

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 98803214.7

C12N 15/86

C12N 15/85

C12N 7/01

C12Q 1/68

A61K 39/00

A61K 48/00

[45] 授权公告日 2005 年 12 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1231589C

[22] 申请日 1998.1.12 [21] 申请号 98803214.7

[30] 优先权

[32] 1997.1.10 [33] GB [31] 9700411.3

[86] 国际申请 PCT/GB1998/000074 1998.1.12

[87] 国际公布 WO1998/030707 英 1998.7.16

[85] 进入国家阶段日期 1999.9.9

[71] 专利权人 拜奥维克斯有限公司

地址 英国牛津郡

[72] 发明人 R·S·科芬 D·S·拉奇曼

审查员 黄 磊

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 谭明胜

权利要求书 3 页 说明书 18 页

[54] 发明名称 真核基因表达盒和其用途

[57] 摘要

一种包含单纯疱疹病毒潜伏相关转录物 P2 区, 启动子以及异源基因(按该顺序有效连接)的表达盒。所说的表达盒掺入到单纯疱疹病毒载体中使得可以向哺乳动物细胞传递异源基因, 供长期表达。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种表达盒, 包含:

1 型或 2 型单纯疱疹病毒的潜伏相关转录物 P2 区, 其中所述的 LAT P2 区由 HSV-1 株 17+ 的由核苷酸 118, 866-120, 219 限定的区域组成, 或是
5 另一种 HSV-1 株或 HSV-2 株的同源区,

非-LAT 启动子, 和
异源基因,

它们按该顺序有效连结, 其中所述 LAT P2 区 能够使异源基因在一被含有该表达盒的 HSV 株感染的真核细胞中在感染后表达至少一个月。

10 2. 按照权利要求 1 的表达盒, 其中 LAT P2 区是 HSV-2 LAT P2 区。

3. 按照权利要求 1 的表达盒, 其中 LAT P2 区是 HSV-1 LAT P2 区。

4. 按照权利要求 3 的表达盒, 其中 LAT P2 区是 HSV-1 株 17+ 的 118, 866-120, 219 位核苷酸。

5. 按照权利要求 1 的表达盒, 其中所说的启动子是病毒启动子。

15 6. 按照权利要求 1 的表达盒, 其中所说的启动子是使所说的异源基因在哺乳动物细胞中表达的哺乳动物的启动子。

7. 按照权利要求 6 的表达盒, 其中所说的哺乳动物启动子是组织特异性启动子。

8. 按照权利要求 6 或 7 的表达盒, 其中所说的哺乳动物细胞是哺乳
20 动物的中枢或外周神经系统的细胞。

9. 按照权利要求 1-7 之任一的表达盒, 其中所说的异源基因编码具有治疗用途的多肽。

10. 按照权利要求 9 的表达盒, 其中所说的基因编码细胞毒性多肽。

11. 按照权利要求 9 的表达盒, 其中所说的基因编码能把药物前体
25 转化成细胞毒性化合物的多肽。

12. 按照权利要求 1-7 之任一的表达盒, 其中所说的异源基因选自编码下列物质的基因: 与细胞分裂调节有关的蛋白质、与细胞代谢途径有关的酶、转录因子和热休克蛋白质。

13. 按照权利要求 1-7 之任一的表达盒, 其中所说的异源基因编码
30 含有至少一个表位的多肽。

14. 按照权利要求 13 的表达盒, 其中所说的多肽来自病原体。

15. 按照权利要求 1 的表达盒, 其还包含第二启动子和第二异源基

因，它们按该顺序与 HSV LAT P2 区有效连接，并以与第一启动子和第一异源基因取向相反的方式连接，其中所说的第二启动子与第一启动子相同或不同，所说的第二异源基因与第一异源基因相同或不同。

16. 按照权利要求 15 的表达盒，其中所说的第二启动子是如权利要求 1 和 5-8 之任一所限定的，所说的第二异源基因是如权利要求 9-14 之任一所限定的。

17. 按照权利要求 15 或 16 的表达盒，其中所说的第一异源基因的产物在合适的生理条件下调节所说的第二异源基因的表达。

18. 包含权利要求 1-12 和 15-17 之任一所限定的表达盒的核酸载体。

19. 按照权利要求 18 的载体，其还包含位于所说表达盒侧翼的哺乳动物的基因组序列。

20. 按照权利要求 18 的载体，其还包含位于所说表达盒侧翼的 HSV 基因组序列。

21. 一种包含按照权利要求 13 或 14 的表达盒的载体。

22. 包含上述权利要求 1-12 和 15-17 之任一所限定的表达盒的 HSV 毒株。

23. 按照权利要求 22 的 HSV 毒株，它是 HSV-1 毒株。

24. 按照权利要求 22 的 HSV 毒株，它是 HSV-2 毒株。

25. 按照权利要求 22 或 23 的 HSV 毒株，其中所说的 LAT P2 区是内源性 HSV LAT P2 区。

26. 一种包含按照权利要求 13 或 14 的表达盒的 HSV 毒株。

27. 一种药物组合物，该组合物包含按照权利要求 1-12 和 15-17 之任一的表达盒，按照权利要求 18-20 之任一的载体或按照权利要求 22-25 之任一的 HSV 毒株，以及药理学上可接受的载体或稀释剂。

28. 按照权利要求 13 或 14 的表达盒，按照权利要求 21 的载体或按照权利要求 26 的 HSV 毒株在生产用于接种哺乳动物的方法的药物中的应用。

29. 一种疫苗，该疫苗包含按照权利要求 13 或 14 的表达盒，按照权利要求 21 的载体或按照权利要求 26 的 HSV 毒株以及药理学上可接受的载体或稀释剂。

30. 一种用于研究真核细胞中一个或多个异源基因的功能的方法，

该方法包括:

(a) 将按照权利要求 1-12 和 15-17 之任一的表达盒, 按照权利要求 18-20 之任一的载体或按照权利要求 22-25 之任一的 HSV 毒株导入至真核细胞内;

5 (b) 检测所说的一个或多个异源基因在所说的真核细胞中的表达作用。

31. 按照权利要求 30 的方法, 其中所说的异源基因是与致病相关的野生型或突变基因。

32. 按照权利要求 30 或 31 的方法, 其中所说的真核细胞有机能障
10 碍, 并且所说的异源基因是野生型的。

33. 按照权利要求 30 或 31 的方法, 其中所说的真核细胞具有一个或多个通过突变失活的内源性基因。

34. 一种产生按照权利要求 22-26 之任一的 HSV 毒株的方法, 该方法包括将按照权利要求 1-17 之任一所限定的表达盒导入到单纯疱疹病毒的基因组内。
15

