

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



PCT



(10) 国际公布号

WO 2012/045286 A1

(43) 国际公布日
2012 年 4 月 12 日 (12.04.2012)

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/861 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01) A61L 27/38 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12R 1/93 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2011/080570

(22) 国际申请日: 2011 年 10 月 9 日 (09.10.2011)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201010512520.2 2010 年 10 月 9 日 (09.10.2010) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 苏州大学 (SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 杨吉成 (YANG, Jicheng) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。 缪竞诚 (MIU, Jingcheng) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。 盛伟华 (SHENG, Weihua) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。 韩亚丽 (HAN, Yali) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。 刘铁连 (LIU, Tielian) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。 张晓锋

(ZHANG, Xiaofeng) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京集佳知识产权代理有限公司 (UNITALEN ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市朝阳区建国门外大街 22 号赛特广场 7 层, Beijing 100004 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: RECOMBINANT VECTOR AND FIBROIN MEMBRANE MODIFIED BY TRANSGENIC BONE STROMAL CELL, AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 重组载体以及转基因骨髓基质细胞修饰的丝素膜及其应用

(57) Abstract: Provided is a recombinant plasmid pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 and pAdTrack-CMV-VEGF165-IRES-Ang-1, collection codes CCTCC M 2010221 and CCTCC M 2010220 respectively. Also provided is a recombinant adenovirus produced when said plasmid is homologously recombined with an adenovirus, and then packaged in a QBI-293A cell. Also provided is a fibroin membrane modified by a transgenic bone stromal cell. After being injected into the corneal limbus of a rabbit, the recombinant adenovirus successfully induces the growth of new corneal blood vessels; after the fibroin membrane is implanted into the corneal layer of a rabbit, new blood vessels grow into the area of the cornea implanted with fibroin membrane, and the blood vessel density significantly increases, hence VEGF165, Ang-1, and CD34 have successful expression in the corneal layer of a rabbit. A rat wound repair experiment further proves that the fibroin membrane can also promote the repair and the growth of blood vessels in wound tissues. The recombinant adenovirus and the fibroin membrane modified by transgenic bone stromal cell in the present invention have value in medical applications.

[见续页]

WO 2012/045286 A1



(57) 摘要:

提供了重组质粒 pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 和 pAdTrack-CMV-VEGF165-IRES-Ang-1，其保藏编号分别为 CCTCC M 2010221、CCTCC M 2010220。还提供了所述质粒与腺病毒同源重组后，在 QBI-293A 细胞中包装产生的重组腺病毒。还提供了转基因骨髓基质细胞修饰的丝素膜。兔角膜缘注射该重组腺病毒后，其能成功诱导角膜新生血管形成；该丝素膜植入兔角膜层后，新生血管长入丝素膜植入区域的角膜内且血管密度明显增多，VEGF165、Ang-1、CD34 在兔角膜层中获得成功表达。大鼠创伤修复实验进一步证明该丝素膜还可促进创伤组织的血管生成和创伤修复。本发明的重组腺病毒以及转基因骨髓基质细胞修饰的丝素膜具有医学应用价值。

重组载体以及转基因骨髓基质细胞修饰的丝素膜及其应用

本申请要求于 2010 年 10 月 09 日提交中国专利局、申请号为 201010512520.2、发明名称为“重组载体以及转基因骨髓基质细胞修饰的丝素膜及其应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本发明涉及生物领域，具体涉及重组载体以及转基因骨髓基质细胞修饰的丝素膜及其应用。

背景技术

机体损伤修复的机制是必须先有微血管的生成，随后形成新生的肉芽组织，然后才能输入所需的各种细胞和营养成分，促进损伤组织的修复。血管新生是一个复杂的、有步骤、有序的过程，不仅需要刺激因素的激发，诸多细胞的参与，还需要各种细胞因子、生长因子的参与以及细胞外基质的协作。Ang-1、VEGF、FGF、PDGF 对伤口肉芽组织形成、血管增生和胶原纤维合成有重要作用。

VEGF 是由两个相同亚基以二硫键交联结合成的二聚体糖蛋白，分子量 40-45KD，其基因位于染色体 6p21.3，全长 14kb，由 8 个外显子和 7 个内含子组成，由于其 mRNA 的剪接方式不同，形成多种存在形式，其中 VEGF121 和 VEGF165 为分泌性可溶性蛋白，可通过与邻近的血管内皮受体结合，发挥促进血管内皮细胞增殖、迁移和增加血管通透性的作用。血管新生中，VEGF 及其受体被认为是作用最强、特异性最高的关键调控因子。VEGF 是血管内皮细胞的特异性有丝分裂原，在体外可促进内皮细胞的生长，在体内可以诱导血管发生。

近年来，在血管新生过程中 Ang-1 及受体 Tie2 对新生血管的形成、重塑、成熟等的重要调节作用正逐渐受到关注。Ang-1 和 VEGF 在血管的再生中二者协同发挥作用，VEGF 作用于血管形成的早期，可促进原始血管网的形成，而 Ang 则作用于随后的血管改建、塑形，促进形

成成熟且有空间结构的血管网，因而 VEGF 和 Ang-1 双基因共表达的基因治疗有可能是促进血管新生的创新探索。

目前，双基因共表达载体的构建策略主要有：1.基因之间以 IRES (internal ribosome entry site) (内部核糖体进入位点) 序列连接；2.双启动子表达载体；3.剪切载体；4.基因之间以 Furin 的切割靶点序列连接；5.基因之间以 2A 序列连接；6.表达融合基因。

基因之间以 IRES (internal ribosome entry site)(内部核糖体进入位点)序列连接，该 IRES 序列及与之相连的基因可同时转录，并以不依赖帽的方式启动远端 mRNA 的翻译，从而在同一个转录本上翻译出不同的蛋白；基因之间插入 polyA-promotor(CMV) 双启动子表达盒构建双基因共表达载体，带有 polyA-promotor(CMV)各自独立启动子的两个表达盒构建于一个载体上，双基因各自独立转录出两种不同的 mRNA，并各自独立翻译出不同的蛋白。

本领域技术人员公知：腺病毒载体是一类很有应用前景的基因治疗病毒载体，腺病毒是一种双链 DNA 病毒，腺病毒载体与其他载体相比有如下许多优点：1. 宿主范围广，对人致病性低；2. 具有感染率高、对分裂和非分裂细胞都能感染；3. 能携带很长的治疗基因和同时表达多个基因；4. 不整合到染色体中，无插入致突变性，安全性好；5. 能有效进行增殖，滴度高，易加工制备等。采用 pAdEasy 腺病毒表达系统具有明显优点：1. 腺病毒质粒的同源重组可在大肠杆菌 BJ5183 中高效进行，且细菌繁殖快，同源重组能力强，因而从根本上克服细胞内同源重组率低的缺陷；2. 腺病毒中可插入 11kb 的基因片段或同时插入多个基因片段；3. 由于在腺病毒骨架中含有的 GFP 报告基因，非常便于监测病毒包装成功与否、检测病毒滴度及感染效率等。所有这些都避免了病毒的空斑克隆纯化过程，大大减少了病毒的制备时间。

构建双基因共表达重组转移载体是作为肿瘤的基因治疗药物的有效途径之一，但到目前为止，国内外没有关于利用 IRES 策略构建 VEGF 和 Ang-1 双基因载体的报道；另外，利用构建 polyA+promoter 双启动子策略构建双基因重组转移载体，虽然理论有相关研究，实践中却并

没有相关报道，而且该方法存在以下难点：在利用在构建 polyA+promoter 双启动子策略构建双基因重组转移载体的过程中，发现 polyA 中有 pacI 酶切位点，无法采用 pacI 酶切线性化后在 293A 细胞中进行腺病毒包装，影响双基因的正常表达。

丝素蛋白膜作为一种新型医用生物材料，具有无毒性、无刺激性、透湿性好等许多优异性能，可以用作伤口敷料，也可用作组织修复的支架材料，甚至可以开发成人工皮肤。而如何使支架材料充足血管化，进一步开发和制备血管诱导丝素蛋白基支架材料联合 MSC 的小口径人工血管仍未见进展。

发明内容

本发明的一个目的是提供基因表达效率高，血管诱导能力强的 VEGF165 及 Ang-1 的重组载体。

本发明提供的 VEGF165 与 Ang-1 双转基因重组质粒 pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1，其保藏号为：CCTCC M 2010221。

所述质粒转移的基因 VEGF165 在 Genebank 中登录号为 AF016050.1，基因 Ang-1 公开在 NCBI Reference Sequence: NM_001146.3 中。

本发明还提供所述重组质粒 M 2010221 与腺病毒 pAdEasy-1 同源重组，在 QBI-293A 细胞中包装产生的重组腺病毒 Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1。

本发明提供的 VEGF165 与 Ang-1 双转基因重组质粒 pAdTrack-CMV-VEGF165-IRES-Ang-1，其保藏号为；CCTCC M 2010220。

本发明还提供所述重组质粒 M 2010220 与腺病毒 pAdEasy-1 同源重组，在 QBI-293A 细胞中包装产生的重组腺病毒 Ad-VEGF165-IRES-Ang-1。

通过在 Ad-polyA+promoter 及 Ad-IRES 空载体间亚克隆入

VEGF165 和 Ang-1 构建 VEGF165 和 Ang-1 双基因共表达腺病毒表达载体。PCR、酶切及基因测序表明 polyA-promoter/IRES 介导的 VEGF165 和 Ang-1 双基因共表达载体构建成功；RT-PCR 结果表明，上述 VEGF165 和 Ang-1 双基因共表达腺病毒载体均能介导外源性 VEGF165 和 Ang-1 基因的转录，成功获得了 VEGF165 和 Ang-1 双基因共表达重组腺病毒。

ELISA 结果证实，不仅 polyA-promoter 比 IRES 介导的双基因表达效率高，而且还进一步证明了在用腺病毒表达载体中 Ang-1 和 VEGF165 基因位于 IRES 或 PolyA-promoter 下游基因的表达量均明显低于上游基因表达量。

本发明还提供所述重组腺病毒 Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1、Ad-VEGF165-IRES-Ang-1 在制备促血管生长药物中的应用。

兔角膜缘注射本发明所述重组腺病毒 Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 及 Ad-VEGF165-IRES-Ang-1 能成功诱导角膜新生血管形成，在腺病毒表达载体中，VEGF165 基因位于 IRES 或 polyA-promoter 上游比位于其下游时能更好的诱导角膜新生血管形成。这一结果与 ELISA 所检测到的 VEGF165 和 Ang-1 细胞因子表达水平也基本一致。

