

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01822075.4

[51] Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 2 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 100457190C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2001.11.15 [21] 申请号 01822075.4

[30] 优先权

[32] 2000.11.17 [33] US [31] 60/248,582

[86] 国际申请 PCT/IL2001/001059 2001.11.15

[87] 国际公布 WO2002/040629 英 2002.5.23

[85] 进入国家阶段日期 2003.7.16

[73] 专利权人 脉管生物生长有限公司

地址 以色列阿什杜德

[72] 发明人 D·哈拉特斯 N·布鲁姆

[56] 参考文献

US5747340 1998.5.5

US5792453 1998.8.17

审查员 常 矛

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥

权利要求书 3 页 说明书 50 页 附图 35 页

[54] 发明名称

表现出内皮细胞特异性的启动子及其使用方法

[57] 摘要

公开了一种在真核细胞中作为启动子起作用的分离的多核苷酸。所述分离的多核苷酸包括本文详述的内皮特异性增强子元件。还公开了一种在内皮细胞中表达目标核酸序列的方法。

1. 一种在真核细胞中作为启动子起作用的分离的多核苷酸, 所述分离的多核苷酸包含增强子元件和至少一个拷贝的 PPE-1 启动子, 所述增强子元件包括至少一个拷贝的 SEQ ID NO:8 中所示的序列。

2. 权利要求 1 的分离的多核苷酸, 其中所述增强子元件还包括至少一个拷贝的 SEQ ID NO:6 中所示的序列。

3. 权利要求 1 的分离的多核苷酸, 其中所述增强子元件包括一个拷贝的 SEQ ID NO:8 中所示的序列和至少两个拷贝的 SEQ ID NO:6 中所示的序列。

4. 权利要求 1 的分离的多核苷酸, 所述分离的多核苷酸还包含低氧效应元件。

5. 权利要求 4 的分离的多核苷酸, 其中所述低氧效应元件包括至少一个拷贝的 SEQ ID NO:5 中所示的序列。

6. 权利要求 1 的分离的多核苷酸, 其中所述增强子元件如 SEQ ID NO:7 中所示。

7. 一种包含权利要求 1-6 中任一项的分离的多核苷酸和目标核酸序列的核酸构建体, 所述目标核酸序列处于所述分离的多核苷酸的调节控制之下。

8. 权利要求 7 的核酸构建体, 其中所述目标核酸序列选自 VEGF、p55 和 PDGF-BB。

9. 一种用权利要求 1-6 中任一项的分离的多核苷酸转化的哺乳动物细胞, 条件是所述细胞不是原位的人细胞。

10. 权利要求 7 的核酸构建体在制备用于在内皮细胞中表达目标核酸序列的药物中的用途。

11. 权利要求 7 的核酸构建体在制备用于调节组织中的血管生成的药物中的用途。

12. 权利要求 11 的用途, 其中调节血管生成为正调节, 并且所述

目标核酸序列编码生长因子。

13. 权利要求 11 的用途，其中所述调节血管生成为负调节，并且所述目标核酸序列编码细胞毒素。

14. 权利要求 10 的用途，其中使所述药物适用于体内系统给药、离体给药或体内局部给药。

15. 一种在真核细胞中作为启动子起作用的分离的多核苷酸，所述分离的多核苷酸包含增强子元件和至少一个拷贝的 PPE-1 启动子，所述增强子元件包括在 SEQ ID NO:7 中所示的序列。

16. 权利要求 15 的分离的多核苷酸，所述分离的多核苷酸还包含低氧效应元件。

17. 权利要求 16 的分离的多核苷酸，其中所述低氧效应元件包括至少一个拷贝的 SEQ ID NO:5 中所示的序列。

18. 一种包含权利要求 15-17 中任一项的分离的多核苷酸和目标核酸序列的核酸构建体，所述目标核酸序列处于所述分离的多核苷酸的调节控制之下。

19. 权利要求 18 的核酸构建体，其中所述目标核酸序列选自 VEGF、p55 和 PDGF-BB。

20. 一种用权利要求 15-17 中任一项的分离的多核苷酸转化的哺乳动物细胞，条件是所述细胞不是原位的人细胞。

21. 权利要求 18 的核酸构建体在制备用于调节组织中的血管生成的药物中的用途。

22. 权利要求 21 的用途，其中调节血管生成为正调节，并且所述目标核酸序列编码生长因子。

23. 权利要求 21 的用途，其中所述调节血管生成为负调节，并且所述目标核酸序列编码细胞毒素。

24. 权利要求 21 的用途，其中使所述药物适用于体内系统给药、离体给药或体内局部给药。

25. 权利要求 9 的细胞在制备用于在内皮细胞中表达目标核酸序

列的药物中的用途。

26. 权利要求 9 的细胞在制备用于调节组织中的血管生成的药物中的用途。

27. 权利要求 20 的细胞在制备用于调节组织中的血管生成的药物中的用途。

表现出内皮细胞特异性的启动子及其使用方法

发明领域和背景

本发明涉及表现出内皮细胞特异性启动子活性的分离的多核苷酸序列及其使用方法，更具体地讲，涉及在内皮细胞中表现出增加的活性和特异性的经修饰的前内皮缩血管肽原(preproendothelin)-1 (PPE-1) 启动子。本发明还涉及对 PPE 启动子的修饰，所述修饰增强其在对包括低氧和血管生成在内的生理条件应答时的表达。

基因治疗是一种不断发展的人类遗传性和获得性疾病的治疗模式。为了开发癌症、心血管疾病和外周血管疾病的基因疗法进行了大量研究，但是在有效而特异性的基因传递方面仍有很大的障碍。一般而言，用重组病毒载体作为穿梭载体、用目标基因进行基因治疗的主要限制因素是目标基因特异性地靶向靶组织的能力。用于该目的的腺病毒能够以不同的亲和力感染各种各样的细胞。事实上，使用非组织特异性启动子可诱导目标基因在肝脏中的至多 95% 的表达；因此非常需要对表达进行调节。此外，目前当对基因打靶时在生长的肿瘤中区别正常血管内皮和正在发育的血管内皮区分开来是办不到的。

在癌症发生和血管疾病中，血管生成即新血管的产生起重要作用。因此，通过基因治疗调节血管内皮的该过程，在诱导对这些疾病的定向治疗中可能是非常重要的。

在体外内皮细胞(EC)和转基因动物模型中，通过逆转录病毒载体达到高效率传递人前内皮缩血管肽原-1 (PPE-1)。然而，现有技术并未公开将该启动子用于体内基因治疗。人 PPE-1 缺乏在其它动物、最值得注意的是小鼠的 PPE-1 基因中发现的调节元件。

美国专利 5,747,340 公开了鼠 PPE-1 启动子及其部分的应用。然而，该专利并没有包括可以应用内皮特异性增强子来提高用 PPE 启动

子实现的表达水平而同时保留内皮特异性的暗示或提示。此外，该专利没有公开在低氧条件下 PPE-1 启动子被诱导至较高的转录水平。

因此，众所周知需要没有上述限制的改进的内皮细胞特异性启动子、其使用方法和用其转化的细胞将是非常有利的。预期公开的本发明将证明在心血管疾病、癌症和伤口愈合治疗方面相对于先前已知的构型而言有增加的效用。

发明概述

按照本发明的一个方面，提供一种在真核细胞中作为启动子起作用的分离的多核苷酸。所述分离的多核苷酸包括一个增强子元件，所述增强子元件包括至少两个拷贝的 SEQ ID NO:6 中所示的序列。

按照本发明的另一方面，提供一种在内皮细胞中表达编码活性 RNA 分子或诸如酶、报道分子等的蛋白质的目标核酸序列的方法。所述方法包括给予受治疗者一种构建体，所述构建体包括处于在真核细胞中起作用的启动子的调节控制之下的目标核酸序列。所述构建体还包括一个增强子元件，所述增强子元件包括至少一个拷贝的 SEQ ID NO:6 中所示的序列。

按照本发明的再一方面，提供一种调节组织中血管生成的方法。所述方法包括给予一种核酸构建体，所述核酸构建体包括：(a)一个内皮细胞特异性启动子；(b)至少一个拷贝的 SEQ ID NO:5 中所示的低氧效应元件；和(c)一个编码血管生成调节剂的核酸序列，所述核酸序列处于所述启动子和所述低氧效应元件的调节控制之下。

按照本发明的又一方面，提供一种在真核细胞中作为启动子起作用的分离的多核苷酸。所述分离的多核苷酸包括一个增强子元件，所述增强子元件包括在 SEQ ID NO:7 中所示的序列。

按照本发明的另一方面，提供一种调节组织中血管生成的方法。所述方法包括给予一种核酸构建体，所述核酸构建体包括：(a)一个内皮细胞特异性启动子；(b)一个增强子元件，所述增强子元件包括在

SEQ ID NO:7 中所示的序列; (c)至少一个拷贝的 SEQ ID NO:5 中所示的低氧效应元件; 和(d)一个编码血管生成调节剂的核酸序列, 所述核酸序列处于所述启动子、所述增强子元件和所述低氧效应元件的调节控制之下。

按照本发明的再一方面, 提供一种在真核细胞中作为启动子起作用的分离的多核苷酸, 所述分离的多核苷酸包括一个增强子元件, 所述增强子元件包括至少一个拷贝的 SEQ ID NO:8 中所示的序列。

按照本发明的再一方面, 提供一种在内皮细胞中表达目标核酸序列的方法, 所述方法包括给予受治疗者一种构建体, 所述构建体包括所述目标核酸序列和一个增强子元件, 所述目标核酸序列处于在真核细胞中起作用的启动子的调节控制之下, 所述增强子元件包括至少一个拷贝的 SEQ ID NO:8 中所示的序列。

按照本发明的又一方面, 提供一种在真核细胞中作为启动子起作用的分离的多核苷酸, 所述分离的多核苷酸包括一个增强子元件, 所述增强子元件包括在 SEQ ID NO:8 中所示的序列。

按照以下描述的本发明优选实施方案中的其它特征, 所述增强子元件包括三个拷贝的 SEQ ID NO:6 中所示的序列。

按照本发明优选实施方案中的其它特征, 所述至少两个拷贝的 SEQ ID NO:6 中所示的序列是相邻的。

按照本发明优选实施方案中的其它特征, 所述分离的多核苷酸还包括一个内皮特异性启动子元件。

按照本发明优选实施方案中的其它特征, 所述内皮特异性启动子元件包括至少一个拷贝的所述 PPE-1 启动子。

按照本发明优选实施方案中的其它特征, 所述分离的多核苷酸还包括一个低氧效应元件。

按照本发明优选实施方案中的其它特征, 所述低氧效应元件包括至少一个拷贝的 SEQ ID NO:5 中所示的序列。

按照本发明优选实施方案中的其它特征, 所述增强子元件如在

SEQ ID NO:7 中所示。

按照本发明优选实施方案中的其它特征，提供一种包括要求保护的分离多核苷酸和目标核酸序列的核酸构建体，所述目标核酸序列处于所述分离的多核苷酸的调节控制之下。

按照本发明优选实施方案中的其它特征，所述目标核酸序列选自 VEGF、p55 和 PDGF-BB。

按照本发明优选实施方案中的其它特征，提供一种用要求保护的分离的多核苷酸转化的哺乳动物细胞。

按照本发明优选实施方案中的其它特征，所述启动子表现出内皮细胞特异性。

按照本发明优选实施方案中的其它特征，所述启动子是在 SEQ ID NO:1 中所示的 PPE-1 启动子。

按照本发明优选实施方案中的其它特征，通过选自以下的方法实现给药：(i)体内系统给药；(ii)离体给予从受治疗者体内取出的细胞，并且随后将所述细胞再回输给所述受治疗者体内；和(iii)体内局部给药。

按照本发明优选实施方案中的其它特征，所述核酸构建体还包括一个增强子元件，所述增强子元件包括至少两个拷贝的 SEQ ID NO:6 中所示的序列。

按照本发明优选实施方案中的其它特征，所述内皮细胞特异性启动子包括至少一个拷贝的所述 PPE-1 启动子。

按照本发明优选实施方案中的其它特征，提供一种包括要求保护的分离的多核苷酸和目标核酸序列的核酸构建体，所述目标核酸序列处于所述分离的多核苷酸的调节控制之下。

按照所述优选实施方案中的其它特征，所述增强子元件还包括至少一个拷贝的 SEQ ID NO:6 中所示的序列。

按照所述优选实施方案中的其它特征，所述增强子元件包括一个拷贝的 SEQ ID NO:8 中所示的序列和至少两个拷贝的 SEQ ID NO:6 中

所示的序列。

按照所述优选实施方案中的其它特征，所述增强子元件还包括至少一个拷贝的 SEQ ID NO:6 中所示的序列。

按照所述优选实施方案中的其它特征，所述至少一个拷贝包括两个拷贝。

按照所述优选实施方案中的其它特征，所述核酸构建体还包括一个增强子元件，所述增强子元件包括至少一个拷贝的 SEQ ID NO:8 中所示的序列。

按照本发明的再一方面，提供一种调节组织中血管生成的方法，所述方法包括给予一种核酸构建体，所述核酸构建体包括：(a)一个内皮细胞特异性启动子；(b)一个增强子元件，所述增强子元件包括至少一个拷贝的 SEQ ID NO:8 中所示的序列；和(c)一个编码血管生成调节剂的核酸序列，所述核酸序列处于所述启动子和所述增强子元件的调节控制之下。

按照所述优选实施方案中的其它特征，所述增强子元件还包括至少一个拷贝的 SEQ ID NO:6 中所示的序列。

按照所述优选实施方案中的其它特征，所述增强子元件包括一个拷贝的 SEQ ID NO:8 中所示的序列和至少两个拷贝的 SEQ ID NO:6 中所示的序列。

本发明通过提供具有内皮细胞特异性的改进的分离的多核苷酸序列及其使用方法成功地克服了目前已知构型的缺点。在序列方面的所述改进使先前认为不可行的治疗各种各样的疾病、失调和病症的方法成为可行的方法。具体地说，所述改进涉及对内皮细胞的特异性增加、目标序列的表达水平增加和包括局部缺血和血管生成在内的病症引起的诱导增加。

附图简述

本文仅通过实施例并参考附图描述本发明。现在具体地参考附图

的细节，着重强调的是，所显示的详细资料仅仅作为实施例，为了说明性地论述本发明的优选实施方案，并且提供这些详细资料是为了提供所认为的对本发明的原理和构思最有用和最容易理解的描述。在这方面，没有试图以比基本上理解本发明所必需的更为详细的方式来说明本发明的结构细节，从附图获取的说明，使得在实践中如何使本发明的所述几种形式具体化对于本领域技术人员而言显而易见的。

在附图中：

图 1 是一幅直方图，说明使用 B2B 细胞系作为非内皮对照，本发明的增强子元件对在牛内皮细胞系和人内皮细胞系中荧光素酶表达的影响。

图 2 是一幅直方图，说明腺病毒载体中的本发明启动子对各种细胞系中荧光素酶表达的内皮特异性。

图 3A 和 3B 是显微照片，说明在 BAEC 细胞系中，在本发明 Ad5PPE-1-3X 和 Ad5CMV 对照构建体控制之下的 GFP 表达。

图 4 是在内皮细胞和非内皮细胞中由 pACPPE-1-3Xp55、pACPPE-1-3X 荧光素酶和 pCCMVp55 诱导的细胞凋亡百分率的直方图。

图 5 是一幅直方图，说明将按照本发明的增强子元件导入启动子构建体中对低氧应答的影响。

图 6 是一幅直方图，说明将按照本发明的增强子元件导入腺病毒载体构建体的启动子中对低氧应答的影响。

图 7 是一幅直方图，说明将按照本发明的增强子元件导入启动子中对牛内皮细胞系和人内皮细胞系中表达水平的影响。

图 8 是一幅直方图，说明在注射含有或者内皮启动子(PPE-1)或者对照(CMV)启动子的腺病毒构建体后在各种器官中所观察的报道基因的表达水平。

图 9A-B 是两张显微照片，说明 Ad5CMVGFP 构建体(图 9a)和 Ad5PPE-1-GFP 构建体(图 9b)在注射所述构建体的小鼠肝脏组织中的细

胞表达。

图 10 是一幅直方图,说明将按照本发明的增强子元件导入启动子中对内皮细胞系和非内皮细胞系中表达水平的影响。

图 11 是一幅直方图,说明将按照本发明的增强子元件导入启动子中对内皮细胞系和非内皮细胞系中表达水平的影响。图 12A-C 是显微照片,分别说明 Ad5PPE-1-3XGFP 转导细胞、Ad5PPE-1GFP 转导细胞和 Ad5CMVGFP 转导细胞中的 GFP 表达。

图 13A-B 分别说明用 moi-1 的 Ad5PPE-1-3XGFP 和 Ad5CMVGFP 转导的 SMC 中的 GFP 表达。

图 14A-B 显示在 HeLa 细胞中进行的与图 13A-B 的实验相似的实验的结果。

图 15A-B 显示在 HepG2 细胞中进行的与图 13A-B 的实验相似的实验的结果。

图 16A-B 显示在 NSF 细胞中进行的与图 13a-b 的实验相似的实验的结果。

图 17A-B 是显微照片,说明在分别注射 Ad5PPE-1GFP 构建体和 Ad5PPE-1-3XGFP 构建体的小鼠血管内衬的内皮细胞中的 GFP 表达。

图 18A-C 是显微照片,说明得自经注射的小鼠肾脏组织的结果。注射 Ad5CMVGFP 的小鼠(图 18A)、注射 Ad5PPE-1GFP 的小鼠(图 18B;在血管壁中可见略高的 GFP 表达;箭头所示)和注射 Ad5PPE-1-3XGFP 的小鼠(图 18C)。

图 19A-C 说明在脾组织切片上进行的、与图 18A-C 中描绘的实验相似的实验。

图 20A-D 和 20 C'-D'说明注射盐水的对照小鼠(图 20A)、注射 Ad5CMVGFP 的小鼠(图 20 B)、注射 Ad5PPE-1GFP 的小鼠(图 20 C)和注射 Ad5PPE-1-3XGFP 的小鼠(图 20D)的肺转移瘤中的 GFP 表达。抗 Cd31 免疫染色(图 20C'-20D')证实在每种转移瘤组织中 GFP 表达和 CD31 表达的共定位。

图 21 是一幅直方图,说明用含有鼠 PPE-1 启动子的质粒转染的 BAEC 中的荧光素酶活性(光单位/ μg 蛋白)当转染细胞在低氧条件下孵育时明显更高。

图 22 是一幅与图 21 相同的直方图,只是使用 Ad5PPE-1Luc 和 Ad5CMVLuc。

图 23 是一系列与图 22 相同的直方图,说明在不同细胞系中的低氧效应。

图 24 是一幅直方图,说明本发明的 3X 序列对 BAEC 细胞中所述 PPE-1 低氧应答的影响。细胞用 Ad5PPE-1Luc 和 Ad5PPE-1-3Xluc 转导。

图 25 是一幅直方图,显示在股动脉结扎后 PPE-1-Luc 转基因小鼠中的荧光素酶表达水平。

图 26A-B 是结合本发明使用的构建体的质粒图谱。

图 27A-D 是一系列结扎后 21 天不同处理组代表性动物结扎肢体的超声波影像。图 27A 对照, Ad5CMVLuc 处理的;图 27B 对照, 盐水处理的;图 27C Ad5PPE-3X-VEGF 处理的;图 27D Ad5CMV-VEGF 处理的。

图 28 是一幅直方图,说明在用 Ad5PPE-1Luc (空心条带)和 Ad5CMVLuc (实心条带)转导的增殖和静息的牛主动脉内皮细胞(BAEC)中的荧光素酶活性。

图 29 是一幅直方图,说明在用 Ad5PPE-1Luc 转导的 BAEC 在正常增殖期间、静息状态和加入 VEGF 后快速增殖期间的荧光素酶活性。

图 30A-B 是直方图,说明在正常注射 Ad5PPE-1Luc 和 Ad5CMVLuc 的 C57BL/6 小鼠主动脉(图 30A)和肝脏(图 30B)中的荧光素酶活性(光单位/ μg 蛋白)。注射后 1 天($n=13$)、5 天($n=34$)、14 天($n=32$)、30 天($n=20$)和 90 天($n=11$)测定活性。

图 31A-B 是直方图,说明在正常注射的 BALB/C 小鼠中注射

Ad5PPE-1Luc (空心条带)或 Ad5CMVLuc (实心条带)后 5 天(图 31A)和 14 天(图 31B) ($n=10$, 对每个时间点而言)检测的相对荧光素酶活性(光单位/ μg 蛋白)。活性以每只动物总体荧光素酶表达的百分率表达。

图 32 是一幅描绘由 ApoE 缺陷型小鼠解剖的主动脉通过 Sudan-IV 着色的现有技术显像。胸主动脉含有较少的着红色的动脉粥样硬化病变, 而腹部包括许多着红色的动脉粥样硬化病变。(摘自 ^{125}I -HDL 和 ^{125}I -BSA 的主动脉粥样硬化病变影像。A. Shaish 等, Pathobiology - 已提交待发表)。

图 33 是一幅直方图, 说明给 ApoE 缺陷型小鼠系统注射 Ad5PPE-1Luc (空心条带; $n=12$)或 Ad5CMVLuc (实心条带; $n=12$)后 5 天检测的绝对荧光素酶活性(光单位/ μg 蛋白)。从腹主动脉观测的荧光素酶活性相当于高病变水平, 而从胸部观测的荧光素酶活性相当于低病变水平。

图 34 是一幅直方图, 说明给诱发伤口愈合的 C57BL/6 小鼠系统注射 Ad5PPE-1Luc (实心条带)或 Ad5CMVLuc (空心条带)后 5 天的绝对荧光素酶活性(光单位/ μg 蛋白)。

图 35 是一幅直方图, 说明诱发 Lewis 肺癌的小鼠的正常肺、肺转移瘤和原发性肿瘤中的荧光素酶活性。通过给原发性肿瘤膜型的背部和转移瘤模型的爪垫注射 D122-96 细胞诱发 Lewis 肺癌。系统注射 Ad5PPE-1Luc ($n=9$; 空心条带)或 Ad5CMVLuc ($n=12$; 实心条带)后 5 天测量荧光素酶活性。活性以光单位/ μg 蛋白表示。

图 36A-D 是显微照片, 说明在肿瘤内注射 Ad5PPE-1GFP 后在带有 LLC 的小鼠肺和肿瘤中的 GFP 表达和组织形态。将组织在 OCT 中冷冻, 然后用冷冻切片机切成 $10\mu\text{m}$ 厚的切片。所有照片都在放大 25 倍的情况下拍摄。图 36A - 肺转移瘤血管生成性血管中的 GFP; 图 36B - 图 36aA 中拍摄的切片的 CD31 抗体免疫染色; 图 36C - 原发性肿瘤血管中的 GFP 表达; 图 36D - 说明血管的 C 切片的相差显微镜照片。

图 37 是一幅直方图, 说明注射 Ad5CMVLuc, Ad5PPE-1Luc 和

Ad5PPE-1-3X-Luc 的诱发 Lewis 肺癌的小鼠的正常肺和肺转移瘤中的荧光素酶表达。通过给转移瘤模型的爪垫注射 D122-96 细胞诱发 Lewis 肺癌。系统注射 Ad5CMVLuc (n=7; 黑色条带)、Ad5PPE-1Luc (n=6; 灰色条带)或 Ad5PPE-1-3XLuc (n=13; 褐色条带)后 5 天测量荧光素酶活性。活性以光单位/ μg 蛋白表示。

图 38 是一幅直方图, 说明注射 Ad5CMV、Ad5PPE-1Luc 和 Ad5PPE-1(3X)的诱发 Lewis 肺癌的小鼠的正常肺和肺转移瘤中以肝脏活性百分率表示的荧光素酶活性(其中肝脏中的活性为 100%)。

图 39A-B 是显微照片, 说明注射 Ad5PPE-1-3X-GFP 的 LLC 肺转移瘤小鼠中 GFP 表达(图 39A)和 Cd31 免疫染色(图 39B)的共定位。

图 40 是一幅直方图, 说明股动脉结扎后 2 天、5 天、10 天和 18 天和对照(未结扎动物 - 第 0 天; n=8, 对于每组而言)的 PPE-1 荧光素酶转基因小鼠肌肉(局部缺血和正常)中的荧光素酶活性(光单位/ μg 蛋白)。

图 41 是一幅直方图, 说明股动脉结扎后 5 天(n=6)、10 天(n=6)和 18 天(n=8)和对照(未结扎的动物 - 第 0 天)的 PPE-1 荧光素酶转基因小鼠的肝、肺和肌肉主动脉(局部缺血和正常)中的荧光素酶活性(光单位/ μg 蛋白)。

图 42 是一幅直方图, 说明在原发性肿瘤中注射 Ad5CMVLuc (实心条带)或 Ad5PPE-1Luc (空心条带)的 LLC 小鼠肝、肺和原发性肿瘤中检测的荧光素酶活性(光单位/ μg 蛋白)。

优选实施方案的描述

本发明属于可用来可靠地将高水平的目标序列表达靶向内皮细胞、尤其是参与血管生成的内皮细胞的改进的内皮细胞特异性启动子。

参考附图和所附说明书, 可以更好地理解本发明的原理和应用。

在详细解释本发明的至少一个实施方案之前, 不用说本发明不限

于其在以下描述中叙述的或在实施例和附图中说明的组分构建和布置细节的应用。本发明允许以各种方式实施或进行其它实施方案或者以各种方式实施或进行本发明。另外，不用说本文所用的短语和术语仅用于说明目的，不应认为是限制性的。

虽然内皮特异性启动子先前已有描述(例如美国专利 5,747,340)，但是这些启动子在将表达靶向内皮细胞时通常是无效的，或者尚未证明在体内对内皮细胞是特异性的。

内皮细胞特异性增强子元件也有描述。Bu 等(J. Biol Chem. (1997) 272 (19): 32613-32622)已证明，三个拷贝(3X)的 PPE-1 的 1X 增强子元件(含有元件 ETE-C、ETE-D 和 ETE-E)在体外给启动子序列赋予内皮细胞特异性，然而，这样的活性尚未在体内得到证实。

