



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101808669 A

(43) 申请公布日 2010. 08. 18

(21) 申请号 200880022935. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 04. 27

A61K 48/00 (2006. 01)

C12N 15/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

11/790, 992 2007. 04. 30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 12. 30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IL2008/000543 2008. 04. 27

(87) PCT申请的公布数据

W02008/132729 EN 2008. 11. 06

(71) 申请人 脉管生物生长有限公司

地址 以色列耶胡达

(72) 发明人 E · 布雷特巴特 L · 班吉奥

D · 哈拉茨 M · 佩莱德

S · 格伦伯格

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 权陆军 付磊

权利要求书 3 页 说明书 84 页 附图 86 页

(54) 发明名称

表现出内皮细胞特异性的启动子和使用其调节血管生成的方法

(57) 摘要

公开了表现出内皮细胞特异性启动子活性的分离多核苷酸序列、新顺式调节元件及其使用方法,所述方法使得能够治疗特征为异常新血管形成或细胞生长的疾病。

1. 分离的多核苷酸,其含有与顺式调节元件在转录上连接的条件复制型腺病毒,所述顺式调节元件能够指导所述腺病毒在血管生成内皮细胞中的转录。

2. 权利要求 1 的分离的多核苷酸,其中所述顺式调节元件是内皮细胞特异性或内皮周细胞特异性启动子,其选自 PPE-1 启动子、PPE-1-3x 启动子、TIE-1 启动子、TIE-2 启动子、内皮糖蛋白启动子、von Willebrand 启动子、KDR/flk-1 启动子、FLT-1 启动子、Egr-1 启动子、ICAM-1 启动子、VCAM-1 启动子、PECAM-1 启动子和主动脉羧肽酶样蛋白 (ACLP) 启动子。

3. 权利要求 1 的分离的多核苷酸,其中所述启动子是前内皮素原 -1 启动子。

4. 权利要求 1 的分离的多核苷酸,其中所述启动子是 PPE-1-3X 启动子。

5. 权利要求 1 的分离的多核苷酸,其中所述顺式调节元件包含共价连接至至少部分 SEQ ID NO:16 所示序列的至少部分 SEQ ID NO:15 所示序列。

6. 权利要求 1 的分离的多核苷酸,其中所述顺式调节元件另外包含 SEQ ID NO:6 所示序列的至少一个拷贝。

7. 权利要求 1 的分离的多核苷酸,其中所述顺式调节元件另外包含 SEQ ID NO:6 所示序列的至少两个拷贝。

8. 权利要求 1 的分离的多核苷酸,另外包含 SEQ ID NO:1 所示序列的至少一个拷贝。

9. 权利要求 1 的分离的多核苷酸,另外包含低氧反应元件。

10. 权利要求 9 的分离的多核苷酸,其中所述低氧反应元件包含 SEQ ID NO:5 所述序列的至少一个拷贝

11. 权利要求 1 的分离的多核苷酸,其中所述顺式调节元件如 SEQ ID NO:7 所示。

12. 权利要求 1 的分离的多核苷酸,其缺乏编码促血管生成剂或抗血管生成剂的非病毒异源序列。

13. 核酸构建体,其包含权利要求 1 的分离的多核苷酸。

14. 核酸构建体,其包含权利要求 12 的分离的多核苷酸。

15. 包含权利要求 1 的分离的多核苷酸的细胞。

16. 表达权利要求 13 的核酸构建体的细胞。

17. 药物组合物,其包含权利要求 1 的分离的多核苷酸和药学上可接受的载体。

18. 在受试者组织中下调血管生成的方法,该方法包括在组织中表达权利要求 13 的核酸构建体,从而在所述组织中下调血管生成。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述顺式调节元件是前内皮素原 -1 启动子。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述启动子是 PPE-1-3X 启动子。

21. 权利要求 18 的方法,其中所述顺式调节元件包含共价连接至至少部分 SEQ ID NO:16 所示序列的至少部分 SEQ ID NO:15 所示序列。

22. 权利要求 18 的方法,其中所述顺式调节元件另外包含 SEQ ID NO:6 所示序列的至少一个拷贝。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述顺式调节元件另外包含 SEQ ID NO:6 所示序列的至少两个拷贝。

24. 权利要求 18 的方法,其中所述顺式调节元件另外包含 SEQ ID NO:1 所示序列的至少一个拷贝。

25. 权利要求 18 的方法,其中所述顺式调节元件另外包含低氧反应元件。

26. 权利要求 25 的方法,其中所述低氧反应元件包含 SEQ ID NO:5 所示序列的至少一个拷贝。

27. 权利要求 18 的方法,另外包含向所述组织施用至少一种选择的能增加所述腺病毒的拷贝数和 / 或增强所述血管生成调节物的表达的化合物。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述化合物是皮质类固醇和 / 或 N- 乙酰半胱氨酸。

29. 权利要求 18 的方法,另外包括向所述组织施用至少一种选择的血管生成调节剂,该调节剂能以协同方式进一步增强所述内皮特异性启动子的活性。

30. 权利要求 29 的方法,其中所述血管生成调节剂是内皮素受体拮抗剂。

31. 权利要求 30 的方法,其中所述内皮素受体拮抗剂是双重 A- 形式和 B- 形式内皮素受体拮抗剂。

32. 权利要求 30 的方法,其中所述内皮素受体拮抗剂是 B- 形式特异性的内皮素受体拮抗剂。

33. 权利要求 32 的方法,其中所述 B- 形式特异性的内皮素受体拮抗剂选自 A192,621 ; BQ788 ; Res 701-1 和 Ro 46-8443。

34. 权利要求 30 的方法,其中所述内皮素受体拮抗剂是除波生坦以外的内皮素受体拮抗剂。

35. 在受试者组织中下调血管生成的方法,该方法包括在组织中表达权利要求 12 的核酸构建体,从而在所述组织中下调血管生成。

36. 治疗与过度新血管形成相关的疾病或状况的方法,该方法包含对有所需要的受试者施用治疗有效量的核酸构建体,所述核酸构建体含有与顺式调节元件在转录上联接的条件复制型腺病毒,所述顺式调节元件能够指导所述腺病毒在血管生成内皮细胞中的转录,从而下调组织中的血管生成,并治疗与过度新血管形成相关的疾病或状况。

37. 权利要求 36 的方法,其中所述顺式调节元件是前内皮素原 -1 启动子。

38. 权利要求 37 的方法,其中所述启动子是 PPE-1-3X 启动子。

39. 权利要求 36 的方法,其中所述顺式调节元件包含共价连接至至少部分 SEQ ID NO:16 所示序列的至少部分 SEQ ID NO:15 所示序列。

40. 权利要求 36 的方法,其中所述顺式调节元件另外包含 SEQ IDNO:6 所示序列的至少一个拷贝。

41. 权利要求 40 的方法,其中所述顺式调节元件另外包含 SEQ IDNO:6 所示序列的至少两个拷贝。

42. 权利要求 36 的方法,另外包含 SEQ ID NO:1 所示序列的至少一个拷贝。

43. 权利要求 36 的方法,另外包含低氧反应元件。

44. 权利要求 36 的方法,其中所述低氧反应元件包含 SEQ ID NO:5 所示序列的至少一个拷贝。

45. 权利要求 36 的方法,其中所述与过度新血管形成相关的疾病或状况选自癌症、转移性疾病、糖尿病性视网膜病、牛皮癣和动脉粥样硬化。

46. 权利要求 36 的方法,其中治疗有效量的所述核酸构建体为约 10^3 至约 10^{16} 个病毒颗粒。

47. 权利要求 46 的方法,其中治疗有效量的所述核酸构建体为约 10^5 至约 10^{13} 个病毒

颗粒。

48. 权利要求 46 的方法,其中治疗有效量的所述核酸构建体为约 10^7 至约 10^{12} 个病毒颗粒。

49. 治疗受试者的肿瘤的方法,该方法包括对有所述需要的受试者施用治疗有效量的核酸构建体,所述核酸构建体含有与顺式调节元件在转录上联接的条件复制型腺病毒,所述顺式调节元件能够指导所述腺病毒在血管生成内皮细胞中的转录,从而下调组织中的血管生成,并治疗肿瘤。

50. 权利要求 49 的方法,其中所述顺式调节元件是内皮细胞特异性或内皮周细胞特异性启动子,其选自 PPE-1 启动子、PPE-1-3x 启动子、TIE-1 启动子、TIE-2 启动子、内皮糖蛋白启动子、von Willebrand 启动子、KDR/flk-1 启动子、FLT-1 启动子、Egr-1 启动子、ICAM-1 启动子、VCAM-1 启动子、PECAM-1 启动子和主动脉羧肽酶样蛋白 (ACLP) 启动子。

51. 权利要求 49 的方法,其中所述核酸构建体另外包含条件复制型腺病毒。

52. 权利要求 49 的方法,另外包含向所述组织施用至少一种选择的能增加所述腺病毒的拷贝数和 / 或增强转基因表达的化合物。

53. 权利要求 52 的方法,其中所述化合物是皮质类固醇和 / 或 N- 乙酰半胱氨酸。

54. 权利要求 49 的方法,另外包含向所述组织施用至少一种选择的血管生成调节剂,该调节剂能以协同方式进一步增强所述顺式调节元件的活性。

55. 权利要求 54 的方法,其中所述血管生成调节剂是内皮素受体拮抗剂。

56. 权利要求 55 的方法,其中所述内皮素受体拮抗剂是 B- 形式特异性的内皮素受体拮抗剂。

57. 权利要求 56 的方法,其中所述 B- 形式特异性的内皮素受体拮抗剂选自 A192,621 ; BQ788 ; Res 701-1 和 Ro 46-8443。

58. 权利要求 51 的方法,其中治疗有效量的所述核酸构建体为约 10^3 至约 10^{16} 个病毒颗粒。

59. 权利要求 58 的方法,其中治疗有效量的所述核酸构建体为约 10^5 至约 10^{13} 个病毒颗粒。

60. 权利要求 59 的方法,其中治疗有效量的所述核酸构建体为约 10^7 至约 10^{12} 个病毒颗粒。

表现出内皮细胞特异性的启动子和使用其调节血管生成的方法

[0001] 发明领域和背景

[0002] 本发明涉及可用于在受试者的特定组织区域中调节血管生成的核酸构建体、药物组合物和方法。更具体地讲,本发明涉及表现出内皮细胞特异性启动子活性的分离多核苷酸序列及其使用方法,再更具体地讲,涉及在内皮细胞中表现出增加的活性和特异性的修饰型前内皮素原-1(PPE-1)启动子以及核酸构建体,它们可用于在特定细胞亚型中激活细胞毒性,由此使得能治疗特征在于异常新血管形成或细胞生长的疾病,或者可用于诱导新血管生长,由此使得能治疗局部缺血疾病。本发明进一步涉及PPE启动子的修饰,所述修饰增强其响应于包括低氧和血管生成在内的生理条件的表达,并涉及新血管生成内皮特异性联合疗法。

[0003] 血管生成 :

[0004] 血管生成指新血管的生长,这是一个主要依赖于毛细血管内皮细胞的运动、增殖和管形成的过程。在血管生成期间,内皮细胞从其静息状态摆脱并迅速增殖。尽管尚不知晓负责将细胞转变成血管生成表型的分子机制,但导致形成新血管的事件次序已有充分的文件记载 [Hanahan, D., Science 277,48-50, (1997)]。血管生长需要内皮萌芽 [Risau, W., Nature386,671-674, (1997)] 或套叠 [Patan, S. 等;Microvasc. Res. 51,260-272, (1996)]。在第一条途径中,可发生以下顺序的事件:(a) 血管基底(通常是毛细血管后小静脉)和间质基质溶解;(b) 内皮细胞向刺激物迁移;(c) 尾随前导内皮细胞之后的内皮细胞增殖;(d) 在内皮素(array)/芽中形成腔(成管);(e) 通过芽的汇合性吻合形成分支和回路,以允许血液流动;(f) 周细胞(即内皮周细胞和平滑肌细胞)包被血管;和(g) 在不成熟血管周围形成基底膜。新血管还可经第二条途径形成:将间质组织柱插入预先存在的血管的腔中。这些柱随后的生长及其稳定化导致血管腔分隔和局部血管网络重建。

[0005] 血管生成在低氧浓度(局部缺血和肿瘤转移等)条件下发生,且因此在新血管形成中可能是一个重要的环境因素。包括促红细胞生成素、转铁蛋白及其受体、大多数葡萄糖转运和糖酵解途径基因、LDH、PDGF-BB、内皮素-1(ET-1)、VEGF和VEGF受体在内的几种基因的表达在低氧条件下被低氧诱导型因子(HIF-1)与调节这些基因转录的低氧反应元件(HRE)的特异性结合所诱导。这些基因响应低氧条件的表达,使细胞能够在低氧条件下发挥作用。

[0006] 血管生成过程受到由肿瘤细胞或正常细胞分泌的血管生成生长因子以及胞外基质组合物和内皮酶活性的调节(Nicosia和Ottinetti,1990, Lab. Invest.,63,115)。在血管生成初期,内皮细胞芽通过预先存在的血管基底膜中的间隙露出(Nicosia和Ottinetti,1990, 参见上文;Schoefl,1963, Virehous Arch, Pathol. Anat. 337,97-141; Ausprunk和Folkman,1977, Microvasc. Res. 14,53-65;Paku和Paweletz,1991, Lab. Invest. 63,334-346)。当新血管生成时,它们的基底膜经历复杂的结构和组成变化,这些变化被认为影响血管生成反应(Nicosia等,1994, Exp Biology. 164,197-206)。

[0007] 血管生成和病理学 :

[0008] 有多种血管生成因子掌控血管生成过程。据了解,在病变期间,促血管生成因子和抗血管生成因子之间的精密平衡被破坏,由此引起非自限性的内皮细胞和内皮周细胞增殖。尽管在正常条件下血管生成是高度受调节的过程,但许多疾病(特征为“血管生成性疾病”)由持续不受调节的血管生成引起。在这样的病状中,不受调节的血管生成或者可直接引起特定疾病,或者可使现有的病理状况恶化。例如,眼新血管形成已被暗示是失明的最主要病因,且是大约 20 种眼病的病理学基础。在某些预先存在的状况如关节炎中,新形成的毛细血管侵入关节并破坏软骨。在糖尿病中,在视网膜中形成的新毛细血管侵入玻璃体液,从而引起出血和失明。直到最近,对在眼新血管形成疾病、关节炎、皮肤病和肿瘤中出现的血管生成仍难以在治疗上进行抑制。

[0009] 不平衡的血管生成代表各种病理状况的特征,且通常支持病理状态的演进。例如,在实体瘤中,血管内皮细胞以快达正常组织中的那些细胞约 35 倍的速度分裂(Denekamp 和 Hobson,1982Br. J. Cancer 46 :711-20)。这样的异常增殖是肿瘤生长和转移所必需的(Folkman,1986Cancer Res. 46 :467-73)。

[0010] 血管内皮细胞增殖在慢性炎症疾病例如类风湿性关节炎、牛皮癣和滑膜炎中也是重要的,其中这些细胞响应于在炎症部位中释放的生长因子而增殖(Brown 和 Weiss,1988, Ann. Rheum. Dis. 47 :881-5)。

[0011] 在动脉粥样硬化中,血管中内皮细胞的单克隆扩增触发动脉粥样硬化斑块的形成(Alpern-Elran 1989, J. Neurosurg. 70 :942-5)。此外,在糖尿病性视网膜病中,失明被认为是由眼内基底膜变化所引起的,眼内基底膜的变化刺激不受控的血管生成和视网膜消耗(West 和 Kumar,1988, Lancet 1 :715-6)。

[0012] 内皮细胞还参与移植排斥。在同种异体移植排斥发作中,内皮细胞表达促粘附决定簇,其指导白细胞运输到移植部位。据认为,白细胞粘附分子对移植物中的内皮细胞的诱导可以被局部释放的细胞因子所诱导,正如已知在炎性损害中所发生的。

[0013] 另一方面,消除的血管生成在疾病发展例如动脉粥样硬化诱发的冠状动脉阻塞(如心绞痛)、意外损伤或外科手术后的坏死损害、或胃肠损害如溃疡中也是一个主要因素。

[0014] 因此,调节或改变血管生成过程在限制该过程促成潜在病状的病理演进方面以及提供研究其病因学的有价值方法方面可具有重要的治疗作用。

[0015] 最近,在开发内皮调节剂(无论是设计为抑制性的还是刺激性的)方面已取得显著进步。例如,施用在置于成年大鼠腹腔中的、胶原蛋白包被基质内的 β FGF 蛋白,导致产生充分血管形成并正常灌注的结构(Thompson 等,PNAS 86 :7928-7932,1989)。据报道,将 β FGF 蛋白注射到冠状动脉闭塞期间的成年犬冠状动脉中,导致心肌功能障碍减轻、心肌梗塞缩小和血管分布增加(Yanagisawa-Miwa 等, Science 257 :1401-1403,1992)。业已报道在心肌局部缺血动物模型中使用 β FGF 蛋白获得了相似结果(Harada 等, J Clin Invest 94 :623-630,1994, Unger 等, AmJ Physiol 266 :H1588-H1595,1994)。

[0016] 然而,对于长期功能性血管的大量形成,需要重复或长期递送上述蛋白因子,从而限制了它们在临床情形中的应用。此外,除与血管生成调节因子生产相关的高成本之外,这些因子的有效递送需要使用待置入冠状动脉内的导管,从而进一步增加了治疗的费用和难度。

[0017] 因此,所有抗血管生成治疗的基本目标都是使增殖微血管的病灶回复到其正常静息状态,并阻止其再生长 [Cancer:Principles & Practice ofOncology,第五版,Vincent T.DeVita, Jr., Samuel Hellman, Steven A.Rosenberg 编辑, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. (1997)]. 同样,促血管生成治疗不仅涉及恢复所需要的血管生成因子,而且涉及重建它们之间的正确平衡 (Dor 等, Ann NY Acad Sci 2003 ;995 :208-16) (关于促血管生成治疗和抗血管生成治疗的详尽综述参见 Zhang 等,Acta Biochand Biophys Cinica,2003 ;35 :873-880,和 Mariani 等, MedGenMed 2003,5 :22 ;和 Folkman, Semin.Onc 2002,29 :15-18)。

[0018] 抗血管生成治疗:

[0019] 鉴于抗血管生成治疗可延缓肿瘤生长演进 (例如视网膜病、良性的和恶性的血管生成性肿瘤),其是强有力的临床方法。

[0020] 一般来说,每一种由不受控毛细血管生长引起的疾病,如糖尿病性视网膜病、牛皮癣、关节炎、血管瘤、肿瘤生长和转移,都是抗血管生长治疗的标靶。

[0021] 例如,超过临床上潜伏大小 (例如几 mm³) 的实体瘤的进行性生长需要连续的新血管生成,即已知为肿瘤血管生成的过程。肿瘤生长和转移是血管生成依赖性的。肿瘤必须连续地刺激新毛细血管的生长,以递送营养和氧供肿瘤自身生长。因此,抗血管生成肿瘤治疗的基础在于阻止肿瘤血管生成或者选择性地破坏肿瘤中已存在的血管 (血管靶向疗法)。

[0022] 最近,已开发出过多抗血管生成剂来治疗恶性疾病,其中一些已处于临床试验中 (关于综述,参见 Herbst 等 (2002) Semin. Oncol. 29 :66-77,和 Mariani 等, MedGenMed 2003 ;5 :22)。

[0023] 研究的大部分肿瘤抗血管生成治疗标靶是在人中调节血管生成的主导过程,即血管内皮生长因子 (VEGF) 与其受体 (VEGFR) 的相互作用。调节 VEGFR 的促血管生成作用的试剂包括 (i) 针对 VEGF 蛋白本身或其受体的抗体 (例如 rhuMAb VEGF,阿瓦斯丁 (Avastin)) ; (ii) 针对 VEGFR 酪氨酸激酶的小分子化合物 (例如, ZD6474 和 SU5416) ;(iii) 靶向 VEGFR 的核酶。

[0024] 其它新的血管生成抑制剂包括具有独特的抗肿瘤和抗血管生成特性的雌二醇的天然代谢物 2- 甲氧雌二醇 (2-ME2),以及分别为纤溶酶原和胶原蛋白 XVIII 的蛋白酶剪切片段的制管张素和内皮抑制素。

[0025] 尽管在临床前模型中有前景,但迄今为止在临床试验中测试的所有抗血管生成剂的全身施用都显示出有限的成功率和相当大的毒性,包括血小板减少症、白细胞减少和咯血。这些结果提示,目前的肿瘤抗血管生成剂作为晚期恶性肿瘤疗法的用途可能有限。O' Reilly 等已经表明,在抗血管生成治疗开始至抗肿瘤作用出现之间的潜伏期可能导致在对治疗起反应之前的初期肿瘤演进 [O' Reilly S 等, (1998) Proc Am Soc ClinOncol 17 :217a]。而且,最近的研究提示,毛细血管床之间的血管生成调节可能不同,从而提示抗血管生成治疗可能需要基于器官 / 组织特异性来最优化 [Arap 等 (1998) Science 279 :377-380]。

[0026] 有趣的是,当对冠状动脉病患者的心肌局部缺血实施针对平滑肌细胞增殖的抗血管生成疗法 (例如肝素、肝素-肽治疗) 时,获得的效果也不理想 [Liu 等, Circulation, 79 :1374-1387 (1989) ;Goldman 等, Atherosclerosis, 65 :215-225 (1987) ;Wolinsky 等, JACC,

15(2):475-481(1990)]。与利用这些试剂治疗心血管疾病有关的各种限制包括:(i) 对心血管疾病患者产生不可耐受的风险水平的全身毒性;(ii) 妨碍外科手术后的血管伤口愈合;(iii) 可能损害周围的内皮和/或其它中间平滑肌细胞。

[0027] 因此,这些以及其它与全身施用抗血管生成因子相关的固有障碍(即基于所需体外不稳定性和高剂量的制造限制;和归咎于次最佳效应的单次快速静脉施用的峰动力学)限制了血管生成因子在新血管形成相关疾病治疗中的有效使用。

[0028] 用于癌症的抗血管生成基因治疗

[0029] 在原发性肿瘤以及转移中的肿瘤细胞增殖由于营养供应受限导致凋亡速率增加而被抵消。只要发生“血管生成转变”和营养供应对肿瘤大小足够,休眠的原发性或转移性肿瘤就开始发展成转移。

[0030] 血管生成转变可经几种机制发生:

[0031] 1. 通过癌基因上调促血管生成基因,例如 VEGF 和 bFGF,或下调血管抑制物(angio-suppressor),例如血小板反应蛋白。

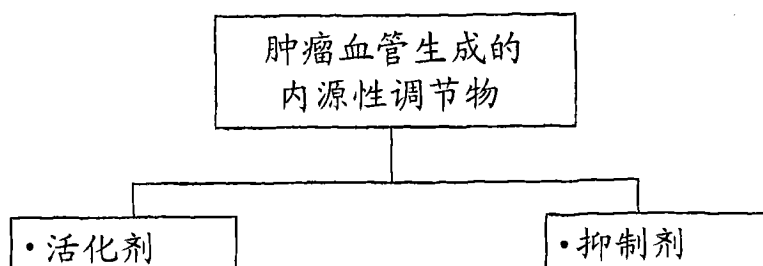
[0032] 2. 通过肿瘤相关的低氧条件活化低氧诱导型因子-1(HIF-1)。

[0033] 3. 肿瘤细胞诱导的肿瘤床成纤维细胞的促血管生成蛋白分泌。

[0034] 4. 骨髓内皮先祖(progenitor)运输入肿瘤。

[0035] 表 1:肿瘤血管生成的内源性调节物:

[0036]



[0037] • 血管内皮生长因子(VEGF)

[0038] • 成纤维细胞生长因子 1(FGF1)

[0039] • 成纤维细胞生长因子 2(FGF2)

[0040] • 血小板衍生生长因子(PDGF)

[0041] • 促血管生成素 2*

[0042] • 促血管生成素 1**

[0043] • 转化生长因子- β *(TGF- β)

[0044] • 肿瘤坏死因子- α *(TNF- α)

[0045] • 白细胞介素-8(IL-8)

[0046] • 血小板衍生内皮细胞生长因子
[0047] (PD-ECGF)

[0048] • 肝细胞生长因子(HGF)

[0049] * 剂量依赖性

[0050] ** 弱血管生成活化剂

[0051] 血管生成的活化剂和抑制剂(参见上文的表 1)之间的相对平衡对将肿瘤保持在

• P53

• 血小板反应蛋白-1*

• 血小板反应蛋白-2

• 组织金属蛋白酶抑制剂(TIMP)

• 制管张素

• 内皮抑制素

• 抗血管生成抗凝血酶 III

• 血管生成抑制性 C-X-C 趋化因子
(PF4、IP-10、MIG)

• 色素内皮衍生因子(PEDF)

• 白细胞介素-12(IL-12)

• 干扰素(INF)- α β γ

静息状态是重要的。降低抑制剂水平或增加活化剂水平改变了平衡,且导致肿瘤血管生成和肿瘤生长。

[0052] 当肿瘤组织距最近血管的厚度超过 150-200 μm 时,向肿瘤组织的氧扩散是不够的。所以,根据定义,超过这些尺寸的所有肿瘤已经打开血管生成。肿瘤细胞增殖率与血管供应无关。但是,血管生成转变一旦发生,凋亡速率就降低达 1/3-1/4(24)。而且,营养供应和分解代谢物释放并不是血管生成性血管对肿瘤凋亡减退的唯一影响因素。微血管系统内皮细胞还分泌进一步抑制肿瘤细胞凋亡的抗凋亡因子、促分裂原和存活因子,例如 b-FGF、HB-EGF、IL-6、G-CSF、IGF-1 和 PDGF。

[0053] 肿瘤细胞由于高突变率而在遗传上不稳定,这为它们提供了超越天然细胞的优势。例如,p53 基因中的突变抑制凋亡率。而且,促血管生成或血管生成抑制剂控制的癌基因改变(例如 ras 癌基因)可诱导血管生成转变。但是,高突变率不是癌症遗传不稳定性的唯一机制。有证据表明肿瘤细胞吞噬“凋亡体”,从而导致非整倍性和遗传不稳定性的进一步增加。总而言之,癌症依赖于血管生成。由于遗传不稳定性,癌症可配合促血管生成细胞因子平衡,该平衡抑制其凋亡率并使得能实现转移接种。

[0054] 人脉管系统包含一兆(trillion)以上的内皮细胞。正常静息内皮细胞的寿命超过 1000 天。尽管参与肿瘤发展的血管生成内皮细胞迅速增殖,但它们因其基因组稳定性、及由此产生的最小的药物抗性和发展出突变克隆的低可能性而与肿瘤细胞不同。而且,因为肿瘤发展的限速因素是血管生成,所以针对血管生成性内皮细胞的治疗能产生高效治疗模式。实际上,几种抗血管生成物质可用作全身治疗的潜在候选物。但是,由于这些试剂是蛋白,且其施用因此有赖于频繁的静脉内施用,其应用提出了严重的生产和保持难题。递送抗血管生成基因为持续的蛋白分泌提供了潜在的解决方案。

[0055] 随着调节血管生成过程的新基因的鉴定,人们一直试图采用体基因治疗来突破这些限制。虽然投入了很大的努力致力于开发癌症、心血管和外周血管疾病的基因治疗方法,但有效且特异性的基因递送仍存在很大障碍[关于综述参见 Feldman AL. (2000) Cancer 89(6):1181-94]。通常使用重组病毒载体作为穿梭载体、利用目标基因进行基因治疗的主要限制因素是将目标基因特异性地导向靶组织的能力。

[0056] 克服这些限制的努力包括使用缀合至细胞毒性基因的组织特异性启动子。例如,Jagger 等已描述了处于内皮特异性启动子控制下表达的细胞毒性基因的内皮细胞靶向,他们利用 KDR 或 E-选择蛋白启动子以在内皮细胞中特异性地表达 TNF α [Jagger RT. 等 Hum Gene Ther(1997)8(18):2239-47]。Ozaki 等用 von-Willebrand 因子(vWF)启动子将单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)递送到 HUVEC[Hum Gene Ther(1996)7(13):1483-90]。但是,这些启动子仅仅显示出微弱的活性,并且不允许高水平表达。

[0057] 几种内皮细胞特异性启动子在现有技术中已有描述。例如,Aird 等 [Proc. Natl. Acad. Sci. (1995)92:7567-571] 分离出可赋予组织特异性体内表达的人 von Willebrand 因子基因的 5' 和 3' 调节序列。然而,这些序列仅可介导一种不均一形式的报告转基因表达。在转基因小鼠中处于 von Willebrand 调节元件调节之下的细菌 LacZ 报告基因揭示出在卵黄囊和成体脑中的内皮细胞亚群中的转基因表达。然而,在脾、肺、肝、肾、心脏、睾丸和主动脉的血管床中以及在血栓调节蛋白基因座中没有检测到表达。

[0058] Korhonen J 等 [Blood(1995)96:1828-35] 分离出促进转基因在小鼠胚胎的整

个血管系统中均匀表达的人和小鼠 TIE 基因启动子。然而,在成体中的表达局限于肺和肾的血管,而在心脏、脑和肝中没有检测到表达。Schlaeger M 等获得了相似的结果,他们分离出 TIE-2 启动子的 1.2kb5' 侧翼区,并且表明转基因表达限于胚胎小鼠的内皮细胞 [Schlaeger TM 等, (1995)Development 121:1089-1098]。

[0059] 因此,这些序列中没有一个在所有发育阶段或成年动物的所有内皮细胞中均一地起作用。此外,这些序列中的一些序列并不局限于内皮。

[0060] 由 Kong 和 Crystal 提出了一种替代方法,该方法包括抗血管生成因子的肿瘤特异性表达。然而,迄今为止,尽管在临床前模型中一些合成的抗血管生成剂与毒性相关,但重组体形式的内源抗血管生成剂的毒性还没有被证实 [Kong 和 Crystal (1998)J. Natl. Cancer Inst. 90:273-76]。

[0061] 制管张素也已被用作可能的抗血管生成剂 (Folkman 等, Cell 1997Jan 24; 88(2):277-85),但由于肿瘤中涉及血管生成调节的因子过多,所以单独的制管张素治疗应非常难以奏效。

[0062] 迄今为止,有前景的临床实验已表明,像 Avastin® 或 Bay- 43906® 的抗血管生成治疗可通过限制肿瘤周围血管的新生长而减慢转移进展。但是,在其中需要显著的抗血管生成作用的癌症病理学中,所述抗血管生成作用破坏大部分或全部现有血管生成性血管并诱导肿瘤坏死,抑制新血管生成和 / 或部分地破坏它们可能不足够。

[0063] 前内皮素原 -1 (PPE-1) 启动子

[0064] Masaki 等在 1988 年发现的内皮素 (ET) 由 ET-1、ET-2 和 ET-3 这 3 个基因组成。内皮素 -1 (ET-1) 为 21 个氨基酸的肽,首先被描述为有效的血管收缩剂和平滑肌细胞促分裂原,由内皮细胞合成。ET-1 在血管内皮中表达,尽管在其它细胞如平滑肌细胞、呼吸道和胃肠上皮、神经元和肾小球系膜细胞中也有一些表达。其表达在各种病理生理状况下被诱导,例如低氧、心血管疾病、炎症、哮喘、糖尿病和癌症。内皮素 -1 触发血管生成因子如 VEGF 和 PDGF 的生产并与其相互作用,且因此在血管生成过程中起作用。

[0065] Hu 等鉴别出位于内皮素 -1 启动子反义链上的低氧反应元件 (HRE)。该元件是低氧诱导型因子 -1 结合位点,是低氧正调节 (人、大鼠和鼠基因的) 内皮素 -1 启动子所必需的。低氧是有力信号,诱导几种基因表达,包括促红细胞生成素 (Epo)、VEGF 和各种糖酵解酶。核心序列 (8 个碱基对) 在响应于低氧条件的所有基因中都是保守的,且侧翼区与其它基因不同。ET-1 低氧反应元件位于 GATA-2 和 AP-1 结合位点之间。

[0066] Bu 等在鼠 PPE-1 启动子 (mET-1) 中鉴别出复杂的调节区,其似乎赋予内皮细胞特异性转录活性,并结合局限于内皮细胞的蛋白或蛋白复合物。该区域称为内皮特异性正转录元件,由位于鼠 PPE-1 启动子的 -364bp 至 -320bp 之间的至少 3 个功能元件组成。全部 3 个元件都是完整活性所必需的。当将一个或三个拷贝构建入最小 mET-1 启动子中时,内皮细胞中的体外报告基因表达相比于无元件的最小启动子增加至 2-10 倍。

[0067] 美国专利 5,747,340 教导了鼠 PPE-1 启动子及其部分的应用。然而,该专利既没有暗示也没有证明内皮特异性增强子可用于增加用 PPE 启动子实现的表达水平而同时保留内皮特异性。此外,该专利也没有教导在低氧条件下 PPE-1 启动子被诱导至较高的转录水平。

[0068] 基因指导的酶前药治疗 (GDEPT) :

[0069] 该策略也称为“自杀基因治疗”。其包括将惰性前药在癌细胞中转变为活性细胞毒性试剂。在 GDEPT 中最广泛使用的两种基因是偶联更昔洛韦 (GCV) 施用的单纯疱疹病毒胸苷激酶 (HSV-TK) 和偶联 5- 氟胞嘧啶 (5FC) 施用的大肠杆菌 (*E. coli*) 胞嘧啶脱氨酶 (CD)。HSV-TK/GCV 系统已经历了广泛的临床前评价以及临床实验。迄今为止, HSV-TK/GCV 系统已表现出不显著的副作用, 例如发热、GCV 全身毒性、骨髓抑制和轻至中度肝毒性。

[0070] HSV-TK/GCV 系统首先由 Kraiselburd 等在 1976 年描述。用含 HSV-TK 的质粒转染的细胞或用含 HSV-TK 的载体转导的细胞对包括阿昔洛韦、更昔洛韦 (GCV)、伐昔洛韦和泛昔洛韦在内的药物超家族正变得敏感起来。鸟苷类似物 GCV 在基因疗法的配置中是最有效的药物。HSV-TK 阳性细胞产生病毒 TK, 其将 GCV 磷酸化成单磷酸 GCV (GCV-MP) 的效力为人 TK 的 3 个数量级高。GCV-MP 随后由天然胸苷激酶磷酸化为二磷酸 GCV, 且最后磷酸化为三磷酸 GCV (GCV-TP)。

[0071] GCV-TP 是有效的 DNA 聚合酶抑制剂, 其通过掺入新生链导致 DNA 合成终止, 从而终止 DNA 延伸并最终引起细胞死亡。因为 GCV 主要影响 HSV-TK 阳性细胞, 所以其副作用最小且罕有, 且主要包括血小板减少症、嗜中性白细胞减少症和中毒性肾损害。而且, 因为 GCV 毒性基于 DNA 合成, 所以其主要影响增殖细胞。HSV-TK/GCV 系统近来已广泛用于癌基因治疗的临床实验。不过, 结果令人失望, 主要受限于体内低转导百分率。

[0072] 近期研究已表征了 HSV-TK/GCV 细胞的细胞毒性机制。他们揭示细胞周期由于 G2-M DNA 损伤检查点的活化而停滞于 S 晚期或 G2 期。发现这些事件导致不可逆的细胞死亡以及与细胞死亡相关的旁观者效应。极度的细胞增大在施用 HSV-TK/GCV 系统的细胞中是公知的形态学变化。这些形态学变化归因于特异性细胞骨架重排。应激肌动蛋白纤维和粗中间丝网出现在细胞周期停滞之后。

[0073] HSV-TK/GCV 系统使用称为“旁观者效应”的放大潜力。旁观者效应代表了 HSV-TK 阳性细胞借助其诱导 HSV-TK 阴性细胞杀伤的现象。

[0074] 旁观者效应: 旁观者效应首先由 Moolten 等描述, 他们发现 HSV-TK 阳性细胞和 HSV-TK 阴性细胞分别为 1 : 9 的混合物在加入 GCV 之后导致完全的细胞杀伤。业已描述了旁观者效应的几种特征:

[0075] 1. 发现旁观者效应高度依赖于细胞 - 细胞接触。

[0076] 2. 其程度在不同细胞类型中不同。

[0077] 3. 其不限于同质细胞类型, 也不限于不同细胞类型的混合物。

[0078] 4. 发现较高水平的 HSV-TK 表达与较高的旁观者效应相关联。

[0079] Culver 等首先在体内模型中证实了旁观者效应。他们证实当以不同比率植入 HSV-TK 阳性肿瘤细胞时肿瘤消退。与体外模型不同, 未发现细胞 - 细胞接触是体内旁观者效应必需的。Kianmanesh 等通过在不同的肝叶中植入其中仅有一些为 HSV-TK 阳性的肿瘤细胞证实了远距离旁观者效应。HSV-TK 阳性和阴性病灶都消退。还在不同来源的细胞之间体内证实了旁观者效应。总而言之, 当在基因递送系统中实施时, HSV-TK 及其旁观者效应有利于肿瘤抑制的有效手段。但是, 迄今为止, 临床研究仅证实了有限的结果。

[0080] 条件复制型腺病毒 (CRAd):

[0081] 当代的腺病毒载体在癌症基因治疗中的用途受到限制, 这主要是由于载体感染正常细胞并继之发生副作用, 而大量肿瘤细胞保持不受转基因的影响的事实。良好的复制载

体应该是对人类弱致病性或无致病性的、肿瘤选择性的并且能够以高剂量施用。

[0082] 对于肿瘤团块增加的晚期疾病,病毒载体穿透肿瘤对于功效是关键。增加肿瘤细胞转导的新的且有力的方法是使用具有复制能力的溶瘤剂 (oncolytic agents),例如条件复制型腺病毒 (CRAd)。已经开发出用于开发 CRAd 载体的两个主要策略,主要集中在早期 1 (E1) 基因的基因工程改造以限制病毒复制到靶细胞且不伤害正常组织。遗传互补型 (1 型) CRAd,例如 Ad524,在立即早期 (E1A) 或早期 (E1B) 腺病毒区具有突变,其在肿瘤细胞中得到互补,但在正常细胞中没有。在反式互补型 (2 型) CRAd 中,通过肿瘤/组织特异性启动子控制病毒复制。然而,在两个实例中,异位肝转导和载体诱导的毒性是主要的顾虑 (Rein 等人,Future Oncol,2006 ;2 :137-43)。因此,对血管生成细胞高度特异、不感染其它细胞类型,而且仅在所需血管生成内皮细胞类型中高效复制的腺病毒载体的现有技术是不足的。

[0083] 因此,对于获得高度特异性的、可靠的血管生成特异性启动子、核酸构建体和病毒载体,从而在受试者的特定组织区域中提供有效调节血管生成的新方法,同时避免毒性副作用和表征现有技术抗血管生成方法的有限成功,存在着广泛认可的需求,并且将是高度有利的。

[0084] 发明概述

[0085] 按照本发明的一个方面,提供了含顺式调节元件的分离多核苷酸,所述顺式调节元件包含共价连接至至少部分 SEQ ID NO :16 所示序列的至少部分 SEQ ID NO :15 所示序列,所述分离的多核苷酸能够在真核细胞中指导在转录上与其连接的多核苷酸序列的转录。还提供了含该分离多核苷酸的核酸构建体、含本发明的核酸构建体的细胞以及接种了所述细胞的支架。

[0086] 按照所述优选实施方案的其它特征,提供了还含有处于顺式调节元件的调节控制之下的核酸序列的核酸构建体。所述核酸序列还可编码血管生成调节物。

[0087] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述核酸序列选自 VEGF、p55、促血管生成素 -1、bFGF 和 PDGF-BB。

[0088] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述支架由合成聚合物、细胞粘附分子或胞外基质蛋白组成。

[0089] 按照所述优选实施方案的其它特征,合成聚合物选自聚乙二醇 (PEG)、羟基磷灰石 (HA)、聚乙醇酸 (PGA)、用编织聚 -1- 交酯加固的 ϵ - 己内酯和 1- 乳酸 [KN-PCLA]、织物 (WV-PCLA)、互连多孔羟基磷灰石钙陶瓷 (IP-CHA)、聚 D, L- 乳酸 - 聚乙二醇 (PLA-PEG)、不饱和聚酯 (丙二醇 - 富马酸) 共聚物 (PPF)、交酯 - 乙交酯共聚物 (PLAGA)、聚羟基链烷酸酯 (PHA)、聚 -4- 羟基丁酸酯 (P4HB) 和聚磷腈。

[0090] 按照所述优选实施方案的其它特征,细胞粘附分子选自整联蛋白、细胞间粘附分子 (ICAM) 1、N-CAM、钙粘着蛋白、生腱蛋白、gicerin 和神经损伤诱导蛋白 2 (ninturin2)。

[0091] 按照所述优选实施方案的其它特征,胞外基质蛋白选自血纤蛋白原、胶原蛋白、纤连蛋白、波形蛋白、微管相关蛋白 1D、神经突增生因子 (NOF)、细菌纤维素 (BC)、层粘连蛋白和明胶。

[0092] 按照本发明的再一方面,提供在真核细胞中表达目标核酸序列的方法,该方法通过向受试者施用包含目标核酸序列的核酸构建体实施,所述目标核酸序列处于顺式调节元件转录控制之下,所述顺式调节元件含共价连接至至少部分 SEQ ID NO :16 所示序列的至少

部分 SEQ ID NO :15 所示序列。

[0093] 按照本发明的又一方面,提供在组织中调节血管生成的方法,该方法通过在所述组织中表达核酸构建体实施,所述核酸构建体包含:(a) 内皮细胞特异性启动子;(b) 至少一个拷贝的 SEQ ID NO :5 所示的低氧反应元件;和(c) 编码血管生成调节物的核酸序列,所述核酸序列处于所述启动子和所述低氧反应元件调节控制之下。

[0094] 按照本发明的另一方面,提供在组织中调节血管生成的方法,所述方法通过在所述组织中表达核酸构建体实施,所述核酸构建体含编码血管生成调节物的核酸序列,所述核酸序列处于顺式调节元件调节控制之下,所述顺式调节元件含共价连接至至少部分 SEQ ID NO :16 所示序列的至少部分 SEQ ID NO :15 所示序列,由此在所述组织中调节血管生成。

[0095] 按照所述优选实施方案中的其它特征,施用通过选自以下的方法实施:全身性体内施用、先体外后体内(ex vivo)施用由受试者身体取出的细胞并将细胞随后再导入受试者体内;以及局部体内施用。

[0096] 按照所述优选实施方案中的其它特征,所述组织是天然组织或工程改造的组织。

[0097] 按照所述优选实施方案中的其它特征,所述核酸序列编码促血管生成因子,且调节血管生成成为上调血管生成。

[0098] 按照所述优选实施方案中的其它特征,所述核酸序列编码血管生成抑制剂,且调节血管生成成为下调血管生成。

[0099] 按照本发明的再一方面,提供核酸构建体,其包含:(a) 编码嵌合多肽的第一多核苷酸区,所述嵌合多肽包含与细胞毒性分子的效应物结构域融合的配体结合结构域;和(b) 第二多核苷酸区,其编码能够在特定组织或细胞中指导所述嵌合多肽表达的顺式调节元件。选择所述配体结合结构域,从而使其能与存在于特定组织或细胞中的配体结合,而所述配体与配体结合结构域的结合活化所述细胞毒性分子的效应物结构域。还提供用本发明的核酸构建体转化的真核细胞。

[0100] 按照所述优选实施方案中的其它特征,所述顺式调节元件是选自以下的内皮细胞特异性启动子或内皮周细胞特异性启动子:PPE-1 启动子、PPE-1-3x 启动子、TIE-1 启动子、TIE-2 启动子、内皮糖蛋白启动子、vonWillebrand 启动子、KDR/flk-1 启动子、FLT-1 启动子、Egr-1 启动子、ICAM-1 启动子、VCAM-1 启动子、PECAM-1 启动子和主动脉羧肽酶样蛋白(ACLP) 启动子。

[0101] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述配体结合结构域是细胞表面受体的配体结合结构域。细胞表面受体可选自:受体酪氨酸激酶、受体丝氨酸激酶、受体苏氨酸激酶、细胞粘附分子和磷酸酶受体。

[0102] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述细胞毒性分子选自 Fas、TNFR 和 TRAIL。

[0103] 按照本发明的另一方面,提供在受试者组织中下调血管生成的方法,该方法通过给所述受试者施用核酸构建体实施,所述核酸构建体设计并构建用于在血管生成细胞亚群中产生细胞毒性。所述核酸构建体包含:(a) 编码嵌合多肽的第一多核苷酸区,所述嵌合多肽包含与细胞毒性分子的效应物结构域融合的配体结合结构域;和(b) 第二多核苷酸区,其编码在血管生成细胞亚群中指导所述嵌合多肽表达的顺式调节元件。选择所述配体结合结构域,从而使其能与存在于或提供给血管生成细胞亚群的配体结合,且所述配体与配体结合结构域的结合活化所述细胞毒性分子的效应物结构域,由此下调所述组织中的血管生

成。

[0104] 按照本发明的再一方面,提供在受试者组织中下调血管生成的方法,该方法如下实施:(a) 在受试者的组织中表达设计并构建用于在血管生成细胞亚群中产生细胞毒性的核酸构建体,所述核酸构建体包含:(i) 编码嵌合多肽的第一多核苷酸区,所述嵌合多肽包含与细胞毒性分子的效应物结构域融合的配体结合结构域,其中选择所述效应物结构域,从而使其在配体与配体结合结构域结合后被活化;和(ii) 第二多核苷酸区,其编码在血管生成细胞亚群中指导所述嵌合多肽表达的顺式作用调节元件;和(b) 给所述受试者施用配体,由此在所述组织中下调血管生成。

[0105] 按照本发明的又一方面,提供在受试者组织中下调血管生成的药物组合物,所述药物组合物包含作为活性成分的核酸构建体和药学上可接受的载体,所述核酸构建体设计并构建用于在血管生成细胞亚群中产生细胞毒性。所述核酸构建体包含:(a) 编码嵌合多肽的第一多核苷酸区,所述嵌合多肽包含与细胞毒性分子的效应物结构域融合的配体结合结构域;和(b) 第二多核苷酸区,其编码在血管生成细胞亚群中指导所述嵌合多肽表达的顺式作用调节元件,其中选择能够结合存在于特定组织或细胞中之配体的配体结合结构域,以使所述配体与所述配体结合结构域的结合活化细胞毒性分子的效应物结构域。

[0106] 按照本发明的再一方面,提供治疗与过度新血管形成相关的疾病或状况的方法。该方法通过施用治疗有效量的核酸构建体实施,所述核酸构建体设计并构建用于在血管生成细胞亚群中产生细胞毒性,所述核酸构建体包含:(i) 编码嵌合多肽的第一多核苷酸区,所述嵌合多肽包含与细胞毒性分子的效应物结构域融合的配体结合结构域;和(ii) 第二多核苷酸区,其编码在血管生成细胞亚群中指导所述嵌合多肽表达的顺式作用调节元件;且其中选择能够结合存在于或提供给血管生成细胞亚群的配体的配体结合结构域,且所述配体与所述配体结合结构域的结合活化细胞毒性分子的效应物结构域,由此在所述组织中下调血管生成,并治疗与过度新血管形成相关的疾病或状况。还提供在受试者中治疗肿瘤的方法,该方法通过施用治疗有效量的核酸构建体实施,所述核酸构建体设计并构建用于在肿瘤细胞中产生细胞毒性。

[0107] 按照本发明的另一方面,提供治疗与局部缺血相关的疾病或状况的方法,该方法通过施用治疗有效量的核酸构建体实施,所述核酸构建体设计并构建用于在血管生成细胞亚群中产生血管生成,由此在所述组织中上调血管生成,且治疗与局部缺血相关的疾病或状况。所述核酸构建体包含:(i) 编码促血管生成因子的第一多核苷酸区;和(ii) 第二多核苷酸区,其编码在血管生成细胞亚群中指导促血管生成因子的表达的顺式作用调节元件。

[0108] 按照所述优选实施方案的其它特征,与局部缺血相关的疾病或状况选自伤口愈合、缺血性中风(ischemic stroke)、缺血性心脏病和胃肠损害。

[0109] 按照本发明的再一方面,提供在受试者的组织中下调血管生成的方法,该方法如下实施:(a) 在所述组织中表达设计并构建用于在血管生成细胞中的细胞毒性的核酸构建体,所述核酸构建体包含:(i) 编码自杀基因的第一多核苷酸区;和(ii) 第二多核苷酸区,其编码能够在血管生成细胞中指导所述自杀基因表达的顺式作用调节元件;和(b) 给所述受试者施用治疗量的前药,所述量在前药被自杀基因转变为毒性化合物时足以造成所述组织的细胞凋亡,由此在所述组织中下调血管生成。

[0110] 按照本发明的又一方面,提供在受试者的组织中下调血管生成的药物组合物,所

述药物组合物包含作为活性成分的核酸构建体和药学上可接受的载体,所述核酸构建体设计并构建用于在血管生成细胞中产生细胞毒性。所述核酸构建体包含:(a) 编码自杀基因的第一多核苷酸区,所述自杀基因能够将前药转变为毒性化合物;和(b) 第二多核苷酸区,其编码能够在血管生成细胞中指导所述自杀基因表达的顺式作用调节元件。

[0111] 按照本发明的另一方面,提供核酸构建体,其包含:(a) 编码自杀基因的第一多核苷酸区,所述自杀基因能够将前药转变为毒性化合物;和(b) 第二多核苷酸区,其编码能够在血管生成细胞中指导所述自杀基因表达的顺式调节元件。还提供用本发明的核酸构建体转化的真核细胞。

[0112] 按照本发明的再一方面,提供在受试者组织中下调血管生成的方法,该方法通过给受试者施用核酸构建体实施,所述核酸构建体设计并构建用于在血管生成细胞中产生细胞毒性。所述核酸构建体包含:(a) 编码自杀基因的第一多核苷酸区;和(b) 第二多核苷酸区,其编码能够在血管生成细胞中指导所述自杀基因表达的顺式调节元件,其中选择能够将前药转变为能够引起细胞毒性作用的毒性化合物的自杀基因,由此下调所述组织中的血管生成。按照本发明的又另一方面,提供治疗与过度新血管形成相关的疾病或状况的方法,该方法通过施用治疗有效量的本发明核酸构建体实施,所述核酸构建体设计并构建用于血管生成细胞中的细胞毒性,由此在所述组织中下调血管生成,并治疗与过度新血管形成相关的疾病或状况。

[0113] 按照本发明的另一方面,提供治疗受试者中的肿瘤的方法,该方法通过施用治疗有效量的核酸构建体实施,所述核酸构建体设计并构建用于在肿瘤细胞中产生细胞毒性,所述核酸构建体包含:(i) 编码自杀基因的第一多核苷酸区;和(ii) 编码能够在肿瘤细胞中指导所述自杀基因表达的顺式作用调节元件的第二多核苷酸区,其中选择能够将前药转变为能够在肿瘤细胞中引起细胞毒性作用的毒性化合物的自杀基因。

[0114] 按照本发明的另一方面,提供分离的多核苷酸,该多核苷酸含有与顺式调节元件在转录上联接的条件复制型腺病毒,所述顺式调节元件能够指导该腺病毒在血管生成内皮细胞中的转录。

[0115] 按照本发明的另一方面,提供在受试者组织中下调血管生成的方法,该方法包括在所述组织中表达含有分离的多核苷酸的核酸构建体,该多核苷酸含有与顺式调节元件在转录上联接的条件复制型腺病毒,所述顺式调节元件能够指导该腺病毒在血管生成内皮细胞中的转录,从而下调所述组织中的血管生成。

[0116] 按照本发明的另一方面,提供治疗与过度新血管形成相关的疾病或状况的方法,该方法包括对有所述需要的受试者施用治疗有效量的核酸构建体,所述核酸构建体含有与顺式调节元件在转录上联接的条件复制型腺病毒,所述顺式调节元件能够指导所述腺病毒在血管生成内皮细胞中的转录,从而下调组织中的血管生成,并治疗与过度新血管形成相关的疾病或状况。

[0117] 按照本发明的另一方面,提供治疗受试者的肿瘤的方法,该方法包括对有所述需要的受试者施用治疗有效量的核酸构建体,所述核酸构建体含有与顺式调节元件在转录上联接的条件复制型腺病毒,所述顺式调节元件能够指导该腺病毒在血管生成内皮细胞中的转录,从而下调组织中的血管生成,并治疗肿瘤。

[0118] 按照所述优选实施方案的其它特征,分离的多核苷酸缺乏编码促血管生成剂或抗

血管生成剂的非病毒异源序列。

[0119] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述自杀基因选自单纯疱疹病毒胸苷激酶、水痘带状疱疹病毒胸苷激酶和细菌胞嘧啶脱氨酶。

[0120] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述前药选自更昔洛韦、阿昔洛韦、1-5- 碘尿嘧啶 FIAU、5- 氟胞嘧啶、6- 甲氧基嘌呤阿糖胞苷及其衍生物。

[0121] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述自杀基因是单纯疱疹病毒胸苷激酶,且所述前药是更昔洛韦、阿昔洛韦、FIAU 或其衍生物。

[0122] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述自杀基因是细菌胞嘧啶脱氨酶,且所述前药是 5- 氟胞嘧啶或其衍生物。

[0123] 按照所述优选实施方案的其他特征,所述自杀基因是水痘带状疱疹病毒胸苷激酶,且所述前药是 6- 甲氧基嘌呤阿糖胞苷或其衍生物。

[0124] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述方法还包括以联合形式给受试者施用至少一种额外治疗模式,选定的额外治疗模式能够以协同方式进一步增强所述细胞毒性。所述至少一种额外治疗模式可选自:化学疗法、放射疗法、光线疗法和光动力疗法、外科手术、营养疗法、切除疗法、联合的放射疗法和化学疗法、臂疗法(brachiotherapy)、质子射束疗法、免疫疗法、细胞疗法和质子射束放射外科手术疗法。

[0125] 按照下述本发明优选实施方案的其它特征,所述核酸序列包含含顺式调节元件的分离多核苷酸,所述顺式调节元件包含共价连接至至少部分 SEQ ID NO:16 所示序列的至少部分 SEQ ID NO:15 所示序列,所述分离多核苷酸能够在真核细胞中指导在转录上与其连接的多核苷酸序列的转录。在所述顺式调节元件中,至少部分 SEQ ID NO:15 所示序列可位于至少部分 SEQ ID NO:16 所示序列的上游,或者至少部分 SEQ ID NO:16 所示序列可位于至少部分 SEQ ID NO:15 所示序列的上游。

[0126] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述顺式调节元件还包含至少一个拷贝的 SEQ ID NO:6 所示序列,或至少两个拷贝的 SEQ ID NO:6。至少两个拷贝的 SEQ ID NO:6 可为邻接的。

[0127] 按照所述优选实施方案的其它特征,至少部分 SEQ ID NO:15 所示序列经接头多核苷酸序列共价连接至至少部分 SEQ ID NO:16 所示序列。接头多核苷酸序列可为启动子和/或增强子元件。

[0128] 按照所述优选实施方案中的其它特征,所述分离多核苷酸包含至少一个拷贝的 SEQ ID NO:1 所示序列。

[0129] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述分离多核苷酸还包含低氧反应元件,所述低氧反应元件优选包含至少一个拷贝的 SEQ ID NO:5 所示序列。

[0130] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述顺式调节元件如 SEQ ID NO:7 所示。

[0131] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述核酸构建体还包含条件复制型腺病毒。

[0132] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述顺式调节元件是选自以下的内皮细胞特异性启动子或内皮周细胞特异性启动子:PPE-1 启动子、PPE-1-3x 启动子、TIE-1 启动子、TIE-2 启动子、内皮糖蛋白启动子、vonWillerband 启动子、KDR/flk-1 启动子、FLT-1 启动子、Egr-1 启动子、ICAM-1 启动子、VCAM-1 启动子、PECAM-1 启动子和主动脉羧肽酶样蛋白(ACLP) 启动子。

[0133] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述方法另外包含给所述组织或所述受试者施用至少一种选择的能增加腺病毒的拷贝数和 / 或增强血管生成调节物的表达的化合物。

[0134] 按照所述优选实施方案的其它特征,其它化合物是皮质类固醇和 / 或 N- 乙酰半胱氨酸。

[0135] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述方法另外包含给所述组织或所述受试者施用至少一种选择的血管生成调节剂,该调节剂能以协同方式进一步增强顺式调节元件或内皮特异性启动子的活性。

[0136] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述至少一种血管生成调节剂是内皮素受体拮抗剂。所述内皮受体拮抗剂可以是双重 A- 形式和 B- 形式内皮素受体拮抗剂,或 B- 形式特异性的拮抗剂。

[0137] 按照所述优选实施方案的其它特征, B- 形式特异性的内皮素受体拮抗剂选自: A192,621 ;BQ788 ;Res 701-1 和 Ro 46-8443。

[0138] 按照所述优选实施方案的其它特征,所述内皮素受体拮抗剂是除波生坦以外的内皮素受体拮抗剂。

[0139] 本发明通过提供含具有新增强子元件的顺式调节元件的分离多核苷酸序列及其使用方法,成功解决了目前已知配置的缺点。新增强子元件可用于制备核酸构建体和药物组合物,它们用于组织特异性地调节转基因表达以及通过基因疗法用于治疗多种病症、疾病和状况。具体地说,本发明的顺式调节元件、分离多核苷酸和药物组合物可连同选定的转基因一起在内皮细胞中用于特异性地上调和 / 或下调血管生成,由此治疗肿瘤、转移疾病和局部缺血性疾病。

[0140] 附图简述

[0141] 本文仅作为实例参考附图描述本发明。现在具体地参考附图的细节,要着重强调的是,所显示的详细资料仅作为实例以及用于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被认为对本发明的原理和概念方面最有用和最容易理解的描述。在这方面,并未试图以比基本上理解本发明所必需的更为详细的方式来显示本发明的结构细节,连同附图的说明使得如何实际上实施本发明的几种形式对于本领域技术人员而言显而易见。

[0142] 在附图中:

[0143] 图 1a-b 是由 TNFR1 胞外区和 Fas 的跨膜区和胞内区构建并克隆到 pcDNA3 质粒 (a) 中或腺病毒载体 (b) 中的 Fas 嵌合体基因的示意图;

[0144] 图 2a-b 说明促凋亡基因 -Fas 嵌合体 and TNFR1 的凋亡活性。图 2a- 说明用 pcDNA-3-TNFR1 (下图) 或者对照空载体 (上图) 和编码 GFP 的表达质粒转染的牛主动脉内皮细胞 (BAEC)。图 2b- 说明用 pcDNA-3-Fas-c (下图) 或者对照空载体 (上图) 和编码 GFP 的表达质粒转染的 293 细胞。利用荧光显微镜术显现转染细胞,且从形态学上确定凋亡活性;

[0145] 图 3a-f 是用促凋亡基因转染的 BAEC 细胞的电子显微镜术图像。转染后 24 小时,将 BAEC 细胞在 2.5% 戊二醛中固定并进行加工。显示的是处于凋亡过程连续阶段的细胞;

[0146] 图 4 是定量转染的 BAEC 和 293 细胞中指示的促凋亡基因的凋亡活性的直方图;

[0147] 图 5a 表示 AdPPE-Fas-c 的 PCR 分析。泳道 1-2- 用包含 PPE-1 启动子和 Fas-c 基

因的引物获得的 PCR 产物。泳道 3-4- 用 Fas-c 引物获得的 PCR 产物。泳道 5-6- 在无模板 DNA 的情况下获得的 PCR 产物；

[0148] 图 5b 是 AdPPE-Fas-c 转染的 BAEC 细胞的蛋白质印迹分析。蛋白样品经 SDS-PAGE 分离,转移到硝酸纤维素膜上,且用针对 TNFR1 胞外部分的多克隆抗体探测。泳道 1-2-pcDNA3-Fas-c BAEC 转染细胞(阳性对照)。泳道 3-4- 用指示 MOI 的 AdPPE-Fas-c 病毒转染的 BAEC 细胞。泳道 5- 非转染细胞。泳道 6-7- 用指示 MOI 的 AdPPE-Luc 转染的 BAEC 细胞；

[0149] 图 6a-d 是说明 Fas- 嵌合体超表达对内皮细胞凋亡的作用的显微照片。用下述物质转染 BAEC 细胞:Ad-PPE-1-3x-Fas- 嵌合体(图 6a);Ad-PPE-1-3x- 萤光素酶(图 6b);Ad-PPE-1-3x-Fas- 嵌合体 和 Ad-PPE1-3x-GFP(图 6c);Ad-PPE-1-3x- 萤光素酶 和 Ad-PPE-1-3x-GFP,各为 MOI 1000(图 6d)。显微照片是在感染后 72 小时拍摄的,x10 放大；

[0150] 图 7 是说明 Ad-PPE-1-3x-Fas- 嵌合体对内皮细胞的凋亡特异性作用的直方图。在用 Ad-PPE-1-3x-Fas- 嵌合体或对照(萤光素酶)病毒感染后 72 小时通过结晶紫染色,定量内皮细胞(BAEC、HUVEC)和非内皮细胞(正常皮肤成纤维细胞-NSF)的生存力；

[0151] 图 8 显示施用 TNF α 对 Fas- 嵌合体介导的凋亡的剂量反应作用。用 Ad-PPE-1-3x-Fas-c 感染 BAEC。感染后 48 小时,向生长培养基中(以指示的剂量)添加 TNF。24 小时后通过结晶紫测定确定生存力；

[0152] 图 9a-e 是说明由 TNF α 配体和 Fas-c 受体的协同作用介导的内皮细胞特异性凋亡的显微照片。所指示的细胞在存在或不存在 TNF α (10ng/ml) 的情况于 Ad-PPE-1-3x-Fas-c 感染后 48 小时下温育;结晶紫染色在感染后 72 小时进行；

[0153] 图 10a 是说明 Ad-CMV-Fas-c 对内皮细胞的 TNF α 依赖性凋亡作用的剂量反应曲线。用指示 MOI 的 Ad-CMV-Fas- 嵌合体感染的 BAEC 细胞的生存力在与 TNF α 温育后确定；

[0154] 图 10b-d 表示 TNF α 配体和 Ad-CMV-Fas- 嵌合体对非内皮细胞 NSF 的凋亡作用。图 10b- 经对照病毒感染的 NSF。图 10c- 经 Ad-CMV-Fas- 嵌合体感染的 NSF。图 10d- 经 Ad-CMV-Fas- 嵌合体感染并与 TNF(10ng/ml) 温育的 NSF；

[0155] 图 11a-c 说明 Ad-PPE-1-3x-Fas-c 的体内抗肿瘤作用。当肿瘤可触知时,用 Ad-PPE-1-3x-Fas-c、Ad-CMV-Fas- 嵌合体、对照病毒或盐水静脉内注射接种有 B16 黑素瘤细胞的小鼠；

[0156] 图 11a- 在治疗时间段期间测量的肿瘤面积。图 11b- 治疗时间段结束时的肿瘤重量。图 11c- 图示 Ad-PPE-1-3x-Fas-c 治疗小鼠和对照小鼠中的肿瘤状态；

[0157] 图 12 是直方图,说明使用 B2B 细胞系(表达内皮素的支气管细胞系)作为对照时本发明的增强子元件对牛内皮细胞系和人内皮细胞系中的萤光素酶表达的作用；

[0158] 图 13 是直方图,说明腺病毒载体中的本发明启动子对各种细胞系中的萤光素酶表达的内皮特异性；

[0159] 图 14A-B 是显微照片,表明了 BAEC 细胞系中由本发明的 Ad5PPE-1-3X(14A) 和 Ad5CMV(14B) 对照构建体控制的 GFP 表达；

[0160] 图 15 是在内皮细胞和非内皮细胞中由 pACPPE-1-3Xp55、pACPPE-1-3X 萤光素酶和 pCCMVp55 诱导的凋亡百分比的直方图；

[0161] 图 16 是直方图,说明将根据本发明的增强子元件导入启动子构建体中对低氧应

答的作用；

[0162] 图 17 是直方图,说明将根据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作用；

[0163] 图 18 是直方图,说明将根据本发明的增强子元件导入启动子中对表达内皮素的牛和人内皮细胞系中的表达水平的作用；

[0164] 图 19 是直方图,说明在注射含有内皮启动子 (PPE-1) 或对照 (CMV) 启动子的腺病毒构建体后在各种器官中观察到的报告基因的表达水平；

[0165] 图 20A-B 是两张显微照片,说明 Ad5CMVGFP 构建体 (图 20A) 和 Ad5PPE-1-GFP 构建体 (图 20B) 在注射所述构建体的小鼠肝组织中的细胞表达；

[0166] 图 21 是直方图,说明将根据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的表达水平的作用；

[0167] 图 22 是直方图,说明将根据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的表达水平的作用；

[0168] 图 23A-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；

[0169] 图 24A-B 说明了分别用 moi-1 的 Ad5PPE-1-3XGFP 和 Ad5CMVGFP 转导的 SMC 中的 GFP 表达；

[0170] 图 25A-B 显示在 HeLa 细胞中进行的与图 24A-B 的实验相似的实验的结果；

[0171] 图 26A-B 显示在 HepG2 细胞中进行的与图 24A-B 的实验相似的实验的结果；

[0172] 图 27A-B 显示在 NSF 细胞中进行的与图 24A-B 的实验相似的实验的结果；

[0173] 图 28A-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；

[0174] 图 29A-C 是显微照片,说明得自经注射的小鼠肾组织的结果。注射 Ad5CMVGFP 的小鼠 (图 29A) ;注射 Ad5PPE-1GFP 的小鼠 (图 29B ;在血管壁中可见略高的 GFP 表达 ;箭标所指) 和注射 Ad5PPE-1-3XGFP 的小鼠 (图 29C) ;

[0175] 图 30A-C 说明在脾组织切片上进行的、与图 29A-C 中描绘的实验相似的实验；

[0176] 图 31A-D 说明注射盐水的对照小鼠 (图 31A)、注射 Ad5CMVGFP 的小鼠 (图 31B)、注射 Ad5PPE-1GFP 的小鼠 (图 31C) 和注射 Ad5PPE-1-3XGFP 的小鼠 (图 31D) 的转移肺中的 GFP 表达。抗 Cd31 免疫染色 (图 31C' -31D') 证实在每种转移组织中 GFP 表达和 CD31 表达共定位；

[0177] 图 32 是直方图,说明用含有鼠 PPE-1 启动子的质粒转染的 BAEC 中的萤光素酶活性 (光单位 / μ g 蛋白) 在转染细胞于低氧条件下温育时明显更高；

[0178] 图 33 是与图 32 相同的直方图,不同的只是使用 Ad5PPE-1Luc 和 Ad5CMVLuc；

[0179] 图 34 是与图 33 相同的直方图,说明在不同细胞系中的低氧效应；

[0180] 图 35 是直方图,说明本发明的 3X 序列对 BAEC 细胞中 PPE-1 低氧应答的作用。细胞用 Ad5PPE-1Luc 和 Ad5PPE-1-3Xluc 转导；

[0181] 图 36 是直方图,显示在股动脉结扎后 PPE-1-Luc 转基因小鼠各种组织中的萤光素酶表达水平；

[0182] 图 37A-B 是结合本发明使用的构建体的质粒图谱；

[0183] 图 38A-F 说明 Ad5PPE-1-3XVEGF 和 Ad5CMVVEGF 对小鼠局部缺血肢体的血液灌注和血管生成的作用。图 38A-D 是结扎后 21 天捕获的各种治疗组小鼠局部缺血肢体的代表性超声 (US) 血管造影灌注图像。黄色信号代表强灌注。该图像的右侧代表肢体远端。图 38A-Ad5PPE-1-3XVEGF 治疗小鼠 ;图 38B-Ad5CMVVEGF 治疗小鼠 ;图 38C- 对照, 盐水治疗小鼠 ;图 38D- 对照, 正常肢体。图 38E-F 是直方图, 说明 : 各种治疗组 US 图像中的平均信号强度 (图 38E) ;以各种治疗组中 CD31+ 细胞数目 /mm² 测量的平均毛细血管密度 (图 38F) ;

[0184] 图 39 是直方图, 说明在用 Ad5PPE-1Luc (空心条) 和 Ad5CMVLuc (黑色条) 转导的增殖和静息牛主动脉内皮细胞 (BAEC) 中的萤光素酶活性 ;

[0185] 图 40 是直方图, 说明用 Ad5PPE-1Luc 转导的 BAEC 在正常增殖、静息状态和加入 VEGF 后的快速增殖期间的萤光素酶活性 ;

[0186] 图 41A-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 41A) 和肝 (图 41B) 中的萤光素酶活性 (光单位 / μ g 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 ;

[0187] 图 42A-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) 或 Ad5CMVLuc (黑色条) 后 5 天 (图 42A) 和 14 天 (图 42B) (每个时间点均为 n = 10) 检测的相对萤光素酶活性 (光单位 / μ g 蛋白)。活性以每只动物全身萤光素酶表达的百分比表示 ;

[0188] 图 43 是描绘由 ApoE 缺陷型小鼠解剖的主动脉通过苏丹 (Sudan)-IV 着色的现有技术图像。胸主动脉含有较少的着红色的动脉粥样硬化病变, 而腹区包含许多着红色的动脉粥样硬化病变。(摘自 Imaging of Aortic atherosclerotic lesions by ¹²⁵I-HDL and ¹²⁵I-BSA. A. Shaish 等, Pathobiology 2001 ;69 :225-29) ;

[0189] 图 44 是直方图, 说明给 ApoE 缺陷型小鼠全身注射 Ad5PPE-1Luc (空心条 ;n = 12) 或 Ad5CMVLuc (黑色条 ;n = 12) 后 5 天检测的绝对萤光素酶活性 (光单位 / μ g 蛋白)。从腹主动脉观测的萤光素酶活性含高病变水平, 而从胸区观测的萤光素酶活性 (低病变水平) ;

[0190] 图 45 是直方图, 说明给诱发伤口愈合的 C57BL/6 小鼠全身注射 Ad5PPE-1Luc (黑色条) 或 Ad5CMVLuc (空心条) 后 5 天的绝对萤光素酶活性 (光单位 / μ g 蛋白) ;

[0191] 图 46 是直方图, 说明诱发 Lewis 肺癌的小鼠的正常肺、转移肺和原发性肿瘤中的萤光素酶活性。通过给原发性肿瘤模型的背部和转移模型的爪垫注射 D122-96 细胞诱发 Lewis 肺癌。全身注射 Ad5PPE-1Luc (n = 9 ;空心条) 或 Ad5CMVLuc (n = 12 ;黑色条) 后 5 天测量萤光素酶活性。活性以光单位 / μ g 蛋白表示 ;

[0192] 图 47A-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 表达和组织形态学。将组织在 OCT 中冷冻, 然后用恒冷切片机切成 10 μ m 的切片。所有照片都在放大 25 倍的情况下拍摄。图 47A- 肺转移的血管生成性血管中的 GFP ;图 47B- 图 47A 中所拍摄切片的 CD31 抗体免疫染色 ;图 47C- 原发性肿瘤血管中的 GFP 表达 ;图 47D- 说明血管的 C 切片的相差 ;

[0193] 图 48 是直方图, 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转移肺中的萤光素酶表达。通过给转移模型的爪垫注射 D122-96 细胞诱发 Lewis 肺癌。全身注射 Ad5CMVLuc (n = 7 ;黑色条)、Ad5PPE-1Luc (n =

6 ;灰色条)或 Ad5PPE-1-3XLuc($n = 13$;褐色条)后 5 天测量萤光素酶活性。活性以光单位/ μg 蛋白表示;

[0194] 图 49 是直方图,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中以肝活性的百分比表示的萤光素酶活性(其中肝中的活性为 100%);

[0195] 图 50A-B 是显微照片,说明注射 Ad5PPE-1-3X-GFP 的 LLC 肺转移小鼠中 GFP 表达(图 50A)和 CD31 免疫染色(图 50B)共定位;

[0196] 图 51 是直方图,说明股结扎后 2 天、5 天、10 天和 18 天和对照(未结扎动物-第 0 天;每组 $n = 8$)的 PPE-1 萤光素酶转基因小鼠肌肉(局部缺血和正常)中的萤光素酶活性(光单位/ μg 蛋白);

[0197] 图 52 是直方图,说明股结扎后 5 天($n = 6$)、10 天($n = 6$)和 18 天($n = 8$)以及对照(未结扎动物-第 0 天)的 PPE-1 萤光素酶转基因小鼠的肝、肺和肌肉主动脉(局部缺血和正常)中的萤光素酶活性(光单位/ μg 蛋白);

[0198] 图 53 是直方图,说明在原发性肿瘤中注射 Ad5CMVLuc(黑色条)或 Ad5PPE-1Luc(空心条)的 LLC 小鼠肝、肺和原发性肿瘤中检测的萤光素酶活性(光单位/ μg 蛋白);

[0199] 图 54A-H 是原位杂交图像,说明各种转基因的组织特异性表达或组成型表达的组织分布。图 54A-C 说明与以下的代表性局部缺血肌肉上的 VEGF 特异性反义探针的原位杂交:A, Ad5PPE-1-3XVEGF 治疗小鼠;B, Ad5CMVVEGF 治疗小鼠;C, 盐水治疗小鼠;D, Ad5CMVVEGF 治疗小鼠的肝切片。箭标表示阳性染色细胞。图 54E-G 说明与来自以下的代表性局部缺血肌肉的 PDGF-B 特异性反义探针的原位杂交:E, Ad5PPE-1-3XPDGF-B 治疗小鼠;F, Ad5CMVPDGF-B 治疗小鼠;G, 盐水治疗小鼠;H, Ad5CMVPDGF-B 治疗小鼠的肝切片;

[0200] 图 55A-B 是直方图,说明 Ad5PPE-1-3XVEGF 或 Ad5CMVVEGF 对小鼠局部缺血肢体中的血液灌注和血管生成的长期作用。A, 股动脉结扎后 50 天各种治疗组 US 图像中的平均信号强度。B, 股动脉结扎后 70 天以各种治疗组中 CD31+ 细胞数目/ mm^2 测量的平均毛细血管密度;

[0201] 图 56A-D 是直方图,说明 Ad5PPE-1-3XPDGF-B 对小鼠局部缺血肢体新血管形成的早期作用和长期作用。图 56A-B- 通过 US 成像测量的平均灌注强度(56A, 股动脉结扎后 30 天;56B, 股动脉结扎后 80 天)。图 56C-D- 以各种治疗组中 CD31+ 细胞数目/ mm^2 测量的平均毛细血管密度(56C, 股动脉结扎后 35 天;56D, 股动脉结扎后 90 天);

[0202] 图 57A-G 说明单独或联合使用处于内皮特异性启动子或组成型启动子调节之下的 PDGF-B 和 VEGF 的血管生成疗法对小鼠局部缺血肢体的新血管形成和血流的长期作用。A, 股动脉结扎后 80 天各种治疗组 US 图像中的平均信号强度。B, 股动脉结扎后 90 天以各种治疗组中 CD31+ 细胞数目/ mm^2 测量的平均毛细血管密度。图 57C-G 是股动脉结扎后 90 天募集到局部缺血肢体肌肉成熟血管内的平滑肌细胞。平滑肌细胞用抗 α -SM 肌动蛋白抗体进行免疫染色(着红色, X20)。C, Ad5PPE-1-3XPDGF-B 治疗的小鼠;D, 联合疗法治疗的小鼠;E, Ad5PPE-1-3XVEGF 治疗小鼠;F, 对照, Ad5PPE-1-3XGFP 治疗小鼠;G, 正常对侧肢体(注意到仅大血管被染色);

[0203] 图 58 说明动脉结扎后 50 天单独的或与促血管生成因子 VEGF 联用的 PDGF-B 对小

鼠局部缺血肢体血液灌注的作用；

[0204] 图 59 是基因定向酶前药治疗 (gene-directed enzyme prodrugtherapy) (GDEPT) 基本原理的示意图；

[0205] 图 60A-B 是代表质粒 pEL8 (3x)-TK 构建的示意图。图 60A 是代表质粒 pEL8 (3x)-TK 构建的示意图。图 60B 是质粒 pACPPE-1 (3x)-TK 的图谱；

