



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102886052 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 30

(21) 申请号 201210365694. X

(22) 申请日 2007. 09. 12

(30) 优先权数据

60/844, 351 2006. 09. 14 US

(62) 分案原申请数据

200780042395. X 2007. 09. 12

(73) 专利权人 迈德詹尼克斯医疗以色列有限公司

地址 以色列米斯加卜

(72) 发明人 A·L·珀尔曼

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 刘鸿林 张晓威

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006. 01)

A61K 47/46 (2006. 01)

A61P 7/06 (2006. 01)

A61P 31/00 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1612717 A, 2005. 05. 04, 摘要、权利要求书, 说明书 2-3 页、5-6 页、22-23 页, 实施例 1-7, 图 14-19.

CN 1816280 A, 2006. 08. 09, 全文.

WO 03006669 A3, 2004. 03. 04, 全文.

CHIQU et al. "Gene therapy strategies for the treatment of chronic viral hepatitis". 《Expert Opinion Biol. Ther. 》. 2001, 第 1 卷 (第 4 期),

CHEN et al. "Adeno-associated virus mediated interferon-gamma inhibits the progression of hepatic fibrosis in vitro and in vivo". 《World J Gastroenterol》. 2005, 第 11 卷

审查员 董桂灵

权利要求书1页 说明书36页
序列表22页 附图7页

(54) 发明名称

长效药物制剂

(57) 摘要

本发明涉及长效药物制剂及其用于制备在持续的时间内向有需要的个体提供治疗性多肽的药物的用途;所述治疗制剂包含经遗传修饰的微器官,其中所述微器官是用辅助病毒依赖型腺病毒载体体外转导的真皮微器官,所述载体包含与一个或多个调节序列可操作地连接的编码治疗性多肽的核酸序列,其中所述一个或多个调节序列包含 CAG 启动子,其中将所述微器官离体保存在培养基中 1-8 周的时间,其中所述治疗性多肽选自红细胞生成素和干扰素 α , 并且其中在植入所述长效制剂后,所述制剂:a. 将所述治疗性多肽在血清中的表达水平比植入前的基础水平提高,所述提高维持超过一个月;和/或 b. 将功能标记比基础水平提高至少 5%。

1. 长效治疗制剂用于制备在持续的时间内向有需要的个体提供治疗性多肽的药物的用途；所述治疗制剂包含经遗传修饰的微器官，其中所述微器官是用辅助病毒依赖型腺病毒载体体外转导的真皮微器官，所述载体包含与一个或多个调节序列可操作地连接的编码治疗性多肽的核酸序列，其中所述一个或多个调节序列包含 CAG 启动子，其中将所述微器官离体保存在培养基中 1-8 周的时间，其中所述治疗性多肽选自红细胞生成素和干扰素 α ，并且其中在植入所述长效制剂后，所述制剂：

a. 将所述治疗性多肽在血清中的表达水平比植入前的基础水平提高，所述提高维持超过一个月；和 / 或

b. 将功能标记比基础水平提高至少 5%。

2. 权利要求 1 的用途，其中所述调节序列还包含 SV40 多聚腺苷酸化序列。

3. 权利要求 1 的用途，其中所述干扰素 α 是干扰素 α 2b。

4. 权利要求 1 的用途，其中编码红细胞生成素的所述核酸序列被优化，以使所述长效制剂在植入后提供所述个体中提高的血细胞比容水平、所述个体中所述提高的血细胞比容水平的提高的持续时间、或它们的组合。

5. 权利要求 4 的用途，其中所述优化的核酸序列是 SEQ ID No:1。

6. 权利要求 1 的用途，其中编码干扰素 α 的所述核酸序列被优化以提高干扰素 α 的水平、提高所述干扰素 α 的水平的持续时间、或它们的组合。

7. 权利要求 6 的用途，其中所述优化的核酸序列是 SEQ ID No:2。

长效药物制剂

[0001] 本申请是 2007 年 9 月 12 日提交的发明名称为“长效药物制剂”的中国专利申请 200780042395. X 的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及长效治疗制剂及其使用方法,所述制剂包含含有载体的经遗传修饰的微器官,所述载体包含与一个或多个调节序列可操作地连接的编码治疗性多肽如红细胞生成素或干扰素 α 的核酸序列。

[0003] 发明背景

[0004] 治疗剂可以口服、经皮、通过吸入、通过注射或通过缓释贮库递送。然而,递送方法受限于药剂在接受者中经历的过程、频繁给药的需要和对可用分子尺寸的限制。对于一些方法,治疗剂的量在给药间变化。

[0005] 涉及将期望的核酸序列/片段亚克隆到载体中(所述载体随后用于修饰特定宿主细胞,所述宿主细胞应产生所需的蛋白质以用于进一步纯化步骤)的蛋白质生成技术在表达的蛋白质的量、蛋白质分泌、翻译后修饰(例如糖基化和蛋白质的精确折叠)等方面受到限制。而且,即使能够获得高水平的蛋白质生成,之后也必须产生大量的重组蛋白并纯化至不含污染物。纯化路线的开发是非常漫长的过程。而且一旦获得纯化的重组蛋白,就必须进行进一步配制以使其稳定和可接受地引入动物或人类中。此外,即使经配制,纯化的重组蛋白仍然由于保持和储存限制而具有有限的贮存期限;因此经常需要反复纯化和配制更多的蛋白质。开发适当制剂的过程也是耗时、困难和昂贵的。

[0006] 因此,广泛认识到需要长效的基于蛋白质的治疗分子,其具有必需的翻译后修饰以保留它们的生物活性,其可被便宜且快速地制备,而不需要通常与获得高水平重组蛋白相关的辛苦且昂贵的方法。

[0007] 一些研究者已试图通过基因治疗获得重组基因产物的体内表达。通常将病毒载体用于体内转导细胞以表达重组基因产物。这些基于病毒的载体具有有益的特性,例如感染靶组织的天然能力。然而,基于逆转录病毒的载体需要在靶组织的基因组内整合以允许重组产物表达(具有激活固有癌基因的潜能)并且只能用于转导活跃分裂的组织。病毒载体通常也不能经受长期转基因表达,这可能至少部分是由于它们因再次宿主免疫应答而被消除。

[0008] 因此,本领域仍然需要具有持续几周或更长时间的一贯高表达水平的重组基因产物制剂和使用那些制剂来治疗疾病的方法。

[0009] 发明概述

[0010] 在一个实施方案中,本发明提供包含经遗传修饰的微器官的长效治疗制剂,所述微器官包含含有与一个或多个调节序列可操作地连接的核酸序列的载体,其中所述核酸序列编码治疗性多肽,从而所述制剂将所述治疗性多肽的表达水平比基础水平提高超过 5%,且所述提高维持超过一个月。在一个实施方案中,所述载体是辅助病毒依赖型腺病毒载体(helper-dependent adenovirus vector)。在一个实施方案中,所述治疗性多肽是红细胞

生成素,而在另一实施方案中,所述治疗性多肽是干扰素 α ,在一个实施方案中所述干扰素 α 为干扰素 α 2b。

[0011] 在另一实施方案中,本发明提供在持续的时间内向有需要的个体提供治疗性多肽的方法,所述方法包括:提供一个或多个遗传修饰的微器官,所述微器官包含含有与一个或多个调节序列可操作地连接的核酸序列的载体;并将所述经遗传修饰的微器官植入所述个体中,其中所述核酸序列编码治疗性多肽,从而所述制剂将所述治疗性多肽的表达水平比基础水平提高超过5%,并将所述提高维持超过一个月。在一个实施方案中,所述载体是辅助病毒依赖型腺病毒载体。在一个实施方案中,所述治疗性多肽是红细胞生成素,而在另一实施方案中,所述治疗性多肽是干扰素 α ,在一个实施方案中所述干扰素 α 为干扰素 α 2b。在另一实施方案中,有需要的个体患有贫血。在另一实施方案中,有需要的个体患有感染。在另一实施方案中,有需要的个体患有癌症。

[0012] 在另一实施方案中,本发明提供与 SEQ ID No:1 的同源性超过85%的核酸序列、包含这样的核酸序列的载体、以及包含这样的载体的细胞。

[0013] 在另一实施方案中,本发明提供与 SEQ ID No:2 的同源性超过85%的核酸序列、包含这样的核酸序列的载体、以及包含这样的载体的细胞。

[0014] 附图简述

[0015] 图1显示由本发明的制剂体外产生的重组优化的人干扰素 α (IFN α) 的水平。

[0016] 图2显示由本发明的制剂体外产生的重组人红细胞生成素 (hEPO) 的水平。HD-Ad-CAG-wt-hEPO GMMO 滴定法 (A)。以 HD-Ad-CAG-wt-hEPO 病毒:1:25;1:100 和 1:1000 稀释度的递增稀释度转导微器官。将 Ad5/CMV/wt-hEPO 稀释成 1:10 和 1:50 的工作浓度。由两种不同皮肤 H-1 和 H-2 产生的 GMMO 之间的比较 (B)。以 HD-Ad-CAG-wt-hEPO 1:25 转导微器官。条形指示通过 ELISA 测量的在每 3-4 天收集和替换的培养基中的 hEPO 浓度。

[0017] 图3显示得自包含表达 EPO 的无肠腺病毒的优化制剂和包含表达 EPO 的腺病毒-5 的微器官的峰值体外红细胞生成素 (EPO) 表达水平的百分数。用 HD-Ad-CAG-hEPO 以 1:25 或用 Ad5/CMV/hEPO 以 1:10 转导微器官。

[0018] 图4显示得自包含优化的和非优化的表达 EPO 的无肠腺病毒的制剂的体外红细胞生成素 (EPO) 表达水平。以 1:100 病毒颗粒的工作稀释度转导微器官。条形指示通过 ELISA 测量的在每 3-4 天收集和替换的培养基中的 hEPO 浓度。

[0019] 图5显示得自包含 CAG 或 CMV 启动子下游的表达 EPO 的无肠腺病毒的制剂的体外红细胞生成素 (EPO) 表达水平。

[0020] 图6显示由本发明的制剂在 SCID 小鼠体内 (A) 和体外 (B) 产生的重组人红细胞生成素的水平和血细胞比容的相关变化 (A)。用 GMMO 对十只小鼠/组进行皮下植入。显示在用腺病毒-hEPO、辅助病毒依赖型腺病毒-hEPO 和辅助病毒依赖型腺病毒-优化 hEPO 转导的 GMMO 和用非转导的 GMMO 植入的小鼠血清中测量的 hEPO 水平 (mU/ml) 和相应的血细胞比容 %。每 10 天进行抽血 (A)。通过离心法测量血细胞比容并通过 hEPO ELISA 试剂盒测量血液中的血清 hEPO 水平。将未植入的 GMMO 保留在培养基中并测量 EPO 的水平 (B)。

[0021] 发明详述

[0022] 在一些实施方案中,本发明涉及长效治疗制剂及其使用方法,所述制剂包含含有载体的经遗传修饰、基于组织的微器官,所述载体包含与一个或多个调节序列可操作地连

接的编码治疗性多肽如红细胞生成素或干扰素 α 的核酸序列。

[0023] 在一个实施方案中,本发明提供包含经遗传修饰的微器官的长效治疗制剂,所述微器官包含含有与一个或多个调节序列可操作地连接的核酸序列的载体,其中所述核酸序列编码治疗性多肽,从而所述治疗性多肽的表达水平比基础水平提高超过 5%,且所述提高维持超过一个月。在另一实施方案中,所述治疗性多肽的表达水平比基础水平提高超过 5%,且所述提高维持超过六个月。

[0024] 在另一实施方案中,本发明提供包含经遗传修饰的微器官的长效治疗制剂,所述微器官包含含有与一个或多个调节序列可操作地连接的核酸序列的载体,其中所述核酸序列编码治疗性多肽,从而所述治疗性多肽的表达水平比基础水平提高超过 5%,所述提高维持超过一个月,且其中所述载体是辅助病毒依赖型腺病毒载体。

[0025] 在另一实施方案中,本发明提供包含经遗传修饰的微器官的长效治疗制剂,所述微器官包含含有与一个或多个调节序列可操作地连接的核酸序列的载体,其中所述核酸序列编码治疗性多肽,从而所述治疗性多肽的表达水平比基础水平提高超过 5%,且所述提高在免疫活性宿主中维持超过一个月。

[0026] 在另一实施方案中,本发明提供包含经遗传修饰的微器官的长效治疗制剂,所述微器官包含含有与一个或多个调节序列可操作地连接的核酸序列的载体,从而所述治疗性核酸的表达水平比基础水平提高超过 5%。在一个实施方案中,所述治疗性核酸在免疫活性宿主中的表达水平比基础水平提高超过 5%,而在另一实施方案中,所述载体是辅助病毒依赖型腺病毒载体。

[0027] 在一个实施方案中,本发明提供长效治疗制剂及其使用方法,其中所述制剂包含经遗传修饰的微器官。在一个实施方案中,用于本文的术语“微器官”在一个实施方案中指源自外植块或与外植块相同的分离的组织或器官结构,所述外植块通过有益于细胞生存和功能的方式制得。在一个实施方案中,微器官保持至少一些与获得它的组织或器官相似的体内结构,或者在另一实施方案中保持至少一些与获得它的组织或器官相似的体内相互作用。在另一实施方案中,微器官保留它们的来源组织或器官的微结构和三维结构并具有选定的维度,以允许充足的养分和气体被动扩散到微器官的细胞内,使细胞废物扩散到微器官的细胞外,从而使由不足的营养和 / 或废物的蓄积所致的细胞毒性和伴随的细胞死亡最小化。在一个实施方案中,微器官是一条真皮组织。

[0028] 在一个实施方案中,微器官的直径为 1-2mm,长度为 30-40mm。在另一实施方案中,微器官的直径可为例如 1-3mm、1-4mm、2-4mm、0.5-3.5mm 或 1.5-10mm。在另一实施方案中,微器官的直径可为例如大约 2mm 或大约 1.5mm。在另一实施方案中,所述微器官的长度可为 5-100mm、10-60mm、20-60mm、20-50mm、20-40mm、20-100mm、30-100mm、40-100mm、50-100mm、60-100mm、70-100mm、80-100mm 或 90-100mm。在另一实施方案中,所述微器官的长度可为大约 20mm、大约 30mm、大约 40mm 或大约 50mm。在一个实施方案中,微器官小于 1.5cm^2 ,且在另一实施方案中小于 1cm^2 。在另一实施方案中,所述直径小于 1.5cm,且在另一实施方案中,所述长度小于 1.5cm。

[0029] 在一个实施方案中,微器官是外植块。在一个实施方案中,微器官源自组织。在另一实施方案中,微器官是组织的切片或部件或部分。在另一实施方案中,微器官是器官的切片或部件或部分。微器官可以不同于皮移植物,在一个实施方案中,不同之处在于微器官被

特别设计成在体内和体外长时间存活,在另一实施方案中,不同之处在于微器官的维度是特定选择的,以允许充足的养分和气体被动扩散到微器官的细胞内并使细胞废物扩散到所述微器官的细胞外,在一个实施方案中使由不足的营养和 / 或废物的蓄积所致的细胞毒性和伴随的细胞死亡最小化。因此,在一个实施方案中,微器官不是皮移植体。在另一实施方案中,微器官可以不同于离体细胞的集合,在一个实施方案中,所述离体细胞的集合生长在天然或人造支架上,不同之处在于微器官保持着它们的来源组织或器官的微结构和三维结构。因此,在一个实施方案中,微器官不是支架上生长的一种或多种细胞类型。

[0030] 微器官的详细描述可以在 US-2003-0152562 中找到,该文献全文纳入本文作为参考。

[0031] 较早的专利 (WO 03/006669、WO 03/03585、WO 04/0993631,它们被纳入本文作为参考) 描述了微器官,它们可以被修饰以表达相关的基因产物,所述微器官可按自主功能态在机体外维持延长的时间段,然后可以被植入皮下或所述机体内的其他位置以治疗疾病或病症。然而,本发明的微器官意外地显示出相关基因产物在体外和体内的长得多的表达特征。

[0032] 用于本文时,术语“外植块”在一个实施方案中指从其在生物中的天然生长位点中取出并在培养基中放置一段时间的组织或器官或其部件。在一个实施方案中,所述组织或器官是有活力的,在另一实施方案中是代谢活性的或它们的组合。

[0033] 用于本文时,术语“微结构”在一个实施方案中指外植块的特性,其中组织外植块的一些或所有细胞和它们在体内处于物理和 / 或功能性接触的至少一种细胞或非细胞物质保持物理和 / 或功能性体外接触。

[0034] 在另一实施方案中,微器官外植块保持它们的来源组织或器官的三维结构。在一个实施方案中,微器官外植块保留它们的来源组织的空间相互作用如细胞-细胞、细胞-基质和细胞-间质相互作用,并保留所述组织的取向。在一个实施方案中,如上所述的空间相互作用的保持允许外植块生物学功能的维持,例如自分泌和旁分泌因子和其他胞外刺激物的分泌,它们在一个实施方案中为外植块提供长期存活力。在一个实施方案中,所述微器官外植块的至少一些细胞与它们在体内与之处于物理和 / 或功能性接触的至少一种细胞或非细胞物质在体外保持它们的物理和 / 或功能性接触。在一个实施方案中,一些细胞指细胞总体的至少约 50%,在另一实施方案中指至少约 60%,在另一实施方案中指至少约 70%,在另一实施方案中指至少约 80%,在另一实施方案中指至少约 90% 或更多。在另一实施方案中,所述外植块的细胞保持着它们从中分离的器官或组织的至少一种生物学活性。

[0035] 在一些实施方案中,本发明的任何制剂会包含本文所述的任何形式或实施方案的经遗传修饰的微器官。在一些实施方案中,本发明的任何制剂会由本文所述的任何形式或实施方案的经遗传修饰的微器官组成。在一些实施方案中,本发明的任何组合物会主要由本文所述的任何形式或实施方案的经遗传修饰的微器官组成。在一些实施方案中,术语“包含”指包括提到的活性剂如经遗传修饰的微器官,以及包括制药工业已知的其他活性剂和药学可接受的运载体 (carrier)、赋形剂、润湿剂、稳定剂等。在一些实施方案中,术语“主要由……组成”指组合物的仅有活性成分是提到的活性成分,然而,可以包括其他化合物来使所述制剂稳定、防腐等,但其他化合物不直接涉及提到的活性成分的治疗效果。在一些实施方案中,术语“主要由……组成”可指促进活性成分释放的组分。在一些实施方案中,术

语“由……组成”指包含活性成分和药学可接受的运载体或赋形剂的组合物。

[0036] 类似地,在一些实施方案中,本发明和用于本发明方法中的载体包括与一个或多个调节序列可操作地连接的核酸序列,其中所述核酸序列编码治疗性多肽。在另一实施方案中,所述载体主要由这样的核酸序列组成,且在另一实施方案中,所述载体由这样的核酸序列组成。

[0037] 可以从分离微器官的哺乳动物的实例包括人类和其他灵长类、诸如完全或部分近亲繁殖的猪(例如雏型猪和转基因猪)、啮齿动物等。微器官可以由许多器官的组织加工而得,在一个实施方案中所述器官为皮肤、真皮、淋巴系统、胰腺、肝、胆囊、肾、消化道、呼吸道、生殖系统、尿道、血液、膀胱、角膜、前列腺、骨髓、胸腺、脾或它们的组合。来自这些器官的外植块可以包括朗氏细胞岛、毛囊、腺体、上皮和结缔组织细胞或者其微结构排列与从中获得外植块的器官的微结构排列相似的组合。在一个实施方案中,可以使用本领域已知的材料、仪器和/或方法在微器官中辨别或识别从中获得外植块的器官的微结构。

[0038] 在一个实施方案中,本发明提供包含经遗传修饰的微器官的制剂及其使用方法。在一个实施方案中,术语“经遗传修饰的微器官”或“GMMO”指表达至少一种重组基因产物的微器官。在其他实施方案中,提到微器官不一定指未经遗传修饰的微器官,但在一些情况下也可以指经遗传修饰的微器官,正如本领域技术人员会由上下文清楚这一点。在一个实施方案中,短语“基因产物”指蛋白质、多肽、肽和功能性 RNA 分子。在一个实施方案中,由所述核酸分子编码的基因产物是要应用于个体的所需基因产物。这样的基因产物的实例包括通常由接收个体的细胞产生的蛋白质、肽、糖蛋白和脂蛋白。在一个实施方案中,所述基因产物并非天然存在于从中收集微器官的生物中和/或存在于植入 GMMO 的生物中,而在另一实施方案中,所述基因产物是天然存在的。在一个实施方案中,所述 GMMO 的基因产物与由微器官的一个或多个细胞内源性表达的基因产物相似或相同。在一个实施方案中,遗传修饰提高非遗传修饰的微器官会产生的基因产物的水平。在另一实施方案中,由 GMMO 表达的基因产物与由微器官的一个或多个细胞内源性表达的基因产物不相似或相同。在另一实施方案中,由所述核酸分子编码的基因产物直接或间接地控制相关基因表达的分子。在另一实施方案中,由所述核酸分子编码的基因产物上调或下调要应用于个体的所需基因产物的表达水平。

[0039] 在另一实施方案中,微器官的遗传修饰可以修改内源基因的表达。这可以通过例如引入增强子、或用于控制内源基因表达的可抑制或可诱导的调控元件来实现。

[0040] 本领域已知的任何方法学均可用于遗传改变所述微器官外植块。可以使用本领域已知的许多不同载体中的任何一种,例如病毒载体、质粒载体、线状 DNA 等,来将编码治疗剂的外源性核酸片段引入靶细胞和/或组织内。可以使用例如感染、转导、转染、磷酸钙介导的转染、DEAE-右旋糖介导的转染、电穿孔、脂质体介导的转染、遗传转化(biolistic)基因递送、使用成融和阴离子型脂质体的脂质体基因递送(这是使用阳离子型脂质体的替代方法)、直接注射、受体介导的摄取、磁穿孔(magnetoporation)、超声或它们的任何组合,以及本领域已知的其他技术插入这些载体(关于进一步的细节,参见例如“Methods in Enzymology”Vol. 1-317, Academic Press, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F. M. 等人 (eds.) Greene Publishing Associates, (1989) 和 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, Sambrook 等人 Cold Spring Harbor Laboratory

Press, (1989), 或其他标准实验室手册)。有关的多核苷酸片段编码序列可以被捆绑到适合转导哺乳动物细胞和适合指导重组产物在转导细胞内表达的表达载体系统中。通过将载体引入微器官附近来实现外源性核酸片段的引入。一旦已经使用上文所述或本领域已知的任何技术将外源性核酸片段引入细胞内, 将可以定量由核酸片段编码的治疗剂的产量和 / 或分泌速率。在一个实施方案中, 术语“外源性”指源自外部的物质, 例如源自细胞或组织外部的核酸。

[0041] 在一个实施方案中, 本发明制剂和方法中的微器官包含载体, 在一个实施方案中所述载体促进重组基因表达。在一个实施方案中, 所述载体是非免疫原性基因转移剂如非病毒载体 (例如 DNA 质粒或小环 DNA)、“无肠”病毒载体, 即没有内源基因 (其在一个实施方案中是由于缺失, 而在另一实施方案中是由于在阻止基因表达的基因中的插入、取代或缺失)、辅助病毒依赖型腺病毒 (HDAd) 载体或腺伴随病毒 AAV (在一个实施方案中为单链, 在另一实施方案中为双链)。在另一实施方案中, 选择所述制剂, 使得重组基因表达导致缺少由微器官的基因产物引起的毒性或免疫介导的排斥。在一个实施方案中, 所述载体是源自病毒的, 在另一实施方案中, 所述载体是质粒。在一个实施方案中, 所述源自病毒的载体源自腺病毒, 在一个实施方案中所述腺病毒是辅助病毒依赖型腺病毒, 而在另一实施方案中, 所述源自病毒的载体源自腺病毒相关的载体, 如下文所述。

[0042] 在一个实施方案中, 术语“载体”或“表达载体”指运载体分子, 核酸序列可以插入其中以被引入能够进行复制的细胞内。在一个实施方案中, 所述核酸分子被转录成 RNA, 然后 RNA 在一些情况下被翻译成蛋白质、多肽或肽。在其他情况下, RNA 序列不被翻译, 例如在反义分子或核酶的产生中。在一个实施方案中, 表达载体可以包含各种“控制序列”, 所述控制序列指特定宿主细胞内可操作地连接的编码序列的转录和可能翻译所必需的核酸序列。在另一实施方案中, 载体还包括复制源。在一个实施方案中, 所述载体可以是穿梭载体, 在一个实施方案中穿梭载体可以在原核细胞和真核细胞两者内繁殖, 或者在另一实施方案中, 所述载体可以被构建成推动它整合到所选生物的基因组内。在其他实施方案中, 所述载体可以是例如质粒、杆粒、噬粒、粘粒、噬菌体、病毒或人工染色体。在一个实施方案中, 所述载体是病毒载体, 在一个实施方案中可以是噬菌体、哺乳动物病毒或植物病毒。