正如本领域众所周知的，体外实验不能可靠地预测体内结果。因此，Bu 等给出的结果，尽管提示有内皮细胞特异性，但是没有提供足够的证据证明 3X 增强子元件的体内效用。

体内研究的缺乏也带来所述 3X 增强子元件在整个生物体内的内皮细胞特异性的问题。该数据的缺乏暗示该元件的治疗应用也成问题，因为当在体内应用时，尤其是当用来调节血管生成时，将血管生成调节剂(例如细胞毒素)的表达特异性地靶向内皮细胞、最好是参与血管生成的特定内皮细胞亚群是必不可少的。

正如以下实施例部分表证明的，本发明人通过繁复的实验首先提供了关于所述 3X 增强子元件体内活性的真凭实据。这样的证据鉴定出非常适合用于治疗应用的 3X 元件及其序列衍生物(例如 SEQ ID NO:7)。

另外，在简化本发明的实施时，发现本发明 PPE-1 增强子序列的新构型给启动子序列赋予在参与血管生成的内皮细胞中的意外高比活。

因此，按照本发明的一方面，提供一种在哺乳动物诸如人类中作为内皮细胞特异性启动子起作用的分离的多核苷酸。

所述分离的多核苷酸包括一个增强子元件,所述增强子元件包括一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:6 中所示的序列和优选一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:8 中所示的序列,正如在以下的实施例部分说明的,所述增强子元件在调节参与血管生成的内皮细胞中的表达方面起重要作用。

本发明可使用的增强子元件的一个具体的新序列构型示于 SEQ ID NO:7 中。

对于本说明书和所附的权利要求书而言,术语“增强子”是指提高启动子转录效率的任何多核苷酸序列。

按照本发明的某些实施方案,所述分离的多核苷酸包括 SEQ ID NO:6 和/或 SEQ ID NO:8 的连续拷贝。这样的序列最好以头尾相接的方向排列,尽管本发明的增强子元件也可以反方向包括一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:8 序列的特定部分,例如在增强子元件的构建中通过使用与 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:8 互补的序列。

所述分离的多核苷酸最好还包括一个内皮细胞特异性启动子序列元件。对于本说明书和所附的权利要求书而言,术语“启动子”是指能够介导下游目标序列的 RNA 转录的任何多核苷酸序列。所述内皮特异性启动子元件可以包括例如至少一个拷贝的 PPE-1 启动子。

所述分离的多核苷酸最好还包括一个低氧效应元件,例如至少一个拷贝的 SEQ ID NO:5 中所示的序列。

因此,按照本发明的该方面,提供一种包括各种增强子元件构型的内皮细胞特异性启动子。

人们将会认识到,所述增强子元件序列可以位于所用的启动子序列内、所述启动子的上游、所述启动子和下游目标序列之间或者位于目标序列内(例如内含子)。

本发明的分离的核酸序列可以用来调节真核组织、尤其是增殖中的内皮细胞例如参与血管生成的内皮细胞中的基因表达。

因此,在某些情况下,可以提供作为核酸构建体部分的本发明分

离的多核苷酸序列，所述核酸构建体还包括处于本发明的分离的多核苷酸的调节控制之下的目标核酸序列。人们将会认识到，这样一种核酸构建体还可以包括任何额外的多核苷酸序列，例如编码选择标记的序列、细菌中的复制起点或编码报道多肽的序列。这样一种核酸构建体最好构建用于哺乳动物细胞表达并且可以来源于病毒。适用于哺乳动物表达的核酸构建体的许多实例是本领域已知的；以下的实施例部分提供几种这类构建体的进一步详细描述。

对于本说明书和所附的权利要求书而言，术语“目标序列”是指能够被RNA聚合酶转录的任何多核苷酸序列。该定义包括可翻译成多肽的编码序列以及反义RNA、结合DNA的RNA、核酶和肯定不会经历翻译的其它分子部分的序列。下文以及在以下的实施例部分提供了可以为按照本发明的构建体所使用的目标核酸序列的多个实施例。

下文叙述的实施例说明，本发明改进的内皮细胞特异性启动子在体内系统给予后可以可靠地将报道基因的表达靶向内皮组织。这些实施例首次进一步说明本发明的分离的多核苷酸可以用来优先在动脉粥样硬化组织和/或血管生成性组织中表达报道蛋白(GFP)，从而首次提供关于所述PPE-1增强子元件及其衍生物在治疗应用中重要性的直接证据。

虽然诸如GFP的报道蛋白的应用可以用于转移性肿瘤生长早期的检测，尤其是在动物模型中或检测转移瘤的非侵入性成像(Yang, M.等, Proc. Nat. Acad. of Sci. (2001) 27: 2616-2621)方面，但是这样的应用仅是要求保护的本发明的计划用途中的一小部分。认为例如AdPPE-1GFP可以与AdPPE1tk、AdPPE-1p55和/或其它抗血管生成性治疗联合使用，以便通过相对非侵入性方法跟踪和治疗血管生成。

预计在例如AdPPE-1-3X-p55构建体中用凋亡诱导因子(例如p55; GenBank 登记号M75866)取代GFP报道基因，会将凋亡信号可靠地靶向生长中肿瘤的血管生成性血管中正在快速增殖的内皮细胞。因为这种载体可以系统给予，所以可以用其在发展中的转移瘤病灶中有效地

诱导凋亡，而无需发现那些病灶的部位。这样的应用代表与现有技术的作法相比的显著改进。通过在正在发育的血管系统中特异性地诱导凋亡，有可能消除血管生成。

可以用一种相反的方法来例如在动脉粥样硬化患者或患有由于疾病或损伤引起的外周循环明显削弱的患者中使组织重新进行血管形成。在这种情况下，可以使用 AdPPE-1-3X-GF 型构建体，其中 GF 为生长因子(例如细胞因子)或其修饰物(例如 AdPPE-1-SEQ ID NO:7-GF)。可供该方面使用的合适生长因子包括但不限于 VEGF (GenBank 登记号 M95200)和大鼠 PDGF-BB (GenBank accession; 与 mus-AF162784 有 99%同一性)和 EGR-1 (GenBank 登记号 M22326) FGFs (包括但不限于 GenBank 登记号 XM 003306)和它们的组合。

人们将会认识到，将低氧效应元件(例如 SEQ ID NO:5)掺入本发明的启动子序列中，可以用来进一步增强对局部缺血组织的表达选择性，因而导致所选组织的新血管形成。由于血液供应得到改善，因此局部缺血得以缓解，低氧效应元件的诱导停止，GF 水平下降和新血管形成过程停止。

按照本发明公开内容产生的启动子序列尤其可用来调节组织中的血管生成。正如以下实施例部分所说明的，含有本发明启动子序列的经修饰的 3X (SEQ. ID. NO: 7)和未经修饰的 PPE-1 启动子都可在 LLC 模型的转移瘤病灶中表达。然而，实施例 22 清楚地说明，经修饰的 3X 序列特异性引起正常肺中报道基因表达水平的降低，同时特异性引起转移瘤病灶中报道基因表达的显著增加。在现有技术中既没有暗示也没有提示可以得到这样的结果。因此，可以预期在基因治疗方面应用包括所述 3X 元件的构建体使至肿瘤的传递最大化，而对周围正常组织的毒性效应减至最低。重要的是，如图 37 所示，即使周围组织含有内皮成分，其情况也是如此。如实施例 11 所证明的，这是因为所述 3X 序列大大提高在快速增殖的内皮组织中的表达水平，甚至在位于 PPE-1 启动子邻近序列中的情况下也是如此。

例如, p55 基因可以结合含有低氧效应元件的本发明启动子使用, 以便特异性地诱导生长中肿瘤的凋亡。因为生长中的肿瘤块往往由于肿瘤生长常常超过周围组织的血管生成能力而局部缺血, 所以认为这种策略是可行的。可以与本发明启动子序列一起使用以便特异性地减小肿瘤块的其它可表达细胞毒素包括但不限于其它促凋亡基因 (pro-apoptotic genes)、单纯疱疹病毒胸苷激酶基因 (HSV-tk; 包括在 pORF-HSV1tk 表达载体中, 可得自 InvivoGen, San Diego, CA)、制管张素 (Genbank 登记号 X05199)、内皮生长抑素 (endostatin) (Genbank 登记号 M33272) 和制管张素-内皮生长抑素嵌合体 (包括在 pORF-HSV1tk 表达载体中, 可得自 InvivoGen, San Diego, CA)。

或者, 或另外, 可以将制管张素基因或内皮生长抑素基因与本发明启动子结合使用, 以便特异性地阻断血管生成, 而无需诱导凋亡。

因此, 按照可供选择的优选实施方案, 可以刺激或阻断血管生成。这一灵活性将会允许本发明可变化的应用, 包括但不限于减少肿瘤块和心脏动脉粥样硬化区的重新血管形成或者血液供应不足的周围组织的新血管形成。一个相关临床方案是应用按照本发明的启动子产生新血管, 以增加糖尿病患者肢体的血液供应。

可以将按照本发明的核酸构建体本身或者以其中所述核酸构建体与合适的载体或赋形剂混合的药用组合物形式将所述核酸构建体给予受治疗者 (哺乳动物, 最好是人类)。

本文所用的“药用组合物”是指此中描述的一种或多种有效成分与其它化学成分诸如生理上合适的载体和赋形剂的制剂。药用组合物的目的是为了便于将化合物给予生物体。

本文的术语“有效成分”是指负责所述生物学效应的核酸构建体。

在下文, 短语“生理上可接受的载体”和“药学上可接受的载体”可互换使用, 是指对生物体不引起显著刺激并且不消除所给予化合物的生物活性和特性的载体或稀释剂。这些短语包括辅料。

本文的术语“赋形剂”是指添加到药用组合物中以进一步促进有

效成分给予的惰性物质。赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙、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。

配制和给予药物的技术可以在以下文献中找到：“Remington’s Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing Co., Easton, PA, 最新版, 所述文献通过引用结合到本文中。

本发明的药用组合物可以通过本领域熟知的方法来生产, 所述方法例如常规混合、溶解、制粒、制糖锭、研磨、乳化、囊、包合(entrapping)或冻干方法。

因此, 可供按照本发明使用的药用组合物可以以常规方法使用一种或多种包括赋形剂和辅料在内的生理上可接受的载体来配制, 所述载体有助于将有效成分加工成为可以药用的制剂中。适宜的制剂取决于所选的给药途径。

对于注射, 所述药用组合物的有效成分可以配制在水溶液中、最好在生理上相容的缓冲液例如 Hank 氏溶液、Ringer 氏溶液或生理盐水缓冲液中。对于经粘膜给药, 在制剂中可以使用适合待穿过的屏障的渗透剂。这类渗透剂是本领域众所周知的。

人们将会认识到, 本发明的分离的多核苷酸已基于其促进或增强内皮谱系的真核细胞中转录的能力分离出来。因此, 用要求保护的分离的多核苷酸转化的哺乳动物细胞是本发明的另一实施方案。这类转化细胞的多个实施例在下文叙述的实施例中提供。

尽管下文提供的实施例具体涉及 3X 序列与 PPE-1 启动子的结合使用, 但是预期本发明的增强子序列当与其它真核启动子序列一起使用时也将会发挥其细胞特异性效应。

这样的预期基于现有技术的以下发现: 已表明增强子元件常常是可移动的, 即它们可以从一个启动子序列转移至另一个不相关的启动子序列并且仍然保持活性。例如参见 D. Jones 等(Dev. Biol. (1995) 171 (1): 60-72); N. S. Yew 等(Mol. Ther. (2001) 4: 75-820)和 L. Wu.等(Gene Ther. (2001) 8; 1416-26)。事实上, Bu 等的早期研究(J. Biol Chem. (1997)

272 (19): 32613-32622)强烈地提示, 与本发明的增强子例如包括 SEQ ID NO:6 的增强子相关的增强子元件可以与组成型启动子例如 SV-40 启动子一起使用。因此, 含有包括经修饰以包括本发明的增强子序列的真核启动子的分离的多核苷酸的构建体、其使用方法和所述分离的多核苷酸也在要求保护的本发明范围内。

因此, 假定按照本发明的增强子元件的一种最小构型是如 SEQ ID NO:8 中所示的分离的多核苷酸。预期该增强子与各种各样的启动子一起发挥作用, 所述启动子包括但不限于内皮特异性启动子(例如 PPE-1; SEQ ID NO.: 1)和组成型启动子例如病毒启动子诸如来源于 CMV 和 SV-40 的病毒启动子。该增强子应该能够给各种各样的启动子赋予内皮特异性。例如通过添加一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:6 中所示的序列, 可以增大所述增强子元件。可以将这些额外的序列连续或不连续加入到 SEQ ID NO.: 8 的序列中。

本发明还包括一种应用构建体在内皮细胞中表达目标核酸序列的方法, 所述构建体依赖于包括至少一个拷贝的 SEQ ID NO:8 中所示序列在内的增强子元件和将高水平的目标序列表达特异性地靶向内皮细胞的启动子。

本文所用的“对从受治疗者体内取出的细胞离体给药并随后将所述细胞再回输给所述受治疗者体内”具体包括干细胞的应用, 如在 (Lyden 等(2001) Nature Medicine 7: 1194-1201)中所描述的。

尽管在下文给出的实施例中描述的实验中使用腺病毒, 但是本领域技术人员可容易地使本发明的构建体适合于其它病毒传递系统。

在检查以下非限制性实施例后, 本发明的其它目的、优点和新特征对于本领域技术人员而言是显而易见的。另外, 上文叙述的和下文权利要求书部分要求保护的本发明各种实施方案和方面的每个都会在以下实施例中找到实验的支持。

实施例

现在参考以下实施例，连同以上的描述一起，以非限制性方式说明本发明。

一般而言，本文所用的命名法以及本发明中所用的实验方法包括分子技术、生物化学技术、微生物学技术和重组 DNA 技术。这些技术在文献中有详尽的解释。参见例如“Molecular Cloning: A laboratory Manual” Sambrook 等, (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” 第 I-III 卷 Ausubel, R. M. 编著(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(编著) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, 第 1-4 卷, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 在美国专利第 4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659 和 5,272,057 号中叙述的方法; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, 第 I-III 卷 Cellis, J. E. 编著(1994); “Current Protocols in Immunology” 第 I-III 卷 Coligan J. E. 编著(1994); Stites 等(编著), “Basic and Clinical Immunology” (第 8 版), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell 和 Shiigi (编著), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W. H. Freeman and Co., New York (1980); 可利用的免疫测定在专利和科学文献中有全面的描述, 参见例如美国专利第 3,791,932、3,839,153、3,850,752、3,850,578、3,853,987、3,867,517、3,879,262、3,901,654、3,935,074、3,984,533、3,996,345、4,034,074、4,098,876、4,879,219、5,011,771 和 5,281,521 号; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M. J. 编著(1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B. D. 和 Higgins S. J. 编著(1985); “Transcription and Translation” Hames, B. D. 和 Higgins S. J. 编著(1984); “Animal Cell Culture” Freshney, R. I. 编著(1986); “Immobilized Cell 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); 所有所述文献通过引用如同全文叙述一样结合到本文中。其它通用参考文献在该文献中提供。据认为其中的方法是本领域众所周知的, 仅为方便读者而提供。其中所包括的所有信息通过引用结合到本文中。

具体地说, 结合下文叙述的实施例进行的实验使用以下方法和材料:

方法和材料

细胞培养

让 Lewis 肺癌细胞- (D122-96) (由 L. Eisenbach 教授友好提供, The Weizmann Institute of Science Rehovot, Israel)、人胚肾细胞(293)和 HeLa 细胞在补充 10%胎牛血清(FCS)、50 U/ml 青霉素、50 μ g/ml 链霉素和 2 mM 谷氨酰胺的 4.5gr/l DMEM (Biological industries, Beit-Haemek, Israel) 中生长。让牛主动脉内皮细胞- BAEC (由 N. Savion 教授友好提供, Goldshlager Institute, Sheba Medical Center, Tel-Hashomer, Israel)、正常皮肤成纤维细胞- NSF、HepG2 和人脐内皮细胞- HUVEC-304 (ATCC, USA)在补充 5% FCS、50 U/ml 青霉素、50 μ g/ml 链霉素和 2 mM 谷氨酰胺的 1.0gr/l DMEM (Biological industries, Beit-Haemek, Israel)中生长。给 BAEC 细胞补充完整的成纤维细胞生长因子(Sigma, St. Louis. MO.)。让 RINr1046-38 (RIN-38)在补充 5% FCS (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel)、50U 青霉素/ml、50 μ g 链霉素/ml 和 2 mM 谷氨酰胺的 199 Earle 氏盐(5.5mM 葡萄糖)培养基中生长。

本文所用的“HepG2”是指 ATCC-HB-8065。

本文所用的“HeLa”是指 ATCC-CCL-2。

本文所用的“人支气管上皮细胞”和“B2B”是指 ATCC-CRL-9609。

本文所用的“HUVEC”和“人脐静脉内皮细胞”是指 ATCC-CRL-1730。

本文所用的“CHO”和“中国仓鼠卵巢”是指 ATCC-61。

低氧诱导

转染或转导后 26 小时, 将细胞在一个独立小室中孵育, 用含有用 N_2 平衡的 0.5% O_2 、5% CO_2 的气流洗涤 30 分钟。将该独立小室置于 5% CO_2 、37℃湿润培养箱中。

细胞和组织中的荧光素酶活性

为了定量测定 PPE-1 启动子的体外和体内活性, 使用荧光素酶基因表达系统试剂盒(Promega Corp., Madison, WI)。转染或转导后 48 小时, 洗涤细胞, 然后加入 200 μ l 裂解缓冲液达 15 分钟。收集细胞裂解液, 于 4℃离心 15 分钟(14,000rpm)。随后, 加入 10 μ l 上清液至 50 μ l 荧光素酶测定缓冲液中。在发光计中测量 20 秒内的所述活性。

为了测定实体组织中的荧光素酶活性, 切取 20mg 样品, 在 1ml 匀浆溶液中匀浆, 于 4℃离心 15 分钟(14,000rpm), 如上所述测定 10 ml 上清液中的荧光素酶活性。结果以荧光素酶光单位/ μ g 蛋白表示。采用 Bradford 测定, 用牛血清白蛋白(BSA)作为标准品, 测量蛋白质。

体外和体内的 GFP 活性

为了测试 GFP 的体外表达, 用 PBS 洗涤细胞两次, 然后将其在新鲜制备的 4%低聚甲醛的 PBS 溶液中固定 30 分钟。固定后, 通过荧光显微镜术进行检查。

为了测试所传递基因的体内细胞分布, 将组织在新鲜制备的含 4%低聚甲醛的 0.1 M 磷酸缓冲液中于 4℃固定 6 小时, 在 30%蔗糖中于 4℃浸泡过夜, 然后在 OCT 化合物(Sakura, USA)中冷冻。用冷冻切片机

将组织块切成 10 μm 厚的切片，然后直接在荧光显微镜(FITC 滤光片)下观察。

增殖细胞和静息细胞

为了比较增殖和静息 BAEC 中的 PPE-1 启动子活性，将细胞分成两组：1. 增殖细胞—在 10% FCS 培养基中生长并有感染力的。2. 静息细胞—转导前 72 小时内开始在无血清培养基生长中而有感染力的。让所有细胞在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 湿润培养箱中生长。

重组复制缺陷型腺病毒的制备

构建若干重组复制缺陷型腺病毒(5 型)。包括鼠前内皮缩血管肽原-1 (PPE-1)启动子(SEQ ID NO:1)的表达盒位于荧光素酶基因(来源于 pGL2-basic GenBank 登记号 X65323)上游，将 SV40 polyA 位点(来源于 pGL2-basic GenBank 登记号 X65323)连接到 pPAC.plpA (无启动子构建体)的 BamHI 限制位点。将 GFP 基因(来源于 pEGFP, GenBank 登记号 AAB02572)于 NotI 限制位点与所述 PPE-1 启动子连接。按照 Becker, T.C. 等所述的方法(Methods Cell biol. 43, Roth M. (编著). New York. Academic Press, 1994, 第 161-189 页)，通过将 pPACPPE-1Luc 或 Ad5PPE-1GFP 与腺病毒质粒 pJM17 共转染，制备被称为 Ad5PPE-1Luc 或 Ad5PPE-1GFP 的复制缺陷型重组腺病毒，然后收获重组病毒体。

制备供大规模生产用的病毒。将浓度为 10^9 - 10^{12} 噬斑形成单位/ml (pfu/ml)的病毒原液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存。供大规模制备用的含有巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子(GenBank 登记号 U47119)的病毒 Ad5CMV-Luc (由 UTSw Dallas, Texas 的 R. Gerard 友好提供)和 Ad5CMV-GFP (Quantum biotechnologies, Carlsbad, Canada)按照关于 PPE-1 病毒载体所描述的方法制备，并将其用作非组织特异性对照。

所述 PPE 启动子的修饰

通过将三个拷贝的 Bu 等(J. Biol Chem. (1997) 272 (19): 32613-32622)发现的正转录元件(positive transcription element)插入到位于 43 个碱基对内源正元件(-364 至-320 bp)下游的 NheI 限制性酶切位点(-286bp), 产生经修饰的鼠 PPE-1 启动子。

本文称为“3X”的增强子片段是鼠 PPE-1 启动子中存在的内源序列元件(SEQ ID NO:1 的核苷酸坐标 407-452)的三联拷贝。先前已经表明, 血管内皮细胞中 PPE-1 启动子活性的诱导依赖于该元件的存在(Bu 等 J. Biol Chem. (1997) 272 (19): 32613-32622)。通过用长度为 96 个碱基对的两条互补单链 DNA 链(BioTechnology industries; Nes Tziona, Israel)(SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3), 合成 3X 片段。使所述两个单链 DNA 片段退火, 用 Klenow 片段(NEB)补平; 所得的双链 DNA 长 145 个碱基对并且包括 Nhe-1 限制位点(SEQ ID NO:4)。

用 T4 连接酶, 将所述 3X 片段连接到内源 Nhe-1 位点下游的鼠 PPE-1 启动子中。让所得的构建体在 DH5 α 感受态细胞中繁殖, 用大量制备(maxi-prep) Qiagene 试剂盒产生大规模质粒制备物。

另外的质粒

野生型 PPE-1 启动子

含有 1.4kb 鼠前内皮缩血管肽原-1 (PPE-1)启动子、具有 SV40 polyA 信号位点的荧光素酶基因(GenBank 登记号 X 65323)和鼠 ET-1 基因的第一内含子的 PPE-1-荧光素酶盒(5249bp), 来源于 Harats 等(J. Clin. Inv. (1995) 95: 1335-1344)使用的 pEL8 质粒(8848bp)。用 BamHI 限制性酶, 然后用提取试剂盒(Qiagen, Hilden, 德国)从 1%琼脂糖凝胶中提取所述 DNA 片段, 从 pEL8 质粒中提取 PPE-1-荧光素酶盒。

无启动子 pPAC.plpA 质粒

含有腺病毒 5 型序列的无启动子 pPAC.plpA 质粒(7594bp)来源于

pPACCMV.pLpA (8800bp)。用 NotI 限制性酶除去 CMV 启动子、多克隆位点和 SV40 聚腺苷酸化位点(1206 bp)，从 1%琼脂糖凝胶中提取片段化 DNA。该线状质粒(7594 bp)用 Klenow 片段补平，用快速 DNA 连接试剂盒将 BamHI 接头与两个粘性末端连接。该线状质粒再用 T4 DNA 连接酶连接，转化到 DH5 α 感受态细胞中，以便扩增具有 BamHI 限制位点的 pPAC.plpA。制备供大规模制备用的质粒并用大量制备 DNA 纯化试剂盒纯化。

pPACPPE-1 荧光素酶质粒

通过用 T4 DNA 连接酶，将 PPE-1-荧光素酶盒插入到 pPAC.plpA 质粒的 BamHI 限制位点中，构建 pPACPPE-1 荧光素酶质粒。随后用该质粒转化 DH5 α 感受态细胞。制备所述质粒(12843bp)以进行大规模制备，并用大量制备 DNA 纯化试剂盒纯化。

pPACPPE-1GFP 质粒

通过用 T4 DNA 连接酶，将位于 PPE-1 启动子下游的 GFP 基因(来源于 pEGFP, GenBank 登记号 AAB02572)亚克隆到 NotI 限制位点中，构建 pPACPPE-1GFP 质粒。

随后用该质粒转化 DH5 α 感受态细胞。制备所述质粒(11,801 bp)以进行大规模制备，并用大量制备 DNA 纯化试剂盒纯化。

pACPPE-1-3X 荧光素酶质粒和 pACPPE-1-3X GFP 质粒

通过将用 BamHI 限制性酶消化从含有 Luc 或 GFP 的 pEL8-3X (图 26B)获得的 PPE-1-3XLuc 盒或 PPE-1-3XGFP 盒插入到 pPAC.plpA 质粒的 BamHI 限制位点中，构建 pPACPPE-1-3X 荧光素酶质粒和 pPACPPE-1-3XGFP 质粒。pEL8-3X 含有位于 BamHI 和 NotI 之间的经修饰的鼠 PPE-1 启动子(1.55kb) (红色)，所述启动子含有位于两个 NheI 位点之间的三联拷贝内皮特异性增强子 3X (如 SEQ ID NO.: 7 所示)。

所述启动子、荧光素酶基因或 GFP 基因、SV40 poly A 位点和内皮缩血管肽-1 基因的第一内含子，它们一起被称为经修饰的 PPE-1 启动子盒，如材料和方法中所述的方法，用 BamHI 限制性酶对其进行消化和提取。制备供大规模制备用的质粒(12843bp)并用大量制备 DNA 纯化试剂盒纯化。

