

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101507822 B

(45) 授权公告日 2012.06.06

(21) 申请号 200910128718.8

(22) 申请日 2004.11.23

(30) 优先权数据

60/524993 2003.11.24 US

(62) 分案原申请数据

200480040613.2 2004.11.23

(73) 专利权人 坎吉有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 D·古 M·泽佩达

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 林森

(51) Int. Cl.

A61K 48/00(2006.01)

A61P 17/02(2006.01)

C12N 15/861(2006.01)

(56) 对比文件

US 20020111304 A, 2002.08.15, 说明书第
1—3,9,18,25,26页.

Todd W. Perkins

等. Adenovirus-mediated gene therapy
using human p21waf-1/cip-1 to prevent
wound healing in a rabbit model
of glaucoma filtration surgery. 《ARCH
OPHTHALMOL 120》. 2002, 第120卷 941-949页.

审查员 李娟娟

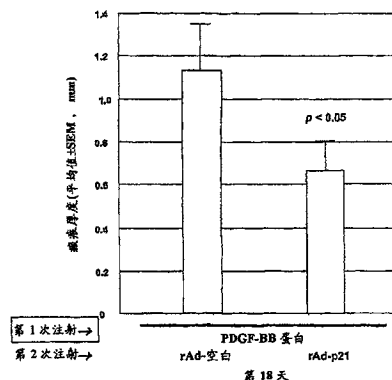
权利要求书 1页 说明书 18页 附图 7页

(54) 发明名称

皮肤瘢痕形成的减少

(57) 摘要

本发明提供了通过在受伤部位表达
p21^{WAF1/Cip1}而减少或抑制皮肤瘢痕形成的方法和
组合物。



1. 一种用途, 其为含表达盒的多核苷酸在制备一种减少瘢痕形成的制剂上的用途, 包括给予具有伤口的对象的皮肤所述多核苷酸, 其中所述表达盒包含有效连接至 p21^{WAF1/Cip1} 编码多核苷酸的启动子, 所述多核苷酸作为含腺病毒蛋白 IX 部分或全部缺失的腺病毒载体的一部分给予。
2. 权利要求 1 的用途, 其中所述腺病毒载体为复制缺陷型腺病毒载体。
3. 权利要求 1 的用途, 其中所述给予步骤导致伤口处的瘢痕疙瘩或增生性瘢痕形成比未处理伤口上的瘢痕形成减少。
4. 权利要求 1 的用途, 其中所述腺病毒载体以 10^5 - 10^9 颗粒数 /cm² 伤口之间的剂量给予。
5. 权利要求 1 的用途, 其中所述载体在生物相容性基质中给予。
6. 权利要求 5 的用途, 其中所述基质包含胶原、金属、羟基磷灰石、生物玻璃、铝酸盐、生物陶瓷材料、纯化的蛋白或胞外基质组合物。
7. 权利要求 5 的用途, 其中所述基质为胶原基质。
8. 权利要求 1 的用途, 其中所述皮肤是被灼伤的皮肤。
9. 一种药物组合物, 所述组合物包含腺病毒载体和药物可接受赋形剂, 所述腺病毒载体包含表达盒, 其中所述组合物适于局部给予, 所述表达盒包含有效连接至 p21^{WAF1/Cip1} 编码多核苷酸的启动子, 所述腺病毒载体含有腺病毒蛋白 IX 部分或全部缺失。
10. 权利要求 9 的药物组合物, 其中所述表达盒在生物相容性基质中。
11. 权利要求 9 的药物组合物, 其中所述腺病毒载体为复制缺陷型腺病毒载体。
12. 权利要求 10 的药物组合物, 其中所述基质包含胶原、金属、羟基磷灰石、生物玻璃、铝酸盐、生物陶瓷材料、纯化的蛋白或胞外基质组合物。
13. 权利要求 10 的药物组合物, 其中所述基质为胶原基质。

皮肤瘢痕形成的减少

[0001] 本申请是申请日为2004年11月23日、申请号为200480040613.2、发明名称为“皮肤瘢痕形成的减少”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关专利申请的交叉参考

[0003] 本发明要求2003年11月24日提交的美国临时专利申请第60/524,993号的优先权,对于所有目的该临时申请通过引用结合到本文中。

[0004] 发明背景

[0005] 过度皮肤瘢痕形成是医疗需求未能满足的领域,产生功能、容貌和心理病态。参见例如 Hunt, T.K., World J Surg 4(3):271-7(1980); Nicolai, J.P. 等, 11(1):29-32(1987)。临床瘢痕管理包括对瘢痕的持续身体评估(包括身体部位)和患者先前瘢痕史二者的考量,所以治疗过程中经常调整临床方案。增生性瘢痕和瘢痕疙瘩的公认保守治疗限于手术、注射皮质类固醇、放疗、硅胶薄膜敷贴和压力疗法。参见例如 Mustoe, T.A. 等, Plast Reconstr Surg, 110(2):560-71(2002)。尽管近来瘢痕管理已试验了供医生使用的新疗法,但瘢痕治疗结果在很大程度上仍不可预期。明确地以负责增生性瘢痕和瘢痕疙瘩的生物机制为目标的治疗应能补充现有疗法,并可改善当前的瘢痕治疗结果。

