(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102421894 A
(43)申请公布日 2012.04.18

(21)申请号 201080019437.X
(22)申请日 2010.04.09
(30)优先权数据
61/171,271 2009.04.21 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2011.11.03
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2010/030471 2010.04.09
(87)PCT申请的公布数据
WO2010/123699 EN 2010.10.28
(71)申请人 迈阿密大学
地址 美国佛罗里达州迈阿密
(72)发明人 O·C·維拉斯奎茲 Z-J·刘
(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313
代理人 刘博
(51)Int.Cl.
C12N 15/00(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61K 31/713(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 24 页 附图 5 页

(54)发明名称

用于促进局部缺血性和糖尿病性创面愈合的组合物、试剂盒和方法

(57)摘要

用于促进糖尿病性创面愈合的组合物、试剂盒和方法是基于SDF-1α特异性上调E选择素在成熟内皮细胞(EC)中的表达，从而引起EC-内皮祖细胞(EPC)黏附和EPC归巢增加这一发现。用于促进糖尿病受试者的创面愈合的方法包括提供治疗有效量的组合物，所述组合物包含E选择素蛋白或编码E选择素蛋白的核酸，以及任选的特异性上调E选择素表达的试剂(例如，SDF-1α)。所述方法还可包括对所述受试者施用高压氧治疗。将所述组合物施用于所述受试者导致受试者的骨髓衍生祖细胞向创面迁移、创面愈合加速以及E选择素表达上调。

CN 102421894 A

1. 一种促进糖尿病受试者的糖尿病性创面愈合的方法，所述方法包括以下步骤：

提供治疗有效量的组合物，所述组合物包含药学上可接受的载体和至少一种选自由下列组成的组的治疗剂：E 选择素蛋白、编码 E 选择素蛋白的核酸和特异性上调 E 选择素表达的试剂；和

将所述组合物在条件下施用于所述受试者，使得受试者的骨髓衍生祖细胞向创面的迁移增加。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述组合物通过口服施用、局部施用或静脉内施用。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中将所述组合物直接施用至所述创面或邻近所述创面的部位。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述骨髓衍生祖细胞包括内皮祖细胞 (EPC)。

5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中对所述受试者施用所述组合物引起创面愈合加速。

6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述组合物包含 E 选择素蛋白或编码 E 选择素蛋白的核酸以及特异性上调 E 选择素表达的试剂，其中特异性上调 E 选择素表达的所述试剂为 SDF-1α 蛋白或编码 SDF-1α 蛋白的核酸。

7. 根据权利要求 1 所述的方法，还包括对所述受试者施用高压氧治疗的步骤。

8. 一种上调具有糖尿病性创面的糖尿病受试者的 E 选择素表达的方法，所述方法包括将包含至少一种 rAAV 病毒粒子的组合物施用于所述糖尿病受试者，所述至少一种 rAAV 病毒粒子包含编码 E 选择素的多核苷酸，所述多核苷酸插入第一 AAV 反向末端重复与第二 AAV 反向末端重复之间，所述组合物的量可有效上调 E 选择素表达、诱导骨髓衍生祖细胞向所述创面迁移以及加速所述受试者的创面愈合。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述至少一种 rAAV 病毒粒子包含血清 2 型衣壳蛋白。

10. 根据权利要求 8 所述的方法，其中将所述组合物直接施用至所述创面或邻近所述创面的部位。

11. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述骨髓衍生祖细胞包括 EPC。

12. 根据权利要求 8 所述的方法，还包括对所述受试者施用 SDF-1α 蛋白或编码 SDF-1α 蛋白的核酸的步骤。

13. 根据权利要求 8 所述的方法，还包括对所述受试者施用高压氧治疗的步骤。

14. 一种促进糖尿病受试者的糖尿病性创面愈合的方法，所述方法包括以下步骤：

提供包含药学上可接受的载体和多种骨髓衍生祖细胞的组合物，其中所述骨髓衍生祖细胞包含编码 E 选择素的多核苷酸；和

以有效增加所述受试者的骨髓衍生祖细胞向所述创面的迁移并加速所述受试者的创面愈合的量将所述组合物施用于所述受试者。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所述编码 E 选择素的多核苷酸包含在病毒载体内。

16. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述病毒载体包含在病毒颗粒内。

17. 根据权利要求 16 所述的方法，其中所述病毒载体为 rAAV 载体，并且所述病毒颗粒

为 AAV 颗粒。

18. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所述组合物还包含 SDF-1α 蛋白或编码 SDF-1α 蛋白的核酸。

19. 根据权利要求 14 所述的方法，其中将所述组合物直接施用至所述创面或邻近所述创面的部位。

20. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所述骨髓衍生祖细胞包括 EPC。

21. 根据权利要求 14 所述的方法，还包括对所述受试者施用高压氧治疗的步骤。

22. 一种用于治疗哺乳动物受试者的至少一种糖尿病性创面的试剂盒，所述试剂盒包括：

(a) 治疗有效量的组合物，所述组合物包含药学上可接受的载体和至少一种选自由下列组成的组的治疗剂：E 选择素蛋白、编码 E 选择素蛋白的核酸和特异性上调 E 选择素表达的试剂；和

(b) 使用说明书。

23. 根据权利要求 1 所述的试剂盒，其中所述组合物包含 E 选择素蛋白或编码 E 选择素蛋白的核酸以及特异性上调 E 选择素表达的试剂，其中特异性上调 E 选择素表达的所述试剂为 SDF-1α 蛋白或编码 SDF-1α 蛋白的核酸。

24. 根据权利要求 1 所述的试剂盒，其中所述使用说明书包括用于对所述受试者施用高压氧治疗的说明书。

用于促进局部缺血性和糖尿病性创面愈合的组合物、试剂盒和方法

技术领域

[0001] 本发明一般涉及药物和基因疗法的领域。更具体地讲，本发明涉及用于促进糖尿病受试者的创面愈合的组合物、试剂盒和方法。

背景技术

[0002] 损伤性创面愈合是糖尿病患者中存在的显著临床问题，并且是下肢截肢的主导原因。当前疗法的成功率有限，并且不足以解决糖尿病患者中存在的微血管病变。糖尿病性创面的不良愈合的特征为受损的血管生成和血管发生。血管发生涉及新血管自 BM 衍生祖细胞的生长，并且有助于出生后新血管形成和创面愈合的过程。骨髓 (BM) 衍生内皮祖细胞 (EPC) 是参与血管发生的关键细胞，并且响应于局部缺血而归巢到外周组织。尚不清楚对 EPC 动员和募集的基本生理刺激（即，局部缺血）为何无法在糖尿病宿主中诱导治疗性 EPC 介导的新血管形成和创面愈合。

[0003] 因此，目前需要增强糖尿病创面愈合的治疗剂和方法。

[0004] 发明概述

[0005] 本文描述了基于 SDF-1α 特异性上调 E 选择素在成熟 EC 中的表达，从而引起 EC-EPC 黏附和 EPC 归巢增加这一发现来促进局部缺血性（例如，糖尿病性）创面愈合的组合物、试剂盒和方法。EPC 靶向组织的归巢机制涉及一连串连续事件，这些事件包括从骨髓利基脱离、活动进入血管中且在循环内移动、感测归巢信号、滚动且黏附到毛细管的内皮细胞 (EC) 单层上以及随后的跨内皮迁移，其中需要 EPC-EC 直接相互作用。本文所述的实验研究了在毛细管的内层 EC 与循环 EPC 之间是否需要直接的细胞间相互作用以实现 EPC 到靶组织的归巢，以及是否至少部分地通过调控 EC 单层上的特异性黏附分子来介导 SDF-1α 对 EPC 归巢的效应。鉴定了介导 SDF-1α 诱导的 EPC 归巢的黏附分子，即 E 选择素。本文所述实验的结果证实，SDF-1α 特异性地上调 E 选择素在鼠和人成熟 EC 单层中的表达，E 选择素负责通过增强 EPC 对 EC 单层的黏附及其跨内皮迁移来介导 SDF-1α 对 EPC 归巢的效应，并且这些效应引起创面新血管形成和创面愈合（新血管形成）的显著增强。这些新发现不仅使人们对潜藏在 SDF-1α 对 EPC 归巢的生物效应背后的分子机制（信号）有了了解，而且还揭示了 E 选择素作为新靶标在局部缺血性（例如，糖尿病性）创面愈合中的治疗应用。

[0006] 除非另有定义，本文所使用的所有技术术语的含义与本发明所属领域中的普通技术人员所通常理解的含义相同。

[0007] 如本文所用，“核酸”或“核酸分子”是指两种或两种以上核苷酸的链，诸如 RNA（核糖核酸）和 DNA（脱氧核糖核酸），以及经化学修饰的核苷酸。“纯化的”核酸分子是实质上与核酸天然存在于其中的细胞或有机体中的其它核酸序列分离的核酸分子（例如 30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、100％无污染）。该术语包括，例如，合并到载体、质粒、病毒或原核生物或真核生物的基因组中的重组核酸分子。纯化核酸的实例包括 cDNA、基因组核酸片段、聚合酶链式反应 (PCR) 产生的核酸、由基因组核酸

的限制酶处理所形成的核酸、重组核酸及化学合成的核酸分子。“重组”核酸分子是通过对两种以其它方式分离的序列片段进行人工组合（例如，通过化学合成或通过由基因工程技术操纵分离的核酸片段）所制备的核酸分子。

[0008] 所谓术语“基因”是指编码特定蛋白质或在某些情况下编码功能或结构 RNA 分子的核酸分子。

[0009] 所谓术语“E 选择素基因”、“E 选择素多核苷酸”或“E 选择素核酸”是指天然人 E 选择素或 E 选择素编码核酸序列，例如，天然人 E 选择素基因（登录号 NM_000450）、具有可由其转录 E 选择素 cDNA 的序列的核酸；和 / 或上述的等位基因变体和同源物。这些术语涵盖双链 DNA、单链 DNA 和 RNA。

[0010] 所谓术语“SDF-1α 基因”、“SDF-1α 多核苷酸”或“SDF-1α 核酸”是指天然人 SDF-1α 或 SDF-1α 编码核酸序列，例如，天然人 SDF-1α 基因（登录号 NM_199168、NM_000609、NM_001033886）、具有可由其转录 SDF-1α cDNA 的序列的核酸；和 / 或上述的等位基因变体和同源物。这些术语涵盖双链 DNA、单链 DNA 和 RNA。

[0011] 当提及核酸分子中的突变时，“隐性”变化为取代核苷酸序列中一个或多个碱基对的那些变化，但不改变由该序列编码的多肽的氨基酸序列。“保守性”变化为这样的变化，其中核酸的蛋白质编码区中的至少一个密码子已改变，使得由核酸序列编码的多肽的至少一个氨基酸被具有相似特性的另一个氨基酸所取代。

[0012] 当提及肽、寡肽或蛋白质中的氨基酸残基时，术语“氨基酸残基”、“氨基酸”和“残基”可互换使用，并且如本文所用，是指通过酰胺键或酰胺键类似物与至少一种其它氨基酸或氨基酸类似物共价连接的氨基酸或氨基酸类似物。

[0013] 如本文所用，“蛋白质”和“多肽”以同义词使用，是指氨基酸的任何肽连接链，而不管长度或翻译后修饰（例如，糖基化或磷酸化）。

[0014] 所谓术语“E 选择素蛋白”或“E 选择素”是指 E 选择素基因的表达产物，诸如天然人 E 选择素蛋白（登录号 AAQ67702、NP_000441.2），或与上述蛋白共有至少 65％（但优选地为 75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或 99％）氨基酸序列同一性并且显示出天然 E 选择素蛋白的功能活性的蛋白。蛋白质的“功能活性”是与蛋白质的生理功能相关的任何活性。例如，天然 E 选择素蛋白的功能活性可包括介导 EC-EPC 黏附，并且通过介导细胞与血管内层的黏附来促进血液白细胞在炎症部位的聚集。

[0015] 所谓术语“SDF-1α 蛋白”或“SDF-1α ”是指 SDF-1α 基因的表达产物，诸如天然人 SDF-1α 蛋白（登录号 CAG29279.1），或与上述蛋白质共有至少 65％（但优选地为 75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或 99％）氨基酸序列同一性并且显示出天然 SDF-1α 蛋白功能活性的蛋白质。蛋白质的“功能活性”是与蛋白质的生理功能相关的任何活性。例如，天然 SDF-1α 蛋白的功能活性可包括例如刺激细胞生长或血管生成。SDF-1α 是充当 EPC 的有效归巢信号的趋化因子（参见 Lapidot 等，Ann NY Acad Sci 938 :83-95, 2001 ;PCT/US2008/003760）。

[0016] 当提及核酸分子、多肽或或传染性病原体时，术语“天然”是指天然存在的（例如，野生型 (WT)）核酸、多肽或传染性病原体。

[0017] 所谓“血管生成”是指源于现有血管的新血管的生长。通过测量无分支的血管节段的数目（每单位面积的节段数目）、功能血管密度（每单位面积的灌注的血管的总长

度）、血管直径或血管体积密度（每单位面积的基于每个节段的长度和直径计算的总血管体积），可测定血管生成。

[0018] 术语“特异性结合”和“特异性地结合”是指在配对种类（诸如酶 / 底物、受体 / 激动剂、抗体 / 抗原等）之间发生的结合，并且所述结合可以由共价或非共价相互作用或共价和非共价相互作用的组合来介导。当两个种类的相互作用产生非共价结合的复合体时，发生的结合通常为静电、氢键或亲脂相互作用的结果。因此，“特异性结合”发生在配对种类之间，其中两者之间存在相互作用，其产生具有抗体 / 抗原或酶 / 底物相互作用特征的结合复合体。具体而言，特异性结合的特征在于配对的一个成员与特定的种类结合，而不与该结合成员的对应成员所属化合物家族中的其它种类结合。

[0019] 如本文所用，短语“序列同一性”是指当两个序列比对以使亚单位配对最大化时（即，考虑到空位和插入），在两个序列（例如，核酸序列、氨基酸序列）中的对应位置上相同亚单位的百分数。可用序列分析软件（例如，得自 Accelrys CGC，San Diego，CA 的序列分析软件包）测定序列同一性。

[0020] 短语“分离的”或“生物纯的”是指基本上或实质上不含如在物质的天然状态中发现的通常伴随其的组分的物质。

[0021] 术语“抗体”意在包括多克隆抗体、单克隆抗体 (mAb)、嵌合抗体、人源化抗体、能以可溶或结合形式标记的抗体的抗独特型（抗 -Id) 抗体及其片段、区域或衍生物，这可通过已知的技术（例如但不限于酶切割、肽合成或重组技术）提供。