体外实验、DNA 转导

转导前 24 小时，将细胞接种到 16 mm 培养皿中。如下进行 BAEC (牛主动脉内皮细胞)、HUVEC (人脐静脉内皮细胞)、LLC (Lewis 肺癌)细胞和 RIN (大鼠胰岛瘤)细胞、HepG2 细胞、HeLa 细胞和正常皮肤成纤维细胞(NSF)的 DNA 转导:将每种细胞系与 1.5 和 10 感染复数(moi)的 Ad5PPE-1Luc 一起在总体积 500 μ l 的生长培养基中孵育 4 小时，然后与总体积为 2 ml 的生长培养基一起孵育 48 小时。用 Ad5CMVLuc 作为非组织特异性对照。

动物

所有动物程序都得到 Sheba Medical Center, Tel-Hashomer 的“Animal Care and Use Committee”的批准。

使用以下不同的小鼠品系:

(i) 3 月龄雄性野生型 C57BL/6 小鼠(Harlan farms, Jerusalem, Israel)。

(ii) 3 月龄雄性 BALB/C 小鼠(Harlan farms, Jerusalem, Israel)。

(iii) 6 月龄雄性和雌性 ApoE 基因缺陷型小鼠，C57BL/6xSJ129 小鼠的杂种(Plump AS.等 Cell (1991) 71: 343-353)。

(iv) 3 月龄雄性和雌性小鼠，该小鼠过量表达处于鼠 PPE-1 启动子(5.9Kb)控制之下的荧光素酶基因，由 Harats 等产生(J. Clin. Inv. (1995) 95: 1335-1344)。

所有小鼠都在 the Lipids and Atherosclerosis Research Institute (脂类

和动脉粥样硬化研究所)生长。

正常小鼠中的组织基因表达

为了测定效率和组织特异性,如上文所述,将 10^{10} pfu/ml Ad5PPE-1Luc 或 Ad5CMVLuc (作为非组织特异性对照)悬浮于 100 μ l 生理盐水中,然后注射到小鼠尾静脉内。注射后 1 天、5 天、14 天、30 天和 90 天测量荧光素酶活性。为了对已表达报道基因的细胞分布进行定位,将 Ad5PPE-1GFP 或 Ad5CMVGFP (10^{10} pfu/ml, 在 100 μ l 生理盐水)注射到 3 月龄正常雄性 C57BL/6 小鼠尾静脉内。注射后 5 天检测到 GFP 表达。所有小鼠看来都很健康并且在肝脏或其它组织中未见毒性或炎症。

组织中的 GFP 活性

为了测试所传递基因的体内细胞分布,将取自注射小鼠的组织样品在新鲜制备的含 4%低聚甲醛的 0.1 M 磷酸缓冲液中于 4℃ 固定 6 小时,在 30%蔗糖中于 4℃ 浸泡过夜,然后在 OCT 化合物(Sakura, California, USA)中冷冻。将组织块切成 10 μ m 厚的切片,然后直接在荧光显微镜(FITC 滤光片)下观察。

肿瘤植入

用胰蛋白酶/EDTA 收获 Lewis 肺癌细胞(LLC),用 PBS 洗涤 3 次,然后用 0.1%锥虫蓝(Biological industries, Beit-Haemek, Israel)计数,以评价其活力。为了测试小鼠体内肿瘤血管生成中的 PPE-1 启动子活性的活性水平,使用两种不同的肿瘤膜型。

在原发性肿瘤膜型中,给小鼠背部(n=17)皮下注射所述细胞(1×10^6 细胞/ml, 在 100 μ l 生理盐水中)。注射后 21 天,将 Ad5PPE-1、Ad5PPE-1GFP、Ad5CMV 或 Ad5CMVGFP (10^{10} pfu/ml)注射到肿瘤组织(IT)中或进行静脉内注射;然后如上所述检测其活性。

在转移性肿瘤膜型中,给小鼠爪垫($n=12$)注射所述细胞(5×10^5 细胞/ml, 在 50 μ l 生理盐水)。当肿瘤组织的直径达到 0.7 mm 时,在无菌麻醉条件下切除爪垫(带有原发性肿瘤)。手术后 14 天,给小鼠尾静脉内注射所述病毒 (Ad5PPE-1、Ad5PPE-1GFP、Ad5CMVLuc 或 Ad5CMVGFP)。

在这两种肿瘤实验模型中,注射病毒后 5 天处死小鼠,切下其组织,测试荧光素酶活性或 GFP 活性。

伤口愈合模型

通过皮下注射戊巴比妥钠(6mg/kg),麻醉 3 月龄雄性 C57BL/6 小鼠。剃下其背上的毛,在背上作 5 cm 的直切口。立即用 4/0 无菌丝线将切口缝合。通过 H&E 和抗 von-Willibrand 抗体免疫组织化学染色,每两天检测愈合伤口中的血管生成过程。

作切口后 10 天,给所述小鼠尾静脉系统注射 10^{10} pfu/ml Ad5PPE-1Luc 或 Ad5CMVLuc。注射后 5 天,处死小鼠,如上所述测定切口部位和作为对照的正常对侧部位的皮肤中的荧光素酶活性。

组织学检查

为了评估肿瘤和转移组织中血管生成的程度,将所述组织切成 5 μ m 厚的切片,然后用苏木精和伊红(H&E)染色。用抗 CD31 (大鼠抗小鼠 CD31 单克隆抗体, Pharminogen, NJ, USA)抗体分析所述肿瘤膜型中的新血管形成。

统计学分析

运用 t-检验 ANOVA 或 Mann-Whitney 秩检验,对各组间统计学显著性差异进行分析。数据以平均值+SE 表示。

实施例 1

3X-PPE-1 质粒活性的体外分析

为了分析 PPE-1-3X 的活性，对 PPE-1-3X 启动子质粒和未经修饰的 PPE-1 启动子质粒的报道基因表达进行比较。将含有或者所述 PPE-1-3X 片段或者所述未经修饰的 PPE-1 片段以及报道基因荧光素酶的报道基因质粒，转染到内皮细胞系和非内皮细胞系以及表达所述 PPE-1 启动子的支气管上皮细胞系(B2B)中(参见上文的材料和方法)。选择 B2B 细胞系是为了提供相对于 PPE-1 启动子而言所述 3X 元件降低在非内皮细胞系中表达的能力的指示。采用脂质转染胺(lipofectamine) (Promega Corp., Madison, WI)完成转染。每种情况下，按照公认分子生物学实践，用βgal-neo 质粒作为转染效率的指示剂。

转染后 48 小时，用裂解缓冲液(Promega Corp., Madison, WI)收获细胞，用发光计(TD-20e - Turner Designs, Sunnyvale, California)分析荧光素酶活性。在平行实验中，分析βgal 活性，以将不同的转化效率标准化。结果总结于图 1 和表 1 中。处于 PPE-3X 控制之下的荧光素酶活性比处于未经修饰的 PPE-1 控制之下的荧光素酶活性高 15-20 倍。在非内皮细胞系中，用 PPE-1 和 PPE-1-3X 两者检测最低表达。这证明 PPE-3X 是用于在体内将基因特异性地传递到内皮细胞中的有前景的候选物。

表 1 – 用 PPE-1 和 PPE-1-3X 荧光素酶构建体转染的细胞中的
荧光素酶活性

质粒	内皮细胞系中的 荧光素酶活性		非内皮细胞系中的 荧光素酶活性
	HUVAC	BAEC	RIN
PPE-1	135.12	1121.3	0.73
PPE-1-3X	768	18331.7	0.32

实施例 2

Ad5PPE-1/荧光素酶的体外活性和特异性

也将 PPE-1/荧光素酶、PPE-1-3X/荧光素酶、PPE-1/GFP 和 PPE-1-3X/GFP 连接到 Ad5 质粒中,以产生 Ad5PPE-1/Luc 和 Ad5PPE-1-3X/luc、Ad5PPE-1/GFP 和 Ad5PPE-1-3X/GFP (Varda-Bloom 等, (2001) Gene therapy 8:819-827)。如下文详述,分别测定这些构建体。

为了测试 Ad5PPE-1/luc 的活性,对 B2B (人支气管上皮)、BAEC (牛主动脉内皮细胞)和 HUVEC (人脐静脉内皮细胞)进行转染。这三个细胞系都表达内皮缩血管肽基因,选择这些细胞系以指示被测构建体在内皮细胞中的表达水平。用不表达内皮缩血管肽的 RIN (大鼠胰腺瘤)细胞系作为阴性对照,用同一构建体进行转染。用 Ad5CMVLuc (处于 CMV 启动子控制之下的荧光素酶)作为所有细胞系中的非内皮特异性对照。

图 2 清楚地说明,用 PPE-1 启动子比用 CMV 启动子在内皮 BAEC 和 HUVEC 细胞系达到的荧光素酶表达要高。在 RIN 细胞中,该细胞不是来源于内皮,CMV 启动子比 PPE-1 启动子产生的荧光素酶活性要高。这些结果证明所述未经修饰的 PPE-1 启动子的内皮特异性。

实施例 3

Ad5PPE-3XLuc 和 Ad5PPE-3XGFP 的活性和特异性

用 Ad5PPE-3X/荧光素酶和 Ad5PPE-3X/GFP 构建体转染上文实施例 2 中所述的细胞系,以便确定 3X 元件对特异性和表达水平的影响。如同在实施例 2 中一样,用 Ad5CMVLuc 作为非内皮特异性对照。与 CMV 启动子相比,检测在 BAEC 细胞系和 HUVEC 细胞系中处于 PPE-3X 启动子控制之下的荧光素酶表达较高。

图 3a 是一张显微照片,说明在 BAEC 细胞系中处于 Ad5PPE-1-3X 控制之下的 GFP 表达。图 3b 是一张显微照片,说明 BAEC 系中

Ad5CMV 的 GFP 表达。如这些图所清楚显示的, PPE-1-3X 启动子在内皮细胞中的活性更高。这些结果清楚地表明, 所述 3X 元件不会降低 PPE-1 启动子的内皮特异性。下文实施例 6 中给出了 PPE-1 启动子和 PPE-1-3X 启动子在细胞培养物中的相对活性。

实施例 4

p55 基因促凋亡活性的体外测定

将 P55 (TNFR1, GenBank 登记号 M75866) 亚克隆到 PACPPE3X (含有 PPE-1-3X 启动子) 和 PACCMV 中后, 如上文所述将这些质粒和 GFP (pEGFP-C1 载体; CLONTECH, Palo Alto, CA) 进行共转染。简而言之, 通过 T4 DNA 连接酶, 将所述基因亚克隆到 PPE-1 启动子(而不是荧光素酶基因)下游的 NotI 限制位点中, 然后将其转化到 DH5 α 感受态细胞中。转染后 24 小时, 肉眼可辨别小而圆的凋亡细胞和正常细胞。用电子显微镜检查用促凋亡质粒转染的细胞显示凋亡的典型外观, 证实了所述肉眼评价。

在 PPE-1-3X 启动子的控制之下, p55 仅在内皮细胞中诱导凋亡(图 4), 而 CMV 启动子没有显示任何细胞特异性活性。处于 PPE-1-3X 控制之下的荧光素酶在任何被测细胞系中都没有诱导凋亡。这些结果表明, 通过应用 PPE-1-3X 启动子, 在内皮细胞中特异性地诱导凋亡是可行的。

实施例 5

低氧效应元件(HRE)可以增强低氧敏感性内皮细胞中的靶基因表达

低氧是一种血管紧张性和结构的重要调节剂。也已表明, 它是一种血管生成的有效刺激物(在缺血性心脏病和癌症中(Semenza, G.L. 等 (2000) Adv Exp Med Biol.; 475: 123-30; Williams, K.J. (2001) Breast Cancer Res. 2001: 3; 328-31 和 Shimo, T. (2001) Cancer Lett. 174; 57-64)。此外, 据报道低氧调节许多基因的表达, 包括促红细胞生成素、

VEGF、糖酵解酶和 ET-1 基因的表达。这些基因受一个共同的氧传感途径(oxygen-sensing pathway)一称为低氧诱导因子-1 (HIF-1)的诱导型转录复合体的控制。所述 HIF-1 复合体通过结合靶基因的顺式作用低氧效应元件(HRE)来介导对低氧的转录反应。HRE 是一个位于包括以下基因的对低氧应答的极少数基因启动子中的保守序列: VEGF、一氧化氮合酶-2, 促红细胞生成素(erythropoietin)和包括内皮缩血管肽-1、ET-1 在内的其它基因。ET-1 启动子在转录起始位点上游位置-118 bp 含有一个反向低氧效应元件, 所述元件含有 7 个碱基对并且位于 GATA-2 和 API 位点之间, 为 5' GCACGTT 3' -50 碱基对(SEQ ID NO:5.)。

前内皮缩血管肽原-1 (PPE-1)启动子含有一个潜在增加其在肿瘤或局部缺血组织的低氧微环境中表达的低氧效应元件(HRE), 从而使其具有“肿瘤组织特异性”和/或“局部缺血组织特异性”。为了评价该 HRE 的实际功能, 结合荧光素酶或 GFP 报道基因以及用腺病毒载体传递对 PPE-1 启动子和 PPE-1-3X 启动子进行分析。

比较在 BAEC 细胞中在氧正常(normoxia)和低氧(hypoxia)条件(0.5% O₂ 达 16h)下处于 PPE-1 启动子或 PPE-1-3X 启动子控制之下的荧光素酶活性。处于 PPE-1 启动子控制之下的荧光素酶活性当暴露于低氧时提高至 5 倍(图 5 和图 6)。此外, 处于 PPE-1-3X 启动子控制之下的荧光素酶活性在低氧条件下提高至 2.5 倍。概括地讲, 将 3X 元件导入 PPE 1 启动子中仍能够提高下游基因对低氧应答的表达水平, 即使在使用 PPE-1-3X 基因时氧正常的表达水平也比用未经修饰的 PPE-1 启动子所观察的表达水平高。

实施例 6

对内皮细胞系中 PPE-1-3X 和 PPE-1 启动子活性的进一步评估

图 7 总结了得自用 pPPE-1/荧光素酶和 pPPE-1-3X/荧光素酶转染

B2B、HUVEC 和 BAEC 的实验的结果。分别在 B2B、HUVEC 和 BAEC 中观察到处于 PPE-1-3X 启动子控制之下的荧光素酶表达高于处于 PPE-1 启动子控制之下的荧光素酶表达(30 倍、8.5 倍和 1.5 倍以上)。这些结果证实了上文所述的结果,并且可用来确立 PPE-1-3X 非常适合将高水平表达特异性地靶向内皮细胞。在将来的体内传递方面,用 PPE-1-3X 构建体实现的较高表达水平意味着可给予更少量的 DNA。这进而将会用来甚至进一步增强特异性。

实施例 7

Ad5PPE-1Luc 在体内的效率、特异性和稳定性

为了证实在实施例 2-6 中所观察的的内皮特异性不是细胞培养物的人为现象,如上文在“正常小鼠中的组织基因表达”中所述的方法,将 Ad5PPE-1/荧光素酶构建体注射到 C57BL/6 小鼠体内。如同在所述体外研究中一样,用 Ad5CMV/荧光素酶作为阴性对照。

注射腺病毒载体后,分析血管形成组织和非血管形成组织中的荧光素酶比活和稳定性。结果总结于图 8(相对于肝中表达的荧光素酶表达)和表 2(荧光素酶表达以机体总表达的百分率表示)。正如所预期的,在 Ad5CMV/荧光素酶治疗的小鼠中,在肝中发现大多数荧光素酶活性(>总机体表达的 80%)。由 PPE-1 启动子控制的荧光素酶活性在肝中较低(总机体表达的 37-54%)。与 Ad5CMV/荧光素酶治疗的小鼠相比(总机体表达的至多 1.8%;表 2),PPE-1 驱动的表达在主动脉中高得多(分别在注射后 5 天和 14 天为总机体表达的 23-33%)。这些结果证实了在细胞培养物中观察的内皮特异性。应该提及的是,肝脏是一个高度血管化器官。因此,如下文详述对各种器官内的细胞表达进行检查。

表 2 - 注射基于 PPE-1 和 CMV 的构建体后 5 天和 14 天
器官中的荧光素酶表达

注射后天数	5		14	
	光单位/ μg 蛋白		光单位/ μg 蛋白	
器官	PPE-1	CMV	PPE-1	CMV
主动脉	13.0 $\pm$ 2.9 (32.7%)	1.4 $\pm$ 0.5 (0.56%)	10.6 $\pm$ 2.4 (12.6%)	1.3 $\pm$ 0.3 (1.1%)
心脏	0.2 $\pm$ 0.1 (0.5%)	1 $\pm$ 0.6 (0.4%)	1.5 $\pm$ 0.3 (1.7%)	1.8 $\pm$ 0.6 (1.6%)
肝脏	22.7 $\pm$ 4.5 (57%)	219 $\pm$ 111.5 (88.6%)	34.9 $\pm$ 7.8 (41.6%)	52.8 $\pm$ 10.6 (46.8%)
肺	0.2 $\pm$ 0.1 (0.5%)	2.3 $\pm$ 1.0 (0.9%)	3.6 $\pm$ 0.8 (4.3%)	2.0 $\pm$ 0.9 (1.8%)
肌肉	0.3 $\pm$ 0.1 (0.7%)	0.8 $\pm$ 0.2 (0.3%)	1.2 $\pm$ 0.3 (1.4%)	1.5 $\pm$ 0.5 (1.3%)
脾脏	1.3 $\pm$ 0.8 (3.2%)	1.6 $\pm$ 0.9 (0.6%)	2.0 $\pm$ 0.4 (2.4%)	2.3 $\pm$ 0.9 (2.0%)
胰腺	2 $\pm$ 0.6 (5.0%)	20.1 $\pm$ 6.8 (8.1%)	26.4 $\pm$ 5.9 (31.5%)	45.2 $\pm$ 24.5 (40.1%)
肾脏	0.1 $\pm$ 0 (0.25%)	0.9 $\pm$ 0.6 (0.4%)	0.6 $\pm$ 0.1 (0.71%)	0.8 $\pm$ 0.3 (0.7%)

表 2 续

图 30A 和图 30 B 证明 110 只注射小鼠的主动脉(A)和肝脏(B)中的绝对荧光素酶活性(光单位/ μg 蛋白)。注射后 1 天(n=13)、5 天(n=34)、14 天(n=32)、30 天(n=20)和 90 天(n=11)测量荧光素酶活性。主动脉中的结果代表主要在内皮细胞中的启动子(PPE-1 或 CMV)活性,而肝脏中的结果代表主要在肝细胞中的其活性。

实施例 8

BALB/C 小鼠中 Ad5PPE-1 的

效率、特异性和稳定性的体内测定

在 12 周龄 BALB/C 小鼠(每组 $n=10$)中重复实施例 7 的实验,以证明所观察的结果不是特定动物品系的人为现象。

因为用腺病毒载体得到的绝对结果在 BALB/C 小鼠中比在 C57BL/6 小鼠中低,所以荧光素酶表达以所有组织中总荧光素酶活性的百分率表示。

在注射 Ad5PPE-1 的小鼠脾脏(90.9%)和注射 Ad5CMV 的小鼠肝脏(86.2%)中观察到注射后 5 天的最高相对荧光素酶表达。也观察到注射后 14 天注射 Ad5PPE-1 的小鼠主动脉中的相对荧光素酶活性(32.9%)与注射后 5 天相对荧光素酶活性(1.75%)相比的显著增加(图 31A 和图 31B; Ad5PPE-1Luc - 空心条带; Ad5CMVLuc - 实心条带)。

这些结果证实,无论用何种小鼠品系, PPE-1 启动子的组织特异性都足以强烈有效地消除肝细胞表达, 尽管肝细胞优先摄入注射的 DNA。

实施例 9

Ad5PPE-1 传递的基因的体内细胞定位

为了确定 PPE-1 表达的基因在体内的细胞表达部位,使用通过腺病毒载体 Ad5PPE-1-GFP 传递的绿色荧光蛋白(GFP)。用 Ad5CMVGFP (Quantum, Canada)作为非内皮细胞特异性阴性对照。静脉内注射后 5 天处死小鼠,并通过荧光显微镜术分析其组织。

在注射 Ad5CMVGFP 载体的小鼠中,在肝细胞中检测到大部分表达,而在肝脏内皮细胞中没有检测到表达(图 9A)。与之形成鲜明对比的是,注射 Ad5PPE-1-GFP 的小鼠(图 9B)显示在肝细胞中没有表达,但在肝脏血管内皮细胞中有显著表达。在其它在内皮中检测到几乎所有的 PPE-1 源表达的组织中也获得相似的结果,而 CMV 源表达是非

内皮性的。这些结果表明, 内皮特异性甚至在含有内皮细胞和非内皮细胞的器官中也可保持。这一发现对预防生长中肿瘤的血管生成具有重大意义。

实施例 10

Ad5PPE-1-3X Luc 和 Ad5PPE-1-3X GFP 的

效率和内皮特异性的体外测定

为了测定 Ad5PPE-1 和 Ad5PPE-1-3X 在细胞中驱动报道基因荧光素酶和绿色荧光蛋白(GFP)表达的相对功效, 用上述细胞系体外测试内皮细胞中的特异性活性。用 Ad5CMVLuc 和 Ad5CMVGFP 作为非组织特异性对照。Ad5PPE-1Luc 和 Ad5PPE-1GFP 用来确定因加入所述 3X 序列所引起的表达水平的相对变化。

在图 10 和图 11 中总结的结果表明, 在 EC 系(牛主动脉内皮细胞 - BAEC)中处于 PPE-1-3X 启动子控制之下的荧光素酶活性与在非内皮细胞 - 大鼠胰腺瘤 - RIN 细胞、HeLA 细胞、HePG2 细胞和正常皮肤成纤维细胞(NSF)中的活性相比增至 5-10 倍(图 10 和图 11)。

图 10 显示在 Ad5PPE-1Luc、Ad5PPE-1-3XLuc 和 Ad5CMVLuc 转导的 B2B 细胞、BAEC 细胞和 RIN 细胞中以光单位/ μ g 蛋白表示的荧光素酶活性。在 Ad5CMVLuc 转导的 RIN 细胞中观察到最高的荧光素酶表达, 然而, 该构建体在 BAEC 细胞和 B2B 细胞中表达差。在 Ad5PPE-1-3Xluc 转导的 BAEC 细胞中观察到第二高水平的荧光素酶表达。Ad5PPE-1Luc 在 BAEC 细胞中以较低的水平表达。在 B2B 细胞系中, Ad5PPE-1Luc 和 Ad5PPE-1-3Xluc 以几乎相同的水平表达。

总的来讲, 在相同的感染条件下(moi=10), 在内皮细胞系中处于 PPE-1-3X 启动子控制之下的荧光素酶活性是处于 PPE-1 启动子控制之下的荧光素酶活性的 23 倍, 是处于 CMV 启动子控制之下的荧光素酶活性的 23-47 倍。尽管处于 CMV 启动子控制之下的荧光素酶表达在非内皮 RIN 细胞中高达 3000 倍(图 10)。

为了确立 PPE-1 和 PPE-1-3X 在其它非内皮细胞谱系中是无活性的, 对 HeLA、HepG2、NSF 细胞系进行转导。用 BAEC 作为内皮对照。图 11 显示在用 Ad5PPE-1Luc, Ad5PPE-1-3XLuc 和 Ad5CMVLuc 转导的 HeLA 细胞、HepG2 细胞、NSF 细胞和 BAEC 细胞中以光单位/ μ g 蛋白表示的荧光素酶活性。用 Ad5CMVLuc 转导, 在 HeLA 细胞、HepG2 细胞和 NSF 细胞中引起高水平的荧光素酶表达。这些细胞系不能表达处于 PPE-1 控制之下的荧光素酶并且用 PPE-1-3X 启动子以低水平表达荧光素酶。正如所预期的, 用 Ad5PPE-1Luc 或 Ad5PPE-1-3XLuc 转导的 BAEC 细胞表现出高荧光素酶表达。

综合考虑, 这些结果表明, 将所述 3X 序列导入 PPE-1 启动子中, 引起内皮细胞系中较高水平的表达, 同时防止非内皮细胞中不想要的表达。

加入所述 3X 序列至 PPE-1 启动子中也增加 EC 系(牛主动脉内皮细胞 - BAEC)中绿色荧光蛋白表达的水平, 如描绘了以 $\text{moi}=1$ 转导的 BAEC 中的 GFP 表达的图 12 A-C 所示。在该实验中, 用 CMV 启动子没有观察到 GFP 的表达。

在图 12 中, 图面 A 表示 Ad5PPE-1-3XGFP 转导的细胞, 图面 B 表示 Ad5PPE-1GFP 转导的细胞, 而图面 C 表示 Ad5CMVGFP。再者, 将所述 3X 序列导入 PPE-1 启动子中, 显著增加所述报道基因的表达。这一结果表明, 所述 3X 序列作为内皮特异性增强子起作用的能力不随待转录的下游基因而变。

此外, Ad5PPE-1-3X-GFP 和 Ad5PPE-1GFP 转导, 导致在非内皮细胞 SMC、HeLA、HePG2 和正常皮肤成纤维细胞(NSF)中与在 CMV 启动子下的高表达相比无 GFP 表达, 如图 13-16 中总结的。

图 13 显示以 $\text{moi}=1$ 的或者 Ad5PPE-1-3XGFP (图面 A) 或者 Ad5CMVGFP (图面 B) 转导的 SMC 中的 GFP 表达。尽管 Ad5CMVGFP 转导导致高水平 GFP 表达, 但是用 Ad5PPE-1-3XGFP 转导不引起 GFP 表达。

图 14 显示在 HeLa 细胞中进行的一个相似实验的结果。如同在前面的图中一样, 图面 A 表示用 Ad5PPE-1-3XGFP 转导的细胞, 图面 B 表示用 Ad5CMVGFP 转导的细胞。再者, 尽管 Ad5CMVGFP 转导导致高水平 GFP 表达, 但是用 Ad5PPE-1-3XGFP 转导不引起 GFP 表达。

图 15 显示在 HepG2 细胞中进行的一个相似实验的结果。如同在前面的图中一样, 图面 A 表示用 Ad5PPE-1(3X)GFP 转导的细胞, 图面 B 表示用 Ad5CMVGFP 转导的细胞。再者, 尽管 Ad5CMVGFP 转导导致高水平 GFP 表达, 但是用 Ad5PPE-1-3XGFP 转导不引起 GFP 表达。

