

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98106350.0

C12N 15/12

C12N 15/85

C12N 15/86

C07H 21/04

A61K 48/00

[45] 授权公告日 2005 年 4 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 1196784C

[22] 申请日 1998.2.5 [21] 申请号 98106350.0

[30] 优先权

[32] 1997. 2. 6 [33] DE [31] 19704301.1

[71] 专利权人 阿文蒂斯药物德国有限公司

地址 联邦德国法兰克福

[72] 发明人 W·格劳里克 D·奈特尔贝克

H-H·赛德拉西克 R·默勒

审查员 张秀丽

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 郭建新

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 4 页

[54] 发明名称 人内皮特异受体基因的启动子及其
用途

[57] 摘要

本发明涉及人内皮特异受体基因的启动子，或其功能性的组成成分，以及它/它们用于制备药物的用途。

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

1. 人内皮特异受体基因的启动子, 由表 1 所示序列、表 1 所示序列的从 36-2415 的核苷酸序列、从 470-2415 的核苷酸序列、从 948-2415 的核苷酸序列、从 1310-2415 的核苷酸序列、或从 1847-2415 的核苷酸序列组成。

2. 核酸构建体, 含有至少一个如权利要求 1 所述的人内皮特异受体基因的启动子序列。

3. 如权利要求 2 所述的核酸构建体, 另外含有一个效应基因, 人内皮特异受体基因的启动子序列激活该效应基因的转录。

4. 如权利要求 3 所述的核酸构建体, 其中人内皮特异受体启动子序列位于效应基因的上游。

5. 如权利要求 2 所述的核酸构建体, 其中人内皮特异受体启动子序列与至少一个另外的激活序列相组合, 这种另外的激活序列选自由病毒特异性, 代谢特异性, 细胞特异性或细胞周期特异性的激活序列组成的组。

6. 如权利要求 2 所述的核酸构建体, 其中核酸是 DNA。

7. 如权利要求 2 所述的核酸构建体, 它被插入载体。

8. 如权利要求 7 所述的核酸构建体, 其中载体是质粒载体或病毒载体。

9. 如权利要求 3 所述的核酸构建体, 其中效应基因是编码活性化合物的基因, 所述活性化合物选自由细胞因子, 趋化因子, 生长因子, 细胞因子的受体, 趋化因子的受体, 生长因子的受体, 以及细胞因子的拮抗剂, 诱导细胞生长抑制、细胞毒性或细胞程序死亡的蛋白质, 抗体, 抗体片断, 血管生成抑制剂, 凝固因子, 凝固抑制剂, 纤溶蛋白, 裂解药物前体从而形成药物的酶, 对血循环有影响的蛋白质, 或能引起免疫反应的感染性病原体的抗原组成的组。

10. 如权利要求 2 所述的核酸构建体, 含有利用启动子序列或内部核

糖体进入位点互相连接的几个效应基因。

11. 含有如权利要求 2 所述的核酸构建体的细胞。

12. 如权利要求 2 所述的核酸构建体用于制备治病药物的用途, 所述疾病选自由肿瘤疾病, 白血病, 自身免疫病, 变态反应, 炎症, 移植物抗宿主反应, 血凝固疾病, 心血管疾病, 贫血, 感染或对 CNS 的损害组成的组。

13. 权利要求 12 的用途, 其中所述炎症是关节炎或者其中所述移植物抗宿主反应是器官排斥。

14. 如权利要求 11 所述的细胞用于制备治病药物的用途, 所述疾病选自由肿瘤疾病, 白血病, 自身免疫病, 变态反应, 炎症, 移植物抗宿主反应, 血凝固疾病, 心血管疾病, 贫血, 感染或对 CNS 的损害组成的组。

15. 权利要求 14 的用途, 其中所述炎症是关节炎或者其中所述移植物抗宿主反应是器官排斥。

人内皮特异受体基因的启动子及其用途

技术领域

本发明涉及人内皮特异受体（endoglin）基因的启动子,或其功能性组成成分,和其用于制药的用途。

背景技术

基因疗法的一个重要难题是对插入细胞的效应基因的转录和翻译的控制。在转录水平上,通过在效应基因编码序列的上游加入启动子或增强子序列使得这一控制成为可能。

“启动子序列”被理解成能与调节蛋白,即所谓的转录因子结合的基因区段,所述转录因子的全体可激活下游效应基因的转录。位于转录方向上的那些区域被称为“下游”序列,而位于相反方向上的序列被称为“上游”序列。“效应基因”一般被理解成其基因产物在基因疗法的意义上具有例如所需效应的结构基因。

这种启动子或增强子序列可以是非细胞特异性的,细胞特异性的,病毒特异性的,代谢特异性的或细胞周期特异性的。这些启动子序列及其例如用于不同疾病的基因疗法的用途的例子列于专利申请 WO96/06940, WO96/06938, WO96/06941 和 WO96/06939。另外,这些专利申请提供了组合这些启动子序列,例如用于细胞特异性地和细胞周期特异性地控制效应基因的技术和例子。