[0043] 在一个实施方案中, 所述病毒载体是腺病毒载体。在另一实施方案中, 所述腺病毒载体可以是任何已知的血清型或亚型。

[0044] 在一个实施方案中, 使用腺病毒作为基因转移载体的一些优点是: 它的中等大小的基因组、易于操作、高滴定度、靶细胞范围广和高感染性。腺病毒基因组的两端包含 100-200 个碱基对反向重复序列 (ITRs), 它们是病毒 DNA 复制和包装所必需的顺式元件。基因组的早期 (E) 区和晚期 (L) 区包含通过病毒 DNA 复制的发生而分开的不同转录单位。E1 区 (E1A 和 E1B) 编码负责调节病毒基因组和少数细胞基因的转录的蛋白质。E2 区 (E2A 和 E2B) 的表达导致用于病毒 DNA 复制的蛋白质的合成。这些蛋白质涉及 DNA 复制、晚期基因表达和宿主细胞关闭。晚期基因的产物, 包括大多数病毒壳体蛋白, 只在显著处理过由主要晚期启动子 (MLP) 造成的单次前转录之后表达。MLP (位于 16.8m. u.) 在感染的晚期过程中特别有效, 且由该启动子引发的所有 mRNA 均具有 5' - 三联前导序列 (TPL), 这使它们成为翻译的优选 mRNA。

[0045] 在另一实施方案中, 所述腺病毒载体是辅助病毒依赖型腺病毒载体, 在另一实施

方案中这与无肠、肠化 (guttled)、最小、完全缺失、高容量、 Δ 或假腺病毒同义,在另一实施方案中缺失所有病毒编码序列,除了支持 DNA 复制的序列,所述支持 DNA 复制的序列在一个实施方案中包括腺病毒末端反向重复序列和包装序列 (ψ)。在另一实施方案中,辅助病毒依赖型腺病毒载体不表达病毒蛋白质。在一个实施方案中,辅助病毒依赖型腺病毒载体只包括复制和包装载体 DNA 所需的腺病毒的顺式作用元件。在一个实施方案中,辅助病毒依赖型腺病毒载体包括大约 500bp 野生型腺病毒序列。在另一实施方案中,所述腺病毒载体还包括填充 DNA 以符合基因组尺寸为 27.7kb 的最小要求,在一个实施方案中需要填充 DNA 以有效地包装到腺病毒壳体内。在一个实施方案中,使用具有最小重复序列的非编码哺乳动物 DNA 作为填充 DNA。在另一实施方案中,填充 DNA 包括非哺乳动物 DNA,在一个实施方案中为非哺乳动物 DNA 为 HPRT 和 / 或 C346 粘粒序列。

[0046] 在一个实施方案中,辅助病毒依赖型腺病毒显示高效的体内转导、高水平的转基因表达,能够保持长期转基因表达,在一个实施方案中是通过避免由病毒蛋白质的残余表达引起的慢性毒性实现的,或其组合。在另一实施方案中,辅助病毒依赖型腺病毒具有高滴定度生成、有效感染的细胞类型广、具有感染分裂中和非分裂中的细胞的能力或它们的组合。在另一实施方案中,用于本发明方法的辅助病毒依赖型腺病毒不诱导对植入微器官的强烈适应性免疫应答,在一个实施方案中其特征在于产生腺特异性 MHC I 型来限制免疫活性宿主中的 CD8 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL),在一个实施方案中这将限制转基因表达的持续时间,在另一实施方案中这会导致腺病毒载体在几周内清除。在另一实施方案中,用于本发明方法的辅助病毒依赖型腺病毒不诱导高细胞毒性 T 细胞水平 (在一个实施方案中可以通过本领域已知的正 CD8 染色测量),在另一实施方案中不诱导高辅助性 T 细胞水平 (在一个实施方案中可以通过本领域已知的正 CD4 染色测量)。

[0047] 在另一实施方案中,辅助病毒依赖型腺病毒具有较低的种系传播和插入诱变的危险,这可能引起致癌性转化,因为所述载体基因组不整合到宿主细胞染色中。在一个实施方案中,辅助病毒依赖型腺病毒的克隆容量特别大 (在一个实施方案中为大约 37kb,在另一实施方案中为大约 36kb),这允许递送整个基因座、多个转基因和大的顺式作用元件以提高、延长和调整转基因表达。

[0048] 在一个实施方案中,用于本发明组合和方法中的辅助病毒依赖型腺病毒系统与 Palmer 和 Ng, 2003 (Mol Ther 8:846) 以及 Palmer 和 Ng, 2004 (Mol Ther 10:792) 中所述类似,这些文献据此全文纳入本文作为参考。在一个实施方案中,在辅助病毒依赖型腺病毒系统的辅助病毒组分的 E3 区内插入填充序列,以使所述辅助腺病毒和所述辅助病毒依赖型腺病毒之间的重组最小化,以产生增殖型腺病毒。

[0049] 在一个实施方案中,本发明的包含辅助病毒依赖型腺病毒载体的制剂显示出 EPO 和 IFN- α 的长期、高体外 (图 1、2 和 6B) 和体内 (图 6A) 表达水平。在另一实施方案中,本发明的包含辅助病毒依赖型腺病毒载体的制剂与包含腺病毒 -5 的微器官相比在转导后至少 100 天内显示峰值表达 EPO 水平的升高百分比 (图 3)。不受限于理论,可能促成本发明微器官的长效、高水平基因表达产物的一个因素是使用了辅助病毒依赖型腺病毒,它在本发明的制剂中对组织无毒和无免疫原性。

[0050] 在另一实施方案中,所述腺病毒载体是 E1 缺失的,而在另一实施方案中,所述腺病毒载体还包括 E2、E3、E4 或它们的组合的缺失。

[0051] 在另一实施方案中,所述病毒载体是腺伴随病毒载体(AAV)。在一个实施方案中,AAV是细小病毒,作为腺病毒原种的污染物被发现。它是普遍存在的病毒(在85%的美国人口中存在抗体),其不关联任何疾病。它还被归类为依赖病毒,因为其复制依赖于辅助病毒如腺病毒的存在。已经分离了至少九种血清型,其中AAV-2被最好地表征。AAV具有直线单链DNA,所述DNA被用壳体包裹到壳体蛋白VP1、VP2和VP3内,以形成直径为20-24nm的二十面体病毒粒子。

[0052] 在一个实施方案中,所述AAV DNA的长度为大约4.7kb。在一个实施方案中,它包含两个可读框并且侧面与两个ITR相连。AAV基因组内存在两个主要基因:rep和cap。rep基因编码负责病毒复制的蛋白质,而cap基因编码壳体蛋白VP1-3。每个ITP形成T形发夹结构。这些末端重复序列是AAV用于染色体整合的唯一必需顺式组分。因此,在一个实施方案中,所述AAV能被用作载体,其中所有的病毒编码序列被除去且被用于递送的基因盒代替。

[0053] 在一个实施方案中,当使用重组AAV(rAAV)作为表达载体时,所述载体包括145-bp ITR,它仅占所述AAV基因组的6%,在另一实施方案中,其在载体中留下空间以组装4.5-kb DNA插入。

[0054] 在一个实施方案中,AAV是安全的,因为认为它是不致病的,也不涉及任何疾病。除去病毒编码序列使得对病毒基因表达的免疫反应最小化,因此,即使有,rAAV也只引发最小的炎症应答。在另一实施方案中,AAV载体是双链的,而在另一实施方案中,AAV载体是自身互补的,在一个实施方案中这绕过对病毒第二链DNA合成的需要,在一个实施方案中这导致早期转基因表达。

[0055] 在另一实施方案中,所述病毒载体是逆转录病毒载体。所述逆转录病毒是一组单链RNA病毒,特征是能够在受感染细胞中通过逆转录过程将它们的RNA转变成双链DNA。然后所得DNA稳定地整合到细胞染色体中作为前病毒并直接合成病毒蛋白质。整合导致病毒基因序列保留在受体细胞及其后代中。所述逆转录病毒基因组包含三个基因,即gag、pol和env,它们分别编码壳体蛋白、聚合酶和包装元件。在所述gag基因上游发现的序列包含用于将基因组包装到病毒中的信号。在病毒基因组的5'和3'端存在两个长末端重复(LTR)序列。它们包含强大的启动子和增强子序列,也是所述宿主细胞基因组的整合所需的。

[0056] 在一个实施方案中,为了构建逆转录病毒载体,将编码一个或多个相关寡核苷酸或多核苷酸序列的核酸插入病毒基因组内代替某些病毒序列,以产生复制缺陷的病毒。为了产生病毒体,构建包含gag、pol和env基因但不含LTR和包装元件的包装细胞系。当将包含cDNA的重组质粒、连同逆转录病毒LTR和包装序列一起引入该细胞系时(通过例如磷酸钙沉淀),所述包装序列允许重组质粒的RNA转录以被包装至病毒颗粒内,然后将其分泌到培养基中。然后收集包含重组逆转录病毒的培养基,任选浓缩,并用于基因转移。逆转录病毒载体能够感染多种细胞类型。然而,整合和稳定表达需要宿主细胞的分裂。

[0057] 在其他实施方案中,所述病毒载体源自病毒如痘苗病毒、慢病毒、骨髓灰质炎病毒、肝炎病毒、乳头瘤病毒、巨细胞病毒、猿猴病毒或单纯疱疹病毒。

[0058] 在本发明的某些实施方案中,包含核酸序列的载体可以包含裸重组DNA(naked recombinant DNA)或质粒。可以通过物理或化学使细胞膜通透的任何方法进行构建体的转

移。在一个实施方案中,所述载体是小环 DNA,在一个实施方案中为用于非病毒基因转移的超螺旋 DNA 分子,它既没有细菌复制源,也没有抗生素耐药标记。在另一实施方案中,小环 DNA 不包括在质粒生成过程中来自基因递送载体的细菌控制区。它们因此比基因治疗中使用的其他质粒更小和潜在地更安全。在一个实施方案中,小环 DNA 产生高收率,易于纯化,并提供了稳健和持久的转基因表达。

[0059] 使用标准重组技术构建载体是本领域公知的(参见例如 Maniatis 等人, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, 1990) 和 Ausubel 等人, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, 1996), 两者均纳入本文作为参考)。

[0060] 在另一实施方案中,载体还包含插入编码标记多肽的异源核酸序列。所述标记多肽可以包括例如 yECitrine、绿色荧光蛋白 (GFP)、DS-Red (红色荧光蛋白)、分泌型碱性磷酸酶 (SEAP)、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、萤光素酶、GFP/EGFP、人生长激素或者本领域技术人员已知的任何数目的其他报告蛋白。

[0061] 在另一实施方案中,所述载体可以包含一个或多个相关基因。因此,在一个实施方案中,本发明的载体可以包含相关基因,所述相关基因在一个实施方案中为红细胞生成素或干扰素 α 2b,在一个实施方案中表达标记,在另一实施方案中在框架内与标记连接,在一个实施方案中允许识别相关基因产物,在另一实施方案中允许区别由微器官产生的相关基因产物和由所述微器官外部的宿主细胞内源性产生的相似基因产物。

[0062] 在一个实施方案中,本发明的包含编码治疗性多肽的核酸的载体被引入微器官中。本领域有许多已知技术可将盒 (cassette) 和 / 或载体引入细胞内以实现本发明的方法,所述技术为例如但不限于:直接 DNA 摄取技术,以及病毒、质粒、线状 DNA 或脂质体介导的转导、受体介导的摄取和引入应用磷酸钙介导和 DEAE-右旋糖介导方法的磁穿孔法、电穿孔或脂质体介导的转染(关于进一步的细节,参见例如 "Methods in Enzymology" 1-317 卷, Academic Press, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel F.M. 等人 (eds.) Greene Publishing Associates, (1989) 和 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 2 版, Sambrook 等人 Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), 或其他标准实验室手册)。

[0063] 在一个实施方案中,用核酸被膜的粒子轰击可以是将裸 DNA 表达构建体转移到细胞中的方法。该方法依赖于将 DNA 被膜的微射弹 (micro-projectile) 加速到高速率以允许它们刺穿细胞膜并进入细胞而不杀灭它们的能力。已经开发了用于加速小粒子的几种装置。一种这样的装置依靠高电压放电以产生电流,然后电流提供驱动力。所用的微射弹已包含生物惰性或生物相容的物质如钨珠或金珠。要理解可以使用任何这些方法将所需的物质引入细胞内,由此产生的细胞被认为是本发明的部分,它们用于实现本发明方法的用途也被认为是本发明的部分。

[0064] 在一个实施方案中,本发明的制剂和方法中的载体包括核酸序列。用于本文时,术语“核酸”指多核苷酸或寡核苷酸如脱氧核糖核酸 (DNA), 并且,在适当时指核糖核酸 (RNA) 或其模拟物。所述术语还应被理解为包括由核苷酸类似物制成的 RNA 或 DNA 的等价物、类似物,并且在可用于所述实施方案时,被理解为包括单链(有义或反义)和双链多核苷酸。该术语包括由天然存在的核苷酸碱基 (nucleobase)、糖和共价核苷间(主链)连接组成的

寡核苷酸以及具有相似功能的包括非天然存在部分的寡核苷酸。因为期望的性质例如增强的细胞摄取、对核酸靶的增强的亲和力和在核酸酶存在时增强的稳定性,这样的修饰或取代的寡核苷酸通常相对于天然形式是优选的。

[0065] 在一个实施方案中,术语“核酸”或“寡核苷酸”指这样的分子,其可以包括但不限于原核序列、真核 mRNA、来自真核 mRNA 的 cDNA、来自真核(例如哺乳动物)DNA 的基因 DNA 序列和甚至合成的 DNA 序列。所述术语还指包括 DNA 和 RNA 的任何已知碱类似物的序列。

[0066] 所述核酸可以通过本领域熟知的任何合成或重组方法制备。核酸可以通过本领域已知的技术进行进一步修饰以改变生物物理或生物学性质。例如,可以修饰所述核酸以提高其对抗核酸酶的稳定性(例如“封端”)、或用于修改其溶解度或对互补序列的亲和力。这些核酸可以包括载体、表达盒、启动子序列、相关基因或它们的任何组合。在另一实施方案中,可以修改其亲脂性,其进而会反映用于递送它的系统的变化,在一个实施方案中,所述系统还会受到是否期望这样的序列保留在皮肤内、或渗透过皮肤、或其任何层的影响。这样的考虑可以影响本发明、所述方法和系统中使用的任何化合物。

[0067] 在一个实施方案中,可以通过本领域已知的方法由四个完整或部分的核苷酸化学合成 DNA。这样的方法包括那些描述于 Caruthers(1985;Science230:281-285)中的。通过制备重叠的双链寡核苷酸、填充到空隙内、并将末端捆绑到一起,也可以合成 DNA(通常参见 Sambrook 等人(1989;Molecular Cloning-A Laboratory Manual,第2版。Cold Spring Harbour Laboratory Press,纽约))。在另一实施方案中,可以通过定向诱变由野生型 DNA 制备灭活的突变(参见例如 Zoller 等人(1982;DNA. 1984 Dec;3(6):479-88);Zoller(1983);和 Zoller(1984;DNA. 1984 Dec;3(6):479-88);McPherson(1991;Directed Mutagenesis:A Practical Approach.Oxford University Press,纽约))。可以通过本领域已知的方法放大获得的 DNA。一种合适的方法是 Saiki 等人(1988;Science. 1988 Jan 29;239(4839):487-491)、Mullis 等人,美国专利 4,683,195 和 Sambrook 等人(1989)所述的聚合酶链反应(PCR)方法。

[0068] 本领域公开了用于修饰核酸以实现特定目的的方法,例如 Sambrook 等人(1989)。而且,本发明的核酸序列可以包括不编码相关蛋白质的核苷酸序列的一个或多个部分。由点突变或由诱导修饰(包括插入、缺失和替代)引起 DNA 序列改变以提高由其编码的多核苷酸的活性、半衰期或制备,这也包括在本发明内。

[0069] 在一个实施方案中,本发明的制剂可以包括核酸,或者在另一实施方案中,本发明的方法可以包括核酸的递送,其中在另一实施方案中,所述核酸是载体的一部分。

[0070] 通过下文所述的本领域常规标准方法,可以评价特定表达载体系统和将核酸引入细胞内的方法的效能。

[0071] 正如本领域技术人员会理解,核酸序列的片段或衍生物或编码蛋白质或肽的基因还可以按照与完全野生型基因或序列相同的方式起作用。同样,核酸序列的形式与野生型序列相比可以有变化,不过在编码相关的蛋白质或肽、或它们的片段时,尽管存在这些变化,但保留的野生型功能仍显示相同的生物学效应。这些各自表示本发明的独立实施方案。

[0072] 在一个实施方案中,本发明的制剂和方法可以用于基因沉默应用。在一个实施方案中,通过使用反义寡核苷酸抑制或消除特定基因的活性或功能,所述反义寡核苷酸为嵌合分子,包含两个或更多个化学上不同的区,分别构成至少一个核苷酸。

[0073] 在一个实施方案中,嵌合寡核苷酸包含至少一个区,其中所述寡核苷酸经修饰以使寡核苷酸耐受核酸酶降解的抗性增加、细胞摄取增加和/或对靶多核苷酸的结合亲和力和增加。寡核苷酸的额外区可以作为能够裂解 RNA:DNA 或 RNA:RNA 杂合体的酶的底物,根据本发明的这方面,其作为通过降解特别序列来沉默基因的方式。可以通过凝胶电泳法常规检测 RNA 靶的裂解,如果必要,可以联合本领域已知的核酸杂交技术。

[0074] 在一个实施方案中,嵌合反义寡核苷酸可以作为包含两个或更多个寡核苷酸和/或修饰的寡核苷酸的复合结构形成,如本领域所述(参见例如美国专利 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356 和 5,700,922),在另一实施方案中可以包含核酶序列。

[0075] 在另一实施方案中,通过使用小干扰 RNA 来实现基因表达的抑制、活性或功能,这提供了对基因表达的序列特异性抑制。控制对应于生物中的单个基因的双链/双螺旋 RNA(dsRNA) 可以通过快速降解受影响的细胞内的 mRNA 来沉默特定基因的表达。这个过程被称为基因沉默,其中 dsRNA 作为特定 RNA 抑制剂(RNAi)起作用。RNAi 可以源自天然来源,例如内源性病毒和转座子活性,或者它可以通过微注射(Fire 等人(1998)被人工引入细胞内(Elbashir SM 等人(2001). Nature 411:494-498),或者通过用产生互补 RNA 或折回 RNA 的基因结构转换,或者通过其他载体(Waterhouse, P. M. 等人(1998). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13959-13964 和 Wang, Z. 等人(2000). J. Biol. Chem. 275, 40174-40179)被人工引入细胞内。在一个实施方案中, RNAi 介导 mRNA 降解包括双螺旋或双链 RNA,或者在其他实施方案中,包括单链 RNA、离体 RNA(部分纯化的 RNA、基本上纯的 RNA、合成的 RNA、重组制备的 RNA)、以及通过添加、缺失和/或改变一个或多个核苷酸而与天然存在的 RNA 不同的改变的 RNA。

[0076] 在一个实施方案中,本发明的制剂和方法中的核酸编码治疗性多肽。在一个实施方案中,术语“多肽”指由通过肽(即:酰胺)键结合的氨基酸残基组成的分子,包括肽、多肽和蛋白质。因此,在一个实施方案中,本发明的多肽可以具有单个或多个共价连接的氨基酸链,还可以包含由二硫键组成的链内或链间连接。在一个实施方案中,一些多肽还可以形成多单位大分子复合物的多单位。在一个实施方案中,所述多肽可以预期具有构象优先性并显示三维结构。构象优先性和三维结构两者通常都均通过多肽的原始(即氨基酸)序列和/或存在(或缺少)二硫键或其他共价或非共价链内或链间相互作用来定义。

[0077] 在一个实施方案中,术语“肽”指天然肽(降解产物、合成的合成肽或重组肽)和/或肽拟似物(通常为合成的合成肽),例如作为肽类似物的肽样物质和半肽样物质,它们可以具有例如修饰以使肽在体内更稳定或更能渗透进细胞内。这种修饰包括但不限于 N 端修饰、C 端修饰、肽键修饰,包括但不限于 $\text{CH}_2\text{-NH}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S=O}$ 、 O=C-NH 、 $\text{CH}_2\text{-O}$ 、 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ 、 S=C-NH 、 CH=CH 或 CF=CH 、主链修饰和残基修饰。用于制备肽拟似化合物的方法是本领域公知的,具体描述于例如 Quantitative Drug Design, C. A. Ramsden Ed., Chapter 17. 2, F. Choplin Pergamon Press(1992),该文献纳入本文作为参考,如同本文完全阐述。

[0078] 所述肽内的肽键($-\text{CO-NH}-$)可以被例如 N-甲基化键($-\text{N}(\text{CH}_3)\text{-CO}-$)、酯键($-\text{C}(\text{R})\text{H-C-O-O-C}(\text{R})\text{-N}-$)、酮亚甲基键($-\text{CO-CH}_2-$)、氮杂键($-\text{NH-N}(\text{R})\text{-CO}-$)(其中 R 为任何烷基如甲基)、carba 键($-\text{CH}_2\text{-NH}-$)、羟乙烯键($-\text{CH}(\text{OH})\text{-CH}_2-$)、硫代酰胺键($-\text{CS-NH}-$)、烯属双键($-\text{CH=CH}-$)、反酰胺键($-\text{NH-CO}-$)、肽衍生物($-\text{N}(\text{R})\text{-CH}_2\text{-CO}-$)(其中 R 是本来存在于碳原子

上的“正”侧链)取代。这些修饰可以发生在肽链内的任何键上,甚至可以同时发生在几个(2-3)键上。

[0079] 天然芳族氨基酸 Trp、Tyr 和 Phe 可以被取代,用于合成非天然氨基酸如 TIC、萘基丙胺酸 (No1)、Phe 的环甲基化衍生物、Phe 的卤代衍生物或邻甲基-Tyr。除了以上所述,本发明的肽还可以包括一个或多个修饰的氨基酸或者一个或多个非氨基酸单体(例如脂肪酸、复合糖等)。

[0080] 在一个实施方案中,术语“氨基酸”或“多个氨基酸”被理解为包括 20 种天然存在的氨基酸;这些氨基酸通常在体内翻译后被修饰,包括例如羟脯氨酸、磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸;以及其他独特的氨基酸,包括但不限于 2-氨基己二酸、羟赖氨酸、异锁链素、正缬氨酸、正亮氨酸和鸟氨酸。此外,术语“氨基酸”可以包括 D- 和 L- 氨基酸两者。

[0081] 用于本文时,除非另有特殊说明,术语“氨基酸”指氨基酸的 D 或 L 立体异构体形式。本发明的范围内还包括等价蛋白质或等价肽,例如具有纯化野生型肿瘤抑制蛋白质的生物活性。“等价蛋白质”和“等价多肽”指背离天然存在的蛋白质或多肽的线性序列,但其氨基酸取代不改变其生物学活性的化合物。这些等价物可以通过用相关氨基酸如同样带电的氨基酸代替一个或多个氨基酸、或通过取代或修饰侧链或官能团而与天然序列不同。

[0082] 所述肽或多肽或者编码它们的 DNA 序列可以获自各种天然或非天然来源,例如原核或真核细胞。在一个实施方案中,所述来源细胞可以是野生型、重组的或突变的。在另一实施方案中,大多数肽或多肽对于微生物如细菌、酵母或真菌、对于病毒、对于动物(包括哺乳动物、无脊椎动物、爬行动物、鸟类和昆虫)或对于植物细胞可以是内源性的。

[0083] 在另一实施方案中,所述肽或多肽可以获自更特殊的来源,例如病毒体粒子的表层膜、特定的细胞溶解产物、组织提取物,或者它们可以限于在细胞膜表面上表达的那些多肽。

[0084] 在另一实施方案中,所述肽或多肽源自特定的细胞或组织类型、发育阶段或疾病状况或阶段。在一个实施方案中,所述疾病状况或阶段是癌症,在另一实施方案中,所述疾病状况为感染,在另一实施方案中为 HIV 感染。在另一实施方案中,所述疾病状况是发育疾患,而在另一实施方案中,所述疾病状况是代谢疾患。

[0085] 本发明的多肽可以是任何的尺寸。可以预期,所述多肽可以表现广泛不同的分子量,一些超过 150-200 千道尔顿(kD)。通常,所述多肽的分子量可为约 5,000 至约 100,000 道尔顿。其他可以落入更窄的范围内,例如约 10,000 至约 75,000 道尔顿,或约 20,000 至约 50,000 道尔顿。在可选的实施方案中,本发明的多肽的长度可以 1-250 个氨基酸残基。在另一实施方案中,本发明的多肽的长度可以 10-200 个氨基酸残基。在可选的实施方案中,本发明的多肽的长度可以 50-100 个氨基酸残基。在可选的实施方案中,本发明的多肽的长度可以 1-250 个氨基酸残基。在可选的实施方案中,本发明的多肽的长度可以 1-250 个氨基酸残基。在一个实施方案中,所述肽或多肽的最大尺寸由它所表达的载体确定,在一个实施方案中为大约 20-37kD、20-25kD、25-30kD、30-37kD 或 35-37kD。在另一实施方案中,所述多肽为 34kD 糖蛋白。

