



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1890375 B

(45) 授权公告日 2011. 12. 07

(21) 申请号 200480036787. 1

A61K 9/16 (2006. 01)

(22) 申请日 2004. 10. 11

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/509, 936 2003. 10. 10 US

WO 02094313 A2, 2002. 11. 28, 说明书全文.

WO 9903981 A1, 1999. 01. 28, 说明书全文.

WO 03011334 A1, 2003. 02. 13, 说明书全文.

WO 0231137 A2, 2002. 04. 18, 说明书全文.

WO 0236792 A, 2002. 05. 10, 说明书第 2-16,

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2006. 06. 09

实施例 2、3, 权利要求书.

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/GB2004/004279 2004. 10. 11

US 6110707 A, 2000. 08. 29, 说明书全文.

(87) PCT 申请的公布数据

WO2005/035771 EN 2005. 04. 21

ROY M. J. . INDUCTION OF ANTIGEN-SPECIFIC

CD8+ T CELLS, HELPER CELLS, AND

PROTECTIVE LEVELS OF ANTIBODY IN HUMANS

BY PARTICLE-MEDIATED ADMINISTRATION

OF A HEPATITIS B VIRUS DNA VACCINE.

VACCINE 19. 2001, 19764-778.

(73) 专利权人 宝德杰克特疫苗有限公司

地址 美国特拉华州

(72) 发明人 J·富勒

审查员 张秀丽

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

C12N 15/85 (2006. 01)

C12N 15/38 (2006. 01)

C12N 15/36 (2006. 01)

C12N 15/17 (2006. 01)

C12N 15/12 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 34 页

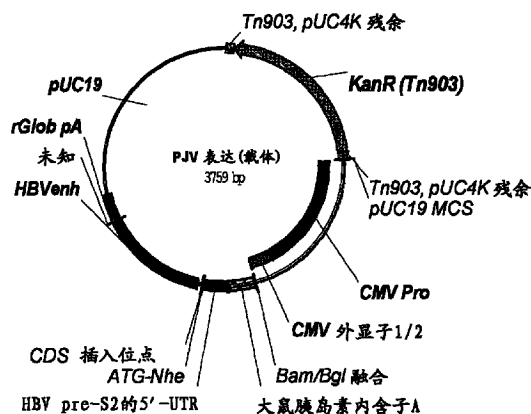
序列表 14 页 附图 13 页

(54) 发明名称

核酸构建体

(57) 摘要

一种核酸构建体, 含有嵌合启动子序列和用于插入与嵌合启动子有效连接的编码序列的克隆位点, 其中, 嵌合启动子序列包括: (a) hCMV 立即早期启动子序列; (b) hCMV 主要立即早期基因的外显子 1 和至少一部分外显子 2; (c) 置换 hCMV 主要立即早期基因的内含子 A 区的异源内含子。



1. 一种核酸构建体,包括:
 - (i) 嵌合启动子序列,该嵌合启动子序列包括:
 - (a)hCMV 立即早期启动子序列;
 - (b)hCMV 主要立即早期基因的外显子 1 和至少一部分外显子 2;
 - (c) 置换 hCMV 主要立即早期基因的内含子 A 区的异源内含子;
 - (ii) 与所述嵌合启动子序列 (i) 有效连接的编码序列;和
 - (iii) 位于编码序列 (ii) 的 3' 端并与之有效连接的增强子序列;其中所述增强子序列来源于 HBsAg 序列的 3' UTR,并且所述编码序列 (ii) 对所述增强子序列是异源的。
2. 根据权利要求 1 的核酸构建体,进一步包括来源于 HBVpreS2 抗原序列、HBV e- 抗原序列或 HSV 型 2gD 抗原序列的非翻译前导序列,其中所述前导序列与所述的启动子和编码序列有效连接,并且所述编码序列对所述非翻译前导序列是异源的。
3. 一种核酸构建体,包括:
 - (i) 嵌合启动子序列,包括:
 - (a)hCMV 立即早期启动子序列;
 - (b)hCMV 主要立即早期基因的外显子 1 和至少一部分外显子 2;
 - (c) 置换 hCMV 主要立即早期基因的内含子 A 区的异源内含子;
 - (ii) 编码序列,与嵌合启动子有效连接;
 - (iii) 非翻译前导序列,选自 HBVpreS2 抗原序列、HBV e- 抗原序列和 HSV 型 2gD 抗原序列,并与嵌合启动子有效连接;和
 - (iv) 增强子序列,来源于 HBsAg 序列的 3' 非翻译区 (UTR),并与嵌合启动子有效连接,其中,所述增强子序列位于编码序列下游。
4. 根据上述任一项权利要求所述的核酸构建体,其中:
 - (i) 所述 hCMV 立即早期启动子序列 (a) 含有 SEQ ID No. 1;和 / 或
 - (ii) 所述 (b) 包括 SEQ ID No. 2。
5. 根据权利要求 1-3 任一项所述的核酸构建体,其中所述异源内含子 (c) 含有选自下列的序列:大鼠胰岛素基因内含子 A 序列、鸡角蛋白基因内含子 A 序列和鸡心脏的肌动蛋白基因内含子 A 序列。
6. 根据权利要求 5 所述的核酸构建体,其中,所述大鼠胰岛素基因内含子 A 序列包括 SEQ ID No. 3。
7. 根据权利要求 2 或 3 所述的核酸构建体,其中:
 - (i) 所述非翻译前导序列选自 SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 6 或 SEQ ID No. 7;和 / 或
 - (ii) 所述增强子序列选自 SEQ ID No. 8。
8. 根据权利要求 1-3 任一项所述的核酸构建体,包括:
 - (i) 聚腺苷酸化序列;和 / 或
 - (ii) 编码信号肽的序列。
9. 根据权利要求 8 所述的核酸构建体,其中:
 - (i) 所述聚腺苷酸化序列为选自下列的基因的聚腺苷酸化序列:兔 β - 珠蛋白基因、人乳头状瘤病毒 (HPV) 早期或晚期基因、HSV-2gB 基因、猿 CMV 立即早期基因和 HSVgD 晚期基因;和 / 或

(ii) 所述信号肽选自人组织纤溶酶原激活剂信号肽 (hTPAsp)、抑肽酶信号肽、烟草伸展蛋白信号肽和鸡溶菌酶信号肽。

10. 根据权利要求 9 所述的核酸构建体, 其中, 所述聚腺苷酸化序列选自 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 13。

11. 根据权利要求 1-3 任一项所述的核酸构建体, 其中, 所述编码序列编码抗原。

12. 根据权利要求 11 所述的核酸构建体, 其中, 所述抗原是病毒、细菌、寄生虫或真菌病原体的抗原、过敏抗原或癌症抗原。

13. 根据权利要求 12 所述的核酸构建体, 其中所述病毒抗原为 HPV、HIV、HSV1、HSV2、流感病毒、甲型肝炎病毒或乙型肝炎病毒抗原。

14. 根据权利要求 13 所述的核酸构建体, 其中, 所述抗原是 HBsAg。

15. 根据权利要求 1 到 3 任一项所述的核酸构建体, 其中所述编码序列编码 ADP 核糖基化的细菌亚基 A 和 / 或 B 亚基。

16. 根据权利要求 15 所述的核酸构建体, 其中所述细菌亚基选自霍乱毒素亚基 A、霍乱毒素亚基 B、大肠杆菌不耐热毒素亚基 A 或大肠杆菌不耐热毒素亚基 B。

17. 根据权利要求 1-3 任一项所述的核酸构建体, 为 DNA 质粒。

18. 包被颗粒, 适合于由颗粒介导的释放装置释放, 所述颗粒包括由上述任一项权利要求所述的核酸构建体包被的载体颗粒。

19. 根据权利要求 18 所述的包被颗粒, 其中所述载体颗粒为金或钨。

20. 一种颗粒介导的释放装置, 负载根据权利要求 18 或 19 所述的包被颗粒。

21. 根据权利要求 20 所述的颗粒介导的释放装置, 为无针注射器。

22. 一种药物制剂, 含有权利要求 1 到 17 任一项所述的核酸构建体以及可药用的赋形剂。

23. 一种疫苗, 含有根据权利要求 11 到 14 任一项所述的核酸构建体。

24. 根据权利要求 23 所述的疫苗, 还含有根据权利要求 15 或 16 所述的核酸构建体。

25. 一种在体外获得在哺乳动物细胞中表达所研究多肽的方法, 所述方法包括将根据权利要求 1 到 17 任一项所述的核酸构建体或权利要求 18 或 19 所述的包被颗粒转移到所述细胞中。

26. 根据权利要求 11 到 14 任一项所述的核酸构建体用于制备疫苗中的用途。

27. 根据权利要求 11 到 14 任一项所述的核酸构建体用于制备针对病原体感染、变态反应或癌症的疫苗中的用途。

28. 根据权利要求 26 或 27 所述的用途, 其中所述疫苗通过注射、透皮颗粒递送、吸入、局部、口服、鼻腔或跨粘膜递送。

核酸构建体

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学和免疫学领域,一般还涉及用于核酸免疫接种的试剂。更具体地,本发明涉及表达抗原多肽的核酸构建体,还涉及使用这类试剂进行核酸免疫接种的方法。

背景技术

[0002] 基因治疗和核酸免疫接种在治疗和预防获得性和遗传性疾病上是颇有发展前景的方法。这类技术能将所需核酸转移到受试者内,并随后在体内表达。转移可通过离体转染来自受试者的细胞或组织,并将转化物质再导入宿主中完成。或者,可将核酸直接给药到受试者体内。

[0003] 这类技术中的每种技术均要求核酸在转染细胞中高效表达,以提供足量的治疗基因产物或抗原基因产物。已知几种因子影响到表达水平,包括转染率,以及所研究基因或序列转录和 mRNA 翻译的效率。

[0004] 本领域已描述多种表达系统,每种表达系统一般都由含所研究基因或核苷酸序列的载体组成,该基因或核苷酸序列与表达调控序列有效连接。这类调控序列包括转录启动子序列和转录起始和终止序列。一般用于哺乳动物细胞表达系统的启动子包括 SV40 早期启动子、巨细胞病毒 (CMV) 启动子,如 CMV 立即早期启动子 (Chapman et al (1991) Nucl. Acids Res. 19:3979-3986)、小鼠乳腺癌病毒长末端重复 (LTR) 启动子、腺病毒主要晚期启动子 (Ad MLP) 以及单纯疱疹病毒 (HSV) 启动子等。通常也使用非病毒启动子,如来源于鼠金属硫蛋白基因的启动子。

[0005] 表达系统通常包括转录调制元件,即指“增强子”。增强子被广义定义为顺式作用序列 (cis-acting agent),它在同启动子 / 基因序列有效连接时,将会提高该基因序列的转录。增强子离所研究序列的有效作用距离比其他表达调控元件 (如启动子) 要远很多,并且可位于所研究序列的任何方向 (Banerji et al. (1981) Cell 27:299-308, deVilleirs et al. (1981) Nucl. Acids Res. 9:6251-6264)。增强子已从多种病毒源中被识别出来,包括多形瘤病毒 (polyoma virus)、BK 病毒 (BK virus)、巨细胞病毒 (cytomegalovirus virus, CMV)、腺病毒 (adenovirus)、猿猴病毒 40 (simian virus 40, SV40)、莫洛尼肉瘤病毒 (Moloney sarcomavirus)、牛乳头状瘤病毒 (bovine papilloma virus) 和劳氏肉瘤病毒 (Rous sarcoma virus) (deVilleirs et al 同上, Rosenthal et al. (1983) Science 222:749-755, Hearing et al. (1983) Cell 33:695-703, Weeks et al. (1983) Mol. Cell. Biol. 3:1222-1234, Levinson et al. (1982) Nature 295:568-572, 和 Luciw et al. (1983) Cell 33:705-716)。

[0006] 许多用于核酸免疫接种和基因治疗的表达系统均使用 hCMV 立即早期启动子。见如授权予 Stinski 的美国专利 No. 5168062 和 5385839, 和欧洲专利说明书 0323997 B1。使用 hCMV 立即早期启动子的表达载体包括,例如 pWRG7128 (Roy et al, Vaccine 19, 764-778, 2001) 和 pBC12/CMV 和 pJW4303 (在 W095/20660 中提及)。Chapman et al (1991) 已报道:

不含 hCMV 内含子 A 时, hCMV 立即早期启动子表达量降低。

发明内容

[0007] 使用可控 (manipulated) 病毒启动子 / 表达序列已开发出一种核酸构建体, 它使宿主细胞中的异源编码序列表达得以提高。该构建体适合抗原编码基因的高效表达, 因此能使用于核酸免疫接种中。特别地, 该构建体能提供到载体颗粒上, 用于颗粒介导的核酸免疫接种。

[0008] 因此, 本发明提供一种核酸构建体, 它包含嵌合启动子序列和插入与嵌合启动子有效连接的编码序列的克隆位点, 其中, 该嵌合启动子序列包括:

[0009] (a) hCMV 立即早期启动子序列;

[0010] (b) hCMV 主要立即早期基因的外显子 1 和至少一部分外显子 2; 和

[0011] (c) 置换 hCMV 主要立即早期基因的内含子 A 区的异源内含子。

[0012] 本发明还提供:

[0013] - 一种核酸构建体, 其包括:

[0014] (i) 嵌合启动子序列, 其包括:

[0015] (a) hCMV 立即早期启动子序列;

[0016] (b) hCMV 主要立即早期基因的外显子 1 和至少一部分外显子 2; 和

[0017] (c) 置换 hCMV 主要立即早期基因的内含子 A 区的异源内含子; 和

[0018] (ii) 插入与嵌合启动子有效连接的编码序列的克隆位点; 和

[0019] (iii) (a) 非翻译前导序列, 其来源于 HBV preS2 抗原序列、HBV e- 抗原序列或 HSV 型 2gD 抗原序列, 并与嵌合启动子有效连接; 和 / 或

[0020] (b) 增强子序列, 其来源于 HBsAg 序列的 3' 非翻译区 (UTR), 或猿 CMV 立即早期基因序列的 3' UTR, 并与嵌合启动子有效连接, 其中, 增强子序列位于克隆位点下游;

[0021] - 一种核酸构建体, 其包括:

[0022] (i) 启动子序列;

[0023] (ii) 非翻译前导序列, 其来源于 HBV preS2 抗原序列、HBV e- 抗原序列或 HSV 型 2gD 抗原序列; 和

[0024] (iii) 有效连接于 (i) 和 (ii) 的编码序列

[0025] 其中, 编码序列对非翻译前导序列是异源的;

[0026] - 一种核酸构建体, 其包括:

[0027] (i) 启动子序列;

[0028] (ii) 编码序列, 其与启动子序列 (i) 有效连接; 和

[0029] (iii) 增强子序列, 位于编码序列 (ii) 的 3' 端, 并与之有效连接;

[0030] 其中, 增强子序列 (iii) 来源于 HBsAg 序列的 3' UTR 或猿 CMV 立即早期基因序列的 3' UTR, 并且编码序列 (ii) 对 3' 端增强子序列是异源的;

[0031] - 一种在哺乳动物细胞中表达所研究多肽的方法, 该方法包括将本发明的核酸构建体转移到所述细胞中, 该构建体包括编码所述多肽的编码序列;

[0032] - 适合于由颗粒介导的释放装置释放的包被颗粒, 该包被颗粒包括由本发明的核酸构建体包被的载体颗粒, 该构建体包括编码所述多肽的编码序列;

- [0033] - 用于颗粒介导的释放装置的剂量容器, 包含包被颗粒;
- [0034] - 一种负载包被颗粒的颗粒介导的释放装置;
- [0035] - 一种核酸免疫接种的方法, 包括给予受试者有效剂量的包被颗粒, 在颗粒中编码序列编码抗原;
- [0036] - 一种经纯化、分离的嵌合启动子序列, 其包括:
- [0037] (a) hCMV 立即早期启动子序列;
- [0038] (b) hCMV 主要立即早期基因的外显子 1 和至少一部分外显子 2; 和
- [0039] (c) 置换 hCMV 主要立即早期基因的内含子 A 区的异源内含子。
- [0040] 由于在此公开, 本发明上述和其他主题、方面、实施方案和优点易于呈现给本领域普通技术人员。

附图说明

- [0041] 图 1 示出使用多种质粒表达载体获得的乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 的表达水平。
- [0042] 图 2 示出加入内含子对 SCC15 细胞中 HBsAg 和 B16 细胞中 β -gal 表达的影响 (三次实验的平均值)。
- [0043] 图 3 示出大鼠胰岛素内含子 A 和 HBV3' UTR 对 SCC15 细胞中 β -gal 表达的影响 (三次实验的平均值)。
- [0044] 图 4 示出大鼠胰岛素内含子 A 和 HBV3' UTR 对 SCC15 细胞中 HSVgD 表达的影响 (三次实验的平均值)。
- [0045] 图 5 示出大鼠胰岛素内含子 A 和 HBV3' UTR 对 SCC15 和 B16 细胞中 SEAP 表达的影响 (每个细胞系重复三次)。
- [0046] 图 6 示出异源信号肽指导 B16 细胞中 SEAP 或 hFc 片段分泌的能力。
- [0047] 图 7 示出使用包含于多种质粒表达载体的抗原编码核酸免疫接种的小鼠血清中检测到的抗体水平。
- [0048] 图 8 是 pJV 表达载体的示意图。
- [0049] 图 9 是 pJV7389 的示意图。
- [0050] 图 10 是 pJV7400 的示意图。
- [0051] 图 11 是 pJV7468 的示意图。
- [0052] 图 12 是 pJV7563 的示意图。
- [0053] 图 13 列出 pJV7563 的碱基组成。
- [0054] 序列说明
- [0055] SEQ ID NO:1 是 hCMV 立即早期启动子序列 (GenBank#M60321, X17403)。
- [0056] SEQ ID NO:2 是 hCMV 主要立即早期基因的外显子 1 和 2 的序列 (GenBank#M60321, X17403)。
- [0057] SEQ ID NO:3 是大鼠胰岛素内含子 A 的序列 (GenBank#J00748)。
- [0058] SEQ ID NO:4 是本发明的嵌合启动子的序列。
- [0059] SEQ ID NO:5 是 HBV preS2 抗原 5' UTR 序列的前导序列 (GenBank#M54923)。
- [0060] SEQ ID NO:6 是 HSV 型 2gD 5' UTR 序列的前导序列 (GenBank#Z86099)。

- [0061] SEQ ID NO:7 是 HBV e 抗原 5' UTR 序列的前导序列 (GenBank#M54923)。
- [0062] SEQ ID NO:8 是 HBVenh 3' UTR 的序列 (GenBank#AF143308)。
- [0063] SEQ ID NO:9 是猿立即早期基因 3' UTR 的序列 (GenBank#M16019)。
- [0064] SEQ ID NO:10 是兔 β -珠蛋白的聚腺苷酸序列 (GenBank#K03256)。
- [0065] SEQ ID NO:11 是猿 sCMV 立即早期基因的聚腺苷酸序列 (GenBank#M16019)。
- [0066] SEQ ID NO:12 是 HSV2 gB 基因的聚腺苷酸序列 (GenBank#Z86099)。
- [0067] SEQ ID NO:13 是 HPV16 早期基因的聚腺苷酸序列 (GenBank#K02718)。
- [0068] SEQ ID NO:14 是 pJV 表达载体的序列
- [0069] SEQ ID NO:15 是 PCR 引物 JF93
- [0070] SEQ ID NO:16 是 PCR 引物 F110
- [0071] SEQ ID NO:17 是 PCR 引物 GW1
- [0072] SEQ ID NO:18 是 PCR 引物 JF254
- [0073] SEQ ID NO:19 是 PCR 引物 GW150
- [0074] SEQ ID NO:20 是 PCR 引物 JF255
- [0075] SEQ ID NO:21 是 PCR 引物 DS1
- [0076] SEQ ID NO:22 是 PCR 引物 DA1
- [0077] SEQ ID NO:23 是 PCR 引物 JF301
- [0078] SEQ ID NO:24 是 PCR 引物 JF302
- [0079] SEQ ID NO:25 是 PCR 引物 JF84
- [0080] SEQ ID NO:26 是 PCR 引物 JF225
- [0081] SEQ ID NO:27 是 PCR 引物 JF335
- [0082] SEQ ID NO:28 是 PCR 引物 JF336
- [0083] SEQ ID NO:29 是 PCR 引物 JF357
- [0084] SEQ ID NO:30 是 PCR 引物 JF365
- [0085] SEQ ID NO:31 是 PCR 引物 JF393
- [0086] SEQ ID NO:32 是 PCR 引物 JF406
- [0087] SEQ ID NO:33 是 PCR 引物 JF256
- [0088] SEQ ID NO:34 是 PCR 引物 JF257
- [0089] SEQ ID NO:35 是 PCR 引物 JF320
- [0090] SEQ ID NO:36 是 PCR 引物 JF321
- [0091] SEQ ID NO:37 是 PCR 引物 JF386
- [0092] SEQ ID NO:38 是 PCR 引物 FcAS
- [0093] SEQ ID NO:39 是寡核苷酸 JF354
- [0094] SEQ ID NO:40 是 PCR 引物 JF355
- [0095] SEQ ID NO:41 是 PCR 引物 JF356
- [0096] SEQ ID NO:42 是寡核苷酸 JF348
- [0097] SEQ ID NO:43 是 PCR 引物 JF349
- [0098] SEQ ID NO:44 是 PCR 引物 JF350
- [0099] SEQ ID NO:45 是寡核苷酸 JF351

- [0100] SEQ ID NO:46 是 PCR 引物 JF352
[0101] SEQ ID NO:47 是 PCR 引物 JF353
[0102] SEQ ID NO:48 是 PCR 引物 JF430
[0103] SEQ ID NO:49 是 PCR 引物 JF442
[0104] SEQ ID NO:50 是 PCR 引物 JF421
[0105] SEQ ID NO:51 是 PCR 引物 JF444
[0106] SEQ ID NO:52 是伪狂犬病病毒 (PRV) 启动子序列
[0107] SEQ ID NO:53 是劳氏肉瘤病毒 (RSV) 启动子序列

发明内容

[0108] 在详细描述本发明前,应该理解的是:本发明并不限于特别示例的分子或者方法参数,因其毫无疑问地可有多种变化形式。同样应该理解的是:本文所用术语只是出于描述本发明具体实施方案的目的,而非意在限制。另外,若无另外指出,本发明的实施将采用病毒学、微生物学、分子生物学、重组 DNA 技术和免疫学中的常规方法,所有这些方法为本领域普通技术人员所熟知。这些技术在文献中有完整的描述,见如 Sambrook 等人编著的《分子克隆:实验室手册》(第二版,1989)(Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2nd Edition,1989)),《DNA 克隆:一种实验方法》第 I 卷和 II 卷(DNACloning:A Practical Approach, vol. I&II(D.Glover, ed.)),《寡核苷酸合成》(Oligonucleotide Synthesis(N.Gait, ed.,1984)),《分子克隆实验指南》(A Practical Guide to Molecular Cloning(1984))和《基础病毒学》第二版第 I 卷和 II 卷(Fundamental Virology,2nd Edition, vol. I&II(B.N.Fields and D.M.Knipe, eds.))。