35. 按照权利要求 34 的方法, 其中通过所述单纯疱疹病毒的基因组与权利要求 18-20 之任一定义的载体之间的同源重组将所述表达盒导入到所说的基因组内。

真核基因表达盒和其用途

发明领域

- 5 本发明涉及一种基因表达盒。该表达盒可用于在真核细胞中指导异源基因的长期表达。本发明还涉及所说表达盒在基因治疗，疫苗生产，以及基因作用分析的方法中的用途。本发明也涉及包含所说表达盒的载体，包括病毒毒株。

发明背景

- 10 单纯疱疹病毒 (HSV) 经常作为神经系统的合适的基因传递的载体，因为它为神经营养生活型并具有在神经元中保持细胞终生的潜伏能力。这一独特能力暗示，通过合适的开发这种载体系统仅仅施用一次就可对一定的疾病具有终生治疗益处，如帕金森氏病其中酪氨酸羟化酶或者 GDNF 在人脑中的表达显示了优势。

- 15 然而，虽然不完整疱疹病毒显示了在体内有效地向神经系统和其它组织传送基因，但由疱疹基因组表达的异源基因的转录常常只持续很短的时间 (<1 周)。当疱疹基因组处于病毒潜伏状态期间所保持的转录失活状态，转录就停止。这样，尽管疱疹载体 DNA 在治疗的细胞中有可能保持至细胞终生，然而由于异源基因通常不被转录(目前)，
20 所以治疗效果仅仅在短期内得以显示。

- 那么，如果开发出在潜伏期间能保持活性的启动子系统，当治疗效果在病毒的潜伏期间仍能继续，就能认识到这些疱疹病毒载体的广泛的潜在价值。这类启动子的另一种所需性质是它们只在将要治疗的细胞类型(即神经元或神经元亚类或其它特定的细胞类型)中具有活
25 性，这样阻止了在某些情况下可能有害的潜在地治疗基因的不适当表达。这样基因治疗限于作用于将要治疗的靶细胞。

- 单纯疱疹病毒(造成唇疱疹 (HSV1) 或生殖疱疹 (HSV2)) 通过皮肤或粘膜表面的磨损感染感觉神经元的轴索的末端，接着，它们在细胞体中迁移至核，并建立潜伏感染或发生裂解复制。影响决定潜伏或裂
30 解感染的因素尚未得以充分了解。然而，在不完整病毒载体的情况下只有潜伏途径是可能的。

 在潜伏期间，疱疹基因组很大程度上为转录失活。然而在该基因

组的长重复片段中的一个小区域转录后产生与潜伏有关的转录物 (LAT), 本文描述的是 HSV1 (HSV2 类似)。LATs 分为两类, 分别为由含 TATA 启动子 (参见 Coffin 和 Latchman, 1996; 本文叙述为 LAT p1) 转录的低丰度的共线性的较大 (约 8 千碱基 (kb)) 的转录物, 和丰度稍高的约 2kb 和 1.5kb 的转录物 (其被认为是由较大转录物剪接的嵌套的稳定内含子)。1.5kb 转录物仅仅在神经元中检测到, 并且在潜伏期间二者的丰度增加。在 LAT p1 和 2kb LAT 的起点之间鉴定出第二个具有十分弱的启动子活性的区域 (参见 Goins 等, 1994; 本文叙述为 LAT P2), 这说明在它一些条件下该区可以单个独转录物的形式进行表达。

利用 LAT 启动子驱动插入到病毒基因组中的异源基因的长期表达几乎不能成功。利用 LAT P1 启动子在短期内能引起高表达水平, 但是在几天后转录迅速被关闭。异源基因在内源性 LAT P2 启动子后各个位置的插入确实显示了长期活性, 但活性十分微弱 (参见 Coffin 和 Latchman, 1996)。类似地, 已报导一个插入到由 LAT P2 启动子 (其连接在 lacZ 编码区上) 组成的 LAT 区域 (在糖蛋白 C 区域) 的外部的构建体在背根神经节中体外情况下显示长期活性, 但是活性也是十分微弱 (例如, Goins 等, 1994)。

发明概要

本发明涉及一种表达盒, 其包含单纯疱疹病毒 LAT P2 区, 启动子以及异源基因 (按该顺序有效连接)。本发明基于 LAT P2 区域可使邻近启动子具有长期活性这一惊人发现的基础上。更重要的是, 利用 LAT P2 区域和邻近启动子来驱动异源基因的表达不仅引起异源基因的长期表达, 而且处于表达高水平。单个 LAT P2 元件也可用来驱动由成对启动子控制地长期表达。此时位于中间的 LAT P2 元件的侧翼是两个背向它并且方向相反的启动子, 这样将两个异源基因与这些启动子有效连接, 可使这两个基因得到长期表达。

我们的假说是上述称作为 LAT P2 (参见 Coffin 和 Latchman, 1996) 或 LAP 2 启动子 (Goins 等, 1994) 的 HSV 基因组的区域在潜伏状态期间其自身不提供启动子活性。而是, 它在周围区域提供改变的 DNA 结构使得在以其它方式转录失活的潜伏基因组中由邻近启动子控制的转录能够持续。

核酸构建体(包括病毒毒株,特别是 HSV 毒株及包含所说的表达盒可用于,例如,在治疗神经系统的疾病或损伤(包括帕金森氏病,脊柱损伤或中风),或者眼疾,心脏或骨骼肌疾病,或恶性肿瘤的方法中传递治疗基因,或者传递编码特定以作为疫苗的抗原的基因。

- 5 本发明也涉及用于研究真核细胞(尤其是哺乳动物的细胞)的基因的功能的方法中,例如,鉴定基因互补细胞机能障碍,或者在野生型或突变体细胞中研究突变基因表达的影响。本发明的方法特别适用于疾病相关基因的功能研究。

- 10 因此本发明提供了一种包含按该顺序有效连接的 HSV 潜伏相关转录物 P2 区,启动子以及异源基因的表达盒。优选的所说的启动子是与潜伏非相关的转录启动子。更优选的启动子是病毒的启动子或哺乳动物的启动子。优选的启动子是使得异源基因在哺乳动物细胞中得以表达的病毒启动子或哺乳动物的启动子,其中所说的细胞优选的是中枢或外周神经系统的细胞,或眼的细胞,心脏或骨骼肌的细胞,更
- 15 优选的是中枢或外周神经系统的细胞。启动子也可以是诱导型和/或组织特异性。