[0006] 皮肤瘢痕形成被说成是正常皮肤构造和功能的大范围破坏,其由于伤口修复而发生,并由于纤维增生反应而演进。参见例如 Clark, R.A.F., Wound Repair: Overview and General Considerations, 载于 THE MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY OF WOUND REPAIR, (R.A.F. Clark 编辑), 1988, 3-35 页。瘢痕疙瘩和增生性瘢痕的发病机制和生物学模式尚未完全知晓。瘢痕疙瘩的特征在于生长超出了原始外伤部位周边,与家族因素有关,并很少退化。参见例如 Tredget, E.E., Ann N Y Acad Sci, 888:165-82(1999)。增生性瘢痕是增生性红斑状纤维病变,经常随时间而经历分解,与组织挛缩相关。参见例如 Tredget, E.E., Ann N Y Acad Sci, 888:165-82(1999)。尽管瘢痕疙瘩和增生性瘢痕在遗传连锁和免疫学参数方面不同,但二者均与成纤维细胞过度增殖和过量胞外基质(ECM)沉积相关。参见例如 Rockwell, W.B. 等, Plast Reconstr Surg, 84(5):827-37; Tsao, S.S. 等, Semin Cutan Med Surg, 21(1):46-75(2002); Nemeth, A.J., J Dermatol Surg Oncol 19(8):738-46(1993)。

[0007] 显然,瘢痕形成仍是在很多情况下难以避免的问题。本发明解决了此问题和其它问题。

[0008] 发明简述

[0009] 本发明提供减少瘢痕形成的方法。在某些实施方案中,该方法包括给予皮肤含表达盒的多核苷酸,其中所述表达盒含有效连接至 p21^{WAF1/Cip1} 编码多核苷酸的启动子。在某些实施方案中,将多核苷酸(任选在载体中)给予对象皮肤上的伤口。

[0010] 在某些实施方案中,DNA 作为载体的一部分给予。在某些实施方案中,载体为病毒载体。在某些实施方案中,病毒载体为腺病毒载体。在某些实施方案中,腺病毒载体为复制缺陷型腺病毒载体。

[0011] 在某些实施方案中,和未处理伤口上瘢痕形成相比,给予步骤使伤口处的瘢痕疙瘩或增生性瘢痕形成减少。在某些实施方案中,腺病毒载体以 10^5 - 10^7 颗粒数(PN)/cm² 伤

口的剂量给予。

[0012] 在某些实施方案中,载体在生物相容性的基质中给予。在某些实施方案中,基质含胶原、金属、羟基磷灰石、生物玻璃、铝酸盐、生物陶瓷材料、纯化的蛋白或胞外基质组合物。在某些实施方案中,基质为胶原基质。

[0013] 在某些实施方案中,皮肤被灼伤。

[0014] 本发明还提供含表达盒和药物可接受赋形剂的药物组合物,其中所述组合物适于局部给予,所述表达盒包含有效连接至 p21^{WAF1/Cip1} 编码多核苷酸的启动子。在某些实施方案中,表达盒(任选为载体的一部分)在生物相容性基质中。

[0015] 在某些实施方案中,基质包含含表达盒的病毒载体。在某些实施方案中,病毒载体为腺病毒载体。在某些实施方案中,腺病毒载体为复制缺陷型腺病毒载体。

[0016] 在某些实施方案中,基质含胶原、金属、羟基磷灰石、生物玻璃、铝酸盐、生物陶瓷材料、纯化的蛋白或胞外基质组合物。在某些实施方案中,基质为胶原基质。

[0017] 定义

[0018] 本文使用的“p21^{WAF1/Cip1}”指野生型全长 p21^{WAF1/Cip1} 蛋白、其活性片段、其活性变体,以及含全长 p21^{WAF1/Cip1} 蛋白或其活性片段或其活性变体的融合蛋白,其中融合蛋白保持 p21^{WAF1/Cip1} 活性。野生型 p21^{WAF1/Cip1} 蛋白是具有细胞调节功能的 164 个氨基酸的蛋白。参见例如美国专利第 5,302,706 号。在科学文献中 p21^{WAF1/Cip1} 还被称为 p21、p21sdi、p21waf1、p21cip1 和 p21pic1。术语“p21^{WAF1/Cip1} 多核苷酸”指编码 p21^{WAF1/Cip1} 的多核苷酸序列,其中所述 p21^{WAF1/Cip1} 包括例如人野生型蛋白和其它生物的同源序列,以及其任何突变体或截短物,或大致表现出和野生型 p21^{WAF1/Cip1} 蛋白相同的功能的融合蛋白。