[0109] 本文所引用的全部出版物、专利和专利申请,不管是上文还是下文,均在此通过引用全文纳入本说明书中。

[0110] 必须注意的是:如在说明书和所附权利要求书中使用的,单数形式的“一”、“一种”和“该”包括复数指代对象,除非上下文中另外明确指出。

[0111] A. 定义

[0112] 若无另外定义,本文所使用的所有技术和科学术语具有本发明所属技术领域普通技术人员通常理解的含义。尽管许多与本文所描述的相似或等同的方法和材料可用于本发明的实施,但本文只描述了优选的材料和方法。

[0113] 在描述本发明中将使用如下术语,并被定义为具有如下含义。

[0114] 在本文中,术语“核酸免疫接种”用来指将编码一个或多个所选抗原的核酸分子导入宿主细胞中,以实现抗原在体内表达。核酸分子可直接导入受试者,如通过标准的肌肉注射或皮内注射、透皮颗粒释放、吸入、局部给药、或通过口服、鼻腔或粘膜方式给药。或者,分子也可在体外导入从受试者取出的细胞中。在后一种情况下,含有所研究核酸分子的细胞被再导入受试者,这样针对核酸分子编码抗原的免疫应答得以启动。在该免疫接种中所使用的核酸分子在本文中一般指“核酸疫苗”。

[0115] 术语“佐剂”是指能特异性或非特异性改变、提高、引导、再引导、增强或启动抗原特异的免疫应答的物质或组合物。因此,佐剂和抗原的共同给药能使给予抗原的受试者获得所需免疫应答必要的抗原剂量降低或减少,或者,共同给药也能在受试者内产生在定性

和 / 或定量上不同的免疫应答。特别地,佐剂的给予能增强免疫应答,如增大强度和 / 或延长持续时间。通过以下方法测定佐剂效果:将佐剂和疫苗组合物,以及疫苗组合物本身给予动物,并且通过使用标准检测方法如放射免疫法、ELISA,和 CTL 分析,比较两组抗体和 / 或细胞介导的免疫性。

[0116] “核心载体”是指被客体核酸 (guest nucleic acid) (如 DNA、RNA) 包被的载体,是为给予规定的颗粒大小和足够高的密度,以获得穿入细胞膜所需动量。因此客体分子能使用颗粒介导的技术被释放 (见如美国专利 No. 5, 100, 792)。核心载体一般包括如钨、金、铂、铁氧化物、聚苯乙烯和乳胶的物质。见如《基因转移的粒子轰击技术》(Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, (1994) Yang, N. ed., Oxford University Press, New York, NY pages 10-11)。

[0117] “无针注射器”是指一种仪器,它不借助于常规的针来穿刺皮肤就能透皮释放微粒组合物。本发明所使用的无针注射器会在本文中详细说明。

[0118] 术语“透皮”释放是指皮内 (如进入真皮或表皮)、透皮 (如“经皮肤的”) 和跨粘膜给药,如,通过将试剂注入或穿过皮肤或粘膜组织释放。见,如 Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives, Hadgraft and Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989); Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications, Robinson and Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987); 和 Transdermal Delivery of Drugs, Vols. 1-3, Kydonieus and Berner (eds.), CRC Press, (1987)。因此,本术语包括从无针注射器释放 (在美国专利 No. 5, 630, 796 中描述) 和颗粒介导的释放 (在美国专利 No. 5, 865, 796 中描述) 中释放。

[0119] “多肽”在最广义上被用来指两个或多个氨基酸亚基、氨基酸类似物,或其它假肽 (peptidomimetics) 的化合物。该亚基可通过肽键或其它键,如脂键、醚键等连接。在本文中使用的术语“氨基酸”指天然的和 / 或非天然的或合成的氨基酸,包括甘氨酸和两种 D 型或 L 型旋光异构体,和氨基酸类似物和假肽。如果肽链较短,三个或多个氨基酸的肽一般被称为寡肽。如果肽链较长,该肽一般被称为多肽或蛋白。

[0120] “抗原”指任何物质,一般指大分子,它能在个体中引发免疫应答。该术语可用来指单个大分子或指一组同质或异质的抗原大分子。本文中使用的“抗原”一般用来指包含一个或多个表位的蛋白分子或其一部分。基于本发明的目的,抗原可从任何合适的来源中获得或得到。另外,基于本发明的目的,“抗原”包括经修饰的蛋白,如天然序列的缺失、插入和置换 (一般在本质上是保守的),只要蛋白保持足够的免疫原性。这些修饰可是刻意的,如通过定向诱变,或者也可是偶然的,如通过产生抗原的宿主的突变。

[0121] 针对所研究抗原的“免疫应答”是在个体中产生针对该抗原的体液和 / 或细胞免疫应答。基于本发明的目的,“体液免疫应答”是指由抗体分子介导的免疫应答,而“细胞免疫应答”是指由 T- 淋巴细胞和 / 或其它白细胞介导的免疫应答。

[0122] 术语“核酸分子”和“多核苷酸”在本文中互换使用,指任何长度的核苷酸 (脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,或其类似物) 的聚合形式。多核苷酸可具有任何三维结构,并能发挥任何已知或未知的功能。多核苷酸的非限制性实例包括基因、基因片段、外显子、内含子、信使 RNA (mRNA)、转移 RNA,核糖体 RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分枝多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离 DNA、任何序列的分离 RNA、核酸探针和引物。

[0123] 多核苷酸一般由四种核苷酸碱基（腺嘌呤（A），胞嘧啶（C），鸟嘌呤（G），和胸腺嘧啶（T）（当多核苷酸是 RNA 时为尿嘧啶（U））的特定序列组成。因此，术语核酸序列是多核苷酸分子的字母表示。这种字母表示能输入具有中央处理单元的计算机的数据库中，用于生物信息学应用，如功能基因组学和同源性查询。

[0124] “载体”能将核酸序列转移到靶细胞（如病毒载体、非病毒载体、微粒载体和脂质体）。一般地，“载体构建体”“表达载体”和“基因转移载体”指任何能指导所研究基因的表达的核酸构建体，它能将基因序列转移到靶细胞。因此，该术语包括克隆和表达载体，以及病毒载体。“质粒”是由染色体外的遗传因子构成的载体。

[0125] “编码”所选抗原的核酸序列是指在合适的调节序列的调控下，在体内转录（在 DNA 的情况下）和翻译（在 mRNA 的情况下）成为多肽的核酸分子。编码序列的边界由 5' 端（氨基端）的起始密码子和 3' 端（羧基端）的翻译终止密码子决定。基于本发明的目的，这些核酸序列包括，但不限于病毒 cDNA、原核或真核 mRNA、病毒基因组序列或原核 DNA 或 RNA，甚至还包括合成 DNA 序列。转录终止序列可位于编码序列的 3' 端。

[0126] “启动子”是启动和调节编码多肽的多核苷酸的转录的核苷酸序列。启动子包括诱导型启动子（与启动子有效连接的多核苷酸序列的表达被分析物、辅助因子、调节蛋白等诱导）、阻抑型启动子（与启动子有效连接的多核苷酸序列的表达被分析物、辅助因子、调节蛋白等阻抑）、和组成型启动子。术语“启动子”或“调控元件”包括全长启动子区和这些区域的功能（如调控转录或翻译）片段。

[0127] “有效连接”指元件的排列，其中以该术语描述的组分被装配以执行其一般功能。因此，与核酸序列有效连接的指定启动子在恰当的酶存在时能影响该序列的表达。启动子无需与该序列毗邻，只要其能指导该序列表达即可。因此例如，间隔的非翻译但被转录的序列可出现在启动子序列和核酸序列间，并且启动子序列仍然被认为与编码序列“有效连接”。

[0128] 本文中“重组”是用来描述基因组、cDNA、半合成或合成来源的核酸分子（多核苷酸），根据其来源或操作法，该核酸分子不与自然状态下与其连接的全部或部分多核苷酸连接，和 / 或与自然状态下不与其连接的多核苷酸连接。单个重组核酸分子中的两个核酸序列自然状态下一般彼此没有关联时，它们相对于彼此而言是“异源的”。

[0129] 本文提到了多核苷酸的同源物。一般地，与另一多核苷酸同源的多核苷酸至少与该多核苷酸 70% 同源，优选至少 80% 或 90%，并更优选至少与其 95%、97% 或 99% 同源。检测同源性的方法为本领域所熟知，并且本领域普通技术人员应该理解的是：在本文上下文中，同源性是以核酸的同一性为基础来计算的。该同源性可能存在于至少 15 个，优选至少 30 个，比如至少 40 个、60 个或 100 个或更多个连续核苷酸的区域。

[0130] 检测多核苷酸的同源性或同一性的方法已为本领域所熟知。如，UWCGC 程序包提供了 BESTFIT 程序，它可用于计算同源性（如以默认设置使用）（Devereux et al (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395）。

[0131] PILEUP 和 BLAST 算法也可用于计算同源性或比对序列（一般以默认设置），如在 Altschul S. F. (1993) *J Mol Evol* 36:290-300; Altschul, S, F et al (1990) *J Mol Biol* 215:403-10 中描述。

[0132] 执行 BLAST 分析的软件通过美国国家生物技术信息中心 (<http://www.ncbi.nlm>).

.nih.gov/) 可公开获得。该算法首先要识别高比值序列对 (high scoring sequence pair, HSP), 这通过识别待查询的序列中长度为 W 的短字段实现, 该字段在与数据库序列中相同长度的字段比对时, 匹配或满足某些正值的阈得分 T 。 T 指相邻字段得分阈 (Altschul et al, 同上)。这些最初的相邻字段命中结果作为启动检索的种子, 以查找含有它们的 HSPs。字段命中结果沿每个序列的两个方向延伸, 使累积比对得分尽量增加。出现以下情形即停止字段命中结果沿两个方向的延伸: 当累积比对得分为零或小于零时, 这是由于一个或多个负分残基比对的累积, 或到达了任一序列的末端。BLAST 算法参数 W 、 T 和 X 决定了比对的敏感性和速度。BLAST 程序使用默认值: 字段长度 (W) 为 11, BLOSUM62 得分矩阵 (见 Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919) 比对值 (B) 为 50, 期望值 (E) 为 10, $M = 5$, $N = 4$, 两条链比较。

[0133] BLAST 算法进行两个序列间相似性的统计分析, 见如 Karlin 和 Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787。由 BLAST 算法提供的相似性的一个量度是最小和概率 (smallest sum probability ($P(N)$)), 它提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间随机出现匹配的概率的指标。例如, 若一个序列和另一个序列相比较时, 最小和概率小于大约 1, 优选小于大约 0.1, 更优选小于大约 0.01, 最优选小于大约 0.001, 则第一个序列被认为同第二个序列是相似的。

[0134] 同源物一般与相关的多核苷酸以显著高于本底的水平杂交。由同源物和多核苷酸间的相互作用所形成的信号水平一般强于“本底杂交”至少 10 倍, 优选至少 100 倍。相互作用的强度可使用诸如放射性标记的探针来检测, 如 ^{32}P 。选择性杂交一般通过使用中度到高度严格条件来实现, 如, 在大约 50°C 到大约 60°C 的 0.03M 氯化钠和 0.003M 柠檬酸钠的条件下。

[0135] 严格杂交条件包括 50% 甲酰胺、5×Denhardt 溶液、5×SSC、0.1% SDS 和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 变性鲑精 DNA, 洗涤条件包括在 37°C 下 2×SSC、0.1% SDS 洗涤, 随后在 68°C 下 1×SSC、0.1% SDS 洗涤。确定的合适的杂交条件已为本领域普通技术人员所熟知, 见如 Sambrook, et al., 同上。

[0136] 同源物与相关多核苷酸中的序列不同在于少于 3、5、10、15、20 或更多个突变 (每一种均可作为置换、缺失或插入)。这些突变可在同源物的至少 30, 比如至少 40、60 或 100 或更多个连续核苷酸的区域测定。在多核苷酸编码多肽处, 优选地, 置换在所编码的氨基酸中形成“保守”变化。保守变化根据下表定义。在保守变化中, 第二列的同一区域的氨基酸, 优选第三列的同一行的氨基酸彼此置换。

[0137]

脂肪族	非极性	GAP
		ILV
	极性 - 不带电	CSTM
		NQ
	极性 - 带电	DE
		KR
芳香族		HFWY

[0138] 在本文中互换使用的术语“个体”和“受试者”是指脊椎动物亚门 (subphylum chordata) 中的任一成员,包括但不限于人和其它灵长类,包括非人灵长类如黑猩猩以及其它猿和猴种;家畜如牛、绵羊、猪、山羊和马;驯养哺乳动物如狗和猫;实验动物包括啮齿类如小鼠、大鼠和豚鼠;鸟类,包括驯养鸟类,野生鸟类和诸如鸡、火鸡的猎鸟和其它鹑鸡类,鸭,鹅等等。本术语并不指特定年龄。因此,成年和新生个体均包括在内。由于所有这些脊椎动物的免疫系统作用方式相似,因此本文中所描述的方法用于上述的脊椎动物种中的任一动物。

[0139] B. 概述

[0140] 本发明涉及核酸构建体,它为宿主细胞中的异源编码序列,特别是抗原编码基因的高效表达提供了可能。更具体地,本发明提供了核酸构建体,它包含嵌合启动子序列和克隆位点,或在某些具体实施方案中基本由嵌合启动子序列和克隆位点组成,因此在克隆序列插入克隆位点时,克隆序列与嵌合启动子有效连接。

[0141] 嵌合启动子包括,或在某些具体实施方案中基本由下列元件组成:

[0142] (a) hCMV 立即早期启动子序列;

[0143] (b) hCMV 主要立即早期基因的外显子 1 和至少一部分外显子 2;和

[0144] (c) 置换 hCMV 主要立即早期基因的内含子 A 区的异源内含子。

[0145] hCMV 立即早期启动子序列 (a) 可包括:

[0146] (i) 天然 hCMV 立即早期启动子序列;

[0147] (ii) 其功能同源变体;或

[0148] (iii) (i) 或 (ii) 的功能片段。

[0149] 一般地,序列 (a) 包括大约 100 到 600,优选 200 到 600,例如 400 到 600 个核苷酸。一般地,序列 (a) 包括出现在 (i) 中的序列,它与转录因子或 RNA 聚合酶连接,或能与相同转录因子和 RNA 聚合酶连接的这些序列的同源物,而非这些序列。一般地,这些序列或其同源物以与 (i) 相同的顺序和 / 或基本相同的相对位置出现在启动子序列 (a) 中。

[0150] 一般地, (i) 包括 hCMV 主要立即早期基因至少从 -100 到 -1,一般 -150 到 -1,如 -500 到 -1 或 -600 到 -1 的核苷酸。序列 (i) 一般包括 hCMV 核心启动子序列,并且还包括 hCMV 立即早期启动子中的一个或多个增强子元件。例如, (i) 可包括从 -118 到 -1,或 -524 到 -1 的核苷酸 (US6218140) 或从 -62 到 -1,或 -465 到 -1 的核苷酸 (US 538 5839)。

[0151] 一般地, (i) 包括一般出现于启动子序列的 TATA 框或 CAAT 框。优选地, 该序列包括 hCMV 立即早期启动子中的一个或多个重复序列。

[0152] 在一个优选的实施方案中, (i) 包括 SEQ ID NO :1。

[0153] 使用已知方法可获得 hCMV 立即早期启动子序列。使用标准技术, 可直接从病毒样本中分离出天然的 hCMV 立即早期启动子, 例如 US5385839 描述了 hCMV 启动子区的克隆。hCMV 立即早期启动子序列可从 Genbank#M60321(hCMV Towne 株) 和 X17403(hCMV Ad169 株) 获得。因此, 天然序列可通过使用基于已知序列的 PCR 引物, 采用 PCR 分离得到。见如 Sambrook et al, 同上中用于获得和分离 DNA 的技术的描述。合适的 hCMV 启动子序列也可从现存质粒载体分离得到。启动子序列也可通过合成产生。

[0154] 功能变体 (ii) 或片段 (iii) 一般可维持和 / 或补充天然启动子 (i) 的活性。一般地, 这种活性是指引起 (包括启动和调控) 有效连接的多核苷酸, 特别是 hCMV 主要立即早期基因的转录的能力。在一个实施方案中, 片段的变体能补充 hCMV 病毒中的天然启动子的活性, 比如允许病毒维持在细胞内感染和 / 或复制的能力。

[0155] 可检测同源变体 (ii) 或片段 (iii) 维持和 / 或补充 (i) 的活性的能力。例如, 可检测变体或片段恢复突变体 hCMV 功能 (如感染和 / 或复制能力) 的能力, 在突变体中, 天然 hCMV 立即早期启动子是缺损的。

[0156] 同源变体 (ii) 或片段 (iii) 可使用下面的差异表达分析 (Comparative Expression Assay) 检测其可用性。待测启动子序列被导入基本载体 (basevector) 中, 置换天然 hCMV 立即早期启动子。一般地, 功能变体或片段允许使用基本载体所提供的表达的至少 50%, 如, 60%、70%、80%、90% 或更高。一般地, 表达发生在至少一种, 但优选两种参照细胞类型中。一般地, 参照细胞为哺乳动物 HEK293T、CHO、HeLa、BHK、3T3 或 COS 细胞。

[0157] 另外或者作为另一种选择, 下面的差异免疫原性分析 (Comparative Immunogenicity Assay) 可检测启动子序列。待测启动子序列被导入基本载体中, 置换天然 hCMV 立即早期启动子。功能启动子序列提供较基本载体获得的抗体滴度相同或较高的抗体滴度, 其中该基本载体具有至少一个、优选两个抗原。优选地, 抗体滴度较基本载体至少高 5%、10%、20%、30% 或 40%。优选的抗原是 HBsAg, HSV 2gD 和 flu-M2 抗原。根据本检测, 天然启动子序列 (i) 的功能同源变体 (ii) 或功能片段 (iii) 允许天然序列获得的最高抗体滴度。

[0158] 如上所述, 构建体可包括外显子序列 (b), 它包括来源于 hCMV 主要立即早期基因的外显子 1 和外显子 2 的序列。外显子是编码序列, 它们天然状态下一般被内含子分隔。在天然 hCMV 主要立即早期基因中, 外显子 1 和 2 一般被天然内含子 A 分隔。在本发明的嵌合构建体中, 外显子 2 序列一般位于外显子 1 序列 3' 端, 没有内含子序列间隔, 因此外显子 1 和外显子 2 序列是连续的。

[0159] 外显子序列 (b) 可包括:

[0160] (i) 天然外显子序列, 一般为外显子 1 和 (全部或部分) 外显子 2;

[0161] (ii) (i) 的功能同源变体; 或

[0162] (iii) (i) 或 (ii) 的功能片段。

[0163] 序列 (i) 可包括大约 50% 到 100% 的天然 hCMV 主要立即早期基因外显子 1 序列,

如,60%到90%,或70%到80%。一般至少有50%的天然外显子1序列,如60%、70%、80%、90%或更多。外显子序列(b)也包括至少部分外显子2序列。在序列(i)中,一般有天然外显子2的两个或多个碱基,如2到9、2到7、或3到5个碱基。有最高达并且包括100%的天然外显子2序列,如5%到95%、20%到80%或40%到60%的天然外显子2序列。一般地,同源变体具有上面就天然序列所提到的任何长度。

[0164] 优选地,(i)包含SEQ ID No.2。

[0165] 通过已知方法能获得合适的外显子序列(b)。见如Sambrook et al.,同上,关于用于获得和分离DNA的技术的描述。通过使用标准技术(见,例如,Maclean, A(1998)“Preparation of HSV-DNA and Production of Infectious Virus”in Herpes Simplex Virus Protocols(在单纯疱疹病毒试验方案中的“感染病毒的HSV-DNA和产物的制备”)S. Brown, A Maclean, editors, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 19-26),天然hCMV主要立即早期基因序列能直接从病毒样本中分离得到。hCMV主要立即早期基因的序列,包括外显子1和外显子2的位置,可在Genebank#M60321, X17403获得。因此,天然外显子1和2序列能通过合适的限制酶切位点切去天然主要基因序列,或通过使用基于已知序列的PCR引物采用PCR分离得到。或者,合适的外显子序列可从现存的质粒载体中分离得到,如pWRG7128。外显子序列也可通过合成,而非克隆制备。变体序列易于通过常规方法,如定向诱变构建得到。

[0166] 一般地,当外显子存在于本发明的构建体中时,它能提高表达,一般能引起与上述天然外显子1和外显子2序列相当的提高。

[0167] 可使用下面的差异表达分析检测外显子序列的功能性。待测外显子序列被导入基本载体中,置换已有外显子序列。一般地,与基本载体相比,若外显子序列在至少一种、优选两种参照细胞类型中其表达非但不停止,反而进一步提高,则该序列是功能性的。一般地,参照细胞是哺乳动物的HEK293T、CHO、HeLa、BHK、3T3或COS细胞。优选地,表达提高了至少5%、10%、20%、30%或40%。根据本检测,天然外显子序列(i)的功能同源变体(ii)或功能片段(iii)为天然序列表达至少提高50%提供了可能。

[0168] 另外或者作为另一种选择,可使用下面的差异免疫原性分析检测外显子序列。待测外显子序列被导入基本载体,置换已有外显子序列。功能外显子序列提供较基本载体所获得的抗体滴度相等或者较高的抗体滴度,其中该基本载体具有至少一个、优选两个抗原。优选地,抗体滴度较基本载体至少高5%、10%、20%、30%或40%。优选的抗原是HBsAg、HSV 2gD和flu-M2抗原。根据本检测,天然外显子序列(i)的功能同源变体(ii)或功能片段(iii)允许由天然序列获得的最高抗体滴度。

[0169] 嵌合启动子构建体包括异源内含子(c),它置换hCMV主要立即早期基因的天然内含子A区。内含子是从由基因转录得到的hnRNA剪接得到的非编码序列。天然状态下异源内含子不存在于编码序列中。

[0170] 异源内含子(c)全部或部分置换hCMV主要立即早期基因的天然内含子(A)。一般地,不存在天然内含子A。

[0171] 一般地,异源内含子(c)为外显子序列(b)3'端。

[0172] 一般地,异源内含子(c)包括:

[0173] (i)天然内含子;

[0174] (ii) (i) 的功能同源变体 ;或

[0175] (iii) (i) 或 (ii) 的功能片段。

[0176] 异源内含子 (c) 一般为病毒或真核生物的内含子。优选地,内含子是哺乳动物的内含子,特别是非人类的内含子,如大鼠或鸡的内含子。优选地,内含子为内含子 A,如,大鼠胰岛素内含子 A,鸡角蛋白内含子 A 或鸡心脏的肌动蛋白内含子 A。

[0177] 一般地,内含子 (c) 长度为大约 50 个核苷酸到大约 1000 个核苷酸,如大约 100 到大约 500 个核苷酸。例如,内含子 (c) 可包括 50 到 500 个核苷酸,如高达 100、200、300 或 400 个核苷酸。优选地,内含子包括天然大鼠胰岛素内含子 A 的第 50 到 133 位的核苷酸,或该序列的同源物。