[0086] 在另一实施方案中,所述肽或多肽是激动剂。在另一实施方案中,所述肽或多肽是拮抗剂。在另一实施方案中,所述肽或多肽是抗原。在另一实施方案中,所述肽或多肽是酶。在另一实施方案中,所述肽或多肽是酶或其他底物的激活剂。在另一实施方案中,所述肽或

多肽是酶或其他底物的抑制剂。在另一实施方案中,所述肽或多肽是激素。在另一实施方案中,所述肽或多肽是调节蛋白。调节蛋白支配着许多相互作用,这些相互作用管理着基因的表达和复制、酶的行为、细胞及其环境之间的相互影响,以及许多其他现象。在另一实施方案中,所述肽或多肽是细胞骨架蛋白。细胞骨架蛋白为细胞形成柔性框架,为细胞器官和形成的机体提供附着点,并使细胞部分之间能够连通。在另一实施方案中,所述肽或多肽是毒素。在另一实施方案中,本发明的治疗性核酸编码一种或多种自杀基因。

[0087] 在另一实施方案中,所述肽或多肽是激动剂、拮抗剂、抗原、酶、酶激活剂、酶抑制剂、酶底物、激素、调节蛋白、细胞骨架蛋白或毒素的功能片段。“功能片段”意在指示肽或多肽的一部分,它们即使在缺乏肽或多肽的剩余部分的情况下也能履行肽或多肽的一种或多种功能。在一个实施方案中,所述功能片段足以介导与相关靶的分子间相互作用。

[0088] 在可选的实施方案中,所述肽结合 DNA 或 RNA 或其片段。在一个实施方案中,所述 DNA 或 RNA 结合肽可以是本领域许多已知的中的任一种,包括但不限于:锌指蛋白如 β - β - α 锌指蛋白、核受体蛋白、环-片-螺旋型蛋白和 GAL4 型蛋白;螺旋-翻转-螺旋蛋白如 Cro 和阻抑蛋白、LacI 嘌呤阻抑蛋白 (PurR)、FokI 限制性内切核酸酶 (DNA 识别区)、 γ - δ 重组酶蛋白 (C-端结构域)、Hin 重组酶蛋白、Trp 阻抑蛋白、Diphtheria tox 阻抑物、分解代谢基因活化蛋白 (CAP)、同源结构域蛋白、RAP1 蛋白、Prd 配对蛋白、Tc3 转座酶蛋白、TFIIB 家族、干扰素调节因子、转录因子家族和 ETS 结构域家族噬菌体;和亮氨酸拉链蛋白如碱性拉链蛋白和拉链型蛋白 (螺旋-环-螺旋)。在另一实施方案中,所述 DNA 或 RNA 结合肽可以是其他 α -螺旋蛋白如 Cre 重组酶家族、乳头瘤病毒 -1 E2 蛋白、组蛋白家族、Ebnal 核蛋白家族、Skn-1 转录因子、高迁移率组蛋白家族和 MADS 盒家族; β -片状蛋白如 TATA 盒结合蛋白; β -发夹/带状蛋白如 Met 阻抑蛋白、Tus 复制终止子蛋白、整合宿主因子蛋白、超嗜热 DNA 结合蛋白、Arc 阻抑物、转录因子 T 结构域;以及其他蛋白家族如 Rel 同源区蛋白和 Stat 家族。在另一实施方案中,所述 DNA 或 RNA 结合肽可以是酶如甲基转移酶蛋白、PvuII 核酸内切酶蛋白、核酸内切酶 V 蛋白、EcoRV 核酸内切酶家族、BamHI 核酸内切酶家族、EcoRI 核酸内切酶家族、DNA 错配核酸内切酶、DNA 聚合酶 I 蛋白、DNA 聚合酶 T7、Dnase I 蛋白、DNA 聚合酶 β 蛋白、Uraci-DNA 糖基化酶、甲基腺嘌呤-DNA 糖基化酶、Homing 核酸内切酶和拓扑异构酶 I 或病毒蛋白如 HIV 逆转录酶。

[0089] 在另一实施方案中,所述肽或多肽是转录或翻译激活剂或它们的片段。在另一实施方案中,所述肽或多肽是转录或翻译阻抑物或其片段。在另一实施方案中,所述肽或多肽是受体或其片段。

[0090] 在一个实施方案中,所述肽或多肽可以是上文所述的任何肽或多肽的关联肽。“关联”肽是与另一分子相互作用和/或结合的任何肽。

[0091] 根据本发明的其他实施方案,重组基因产物可以由与相应的天然多核苷酸相比具有修饰核苷酸序列的多核苷酸编码。

[0092] 除了蛋白质,重组基因产物还可以包括功能 RNA 分子。

[0093] 根据本发明的另一实施方案,本发明的制剂和方法可以提供产生功能 RNA 分子的微器官。功能 RNA 分子可以包括反义寡核苷酸序列、包括本文所述反义寡核苷酸的核酶和与本文所述反义寡核苷酸融合的核酶序列。这样的核酶可使用固相寡核苷酸合成法方便地合成。

[0094] 核酶正越来越多地被用于通过裂解编码相关蛋白质的 mRNA 来序列特异性地抑制基因表达 [Welch 等人, “Expression of ribozymes in gene transfer systems to modulate target RNA levels.” *Curr Opin Biotechnol.* 1998 October; 9(5):486-96]。设计核酶来裂解任何特定靶 RNA 的可能性已经使它们在基础研究和治疗应用两者中成为有价值的工具。在治疗领域,核酶已经被开发用于针对感染性疾病中的病毒 RNA、癌症中的显性致癌基因和遗传性疾患中的特定体细胞突变 [Welch 等人, “Ribozyme gene therapy for hepatitis C virus infection.” *Clin Diagn Virol.* Jul. 15, 1998; 10(2-3):163-71]。最值得注意的,几种用于 HIV 患者的核酶基因治疗方案已经处于 1 期试验中。最近,核酶已经被用于转基因动物研究、基因靶确认和途径阐明。几种核酶处于各种临床试验阶段。ANGIOZYME 是用于人体临床试验研究的第一种化学合成的核酶。ANGIOZYME 特异性地抑制 VEGF-r (血管内皮生长因子受体) 的形成, VEGF-r 是血管发生途径的关键组分。Ribozyme Pharmaceuticals, Inc. 以及其他厂商已经在动物模型中证实了抗血管发生治疗的重要性。HEPTAZYME 被设计成选择性破坏丙型肝炎病毒 (HCV) RNA 的核酶,发现它在细胞培养测定中能有效地减少丙型肝炎病毒 RNA。

[0095] 如上文所述,在一个实施方案中,本发明的制剂和方法提供治疗制剂,所述治疗制剂包含编码治疗性多肽的核酸序列。在一个实施方案中,术语“治疗剂”指在提供给有需要的个体时可提供有益效果的分子。在一些情况下,所述分子是治疗剂的原因在于它可以代替个体中缺少或减少的这样的分子。在一个实施方案中,所述治疗性蛋白质是个体中缺少的蛋白质,例如在个体具有所需蛋白质的内源性无效或错义突变的情况下。在其他实施方案中,所述内源性蛋白质是突变的,并会产生无功能的蛋白质,需要提供功能性蛋白质来补偿。在其他实施方案中,异源性蛋白质的表达加上低内源性水平,导致给定蛋白质的累积表达增强。在其他实施方案中,所述分子刺激信号级联,其提供细胞或宿主功能的关键元件的表达或分泌或其他作用。

[0096] 在一个实施方案中,术语“治疗制剂”描述了可用于诊断,或者在另一实施方案中可用于治愈,或者在另一实施方案中可用于缓解,或者在另一实施方案中可用于治疗,或者在另一实施方案中可用于预防疾病、疾患、病症或感染的物质。在一个实施方案中,本发明的“治疗制剂”指影响其应用靶的结构或功能的任何物质。

[0097] 在另一实施方案中,本发明的“治疗制剂”是在向疾病或疾患所折磨的个体给药时能减轻其症状的分子。在一个实施方案中,本发明的“治疗制剂”是合成分子,或者在另一实施方案中是从在自然界中发现的来源中分离的天然存在的化合物。

[0098] 在一个实施方案中,所述治疗性多肽是红细胞生成素,而在另一实施方案中,所述治疗性多肽是干扰素 α , 在一个实施方案中所述干扰素 α 为干扰素 α 2b。在一个实施方案中,所述治疗性多肽是任何其他治疗性多肽。

[0099] 在一个实施方案中,“治疗”指治疗性治疗和预防性或防止性治疗措施两者,其中目的是防止或减轻上文所述的目标病理病症或疾患。因此,在一个实施方案中,进行治疗可以包括直接影响或治愈、压制、抑制、防止疾病、疾患或病症、减少其严重性、延迟其发生、减少其相关症状、或它们的组合。因此,在一个实施方案中,“进行治疗”特别指延迟进程、加速缓和、诱导缓和、扩大缓和、加速恢复、提高可选的治疗的效能或降低对替换治疗的耐受性、或它们的组合。在一个实施方案中,“进行防止”特别指延迟症状的发作、防止疾病复发、减

少复发发作的次数或频率、增加症状性发作之间的潜伏期、或它们的组合。在一个实施方案中，“进行压抑”或“进行抑制”特别指减少症状的严重性、减少急性发作的严重性、减少症状的数目、减少疾病相关的症状的发生率、减少症状的潜伏期、改善症状、减少继发性症状、减少继发性感染、延长患者存活期、或它们的组合。

[0100] 在一个实施方案中，症状是原发性的，而在另一实施方案中症状是继发性的。在一个实施方案中，“原发性”指作为特定疾病的直接结果的症状，而在一个实施方案中，“继发性”指源自原发性病因或作为原发性病因的结果的症状。在一个实施方案中，用于本发明的化合物治疗原发性或继发性症状或涉及所述疾病的继发性并发症。在另一实施方案中，“症状”可以是疾病或病理状况的任何表现。

[0101] 在一个实施方案中，治疗性核酸可以编码治疗性多肽，在一个实施方案中，所述治疗性多肽包括酶、酶辅因子、细胞毒性蛋白、抗体、通道蛋白、转运蛋白、生长因子、激素、细胞因子、受体、粘蛋白、表面活性剂、适体或激素。在另一实施方案中，所述治疗性多肽可以是上面所述的一种或多种种类。在另一实施方案中，治疗性核酸可以编码下文所述的功能性 RNA。

[0102] 在一个实施方案中，术语“抗体或抗体片段”指完整的抗体分子以及能够与表位结合的其功能片段，如 Fab、F(ab')₂ 和 Fv。在一个实施方案中，Fab 片段指包含抗体分子的单价抗原结合片段的片段，其可以通过用酶木瓜蛋白酶消化整个抗体以获得完整轻链和一部分单重链。在一个实施方案中，Fab' 片段指抗体分子的一部分，所述片段可以通过用胃蛋白酶处理整个抗体，然后还原，以获得完整轻链和一部分重链来得到。每个抗体分子可以获得两个 Fab' 片段。在一个实施方案中，(Fab')₂ 指抗体的片段，所述片段可以通过用酶胃蛋白酶处理整个抗体，之后不进行还原而获得。在另一实施方案中，F(ab')₂ 是通过两个二硫键连接到一起的两个 Fab' 片段的二聚物。在一个实施方案中，Fv 可以指遗传工程片段，它包含轻链的可变区和重链的可变区，表现为两个链。在一个实施方案中，所述抗体片段可以是单链抗体（“SCA”）、包含轻链的可变区和重链的可变区的遗传工程分子，通过合适的多肽连接基连接成基因融合的单链分子。

[0103] 制备这些片段的方法是本领域已知的（参见例如 Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 纽约, 1988, 该文献纳入本文作为参考）。

[0104] 在一个实施方案中，所述抗体会识别表位，在另一实施方案中表位指抗体的互补位所要结合的抗原上的抗原决定簇。在其他实施方案中，表位决定簇可以由分子的化学活性表面活性基团如氨基酸或碳水化合物侧链组成，在其他实施方案中可以具有特定的三维结构特性，和 / 或在其他实施方案中具有特定的电荷特性。

[0105] 在一个实施方案中，所识别的表位来自病原，或者在另一实施方案中来自致病细胞，或者在另一实施方案中来自异常表达的蛋白质，在另一实施方案中，异常表达可以指表达的位置、数量或它们的组合。

[0106] 抗体片段的另一种形式是编码单个互补性决定区 (CDR) 的肽。CDR 肽（“最小识别单位”）可以通过构建编码相关抗体的 CDR 的基因来获得。通过例如使用聚合酶链反应以从抗体产生细胞的 RNA 中合成可变区来制备这样的基因。参见例如 Larrick 和 Fry, *Methods*, 2:106-10, 1991。

[0107] 在一个实施方案中,所述抗体是杀肿瘤的,因此可治疗某些癌症。具有杀肿瘤活性的抗体也是本领域已知的,它们的任何使用都可以代表本发明的实施方案,包括 IMC-C225、EMD 72000、OvaRex Mab B43.13、抗神经节苷脂 G(D2) 抗体 ch14.18、C017-1A、曲妥珠单抗、rhuMab VEGF、sc-321、AF349、BAF349、AF743、BAF743、MAB743、AB1875、抗 -Flt-4AB3127、FLT41-A、利妥昔单抗、2C3、CAMPATH 1H、2G7、 α IR-3、ABX-EGF、MDX-447、抗 -p75 IL-2R、抗 -p64 IL-2R 和 2A11。

[0108] 在一个实施方案中,本发明的“治疗性核酸”可以编码或者所述“治疗性多肽”可以是用作下列药物的分子:抗高血压药、抗抑郁药、抗焦虑药、抗凝结药、抗惊厥药、血液葡萄糖降低药、解充血药、抗组胺药、镇咳药、抗炎药、抗精神病药、认知增强药、降胆固醇药、减肥药、自身免疫性疾病治疗药、抗阳萎药、抗菌药和抗真菌药、安眠药、抗帕金森症药、抗生素、抗病毒药、抗肿瘤药、巴比妥类、镇静药、营养剂、 β -阻断剂、催吐药、止吐药、利尿药、抗凝血药、强心药、雄激素类、肾上腺皮质激素类、同化激素类药、生长激素促分泌剂、抗感染药、冠状血管扩张药、碳酸酐酶抑制剂、抗原动物药、胃肠病用药、5-羟色胺拮抗剂、麻醉药、降糖药、多巴胺能药、抗阿尔茨海默病药、抗溃疡药、血小板抑制剂和糖原磷酸化酶抑制剂。

[0109] 在一个实施方案中,本发明的“治疗制剂”是抗菌药、抗病毒药、抗真菌药或抗寄生虫药。在另一实施方案中,所述治疗制剂具有细胞毒性或抗癌活性。在另一实施方案中,所述治疗制剂是免疫刺激剂。在另一实施方案中,所述治疗制剂抑制炎症或免疫应答。

[0110] 在一个实施方案中,所述治疗性核酸可以编码或者所述治疗性多肽可以是细胞因子如干扰素或白介素、或它们的受体。缺少细胞因子的表达或缺少正确的细胞因子的表达牵涉易于患病,提高表达可以导致耐受许多感染。可以改变细胞因子的表达模式以产生有益效果,例如使免疫应答在感染或在自身免疫疾病中偏向 Th1 型表达模式或 Th2 模式,其中改变的表达模式可以证明对宿主是有益的。

[0111] 在另一实施方案中,所述治疗性核酸可以编码或者所述治疗性多肽可以是酶,例如参与糖原贮积或裂解的酶。在另一实施方案中,所述治疗性蛋白质包括转运蛋白,例如离子转运蛋白如 CFTR 或葡萄糖转运蛋白或其缺乏或不表达会导致各种疾病的其他转运蛋白。

[0112] 在另一实施方案中,所述治疗性核酸编码或者所述治疗性多肽是肿瘤抑制物或促凋亡化合物,它们改变癌症相关事件的进程。

[0113] 在另一实施方案中,本发明的治疗性核酸可以编码或者所述治疗性多肽可以是免疫调节蛋白。在一个实施方案中,所述免疫调节蛋白包括细胞因子、趋化因子、补体或组分如白介素 1-15、干扰素 α 、 β 或 γ 、肿瘤坏死因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、趋化因子如嗜中性白细胞活化蛋白(NAP)、巨噬细胞趋化和活化因子(MCAF)、RANTES、巨噬细胞炎性肽 MIP-1a 和 MIP-1b。

[0114] 在另一实施方案中,本发明的治疗性核酸可以编码或者所述治疗性多肽可以是生长因子或组织促进因子。在一个实施方案中,所述治疗化合物是骨形态生成蛋白或 OP-1、OP-2、BMP-5、BMP-6、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-9、DPP、Vg-1、60A 或 Vgr-1。在另一实施方案中,所述治疗性核酸编码促进神经再生或修复的 RNA 或肽,并且可以包括 NGF 或其他生长

因子。在另一实施方案中,所述治疗性多肽促进神经再生或修复,并且可以包括 NGF 或其他生长因子。

[0115] 在另一实施方案中,所述治疗性核酸可以编码或者所述治疗性多肽可以是下列物质:天然或非天然胰岛素、淀粉酶、蛋白酶、脂酶、激酶、磷酸酶、糖基转移酶、胰蛋白酶原、糜蛋白酶原、羧肽酶、激素、核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶、三酰基甘油酯酶、磷脂酶 A2、弹性蛋白酶、淀粉酶、凝血因子、UDP 葡糖醛酸基转移酶、鸟氨酸转氨甲酰基酶、细胞色素 p450 酶、腺苷脱氨酶、血清胸腺因子、胸腺体液因子、促胸腺生成素、生长激素、生长调节素、共刺激因子、抗体、集落刺激因子、红细胞生成素、表皮生长因子、肝红细胞生成因子(肝细胞生成素)、肝细胞生长因子、白介素、干扰素、负生长因子、成纤维细胞生长因子、 α 家族转换生长因子、 β 家族转换生长因子、胃泌素、分泌素、缩胆囊素、促生长素抑制素、5-羟色胺、P 物质、转录因子或它们的组合。

[0116] 在另一实施方案中,所述基因包括报道基因。在一个实施方案中,所述报道基因编码荧光蛋白。在一个实施方案中,所述荧光蛋白是 yECitrine 或黄色荧光蛋白。在一个实施方案中,所述荧光蛋白是水母绿荧光蛋白或其突变体或变异体。在另一实施方案中,所述 GMMO 可以具体包括除报道基因或编码报道蛋白的基因以外的任何基因。

[0117] 在另一实施方案中,所述报道基因带来耐药性。在一个实施方案中,所述报道基因带来对抗生素如氨苄西林、卡那霉素、四环素等的耐受性,正如本领域技术人员所理解。在另一实施方案中,所述抗生素耐受基因可以包括带来对新霉素(neo)、杀稻瘟素、大观霉素、红霉素、腐草霉素、Tn917、庆大霉素和博来霉素的耐受性的那些基因。新霉素耐受基因的实例是转座子 Tn5 的新霉素耐受基因,它编码新霉素磷酸转移酶 11,这带来了对各种抗生素,包括 G418 和卡那霉素的耐受性。在另一实施方案中,所述报道基因是氯霉素乙酰转移酶基因(cat)并带来对氯霉素的耐受性。

[0118] 在一个实施方案中,本发明的制剂和方法用于预防或治疗性干预病毒感染,或者在另一实施方案中用于预防或治疗性干预细菌、寄生虫或真菌感染,或它们的组合。

[0119] 根据本发明的这方面,本发明的制剂和方法用于预防或治疗性干预疾病。在一个实施方案中,由此治疗的个体的疾病可以包括但不限于:肌营养不良症、癌症、心血管疾病、高血压、感染、肾脏病、神经变性疾病如阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿舞蹈病、克-雅病、自身免疫疾病如狼疮、类风湿性关节炎、心内膜炎、格雷夫斯病或 ALD、呼吸疾病如哮喘或囊性纤维化、骨病如骨质疏松、关节病、肝病、皮肤病如银屑病或湿疹、眼病、耳鼻喉病、其他神经病如 Turret 综合征、精神分裂症、抑郁、孤独症或中风、或代谢疾病如糖原贮积病或糖尿病。要理解可以通过本发明的制剂和根据本发明的方法实现的表达特定蛋白质、提供治疗性蛋白质、提供药物、抑制特定蛋白质表达等的任何疾病都被认为是本发明的部分。

[0120] 在一个实施方案中,本发明的制剂和方法包括与一个或多个调节序列可操作地连接的核酸序列。在一个实施方案中,被引入微器官分子内的核酸分子是适合在由所述核酸编码的基因产物的细胞中表达的形式。因此,在一个实施方案中,所述核酸分子包括转录基因(或其部分)所需的编码和调节序列。当所述基因产物是蛋白质或肽时,所述核酸分子包括翻译核酸分子所需的编码和调节序列,包括启动子、增强子、多聚腺苷酸化信号、转运已编码蛋白质或肽所必需的序列,例如在一个实施方案中,用于将蛋白质或肽转运到细胞或分泌物表面的 N-端信号序列。

[0121] 基于基因产物要在其中表达的细胞的类型和基因产物所需的表达水平选择用于调节基因产物表达的核苷酸序列（例如启动子和增强子序列）。例如，可以使用已知能带来与启动子连接的基因的细胞类型特异性表达的启动子。可以将对成肌细胞基因表达具有特异性的启动子连接到相关基因上，以带来该基因产物的肌肉特异性表达。本领域已知的肌肉特异性调控元件包括肌营养不良蛋白基因 (Klamut 等人 (1989) *Mol. Cell Biol.* 9:2396)、肌酸激酶基因 (Buskin 和 Hauschka, (1989) *Mol. Cell Biol.* 9:2627) 和肌钙蛋白 (Mar 和 Ordahl, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:6404) 的上游区。角蛋白基因中的负响应元件调节转录表达 (Jho Sh 等人 (2001). *J. Biol Chem.*)。对其他细胞类型特异性的调控元件是本领域已知的（例如白蛋白增强子用于肝特异性表达；胰岛素调控元件用于胰岛细胞特异性表达；各种神经细胞特异性调控元件，包括神经肌营养不良蛋白、神经烯醇酶和 A4 淀粉样物质启动子）。可选地，可以使用能够指挥各种不同细胞类型中的基因的组成型表达的调控元件，例如病毒调控元件。通常用于驱动基因表达的病毒启动子的例子包括源自多瘤病毒、腺病毒 2、巨细胞病毒 (CMV) 和猿猴病毒 40 和逆转录病毒 LTR 的那些。可选地，可以使用能提供与其连接的基因的可诱导表达的调控元件。可诱导调控元件（例如可诱导的启动子）的使用允许操纵基因产物在细胞中的生成。用于真核细胞的潜在有用的可诱导调节系统的实例包括激素调节的元件（例如参见 Mader, S. 和 White, J. H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5603-5607)、合成配体调节的元件（参见例如 Spencer, D. M. 等人 1993) *Science* 262:1019-1024) 和电离辐射调节的元件（例如参见 Manome, Y. 等人 (1993) *Biochemistry* 32:10607-10613; Datta, R. 等人 (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1014-10153)。可能开发出来的其他组织特异性或可诱导调节系统也可以用于本发明。

[0122] 在一个实施方案中，本发明的调节序列可以包括 CMV 启动子，而在另一实施方案中，所述调节序列可以包括 CAG 启动子。在一个实施方案中，CAG 启动子是组合了人巨细胞病毒即刻早期增强子和修饰的鸡 β -肌动蛋白启动子和第一内含子的复合启动子。在一个实施方案中，调节序列可以包括猿猴病毒 40 (SV)-40 多聚腺苷酸化序列，在一个实施方案中，所述序列是大多数信使 RNA 分子在真核细胞内在它们的 3' 末端终止的机理。在一个实施方案中，所述聚腺苷 (poly-A) 尾部保护 mRNA 分子免受核酸外切酶破坏，这对于转录终止、从核子中输出 mRNA 和翻译很重要。在一个实施方案中，本发明的制剂可以包含一个或多个调节序列。

[0123] 在一个实施方案中，本发明的包含 CMV 或 CAG 启动子以及 SV40 的制剂显示出 EPO 和 IFN- α 的长期、高体外（图 1、5 和 7B）和体内（图 6A）表达水平。不受理论的约束，可能有助于本发明微器官的长效、高水平基因产物的一个因素是使用 CMV 或者 CAG 作为启动子，它们可能在微器官外植块中对于启动组成型基因表达特别有效。

[0124] 在一个实施方案中，术语“启动子”指 DNA 序列，其在一个实施方案中处于编码序列的直接上游并且对于基因的基础和 / 或调节转录很重要。在一个实施方案中，本发明的启动子与相关基因可操作地连接。在另一实施方案中，所述启动子是内源性启动子的突变体，在适当的条件下，所述内源性启动子通常涉及相关基因的表达。