[0019] “p21^{WAF1/Cip1}”活性指补充 p21^{WAF1/Cip1} 突变的能力和用作细胞周期蛋白依赖性激酶活性抑制剂(Harper, J. W. 等, Cell 75:805-816(1993))和/或抑制细胞周期进展的能力。参见例如 Harper, J. W. 等, 出处同上;Xiong, Y. 等, Cell 71:505-514(1992)。

[0020] 术语“基因”指参与产生多肽链的 DNA 节段;其包括编码区前后的区域(前导序列和尾随序列)以及各个编码节段(外显子)之间的间插序列(内含子)。

[0021] 术语“核酸”指或单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。除非有明确限制,否则该术语包括含天然核苷酸已知类似物的核酸,该类似物具有与参比核酸相似的结合特性,并以类似于天然核苷酸的方式代谢。除非另有说明,否则特定的核酸序列还默认包括其保守修饰的变体(例如简并密码子置换)和互补序列以及明确指出的序列。具体地讲,可通过产生其中一个或多个选定(或者全部)密码子的第三个位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基置换的序列,实现简并密码子置换(Batzer 等, Nucleic Acid Res. 19:5081(1991);Ohtsuka 等, J. Biol. Chem. 260:2605-2608(1985);和 Cassol 等(1992);Rossolini 等, Mol. Cell. Probes 8:91-98(1994))。

[0022] 在本文可交互使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白”指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基为对应天然氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及适用于天然氨基酸聚合物和非天然氨基酸聚合物。本文使用的该术语包括任何长度的氨基酸链,包括全长蛋白(即抗原),其中氨基酸残基通过共价肽键相连接。

[0023] 术语“氨基酸”指天然和合成氨基酸,以及以类似于天然氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然氨基酸是遗传密码编码的氨基酸,以及之后修饰的氨基

酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指具有与天然氨基酸相同的基本化学结构(即结合 H、羧基、氨基和 R 基团的 α 碳)的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这种类似物具有修饰的 R 基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽骨架,但仍保留和天然氨基酸相同的基本化学结构。“氨基酸模拟物”指所具有结构与氨基酸的一般化学结构不同的化学化合物,但其以和天然氨基酸类似的方式起作用。

[0024] 本文以 IUPAC-IUB 生化命名委员会推荐的、通常已知的 3 字母符号或单字母符号表示氨基酸。同样,核苷酸可由其一般公认的单字母代码表示。

[0025] “表达盒”指重组或合成产生的核酸,其具有一系列允许特定核酸在宿主细胞中转录的特定核酸元件。表达盒可为质粒、病毒或其它核酸的一部分。通常,表达盒包含有效连接至待转录核酸的启动子。

[0026] “生物相容性基质”指在要给予基质的宿主对象中不产生显著的变态反应或其它副反应的基质。

[0027] 术语“有效连接”指核酸表达控制序列(例如启动子或一系列转录因子结合位点)和第二个核酸序列之间的功能连接,其中表达控制序列引导对应于第二个序列的核酸的转录。

[0028] 术语“启动子”或“调节元件”指位于转录起点上游或下游的区域或序列决定簇,其涉及识别和结合 RNA 聚合酶和其它蛋白,以启动转录。“组成型”启动子是在大部分环境和发育条件下有活性的启动子。“诱导型”启动子是在环境或发育调节下有活性的启动子。

[0029] 附图简述

[0030] 图 1A 图示了在 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理后初级人皮肤成纤维细胞中的增殖作用和 I 型前胶原蛋白检测结果。该图图示了初级人皮肤成纤维细胞中的 p21^{WAF1/Cip1} 蛋白表达。用浓度逐渐增加的 rAd 处理细胞 48 小时,用抗-p21^{WAF1/Cip1}-FITC 抗体标记,并通过 FACS 分析。在直方图中,线(A,虚线)代表未处理细胞的染色。线(B)代表用 1×10^7 PN/ml rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理的细胞的染色。线(C)代表用 1×10^8 PN/ml rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理的细胞的染色。线(D)代表用 1×10^9 PN/ml rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理的细胞的染色。直方图是 3 个实验的代表。

[0031] 图 1B 图示了给予各种腺病毒载体后的细胞周期停滞。用浓度逐渐增加的 rAd(X-轴)处理细胞 48 小时,用 BrdU 脉冲标记,通过 FACS 分析。将数据以掺入 BrdU 的细胞的百分率绘制在 Y 轴上(实心直方图)。每条代表三孔平行实验的平均值 ± 1 倍标准偏差。 1×10^8 PN/ml 和 1×10^9 PN/ml 剂量的 rAd-空白和 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理组之间的对比是显著的($p < 0.05$)。

