refs]. Clinical Chemistry *36*, 415-420.

Vance, M.L., Kaiser, D.L., Evans, W.S., Furlanetto, R., Vale, W., Rivier, J., and Thorner, M.O. (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.

Vansteenkiste, J., Pirker, R., Massuti, B., Barata, F., Font, A., Fiegl, M., Siena, S., Gateley, J., Tomita, D., Colowick, A.B., and Musil, J. (2002). Double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of darbepoetin alfa in lung cancer patients receiving chemotherapy. J. Natl. Cancer Inst. *94*, 1211-1220.

Vegeto, E., Allan, G.F., Schrader, W.T., Tsai, M.J., McDonnell, D.P., and O'Malley, B.W. (1992). The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. Cell *69*, 703-713.

Verhelst, J., Abs, R., Vandeweghe, M., Mockel, J., Legros, J.J., Copinschi, G., Mahler, C., Velkeniers, B., Vanhaelst, L., Van Aelst, A., De Rijdt, D., Stevenaert, A., and Beckers, A. (1997). Two years of replacement therapy in adults with growth hormone deficiency. Clin. Endocrinol. (Oxf) *47*, 485-494.

Vilquin, J.T., Kennel, P.F., Paturneau-Jouas, M., Chapdelaine, P., Boissel, N., Delaere, P., Tremblay, J.P., Scherman, D., Fiszman, M.Y., and Schwartz, K. (2001). Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal

models of muscular dystrophies. Gene Ther. *8*, 1097-1107.

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

Wada, M., Uchida, H., Ikeda, M., Tsunekawa, B., Naito, N., Banba, S., Tanaka, E., Hashimoto, Y., and Honjo, M. (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.

Weinroth, S.E., Parenti, D.M., and Simon, G.L. (1995). Wasting syndrome in AIDS: pathophysiologic mechanisms and therapeutic approaches. Infect. Agents Dis. *4*, 76-94.

Wells, K.E., Maule, J., Kingston, R., Foster, K., McMahon, J., Damien, E., Poole, A., and Wells, D.J. (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.

Wiethoff, C.M., Smith, J.G., Koe, G.S., and Middaugh, C.R. (2001). The potential role of proteoglycans in cationic lipid-mediated gene delivery. Studies of the interaction of cationic lipid-DNA complexes with model glycosaminoglycans. J. Biol. Chem. *276*, 32806-32813.

Wilson, J.M., Birinyi, L.K., Salomon, R.N., Libby, P., Callow, A.D., and Mulligan, R.C. (1989). Implantation of vascular grafts lined with genetically modified endothelial cells. Science *244*, 1344-1346.

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

Wu, G.Y. and Wu, C.H. (1988a). Evidence for targeted gene delivery to Hep G2 hepatoma cells in vitro. Biochemistry *27*, 887-892.

Wu, G.Y. and Wu, C.H. (1988b). Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. J. Biol. Chem. *263*, 14621-14624.

Wu, H.K., Squire, J.A., Song, Q., and Weksberg, R. (1997). Promoter-dependent tissuespecific expressive nature of imprinting gene, insulin-like growth factor II, in human tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun. *233*, 221-226.

Xie, T.D. and Tsong, T.Y. (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.

Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1996). The extreme C terminus of progesterone receptor contains a transcriptional repressor domain that functions through a putative corepressor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *93*, 12195-12199.

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

Yeh, S.S. and Schuster, M.W. (1999). Geriatric cachexia: the role of cytokines. Am. J Clin. Nutr. *70*, 183-197.

Yin, D. and Tang, J.G. (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 Mikawa, H. (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 Konieczny, S.F. (1992). Different E-box regulatory sequences are functionally distinct when placed within the context of the troponin enhancer. Nucleic Acids Res. *20*, 5105-5113.

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

圖式簡單說明

圖 1 顯示 GHRH 或其生物學等同物的胺基酸序列。

圖 2 顯示接受了不同濃度 pSP-HV-GHRH 質體注射的健康狗體內 IGF-I 水平上升的百分比。

圖 3 顯示在第 0 天接受了 100mcg/kg 到總量不超過 1000mcg pSP-HV-GHRH 質體注射的癌症狗體內，在注射後 9-27 和 28-56 天 IGF-I 水平上升的百分比。

圖 4 顯示接受了不同濃度 pSP-HV-GHRH 質體注射的健康狗體重增加的百分比。

圖 5 顯示用 GHRH 質體療法進行治療的患有自發性惡性腫瘤的狗體內紅細胞數量，以癌症狗作爲對照。

圖 6 顯示用 GHRH 質體療法進行治療的患有自發性惡性腫瘤的狗體內血紅蛋白數值，以癌症狗作爲對照。

圖 7 顯示用 GHRH 質體療法進行治療的患有自發性惡性腫瘤的狗體內紅細胞壓積，以癌症狗作爲對照。

圖 8 顯示用 GHRH 質體療法進行治療的患有自發性惡性腫瘤的狗體內淋巴細胞的百分比，以癌症狗作爲對照。

圖 9 顯示米非司酮(mifepristone)-依賴性 GHRH/GeneSwitch®系統的流程圖。質體 p1633 編碼 GeneSwitch®調節蛋白，該蛋白是酵母 GAL4 DNA 結合域(“GAL4”)，截短的人黃體酮受體配體-結合域(“hPRLBD”)以及人 NF-κB p65 亞基的啓動域(“p65”)的嵌合蛋白。該蛋白作爲無活性的單體合成。與米非司酮(mifepristone)的結合引發了構象的變化，該構象的變化會導致啓動作用和二聚作用。被啓動的同型二聚體與誘導型啓動子 GAL4 位點結合並刺激 GHRH 基因的轉錄。

圖 10 顯示在左肋腹接受了 $2x10^6$ Lewis 肺腺癌細胞的免疫活性 C57/B16 小鼠體內腫瘤體積的發展。被治療的動物在腫瘤細胞植入後第 1 天接受 20 毫克表達人生長激素釋放激素的質體，而對照組接受了對照 β-半乳糖苷酶質體。GHRH 治療的腫瘤動物的腫瘤發育和進展明顯緩慢。

圖 11 顯示在左肋腹接受了 $2x10^6$ Lewis 肺腺癌細胞的免疫活性 C57/B16 小鼠存活期。被治療的動物在腫瘤細胞

植入後第 1 天接受 20 毫克表達人生長激素釋放激素的質體，而對照組接受了對照 β-半乳糖苷酶質體。GHRH 治療的腫瘤動物的存活時間有所提高。

圖 12 顯示在左肋腹接受了 $2x10^6$ Lewis 肺腺癌細胞的免疫活性 C57/B16 小鼠的腎臟大小。被治療的動物在腫瘤細胞植入後第 1 天接受 20 毫克表達人生長激素釋放激素的質體，而對照組接受了對照 β-半乳糖苷酶質體。對照動物的腎臟明顯更小，是腎衰竭的迹象。

圖 13 顯示對照組動物與 GHRH-治療動物相比其轉移相關性標記有所增高，組織病理學報告顯示對照動物中的轉移遠比接受治療的動物中多。

圖 14 顯示在接受質體媒介的生長激素釋放激素(組成型活性 pGHRH 或受調節的 Gene Switch 系統 GHRH-IS+/-MFP)治療的裸鼠中腫瘤生長並沒有增長。NCI——人肺腺癌細胞系。在治療後 33 天，組成型活性 GHRH 進行治療的動物與對照相比腫瘤更小($p<0.02$)。其他組與對照相比差異不顯著。

圖 15 顯示在注射後 56 天，狗體內的蛋白代謝。

圖 16 顯示在注射後 56 天，狗體內的血液值。

圖 17 顯示在注射後 56 天，狗體內的骨代謝。

圖 18 顯示狗的診斷特異性治療及存活。

圖 19 顯示癌症狗體內的血液值。

圖 20 顯示老年健康狗體內的血液值。

序列表

<110> 愛德維西斯股份有限公司

<120> 治療慢性病活體的質體媒介的補充品
<130> 108328.00073 - AVSI-0007

<140> TW091135752
<141> 2002-12-10

<160> 25

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是His1和 Val2 取代Try1 和Ala2, Gly15 被Ala15取代,Met27, Ser28 被Leu27和Asn28取代的生長激素釋放激素.("GHRH")。

<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> 這是生長激素釋放激素(GHRH)經過修飾的胺基酸序列。Gly15 替換成 Ala15 加強了螺旋構像。這是 TI-GHRH 序列,所以它還有 Ile2 取代 Ala2,Gly15 被 Ala15 取代,Met27,Ser28 被 Leu27 和 Asn28 取代。

<400> 2

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> 3
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是 Val2 取代 Ala2,Gly15 被 Ala15 取代,Met27, Ser28 被 Leu27 和 Asn28 取代的生長激素釋放激素。

<400> 3

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> 4
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 這是Gly15被Ala15取代,Met27,Ser28被Leu27和Asn28取代的豬生長激素釋放激素("GHRH").

<400> 4

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> 5
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是(1-44)NH2的人工序列

<400> 5

Thr 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> 6
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是 GHRH(1-40)OH 的人工序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 1 位的 Xaa 可以是酪胺酸,織胺酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 2 位的 Xaa 可以是丙胺酸,纈胺酸或是白胺酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> 15 位的 Xaa 可以是丙胺酸,纈胺酸或是白胺酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)..(27)
<223> 27 位的 Xaa 可以是甲硫胺酸,或白胺酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> 28 位的 Xaa 可以是絲胺酸或天冬醯胺酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (34)..(34)
<223> ARG 也可以是 SER

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (38)..(38)
<223> Gln 也可以是 Arg

<400> 6

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 Arg Asn Gln Glu Gln Gly Ala
35 40

<210> 7
<211> 323
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 這是真核生物啓動子 c5-12 的核酸序列

<400> 7
cggccgtccg ccctcggcac catcctcacg acacccaaat atggcgacgg gtgaggaatg 60

gtggggagtt atttttagag cggtgaggaa ggtgggcagg cagcaggtgt tggcgctcta 120

aaaataactc ccgggagtta tttttagagc ggaggaatgg tggacaccca aatatggcga 180

cggttcctca cccgtcgcca tatttgggtg tccgccctcg gccggggccg cattcctggg 240

ggccgggcgg tgctcccgcc cgcctcgata aaaggctccg gggccggcgg cggcccacga 300

gctacccgga ggagcgggag gcg 323

<210> 8
<211> 190
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是人生長激素("hGH")聚 A 尾的核酸序列

<400> 8
gggtggcatc cctgtgaccc ctccccagtg cctctcctgg ccctggaagt tgccactcca 60

gtgcccacca gccttgtcct aataaaatta agttgcatca ttttgtctga ctaggtgtcc 120

ttctataata ttatggggtg gaggggggtg gtatggagca aggggcaagt tgggaagaca 180

acctgtaggg 190

<210> 9
<211> 219
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是豬生長激素釋放激素的 cDNA

<400> 9
atggtgctct gggtgttctt ctttgtgatc ctcaccctca gcaacagctc ccactgctcc 60

ccacctcccc ctttgaccct caggatgcgg cggcacgtag atgccatctt caccaacagc 120

taccggaagg tgctggccca gctgtccgcc cgcaagctgc tccaggacat cctgaacagg 180

cagcagggag agaggaacca agagcaagga gcataatga 219

<210> 10
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是豬生長激素釋放激素的胺基酸序列

<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 Arg Asn Gln Glu Gln Gly Ala
35 40

<210> 11
<211> 3534
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是 HV-GHRH 質體操縱性連接的組份的核酸序列

<400> 11
gttgtaaaac gacggccagt gaattgtaat acgactcact atagggcgaa ttggagctcc 60

accgcggtgg cggccgtccg ccctcggcac catcctcacg acacccaaat atggcgacgg 120

gtgaggaatg gtggggagtt atttttagag cggtgaggaa ggtgggcagg cagcaggtgt 180

tggcgctcta aaaataactc ccgggagtta ttttagagc ggaggaatgg tggacaccca 240

aatatggcga cggttcctca cccgtcgcca tatttgggtg tccgccctcg gccggggccg 300

cattcctggg ggccgggcgg tgctcccgcc cgcctcgata aaaggctccg gggccggcgg 360

cggcccacga gctacccgga ggagcgggag gcgccaagct ctagaactag tggatcccaa 420

ggcccaactc cccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatggtgct 480

ctgggtgttc ttctttgtga tcctcaccct cagcaacagc tcccactgct ccccacctcc 540

ccctttgacc 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 ccttgtccta ataaaattaa gttgcatcat tttgtctgac taggtgtcct 840

tctataatat tatggggtgg agggggggtgg tatggagcaa ggggcaagtt gggaagacaa 900

cctgtagggc ctgcggggtc tattgggaac caagctggag tgcagtggca caatcttggc 960

tcactgcaat ctccgcctcc tgggttcaag cgattctcct gcctcagcct cccgagttgt 1020

tgggattcca ggcatgcatg accaggctca gctaattttt gtttttttgg tagagacggg 1080

gtttcaccat attggccagg ctggtctcca actcctaatc tcaggtgatc tacccacctt 1140

ggcctcccaa attgctggga ttacaggcgt gaaccactgc tcccttccct gtccttctga 1200

ttttaaaata actataccag caggaggacg tccagacaca gcataggcta cctggccatg 1260

cccaaccggt gggacatttg agttgcttgc ttggcactgt cctctcatgc gttgggtcca 1320

ctcagtagat gcctgttgaa ttcgataccg tcgacctcga ggggggggccc ggtaccagct 1380

tttgttccct ttagtgaggg ttaatttcga gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc 1440

ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt 1500

gtaaagcctg gggtgcctaa tgagtgagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc 1560

ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg 1620

ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct 1680

cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcactcaaa ggcggtaata cggttatcca 1740

cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga 1800

accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgcccccct gacgagcatc 1860

acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg 1920

cgtttccccc tggaagctcc ctcgtgcgct ctcctgttcc gaccctgccg cttaccggat 1980

acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt 2040

atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa ccccccgttc 2100

agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg 2160

acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg 2220

gtgctacaga gttcttgaag tggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg 2280

gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg 2340

gcaaacaaac caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca 2400

gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagaaga 2460

actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc gggagcggcg ataccgtaaa 2520

gcacgaggaa gcggtcagcc 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

gatgctcttc gtccagatca tcctgatcga caagaccggc ttccatccga gtacgtgctc 2820

gctcgatgcg atgtttcgct tggtggtcga atgggcaggt agccggatca agcgtatgca 2880

gccgccgcat tgcatcagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg tgagatgaca 2940

ggagatcctg ccccggcact tcgcccaata gcagccagtc ccttcccgct tcagtgacaa 3000

cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccg tcgtggccag ccacgatagc cgcgctgcct 3060

cgtcctgcag ttcattcagg gcaccggaca ggtcggtctt gacaaaaaga accgggcgcc 3120

cctgcgctga cagccggaac acggcggcat cagagcagcc gattgtctgt tgtgcccagt 3180

catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat ccatcttgtt 3240

caatcatgcg aaacgatcct catcctgtct cttgatcaga tcttgatccc ctgcgccatc 3300

agatccttgg cggcaagaaa gccatccagt ttactttgca gggcttccca accttaccag 3360

agggcgcccc agctggcaat tccggttcgc ttgctgtcca taaaaccgcc cagtctagca 3420

actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg 3480

gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtca cgac 3534

<210> 12
<211> 3534
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 這是 TI-GHRH 質體操縱性連接的組份的核酸序列

<400> 12
gttgtaaaac gacggccagt gaattgtaat acgactcact atagggcgaa ttggagctcc 60

accgcggtgg cggccgtccg ccctcggcac catcctcacg acaccaaat atggcgacgg 120

gtgaggaatg gtggggagtt atttttagag cggtgaggaa ggtgggcagg cagcaggtgt 180

tggcgctcta aaaataactc ccgggagtta ttttagagc ggaggaatgg tggacaccca 240

aatatggcga cggttcctca cccgtcgcca tatttgggtg tccgccctcg gccggggccg 300

cattcctggg ggccgggcgg tgctcccgcc cgcctcgata aaaggctccg gggccggcgg 360

cggcccacga gctacccgga ggagcgggag gcgccaagct ctagaactag tggatcccaa 420

ggcccaactc cccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatggtgct 480

ctgggtgttc ttctttgtga tcctcaccct cagcaacagc tcccactgct ccccacctcc 540

ccctttgacc ctcaggatgc ggcggtatat cgatgccatc 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 ccttgtccta ataaaattaa gttgcatcat tttgtctgac taggtgtcct 840

tctataatat tatggggtgg aggggggtgg tatggagcaa ggggcaagtt gggaagacaa 900

cctgtagggc ctgcggggtc tattgggaac caagctggag tgcagtggca caatcttggc 960

tcactgcaat ctccgcctcc tgggttcaag cgattctcct gcctcagcct cccgagttgt 1020

tgggattcca ggcatgcatg accaggctca gctaattttt gtttttttgg tagagacggg 1080

gtttcaccat attggccagg ctggtctcca actcctaatc tcaggtgatc tacccacctt 1140

ggcctcccaa attgctggga ttacaggcgt gaaccactgc tcccttccct gtccttctga 1200

ttttaaaata actataccag caggaggacg tccagacaca gcataggcta cctggccatg 1260

cccaaccggt gggacatttg agttgcttgc ttggcactgt cctcttcatgc gttgggtcca 1320

ctcagtagat gcctgttgaa ttcgataccg tcgacctcga gggggggccc ggtaccagct 1380

tttgttccct ttagtgaggg ttaatttcga gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc 1440

ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt 1500

gtaaagcctg gggtgcctaa tgagtgagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc 1560

ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg 1620

ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct 1680

cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcactcaaa ggcggtaata cggttatcca 1740

cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga 1800

accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgcccccct gacgagcatc 1860

acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg 1920

cgtttccccc tggaagctcc ctcgtgcgct ctcctgttcc gaccctgccg cttaccggat 1980

acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt 2040

atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa ccccccgttc 2100

agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg 2160

acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg 2220

gtgctacaga gttcttgaag tggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg 2280

gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg 2340

gcaaacaaac caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca 2400

gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagaaga 2460

actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc gggagcggcg ataccgtaaa 2520

gcacgaggaa gcggtcagcc 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

gatgctcttc gtccagatca tcctgatcga caagaccggc ttccatccga gtacgtgctc 2820

gctcgatgcg atgtttcgct tggtggtcga atgggcaggt agccggatca agcgtatgca 2880

gccgccgcat tgcatcagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg tgagatgaca 2940

ggagatcctg ccccggcact tcgcccaata gcagccagtc ccttcccgct tcagtgacaa 3000

cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccg tcgtggccag ccacgatagc cgcgctgcct 3060

cgtcctgcag ttcattcagg gcaccggaca ggtcggtctt gacaaaaaga accgggcgcc 3120

cctgcgctga cagccggaac acggcggcat cagagcagcc gattgtctgt tgtgcccagt 3180

catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat ccatcttgtt 3240

caatcatgcg aaacgatcct catcctgtct cttgatcaga tcttgatccc ctgcgccatc 3300

agatccttgg cggcaagaaa gccatccagt ttactttgca gggcttccca accttaccag 3360

agggcgcccc agctggcaat tccggttcgc ttgctgtcca taaaaccgcc cagtctagca 3420

actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg 3480

gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtca cgac 3534

<210> 13
<211> 3534
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是 TV-GHRH 質體操縱性連接的組份的核酸序列

<400> 13

gttgtaaaac gacggccagt gaattgtaat acgactcact atagggcgaa ttggagctcc 60

accgcggtgg cggccgtccg ccctcggcac catcctcacg acacccaaat atggcgacgg 120

gtgaggaatg gtggggagtt atttttagag cggtgaggaa ggtgggcagg cagcaggtgt 180

tggcgctcta aaaataactc ccgggagtta tttttagagc ggaggaatgg tggacaccca 240

aatatggcga cggttcctca cccgtcgcca tatttgggtg tccgccctcg gccggggccg 300

cattcctggg ggccgggcgg tgctcccgcc cgcctcgata aaaggctccg gggccggcgg 360

cggcccacga gctacccgga ggagcgggag gcgccaagct ctagaactag tggatcccaa 420

ggcccaactc cccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatggtgct 480

ctgggtgttc ttctttgtga tcctcaccct cagcaacagc tcccactgct ccccacctcc 540

ccctttgacc ctcaggatgc ggcggtatgt 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 ccttgtccta ataaaattaa gttgcatcat tttgtctgac taggtgtcct 840

tctataatat tatggggtgg aggggggtgg tatggagcaa ggggcaagtt gggaagacaa 900

cctgtagggc ctgcggggtc tattgggaac caagctggag tgcagtggca caatcttggc 960

tcactgcaat ctccgcctcc tgggttcaag cgattctcct gcctcagcct cccgagttgt 1020

tgggattcca ggcatgcatg accaggctca gctaattttt gtttttttgg tagagacggg 1080

gtttcaccat attggccagg ctggtctcca actcctaatc tcaggtgatc tacccacctt 1140

ggcctcccaa attgctggga ttacaggcgt gaaccactgc tcccttccct gtccttctga 1200

ttttaaaata actataccag caggaggacg tccagacaca gcataggcta cctggccatg 1260

cccaaccggt gggacatttg agttgcttgc ttggcactgt cctctcatgc gttgggtcca 1320

ctcagtagat gcctgttgaa ttcgataccg tcgacctcga gggggggccc ggtaccagct 1380

tttgttccct ttagtgaggg ttaatttcga gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc 1440

ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt 1500

gtaaagcctg gggtgcctaa tgagtgagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc 1560

ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg 1620

ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct 1680

cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcactcaaa ggcggtaata cggttatcca 1740

cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga 1800

accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgcccccct gacgagcatc 1860

acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg 1920

cgtttccccc tggaagctcc ctcgtgcgct ctcctgttcc gaccctgccg cttaccggat 1980

acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt 2040

atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa ccccccgttc 2100

agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg 2160

acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg 2220

gtgctacaga gttcttgaag tggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg 2280

gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg 2340

gcaaacaaac caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca 2400

gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagaaga 2460

actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc gggagcggcg ataccgtaaa 2520

gcacgaggaa gcggtcagcc 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

gatgctcttc gtccagatca tcctgatcga caagaccggc ttccatccga gtacgtgctc 2820

gctcgatgcg atgtttcgct tggtggtcga atgggcaggt agccggatca agcgtatgca 2880

gccgccgcat tgcatcagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg tgagatgaca 2940

ggagatcctg ccccggcact tcgcccaata gcagccagtc ccttcccgct tcagtgacaa 3000

cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccg tcgtggccag ccacgatagc cgcgctgcct 3060

cgtcctgcag ttcattcagg gcaccggaca ggtcggtctt gacaaaaaga accgggcgcc 3120

cctgcgctga cagccggaac acggcggcat cagagcagcc gattgtctgt tgtgcccagt 3180

catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat ccatcttgtt 3240

caatcatgcg aaacgatcct catcctgtct cttgatcaga tcttgatccc ctgcgccatc 3300

agatccttgg cggcaagaaa gccatccagt ttactttgca gggcttccca accttaccag 3360

agggcgcccc agctggcaat tccggttcgc ttgctgtcca taaaaccgcc cagtctagca 3420

actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg 3480

gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtca cgac 3534

<210> 14
<211> 3534
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是 15/27/28 GHRH 質體操縱性連接的組份的核酸序列

<400> 14
gttgtaaaac gacggccagt gaattgtaat acgactcact atagggcgaa ttggagctcc 60

accgcggtgg cggccgtccg ccctcggcac catcctcacg acacccaaat atggcgacgg 120

gtgaggaatg gtggggagtt atttttagag cggtgaggaa ggtgggcagg cagcaggtgt 180

tggcgctcta aaaataactc ccgggagtta ttttagagc ggaggaatgg tggacaccca 240

aatatggcga cggttcctca cccgtcgcca tatttgggtg tccgccctcg gccggggccg 300

cattcctggg ggccgggcgg tgctcccgcc cgcctcgata aaaggctccg gggccggcgg 360

cggcccacga gctacccgga ggagcgggag gcgccaagct ctagaactag tggatcccaa 420

ggcccaactc cccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatggtgct 480

ctgggtgttc ttctttgtga tcctcaccct cagcaacagc tcccactgct ccccacctcc 540

ccctttgacc ctcaggatgc ggcggtatat cgatgccatc 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 ccttgtccta ataaaattaa gttgcatcat tttgtctgac taggtgtcct 840

tctataatat tatggggtgg aggggggtgg tatggagcaa ggggcaagtt gggaagacaa 900

cctgtagggc ctgcggggtc tattgggaac caagctggag tgcagtggca caatcttggc 960

tcactgcaat ctccgcctcc tgggttcaag cgattctcct gcctcagcct cccgagttgt 1020

tgggattcca ggcatgcatg accaggctca gctaattttt gtttttttgg tagagacggg 1080

gtttcaccat attggccagg ctggtctcca actcctaatc tcaggtgatc tacccacctt 1140

ggcctcccaa attgctggga ttacaggcgt gaaccactgc tcccttccct gtccttctga 1200

ttttaaaata actataccag caggaggacg tccagacaca gcataggcta cctggccatg 1260

cccaaccggt gggacatttg agttgcttgc ttggcactgt cctctcatgc gttgggtcca 1320

ctcagtagat gcctgttgaa ttcgataccg tcgacctcga gggggggccc ggtaccagct 1380

tttgttccct ttagtgaggg ttaatttcga gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc 1440

ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt 1500

gtaaagcctg gggtgcctaa tgagtgagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc 1560

ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg 1620

ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct 1680

cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcactcaaa ggcggtaata cggttatcca 1740

cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga 1800

accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgcccccct gacgagcatc 1860

acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg 1920

cgtttccccc tggaagctcc ctcgtgcgct ctcctgttcc gaccctgccg cttaccggat 1980

acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt 2040

atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa ccccccgttc 2100

agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg 2160

acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg 2220

gtgctacaga gttcttgaag tggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg 2280

gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg 2340

gcaaacaaac caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca 2400

gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagaaga 2460

actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc gggagcggcg ataccgtaaa 2520

gcacgaggaa gcggtcagcc 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

gatgctcttc gtccagatca tcctgatcga caagaccggc ttccatccga gtacgtgctc 2820

gctcgatgcg atgtttcgct tggtggtcga atgggcaggt agccggatca agcgtatgca 2880

gccgccgcat tgcatcagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg tgagatgaca 2940

ggagatcctg ccccggcact tcgcccaata gcagccagtc ccttcccgct tcagtgacaa 3000

cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccg tcgtggccag ccacgatagc cgcgctgcct 3060

cgtcctgcag ttcattcagg gcaccggaca ggtcggtctt gacaaaaaga accgggcgcc 3120

cctgcgctga cagccggaac acggcggcat cagagcagcc gattgtctgt tgtgcccagt 3180

catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat ccatcttgtt 3240

caatcatgcg aaacgatcct catcctgtct cttgatcaga tcttgatccc ctgcgccatc 3300

agatccttgg cggcaagaaa gccatccagt ttactttgca gggcttccca accttaccag 3360

agggcgcccc agctggcaat tccggttcgc ttgctgtcca taaaaccgcc cagtctagca 3420

actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg 3480

gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtca cgac 3534

<210> 15
<211> 3534
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是野生型 GHRH 的全長質體序列

<400> 15
gttgtaaaac gacggccagt gaattgtaat acgactcact atagggcgaa ttggagctcc 60

accgcggtgg cggccgtccg ccctcggcac catcctcacg acacccaaat atggcgacgg 120

gtgaggaatg gtggggagtt atttttagag cggtgaggaa ggtgggcagg cagcaggtgt 180

tggcgctcta aaaataactc ccgggagtta ttttagagc ggaggaatgg tggacaccca 240

aatatggcga cggttcctca cccgtcgcca tatttgggtg tccgccctcg gccggggccg 300

cattcctggg ggccgggcgg tgctcccgcc cgcctcgata aaaggctccg gggccggcgg 360

cggcccacga gctacccgga ggagcgggag gcgccaagct ctagaactag tggatcccaa 420

ggcccaactc cccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg ccatggtgct 480

ctgggtgttc ttctttgtga tcctcaccct cagcaacagc tcccactgct ccccacctcc 540

ccctttgacc ctcaggatgc ggcggtatgc agatgccatc ttcaccaaca gctaccggaa 600

ggtgctgggc cagctgtccg cccgcaagct gctccaggac atcatgagca ggcagcaggg 660

agagaggaac caagagcaag gagcataatg actgcaggaa ttcgatatca agcttatcgg 720

ggtggcatcc ctgtgacccc tccccagtgc ctctcctggc cctggaagtt gccactccag 780

tgcccaccag ccttgtccta ataaaattaa gttgcatcat tttgtctgac taggtgtcct 840

tctataatat tatggggtgg aggggggtgg tatggagcaa ggggcaagtt gggaagacaa 900

cctgtagggc ctgcggggtc tattgggaac caagctggag tgcagtggca caatcttggc 960

tcactgcaat ctccgcctcc tgggttcaag cgattctcct gcctcagcct cccgagttgt 1020

tgggattcca ggcatgcatg accaggctca gctaattttt gtttttttgg tagagacggg 1080

gtttcaccat attggccagg ctggtctcca actcctaatc tcaggtgatc tacccacctt 1140

ggcctcccaa attgctggga ttacaggcgt gaaccactgc tcccttccct gtccttctga 1200

ttttaaaata actataccag caggaggacg tccagacaca gcataggcta cctggccatg 1260

cccaaccggt gggacatttg agttgcttgc ttggcactgt cctctcatgc gttgggtcca 1320

ctcagtagat gcctgttgaa ttcgataccg tcgacctcga gggggggccc ggtaccagct 1380

tttgttccct ttagtgaggg ttaatttcga gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc 1440

ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt 1500

gtaaagcctg gggtgcctaa tgagtgagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc 1560

ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg 1620

ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct 1680

cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcactcaaa ggcggtaata cggttatcca 1740

cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga 1800

accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgcccccct gacgagcatc 1860

acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg 1920

cgtttccccc tggaagctcc ctcgtgcgct ctcctgttcc gaccctgccg cttaccggat 1980

acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt 2040

atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc 2100

agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg 2160

acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg 2220

gtgctacaga gttcttgaag tggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg 2280

gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg 2340

gcaaacaaac caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca 2400

gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagaaga 2460

actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc gggagcggcg ataccgtaaa 2520

gcacgaggaa gcggtcagcc 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

gatgctcttc gtccagatca tcctgatcga caagaccggc ttccatccga gtacgtgctc 2820

gctcgatgcg atgtttcgct tggtggtcga atgggcaggt agccggatca agcgtatgca 2880

gccgccgcat tgcatcagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg tgagatgaca 2940

ggagatcctg ccccggcact tcgcccaata gcagccagtc ccttcccgct tcagtgacaa 3000

cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccg tcgtggccag ccacgatagc cgcgctgcct 3060

cgtcctgcag ttcattcagg gcaccggaca ggtcggtctt gacaaaaaga accgggcgcc 3120

cctgcgctga cagccggaac acggcggcat cagagcagcc gattgtctgt tgtgcccagt 3180

catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat ccatcttgtt 3240

caatcatgcg aaacgatcct catcctgtct cttgatcaga tcttgatccc ctgcgccatc 3300

agatccttgg cggcaagaaa gccatccagt ttactttgca gggcttccca accttaccag 3360

agggcgcccc agctggcaat tccggttcgc ttgctgtcca taaaaccgcc cagtctagca 3420

actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg 3480

gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtca cgac 3534

<210> 16
<211> 4260
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 這是 pSP-SEAP cDNA 構建體的序列

<400> 16

ggccgtccgc cttcggcacc atcctcacga cacccaaata tggcgacggg tgaggaatgg 60

tggggagtta tttttagagc ggtgaggaag gtgggcaggc agcaggtgtt ggcgctctaa 120

aaataactcc cgggagttat ttttagagcg gaggaatggt ggacacccaa atatggcgac 180

ggttcctcac ccgtcgccat atttgggtgt ccgccctcgg ccggggccgc attcctgggg 240

gccgggcggt gctcccgccc gcctcgataa aaggctccgg ggccggcggc ggcccacgag 300

ctacccggag gagcgggagg cgccaagctc tagaactagt ggatcccccg ggctgcagga 360

attcgatatc aagcttcgaa tcgcgaattc gcccaccatg ctgctgctgc tgctgctgct 420

gggcctgagg ctacagctct ccctgggcat catcccagtt gaggaggaga acccggactt 480

ctggaaccgc gaggcagccg aggccctggg tgccgccaag aagctgcagc ctgcacagac 540

agccgccaag aacctcatca tcttcctggg cgatgggatg ggggtgtcta cggtgacagc 600

tgccaggatc ctaaaagggc agaagaagga caaactgggg cctgagatac ccctggccat 660

ggaccgcttc ccatatgtgg ctctgtccaa gacatacaat gtagacaaac atgtgccaga 720

cagtggagcc acagccacgg cctacctgtg cggggtcaag ggcaacttcc agaccattgg 780

cttgagtgca gccgcccgct ttaaccagtg caacacgaca cgcggcaacg aggtcatctc 840

cgtgatgaat cgggccaaga aagcagggaa gtcagtggga gtggtaacca ccacacgagt 900

gcagcacgcc tcgccagccg gcacctacgc ccacacggtg aaccgcaact ggtactcgga 960

cgccgacgtg cctgcctcgg cccgccagga ggggtgccag gacatcgcta cgcagctcat 1020

ctccaacatg gacattgacg tgatcctagg tggaggccga aagtacatgt ttcgcatggg 1080

aaccccagac cctgagtacc cagatgacta cagccaaggt gggaccaggc tggacgggaa 1140

gaatctggtg caggaatggc tggcgaagcg ccagggtgcc cggtatgtgt ggaaccgcac 1200

tgagctcatg caggcttccc tggacccgtc tgtgacccat ctcatgggtc tctttgagcc 1260

tggagacatg aaatacgaga tccaccgaga ctccacactg gacccctccc tgatggagat 1320

gacagaggct gccctgcgcc tgctgagcag gaaccccccgc ggcttcttcc tcttcgtgga 1380

gggtggtcgc atcgaccatg gtcatcatga aagcagggct taccgggcac tgactgagac 1440

gatcatgttc gacgacgcca ttgagagggc gggccagctc accagcgagg aggacacgct 1500

gagcctcgtc actgccgacc actcccacgt cttctccttc ggaggctacc ccctgcgagg 1560

gagctccatc ttcgggctgg cccctggcaa ggcccgggac aggaaggcct acacggtcct 1620

cctatacgga aacggtccag gctatgtgct caaggacggc gcccggccgg atgttaccga 1680

gagcgagagc gggagccccg agtatcggca gcagtcagca gtgccccctgg acgaagagac 1740

ccacgcaggc gaggacgtgg cggtgttcgc gcgcggcccg caggcgcacc tggttcacgg 1800

cgtgcaggag cagaccttca tagcgcacgt catggccttc gccgcctgcc tggagcccta 1860

caccgcctgc gacctggcgc cccccgccgg caccaccgac gccgcgcacc cgggttactc 1920

tagagtcggg gcggccggcc gcttcgagca gacatgataa gatacattga tgagtttgga 1980

caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaa tgctttattt gtgaaatttg tgatgctatt 2040

gctttatttg taaccattat aagctgcaat aaacaagtta acaacaacaa ttgcattcat 2100

tttatgtttc aggttcaggg ggaggtgtgg gaggtttttt aaagcaagta aaacctctac 2160

aaatgtggta aaatcgataa ggatccgtcg accgatgccc ttgagagcct tcaacccagt 2220

cagctccttc cggtgggcgc ggggcatgac tatcgtcgcc gcacttatga ctgtcttctt 2280

tatcatgcaa ctcgtaggac aggtgccggc agcgctcttc cgcttcctcg ctcactgact 2340

cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac 2400

ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa 2460

aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgtttt ccataggctc cgccccctg 2520

acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa 2580

gataccaggc gtttcccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc 2640

ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac 2700

gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac 2760

ccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag tccaacccgg 2820

taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt 2880

atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga 2940

cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct 3000

cttgatccgg caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga 3060

ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat ctttictacg gggtctgacg 3120

ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct 3180

tcacctagat ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt 3240

aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc 3300

tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg 3360

gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag 3420

atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggt cctgcaactt 3480

tatccgcctc catccagtct attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag 3540

ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt 3600

ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca 3660

tgttgtgcaa aaaagcggtt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg 3720

ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat 3780

ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgta 3840

tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca 3900

gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct 3960

taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat 4020

cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa 4080

agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt caatattatt 4140

gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa 4200

ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gcgccctgta 4260

<210> 17
<211> 2710
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 這是帶有生長激素釋放激素("GHRH")序列類似物小鼠優化密碼子的質體載體

<400> 17

tgtaatacga ctcactatag ggcgaattgg agctccaccg cggtggcggc cgtccgccct 60

cggcaccatc ctcacgacac ccaaatatgg cgacgggtga ggaatggtgg ggagttattt 120

ttagagcggt gaggaaggtg ggcaggcagc aggtgttggc gctctaaaaa taactcccgg 180

gagttatttt tagagcggag gaatggtgga cacccaaata tggcgacggt tcctcacccg 240

tcgccatatt tgggtgtccg ccctcggccg gggccgcatt cctgggggcc gggcggtgct 300

cccgcccgcc tcgataaaag gctccggggc cggcggcggc ccacgagcta cccggaggag 360

cgggaggcgc caagcggatc ccaaggccca actccccgaa ccactcaggg tcctgtggac 420

agctcaccta gctgccatgg tgctctgggt gctctttgtg atcctcatcc tcaccagcgg 480

cagccactgc agcctgcctc ccagccctcc cttcaggatg cagaggcacg tggacgccat 540

cttcaccacc aactacagga agctgctgag ccagctgtac gccaggaagg tgatccagga 600

catcatgaac aagcagggcg agaggatcca ggagcagagg gccaggctga gctgataagc 660

ttatcggggt ggcatccctg tgacccctcc ccagtgcctc tcctggccct ggaagttgcc 720

actccagtgc ccaccagcct tgtcctaata aaattaagtt gcatcatttt gtctgactag 780

gtgtccttct ataatattat ggggtggagg ggggtggtat ggagcaaggg gcaagttggg 840

aagacaacct gtagggctcg agggggggcc cggtaccagc ttttgttccc tttagtgagg 900

gttaatttcg agcttggtct tccgcttcct cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc 960

ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag 1020

gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa 1080

aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc 1140

gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc 1200

ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg 1260

cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt 1320

cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccccgtt cagcccgacc 1380

gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc 1440

cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag 1500

agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag aacagtattt ggtatctgcg 1560

ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa 1620

ccaccgctgg tagcggtggt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag 1680

gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggctagc gcttagaaga actcatccag 1740

cagacggtag aatgcaatac gttgagagtc tggagctgca ataccataca gaaccaggaa 1800

acggtcagcc cattcaccac ccagttcctc tgcaatgtca cgggtagcca gtgcaatgtc 1860

ctggtaacgg tctgcaacac ccagacgacc acagtcaatg aaaccagaga aacgaccatt 1920

ctcaaccatg atgttcggca ggcatgcatc accatgagta actaccaggt cctcaccatc 1980

cggcatacga gctttcagac gtgcaaacag ttcagccggt gccagaccct gatgttcctc 2040

atccaggtca tcctggtcaa ccagacctgc ttccatacgg gtacgagcac gttcaatacg 2100

atgttttgcc tggtggtcaa acggacaggt agctgggtcc agggtgtgca gacgacgcat 2160

tgcatcagcc atgatagaaa ctttctctgc cggagccagg tgagaagaca gcaggtcctg 2220

acccggaact tcacccagca gcagccagtc acgaccagct tcagtaacta catccagaac 2280

tgcagcacac ggaacaccag tggttgccag ccaagacaga cgagctgctt catcctgcag 2340

ttcattcaga gcaccagaca ggtcagtttt aacaaacaga actggacgac cctgtgcaga 2400

cagacggaaa acagctgcat cagagcaacc aatggtctgc tgtgcccagt cataaccaaa 2460

cagacgttca acccaggctg ccggagaacc tgcatgcaga ccatcctgtt caatcatgcg 2520

aaacgatcct catcctgtct cttgatcaga tcttgatccc ctgcgccatc agatccttgg 2580

cggcaagaaa gccatccagt ttactttgca gggcttccca accttaccag agggcgcccc 2640

agctggcaat tccggttcgc ttgctgtcca taaaaccgcc cagtctagca actgttggga 2700

agggcgatcg 2710

<210> 18
<211> 2713
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是帶有生長激素釋放激素("GHRH")序列類似物大鼠優化密碼子的質體載體