- 这样表达盒或载体(优选的是病毒毒株,更优选的是 HSV 毒株及包含本发明的表达盒)可用于将异源基因传送到它将加以表达的哺乳动物细胞内。这样的表达盒和载体在多种应用中有用,例如,基因治
- 20 疗,疫苗,基因功能的体外或体内分析方法或研究。

术语异源基因旨在包括任何在 HSV 基因组中未发现的基因。异源基因可以是任何野生型基因的等位基因的变体,或者是突变基因。异源基因优选地编码具有治疗用途的多肽,包括具有细胞毒性的或能够把前药转化成为细胞毒性化合物的多肽。

- 25 基因治疗和其它治疗应用可能都要求施用多基因。多基因的表达对多种疾病的治疗有利,例如利用多神经营养因子。由于 HSV 没有其它病毒载体系统的包装能力限制,因此 HSV 格外适用。这样可将多个异源基因置于它的基因组内部。本发明,例如,至少有两种方法可完成这一目的。例如,可将多个本发明的表达盒引入到特定 HSV 毒株
- 30 中。每一表达盒可以包含一个异源基因。另一方法是利用成对的启动子,它们以相反的方向背向位于中间的LAT P2元件(相同或不同的启动子),这些启动子分别驱动异源基因(相同或不同的异源基因)的表

达。

这样本发明也提供了一种还包含第二启动子和第二异源基因的表达盒，其中所说的启动子和异源基因按该顺序与 HSV LAT P2 区有效连接，并以与第一启动子和第一异源基因取向相反的方式连接。第二启动子可以与第一启动子相同或不同。第二异源基因可以与第一异源基因相同或不同。在特别优选的实施方案中，第一启动子是非 LAT 启动子，第二启动子是 LAT p1 启动子。

总之，这种排列提供了一对启动子/异源基因构建体以方向相反的方式位于单个 LAT P2 区的侧翼，这使得成对的基因得以长期表达，其中所说的基因可以相同或不同，可由相同或不同的启动子驱动。

也可利用组合方法，即将一个或多个第一种类型的表达盒与一个或多个第二种类型的表达盒一起导入到 HSV 毒株的基因组内。因而，在合适的地方，被称为“表达盒”的应包括任一类型的多重表达盒。

本发明进一步提供表达盒与载体的利用，优选的是包含表达盒的 HSV 毒株在人类和动物的治疗上的用途。例如，包含表达盒的 HSV 毒株可用于治疗神经系统的疾病或损伤（包括帕金森氏病，脊柱损伤或中风），或者眼疾，心脏或骨骼肌疾病，或恶性肿瘤的治疗。减毒处理这些 HSV 毒株，使得它们不能在人和动物细胞中经历裂解循环。

本发明的表达盒也可用于研究真核细胞（优选的是哺乳动物的细胞）的基因的功能的方法中，例如，鉴定基因互补细胞机能障碍，或者在野生型或突变体细胞中研究突变基因表达的影响。本发明的方法特别适用于疾病相关基因的功能研究。

本发明也提供了用于产生病毒毒株（优选的是包含本发明的表达盒的 HSV 毒株）的方法，该方法包括优选地通过同源重组的方法将本发明的表达盒导入到病毒毒株的基因组内。

发明详述

A. 表达盒-LAT P2 区，启动子，异源基因

本发明的表达盒本质上包括按该顺序有效连接的 LAT P2 区，启动子以及异源基因。术语“有效连接”是指并列连接，其中的组分处于可使他们按所计划的方式起作用的关系中。这样，例如，与异源基因序列有效连接的启动子以可使异源基因在一定条件（其适合由启动子控制的表达活化）下可完成表达的方式进行连接。

表达盒还包含按该顺序与 HSV LAT P2 区有效连接并与第一启动子和第一异源基因以取向相反的方式连接的第二启动子和第二异源基因,其中所说的第二启动子和第二异源基因可以与第一启动子和第一异源基因相同或不同。这样一对启动子/异源基因构建体以方向相反的方式位于单个 LAT P2 区侧翼,这使得成对的基因得以长期表达,其中所说的基因可以相同或不同,可由相同或不同的启动子驱动。此外,在合适的生理条件下,第一异源基因的产物可调节第二异源基因或反过来也一样的表达。

术语“长期表达”是指在被本发明的单纯疱疹病毒感染的细胞中即使单纯疱疹病毒进入潜伏状态后的异源基因的表达。优选的,至少两周,更优选的在感染后至少一个或两个月,最优选的是细胞终生。

表达盒的构筑可通过本领域技术人员熟知的常规克隆技术(参见,例如, Sambrook 等, 1989, 分子克隆实验室手册; 冷泉港出版社)。

1. LAT P2 域

本文定义 LAT P2 域为 HSV1 核苷酸 118,866-120,219(基因库 HE1CG: 从 PstI-BstXI 位点)或者该区域的片段或衍生物,其中所说的区域包括能使异源基因在本发明的表达盒中长期表达的与 HSV2 同源的区域。

2. 启动子

启动子是指非来源于 HSV 的 LAT P2 区域的转录启动子。术语启动子为本领域人员所熟知,其包括在大小和复杂度上从最小的启动子至包含上游元件和增强子的启动子的核酸区域。将启动子与 LAT P2 区域和其下游有效连接。将第二启动子以相反的取向有效连结在 LAT P2 区域的上游也是可能的,这样 LAT P2 区域授与两个启动子具有长期活性。

启动子从在哺乳动物(优选的是人类)的细胞中具有功能的启动子中进行选择。启动子可来源于病毒或真核基因的启动子序列。例如,它可以是来源于在其内的异源基因的表达能发生的细胞的基因组的启动子,优选的是哺乳动物的中枢或外周神经系统的细胞。关于真核启动子,它们可以是以普遍方式起作用的启动子(如 α -肌动蛋白的, β -肌动蛋白, 微管蛋白的启动子),或者,还有以组织特异性方