图 16 显示在 NSF 细胞中进行的一个相似实验的结果。如同在前面的图中一样, 图面 A 表示用 Ad5PPE-1-3XGFP 转导的细胞, 图面 B 表示用 Ad5CMVGFP 转导的细胞。再者, 尽管 Ad5CMVGFP 转导导致高水平 GFP 表达, 但是用 Ad5PPE-1-3XGFP 转导引起极低的 GFP 表达。

这些结果综合起来考虑表明, 高水平的内皮特异性和高水平的内皮表达可通过使用含有 SEQ ID NO.: 7 的 3X 序列的经修饰的 PPE-1 启动子而获得。

实施例 11

由 Ad5PPE-1-3X 传递的报道基因的体内细胞定位

为了测定处于 PPE-1-3X 启动子控制之下表达的报道基因的体内细胞定位模式, 如上文所述将 Ad5PPE-1-3XGFP 和 Ad5PPE-1GFP 注射到小鼠体内。静脉内注射后 5 天, 处死小鼠并通过荧光显微镜术分析其组织。

注射 Ad5PPE-1-3XGFP 的小鼠与注射 Ad5PPE-1GFP 的小鼠相比, 在肝血管、肾血管和脾血管的内皮细胞中观察到显著更高的 GFP 活性。图 17A 和图 17B 显示代表性结果。

图 17A 显示注射 Ad5PPE-1GFP 的小鼠血管内衬的内皮细胞中的低水平 GFP 表达。图 17B 显示由于加入所述 3X 序列至所述构建体中

产生的水平高得多的 GFP 表达。

尽管在血管内衬(lining)中高表达,但是在肝细胞、肾小球、上皮细胞和脾细胞中没有检测到表达(图 18 和图 19)。

图 18 显示得自注射小鼠肾脏组织的代表性结果。注射 Ad5CMVGFP 的小鼠(图 18A)、注射 Ad5PPE-1GFP 的小鼠(图 18b)和注射 Ad5PPE-1-3XGFP 的小鼠(图 18C)在肾细胞中都表现出低 GFP 活性。在 18B 中,在血管壁中可见略高的 GFP 表达(箭头所示)。

图 19 显示注射小鼠脾组织的代表性结果。注射 Ad5CMVGFP 的小鼠(图 19A)、注射 Ad5PPE-1GFP 的小鼠(图 19B)和注射 Ad5PPE-1-3XGFP 的小鼠(图 19 C)在脾细胞中都表现出低水平的 GFP 活性。在注射 Ad5PPE-1-3XGFP 的小鼠血管可见较高的 GFP 活性(箭头所示)。

这些结果证实,PPE-1 启动子和 PPE-1-3X 启动子在体内均为内皮细胞特异性的。它们进一步提示,这两种启动子的活性限于非增殖性内皮组织(即健康器官的血管)。因此,在肿瘤血管生成性模型中进行各种测定。

实施例 12

肿瘤新血管形成中 Ad5PPE-1 构建体的体内测定

为了确定 AD5PPE 将报道基因的表达特异性地靶向肿瘤中血管生成性血管的能力,使用鼠 LLC 模型(上文在材料和方法描述的)。

在一个实验中,系统注射 Ad5PPE-1Luc 或 Ad5CMVLuc (各 10^{10} pfu/ml)后 5 天测试肿瘤新血管形成中的荧光素酶表达。

在该实验中,给原发性肿瘤模型和转移性肿瘤模型系统注射 Ad5CMVLuc 在原发性肿瘤或肺转移瘤中均产生最低表达。该表达水平与在未经实验的正常肺中由 CMV 指导的荧光素酶的最低表达相似(图 35; 实心条带; n=12)。与之鲜明对比的是,在 PPE-1 启动子的控制下(图 35; 空心条带; n=9),高血管生成性肺转移瘤与荧光素酶活性相关,所述荧光素酶活性为在血管化程度低的原发性肿瘤和未经过实验

的肺中的荧光素酶活性的约 200 倍。

在诸如肝脏、肾脏、心脏和胰腺的非转移瘤组织中的荧光素酶表达最低。主动脉中的表达水平大约是肺转移瘤中所述水平的 30%。

在在所述 LLC 模型的另一个实验中，用 Ad5PPE-1GFP 构建体和 Ad5CMVGFP 构建体来对原发性肿瘤和肺转移瘤中的报道基因表达进行定位。

注射 Ad5PPE-1GFP 的小鼠在原发性肿瘤血管中显示高水平的 GFP 特异性表达(图 36C)，尽管在肿瘤细胞本身没有检测到表达。这一观察结果与实施例 20 中提供的 LLC 细胞培养物模型的结果相一致。在肺转移瘤中，在转移瘤病灶的大主动脉和血管生成性小血管两者中均检测到高水平的 GFP 表达(图 36A)。在正常肺组织中没有检测到表达。内皮细胞定位为 GFP 表达(图 16A)和 CD31 抗体免疫染色(图 16B)的共定位所证实。与之形成鲜明对比的是，在注射 Ad5CMVGFP 的小鼠中，在原发性肿瘤和肺转移瘤两者中均没有检测到 GFP 活性。

图 36C 说明肿瘤内注射 Ad5PPE-1GFP 后在原发性肿瘤血管中的 GFP 表达。图 36D 是一幅与图面 C 相同的说明肿瘤及其血管的相差图像。

这些结果表明，PPE-1 不驱动肿瘤细胞自身中的高水平表达，而所述启动子却驱动肿瘤内血管内皮中、尤其是在快速增殖的血管生成性血管中的高水平表达。

给原发性皮下肿瘤模型肿瘤内注射 Ad5CMV，导致在肿瘤组织中的高荧光素酶表达，而在肝脏中导致中等水平表达(肿瘤表达量的 10%；图 42)。在肺转移瘤中没有检测到表达。另一方面，当肿瘤内注射时，处于 PPE-1 启动子控制之下的荧光素酶表达，导致在原发性肿瘤和肺转移瘤中的相似荧光素酶表达水平，而在肝脏中没有检测到表达。

实施例 13

癌细胞培养物系统中的 Ad5PPE-1 构建体的测定

为了测定 Ad5PPE-1 和 Ad5CMV 在癌细胞中驱动荧光素酶表达的效率，使用 D122-96 Lewis 肺癌细胞系。

以不同的感染复数(moi)进行体外转导。结果表明，两种腺病毒载体均能够将荧光素酶基因转导给这些细胞(表 3)。然而，由 PPE-1 启动子指导的荧光素酶活性在 LLC 细胞中比在内皮细胞中检测到的所述活性低得多，分别为 50 光单位/ μg 蛋白对 1000-2500 光单位/ μg 蛋白。

表 3 – 用 Ad5PPE-1Luc 和 Ad5CMVLuc 体外转导 Lewis 肺癌细胞系(D122-96)

	MOI=1	MOI=5	MOI=10
Ad5PPE-1	8.1 $\pm$ 0.06	33.95 $\pm$ 7.0	50.7 $\pm$ 5.0
Ad5CMV	9.3 $\pm$ 1.1	47.3 $\pm$ 4.0	88.13 $\pm$ 10.1

实施例 14

所述 3X 序列在肿瘤血管生成性血管中效应的体内测定

为了确定所述 3X 序列对血管生成性血管中 PPE-1 启动子的效应，使用 Lewis 肺癌(LLC)转移瘤模型(上文在材料和方法中描述的)。如材料和方法所述的方法，静脉内注射 10^{10} 感染单位的 Ad5PPE-1GFP、Ad5PPE-1-3XGFP 或 Ad5CMVGFP 后 5 天，处死小鼠并分析其组织。

图 20 A-D 总结了注射盐水的对照小鼠(图 20A)、注射 Ad5CMVGFP 的小鼠(图 20 B)、注射 Ad5PPE-1GFP 的小鼠(图 20 C)和注射 Ad5PPE-1-3XGFP 的小鼠(图 20D)的肺转移瘤中的 GFP 表达。抗 CD31 免疫染色(图 20C'-20D')证实每种转移瘤组织中 GFP 表达的位置。结果表明，在对照—注射盐水的小鼠中没有检测到 GFP 表达(图 20A)，在注射 CMV 的小鼠支气管上皮周围有微弱表达，而在这些小

鼠肺转移瘤血管生成性血管中没有表达(图 20B)。在注射 Ad5PPE-1GFP 的小鼠肺转移瘤中观察到低 GFP 表达(图 20C 和 20C'),而在注射 Ad5PPE-1-3XGFP 的小鼠新血管中观察到高且特异性的表达(图 20D 和 20 D')。

这些结果解释了实施例 10 的体内结果和实施例 2、3 和 6 的体外结果之间明显不一致的结果。PPE-1 启动子和 PPE-1-3X 启动子两者都是内皮特异性的。然而,所述 3X 序列大大提高了快速增殖的内皮组织诸如生长中肿瘤的新形成的血管中的表达水平。

实施例 15

所述 3X 元件对肿瘤血管生成性血管中 PPE-1 启动子的效应

为了研究本发明的 3X 元件对肿瘤血管生成性血管中 PPE-1 启动子功效和特异性活性的影响,使用 LLC 转移瘤模型。如上文所述的方法,静脉内注射 10^{10} pfu/ml Ad5PPE-1Luc、Ad5PPE-1-3XLuc、Ad5CMVLuc、Ad5PPE-1GFP、Ad5PPE-1-3X-GFP 或 Ad5CMVGFP 后 5 天,处死小鼠并分析其组织的荧光素酶表达或 GFP 表达。

图 37 是一幅直方图,比较系统注射 Ad5PPE-1-3Xluc、Ad5PPE-1Luc 或 Ad5CMVLuc 后在正常肺和肺转移瘤中的荧光素酶表达。各实验组为 Ad5CMVLuc (n=7; 黑色条带)、Ad5PPE-1Luc (n=6; 灰色条带)和 Ad5PPE-1-3XLuc (n=13; 褐色条带)。活性以光单位/ μ g 蛋白表示。

处于 PPE-1-3X 启动子控制之下的荧光素酶表达在肺转移瘤中相对其在正常肺中的活性而言高达 35 倍,是由无所述 3X 元件的 PPE-1 启动子驱动的表达的 3.5 倍($p < 0.001$)。在注射 Ad5PPE-1-3XLuc 的小鼠的其它组织中检测到非常低的荧光素酶活性。计算每只经注射的动物肺中荧光素酶表达占肝中表达的百分率揭示出,与正常肺中的所述活性相比,肺转移瘤中的所述活性增加至 10 倍(图 38)。

为了将报道基因表达定位至特定细胞类型,使用 GFP 构建体。图 39 显示注射 Ad5PPE-1-3XGFP 的小鼠肺转移瘤中的 GFP 表达(图

39A)。通过 CD31 抗体免疫染色(图 39B)证实 GFP 表达定位于新血管中。在对照—注射盐水的小鼠中没有检测到 GFP 表达。注射 CMV 的小鼠支气管上皮周围低水平表达,但在肺转移瘤的血管生成性血管中没有表达。概括地讲,这些结果表明,表达水平大大增加是由于将 3X 元件导入 Ad5PPE-1 构建体中所致,并且这种增加的表达对肿瘤血管生成性血管是特异性的。可能是,所观察的效应可能与上文所述的低氧应答相关,进一步提高了目标序列的表达水平。

实施例 16

PPE-1 低氧应答的进一步表征

为了进一步表征低氧对鼠 PPE-1 启动子活性的影响,用一种 DNA 质粒(pEL8; 图 26A)转染牛主动脉内皮细胞(BAEC)。pEL8 质粒含有鼠 PPE-1 启动子(1.4kb) (红色)、荧光素酶基因(1842 bp)、SV40 poly A 位点和内皮缩血管肽-1 基因的第一内含子,它们一起被称为 PPE-1 启动子盒,如材料和方法中所述的方法,用 BamHI 限制性酶对其进行消化和提取。转染后,让细胞经历低氧条件。

经历 18 小时低氧(0.5% O₂)的转染 BAEC 中的荧光素酶表达是氧正常环境下生长的细胞中的荧光素酶表达的 8 倍(图 21)。图 21 显示用含有鼠 PPE-1 启动子的质粒转染的 BAEC 中的荧光素酶活性(光单位/ μ g 蛋白)当转染细胞在低氧环境下孵育时明显更高。同样的转染效率通过与 β -半乳糖苷酶报道载体共转染和 LacZ 活性的测定得以证实。

为了确定由腺病毒载体传递的鼠 PPE-1 启动子是否也受到低氧的正调节,用 Ad5PPE-1Luc 转导 BAEC。在该实验中用 Ad5CMVLuc 作为非特异性对照。结果总结于图 22 中。用 Ad5PPE-1Luc 转导的 BAEC 中的低氧荧光素酶活性。与之明显相反,在 Ad5CMV 转导的细胞中没有检测到氧正常和低氧之间的显著性差异(图 22)。

为了了解 PPE-1 启动子活性的增强是否是内皮细胞特异性的,用 Ad5PPE-1 (moi=10)转导不同的细胞系(BAEC、B2B、CHO、RIN 和心

肌细胞), 然后让其经历低氧(0.5% O₂)或氧正常环境。结果总结于图 23 中。荧光素酶表达在低氧环境下培养的 B2B 细胞中略微增加, 而在低氧环境中培养的 BAEC 细胞中显著增加。与氧正常相比, 低氧环境降低其它细胞系中的荧光素酶表达。这些结果证实, PPE-1 启动子的低氧诱导主要在内皮细胞谱系中发生。

实施例 17

所述 3X 序列对 PPE-1 低氧应答的影响

为了确定所述 3X 序列对 PPE-1 低氧应答的影响, 用 Ad5PPE-1Luc 和 Ad5PPE-1(3X)Luc 转导 BAEC。转导后, 如上文详述, 将 BAEC 细胞或者在低氧环境中或者在氧正常环境中孵育。结果总结于图 24 中。使用 Ad5PPE-1Luc 构建体的荧光素酶表达在对低氧应答时显著增加(7 倍) (低氧条件下为 2578, 而氧正常条件下为 322.1)。相比之下, Ad5PPE-1(3X)Luc 构建体在对低氧应答时仅表现出增至 1.5 倍(从氧正常条件下的 2874.5 增加至低氧条件下的 4315)。这些结果表明, 当在 PPE-1 启动子中加入所述 3X 序列时所观察的高氧正常表达水平在一定程度上起掩蔽低氧应答的作用。

实施例 18

在转基因小鼠模型中 PPE-1 对低氧应答的测定

为了检查经历局部低氧/局部缺血的组织中的鼠 PPE-1 启动子活性, 使用如上文在材料和方法中描述的 mPPE-1-Luc 转基因小鼠。如先前描述的方法(Couffignal T.等(1998) Am. J. Pathol. 152; 1667-1679), 诱发小鼠发生局部后肢的局部缺血。简而言之, 用戊巴比妥钠(40 mg/kg, IP)麻醉动物。通过对隐动脉和腘动脉分叉近端约 2 mm 的右股动脉结扎, 诱发后肢发生单侧局部缺血。为了证实灌注时机能变化的诱导, 通过配备 7.5 MHz 传感器和血管造影软件的 Synergy 超声系统(GE), 在第 4 天和第 14 天进行超声波成像。将动物在常规条件下关养至多 18

天。

结扎后 2 天、5 天、10 天和 18 天，测定局部缺血肌肉、正常未结扎肌肉、肝、肺和主动脉中的荧光素酶表达。

在图 25 中总结的结果显示，在结扎后数天期间，在肝、肺和主动脉中没有检测到显著性差异，但是荧光素酶基因表达在正常未结扎肌肉和局部缺血肌肉两者中在股动脉结扎后增加。结扎后 5 天在局部缺血肌肉中检测到峰值荧光素酶表达，而股动脉结扎后 10 天在未结扎肌肉中也检测到峰值荧光素酶表达。这表明 PPE-1 启动子的低氧效应在体内系统中是有功能的。非局部缺血肌肉中的荧光素酶表达在所测试的天数期间与其在对照未经手术组织中的表达(天数=0)相比并没有变化。相比之下，第 5 天在局部缺血肌肉中的荧光素酶表达明显高于其它时间点。

第 5 天，PPE-1 驱动的荧光素酶表达与在对照未经手术小鼠中并且与在第 10 天和第 18 天与局部缺血肌肉相比高至 2.5 倍(图 40)。

在经历局部缺血的转基因小鼠的其它非局部缺血组织包括肝、肺和主动脉中的荧光素酶表达揭示出，在诱发局部缺血后 18 天内，在这些组织中的荧光素酶表达没有显著变化(图 41)。

此外，这些结果证实，荧光素酶表达在含有高百分率的内皮组织的组织(肺和主动脉)中比在含有低百分率的内皮组织的组织(肝脏和非局部缺血肌肉)中高。

实施例 19

细胞增殖水平对内皮细胞中 Ad5PPE-1Luc 活性的影响

为了确定细胞增殖水平对 Ad5PPE-1Luc 的效率和特异性活性的影响，体外测试内皮细胞血管生成性模型(BAEC)。或者通过除去血清诱导经转导的 BAEC 静息，或者让其在 10% FCS 中生长而正常增殖。简而言之，将细胞转导 48 小时或者作为静息细胞 - 除去血清后 72 小时，或者作为增殖细胞 - 在正常培养基(10% FCS)中。荧光素酶活性

以根据细胞量的差异标准化的光单位/ μg 蛋白表示。所给出的结果是得自 4 个代表性独立实验的三个重复试验的平均值。

处于 PPE-1 启动子控制之下的荧光素酶表达(空心条带; 图 28)在正常增殖的 BAEC 中是在静息细胞中的 4 倍, 并且在正常增殖的 BAEC 中是处于 CMV 启动子控制之下的荧光素酶表达的 25 倍(实心条带; 图 28)。此外, 在增殖细胞中, 处于 PPE-1 启动子控制之下的活性是处于 CMV 启动子控制之下的活性的 10 倍。

为了体外模拟血管生成性病症, 测试通过加入 40 ng/ml 血管内皮生长因子(VEGF)诱导快速增殖的 BAEC 中的 Ad5PPE-1Luc 活性。如上文所述, 比较在正常增殖细胞和静息细胞中在这些条件下的活性。用 VEGF 诱导细胞增殖的 BAEC 中的荧光素酶表达是在正常增殖细胞中的 44 倍, 而是在静息细胞中的 83 倍(图 29)。

总的来讲, 这些实验表明, 处于 PPE-1 启动子转录控制之下的目标序列的活性水平随细胞增殖水平而变动, 其中快速增殖引起高水平的表达。

实施例 20

对诱发动脉粥样硬化的小鼠体内的 PPE-1 启动子的测定

为了测试动脉粥样硬化血管中 Ad5PPE-1 载体的效率和特异性, 给 6 月龄 ApoE 缺陷型小鼠(Plump, A.S.等 Cell; 1991; 71:343-353)系统注射 10^{10} pfu/ml 所述病毒载体。

随着 ApoE 缺陷型小鼠衰老, 在无提供脂质的饮食的诱导下, 它们产生高胆固醇值和广泛的致动脉粥样硬化斑。图 32 是一张从 ApoE 缺陷型小鼠解剖的苏丹-IV 着色的主动脉照片。注意到胸主动脉含有的红色染色的动脉粥样硬化病变较少, 而腹部高度动脉粥样硬化(图 32 摘自 ^{125}I -HDL 和 ^{125}I -BSA 的主动脉粥样硬化病变成像。A. Shaish 等, Pathobiology - 已提交待发表)。

图 33 总结了给 ApoE 缺陷型小鼠系统注射 Ad5PPE-1Luc (空心条

带; n=12)和 Ad5CMVLuc (实心条带; n=12)后 5 天所观察到的荧光素酶表达。结果以含有较少的动脉粥样硬化病变的胸主动脉和富含动脉粥样硬化病变的腹主动脉中的绝对荧光素酶表达来表示。

与处于对照 CMV 启动子控制之下的表达相比, 受 PPE-1 启动子控制的荧光素酶表达在高度动脉粥样硬化的腹部中为 6 倍, 而在轻微动脉粥样硬化的胸主动脉中为 1.6 倍。

在注射 Ad5PPE-1Luc 的小鼠的两个主动脉区之间没有观察到显著性差异, 而在注射 Ad5CMVLuc 的小鼠胸主动脉中与含有病变的腹主动脉中的低表达相比, 观察到荧光素酶表达。

这些结果表明, 组成型启动子(CMV)在动脉粥样硬化最严重的部位往往不起作用, 而 PPE-1 启动子相对而言不受疾病进程的影响。

实施例 21

伤口愈合模型中 PPE-1 启动子的测定

为了测试 Ad5PPE-1 构建体在将荧光素酶表达靶向愈合伤口血管方面的效率和特异性活性, 使用如上文在材料和方法中描述的伤口愈合鼠。

如同在其它实验中一样, 用 Ad5CMVLuc 作为非组织特异性对照。处于 PPE-1 启动子(图 34; 空心条带)控制之下的荧光素酶活性在正常区域(6.8 ± 3.2)和愈合伤口区域(5 ± 1.6)中与处于 CMV 控制(图 34; 实心条带)之下所观察到的活性相比都较高。

因为 CMV 启动子和 PPE-1 启动子在愈合伤口中均表现出降低的表达水平, 所以这些结果难以解释。尽管这是意想不到的观察结果, 但显然 PPE-1 启动子在正常和愈合组织中都比 CMV 启动子驱动表达的水平高。坏死性瘢痕组织的存在可能引起在愈合伤口中用两种启动子所观察的降低的表达水平。

虽然结合本发明的具体实施方案描述了本发明, 但是显然许多替

代方案、修改和变化对于本领域技术人员是显而易见的。因此，本发明计划包括属于所附权利要求书的精神和广范围内所有这样的改变、修改和变化。本说明书中提及的所有出版物、专利、专利申请和由其登记号标识的序列通过引用全部结合到本说明书中，其程度如同每个单独的出版物、专利、专利申请和由其登记号标识的序列具体而单独地通过引用结合到本文中。另外，本申请中的任何参考文献的引用或标识不应解释为承认这样的参考文献对于本发明而言是现有技术。

CPCH0361255P

序 列 表

<110> Harats, Dror

<120> 表现出内皮细胞特异性的启动子及其使用方法

<130> 01/22752

<150> US 60/248, 582

<151> 2000-11-17

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1334

<212> DNA

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 1

```

gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtagtgtta cttctgatcg      60
gogatactag ggagataagg atgtacctga caaaaccaca ttgttgttgt tatcattatt      120
atttagtttt ccttccttgc taactcotga cggaatcttt ctcacctcaa atgcgaagta      180
ctttagttta gaaaagactt ggtggaaggg gtggtggtgg aaaagtaggg tgatcttcca      240
aactaatctg gttccccgcc cgccccagta gctgggattc aagagcgaag agtggggatc      300
gtcccccttg ttgatcagaa agacataaaa ggaaaatcaa gtgaacaatg atcagoccca      360
cctcaccccc acccccctgc ggcgcacaaa tacaatctat ttaattgtac ttcatacttt      420
tcattccaat ggggtgactt tgcttctgga gaaactcttg attcttgaac tctggggctg      480
gcagctagca aaagggaag cgggctgctg ctctctgcag gttctgcagc ggtctctgtc      540
tagtgggtgt tttctttttc ttagccctgc ccctggattg tcagacggcg ggcgtctgcc      600
tctgaagtta gcctgattt cctctagagc cgggtcttat ctctgctgc acgttgctg      660
tgggtgacta atcacacaat aacattgttt agggctggaa taaagtcaga gctgtttacc      720
cccactctat aggggttcaa tataaaaagg cggcggagaa ctgtccgagt cagacgcgtt      780
cctgcaccgg cgtgagagc ctgaccgggt ctgctccgct gtcttgcgc gctgcctccc      840
ggctgcccgc gacgctttcg cccagtgga agggccactt gctgaggacc gcgtgagat      900
ctaaaaaaaa aacaaaaaac aaaaaacaaa aaaaccaga ggogatcaga gcgaccagac      960
acogtctctt togtttttgca ttgagttcca tttgcaaccg agttttcttt ttttctttt      1020
tccccactct tctgacctt ttgcagaatg gattattttc ccgtgatctt ctctctgtg      1080
ttcgtgactt tccaaggagc tccagaaaca ggtagcgcc acttgcaaat cttctactt      1140
cagcgcagca gttatcgctt ctgtttttca cttttcttct tttcttttct ttcattcttt      1200

```

```

cctttttatt tattttttta attactgaag ctocagcagc aagtgcotta caattaatta 1260
acttctgtgt gaagcgaaag aaataaaacc cctgtttgaa tacagctgac tacaaccgag 1320
tatcgcatag ctte 1334

```

<210> 2
 <211> 96
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

```

<400> 2
gctagcgtac ttcatacttt tcattccaat ggggtgactt tgcttctgga ggggtgacttt 60
gcttctggag ccaatgggta cttcatactt ttcatt 96

```

<210> 3
 <211> 96
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

```

<400> 3
gctagcctcc agaagcaaag tcacccatt ggaatgaaa gtatgaagta caatgaaaag 60
tatgaagtac ccattggctc cagaagcaaa gtcacc 96

```

<210> 4
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Nhe-1 限制位点

```

<400> 4
gctagc 6

```

<210> 5
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> 小家鼠(Mus musculus)

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 低氧效应元件 - E 框

<400> 5
 gcacgt

6

<210> 6
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 小家鼠(Mus musculus)

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 鼠内皮特异性增强子元件

<400> 6
 gtacttcata cttttcattc caatgggggtg actttgcttc tgga

44

<210> 7
 <211> 143
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 起源于 PPE-1 启动子的鼠增强子序列的三联拷贝

<400> 7
 gtacttcata cttttcattc caatgggggtg actttgcttc tggagggtga ctttgcttct 60
 ggagccagta cttcatactt ttcatgttac ttcatacttt tcattccaat ggggtgactt 120
 tgcttctgga ggctagctgc cag 143