[0206] 图 61 是通过 UV 荧光显现的 AdPPE-1 (3x)-TK 载体 PCR 产物的琼脂糖凝胶分离。使用两种引物：正向引物 5' -ctcttgattcttgaactctg-3' (前内皮素原启动子序列中的 455-474bp) (SEQ ID NO :9) 和反向引物 5' -taaggcatgcccattgttat-3' (HSV-TK 基因序列中的 1065-1084bp) (SEQ IDNO :10)。其它载体的特异性引物未产生 PCR 产物。观察到 1kb 条带, 证实在 AdPPE-1 (3x)-TK 病毒中存在 PPE-1 (3x) 启动子和 HSV-TK 基因。泳道 1 :100bp 大小标记梯。泳道 2 :pACPPE-1 (3x)-TK 质粒。泳道 3 :AdPPE-1 (3x)-TK 病毒。泳道 4 :无 DNA ；

[0207] 图 62A-C 显示了载体 AdPPE-1 (3x)-TK (图 62a)、AdPPE-1 (3x)-Luc (图 62b) 和 AdCMV-TK (图 62c) 的线性示意图；

[0208] 图 63 是一系列显微照片, 说明处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 的优良内皮细胞细胞毒性。用 0.1、1、10、100 和 1000 感染复数 (m. o. i.) 的 AdPPE-1 (3x)-TK、AdCMV-TK 和 AdPPE-1 (3x)-Luc 转导牛主动脉内皮细胞 (BAEC)。在转导后 4 小时加入 GCV (1 μ g/ml)。对照是用无 GCV 的载体或无载体的 GCV 转导的细胞。实验在 96 孔板中进行两次, 每组 12 个孔。两个对照都不诱导细胞死亡 (未示出数据)。以显著低于 AdCMV-TK 的 m. o. i. 在 AdPPE-1 (3x)+GCV 处理细胞中明显观察到细胞毒性特有的形态学变化 (细胞扩大、延伸和膨胀) 和细胞毒性 (汇合丧失)。用 AdPPE-1 (3x)-Luc 转导的细胞保持健康 (小尺寸、圆形并汇合) ；

[0209] 图 64 图示了处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 的内皮细胞细胞毒性。BAEC 在 96 孔板中制备, 并如图 13 转导, 接着在转导后 4 小时加入 1 μ g/ml GCV。加入载体后 10 天, 使用结晶紫染色测定细胞生存力。观察到 AdPPE-1 (3x)+GCV 在高 m. o. i. 时的优良细胞毒性；

[0210] 图 65 是一系列显微照片, 说明在 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 和更昔洛韦施用的内皮细胞细胞毒性的优良协同作用。如上文所述用感染复数 (m. o. i.) 为 10 的 AdPPE-1 (3x)-TK、AdCMV-TK 和 AdPPE-1 (3x)-Luc 转导牛主动脉内皮细胞 (BAEC), 并使其接触在转导后 4 小时加入的浓度渐增的 GCV (如所示的 0.001-10 μ g/ml)。对照为用无 GCV 的载体或无载体的 GCV 转导的细胞。实验在 96 孔板中进行两次, 每组 12 个孔。两个对照都不诱导细胞死亡 (未示出数据)。在显著低于接触 AdCMV-TK 的细胞的 GCV 浓度, 于 AdPPE-1 (3x)+GCV 处理细胞中明显观察到细胞毒性特有的形态学变化 (细胞扩大、延伸和膨胀) 和细胞毒性 (汇合丧失) ；

[0211] 图 66 图示了在 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 和更昔洛韦施用的内皮细胞细胞毒性的协同作用。BAEC 在 96 孔板中制备, 并如图 65 转导, 接着在转导后 4 小时加入渐增浓度 (0.0001-10 μ g/ml) 的 GCV。加入载体后 10 天, 使用结晶紫染色测定细胞生存力。与 AdCMV-TK 的强组成型 TK 表达相比, 观察到 AdPPE-1 (3x)+GCV 在高于 0.01 μ g/ml 的 GCV 浓度时的优良细胞毒性；

[0212] 图 67 是一系列显微照片,说明处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 和更昔洛韦施用的特异性协同内皮细胞毒性。内皮细胞 [牛主动脉内皮细胞 (BAEC)、人脐静脉内皮细胞 (HUVEC)] 和非内皮细胞 [人肝癌细胞 (HepG-2)、人正常皮肤成纤维细胞 (NSF)] 用 m. o. i. 为 10 的 AdPPE-1 (3x)-TK、AdPPE-1 (3x)-Luc 或 AdCMV-TK 转导,接着在转导后 4 小时施用 $1 \mu\text{g/ml}$ GCV。实验在 96 孔板中进行两次,每组 12 个孔。转导后 4 天用显微镜检测细胞毒性和细胞形态学变化。观察到 BAEC 和 HUVEC 培养物中 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 的优良细胞毒性作用 [细胞毒性特有的形态学变化 (细胞扩大、延伸和膨胀) 和细胞毒性 (汇合丧失)], 及这种作用在 HepG-2 和 NSF 培养物中不存在 (细胞保持小尺寸、圆形和汇合)。AdPPE-1 (3x)-Luc+GCV 对所有细胞类型都无毒性;

[0213] 图 68 是直方图,代表处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 和更昔洛韦施用的特异性协同内皮细胞细胞毒性。内皮细胞 (BAEC 和 HUVEC) 和非内皮细胞 (HepG-2 和 NSF) 在 96 孔板中制备,并如图 67 转导,接着在转导后 4 小时加入浓度渐增 ($1 \mu\text{g/ml}$) 的 GCV。加入载体后 10 天,使用结晶紫染色测定细胞生存力。与 AdCMV-TK+GCV 的非特异性细胞毒性相比,观察到 AdPPE-1 (3x)+GCV 的优良内皮特异性细胞毒性;

[0214] 图 69 是一系列显微照片,说明处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 和更昔洛韦施用在极端感染复数时的内皮选择性细胞毒性。如在图 66 中一样,以较高 m. o. i. 100 的 AdPPE-1 (3x)-TK、AdPPE-1 (3x)-Luc 或 AdCMV-TK 转导非内皮 (NSF) 细胞,接着在转导后 4 小时施用 $1 \mu\text{g/ml}$ GCV。实验在 96 孔板中进行两次,每组 12 个孔。转导后 4 天用显微镜检测细胞毒性和细胞形态学变化。与 AdCMV-TK+GCV 的非特异性细胞毒性相比,观察到 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 对 NSF 细胞形态学没有作用;

[0215] 图 70 是一系列照片,说明处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 体内表达和更昔洛韦 (GCV) 施用对转移生长的协同抑制。在 14 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 ($n = 77$) 中通过将 LLC 肿瘤细胞接种入左爪垫诱发 Lewis 肺癌 (LLC) 肺转移,该爪垫在原发性肿瘤一达到 7mm 大小时就截除。5 天后,将 10^{11} PFU 的腺病毒载体 [AdPPE-1 (3x)-TK+GCV ; AdCMV-TK+GCV ; 无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK] 注射入尾静脉,接着注射 100mg/kg GCV 达 14 天。在载体注射后第 24 天时处死小鼠,并取出肺进行检查和分析。对照小鼠接受盐水和 GCV。与 AdCMV-TK+GCV、无 GCV 的 AdPPE-1 和无腺病毒的 GCV 治疗的小鼠肺相比,在 AdPPE-1 (3x)+GCV 治疗的小鼠肺中观察到程度显著降低的转移扩散;

[0216] 图 71 是直方图,说明处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 体内表达和更昔洛韦 (GCV) 施用对转移生长的协同抑制。如上文所述在 C57BL/6 小鼠中诱发肺转移,且用 10^{11} PFU 的腺病毒载体 [AdPPE-1 (3x)-TK+GCV ; AdCMV-TK+GCV ; 无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK] 和 GCV (100mg/kg) 治疗小鼠。在载体注射后第 24 天时处死小鼠,且取出肺进行肺转移评价。对照小鼠接受盐水和 GCV。与无 GCV (超过 85%) 和 AdCMV-TK+GCV 以及盐水 +GCV 对照 (超过 75%) 中的转移块相比,在 AdPPE-1 (3x)+GCV 治疗小鼠中观察到对转移块的显著抑制;

[0217] 图 72a-72c 是肺转移的代表性组织病理学切片,说明处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 体内表达和更昔洛韦 (GCV) 施用对转移病理的协同抑制。如上文所述在 C57BL/6 小鼠中诱发肺转移,且用 10^{11} PFU 的腺病毒载体 [AdPPE-1 (3x)-TK+GCV ; AdCMV-TK+GCV ; 无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK] 和 GCV (100mg/kg) 治疗小鼠。在载体注射后第 24 天时处死小鼠,

且制作肺转移组织（图 72a 和 72b）或肺组织（图 72c）的切片，并用苏木精和伊红染色。在施用 AdPPE-1 (3x)+GCV 的肺转移中观察到大范围的中心坏死和众多单核浸润物簇（图 72a 和 72b）；

[0218] 图 73a-73b 是肺转移的 TUNEL 和抗胱天蛋白酶 -3 染色的诱发性 LLC 肺转移的代表性组织病理学切片，说明处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 体内表达和更昔洛韦 (GCV) 施用对肿瘤凋亡的协同增强作用。对如图 71a-71b 所述诱发和制备的 LLC 肺转移的切片进行固定并包埋在石蜡中，且通过使用 Klenow-FragE1 (Oncogene, Cambridge, MA) 的脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 切口末端标记 (TUNEL) 测定（图 73a）和抗胱天蛋白酶 -3 特异性免疫组织病理学（73b）测定凋亡指示物。在静脉内 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗小鼠的肺转移中观察到凋亡增强；

[0219] 图 74a 和 74b 是用肺转移的 TUNEL 和抗胱天蛋白酶 -3 染色的诱发性 LLC 肺转移的代表性组织病理学切片，说明处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 体内表达和更昔洛韦 (GCV) 施用对肿瘤凋亡的内皮特异性协同增强作用。如图 73a-73b 所述对诱发和制备的 LLC 肺转移的切片进行固定并包埋在石蜡中，且通过使用 Klenow-FragE1 (Oncogene, Cambridge, MA) 的脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 切口末端标记 (TUNEL) 测定（图 74a）和抗胱天蛋白酶 -3 特异性免疫组织病理学（74b）测定凋亡指示物。黑色箭标指示红细胞，红色箭标指示凋亡的内皮细胞，而白色箭标指示凋亡肿瘤细胞。在静脉内 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗小鼠的肺转移的血管（内皮）区中观察到凋亡增强；

[0220] 图 75a-75d 是鼠肺癌组织的代表性免疫组织病理学切片，说明处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 体内表达和更昔洛韦 (GCV) 施用对血管生成的内皮特异性协同抑制作用。如图 73a-73b 所述对诱发和制备的 LLC 肺转移（图 75a）、肝（图 75c）和正常肺组织（图 75b）的切片进行固定并包埋在石蜡中，且通过抗 CD-31 免疫荧光测定血管生成指示物。在 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗小鼠的肺转移中观察到短的、模糊的血管，没有连续性或分支。图 75d 是直方图，显示了肺转移血管形成（血管生成）的基于计算机的血管密度评价 (Image Pro-Plus, Media Cybernetics Incorporated)。左条：AdPPE-1 (3x) TK+GCV；右条：无 GCV 的 AdPPE-1 (3x) TK；

[0221] 图 76 是鼠肝组织的代表性组织病理学切片，说明在处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 体内表达和更昔洛韦 (GCV) 施用中没有肝脏毒性。如图 73a-73b 所述诱发和制备的带有 LLC 肺转移的小鼠肝切片进行固定并包埋在石蜡中，且用苏木精和伊红染色。与用组成型表达的 AdCMV-TK+GCV（右图）治疗小鼠肝中的显著细胞毒性相比，在 AdPPE-1-TK+GCV (3x)（左图）治疗小鼠肝中没有观察到细胞毒性指示物；

[0222] 图 77 描述了 RT-PCR 分析，说明了处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 表达和更昔洛韦 (GCV) 施用的器官特异性表达。如图 73a-73b 所述，在 9 只 15 周龄的 C57BL/6 雄性小鼠中诱发和制备 LLC 肺转移。在原发性肿瘤去除后 14 天静脉内递送腺病毒载体 [AdPPE-1 (3x)-TK 和 AdCMV-TK] 和盐水对照。在注射载体后 6 天处死小鼠，且收获器官。如下文所述提取不同器官的 RNA，且用 PPE-1 (3x) 启动子引物和 HSV-TK 基因引物通过 RT-PCR 扩增 PPE-1 (3x) 和 HSV-TK 转录物。观察到处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 的内皮特异性表达（中部，底部图）；

[0223] 图 78a 和 78b 图示了 Balb/c 鼠结肠癌肿瘤模型中的亚治疗和无毒辐射范围。用

CT-26 结肠癌细胞接种入 20 只 8 周龄 Balb/c 雄性小鼠的左股, 且其在肿瘤直径已达到 4-6mm 时在全身麻醉下接受 0、5、10 或 15Gy 的局部辐射。对于肿瘤体积 (76a), 按照式 $V = \pi/6 \times \alpha^2 \times \beta$ (α 是短轴, 且 β 是长轴) 计算肿瘤轴。5Gy 剂量仅诱导部分的、非统计学显著的肿瘤发展延迟 (图 78a), 且没有显著的体重减轻 (图 78b);

[0224] 图 79a-79g 说明联合亚治疗放疗与处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 表达和更昔洛韦 (GCV) 施用在鼠结肠癌中协同抑制肿瘤生长。用 CT-26 结肠癌肿瘤细胞接种 100 只 8 周龄的雄性 Balb/C 小鼠。肿瘤轴一达到 4-6mm, 就将 10^{11} PFU 的病毒载体 [AdPPE-1 (3x)-TK 或 AdCMV-TK] 静脉内注射入尾静脉, 接着按指示每日腹膜内注射 GCV (100mg/kg 体重) 达 14 天。载体施用后 3 天, 用局部 5Gy 剂量辐射小鼠。按照式 $V = \pi/6 \times \alpha^2 \times \beta$ (α 是短轴, 且 β 是长轴) 评价肿瘤体积。图 79a 显示了载体注射后 14 天时的平均肿瘤体积 $\pm$ S. E.。图 79b 显示了放疗治疗组中随时间变化的平均肿瘤体积进展。图 79c 显示了 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗小鼠中随时间变化的平均肿瘤体积进展。图 79d 显示了 AdCMV-TK+GCV 治疗小鼠中随时间变化的平均肿瘤体积进展。图 79e 显示了对照盐水+GCV 治疗小鼠中随时间变化的平均肿瘤体积进展。图 79f 显示了无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK 治疗小鼠中随时间变化的平均肿瘤体积进展。图 79g 是处死当天 Balb/C 小鼠中 CT-26 原发性肿瘤总病理学的代表性示例。与非靶向载体 AdCMV-TK ($p = 0.04$) (图 79c-79f) 相比, 观察到放疗仅显著加强血管生成性内皮细胞转录靶向的载体 AdPPE-1 (3x)-TK。在没有放疗的情况下, 采用所有病毒载体的治疗方案都是无效的;

[0225] 图 80a-80b 是原发性 CT-26 肿瘤的代表性组织病理学切片, 表明亚治疗放疗与处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 表达和更昔洛韦 (GCV) 施用联合在鼠结肠癌中协同诱导肿瘤坏死。对如图 79a-79g 所述诱发和制备的 CT-26 结肠癌肿瘤切片进行固定并包埋在石蜡中, 且用苏木精和伊红染色。观察联合的 AdPPE-1 (3x)+GCV+ 低剂量放疗情况下的坏死区域 (图 80a) 和肉芽组织区域 (图 80b);

[0226] 图 81a-81b 是用 TUNEL 和抗胱天蛋白酶 -3 染色的诱发原发性结肠癌肿瘤的代表性组织病理学切片, 说明放疗与处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 体内表达和更昔洛韦 (GCV) 施用联合协同增强内皮细胞和肿瘤的凋亡。对如图 77a-77g 所述诱发和制备的 CT-26 原发性结肠癌肿瘤切片进行固定并包埋在石蜡中, 且通过使用 Klenow-FragE1 (Oncogene, Cambridge, MA) 的脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 切口末端标记 (TUNEL) 测定 (图 81a) 和抗胱天蛋白酶 -3 特异性免疫组织病理学 (81b) 测定凋亡指示物。在用联合的放疗和静脉内 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗小鼠的肿瘤中观察到大范围的凋亡 (图 81a) 和胱天蛋白酶 -3 阳性内皮细胞 (81b);

[0227] 图 82 是用抗胱天蛋白酶 -3 染色的诱发原发性结肠癌肿瘤的代表性组织病理学切片, 表明放疗与处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 体内表达和更昔洛韦 (GCV) 施用联合协同增强内皮细胞和肿瘤的凋亡。对如图 79a-79g 所述诱发和制备的 CT-26 原发性结肠癌肿瘤切片进行固定并包埋在石蜡中, 且通过抗胱天蛋白酶 -3 特异性免疫组织病理学测定凋亡指示物。黑色箭标指示红细胞, 红色箭标指示凋亡内皮细胞, 且白色箭标指示凋亡肿瘤细胞。观察到 GCV 依赖性凋亡作用;

[0228] 图 83a 和 83b 是用抗 CD-31 染色的肝组织和诱发的原发性结肠癌肿瘤的代表性组织病理学切片, 说明放疗与处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 体内表达和更昔洛韦

(GCV) 施用联合协同增强对肿瘤血管形成的抑制。对肝组织 (83b) 和如图 79a-79g 所述诱发的制备的 CT-26 原发性结肠癌肿瘤 (83a) 切片进行固定并包埋在石蜡中, 且与内皮特异性抗 CD-31 反应, 用于免疫组织病理分析。黑色箭标指示红细胞, 红色箭标指示凋亡内皮细胞, 且白色箭标指示凋亡肿瘤细胞。与肝细胞中的正常血管形成 (83b) 相比, 观察到放疗和静脉内 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 联合治疗小鼠肿瘤中的广泛血管破坏 (83a) ;

[0229] 图 84 是小鼠肝组织的代表性组织病理学切片, 表明放疗与处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 表达和更昔洛韦 (GCV) 施用的组织特异性细胞毒性。对接触单独及联合的载体 (AdPPE-1 (3x)-TK 和 AdCMV-TK) 和 GCV 的小鼠肝切片进行固定, 并包埋在石蜡中, 且用苏木精和伊红染色。观察到 AdCMV-TK 和更昔洛韦 (左图) 的一般轻微肝脏毒性, 和在 AdPPE-1 (3x)-TK 治疗的肝中 (右图) 没有血管异常 ;

[0230] 图 85a 和 85b 图示了 C57Bl/6 肺癌转移模型中的亚治疗和无毒辐射范围。用 Lewis 肺癌 (LLC) 细胞接种入 35 只 8 周龄 C57Bl/6 雄性小鼠的左爪垫, 并在去除原发性肿瘤后 8 天在全身麻醉下以 0、5、10 或 15Gy 接受辐射到胸壁内。在去除肿瘤后 28 天时处死小鼠。体重减轻指示转移性疾病。5Gy 剂量不是治疗性的 (图 85a), 也不是有毒的 (图 85b) ;

[0231] 图 86a-86d 说明了亚治疗放疗与处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 表达和更昔洛韦 (GCV) 施用联合在鼠肺癌中协同抑制转移性疾病。将 LLC 细胞接种入 180 只 8 周龄雄性 Balb/C 小鼠的左爪垫中。一发展原发性肿瘤就在全身麻醉下截除该爪。截除后 5 天, 将 10^{10} PFU 载体 [AdPPE-1 (3x)-TK 或 AdCMV-TK] 注射入尾静脉, 接着每日腹膜内注射 GCV (100mg/kg) 达 14 天。载体注射后 3 天, 在全身麻醉下施用针对小鼠胸壁的单次 5Gy 剂量放疗。图 86a 显示了在 55 天内辐射过的、无载体治疗的小鼠的存活。图 86b 显示了 AdPPE-1 (3x)-TK 治疗小鼠的存活。图 86c 显示了 AdCMV-TK 治疗小鼠的存活。图 86d 显示了盐水治疗的对照小鼠的存活。与非靶向载体 AdCMV-TK (图 86b-86d) 相比, 观察到放疗仅显著增强血管生成内皮细胞转录靶向的载体 AdPPE-1 (3x)-TK。在没有放疗的情况下使用所有病毒载体的治疗方案都是无效的 ;

[0232] 图 87a-87c 是一系列直方图, 显示了在 CMV 启动子控制之下的 Fas-c 的内皮细胞细胞毒性。牛主动脉内皮细胞 (BAEC) 在用 100 (左)、1000 (右) 和 10000 (左下) moi 的 CMV-FAS (黑色) 或 CMV-LUC (灰色, 阴性对照) 转导后 72 小时和在以不同浓度加入人 TNF- α 配体后 24 小时用结晶紫染色。观察到在高 moi 和 TNF- α 浓度时 BAE 细胞的生存力下降 ;

[0233] 图 88 是噬斑发展图, 表明相比于 CMV-LUC (红色正方形), 用 CMV-FAS (蓝色菱形) 增强了 293 细胞中病毒复制的扩散。CMV-FAS 和 CMV-LUC 的 CsCl 带状原液的滴度如下文所述通过 PFU 测定来测定。数据按照对数标度以每 2-3 天噬斑测定观察到的噬斑数作图 ;

[0234] 图 89a 和 89b 是一系列 293 细胞培养物的照片, 说明与 CMV 萤光素酶相比, 采用 CMV-FAS-c 的病毒感染的细胞-细胞扩散 (噬斑形成) 速率较高。转染后 4 天, 拍摄相同稀度的 CMV-FAS (左图) 和 CMV-LUC (右图) 的噬斑照片。CMV-FAS 的噬斑明显大于 CMV-LUC 的噬斑, 从而表明可能由凋亡诱导的细胞-细胞扩散速率较高 ;

[0235] 图 90 是直方图, 说明在 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 Fas-c 和阿霉素施用的特异性协同内皮细胞毒性。BAE 细胞在载体 (PPE-1 (3x)-FAS) 转导 (10^3 moi) 后 48 小时接触 100nM 阿霉素。Dox+PPE-fas = 阿霉素 + PPE-1 (3x)-Fas-c (橙色) ; Dox = 单独的阿霉素 (绿

色);PPE-FAS = PPE-1 (3x)-FAS(红色);未处理=黑色。细胞在载体转导后 96 小时用结晶紫染色,且显微镜评价细胞生存力。观察到 AdPPE-1 (3x)-Fas-c 和阿霉素之间有内皮细胞毒性的显著协同作用;

[0236] 图 91a-91b 图示说明了处于内皮素 (PPE-13X) 控制之下的 VEGF 对工程改造组织构建体中的血管生成的优良诱导作用。组织工程改造构建体 (未公开的程序) 在培养基有或没有补加 VEGF (50ng/ml) 的情况下生长。用 Ad5PPEC-1-3x VEGF 病毒或对照 Ad5PPEC-1-3x GFP 腺病毒 (对照病毒) 感染平行构建体 (达 4 小时)。在培养 2 周后固定构建体,包埋、制作切片并染色。血管形成表示为血管数/mm² 和切片中血管形成的面积百分比。图 91a 表明,用 Ad5PPEC-1-3x VEGF 感染细胞对在工程改造构建体中形成的血管样结构的数目和大小具有诱导作用。与接触培养基中的 VEGF (VEGF 培养基) 的构建体相比,观察到 Ad5PPEC-1-3x VEGF 转导的组织构建体 (VEGF 病毒) 中血管形成的两个参数急剧增加 (4-5X)。图 91b 是 LUC 发光强度的直方图,说明与 Ad5PPEC-1-3x GFP 对照相比,与 Ad5PPEC-1-3x VEGF 感染的细胞一起生长的植入组织构建体的存活和血管形成较好;

[0237] 图 92 是野生型鼠 PPE-1 启动子 DNA 序列。所述启动子包含内源内皮特异性正转录元件 (黑色斜体)、NF-1 反应元件 (粉色斜体)、GATA-2 元件 (红色斜体)、HIF-1 反应元件 (蓝色斜体)、AP-1 位点 (绿色斜体)、CAAT 信号 (橙色斜体) 和 TATA 框 (紫色斜体);

[0238] 图 93 是修饰型鼠前内皮素原 -1 启动子的 3x 片段序列。所述片段包含 2 个完整内皮细胞特异性正转录元件 (红色) 和两个作为反向的半个原始序列定位的部分 (蓝色): SEQ ID NO:15 (转录元件 SEQ ID NO:6 的 3' 部分的核苷酸) 和 SEQ ID NO:16 (转录元件 SEQ ID NO:6 的 5' 部分的核苷酸);

[0239] 图 94 是直方图,说明了在转基因小鼠中在 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 LUC 基因表达的组织特异性的、波生坦诱导的增强;

[0240] 图 95a 和 95b 是直方图,说明根据 ELISA 测量的,不存在针对 PPE-1 (3x) 启动子控制下表达的转基因的宿主免疫应答。与在 PPE-1 (3x)Fas-c 治疗小鼠中引起的最小抗 TNF-R1 应答 (图 95b) 相比,观察到非特异性的抗腺病毒载体 (adenovector) 应答 (图 95a);

[0241] 图 96 是直方图,说明了内皮细胞中在 PPE-1 启动子控制下的 LUC 基因表达的 ET-B 特异性的增强。如上文所述,用 PPE-1-萤光素酶构建体 (pEL-8) 瞬时地转染牛主动脉内皮细胞。用不同浓度的内皮素拮抗剂处理后 1 小时,计算相对萤光素酶活性。将相对萤光素酶活性计算为光单位与 β -半乳糖苷酶单位的比, β -半乳糖苷酶活性源自组成型活性的 lacZ 构建体的共转染。相对于未处理的细胞表达值 (浓度 0 μ M = 100%)。值代表着一式三份的平均值 $\pm$ S.E.。* 相比于未处理的细胞, $P < 0.05$ (斯氏 t 检验)。注意到 BQ788 对 LUC 表达的剂量依赖性的、ET-1_B 特异性的增强 (灰色条),和 ET-1_A 特异性的抑制剂 BQ123 的增强的缺乏 (黑色条);

[0242] 图 97A 和 97B 是直方图,说明了双重 ET-1_A 和 ET-1_B 抑制剂波生坦转基因小鼠前内皮素原合成和分泌的增强。用波生坦 (100mg/kg) 处理表达在前内皮素原 -1 (PPE-1) 启动子控制下的 LUC 基因的转基因小鼠 30 天。图 97A 显示了从转基因动物肺提取的总 RNA 的直方图。图 97B 显示了前内皮素原 -1mRNA 水平的直方图 (通过半定量 RT-PCR 测量)。将这些值对 β -肌动蛋白标准化,且然后以任意单位图形显示。图 97B 显示了对照 (空心条)

或波生坦 - 处理的小鼠 (灰色阴影条) 中的免疫反应性的内皮素 -1 (ET-1) 水平。将结果表达为与对照未处理的小鼠相比, 5 只小鼠的平均值 $\pm$ S. E. (斯氏 t 检验);

[0243] 图 98 是直方图, 说明了皮质类固醇对腺病毒载体转化的内皮细胞中重组蛋白表达的增强。将 BAEC 暴露于 $3 \mu\text{M}$ 地塞米松 (灰色条) 或无类固醇 (黑色条) 48 小时, 然后以 10^{-4} 的 MOI, 用含有在组成型 CMV 启动子控制下的 LUC 基因的腺病毒构建体转染。将重组基因表达表示为 % 萤光素酶 / μg 细胞总蛋白。注意到在所有 MOI, 皮质类固醇对表达的一致增强, 在 1000 的 MOI 最高达 300% ;

[0244] 图 99 是荧光显微照片, 说明了皮质类固醇对内皮细胞中在 PPE-1 启动子控制下的重组蛋白的表达的增强。在用 AdPPE-GFP 感染 (在 100 的 MOI, 48 小时) 之前 48 小时, 将 BAEC 暴露于地塞米松 ($3 \mu\text{M}$)。显微照片是 2 个代表性孔的照片, 各自是对照 (上面) 和地塞米松 - 处理的 (下面) BAEC。注意到在地塞米松处理的细胞中显著更强的绿色荧光信号;

[0245] 图 100 是条件复制型腺病毒载体 AdPPE3X-E1 (血管生成内皮特异性的, 无报道基因序列)、AdCMV-E1 (非组织特异性的, 无报道基因) 和 AdPPE3X-GFP (血管生成内皮特异性的, 绿色荧光蛋白 (GFP) 报道基因) 的示意图;

[0246] 图 101a-101e 说明本发明的血管生成内皮特异性腺病毒载体的内皮细胞特异性复制。图 101a-c 显示, 通过 qRT-PCR 在非内皮人支气管癌细胞 (A549) (图 101a)、肝癌细胞 (HepG2) (图 101b) 和正常皮肤成纤维细胞 (NSF) (图 101c)、以及内皮人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) (101d) 中对腺病毒后代产生的量化。用 AdPPE3x-E1、AdCMV-E1 和 AdPPE3x-GFP 腺病毒以 1MOI 感染细胞单层。在感染后 2、24、48 和 72 小时通过 qRT-PCR 测定从细胞和培养基回收的病毒的量。计算腺病毒拷贝数相对于首次测量 (2 小时) 随时间过去的倍数增加。图 101e 是直方图, 显示各组在时间 0、24 小时 (第 1 天)、48 小时 (第 2 天) 和 72 小时 (第 3 天) 的相对病毒拷贝数。通过将 AdCMV-E1 拷贝数除以 AdPPE3x-E1 拷贝数计算相对拷贝数。注意到在非上皮细胞中缺乏 AdPPE3x-E1 复制, 而在 HUVEC 中高水平复制;

[0247] 图 102a-102h 是显微照片, 说明本发明的血管生成内皮特异性腺病毒载体在内皮细胞中的优先复制和感染性。用非特异性对照载体 AdCMV-E1 (图 102a-102d) 或 AdPPE3X-E1 (图 102e-102h) 以 1MOI 感染培养在 24 孔板中的非内皮 HepG2 细胞 (图 102a、102b、102e 和 102f) 和内皮 HUVEC (图 102c、102d、102g 和 102h), 并使其生长 96 小时。用山羊抗六邻体抗体对培养物免疫染色 (棕色), 检测 48 小时 (图 102a、102c、102e 和 102g) 和 96 小时 (图 102b、102d、102f 和 102h) 的病毒复制。放大率 $\times 100$;

[0248] 图 103a-103h 说明本发明的血管生成内皮特异性腺病毒载体感染的内皮特异性致细胞病变作用。图 103a-d 是细胞培养物照片, 显示以渐增剂量 (1、10、100 和 1000MOI) 的 AdPPE3x-E1 和对照 AdCMV-E1 和 AdPPE3x-GFP 腺病毒载体感染每孔 10^5 个非内皮细胞 (A549, 图 103a; HepG2, 图 103b; 和 NSF, 图 103c) 和内皮细胞 (HUVEC, 图 103d) 后 7 天, 实施的半定量细胞毒性测试的代表性结果。感染后 7 天时, 用结晶紫对剩余的存活细胞染色 (蓝色区域)。图 103e-f 是直方图, 描述在所示 MOI, 以 AdPPE3X-E1 (深灰条) 和对照载体 AdCMV-E1 (浅灰条) 和 E1- 缺失的 AdPPE3X-GFP (黑条) 感染非内皮细胞 A549 (图 103e)、HepG2 (图 103f) 和 NSF (图 103g) 和内皮细胞 HUVEC (图 103h) 细胞单层培养物的结果。未感染的细胞 (MOI = 0) 是对照培养物。在感染后 7 天以 MTS 测定定量评估细胞生存力。值为一式三份的平均值 $\pm$ S. E. *P < 0.01 ;

[0249] 图 104a-104d 是显微照片,说明本发明的血管生成内皮特异性腺病毒载体感染的抗血管生成作用。用伪载体(图 104a)、对照 AdCMV-E1(图 104b)载体、E1-缺失的 AdPPE3x-GFP(图 104c)和 AdPPE3X-E1(图 104d)病毒以 10MOI 一式三份地感染六孔板上的 HUVEC 单层。为了评价 AdPPE 3X 对毛细血管形成的作用,将感染细胞和未感染细胞接种在 **Matrigel®**上,并在培养后 8 小时通过光学显微镜术记录毛细管的自发形成;

[0250] 图 105 是直方图,显示本发明的血管生成内皮特异性腺病毒载体的抗血管生成作用的定量表达,如上图 104a-104d 所述。为了定量评价,将毛细管定义为连接细胞群的细胞延伸或分支点。注意到,与分别以 AdCMV-E1 或 AdPPE3x-GFP 感染的细胞相比,以 AdPPE-3x-E1 感染的细胞中,毛细血管样结构数目少 92%和 95% ($P < 0.01$);

[0251] 图 106a-106b 是图 104a-104d 中所述 HUVEC 单层培养物的荧光显微照片。将 HUVEC 单层培养物以 AdPPE3x-E1 和 AdPPE3x-GFP 共感染(图 106a 和 106b),并施用荧光显微镜术记录毛细管形成,从而显示细胞事实上被各病毒感染;

[0252] 图 107 是曲线图,描述本发明的血管生成内皮特异性腺病毒载体的体内感染缺乏一般的毒性作用。给 3 只棉鼠的组静脉内(i. v.)注射 1×10^{11} 个颗粒的 AdPPE3X-E1(封闭三角形)、AdCMV-E1(开放三角形)和 AdPPE3X-GFP(开放正方形)或盐水对照(封闭正方形)。注意到,与非组织特异性 AdCMV-E1 感染的显著体重减轻相比,以 AdPPE3X-E1 和 AdPPE3X-GFP 感染不存在对体重的作用;

[0253] 图 108 是直方图,描述本发明的血管生成内皮特异性腺病毒载体的体内感染缺乏肝特异性毒性作用。如上图 107 所述,注射病毒载体后 6 天,测定来自棉鼠的血浆样品的肝毒性标记谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)水平;

[0254] 图 109a-109d 是组织学切片的显微照片,描述本发明的血管生成内皮特异性腺病毒载体的体内感染缺乏肝特异性毒性作用。将如上图 107 所述感染的棉鼠在感染后 6 天处死,取出肝并切片,以苏木精和伊红染色,并检查肝毒性证据。图 109a- 盐水对照;图 109b-AdPPE 3X-GFP;图 109c-AdPPE 3X-E1;图 109d-AdCMV-E1。注意到,以组织特异性 AdPPE 3X E1 或 AdPPE 3X-GFP 感染不存在肝毒性作用。放大率 $\sim 200\times$;

[0255] 图 110a-110e 是显微照片(图 110a-110d)和直方图(图 110e),显示在棉鼠中本发明的血管生成内皮特异性腺病毒载体体内抑制 **Matrigel®**塞中的新血管形成。在给棉鼠注射之前,将 **Matrigel®**塞重悬于具有 10^9 个 AdPPE 3X E1(图 110b)、AdPPE3X-GFP(图 110c)或 AdCMV-E1(图 110d)病毒颗粒、或无病毒(图 110a)的盐水和 bFGF 中。以苏木精和伊红染色的注射后 14 天 **Matrigel®**塞的组织切片(图 110a-110d)在除了 AdPPE 3X-E1 处理的(图 110b)的塞之外的所有栓塞中均显示明显的新血管形成和细胞浸润(放大率 = $200\times$)。图 110e 是图 110a-110d 所示切片的组织学分析图解。值为平均值 $\pm$ SEM,每组 $N = 4$;

[0256] 图 111a-111j 是大鼠中 LCRT 肺转移模型生长特征的图示(图 111a-111d)、照片(图 111e-111h)和组织病理学(图 111i-111j)表现。将 LCRT 细胞皮下注射到棉鼠中(第 0 天),并每隔一天评价普通参数(体重,图 111a)和肿瘤和转移生长的组织特异性参数(肿瘤体积,图 111b;肿瘤重量,图 111c;肺转移重量,图 111d),进行 28 天。对于具有肿瘤的大鼠, $N = 18$,且对于盐水注射对照, $n = 3$ 。图 111a- 各个条表示平均重量 $\pm$ SE。* 与对照比较 $P < 0.05$ 。图 111b- 如下文实施例部分所述计算肿瘤体积。各个条表示平均值 $\pm$ SE。

对于第 10、18、25 和 28 天, n 分别等于 2、3、3 和 7。* 与第 10 天的重量比较 $P < 0.05$; ** 与第 10 天和 18 天重量比较 $P < 0.05$ 。图 111c- 肿瘤重量 - 各个条表示平均值 $\pm$ SE。对于第 10、18、25 和 28 天, n 分别等于 2、3、3 和 7。* 与第 10 天的重量比较 $P < 0.05$; ** 与第 10 天和 18 天重量比较 $P < 0.05$ 。图 111d- 从各个具有肿瘤的器官减去平均正常器官湿重 (400mg) 计算肺转移重量。各个条表示平均值 $\pm$ SE。对于第 10、18、25 和 28 天, n 分别等于 2、3、3 和 7。** 与第 10 天和 18 天重量比较 $P < 0.05$ 。图 111e 是棉鼠肋腹中代表性 LCRT 肿瘤的照片。图 111f 是棉鼠肋腹中具有中心坏死和出血的代表性 LCRT 肿瘤的照片。图 111g 和 111h 是在注射 LCRT 细胞后第 25 天和 28 天的代表性大鼠肺表面的照片。箭标: 肺表面上的转移。图 111i 和 111j 是 LCRT 细胞注射后第 25 天 (图 111i) 或 18 天 (图 111j) 的苏木精和伊红染色的大鼠肺切片显微照片, 显示细支气管附近的转移 (图 111i, 箭标=细支气管, 虚线箭标=转移, 放大率 X100) 和显微转移 (图 111j, 箭标=转移, 放大率 X200) ;

[0257] 图 112 是直方图, 显示通过全身施用本发明的血管生成内皮特异性腺病毒载体对体内肺转移生长的有效抑制。在雌性棉鼠内生成 LCRT 肺转移。如所示的, 全身注射 (心内递送, 至左心室) AdPPE3x-E1、AdCMV-E1、AdPPE3x-GFP 或盐水。通过从各个具有肿瘤的器官减去平均正常器官湿重 (400mg) 计算归结于肿瘤负荷的器官重量。各个条表示平均值 $\pm$ SE, n = 8。* 根据双向 Anova 与盐水组相比 $P < 0.05$ 。注意到血管生成特异性 AdPPE 3X-E1 病毒载体的出色抑制;

[0258] 图 113a-113b 是直方图, 说明本发明的血管生成内皮特异性腺病毒载体的强烈的转移特异性病毒复制。如上图 111 和 112 中所述, 通过注射 LCRT 细胞将转移性生长引入棉鼠。通过定量 PCR 扩增腺病毒 E4 序列, 检测从感染后 8 天的肺 (图 113a) 或肝 (图 113b) 组织提取的 DNA 中的病毒 DNA。将相对病毒 E4 拷贝数定义为各样品相对于在盐水处理对照组织中检测的 E4 拷贝数的倍数增加 (盐水等于 1)。

[0259] 优选实施方案的描述

[0260] 本发明是表现出内皮细胞特异性启动子活性的多核苷酸序列及其使用方法。更具体地说, 本发明涉及一种在内皮细胞中表现出增加的活性和特异性的修饰型前内皮素原 -1 (PPE-1) 启动子和核酸构建体, 其可用于在特定细胞亚群中活化凋亡, 由此使得能够治疗特征在于异常新血管形成或细胞生长的疾病。本发明还涉及 PPE 启动子的修饰, 所述修饰响应于包括低氧和血管生成在内的生理条件而增强其表达, 并涉及新血管生成内皮特异性联合疗法。

[0261] 在详细解释本发明的至少一个实施方案之前, 要理解的是, 本发明在其应用方面不限于在以下描述中叙述的或实施例列举的细节。本发明能够具有其它实施方案或以各种方式实施或进行。同样, 要理解的是, 本文所用的短语和术语仅用于说明目的, 且不应被认为是限制性的。

[0262] 失衡的血管生成代表各种病理状况的特征, 且通常支持病理状态的进展。例如, 在实体瘤中, 血管内皮细胞的分裂进度是正常组织中的那些细胞的约 35 倍 (Denekamp 和 Hobson, 1982 Br. J. Cancer 46 :711-20)。这样的异常增殖是肿瘤生长和转移所必需的 (Folkman, 1986 Cancer Res. 46 :467-73)。血管内皮细胞增殖在慢性炎症性疾病例如类风湿性关节炎、牛皮癣和滑膜炎中也是重要的, 其中这些细胞响应于在炎症部位中释放的生长

因子而增殖 (Brown 和 Weiss, 1988, Ann. Rheum. Dis. 47 :881-5)。另一方面,在局部缺血状况如心脏缺血、外周血管疾病、伤口愈合、灼伤瘢痕形成和同类疾病中,血管生成的诱导具有治愈作用 (Thompson 等, PNAS 86 :7928-7932, 1998), 且因此是有益的。

[0263] 因此,调节或修饰血管生成过程在限制该过程对基础性疾病状态的病理进展的影响以及为研究这种疾病的病因学提供有价值方法方面可具有重要的治疗作用。最近,在开发无论是设计成抑制性的还是刺激性的内皮调节剂方面都已取得显著进展 (关于新近的综述,参见 Mariani 等 GenMedGen 2003, 5 :22)。然而,对于促血管生成应用和持久功能性血管的大量形成,需要重复或长期递送上述蛋白因子,从而限制了它们在临床情形中的应用。此外,除与血管生成调节因子生产相关的高成本之外,这些因子的有效递送也需要使用待置入冠状动脉内的导管,这进一步增加了治疗的费用和难度。

[0264] 迄今为止,有前景的临床实验已表明,如同 Avastin® 或 Bay-43906® 的抗血管生成治疗可通过限制肿瘤周围的新血管生长而减弱转移进展。但是,在其中需要破坏大部分或全部现有血管生成性血管并诱导肿瘤坏死的显著抗血管生成作用的癌症病理学中,抑制新血管生成和 / 或部分破坏它们可能并不足够。此外,尽管在临床前模型中有前景,但迄今为止在临床试验中测试的所有抗血管生成剂的全身施用都已显示出有限的成功率和相当大的毒性,包括血小板减少症、白细胞减少症和咯血。因此,治疗剂的内皮特异性靶向对促血管生成治疗和抗血管生成治疗是必需的。本领域业已描述了内皮特异性启动子,实例包括 flk-1、Flt-1 Tie-2VW 因子和内皮素 -1 (参见 Gu 等的美国专利第 6, 200, 751 号; Williams 等的美国专利第 5, 916, 763 号和 Harats 等的美国专利第 5, 747, 340 号, 这些专利全部都在此引入作为参考)。本领域还已经描述了在内皮特异性启动子控制下表达的治疗基因的内皮细胞靶向。例如, Jagger 等使用 KDR 或 E- 选择蛋白启动子在内皮细胞中特异性表达 TNF α [Jagger RT. 等, Hum Gene Ther (1997) 8(18) :2239-47], 而 Ozaki 等使用 von-Willebrand 因子 (vWF) 启动子向 HUVEC 递送单纯疱疹病毒胸苷激酶 (HSV-tk) [HumGene Ther (1996) 7(13) :1483-90]。尽管这些启动子被认为是内皮细胞特异性的,但研究已表明,这些启动子中有许多在将表达导向内皮细胞方面是无效的,没有所需的严格特异性,仅表现出微弱活性,且未允许高水平表达。

[0265] 一种构建更有效和特异性的治疗用内皮启动子的方法一直以来都是鉴别和包含组织特异性增强子元件。例如, Bu 等 (J. Biol Chem. (1997) 272(19) :32613-32622) 先前已描述了内皮细胞特异性的增强子元件,他们证实, 3 个拷贝的 PPE-1 增强子元件 (含有元件 ETE-C、ETE-D 和 ETE-E) 在体外赋予启动子序列内皮细胞特异性。但是,未能证实增强子元件的体内应用。

[0266] 如下文的实施例部分清晰阐述的,本发明已证实了适用于体内治疗用途的增强子元件。通过生成独特的、修饰型三次重复的 (3x) 增强子元件 (SEQ ID NO :7) 并在体外和体内评价其指导内皮特异性基因表达的活性,本领域的发明人已进一步构建了高度活性的增强子元件,其包含新的、重排方向的 3x 增强子元件序列的部分。此修饰型增强子元件表现出对参与血管生成的增殖性内皮细胞的增强特异性,而在正常内皮细胞中的体内活性可忽略。因此,本领域的发明人已首次鉴别了在重构时赋予邻近的启动子序列优良活性的增强子元件的部分。

[0267] 因此,按照本发明的一个方面,提供含顺式调节元件的分离多核苷酸,所述顺式调

节元件能够在真核细胞中指导在转录上与其连接的多核苷酸序列的转录。所述分离多核苷酸包含共价连接至至少部分 SEQ ID NO:16 所示序列的至少部分 SEQ ID NO:15 所示序列。在一个优选实施方案中,在所述顺式调节元件中,所述至少部分 SEQ ID NO:15 所示序列位于所述至少部分 SEQ ID NO:16 所示序列的上游。在另一个优选实施方案中,在所述顺式调节元件中,至少部分 SEQ ID NO:16 所示序列位于所述至少部分 SEQ ID NO:15 所示序列的上游。

[0268] SEQ ID NO:15 是代表鼠内皮特异性增强子元件 (SEQ ID NO:6) 的核苷酸坐标 27-44 的多核苷酸序列,在 3' 末端连接一个额外的鸟苷酸,且 SEQ ID NO:16 是代表鼠内皮特异性增强子元件 (SEQ ID NO:6) 的核苷酸坐标 1-19 的多核苷酸序列。

[0269] 对本说明书和所附权利要求书来说,术语“增强子”指优选但非排它性地以组织特异性方式增加启动子转录活性的任意多核苷酸序列。本文使用的术语“组织特异性增强子”指以组织依赖性 or 背景序列依赖性 (context-dependent) 方式增加启动子转录活性的增强子。应当认识到,这样的“组织特异性启动子”在不相容的组织或环境中降低、抑制或甚至沉默启动子的转录活性。

[0270] 按照本发明的一些实施方案,分离多核苷酸包含邻接拷贝的至少部分 SEQ ID NO:15 和 16。这样的序列优选以头-尾方向定位,尽管可构建本领域众所周知的其它方向,例如反向方向 (尾-尾或头-头)、互补方向 (用“t”取代“a”、用“a”取代“t”、用“c”取代“g”以及用“g”取代“c”)、反向互补方向等。所述至少部分 SEQ ID NO:15 所示序列可直接共价连接至所述至少部分 SEQ ID NO:16 所示序列,或在优选实施方案中,两个序列可通过接头多核苷酸序列连接。本文使用的术语“接头多核苷酸”指在两个或更多个侧翼多核苷酸 (例如 SEQ ID NO:15 和 16) 之间连接的多核苷酸序列。一种这样的优选接头序列例如为三核苷酸序列“cca”,其是如 SEQ ID NO:7 的 55-57 位中的核苷酸所示的接头序列。其它合适的接头序列可包括天然或人工的完整附加增强子元件,例如多拷贝的 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、PPE-1 的 1× 增强子元件、附加的完整启动子、低氧反应元件 (例如 SEQ ID NO:5) 等。

[0271] 本文使用的术语“部分 SEQ ID NO:15 所示序列.....”或“部分 SEQ ID NO:16 所示序列.....”定义为代表指明序列的 5' 末端、3' 末端或其间任意序列的至少 8 个邻接核苷酸的序列。因此,例如,代表 SEQ ID NO:15 的核苷酸坐标 1-8、1-9、1-10、1-11..... 累加 1 个核苷酸直至核苷酸坐标 1-17 的序列皆构成了根据本发明的部分 SEQ ID NO:15,代表 SEQ ID NO:15 的核苷酸坐标 2-9、2-10、2-11..... 至 2-17 的全部序列也如是,代表 SEQ ID NO:15 的核苷酸坐标 3-10、3-11、3-12..... 至 3-17 的全部序列也如是,直至包括在内的代表 SEQ ID NO:15 的核苷酸坐标 10-17 的序列。类似地,代表 SEQ ID NO:16 的核苷酸坐标 1-8、1-9、1-10、1-11..... 累加 1 个核苷酸直至核苷酸坐标 1-19 的序列皆构成了根据本发明的部分 SEQ ID NO:16,代表核苷酸坐标 2-9、2-10..... 的序列也如是,如上文所述。

[0272] 在将本发明付诸实施时,揭示出修饰型增强子 PPE-1 (3x) 包括连接至 SEQ ID NO:16 所示序列的 SEQ ID NO:15 所示序列,紧在其上游和下游侧接鼠内皮特异性增强子元件拷贝 (1×) (参见 SEQ ID NO:7)。因此,在一个优选实施方案中,本发明的顺式调节元件还包含至少一个拷贝的 SEQ ID NO:6 所示序列。在更优选实施方案中,所述顺式调节元件包

含至少两个拷贝的 SEQ ID NO :6 所示序列。在最优选实施方案中,本发明的顺式调节元件如 SEQ ID NO :7 所示。

[0273] 优选分离多核苷酸还包含内皮细胞特异性启动子序列元件。对本说明书和所附权利要求书来说,术语“启动子”指能够介导下游目标序列的 RNA 转录的任意多核苷酸序列。内皮特异性启动子元件可包括例如至少一个拷贝的 PPE-1 启动子。本发明的核酸构建体可使用的适宜启动子/增强子的实例包括内皮特异性启动子:前内皮素原 -1, PPE-1 启动子 (Harats D, J Clin Invest. 1995 Mar ;95(3) :1335-44), PPE-1-3x 启动子 [PCT/IL01/01059 ;Varda-Bloom N, Gene Ther 2001 Jun ;8(11) :819-27], TIE-1 (S79347, S79346) 和 TIE-2 (U53603) 启动子 [Sato TN, Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Oct 15 ;90(20) :9355-8], 内皮糖蛋白启动子 [Y11653 ;Rius C, Blood 1998 Dec 15 ;92(12) :4677-90], von Willebrand 因子 [AF 152417 ;Collins CJ Proc Natl Acad Sci U S A 1987 Jul ;84(13) :4393-7], KDR/flk-1 启动子 [X89777、X89776 ;Ronick V, Circ Res 1996 Aug ;79(2) :277-85], FLT-1 启动子 [D64016 AJ224863 ;Morishita K, J Biol Chem 1995 Nov 17 ;270(46) :27948-53], Egr-1 启动子 [AJ245926 ;Sukhatme VP, Oncogene Res 1987 Sep-Oct ;1(4) :343-55], E- 选择蛋白启动子 [Y12462 ;Collins T J Biol Chem 1991 Feb 5 ;266(4) :2466-73] ;内皮粘附分子启动子:ICAM-1 [X84737 ;Horley KJ EMBO J 1989 Oct ;8(10) :2889-96], VCAM-1 [M92431 ;Iademarco MF, J Biol Chem 1992 Aug 15 ;267(23) :16323-9], PECAM-1 [AJ313330 X96849 ;CD31, Newman PJ, Science 1990 Mar 9 ;247(4947) :1219-22], 血管平滑肌特异性元件:CArG 框 X53154 和主动脉羧肽酶样蛋白 (ACLP) 启动子 [AF332596 ;Layne MD, Circ Res. 2002 ;90 :728-736] 和主动脉优先表达基因 -1 [Yen-Hsu Chen J. Biol. Chem. , 276 卷, 第 50 期, 47658-47663, 2001 年 12 月 14 日]。其它合适的内皮特异性启动子在本领域众所周知,例如 EPCR 启动子 (Gu 等的美国专利第 6, 200, 751 号) 和 VEGF 启动子 (Williams 等的美国专利第 5, 916, 763 号)。

[0274] 本文使用的术语“血管生成调节剂”定义为能抑制或增强组织中的血管生成的分子或化合物。这样的血管生成调节剂可以是抗血管生成因子,例如血管生成的重要靶的拮抗剂,例如,内皮素受体,或血管生成因子,从而造成内皮特异性启动子活性的上调或下调。

[0275] 要认识到的是,其它非内皮启动子也可整合到上述分离多核苷酸中,以在多种组织中指导所需核酸序列表达。适用于本发明构建体的启动子在本领域众所周知。这些启动子包括但不限于病毒启动子 (例如逆转录病毒 ITR、LTR、立即早期病毒启动子 (IEp) (例如疱疹病毒 IEp (例如 ICP4-IEp 和 ICP0-IEp) 和巨细胞病毒 (CMV) IEp) 以及其它病毒启动子 (例如晚期病毒启动子、潜伏期活性启动子 (LAP)、劳斯肉瘤病毒 (RSV) 启动子和鼠白血病病毒 (MLV) 启动子))。其它合适的启动子是真核启动子,其包括增强子序列 (例如兔 β -珠蛋白调节元件)、组成型活性启动子 (例如 β 肌动蛋白启动子等)、信号和 / 或组织特异性启动子 (例如诱导型和 / 或阻遏型启动子,例如 TNF 或 RU486 反应性启动子、金属硫蛋白启动子、PSA 启动子等) 和肿瘤特异性启动子,例如端粒酶、丝束蛋白 (plastin) 和己糖激酶启动子。

[0276] 优选地,分离的多核苷酸还包含低氧反应元件,例如至少一个拷贝的 SEQ ID NO :5 所示序列。

[0277] 本发明的分离核酸序列可用于在真核组织中调节基因表达,且具体地说是在增殖

性内皮细胞（例如涉及血管生成的内皮细胞）中调节基因表达，或者可用于在静息内皮细胞中沉默（抑制）基因表达。

[0278] 因此，在一些情况下，可提供本发明的分离多核苷酸序列，作为核酸构建体的部分，所述核酸构建体还包含处于本发明的分离多核苷酸调节控制之下的核酸序列。本发明的核酸构建体还可包含另外的多核苷酸序列，例如编码选择标记或报告多肽的序列、编码细菌中的复制起点的序列、允许由单个 mRNA 翻译几种蛋白的序列（IRES）、用于启动子-嵌合多肽编码区的基因组整合的序列和 / 或一般包含在哺乳动物表达载体中的序列，所述哺乳动物表达载体例如为可得自 Invitrogen 的 pcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pZeoSV2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1；可得自 Promega 的 pCI；可得自 Stratagene 的 pBK-RSV 和 pBK-CMV；可得自 Clontech 的 pTRES，以及它们的衍生物。这样的核酸构建体优选构建用于哺乳动物细胞表达，且可为病毒来源的。适用于哺乳动物表达的核酸构建体的众多实例是本领域已知的；以下的实施例部分提供了几个此种构建体的其它细节。

[0279] 对本说明书和所附权利要求书来说，术语“处于……调节控制之下的核酸序列”指具有被 RNA 聚合酶转录的能力的任意多核苷酸序列，其转录可由顺式调节元件指导，例如本发明的顺式调节元件。该定义包括可翻译为多肽的编码序列以及反义 RNA、结合 DNA 的 RNA、核酶和并非注定会经历翻译的其它分子部分的序列。根据本发明的构建体可使用的核酸序列的实例为例如血管生成的正和负调节物，例如 VEGF、FGF-1、FGF-2、PDGF、促血管生成素-1 和促血管生成素-2、TGF- β 、IL-8（关于血管生成调节物的广泛清单，参见上文表 1）；细胞毒性药物；报告基因等。在优选实施方案中，所述核酸序列选自血管生成调节物 VEGF、p55、促血管生成素-1、bFGF 和 PDGF-BB。适于本发明的顺式调节元件控制的其它可转录核酸序列提供于下文和以下的实施例部分。

[0280] 下文提出的实施例表明，在全身体内施用后，本发明的新顺式调节元件可以在局部缺血和 / 或血管生成（增殖）性内皮组织中优先的方式将报告基因（GFP 和 LUC）表达可靠地引导至内皮组织。更有意义的是，所述实施例还表明，本发明的分离多核苷酸可用于在肿瘤、转移、局部缺血组织和 / 或血管生成组织中优先表达治疗基因，从而提供有关本发明的顺式调节元件及其衍生物在治疗应用中的重要性的直接证据。

[0281] 在一个实施方案中，本发明的核酸构建体用于上调组织中的血管生成，及治疗或预防与局部缺血相关的疾病或状况。这些可由增强的血管生成获益的疾病和状况在本领域众所周知，例如伤口愈合、缺血性中风、缺血性心脏病和胃肠损害。

[0282] 本文使用的术语“下调血管生成”指减缓或阻止导致新血管生成的血管生成过程。术语“上调血管生成”指增强休眠的或起最低作用的内皮细胞血管生成活化剂的表达。

[0283] 因此，本发明可用于基因治疗。本文使用的基因治疗指将目标遗传材料（例如 DNA 或 RNA）转移至宿主中，以治疗或预防遗传性或获得性疾病或状况或表型。目标遗传材料编码需要其在体内生产的产物（例如蛋白、多肽、肽、功能性 RNA、反义序列）。例如，目标遗传材料可编码有治疗价值的激素、受体、酶、多肽或肽。关于综述，一般参见教科书“Gene Therapy”（Advanced in Pharmacology 40, Academic Press, 1997）。

[0284] 已发展出基因治疗的两种基本方法：(1) 先体外后体内和 (2) 体内基因治疗。在先体外后体内基因治疗中，从患者取出细胞，在培养的同时体外处理。一般来说，经合适的

基因递送载体 / 方法 (转染、转导、同源重组等) 和符合需要的表达系统将功能替代基因导入细胞中,然后在培养物中扩增修饰型细胞,并将其返回宿主 / 患者中。业已表明,这些经遗传再植的细胞原位表达转染的遗传材料。

[0285] 在体内基因治疗中,不从受试者取出靶细胞,而是将待转移的遗传材料原位 (即处于接受者内) 导入到接受者生物细胞中。在替代实施方案中,如果宿主基因是缺陷型的,则所述基因被原位修复 (Culver,1998. (摘要)Antisense DNA & RNA based therapeutics,1998 年 2 月,Coronado, CA)。

[0286] 业已表明,这些基因改造细胞原位表达转染的遗传材料。

[0287] 基因表达载体能够将异源核酸递送 / 转移入宿主细胞中。表达载体可包含以本领域已知的细胞选择性方式控制核酸的靶向、表达和转录的元件。应当指出的是,经常可用表达载体的 5' UTR 和 / 或 3' UTR 替换所述基因的 5' UTR 和 / 或 3' UTR。因此,本文使用的表达载体根据需要可不包含待转移的实际基因的 5' UTR 和 / 或 3' UTR,而仅包含特定的氨基酸编码区。

[0288] 表达载体可包含控制异源材料转录的启动子,且可为组成型或诱导型启动子以允许选择性转录。任选地,可包括获得必需的转录水平可能需要的增强子。增强子一般为这样的任意非翻译 DNA 序列,其与编码序列邻接 (以顺式方式) 而起作用,以改变启动子控制的基础转录水平。表达载体还可包括如下文所述的选择基因。

[0289] 可通过本领域的多种已知方法中的任一种将载体导入细胞或组织中。这样的方法一般可见于 Sambrook 等, *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York 1989,1992) ;Ausubel 等, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland 1989) ;Chang 等, *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, MI 1995) ;Vega 等, *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor MI (1995), *Vectors :A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston MA 1988) ;和 Gilboa 等 (*Biotechniques* 4(6) :504-512,1986) 中的描述,且包括例如稳定或瞬时转染、脂转染、电穿孔和用重组病毒载体感染。另外,参见关于涉及中枢神经系统的载体的美国专利 4,866,042,还参见关于正 - 负选择方法的美国专利 5,464,764 和 5,487,992。

[0290] 通过感染导入核酸提供了几种超越其它列出的方法的优势。由于其感染特性可获得较高效率。而且,病毒是非常特化的,且通常在特定细胞类型中感染和繁殖。因此,其天然特异性可用于将载体靶向体内或组织中或混合细胞培养物中的特定细胞类型。还可利用特异性受体或配体修饰病毒载体,以通过受体介导的事件改变靶向特异性。

[0291] 导入并表达重组序列的 DNA 病毒载体的具体实例是腺病毒衍生载体 Adenov53TK。该载体表达用于正或负选择的疱疹病毒胸苷激酶 (TK) 基因和所需重组序列的表达盒。该载体可用于感染具有腺病毒受体的细胞,包括大部分上皮起源的癌症以及其它癌症。该载体以及表现出相似所需功能的其它载体可用于处理混合的细胞群,且其可包括例如体外或先体外后体内细胞培养物、组织或人受试者。

[0292] 还可包括限制特定细胞类型表达的特征。这样的特征包括例如对所需细胞类型特异性的启动子和调节元件。

[0293] 另外,重组病毒载体可用于所需核酸的体内表达,因为它们提供了诸如侧向感染

(lateral infection) 和靶向特异性的优势。侧向感染是例如逆转录病毒生活周期中固有的, 且是单个感染细胞产生许多子代病毒体的过程, 所述病毒体出芽并感染邻近细胞。结果是大量被快速感染, 其中大部分开始时未被原始病毒颗粒感染。这与垂直型感染相对照, 在垂直型感染中, 感染因子仅通过子代传播。还可产生不能侧向传播的病毒载体。如果所需目的是将特定基因导入仅局部化的大量靶细胞中, 则该特征可能有用。

[0294] 如上所述, 病毒是高度特化的感染因子, 其在许多情况下已进化得能避开宿主防御机制。通常, 病毒在特定细胞类型中感染和繁殖。病毒载体的靶向特异性利用其天然特异性, 以特异性地靶向预定的细胞类型, 且由此将重组基因导入被感染细胞中。本发明方法使用的载体将取决于被靶向的所需细胞类型, 且将是本领域技术人员已知的。例如, 如果要治疗乳腺癌, 则可使用对此种上皮细胞特异性的载体。同样, 如果要治疗造血系统的疾病或病理状况, 则可使用对血细胞及其前体特异性的病毒载体, 优选对特定类型的造血细胞特异性的病毒载体。

[0295] 可构建逆转录病毒载体, 以起感染性颗粒的作用, 或仅进行单次初始感染轮次。在前一种情况下, 修饰病毒基因组, 从而使得其保持合成新病毒蛋白和 RNA 的全部必需基因、调节序列和包装信号。一旦合成了这些分子, 宿主细胞就将 RNA 包装成新病毒颗粒, 新病毒颗粒能够进行更多轮的感染。还对载体基因组进行工程改造, 以编码和表达所需重组基因。对非感染性病毒载体来说, 通常使载体基因组突变, 以破坏将 RNA 被囊化到病毒颗粒中所需要的病毒包装信号。如果没有此信号, 形成的任何颗粒都将不含基因组, 且因此不能进行至随后轮次的感染。载体的具体类型将取决于预期用途。实际的载体也是已知的, 且在本领域容易获得, 或者可由本领域技术人员使用众所周知的方法构建。

[0296] 重组载体可以几种方式施用。例如, 如果使用病毒载体, 则所述程序可利用其靶向特异性, 并因此不必在患病部位局部施用。但是, 局部施用可提供更快速和更有效的治疗, 施用还可通过例如静脉内或皮下注射入受试者中实施。将病毒载体注射入脊髓液也可用作施用模式, 尤其是对神经变性疾病而言。在注射后, 病毒载体将循环, 直至它们识别具有适宜的感染靶向特异性的宿主细胞。

[0297] 在现有技术中基因治疗规程遇到的最常见问题是效力差和宿主对载体的免疫应答。效力差可能起因于所递送的材料不能进入细胞中、不能整合入基因组中或不能以合适水平表达。另外, 随着时间推移应答经常差。这意味着可能有利的再施用经常由于上述免疫应答而成问题。

[0298] 这样的治疗应用包括靶组织中的血管生成的增强和抑制。根据针对本发明顺式调节元件指导的核酸序列优先表达的细胞反应, 可产生导致血管生成增强的内皮细胞增殖, 或导致血管生成下降和局部缺血的内皮细胞增殖抑制。

[0299] 因此, 在本发明的核酸构建体中包含其表达有细胞毒性的核酸序列, 提供了在例如肿瘤的血管生成血管中将细胞死亡靶向快速增殖内皮细胞的方法。因为这样的载体可全身施用, 所以其可用于在发展中的转移病灶中有效诱导细胞死亡, 优于任何目前可获得的鉴别和定位这种转移扩散病灶的能力。

[0300] 这些可与本发明的构建体一起用于癌症基因治疗的治疗性核酸序列经常分类为目标在于恢复突变基因活性和控制的矫正性基因治疗、目标在于敏化抗癌细胞之免疫系统的免疫调节性基因治疗以及目标在于通过前药或毒性剂(自杀基因治疗)、促凋亡基因、抗

血管生成基因或增强化疗或放疗来杀伤癌细胞的细胞减少性基因治疗。适于与本发明的顺式调节元件一起用于矫正性基因治疗的核酸序列包括但不限于：p53 基因 (GenBank 登记号 BC018819)，其表达在癌细胞中受到抑制的抗癌性 DNA 稳定基因；Cip/Kip (p21, GenBank 登记号 NM000389)；和 p27, GenBank 登记号 NM004064) 和 Ink4 (p14, GenBank 登记号 NM058197)，细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂。适于与本发明的顺式调节元件一起用于抑制癌基因功能的核酸序列包括但不限于：干扰癌基因（例如 ras、myc、erbB2 和 bc1-2）转录和翻译的反义寡核苷酸以及干扰其翻译的催化性核酶。抗癌基因反义多核苷酸和核酶多核苷酸的合成和使用方法在本领域众所周知，且详述于例如 Roth 等的美国专利第 6,627,189 号、Bennet 等的美国专利第 6,265,216 号和 Calabretta 等的美国专利第 5,734,039 号，所有这些专利都完整地在此引入作为参考。制备和使用催化性抗癌基因核酶的方法描述于例如 Leopold 等的美国专利第 5,635,385 号，该专利完整地在此引入作为参考。

[0301] 在本发明的再一个实施方案中，在本发明的顺式调节元件控制下表达的核酸序列涉及免疫调谐基因表达，设计用于防止肿瘤细胞和转移细胞逃避免疫监视。编码适于与本发明的顺式调节元件一起使用的免疫调谐因子的核酸序列是细胞因子基因，用于增强细胞毒性 T 细胞识别肿瘤抗原和外源外来免疫原的胞内分子基因（以诱导非特异性局部免疫反应）。合适的免疫刺激因子包括但不限于人 IL-2、干扰素如人 α 、 β 或 γ 干扰素、人 T 细胞粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、人肿瘤坏死因子 (TNF) 和淋巴毒素 (TNF-b)。人 IL-2 基因已克隆并测序，且可作为例如 pBC12/HIV/IL-2 (可得自美国典型培养物保藏中心 (“ATCC”)，保藏号 67618) 的 0.68kB BamHI-HinDIII 片段获得。此外，人 β 干扰素、人 GM-CSF、人 TNF 和人淋巴毒素的序列是已知的并可获得的。具体地说，人 γ 干扰素的序列是已知的 (Fiers 等, (1982) *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 299:29-38)，且已登录于 GenBank，登记号 M25460。人 GM-CSF 的序列是已知的 (Wong 等 (1985) *Science* 228:810-815)，且已登录于 GenBank，登记号 M10663。人 TNF 序列业已描述 (Wang 等, (1985) *Science* 228:149-154)，且登录于 GenBank，登记号 M10988。人淋巴毒素 (TNF-b) 的序列也已公开 (Iris 等, (1993) *Nature Genet.* 3:137-145)，且登录于 GenBank，登记号 Z15026。

[0302] 在又一个实施方案中，在本发明的顺式调节元件控制下表达的核酸序列涉及细胞减少性基因治疗或通过直接或间接基因递送杀伤靶细胞。在一个优选实施方案中，核酸序列是细胞毒性基因，例如但不限于自杀基因，如 p53 和 egr-1-TNF- α ，用于药物易感性治疗的细胞毒性前药 / 酶，例如更昔洛韦 / 胸苷激酶和 5-氟胞嘧啶 / 胞嘧啶脱氨酶，以及抗转移基因，如 5E1A。具体细胞毒性构建体的实例详述于以下的实施例部分。

[0303] 在另一个实施方案中，在本发明的顺式调节元件控制下表达的核酸序列可涉及遗传放射性同位素治疗：将放射性标记的儿茶酚胺 I^{131} -间碘苄基胍摄取入表达去甲肾上腺素受体 (NAT) 的细胞中，是已确立的用于嗜铬细胞瘤、成神经细胞瘤、类癌瘤和甲状腺髓样癌的治疗形式。或者，钠碘同向转运蛋白 (symporter) (NIS) 介导碘摄取入正常和恶性甲状腺细胞中。业已报道，NIS 基因作为转基因在体外和体内模型中抑制前列腺癌。

[0304] 可使用相反的方法使组织再血管形成，例如在动脉粥样硬化患者中或在由于疾病或损伤（例如糖尿病）而罹患显著的外周循环损伤的患者中。在此情况下，可使用 AdPPE-1-3X-GF 型构建体，其中 GF 是生长因子（例如细胞因子）或其修饰物（例如 AdPPE-1-SEQ ID NO:7-GF）。用于本文上下文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 登记号 ;与 mus-AF162784 具有 99% 同一性) 和 EGR-1 (GenBank 登记号 M22326)、FGF (包括但不限于 GenBank 登记号 XM 003306) 及其组合。

[0305] 要认识到的是,优选按照本发明的该方面可使用超过一种血管生成因子,以避免已表明与单独施用 VEGF 相关的血管不成熟和血管退化的问题(关于进一步的细节,参见实施例部分的实施例 27 和 31)。联合治疗可模拟内皮通道出芽的第一阶段,以及随后募集平滑肌细胞以稳定新生血管 [Richardson DM 等, (2001) Nat. Biotechnol. 19 :1029-1034]。根据本发明该方面的联合治疗可通过将目标多核苷酸克隆在相同核酸构建体上实施,所述目标多核苷酸的每一个都处于本发明的分离核酸调节之下。备选地或优选地,目标多核苷酸的每一个都可分别克隆入本发明的核酸构建体中,由此使得能够对诱导的血管生成过程更紧密地调节。

[0306] 低氧反应元件(例如 SEQ ID NO :5)整合到本发明的启动子序列中也可用于本发明,以进一步增强对局部缺血组织的表达选择性,由此导致选定组织的新血管形成。随着血液供应改善,局部缺血减轻,低氧反应元件不再被诱导,GF 水平下降,且新血管形成过程被停止。

[0307] 应当认识到,使用本发明的核酸构建体对内皮组织进行基因治疗,提供了用不能靶向血管生成内皮细胞的其它方法不可达到的时序协调。如以下的实施例部分所阐述的,含本发明的新增强子元件[例如 PPE-1 (3x)]的顺式调节元件特异性地指导在经历血管增殖的组织中的重组基因表达增加,同时防止重组基因在其它非血管生成组织中表达(参见实施例 12、14、16、19、20、23、27、29、34 和 35)。在本发明的顺式调节元件和构建体转录控制下的治疗基因表达与基因产物所针对的细胞过程(血管生成性生长过程)的活化相一致,从而允许更高的效力和治疗所需的有效剂量显著下降。

[0308] 因此,预期含本发明的顺式调节元件的构建体在基因治疗背景中的使用可将向肿瘤的递送最大化,同时使对周围正常组织的毒性作用最小化。有意义的是,如在以下实施例部分中阐述的,即便在周围组织含内皮组分的情况下也是如此。这是因为即便在 PPE-1 启动子背景下,本发明的顺式调节元件也极大地提高了快速增殖的内皮组织中的表达水平,如实施例 16 所证实的。

[0309] 尽管下文提供的实施例具体涉及了本发明的顺式调节序列连同 PPE-1 启动子的用途,但预期本发明的增强子元件在与其它真核启动子序列一起使用时也将发挥其细胞特异性作用。

[0310] 这样的预期基于现有技术的观察结果,该结果表明,增强子元件经常是可移动的,即它们可由一个启动子序列转移至另一个不相关的启动子序列并仍保持活性。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)。实际上,Bu 等 (J. Biol Chem. (1997) 272 (19) : 32613-32622) 的早期工作强有力地表明,与本发明的那些增强子元件(例如含 SEQ ID No. 15 和 16 或 SEQ ID NO :6 的增强子)相关的增强子元件,可与组成型启动子如 SV-40 启动子一起使用。同样,包含经修饰以包含本发明增强子序列的真核启动子的构建体、使用经修饰以包含本发明增强子序列的真核启动子的方法和包含经修饰以包含本发明增强子序列的真核启动子的分离多核苷酸,完全在要求保护的本发明的范围内。

[0311] 因此,假定根据本发明的增强子元件的最小配置是含共价连接至至少部分 SEQ ID

NO:16 所示序列的至少部分 SEQ ID NO:15 所示序列的分离多核苷酸。预期该增强子与各种各样的启动子一起起作用,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,如来源于 CMV 和 SV40 的启动子。此增强子应当能够向各种各样的启动子赋予内皮特异性。所述增强子元件可被增大,例如通过加入一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:6 所示序列。这些额外的序列可邻接或非邻接地加入到 SEQ ID NO:8 序列中。

[0312] 本发明还包括在内皮细胞中表达目标核酸序列的方法,该方法使用依赖于增强子元件和启动子的构建体,所述增强子元件含共价连接至至少部分 SEQ ID NO:16 所示序列的至少部分 SEQ ID NO:15 所示序列,以将目标序列高水平表达特异性地导向内皮细胞。

[0313] 本文所用的“对从受试者身体取出的细胞先体外后体内施用并随后将所述细胞再导入所述受试者身体内”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。

[0314] 尽管在下文给出的实施例中描述的实验中使用腺病毒,但是本领域普通技术人员可容易地使本发明的构建体适合于其它病毒递送系统。

[0315] 含有内皮细胞特异性启动子的病毒载体也可以与其它方法联合使用,以增强所述病毒载体的靶向。这样的方法包括短肽配体和 / 或双特异性或双功能性分子或双抗体 (Nettelbeck 等, *Molecular Therapy* 3:882;2001)。

[0316] 要指出的是,在基因治疗背景下针对组织中表达的治疗性转基因的宿主免疫应答,在开发和设计有效的基因治疗规程方面是重要考虑因素。针对重组转基因产物的不利免疫应答既可干扰药物递送的效力,又可导致炎症、细胞毒性和疾病。因此,所表达的重组治疗性分子的抗原性潜力在基因治疗中极为重要。

[0317] 在将本发明付诸实施时,出乎意料地揭示出:作为 Ad5PPE-1 (3x) 核酸构建体的部分表达的人多肽 (TNF-R1) (实施例 41, 图 95b) 在小鼠中没有抗原性,且在宿主中不诱导显著的免疫应答,尽管明显存在针对施用处于 CMV 启动子控制下的 Fas-c 嵌合基因的抗 TNF-R1 应答 (图 95)。因此,本发明的分离多肽可用于降低或消除针对一种或多种内源表达的重组转基因产物的宿主免疫应答,这可通过在细胞中表达处于本发明的顺式调节元件转录控制下的重组转基因 (或基因) 来实现。优选地,所述顺式调节元件是 PPE-1 (3x) 启动子。

[0318] 在将本发明付诸实施时,令人惊奇地揭示出血管生成内皮特异性启动子 PPE-1 (3x) 响应于抗血管生成治疗的额外增强。图 94 表明,响应于施用双重内皮素受体 (ETA 和 ETB) 拮抗剂波生坦,在携带核酸构建体的转基因小鼠的高度血管形成器官 (主动脉、心脏、肺、气管和脑) 中的萤光素酶表达优先增强,其中所述核酸构建体含处于 PPE-1 (3x) 控制下的 LUC 报告转基因。抗血管生成治疗与处于本发明的顺式调节元件控制下的治疗性重组基因的转基因表达组合的这种协同作用,提供了先前未公开的药物靶向和降低的抗血管生成治疗剂量需求的可能性。尽管不希望受限于单一假设,但认为对抗血管生成治疗的内源组织反应,在经自分泌环活化内皮素启动子诱导物时,实际上增强了本发明核酸构建体的内皮素启动子元件。因此,在一个实施方案中,包含本发明的顺式调节元件的构建体与附加的抗血管生成治疗联合施用,其中选定的抗血管生成治疗能够诱导内皮特异性启动子活性的内源增强子。在本领域众所周知的抗血管生成治疗包括但不限于内皮

素受体拮抗剂如波生坦、VEGF 受体拮抗剂、制管张素和内皮抑制素以及抗血管生成抗体,例如贝伐单抗 (Bevacizumab) 和 Novast。

[0319] 另外,应当理解,包含本发明的顺式调节元件或具有内皮特异性启动子活性的其它顺式调节元件的构建体的施用,和能诱导内皮特异性启动子活性的这些附加疗法的组合,可以用于增加包含促血管生成序列的构建体的表达,从而增强血管生成活性,例如,在局部缺血状况的治疗中。