式起作用的启动子(如丙酮酸激酶基因的启动子)。尤其优选的是仅仅在特定神经元的细胞类型内活化的启动子(例如酪氨酸羟化酶(TH)的, L7 的, 或神经元特异性的烯醇化酶(NSE)的启动子)。它们也可以是对特定刺激作出反应的启动子, 例如结合甾族激素受体的启动子。也可利用病毒的启动子, 例如 Moloney 鼠白血病病毒长末端重复序列, (MMLV LTR)启动子, HSVI 或 HSV2 LAT p1 启动子, rous 肉瘤病毒(RSV)LTR 启动子或人类巨细胞病毒(CMV)IE 启动子。

启动子为诱导型的更有利, 这样在细胞生命期内可调节异源基因的表达水平。诱导性是指可以调节利用启动子所获得的表达水平。例如, 在优选的实施方案中其中两个启动子以相反的方向位于单个 LAT P2 区域的侧翼, 其中一个启动子包含了对以前报导的 tet 阻遏物/VP16 转录激活融合蛋白质作出响应的启动子(Gossen 和 Bujard, 1992; Gossen 等, 1995), 其并且驱动要调节的异源基因的表达。第二启动子将包含一个强启动子(例如 CMV IE 启动子), 其驱动 tet 阻遏物/VP16 融合蛋白质的表达。这样在这一例子中第一异源基因的表达将取决于四环素的存在或缺乏。

此外, 这些启动子的之任一可以通过增加另外的调节序列(例如增强子序列)进行修饰。也可以利用嵌合的启动子, 其包含来自上述两个或多个不同启动子的序列元件。

3. 异源基因

术语“核酸”包括核糖核酸, 脱氧核糖核酸以及其类似物。术语异源基因包含任何除了 HSV 基因组中存在的基因。异源基因可以是任何野生型基因的等位基因的变体, 或者是突变基因。术语“基因”旨在于包括能至少被转录的各种核酸序列。这样, 这一定义包括了编码信使核糖核酸, 转移 RNA 和 rRNA 的序列。关于启动子其序列可以是有义或反义取向。按照大家熟知技术可利用反义构建体阻止细胞内基因的表达。编码信使核糖核酸的序列可以选择性地包括一些或所有 5'和/或 3'端天然转录的但是不翻译的侧翼序列, 或者其以其它方式与翻译的编码序列相联。它还可选择性地包括通常与所转录的序列相关联的有关的转录调控序列, 例如转录终止信号, 聚腺苷酸化位点以及下游增强子元件。

异源基因可以编码, 例如, 与细胞分裂调节的有关蛋白质, 例如

生长因子(包括神经营养生长因子(如脑来源的神经营养因子,胶质细胞来源的神经营养因子, NGF, NT3, NT4 和 NT5)), 细胞因子(如 α -, β -或 γ -干扰素, 白介素(包括 IL-1, IL-2), 肿瘤坏死因子, 或类胰岛素的生长因子 I 或 II), 蛋白激酶(如 MAP 激酶), 蛋白磷酸酶和任何上述物质的细胞受体。异源基因可以编码与细胞代谢途径有关的酶, 例如与氨基酸的生物合成或降解有关的酶(如酪氨酸羟化酶), 与嘌呤或嘧啶生物合成或降解有关的酶, 以及与神经递质(如多巴胺)的生物合成或降解有关的酶, 或者编码调节这些途径的蛋白质, 例如蛋白激酶和磷酸酶。异源基因也可编码与它们的调节有关的转录因子或蛋白质, 例如 Bm3 家族的成员, 或 Rb 家族的小型蛋白诸如 Rb 或 p107, 膜蛋白(如视紫红质), 结构蛋白(如肌营养不良蛋白)或热休克蛋白质如 hsp70。

优选的是异源基因编码具有治疗用途的多肽或其功能可能与疾病过程相关的多肽。例如, 上述蛋白质中的酪氨酸羟化酶和胶质细胞来源的神经营养因子可用于治疗帕金森氏病, 视紫红质可用于治疗眼疾, 肌营养不良蛋白可用来治疗肌肉萎缩, 热休克蛋白质可用来治疗与局部缺血紧张相关的心脑病。治疗用途的多肽也可包括细胞毒性多肽(如蓖麻毒蛋白)或利用(例如, 定位病毒的酶前药治疗或定位基因的酶前药治疗的方法, 能够将前药转化成为细胞毒性的化合物的酶。在后者情况下, 要求保证酶具有合适的信号序列以定位到细胞表面, 优选的是使得酶暴露在细胞表面的外部但锚定在细胞膜上的信号序列。合适的酶包括细菌的硝基还原酶(如 W093/08288 描述的大肠杆菌硝基还原酶)或羧肽酶, 尤其是 W088/07378 描述的羧肽酶 CPG2。其它酶在参考 EP-A-415731 中可找到。合适的前药包括氮芥前药和其它化合物如本文一并参考的 W088/07378, W089/10140, W090/02729 和 W093/08288 中所描述的那些化合物。

异源基因也可编码作为疫苗利用的抗原多肽。优选地, 这些抗原多肽来自致病有机体例如细菌或病毒或肿瘤。

异源基因也可包括标记基因(例如编码 β -半乳糖苷酶或绿色荧光蛋白)或其产物调节其它基因的表达的基因(例如, 上述的转录调节因子包含 tet 阻遏物/VP16 转录激活融合蛋白)。

B. 载体

表达盒可以以裸露的核酸构建体形式进行利用。此外,可将它导入到各种核酸载体中。载体包括质粒和病毒载体,优选的是 HSV 载体。载体还可包含位于表达盒侧翼的序列,它们含有与真核基因组序列同源的序列,优选的是哺乳动物的基因组序列,或病毒的基因组序列。这可把表达盒通过同源重组而导入真核细胞或病毒的基因组内。具体地说,包含侧翼为病毒序列(优选的是 HSVI 或 HSV2 序列)的表达盒的质粒载体可用来制备适于向哺乳动物的细胞传送表达盒的病毒载体(优选的是 HSV 载体)。下文详述单纯疱疹病毒。然而,所采用的技术是技术人员所熟知的技术,并且其适于其它病毒如腺病毒。其它的合适的病毒载体的例子包括能够将其它们的染色体组整合到宿主细胞的基因组上的病毒载体,例如逆转录病毒,包括慢病毒和腺伴随病毒。

C. 单纯疱疹病毒载体

1. 病毒毒株

本发明的包含表达盒的 HSV 毒株可来自例如 HSV1 或 HSV2 毒株,或者其衍生物,优选的是 HSV1。衍生物包括包含 HSV1 和 HSV2 毒株的 DNA 的类型内的重组体。优选地,衍生物具有与 HSV1 或 HSV2 基因组至少 70% 的序列同源性,更优选的至少 90%,尤其优选的 95%。