兔角膜缘注射重组腺病毒 Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 及 Ad-VEGF165-IRES-Ang-1 能成功诱导角膜新生血管形成，且前者比后者效果更为显著，而无论是 IRES 载体还是 polyA-promoter 载体，VEGF165 基因位于载体下游时则不能很好的诱导角膜新生血管形成。这可能与 VEGF165 基因位于载体下游时的表达量的高低有关。因为血管生成是多种正、负性调节因子直接或间接作用的结果，VEGF/VEGFR、Ang/Tie 2 只有在空间、时间和数量上进行精细调节才能形成有功能的血管，VEGF165 作用于血管形成早期，促进原始血管网形成，而 Ang1 则作用于随后的血管改建、塑形，促进形成成熟、有空间结构的血管网。VEGF 在此过程中起主要作用，Ang1 则起到协同作用。当 VEGF165 位于载体下游时，表达量很低，仅为上游基因表

达量 30%-40%，所以兔角膜边缘注射 Ad-Ang-1-polyA-promoter-VEGF165、Ad-Ang-1-IRES-VEGF165 一月后，几乎未见角膜新生血管生成，结果不能很好的诱导角膜新生血管形成。

本发明的另一个目的是提供一种制备转基因细胞修饰的丝素膜的方法，包含以下步骤：

将骨髓基质细胞接种于丝素膜上，加入所述重组腺病毒 Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 或 Ad-VEGF165-IRES-Ang-1，所述再生丝素膜每平方厘米上骨髓基质细胞浓度为 0.5×10^5 - 1×10^5 ，重组腺病毒接种量为 20-30MOI，于 37℃，5%CO₂ 条件培养。

骨髓基质细胞（Marrow stromal cells，MSC）具有典型的干细胞特点，有多向分化潜能和强大的增殖能力，骨髓基质细胞取材方便，可在细胞培养时利用该细胞贴壁生长的特性将其分离纯化，而造血细胞在换液时逐步被清除，便于自体移植。

作为优选，所述骨髓基质细胞处于对数生长期。

作为优选，所述骨髓基质细胞为原代培养的骨髓基质细胞，细胞浓度 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 。

作为优选，所述培养时间为 48-72 小时。

本发明还提供所述方法制备的转基因细胞修饰的丝素膜。

本发明还提供所述转基因细胞修饰的丝素膜在制备制备血管诱导性的医用生物材料的应用。

丝素膜是由丝素蛋白经物理或化学方法合成一种生物相容性很好的新型医用生物材料，不仅无细胞毒性，对种子细胞遗传学特性无影响，对细胞周期和凋亡没有不良影响，对机体也不引起炎症反应，不引起溶血，而且表现出卓越的生物相容性，细胞在丝素材料上能很好的粘附、扩增和增殖，利于内皮化形成血管样组织，体内试验能修复骨缺损和愈合皮肤创伤。

在本发明的实施例中，丝素膜是物理交联再生丝素膜，家蚕丝素是由乙氨酸、丙氨酸、丝氨酸等 18 种氨基酸所组成的天然蛋白质，将家蚕丝用 Na₂CO₃ 溶液脱胶，CaCl₂·CH₃CH₂OH·H₂O（摩尔比为 1：2：8）

三元溶剂溶解，经透析、过滤后，流延法60℃干燥成膜，经Co-60辐照灭菌后密封保存备用，即为物理交联再生丝素膜，以下简称为再生丝素膜。

将处于对数生长期的兔骨髓基质细胞消化调至细胞浓度 $1 \times 10^5/\text{ml}$ ，以1ml/孔接种于铺有再生丝素膜的24孔细胞培养板上，实验分组同前，感染病毒48h后，取各组上清，按ELISA检测试剂盒说明测定Ang1、VEGF的含量。结果显示：未经转基因修饰的兔骨髓基质细胞仅能低水平分泌VEGF165及Ang-1细胞因子，但接种本发明所述重组腺病毒组表达VEGF165及Ang-1水平明显提高。

植入转Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang1基因细胞修饰的再生丝素膜后角膜基质内SF+MSC+Ad-VEGF165-Ang-1组的HE染色可见丰富的毛细血管，CD34免疫组化分析呈现明显强阳性，微血管密度为 (17 ± 3.5) 个/高倍视野，而SF+MSC+Ad-GFP组与SF+MSC组角膜基质内毛细血管少见，未见明显CD34阳性表达，差别有统计学意义(* $P < 0.05$)。

兔角膜层植入转VEGF165及Ang-1基因细胞修饰的再生丝素膜后的SF+MSC+Ad-VEGF165-Ang-1组角膜基质内可见VEGF165、Ang-1阳性表达，呈现棕黑色，而SF+MSC+Ad-GFP组与SF+MSC组角膜基质内未见明显VEGF及Ang-1阳性表达，差别有统计学意义($P < 0.05$)。

兔角膜层植入转VEGF165及Ang-1基因细胞修饰的再生丝素膜后的SF+MSC+Ad-VEGF165-Ang-1组HIF- α 、bFGF的表达呈棕黑色，显著高于SF+MSC+Ad-GFP组与SF+MSC对照组($P < 0.05$)；而EGF、PDGF的表达与SF+MSC+Ad-GFP组与SF+MSC对照组均呈现棕色，组间无统计学意义($P > 0.05$)，说明转VEGF165及Ang-1基因细胞修饰的再生丝素膜不仅VEGF165及Ang-1目的基因使能在角膜层中有效表达，而且能促进骨髓基质细胞分泌的HIF- α 、bFGF水平提高，并维持骨髓基质细胞分泌的EGF、PDGF的正常稳定表达。

与现有技术相比，本发明提供的经PolyA-promoter和IRES构

建的 VEGF165 及 Ang-1 双基因重组转移质粒 pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 (保藏编号为 CCTCC M 2010221) 和 pAdTrack-CMV-VEGF165-IRES-Ang-1 (保藏编号为 CCTCC M 2010220), 以及经 QBI-293A 细胞包装产生的 Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 和 Ad-VEGF165-IRES-Ang-1 重组腺病毒载体使 VEGF165 和 Ang-1 基因理想而又成功的组合在同一个载体上, 均能获得成功表达, 并且通过双基因表达产物的联合作用, 促进血管生成和创伤修复。

大鼠创伤修复实验进一步证明, 本发明所述转基因骨髓基质细胞修饰的丝素材料还可促进创伤组织的血管生成, 为进一步研制出具血管诱导性的医用生物材料如小口径人工血管创造了条件。

生物材料保藏信息说明:

1、pAdTrack-CMV-Ang-1-IRES-VEGF165 质粒, 已于 2010 年 9 月 15 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 地址为中国武汉大学, 保藏编号为 CCTCC M 2010220, 分类命名为大肠杆菌 DH5a/pAdTrack-CMV-hVEGF165-IRES-hAng-1。

2、pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 质粒, 已于 2010 年 9 月 15 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 地址为中国武汉大学, 保藏编号为 CCTCC M 2010221, 分类命名为大肠杆菌 DH5a/pAdTrack-CMV-hVEGF165-polyA-Promter-hAng-1。

附图说明:

图 1 示本发明所述 AdTrack-CMV-PolyA-promoter 质粒图谱。

图 2 示兔角膜新生血管生长面积计算图例。

图 3 示 HE 及免疫组化法检测病毒注射角膜缘后诱导血管形成的能力。

图 4 示再生丝素膜上兔骨髓基质细胞中 VEGF165、Ang-1 基因的 RT-PCR 电泳图。

1.SF+MSC 组; 2. SF+MSC+Ad-GFP 组; 3. SF+MSC+Ad-VA 组。

图 5 示转基因细胞修饰的再生丝素膜植入兔角膜层后对角膜新生血管形成的影响; SF:再生丝素膜; MSC: 兔骨髓基质细胞。

图 6 示植入转基因细胞修饰的再生丝素膜的兔角膜层中 VEGF165、Ang-1、HIF- α 、bFGF、EGF、PDGF 免疫组化分析统计图。

图 7 示免疫组化检测大鼠创伤恢复组织中 VEGF 的表达: SFMSCVA 组分别与 PBS 组, SF 组, SFMSC 组比较, $\triangle P < 0.05$; SFMSC 组分别与 PBS 组, SF 组比较, $* P < 0.05$ 。

图 8 示免疫组化检测大鼠创伤恢复组织中 Ang-1 的表达: SFMSCVA 组分别与 PBS 组, SF 组, SFMSC 组比较, $\triangle P < 0.05$; SFMSC 组分别与 PBS 组, SF 组比较, $* P < 0.05$ 。

图 9 示免疫组化检测大鼠创伤恢复组织中 CD34 的表达: SFMSCVA 组分别与 PBS 组, SF 组, SFMSC 组比较, $\triangle P < 0.05$; SFMSC 组分别与 PBS 组, SF 组比较, $* P < 0.05$ 。

具体实施方式

为了进一步了解本发明, 下面结合实施例对本发明优选实施方案进行描述, 但是应当理解, 这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点, 而不是对本发明权利要求的限制。

以下以具体实施例说明本发明的效果, 但本发明的保护范围不受以下实施例的限制。

本发明公开了一种双基因共表达载体以及转基因骨髓基质细胞修饰的再生丝素膜, 本领域技术人员可以借鉴本文内容, 适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是, 所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的, 它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述, 相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合, 来实现和应用本发明技术。

按照本发明, 角膜缘注射本发明所述重组腺病毒能成功诱导角膜新生血管形成; 培养于丝素膜上生长的兔骨髓基质细胞经本发明所述

重组腺病毒感染细胞后,可成功表达 VEGF165 及 Ang-1 基因;转基因细胞修饰的丝素膜植入兔角膜层后 2 周新生血管长入丝素膜植入区域的角膜内且维持 1 月以上,HE 染色与免疫组化显示血管密度明显增多,VEGF165、Ang-1、CD34 在兔角膜层中获得成功表达。大鼠创伤修复实验进一步证明本发明所述转基因骨髓基质细胞修饰的丝素膜还可促进创伤组织的血管生成,说明本发明所述重组腺病毒以及转基因骨髓基质细胞修饰的丝素膜具有潜在的应用价值。

为了进一步了解本发明,下面结合实施例对本发明优选实施方案进行描述,但是应当理解,这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点,而不是对本发明权利要求的限制。

以下以具体实施例说明本发明的效果,但本发明的保护范围不受以下实施例的限制。

实施例 1: pAdTrack-CMV-Ang-1-PolyA-promoter-VEGF165 双基因重组转移质粒图谱

在申请号为 200810244301.3 中国发明专利申请说明书公开 polyA Δ 296~298-promoter (简称 PolyA-promoter) 和 IRES 序列。本发明所述双基因重组转移质粒是在 pAdTrack-CMV-PolyA-promoter 转移质粒的基础上,在 Bgl II、Sal I 酶切位点间插入 Ang-1 片段,在 Not I、Xho I 酶切位点间插入 VEGF165 片段,质粒图谱如图 1 所示。

实施例 2: 目的基因的克隆

比对 Ang-1 的保守序列,设计引物 P1、P2 (如表 1),两端分别引入 Bgl II、Sal I 酶切位点;以本科室已构建的含有 Ang-1 片段的 pAdTrack-CMV-Ang-1-IRES-VEGF165 质粒为模板,PCR 扩增获得的 Ang-1 目的片段的 PCR 产物经琼脂糖电泳鉴定。