[0320] 在将本发明进一步付诸实施时,表明与 B- 形式特异性内皮素受体拮抗剂 (BQ788) 温育牛主动脉内皮细胞 (BAEC) 诱导内皮特异性启动子 [PPE-1 (3X)] 活性的增强,而暴露于 A- 形式内皮素受体激动剂 (BQ123) 对内皮素启动子活性没有作用 (图 96)。使用表达在 PPE-1 启动子控制下的萤光素酶基因的转基因小鼠的进一步实施已经表明,BQ-788 对 B- 形式内皮素受体的阻断导致增加的内皮素转录和循环血浆内皮素的增加 (图 97A 和 97B)。

[0321] 因而,在一个实施方案中,与附加疗法相组合地施用包含本发明的顺式调节元件的构建体,其中所述附加疗法是 B- 形式内皮素受体的阻断。这样的阻断可以通过非选择性的内皮素受体拮抗剂,例如、但不限于:波生坦;A-186086;Ro-61-6612;SB-209,670;SB-217,243;PD142,893;和 PD 145,065,或通过选择性的 B 亚型内皮素受体拮抗剂,例如、但不限于:A192,621;BQ788;Res 701-1 和 Ro 46-8443 (Sigma-Aldrich, Inc. StLouis, MO)。

[0322] 应当理解,宿主细胞对腺病毒载体感染的响应的减弱,可以提高在这样的载体中递送的编码重组蛋白的构建体的表达。最近,已经表明,皮质类固醇(地塞米松)施用可以预防有些免疫-和细胞凋亡-有关的重组腺病毒感染的内皮的损伤 (Murata, 等人 Arterioscler Thromb Vasc Biol2005;25:1796-803),从而抑制促炎基因表达和最优化体外和体内重组基因表达效率。显示了皮质类固醇对腺病毒中转基因表达的增强作用是特异性的,在内皮细胞中比在有些肿瘤细胞系中更显著。

[0323] 另外,最近已经表明,用 N- 乙酰半胱氨酸处理细胞 (Jornot 等人, Journal of Genetic Medicine 2002;4:54-65) 增强腺病毒-处理的内皮细胞中的转基因表达和病毒穿入。

[0324] 在将本发明付诸实施时,发现皮质类固醇治疗增强腺病毒介导的瞬时表达中转基因的表达式。在用表达在组成型 CMV 启动子控制下的萤光素酶的腺病毒构建体 (Ad-CMV-LUC) 感染之前用 3 μ M 地塞米松处理过的 BAEC 细胞中按照每 μ g 总蛋白的萤光素酶百分比测得的萤光素酶表达增加了超过 3 倍。另外,在用在内皮特异性启动子 PPE-1 控制下的携带报告基因绿色荧光蛋白 (GFP) 的腺病毒构建体感染之前用 3 μ M 地塞米松处理过的 BAEC 中的重组基因表达与未处理的对照相比显著增强 (参见下文实施例 42)。

[0325] 因而,在另一个实施方案中,与用于增加病毒颗粒的拷贝数和/或增强转导细胞中的转基因表达的其它一种或多种化合物组合地施用包含本发明的顺式调节元件的病毒构建体,其中所述其它一种或多种化合物是皮质类固醇(例如,例如地塞米松)和/或 N- 乙酰半胱氨酸 (NAC)。

[0326] 本发明的构建体和方法尤其适用于组织工程改造。VEGF 和 PDGF 常用于诱导血管形成,但是,这些因子以有效方式施用的方法仍不是最佳的。在体外,将所述生长因子加入到生长培养基中。在这种方法中需要相对较高的浓度。在体内,工程改造的组织构建体需要快速血管形成和诱导植入部位的血管生成。本发明的顺式调节元件和核酸构建体可用于

体内和先体外后体内的组织新血管形成,例如用于组织工程改造、伤口愈合处理等。在将本发明付诸实施时,首次证实处于 PPE-1 (3x) 调节控制下的血管生成因子优先在血管形成的体外工程改造组织中表达,且在体外和体内工程改造组织中提供优良的新血管形成。

[0327] 用 Ad5PPEC-1-3x VEGF 感染细胞对在工程改造构建体中形成的血管样结构的数目和大小具有诱导作用,从而导致与向培养基中加入 VEGF 相比,Ad5PPEC-1-3x VEGF 病毒处理样品中的血管数目和血管面积百分比增加至 4-5 倍(图 91a)。在体内研究中,分析基于植入支架的组织构建体的存活、分化、整合和血管形成。与对照构建体相比,用 Ad5PPEC-1-3x VEGF 病毒感染的构建体显示血管结构增加。

[0328] 因此,在一个优选实施方案中,本发明的核酸构建体用于调节组织中的血管生成,所述组织是天然组织或工程改造组织。

[0329] 使用基于萤光素酶的成像系统,本发明的发明人揭示,用 Ad5PPEC-1-3x VEGF 感染的植入构建体具有比仅用 AAV-萤光素酶感染的对照构建体更高的信号,从而表明用 Ad5PPEC-1-3x VEGF 体外感染可提升所植入的工程改造组织构建体的存活和血管形成(图 91b)。此外,含用本发明的腺病毒构建体转导的细胞的这种工程改造组织构建体可经细胞裂解,构成用于周围组织的治疗性的重组病毒颗粒来源。

[0330] 因此,按照本发明的一个方面,提供含本发明的核酸构建体的细胞。按照本发明的另一方面,这些细胞用于接种待用支架,例如用于组织工程改造。使用支架进行组织工程改造的方法在本领域众所周知(参见例如美国专利第 6,753,181、6,652,583、6,497,725、6,479,064、6,438,802、6,376,244、6,206,917、6,783,776、6,576,265、6,521,750、6,444,803、6,300,127、6,183,737、6,110,480、6,027,743 和 5,906,827 号,以及美国专利申请第 0040044403、0030215945、0030194802、0030180268、0030124099、0020160510、0020102727 号,这些文献在此引入作为参考,所有这些文献都教导了组织支架上工程改造组织的产生)。合适的支架可由合成聚合物、细胞粘附分子或胞外基质蛋白组成。

[0331] 本发明使用的细胞粘附/ECM 蛋白可为任何细胞粘附和/或胞外基质蛋白,包括但不限于血纤蛋白原、胶原蛋白、整联蛋白(Stefanidakis M 等,2003;J Biol Chem. 278:34674-84)、细胞间粘附分子(ICAM)1(van deStolpe A 和 van der Saag PT.1996;J.Mol. Med. 74:13-33)、生腱蛋白、纤连蛋白(Joshi P 等,1993;J. Cell Sci. 106:389-400)、波形蛋白、微管相关蛋白 1D(Theodosis DT.2002;Front Neuroendocrinol. 23:101-35)、gicerin、神经突增生因子(NOF)(Tsukamoto Y 等,2001;Histol.Histopathol. 16:563-71)、聚羟基链烷酸酯(PHA)、细菌纤维素(BC)、明胶和/或神经损伤诱导蛋白 2(ninjurin 2)(Araki T 和 Milbrandt J.2000;J.Neurosci. 20:187-95)。

[0332] 本发明使用的合成聚合物可为聚乙二醇(PEG)、羟基磷灰石(HA)、聚乙醇酸(PGA)(Freed LE, Biotechnology(N Y).1994 Jul;12(7):689-93.)、用编织聚-1-交酯加固的 ϵ -己内酯和 1-乳酸[KN-PCLA](Ozawa T 等,2002;J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 124:1157-64)、织物(WV-PCLA)[Ozawa,2002(出处同上)]、互连多孔羟基磷灰石钙陶瓷(IP-CHA)、聚 D, L, -乳酸-聚乙二醇(PLA-PEG)(Kaito T 等,2005;Biomaterials. 26:73-9)、不饱和聚酯(丙二醇-富马酸)共聚物(PPF)(Trantolo DJ 等,2003;Int. J. Oral Maxillofac. Implants. 18:182-8)、交酯-乙交酯共聚物(PLAGA)(Lu HH 等,2003;J. Biomed. Mater. Res. 64A(3):465-74)、聚-4-羟基丁酸酯(P4HB)和/或聚磷腈(Cohen S

等,1993 ;Clin. Mater. 13(1-4) :3-10)。

[0333] 在将本发明付诸实施时,本发明的发明人已揭示,将促凋亡试剂的组织特异性表达与特异性活化组合使得能够选择性地使参与血管生成的细胞凋亡,而不使非靶组织或细胞接触这些试剂,从而避免了现有技术中的治疗方法特有的毒性副作用和冗余现象。

[0334] 因此,按照本发明的一个方面,提供在受试者组织中下调血管生成的方法。此处所用的短语“下调血管生成”指减缓或者阻止导致新血管生成的血管生成过程。

[0335] 本发明该方面的方法通过向受试者施用经设计并构建用于血管生成细胞亚群中的细胞毒性的核酸构建体来实现。此处所用的短语“血管生成细胞”指参与或有助于血管生成过程的任何细胞。因此,血管生成细胞包括但不限于内皮细胞、平滑肌细胞。

[0336] 本文使用的术语“细胞毒性”指化合物或过程以潜在不可逆的方式破坏细胞的正常代谢、功能和 / 或结构、更经常导致细胞死亡的能力。“细胞毒性分子”在本文定义为在限定条件下具有在细胞中产生细胞毒性或诱导细胞毒性过程或途径的能力的分子。这样的细胞毒性分子包括细胞毒性药物,例如但不限于抗代谢物,如氨甲蝶呤、核苷类似物、氮芥化合物、蒽环类、凋亡诱导物如胱天蛋白酶以及编码细胞毒性药物和细胞毒性过程的其它诱导物的基因例如 Fas-c 嵌合基因。细胞毒性药物和分子可为绝对细胞毒性的,与其它因子无关,例如抗代谢药物;或者可为条件型细胞毒性的,依赖于其它细胞毒性或非细胞毒性因子的相互作用。产生细胞毒性的结构域定义为细胞毒性分子中能够诱导或启动细胞毒性的部分,例如细胞毒性基因的编码序列。细胞毒性途径尤其包括凋亡和坏死。

[0337] 在本发明的一个优选实施方案中,细胞毒性剂的表达针对血管生成细胞亚群。为了将细胞毒性剂的特异性表达引导至血管生成细胞亚群,本发明的核酸构建体包含编码嵌合多肽的第一多核苷酸区,所述嵌合多肽包含配体结合结构域,其例如可为受体酪氨酸激酶、受体丝氨酸激酶、受体苏氨酸激酶、细胞粘附分子或磷酸酶受体的细胞表面受体结构域,该细胞表面受体结构域融合至细胞毒性分子(例如 Fas、TNFR 和 TRAIL)的效应物结构域。

[0338] 这样的嵌合多肽可包括融合至任意细胞毒性结构域的任何配体结合结构域,只要配体结合结构域的活化(即经配体结合)通过细胞毒性分子的效应物结构域触发细胞毒性。

[0339] 配体结合结构域和与之融合的产生细胞毒性的结构域的选择根据被靶向用于凋亡的血管生成细胞类型受影响。例如,当靶向特定的内皮细胞亚群(例如增殖的内皮细胞或表现出肿瘤表型的内皮细胞)时,嵌合多肽包含配体结合结构域,所述配体结合结构域能够结合天然存在于该内皮细胞的环境中并优选不存在于其它非靶向组织的内皮细胞中的配体(例如 TNF、VEGF)。这样的配体可由内皮细胞分泌(自分泌)、由邻近的肿瘤细胞分泌(旁分泌)或特异性地靶向这些内皮细胞。

[0340] 在上文、以及以下的实施例部分的实施例 7 和 33-36 中提供了合适的嵌合多肽的实例。优选地,嵌合多肽为详述于以下的实施例部分的实施例 7-9 中的 Fas-c 嵌合体,或描述于实施例 33-36 的 HSV-TK 基因。业已表明,Fas-c 嵌合体的表达经 FADD 介导的 Fas 死亡途径的活化来诱导凋亡。HSV-TK 转基因的表达导致转导细胞对药物(例如更昔洛韦和阿昔洛韦)的超敏感性,从而导致凋亡和坏死性细胞死亡。

[0341] 使用这样的嵌合多肽是特别有利的,因为如后文的实施例部分所示,其使得能在

特定的血管生成细胞亚群中有效和有力地活化细胞毒性,同时避免在其它不被细胞死亡靶向的细胞亚群中活化。

[0342] 如在以下的实施例部分的实施例 33-38 中所阐述的,体外和体内施用本发明的核酸构建体(包括处于 PPE-1 (3x) 启动子元件的转录控制之下的 HSV-TK 基因),产生优良的、更昔洛韦依赖性的内皮细胞细胞毒性。细胞毒性限于血管生成内皮细胞,在肿瘤和转移中产生选择性的凋亡性和坏死性细胞死亡。

[0343] 因此,本发明的核酸构建体可用于递送能够将前药转变为毒性化合物的自杀基因。在一个优选实施方案中,所述核酸构建体包括编码此自杀基因的第一多核苷酸区和编码能够指导所述自杀基因在血管生成细胞中表达的顺式作用调节元件的第二多核苷酸区。

[0344] 在本发明的构建体和方法中,治疗性核酸序列或“自杀基因”是编码产物的核酸,其中所述产物通过其自身或在其它化合物存在下引起细胞死亡。要认识到的是,上述构建体仅代表自杀构建体的一个实例。其它实例是水痘带状疱疹病毒胸苷激酶和可将 5- 氟胞嘧啶转变为高度毒性的化合物 5- 氟尿嘧啶的细菌基因胞嘧啶脱氨酶。

[0345] 本文使用的“前药”指可用于本发明方法的、可转变为毒性产物(即对肿瘤细胞有毒性)的任意化合物。所述前药通过用于本发明方法的载体中的治疗性核酸序列(自杀基因)的基因产物转变为毒性产物。此前药的代表性实例是更昔洛韦,其通过 HSV- 胸苷激酶在体内转变为毒性化合物。更昔洛韦衍生物随后对肿瘤细胞有毒性。前药的其它代表性实例包括阿昔洛韦、FIAU[1-(2- 脱氧 -2- 氟 - β -D- 呋喃型阿糖基)-5- 碘尿嘧啶]、用于 VZV-TK 的 6- 甲氧基嘌呤阿糖胞苷以及用于胞嘧啶脱氨酶的 5- 氟胞嘧啶。优选的自杀基因 / 前药组合是细菌胞嘧啶脱氨酶和 5- 氟胞嘧啶及其衍生物、水痘带状疱疹病毒 TK 和 6- 甲基嘌呤阿糖胞苷及其衍生物、HSV-TK 和更昔洛韦、阿昔洛韦、FIAU 或其衍生物。制备和使用自杀基因 / 前药构建体的方法详述于 Woo 等的美国专利第 6,066,624 号以及下文的实施例部分。

[0346] 在一个优选实施方案中,顺式作用调节元件是内皮或内皮周特异性启动子。因为用条件复制型腺病毒载体转导细胞明显在靶细胞裂解和病毒感染传播方面更有效,所以核酸构建体优选包括条件复制型腺病毒。本发明的这种 CRAD 构建体详述于以下的实施例部分。

[0347] 在将本发明付诸实施时,发现在本发明的顺式作用调节元件转录控制下的 CRAD 构建体在体外选择性抑制血管生成上皮细胞中的生长和发育和体内治疗与过度新血管形成相关的疾病和状况中有效。如实施例 43 所示,修饰的 CRAD 构建体体内有效降低内皮细胞生存力(降低 90%),而不降低非内皮细胞生存力,并且在体外 matrigel 测定中选择性抑制血管生成中类似地有效,在所述修饰的 CRAD 构建体中,已由修饰的前内皮素原 -1 启动子 PPE-1 3X 取代 E1 启动子。实施例 44 显示,尽管将高剂量的相同 CRAD 构建体全身施用于大鼠对于体重减轻或肝毒性没有显著作用,但与施用对照腺病毒无效相比,LCRT 转移瘤模型中的转移负荷在 CRAD 处理动物中降低超过 50%。

[0348] 因此,将腺病毒置于修饰的前内皮素原启动子(例如 PPE-1 3X)的转录控制下,产生表达的高度血管生成特异性,并且可以采用到为转移、肿瘤和癌症相关状况的治疗提供新的和有力的解决方案。可以如上文详细描述的和目的序列连接,或者如下文实施例 43 和 44 所述,以缺乏目的序列的病毒构建体形式,提供这种血管生成特异性 CRAD 构建体。可

以如此处所述制备和施用这种含病毒多核苷酸以及包含其的构建体。此外,可以将本发明的修饰的 CRAD 与其它已知增强或加强病毒在感染的上皮细胞中表达的化合物(例如内皮素-1 受体拮抗剂、皮质类固醇和 N-乙酰半胱氨酸)一起施用。

[0349] 因此,提供分离的多核苷酸,该多核苷酸含有与顺式调节元件在转录上连接的条件复制型腺病毒,所述顺式调节元件能够指导腺病毒在血管生成内皮细胞中的转录。根据本发明的一个方面,该多核苷酸含有与所述顺式调节元件在转录上连接的条件复制型腺病毒,并且进一步缺乏编码促血管生成剂和/或抗血管生成剂(例如细胞毒剂、促凋亡剂等)的异源性非病毒序列。顺式调节元件可以是内皮启动子,例如修饰的 PPE-13X 启动子,优选整合血管生成内皮控制元件,该控制元件含有的多核苷酸具有 SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:16 中所述序列,更优选另外含有 SEQ ID NO:6 的至少一个拷贝,最优选整合 SEQ ID NO:7 中所述序列。可以将这种血管生成特异性构建体用于治疗以过度血管生成作为特征的状况,例如癌症、转移性疾病、肿瘤生长、牛皮癣、动脉粥样硬化等,以及用于下调血管生成的组合物和方法中。

[0350] 优选地,本发明的核酸构建体通过例如全身施用途径或经口、直肠、跨粘膜(尤其是经鼻)、肠或肠胃外施用途径施用于受试者。全身施用包括肌肉内、皮下和髓内注射以及鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内、眼内注射或瘤内施用。

[0351] 优选地,所述受试者是哺乳动物,更优选是人,最优选是患有特征为过度或异常新血管形成的疾病的人,所述疾病例如为以肿瘤生长、增生性糖尿病性视网膜病、关节炎等为特征的疾病。

[0352] 本发明的核酸构建体可以自身或作为药物组合物的部分(活性成分)施用于受试者。

[0353] 现有技术教导了多种递送策略,其可用于向多种细胞类型有效递送裸的或载体提供的多核苷酸(参见例如 Luft(1998)J Mol Med 76(2):75-6;Kronenwett 等,(1998)Blood 91(3):852-62;Rajur 等,(1997)Bioconj Chem 8(6):935-40;Lavigne 等,(1997)Biochem Biophys Res Commun 237(3):566-71 和 Aoki 等,(1997)Biochem Biophys Res Commun 231(3):540-5)。

[0354] 本文所用的“药物组合物”指本文所述的一种或多种活性成分或试剂与其它化学组分(如生理学适宜的载体或赋形剂)的制剂。药物组合物的目的在于便于将化合物施用于生物。

[0355] 在下文中,短语“生理学可接受的载体”和“药学可接受的载体”可互换使用,指不对生物造成明显刺激、且不取消所施用的核酸构建体之生物活性和特性的载体或稀释剂。佐剂包含在这些短语之中。

[0356] 术语“赋形剂”在本文中指添加到药物组合物中以进一步促进活性成分施用的惰性物质。赋形剂的非限制性实例包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各类淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0357] 药物的配制和施用技术可参见“Remington's Pharmaceutical Sciences,”Mack Publishing Co., Easton, PA, 最新版,其在此引入作为参考。

[0358] 适宜的施用途径可包括例如经口、直肠、跨粘膜(尤其是经鼻)、肠或肠胃外递送,包括肌肉内、皮下和髓内注射以及鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内或眼内注射。

[0359] 或者,人们可将所述药物组合物以局部方式而非全身方式施用,例如经由将所述药物组合物直接注射到患者的组织区域内。在本发明上下文中,直接施用于肿瘤组织是局部施用的相关实例。

[0360] 本发明的药物组合物可以利用本领域已知的方法制造,例如通过传统的混合、溶解、造粒、裹覆糖衣片(dragee-making)、研磨、乳化、被囊化、包载或冻干方法。

[0361] 因此,按照本发明使用的药物组合物可通过传统方式用一种或多种生理学可接受的、含赋形剂和助剂的载体配制,所述载体有助于将活性成分加工到药学可用的制剂中。适当的制剂取决于所选的施用途径。

[0362] 对于注射,药物组合物的活性成分可配制在水溶液中,优选地配制在生理学相容的缓冲液中,比如 Hank 氏溶液、林格液或生理盐缓冲液。对于跨粘膜施用,在制剂中应用适合于待透过屏障的渗透剂。这种渗透剂在本领域通常是已知的。

[0363] 对于经口施用,所述药物组合物可容易地通过将活性化合物与本领域众所周知的药学上可接受的载体组合配制。所述载体使得能够将药物组合物配制成片剂、丸剂、糖衣片、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆、悬浮液等用于由病人口服。经口使用的药学制剂可利用固体赋形剂制造,任选地将所得混合物研磨,且在根据需要加入适当助剂后加工颗粒混合物,以获得片剂或糖衣片核。适宜的赋形剂具体地说是填料,例如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇;纤维素制剂,例如玉米淀粉、小麦淀粉、稻淀粉、马铃薯淀粉、明胶、西黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠;和/或生理学可接受的聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。需要时可以添加崩解剂,如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、或藻酸或其盐,如藻酸钠。

[0364] 为糖衣片核提供适当的包衣。为此目的,可使用浓缩糖溶液,其任选地可包含阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波泊尔凝胶、聚乙二醇、二氧化钛、漆溶液和适当的有机溶剂或溶剂混合物。可向片剂或糖衣片包衣添加着色剂或色素,以鉴别或表征不同的活性化合物剂量的组合。

[0365] 可经口使用的药物组合物包括由明胶制成的推入契合(push-fit)胶囊,以及由明胶和增塑剂(如甘油或山梨糖醇)制成的密封软胶囊。推入契合胶囊可包含活性成分,其与填料(如乳糖)、粘合剂(如淀粉)、润滑剂(如滑石或硬脂酸镁)和任选的稳定剂混合。在软胶囊中,所述活性成分可溶解或悬浮在合适的液体中,如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。另外,可添加稳定剂。所有经口施用的制剂都应适于选定施用途径的剂量。

[0366] 对于口腔含化施用,所述组合物可采用以常规方式配制的片剂或糖锭形式。

[0367] 对于经鼻吸入施用,按照本发明使用的活性成分可方便地以气溶胶喷雾剂形式递送,所述气溶胶喷雾剂由加压包装或喷雾器使用适当的推进剂如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷或二氧化碳提供。对于加压气溶胶,剂量单位可通过提供阀确定以递送计量的量。分配器中所用的胶囊和药液筒(例如明胶)可配制成包含所述化合物和适当的粉末基质(例如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0368] 本文所述的药物组合物可被配制用于肠胃外施用,例如快速浓注或连续输注。注射用制剂可以单位剂型提供,例如在安瓿中或多剂容器中,任选地添加防腐剂。所述组合物可为在油性或水性载体中的悬浮液、溶液或乳剂,且可包含例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂的配制试剂。

[0369] 用于肠胃外施用的药物组合物包括为水溶性形式的活性制剂水溶液。另外，活性成分的悬浮液可制成合适的油性或水基注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油如芝麻油，或合成脂肪酸酯，如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。水性注射悬浮液可包含增加悬浮液粘性的物质，如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。任选地，所述悬浮液还可包含合适的稳定剂或增加活性成分溶解性的试剂，以使得可以制成高浓缩溶液。

[0370] 或者，所述活性成分可为粉末形式，用于在使用前用适当的载体如无菌无致热原水基溶液进行构建。

[0371] 还可以利用例如传统的栓剂基材如可可脂或其它甘油酯将本发明的药物组合物配制成直肠组合物，例如栓剂或滞留型灌肠剂。

[0372] 适用于本发明上下文的药物组合物包括其中含有有效实现预期目的的量的活性成分的组合物。更具体地说，治疗有效量指有效阻止、减轻或改善疾病症状（例如进行性骨量损失）或延长治疗受试者存活的活性成分（例如反义寡核苷酸）的量。

[0373] 治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力内，尤其是在依照本文提供的详细公开内容的情况下。

[0374] 对于用于本发明方法的任何制剂，所述治疗有效量或治疗有效剂量首先可由体外和细胞培养测定估测。例如，可在动物模型如骨硬化病的鼠 Src 缺陷模型中配制剂量（Boyce 等，(1992) J. Clin. Invest. 90, 1622-1627 ;Lowe 等，(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 4485-4489 ;Soriano 等，(1991) Cell 64, 693-702），以达到所需的浓度或滴度。这样的信息可用于更准确地确定人中的有用剂量。

[0375] 本文所述的活性成分的毒性、细胞毒性和治疗功效可通过标准的药学程序在体外、细胞培养物或实验动物中确定。从这些体外和细胞培养测定以及动物研究中获得的数据可用于配制一系列人用剂量。所述剂量可根据所用剂型和所用施用途径变化。精确的制剂、施用途径和剂量可由个别医师根据病人的状况选择。（参见例如 Fingl 等，1975，载于“*The Pharmacological Basis of Therapeutics*”，第一章第 1 页）。

[0376] 剂量和间隔可被单独调整到足以阻碍肿瘤进展的活性成分水平（最低有效浓度，MEC）。MEC 将随各个制剂变化，但可由体外数据估测。达到 MEC 所必需的剂量将取决于个体特征和施用途径。可利用检测测定确定血浆浓度。

[0377] 根据被治疗状况的严重性和反应性，给药可以是单次或多次施用，疗程持续几天到几周或实现疾病状态减轻。

[0378] 所施用组合物的量当然将取决于治疗受试者、病痛严重程度、施用方式、处方医师的判断等等。

[0379] 需要时，本发明的组合物可以在包装或分配装置中提供，例如经 FDA 核准的试剂盒，其可包括含有活性成分的一个或多个单位剂型。例如，所述包装可包括金属或塑料箔，例如泡罩包装。所述包装或分配器装置可随附施用说明书。所述包装或分配器还可提供有管理药品生产、使用或销售的政府机构规定形式的伴随容器的通知书，该通知书反映了该政府机构对所述组合物形式或人或兽医施用的批准。此通知书例如可为经美国食品和药品管理局（U.S. Food and Drug Administration）批准的处方药标签，或者可为批准产品的插页。还可以制备含有在相容药学载体中配制的本发明制剂的组合物，其放置在合适的容器中，且标识出治疗指定状况，如上文的进一步详述一样。

[0380] 本发明的药物组合物可进一步包括任何附加成分,所述附加成分可改善细胞对所述核酸构建体的摄取,提升由所述核酸构建体编码的嵌合多肽或自杀基因在细胞中的表达,或提升所表达的嵌合多肽或自杀基因产物的活性。

[0381] 例如,用工程改造抗体或小肽处理载体可提高腺病毒载体向 EC 细胞中的摄取。这样的“腺体 (adenobody)”治疗显示出将腺病毒构建体有效导向细胞上的 EGF 受体 (Watkins 等,1997, Gene Therapy 4 :1004-1012)。另外, Nicklin 等已表明,通过噬菌体展示分离的小肽增加了载体在内皮细胞中的特异性和效率,且降低了在培养物肝细胞中的表达 (Nicklin 等,2000, Circulation 102 :231-237)。在最近的研究中, FGF 再靶向的腺病毒载体降低了 tk 在小鼠中的毒性 (Printz 等,2000, Human Gene Therapy 11 :191-204)。

[0382] 业已表明,低剂量辐射主要在 G2/M 期引起 DNA 链断裂,引起细胞膜损伤,从而增强旁观者效应,且由此在联合施用时可加强其它细胞毒性和抗癌治疗。血管内皮细胞尤其适合于这样的联合或附加治疗,因为已证实低剂量辐射特异性地靶向微血管内皮细胞的凋亡系统 (Kolesnick 等, Oncogene 2003 ;22 :5897-906)。业已表明制管张素加强低剂量辐射的疗效 (Gorski 等, Can Res 1998 ;58 :5686-89)。但是,对辐射的作用仍了解不多,因为也已经表明辐射增加促血管生成性“组织修复因子” (Itasaka 等, Am Assoc Canc Res, 2003 ;摘要 115)。类似地,已表明某些化疗剂活化特定细胞毒性和凋亡途径 [阿霉素、顺铂和丝裂霉素 C 诱导 Fas 受体、FADD 和 FADD/MORT-1 途径中的其它促凋亡信号累积 (Micheau 等, BBRC 1999 256 :603-07)]。在将本发明付诸实施时,令人惊奇地揭示出,低剂量辐射治疗对核酸构建体 (包括处于 PPE-1 (3x) 控制下的 TK 和更昔洛韦施用) 的抗肿瘤和抗转移有效性具有明显的协同作用 (实施例 35 和 36, 图 79-86)。这在本发明上下文中是特别有关联的,因为已证实这样的低剂量辐射可活化 TK 表达和疗效,可特异性地加强阿霉素化疗作用,并已知活化 FADD/MORT-1 凋亡途径 (Kim 等, JBC 2002 ;277 :38855-62)。

[0383] 此联合治疗的效力的进一步证据描述于实施例 37, 该实施例阐述了在内皮细胞 (BAEC) 中联合施用阿霉素和 AdPPE-1 (3x) -Fas-c 嵌合构建体的协同作用 (图 91)。因此,对于与异常血管生成相关的疾病或状况,可使用本发明的核酸构建体和含其的药物组合物单独地或与一种或多种针对该疾病的其它确立的或实验性治疗方案联合进行治疗。适于与本发明的核酸构建体或编码其的多核苷酸联合的治疗癌症的治疗方案包括但不限于化学疗法、放射疗法、光线疗法和光动力学治疗、外科手术、营养疗法、切除疗法、联合的放射疗法和化学疗法、臂疗法 (brachiotherapy)、质子射束疗法、免疫疗法、细胞疗法和质子射束放射外科手术疗法。

[0384] 可与本发明的化合物共同施用的抗癌药物包括但不限于异噻唑醋酸 (Acivicin)、阿柔比星 (Aclarubicin)、盐酸阿可达唑 (Acodazole Hydrochloride)、阿克罗宁 (Acronine)、亚得里亚霉素 (Adriamycin)、阿多来新 (Adozelesin)、阿地白介素 (Aldesleukin)、六甲密胺 (Altretamine)、丙氨肽霉素 (Ambomycin)、阿美坦醌 (Ametantrone Acetate)、氨鲁米特 (Aminoglutethimide)、安吡啶 (Amsacrine)、阿那曲唑 (Anastrozole)、氨茴霉素 (Anthramycin)、天冬酰胺酶 (Asparaginase)、曲林菌素 (Asperlin)、氮杂胞苷 (Azacitidine)、阿扎替派 (Azetepa)、阿佐霉素 (Azotomycin)、巴马司他 (Batimastat)、苯佐替派 (Benzodepa)、比卡鲁胺 (Bicalutamide)、盐酸比桑郡 (Bisantrene Hydrochloride)、二甲磺酸双奈法德 (Bisnafide Dimesylate)、比

折来新 (Bizelesin)、硫酸博来霉素 (Bleomycin Sulfate)、白瑞夸尔钠 (Brequinar Sodium)、溴匹利明 (Bropirimine)、白消安 (Busulfan)、放线菌素 C (Cactinomycin)、卡鲁睾酮 (Calusterone)、卡拉酰胺 (Caracemide)、卡贝替姆 (Carbetimer)、卡铂 (Carboplatin)、卡莫司汀 (Carmustine)、盐酸卡米诺霉素 (Carubicin Hydrochloride)、卡折来新 (Carzelesin)、西地芬戈 (Cedefingol)、苯丁酸氮芥 (Chlorambucil)、西罗里霉素 (Cirolemycin)、顺铂 (Cisplatin)、克拉屈滨 (Cladribine)、甲磺酸克雷斯托 (Crisnatol Mesylate)、环磷酰胺 (Cyclophosphamide)、阿糖胞苷 (Cytarabine)、达卡巴嗪 (Dacarbazine)、放线菌素 D (Dactinomycin)、盐酸柔红霉素 (Daunorubicin Hydrochloride)、脱氧氮杂胞苷 (Decitabine)、右奥马铂 (Dexormaplatin)、地扎胍宁 (Dezaguanine)、甲磺酸地扎胍宁 (Dezaguanine Mesylate)、地吡酮 (Diaziquone)、多西他赛 (Docetaxel)、阿霉素 (Doxorubicin)、盐酸阿霉素 (Doxorubicin Hydrochloride)、屈洛西芬 (Droloxifene)、柠檬酸屈洛西芬 (Droloxifene Citrate)、丙酸 2- 甲氢睾酮 (Dromostanolone Propionate)、偶氮霉素 (Duazomycin)、依达曲沙 (Edatrexate)、盐酸艾佛鸟氨酸 (Eflornithine Hydrochloride)、依沙芦星 (Elsamitrucin)、恩络铂 (Enloplatin)、恩普氨酯 (Enpromate)、依匹哌啉 (Epiropidine)、盐酸表阿霉素 (Epirubicin Hydrochloride)、厄布洛唑 (Erbulozole)、盐酸去羟阿霉素 (Esorubicin Hydrochloride)、雌莫司汀 (Estramustine)、雌莫司汀磷酸钠 (Estramustine Phosphate Sodium)、依他硝唑 (Etanidazole)、依托泊苷 (Etoposide)、磷酸依托泊苷 (Etoposide Phosphate)、氯苯乙嘧啶 (Etoprine)、盐酸法罗唑啉 (Fadrozole Hydrochloride)、法扎拉滨 (Fazarabine)、芬维 A 胺 (Fenretinide)、氟尿苷 (Floxuridine)、磷酸氟达拉滨 (Fludarabine Phosphate)、氟尿嘧啶 (Fluorouracil)、氟西他宾 (Fluorocitabine)、磷喹酮 (Fosquidone)、福司曲辛钠 (Fostriecin Sodium)、吉西他滨 (Gemcitabine)、盐酸吉西他滨 (Gemcitabine Hydrochloride)、羟基脲 (Hydroxyurea)、盐酸去甲柔毛霉素 (Idarubicin Hydrochloride)、异环磷酰胺 (Ifosfamide)、伊莫佛新 (Ilmofosine)、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 α -n1、干扰素 α -n3、干扰素 β -1a、干扰素 γ -1b、异丙铂 (Iproplatin)、盐酸伊立替康 (Irinotecan Hydrochloride)、生长妥林 (Lanreotide Acetate)、来曲唑 (Letrozole)、醋酸亮丙瑞林 (Leuprolide Acetate)、盐酸利阿唑 (Liarozole Hydrochloride)、洛美曲索钠 (Lometrexol Sodium)、洛莫氮芥 (Lomustine)、盐酸洛索蒽醌 (Losoxantrone Hydrochloride)、马丙考 (Masoprocol)、美登素 (Maytansine)、盐酸氮芥 (Mechlorethamine Hydrochloride)、醋酸甲地孕酮 (Megestrol Acetate)、醋酸美仑孕酮 (Melengestrol Acetate)、美法仑 (Melphalan)、美洛格端 (Menogaril)、巯嘌呤 (Mercaptopurine)、甲氨蝶呤 (Methotrexate)、甲氨蝶呤钠 (Methotrexate Sodium)、氯苯氨啉 (Metoprine)、四甲尿烷亚胺 (Meturedapa)、米汀多酰胺 (Mitindomide)、米托克星 (Mitocarcin)、丝裂红素 (Mitocromin)、丝裂吉菌素 (Mitogillin)、丝裂马菌素 (Mitomalcin)、丝裂霉素 (Mitomycin)、丝裂帕菌素 (Mitosper)、米托坦 (Mitotane)、盐酸米托蒽醌 (Mitoxantrone Hydrochloride)、麦考酚酸 (Mycophenolic Acid)、洛可达唑 (Nocodazole)、诺加拉霉素 (Nogalamycin)、奥马铂 (Ormaplatin)、奥昔舒仑 (Oxisurau)、紫杉醇 (Paclitaxel)、培加帕酶 (Pegaspargase)、培利霉素 (Peliomycin)、戊氮芥 (Pentamustine)、硫酸培来霉素 (Peplomycin Sulfate)、

哌磷酰胺 (Perfosfamide)、哌泊溴烷 (Pipobroman)、哌泊舒凡 (Piposulfan)、盐酸必散特隆 (Piroxantrone Hydrochloride)、普卡霉素 (Plicamycin)、普洛美坦 (Plomestane)、吡吩姆钠 (Porfimer Sodium)、泊非罗霉素 (Porfiromycin)、松龙苯芥 (Prednimustine)、盐酸丙卡巴肼 (Procarbazine Hydrochloride)、嘌呤霉素 (Puromycin)、盐酸嘌呤霉素 (Puromycin Hydrochloride)、吡唑霉素 (Pyrazofurin)、利波腺苷 (Riboprime)、吡鲁米特 (Rogletimide)、沙芬戈 (Safingol)、盐酸沙芬戈 (Safingol Hydrochloride)、司莫司汀 (Semustine)、双曲秦 (Simtrazene)、斯帕磷酸钠 (Sparfosate Sodium)、司帕素霉素 (Sparsomycin)、盐酸锗螺胺 (Spirogermanium Hydrochloride)、螺旋氮芥 (Spiromustine)、顺螺铂 (Spiroplatin)、链黑霉素 (Streptonigrin)、链脲霉素 (Streptozocin)、磺氯苯脲 (Sulofenur)、他利霉素 (Talisomycin)、他克唑 (Taxol)、替可加兰钠 (Tecogalan Sodium)、喃氟啉 (Tegafur)、盐酸替洛萸醌 (Teloxantrone Hydrochloride)、替莫泊芬 (Temoporfin)、替尼泊苷 (Teniposide)、台罗西隆 (Teroxirone)、睾内酯 (Testolactone)、硫唑鸟嘌呤 (Thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (Thioguanine)、噻替派 (Thiotepa)、噻唑呋林 (Tiazofuirin)、替拉扎明 (Tirapazamine)、盐酸拓扑替康 (Topotecan Hydrochloride)、柠檬酸托瑞米芬 (Toremifene Citrate)、醋酸 7- 甲诺酮 (Trestolone Acetate)、磷酸曲西瑞宾 (Triciribine Phosphate)、曲美沙特 (Trimetrexate)、三甲曲沙葡萄糖醛酯 (Trimetrexate Glucuronate)、曲普瑞林 (Triptorelin)、盐酸九布洛唑 (Tubulozole Hydrochloride)、尿嘧啶氮芥 (Uracil Mustard)、乌瑞替哌 (Uredepa)、伐普肽 (Vapreotide)、维替泊芬 (Verteporfin)、硫酸长春碱 (Vinblastine Sulfate)、硫酸长春新碱 (Vincristine Sulfate)、长春地辛 (Vindesine)、硫酸长春地辛 (Vindesine Sulfate)、硫酸长春匹定 (Vinepidine Sulfate)、硫酸长春甘酯 (Vinglycinatate Sulfate)、硫酸长春素 (Vinleurosine Sulfate)、长春瑞宾 (Vinorelbine Tartrate)、硫酸异长春碱 (Vinrosidine Sulfate)、硫酸长春氮芥 (Vinzolidine Sulfate)、伏罗唑 (Vorozole)、折尼拉汀 (Zeniplatein)、净司他丁 (Zinostatin)、盐酸佐柔比星 (Zorubicin Hydrochloride)。其余的抗癌剂包括公开于 Antineoplastic Agents (Paul Calabresi 和 Bruce A. Chabner) 第 52 章和其中的引言、Goodman 和 Gilman 的 “The Pharmacological Basis of Therapeutics”, 第 8 版, 1990, McGraw-Hill, Inc. (Health Professions Division) 的 1202-1263 中的那些抗癌剂。

[0385] 应当认识到, 尽管优选靶向接触配体或细胞毒性前药的细胞, 但本发明还设想本发明的核酸构建体在不接触配体或细胞毒性前药或者天然不受其影响的细胞中表达。在此情况下, 本发明的方法包括将此配体或前药施用于转化细胞的步骤。这样的施用可通过使用任一种上述施用方法实现。优选地, 所述配体或前药使用例如抗体缀合的靶向以细胞靶向的方式施用, 从而使得细胞毒性的活化是高度特异性的。细胞毒性或凋亡活化的这种方法详述于以下的实施例部分。

[0386] 因此, 本发明提供核酸构建体、含此种构建体的药物组合物和使用此种构建体在以过度或异常血管生成成为特征的组织区中下调血管生成的方法。

[0387] 由于本发明使得能够在特定细胞亚群中靶定表达, 所以本发明还可进行修改并用于治疗各种肿瘤。

[0388] 因此, 按照本发明的另一方面, 提供治疗肿瘤的方法。

[0389] 本发明该方面的方法通过在肿瘤细胞中表达上述嵌合多肽或自杀基因来实施。

[0390] 因此,根据本发明的这一方面,所述多肽嵌合体或自杀基因的表达由肿瘤特异性元件指导,所述肿瘤特异性元件例如但不限于胃泌素释放肽 (GRP) 启动子 [AF293321S3; Morimoto E Anticancer Res 2001 年 1 月 -2 月;21(1A):329-31]、hTERT 启动子 [AH007699;Gu J, Gene Ther 2002 年 1 月;9(1):30-7]、己糖激酶 II 型启动子 [AF 148512; Katabi MM, HumGene Ther. 1999 年 1 月 20 日;10(2):155-64] 或 L 丝束蛋白启动子 [L05490, AH002870, MMU82611;Peng XY, Cancer Res. 2001 年 6 月 1 日;61(11):4405-13]。

[0391] 多肽嵌合体 (例如 Fas-c) 或自杀基因在肿瘤细胞中的表达激活这些细胞中的细胞毒性和 / 或凋亡,并从而导致细胞死亡,这进而引起肿瘤生长减缓或停滞,并有可能引起肿瘤收缩。

[0392] 在检查以下的非限制性实施例后,本发明的其它目的、优点和新特征对于本领域普通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所要求保护的本发明各种实施方案和方面的每一个都在以下实施例中得到实验支持。

实施例

[0393] 现在参考以下实施例,连同以上的描述一起,以非限制性方式阐述本发明。

[0394] 一般而言,本文所用的命名法以及本发明中所用的实验室程序包括分子技术、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解释。参见例如“Molecular Cloning:A laboratory Manual”Sambrook 等, (1989);“Current Protocols in Molecular Biology”I-III 卷, Ausubel, R. M. 编辑, (1994); Ausubel 等,“Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson 等, “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren 等 (编辑) “Genome Analysis:A Laboratory Manual Series”, 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”, I-III 卷 Cellis, J. E. 编著 (1994);“Current Protocols in Immunology”I-III 卷 Coligan J. E. 编辑, (1994); Stites 等 (编辑), “Basic and Clinical Immunology” (第 8 版), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell 和 Shiigi (编辑), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W. H. Freeman and Co., New York (1980); 可用的免疫测定在专利和科学文献中有全面描述, 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. 编辑, (1984);“Nucleic Acid Hybridization”Hames, B. D. 和 Higgins S. J. 编辑, (1985);“Transcription and Translation”Hames, B. D. 和 Higgins S. J. 编辑, (1984);“Animal Cell Culture”Freshney, R. L. 编辑, (1986);“Immobilized Cells and Enzymes”IRL Press, (1986);“A Practical Guide to Molecular Cloning”Perbal, B., (1984) 和“Methods in Enzymology”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) ;所有这些文献均如同在本文完整叙述一样引入到本文中。其它通用参考文献贯穿于本文件提供。其中的程序被认为是本领域众所周知的,且仅为方便读者而提供。其中所包含的所有信息都在此引入作为参考。

[0395] 具体地说,结合下文提及的实施例进行的实验使用以下方法和材料:

[0396] 材料和方法

[0397] 细胞培养

[0398] 使 Lewis 肺癌细胞-(D122-96)、人胚肾细胞(293) 和 HeLa 细胞在补加了 10% 胎牛血清(FCS)、50U/ml 青霉素、50 ? g/ml 链霉素和 2mM 谷氨酰胺的 4.5gr/l DMEM(Biological industries,Belt-Haemek,以色列) 中生长。使牛主动脉内皮细胞-BAEC、正常皮肤成纤维细胞-NSF、HepG2 和人脐内皮细胞-HUVEC-304(ATCC, USA) 在补加了 5% FCS、50U/ml 青霉素、50 ? g/ml 链霉素和 2mM 谷氨酰胺的 1.0gr/l DMEM(Biological industries,Beit-Haemek,以色列) 中生长。给 BAEC 细胞补加完全成纤维细胞生长因子(Sigma, St.Louis.MO.)。使 RINr1046-38(RIN-38) 在补加了 5% FCS(Biological Industries, Beit-Haemek,以色列)、50U 青霉素 /ml、50 ? g 链霉素 /ml 和 2mM 谷氨酰胺的 199Earle 氏盐(5.5mM 葡萄糖) 培养基中生长。

[0399] 本文所用的“HepG2”指 ATCC-HB-8065。

[0400] 本文所用的“HeLa”指 ATCC-CCL-2。

[0401] 本文所用的“人支气管上皮细胞”和“B2B”指 ATCC-CRL-9609。

[0402] 本文所用的“HUVEC”和“人脐静脉内皮细胞”指 ATCC-CRL-1730。

[0403] 本文所用的“CHO”和“中国仓鼠卵巢”指 ATCC-61。

[0404] 低氧诱导

[0405] 转染或转导后 26 小时,将细胞在分离的室中温育,用以 N₂ 平衡的含有 0.5% O₂、5% CO₂ 的气流洗涤 30 分钟。将该分离的室置于 5% CO₂、37℃湿润培养箱中。

[0406] 细胞和组织中的萤光素酶活性

[0407] 为了定量测定 PPE-1 启动子的体外和体内活性,使用萤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,加入 200 ? 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 ? l 上清液至 50 ? l 萤光素酶测定缓冲液中。用发光计测量 20 秒时间段内的所述活性。

[0408] 为了测定实体组织中的萤光素酶活性,切取 20mg 样品,且在 1ml 匀浆溶液中匀浆,并于 4℃离心 15 分钟(14,000rpm),如上所述测定 10ml 上清液中的萤光素酶活性。结果以萤光素酶光单位 /1 ? g 蛋白表示。蛋白质采用 Bradford 测定测量,以牛血清清蛋白(BSA) 为标准。

[0409] 体外和体内 GFP 活性

[0410] 为了测试 GFP 的体外表达,细胞用 PBS 洗涤两次,并用新鲜制备的 4%低聚甲醛的 PBS 溶液固定 30 分钟。固定后,通过荧光显微镜术进行检查。

[0411] 为了测试所递送基因的体内细胞分布,将组织在新鲜制备的溶于 0.1M 磷酸盐缓冲液的 4%低聚甲醛中于 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。用恒冷切片机将组织块切成 10 μ m 厚的切片,然后直接在荧光显微镜 (FITC 滤光片) 下观察。

[0412] 增殖细胞和静息细胞

[0413] 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 培养基中生长和感染。2. 静息细胞 - 转导前 72 小时内开始在无血清培养基中生长和感染。

[0414] 使所有细胞皆在 5% CO₂、37°C 湿润培养箱中生长。

[0415] 重组复制缺陷型腺病毒的制备

[0416] 构建几个重组复制缺陷型腺病毒 (5 型)。包含鼠前内皮素原 -1 (PPE-1) 启动子 (SEQ ID NO:1) 的表达盒位于萤光素酶基因 (来源于 pGL2-basic, GenBank 登记号 X65323) 上游,且将 SV40 聚腺苷酸化位点 (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 PPE-1 启动子连接。按照 Becker, T. C. 等 (Methods Cell Biol. 43; Roth M. (编著) New York. Academic Press, 1994, 161-189 页) 所述,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。

[0417] 制备大规模生产用病毒。将浓度为 10⁹-10¹² 噬斑形成单位 /ml (pfu/ml) 的病毒原液于 4°C 贮存。按照对 PPE-1 病毒载体的描述制备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 和 Ad5CMV-GFP (Quantum biotechnologies, Carlsbad, 加拿大),并将其用作非组织特异性对照。

[0418] PPE 启动子的修饰

[0419] 通过将 Bu 等 (J. Biol. Chem. (1997) 272(19):32613-32622) 发现的正转录元件的三个拷贝插入到位于 43 个碱基对内源正元件 (-364 至 -320bp) 下游 (-286bp) 的 NheI 限制酶位点,开发修饰型鼠 PPE-1 启动子。

[0420] 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) 的三重拷贝。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, 以色列) (SEQ ID NO:2 和 3) 合成 3X 片段。使所述两个单链 DNA 片段退火,且用克列诺 (Klenow) 片段 (NEB) 填补;所得的双链 DNA 长 145 个碱基对,并包含 Nhe-1 限制位点 (SEQ ID NO:4)。

[0421] 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 感受态细胞中繁殖,且用大量制备 Qiagene 试剂盒生产大规模质粒制剂。

[0422] 另外的质粒

[0423] 野生型 PPE-1 启动子

[0424] 含有 1.4kb 鼠前内皮素原 -1 (PPE-1) 启动子、具有 SV40 聚腺苷酸化信号 (GenBank 登记号 X 65323) 位点的萤光素酶基因和鼠 ET-1 基因的第一内含子的 PPE-1-萤光素酶盒 (5249bp) 来源于 Harats 等 (J. Clin. Inv. (1995) 95:1335-1344) 使用的 pEL8 质粒

(8848bp)。用 BamHI 限制酶从 pEL8 质粒中提取 PPE-1- 萤光素酶盒,然后用提取试剂盒 (Qiagen, Hilden, 德国) 从 1% 琼脂糖凝胶中提取 DNA 片段。

[0425] 无启动子 pPAC. plpA 质粒

[0426] 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 限制酶除去 CMV 启动子、多克隆位点和 SV40 聚腺苷酸化位点 (1206bp), 从 1% 琼脂糖凝胶中提取片段化 DNA。该线性质粒 (7594bp) 通过克列诺片段补平, 且用快速 DNA 连接试剂盒将 BamHI 接头与两个粘性末端连接。该线性质粒用 T4DNA 连接酶再连接, 并转化到 DH5 α 感受态细胞中, 以扩增具有 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。

[0427] pPACPPE-1 萤光素酶质粒

[0428] 通过用 T4DNA 连接酶, 将 PPE-1- 萤光素酶盒插入到 pPAC. plpA 质粒的 BamHI 限制位点中, 构建 pPACPPE-1 萤光素酶质粒。随后用该质粒转化 DH5 α 感受态细胞。制备大规模制备用质粒 (12843bp), 并用大量制备 DNA 纯化试剂盒纯化。

[0429] pPACPPE-1GFP 质粒

[0430] 通过用 T4DNA 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。

[0431] 随后用该质粒转化 DH5 α 感受态细胞。制备大规模制备用质粒 (11, 801bp), 并用大量制备 DNA 纯化试剂盒纯化。

[0432] pACPPE-13X 萤光素酶质粒和 pACPPE-13X GFP 质粒

[0433] 通过将经 BamHI 限制酶消化由含有 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 萤光素酶和 pPACPPE-1-3XGFP。pEL8-3X 含有位于 BamHI 和 NotI 之间的修饰型鼠 PPE-1 启动子 (1.55kb) (红色), 所述启动子含有位于两个 NheI 位点之间的三重内皮特异性增强子 3X (如 SEQ ID NO:7 所示)。所述启动子、萤光素酶基因或 GFP 基因、SV40 聚腺苷酸化位点和内皮素 -1 基因的第一内含子, 它们一起被称为 PPE-1 修饰性启动子盒, 如材料和方法中所述, 用 BamHI 限制酶对其进行消化和提取。制备供大规模制备用的质粒 (12843bp), 并通过大量制备 DNA 纯化试剂盒纯化。

[0434] SV40- 萤光素酶报道质粒 (Promega GmbH, Mannheim, 德国) 用作 BAEC 实验中的非选择性启动子对照。

[0435] 体外实验、DNA 转导 - 转导前 24 小时, 将细胞铺平板到 24 孔或 96 孔皿中。对样品孔内的分汇合 (subconfluent) 细胞进行计数。然后, 吸出各孔中的生长培养基, 且将指定病毒载体以指定的感染复数 (MOI) 在感染培养基 (DMEM 或 RPMI 1640, 2% FBS) 中稀释并加入到单层中。将细胞在室温下温育 4 小时。然后, 加入完全培养基, 且将该细胞在 37°C、5% CO₂ 下温育 72 小时。

[0436] 动物

[0437] 所有动物程序都得到 Sheba Medical Center, Tel-Hashomer 的 “Animal Care and Use Committee” 批准。

[0438] 使用以下的不同小鼠品系:

[0439] (i) 3 月龄雄性野生型 C57BL/6 小鼠 (Harlan farms, Jerusalem, 以色列)。

[0440] (ii) 3 月龄雄性 BALB/C 小鼠 (Harlan farms, Jerusalem, 以色列)。

[0441] (iii) 6 月龄雄性和雌性 ApoE 基因缺陷型、C57BL/6xSJ 129 小鼠的小鼠杂种 (Plump AS. 等, Cell(1991)71:343-353)。

[0442] (iv) 3 月龄雄性和雌性小鼠, 该小鼠超表达处于鼠 PPE-1 启动子控制之下的萤光素酶基因 (5.9Kb), 由 Harats 等产生 (J. Clin. Inv. (1995)95:1335-1344)。

[0443] 所有小鼠都在脂质和动脉粥样硬化研究所 (Lipids and Atherosclerosis Research Institute) 生长。

[0444] 正常小鼠中的组织基因表达

[0445] 为了测定效率和组织特异性, 如上文所述, 将 10^{10} pfu/ml 的 Ad5PPE1Luc 或 Ad5CMVLuc (作为非组织特异性对照) 悬浮于 100 ? 1 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 天测定萤光素酶活性。为了定位所表达报告基因的细胞分布, 将 Ad5PPE-1GFP 或 Ad5CMVGFP (10^{10} pfu/ml, 在 100 μ l 生理盐水中) 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 GFP 表达。所有小鼠看来都健康, 并且在肝或其它组织中未见毒性或炎症。

[0446] 组织中的 GFP 活性

[0447] 为了测试所递送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溶于 0.1M 磷酸盐缓冲液的 4% 低聚甲醛中于 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 ? m 厚的切片, 且直接在荧光显微镜 (FITC 滤光片) 下观察。

[0448] 肿瘤植入:

[0449] 用胰蛋白酶/EDTA 收获 Lewis 肺癌细胞 (LLC), 用 PBS 洗涤 3 次, 且用 0.1% 锥虫蓝 (Biological industries, Beit-Haemek, 以色列) 计数, 以评价其生存力。为了测试小鼠肿瘤血管生成中的 PPE-1 启动子活性的活性水平, 使用两种不同的肿瘤膜型。

[0450] 在原发性肿瘤膜型中, 将细胞 (1×10^6 细胞 /ml, 在 100 ? 1 生理盐水中) 皮下注射入小鼠背部 (n = 17)。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, 且如上所述检测其活性。

[0451] 在转移性肿瘤模型中, 给小鼠爪垫 (n = 12) 注射细胞 (5×10^5 细胞 /ml, 在 50 ? 1 生理盐水中)。当肿瘤组织的直径达到 0.7mm 大小时, 在麻醉和无菌条件下切除爪垫 (带有原发性肿瘤)。外科手术后 14 天, 给小鼠尾静脉内注射病毒 (Ad5PPE-1、Ad5PPE-1GFP、Ad5CMVLuc 或 Ad5CMVGFP)。

[0452] 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, 且测试萤光素酶活性或 GFP 活性。

[0453] 伤口愈合模型

[0454] 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, 且作 5cm 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, 每两天检查愈合伤口中的血管生成过程。

[0455] 作切口后 10 天, 向尾静脉全身注射 10^{10} pfu/ml 的 Ad5PPE-1Luc 或 Ad5CMVLuc。注射后 5 天, 处死小鼠, 且如上所述测定切口部位皮肤和作为对照的正常对侧部位中的萤光

素酶活性。

[0456] 组织学检查 - 为了评价肿瘤和转移组织中血管生成的程度,将组织切成 $5\mu\text{m}$ 厚的切片,且用苏木精和伊红 (H&E) 染色。用抗 CD31 (大鼠抗小鼠 CD31 单克隆抗体, Pharminogen, NJ, USA) 抗体分析肿瘤模型中的新血管形成。

[0457] 用于 VEGF 和 PDGF-B 转基因表达的质粒和腺病毒载体 - 重组复制缺陷型腺病毒血清型 5 如 Varda-Bloom, N. 等 [Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. (2001) Gene Ther 8, 819-27] 所述构建。简而言之,对 pACCMV.pLpA 质粒进行修饰,以包含处于巨细胞病毒 (CMV) 立即早期启动子调节之下的鼠 VEGF₁₆₅ (GenBank 登记号 M95200) 或大鼠 PDGF-B (GenBank 登记号 AF162784) 的 cDNA。用相同的 cDNA 序列构建 pACPPE-1-3X 质粒,其中 CMV 启动子被修饰型鼠前内皮素原 -1 (PPE-1-3X) 启动子取代。每种质粒与 pJM17 质粒共转染到 HEK293 细胞中,以产生各种重组腺病毒。让病毒在 HEK293 细胞中繁殖并降至 10^{10} PFU/ml 的浓度。对照载体用类似地产生。

[0458] 小鼠后肢局部缺血模型和基因治疗 - 至少 12 周龄的雄性和雌性 C57B16 小鼠 (Harlan Laboratories Ltd., 以色列) 按照 Animal Care and Use Committee of Sheba Medical Center 的指南进行维持。根据先前介绍的规程 [Couffinhal, T. 等, Mouse model of angiogenesis. Am J Pathol 152, 1667-79. (1998)], 诱导后肢局部缺血。简而言之,用戊巴比妥钠 (40mg/kg, IP) 麻醉动物。剃掉肢体软毛后,对邻近隐动脉和腓动脉分叉处的右股动脉进行结扎。结扎后 5 天,静脉内施用 10^9 PFU 的各种腺病毒载体。

[0459] 超声波成像 - 采用 Synergy 超声波系统 (General Electric, USA), 于 7.5MHz 以血管造影方式,在结扎后以 7 天的间隔,进行超声波成像。在成像时让动物苏醒并受约束。让动物在常规条件下适应最高达 90 天。

[0460] 免疫组织化学 - 将处死的局部缺血小鼠的两个后肢骨骼肌和肝组织在 OCT 化合物中冷冻,并进行冷冻切片。内皮细胞用大鼠单克隆抗 CD31 抗体 (PharMingen, San Diego, CA) 进行免疫染色。平滑肌细胞用小鼠多克隆抗 - α -SMactin 抗体 (SIGMA, St. Louis, MO) 进行免疫染色。背景用苏木精染色。

[0461] 原位杂交 - 由局部缺血动物的两个后肢制备 $5\mu\text{m}$ 骨骼肌切片。用有义或反义 DIG- 标记探针对 VEGF₁₆₅ 或 PDGF-B 进行原位杂交,然后用抗 DIG-AP 缀合物 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, 德国) 检测洋地黄毒苷 (DIG)。背景用甲基绿染色。

[0462] 图像加工 - 运用 Image-Pro Plus 软件工具 (Media Cybernetics, SilverSpring, MD) 处理超声波图像。计算出每幅图像说明最强灌注的着色像素数。

[0463] 血管生成的调节剂 - 给转基因小鼠饲喂正常食物饮食或补加了波生坦 (Actelion Ltd., Allschwil, 瑞士), 双重 ET-1_{A/B} 受体拮抗剂的饮食。假定一只动物每天消耗 4g 食物,给每只小鼠施用 100mg 波生坦 /kg 体重,持续 30 天。处死动物,并测试萤光素酶活性,肺 ET-1mRNA 水平和 irET-1 血清水平。

[0464] 统计学分析

[0465] 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。

[0466] 实验结果

[0467] 实施例 1

[0468] 内皮细胞 (BAEC) 和 293 细胞中促凋亡基因活性的体外测定

[0469] 在癌症治疗中, 抗血管生成治疗靶向滋养生长中的肿瘤的发展中脉管系统 [Folkman J. N Engl J Med(1995) 333(26):1757-63]。随着凋亡或程序性细胞死亡研究的进展, 已鉴定出了众多编码选择性和有效的细胞死亡调节剂的基因 [Strasser 等, Annu Rev Biochem(2000) 69:217-45]。

[0470] 本研究筛选了几种促凋亡基因, 以鉴别最适于抗血管生成治疗的试剂。经 PCR 扩增几种促凋亡基因, 包括 MORT1 (FADD-Fas 相关死亡结构域蛋白, GenBank 登记号 NM_003824)、RIP (受体-相互作用-蛋白, GenBank 登记号 U25995)、CASH (c-FLIP, GenBank 登记号 AF010127)、MACH (胱天蛋白酶 8 GenBank 登记号 X98172)、CPP32 (胱天蛋白酶 3, GenBank 登记号 U13737)、胱天蛋白酶 9 (U60521) 和先前描述的两个“死亡受体”的融合体 Fas- 嵌合体 (Fas-c), 其是由 TNFR1 的胞外区和 Fas 的跨膜区和胞内区域构建的 [Boldin MP 等, J Biol Chem(1995) 270(14):7795-8, 参见图 1a], 并利用众所周知的现有技术的克隆技术克隆入 pcDNA3 (Invitrogen, Inc.) 哺乳动物表达载体中。

[0471] 这些促凋亡基因构建体随 pGFP 一起在 BAEC (牛主动脉内皮细胞) 和用作非内皮对照细胞的 293 细胞中共表达。转染后 24 小时, 利用荧光显微镜术分析细胞。用荧光显微镜术根据典型形态学 (即小而圆的形状) 鉴别凋亡细胞 (图 2a-b)。用电子显微镜术实施凋亡表型的进一步评价 (图 3a-f)。凋亡作用的定量表明, MORT1、TNFR1 和 Fas- 嵌合体在 BAEC 和 293 细胞中诱导最高的凋亡活性 (图 4a-b)。在这方面, 胱天蛋白酶 3 和 9 效力较低, 这可能是因为它们为无活性酶原形式。根据这些结果, 选择 Fas- 嵌合体 (Fas-c) 基因来产生用于抗血管生成治疗的腺病毒载体。

[0472] 实施例 2

[0473] 制备编码处于修饰型 PPE-1 启动子 (PPE-1 (3x)) 控制下的 Fas- 嵌合体的重组腺病毒

[0474] 将编码全长 Fas- 嵌合体的 cDNA 亚克隆到包含修饰型前内皮素原 1 启动子的质粒 pPACPPE1-3x 中 (参见图 1b)。通过将该质粒与 pJM17 质粒共转染到人胚肾 293 细胞中制备重组腺病毒。通过 PCR 扩增验证成功的病毒克隆 (图 5a)。

[0475] 为了测定 Fas-c 在靶细胞中的表达, 用指示滴度的 Ad-PPE-1 (3x)-Fas-c 转导内皮 BAEC 细胞。转导后 72 小时裂解细胞, 并用非还原性 SDS-PAGE 凝胶分离细胞蛋白。用抗 TNFR1 抗体 (Sc-7895, Santa-Cruz Biotech) 进行蛋白质印迹分析。如图 5b 所试实的, 于 45kD 处迁移的主条带非常明显, 且其表达是剂量依赖性的, 提示所述嵌合蛋白正确折叠和表达。相反, 在非转导内皮细胞或用对照空病毒载体转导的细胞中没有明显的对应条带。因此, 这些结果证实, 腺病毒介导的 Fas-c 基因转移导致靶细胞中的转基因表达。

[0476] 实施例 3

[0477] Ad-PPE-1 (3x)-Fas-c 表达诱导内皮细胞凋亡

[0478] 测定 Ad-PPE-1 (3x)-Fas 嵌合体诱导内皮细胞凋亡的能力。如图 6a-b 所示, 前内皮素原指导的、腺病毒介导的内皮细胞转导导致明显且大量细胞死亡; 用 Ad-PPE-1 (3x)-Fas-c (10^3 MOI) 感染的 HUVEC 和 BAEC 有经受凋亡的粘附细胞的形态特征, 包括膜起泡、变圆和皱缩以及脱离培养皿。相反, 用对照病毒以相同 MOI 感染的细胞维持正常外观和生长速率。用 100 MOI 转导的细胞仅表现出最低程度的细胞死亡 (数据未显示)。

[0479] 通过在表达受 PPE-1 启动子控制的报告基因 GFP 的细胞中表达此病毒,对 Ad-PPE-1 (3x)-Fas-c 的细胞毒性特性实施进一步评价。如从图 6c-d 中明显可见,大部分转导细胞在转导后 72 小时获得典型凋亡外观,而用对照病毒和 Ad-PPE-GFP 共转导的细胞看起来正常。

[0480] 利用结晶紫染色来定量 Fas-c 的细胞毒性作用。如图 7 所示,用 Ad-PPE-Fas-c 感染 BAEC 和 HUVEC 分别导致 57% 和 65% 的死亡率,而对照病毒不影响细胞生存力。

[0481] 通过用此载体感染 NSF (正常皮肤成纤维细胞) 证实促凋亡载体 Ad-PPE-Fas- 的内皮细胞特异性。这些表达低水平 PPE-1 的细胞 [Varda-Bloom, N. 等, Gene Ther 8, 819-27. (2001)] 不受 Ad-PPE-Fas-c 感染影响。相反,重组载体 Ad-CMV-Fas-c 在这些细胞中诱导凋亡。

[0482] 实施例 4

[0483] 共同施用 Ad-PPE-1 (3x)-Fas-c 受体和 TNF α 配体以选择性方式增大促凋亡作用

[0484] 研究了 TNF α 增大表达 Fas-c 的细胞中的凋亡作用的能力。将人 TNF α 添加到用 Ad-PPE-Fas-c (MOI 100) 病毒感染后 48 小时的内皮细胞培养物中。24 小时后测定细胞生存力。如图 8 所示, TNF α (10ng/ml) 诱导 Ad-PPE-1 (3x)-Fas-c 感染的细胞生存力下降 73%, 而单独的 TNF α 或对照病毒 (Ad-Luc) 感染的细胞中没有实现显著死亡率。

[0485] 为证实 TNF α 的作用,处理细胞特异性。用 Ad-PPE-Fas-c 或对照病毒感染 NSF (正常皮肤成纤维细胞)、DA3 (小鼠乳腺癌)、D122 (Lewis 肺癌) 和 B16 黑素瘤细胞。48 小时后,向培养物中补加 TNF α , 且用结晶紫染色后评定细胞形态学。如图 9a-e 所示,用 Ad-PPE-Fas-c 感染的非内皮细胞表现出正常外观,且不受 TNF 影响。另一方面,腺病毒介导的 Fas-c 感染 BAEC 在添加 TNF 时导致细胞生存力明显下降。图 10a 显示了由 CMV 启动子驱动的 Fas-c 的非选择性凋亡活性,说明 Ad-CMV-Fas-c 对内皮细胞的 TNF 依赖性凋亡作用。与 TNF 温育后测定用指示 MOI 的 Ad-CMV-Fas- 嵌合体感染的 BAEC 细胞的生存力。

[0486] 值得注意的是,非内皮特异性载体 Ad-CMV-Fas-c 引起内皮细胞和非内皮细胞两者的 TNF α 依赖性凋亡 (图 10b-d)。

[0487] 实施例 5

[0488] Ad-PPE1 (3x)-Fas-c 诱导小鼠中的 B16 黑素瘤体内生长阻滞

[0489] 用 B16 黑素瘤小鼠模型来检验由 PPE1-3x 启动子表达的 Fas-c 的抗肿瘤作用。将 B16 黑素瘤细胞 (8×10^5) 皮下注射到 40 只 C57b1/6 小鼠胁腹区。当肿瘤可触知 (约 5×5 毫米) 时,将小鼠随机分成如下 4 组: (i) 对照 - 盐水注射; (ii) 对照病毒 (包含受 PPE 启动子控制的荧光素酶的腺病毒); (iii) 包含受前内皮素原 (PPE) 启动子控制的 Fas-TNF 受体嵌合基因的 Ad-PPE1-3x-Fas-c- 病毒; 和 (iv) 包含受非内皮特异性 CMV 启动子控制的 Fas-TNF 受体嵌合基因的 Ad-CMV-Fas-c- 病毒。

[0490] 用手持测径器测量肿瘤大小 (长和宽)。如图 11a 所示,与对照小鼠相比,用 Ad-PPE1-3x-Fas-c 或 Ad-CMV-Fas-c 处理的小鼠肿瘤尺寸较小。在治疗期结束时, Ad-PPE1-3x-Fas-c 处理小鼠中的肿瘤重量也较低 (图 11b)。用 Ad-PPE1-3x-Fas-c 注射的小鼠显示其肿瘤明显坏死 (图 11c)。

[0491] 转移疾病的抑制: Lewis 肺癌模型: 在转移性 Lewis 肺癌模型中选一步检验 PPE-1 (3x)-Fas-c 嵌合体的表达特异性和抑制肿瘤生长的功效。如下文详述在雄性

C57BL/6J 中诱发肺 LLC 转移, 且以 9 天的间隔给小鼠注射两次病毒载体 AdPPE-1 (3x) LUC、AdPPE-1 (3x)-Fas-c 和 AdCMV-Fas-c (Greenberger 等, J Clin Invest 2004 ;113 : 1017-1024)。

[0492] 在病毒施用后 6 天由小鼠收获器官, 且通过 PCR 测定 Fas-c 表达。PPE-1 (3x) 启动子对 Fas-c 的转录控制导致表达受限于具有肿瘤的肺 (结果未显示), 与 CMV-Fas-c- 处理小鼠中的 Fas-c 表达的广泛分布完全相反 (未显示数据, 参见 Greenberger 等, J Clin Invest 2004 ;113 :1017-1024)。

[0493] 此外, 处理组和对照组的肺的总体病理学检查揭示, 向具有转移的小鼠施用 AdPPE-1 (3x)-Fas-c 抑制肿瘤生长, 且降低肺表面上生长中的肿瘤的大小, 而对照动物肺几乎被肿瘤组织完全取代 (未显示数据, 参见 Greenberger 等, J Clin Invest 2004 ;113 : 1017-1024)。

[0494] 另外, 处理小鼠和对照小鼠肺切片的组织病理学以及 TUNEL 和内皮特异性 CD31 染色揭示, 向具有转移的小鼠施用 AdPPE-1 (3x)-Fas-c 在肿瘤组织中引起与对肿瘤血管内皮的广泛损伤相关的大范围凋亡和坏死。相反, 对照处理小鼠的血管未受影响 (未显示数据, 参见 Greenberger 等, J Clin Invest 2004 ;113 :1017-1024)。

[0495] 实施例 6

[0496] 3X-PPE-1 质粒体外活性的分析

[0497] 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 启动子质粒中的报告基因表达进行比较。将含有 PPE-1-3X 片段或未经修饰的 PPE-1 片段以及报告基因萤光素酶的报告基因质粒转染到内皮细胞系和非内皮细胞系以及表达 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 元件降低非内皮细胞系中表达的能力的指示。采用脂质转染胺 (Promega Corp., Madison, WI) 完成转染。每种情况下, 按照公认的分子生物学实践, 用 β -gal-neo 质粒作为转染效率的指示剂。

[0498] 转染后 48 小时, 用裂解缓冲液 (Promega Corp., Madison, WI) 收获细胞, 且用发光计 (TD-20e-Turner Designs, Sunnyvale, California) 分析萤光素酶活性。在平行实验中, 分析 β -gal 活性, 以将不同的转化效率标准化。结果总结于图 12 和表 2 中。处于 PPE-3X 控制之下的萤光素酶活性为处于未经修饰的 PPE-1 控制之下的萤光素酶活性的 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递送到内皮细胞中的有前景候选物。

[0499] 表 2- 用 PPE-1 和 PPE-1-3X 萤光素酶构建体转染的细胞中的萤光素酶活性

[0500]

质粒	萤光素酶活性: 内皮细胞系		非内皮细胞系
	HUVAC	BAEC	
PPE-1	135.12	1121.3	0.73
PPE-1-3X	768	18331.7	0.32

[0501] 实施例 7

[0502] Ad5PPE-1/ 萤光素酶的体外活性和特异性

[0503] 也将 PPE-1/ 萤光素酶、PPE-1-3X/ 萤光素酶、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。

[0504] 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素基因,且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。用不表达内皮素的 RIN(大鼠胰岛肿瘤)细胞系作为阴性对照,且用相同构建体进行转染。用 Ad5CMVLuc(处于 CMV 启动子控制之下的萤光素酶)作为所有细胞系中的非内皮特异性对照。

[0505] 图 13 清楚说明,用 PPE-1 启动子比用 CMV 启动子在内皮 BAEC 和 HUVEC 细胞系中达到的萤光素酶表达要高。在非内皮来源的 RIN 细胞中,CMV 启动子比 PPE-1 启动子产生的萤光素酶活性要高。这些结果证实了未经修饰的 PPE-1 启动子的内皮特异性。

[0506] 实施例 8

[0507] Ad5PPE-3XLuc 和 Ad5PPE-3XGFP 的活性和特异性

[0508] 用 Ad5PPE-3X/ 萤光素酶和 Ad5PPE-3X/GFP 构建体转染上文实施例 7 中所述的细胞系,以确定 3X 元件对特异性和表达水平的影响。如同在实施例 7 中一样,用 Ad5CMVLuc 作为非内皮特异性对照。与 CMV 启动子相比,在 BAEC 细胞系和 HUVEC 细胞系中检测出处于 PPE-3X 启动子控制之下的较高萤光素酶表达。

[0509] 图 14A 是显微照片,说明在 BAEC 细胞系中处于 Ad5PPE-1-3X 控制之下的 GFP 表达。图 14B 是显微照片,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更有活性。这些结果清楚表明,所述 3X 元件不降低 PPE-1 启动子的内皮特异性。下文实施例 11 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。

[0510] 实施例 9

[0511] p55 基因促凋亡活性的体外测定

[0512] 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 T4DNA 连接酶将所述基因亚克隆到 PPE-1 启动子(而不是萤光素酶基因)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,目测可辨别小而圆的凋亡细胞和正常细胞。用促凋亡质粒转染的细胞的电子显微镜术显示出典型凋亡外观,从而证实所述目测评价。

[0513] 在 PPE-1-3X 启动子控制之下,p55 仅在内皮细胞中诱导凋亡(图 15),而 CMV 启动子没有显示任何细胞特异性活性。处于 PPE-1-3X 控制之下的萤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。

[0514] 实施例 10

[0515] 低氧反应元件(HRE)可增强低氧敏感性内皮细胞中的靶基因表达

[0516] 低氧是血管紧张性和结构的重要调节剂。还已表明,它是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) AdvExp 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包括促红细胞生成素、VEGF、糖酵解酶和 ET-1 的表达。这些基因受共同的氧传感途径 (oxygen-sensing pathway),称为低氧诱导型因子-1(HIF-1) 的诱导型转录复合体控制。所述 HIF-1 复合体通过结合靶基因的顺式作用低氧反应元件 (HRE) 来介导对低氧的转录反应。HRE 是位于对低氧应答的少数基因启动子中的保守序列,所述基因包括:VEGF、氧化氮合酶-2、促红细胞生成素和包括内皮素-1-ET-1 在内的其它基因。ET-1 启动子在转录起始位点上游-118bp 位含有反向低氧反应元件,该元件含有 7 个碱基对,且位于 GATA-2 和 -50 碱基对的 AP1 位点 5' GCACGTT 3' 之间。(SEQ ID NO:5)。

[0517] 前内皮素原-1(PPE-1) 启动子含有具有增加其在肿瘤或局部缺血组织的低氧微环境中表达之潜力的低氧反应元件 (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,结合萤光素酶或 GFP 报告基因以及用腺病毒载体递送对 PPE-1 启动子和 PPE-1-3X 启动子进行测定。

[0518] 比较在 BAEC 细胞中在常氧和低氧条件 (0.5% O₂ 达 16 小时) 下处于 PPE-1 启动子或 PPE-1-3X 启动子控制之下的萤光素酶活性。处于 PPE-1 启动子控制之下的萤光素酶活性当暴露于低氧时提高至 5 倍 (图 16 和图 17)。此外,处于 PPE-1-3X 启动子控制之下的萤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 PPE1 启动子中仍能够增加下游基因对低氧应答的表达水平,即使在使用 PPE-1-3X 基因时常氧的表达水平比用未经修饰的 PPE-1 启动子所观察的表达水平高。