[0032] 图 1C 图示了给予各种腺病毒载体后的 PIP 蛋白水平。细胞与浓度递增的重组腺病毒(X-轴)温育 48 小时。收集细胞裂解物,通过 ELISA 分析 PIP。数据以 ng PIP/ml 总裂解物蛋白(Y轴)作图。每条代表三孔平行实验的平均值 ± 1 倍标准偏差。 3×10^9 PN/ml rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理组和所有其它组之间的对比是显著的($p < 0.05$)。

[0033] 图 2 图示了大鼠 PVA 海绵模型的注射日程表。在第 0 天植入 PVA 海绵,在海绵植入后 4 天传递 rAd-PDGF-B 进行预处理。在 rAd-PDGF-B 预处理后 3 天传递 rAd-p21^{WAF1/Cip1}, 5 天后收集所有海绵。

[0034] 图 3 图示了 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理对肉芽组织填充的作用。在植入后 12 天(rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理后 5 天)收集 PVA 海绵,并进行三色染色。如“材料和方法”所述通过图

像定量分析评价肉芽组织填充的平均百分率。rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 对 rAd-PDGF-B/载体和 rAd-PDGF-B/rAd-空白接受组之间的对比是显著的（分别为 $p < 0.001$ 和 $p = 0.05$ ）。但是，在 rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 对载体 / 载体和 rAd-空白 / rAd-空白接受组之间未观察到显著性差异 ($p > 0.3$)。每个处理组 $N = 7$ 。

[0035] 图 4A 和图 4B 图示了体内 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理后的增殖指数 -BrdU 和 Ki67 阳性细胞的平均百分率。用在载体 / 载体、rAd-PDGF-B/载体、rAd-PDGF-B/rAd-空白和 rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理的海绵中的抗 -BrdU 和 Ki67 抗体进行免疫组织化学。rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理组对 rAd-PDGF-B/载体和 rAd-PDGF-B/rAd-空白组之间的对比是显著的 ($*p < 0.01$)，以及 rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理组对 rAd-PDGF-B/载体和载体 / 载体处理组之间的对比是显著的 ($**p < 0.001$)。对于 BrdU，计数了每个处理的 3 块海绵的 9 个区域。对于 Ki67，计数了每个处理组的 4 块海绵。

[0036] 图 5 表明，在兔耳过多瘢痕形成模型中，在皮内给予 rAd-p21 后，p21 表达抑制瘢痕厚度增加。

[0037] 发明详述

[0038] 1. 引言

[0039] 本发明提供在受伤皮肤中减少和治疗瘢痕形成的方法和组合物。本发明提供：向伤口部位传递 p21^{WAF1/Cip1} 和在伤口部位表达 p21^{WAF1/Cip1} 减少肉芽组织和成纤维细胞的出现。不是意图限制本发明的范围，相信 p21^{WAF1/Cip1} 抑制炎性细胞（例如嗜中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞、成纤维细胞等）作用，否则该作用应在伤口愈合过程中产生过多瘢痕形成和细胞增殖。

[0040] 本发明方法包括向伤口部位传递含 p21^{WAF1/Cip1} 或其活性片段的多肽的编码多核苷酸。在伤口部位表达 p21^{WAF1/Cip1} 导致伤口闭和而减少了其它情况下会出现的瘢痕形成。本发明特别用于预防或改善增生性瘢痕形成和瘢痕疙瘩的出现和生长。

[0041] II. 伤口

[0042] 本发明可用于减少皮肤上任何伤口的瘢痕形成。不是意图限制本发明的范围，由例如灼伤、刺、切和 / 或擦伤产生的皮肤损伤包括可按照本发明方法治疗的伤口。本发明方法可用于减少手术（包括整容手术）后的瘢痕形成。