[0125] 在一个实施方案中，本发明组合物的启动子和用于本发明方法中的启动子是可调节的启动子。在另一实施方案中，可调节的启动子指使得下游基因的表达作为特定条件的

发生或提供的功能而发生的启动子,所述特定条件刺激特定启动子的表达。在一些实施方案中,这样的条件直接导致启动表达,或者在其他实施方案中导致除去表达的障碍。在一些实施方案中,这样的条件导致关闭或减少表达。

[0126] 在一个实施方案中,这样的条件可以包括特定的温度、养分、缺少养分、存在金属或本领域技术人员已知的其他刺激物或环境因素。在一个实施方案中,可调节的启动子可以通过半乳糖(例如UDP-半乳糖差向异构酶(GAL10)、半乳糖激酶(GAL1))、葡萄糖(例如醇脱氢酶 II(ADH2))或磷酸盐(例如酸性磷酸酶(PHO5))调节。在另一实施方案中,可调节的启动子可以通过热激(热激启动子)或化学品如IPTG或四环素等本领域技术人员已知的其他条件活化。要理解任何可调节的启动子和用于这样的调节的条件均被本发明的载体、核酸和方法所包括,并代表本发明的实施方案。

[0127] 在一个实施方案中,本发明的制剂和方法将治疗性多肽或核酸的水平比基础水平提高至少5%。在另一实施方案中,治疗性多肽或核酸的水平比基础水平提高至少7%,在另一实施方案中提高至少10%,在另一实施方案中提高了至少15%,在另一实施方案中提高至少20%,在另一实施方案中提高至少25%,在另一实施方案中提高至少30%,在另一实施方案中提高至少40%,在另一实施方案中提高至少50%,在另一实施方案中提高至少60%,在另一实施方案中提高至少75%,在另一实施方案中提高至少100%,在另一实施方案中提高至少125%,在另一实施方案中提高至少150%,在另一实施方案中比基础水平提高至少200%。

[0128] 在一个实施方案中,本发明的制剂使得治疗性多肽或核酸的表达与“基础水平”相比得到提高,在一个实施方案中,“基础水平”是没有给药或以其他方式接触本发明的治疗制剂时宿主或细胞培养物中表达的基因水平。

[0129] 在另一实施方案中,本发明的制剂和方法将治疗性多肽或核酸的水平提高到大约2000ng/天,或者在另一实施方案中为1500ng/天,或者在另一实施方案中为1000ng/天,或者在另一实施方案中为750ng/天,或者在另一实施方案中为500ng/天,或者在另一实施方案中为250ng/天,或者在另一实施方案中为150ng/天,或者在另一实施方案中为100ng/天,或者在另一实施方案中为75ng/天,或者在另一实施方案中为50ng/天,或者在另一实施方案中为25ng/天。在另一实施方案中,本发明的制剂和方法将治疗性多肽的水平提高到20-70mU/mL,或者在另一实施方案中为50-100mU/mL,或者在另一实施方案中为5-20mU/mL,或者在另一实施方案中为100-200mU/mL,或者在另一实施方案中为10-70mU/mL,或者在另一实施方案中为5-80mU/mL。在另一实施方案中,本发明的制剂和方法将治疗性多肽的水平提高到500-1000mU/mL,或者在另一实施方案中为250-750mU/mL,或者在另一实施方案中为500-5000mU/mL。

[0130] 在一个实施方案中,本发明的制剂和方法将功能标记(在一个实施方案中为血细胞比容水平)比基础水平提高至少5%。在另一实施方案中,所述功能标记的水平比基础水平提高至少7%,在另一实施方案中提高至少10%,在另一实施方案中提高至少15%,在另一实施方案中提高至少20%,在另一实施方案中提高至少25%,在另一实施方案中提高至少30%,在另一实施方案中提高至少40%,在另一实施方案中提高至少50%,在另一实施方案中提高至少60%,在另一实施方案中提高至少75%,在另一实施方案中提高至少100%,在另一实施方案中提高至少125%,在另一实施方案中提高至少150%,在另一实施方案中比基础水平提高至少200%。

[0131] 在一个实施方案中,本发明的治疗制剂是“长效的”,在一个实施方案中,长效制剂指能够提高治疗性多肽或核酸的分泌、表达、生成、循环或持久性的制剂。在一个实施方案中,治疗性多肽或核酸的表达水平比基础水平提高至少一个月,或者在另一实施方案中提高至少六个月。在另一实施方案中,血细胞比容的水平提高至少 2 周,在另一实施方案中提高至少 3 周,在另一实施方案中提高至少 4 周,在另一实施方案中提高至少 5 周,在另一实施方案中提高至少 6 周,在另一实施方案中提高至少 8 周,在另一实施方案中提高至少 2 个月,在另一实施方案中提高至少 2 个月,在另一实施方案中提高至少 2 个月,在另一实施方案中提高至少 3 个月,在另一实施方案中提高至少 4 个月,在另一实施方案中提高至少 5 个月,在另一实施方案中提高至少 7 个月,在另一实施方案中提高至少 8 个月,在另一实施方案中提高至少 9 个月,在另一实施方案中提高至少 10 个月,在另一实施方案中提高至少 11 个月,或者在另一实施方案中提高至少 1 年。在另一实施方案中,治疗性多肽或核酸的表达水平提高至少 4-6 个月。

[0132] 在一个实施方案中,将编码治疗性多肽或核酸的核酸序列优化以提高治疗性多肽或核酸表达的水平,或者在另一实施方案中用于提高治疗性多肽或核酸表达的持续时间,或者在另一实施方案中用于提供它们的组合。

[0133] 在一个实施方案中,术语“优化(的)”指期望的改变,在一个实施方案中,所述期望的改变指基因表达的改变,且在另一实施方案中指蛋白质表达的改变。在一个实施方案中,优化的基因表达指优化的基因表达调节。在另一实施方案中,优化的基因表达指基因表达提高。根据这方面并在一个实施方案中,意欲基因表达与野生型相比提高 2 倍至 1000 倍。在另一实施方案中,意欲基因表达提高 2 倍至 500 倍,在另一实施方案中,意欲基因表达提高 2 倍至 100 倍,在另一实施方案中,意欲基因表达提高 2 倍至 50 倍,在另一实施方案中,意欲基因表达提高 2 倍至 20 倍,在另一实施方案中,意欲基因表达提高 2 倍至 10 倍,在另一实施方案中,意欲基因表达提高 3 倍至 5 倍。

[0134] 在另一实施方案中,优化的基因表达可以是在特定环境条件下基因表达的提高。在另一实施方案中,优化的基因表达可以包括基因表达的降低,在另一实施方案中降低基因表达可以仅仅处于特定环境条件下。

[0135] 在另一实施方案中,优化的基因表达指基因表达的持续时间提高。根据这方面并在一个实施方案中,意欲基因表达的持续时间与野生型相比提高 2 倍至 1000 倍。在另一实施方案中,意欲基因表达的持续时间提高 2 倍至 500 倍,在另一实施方案中,意欲基因表达的持续时间提高 2 倍至 100 倍,在另一实施方案中,意欲基因表达的持续时间提高 2 倍至 50 倍,在另一实施方案中,意欲基因表达的持续时间提高 2 倍至 20 倍,在另一实施方案中,意欲基因表达的持续时间提高 2 倍至 10 倍,在另一实施方案中,意欲基因表达的持续时间提高 3 倍至 5 倍。在另一实施方案中,基因表达持续时间的增加是与无载体表达对照的表达相比,或者可选地,与野生型载体表达对照的基因表达相比。

[0136] 在一个实施方案中,通过转录沉默、低 mRNA 半衰期、交替剪接事件、过早多聚腺苷酸化、不足的核转位和稀有 tRNA 池的可用性不足阻碍在哺乳动物细胞中的表达。在信息编码转基因时发现哺乳动物表达中的许多问题的来源,还包括许多重要哺乳动物基因的自体表达。哺乳动物 RNA 的优化可以包括修饰顺式作用元件的修饰、其 GC 含量的适应、修改相对于哺乳动物细胞的非限制性 tRNA 池的密码子偏倚、避免内部同源区和排除 RNAi's。

[0137] 因此,在一个实施方案中,当依赖仔细设计合成基因时,可以在哺乳动物宿主内期望具有延长半衰期的稳定信息、组成型核输出和高水平的蛋白质生成。

[0138] 因此,在一个实施方案中,优化基因需要使密码子使用适应宿主基因的密码子偏好,在一个实施方案中,所述宿主基因为智人基因 (*Homo sapiens genes*);调整极高 (>80%)或极低 (<30%)GC 含量的区;避免一种或多种下列顺式作用序列基元:内部 TATA-盒、chi-位点和核糖体进入位点;AT 富集或 GC 富集序列伸展;ARE、INS、CRS 序列元件;重复序列和 RNA 二级结构;(隐藏)剪接供位和受位、分支点;或它们的组合。在一个实施方案中,优化基因以在智人细胞中表达。在另一实施方案中,优化基因以在微器官中表达。在另一实施方案中,优化基因以在真皮细胞中表达。

[0139] 在一个实施方案中,如本文所证实的,与由无肠腺病毒载体表达的非优化的 EPO 或与由腺病毒 5 载体表达的非优化的 EPO 相比,优化的基因如 EPO 将峰值表达水平的上升百分比保持更长的时间(图 3 和 4)。

[0140] 在一个实施方案中,术语“基因”指能够被表达为特定蛋白质的核酸片段,包括编码序列之前(5'非编码序列)和之后(3'非编码序列)的调节序列。“天然基因(native gene)”指在自然界中发现的具有其自身调节序列的基因。“嵌合基因”指不是天然基因的任何基因,包括没有在自然界中一起被发现的调节和编码序列。因此,嵌合基因可以包括源自不同来源的调节序列和编码序列,或者源自相同的来源、但排列方式与在自然界中发现的排列方式不同的调节序列和编码序列。“内源基因”指在生物的基因组中处于其天然位置的天然基因。“外源”基因指通常没有在宿主生物中发现,但通过基因转移引入宿主生物中的基因。外源基因可以包括被插入非天然生物中的天然基因或嵌合基因。“转基因”是通过转换过程引入基因组内的基因。

[0141] 在一个实施方案中,所述治疗性核酸可以是编码 RNA 分子(有义或反义)、肽、多肽、糖蛋白、脂蛋白或它们的组合或任何其他修饰后多肽的任何基因。在本发明的一个实施方案中,相关基因可以是组织样本中天然表达的。在本发明的另一实施方案中,所述组织样本可以是经过遗传加工的,从而至少一个细胞会表达相关基因,所述相关基因不是由细胞天然表达的或者在细胞内具有改变的表达特征。在一个实施方案中,本发明的治疗性核酸可以编码或者所述治疗性多肽可以是美国专利申请序列号 10/376,506 中所列的任何蛋白质,该文献全文纳入本文作为参考。

[0142] 在一个实施方案中,所述遗传修饰的微器官是遗传修饰的真皮微器官。“真皮”微器官可以包括多个真皮组分,在一个实施方案中,真皮是位于表皮下面的皮肤部分。这些组分可以包括皮肤成纤维细胞、表皮细胞、其他细胞类型、毛囊基底、神经末梢、汗腺和皮脂汗、以及血管和淋巴管。在一个实施方案中,真皮微器官可以包括脂肪组织,其中在一个实施方案中,真皮微器官可以不包括脂肪组织。关于真皮微器官的进一步细节,包括收集、在培养基中保存和移植所述真皮微器官的方法描述于 PCT 专利申请 W02004/099363 中,该文献全文纳入本文作为参考。

[0143] 在另一实施方案中,本发明提供在持续的时间内向有需要的个体提供治疗性多肽的方法,所述方法包括:提供一个或多个经遗传修饰的微器官,所述微器官包含含有与一个或多个调节序列可操作地连接的核酸序列的载体;并将所述经遗传修饰的微器官植入所述个体中,其中所述核酸序列编码治疗性多肽,从而所述治疗性核酸或多肽的表达水平比基

础水平提高超过 5%，并且所述提高维持超过一个月。在另一实施方案中，本发明提供在持续的时间内向有需要的个体提供治疗性多肽的方法，所述方法包括：提供一个或多个经遗传修饰的微器官，所述微器官包含含有与一个或多个调节序列可操作地连接的核酸序列的载体；并将所述经遗传修饰的微器官植入所述个体中，其中所述核酸序列编码治疗性多肽，并且其中所述载体是辅助病毒依赖型腺病毒载体。在另一实施方案中，本发明提供在持续的时间内向有需要的个体提供治疗性多肽的方法，所述方法包括：提供一个或多个经遗传修饰的微器官，所述微器官包含含有与一个或多个调节序列可操作地连接的核酸序列的载体；并将所述经遗传修饰的微器官植入所述个体中，其中所述核酸序列编码治疗性多肽，并且其中所述载体是辅助病毒依赖型腺病毒载体。

[0144] 在另一实施方案中，上文所述的方法向有需要的个体提供治疗性核酸，其中所述治疗性核酸或多肽的表达水平比基础水平提高超过 5%，并且所述增加维持超过 1 小时、3 小时、6 小时、9 小时、12 小时、18 小时、1 天或 2 天，其中所述载体是辅助病毒依赖型腺病毒载体或其组合。

[0145] 在一个实施方案中，本发明提供上文所述的治疗制剂，其中所述治疗性多肽是红细胞生成素，或者其中所述治疗性核酸编码红细胞生成素。在另一实施方案中，本发明提供长效红细胞生成素制剂，所述制剂包含经遗传修饰的微器官，所述微器官包含含有与一个或多个调节序列可操作地连接的核酸序列的载体，其中所述核酸序列编码红细胞生成素，从而所述制剂将红细胞生成素的水平比基础水平提高超过 5%，并且所述提高的红细胞生成素水平持续超过一个月。在另一实施方案中，本发明提供向有需要的个体提供治疗制剂的方法，其中所述治疗性多肽是红细胞生成素，或者其中所述治疗性核酸编码红细胞生成素。在另一实施方案中，本发明提供向有需要的个体提供红细胞生成素的方法。

[0146] 在另一实施方案中，本发明提供在持续的时间内向有需要的个体递送红细胞生成素的方法，所述方法包括：提供一个或多个经遗传修饰的微器官，所述微器官包含含有与一个或多个调节序列可操作地连接的核酸序列的载体；并将所述经遗传修饰的微器官植入所述个体中，其中所述核酸序列编码红细胞生成素，从而红细胞生成素的水平比基础水平提高超过 5%，并且所述提高的红细胞生成素水平持续超过一个月。

[0147] 在另一实施方案中，本发明提供在持续的时间内诱导有需要的个体中形成新血细胞的方法，所述方法包括：提供一个或多个经遗传修饰的微器官，所述微器官包含含有与一个或多个调节序列可操作地连接的核酸序列的载体；并将所述经遗传修饰的微器官植入所述个体中，其中所述核酸序列编码红细胞生成素，从而红细胞生成素的水平比基础水平提高超过 5%，并且所述提高的红细胞生成素水平持续超过一个月。

[0148] 在一个实施方案中，红细胞生成素 (EPO) 是糖蛋白激素，其涉及将红细胞系的始祖细胞成熟为红细胞。在一个实施方案中，红细胞生成素对于调节循环中的红细胞水平是重要的。天然存在的红细胞生成素由肾和肝产生，在血液中循环，并且在另一个实施方案中，为响应缺氧而刺激骨髓生成红细胞。

[0149] 在一个实施方案中，本发明组合物和方法的 EPO 可以包括与从人类或动物的尿、或者在另一实施方案中从人或动物的血浆中提取的与 EPO 相似的糖基化模式。

[0150] 编码红细胞生成素的基因的识别、克隆和表达描述于美国专利 5,756,349；5,955,422；5,618,698；5,547,933；5,621,080；5,441,868 和 4,703,008，这些文献纳入本

文作为参考。关于从支持哺乳动物细胞的生长的包含重组红细胞生成素质粒的细胞培养基中纯化重组红细胞生成素的描述包含在例如 Lai 等人的美国专利 4,667,016 中,该文献纳入本文作为参考。通过遗传工程技术产生重组红细胞生成素涉及从用编码红细胞生成素的基因转换的宿主细胞中体外表达蛋白质产物,所述重组红细胞生成素已经被用于治疗由慢性肾脏功能衰竭的贫血。目前,EPO 被用于治疗肾衰竭的贫血、与用齐多夫定 (AZT) 治疗患者的 HIV 感染相关的贫血,以及与癌症化疗相关的贫血。给药 rhu-EPO 已经变成肾功能不全继发性贫血的常规治疗,其中使用每周给药三次的 50-75u/kg 制剂来逐步恢复血细胞比容并消除输液依赖性。

[0151] 用一种或多种寡糖基团修饰由真核细胞生成的许多细胞表面和分泌蛋白被称为糖基化,糖基化能明显影响蛋白质稳定性、分泌和亚细胞定位以及生物学活性。在一个实施方案中,源自人尿的红细胞生成素和具有 1-165 个人红细胞生成素氨基酸序列的重组红细胞生成素(在哺乳动物细胞中表达)两者均包含三个 N 连接和一个 O 连接寡糖链,它们一起构成糖蛋白总分子量的约 40%。在一个实施方案中,与糖基化的但确实保留一些体外活性的形式相比,未糖基化的红细胞生成素具有大大降低的体内活性。在一个实施方案中,本发明的组合物和用于本发明方法中的 EPO 是完全糖基化的,而在另一实施方案中,它们包括一些糖基化残基,而在另一实施方案中,它们是未糖基化的。

[0152] 在一个实施方案中,所述 EPO 基因可以是野生型 EPO 基因,而在另一实施方案中,所述 EPO 基因可以是经过修饰的。在一个实施方案中,所述经过修饰的 EPO 基因可以是优化的。

[0153] 在一个实施方案中,所述 EPO 基因具有对应于基因库登记号: X02158 ;AF202312 ;AF202311 ;AF202309 ;AF202310 ;AF053356 ;AF202306 ;AF202307 或 AF202308 中所列的核酸序列,或者编码对应于基因库登记号:CAA26095 ;AAF23134 ;AAF17572 ;AAF23133 ;AAC78791 或 AAF23132 中所列的蛋白质序列。在另一实施方案中,所述 EPO 前体基因具有对应于基因库登记号:NM_000799 ;M11319 ;BC093628 或 BC111937 中所列的核酸序列,或者编码对应于基因库登记号:NP_000790 ;AAA52400 ;AAH93628 或 AAI11938 中所列的蛋白质序列。在另一实施方案中,所述 EPO 基因具有如 SEQ ID No:7 中所示的核酸序列,而在另一实施方案中,所述 EPO 基因具有如 SEQ ID No:8 中所示的氨基酸序列。在另一实施方案中,所述 EPO 基因具有与 SEQ ID No:7 中所示同源的核酸序列,而在另一实施方案中,所述 EPO 基因具有与 SEQ ID No:8 中所示同源的氨基酸序列。

[0154] 在一个实施方案中,本发明的制剂可以用于治疗患有贫血的个体。在一个实施方案中,贫血定义为“红细胞中携氧血红蛋白的量的病理性不足”。贫血的症状包括疲劳、履行日常功能的能力下降、认知功能受损、头痛、眩晕、胸痛和呼吸短促、恶心、抑郁、疼痛或它们的组合。在一个实施方案中,贫血涉及预后不良和升高的死亡率。

[0155] 贫血通常是肾衰竭致使由肾产生的红细胞生成素下降的后果。在另一实施方案中,贫血是由于癌症浸润、淋巴瘤或白血病或骨髓移植致使由骨髓生成的红细胞(类红细胞)下降引起的。贫血的其他原因包括:由于过度流血如出血或异常月经流血导致的血液损失;癌症治疗,如手术、放疗、化疗、免疫治疗或它们的组合;癌性骨髓的浸润或替换;溶血增加,在一个实施方案中是红细胞的崩溃或破坏;低水平的红细胞生成素或它们的组合。在一个实施方案中,贫血指范科尼贫血,在一个实施方案中,所述范科尼贫血是导致骨髓衰

竭（再生障碍性贫血）并通常导致急性髓细胞源性白血病（AML）的遗传性贫血。在另一实施方案中，贫血指戴-布二氏贫血、正常红细胞性贫血、再生障碍性贫血、缺铁性贫血、维生素缺乏性贫血、铁粒幼细胞性贫血、阵发性睡眠性血红蛋白尿、慢性病性贫血、肾疾病和透析中的贫血、或它们的组合。在另一实施方案中，本发明的长效 EPO 制剂被用于治疗糖尿病个体。根据这方面并在一个实施方案中，本发明的 EPO 制剂可以与本领域已知的其他糖尿病治疗联合使用，所述治疗特别包括给药胰岛素、口服降糖药，在一个实施方案中所述降糖药为磺酰脲（sulfonurea）药物，在一个实施方案中所述磺酰脲药物特别包括；利糖妥片、格列本脲、格列本脲微粉片剂（glynase）和亚莫利；格华止、噻唑烷二酮类，特别包括曲格列酮片剂、艾可拓和文迪雅；或它们的组合。在另一实施方案中，本发明的长效 EPO 制剂被用于治疗患有慢性肾疾病的个体，而在另一实施方案中，被用于治疗患有晚期肾脏病的个体。在另一实施方案中，本发明的制剂被用于易患上述疾病或病症的个体。

[0156] 要理解本发明的制剂和方法可以用于治疗贫血，无论贫血的原因是什么以及是否已知贫血的原因。

[0157] 在一个实施方案中，本发明的制剂和方法可以与有效治疗贫血的其他治疗一起给药。在一个实施方案中，其他治疗包括补铁、补充维生素 B12、额外来源的红细胞生成素、雄激素、生长因子如 G-CSF 或它们的组合。在另一实施方案中，本发明的制剂和方法可以联合其他治疗如血液和骨髓干细胞移植进行给药。

[0158] 在一个实施方案中，本发明提供如上文所述的治疗制剂，其中所述治疗性多肽是干扰素或其中所述治疗性核酸编码干扰素，在一个实施方案中，所述干扰素为干扰素 α ，在一个实施方案中所述干扰素 α 为干扰素 α 2a。在另一实施方案中，本发明提供包括经遗传修饰的微器官的长效干扰素 α 制剂，所述微器官包含含有与一个或多个调节序列可操作地连接的核酸序列的载体，其中所述核酸序列编码干扰素 α ，从而所述制剂将干扰素 α 的水平比基础水平提高超过 5%，且所述提高的干扰素 α 水平持续超过一个月。在另一实施方案中，本发明提供向有需要的个体提供治疗制剂的方法，其中所述治疗性多肽是干扰素，或者其中所述治疗性多肽编码干扰素，在一个实施方案中，所述干扰素为干扰素 α ，在一个实施方案中所述干扰素 α 为干扰素 α 2a。在另一实施方案中，本发明提供向有需要的个体提供治疗性多肽即干扰素的方法，在一个实施方案中，所述干扰素为干扰素 α ，在一个实施方案中所述干扰素 α 为干扰素 α 2a。

[0159] 在一个实施方案中，干扰素是能够在细胞上产生多效性效应如抗病毒、抗增殖和抗炎效应的多功能细胞因子。因为细胞对干扰素、干扰素 α 和干扰素 β 的这些响应，它们在临床上已被发现可用于治疗病毒性、增殖性和炎性疾病如多发性硬化、乙型肝炎、丙型肝炎和几种形式的癌症。干扰素治疗也可以潜在地用于治疗其他炎性疾病、病毒疾病和增殖疾病。因此，需要干扰素的个体可以患有一种或所有上述疾病或病症。

[0160] 有三类主要的干扰素：阿尔法（ α ）、贝塔（ β ）和伽马（ γ ）。除了它们的抗病毒和抗致癌性质外，干扰素还能活化巨噬细胞和天然杀伤性淋巴细胞，并提高主要组织相容性复合物糖蛋白 I 类和 II 类。干扰素 α 由白细胞（B 细胞和 T 细胞）分泌。干扰素 β 由成纤维细胞分泌，干扰素 γ 由 T 细胞和天然杀伤性淋巴细胞分泌。

[0161] 在一个实施方案中，所述治疗性多肽是干扰素 α ，在另一实施方案中是干扰素 β ，或者在另一实施方案中是干扰素 γ 。在另一实施方案中，所述治疗性多肽是干扰素 α

的任何亚型,包括但不限于:1、2、4、5、6、7、8、10、13、14、16、17或21。在另一实施方案中,所述治疗性多肽是干扰素 ω 、 ϵ 、 κ 或它们的同源物。在另一实施方案中,所述治疗性多肽是干扰素 λ 或其同源物。在另一实施方案中,所述治疗性多肽是干扰素 λ 的任何亚型,包括但不限于:白介素(IL)28A、IL28B或IL29。在另一实施方案中,所述治疗性多肽是干扰素 ζ 、 μ 、 σ 、 δ 或它们的同源物。