[0519] 实施例 11

[0520] 对内皮细胞系中 PPE-1-3X 和 PPE-1 启动子活性的进一步评估

[0521] 图 18 总结了得自用 pPPE-1/ 萤光素酶和 pPPE-1-3X/ 萤光素酶的 B2B、HUVEC 和 BAEC 转染实验的结果。分别在 B2B、HUVEC 和 BAEC 中观察到处于 PPE-1-3X 启动子控制之下的萤光素酶表达高于处于 PPE-1 启动子控制之下的萤光素酶表达 (是后者的 30 倍、8.5 倍和 1.5 倍)。这些结果证实了上文给出的结果,并可用于确立 PPE-1-3X 非常适合将高水平表达特异性地导向内皮细胞。在将来的体内递送背景中,用 PPE-1-3X 构建体实现的较高表达水平转化为施用更少量的 DNA。这进而会用来甚至进一步增加特异性。

[0522] 实施例 12

[0523] Ad5PPE-1Luc 在体内的效率、特异性和稳定性

[0524] 为了证实在实施例 7-10 中所观察的表的内皮特异性不是细胞培养物的人为产物,如上文在“正常小鼠中的组织基因表达”中所述,将 Ad5PPE-1/ 萤光素酶构建体注射到 C57BL/6 小鼠中。如同在所述体外研究中一样,用 Ad5CMV/ 萤光素酶作为阴性对照。

[0525] 注射腺病毒载体后,测定血管形成组织和非血管形成组织中的萤光素酶的比活性和稳定性。结果总结于图 19 (相对于肝中表达的萤光素酶表达) 和表 3 (萤光素酶表达以身体总表达的百分比表示)。正如所料,在 Ad5CMV/ 萤光素酶治疗的小鼠中,在肝中发现大部分萤光素酶活性 (> 总身体表达的 80%)。由 PPE-1 启动子控制的萤光素酶活性在肝中较低 (总身体表达的 37-54%)。与 Ad5CMV/ 萤光素酶治疗的小鼠相比 (最高达总身体表达的 1.8%; 表 2), PPE-1 驱动的表达在主动脉中高得多 (在注射后 5 天和 14 天分别为总身体表达的 23-33%)。这些结果证实了在细胞培养物中观察到的内皮特异性。应记得的

是,肝是高度血管形成器官。因此,如下文详述对器官内的细胞表达进行检查。

[0526] 表 3- 注射基于 PPE-1 和 CMV 的构建体后 5 天和 14 天器官中的萤光素酶表达

注射后 天数	5		14	
	光单位/ μ g 蛋白		光单位/ μ g 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	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	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	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	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%)

[0528] 图 41A 和 41B 图示了 110 只注射小鼠的主动脉 (A) 和肝 (B) 中的绝对萤光素酶活性 (光单位/ μ g 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) 测量萤光素酶活性。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,而肝中的结果代表其主要在肝细胞中的活性。

[0529] 实施例 13

[0530] BALB/C 小鼠中 Ad5PPE-1 的体内效率、特异性和稳定性的测定

[0531] 在 12 周龄 BALB/C 小鼠 (每组 n = 10) 中重复实施例 12 的实验,以证明所观察的结果不是特定动物品系的人为产物。

[0532] 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,所以萤光素酶表达以所有组织中总萤光素酶活性的百分比表示。

[0533] 在注射 Ad5PPE-1 的小鼠脾 (90.9%) 和注射 Ad5CMV 的小鼠肝 (86.2%) 中观察到注射后 5 天的最高相对萤光素酶表达。还观察到注射后 14 天注射 Ad5PPE-1 的小鼠主动脉中的相对萤光素酶活性 (32.9%) 与注射后 5 天的其活性 (1.75%) 相比显著增加 (图 42A 和 42B ;Ad5PPE-1Luc- 空心条 ;Ad5CMVLuc- 黑色条)。

[0534] 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地有效消除肝细胞表达,尽管肝细胞优先摄入注射的 DNA。

[0535] 实施例 14

[0536] Ad5PPE-1 所递送基因的体内细胞定位

[0537] 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 递送的绿色荧光蛋白 (GFP)。用 Ad5CMVGFP (Quantum, 加拿大) 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。

[0538] 在注射 Ad5CMVGFP 载体的小鼠中, 在肝细胞中检测到大部分表达, 而在肝内皮细胞中没有检测到表达 (图 20A)。与之形成鲜明对比的是, 注射 Ad5PPE-1-GFP 的小鼠 (图 20B) 显示在肝细胞中没有表达, 但在肝血管内皮细胞中有显著表达。在其它组织中也获得相似的结果, 在那里于内皮中检测到几乎所有 PPE-1 驱动的表达, 而无 CMV 驱动的表达是内皮性的。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。

[0539] 实施例 15

[0540] Ad5PPE-1-3X Luc 和 Ad5PPE-1-3X GFP 的体外效率和内皮特异性的测定

[0541] 为了测定 Ad5PPE-1 和 Ad5PPE-1-3X 在细胞中驱动报告基因萤光素酶和绿色荧光蛋白 (GFP) 表达的相对功效, 用上文所述细胞系体外测试内皮细胞中的比活性。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 3X 序列所引起的表达水平的相对变化。

[0542] 在图 21 和图 22 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 启动子控制之下的萤光素酶活性是在非内皮细胞 - 大鼠胰岛瘤 -RIN、HeLA、HepG2 和正常皮肤成纤维细胞 (NSF) 中的活性的 5-10 倍 (图 21 和图 22)。

[0543] 图 21 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 蛋白表示的萤光素酶活性。在 Ad5CMVLuc 转导的 RIN 细胞中观察到最高的萤光素酶表达, 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 细胞中观察到次最高水平的萤光素酶表达。Ad5PPE-1Luc 在 BAEC 细胞中以较低水平表达。在 B2B 细胞系中, Ad5PPE-1Luc 和 Ad5PPE-1-3XLuc 以几乎相同的水平表达。

[0544] 总的来讲, 在相同感染条件下 ($\text{moi} = 10$), 在内皮细胞系中处于 PPE-1-3X 启动子控制之下的萤光素酶活性是处于 PPE-1 启动子控制之下的萤光素酶活性的 23 倍, 且是处于 CMV 启动子控制之下的萤光素酶活性的 23-47 倍。而处于 CMV 启动子控制之下的非内皮 RIN 细胞中的萤光素酶表达高达 3000 倍 (图 21)。

[0545] 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, 转导了 HeLA、HepG2、NSF 细胞系。用 BAEC 作为内皮对照。图 22 显示了在用 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 蛋白表示的萤光素酶活性。用 Ad5CMVLuc 转导在 HeLA 细胞、HepG2 细胞和 NSF 细胞中引起高水平的萤光素酶表达。这些细胞系不能表达处于 PPE-1 控制之下的萤光素酶, 且在 PPE-1-3X 启动子控制之下以低水平表达萤光素酶。正如所料, 用 Ad5PPE-1Luc 或 Ad5PPE-1-3XLuc 转导的 BAEC 细胞表现出高萤光素酶表达。

[0546] 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。

[0547] 加入 3X 序列至 PPE-1 启动子中还增加 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 23A-C 所示。在该实验中, 用 CMV 启动子没有观察到 GFP 的表达。

[0548] 在图 23 中,图 A 表示 Ad5PPE-1-3XGFP 转导的细胞,图 B 表示 Ad5PPE-1GFP 转导的细胞,而图 C 表示 Ad5CMVGFP。再次,将 3X 序列导入 PPE-1 启动子中显著增加报告基因的表达。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并不随待转录的下游基因而变。

[0549] 此外,相比于在 CMV 启动子下的高表达,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) 中无 GFP 表达,如图 24-27 中总结的。

[0550] 图 24 显示了以 $\text{moi} = 1$ 的 Ad5PPE-1-3XGFP (图 A) 或 Ad5CMVGFP (图 B) 转导的 SMC 中的 GFP 表达。尽管 Ad5CMVGFP 转导导致高水平 GFP 表达,但用 Ad5PPE-1-3XGFP 转导不引起 GFP 表达。

[0551] 图 25 显示了在 HeLa 细胞中进行的相似实验的结果。如同在前面的图中一样,图 A 表示用 Ad5PPE-1-3XGFP 转导的细胞,而图 B 表示用 Ad5CMVGFP 转导的细胞。再次,尽管 Ad5CMVGFP 转导导致高水平 GFP 表达,但用 Ad5PPE-1-3XGFP 转导不引起 GFP 表达。

[0552] 图 26 显示在 HepG2 细胞中进行的相似实验的结果。如同在前面的图中一样,图 A 表示用 Ad5PPE-1 (3X)GFP 转导的细胞,而图 B 表示用 Ad5CMVGFP 转导的细胞。再次,尽管 Ad5CMVGFP 转导导致高水平 GFP 表达,但用 Ad5PPE-1-3XGFP 转导不引起 GFP 表达。

[0553] 图 27 显示了在 NSF 细胞中进行的相似实验的结果。如同在前面的图中一样,图 A 表示用 Ad5PPE-1-3XGFP 转导的细胞,而图 B 表示用 Ad5CMVGFP 转导的细胞。再次,尽管 Ad5CMVGFP 转导导致高水平 GFP 表达,但用 Ad5PPE-1-3XGFP 转导引起极低的 GFP 表达。

[0554] 这些结果综合起来表明,高水平的内皮特异性和高水平的内皮表达通过使用含 SEQ ID NO. :7 的 3X 序列的修饰型 PPE-1 启动子而获得。

[0555] 实施例 16

[0556] Ad5PPE-1-3X 递送的报告基因的体内细胞定位

[0557] 为了测定处于 PPE-1-3X 启动子控制之下表达的报告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。

[0558] 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 28A-B 显示了代表性结果。

[0559] 图 28A 显示了注射 Ad5PPE-1GFP 的小鼠血管内衬内皮细胞中的低水平 GFP 表达。图 28B 显示了由于加入 3X 序列至构建体中产生的水平高得多的 GFP 表达。

[0560] 尽管在血管内衬中高表达,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)。

[0561] 图 29 显示了得自注射小鼠肾组织的代表性结果。注射 Ad5CMVGFP 的小鼠 (图 29A)、注射 Ad5PPE-1GFP 的小鼠 (图 29b) 和注射 Ad5PPE-1-3XGFP 的小鼠 (图 29C) 在肾细胞中都表现出低 GFP 活性。在图 29B 中,在血管壁中可见略高的 GFP 表达 (箭标所指)。

[0562] 图 30 显示了注射小鼠脾组织的代表性结果。注射 Ad5CMVGFP 的小鼠 (图 30A)、注射 Ad5PPE-1GFP 的小鼠 (图 30B) 和注射 Ad5PPE-1-3XGFP 的小鼠 (图 30C) 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 (箭标所指)。

[0563] 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, 在肿瘤血管生成模型中进行测定。

[0564] 实施例 17

[0565] 肿瘤新血管形成中 Ad5PPE-1 构建体的体内测定

[0566] 为了确定 AD5PPE 将报告基因的表达特异性地导向肿瘤中血管生成性血管的能力, 使用鼠 LLC 模型 (上文在材料和方法中描述的)。在一个实验中, 全身注射 Ad5PPE-1Luc 或 Ad5CMVLuc (各 10^{10} pfu/ml) 后 5 天测试肿瘤新血管形成中的萤光素酶表达。

[0567] 在该实验中, 给原发性肿瘤模型和转移肿瘤模型全身注射 Ad5CMVLuc 导致在原发性肿瘤或转移肺中均产生最低表达。该表达水平与在首次用于实验的正常肺中由 CMV 指导的萤光素酶的最低表达相似 (图 35; 黑色条; $n = 12$)。与之鲜明对比的是, 在 PPE-1 启动子控制下 (图 35; 空心条; $n = 9$), 高血管生成性肺转移与萤光素酶活性相关, 所述萤光素酶活性为在血管形成程度低的原发性肿瘤和首次用于实验的肺中的萤光素酶活性的约 200 倍。

[0568] 在诸如肝、肾、心脏和胰的非转移组织中的萤光素酶表达最低。主动脉中的表达水平大约是转移肺中所述水平的 30%。

[0569] 在 LLC 模型的另一个实验中, 用 Ad5PPE-1GFP 构建体和 Ad5CMVGFP 构建体将报告基因表达定位于原发性肿瘤和转移肺中。

[0570] 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 47C), 尽管在肿瘤细胞自身中没有检测到表达。此观察结果与实施例 20 中提供的 LLC 细胞培养物模型的结果相一致。在肺转移中, 在转移病灶的大动脉和小血管生成性血管两者中均检测到高水平的 GFP 表达 (图 47A)。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 47A) 和 CD31 抗体免疫染色 (图 47B) 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两者中均没有检测到 GFP 活性。

[0571] 图 47C 说明瘤内注射 Ad5PPE-1GFP 后在原发性肿瘤血管中的 GFP 表达。图 47D 是与说明肿瘤及其血管的图 C 一样归档的相差图像。

[0572] 这些结果表明, 尽管 PPE-1 不驱动肿瘤细胞自身中的高水平表达, 但所述启动子的确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。

[0573] 给原发性皮下肿瘤模型瘤内注射 Ad5CMV, 导致在肿瘤组织中的高萤光素酶表达, 及在肝中导致中等水平表达 (肿瘤表达量的 10%; 图 53)。在转移肺中没有检测到表达。另一方面, 当瘤内注射时, 处于 PPE-1 启动子控制之下的萤光素酶表达在原发性肿瘤和转移肺中产生相似的萤光素酶表达水平, 而在肝中没有检测到表达。

[0574] 实施例 18

[0575] 癌细胞培养物系统中的 Ad5PPE-1 构建体的测定

[0576] 为了测定 Ad5PPE-1 和 Ad5CMV 在癌性细胞中驱动萤光素酶表达的效率, 使用 D122-96Lewis 肺癌细胞系。

[0577] 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萤光素酶基因转导给这些细胞 (表 4)。然而, 由 PPE-1 启动子指导的萤光素酶活性在 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 / 10^6 g 蛋白对 1000-2500

光单位 / ? g 蛋白。

[0578] 表 4- 用 Ad5PPE-1Luc 和 Ad5CMVLuc 体外转导 Lewis 肺癌细胞系 (D122-96)

[0579]

	MOI = 1	MOI = 5	MOI = 10
AdPPE-1	8.1 ± 0.06	33.95 ± 7.0	50.7 ± 5.0
Ad5CMV	9.3 ± 1.1	47.3 ± 4.0	88.13 ± 10.1

[0580] 实施例 19

[0581] 3X 序列在肿瘤血管生成性血管中体内作用的测定

[0582] 为了确定 3X 序列对血管生成性血管中 PPE-1 启动子的作用,使用 Lewis 肺癌 (LLC) 转移模型 (上文材料和方法中所描述的)。如材料和方法所述的,静脉内 (IV) 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。

[0583] 图 31A-D 总结了注射盐水的对照小鼠 (图 31A)、注射 Ad5CMVGFP 的小鼠 (图 31B)、注射 Ad5PPE-1GFP 的小鼠 (图 31C) 和注射 Ad5PPE-1-3XGFP 的小鼠 (图 31D) 的转移肺中的 GFP 表达。抗 CD31 免疫染色 (图 31C' -20D') 证实每种转移组织中 GFP 表达的位置。结果表明,尽管在对照 - 注射盐水的小鼠中没有检测到 GFP 表达 (图 31A),在注射 CMV 的小鼠上皮支气管周围有微弱表达,但在这些小鼠转移肺血管生成性血管中没有表达 (图 31B)。在注射 Ad5PPE-1GFP 的小鼠转移肺中观察到低 GFP 表达 (图 31C 和 31C'),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 31D 和 31D')。

[0584] 这些结果解释了实施例 15 的体内结果和实施例 7、8 和 11 的体外结果之间明显不一致之处。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 序列大大增加了快速增殖的内皮组织 (诸如生长肿瘤中的新形成血管) 中的表达水平。

[0585] 实施例 20

[0586] 3X 元件对肿瘤血管生成性血管中 PPE-1 启动子的作用

[0587] 为了研究本发明的 3X 元件对肿瘤血管生成性血管中 PPE-1 启动子功效和比活性的作用,使用 LLC 转移模型。如上文所述,静脉内 (i. v.) 注射 10^{10} pfu/ml 的 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萤光素酶表达或 GFP 表达。

[0588] 图 48 是直方图,比较全身注射 Ad5PPE-1-3Xluc、Ad5PPE-1Luc 或 Ad5CMVLuc 后在正常肺和转移肺中的萤光素酶表达。各实验组为 Ad5CMVLuc (n = 7; 黑色条)、Ad5PPE-1Luc (n = 6; 灰色条) 和 Ad5PPE-1-3XLuc (n = 13; 褐色条)。活性以光单位 / μ g 蛋白表示。

[0589] 处于 PPE-1-3X 启动子控制之下的萤光素酶表达在转移肺中是其在正常肺中的活性的 35 倍,且是由无所述 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萤光素酶活性。计算每只经注射的动物肺中萤光素酶表达占肝中表达的百分比揭示出,与正常肺中的所述活性相比,转移肺中的所述活性增加至 10 倍 (图 49)。

[0590] 为了将报告基因表达定位至特定细胞类型,使用 GFP 构建体。图 50A-B 显示了注射 Ad5PPE-1-3XGFP 的小鼠转移肺中的 GFP 表达(图 50A)。通过 CD31 抗体免疫染色(图 50B)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 的小鼠上皮支气管周围有低水平表达,但在转移肺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,所观察的作用可能与上文所述的低氧应答结合,以进一步增强目标序列的表达水平。

[0591] 实施例 21

[0592] PPE-1 低氧应答的进一步表征

[0593] 为了进一步表征低氧对鼠 PPE-1 启动子活性的作用,用 DNA 质粒(pEL8;图 37A)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)、萤光素酶基因(1842bp)、SV40 聚腺苷酸化(poly A)位点和内皮素-1 基因的第一内含子,它们合称为 PPE-1 启动子盒,如材料和方法中所述,用 BamHI 限制酶对其进行消化和提取。转染后,让细胞经历低氧条件。

[0594] 经历 18 小时低氧(0.5% O₂)的转染的 BAEC 中的萤光素酶表达为常氧环境下生长的细胞中的萤光素酶表达的 8 倍(图 32)。图 32 显示,用含有鼠 PPE-1 启动子的质粒转染的 BAEC 中的萤光素酶活性(光单位/μg 蛋白)当转染的细胞在低氧环境下温育时明显更高。同样的转染效率通过与 β-半乳糖苷酶报告载体共转染和 LacZ 活性测定得以证实。

[0595] 为了确定由腺病毒载体递送的鼠 PPE-1 启动子是否也受到低氧的上调,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 33 中。用 Ad5PPE-1Luc 转导的 BAEC 中的低氧萤光素酶活性。与之明显相反,在 Ad5CMV 转导的细胞中没有检测到常氧和低氧之间的显著性差异(图 33)。

[0596] 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),且让其经历低氧(0.5% O₂)或常氧环境。结果总结于图 34 中。萤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。与常氧相比,低氧环境降低其它细胞系中的萤光素酶表达。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。

[0597] 实施例 22

[0598] 3X 序列对 PPE-1 低氧应答的作用

[0599] 为了确定 3X 序列对 PPE-1 低氧应答的作用,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常氧环境中温育。结果总结于图 35 中。使用 Ad5PPE-1Luc 构建体的萤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,而常氧条件下为 322.1)。相比之下,Ad5PPE-1(3X)Luc 构建体在对低氧应答时仅表现出 1.5 倍的增加(从常氧条件下的 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 3X 序列时所观察的高常氧表达水平在一定程度上起掩蔽低氧应答的作用。

[0600] 实施例 23

[0601] 在转基因小鼠模型中 PPE-1 对低氧应答的测定

[0602] 为了检查经历区域低氧/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 (Couffinhal T. 等, (1998) Am. J. Pathol. 152 ;1667-1679) 所述,诱发小鼠发生区域性后肢局部缺血。简而言之,用戊巴比妥钠 (40mg/kg, IP) 麻醉动物。通过对邻近隐动脉和腘动脉分叉处约 2mm 的右股动脉结扎,诱发后肢单侧局部缺血。为了证实灌注中功能变化的诱导,通过配备 7.5MHz 转换器和血管造影软件的 Synergy 超声波系统 (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圈养最高达 18 天。

[0603] 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、肺和主动脉中的萤光素酶表达。

[0604] 在图 36 中总结的结果显示,尽管在结扎后数天期间,在肝、肺和主动脉中没有检测到显著性差异,但是在股动脉结扎后萤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均增加。尽管在结扎后 5 天在局部缺血肌肉中检测到峰值萤光素酶表达,但在股动脉结扎后 10 天在未结扎肌肉中检测到峰值萤光素酶表达。这表明 PPE-1 启动子的低氧应答在体内系统中是有功能的。非局部缺血肌肉中的萤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萤光素酶表达明显高于其它时间点。

[0605] 第 5 天, PPE-1 驱动的萤光素酶表达为在对照未经手术小鼠中,及第 10 天和第 18 天局部缺血肌肉的 2.5 倍 (图 51)。

[0606] 在经历区域局部缺血的转基因小鼠的其它非局部缺血组织包括肝、肺和主动脉中的萤光素酶表达揭示出,在诱发局部缺血后 18 天内,在这些组织中的萤光素酶表达没有显著变化 (图 52)。

[0607] 此外,这些结果证实,萤光素酶表达在含有高百分比内皮组织的组织 (肺和主动脉) 中比在含有低百分比内皮组织的组织 (肝和非局部缺血肌肉) 中高。

[0608] 实施例 24

[0609] 细胞增殖水平对内皮细胞中 Ad5PPE-1Luc 活性的作用

[0610] 为了确定细胞增殖水平对 Ad5PPE-1Luc 的效率和比活性的作用,体外测试内皮细胞血管生成性模型 (BAEC)。通过血清除尽诱导经转导的 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,作为静息细胞 - 血清除尽后 72 小时,或者作为增殖细胞 - 在正常培养基 (10% FCS) 中。萤光素酶活性以光单位 / ? g 蛋白表示,以对细胞量差异标准化。所给出的结果是得自 4 个代表性独立实验的一式三份试验的平均值。

[0611] 处于 PPE-1 启动子控制之下的萤光素酶表达 (空心条 ;图 28) 在正常增殖的 BAEC 中是在静息细胞中的 4 倍,且在正常增殖的 BAEC 中是处于 CMV 启动子控制之下的萤光素酶表达的 25 倍 (黑色条 ;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。

[0612] 为了体外模拟血管生成性状况,测试通过加入 40ng/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,比较在这些条件下正常增殖细胞和静息细胞中的活性。用 VEGF 诱导细胞增殖的 BAEC 中的萤光素酶表达是在正常增殖细胞中的 44 倍,且是在静息细胞中的 83 倍 (图 40)。

[0613] 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,快速增殖引起较高水平的表达。

[0614] 实施例 25

[0615] 对诱发动脉粥样硬化的小鼠中的 PPE-1 启动子的测定

[0616] 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) 全身注射 10^{10} pfu/ml 病毒载体。

[0617] 随着 ApoE 缺陷型小鼠衰老,在没有脂质获取膳食 (lipid reach diet) 诱导的情况下,它们发展高胆固醇值和广泛的致动脉粥样硬化斑。图 43 是从 ApoE 缺陷型小鼠解剖的 Sudan-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,而腹区高度动脉粥样硬化。(图 43,摘自 Imaging of Aortic atherosclerotic lesions by 125I-HDL and 125I-BSA. A. Shaish 等, Pathobiology-Pathobiol 2001 ;69 :225-9)。

[0618] 图 44 总结了给 ApoE 缺陷型小鼠全身注射 Ad5PPE-1Luc (空心条 ;n = 12) 和 Ad5CMVLuc (黑色条 ;n = 12) 后 5 天所观察到的萤光素酶表达。结果以含有较少动脉粥样硬化病变的胸区和富含动脉粥样硬化病变的腹主动脉中的绝对萤光素酶表达来表示。

[0619] 与处于对照 CMV 启动子之下的表达相比,受 PPE-1 启动子控制的萤光素酶表达在高度动脉粥样硬化的腹部中为 6 倍高,而在轻微动脉粥样硬化的胸主动脉中为 1.6 倍高。

[0620] 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,而与含有病变的腹主动脉中的低表达相比,在 Ad5CMVLuc 注射组的胸主动脉中观察到较高的萤光素酶表达。

[0621] 这些结果表明,尽管组成型启动子 (CMV) 在动脉粥样硬化最严重的区域往往不起作用,但 PPE-1 启动子相对而言不受疾病进程影响。

[0622] 实施例 26

[0623] 伤口愈合模型中 PPE-1 启动子的测定

[0624] 为了测试 Ad5PPE-1 构建体在将萤光素酶表达导向愈合伤口血管方面的效率和比活性,使用如上文在材料和方法中描述的鼠伤口愈合。

[0625] 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 45 ;空心条) 控制之下的萤光素酶活性在正常区域 (6.8 ± 3.2) 和愈合伤口区域 (5 ± 1.6) 中均比处于 CMV 控制 (图 45 ;黑色条) 之下所观察到的活性高。

[0626] 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 启动子在正常组织和愈合组织中都比 CMV 启动子驱动的表达水平高。坏死性瘢痕组织的存在可能是在愈合伤口中用两种启动子所观察到的表达水平降低的原因。

[0627] 实施例 27

[0628] VEGF 和 PDGF-B 对局部缺血肌肉血管的靶向表达

[0629] 体内诱导血管生成时常导致产生由内皮细胞组成的原始血管网络。这些新生血管容易破裂、有退化和渗漏倾向并且灌注差。为了克服这些局限,需要定位、定时和剂量可控地递送各种能够募集内皮细胞以及内皮周细胞 (即小血管中的周细胞或较大血管中的平滑肌细胞) 的血管生成因子。

[0630] 修饰型前内皮素原 -1 启动子 PPE-1-3X 用于在局部缺血肢体肌肉的内皮中表达 VEGF 或 PDGF-B,即将平滑肌细胞募集到分泌起源的内皮分泌的因子,从而阻止新形成的血

管的高渗透性。

[0631] 为了测定 VEGF 和 PDGF-B 在局部缺血组织中的表达,进行原位杂交。如图 54A-C 所示,尽管在来自 Ad5PPE-1-3XVEGF 治疗小鼠的局部缺血肌肉切片中可检测到 VEGF mRNA 的显著表达,但在 Ad5CMVVEGF 或盐水治疗小鼠的肌肉切片中基本上没有观测到信号。类似地,在用 Ad5PPE-1-3XPDGF-B 治疗的小鼠的局部缺血肢体肌肉中检测到 PDGF-B mRNA 的存在,但在 Ad5CMVPDGF-B 或盐水治疗小鼠中却没有检测到(图 54E-G)。有趣的是,图 12A 和图 12E 中的信号模式类似血管结构。值得注意的是,各种治疗组的代表性肝切片证明 VEGF 或 PDGF-B 在 Ad5CMV 治疗的动物中大量表达(图 54D 和 54H),而在 Ad5PPE-1-3X 载体治疗小鼠的肝中没有检测到表达(数据未显示)。

[0632] 总而言之,该测定表明,Ad5PPE-1-3X 载体介导血管生成因子在靶器官中的可测量表达,而组成型 Ad5CMV 载体几乎只在肝组织中表达其转基因。

[0633] 实施例 28

[0634] PPE 介导的 VEGF 表达增强的血管生成

[0635] 将 Ad5PPE-1-3XVEGF 的治疗作用与先前报道的 Ad5CMVVEGF 的治疗作用进行比较。股动脉结扎后 5 天,将 10^9 PFU 的任一治疗载体以及报告载体 Ad5CMV 萤光素酶和等体积的盐水(作为对照)全身施用于小鼠。以血管造影模式获得两个肢体的内侧面(medial aspect)的超声波(US)图像。如图 38A-D 所示,在结扎后 21 天,对照动物中的灌注信号减少并截短;然而,在 Ad5PPE-1-3XVEGF 治疗小鼠和 Ad5CMVVEGF 治疗小鼠的 US 图像中均观察到持续增强的信号。在两个 VEGF 治疗组中,第 21 天的平均灌注强度是对照组平均灌注强度的 3 倍以上($p < 0.01$),并且与所述动物的正常对侧肢体记录的结果相似(图 38E)。股动脉结扎并使用内皮特异性标记抗 CD-31 后 21 天进行的免疫组织化学分析显示,分别与 Ad5CMVVEGF 组和对照组中的 585 和 485 个 CD31+ 细胞/ mm^2 相比,在 Ad5PPE-1-3XVEGF 治疗小鼠的局部缺血肌肉切片中的平均值为 546 个 CD31+ 细胞/ mm^2 (图 38F)。该数据表明,用 Ad5PPE-1-3XVEGF 短期治疗与 Ad5CMVVEGF 的有效 CMV 启动子治疗同样有效。此外,用 H&E 染色的小鼠肝切片显示,没有肝炎或其它慢性病理变化的指征(数据未显示),从而排除了腺病毒对肝细胞的向性效应。

[0636] 实施例 29

[0637] PPE 调节的表达延长的 VEGF 基因治疗的作用

[0638] 考察针对血管生成诱导的促血管生成因子的组织特异性表达和组成型表达的对比。在长达 70 天的实验中,对 PPE 调节的和 CMV 调节的 VEGF 表达对灌注和血管生成的作用进行了测试。具有局部缺血肢体的小鼠如上进行治疗(参见实施例 28)。US 成像揭示出自病毒施用后 1-2 周开始在两个治疗组中灌注方面的显著改善,而在对照组中检测到微小变化(数据未显示)。股动脉结扎后 50 天和 60 天,检测到 Ad5PPE-1-3XVEGF 治疗的长期作用。与 Ad5CMVVEGF 或盐水治疗的小鼠相比,在 Ad5PPE-1-3XVEGF 治疗的小鼠中灌注显著增加。Ad5CMVVEGF 治疗动物和对照治疗动物之间的灌注差异在那个时间间隔期间减少。第 50 天,Ad5PPE-1-3XVEGF 治疗组的平均灌注强度比 Ad5CMVVEGF 或盐水治疗小鼠的平均灌注强度高约 50%,而与对侧正常肢体的平均灌注强度相似($p < 0.01$,图 55A)。第 70 天处死动物后,Ad5PPE-1-3XVEGF 治疗小鼠的肌肉切片中的毛细血管密度为 747 个 CD31+ 细胞/ mm^2 ,分别比 Ad5CMVVEGF 组(474 个 CD31+ 细胞/ mm^2)和对照组(342 个 CD31+ 细胞/ mm^2)

高 57% 和 117% ($p < 0.01$, 图 55B)。

[0639] 实施例 30

[0640] PPE 启动子内皮特异性 PDGF-B 表达增强的血管生成

[0641] PDGF-B 是旁分泌内皮分泌的因子, 已经表明它通过募集平滑肌细胞而参与血管成熟, 且也可能参与血管生成 [Edelberg, J. M. 等, *Circulation* 105, 608-13. (2002); Hsu 等, *J Cell Physiol* 165, 239-45. (1995); Koyama, N. 等, *J Cell Physiol* 158, 1-6. (1994)]。另外, 已经表明 PDGF-B 参与内膜增厚 [Sano, H. 等, *Circulation* 103, 2955-60. (2001); Kaiser, M. 等, *Arthritis Rheum* 41, 623-33. (1998)], 并参与成纤维细胞增殖 [Nesbit, M. 等, *Lab Invest* 81, 1263-74. (2001); Kim, WJ. 等, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1364-72. (1999).]。在体外和体内测试 PDGF-B 处于内皮特异性调节下诱导血管生成的能力。

[0642] 同 Ad5PPE-1-3XVEGF 一样, Ad5PPE-1-3XPDGF-B 载体在体外诱导内皮细胞中的血管生成性变化 (数据未显示)。用 10MOI 的 Ad5PPE-1-3XPDGF-B 转导在血纤蛋白包被的培养器具中培养的内皮细胞导致形成二维环状结构和血纤蛋白降解。

[0643] 对于体内作用, 在股动脉结扎后 5 天用 10^9 PFU 的 Ad5PPE-1-3XPDGF-B 对小鼠进行全身治疗。结扎后 30 天, Ad5PPE-1-3XPDGF-B 治疗小鼠的平均灌注强度比对照组的平均灌注强度高约 90% (图 56A)。结扎后 80 天, Ad5PPE-1-3XPDGF-B 治疗组的灌注强度比对照组的灌注强度高 60% (图 56B)。

[0644] 结扎后 35 天和 90 天测量毛细血管密度。在短时间间隔内, Ad5PPE-1-3XPDGF-B 治疗小鼠的局部缺血肌肉切片中的平均毛细血管密度为 516 个 CD31+ 细胞 /mm², 而在盐水治疗组中, 平均毛细血管密度为 439 个 CD31+ 细胞 /mm² (图 56C)。结扎后 90 天, Ad5PPE-1-3XPDGF-B 治疗小鼠的平均毛细血管密度略微增加到 566 个 CD31+ 细胞 /mm², 而在对照组中检测到中等减少 (378 个 CD31+ 细胞 /mm², 图 56D)。

[0645] 结果表明, Ad5PPE-1-3XPDGF-B 载体本身是有效的血管生成治疗, 它不仅在施用后短期内诱导血管生成, 而且能够长时间段地维持治疗作用。在用 Ad5PPE-1-3XPDGF-B 治疗小鼠的肝中没有检测到慢性变化。

[0646] 实施例 31

[0647] 内皮细胞中的 PDGF-B 表达使血管成熟

[0648] 采用两种治疗模式检验以下假设: 在联合疗法中使用 VEGF 和 PDGF-B 这两者可实现血管生成和血管系统成熟的进一步增强, 这两种治疗模式是: (i) 单次施用 10^9 PFU 的 Ad5PPE-1-3XVEGF 和 Ad5PPE-1-3XPDGF-B; (ii) 在施用 Ad5PPE-1-3XVEGF 后 5 天施用相似剂量的 Ad5PPE-1-3XPDGF-B。这两种模式均获得相同的结果, 且因此将其认为是相同的。结扎后 90 天, 与对照 Ad5PPE-1-3XGFP 治疗的小鼠相比, 所述联合疗法和 Ad5PPE-1-3XVEGF 治疗小鼠均表现出显著更高的毛细血管密度, 但在各种治疗组中不存在显著性差异 (图 57B)。然而, 联合疗法组中 US 成像的平均灌注强度比 Ad5PPE-1-3XVEGF 治疗组最高高 42% (图 57A)。这可用联合疗法组和 Ad5PPE-1-3XPDGF-B 治疗小鼠的局部缺血肌肉中小血管的成熟来解释。在用联合疗法或 Ad5PPE-1-3XPDGF-B 治疗小鼠的对 α -SMA 免疫染色的肌肉切片中, 观察到血管平滑肌细胞的明显染色 (图 57C-D)。在对照和 Ad5PPE-1-3XVEGF 治疗小鼠中可以观察到稀疏染色 (图 57E-F)。在正常肢体肌肉中, 较大的小动脉和小静脉周围

存在明显染色（图 57G）。在用 Ad5PPE-1-3XPDGF-B 治疗的小鼠中，相似的结果早在结扎后 35 天就可获得（数据未显示）。结扎后 35 天，治疗小鼠肝切片中的慢性变化不明显。

[0649] 这些结果在独立的实验中得到进一步证实，该实验考察单独的和联合疗法中的 PDGF-B 对结扎后 50 天血液灌注的作用。如图 58 所示，结扎后 50 天，联合疗法组的血液灌注强度与正常肢体的十分相似。该作用是 PPE-3X 依赖性的，因为这两种生长因子的组成型表达（CMV 启动子）仅导致产生一半的灌注能力。有趣的是，单独的 PDGF-B 的 PPE-3X 依赖性表达可以介导与联合疗法诱导几乎相同的灌注（即 77%）。然而，使用组成型启动子时这样的结果并不明显。

[0650] 这些结果证实，PPE-1-3X 启动子尽管全身施用也能够足够强地激活治疗基因，而不损害在血管生成性内皮细胞中的优先表达。此外，这些结果还证实 PDGF-B 为可介导其血管生成作用的促血管生成因子，而无需再加入公认的血管生成生长因子如 VEGF。

[0651] 实施例 32

[0652] 构建和表征 AdPPE-1(3x)-TK 载体

[0653] HSV-TK/GCV 是最广泛研究和实施的细胞减少性基因药物联合。使用含 HSV-TK 的质粒转染的细胞或用含 HSV-TK 的载体转导的细胞对包括阿昔洛韦、更昔洛韦（GCV）、伐昔洛韦和泛昔洛韦在内的药物超家族敏感。鸟苷类似物 GCV 在与 TK 组合时是活性最强的药物。HSV-TK 阳性细胞产生病毒 TK，其将 GCV 磷酸化成单磷酸 GCV（GCV-MP）的有效性高达人 TK 的 3 个数量级。GCV-MP 随后由天然胸苷激酶磷酸化成二磷酸 GCV，且最终磷酸化成三磷酸 GCV（GCV-TP）。

[0654] 首先，制备两种质粒。一种质粒包含受控于修饰型鼠前内皮素原 -1（PPE-13x）启动子的 HSV-TK 基因，且制备该质粒以检验由 PPE-1(3x) 启动子控制的基因的体外功效。制备含由 PPE-1(3x) 启动子控制的 HSV-TK 基因以及腺病毒序列的更大质粒，用于通过同源重组制备病毒载体。通过两种限制酶由 4348bp 的质粒 pORF-HSV1TK 消化出 HSV-TK 基因（1190bp）。SalI 限制位点靠着（against）HSV-TK 基因的 5' 末端定位，且 EcoRI 位点靠着 3' 末端定位。将 HSV-TK 基因连接至 3400bp 质粒 pBluescript-SK 的多克隆位点，所述质粒 pBluescript-SK 在插入的基因的上游含 NotI 限制位点（靠着 HSV-TK 基因的 3' 末端）。SalI 位点经受克列诺（Klenow）程序，且 NotI 接头连接至 HSV-TK 基因的 5' 末端。HSV-TK 基因（现在由两个 NotI 限制位点翼侧包围）连接至上文所述的两个质粒 pEL8(3x)-Luc 和 pACPPE-1(3x)-GFP 的 NotI 限制位点中：

[0655] 1. 8600bp 质粒称为 pEL8(3x)-Luc，代替 1842bp 的萤光素酶基因，侧接两个 NotI 限制位点。pEL8(3x)-TK 质粒包含 PPE-1(3x) 启动子、HSV-TK 基因、SV-40 聚腺苷酸化位点和鼠内皮素 -1 基因的第一内含子（图 60a）。

[0656] 2. 11946bp 质粒 pACPPE-1(3x)-GFP，代替 1242bp 的绿色荧光蛋白（GFP）基因，由两个 NotI 限制位点翼侧包围（图 60b）。

[0657] 构建具有受控于修饰型鼠前内皮素原 -1 启动子的 HSV-TK 基因的腺病毒 -5 载体。在第一代（E1 基因缺失，E3 不完整）腺病毒 -5 载体的基础上构建称为 AdPPE-1(3x)-TK 的复制缺陷型载体。使用众所周知的常规克隆技术，通过质粒 pACPPE-1(3x)-TK 和 pJM-17(40.3kb) 在人胚肾 -293（HEK-293）中的共转染制备重组载体。pJM-17 质粒包含除 E1 基因之外的完整腺病毒 -5 基因组。HEK-293 细胞系替代了 E1 缺失，因为它们含反式 E1

基因。40 种同源重组中有一种诱导载体 AdPPE-1 (3x)-TK。

[0658] AdPPE-1 (3x)-TK 载体表征。对病毒 DNA 进行 PCR 分析,以验证重组腺病毒中 TK 转基因和启动子的存在。使用两种引物:正向引物 5' -ctcttgattccttgaactctg-3' (前内皮素原启动子序列中的 455-474bp) (SEQ ID No:9) 和反向引物 5' -taaggcatgcccattgttat-3' (HSV-TK 基因序列中的 1065-1084bp) (SEQ ID No:10)。使用在我们的实验室中产生的其它载体引物,以验证载体纯度。约 1kb 的条带证实 AdPPE-1 (3x)-TK 病毒中存在 PPE-1 (3x) 启动子和 HSV-TK 基因 (图 61)。但是,构建的腺病毒载体的其它引物没有一个能提供任何产物。因此,所述载体是纯集落。

[0659] 所述病毒在 HEK-293 细胞中进一步纯化,以分离单个病毒克隆。

[0660] 在双脱氧核苷酸存在下通过循环测序反应对 AdPPE-1 (3x)-TK 的病毒 DNA 测序,对其进行化学修饰,以在 UV 光下发荧光。4 种引物用于验证完整转基因的存在:

[0661] 1. 正向引物 5' -ctcttgattccttgaactctg-3' (在前内皮素原启动子中的 455-474bp) (SEQ ID NO:9),之后是“3x”元件。

[0662] 2. 反向引物 5' -gcagggctaagaaaaagaaa-3' (在前内皮素原启动子中的 551-570bp) (SEQ ID NO:11)。

[0663] 3. 正向引物 5' -tttctttttcttagccctgc-3' (在前内皮素原启动子中的 551-570bp) (SEQ ID NO:12)。

[0664] 4. 反向引物 5' -taaggcatgcccattgttat-3' (在 HSV-TK 基因中的 1065-1084bp) (SEQ ID NO:10),其处于 HSV-TK 基因中。

[0665] 使用称为 2 (SEQ ID NO:11) 和 3 (SEQ ID NO:12) 的引物,因为仅由引物 1 (SEQ ID NO:9) 和 3 (SEQ ID NO:10) 不能获得产物。结果显示与小鼠 (*Mus musculus*) Balb/c 前内皮素原-1 基因启动子区 gi|560542|gb|U07982.1|MMU07982[560542] (SEQ ID NO:1) 具有 99% 同一性,以及显示出与单纯疱疹病毒胸苷激酶基因 gi|59974|emb|V00470.1|HERPES[59974] 具有 99.4% 同一性。AdPPE-1 (3X) 序列详述于图 92。

[0666] 3x 序列 (图 93) 包含内皮特异性正转录元件的额外一式三份重复。如上文所述,在此 145bp 序列中,有两个完整的内皮特异性正转录元件和一个被切成两个反向顺序的片段的序列。

[0667] 对照载体。构建两个腺病毒载体,一个没有 PPE-1 (3x) 启动子,且第二个没有 Luc 基因,以用作 AdPPE-1 (3X) 载体的对照。载体 AdCMV-TK (用作非组织特异性启动子对照) 包含由早期巨细胞病毒 (CMV) 启动子控制的 HSV-TK 基因 (图 62c)。载体 AdPPE-1 (3x)-Luc 包含由修饰型鼠前内皮素原-1 启动子控制的萤光素酶 (Luc) 基因 (图 62b)。所述病毒以按比例放大批次培养,并以 10^9 - 10^{12} 颗粒/ml 的浓度储存于 -20°C 。

[0668] 实施例 33

[0669] 更昔洛韦和处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 的细胞毒性:在 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 在体外的优良内皮细胞细胞毒性通过与对照载体 AdCMV-TK 和 AdPPE-1 (3x)-Luc 对比,在内皮细胞系中体外评价 AdPPE-1 (3x)-TK 的特异性内皮细胞靶向的细胞毒性。

[0670] AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 在低感染复数 (moi) 时有细胞毒性:用感染复数 (m. o. i.) 为 0.1、1、10、100 和 1000 的 AdPPE-1 (3x)-TK、AdCMV-TK 和 AdPPE-1 (3x)-Luc 转导牛主动

脉内皮细胞 (BAEC)。转导后 4 小时加入 GCV ($1 \mu\text{g/ml}$)。对照是用无 GCV 的载体或无载体的 GCV 转导的细胞。两个对照都未诱导细胞死亡 (数据未显示)。于显著低于 AdCMV-TK 的 m. o. i. 在 AdPPE-1 (3x)+GCV 处理细胞中注意到明显的细胞毒性的特征性形态学变化 (细胞扩大、延伸和膨胀) 和汇合丧失。AdPPE-1 (3x)-Luc 转导的细胞保持健康 (小尺寸、圆形和汇合, 图 63)。通过用结晶紫染色测定评价细胞生存力 (图 64), 证实与 GCV 施用组合的 AdPPE-1 (3x)-TK 载体在 BAE 细胞中于低于受强组成型 CMV 启动子控制的 TK 基因的 m. o. i. 表现出较高的细胞毒性。

[0671] AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 在低浓度 GCV 时有细胞毒性: 如上文所述, 用 AdPPE-1 (3x)-TK、AdCMV-TK 和 AdPPE-1 (3x)-Luc 以感染复数 (m. o. i.) 10 转导牛主动脉内皮细胞 (BAEC), 并使该细胞接触转导后 4 小时加入的浓度渐增的 GCV ($0.001-10 \mu\text{g/ml}$, 如图所示)。用无 GCV 的载体转导的对照细胞或接受无载体的 GCV 的对照细胞在任何浓度都未显示出细胞死亡的指征 (数据未显示)。在比接触 AdCMV-TK (中间系列) 的细胞显著低的 GCV 浓度, 在 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 处理细胞中注意到明显的细胞毒性的特征性形态学变化 (细胞扩大、延伸和膨胀) 和汇合丧失 (图 65)。通过用结晶紫染色测定评价细胞生存力 (图 66), 证实与 GCV 施用组合的 AdPPE-1 (3x)-TK 载体在 BAE 细胞中且于比受强组成型 CMV 启动子控制的 TK 基因低的 GCV 浓度表现出较高的细胞毒性。

[0672] AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 细胞毒性对内皮细胞是特异性的: 为了评价载体 AdPPE-1 (3x)-TK 对内皮细胞的特异性和功效, 用 AdPPE-1 (3x)-TK、AdPPE-1 (3x)-Luc 或 AdCMV-TK 以 m. o. i. 10 转导内皮细胞 [牛主动脉内皮细胞 (BAEC)、人脐静脉内皮细胞 (HUVEC)] 和非内皮细胞 [人肝癌细胞 (HepG-2)、人正常皮肤成纤维细胞 (NSF)], 接着在转导后 4 小时施用 $1 \mu\text{g/ml}$ GCV。转导后 4 天检测细胞毒性和细胞形态学变化。AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 在 BAEC 和 HUVEC 中特异性地诱导细胞毒性, 而 AdCMV-TK+GCV 仅在 HepG-2 中诱导细胞毒性。NSF 对 m. o. i. = 10 的所有载体都有抗性。AdPPE-1 (3x)-Luc+GCV 对所有细胞类型都无毒 (图 67)。通过用结晶紫染色测定评价细胞生存力 (图 68), 证实与受强组成型 CMV 启动子控制的 TK 基因 (AdCMV-TK+GCV) 的非特异性细胞毒性相比, 与 GCV 施用组合的 AdPPE-1 (3x)-TK 载体表现出协同的内皮细胞特异性细胞毒性。

[0673] 用 AdPPE-1 (3x)-TK、AdPPE-1 (3x)-Luc 或 AdCMV-TK 以较高的 m. o. i. 100 转导非内皮性 NSF 细胞, 接着在转导后 4 小时施用 $1 \mu\text{g/ml}$ 的 GCV 时, 未观察到 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 对细胞形态学的作用 (图 69)。相反, 用处于强组成型 CMV 启动子控制之下的 TK (AdCMV-TK+GCV) 处理的细胞显示出强的非特异性细胞毒性, 从而证实了即使在极端的感染复数下, 处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 和更昔洛韦施用也有内皮选择性细胞毒性。

[0674] 总之, 这些结果首次表明, 载体 AdPPE-1 (3x)-TK 能够特异性诱导内皮细胞包括人内皮细胞的杀伤。而且, 载体 AdPPE-1 (3x)-TK 完全受控于前药 GCV, 且于相对低的 GCV 浓度具有相当的活性。最后, 尽管腺病毒载体的内皮细胞转导功效相对低, 但内皮细胞杀伤是高效的。

[0675] 实施例 34

[0676] 施用更昔洛韦和处于 PPE-1 (3x) 启动子控制下的 TK 的治疗作用: 在 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 在体内的优良内皮细胞细胞毒性在癌症肿瘤发生和转移生长的动物

模型中,通过与全身施用 GCV 和对照载体 AdCMV-TK 和 AdPPE-1 (3x)-Luc 相比,体内评价 AdPPE-1 (3x)-TK 的特异性内皮细胞靶向的细胞毒性的治疗功效。

[0677] 处于 PPE-1 (3x) 启动子控制下的 TK 体内表达和更昔洛韦 (GCV) 施用对 Lewis 肺癌 (LLC) 中转移性生长的协同抑制作用: Lewis 肺癌是充分表征的、具有高度转移潜力的严重侵袭性恶性癌症的动物模型。已尝试了使用细胞因子 IL-2 (Kwong 等, Chest 119 :112 :1332-37)、采用内皮启动子 Tie/Tek 和 GCV (dePalma 等, Nat Med 2003 ;9 :789-795) 以及体外 VEGF 启动子和 GCV (Koshikawa 等, Cane Res 2000 ;60 :2936-41) 与 HSV-TK 进行联合治疗。为了测试全身施用 AdPPE-1 (3x) 和 GCV 对转移性疾病的作用,通过用肿瘤细胞接种左足且一发展原发性肿瘤就截足来诱发 LLC 肺转移。去除原发性肿瘤后 5 天静脉内施用腺病毒载体 [AdPPE-1 (3x)-TK+GCV ;AdCMV-TK+GCV ;无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK], 接着每日腹膜内施用 GCV 达 14 天。

[0678] 如下排除小鼠: 22 只小鼠由于无发展原发性肿瘤而被排除, 1 只小鼠由于载体注射失败而被排除, 8 只小鼠无任何肺转移踪迹而死亡。在排除的小鼠中, 18 只小鼠在入选前被排除, 6 只由组 1 (AdPPE-1 (3x)-TK+GCV) 排除, 2 只由组 2 (AdCMV-TK+GCV) 排除, 3 只由组 3 (无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK) 排除, 且 2 只由组 4 (盐水 +GCV) 排除。在载体注射后第 24 天处死小鼠。在第 24 天, 对照组 (盐水 +GCV 和无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK) 中 25% 的小鼠由于肺转移扩散而死亡。图 70 显示了治疗组和对照组的代表性肺组织, 从而表明在 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗小鼠的肺中的转移扩散程度比 AdCMV-TK+GCV、无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK 和无腺病毒的 GCV 治疗的小鼠肺中的转移扩散程度显著降低。

[0679] 在处死后, AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗的小鼠转移的平均重量 (转移性疾病程度指标) 低至用无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK 治疗小鼠的该平均重量的 1/3. 3 (平均值 $\pm$ SE : 分别为 $0.3\text{g} \pm 0.04$ 对 $0.8\text{g} \pm 0.2$; $p < 0.05$)。用 AdCMV-TK+GCV 或用盐水 +GCV 治疗的小鼠转移的平均重量与其它组别的该平均重量无统计学差异 (图 71)。

[0680] 处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 体内表达和更昔洛韦 (GCV) 对转移性肺组织的细胞毒性作用: 为了确定 AdPPE-1 (3x) 和 GCV 施用对 LLC 转移生长的作用机制, 对转移性肺的肺组织进行苏木精和伊红染色 (图 72a-72c)。在取自无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK 或盐水 +GCV 治疗小鼠的肺转移中检测到轻微的外周坏死 (图 72a)。取自 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗小鼠的肺组织表现出肺泡和支气管周围单核浸润, 而在取自用无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK 或盐水 +GCV 治疗小鼠的肺中未检测到浸润。与取自用无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK 或盐水 +GCV 治疗小鼠的转移相比, 取自 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗小鼠的肺转移表现出单核浸润簇 (图 72b、c)。还在取自 AdCMV-TK+GCV 治疗小鼠的标本中检测到最少的坏死和单核浸润。结果提示, AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 在肺转移中诱导增加的中心坏死和单核浸润。

[0681] 为确定负责 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 对 LLC 肺转移的抑制作用的细胞死亡特征, 对肺组织进行 TUNEL 和抗胱天蛋白酶 -3 染色, 以评价凋亡。与无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK 或盐水 +GCV 治疗小鼠相比, AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗小鼠的肺转移呈现出众多的凋亡肿瘤细胞 (图 73a 和 73b)。与 AdCMV-TK+GCV 治疗小鼠的标本相比, 取自 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗小鼠肺之标本的组织病理学切片显示出显著更高层次的 DNA 损伤 (TUNEL, 图 73a) 和胱天蛋白酶 -3 (图 73b), 从而表明肿瘤细胞凋亡。更有意义的是, 转移肺的组织病理切片的 TUNEL

和胰天蛋白酶-3 染色在静脉内 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗小鼠肺转移血管(内皮)区中表现出增强的凋亡(图 74),从而表明处于 PPE-1 (3x) 启动子控制下的 TK 体内表达和更昔洛韦(GCV)施用对转移细胞凋亡的协同增强作用。结果提示,全身施用 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 诱导大规模的肿瘤细胞凋亡。而且,血管生成性内皮细胞凋亡可能是大规模中心转移坏死和凋亡的机制。

[0682] 处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 表达和更昔洛韦(GCV)施用在转移性疾病中具有体内抗血管生成作用:CD-31 是血管生成的特征性内皮细胞标记。对转移肺组织进行抗 CD-31 染色,以确定内皮细胞涉及全身性 AdPPE-1 (3x)+GCV 的抗转移作用的情况。图 75a-75d 揭示,AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗小鼠的肺转移中的血管生成性血管短,无连续性或分支,且边界模糊(图 75a-75c)。在无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK 或盐水+GCV 治疗小鼠的肺转移中的血管生成性血管表现为具有丰富分支和明显边界的长血管(图 75a)。在 AdCMV-TK+GCV 治疗小鼠的肺转移中也检测到最低程度的异常血管系统,尽管远小于 AdPPE-1 (3x)-TK 治疗小鼠的状况(未显示)。对肝血管没有作用说明了对增殖的内皮组织的这种抗血管生成作用的特异性(图 75c)。基于计算机的血管密度测量(Image Pro-Plus, Media Cybernetics Incorporated)表明,AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 组的肺转移中的血管密度小至无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK 治疗组的 1/1.5(分别为 $40107.7 \mu\text{m}^2$ 对 $61622.6 \mu\text{m}^2$)(图 75d)。

[0683] 综上所述,这些结果表明,全身施用 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 通过高度选择性诱导血管生成内皮细胞凋亡而诱发中心转移坏死和凋亡。

[0684] 全身 AdCMV-TK+GCV 施用在具有 LLC 肺转移的小鼠中诱发肝脏毒性。因为全身施用腺病毒载体的其中一种主要副作用是肝毒性,所以在具有诱发的 LLC 肿瘤的 C57BL/6 小鼠中测定肝形态学。治疗肝组织和对照肝组织的苏木精和伊红染色切片分析揭示,用处于组成型启动子 AdCMV-TK 控制之下的 TK+GCV 治疗的小鼠的肝表现出门(portal)和门管周单核浸润以及小汇合坏死区域,而 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗小鼠和对照组的肝仅表现出最小的单核浸润和肝细胞核增大(图 76)。结果表明,尽管处于 CMV 启动子控制之下的 TK 组成型表达明显有肝毒性,但采用血管生成特异性 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗没有观察到对肝形态学的不利副作用。

[0685] 处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 体内表达的严格器官特异性:为评价处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 HSV-TK 表达的抗转移作用的器官和组织特异性程度,使用 HSV-TK 引物和 β -肌动蛋白引物对用腺病毒载体治疗的具有 LLC 肺转移的小鼠不同器官的多种组织进行 PCR 分析。

[0686] 9 只 15 周龄的 C57BL/6 雄性小鼠入选。通过用肿瘤细胞接种左足以及一发展原发性肿瘤就截足来诱发 LLC 肺转移。在去除原发性肿瘤后 14 天静脉内递送腺病毒载体(AdPPE-1 (3x)-TK 和 AdCMV-TK)或盐水。在注射载体后 6 天处死小鼠,且如所述由收获的器官提取 RNA。对 RNA 实施逆转录酶 PCR,接着使用 HSV-TK 引物和 β 肌动蛋白引物进行 PCR。在 AdPPE-1 (3x)-TK 治疗小鼠的肺中检测到阳性 HSV-TK 表达,而在肝中没有检测到 HSV-TK 表达。相比之下,在 AdCMV-TK 治疗的小鼠肝中检测到高度阳性的 HSV-TK 表达,且在肺中没有检测到表达(图 77)。根据 β 肌动蛋白校正的基于计算机的光密度测定法(Optiquant, Packard-Instruments)表明,与 AdCMV-TK 治疗小鼠中的肝/肺表达

比率 5.8 相比, AdPPE-1 (3x)-TK 治疗小鼠中的肝 / 肺表达比率为 11.3。这些结果表明, AdPPE-1 (3x)-TK 治疗小鼠主要在富血管生成器官 (即转移性肺) 中表达 HSV-TK 基因, 而处于 CMV 启动子控制之下的 TK 表达 (AdCMV-TK 治疗小鼠) 主要在柯萨奇腺病毒受体富集器官如肝中进行 (图 77)。还在 AdPPE-1 (3x)-TK 治疗小鼠的睾丸中检测到强阳性 HSV-TK 表达。尽管不希望受限于单一假设, 但将认识到, 在 AdPPE-1 (3x)-TK 治疗小鼠中的阳性表达可能由性腺中内皮素启动子的高度表达来解释。在 AdCMV-TK 治疗小鼠中的阳性表达由相对高的 RNA 洗脱 (RNA elution) 来解释, 如由高度阳性的 β -肌动蛋白条带反映出来的。

[0687] 总之, 这些结果表明, 全身施用 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 通过诱导中心转移坏死和选择性诱导血管生成性内皮细胞凋亡, 可以安全和组织特异性方式有效抑制甚至高度侵袭性的癌症转移扩散。

[0688] 实施例 35

[0689] 施用更昔洛韦和处于 PPE-1 (3x) 启动子控制下的 TK 与放疗联合: 体内协同的内皮细胞细胞毒性

[0690] 就导致不希望的副作用减少的所需剂量降低和治疗持续时间缩短而言, 以及就由不同治疗机制的协同会聚产生的更大治疗功效而言, 多形式抗癌治疗提供了超越个别治疗的显著优势 (关于近期综述参见 Fang 等, Curr Opin Mol Ther 2003 ;5 :475-82)。为了测试在多形式治疗中 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 施用的功效, 评价与单剂放疗联合的全身性 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 施用对 Balb/C 小鼠中缓慢生长的原发性 CT-26 结肠癌和 C57Bl/6 小鼠中的转移性 Lewis 肺癌的作用。

[0691] 局部单剂 5Gy 放疗对具有原发性 CT-26 结肠癌肿瘤的 Balb/C 小鼠是无毒的和亚治疗性的: 用 CT-26 结肠癌接种入 20 只 8 周龄雄性 BALB/C 小鼠的左股, 以发现亚治疗性且无毒的辐射剂量。肿瘤直径一达到 4-6mm, 就用局部单剂辐射治疗小鼠。检查 4 个辐射剂量: 0Gy (黑色圆)、5Gy (空心圆)、10Gy (黑色三角形) 或 15Gy (空心三角形)。通过测量大轴和小轴每日评价肿瘤体积 [按照式 $V = \pi / 6 \times \alpha^2 \times \beta$ (α 是短轴, 且 β 是长轴) 计算]。每日通过观察和称重监控小鼠保持良好状态。与未治疗的小鼠相比, 10 和 15Gy 剂量抑制肿瘤进程的发展 (分别为 $p = 0.039$ 、 $p = 0.029$)。但是, 5Gy 剂量仅诱导部分的、非统计学显著的肿瘤发展延迟 (图 78a), 且在 5Gy 治疗小鼠中, 既没有检测到显著的重量减轻 (图 78b), 也没有检测到异常行为。根据这些结果, 在联合治疗实验中使用单剂 5Gy 放疗。

[0692] 处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 TK 体内表达和更昔洛韦 (GCV) 施用联合局部 5Gy 放疗抑制了原发性结肠癌肿瘤进展: 用 CT-26 结肠癌肿瘤细胞接种 100 只 8 周龄雄性 Balb/C 小鼠。肿瘤轴一达到 4-6mm, 就向尾静脉中静脉内注射 10^{11} PFU 病毒载体 [AdPPE-1 (3x)-TK 或 AdCMV-TK], 接着每天按指示腹膜内注射 GCV (100mg/kg 体重) 达 14 天。载体施用后 3 天, 用局部 5Gy 剂量辐射小鼠。按照式 $V = \pi / 6 \times \alpha^2 \times \beta$ (α 是短轴, 且 β 是长轴) 评价肿瘤体积。在处死时, 给小鼠照相, 且收获肿瘤和肝标本进行组织学分析。

[0693] 与其它治疗方案相比, AdPPE-1 (3x)-TK+GCV+ 放疗抑制肿瘤进展。平均肿瘤抑制持续时间约 2 周, 与腺病毒活性持续时间相匹配。AdPPE-1 (3x)-TK+GCV+ 放疗治疗组的平均肿瘤体积进展小于 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗组 ($p = 0.04$) 和 AdCMV-TK+GCV 治疗组 ($p = 0.008$)。而且, 该组 (AdPPE-1 (3x)-TK+GCV+ 放疗) 中的平均肿瘤体积进展小于所有其它组中累积的平均肿瘤体积进展 ($p = 0.0025$)、所有非辐射组 (AdPPE-1 (3x)-TK+GCV、

Ad5CMV-TK+GCV、无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK 和盐水 +GCV ; $p = 0.0005$) 中的累积平均肿瘤体积进展以及其它辐射组 (Ad5CMV-TK+GCV+ 放疗、无 GCV 的 AdPPE-1 (3x)-TK+ 放疗以及盐水 +GCV+ 放疗 ; $p = 0.041$) 中的累积平均肿瘤体积进展 (图 79a、b)。与非靶向载体 AdCMV-TK 相比,放疗仅显著加强血管生成内皮细胞转录靶向的载体 AdPPE-1 (3x)-TK ($p = 0.04$) (图 79c-f)。在没有放疗时采用所有病毒载体的治疗方案都无效。

[0694] 总之,这些结果表明了联合的 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 和放疗在体内对 CT-26 结肠癌肿瘤发展的显著协同性肿瘤抑制作用。

[0695] AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 联合放疗诱导大规模肿瘤坏死:为了确定联合的 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 和放疗的抗肿瘤发生作用的机制,对肿瘤组织进行苏木精和伊红染色。肿瘤组织是细胞过多的 (hypercellular)、凝缩的并具有高有丝分裂指数。检测所有组中的两种要素:坏死和坏死区域中的肉芽组织。与取自非辐射小鼠的肿瘤相比,取自用包含辐射的方案治疗的小鼠的肿瘤表现出更大的坏死区域和肉芽组织。在这些组中,坏死 (图 80a) 和肉芽组织 (图 80b) 主要位于中心。AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 联合放疗治疗的小鼠表现出最广泛的坏死和肉芽组织 (图 80a 和 80b),估计占标本面积的约 55% -80% (图 80)。与其它非辐射组相比,取自用无放疗的 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 治疗的小鼠的肿瘤表现出相对更大的坏死区域 (数据未显示)。结果提示,AdPPE-1 (3x)-TK+GCV+ 放疗诱发大规模中心肿瘤坏死,其部分地被肉芽组织替代。

[0696] AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 联合放疗诱导内皮细胞和大规模肿瘤凋亡:为确定负责 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 和放疗对结肠癌肿瘤的抑制作用的细胞死亡特征,对肿瘤组织进行 TUNEL 和抗胱天蛋白酶 -3 染色,以显现凋亡细胞。TUNEL 染色在辐射组中显现出中心坏死区域周围的凋亡肿瘤细胞。在由 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 联合放疗治疗小鼠取出的肿瘤中检测到比任何其它组都更多的凋亡肿瘤细胞 (图 30a)。由肿瘤切片的抗胱天蛋白酶 -3 染色检测到相同的凋亡细胞模式。而且,被凋亡肿瘤细胞包围的坏死区域 (白色箭标) 为蛇形,且就含有增加的血管密度而言是独特的 (图 81b)。凋亡区域中的血管内皮细胞表现出阳性抗胱天蛋白酶 -3 染色 (图 82)。

[0697] 总之,这些结果提示,AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 联合放疗在结肠癌肿瘤的坏死区域周围诱导大规模的肿瘤细胞凋亡。而且,肿瘤凋亡区域中的血管生成性血管密度增加、坏死和凋亡区域的形状以及内皮细胞凋亡的存在表明血管周围坏死在血管生成组织损伤之后发生。

[0698] 联合的 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 联合放疗在体内抑制肿瘤发展方面具有抗血管生成作用:CD-31 是血管生成的特征性内皮细胞标记。对肿瘤组织进行抗 CD-31 免疫染色,以证实联合治疗对内皮细胞的直接作用。由采用含单独辐射的方案治疗的小鼠取出的肿瘤切片的血管生成性血管短,没有连续性或分支,且边界模糊。施用无 GCV 的单独载体未引起异常 (图 83a),而 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 联合放疗显示出最广泛的血管异常 (图 32a)。肝血管未受影响 (图 83b)。结果表明,施用联合放疗的 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 在血管生成性血管中诱发广泛的血管破坏。

[0699] 全身性施用 AdCMV-TK+GCV 但无 AdPPE-1 (3x) 施用在具有 CT-26 结肠癌肿瘤的小鼠中诱发肝脏毒性:因为全身施用腺病毒载体的其中一种主要副作用是肝毒性,所以对载体治疗小鼠、联合治疗小鼠和对照小鼠的肝组织进行苏木精和伊红染色。每个治疗组中的

肝标本都显示出增大的肝细胞核和 Kupfer 细胞增生。最显著的变化在用有或无放疗的 AdCMV-TK+GCV 治疗小鼠中表现出来 (图 84)。在组间没有发现肝功能血浆标记 (肝酶 SGOT、SGPT) 或肾功能血浆标记 (尿素、肌酸酐) 的差异。应当指出的是,肝内皮细胞不受载体 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 联合放疗的影响 (图 84,右图)。结果表明,在 CMV 启动子控制下表达 HSV-TK 的腺病毒载体相对有肝毒性。

[0700] 综上所述,这些结果提示,AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 对于静脉内施用是安全的。而且,所述载体仅在与加入的无毒、局部递送的放疗联合时有效抑制缓慢生长的原发性肿瘤进展。尽管不希望受限于单一假设,然而看起来经由凋亡而特异性抑制肿瘤血管生成似乎是肿瘤抑制的机制。而且,AdPPE-1 (3x)-TK 载体的细胞毒性活性依赖于 GCV 和放疗的施用。

[0701] 实施例 36

[0702] 施用更昔洛韦和处于 PPE-1 (3x) 启动子控制下的 TK 联合放疗:体内协同增强转移性癌症中的存活

[0703] 为了评价 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 和单剂放疗的抗血管生成活性对癌症中的长期存活的联合作用,选择在快速转移的 Lewis 肺癌模型中全身施用载体和 GCV 和放疗。

[0704] 局部单剂 5Gy 放疗对具有 Lewis 肺癌转移的 C57Bl/6 小鼠是无毒的和亚治疗性的:用 LLC 细胞接种入 35 只 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠的左爪垫。一发展原发性肿瘤就在全身麻醉下截足。截足后 8 天在全身麻醉下施用针对小鼠胸壁的单剂放疗。检查 5 个辐射剂量:0、2、50、10 和 15Gy。去除原发性肿瘤后 3-4 周,未辐射小鼠开始体重下降,这是转移疾病的病征。由此按照去除原发性肿瘤后第 28 天的计划处死小鼠。通过观察和称重每日监控小鼠保持良好状态。用 15Gy 治疗的 6 只小鼠中有 5 只在辐射后 5 天内死亡,没有任何肺转移的症征。如下排除小鼠:1 只小鼠由于相比于其它组原发性肿瘤发展延迟 2 周而被排除。3 只小鼠在随访期间死亡,且未进行尸体剖检。在被排除的小鼠中,1 只小鼠在入选前被排除,1 只来自未治疗组,1 只来自 2Gy 组,且 1 只来自 5Gy 组。用 10Gy 治疗的小鼠的平均转移重量低于其它组的该重量,但仅与 5Gy 治疗组有统计学差异 ($p = 0.001$) (图 85a)。如前所述,15Gy 辐射治疗的小鼠在 5 天内死亡,无任何转移踪迹。10Gy 治疗小鼠在辐射后 10 天表现出非显著性的短暂重量下降 (图 85b)。因为单剂 5Gy 放疗既不是治疗性的 (图 85a) 也不是有毒性的 (图 85b),所以其用于联合治疗实验。

[0705] 联合的亚治疗性放疗和处于 PPE-1 (3x) 启动子控制下的 TK 表达连同更昔洛韦 (GCV) 施用协同抑制鼠肺癌中的转移性疾病:将 LLC 细胞接种入 180 只 8 周龄雄性 Balb/C 小鼠左爪垫中。一发展原发性肿瘤就在全身麻醉下截足。截足后 5 天,将 10^{10} PFU 载体 [AdPPE-1 (3x)-TK 或 AdCMV-TK] 注射入尾静脉中,接着每日腹膜内注射 GCV (100mg/kg) 达 14 天。载体注射后 3 天,在全身麻醉下施用针对小鼠胸壁的单剂 5Gy 放疗。

[0706] 小鼠分为 6 组:1. Ad5PPE-1 (3x)-TK+GCV, 2. Ad5CMV-TK+GCV, 3. 盐水 +GCV, 4. Ad5PPE-1 (3x)-TK+GCV+ 放疗, 5. Ad5CMV-TK+GCV+ 放疗, 和 6. 盐水 +GCV+ 放疗。小鼠排除:4 只小鼠在截腿后不久死亡,4 只小鼠由于原发性肿瘤对于入选来说太大而被排除,7 只小鼠由于原发性肿瘤发展晚而被排除,12 只小鼠没有任何肺转移踪迹而死亡,1 只小鼠由于两侧眼排出物而被排除。在排除的小鼠当中,14 只在入选前内排除,2 只由组 1 排除,2 只由组 2 排除,2 只由组 3 排除,4 只由组 4 排除,3 只由组 5 排除,且 1 只由组 6 排除。

[0707] 用 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV+ 放疗治疗的小鼠的存活显著长于任何其它治疗组中的

小鼠 ($p = 0.05$) (图 86a)。而且,相比于非靶向载体 AdCMV-TK,放疗仅显著增强血管生成性内皮细胞转录靶向的载体 AdPPE-1 (3x)-TK ($p = 0.04$) (图 86b-d)。结果表明,全身施用 AdPPE-1 (3x)-TK 载体 +GCV+ 单剂放疗的联合治疗协同延长了转移性疾病中的存活。

[0708] 实施例 37

[0709] 用处于 PPE-1 (3x) 启动子控制之下的 Fas 和 TNFR 嵌合基因的双重治疗:与阿霉素协同增强体外内皮细胞特异性

[0710] 为了测试化疗和除 HSV/TK 以外的“自杀基因”的血管生成性内皮特异性表达联合的功效,单独地和与蒽环类糖苷阿霉素 (DOX) 联合向 BAE 细胞施用 AdPPE-1 (3x)-Fas-c,其具有与 Fas- 嵌合体 (Fas-c, 参见上文的详述) 组合的 PPE-1 (3x) 启动子。

[0711] 根据 BAE 细胞中细胞存活 (% 生存力, 通过结晶紫染色评价) 测量的凋亡在 AdPPE-1 (3x)-Fas-c+DOX 治疗小鼠中显著高于在单独的 AdPPE-1 (3x)-Fas-c 或 DOX 治疗小鼠中的凋亡 (图 91)。

[0712] 这些结果表明,PPE-1 (3x) 启动子可用于指导其它治疗基因构建体的有效的、内皮特异性的表达,并且 PPE-1 (3x) 依赖性的、凋亡诱导性的 Fas-c 表达和化疗的联合导致产生高度有效的协同内皮凋亡。

[0713] 实施例 38

[0714] 条件复制型腺病毒载体

[0715] 材料和实验方法

[0716] 细胞培养:牛主动脉内皮细胞 (BAEC) 和人正常皮肤成纤维细胞 -NSF 细胞系在含 10% 热灭活 FCS、100 μ g/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的低葡萄糖 DMEM 中培养。HeLa (人子宫颈上皮腺癌)、Lewis 肺癌细胞 (D 122-96) 和 293 (人胚肾) 细胞系在含 10% 热灭活 FCS、100 μ g/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的高葡萄糖 DMEM 中培养。人脐内皮细胞 -HUVEC (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.) 在 EGM-2Bullet 试剂盒 (Clonetics, Bio-Whittaker, Inc., MD, USA) 中培养。人肺癌细胞系 (A549) 在含 10% 热灭活 FCS、100 μ g/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 MEM 中培养。所有细胞都在 37°C、5% CO₂、湿润气氛中生长。

[0717] 质粒和病毒载体构建:

[0718] 质粒克隆:将萤火虫萤光素酶 cDNA 亚克隆入 pcDNAIII 表达质粒 (含 CMV 启动子区, Invitrogen) 的多克隆位点中,以及亚克隆入含 PPE1-3x 启动子和腺病毒 -5DNA 序列部分的 pPACPPE-1. p1pA 中。通过从 pPACPPE-1. p1pA 质粒中缺失 PPE-1 启动子的第一内含子克隆第三种质粒。先前已在我们的实验室中克隆了这 3 个质粒,并用于细胞培养物转染。

[0719] 复制缺陷型载体克隆:将 FAS- 嵌合体的 cDNA 亚克隆入 pPACPPE-1. p1pA 和 pPACCMV. p1pA 质粒中。这些质粒与含大部分腺病毒 -5 基因组的 pJM17 共转染,且用磷酸钙法共转染入 293 人胚肾细胞系 (ATCC) 中。该细胞系设计成包含病毒复制必需但不包含在 pPAC. p1pA 或 pJM17 质粒中的 E1 基因。所述质粒在所述细胞中经历同源重组,且约 2 周后形成重组病毒,并开始复制且最终引起细胞裂解。分离病毒集落并增殖,且其确切插入方向通过 PCR 验证。复制缺陷型载体先前通过现有技术的常规克隆技术制备。

[0720] 条件复制型腺病毒 (CRAD) 构建:使用 AdEasy 法 (Stratagene, LaJollaCA) 构建 CRAD。如下修饰含腺病毒 -5DNA 序列部分的质粒 PShuttle-MK:由中期因子 (Midkine) (mk)

启动子和连续的腺病毒 E1 区替代 pShuttle(Stratagene, La Jolla, CA) 中的多克隆位点和右臂。之后,以无内含子的 PPE1-3x 替代 MK 启动子。通过在所述启动子和 E1 之间亚克隆 IRES 序列(得自 pIRES-EYFP 质粒, BD Biosciences)和 FAS- 嵌合体 cDNA 来构建第二种质粒。IRES 允许由相同转录物翻译两种蛋白质。所获得的两种穿梭物(shuttle)用 PmeI 消化线性化,且随后转化入大肠杆菌 BJ5183ADEASY-1(Stratagene)中。该种细菌已用 pADEASY-1 质粒转化,所述 pADEASY-1 质粒含除 E1 和 E3 基因区以外的大部分腺病毒 -5 序列。质粒在细菌中经历同源重组(在 pShuttle 和 pADEASY-1 之间),由此生成完整载体基因组。重组体随后用 PacI 消化,并用磷酸钙法转染入 293 人胚肾细胞系(ATCC)中。余下的程序如对复制缺陷型载体的描述一样。

[0721] 通过将普通启动子 CMV(巨细胞病毒)亚克隆在 E1 基因之前构建阳性对照病毒 CMV-E1。CMV-E1 病毒是遍在性的,且对内皮细胞没有特异性。

[0722] 按照上述方法构建以下的复制缺陷型载体和 CRAD:

[0723] 复制缺陷型载体:

[0724] PPE-1(3x)-FAS、CMV-FAS、CMV-LUC(LUC- 萤火虫萤光素酶报告基因的缩写)、PPE-1(3x)-LUC。

[0725] CRAD:

[0726] PPE-1(3x)-CRAD、PPE-1(3x)-Fas-CRAD、CMV-E1。

[0727] 转染实验:BAEC 和 HeLa 细胞在 24 孔板中培养至 60-70% 汇合。使用 0.4 μ g/孔表达构建体和作为转染效率对照的 0.04 μ g/孔 pEGFP-C1 载体(CLONTECH, Palo Alto, CA)进行共转染。Lipofectamine 和 Lipofectamine plus(Invitrogen, Carlsbad, CA)用于转染。于 37°C 温育 3 小时后,用生长培养基替换转染混合物。

[0728] 转导实验:载体(PPE-FAS、CMV-FAS、CMV-LUC、PPE-LUC)用感染生长培养基(含 2% FCS,而不是正常生长培养基中的 10%)稀释,以达到 10、100、1000、10000 的感染复数(moi)。感染复数根据每个靶细胞的病毒数计算。靶细胞(BAEC 和 293)已在转导前 24 小时接种。在转导当天,用含以所需 moi 混合在 0.1 或 2ml 感染培养基中的病毒的溶液分别替换 96 孔板或 60mm 板的细胞生长培养基。细胞温育 4 小时,接着向转导细胞中加入新鲜培养基。