在治疗方法中利用 HSV 毒株要求减毒毒株处理,这样它们不能建立裂解循环。具体地说,如果将 HSV 载体用于人类基因治疗中,表达盒应该优选地插入一个必需基因。这是因为如果载体病毒遇到野生型病毒,通过重组可以发生异源基因转移到野生型病毒。然而,只要异源基因中插入了一个必需基因,重组转移将使受体病毒中缺失必需基因,并且阻止异源基因“逃跑”成为感受态野生型病毒的复制。

减毒毒株可用来产生本发明的 HSV 毒株,本文仅仅给出其例子,包括在 ICP34.5 或 ICP27 有突变的毒株,例如均发生 ICP34.5 突变的毒株 1716(MacLean 等, 1991), 毒株 R3616 和 R4009(Chou 和 Roizman, 1992)和 R930(Chou 等, 1994), 以及 ICP27 缺失的 d27-1(Rice 和 Knipe, 1990)。此外, ICP4, ICP0, ICP22, ICP6, ICP47, vhs 或 gH 缺失的毒株, 在 VMW65 发生失活突变的毒株, 或上述的任何组合均可用来产生本发明的 HSV 毒株。

用于描述各种 HSV 基因的术语参见 Coffin 和 Latchman, 1996。

2. 互补细胞系

ICP27 缺损的 HSV 病毒在表达 ICP27 细胞株中进行繁殖, 例如 V27 细胞(Rice 和 Knipe, 1990), 2-2 细胞(Smith 等, 1992)或 B130/2 细胞(参见实施例), 优选的是 B130/2 细胞。

- 5 通过用一种包含功能 HSV ICP27 基因(其能在所说的细胞中被表达)的载体(优选的是质粒载体)和编码选择性标记(例如新霉素抗性)的载体(优选的是质粒载体)共转染哺乳动物的细胞(例如 Vero 或 BHK 细胞)可制备表达 ICP27 的细胞系。然后筛选具有选择性标记的克隆, 并进一步确定哪些克隆也表达有功能的 ICP27, 例如利用为本领域技术人员所熟知的方法(例如 Rice 和 Knipe, 1990 所描述的方法)根据他们支持 ICP27~ 突变 HSV 毒株的生长的能力确定。

如上述制备不会使 ICP27~ 突变 HSV 毒株回复突变成具有有功能的 ICP27 毒株的细胞系, 确保含有功能 ICP27 基因的载体不含有与 ICP27~ 突变体病毒重叠(即同源)的序列。

- 15 当本发明的 HSV 毒株包含对其它必需基因(例如 ICP4)的失活修饰时, 互补细胞系将还包含一个有功能的 HSV 基因, 其以 ICP27 的所描述的相同方式互补被修饰的必需基因。

3. 突变方法

- 20 通过本领域中熟知的几种技术可使 HSV 基因的功能失活。例如, 通过缺失, 取代或插入(优选的是缺失)可使它们功能失活。缺失可除去部分或整个基因。插入的序列可以包括上述的表达盒。

- HSV 毒株的突变可通过本领域技术人员熟知的同源重组的方法得到。例如, 用含有突变序列(其侧翼为 HSV 的同源序列)的载体(优选的是质粒载体)转染 HSV 基因组 DNA。突变序列可包含缺失, 插入或取代, 所有这些可通过常规技术来构建。插入可包括选择性标记基因, 例如 *lacZ*, 例如, 通过 β -半乳糖苷酶活性来筛选重组病毒。

- 也可在其它 HSV 基因中获得突变, 例如基因 ICP0, ICP4, ICP6, ICP22, ICP47, VMW65, gH 或 vhs。为 VMW65 基因时, 整个基因不能全缺失, 因为它编码一种必需的结构蛋白, 但是可进行小的失活插入其可消除 VMW65 转录激活 IE 基因的能力(Ace 等, 1989)。

4. 包含表达盒的 HSV 毒株

表达盒可插入到 HSV 基因组中的任何位置, 只要病毒仍然可以繁

殖, 如果异源基因插入在必需基因内, 那么要求利用携带另一个 HSV 必需基因的细胞系(如 2. 所描述的)。例如, 如果异源基因插入在 HSV 毒株的 ICP27 基因内, 那么需要表达 ICP27 的细胞系。表达盒优选插入到 ICP27 突变的区域内, 因为在不太可能事件中突变通过与野生型病毒的重组得到修复, 这种修复除去了插入的表达盒。

例如, 如同上述的导入突变, 通过 HSV 毒株与具有表达盒(其侧翼是 HSV 序列)的质粒载体的同源重组可将表达盒插入到 HSV 基因组中。利用本领域熟知的克隆技术可将表达盒导入到包含 HSV 序列的合适的质粒载体中。

10 在病毒基因组内插入多个表达盒是可能的, 这样一个病毒载体可包含多个本发明的表达盒。

通过克隆包含了内源性 LAT P2 区域的下游区有效连接了异源基因的启动子的构建体来利用内源性 LAT P2 区域也是可能的。另一个构建体可以相反的取向克隆到 LAT P2 区域的上游区。这样所形成的病毒将包含本发明的表达盒, 但是其通过与上述稍不同的方法来制备。

D. 施用

本发明的表达盒可用来向需要治疗的人或动物传送治疗基因。具体地说, 单纯疱疹病毒的神经营养性质使得利用包含本发明的表达盒的减毒 HSV 毒株非常适于治疗某些疾病, 例如帕金森氏病, 神经系统疾病, 脊椎损伤, 中风或恶性肿瘤, 例如神经胶质瘤。此外, 本发明的表达盒可用来传送作为疫苗用途的编码潜在免疫原性的多肽的基因。

25 本发明的表达盒可以以裸露的核酸构建体(优选的还包含侧翼的与宿主细胞基因组同源的序列)形式直接施用。通过几种已知的技术(包括 biolistic 转化和脂转染技术)促进哺乳动物细胞摄取裸露的核酸构建体。

此外, 表达盒可以作为核酸载体的一部分来施用, 这些载体包括质粒载体或病毒载体, 优选的是 HSV。

30 优选地, 送递载体(即, 例如裸露的核酸构建体或包含表达盒的病毒载体)以及药学上可接受的载体或稀释剂相结合以产生药物组合物。合适的载体和稀释液包括等渗盐溶液, 例如磷酸缓冲盐水。可将