[0043] 理想地，伤口一出现后就尽快处理伤口。例如，在某些情况下，在伤口出现后 72、48、24、18、12、6、3 或 1 小时处理伤口。对于手术瘢痕，本发明的方法和组合物与手术同时给予。但是，可通过在出现伤口后的长时间后处理，实现抗瘢痕形成作用。一般来说，伤口出现和载体给予之间的时间越长，应用于伤口的 p21^{WAF1/Cip1} 载体量越应增加。对于其中基因处于强组成型启动子（例如本文例举的巨细胞病毒立即早期（“CMV”）启动子）控制下的复制缺陷型腺病毒载体，剂量通常约为 $1 \times 10^5 \text{PN/cm}^2$ – $1 \times 10^9 \text{PN/cm}^2$ 、 $1 \times 10^5 \text{PN/cm}^2$ – $1 \times 10^8 \text{PN/cm}^2$ 或 $1 \times 10^5 \text{PN/cm}^2$ – $1 \times 10^7 \text{PN/cm}^2$ 。典型剂量为约 $5 \times 10^6 \text{PN/cm}^2$ 。以上参考剂量在伤口出现后立即（即在 1 天内）给予伤口部位。如果腺病毒载体明显较晚（例如伤口出现后 1 周）应用，则为了实现相似的作用，可能必须将载体剂量增加约 10–100 倍。据 WAF1ELISA 试剂盒（由 Oneogene Research Products, San Diego, CA 商购，目录号 #QIA18）测定，组织中 p21^{WAF1/Cip1} 的典型有效浓度约为 50–150 单位活性，目标浓度约为 80–100 单位活性。

[0044] 通常，本发明方法抑制或减少瘢痕形成，但不抑制伤口闭合。p21^{WAF1/Cip1} 如果以足

量表达,则可抑制伤口闭合。例如,含 p21^{WAF1/Cip1} 多核苷酸的 2×10^{11} PN/cm² 腺病毒载体足以在动物模型中延迟上皮再形成。另外,以此剂量可观察到对伤口抗张强度的作用。因此,理想的是使用足量的含 p21^{WAF1/Cip1} 多核苷酸的载体抑制或减少瘢痕形成,同时不给予太多载体,以至于延迟上皮再形成或明显降低抗张强度。

[0045] III. 基因传递

[0046] 为引入编码 p21 的多核苷酸序列,可将含启动子(其有效连接至 p21 多核苷酸)的裸质粒掺入到伤口处的细胞中。或者,将 p21^{WAF1/Cip1} 多核苷酸掺入到病毒或非病毒传递系统中,然后导入伤口中。

[0047] 1. 非病毒传递系统

[0048] 能够引导伤口中的 p21^{WAF1/Cip1} 多核苷酸表达的非病毒传递系统包括表达质粒。表达质粒是自主复制的、染色体外环状 DNA 分子,不同于正常基因组,在能够影响靶细胞中的 DNA 序列表达的非选择性条件下不是细胞存活所必需的。质粒在细菌中自主复制,以利于细菌生产,但含细胞周期蛋白依赖性激酶基因的这种质粒不一定在靶细胞中复制以获得治疗效果。转基因也可处于组织特异性启动子区控制之下,以使转基因仅在特定细胞类型(例如炎症细胞,包括例如嗜中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞,以及成纤维细胞和角化细胞)中表达。本领域技术人员容易鉴别可用于实施本发明的各种表达质粒。

[0049] 表达质粒还可含启动子、增强子或其它有助于 p21 多核苷酸表达的序列。尽管人们可使用组成型启动子(如 CMV),但也可使用在靶细胞中有特异性活性的启动子,如 pFascin 启动子(Sudowe 等, *Molecular Therapy* 8(4):(2003)) 和角蛋白 -12 启动子(Ikawa 等, *Molecular Therapy* 8(4):666(2003))。响应化学刺激或其它刺激而在某些条件下起作用的诱导型启动子也可用于有效控制 p21^{WAF1/Cip1} 表达。诱导型启动子的实例在科学文献中是已知的。参见例如 Yoshida 和 Hamada, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 230:426-430(1997); Iida 等, *J. Virol.* 70(9):6054-6059(1996); Hwang 等, *J. Virol.* 71(9):7128-7131; Lee 等, *Mol. Cell. Biol.* 17(9):5097-5105(1997); 和 Dreher 等, *J. Biol. Chem.* 272(46):29364-29371(1997)。辐射诱导型启动子的实例包括 EGR-1 启动子。参见例如 Boothman 等, (1994) 138 卷, 附页 S68-S71。

[0050] 可包含另外的基因,例如编码药物抗性的基因,以允许选择和筛选存在的重组载体。例如,这些另外的基因可包括例如编码新霉素抗性、多药物抗性、胸苷激酶、 β -半乳糖苷酶、二氢叶酸还原酶(DHFR)和氯霉素乙酰转移酶的基因。

[0051] 含 p21^{WAF1/Cip1} 多核苷酸的表达质粒可囊化入脂质体中。脂质体包括乳浊液、泡沫、胶束、不溶性单层、液晶、磷脂分散剂、薄片层等。使用脂质体载体将 DNA 序列传递至靶细胞在本领域众所周知。可利用各种方法制备脂质体,如例如 Szoka 等, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467(1980); 美国专利第 4,394,448 号、第 4,235,871 号、第 4,501,728 号、第 4,837,028 号和第 5,019,369 号所述。用于实施本发明的脂质体可由一种或多种标准成囊泡脂质形成,其通常包括中性和带负电荷的磷脂和固醇(例如胆固醇)。