[0178] 优选地,异源内含子 (c) 能从真核宿主细胞的 RNA 转录产物中剪接。一般地,内含子包括一个或多个供体序列 (如 GT)、受体序列 (如 AG)、3' 嘧啶富集区和分枝点序列。若含嘧啶富集区,该区可包括,如至少 5、8、10 或更多嘧啶。优选地,内含子包括至少一个供体序列、一个受体序列和一个分枝点序列。一般地,在嵌合构建体中,内含子 (c) 包括来源于外显子序列的非内含子侧翼序列,该外显子序列发现于天然内含子 (i) 的内含子 / 外显子边界。侧翼外显子序列可为天然外显子序列或该序列的同源物,该同源物基本保持天然序列相同活性,如保持剪接功能。一般在内含子的两端均包括外显子序列的 5 到 10、优选 7 到 10 个碱基。

[0179] 内含子 (c) 可是人工内含子,只要内含子是功能性的。例如,可使用重组或嵌合内含子。这种内含子可包括一个以上天然内含子的序列。

[0180] 一般地,内含子 (c) 包括存在于 hCMV 内含子 A 的序列,它与转录因子或调控蛋白结合,或能与相同转录因子或蛋白结合的这些序列的同源物,而非这些序列。一般地,这些序列或其同源物以与 hCMV 内含子 A 中相同的顺序和 / 或基本相同的相对位置出现在内含子 (c) 中。

[0181] 内含子 (c) 包括同源变体 (ii),其中天然内含子 (i) 的序列经修饰以除去内部的限制酶切位点。如,可使用大鼠胰岛素内含子 A 的同源变体,其内部的 NheI 位点已被破坏。

[0182] 优选地,内含子 (c) 包括:

[0183] (i) SEQ ID No. 3;

[0184] (ii) (i) 的功能同源变体 ;或

[0185] (iii) (i) 或 (ii) 的功能片段。

[0186] 内含子序列 (c) 可使用标准克隆技术获得。例如,大鼠胰岛素内含子 A 序列在 GeneBank J00748,鸡角蛋白内含子序列在 GeneBank J00847 以及鸡心脏的 (肌动蛋白) 内含子 A 序列在 GeneBank X02212 中可得。内含子序列可使用基于已知序列的引物从天然来源中分离得到。序列也可合成制备。变体序列可通过突变获得。

[0187] 一般地,诸如功能变体 (ii) 或功能片段 (iii) 的功能内含子序列基本具有与天然内含子 (i) 相同的活性,和 / 或补充其活性。在一个实施方案中,该活性是指剪接活性。

[0188] 可使用常规剪接分析检测内含子 (c) 序列的剪接活性。一般地,在该检测中,功能同源物 (ii) 或功能片段 (iii) 显示出至少 50%,如 60%、70%、80%、90% 到高达 100% 或更高天然内含子 (i) 的剪接率。

[0189] 一般地,异源内含子序列出现在本发明的构建体中时,它能提高表达。一般地,变

体 (ii) 或片段 (iii) 内含子较天然内含子 (i) 能产生相当的提高。

[0190] 潜在的内含子序列 (c) 的功能可使用下面的差异表达分析检测。异源内含子被导入基本载体中。一般地,在与基本载体进行比较时,若异源内含子序列在至少一种、优选两种参照细胞类型中其表达提高 25% 或更高,则该序列是功能性的。一般地,参照细胞是哺乳动物 HEK293T、CHO、HeLa、BHK、3T3 或 COS 细胞。表达提高至少 35%、45%、55% 或更高。根据本检测,天然内含子序列 (i) 的功能变体 (i) 或功能片段 (ii) 为天然序列表达提高 50% 以上提供了可能。

[0191] 另外或者作为另一种选择,可使用下面的差异免疫原性分析检测异源内含子 (c) 序列的功能性。内含子 (c) 序列被导入基本载体中。功能内含子 (c) 序列提供与基本载体所获得的抗体滴度相同或者较高的抗体滴度,该基本载体具有至少一个、优选两个抗原。优选地,抗体滴度较基本载体至少提高 5% 或 10%,如 20%、30% 或 40%。优选的抗原是 HBsAg、HSV2gD 和 flu-M2 抗原。根据本检测,天然内含子序列 (i) 的功能变体 (ii) 或功能片段 (iii) 允许由天然序列获得的最高抗体滴度。

[0192] 可使用标准克隆技术获得合适的异源内含子序列。例如,大鼠胰岛素内含子 A 序列在 GeneBank J00748,鸡角蛋白内含子 A 在 GeneBank J00847 以及鸡心脏的肌动蛋白内含子 A 序列在 GeneBank X02212 中可得。内含子序列可使用基于已知序列数据的引物从天然来源中分离得到。合适的序列还可通过合成制备。

[0193] 可使用标准克隆或分子生物学技术,将组成序列 (a)、(b) 和 (c) 适当地连接在一起以形成嵌合启动子。优选地,内含子序列 (c) 位于外显子序列 (b) 的 3' 端。嵌合启动子构建体与克隆位点相连接,在有合适的酶参与下,通过这种方式启动子会影响插入到该位点的编码序列的表达。合适的克隆位点,包括多克隆位点,已为本领域所熟知,如 pUC19, pBC SK, pBluescript II KS, cDNA3.1, pSP72, pGEM 7Z 多克隆位点。

[0194] 一般地,用于插入 (或已经插入) 克隆位点的核酸编码与治疗相关的多肽。优选编码序列适用于核酸免疫接种或基因治疗中。因此,核酸插入序列可包括能提供免疫性的序列,例如免疫原性序列,它在释放给受试者时能引起体液和 / 或细胞免疫应答。或者,核酸可包括一个或多个编码治疗性多肽 (如靶细胞基因组缺损或缺少的蛋白,或具有所需生物或治疗效应 (如抗病毒功能) 的非天然蛋白) 的基因。对于遗传病的治疗,能将对应于已知在具体病症中缺失的基因的功能性基因给予受试者。优选地,核酸是 DNA。

[0195] 用于插入的合适的核酸包括那些用于治疗炎性疾病、自身免疫疾病、慢性病和传染病的核酸,包括病症如艾滋病、癌症、神经系统疾病、心血管系统疾病、高胆固醇血症 (hypercholesterolemia); 各种血液病包括各种贫血 (anemias)、地中海贫血 (thalassemia) 和血友病 (hemophilia); 遗传缺陷如囊肿性纤维化 (cystic fibrosis)、Gaucher 疾病、腺苷脱氨酶 (ADA) 缺乏症 (adenosine deaminase deficiency)、肺气肿 (emphysema) 等。

[0196] 例如,在治疗实体瘤 (solid tumor) 的方法中,如下基因可在肿瘤位点或其附近插入表达:编码毒性肽的基因 (即诸如蓖麻毒素 (ricin)、白喉毒素 (diphtheria toxin) 和眼镜蛇毒因子 (cobra venom factor) 的化学治疗剂)、诸如 p53 的肿瘤抑制基因,编码转化癌基因的反义链的 mRNA 序列的基因,编码抗肿瘤肽如肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 和其它细胞因子的基因,或转化癌基因的反式显性阴性突变体 (transdominant negative mutant)。

[0197] 同样,也包括编码多肽的核酸,已知该多肽表现出抗病毒和 / 或抗细菌活性、或刺激宿主免疫系统。核酸可编码多种细胞因子 (或其功能片段) 中的一种,如白细胞介素 (interleukin)、干扰素 (interferon) 和集落刺激因子 (colony stimulating factor)。核酸可编码治疗或预防许多疾病的抗原,包括但不限于癌症、过敏、中毒和被病原体感染。该病原体包括但不限于真菌、病毒;病毒包括人乳头瘤病毒 (Human Papilloma virus, HPV)、HIV、HSV2/HSV1、流感病毒 (influenza virus, 甲型、乙型和丙型)、脊髓灰质炎病毒 (Polio virus)、RSV 病毒 (RSV virus)、鼻病毒 (Rhinovirus)、轮状病毒 (Rotavirus)、甲型肝炎病毒 (Hepatitis A virus)、诺瓦克病毒组 (Norwalk Virus Group)、肠道病毒 (Enterovirus)、星状病毒 (Astrovirus)、麻疹病毒 (Measles virus)、Par 流感病毒 (Par Influenza Virus)、腮腺炎病毒 (Mumps Virus)、水痘 - 带状疱疹病毒 (Varicella-zoster virus)、巨细胞病毒 (cytomegalovirus)、非洲淋巴细胞瘤病毒 (Epstein-Barr Virus)、腺病毒 (Adenovirus)、德国麻疹病毒 (Rubella virus)、人 T 细胞淋巴瘤 I 型病毒 (Human T-cell Lymphoma type I virus, HTLV-I)、乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV)、丁型肝炎病毒 (Hepatitis D virus)、痘病毒 (Pox virus)、马尔堡病毒和埃博拉病毒 (Marburg and Ebola);细菌包括:结核杆菌 (*M. tuberculosis*)、衣原体 (*Chlamydia*)、淋病菌 (*N. gonorrhoeae*)、志贺氏杆菌 (*Shigella*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、霍乱弧菌 (*Vibrio Cholera*)、苍白密螺旋体 (*Treponema Pallidum*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、百日咳杆菌 (*Bordetella Pertussis*)、布鲁氏菌 (*Brucella*)、土拉热弗朗西施氏菌 (*Francisella tularensis*)、幽门螺旋菌 (*Meningococcus*)、问号钩端螺旋体 (*Leptospira interrogans*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*)、链球菌 (*Streptococcus*) (A 和 B 型)、肺炎球菌 (*Pneumococcus*)、脑膜炎球菌 (*Meningococcus*)、流感嗜血杆菌 (*Hemophilus influenza*) (b 型)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、Complybacteriosis、粘膜炎莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*)、腹股沟肉芽肿 (*Donovanosis*) 和放线菌 (*Actinomycosis*);真菌病原体包括念珠菌 (*Candidiasis*) 和曲霉 (*Aspergillosis*);寄生虫病原体包括绦虫 (*Taenia*)、吸虫 (Flukes)、蛔虫 (Roundworms)、变形虫 (*Amebiasis*)、贾第虫 (*Giardiasis*)、隐孢子虫属 (*Cryptosporidium*)、血吸虫 (*Schistosoma*)、卡氏肺囊虫 (*Pneumocystis carinii*)、弓滴虫 (*Trichomoniasis*) 和旋毛虫 (*Trichinosis*)。该核酸也可用来针对多种畜禽疾病提供合适的免疫应答,如口蹄疫 (Foot and Mouth Disease)、冠状病毒 (Coronavirus)、出血败血性巴斯德氏菌 (*Pasteurella multocida*)、缠绕杆菌属 (*Helicobacter*)、寻常圆线虫 (*Strongylus vulgaris*)、胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、牛病毒性腹泻病毒 (Bovine viral diarrhea virus, BVDV)、肺炎杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大肠杆菌 (*E. coli*)、百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*)、副百日咳杆菌 (*Bordetella parapertussis*) 和支气管败血性博德特氏菌 (*Bordetella bronchiseptica*)。因此,一方面,本发明的核酸构建体可在疫苗中使用。

[0198] 在一些实施方案中,核酸构建体编码佐剂。因此,插入克隆位点 (用于插入编码序列) 的序列可编码作为佐剂的多肽。在优选的实例中,所编码佐剂可为 ADP- 核糖基化的细菌毒素。这些毒素包括白喉毒素 (diphtheria toxin, DT)、百日咳毒素 (pertussis toxin, PT)、霍乱毒素 (cholera toxin, CT)、大肠杆菌不耐热肠毒素 (*E. coli* heat labile

toxins, LT1 和 LT2)、假单胞杆菌内毒素 A(Pseudomona endotoxin A)、假单胞菌外毒素 S(Pseudomonas extoxin S)、仙人掌杆菌胞外酶(B cereusexoenzyme)、球形芽孢杆菌毒素(B. sphaericus toxin)、肉毒梭菌 C2 和 C3 毒素(C botulinum C2 and C3 toxin)、泥渣梭菌胞外酶(C. limosumexoenzyme), 以及来自产气荚膜梭菌(C. perfringens)、螺状梭菌(Cspiroforma) 和艰难梭菌(C difficile) 的毒素和金黄色葡萄球菌 EDIN(Staphylococcus aureus EDIN)。大部分 ADP- 核糖基化的细菌毒素包含 A 亚基和 B 亚基。构建体可表达 A 亚基、B 亚基和 / 或两个亚基一起表达。

[0199] 在一个优选的实例中, 核酸构建体可编码大肠杆菌不耐热毒素和 / 或霍乱毒素, 并特别表达大肠杆菌不耐热毒素。CT 的 A 亚基和 B 亚基基因的完整序列的 GenBank 条目见于基因位点 (Locus) VIBCTXABB (基因存取号 No. D30053), 而 LT 的 A 亚基和 B 亚基基因的完整序列的 GenBank 条目见于基因位点 AB0116677 (基因存取号 No. AB011677)。

[0200] 构建体能表达特定佐剂的活性变体或片段。若变体或片段保持所来源多肽的至少部分佐剂活性, 则说其具有活性。因此, 与没有佐剂同抗原一起给药时观察到的免疫应答相比, 变体和 / 或片段仍然能增强针对特定抗原的免疫应答。被编码序列可是 CT 的 A 亚基和 / 或 B 亚基的活性片段或变体, 并特别为 LT 的 A 亚基和 / 或 B 亚基的活性片段。

[0201] 毒素亚基可缺失天然存在的信号序列。天然存在的外毒素亚基可被修饰以将毒素解毒。A 亚基可被修饰以干扰 ADP- 核糖基转移酶的活性或将该酶失活。

[0202] 因此, 本发明的佐剂构建体可用于提高针对特定抗原的免疫应答。增强的免疫应答包括强度更大或时间更长的免疫应答。这意味着当再次遇到抗原时, 免疫应答比未给予佐剂时更强。增强的免疫应答可产生更高的抗体滴度。在一些构建体中, 特别是在那些表达外毒素亚基的构建体中, 佐剂可产生针对所研究抗原的放大的细胞应答, 和 T 辅助细胞 1 样免疫应答。

[0203] 插入克隆位点的核酸可包括聚腺苷酸化 (polyA) 序列。这种 PolyA 序列一般来源于编码序列。或者, 异源 polyA 序列出现在本发明的核酸构建体中。一般地, polyA 序列可位于克隆位点下游, 这样可有效连接于插入克隆位点的编码序列。使用标准克隆技术可将任何合适的 polyA 序列导入构建体中。该 polyA 序列为本领域所熟知。

[0204] poly A 序列可为:

[0205] (i) 天然 polyA 序列;

[0206] (ii) (i) 的功能同源变体; 或

[0207] (iii) (i) 或 (ii) 的功能片段。

[0208] 天然 polyA 序列 (i) 可为, 例如兔 β - 珠蛋白基因 polyA, 人乳头状瘤病毒 (HPV) 早期或晚期基因 polyA, HSV-2gB 基因 polyA, 猿 CMV 立即早期基因 polyA 或 HSVgD 晚期基因 polyA。

[0209] 优选地, 天然 polyA 序列 (i) 选自 SEQ ID No. 10 (GenBank K03256)、SEQ ID No. 11 (GenBank M16019)、SEQ ID No. 12 (GenBank Z80699) 和 SEQ ID No. 13 (GenBank K02718)。

[0210] 一般地, 功能 polyA 序列是保留聚腺苷酸化活性的序列。

[0211] 可使用常规表达分析检测 polyA 序列将 RNA 转录产物聚腺苷化的能力。在检测中发现: 功能同源变体 (ii) 或功能片段 (iii) 一般具有天然 polyA 序列的至少 50%, 例如

60%、70%、80%或更高 polyA 活性。

[0212] 一般地,在 polyA 序列出现在本发明的构建体中时,会提高表达,一般会产生相对于上述天然 polyA 序列 (i) 相当的提高。

[0213] 可使用下述差异表达分析检测 polyA 序列的功能性。待测 polyA 区被导入基本载体,以置换 RBGpA。和基本载体相比,若 polyA 在至少一种(优选两种)参照细胞类型中非但不停止表达,反而(优选)提高表达,则认为待测 polyA 是功能性的。优选地,表达提高至少 5%、10%、20%、30%、40%或 50%或更高。优选的细胞类型为哺乳动物的 HEK293T、CHO、HeLa、BHK、3T3 或 COS 细胞。根据本检测,若同源变体 (ii) 或片段 (iii) 能获得高于天然 polyA 序列 (i) 表达量的 50%,则认为其是功能性的。

[0214] 另外或者作为另一种选择,可使用如下差异免疫原性分析检测 polyA 序列的活性。polyA 序列被导入基本载体中,以置换 RBCpA。功能性 polyA 序列提供较基本载体所获得的抗体滴度至少相同或更高的抗体滴度,该基本载体含至少一个、优选含两个抗原。优选地,该抗体滴度至少高于基本载体所获得的抗体滴度的至少 5%、10%,如 20%、30%或 40%。优选的抗原是 HBsAg、HSV2gD 和 Flu-M2 抗原。若同源变体 (ii) 或片段 (iii) 能获得天然 polyA 序列所获得的最高抗体滴度,则认为其是功能性的。

[0215] 核酸构建体还包括另外的调控序列,它影响插入克隆位点的编码序列的表达。该构建体可包括非翻译前导序列。该序列在构建体中与嵌合启动子有效连接,因此它同样与插入克隆位点的编码序列有效连接。前导序列提供表达插入编码序列的翻译起始位点,并一般含 Kozak 序列。

[0216] 一般地,非翻译前导序列包括:

[0217] (i) 天然非翻译前导序列;

[0218] (ii) (i) 的功能同源变体;或

[0219] (iii) (i) 或 (ii) 的功能片段。

[0220] 一般地,天然序列 (i) 是真核生物的序列或病毒序列,特别是感染真核生物的病毒。优选地,天然序列 (i) 是 HBV 或 HSV 序列,如 HBV preS2 抗原序列,HBV e- 抗原序列,或 HSV 型 2gD 抗原序列。特别优选地, (i) 选自 SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 6 和 SEQ ID No. 7。

[0221] 一般地,前导序列包括 (i) 中的序列,它能结合转录元件或调节蛋白,或者能结合相同元件或蛋白的这些序列的同源物。一般地,这些序列或其同源物以与 (i) 中相同的顺序和/或基本相同的相对位置出现在前导序列中。一般地,前导序列包含表达插入的编码序列的翻译起始位点。一般地,前导序列包含 Kozak 序列。

[0222] 一般地,非翻译前导序列长为大约 10 个到大约 200 个核苷酸,例如大约 15 个到 150 个核苷酸,优选 15 个到大约 130 个核苷酸的长度。例如,可使用含 15、50、75 或 100 个核苷酸的前导序列。

[0223] 一般地,功能性非翻译前导序列可提供编码序列表达的翻译起始位点,所述编码序列与前导序列有效连接。一般地,功能变体 (ii) 或片段 (iii) 具有基本与天然序列 (i) 相同的活性和/或补充其活性,该天然序列通常促进或增强与该序列有效连接的编码序列的表达。

[0224] 使用标准方法可检测变体 (ii) 或片段 (iii) 作为非翻译前导序列相对于天然前导序列的活性。例如,可制备含与天然编码序列有效连接的天然前导序列 (i) 的表达载体,

并且在合适的宿主细胞,如哺乳动物 HEK293T、CHO、HeLa、BHK、3T3 或 COS 细胞中监测其表达。可制备待测构建体,其中天然前导序列被同源变体或片段置换,并再监测在相同宿主细胞中的表达。一般地,变体 (ii) 或片段 (iii) 具有天然序列表达量的至少 50%,如 60%、70%、80%、90%或 100%或更高。

[0225] 可在下面的差异表达分析中检测潜在的前导序列的可利用性。待测前导序列被导入基本载体,以置换 HBV preS2 5'UTR。与基本载体相比,功能性前导序列在至少一种(并优选二种)参照细胞类型中非但不停止表达,反而(优选)提高表达。一般地,表达提高了至少 5%、10%、20%、30%、40%或 50%。优选的细胞类型是哺乳动物 HEK293T、CHO、HeLa、BHK、3T3 或 COS 细胞。根据本检测,若同源变体 (ii) 或片段 (iii) 较天然前导序列所获得的表达高过 50%,则认为其是功能性的。

[0226] 另外或者作为另一种选择,可在下面的差异免疫原性分析中检测前导序列的活性。前导序列被导入基本载体,以置换 HBV preS2 5'UTR。功能性前导序列提供与基本载体获得的抗体滴度至少相同或更高的抗体滴度,该基本载体含有至少一个、优选两个抗原。优选地,抗体滴度至少高于基本载体的 5%、10%、20%、30%或 40%。优选的抗原是 HBsAg、HSV 2gD 和 Flu-M2 抗原。若同源变体 (ii) 或片段 (iii) 具有天然前导序列 (i) 所具有的最高抗体滴度,则认为其是功能性的。

[0227] 使用标准方法可获得合适的前导序列。例如,HBV preS2 抗原序列、HBV e- 抗原序列和 HSV 型 2gD 抗原序列分别可在 GenBank M54923、M54923 和 Z86099 获得。可基于该已知序列设计引物,并用于分离同源序列。前导序列可基于已知序列合成。

[0228] 核酸构建体可包括增强子序列。一般地,增强子序列位于克隆位点的 3' 端,并与嵌合启动子和插入编码序列有效连接,并起到提高插入序列的转录水平的作用。

[0229] 一般地,增强子包括:

[0230] (i) 天然增强子;

[0231] (ii) (i) 的功能同源变体;或

[0232] (iii) (i) 或 (ii) 的功能片段。

[0233] 一般增强子序列包括大约 50 到大约 850 个核苷酸,如大约 75 个到大约 500 个核苷酸。可使用大约 100、200、300 或 400 个核苷酸的增强子。

[0234] 一般地,(i) 是真核生物的增强子或病毒的增强子,特别是感染真核生物的病毒的增强子。通常这种增强子出现在基因的 3' 非翻译区 (3' UTR)。优选地,(i) 是 HBV 或 CMV 增强子,如 HBs Ag 3' UTR 或猿 CMV 立即早期基因 3' UTR。优选地,(i) 含有 SEQ ID No. 8 或 SEQID No. 9。

[0235] 一般地,构建体中的增强子含有 (i) 中的序列,它结合转录元件或调节蛋白如转录因子,或者结合相同元件或蛋白的该序列的同源物。优选地,这些序列以与 (i) 中相同的顺序和/或基本相同的相对位置存在。

[0236] 一般地,功能性增强子可增强或提高多核苷酸的表达,如与增强子序列有效连接的编码序列。一般地,功能同源变体 (ii) 或片段 (iii) 具有与天然增强子 (i) 基本相同的活性(如增强表达)或补充其活性。

[0237] 使用增强子捕获分析 (enhancer trap assay) 可检测增强子活性。实验方法已为本领域所熟知。在该分析中,功能同源变体 (ii) 或片段 (iii) 优选具有天然增强子所具有