[0162] 在一个实施方案中,IFN与特定细胞表面受体复合物结合,在一个实施方案中,所述特定细胞表面受体复合物为包含IFNAR1和IFNAR2链的干扰素 α 受体(IFNAR),在另一实施方案中为包含两个IFNGR1和两个IFNGR2亚单位的干扰素 γ 受体(IFNGR)复合物,在另一实施方案中为包含IL10R2和IFNLR1的受体复合物。在一个实施方案中,干扰素通过JAK-STAT信号途径传递信号。

[0163] 在一个实施方案中,本发明的制剂和方法中的干扰素是干扰素 α 。在一个实施方案中,本发明的制剂和方法中的干扰素是干扰素 α 2b。在一个实施方案中,IFN- α -2b是重组、未糖基化的165-氨基酸 α 干扰素蛋白,包含来自人类白细胞的IFN- α -2b基因。IFN- α -2b是I型、水溶性干扰素,分子量为19,271道尔顿(19.271kDa)。在一个实施方案中,IFN- α -2b的比活按照HPLC测定为约 2.6×10^8 (2亿6千万)国际单位/mg。

[0164] 在一个实施方案中,IFN- α -2b是I型干扰素中的一种,它属于较大螺旋细胞因子超家族,该超家族包括生长激素、白介素、几种集落刺激因子和几种其他调节分子。它们都作为细胞活性的调节剂,通过与被称为IFNAR1和IFNAR2的细胞表面受体复合物相互作用来起作用,并活化各种信号转导途径。干扰素在细胞内产生抗病毒和抗增殖响应。

[0165] 在一个实施方案中,本发明的长效IFN- α 制剂可以用于预防或治疗多毛细胞白血病、性病湿疣、卡波西肉瘤、慢性非甲非乙型肝炎、乙型肝炎或它们的组合。在另一实施方案中,本发明的长效IFN- α 制剂可以给药易患上述疾病或病症中的一种的个体或者已经或将要暴露于感染剂的个体,如本文所述。在另一实施方案中,本发明的长效IFN- α 制剂可以用于预防或治疗丙型肝炎。根据这方面并在一个实施方案中,本发明的制剂可以与其他丙型肝炎治疗同时或交替给药,所述其他丙型肝炎治疗特别包括利巴韦林、干扰素、聚乙二醇干扰素或它们的组合。

[0166] 在另一实施方案中,长效IFN- α 制剂可以单独或与化疗剂联合使用或评价各种其他细胞增殖性疾患,所述疾患包括慢性髓性白血病、多发性骨髓瘤、表浅膀胱肿瘤、皮肤癌(特别包括基底细胞癌和恶性黑素瘤)、肾细胞癌、卵巢癌、低级淋巴细胞和皮肤T细胞淋巴瘤和胶质瘤。在另一实施方案中,长效IFN- α 制剂可以单独或与其他化疗剂联合用于预防或治疗由肺癌、结肠直肠癌和乳腺癌产生的实体瘤。在另一实施方案中,长效IFN- α 制剂可以用于预防或治疗多发性硬化。在另一实施方案中,长效IFN- α 制剂可以用于预防或治疗组织细胞疾病,在一个实施方案中,所述组织细胞疾病为埃尔德海姆-切斯特病(ECD),在一个实施方案中该病是攻击机体结缔组织的潜在致命疾患,在一个实施方案中由组织细胞的过度生成引起,在一个实施方案中,过度生成的组织细胞在松散的结缔组织中积累,使结缔组织变厚变密。在另一实施方案中,长效IFN- α 制剂可以用于预防或治疗严重的眼贝切特病。

[0167] 在一个实施方案中,所述干扰素 α 基因具有对应于基因库登记号:K01900;M11003或M71246中所列的核酸序列,或者编码对应于基因库登记号:AAA52716;AAA52724

或 AAA52713 中所列的蛋白质序列。在一个实施方案中,所述干扰素 β 基因具有对应于基因库登记号 :M25460 ;AL390882 或 CH236948 中所列的核酸序列,或者编码对应于基因库登记号 :AAC41702 ;CAH70160 或 EAL24265 中所列的蛋白质序列。在一个实施方案中,所述干扰素 γ 基因具有对应于基因库登记号 :J00219 ;AF506749 ;NM_000619 或 X62468 中所列的核酸序列,或者编码对应于基因库登记号 :AAB59534 ;AAM28885 ;NP_000610 或 CAA44325 中所列的蛋白质序列。在另一实施方案中,所述干扰素 α 基因具有如 SEQ ID No:9 中所示的核酸序列,而在另一实施方案中,所述干扰素 α 基因具有如 SEQ ID No:10 中所示的氨基酸序列。在另一实施方案中,所述干扰素 α 基因具有与 SEQ ID No:9 中所示同源的核酸,而在另一实施方案中,所述干扰素 α 基因具有与 SEQ ID No:10 中所示同源的氨基酸序列。

[0168] 在另一实施方案中,本发明提供在持续的时间内向有需要的个体递送干扰素 α 的方法,所述方法包括:提供一个或多个经遗传修饰的微器官,所述微器官包含含有与一个或多个调节序列可操作地连接的核酸序列的载体;并将所述经遗传修饰的微器官植入所述个体中,其中所述核酸序列编码干扰素 α ,从而干扰素 α 的水平比基础水平提高超过 5%,并且所述提高的干扰素 α 水平持续超过一个月。

[0169] 在一个实施方案中,本发明的制剂和方法提供被优化用于提高由所述核酸编码的治疗性多肽的表达水平、持续时间或它们的组合的核酸。在另一实施方案中,本发明提供与 SEQ ID No:1 的同源性超过 85% 的核酸序列、包含这样的核酸序列的载体,以及包含这样的载体的细胞。

[0170] 在另一实施方案中,本发明提供与 SEQ ID No:2 的同源性超过 85% 的核酸序列、包含这样的核酸序列的载体,以及包含这样的载体的细胞。

[0171] 用于本文时,术语“同源性”在指代任何核酸序列时指候选序列的核苷酸的百分比与相应的天然核酸序列的核苷酸百分比相同。

[0172] 在一个实施方案中,术语“同源性”、“同源物”或“同源的”在任何情况下均指示所提及的序列在一个实施方案中显示与所指示的序列的至少 70% 的一致。在另一实施方案中,所述核酸序列显示与所指示的序列的至少 72% 的一致。在另一实施方案中,所述核酸序列显示与所指示的序列的至少 75% 的一致。在另一实施方案中,所述核酸序列显示与所指示的序列的至少 77% 的一致。在另一实施方案中,所述核酸序列显示与所指示的序列的至少 80% 的一致。在另一实施方案中,所述核酸序列显示与所指示的序列的至少 82% 的一致。在另一实施方案中,所述核酸序列显示与所指示的序列的至少 85% 的一致。在另一实施方案中,所述核酸序列显示与所指示的序列的至少 87% 的一致。在另一实施方案中,所述核酸序列显示与所指示的序列的至少 90% 的一致。在另一实施方案中,所述核酸序列显示与所指示的序列的至少 92% 的一致。在另一实施方案中,所述核酸序列显示与所指示的序列的至少 95% 的一致。在另一实施方案中,所述核酸序列显示与所指示的序列的 95%–100% 的一致。类似地,提及与特定序列的一致包括两者直接一致,以及与本文定义的序列的同源性。

[0173] 可以通过本领域充分描述的方法,通过用于序列排列的计算机算法测定同源性。例如,核酸序列同源性的计算机算法分析可以包括利用任何数目的可用软件包,比如例如 BLAST、DOMAIN、BEAUTY (BLAST Enhanced Alignment Utility)、GENPEPT 和 TREMBL 程序包。

[0174] 测定同源性的另外的手段是通过测定核酸序列杂交,本领域充分描述了其方法(参见例如“Nucleic Acid Hybridization”Hames, B. D. 和 Higgins S. J., Eds.

(1985); Sambrook 等人, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, (1-3 卷) Cold Spring Harbor Press, 纽约; 以及 Ausubel 等人 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, 纽约)。在一个实施方案中, 可以在中等至苛刻条件下运行杂交方法。杂交条件为例如在包含下列成分的溶液中以 42° C 温育过夜: 10-20% 甲酰胺、5 X SSC (150mM NaCl, 15mM 柠檬酸三钠)、50mM 磷酸钠 (pH 7.6)、5 X Denhardt 溶液、10% 硫酸右旋糖和 20 μ g/ml 变性的、剪切鲑精 DNA。

[0175] 在一个实施方案中, 本发明提供包含微器官的治疗制剂及其使用方法。在一个实施方案中, 治疗微器官的制备包括: (a) 从供体个体中获得多个微器官外植块, 所述多个微器官外植块各自包含细胞群, 所述多个微器官外植块各自保持它们的来源器官的微结构, 同时具有选定的维度, 以允许充足的养分和气体扩散到微器官外植块的细胞内, 使细胞废物扩散到所述微器官外植块之外, 从而使由所述微器官外植块中不足的营养和 / 或废物的积累所致的细胞毒性和伴随的死亡最小化; (b) 遗传修饰所述多个微器官外植块, 以获得多个经遗传修饰的微器官外植块, 所述微器官包含和分泌的蛋白质的至少一个氨基酸是不同的; 并 (c) 将所述多个经遗传修饰的微器官外植块植入多个接受者个体中。

[0176] 在一个实施方案中, 治疗性微器官的制备按照 PCT 专利 WO 03/006669、WO 03/03585 和 WO 04/0993631 中所述进行, 这些文献被全文纳入本文作为参考。

[0177] 用于制备微器官并将其加工成经遗传修饰的微器官的方法公开于 WO2004/099363, 该文献全文纳入本文作为参考。微器官包括限定的组织维度, 从而确保养分和气体扩散进入三维微器官的每个细胞, 并确保细胞废物充分扩散离开得到外植块。在一个实施方案中, 将微器官离体保存在基本培养基中, 能够保持延长的时间段, 从而当使用病毒或非病毒载体将所需候选基因以受控的离体转导方式结合到微器官的细胞中时, 从而产生经遗传修饰的微器官。

[0178] 在一个实施方案中, 使用钻子和钻取针 (coreing needle) 收集微器官, 如下文所述。在另一实施方案中, 使用收集系统收集微器官, 所述收集系统在插入钻取器的过程中利用真空保持皮肤紧绷和打开裂缝。在另一实施方案中, 可以使用可用于收集真皮组织的任何工具收集适当尺寸的微器官, 包括但不限于 PCT 申请 WO 04/099363 中所述的那些工具和方法。

[0179] 可以通过本领域公知的许多方法将重组核酸引入到所述微器官中以产生经遗传修饰的微器官或生物泵。可以利用核酸构建体以稳定或瞬时转导微器官细胞。在稳定转导中, 将核酸分子整合到微器官细胞基因组中, 这样它就表现稳定和遗传性状。在瞬时转导中, 将所述核酸分子保留在转导分子中作为附加体并被细胞表达, 但它没有被整合到基因组中。当所述转导细胞由于附加体的损失成为迅速分裂细胞时, 这样的附加体可以导致瞬时表达, 或者当其中所述转导细胞是未分裂细胞时, 这种附加体可以导致长期表达。

[0180] 通常, 根据将所述序列引入所述微器官中的优选方法, 将核酸序列亚克隆到特定载体内, 如上文所述。一旦将所需的核酸片段亚克隆到特定载体内, 它就变成重组载体。

[0181] 在一个实施方案中, 微器官在遗传修饰之前和之后在 32° C 温育, 而在另一实施方案中, 它们在 37° C 温育。在另一实施方案中, 微器官在 33° C、34° C、35° C、36° C、38° C、39° C、40° C、28° C、30° C、31° C、25° C、42° C 或 45° C 温育。

[0182] 在一个实施方案中, 微器官在遗传修饰之前和之后在 10% CO₂ 中温育, 而在另一实

实施方案中,它们在 5% CO₂ 中温育。在另一实施方案中,微器官在 12% CO₂、15% CO₂、17% CO₂ 或 20%CO₂ 中温育。在另一实施方案中,微器官在 2% CO₂、6% CO₂、7% CO₂、8% CO₂ 或 9% CO₂ 中温育。

[0183] 在另一实施方案中,温育温度、CO₂ 浓度或它们的组合可以在遗传修饰之前、过程中或之后保持在单一温度或浓度,而在另一实施方案中,温育温度、CO₂ 浓度或它们的组合可以在微器官的遗传修饰之前、过程中或之后在不同的点进行调整。

[0184] 在另一实施方案中,微器官在 85-100% 湿度下温育,在另一实施方案中为 95% 湿度,在另一实施方案中为 90% 湿度,在另一实施方案中为 98% 湿度。

[0185] 在一个实施方案中,可以使用本领域已知的任何方法检测治疗性核酸或多肽的水平。可以通过本领域常规使用的标准方法评价特定的表达载体系统和将核酸引入细胞内的方法的效能。例如,可以通过滤膜杂交技术(例如 DNA 印迹法)检测引入细胞的 DNA,可以通过例如 RNA 印迹法、RNA 酶保护或逆转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)检测由诱导的 DNA 的转录产生的 RNA。可以通过适当的测定法检测基因产物,例如通过免疫学检测产生的蛋白质,例如使用特异性抗体,或者通过功能测定法来检测基因产物的功能活性,例如酶测定法。在一个实施方案中,可以使用 ELISA、蛋白质印迹或放射性免疫测定来检测蛋白质。如果要由细胞表达的相关基因产物不能容易地测定,可以首先使用与待用调控元件和载体连接的报告基因来优化表达系统。所述报告基因编码能够容易检测的基因产物,因此能够被用于评价系统的效能。本领域使用的标准报告基因包括编码 β-半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、萤光素酶和人生长激素的基因。

[0186] 因此,在一个实施方案中,在体外测量治疗性多肽或核酸表达水平,而在另一实施方案中,在体内测量治疗性多肽或核酸表达水平。在一个实施方案中,体外测定多肽或核酸的表达水平,在一个实施方案中为 EPO 水平,在另一实施方案中为 IFN-α 水平,允许通过测定微器官体外分泌的治疗剂水平;评估所述治疗剂的体外生成水平和分泌水平与体内血清水平之间的关系;并基于测定的分泌水平和估计的关系,确定要植入的治疗制剂的量,来确定要植入患者体内的微器官的数目。

[0187] 在本发明的另一个优选实施方案中,多核苷酸也可以包括反式或顺式作用增强子或阻抑物元件,它们调节所述微器官的细胞内、或被引入所述微器官内的另外的重组基因表达的内源基因的转录或翻译。可以用于哺乳动物细胞的合适的翻译或转录调控元件的许多实例是本领域已知的。

[0188] 例如,转录调控元件包括顺式或反式作用元件,它们是激活特定启动子的转录所必需的 [(Carey 等人, (1989), J. Mol. Biol. 209:423-432; Cress 等人, (1991), Science 251:87-90; 和 Sadowski 等人, (1988), Nature 335:5631-564)]。

[0189] 翻译激活剂的实例是花椰菜花叶病毒翻译激活剂 (TAV) [参见例如 Futterer 和 Hohn, (1991), EMBO J. 10:3887-3896]。在该系统中,产生双顺反子 mRNA。也就是说,在同一 mRNA 内,由同一启动子转录两个编码区。在缺少 TAV 时,核糖体只翻译第一顺反子,然而在表达 TAV 的细胞中,两个顺反子都被翻译。

[0190] 可以通过常规实践的基因敲入技术将顺式作用调控元件的多核苷酸序列引入微器官的细胞中。关于基因敲入/敲除方法学的综述,参见例如美国专利 5,487,992、5,464,764、5,387,742、5,360,735、5,347,075、5,298,422、5,288,846、5,221,778、

5, 175, 385, 5, 175, 384, 5, 175, 383, 4, 736, 866, 且 Burke 和 Olson, *Methods in Enzymology*, 194:251-270, 1991; Capecchi, *Science* 244:1288-1292, 1989; Davies 等人, *Nucleic Acids Research*, 20(11):2693-2698, 1992; Dickinson 等人, *Human Molecular Genetics*, 2(8):1299-1302, 1993; Duff 和 Lincoln, "Insertion of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human APP gene and expression in ES cells", *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*, 1995; Huxley 等人, *Genomics*, 9:742-750 1991; Jakobovits 等人, *Naure*, 362:255-261 1993; Lamb 等人, *Naure Genetics*, 5:22-29, 1993; Pearson 和 Choi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90:10578-82; Rothstein, *Methods in Enzymology*, 194:281-301, 1991; Schedl 等人, *Nature*, 362:258-261, 1993; Strauss 等人, *Science*, 259:1904-1907, 1993, W094/23049、W0 93/14200、W0 94/06908 和 W0 94/28123 也提供了信息。

[0191] 为了专门评价重组产物的生成,也可能需要下调内源性序列。为此,可以使用反义 RNA 作为内源性序列灭活的手段。将与内源性 mRNA 序列互补的外源性多核苷酸编码序列转录到所述微器官的细胞内。也可以通过本领域熟知的基因敲除技术完成向下调节 ("Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook 等人, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel 等人, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, 纽约 (1988))。

[0192] 也可能需要过度表达重组产物。可以通过在各个载体中提供一个或多个编码序列的高拷贝数来实现过度表达。这些外源性多核苷酸序列可以被置于哺乳动物表达载体的合适启动子的转录控制下以调节它们的表达。在另一实施方案中,可以使用相同基因或几种相关基因的多个副本作为提高多肽或核酸表达的手段。在一个实施方案中,通过 DNA 元件稳定表达,在另一实施方案中,所述 DNA 元件为基体相关区 (MARs) 或支架相关区 (SARs)。

[0193] 在一个实施方案中,腺病毒载体是本发明组合物和用于本发明方法的载体。在使用腺病毒载体作为载体的实施方案中,辅助病毒依赖型腺病毒系统可以被用于一个实施方案,以制备表达治疗性多肽或核酸的辅助病毒依赖型腺病毒载体来转化微器官。在一个实施方案中,这样的辅助病毒依赖型腺病毒系统包括辅助病毒依赖型腺病毒、辅助病毒,用于制备本发明制剂的生产细胞系如 Palmer 和 Ng, 2003 *Mol Ther* 8:846 以及 Palmer and Ng, 2004 *Mol Ther* 10:792 中所述,这些文献据此全文纳入本文作为参考。

[0194] 在一个实施方案中,辅助细胞系被指定为 293,其通过 Ad5 DNA 片段由人胚肾细胞转化并组成性地表达 E1 蛋白质,所述辅助细胞系被用于产生和繁殖复制缺陷的腺病毒载体。在另一实施方案中,辅助细胞系可以源自人肌肉细胞、造血细胞或其他人胚胎间质细胞或上皮细胞。可选地,所述辅助细胞系可以源自许可人腺病毒的其他哺乳动物物种的细胞。这样的细胞包括例如 Vero 细胞或其他猴胚胎间质细胞或上皮细胞。

[0195] 在一个实施方案中,将微器官离体保存一段时间,该时间可为几小时到几个月。在一个实施方案中,它们在植入前被保存了几天,在另一实施方案中在植入前被保存了几周。不受理论的约束,在一个实施方案中,所述温育允许细胞处理和裂解病毒蛋白质,在一个实

实施方案中所述病毒蛋白质是作为病毒载体转导的结果的病毒壳体。在一个实施方案中,壳体蛋白的这样的翻转发生在 2-3 天内,从而在一个实施方案中,在离体第 10 天时,即使有也剩下很少病毒壳体蛋白。在一个实施方案中,病毒壳体的裂解进一步减少了本发明制剂的免疫原性并提高了相关基因的表达水平和表达持续时间。在另一实施方案中,所述温育允许早期 HD-Ad 载体诱导的先天免疫应答在体外发生,在一个实施方案中,在缺少腺基因转录时该响应不会持续超过 24 小时。在另一实施方案中,HD-Ad 载体没有引发由淋巴细胞浸润和在另一实施方案中由 Ad- 特异性 CTL 诱导的后期适应性响应,所述响应通常在给药转录活性第一代 Ad 载体之后,在一个实施方案中主要描绘了其特性。

[0196] 在一个实施方案中,将离体微器官以 $1.6-3 \times 10^9$ 感染微粒 (ip)/ml、 $3-4 \times 10^{12}$ 病毒颗粒 /ml 或 2×10^{11} 病毒颗粒 /ml 的剂量暴露于病毒载体。在另一实施方案中,将离体微器官以 $1 \times 10^3-1 \times 10^{12}$ 病毒颗粒 /ml,在另一实施方案中以 $1 \times 10^3-1 \times 10^9$,在另一实施方案中以 $1 \times 10^6-1 \times 10^9$,在另一实施方案中以 $1 \times 10^6-1 \times 10^{12}$ 病毒颗粒 /ml 的剂量暴露于病毒载体。在一个实施方案中,在微器官内给药个体的病毒颗粒 /g 机体体重的剂量小于 1×10^3 ,在另一实施方案中小于 1×10^2 ,在另一实施方案中小于 1×10^1 病毒颗粒 /g 个体体重。

[0197] 在一个实施方案中,使用生长因子提高微器官中细胞的数目。

[0198] 在一个实施方案中,可以在植入之前评价体外表达,从而能够进行表达重组蛋白的体外与体内相关性研究。

[0199] 在本发明的一些实施方案中,由下列一种或多种因素确定包含待植入的遗传修饰细胞的组织样本的量:基于调整原则常规向这些个体给药的相关治疗剂的相应量、用于类似个体的特定临床方案或人口统计、在他 / 她以前已经通过注射或其他途径接受治疗剂如相关蛋白质的情况下,具体用于同一个体的相应量、个体的数据例如体重、年龄、身体状况、临床状态、以前将遗传修饰的细胞向其他类似个体给药时组织样本的药代动力学数据、以前将遗传修饰的细胞向该个体给药时组织样本的响应或它们的组合。因此,在一个实施方案中,体外测定一个或多个微器官的基因产物的表达水平,测定或估计治疗性多肽或核酸的体外和体内表达水平之间的关系,基于计算或估计关系来确定要植入特定患者体内的微器官的数目。可以如前所述调整治疗剂的剂量 (W02004/099363)。

[0200] 在一个实施方案中,微器官或遗传修饰的微器官可以在体外保持预定的 (proscribed) 时间段,直到需要将它们植入宿主中为止。在一个实施方案中,微器官或遗传修饰的微器官可以在培养基中保持或贮存 1-7 天、1-8 周或 1-4 个月。在另一实施方案中,包围组织样本的上清液培养基中剩余的治疗剂可以被分离并注射或应用到相同或不同的个体中。

[0201] 作为可替换的或附加的,经遗传修饰的微器官可以通过本领域已知的方法低温保存,非限制性的实例为在由组织样本形成后或在遗传改变后,即刻在包含 10% DMSO 的 DMEM 中逐级冷冻 (0°C 、 -20°C 、 -80°C 、 -196°C)。

[0202] 在一个实施方案中,本发明的制剂可以植入受疾病或疾患影响的器官或系统内,所述疾病或疾患可以通过使所述微器官定位于期望位点的方法或途径来治疗或预防。在另一实施方案中,植入制剂的位置远离受疾病或疾患影响的器官或系统。因此,尽管在一个实施方案中,重组蛋白是局部释放的,在另一实施方案中,所述重组蛋白扩散到淋巴系统内,在另一实施方案中,这会最终导致重组蛋白的全身分布。因此,本发明提供不同浓度的治疗

制剂用于治疗在有需要的个体的任何部位中表现出的疾病或疾患的用途。

[0203] 根据这方面并且在一个实施方案中,本发明的制剂可被植入瘤内。在另一实施方案中,制剂可以植入远离肿瘤的位置,在一个实施方案中这涉及肿瘤的特定类型的转移。在另一实施方案中,本发明的制剂可以植入个体的肾内,在一个实施方案中是囊下植入。在另一实施方案中,本发明的制剂经腹腔镜(laparoscopically)植入。

[0204] 在一个实施方案中,本发明的制剂可以被单次植入用于急性治疗短暂的病症,或者可以被多次植入,尤其是在进行性、复发性或退行性疾病的情况中。在一个实施方案中,可以同时给药本发明的一个或多个制剂,或者在另一实施方案中,它们可以错开的方式给药。在一个实施方案中,所述错开的方式可以依照疾病的阶段或时期的指示。

[0205] 在一个实施方案中,将所述微器官植入个体中的期望位置,使得所述微器官的至少一部分细胞仍然有活力。在本发明的一个实施方案中至少约 5%,在本发明的另一实施方案中至少约 10%,在本发明的另一实施方案中至少约 20%,在本发明的另一实施方案中至少约 30%,在本发明的另一实施方案中至少约 40%,在本发明的另一实施方案中至少约 50% 或更多的细胞在向个体给药后仍然有活力。细胞在向个体给药后的存活期可以短至几小时,例如二十四小时,到几天,到长至几周或几个月或几年。