[0022] 如本文所用，术语“慢性创面”和“问题性创面”以及“糖尿病性创面”是指这样的创面，其未达到持久的解剖学及功能结果，并且其无法按照以下正常的创面愈合过程愈合：去除坏死碎片和感染、消退炎症、修复结缔组织基质、血管生成以及表面重修。例如，当缺氧在病理学增加时，创面愈合受损并且创面感染速率增加。正常愈合的基本部分是临时创面基质中新血管的形成，其被称为肉芽组织形成。

[0023] 术语“血管生成”是指在一个实施方案中是这样的过程，通过该过程，创面邻近的成熟血管网的居留内皮细胞进行增殖，并且在其它实施方案中，迁移并重塑成新血管，该新血管在成熟基质细胞（如成纤维细胞）的辅助下长成初始无血管的创面组织。在另一个实施方案中，术语“血管发生”是指新生的过程，通过该过程，EPC 被募集至创面，分化成内皮细胞并且生成替代性血管网。

[0024] 所谓术语“祖细胞”或“内皮祖细胞”或“EPC”是指具有能够通过分化和增殖产生完全分化的、功能性子代的能力的任何体细胞。在另一个实施方案中，祖细胞包括来自任何组织或器官系统（包括但不限于血液、神经、肌肉、皮肤、消化道、骨骼、肾脏、肝脏、胰腺、胸腺等）的祖代细胞。祖细胞不同于“分化的细胞”，其在另一个实施方案中被定义为这样的细胞，其可能具有或可能不具有增殖（即，自复制）的能力，但其在正常生理条件条件下不能经历向不同细胞类型的进一步分化。在一个实施方案中，祖细胞进一步不同于异常细胞，诸如癌细胞，尤其是白血病细胞，其尽管看上去未成熟或未分化，但其增殖（自复制），但通常不会进一步分化。

[0025] 如本文所用，术语“全能细胞 (totipotent)”是指未定型的祖细胞，诸如胚胎干细胞，即，对于产生所有类型的成熟细胞是必要和充分的。保留产生所有胰细胞系的能力但不能自我更新的祖细胞称为“多潜能细胞 (pluripotent)”。在另一个实施方案中，产生一些

但并非所有内皮细胞系并且不能自我更新的细胞称为“多能细胞 (multipotent)”。

[0026] 如本文所用，短语“骨髓衍生祖细胞”和“BM 衍生祖细胞”是指来自骨髓干细胞系的祖细胞。骨髓衍生祖细胞的实例包括骨髓衍生间充质干细胞 (MSC) 和 EPC。

[0027] 术语“归巢”是指吸引和刺激参与愈合的细胞迁移到损伤部位并辅助修复的信号。

[0028] 所谓短语“治疗有效量”和“有效剂量”是指足以产生治疗上（例如，临床上）所需结果的量；结果的确切性质将根据所治疗病症的性质而变化。例如，在待治疗的病症是未愈合的糖尿病性创面的情况下，则结果可为创面的愈合（通过特异性上调 E 选择素在成熟 EC 中的表达，导致 EC-EPC 黏附增加、EPC 归巢以及创面新血管形成增加）。本文所述的组合物和疫苗可以每天一次或多次至每周一次或多次施用。技术人员将意识到，某些因素可影响有效治疗受试者所需的剂量和时程，这些因素包括但不限于疾病或病症的严重程度、先前的治疗、受试者的综合健康情况和 / 或年龄，以及存在的其它疾病。此外，用治疗有效量的本发明组合物或疫苗治疗受试者包括单次治疗或一系列治疗。

[0029] 如本文所用，术语“治疗”被定义为将本文所述或通过本文所述的方法鉴定的治疗剂应用或施用于患者，或将所述治疗剂应用或施用于来自患者的分离组织或细胞系，所述患者具有疾病、疾病症状或疾病的诱因，治疗目的在于治愈、愈合、缓解、减轻、改变、补救、改善、改良或影响疾病、疾病症状或疾病的诱因。

[0030] 术语“患者”、“受试者”和“个体”在本文中可互换使用，并且是指待治疗的哺乳动物受试者，优选人类患者。在一些情况下，本发明的方法可用于实验动物、兽医应用和开发针对疾病的动物模型，包括但不限于啮齿动物，包括小鼠、大鼠和仓鼠，以及非人灵长类。

[0031] 因此，本文描述的是一种促进糖尿病受试者的糖尿病性创面愈合的方法。所述方法包括以下步骤：提供治疗有效量的组合物，所述组合物包含药学上可接受的载体和至少一种选自由下列组成的组的治疗剂：E 选择素蛋白、编码 E 选择素蛋白的核酸和特异性上调 E 选择素表达的试剂；和将组合物在条件下施用于受试者，使得受试者的骨髓衍生祖细胞（例如，EPC）向创面的迁移增加。所述组合物可例如通过口服施用、局部施用、静脉内施用、直接施用至创面或邻近创面的部位，或经血管内导管施用。对受试者施用所述组合物导致创面愈合加快。在一个实施方案中，组合物包含 E 选择素蛋白或编码 E 选择素蛋白的核酸，以及特异性上调 E 选择素表达的试剂，其中特异性上调 E 选择素表达的试剂为 SDF-1α 蛋白或编码 SDF-1α 蛋白的核酸。所述方法还可包括对受试者施用高压氧治疗的步骤。

[0032] 本文还描述了一种上调具有糖尿病性创面的糖尿病受试者的 E 选择素表达的方法。所述方法包括将包含至少一种 rAAV 病毒粒子的组合物施用于糖尿病受试者，所述至少一种 rAAV 病毒粒子包含编码 E 选择素的多核苷酸，所述多核苷酸插入第一 AAV 反向末端重复与第二 AAV 反向末端重复之间，所述组合物的量可有效上调 E 选择素表达、诱导骨髓衍生祖细胞（例如，EPC）向创面的迁移以及加速受试者的创面愈合。所述至少一种 rAAV 病毒粒子可包含血清 2 型衣壳蛋白。可将所述组合物例如直接施用至创面或邻近创面的部位。所述方法还可包括对受试者施用 SDF-1α 蛋白或编码 SDF-1α 蛋白的核酸和 / 或对受试者施用高压氧治疗的步骤。

[0033] 本文还描述了一种用于治疗哺乳动物受试者的至少一种糖尿病性创面的试剂盒。所述试剂盒包含治疗有效量的组合物（包含药学上可接受的载体和至少一种选自下列的治疗剂：E 选择素蛋白、编码 E 选择素蛋白的核酸和特异性上调 E 选择素表达的试剂）和使

用说明书。在一个实施方案中，所述组合物包含 E 选择素蛋白或编码 E 选择素蛋白的核酸，以及特异性上调 E 选择素表达的试剂，其中特异性上调 E 选择素表达的试剂为 SDF-1α 蛋白或编码 SDF-1α 蛋白的核酸。在一个实施方案中，所述使用说明书包括用于对受试者施用高压氧治疗的说明书。

[0034] 本文还描述了一种促进糖尿病受试者的糖尿病性创面愈合的方法。所述方法包括以下步骤：提供包含药学上可接受的载体和多种骨髓衍生祖细胞的组合物，其中所述骨髓衍生祖细胞包含编码 E 选择素的多核苷酸；和以有效增加骨髓衍生祖细胞（例如，EPC）向创面的迁移并加速受试者的创面愈合的量将组合物施用于受试者。编码 E 选择素的多核苷酸可在病毒载体内，例如，病毒颗粒内包含的病毒载体（例如，AAV 颗粒内的 rAAV 载体）。组合物还可包含 SDF-1α 蛋白或编码 SDF-1α 蛋白的核酸，并且可直接施用至创面或邻近创面的部位。在一个实施方案中，所述方法还可包括对受试者施用高压氧治疗的步骤。

[0035] 尽管与本文所述类似或等同的组合物、试剂盒和方法可用于实施或测试本发明，但下文仍将描述合适的组合物、试剂盒和方法。本文提到的所有出版物、专利申请和专利的全文以引用方式并入。如有冲突，则以本说明书（包括定义）为准。下文描述的具体实施方案仅为说明性的，而并不旨在进行限制。

附图说明

[0036] 图 1 为细胞的系列显微图和显示 SDF-1α 工程改造的 BMDF 促进新血管形成和糖尿病性创面愈合的图。(A) 左图：以恢复百分数表示的创面愈合速率。使两组 NOD 小鼠受伤，并且用 mSDF-1α/BMDF 与 GFP/BMDF 对比治疗。通过数字摄影术和 ImageJ 分析来每天测定初始创伤面积的比率，直至创面愈合。与用 GFP/BMDF 治疗的对照组相比，用 mSDF-1α/BMDF 治疗的患糖尿病小鼠从第 3 天开始具有显著改善的创面闭合率。右图：示出各组在不同天数时的代表性创面。(B)：使用 Dil 染料的创面血管灌注。上图：示出通过激光扫描共焦显微镜在第 5 天测定的各组的 Dil 染色的创面血管的代表性图像。下图：创面中血管密度的量化。阈值面积的百分比覆盖所有检测为整个创伤面积百分数的血管。与对照组相比，mSDF-1α/BMDF 治疗的创面具有显著较高的血管密度。数据以各组中四个创面的平均值 ±SD 呈现。(C)：用 mSDF-1α/BMDF 与 GFP/BMDF 注射的创面组织的 IHC 的对比，用于检测 mSDF-1α。与 GFP/BMDF 治疗的创面 (40X) 相比，在 mSDF-1α/BMDF 治疗的创面中观察到较强的 mSDF-1α 表达（褐色）。

[0037] 图 2 为 EC 单层的照片和显示 EPC 对 SDF-1α 刺激 EC 单层的体外黏附增加的图。将 Dil-Ac-LDL 标记的 EPC 加到用 SDF-1α 或 BSA 刺激的 EC 单层。30 分钟后，冲洗掉未结合的 EPC。通过荧光扫描量化结合的 EPC。(A)：代表性图像。(B)：定量数据。数据以三次独立测定的平均值 ±SD 呈现，这三次独立测定中的样品完全相同。

[0038] 图 3 为电泳胶的图、照片；NOD 小鼠创面的一系列显微图；以及创面组织的显微图，该图显示 SDF-1α 刺激上调 E 选择素在 EC 单层中的表达。(A) 将 HMVEC 用 SDF-1α 或 BSA 刺激 4 小时，并且提取全部 RNA。使用 RT2 PCR 测定分析细胞外基质和黏附分子的表达。E 选择素的表达通过 SDF-1α 刺激而上调。与 SDF-1α 处理的 EC 相比，将 BSA 处理的 EC 中 mRNA 的水平设为 " 1 "。(B) 通过蛋白质印迹分析验证 E 选择素的表达。用 SDF-1α 或 BSA 刺激 HMVEC，并且在不同时间点收获细胞，将 β- 肌动蛋白用作内参照。(C) 与用 LacZ/AAV

注射的NOD小鼠创面相比，用mSDF-1α/AAV注射的NOD小鼠创面中的E选择素的血管表达增加。通过免疫染色检测血管中KDR（红色）和E选择素（绿色）的共表达（黄色）。(D)通过IHC检测用mSDF-1α/AAV注射的创面组织中SDF-1α的表达增加。

[0039] 图4为EC的一对图和一系列显微图，显示SDF-1α诱导的EC单层中的E选择素增加了EPC黏附和跨内皮迁移。(A)与BSA处理的EC单层相比，更多的EPC黏附至SDF-1α刺激的EC单层。加入抗E选择素的阻断性Ab在此细胞间黏附测定中抑制了SDF-1α刺激的EC与EPC之间的相互作用。数据以三次独立测定的平均值±SD呈现，这三次独立测定中的样品完全相同。(B，上图）与具有BSA处理的EC单层的transwell相比，观察到跨移至具有SDF-1α刺激的EC单层的transwell的下室的Dil-Ac-LDL标记的EPC增多。抗E选择素的阻断性Ab抑制此EPC跨内皮迁移。(B，下图）通过荧光扫描仪量化transwell的下室上的Dil-EPC。抗E选择素的阻断性Ab抑制了SDF-1α刺激的EC与EPC之间的相互作用。数据以三次独立测定的平均值±SD呈现，这三次独立测定中的样品完全相同。

[0040] 图5为蛋白质印迹的照片，其示出SDF-1α诱导E选择素配体在EPC中的表达。通过SDF-1α刺激EPC，并在不同的时间点收获细胞。通过蛋白质印迹分析检验E选择素配体、CD162和CD44的表达，β-肌动蛋白用作内参照。将实验重复两次。

[0041] 图6为一系列照片和图，其显示在后肢局部缺血和表皮创伤的鼠模型中E选择素参与SDF-1α诱导的EPC归巢、新血管形成和创面愈合。(A)上图：非侵害LDI测量的代表性图像，其显示E-sel$^{-/-}$与WT小鼠在股动脉结扎/切除后血流自发复原到局部缺血性后肢的对比。下图：LDI测量的定量数据。两组小鼠的局部缺血性后肢与正常后肢在不同时间点的比率。数据以从各组(n＝6个/组）得到的平均值±SD呈现。(B)E-sel$^{-/-}$与WT的创面闭合率对比。上图：E-sel$^{-/-}$和WT小鼠中创面愈合的代表性图像。E选择素的缺失延迟了创面愈合。下图：E-sel$^{-/-}$与WT小鼠的定量创面闭合率对比。数据以从各组(n＝6个/组）得到的创面闭合（恢复）百分比的平均值±SD呈现。(C)使用Dil染料的创面血管灌注。上图：示出通过共焦激光扫描摄影术在第7天检测的各组的Dil染色创面血管的代表性图像。下图：在第7天对剩余创面的整个区域的血管密度进行的软件辅助定量，以荧光百分数表示。与E-sel$^{-/-}$小鼠的创面相比，WT小鼠的创面具有显著较高的血管密度。数据以各组中三个创面的平均值±SD呈现。(D)E-sel对于EPC归巢到创面损伤区而言是必须的。将来自ROSA26(LacZ^{+})小鼠的1×10^{7}个骨髓细胞分别移植到E-sel$^{-/-}$和WT小鼠中。创建局部缺血性后肢创面，并且将SDF-1α注射到创面中。细胞移植后7天，收获创面，并对冷冻样品进行X-gal（蓝色）和抗-KDR（褐色）染色。上图：双重染色的代表性图像。下图：从创面样品的5个随机选择的区域中对双阳性细胞进行计数。数据为得自各组的平均值±SD(n＝3个创面/组）的百分数。

[0042] 发明详述

[0043] 本文所述的组合物、方法和试剂盒基于通过EC和循环EPC调节成熟SDF-1α介导的EPC归巢的信号的发现。在以下描述的实验中，显示经由基于细胞的疗法的创面中增加水平的SDF-1α促进糖尿病小鼠的愈合（截止第3天，愈合率增加～20％，P＝0.006)。SDF-1α增加了EC-EPC黏附，并且特异性上调人微血管EC中的E选择素表达(4.6倍增加，P＜0.01)。此效应在实验小鼠的血管中也是显著的，并且导致创面新血管形成增加。SDF-1α对EC-EPC黏附和EPC归巢的调节效应受到E选择素的特异性介导，因为施用E选择素拮抗