依据启动子的选择和组合,这些中的后者造成依赖这些启动子的效应基因更多或更少受限制的和/或更强或更弱的转录。

内皮细胞是基因疗法的一例有利的靶细胞,这一方面是由于对于注射至循环系统的基因构建体而言内皮细胞是直接可及的,另一方面是由于它们直接涉及多种疾病的发展和进程以及治愈过程,和/或直接与这些疾病的位点相邻,所述疾病如肿瘤疾病,炎症,变态反应,自身免疫病,器官排斥反应,和循环和凝固疾病。

通常,靶细胞特异性启动子是在相关靶细胞中能特别强有力地或在很大程度上唯一被形成的那些蛋白质的基因的启动子。对于内皮细胞而言,

内皮特异受体是这些蛋白质的一个例子。

内皮特异受体是 TGF β 的非信号转移受体 (Gougos et al., J. Biol. Chem. 265, 8361 (1990), Cheifetz, J. Biol. Chem. 267, 19027 (1992), Moren et al., BBRC 189, 356 (1992))。尽管它在正常的内皮上以少量出现, 在增殖的内皮上表达的程度增高 (Westphal et al., J. Invest. Derm. 100, 27 (1993), Burrows et al., Pharmac. Ther. 65, 155 (1994))。有关启动子的强度和细胞特异性没有另外的信息可以得到。尽管内皮特异受体基因在约四年前就已为人所知 (Bellon et al., (1993)), 迄今为止仍不可能分离内皮特异受体启动子。

Bellon 等人已描述了人内皮特异受体的 cDNA 序列 (Eur. J., Immunol. 23, 2340 (1993)), Ge 等人已描述了鼠内皮特异受体的 cDNA 序列 (Gene 138, 201 (1994))。尽管可获得内皮特异受体基因部分 5' 非翻译区域的序列信息, 但是有关此区域的功能或有关启动子区域知之甚少。

VEGF 受体是另一种内皮细胞特异性的蛋白质。在这种情况下, 它可被分成两个受体 (Plate et al., Int. J. Cancer 59, 520 (1994)): 一个是 VEGF 受体 1 (flt-1), (de Vries et al., Science 255, 989 (1992)), 它在其胞质组成成分中含有 fms-样酪氨酸激酶, 另一个是 VEGF 受体 2 (flk-1, KDR), (Terman et al., BBRC 187, 1579 (1992)), 它在其胞质组成成分中含有酪氨酸激酶。几乎只在内皮细胞中发现了这两种受体 (Senger et al., Cancer Metast. Rev. 12, 303 (1993))。

其他内皮细胞特异性受体酪氨酸激酶是 tie-1 或 tie-2 (Partanen et al., Mol. Cell. Biol. 12, 1698 (1992), Schnürch und Risau, Development 119, 957 (1993), Dumont et al., Oncogene 7, 1471 (1992)), 和 B61 受体 (Eck 受体), (Bartley et al., Nature 368, 558 (1994), Pandey et al., Science 268, 567 (1995), van der Geer et al., Ann. Rev. Cell. Biol. 10, 251 (1994))。

其他内皮细胞特异性蛋白质是 B61 分子, 它表示 B61 受体的配体 (Holzman et al., J. Am. Soc. Nephrol. 4, 466 (1993), Bartley et al., Nature 368, 558 (1994)); 内皮肤, 尤其是内皮肤 B (O'Reilly et al., J.

Cardiovasc. Pharm. 22, 18 (1993), Benatti et al., J. Clin. Invest 91, 1149 (1993), O'Reilly et al., BBRC 193, 834 (1993) , 其启动子序列已由 Benatti 等人描述于 J. Clin. Invest 91, 1149 (1993) 中; 内皮肽 1 (Yanasigawa et al., Nature 332, 411 (1988)), 其启动子序列已由 Wilson 等人描述于 Mol. Cell. Biol. 10, 4654 (1990); 内皮肽受体, 尤其是内皮肽 B 受体 (Webb et al., Mol. Pharmacol. 47, 730 (1995), Haendler et al., J. Cardiovasc. Pharm. 20, 1 (1992)); 甘露糖 6-磷酸受体 (Perales et al., Eur. J. Biochem. 226, 225 (1994)), 其启动子序列已由 Ludwig 等人 (Gene 142, 311 (1994)), Oshima 等人 (J. Biol. Chem. 263, 2553 (1988)) 和 Pohlmann 等人 (PNAS USA 84, 5575 (1987)) 描述; 和 von Willebrand 因子 (vWF), 其启动子序列已由 Jahroudi 和 Lynch (Mol. Cell. Biol. 14, 999 (1994)), Ferreira 等人 (Biochem. J. 293, 641 (1993)) 和 Aird 等人 (PNAS USA 92, 4567 (1995)) 描述。