<400> 18
tgtaatacga ctcactatag ggcgaattgg agctccaccg cggtggcggc cgtccgccct 60

cggcaccatc ctcacgacac ccaaatatgg cgacgggtga ggaatggtgg ggagttattt 120

ttagagcggt gaggaaggtg ggcaggcagc aggtgttggc gctctaaaaa taactcccgg 180

gagttatttt tagagcggag gaatggtgga cacccaaata tggcgacggt tcctcacccg 240

tcgccatatt tgggtgtccg ccctcggccg gggccgcatt cctgggggcc gggcggtgct 300

cccgcccgcc tcgataaaag gctccggggc cggcggcggc ccacgagcta cccggaggag 360

cgggaggcgc caagcggatc ccaaggccca actccccgaa ccactcaggg tcctgtggac 420

agctcaccta gctgccatgg ccctgtgggt gttcttcgtg ctgctgaccc tgaccagcgg 480

aagccactgc agcctgcctc ccagccctcc cttcagggtg cgccggcacg ccgacgccat 540

cttcaccagc agctacagga ggatcctggg ccagctgtac gctaggaagc tcctgcacga 600

gatcatgaac aggcagcagg gcgagaggaa ccaggagcag aggagcaggt tcaactgata 660

agcttatcgg ggtggcatcc ctgtgacccc tccccagtgc ctctcctggc cctggaagtt 720

gccactccag tgcccaccag ccttgtccta ataaaattaa gttgcatcat tttgtctgac 780

taggtgtcct tctataatat tatggggtgg aggggggtgg tatggagcaa ggggcaagtt 840

gggaagacaa cctgtagggc tcgaggggggg gcccggtacc agcttttgtt ccctttagtg 900

agggttaatt tcgagcttgg tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg 960

ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat 1020

caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta 1080

aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa 1140

atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc 1200

cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt 1260

ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca 1320

gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaacccccc gttcagcccg 1380

accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat 1440

cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta 1500

cagagttctt gaagtggtgg cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct 1560

gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 1620

aaaccaccgc tggtagcggt ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 1680

aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggct agcgcttaga agaactcatc 1740

cagcagacgg tagaatgcaa tacgttgaga gtctggagct gcaataccat acagaaccag 1800

gaaacggtca gcccattcac cacccagttc ctctgcaatg tcacgggtag ccagtgcaat 1860

gtcctggtaa cggtctgcaa cacccagacg accacagtca atgaaaccag agaaacgacc 1920

attctcaacc atgatgttcg gcaggcatgc atcaccatga gtaactacca ggtcctcacc 1980

atccggcata cgagctttca gacgtgcaaa cagttcagcc ggtgccagac cctgatgttc 2040

ctcatccagg tcatcctggt caaccagacc tgcttccata cgggtacgag cacgttcaat 2100

acgatgtttt gcctggtggt caaacggaca ggtagctggg tccagggtgt gcagacgacg 2160

cattgcatca gccatgatag aaactttctc tgccggagcc aggtgagaag acagcaggtc 2220

ctgacccgga acttcaccca gcagcagcca gtcacgacca gcttcagtaa ctacatccag 2280

aactgcagca cacggaacac cagtggttgc cagccaagac agacgagctg cttcatcctg 2340

cagttcattc agagcaccag acaggtcagt tttaacaaac agaactggac gaccctgtgc 2400

agacagacgg aaaacagctg catcagagca accaatggtc tgctgtgccc agtcataacc 2460

aaacagacgt tcaacccagg ctgccggaga acctgcatgc agaccatcct gttcaatcat 2520

gcgaaacgat cctcatcctg tctcttgatc agatcttgat cccctgcgcc atcagatcct 2580

tggcggcaag aaagccatcc agtttacttt gcagggcttc ccaaccttac cagagggcgc 2640

cccagctggc aattccggtt cgcttgctgt ccataaaacc gcccagtcta gcaactgttg 2700

ggaagggcga tcg 2713

<210> 19
<211> 2704
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是帶有生長激素釋放激素("GHRH")序列類似物牛優化密碼子的質體載體

<400> 19
tgtaatacga ctcactatag ggcgaattgg agctccaccg cggtggcggc cgtccgccct 60

cggcaccatc ctcacgacac ccaaatatgg cgacgggtga ggaatggtgg ggagttattt 120

ttagagcggt gaggaaggtg ggcaggcagc aggtgttggc gctctaaaaa taactcccgg 180

gagttatttt tagagcggag gaatggtgga cacccaaata tggcgacggt tcctcacccg 240

tcgccatatt tgggtgtccg ccctcggccg gggccgcatt cctgggggcc gggcggtgct 300

cccgcccgcc tcgataaaag gctccggggc cggcggcggc ccacgagcta cccggaggag 360

cgggaggcgc caagcggatc ccaaggccca actccccgaa ccactcaggg tcctgtggac 420

agctcaccta gctgccatgg tgctgtgggt gttcttcctg gtgaccctga ccctgagcag 480

cggctcccac ggctccctgc cctcccagcc tctgcgcatc cctcgctacg ccgacgccat 540

cttcaccaac agctaccgca aggtgctcgg ccagctcagc gcccgcaagc tcctgcagga 600

catcatgaac cggcagcagg gcgagcgcaa ccaggagcag ggagcctgat aagcttatcg 660

gggtggcatc cctgtgaccc ctccccagtg cctctcctgg ccctggaagt tgccactcca 720

gtgcccacca gccttgtcct aataaaatta agttgcatca ttttgtctga ctaggtgtcc 780

ttctataata ttatggggtg gaggggggtg gtatggagca aggggcaagt tgggaagaca 840

acctgtaggg ctcgaggggg ggcccggtac cagcttttgt tccctttagt gagggttaat 900

ttcgagcttg gtcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc 960

ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata 1020

acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 1080

cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 1140

caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa 1200

gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc 1260

tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt 1320

aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 1380

ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta tcgccactgg 1440

cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct 1500

tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc 1560

tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 1620

ctggtagcgg tggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 1680

aagaagatcc tttgatcttt tctacggggc tagcgcttag aagaactcat ccagcagacg 1740

gtagaatgca atacgttgag agtctggagc tgcaatacca tacagaacca ggaaacggtc 1800

agcccattca ccacccagtt cctctgcaat gtcacgggta gccagtgcaa tgtcctggta 1860

acggtctgca acacccagac gaccacagtc aatgaaacca gagaaacgac cattctcaac 1920

catgatgttc ggcaggcatg catcaccatg agtaactacc aggtcctcac catccggcat 1980

acgagctttc agacgtgcaa acagttcagc cggtgccaga ccctgatgtt cctcatccag 2040

gtcatcctgg tcaaccagac ctgcttccat acgggtacga gcacgttcaa tacgatgttt 2100

tgcctggtgg tcaaacggac aggtagctgg gtccagggtg tgcagacgac gcattgcatc 2160

agccatgata gaaactttct ctgccggagc caggtgagaa gacagcaggt cctgacccgg 2220

aacttcaccc agcagcagcc agtcacgacc agcttcagta actacatcca gaactgcagc 2280

acacggaaca ccagtggttg ccagccaaga cagacgagct gcttcatcct gcagttcatt 2340

cagagcacca gacaggtcag ttttaacaaa cagaactgga cgaccctgtg cagacagacg 2400

gaaaacagct gcatcagagc aaccaatggt ctgctgtgcc cagtcataac caaacagacg 2460

ttcaacccag gctgccggag aacctgcatg cagaccatcc tgttcaatca tgcgaaacga 2520

tcctcatcct gtctcttgat cagatcttga tcccctgcgc catcagatcc ttggcggcaa 2580

gaaagccatc cagtttactt tgcagggctt cccaacctta ccagagggcg ccccagctgg 2640

caattccggt tcgcttgctg tccataaaac cgcccagtct agcaactgtt gggaagggcg 2700

atcg 2704

<210> 20

<211> 2704
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是帶有生長激素釋放激素("GHRH")序列?似物綿羊優化密碼子的質體載體

<400> 20
tgtaatacga ctcactatag ggcgaattgg agctccaccg cggtggcggc cgtccgccct 60

cggcaccatc ctcacgacac ccaaatatgg cgacgggtga ggaatggtgg ggagttattt 120

ttagagcggt gaggaaggtg ggcaggcagc aggtgttggc gctctaaaaa taactcccgg 180

gagttatttt tagagcggag gaatggtgga cacccaaata tggcgacggt tcctcacccg 240

tcgccatatt tgggtgtccg ccctcggccg gggccgcatt cctgggggcc gggcggtgct 300

cccgcccgcc tcgataaaag gctccggggc cggcggcggc ccacgagcta cccggaggag 360

cgggaggcgc caagcggatc ccaaggccca actccccgaa ccactcaggg tcctgtggac 420

agctcaccta gctgccatgg tgctgtgggt gttcttcctg gtgaccctga ccctgagcag 480

cggaagccac ggcagcctgc ccagccagcc cctgaggatc cctaggtacg ccgacgccat 540

cttcaccaac agctacagga agatcctggg ccagctgagc gctaggaagc tcctgcagga 600

catcatgaac aggcagcagg gcgagaggaa ccaggagcag ggcgcctgat aagcttatcg 660

gggtggcatc cctgtgaccc ctccccagtg cctctcctgg ccctggaagt tgccactcca 720

gtgcccacca gccttgtcct aataaaatta agttgcatca ttttgtctga ctaggtgtcc 780

ttctataata ttatggggtg gaggggggtg gtatggagca aggggcaagt tgggaagaca 840

acctgtaggg ctcgaggggg ggcccggtac cagcttttgt tcccttagt gagggttaat 900

ttcgagcttg gtcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc 960

ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata 1020

acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 1080

cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 1140

caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa 1200

gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc 1260

tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt 1320

aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 1380

ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta tcgccactgg 1440

cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct 1500

tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc 1560

tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 1620

ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 1680

aagaagatcc tttgatcttt tctacggggc tagcgcttag aagaactcat ccagcagacg 1740

gtagaatgca atacgttgag agtctggagc tgcaatacca tacagaacca ggaaacggtc 1800

agcccattca ccacccagtt cctctgcaat gtcacgggta gccagtgcaa tgtcctggta 1860

acggtctgca acacccagac gaccacagtc aatgaaacca gagaaacgac cattctcaac 1920

catgatgttc ggcaggcatg catcaccatg agtaactacc aggtcctcac catccggcat 1980

acgagctttc agacgtgcaa acagttcagc cggtgccaga ccctgatgtt cctcatccag 2040

gtcatcctgg tcaaccagac ctgcttccat acgggtacga gcacgttcaa tacgatgttt 2100

tgcctggtgg tcaaacggac aggtagctgg gtccagggtg tgcagacgac gcattgcatc 2160

agccatgata gaaactttct ctgccggagc caggtgagaa gacagcaggt cctgacccgg 2220

aacttcaccc agcagcagcc agtcacgacc agcttcagta actacatcca gaactgcagc 2280

acacggaaca ccagtggttg ccagccaaga cagacgagct gcttcatcct gcagttcatt 2340

cagagcacca gacaggtcag ttttaacaaa cagaactgga cgaccctgtg cagacagacg 2400

gaaaacagct gcatcagagc aaccaatggt ctgctgtgcc cagtcataac caaacagacg 2460

ttcaacccag gctgccggag aacctgcatg cagaccatcc tgttcaatca tgcgaaacga 2520

tcctcatcct gtctcttgat cagatcttga tcccctgcgc catcagatcc ttggcggcaa 2580

gaaagccatc cagtttactt tgcagggctt cccaacctta ccagagggcg ccccagctgg 2640

caattccggt tcgcttgctg tccataaaac cgcccagtct agcaactgtt gggaagggcg 2700

atcg 2704

<210> 21
<211> 2713
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是帶有生長激素釋放激素("GHRH")序列類似物?優化密碼子的質體載體

<400> 21
tgtaatacga ctcactatag ggcgaattgg agctccaccg cggtggcggc cgtccgccct 60

cggcaccatc ctcacgacac ccaaatatgg cgacgggtga ggaatggtgg ggagttattt 120

ttagagcggt gaggaaggtg ggcaggcagc aggtgttggc gctctaaaaa taactcccgg 180

gagttatttt tagagcggag gaatggtgga cacccaaata tggcgacggt tcctcacccg 240

tcgccatatt tgggtgtccg ccctcggccg gggccgcatt cctgggggcc gggcggtgct 300

cccgcccgcc tcgataaaag gctccggggc cggcggcggc ccacgagcta cccggaggag 360

cgggaggcgc caagcggatc ccaaggccca actccccgaa ccactcaggg tcctgtggac 420

agctcaccta gctgccatgg ccctgtgggt gttctttgtg ctgctgaccc tgacctccgg 480

aagccactgc agcctgccac ccagcccacc cttccgcgtc aggcgccacg ccgacggcat 540

cttcagcaag gcctaccgca agctcctggg ccagctgagc gcacgcaact acctgcacag 600

cctgatggcc aagcgcgtgg gcagcggact gggagacgag gccgagcccc tgagctgata 660

agcttatcgg ggtggcatcc ctgtgacccc tccccagtgc ctctcctggc cctggaagtt 720

gccactccag tgcccaccag ccttgtccta ataaaattaa gttgcatcat tttgtctgac 780

taggtgtcct tctataatat tatggggtgg aggggggtgg tatggagcaa ggggcaagtt 840

gggaagacaa cctgtagggc tcgaggggggg gcccggtacc agcttttgtt ccctttagtg 900

agggttaatt tcgagcttgg tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg 960

ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat 1020

caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta 1080

aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa 1140

atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc 1200

cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt 1260

ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca 1320

gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaacccccc gttcagcccg 1380

accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat 1440

cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta 1500

cagagttctt gaagtggtgg cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct 1560

gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 1620

aaaccaccgc tggtagcggt ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 1680

aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggct agcgcttaga agaactcatc 1740

cagcagacgg tagaatgcaa tacgttgaga gtctggagct gcaataccat acagaaccag 1800

gaaacggtca gcccattcac cacccagttc ctctgcaatg tcacgggtag ccagtgcaat 1860

gtcctggtaa cggtctgcaa cacccagacg accacagtca atgaaaccag agaaacgacc 1920

attctcaacc atgatgttcg gcaggcatgc atcaccatga gtaactacca ggtcctcacc 1980

atccggcata cgagctttca gacgtgcaaa cagttcagcc ggtgccagac cctgatgttc 2040

ctcatccagg tcatcctggt caaccagacc tgcttccata cgggtacgag cacgttcaat 2100

acgatgtttt gcctggtggt caaacggaca ggtagctggg tccagggtgt gcagacgacg 2160

cattgcatca gccatgatag aaactttctc tgccggagcc aggtgagaag acagcaggtc 2220

ctgacccgga acttcaccca gcagcagcca gtcacgacca gcttcagtaa ctacatccag 2280

aactgcagca cacggaacac cagtggttgc cagccaagac agacgagctg cttcatcctg 2340

cagttcattc agagcaccag acaggtcagt tttaacaaac agaactggac gaccctgtgc 2400

agacagacgg aaaacagctg catcagagca accaatggtc tgctgtgccc agtcataacc 2460

aaacagacgt tcaacccagg ctgccggaga acctgcatgc agaccatcct gttcaatcat 2520

gcgaaacgat cctcatcctg tctcttgatc agatcttgat cccctgcgcc atcagatcct 2580

tggcggcaag aaagccatcc agtttacttt gcagggcttc ccaaccttac cagagggcgc 2640

cccagctggc aattccggtt cgcttgctgt ccataaaacc gcccagtcta gcaactgttg 2700

ggaagggcga tcg 2713

<210> 22
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是人生長激素("hGH")5'未翻譯區("5' UTR)的核酸序列

<400> 22
caaggcccaa ctccccgaac cactcagggt cctgtggaca gctcacctag ctgcc 55

<210> 23
<211> 782
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是質體 pUC-18 復制起始區的核酸序列

<400> 23
tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta 60

tcagctcact caaaggcggt aatacggtta 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 gttcggtgta ggtcgttcgc 420

tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt 480

aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact 540

ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtgg 600

cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 660

accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggt 720

ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 780

tt 782

<210> 24
<211> 5
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是 NEO 核糖體結合位點

<400> 24
tcctc 5

<210> 25

<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 這是原核生物 PNEO 啓動子的核酸序列

<400> 25
accttaccag agggcgcccc agctggcaa 29

肆、中文發明摘要

本發明涉及質體媒介補充的組合物和方法。組合物和方法可用於延遲腫瘤生長；延遲惡液質，消瘦，貧血及其它通常與患癌症的動物相關的作用。總的說來，本發明具體可如下實施：將有效量的編碼 GHRH 或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送到活體組織中，並使編碼的基因表達。例如，當這種核酸序列被運送到活體組織特異性的特定細胞中時，能夠獲得組成型表達。而且，GHRH 或其功能性生物學等同物基因的外部調節可通過由分子開關分子調節的誘導型啓動子而實現，其中分子開關分子被施用給活體。

伍、英文發明摘要

The present invention pertains to compositions and methods for plasmid-mediated supplementation. The compositions and method are useful for retarding the growth of the tumor, and retarding cachexia, wasting, anemia and other effects that are commonly associated in cancer bearing animals. Overall, the embodiments of the invention can be accomplished by delivering an effective amount of a nucleic acid expression construct that encodes a GHRH or functional biological equivalent thereof into a tissue of an animal and allowing expression of the encoded gene in the animal. For example, when such a nucleic acid sequence is delivered into the specific cells of the animal tissue specific constitutive expression is achieved. Furthermore, external regulation of the GHRH or functional biological equivalent thereof gene can be accomplished by utilizing inducible promoters that are regulated by molecular switch molecules, which are given to the animal.

申請專利範圍

1. 一種治療活體貧血症的方法，包括：將有效量的編碼生長激素釋放激素(“GHRH”)或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送到活體細胞內。
2. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中將核酸表達構建體運送到活體細胞的方法包括電穿孔。
3. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中活體細胞是體細胞，或幹細胞。
4. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中核酸表達構建體包含 SeqID# 11, SeqID# 12, SeqID# 13, SeqID# 14, SeqID# 17, SeqID# 18, SeqID# 19, SeqID# 20, 或 SeqID# 21。
5. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中核酸表達構建體進一步包含一種轉染-促進多肽。
6. 如申請專利範圍第 5 項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。
7. 如申請專利範圍第 5 項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。
8. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中運送核酸表達構建

體到活體細胞能夠起始編碼的GHRH或其功能性生物學等同物表達。

9. 如申請專利範圍第 8 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是在活體組織特異性細胞中表達。

10. 如申請專利範圍第 9 項的方法，其中活體組織特異性細胞包括肌細胞。

11. 如申請專利範圍第 8 項的方法，其中編碼的 GHRH 是生物活性多肽，而編碼的 GHRH 功能性生物學等同物是被基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

12. 如申請專利範圍第 8 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID # 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸(“Y”)，或織胺酸(“H”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸(“A”)，纈胺酸(“V”)，或異白胺酸(“I”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸(“A”)或甘胺酸(“G”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4 是甲硫胺酸(“M”)或白胺酸(“L”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5 是絲胺酸(“S”)或天冬醯胺酸(“N”)的 D-或 L-異構體

胺基酸；

或其組合。

13. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中核酸表達構建體編碼含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的多肽序列。

14. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素("GH")的分泌。

15. 一種治療活體貧血症的方法，包括：

（a） 將有效量的第一核酸表達構建體和有效量的第二核酸表達構建體運送到活體細胞內；其中第一核酸表達構建體編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物；其中第二核酸表達構建體具有調節蛋白的編碼區域；以及

（b） 將分子開關分子運送到活體體內，其中該分子開關分子負責調節蛋白的啓動。

16. 如申請專利範圍第 15 項的方法，其中第一核酸表達構建體到活體細胞的運送方法包括電穿孔。

17. 如申請專利範圍第 15 項的方法，其中第二核酸表達構建體到活體細胞的運送方法包括電穿孔。

18. 如申請專利範圍第 15 項的方法，其中第一核酸表達構建體編碼含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的多肽序列。

19. 如申請專利範圍第 15 項的方法，其中第一核酸表達構

建體進一步含有一種轉染-促進多肽。

20. 如申請專利範圍第 19 項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。

21. 如申請專利範圍第 19 項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

22. 如申請專利範圍第 15 項的方法，其中運送第二核酸表達構建體到活體細胞能夠起始編碼的調節蛋白表達。

23. 如申請專利範圍第 22 項的方法，其中編碼的調節蛋白是在活體細胞中表達，但是無活性。

24. 如申請專利範圍第 23 項的方法，其中運送分子開關到活體細胞可啓動調節蛋白，並且該分子開關包含米非司酮(mifepristone)或其功能性等同物。

25. 如申請專利範圍第 24 項的方法，其中活性調節蛋白能起始第一核酸序列所編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物表達。

26. 如申請專利範圍第 25 項的方法，其中編碼的 GHRH 是生物活性多肽，而編碼的 GHRH 功能性生物學等同物是被基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

27. 如申請專利範圍第 25 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID # 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸(“Y”)，或織胺酸(“H”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸(“A”)，纈胺酸(“V”)，或異白胺酸(“I”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸(“A”)或甘胺酸(“G”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4 是甲硫胺酸(“M”)或白胺酸(“L”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5 是絲胺酸(“S”)或天冬醯胺酸(“N”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

28. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素(“GH”)的分泌。

29. 如申請專利範圍第 15 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素(“GH”)的分泌。

30. 一種治療活體貧血症的方法，包括：將重組生長激素釋放激素(“GHRH”)或其生物學功能性等同物運送到活體體內。

31. 如申請專利範圍第 30 項的方法，其中重組 GHRH 是生物活性多肽，而重組的 GHRH 功能性生物學等同物是被遺傳操作而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