剂显著抑制了 SDF-1α 诱导的 EC-EPC 黏附、EPC 归巢、创面新血管形成和创面愈合。介导 SDF-1α 诱导的创面愈合的 E 选择素的募集在 E-sel$^{-/-}$ 小鼠模型中得以证实。SDF-1α 工程改造的基于细胞的疗法通过特异性上调成熟 EC 中的 E 选择素表达而导致 EC-EPC 黏附增加、EPC 归巢以及创面新血管形成增加，从而促进小鼠的糖尿病性创面愈合。这些发现使人们对潜藏在 SDF-1α 对 EPC 归巢的生物效应背后的信号有了新的了解，并且指明 E 选择素作为对局部缺血性（例如，糖尿病性）创面愈合中的 EPC 运输进行治疗性操纵的新的可能靶标。

[0044] 下面描述的优选实施方案阐释了这些组合物、疫苗、试剂盒和方法的适应范围。然而，根据这些实施方案的描述，本发明的其它方面可基于下文提供的描述完成和 / 或实施。

[0045] 生物学方法

[0046] 本文描述了涉及常规分子生物学技术的方法。此类技术通常是本领域中已知的，并且详细描述于以下方法论文中：例如 Molecular Cloning：ALaboratory Manual，第 3 版，第 1-3 卷，Sambrook 等编著，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，N.Y.，2001；和 Current Protocols in Molecular Biology，Ausubel 等编著，Greene Publishing and Wiley-Interscience，New York，1992（定期更新）。免疫学技术通常是本领域中已知的，并且详细描述于以下方法论文中：例如 Advances in Immunology，第 93 卷，Frederick W.Alt 编著，Academic Press(Burlington，MA)，2007；Making and Using Antibodies：A Practical Handbook，Gary C.Howard 和 Matthew R 编著，Kaser，CRC Press，Boca Raton，Fl，2006；Medical Immunology，第 6 版，Gabriel Virella 编著，Informa Healthcare Press，London，England，2007；和 Harlow and Lane ANTIBODIES：A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，NY，1988。常规的基因转移方法和基因疗法也适用于本发明。参见例如 Gene Therapy：Principles and Applications，T.Blackenstein，Springer Verlag 编著，1999；和 Therapy Protocols(Methods in Molecular Medicine)，P.D.Robbins 编著，Humana Press，1997。

[0047] 促进局部缺血性创面愈合的组合物

[0048] 本文描述了用于促进糖尿病受试者的局部缺血性（例如，糖尿病性）创面愈合的组合物。本文所述的组合物可用于促进任何类型的局部缺血性创面的愈合，诸如糖尿病性创面。此类组合物通常包括治疗有效量的组合物，所述治疗有效量的组合物包含药学上可接受的载体和至少一种治疗剂，诸如 E 选择素蛋白或编码 E 选择素蛋白的核酸。组合物还可包含特异性上调 E 选择素表达的试剂。在此实施方案中，可使用特异性上调 E 选择素表达的任何合适试剂。例如，可使用 SDF-1α。另外的实例包括 IL-1、TNF-α 和脂多糖 (LPS)。在此实施方案中，组合物包含 E 选择素蛋白或编码 E 选择素蛋白的核酸，以及 SDF-1α 蛋白或编码 SDF-1α 蛋白的核酸。将组合物施用于受试者导致受试者的骨髓衍生祖细胞向创面的迁移增加和创面愈合加速。创面愈合的特征在于创面的上皮再形成。

[0049] 可使用任何合适的方案（例如，基于 A 蛋白和 G 蛋白微珠的抗 E 选择素抗体捕获技术 (Invitrogen)）来分离或合成 E 选择素蛋白。在施用 E 选择素蛋白的典型实施方案中，通过转化细菌细胞（例如，大肠杆菌）或转染哺乳动物细胞，然后从这些细胞中纯化 E 选择素，来制备 / 合成 E 选择素蛋白。在其中也施用 SDF-1α 蛋白的实施方案中，以类似方式制备 SDF-1α 蛋白。

[0050] 在另一个实施方案中，可将编码 E 选择素的核酸施用于受试者，以治疗糖尿病性创面。编码 E 选择素的编码序列可与登录号为 NM_000450 的核苷酸序列相同，或其也可为不同的编码序列，该不同的编码序列由于遗传密码的冗余和简并性而编码与登录号为 NM_000450 的多核苷酸相同的多肽。如本文所述的其它核酸分子包括天然 E 选择素基因的变体，诸如编码天然 E 选择素蛋白的片段、类似物和衍生物的那些。此类变体可为例如天然 E 选择素基因的天然存在的等位基因变体、天然 E 选择素基因的同源物或天然 E 选择素基因的非天然存在的变体。这些变体具有关于一个或多个碱基不同于天然 E 选择素基因的核苷酸序列。例如，此类变体的核苷酸序列的特征可为天然 E 选择素基因的一个或多个核苷酸的缺失、添加或取代。

[0051] 在其它实施方案中，在结构上显示出实质变化的变异 E 选择素蛋白可通过进行核苷酸取代产生，所述核苷酸取代引起被编码多肽中小于保守变化的变化。此类核苷酸取代的实例为引起关于 (a) 多肽骨架的结构 ；(b) 多肽的电荷或疏水性 ；或 (c) 氨基酸侧链体积的变化的取代。通常预期产生蛋白性质的最大变化的核苷酸取代为引起密码子的非保守变化的核苷酸取代。可能引起蛋白结构的较大变化的密码子变化的实例包括引起以下取代的密码子变化 ：(a) 亲水残基，例如丝氨酸或苏氨酸被取代为疏水残基，例如，亮氨酸、异亮氨酸、苯基丙氨酸、缬氨酸或丙氨酸 ；(b) 半胱氨酸或脯氨酸被取代为其它任意残基 ；(c) 具有正电性侧链的残基，例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸被取代为负电性残基，例如谷氨酰胺或天冬氨酸 ；或 (d) 具有大侧链的残基，例如苯基丙氨酸被取代为无侧链的残基，例如甘氨酸。

[0052] 如本文所述的天然 E 选择素基因或天然 E 选择素 mRNA 的天然存在的等位基因变体为从人组织分离的核酸，所述核酸与天然 E 选择素基因或天然 E 选择素 mRNA 具有至少 75％（例如，76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％和 99％）的序列同一性，并且编码与天然 E 选择素蛋白具有结构相似性的多肽。如本文所述的天然 E 选择素基因或天然 E 选择素 mRNA 的同源物为从其它物种分离的核酸，所述核酸与天然人 E 选择素基因或天然人 E 选择素 mRNA 具有至少 75％（例如，76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％和 99％）的序列同一性，并且编码与天然人 E 选择素蛋白具有结构相似性的多肽。可搜索公共和 / 或专有核酸数据库，以鉴定与天然 E 选择素基因或天然 E 选择素 mRNA 具有高百分比（例如，70％、80％、90％或更高）的序列同一性的其它核酸分子。

[0053] 非天然存在的 E 选择素基因或 mRNA 变体为非天然存在（例如，由人手工制备）的核酸，其与天然人 E 选择素基因或天然人 E 选择素 mRNA 具有至少 75％（例如，76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％和 99％）的序列同一性，并且编码与天然人 E 选择素蛋白具有结构相似性的多肽。非天然存在的 E 选择素基因变体的实例为编码 E 选择素蛋白片段的基因变体、在严格条件下与天然 E 选择素基因或与天然 E 选择素基因的补体杂交的基因变体、与天然 E 选择素基因或其补体共有至少 65％序列同一性的基因变体以及编码 E 选择素融合蛋白的基因变体。

[0054] 如本文所述的编码天然 E 选择素蛋白片段的核酸为编码天然 E 选择素蛋白的例如 2 个、5 个、10 个、25 个、50 个、100 个、150 个、200 个或更多个氨基酸残基的核酸。编码或杂

交编码天然 E 选择素蛋白片段的核酸的较短的寡核苷酸（例如，具有 6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、20 个、30 个、50 个碱基对长度的寡核苷酸）可用作探针、引物或反义分子。编码天然 E 选择素蛋白片段的核酸可通过酶消化（例如，使用限制酶）或化学降解全长天然 E 选择素基因、E 选择素 mRNA 或 cDNA 或前述的变体来制备。使用先前报道的天然人 E 选择素基因的核苷酸序列和天然 E 选择素蛋白的氨基酸序列，本领域的技术人员可通过例如标准核酸诱变技术或通过化学合成制备核苷酸序列中具有最小变异的核酸分子。变异 E 选择素核酸分子可表达产生变异 E 选择素蛋白。

[0055] 促进糖尿病性创面愈合的方法

[0056] 促进糖尿病受试者的糖尿病性创面愈合的方法的一个实施方案包括提供治疗有效量的组合物，该组合物包含药学上可接受的载体和至少一种治疗剂，诸如 E 选择素蛋白、编码 E 选择素蛋白的核酸和特异性上调 E 选择素表达的试剂；和在条件下将组合物施用于受试者，使得受试者的骨髓衍生祖细胞（例如，EPC）向创面的迁移增加。例如，组合物可包含 E 选择素蛋白或编码 E 选择素蛋白的核酸以及特异性上调 E 选择素表达的试剂，诸如 SDF-1α 蛋白或编码 SDF-1α 蛋白的核酸。在此方法中，所述组合物可以任何合适的途径施用，例如口服施用、局部施用、静脉内施用或直接施用至创面或邻近创面的部位。对受试者施用所述组合物导致创面愈合加快。

[0057] 一种使糖尿病受试者的糖尿病性创面愈合的方法还可包括对受试者施用高压氧治疗。在本文所述的方法中，高压氧疗法（HBO_2）通常为在微脉管系统已变薄的情况下用于刺激创面愈合的辅助疗法。用 HBO_2 治疗糖尿病受试者的方法描述于例如 PCT/US2008/003760 中，其以引用的方式并入本文。在促进糖尿病受试者（患者）的创面愈合的方法的一个实例中，患者每天一次或两次接受 20 次或更多次下述治疗：在加压室中呼吸介于约 2.0 至约 3.2 绝对大气压（ATA）下的 100％ O_2。治疗时间范围通常从约 10 分钟至约 240 分钟（例如，约 10 分钟、15 分钟、30 分钟、60 分钟、90 分钟、120 分钟、150 分钟、180 分钟、210 分钟、240 分钟，等）。

[0058] 在另一个实施方案中，一种上调具有糖尿病性创面的糖尿病受试者的 E 选择素表达的方法，包括将包含至少一种 rAAV 病毒粒子的组合物施用于糖尿病受试者，所述至少一种 rAAV 病毒粒子包含编码 E 选择素的多核苷酸，所述多核苷酸插入第一 AAV 反向末端重复与第二 AAV 反向末端重复之间。在此实施方案中，所述组合物的量可有效上调 E 选择素表达、诱导骨髓衍生祖细胞（例如，EPC）向创面的迁移以及加速受试者的创面愈合。在此方法中，所述至少一种 rAAV 病毒粒子可包含血清 2 型衣壳蛋白。如在本文所述的其它实施方案中那样，所述组合物可以任何合适的途径施用，例如，口服施用、局部施用、静脉内施用或直接施用至创面或邻近创面的部位。此方法还可包括对受试者施用 SDF-1α 蛋白或编码 SDF-1α 蛋白的核酸，和 / 或对受试者施用高压氧治疗的步骤。

[0059] 在另一个实施方案中，一种促进糖尿病受试者的糖尿病性创面愈合的方法包括以下步骤：提供包含药学上可接受的载体和多种骨髓衍生祖细胞的组合物，和以有效增加骨髓衍生祖细胞（例如，EPC）向创面的迁移以及加速受试者的创面愈合的量将组合物施用于受试者。在此实施方案中，所述骨髓衍生祖细胞包含编码 E 选择素的多核苷酸。编码 E 选择素的多核苷酸可包含在病毒载体内，诸如 rAAV 载体。通常，rAAV 载体在 rAAV 病毒（颗

粒）内。在此实施方案中，所述组合物还可包含 SDF-1α 蛋白或编码 SDF-1α 蛋白的核酸。如果所述组合物包含编码 SDF-1α 的核酸，则该核酸可存在于 rAAV 载体内、第二 rAAV 载体内或不同于 rAAV 的病毒载体内。所述组合物可以任何合适的途径施用，例如口服施用、局部施用、静脉内施用或直接施用至创面或邻近创面的部位。所述方法还可包括对受试者施用高压氧治疗的步骤。

[0060] 本文所述的方法可用于治疗多种不同类型的创面。糖尿病性创面的一个实例为青斑样血管病变，其为一种以与网状青斑和白色萎缩相关的疼痛性溃疡为特征的病症。糖尿病性创面的另一个实例为糖尿病性溃疡，例如，外周动脉疾病性溃疡、静脉郁血性溃疡、慢性未愈合溃疡、压迫性溃疡、褥疮性溃疡、慢性足部溃疡等。创面还可为以上列出的一种或多种创面的组合。糖尿病受试者可具有一种或多种待治疗的创面。受试者包括任何哺乳动物，诸如人类、大鼠、小鼠、猫、犬、山羊、绵羊、马、猴子、类人猿、兔子、牛等。受试者（例如，哺乳动物）可处于任何发育阶段，包括成年和幼年。靶组织可为受试者体内的任何组织，诸如视网膜、肝脏、肾脏、心脏、肺、胃肠道组成部分、胰腺、胆囊、膀胱、中枢神经系统（包括脑）、表皮、骨骼等。

[0061] 在其中将编码 E 选择素的核酸（以及任选的编码用于调节 EPC 归巢的 SDF-1α 或其它试剂的核酸）施用于糖尿病受试者的方法中，本文所述的核酸还可包含一个或多个表达控制序列，其可操作性地连接至编码 E 选择素的核酸（以及任选的编码用于调节 EPC 归巢的 SDF-1α 或其它试剂的核酸）。许多此类序列是已知的。要包括的序列可根据其在其它应用中的已知功能进行选择。表达控制序列的实例包括启动子、绝缘子、沉默子、应答元件、内含子、增强子、起动位点、终止信号和 pA 尾。

[0062] 为使 E 选择素（以及任选的 SDF-1α）达到适当水平，可采用适合用在靶细胞中的许多启动子的任何一种。例如，可使用不同强度的组成型启动子。如本文所述的表达载体和质粒可包括一种或多种组成型启动子，诸如病毒启动子或哺乳动物基因的启动子，其通常积极促进转录。组成型病毒启动子的实例包括单纯疱疹病毒 (HSV)、胸苷激酶 (TK)、劳氏肉瘤病毒 (RSV)、猿猴病毒 40(SV40)、小鼠乳腺瘤病毒 (MMTV)、Ad E1A 和巨细胞病毒 (CMV) 启动子。组成型哺乳动物启动子的实例包括多种持家基因启动子，例如 β- 肌动蛋白启动子。