其他内皮细胞特异性蛋白质是: 由经激活的内皮细胞产生的, 以例如 IL-1 α 和 IL-1 β 形式存在的 IL-1 (Warner et al., J. Immunol. 139, 1911 (1987)), 其启动子序列已描述于 Hangen et al., Mol. Carcinog. 2, 68 (1986), Turner et al., J. Immunol. 143, 3556 (1989), Fenton et al., J. Immunol. 138, 3972 (1987), Bensi et al., Cell Growth Diff. 1, 491 (1990), Hiscott et al., Mol. Cell. Biol. 13, 6231 (1993) 和 Mori et al., Blood 84, 1688 (1994); IL-1 受体, 其启动子序列已描述于 Ye et al., PNAS USA 90, 2295 (1993); 和血管细胞粘附分子 (VCAM-1), VCAM-1 在内皮细胞中的表达由脂多糖激活; TNF- α (Neish et al., Mol. Cell. Biol. 15, 2558 (1995)); IL-4 (Iademarco et al., J. Clin. Invest. 95, 264 (1995)); 和 IL-5 (Marni et al., J. Clin. Invest. 92, 1866 (1993)). VCAM-1 的启动子序列已描述于 Neish et al., Mol. Cell. Biol. 15, 2558 (1995), Ahmad et al., J. Biol. Chem. 270, 8976 (1995), Neish et al., J. Exp. Med. 176, 1583 (1992), Iademarco et al., J. Biol. Chem. 267, 16323 (1992) 和 Cybulsky et al., PNAS USA 88, 7859 (1991) .

其他内皮细胞特异性启动子是合成的激活物序列, 因为由转录因子的寡聚化结合位点组成的合成的激活物序列也可用作天然内皮特异性启动子

的替代物, 所述转录因子在内皮细胞中优先或选择性地具有活性, 例如转录因子 GATA-2, 它在内皮肽-1 基因中的结合位点是 5'-TTATCT-3' (Lee et al., Biol. Chem. 266, 16188 (1991), Dorfmann et al., J. Biol. Chem. 267, 1279 (1992) 和 Wilson et al., Mol. Cell. Biol. 10, 4854 (1990)); 和脑特异性, 内皮葡萄糖-1-转运蛋白, 因为脑内皮细胞可独特地, 非常强烈地表达此转运蛋白以将 D-葡萄糖跨内皮转运至脑 (Gerhart et al., J. Neurosci. Res. 22, 464 (1989)). Murakami 等人已描述了启动子序列 (J. Biol. Chem. 267, 9300 (1992))。

尽管这些启动子对内皮细胞具有相当大的特异性, 但是这些启动子中的一些仅有相对低的活性, 例如 von Willebrand 因子基因或 VEGF 受体 1 (flk-1) 基因的启动子。而通过将这种“弱”启动子与基本的启动子 (如 SV40) 或增强子组合即可增强“弱”启动子的活性, 这通常会引起相伴随的特异性降低。

发明内容

因此本发明的目的是发现既强烈又对内皮具有特异性的启动子。

目前已经出乎意料地发现内皮特异受体基因的启动子特别地具有这些特性。

因此本发明涉及人内皮特异受体基因的启动子, 或其功能性的组成成分和变体。已发现此启动子最大可延伸至 2415 个碱基对 (见表 1, SEQ ID NO:1) 并优选包含包括起始序列的核苷酸序列 1-2378。

为了鉴定根据本发明的启动子, 在质粒 pGL3 (Promega) 中将内皮特异受体基因的启动子序列或其部分与报道基因 (例如编码荧光素酶的基因) 相连接, 用此构建体转染内皮细胞 (ECV-304 细胞系) 和作比较用的颈癌细胞 (HeLa 细胞系)。我们惊奇地发现内皮特异受体启动子比 vWF 启动子强 80 倍, 这很令人惊奇, 因为如上所述 vWF 以内皮特异性的方式表达, 所以预期内皮特异受体启动子的强度会与 vWF 启动子的相似。还发现内皮特异受体启动子在内皮细胞中的活性比在颈癌细胞中的约高 30 倍。这很令人惊奇, 因为 vWF 启动子, 同样为内皮特异性的, 它在内皮细胞中的强度与在颈癌细胞中的相似。因此, 根据本发明的内皮特异受体启动子在强度方面和内皮特异性的方面都明显超过了 vWF 基因启动子。

另外还发现根据本发明的启动子的部分也显示出强烈的内皮细胞特异

性的活性。

因此，以 SV40 启动子的活性作为基准，在内皮细胞中得到了下文所列的内皮特异受体基因启动子的 5′-末端缺失的构建体的下列相对活性：

核苷酸序列	相对活性
SV40 启动子	1
内皮特异受体启动子 (表 1, SEQ ID NO:1)	
1-2415	11.5
部分序列:	
36-2415	10.2
470-2415	13.0
948-2415	10.0
1310-2415	2.0
1847-2415	3.3
2339-2415	0.2