[0729] 分别由 PFU 滴定(参见下文)和 ApoPercentage 试剂盒(AccurateChemical, Westbury, NY)评价载体复制和凋亡诱导。结晶紫染色也用于评价附着于板表面的细胞量,作为细胞生存力的指示。

[0730] 测试病毒滴度-噬斑形成单位测定(PFU):滴定病毒原液并储存于 -80°C。利用感染培养基稀释的连续稀度(10^{-2} - 10^{-13})的病毒载体感染 293 细胞的分汇合(80%)培养物 2 小时。2 小时后,用 PBS 洗涤培养基,且替换为琼脂覆层。在约 2 周后有明显噬斑的最高稀度定为以 PFU/ml 为单位的浓度(PFU- 噬斑形成单位)。

[0731] 结果

[0732] 细胞毒性基因表达增强腺病毒复制:为了检验凋亡诱导对病毒复制的影响,在 293(人胚肾)细胞系中检验 CMV-FAS 复制。在该细胞系中,所述病毒可通过 FAS-c 或因其复制引起的细胞裂解诱导凋亡。早期(病毒感染后几小时)凋亡可能干扰病毒复制,而晚期凋亡(病毒感染后几天)可能增强病毒传播。

[0733] 为了测试 CMV-FAS 诱导凋亡的能力,转导 BAEC,且通过生存力的 ELISA- 结晶紫测定来评价细胞凋亡(图 89)。较高浓度(10000moi)的 CMV-FAS 在没有活化配体(TNF- α)的情况下诱导凋亡,而在较低浓度时需要加入所述配体来诱导凋亡。

[0734] 通过 293 细胞中的噬斑发展来测定细胞至细胞的 CMV-FAS 传播。如按照噬斑发展速率和噬斑大小所观察到的(图 88 和 89),和非凋亡诱导载体 CMV-LUC 相比,采用 CMV-FAS 载体时噬斑发展以较高速率发生。

[0735] 通过萤光素酶报告基因评价有和没有内含子时 PPE1-3x 启动子诱导 RNA 转录的能力(未显示)。未观察到显著差异。

[0736] 这些结果表明,通过宿主细胞的额外凋亡裂解,可增强腺病毒载体的复制,所述载体例如为上文所述的血管生成性、内皮特异性病毒构建体 AdPPE-1(3x),其携带诱导凋亡的“杀伤”基因如 FAS。

[0737] 实施例 39

[0738] VEGF 表达的 PPE-1(3x) 控制增强工程改造组织的新血管形成和存活

[0739] 为了研究处于内皮素启动子控制下的 VEGF 表达在体外和体内对工程改造组织构建体的血管形成的作用,用 Ad5PPEC-1-3x VEGF 感染细胞,并分析构建体,以观察对血管形成的作用。

[0740] 图 91a 表明,用 Ad5PPEC-1-3x VEGF 感染细胞对在工程改造构建体中形成的血管样结构的数目和大小具有诱导作用。构建体在培养基有或没有补加 VEGF(50ng/ml)的情况下培养。用 Ad5PPEC-1-3x VEGF 病毒或对照 GFP 腺病毒感染平行构建体(达 4 小时)。在培养 2 周后,对构建体进行固定、包埋、切片和染色。

[0741] 在加入 VEGF 至培养基和用 Ad5PPEC-1-3x VEGF 感染细胞之间进行对比,发现用 Ad5PPEC-1-3x VEGF 病毒处理的样品中的血管数和血管面积百分比增加至 4-5 倍(图 91a)。

[0742] 在体内研究中,使用 3 种不同模型分析植入物的体内存活、分化、整合和血管形成。这些模型包括(i)在 SCID 小鼠背部皮下植入,(ii)植入裸大鼠四头肌中,和(iii)用构建体替代裸小鼠前腹肌节。

[0743] 构建体被宿主血管渗透。Ad5PPEC-1-3x VEGF 病毒感染的构建体与对照构建体相比显示出血管结构增加。

[0744] 为评价组织工程改造构建体的体内存活和整合,我们使用基于萤光素酶的成像系统。体内成像系统(IVIS)通过检测由全身施用的萤光素和局部产生的萤光素酶的相互作用产生的光来工作。构建体用编码萤光素酶的腺伴随病毒(AAV)载体感染 48 小时,然后移植。接着将构建体原位置于裸小鼠的前腹肌壁中。在外科手术时将 AAV-萤光素酶注射入每只小鼠左下肢,以用作阳性对照。外科手术后 3-4 周,小鼠接受萤光素,以评价对组织工程改造构建体的灌注。

[0745] 用 Ad5PPEC-1-3x VEGF 感染(和之后用 AAV-萤光素酶感染)的构建体具有比仅用 AAV-萤光素酶感染的对照构建体高的信号(未显示结果)。总之,这些结果提示,用 Ad5PPEC-1-3x VEGF 体外感染可改善植入的工程改造组织构建体的存活和血管形成。

[0746] 实施例 40

[0747] 抗血管生成治疗体内活化 PPE-1(3x) 启动子

[0748] 许多组织对血管生成阻抑的常见应答是响应于由控制血管稳态的自身调节的

自分泌反馈回路产生的复杂信号传导上调内源性血管生成途径（参见 Hahn 等, *Am J Med* 1993, 94:13S-19S, 和 Schramek 等, *SenimNephrol* 1995;15:195-204）。为了确定此机制如何能影响处于 PPE-1 (3x) 启动子控制下的核酸序列的表达, 在有和没有施用有效抗血管生成药物波生坦的情况下, 测量用本发明核酸构建体转化的转基因小鼠组织中的体内发光水平, 其中所述核酸构建体含处于 PPE-1 (3x) 控制下的萤光素酶 (LUC) 基因 [PPE-1 (3x)-LUC]。波生坦 (Tracleer™) 是双重内皮素受体 (ETA 和 ETB) 拮抗剂, 目前临床上批准用于多种适应症, 最重要的是肺动脉高血压和肺纤维化。

[0749] 如上文详述的, 通过本领域众所周知的克隆方法, 产生携带本发明的 PPE-1 (3x)-LUC 构建体或 Harats 等人 (*J Clin Invest* 1995;95:1335-44) 详述的 PPE-1-LUC 构建体的转基因小鼠。用食物饮食或含 100mg/kg/天波生坦的食物饮食经口饲喂 10 周龄 PPE-1 (3x)-Luc 或 PPE-1-LUC 转基因小鼠 (每组 $n = 5$) 达 30 天。如在上文的方法部分中所述, 在治疗最后一日处死小鼠, 并取出器官, 取出的小鼠器官用于测量发光强度。

[0750] 图 94 显示了 PPE-1 (3x) 启动子赋予转基因小鼠中的重组基因以组织特异性超表达。一般具有较高内皮素活性的器官如心脏和主动脉, 以及具有程度低一些的内皮素活性的器官脑、气管和肺, 与肝或肾相比显示出增加的发光强度。但是, 在大部分器官中, 波生坦施用使发光强度显著增强 (在心脏组织中最高达 40%) (图 94), 由此表明具体的内皮素受体拮抗剂和一般的血管生成抑制剂, 可活化本发明的内皮特异性启动子, 并以组织特异性方式诱导处于 PPE-1 (3x) 转录控制下的转基因表达进一步增强。细胞内前内皮素原-1mRNA 和循环内皮素-1 的水平测量, 表明给表达在 PPE-1 启动子控制下的萤光素酶的转基因小鼠施用内皮素受体拮抗剂 (例如波生坦) 事实上导致增强的组织内皮素-1 转录 (图 97A) 和在血浆中检测到的增加的免疫反应性的内皮素-1 (图 97B)。

[0751] 为了进一步测定在 PPE-1 启动子控制下的基因产物的表达增强的特异性, 将双重内皮素拮抗剂波生坦对内皮素受体活性的抑制作用与 ET-1_A (BQ123, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 和 ET-1_B (BQ788, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 的个别特异性拮抗剂的抑制作用相对比。图 96 显示了用在 PPE-1 启动子 (上文所述的质粒 pEL8-LUC) 或对照 SV40 启动子控制下的萤光素酶表达质粒转染、随后用 ET-1 受体拮抗剂波生坦、BQ123 或 BQ788 处理 1 小时的牛主动脉内皮细胞 (BAEC) 培养物中测量的萤光素酶活性, 表达为未处理对照的百分比。

[0752] 用波生坦和 BQ788 处理测量到在 PPE-1 启动子控制下的萤光素酶活性的显著增加, 但是 BQ123 (ET-1_A 拮抗剂) 不然。波生坦和 BQ788 处理 (在 1 μ M) 导致萤光素酶活性与未处理对照相比分别有 1.6 和 1.3 倍增加 (图 96)。在 SV40-萤光素酶转染的细胞中没有观察到显著增加 (数据未显示)。

[0753] 总之, 这些结果表明, 响应于 ET_B 阻断的增加的前内皮素原-1mRNA 水平由增加的 PPE-1 启动子活性介导, 这暗示着响应于 ET-1 受体阻断在 PPE-1 控制下的基因增强的转录。此外, 可以体外和体内检测增加的 PPE-1 启动子活性, 分别用于短期和长期处理。

[0754] 如本文所显示的, PPE-1mRNA 水平与表达在 PPE-1 启动子控制下的萤光素酶报告基因的转基因小鼠的萤光素酶活性相关。因而, 该模型也可以用于评价包括高血压、癌症和急性肾衰竭在内的不同病理生理学状态中的 ET-1 表达。

[0755] 实施例 41

[0756] 在 PPE-1 (3x) 启动子控制下体内表达的转基因不是免疫原性的

[0757] 如上文所述,同其它长期治疗模式一样,基因治疗经常伴有针对持续接触所表达的转基因蛋白产生的内源性宿主免疫反应。转基因蛋白的免疫刺激可引起治疗功效降低、炎症并有时引起严重副作用。为了测试针对使用本发明的顺式反应调节元件表达的转基因的宿主免疫应答,在具有 LLC 微转移、并用携带 Fas-TNF-R1 嵌合体 (Ad5PPE-1 (3x)Fas-c 和 Ad5CMV Fas-c) 或 LUC 报告基因 (Ad5PPE-1 (3x) Luc) 的载体治疗的小鼠 (每组 6 只小鼠) 中测定抗腺病毒异己酮和 TNF-R1 的抗体效价。对照小鼠用盐水治疗。

[0758] 载体以注射之间 5 天的间隔注射 3 次。在最后一次载体注射后 10 天处死小鼠,以使用 ELISA 测定来测定抗腺病毒和抗人 TNF-R1 (由所插入的转基因表达的蛋白) 的抗体水平。

[0759] 出乎意料的是,发现抗人 TNF-R1 的抗体水平低于 Ad5-PPE (3x) -Fas-c 治疗小鼠中的检测水平,而这些水平在非特异性 Ad5-CMV-fas 载体治疗小鼠中相对较高 (图 95b)。抗腺病毒异己酮抗原的抗体效价在注射不同病毒的组别间是相似的 (图 95a)。这些结果表明,使用本发明的 PPE-1 (3x) 构建体表达的转基因被宿主免疫系统良好耐受,与系统发生接近度 (phylogenetic proximity) 无关。

[0760] 实施例 42

[0761] 皮质类固醇处理增强内皮细胞中转基因的表达

[0762] 最近已经表明,皮质类固醇 (地塞米松) 施用可以预防一些免疫 - 和凋亡 - 有关的重组腺病毒感染的内皮损伤 (Murata, 等人 ArteriosclerThromb Vasc Biol 2005 ;25 : 1796-803), 从而抑制促炎症基因表达和最优化体外和体内重组基因表达效率。为了测试皮质类固醇是否可以增强内皮细胞中病毒介导的转基因表达,在转染之前,用地塞米松处理用包含萤光素酶报告分子编码序列或绿色荧光蛋白 (GFP) 报告分子编码序列的腺病毒构建体转染过的 BAEC 细胞。

[0763] 图 98 表明,在用表达在 CMV 启动子控制下的萤光素酶的腺病毒 (Ad-CMV-LUC) 感染之前用 3 μ M 地塞米松处理过的 BAEC 细胞中按照每 μ g 总蛋白的萤光素酶百分比测得的萤光素酶表达增加至超过 3 倍。最突出的作用是用 1000 感染复数。图 99 举例说明了在 PPE-1 启动子控制下的有活性的重组绿色荧光蛋白 (GFP) 在内皮 BAEC 中的表达,这由皮质类固醇 - 处理的细胞的增强的绿色指示。

[0764] 因而,皮质类固醇可以增强内皮细胞中病毒介导的转基因表达,且可以与本发明的方法一起使用。

[0765] 实施例 43

[0766] 血管生成特异性 CRAD 载体

[0767] 材料和方法:

[0768] PPE1-3x 启动子控制的 CRAd 的构建 (AdPPE3x-E1) 如上文实施例 38 所述,使用 AdEasy 方法 (Stratagene) 构建血管生成上皮特异性复制缺陷型腺病毒载体 AdPPE3X-E1CRAd。以 PPE1-3x 取代穿梭质粒的中期因子 (mk) 启动子。将产生的穿梭质粒 pPPE-E1 用 PmeI 消化线性化并随后转化入大肠杆菌 BJ5183ADEASY-1 中,所述大肠杆菌 BJ5183ADEASY-1 已经以 pADEASY-1 质粒转化,含有除 E1 和 E3 基因区之外的大部分腺病

毒-5 序列。通过细菌内同源重组产生完整载体基因组。将重组体转染入 293 人胚肾细胞系。细胞裂解后,增殖病毒集落,并通过 PCR 验证其准确的插入方向。

[0769] 阳性对照病毒 AdCMV-E1 和阴性对照 AdPPE3X-GFP 的构建和克隆如上文实施例 38 所详述。AdPPE3x-GFP 编码处于 PPE1-3x 启动子控制下的绿色荧光蛋白 (GFP) 基因。它起到复制缺陷型腺病毒对照的作用。AdPPE3X-E1、AdCMV-E1 和 AdPPE3X-GFP 载体示意图示于图 100 中。

[0770] 结果

[0771] PPE 3X 启动子控制下的 CRAD 血管生成特异性复制:为了评价 AdPPE3x-E1 是否在内皮细胞中特异性复制,测试病毒载体在内皮和非内皮细胞系中的复制。用 AdCMV-E1、AdPPE3x-E1 或 AdPPE3x-GFP 以 1 感染复数 (MOI,以每个靶细胞的病毒数计算) 感染人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 和非 EC- 正常皮肤成纤维细胞 (NSF)、HepG2 (肝癌细胞) 和 A549 (人支气管癌细胞)。使用 E1- 缺失的非复制腺病毒载体 AdPPE3x-GFP 作为阴性对照。使用 AdCMV-E1 作为阳性对照。感染后 72 小时期间在指示的时间点收获细胞和培养基,并对 E4 基因进行定量实时 PCR 分析。E4 存在于所有三个载体中,而其拷贝数是病毒拷贝数的指示。通过将各个时间点的病毒基因组拷贝数除以病毒感染后 2 小时获得的病毒基因组拷贝数,计算倍数诱导。通过将 AdCMV-E1 拷贝数除以 AdPPE3x-E1 拷贝数,计算相对拷贝数。

[0772] 在测试的所有细胞系中,AdCMV-E1 和 AdPPE3X-E1 复制,而复制缺陷型阴性对照 AdPPE3x-GFP 没有复制 (图 101a-d)。在 HUVEC 中,AdPPE3X-E1 以与 AdCMV-E1 相当的水平复制 (图 101e)。然而,在非内皮细胞中,AdCMV-E1 比 AdPPE3X-E1 复制的快,且因此,AdCMV-E1 与 AdPPE3X-E1 之间的比率在感染后 24、48 和 72 小时增加 (图 101e)。

[0773] 揭示了不同细胞系间的病毒复制速度差异,因为例如 AdCMV-E1 在感染后 72 小时的 A549 细胞中达到了病毒拷贝数中超过 104 倍诱导的水平,而在 HUVEC 中它达到了病毒拷贝数中低于 103 倍诱导的水平。

[0774] 该结果证实,与 AdCMV-E1 相比,AdPPE3X-E1 优先在内皮细胞中复制。

[0775] AdPPE3X-E1 优先在内皮细胞中扩散:为了测试 AdPPE3x-E1 在 EC 中的选择性复制是否也导致在内皮细胞中的选择性扩散,用 AdCMV-E1 或 AdPPE3X-E1 在 1 感染复数 (MOI) 感染 HUVEC 和 HepG2 (肝癌细胞),且在感染后 48 和 96 小时对病毒六邻体进行免疫组织化学染色。

[0776] 在用 AdPPE3X-E1 和 AdCMV-E1 感染的 HUVEC 和 HepG2 细胞中可以以时间依赖性方式检测到病毒六邻体。然而,用 AdCMV-E1 感染 HepG2 后,对病毒六邻体染色阳性的细胞量显著高于 AdPPE3X-E1 感染后的所述细胞量。与此相反,用 AdPPE3x-E1 感染后,对病毒六邻体染色阳性的 HUVEC 细胞量与 AdCMV-E1 感染后的类似 (图 102a-102h),从而说明与 AdCMV-E1 相比,AdPPE3X-E1 在肝 (肝癌) 细胞中扩散差,但是在内皮细胞中以类似的程度扩散。总而言之,这些结果说明 AdPPE3X-E1 的有效及选择性上皮细胞复制。

[0777] AdPPE3X-E1 的体外特异性内皮致细胞病变作用:

[0778] 腺病毒在宿主细胞中的复制最终引起宿主细胞裂解。由于 AdPPE3X-E1 优先在内皮细胞中复制和扩散,所以在内皮细胞和非内皮细胞中评价体外内皮细胞中裂解的诱导。

[0779] 用 AdCMV-E1、AdPPE3x-E1 或 AdPPE3x-GFP 在 1、10、100、1000 感染复数感染人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 和非 EC- 正常皮肤成纤维细胞 (NSF)、HepG2 (肝癌细胞) 和 A549 (人

支气管癌细胞)。使用 AdPPE3x-GFP 作为阴性对照(见图 100)。使用非特异性 AdCMV-E1 作为阳性对照。通过结晶紫半定量测定或定量 MTS 测定评价感染后 7 天的细胞生存力。

[0780] 图 103a-h 显示感染后 7 天,与用 E1- 缺失的 AdPPE3X-GFP 转导的细胞相比,用 AdPPE3X-E1 和 AdCMV-E1 感染的 HUVEC 显示明显的细胞生存力的降低。因此,在内皮细胞系中,用 AdPPE 3x-E1 和 AdCMV-E1 载体感染具有类似的裂解作用。与此相反,在非内皮细胞中观察到 AdCMV-E1 和 AdPPE3X-E1 之间的细胞毒性的明显区别。AdPPE3X-E1 的 MOI 分别需要增加 10 倍或 100 倍以达到 AdCMV-E1 在 NSF 细胞或 A549 和 HepG2 细胞中诱导的相同细胞毒性(图 103a-d)。在定量 MTS 测定中观察到类似结果,其中 AdCMV-E 病毒在 NSF、HepG2 和 A549 细胞中分别以 MOI 100、10 和 10 诱导细胞生存力中 70-95% 的降低($p < 0.01$),而 AdPPE3x-E1 仅仅引起最低限度的细胞毒性(图 103e-h)。在 MOI 100 和 10 用 AdPPE3X-E1 和 AdCMV-E1 感染的 HUVEC 显示细胞生存力的 80-100% 降低($p < 0.01$),而用 E1- 缺失的 AdPPE3X-GFP 转导的细胞中没有观察到细胞生存力降低。

[0781] 因此,这些结果明确指出,与 AdCMV-E1 感染的非选择性致细胞病变作用相比,AdPPE3X-E1 感染导致内皮细胞中的选择性致细胞病变作用。

[0782] AdPPE3X-E1 在 Matrigel® 中抑制 HUVEC 的体外新血管形成:为了测试 AdPPE3x-E1 感染对体外血管生成的作用,使用 Matrigel® 模型。内皮细胞在包被 Matrigel 的表面产生了复杂的蛛网样网络。这些网络高度提示微血管毛细血管体系,并用作体外和体内血管生成研究的测定。使用光学显微镜术和荧光显微镜术,观察并定量毛细管发育(定义为连接细胞群的细胞延伸或分支点)。

[0783] 图 104a-c 显示,用 AdCMV-E1 和 AdPPE3X-GFP 感染的 HUVEC 以及未感染的细胞形成毛细血管样结构网络。相反,用 AdPPE3X-E1 感染的 HUVEC 没有分化为毛细血管结构(图 104d)。当与用 AdCMV-E1 或 AdPPE3X-GFP 感染的细胞相比时,在用 AdPPE3X-E1 感染的细胞中,毛细血管样结构数分别少 92% 和 95% ($P < 0.01$)(图 105)。当与用 AdPPE3X-GFP 感染的细胞相比时,也注意到用 AdCMV-E1 感染的细胞中毛细血管样结构形成降低了 37% ($P < 0.05$)。AdPPE3X-GFP 和 AdPPE3X-E1 共感染证实细胞确实被病毒感染,且转基因 GFP 得到表达(图 106a-106b)。

[0784] 这些结果证实,用 AdPPE3X-E1 感染有效且特异的抑制体外血管生成,而且,与 AdCMV-E1 相比,AdPPE3X-E1 特异且有效复制。

[0785] 实施例 44

[0786] AdPPE3X-E1 血管生成特异性 CRAd 载体的体内特异性和功效

[0787] 材料与方法:

[0788] 棉鼠肺转移模型:

[0789] 棉鼠中 LCRT 细胞系和皮下肿瘤的确立如上所述。观察到皮下肿瘤经常转移到肺。为了评价肺转移的诱导,将 LCRT 细胞皮下注射到棉鼠胁腹。三只棉鼠没有注射且作为对照。皮下注射后每隔一天测量动物重量,持续 28 天。在注射后 10、18、25 和 28 天,分别处死 2 只、3 只、3 只和 7 只大鼠。一旦两只大鼠死亡,则确定处死的最后一天。尸体剖检时,在解剖后测量肿瘤重量、肿瘤体积和肺转移重量。

[0790] 动物体重逐渐增加,在 28 天,对照组中最高达 10% 而具有肿瘤的组中最高达 15%,在 20-25 天具有显著性差异(图 111a);该差异可以归结于增加的肿瘤重量。在 25

至 28 天,在具有肿瘤的大鼠中观察到急剧的体重减轻。大鼠看起来不舒服且疲劳,活动性减少。

[0791] 肿瘤体积和重量逐渐增加,分别从 10 天的 $0.92 \pm 0.23 \text{ cm}^3$ 和 $1.05 \pm 0.45 \text{ gr}$ 至 18 天的 $4.04 \pm 0.12 \text{ cm}^3$ 和 $4.10 \pm 0.68 \text{ gr}$ 、25 天的 $13.03 \pm 0.36 \text{ cm}^3$ 和 $20.80 \pm 6.93 \text{ gr}$ 、以及 28 天的 $15.14 \pm 4.36 \text{ cm}^3$ 和 $15.04 \pm 2.98 \text{ gr}$,与 10 天的肿瘤体积和重量相比,在 18 天是显著的,而与 18 天的肿瘤体积和重量相比,在 25 和 28 天是显著的(图 111b 和 111c)。在大部分大鼠中,从 20 天开始在肿瘤中形成坏死性出血性病灶(图 111f)。

[0792] 肺转移重量从 10 天的 $0.4 \pm 0 \text{ gr}$ 增加至 18 天的 $0.47 \pm 0.07 \text{ gr}$ 、25 天的 $0.97 \pm 0.12 \text{ gr}$ 和 28 天的 $1.04 \pm 0.09 \text{ gr}$,当与 18 天的转移重量相比时,在 25 和 28 天是显著的(图 23D)。大转移(macrometastases)在 18 天不存在,但从 25 天开始观察到。在每个肺上均发现 10-15 个最大尺寸 1-3mm 的微红色或白色结节(图 111g 和 111h)。结节是软到硬的,并且大多位于肺实质中。没有对特定肺小叶的优先选择,且分布模式是分散的。在 28 天观察到肺组织被肺肿瘤沉积物取代。组织病理学揭示在 25 和 28 天时肺中轻度淤血以及轻度至中度肺泡壁增厚。瘤形成结节由具有多个有丝分裂形状的卵圆形至纺锤形细胞组成。大部分瘤形成结节与转移周围的慢性炎症关联。少数血管也得到鉴定,并在 18 天沿肺泡壁和血管观察到肺微转移(图 111i、111j)。在总病理水平,没有发现对其它器官的转移。

[0793] 在试验结束处死的所有大鼠均有肺转移。从皮下注射后 18 天鉴定了微转移,且在 28 天之前,所有动物均发展了广泛肺转移。

[0794] 结果

[0795] 评价 AdPPE3X-E1 在棉鼠中诱导的体内一般毒性和肝毒性:由于人腺病毒不在小鼠中复制,所以评价体内施用 AdPPE3X-E1 在棉鼠(*Sigmodon hispidus*)中诱导的肝和一般毒性。使用棉鼠,因为它们被认为是人腺病毒的半容纳宿主;即,人腺病毒在棉鼠中复制,但是当与在人体内复制相比时是轻微的程度。由于肝毒性在新治疗模式的临床应用中及其重要,而且特别是因为全身施用腺病毒主要转导肝组织,所以监控肝脏毒性。

[0796] 以 10^{11} 病毒颗粒/大鼠静脉内施用 AdCMV-E1 的棉鼠在 24 小时后看起来不舒服,脱毛,活动性减少且具有一些体重减轻(图 107)。相反,以相等剂量的 AdPPE3X-E1、AdPPE3X-GFP 或盐水处理的动物没有表现明显的身体或行为改变(图 107)。因此,即使高剂量,AdPPE3X-E1 的全身施用没有诱导一般毒性。

[0797] 通过测量血浆 AST 和 ALT 水平定量肝毒性,其中血浆 AST 和 ALT 水平被常规用作肝损伤的标记。静脉内施用 AdPPE3X-E1 和 AdPPE3X-GFP 对肝酶水平具有可忽略的作用,而施用 AdCMV-E1 引起肝特异性血浆转氨酶水平升高(图 108)。施用 AdPPE3X-E1 载体后第 0 天和第 14 天没有测量到显著差异(数据未显示)。

[0798] 静脉内(i.v.)注射后 6 天,肝组织病理学分析揭示了 AdCMV-E1 诱导的肝炎、肝细胞广泛膨胀和隆起、以及炎性坏死性病灶,这些是肝炎的指征(图 109d)。在盐水处理组中没有观察到肝炎(图 109a)。在 AdPPE3X-E1(图 109c)和 AdPPE3X-GFP 处理大鼠(图 109b)肝切片中观察到轻度肝炎。在注射后 14 天所有处理大鼠的肝切片中也观察到了轻度肝炎。然而,全身施用后 0 天没有观察到显著的组织学变化(数据未显示)。

[0799] 该结果明确指出,尽管全身施用 AdCMV-E1 刚施用后 6 天就强烈诱导一般毒性和肝

脏毒性,但在相同动物中全身施用 AdPPE3X-E1 仅仅导致与非复制对照载体 (AdPPE3x-GFP) 类似的最低限度的肝脏毒性。最值得注意的是,全身施用 AdPPE 3X-E1 没有引起注射大鼠的大量死亡,且静脉内注射 AdPPE 3X-E1 后 14 天前,所有大鼠看起来健康,没有明显毒性迹象。因此,这些结果指出,可以安全的全身施用 AdPPE3X-E1。AdPPE3X-E1 体内抑制棉鼠中 Matrigel® 塞上的血管生成:使用 Matrigel® 模型以测试 AdPPE3X-E1 对体内血管生成的作用。与血管生成因子例如 bFGF 组合时,Matrigel® 诱导内皮细胞迁移和毛细管形成。感染后 14 天,以盐水重悬的补充 bFGF 的 Matrigel® 引起细胞浸润和毛细管形成 (图 110a)。添加 AdPPE3X-GFP 或 AdCMVE1 不影响补充 bFGF 的 Matrigel® 内的细胞侵入 (图 110c 和 110d)。相反,在以 AdPPE3X-E1 重悬的 Matrigel 塞中观察到最低限度的细胞侵入而没有毛细管形成 (图 110b)。组织学分析 (图 110e) 显示,与其它组 (2 和 3 分) 相比,AdPPE3X-E1 处理降低了塞中的细胞浸润和增值 (1 和 2 分) (图 110e)。

[0800] 结果证明,在血管生成特异性启动子控制下的复制缺陷型腺病毒 (例如 AdPPE3X-E1) 可以有效体内抑制棉鼠血管生成。

[0801] 全身施用 Ad-PPE3X-E1 抑制肺转移生长:为了评价 AdPPE3X-E1 对肺转移的作用,如上所述在棉鼠中诱导肺转移。注射 LCRT 细胞后 15 天,大鼠 [随机分配到 4 组中 (n = 8)] 直接在心脏左心室中接受 100 μ l AdPPE3x-E1、AdPPE3x-GFP、AdCMV-E1 或盐水 (对照) 中的 6×10^{10} 病毒颗粒。基于前期肺转移确立实验选择病毒注射时间,在所述肺转移确立实验中,在 18 天观察到微转移,而平均存活时间经评价为从 LCRT 细胞注射起 28 天。因此,估计 LCRT 细胞注射后 15 天将是微转移发展的最佳时间。

[0802] 每天监控大鼠重量、肿瘤外观、肿瘤大小和健康。当两只盐水注射的对照大鼠死于转移时 (第 23 天),处死大鼠。在处死当天测量下列参数:肿瘤重量和体积、肝和肺重量、血浆尿素、肌酸酐、尿酸、ALT、AST、LDH、CPK、清蛋白和 ALP。将肿瘤、脾、肺、脑、肝、肾和心脏组织分为三份:一份冷冻于用于腺病毒六邻体免疫组织化学分析的化合物中,第二份骤冻并储存于 -80°C 用于病毒基因组 qRT-PCR (E4),而将第三份固定于 PBS 缓冲的 4% 福尔马林中用于组织化学分析。

[0803] 所有动物的体重以类似的速度逐渐增加。在 LCRT 细胞注射后 23 天处死大鼠。除了肺转移重量之外,所测量参数中没有发现显著差异,当与盐水处理组相比时,AdPPE3X-E1 处理组中肺转移重量降低了 55% ($p < 0.05$, 图 112)。

[0804] 受累和未受累器官中的病毒复制 [通过对病毒基因组 (E4) 的 qRT-PCR] 显示,与肝组织相比 (图 113b), AdPPE 3X-E1 在转移肺组织中强烈且选择性复制 (图 113a)。

[0805] 该结果明确指出由 AdPPE 3X-E1 诱导的强烈且特异性抗转移作用。

[0806] 综上所述,这些结果显示,PPE 3X 控制的 CRAds (例如 AdPPE3X-E1) 的内皮特异性得到体外和体内证明。在体外,这通过对 E4 病毒基因的定量 PCR 分析和对六邻体抗原的免疫染色显示。AdPPE3X-E1 在内皮细胞中的复制与非选择性复制腺病毒载体对照 AdCMV-E1 类似,但是复制速度在非内皮细胞中降低最多达 60 倍。此外,用 AdPPE3X-E1 和 AdCMV-E1 感染的内皮细胞显示类似的 90% 细胞生存力降低,而仅 AdCMV-E1 在非内皮细胞中诱导细胞生存力降低。在用非复制的 E1- 缺失的 AdPPE3x-GFP 转导的细胞中,没有观察到细胞生存力的降低。在血管生成体外 matrigel 模型中,与用对照载体感染的内皮细胞相反,用 AdPPE3X-E1 感染的内皮细胞没有发育毛细血管样结构。

[0807] 体内毒性测试证明,棉鼠对 AdPPE3X-E1 或对照载体的 10^{11} 病毒颗粒 / 大鼠的静脉内注射耐受,在 AdCMV-E1 处理组中仅具有短暂的体重减轻和肝毒性。

[0808] 在体内测试中,AdPPE3X-E1 在棉鼠中显著降低体外 Matrigel® 模型中的血管生成,而与盐水处理大鼠相比,全身施用 AdPPE3X-E1 将肺转移负荷降低 55% ($P < 0.05$)。在对照腺病毒载体中没有观察到显著降低。定量 PCR 分析证明,与对照载体相比,AdPPE3X-E1 在血管生成器官中选择性复制 - 其病毒拷贝数在肺转移中增加至 2 ~ 5 倍。与 AdPPE3X-GFP 相比,在其它器官中没有观察到显著差异。

[0809] 因此,血管生成特异性启动子控制下的 CRAd 载体 (例如 AdPPE3X-E1) 可以选择性复制并裂解内皮细胞,在血管生成模型中具有增强的作用。最显著的是,全身施用 AdPPE3X-E1 在免疫活性动物模型 (LCRT 棉鼠肺转移) 中明显地抑制转移生长,而没有全身毒性迹象。

[0810] 要认识到的是,为清楚起见而在独立实施方案背景下描述的本发明的某些特征也可组合在单一实施方案中提供。相反,为简短起见而在单一实施方案背景下描述的本发明的各种特征也可独立地或以任意合适的子组合方式提供。

[0811] 尽管已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宽泛范围内的所有这样的替代方案、修改和变化。本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请都全文引入到本说明书中作为参考,其程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请具体而单独地被指明引入本文中作为参考。另外,本申请中的任何参考文献的引用或鉴定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。

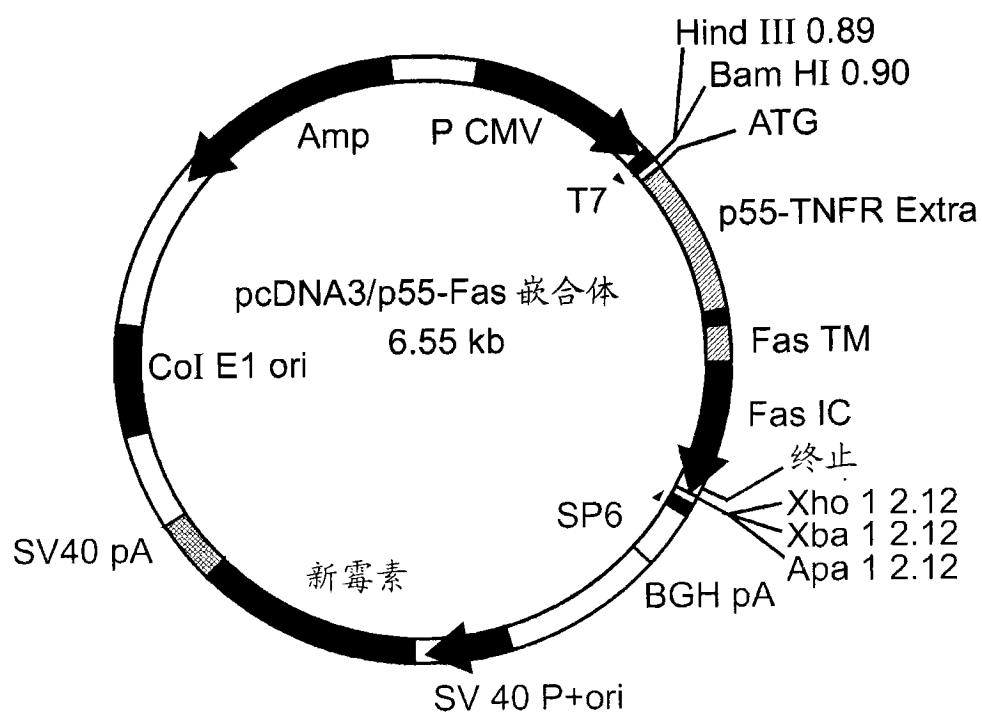


图 1a

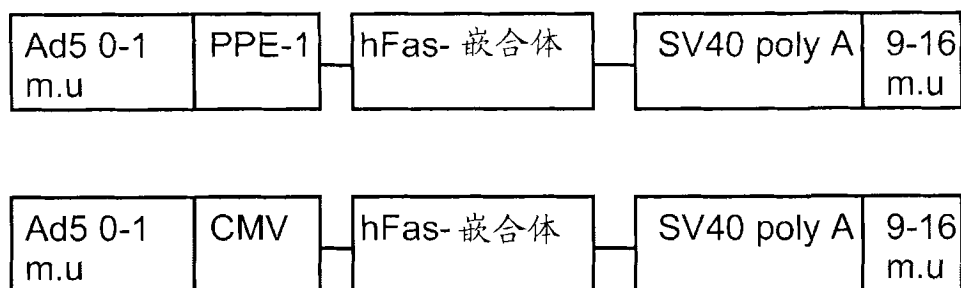


图 1b



图 2a



图 2b

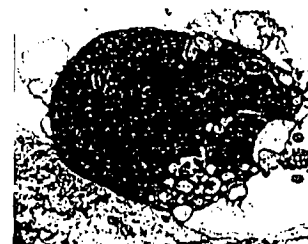


图 3a

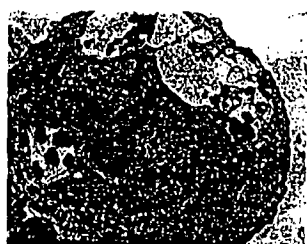


图 3b

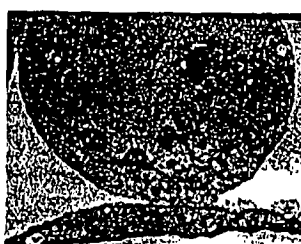


图 3c

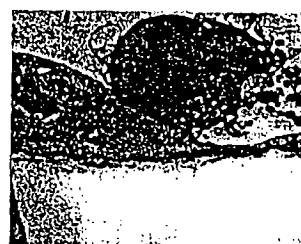


图 3d

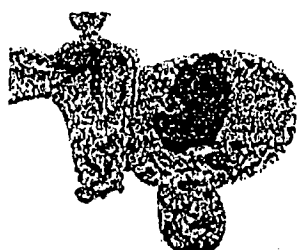


图 3e



图 3f

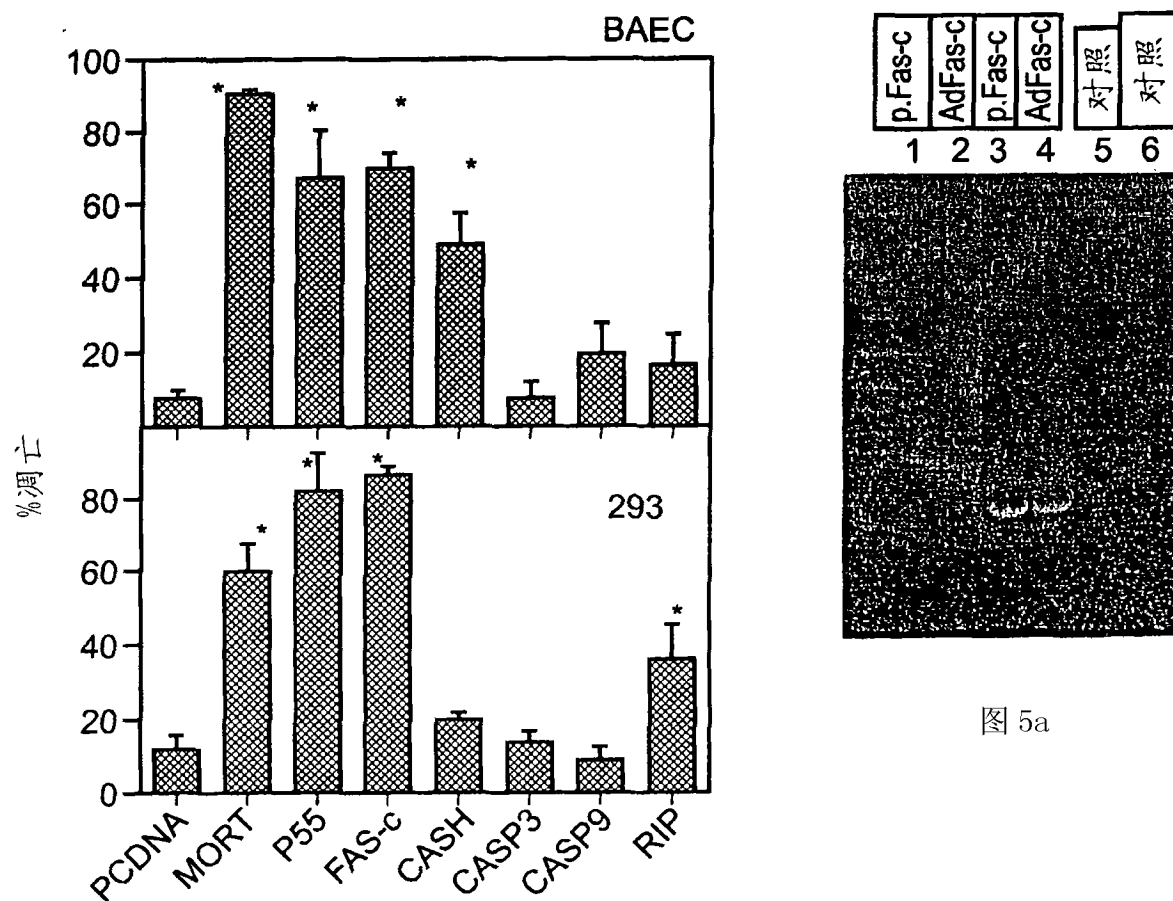


图 5a

图 4

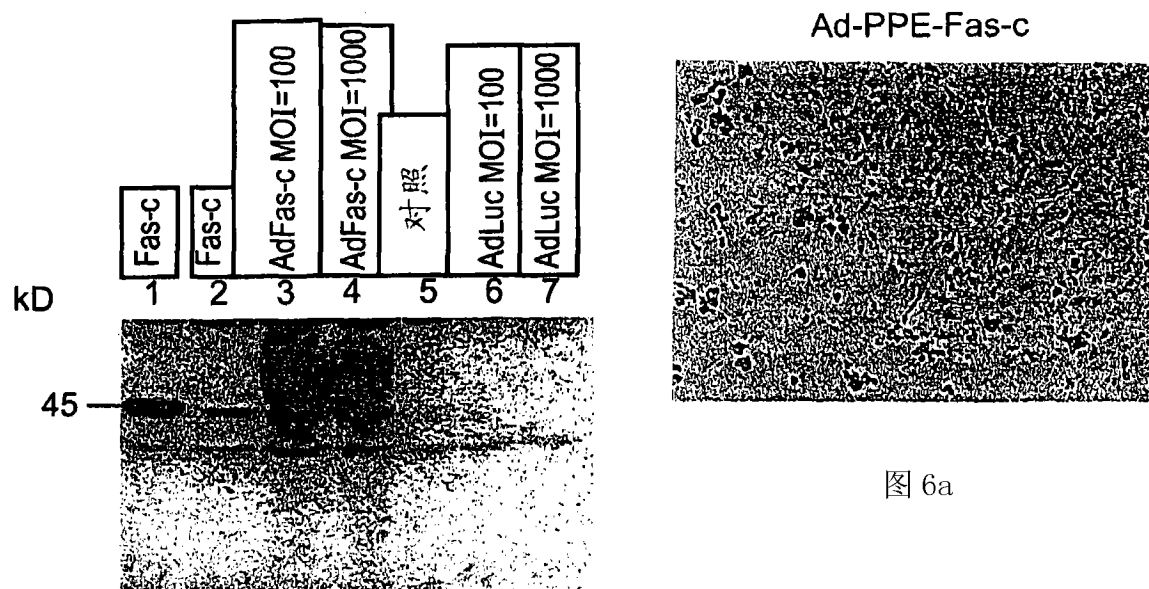


图 6a

图 5b

Ad-PPE-Luc

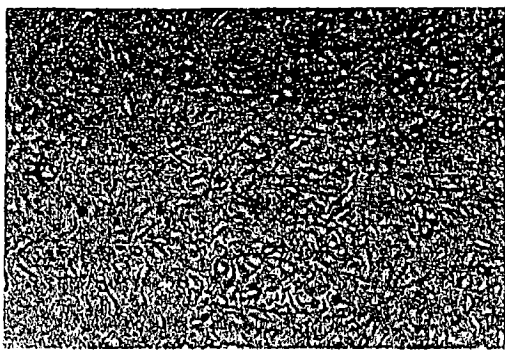


图 6b

Ad-PPE-Fas-c



图 6c

Ad-PPE-Luc

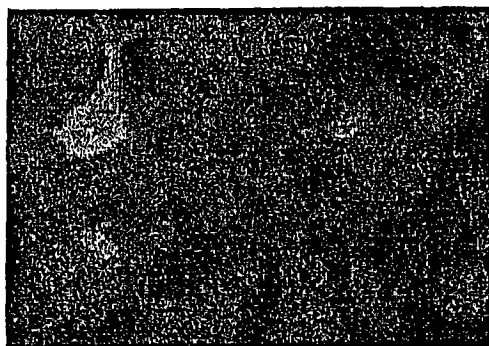


图 6d

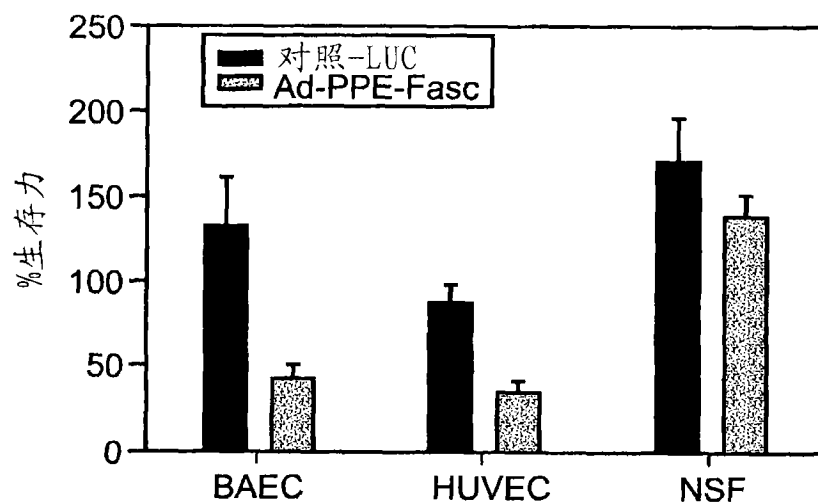


图 7

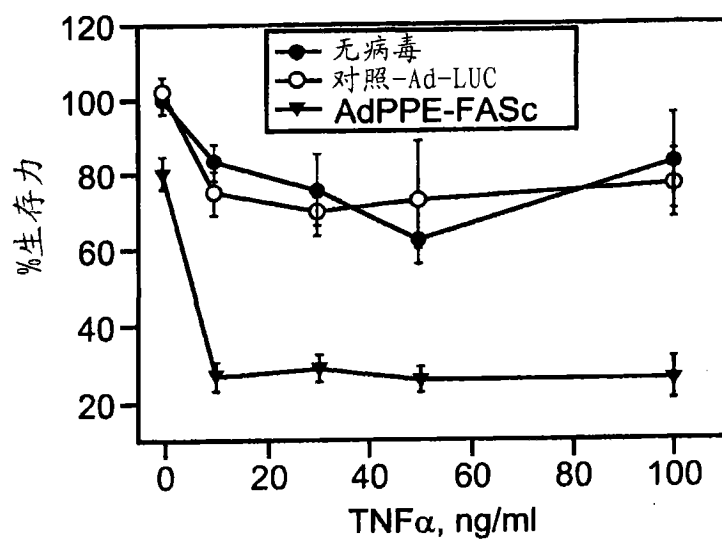


图 8

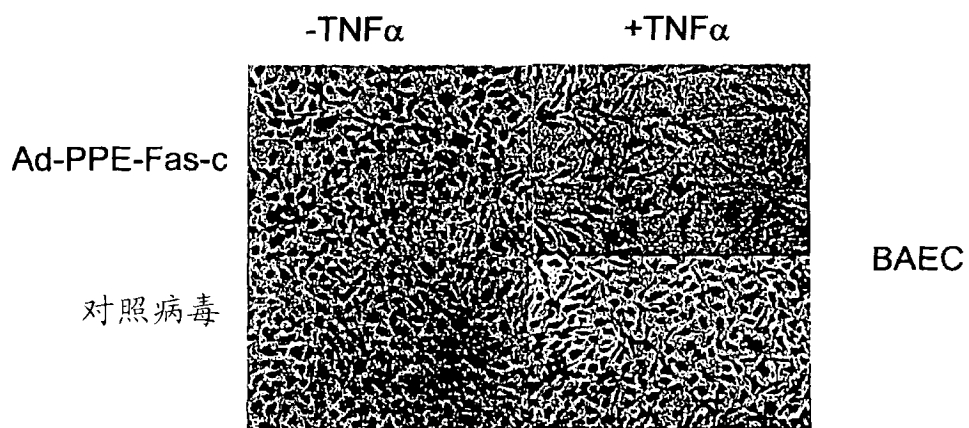


图 9a

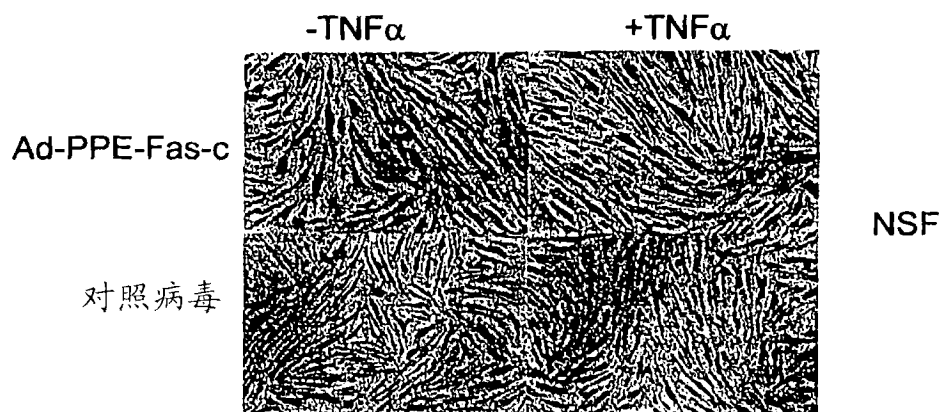


图 9b

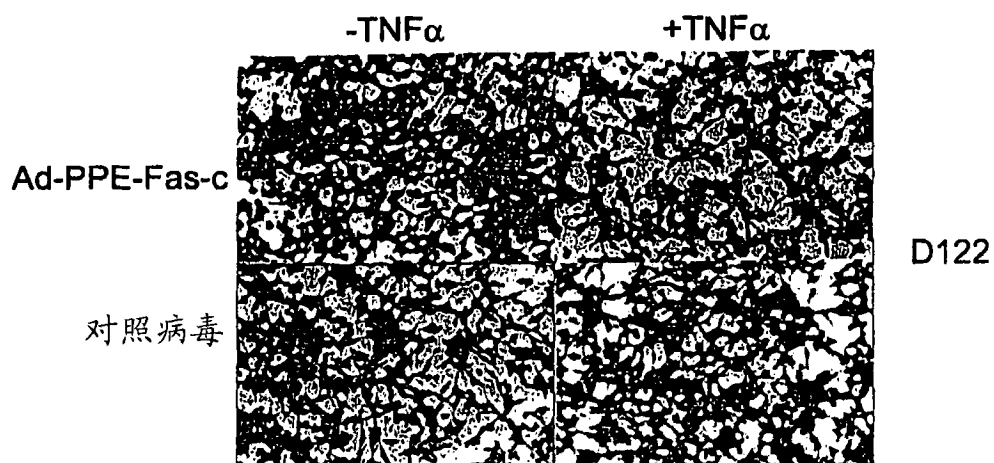


图 9c

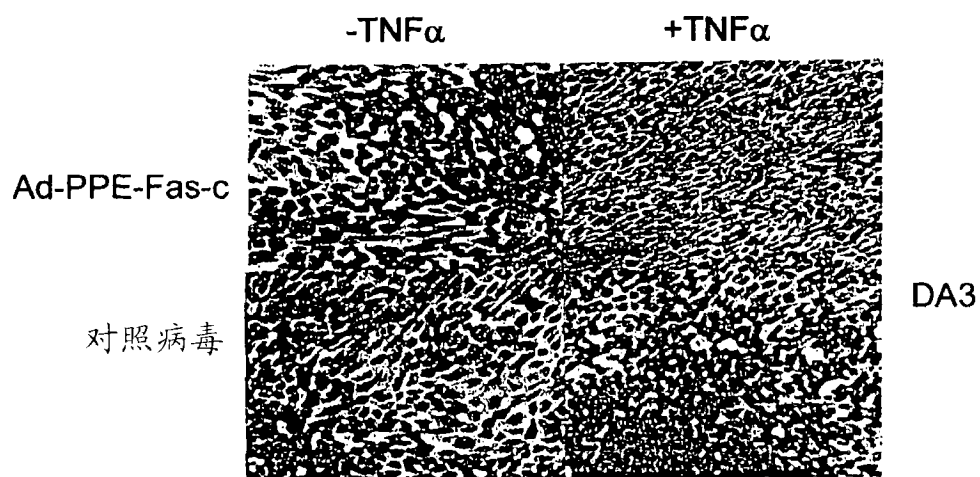


图 9d

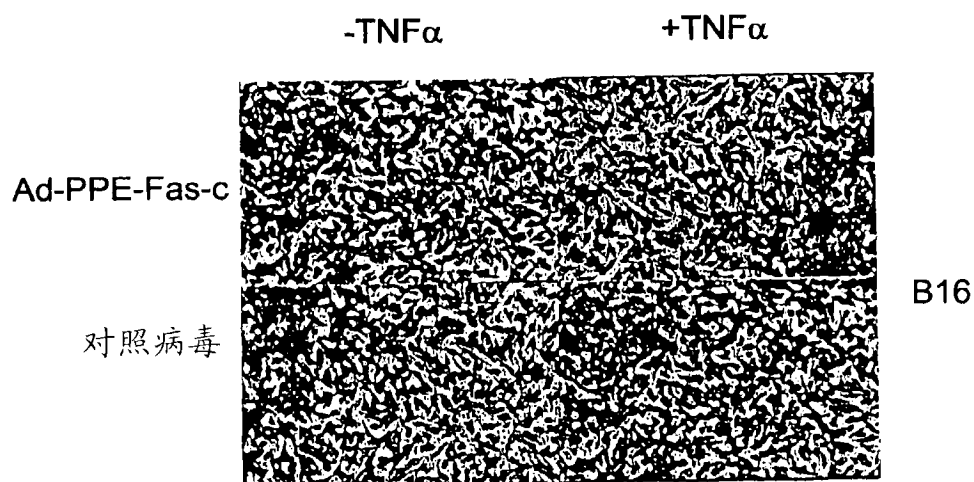


图 9e

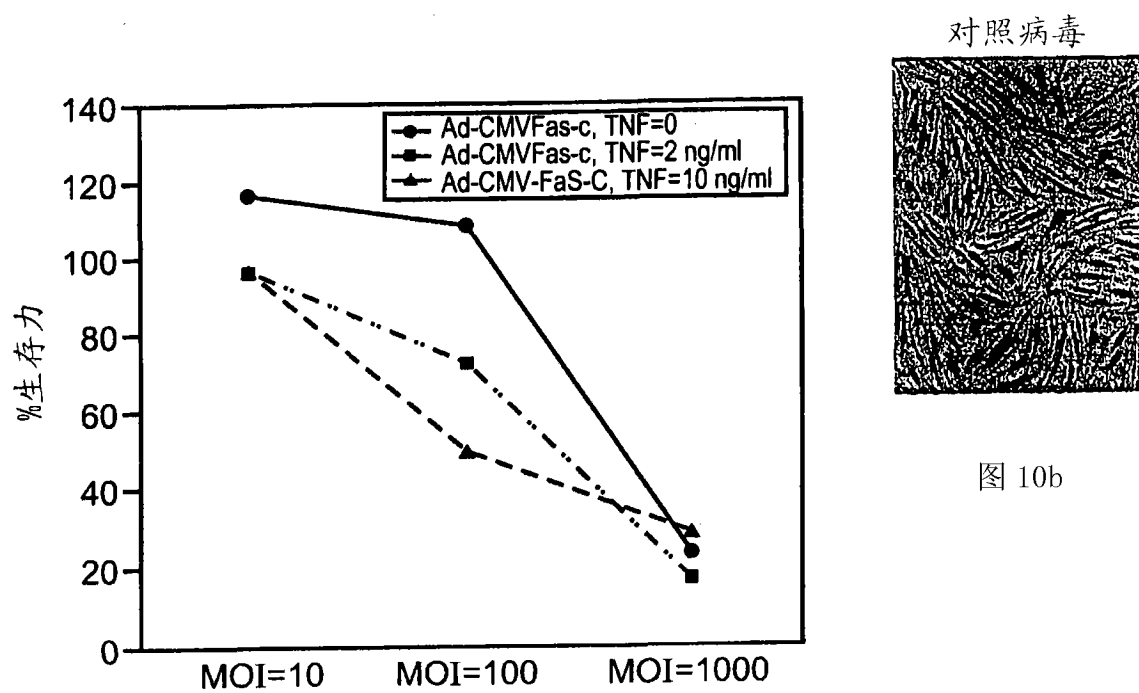


图 10a

Ad-CMV-Fas-c

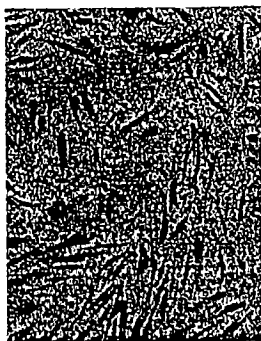


图 10c

Ad-CMV-Fas-c
+TNF α 

图 10d

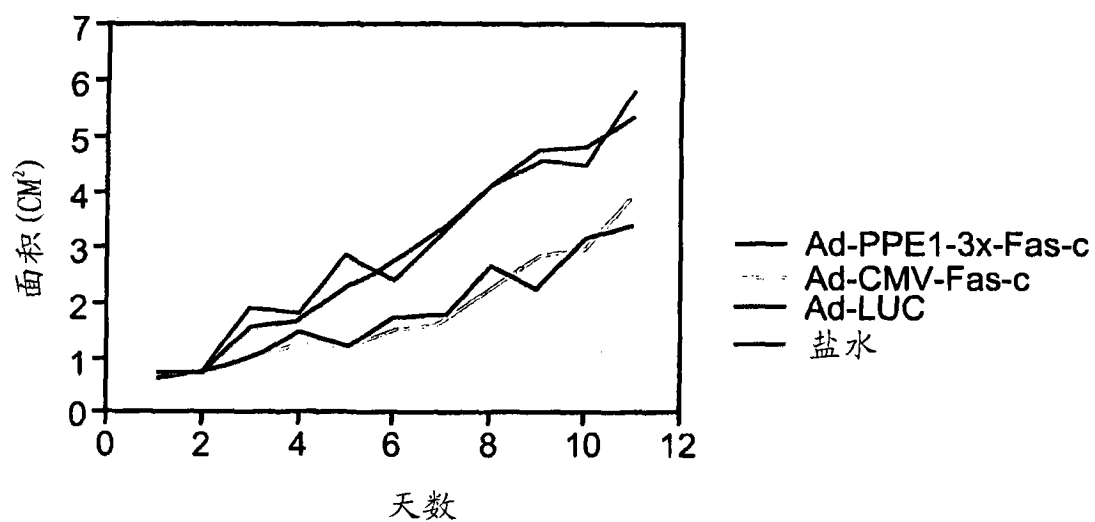


图 11a

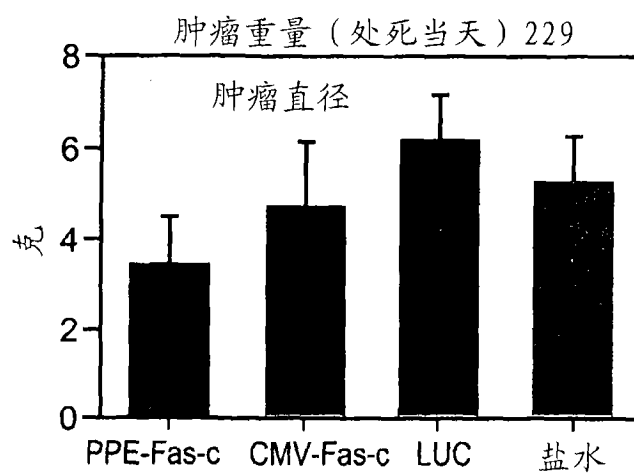


图 11b

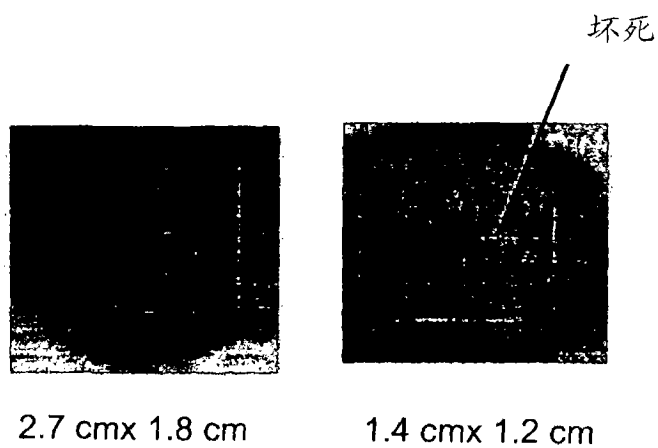


图 11c

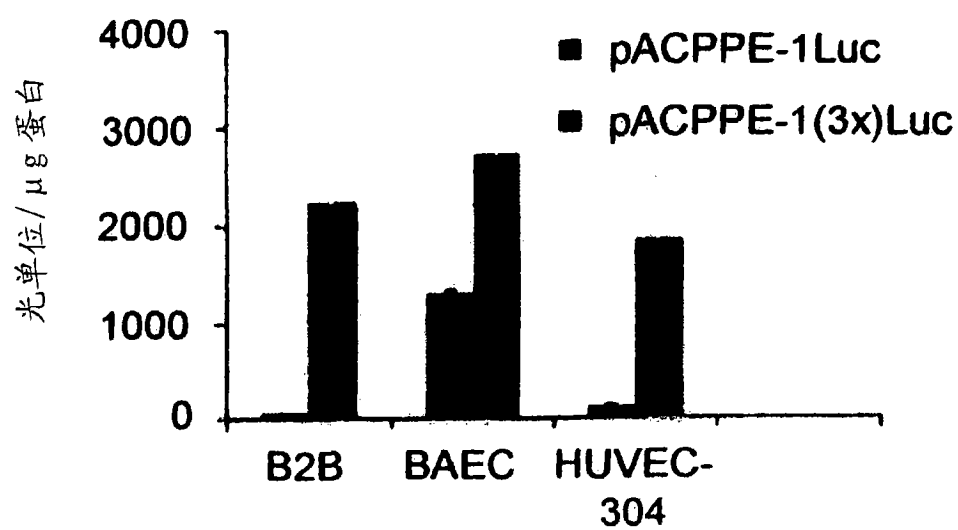


图 12

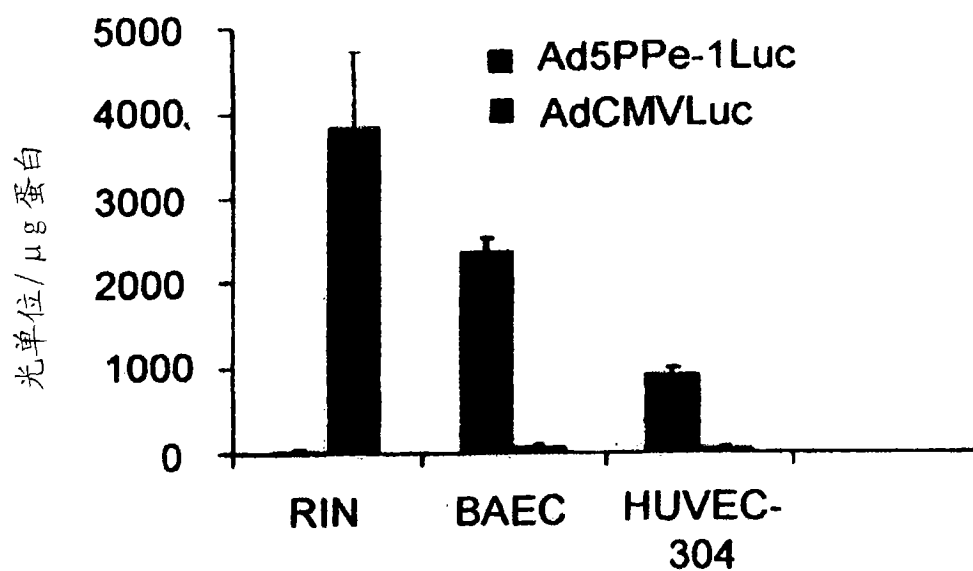


图 13

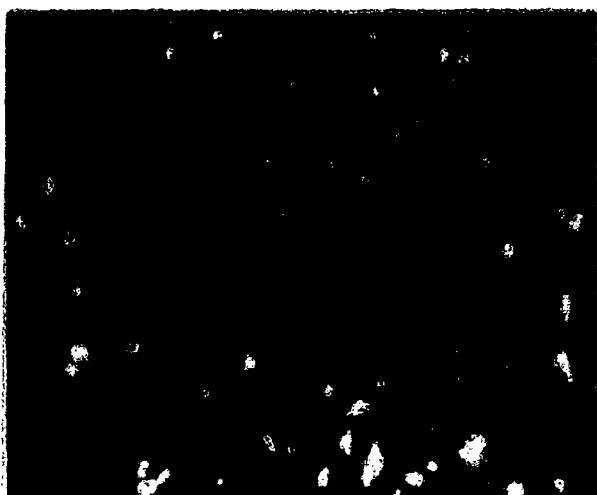


图 14a



图 14b

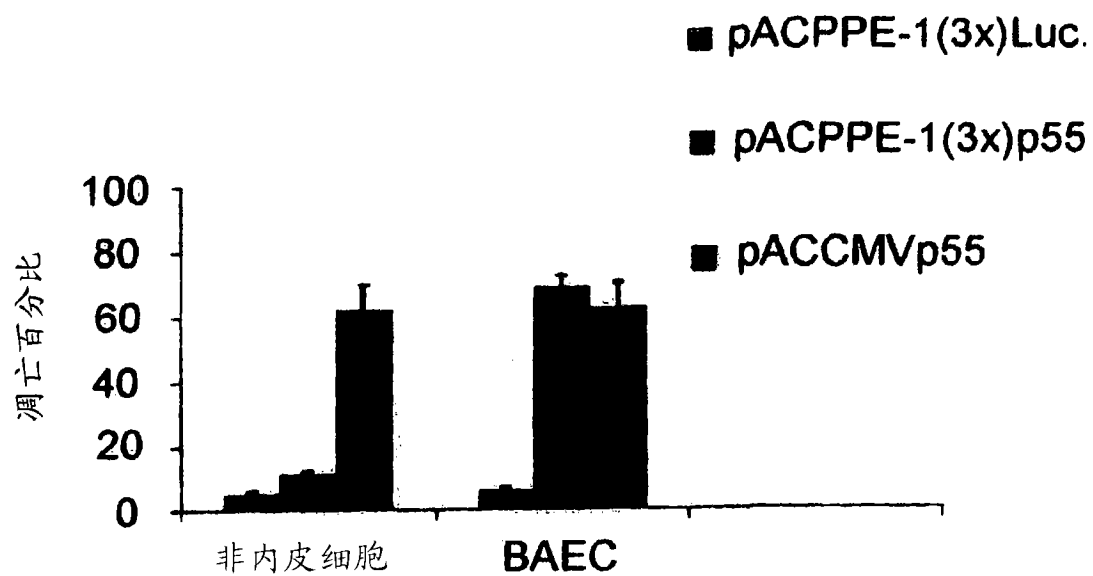


图 15

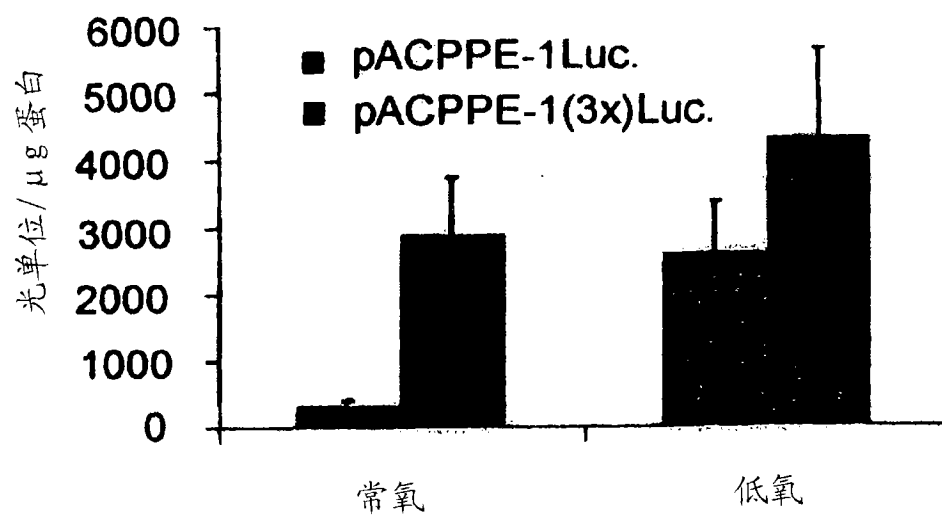


图 16

转导入牛主动脉内皮细胞

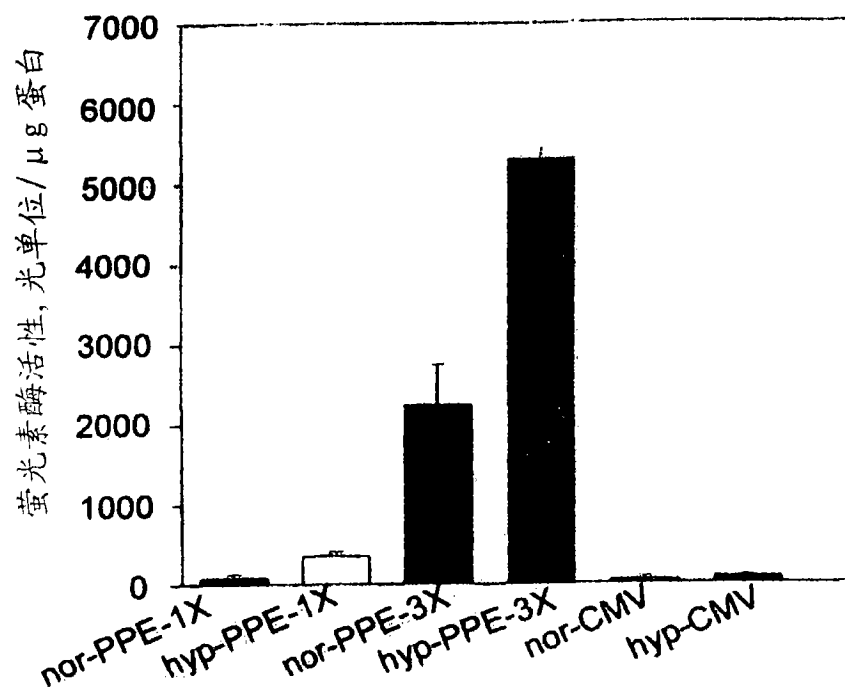


图 17

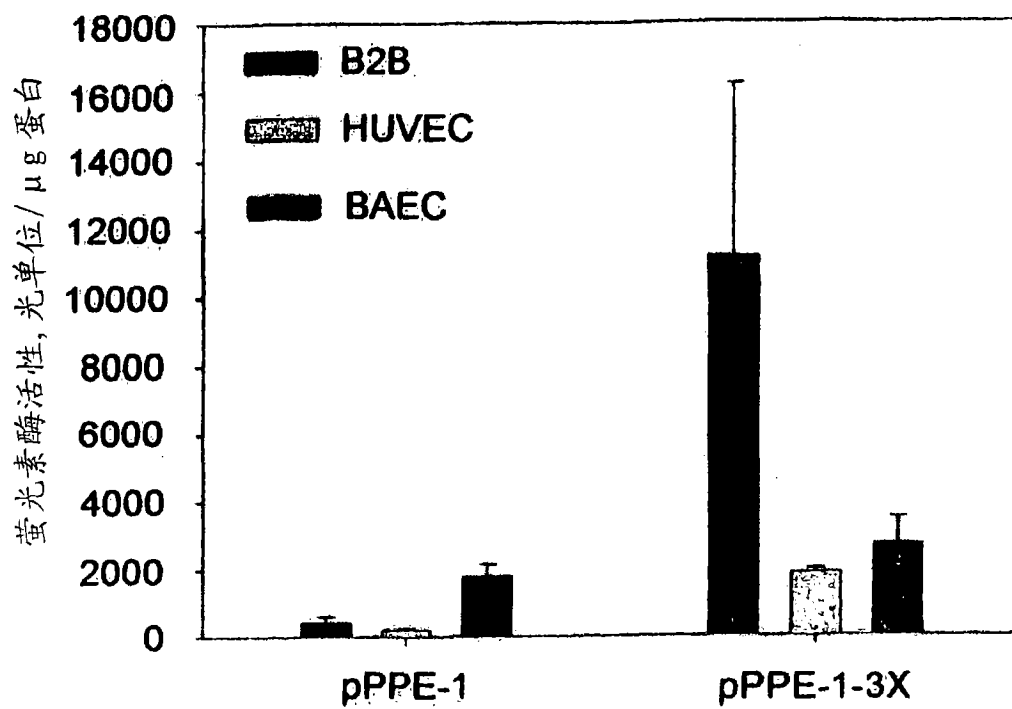


图 18

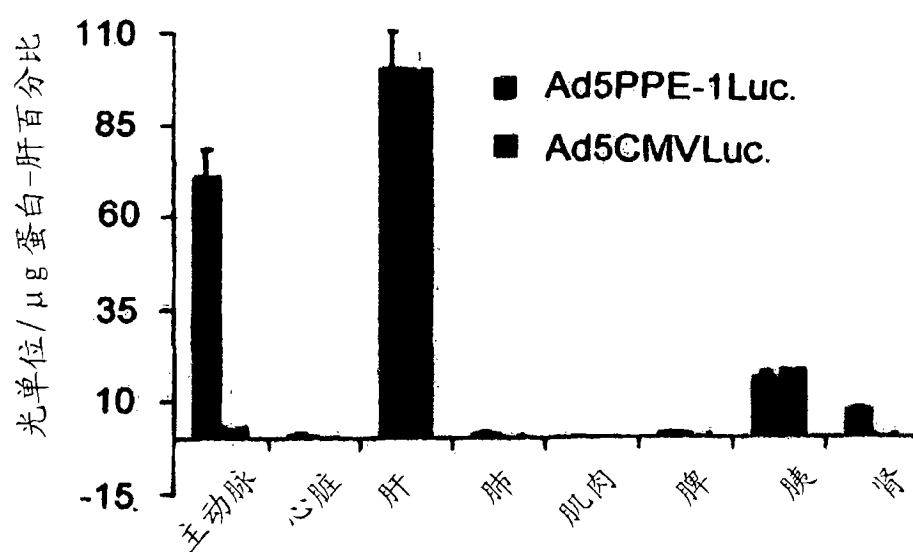


图 19



图 20a

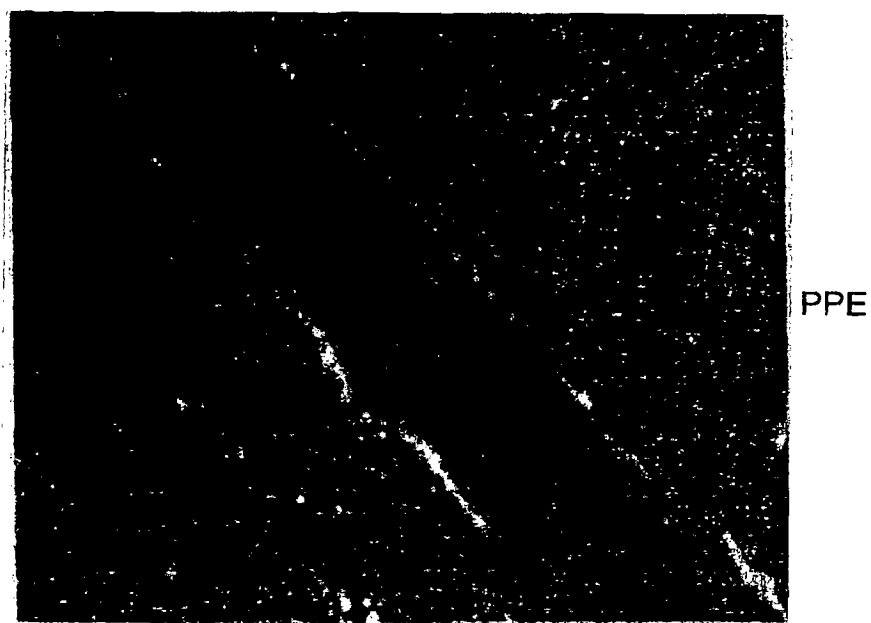


图 20b

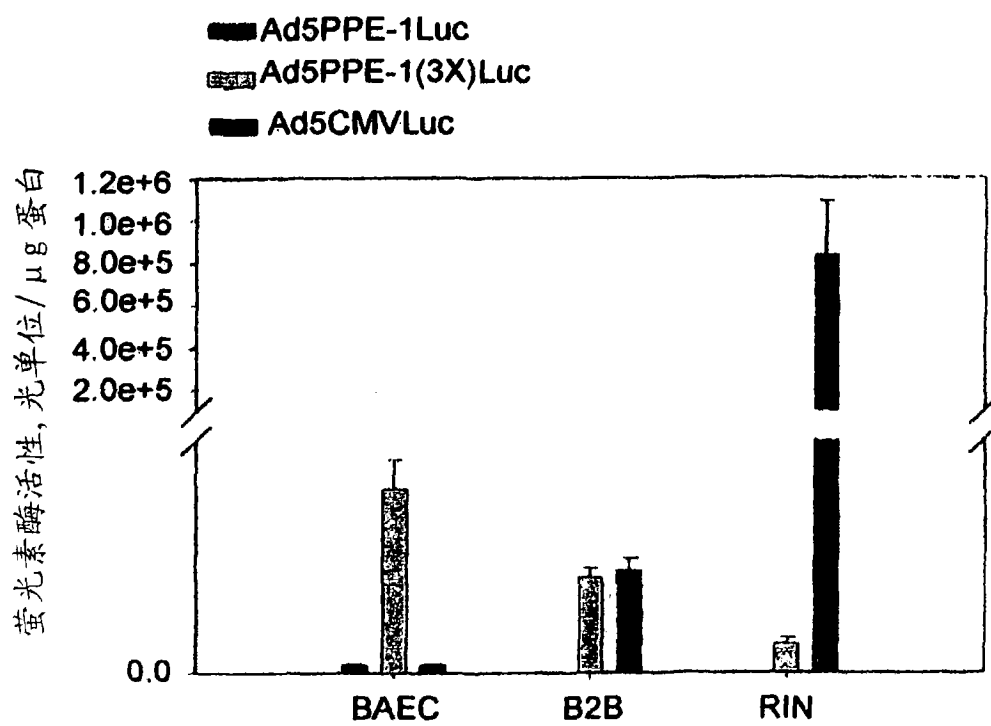


图 21

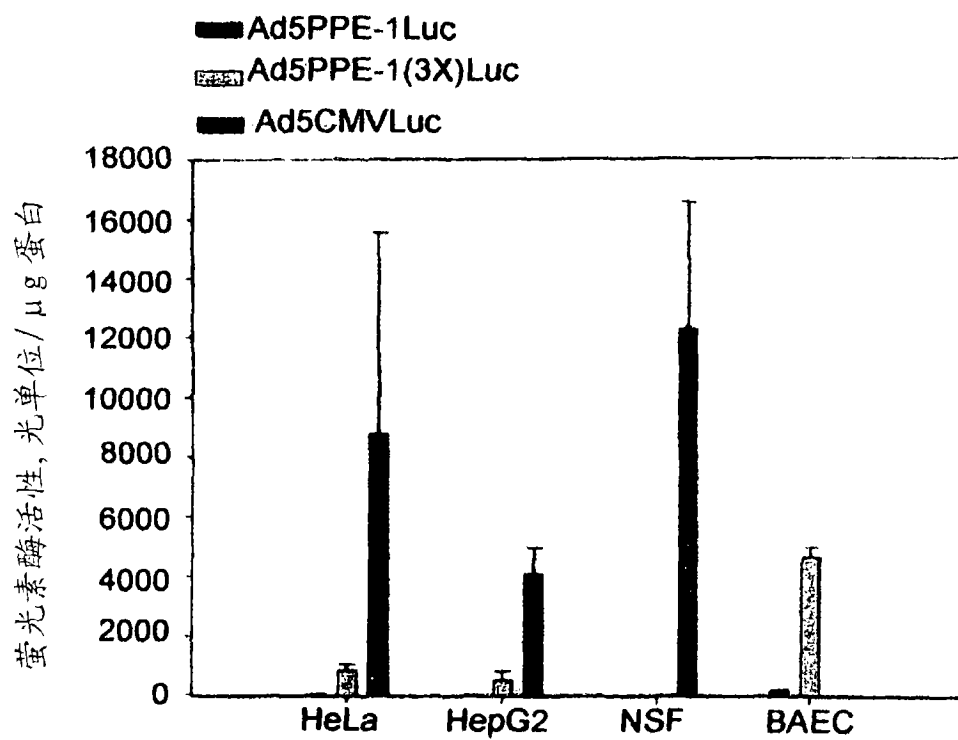


图 22



图 23a



图 23b



图 23c



图 24a



图 24b

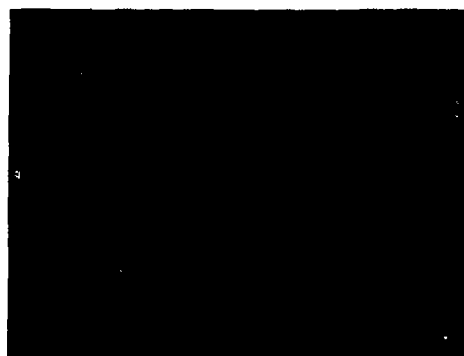


图 25a



图 25b



图 26a



图 26b



图 27a



图 27b



图 28a



图 28b



图 29a



图 29b



图 29c

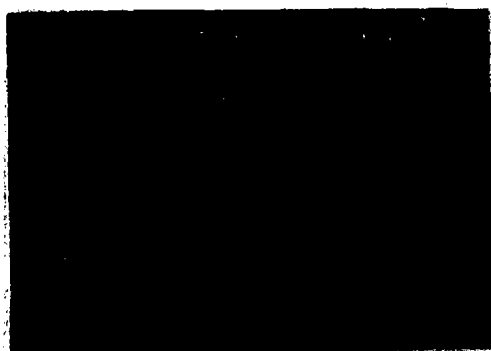


图 30a



图 30b



图 30c

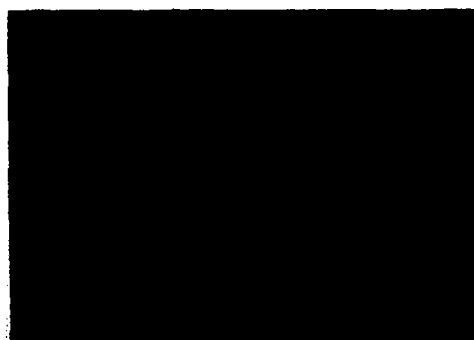


图 31a



图 31b

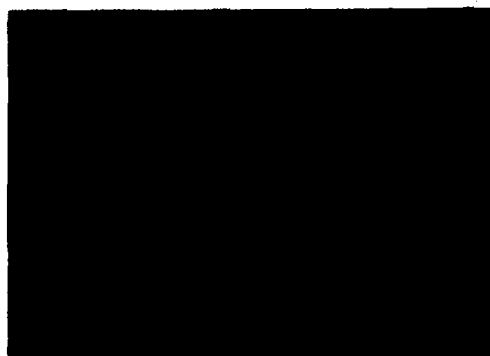


图 31c

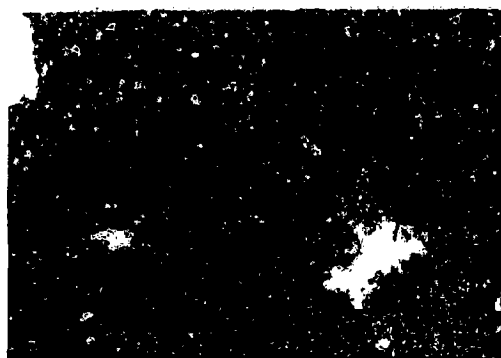


图 31c'