比对 VEGF165 的保守序列,设计引物 P3、P4 (如表 1),两端分别引入 Not I、Xho I 酶切位点,以本科室已构建的含有 VEGF165 片段的 pAdTrack-CMV-Ang-1-IRES -VEGF165 质粒为模板,PCR 扩增获

得的 VEGF165 目的片段的 PCR 产物经琼脂糖电泳鉴定。

表 1 PCR 引物

	Sense	Antisense
Ang-1 (Bgl II 、 Sal I)	P1:5'-tagagatctatgacagtt ttcctttcctttgc -3'	P2:5'-Accgtcgacctcaaaaatct aaaggtcgaatcatc-3'
VEGF165 (Not I 、 Xho I)	P3:5'-gcagcggccgcatga actttctgctgtcttggtg-3'	P4:5'-Taactcgagtcaccgcctcg gcttgtcacatc-3'
VEGF165 (Bgl II 、 Sal I)	P5:5'-gcaagatctatgaacttt ctgctgtcttggtg -3'	P6:5'-Taagtcgacctcaccgcctc ggcttgtcacatc-3'
Ang-1 (Not I 、 Xho I)	P7:5'-taggcggccgcatgac agtttctcttctttgc-3'	P8:5'-accctcgagtcaaaaatctaa aggtcgaatcatc-3'

PCR 条件为: 94℃预变性 2min, 94℃变性 50s, 58℃退火 50s, 72℃延伸 50s, 共循环 30 次, 最后 72℃后延伸 10min。

PCR 体系如下:

10×PCR 缓冲液 (含有 Mg ²⁺)	5μl
dNTPmix(10mM each)	1μl
引物 P1 (25μM)	1μl
引物 P2 (25μM)	1μl
pAdTrack-CMV-Ang-1-IRES-VEGF165 质粒模板	1μl
ddH ₂ O	40μl
Taq DNA 聚合酶 (5U/μl)	1μl
终体积	50μl

实施例 3: pAdTrack-CMV-Ang-1-PolyA-promoter 单基因重组转移质粒的构建

将由 DNA 清洁试剂盒纯化的 Ang-1 基因的 PCR 产物和小量质粒抽提试剂盒提取的转移质粒 pAdTrack-CMV-PolyA-promoter 分别用 Bgl II 、 Sal I 37℃双酶切 5h 后, 割胶回收目的片段, 按试剂盒胶回收

方法和步骤操作, 然后用 T4 DNA 连接酶将其在 4℃ 连接过夜, 继而再将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 并在含 Kana(50 μ g/ml)抗性平板中挑选阳性单克隆, 经 PCR、双酶切鉴定和 DNA 序列测定鉴定后, 阳性克隆菌-20℃冰箱保种备用。

双酶切体系如下:

pAdTrack-CMV-PolyA-promoter 质粒双酶切体系		Ang-1 PCR 产物双酶切体系	
10×Buffer H	2 μ l	10×Buffer H	3 μ l
pAdTrack-CMV-PolyA-promoter 质粒	15 μ l	VEGF165 PCR 产物	23 μ l
Bgl II	1.5 μ l	Bgl II	2 μ l
Sal I	1.5 μ l	Sal I	2 μ l
终体积	20 μ l	终体积	30 μ l

连接体系如下:

纯化的双酶切 Ang-1 PCR 产物	8 μ l
纯化的双酶切 pAdTrack-CMV-PolyA-promoter 大片段	8 μ l
10×Buffer	2 μ l
T4 DNA ligase	2 μ l
终体积	20 μ l

CaCl₂ 法制备 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞和转化技术路线如下:

转化前一天, DH5 α 按 1%接种 5ml LB 培养基 37℃培养过夜, 按 1%转种 5ml LB 培养基 37℃培养, 至 OD_{600nm} 约为 0.2(约培养 1.3h), 将菌液倒入 5 ml 离心管中 5000r/min, 离心 5min 收集菌体, 加入 5ml 预冷的 100mM CaCl₂, 悬浮菌体后 0℃, 20~30min 后, 5000 r/min, 离心 5min 收集菌体用约 600 μ l 100mM 预冷 CaCl₂ 悬浮菌体, 并按下表进行转化, 并置隔水式恒温培养箱 37℃培养 16h 挑阳性克隆鉴定, 即得到 pAdTrack-CMV-Ang-1-PolyA-promoter 单基因重组转移质粒, 质粒抽提、PCR 和双酶切鉴定方法同上。

转化组	受体菌	DNA	培养板
阳性组	60μl	1μl 质粒	Kana
阴性组	60μl	—	Kana
实验组	60μl	20μl 连接液	Kana

实施例 4: 构建 pAdTrack-CMV- Ang-1-PolyA-promoter-VEGF165 双基因重组转移质粒

在 VEGF165 基因克隆和实施例 2 构建的 pAdTrack-CMV-Ang-1-PolyA-promoter 单基因重组转移质粒的基础上, 将经 Not I、Xho I 双酶切并经胶回收的 VEGF165 基因片段和 pAdTrack-CMV-Ang-1-PolyA-promoter 质粒片段, 用 T4 DNA 连接酶连接, 构建 pAdTrack-CMV- Ang-1-PolyA-promoter-VEGF165 双基因重组转移质粒。

实施例 5: pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 双基因重组转移质粒的构建

参照实施例 1-4, 对 VEGF165 和 Ang-1 的保守序列, 设计引物 P5、P6 及 P7、P8 (如表 1), VEGF165 引物两端分别引入 Bgl II、Sal I 酶切位点; Ang-1 引物两端分别引入 Not I、Xho I 酶切位点, 以含有 VEGF165 和 Ang-1 片段的 pAdTrack-CMV-Ang-1-IRES-VEGF165 质粒为模板, PCR 扩增获得的 VEGF165 和 Ang-1 目的片段的 PCR 产物经琼脂糖电泳鉴定。

双酶切目的基因 PCR 产物及 pAdTrack-CMV-PolyA-promoter 空载体质粒, 胶回收后用 T4 DNA 连接酶将其 4℃连接过夜, 继而连接产物转化大肠杆菌 DH5α 和含 Kana(50μg/ml)的 LB 琼脂平板筛选挑单克隆, 由此在多克隆位点(MCS)中在 Bgl II、Sal I 酶切位点间插入 VEGF165 片段, 在 Not I、Xho I 酶切位点间插入 Ang-1 片段。并用 PCR、双酶切鉴定和 DNA 序列测定, 阳性克隆菌保种备用。

pAdTrack-CMV-VEGF165-IRES-Ang-1 双基因重组转移质粒的构建: 在 pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 双基因重组转移质粒构建的基础上, 将经 Bgl II、Sal I 双酶切并经胶回收的 pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 的 VEGF165 基因片段和 pAdTrack-CMV-IRES 质粒大片段, 用 T4 DNA 连接酶连接, 构建 pAdTrack-CMV-VEGF165-IRES 单基因重组转移质粒。其构建方法同实施例 3。

经 Not I、Xho I 双酶切并经胶回收的 pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 的 Ang-1 基因片段和 pAdTrack-CMV-VEGF165-IRES 单基因重组转移质粒大片段, 并用 T4 DNA 连接酶将其 4℃ 连接过夜, 继而连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 和含 Kana(50 μ g/ml) 的 LB 琼脂平板筛选挑单克隆, 并用 PCR、双酶切鉴定, 阳性克隆菌保种备用。其方法同实施例 4, 所述双基因重组转移质粒 pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 已于 2010 年 9 月 15 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC M 2010221。

参照上述方法构建 pAdTrack-CMV-VEGF165-IRES-Ang-1、pAdTrack-CMV-Ang-1-IRES-VEGF165 质粒, 其中所述双基因重组转移质粒 pAdTrack-CMV-VEGF165-IRES-Ang-1 已于 2010 年 9 月 15 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC M 2010220。

实施例 6: 双基因重组转移质粒的鉴定

重组载体 pAdTrack-CMV-Ang-1-PolyA-promoter-VEGF165 质粒为模板, P1、P2 为引物 PCR 能扩增出 Ang-1 目的基因片段, 其大小与预期扩增的 Ang-1 理论值大小 (1497bp) 相一致, 以 P3、P4 为引物 PCR 能扩增出 VEGF165 目的基因片段, 其大小与预期扩增的 VEGF165 理论值大小 (576bp) 相一致。经 Bgl II、Sal I 酶切释放出 1497bp 大小的 Ang-1 片段, Not I、Xho I 酶切释放出 576bp 大小的 VEGF165 片

段，均表明 Ang-1 及 VEGF165 目的基因片段已成功亚克隆于 pAdTrack-CMV-PolyA-promoter 改造空转移质粒中。DNA 序列测定进一步证实成功构建了 pAdTrack-CMV-Ang-1-PolyA-promoter-VEGF165 双基因重组转移质粒。

参照上述方法，对其他双基因重组转移质粒 pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1、pAdTrack-CMV-VEGF165-IRES-Ang-1 等进行鉴定及 DNA 序列测定，进一步证实构建成功。

实施例 7：同源重组腺病毒质粒的构建和鉴定

将 pAdTrack-CMV-Ang-1-PolyA-promoter-VEGF165、pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 和 pAdTrack-CMV-VEGF165-IRES-Ang-1 重组转移质粒分别与骨架质粒 pAdEasy-1 在 BJ5183 细菌中同源重组后挑克隆提取质粒，据分子量大小初步筛选 pAdEasy-1-pAd-Ang-1-PolyA-promoter-VEGF165、pAdEasy-1-pAd-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 和 pAdEasy-1-pAd-VEGF165-IRES-Ang-1 同源重组阳性克隆，琼脂糖电泳结果表明，pAd-Ang-1-PolyA-promoter-VEGF165 与 pAdEasy-1 共转化组所挑的 5 个克隆有 4 个为阳性克隆；pAd-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 与 pAdEasy-1 共转化组所挑的 6 个克隆有 5 个为阳性克隆；pAd-VEGF165-IRES-Ang-1 与 pAdEasy-1 共转化组所挑的 4 个克隆有 2 个为阳性克隆；PacI 酶切鉴定均可获得 30kb 大小左右的腺病毒基因组片段和独特的 4.5kb 或者 3.0kb 大小的 ori 及卡那霉素抗性编码基因片段。

实施例 8：重组腺病毒的包装、扩增及其效价检测

Pac I 线性化的 pAdEasy-1-pAd-Ang-1-PolyA-promoter-VEGF165、pAdEasy-1-pAd-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 和 pAdEasy-1-pAd-VEGF165-IRES-Ang-1 同源重组腺病毒质粒按

Lipofectamine™2000 操作说明经 Lipofectamin 脂质体分别转染 293A 细胞后，荧光显微镜下可见 GFP 的表达，且荧光强度随培养时间延长逐渐增强。转染 10d 后分别收集 Ad-Ang-1-PolyA-promoter-VEGF165 、 Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 、 Ad-VEGF165-IRES-Ang-1 和 Ad-Ang-1-IRES-VEGF165 第一代腺病毒，再二次感染 293A 细胞，在倒置荧光显微镜下可观察到荧光，并出现 CPE，结果表明该四种病毒在 293A 细胞中包装成功。经多轮感染、扩增后，最终获得可达 5×10^9 pfu/ml 效价病毒子于 -80°C 保存备用。