[0206] 在接受者个体中植入微器官提供了所述重组产物的持续剂量。可以在植入之前准备所述微器官以有效结合到宿主中,从而促进例如在植入组织内形成血管。重组产物因此可以在生产后立即递送到外周接受者循环中。可选地,可以在植入之前准备微器官以防止细胞粘附和有效结合到宿主中。防止血管形成的方法的实例包括将微器官包装到用丝线或尼龙等制成的可商购的细胞密封限定直径的生物学网袋如 GORE-TEX 袋(Terrill P J, Kedwards S M, 和 Lawrence J C. (1991) The use of GORE-TEX bags for hand bums. Burns 17(2):161-5) 中,或者用防止细胞粘附的材料如 Teflon 涂布的其他多孔膜中。

[0207] 然后通过例如设计用于受控递送化合物如药物、包括蛋白质型生物药剂的聚合装置递送由微器官产生的基因产物。在本发明的语境中,各种生物学相容的聚合物(包括水凝胶),包括可生物降解的和不可生物降解的聚合物两者都可以用于形成将微器官的基因产物持续释放到特定目标位置的植入物。这样的植入物的产生是本领域公知的(参见例如 Concise Encyclopedia of Medical & Dental Materials, ed. By David Williams (MIT Press: Cambridge, Mass., 1990); Sabel 等人的美国专利 4,883,666; Aebischer 等人的美国专利 4,892,538; Aebischer 等人的美国专利 5,106,627; Lim 美国专利 4,391,909 和 Sefton 美国专利 4,353,888)。

[0208] 可以通过标准的外科技术,或者通过利用特殊改制的注射器,使用适合给药微器官的注射器将微器官制剂注射到哺乳动物的预期组织区域内,来植入本发明的经遗传修饰的微器官。在另一实施方案中,使用导管植入微器官。在一个实施方案中,PCT 公布 W02 04/099363 中所述的任何植入方法都可以使用并被认为是本发明的实施方案。

[0209] 在一个实施方案中,微器官被植入皮下、皮内、肌内、腹膜内或胃内。在一个实施方案中,术语“植入”排除作为裂缝厚度或完全厚度的皮肤移植物被移植。在本发明的一个实施方案中,用于植入的供体微器官优选由接受者哺乳动物(即自体),或者由同源的哺乳动物的器官组织来制备,但异源和异种组织也可以用于制备所述微器官,条件是在植入之前、或者在植入过程中采取供应措施,以避免移植物排斥和/或移植物抗宿主病(GVHD)。用于

本文时, GVHD 指移植物抗宿主病, 这是由对抗接受者宿主的移植免疫应答引起的组织移植(移植物)后果。更具体地, 移植物抗宿主病是由供体 T 淋巴细胞(T 细胞)引起的, 它将接受者识别为外来物并攻击接受者的细胞。用于防止或缓解移植物排斥或 GVHD 的许多方法是本领域已知的, 并可用于本发明的方法。在一个实施方案中, 为了便于将细胞群移植到可能经受宿主免疫攻击的组织内, 例如在使用异种移植如猪-人移植时, 可以将微器官插入或包封到生物相容的免疫保护材料如可反复使用、不可生物降解或可生物降解的装置内, 然后移植到接受者个体中。

[0210] 在另一实施方案中, 用于植入的供体微器官优选由供体制备, 所述供体与接受者是人白细胞抗原(HLA)匹配的, 在一个实施方案中, HLA 是人体内的主要组织相容性复合物。在一个实施方案中, 供体和接受者的 I 类主要组织相容性复合物(MHC)基因、II 类 MHC 基因或它们的组合匹配。在一个实施方案中, I 类 MHC 基因包括 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C, 其中在一个实施方案中, I 类 MHC 基因的不匹配增加了移植物排斥的危险, 在一个实施方案中, II 类 MHC 基因包括 HLA-DPA1、HLA-DPB1、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DRA、HLA-DRB1, 其中在一个实施方案中, II 类 MHC 基因的不匹配增加了 GVHD 的危险。在另一实施方案中, 供体和接受者的 HLA-DM 和 HLA-DO 基因匹配。

[0211] 在一个实施方案中, 通过本领域已知的技术增强病毒从离体细胞的周转或消除, 这样的技术如物理方法(在一个实施方案中是加热)、使用抗病毒剂、刺激细胞的病毒翻转的药剂等。

[0212] 在一个实施方案中, 尽管本发明的长效制剂提高核酸或多肽表达的水平 and 持续时间, 但核酸或多肽表达的水平没有无限地升高。不受理论的约束, 在一个实施方案中, 作为表达重组核酸或多肽的分化真皮成纤维细胞的死亡的结果, 由本发明的长效制剂表达的核酸或多肽的水平可以作为时间的函数而下降。

实施例

[0213] 实验材料和方法

[0214] 材料和设备清单

[0215] 制备培养基用于生长微器官并包含 DMEM-HEPES 培养基(高葡萄糖 4, 500mg/L 和 25mM HEPES ;Hi-Clone Cat# SH3A1448.02), 所述 DMEM-HEPES 培养基包含 1% 谷氨酰胺并添加有 50 μ g/ml 庆大霉素(RAFA 实验室, 用于注射)和 0.1% 两性霉素 B(BMS, Fungizone I. V.)(在培养基中的最终浓度为 2.5 μ g/ml 两性霉素 B)。在一些实验中, 将 10% 血清代替品添加物(SSS, Irvine Scientific, Cat# 99193)、10% 自体人血清或 10% 胎牛血清(FBS 或 FCS)添加到制备培养基中。

[0216] 真皮微器官的收集——同心针法

[0217] 从供体的下腹部区域的皮肤区域收集人皮肤微器官。为防止收集表皮, 沿着直线, 从要收集微器官的皮肤区域的一侧切出经过角质层进入真皮的浅裂缝(1-2mm 深), 在离第一个裂缝 30mm 处, 平行地切出相似的裂缝。裂缝之间的距离决定了微器官长度并在整个实验中保持恒定。

[0218] 将细口(通常为 22GA)皮下注射用针连接到充满无菌盐水的 1ml 注射器上, 将其插入第一个裂缝处的暴露真皮内并沿着收集位置的真皮向着对面的裂缝滑动, 在必要时将

针构成角度以使它在对面的裂缝处穿出真皮。

[0219] 接下来,用手术钳沿着引导针的长度夹紧外部皮肤。稍微提起陷入真皮的针以抬高包围它的皮肤区域,有时在夹紧皮肤之前,在插入皮下注射用针的点之下使用钩形装置来帮助提起皮肤。引导针的顶端从其出口点突出,将其插入钻取针(1-3mm 直径, Point Technologies, CO USA)的尖锐前端内,钻取针用可商购的钻子(例如 Aesculap Micro Speed GD 650, GD 657)支撑。将少量无菌盐水从注射器中注射到钻取针内。启动钻子,以高速(通常为 3000-7000 RPM)旋转钻取针,在旋转的同时,将钻子和钻取针沿着引导针的轴手工向前推进,以切出 30-40mm 长度的圆柱形皮肤核心(真皮微器官),其外径大约为钻取针的内径。所述真皮微器官通常仍然附着在引导针上,将其从钻取针内退出并放入制备培养基(如上所述)中,并将钻取针从皮肤上取下。

[0220] 使用镊子,将每个微器官转移到 24 孔板的标记单个孔内,孔中包含 1000 \square 1 制备培养基。为除去碎屑,用 1000 \square 1 制备培养基将每个微器官的培养基再更换两次。然后将包含 1000 \square 1 制备培养基内的微器官的板转移到在 32° C、10% CO₂ 和 ~95% 湿度下保持平衡的温育器中,经过 24 小时恢复期。

[0221] 病毒转导

[0222] 将每个微器官转移到 48 孔板的孔内进行转导,该 48 孔板具有较小的孔,需要较小的总液体体积,来保存病毒。将培养基小心地从每个孔中移出,而不扰乱里面的微器官。在临床前实验过程中,测试了三种不同的载体:1.6-3 \times 10⁹ 感染粒子(ip)/ml 第一代腺病毒(Molecular Medicine)、大约 3-4 \times 10¹² 病毒颗粒/ml 辅助病毒依赖型腺病毒(Baylor)、或大约 2 \times 10¹¹ 病毒颗粒/ml 腺伴随病毒(University of Pennsylvania),它们分别包含重组人 EPO 基因、优化的重组人 EPO 基因或优化的 IFN- α 基因,将它们包含或不含 FCS 的 DMEM-HEPES(Gibco Ca# 42430-025)中分别稀释 1:10、1:25、1:50、1:100、1:500 或 1:1000。向 48 孔板的每个孔中充入 100 μ L 稀释滴定度的病毒中的一种。将板放入 CO₂ 温育器内,通过在数字式微滴定振荡器上以 300rpm 搅动 2 小时并在不振荡的情况下再温育 16-22 小时来帮助转导。

[0223] 在转导后,将转导的微器官转移到 24 孔板上,然后用制备培养基(不含 FCS)洗涤三次,以除去非转导的病毒颗粒。在洗涤后,将生物泵保持在 1mL 制备培养基中,处于湿度 95%、10% CO₂ 和 32° C 的标准高湿度 CO₂ 温育器内。在除去病毒载体七十二小时后,用新鲜培养基代替制备培养基,并测定已消耗的培养基的等分部分的分泌重组蛋白水平。

[0224] 离体微器官保持

[0225] 每 3-4 天,收集用过的制备培养基,评价分泌的重组蛋白水平和葡萄糖水平以及生物泵的存活力。将新鲜制备培养基添加到 24 孔板内。

[0226] 分泌的蛋白质测量

[0227] 根据制造商的说明书,使用酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(Quantikine 人红细胞生成素;R&D Systems;人干扰素 α ELISA 试剂盒,PBL Biomedical Laboratories)来测定人 EPO(hEPO)和 IFN α 浓度以及分泌水平。

[0228] 葡萄糖测量

[0229] 根据制造商的说明书,使用 Sigma-Aldrich Corporation GAG020 Glucose(GO)测定试剂盒评价组织葡萄糖消耗。

[0230] 血细胞比容测量

[0231] 根据制造商的说明书,使用Sigma-Aldrich Corporation GAG020 Glucose(G0)测定试剂盒评价组织葡萄糖消耗。

[0232] 如本领域中已知,使用由国家临床实验标准委员会(NCCLS)推荐的参照法,使用离心测定血细胞比容水平。为测定血细胞比容,将试管中的全血在 $10-15,000\times g$ 离心5分钟,以使红细胞成丸(称为浓缩红细胞),使用读图仪,在离心后10分钟内测量浓缩红细胞柱与毛细管中样本总长的比率。

[0233] 微器官植入

[0234] 在一些实验中,在测定组织葡萄糖消耗后,将经遗传修饰的微器官或对照微器官皮下植入重症联合免疫缺陷(SCID)小鼠中,以确定微器官是有活力的。体重为约25克的雄性和雌性SCID小鼠被 $140\mu l$ 稀释的Ketaset(盐酸氯胺酮)($400\mu l$ Ketaset和 $600\mu l$ 盐水)麻醉或在微器官转导10天后,将对照微器官或表达EPO的微器官皮下植入。

[0235] 实施例1

[0236] 由GMMO体外产生的EPO和IFN α 水平

[0237] 如上所描述制备微器官并用与CAG启动子连接的表达优化的IFN α 基因的辅助病毒依赖型腺病毒载体转导,如上所述。然后将GMMO保持在培养基中,通过ELISA评价产生的IFN α 的水平。在收集后至少40天中,表达优化的IFN α 的微器官体外产生超过1000ng/天的IFN α (图1),在收集后至少142天中,表达重组hEPO的微器官体外产生超过1000ng/天的hEPO(图2A-B)。

[0238] 与包含编码hEPO的腺病毒-5载体的微器官相比,包含编码优化的hEPO的无肠腺病毒载体的GMMO将更高的峰值表达百分比保持超过200天(图3)。与包含编码非优化的hEPO的无肠腺病毒载体的微器官相比,包含编码优化的hEPO的无肠腺病毒载体的微器官也将更高的峰值表达百分比保持更长的时间(图4)。最后,与包含CMV增强子下游的编码hEPO的无肠腺病毒载体的微器官相比,包含CAG增强子下游的编码hEPO的无肠腺病毒载体的微器官显示出更高水平的hEPO表达,hEPO作为转导后天数的函数生长得更显著(图5)。

[0239] 实施例2

[0240] 由保存在体外和植入SCID小鼠血清中的表达人EPO的GMMO产生的EPO水平

[0241] 如上所描述制备表达EPO的微器官。在培养总共九天后,测量每个微器官产生的EPO的量,使用该值确定给每只小鼠植入表达相等水平的EPO的微器官。在第十天,将两个微器官皮下植入每只SCID小鼠体内,在十天后进行的第一次测量时,在SCID小鼠血清中测量的hEPO水平明显高于基线水平。在植入后至少216天内水平仍然高,SCID小鼠体内的血细胞比容在至少157天中明显上升(图6A)。在与植入的表达EPO的微器官相同的时间,从同一供体制备未植入的表达EPO的微器官,但将其保存在体外,所述微器官连续保持高水平的EPO生成(图6B)。与用重组hEPO基因转导的微器官相比,用包含优化的hEPO基因的载体转导的微器官在体内(图6A)和体外(图6B)均产生更高水平的EPO。在植入微器官后,与植入前相比,植入了不产生EPO的微器官的对照SCID小鼠没有显示出血清EPO水平上升和血细胞比容水平的明显变化(图6A)。包括表达EPO的腺病毒-5的微器官被用作阳性对照,相对于包括表达EPO的优化或非优化无肠腺病毒载体的微器官的1:100滴定度,阳性对照以1:10的滴定度使用。

[0242] 实施例 3

[0243] 植入遗传修饰微器官的人在临床试验中产生的 EPO 水平

[0244] 按照以前的描述 (Lippin 等人, 2005, Blood 106 (7):2280-6, 全文纳入本文作为参考) 进行临床试验, 除了会如上文所描述收集和基因修饰微器官。

[0245] I 期临床试验在以色列进行, 在患有慢性肾病的透析前贫血患者中植入本发明的持续型自体 hEPO-GMMO。期望用 GMMO-hEPO 单次植入治疗来提供 4-6 个月的有效 EPO 治疗。I/II 期 GMMO hEPO 试验经以色列卫生部批准并在 Hadassah 医疗部门进行。关于所需规定和临床标准的所有步骤均符合 FDA 要求, 以便于基于美国的临床试验。

[0246] 在准备计划的临床试验时, 在 SCID 小鼠中进行所需的临床前毒理学研究。这些研究按照前面所述 (Brill-Almon 等人 Molecular Therapy 12 (2), 274-282) 进行, 具有超过 20 天的附加的时间点。在符合 FDA GMP 的工厂中制备用于临床试验的 HD-Ad-hEPO 载体以符合用于患者时所要求的 FDA 原则 (GMP)。将 GMMO 植入四到六个月, 然后在试验结束时除去或切除, 或者如果 PI 要求并经伦理委员会批准, 可延长时间。

[0247] 如表 1 所示, 毒理学研究包括三组 SCID 小鼠, 具有相等数目的雄性和雌性个体。由于 SCID 小鼠的高死亡率, 每组包括了大量动物。

[0248] 表 1. 实验设计

[0249]

GMMO 剂量	小鼠总数	第 8 周处死数	第 16 周处死数	第 24 周处死数
100-150IU Epo/ 天	30 (17M, 17F)	5M, 5F	5M, 5F	5M, 5F
300-450IU Epo/ 天	30 (17M, 17F)	5M, 5F	5M, 5F	5M, 5F
对照 - 非转导	30 (17M, 17F)	5M, 5F	5M, 5F	5M, 5F

[0250] 第一组中, 每只动物最多接受单个真皮 30mm hEPO GMMO 或者更可能是一部分 GMMO, 它们分泌 100-150IU EPO/ 天。由于每只小鼠重量为大约 25 克, 因此该剂量等于 4,000-6000IU/ 天 /kg 小鼠 (为建议植入人类患者的最高预期剂量的 25 倍或更多)。由于 GMMO 的小尺寸以及这种小尺寸对其处理的影响, 植入组织的尺寸通常相当于整个 GMMO 的至少 1/4。

[0251] 第二组中, 每只动物最多接受单个真皮 30mm hEPO GMMO 或者更可能是一部分 GMMO, 它们会分泌 300-450IU EPO/ 天。由于小鼠重量为大约 25 克, 因此该剂量等于 12,000-18,000IU/ 天 /kg 小鼠 (为建议植入人类患者的最高预期剂量的 80-120 倍或更多)。

[0252] 在第三组, 即对照组, 每只动物接受三分之一 (10mm) 30mm 真皮非转导的 GMMO。

[0253] 给药原则: 在测量由 GMMO 体外产生的实际每日蛋白质的量后, 通过调整 GMMO 的数目或尺寸, 控制植入前的 GMMO-hEPO 给药。在上面所列的实验方案中, 用与我们在临床试验中所用相似的病毒滴度转导微器官, 从而将 GMMO 中的细胞暴露至相似的多重感染。这些 GMMO 产生的分泌 hEPO 的一般水平在 300-1000IU/ 生物泵 / 天的范围内。因此, 预期由 1/3BP (相当于 1.0cm) 和 2/3BP (相当于 2.0cm) 分泌的最低 EPO 的量分别为大约 100IU 和

200IU。通过植入短于 0.5cm 的片段,可以降低小鼠中的剂量。

[0254] 基于我们前面临床试验的结果,预期大约 1500-3500IU/70kg 患者(或 1-3 个 GMMO)足以引起网状细胞的持续生成并导致血细胞比容上升。因此,从植入 25 克小鼠中的单个 GMMO 或 GMMO 片段分泌的 100IU EPO,是我们建议植入人类患者的最高预期剂量的至少 25 倍或更高。因此,在该研究中使用至少 1/4GMMO 即可提供充分的安全裕度(safety margin)以测试 GMMO-EPO 在小鼠中的毒理学效应并支持临床剂量。

[0255] 正如我们已经证明的,来自多例人类腹部皮肤样本 GMMO 的 hEPO 分泌水平为大约 300-1000IU/天。尽管来自相同的皮肤样本的 GMMO 的分泌水平相似,但不同皮肤样本之间的变异性较高。正如我们已经证明,通过在植入前测量体外分泌水平,在 GMMO 植入小鼠之前解决剂量变异性。除了组织学,整个研究都会在 GLP 下完成。组织学玻片会由一组经认证的病理学家盲态审核。要进行的试验包括:

[0256] 临床体征:每天

[0257] 体重:隔天

[0258] 器官重量:心、肝、肾、脾、脑、胸腺(如果能够找到)会在最后处死时测定

[0259] 临床化学:在最后处死时

[0260] 完整的血液学特征:在最后处死时。要包括血清 hEPO 水平和血细胞比容。

[0261] 临床病理学:在最后处死时

[0262] 组织学包括:植入位点、肝、肾、淋巴结、心、脾、骨髓及在尸检和骨髓中发现的任何损伤都会在最后处死时进行检查。

[0263] 所有其他器官都会被保存用于未来分析。

[0264] 与涉及细胞的瞬时转导的其他方法或迅速翻转的细胞相比,本发明的长效 EPO 制剂包含不再复制的细胞。因此,所述 EPO 制剂从稳定的构建体产生稳定的蛋白质并被预期会继续产生已经表征过的蛋白质。

[0001]

序列表

<110> 迈德詹尼克斯医疗以色列有限公司

<120> 长效药物制剂

<130> P-8802-PC

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 582

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> optimized variation of human EPO

<400> 1

```

atgggegtgc acgagtgcc cgcttgctg ttgctgctgc tgcctctgt gtctctgccc   60
ctgggcctgc ctgtgctggg agccctccc cgctgatct ggcacagcc ggtgctggaa   120
agatacctgc tgaagecaa agaggccgag aacatcaca ccgctgcgc cgagcactgc   180
agcctgaacg agaatatca cgtccccgac accaaggtga acttctacg ctggaagcgg   240
atggaagtgg gccagcagc cgtggaagt tggcaggcc tggcctgct gtccgaggcc   300
gtgctgagag ggcagccct gctggtgaa agcagccagc cctgggagcc tctgcagctg   360
cacgtggaca aggcctgag cggcctgagg agcctgacca cctgctgag ggcctgggc   420
gccagaaag aggcctcag cccctgat gccctctg ccgcccctct gggaccatc   480
accgctgaca ccttcggaa gctgttcgg gtgtacagca acttctgct ggcgaagctg   540
aagctgtaca ccggcgagc ctgcccagc ggcgctgct ga                               582

```

<210> 2

<211> 645

[0002]

<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	optimized variation of human IFN alpha 2b	
<400>	2	
ggcgcgccaa gcttgcgatg ctgcaggteg actctagaact gccatggccc tgaccttcgc		60
cctgctggtg gccctgctgg tgcctgctcga caagagcagc tgcagcgtgg gctgcgacct		120
gccccagacc cacagcctgg gcagccggcg gacctgatg ctgctggccc agatgcggcg		180
gatcagcctg ttcagctgcc tgaaggaccg gcacgacttc ggcttcccc aggaagagtt		240
oggcaaccag ttccagaagg ccgagacat cccctgctg cagcagatga tccagcagat		300
cttcaacctg ttcagcacca aggacagcag cgcgcctgg gacgagacc tgctggacaa		360
gttttaacc gagctgtacc agcagctgaa cgacctggaa gctgctgta tccagggegt		420
gggcgtgacc gagaccccc tgatgaaaga ggacagcacc ctggccgtgc ggaagtactt		480
ccagcggatc acctgtacc tgaagagaa gaagtacagc cctgcgctt ggaagtgggt		540
gcgggcagag atcatgcgga gcttcagcct gacgaaccaac ctgcaggaaa gctgcggag		600
caaagagtga ggatccccgg gtaccgagct cgaattctta attaa		645
<210>	3	
<211>	4684	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequences from adenovirus, CMV, and variation of human EPO	
<400>	3	
catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt		60
ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt		120
gatgttgcga gtgtggcgga acacatgtaa gcgaaggatg tggcaaaagt gacgtttttg		180

[0003]

gtgtgcgccc gtgtacacag gaagtgacaa ttttgcgccc gttttaggcg gatgtttag 240
 taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga 300
 agtgaaatct gaataatitit gtgttactca tagcgcgtaa tatttgtctc ggcccgccgg 360
 gaatttgacc gtttactgtg agactcgcgc aggtgttttt ctcaggtgtt ttcccgcttc 420
 cgggtcaaag ttggcgtttt attattatag tcagctgacg tgtagtgtat ttatacccg 480
 tgagttctc aagagccac tcttgagtgc cagcagtag agttttctc tccgagccg 540
 tccgacaccg ggagcgccg cctcgagcta gctgttgaca ttgattattg actagttatt 600
 aatagtaate aattaccggg tcattagttc atagccata tatggagttc cgcgttacct 660
 aacttacggt aatggcccc cctggctgac cgcceaacg cccccccca ttgaagtea 720
 taatgacgta tgttccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg 780
 agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcataig ccaagtacg 840
 cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgctggca ttatgccag tacatgacct 900
 tatgggactt tctacttgg cagtacatct acgtattagt cctcgtatt acctgggtga 960
 tgcggttttg gcagtacatc aatggcgctg gatagcggtt tgactcacgg ggatttccaa 1020
 gtctccacce cattgacgtc aatgggagt ttgtttggca ccaaatcaa cgggacttcc 1080
 caaatgtcg taacaactcc gcccattga cgcgaatggc cggtagcgt gtacgggtgg 1140
 aggtctatat aagcagagct cgtttagtga accgtaagct tgcattccig caggctgact 1200
 ctgactgcc atggcgctgc acgagtgcgc ccctggctg ttgctctgc tctcctgct 1260
 gtctctgcc ctggcctgc ctgtctggg agccccctcc cggctgatct ggcacagccg 1320
 ggtgctggaa agataactgc ttgaagccaa agagccgag aacatcaca ccgctgcgc 1380
 cgagcactgc agcctgaacg agaatatcac cgtgccccgac accaaggtga acttctacg 1440
 ctggaagcgg atggaagtgg gccagcagc cgtggaagtg ttgcagggcc tgccctgct 1500