因此“启动子的功能性组成成分”应理解成具有启动子活性的本发明启动子的所有部分序列，尤其是从约 1 - 约 2378，从约 36 - 约 2378，从约 470 - 约 2378 和从约 948 - 约 2378 的部分序列，以及从约 36 - 约 2415，从约 470 - 约 2415 和从约 948 - 约 2415 的部分序列，优选从约 470 - 约 2415 和从约 470 - 约 2378 的部分序列。具有启动子活性的部分序列也例如从约 1310 - 约 2415 和从约 1310 - 约 2378，和从约 1847 - 约 2415 和从约 1847 - 约 2378 延伸。

然而本发明并不局限于如 SEQ ID NO:1 所示的启动子及其功能性组成成分，还包括具有启动子活性的变体。此特性的变体包括例如缺失，增加，插入和/或取代一个或多个碱基，优选约 1 - 约 50，尤其是约 1 - 约 25，特别是约 1 - 约 5 个碱基。使用例如所述的荧光素酶检测法可容易地测定启动子活性。

本发明还进一步涉及核酸构建体，所述构建体包括：

a)至少一个根据本发明的启动子的核酸序列(组分 a))和, 适当时, b)至少一个效应基因(组分 b)), 此效应基因的转录由组分 a)激活。组分 a)优选位于组分 b)的上游。

本发明还涉及一种核酸构建体, 其中根据本发明的内皮特异受体基因的启动子序列与另一个靶细胞特异性, 病毒特异性, 代谢特异性或细胞周期特异性的启动子序列和至少一个效应基因相组合, 其中启动子序列的组合控制了至少一个效应基因的转录的激活。

根据本发明的核酸构建体优选由 DNA 组成。术语“核酸构建体”应理解成由核酸组成并能在靶细胞中转录的人工结构。优选将它们插入载体中, 例如插入象质粒这样的非病毒载体中, 或病毒载体中。本领域技术人员可熟练制备非病毒载体和病毒载体。

本发明还涉及含有根据本发明的核酸构建体的细胞。

一般情况下, 效应基因的选择取决于要用基因构建体治疗的疾病。

专利申请 WO96/06940 , WO96/06938 , WO96/06941 和 WO96/06939 中详细描述了用于治疗肿瘤疾病, 白血病, 自身免疫病, 变态反应, 关节炎, 炎症, 器官排斥, 移植物抗宿主反应, 血凝固系统的疾病, 心血管疾病, 贫血, 感染或对 CNS 的损害的这些效应基因的例子。

例如, 适合本发明的效应基因编码细胞因子, 趋化因子, 生长因子, 细胞因子的受体, 趋化因子的受体或生长因子的受体, 以及细胞因子的拮抗剂, 诱导细胞生长抑制、细胞毒性或细胞程序死亡的蛋白质, 抗体或抗体片断, 血管生成抑制剂, 凝固因子, 凝固抑制剂, 纤溶蛋白, 裂解药物前体从而形成药物的酶, 对血循环发挥作用的蛋白质, 或能引起免疫反应的感染性病原体的抗原。

根据本发明的核酸构建体可进一步含有利用启动子序列或内部核糖体进入位点(IRES)互相连接的两个或多个相同或不同的效应基因。这些构建体的例子已在上述专利申请中给出。

根据本发明的核酸构建体可用于例如, 仅内皮细胞特异性地或内皮细胞特异性地和以代谢特异性地方式, 内皮细胞特异性地和细胞周期特异性地和/或内皮细胞特异性地和病毒特异性地表达基因, 优选基因可编码药理活性化合物或能裂解无活性药物前体从而产生有活性药物的酶。

优选使用根据本发明的核酸构建体制备用于治疗上述疾病的药物，药物的制备一般包括将核酸构建体克隆到适当的载体中，然后例如施用给病人。本领域技术人员熟悉根据本发明的启动子和根据本发明的核酸构建体的其他应用。

下文的实施例，以及表和图欲更详细地描述，而不是为了限制本发明。

表的描述：

表 1：人内皮特异受体启动子的序列。碱基对 1 对应于位于最远的 5' 端的序列区。高度保守的 Alu 序列位于碱基对 1360 - 1666 区，而与公开的 *M. musculus* cDNA 的同源性开始于在 3' 区域的碱基对 2300，与公开的 *H. sapiens* cDNA 的部分（5' 非翻译区）的同源性开始于碱基对 2379。

附图说明

图 1：人内皮特异受体启动子的克隆。A：将通过 PCR 制备的人内皮特异受体启动子的片断连接到载体 pCR2.1（Invitrogen）的 TA 克隆位点。B：用酶 *Mlu*I 和 *Xho*I 从构建体 pCR2.1Endo 上切下含有人内皮特异受体启动子的片断并克隆到荧光素酶报告基因的载体 pGL3（Promega）上。

图 2：不同的内皮细胞特异性启动子的荧光素酶活性。将所有的启动子克隆到 pGL3 中，以 SV40 基本启动子为基础使所有的值标准化。SV40：不含增强子的 SV40 基本启动子。pGL3Endo：内皮特异受体启动子（见图 1B）。vWF+SV40 增强子：被上游 SV40 增强子增强的 von Willebrand 因子的启动子。flk-1：VEGF 受体 flk-1 的启动子（-224/以 ATG 起始）。vWF：不含另外的增强子的 von Willebrand 因子启动子（-487/+247）。