的至少 50% 的增强子活性。一般地,该活性为天然增强子的至少 60%、70%、80%、90%、100% 或更高。一般地,在该分析中功能变体 (ii) 或片段 (iii) 能补充天然增强子 (i) 的活性。

[0238] 使用下述差异表达分析可检测增强子的可利用性。待测 3'UTR 序列被导入基本载体中。在本分析中,与基本载体相比,若 3'UTR 在至少一种(更优选两种)参照细胞类型中非但不停止表达,反而(优选)提高表达,则认为其具有可利用性。优选地,表达提高了至少 5%、10%、20%、30%、40% 或 50%。优选的细胞类型为哺乳动物的 HEK293T、CHO、HeLa、BHK、3T3 或 COS 细胞。根据本分析,若同源变体 (ii) 或片段 (iii) 较天然增强子序列 (i) 所获得的表达提高了 50% 以上,则认为其具有功能性。

[0239] 另外或者作为另一种选择,可在下述差异免疫原性分析中检测增强子序列的活性。3'UTR 被导入基本载体中。功能性增强子序列具有较基本载体所获得的抗体滴度相同或更高的抗体滴度,该基本载体含至少一个、优选两个抗原。优选地,该抗体滴度较基本载体提高至少 5%、10%、20%、30% 或 40%。优选的抗原是 HBs Ag、HSV2gD 和 Flu-M2 抗原。若同源变体 (ii) 或片段 (iii) 具有天然增强子序列 (i) 的最高抗体滴度,则认为其是功能性的。

[0240] 使用标准克隆方法可获得合适的增强子序列。例如,可在 GenBankAF143308 和 M16019 获得 HBs Ag 3' UTR 序列、或猿 CMV 立即早期基因 3' UTR 序列。引物可基于已知序列设计,并用于分离同源序列。

[0241] 在一个优选的实施方案中,核酸构建体包括异源 polyA 序列,异源前导序列和异源增强子,均与嵌合启动子有效连接,以高效表达插入的编码序列。

[0242] 在另外一方面,本发明还提供一种核酸构建体,包括如下元件或基本由如下元件组成:

[0243] (i) 启动子序列;

[0244] (ii) 非翻译前导序列,其来源于 HBV preS2 抗原序列、HBV e- 抗原序列或 HSV 型 2gD 抗原序列;和

[0245] (iii) 与 (i) 和 (ii) 有效连接的编码序列

[0246] 其中,该编码序列对非翻译前导序列是异源的。

[0247] 一般地,启动子序列 (i) 来源于病毒或真核生物的启动子序列。该启动子序列可为天然的启动子序列、天然序列的功能性同源物或两者的功能片段。合适的天然启动子包括,如, hCMV 立即早期启动子、伪狂犬病病毒 (PRV) 启动子或劳氏肉瘤病毒 (RSV) 启动子。优选地,该天然启动子包括 SEQ ID NO:52 或 SEQ ID NO:53。

[0248] 可使用诸如上述嵌合启动子的人工启动子构建体,只要该启动子是功能性的。

[0249] 一般地,功能性启动子序列可引起(包括启动和调控)适当的宿主细胞中有效连接的编码序列的转录。

[0250] 可使用常规表达分析检测启动子序列的启动子活性。一般地,在此分析中,天然启动子序列的功能性同源物或片段具有天然序列的表达量的至少 50%,例如至少 60%、70%、80% 或 90%。

[0251] 非翻译前导序列 (ii) 如上所述。合适的编码序列 (iii) 包括已在嵌合启动子构建体中描述的编码序列。但是,在本发明的此方面,编码序列对非翻译前导序列是异源的。一

般地,本构建体包括 polyA 序列(已描述)可来自编码序列,或在构建体中作为异源 polyA 序列。已描述了合适的 polyA 序列。该构建体还包括位于编码序列 3' 端的增强子序列。在嵌合启动子构建体中已描述了合适的增强子序列。

[0252] 在另一方面,本发明提供了一种核酸构建体,包括下述组分或在某些实施方案中基本由下述组分组成:

[0253] (i) 启动子序列;

[0254] (ii) 编码序列,其与启动子序列 (i) 有效连接;和

[0255] (iii) 增强子序列,位于编码序列 (ii) 的 3' 端,并与之有效连接。

[0256] 其中,增强子序列 (iii) 来源于 HBsAg 序列的 3' UTR 或猿 CMV 立即早期基因序列的 3' UTR,并且编码序列 (ii) 对增强子序列是异源的。

[0257] 构建体可包括非翻译前导序列,如在嵌合启动子构建体中已经描述的那些前导序列。

[0258] 一般地,启动子序列 (i) 来源于病毒或真核生物的启动子序列。启动子序列可为天然启动子序列、天然序列的功能性同源物或两者的功能片段。例如,合适的天然启动子包括 hCMV 立即早期启动子、伪狂犬病病毒 (PRV) 启动子或劳氏肉瘤病毒 (RSV) 启动子。优选地,天然启动子包括 SEQ ID NO:52 或 SEQ ID NO:53。

[0259] 可使用诸如上述嵌合启动子的人工启动子构建体,只要该启动子是功能性的。

[0260] 功能性启动子序列一般可引起(包括启动和调节)合适的宿主细胞中有效连接的编码序列的转录。

[0261] 使用常规表达分析可检测启动子序列的启动子活性。一般地,在该分析中,天然启动子序列的功能性同源物或片段具有天然序列的表达的至少 50%,例如至少 60%、70%、80%或 90%。

[0262] 合适的编码序列 (ii) 包括已在嵌合启动子构建体中提及的序列。但是,在此方面,编码序列与对 3' 增强子序列是异源的。该构建体的增强子序列 (iii) 如上所述。一般地,本构建体也包括 polyA 序列。如在嵌合启动子构建体中一样,该 polyA 区可来自编码序列 (ii) 或可作为该构建体中的异源 polyA 元件。

[0263] 根据本发明的任何一方面的构建体可包括信号肽序列。插入与启动子有效连接的信号肽序,这样信号肽就能表达,并辅助由编码序列(也与启动子有效连接)编码的多肽的分泌。

[0264] 一般地,信号肽序列编码 10 到 30 个氨基酸的肽,如 15 到 20 个氨基酸。通常氨基酸主要为疏水的。通常情况下,信号肽将带有该信号肽的正在合成的多肽链引导至表达细胞的内质网中。该信号肽在内质网中被切除,并通过高尔基体分泌多肽。

[0265] 用于本发明的信号肽可包括:

[0266] (i) 天然信号肽序列;

[0267] (ii) (i) 的同源变体,它保留信号肽活性;或

[0268] (iii) (i) 或 (ii) 的片段,它保留信号肽活性。

[0269] 例如,序列 (i) 可为人组织纤溶酶原激活剂信号肽 (hTPAsp) (GenBank L00141)、抑肽酶信号肽 (GenBank AAD13685)、烟草伸展蛋白信号肽 (GenBank JU0465)、或鸡溶菌酶信号肽 (GenBank AF410481)。

[0270] 适用于本发明的信号肽是能分泌异源蛋白的信号肽。功能性信号肽可在下述分析中被鉴定：比较待测信号肽的效果和已知信号肽的效果－如人组织纤溶酶原激活剂信号肽(hTPAsp)－和没有信号肽的效果。可使用下述差异表达分析,但需要有如下修改。构建分泌表达载体,其包括具有待测信号肽、hTPAsp 或没有信号肽的基本载体。缺少天然信号肽的多肽编码序列被插入载体,并将该载体转化进入参照宿主细胞中。优选的细胞是哺乳动物 HEK293T、CHO、HeLa、BHK、3T3 或 COS 细胞。细胞培养液用于分析多肽表达水平。与缺少信号肽,具有至少一种、优选两种多肽的载体相比,功能性信号肽能使多肽在较高水平上分泌。一般地,分泌量提高 5%,或更优选提高 10%或更高,如提高 20%或 50%或更高。一般地,分泌水平与使用 hTPAsp 获得的分泌水平相当。

[0271] 编码蛋白能在表达细胞外分泌具有诸多优点,特别是在该蛋白为抗原时。比如,抗原分泌量提高为由免疫细胞(巨噬细胞、Langehan 细胞、B 细胞、T 细胞等)引起的更高抗原摄入和应答提供了可能,使抗原具有到达血流和信号分子(细胞因子)的能力、使抗原能找到细胞配体并发挥作用(抗体,毒素如霍乱毒素、大肠杆菌 LT),并参与普通的细胞生物化学过程(细胞受体)。

[0272] 本发明的核酸构建体可为质粒表达载体的形式。因此该载体可包括其它元件,如复制起点或选择子基因。这些元件为本领域所熟知,并可通过使用标准技术被纳入其中。在一个实施方案中,质粒载体具有 SEQ ID NO:14 的序列。或者,该构建体可包括在病毒载体构建体中。

[0273] 在某些实施方案中,本发明的核酸构建体可包括在此定义的两个或多个嵌合启动子。因此,构建体可包括多个嵌合启动子,并且特别地,该构建体可具有两个、三个、四个、五个或多个嵌合启动子。优选地,嵌合启动子分别与用于插入编码序列的克隆位点有效连接。因此,该构建体可表达两个、三个、四个、五个或多个编码序列。所表达的编码序列可为在此具体描述的任何序列。在一个优选的实例中,构建体具有两个嵌合启动子,它们分别具有与它们有效连接的编码序列。特别地,这两种启动子可彼此独立地转录。

[0274] 特别地,具有两个启动子的构建体可表达 ADP-核糖基化细菌毒素的 A 亚基和 B 亚基,包括本文所述的任何一种,并优选 LTA 亚基和 B 亚基。

[0275] 在构建体具有多个嵌合启动子的情况下,每个启动子均包括,或有效连接到本文提及的任何序列。在一个特别优选的实例中,一个或多个启动子的异源内含子可为大鼠胰岛素基因内含子 A 序列。一个或多个嵌合启动子也可优选包括 HSV-2gB pre-S2 的 5'UTR。一个或多个启动子可包括大鼠 β 珠蛋白基因的聚腺苷酸化序列。

[0276] 在一优选的实例中,本发明的核酸构建体可包括两个嵌合启动子序列,且每个启动子序列有效连接到插入编码序列的克隆位点,其中,每个嵌合启动子包含:

[0277] (a)hCMV 立即早期启动子序列;

[0278] (b)hCMV 主要立即早期基因的外显子 1 和至少一部分外显子 2;和

[0279] (c)置换 hCMV 主要立即早期基因的内含子 A 区的异源内含子。

[0280] 与一个嵌合启动子有效连接的编码序列编码 LTA 亚基,与另一启动子连接的编码序列编码 LTB 亚基。因此,构建体能表达两种亚基。优选地:

[0281] - 每个启动子的异源内含子是大鼠胰岛素基因内含子 A 序列;

[0282] - 编码每个 LT 亚基的序列有效连接到 HBV pre-S2 的 5'UTR;和/或

[0283] - 每个 LT 编码序列与大鼠 β 珠蛋白基因聚腺苷酸化序列有效连接。

[0284] 本发明的多核苷酸构建体基本不含细胞或细胞物质或与其一起存在。它可以是基本分离的形式,或基本纯化的形式,在每种形式下,它在制剂中一般包括至少 90%,如至少 95%、98%或 99%的多核苷酸或干物质。

[0285] 本核酸分子可被释放到适合的宿主细胞中,以表达与启动子有效连接的多核苷酸。优选地,宿主细胞是哺乳动物细胞,特别是人的细胞。释放核酸到这些细胞中的适合的方法为本领域所熟知,包括,如葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、电穿孔和直接显微注射到细胞核。

[0286] 如上所述,构建体中的核酸编码序列可编码治疗相关的多肽。因此,使用标准基因释放方法,本构建体可用于核酸免疫接种或基因治疗。用于基因释放的合适方法已为本领域所熟知,如下所详细说明。核酸分子可直接释放到受试者,或者,离体释放到来自受试者的细胞,然后将细胞重新植入受试者。

[0287] 就在核酸免疫接种或基因治疗中的使用方法而言,核酸构建体能如常规药物制剂那样制备。可使用本领域普通技术人员可得的标准药理配方化学和方法制备。例如,含有一个或多个核酸序列(如以合适的载体形式如 DNA 质粒形式存在)的组合物能与一种或多种药理学上可接受的赋形剂或载体联合,以提供一种液体制剂。

[0288] 辅助物质,如湿润剂或乳化剂,pH 缓冲物质等等,可存在于赋形剂或载体中。这些赋形剂、载体和辅助物质一般是药剂,它可给药,没有异常毒性,并且在作为疫苗组合物时不会在接受该组合物的个体内引起免疫应答。药理学上可接受的赋形剂包括,但不限于液体,如水、盐水、聚乙二醇、透明质酸、丙三醇和乙醇。其中还可包括药理学上可接受的盐,例如,无机酸盐,如氢氯化物、氢溴化物、磷酸盐、硫酸盐等,有机酸盐,如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、安息香酸盐等。尽管没有要求,但优选制剂包括起着稳定剂的作用的、在药理学上可接受的赋形剂,特别是针对肽、蛋白或其它分子,如果它们包括在组合物中。同样起着肽的稳定剂作用的合适的载体的实例包括,但不限于药品级的葡萄糖、蔗糖、乳糖、海藻糖、甘露醇、山梨醇、纤维醇、葡聚糖等。其它合适的载体还包括,但不限于淀粉、纤维素、磷酸钠或磷酸钙、柠檬酸、酒石酸、甘氨酸、高分子量聚乙二醇(PEG)和其组合。在 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(MarkPub. Co., N. J. 1991) 中非常详细地描述了药理学上可以接受的赋形剂、载体和辅助物质,在此通过引用被纳入本申请中。

[0289] 在组合物中也可包括核酸摄入和/或表达的某些促进剂(facilitator) (“转染促进剂”, transfection facilitating agent),例如促进剂如布比卡因(bupivacaine)、心脏毒素(cardiotoxin)和蔗糖,转染易化载体如一般用于释放核酸分子的脂质体制剂或脂质制剂。阴离子脂质体和中性脂质体来源广泛,并且其可释放核酸分子是广为人知的(见如 Liposomes: A practical Approach, (1990) RPC New Ed., IRL Press)。阳离子脂质制剂也是公知的用于释放核酸分子的载体。合适的脂质制剂包括 DOTMA(N-[1-(2,3-二油酰氧)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵, N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride),其商品名为 Lipofectin™,和 DOTAP(1,2-二(油酰氧)-3-(三甲铵基)丙烷, 1,2-bis(dioleoyloxy)-3-(trimethylammonio)propane), 见如 Felgner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7416; Malone et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6077-6081; 美国专利 No 5,283,185 和 5,527,928, 和国际公布 No W090/11092、W091/15501

和 W095/26356。这些阳离子脂质可优选与中性脂质联合使用,如 DOPE (二油酰磷脂酰乙醇胺, dioleoyl phosphatidylethanolamine)。可加入上述脂质或脂质体制剂中的其他转染促进组合物包括精胺衍生物 (见如国际公布 No. WO 93/18759) 和透膜化合物如 GALA、短杆菌肽 (Gramicidine S) 和阳离子胆盐 (见如国际公布 No. WO 93/19768)。

[0290] 或者,本发明的核酸分子可被包入、被吸入或结合至微粒载体。合适的微粒载体包括来源于聚甲基丙烯酸甲酯聚合物 (polymethylmethacrylate polymer) 的微粒载体,和来源于聚(丙交酯)(poly(lactide)) 和聚(丙交酯-乙交酯)(poly(lactide-co-glycolide)) 的 PLG 微粒。见如 Jeffery et al. (1993) Pharm. Res. 10: 362-368。也可使用其它微粒系统和聚合物,如聚合物如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚鸟氨酸、精胺、亚精胺,和这些分子的缀合物。

[0291] 组合物一旦形成,能通过诸多已知方法和技术释放至受试者体内。

[0292] 例如,液体制剂可为可注射溶液、悬浮液或乳液,并使用普通针头和注射器、或液体喷射注射系统,通过非肠道注射、皮下注射、皮内注射、肌肉注射、静脉注射给药。液体制剂也可局部给药至皮肤或粘膜组织,或为磨碎的喷雾剂,适合用于呼吸或肺部给药。其它给药方式包括口服给药、栓剂和主动或被动透皮释放技术。

[0293] 或者,组合物可离体给药,如已知将转化细胞释放和重新植入受试者内(如葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、电穿孔和直接显微注射到细胞核)。

[0294] 组合物以与药剂相容剂量给药给受试者,该剂量在预防和/或治疗上是有效的。合适的有效剂量将会落入相对较宽的范围内,但容易为本领域普通技术人员采用常规试验测定。就测定所需剂量的目的而言,《医师药理学参考书》(Physicians Desk Reference) 和 Goodman 和 Gilman 的《治疗的药理学基础》(The Pharmacological Basis of Therapeutic) 是有用的。例如,一般地,多核苷酸的有效剂量在大约 0.001 到 1000 μ g,更优选在 0.01 到 10.0 μ g 的范围内。

[0295] 在一个实例中,本发明的核酸构建体可与另一个核酸构建体联合使用。在某种情况下,核酸构建体可为本文所描述的一种表达佐剂的构建体,另外一种构建体可为编码一个或多个抗原的构建体。在一个优选的实例中,两种构建体均采用本发明的嵌合启动子。

[0296] 在一种构建体表达佐剂,另一种构建体表达一个抗原或多个抗原时,抗原可特别来自 HSV 或肝炎病毒(特别是乙型肝炎病毒)。特别地,抗原可为 HSV ICP0、ICP4、ICP22 和/ICP 27 抗原,并优选所有这四种。在这种抗原表达时,佐剂构建体特别表达 LTA 和/或 LTB,并特别共同表达。

[0297] 两种构建体可分别、同时或连续给药。这两种构建体可在同一组合物或不同组合物中给药。特别地,在一种构建体具有佐剂效应时,两种构建体将被释放,这样可观察到佐剂效应,即:和若佐剂不与抗原一起给药相比,佐剂和抗原一起给药所形成的免疫应答增强和/或时间延长。在一个优选的实例中,两种构建体在同一组合物中释放,优选在相同的载体颗粒上。

[0298] 在一个优选的实施方案中,使用颗粒介导的释放技术将本发明的核酸构建体释放给靶细胞。释放核酸制剂的颗粒介导的方法为本领域所熟知。

[0299] 采用各种本领域已熟知的技术,通过将本发明的核酸分子包被到载体颗粒(如核心载体)上可形成用于颗粒介导的释放系统的颗粒。载体颗粒选自在颗粒大小范围内具有

合适密度的物质,该颗粒大小一般用于从颗粒介导的释放装置的细胞内释放。一般地,载体颗粒的直径为 0.1 到 5 μm ,如 0.5 到 3 μm ,优选 1 到 2 μm 。最佳载体颗粒大小当然取决于靶细胞的直径。或者,可使用胶体金颗粒,其中包被的胶体金被给药(如注射)到组织(如皮肤或肌肉),随后被具有免疫能力的细胞摄入。

[0300] 通常,载体颗粒选自惰性金属。该金属是惰性的是因为他们没有生理学活性。基于本发明的目的,可使用钨、金、铂和铱载体颗粒。优选钨和金颗粒。平均直径为 0.5 到 2.0 μm 的钨颗粒易于得到。尽管这种颗粒在用于颗粒加速释放方法中有着最佳密度,并为使用 DNA 进行高效包被提供可能,但是,钨对于某些细胞类型具有潜在的毒性。金颗粒或微晶金(microcrystalline gold)(如金粉 A1570,可从 Engelhard Corp. 获得,East Newark, NJ)也发现可采用本方法使用。金颗粒大小均一(从 Alpha Chemicals 获得,颗粒大小为 1-3 μm ,或从 Degussa, South Plainfield, NJ 获得,颗粒大小在一定范围内,包括 0.95 μm),并且降低了毒性。微晶金具有不同的颗粒大小分布,一般在范围 0.1-5 μm 间。但是,微晶金(microcrystalline gold)的不规则表面积为使用核酸高效包被提供了可能。

[0301] 将 DNA 或 RNA 包被或沉淀在金或钨颗粒上的多种方法为公知,并且已经进行了描述。一般地,其中大部分方法将质粒 DNA、 CaCl_2 和亚精胺结合在定量的金或钨上。在包被处理过程中将产生的溶液一直搅拌以确保反应混合物的均一性。在核酸沉淀后,包被颗粒可转移到合适的膜上并在使用前干燥,然后包被到样本模块(sample module)或样本盒(cassette)的表面,或负载到特别是用于颗粒介导的释放装置的释放盒(delivery cassette)中。

[0302] 或者,本发明的多核苷酸可制备成微粒组合物。使用上述标准药理配方化学进行制备。例如,多核苷酸可结合一种或多种在药理学上可接受的赋形剂或载体,以提供合适的组合物。然后,使用标准技术,如通过简单蒸发(风干)、真空干燥、喷雾干燥、冷冻干燥(冻干)、喷雾-冷冻干燥、喷雾包被、沉淀、超临界流体颗粒制备等,将制备得到的组合物制备成颗粒。如果需要,可使用在国际公布 No. W097/48485(通过引用纳入本发明)中描述的技术将得到的颗粒致密。

[0303] 这些方法可用来获得核酸颗粒,该核酸颗粒大小范围在大约 0.01 到大约 250 μm ,优选大约 10 到大约 150 μm ,并最优选大约 20 到大约 60 μm ;并且颗粒密度范围在大约 0.1 到大约 25g/ cm^3 ,堆密度在大约 0.5 到大约 3.0g/ cm^3 ,或更大。

[0304] 含核酸分子的颗粒一旦形成,可包装到一单位剂量或多单位剂量的容器中。该容器可包含装有合适量颗粒的密封紧密的容器。该颗粒可包装成无菌制剂,因此,该密封紧密的容器可经专门设计,以使制剂在释放给受试者之前保持其无菌性。该容器优选经改装,以直接用于颗粒介导的释放装置。一般地,该容器为胶囊、铝箔包装(foil pouches)、囊剂、药盒等形式。含合适剂量颗粒的颗粒释放装置可以预负载的形式提供。然后,预负载装置也可在紧密封闭的容器中预先安装。

[0305] 包装颗粒的容器可进一步标记,以识别组合物,并提供相关剂量信息。另外,容器可用标签标记,该标签的形式由政府机关,如食品药品监督管理局规定,该标签表明其中所装的人用核酸制剂的使用或销售得到制造业的联邦法律下属机构的许可。

[0306] 适用于颗粒介导的释放装置的颗粒加速装置已为本领域所熟知。例如,现在的基因枪装置使用爆发性的、电的或气体的释放方法推进包被载体颗粒到靶细胞。包被载体颗

粒能以可释放的方式附着在可移动载体片层上,或以可除去的方式附着在气流通过的表面上,将该颗粒抬离表面并加速到靶标。气体释放装置的实例在美国专利 No. 5, 204, 253 中描述。爆发型装置在美国专利 No. 4, 945, 050 中描述。适用于本文的电释放装置的实例在美国专利 No. 5, 120, 657 中描述。另外一种电释放装置在美国专利 No. 5, 149, 655 中描述。所有这些专利的公开以引用的方式全文纳入本文。