组合物制成肠胃外，肌内，静脉内，颅内，皮下，眼内，以及透皮施用的制剂。

将含有用于基因治疗的治疗基因的表达盒以其会在适当的区域整合到细胞内的方法来施用药物组合物。例如，当基因治疗的靶是中枢或外周神经系统并且表达盒由单纯疱疹病毒载体进行传送时，可在突触末端定位的区域中施用组合物，这样末端可摄取这些病毒并且通过逆行轴索运输以一种逆行的方式经轴突运输至轴索的细胞体中。通常通过趋实体性接种方法将药物组合物施用至人脑。当施用药物组合物至眼时，视网膜下注射是通常采用的技术。

当用病毒载体将表达盒传送至细胞时，所施用的病毒的量通常在 10^3 至 10^{10} pfu的范围内，优选 10^5 至 10^8 pfu，更优选 10^6 至 10^7 pfu。注射时，通常施用1-10 μ l位于药学上可接受的合适的载体或稀释剂中的病毒。

当表达盒以裸露的核酸形式施用时，所施用的核酸的量通常在1 μ g-10mg的范围内，优选100 μ g至1mg。

当异源基因处于诱导型启动子的控制下时，在治疗整段时期内只需诱导基因的表达。一旦疾病治愈了，除去诱导物，异源基因的表达即停止。这点具有很大的临床优点。例如，这样一种系统包括上述的施用抗生素四环素，其通过影响tet阻遏物/VP16融合蛋白质而激活基因表达。

在利用本发明的表达盒的治疗中，组织特异性启动子具有协助作用。例如，几种神经疾病是由于仅仅在小子集细胞中的特定基因产物的异常表达而引起的。仅在相关影响的细胞类型中表达治疗基因将是有利的，尤其在这样的基因在其它细胞类型中表达时有毒性的情况下。

所描述的施用途径和剂量仅作为指导，因为熟练的医师能够针对任何具体的患者与疾病决定最佳施用途径和剂量。

E. 分析方法

本发明的表达盒也可用于科学研究的方法中。这样，本发明的另一方面还涉及在体外或体内分析真核细胞(优选的是哺乳动物的细胞)中的基因功能的方法。异源的功能可由下列方法来确定：

(a) 将本发明的包含所说异源基因的表达盒导入到真核细胞

内；并且

(b) 检测所说异源基因在所说的细胞中的表达作用。

例如，某些细胞具有细胞分裂时的温度敏感缺陷。若按照本发明将包含异源基因的表达盒导入到缺陷细胞内并且这些细胞在限定的温度下生长，技术人员将易于检测出异源基因是否能弥补细胞分裂中的缺陷。类似地，如果异源基因的表达能纠正细胞中可观察到的突变表型，那么可以应用其它已知的技术进行检测。

这种方法也可用于进行异源基因的系统突变以确定由该基因编码的蛋白质的哪一个区域与恢复突变表型有关。

本方法也可用于具有所谓的“基因剔除”的动物，例如小鼠。利用本发明的表达盒将野生型异源基因导入到动物体内，并利用本领域已知的各种行为学的，组织化学的，以及生化的分析方法确定对动物的影响。此外，可将突变的异源基因导入到野生型或“基因缺失”的动物内，从检测是否诱导疾病相关的病理学。这一应用的例子是在啮齿类动物中枢神经系统中利用编码朊病毒的基因诱导 Creutzfeld-Jacob 和其它朊病毒类型的疾病。其它疾病模型可包括老年痴呆症，运动神经元疾病或帕金森氏病模型。

由于利用一种或多种表达盒将至少两个不同的异源基因导入到细胞内是可能的，研究两种或多种基因产物之间的相互作用也是可能的。

这样，本发明的方法尤其可用于研究疾病相关基因的功能。利用本发明的方法来研究基因功能的一个优点是：控制特定基因的暂时表达的能力意味着在细胞发育或修复中确定哪个阶段需要表达的基因(即使是完全表达)是可能的。

参照下列实施例描述本发明，这些实施例是说明性的但不是限制性的。

实施例

实施例 1 至 8，描述了下列构建体的可引起长期表达的 LAT P2 区域的利用：

1. 驱动 lacZ 长期表达的 MMLV LTR 启动子，其来自 ICP34.5 缺失的并且 VMW65 反式激活活性消失的病毒(病毒毒株 1764/pR14)中的 LAT 区域。本发明中，MMLV LTR/LacZ 盒直接插入在 LAT 区域中 LAT P2

之后。

2. 驱动 lacZ 表达的 CMV 启动子, 其来自 ICP27 缺失的病毒(病毒毒株 17+/D27/pR19lacZ)中的 LAT 区域。本发明中, CMV IE 启动子 lacZ 盒直接插入在 LAT 区域中 LAT P2 之后。

5 3. 驱动 lacZ 的 LAT P2/CMV 启动子, 其来自 ICP27 基因座(即又有 ICP27 缺失的病毒)(病毒毒株 17+/D27/pR20)。本发明中, 利用授与非 LAT 启动子长期活性的 LAT P2 区域与其它 LAT 序列隔离。

4. 一段 LAT P2 区域, 其下游侧翼有 MMLV LTR 启动子/GFP 盒且上游端有相反取向的 LAT p1 启动子/lacZ 盒(pR20.9 盒), 并且其被插入
10 到 ICP34.5 缺失的并且具有 VMW65 失活突变的病毒(病毒毒株 1764/pR20.9)的 UL43 基因。

材料和方法

病毒和细胞系

通过同源重组的标准方法(例如, 参见 Coffin 以及 Latchman,
15 1996; Coffin 等, 1996)接着通过 X-gal 染色检测 lacZ 活性, 噬斑纯化和 Southern 印迹检查重组病毒的正确基因组结构从而制备所有病毒。

(a) 亲本病毒和 ICP27-互补细胞系:

17+/D27w

20 用标准的方法, 首先通过同源重组的方法从以前所产生的 ICP27 缺失的病毒(其中 lacZ 已插入在 ICP27 基因座内)中除去 lacZ 基因, 然后 X-gal 染色之后选择白噬斑从而可获得不包含标记基因的 ICP27 缺失的突变体。该病毒命名为 17+/D27w, 它除了缺失核苷酸 113, 273-117, 854 外其它均为野生型, 这样它没有编码 ICP27(UL54)
25 的序列并且无非必需的基因 UL55 和 UL56, 因此它必须培育在表达 ICP27 的细胞系内。核苷酸编号是指 HSV1 毒株 17+序列(Genbank no. HE1CG)。