图 3：在内皮细胞和非内皮细胞中人内皮特异受体启动子的荧光素酶活性。构建体与图 2 相同。以 SV40 基本启动子为基础标准化，将内皮特异受体启动子在内皮细胞系 ECV304 中的活性与其在 HeLa 颈癌细胞系中的活性相比较。在此试验中，ECV304 细胞中的活性比 HeLa 细胞中的活性约高 29 倍。

图 4：内皮特异受体启动子上推断的转录因子结合位点。仅仅显示了 Alu 序列和 cDNA 起点之间的区域。所有的结合位点都位于正（+）链上。

具体实施方式

实施例

使用 PromoterFinder™ DNA Walking 试剂盒 (Clontech) 克隆启动子。在两轮 PCR 中, 使用此试剂盒, 借助于两个基因特异性的引物, 从人内皮特异受体 cDNA 的 5' 非翻译区扩增了位于公开序列的 5' 端的约 2.4 千碱基对的片断, 所述引物是

E1: GCTGGGCTGGAGTTGCTGTCCGAAGGATG (SEQ ID NO.: 2)

E2: AATGGATGGCAGTGACAGCAGCAGTCCTG (SEQ ID NO.: 3)

PCR 的条件如下所述:

1. PCR: 引物 E1, 94 °C 25 秒, 94 °C 25 秒, 63 °C 20 秒, 68 °C 4 分钟, 39 次循环, 68 °C 4 分钟

2. (嵌套) PCR: 引物 E2, 94 °C 25 秒, 94 °C 25 秒, 61 °C 20 秒, 68 °C 4 分钟, 26 次循环, 68 °C 4 分钟

聚合酶: Expand™ Long Template PCR 系统 (Boehringer Mannheim)。

通过 QIAquick™ 自旋柱 (Qiagen) 纯化 PCR 片断并插入 TA 克隆载体 (Original TA Cloning™ 试剂盒 (Invitrogen))。测定此构建体 pCR2.1Endo (见图 1a) 的序列, 将经克隆的区域鉴定为人内皮特异受体基因的 2415 碱基对的 5' 区域 (序列, 见表 1)。

将此载体中的经克隆区域克隆到荧光素酶报道基因的载体, 即 pGL3 (Promega) 上, 并如同构建体 pGL3Endo (见图 1b) 那样在 HeLa 和 ECV304 细胞中检测其启动子活性。

或者通过 DEAE/葡聚糖法 (由 Sompayrac et al., PNAS 78, 7575 (1981) 而改进), 或者使用 LipofectAMINE™ (Gibco BRL) 转染细胞。SV40 基本启动子与 pGL3Endo 构建体一起被转染以作为标准; 还转染了具有或不具有 SV40 增强子的 flk-1- (VEGF) (-225/以 ATG 起始) 启动子和 von Willebrand 因子 (vWF) (-487/+247) 启动子。含有 SV40 增强子的后一个 vWF 启动子构建体与众不同, 因为其活性显著高于野生型启动子, 而其选择性尽管有所降低, 但仍然存在。将所有的构建体克隆到 pGL3 中, 按 Herber 等人 (Oncogene 9, 1295 (1994)) 和 Lucibello 等人 (EMBO J. 14, 132 (1995)) 所述方法进行荧光素酶测定。

不同启动子在 ECV304 细胞中的荧光素酶活性（图 2）表明内皮特异受体基因 5' 区域的经克隆片断具有启动子活性。与其他典型的内皮细胞特异性的启动子相比，此启动子的活性非常高，比 flk-1 启动子的活性高 4 倍，比 vWF 启动子的活性高 80 多倍。甚至当 vWF 启动子被 SV40 增强子序列增强时，pGL3Endo 构建体的活性仍然较高。这些数据证实了经克隆的区域是人内皮特异受体基因的启动子。

图 3 表示在 ECV304 细胞和 HeLa 颈癌细胞系中内皮特异受体启动子活性的比较。当以 SV40 基本启动子为基础标准化时，在 ECV304 细胞中的活性比在 HeLa 细胞中的高约 29 倍。这表明经克隆的启动子不仅在内皮细胞中具有活性，而且对这些细胞具有选择性。

图 4 表示内皮特异受体启动子上推断的转录因子结合位点。一些高度同源性的潜在的结合位点位于保守的 Alu 序列和公开的 cDNA 之间的区域，所述位点可能负责启动子的选择性和活性并包括几个保守的 NF- κ B 结合位点。