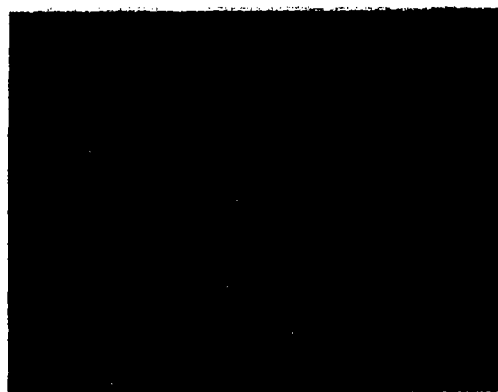


图 31d

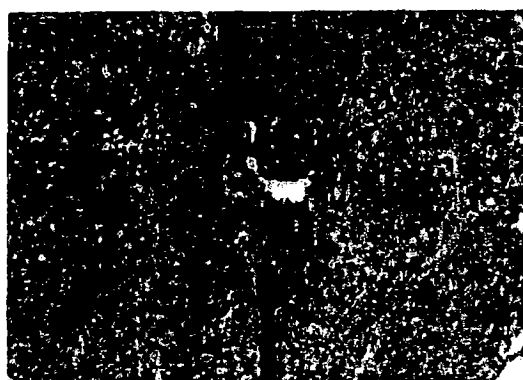


图 31d'

