



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102796741 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 28

(21) 申请号 201210210646. 3 *A61P 17/02* (2006. 01)
(22) 申请日 2007. 07. 31 *A61P 1/16* (2006. 01)
(30) 优先权数据 *A61P 15/00* (2006. 01)
60/834, 157 2006. 07. 31 US *A61P 27/02* (2006. 01)
A61P 19/08 (2006. 01)
(62) 分案原申请数据
200780035863. 0 2007. 07. 31
(71) 申请人 脉管生物生长有限公司
地址 以色列耶胡达
(72) 发明人 E. 布赖特巴特 L. 班乔 R. 塔尔
(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公
司 72001
代理人 林毅斌 李进
(51) Int. Cl.
C12N 15/12 (2006. 01)
C12N 15/63 (2006. 01)
C12N 5/10 (2006. 01)
C07K 14/47 (2006. 01)
A61K 38/17 (2006. 01)
A61K 48/00 (2006. 01)
A61P 9/10 (2006. 01)
A61P 9/14 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 29 页
序列表 14 页 附图 26 页

(54) 发明名称

多肽和其编码多核苷酸及它们在治疗缺血相
关医学病症中的应用

(57) 摘要

多肽和其编码多核苷酸及它们在治疗缺血相
关医学病症中的应用。本文公开了包含编码具有
HIF-1 α 氨基酸序列的多肽的核酸序列的分离多
核苷酸, 该多肽可稳定表达并具有组成型活性。也
公开了其编码的分离多肽及其应用。

1. 包含编码具有 HIF-1 α 氨基酸序列的多肽的核酸序列的分离多核苷酸,所述多肽可稳定表达并具有组成型活性。

2. 权利要求 1 的分离多核苷酸,其中所述核酸序列列于 SEQ ID NO:1。

3. 权利要求 1 的分离多核苷酸,其中所述氨基酸序列列于 SEQ ID NO: 2。

4. 权利要求 1 的分离多核苷酸,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID NO: 3 至少 90% 同源并包含对应于 SEQ ID NO: 3 的 402 位脯氨酸的突变,对应于 SEQ ID NO: 3 的 564 位脯氨酸的突变和对应于 SEQ ID NO: 3 的 803 位天冬酰胺的突变。

5. 包含编码具有 HIF-1 α 氨基酸序列的多肽的氨基酸序列的分离多肽,所述多肽可稳定表达并具有组成型活性。

6. 权利要求 5 的分离多肽,其中所述氨基酸序列列于 SEQ ID NO: 2。

7. 权利要求 5 的分离多肽,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID NO: 3 至少 90% 同源并包含对应于 SEQ ID NO: 3 的 402 位脯氨酸的突变,对应于 SEQ ID NO: 3 的 564 位脯氨酸的突变和对应于 SEQ ID NO: 3 的 803 位天冬酰胺的突变。

8. 包含权利要求 1 的多核苷酸的核酸构建体。

9. 权利要求 8 的核酸构建体,其进一步包含顺式 - 调控元件。

10. 权利要求 9 的核酸构建体,其中所述顺式 - 调控元件包含启动子元件。

11. 权利要求 10 的核酸构建体,其中所述启动子元件为内皮特异性启动子元件。

12. 权利要求 11 的核酸构建体,其中所述内皮特异性启动子元件包含至少一个 PPE-1 启动子拷贝。

13. 权利要求 12 的核酸构建体,其中所述 PPE-1 启动子列于 SEQ ID NO: 4。

14. 权利要求 9 的核酸构建体,其中所述顺式 - 调控元件进一步包含低氧响应元件。

15. 包含权利要求 8 的核酸构建体的细胞。

16. 药用组合物,包含作为活性物质的权利要求 8 的核酸构建体和药学可接受载体。

17. 治疗与低氧或缺血、组织灌注内含物减少或“低血流”相关的医学病症的方法,所述方法包括给予需要治疗的患者治疗有效量的能在受试者细胞中上调权利要求 5 的多肽的药剂,藉此治疗血管生成相关疾病。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述药剂为权利要求 5 的多肽。

19. 权利要求 17 的方法,其中所述药剂为权利要求 8 的核酸构建体。

20. 权利要求 14 的方法,其中所述给药具有系统作用。

21. 权利要求 17 的方法,其中所述缺血相关医学病症选自创伤愈合、缺血性发作、缺血性心脏病、外周血管疾病、肾动脉疾病、胃肠道损伤、烧伤、皮肤移植、血管移植、器官修复、骨修复病症、肝病、子宫病症、眼睛血管生成病症、骨再生病症、软骨修复病症和平滑肌细胞病症。

多肽和其编码多核苷酸及它们在治疗缺血相关医学病症中的应用

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日为2007年7月31日,申请号为200780035863.0(PCT/IL2007/000959),发明名称为“多肽和其编码多核苷酸及它们在治疗缺血相关医学病症中的应用”。

[0002] 发明领域及背景

[0003] 本发明涉及多肽和其编码多核苷酸及它们在治疗缺血相关医学病症中的应用。

[0004] 血管生成是从之前存在血管上芽生新的血管。它可在多种生理条件下发生,例如女性生殖周期,以及包括肿瘤、组织缺血和伤口愈合的病理学条件。

[0005] 缺血性心脏病是很多工业化国家中死亡率的主要原因,仅在美国每年引起超过500000例的死亡。当前的治疗选择包括药物治疗、冠状动脉血管成形术以及更具侵入性的冠状动脉搭桥术(CABG)。

[0006] 但是,在所有这些案例中,技术性问题包括所涉及动脉的大小、缺少恰当的末梢脉管系统、导致阻塞的动脉损伤的复杂性以及患者的一般临床病症经常阻止缺血组织的血管再形成。

[0007] 近来研发出一种侵入性较小的方法——治疗性血管生成。该术语指引入旨在促进缺血组织新血管形成的促血管新生因子,从而减轻缺血。已有两个主要方法用于治疗性血管生成领域;第一个是以裸露DNA形式或用病毒载体传递多种细胞因子的血管生成基因疗法,最常用的是血管内皮生长因子(VEGF)和成纤维细胞生长因子(FGF)。另一最新方法是用完全分化的细胞、内皮祖细胞或间充质干细胞的细胞治疗。两种方法均在动物模型和初期临床试验中显示成功。

[0008] 但是,在治疗性血管生成成为缺血病患者的真正临床选择之前仍然存在很多障碍需要克服。

[0009] 对于血管生成基因疗法,这些障碍包括转基因表达的组织特异性需求、传递载体的选择、剂量和时间的优化、给药途径的优化以及不良事件例如水肿和发生肿瘤的可能性。

[0010] 血管生成基因疗法成功的另一个限制是新形成血管不够成熟以及它们之后的退化,从而阻止显著而持久的治疗效果。这有可能是因为所递送的血管生成基因仅在相对较短的时间段内表达使得无法发生血管成熟和平滑肌细胞募集,或者因为血管成熟需要多种血管生成因子才能发生。可能的解决办法是使用能同时激活多种血管生成因子的上游血管生成调节剂,从而与生理学血管生成更加相似。这一因子是低氧诱导因子1(HIF-1)。

[0011] 低氧诱导因子(HIF-1)是一种转录因子,是缺氧响应的主要调节剂,在低氧状态下可活化多于40个基因。它是由两个亚单位组成的杂二聚体转录因子;亚单位 α 受到氧水平的严密调节并在低氧时被诱导,而亚单位 β 不论氧张力如何可组成型表达。

[0012] HIF-1 α 包含两个转活结构域(N-TAD和C-TAD)和一个氧-依赖型降解结构域(ODDD)。在常氧条件下蛋白质von-Hippel-Lindau(VHL)与HIF-1 α 的ODDD相互作用并作为E3-泛素连接酶复合物的一部分,因此将HIF-1 α 送至蛋白体降解。在低氧下,HIF-1 α 与HIF-1 β 二聚体化并活化其核内目标基因的转录。

[0013] 最近已显示 VHL 与 HIF-1 α 的相互作用由 HIF-1 α 蛋白内的两个特异残基的脯氨酰羟基化作用促成 (Epstein, A. C. 等, 2001, Cell 107, 43-54. Masson, N 等, 2001, Embo J 20, 5197-206)。

[0014] 已发现有三种脯氨酰羟基化酶 (PHD 1-3) 可在常氧下羟基化 HIF-1 α 。PHD 1 和 2 在残基 402 和 564 处羟基化而 PHD 3 仅在残基 564 处羟基化。

[0015] HIF-1 α 的第二种调控机制发现于 2002 年 (Lando, D 等, 2002, Science 295, 858-61) 并包括残基 803 处 HIF-1 α 的天冬酰胺酰羟基化作用, 由天冬酰胺酰羟基化酶催化, 也称作因子抑制 HIF-1 (FIH-1)。这一羟基化作用阻止 HIF-1 α 与辅因子 p300 的相互作用, 因此妨碍了 HIF-1 α 的转录活性。

[0016] 因此, 在常氧下有两种机制与 HIF-1 α 活性的降低有关, 一种通过脯氨酰基羟基化作用影响其稳定性, 另一种通过天冬酰胺酰基羟基化作用影响其转录活化。

[0017] 这些脯氨酰基和天冬酰胺酰基羟基化酶均为双加氧酶, 它们为 2- 酮戊二酸并且不依赖铁离子, 它们对细胞氧的需求可提供它们作为氧传感器活性的基础。

[0018] 已验证残基 402 和 564 处两个特异位点的突变可破坏 HIF-1 α 和 VHL 之间的相互作用, 因此使得 HIF-1 α 组成型稳定 (Masson 等, 2001, Embo J 20, 5197-206)。所得突变体 HIF-1 α 与驱动 HRE- 荧光素酶构建体表达中的低氧处理具有相同的活性。残基 564 和 803 的两处突变显示可给予 HIF-1 α 完整的转录活性, 与经低氧模拟铁螯合剂 2, 2'- 联吡啶处理所得活性相似 (Lando 等, 2002, Science 295, 858-61)。

[0019] 在角蛋白 14 启动子的调控下过表达缺失残基 401-602 的突变体 hHIF-1 α 的转基因小鼠显示出皮肤血管化作用增强 (Elson, D. A. 等, 2001, Genes Dev 15, 2520-32)。这些小鼠显示出 Glut-1 和 VEGF 的 mRNA 上调, 它们是 HIF-1 α 的已知靶点。与 VEGF 过表达小鼠比较, 这些小鼠血管的易漏性低并且显示出更大的成熟度。这可由 HIF-1 α 诱导多个血管生成因子 (即促红细胞生成素) 的活化这一事实解释, 与生理性血管生成反应相似, 与单独 VEGF 的作用相反。此外, HIF-1 α 诱导 VEGF 许多异构形式和其它基因的活化, 又一次与生理反应更相似, 这通过给予单一的异构形式无法完成。

[0020] 2000 年第一次在血管生成基因疗法中检测了 HIF-1 α 的组成型活性形式 (Vincent, K. A. 等, 2000, Circulation 102, 2255-61)。它包含 DNA 结合结构域和 HIF-1 α 的二聚体化结构域, 其在 CMV 启动子的调控下与单纯疱疹病毒 (HSV) 的转活结构域 VP16 相连。所得突变体可体内诱导 HIF 目标基因。当以裸露 DNA 局部给予时, 它可在小鼠后肢缺血模型中引起毛细血管密度和血液灌注增加。当 IM 注射大鼠 MI 模型时相同的构建体时也显示出治疗作用 (Shyu, K. G. 等, 2002, Cardiovasc Res 54, 576-83)。

[0021] 在 CMV 启动子调控下表达缺失残基 401-602 的组成型活性突变体 HIF-1 α 的腺病毒也可诱导视网膜非缺血组织中的血管生成 (Kelly, B. D. 等, 2003 Circ Res 93, 1074-81)。

[0022] 上述两种构建体具有 HIF-1 α 分子的大片段缺失, 并缺少天然 HIF-1 α 转活结构域 (N-TAD 和 C-TAD) 之一或二者, 其可引起活化潜能和 HIF-1 α 特异性降低。此外, 这些构建体在 CMV (通用和非特异性启动子) 调控下表达 HIF-1 α , 由于非特异性表达和潜在的副作用, 限制了它的应用。

[0023] 已使用多种给药途径向缺血区域给予治疗基因, 包括外周缺血下的血管内和肌肉

内给药和心肌缺血下的心肌内、心包内和冠状动脉内给药。静脉内途径带来的优点包括易于进入而不需侵入性操作,技术安全性和低成本以及适用于大患者群。然而,尽管有这些明显的临床优点,这一给药途径并不常用,这是由于该载体的全身分布导致目标器官中转基因表达低以及非目标器官中的不必要表达引起全身副作用,这限制了可给予的剂量。这一限制又接着限制了治疗的功效。促血管新生基因的不必要表达可诱导病理性血管生成,可能导致肿瘤形成和视网膜病,因此是不可接受的。因此,引导缺血目标器官中特异的转基因表达的能力对于有效和安全的全身给药是非常重要的。

[0024] 因此人们广泛认识到对将是非常有利的促血管新生因子和安全有效给药方法的需要。

[0025] 发明简述

[0026] 根据本发明的一个方面提供了分离的包含编码具有 HIF-1 α 氨基酸序列的多肽的核酸序列的多核苷酸,该多肽可稳定表达并具有组成型活性。

[0027] 根据下文所述本发明优选实施方案的进一步特点,该核酸序列列于 SEQ ID NO :1。

[0028] 根据所述优选实施方案中又进一步特点,该氨基酸序列列于 SEQ ID NO :2。

[0029] 根据所述优选实施方案的又进一步特点,该氨基酸序列至少 90% 与 SEQ ID NO :3 同源并包含对应于 SEQ ID NO :3 的 402 脯氨酸位点的突变、对应于 SEQ ID NO :3 的 564 脯氨酸位点的突变和对应于 SEQ ID NO :3 的 803 天冬酰胺位点的突变。

[0030] 根据本发明的另一方面,提供了分离的包含编码具有 HIF-1 α 氨基酸序列的多肽的氨基酸序列的多肽,该多肽可稳定表达并具有组成型活性。

[0031] 根据所述优选实施方案中又进一步特点,该氨基酸序列列于 SEQ ID NO :2。

[0032] 根据所述优选实施方案的又进一步特点,该氨基酸序列至少 90% 与 SEQ ID NO :3 同源并包含对应于 SEQ ID NO :3 的 402 脯氨酸位点的突变、对应于 SEQ ID NO :3 的 564 脯氨酸位点的突变和对应于 SEQ ID NO :3 的 803 天冬酰胺位点的突变。

[0033] 根据本发明的另一方面提供了包含本发明多核苷酸的核酸构建体。

[0034] 根据所述优选实施方案的又进一步特点,该核酸构建体进一步包含顺式 - 调控元件。

[0035] 根据所述优选实施方案的又进一步特点,该顺式 - 调控元件包含启动子元件。

[0036] 根据所述优选实施方案的又进一步特点,该启动子元件为内皮特异性启动子元件。

[0037] 根据所述优选实施方案的又进一步特点,该内皮特异性启动子元件包含至少一个 PPE-1 启动子拷贝。

[0038] 根据所述优选实施方案的又进一步特点,该 PPE-1 启动子列于 SEQ ID NO :4。

[0039] 根据所述优选实施方案的又进一步特点,该顺式 - 调控元件进一步包含低氧反应元件。

[0040] 根据本发明又另一方面提供了包含该核酸构建体的细胞。

[0041] 根据本发明又另一方面提供了包含作为活性物质的该核酸构建体和药学可接受载体的药用组合物。

[0042] 根据本发明的附加方面提供了治疗与低氧或缺血、组织灌注内含物减少 (reduced tissue perfusion inclusion) 或“低血流”相关的医学病症的方法,该方法包括给予需

要治疗的受试者治疗有效量的可上调受试者细胞中本发明多肽的药剂,藉此治疗血管生成-相关疾病。

[0043] 根据所述优选实施方案的又进一步特点该药剂为多肽。

[0044] 根据所述优选实施方案的又进一步特点该药剂为核酸构建体。

[0045] 根据所述优选实施方案的又进一步特点所述给药具有全身作用。

[0046] 根据所述优选实施方案的又进一步特点该与缺血相关的疾病或病症选自创伤愈合、缺血性发作、缺血性心脏病、外周血管疾病、肾动脉疾病、胃肠道损伤、烧伤、皮肤移植、血管移植、器官修复、骨修复病症、肝病、子宫病症、眼睛血管生成病症、骨再生病症、软骨修复病症和平滑肌细胞病症。

[0047] 本发明通过提供与缺血相关的医学病症的新颖治疗成功克服了目前已知构型的缺点。

[0048] 除非另外定义,本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。尽管可使用与本发明所述者相似或等同的方法和材料实施或检测本发明,下文描述了适当的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考均以其完整内容以参考形式并入本文。如有冲突,以本专利说明书(包括定义)为准。此外,所述材料、方法和实施例仅为示例性并不具有限制性。

[0049] 附图简述

[0050] 在本文中参考附图仅举例描述本发明。现具体参考详细的附图,应强调的是所显示的详细说明仅为举例而言并仅用于本发明优选实施例的说明性讨论,并以提供被认为是本发明原理和概念方面最有用和最易理解的描述为由而展示。就此而言,并未试图以比基本理解本发明所需更多的细节显示本发明的结构细节,对附图的描述使得本领域技术人员可显而易见如何实施本发明的数种形式。

[0051] 在这些图中:

[0052] 图 1A-E 为说明与 P402A P564G 和 P564A N803A 双突变体相比三突变体 HIF-1 α 转录活性的线条图和照片。用 p2.1 HRE-luc 和不同的 HIF-1 α 质粒或 pcDNA3 对照共转染后在 HEK293(图 1A) 和 BAEC(图 1B) 中测量 HRE-介导的转录。数据以荧光素酶比值表示并标准化至 β -gal(平均值 $\pm$ S.D)。与双突变体相比 * $p < 0.001$ 。图 1C 为用 HIF-1 α 质粒或 pcDNA3 对照转染后 48 小时分离自 HeLa 细胞的 mRNA 的 RT-PCR 分析。2,2'-联吡啶(2,2'-DP) 处理显示于图 1D。用 p2.1 HRE-luc 和不同的 HIF-1 α 质粒或 pcDNA3 对照共转染后在 VL-缺陷肾细胞癌细胞中测量 HRE 介导转录。数据以荧光素酶比值表示并标准化至 β -gal(平均值 $\pm$ S.D)。* $p < 0.001$ 并且 + $p = 0.003$ 比 P402A P564G 突变体。用 p2.1 HRE-荧光素酶、HIF-1 α 质粒和所指量的 F1H-1 反义(图 1E) 共转染 HEK293 细胞。数据以荧光素酶比值表示并标准化至 β -gal(平均值 $\pm$ S.D)。

[0053] 图 2A-H 为说明三突变体 HIF-1 α 比 P402A P564G 和 P564A N803A 双突变体显示出更大血管生成潜能的照片和条线图。图 2A-F 为在被 pcDNA3(图 2A)、wt-HIF-1 α (图 2B)、P402A P564G(图 2C)、P564A N803A(图 2D)、三突变体(图 2E) 或 VEGF(图 2F) 转染的 HUVECs 中体内血管生成测定的代表性照片。图 2G 为说明已转染 HUVECs 管形成的条线图,其通过计数每高倍显微镜视野的毛细血管分支数量定量。结果以 5 个随机显微镜视野的平均值 $\pm$ S.D 表示。图 2H 为说明已转染 HUVECs 的 VEGF 蛋白浓度的条线图,用 ELISA 测定,

结果以平均值 $\pm$ S.D 表示。* $p = 0.029$ 比 P402A P564G。

[0054] 图 3A-H 为说明 PPE1-3x 启动子的内皮和缺血特异性的荧光显微镜切片的照片。图 3A-F 显示了使后肢缺血或进行假操作的小鼠腓肠肌的荧光显微镜切片,7 天后经尾静脉向这些小鼠系统注射生理盐水(图 3A 和 3D)、Ad-CMV-GFP(图 3B 和 3E)或 Ad-PPE1-3x-GFP(图 3C 和 3F)。图 3G-H 显示了用 Ad-PPE1-3x-GFP 处理的小鼠腓肠肌的切片,如显示由表达 GFP 的内皮细胞组成的毛细血管中的红细胞(箭头所指)的荧光显微镜(图 3G)下或相差显微镜下(图 3H)所见。

[0055] 图 4A-F 说明了局部 Ad-CMV- 三突变体和 Ad-PPE- 三突变体处理可增强缺血后血管生成。图 4A 为左股动脉结扎后即刻和第 7、14、21 和 28 天缺血肢中血流的条线图。数据以左(缺血)与右(非-缺血)肢灌注的比值表示。生理盐水, $n = 8$; Ad-CMV-Luc, $n = 11$; Ad-CMV-wt, $n = 11$; Ad-CMV- 三突变体, $n = 12$; Ad-PPE- 三突变体, $n = 11$ 。图 4B 为手术 28 天后缺血(左)和非缺血(右)肢的代表性激光多普勒血流影像。在颜色编码影像中,红色表示正常灌注而蓝色表示低和/或无灌注。图 4C 为手术后 21 天小鼠后肢的代表性照片。图 4D 为说明手术后 21 天出现趾坏死的小鼠比例的条线图。图 4E-F 显示股动脉结扎后 28 天腓肠肌切片的毛细血管的代表性 CD31 染色(图 4E)和定量(图 4F)。* $p < 0.01$ 。

[0056] 图 5A-N 说明了系统给药之后 Ad-PPE- 三突变体的毒性小于 Ad-CMV- 三突变体。图 5A 为说明系统注射生理盐水或腺病毒后一段时间小鼠体重变化的点状图。图 5B-D 为说明系统注射生理盐水或腺病毒 5 和 21 天后血清胆红素(图 5B)、AST(图 5C)和 ALT(图 5D)水平的条线图。图 5E-N 为系统注射生理盐水(图 5E-F)、AdCMV-Luc(图 5G-H)、AdCMV-wt(图 5I-J)、AdCMV- 三突变体(图 5K-L)、AdPPE- 三突变体(图 5M-N)5(图 5E、G、I、K 和 M)和 21 天(图 5F、H、J、L 和 N)后小鼠肝的组织切片。

[0057] 图 6A-F 说明了系统 Ad-PPE- 三突变体而不是 Ad-CMV- 三突变体 处理可增强缺血后血管生成。图 6 为左股动脉切除后即刻和 7、14、21 和 28 天测量的缺血肢的血流的点状图。数据以左(缺血)和右(非缺血)肢灌注的比值表示。盐水, $n = 9$; Ad-CMV-Luc, $n = 8$; Ad-CMV-wt, $n = 9$; Ad-CMV- 三突变体, $n = 7$; Ad-PPE- 三突变体, $n = 8$ 。图 6B 为显示手术后 21 天出现趾坏死小鼠的百分比的条线图。图 6C 显示了手术后 21 天小鼠后肢的代表性照片。图 6D 为手术后 28 天缺血(左)和非缺血(右)肢的代表性激光多普勒血流影像。在颜色编码的影像中,红色表示正常灌注而蓝色表示低和/或无灌注。图 6E-F 显示股动脉结扎后 28 天腓肠肌切片的毛细血管的代表性 CD31 染色(图 6E)和定量(图 6F)。* $p < 0.01$ 。

[0058] 图 7A 为在 BAEC 中表达 HIF-1 α 的腺病毒的 HRE- 介导转录的比较。用 p2.1 HRE-Luc 转染 BAEC,24 小时后用腺病毒以 MOI 20 或 MOI 200 感染。数据以荧光素酶光单位(平均值 $\pm$ S.D)表示。

[0059] 图 7B 为 HeLa 细胞中 HIF-1 α 的蛋白质印迹分析。用 Ad-CMV-GFP、Ad-CMV-wtHIF-1 α 、Ad-CMV- 三突变体或 Ad-PPE1-3x- 三突变体或模拟感染对 HeLa 进行感染。感染后 48 小时进行蛋白质印迹分析。

[0060] 图 7C-G:在 HUVEC 中表达 HIF-1 α 的腺病毒的体外血管生成测定。模拟感染(C)或用 Ad-CMV-GFP(D)、Ad-CMV-wtHIF-1 α (E)、Ad-CMV- 三突变体(F)或 Ad-PPE1-3x- 三突变体(G)感染 HUVEC。48 小时之后进行体外血管生成测定。图 C-G 为管形成的代表性照片。

[0061] 图 7H:为说明经 ELISA 测定的被感染 HUVECs 的 VEGF 蛋白浓度的条线图,以平均值 $\pm$ S.D 表示。* $p = 0.01$ 比 Ad-CMV-wtHIF-1 α 。