实施例 9: 重组腺病毒的 RT-PCR 鉴定

分别收集经 Ad-Ang-1-PolyA-promoter-VEGF165 、 Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 、 Ad-VEGF165-IRES-Ang-1 感染的 QBI-293A 细胞和未感染病毒的 QBI-293A 细胞，提取其总 RNA 进行 RT-PCR，以制备的 3 组 cDNA 为模板，P1、P2；P3、P4 为引物分别鉴定 VEGF165、Ang-1、内参照 β -actin 基因在 QBI-293A 细胞中的转录。可见各感染组均可产生预期大小的 576bp VEGF165、1497bp Ang-1 产物；QBI-293A 未感染病毒的细胞对照组在相应位置均未产生上述条带。RT-PCR 鉴定结果初步表明成功构建了由 IRES 介导和 polyA+promoter 介导的三套 Ang-1 和 VEGF165 双基因共表达重组腺病毒表达载体。

实施例 10: ELISA 法比较四种重组腺病毒在 WI-38 细胞中 VEGF165 和 Ang-1 细胞因子分泌水平

将处于对数生长期的 WI-38 细胞消化调至细胞浓度 1×10^8 L-1，以 1ml/孔接种于 24 孔细胞培养板上，细胞培养 24h 后用 50MOI 的 Ad-Ang-1-PolyA-promoter-VEGF165、Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 、 Ad-Ang-1-IRES-VEGF165、Ad-VEGF165-IRES-Ang-1 和空载体 Ad-GFP 腺病毒感染 WI-38 细胞，每组设 3 个复孔，感染病毒 48h 后，观察细胞生长形态及病毒感染后荧光强度。

上述各组细胞在病毒感染 48h 后, 取各组细胞培养上清, 用 ELISA 法测定上清中 VEGF165 和 Ang-1 的含量, 结果显示: PBS 组与 Ad-GFP 组中各组 WI-38 细胞分泌较少水平的 VEGF165 和 Ang-1 细胞因子, 但 IRES/PolyA-promoter 介导的 VEGF165 及 Ang-1 双基因组可使导入 VEGF165 和 Ang-1 目的基因各组的 WI-38 细胞中的表达水平均有更明显的提高 ($P < 0.05$); IRES 介导的 Ang-1 及 VEGF165 基因, 无论在 IRES 上游或下游, 其表达量均低于由 polyA-promoter 介导的相同位置的 Ang-1 及 VEGF165 基因表达量 ($P < 0.05$), 同时 Ang-1/VEGF165 在同一载体上、下游不同位置, 其下游基因的表达量均明显低于上游基因表达量 ($P < 0.05$)。

结果表明, 腺病毒介导的 VEGF165 及 Ang-1 双基因载体能在 WI38 细胞中有效表达; polyA-promoter 比 IRES 介导的双基因表达效率高, 同时两者下游基因的表达量均明显低于上游基因表达量。

实施例 11: 兔角膜缘注射 IRES/PolyA-promoter 介导的 VEGF165 及 Ang-1 双基因病毒诱导角膜新生血管能力的比较

取新西兰大白兔 10 只, 随机分为五组, 分别注射 Ad-Ang-1-PolyA-promoter-VEGF165、Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1、Ad-Ang-1-IRES-VEGF165、Ad-VEGF165-IRES-Ang-1 及 Ad-GFP 病毒。肌肉注射氯胺酮 5mg/kg 全身麻醉, 兔眼周擦拭安尔碘消毒, 每只眼滴 1~2 滴倍诺喜表面麻醉, 置开睑器, 用庆大霉素注射液冲洗双眼结膜囊。每只兔眼上方 12 点角巩膜缘处角膜基质内注射上述五种病毒各 0.05ml, 注射结束庆大霉素注射液再次冲洗结膜囊, 涂金霉素眼膏。角膜基质内注射病毒第 3 天, 第 1 周, 第 1 月分别照相记录角膜新生血管形成情况。角膜新生血管生长面积计算按 Robert 电脑数学模型公式计算: $C/12 \times 3.1416[r^2 - (r-l)^2]$ (图 2)。其中 C 为发生新生血管的角膜圆周钟点数, r 为角膜半径, l 为血管长度。

结果显示: 注射 Ad-VEGF165-polyA-promoter-Ang-1、Ad-VEGF165-IRES-Ang-1 的兔角膜边缘, 1w 后角膜缘注射区附近结膜

血管中度充血，充血局限在病毒注射区域；注射后 2 w 角膜缘附近结膜充血稍有减轻，可见毛刷样新生血管长入角膜内；注射后第 4w 结膜充血明显减轻，可见角膜新生血管已延伸至瞳孔缘，其顶端分叉，部分交织呈网状；且前者比后者更为显著（ $p < 0.05$ ）；而注射 Ad-Ang-1-polyA-promoter-VEGF165、Ad-Ang-1-IRES-VEGF165 及 Ad-GFP 的兔角膜边缘，1w 后仅引起角膜缘注射区附近结膜轻度充血，注射后 2 w 结膜充血既明显减轻，仅少量血管长入角膜内，且局限于角膜边缘，注射后第 4w 结膜充血完全消退，角膜内仅存极少量新生血管，该三组间无明显统计学差异（ $p > 0.05$ ）。

表明兔角膜缘注射 Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1 及 Ad-VEGF165-IRES-Ang-1 能成功诱导角膜新生血管形成，且前者比后者效果更为显著，而无论是 IRES 载体还是 polyA-promoter 载体，VEGF165 基因只有位于载体上游时才能成功的诱导角膜新生血管形成，位于载体下游时则不能很好的诱导角膜新生血管形成。

实施例 12：免疫组化法检测兔角膜中 VEGF165 及 Ang-1 的表达。

参照实施例 10 所述方法兔角膜注射病毒一月后，注射处死实验兔，摘除眼球，取全角膜片立即置 10%福尔马林固定，常规石蜡包埋，垂直于角膜表面连续切片，厚约 5 μ m。将包埋的角膜组织按免疫组化 SP 法分别检测 VEGF165、Ang-1 因子的表达，染色结果：细胞浆黄色(+)；棕色(++)；棕黑色(+++)。

结果显示：注射含 VEGF165 及 Ang-1 病毒的兔角膜层中均可见 VEGF165、Ang-1 不同程度的阳性表达，其中 VEGF165 和 Ang-1 位于 polyA-promoter/IRES 上游时比位于下游时阳性表达更为明显，呈棕黑色(+++)，而注射 Ad-GFP 病毒的角膜层中未见明显 VEGF165 及 Ang-1 阳性表达。

实施例 13：HE 染色及 CD34 免疫组化法检测兔角膜中新生血管密度

参照实施例 10 所述方法兔角膜缘注射双基因病毒，分别于注射病

毒 1 月后空气注射处死实验兔，摘除眼球。取全角膜片立即置 10%福尔马林固定，常规石蜡包埋，垂直于角膜表面连续切片，厚约 5 μ m。HE 染色及 CD34 免疫组化法检测兔角膜中微血管密度。以含红细胞的红色血管腔（HE 染色）或棕黄色血管腔（CD34 染色）为阳性血管数。免疫组化检测每张切片 100 倍光镜下观察，共记数 10 个视野进行分析统计。所有数据用 $\bar{X} \pm S$ 表示，用 SAS 软件对所有实验数据进行统计学处理，采用方差分析， $P < 0.05$ 。

结果如图 3 所示，注射 Ad-VEGF165-polyA-promoter-Ang-1、Ad-VEGF165-IRES-Ang-1 的兔角膜与注射 Ad-Ang-1-polyA-promoter-VEGF165、Ad-Ang-1-IRES-VEGF165 及 Ad-GFP 的角膜相比，HE 染色可见丰富的毛细血管，CD34 免疫组化分析呈现明显强阳性，微血管密度为 (11.9 ± 2.4) 个/高倍视野，差别有统计学意义 ($P < 0.05$)，且前者比后者更为显著 ($P < 0.05$)；而注射 Ad-Ang-1-polyA-promoter-VEGF165、Ad-Ang-1-IRES-VEGF165 及 Ad-GFP 的三组兔角膜边缘内毛细血管均少见，未见明显 CD34 阳性表达，差别无统计学意义 ($P > 0.05$)。

实施例 14：兔骨髓基质细胞的分离和培养

取新西兰大白兔一只(苏州大学实验动物中心)，骨髓穿刺法获得兔骨髓原代细胞，加入含 5% 胎牛血清的合成细胞培养基(EBM-2-MV)中，置 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 下培养。将 3 d 后换液，以去除未贴壁的血细胞。7~14d 细胞即可铺满细胞培养瓶底，兔骨髓基质细胞(Rabbit bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)呈贴壁生长，并形成细胞集落，经换液或传代，非贴壁的杂细胞被清除，基质细胞得以纯化而继续培养。

0.25%胰酶消化原代分离培养的骨髓基质细胞[MSC]，调至细胞浓度 1×10^8 L⁻¹，以 1ml/孔接种于铺有再生丝素膜[SF]的 24 孔培养板上，分三组：实验组（加入 50MOI Ad-VEGF165-polyA-promoter-Ang-1 的 SF+MSC+Ad-VEGF165-polyA-promoter-Ang-1 组，简称：

SF+MSC+Ad-VA 组)、阴性对照组(加入 50MOI Ad-GFP 的 SF+MSC+Ad-GFP 组)、细胞对照组(SF+MSC 组), 每组设三个复孔, 于 37℃, 5%CO₂ 条件下培养 72 h 后在倒置荧光显微镜下观察细胞形态变化及荧光感染情况。

再生丝素膜上生长的兔骨髓基质细胞呈贴壁生长, 状态良好, 细胞透明, 形态完整, 呈梭形伸展。感染腺病 Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1、Ad-GFP 的兔骨髓基质细胞在荧光显微镜下可见强绿色荧光, 而未感染腺病毒的细胞则无荧光。这显示再生丝素膜对转基因细胞生长无不良作用。

实施例 15: RT-PCR 法检测再生丝素膜上 Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang1 转基因兔骨髓基质细胞的细胞因子转录水平

用 50MOI 的 Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang1 和 Ad-GFP 病毒分别感染再生丝素膜上培养的兔骨髓基质细胞 48h 后, 收集细胞, PBS 洗涤 2-3 次, 按试剂盒说明书要求提取细胞总 RNA, 用 VEGF165 引物 P5: 5'-gcaagatctatgaactttctgctgtcttgggtg-3',