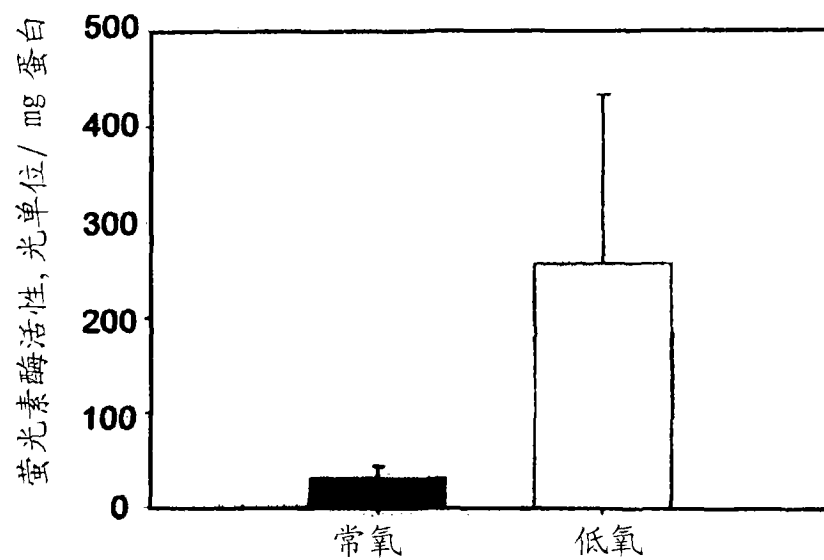


图 32

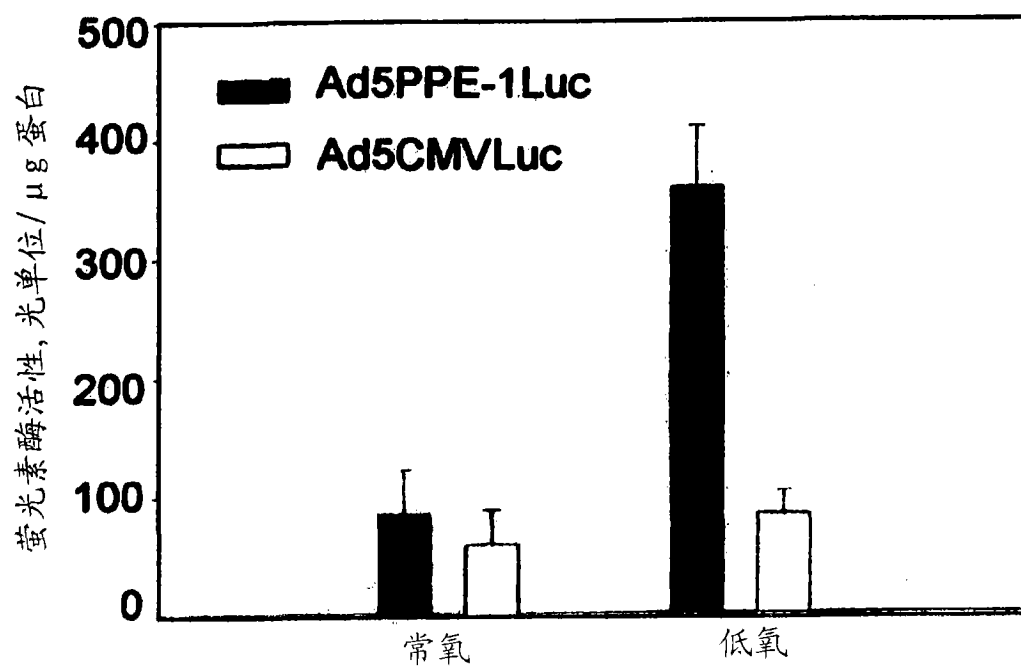


图 33

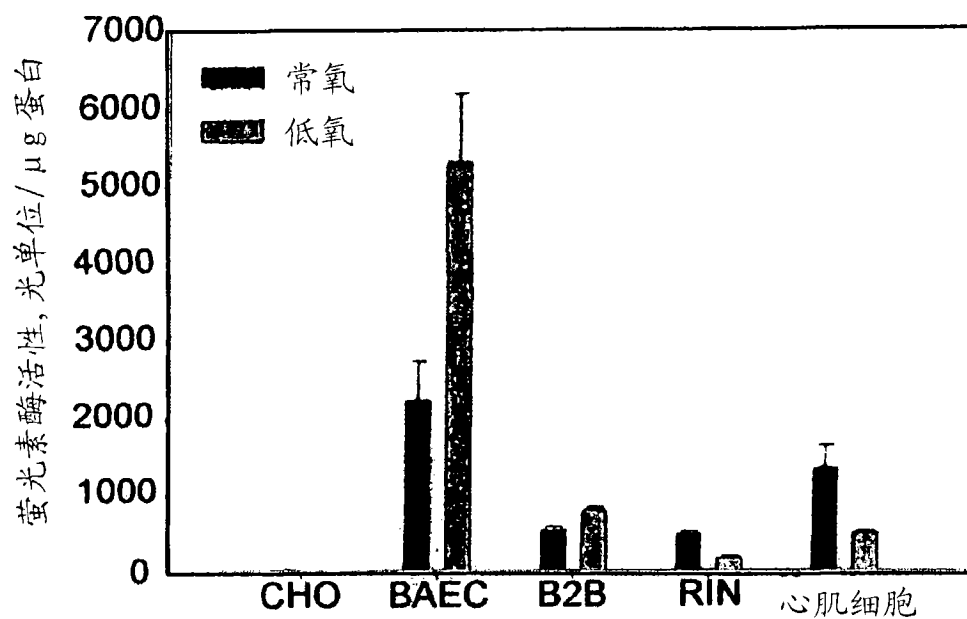


图 34

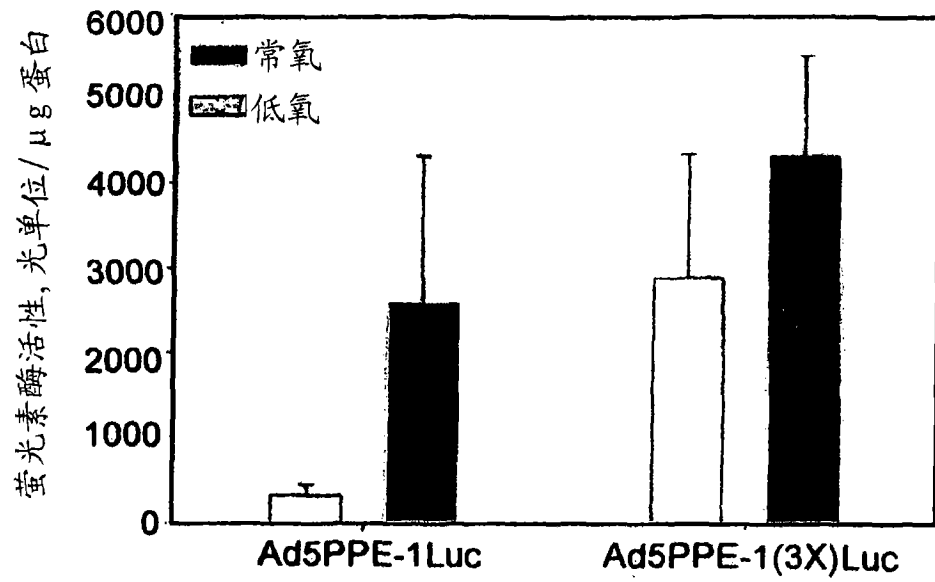


图 35

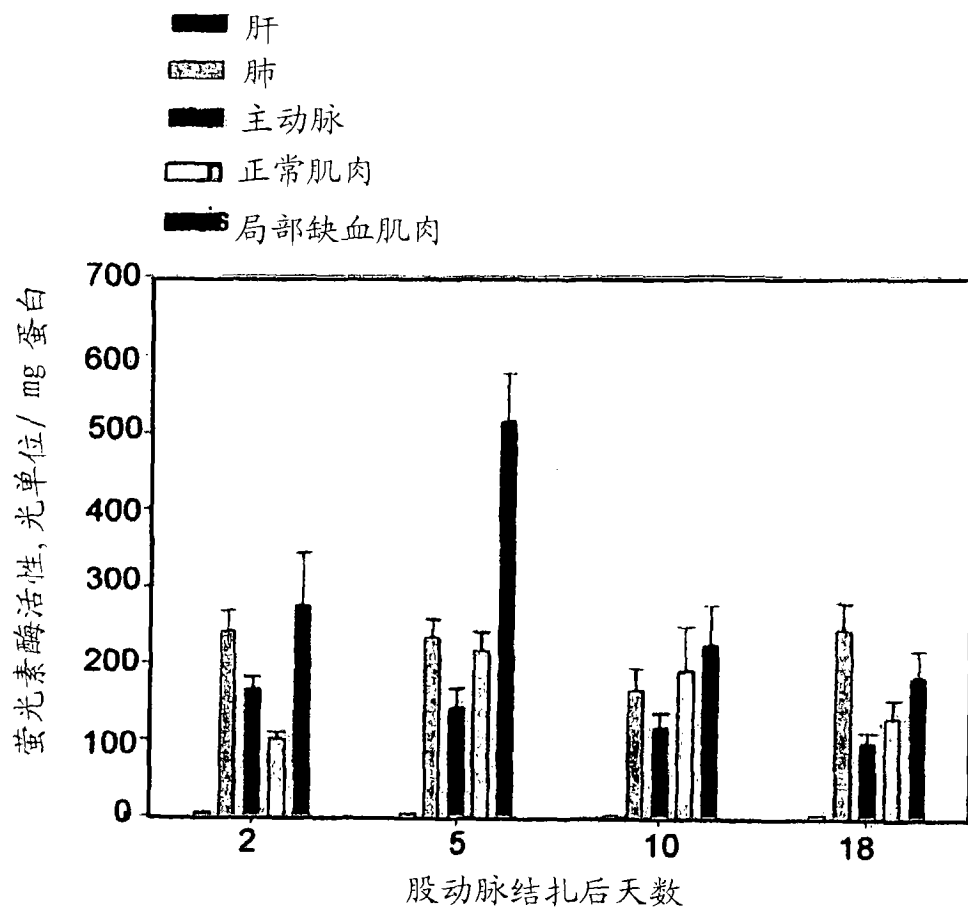


图 36

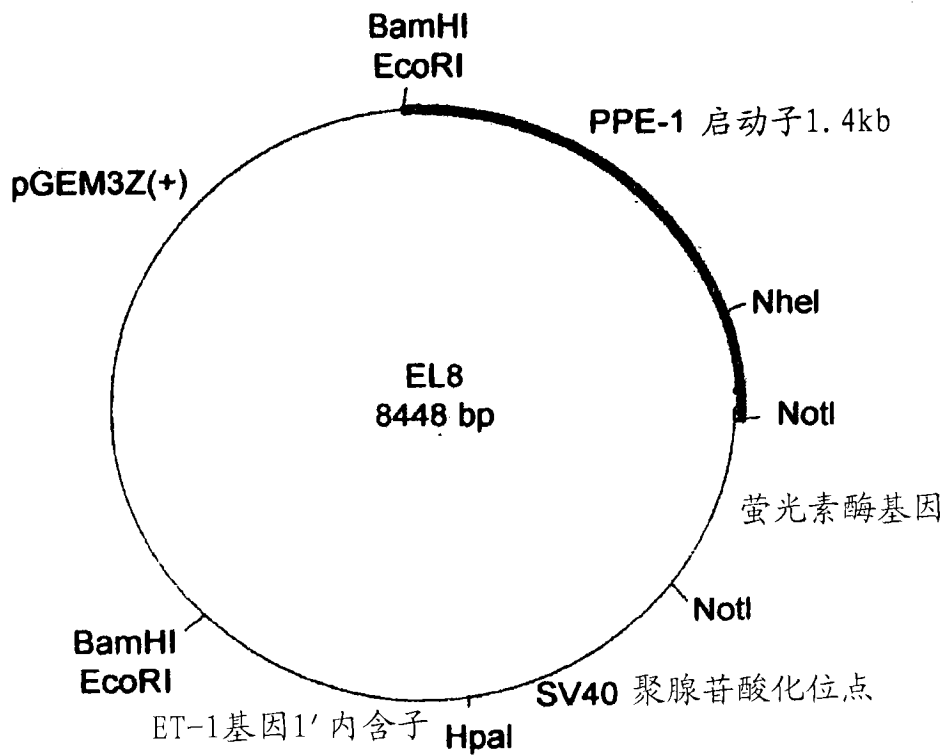


图 37a

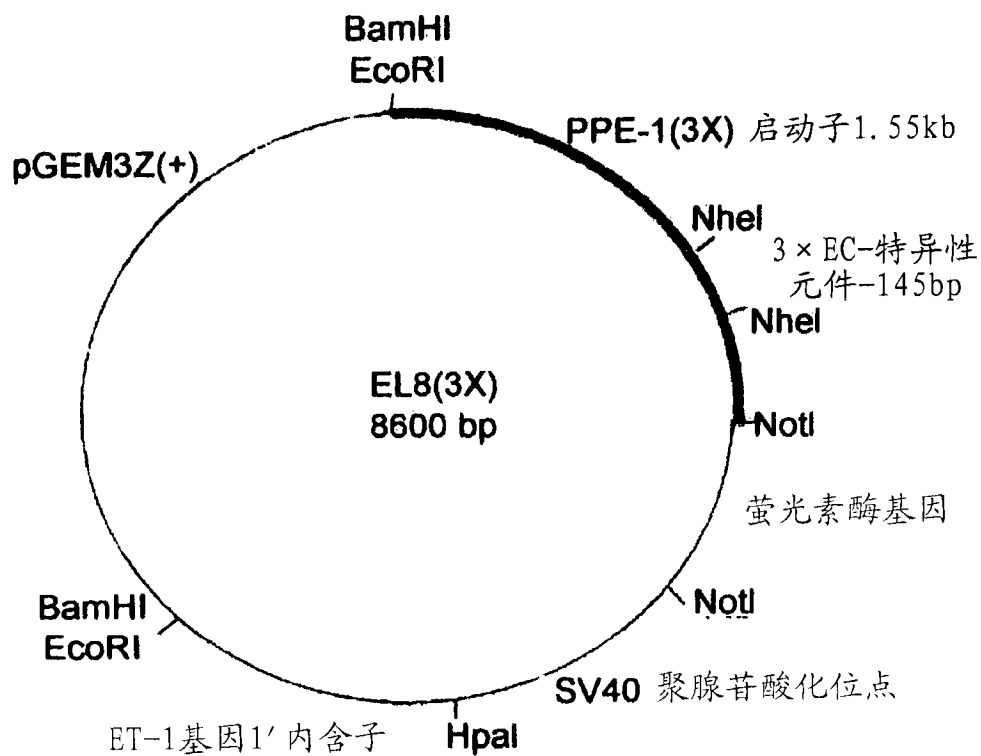


图 37b

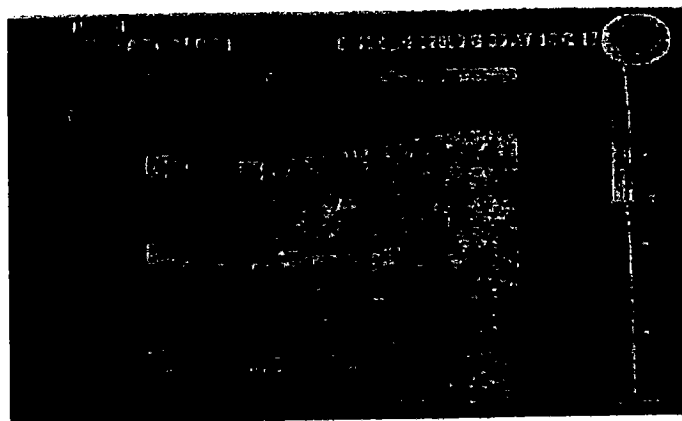


图 38a

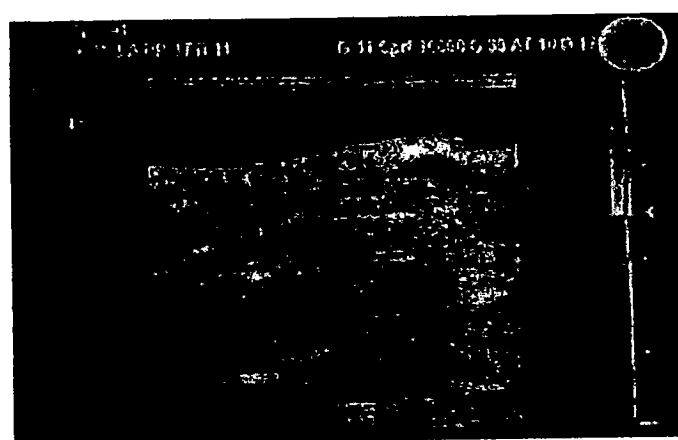


图 38b

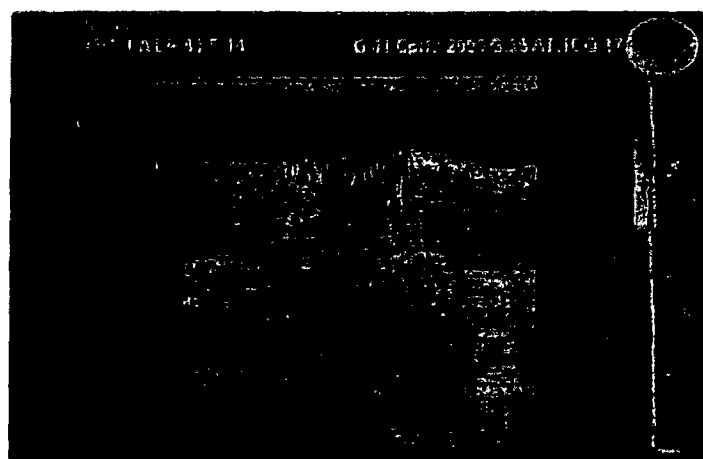


图 38c



图 38d

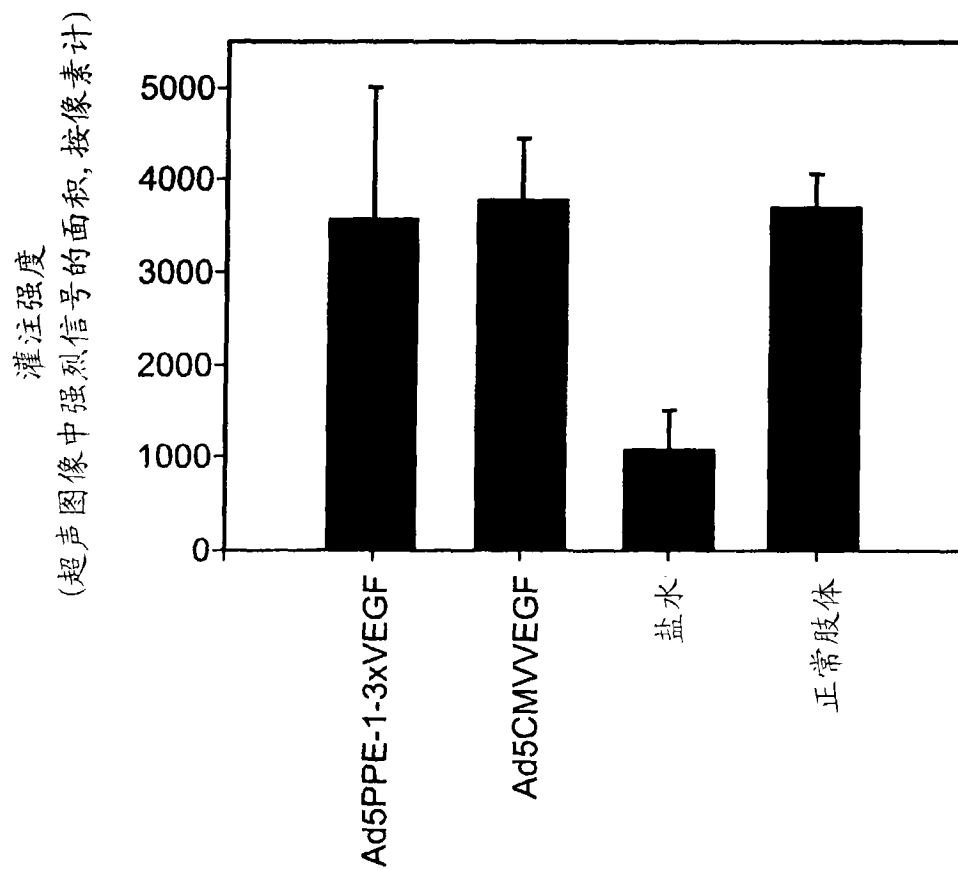


图 38e

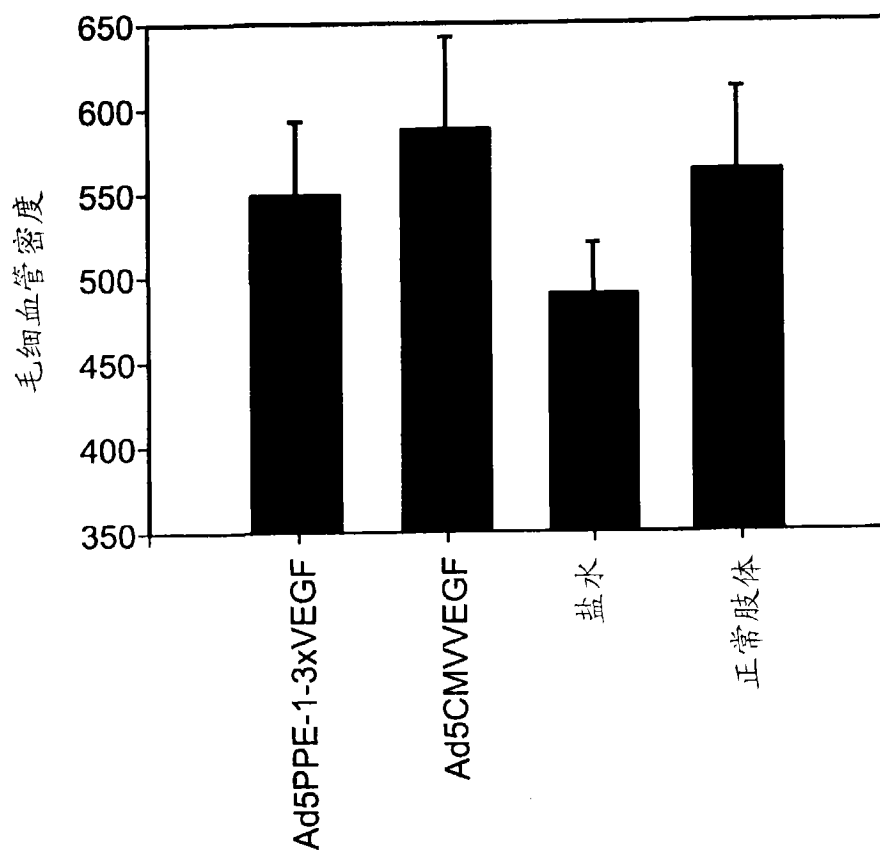


图 38f

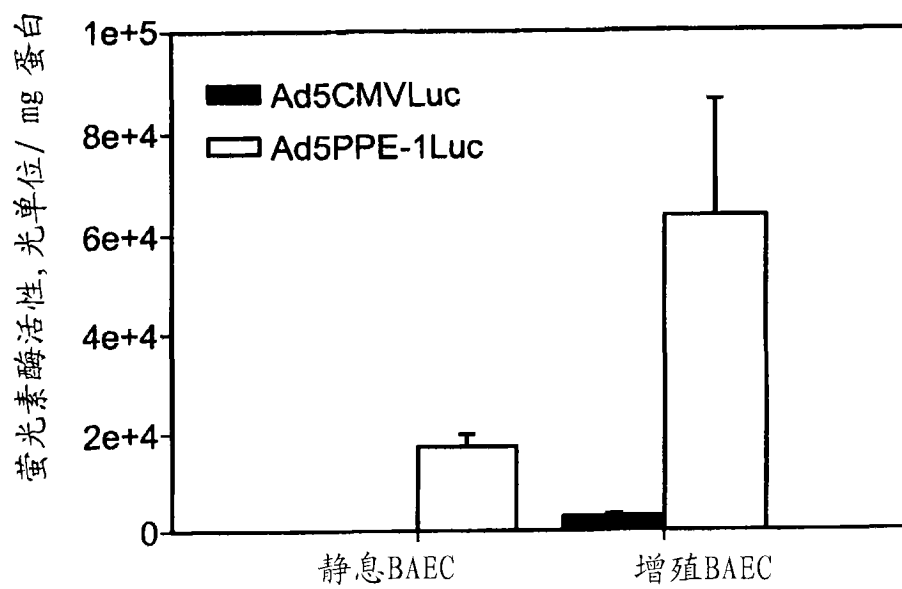


图 39

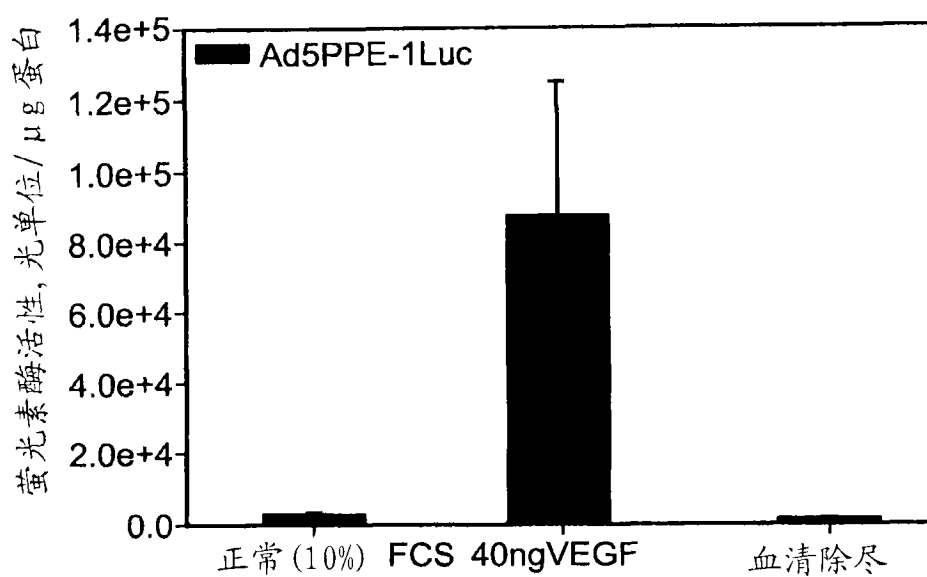


图 40

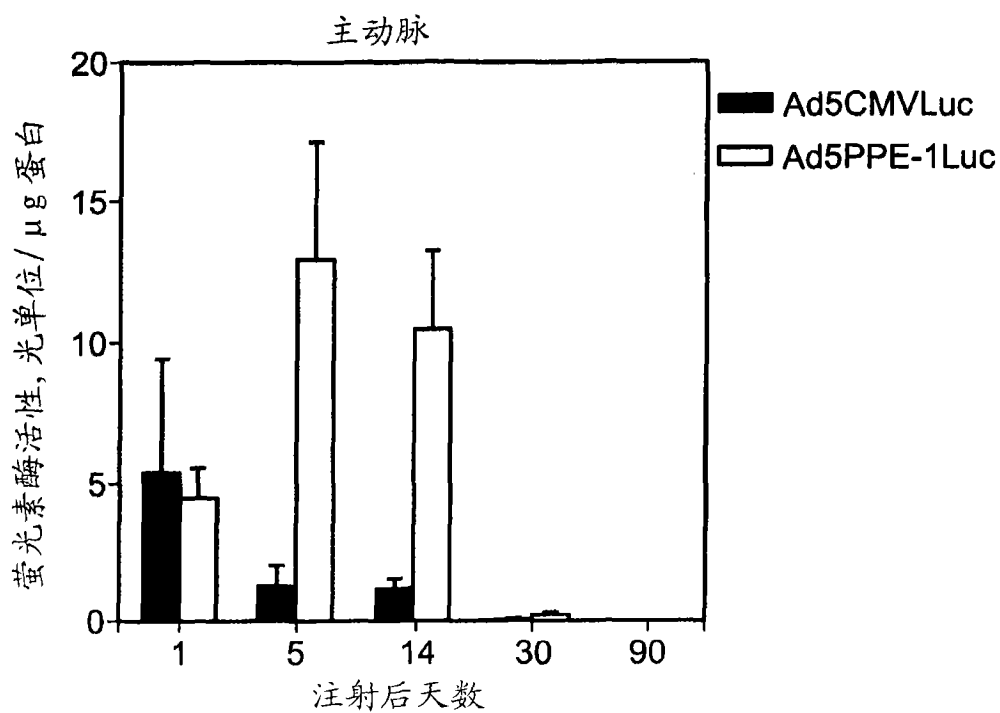


图 41a

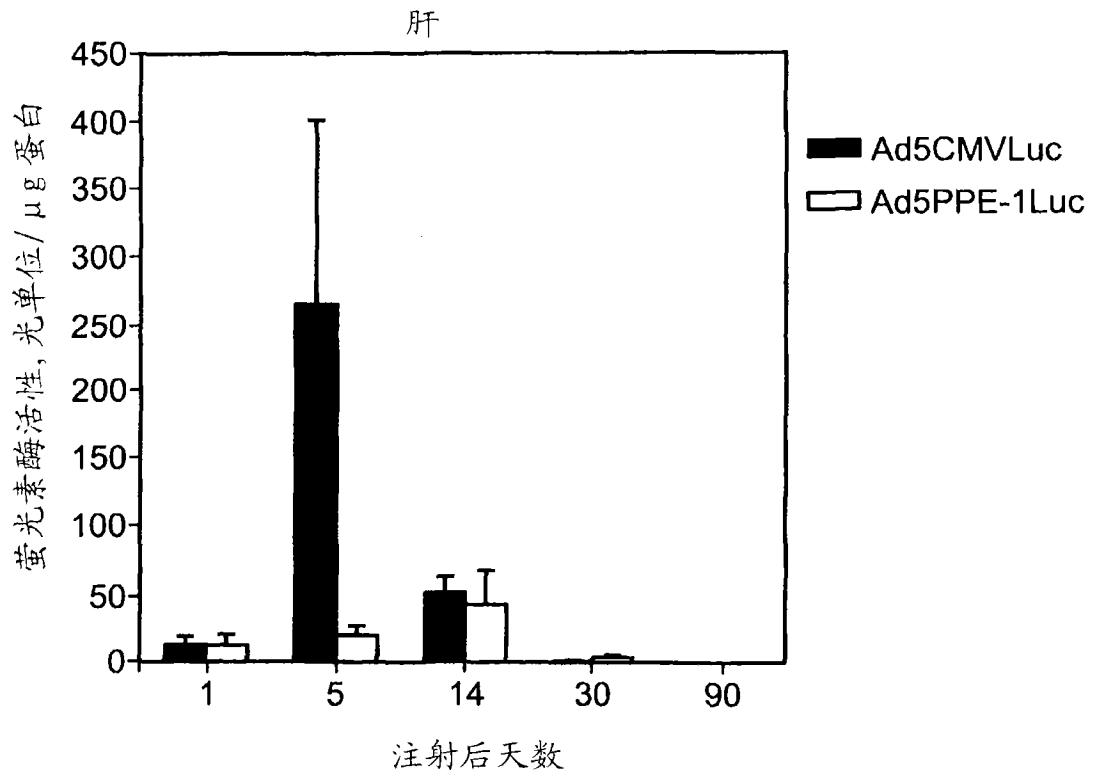


图 41b

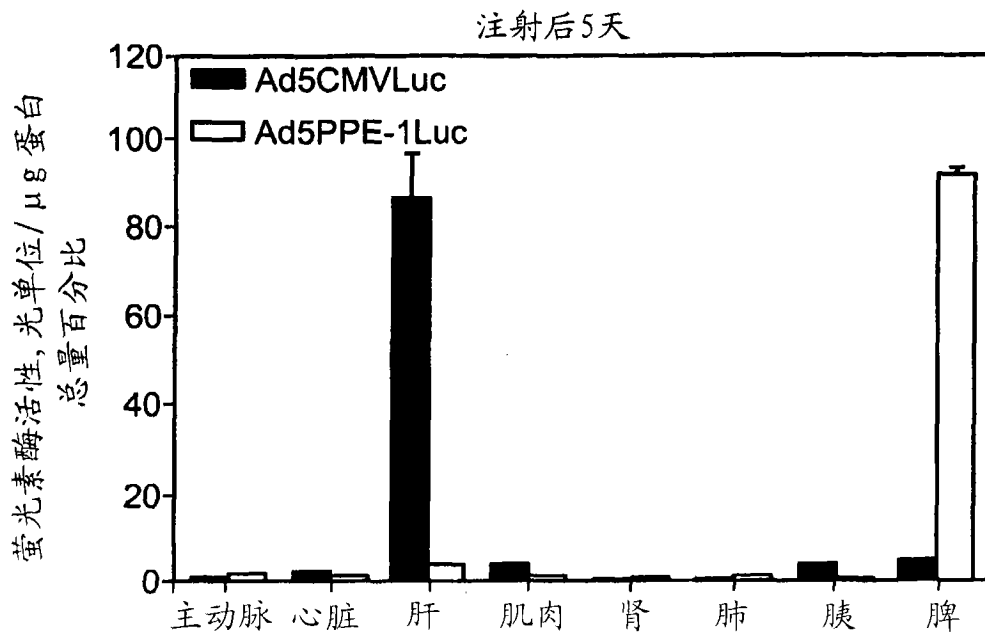


图 42a

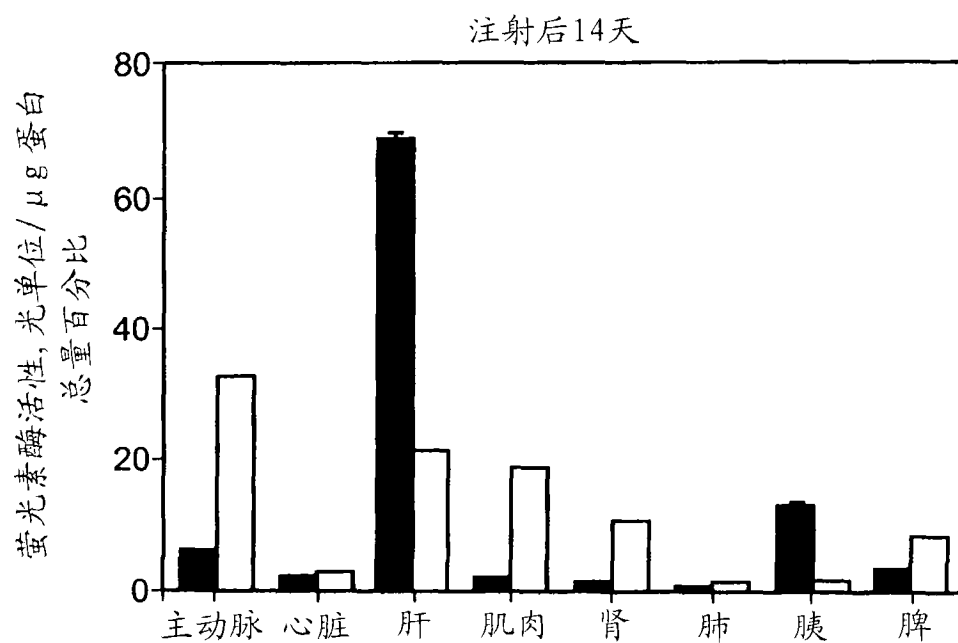


图 42b



图 43

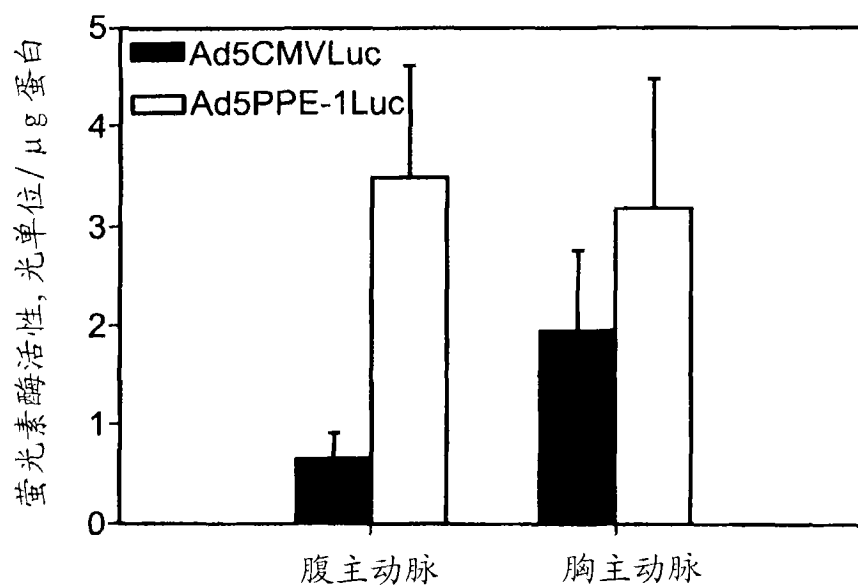


图 44

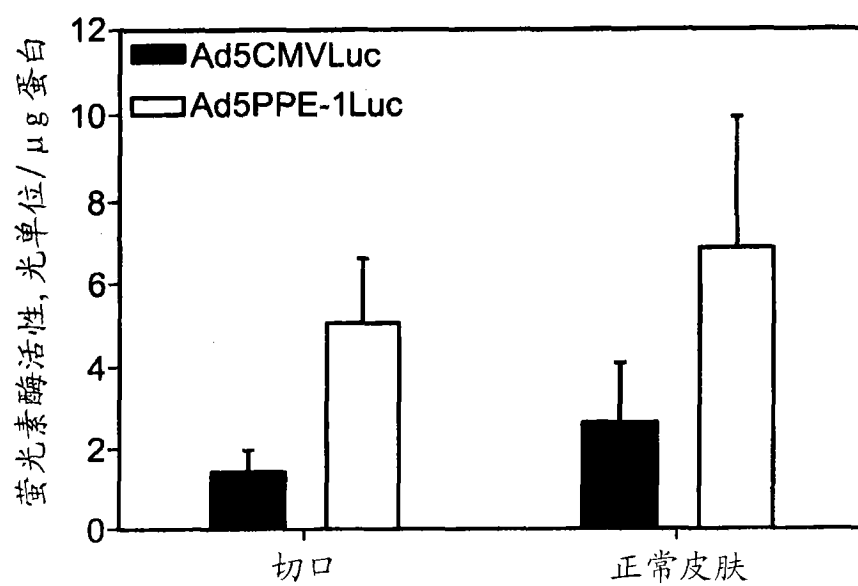


图 45

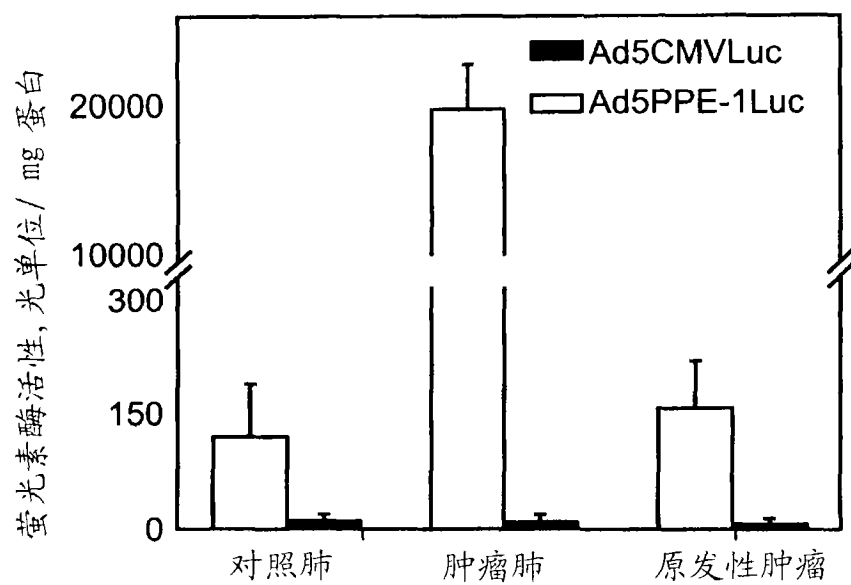


图 46

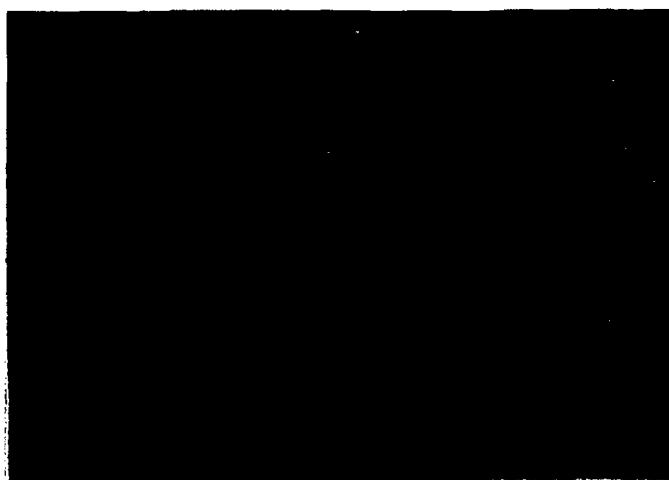


图 47a

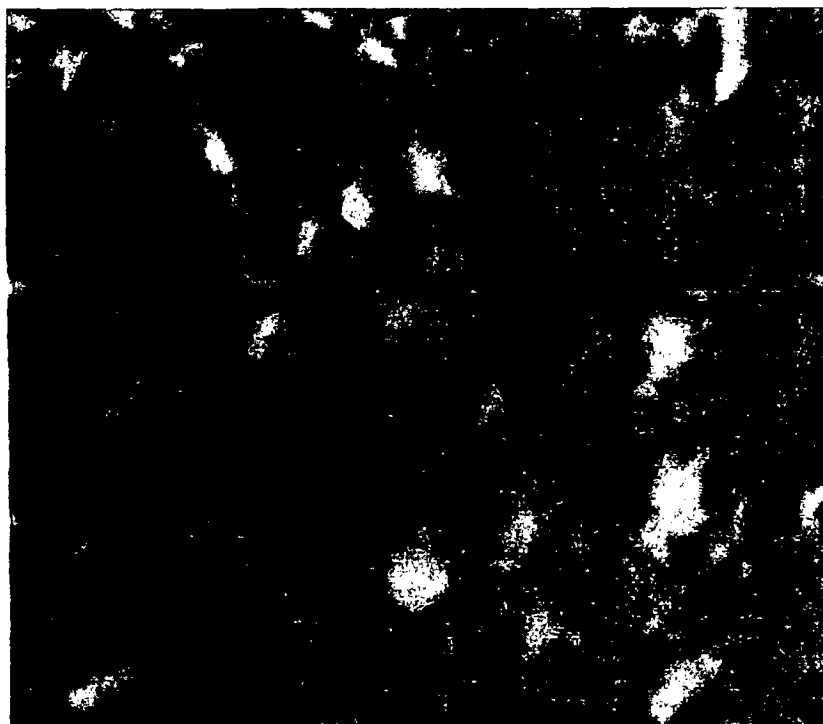


图 47b

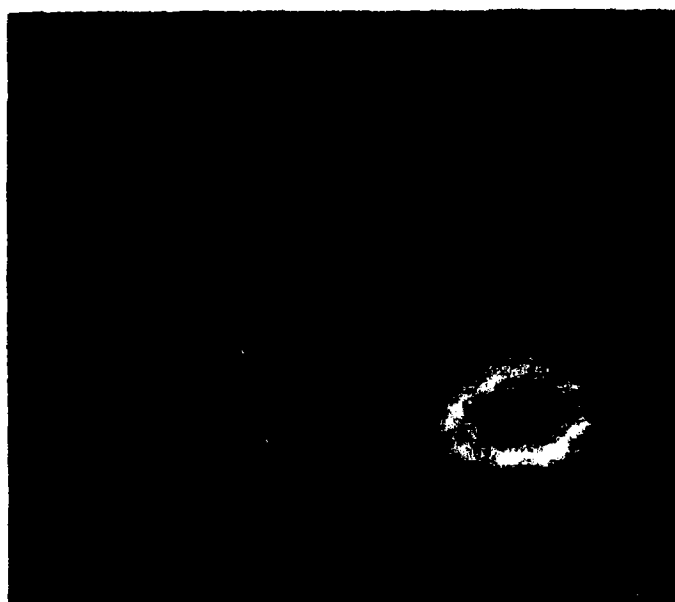


图 47c

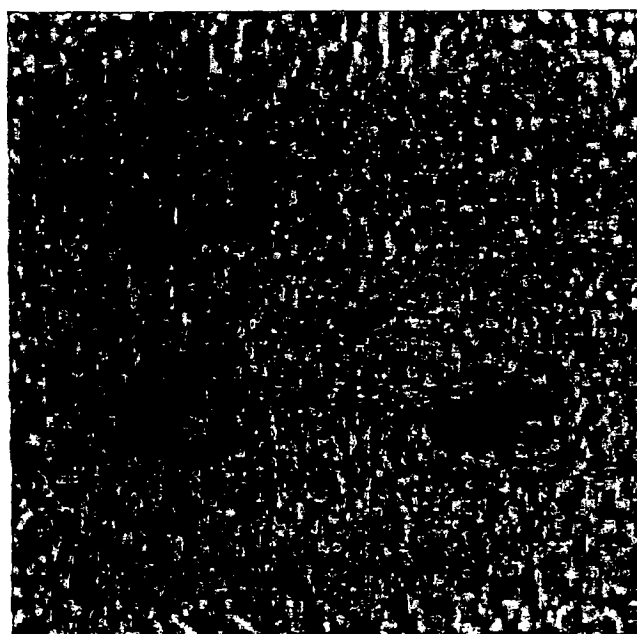


图 47d

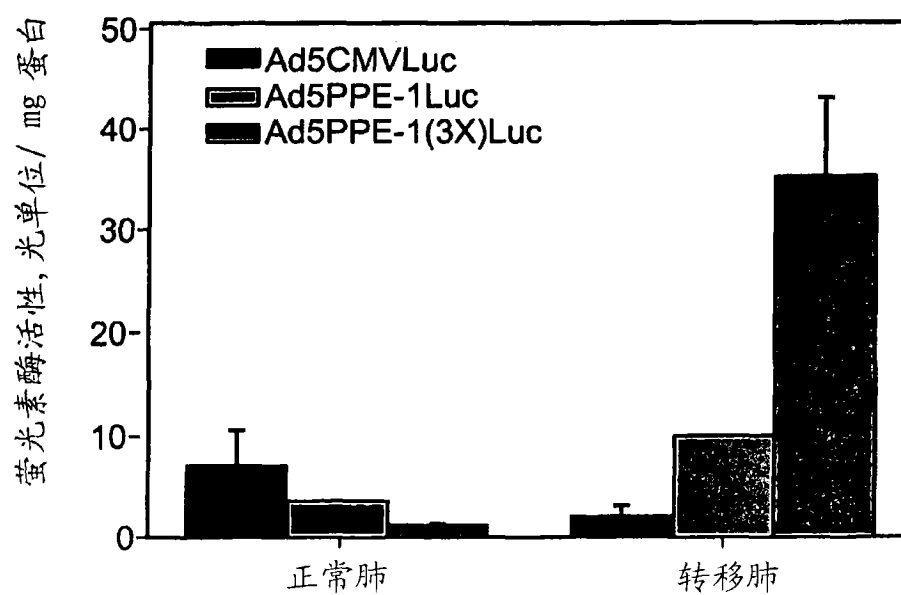


图 48

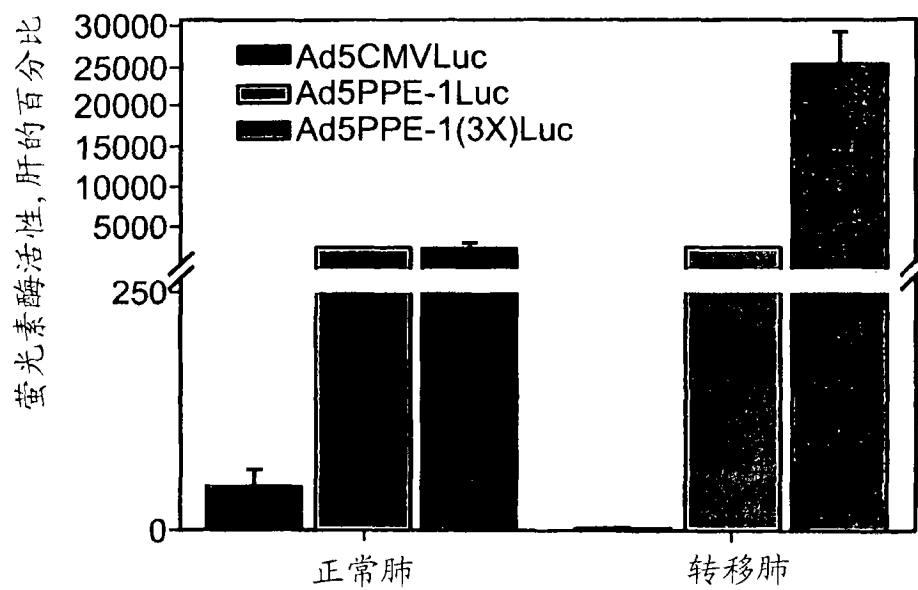


图 49



图 50a



图 50b

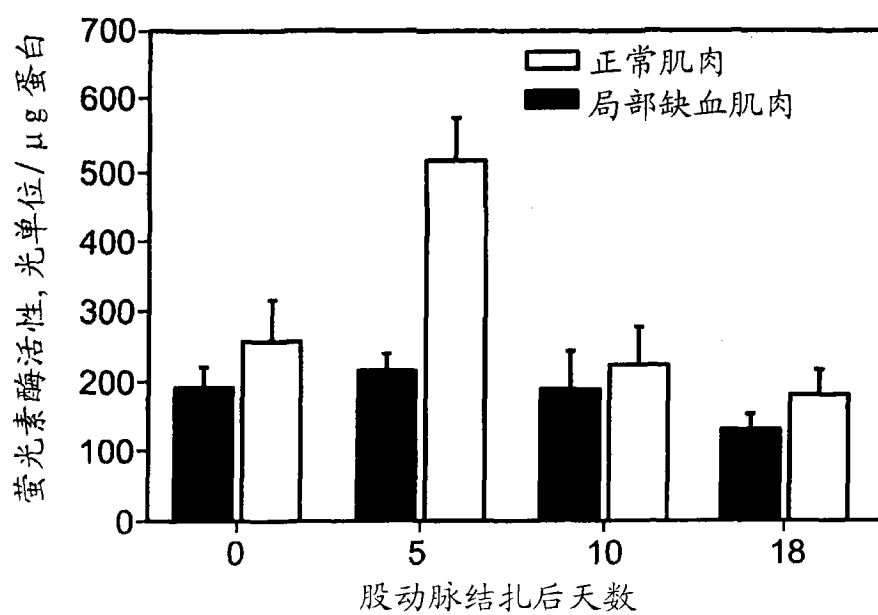


图 51

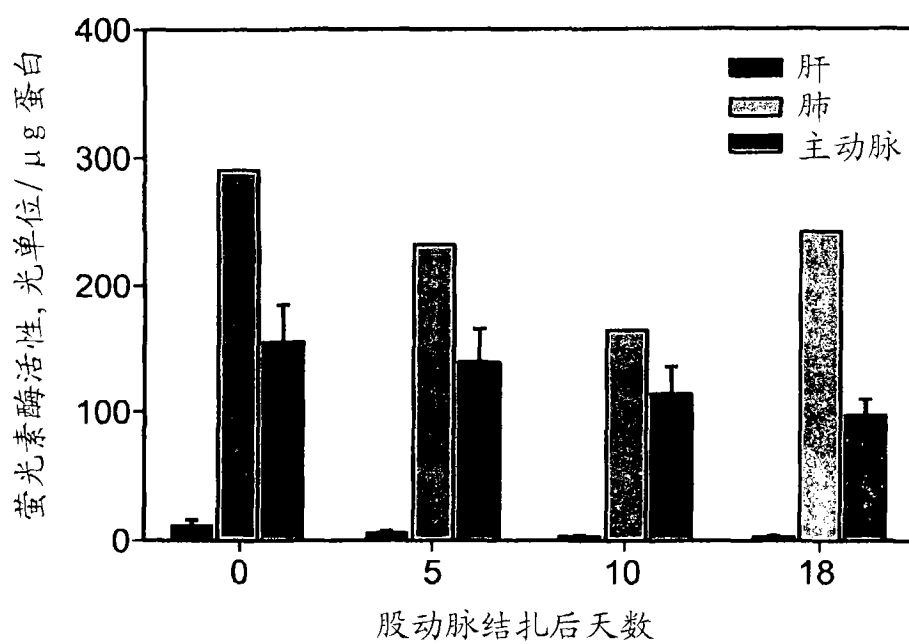


图 52

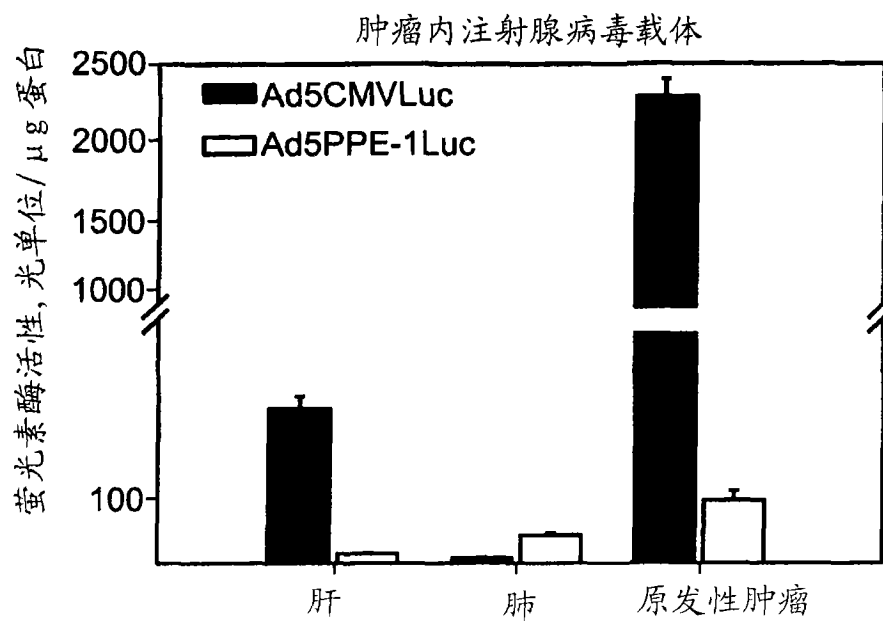


图 53

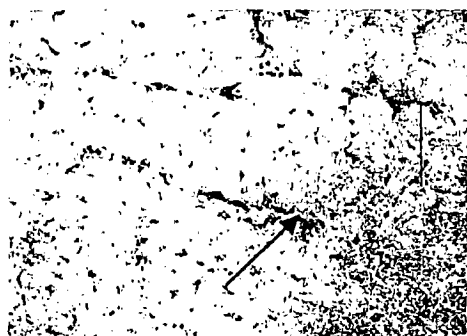


图 54a

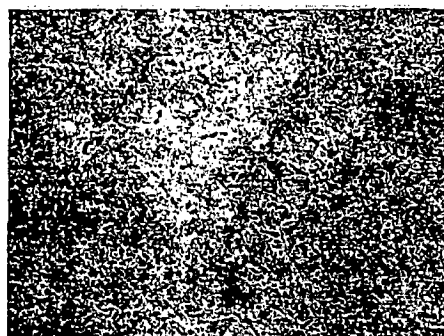


图 54b

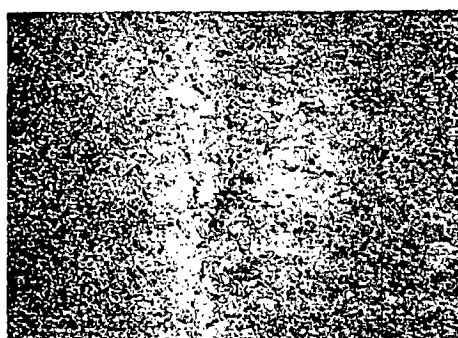


图 54c

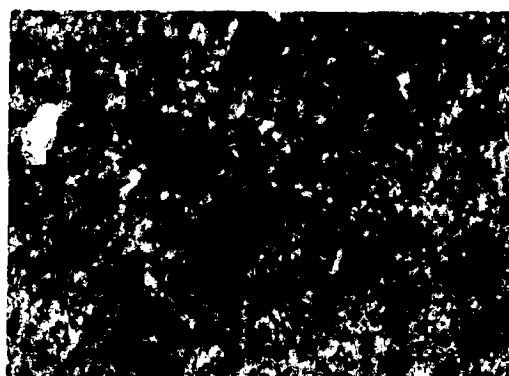


图 54d

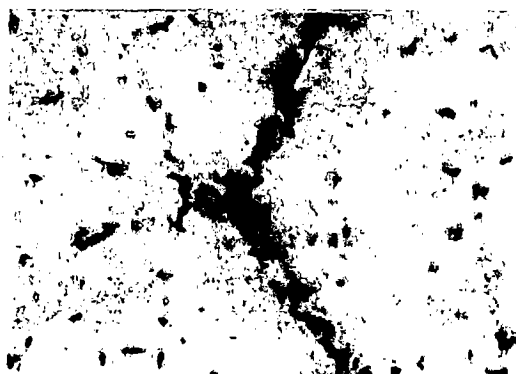


图 54e

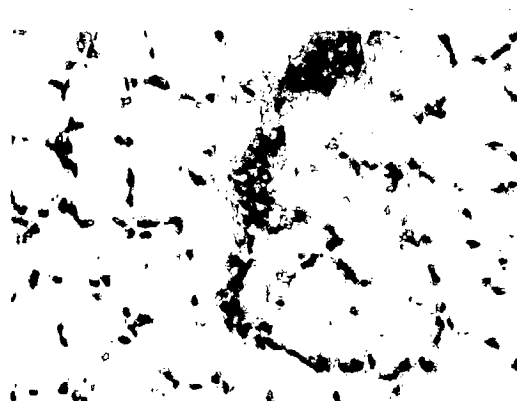


图 54f

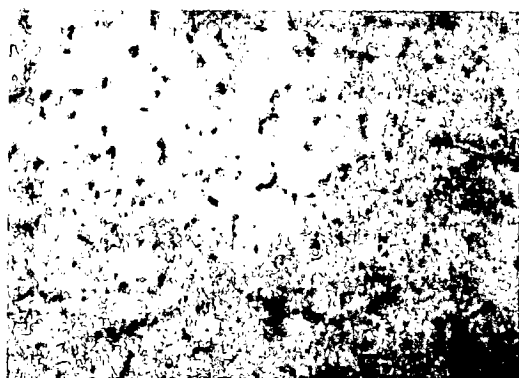


图 54g

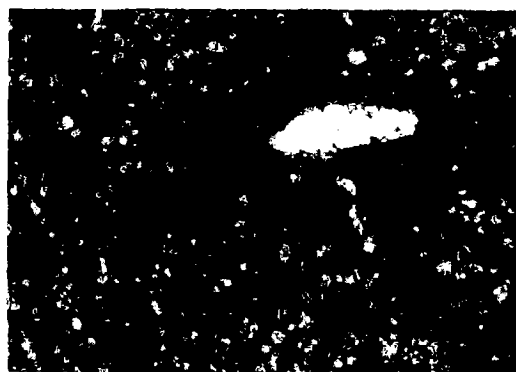


图 54h

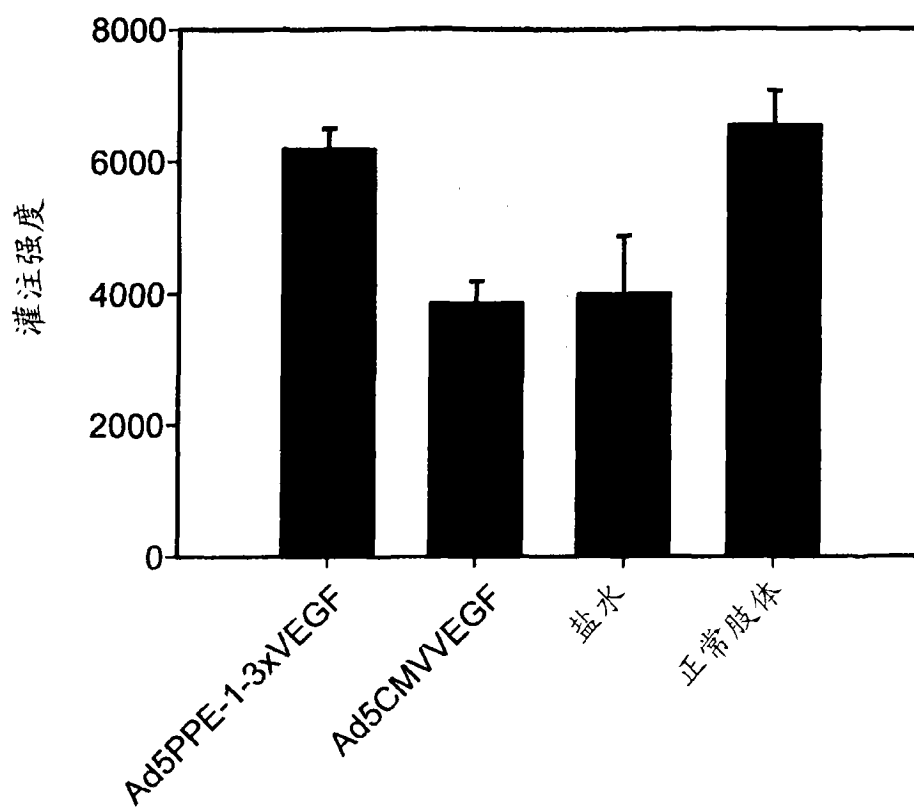


图 55a

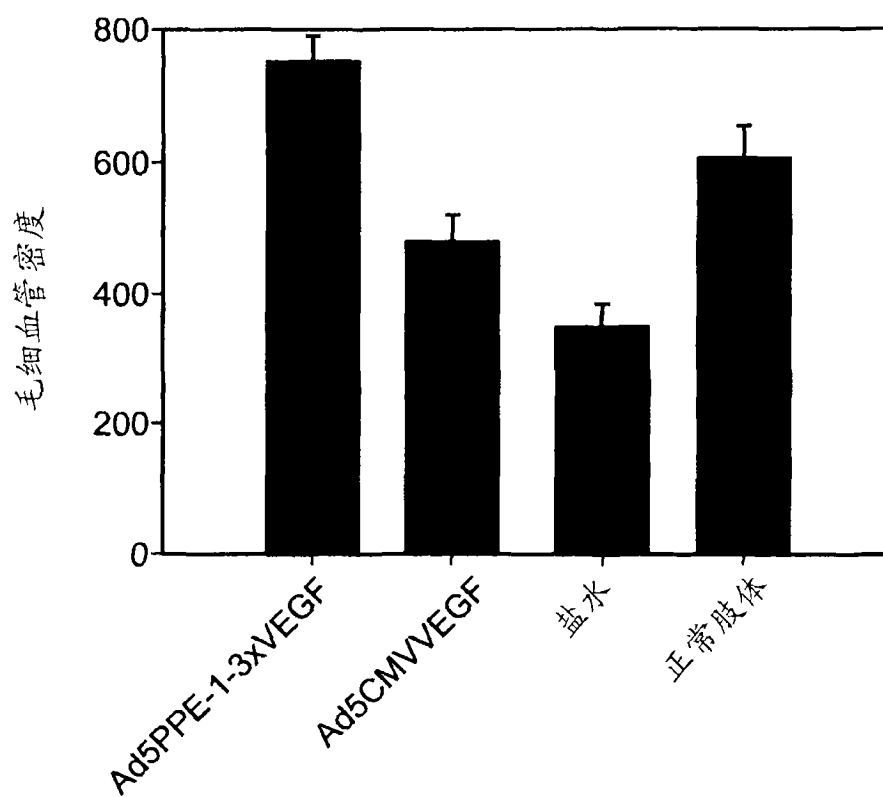


图 55b

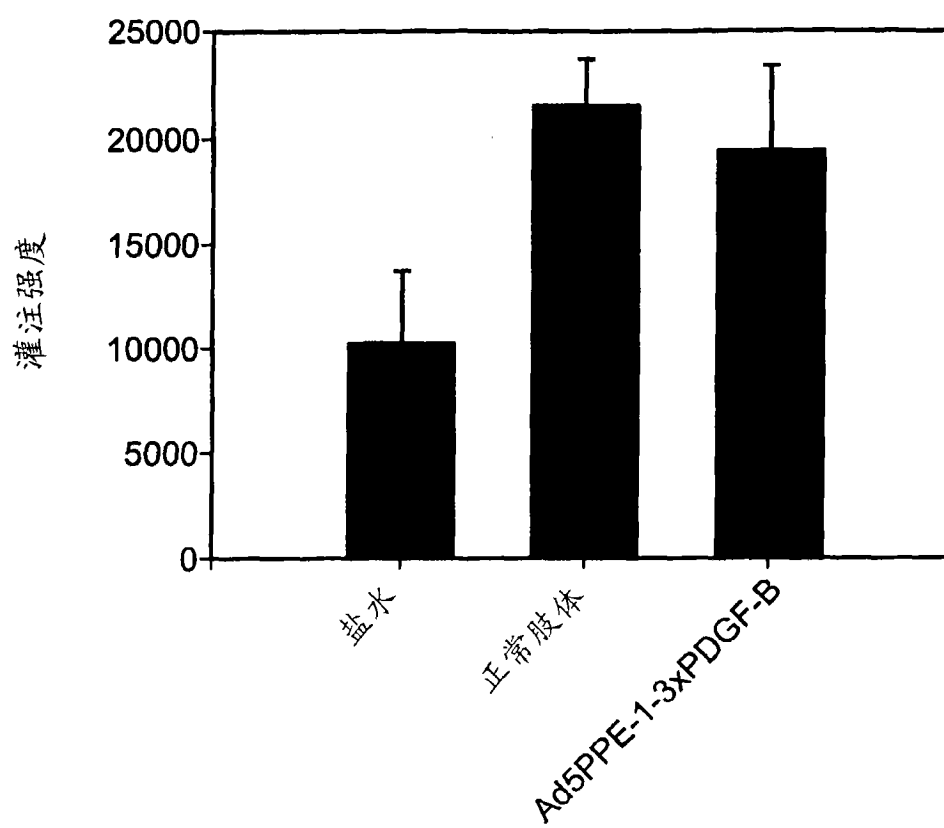


图 56a

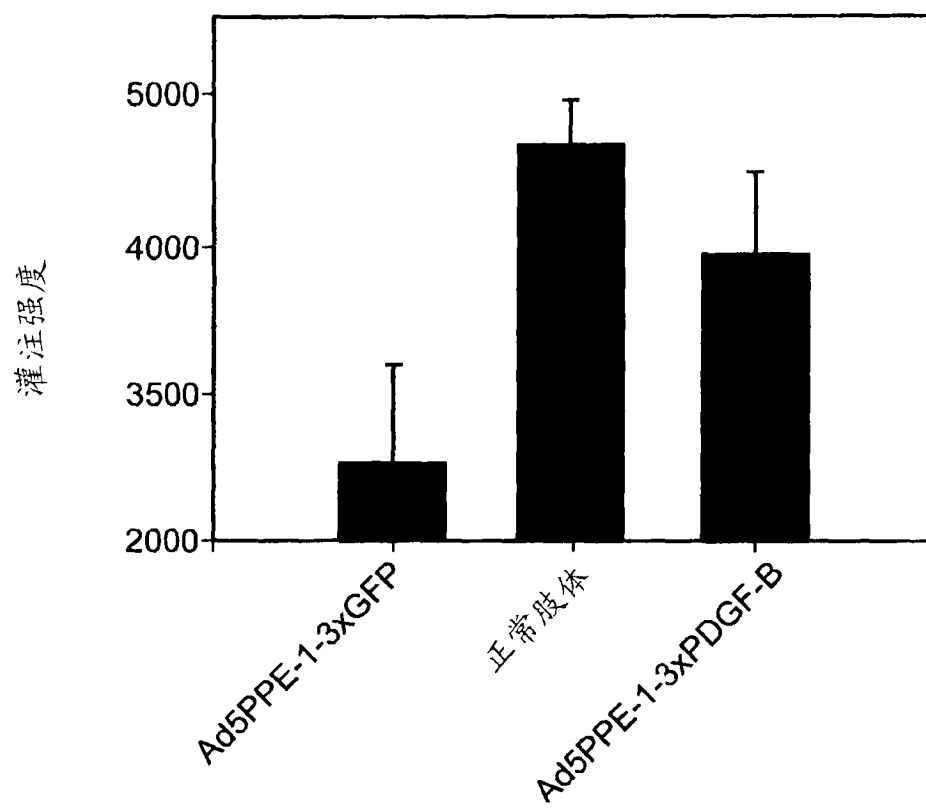


图 56b

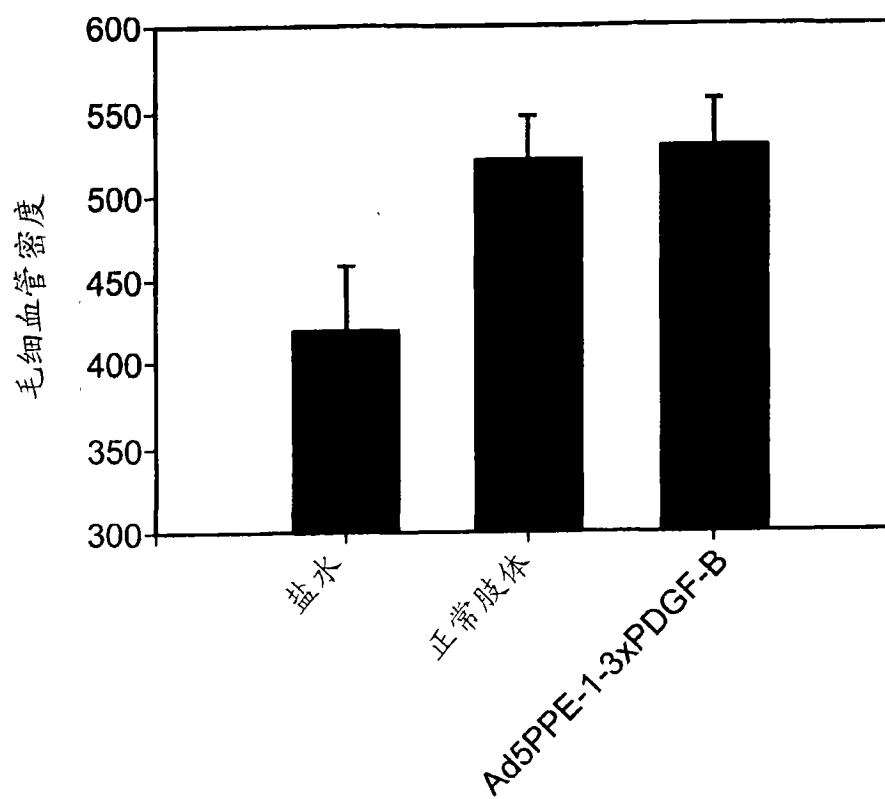


图 56c

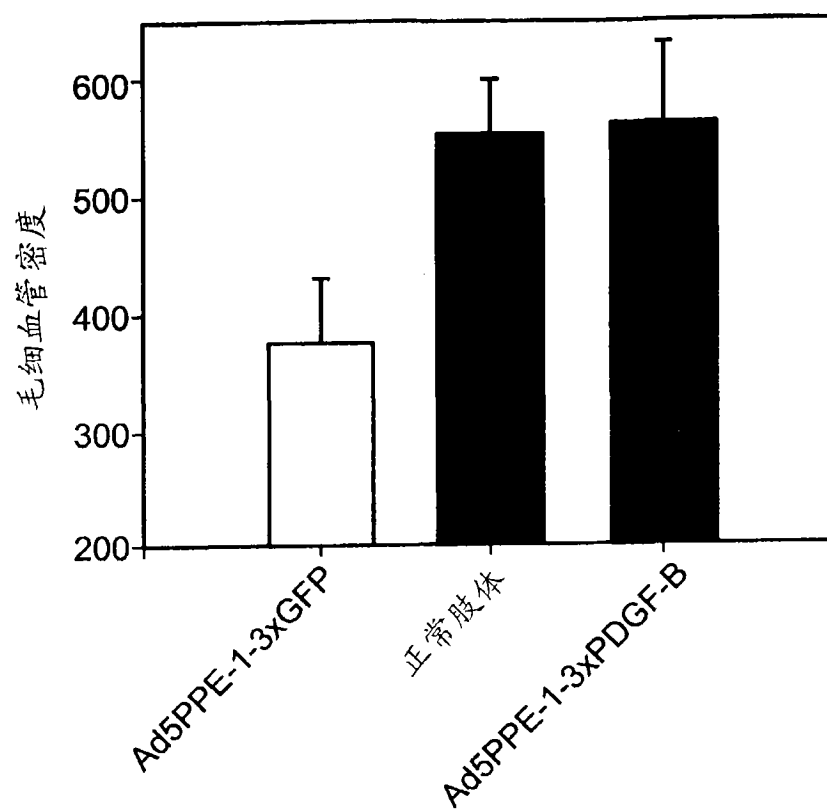


图 56d

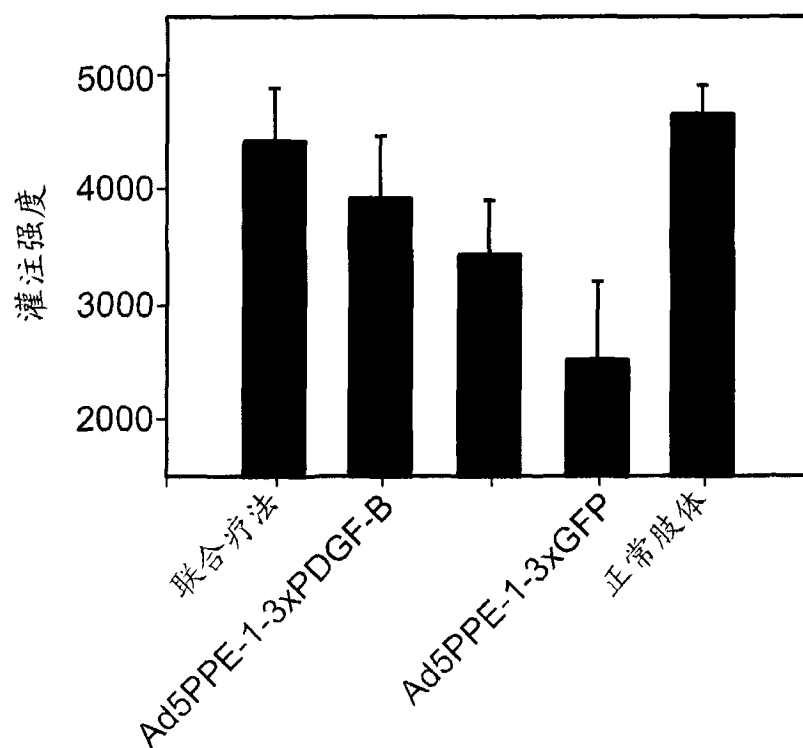


图 57a

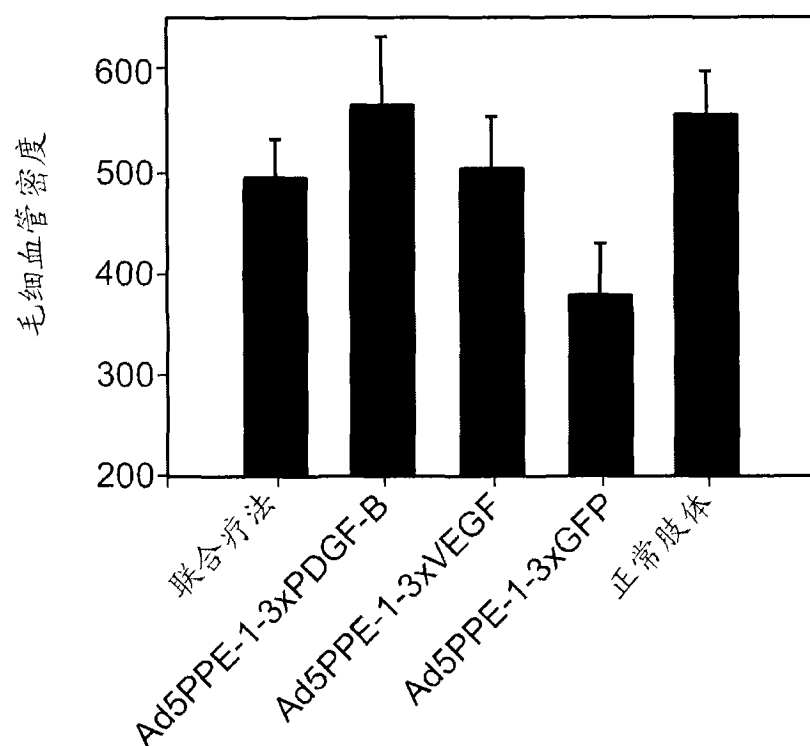


图 57b

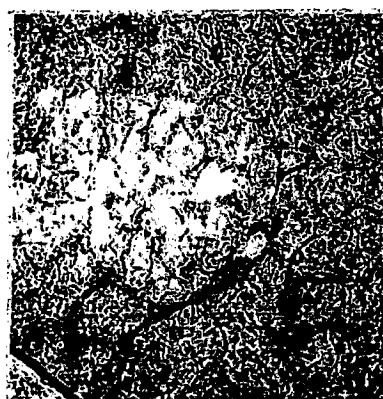


图 57c

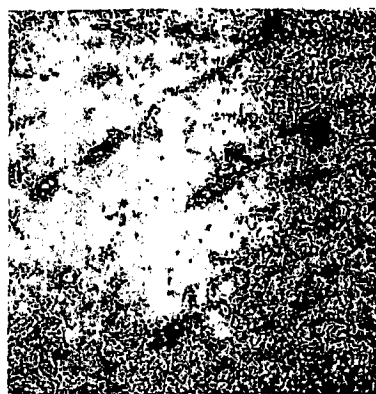


图 57d



图 57e

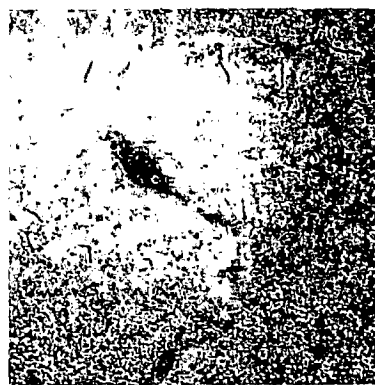


图 57f

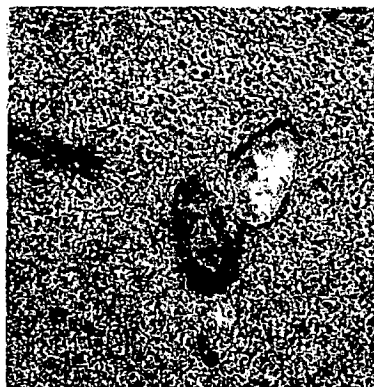


图 57g

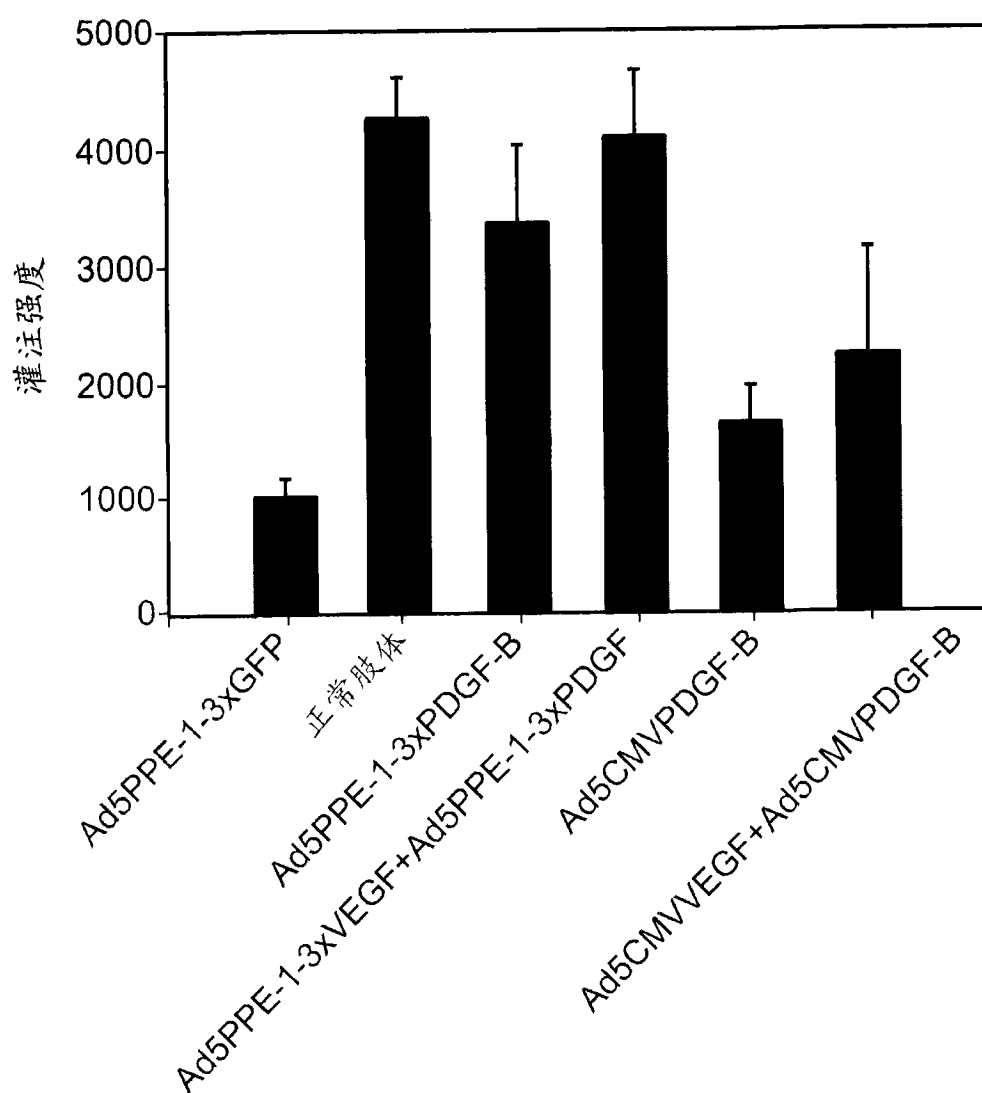


图 58

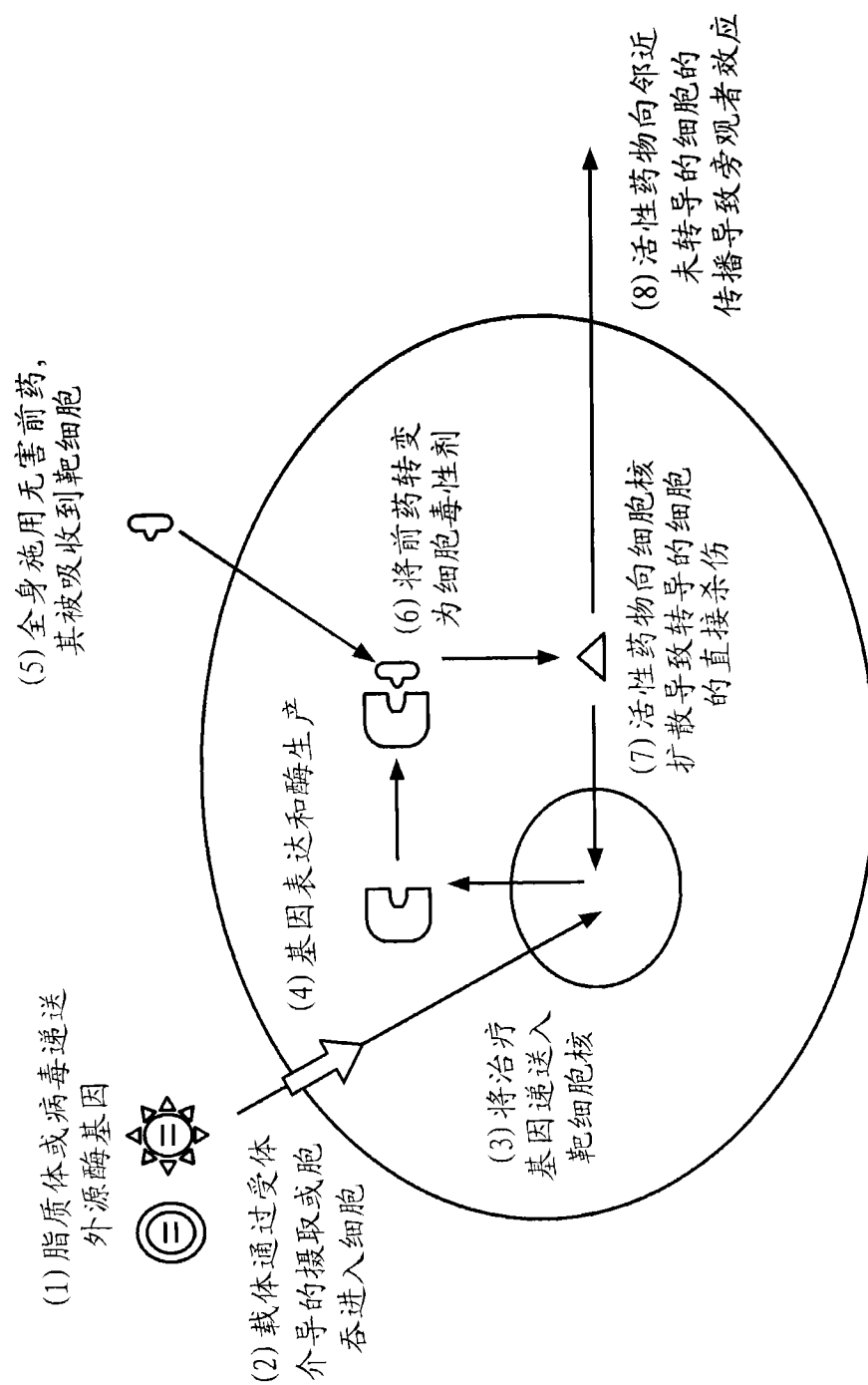


图 59

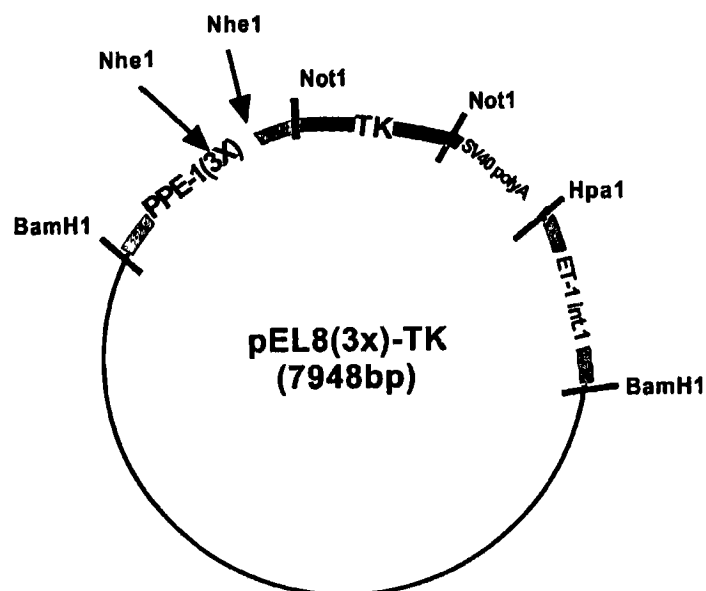


图 60A

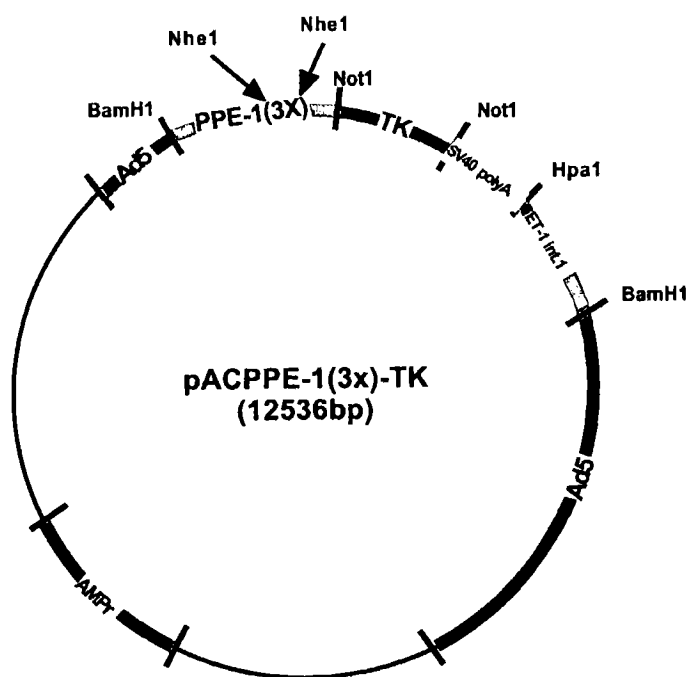


图 60B

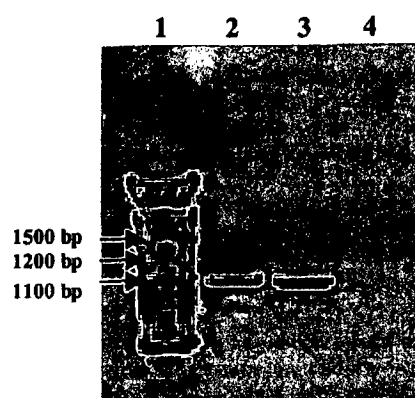


图 61

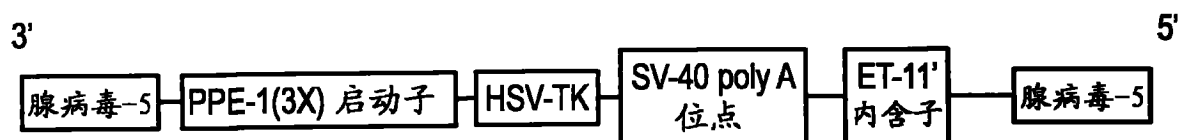


图 62a

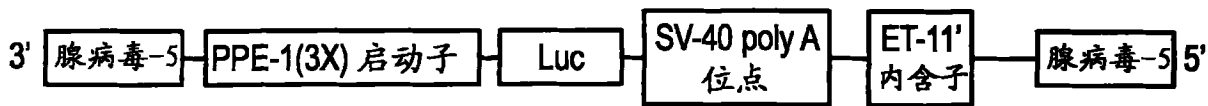


图 62b

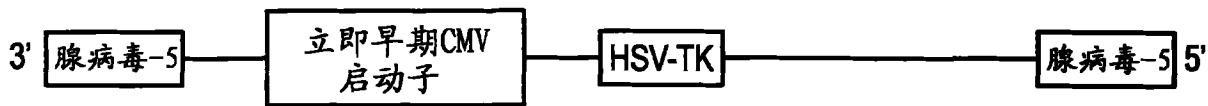


图 62c

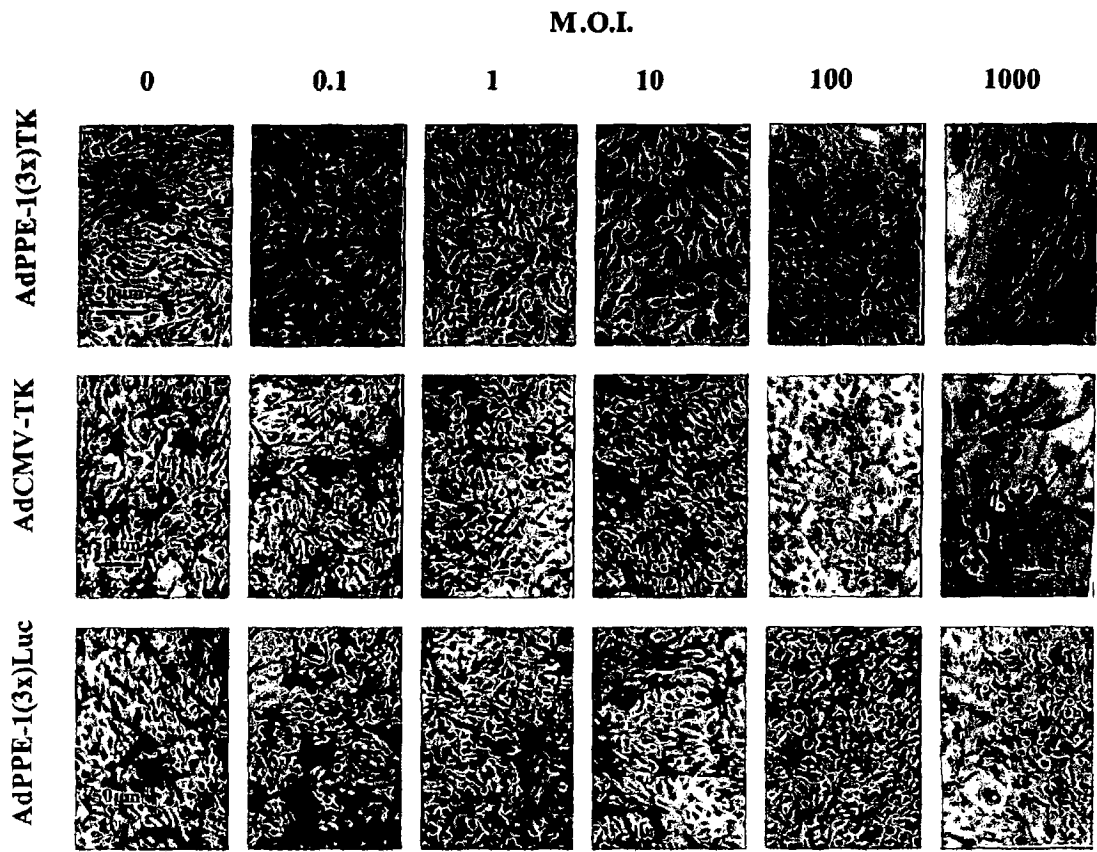


图 63

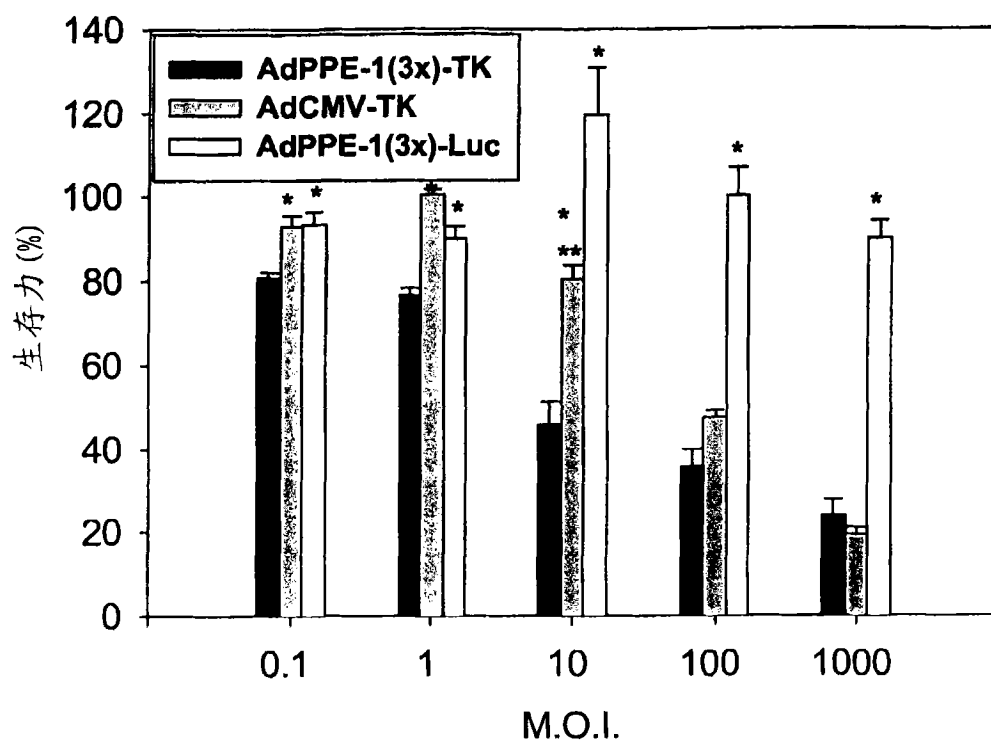


图 64

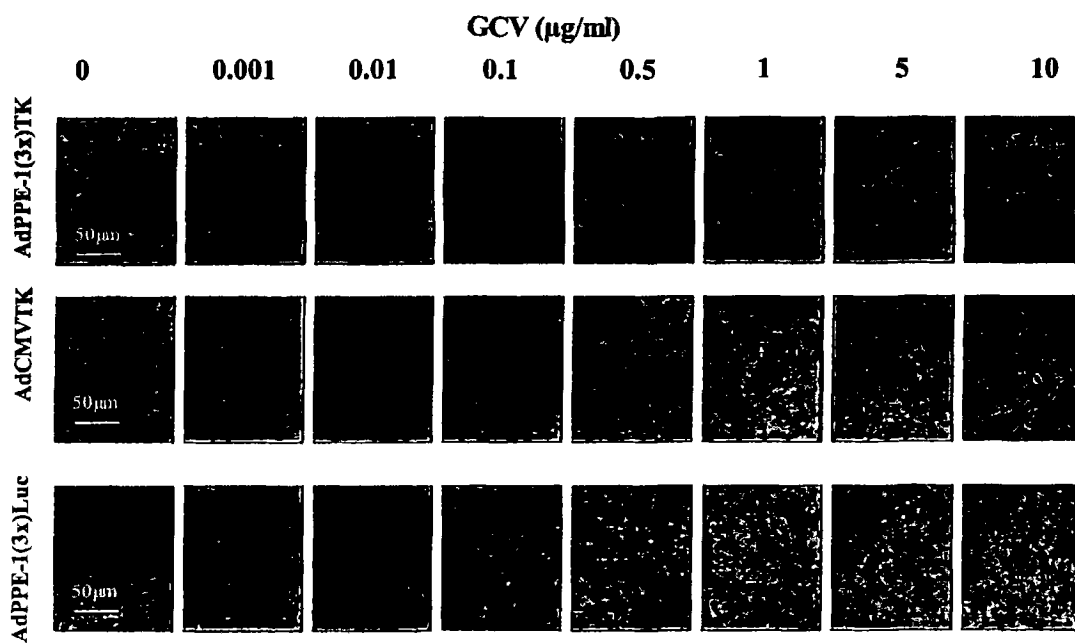


图 65

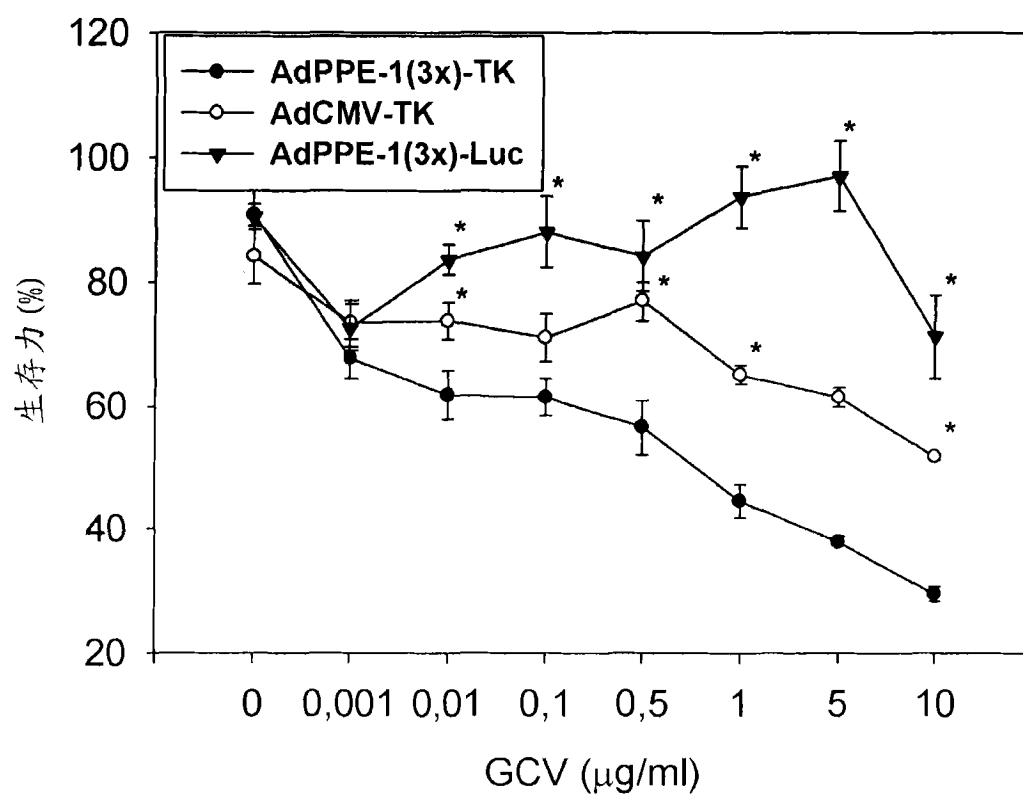


图 66

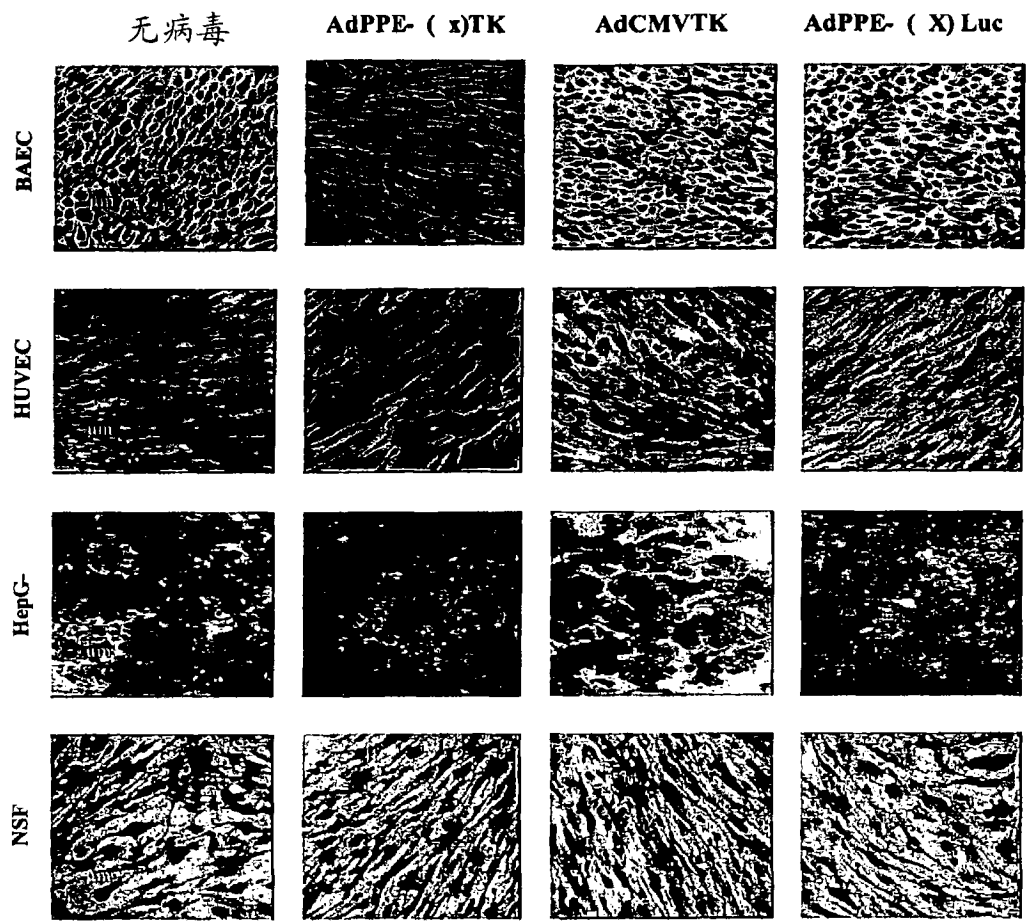


图 67

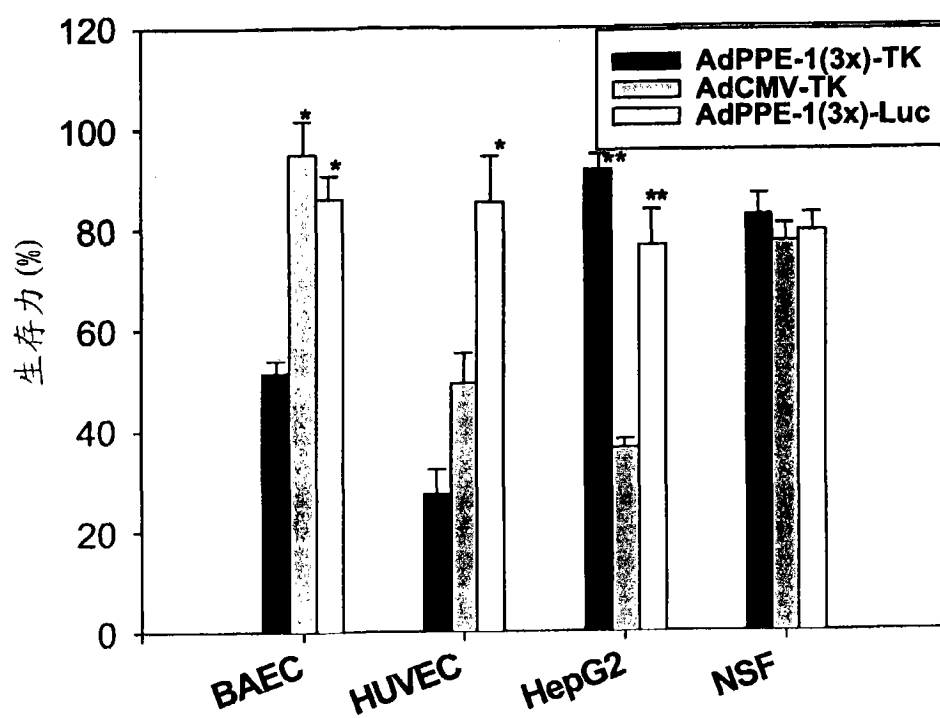


图 68

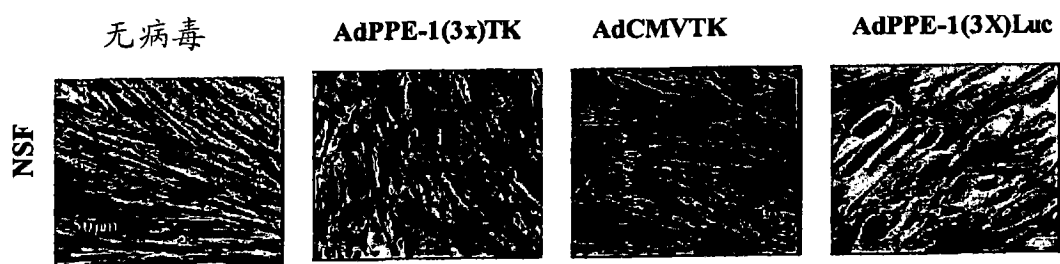


图 69

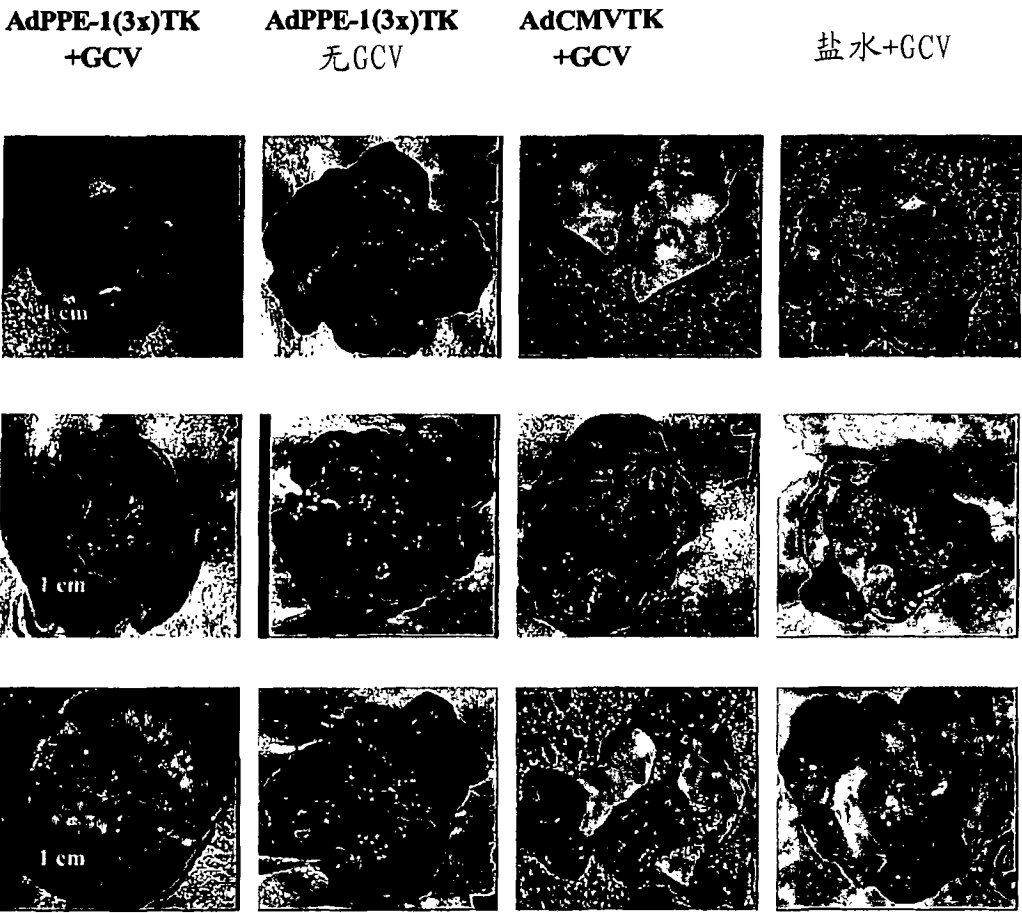


图 70

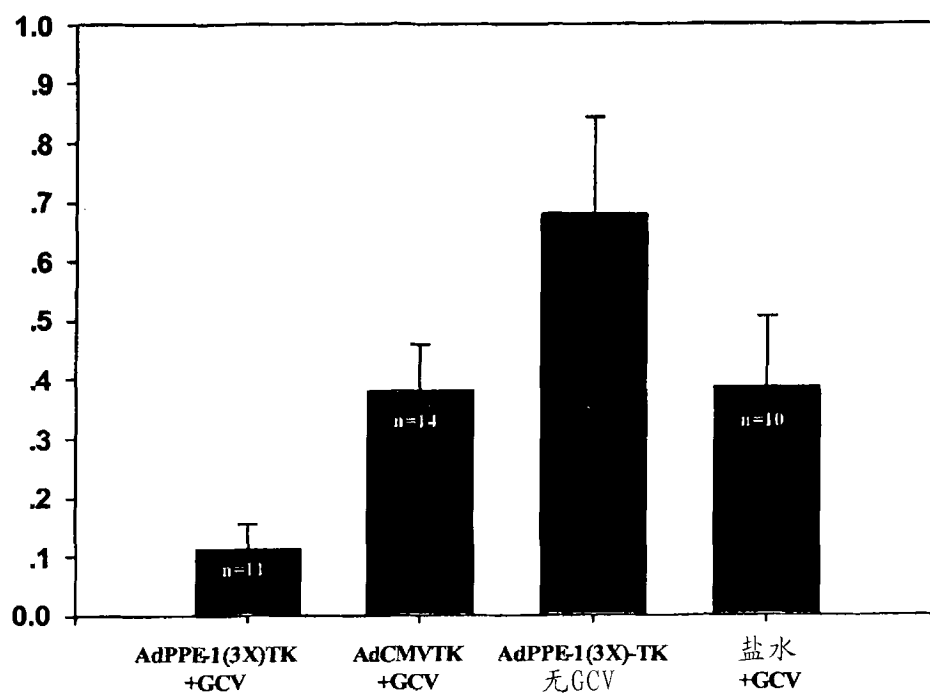


图 71

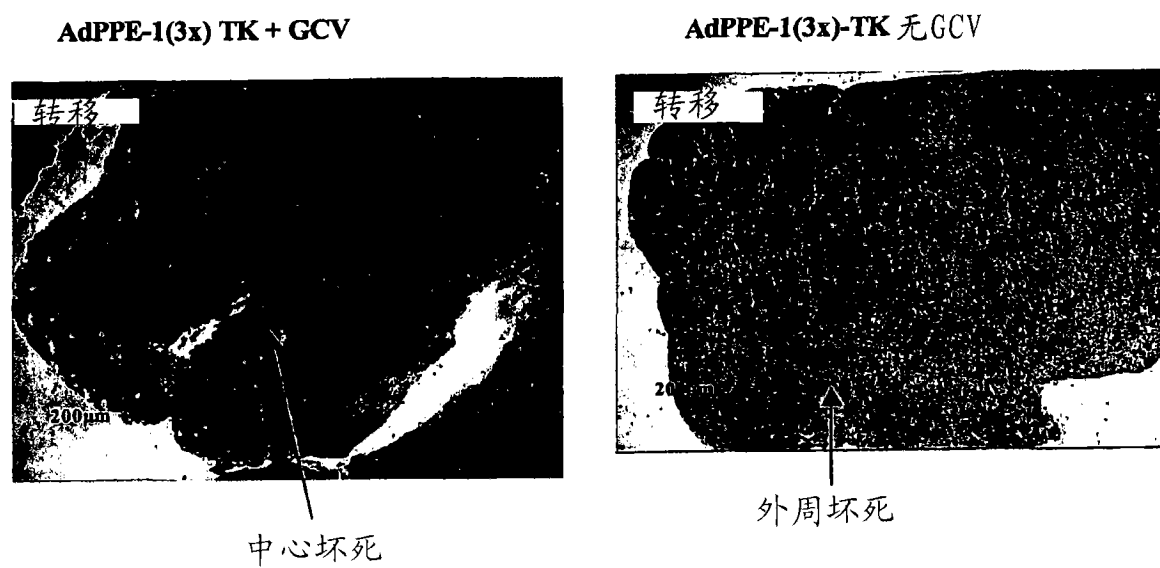
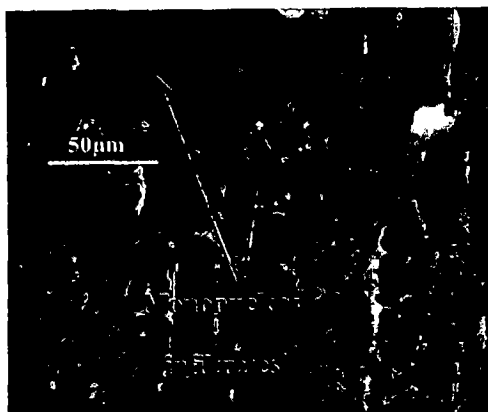


图 72a

AdPPE-1(3x)TK + GCV



AdPPE-1(3x)TK 无GCV

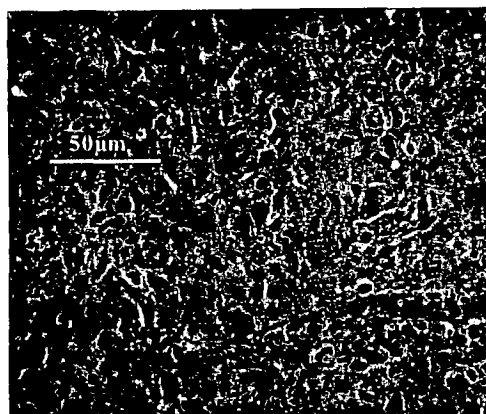


图 72b

AdPPE-1(3x)TK + GCV



单核浸润物

AdPPE-1(3x)TK 无GCV

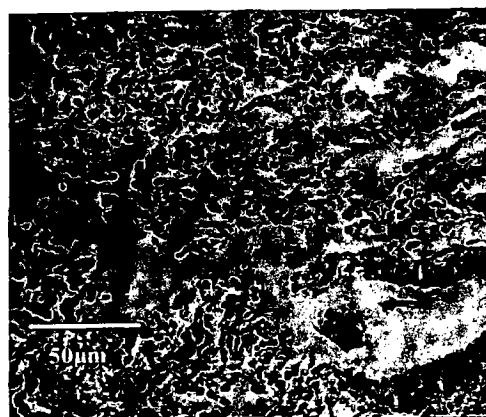
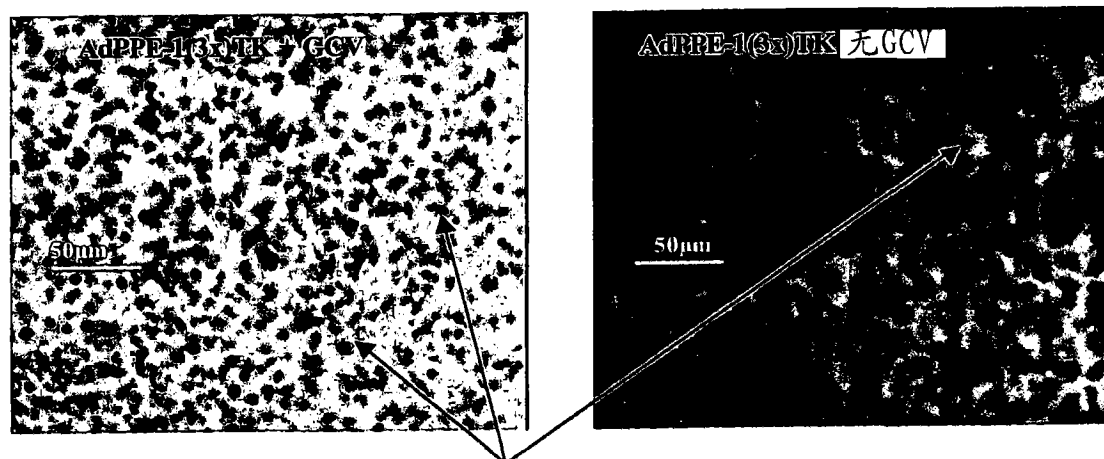
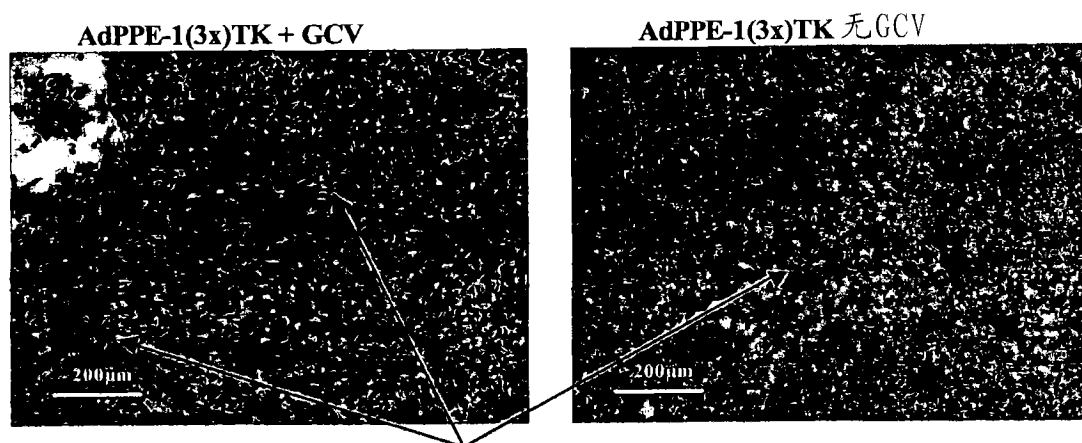


图 72c



凋亡肿瘤细胞

图 73a



凋亡肿瘤细胞

图 73b

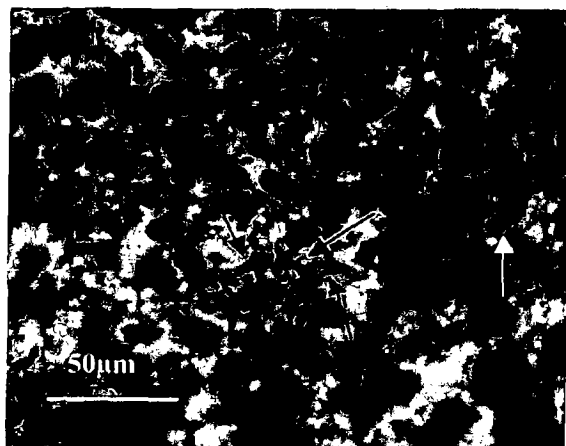
AdPPE-1(3x)TK + GCV

图 74a

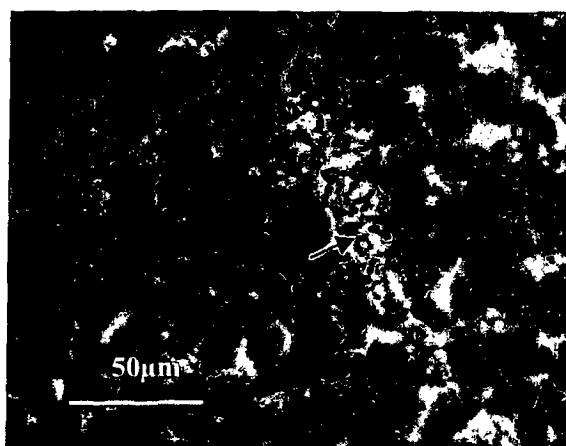
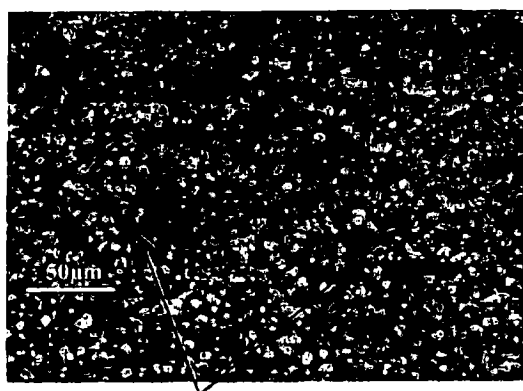
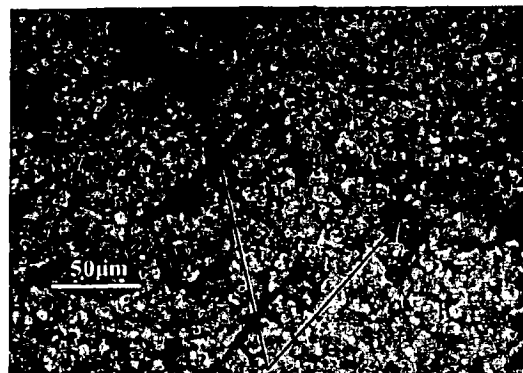
AdPPE-1(3x)TK 无 GCV

图 74b

AdPPE-1(3x)TK + GCV

短血管, 无分支或
连续性

AdPPE-1(3x)TK 无 GCV

大量血管, 具有清晰
边界和分支

图 75a

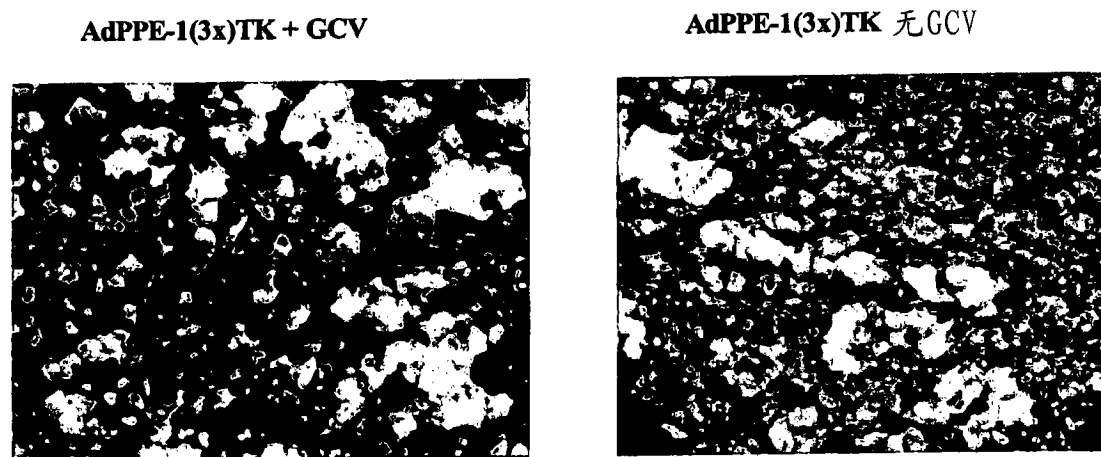
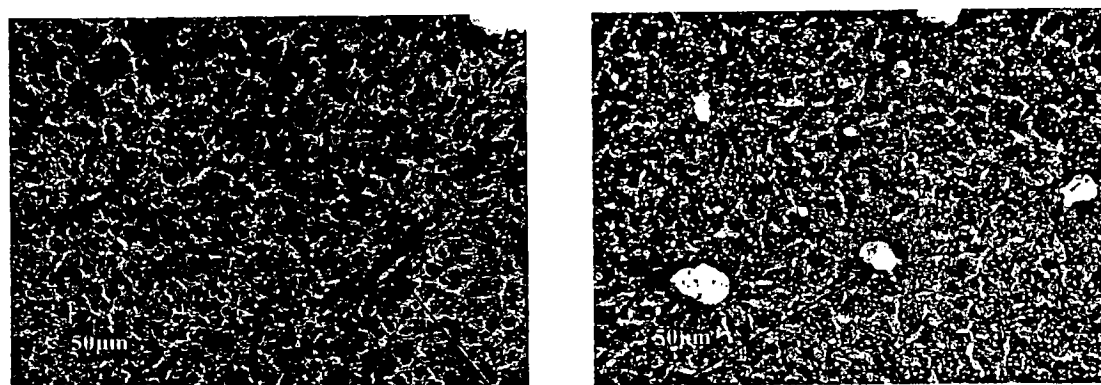