[0062] 优选实施方案的描述

[0063] 本发明涉及 HIF-1 α 多肽和其编码多核苷酸,包含它们的药用组合物及其生产和使用方法。

[0064] 具体而言,本发明可用于治疗与缺血相关的疾病。

[0065] 在详细说明本发明的至少一个实施方案之前,应理解的是本发明 的应用不受限于下文描述或由实施例例证的细节。本发明可有其它的实施方案并以各种方法实施或进行。而且,应当理解的是本文使用的措辞和术语仅用于描述性目的并不应被认为具有限制性。

[0066] 低氧-诱导因子 1 α (HIF-1 α) 为异二聚体转录因子和对低氧水平响应的关键调节剂,其已被建议作为治疗性血管生成的潜在候选物。可通过点突变 P402A 和 P564G 达到 HIF-1 α 的稳定化 [Masson 等,2001, Embo J 20,5197-206],而通过点突变 N803A 达到其 C- 转活结构域 (C-TAD) 的组成型活性 [Lando 等,2002, Science 295,858-61]。

[0067] 在将本发明付诸实践的过程中,发明人通过基因工程构建了结合三个点突变 P402A P564G N803A 的 HIF-1 α 突变形式 (三突变体),使 HIF-1 α 既稳定又具有组成型活性。令人惊讶的是与两个已知的 HIF-1 α 双突变体相比三突变体对与低氧响应元件相连的报告基因的表达表现出协同作用,如图 1A-B 所示。因此,发明人表明 HIF-1 α C- 转活结构域的组成型活化而不仅仅是 HIF-1 α 分子的稳定性对最佳 HIF- 介导转录和促血管新生作用是必要的。因此,本发明的三突变体 HIF-1 α 或其编码多核苷酸可用于治疗与血管生成相关的疾病或病症。

[0068] 如图 2G-H 所示,如体外血管生成测定所表明,本发明的三突变体比 P402A P564G 和 P564A N803A 双突变体显示出更强的血管生成功效。此外,如图 4A-F 所示,在小鼠后肢缺血模型中与表达野生型 HIF-1 α 的腺病毒和对照相比表达本发明三突变体 HIF-1 α 的腺病毒显示出血液灌注增强和毛细血管密度增高。经修饰的前内皮素原 -1 启动子显示允许在缺血内皮细胞中的特异表达 (图 3C 和 3F)。在这一启动子调控下表达三突变体 HIF-1 α 比在组成型活性启动子调控下表达三突变体 (图 5A-N 和 6A-D) 降低了异位表达和全身副作用。

[0069] 因此,根据本发明的一个方面,提供了包含编码具有 HIF-1 α 氨基酸序列的多肽的氨基酸序列的分离多肽,该多肽可稳定表达并具有组成型活性。

[0070] 如本文所使用,短语 " HIF-1 α " 指至少一个 HIF-1 α 的活性部分 (即, 具有 HIF-1 α 活性的部分)。优选本发明 HIF-1 α 为人 HIF-1 α , 例如 GenBank 登录号 :NM001530。

[0071] 如本文所使用短语 "HIF-1 α 活性" 指至少 HIF-1 α 的转录因子活性,即, HIF-1 α 转录性上调目标血管生成基因的能力。为了以转录因子发挥作用, HIF-1 α 与 HIF-1 β 二聚体化并与辅 - 因子例如 P300 结合。因此本发明 HIF-1 α 优选包含功能性 DNA 结合结构域和功能性辅 - 因子和 HIF-1 β 结合结构域。本发明 HIF-1 α 不必要包含例如氨基或羧基端氨基酸,因为这些末端序列对于 HIF-1 α 活性不是必须的。

[0072] 如本文所使用,短语 "组成型活性" 指包含不被细胞低氧状态调控的转录活性的 HIF-1 α 。

[0073] 如本文所使用,短语“稳定表达”指对低氧响应时蛋白体降解不增加的多肽。因此该多肽的半衰期不被 Von-Hippel-Lindau (VHL) 的存在所改变。优选地,本发明多肽的半衰期至少比野生型多肽半衰期(即不包含突变)大约 2 倍,更优选大 5 倍。

[0074] 根据本发明这一方面的优选实施方案,本发明多肽与 SEQ ID NO:3 至少 50% 同源,更优选至少 60% 同源,更优选至少 70% 同源,更优选至少 80% 同源,最优选至少 90% 同源并包含对应于 SEQ ID NO:3 脯氨酸 402 位点的突变、对应于 SEQ ID NO:3 脯氨酸 564 位点的突变和对应于 SEQ ID NO:3 天冬酰胺 803 位点的突变。

[0075] 如本文所使用,术语“突变”指与野生型序列 (GenBank 登录号:NM001530 (GI:31077212)) 相比氨基酸序列的改变。

[0076] 突变可包含缺失或替换。示例性突变包括对应于 402 位脯氨酸的丙氨酸、对应于 564 位脯氨酸的甘氨酸和对应于 803 位天冬酰胺的丙氨酸。

[0077] 因此,根据优选实施方案本发明多肽列于 SEQ ID NO:2。

[0078] 此外,本发明多肽可包含 SEQ ID NO:3 的其它保守改变。

[0079] 本文使用的短语“保守改变”指氨基酸残基被另一种生物学相似残基替换。保守改变的实例包括亲水残基例如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸替换另一亲水残基,或极性残基替换另一极性残基,例如精氨酸替换赖氨酸、谷氨酸替换天冬氨酸或谷氨酰胺替换天冬酰胺。术语“保守改变”也包括使用被替换的氨基酸取代未被替换的母体氨基酸,只要已替换多肽的抗体也可与未替换多肽发生免疫反应。

[0080] 可使用蛋白质工程方法,例如展示技术发现其它可使本发明 HIF-1 α 以及 HIF-1 α 活性部分具有稳定性和组成型活性的突变。

[0081] 构建展示文库的方法为本领域已知。这些方法描述于,例如,Young AC 等,“多糖结合抗体至新型隐球菌及其与噬菌体展示文库的肽的复合物的三维结构:对鉴定肽模拟位点的意义”(“The three-dimensional structures of a polysaccharide binding antibody to *Cryptococcus neoformans* and its complex with a peptide from a phage display library: implications for the identification of peptide mimotopes”) *J Mol Biol* 1997 Dec 12;274(4):622-34;Giebel LB 等,“筛选环形肽噬菌体文库鉴定以高亲和性与抗生物素蛋白链菌素结合的配体”(“Screening of cyclic peptide phage libraries identifies ligands that bind streptavidin with high affinities”) *Biochemistry* 1995 Nov 28;34(47):15430-5;Davies EL 等,“使用衍生自鸡免疫球蛋白基因的文库筛选特异性噬菌体展示抗体”(“Selection of specific phage-display antibodies using libraries derived from chicken immunoglobulin genes”) *J Immunol Methods* 1995 Oct 12;186(1):125-35;Jones C RT 等,“分子识别和生物分离的现有趋势”(“Current trends in molecular recognition and bioseparation”) *J Chromatogr A* 1995 Jul 14;707(1):3-22;Deng SJ 等,“从合成基因文库中筛选改良的碳水化合物-结合单链抗体的基础”(“Basis for selection of improved carbohydrate-binding single-chain antibodies from synthetic gene libraries”) *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 May 23;92(11):4992-6;以及 Deng SJ 等,“通过噬菌体展示筛选碳水化合物结合改进的抗体单链可变区片段”(“Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display”) *J Biol Chem* 1994 Apr 1;

269(13):9533-8,均以参考形式并于本文。

[0082] 也可使用计算机生物学发现可使本发明 HIF-1 α 具有稳定性和组成型活性的其它突变。举例而言,可使用各种三维计算机工具用计算机分析各种突变 HIF-1 α 肽序列赋予稳定性和组成型活性的能力。可使用可用于展示三维结构模型的软件程序例如 RIBBONS(Carson, M., 1997. *Methods in Enzymology* 277, 25)、O(Jones, TA. 等, 1991. *Acta Crystallogr.* A47, 110)、DINO(DINO: Visualizing Structural Biology(2001) <http://www.dino3d.org>) ;QUANTA、INSIGHT、SYBYL、MACROMODE、ICM、MOLMOL、RASMOL 和 GRASP(综述于 Kraulis, J., 1991. *Appl Crystallogr.* 24, 946) 建模预期突变肽序列以鉴定可用突变。

[0083] 如本文所使用,术语“多肽”涵盖天然多肽(或是降解产物,或是合成性合成多肽或是重组多肽)和模拟肽(通常为合成型合成多肽)以及类肽和半类肽(其为多肽类似物),它们具有的一些修饰可使多肽在体内更稳定或更容易进入细胞。这些修饰包括但不限于 N 端修饰、C 端修饰、多肽键修饰,包括但不限于 CH₂-NH、CH₂-S、CH₂-S = O、O = C-NH、CH₂-O、CH₂-CH₂、S = C-NH、CH = CH 或 CF = CH、骨架修饰和残基修饰。制备模拟肽化合物的方法为本领域已知并描述于例如 *Quantitative Drug Design*, C. A. Ramsden Gd., 17.2 章, F. Choplin Pergamon Press(1992), 其以参考形式并于本文如同完整列于本文。这一方面的进一步细节提供于下文。

[0084] 该多肽内的多肽键(-CO-NH-)可通过以下方式替换,例如 N-甲基化键(-N(CH₃)-CO-)、酯键(-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-)、酮亚甲基键(-CO-CH₂-)、 α -氮杂键(-NH-N(R)-CO-) ,其中 R 为烷基,例如甲基、亚甲基氨基键(carba bonds) (-CH₂-NH-)、羟亚乙基键(-CH(OH)-CH₂-)、硫代碳酰胺键(-CS-NH-)、烯属双键(-CH = CH-)、逆酰胺键(-NH-CO-)、多肽衍生物(-N(R)-CH₂-CO-) ,其中 R 为“正常”侧链,天然存在于碳原子上。

[0085] 这些修饰可发生在沿着多肽链的任何键上甚至同时发生在数个键上(2-3)。

[0086] 天然芳香族氨基酸 Trp、Tyr 和 Phe 可替换成合成非天然酸,例如苯胺乙酸、TIC、萘基丙氨酸(No1)、Phe 的环甲基化衍生物、Phe 的卤代衍生物或 o-甲基-Tyr。

[0087] 除以上所述,本发明多肽也可包括一个或多个经修饰的氨基酸或一个或多个非氨基酸单体(例如,脂肪酸、复合碳水化合物等)。

[0088] 如说明书和下文的权利要求部分所使用,术语“氨基酸”或“多个氨基酸”应理解为包括 20 种天然氨基酸;那些氨基酸常常被体内转录后修饰,包括例如羟基脯氨酸、磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸;以及其它罕见氨基酸,包括但不限于 2-氨基己二酸、羟基赖氨酸、异锁链赖氨酸、原缬氨酸、己氨酸和鸟氨酸。此外,术语“氨基酸”包括 D 和 L-氨基酸二者。

[0089] 以下表 1 和 2 列出了可用于本发明的天然氨基酸(表 1)和非常规或经修饰的氨基酸(表 2)

[0090] 表 1

[0091]

氨基酸	三字母缩写	单字母符号
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酰胺	Gln	Q
谷氨酸	Glu	E
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V
任何上述氨基酸	Xaa	X

[0092]

[0093] 表 2

[0094]

非常规氨基酸	编码	非常规氨基酸	编码
α -氨基丁酸	Abu	L-N-甲基丙氨酸	Nmala
α -氨基- α -丁酸甲酯	Mgab	L-N-甲基精氨酸	Nmarg
氨基环丙烷-	Cpro	L-N-甲基天冬酰胺	Nmasn
羧化物		L-N-甲基天冬氨酸	Nmasp
氨基异丁酸	Aib	L-N-甲基半胱氨酸	Nmcys
氨基降冰片烷基-	Norb	L-N-甲基谷氨酰胺	Nmgin
羧化物		L-N-甲基谷氨酸	Nmglu
丙氨酸环己酯	Chexa	L-N-甲基组氨酸	Nmhis
丙氨酸环戊酯	Cpen	L-N-甲基异亮氨酸	Nmile
D-丙氨酸	Dal	L-N-甲基亮氨酸	Nmleu
D-精氨酸	Darg	L-N-甲基赖氨酸	Nmlys
D-天冬氨酸	Dasp	L-N-甲基甲硫氨酸	Nmmet

[0095]

D-半胱氨酸	Dcys	L-N-甲基正亮氨酸	Nmnle
D-谷氨酰胺	Dgln	L-N-甲基正缬氨酸	Nmnva
D-谷氨酸	Dglu	L-N-甲基鸟氨酸	Nmorn
D-组氨酸	Dhis	L-N-甲基苯丙氨酸	Nmphe
D-异亮氨酸	Dile	L-N-甲基脯氨酸	Nmpro
D-亮氨酸	Dleu	L-N-甲基丝氨酸	Nmser
D-赖氨酸	Dlys	L-N-甲基苏氨酸	Nmthr
D-甲硫氨酸	Dmet	L-N-甲基色氨酸	Nmtrp
D-鸟氨酸	Dorn	L-N-甲基酪氨酸	Nmtyr
D-苯丙氨酸	Dphe	L-N-甲基缬氨酸	Nmval
D-脯氨酸	Dpro	L-N-甲基乙基甘氨酸	Nmetg
D-丝氨酸	Dser	L-N-甲基-t-丁基甘氨酸	Nmtbug
D-苏氨酸	Dthr	L 正亮氨酸	Nle
D-色氨酸	Dtrp	L-正缬氨酸	Nva
D-酪氨酸	Dtyr	α -甲基-氨基异丁酯	Maib
D-缬氨酸	Dval	α -甲基- γ -氨基异丁酯	Mgabu
D- α -甲基丙氨酸	Dmala	α 乙基环己基丙氨酸	Mchexa
D- α -甲基精氨酸	Dmarg	α -甲基环戊基丙氨酸	Mcpen
D- α -甲基天冬酰胺	Dmasn	α -甲基- α -萘基丙氨酸	Manap
D- α -甲基天冬氨酸	Dmasp	α - 甲基青霉胺	Mpen
D- α -甲基半胱氨酸	Dmcys	N-(4-氨基丁基)甘氨酸	Nglu
D- α -甲基谷氨酰胺	Dmgln	N-(2-氨基乙基)甘氨酸	Naeg
D- α -甲基组氨酸	Dmhis	N-(3-氨基丙基)甘氨酸	Norn
D- α -甲基异亮氨酸	Dmile	N- 氨基- α -丁酸甲酯	Nmaabu
D- α -甲基亮氨酸	Dmleu	α -萘基丙氨酸	Anap
D- α -甲基赖氨酸	Dmlys	N-苄基甘氨酸	Nphe
D- α -甲基甲硫氨酸	Dmmet	N-(2-氨基甲酰基乙基)甘	Ngln

[0096]

		氨酸	
D- α -甲基鸟氨酸	Dmorn	N-(氨甲酰基甲基)甘氨酸	Nasn
D- α -甲基苯丙氨酸	Dmphe	N-(2-羧乙基)甘氨酸	Nglu
D- α -甲基脯氨酸	Dmpro	N-(羧甲基)甘氨酸	Nasp
D- α -甲基丝氨酸	Dmser	N-环丁基甘氨酸	Ncbut
D- α -甲基苏氨酸	Dmthr	N-环庚基甘氨酸	Nchep
D- α -甲基色氨酸	Dmtrp	N-环己基甘氨酸	Nchex
D- α -甲基酪氨酸	Dmtty	N-环癸基甘氨酸	Ncdec
D- α -甲基缬氨酸	Dmval	N-环十二烷基甘氨酸	Ncdod
D- α -甲基丙氨酸	Dnmala	N-环辛基甘氨酸	Ncoct
D- α -甲基精氨酸	Dnmarg	N-环丙基甘氨酸	Ncpro
D- α -甲基天冬酰胺	Dnmasn	N-环十一烷基甘氨酸	Ncund
D- α -甲基天冬氨酸	Dnmasp	N-(2,2-二苯基乙基)甘氨酸	Nbhm
D- α -甲基半胱氨酸	Dnmcys	N-(3,3-二苯基丙基)甘氨酸	Nbhe
D-N-甲基亮氨酸	Dnmleu	N-(3-吡啶基乙基)甘氨酸	Nhtrp
D-N-甲基赖氨酸	Dnmlys	N-甲基- γ -氨基异丁酯	Nmgabu
N-甲基环己基丙氨酸	Nmchexa	D-N-甲基甲硫氨酸	Dnmmt
D-N-甲基鸟氨酸	Dnmorn	N-甲基环戊基丙氨酸	Nmcpn
N-甲基甘氨酸	Nala	D-N-甲基苯丙氨酸	Dnmphe
N-甲基氨基异丁酯	Nmaib	D-N-甲基脯氨酸	Dnmpro
N-(1-甲基丙基)甘氨酸	Nile	D-N-甲基丝氨酸	Dnmser
N-(2-甲基丙基)甘氨酸	Nile	D-N-甲基丝氨酸	Dnmser
N-(2-甲基丙基)甘氨酸	Nleu	D-N-甲基苏氨酸	Dnmthr

[0097]

D-N-甲基色氨酸	Dnmtrp	N-(1-甲基乙基)甘氨酸	Nva
D-N-甲基酪氨酸	Dnmtyr	N-甲基-萘基丙氨酸	Nmanap
D-N-甲基缬氨酸	Dnmval	N-甲基青霉胺	Nmpen
γ -氨基丁酸	Gabu	N-(p-羟苯基)甘氨酸	Nhtyr
L-t-丁基甘氨酸	Tbug	N-(硫代甲基)甘氨酸	Ncys
L-乙基甘氨酸	Etg	青霉胺	Pen
L-高苯丙氨酸	Hphe	L- α -甲基丙氨酸	Mala
L- α -甲基精氨酸	Marg	L- α -甲基天冬酰胺	Masn
L- α -甲基天冬氨酸	Masp	L- α -甲基-叔-丁基甘氨酸	Mtbug
L- α -甲基半胱氨酸	Mcys	L-甲基乙基甘氨酸	Metg
L- α -甲基谷氨酰胺	Mgln	L- α -甲基谷氨酸	Mglu
L- α -甲基组氨酸	Mhis	L- α -甲基高苯丙氨酸	Mhphe
L- α -甲基异亮氨酸	Mile	N-(2-甲基硫代乙基)甘氨酸	Nmet
D-N-甲基谷氨酰胺	Dnmgln	N-(3-胍基丙基)甘氨酸	Narg
D-N-甲基谷氨酸	Dnmglu	N-(1-羟乙基)甘氨酸	Nthr
D-N-甲基组氨酸	Dnmhis	N-(羟乙基)甘氨酸	Nser
D-N-甲基异亮氨酸	Dnmile	N-(咪唑基乙基)甘氨酸	Nhis
D-N-甲基亮氨酸	Dnmleu	N-(3-吡啶基乙基)甘氨酸	Nhtrp
D-N-甲基赖氨酸	Dnmlys	N-甲基- γ -氨基异丁酯	Nmgabu
N-甲基环己基丙氨酸	Nmchexa	D-N-甲基甲硫氨酸	Dnmmt
D-N-甲基鸟氨酸	Dnmorn	N-甲基环戊基丙氨酸	Nmcpn
N-甲基甘氨酸	Nala	D-N-甲基苯丙氨酸	Dnmphe
N-甲基氨基异丁酯	Nmaib	D-N-甲基脯氨酸	Dnmpro
N-(1-甲基丙基)甘氨酸	Nile	D-N-甲基丝氨酸	Dnmser

[0098]

N-(2-甲基丙基)甘氨酸	Nleu	D-N-甲基苏氨酸	Dnmthr
D-N-甲基色氨酸	Dnmtrp	N-(1-甲基乙基)甘氨酸	Nval
D-N-甲基酪氨酸	Dnmtyr	N-甲基 α -萘基丙氨酸	Nmanap
D-N-甲基缬氨酸	Dnmval	N-甲基青霉胺	Nmpen
γ -氨基丁酸	Gabu	N-(对-羟苯基)甘氨酸	Nhtyr
L-叔-丁基甘氨酸	Tbug	N-(硫代甲基)甘氨酸	Ncys
L-乙基甘氨酸	Etg	青霉胺	Pen
L-高苯丙氨酸	Hphe	L- α -甲基丙氨酸	Mala
L- α -甲基精氨酸	Marg	L- α -甲基天冬酰胺	Masn
L- α -甲基天冬氨酸	Masp	L- α -甲基-叔-丁基甘氨酸	Mtbug
L- α -甲基半胱氨酸	Mcys	L-甲基乙基甘氨酸	Metg
L- α -甲基谷氨酰胺	Mgln	L- α -甲基谷氨酸	Mglu
L- α -乙基组氨酸	Mhis	L- α -甲基高苯丙氨酸	Mhphe
L- α -乙基异亮氨酸	Mile	N-(2-甲基硫代乙基)甘氨酸	Nmet
L- α -甲基亮氨酸	Mleu	L- α -甲基赖氨酸	Mlys
L- α -甲基甲硫氨酸	Mmet	L- α -甲基正亮氨酸	Mnle
L- α -甲基正缬氨酸	Mnva	L- α -甲基鸟氨酸	Morn
L- α -甲基苯丙氨酸	Mphe	L- α -甲基脯氨酸	Mpro
L- α -甲基丝氨酸	mser	L- α -甲基苏氨酸	Mthr
L- α -乙基缬氨酸	Mtrp	L- α -甲基酪氨酸	Mtyr
L- α -甲基亮氨酸	Mval Nnbhm	L-N-甲基高苯丙氨酸	Nmhphe
N-(N-(2,2-二苯基乙基))		N-(N-(3,3-联苯基丙基))	
氮甲酰甲基-甘氨酸	Nnbhm	氮甲酰甲基(1)甘氨酸	Nnbhe

[0099]

1-羧基-1-(2,2- 联苯基乙氨基)	Nmbc		
-------------------------	------	--	--

[0100] 本发明的分离多肽可使用标准的固相技术生物合成。这些方法包括专有固相合成、部分固相合成方法、片段浓缩、经典溶液合成。当不能通过重组技术生产（即不被核酸序列编码）并因此采用不同的化学法或合成短肽时优选使用这些方法。

[0101] 固相多肽合成方法为本领域已知并进一步描述于 John Morrow Stewart 和 Janis Dillaha Young, Solid Phase Polypeptide Syntheses(第 2 版., Pierce Chemical Company, 1984)。

[0102] 可通过制备型高效液相色谱仪 [Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman 和 Co. N. Y.] 分离合成多肽, 其组成可经氨基酸测序验证。

[0103] 优选使用重组技术生成本发明的分离多肽, 因为这些技术更适用于生成相对较长（即长于 20 个氨基酸）和大量的多肽。该类重组技术描述于 Bitter 等, (1987) Methods in Enzymol. 153 :516-544, Studier 等 (1990) Methods in Enzymol. 185 :60-89, Brisson 等 (1984) Nature 310 :511-514, Takamatsu 等 (1987) EMBO J. 6 :307-311, Coruzzi 等 (1984) EMBO J. 3 :1671-1680 和 Brogli 等, (1984) Science 224 :838-843, Gurley 等 (1986) Mol. Cell. Biol. 6 :559-565 以及 Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, 第 VIII 部, 第 421-463 页。

[0104] 这些技术可用于体外、先体外后体内和体内（后两者进一步描述于下文）生成本发明的分离多肽。

[0105] 为了使用重组技术生产本发明的分离 HIF-1 α 多肽, 可使用包含编码该多肽序列的核酸序列的分离多核苷酸。示例性核酸序列列于 SEQ ID NO :1。

[0106] 术语“核酸序列”指由天然碱基、糖和共价核苷键（例如骨架）组成的脱氧核糖核酸序列以及具有与对应的天然部分具有相似功能的非天然部分的寡聚核苷酸。本发明可进行这些修饰只要仍然允许重组表达。

[0107] 根据本发明这一方面的 HIF-1 α 的核酸序列可为互补多核苷酸序列 (cDNA)、基因组多核苷酸序列和 / 或混合多核苷酸序列（例如, 上述的组合）。

[0108] 如本文所使用, 短语“互补多核苷酸序列”指使用逆转录酶或任何其它 RNA 依赖型 DNA 聚合酶由信使 RNA 逆转录得到的序列。可使用 DNA 依赖型 DNA 聚合酶体内或体外扩增该类序列。