[0052] 这种成囊泡脂质的实例包括 DC-cho1、DOGS、DOTMA、DOPE、DOSPA、DMRIE、DOPC、DOTAP、DORIE、DMRIE-HP、n-亚精胺胆固醇氨基甲酸酯和其它如美国专利第 5,650,096 号公开的阳离子脂质。脂质的选择一般受以下因素指导:例如脂质体大小、酸不稳定性和血流中的脂质体稳定性。可将其它组分加入到脂质体制剂中,以增加血清半衰期,例如美国专利第

5, 013, 556 号和第 5, 213, 804 号所描述的聚乙二醇包被（所谓的“PEG 化”）。

[0053] 为了利于将治疗基因传递入特定组织或器官，可有利地将利于细胞靶向的元件掺入到非病毒传递系统中。

[0054] 2. 病毒传递系统

[0055] 在其它情况下，通过病毒传递系统传递 DNA 序列，其中 p21^{WAF1/Cip1} 多核苷酸掺入到能够感染靶细胞的病毒基因组中，且 p21^{WAF1/Cip1} 多核苷酸有效连接至表达和控制序列，使得该多核苷酸在合适的条件下于靶细胞中表达。用于实施本发明的载体还可来源于病毒基因组。可使用的载体包括重组修饰的包膜或非包膜 DNA 和 RNA 病毒，优选选自杆状病毒科、细小病毒科、小核糖核酸病毒科、疱疹病毒科、痘病毒科或腺病毒科。还可使用利用了各个亲代载体特性的优势元件的嵌合载体。参见例如 Feng 等，*Nature Biotechnology* 15: 866-870 (1997)。可通过重组 DNA 技术修饰这种病毒基因组，以包含 p21^{WAF1/Cip1} 多核苷酸，并可将其工程改造为复制缺陷型、条件复制型或增殖型。通常，载体为复制缺陷型或条件复制型。示例性载体来源于腺病毒、腺相关病毒和逆转录病毒基因组。在某些实施方案中，载体为来源于人腺病毒基因组的非复制型载体。转基因也可处于组织特异性启动子区控制之下，使得转基因仅在特定细胞类型中表达。

[0056] 在其它情况下，为确保 p21^{WAF1/Cip1} 多核苷酸有效传递至特定组织或器官，可有利地将利于细胞靶向的元件掺入到病毒传递系统中。可通过加入允许受体介导胞吞进入特定细胞的受体的配体或特异性抗体，修饰用于包装本发明构建物的病毒包膜（例如 WO 93/20221、WO 93/14188、WO 94/06923）。在本发明的某些实施方案中，本发明的 DNA 构建物连接至病毒蛋白，例如腺病毒颗粒，以利于胞吞作用。参见例如 Curiel 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88: 8850-8854 (1991)。通过修饰病毒包膜蛋白，在来源于具有特征性广谱感染性的病毒的载体中，也可实现细胞类型特异性或细胞类型靶向。例如，通过选择性修饰病毒基因组头节区 (konb) 和尾丝编码序列，以实现与独特细胞表面受体具有特异性相互作用的修饰头节区和尾丝结构域的表达，从而用腺病毒载体实现了细胞靶向。此修饰的实例描述于 Wickham 等，*J. Virol.* 71(11): 8221-8229 (1997)（将 RGD 肽掺入到腺病毒尾丝蛋白中）；Arnberg 等，*Virology* 227: 239-244 (1997)（修饰腺病毒尾丝基因，以实现眼和生殖道的定向）；Harris 和 Lemoine *TIG* 12(10): 400-405 (1996)；Stevenson 等，*J. Virol.* 71(6): 4782-4790 (1997)；Michael 等，*Gene Therapy* 2: 660-668 (1995)（将胃泌素释放肽片段掺入到腺病毒尾丝蛋白中）；和 Ohno 等，*Nature Biotechnology* 15: 763-767 (1997)（将 A 蛋白-IgG 结合域掺入到 Sindbis 病毒中）；和美国专利第 5, 721, 126 号和第 5, 559, 099 号。通过缀合抗体或抗体片段至包膜蛋白，已获得其它细胞特异性靶向方法。参见例如 Michael 等，*J. Biol. Chem.* 268: 6866-6869 (1993)，Watkins 等，*Gene Therapy* 4: 1004-1012 (1997)；Douglas 等，*Nature Biotechnology* 14: 1574-1578 (1996)。或者，可将特定部分缀合至病毒表面，以实现靶向。参见例如 Nilson 等，*Gene Therapy* 3: 280-286 (1996)（将 EGF 缀合至逆转录病毒蛋白）。