32. 如申請專利範圍第 30 項的方法，其中重組的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID# 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸("Y")，或織胺酸("H")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸("A")，纈胺酸("V")，或異白胺酸("I")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸("A")或甘胺酸("G")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4 是甲硫胺酸("M")或白胺酸("L")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5 是絲胺酸("S")或天冬醯胺酸("N")的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

33. 如申請專利範圍第 30 項的方法，其中重組的 GHRH 或其功能性生物學等同物是含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的通式。

34. 如申請專利範圍第 30 項的方法，其中重組的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素("GH")的分泌。

35. 一種提高活體紅細胞總量的方法，包括：將有效量的編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同

物的核酸表達構建體運送到活體細胞內。

36. 如申請專利範圍第 35 項的方法，其中核酸表達構建體到活體細胞的運送方法包括電穿孔。

37. 如申請專利範圍第 35 項的方法，其中活體細胞是體細胞，或幹細胞。

38. 如申請專利範圍第 35 項的方法，其中核酸表達構建體包含 SeqID# 11, SeqID# 12, SeqID# 13, SeqID# 14, SeqID# 17, SeqID# 18, SeqID# 19, SeqID# 20, 或 SeqID# 21。

39. 如申請專利範圍第 35 項的方法，其中核酸表達構建體進一步包含一種轉染-促進多肽。

40. 如申請專利範圍第 39 項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。

41. 如申請專利範圍第 39 項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

42. 如申請專利範圍第 35 項的方法，其中運送核酸表達構建體到活體細胞能夠起始編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物表達。

43. 如申請專利範圍第 42 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是在活體組織特異性細胞中表達。

44. 如申請專利範圍第 43 項的方法，其中活體組織特異性細胞包括肌細胞。

45. 如申請專利範圍第 42 項的方法，其中編碼的 GHRH 是

生物活性多肽，而編碼的 GHRH 功能性生物學等同物是被遺傳操作而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

46. 如申請專利範圍第 42 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID# 6)：

-X_1-X_2-DAIFTNSYRKVL-**X_3-**QLSARKLLQDI-**X_4-X_5-**RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸(“Y”)，或織胺酸(“H”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸(“A”)，纈胺酸(“V”)，或異白胺酸(“I”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸(“A”)或甘胺酸(“G”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4 是甲硫胺酸(“M”)或白胺酸(“L”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5 是絲胺酸(“S”)或天冬醯胺酸(“N”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

47. 如申請專利範圍第 35 項的方法，其中核酸表達構建體編碼含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的多肽序列。

48. 如申請專利範圍第 35 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素

("GH")的分泌。

49. 一種提高活體體內紅細胞總量的方法，包括：

（a） 將有效量的第一核酸表達構建體和有效量的第二核酸表達構建體運送到活體細胞內；其中第一核酸表達構建體編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物；其中第二核酸表達構建體具有調節蛋白的編碼區域；以及

（b） 將分子開關分子運送到活體體內，其中該分子開關分子負責調節蛋白的啓動。

50. 如申請專利範圍第 49 項的方法，其中第一核酸表達構建體到活體細胞的運送包括電穿孔。

51. 如申請專利範圍第 49 項的方法，其中第二核酸表達構建體到活體細胞的運送方法包括電穿孔。

52. 如申請專利範圍第 49 項的方法，其中第一核酸表達構建體編碼含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的多肽序列。

53. 如申請專利範圍第 49 項的方法，其中第一核酸表達構建體進一步含有一種轉染-促進多肽。

54. 如申請專利範圍第 53 項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。

55. 如申請專利範圍第 53 項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

56. 如申請專利範圍第 49 項的方法，其中運送第二核酸表達構建體到活體細胞能夠起始編碼的調節蛋白表達。

57. 如申請專利範圍第 56 項的方法，其中編碼的調節蛋白是在活體細胞中表達，但是無活性。

58. 如申請專利範圍第 57 項的方法，其中運送分子開關到活體細胞可啓動調節蛋白，並且該分子開關包含米非司酮或其功能性等同物。

59. 如申請專利範圍第 58 項的方法，其中活性調節蛋白能起始第一核酸序列所編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物表達。

60. 如申請專利範圍第 49 項的方法，其中編碼的 GHRH 是生物活性多肽，而編碼的 GHRH 功能性生物學等同物是被基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

61. 如申請專利範圍第 49 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID # 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸(“Y”)，或織胺酸(“H”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸(“A”)，纈胺酸(“V”)，或異白胺酸(“I”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸(“A”)或甘胺酸(“G”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4 是甲硫胺酸(“M”)或白胺酸(“L”)的 D-或 L-異構體胺

基酸；

X_5是絲胺酸(“S”)或天冬醯胺酸(“N”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

62. 如申請專利範圍第 61 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素(“GH”)的分泌。

63. 如申請專利範圍第 49 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素(“GH”)的分泌。

64. 一種提高活體體內紅細胞總量的方法，包括：將重組生長激素釋放激素(“GHRH”)或其生物學功能性等同物運送到活體體內。

65. 如申請專利範圍第 64 項的方法，其中重組 GHRH 是生物活性多肽，而重組的 GHRH 功能性生物學等同物是被基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

66. 如申請專利範圍第 64 項的方法，其中重組的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID# 6)：

-X_1-X_2-DAIFTNSYRKVL-**X_3-**QLSARKLLQDI-**X_4-X_5-**RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1是酪胺酸(“Y”)，或織胺酸(“H”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2是丙胺酸("A")，纈胺酸("V")，或異白胺酸("I")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3是丙胺酸("A")或甘胺酸("G")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4是甲硫胺酸("M")或白胺酸("L")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5是絲胺酸("S")或天冬醯胺酸("N")的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

67. 如申請專利範圍第 64 項的方法，其中重組的 GHRH 或其功能性生物學等同物是含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的通式。

68. 如申請專利範圍第 64 項的方法，其中重組的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素("GH")的分泌。

69. 一種逆轉活體消瘦的方法，包括：將有效量的編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送到活體細胞內。

70. 如申請專利範圍第 69 項的方法，其中將核酸表達構建體運送到活體細胞的方法包括電穿孔。

71. 如申請專利範圍第 69 項的方法，其中活體細胞是體細胞，或幹細胞。

72. 如申請專利範圍第 69 項的方法，其中核酸表達構建體包含 SeqID# 11, SeqID# 12, SeqID# 13, SeqID# 14,

SeqID# 17, SeqID# 18, SeqID# 19, SeqID# 20, 或 SeqID# 21。

73. 如申請專利範圍第 69 項的方法，其中核酸表達構建體進一步包含一種轉染-促進多肽。

74. 如申請專利範圍第 73 項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。

75. 如申請專利範圍第 73 項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

76. 如申請專利範圍第 69 項的方法，其中運送核酸表達構建體到活體細胞能夠起始編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物表達。

77. 如申請專利範圍第 76 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是在活體組織特異性細胞中表達。

78. 如申請專利範圍第 77 項的方法，其中活體組織特異性細胞包括肌細胞。

79. 如申請專利範圍第 76 項的方法，其中編碼的 GHRH 是生物活性多肽，而編碼的 GHRH 功能性生物學等同物是被基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

80. 如申請專利範圍第 76 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID# 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1是酪胺酸(“Y”)，或織胺酸(“H”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2是丙胺酸(“A”)，纈胺酸(“V”)，或異白胺酸(“I”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3是丙胺酸(“A”)或甘胺酸(“G”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4是甲硫胺酸(“M”)或白胺酸(“L”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5是絲胺酸(“S”)或天冬醯胺酸(“N”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

81. 如申請專利範圍第 69 項的方法，其中核酸表達構建體編碼含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的多肽序列。

82. 如申請專利範圍第 69 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素(“GH”)的分泌。

83. 一種逆轉活體消瘦的方法，包括：

（a） 將有效量的第一核酸表達構建體和有效量的第二核酸表達構建體運送到活體細胞內；其中第一核酸表達構建體編碼生長激素釋放激素(“GHRH”)或其功能性生物學等同物；其中第二核酸表達構建體具有調節蛋白的編碼區域；以及

（b） 將分子開關分子運送到活體體內，其中該分子開關分子負責調節蛋白的啓動。

84. 如申請專利範圍第 83 項的方法，其中第一核酸表達構建體到活體細胞的運送包括電穿孔。

85. 如申請專利範圍第 83 項的方法，其中第二核酸表達構建體運送到活體細胞的方法包括電穿孔。

86. 如申請專利範圍第 83 項的方法，其中第一核酸表達構建體編碼含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的多肽序列。

87. 如申請專利範圍第 83 項的方法，其中第一核酸表達構建體進一步含有一種轉染-促進多肽。

88. 如申請專利範圍第 87 項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。

89. 如申請專利範圍第 87 項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

90. 如申請專利範圍第 83 項的方法，其中運送第二核酸表達構建體到活體細胞能夠起始編碼的調節蛋白表達。

91. 如申請專利範圍第 90 項的方法，其中編碼的調節蛋白是在活體細胞中表達，但是無活性。

92. 如申請專利範圍第 91 項的方法，其中運送分子開關到活體細胞可啓動調節蛋白，並且該分子開關包含米非司酮(mifepristone)或其功能性等同物。

93. 如申請專利範圍第 92 項的方法，其中活性調節蛋白能起始第一核酸序列所編碼的 GHRH 或其功能性生物學等

同物表達。

94. 如申請專利範圍第 93 項的方法，其中編碼的 GHRH 是生物活性多肽，而編碼的 GHRH 功能性生物學等同物是被基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

95. 如申請專利範圍第 93 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID # 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸("Y")，或織胺酸("H")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸("A")，纈胺酸("V")，或異白胺酸("I")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸("A")或甘胺酸("G")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4 是甲硫胺酸("M")或白胺酸("L")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5 是絲胺酸("S")或天冬醯胺酸("N")的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

96. 如申請專利範圍第 95 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素("GH")的分泌。

97. 如申請專利範圍第 83 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素("GH")的分泌。

98. 一種逆轉活體消瘦的方法，包括：將重組生長激素釋放激素("GHRH")或其生物學功能性等同物運送到活體體內。

99. 如申請專利範圍第 98 項的方法，其中重組 GHRH 是生物活性多肽，而重組的 GHRH 功能性生物學等同物是被遺傳操作而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

100. 如申請專利範圍第 98 項的方法，其中重組的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID# 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸("Y")，或織胺酸("H")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸("A")，纈胺酸("V")，或異白胺酸("I")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸("A")或甘胺酸("G")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4 是甲硫胺酸("M")或白胺酸("L")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5 是絲胺酸("S")或天冬醯胺酸("N")的 D-或 L-異構體

胺基酸；

或其組合。

101. 如申請專利範圍第100項的方法，其中重組的GHRH或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素("GH")的分泌。

102. 如申請專利範圍第98項的方法，其中重組的GHRH或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素("GH")的分泌。

103. 一種逆轉活體異常體重降低的方法，包括：將有效量的編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送到活體細胞內。

104. 如申請專利範圍第103項的方法，其中核酸表達構建體運送到活體細胞的方法包括電穿孔。

105. 如申請專利範圍第103項的方法，其中活體細胞是體細胞，或幹細胞。

106. 如申請專利範圍第103項的方法，其中核酸表達構建體包含SeqID# 11, SeqID# 12, SeqID# 13, SeqID# 14, SeqID# 17, SeqID# 18, SeqID# 19, SeqID# 20, 或SeqID# 21。

107. 如申請專利範圍第103項的方法，其中核酸表達構建體進一步包含一種轉染-促進多肽。

108. 如申請專利範圍第107項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。

109. 如申請專利範圍第107項的方法，其中轉染-促進多

肽包含聚-L-麩胺酸。

110. 如申請專利範圍第 103 項的方法，其中運送核酸表達構建體到活體細胞能夠起始編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物表達。

111. 如申請專利範圍第 107 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是在活體組織特異性細胞中表達。

112. 如申請專利範圍第 111 項的方法，其中活體組織特異性細胞包括肌細胞。

113. 如申請專利範圍第 107 項的方法，其中編碼的 GHRH 是生物活性多肽，而編碼的 GHRH 功能性生物學等同物是被基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

114. 如申請專利範圍第 107 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID# 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸(“Y”)，或織胺酸(“H”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸(“A”)，纈胺酸(“V”)，或異白胺酸(“I”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸(“A”)或甘胺酸(“G”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4是甲硫胺酸("M")或白胺酸("L")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5是絲胺酸("S")或天冬醯胺酸("N")的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

115. 如申請專利範圍第 103 項的方法，其中核酸表達構建體編碼含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的多肽序列。

116. 如申請專利範圍第 103 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素("GH")的分泌。

117. 一種逆轉活體異常體重降低的方法，包括：

（a） 將有效量的第一核酸表達構建體和有效量的第二核酸表達構建體運送到活體細胞內；其中第一核酸表達構建體編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物；其中第二核酸表達構建體具有調節蛋白的編碼區域；以及

（b） 將分子開關分子運送到活體體內，其中該分子開關分子負責調節蛋白的啓動。

118. 如申請專利範圍第 117 項的方法，其中第一核酸表達構建體運送到活體細胞的方法包括電穿孔。

119. 如申請專利範圍第 117 項的方法，其中第二核酸表達構建體運送到活體細胞的方法包括電穿孔。

120. 如申請專利範圍第 117 項的方法，其中第一核酸表

達構建體編碼含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的多肽序列。

121. 如申請專利範圍第 117 項的方法，其中第一核酸表達構建體進一步含有一種轉染-促進多肽。

122. 如申請專利範圍第 121 項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。

123. 如申請專利範圍第 121 項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

124. 如申請專利範圍第 117 項的方法，其中運送第二核酸表達構建體到活體細胞能夠起始編碼的調節蛋白表達。

125. 如申請專利範圍第 124 項的方法，其中編碼的調節蛋白是在活體細胞中表達，但是無活性。

126. 如申請專利範圍第 125 項的方法，其中運送分子開關到活體細胞可啓動調節蛋白，並且該分子開關包含米非司酮(mifepristone)或其功能性等同物。

127. 如申請專利範圍第 126 項的方法，其中活性調節蛋白能起始第一核酸序列所編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物表達。

128. 如申請專利範圍第 127 項的方法，其中編碼的 GHRH 是生物活性多肽，而編碼的 GHRH 功能性生物學等同物是被基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

129. 如申請專利範圍第 127 項的方法，其中編碼的 GHRH

或其功能性生物學等同物是通式(SEQID # 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1是酪胺酸("Y")，或織胺酸("H")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2是丙胺酸("A")，纈胺酸("V")，或異白胺酸("I")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3是丙胺酸("A")或甘胺酸("G")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4是甲硫胺酸("M")或白胺酸("L")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5是絲胺酸("S")或天多醯胺酸("N")的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

130. 如申請專利範圍第 117 項的方法，其中核酸表達構建體編碼含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的多肽序列。

131. 如申請專利範圍第 117 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素("GH")的分泌。

132. 一種提高慢性病活體體重的方法，包括：將重組生長激素釋放激素("GHRH")或其生物學功能性等同物運送到活體體內。

133. 如申請專利範圍第 132 項的方法，其中重組 GHRH 是生物活性多肽，而重組的 GHRH 功能性生物學等同物是被基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

134. 如申請專利範圍第 132 項的方法，其中重組的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID# 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸("Y")，或織胺酸("H")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸("A")，纈胺酸("V")，或異白胺酸("I")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸("A")或甘胺酸("G")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4 是甲硫胺酸("M")或白胺酸("L")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5 是絲胺酸("S")或天冬醯胺酸("N")的 D-或 L-異構體胺基酸；或其組合。

135. 如申請專利範圍第 132 項的方法，其中重組的 GHRH 或其功能性生物學等同物是含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的通式。

136. 如申請專利範圍第 132 項的方法，其中重組的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進慢性病活體體內生

長激素("GH")的分泌。

137. 一種逆轉活體體內淋巴細胞增殖抑制作用的方法，包括：將有效量的編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送到活體細胞內。

138. 如申請專利範圍第 137 項的方法，其中核酸表達構建體運送到活體細胞的方法包括電穿孔。

139. 如申請專利範圍第 137 項的方法，其中活體細胞是體細胞，或幹細胞。

140. 如申請專利範圍第 137 項的方法，其中核酸表達構建體包含 SeqID# 11, SeqID# 12, SeqID# 13, SeqID# 14, SeqID# 17, SeqID# 18, SeqID# 19, SeqID# 20, 或 SeqID# 21。

141. 如申請專利範圍第 137 項的方法，其中核酸表達構建體進一步包含一種轉染-促進多肽。

142. 如申請專利範圍第 141 項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。

143. 如申請專利範圍第 141 項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

144. 如申請專利範圍第 137 項的方法，其中運送核酸表達構建體到活體細胞能夠起始編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物表達。

145. 如申請專利範圍第 144 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是在活體組織特異性細胞中

表達。

146. 如申請專利範圍第 145 項的方法，其中活體組織特異性細胞包括肌細胞。

147. 如申請專利範圍第 144 項的方法，其中編碼的 GHRH 是生物活性多肽，而編碼的 GHRH 功能性生物學等同物是被基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

148. 如申請專利範圍第 144 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID# 6)：

-X_1-X_2-DAIFTNSYRKVL-**X_3-**QLSARKLLQDI-**X_4-X_5-**RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸("Y")，或織胺酸("H")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸("A")，纈胺酸("V")，或異白胺酸("I")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸("A")或甘胺酸("G")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4 是甲硫胺酸("M")或白胺酸("L")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5 是絲胺酸("S")或天冬醯胺酸("N")的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

149. 如申請專利範圍第 137 項的方法，其中核酸表達構

建體編碼含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的多肽序列。

150. 如申請專利範圍第 137 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素("GH")的分泌。

151. 一種逆轉活體體內淋巴細胞增殖抑制作用的方法，包括：

（a） 將有效量的第一核酸表達構建體和有效量的第二核酸表達構建體運送到活體細胞內；其中第一核酸表達構建體編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物；其中第二核酸表達構建體具有調節蛋白的編碼區域；以及

（b） 將分子開關分子運送到活體體內，其中該分子開關分子負責調節蛋白的啓動。

152. 如申請專利範圍第 151 項的方法，其中第一核酸表達構建體運送到活體細胞的方法包括電穿孔。

153. 如申請專利範圍第 151 項的方法，其中第二核酸表達構建體到活體細胞的運送包括電穿孔。

154. 如申請專利範圍第 151 項的方法，其中第一核酸表達構建體編碼含有 SeqID#1, SeqID=2，SeqID#3，或 SeqID#4 的多肽序列。

155. 如申請專利範圍第 151 項的方法，其中第一核酸表達構建體進一步含有一種轉染-促進多肽。

156. 如申請專利範圍第 155 項的方法，其中轉染-促進多

肽包含帶電荷的多肽。

157. 如申請專利範圍第 155 項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

158. 如申請專利範圍第 151 項的方法，其中運送第二核酸表達構建體到活體細胞能夠起始編碼的調節蛋白表達。

159. 如申請專利範圍第 158 項的方法，其中編碼的調節蛋白是在活體細胞中表達，但是無活性。

160. 如申請專利範圍第 159 項的方法，其中運送分子開關到活體細胞可啓動調節蛋白，並且該分子開關包含米非司酮(mifepristone)或其功能性等同物。

161. 如申請專利範圍第 160 項的方法，其中活性調節蛋白能起始第一核酸序列所編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物表達。

162. 如申請專利範圍第 161 項的方法，其中編碼的 GHRH 是生物活性多肽，而編碼的 GHRH 功能性生物學等同物是被基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

163. 如申請專利範圍第 161 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID # 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸(“Y”)，或織胺酸(“H”)的 D-或 L-異構體胺

基酸；

X_2是丙胺酸(“A”)，纈胺酸(“V”)，或異白胺酸(“I”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3是丙胺酸(“A”)或甘胺酸(“G”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4是甲硫胺酸(“M”)或白胺酸(“L”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5是絲胺酸(“S”)或天冬醯胺酸(“N”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

164. 如申請專利範圍第 163 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素(“GH”)的分泌。

165. 如申請專利範圍第 151 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素(“GH”)的分泌。

166. 一種逆轉活體體內淋巴細胞增殖抑制作用的方法，包括：將重組生長激素釋放激素(“GHRH”)或其生物學功能性等同物運送到活體體內。

167. 如申請專利範圍第 166 項的方法，其中重組 GHRH 是生物活性多肽，而重組的 GHRH 功能性生物學等同物是被基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

168. 如申請專利範圍第 166 項的方法，其中重組的 GHRH

或其功能性生物學等同物是通式(SEQID# 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1是酪胺酸("Y")，或織胺酸("H")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2是丙胺酸("A")，纈胺酸("V")，或異白胺酸("I")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3是丙胺酸("A")或甘胺酸("G")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4是甲硫胺酸("M")或白胺酸("L")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5是絲胺酸("S")或天冬醯胺酸("N")的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