[0109] 如本文所使用, 短语“基因组多核苷酸序列”指衍生（分离）自染色体的序列并因此其代表了染色体的连续部分。

[0110] 如本文所使用, 短语“混合多核苷酸序列”指至少部分为互补并且至少部分为基因组序列的序列。混合序列可包括一些编码本发明多肽必须的外显子序列以及插入其间的一些内含子序列。内含子序列可为任何来源, 包括其它基因并通常包括保守剪切信号序列。该类内含子序列可进一步包括顺式作用表达调控元件。

[0111] 为了使用重组技术生成本发明的 HIF-1 α 多肽, 将其编码多核苷酸连接至核酸表达载体, 这样该多核苷酸序列受顺式调控序列（例如, 启动子序列）的转录控制。

[0112] 许多原核或真核细胞可用作表达本发明多肽的宿主-表达系统。这些包括但不限于微生物,例如用包含该多肽编码序列的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 转化的细菌;用包含该多肽编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母;用重组病毒表达载体(例如,花椰菜花斑病毒、CaMV、烟草花叶病毒、TMV)感染或包含该多肽编码序列的重组质粒表达载体例如 Ti 质粒转化的植物细胞系统。

[0113] 适用于本发明这一实施方案的组成型启动子包括在绝大多数环境条件下和绝大多数细胞类型例如细胞巨化病毒(CMV)和劳斯氏肉瘤病毒(RSV)中具有功能(即可引导转录)的序列。

[0114] 适用于本发明这一实施方案的诱导型启动子包括例如四环素诱导型启动子(Srour, M. A. 等, 2003. *Thromb. Haemost.* 90 :398-405)。

[0115] 根据本发明这一实施方案的表达载体可包括可使这一载体适用于在原核细胞、真核细胞或优选二者(例如,穿梭载体)中表达的附加序列。典型的克隆载体包含转录和翻译起始序列(例如,启动子、增强子)以及转录和翻译终止子(例如多腺苷酸化信号)。

[0116] 真核启动子通常包含两类识别序列,TATA 盒和上游启动子元件。TATA 盒位于转录起始位点上游的 25-30 碱基对,其被认为参与了引导 RNA 聚合酶以起始 RNA 合成。其它上游启动子元件决定了转录起始的速度。

[0117] 增强子元件可将相连的同源或异源启动子的转录激活至 1000 倍。当置于转录起始位点下游或上游时增强子具有活性。许多衍生自病毒的增强子元件具有较宽的宿主范围并且在多种组织中具有活性。例如,SV40 早期基因增强子适用于许多细胞类型。其它适用于本发明的增强子/启动子组合包括衍生自多瘤病毒、人或鼠巨细胞病毒(CMV)、来自各种逆转录病毒例如鼠白血病病毒、鼠或劳斯氏肉瘤病毒和 HIV 的长重复序列的那些。参见, *Enhancers and Eukaryotic Expression*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 1983,以参考文献并于本文。

[0118] 可将多腺苷酸化序列添加入表达载体以增加由本发明表达载体表达的多肽的翻译效率。准确有效的多腺苷酸化需要两种截然不同的序列元件:位于多腺苷酸化位点下游的富含 GU 或 U 的序列和位于上游 11-30 个核苷酸的 6 核苷酸高度保守序列 AAUAAA。适用于本发明的终止和多腺苷酸化信号包括衍生自 SV40 者。

[0119] 除了已述元件,本发明表达载体可通常包含用于增加已克隆核酸表达水平或辅助鉴定携带该重组 DNA 的细胞的其它特定元件。例如,许多动物病毒包含可加强病毒基因组在允许细胞类型中的染色体外复制的 DNA 序列。携带这些病毒复制子的质粒可以游离基因复制,只要质粒携带的或宿主基因组包含的基因提供了适当的因子。

[0120] 该载体可包括或不包括真核复制子。如果存在真核复制子,那么可使用适当的筛选标记在真核细胞中扩增该载体。如果该载体不包含真核复制子,则不可能出现以游离基因扩增。而是该重组 DNA 整合入工程细胞的基因组中,其中该启动子引导期望核酸的表达。

[0121] 本发明的表达载体可进一步包括附加多核苷酸序列,其允许例如从单个 mRNA 例如内核糖体进入位点(IRES)和启动子-嵌合多肽的基因组整合序列翻译数种蛋白质。

[0122] 哺乳动物表达载体的实例包括但不限于 pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81(可从 Invitrogen 获得),可从 Promega 获得的 pCI,可

从 Strategene 获得的 pMbac、pPbac、pBK-RSV 和 pBK-CMV, 可从 Clontech 获得的 pTRES, 以及它们的衍生物。

[0123] 本发明也可使用包含来自真核生物病毒例如逆转录病毒的调控元件的表达载体。SV40 载体包括 pSVT7 和 pMT2。衍生自牛乳头状瘤病毒的载体包括 pBV-1MTHA, 衍生自艾伯斯坦-巴尔病毒 (Epstein Bar virus) 的载体包括 pHEB0 和 p205。其它示例性载体包括 pMSG、pAV009/A⁺、pMT010/A⁺、pMAMneo-5、杆状病毒 pDSVE 和任何其它在 SV-40 早期启动子、SV-40 晚期启动子、金属硫蛋白启动子、鼠乳腺癌病毒启动子、劳斯氏肉瘤病毒启动子、多角体蛋白启动子或其它对真核细胞表达有效的启动子的引导下允许蛋白质表达的载体。

[0124] 可使用多种方法将本发明表达载体引入细胞。这些方法描述于 Sambrook 等, 分子克隆: 实验室手册 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992); Ausubel 等, 分子生物学实验手册 (Current Protocols in Molecular Biology), John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang 等, 体细胞基因疗法 (Somatic Gene Therapy), CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995); Vega 等, 基因打靶 (Gene Targeting), CRC Press; Ann Arbor Mich. (1995), 载体: 分子克隆载体综述以及它们的应用 (Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses), Butterworths, Boston Mass. (1988) 和 Gilboa et al. [Biotechniques 4(6): 504-512, 1986] 并包括, 例如, 稳定或瞬时转染、脂转染、电穿孔和用重组病毒载体感染。此外, 阳性-阴性筛选方法参见美国专利第 5464764 和 5487992 号。

[0125] 在允许重组多肽大量表达的有效条件下培养已转化细胞。有效培养条件包括但不限于有效培养基、生物反应器、温度、pH 和允许蛋白质生产的氧条件。有效培养基指可于其中培养细胞生产本发明重组多肽的任何培养基。该类培养基通常包括含有可同化碳、氮和磷源的含水溶液、适当的盐、矿物质、金属和其它营养成分, 例如维生素。可在传统的发酵生物反应器、摇瓶、试管、微量滴定皿和培养皿中培养本发明细胞。可在适合重组细胞的温度、pH 和氧含量下进行培养。该培养条件为本领域普通技术人员已知。

[0126] 应理解的是除了包含插入编码序列 (编码该多肽) 转录和翻译的必须元件之外, 本发明的表达构建体还应包括用于优化被表达多肽的稳定性、生成、纯化、产量或活性的序列。

[0127] 根据用于生产的载体和宿主体系, 所得本发明多肽可保留于重组细胞内、分泌至发酵培养基中、分泌至细胞膜间隙, 例如大肠杆菌的周质空间或保留于细胞或病毒膜的外表面。

[0128] 在预定的培养时间之后可进行重组多肽的回收。

[0129] 本文使用的短语“回收重组多肽”指收集包含该多肽的全部发酵培养基并不需包含附加的分离或纯化步骤。

[0130] 因此, 可使用多种标准蛋白纯化技术纯化本发明多肽, 例如但是不限于亲和层析法、离子交换色谱法、过滤、电泳、疏水作用色谱法、凝胶过滤色谱法、反相色谱法、刀豆球蛋白 A 色谱法、色谱聚焦法和分级增溶法。

[0131] 为了辅助回收, 可将被表达的编码序列设计成编码本发明多肽和融合的可裂解部分。可设计该融合蛋白这样可通过亲和色谱法容易地纯化该多肽; 例如, 通过将可裂解部分固定化至特异的柱子上。如果在该多肽和可裂解部分之间设计了裂解位点, 用可在该位

点特异裂解融合蛋白的适当的酶或试剂处理从色谱柱中释放该多肽 [例如, 参见 Booth 等, Immunol. Lett. 19 :65-70 (1988) 和 Gardella 等, J. Biol. Chem. 265 :15854-15859 (1990)]。

[0132] 生产本发明多肽后, 可生成可特异性识别该突变形式而不是天然形式的抗体。该类抗体可用于验证其表达。

[0133] 由于本发明多肽包含血管生成作用, 所以它们可用于治疗和缺血相关的疾病或病症。

[0134] 因此, 根据本发明的另一方面, 提供了治疗与缺血相关的疾病或病症的方法, 该方法包括给予需要治疗的受试者治疗有效量的可上调本发明多肽的药剂。

[0135] 如本文所使用, 术语“治疗”指减轻或减少与血管生成相关疾病相关的症状。优选地, 治疗可治愈, 例如基本消除与血管生成相关疾病相关的症状。

[0136] 如本文所使用, 术语“受试者”指任何 (例如, 哺乳动物) 受试者, 优选人类受试者。

[0137] 如本文所使用, 术语“低氧”指氧减少的状态。当肺功能降低或血流减少时会出现这一状态。

[0138] 如本文所使用, 术语“缺血”指血流减少, 其可由被血块 (血栓) 或任何外源循环物 (栓塞物) 阻塞的动脉或静脉引起, 或由血管病症例如动脉粥样硬化引起。或者, 当动脉并未阻塞但是目标组织对氧的需求相对于供给增加而引起缺血。血流减少可引起突然发作和持续时间短 (急性缺血) 或可引起缓慢发作并持续时间长或频繁复发 (慢性缺血)。急性缺血常常与局部、不可逆组织坏死 (梗塞) 相关, 而慢性缺血通常与瞬时低氧组织损伤相关。然而, 如果灌注减少延长或严重, 慢性缺血也可与梗塞相关。梗塞形成通常发生在脾、肾、肺、大脑和心脏, 产生病症例如肠梗塞、肺梗塞、缺血性发作和心肌梗塞。

[0139] 因此本发明明确预期可应用于治疗与任何缺血事件相关的医学病症的方法, 无论是急性、瞬时或慢性。急性缺血事件可包括与手术、器官移植、梗塞 (例如脑、肠、心肌、肺等)、外伤、创伤或损伤等相关者。与缺血相关的慢性事件包括高血压、糖尿病、闭塞性动脉病、慢性静脉功能不全、雷诺氏病、硬化、充血性心力衰竭、全身性硬化症等。

[0140] 与缺血相关的其它疾病或病症包括但不限于伤口愈合、胃肠损害、自身免疫疾病和神经变性病症。

[0141] 具体病症的实例包括但不限于伤口愈合、缺血性发作、缺血性心脏病、周围血管疾病、肾动脉疾病、胃肠损伤、烧伤、皮肤移植、血管移植、器官修复 (例如先体外后体内和体内)、骨修复病症、肝病、子宫病症、眼睛血管生成病症 (即视网膜剥离、年龄相关黄斑变性)、骨再生病症、软骨修复病症和平滑肌细胞病症。

[0142] 根据一个实施方案, 可上调本发明多肽的药剂为本发明的 HIF-1 α 多肽, 即生成该多肽并接着将其给予受试者。生成本发明分离多肽的方法描述于上文。

[0143] 因为优选在血管生成 (即增殖的内皮细胞) 部位提供本发明 HIF-1 α 多肽, 优选局部给予该多肽或包含靶向给药系统 (例如, 靶向脂质体)。

[0144] 将本发明 HIF-1 α 多肽靶向血管生成位点的尤其优选的方法为靶向基因疗法。

[0145] 本文使用的基因疗法指将感兴趣的遗传物质 (例如, DNA 或 RNA) 转移至宿主以治疗或预防遗传性或获得性疾病或病症或表型。感兴趣的遗传物质编码需要体内生产的产物 (例如, 蛋白质、多肽、肽、功能性 RNA、反义)。例如, 该感兴趣的遗传物质可编码具有治疗价

值的激素、受体、酶、多肽或肽。一般性综述可见课文“基因疗法”(高级药理学 40 (“Advanced in Pharmacology 40”), Academic Press, 1997)。

[0146] 已演化出两种基因疗法的基本方法:(1) 先体外后体内和 (2) 体内基因疗法。在先体外后体内基因疗法中,从患者移除细胞并在培养的时候进行体外处理。一般而言,通过适当的基因传递系统/方法(转染、转导、同源重组等)将功能性替代基因根据需要引入细胞和表达体系,然后扩增培养经修饰的细胞并返回至宿主/患者。这些基因再植细胞已显示可原位表达转染的遗传物质。这些细胞可为受试者的自体或非-自体细胞。由于非-自体细胞在给予人体时很可能引起免疫反应,所以研发了数种方法降低非-自体细胞排斥的可能性。这些包括或者抑制受体的免疫系统或在移植前将非-自体细胞包封在免疫隔离半透膜中。

[0147] 在体内基因疗法中,不是将靶细胞从受试者移除而是原位将需转移的遗传物质引入受体生物体的细胞中。在可选择的实施方案中,如果宿主基因是有缺陷的,原位修复该基因 (Culver, 1998. (Abstract) Antisense DNA&RNA based therapeutics, February 1998, Coronado, CA)。

[0148] 遗传学改变的细胞已显示可原位表达转染的遗传物质。

[0149] 为了达到特异性,用于表达本发明多肽的核酸构建体优选包含内皮细胞特异性启动子序列元件。该内皮特异性启动子元件可包括例如至少 SEQ ID NO:4 所列 PPE-1 启动子的一个拷贝。可被本发明核酸构建体利用的适当启动子/增强子的实例包括内皮特异性启动子:前内皮素原-1、PPE-1 启动子 (Harats D, J Clin Invest. 1995 Mar; 95(3): 1335-44)、PPE-1-3x 启动子 [PCT/IL01/01059; Varda-Bloom N, Gene Ther 2001 Jun; 8(11): 819-27]、TIE-1 (S79347, S79346) 和 TIE-2 (U53603) 启动子 [Sato TN, Proc Natl Acad Sci USA 1993 Oct 15; 90(20): 9355-8]、Endoglin 启动子 [Y11653; Rius C, Blood 1998 Dec 15; 92(12): 4677-90]、von Willebrand 因子 [AF152417; Collins CJ Proc Natl Acad Sci USA 1987 Jul; 84(13): 4393-7]、KDR/flk-1 启动子 [X89777, X89776; Ronicke V, Circ Res 1996 Aug; 79(2): 277-85]、FLT-1 启动子 [D64016 AJ224863; Morishita K, J Biol Chem 1995 Nov 17; 270(46): 27948-53]、Egr-1 启动子 [AJ245926; Sukhatme VP, Oncogene Res 1987 Sep-Oct; 1(4): 343-55]、E-selectin 启动子 [Y12462; Collins T J Biol Chem 1991 Feb 5; 266(4): 2466-73]、内皮黏附分子启动子: ICAM-1 [X84737; Horley KJ EMBO J 1989 Oct; 8(10): 2889-96]、VCAM-1 [M92431; Iademarco MF, J Biol Chem 1992 Aug 15; 267(23): 16323-9]、PECAM-1 [AJ313330 X96849; CD31, Newman PJ, Science 1990 Mar 9; 247(4947): 1219-22]、血管平滑肌特异性元件: CArG 盒 X53154 和主动脉羧肽酶样蛋白 (ACLP) 启动子 [AF332596; Layne MD, Circ Res. 2002; 90: 728-736] 以及主动脉优先表达基因-1 [Yen-Hsu Chen J. Biol. Chem., Vol. 276, Issue 50, 47658-47663, December 14, 2001]。其它适当的内皮特异性启动子为本领域已知,例如, EPCR 启动子 (Gu 等美国专利第 6200751 号) 和 VEGF 启动子 (Williams 等, 美国专利第 5916763 号)。

[0150] 优选地,本发明核酸构建体进一步包括低氧反应元件,例如 SEQ ID NO:5 所列序列的至少一个拷贝。因为 HIF-1 与该反应元件结合,在该反应元件调控下表达的 HIF-1 α 转基因应接着进一步活化该启动子,因此形成正反馈回路,增强了转录反应。

[0151] 体内和先体外后体内基因疗法中通过感染引入核酸比其它所列方法具有数种优

点。由于它们的高感染性可获得更高的效率。而且,病毒是非常专门化的,通常感染特异细胞类型并在其中增殖。因此,它们的天然特异性可用于靶向体内或组织中或混合细胞培养中的特异细胞类型。也可用特异受体或配体修饰病毒载体以通过受体介导事件改变靶标特异性。

[0152] 此外,重组病毒载体可用于体内表达需要的核酸因为它们可提供例如横向感染和靶向特异性的优点。横向感染是例如逆转录病毒生命周期固有的,是单个被感染细胞产生许多可出芽并感染邻近细胞的子代病毒粒子的过程。结果是大量被迅速感染,其中绝大多数不是被原始病毒颗粒初次感染。这与垂直型感染相反,其中感染剂仅通过子代传播。也可产生不能横向传播的病毒载体。如果期望目的是仅引入具体基因至集中数量的靶细胞这一特点是可用的。

[0153] 如上所述,病毒是非常特异性的感染剂,在许多情况下它们进化以逃避宿主的防御基质。通常病毒感染特异的细胞类型并在其中扩增。病毒载体的靶向特异性利用其天然的特异性以特异靶向预定的细胞类型并因此将重组基因引入被感染的细胞。用于本发明方法的载体将取决于期望靶向的细胞类型并为本领域技术人员已知。

[0154] 应理解的是虽然下文所示实施例所述的试验中应用了腺病毒,但是本领域普通技术人员可轻易将本发明构建体适应于其它病毒传递体系。

[0155] 可将逆转录载体构建成感染性颗粒或只进行单周期感染。在前一种情况下,修饰病毒的基因组这样它可保留所有的必要基因、调控序列和包装信号以合成新的病毒蛋白和RNA。一旦合成了这些分子,宿主细胞将RNA包装至新病毒颗粒中,其可再进行几轮感染。载体的基因组也可设计成编码和表达需要的重组基因。在非感染性病毒载体的情况下,常常突变该载体基因组以破坏将RNA包装入病毒颗粒所需的病毒包装信号。没有这一信号,任何形成的颗粒将不包含基因组,因此不能进行后继几轮感染。载体的特异类型取决于预期应用。实际载体为本领域已知并可轻易获得或可由本领域技术人员使用熟知的方法学构建。

[0156] 由于用条件复制腺病毒载体转导细胞在目标细胞溶解和病毒感染传播中更显著有效,所以该核酸构建体可包括条件复制腺病毒。

[0157] 包含内皮细胞特异性启动子的病毒载体也可与其它方法组合以增强病毒载体的靶向性。这些方法包括短肽配体和/或双特异性或双功能分子或双价抗体(Nettelbeck等,Molecular Therapy 3:882;2001)。

[0158] 本发明多肽和多核苷酸可以单独自身或作为药用组合物的一部分(当其与药学可接受的载体混合时)提供。

[0159] 如本文所使用“药用组合物”指一种或多种本文所述活性成分与其它化学组分例如生理适用的载体和辅料的制剂。药用组合物的目的为辅助将化合物给予生物体。

[0160] 本文中术语“活性成分”指多肽或多核苷酸制剂,其引起了生物效应。

[0161] 在下文中,短语“生理可接受的载体”和“药学可接受的载体”可交替使用,指不引起对生物体显著刺激并不会影响给予化合物的生物活性和性质的载体或稀释剂。佐剂包括于这些短语中。包括在药学可接受载体中的成分之一为例如聚乙二醇(PEG),一种在有机和含水介质中具有宽程溶解度的生物相容性聚合物(Mutter等,(1979)。

[0162] 本文中的术语“辅料”指加入药用组合物以辅助活性成分给药的惰性物质。辅料

的非限制性实例包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0163] 药物的配制和给药技术可参见 " Remington's Pharmaceutical Sciences, " Mack Publishing Co., Easton, PA, 最新版本, 以参考形式并入本文。

[0164] 适当的给药途径可包括例如口腔、直肠、经粘膜、经鼻、肠道或肠胃外给药, 包括肌肉内、皮下和髓内注射以及鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内或眼内注射。

[0165] 或者, 可以局部而不是系统方式给予该制剂, 例如通过将制剂直接注射至患者身体的特定区域。

[0166] 可以数种方法给予重组载体。例如如果使用包含内皮细胞特异性启动子的载体, 该方法可利用它们的靶向特异性并因此不必在患病位点局部给药。因此, 根据本发明的优选实施方案, 可系统给药该核酸构建体 (即静脉内或皮下)。如实施例 5 所示, 与内皮细胞特异性启动子相连的本发明多核苷酸的系统给药比与组成型活性启动子相连的相同多核苷酸的系统给药显示出更高的安全性曲线以及在患病位点可更有效地促进血管生成。

[0167] 将病毒载体注射入脊髓液也可作为一种给药方式, 尤其是在神经变性疾病中。注射后, 该病毒载体将循环直至识别具有适当靶向特异性的宿主细胞以进行感染。

[0168] 可通过本领域熟知的方法生产本发明的药用组合物, 例如通过常规的混合、溶解、制粒、制锭、研磨、乳化、装胶囊、包封或冻干方法。

[0169] 根据本发明的药用组合物可使用一种或多种包含辅料和助剂 (可辅助将活性成分加工成可药用的制剂) 的生理可接受载体以常规方法配制。适当的制剂取决于所选给药途径。

[0170] 对于注射剂而言, 本发明活性成分可配制成含水溶液, 优选在生理相容性缓冲液中, 例如 Hank's 液、Ringer's 液或生理盐水缓冲液。对于经粘膜给药, 在制剂中使用适于需渗透屏障的渗透剂。这些渗透剂为本领域已知。

[0171] 对于口服给药, 可通过将活性化合物与本领域熟知的药学可接受载体混合配制化合物。这些载体可使本发明化合物被配制用于患者口服的片剂、丸剂、锭剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、膏剂、混悬剂等。可使用固体辅料制备用于口服的药理制剂, 任选将所得混合物研磨, 在需要时加入适当的助剂之后处理颗粒混合物以获得药片或糖锭芯。适当的辅料尤其是填充剂例如糖包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇; 纤维素制剂例如玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、土豆淀粉、明胶、西黄蓍胶, 甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠; 和/或生理可接受的聚合物, 例如聚乙烯吡咯酮 (PVP)。如果需要的话可加入崩解剂, 例如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或褐藻酸或其盐例如海藻酸钠。

[0172] 可与适当的包衣一起提供糖锭芯。就这一目的而言, 可使用浓缩的糖溶液, 其可任选包含阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、聚羧乙烯凝胶、聚乙二醇、二氧化钛、漆溶液 (lacquer solutions) 和适当的有机溶剂或溶剂混合物。可在药片或糖锭包衣中加入染料或着色剂用于鉴别或特征化活性化合物剂量的不同组合。

[0173] 可以口服的药用组合物包括由明胶组成的拼装胶囊和由明胶和增塑剂例如甘油或山梨醇组成的软密封胶囊。拼装胶囊可包含与填充剂例如乳糖、粘合剂例如淀粉、润滑剂例如滑石或硬脂酸镁以及任选稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中, 活性成分可溶解或悬浮于适当的液体中, 例如脂肪油液体石蜡或液体聚乙二醇。此外, 可加入稳定剂。用于口服

给药的所有配方应为适合所选给药途径的剂量。

[0174] 对于口腔含化给药,该组合物可为以常规方法配制的片剂或锭剂的形式。

[0175] 对于鼻吸入给药,根据本发明使用的活性成分可适当地以来自加压包装或使用适当抛射剂的喷雾器的气雾剂形式给药,抛射剂例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷或二氧化碳。在加压气雾剂中,应提供可给予已测定量的测定剂量单位。用于配药器中的例如明胶的胶囊和药筒可配制成包含化合物和适当粉末基质例如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0176] 本文描述的制剂可配制用于肠胃外给药,例如通过单次注射或连续输注。用于注射的制剂可以例如安剂或任选加入了防腐剂的多剂量容器的形式提供单位剂量。该组合物可为混悬液、溶液或在油或水载体中的乳剂并可包含配制试剂例如混悬、稳定和 / 或分散剂。

[0177] 用于非肠胃给药的药用组合物包括水溶性形式的活性制剂的含水溶液。此外,活性成分的混悬液可制备成以适当的油或水为基质的注射混悬液。适当的亲脂溶剂或溶媒包括脂肪油例如芝麻油或合成脂肪酸酯例如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。含水注射混悬液可包含增强混悬液粘性的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。该混悬液也可任选包含适当的稳定剂或可增加活性成分溶解度以允许制备高度浓缩溶液的试剂。