P6: 5'-taagtcgacctcaccgcctcggcttgtcacatc-3',

Ang1 引物 P7: 5'-taggcggccgcatgacagtttcccttgc-3',

P8: 5'-accctcgagtcaaaaatctaaaggctgaatcatc-3' 进行 RT-PCR 鉴定, PCR 反应条件为 94℃ 4min, 94℃ 50sec、58℃ 50sec、72℃ 1min、35 cycle, 72℃ 10min, 最后各取 10μl 产物与 DNA Marker 行琼脂糖凝胶电泳。

结果如图 4 显示: SF+MSC+Ad-VA 组的 VEGF165、Ang-1 基因和 β-actin 均出现阳性条带; 而 SF+MSC 组及 SF+MSC+Ad-GFP 组均只有 β-actin 出现阳性条带。

实施例 16: ELISA 法检测再生丝素膜上 Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang1 转基因兔骨髓基质细胞的细胞因子分泌水平将处于对数生长期的兔骨髓基质细胞(MSC)消化调至细胞浓度 1×10^5 /ml, 以 1ml/孔接种于铺有再生丝素膜(SF)的 24 孔细胞培养板上, 实验分组同前, 感

染病毒 48h 后，取各组上清，按 ELISA 检测试剂盒说明测定 VEGF、Ang1 的含量。结果显示：SF+MSC 组与 SF+MSC+Ad-GFP 组中兔骨髓基质细胞仅能低水平自分泌 VEGF165 及 Ang-1 细胞因子，但 SF+MSC+Ad-VA 组表达水平明显提高（* $P < 0.05$ ）。

实施例 17：Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang1 转基因兔骨髓基质细胞修饰的再生丝素膜植入兔角膜层后新生血管的观察及测量

肌肉注射氯胺酮 5mg/kg 全身麻醉，兔眼周擦拭安尔碘消毒，每只眼滴 1~2 滴倍诺喜表面麻醉，置开睑器，用庆大霉素注射液冲洗双眼结膜囊。以角膜 12 点方向为中心“L”形（5×4mm）切开角膜基质，深度为 1/2 角膜厚度，用钻石刀水平分离角膜基质层，在角膜基质内形成 5×4mm 囊袋，将 4×3mm 转基因细胞修饰的再生丝素膜埋入角膜层间，角膜切口缝合 3 针，植入结束后庆大霉素注射液再次冲洗结膜囊，涂金霉素眼膏。

兔角膜植入转基因细胞修饰的再生丝素膜后第 1 周，第 2 周，第 1 月分别照相记录角膜新生血管形成情况。角膜新生血管生长面积计算按 Robert 电脑数学模型公式计算： $C / 12 \times 3.1416 [r^2 - (r-l)^2]$ （图 2）。其中 C 为发生新生血管的角膜圆周钟点数，r 为角膜半径，l 为血管长度，统计结果见图 5。

兔角膜层植入转基因细胞修饰的再生丝素膜 1w 后，五组兔角膜缘均出现的中度结膜充血，充血局限于手术切口周围；丝素材料（SF）植入区域的角膜轻度水肿；角膜缘可见毛刷样细小毛细血管；再生丝素材料植入 2w 后各组角膜缘附近结膜充血均减轻，丝素材料植入区域的角膜水肿稍有减轻；SF+MSC+Ad-GFP 组及 SF+MSC 组角膜缘周围毛刷样细小血管逐渐消退，而 SF+MSC+Ad-A（Ad-PolyA-promoter-Ang-1）、SF+MSC+Ad-V（Ad-VEGF-PolyA-promoter）、SF+MSC+Ad-VA 组毛刷样新生血管变粗，由角膜缘延伸入丝素膜植入区域，且 SF+MSC+Ad-V、SF+MSC+Ad-VA 组比 SF+MSC+Ad-A 组更为明显；植入第 4w 后各组结膜充血基本消退；角膜缘处毛细血管完全

消退；SF 植入区域的角膜逐渐透明，SF+MSC+Ad-GFP 组及 SF+MSC 组再生丝素膜植入区域内的新生血管基本消退，而 SF+MSC+Ad-A、SF+MSC+Ad-V、SF+MSC+Ad-VA 组血管形成较多，其中 SF+MSC+Ad-VA 组血管形成更为明显，粗大新生血管已完全覆盖再生丝素膜移植区域，并达到角膜中央区域（* $P < 0.05$ ）。

实施例 18：HE 染色及 CD34 免疫组化法检测转基因细胞修饰的再生丝素膜植入后兔角膜中新生血管密度

分别于角膜植入转基因修饰的再生丝素膜 1 月后空气注射处死实验兔，摘除眼球。取全角膜片立即置 10%福尔马林固定，常规石蜡包埋，垂直于角膜表面连续切片，厚约 5 μ m。HE 染色及 CD34 免疫组化法检测兔角膜中微血管密度。免疫组织化学染色(武汉博士德公司提供一抗，上海基因公司提供二抗)具体方法如下：石蜡切片，0.3%过氧化氢孵育 30min，PBS 浸泡，加入 10%正常山羊血清(PBS 稀释)10min，加入 VEGF(1:30)一抗，PBS 冲洗，滴加广谱生物素标记的二抗 37℃ 孵育，ABC 显色剂显色，复染，封片。以含红细胞的红色血管腔（HE 染色）或棕黄色血管腔（CD34 染色）为阳性血管数。免疫组化检测每张切片 100 倍光镜下观察，共记数 10 个视野进行分析统计。

结果显示，植入转 Ad-VEGF165-Ang1 基因细胞修饰的再生丝素膜后角膜基质内 SF+MSC+Ad-VEGF165-Ang-1 组的 HE 染色可见丰富的毛细血管，CD34 免疫组化分析呈现明显强阳性，微血管密度为 (17 $\pm$ 3.5) 个 / 高倍视野，而 SF+MSC+Ad-GFP 组与 SF+MSC 组角膜基质内毛细血管少见，未见明显 CD34 阳性表达，差别有统计学意义(* $P < 0.05$)。

实施例 19：免疫组化法观察转基因细胞修饰的再生丝素膜植入后角膜层中 VEGF165、Ang-1、HIF- α 、bFGF、EGF、PDGF 的表达

兔角膜植入转基因修饰的再生丝素膜一月后，注射处死实验兔，摘除眼球，取全角膜片立即置 10%福尔马林固定，常规石蜡包埋，垂

直于角膜表面连续切片，厚约 5 μ m。将包埋的角膜组织按免疫组化 SP 法分别检测 VEGF165、Ang-1、HIF- α 、bFGF 等因子的表达，染色结果：细胞浆黄色(+); 棕色(++); 棕黑色(+++)。免疫组化检测每张切片 400 倍光镜下观察，共记数 10 个视野，使用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件分别测量所采集角膜组织中 VEGF165、Ang-1、HIF- α 、bFGF、EGF、PDGF 阳性面积百分比(Ratio of positive area)，计算其平均值。所有数据用 $\bar{X} \pm S$ 表示，用 SAS 软件对所有实验数据进行统计学处理，采用方差分析， $P < 0.05$ 。

结果见图 6，显示：兔角膜层植入转 VEGF165 及 Ang-1 基因细胞修饰的再生丝素膜后的 SF+MSC+Ad-VEGF165-Ang-1 组角膜基质内可见 VEGF165、Ang-1 阳性表达，呈现棕黑色(+++)，而 SF+MSC+Ad-GFP 组与 SF+MSC 组角膜基质内未见明显 VEGF 及 Ang-1 阳性表达，差别有统计学意义 ($P < 0.05$)。

兔角膜层植入转 VEGF165 及 Ang-1 基因细胞修饰的再生丝素膜后的 SF+MSC+Ad-VEGF165-Ang-1 组 HIF- α 、bFGF 的表达呈棕黑色(+++)，显著高于 SF+MSC+Ad-GFP 组与 SF+MSC 对照组 ($P < 0.05$)；而 EGF、PDGF 的表达与 SF+MSC+Ad-GFP 组与 SF+MSC 对照组均呈现棕色(++)，组间无统计学意义 ($P > 0.05$)，说明转 VEGF165 及 Ang-1 基因细胞修饰的再生丝素膜不仅 VEGF165 及 Ang-1 目的基因使能在角膜层中有效表达，而且能促进骨髓基质细胞自分泌的 HIF- α 、bFGF 水平提高，并维持骨髓基质细胞自分泌的 EGF、PDGF 的正常稳定表达。

实施例 20：大鼠骨髓基质细胞的分离和培养

取雄性 SD 大鼠(苏州大学实验动物中心)，拉颈处死后无菌条件下取双侧胫骨和股骨，剪去干骺端，用 EBM-2-MV 完全培养液冲洗骨髓腔，培养液中添加了 SingleQuots，其中含血管内皮细胞生长因子(VEGF)、碱性成纤维生长因子(FGF2)、R3 胰岛素生长因子(R3-IGF-1)、内皮生长因子(EGF)、抗坏血酸及 5% 胎牛血清等相关组分，将含 5% 胎牛血清的合成细胞培养基(EBM-2-MV)，收集冲洗液于培养皿中，

轻轻吹匀，置 37℃，5 % CO₂ 下培养。3 d 后换液，以去除未贴壁的血细胞。7 ~ 14d 细胞即可铺满细胞培养瓶底，大鼠骨髓基质细胞(rat marrow stromal cells, rMSCs)呈贴壁生长，并形成细胞集落，经换液 2-3 次后，非贴壁的杂细胞大部分被清除，骨髓基质细胞得以初步纯化而继续培养。

0.25%胰酶消化原代分离培养的骨髓基质细胞，调至细胞浓度 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ ，以 1ml/孔接种于铺有再生丝素膜的 24 孔培养板上，细胞培养 24h 后用 50MOI 的 Ad-VEGF165 -Ang1 重组腺病毒(Ad-AV 组)和空载体 Ad- PolyA-promoter 与 Ad-IRES (空载体对照组)，同时设未感染病毒的细胞对照组。

实施例 21：大鼠创伤修复实验

1、实验方法

6 ~ 8 周健康雄性 SD 大鼠 40 只，体重 180 ~ 220g，实验时动物用 3.5%水合氯醛按 10ml/kg 体重经腹腔注射麻醉，在脊柱旁腰背部两侧分别作约 2 cm×2cm 的方形切口，深达皮下即皮肤全层。将创伤大鼠分为 4 组：再生丝素膜 (SF) 组、再生丝素膜+MSC 细胞 (SFMSC) 组、再生丝素膜+ MSC 细胞+Ad- VEGF -Ang1 (SFMSCVA) 组及空白对照 (PBS)组，每组为 10 只。选取伤后 7、14 d 共两个时相点，每组每个时相点各 10 个创面(每只大鼠 2 个创面)。距创口周围的 0.5cm 处，在上下左右 4 处将实施例 20 准备好的各组丝素材料用手术线将其与皮肤缝合覆盖创口，空白对照组不作任何处理；术后在其创面外涂红霉素软膏以防感染，将动物单笼喂养，自由进食、水。