169. 如申請專利範圍第166項的方法，其中重組的GHRH或其功能性生物學等同物是含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的通式。

170. 如申請專利範圍第166項的方法，其中重組的GHRH或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素("GH")的分泌。

171. 一種治療活體免疫功能障礙的方法，包括：將有效量的編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送到活體細胞內。

172. 如申請專利範圍第 171 項的方法，其中核酸表達構建體運送到活體細胞的方法包括電穿孔。

173. 如申請專利範圍第 171 項的方法，其中活體細胞是體細胞，或幹細胞。

174. 如申請專利範圍第 171 項的方法，其中核酸表達構建體包含 SeqID# 11, SeqID# 12, SeqID# 13, SeqID# 14, SeqID# 17, SeqID# 18, SeqID# 19, SeqID# 20, 或 SeqID# 21。

175. 如申請專利範圍第 171 項的方法，其中核酸表達構建體進一步包含一種轉染-促進多肽。

176. 如申請專利範圍第 175 項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。

177. 如申請專利範圍第 175 項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

178. 如申請專利範圍第 171 項的方法，其中運送核酸表達構建體到活體細胞能夠起始編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物表達。

179. 如申請專利範圍第 178 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是在活體組織特異性細胞中表達。

180. 如申請專利範圍第 179 項的方法，其中活體組織特異性細胞包括肌細胞。

181. 如申請專利範圍第 178 項的方法，其中編碼的 GHRH 是生物活性多肽，而編碼的 GHRH 功能性生物學等同物

是被基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

182. 如申請專利範圍第 178 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID# 6)：

-X_1-X_2-DAIFTNSYRKVL-**X_3-**QLSARKLLQDI-**X_4-X_5-**RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸(“Y”)，或織胺酸(“H”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸(“A”)，纈胺酸(“V”)，或異白胺酸(“I”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸(“A”)或甘胺酸(“G”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4 是甲硫胺酸(“M”)或白胺酸(“L”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5 是絲胺酸(“S”)或天冬醯胺酸(“N”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

183. 如申請專利範圍第 171 項的方法，其中核酸表達構建體編碼含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的多肽序列。

184. 如申請專利範圍第 171 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素(“GH”)的分泌。

185. 一種治療活體免疫功能障礙的方法，包括：

（a） 將有效量的第一核酸表達構建體和有效量的第二核酸表達構建體運送到活體細胞內；其中第一核酸表達構建體編碼生長激素釋放激素(“GHRH”)或其功能性生物學等同物；其中第二核酸表達構建體具有調節蛋白的編碼區域；以及

（b） 將分子開關分子運送到活體體內，其中該分子開關分子負責調節蛋白的啓動。

186. 如申請專利範圍第 185 項的方法，其中第一核酸表達構建體運送到活體細胞的方法包括電穿孔。

187. 如申請專利範圍第 185 項的方法，其中第二核酸表達構建體運送到活體細胞的方法包括電穿孔。

188. 如申請專利範圍第 185 項的方法，其中第一核酸表達構建體編碼含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的多肽序列。

189. 如申請專利範圍第 185 項的方法，其中第一核酸表達構建體進一步含有一種轉染-促進多肽。

190. 如申請專利範圍第 189 項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。

191. 如申請專利範圍第 189 項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

192. 如申請專利範圍第 185 項的方法，其中運送第二核酸表達構建體到活體細胞能夠起始編碼的調節蛋白表達。

193. 如申請專利範圍第 192 項的方法，其中編碼的調節蛋白是在活體細胞中表達，但是無活性。

194. 如申請專利範圍第 193 項的方法，其中運送分子開關到活體細胞可啓動調節蛋白，並且該分子開關包含米非司酮(mifepristone)或其功能性等同物。

195. 如申請專利範圍第 194 項的方法，其中活性調節蛋白能起始第一核酸序列所編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物表達。

196. 如申請專利範圍第 195 項的方法，其中編碼的 GHRH 是生物活性多肽，而編碼的 GHRH 功能性生物學等同物是經基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

197. 如申請專利範圍第 195 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID # 6)：

-X_1-X_2-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸(“Y”)，或織胺酸(“H”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸(“A”)，纈胺酸(“V”)，或異白胺酸(“I”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸(“A”)或甘胺酸(“G”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4 是甲硫胺酸(“M”)或白胺酸(“L”)的 D-或 L-異構體胺

基酸；

X_5是絲胺酸(“S”)或天冬醯胺酸(“N”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

198. 如申請專利範圍第 197 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素(“GH”)的分泌。

199. 如申請專利範圍第 185 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素(“GH”)的分泌。

200. 一種治療活體免疫功能障礙的方法，包括：將重組生長激素釋放激素(“GHRH”)或其生物學功能性等同物運送到活體體內。

201. 如申請專利範圍第 200 項的方法，其中重組 GHRH 是生物活性多肽，而重組的 GHRH 功能性生物學等同物是經基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

202. 如申請專利範圍第 200 項的方法，其中重組的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID# 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1是酪胺酸(“Y”)，或織胺酸(“H”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2是丙胺酸("A")，纈胺酸("V")，或異白胺酸("I")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3是丙胺酸("A")或甘胺酸("G")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4是甲硫胺酸("M")或白胺酸("L")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5是絲胺酸("S")或天多醯胺酸("N")的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

203. 如申請專利範圍第 200 項的方法，其中重組的 GHRH 或其功能性生物學等同物是含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的通式。

204. 如申請專利範圍第 200 項的方法，其中重組的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素("GH")的分泌。

205. 一種延長慢性病活體平均壽命的方法，包括：將有效量的編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送到慢性病活體細胞內。

206. 如申請專利範圍第 205 項的方法，其中核酸表達構建體運送到慢性病活體細胞的方法包括電穿孔。

207. 如申請專利範圍第 205 項的方法，其中慢性病活體細胞是體細胞，或幹細胞。

208. 如申請專利範圍第 205 項的方法，其中核酸表達構

建體包含 SeqID# 11, SeqID# 12, SeqID# 13, SeqID# 14, SeqID# 17, SeqID# 18, SeqID# 19, SeqID# 20, 或 SeqID# 21。

209. 如申請專利範圍第 205 項的方法，其中核酸表達構建體進一步包含一種轉染-促進多肽。

210. 如申請專利範圍第 209 項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。

211. 如申請專利範圍第 209 項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

212. 如申請專利範圍第 205 項的方法，其中運送核酸表達構建體到慢性病活體細胞能夠起始編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物表達。

213. 如申請專利範圍第 212 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是在慢性病活體組織特異性細胞中表達。

214. 如申請專利範圍第 213 項的方法，其中慢性病活體組織特異性細胞包括肌細胞。

215. 如申請專利範圍第 212 項的方法，其中編碼的 GHRH 是生物活性多肽，而編碼的 GHRH 功能性生物學等同物是經基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

216. 如申請專利範圍第 212 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID# 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQ

QGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1是酪胺酸(“Y”)，或織胺酸(“H”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2是丙胺酸(“A”)，纈胺酸(“V”)，或異白胺酸(“I”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3是丙胺酸(“A”)或甘胺酸(“G”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4是甲硫胺酸(“M”)或白胺酸(“L”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5是絲胺酸(“S”)或天冬醯胺酸(“N”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

217. 如申請專利範圍第 205 項的方法，其中核酸表達構建體編碼含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的多肽序列。

218. 如申請專利範圍第 205 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進慢性病活體體內生長激素(“GH”)的分泌。

219. 一種延長慢性病活體平均壽命的方法，包括：

（a） 將有效量的第一核酸表達構建體和有效量的第二核酸表達構建體運送到活體細胞內；其中第一核酸表達構建體編碼生長激素釋放激素(“GHRH”)或其功能性生物學等同物；其中第二核酸表達構建體

具有調節蛋白的編碼區域；以及

（b） 將分子開關分子運送到活體體內，其中該分子開關分子負責調節蛋白的啓動。

220. 如申請專利範圍第 219 項的方法，其中將第一核酸表達構建體運送到慢性病活體細胞的方法包括電穿孔。

221. 如申請專利範圍第 219 項的方法，其中將第二核酸表達構建體運送到慢性病活體細胞的方法包括電穿孔。

222. 如申請專利範圍第 219 項的方法，其中第一核酸表達構建體編碼含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的多肽序列。

223. 如申請專利範圍第 219 項的方法，其中第一核酸表達構建體進一步含有一種轉染-促進多肽。

224. 如申請專利範圍第 223 項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。

225. 如申請專利範圍第 223 項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

226. 如申請專利範圍第 219 項的方法，其中運送第二核酸表達構建體到慢性病活體細胞能夠起始編碼的調節蛋白表達。

227. 如申請專利範圍第 226 項的方法，其中編碼的調節蛋白是在慢性病活體細胞中表達，但是無活性。

228. 如申請專利範圍第 227 項的方法，其中運送分子開關到慢性病活體細胞可啓動調節蛋白，並且該分子開關包含米非司酮(mifepristone)或其功能性等同物。

229. 如申請專利範圍第 228 項的方法，其中活性調節蛋白能起始第一核酸序列所編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物表達。

230. 如申請專利範圍第 229 項的方法，其中編碼的 GHRH 是生物活性多肽，而編碼的 GHRH 功能性生物學等同物是被遺傳操作而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於 GHRH 多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

231. 如申請專利範圍第 229 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物是通式(SEQID # 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸("Y")，或織胺酸("H")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸("A")，纈胺酸("V")，或異白胺酸("I")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸("A")或甘胺酸("G")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4 是甲硫胺酸("M")或白胺酸("L")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5 是絲胺酸("S")或天冬醯胺酸("N")的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

232. 如申請專利範圍第 231 項的方法，其中編碼的 GHRH

或其功能性生物學等同物能夠促進慢性病活體體內生長激素("GH")的分泌。

233. 如申請專利範圍第219項的方法，其中編碼的GHRH或其功能性生物學等同物能夠促進慢性病活體體內生長激素("GH")的分泌。

234. 一種延長慢性病活體平均壽命的方法，包括：將重組生長激素釋放激素("GHRH")或其生物學功能性等同物運送到慢性病活體體內。

235. 如申請專利範圍第234項的方法，其中重組GHRH是生物活性多肽，而重組的GHRH功能性生物學等同物是經基因工程處理而使其含有獨特胺基酸序列同時相較於GHRH多肽還具有類似或改進生物活性的多肽。

236. 如申請專利範圍第234項的方法，其中重組的GHRH或其功能性生物學等同物是通式(SEQID# 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1是酪胺酸("Y")，或織胺酸("H")的D-或L-異構體胺基酸；

X_2是丙胺酸("A")，纈胺酸("V")，或異白胺酸("I")的D-或L-異構體胺基酸；

X_3是丙胺酸("A")或甘胺酸("G")的D-或L-異構體胺基酸；

X_4是甲硫胺酸("M")或白胺酸("L")的D-或L-異構體胺

基酸；

X_5是絲胺酸("S")或天冬醯胺酸("N")的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

237. 如申請專利範圍第 234 項的方法，其中其中重組的 GHRH 或其功能性生物學等同物是含有 SeqID#1, SeqID#2，SeqID#3，或 SeqID#4 的通式。

238. 如申請專利範圍第 234 項的方法，其中重組的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進慢性病活體體內生長激素("GH")的分泌。

239. 一種治療患有腫瘤的活體的方法，所述腫瘤選自：腺瘤；巨細胞瘤；黑素瘤；肉瘤；或實性腫瘤；該方法包括：

將有效量的編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送到活體組織內；其中隨後的 GHRH 或其生物學等同物表達足以延遲腫瘤的生長。

240. 如申請專利範圍第 239 項的方法，進一步包括：對組織施加細胞轉染脈衝；其中，細胞轉染脈衝是施加給組織上含有運送的核酸表達構建體的區域。

241. 如申請專利範圍第 240 項的方法，進一步包括：對組織施加細胞轉染脈衝前，將一對電極安置在組織內；其中核酸表達構建體是運送到組織中插入了電極對的區域。

242. 如申請專利範圍第 240 項的方法，其中細胞轉染脈衝是電脈衝或血管壓力脈衝。

243. 如申請專利範圍第 239 項的方法，其中運送核酸表達構建體到活體組織的方法包括電穿孔。

244. 如申請專利範圍第 239 項的方法，其中運送是通過注射，基因槍，或金顆粒轟擊實現。

245. 如申請專利範圍第 239 項的方法，其中活體是家畜；食用動物(food animal)；或牲口。

246. 如申請專利範圍第 239 項的方法，其中活體是人。

247. 如申請專利範圍第 239 項的方法，其中核酸表達構建體基本上不含病毒骨架(viral backbone)。

248. 如申請專利範圍第 239 項的方法，其中核酸表達構建體的啓動子包括組織特異性啓動子。

249. 如申請專利範圍第 248 項的方法，其中組織特異性啓動子包括肌特異性啓動子。

250. 如申請專利範圍第 248 項的構建體，其中啓動子包括 SPc5-12。

251. 如申請專利範圍第 239 項的方法，其中核酸表達構建體 3'未翻譯區是人生長激素 3'UTR，牛生長激素 3'UTR，骨骼 α 肌動蛋白 3'UTR，或 SV40 多聚腺苷信號。

252. 如申請專利範圍第 239 項的方法，其中組織包括肌肉。

253. 如申請專利範圍第 239 項的方法，其中核酸表達構

建體是 SeqID# 11, SeqID# 12, SeqID# 13, SeqID# 14, SeqID# 17, SeqID# 18, SeqID# 19, SeqID# 20, 或 SeqID# 21。

254. 如申請專利範圍第239項的方法，其中編碼的GHRH或其功能性生物學等同物包括 SeqID#1。

255. 如申請專利範圍第239項的方法，其中編碼的GHRH或其功能性生物學等同物包括 SeqID#2。

256. 如申請專利範圍第239項的方法，其中編碼的GHRH或其功能性生物學等同物包括 SeqID#3。

257. 如申請專利範圍第239項的方法，其中編碼的GHRH或其功能性生物學等同物包括 SeqID#4。

258. 如申請專利範圍第239項的方法，其中編碼的GHRH或其功能性生物學等同物包括 SeqID#10。

259. 如申請專利範圍第239項的方法，其中編碼的GHRH或其功能性生物學等同物包括胺基酸通式(SEQID # 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸("Y")，或織胺酸("H")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸("A")，纈胺酸("V")，或異白胺酸("I")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸("A")或甘胺酸("G")的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4是甲硫胺酸(“M”)或白胺酸(“L”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5是絲胺酸(“S”)或天冬醯胺酸(“N”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

260. 如申請專利範圍第 239 項的方法，其中核酸表達構建體進一步含有一種轉染-促進多肽。

261. 如申請專利範圍第 259 項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。

262. 如申請專利範圍第 259 項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

263. 如申請專利範圍第 239 項的方法，其中編碼的 GHRH 功能性生物學等同物是相較於 GHRH 多肽具有類似或改進生物活性的多肽。

264. 如申請專利範圍第 239 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素(“GH”)的分泌。

265. 如申請專利範圍第 239 項的方法，其中腫瘤包括良性或惡性腫瘤。

266. 如申請專利範圍第 239 項的方法，其中預防了活體腎衰竭。

267. 一種治療患有癌的活體的方法，該方法包括：將有效量的編碼生長激素釋放激素(“GHRH”)或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送到活體組織中；其中

隨後的GHRH或功能性生物學等同物表達足以延遲癌的生長。

268. 如申請專利範圍第267項的方法，進一步包括：對組織施加細胞轉染脈衝；其中，細胞轉染脈衝是施加給組織上含有運送的核酸表達構建體的區域。

269. 如申請專利範圍第268項的方法，進一步包括：對組織施加細胞轉染脈衝；將一對電極安置在組織內；其中核酸表達構建體是運送到組織中插入了電極對的區域。

270. 如申請專利範圍第268項的方法，其中細胞轉染脈衝是電脈衝或血管壓力脈衝。

271. 如申請專利範圍第267項的方法，其中運送核酸表達構建體到活體組織的方法包括電穿孔。

272. 如申請專利範圍第267項的方法，其中運送是通過注射，基因槍，或金顆粒轟擊實現。

273. 如申請專利範圍第267項的方法，其中活體是家畜；食用動物(food animal)；或牲口。

274. 如申請專利範圍第267項的方法，其中活體是人。

275. 如申請專利範圍第267項的方法，其中核酸表達構建體基本上不含病毒骨架(viral backbone)。

276. 如申請專利範圍第267項的方法，其中核酸表達構建體的啓動子包括組織特異性啓動子。

277. 如申請專利範圍第276項的方法，其中組織特異性啓動子包括肌特異性啓動子。

278. 如申請專利範圍第 276 項的構建體，其中啓動子包括 SPc5-12。

279. 如申請專利範圍第 267 項的方法，其中核酸表達構建體 3'未翻譯區是人生長激素 3'UTR，牛生長激素 3'UTR，骨骼 α 肌動蛋白 3'UTR，或 SV40 多聚腺苷信號。

280. 如申請專利範圍第 267 項的方法，其中組織包括肌肉。

281. 如申請專利範圍第 267 項的方法，其中核酸表達構建體是 SeqID# 11, SeqID# 12, SeqID# 13, SeqID# 14, SeqID# 17, SeqID# 18, SeqID# 19, SeqID# 20, 或 SeqID# 21。

282. 如申請專利範圍第 267 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#1。

283. 如申請專利範圍第 267 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#2。

284. 如申請專利範圍第 267 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#3。

285. 如申請專利範圍第 267 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#4。

286. 如申請專利範圍第 267 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#10。

287. 如申請專利範圍第 267 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括胺基酸通式(SEQID # 6)：

-X_1-X_2-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1是酪胺酸(“Y”)，或織胺酸(“H”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2是丙胺酸(“A”)，纈胺酸(“V”)，或異白胺酸(“I”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3是丙胺酸(“A”)或甘胺酸(“G”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4是甲硫胺酸(“M”)或白胺酸(“L”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5是絲胺酸(“S”)或天冬醯胺酸(“N”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

288. 如申請專利範圍第 267 項的方法，其中核酸表達構建體進一步含有一種轉染-促進多肽。

289. 如申請專利範圍第 287 項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。

290. 如申請專利範圍第 287 項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

291. 如申請專利範圍第 267 項的方法，其中編碼的 GHRH 功能性生物學等同物是相較於 GHRH 多肽具有類似或改進生物活性的多肽。

292. 如申請專利範圍第 267 項的方法，其中編碼的 GHRH

或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素("GH")的分泌。

293. 如申請專利範圍第 267 項的方法，其中腫瘤包括良性或惡性腫瘤。

294. 一種治療白血病或淋巴瘤活體的方法，該方法包括：將有效量的編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送到活體組織中；其中隨後的 GHRH 或功能性生物學等同物表達足以延遲白血病或淋巴瘤的生長率。

295. 如申請專利範圍第 294 項的方法，進一步包括：對組織施加細胞轉染脈衝；其中，細胞轉染脈衝是施加給組織上含有運送的核酸表達構建體的區域。

296. 如申請專利範圍第 295 項的方法，進一步包括：對組織施加細胞轉染脈衝前，將一對電極安置在組織內；其中核酸表達構建體是運送到組織中插入了電極對的區域。

297. 如申請專利範圍第 295 項的方法，其中細胞轉染脈衝是電脈衝或血管壓力脈衝。

298. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中運送核酸表達構建體到活體組織的方法包括電穿孔。

299. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中運送是通過注射，基因槍，或金顆粒轟擊。

300. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中活體是家畜；食用動物(food animal)；或牲口。

301. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中活體是人。

302. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中核酸表達構建體基本上不含病毒骨架(viral backbone)。

303. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中核酸表達構建體的啓動子包括組織特異性啓動子。

304. 如申請專利範圍第 303 項的方法，其中組織特異性啓動子包括肌特異性啓動子。

305. 如申請專利範圍第 303 項的構建體，其中啓動子包括 SPc5-12。

306. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中核酸表達構建體 3'未翻譯區是人生長激素 3'UTR，牛生長激素 3'UTR，骨骼 α 肌動蛋白 3'UTR，或 SV40 多聚腺苷信號。

307. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中組織包括肌肉。

308. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中核酸表達構建體是 SeqID# 11, SeqID# 12, SeqID# 13, SeqID# 14, SeqID# 17, SeqID# 18, SeqID# 19, SeqID# 20, 或 SeqID# 21。

309. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#1。

310. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#2。

311. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中編碼的 GHRH

或其功能性生物學等同物包括 SeqID#3。

312. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#4。

313. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#10。

314. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括胺基酸通式(SEQID # 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸(“Y”)，或織胺酸(“H”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸(“A”)，纈胺酸(“V”)，或異白胺酸(“I”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸(“A”)或甘胺酸(“G”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4 是甲硫胺酸(“M”)或白胺酸(“L”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5 是絲胺酸(“S”)或天冬醯胺酸(“N”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

315. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中核酸表達構建體進一步含有一種轉染-促進多肽。

316. 如申請專利範圍第 315 項的方法，其中轉染-促進多

肽包含帶電荷的多肽。

317. 如申請專利範圍第 315 項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

318. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中編碼的 GHRH 功能性生物學等同物是相較於 GHRH 多肽具有類似或改進生物活性的多肽。

319. 如申請專利範圍第 294 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素(“GH”)的分泌。

320. 一種預防活體產生轉移性腫瘤的方法，包括：將有效量的編碼生長激素釋放激素(“GHRH”)或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送到活體組織中；其中隨後的 GHRH 或功能性生物學等同物表達足以延轉移性腫瘤的發生。

321. 如申請專利範圍第 320 項的方法，進一步包括：對組織施加細胞轉染脈衝；其中，細胞轉染脈衝是施加給組織上含有運送的核酸表達構建體的區域。

322. 如申請專利範圍第 321 項的方法，進一步包括：對組織施加細胞轉染脈衝；將一對電極安置在組織內；其中核酸表達構建體是運送到組織中插入了電極對的區域。

323. 如申請專利範圍第 321 項的方法，其中細胞轉染脈衝是電脈衝或血管壓力脈衝。

324. 如申請專利範圍第 320 項的方法，其中運送核酸表

達構建體到活體組織的方法包括電穿孔。

325. 如申請專利範圍第 320 項的方法，其中運送是通過注射，基因槍，或金顆粒轟擊實現。

326. 如申請專利範圍第 320 項的方法，其中活體是家畜；食用動物(food animal)；或牲口。

327. 如申請專利範圍第 320 項的方法，其中活體是人。

328. 如申請專利範圍第 320 項的方法，其中核酸表達構建體基本上不含病毒骨架(viral backbone)。

329. 如申請專利範圍第 320 項的方法，其中核酸表達構建體的啓動子包括組織特異性啓動子。

330. 如申請專利範圍第 329 項的方法，其中組織特異性啓動子包括肌特異性啓動子。

331. 如申請專利範圍第 329 項的構建體，其中啓動子包括 SPc5-12。

332. 如申請專利範圍第 320 項的方法，其中核酸表達構建體 3'未翻譯區是人生長激素 3'UTR，牛生長激素 3'UTR，骨骼 α 肌動蛋白 3'UTR，或 SV40 多聚腺苷信號。

333. 如申請專利範圍第 320 項的方法，其中組織包括肌肉。

334. 如申請專利範圍第 320 項的方法，其中核酸表達構建體是 SeqID# 11, SeqID# 12, SeqID# 13, SeqID# 14, SeqID# 17, SeqID# 18, SeqID# 19, SeqID# 20, 或 SeqID# 21。

335. 如申請專利範圍第320項的方法，其中編碼的GHRH或其功能性生物學等同物包括SeqID#1。

336. 如申請專利範圍第320項的方法，其中編碼的GHRH或其功能性生物學等同物包括SeqID#2。

337. 如申請專利範圍第320項的方法，其中編碼的GHRH或其功能性生物學等同物包括SeqID#3。

338. 如申請專利範圍第320項的方法，其中編碼的GHRH或其功能性生物學等同物包括SeqID#4。

339. 如申請專利範圍第320項的方法，其中編碼的GHRH或其功能性生物學等同物包括SeqID#10。

340. 如申請專利範圍第320項的方法，其中編碼的GHRH或其功能性生物學等同物包括胺基酸通式(SEQID # 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1是酪胺酸("Y")，或織胺酸("H")的D-或L-異構體胺基酸；

X_2是丙胺酸("A")，纈胺酸("V")，或異白胺酸("I")的D-或L-異構體胺基酸；

X_3是丙胺酸("A")或甘胺酸("G")的D-或L-異構體胺基酸；

X_4是甲硫胺酸("M")或白胺酸("L")的D-或L-異構體胺基酸；

X_5是絲胺酸("S")或天冬醯胺酸("N")的D-或L-異構體

胺基酸；

或其組合。

341. 如申請專利範圍第320項的方法，其中核酸表達構建體進一步含有一種轉染-促進多肽。

342. 如申請專利範圍第341項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。

343. 如申請專利範圍第341項的方法，其中轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

344. 如申請專利範圍第320項的方法，其中編碼的GHRH功能性生物學等同物是相較於GHRH多肽具有類似或改進生物活性的多肽。

345. 如申請專利範圍第320項的方法，其中編碼的GHRH或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素("GH")的分泌。

346. 如申請專利範圍第320項的方法，其中腫瘤包括良性或惡性腫瘤。

347. 一種治療轉移性腫瘤細胞生長活體的方法，腫瘤細胞選自：腺瘤；癌，白血病，淋巴瘤，巨細胞瘤；黑素瘤；肉瘤；和實性腫瘤；該方法包括：

（a） 將有效量的編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送到活體組織中；

（b） 對該組織施加電穿孔細胞脈衝

其中：

核酸表達構建體包括：

肌特異性啓動子；

編碼的 GHRH 或功能性生物學等同物；人生長激素 3' 未翻譯區("3'UTR")；啓動子，編碼的 GHRH 或功能性生物學等同物，和 3'未翻譯區均操縱性連接，GHRH 或生物學等同物的體內表達由啓動子調控，並且該構建體基本上不含有病毒骨架(viral backbone)；

隨後的 GHRH 或功能性生物學等同物表達能夠促進活體體內生長激素("GH")的分泌，並足以延遲細胞的轉移性生長。

348. 如申請專利範圍第 347 項的方法，進一步包括：對組織施加細胞轉染脈衝前，將一對電極安置在組織內；其中核酸表達構建體是運送到組織中插入了電極對的區域。

349. 如申請專利範圍第 347 項的方法，其中活體是家畜；食用動物(food animal)；或耕畜。

350. 如申請專利範圍第 347 項的方法，其中活體是人。

351. 如申請專利範圍第 347 項的方法，其中核酸表達構建體是 SeqID# 11, SeqID# 12, SeqID# 13, SeqID# 14, SeqID# 17, SeqID# 18, SeqID# 19, SeqID# 20, 或 SeqID# 21。

352. 如申請專利範圍第 347 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#1。

353. 如申請專利範圍第 347 項的方法，其中編碼的 GHRH

或其功能性生物學等同物包括 SeqID#2。

354. 如申請專利範圍第 347 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#3。

355. 如申請專利範圍第 347 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#4。

356. 如申請專利範圍第 347 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#10。

357. 如申請專利範圍第 347 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包含胺基酸通式(SEQID # 6)：

$-X_1-X_2$-DAIFTNSYRKVL-X_3-QLSARKLLQDI-X_4-X_5-RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸(“Y”)，或織胺酸(“H”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸(“A”)，纈胺酸(“V”)，或異白胺酸(“I”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸(“A”)或甘胺酸(“G”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4 是甲硫胺酸(“M”)或白胺酸(“L”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5 是絲胺酸(“S”)或天冬醯胺酸(“N”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

358. 如申請專利範圍第 347 項的方法，其中核酸表達構

建體進一步含有一種帶電荷的轉染-促進多肽，該帶電荷的轉染-促進多肽包含聚-L-麩胺酸。

359. 一種治療活體腎衰竭的方法，該方法包括：將有效量的編碼生長激素釋放激素("GHRH")或其功能性生物學等同物的核酸表達構建體運送到活體組織中；其中隨後的GHRH或功能性生物學等同物表達足以延遲癌的生長。

360. 如申請專利範圍第359項的方法，進一步包括：對組織施加細胞轉染脈衝；其中，細胞轉染脈衝是施加給組織上含有運送的核酸表達構建體的區域。

361. 如申請專利範圍第360項的方法，進一步包括：對組織施加細胞轉染脈衝前，將一對電極安置在組織內；其中核酸表達構建體是運送到組織中插入了電極對的區域。

362. 如申請專利範圍第360項的方法，其中細胞轉染脈衝是電脈衝或血管壓力脈衝。

363. 如申請專利範圍第359項的方法，其中運送核酸表達構建體到活體組織的方法包括電穿孔。

364. 如申請專利範圍第359項的方法，其中運送是通過注射，基因槍，或金顆粒轟擊實現。

365. 如申請專利範圍第359項的方法，其中活體是家畜；食用動物(food animal)；或牲口。

366. 如申請專利範圍第359項的方法，其中活體是人。

367. 如申請專利範圍第359項的方法，其中核酸表達構

建體基本上不含病毒骨架(viral backbone)。

368. 如申請專利範圍第 359 項的方法，其中核酸表達構建體的啓動子包括組織特異性啓動子。

369. 如申請專利範圍第 368 項的方法，其中組織特異性啓動子包括肌特異性啓動子。

370. 如申請專利範圍第 368 項的構建體，其中啓動子包括 SPc5-12。

371. 如申請專利範圍第 359 項的方法，其中核酸表達構建體 3'未翻譯區是人生長激素 3'UTR，牛生長激素 3'UTR，骨骼 α 肌動蛋白 3'UTR，或 SV40 多聚腺苷信號。

372. 如申請專利範圍第 359 項的方法，其中組織包括肌肉。

373. 如申請專利範圍第 359 項的方法，其中核酸表達構建體是 SeqID# 11, SeqID# 12, SeqID# 13, SeqID# 14, SeqID# 17, SeqID# 18, SeqID# 19, SeqID# 20, 或 SeqID# 21。

374. 如申請專利範圍第 359 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#1。

375. 如申請專利範圍第 359 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#2。

376. 如申請專利範圍第 359 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#3。

377. 如申請專利範圍第 359 項的方法，其中編碼的 GHRH

或其功能性生物學等同物包括 SeqID#4。

378. 如申請專利範圍第 359 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括 SeqID#10。

379. 如申請專利範圍第 359 項的方法，其中編碼的 GHRH 或其功能性生物學等同物包括胺基酸通式(SEQID # 6)：

-X_1-X_2-DAIFTNSYRKVL-**X_3-**QLSARKLLQDI-**X_4-X_5-**RQQGERNQEQGA-OH

其中通式具有下述特徵：

X_1 是酪胺酸(“Y”)，或織胺酸(“H”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_2 是丙胺酸(“A”)，纈胺酸(“V”)，或異白胺酸(“I”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_3 是丙胺酸(“A”)或甘胺酸(“G”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_4 是甲硫胺酸(“M”)或白胺酸(“L”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

X_5 是絲胺酸(“S”)或天冬醯胺酸(“N”)的 D-或 L-異構體胺基酸；

或其組合。

380. 如申請專利範圍第 359 項的方法，其中核酸表達構建體進一步含有一種轉染-促進多肽。

381. 如申請專利範圍第 380 項的方法，其中轉染-促進多肽包含帶電荷的多肽。

382. 如申請專利範圍第 380 項的方法，其中轉染-促進多

肽包含聚-L-麩胺酸。

383. 如申請專利範圍第359項的方法，其中編碼的GHRH功能性生物學等同物是相較於GHRH多肽具有類似或改進生物活性的多肽。

384. 如申請專利範圍第359項的方法，其中編碼的GHRH或其功能性生物學等同物能夠促進活體體內生長激素("GH")的分泌。

385. 如申請專利範圍第359項的方法，其中腎衰竭是起於患有癌症症活體，所述癌症選自：腺瘤；癌，白血病，淋巴瘤，巨細胞瘤；黑素瘤；肉瘤；和實性腫瘤。

386. 如申請專利範圍第385項的方法，其中癌症包括良性或惡性腫瘤。

圖 1

YADAIFTNSYRKVL**G**QLSARKLLQDI**MS**RQQGERNQEQGA-OH	**porcine wild-type**
HVDAIFTNSYRKVL**A**QLSARKLLQDI**LN**RQQGERNQEQGA-OH	**HV-GHRH**
YIDAIFTNSYRKVL**A**QLSARKLLQDI**LN**RQQGERNQEQGA-OH	**TI-GHRH**
YVDAIFTNSYRKVL**A**QLSARKLLQDI**LN**RQQGERNQEQGA-OH	**TV-GHRH**
YADAIFTNSYRKVL**A**QLSARKLLQDI**LN**RQQGERNQEQGA-OH	**15/27/28-GHRH**