通过在以前制备的 ICP27 互补 BHK 细胞系 B130/2 中培育可产生 ICP27 缺失病毒并获得其储备, 其中互补 BHK 细胞系是通过质粒
30 pSG130BS(Sekulovich 等, 1988)DNA 与编码新霉素抗性的质粒 pMamNeo(Invitrogen)共转染到 BHK 细胞内然后选择具有新霉素抗性的克隆来获得的。选择能使 HSV1 ICP27 缺失突变体高度生长的克隆

(B130/2)用于培育病毒。pSG130BS 含有来自 HSV1(核苷酸 113,322-115,743)的 BamHI/SacI 片段,其编码完全的 ICP27 与部分 UL55 序列。

1764

- 5 以前已描述过 HSV 毒株 1764(Coffin 等, 1996)。它缺失了编码 ICP34.5 的基因(MacLean 等, 1991)并且在编码 VMW65(毒粒逆激活蛋白)的基因上发生了失活突变(Ace 等, 1989)。体外病毒生长 ICP34.5 是非必需的,而且 VMW65 可通过在培养基中加入环己烷-二乙酰胺得以补充(McFarlane 等, 1992),因此可培育在 BHK 细胞上。

10 实施例 1 - 1764/pR14 的构建

- 用纯化的 1764 的基因组 DNA 与质粒 pR14 共转染到 BHK 细胞内,然后 X-gal 染色之后选择蓝噬斑,这样就可产生病毒毒株 1764/pR14。pR14 的制备通过将 MMLV LTR/lacZ 序列插入到 pNot 3.5 内而获得。pNot 3.5 含有的来自克隆在 pGem5(Promega)的 NotI 位点内的 HSV1 的 LAT 区域(核苷酸 118439-122025)的 3.5Kb NotI 片段。MMLV LTR/lacZ 的插入由两个步骤来完成:

- 1: 将来自 pCH110(Phannacia)的 lacZ 基因(HindIII-BamHI)插入到 pJ4(其包含 MMLV LTR 启动子/聚连接物/SV40 的聚 A 序列;(Morgenstern 和 Land, 1990)的 HindIII 位点内,得到 pJ4lacZb。
- 20 2: 通过用 NheI 和 PstI 切割 pJ4lacZ,将来自 pJ4lacZ 的 MMLV LTR/lacZpolyA 插入在 pNot 3.5 的 BbsI 位点(在 LAT P2 后端)上,得到 pR14。取向: LAT P1/LAT P2/LTR/lacZ。

实施例 2-17+/D27/pR19lacZ 的构建

- 用纯化的 17+/D27w 基因组 DNA 与质粒 pR19lacZ 共转染进 B130/2 细胞内,然后 X-gal 染色后选择蓝噬斑,来产生病毒毒株 17+/D27/pR19lacZ。pR19lacZ 是通过将 CMV IE 启动子/lacZ/polyA 盒插入到 pNot 3.5 的 BstXI 位点内(即在 LAT P2 之后)而制备的。首先将来自 pCH110(Pharmacia)的 lacZ 基因(HindIII-BamHI)克隆在 pcDNA3(Invitrogen, 包含 CMV IE 启动子/聚连接物/polyA 序列)的 BamHI 和 HindIII 位点之间。然后用 NruI 和 BbsI 切割 CMV IE 启动子/lacZ/polyA 盒,并插入到 pNot 3.5 中的 BstXI 位点内。取向: LAT P1/LAT P2/CMV/lacZ/polyA。

实施例 3 - 17+/D27/pR20 的构建

用纯化的 17+/D27w 基因组 DNA 与质粒 pR20 共转染到 B130/2 细胞内, 然后 X-gal 染色后选择蓝噬斑, 来产生病毒毒株 17+/D27/pR20. pR20 是通过将 LAT P2/CMV IE 启动子/lacZ/polyA 盒(来自 pR19lacZ 的 PstI-SrfI. SrfI 位点恰好在 pNot 3.5 内 BstXI 位点后。)插入到 pDMN 内而获得的. pDMN 通过缺失克隆在 pACYC184(NBL)内的 HSV1 基因组的 EcoRI B 片段的 NotI/XmnI 片段, 留下包含 ICP27 基因和侧翼序列 (HSV1 毒株 17+核苷酸 11095-118439) 进行制备. 通过 MluI 消化和再连接除去一对编码整个 ICP27 编码序列的 MluI 片段与非必需基因 UL55 和 56(核苷酸 113273-116869). 然后在 MluI 位点插入 LAT P2/CMV IE 启动子/lacZ/polyA 盒.

实施例 4 - 1764/pR20.9 的构建

用纯化的 1764 基因组 DNA 与质粒 pR20.9/43 共转染, 使得 pR20.9 盒插入在病毒毒株 1764 的 UL43 基因内从而产生病毒毒株 1764-pR20.9. 该构建体包含两个异源基因, 第一基因绿色荧光蛋白 (GFP) 处于 MMLV LTR 启动子的控制下, 而第二基因 lacZ 处于 LAT p1 启动子的控制下. 它们以相反的方向位于 LAT P2 区域的侧翼, 这样各基因 (lacZ 和 GFP) 从中心位置的 LAT P2 区开始以相反的方向转录.

质粒 pR20.9/43 由下列步骤进行构建:

(i) 将 GFP 插入在质粒 pcDNA3(Invitrogen)内, 其通过用 AgeI 和 NotI 切割下质粒 pEGFP-N1(Clontech)的 GFP 基因并将其插入到质粒 pcDNA3 的 EcoRI 和 NotI 位点之间来完成, 这样得到质粒 pcDNA3GFP. GFP 基因的起始处定位在 CMV 启动子之后.

(ii) 将来自 pJ4(NheI-Hind III)的 MMLV 启动子插入到 pcDNA3GFP 的 BamHI 位点内的, 得到了 pcMMLVGFP, 其中 pJ4 的 NheI 位点位于 CMV 启动子之后.

(iii) 将来自 pcMMLVGFP 的 MMLV/GFP/pA 盒插入到 pNot3.5 内, 其通过用 HindIII 和 BbsI 进行切割并插入在 pNot3.5 的 BstXI 位点之间(即在 LAT P2 序列之后)而完成, 其中 MMLV 启动子位于 LAT P2 区之后, 这样得到了质粒 p3.5MG.