表 1：（ SEQ ID NO:1 ）

1	CGGGGGTTCC TCCTCTGTAA AGTGGAGGTA
31	TAACGGTACC CACCTCCTGG GGTGGCTGTG
61	AGGATTCAGA GCTGATAAGG TGAACGCCTA
91	GGGCGGGCCC TGGTGCAGAG AGAGCGCTCA
121	GCTCCTAGGG CTGGATTAAC TGTCCCTGGG
151	GCACAGATCT CGGTCTGGGG CCTGTGGAAG
181	CCTCAGAGCC ACCCCTGAAC CCCCACCGAG
211	CCACCCTTTG CCTCGCAGTG CCCATGGCCT
241	CGTCTCCGAG GTTACAGGAA AAGGCAGAGG
271	AGATGCCCTT CTCAGGGTGG CCCTCTGGGA
301	GAGGACACTC TCCCTTGACC TCAAAGCCAC
331	GCTTGGCTGC AAAGTGGCCA GGCAGCCACA
361	AGGCTGGGCA AGCAGAACGA TCCCTAATCC
391	CCACCCAAAG AGCCACACCG ACCCTCCCAG
421	CCGCTGTGAC AGCTCCTGCA GAGACAAACA
451	CACGGCCTAC TCTTGTACC CGGGCCGGCC
481	AATAAGCACG GAGAGGCAAG GCCTCAGACC
511	CTGGACAGAC ATCCTCCCTC CAGAGGCACC

541 AGGGCCTCAG CCTTCTCCTC CCTCCCTGGG
571 CCTCAATTTT TCCACCTGTG ACCCAGGGCA
601 GGTGGATCCA GGGAGAAGAA CCTTCTGGCT
631 CCATCTCACC ATGGGTCCTG GCAGCACACA
661 CAAAGATTTG GCCTCTCAAA GCCTAGCTCT
691 GCCAGCGTCC TTCTGCTCAA GAACTCTCCA
721 TGA CTCCCAG TGGCCCTAAG GACAAAGTCC
751 TGGCATTGGA GGCCCTCCCA ATGCAGGGCC
781 AGACTCTGCC TCTCCAGCTT CCTGTCCCCA
811 CCACACCCCT GCTGGTCTCA CGGTGGTCCG
841 ACTGTTTCCT GCTTCTGTGC CTTTGCTTAG
871 TCTGGCACCC CTGCCTGGCA TGCTTTCCTC
901 ACCCCTTCTT CTCCCCAATC CCAACTCACC
931 CAGTCTTTCA AAGGGCAGGC CTAAATACCA
961 GGCCCTCCAG GTGGCCCAGG ATTCCTTCTC
991 TGAGCTTTCA TGGGCCTGGC CCTGGGTGCT
1021 ACCTGTGAGT AGTCCCACGG TGGGTACATA
1051 GTAGGTGCGC TTA CTGTTCG CAGAATGAAC
1081 ATGGGACAGT TTGGGGACTG TCACCCAGCT

1111	CAGGGAGCAC TGATGGGGAA GCATCTCCTG
1141	TATGTCCCAG GGCTCAGTGC TGTAGTGTCC
1171	TGACCCTCAG AAATCTCATA ATGGCTTGGT
1201	CAGGAAGGCA TCGTGCCCCA CTTTGCAAAC
1231	AGGGGGTGCT GAGAATTGAG GGGCCTTGTC
1261	CAAGGTCTCA TGGCTAGGAG CAAGCAGAAT
1291	CGGATTTGAA CCCAGGGCCA CGTGACTTCA
1321	GAAGTGCCAT TAAAGTCCCC ATAATTCGGA
1351	GCTGTCTTCT TTTTTTTTT CTTTCTTTT
1381	TTTGAGACCG AGCCTCACTC TGTCACCTAG
1411	GCCAGGAGTG CAGTGGTCTG ATCTCAGCTC
1441	ACTGCAACCT CCGCCTCCTA GGTTC AAGTG
1471	ATTCTCTAGC CTCAGCCTCC CAAGTAGCTG
1501	GGACTACAGG CGCACGTCAT CATGCCCAGC
1531	TAACTTTTGT ATTTT TAGTA GAGATGGGTT
1561	TTCACCATGT TGGTCAGGCT GGTCTCGAAC
1591	TCCTGACCTC AAGTGATCCG TCTGCCTCGG
1621	CCTCTCAAAG TGCTGGGATT ATAGGCTTGA
1651	GCCACTACAC TCGGCCTGGA GCTGTGTTTT

1681	GTCGGTGAAG GATTTTCCAC CCATGAAGGG
1711	GTCAGACGTG AAGCGTGTGG CCCTGGGCAG
1741	CTCCTCTGAG CCCAGAGACG CCAGCCCTAG
1771	CCGCCTTGCT GTGCCACTTT GGGACTTCCC
1801	TCCCTAGCCT GAGCTTCAGT TTTCCTGCCT
1831	GTTAGGCAGC CCCATGTCAA CTGCACTTAG
1861	TAGGCCGGGT TTGATGCCCCG ACAAGACGTG
1891	AAGTGGTGGA GGTGGGCAGG ATCCCAGCGC
1921	TACCATCTTC TTGAACCACT GATCTCAACA
1951	CATCGGATTT CTGTTTCCTC ATCTGCAAAA
1981	TGGGATCAGT GAGCTCAGGT GGGTCACAAA
2011	TTCTACAGGA ACTACTTTAG CCAAGCCCGG
2041	CCCCCTGAAA GTTCCCCTCG GTGGGCAGTT
2071	AGGGTGATTG TTTTCATCTG TGGGGCTCCC
2101	TGATGCGTCC CACCCACCAG CCTTGGAGAG
2131	GGTGGGATGG GAGGGTGGGG TGCTTGGGGA
2161	GACAAGCCTA GAGCCTGGGC CCTCCCACCC
2191	CACTGCCTCC CCCCATCCCA GGGCCCCCCA
2221	CCCAGTGACA AAGCCCGTGG CACTTCCTCT