[0307] 颗粒也可使用无针注射装置给药,如在授权给 Bellhouse 等人的美国专利 No. 5, 630, 796 (“the powderJect[®] needleless syringe device”) 和国际公布 No. WO 94/24263, WO 96/04947, WO 96/12513 和 WO96/20022 中描述,并全部以引用的方式纳入本文。

[0308] 如在美国专利 No. 5, 630, 796 中描述的装置可为笔状装置,以从上到下的线性顺序依次包括贮气筒、颗粒盒或颗粒包,和与消声器相连的超声喷嘴。颗粒在合适的容器中,如由两张可破聚合膜形成的盒,该聚合膜被热封闭成一垫圈状隔圈以形成完备的封闭单位。可选择膜材料以获得特定的开口模式和破裂压力,这指明了超音流启动的条件。

[0309] 运行时,促使装置将压缩气体从贮气筒释放到装置内的膨胀室。被释放的气体与颗粒盒接触,并在达到足够压力时,突然突破盒膜将颗粒导入超声喷嘴用以随后的释放。喷嘴被设计以获得特定的气体速度和流动方式以释放一定量颗粒到靶表面的预定区域。消声器用来减弱由超声气流所产生的噪音。

[0310] 国际公布 No. WO 96/20022 中所描述的释放系统也使用压缩气体源的能量来加速和释放粉状组合物。但是,不同于美国专利 No. 5, 630, 796 中的系统,它采用冲击波代替气体流加速颗粒。更具体地说,由冲击波在弹性圆顶(flexible dome)后面所形成的瞬时压力的升高撞击圆顶的背部,在沿靶表面方向引起弹性圆顶的突然外翻。这种突然外翻效应以足够的速度和动量发射出粉状组合物(其位于圆顶的外侧),以穿透靶组织,如口腔粘膜组织。粉状组合物在圆顶完全外翻瞬间释放。该圆顶也完全包含高压气流,因此它并不与组织相接触。由于气体在该释放操作中并不释放,因此该系统在本质上是安静的。这种设计可在其它密闭或其它非常敏感的应用中使用,例如以将颗粒释放到最小受损的手术部位。

[0311] 颗粒可在体内直接释放给受试者,或体外释放给来自受试者的细胞,然后将转化细胞重新植入受试者。就在体内释放而言,颗粒注射一般是皮下注射、表皮注射、皮内注射、粘膜内注射(如鼻腔注射、直肠注射和/或阴道注射)、腹膜内注射、静脉注射、口腔注射或肌肉注射。优选地,释放到最终分化的细胞;但是,颗粒也可释放到未分化,或部分分化的细胞如血液和皮肤成纤维细胞的干细胞。最优选地,释放到皮肤表皮细胞。

[0312] 颗粒以与剂量制剂相容的方式、并以在预防和/或治疗上有效的剂量被释放给受试者。该微粒组合物的“治疗有效剂量”是指足够治疗或预防疾病或病症症状,并将落入采用常规方法可测定的相对宽的范围。一般地,颗粒以每单位剂量 0.001 到 1000 μg ,更优选 0.01 到 10.0 μg 的核酸剂量释放。但是,所需精确剂量根据接受治疗的个体的年龄和全身状况以及所选择的具体核酸序列,以及其它因素的不同而不同。通过临床检测可非常容易确定合适的有效剂量。就确定所需含量而言,《医师药理学参考书》和 Goodman 和 Gilman 的《治疗的药理学基础》是有用的。

[0313] 分析

[0314] 差异表达分析

[0315] 适当的元件有效性试验可确定元件对多肽表达的影响。检测元件有效性的比较基础是“基本载体”，一般（除非另外提及）是指质粒，它含 hCMV 启动子、hCMV 外显子 1、hCMV 外显子 2 的 9 个碱基、HBVpreS2 的 5' UTR 和兔 β -珠蛋白₂ 聚腺苷酸化区，它位于驱动编码序列表达处。一般地，基本载体是 pJV7384、pJV7401、pJV7450 或 pJV7533。导入异源内含子和 3' UTR，或将启动子序列、外显子、5' UTR 和 polyA 位点导入基本载体中形成待测表达载体。因此，可检测功能变体或片段。

[0316] 基本载体和待测载体被转化进入合适的宿主细胞和用于分析多肽表达水平的细胞中。优选地，使用哺乳动物宿主细胞。合适的细胞包括哺乳动物 HEK 293T、CHO、HeLa、BHK、3T3 或 COS 细胞。

[0317] 一般地，功能元件会产生与基本载体相当的表达量，如至少相同或更高。优选地，在一种以上细胞类型并使用一个以上编码序列检测表达。

[0318] 提供了合适的实验方法，例如下面的实施例 1 到 13。

[0319] 差异免疫原性分析

[0320] 若所表达的多肽为抗原，进行另一检测以鉴定功能性构建体元件或特别优选的构建体元件。在此分析中，元件对免疫应答的影响在将表达载体释放到待测机体后测定。针对抗原的抗体水平是判断免疫应答的最为简单的方式。将不同组次的小鼠用如上构建的基本载体或待测载体接种。在恰当的时间后收集血清并分析抗体水平。

[0321] 该实验进行了两次，并用两次实验所有组次中获得的抗体水平作坐标图。和基本载体相比，在两次实验中，功能元件针对一特定抗原将产生至少相同或更高的抗体滴度。优选地，可使用一个以上抗原观察到该结果，表明了在该表达系列中元件有效性的宽度。

[0322] 提供了合适的实验方法，如下面的实施例 14。

[0323] C. 实验

[0324] 下面是实施本发明的具体实施方案的实施例。这些实施例仅供说明，并非意在以任何方式限制本发明的范围。

[0325] 已努力确保所使用的数字（如含量、温度等）的准确性，但是毫无疑问也应允许某些实验误差和偏差。

[0326] 方法

[0327] 标准 PCR 条件

[0328] 下面是用于构建载体的标准 PCR 条件：1×PCR 核心缓冲液 w/1.5mM MgCl₂ (Promega Corporation, Madison, WI)，每种引物各 0.400 μM，每种 dNTP (USB, Inc, Cleveland, OH) 各 200 μM，2.5 μ Taq 聚合酶 (Promega Corporation, Madison, WI)，1.0ng 模板 DNA，加水到 100 μl，并用矿物油 (Aldrich Chemical, Inc, Milwaukee, WI) 覆盖。PTC-200 热循环器 (thermocycler) (MJ Research, Inc. Waltham, MA) 被编程执行如下程序：4' @95°C，30 个循环 (1' @95°C / 1' 15" @55°C / 1' @72°C)，10' @72°C，4°C 保持)。在限制性内切酶 (New England Biolabs, Beverly, MA) 剪切前，使用 QIAquick[®] PCR 纯化试剂盒 (Qiagen Inc, Valencia, CA) 从 PCR 反应中取出扩增产物。

[0329] 所有 PCR 产物在克隆后被测序以确定扩增的保真度。

[0330] 实施例 1. 乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 载体系列的构建

[0331] 构建了许多表达 HBsAg 的质粒表达载体。

[0332] 原材料

[0333] (i)pWRG7128(Roy, M, et al. Vaccine(2001)19:764-778),它含有 hCMV 立即早期启动子序列,hcMV 主要立即早期基因的第一外显子、第一内含子和部分第二外显子,含侧翼区(来源于 HBV preS25'UTR 的序列和 3'转录后应答元件)的 HBsAg 编码序列和牛生长激素聚腺苷酸化区(BGHpA)。

[0334] (ii)pJV7284, pWRG7128 的衍生物,它用兔 β 珠蛋白聚腺苷酸化区(RBGpA)替换 BGHpA。

[0335] (a)pJV7384(CMV(无内含子)、HBV preS2 5' UTR 和 RBGpA)

[0336] 采用标准条件,用 JF93(SEQ ID NO:15)和 F110(SEQ ID NO:16)扩增 pWRG7128, Sal I 和 BamH I 剪切,以分离含 CMV 启动子、外显子 1 和部分外显子 2 序列的插入片段。BamH I 和 BstX I 剪切 pAM6(ATCC, Mannassas, VA),以分离含 HBsAg 5'UTR 和大概 70% HBsAg 编码区的插入片段。Sal I 和 BstX I 剪切 pJV7284,以形成一载体片段,将两个插入片段连接到该载体片段,得到 pJV7293。

[0337] 用引物 GW1(SEQ ID NO:17)和 JF254(SEQ ID NO:18)PCR 扩增 pWRG7128,并用 BstX I 和 Bgl II 剪切以分离含 HBsAg 编码区 3'端的插入片段。BstX I 和 Bgl II 剪切 pJV7293,以形成一载体片段,将插入片段连接到载体片段,得到载体 pJV7384。

[0338] (b)pJV7382(CMV(无内含子)、HBsAg 3' UTR、HBV preS2 5' UTR 和 RBGpA)

[0339] Xho I 和 Xba I 剪切 pJV7293,以形成含 CMV 启动子/外显子和具有 HBsAg 编码序列 5'端的 5'-UTR 的插入片段。Xba I 和 Bcl I 剪切 pWRG7128,以形成含大部分 HBsAg 编码序列和其 3'-UTR 的插入片段。Xho I 和 Bgl II 剪切 pJV7284,以形成一载体片段,将两个插入片段连接到该载体片段,得到载体 pJV7382。

[0340] (c)pJV7389(CMV(RIA))、HBsAg 3' UTR、HBV preS2 5' UTR 和 RBGpA)

[0341] 使用引物 GW150(SEQ ID NO:19)和 JF255(SEQ ID NO:20)将大鼠胰岛素内含子 A(RIA)从质粒 p5' rIns(来源未知)PCR 扩增。BamH I 剪切 PCR 产物,并插入经 BamH I 线性化的 pJV7382,得到 pJV7389。

[0342] (d)pJV7387(CMV(RIA))、HBV preS2 5' UTR 和 RBGpA)

[0343] BstX I 和 EcoR I 剪切 pJV7384,以形成含 HBsAg 编码区的 3'端和 RBGpA 的插入片段。BstX I 和 EcoR I 剪切 pJV7389,以形成一载体片段,将插入片段连接到该载体片段,得到载体 pJV7387。

[0344] 实施例 2. 单纯疱疹病毒糖蛋白 D 抗原(HSVgD)载体系列的构建

[0345] 构建了许多表达 HSVgD 的质粒表达载体。

[0346] 原材料

[0347] (a)pJV7334, pWRG7284(pJV 7284)的衍生物,紧邻 ATG 起始密码子下游的框内 Nhe I 置换 HBsAg 编码序列,后继带有 BamHI 的填充片段,紧接 HBC Enh 的 5'端。

[0348] (b)pWRG7202,含填充片段的 pGem3Z(Promega)的衍生物,该填充片段为编码序列融合到 Nhe I 位点下游的人组织纤溶酶原激活剂(TPA)信号肽提供了可能。

[0349] (a)pJV7392(CMV(天然内含子)、HBsAg 3' UTR、HBsAg 5' UTR 和 RBGpA)

[0350] 用引物 DS1(SEQ ID NO:21)和 DA1(SEQ ID NO:22)从病毒 DNA 原种(Advanced Biotech, Inc, Columbia, MD)PCR 扩增 HSV2gD 的编码区,并用 Nhe I 和 EcoR I 剪切,以形成

一插入片段。Nhe 1 和 EcoR 1 剪切 pJV7202, 以形成一载体片段, 将插入片段连接到该载体片段, 产生载体 pJV7391。

[0351] Nhe 1 和 Bgl 2 剪切 pJV7391, 以形成含 HSV2 gD 编码序列的插入片段。Nhe 1 和 BamH 1 剪切 pJV7334, 以形成一载体片段, 将插入片段连接到该载体片段, 产生载体 pJV7392。该载体由下列表达元件组成: hCMV 立即早期启动子序列, hCMV 主要立即早期基因的第一外显子、第一内含子和部分第二外显子, HBsAg 5' -UTR、HSV2 gD 基因的编码序列、HBsAg 3' -UTR 和 RBGpA。

[0352] (b)pJV7399(CMV(无内含子)、HBsAg 3' UTR、HBsAg 5' UTR 和 RBGpA)

[0353] 按如下方法构建无内含子的 pJV7392。Hind 3 和 Nde 1 剪切 pJV7384, 以分离含卡那霉素抗性基因 5' 端和 CMV 启动子的插入片段。Nde 1 和 Ssp 1 剪切 pJV7384, 以分离含 CMV 启动子 3' 端、CMV 外显子 1/2 和 HBsAg 5' -UTR 的 5' 端的插入片段。该插入片段插入 pJV7392 中, 并且除去 Hind 3-Ssp 1 片段, 得到 pJV7399。

[0354] (c)pJV7400(CMV(RIA)、HBsAg 3' UTR、HBsAg 5' UTR 和 RBGpA)

[0355] 按如下方法构建含 RIA 的 pJV7392。Hind 3 和 Nde 1 剪切 pJV7384, 以分离含卡那霉素抗性基因 5' 端和 CMV 启动子的插入片段。Nde 1 和 Ssp 1 剪切 pJV7387, 以分离含 CMV 启动子 3' 端、CMV 外显子 1/2(部分)、RIA 和 HBsAg 5' -UTR 5' 端的插入片段。该插入片段插入 pJV7392 中, 并且除去 Hind 3-Ssp 1 片段, 得到 pJV7400。

[0356] (d)pJV7401(CMV(无内含子)、HBsAg 5' UTR 和 RBGpA)

[0357] 按如下方法构建无 3'-UTR 的 pJV7399。Bsp 120I 和 Bgl 2 剪切 pJV7391, 以分离含 HSV2 gD 基因的 3' 端的插入片段。Bgl 2 和 EcoR 1 剪切 pJV7284, 以分离 RBGpA 信号。该插入片段插入 pJV7399 中, 并且除去 Bsp 120I-EcoR 1 片段, 得到 pJV7401。

[0358] (e)pJV7402(CMV(RIA)、HBsAg 5' UTR 和 RBGpA)

[0359] 按如下方法构建无 3'-UTR 的 pJV7400。Bsp 120I 和 Bgl 2 剪切 pJV7391, 以分离含 HSV2 gD 基因 3' 端的插入片段。Bgl 2 和 EcoR 1 剪切 pJV7284, 以分离 RBGpA 信号。该插入片段连接到 pJV7400 中, 并且除去 Bsp 120I-EcoR 1 片段, 得到 pJV7402。

[0360] 实施例 3. Flu M2 抗原载体系列的构建

[0361] (a)pJV7450(CMV(无内含子)、HBsAg 5' UTR 和 RBGpA)

[0362] 使用引物 JF301(SEQ ID NO:23) 和 JF302(SEQ ID NO:24) 从质粒 pFL-M2(Joel Haynes, PJV)PCR 扩增 Flu M2 编码区, 并用 Nhe 1 和 Bgl 2 剪切, 以形成一插入片段。Nhe 1 和 Bgl2 剪切 pJV7401, 以形成一载体片段, 插入片段连接到其中, 得到 pJV7450。

[0363] (b)pJV7452(CMV(无内含子)、HBsAg 3' UTR、HBsAg 5' UTR 和 RBGpA)

[0364] 使用引物 JF84(SEQ ID NO:25) 和 JF225(SEQ ID NO:26) 从 pJV7389 PCR 扩增 3' UTR 片段, Bsp 120I 剪切、T4 DNA 聚合酶填充, Bgl 2 接头(cat#1036, New England Biolabs) 连接。Bgl2 和 EcoR1 剪切该片段, 以分离含 HBsAg 3' UTR 和 RBGpA 区的插入片段。Bgl2 和 EcoR1 剪切 pJV7450, 以形成一载体片段, 插入片段连接到其中, 得到 pJV7452。

[0365] (c)pJV7458(CMV(RIA)、HBsAg 5' UTR 和 RBGpA)

[0366] 按如下方法构建含 RIA 的 pJV7450: BamH 1 剪切 pJV7389, 以分离含 RIA 的插入片段。BamH 1 剪切 pJV7450, 以形成载体片段, 插入片段连接到其中, 得到 pJV7458。

[0367] (d)pJV7468(CMV(RIA)、HBsAg 3' UTR、HBsAg 5' UTR 和 RBGpA)

[0368] 按如下方法构建含 HBsAg 3' UTR 的 pJV7458。Bgl2 和 EcoR1 剪切 pJV7452,以制备含 HBsAg 3' UTR 和 RBGpA 的插入片段。Bgl 2 和 EcoR 1 剪切 pJV7458,以形成一载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7468。

[0369] 实施例 4. β -gal 载体系列的构建

[0370] (a)pJV7488(CMV(无内含子)、HBsAg 3' UTR、HBsAg 5' UTR 和 RBGpA)

[0371] 使用引物 JF335(SEQ ID NO:27) 和 JF336(SEQ ID NO:28) 扩增 CMV- β (Clontech),并用 Nhe 1 和 Bgl 2 剪切,以分离编码 β -半乳糖苷酶的插入片段。Nhe 1 和 Bgl 2 剪切 pJV7452,以形成一载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7488。

[0372] (b)pJV7533(CMV(无内含子)、HBsAg 5' UTR 和 RBGpA)

[0373] Bgl2 和 EcoR 1 剪切 pJV7450,以分离含 RBGpA 的插入片段。Bgl2 和 EcoR 1 剪切 pJV7488,以形成一载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7533。

[0374] (c)pJV7551(CMV(RIA/Nhe1)、HBsAg 3' UTR、HBsAg 5' UTR 和 RBGpA)

[0375] Xho 1 和 BamH 1 剪切 pJV7530(见实施例 5),以分离含穿过 RIA 的 CMV 启动子的插入片段。Xho 1 和 BamH 1 剪切 pJV7488,以形成一载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7551。

[0376] (d)pJV7552(CMV(RIA/Nhe1)、HBsAg 5' UTR 和 RBGpA)

[0377] Xho 1 和 BamH 1 剪切 pJV7530,以分离含穿过 RIA 的 CMV 启动子的插入片段。Xho 1 和 BamH 1 剪切 pJV7533,以形成一载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7552。

[0378] 实施例 5. pJV 表达载体 (pJV7563) 的构建

[0379] (a)pJV7496

[0380] 使用引物 JF357(SEQ ID NO:29) 和 JF365(SEQ ID NO:30)PCR 扩增 pJV7389, T4 DNA 聚合酶处理钝化末端,Sal 1 剪切,以分离编码卡那霉素抗性基因的插入片段。Ava 1 剪切 pJV7389, T4 DNA 聚合酶处理钝化末端,Sal 1 剪切,以分离一载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7496。

[0381] (b)pJV7530

[0382] 使用引物 JF393(SEQ ID NO:31) 和 JF406(SEQ ID NO:32)PCR 扩增 pJV7389, Bgl2 和 BamH 1 剪切,以分离含 RIA(缺失内部 Nhe1 位点)的插入片段。BamH 1 剪切 pJV7496,以制备一载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7530。

[0383] (c)pJV7549

[0384] BamH 1 和 BcoR5 剪切 pJV7468,以分离含 M2 和部分 HBV 3' ENH 的插入片段。BamH 1 和 EcoR5 剪切 pJV7530,以制备一载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7549。

[0385] (d)pJV7563

[0386] 将引物 JF256(SEQ ID NO:33) 和 JF257(SEQ ID NO:34) 退火以制备由多克隆位点组成的插入片段。Nhe 1 和 Bgl2 剪切 pJV7549,以制备一载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7563。图 12 示出 pJV7563 质粒图谱。图 13 给出质粒 pJV7563 的碱基组成。质粒 pJV7563 中的元件及其位置如下所示:

[0387] 1-44 转座子 903 序列

[0388] 45-860 来自转座子 903 的卡那霉素抗性编码序列

[0389] 861-896 转座子 903 序列

- [0390] 897-902 SalI 位点
- [0391] 903-1587 CMV 启动子
- [0392] 1588-1718 来自 CMV 立即早期基因的非翻译前导序列
- [0393] 1719-1724 BamHI 和 BglII 限制性酶的融合
- [0394] 1725-1857 大鼠胰岛素内含子 A
- [0395] 1858-1863BamHI 位点
- [0396] 1864-1984 HBV 表面抗原 5' 非翻译前导序列
- [0397] 1985-1993 合成起始密码子 /NheI 克隆位点
- [0398] 1994-2011 合成克隆位点
- [0399] 2012-2544 HBV 增强子
- [0400] 2545-2555 原载体序列。NCBI 数据库中没有命中结果
- [0401] 2556-2686 兔 β -珠蛋白聚腺苷酸化区
- [0402] 2687-3759 pUC19 载体序列
- [0403] 实施例 6. 使用人分泌型碱性磷酸酶 (SEAP) 和人 IgG Fc 片段 (hFc) 作为模型抗原, 构建信号肽表达载体系列
- [0404] (i) pJV7507 (hTPA_{sp} 和 SEAP)
- [0405] 使用引物 JF320 (SEQ ID NO:35) 和 JF321 (SEQ ID NO:36) PCR 扩增 pSEAP-Basic (Clontech), Nhe I 和 Bgl II 剪切, 以分离由人 SEAP 片段组成的插入片段。Nhe I 和 Bgl II 剪切 pJV7079 (Macklin, et. al.), 以制备一载体片段, 插入片段连接到其中, 得到 pJV7507。
- [0406] (ii) pJV7508 (hTPA_{sp} 和 hFc)
- [0407] 使用引物 JF386 (SEQ ID NO:37) 和 FcAS (SEQ ID NO:38) PCR 扩增人 DNA, Nhe I 和 Bgl II 剪切, 以分离由人 IgG Fc 片段组成的插入片段。Nhe I 和 Bgl II 剪切 pJV7079, 以制备一载体片段, 插入片段连接到其中, 得到 pJV7508。
- [0408] (iii) 抑肽酶信号肽编码序列的制备
- [0409] 使用引物 JF355 (SEQ ID NO:40) 和 JF356 (SEQ ID NO:41) PCR 扩增合成的寡核苷酸 JF354 (SEQ ID NO:39), 以形成抑肽酶信号肽的编码序列。
- [0410] (iv) 烟草伸展蛋白信号肽编码序列的制备
- [0411] 使用引物 JF349 (SEQ ID NO:43) 和 JF350 (SEQ ID NO:44) PCR 扩增合成的寡核苷酸 JF348 (SEQ ID NO:42), 以形成烟草伸展蛋白信号肽的编码序列。
- [0412] (v) 鸡溶菌酶信号肽编码序列的制备
- [0413] 使用引物 JF352 (SEQ ID NO:46) 和 JF353 (SEQ ID NO:47) PCR 扩增合成的寡核苷酸 JF351 (SEQ ID NO:45), 以形成鸡溶菌酶信号肽的编码序列。
- [0414] (a) Flu M2 抗原信号肽系列
- [0415] pJV7499 (CMV (无内含子)、HBsAg5' UTR、RBGP_A、抑肽酶信号肽)
- [0416] pJV7497 (CMV (无内含子)、HBsAg5' UTR、RBGP_A、烟草伸展蛋白信号肽)
- [0417] pJV7500 (CMV (无内含子)、HBsAg5' UTR、RBGP_A、鸡溶菌酶信号肽)
- [0418] S_{Pe} I 和 Nhe I 剪切信号肽编码序列, 以分离插入片段。Nhe I 剪切 pJV7450, 以制备载体片段, 插入片段连接到其中, 得到 pJV7499 (抑肽酶)、pJV7497 (烟草伸展蛋白) 和

pJV7500(鸡溶菌酶)。

[0419] (b)SEAP 信号肽系列

[0420] pJV7513(CMV(无内含子)、HBsAg5' UTR、RBGP A、抑肽酶信号肽)