[0004]

gtccgaggec gtgctgagag ggcaggecct gctggtgaac agcagccagc cctggggagc 1560
 tetgcagctg cacgtggaca aggcctgtgag eggcctgcgg agcctgacca ccctgctgag 1620
 ggcctgggc gccagaaag aggcctcag cccctgat gcgcctctg ccgcccctct 1680
 gggaccatc accgccgaca ccttccgaa gctgttccgg gtgtacagca acttctgcg 1740
 gggaagetg aagctgtaca ccggcgagc ctgccggacc ggcgatect gaggateccc 1800
 ggttaccgag ctgaattct ttgtagaggt ttacttgcct ttaaaaaacc tcccacacct 1860
 cccctgaac ctgaacata aaatgaatgc aattgttgtt gtaacttgt ttattgcagc 1920
 ttataatggt tacaaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaataaag cattttttc 1980
 actgcattct agttgtggt tgcctaaact catcaatgta tcatatcgg cgcgcggg 2040
 cctacgtea ccgcccctg tcccacgcc cgcgcacgt cacaaactcc acccctcat 2100
 tatcatattg gcttcaatcc aaaataaggt atattattga tgatggccc agcggcccct 2160
 ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgat gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg 2220
 gogaatggga cgcgccctgt agcggcgcct taagcgcggc ggtgtggtg gttacgcga 2280
 gcgtgaccgc tacaattgcc agcgcctag cgcgcctcc ttctcttcc ttcccttct 2340
 ttctgcacc gttcgcggc ttcccctc aagctctaaa tgggggctc ccttagggt 2400
 tccgatttag tctttagcg cactcagcc ccaaaaaact tgattagggt gatggttcc 2460
 gtagtgggcc atgcctga tagacggtt ttgccttt gacgttgag tccagttct 2520
 ttaatagtgg actctgttc caaactgaa caaactcaa cctatctcg gtctattct 2580
 ttgatttata agggatttg ccgattcgg cctattggt aaaaaatgag ctgattaac 2640
 aaaaatttaa cgcgaattt acaaaaat taacgctac aatttaggt gcactttcg 2700
 gggaaatgt cgcggaacc ctattgttt atttttctaa atacattcaa atatgtacc 2760
 gctcatgaga caataacct gataaatgt tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag 2820

[0005]

tattcaacat ttccgtgteg cecttattcc cttttttgcg gcattttgce ttcctgtttt	2880
tgctcacceca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgetgaa gatcagttgg gtgcacgagt	2940
gggttacate gaactggate tcaacagecg taagatcett gagagtttte gccccgaaga	3000
acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgetatgt ggecggtat tateccgtat	3060
tgaogccggg caagageaac tgggtgceg catacactat tctcagaatg acttggttga	3120
gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag	3180
tgetgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatecgagg	3240
accgaaggag ctaaccgctt ttttgcaaa catgggggat catgtaacte gccttgatcg	3300
tigggaaccg gagetgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgaigcctgt	3360
agcaatggea acaacgttgc gcaaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg	3420
gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcgge	3480
cttccgget ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcg	3540
tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgat atcgtagtta tctaacgac	3600
ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact	3660
gattaageat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa	3720
acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt ttgataatc tcatgaccaa	3780
aateccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg	3840
atcttcttga gatccitttt ttctgcegt aatctgetgc ttgcaaaaa aaaaaccacc	3900
gtaccacgcg gtggtttggt tgccggatec agagetacca actcttttcc cgaaggtaac	3960
tggettccgc agagcgcaga taccaaatac tgtcctteta gtgtagccgt agttaggeca	4020
ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgtc ctgetaatcc tgttaccagt	4080
ggetgctgce agtggcgata agtctgtctc taccgggttg gactcaagac gatagttacc	4140

[0006]

ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg 4200
 aacgacctac accgaactga gataacctaca gcgtgageta tgagaaagcg ccacgettcc 4260
 cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac 4320
 gagggagctt ccaggggaa acgcctggtta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct 4380
 ctgacttgag cgtcgatfff tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc 4440
 cagcaacgcg gcctffttac ggttccctgce cttttctggt ccttttgctc acatgttctt 4500
 tccctgcfta tcccctgatt cigtggataa ccgtattacc gccittgagt gagctgatac 4560
 cgctcgcgcg agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg 4620
 cccaatacgc aaaccgcctc tcccgcgcg ttgcccgatt cattaatgca ggggcgcctg 4680
 cggc 4684

<210> 4

<211> 5261

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequences from adenovirus, CAG, and variation of human EPO

<400> 4

catcatcaat aatatacett attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt 60
 ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgig gcggaagtgt 120
 gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgttttig 180
 ggtgcccgcg gtgtacacag gaagtgaaa ttttcgcgcg gttttaggcg gatgtttag 240
 taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga 300
 agtgaaatct gaataatfff gtgttactca tagcgcgtaa tatttgccta gggcccgggg 360
 gaatttgacc gtttacgtgg agactcgcgc aggtgttttt ctcaggtggt ttcgcgcttc 420

[0007]

cgggtcaaag ttggegTTTT attattatag tcagctgacg tgtagtgtat ttatacccg 480
 tgagttcctc aagagccac tcttgagtgc cagcagtag agttttctcc tccgagccgc 540
 tccgacaccg ggaggegcgc cctegageta gccctagtt attaatagia atcaattacg 600
 gggtcattag ttcatagecc atatatggag ttcecggtta cataacttac ggtaaattgc 660
 ccgectgget gaccgeccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc 720
 ataglaecgc caatagggac ttccallga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact 780
 gcccacttgg cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat 840
 gacggtaaatt ggccccctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttctact 900
 tggcagtaca tctaegtatt agtcateget attaacatgg tcgaggtgag ccccacgttc 960
 tgettcactc tccccatctc cccccctcc ccacccccaa ttttgtattt atttattttt 1020
 taattatttt gtgcagcgat gggggcgggg gggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg 1080
 gggcgggggc aggggcgggg cggggcgagg cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc 1140
 ggcgcgcctc gaaagtctc ttttatggcg aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag 1200
 cgaagcgcgc ggcgggcggg agtcgctgcg cgtgccttc gccccgtgcc ccgctccgcc 1260
 gcgcctcgc gccgcccc ccgctctga ctgaccgct tactcccaca ggtgagcggg 1320
 cgggaecgcc cttctctcc ggctgtaat tgcgcttg tttaatgac gcttgtttct 1380
 tttctgtgce tgcgtgaaag ccttgagggg ctccgggagc gccggcagga aggaaatggg 1440
 cggggaggge cttcgtcgt cgcgcgcgc cgtcccctt ctccctctc agcctcgggg 1500
 ctgctcgcgg ggggacggt gccttcgggg gggacgggce agggcggggt tcgcttctg 1560
 gcgtgtgacc ggcggtctc gagcctctgc taaccatgtt catgccttet ttttttct 1620
 acagctcctg ggcaacgtgc tggttattgt gctgtctcat ctttttgc aagaattgat 1680
 taattcgagc gaacgcgtc agtcgctcgg tacgatttaa attgaattgg gctcgagatc 1740

[0008]

tgcgatctaa gtaagettgc atgcctgcag gtegaeteta gactgccatg ggcgtgcacg	1800
agtgccecegc ctggetgtgg ctgetgtgt cectgetgtc tetgcectg ggctgcctg	1860
tgetgggagc cctceccgg ctgatctgag acagecgggt getggaaaga tacctgttg	1920
aagccaaaga ggccgagaac atcaccaccg gctgegcga gcactgcage ctgaacgaga	1980
atacacegt gcccgacacc aaggigaact tctacgctg gaagcggatg gaagtgggc	2040
agcaggccgt ggaagtgtgg cagggcctgg cctgetgtc cgaggccgtg ctgagagggc	2100
aggccctgct ggtgaacagc agccagcct gggagcctct gcagctgcac gtggacaagg	2160
ccgtgagcgg cctgcccagc ctgaccacc tctgagggc cctgggcgc cagaaagagg	2220
ccatcagccc cctgatgccc gccctgcgc cccctctgag gaccatcacc gccgacacct	2280
tccggaaget gttccgggtg tacagcaact tctgcccgg caagctgaag ctgtacaccg	2340
gegagccctg ccggaccggc gatcgtgag gatecccggg taccgagctc gaattctttg	2400
tagaggtttt acttgettta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa	2460
tgaatgcaat tgttgtgtt aacttgttta ttgcagetta taatggttac aaataaagca	2520
atagcaccac aaattcaca aataaageat tttttcact gcattctagt tgtggtttgt	2580
ccaaactcat caatgtatg atatcggcgc gccgggcccc tacgtcacc gccccgttcc	2640
cacgcccgc gccacgtcac aaactccacc cctcattat catattggt tcaatccaaa	2700
ataaggtata ttattgatga tggccgcagc gcccctggc gtaatagcga agaggcccgc	2760
accgatgccc ctcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatgggacgc gccctgtagc	2820
ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttcccagc	2880
gccctagcgc ccgtccttt cgtttcttc ccttccttc tcccacggt ccccgtttt	2940
cccctcaag ctctaaatcg gggctccct ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac	3000
ctcgacccca aaaaacttga ttagggtgat ggttcacgta gtgggcccac gccctgatag	3060

[0009]

acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttettta atagtggact cttgttccaa 3120
 actggaacaa cactcaacce tatctcggtc tattcttttg atttataagg gattttgccg 3180
 atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac 3240
 aaaataftaa cgettacaat ttaggtgcea cttttcgggg aaatgtgegc ggaaccecta 3300
 tttgtttatt ttctaaata cattcaaata tgtatceget catgagacaa taacctgat 3360
 aaatgcttca ataatatga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgecc 3420
 ttattccett ttttgcgcea ttttgccttc ctgtttttgc tcaeccagaa acgctggtga 3480
 aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca 3540
 acageggtaa gatecttgag agttttgcc ccaagaacg ttttccaatg atgagcactt 3600
 ttaaagttet gctatgtgce geggtattat cccgtattga cgcgggcaa gagcaactcg 3660
 gtcgcegeat acactattct cagaatgaet tggttgagta ctcaccagtc acagaaaage 3720
 atcttacgga tggeatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgcataacc atgagtgata 3780
 acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgtttttt 3840
 tgcacaacat gggggateat gtaactegcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag 3900
 ccataccaaa cgacgagcgt gacaccaaga tgccctgtagc aatggcaaca acgttgcgca 3960
 aactaftaac tggegaacta ctactctag cttcccgca acaattaata gactggatgg 4020
 aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggtgge tggtttattg 4080
 ctgataaac tggagecggc gagegtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag 4140
 atggttaagec ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcagca actatggatg 4200
 aacgaaatag acagatcget gagataggtg cctcaactgat taagcattgg taactgtcag 4260
 accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga 4320
 tetaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaaat cccttaacgt gagttttctg 4380

[0010]

tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc 4440
 tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagecgtg gtttgtttgc 4500
 cggatcaaga getaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac 4560
 caaatactgt ccttctagt tagccgtagt taggccacca ctccaagaac tcigtageac 4620
 cgctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 4680
 cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct 4740
 gaacgggggg ttctgtcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 4800
 acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt 4860
 atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg 4920
 cctggtatct ttatagtcct gtcgggttcc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt 4980
 gatgctcgtc aggggggceg agcctatgga aaaacgccag caocgcggcc tttttacggt 5040
 tectggcett ttcttgccct tttgctcaca tgttttttcc tgcgttatcc cctgattctg 5100
 tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg 5160
 agegcagcga gtcagtgagc gaggaagegg aagagegccc aatacgcaaa ccgectctcc 5220
 ccgcgcgttg gccgattcat taatgcaggg gccgctgcgg c 5261

<210> 5

<211> 4669

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequences from adenovirus, CMV, and variation of human IFN alpha 2b

<400> 5

catcatcaat aatatacett attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt 60

[0011]

ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt	120
gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa ggcacggatg tggcaaaagt gacgtttttg	180
gtgtgcgcgc gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgcg gttttaggeg gatgtttag	240
taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccatttccgc gggaaaactg aataagagga	300
agtgaaatct gaataatfff gtgttactca tagcgcgtaa tatttgccta gggccgcggg	360
gactttgacc gtttacgtgg agactcgcgc aggtgttttt ctcaggtgtt ttccgcgttc	420
cgggtcaaag ttggcgtttt attattatag tcagctgacg tgtagtgtat ttatacccg	480
tgagttcttc aagagccac tcttgagtgc cagcagtag agttttctcc tccgagccgc	540
tccgacaccg ggagcgcgc cctcgagcta gcgtttgaca ttgattatig actagttatt	600
aatagtaate aattaccggg tcattagtcc atagcccata tatggagtcc cgcgttacat	660
aacttacggt aatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccccca ttgacgteaa	720
taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg	780
agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtaacataig ccaagtacgc	840
cccatttga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag tacatgacct	900
tatgggaact tctacttgg cagtacatct acgtattagt cctcgtatc accatggtga	960
tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg ggatttccaa	1020
gtctccacc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaatcaa cgggacttcc	1080
caaatgtcg taacaactcc gccccattga cgcgaatggg cggtagcgt gtaaggtggg	1140
aggtctatat aagcagagct cgtttagtga accgtaagct tgcattgctg caggtcact	1200
ctagactgac atggccctga ccttcgcct gcctgtggcc ctgctgttgc tgtctgcaa	1260
gagcagctgc agcgtgggt gcgacctgcc ccagaccac agcctgggca gccggcgac	1320
cctgatctg ctgcccaga tgcggcgat cagcctgttc agctgctga aggaccgca	1380

[0012]

cgacttcgge ticecccagg aagagttcgg caaccagttc cagaaggecg agaccatccc 1440
 cgtgctgcaac gagatgatcc agcagatctt caacctgttc agcaceaagg acagcagcgc 1500
 cgccctgggac gagaccctgc tggacaagtt ctacaccgag ctgtaccagc agctgaacga 1560
 cctggaagec tgcgtgatcc agggcgtggg cgtgaccgag acccccctga tgaagagga 1620
 cageatcctg gccgtgcgga agtacttcca geggatcacc ctgtacctga aagagaagaa 1680
 glacagcccc tgcgcctggg aagtgggtgcg ggccgagatc atgcccagct tcagccctgag 1740
 caccaacctg caggaaagcc tgcggagcaa agagttagga tccccgggta ccgagctcga 1800
 attctttgta gaggttttac ttgctttaa aaacctccca caccctcccc tgaacctgaa 1860
 acataaaatg aatgcaattg ttgttgtaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia 1920
 ataaagcaat agcaccacaa atttcacaaa taaageattt ttttcaactgc attctagtgg 1980
 tggtttgtec aaacteatca atgtatgat atcggcgcgc eggccccta cgtcaccgcg 2040
 ccgcttccca cgcgccgcgc caogtcacaa actccacecc ctcaattatca tattgcttc 2100
 aatecaaaat aaggatattt attgatgatg gccgcagcgg cccctggcgt aatagcgaag 2160
 agcccgcac cgategccct tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tgggacgcgc 2220
 cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tggtggttac gcgcagcgtg accgctacac 2280
 ttgccagegc cctagegcc getcctttag cttcttccc ttcctttctc gccagttcg 2340
 ccgctttcc cgtcaagct ctaaateggg ggtcccttt agggttccga tttagtctt 2400
 tacggcacc cagccccaaa aaacttgatt aggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc 2460
 cctgatagac ggtttttgc cctttgacgt tggagtcac gtctttaat agtggactct 2520
 tgttccaaac tggacaaca ctcaacccta tctcggctca ttcttttgat ttataaggga 2580
 ttttgccgat ttccgectat tggttaaaa atgagctgat ttaacaaaa tttaacgcga 2640
 attttaaaa aatattaacg ctacaattt aggtggcact tttcgggaa atgtgcgcgg 2700

[0013]

aaccctatt tgtttatfff	tetaaataca ttcaaatatg	tatecgctca tgagacaata	2760
accctgataa atgcttcaat	aatattgaaa aaggaagagt	atgagtattc aacatttccg	2820
tgtcgccett attcectfff	ttgcggcatt ttgccttctt	gtttttgctc acccagaaac	2880
gctgggtgaaa gtaaaagatg	cigaagatea gttgggtgca	cgagtgggtt acatcgaact	2940
ggatctcaac agcggtaaga	tecttgagag ttttcgcccc	gaagaacgtt ttccaatgat	3000
gagcactfff aaagttctgc	tatgtggcgc ggtattatcc	cgtattgacg ccgggcaaga	3060
gcaactcggf cgcgcatac	actattctca gaatgacttg	gttgagtaet caccagtcac	3120
agaaaagcat cttacggatg	geatgacagt aagagaatta	tgcagtgctg ccataacat	3180
gagtgataac actgcggcca	aettacttct gacaacgac	ggaggaccga aggagctaac	3240
cgcttttttg cacaacatgg	gggatcatgt aactcgctt	gategttggg aaccggagct	3300
gaatgaagcc ataccaaacg	acgagcgtga caccacgatg	cctgtageaa tggeaacaac	3360
gttgcgcaaa ctattaactg	gcgaactact tactctagct	tcceggcaac aattaataga	3420
ctggatggag gcggataaag	ttgcaggacc acttctgegc	tcggcccttc cggetggetg	3480
gtttattgct gataaatctg	gagccggtga gcgtgggtct	cgcggtatca ttgcagcact	3540
ggggccagat ggtaagccct	ccgfatcgt agttatctac	acgacgggga gtcaggcaac	3600
tatggatgaa cgaaatagac	agatcgctga gataggtgcc	tactgatta agcattggta	3660
actgtcagac caagtttact	catatatact tttagattgat	ttaaaacttc atttttaatt	3720
taaaaggatc taggtgaaga	tcctttttga taatctcatg	accaaaatcc cttaacgtga	3780
gttttcgttc cactgagcgt	cagaccccgf agaaaagatc	aaaggatctt cttgagatcc	3840
ttttttctg cgcgtaatct	getgcttgca aacaaaaaaaa	ccaccgttac cagcgggtgt	3900
ttgtttgccg gatcaagagc	taccaactct ttttccgaag	gtaactgget tcagcagagc	3960
gcagatacca aatactgtcc	tictagtgia gccgtagtta	ggccaccaet tcaagaacte	4020

[0014]

tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg 4080
 ogataagtgc tgtcttaccg ggttggactc aagaecgatag ttaccggata aggcgcagcg 4140
 gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagegaacga cctacacega 4200
 actgagatac ctacagegtg agctatgaga aagegccacg cttcecaag ggagaaagge 4260
 ggacaggtat ccggtaacgc gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg 4320
 gggaaacgcc tggatatctt atagtctctg egggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg 4380
 atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgceagca acgcgccett 4440
 tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgcctcaatg ttctttctcg cgttateccc 4500
 tgattctgtg gataaccgta ttaccgctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg 4560
 aacgaccgag cgcagcagct cagttagcga ggaagcggaa gagegcccaa tacgcaaacc 4620
 gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcaggggc cgtcgggc 4669

<210> 6

<211> 5246

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequences from adenovirus, CAG, and variation of human IFN alpha 2b

<400> 6

catcatcaat aatatacctt attttgatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt 60
 ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt 120
 gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gegacggatg tggcaaaagt gacgtttttg 180
 gtgtgcgccg gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgag gttttaggcg gatgttgtag 240
 taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga 300
 agtgaaatct gaataatttt ggttactca tagcggtaa tattgtcta gggccgcggg 360

[0015]

gactttgacc gtttacgtgg agactcgecc aggtgttttt ctcaggtggt ttcegegttc 420
cgggtcaaag ttggcgtttt attattatag tcagctgacg tgtagtgtat ttataccgg 480
tgagttcctc aagaggccac tcttgagtgc cagcagtag agttttctcc tccgagccgc 540
tccgacaccg ggaggegegc cctcgageta gcccctagtt attaatagta atcaattacg 600
gggtcattag ttcatagecc atatatggag ttccgcgta cataacttac ggtaaattgc 660
ccgcclggct gaccgcccac cgacccccgc ccattgaagt caataatgac gtagtltccc 720
atagtaacgc caatagggac ttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaaact 780
gcccacttgg cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgecccctat tgacgtcaat 840
gacggtaaatt ggcccgcctg gcattatgac cagtacatga ccttatggga ctltectact 900
tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgtt attaccatgg tcgaggtgag ccccacgttc 960
tgcttcactc tccccatctc cccccctccc ccaccccac ttttgtattt atttatttt 1020
taattatttt gtgcagcgat gggggcgggg gggggggggg ggcgcgcgcc aggcgggggc 1080
gggcgggggc aggggcgggg cggggcgagg cggagagggt cggcggcagc caatcagagc 1140
ggcgcgctcc gaaagtctc ttttatggcg aggcggcgcc ggcggcgccc ctataaaaag 1200
cgaagcgcgc ggcgggcggg agtcgctgcg cgtgccttc gcccctgccc ccgctccgcc 1260
gcgcctcgc gcgcccgc cggctctga ctgaccgct tactcccaca ggtgagcggg 1320
cgggaecgcc ctctctccc ggctgtaat tagccttgg tttaatgac gcttgtttct 1380
ttctgtgge tgcgtgaaag ccttgaggg ctccgggagc gccggcagga aggaaatggg 1440
cggggagggc ctctctccc gcgcgcgc cgtcccctt ctcccctcc agcctcggg 1500
ctgtccgccc ggggacggct gccttcgggg gggacggggc agggcggggt tcgcttctg 1560
gcgtgtgacc ggcggtctc gagcctctgc taacctggt catgcctct tcttttctc 1620
acagctctg ggcaacgtgc tggttattgt gctgtctcat ctttttgcg aagaattgat 1680

[0016]

taattcgcgc gaacgcgtcg agtcgcctcgg tacgatttaa attgaattgg gctcgcagatc	1740
tgcgatctaa gtaagcttgc atgcctgcag gtcgaacteta gactgcatg gccctgacct	1800
tcgccctgct ggtggccctg ctggtgctgt cctgcaagag cagctgcagc gtgggctgcg	1860
acctgcecca gaccacagc ctgggcagcc ggcggacct gatgctctg gccagatgc	1920
ggcggatcag cctgttcagc tgcctgaagg accgacaga ctteggcttc cccaggaag	1980
agttcggcaa ccagttccag aaggccgaga ccatccccgt gctgcacagc atgatccagc	2040
agatcttcaa cctgttcagc accaaggaca gcagcgcgc ctgggacagc acctgctgg	2100
acaagtteta caccgagctg taccagcagc tgaacgaact ggaagcctgc gtgatccagg	2160
gcgtgggctg gaccgagacc cccctgatga aagaggacag catcctgccc gtgcggaagt	2220
acttccagcg gatcaccctg tacctgaaag agaagaagta cagccccctgc gccctgggaag	2280
tgggtcgggc cgagatcatg cggagcttea gcctgagcac eaaectgcag gaaagcctgc	2340
ggagcaaaga gtgaggatcc ccgggtaccg agctcgaatt cttttagtag gttttacttg	2400
ctttaaaaa cctcccacac ctccccctga acctgaaaca faaaatgaat gcaattgttg	2460
tigttaactt gtttatgca gcttataat gttacaaata aagcaatagc atcaciaaatt	2520
tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg	2580
tatcgatata ggcgcgcgg gccctacgt caccgcgcc gttccacgc cccgcgccac	2640
gtcaciaaact ccacccttc attatcatat tggettcaat ccaaataag gtatattatt	2700
gatgatggcc gcagcggccc ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttc	2760
caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgcct gtageggcgc attaagegcg	2820
gggggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct agcgcgccct	2880
ctttctctt tcttcccttc cttctctgcc acgttcgcgc gctttccccc tcaagcteta	2940
aatcgggggc tcccttagg gttccgatt agtgetttae ggcacctega cccccaaaa	3000

[0017]

cttgattagg	gtgatggttc	acgtagtggg	ccategcct	gatagacggt	ttttcgcct	3060
ttgacgttgg	agtccaagtt	ctttaatagt	ggactettgt	tccaaactgg	aacaacactc	3120
aacctatct	cggtctattc	ttttgattta	taagggattt	tgccgatttc	ggcctattgg	3180
tfaaaaaatg	agctgattta	acaaaaattt	aacgegaatt	ttaacaaaat	attaacgctt	3240
acaatttagg	tggcactttt	cggggaaatg	tgcgcggaac	ccctatttgt	ttatttttct	3300
aaatacattc	aaatatgtat	ccgctcatga	gacaataacc	ctgataaatg	cttcaataat	3360
attgaaaaag	gaagagtaig	agtattcaac	atttccgtgt	cgcccttatt	cccttttttg	3420
cggcattttg	ctttccgttt	tttgcctacc	cagaaacget	ggtgaaagta	aaagatgctg	3480
aagatcagtt	gggtgcacga	gigggttaca	togaactgga	tctcaacagc	ggtaagatcc	3540
ttgagagttt	tgcctccgaa	gaacgttttc	caatgatgag	cactttttaa	gttctgctat	3600
gtggcgcggt	attatccogt	attgacgcgc	ggcaagagca	actcggctgc	cgcatfacact	3660
attctcagaa	tgacttgggt	gagtactcac	cagtcacaga	aaagcatctt	acggatggca	3720
tgacagtaag	agaattatgc	agtgetgcca	taacctgag	tgataacact	gcgccaact	3780
tacttctgac	aacgatogga	ggaccgaagg	agctaacccg	ttttttgcac	aacatggggg	3840
atcatgtaac	tgccttgat	cgttggaac	cggagctgaa	tgaagccata	ccaaacgacg	3900
agcgtgacac	cacgatgect	gtagcaatgg	caacaacggt	gcgcaacta	ttaactggcg	3960
aaactacttac	tctagcttcc	cggcaacaat	taatagactg	gatggagcgc	gataaagttg	4020
caggaccact	tctgcctcgc	gcccttccgg	ctggctggtt	tattgctgat	aaatctggag	4080
ccggtgagcg	tgggtctcgc	ggtatcattg	cagcaactgg	gccagatggt	aagccctccc	4140
gtatcgtagt	tatctacacg	acggggagtc	aggcaactat	ggatgaacga	aatagacaga	4200
tccgtgagat	aggtgcctca	ctgattaage	attggtaact	gtcagaccaa	gtttactcat	4260
atatacttta	gattgattta	aaacttcatt	tttaatttaa	aaggatctag	gtgaagatcc	4320