术后每天观察动物创口愈合情况，7、14 d 以水合氯醛作腹腔注射麻醉后观察各组血管分布结果，并取其组织置于 10%中性甲醛溶液中固定、石蜡包埋，制作病理切片行 HE 染色，再采用 Ang-1、VEGF 和 CD34 抗体检测组织中目的基因的表达和血管密度。

石蜡切片用免疫组化染色步骤按 SP 免疫组化试剂盒说明书检测 VEGF、Ang-1 和 CD34 因子的表达，初步研究创面愈合的机制。每张

切片 400 倍光镜下观察, 共记数 10 个视野, 使用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件分别测量所采集全层皮肤缺损创面中 VEGF、Ang-1 和 CD34 阳性面积百分比(Ratio of positive area), 计算其平均值。所有数据用 $\bar{X} \pm S$ 表示, 用 SAS 软件对所有实验数据进行统计学处理, 采用方差分析, $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 创面一般观察

伤后 1d, 再生丝素膜+MSC 的 SFMSC 组、再生丝素膜+MSC+Ad-VA 的 SFMSCVA 组伤口开始收缩且出现少许红晕, 表明肉芽组织已在生长, 而其他各组伤口湿润; 伤后 3d, SFMSC 组、SFMSCVA 组较空白对照 PBS 组和再生丝素膜 SF 组肉芽组织生长明显, 创缘皮肤收缩明显; 伤后 7d, 前者伤口干燥、无感染, 创面底部及创缘可见不同程度的新生毛细血管, 而后者伤口湿润、有渗出。伤后 14d, 前者大鼠创缘端表皮增生并覆盖部分创面, 肉芽组织趋于成熟, 而后者创面内肉芽组织疏松, 并且 SFMSCVA 组均高于 SFMSC 组。

2.2 HE 染色观察

结果显示, 术后 7d, SFMSC 组、SFMSCVA 组大鼠创面底部及创缘肉芽组织较致密, 毛细血管和成纤维细胞丰富, 而 PBS 组、SF 组大鼠创面内新生毛细血管较少, 深层肉芽组织疏松; 术后 14 d, SFMSC 组、SFMSCVA 组大鼠创缘端表皮增生并覆盖部分创面, 肉芽组织趋于成熟, 成纤维细胞较丰富, 毛细血管与创面垂直生长, 并且 SFMSCVA 组均高于 SFMSC 组。

2.3 免疫组织化学观察

创伤恢复的组织切片经 VEGF 抗体免疫组化 SP 法染色检测, 结果见图 7-9, 显示 VEGF 主要分布在成纤维细胞及血管内皮细胞的胞浆中, 术后 7d, PBS 组、SF 组 VEGF 为阳性, 而 SFMSC 组、SFMSCVA 组则为强阳性, 其差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后 14d, 各组 VEGF 表达均减弱, 但 SFMSC 组、SFMSCVA 组仍高于 PBS 组、SF 组($P < 0.05$)。

05)，并且 SFMSCVA 组均高于 SFMSC 组，而 PBS 组与 SF 组均没有明显差别。

创伤恢复的组织切片经 Ang-1 抗体免疫组化 SP 法染色检测，结果显示，术后 7d，PBS 组、SF 组 Ang-1 为阳性，而 SFMSC 组、SFMSCVA 组则为强阳性，其差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。术后 14d，各组 Ang-1 表达均减弱，但 SFMSC 组、SFMSCVA 组仍高于 PBS 组、SF 组，并且 SFMSCVA 组均高于 SFMSC 组 ($P < 0.05$)，而 PBS 组与 SF 组均没有明显差别。

创伤恢复的组织切片经 CD34 抗体免疫组化 SP 法染色检测，结果显示，术后 7d，PBS 组、SF 组大鼠全层皮肤缺损创面内毛细血管内皮细胞胞质内 CD34 呈阳性，而 SFMSC 组、SFMSCVA 组则为强阳性，其差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，术后 14d，各组 CD34 阳性的毛细血管数均减少，但 SFMSC 组、SFMSCVA 组大鼠全层皮肤缺损创面中毛细血管数仍高于 PBS 组、SF 组，并且 SFMSCVA 组均高于 SFMSC 组 ($P < 0.05$)，而 PBS 组与 SF 组均没有明显差别。

实施例 22：其它三种双基因重组腺病毒的效果检测

参照实施例 14-21 所述方法，对另外三种双基因重组腺病毒 Ad-Ang-1-IRES-VEGF165、Ad-VEGF165-IRES-Ang-1、Ad-Ang-1-PolyA-promoter-VEGF165 检进行转基因细胞修饰的再生丝素膜植入后观察兔角膜中新生血管密度，角膜层中 VEGF165、Ang-1、HIF- α 、bFGF、EGF、PDGF 的表达，兔骨髓基质细胞的细胞因子转录水平以及大鼠创伤修复实验，检测结果显示，仅仅双基因重组腺病毒 Ad-VEGF165-IRES-Ang-1 具有与 Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang1 重组腺病毒类似的促进血管增生的作用，其转骨髓基质细胞修饰的丝素材料可促进创伤组织的血管生成，实验过程在此不再赘述。

以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

权 利 要 求

1、一种重组质粒 pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1，其保藏号为：CCTCC M 2010221。

2、经权利要求 1 所述重组质粒与腺病毒 pAdEasy-1 同源重组在 QBI-293A 细胞中包装产生的重组腺病毒 Ad-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1。

3、一种重组质粒 pAdTrack-CMV-VEGF165-IRES-Ang-1，其保藏号为；CCTCC M 2010220。

4、经权利要求 3 所述重组质粒与腺病毒 pAdEasy-1 同源重组，在 QBI-293A 细胞中包装产生的重组腺病毒 Ad-VEGF165- IRES-Ang-1。

5、权利要求 2 或 4 所述重组腺病毒在制备促血管生长药物中的应用。

6、一种制备转基因细胞修饰的丝素膜的方法，其特征在于，包含以下步骤：

将骨髓基质细胞接种于丝素膜上，加入权利要求 2 或 4 所述重组腺病毒，所述再生丝素膜每平方厘米上骨髓基质细胞浓度为 0.5×10^5 - 1×10^5 ，重组腺病毒接种量为 20-30MOI，于 37℃，5%CO₂ 条件培养。

7、根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述骨髓基质细胞处于对数生长期。

8、根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述骨髓基质细胞为原代培养的骨髓基质细胞，细胞浓度 1×10^8 L⁻¹。