<210> 8
 <211> 47

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EDC 片段

<400> 8
ctggaggggtg actttgcttc tggagccagt acttcatact tttcatt

47

图 1

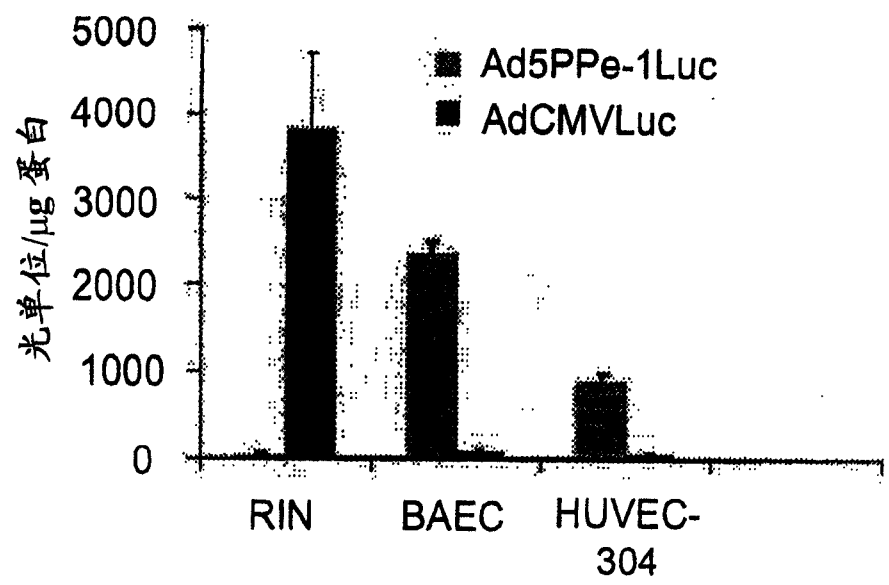
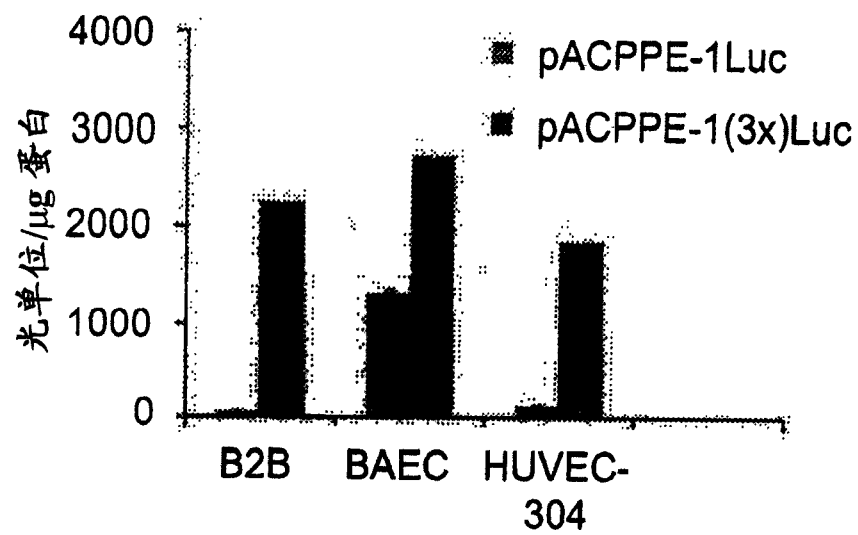


图 2

图 3a

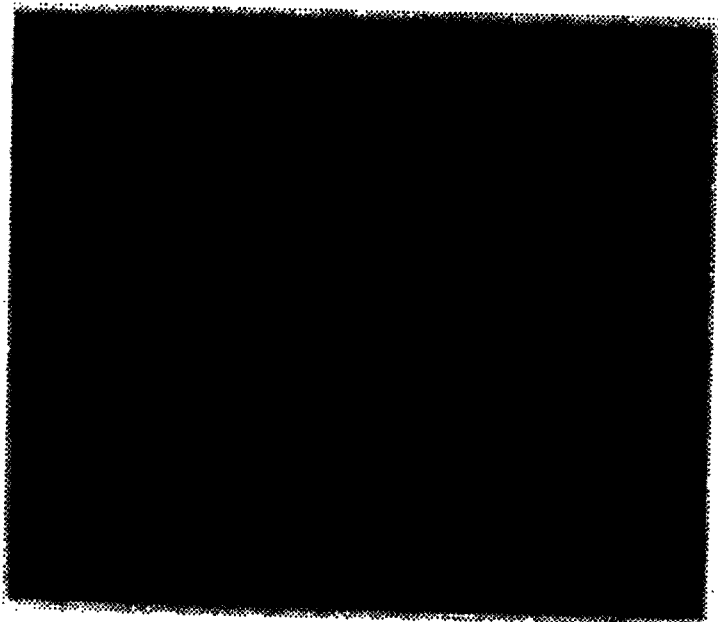
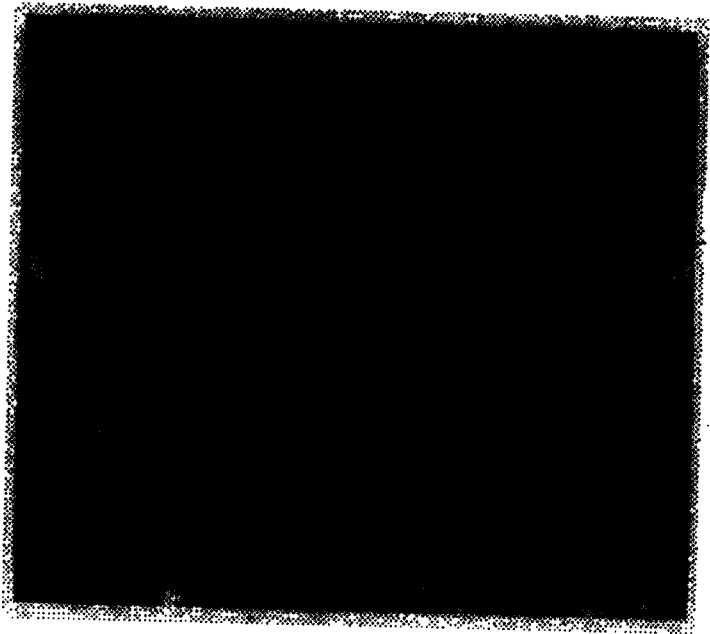


图 3b

图 4

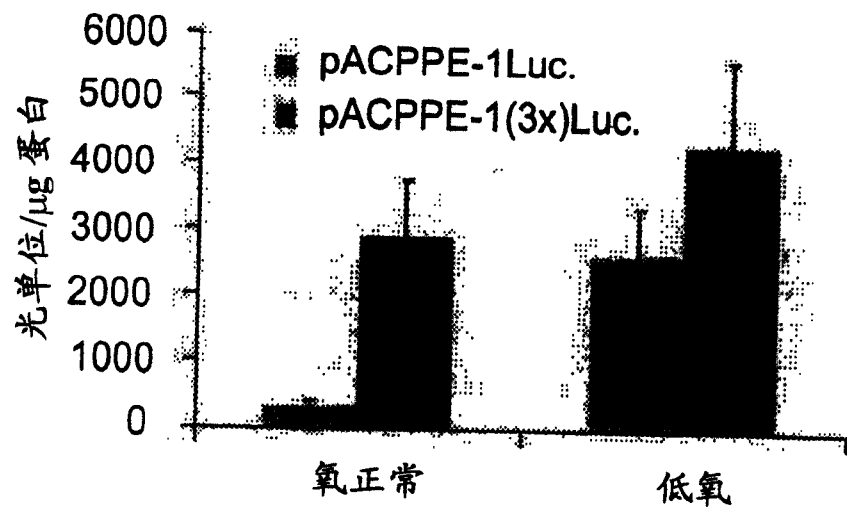
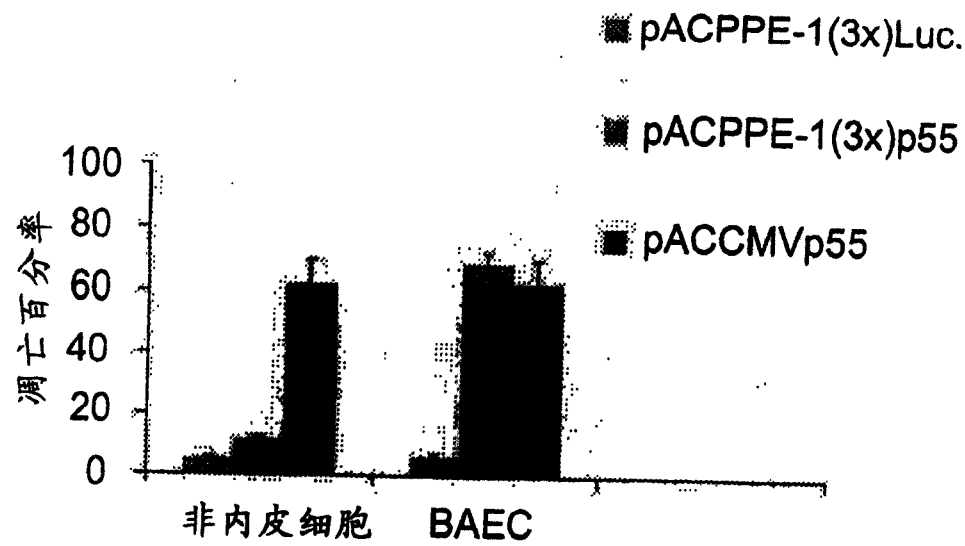


图 5

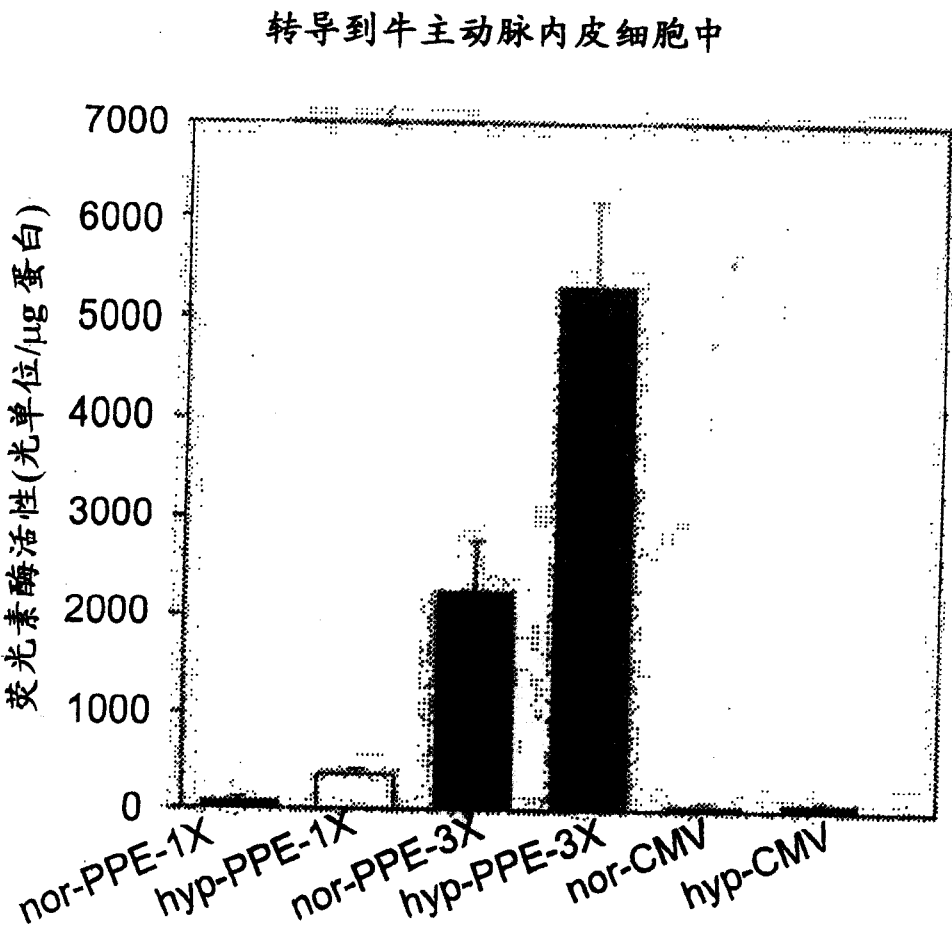


图 6

图 7

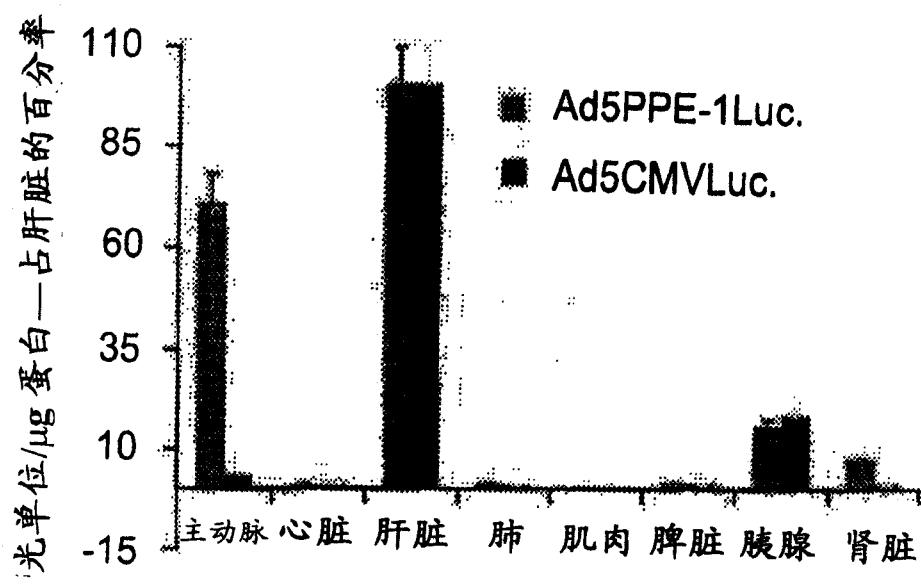
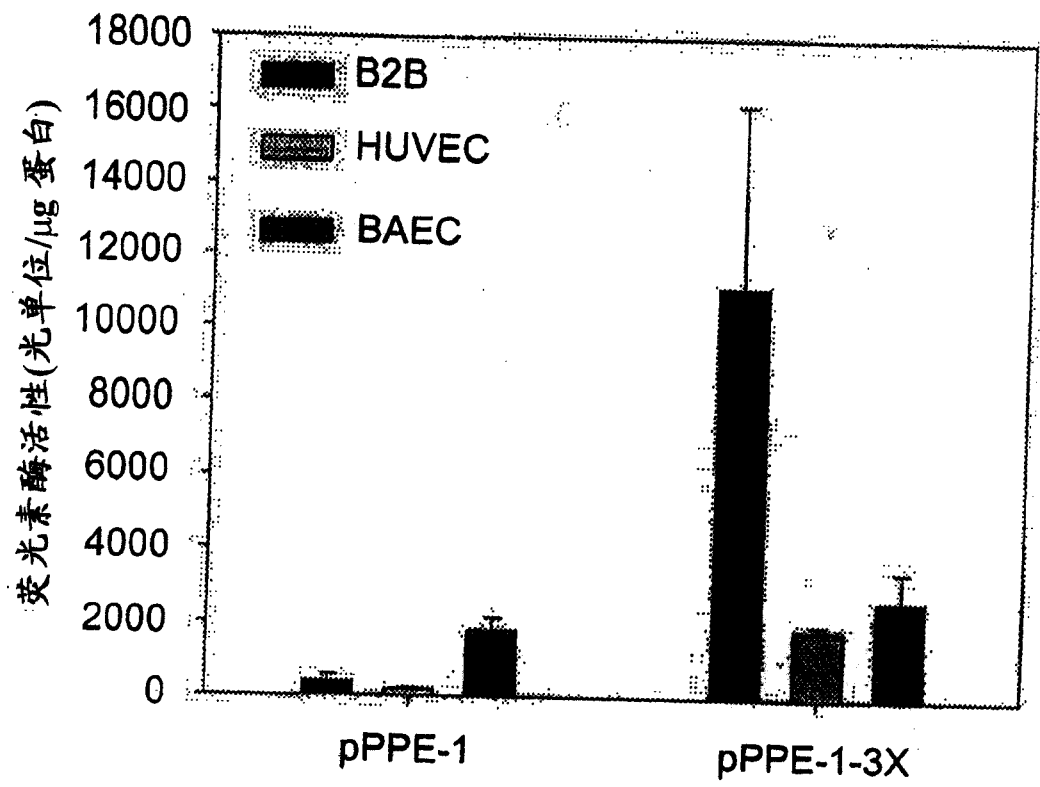


图 8

图 9a

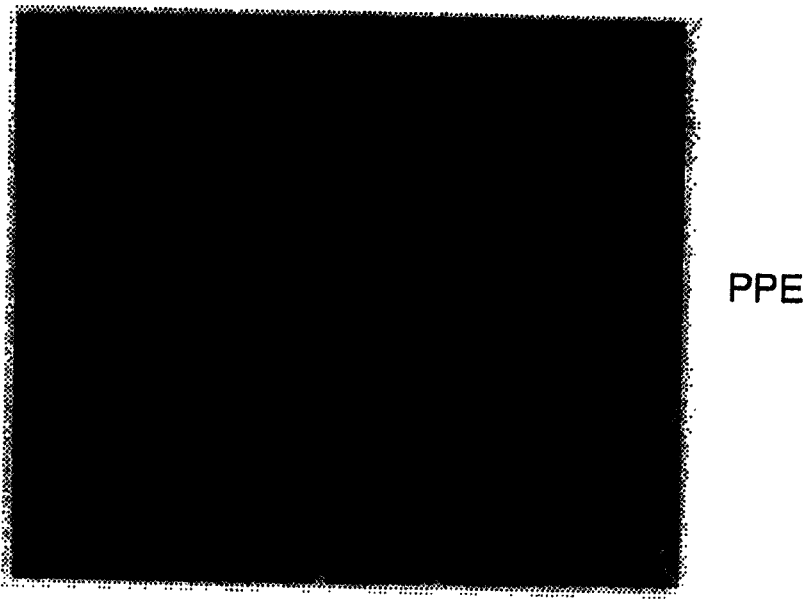
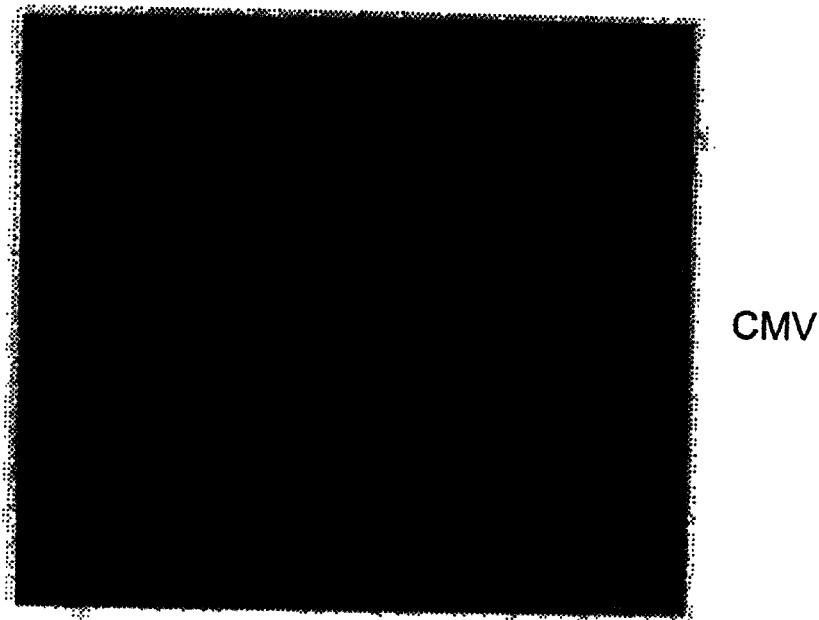


图 9b

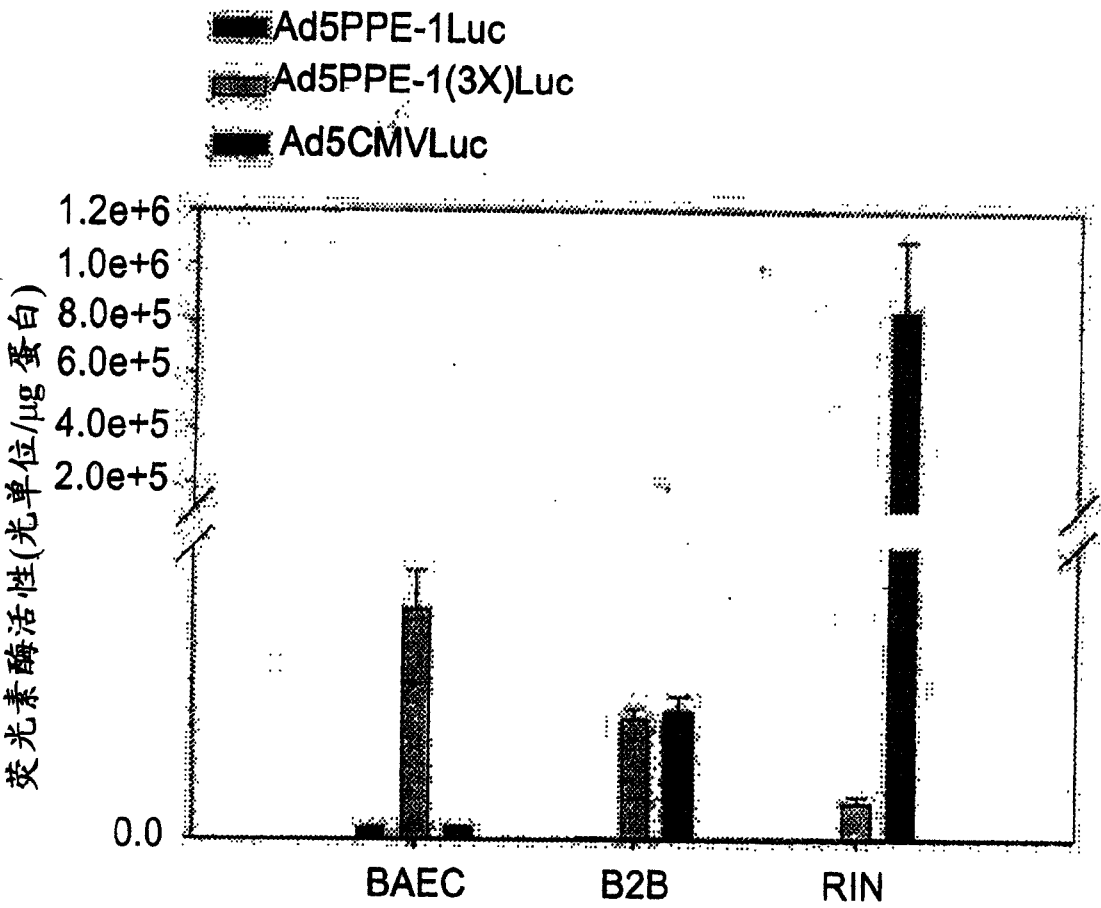


图 10

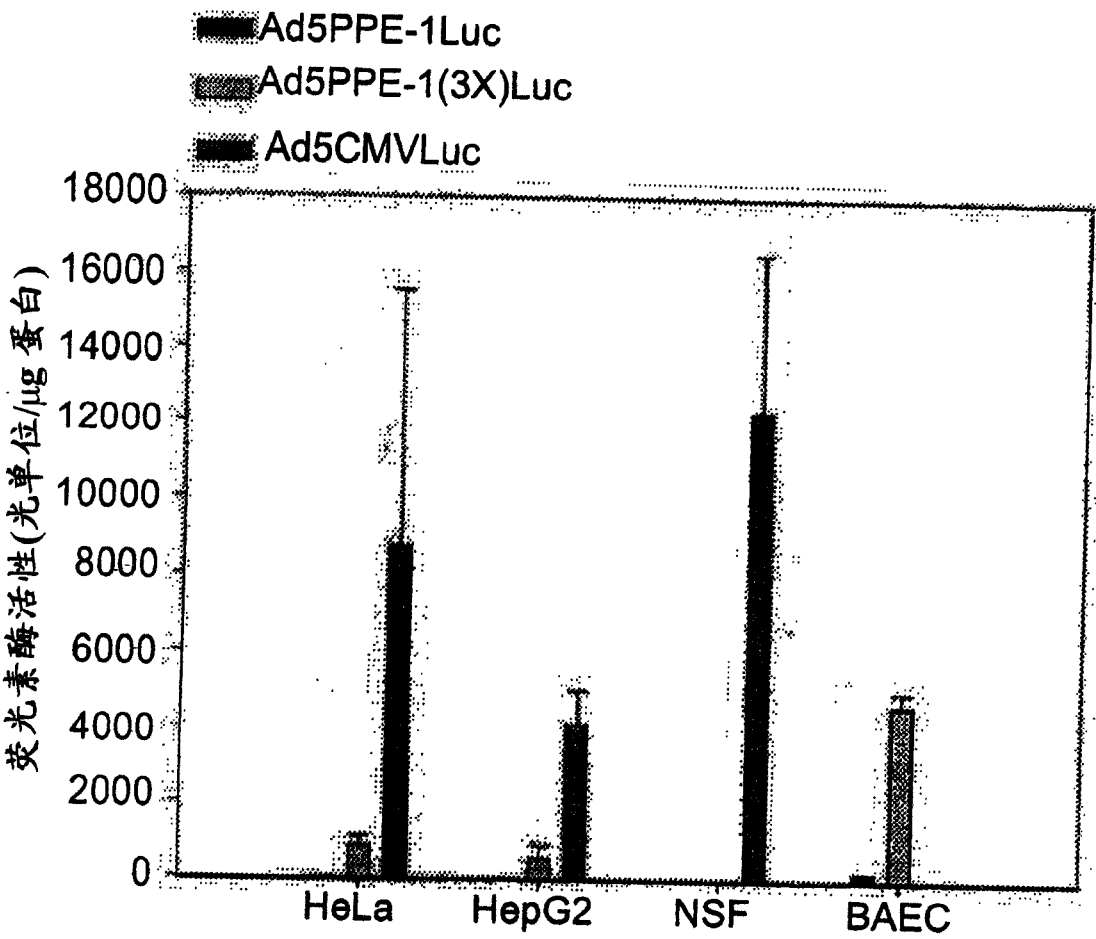


图 11

图 12a



图 12b

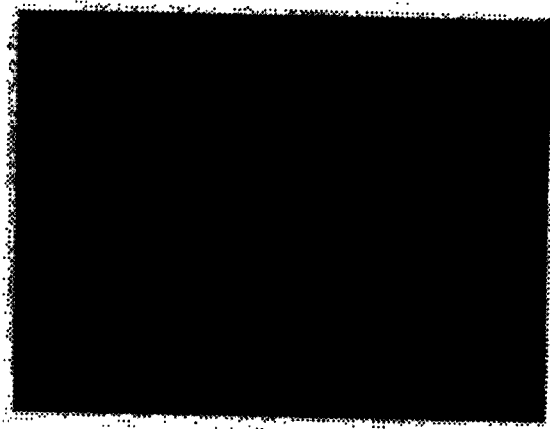


图 12c

图 13a



图 13b



图 14a

图 14b

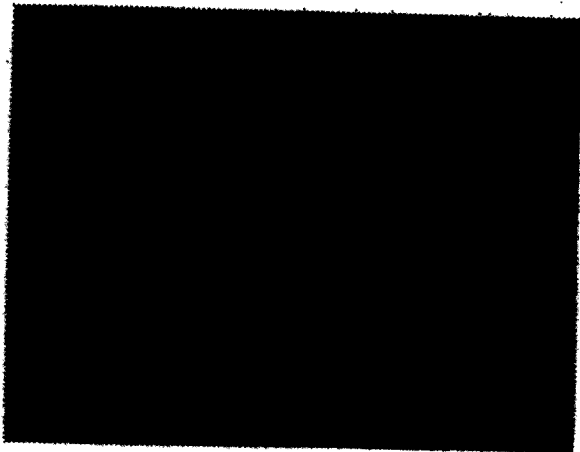
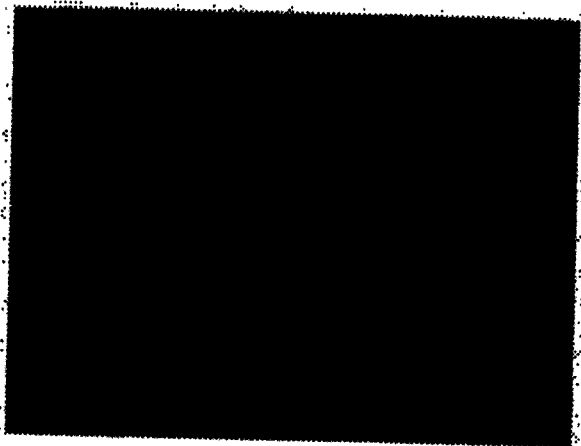