[0178] 或者,该活性成分可为粉末形式以在使用之前用适当的溶媒溶解,例如以无菌、无热源水为基础的溶液。

[0179] 也可使用例如常规的栓剂基质例如可可脂或其它甘油酯将本发明制剂配制成直肠组合物例如栓剂或保留灌肠剂。

[0180] 适用于本发明背景的药用组合物包括其中包含可达到预期目的的有效量的活性成分的组合物。更具体而言,治疗有效量指可有效预防、减轻或缓解疾病症状或延长接受治疗的受试者的生命的活性成分的量。

[0181] 本领域技术人员可熟练确定治疗有效量。

[0182] 对于用于本发明方法的任何制剂,可从体外测定法中初步估算治疗有效量或剂量。例如,可在动物模型中测定剂量并且这一信息可用于更准确的测定人的可用剂量。

[0183] 可通过体内、细胞培养物内或试验动物内的标准药物操作测定本文所述活性成分的毒性和疗效。这些体内和细胞培养测定法和动物研究获得的数据可用于形成用于人的剂量范围。剂量可随着所用剂量和给药途径而变化。单个医生可考虑患者的情况选择精确的制剂、给药途径和剂量 [参见,例如, Fingl 等, (1975) " The Pharmacological Basis of Therapeutics " , Ch. 1 p. 1]。

[0184] 根据预治疗病症的严重性和反应性,可使用单剂量或多剂量给药,疗程可从数天至数周直至治疗显效或达到对疾病状态的降低。

[0185] 所给予组合物的量当然取决于被治疗的受试者、病痛的严重性、给药方式、处方医生的判断等。

[0186] 应理解的是本发明多肽和多核苷酸可与附加活性物质一起提供以达到与使用各试剂单独治疗相比更好的疗效。在这种治疗中应采取措施 (例如,互补试剂的给药和选择) 预防与联合疗法相关的副作用。

[0187] 也可制备包括配制于相容性药用载体中的本发明制剂的组合物,置于适当的容器

中并标注适应症的治疗。

[0188] 如需要的话,本发明组合物可提供于包装或配药装置中,例如 FDA 批准的试剂盒,其可包含一个或多个包含活性成分的剂型。包装可包含例如金属或塑料箔,例如泡罩包装。包装或配药装置可伴有给药说明。包装和配药器上也可有与该容器相关的,管理药物生产、使用或销售的政府机构规定的形式的通告,该通告可反应该机构批准组合物的形式或人或兽用给药。该通告例如可为由美国食品药品监督管理局批准的用于处方药的标签或为已批准产品的说明书。

[0189] 本领域普通技术人员在考察了以下实施例(不具有限制性)后显而易见本发明的其它对象、优点和新颖特点。此外,如上文所述以及下文权利要求部分所要求的本发明的各实施方案和方面可在以下实施例中找到试验依据。

实施例

[0190] 现参考以下实施例与上述说明书一起以非限制方式说明本发明。

[0191] 一般而言,本文使用的命名法和本发明使用的实验室操作包括分子、生物化学、微生物和重组 DNA 技术。这些技术已在文献中详细说明。例如,参见,"Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook 等,(1989); "Current Protocols in Molecular Biology" 第 I-III 卷 Ausubel, R. M., 编辑 (1994); Ausubel 等, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson 等, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren 等(编辑) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", 第 1-4 卷, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 美国专利号 4666828; 4683202; 4801531; 5192659 和 5272057 中所列方法; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", 第 I-III 卷 Cellis, J. E., 编辑 (1994); "Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique", Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), 第 3 版; "Current Protocols in Immunology" 第 I-III 卷 Coligan J. E., 编辑 (1994); Stites 等(编辑), "Basic and Clinical Immunology" (第 8 版, Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell 和 Shiigi(编辑), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); 可用的免疫测定法大量描述于专利和科学文献中, 参见, 例如美国专利号 3791932; 3839153; 3850752; 3850578; 3853987; 3867517; 3879262; 3901654; 3935074; 3984533; 3996345; 4034074; 4098876; 4879219; 5011771 和 5281521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., 编辑 (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. 和 Higgins S. J. 编辑.(1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. 和 Higgins S. J. 编辑.(1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I. 编辑 (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) 和 "Methods in Enzymology" 第 1-317 卷, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak 等, "Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); 均以参考形式并

于本文如其全文列于本文一样。本文件中提供了其它普通参考文献。其中的操作为本领域熟知并提供以方便读者。其中包含的所有信息均以参考形式并于本文。

[0192] 实施例 1

[0193] 三突变体 HIF-1 α 比 P402A P564G 和 P564A N803A 双突变体显示更强的转录活性

[0194] HIF-1 α 的点突变 P402A 和 P564G 之前显示可消除其与肿瘤抑制基因 VHL 之间的相互作用,因此防止了其后续的蛋白体降解。这得到在常氧状态被稳定化的 HIF-1 α ,达到与低氧状态可比的活性水平。相似地,具有点突变 P564A N803A 的 HIF-1 α 显示在常氧下与用低氧模拟铁螯合剂 2,2' - 联吡啶处理后野生型 HIF-1 α 具有一样的活性。本发明假定所有三种突变体的组合可能得到突变的 HIF-1 α ,命名为“三突变体”,其比 P402A P564G 突变体的活性更强并且比 P564A N803A 突变体更稳定,因此对治疗性血管生成目的更有效。

[0195] 材料和方法

[0196] 细胞培养:使用以下细胞系:牛主动脉内皮细胞(BAECs)由 N. Savion(Goldschleger Eye Institute, Sheba Medical Center)惠赠。人胚肾细胞(HEK293 细胞)购自美国典型菌种保藏中心(Rockville, Maryland, USA)。使用 293 细胞的 20-26 传代。HeLa 细胞由 Y. Keisary(Tel Aviv University)惠赠。如前所述[Jaffe, E. A. 等, J Clin Invest 52, 2745-56 (1973)]制备人脐静脉 ECs(HUVECs)。肾细胞癌(RCC)细胞由 G. Lavi. (Angiogenesis Institute, Sheba Medical Center)惠赠。在添加了 10% FCS、2mM 谷氨酰胺和 100U/ml 青霉素/链霉素的 DMEM 中培养 BAEC、HEK293 细胞和 RCC。在添加了 10% FCS 和 100U/ml 青霉素/链霉素的 MEN 中培养 HeLa 细胞。HUVECs 在 EGM-2 和 2% FCS 中生长(Clontec, San-Diego, California, USA)。所有细胞于 37°C 5% CO₂- 加湿培养箱中生长。

[0197] 表达构建体:野生型 HIF-1 α 和 pEE-bos 质粒中的 P564A N803A HIF-1 α 突变体由 M. Whitelaw(Adelaide University)惠赠。pcDNA3 质粒中的 P402A P564G HIF-1 α 突变体由 P.J. Ratcliffe(Oxford University)惠赠。pCR3. 1-HA-FIH-1 反义质粒由 G. Semenza(Johns Hopkins University)惠赠。p2.1 HRE- 荧光素酶购自美国典型菌种保藏中心(Rockville, Maryland, USA)并描述于前文[Mahon, P. C. 等, Genes Dev 15, 2675-86 (2001)]。

[0198] 质粒 SV40- β -gal 购自 Promega(Madison WI, USA)。将 P564A N803A HIF-1 α 突变体的 Bsu26I/NotI 消化片段插入经 Bsu26I/NotI 消化的 P564G HIF-1 α 载体构建三突变 HIF-1 α 。由 DNA 测序验证质粒的完整性。对于转染试验,将野生型和突变体 HIF-1 α cDNAs 亚克隆至 pcDNA3 载体(Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA)。

[0199] 瞬时转染试验:用 200ng p2.1 HRE- 荧光素酶、100ng pSV40- β -gal 和 100ng pcDNA3 空质粒、野生型 HIF-1 α 、P402A P564G、P564A N803A 或三突变体之一使用 Lipofectamine Plus 试剂(Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA)根据使用说明在 24- 孔板中共转染 HEK293、BAEC 和 RCC 细胞,一式三份。在 FIH-1 反义试验中,使用 Lipofectamine Plus 试剂用 100ng p2.1 HRE- 荧光素酶、100ng pSV40- β -gal 和 100ng pcDNA3 空质粒、野生型 HIF-1 α 、P402A P564G、P564A N803A 或三突变体之一以及 0-400ng pcDNA3-HA-FIH-1 反义或 pcDNA3 进行转染,一式三份。48 小时后用 β -gal 测定法系统(Promega, Madison WI, USA)根据使用说明测定荧光素酶和 β -gal 活性。接着使用 Turner Luminometer model 20e(Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA)测量荧光素酶。用 β -gal

水平对荧光素酶活性结果进行转染效率方面的标准化。对于 HeLa 细胞中的 RT-PCR 试验, 使用 Lipofectamine Plus 试剂在 24-孔板中用 300ng 各种质粒进行转染。根据使用说明使用 Polymag (Chemicell, GmbH, Berlin, Germany) 进行质粒磁转染生长于 60mm 平皿中的 HUVEC。当指明时, 在细胞裂解前 16 小时用 150 μ M 2,2'-联吡啶处理。

[0200] 荧光素酶和 β -半乳糖苷酶测定法: 根据使用说明使用 β -gal 测定法体系 (Promega, Madison WI, USA) 测定荧光素酶和 β -gal 活性。用 β -gal 水平对荧光素酶活性进行转染效率方面的标准化。

[0201] RT-PCR 测定法: 转染后 48 小时, 裂解细胞并根据操作方案用 RNeasy 小量制备试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 分离总 RNA。使用 FastStart PCR Master 试剂盒 (Roche, Mannheim, Germany) 逆转录 RNA 至 cDNA。对以下基因进行半定量 RT-PCR: HIF-1 α 、GAPDH、VEGF、碳酸酐酶 9 (CA-9) 和 PDGF-B。引物、退火温度和循环数见表 3。

[0202] 表 3

[0203]

基因	引物和 SEQ ID NOs	退火温度 (°C)	循环 数
HIF-1 α	正 向 :GTCGGACAGCCTCACCAAACAGAG SEQ ID NO: 6	60	24

[0204]

	反向: GTTAACTTGATCCAAAGCTCTGAG SEQ ID NO: 7		
CA-9	正向: CACGTGGTTCACCTCAGCAC SEQ ID NO: 8 反向: CAGCGATTTCTTCCAAGCG SEQ ID NO: 9	60	30
VEGF	正向: CAGCGCAGCTACTGCCATCCAATCGAGA SEQ ID NO: 10 反向: GCTTGTCACATCTGCAAGTACGTTTCGTTTA SEQ ID NO: 11	59	34
PDGF-B	正向: ATCGCCGAGTGCAAGACGCG SEQ ID NO: 12 反向: AAGCACCATTGGCCGTCCGA SEQ ID NO: 13	60	34
GAPDH	正向: ACCACAGTCCATGCCATCAC SEQ ID NO: 14 反向: TCCACCACCCTGTTGCTGTA SEQ ID NO: 15	60	24

[0205] 结论

[0206] 在人胚肾 293 (HEK293) 和牛主动脉内皮细胞 (BAEC) 二者中, 与 P402A P564G 和 P564A N803A 双突变体相比瞬时转染的三突变体 HIF-1 α 在常氧下显示出转录活性增加了 2-2.5 倍 (图 1A-B)。

[0207] 该三突变体也可引起 HIF-1 α 靶基因更多的 mRNA 诱导。因此, 用不同突变体瞬时转染 HeLa 细胞后进行 mRNA 提取和 RT-PCR 分析。如图 1C 所示, 所有经 HIF-1 α 构建体转染的细胞中的 HIF-1 α 的 mRNA 具有可比性并远高于空质粒对照, 如转染后预期。与之前结果相一致, 三突变体 HIF-1 α 比双突变体和野生型 HIF-1 α 可引起更多的 HIF-1 α 靶基因碳酸酐酶 9 (CA-9)、VEGF 和 PDGF-B 的 mRNA 诱导。由于其暴露于脯氨酰羟化化作用的 P402 残基, 理论上仍可发生 VHL 介导的 P564A N803A 突变体的蛋白降解。为了证明所观察到的三突变体和 P564A N803A 突变体之间的转录诱导的差异是由 VHL- 介导降解引起, 使用 VHL- 缺陷肾细胞癌 (RCC) 细胞系。在常氧下在 RCC 中 HIF-1 α 突变体瞬时转染后对 HRE- 介导的荧光素酶转录显示野生型 HIF-1 α 的活性增加至稳定化 P402A P564G 突变体的水平, 表明蛋白体降解的抑制 (图 1D)。如预期, 观察到 P564A N803A 突变体的活性增加至三突变体的

水平。

[0208] 虽然 P402A P5645G 突变体被稳定化,但是其理论上仍可被 FIH-1 在残基 N803 羟基化,导致其失活,这是所观察到的它与三突变体之间转录差异的最可能的解释。HEK293 中反义敲除处理对 FIH-1 的抑制引起常氧下野生型 HIF-1 α 对 HRE- 介导转录的剂量-依赖型增加(图 1E)。如预期,FIH-1 抑制引起 P402A P564G 突变体比三突变体更大的活性成倍降低,表明 FIH-1 确实与之前观察到的三突变体的更高活性有部分关系。

[0209] 实施例 2

[0210] C- 转活结构域活化对最佳 HIF-1 α - 介导的血管生成是必要的

[0211] 为了评价三突变体增加的转录能力对治疗性血管生成的意义,在 HIF-1 α 构建体转染后使用体外血管生成测定法在人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 中进行不同突变体的比较。

[0212] 材料和方法

[0213] 体外血管生成测定法:将生长于 60mm 培养皿的经转染或感染的 HUVECs 在 EGM-2 培养基中维持 24 小时然后用 EBM-2 进行培养基替换。在测定前将细胞在 EBM-2 中继续保持 24 小时。然后细胞受胰蛋白酶作用并以 50000 细胞/孔接种至预涂渍了生长因子减少的基质胶 (BD Biosciences, USA) 的 24 孔板中。监控 8 小时的毛细管和管形成。通过计数 5 个随机显微镜视野下各高倍显微镜视野的毛细管分枝的数量进行毛细管形成定量。

[0214] VEGF ELISA:将生长于 60mm 培养皿的经转染或感染的 HUVECs 在 EGM-2 培养基中维持 24 小时然后用 EBM-2 进行培养基替换。在加入裂解缓冲液 (PBS 中 20mM Tris, pH 7.5, 1% Triton 和完全性微小 (mini) 蛋白酶抑制剂混合物片, Roche Diagnostics, GmbH, Germany) 之前将细胞在 EBM-2 中继续保持 24 小时。于 10000rpm 离心细胞裂解物 15 分钟。根据操作方案 (R&D Systems) 进行人 VEGF 蛋白的 ELISA。

[0215] 蛋白印迹分析:在 60mm 培养皿中培养 HUVECs 并生长至亚汇合。如上所述用 Ad-PPE- 三突变体、Ad-CMV- 三突变体、Ad-CMV-wt 或 Ad-CMV-GFP 感染细胞。裂解和评价蛋白含量 (Micro BCA; Pierce Biotechnology Inc., Rockford, Illinois, USA) 之后,用 SDS-PAGE 分离包含等量蛋白的样品并转移至 Optitran BA-S83 强化的硝酸纤维素膜上 (Schleicher&Schuell BioScience Inc., Keene, New Hampshire, USA)。用鼠抗-人 HIF-1 α 多克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA) 探测该膜,然后用 HRP- 结合二抗探测并进行 ECL 反应。

[0216] 结论

[0217] 虽然空质粒载体未引起管形成,但是所有 HIF-1 α 构建体、VEGF 和 FCS 阳性对照均刺激血管生成(图 2A-F)。野生型 HIF-1 α 和 P402A P564G 刺激管形成的程度相似但是二者与 P564A N803A 和三突变体相比血管生成作用显著降低 ($p < 0.001$) (图 2G)。与这些发现一致,用 wt-HIF1 α 或 P402A P564G 处理后 HUVECs 中的 VEGF 蛋白浓度非常相似并显著低于用 P564A N803A 或三突变体处理 ($p = 0.029$) (图 2H)。与 wt-HIF1 α 和 P402A P564G (图 2H) 相比,用 P564A N803A 或三突变体处理分别引起 VEGF 蛋白增加 6- 倍和 10- 倍。这些结果表明 HIF-1 α 稳定性不足,组成型活性的 C-TAD 对 HIF-1 α 的最大血管生成作用是必须的。P564A N803A 和三突变体之间未观察到差异。这可能是由于高 HIF-1 α 过表达饱和了羟化酶,因此掩盖了由稳定性引起的任何差异,与图 1D 中 RCC 中发现的状况相似。

[0218] 实施例 3

[0219] PPE-1-3x 启动子在缺血中的表达和特异性

[0220] 全身促血管新生基因疗法的可行性和安全性的前提条件是在目标缺血组织中的充分强效和特异表达。为了对经修饰的 PPE-1 启动子在缺血条件下的表达和特异性进行表征,使用在 PPE-1-3x 调控下表达 GFP 的腺病毒 (Ad-PPE-1-3x-GFP)。

[0221] 材料和方法

[0222] 腺病毒载体的构建:用 Vector Biolabs (Philadelphia, USA) 通过同源重组生成 Ad-PPE- 三突变体、Ad-CMV- 三突变体和 Ad-CMV-wt 载体。PCR 验证病毒构建体的成功产生,然后进行两轮空斑纯化。然后在 HEK293 中进行大规模的病毒空斑扩增,接着进行 CsCl 纯化。

[0223] 动物:使用 12 周大的雌性 C57BL/6J 小鼠 (Harlan Laboratories Ltd., Jerusalem, Israel)。所有动物操作均得到 Sheba 医学中心动物管理和使用委员会 (Animal Care and Use Committee of Sheba Medical Center) 的批准。

[0224] 后肢缺血模型和腺病毒注射液:使用氯胺酮和甲苯噻嗪混合物将 12 周大的 C57BL/6J 雌性小鼠麻醉。对 Couffinhal 等¹⁵所述方法进行修改并用于使这些小鼠后肢缺血。切开覆盖左股动脉的皮肤,接着将深层和浅表股动脉的分叉附近以及腘动脉附近的股动脉结扎。去除结扎线之间的动脉部分并切除所有分枝。对于局部肌肉内注射,于手术时在三个位点(股四头肌、内收肌和腓肠肌)注射 20 μ l 的 2×10^{10} VP 或生理盐水。对于系统静脉内注射,在手术后 7 天经尾静脉注射 100 μ l 的 1×10^{11} VP 或生理盐水。

[0225] GFP 分析:病毒注射后 7 天将小鼠处死并收集腓肠肌组织,于含 4%多聚甲醛的 0.1M 磷酸盐缓冲液中于 4℃固定 24 小时,在 30%蔗糖溶液中 4℃浸渍 48 小时然后冷冻于 OCT 化合物 (OCT compound) (Sakura, CA, USA)。用低温切片机将组织块切割成 5 μ m 厚的横切面并在荧光显微镜 (FITC 滤过器) 下直接观察。所有组织处理均在暗光下进行以防止 GFP 漂白。

[0226] 结果

[0227] 通过结扎股动脉使小鼠后肢缺血或进行假操作,然后肌肉内注射 Ad-PPE-1-3x-GFP。给对照动物注射 Ad-CMV-GFP 或生理盐水。在缺血和非缺血肌肉的肌肉细胞和内皮细胞的肌肉组织切片中检测到 Ad-CMV-GFP 注射后的 GFP 表达。相反,在缺血肌肉的内皮细胞中检测到注射 Ad-PPE-1-3x-GFP 后的 GFP 表达而未在非缺血组织中检测到表达。这些结果表明经修饰的 PPE-1 启动子对内皮组织和缺血状态的特异性。

[0228] 静脉内给予 Ad-PPE-1-3x-GFP 以测定该启动子是否也可引起静脉系统注射后的表达,其中病毒散布在体内并仅有一小部分到达靶器官。为了这一目的,手术后 7 天后肢缺血或进行假操作的小鼠尾静脉注射 Ad-PPE-1-3x-GFP 和 Ad-CMV-GFP 或生理盐水作为对照。因为股动脉结扎后缺血后肢的血流立即降低至小于正常后肢的 10%并且于我们的模型中几乎为零,因此在注射前有 7 天的间隔,目的在于使进行充分的血管化作用,因此使得病毒可到达缺血靶标。如图 3A-F 所示,系统注射 Ad-CMV-GFP 之后在缺血和非缺血肌肉的组织切片中检测到 GFP 的非特异性表达(图 3B 和 3E),注射 Ad-PPE-1-3x-GFP(图 3C 和 3F)之后仅在缺血肌肉的内皮细胞中检测到 GFP 的特异性表达。

[0229] 实施例 4

[0230] 局部注射 Ad-PPE- 三突变体 HIF-1a 可增强缺血的新生血管形成

[0231] 进行以下试验以测定在 PPE-1-3x 启动子表达下用腺病毒 - 介导的三突变体 HIF-1 α 进行肌肉内处理是否可促进体内血管生成。

[0232] 材料和方法

[0233] 监控后肢血流：将小鼠麻醉并于 37℃ 加热板上放置 5 分钟以最小化温度差异。在手术后即刻和术后 7、14、21 和 28 天用激光多普勒灌注影像系统 (Moor Instruments Ltd., UK) 测量后肢血流。蓝色表示低和 / 或无灌注信号, 而红色表示最高灌注信号。记录彩色照片并通过计算缺血和非缺血后肢的平均灌注进行分析。为了考虑例如环境光照和温度这样的变量, 结果以左肢 (缺血) 与右肢 (非缺血) 灌注的比值表示。

[0234] 免疫组织化学和毛细血管密度的定量：在第 28 天处死时, 切断后肢肌肉组织, 冷冻于 Tissue-Tek OCT 化合物 (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, California, USA) 并横向冷冻切片。使用鼠单克隆抗 -CD31 抗体 (Pharmingen, San Diego, California, USA) 免疫染色 ECs, 背景用苏木精染色。

[0235] 结果

[0236] 肌肉内注射 Ad-PPE-1-3x- 三突变体、Ad-CMV- 三突变体或 Ad-CMV-wt 后诱导后肢缺血。对照动物注射 Ad-CMV-Luc 或生理盐水。在 28 天的时间内检查临床结果和血管生成指数。手术后即刻缺血肢的血流立即降至小于所有小鼠组正常肢的 10%。在第 21 天, Ad-CMV- 三突变体或 Ad-PPE-1-3x- 三突变体处理的小鼠相对于 Ad-CMV-wt, Ad-CMV-Luc 或生理盐水对照组显示出后肢血流的显著增加 (图 4A)。第 28 天 Ad-CMV- 三突变体和 Ad-PPE-1-3x- 三突变体均将缺血后肢的灌注提高至约正常肢的 50%, 显著多于 Ad-CMV-wt 或对照处理 (图 4A-B)。此外, Ad-CMV- 三突变体或 Ad-PPE- 三突变体处理可从根本上降低缺血 - 诱导型趾坏死和自离断, 这在用 Ad-CMV-wt 或对照处理的小鼠中显著, 与缺血肢血流提高一致 (图 4C-D)。与血流结果一致, CD31 染色后肌肉毛细血管密度定量显示用 Ad-CMV- 三突变体和 Ad-PPE-1-3x- 三突变体处理的动物中毛细血管与肌肉纤维的比值高于 Ad-CMV-wt 和对照处理的动物 (图 4E 和 4F)。

[0237] 实施例 5

[0238] 与 Ad-CMV- 三突变体相比系统给药 Ad-PPE-1-3x- 三突变体更安全并 无副作用

[0239] 进行以下试验以比较系统给药 Ad-PPE-1-3x- 三突变体与 Ad-CMV- 三突变体两者的安全曲线。与局部肌肉内注射 (绝大部分的腺病毒聚集在注射部位) 相反, 经尾静脉静脉内给药后绝大多数的腺病毒到达并转导肝。因此, 就治疗的安全性而言, 监控肝功能的变化和小鼠中发生的其它全身表现尤其重要。

[0240] 材料和方法

[0241] 血清胆红素、AST 和 ALT 的测量：在注射后第 5 天和 21 天获得小鼠血清并使用自动分析仪进行分析。

[0242] 免疫组织化学和毛细血管密度的定量：如实施例 4 所述。

[0243] 后肢血流的监控：如实施例 4 所述。

[0244] 统计方法：用 SigmaStat (SPSS Science, Chicago, Illinois, USA) 进行统计分析。在体外研究中进行重复量数单因子变异数分析 (One-way repeated-measures ANOVA), 对后肢缺血模型使用斯氏 t 检验; p 小于 0.05 认为具有显著性。数据以平均值 $\pm$ SEM 表示并用 SigmaPlot 或 Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) 作图。