2251	ACCCGGTTGG CAGGCGGCCT GGCCCAGCCC
2281	CTTCTCTAAG GAAGCGCATT TCCTGCCTCC
2311	CTGGGCCCGGC CGGGCTGGAT GAGCCGGGAG
2341	CTCCCTGCTG CCGGTCATAC CACAGCCTTC
2371	ATCTGCGCCC TGGGGCCAGG ACTGCTGCTG
2401	TCACTGCCAT CCATT

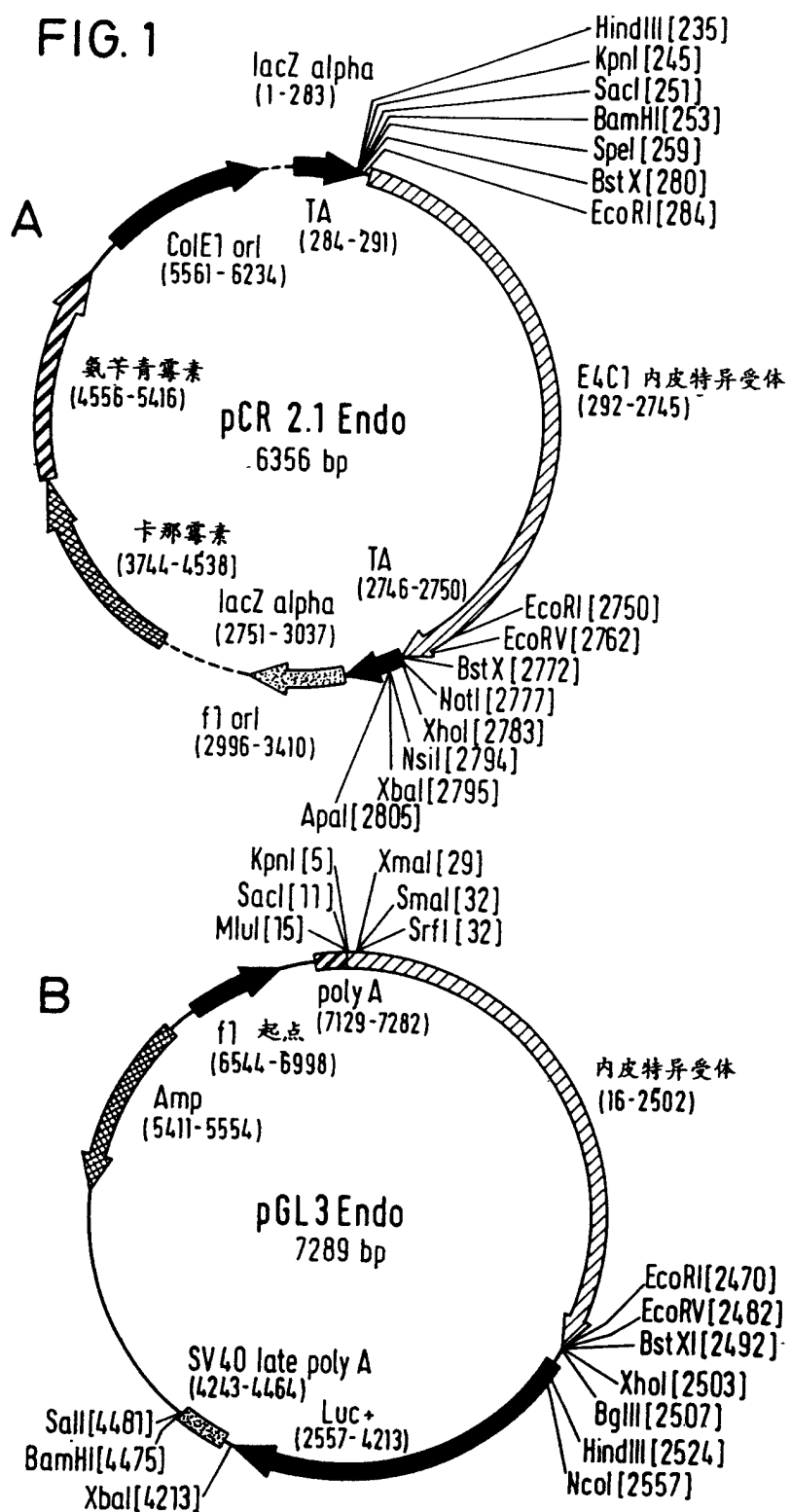


图 2. ECV304 细胞中不同的内皮细胞特异性启动子的比较

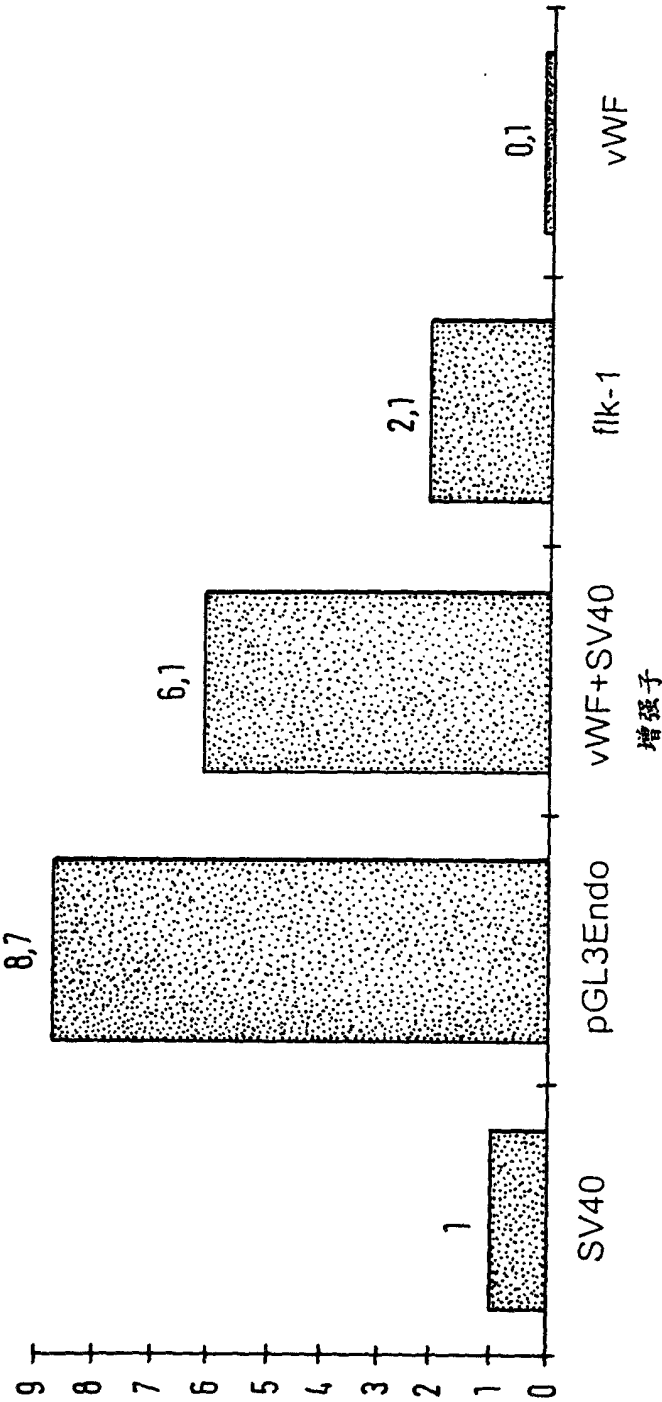


图 3. 经克隆的人内皮特异受体 5' 区域的启动子活性

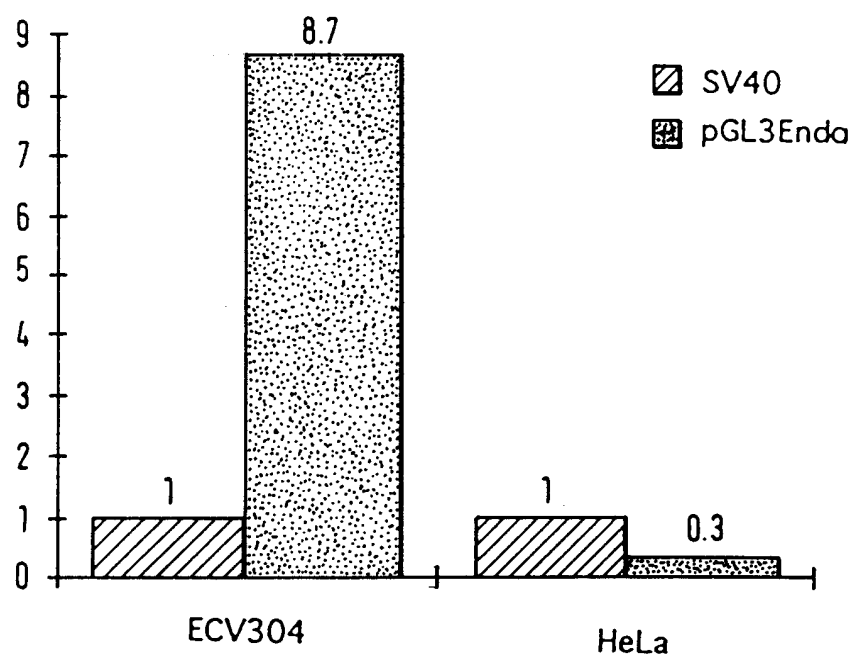


图 4