[0063] 也可设想将诱导型启动子和 / 或调节元件用于本文所述的组合物和方法中。合适的诱导型启动子的实例包括得自诸如下列的基因的诱导型启动子 :细胞色素 P450 基因、热休克蛋白基因、金属硫蛋白基因和激素诱导型基因，例如雌激素基因启动子。诱导型启动子的另一个实例为对四环素应答的 tetVP16 启动子。

[0064] 组织特异性启动子和 / 或调节元件可用于本文所述组合物和方法的某些实施方案中。可与如本文所述的表达载体一起使用的此类启动子的实例包括 Tie-2 或 KDR_ 启动子。

[0065] 如本文所述的组合物（例如，包含编码 E 选择素的病毒载体的组合物）可通过任何合适的技术施用于哺乳动物受试者。根据本文所述的组合物和方法，提供了使用病毒载体以将 E 选择素基因引入细胞的多种技术。病毒是自然进化的将其基因高效递送到宿主细胞中的媒介物，因此其为递送治疗性基因的理想载体系统。优选的病毒载体表现出对宿主细胞的低毒性，并且产生（例如，以组织特异性方式）治疗量的 E 选择素蛋白。病毒载体方

法和方案可查看 Kay 等，NatureMedicine 7 :33-40，2001。

[0066] 虽然下面描述的实验涉及 rAAV 和慢病毒属，但可使用任何合适的病毒载体。已知许多病毒载体在本领域中用于将基因递送至哺乳动物受试者以及以下实例的非详尽列表。将重组腺病毒用作基因疗法载体的方法论述在例如 W.C.Russell，Journal of General Virology 81 :2573-2604，2000，和 Bramson 等，Curr.Opin.Biotechnol.6 :590-595，1995。使用单纯疱疹病毒载体的方法论述在例如 Cotter 和 Robertson，Curr.Opin.Mol.Ther.1 :633-644，1999。也可使用复制缺陷型慢病毒载体（包括 HIV）。使用慢病毒载体的方法论述在例如 Vigna 和 Naldini，J.Gene Med.5 :308-316，2000 ；和 Miyoshi 等，J.Virol.72 :8150-8157，1998。也可使用逆转录病毒载体，包括基于鼠白血病病毒的载体。使用基于逆转录病毒载体的方法论述在例如 Hu 和 Pathak，Pharmacol.Rev.52 :493-511，2000 ；和 Fong 等，Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.17 :1-60，2000。可用的其它病毒载体包括甲病毒 (Alphaviruses)，包括塞姆利基森林病毒 (Semliki Forest Virus) 和辛德比斯病毒 (Sindbis Virus)。杂合病毒载体可用于将 E 选择素基因递送至靶组织（例如，糖尿病性创面）。构建杂合载体的标准技术为本领域技术人员所熟知。此类所述技术可在例如 Sambrook 等，In Molecular Cloning :A laboratory manual。Cold Spring Harbor，NY 或许多讨论重组 DNA 技术的实验室手册中找到。

[0067] 在一些实施方案中，本文所述的组合物和方法的核酸可并入 rAAV 载体和 / 或病毒粒子中，以有利于其向细胞内的引入。有用的 rAAV 载体为重组核酸构建体，其包括 (1) 要表达的异源序列（例如，编码 E 选择素蛋白的多核苷酸）和 (2) 有利于异源基因整合和表达的病毒序列。病毒序列可包括在 cis 中将 DNA 复制和包装到病毒粒子（例如，功能性 ITR) 所需的 AAV 的那些序列。在典型应用中，异源基因编码 E 选择素，其可用于增加糖尿病受试者的骨髓衍生祖细胞向创面的迁移和促进创面愈合。此类 rAAV 载体还可包含标记物或报告基因。有用的 rAAV 载体的一个或多个 AAV WT 基因完全或部分缺失，但仍保留功能性侧翼 ITR 序列。AAV ITR 可以是适于特定应用的任何血清型（例如，源于血清型 2）。使用 rAAV 载体的方法论述在例如 Tal，J.，J.BioMed.Sci.7 :279-291，2000 和 Monahan and Samulski，Gene delivery 7 :24-30，2000。

[0068] 本发明的核酸和载体可并入 rAAV 病毒粒子中，以有利于核酸或载体向细胞的引入。AAV 的衣壳蛋白构成外表面、病毒粒子的非核酸部分并且由 AAV cap 基因编码。该 cap 基因编码三种病毒外壳蛋白质 :VP1、VP2 和 VP3，这三种病毒外壳蛋白质对于病毒粒子装配是必须的。rAAV 病毒粒子的构建已有描述。参见例如，美国专利 No.5,173,414、No.5,139,941、No.5,863,541 和 No.5,869,305、No.6,057,152、No.6,376,237 ；Rabinowitz 等，J.Virol.76 :791-801，2002 ；和 Bowles 等，J.Virol.77 :423-432，2003。

[0069] 可用于本发明的 rAAV 病毒粒子包括源于多种 AAV 血清型（包括 1 型、2 型、3 型、4 型、5 型、6 型、7 型、8 型和 9 型）的那些 rAAV 病毒粒子。不同血清型的 AAV 载体和 AAV 蛋白的构建和使用在以下文献中有所论述 :Chao 等，Mol.Ther.2 :619-623，2000 ；Davidson 等，PNAS 97 :3428-3432，2000 ；Xiao 等，J.Virol.72 :2224-2232，1998 ；Halbert 等，J.Virol.74 :1524-1532，2000 ；Halbert 等，J.Virol.75 :6615-6624，2001 ； 和 Auricchio 等，Hum.Molec.Genet.10 :3075-3081，2001。

[0070] 还可用于本文所述组合物、试剂盒和方法的是假型 rAAV。假型载体包括给定血

清型假型的 AAV 载体，其中衣壳基因源于不同于给定血清型的血清型。涉及假型 rAAV 病毒粒子的构建和使用的技术是本领域中已知的，并且在以下文献中有所描述 :Duan 等，J.Virol，75 :7662-7671，2001 ;Halbert 等，J.Virol，74 :1524-1532，2000 ;Zolotukhin 等，Methods，28 :158-167，2002 ;和 Auricchio 等，Hum.Molec.Genet.10 :3075-3081，2001。

[0071] 与非突变衣壳病毒粒子相比，病毒粒子衣壳内具有突变的 AAV 病毒粒子可用于更有效地感染特定细胞类型。例如，合适的 AAV 突变体可具有配体插入突变，以有利于将 AAV 靶向至特定细胞类型。包括插入突变体、丙氨酸筛选突变体和附加表位突变体在内的 AAV 衣壳突变体的构建和表征在 Wu 等，J.Virol.74 :8635-45，2000 中有所描述。可用于本文所述方法和组合物的其它 rAAV 病毒粒子包括由病毒的分子育种以及外显子改组所产生的那些衣壳杂合体。参见 Soong 等，Nat.Genet.25 :436-439，2000 ;以及 Kolman 和 Stemmer Nat.Biotechnol 19 :423-428，2001。

[0072] 可通过注射（例如通过团注射或连续输注）来进行病毒载体或病毒颗粒的肠胃外施用。用于注射的制剂可以单位剂型存在，例如，在安瓿瓶或在多剂量容器中，并加入防腐剂。所述组合物可采用例如在油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳液的形式，并且可包含例如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂的配制剂。作为另外的选择，载体或病毒颗粒可呈粉末形式（例如，冻干的），以便在使用前与合适的媒介物（例如，不含热原的灭菌水）组构。

[0073] 除了病毒载体之外，可使用将编码 E 选择素的核酸引入具有至少一种糖尿病性创面的糖尿病受试者的任何合适的媒介物或载体。例如，可使用基于超声的基因递送技术。另外的实例包括粒子轰击和细胞电通透。也可使用与质粒 DNA 形成多细胞聚集体的合成基因转移分子。此类分子包括聚合 DNA 结合阳离子 (Guy 等，Mol.Biotechnol.3 :237-248，1995)，阳离子两亲物（脂多胺和阳离子脂质，Feigner 等，Ann.NY Acad.Sci.772 :126-139，1995) 和阳离子脂质体 (Fominaya 等，J.Gene Med.2 :455-464，2000)。

[0074] 在一些实施方案中，将包含 rAAV-E 选择素载体或病毒的 EPC 施用于糖尿病受试者，以治疗一种或多种糖尿病性创面。可使用若干种方法将 EPC 引入受试者，包括导管介导的递送 I.V.（例如，血管内导管），或直接注射到靶位点（例如，糖尿病性创面）中。用于分离供体干细胞和移植此类分离细胞的技术是本领域中已知的。本文所述的方法还设想用 rAAV 病毒粒子转导的细胞的体外递送。体外基因递送可用于将例如 rAAV 转导的宿主细胞（例如，EPC) 移植回宿主中。合适的体外方案可包括若干步骤。可从宿主中收获一部分靶组织（例如，骨髓衍生 EPC)，并且可使用 rAAV 病毒粒子将 E 选择素编码核酸转导至受试者（即，宿主）细胞中。然后这些经遗传修饰的细胞可移植回受试者中。可使用若干种方法将细胞重新引入受试者中，包括静脉内注射、腹膜内注射或原位注射到靶组织中。用经体外修饰的 rAAV 转导或感染的细胞的微囊化是可使用的另一种技术。根据本发明，可使用自体和异体细胞移植。

[0075] 为了增加 BM 衍生祖细胞从 BM 到非 BM 隔室（例如，靶组织）的募集，如本文所述的用于促进创面愈合的组合物除了 E 选择素和 SDF-1α 之外，可包含能够促进 BM 衍生祖细胞募集的任何其它制剂。许多此类制剂是已知的。参见，例如国际申请 WO 00/50048 中描述的那些 ;整联蛋白（例如，α4、α5)、黏附分子的选择素家族、VCAM-1 和集落刺激因子。

[0076] 本文所述的治疗方法通常包括将治疗有效量的本文所述的组合物施用于需要其的受试者（例如，动物、人），包括哺乳动物，特别是人。此类治疗将适于施用于患有、具有、

易患疾病、病症或其症状或处于患疾病、病症或其症状的风险的受试者，特别是人。“处于风险”的那些受试者的判定可通过任何客观或主观判定（通过诊断性试验或受试者或医疗服务人员的意见）来完成。本文的方法和组合物还可用于治疗任何可能涉及下调 E 选择素信号转导、表达或活性的其它病症。

[0077] 在一个实施方案中，促进糖尿病受试者的糖尿病性创面愈合的方法包括监测治疗进展。监测受试者的治疗进展通常包括测定具有糖尿病性创面的受试者的创面尺寸的测量值或其它诊断测量值，然后对受试者施用足以促进受试者的创面愈合的治疗量的本文所述的组合物。在将足以促进愈合的治疗量的本文所述的组合物施用于受试者后的一个或多个时间点，测定创面尺寸的第二次测量值，并与创面尺寸的第一次测量值进行比较。将第一次测量值与随后的测量值进行比较，以监测创面愈合的过程（例如，创面尺寸减小）和治疗功效。

[0078] 试剂盒

[0079] 本文描述了用于治疗哺乳动物受试者的至少一种糖尿病性创面的试剂盒。典型的试剂盒包含治疗有效量的组合物，该组合物包含药学上可接受的载体和至少一种治疗剂（诸如 E 选择素蛋白、编码 E 选择素蛋白的核酸或特异性上调 E 选择素表达的试剂），以及使用说明书。在一个实施方案中，试剂盒包含治疗组合物（包含治疗有效量的 E 选择素蛋白或编码 E 选择素蛋白的核酸和特异性上调 E 选择素表达的试剂）以及使用说明书。例如，用于治疗哺乳动物受试者的至少一种糖尿病性创面的试剂盒包含治疗组合物，该组合物包含治疗有效量的 E 选择素蛋白或编码 E 选择素（例如，rAAV-E 选择素）的核酸和治疗有效量的促进创面愈合的 SDF-1α 以及单位剂型的药学上可接受的载体。通常，本文所述的试剂盒包括包装和使用说明书。在一些实施方案中，试剂盒包括容纳治疗性或预防性组合物的无菌容器；此类容器可为盒子、安瓿、瓶子、小瓶、管、袋子、小袋、泡罩包装或本领域中已知的其它合适的容器形式。此类容器可由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或其它适于容纳药物的材料制成。在其中除了本文所述的治疗组合物外还将高压氧治疗施用于待治疗的受试者的实施方案中，使用说明书通常包括用于对受试者施用高压氧治疗的说明书。

[0080] 在要将 EPC（例如，包含 rAAV-E 选择素的 EPC）施用于糖尿病受试者的实施方案中，如本文所述的试剂盒包含治疗量的 EPC 以及用于将细胞施用于具有一种或多种糖尿病性创面的受试者的说明书。可通过适于运送和储存细胞的任何方式封装细胞；此类方法是本领域所熟知的。说明书通常包括以下的一种或多种：细胞描述；剂量日程表和用于治疗糖尿病性创面的施用方法；注意事项；警告；适应症；禁忌症；过剂量信息；不良反应；动物药理学；临床研究；和 / 或参照。可将说明书可直接印在容器（如果有），或作为施加至容器的标签，或作为单独的纸页、小册子、卡片或折页在容器中或与容器一起提供。

[0081] 组合物的施用

[0082] 本发明的组合物可以任何合适的制剂施用于哺乳动物（例如，啮齿动物、人）。例如，如本文所述的用于促进创面愈合的组合物（例如，E 选择素、编码 E 选择素的核酸、SDF-1α）可配制成药学上可接受的载体或稀释剂，诸如生理盐水或缓冲盐溶液。可根据施用模式和途径以及标准药学实践选择来选择合适的载体和稀释剂。示例性的药学上可接受的载体和稀释剂以及药物制剂的描述可在本领域的标准文本 Remington′ s Pharmaceutical Sciences 以及 USP/NF 中找到。可向组合物中添加其它物质以稳定和 / 或