[0245] 结果

[0246] 手术后 7 天向后肢缺血模型小鼠经尾静脉全身性注射 Ad-PPE-1-3x- 三突变体、Ad-CMV- 三突变体和 Ad-CMV-wt, 同时以 Ad-CMV-Luc 和生理盐水为对照。注射后的第 1 天, 除生理盐水处理动物外, 所有小鼠组的体重显著减少。虽然其它腺病毒处理小鼠在注射后第 3 天恢复了原先的体重, 但是 Ad-CMV- 三突变体处理组小鼠的体重继续降低并在第 4 天达到峰值减少了 10%, 表明有系统疾病 (图 5A)。注射后第 5 天检查小鼠肝功能发现 Ad-CMV- 三突变体处理小鼠的血清胆红素是生理盐水对照组的 25 倍, 表明有严重的黄疸。Ad-CMV-wt 导致血清胆红素轻微升高 (图 5C)。此外, 在第 5 天 Ad-CMV- 三突变体、Ad-CMV-wt 和 Ad-CMV-Luc 处理小鼠的血清 AST 和 ALT 水平显著升高 (图 5B 和 5D)。与 Ad-CMV- 三突变体处理小鼠表现出的肝病的明显系统表现相反, Ad-PPE- 三突变体处理小鼠未显示疾病体征, 而且它们的血清胆红素、AST 和 ALT 水平与生理盐水处理小鼠相当。与这些发现一致, 第 5 天处死的 Ad-CMV- 三突变体处理小鼠的肝组织切片显示显著的炎症和淋巴细胞浸润, 而 Ad-PPE-1-3x- 三突变体、Ad-CMV-Luc 和生理盐水对照组未显示病症 (图 5E-N)。在 Ad-CMV-wt 处理组也发现了轻微的淋巴细胞浸润。在此肝病的急性期之后, Ad-CMV- 三突变体处理小鼠显示出逐渐部分恢复。它们恢复了体重, 并在注射后第 28 天它们的血清胆红素恢复正常。但是, 与 Ad-PPE-1-3x- 三突变体和生理盐水对照处理小鼠相比, 它们的血清 AST 和 ALT 仍有升高, 而与 Ad-CMV-wt 和 Ad-CMV-Luc 组相似。在注射后第 21 天的肝组织切片中也观察到这种部分肝恢复 (图 5E-N), 显示 Ad-CMV- 三突变体处理动物中轻微的残留淋巴细胞浸润。

[0247] 在治疗后, 与 Ad-CMV- 三突变体和其它所有治疗组相比, 在手术后第 21 天首次发现 Ad-PPE- 三突变体处理小鼠显示缺血后肢血液灌流有显著更大的提高, 并在手术后第 28 天达到约正常肢灌流 45%, 相比之下 Ad-CMV- 三突变体组为 30% (图 6A-B)。缺血后肢的临床结果与血流增加一致, 表明与所有其它组相比 Ad-PPE- 三突变体小鼠中的趾坏死和自断离显著减少 (图 6C-D)。此外, CD31 染色后的肌肉毛细血管密度定量显示用 Ad-PPE-1-3x- 三突变体处理的动物中毛细血管与肌肉纤维的比值高于 Ad-CMV- 三突变体和其它所有组 (图 6E-F)。

[0248] 应理解的是为清楚起见本文中以单独实施方案描述的一些特点也可在单个的实施方案中组合在一起提供。相反, 本文中为简略起见所述单个实施方案的各种特点也可单独或以任何适当的亚组合提供。

[0249] 虽然已结合其特定实施方案一起描述本发明, 但明显的是许多选择、修改和变体对本领域技术人员而言是显而易见的。因此, 本文预期涵盖这些属于附加权利要求的精神和范围内的选择、修改和变体。本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请以其全文作为参考并于本文, 如同各单独出版物、专利或专利申请具体和单独指明并于本文作为参考。此外, 本专利中的引文或任何参考文献不应理解为承认该参考文献可作为本发明的现有技术。

[0001]

<110> 脉管生物生长有限公司

<120> 多肽和其编码多聚核苷酸及它们在治疗缺血相关医学病症中的应用

<130> 45501

<160> 15

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2481

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 三突变体 HIF-1a 编码序列

<400> 1

atggagggcg cggcggcgc gaacgacaag aaaaagataa gttctgaacg tcgaaaagaa	60
aagtctcgag atgcagccag atctcggcga agtaaagaat ctgaagtttt ttatgagett	120
gtcatcagt tgcacattcc acataatgtg agttcgcatc ttgataaggc ctctgtgatg	180
agccttacca tcagctattt gcgtgtgagg aaacttctgg atgctggtga ttggatatt	240
gaagatgaca tgaaagcaca gatgaattgc ttttatttga aagccttgga tggttttgtt	300
atggtttctc cagatgatgg tgacatgatt tacatttctg ataatgtgaa caaatacatg	360
ggattaaact agtttgaact aactggacac agtgtgtttg attttactca tccatgtgac	420
catgaggaaa tgagagaaat gcttacacac agaaatggcc ttgtgaaaaa gggtaaagaa	480
caaaacacac agcgaagctt ttttctcaga atgaagtgtc ccctaactag ccgaggaaga	540
actatgaaca taaagtctgc aacatggaag gtattgcact gcacaggeca cattcacgta	600
tatgatacca acagtaacca acctcagtgt ggggtataaga aaccacctat gacctgett	660
gtgctgattt gtgaacccat tctcaccaca tcaaatattg aaattccttt agatagcaag	720
actttcctca gtgcacacag cctggatatg aaattttctt attgtgatga aagaattacc	780
gaattgatgg gatatgagcc agaagaactt ttaggcgcgt caatttatga atattatcat	840
gctttggact ctgatcatct gacaaaaact catcatgata tgtttactaa aggacaagtc	900
accacaggac agtacaggat gcttgccaaa agagggtgat atgtctgggt tgaaactcaa	960

[0002]

gcaactgtca tatataacac caagaattct caaccacagt gcattgtatg tgtgaattac	1020
gttgtgagtg gtattattca gcacgacttg attttctccc ttcaacaaac agaatgtgtc	1080
cttaaaccgg ttgaatcttc agatatgaaa atgactcage tattcaccaa agttgaatca	1140
gaagatacaa gtagcctctt tgacaaactt aagaaggaac ctgatgettt aactttgtctg	1200
gcegcagccg ctggagacac aatcatactt ttagattttg gcagcaacga cacagaaact	1260
gatgaccagc aactigagga agtaccatta tataatgatg taatgctccc ctcacccaac	1320
gaaaaattac agaataataa ttiggcaatg tctccattac ccaccgtga aacgccaaag	1380
ccacttogaa gtagtgotga ccctgcactc aatcaagaag ttgcattaaa attagaacca	1440
aateccagagt cactggaact ttcttttacc atgccccaga ttcaggatca gacacctagt	1500
ccctccgatg gaagcactag acaaagttca cctgagccta atagtcccag tgaatattgt	1560
ttttatgtgg atagtgatat ggtcaatgaa ttcaagttgg aattggtaga aaaacttttt	1620
gtgaagaca cagaagcaaa gaaccctttt tctactcagg acacagattt agacttggag	1680
atgtagctg gctatctccc aatggatgat gacttccagt tacgttcttt cgatecgttg	1740
tcaccattag aaagcagttc cgcaagccct gaaagegcaa gtcctcaaag cacagttaca	1800
gtattccage agactcaaat acaagaacct actgetaatg ccaccactac caetgccacc	1860
actgaatgat taaaaacagt gacaaaagac cgtatggaag acattaaaat attgattgca	1920
tctccatctc ctaccacat acataaagaa actactagtg ccacatcatc accatataga	1980
gatactcaaa gtgggacagc ctcaccaaac agagcaggaa aaggagtcac agaacagaca	2040
gaaaaatctc atccaagaag ccctaactg ttatctgtcg ctttgagtca aagaactaca	2100
gttcctgagg aagaactaaa tccaaagata ctagctttgc agaattgtca gagaaagcga	2160
aaaatggaac atgatggttc actttttcaa gcagtaggaa ttggaacatt attacagcag	2220
ccagacgate atgcagctac tacatcactt tcttggaaac gtgtaaaagg atgcaaactc	2280
agtgaacaga atggaatgga gcaaaagaca attattttaa taccctctga tttagcatgt	2340
agactgotgg ggcaatcaat ggatgaaagt ggattaccac agctgaccag ttatgattgt	2400
gaagttgtg ctccatatac aggcagcaga aacctactgc aggttgaaga attactcaga	2460
gctttggatc aagttaactg a	2481

[0003]

<210> 2
<211> 826
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 三突变体 HIF-1a

<400> 2

Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
1 5 10 15

Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
20 25 30

Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
35 40 45

Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
50 55 60

Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
65 70 75 80

Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
85 90 95

Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile
100 105 110

Ser Asp Asn Val Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr
115 120 125

Gly His Ser Val Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met
130 135 140

Arg Glu Met Leu Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu
145 150 155 160

Gln Asn Thr Gln Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr
165 170 175

[0004]

Ser	Arg	Gly	Arg	Thr	Met	Asn	Ile	Lys	Ser	Ala	Thr	Trp	Lys	Val	Leu
			180					185					190		
His	Cys	Thr	Gly	His	Ile	His	Val	Tyr	Asp	Thr	Asn	Ser	Asn	Gln	Pro
			195					200					205		
Gln	Cys	Gly	Tyr	Lys	Lys	Pro	Pro	Met	Thr	Cys	Leu	Val	Leu	Ile	Cys
			210					215					220		
Glu	Pro	Ile	Pro	His	Pro	Ser	Asn	Ile	Glu	Ile	Pro	Leu	Asp	Ser	Lys
225							230				235				240
Thr	Phe	Leu	Ser	Arg	His	Ser	Leu	Asp	Met	Lys	Phe	Ser	Tyr	Cys	Asp
							245				250				255
Glu	Arg	Ile	Thr	Glu	Leu	Met	Gly	Tyr	Glu	Pro	Glu	Glu	Leu	Leu	Gly
							260								270
Arg	Ser	Ile	Tyr	Glu	Tyr	Tyr	His	Ala	Leu	Asp	Ser	Asp	His	Leu	Thr
							275								285
Lys	Thr	His	His	Asp	Met	Phe	Thr	Lys	Gly	Gln	Val	Thr	Thr	Gly	Gln
							290								300
Tyr	Arg	Met	Leu	Ala	Lys	Arg	Gly	Gly	Tyr	Val	Trp	Val	Glu	Thr	Gln
305															320
Ala	Thr	Val	Ile	Tyr	Asn	Thr	Lys	Asn	Ser	Gln	Pro	Gln	Cys	Ile	Val
															335
Cys	Val	Asn	Tyr	Val	Val	Ser	Gly	Ile	Ile	Gln	His	Asp	Leu	Ile	Phe
															350
Ser	Leu	Gln	Gln	Thr	Glu	Cys	Val	Leu	Lys	Pro	Val	Glu	Ser	Ser	Asp
															365
Met	Lys	Met	Thr	Gln	Leu	Phe	Thr	Lys	Val	Glu	Ser	Glu	Asp	Thr	Ser
															380
Ser	Leu	Phe	Asp	Lys	Leu	Lys	Lys	Glu	Pro	Asp	Ala	Leu	Thr	Leu	Leu
385															400

[0005]

Ala Ala Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn		
405	410	415
Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn		
420	425	430
Asp Val Met Leu Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu		
435	440	445
Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser		
450	455	460
Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro		
465	470	475 480
Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp		
485	490	495
Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu		
500	505	510
Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val		
515	520	525
Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr		
530	535	540
Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu		
545	550	555 560
Met Leu Ala Gly Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser		
565	570	575
Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser		
580	585	590
Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln		
595	600	605

[0006]

Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu 610	615	620
Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala 625	630	635 640
Ser Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser Ala Thr Ser 645	650	655
Ser Pro Tyr Arg Asp Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro Asn Arg Ala 660	665	670
Gly Lys Gly Val Ile Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro Arg Ser Pro 675	680	685
Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val Pro Glu Glu 690	695	700
Glu Leu Asn Pro Lys Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln Arg Lys Arg 705	710	715 720
Lys Met Glu His Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly Ile Gly Thr 725	730	735
Leu Leu Gln Gln Pro Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Trp 740	745	750
Lys Arg Val Lys Gly Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly Met Glu Gln 755	760	765
Lys Thr Ile Ile Leu Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly 770	775	780
Gln Ser Met Asp Glu Ser Gly Leu Pro Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Cys 785	790	795 800
Glu Val Ala Ala Pro Ile Gln Gly Ser Arg Asn Leu Leu Gln Gly Glu 805	810	815
Glu Leu Leu Arg Ala Leu Asp Gln Val Asn 820	825	

[0007]

<210> 3
 <211> 826
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

 <400> 3

 Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
 1 5 10 15

 Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
 20 25 30

 Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
 35 40 45

 Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
 50 55 60

 Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
 65 70 75 80

 Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
 85 90 95

 Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile
 100 105 110

 Ser Asp Asn Val Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr
 115 120 125

 Gly His Ser Val Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met
 130 135 140

 Arg Glu Met Leu Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu
 145 150 155 160

 Gln Asn Thr Gln Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr
 165 170 175

 Ser Arg Gly Arg Thr Met Asn Ile Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val Leu

[0008]

180	185	190
His Cys Thr Gly His Ile His Val Tyr Asp Thr Asn Ser Asn Gln Pro		
195	200	205
Gln Cys Gly Tyr Lys Lys Pro Pro Met Thr Cys Leu Val Leu Ile Cys		
210	215	220
Glu Pro Ile Pro His Pro Ser Asn Ile Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys		
225	230	235 240
Thr Phe Leu Ser Arg His Ser Leu Asp Met Lys Phe Ser Tyr Cys Asp		
245	250	255
Glu Arg Ile Thr Glu Leu Met Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Leu Leu Gly		
260	265	270
Arg Ser Ile Tyr Glu Tyr Tyr His Ala Leu Asp Ser Asp His Leu Thr		
275	280	285
Lys Thr His His Asp Met Phe Thr Lys Gly Gln Val Thr Thr Gly Gln		
290	295	300
Tyr Arg Met Leu Ala Lys Arg Gly Gly Tyr Val Trp Val Glu Thr Gln		
305	310	315 320
Ala Thr Val Ile Tyr Asn Thr Lys Asn Ser Gln Pro Gln Cys Ile Val		
325	330	335
Cys Val Asn Tyr Val Val Ser Gly Ile Ile Gln His Asp Leu Ile Phe		
340	345	350
Ser Leu Gln Gln Thr Glu Cys Val Leu Lys Pro Val Glu Ser Ser Asp		
355	360	365
Met Lys Met Thr Gln Leu Phe Thr Lys Val Glu Ser Glu Asp Thr Ser		
370	375	380
Ser Leu Phe Asp Lys Leu Lys Lys Glu Pro Asp Ala Leu Thr Leu Leu		
385	390	395 400

[0009]

Ala Pro Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn		
405	410	415
Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn		
420	425	430
Asp Val Met Leu Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu		
435	440	445
Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser		
450	455	460
Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro		
465	470	475
Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp		
485	490	495
Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu		
500	505	510
Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val		
515	520	525
Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr		
530	535	540
Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu		
545	550	555
Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser		
565	570	575
Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser		
580	585	590
Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln		
595	600	605
Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu		

[0010]

610	615	620
Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala		
625	630	635 640
Ser Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser Ala Thr Ser		
	645	650 655
Ser Pro Tyr Arg Asp Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro Asn Arg Ala		
	660	665 670
Gly Lys Gly Val Ile Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro Arg Ser Pro		
	675	680 685
Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val Pro Glu Glu		
	690	695 700
Glu Leu Asn Pro Lys Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln Arg Lys Arg		
705	710	715 720
Lys Met Glu His Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly Ile Gly Thr		
	725	730 735
Leu Leu Gln Gln Pro Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Trp		
	740	745 750
Lys Arg Val Lys Gly Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly Met Glu Gln		
	755	760 765
Lys Thr Ile Ile Leu Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly		
	770	775 780
Gln Ser Met Asp Glu Ser Gly Leu Pro Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Cys		
785	790	795 800
Glu Val Asn Ala Pro Ile Gln Gly Ser Arg Asn Leu Leu Gln Gly Glu		
	805	810 815
Glu Leu Leu Arg Ala Leu Asp Gln Val Asn		
	820	825

[0011]

<210> 4
 <211> 978
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> PPE-1 启动子

 <400> 4
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtagtgtta cttctgateg 60
 gcgatactag ggagataagg atgtacctga caaaaccaca ttgttgttgt tatcattatt 120
 atttagtttt ccttccttgc taactcctga cggaatcttt ctcacctcaa atgcgaagta 180
 ctttagttta gaaaagactt ggtggaaggg gtggtggtgg aaaagtaggg tgatcttcca 240
 aactaatcig gtccccgcc egccccagta getgggaitc aagagegaag agtggggatc 300
 gtccccctgt ttgatcagaa agacataaaa ggaaaatcaa gtgaacaatg atcagcccca 360
 cctccacccc acccccctgc gcgcgcacaa tacaatctat ttaattgtac ttcatacttt 420
 tcattccaat ggggtgactt tgcctctgga gaaactcttg attcttgaac tctggggetg 480
 gcagctagca aaaggggaag cgggctgctg ctctctgcag gtctctgcgc ggtctctgtc 540
 tagtgggtgt tttcttttcc ttagccctgc ccctggattg tcagacggcg ggcgtctgcc 600
 tctgaagtta gcctgattt cctctagago cgggtcttat ctctgctgc acgttgcctg 660
 tgggtgacta atcacacaat aacattgttt agggctggaa taaagtcaga getgtttacc 720
 cccactctat aggggttcaa tataaaaagg cggcggagaa ctgtccgagt cagacgcgtt 780
 cctgcacogg cgtgagagc ctgaccoggt ctgtccogct gtccttgccc gotgcotccc 840
 ggetgcccgc gacgtttcg ccccagtga agggccactt getgaggacc gcgtgagat 900
 ctaaaaaaaa aacaaaaaac aaaaaacaaa aaaaccaga ggcgatcaga gcgaccagac 960
 accgtcctct tcgttttgca ttgagttcca ttgcaaccg agttttcttt ttctctttt 1020
 tccccactct tctgaccctt ttgcagaatg gattattttc cctgatctt ctctctgtg 1080
 ttctgtactt tccaaggagc tccagaaaca ggtaggcgcc acttgccaat cttctactt 1140
 cagegcagca gttatcgctt ctgttttcca cttttcttcc tttcttttct ttcattcttt 1200
 cctttttatt tattttttta attactgaag ctccagcagc aagtgcctta caattaatta 1260

[0012]

acttctgtgt gaagegaaag aaataaaacc cctgtttgaa tacagctgac tacaaccgag	1320
tategcatag ettc	1334
<210> 5	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低氧反应原件	
<400> 5	
gcacgt	6
<210> 6	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
<400> 6	
gtcggacagc ctcaccaaac agag	24
<210> 7	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
<400> 7	
gttaacttga tccaaagctc tgag	24
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链 DNA 寡核苷酸	
<400> 8	
cacgtggttc acctcagcac	20

[0013]

<210>	9	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
<400>	9	
	cagcgatttc ttccaagcg	19
<210>	10	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
<400>	10	
	cagcgagct actgcatcc aatcgaga	28
<210>	11	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
<400>	11	
	gottgtcaca tetgcaagta cgttegttta	30
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
<400>	12	
	atcgccgagt gcaagacgcg	20
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0014]

<220>		
<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
<400>	13	
	aagcaccatt ggccgtccga	20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
<400>	14	
	accacagtcc atgccatcac	20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链 DNA 寡核苷酸	
<400>	15	
	tccaccaccc tgttgetgta	20