圖 2

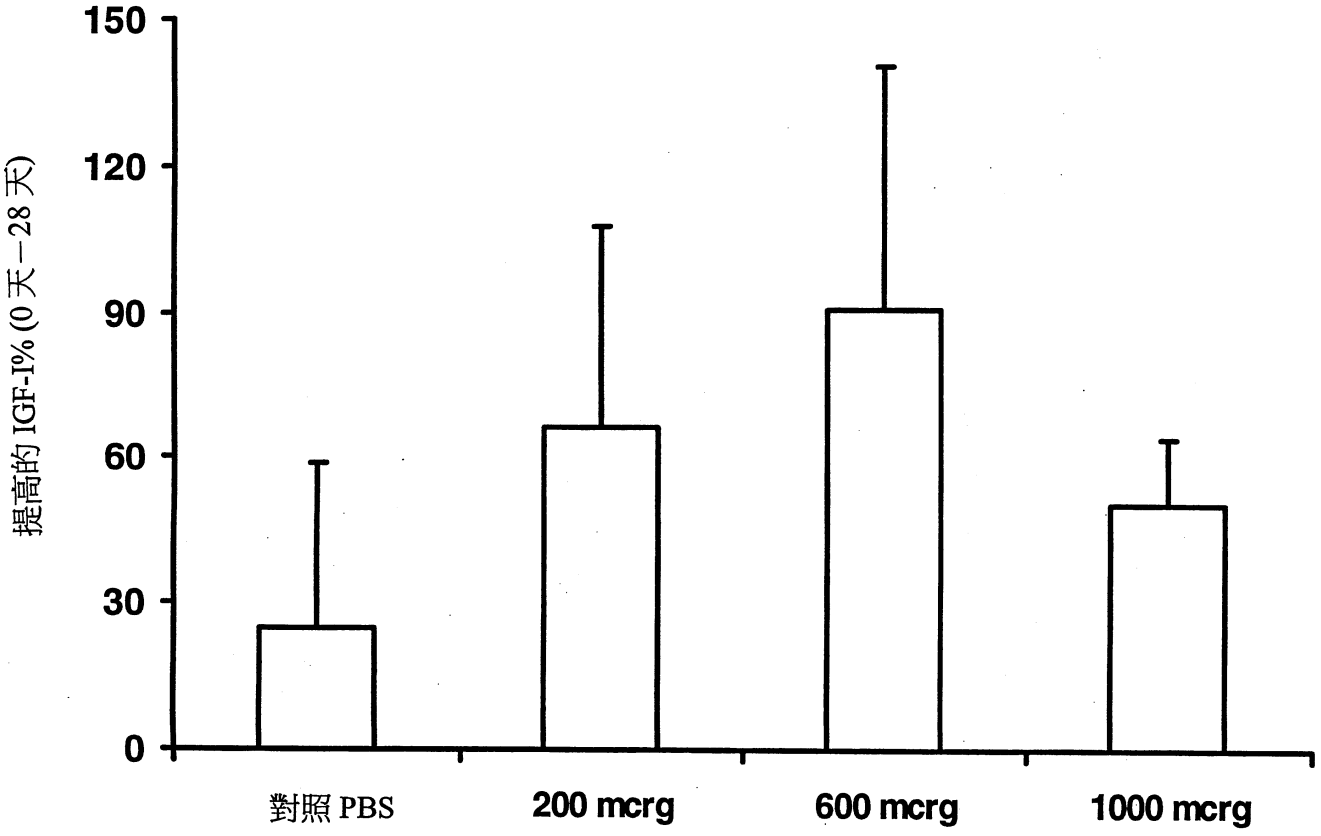

150
120
90
60
30
0
提高的 IGF-I% (0 天－28 天)
對照 PBS
200 mcrg
600 mcrg
1000 mcrg

圖 3

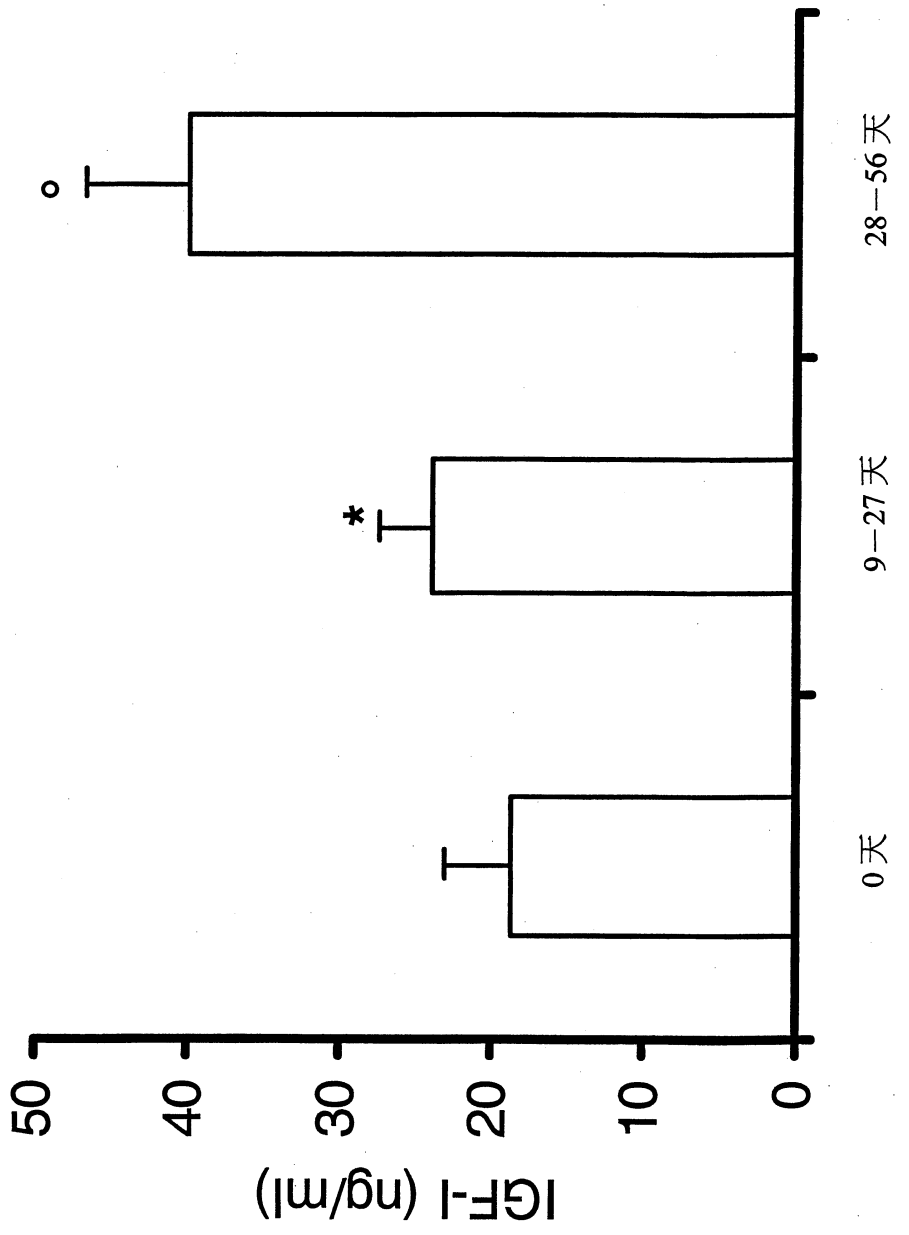


圖 4

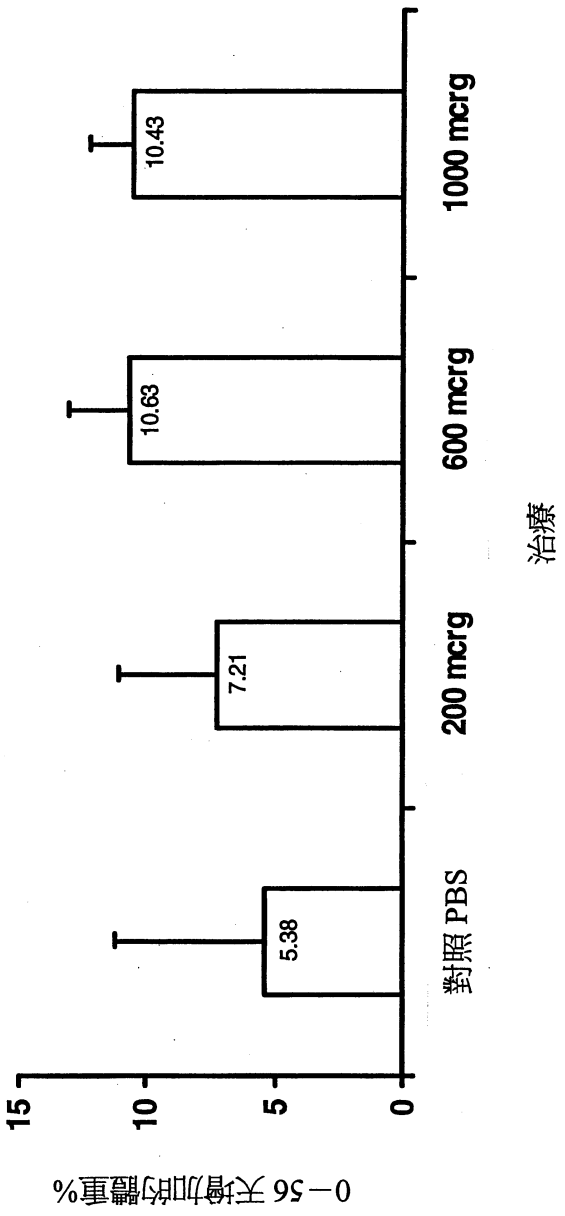
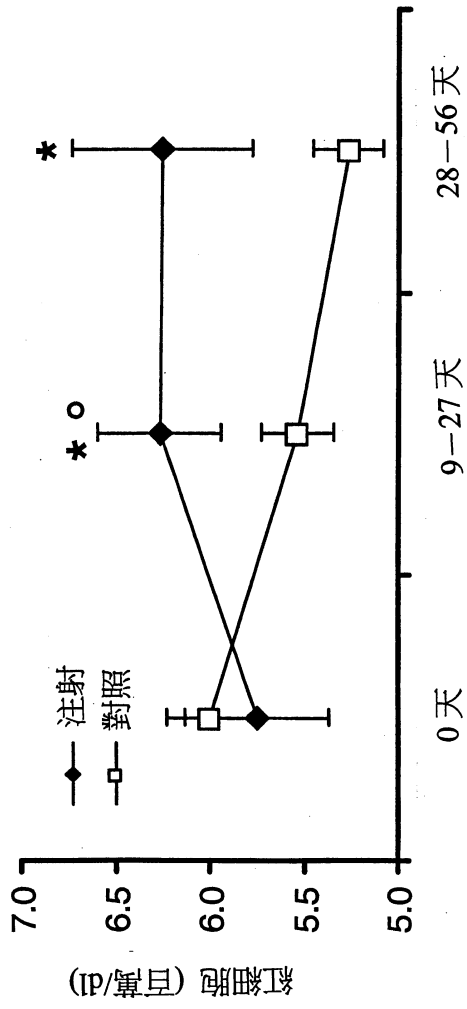
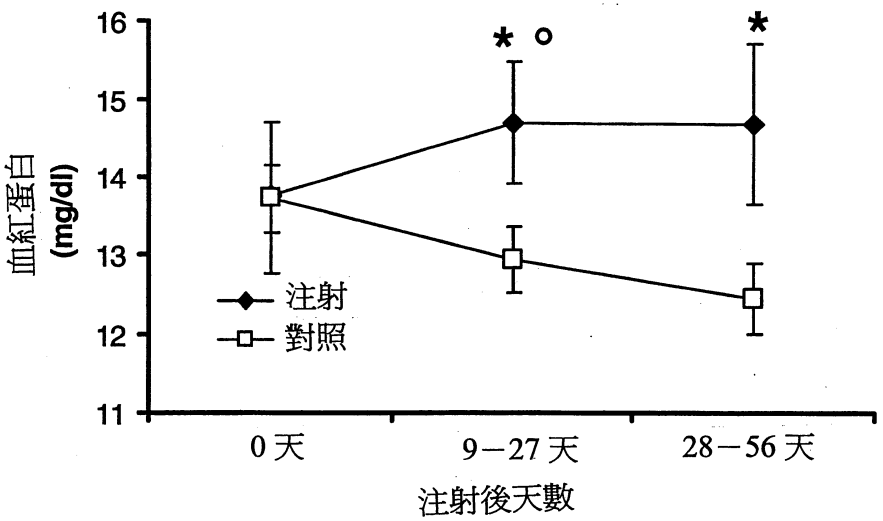

0－56 天增加的體重%
15
10
5
0
5.38
7.21
10.63
10.43
對照 PBS
200 mcrg
600 mcrg
1000 mcrg
治療

圖 5



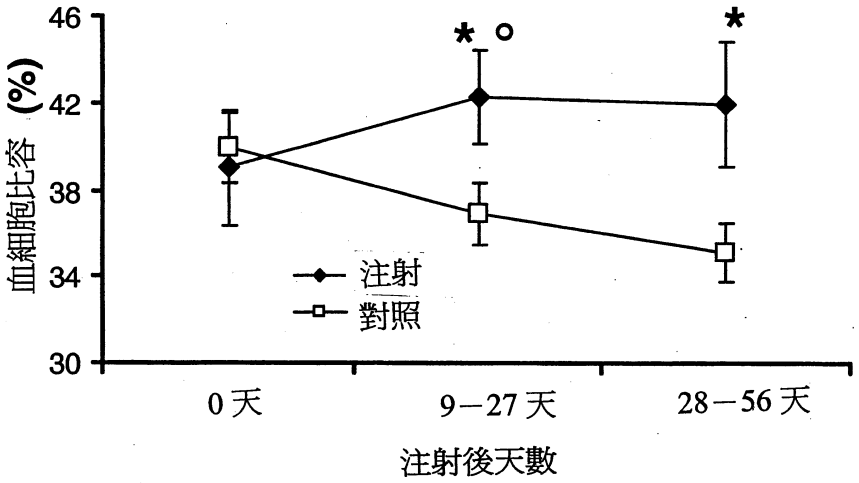
RBC	0天	9－27 天	28－56 天
注射	5.75 +/- 0.39	6.27 +/- 0.33	6.25 +/- 0.47
對照	6.00 +/- 0.24	5.53 +/- 0.19	5.26 +/- 0.19
TTEST pst/pri		0.03	0.06
TTEST pst/ctr		0.03	0.02

圖 6



Hb	0 天	9－27 天	28－56 天
注射	13.74 +/- 0.97	14.68 +/- 0.78	14.65 +/- 1.03
對照	13.71 +/- 0.43	12.94 +/- 0.41	12.44 +/- 0.44
TTEST pst/pri		0.02	0.08
TTEST pst/ctr		0.02	0.02

圖 7



Ht	0 天	9－27 天	28－56 天
注射	39 +/- 2.62	42.22 +/- 2.17	41.88 +/- 2.86
對照	39.92 +/- 1.65	36.88 +/- 1.44	35.12 +/- 1.33
TTEST pst/pri		0.03	0.07
TTEST pst/ctr		0.02	0.01

圖 8

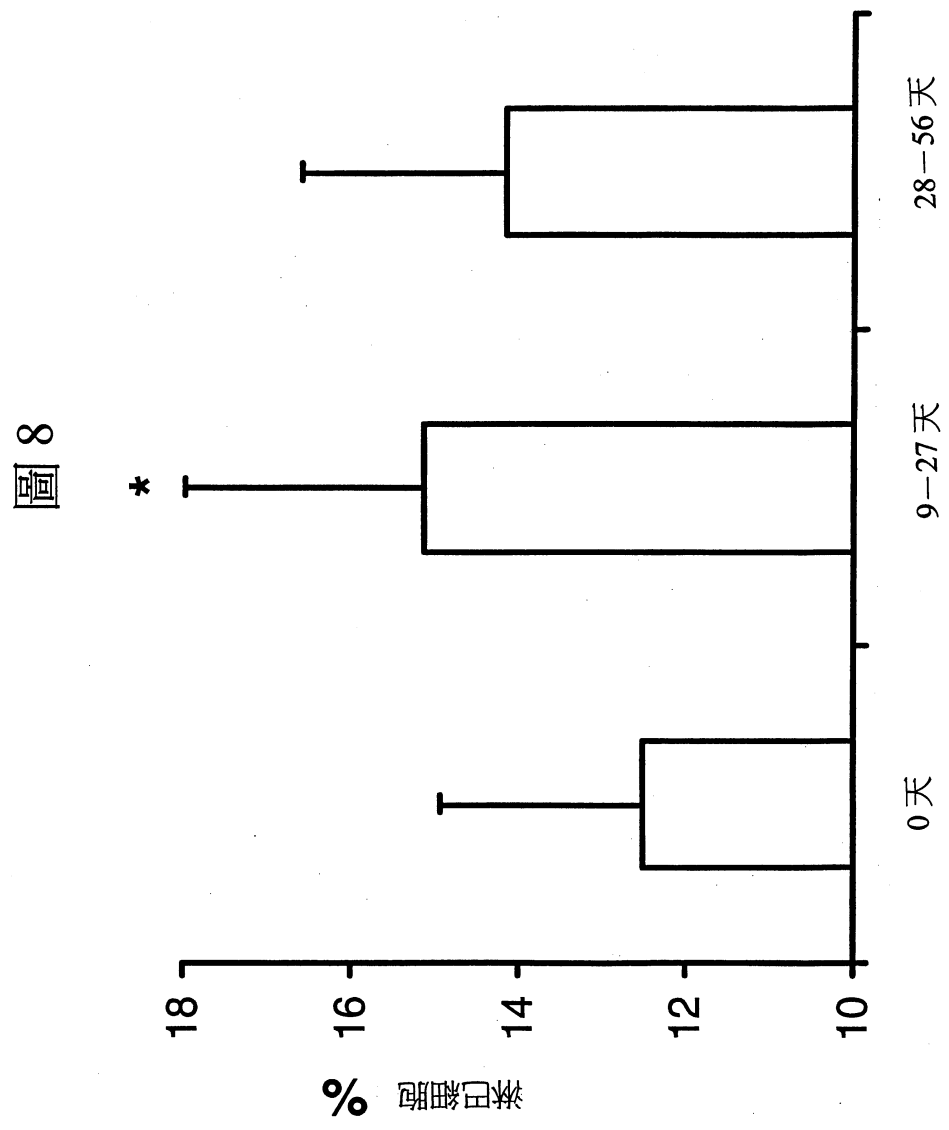


圖 9

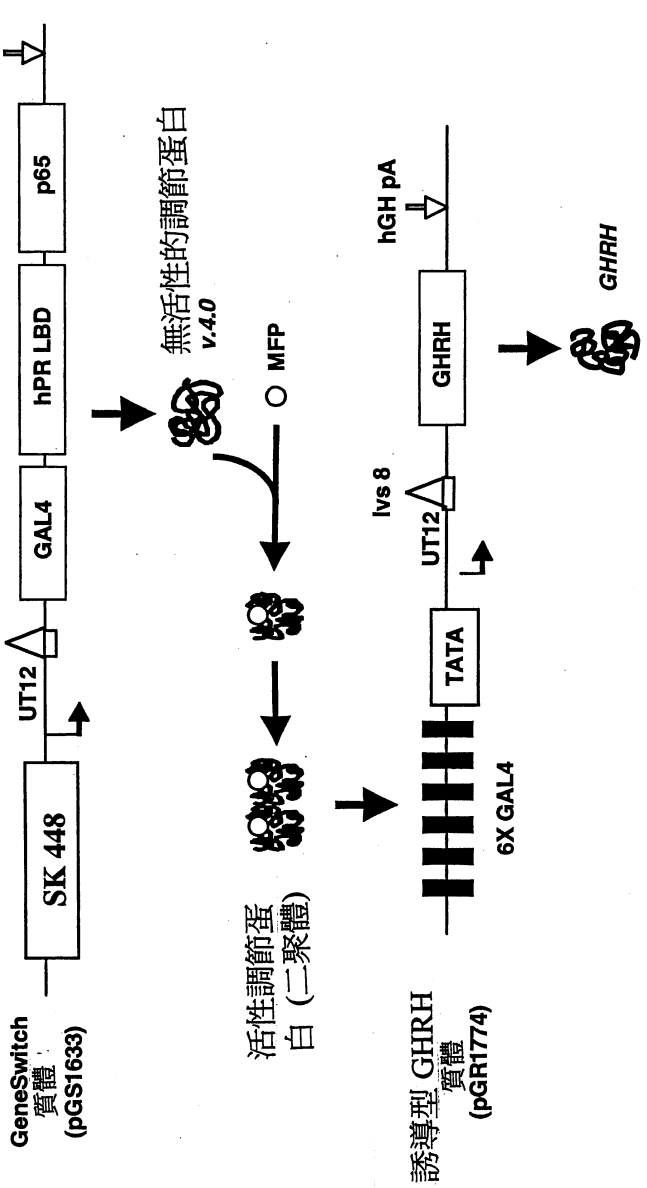
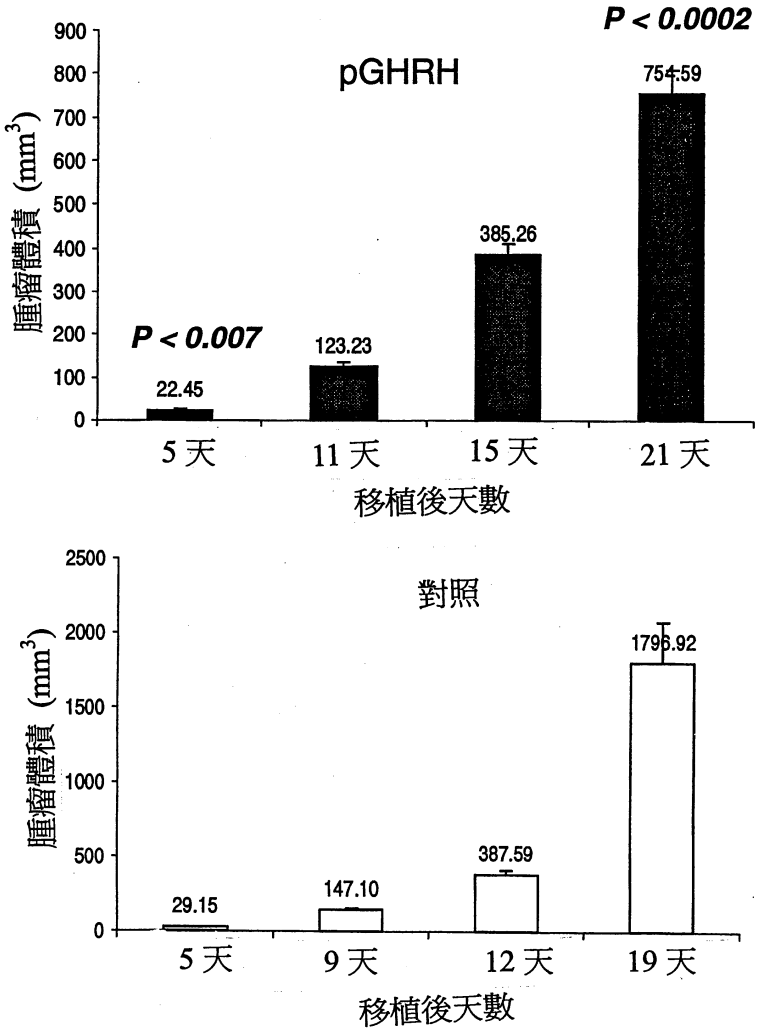

hGH pA
p65
hPR LBD
GAL4
UT12
Ivs 8
SK 448
GeneSwitch
質體
(pGS1633)
無活性的調節蛋白
v.4.0
MFP
活性調節蛋
白 (二聚體)
hGH pA
GHRH
UT12
Ivs 8
TATA
6X GAL4
誘導型 GHRH
質體
(pGR1774)
GHRH

圖 10


P < 0.0002
pGHRH
754.59
385.26
P < 0.007
123.23
22.45
腫瘤體積 (mm3)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
5 天
11 天
15 天
21 天
移植後天數
對照
1796.92
387.59
147.10
29.15
腫瘤體積 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
5 天
9 天
12 天
19 天
移植後天數

200301778

圖 11

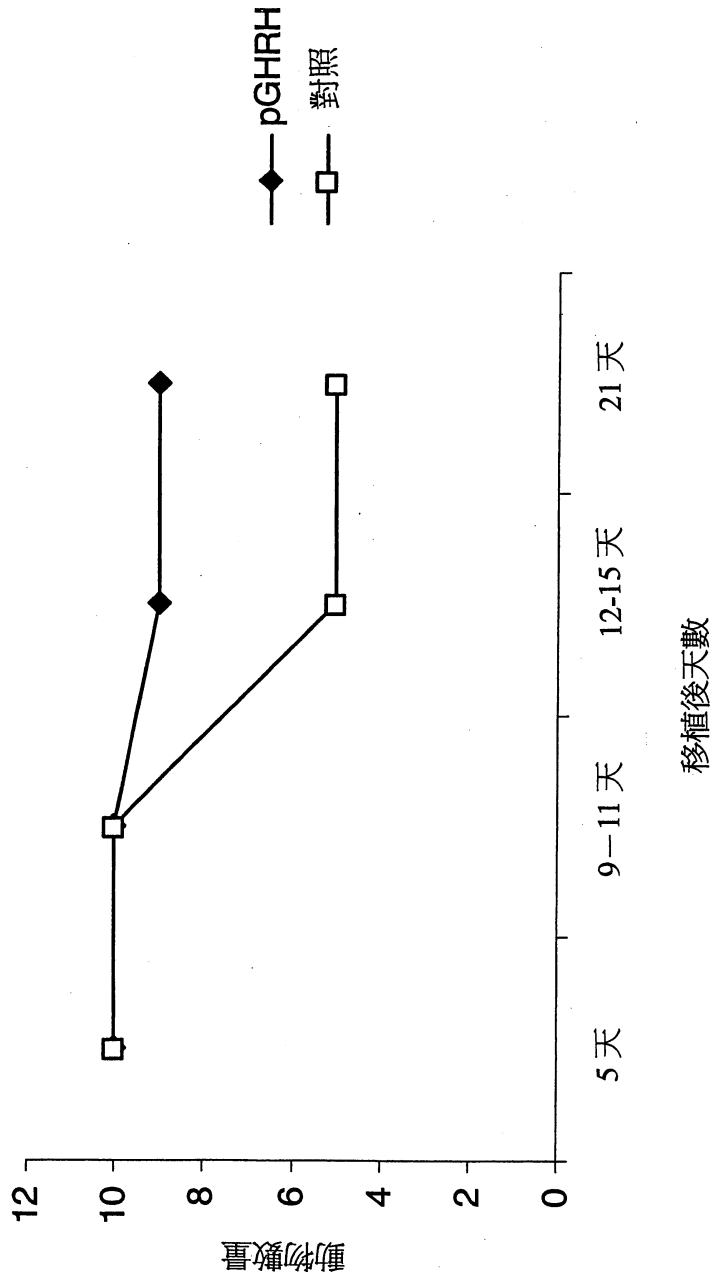


圖 12

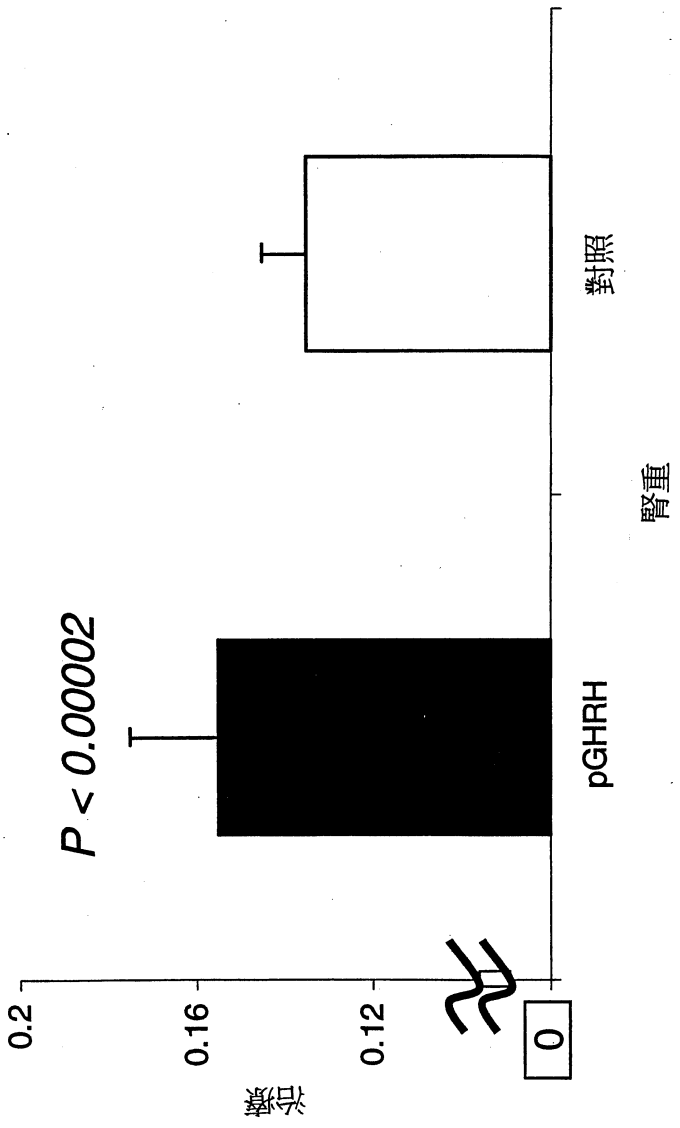
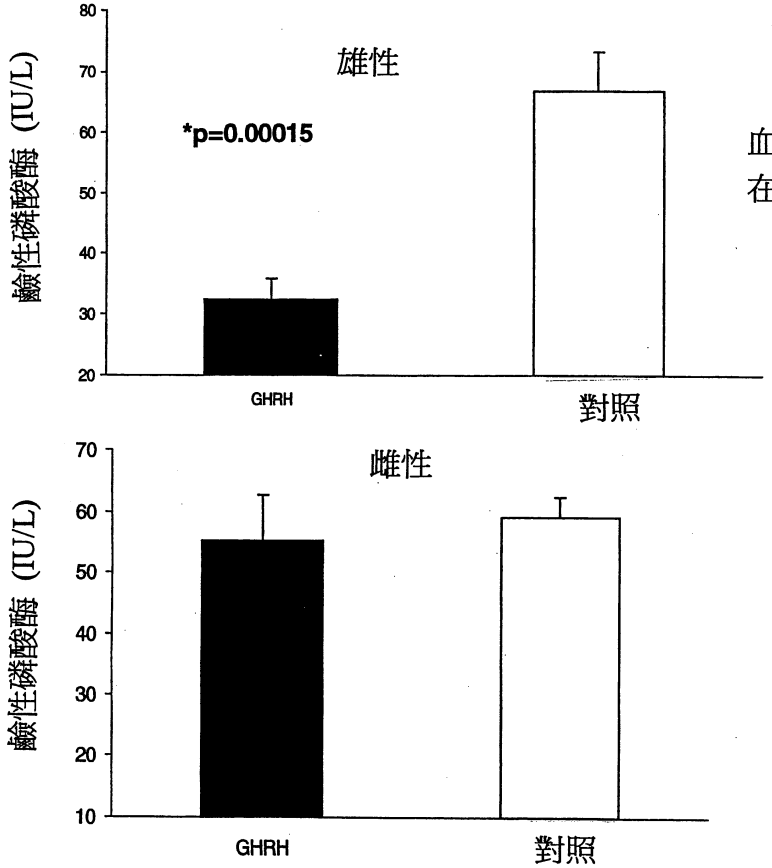