[0421] pJV7512(CMV(无内含子)、HBsAg5' UTR、RBGP A、烟草伸展蛋白信号肽)

[0422] pJV7510(CMV(无内含子)、HBsAg5' UTR、RBGP A、鸡溶菌酶信号肽)

[0423] Xho 1 和 Nhe 1 剪切 pJV7499、7497 和 7500,以分离由穿过质粒的信号肽编码序列的 CMV 启动子组成的插入片段。Xho 1 和 Nhe 1 剪切 pJV7507,以制备载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7513(抑肽酶)、pJV7512(烟草伸展蛋白)和 pJV7510(鸡溶菌酶)。

[0424] (c)hFc 信号肽系列

[0425] pJV7524(CMV(无内含子)、HBsAg5' UTR、RBGP A、抑肽酶信号肽)

[0426] pJV7525(CMV(无内含子)、HBsAg5' UTR、RBGP A、烟草伸展蛋白信号肽)

[0427] pJV7526(CMV(无内含子)、HBsAg5' UTR、RBGP A、鸡溶菌酶信号肽)

[0428] Xho 1 和 Nhe 1 剪切 pJV7499、7497 和 7500,以分离由穿过质粒的信号肽编码序列的 CMV 启动子组成的插入片段。Xho 1 和 Nhe 1 剪切 pJV7508,以制备载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7524(抑肽酶)、pJV7525(烟草伸展蛋白)和 pJV7526(鸡溶菌酶)。

[0429] 实施例 7. 人分泌型碱性磷酸酶(SEAP)系列的构建

[0430] (a)pJV7531(CMV(无内含子)、HBsAg5' UTR、RBGP A、鸡溶菌酶信号肽)

[0431] Sal 1 和 Bgl 2 剪切 pJV7510,以分离含穿过溶菌酶信号肽的 CMV 启动子的插入片段。Sal 1 和 Bgl 2 剪切 pJV7450,以形成载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7531。

[0432] (b)pJV7554(CMV(RIA/Nhe1)、HBsAg5' UTR、RBGP A、鸡溶菌酶信号肽)

[0433] Xho 1 和 BamH 1 剪切 pJV7530,以分离含穿过 RIA 的 CMV 启动子的插入片段。Xho 1 和 BamH 1 剪切 pJV7531,以形成载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7554。

[0434] (c)pJV7568(CMV(无内含子)、HBsAg 3' UTR、HBsAg5' UTR、RBGP A、鸡溶菌酶信号肽)

[0435] Bgl 2 和 EcoR 1 剪切 pJV7563,以分离含 HBV 3'UTR 和 RBGP A 的插入片段。Bgl 2 和 EcoR 1 剪切 pJV7531,以形成载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7568。

[0436] (d)pJV7572(CMV(RIA/Nhe1)、HBsAg 3'UTR、HBsAg5'UTR、RBGP A、鸡溶菌酶信号肽)

[0437] Bgl 2 和 EcoR 1 剪切 pJV7563,以分离含 HBV 3'UTR 和 RBGP A 的插入片段。Bgl 2 和 EcoR 1 剪切 pJV7554,以形成载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7572。

[0438] 实施例 8. 使用鸡角蛋白和鸡心脏的肌动蛋白内含子构建 β -gal 和 HBsAg 载体

[0439] (a)pJV7557(β -gal、CMV(cA 内含子)、HBsAg3' UTR、HBsAg5' UTR 和 RBGP A)

[0440] 使用引物 JF430(SEQ ID NO :48) 和 JF442(SEQ ID NO :49)PCR 扩增鸡 DNA, Bgl 2 和 BamH 1 剪切,以分离由鸡心脏的肌动蛋白的内含子和侧翼外显子序列组成的插入片段。BamH 1 剪切 pJV7488,以制备载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7557。

[0441] (b)pJV7558(β -gal、CMV(cK 内含子)、HBsAg3' UTR、HBsAg5' UTR 和 RBGP A)

[0442] 使用引物 JF421(SEQ ID NO :50) 和 JF444(SEQ ID NO :51)PCR 扩增鸡 DNA, Bgl 2 和 BamH 1 剪切,以分离由鸡角蛋白基因的内含子和侧翼外显子序列组成的插入片段。BamH 1 剪切 pJV7488,以制备载体片段,插入片段连接到其中,得到 pJV7558。

[0443] (c)pJV7578(HBsAg、CMV(cA 内含子)、HBsAg3' UTR、HBsAg5' UTR 和 RBGP A)

[0444] Sal I 和 BamH I 剪切 pJV7557, 以分离由穿过内含子区的 CMV 启动子组成的插入片段。Sal I 和 BamH I 剪切 pJV7496, 以制备载体片段, 插入片段连接到其中, 得到 pJV7558。

[0445] (d) pJV7579 (HBsAg、CMV (cA 内含子)、HBsAg3' UTR、HBsAg5' UTR 和 RBGpA)

[0446] Sal I 和 BamH I 剪切 pJV7558, 以分离由穿过内含子区的 CMV 启动子组成的插入片段。Sal I 和 BamH I 剪切 pJV7496, 以制备载体片段, 插入片段连接到其中, 得到 pJV7579。

[0447] 实施例 9. HBsAg 载体系列抗原表达的离体分析

[0448] 在第一天, SCC15 (ATCC) 或 B16 (来源未知, ATCC 可得) 细胞以 20% -40% 汇合 (confluency) 接种到 6 孔组织培养板, 并在培养箱中过夜生长。宿主细胞在 ATCC 推荐的培养液中增殖。

[0449] 在第二天, 实施转染反应。对每种待测载体而言, 将 20 μ l Lipofectin[®] 试剂 (Life Technologies Inc, Grand Island, NY) 加入 180 μ l Optimem[®] 培养液 (Life Technologies Inc, Grand Island, NY), 并在室温下孵育 45min。对每种待测载体, 在 40min 时, 2 μ g 载体与 200 μ l Optimem[®] 混合。在 45min 时, 将载体和 Lipofectin[®] 溶液混合在一起, 并在室温下再静置 10 分钟。在最后孵育期间, 将接种的宿主细胞从培养箱中取出并用 Optimem[®] 培养液洗涤两次。在 10min 时, 将 1.6ml Optimem[®] 加入 Lipofectin[®] / 载体混合物, 并将 1ml 所得混合物加到两个细胞孔中。将宿主细胞再次放入培养箱并静置 5 小时, 在 5 小时时, 去除 Lipofectin[®] / 载体混合物, 并换上标准细胞生长液。

[0450] 在更换培养液后 18 到 24 小时, 从组织培养板中取出从 50 到 100 μ l 的细胞生长液, 将该样本放入 AUSZYME[®] Monoclonal 诊断试剂盒 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) 中的反应池, 分析抗原表达水平。待测样本的体积用 PBS 调至 200 μ l, 然后每个样本中加入 50 μ l 缀合物和反应微球。反应池在 40 $^{\circ}$ C 孵育 80min, 此后, 洗去孔中所有液体反应组分。将反应微球转移到新的试管中, 此后加入 300 μ l 显色反应缓冲液。30 分钟后加入 1M 硫酸终止显色反应, 并在 490nm 测定反应的吸光度。图 1 中示出的数据是两次实验中两个孔的平均吸光度。

[0451] 如图 1 所示, 将 RIA、HBV 3' UTR 或两者共同导入基本载体 (CMV 启动子、外显子和聚腺苷酸化区) 提高了 SCC15 细胞中 HBsAg 的表达。如图 2 所示, 将鸡角蛋白或鸡心脏的肌动蛋白内含子导入基本载体 (CMV 启动子、外显子、HBV 3' UTR 和聚腺苷酸化区) 提高了 SCC15 细胞中 HBsAg 的表达。

[0452] 实施例 10. β -gal 载体系列抗原表达的离体分析

[0453] 如实施例 9 所述, 转染 SSC-15 或 B16 宿主细胞。

[0454] 在更换培养液后的 18 到 40 小时, 去除培养液上清, 并用 PBS 洗涤细胞。去除洗涤液后, 用 500 μ l 裂解缓冲液 (50mM NaPO₄, 0.1% Triton X-100, pH7) 孵育细胞 5min, 以裂解细胞, 然后采用物理方法将细胞刮离塑料皿。将裂解液离心两分钟以除去细胞碎片, 并将 10 到 25 μ l 澄清裂解液加入到 500 μ l 反应缓冲液 (80ug/ml 邻硝基苯-吡喃半乳糖苷 (o-nitrophenyl galactopyranoside), 50mM NaPO₄, pH7) 并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 到 20 分钟。加入 500 μ l 1M Na₂CO₃ 中止反应并在 405nm 读取吸光度。数据用增强载体 (含有内含子、

HBVenh 或两者均含有) 的表达量与基本载体的表达量的比率表示。

[0455] RIA、HBV 3' UTR 或两者共同加入基本载体 (CMV 启动子、外显子和聚腺苷酸化区) 提高了 β -gal 在两种细胞系中的表达。图 3 示出了 SCC15 细胞得到的结果。将鸡角蛋白或鸡心脏的肌动蛋白内含子加到基本载体 (CMV 启动子、外显子、HBV 3' UTR 和聚腺苷酸化区) 提高了 β -gal 在两种细胞系中的表达。图 2 示出了 B16 细胞得到的结果。

[0456] 实施例 11. HSV gD 载体系列抗原表达的离体分析

[0457] 如实施例 9 所述, 转染 SSC15 或 B16 宿主细胞。转染 18 小时后, 将板冰浴 15min。然后用 2ml PBS (Biowhittaker, Walkville, MD) 洗涤各孔。0.05% PBS 稀释的戊二醛 (Polysciences Inc, Warrington, PA) 固定细胞, 并在室温下孵育 30min。随后所有的孵育在室温下持续 1 小时并在每次孵育之间, 进行如上所述的洗涤。用 2ml 5% 奶粉 (溶于 PBS) (Bio Rad Laboratories, Melville, NY) 封闭板中的细胞。随后用 2% 奶粉 / PBS / 0.05% Tween-20 (Sigma, St. Louis, MO) 1 : 1000 稀释的抗 gD 单克隆抗体 (ABI, Columbia, MD) 1ml 和用 PBS / 0.1% Tween-20 1 : 2500 稀释的山羊抗小鼠 HRP (KPL, Gaithersburg, MD) 1ml 孵育。用 1ml TMB 微孔底物 (BioFX, Owings Mills, MD) 进行显色反应。1M H_2SO_4 终止反应, 将液体转移到塑料比色皿中并在 450nm 读取光密度值。数据用增强载体 (含有内含子、HBVenh 或两者均含有) 的表达量与基本载体的表达量的比率表示。

[0458] 将含或不含 HBV 3' UTR 的 RIA 导入到基本载体 (CMV 启动子、外显子和聚腺苷酸化区), 提高了 HSV gD 在两种细胞中的表达。图 4 示出了 SC15 得到的结果。

[0459] 实施例 12. SEAP 载体系列抗原表达的离体分析

[0460] 如实施例 9 所述, 转染 SSC-15 或 B16 宿主细胞。在更换培养液后 18 到 40 小时, 去除培养液上清, 并将上清在 70℃ 加热 30min。将 10-25 μ l 热灭活的上清与 1/10 体积的 100mM I- 高精氨酸一起孵育 5min。将 500 μ l 碱性磷酸酶反应缓冲液 (cat#172-1063, Bio-Rad, 根据说明书制备) 加入该裂解液并在 37℃ 孵育 10 到 20min。加入 500 μ l 1M NaOH 终止反应并在 405nm 读取吸光度。数据用增强载体 (含有内含子、HBVenh 或两者均含有) 的表达量与基本载体的表达量的比率, 或实验组信号肽的表达量与人 TPA 信号肽载体的表达量的比率表示。

[0461] 如图 5 所示, RIA、HBV 3' UTR 或两者一起导入基本载体 (CMV 启动子、外显子和聚腺苷酸化区) 提高了 SEAP 在 B16 细胞中的表达。出乎意料的是, 仅仅将 HBV 3' UTR 导入基本载体 (CMV 启动子、外显子和聚腺苷酸化区) 提高了 SEAP 在 SCC15 细胞中的表达。

[0462] 将牛抑肽酶、鸡溶菌酶或烟草伸展蛋白的信号肽加入到成熟的 SEAP 的 N 端, 为 SEAP 有效分泌进入两种细胞系的细胞培养液上清提供了可能。图 6 示出 B16 细胞的结果。

[0463] 实施例 13. 人 IgG Fc 片段信号肽系列抗原表达的离体分析

[0464] 如实施例 9 所述, 转染 SSC-15 或 B16 宿主细胞。在更换培养液后的 18 到 40 小时, 去除培养液上清。

[0465] ELISA 板 (Costar) 每孔加入 100 μ l 山羊抗人 IgG (Sigma#I3382, 用碳酸盐包被缓冲液 1/1000 稀释), 并在 4℃ 过夜孵育。随后所有的孵育均在室温下持续 1 小时, 并在每次孵育之间用洗涤液 (10mM Tris、150mM NaCl、0.1% Brij-35, pH8.0) 洗涤。然后用 100 μ l 5% 奶粉 (溶于 PBS) 封闭, 随后与用稀释缓冲液 (2% 奶粉、PBS、0.05% Tween-20) 系列稀释的培养液上清一起孵育。然后与 100 μ l 每孔的山羊抗人 IgG/HRP (Sigma#A6029, 稀释缓

冲液 1/5000 稀释)一起孵育,然后用 100 μ l TMB 微孔底物进行显色反应。用 100 μ l 1M H_2SO_4 终止反应,并在 405 读取吸光度。数据用实验组信号肽的表达量与人 TPA 信号肽载体的表达量的比率表示。

[0466] 将牛抑肽酶、鸡溶菌酶或烟草伸展蛋白的信号肽加入到人 Fc 片段的 N 端,为 hFc 有效分泌进入两种细胞系的细胞培养液上清提供了可能。图 6 示出 B16 细胞的结果。

[0467] 实施例 14. HBsAg、HSVgD 和 Flu-M2 质粒表达载体在小鼠的免疫接种中的应用

[0468] a. 免疫接种药筒的制备

[0469] 对每个待测质粒而言,称取 25mg 2 微米金粉到离心管中,在加入 250 μ l 等份 50mM 亚精胺 (Aldrich Chemical, Inc, Milwaukee, WI) 后,振荡试管并经短时间的超声破碎。离心去除金粉,换上 100 μ l 新鲜的亚精胺。振荡使金粉重新悬浮,然后将 25 μ g DNA 加入试管中混合。边轻轻振荡试管,边加入 100 μ l 10% $CaCl_2$ (Fujisawa USA, Inc, Deerfield, IL),以在金珠上沉淀 DNA。沉淀反应可在工作台面上进行 10min,随后通过短时间离心收集金珠并用无水乙醇 (Spectrum Quality Products, Inc, Gardena, CA) 洗涤三次,以除去过量的沉淀试剂。然后用溶于无水乙醇的 3.6ml 0.05mg/ml 聚乙烯吡咯烷酮 (360KD, Spectrum Quality Products, Inc, Gardena, CA) 重悬洗涤后的金珠 /DNA 复合物。然后将此浆液注入位于旋管器 (tube turner, PowderJect Vaccines) 中的 Tefzel 管 (McMaster-Carr, Chicago, IL) 中,用金珠 /DNA 复合物包被 Tefzel 管内侧。在旋管过程完成后,试管被切成 0.5" 的疫苗“针剂”,该针剂被负载于 XR1 装置 (PowderJect Vaccines) 中,以释放给小鼠。

[0470] b. 接种程序

[0471] 用 Ketaset (Fort Dodge) 和 Rompun (Bayer) 的混合物麻醉 4 到 6 周龄的小鼠。用电动剪毛机剃腹部以除去体毛,通过 XR1 装置 (450psi) 将两个疫苗“针剂”无交叠地释放到剃毛区。将动物放回笼中并在接种后 6 周采血。Balb/c 小鼠用于评估 HBsAg 表达载体,Swiss Webster 小鼠用于评估 HSV-gD 和 Flu M2 表达载体。

[0472] 血清中抗-HBsAg 抗体的分析

[0473] 在第六周从接种动物获取血样。将从血样中分离的血清放入 AUSAB $\text{\textcircled{R}}$ EIA 诊断试剂盒 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) 的反应池的孔中。所加血清的体积取决于样本的抗体滴度,将样本用样本稀释缓冲液稀释以落入用定量分析板可获得的值内。从 AUSAB $\text{\textcircled{R}}$ 定量分析板 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) 每个小瓶中取出 200 μ l 加入到反应池的孔中。每孔中加入一个微球,随后密封反应池并在 40 $^{\circ}$ C 孵育二小时,然后洗去孔中所有的液体反应组分。每孔加入 200 μ l 缀合物混合物,随后密封反应池并在 40 $^{\circ}$ C 孵育二小时,然后洗去孔中所有的液体反应组分。珠被转移到新的试管,随后加入 300 μ l 显色反应缓冲液。30 分钟时加入 1M 硫酸终止显色反应,并用 Quantum II $\text{\textcircled{R}}$ 分光光度计 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) 490nm 检测反应物的吸光度。通过将样本的吸光度与由定量板产生的标准曲线相比较,分光光度计可以计算样本的抗体水平。然后用稀释因子矫正抗体水平。图 7 所示数据是用某一特定载体接种的所有动物的几何平均滴度。

[0474] 血清中抗 Flu M2 抗原抗体的分析

[0475] 用浓度为 1 μ g/ml 的合成 Flu M2 肽 (QCB/Biosource, Hopkinton, MA) (溶于

PBS(Biowhittaker, Walkerville, MD)) 包被 96 孔 Costar 培养液结合 ELISA 板 (Fisher Scientific,Pittsburgh,PA),并在 4℃过夜孵育。10mM Tris(Sigma,St.Louis,MO)/150mM NaCl(FisherScientific)/0.1% Brij-35(Sigma) 将板洗涤三次,然后用 5%奶粉 (BioRad Laboratories,Melville,NY) (溶于 PBS) 室温封闭 1 小时。随后所有的孵育均在室温下进行 1 小时,并如上所述在每次孵育之间洗涤。2%奶粉 /PBS/0.05% Tween-20(Sigma) 稀释样本小鼠血清、标准品 (高滴度,抗 M2 小鼠血清) 和阴性对照 (抗 HBsAg 小鼠血清),并在 ELISA 板中孵育。用 2%奶粉 /PBS/0.05% Tween-20 1 : 8000 稀释山羊抗小鼠 IgG(H+L) 生物素缀合的抗体 (Southern BiotechnologyAssociate,Birmingham,AL),随后用 PBS/0.1% Tween-20 1 : 8000 稀释链霉亲和素-辣根过氧化物酶缀合物 (Southern Biotechnology)。用底物 TMB(BioFX,Owings Mills,MD) 进行显色反应。用 1M H₂SO₄ 终止反应并用超精酶标仪 (Molecular Devices,Sunnyvale,CA) 在 450nm 读取吸光度。使用 SoftMax Pro 4.1 软件 (Molecular Devices),四参数分析计算端点滴度,并将滴度根据具有已知滴度的标准血清进行标准化,以将组间和组内的变异最小化。结果如图 7 所示。

[0476] 血清中抗 HSV gD 抗原抗体的分析

[0477] 用浓度为 1μg/ml 的 HSV gD(Viral Therapeutics,Ithaca,NY) 蛋白 (溶于 PBS(Biowhittaker, Walkerville, MD)) 包被 96 孔 Costar 培养液结合 ELISA 板 (Fisher Scientific,Pittsburgh,PA),并在 4℃过夜孵育。10mM Tris(Sigma,St.Louis,MO)/150mM NaCl(FisherScientific)/0.1% Brij-35(Sigma) 将板洗涤三次,然后用 5%奶粉 (BioRad Laboratories,Melville,NY) (溶于 PBS) 室温封闭 1 小时。随后所有的孵育均在室温下进行 1 小时,并如上所述在每次孵育之间洗涤。2%奶粉 /PBS/0.05% Tween-20(Sigma) 稀释样本小鼠血清、标准品 (高滴度,抗 gD 小鼠血清) 和阴性对照 (抗 HBsAg 小鼠血清),并在 ELISA 板中孵育。用 2%奶粉 /PBS/0.05% Tween-20 1 : 8000 稀释山羊抗小鼠 IgG(H+L) 生物素缀合的抗体 (Southern BiotechnologyAssociate,Birmingham,AL),随后用 PBS/0.1% Tween-20 1 : 8000 稀释链霉亲和素-辣根过氧化物酶缀合物 (Southern Biotechnology)。用底物 TMB(BioFX,Owings Mills,MD) 进行显色反应。用 1M H₂SO₄ 终止反应并用超精酶标仪 (Molecular Devices,Sunnyvale,CA) 在 450nm 读取吸光度。使用 SoftMax Pro 4.1 软件 (Molecular Devices),四参数分析计算端点滴度,并将滴度根据具有已知滴度的标准血清进行标准化,以将组间和组内的变异最小化。结果如图 7 所示。

[0478] 因此,描述了新的核酸构建体、含有这些构建体的组合物以及使用这些组合物的核酸免疫接种技术。尽管本发明的优选的实施方案已经详细描述,应该理解的是:可进行明显的修改,但并不背离本发明的宗旨以及所附权利要求书中所定义的本发明的范围。

[0001]

序列表

<110> 宝德杰克特疫苗有限公司等

<120> 核酸构建体

<130> N.90070A GCW/DP

<140> PCT/GB2004/004279

<141> 2004-10-11

<150> US 60/509,936

<151> 2003-10-10

<160> 53

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 685

<212> DNA

<213> 人巨细胞病毒

<400> 1

```

aatattggct attggccatt gcatacgttg tatctatatc ataatatgta catttatatt      60
ggctcatgtc caatatgacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa      120
tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg      180
gtaaatggcc cgcctggctg accgcccac gaccccgcc cattgacgtc aataatgacg      240
tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccatigac gtcaatgggt ggagtattta      300
cggtaaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtcc gcccctatt      360
gacgtcaatg acggtaaatg gcccgctgg cattatgccc agtacatgac cttacgggac      420
tttctactt ggccagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatcgggtt      480
tggcagtaca ccaatggcg tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtctccac      540
cccattgacg tcaatgggag ttgttttgg caccaaaac aacgggactt tccaaaatgt      600
cgtaataacc cggcccgtt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat      660
ataagcagag ctcgtttagt gaacc                                     685

```

<210> 2

<211> 131

<212> DNA

<213> 人巨细胞病毒

<400> 2

```

gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gttttgacct ccatagaaga caccgggacc      60
gatccagcct ccgcgccgg gaacggtgca ttggaacgcg gattccccgt gccaagagtg      120
actcaccgtc c                                     131