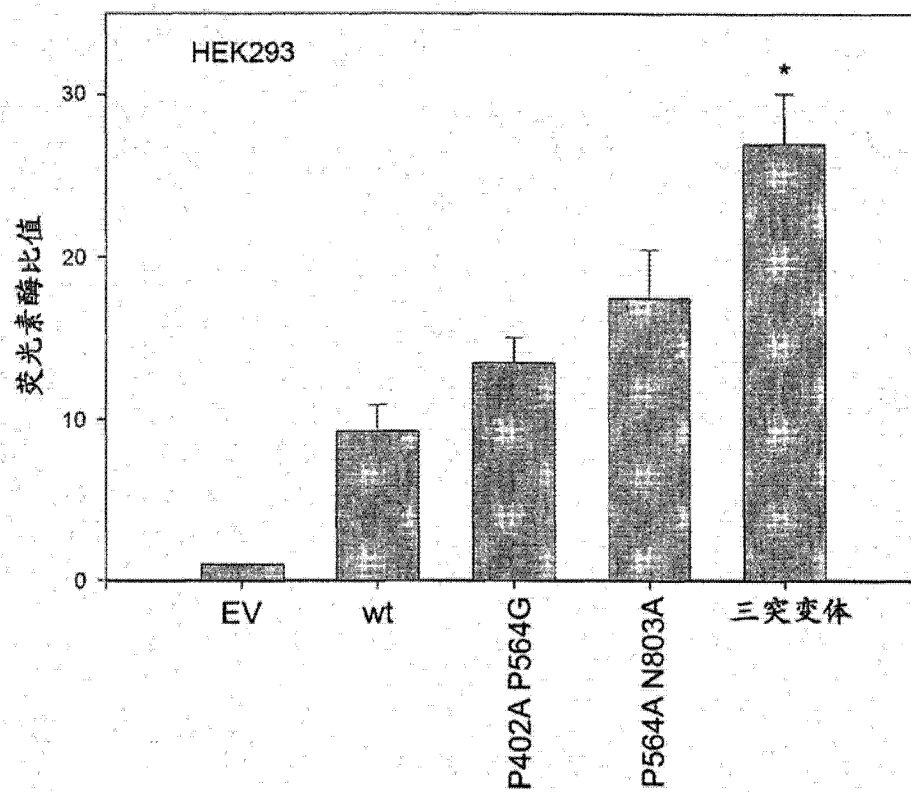


图 1a

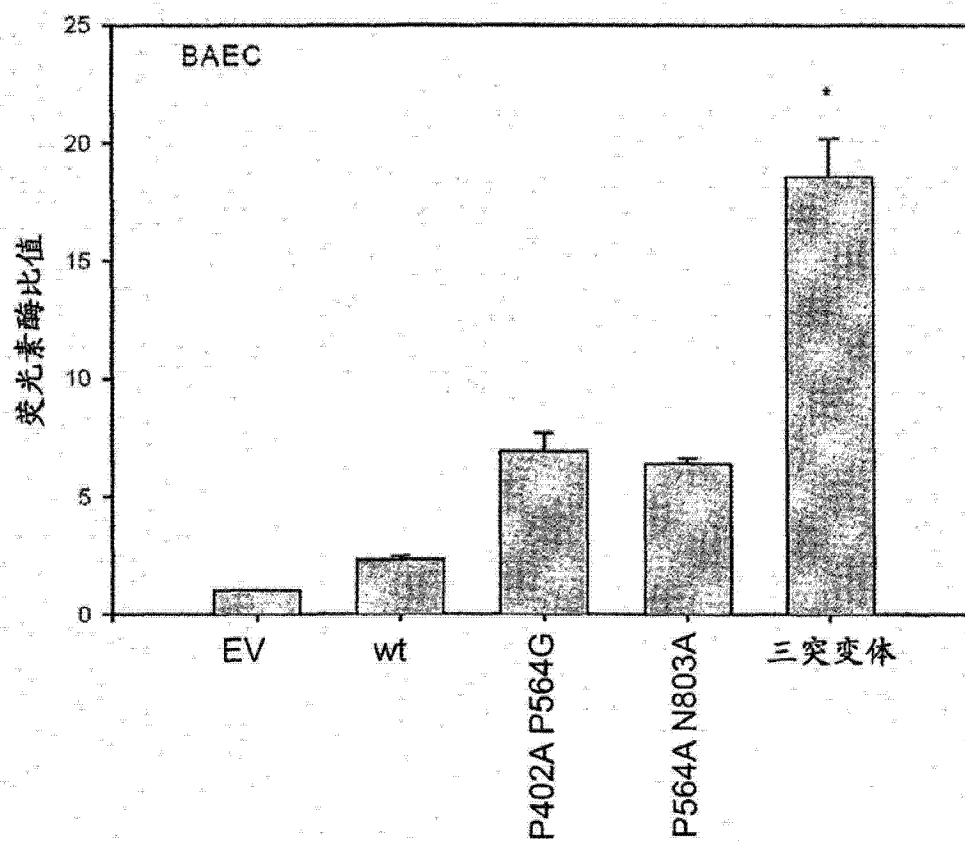


图 1b

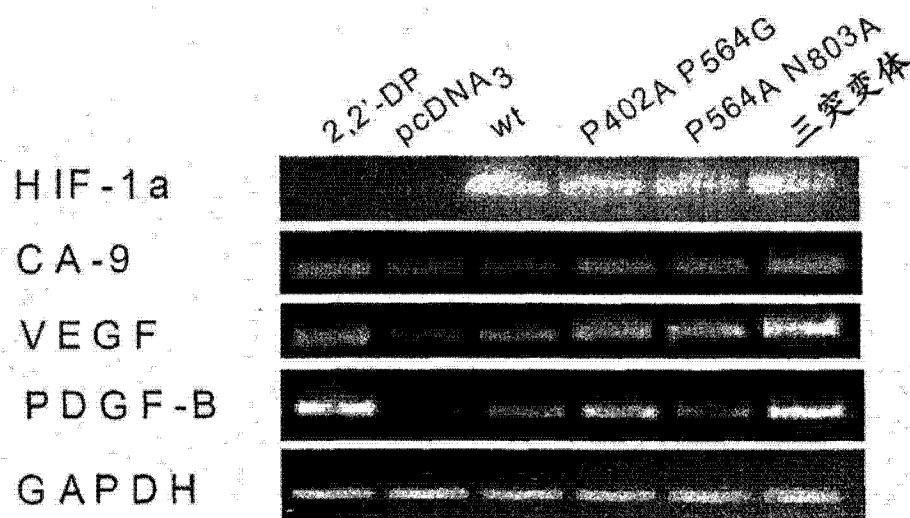


图 1c

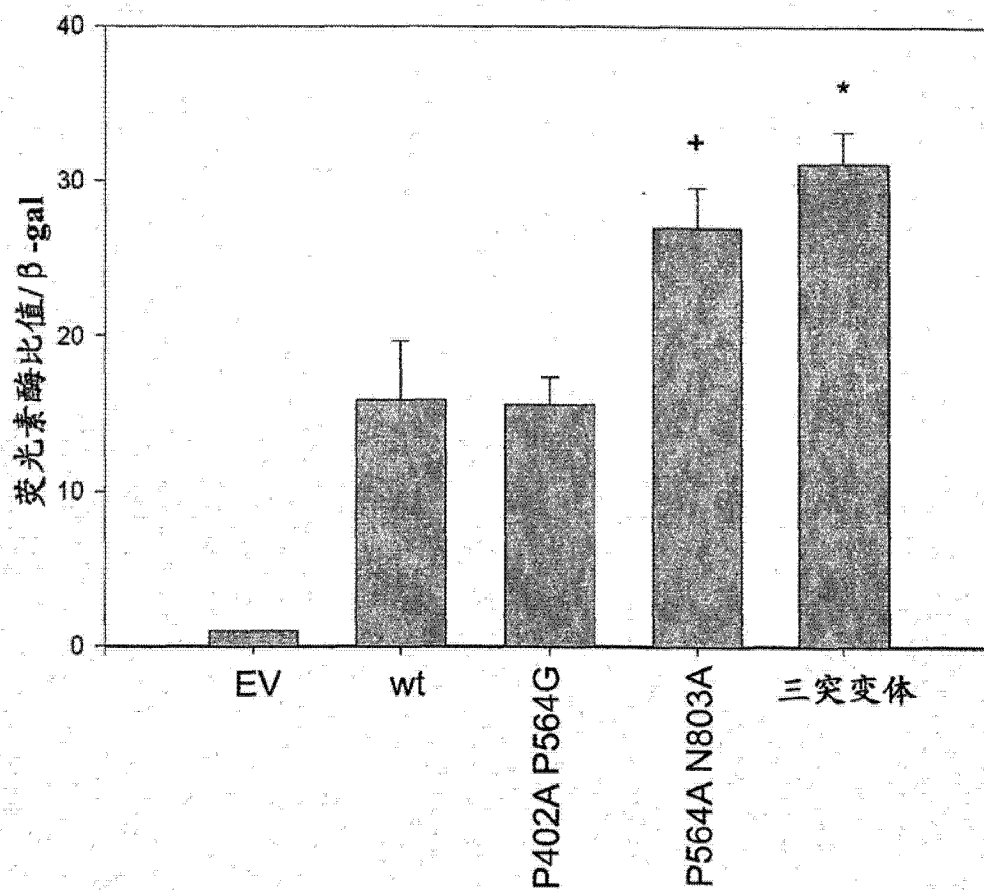


图 1d

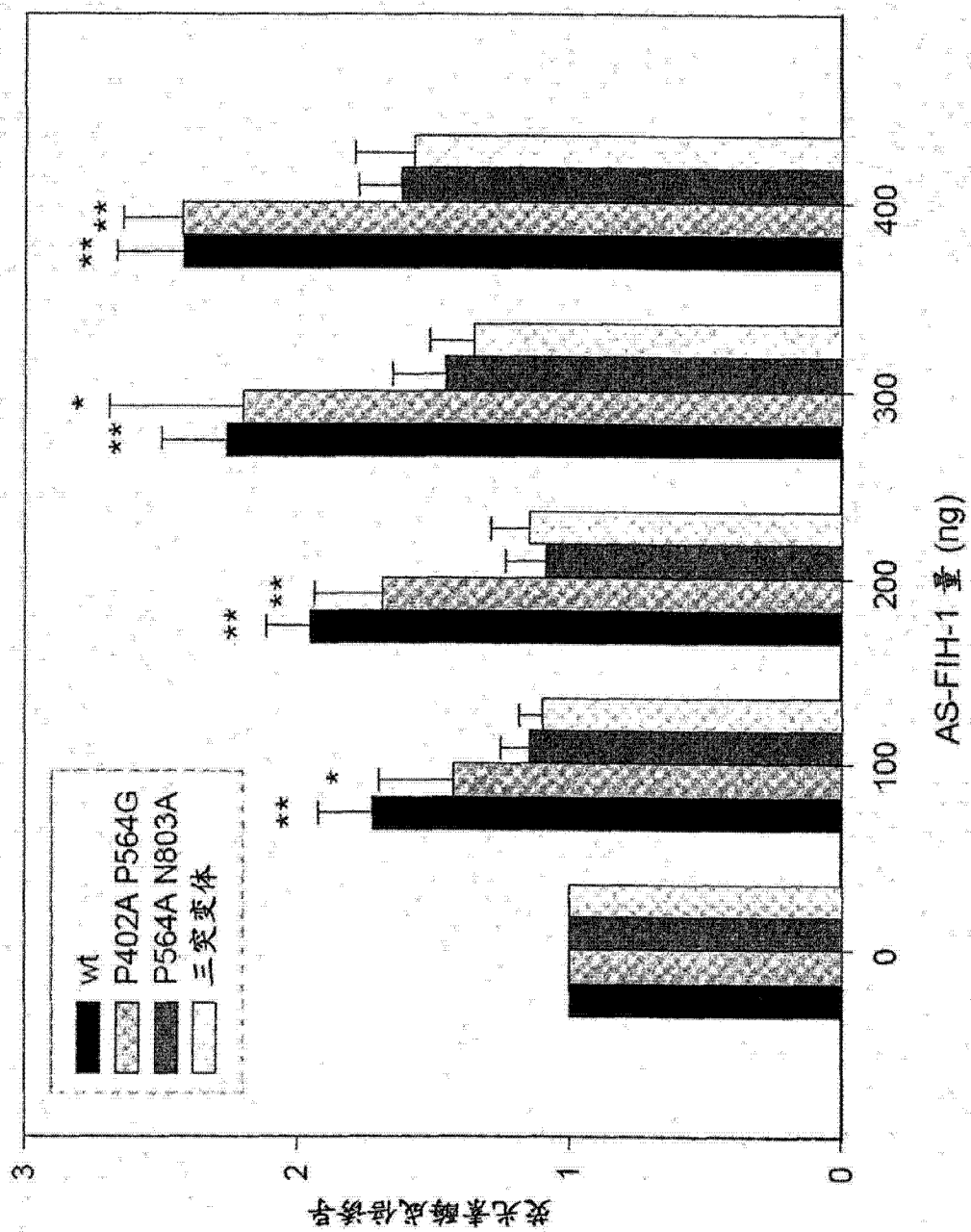


图 1e

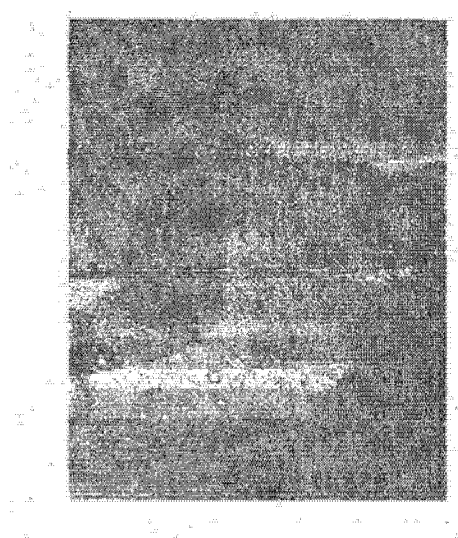


图 2a

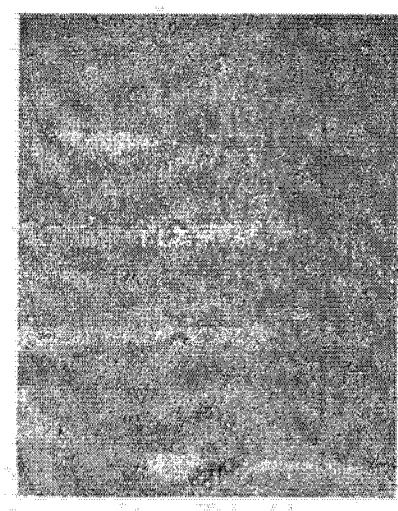


图 2b

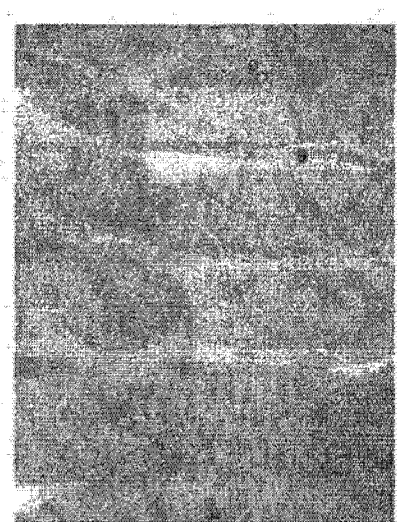


图 2c

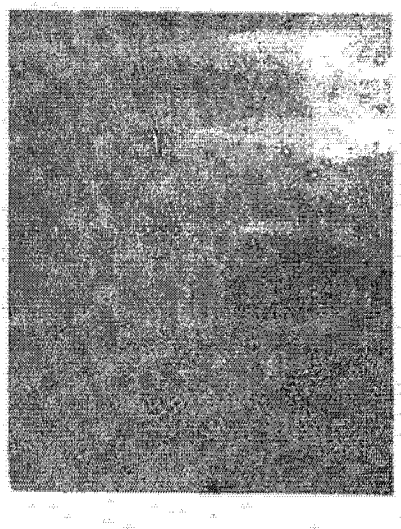


图 2d

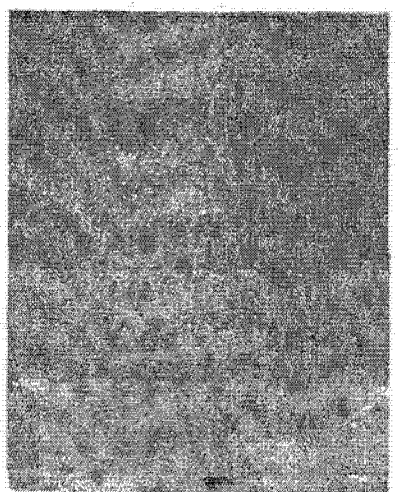


图 2e

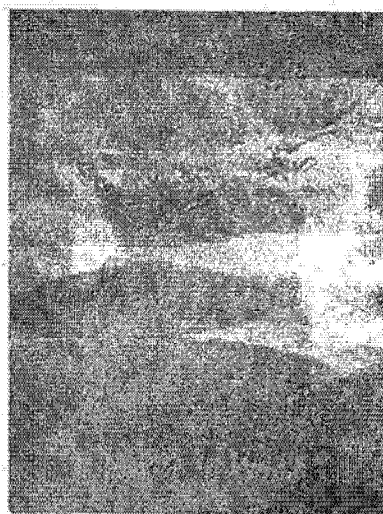


图 2f

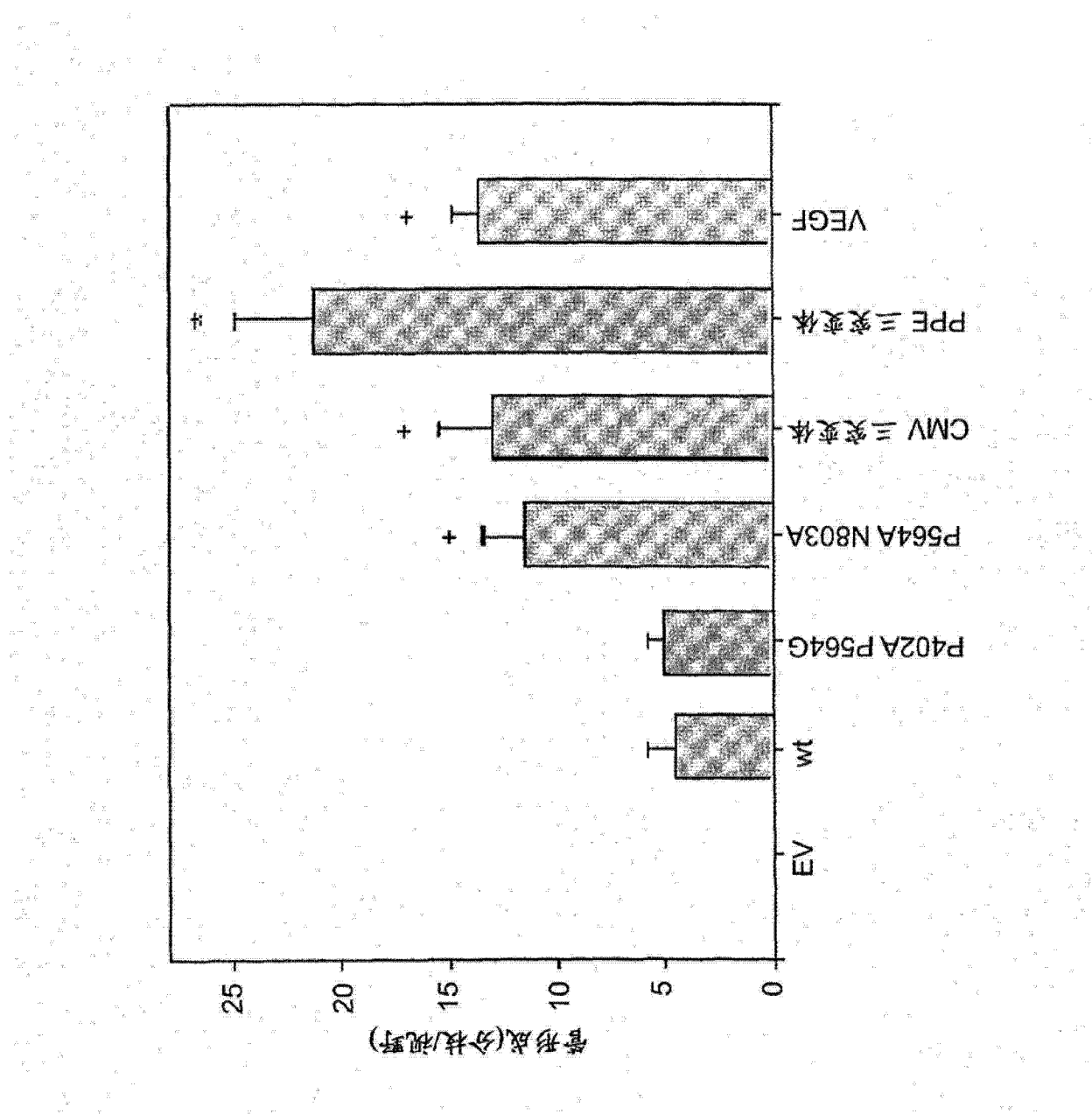


图 2g

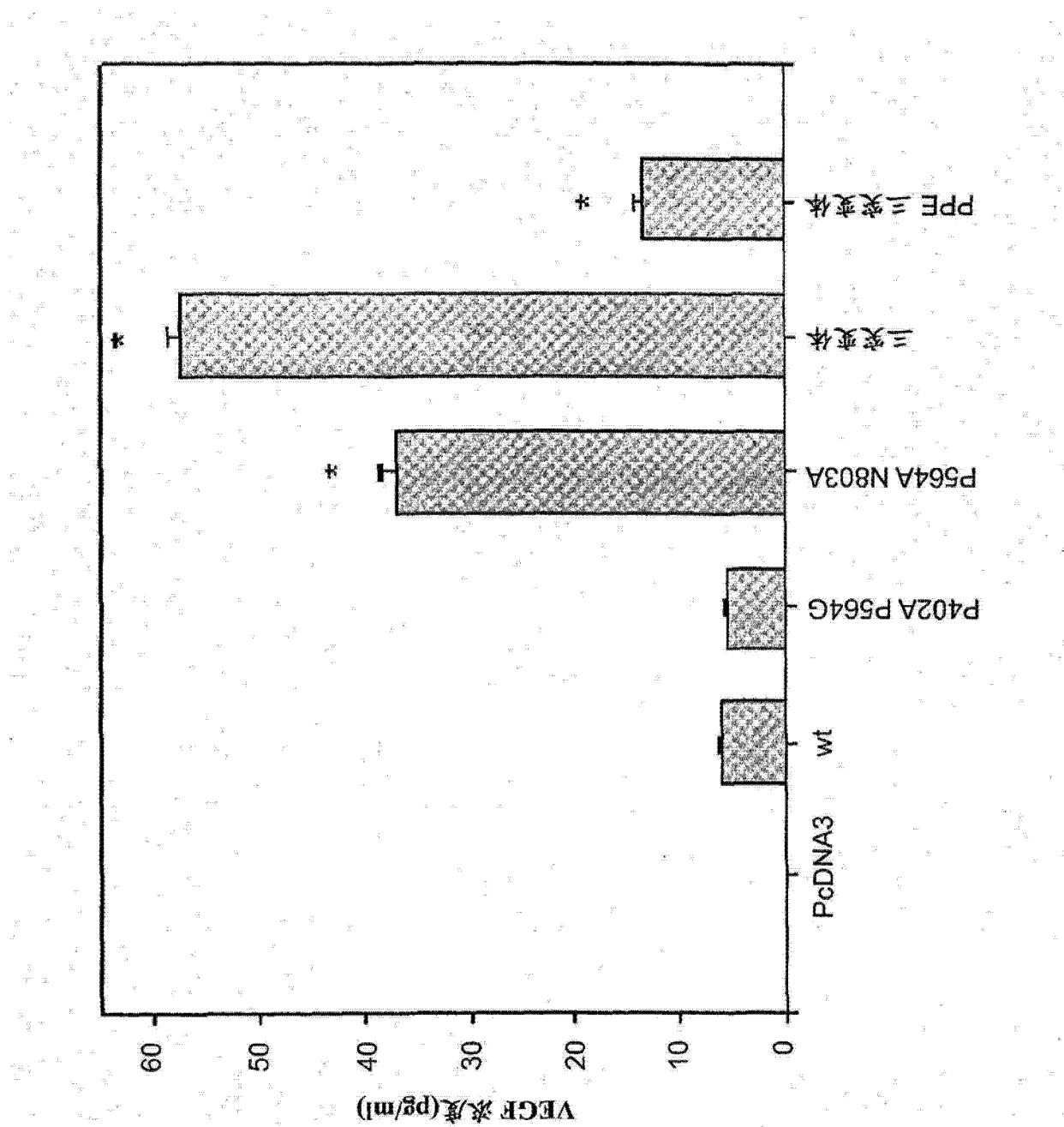


图 2h

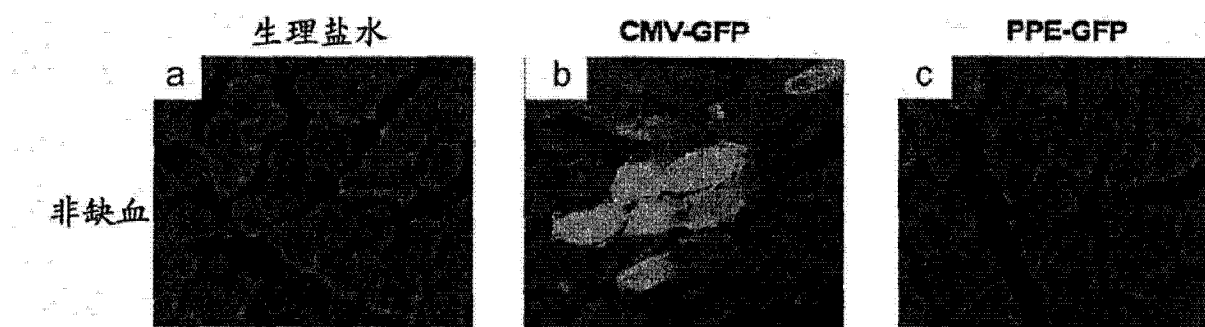


图 3a

图 3b

图 3c

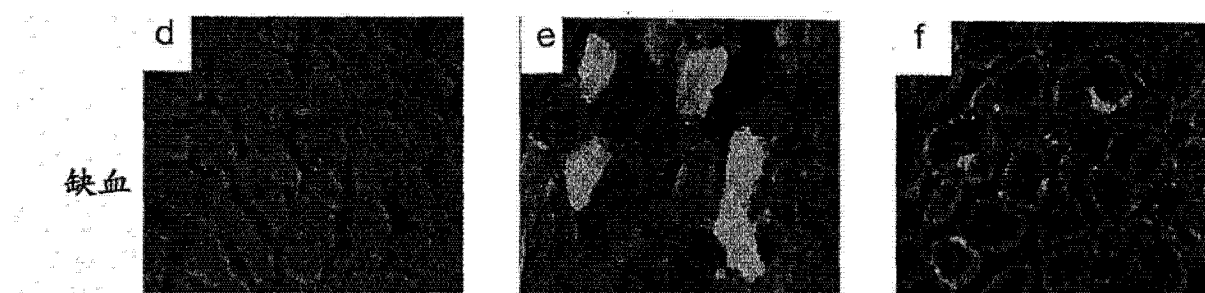


图 3d

图 3e

图 3f

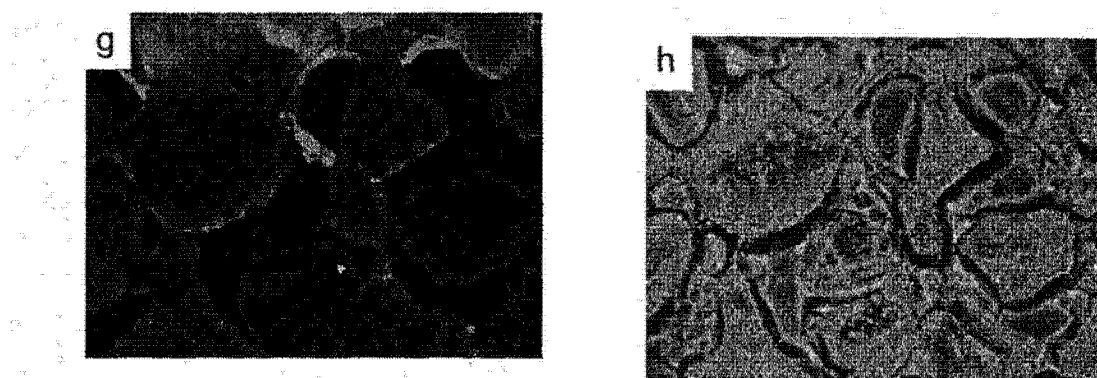


图 3g

图 3h