(iv) 将来自 Ddel-StyI 的 LAT P1 启动子(nt 118,179-118,877)插

入在 pGem5(Promega)的 EcoRV 和 SpeI 位点之间(方向: StyI 连接 EcoRV, DdeI 连接 SpeI), 得到 pGemSPI.

(v) 将来自 pCH110(Pharmacia)的 lacZ(HindIII-BamHI)插入在 pGEM5PI 的 NcoI 位点内(方向: HindIII 在 LAT P1 序列之后), 得到 pPl/lacZ.

(VI) 将编码一个 SrfI 位点(5'-GCCCCGGCCATG)的寡核苷酸插入在 pPl/lacZ 的 SphI 位点内, 得到 pPl/lacZSrf.

(vii) 将来自 p3.5MG 的 LAT P2/MMLV/GFP/pA 盒(PstI 片段)插入在 pPl/lacZSrf 的 NsiI 位点内, 其中来自 p3.5MG 的 LAT P2 区位于 pPl/lacZSrf 的 LAT P1 区之后, 得到质粒 pR20.9.

(viii) 将 pR20.9 盒插入在 UL43 侧翼区中, 其通过用 SrfI 切割并插入在 p35 唯一的 NsiI 位点内而完成, 得到 pR20.9/43. p35 含有克隆在 pGem1(Promega)内的 HSV1 nts 91,610-96,751(BamHI-EcoRI).

15 实施例 5 - 用 1764/pR14/TH 接种小鼠/大鼠 外周神经系统

通过爪垫接种小鼠(1×10^7 pfu), 接着处死小鼠并解剖腰背根神经节来检测 1764/pR14. 用标准方法(Coffin 等, 1996)进行固定和 X-gal 染色, 随后分别在 2 天, 2 周, 1 个月和 2 个月(检测的最长时间)可观察到腰神经节 L4 和 L5 处为蓝色, 这表明了长期的启动子活性.

20 中枢神经系统

在给大鼠纹状体(200-220g 路易斯大鼠)进行趋实体性接种($2 \mu\text{l}$ 5×10^5 pfu)后, 接着分别在 2 天, 2 周, 1 个月和 2 个月(检验的最长时间)进行固定和 X-gal 染色后, 1764/pR14 为蓝色. 这再次表明长期的启动子活性.

25 实施例 6 - 用 17+/D27/PR19 接种大鼠 中枢神经系统

在给大鼠纹状体(200-220g 路易斯大鼠)进行趋实体性接种($2 \mu\text{l}$ 5×10^6 pfu)后, 并分别在 2 天, 2 周, 1 个月和 2 个月(检验的最长时间)进行固定和 X-gal 染色后, 17+/D27/pR19 显示了强的蓝色. 这表明 CMV IE 启动子当放置在 LAT P2 之后时, 能象 MMLV LTR 一样显示出长期活性.

实施例 7 - 用 17+/D27/pR20 接种大鼠

中枢神经系统

在给大鼠纹状体(200-220g 路易斯大鼠)进行趋实体性接种($2\mu\text{l}$ $5\times 10^6\text{pfu}$)后,并分别在2天,2周,1个月(检验的最长时间)进行固定和 X-gal 染色后,17+/D27/pR20 也显示了强的蓝色。重要地是,这表明当插入在疱疹基因组中的其它位置时(即不在 LAT 区域内),LAT P2 能使邻近的启动子具有长期活性。

实施例 8 - 用 1764/pR20.9 接种小鼠

外周神经系统

通过爪垫接种小鼠($1\times 10^7\text{pfu}$),接着处死小鼠并解剖腰背根神经节来检测 1764/pR20.9。固定后在荧光显微镜(荧光光学设备)下能观察到在腰神经节 L4 和 L5 处(以及较低程度在其它 DRG 中)有强的绿色荧光, X-gal 染色后在2天,2周,1个月和2个月(检测的最长时间)时在相同细胞中可观察到蓝色。这表明两个启动子在长时间内均处于激活状态,并显示了利用本发明的盒可有效地表达成对基因。

参 考 文 献

1. Coffin RS 和 LatchmDS. 以单纯疱疹病毒为基础的载体,在 LatchmDS (编辑)神经系统的遗传操作中,学院出版社: 伦敦, 1996, pp 99-114.
2. MacLeAR 等与 Glasgow 毒株 17+的早期基因 I 和'a'序列之间的序列相关的单纯疱疹病毒类型 I 缺失变体 1714 和 1716 小神经痘苗, 遗传病毒学杂志 1991; 72: 632-639.
3. Morgenstem JP 和 Land H. 一系列哺乳动物的表达载体以及在稳定与短暂感染的细胞中它们对报导基因表达的鉴定 NAR 1990.; 18: 1068.
4. Sekulovich RE 等, 1988, 病毒学杂志 64: 3916-3926.
5. Ace C 等不能逆诱导早期基因表达的单纯疱疹病毒类型 I 变体的构建和特征, 病毒学杂志 1989; 63: 2260-2269.
6. McFarlane M, Daksis JI, Preston CM. 无 VMW65 的逆诱导情况下环己烷二乙酰胺刺激单纯疱疹病毒早期基因表达, 遗传病毒学杂志 1992; 73: 285-292.

-
7. Rice, SA 和 knipe DM, 1990, 病毒学杂志 64: 1704-1715.
 8. Chou, J., Poon, APW, Johnson, J. 和 RoiznB. 人类细胞对单纯疱疹病毒的 $y_134.5$ 基因中的缺失和终止密码子的差别效应, 病毒学杂志 1994; 68: 8304-8311.
 - 5 9. Smith, IL 等, 1992, 病毒学 186: 74-86.
 - 10 10. Coffin RS 等, 1996, 基因治疗 3: 886-891.
 11. Chou, J. 和 Roiznan, B. 单纯疱疹病毒的 $y_134.5$ 基因阻止成神经细胞瘤细胞引起神经元细胞中程序性细胞死亡的蛋白质合成特征的全部关闭, PNAS 1992; 89: 3266-3270.
 12. Gossen M 和 Bujard H, 1992, PNAS 89: 5547-5551.
 13. Gossen M 等, 1995, 科学 268: 1766-1769.
 14. Sambrook 等, 1989, 分子克隆-实验手册. 冷泉港出版社.
 15. Goins, W. F. 等, 1994, 病毒学杂志 68: 2239-2252.