```

<210> 3

<211> 135

<212> DNA

<213> 大鼠 (Rattus rattus)

<400> 3

```

atcagcaagc aggtatgtac tetccagggt gggcctggct tccccagtca agactccagg      60
gatttgaggg acgctgtggg ctcttctctt acatgtacct ttgctagcc tcaaccctga      120
ctatcttcca ggta                                     135

```

<210> 4

<211> 955

<212> DNA

<213> 人工序列

[0002]

<220>

<223> 嵌合启动子序列

<400> 4

aatattggct	attggccatt	gcatacgttg	tatctataac	ataatatgta	catttatatt	60
ggctcatgtc	caatatgacc	gccatgttga	cattgattat	tgactagtta	ttaatagtaa	120
tcaattacgg	ggtcattagt	tcatagccca	tatatggagt	tccgcgttac	ataacttacg	180
gtaaatggcc	cgccctggctg	accgcccac	gacccccgcc	cattgacgtc	aataatgacg	240
tatgttccca	tagtaacgcc	aatagggact	ttccattgac	gtcaatgggt	ggagtattta	300
cggtaaacctg	cccacttggc	agtacatcaa	gtgtatcata	tgccaagtcc	gccccctatt	360
gacgtcaatg	acggtaaagt	gcccgcctgg	cattatgccc	agtacatgac	cttacgggac	420
tttcctactt	ggcagtagcat	ctacgtatta	gtcatcgcta	ttaccatggg	gatgcggttt	480
tggcagtaca	ccaatgggcg	tggatagcgg	tttgactcac	ggggatttcc	aagtctccac	540
cccattgacg	tcaatgggag	tttgtttttg	caccaaaatc	aacgggactt	tccaaaatgt	600
cgtaataacc	ccgccccgtt	gacgcaaagt	ggcggtaggc	gtgtacgggtg	ggagggtctat	660
ataagcagag	ctcgtttagt	gaaccgtcag	atcgccctga	gacgccatcc	acgtgtttt	720
gacctccata	gaagacaccg	ggaccgatcc	agcctccgcg	gccgggaacg	gtgcattgga	780
acgcggattc	cccgtgccaa	gagtgactca	ccgtccggat	ctcagcaagc	aggtatgtac	840
tctccagggt	gggcctggct	tccccagtea	agactccagg	gatttgaggg	acgtgtggg	900
ctcttctctt	acatgtacct	tttgcttgcc	tcaaccctga	ctatcttcca	ggtca	955

<210> 5

<211> 121

<212> DNA

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 5

cagagtcagg	ggtctgtatt	ttcctgctgg	tggtccagt	tcaggaacag	taaaccctgc	60
tccgaatatt	gcctctcaca	tctcgtcaat	ctccgcgagg	actggggacc	ctgtgacgaa	120
c						121

<210> 6

<211> 57

<212> DNA

<213> 单纯疱疹病毒

<400> 6

ataagctgca	ttgcgaacca	ctagtcgccg	tttttcgtgt	gcacgcgta	tcacggc	57
------------	------------	------------	------------	-----------	---------	----

<210> 7

<211> 48

<212> DNA

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 7

ctttgtacta	ggaggctgta	ggcataaatt	ggtctgttca	ccagcacc		48
------------	------------	------------	------------	----------	--	----

<210> 8

<211> 533

<212> DNA

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 8

taacaaaaca	aaaagatggg	gttattccct	aaacttcattg	ggttacgtaa	ttggaagtig	60
ggggacattg	ccacaagatc	atattgtaca	aaagatcaaa	cactgtttta	gaaaacttcc	120
tgtaaacagg	cctattgatt	ggaaagtatg	tcaaaggatt	gtgggtcttt	tgggctttgc	180
tgtctccattt	acacaatgtg	gatatactgc	cttaatgcct	ttgtatgcat	gtatacaagc	240
taaacaggct	ttcactttct	cgccaactta	caaggccttt	ctaagtaaac	agtacatgaa	300

[0003]

cctttacccc gttgctcggc aacggcctgg tctgtgccaa gtgtttgctg acgcaacccc	360
cactggctgg ggcttgcca taggcatca gcgcattgct ggaaccttg tggctcctct	420
gccgatccat actgcggaac tcctagccgc ttgttttgct cgcagccggt ctggagcaaa	480
gctcatagga actgacaatt ctgtcgtcct ctgcggaaa tatacatcgt ttc	533

<210> 9
 <211> 158
 <212> DNA
 <213> 猿巨细胞病毒

<400> 9	
gtcagacaga cagacagtta tatgggctgg tccctataac tctgccattg taaccccata	60
tagccagaca gttagcattg catctattga tgatgtacta atgtattgta accccccta	120
tgccattgtc taactgtact aatgtatgat attatacc	158

<210> 10
 <211> 131
 <212> DNA
 <213> 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 10	
gatctttttc cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agccccctga gcattctgact	60
tctggctaataaagaaatt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc	120
tcactcggaa g	131

<210> 11
 <211> 204
 <212> DNA
 <213> 猿巨细胞病毒

<400> 11	
atatatactc tatgttatac tctatgatatacaatataata ctcatgaaca ctatgtactt	60
ggtgtatgac tcattattgt ctgggacttg gttgggactt ggttggttg gaagaatgtt	120
gtgcctgtac ttgtgctgtg ctgtggatct caataaatgt gactatgttc aaaacactaa	180
gtgcccccggtgtcttcttta acta	204

<210> 12
 <211> 163
 <212> DNA
 <213> 单纯疱疹病毒2

<400> 12	
gaagacgagc tctaaggag gggaggggag ctgggcttgt gtataaataa aaagacaccg	60
atgttcaaaa atacacatga ctcttggtat tgttttgcct tggtttttat ttgggggggg	120
gggggcgtgt gactagaaaa acaaatgcag acatgtgcta acg	163

<210> 13
 <211> 191
 <212> DNA
 <213> 人乳头状瘤病毒 16型

<400> 13	
aattgttaca tataattgtt gtataccata acttactatt ttttctttt tattttcata	60
tataattttt tttttgttt gttgtttgt tttttaataa actgttatta cttacaatg	12
cgacacaaac gttctgcaaa acgcacaaaa cgtgcacggt ctaccaact ttataaaaca	180
tgcaaacagg c	191

[0004]

<210> 14
<211> 3759
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pJV表达载体

<220>
<221> 内含子
<222> (1725)..(1857)
<223> 大鼠胰岛素内含子A

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(44)
<223> Tn903, pUC4K残余

<220>
<221> misc_feature
<222> (861)..(896)
<223> Tn903, pUC4K残余

<220>
<221> misc_feature
<222> (897)..(902)
<223> pUC19 MCS

<220>
<221> 聚腺苷酸化—信号
<222> (2556)..(2686)
<223> rGLOB pA

<220>
<221> 聚腺苷酸化_位点
<222> (2647)..(2647)
<223> 聚腺苷酸化_位点_1

<220>
<221> 启动子
<222> (903)..(1587)
<223> CMV Pro

<220>
<221> 3' UTR
<222> (2012)..(2544)
<223> HBVenh

<220>
<221> 5' UTR
<222> (1864)..(1984)
<223> HBV pre-S2 5'-UTR

<220>
<221> misc_feature
<222> (1719)..(1724)
<223> Bam/Bgl融合物

<220>
<221> misc_feature
<222> (1985)..(1987)
<223> ATG-Nhe

[0005]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1988)..(2011)
 <223> CDS 插入位点

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2545)..(2555)
 <223> 未知

<220>
 <221> 外显子
 <222> (1588)..(1718)
 <223> CMV 外显子 1/2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2693)..(3759)
 <223> pUC19

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(860)
 <223> KanR (Tn903) 互补物

<400> 14
 ggcgtaatgc tctgccagtg ttacaaccaa ttaaccaatt ctgattagaa aaactcatcg 60
 agcatcaaat gaaactgcaa ttatttcata tcaggattat caataccata tttttgaaaa 120
 agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca ccgaggcagt tccataggat ggcaagatcc 180
 tgggtatcgg ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatac aacctattaa ttccccctcg 240
 tcaaaaataa gggtatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc cgggtgagaat 300
 ggcaaaaagct tatgcatttc ttccagact tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca 360
 tcaaaatcac tcgcatacac caaaccgtta ttcatctcgt attgcgctcg agcgagacga 420
 aatacgcgat cgctgttaaa aggacaatta caaacaggaa tcgaatgcaa ccggcgagg 480
 aacactgcca gcgcatacac aatattttca cctgaatcag gatattcttc taatacctgg 540
 aatgctgttt tcccggggat cgcagtgggt agtaaccatg catcatcagg agtacggata 600
 aaatgcttga tggctcgaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca 660
 tctgtaacat cattggcaac gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc tggcgcatcg 720
 ggcttcccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat 780
 ttatacccat ataaatcagc atccatgttg gaatttaatc gcggcctcga gcaagacgtt 840
 tccggttgaa tatggctcat aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc agacaggctc 900
 acaatatgtg ctattggcca ttgcatacgt tgtatctata tcataatatg tacatttata 960
 ttggctcatg tccaatatga ccgccatgtt gacattgatt attgactagt tattaatagt 1020
 aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcgtt acataactta 1080
 cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgcccc acgacccccg ccattgacg tcaataatga 1140
 cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt 1200
 tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta 1260
 ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct gccattatgc ccagtacatg accttacggg 1320
 actttcctac ttggcagtag atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggg 1380
 tttggcagta caccaatggg cgtggatagc ggtttgaact acggggattt ccaagtctcc 1440
 accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaaa tcaacgggac tttccaaaat 1500
 gtcgtaataa ccccgccccg ttgacgcaaa tggcggttag gcgtgtacgg tgggaggctc 1560
 atataagcag agctcgttta gtgaacc gtc aga tcg cct gga gac gcc atc cac 1614
 Val Arg Ser Pro Gly Asp Ala Ile His
 1 5

gct gtt ttg acc tcc ata gaa gac acc ggg acc gat cca gcc tcc gcg 1662
 Ala Val Leu Thr Ser Ile Glu Asp Thr Gly Thr Asp Pro Ala Ser Ala
 10 15 20 25

[0006]

gcc ggg aac ggt gca ttg gaa cgc gga ttc ccc gtg cca aga gtg act 1710
Ala Gly Asn Gly Ala Leu Glu Arg Gly Phe Pro Val Pro Arg Val Thr
30 35 40

cac cgt cc ggatctcagc aagcaggtat gtactctcca gggtagggcct ggcttcccca 1768
His Arg

gtcaagactc cagggatttg agggacgctg tgggctcttc tcttacatgt accttttgc 1828
tgccctcaacc ctgactatct tccaggctcag gatcccagag tcaggggtct gtattttcct 1888
gctggtggct ccagttcagg aacagtaaac cctgctccga atattgcctc tcacatctcg 1948
tcaatctccg cgaggactgg ggaccctgtg acgaacatgg ctacggggcc cagatctggg 2008
ccctaacaaa acaaaaagat ggggttattc cctaaacttc atgggttacg taattggaag 2068
ttgggggaca ttgccacaag atcatattgt acaaaaagatc aaacactgtt ttagaaaaact 2128
tcctgtaaaac aggcctattg attggaaagt atgtcaaagg attgtgggtc ttttgggctt 2188
tgctgtctcca ttacacaaat gtggatatcc tgccttaatg cctttgtatg catgtatata 2248
agctaaacag gctttcactt tctcgccaac ttacaaggcc tttctaagta aacagtacat 2308
gaacctttac cccgttgctc ggcaacggcc tggctctgtc caagtgtttg ctgacgcaac 2368
ccccactggc tggggcttgg ccataggcca tcagcgcctg cgtggaacct ttgtggctcc 2428
tctgcccagc catactgcgg aactcctagc cgcttgtttt gctcgcagcc ggtctggagc 2488
aaagctcata ggaactgaca attctgtcgt cctctcgcgg aaatatacat cgtttcgcac 2548
tacgtatgat cttttccct ctgcaaaaaa ttatggggac atcatgaagc cccttgagca 2608
tctgacttct ggctaataaa ggaaatttat ttcatattga atagtgtgtt ggaatttttt 2668
gtgtctctca ctccgaagga attctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg 2728
gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttccct cgctcactga ctgctgcgc tcggctcgtc 2788
ggctgcggcg agcgggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag 2848
gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa 2908
aggcccgctt gctggcgctt tcccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc 2968
gacgctcaag tcagaggtag cgaaaccgca caggactata aagataccag gcgtttcccc 3028
ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgccc gcttaccgga tactgtccg 3088
cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt 3148
cggtgtaggc cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc 3208
gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaacc ggtaagacac gacttatcgc 3268
cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgtctacg 3328
agtctctgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag aacagtattt ggtatctgcg 3388
ctctctgtaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttaggtg ctcttgatcc ggcaaaacaa 3448
ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag 3508
gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggctctga cgctcagtgg aacgaaaact 3568
cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat ctacacctag atccitttaa 3628
attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt 3688
accaatgctt aatcagttag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag 3748
ttgcctgact c 3759

<210> 15
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 15
ggaggatccg gacggtgagt cactcttggc acggggaatc cg 42

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

[0007]

<220>		
<223>	引物	
<400>	16	
	ggtgaatatg gtcataaca c	21
<210>	17	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	17	
	ccgccgaaca tggagaacat cgc	23
<210>	18	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	18	
	cacagatcitt ttgttagggt ttaaattgtat acc	33
<210>	19	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	19	
	ggaggatcct gacctggaag atagtcacc	29
<210>	20	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	20	
	ggaggatcca tcagcaagca ggtatg	26
<210>	21	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	

[0008]

<400> 21 ggagctagcg ggcgtttgac ctccggcgtc ggg	33
<210> 22 <211> 37 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 22 ggagaattca gatctcctct agtaaaacaa tggctgg	37
<210> 23 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 23 ggagctagcc ttctaaccga ggtcg	25
<210> 24 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 24 ggaagatctc cttactccag ctctatgctg	30
<210> 25 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 25 ggcgaattcc ttccgagtga gagacac	27
<210> 26 <211> 43 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 26	

[0009]

ggagtataca tttaaagggc cctaacaaaa caaaaagatg ggg	43
<210> 27	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 27	
ggagctagct cgtttacttt gaccaagaac g	31
<210> 28	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 28	
ggaagatctc cttatTTTTg acaccagacc aactgg	36
<210> 29	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 29	
ggagtcgacc tgtctgctta cataaacag	29
<210> 30	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 30	
cgtaatgctc tgccagtgtt acaacc	26
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 31	
gaaagatctc agcaagcagg	20

[0010]

<210> 32
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 32
ggaggatcct gacctggaag atagtcaggg ttgaggcaag caaaagg 47

<210> 33
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 33
ctagcgggcc ca 12

<210> 34
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 34
gatctgggcc cg 12

<210> 35
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 35
ggagctagca tcatcccagt tgaggagg 28

<210> 36
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 36
ggtagatctc ctcatgtctg ctcgaagc 28

<210> 37

[0011]

<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	37	
	ccaagctagc gacaaaactc acacatgcc	29
<210>	38	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	38	
	ggaagatctc gtttaccctc gtcatttacc cggagacagg gagag	45
<210>	39	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	39	
	aagatgtcca gactctgtct ctccgtggcc ctctctgtgc tctctgggac actcgcc	57
<210>	40	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	40	
	ggaactagta agatgtccag actc	24
<210>	41	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	41	
	ggaagctagc ggcgagtgtc ccgag	25
<210>	42	
<211>	75	
<212>	DNA	

[0012]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 42

ggaaagatgg ccagcctctt tgccacattt ctctgggtgc tctgagcct cagcctcgcc 60
agcgaaagca gcgcc 75

<210> 43

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 43

ggaactagtg gaaagatggc cagc 24

<210> 44

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 44

ggaagctagc ggcgctgctt tctctg 26

<210> 45

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 45

aggtctttgc taatcttggg gctttgcttc ctgcccctgg ctgctctggg g 51

<210> 46

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 46

ggaactagta ggtctttgct aatc 24

<210> 47

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

[0013]

<220>		
<223>	引物	
<400>	47	25
	ggaagctagc ccccagagca gccag	
<210>	48	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	48	31
	ggagctagct cgtttacttt gaccaagaac g	
<210>	49	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	49	25
	ggaagatctc cggtgagtgg tgctg	
<210>	50	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	50	32
	gcaggatcca gtagacctgg agagaggaca ag	
<210>	51	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	51	29
	ggaagatcta caaggtgagc tgctgtggc	
<210>	52	
<211>	490	
<212>	DNA	
<213>	伪狂犬病病毒	
<400>	52	60
	tggccgcaga gcgggccggg catgcaaate agaggcgcgc gggagacgcc tccgcgcgcc	

[0014]

cattggcccg	ggcgagccga	gatggccgcc	gcgggggccc	gacatgcaaa	gtagacgcga	120
gaggaagtag	ggagagaaat	cccatgggcc	gtcgaggggc	caagatggcg	ccctcggggc	180
cggacatgca	aagtagacgc	gagaggaagt	gggcgagaga	aatcccattg	gccgtcgatg	240
gggcaagatg	gccgccgcgg	gggccgggca	tgcaaatggt	cctcgcgagg	aagtccctcg	300
cgaaatccca	ttggccggcg	gccgccatct	tgggccgggc	atgcaaagca	gacggcagag	360
gaagcgggcg	agaaaaatcc	cattggccgg	ccgtcgggga	agtccgcggc	gaaaaatcggc	420
cattgggtccg	cttacctggg	ggcgggctct	cctcggggcg	cttataagcg	cggtctccat	480
cgtagcactt						490

<210> 53

<211> 495

<212> DNA

<213> 劳氏肉瘤病毒

<400> 53

ctgctccctg	cttgtgtgtt	ggaggtcgct	gagtagtgcg	cgagcaaaat	ttaagctaca	60
acaaggcaag	gcttgaccga	caattgcatg	aagaatctgc	ttagggttag	gcgttttgcg	120
ctgcttcgcg	atgtacgggc	cagatatacg	cgtatctgag	gggactaggg	tgtgtttagg	180
cgaaaagcgg	ggcttcgggt	gtacgcgggt	aggagttccc	tcaggatata	gtagtttcgc	240
ttttgcatag	ggagggggaa	atgtagtctt	atgcaataca	cttgtagtct	tgcaacatgg	300
taacgatgag	ttagcaacat	gccttacaag	gagagaaaaa	gcaccgtgca	tgccgattgg	360
tggaagtaag	gtggtacgat	cgtgccttat	taggaaggca	acagacaggt	ctgacatgga	420
ttggacgaac	cactgaattc	cgcattgcag	agataattgt	atttaagtgc	ctagctcgat	480
acaataaacg	ccatt					495