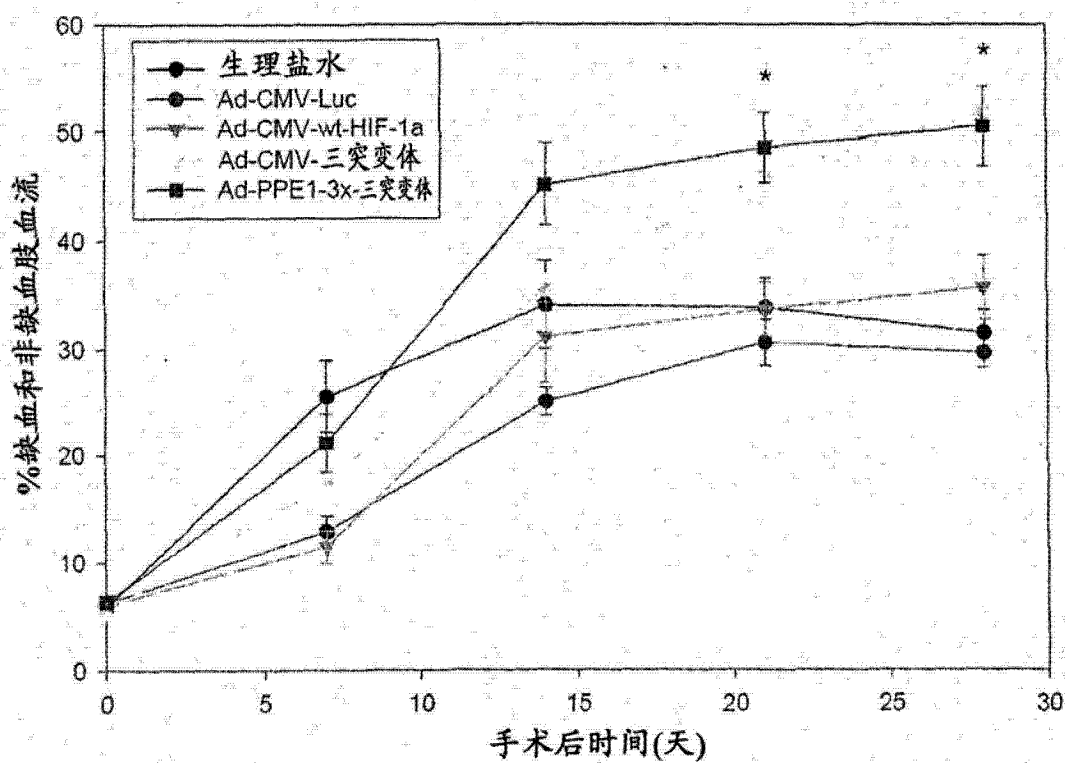


图 4a

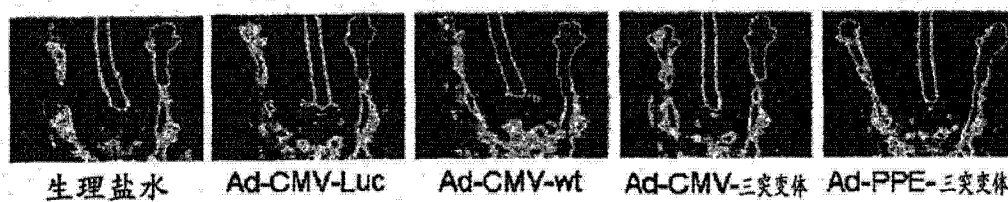


图 4b

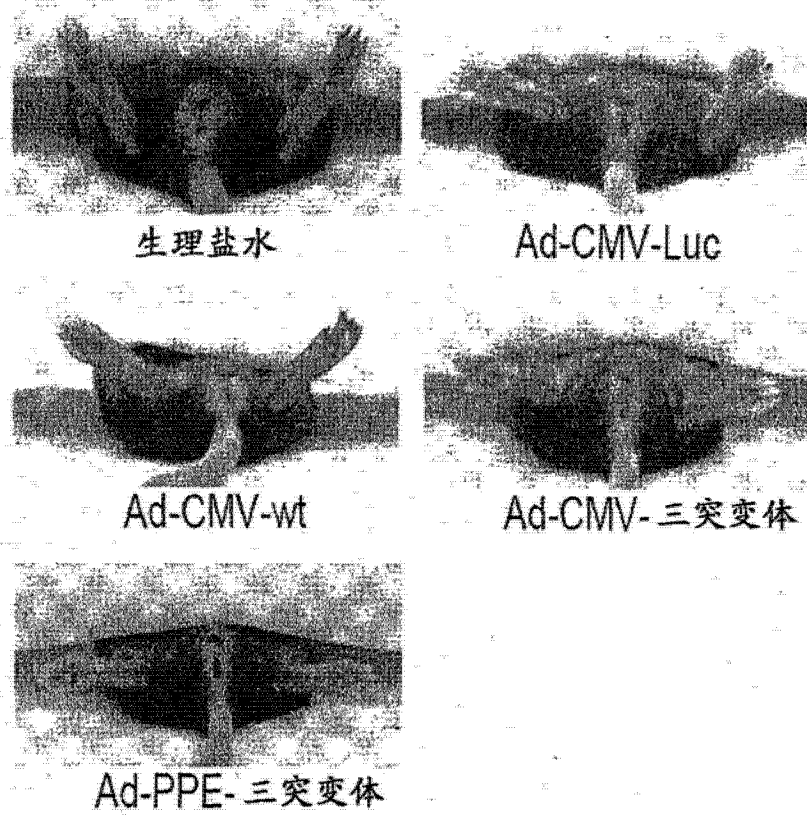


图 4c

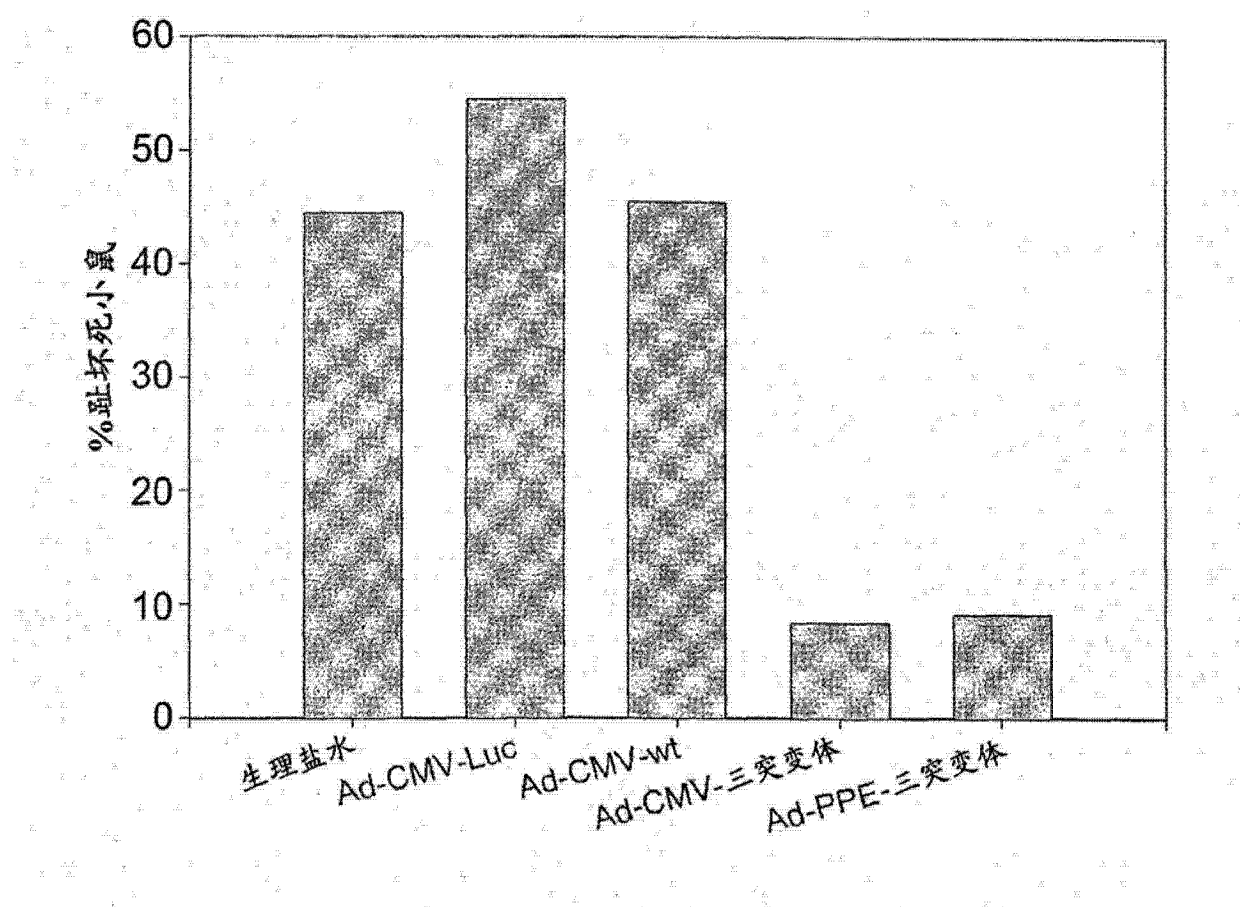


图 4d

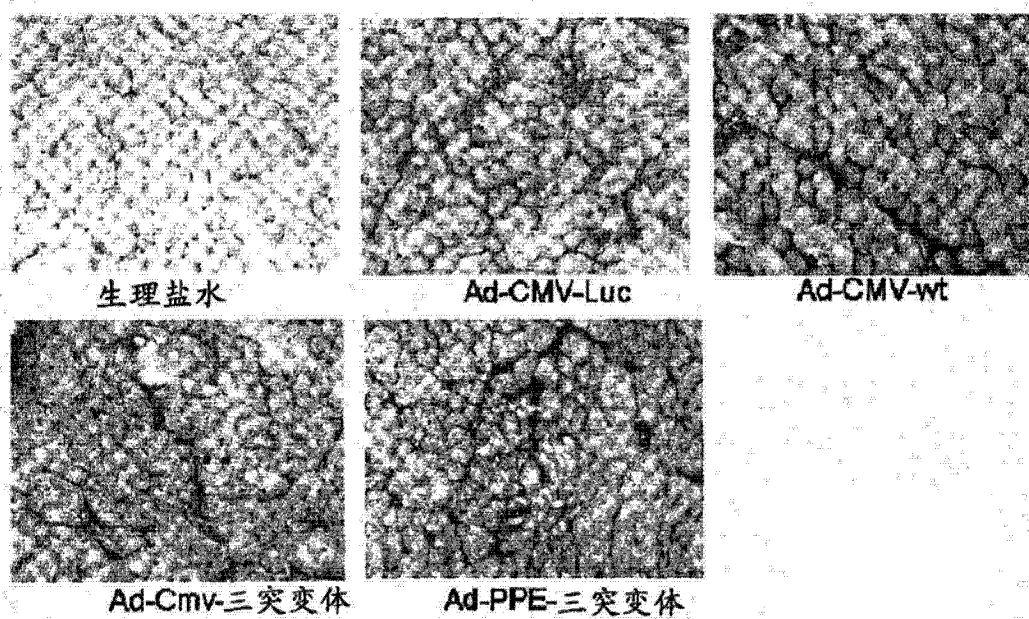


图 4e

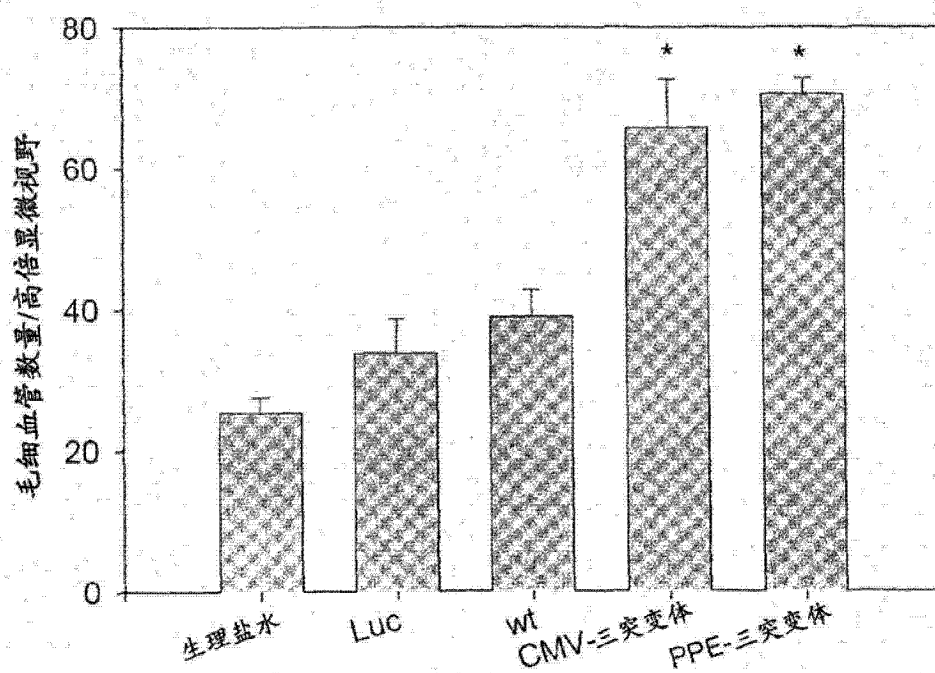


图 4f

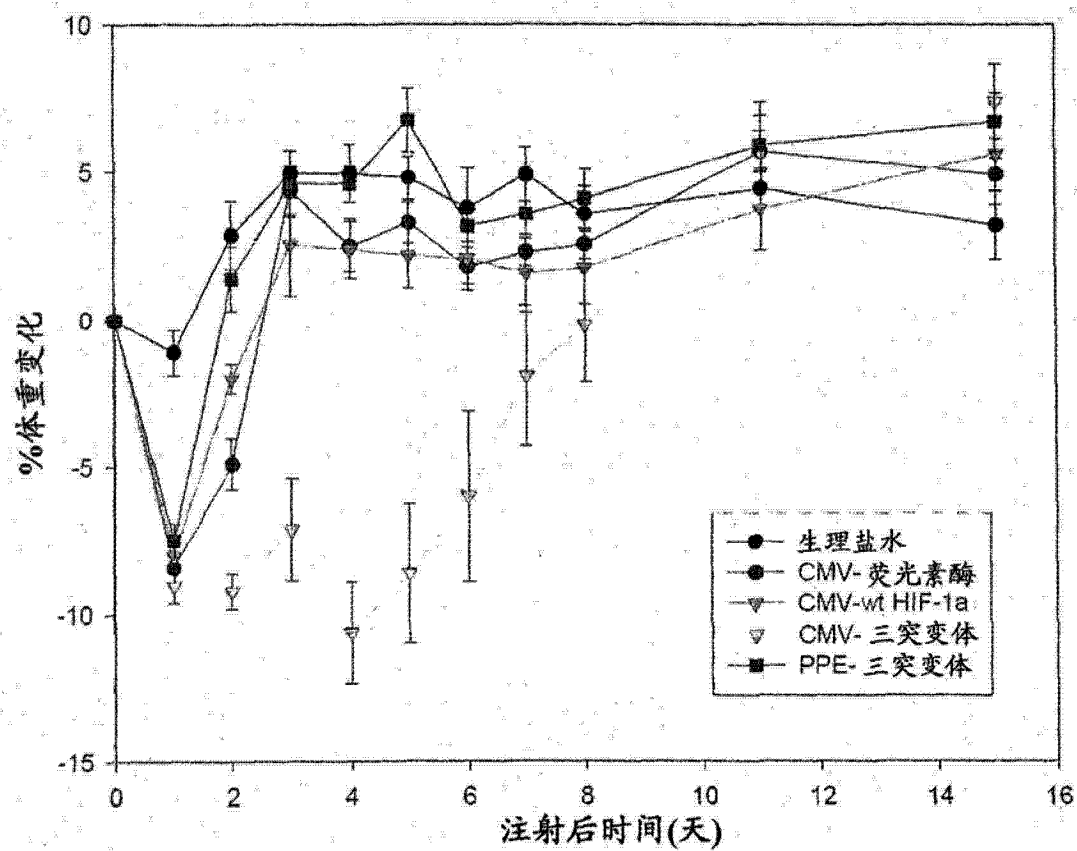


图 5a

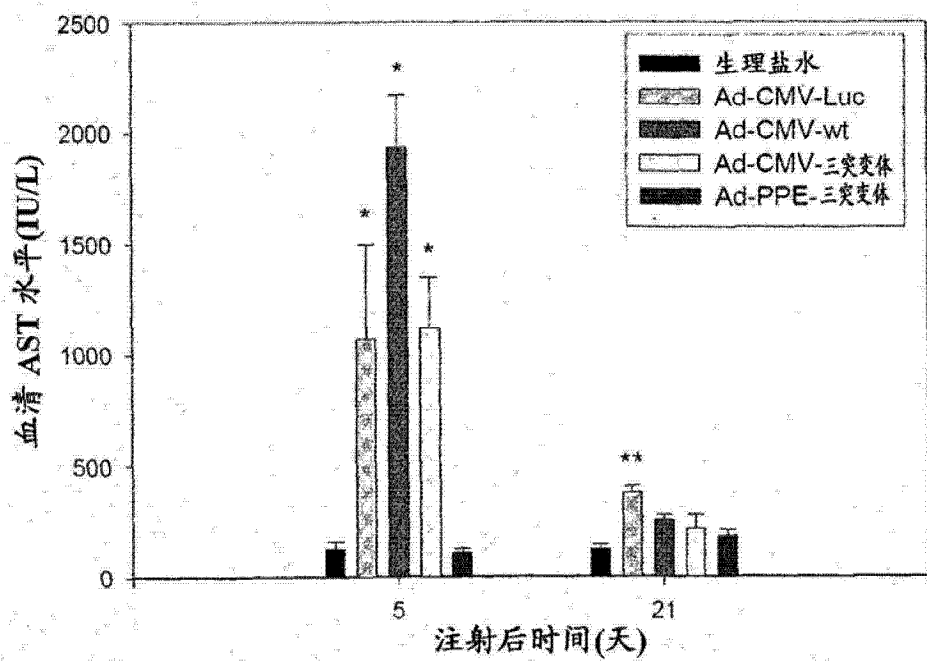


图 5b

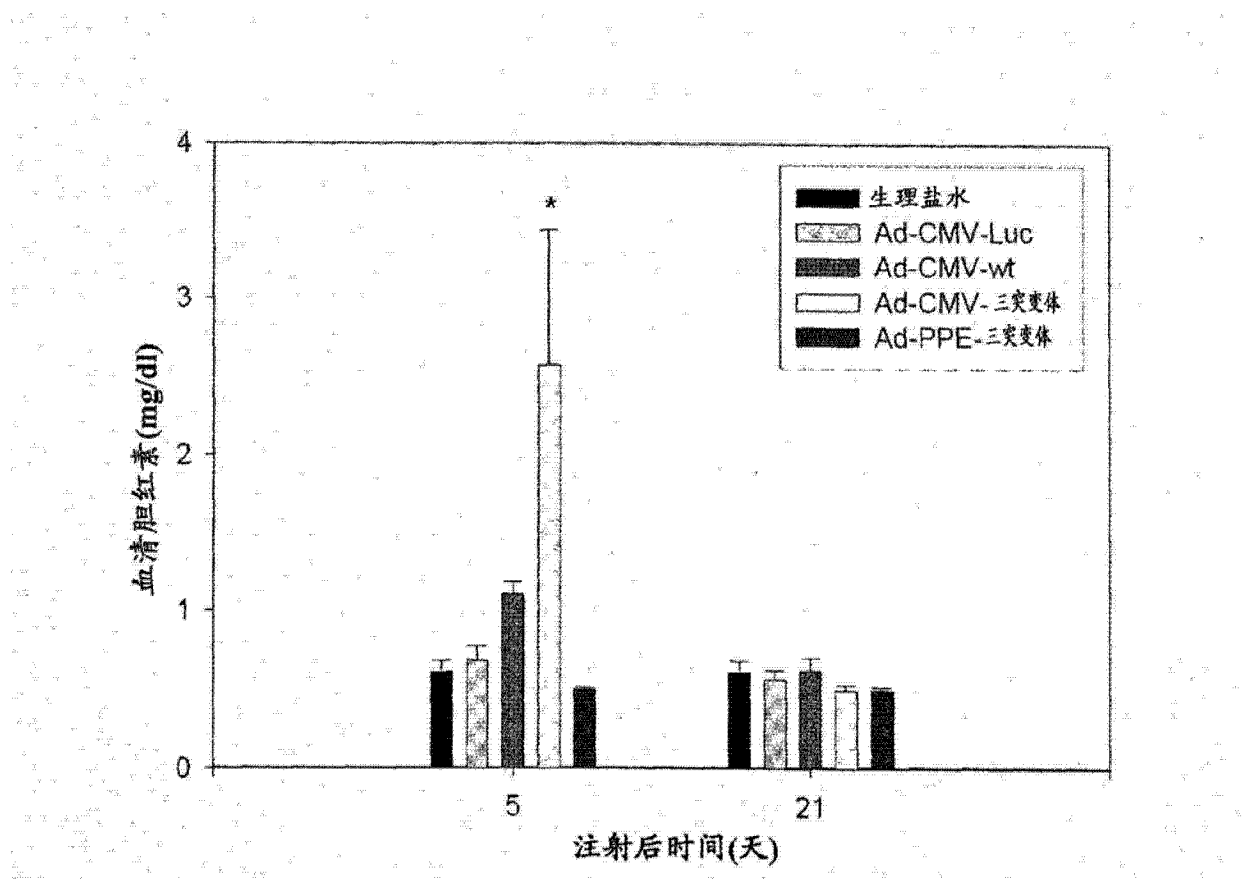


图 5c

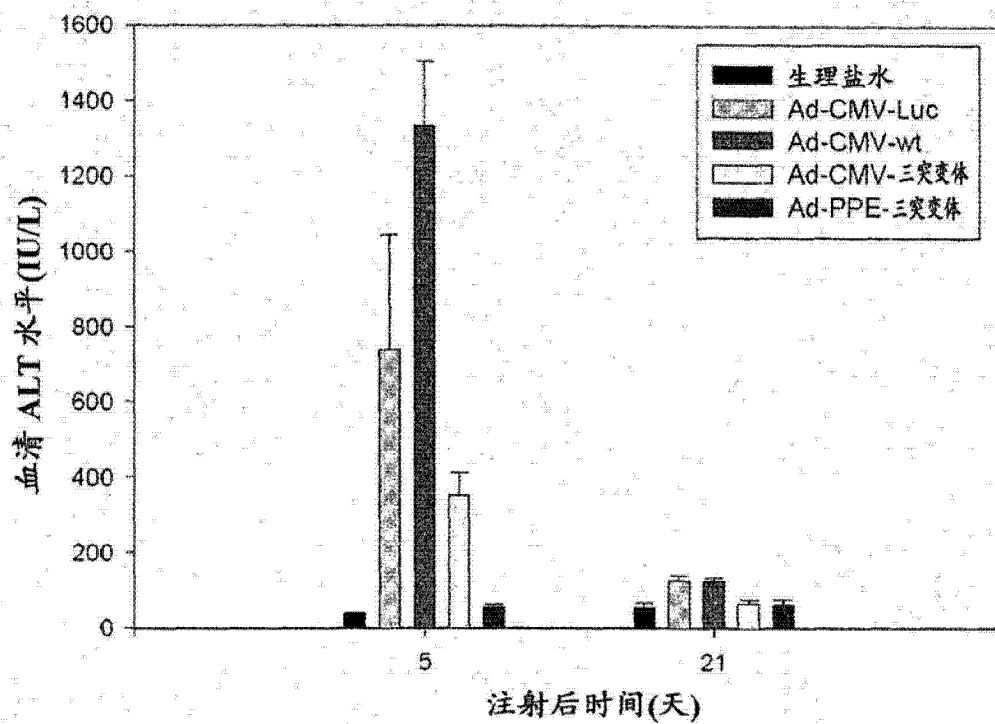


图 5d

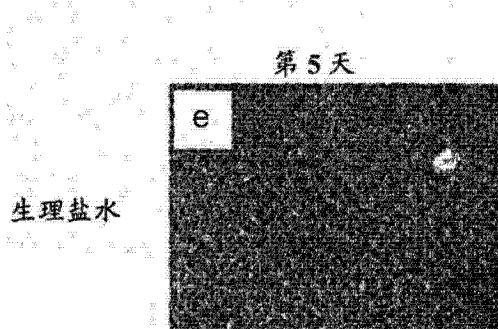


图 5e

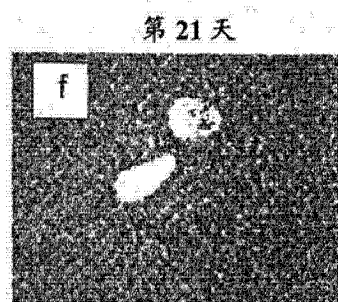


图 5f

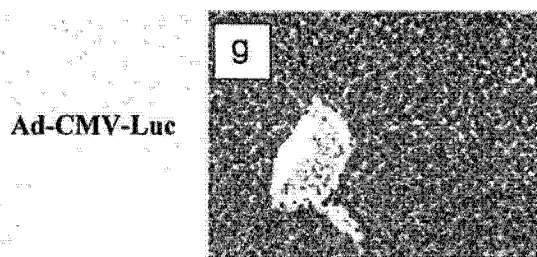


图 5g

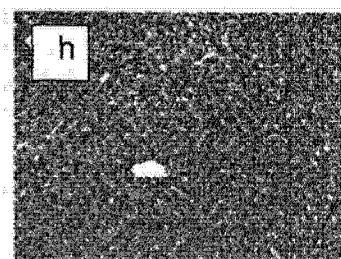


图 5h

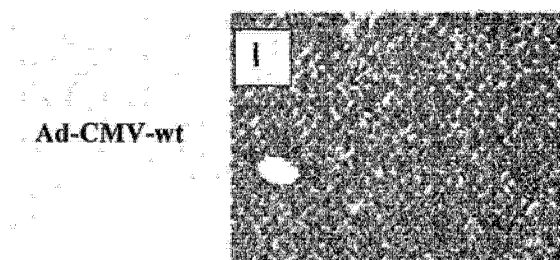


图 5i

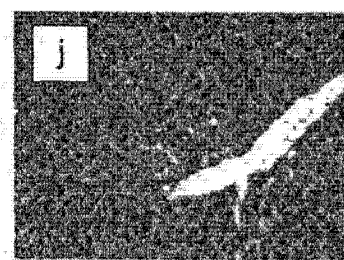


图 5j

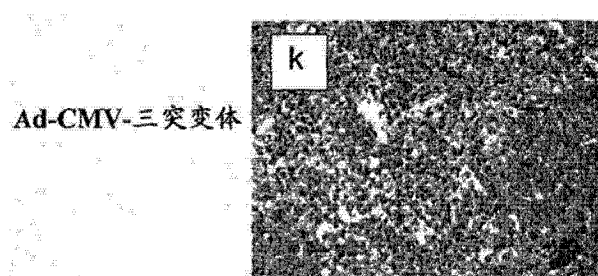


图 5k