圖 13



血清鹼性磷酸酶，腫瘤轉移的標誌，在接受治療的動物中降低

質體媒介的 GHRH 療法降低了患有 LL 腫瘤的雄性和雌性 C57/B16 小鼠中的轉移大量對照動物患有肺轉移

圖 14

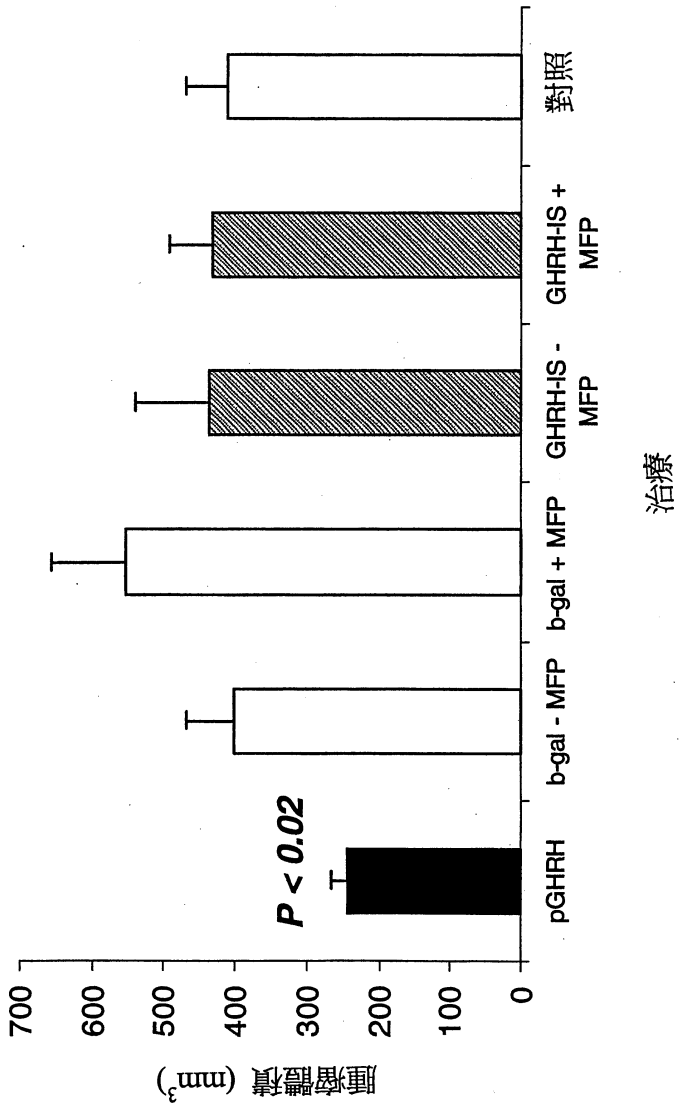

腫瘤體積 (mm^3)
0
100
200
300
400
500
600
700
P < 0.02
pGHRH
b-gal - MFP
b-gal + MFP
GHRH-IS - MFP
GHRH-IS + MFP
對照
治療

圖 15 顯示注射後第 56 天的蛋白代謝

I 組 (對照)												
4 隻狗	AST (SGOT)	ALT (SGPT)	T.膽紅素	Alk Phos	GGT	Tot.蛋白	白蛋白	球蛋白	A/G 比	膽固醇	BUN	肌酸酐
注射前平均值	19.75	27.75	0.10	43.25	7.00	6.25	3.43	2.83	1.28	164.25	11.75	0.73
注射後平均值	20.25	29.25	0.10	37.25	2.50	6.23	3.58	2.65	1.40	190.00	14.50	0.68
平均Δ值	0.50	1.50	0.00	-6.00	-4.50	-0.03	0.15	-0.18	0.13	25.75	2.75	-0.05
Δ/平均值%	2.53	5.41	0.00	-13.87	-64.29	-0.40	4.38	-6.19	9.80	15.68	23.40	-6.90
II 組 (200mcg)												
8 隻狗	AST (SGOT)	ALT (SGPT)	T.膽紅素	Alk Phos	GGT	Tot.蛋白	白蛋白	球蛋白	A/G 比	膽固醇	BUN	肌酸酐
注射前平均值	25.50	31.75	0.10	32.88	5.75	6.21	3.38	2.84	1.26	161.75	9.88	0.63
注射後平均值	23.63	31.38	0.11	38.38	4.38	6.44	3.61	2.83	1.39	157.25	11.63	0.70
平均Δ值	-1.88	-0.38	0.01	5.50	-1.38	0.23	0.24	-0.01	0.13	-4.50	1.75	0.08
Δ/平均值%	-7.35	-1.18	12.50	16.73	-23.91	3.62	7.04	-0.44	9.90	-2.78	17.72	12.00
III 組 (600mcg)												
8 隻狗	AST (SGOT)	ALT (SGPT)	T.膽紅素	Alk Phos	GGT	Tot.蛋白	白蛋白	球蛋白	A/G 比	膽固醇	BUN	肌酸酐
注射前平均值	24.14	29.43	0.10	33.00	4.75	6.15	3.43	2.73	1.29	172.63	11.88	0.70
注射後平均值	25.63	29.88	0.10	42.75	4.25	6.31	3.31	2.96	1.28	176.50	13.88	0.69
平均Δ值	1.48	0.45	0.00	9.75	-0.50	0.16	-0.11	0.24	-0.01	3.88	2.00	-0.01
Δ/平均值%	6.14	1.52	0.00	29.55	-10.53	2.64	-3.28	8.72	-0.97	2.24	16.84	-1.79
Iv 組 (1000mcg)												
8 隻狗	AST (SGOT)	ALT (SGPT)	T.膽紅素	Alk Phos	GGT	Tot.蛋白	白蛋白	球蛋白	A/G 比	膽固醇	BUN	肌酸酐
注射前平均值	24.63	29.38	0.10	41.25	6.25	5.98	3.40	2.58	1.33	149.25	11.38	0.69
注射後平均值	24.75	32.25	0.14	45.88	3.88	5.88	3.58	2.30	1.58	158.25	13.13	0.73
平均Δ值	0.13	2.88	0.04	4.63	-2.38	-0.10	0.18	-0.28	0.25	9.00	1.75	0.04
Δ/平均值%	0.51	9.79	37.50	11.21	-38.00	-1.67	5.15	-10.68	18.87	6.03	15.38	5.45

圖 16 顯示注射後 56 天狗體內血液值

	1 組 (對照) 4 隻狗				2 組 (200mcg) 8 隻狗				3 組 (600mcg) 8 隻狗				4 組 (1000mcg) 8 隻狗		
血液值	平均 Pre-Inj	平均 Post-Inj	平均 Δ	%Δ 平均	平均 Pre-Inj	平均 Post-Inj	平均 Δ	%Δ 平均	平均 Pre-Inj	平均 Post-Inj	平均 Δ	%Δ 平均	平均 Pre-Inj	平均 Post-Inj	平均 Δ
WBC	10.88	9.78	-1.10	*-10.1*	10.56	9.90	-0.66	*-6.3*	10.50	13.38	2.88	*27.4*	10.63	11.25	0.63
RBC	6.63	7.60	0.98	*14.7*	6.50	7.56	1.06	*16.3*	6.81	7.30	0.49	*7.2*	7.03	7.39	0.36
HGB	14.90	16.65	1.75	*11.7*	14.20	17.04	2.84	*20.0*	15.10	16.08	0.98	*6.5*	15.63	16.91	1.29
PCV	47.50	53.50	6.00	*12.6*	45.38	52.88	7.50	*16.5*	48.25	51.00	2.75	*5.7*	50.13	52.25	2.13
MCV	72.25	70.75	-1.50	*-2.1*	69.75	70.13	0.38	*0.5*	70.63	69.75	-0.88	*-1.2*	71.13	70.75	-0.38
MCH	22.53	22.03	-0.50	*-2.2*	21.91	22.56	0.65	*3.0*	22.13	21.90	-0.23	*-1.0*	22.23	22.91	0.69
MCHC	31.25	31.25	0.00	*0.0*	31.75	32.38	0.63	*2.0*	31.63	31.38	-0.25	*-0.8*	31.25	32.38	1.13
N (%)	69.25	60.75	-8.50	*-12.3*	66.75	62.88	-3.88	*-5.8*	61.63	65.63	4.00	*6.5*	58.00	62.25	4.25
Lym (%)	20.75	27.50	6.75	*32.5*	24.38	28.00	3.63	*14.9*	24.25	24.63	0.38	*1.5*	33.25	27.00	-6.25
Mono (%)	4.75	4.75	0.00	*0.0*	4.75	3.75	-1.00	*-21.1*	5.50	4.63	-0.88	*-15.9*	3.75	3.50	-0.25
Eos (%)	5.25	7.00	1.75	*33.3*	4.13	5.38	1.25	*30.3*	5.25	5.00	-0.25	*-4.8*	4.88	7.25	2.38
Bas (%)	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00		0.13	0.00	-0.13
D.BR	0.00	0.00	0.00		0.00	0.01	0.01		0.00	0.01	0.01		0.03	0.03	0.00
LDH	25.75	22.50	-3.25	*-12.6*	47.75	26.50	-21.25	*-44.5*	34.88	24.50	-10.38	*-29.7*	28.00	31.50	3.50
rothrombin Time	7.50	7.70	0.20	*2.7*	8.36	8.34	-0.03	*-0.3*	9.13	8.20	-0.93	*-10.1*	7.93	8.34	0.41
Qnt Plat	118.25	259.75	141.50	*119.7*	140.50	263.50	123.00	*87.5*	239.25	291.25	52.00	*21.7*	271.25	283.88	12.63
葡萄糖	123.00	110.75	-12.25	*-10.0*	114.25	108.88	-5.38	*-4.7*	119.50	112.13	-7.38	*-6.2*	113.50	109.63	-3.88
澱粉酶	894.50	819.25	-75.25	*-8.4*	885.50	887.50	2.00	*0.2*	806.50	874.38	67.88	*8.4*	836.63	898.75	62.13
脂酶	218.50	213.00	-5.50	*-2.5*	198.00	224.88	26.88	*13.6*	315.50	262.38	-53.13	*-16.8*	217.00	223.13	6.13
Na	146.75	145.75	-1.00	*-0.7*	146.00	145.00	-1.00	*-0.7*	146.25	145.00	-1.25	*-0.9*	146.00	145.88	-0.13
K	4.33	4.25	-0.08	*-1.7*	4.11	4.09	-0.02	*-0.6*	4.48	4.25	-0.23	*-5.0*	4.38	4.26	-0.11
Na/K 比	34.25	34.75	0.50	*1.5*	35.63	35.50	-0.13	*-0.4*	32.75	34.25	1.50	*4.6*	33.50	34.25	0.75
Cl-	110.75	108.00	-2.75	*-2.5*	111.13	107.25	-3.88	*-3.5*	111.25	108.13	-3.13	*-2.8*	110.50	109.00	-1.50
CPK	91.50	125.75	34.25	*37.4*	178.13	119.75	-58.38	*-32.8*	180.50	143.25	-37.25	*-20.6*	128.88	147.75	18.88
TGR	34.25	41.25	7.00	*20.4*	33.38	40.00	6.63	*19.9*	31.50	38.63	7.13	*22.6*	34.75	42.00	7.25
摩爾滲透壓濃度 Calc.	304.50	302.75	-1.75	*-0.6*	301.88	300.13	-1.75	*-0.6*	303.25	301.38	-1.88	*-0.6*	302.38	302.63	0.25
Corr. Ca	10.00	10.15	0.15	*1.5*	10.03	10.70	0.67	*6.6*	10.00	10.38	0.38	*3.8*	9.93	10.25	0.32
Mg	1.48	1.48	0.00	*0.0*	1.56	1.50	-0.06	*-4.0*	1.50	1.46	-0.04	*-2.5*	1.51	1.41	-0.10

圖 17 顯示注射後 56 天狗體內的骨代謝

I 組 (對照)				
4 隻狗	磷	鈣	Ca/PO4 比	
注射前平均值	4.25	9.83	2.33	
注射後平均值	4.53	10.38	2.29	
平均Δ值	0.28	0.55	-0.03	
Δ/平均值%	6.47	5.60	-1.38	
II 組 (200mcg)				
8 隻狗	磷	鈣	Ca/PO4 比	
注射前平均值	4.25	9.83	2.39	
注射後平均值	4.14	10.40	2.51	
平均Δ值	-0.11	0.58	0.13	
Δ/平均值%	-2.65	5.85	5.28	
III 組 (600mcg)				
8 隻狗	磷	鈣	Ca/PO4 比	
注射前平均值	4.44	10.05	2.29	
注射後平均值	3.99	10.20	2.56	
平均Δ值	-0.45	0.15	0.27	
Δ/平均值%	-10.14	1.49	11.82	
Iv 組 (1000mcg)				
8 隻狗	磷	鈣	Ca/PO4 比	
注射前平均值	4.83	9.91	2.11	
注射後平均值	3.74	10.16	2.72	
平均Δ值	-1.09	0.25	0.61	
Δ/平均值%	-22.54	2.52	28.71	

圖 18 顯示狗的診斷特異性治療及存活

組	治療	藥物		劑量	狗#	癌類型	狗#	存活天數
對照	Radiation		GC1	80 Rads (26 visits)	1	惡瘤	1	254
	化療	長春新鹼	GC2	0.5-0.65 (mg/M²)	1	MCT	1	182
		阿黴素	GC3	30 (mg/M²)	1	肉瘤	1	178
		Carboplatin	GC4	90 (mg/M²)	1	黑素瘤	1	133*
		CCNU	GC5	65 (mg/M₂)	1	淋巴瘤	1	180
		Vin/Cyt	GC6/GC7/GC8/GC9	0.4-0.7 / 200-300 (mg/M²)	6	淋巴瘤	4	104/104/104/189*
			GC10			肉瘤	1	167
			GC11			白血病	1	275
		Vin/Adr	GC12	0.5-0.6 / 30 (mg/M²)	1	S肉瘤	1	49*
			GC13	0.5-0.6 / 30 (mg/M²)	1	淋巴瘤	1	130
		Cyt/Adr	GC14	? / 30 (mg/M²)	1	肉瘤	1	171
		Vin/Cyt/Adr	GC15	0.5-0.6 / 200 / 30 (mg/M²)	2	淋巴瘤	1	180
			GC16			肉瘤	1	147*
	Rad./ Chemo.	長春新鹼/CCNU	GC17	0.5-0.6 / 60 (mg/M²) 80 Rads (18 visits)	1	MCT	1	178*
		阿黴素	GC18	15-30 (mg/M²) 80 Rads (19 visits)	1	肉瘤	1	106
		Carboplatin	GC19	90 (mg/M²) 80 Rads (6 visits)	1	黑素瘤	1	258
實驗	輻射		GE1/GE2	80 Rads (6-21 visits)	6	肉瘤	2	167 - 167
			GE3			MCT	1	251
			GE4			腺瘤	1	251
			GE5/GE6			實性腫瘤	2	174 -- 124*
	化療	Cytoxin	GE7	350 (mg/M²)	1	非"肺結核"		72*
		Vin/Cyt/Adr/Car	GE8	0.75 / 300 / 15-30 / 200 (mg/M²)	1	肉瘤	1	167
	Rad./ Chemo.	Vin/Cyt/Adr	GE9	0.6-0.7 / 200-300 / 30 (mg/M²) 80 Rads (2-3 visits)	1	淋巴瘤	1	67*
		Vin/Cyt	GE10	0.6 / 200 (mg/M²) 80 Rads (3 visits)	1	腺瘤	1	83
	外科切除		GE11		1	實性腫瘤	1	97

圖 19 顯示瘤症狗體內血液值

實驗注射狗	WBC/HPF	RBC/HPF	HGB	PCV (%)	MCV	MCH	MCHC	Neutrophils	Lymphs (%	Monos (%)	EOS (%)	Basophils
注射前平均值	7.97	5.64	13.29	38.29	67.86	23.50	34.86	78.00	13.00	7.43	1.67	1.00
注射後平均值	7.04	**6.59**	**15.11**	**43.88**	66.75	23.01	34.50	77.13	15.38	5.63	2.60	1.00
平均Δ值	-1.89	1.03	2.06	6.29	-0.86	-0.41	-0.29	-1.71	3.71	-1.86	0.67	0.00
Δ/平均值%	*-23.66*	*18.23*	*15.48*	*16.42*	-1.26	-1.76	-0.82	-2.20	28.57	-25.00	40.00	0.00
TTEST	**0.04**	**0.01**	**0.02**	**0.02**	0.77	0.27	0.05	0.21	0.35	0.29	0.98	
對照-未注射狗	WBC/HPF	RBC/HPF	HGB	PCV (%)	MCV	MCH	MCHC	Neutrophils	Lymphs (%	Monos (%)	EOS (%)	Basophils
平均值	12.72	5.72	13.26	38.00	66.40	23.36	35.22	71.91	18.80	6.91	2.76	0.32
平均Δ值	-1.40	-0.46	-0.91	-1.92	-0.08	0.17	0.44	-3.70	3.43	0.58	0.16	0.04
Δ/平均值%	-11.02	*-8.10*	*-6.82*	*-5.06*	-0.12	0.74	1.24	-5.15	18.24	8.33	5.92	10.89

圖 20 顯示老年健康狗體內血液值

Gulf Coast- 非癌症/實驗											
4 隻狗				RBC	HGB	WBC	Lymphocy	T.蛋白	白蛋白	球蛋白	A/G 比	膽固醇
注射前平均值				6.53	15.90	8.55	18.50	6.30	3.50	2.80	1.28	247.00
注射後平均值				6.73	16.33	8.80	14.50	6.50	3.40	3.10	1.10	264.75
Δ值				0.20	0.42	0.25	-4.00	0.20	-0.10	0.30	-0.18	17.75
Δ/平均值%				**0.03**	**0.03**	**0.03**	**-0.28**	**0.03**	**-0.03**	**0.10**	**-0.16**	**0.07**

Gulf Coast- 非癌症/實驗							
4 隻狗	BUN	肌酸酐	BUN/Creat	磷	鈣	Ca/PO4 比	葡萄糖
注射前平均值	13.25	0.73	19.50	4.20	10.65	2.54	110.00
注射後平均值	12.00	0.83	14.50	3.73	10.78	2.89	104.25
Δ值	-1.25	0.10	-5.00	-0.48	0.13	0.13	-5.75
Δ/平均值%	**-0.10**	**0.12**	**-0.34**	**-0.13**	**0.01**	**0.04**	**-0.06**

陸、(一)、本案指定代表圖爲：第 3 圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

柒、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：