9、根据权利要求 6-8 任一项所述方法制备的转基因细胞修饰的丝素膜。

10、根据权利要求 9 所述的转基因细胞修饰的丝素膜在制备血管诱导性和创伤修复的医用生物材料的应用。

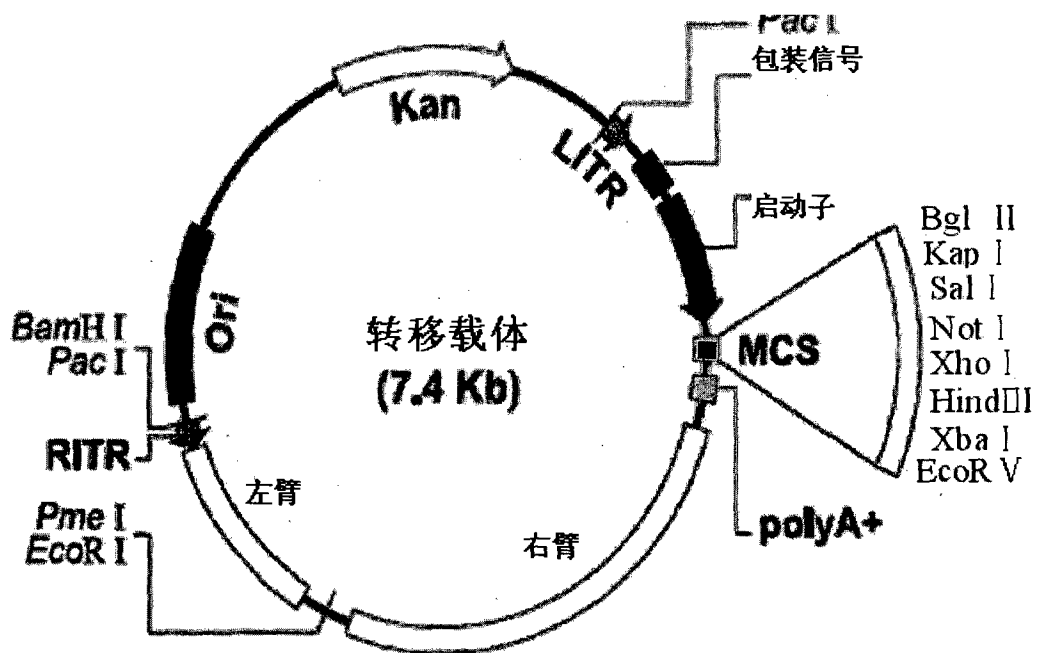


图 1

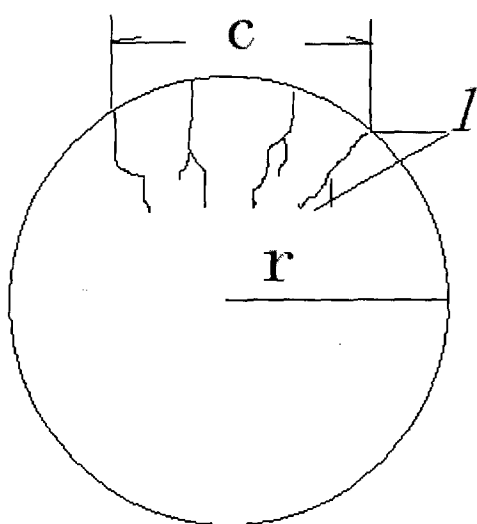


图 2

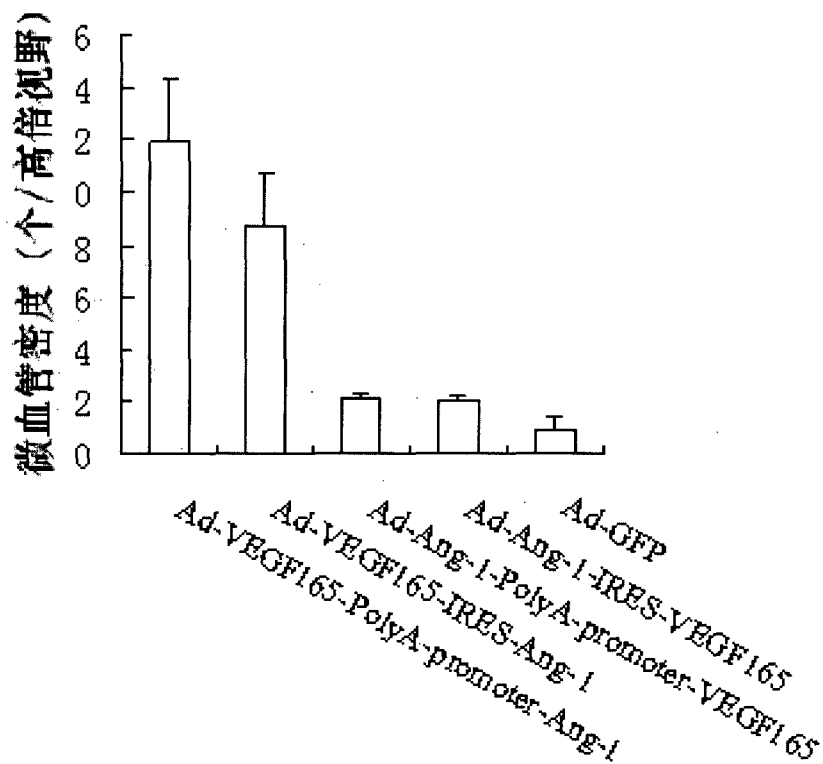


图 3

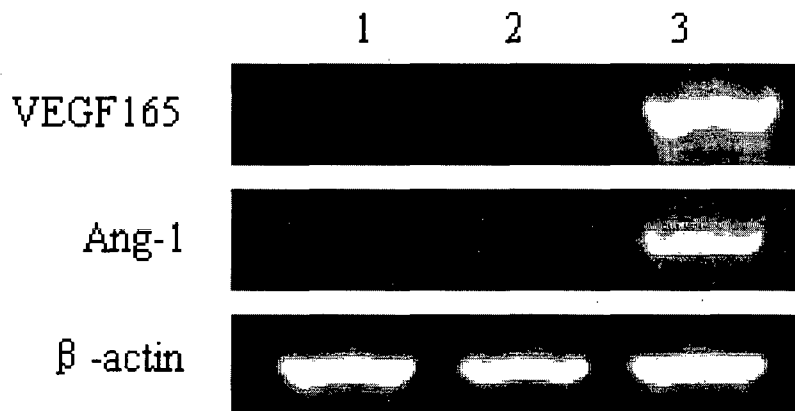


图 4

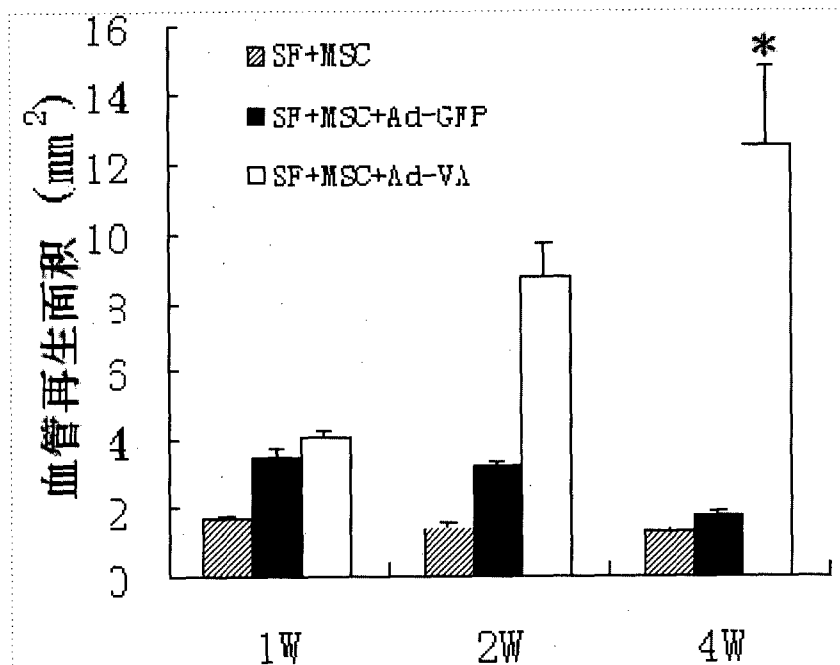


图 5

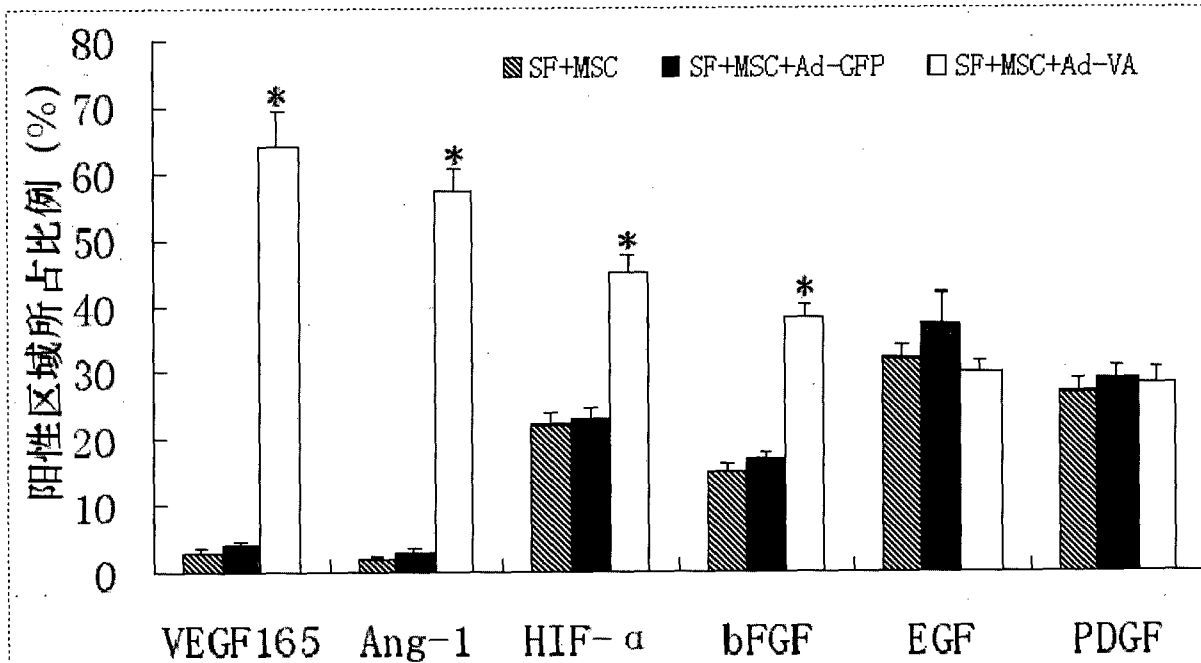


图 6

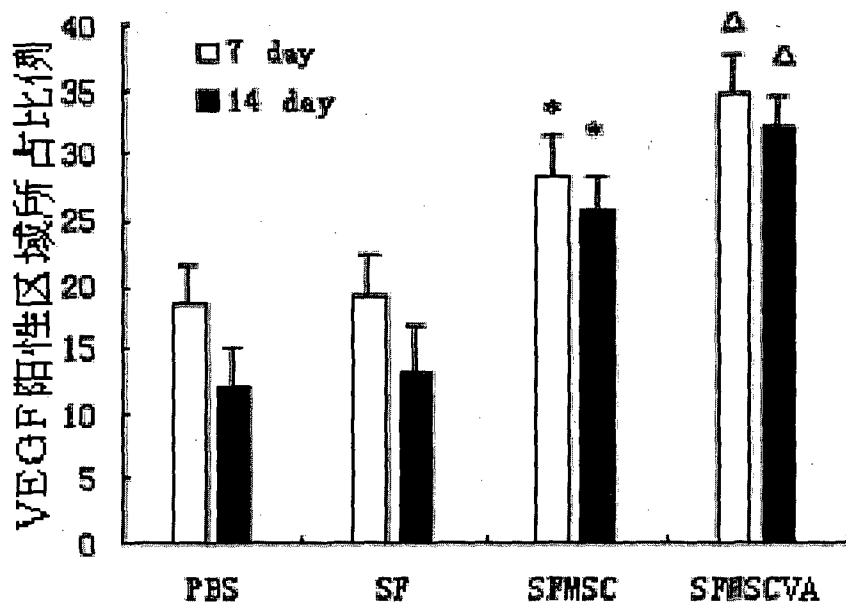


图 7

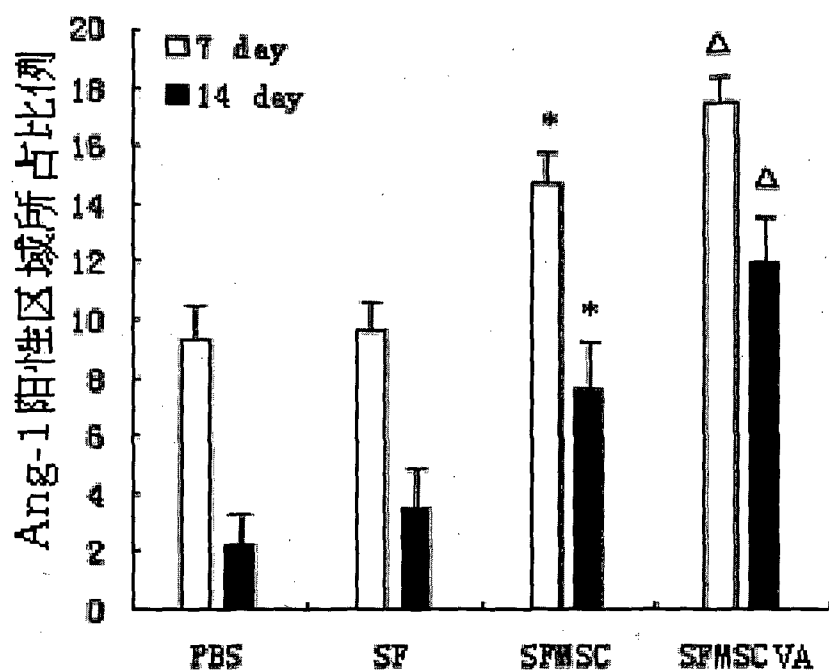


图 8

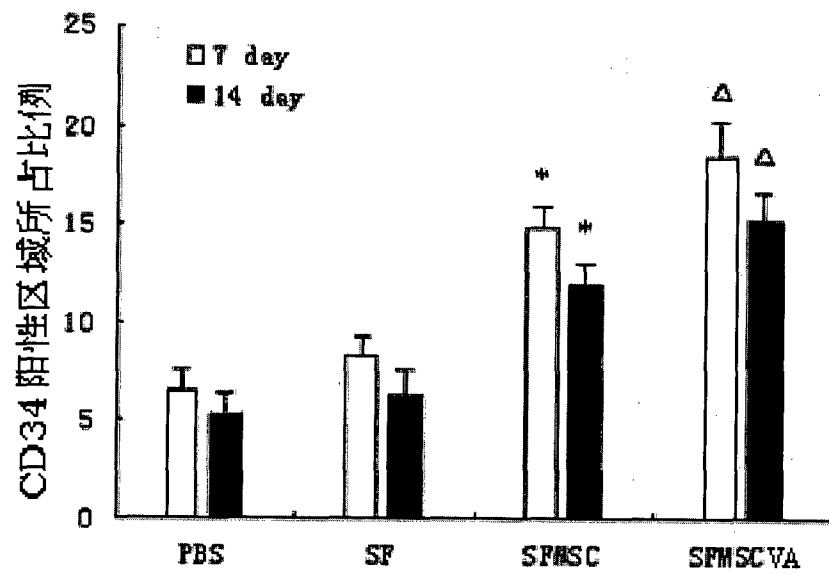


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/080570**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:C12N,A61K,A61P,A61L,C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Databases: CPRSABS, CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, ISI WEB OF KNOWLEDGE (BIOSIS, EMBASE, MEDLINE), CNKI