图 15a

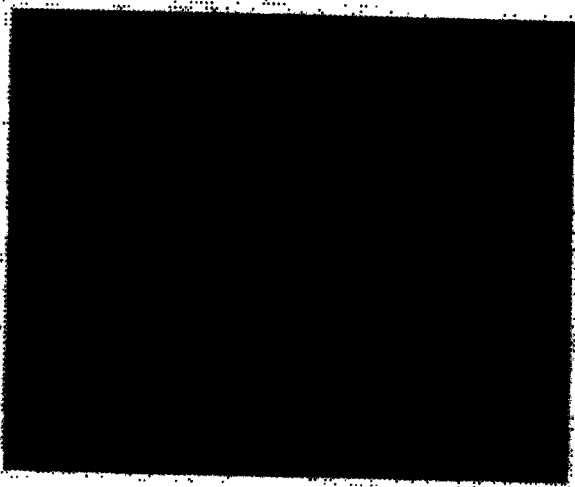


图 15b

图 16a

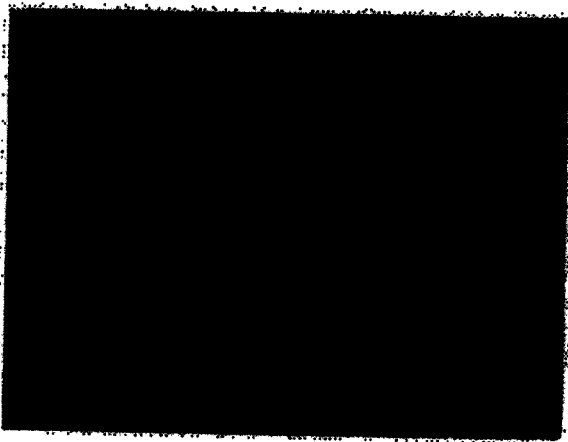


图 16b

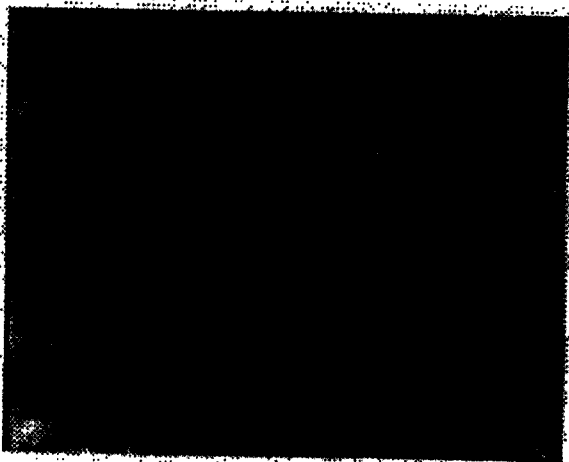


图 17a

图 17b

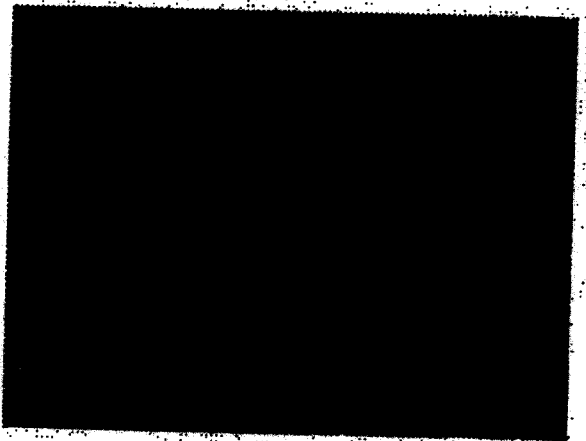
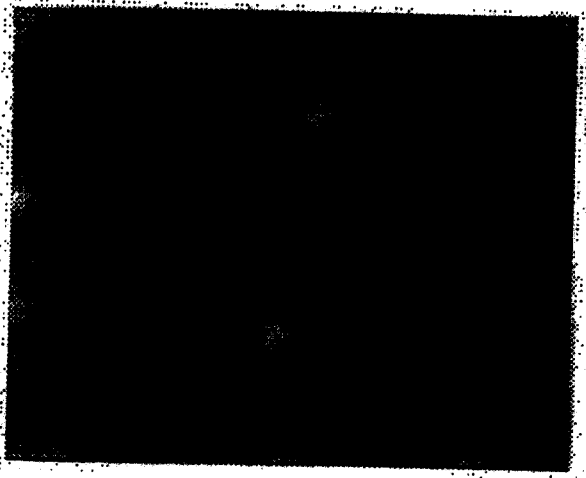


图 18a

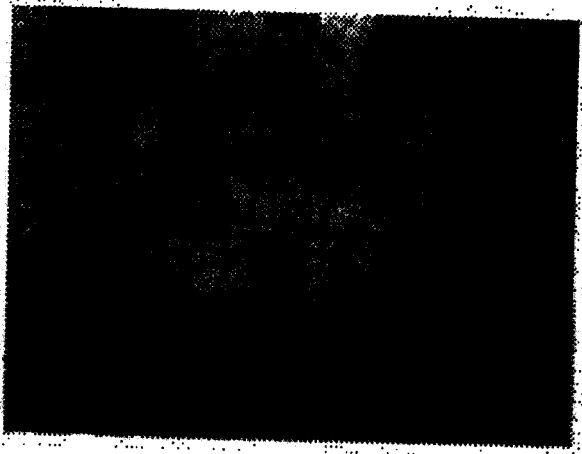


图 18b

图 18c



图 19a



图 19b

图 19c

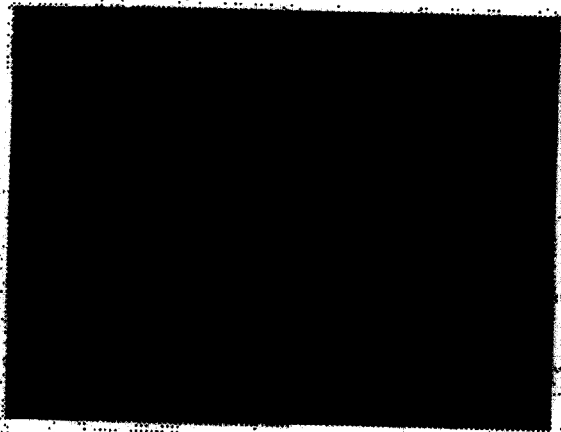
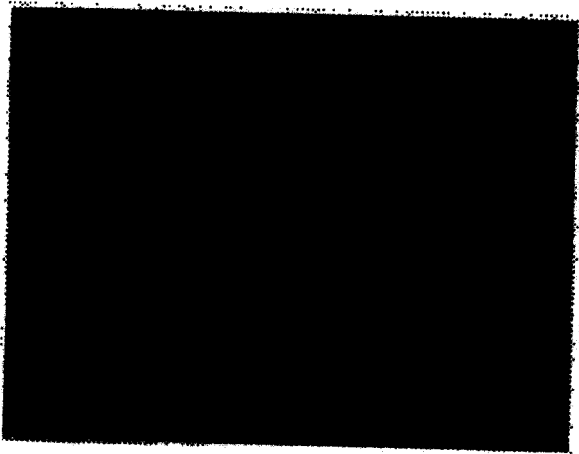


图 20a



图 20b

图 20c



图 20c'

图 20d

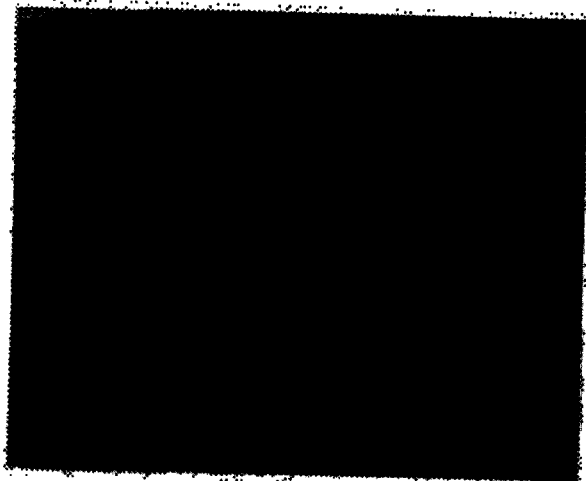


图 20d'

图 21

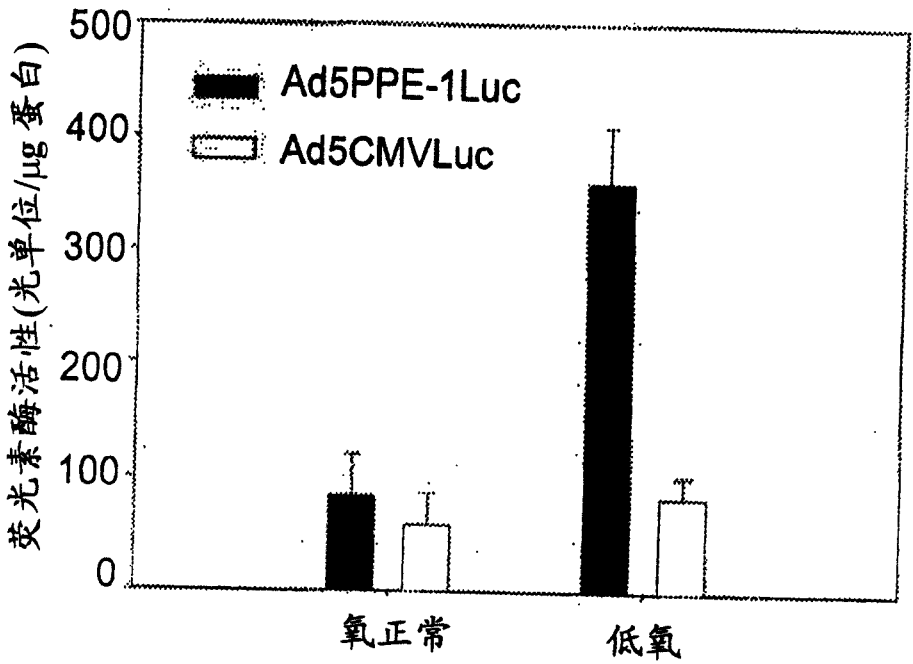
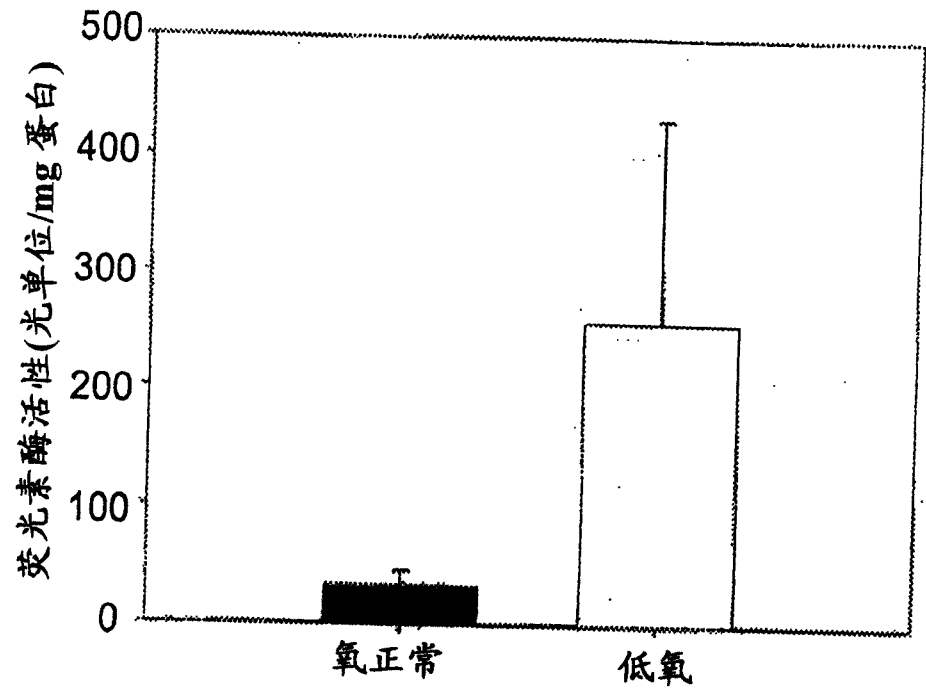


图 22

图 23

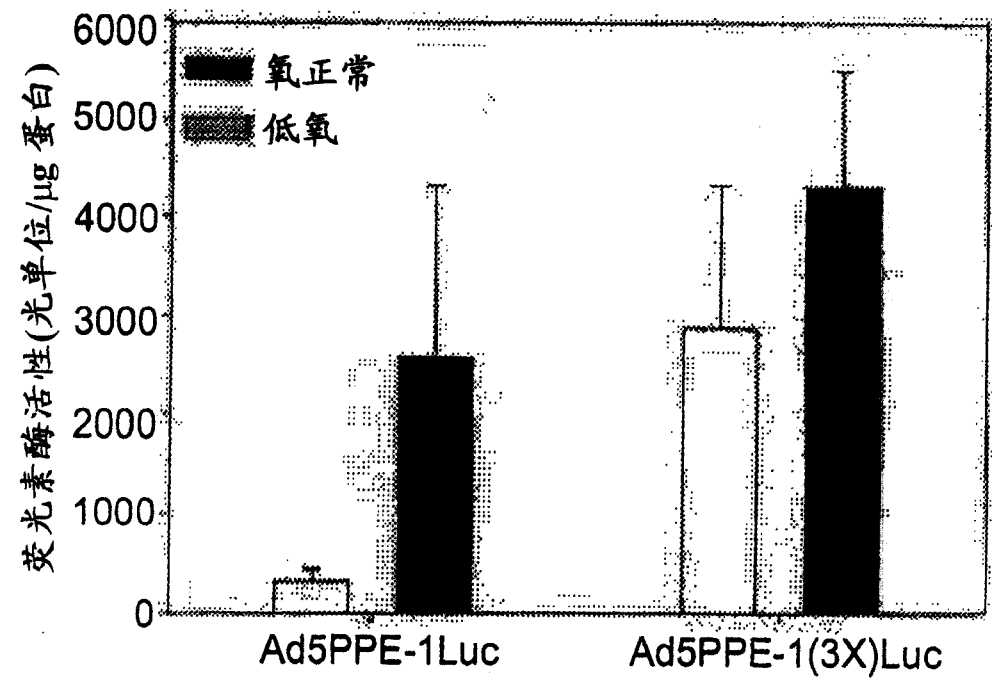
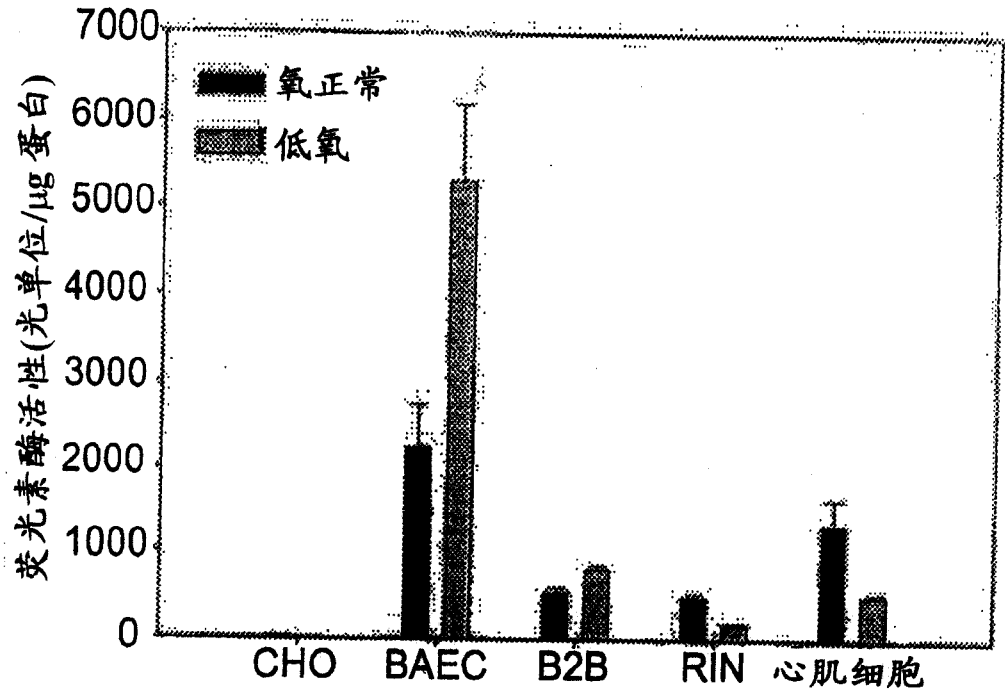