保存组合物。

[0083] 可通过任何常规技术将本发明的组合物施用于哺乳动物。通常，此类施用将为局部施用（例如，气雾剂、霜膏、泡沫剂、凝胶、液体、软膏、糊剂、粉末、洗剂、喷剂、贴剂、贴片或敷料）或口服施用。当组合物在一个实施方案中配制成用于口服递送时，活性化合物可以与赋形剂混合，并以可吸收的片剂、口含片、锭剂、胶囊、酏剂、混悬剂、糖浆剂、薄片剂等的形式使用。片剂、锭剂、丸剂、胶囊等也可以包含下列组分：粘合剂，例如黄芪胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶；赋形剂，诸如磷酸二钙；崩解剂，例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸等；润滑剂，诸如硬脂酸镁；并且可以加入甜味剂，例如蔗糖、乳糖或糖精，或者调味剂，例如薄荷、冬青油或樱桃调味剂。当单位剂型是胶囊时，除了上述类型的物质以外，其可包含液体载体。多种其它材料可作为包衣存在或以其它方式改变剂量单位的物理形式。例如，可用紫胶、糖或两者对片剂、丸剂或胶囊进行包衣。酏剂的糖浆可包含活性化合物、作为甜味剂的蔗糖、作为防腐剂的甲基和对羟基苯甲酸丙酯、染料和调味剂（例如樱桃或柑橘调味剂）。此外，活性化合物可以掺入到持续释放、脉冲释放、控制释放或延迟释放的制剂或剂型中。

[0084] 作为另外的选择，施用可为肠胃外施用（例如，静脉内、皮下、瘤内、肌肉内、腹膜内或鞘内引入）。本文中也可以通过真皮内贴剂提供组合物，即，将贴剂邻近待治疗的皮肤区域施用。如如本文所使用的“贴剂”包括至少本文提供的组合物和覆盖层，使得可将贴剂置于待治疗的皮肤区域上。贴剂可被设计成使本文提供的组合物透过角质层到达表皮或真皮中的递送最大化、减少滞后时间、促进均匀吸收和减少机械磨擦。

[0085] 还可通过例如，手术递送至内部或外部靶部位，或通过导管（例如，血管内导管）到达血管可触及的部位，从而将组合物直接施用至靶部位。当治疗具有糖尿病性创面的受试者时，可将组合物通过静脉内施用至受试者，直接到达创口中或到达创面。可以快速灌注、多次注射或通过连续输注（例如，静脉内，通过腹膜透析、泵输注）来使用组合物。对于肠胃外施用，将组合物优选地配制成无菌的不含热原的形式。

[0086] 如本文所述的药物组合物可配制成大致在施用时即刻或在施用后的预定时间或时间段释放治疗剂（例如，E 选择素蛋白、编码 E 选择素的核酸、特异性上调 E 选择素表达的试剂）。后一类型的组合物通常称为控释制剂。可使用在体内形成基本上恒定的药物浓度并历经持续时间段的制剂。在另一个实施方案中，可使用在预定滞后时间后在体内形成基本上恒定的药物浓度并历经持续时间段的制剂。作为另一个实例，可使用这样的制剂，其通过在体内保持相对恒定有效的水平，同时将与活性物质的血浆水平波动相关的不利副作用降至最低来在预定时间段维持作用。还可在本文所述的组合物中使用的是允许方便给药使得以例如一周一次或两周一次来施用剂量的制剂，以及通过使用例如渗透泵或基于超声的基因递送技术将治疗剂递送到特定细胞类型（例如，内皮细胞）来靶向糖尿病性创面的制剂。

[0087] 可使用许多策略来实现使所递送治疗剂的释放速率大于代谢速率的控释。在一个实例中，通过适当选择多种种制剂参数和成分，包括例如多种类型的控释组合物和包衣来实现控释。治疗剂可与适当的赋形剂配制成药物组合物，该药物组合物在施用时以可控方式释放治疗剂。实例包括单或多单位片剂或胶囊组合物、油性溶液、悬浮液、乳剂、微胶囊、微球、分子络合物、纳米颗粒、贴剂和脂质体。

[0088] 有效剂量

[0089] 上述组合物优选地以有效量施用于哺乳动物（例如，人），即，该量能够在被治疗的哺乳动物中产生期望结果（例如，通过特异性上调 E 选择素在成熟 EC 中的表达而引起增加 EC-EPC 黏附、EPC 归巢和创面新血管形成，以此促进小鼠的糖尿病性创面愈合）。此类治疗有效量可按下文所述进行确定。

[0090] 可通过标准药物程序、使用培养物中的或实验动物的细胞来测定 LD_{50}（使 50％的群体致死的剂量），从而确定本发明的方法中所利用的组合物的毒性和治疗功效。毒效和疗效之间的剂量比为治疗指数，并且其可以表示为比率 LD_{50}/ED_{50}。表现出大的治疗指数的那些组合物是优选的。当使用表现出毒副作用的那些组合物时，应注意设计将此类副作用的潜在损伤降至最低的递送体系。优选组合物的剂量优选地在包括具有很小或无毒性的 ED_{50} 的范围之内。该剂量可根据所采用的剂型和所利用的施用途径在此范围内发生变化。

[0091] 正如医疗和兽医领域中所熟知，用于任何一个受试者的剂量取决于多种因素包括受试者的体格、身体表面积、年龄、待施用的具体组合物、时间和施用途径、总体健康情况以及同时施用的其它药物。对于颗粒的静脉内施用而言，预期适当的剂量将在例如每个创面约 10^9 个病毒颗粒的范围内，而对于重组蛋白（例如，SDF-1α、E 选择素）而言，适当剂量例如为 25μg/kg。

实施例

[0092] 通过以下具体实施例对本发明做进一步阐释。所提供的这些实施例仅用于举例说明，而不应理解为以任何方式对本发明的范围进行限制。

[0093] 实施例 1-E 选择素响应于 SDF-1α 而介导内皮祖细胞归巢并且介导正常肢体血管再形成和创面愈合速率：对未愈合糖尿病相关的微血管病和未愈合创面的潜在临床效用。

[0094] SDF-1α 用作使 EPC 从骨髓募集到需要新血管形成的周边区域的归巢信号（Gallagher 等，SDF-1α as a critically important factor，deficient in Diabetes-associated non-healing cutaneous wounds：J Clin Invest 2007，117：1249-1259），但是迄今为止尚未发现 SDF-1α 导致循环 EPC 归巢至靶组织的机制。据推测毛细管内层的成熟 EC 和循环 EPC 之间需要直接的细胞间相互作用，以实现 EPC 到靶组织的归巢，并且此类相互作用影响肢体血管再形成和表皮创面愈合的速率。本文描述了对由成熟 EC 上介导 EPC 归巢过程的 SDF-1α 所调节的特异性黏附分子的鉴定；得自小鼠和人细胞研究的新数据将此分子鉴定为 E 选择素。另外的数据表明肢体血管再形成和创面愈合受到组织水平的 E 选择素表达的有利影响。还推测局部递送至患有微血管病的未愈合创面（诸如糖尿病患者的未愈合创面）的 E 选择素将达到作为新的创面愈合技术的效用。正在开发可在局部缺血性和糖尿病性创面中进行测试的编码 E 选择素的 AAV 载体。

[0095] 使用 RT^2 Profiler PCR 阵列，在培养的人成熟 EC 中对由 SDF-1α 诱导的细胞外基质和黏附分子进行研究。经所述阵列发现显著提高了基因表达的分子通过蛋白质印迹法和免疫组织化学得以证实。通过细胞黏附和跨内皮迁移测定来研究 SDF-1α 对人 EPC 与 EC 之间的直接细胞间相互作用的效应。通过在体外和体内使用拮抗剂来研究鉴定的黏附分子在介导 SDF-1α 诱导的 EC-EPC 相互作用、EPC 归巢、肢体血管再形成和创面愈合方面的特殊作用。进行骨髓移植实验（将得自 Rasa26 小鼠的骨髓细胞移植到 $E\text{-}sel^{+/+}$ 与 $E\text{-}sel^{-/-}$ 小

鼠中），以研究 EPC 到创面的募集和创面愈合速率，有或无 E 选择素的组织水平的表达。通过 ANOVA 分析数据。

[0096] SDF-1α 显著增加了体外 EC-EPC 黏附和跨内皮迁移，并且增强了体内 EPC 归巢。SDF-1α 特异性上调 E 选择素而非 P 选择素和 L 选择素在培养的人成熟微血管 EC 和实验小鼠的血管中的表达。SDF-1α 对 EC-EPC 黏附和 EPC 归巢的调节效应受到 E 选择素的特异性介导，因为施用 E 选择素拮抗剂显著抑制了 SDF-1α 诱导的 EC-EPC 黏附、跨移和 EPC 归巢。E 选择素的组织水平表达是体内正常创面愈合和新血管形成所需要的，并且有利地影响这两种对正常愈合和糖尿病相关的未愈合创面中存在缺陷关键的生物学事件。

[0097] 总之，SDF-1α 特异性上调 E 选择素在成熟 EC 中的表达，从而引起增加 EC-EPC 黏附、EPC 归巢、肢体血管再形成和创面愈合。这些新的发现使人们对潜藏在 SDF-1α 对 EPC 归巢和糖尿病性创面愈合的生物效应背后的分子机制有了深刻的理解，并且通过直接推论指明 E 选择素为在糖尿病相关微血管病和未愈合表皮创面中对 EPC 运输、新血管形成和创面愈合进行治疗性操纵的新靶标。

[0098] 实施例 2-将 E 选择素鉴定为调节出生后新血管形成：影响糖尿病性创面愈合的新靶标

[0099] 此前报道，在糖尿病性创面中 SDF-1α（一种使 EPC 募集新血管形成区域的归巢信号）被下调 (Gallagher 等，J Clin Invest 2007，117：1249-1259)。在以下描述的实验中，研究了成熟 EC 和循环 EPC 通过其实现 SDF-1α 介导的 EPC 归巢的信号。与注射对照细胞相比，通过注射 SDF-1α 工程改造的骨髓衍生成纤维细胞使糖尿病性创面中的 SDF-1α 治疗性增加 (N ＝ 48(20，NOD)，(28，STZ-C57))。通过蛋白质印迹法和免疫组织化学验证 PCR 阵列基因表达差异。通过在体外和体内使用拮抗剂来进一步研究黏附分子在介导 SDF-1α 诱导的 EPC 归巢和创面愈合方面的作用。经由基于细胞的疗法增加创面 SDF-1α 促进了糖尿病小鼠的愈合（截止第 3 天愈合率增加～ 20％，p ＝ 0.006)。SDF-1α 增加了 EC-EPC 黏附，并且特异性上调 E 选择素在人微血管 EC 中的表达 (2.3 倍增加，p ＜ 0.01)。此效应在实验小鼠的血管中也是显著的，并且导致创面新血管形成增加。SDF-1α 对 EC-EPC 黏附和 EPC 归巢的调节效应受到 E 选择素的特异性介导，因为施用 E 选择素拮抗剂显著抑制了 SDF-1α 诱导的 EC-EPC 黏附、EPC 归巢、创面新血管形成和创面愈合。SDF-1α 工程改造的基于细胞的疗法通过特异性上调 E 选择素在成熟 EC 中的表达而导致 EC-EPC 黏附增加、EPC 归巢以及创面新血管形成增加，从而促进小鼠的糖尿病性创面愈合。这些发现使人们对潜藏在 SDF-1α 对 EPC 归巢的生物效应背后的信号有了新的了解，并且指明 E 选择素是对糖尿病性创面愈合中的 EPC 运输进行治疗性操纵的新靶标。

[0100] 材料和方法

[0101] HMVEC 分离自正常人真皮，并且在涂覆 1％明胶的板上进行培养。人 EPC 购自 NDRI，Philadelphia，PA，并且在包含补充物和 5％胎牛血清 (FBS)(Cambrex Bioscience，Walkersville，MD) 的完全 EGM2 培养基中进行培养。在补充有 10％ FBS 的 DMEM(Invitrogen，Carsbad，CA) 中培养 293、293T 和 NIH/3T3 细胞。所有细胞均在 37℃下于包含 5％ CO_2 的 98％潮湿空气中进行孵育。对于细胞黏附和跨内皮迁移测定，将 EPC 用 Dil-Ac-LDL(BT-902，Biomedical Technologies，Stoughton，MA) 在 37℃下标记 4 小时，并且用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 冲洗。将亚汇合 HMVEC 或 EPC 用重组人 SDF-1α (100ng/ml) 刺

激实验中所示的各个时间。BSA(100ng/ml) 用作对照。

[0102] 8-12 周龄的野生型 (WT) 雌性 C57 BL6 小鼠购自 Charles River(Wilmington,MA)。10-12 周大的 NOD(NOD/shiltJ)、8 周大的 E-sel$^{-/-}$(B6.129S4-sele$^{tmiDmil/J}$) 小鼠和 10-12 周大的 Rosa26(lacZ^{+})(B6.129S7-GT(ROSA)26sor/J) 小鼠购自 Jackson Laboratory(Bar Harbor,ME)。对于所有手术程序,通过 i.p. 注射 80mg/kg 氯胺酮和 20mg/kg 甲苯噻嗪使小鼠麻醉。对于骨髓移植实验,将 1×10^{7} 个得自 Rosa26 小鼠的骨髓细胞悬浮在 100μl PBS 中,并且通过尾静脉注射移植到 E-sel$^{-/-}$ 或 WT 小鼠 (C57 BL6) 中。

[0103] 按照此前所述诱导和监测链脲菌素 (STZ,Sigma-Aldrich) 糖尿病 (Gallagher 等,J Clin Invest 2007,117 :1249-1259)。NOD 小鼠通常在 14-20 周内发展产生糖尿病。研究了总共 48 只糖尿病小鼠 (N = 28,STZ-C57 ;N = 20,NOD)。使用血糖仪测定小鼠尾静脉的血糖。一旦血糖达到 250mg/dl,就对小鼠每天进行测定并保持 3 天,然后用于实验中。糖尿病小鼠的平均血糖水平为 446mg/dl(范围为 356-512mg/dl),而对照非糖尿病小鼠的平均血糖水平为 122mg/dl(范围为 96-137mg/dl)。使用 6mm 钻取活检在小鼠背部的背面造成创面。移除全层皮肤,露出下面的肌肉。