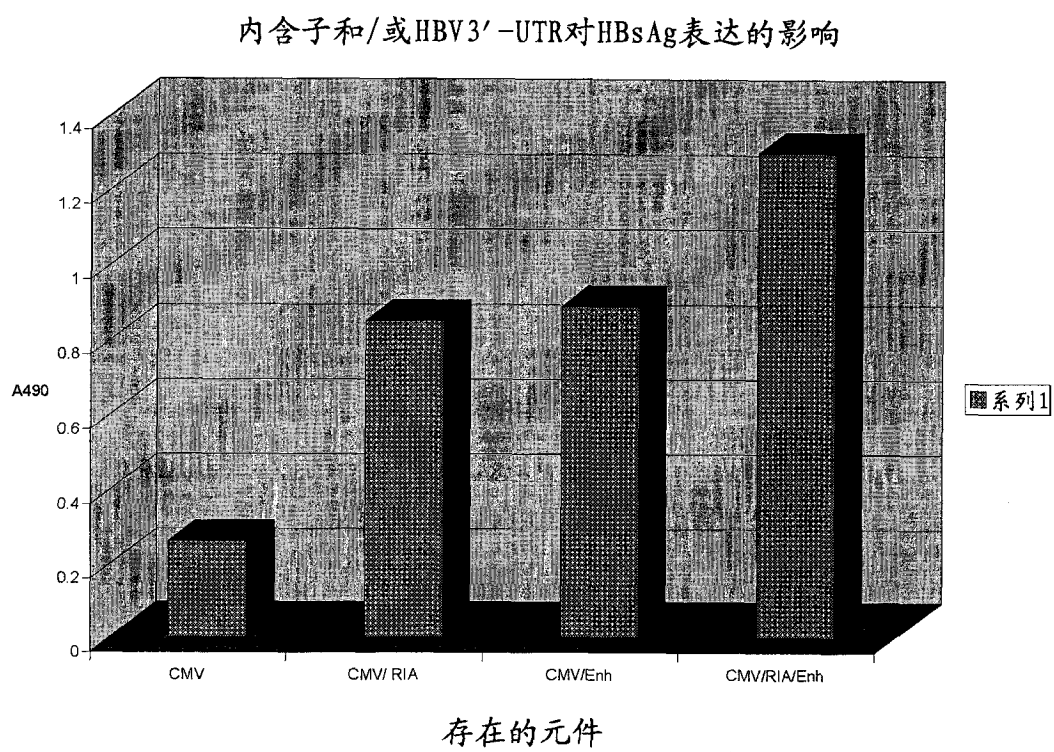


图 1

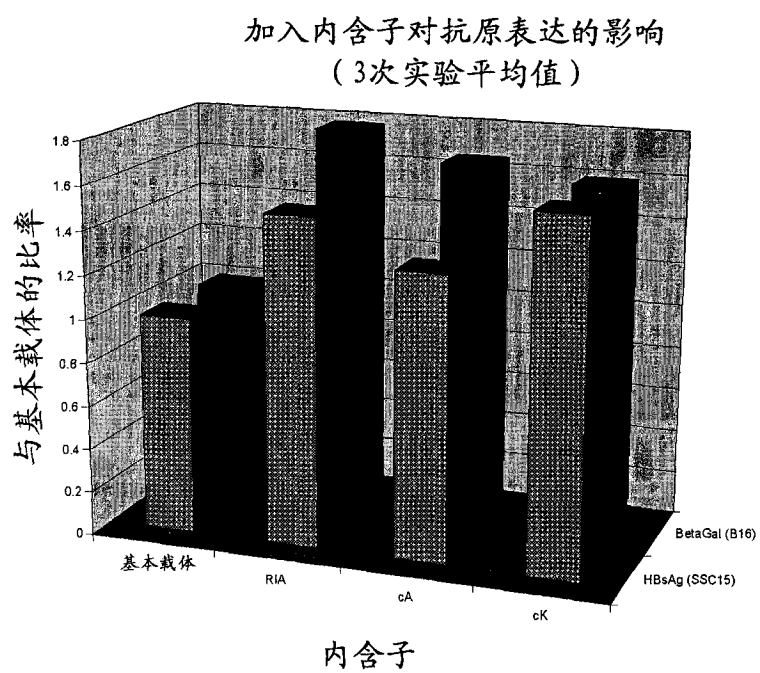


图 2

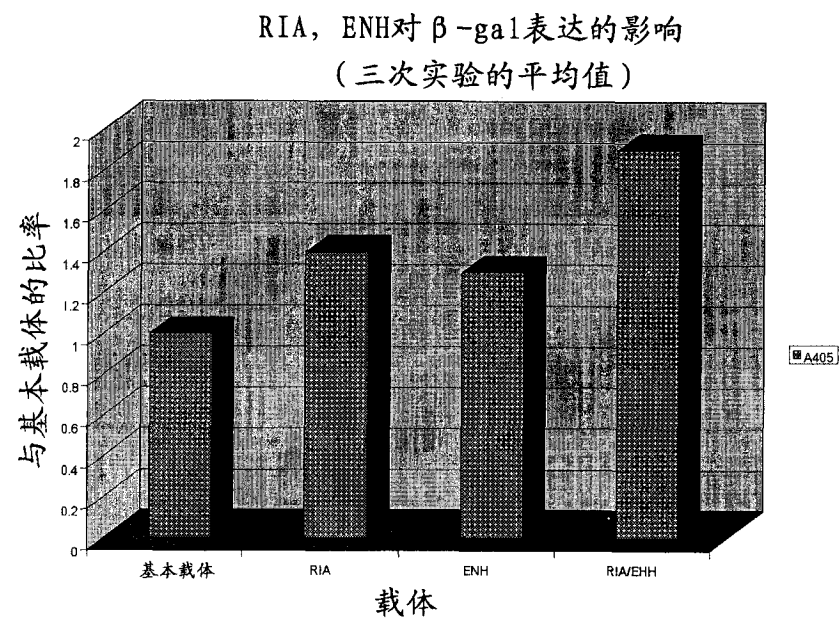


图 3

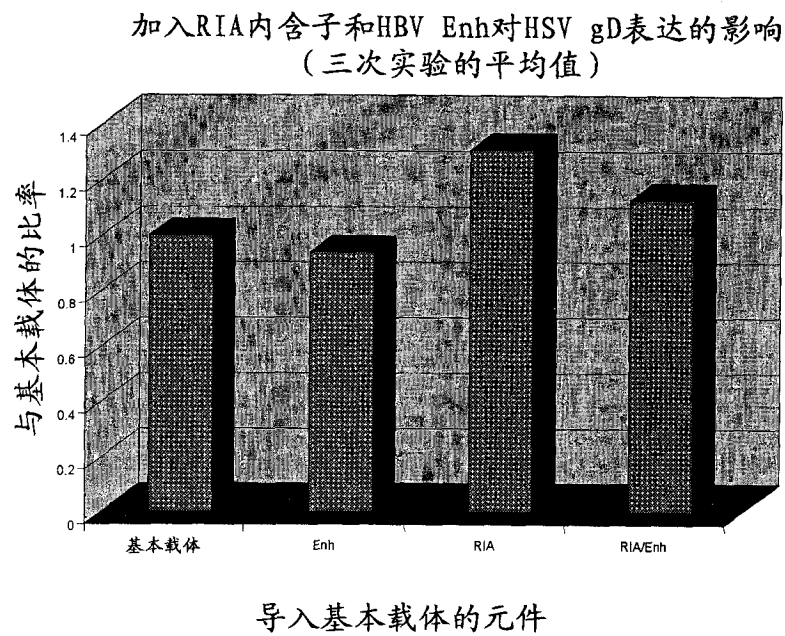


图 4

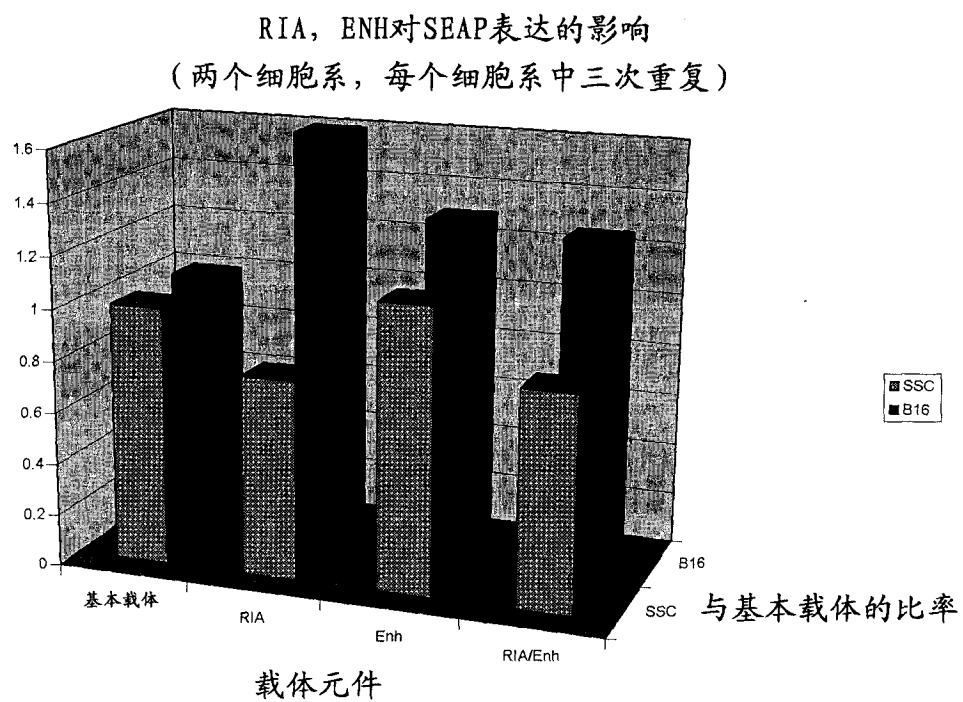


图 5

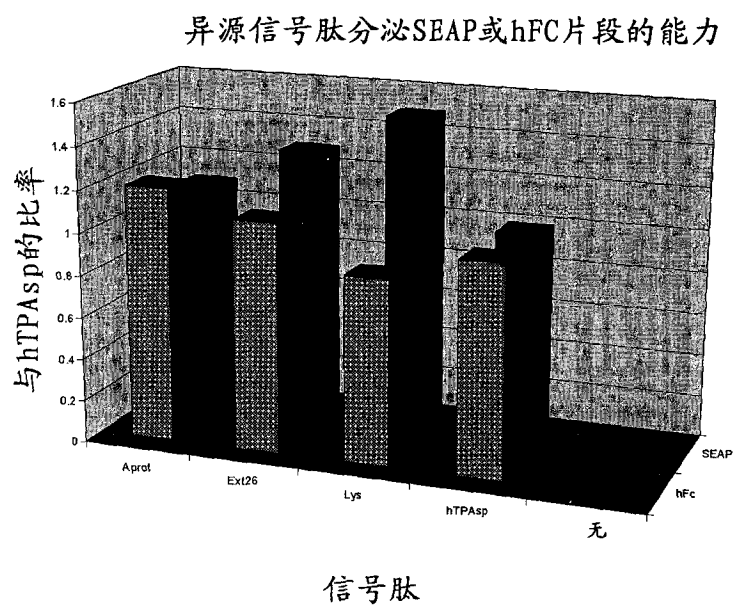
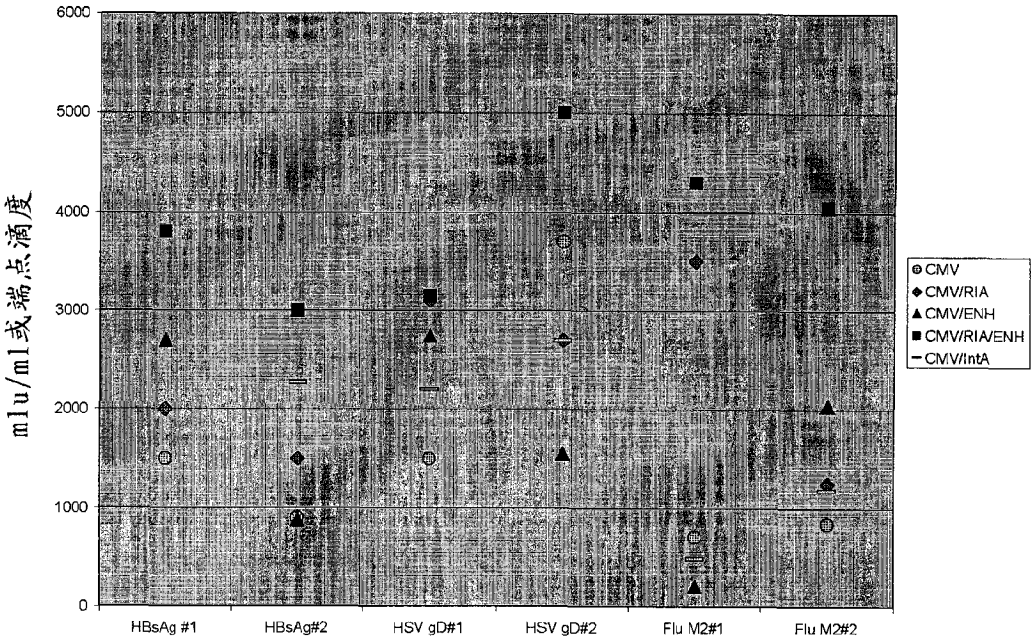


图 6



实验

图 7

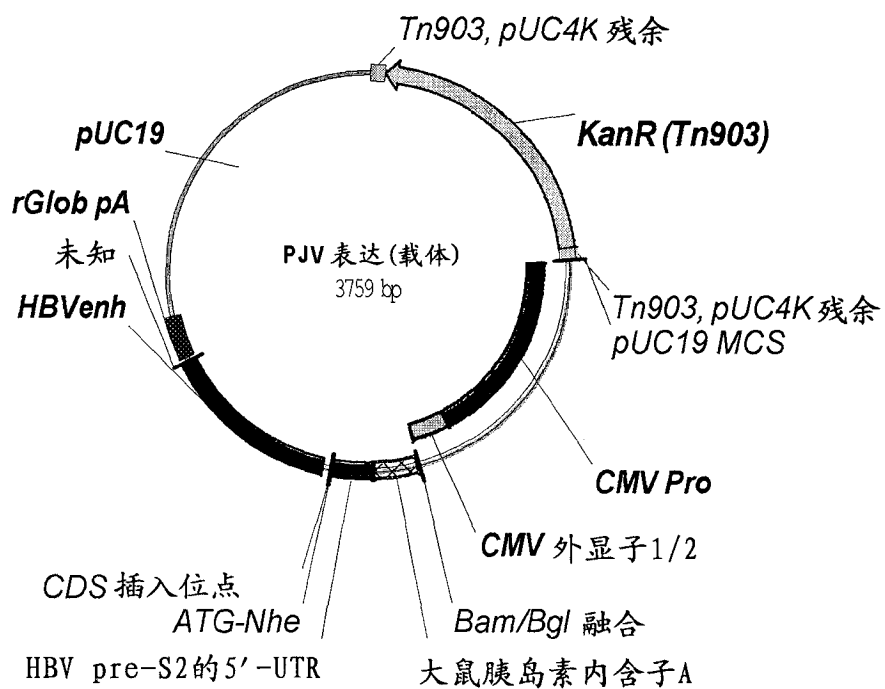


图 8

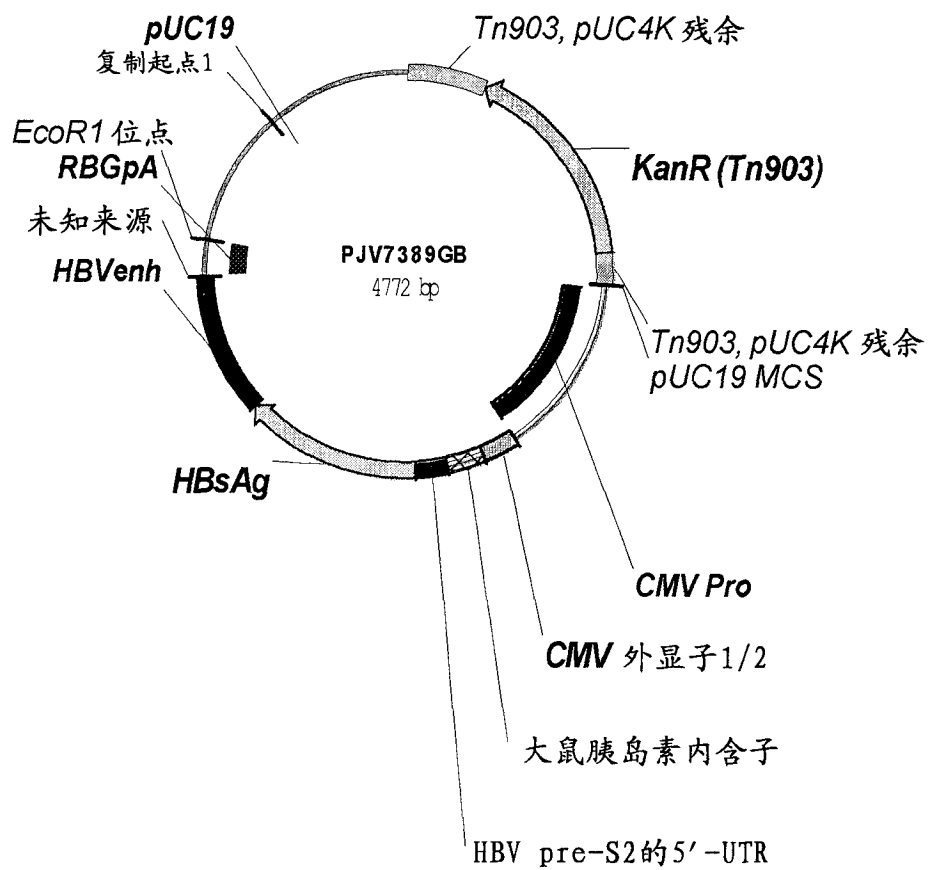


图 9

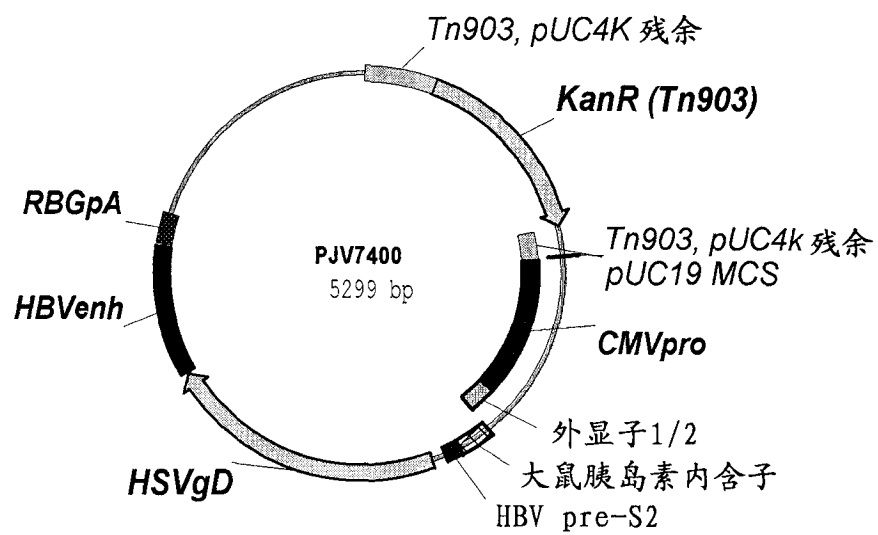


图 10

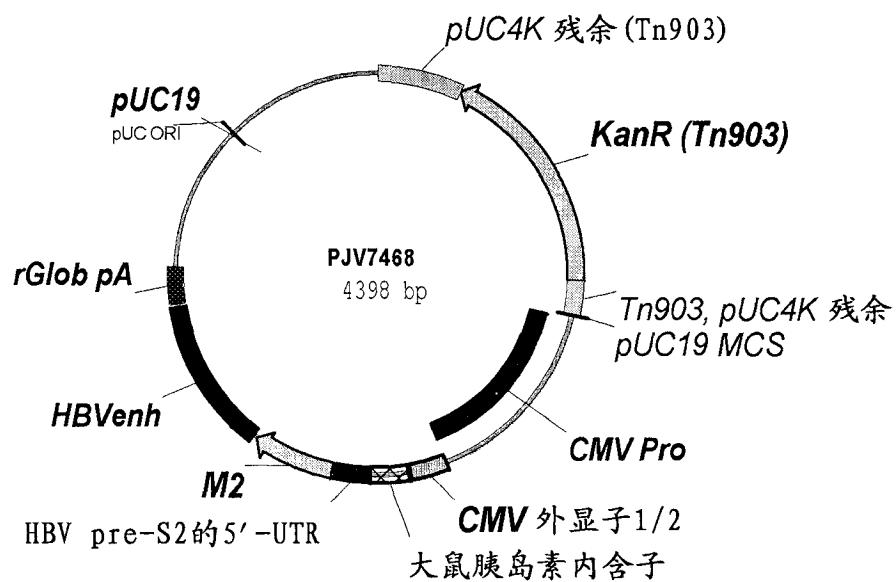


图 11

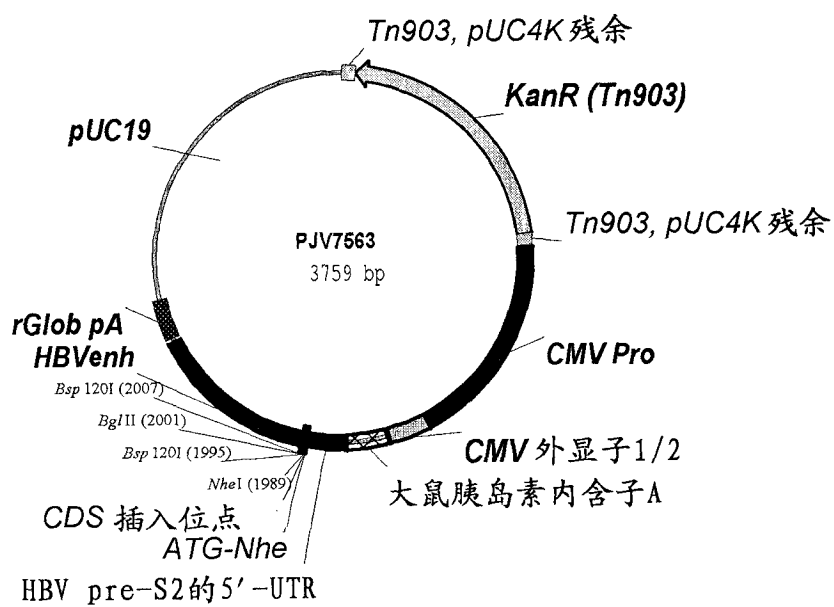


图 12

ggcgtaatgctctgccagtgttacaaccaattaaccaattctgattagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatat
caggattatcaatacatattttgaaaaagccgtttctgaatgaaggagaaaaactcaccgaggcagttccataggatggcaagatcc
tggtatcggtctgcgattccgactcgtccaacatcaatacaacctattatccctcgtcaaaaataagggttatcaagtgagaaatca
ccatgagtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagccttatgcattcttccagacttggtcaacaggccagccattacgctcgtc
atcaaaatcactcgcatacaaccaaacggttattcattcgtgattgcgcctgagcgagacgaaatacgcgacgctgtttaaaggacaa
ttacaaacaggaatcgaatgcaaccggcgaggaacactgccagcgcatacaaatattttcacctgaatcaggatattcttctaata
cctggaatgctgtttccggggatcgagtggtgagtaacatgcatcatcaggagtagcggataaaatgcttgatggtcgggaagag
gcataaattccgctcagccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgtttcagaacaactctgg
cgcatcggggttcccatacaatcgatagattgtcgcacctgattgcccgacattatcgcgagccatttatacccatataaatcagcat
ccatgttggaaatlaatcgcggcctcgagcaagacgttcccgttgaatatggctcataacacccctgtattactgtttatgtaagcaga
caggtcgacaatattggctattggccattgcatacgttctatctatcataatgtacatttatattggctcatgtccaatgatccgccaa
tgttgacattgatttactagttattaatagtaataacattacgggggtcattagttcatagcccatataggagtccgcgttacataactta
cggtaaatggcccgctggctgacggcccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaaata
gggactttccattgacgtcaatgggtggagtattacggtaaaactgccacttggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaaagtcggcc
ccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgccagtagcatgaccttacgggactttctacttggcagtagcatct
acgtattagtcacgctattaccatgggtgatgcgggttttggcagtagcaccaatggggcgtggatagcgggttgactcacggggatttcca
agtctccacccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtataaaccggcccggtt
gacgcaaatgggggtaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaaccgtcagatcgctggagacgc
catccacgctgtttgacctccatagaagacaccgggacccagatccagcctccgcccgggaacggtgcattggaacgcggattc
cccgtgccaaagtagtaccctccggtatcagcaagcaggtatgtactctccaggggtggcctggcttcccagtcagagctc
cagggatttgaggagcgtgtgggctcttcttcatatgtaccttttgcctgctcaaccctgactatctccaggtcaggatcccagag
tcaggggtctgtatttctgctgtgtggctccagttcaggaacagtaaacctgctccgaatattgcctctcacatctcgtcaatctccg
cgaggactggggaccctgtgacgaacatggctagcggggccagatctggggccctaacaaaaaagatgggggttattccctaa
acttcatgggttacgtaattggaagttgggggacattgccacaagatcatattgtacaaaagatcaaacactgttttagaaaacttctg
taaacaggcctattgattgaaagtagtcaaaggattgtgggtcttttgggcttggctcctacacaaatgtggatattctgcctta
atgcttctgtatgcatgtatacaagctaaacaggctttcactttctgccaaacttacaaggcctttctaagtaaacagtagatgaacttta
ccccgttgcctggcaacggcctggctgtgccaagtgttgcgtgacgaacccccactggctggggcttggccataggccatcagc
gcatcggtggaaccttgggtcctctgccgatccatactgcggaactcctagccgcttgttgcctgcagccggtctggagcaaa
gctcataggaactgacaattctgtcgtcctctcgcggaaatatacatcgttccgatctacgtatgatcttttccctctgcaaaaattatg
gggacatcatgaagcccttgagcatctgacttctggctaataaaggaaatttatttcattgcaatagtgttggaaatttttgtgtctc
cactcgggaaggaaattctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggttgcgtattgggcgtcttccgcttctcgtc
actgactcgtcgcgtcgtcgttgcgtcgcggcgagcggtatcagctcactcaaaaggcggtatcaggttatccacagaatcagg
ggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacgtaaaaaggccgcttgcgtggcgtttttcca
taggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcagcgtcaagtcagagggtggcgaacccgacaggactataaagatacca
ggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgtctcctgttccgacctgcccgttaccggatactgtccgcctttctcccttcgggaa
gcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggttaggtcgttcccaagctgggctgtgtgcacgaaccccc
cgttcagcccagccgtgcgccttatccggtaactatcgtcttagtccaacccggtaagacacgacttatccactggcagcagc
cactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgtacagagttctgaagtgtggcctaactacggctacactagaa
gaacagtaattgtatctgcgtctgtgaagccagttaccttcggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaacaaccaccgc
tggtagcgggtgtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttgatcttttctacggggtct
gacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttggcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaaataaaa
tgaagttttaaataatctaaagtatatatgagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcgtct
gtctatttcgttcacatagttgcctgactc

图 13