图 24

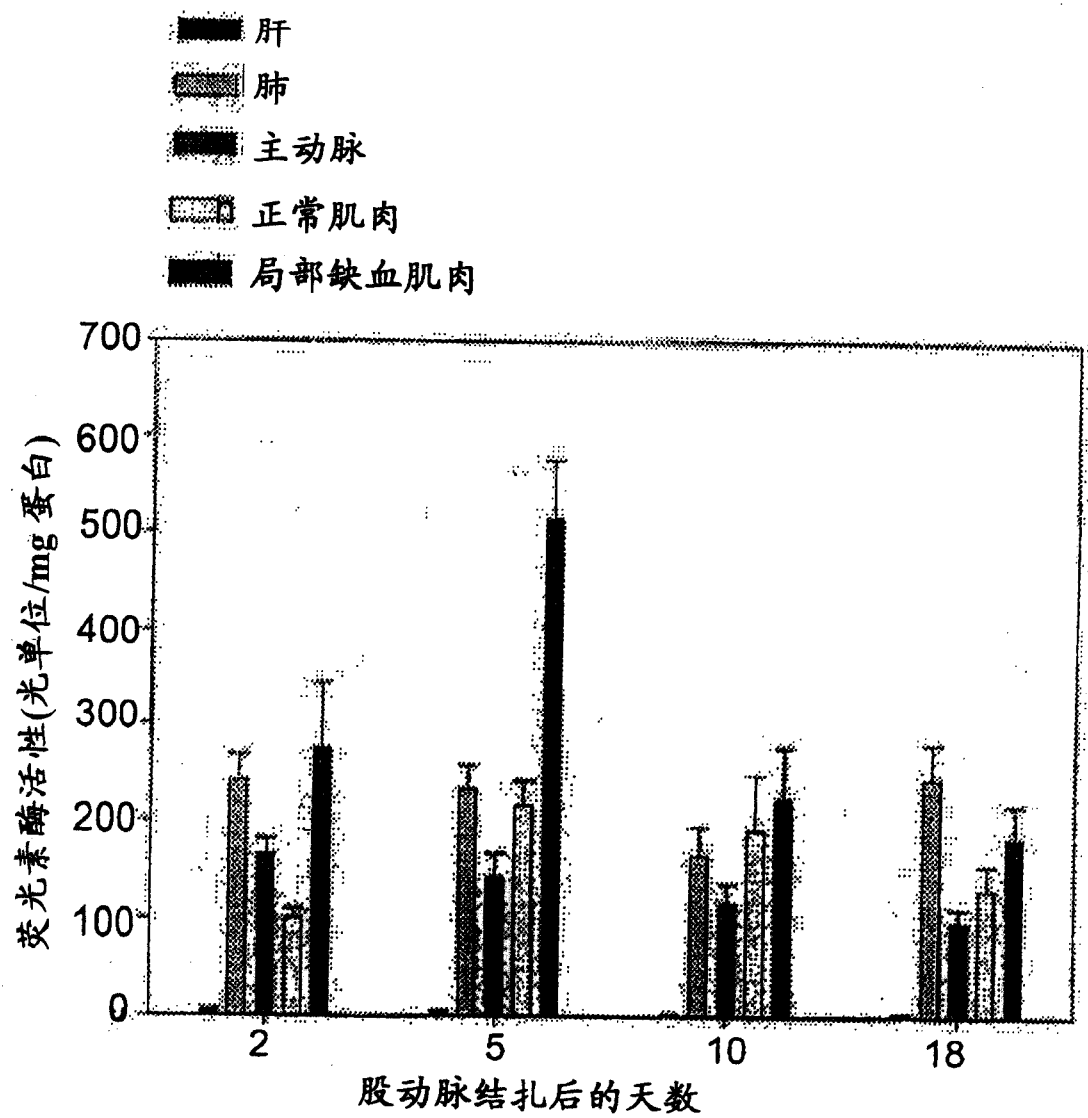


图 25

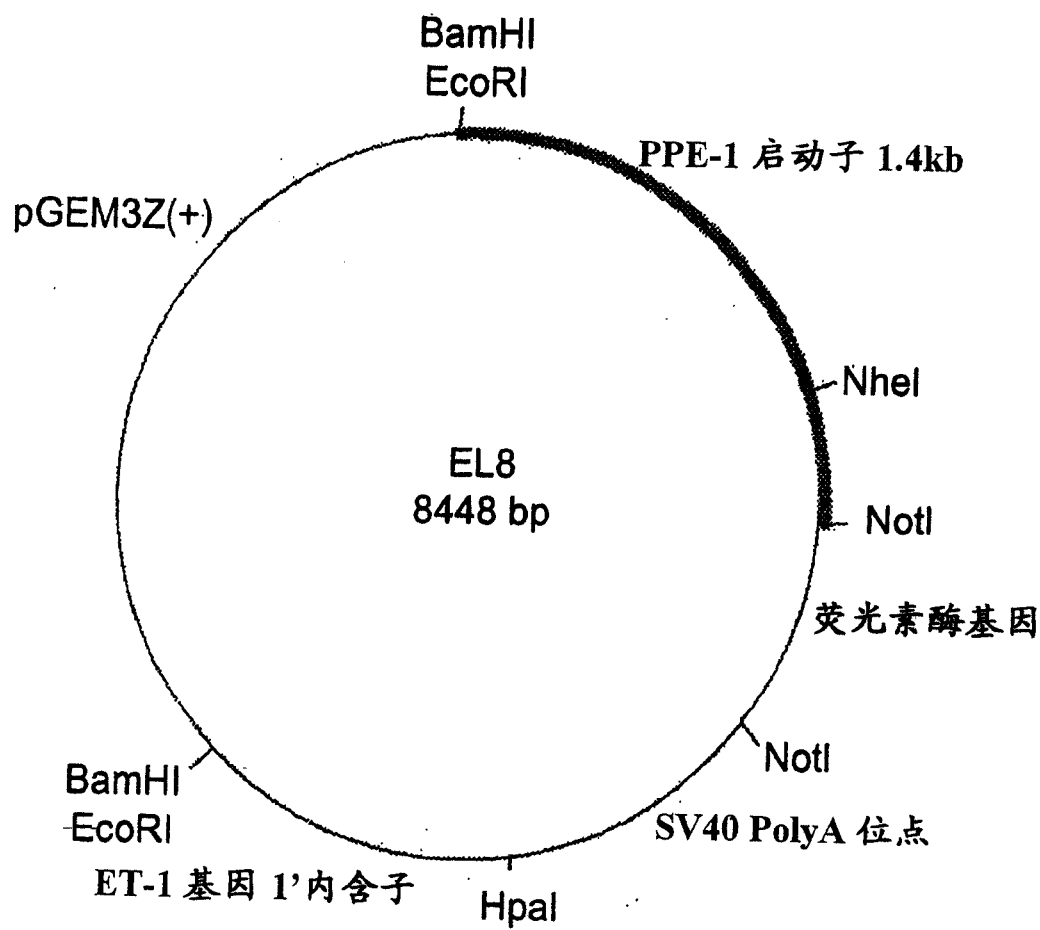


图 26a

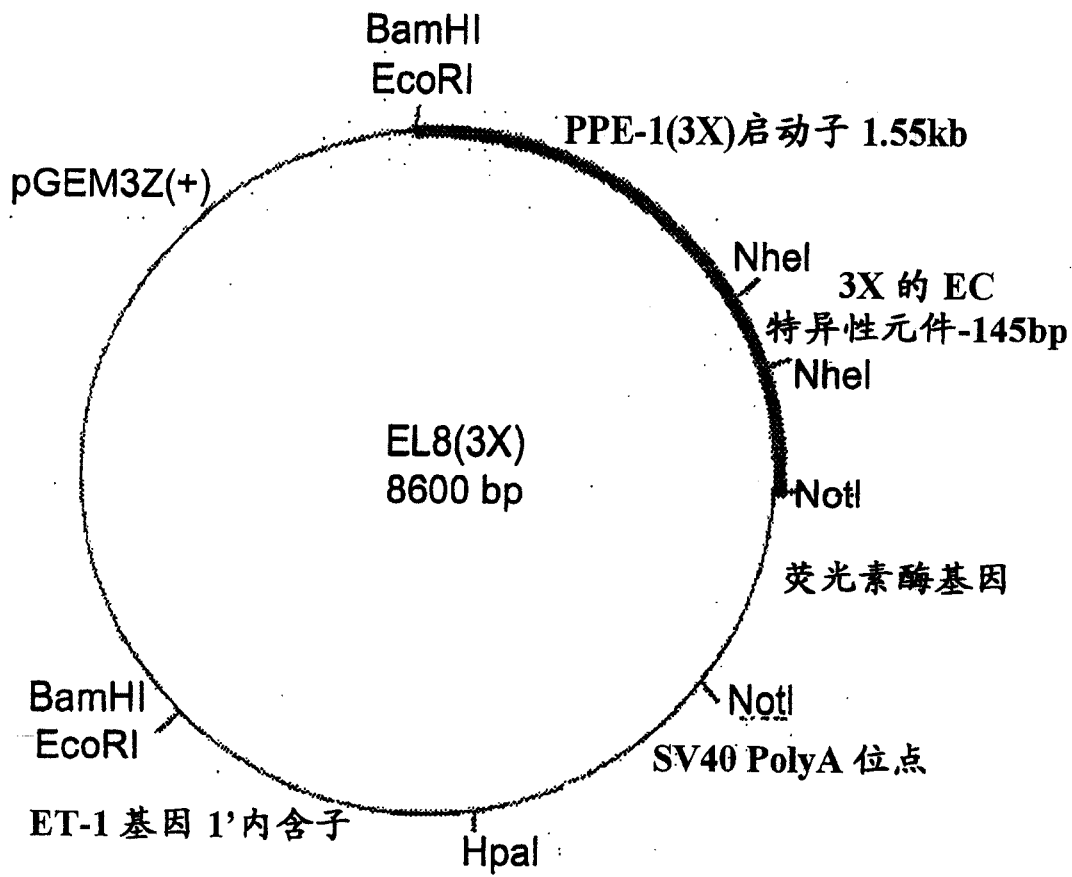


图 26b

图 27a

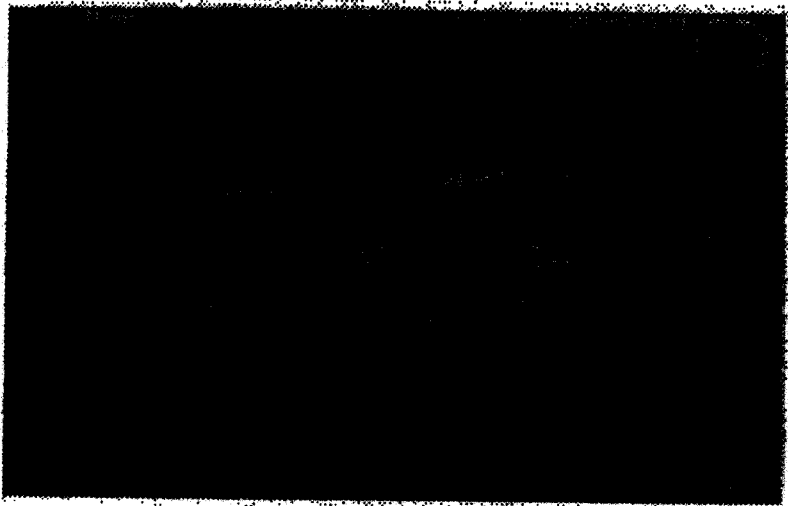


图 27b

图 27c

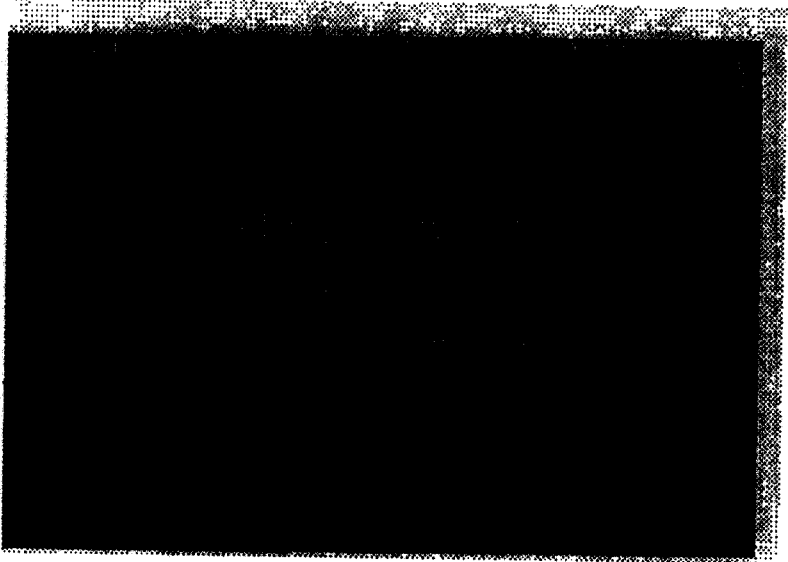


图 27d

图 28

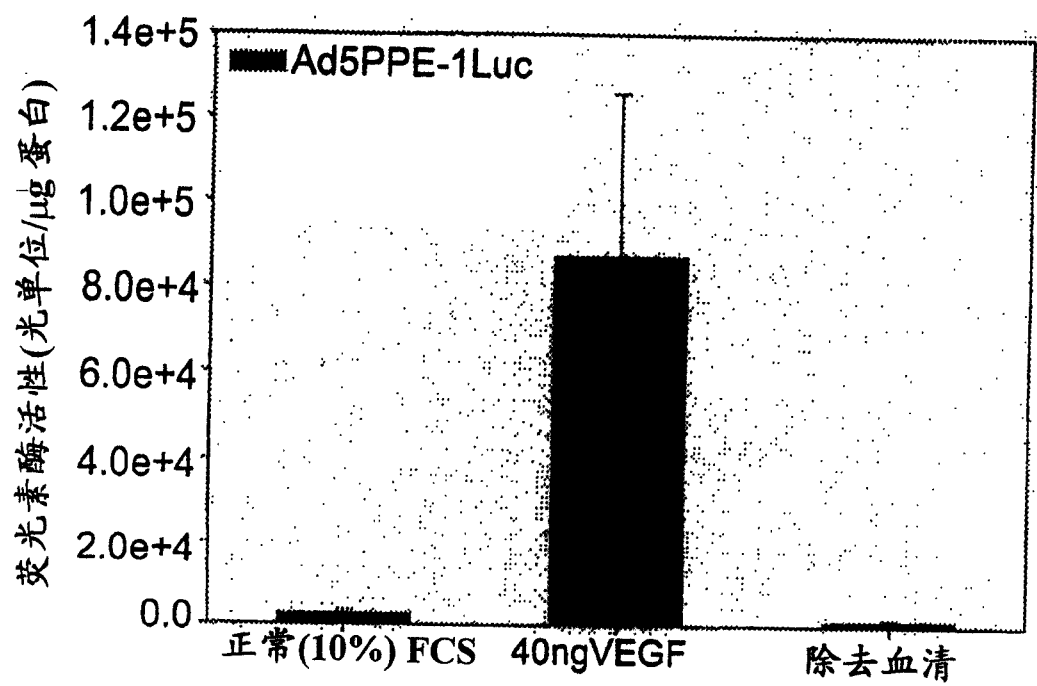
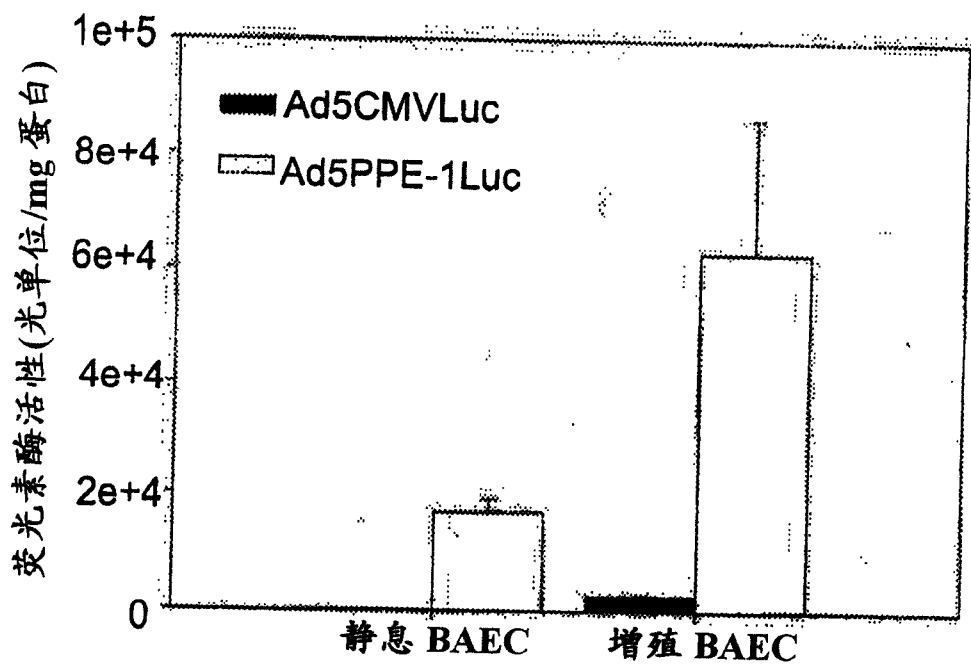


图 29

图 30a

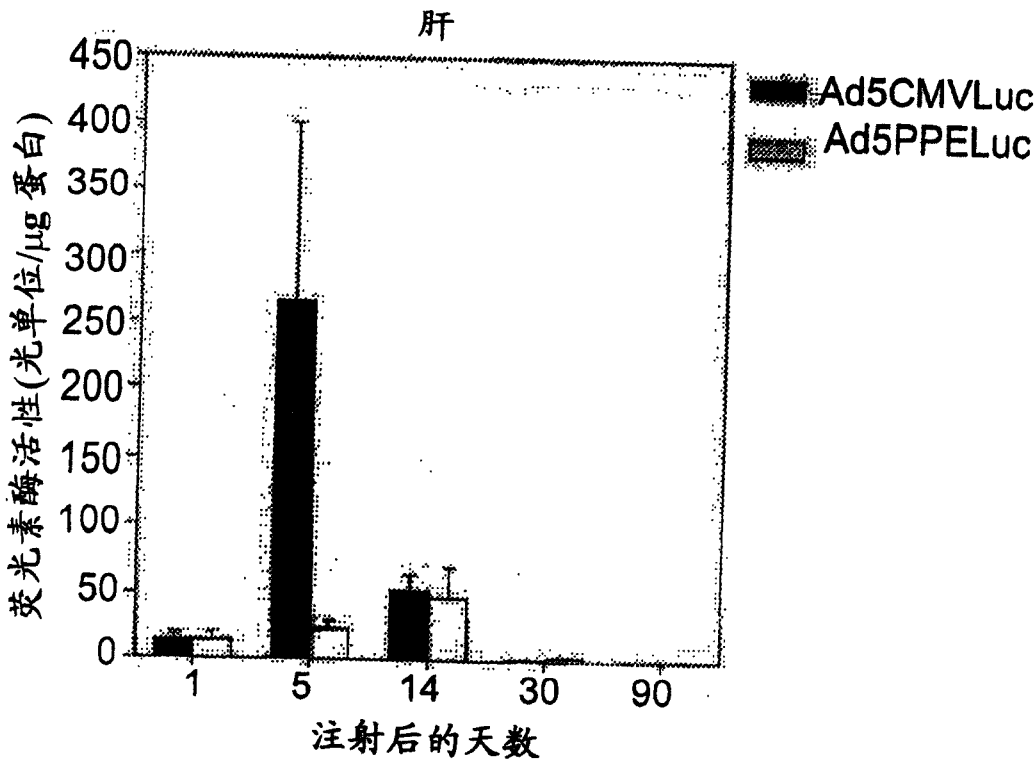
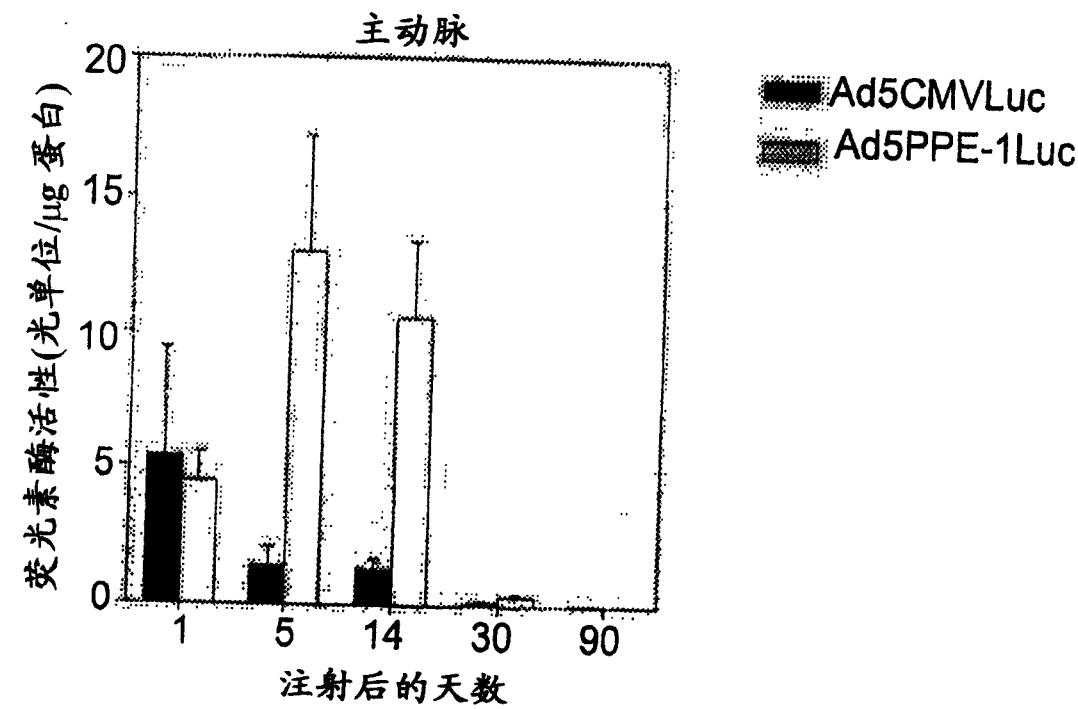


图 30b

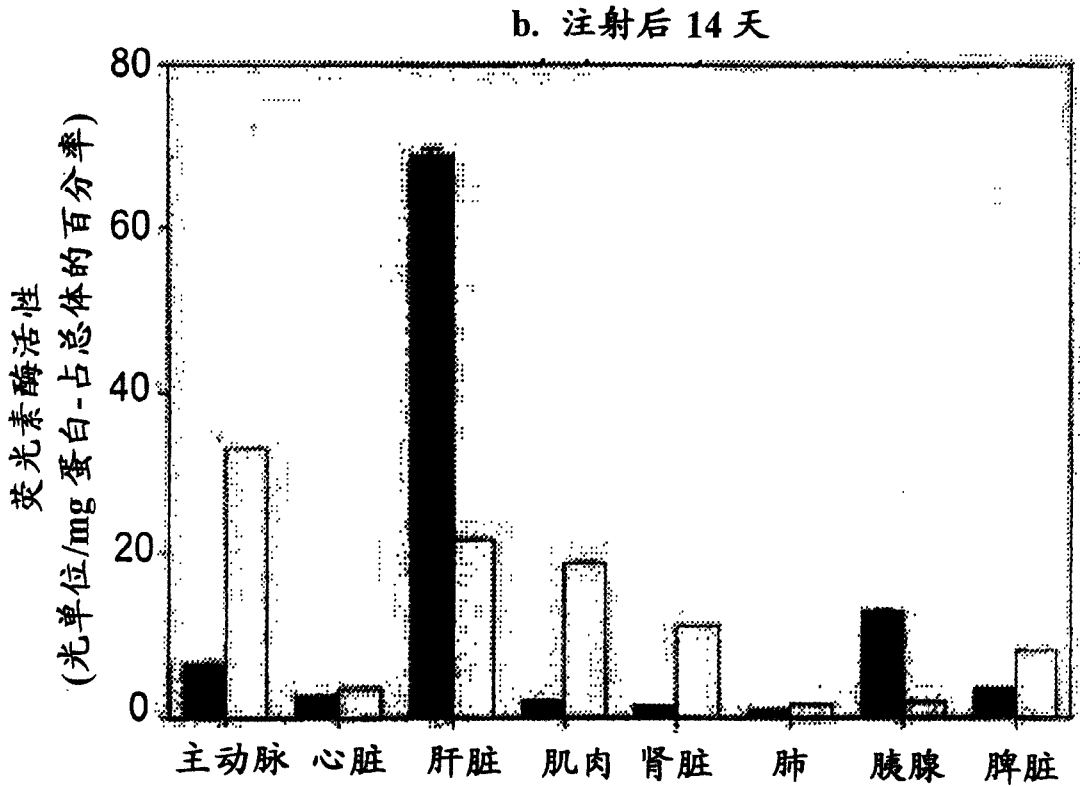
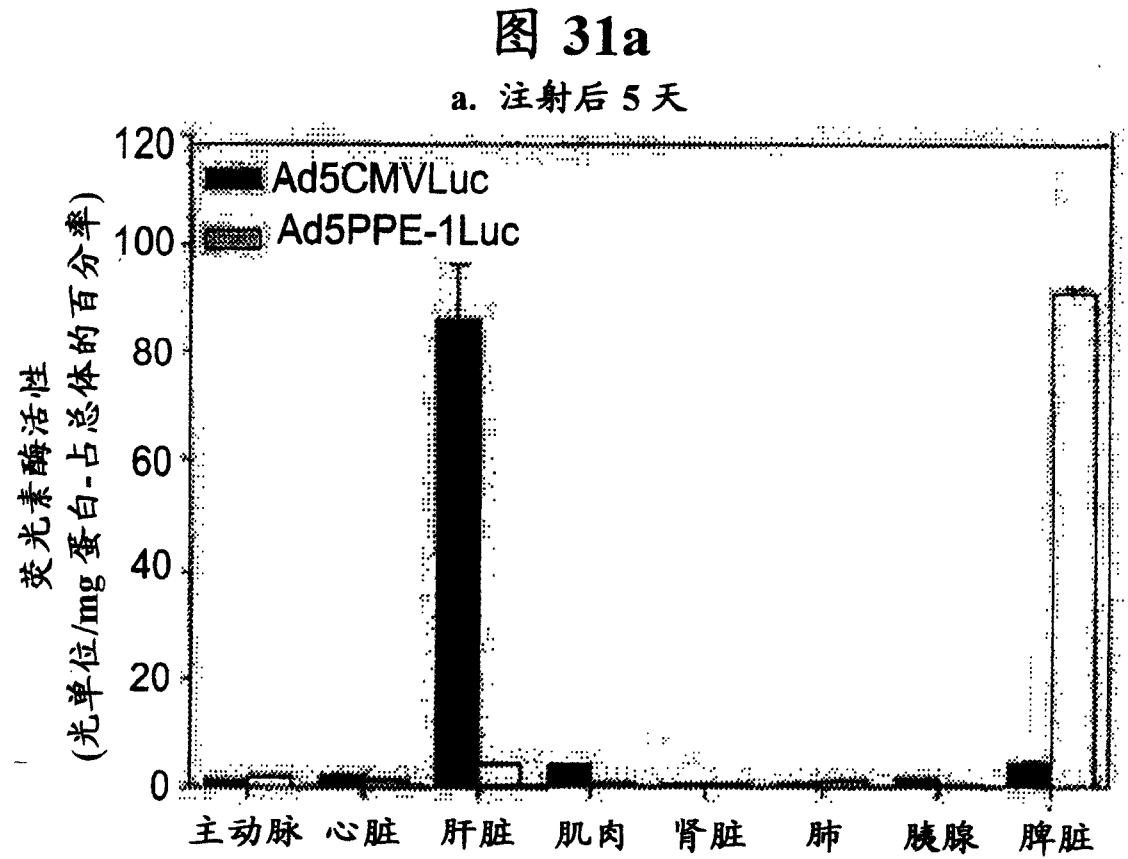


图 31b

图 32

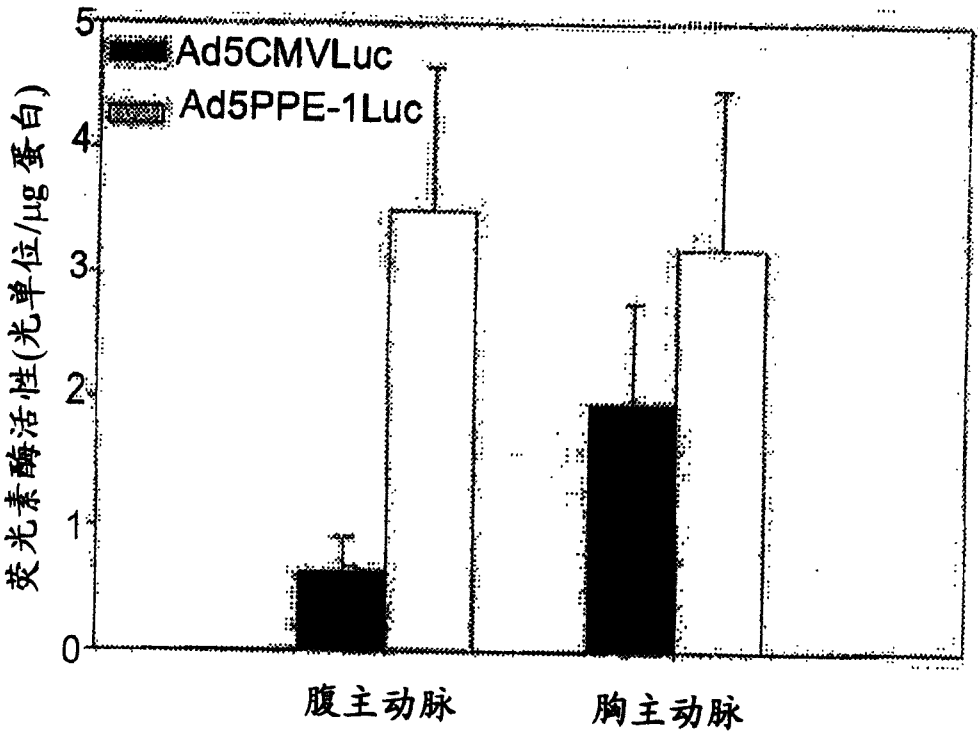


图 33

图 34

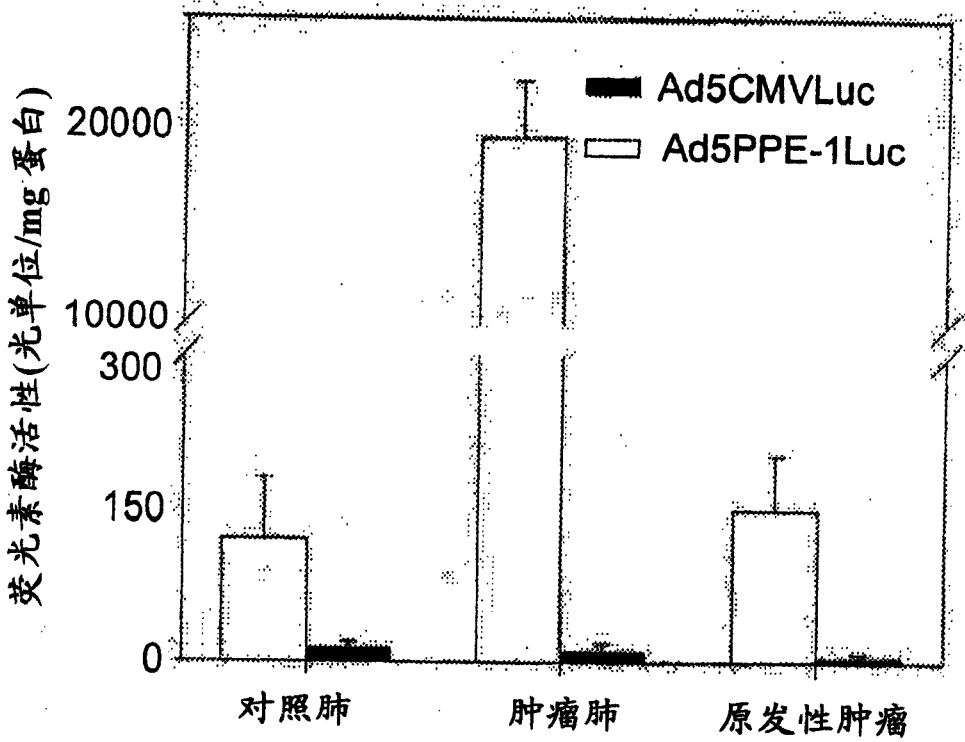
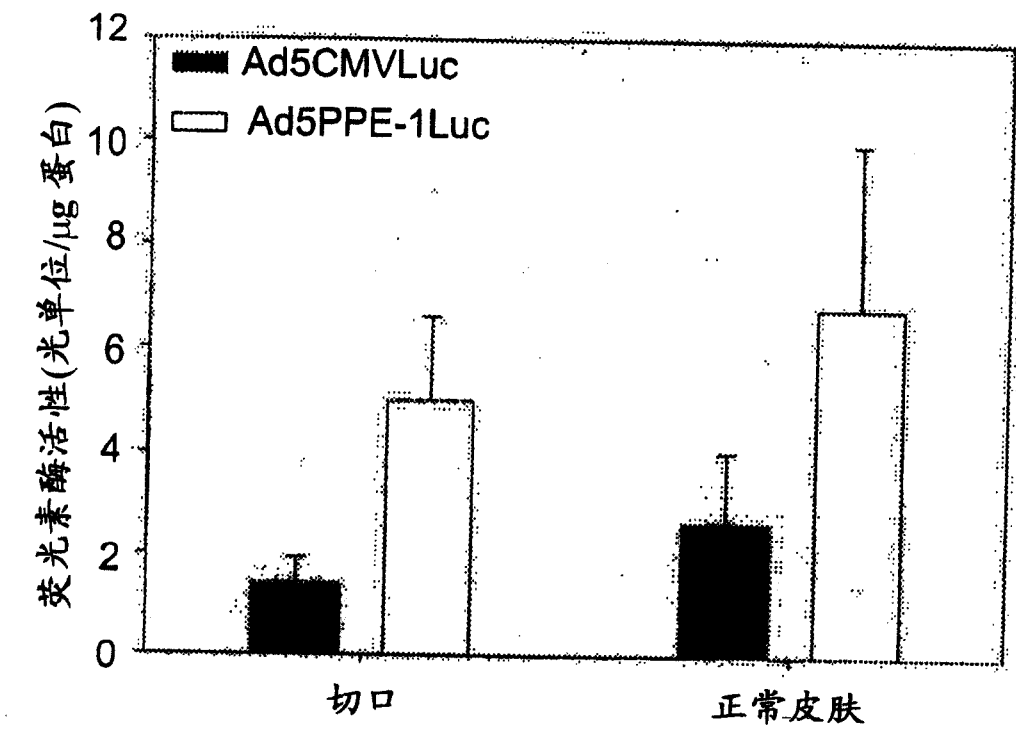