[0104] 根据此前证明最佳病毒转导效率的研究和预计的可能临床相关性,选择慢病毒载体用于体外研究,并且选择腺相关病毒载体用于体内实验,以作为操纵 SDF-1α 水平的工具。通过将人或鼠 SDF-1α 基因插入 pHX 载体来构建人 SDF-1cc/lenti(Balint 等,J Clin Invest 2005,115 :3166-3176)。如此前所述构建对照载体 GFP/lenti(Liu 等,Cancer Res 2006,66 :4182-4190)。通过用所述三种质粒共转染 293T 细胞来实现假型慢病毒的制备 (Liu 等,FASEB J 2006,20 :1009-1011)。转染后 48 小时收集的慢病毒在 NIH/3T3 细胞中表现出大约 10^{7} 个转导单位 /ml 的滴定浓度。为通过慢病毒感染靶细胞,在 4μg/ml 聚凝胺 (Sigma-Aldrich) 存在下将细胞暴露于 MOI(多重性感染)5 的病毒接触六小时。然后将细胞洗涤,用常规完全培养基另外培养两天,并且通过 ELISA 分析蛋白质表达或汇集用于随后的各实验所示的分析。通过将鼠 SDF-1α 或 LacZ 基因插入 AAV2 载体中来构建鼠 SDF-1α/AAV 和对照载体 LacZ/AAV(Gao 等,Curr Gene Ther 2005,5 :285-297)。通过用三种质粒转染 293 细胞来制备 AAV,并且将 AAV 通过肝素色谱法纯化并进行滴定。对于使用重组 AAV 的局部创面注射,将 100μl PBS 中 10^{12} 个病毒单位 /ml 的 AAV 注射到创面基底中。对于基于细胞的疗法,通过将鼠骨髓细胞在塑料培养皿上于补充有 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养两周,同时每 3 天更换一次培养基,以此产生骨髓衍生的成纤维细胞 (BMDF)。贴壁细胞呈锭形并且为与肌成纤维细胞显型一致的 α- 平滑肌肌动蛋白 $^{+}$(αSMC^{+})。用编码鼠 SDF-1α 或 GFP 的慢病毒载体转导 BMDF(作为对照)。通过 ELISA 证实 BMDF 中的外源 mSDF-1α 的表达 (数据未示出)。形成 6mm 钻取活检皮肤创面,并且将悬浮在 100μl PBS 中的 1×10^{7}mSDF-1α/BMDF 与 GFP/BMDF 注射到创面中。

[0105] 人黏附分子 &ECM RT Profiler™ PCR 阵列定量描绘了黏附分子和 ECM 的 84 种基因的表达 (#PA-011,SABiosciences,Frederick,MD)。使用 Trizol® (Invitrogen) 从细胞中提取全部 RNA,并且使用 RT^{2}FirstStrand 试剂盒 (SABiosciences) 合成 cDNA。根据制造商的协议实施 PCR 阵列。阈值周期 (Ct) 值用于绘制标准曲线。将所有样品均归一化为 β- 肌动蛋白的相对水平,并且将结果表示为相对水平的荧光强度。

[0106] 根据制造商方案,通过 Quantikine® SDF-1α ELISA 试剂盒 (DY460,R&D Systems)

测定细胞培养物上清液中 SDF-1α 的浓度。

[0107] 将 HMVEC 的 EC 单层在 24 孔板中培养至接近汇合度，并用 100ng/ml 的重组人 SDF-1α 或 BSA 刺激 8 小时。随后，用不含 SDF-1α 的 EGM2 培养基替换培养基。将预先标记并且以悬浮液在 2％琼脂糖涂覆的板上培养 16 小时的 1×10^5 个 Dil-Ac-LDL 标记的 EPC 加入孔中，并且在 37℃下与 HMVEC 单层共同培养 1 小时。将未结合的 EPC 用 PBS 洗涤两次除去，并且将黏附的 Dil-Ac-LDL 标记的 EPC 通过荧光扫描仪 (GE Typhoon Trio,Piscataway, NJ) 测定并照相。

[0108] 将 1×10^4 个细胞 / 孔的 HMVEC 在纤连蛋白 (5μg/ml) 涂覆的 24transwell 小室 (8.0μM 孔 ;Falcon 353097,Becton Dickinson Bedford,MA) 的上室中进行培养。在每次实验之前，通过倒置荧光显微镜确认单层。将 HMVEC 单层用 100ng/ml 的重组人 SDF-1α 或 BSA 刺激 8 小时。将以上详述的预先标记的 1×10^4 个 Dil-Ac-LDL 标记 EPC 加入 0.3mL 基础 EGM2 培养基的上室中。将 0.6mL 完全 EGM2 培养基加入 transwell 小室的下室中。将细胞在 37℃下培养 12 小时，并且量化从 transwell 小室的上室到下室穿越的 EPC。

[0109] 按照 (Liu 等，Mol Cell Biol 2003,23 :14-25) 所述进行免疫印迹。将膜用 E 选择素的抗体 (Ab)(ab-18981) 或 β- 肌动蛋白 (AC-15，Abeam，Cambridge，MA) 探测。然后用 HRP 缀合的二抗 Ab(Santa Cruz，Santa Cruz，CA) 进行探测，并进行 ECL(Amersham Biosciences,Piscataway,NJ)。将膜脱去，并且根据各实验所需进行再次印迹。

[0110] 对于免疫染色和免疫组织化学 (IHC)，将 5μm 石蜡或冰冻切片进行加工，然后在 4℃下与 FITC- 抗 -E 选择素 (R&D Systems)、PE- 抗 -KDR(Cell Signaling Technology, Danvers,MA) 或抗 -SDF-1α (sc28876,Santa Cruz) 孵育过夜，然后用 HRP 缀合的二抗进行孵育。使用 DAB 试剂盒 (Dako,Carpinteria,CA) 检测免疫反应性。用 DAPI(Vector Labs, Burlingame，CA) 或苏木精 (IHC) 对细胞核进行复染。通过用得自同一制造商的非免疫原同型匹配 Ab 替换一抗来制备所有抗体的阴性对照。

[0111] 为了诱发肢体局部缺血，将全长 (约 3-4mm) 的右股动脉 / 静脉血管束结扎并切除 (研究两组小鼠 :$E\text{-}sel^{-/-}$ 小鼠 (n ＝ 6) 和 WT 小鼠 (n ＝ 6))。然后将皮肤用 5-0 尼龙 (Ethicon) 封闭。通过激光多普勒灌注成像证实肢体局部缺血。使用 4mm 钻取活检在小鼠股骨的腹侧面上造成局部缺血性后肢创面。移除皮肤的全层部分，以露出下面位于股骨弯折的水平位置远端的肌肉。使重组鼠 SDF-1α 蛋白 (R&D Systems) 在 PBS 中重构，并在手术刚好完成后注射到创面基底 (25μg/kg) 中。

[0112] 随后用 Olympus 数码照相机对创面连续每天拍摄数码照片。所有照片中均包括标尺，以允许校准测量值。使用 ImageJ 软件 (Imaging Processing and Analysis in Java, National Institutes of Health，MD) 分析图像。每天测定创伤面积，并且将创面恢复百分率表示为 [(初始创伤面积 - 日创伤面积)/(初始创伤面积)]×100。

[0113] 使用专门配制的包含 Dil(D-282,Invitrogen/ 分子探针) 的水溶液 (7ml/ 小鼠)、通过活体灌注直接在体内标记麻醉小鼠的小鼠血管，所述水溶液在接触时并入内皮细胞膜中，并且在处死动物之前经由直接心内注射施用。在 Dil 灌注后注射 7ml 固定剂 (4％多聚甲醛)，并且收获全部创面组织。通过使用激光扫描共聚焦显微镜 (Vibratome(VT1000S,Leica Microsystems) 扫描厚度或深度为 200μm 的整个创面组织来显现血管网。使用 ImageJ 软件量化血管密度，以评估归一化为全部扫描创伤面积的红色 Dil 标记血管的总数目。

[0114] 使用激光多普勒灌注成像 (LDI)(Periscan PIM II,Perimed AB,Sweden) 每日对肢体灌注进行评估。将肢体定义为小鼠股骨弯折处远端的所有成像组织。在具有基于重量的镇静作用的温度控制设备中进行 LDI,以将温度波动和镇静作用水平所引起的人为因素减至最少。将相对灌注数据表示为局部缺血性 (右) 与正常 (左)) 肢体血流量的比率。

[0115] 在形成局部缺血性后肢创面 (右) 后通过尾静脉注射将得自 10 ～ 12 周大的 Rosa26(LacZ^{+}) 小鼠的 1×10^{7} 个骨髓细胞移植到 E-sel$^{-/-}$ 小鼠 (n = 6) 和 WT 小鼠 (n = 6) 中。通过 β - 半乳糖苷酶测定量化募集到创面组织并且融入组织切片中的血管中的 LacZ^{+}EPC 的数目。将收获的创面组织冷冻,并且然后将组织切片在室温下与 X-gal(Fermentas, Canada) 和抗 -KDR(ab-2349, Abeam) 孵育 2 小时。用核固红 (Vector Labs) 对切片进行复染。通过对术后第 7 天的切除创面 (n = 3) 下的创面肉芽组织连续切片中的 KDR^{+} 血管内的 β - 半乳糖苷酶$^{+}$细胞进行计数,来量化 EPC 的数目,其中采用至少 3 个连续切片,每个切片采用 5 个随机高倍视野 (HPF,40X)。

[0116] 使用 ANOVA 和双尾 Student t 检验对差异进行统计分析。使用 Microsoft Excel(Microsoft Corp, Redmond, WA) 分析数据。数据以平均值 ± 标准误差表示。当 $p < 0.05$ 时,数值被视为在统计上是显著的。

[0117] 结果

[0118] SDF-1α 工程改造的基于细胞的疗法促进表皮创面新血管形成和糖尿病性创面愈合。通过由居留成纤维细胞加工的结缔组织元件对表皮创面的肉芽组织中的微脉管系统进行物理支撑。这些成纤维细胞提供了促进且维持新形成血管的独特微环境。成纤维细胞及其活性对应物 (肌成纤维细胞) 通过合成细胞外基质 (ECM) 和分泌多种可溶性因子,在创面愈合过程中在调节新血管形成方面起关键作用 (Tomasek 等, Nat Rev Mol Cell Biol 2002,3 :349-363 ;Kalluri 和 Zeisberg, Nat Rev Cancer 2006,6 :392-401 ;Hinz 等, Am J Pathol 2007,170 :1807-1816)。此前报道在糖尿病性鼠创面中 SDF-1α 的组织水平显著降低,部分是由于其在肌成纤维细胞中的下调所致。肌成纤维细胞可源于局部、居留成纤维细胞或源于循环间充质细胞前体细胞 / 干细胞 (De Wever 和 Mareel, J Pathol 2003,200 : 429-447 ;Direkze 等, Cancer Res 2004,64 :8492-8495)。

[0119] 测试 SDF-1α 工程改造的基于细胞的疗法对糖尿病性创面愈合的功效。目的在于测试成纤维细胞源 SDF-1α 对遗传性 (NOD) 糖尿病鼠模型的糖尿病性创面愈合的促愈合效应。选择 BMDF,由于已知具有糖尿病相关创面的患者的成熟居留表皮成纤维细胞受损,并因此与可能的治疗媒介物具有很少的临床相关性。将悬浮在 100μl PBS 中的 1×10^{7}mSDF-1α /BMDF 与 GFP/BMDF 注射到创面中。每天对创面照相,直至其闭合。用 mSDF-1α /BMDF 处理的糖尿病性创面完全愈合显著快于用 GFP/BMDF 注射的糖尿病性创面 (图 1A)。在具有表皮创面的 STZ-C57 糖尿病小鼠中观察到类似的促愈合结果。对创面的裸露载体处理也显示出促愈合响应,但不如基于细胞的方法显著。在第 4 天和第 5 天观察到最显著的差异。相应地,与对照创面相比,用 mSDF-1α /BMDF 处理的创面中产生显著更多的活性新血管形成,如用 Dil 染料进行血管灌注后对创面进行的共聚焦激光扫描显微镜法所证明 (图 1B)。收获创面并进行 IHC 分析。经 IHC 证实,与用 GFP/BMDF 注射相比,用 mSDF-1α /BMDF 注射的创面中 SDF-1α 的表达更强 (图 1C)。这些结果证实了 SDF-1α 在糖尿病鼠模型中的促愈合和促血管生成效应,并且提供了 SDF-1α 工程改造的基于细胞的

疗法可用作治疗糖尿病性创面的新型工具的临床前证据。

[0120] 增强人 EPC 对 SDF-1α 刺激的 EC 单层的体外黏附。为了测试通过调节成熟内皮细胞上的黏附分子来介导 SDF-1α 对 EPC 归巢的效应这一假说，要检验 SDF-1α 刺激在体外细胞间黏附测定中是否可使 EC 单层更有可能支持 EPC 的黏附。用重组人 SDF-1α 或 BSA 刺激 24 孔板中培养的亚汇合 HMVEC。将 Dil-Ac-LDL 标记的 EPC 加入孔中，并与 EC 单层共同培养 1 小时。将未结合的 EPC 用 PBS 洗涤两次除去，并且通过荧光扫描仪测定黏附的 Dil-Ac-LDL 标记的 EPC(图 2A)。与 BSA 处理的对照相比（图 2B)，黏附到 SDF-1α 刺激的 EC 单层上的 EPC 的数目增加了大约 7 倍。此数据表明 SDF-1α 刺激促进直接的 EPC-EC 黏附，提示 EC 上某些黏附分子的表达可受 SDF-1α 特异性调节。

[0121] SDF-1α 刺激上调 E 选择素在 EC 单层中的表达（体外）和在小鼠的创面毛细管内皮中的表达（体内）。为了鉴定 EC 单层中的 SDF-1a 所上调的黏附分子，实施 RT^{2}Profiler™ PCR 阵列。用 100ng/ml 的重组人 SDF-1α 蛋白与 BSA 对亚汇合 HMVEC 进行刺激 4 小时。收获细胞，并且提取全部 RNA，并且进行 RT^{2}Profiler™ PCR 阵列。在阵列中测试的 84 种基因中，13 种上调（＞1.5 倍)，而 20 种下调（＜1.5 倍)，并且 51 种未变化（表 1)。值得注意的是，E 选择素基因的表达在 SDF-1α 刺激后增加了约 1.3 倍（图 3A)。为了证实观察到的 E 选择素的 mRNA 的上调，进行免疫印迹分析，并且证实与 BSA 处理的 EC 单层相比，SDF-1α 刺激的 EC 单层中 E 选择素的蛋白质表达上调（图 3B)。为了进一步证实 SDF-1α 在体内使 E 选择素在成熟内皮细胞中上调，通过免疫染色检验用 mSDF-1α/AAV 与 lacZ/AAV 注射的糖尿病性 NOD 小鼠创面中的血管。用 FITC 缀合的抗 -E 选择素 Ab 对 E 选择素进行染色，并用 PE 缀合的抗 -KDR Ab 对 EC 进行染色。与用 LacZ/AAV 注射的糖尿病性鼠创面相比，用 mSDF-1α/AAV 注射的糖尿病性鼠创面中新血管的 EC 表达出更强的 E 选择素（黄色)(图 3C)。通过 IHC 证明 mSDF-1α/AAV 的组织水平增加（图 3D)。这些实验将 E 选择素鉴定为一种关键的黏附分子，其上调作为血管 EC 中 SDF-1α 的下游靶标。

[0122] 表 1-SDF-1α 刺激后 4 小时内 HMVEC 中基因的上调和下调。

[0123]