[0057] 条件复制型病毒载体用于在特定细胞类型中实现选择性表达，同时避免不适当的广谱感染。条件复制型载体的实例描述于 Bischoff 等，*Science* 274: 373-376 (1996)；Pennisi, E., *Science* 274: 342-343 (1996)；Russell, S. J. *Eur. J. of Cancer* 30A(8): 1165-1171 (1994)。

[0058] 在某些情况下,特别是在使用条件复制型或增殖型载体时,除了 p21^{WAF1/Cip1} 多核苷酸以外,可能还需要在病毒载体中包含自杀基因。自杀基因是一种核酸序列,其表述使细胞易被外部因素杀死或在细胞中产生毒性环境。自杀基因的一个广为人知的实例是胸苷激酶(TK) 基因(参见例如美国专利第 5,631,236 号和美国专利第 5,601,818 号),其中表达 TK 基因产物的细胞容易通过给予更昔洛韦而被选择性杀死。这提供了针对病毒载体传递系统的“安全阀”,以防止由自发产生广谱感染性的完全增殖型病毒载体所引起的大范围感染。

[0059] 在本发明的某些实施方案中,载体来源于腺病毒科属。特别优选的载体来源于人腺病毒 2 型或 5 型。这种载体由于在 E1a 和 / 或 E1b 编码区有修饰和缺失,所以通常是复制缺陷型的。优选实现特定表达特征或利于重复给予或降低免疫应答的其它病毒基因组修饰。

[0060] 在某些实施方案中,重组腺病毒载体的 E4 编码区完全或部分缺失,任选保留(或缺失)E4 ORF6 和 ORF 6/7。已表明 E3 编码序列不是必需的,其可由腺病毒载体中缺失,但优选保留。在某些实施方案中,修饰 E3 的启动子操作子区,以增加 E3 表达,获得对治疗性载体更有利的免疫学特性。在某些实施方案中,使用的载体是人腺病毒 5 型载体,其含处于巨细胞病毒启动子区控制之下的 p21^{WAF1/Cip1} 多核苷酸,以及具有在 CMV 启动子控制之下的 E3、缺失 E4 编码区同时保留 E4 ORF6 和 ORF 6/7 的三部分前导序列。

[0061] 在某些实施方案中,腺病毒表达载体含部分或全部缺失的蛋白 IX。参见例如美国专利公开第 2003/0091534 号。其它腺病毒载体包括描述于例如美国专利公开第 2003/0192066 号和第 2003/0157688 号的载体。

[0062] IV. 药物制剂

[0063] 本发明进一步提供用于给予的在病毒或非病毒传递系统中含 p21^{WAF1/Cip1} 多核苷酸的药物制剂。配制本发明组合物,以本领域已知的、可接受用于给予哺乳动物对象(优选人)的方式给予。具体地说,传递系统可配制成局部给予。

[0064] 本发明的组合物可以局部制剂或聚合基质、水溶胶基质、聚合植入体或允许缓慢或持续释放组合物的包囊制剂给予。任何含 p21^{WAF1/Cip1} 编码 DNA 的生物相容性基质材料都可按照本发明配制和使用。

[0065] 本发明的活化基因的基质可来源于任何生物相容性材料。这种材料可包括但不限于配制成支持细胞粘附和生长的支架、粉末或凝胶的生物可降解或非生物可降解材料。基质可来源于合成聚合物或天然蛋白,例如胶原蛋白、其它胞外基质蛋白或其它结构大分子。

[0066] 可用于本发明的组合物、装置和方法的基质类型实际上没有限制,可包括生物基质和合成基质。基质具有通常与“生物相容性”相关的所有特征,因为其在给予哺乳动物宿主时不产生副反应、变态反应或其它不适当反应的形式。这种基质可由天然或合成材料形成。基质通常为生物可降解的。基质可采用海绵、植入体、管、Telfa® 垫、Band-Aid® 牌胶带、绷带、衬垫、冻干组分、凝胶、敷片、人工皮肤、粉末或纳米颗粒的形式。另外,基质可设计成允许持续释放和 / 或提供细胞可迁移至其中并被转导的框架,以及提供利于愈合的结构框架。

[0067] 可使用的生物可降解聚合物在本领域众所周知,包括(以举例和非限制性方式)聚酯,例如聚乙交酯、聚交酯和聚乳酸聚乙醇酸共聚物(“PLGA”)(Langer and Folkman, Nature 263:797-800(1976));聚醚,例如聚己酸内酯(“PCL”);聚酐;聚氰基丙烯酸烷基酯,

例如氰基丙烯酸正丁酯和氰基丙烯酸异丙酯；聚丙烯酰胺；聚（原酸酯）；聚膦腈；多肽；聚氨甲酸乙酯；以及这些聚合物的混合物。还可使用聚乙二醇（PEG）、环糊精和衍化环糊精以及胶原蛋白的聚合物（无论是天然来源还是重组来源获得）。