图 35

图 36a

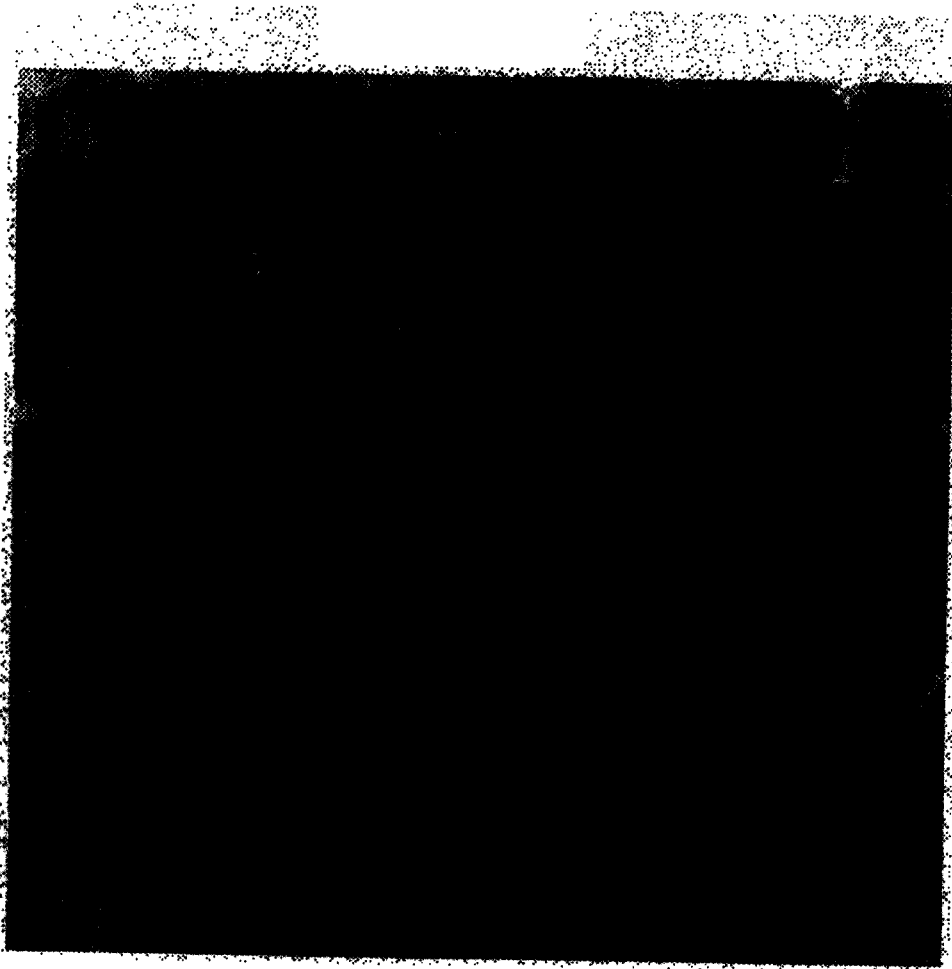
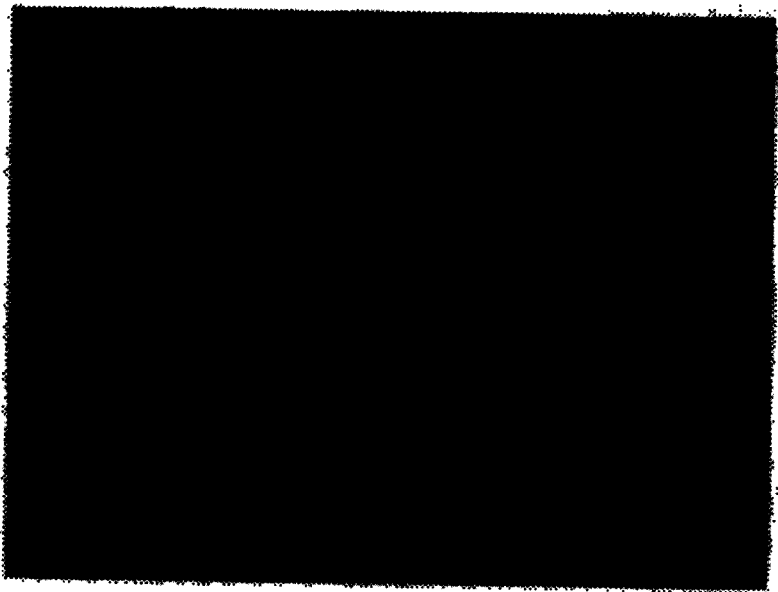


图 36b

图 36c

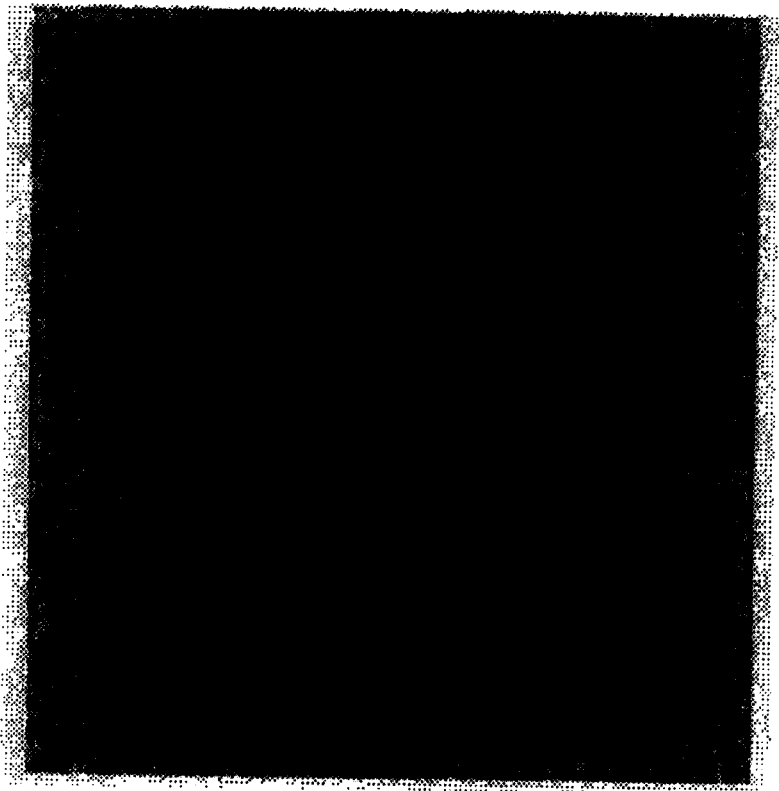
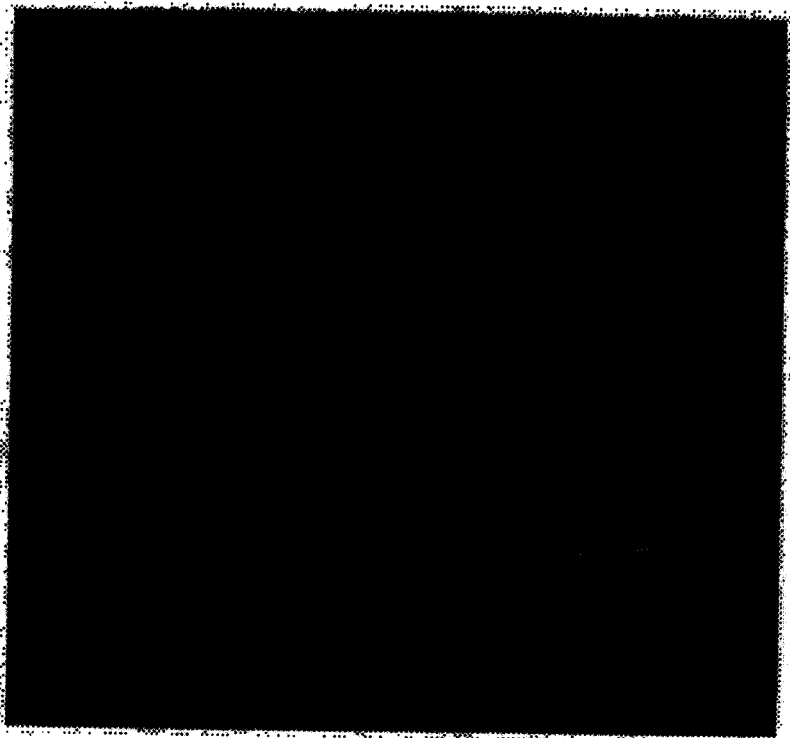


图 36d

图 37

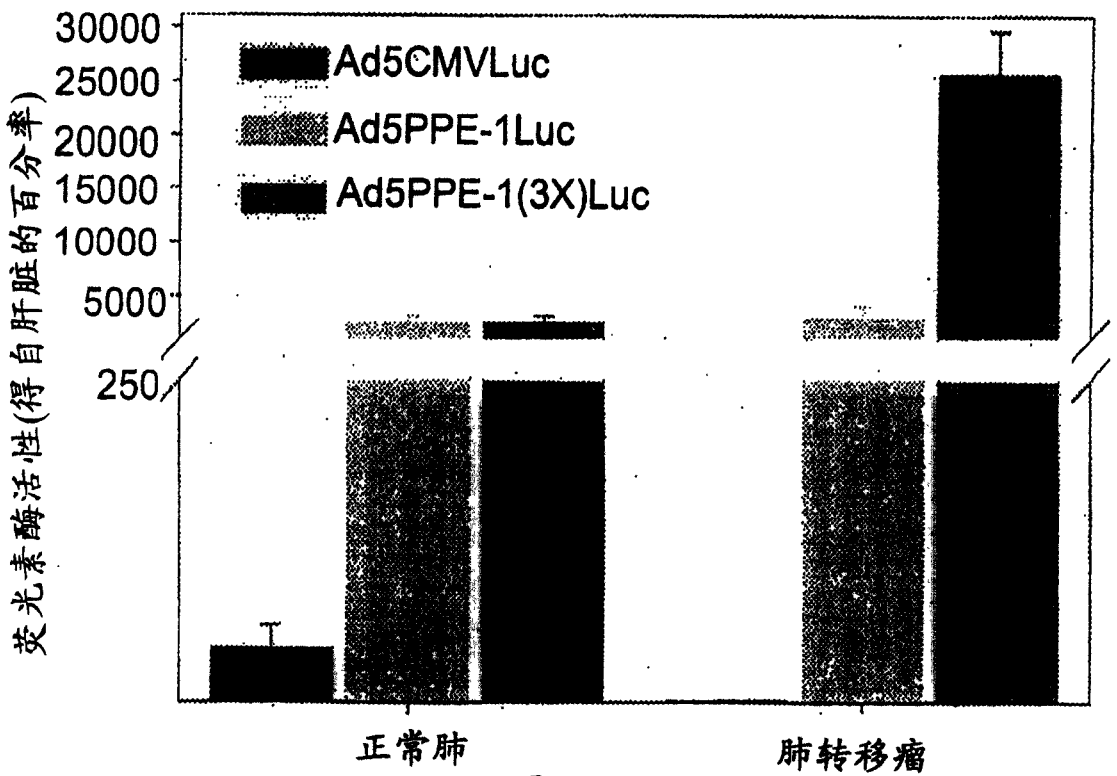
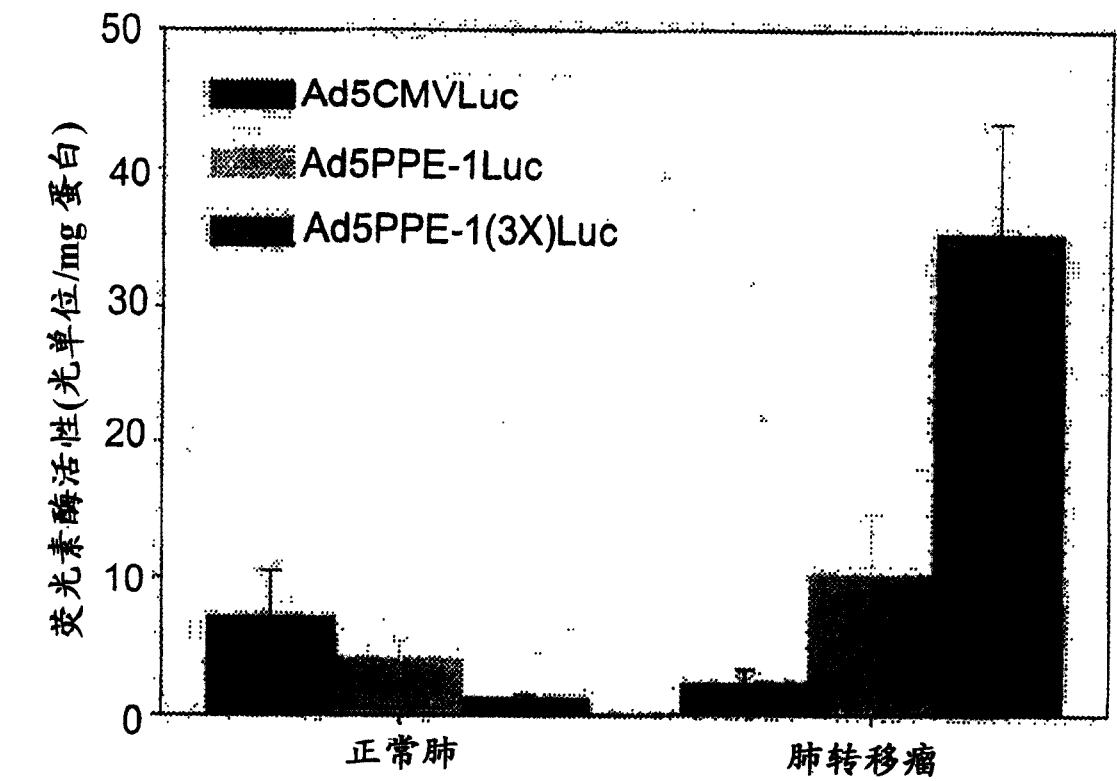


图 38

图 39a

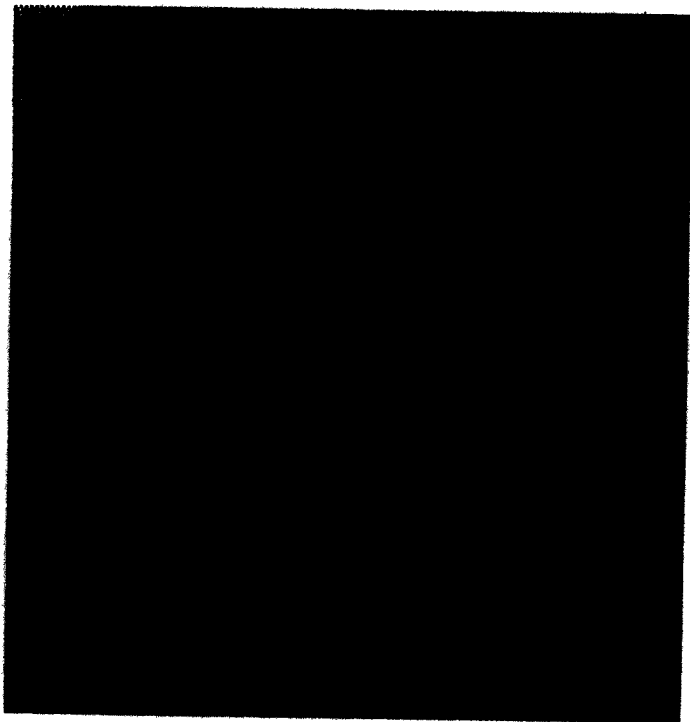


图 39b

图 40

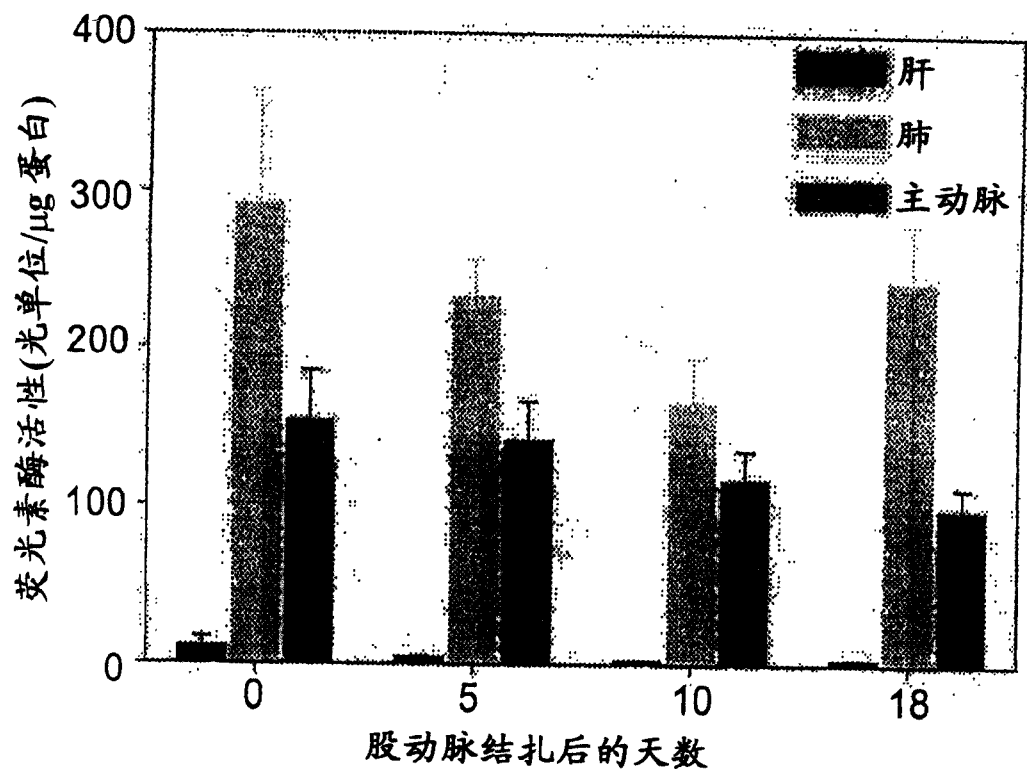
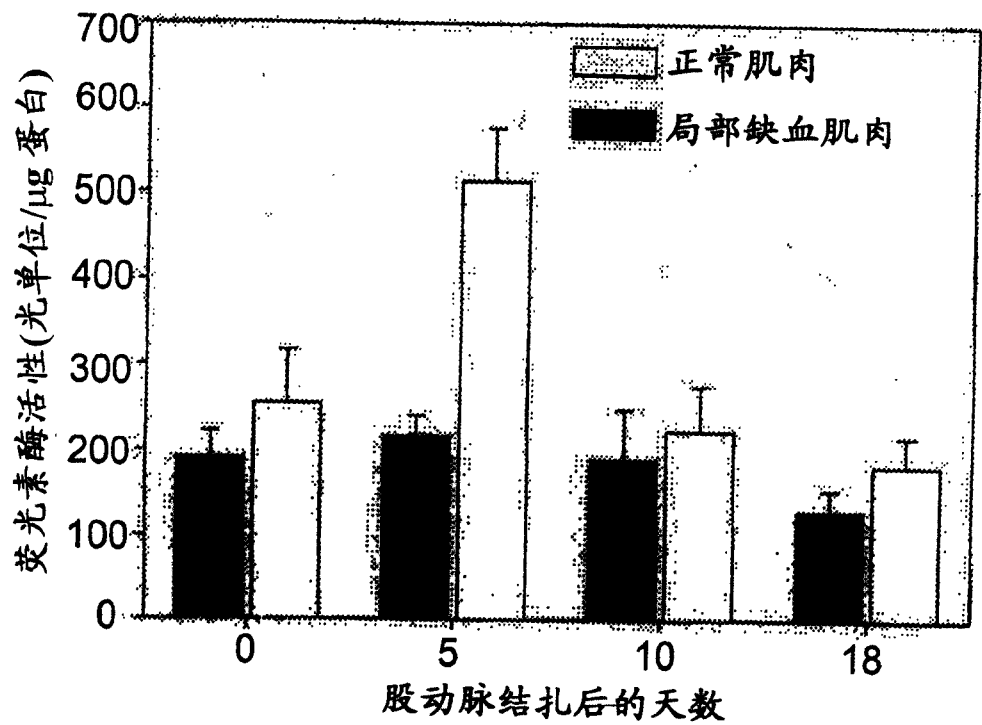


图 41

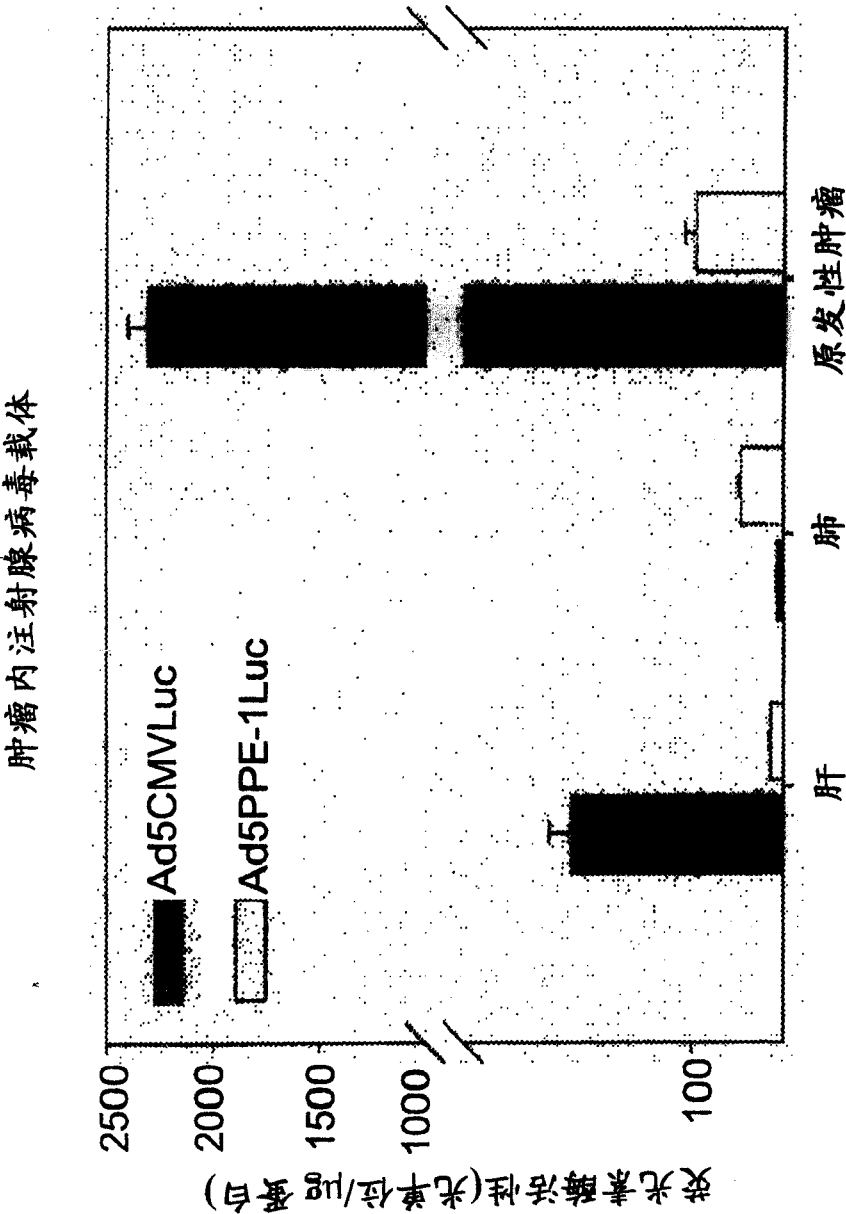


图 42