Search terms: recombinant, plasmid? ,adenovirus, Fibroin membrane?, marrow stroma cell, vascular endothelial growth factor, VEGF, angiopoietin, Ang-1,pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1, CCTCC M 2010221, pAdTrack-CMV-VEGF165-IRES-Ang-1, CTCC M 2010220,Ad-VEGF 165-PolyA-promoter-Ang-1,Ad-VEGF165-IRES-Ang-1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU, Tielian, "Study on Inducing Angiogenesis of Regenerated Silk Fibroin Film Modified by the Ang-1 or/and VEGF165 Transgenic Cells and Its Mechanism", Chinese Master's Theses Full-text Database, ISSN:1674-0246, Medicine and Health Sciences, no.9, pages:E080-47, 30 Sep. 2009(30.09.2009), see paragraph 3 of abstract, figures 1-2 of page 6, the fourth paragraph from the bottom of page 10 to page12 paragraph 4, page 38 the first line to page 65 the last line	1-5
X	CN1594556A (TAN,Zui), 16 Mar. 2005 (16.03.2005), see claims 1-2	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 05 Jan. 2012 (05.01.2012)	Date of mailing of the international search report 19 Jan. 2012 (19.01.2012)
--	---

Name and mailing address of the ISA
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

XING, Yunlong

Telephone No. (86-10)62411094

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/080570

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHANG, Jinkang et al., "Construction and target gene expression of recombinant adenovirus vectors containing vascular endothelial growth factor 165 and angiopoietin-1", Orthopedic Journal of China, ISSN:1005-8478, Vol.18, no.4, pages:312-315, 28 Feb.2010(28.02.2010), see abstract, page 313 left column paragraph 2 to the fourth paragraph from the bottom of right column	1-5
X	WO0212539A2 (MULTI-GENE VASCULAR SYSTEMS LTD et al.), 14 Feb. 2002 (14.02.2002), see claims 1,17,18	1,3
X	Ye, Lei et al., "Improved angiogenic response in pig heart following ischaemic injury using human skeletal myoblast simultaneously expressing VEGF(165) and angiopoietin-1". EUROPEAN JOURNAL OF HEART FAILURE, 31 Jan. 2007 (31.01.2007), vol.9, no.1, pages:15-22, ISSN:1388-9842, see abstract, page 16 left column paragraph 2 to right column paragraph 1, page 18 right column the last paragraph	1-5
PX	CN102191209A (UNIV SOOCHOW), 21 Sep. 2011 (21.09.2011), see claims 1-5	1-5
A	WO2006047799A2 (AHARINEJAD SEYEDHOSSEIN), 11 May 2006 (11.05.2006), see the whole document	1-10
A	Nikola Arsic et al., "Induction of functional neovascularization by combined VEGF and angiopoietin-1 gene transfer using AAV vectors", MOLECULAR THERAPY, 30 Apr. 2003 (30.04.2003), vol.7, no.4, pages:450-459, ISSN: 1525-0016, see the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/080570

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/080570

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

IPC:

C12N 15/861 (2006.01) i

C12N 7/01 (2006.01) i

A61K 48/00 (2006.01) i

A61P 9/00 (2006.01) i

A61L 27/38 (2006.01) i

C12R 1/93(2006.01) n

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-2(entirely), claim 5 (partially) relate to a recombinant plasmid pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1, the recombinant adenovirus prepared by the plasmid and the use thereof.

Claims 3-4(entirely), claim 5 (partially) relate to a recombinant plasmid pAdTrack-CMV-VEGF165-IRES-Ang-1, the recombinant adenovirus prepared by the plasmid and the use thereof.

The common technical feature among the inventions above is the recombinant plasmid or adenovirus that contains VEGF165 and Ang-1 simultaneously. However, the common technical feature has already been disclosed by prior art (ZHANG, Jinkang et al., "Construction and target gene expression of recombinant adenovirus vectors containing vascular endothelial growth factor 165 and angiopoietin-1", Orthopedic Journal of China, ISSN: 1005-8478, Vol.18, no.4, pages:312-315, 28 Feb.2010(28.02.2010), see abstract, page 313 left column paragraph 2 to the fourth paragraph from the bottom of right column). Therefore, there is no special technical feature among the inventions. The application does not meet the requirements of unity of invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2011/080570

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN1594556A	16.03.2005	None	
WO0212539A2	14.02.2002	AU8006001A	18.02.2002
		EP1307582A2	07.05.2003
		CZ20030444A3	15.10.2003
		HU0300727A2	28.10.2003
		ZA200301386A	26.05.2004
		JP2004520009A	08.07.2004
		US2004151707A1	05.08.2004
		INCHENP200300341E	08.04.2005
		EP1307582B1	28.05.2008
		DE60134234E	10.07.2008
		EP2163642A1	17.03.2010
		US7767201B2	03.08.2010
CN102191209A	21.09.2011	None	
WO2006047799A2	11.05.2006	EP1655035A1	10.05.2006

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:C12N,A61K,A61P,A61L,C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称,和使用的检索词(如使用))

数据库: CPRSABS, CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, ISI WEB OF KNOWLEDGE (BIOSIS, EMBASE, MEDLINE), CNKI

检索词: 重组质粒,重组腺病毒,丝素膜,骨髓基质细胞,血管内皮生长因子,血管生成素,recombinant, plasmid?, adenovirus, Fibroin membrane?, marrow stroma cell, vascular endothelial growth factor, VEGF, angiopoietin, Ang-1, pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1, CCTCC M 2010221, pAdTrack-CMV-VEGF165-IRES-Ang-1, CTCC M 2010220, Ad-VEGF 165-PolyA-promoter-Ang-1, Ad-VEGF165-IRES-Ang-1

C. 相关文件

类 型*	引用文件,必要时,指明相关段落	相关的权利要求
X	刘铁连, “Ang-1 或/和 VEGF165 转基因细胞修饰的再生丝素膜诱导血管形成效应及分子机制研究”, 中国优秀硕士学位论文全文数据库, ISSN: 1674-0246, 医药卫生科技辑 第 9 期,第 E080-47 页, 30.09 月 2009(30.09.2009), 参见摘要第 3 段, 第 6 页图 1-2, 第 10 页倒数第 4 段-第 12 页第 4 段, 第 38 页第 1 行-第 65 页最后 1 行	1-5
X	CN1594556A (谭最), 16.03 月 2005 (16.03.2005),参见权利要求 1-2	1-5
X	张金康等人, “携带人 VEGF_(165)和 ANG-1 双基因的腺病毒载体的构建及目的基因的表达”, 中国矫形外科杂志, ISSN: 1005-8478, 第 18 卷, 第 4 期, 第 312-315 页, 28.02 月 2010(28.02.2010), 参见摘要, 第 313 页左栏第 2 段-右栏倒数第 4 段	1-5

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

05.01 月 2012 (05.01.2012)

国际检索报告邮寄日期

19.1 月 2012 (19.01.2012)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

授权官员

邢云龙

电话号码: (86-10) 62411094

C(续). 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO0212539A2 (MULTI-GENE VASCULAR SYSTEMS LTD 等), 14.02 月 2002 (14.02.2002), 参见权利要求 1,17,18	1,3
X	Ye, Lei 等, “Improved angiogenic response in pig heart following ischaemic injury using human skeletal myoblast simultaneously expressing VEGF(165) and angiopoietin-1” . EUROPEAN JOURNAL OF HEART FAILURE, 31.01 月 2007 (31.01.2007), 第 9 卷, 第 1 期, 第 15-22 页, ISSN:1388-9842, 参见摘要, 第 16 页左栏第 2 段-右栏第 1 段, 第 18 页右栏最后 1 段	1-5
PX	CN102191209A (苏州大学), 21.09 月 2011 (21.09.2011), 参见权利要求 1-5	1-5
A	WO2006047799A2 (AHARINEJAD SEYEDHOSSEIN), 11.05 月 2006 (11.05.2006), 参见全文	1-10
A	Nikola Arsic 等, “Induction of functional neovascularization by combined VEGF and angiopoietin-1 gene transfer using AAV vectors” , MOLECULAR THERAPY, 30.04 月 2003 (30.04.2003), 第 7 卷, 第 4 期, 第 450-459 页, ISSN: 1525-0016, 参见全文	1-10

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☐ 权利要求：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，
具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：
参见附加页。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☒ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说，是权利要求：
4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

A.主题的分类:

IPC:

C12N 15/861 (2006.01) i

C12N 7/01 (2006.01) i

A61K 48/00 (2006.01) i

A61P 9/00 (2006.01) i

A61L 27/38 (2006.01) i

C12R 1/93(2006.01) n

第III 栏 缺乏发明单一性的意见

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

权利要求 1-2（全部），权利要求 5（部分）涉及一种重组质粒

pAdTrack-CMV-VEGF165-PolyA-promoter-Ang-1、其所产生的重组腺病毒及其应用。

权利要求 3-4（全部），权利要求 5（部分）涉及一种重组质粒 pAdTrack-CMV-VEGF165-IRES-Ang-1、其所产生的重组腺病毒及其应用。

两组发明之间共同的技术特征就是同时含有 VEGF165 和 Ang-1 基因的重组质粒或重组腺病毒，然而该共同技术特征已经被现有技术文献（刘铁连，“Ang-1 或/和 VEGF165 转基因细胞修饰的再生丝素膜诱导血管形成效应及分子机制研究”，中国优秀硕士学位论文全文数据库, ISSN: 1674-0246, 医药卫生科技辑 第 9 期,第 E080-47 页, 30.09 月 2009(30.09.2009), 参见摘要第 3 段，第 6 页图 1-2，第 10 页倒数第 4 段-第 12 页第 4 段，第 38 页第 1 行-第 65 页最后 1 行）所公开，因此两组发明之间没有特定技术特征，缺乏单一性。

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2011/080570

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1594556A	16.03.2005	无	
WO0212539A2	14.02.2002	AU8006001A	18.02.2002
		EP1307582A2	07.05.2003
		CZ20030444A3	15.10.2003
		HU0300727A2	28.10.2003
		ZA200301386A	26.05.2004
		JP2004520009A	08.07.2004
		US2004151707A1	05.08.2004
		INCHENP200300341E	08.04.2005
		EP1307582B1	28.05.2008
		DE60134234E	10.07.2008
		EP2163642A1	17.03.2010
		US7767201B2	03.08.2010
CN102191209A	21.09.2011	无	
WO2006047799A2	11.05.2006	EP1655035A1	10.05.2006