[0018]

tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttctgtccac tgagcgtcag 4380
 accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt tttctgctgc gtaatctget 4440
 gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cgggtggttg tttgccgat caagagctac 4500
 caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgcga gataccaaat actgtctctt 4560
 tagttagacc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 4620
 ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 4680
 tggactcaag acgatagtta ccgataagg cgcagcggtc ggctgaacg gggggttctg 4740
 gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 4800
 tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcggc caggtatccg gtaagcggca 4860
 ggttcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tctctttata 4920
 gtctgtcgg gttteccac ctctgaettg agcgtcgtt tttgtgatgc tctcagggg 4980
 ggccgagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttctctg gccttttget 5040
 ggccttttgc tcaatgttc tttctgctg tateccctga ttctgtgat aaccgtatta 5100
 ccgccttga gtgagctgat accgctgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag 5160
 tgagcagga agcgggaagag cgccaatac gcaaaccgcc tctcccgcg cgttgccgca 5220
 ttcattaatg caggggccgc tgcggc 5246

<210> 7

<211> 582

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atgggggtgc acgaatgtcc tgccctgctg tggtctctcc tctccctgct gtegetccct 60

ctgggectcc cagtctggg cgccecaaca cgcctcatct gtgacagccg agtctggag 120

[0019]

aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aataatcaga cgggctgtgc tgaacctgc 180
 agettgaatg agaatacac tgtcccagac accaaagtta atttctatgc ctggaagagg 240
 atggaggctg ggcagcagge cgtagaagtc tggcagggcc tggccctgct gtcggaagct 300
 gtectgoggg gccaggeect gttggteaac tetteccage cgtgggagcc cctgcagctg 360
 catgtggata aagecgtcag tggccttcgc agcctcacca ctctgcttcg ggctctggga 420
 gccagaagg aagccatctc cctccagat gggcctcag ctgctccact ccgaacaatc 480
 actgctgaca ctctccgcaa actcttcoga gtctactcca atttctccg gggaaagctg 540
 aagetgfacg caggggagge ctgcaggaca ggggacagat ga 582

<210> 8

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ggcgcgccaa gettgcattg ctgcaggctg actctagact gccatggcct tgaaccttgc 60
 tttactggtg gccctcttgg tctcagctg caagtcgaagc tctctgttgg gctgtgatct 120
 gccctcaaac cacagcctgg gtagcaggag gaccttgatg ctctctggcac agatgaggag 180
 aatctctctt ttctctctct tgaaggacag acatgacttt ggatttcccc aggaggagtt 240
 tggcaaccag ttccaaaagg ctgaaacctc cctgtcctc catgagatga tcagcagat 300
 ctccaatctc ttcagcacia aggactcctc tctgtcttgg gatgagacce tcttagacaa 360
 attctacact gaactctacc agcagctgaa tgacctgaa gccctgtgtg tacagggggt 420
 gggggtgaca gagactcccc tgatgaagga ggaactccatt ctggetgtga ggaataact 480
 ccaagaatc actctctatc tgaagagaa gaaatacage ccttgtgcct gggaggttgt 540
 cagagcagaa atcatgagat cttttcttt gtaacaaaac ttgcaagaaa gtttaagaag 600
 taaggaatga gcatcccagg gtaccgagct cgaattctta attaa 645

[0020]

Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro
 145 150 155 160

Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu
 165 170 175

Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
 180 185

<210> 10

<211> 193

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

[0022]

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

由长效IFN 制剂体外分泌重组优化的干扰素 α (IFN α)的水平

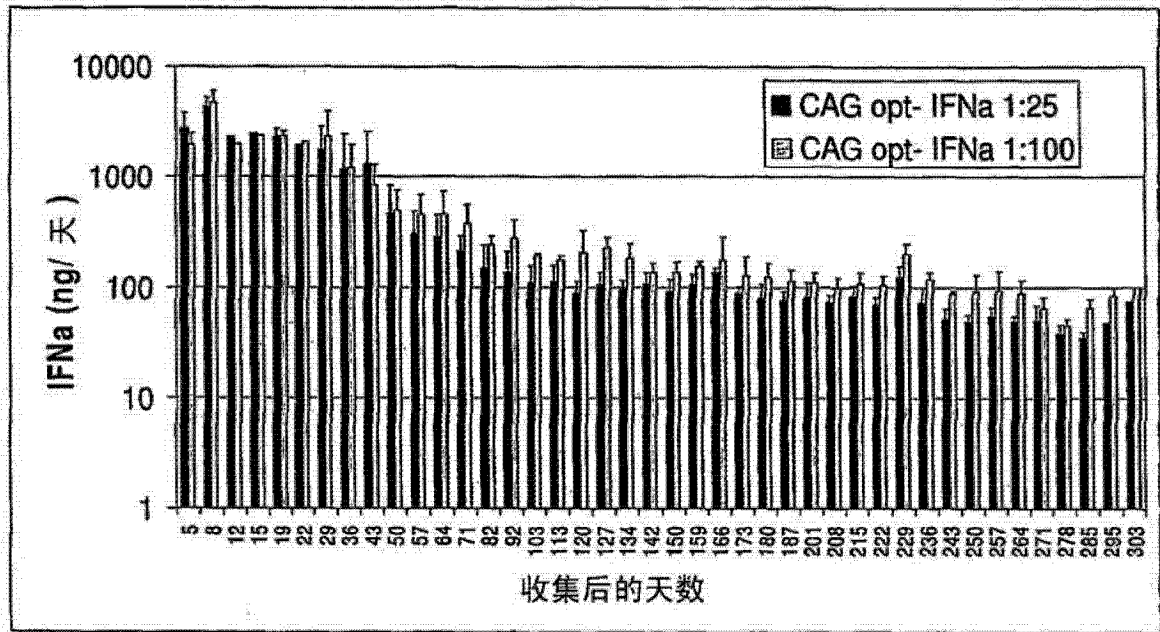


图 1

由长效EPO制剂体外分泌红细胞生成素(EPO)的水平

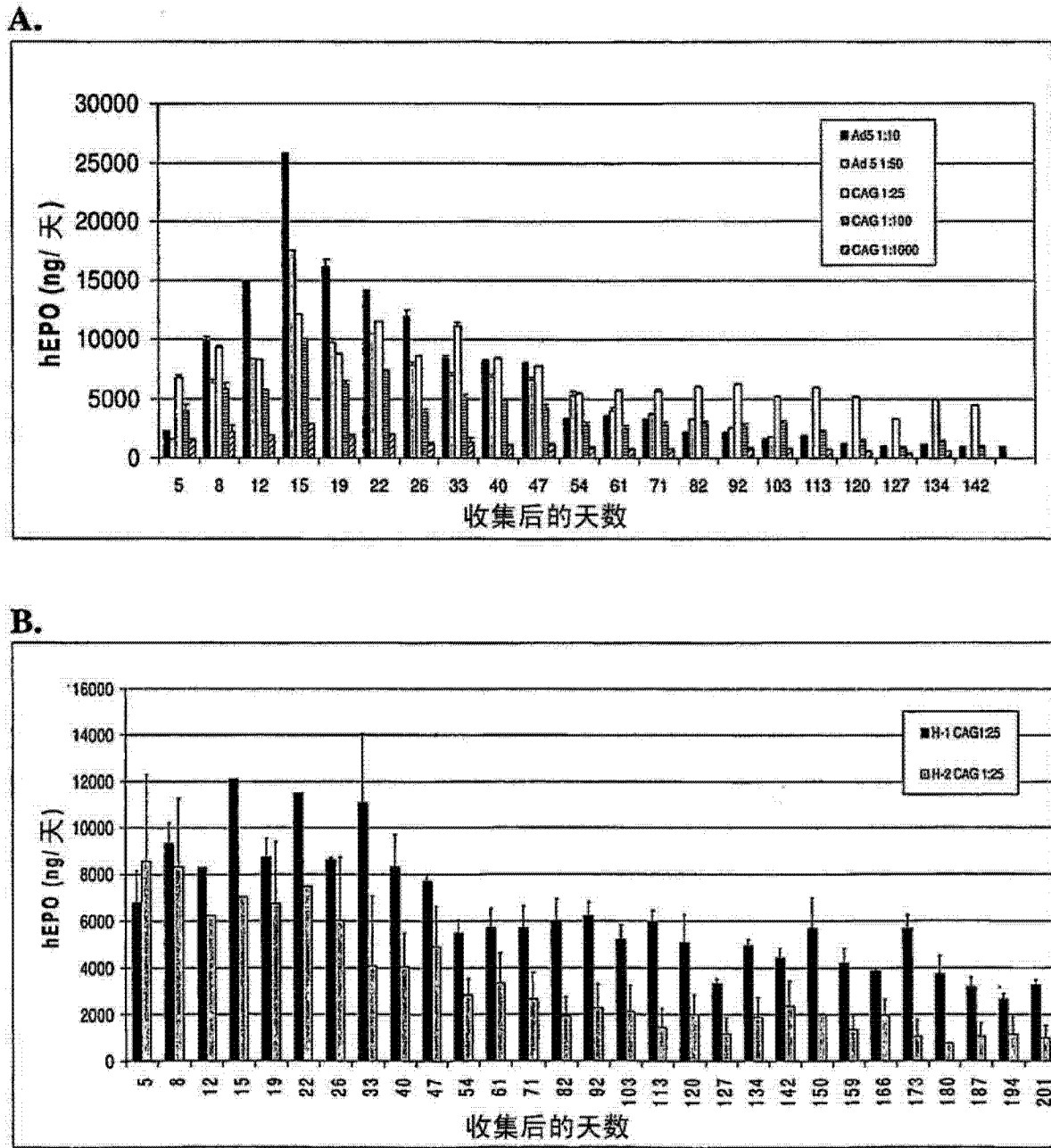


图 2

得自包含表达EPO的无肠腺病毒的优化制剂和包含表达EPO的腺病毒-5的微器官的体外红细胞生成素(EPO)表达水平

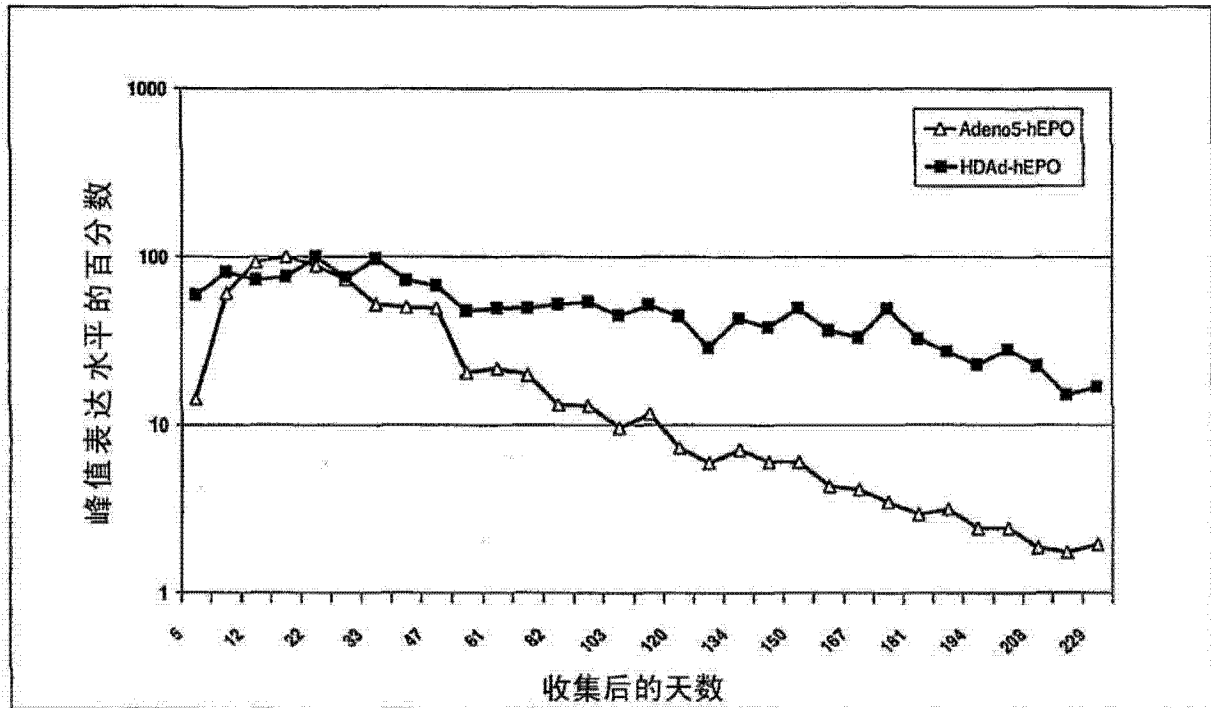


图 3

得自包含优化的和非优化的表达EPO的无肠腺病毒的制剂的
体外红细胞生成素(EPO)表达水平之间的比较

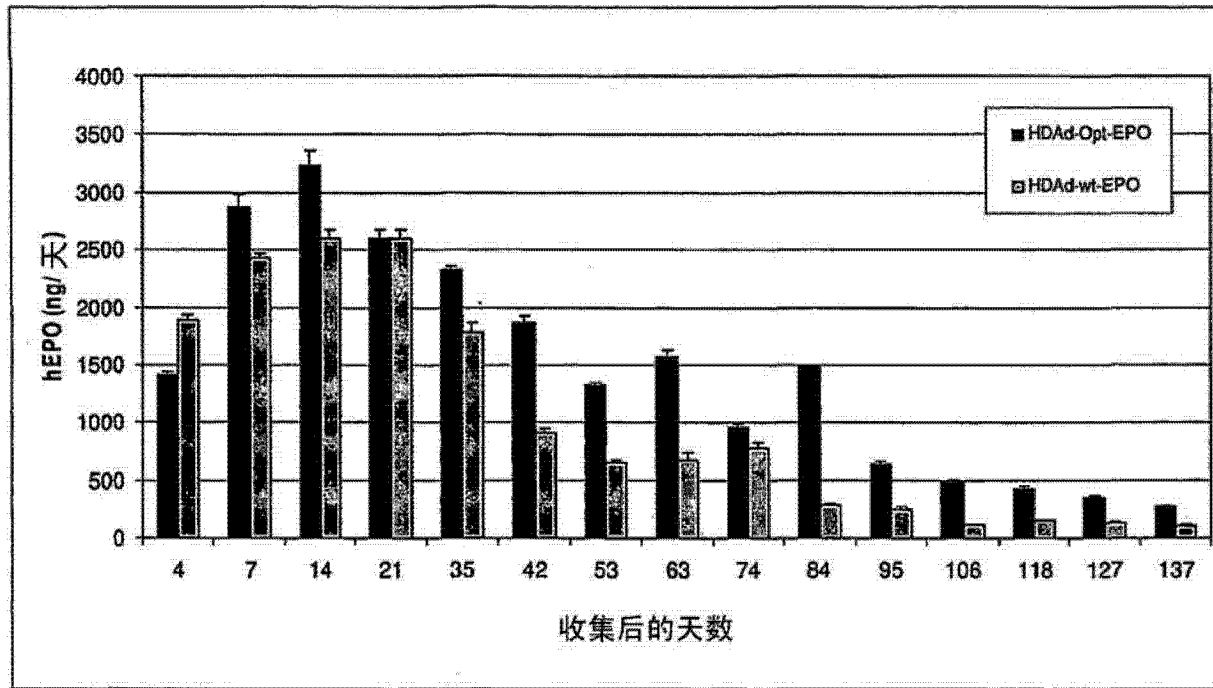


图 4

得自包含CAG或CMV启动子下游的表达EPO的无肠腺病毒的制剂的
体外红细胞生成素 (EPO) 表达水平

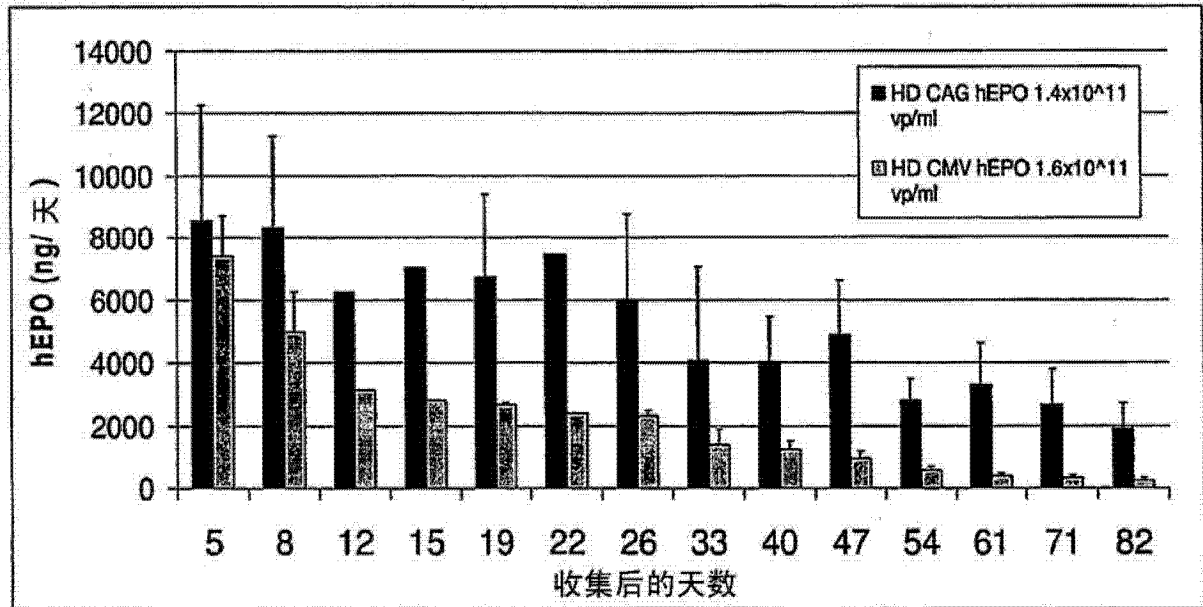


图 5

由植入有包含微器官(A)的制剂的SCID小鼠体内产生的和由非植入制剂(B)体外产生的
红细胞生成素(EPO)的水平和血细胞比容%

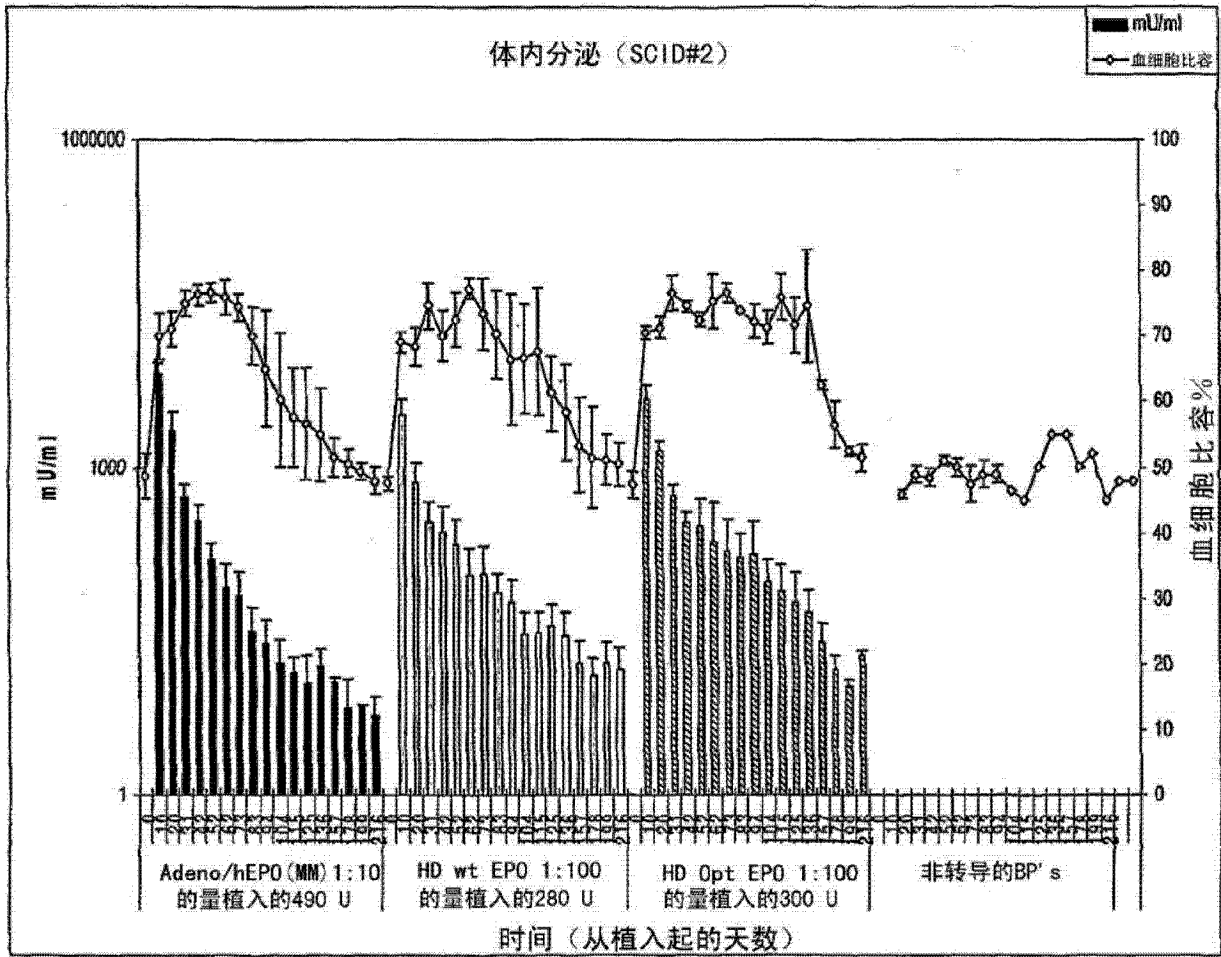


图 6A

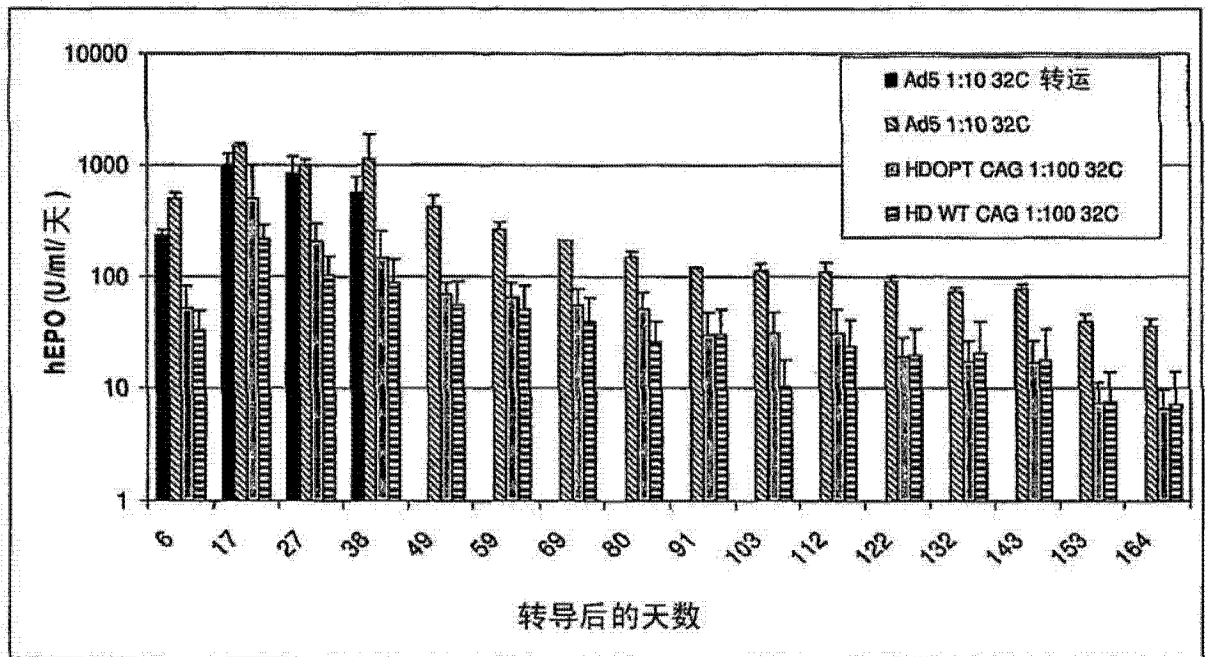


图 6B