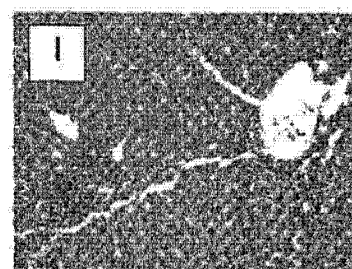


图 5l

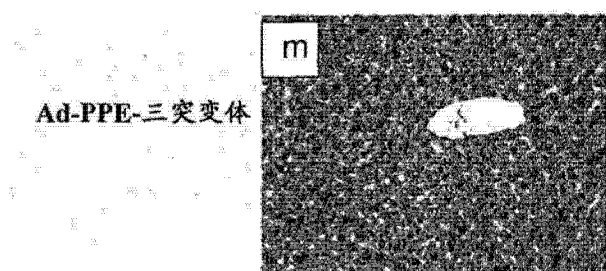


图 5m

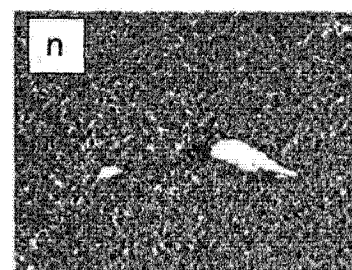


图 5n

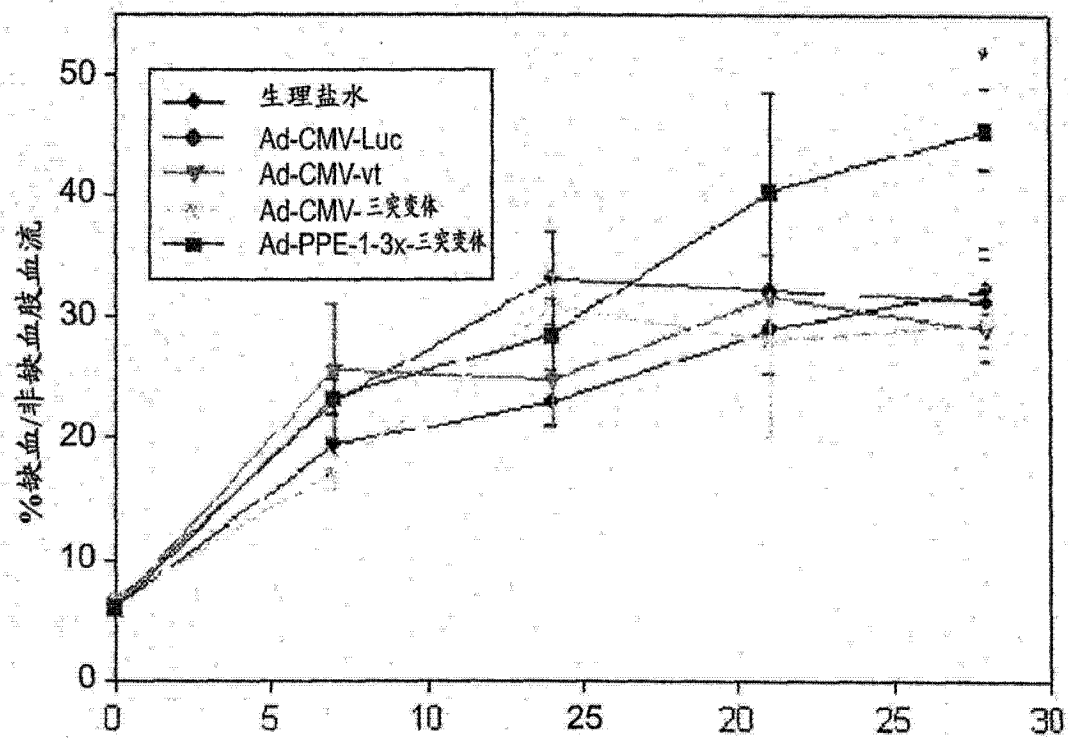


图 6a

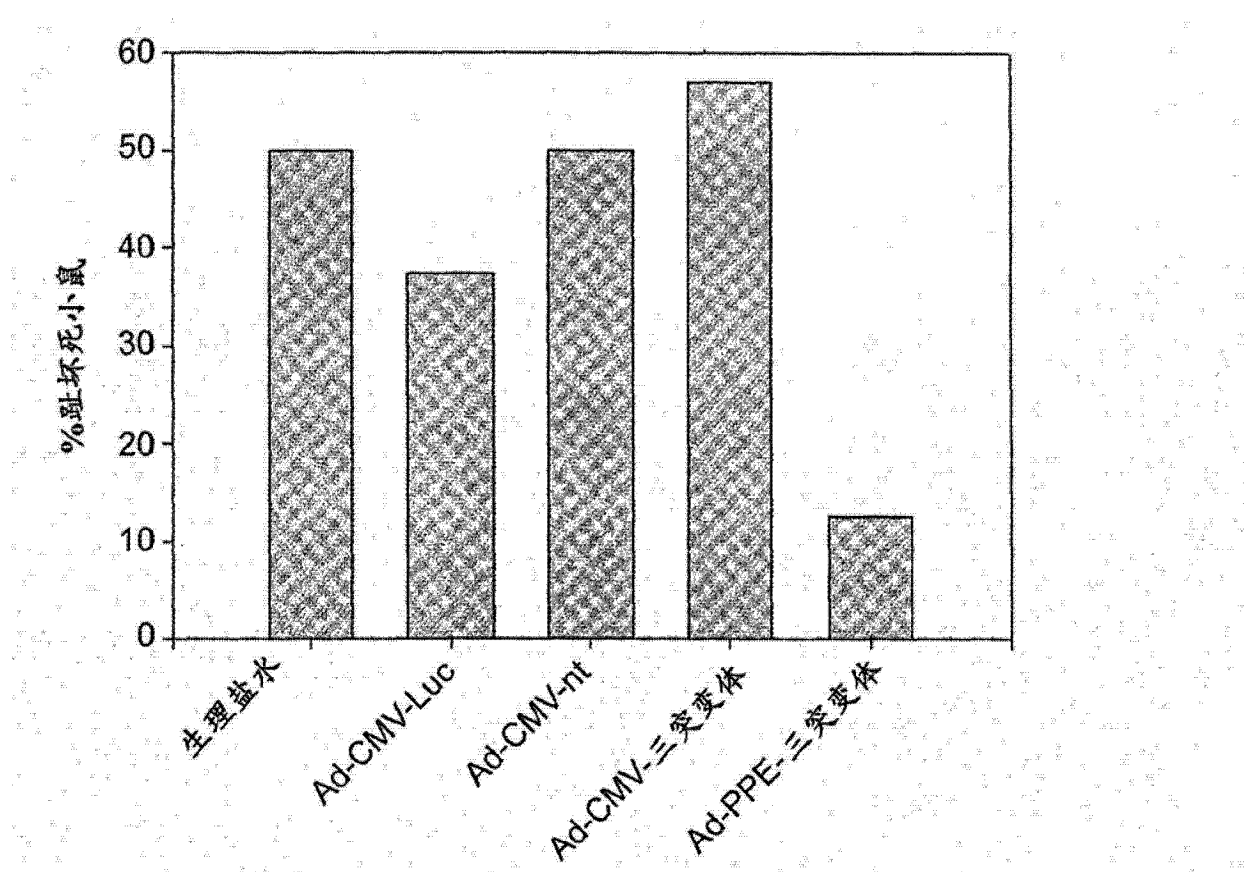


图 6b

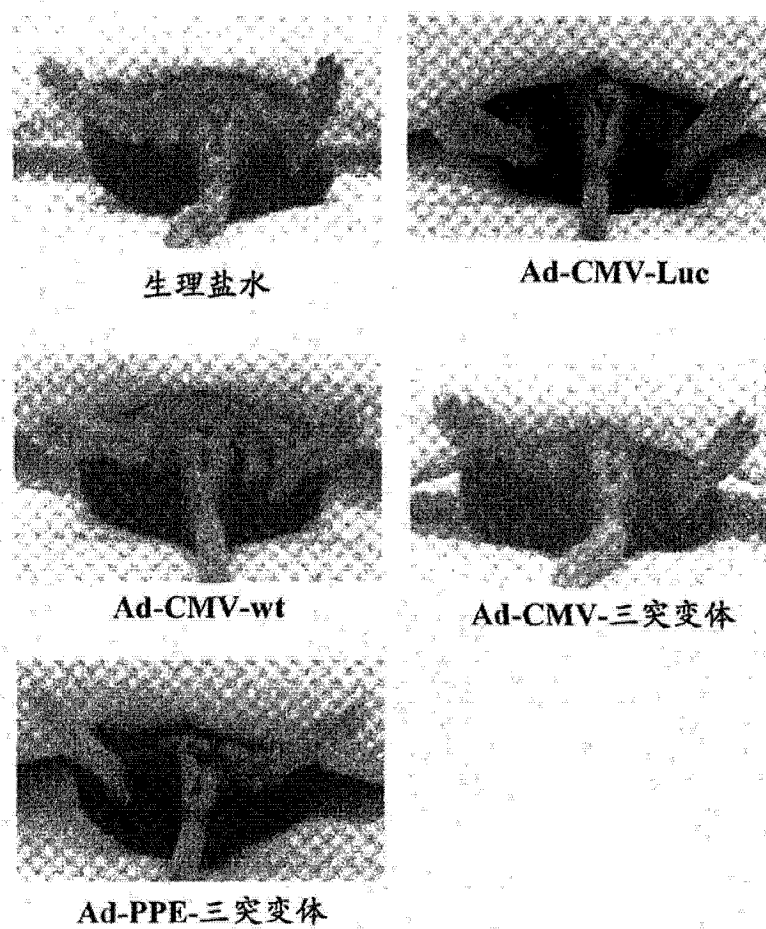


图 6c

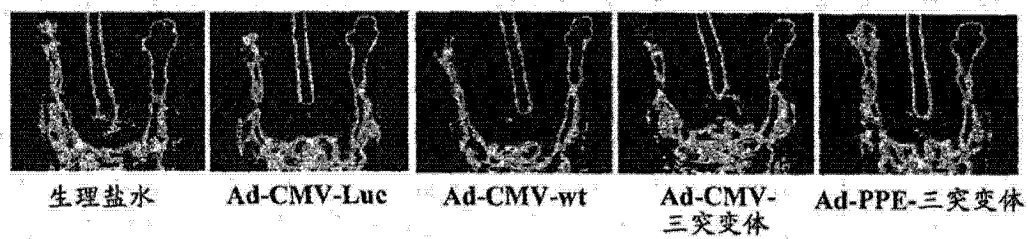


图 6d

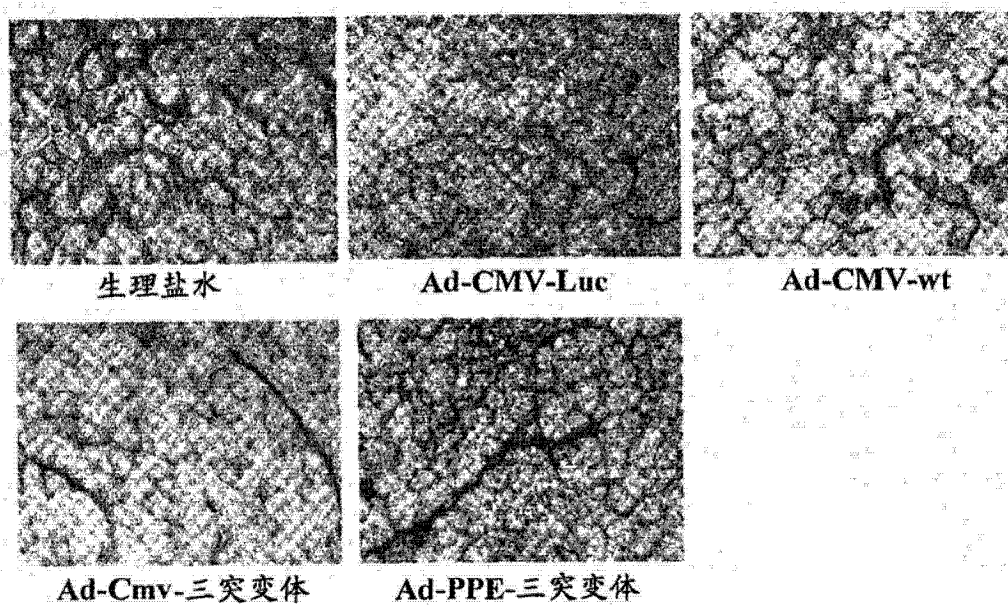


图 6e

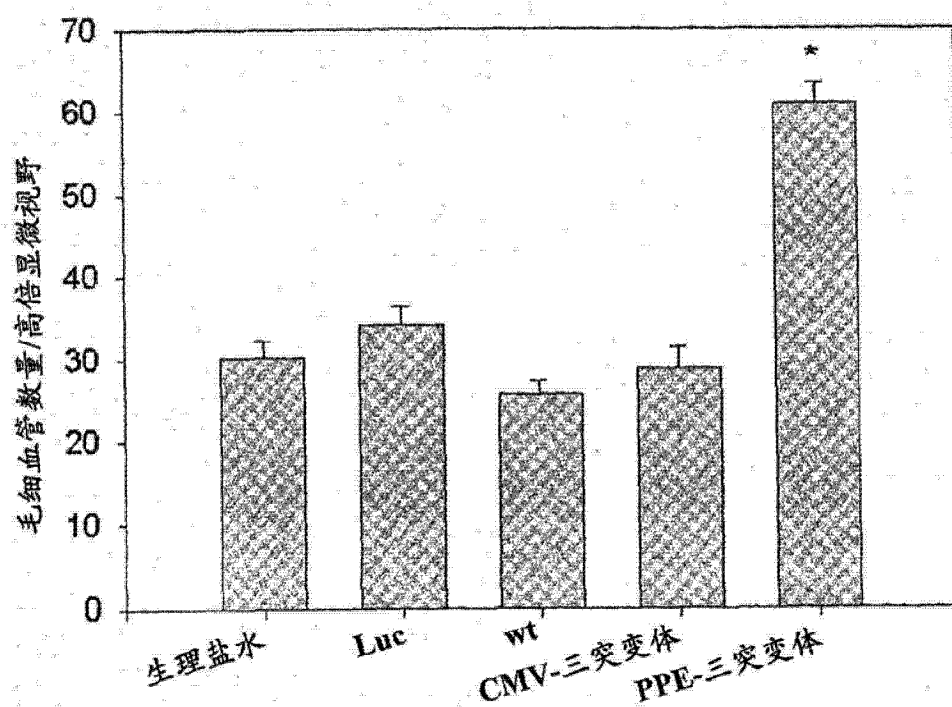


图 6f

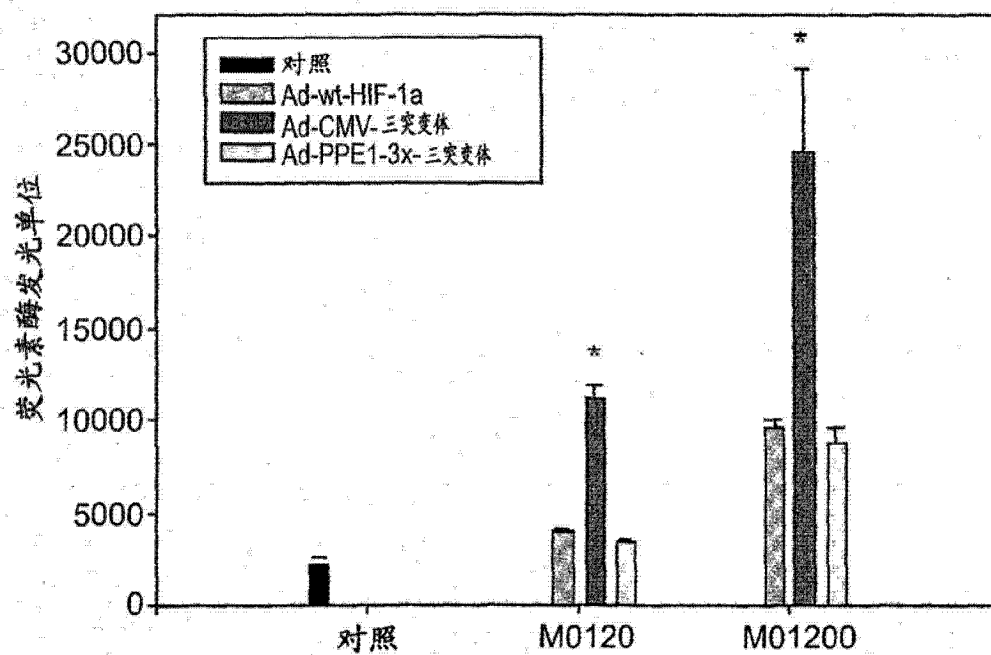


图 7a

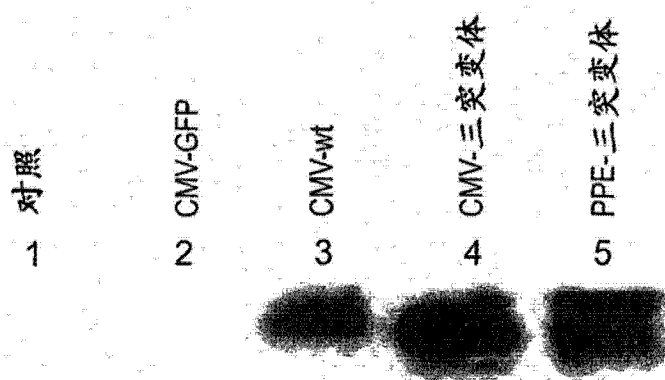


图 7b

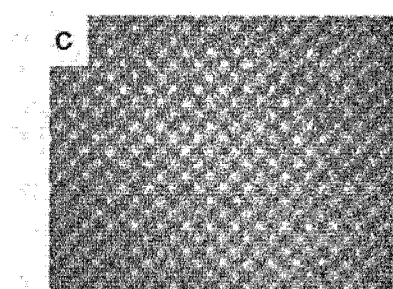


图 7c

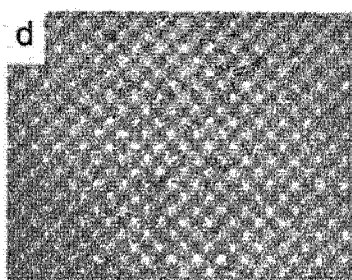


图 7d

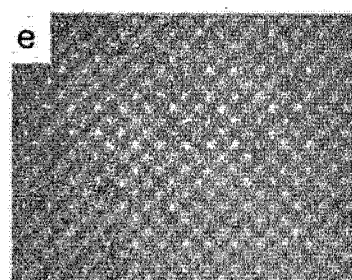


图 7e

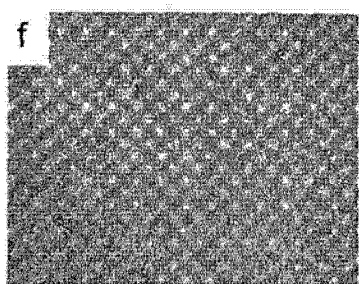


图 7f

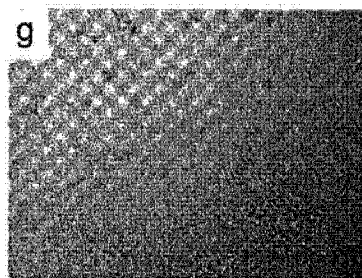


图 7g

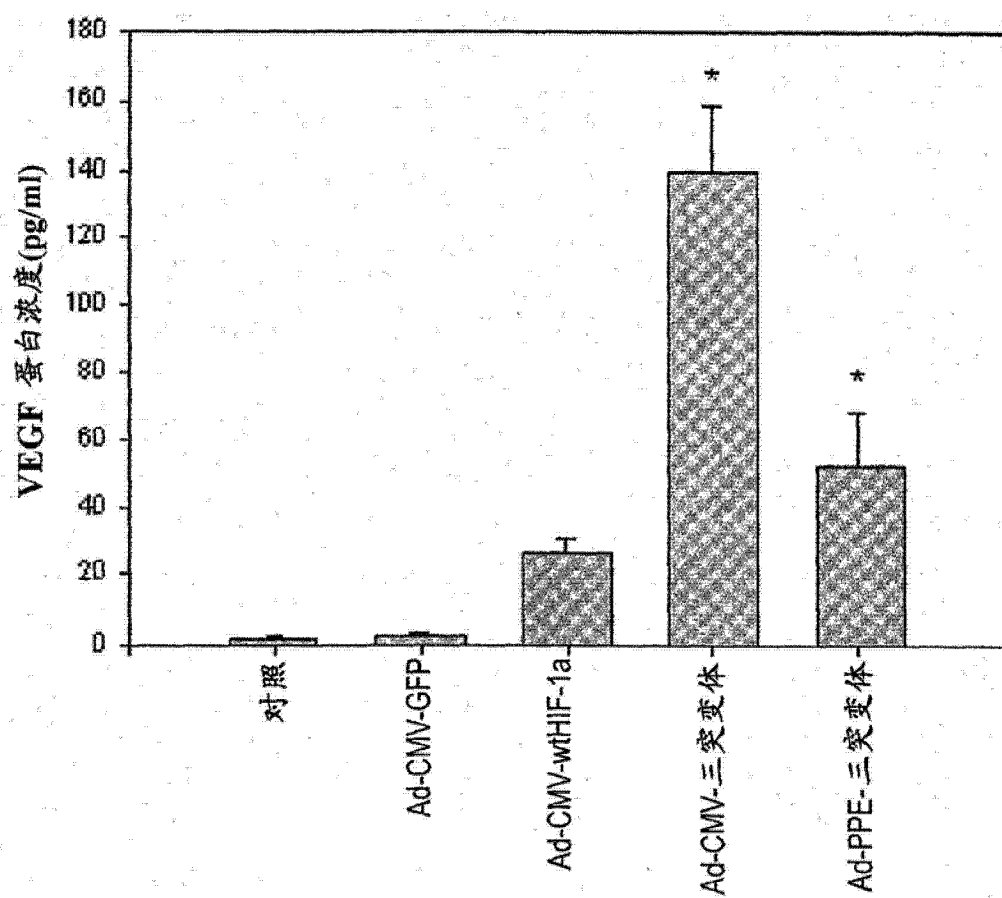


图 7h