上调	mRNA 变化倍数
CO11A1/COLL6	2.14
CD49D/IA4	1.87
CD49f/ITGA6B	2.14
CD51/DKFZp686A08142	2.3
LAMB2	2
CLG1/HNC	3.73
CD62E/ELAM	2.3
CD62/CD62P	2.3
DYT11/ESG	1.74
BNSP/BSPI	2.14
THBS/TSP	1.74
CLGI/EPA	1.74
CD106/DKFZp779G2333	2.14
下调	
CSPG2/DKFZp686K06110	-2.14
CCN2/HCS24	-3.03
CTNNB/DKFZp686D02253	-2.00
CAS/CTNND	-3.73
CIG/DKFZp686F10164	-3.48
BB2/CD54	-2.82
CD49a/VLA1	-4.90

[0124]

BR/CD49B	-3.03
CD49e/FNRA	-5.30
CD29/FNRB	-2.30
CD61/GP3A	-2.30
FLJ26658	-8.57
LAMM	-2.82
CLM	-2.82
LAMNB1	-5.28
MMP-X2/MTmmP2	-6.06
CLG4/CLG4A	-4.28
ON	-2.63
CAR/CMAR	-4.00
TSP3	-2.46

[0125] 上调的 E 选择素负责介导 SDF-1α 增强的 EC-EPC 相互作用和 EPC 跨内皮迁移。为了研究上调的 E 选择素是否负责介导 SDF-1α 增强的 EC-EPC 黏附，测试 E 选择素拮抗剂对 EPC 对 SDF-1α 刺激的 EC 单层的体外黏附的效应。将 24 孔板中培养的亚汇合 HMVEC 用 100ng/ml 的重组人 SDF-Iα 或 BSA 刺激 8 小时，并且将培养基用包含 E 选择素中和 Ab 或同型匹配对照 Ab(2μg/ml) 的不含 SDF-1α 的 EGM2 培养基更换，并且在 37℃下孵育 15 分钟，然后添加 EPC。随后，将以上详述的预先标记的 1×10^5 个 Dil-Ac-LDL 标记的 EPC 加入孔中，并且在 37℃下与 EC 单层共同培养 1 小时。将未结合的 EPC 用 PBS 洗涤两次除去，并且通过荧光扫描仪测定黏附的 Dil-Ac-LDL 标记的 EPC。E 选择素中和 Ab 的添加显著抑制了黏附到 SDF-1α 刺激的 EC 单层的 EPC 的数目，而对照 Ab 无显著效应（图 4A）。为了进一步研究 E 选择素在介导 EPC 与 EC 单层之间的特定相互作用方面的生物学功能，检验 EPC 与 EC 单层之间增加的黏附是否导致更多的 EPC 跨移穿过 EC 单层，如果是，则检验此跨移效应是否依赖于 E 选择素。在体外 transwell 系统中测试 EPC 跨内皮迁移。在 γhSDF-1α 或 BSA 存在下，将 HMVEC 单层在内皮细胞 transwell 小室的上室中进行培养。在将 EPC 加入小室的 15 分钟前，分别用含有 γhSDF-1α 或 BSA 的新鲜培养基更换下室中的 EGM2 培养基。将按上述制备的 1×10^5 个 Dil-Ac-LDL 标记的 EPC 的悬浮液加入小室中并在 37℃下培养过夜。与 BSA 处理的 EC 单层相比，SDF-1α 刺激的 EC 单层显示显著增加了 EPC 从上 transwell 小室到下 transwell 小室的跨移（图 4B）。重要的是，此效应至少部分地依赖于 E 选择素，因为通过将中和 Ab(2μg/ml) 添加到 transwell 中而对 E 选择素的阻断能够显著抑制 EPC 跨内皮迁移（图 4B）。总的来说，这些结果证明上调的 E 选择素负责介导 SDF-1α 增强的 EC-EPC 黏附和 EPC 跨内皮迁移。

[0126] 0110SDF-1α 刺激上调 E 选择素配体在 EPC 中的表达。最终，创面毛细管的内层 EC 与循环 EPC 之间的直接相互作用将取决于两种细胞类型的表面上的黏附分子的彼此相

关的对应物。据推测，SDF-1α 可诱导 EC 和 EPC 上的相关黏附分子的表达。根据以上详述的结果，即 EC 上 SDF-1α 诱导的 E 选择素介导直接的 EC-EPC 相互作用，检验两种 E 选择素配体 CD44 和 CD162(PSGP-I) 响应 SDF-1α 刺激而在 EPC 上的表达。将亚汇合人 EPC 分别用 γhSDF-1α 或 BSA 刺激多个时间段。收获细胞，并进行免疫印迹分析。未刺激的 EPC 表达强的基础水平的 CD162 和低水平的 CD44。SDF-1α 刺激上调 CD162 和 CD44 两者在 EPC 中的表达（图 5）。CD162 和 CD44 的诱导首先在 SDF-1α 刺激后 4 小时观察到，并且持续增加直到 16 小时。这些实验证实，EPC 表达基础水平的 E 选择素配体，并且表明 SDF-1α 能够上调这些 E 选择素配体在 EPC 中的表达，这与以下总体假说一致，即可溶性因子 SDF-1α 通过特异性调节黏附分子在这两种关键细胞类型、成熟内皮细胞和 EPC 上的分布来介导 EPC 归巢效应。

[0127] 在鼠局部缺血性后肢和表皮创面模型中，E 选择素对于介导 SDF-1α 对 EPC 归巢、新血管形成和创面愈合的效应而言是必须的。为了研究 SDF-1α 诱导的 E 选择素在 EPC 归巢、新血管形成和表皮创面愈合方面的具体生物学重要性，采用结合骨髓移植的功能缺失方法。在 E-sel$^{-/-}$ 与 WT 小鼠中建立经由股骨结扎 / 切除和随后的两侧 4mm 表皮切除创伤所形成的单侧后肢局部缺血的鼠模型。将重组鼠 SDF-1α 经由直接创面注射施用至创面。通过将得自 Rosa26(LacZ^{+}) 小鼠的 1×10^{7} 个骨髓细胞经由尾静脉注射到小鼠中来提供进一步治疗，以（部分地）量化 EPC 归巢对新血管形成和创面愈合的贡献。LDI 用于证实术后肢体局部缺血，并且经由随时间推移测定的平均灌注值来监测和量化后肢血流的自发恢复。经由数码摄影术获得每日的创伤面积测量值。通过对在第 7 天自一半的实验小鼠中收获的创面组织进行血管 Dil 灌注和随后的激光扫描共聚焦显微镜法，来评估创面组织中的新血管形成。在剩余的小鼠中，收获创面并进行 IHC。通过用 β-gal（蓝色）和抗 -KDR 进行双重染色来检测募集至创面组织且合并到血管的 EPC。与 WT 小鼠相比，E-sel$^{-/-}$ 小鼠的局部缺血性后肢表现出灌注随时间的延迟的改善，正如显著较低的平均通量测量值所示（图 6A）。一致的是，E-sel$^{-/-}$ 小鼠的局部缺血性创面比 WT 小鼠的闭合速率显著较低（图 6B）。此外，与 WT 小鼠的局部缺血性创面相比，E-sel$^{-/-}$ 小鼠的局部缺血性创面的血管化更加不良（图 6C）。E-sel$^{-/-}$ 小鼠的局部缺血性创面中的不良新血管形成至少部分地与较少的 EPC 归巢有关，因为与 WT 小鼠相比，在 E-sel$^{-/-}$ 小鼠的局部缺血性创面的血管中检测到显著较少的 LacZ^{+} 细胞（图 6D）。这些体内实验证明 E 选择素对于介导 SDF-1α 诱导的 EPC 归巢、新血管形成和创面愈合而言是必须的。

[0128] 本文所描述的实验证明 SDF-1α 特异性上调 E 选择素在成熟 EC 中的表达和 E 选择素配体在 EPC 上的表达，从而介导 EC-EPC 黏附和 EPC 归巢。这些发现使人们对潜藏在 SDF-1α 对 EPC 归巢的生物效应背后的分子机制有了深刻的和新的理解，并且指明 E 选择素为在糖尿病相关微血管病和延迟的创面愈合（以及其它局部缺血性创面）中对 EPC 归巢进行治疗性操纵的新靶标。对 EC 和 EPC 中 E 选择素及其配体的调节提供了不仅调节 EPC 相关的直接血管生成响应，而且调节对创面愈合的相关的直接和间接效应的机会，所述效应与未解决的延迟的糖尿病相关表皮创面愈合的临床问题内在地相关。

[0129] 其它实施方案

[0130] 可对组合物、试剂盒和方法步骤的部分或全部进行改进。本文引用的所有参考文献，包括出版物、专利申请和专利在此以引用方式并入。除非另有声明，本文提供的任何或

所有实例或示例性语言（例如，“诸如”）的用途旨在解释本发明，而并非对本发明的范围进行限制。例如，尽管本文所述的实验涉及糖尿病性创面，但本文所述的组合物、试剂盒和方法可用于多种其它治疗性和预防性应用，包括任何糖尿病性创面。本文中关于本发明或优选实施方案的性质或有益效果的任何陈述并非旨在进行限制，并且所附权利要求不应视为受此类陈述的限制。更通常而言，说明书中的任何语言均不应解释为指示任何未要求保护的要素对于本发明的实施而言是必须的。本发明在适用法律允许的条件下包括所附权利要求中所提及主题的所有修改和等效形式。此外，除非在本文另有指示或在上下文中清楚地禁忌，本发明还涵盖上述要素以所有可能方式的任意组合。

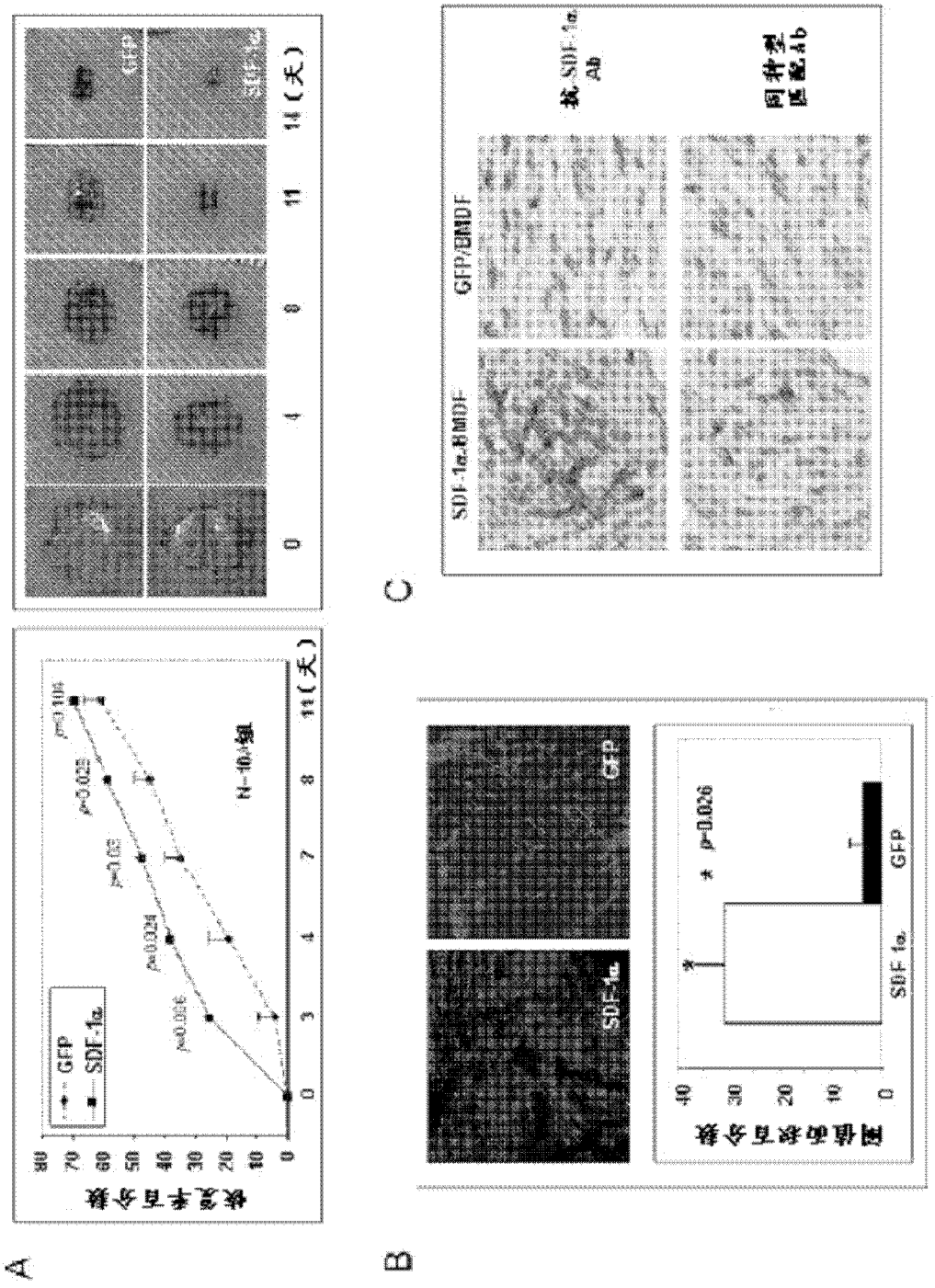
A
B
C
GFP
SDF-1α
SDF-1α-BMDF
GFP/BMDF
抗SDF-1α Ab
同种型匹配Ab
N=10小组
11(天)
14(天)
p=0.026