图 75b



血管

图 75c

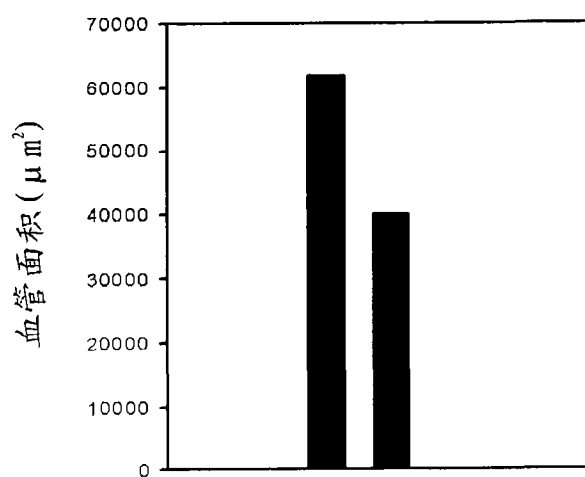


图 75d

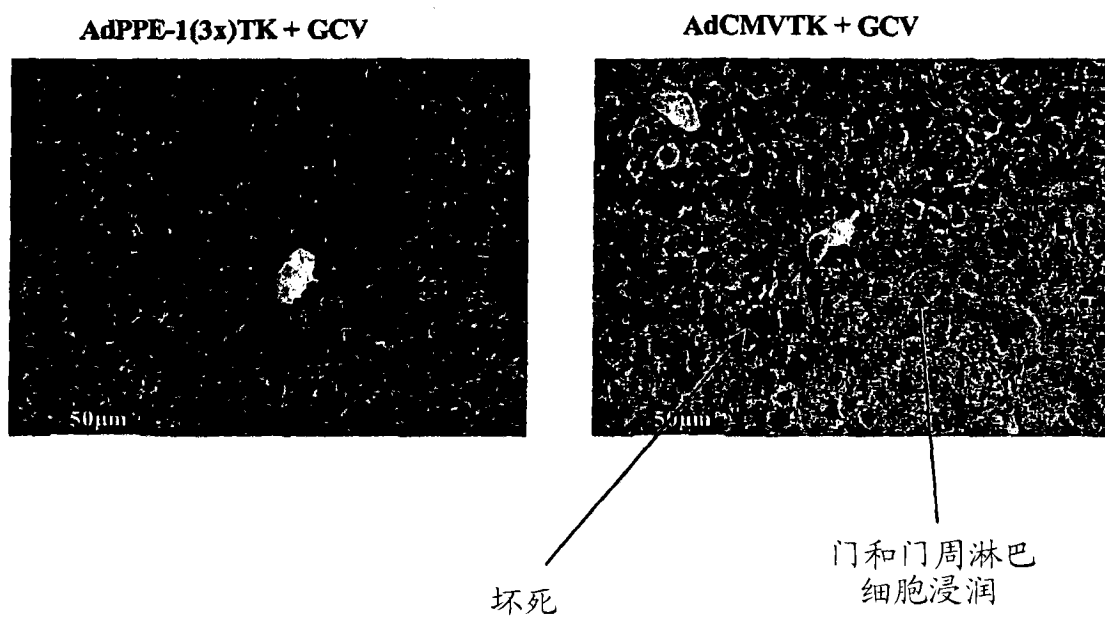


图 76

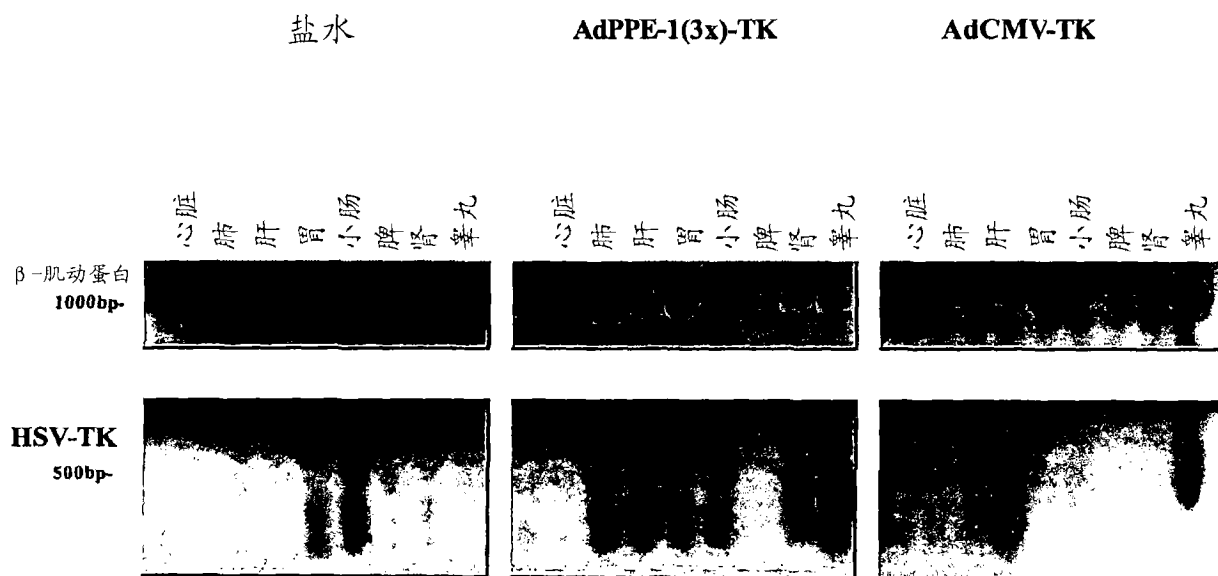


图 77

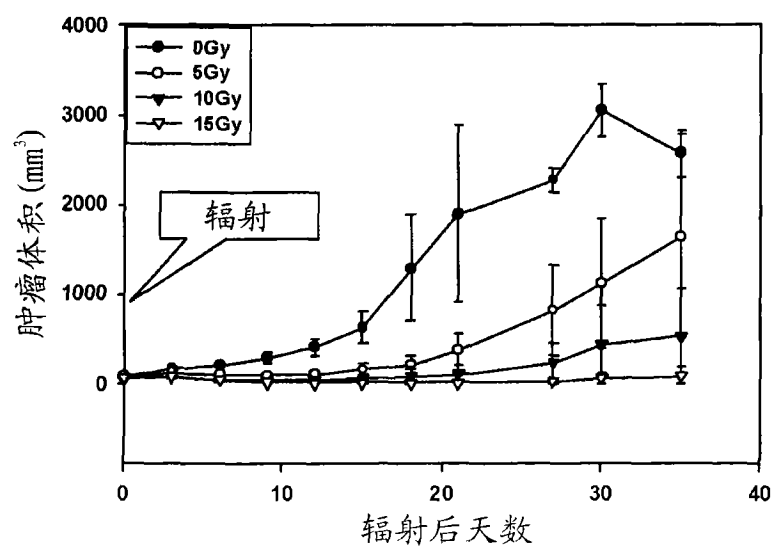


图 78a

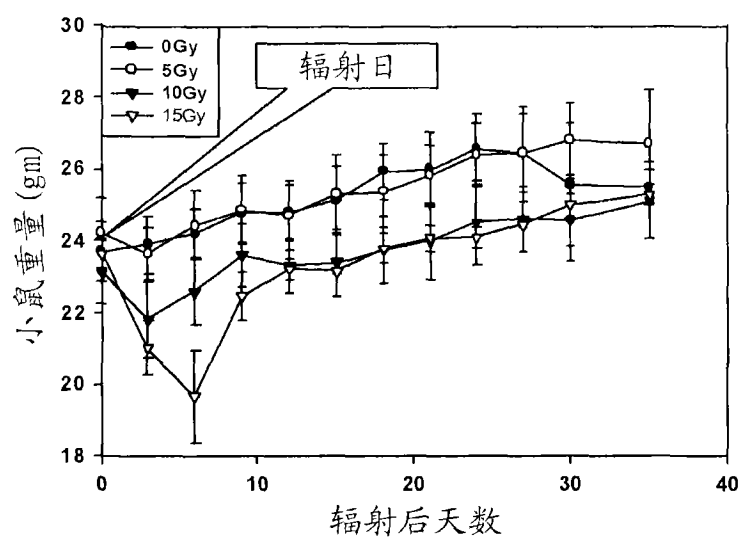


图 78b

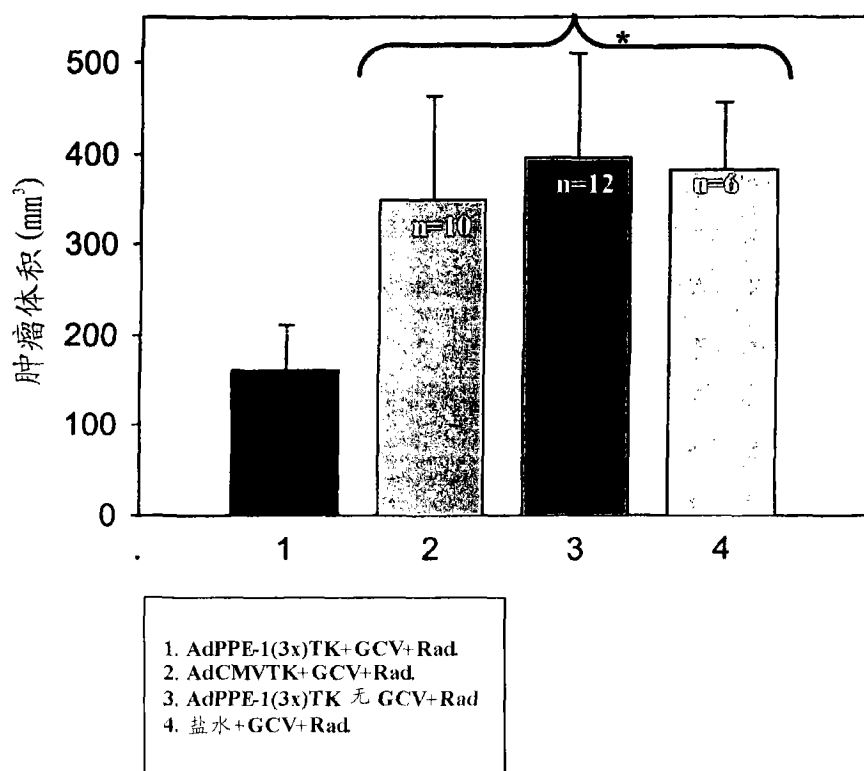


图 79a

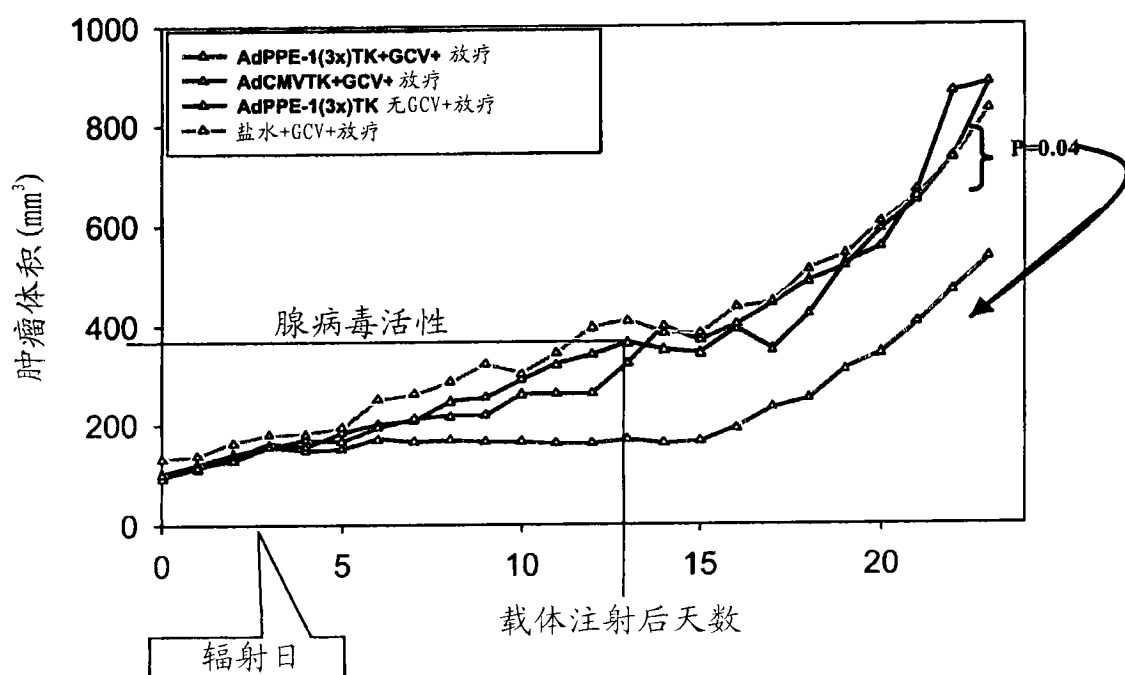


图 79b

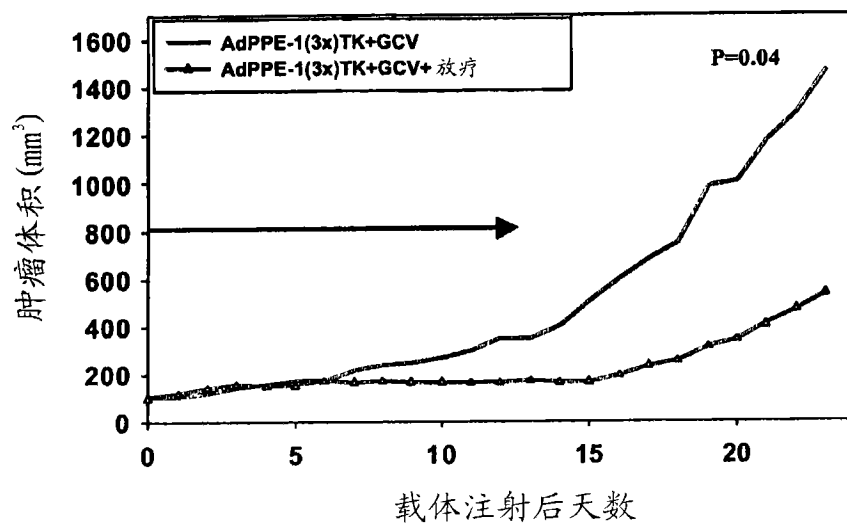


图 79c

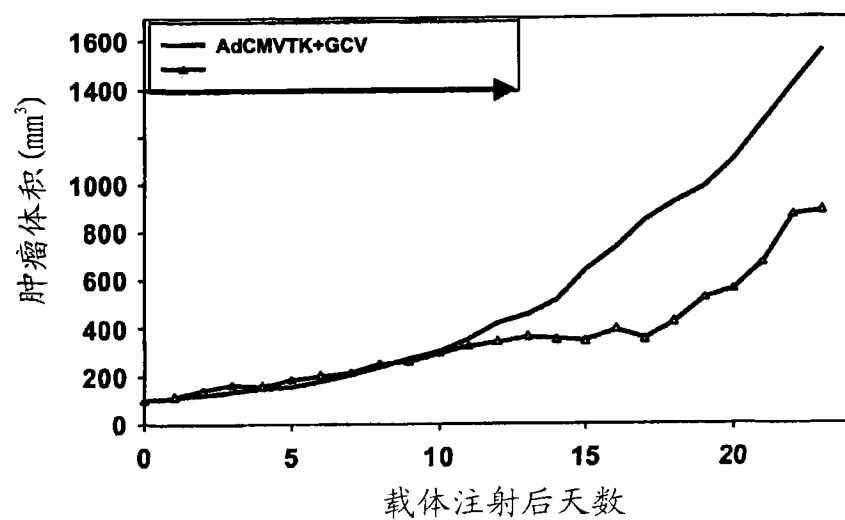


图 79d

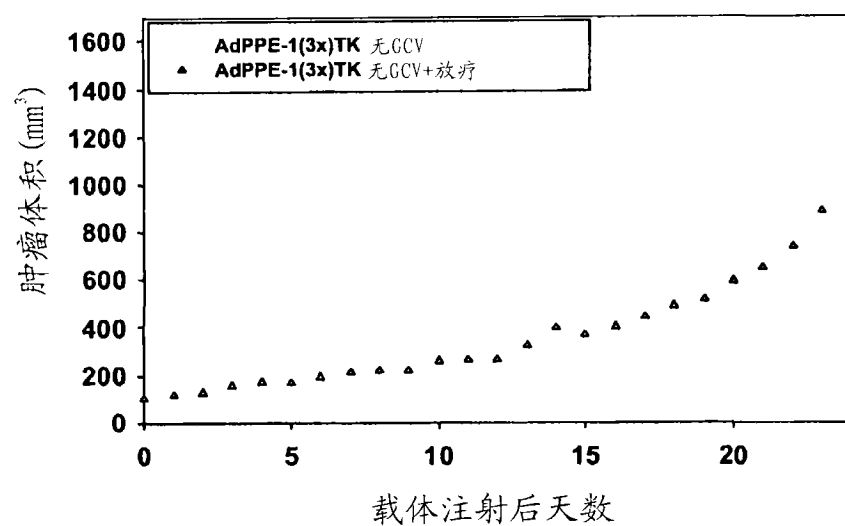


图 79e

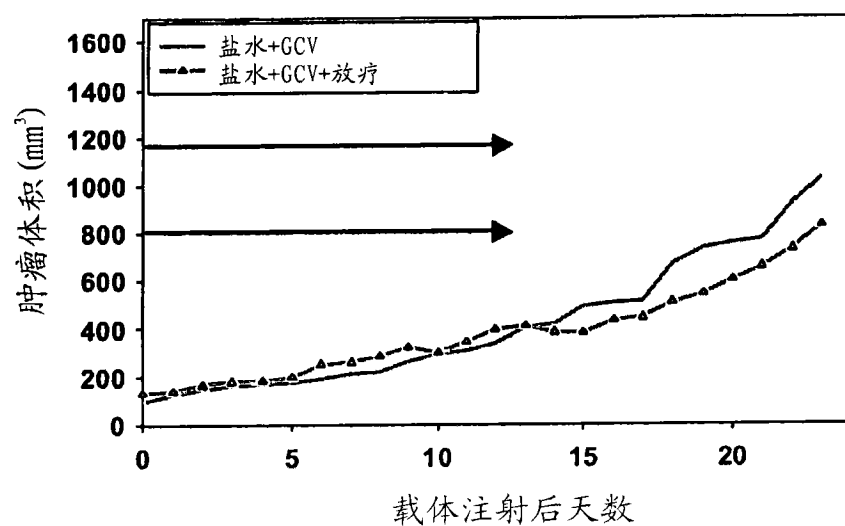


图 79f

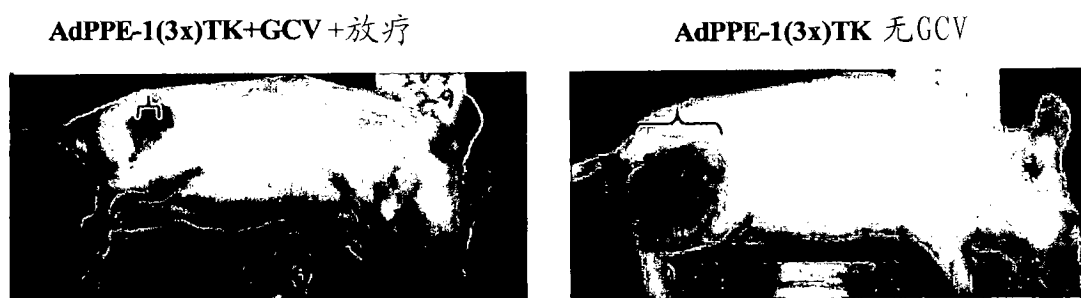


图 79g

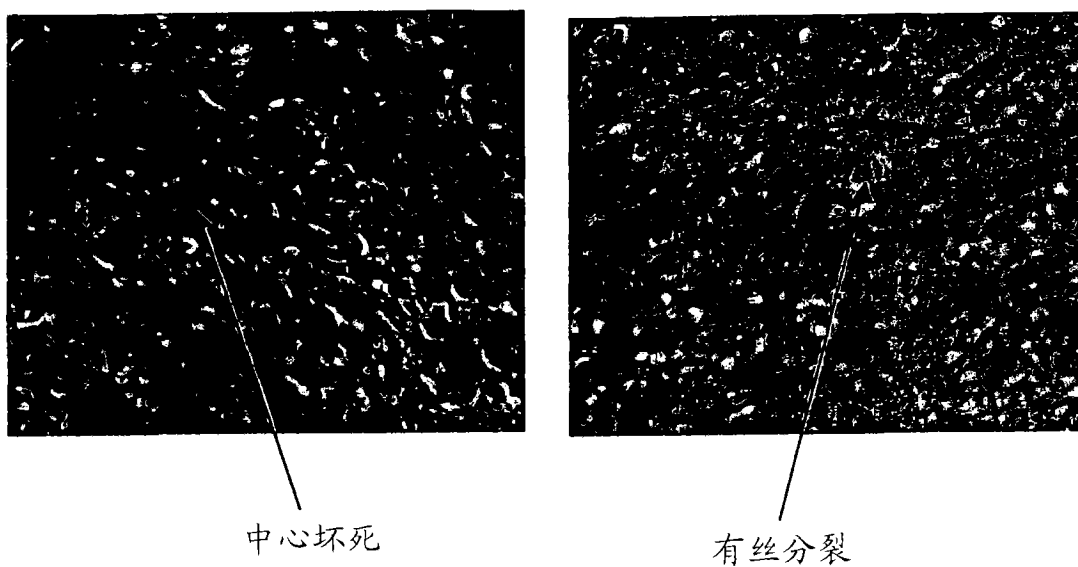


图 80a

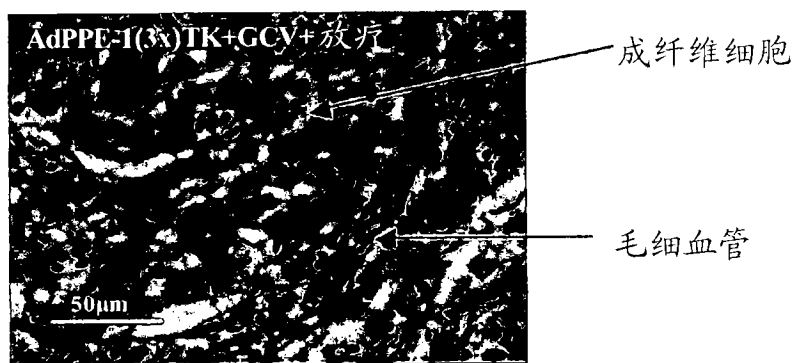


图 80b

AdPPE-1(3x)TK+GCV+放疗

AdPPE-1(3x)TK 无 GCV

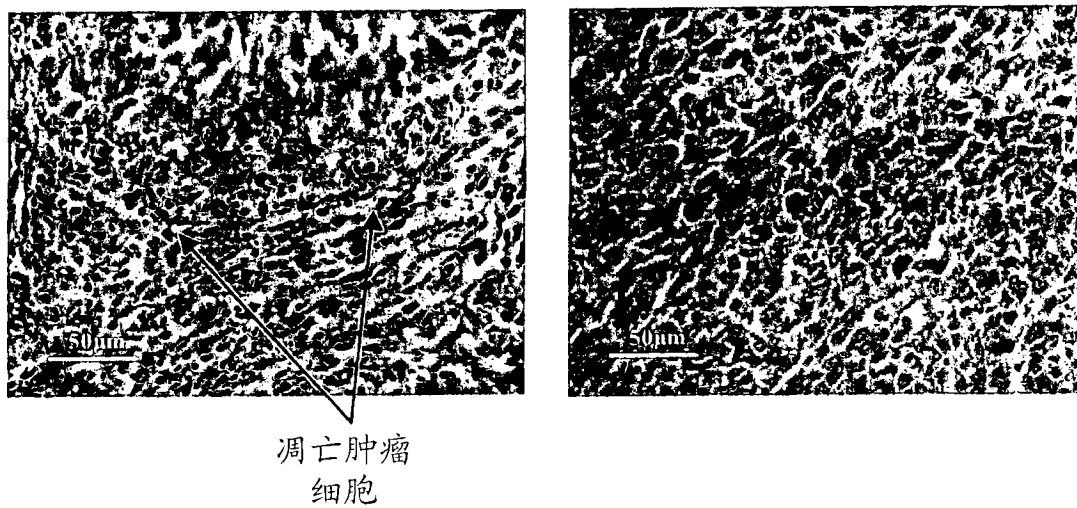


图 81a

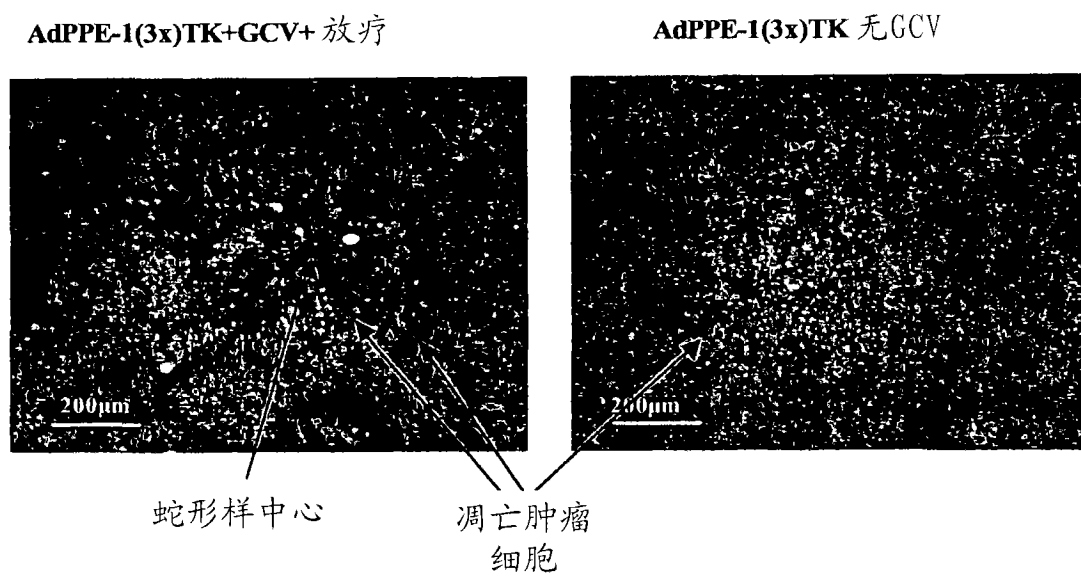


图 81b

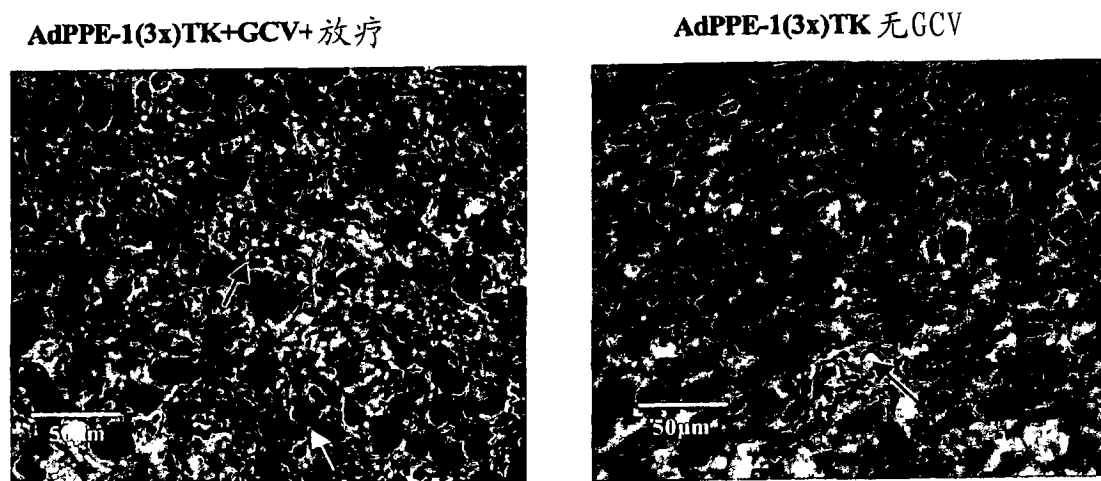


图 82

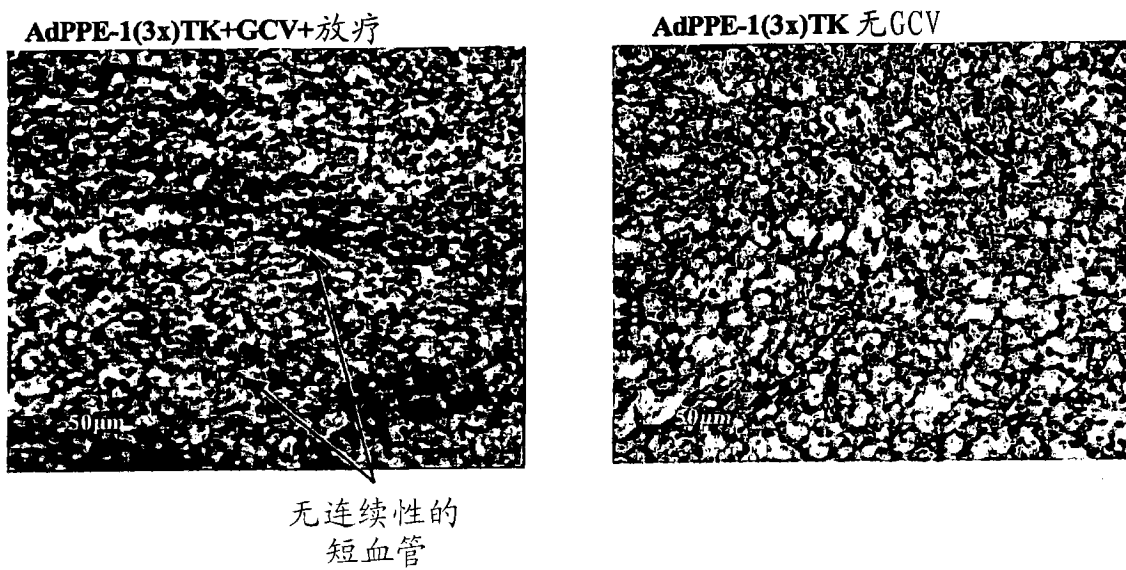


图 83a

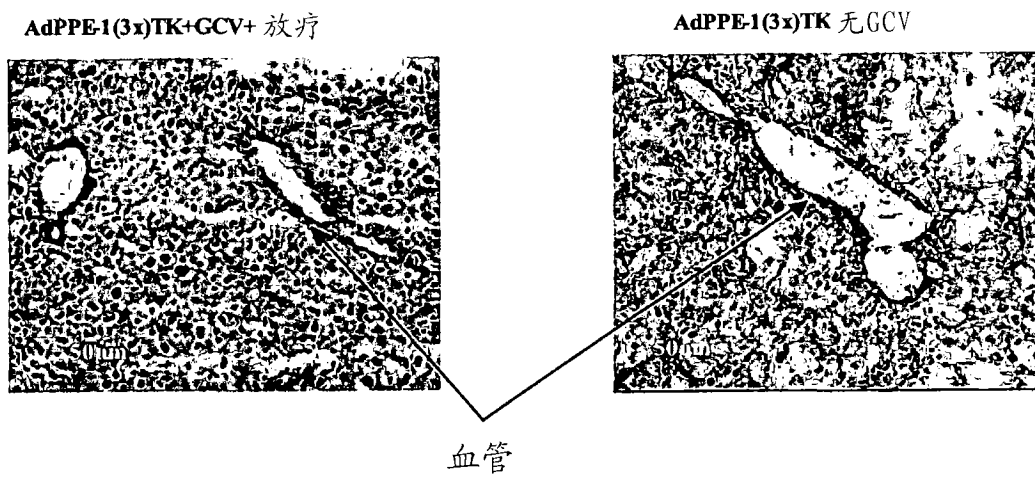


图 83b

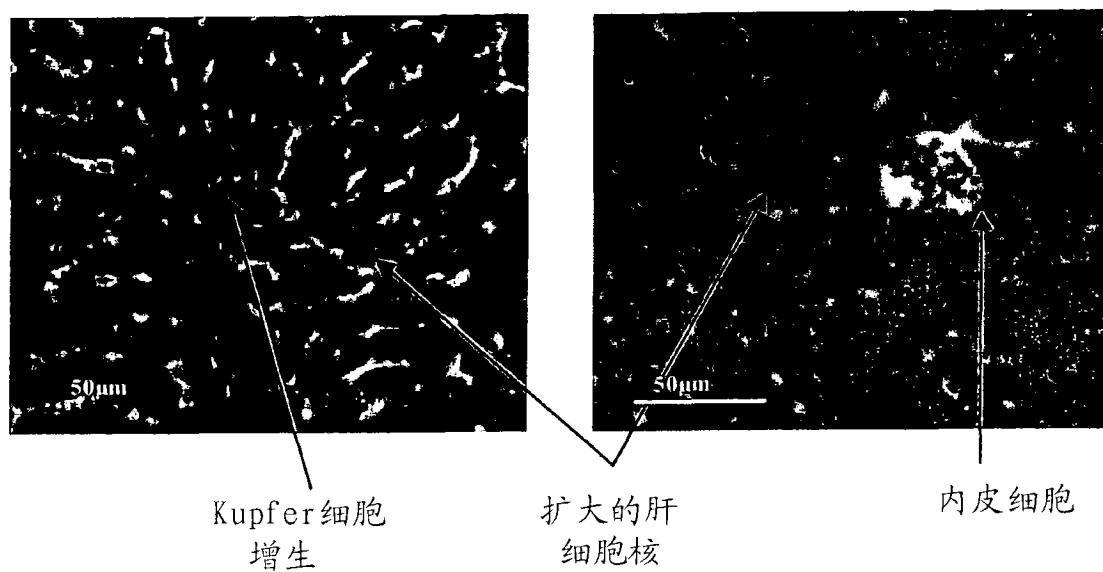


图 84

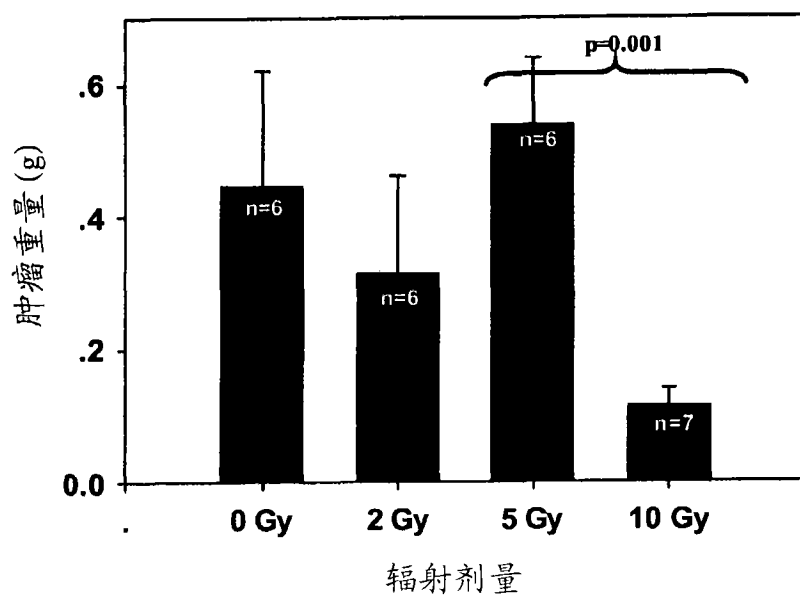


图 85a

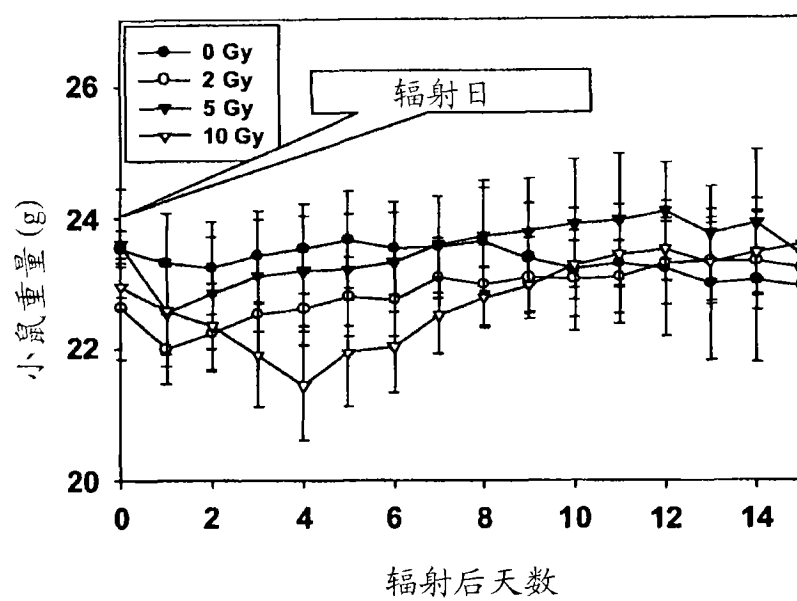


图 85b

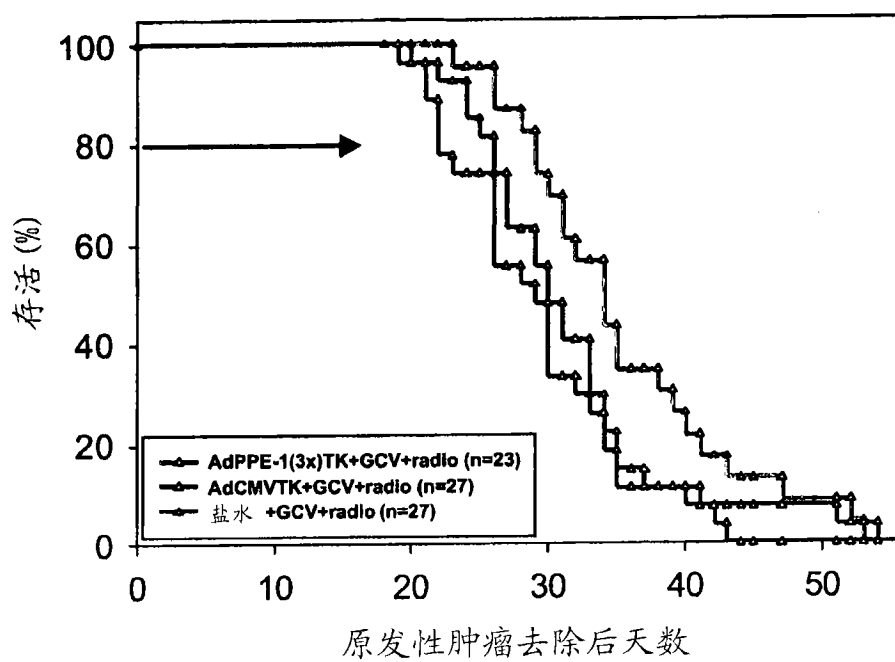


图 86a

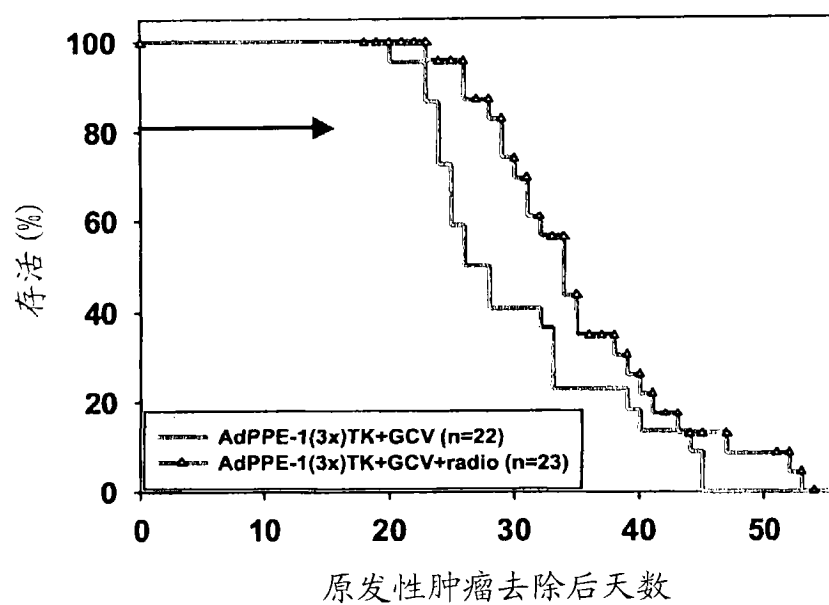


图 86b

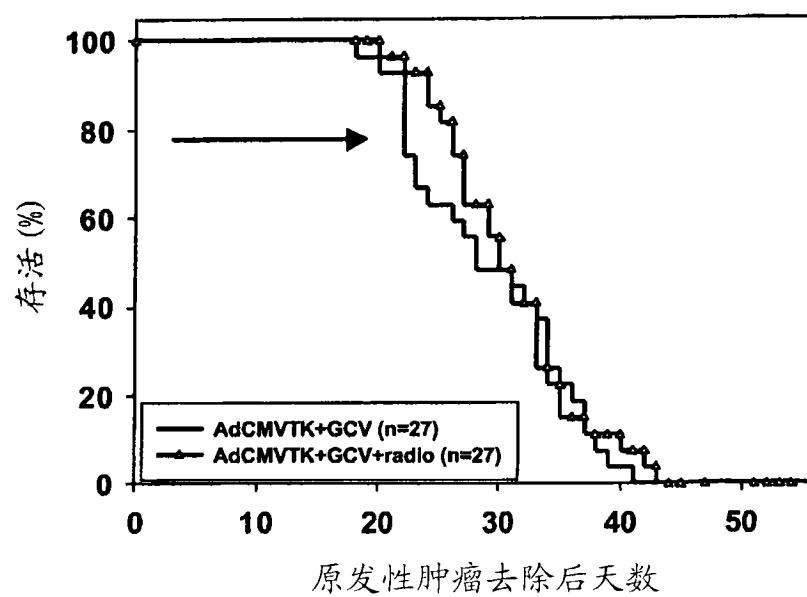


图 86c

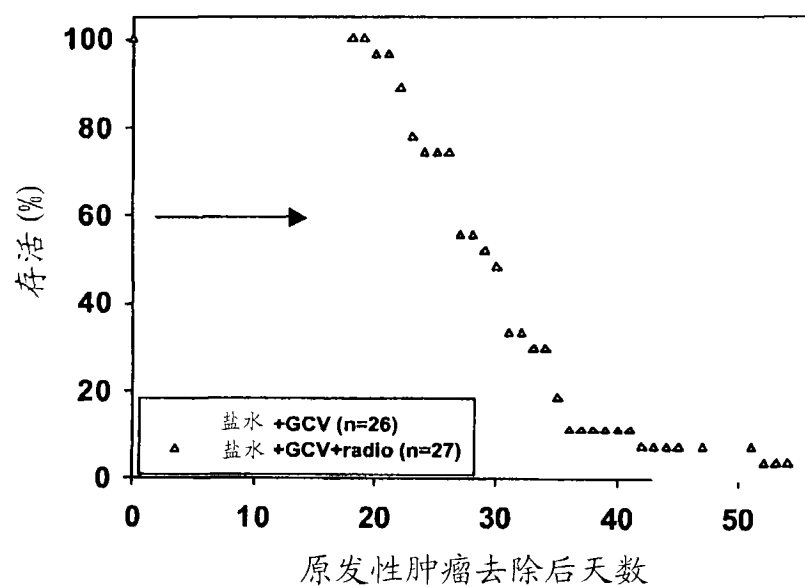


图 86d

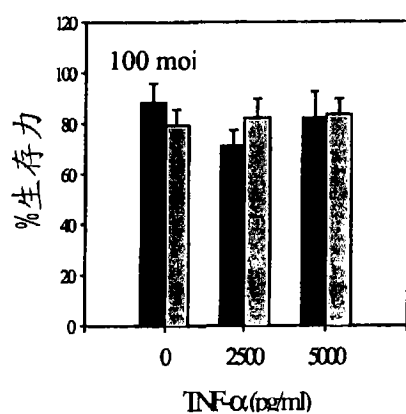


图 87a

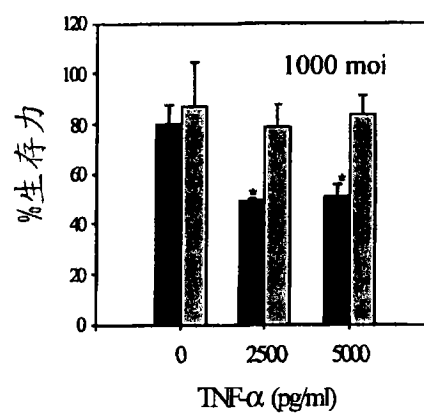


图 87b

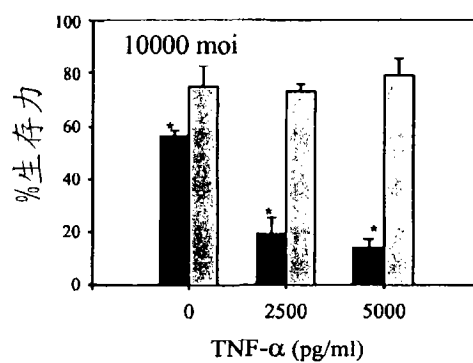


图 87c

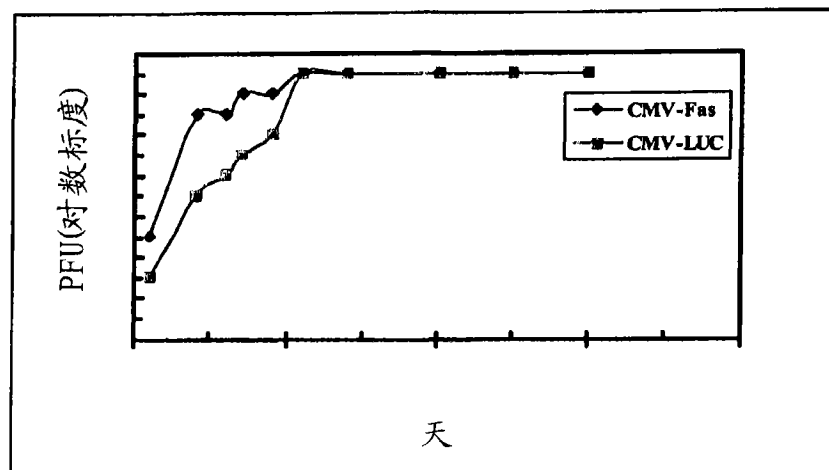


图 88

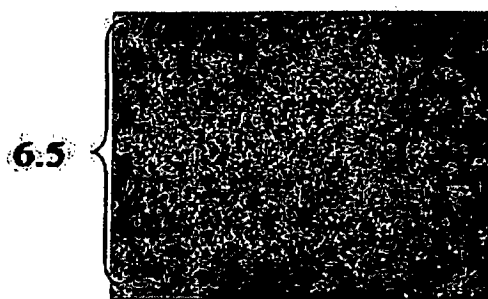


图 89a

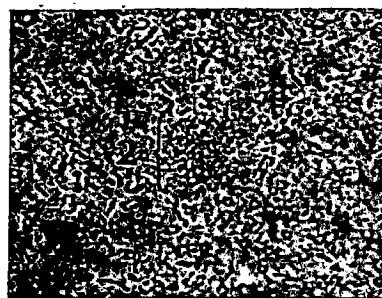


图 89b

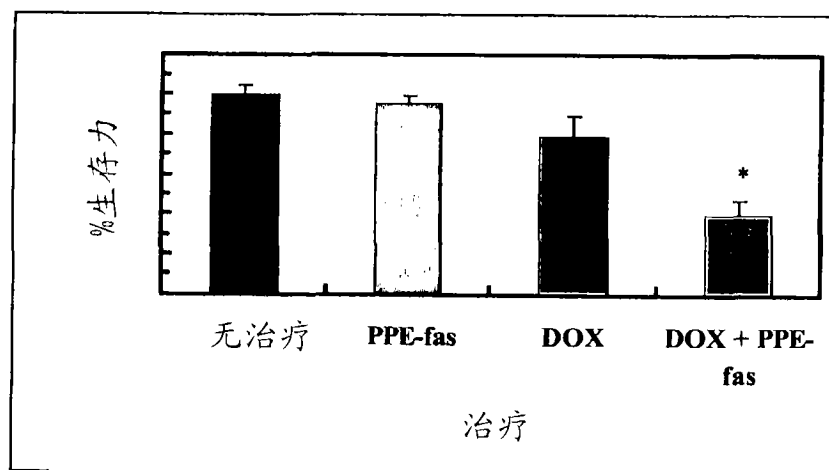


图 90

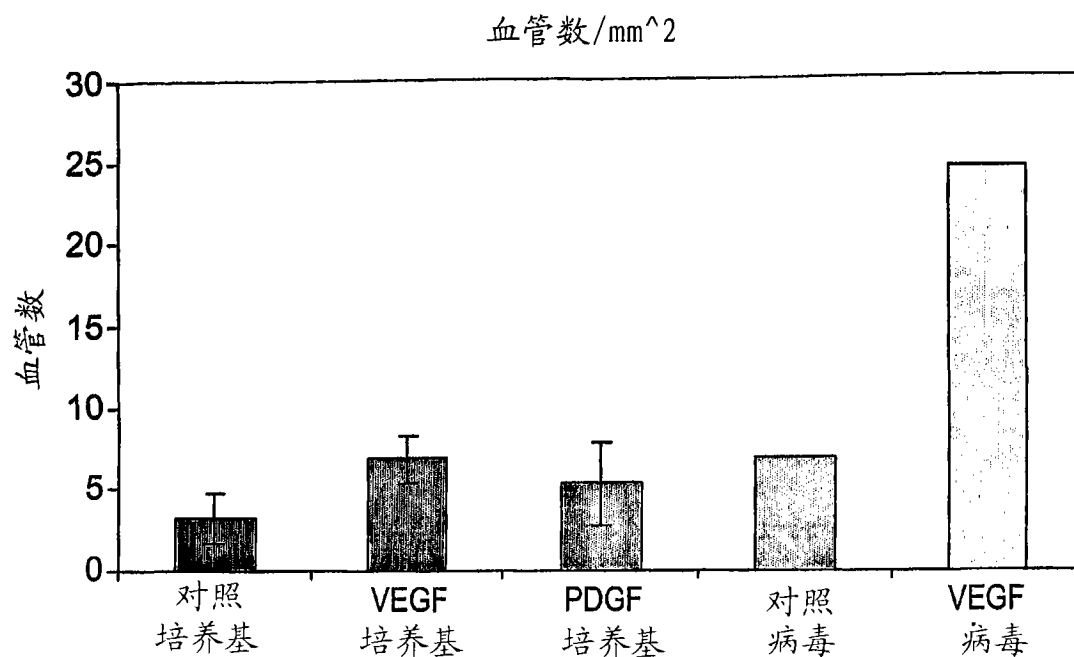


图 91a

Ad5PPEC-1-3x VEGF 对工程改造植入物的血管形成的作用

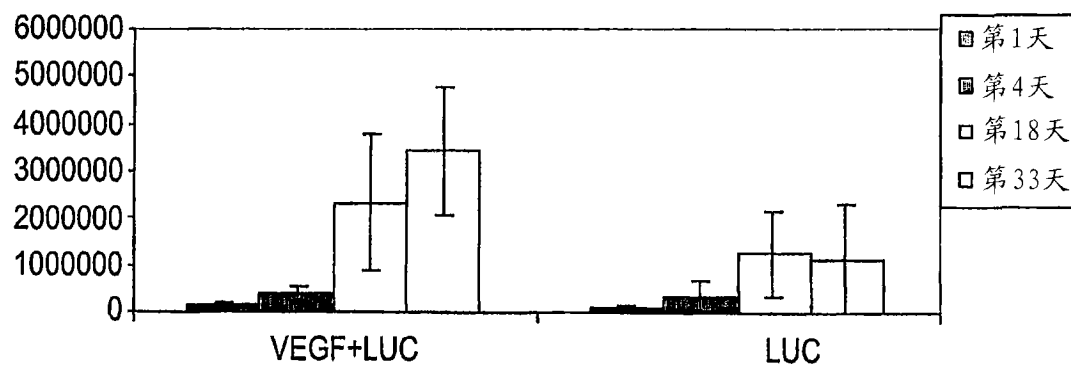


图 91b

gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt ctctgatcg gcgatactag ggagataagg
 atgtacctga caaaaccaca ttgtgtgtgt taltattatt atttagtttt ccttccttgc taactcctga cggaaicttt
 ctccaccicaa atgcgaagta cttagttta gaaaagactt ggtggaaggg gtggtggtgg aaaagtaggg tgatctcca
 aactaatctg gtccccgcc cgccccagta gctgggattc aagagcgaag agtggggatc gtccccctgt ttgacagaa
 agacataaaa ggaaaatcaa gtgaacaatg atcagcccca cctccacccc acccccctgc gcgcgcacaa
 tacaatctat ttaatt *gtacttcatacttttcattccaatggggtgactttgcttctggag* aaactcttg attctgaac
 tctggggctg *gcagctagca* aaaggggaag cgggctgctg ctctctgcag gttctgcagc ggictctgtc
 tagtgggtgt ttctttttc ttgcccctgc cctggattg tcagacggcg ggcgtctgcc tctgaagta gccgtgatt
 cctctagagc cgggtcttat *ctctggctgc acgtgcctg tgggtgacta atcacacaa* aacattgttt agggctggaa
 taaagtcaga gctgtttacc cccactctat aggggttcaa *tataaaaagg* cggcggagaa ctgtccgagt cagacgcgt
 cctgcaccgg cgctgagagc ctgaccgggt ctgctccgct gtcttgcgc gctgcctccc ggctgcccgc gacgcttgc
 cccagtgga agggccactt gctgaggacc gcgctgagat ctaaaaaaa aacaaaaaac aaaaaacaaa
 aaaaccaga ggcatcaga gcgaccagac accgtcctct tcttttga ttgagttcca ttgcaaccg agtttcttt
 ttctcttt tccccactct tctgacctt ttgagaatg gattatttc ccgtgactt ctctctctg ttctgtact
 tccaaggagc tccagaaaca ggtaggcgcc acttgcaat ctttctact cagcgcagca gtatcgctt ctgtttcca
 ctittcttc ttctttttc ttattcttt cctttttatt tttttttta attactgaag ctccagcagc aagtgccta caattaata
 acttctgtgt gaagcgaag aaataaaacc cctgttgaa tacagctgac tacaaccgag tatcgcatag ctic-1334

图 92

5'- *gtacttcatacttttcattccaatggggtgactttgcttctggag* ggtgactttgcttctggag cca
gtacttcatacttttcatt *gtacttcatacttttcattccaatggggtgactttgcttctggag* gctagctgccag
 -3'

图 93

波生坦对PPE-Luc转基因小鼠的作用

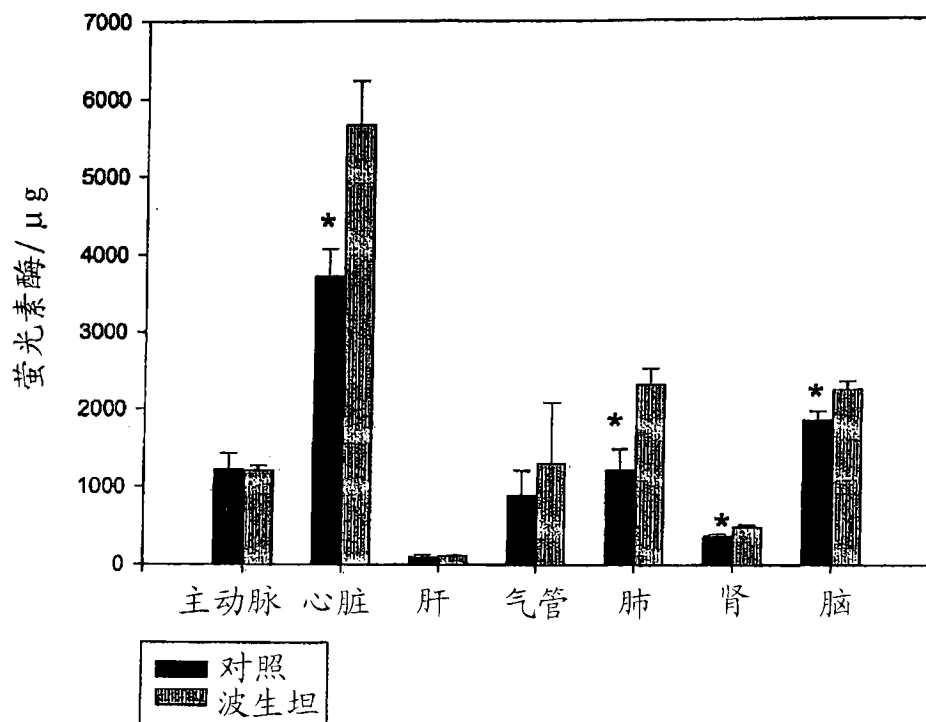


图 94

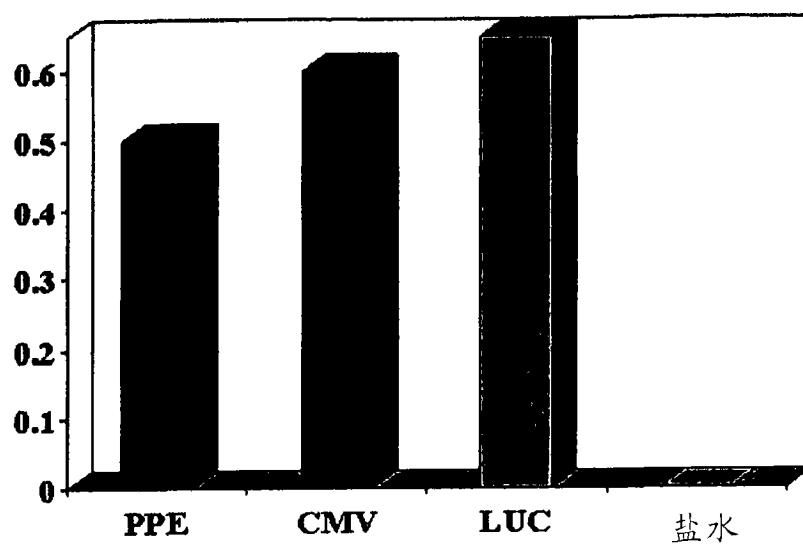


图 95a

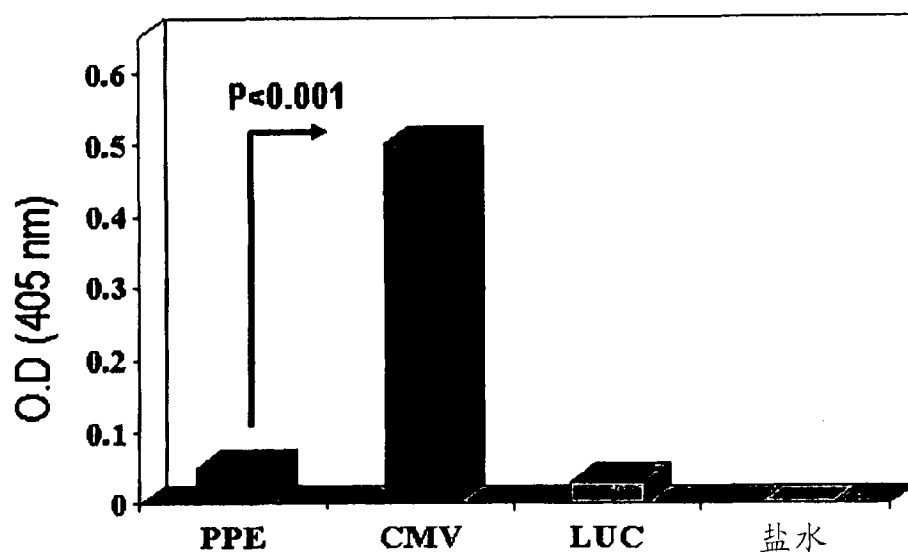


图 95b

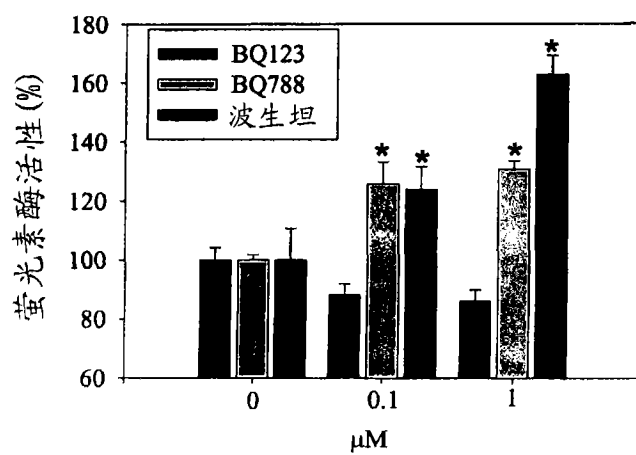


图 96

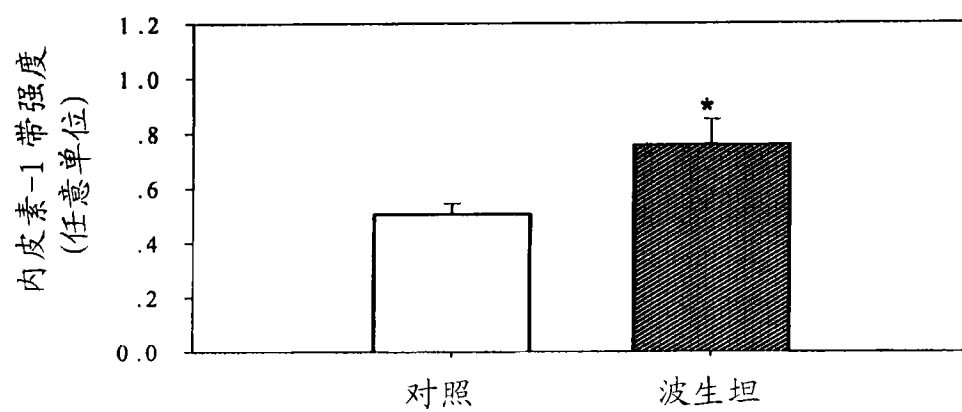


图 97A

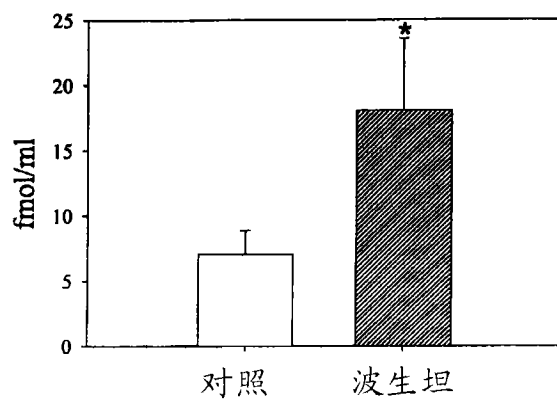


图 97B

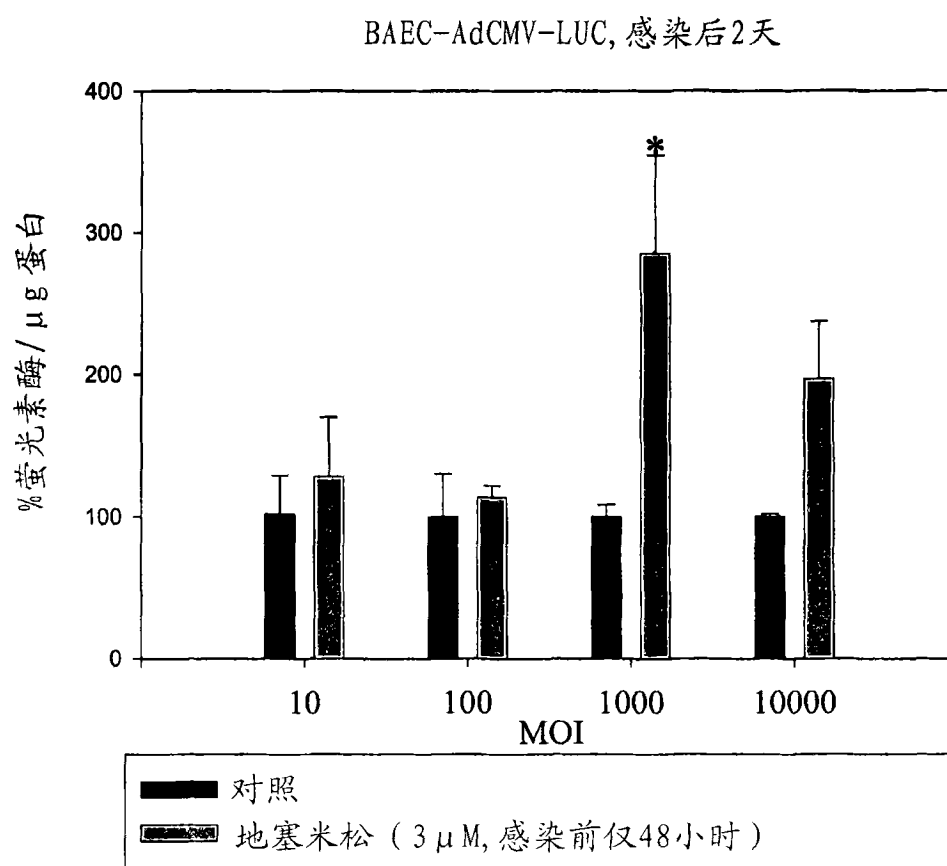


图 98

AdPPE-GFP (100 MOI)



无治疗

Dex 3 μ M

图 99

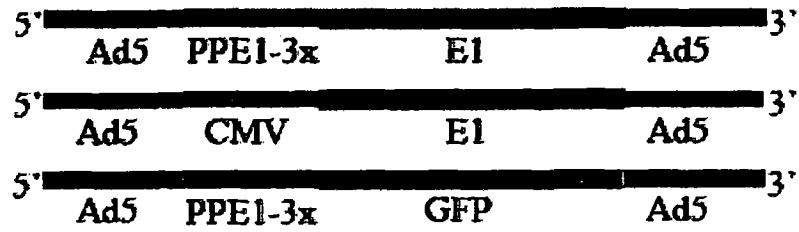


图 100

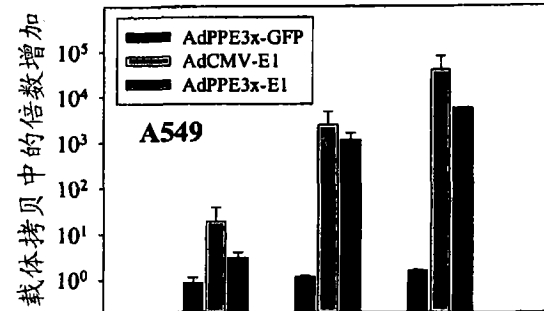


图 101a

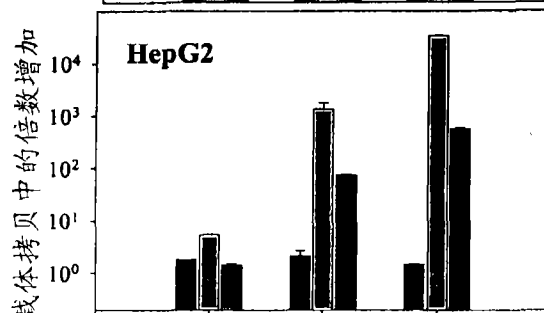


图 101b

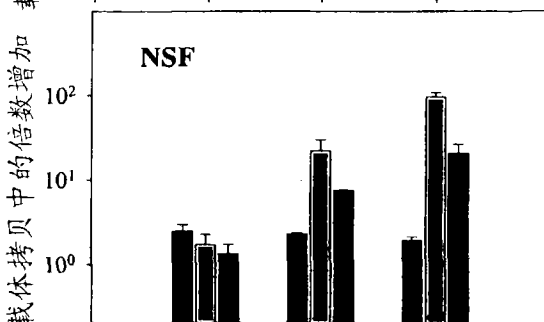


图 101c

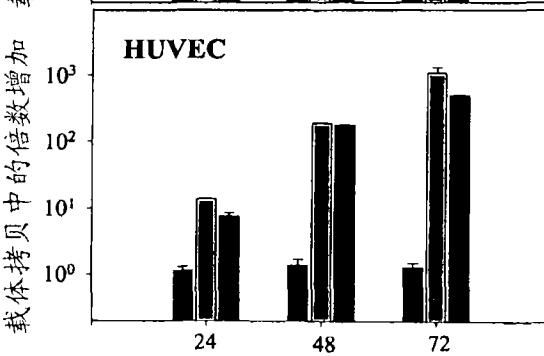


图 101d

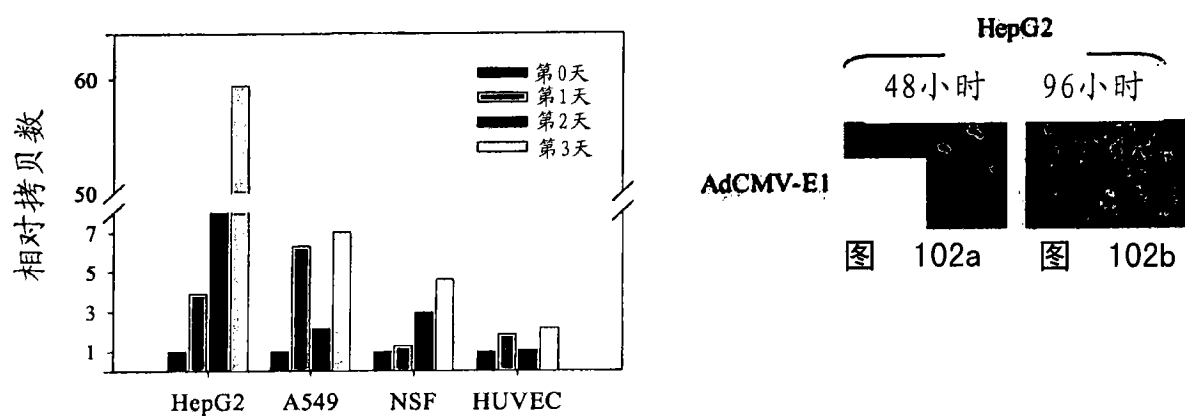


图 101e

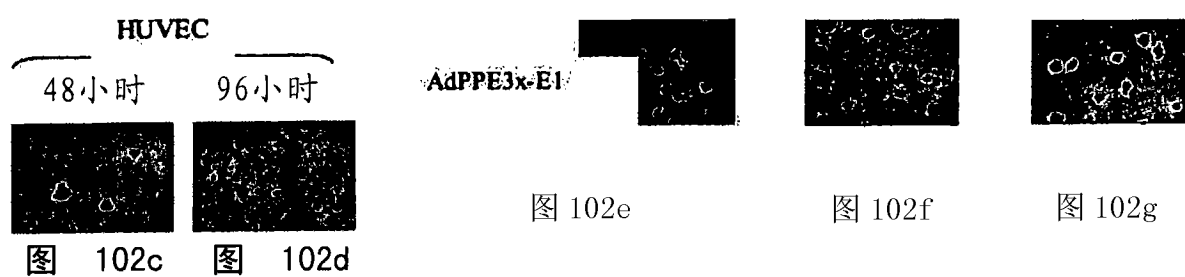


图 102h

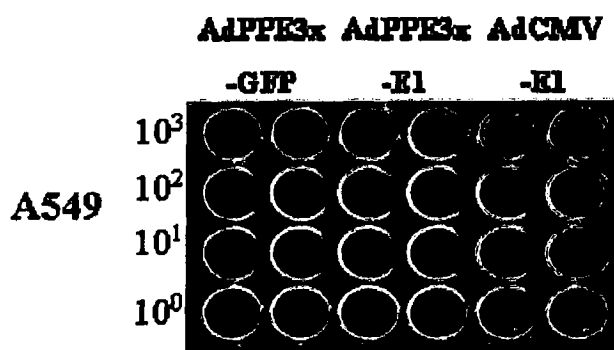


图 103a

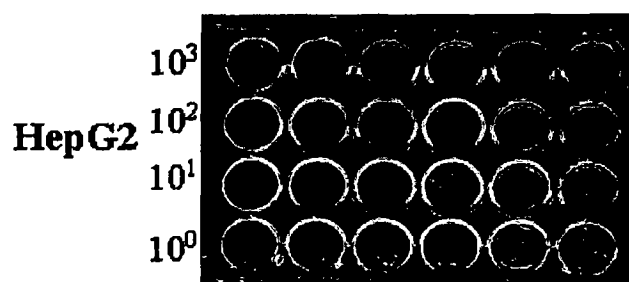


图 103b

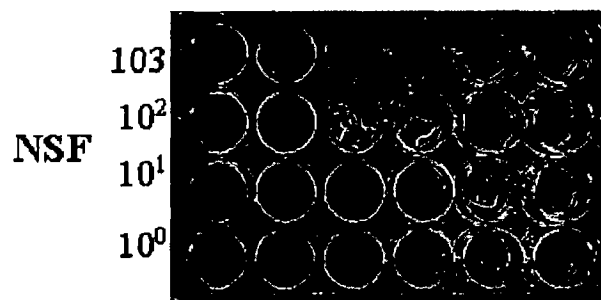


图 103c

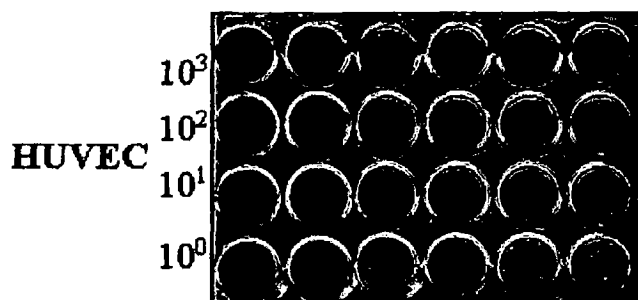


图 103d

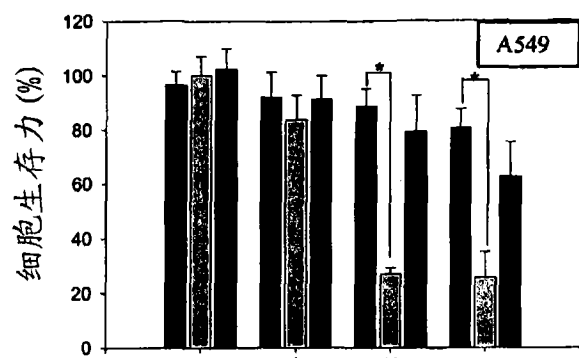


图 103e

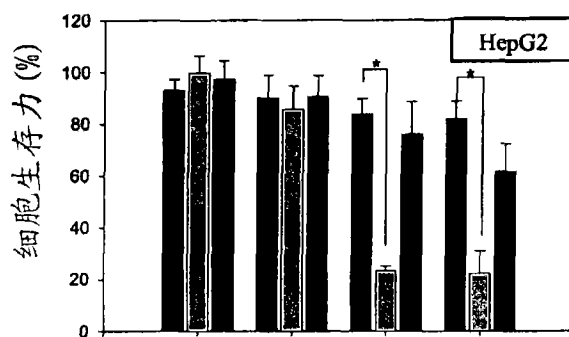


图 103f

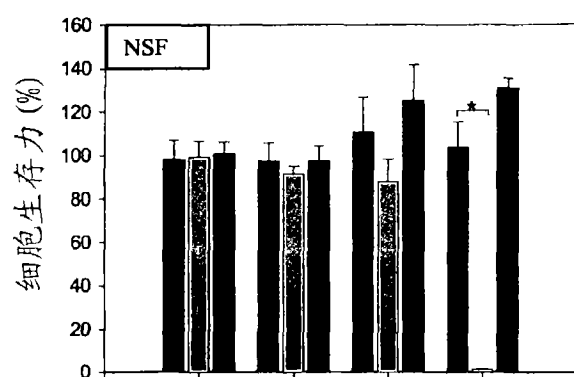


图 103g

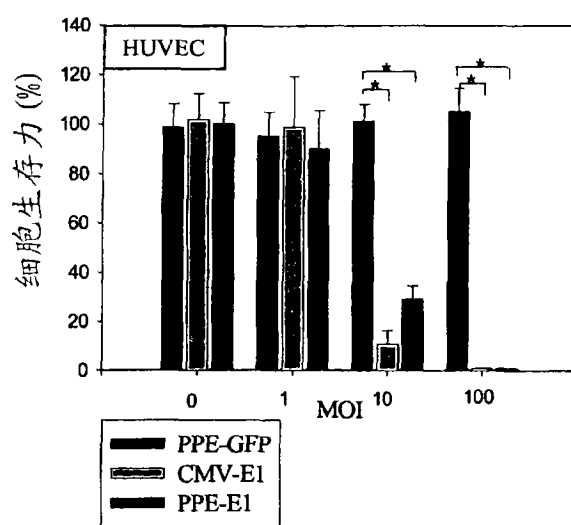


图 103h

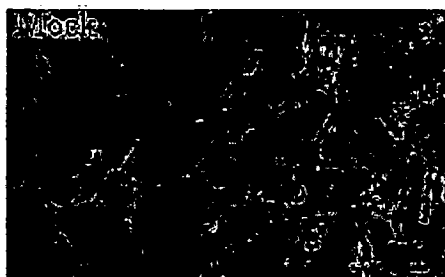


图 104a

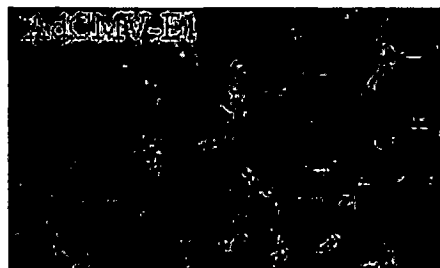


图 104b

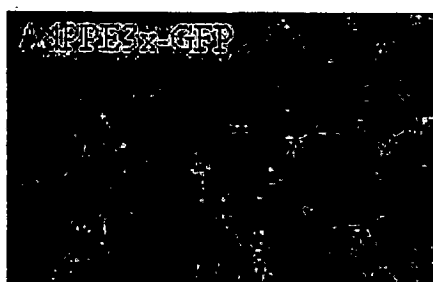


图 104c



图 104d

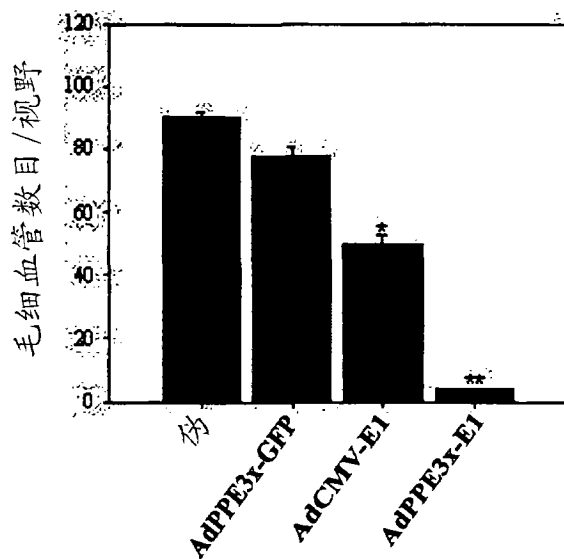


图 105

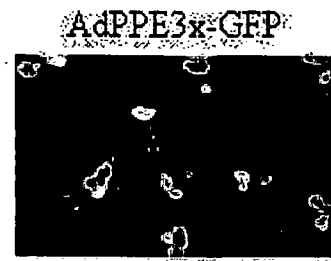


图 106a



图 106b

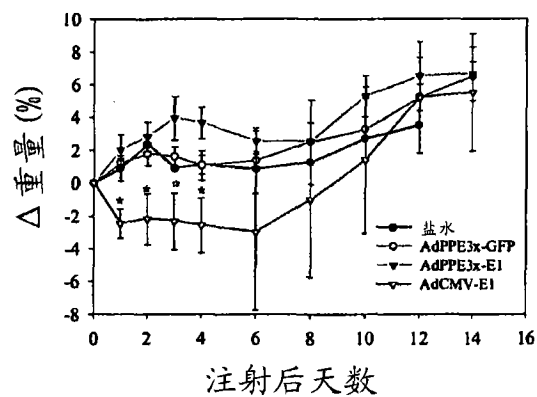


图 107

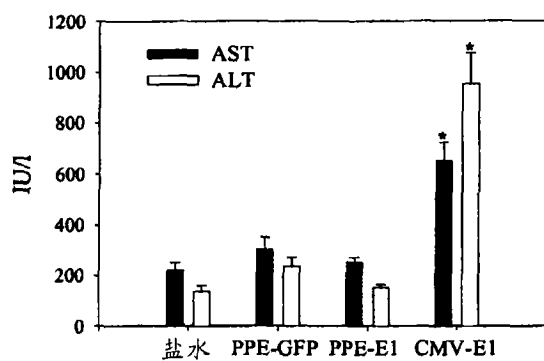


图 108

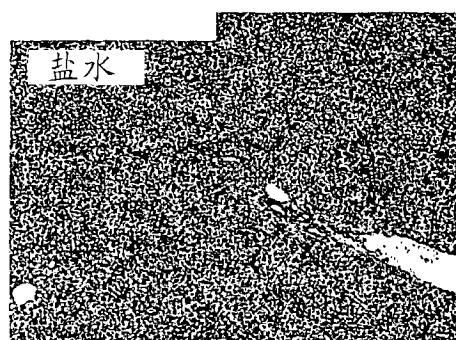


图 109a



图 109b

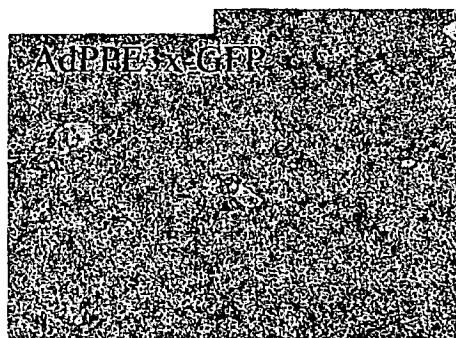


图 109c

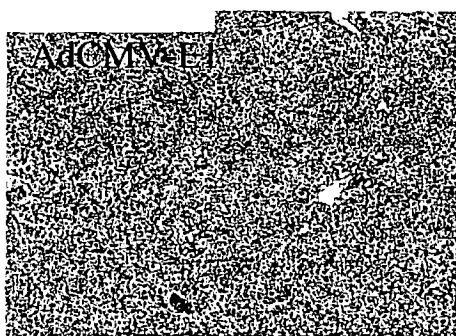


图 109d

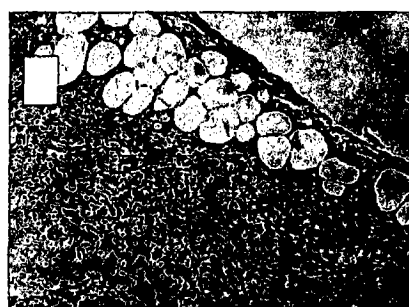


图 110a

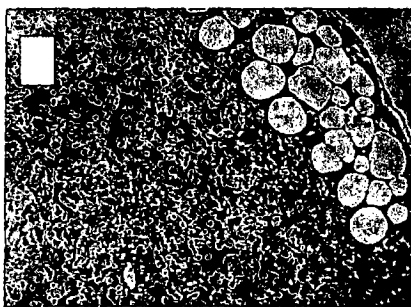


图 110b



图 110c

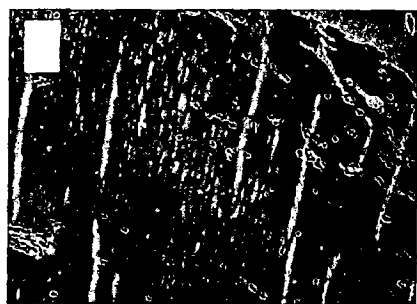


图 110d

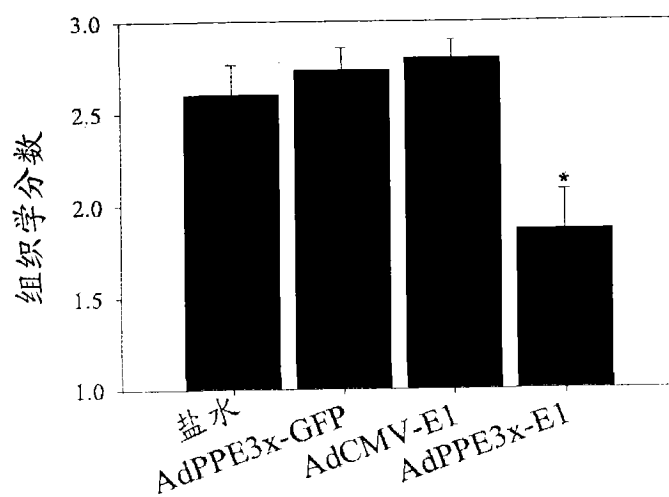


图 110e

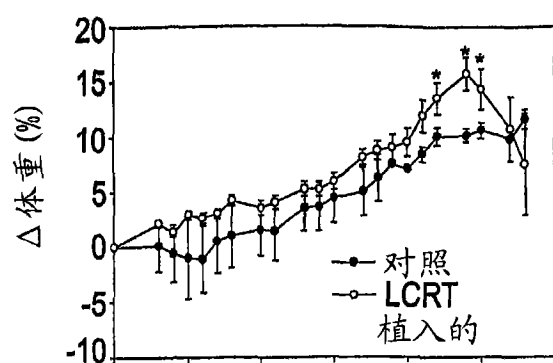


图 111a

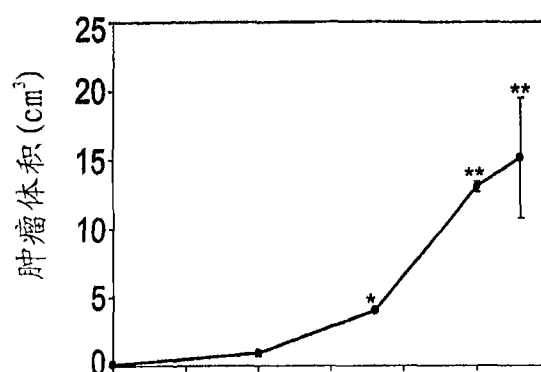


图 111b

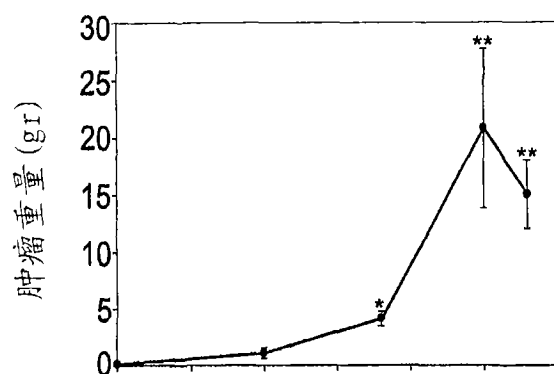


图 111c

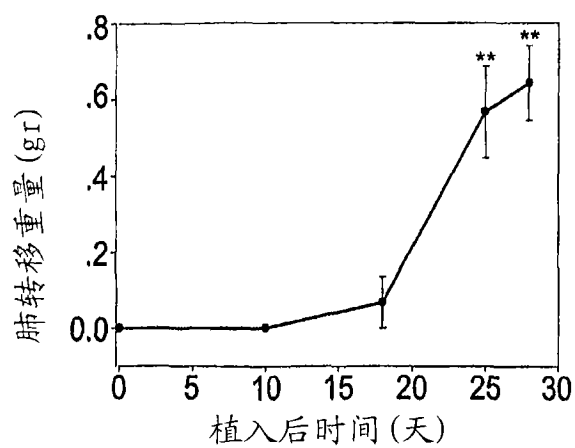


图 111d

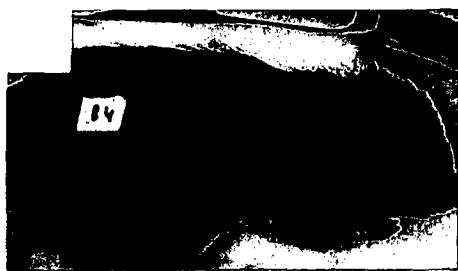


图 111e

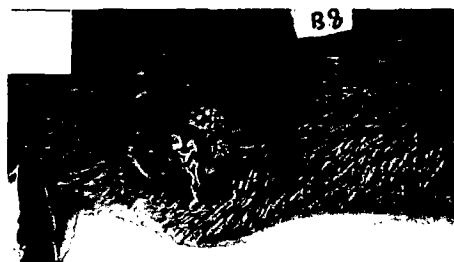


图 111f

图 111g



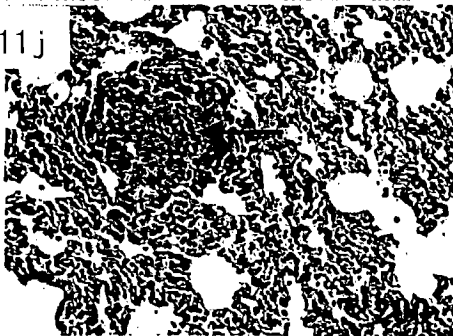
图 111h



图 111i



图 111j



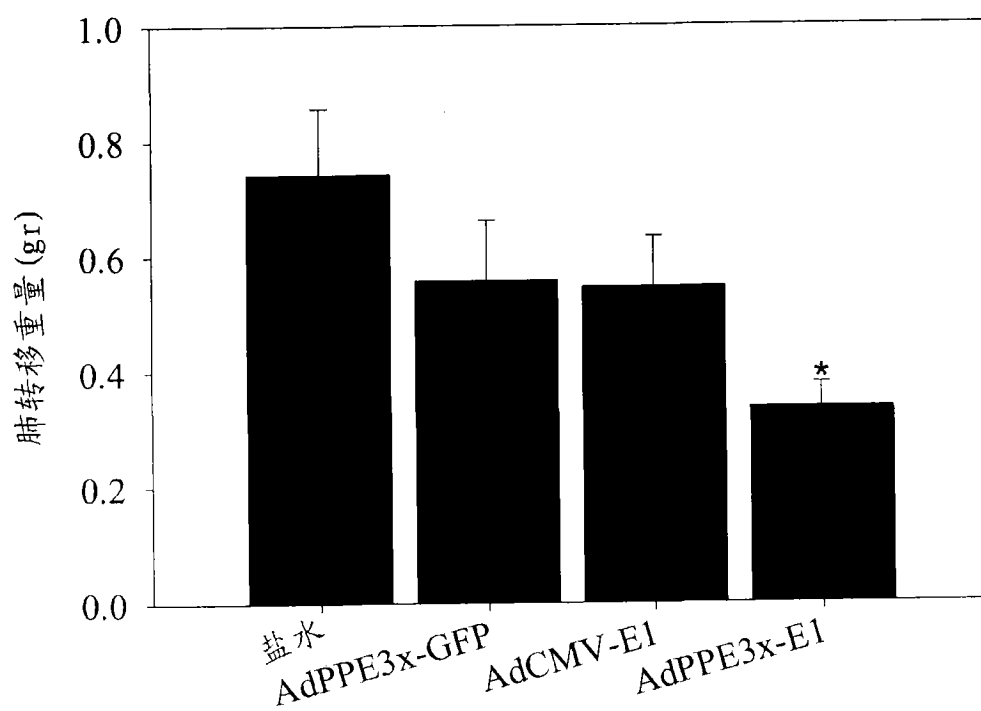


图 112

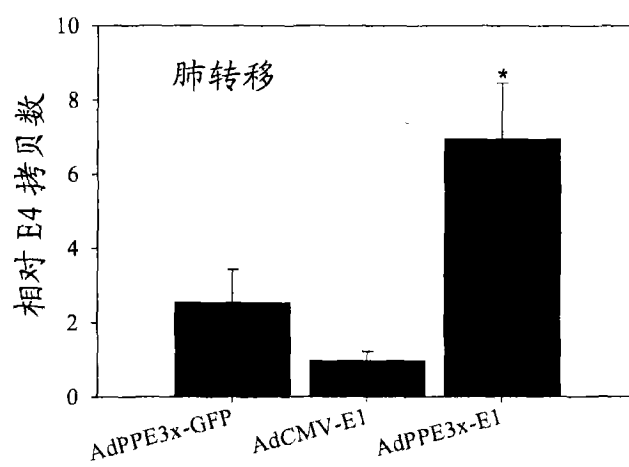


图 113a

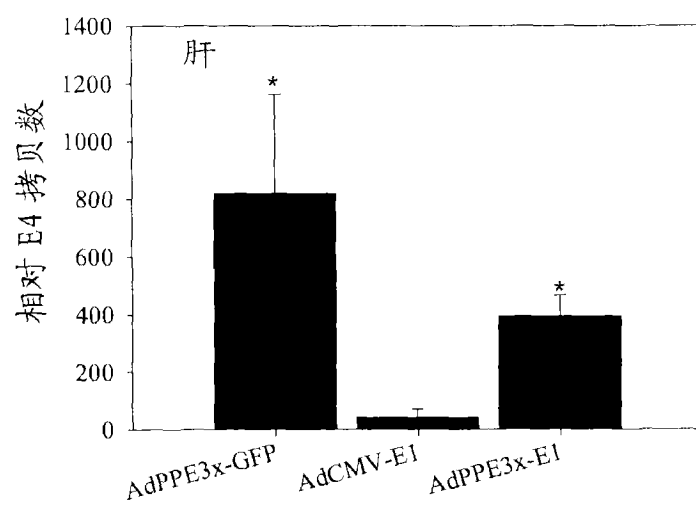


图 113b