图 1

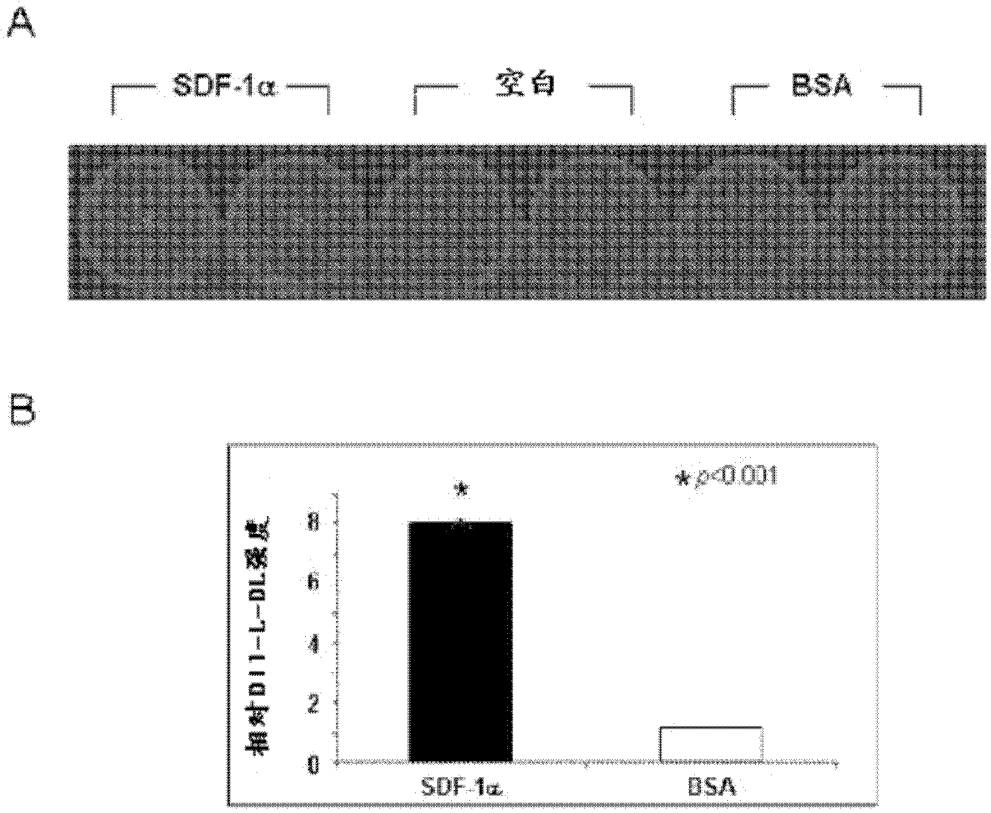

图 2

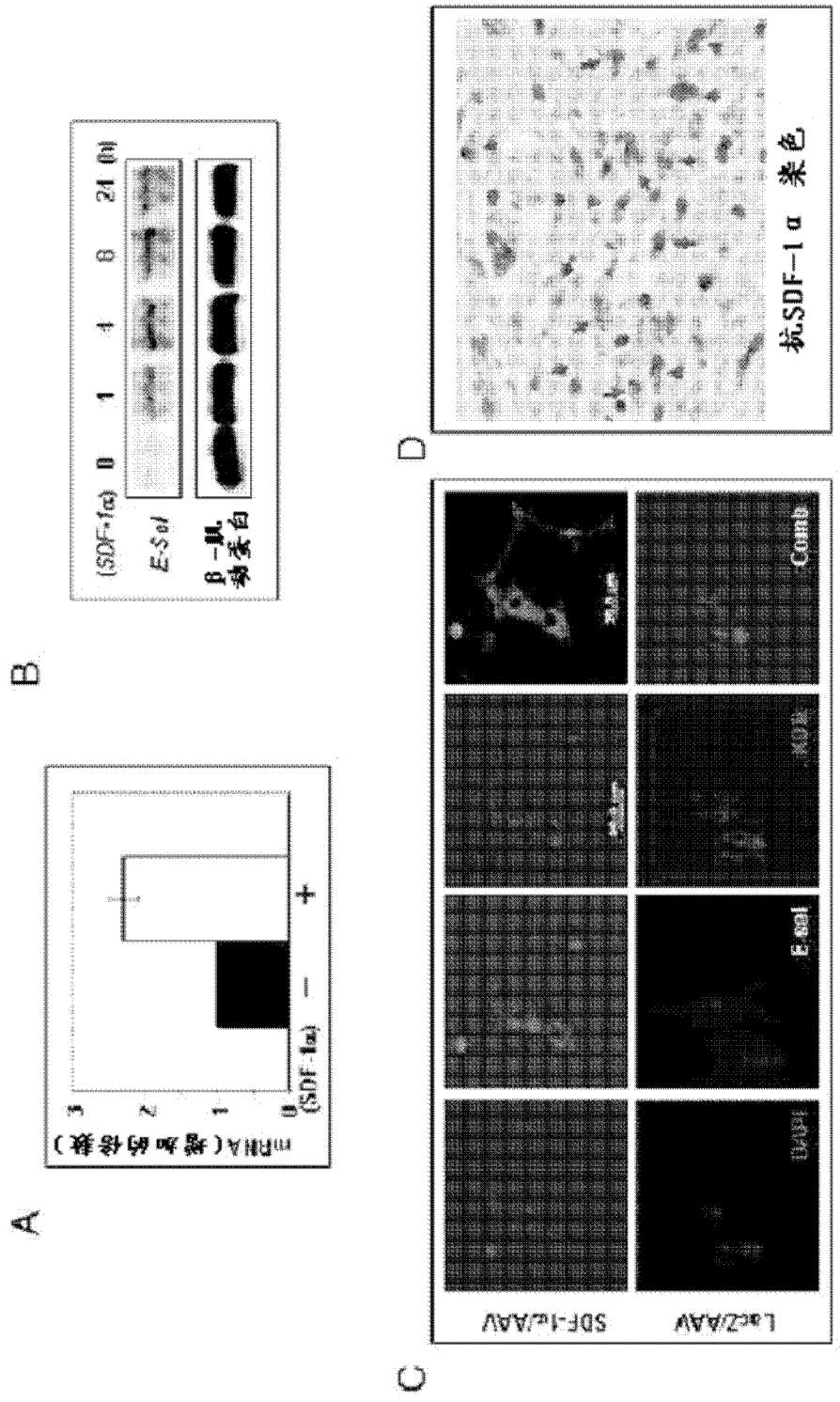
A
mRNA（相对的倍数）
3
2
1
0
(SDF-1α) —
+
B
(SDF-1α) 0 1 4 8 24 (h)
E-Sel
β-肌动蛋白
C
LacZ/AAV
SDF-1α/AAV
E-sel
Comb
D
抗SDF-1α 染色

图 3

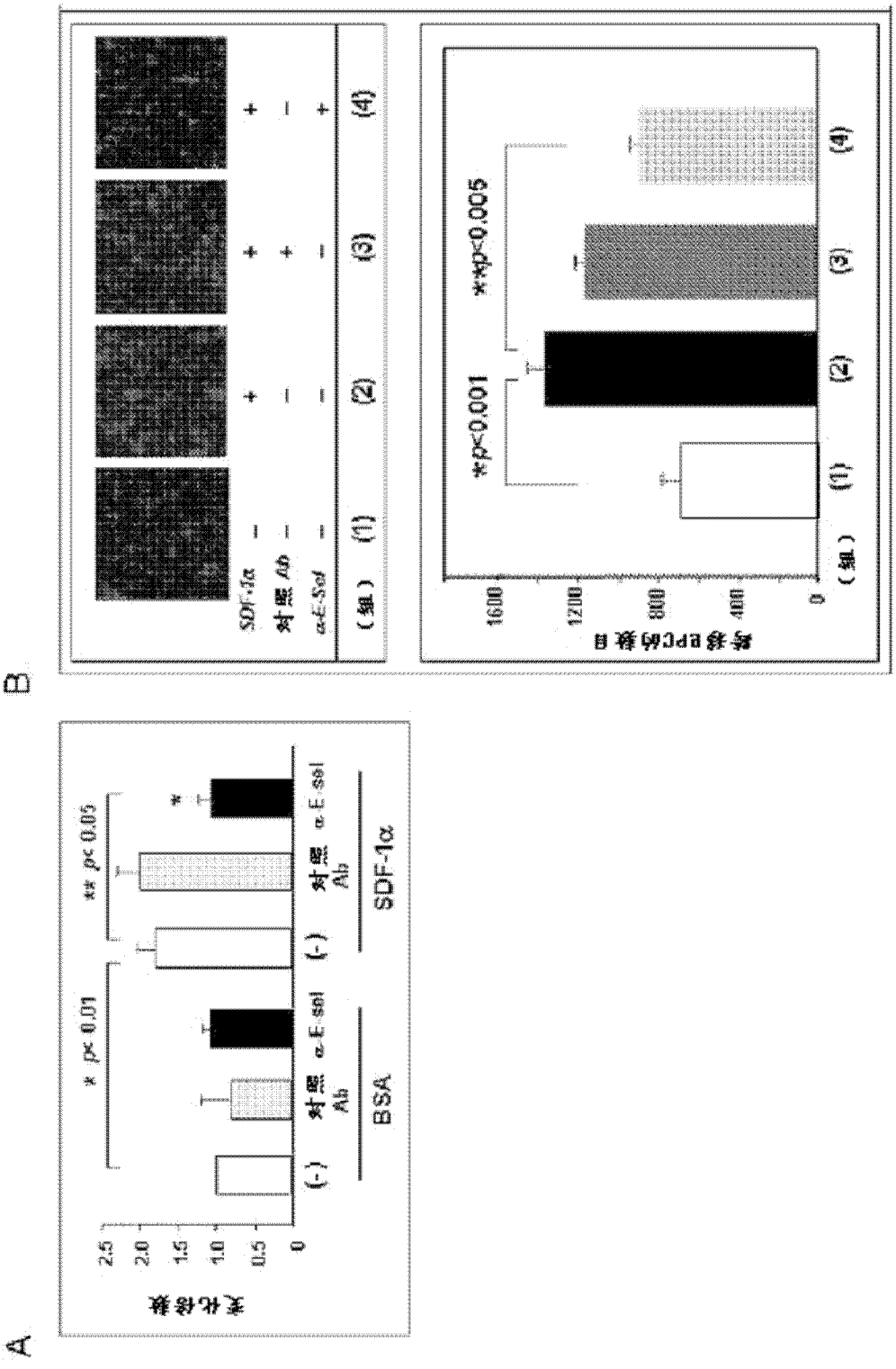
A
B
变化倍数
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
* p< 0.01
** p< 0.05
(-)
对照 Ab
α-E-sel
BSA
SDF-1α
SDF-1α
对照 Ab
α-E-Sel
(组)
(1)
(2)
(3)
(4)
*p<0.001
**p<0.005
1600
1200
800
400
0

图 4

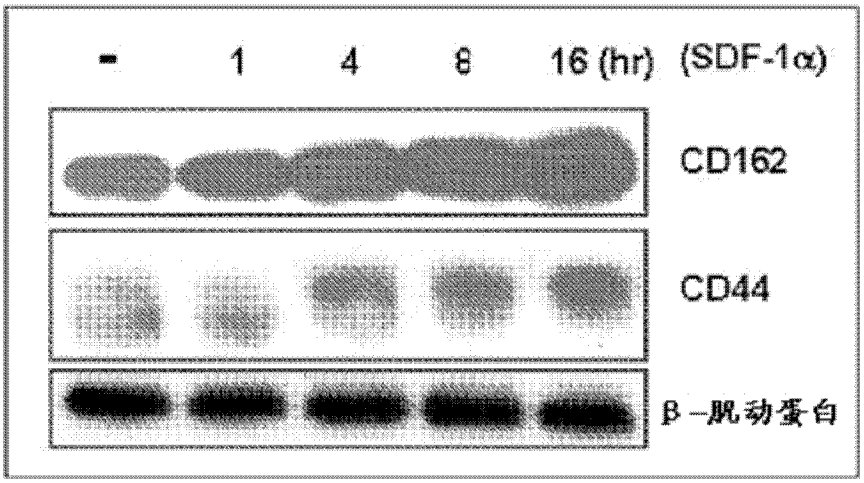
-
1
4
8
16 (hr)
(SDF-1α)
CD162
CD44
β-肌动蛋白

图 5

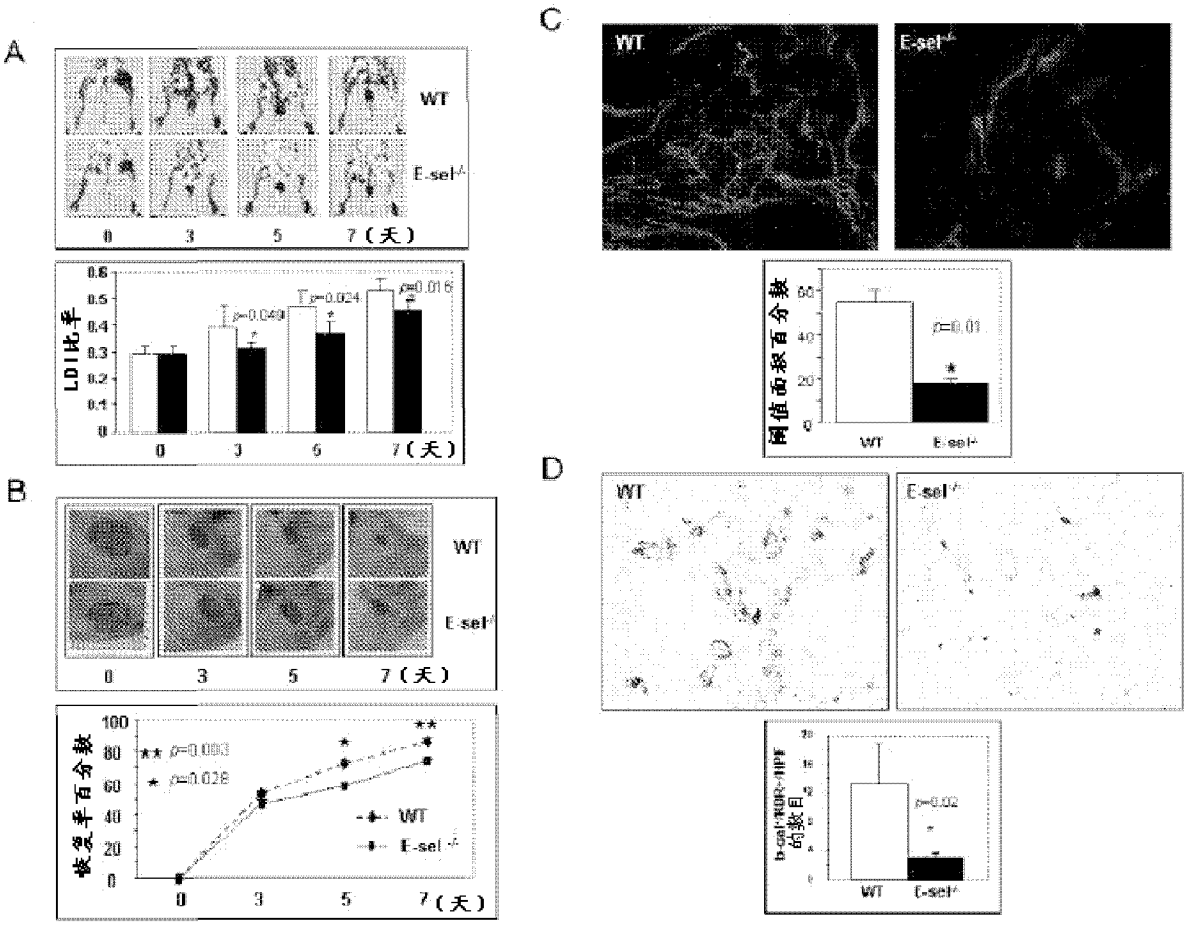
A
WT
E-sel-/-
0
3
5
7（天）
LDI比率
B
恢复率百分数
C
WT
E-sel-/-
网值面积百分数
D
WT
E-sel-/-

图 6