[0068] 一种控制基质释放核酸的方法包括控制聚合物分子量以及基质化学组成。例如，对于 PLGA 基质，乳酸 / 乙醇酸的组成比率影响释放周期。一般来说，较高的乳酸 / 乙醇酸比率，例如 75/25，将提供较长期的核酸可控持续释放，而较低的乳酸 / 乙醇酸比率将提供更迅速的核酸释放。

[0069] 另一种合适材料的具体实例是纤维胶原蛋白，其可由组织提取和部分纯化，然后除菌，接着冻干。基质还可由腱或皮肤胶原蛋白制备，其可由各种商业来源获得，例如 Sigma and Collagen Corporation。胶原蛋白基质还可如美国专利第 4,394,370 号和第 4,975,527 号所述制备。

[0070] 另外，可使用由胶原蛋白和葡糖胺聚糖（GAG）制备的网架（如美国专利第 4,505,266 号或美国专利第 4,485,097 号中所述）实施本发明。胶原蛋白 / GAG 基质可有效地用作修复细胞可迁移入其中的支持体或“支架”结构。胶原蛋白基质，例如美国专利第 4,485,097 号公开的胶原蛋白基质，也可用作基质材料。

[0071] 在将基质应用至伤口部位之前，可去除损伤的皮肤或衍生的组织。本发明的基质可含可改善伤口愈合以及使炎症、感染和 / 或过度增殖反应最小化的其它因子或化合物。这些物质的实例包括硝酸银和抗生素。

[0072] V. 载体

[0073] 当传递系统被配制成溶液或悬浮液时，传递系统在可接受的载体中，优选在水性载体中。可使用各种水性载体，例如水、缓冲水溶液、0.9% 盐水、0.3% 甘氨酸、透明质酸等。这些组合物可通过常规的众所周知的灭菌技术灭菌，或可除菌过滤。获得的水溶液可照原样包装使用，或冻干，冻干制剂在给予前与无菌溶液混合。

[0074] 根据近似生理状态的要求，组合物可含药物可接受的辅助物质，例如 pH 调节剂和缓冲剂、渗透压调节剂、润湿剂等，例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、山梨聚糖单月桂酸酯、油酸三乙醇胺等。

[0075] 在药物制剂中的本发明组合物的浓度可广泛变化，即由少于约 0.01%（体积）、通常在或至少约 2%（体积）直至多达 20% -50%（体积）或以上，并按照选定的具体给予方式，主要根据液体体积、粘度等选择。

[0076] VII. 传递增强剂

[0077] 本发明的药物制剂可任选包含一种或多种传递增强剂。术语“传递增强剂”包括利于核酸或蛋白分子向靶细胞转移的物质。这种传递增强剂的实例包括去污剂、醇、二醇、表面活性剂、胆汁盐、肝素拮抗剂、环加氧酶抑制剂、高渗盐溶液和乙酸盐。醇包括例如美国专利第 5,789,244 号描述的脂族醇，如乙醇、N-丙醇、异丙醇、丁醇、乙酰乙醇（acetyl alcohol），其全部教导通过引用整体结合到本文中。二醇包括甘油、丙二醇、聚乙二醇和其它低分子量二醇，例如甘油和硫代甘油。

[0078] 乙酸盐如乙酸、葡糖酸和乙酸钠，是另外的传递增强剂实例。

[0079] 表面活性剂的实例是十二烷基硫酸钠（SDS）和溶血卵磷脂、聚山梨醇酯 80、壬基苯氧基聚氧乙烯、溶血磷脂酰胆碱、聚乙二醇 400、聚山梨醇酯 80、聚氧乙烯醚、聚乙二醇醚

表面活性剂和 DMSO。可使用胆汁盐（例如牛磺胆酸盐、牛磺脱氧胆酸钠、脱氧胆酸盐、鹅脱氧胆酸盐、甘氨酸、甘氨酸鹅脱氧胆酸）和其它收敛剂（例如硝酸银）。还可使用肝素拮抗剂，例如季胺盐，如硫酸鱼精蛋白。可使用环氧酶抑制剂，例如水杨酸钠、水杨酸和非甾族抗炎药物（NSAIDS），例如吲哚美辛、萘普生、双氯芬酸。

[0080] SYN3 是一种增强基因传递的表面活性剂样分子，描述于美国专利第 6,392,069 号，对于所有目的其全部教导通过引用结合到本文中。另外的化合物还描述于美国专利说明书第 2003/0170216 号，其通过引用结合到本文中。

[0081] 如美国专利第 6,165,779 号（其全部教导通过引用结合到本文中）所述，使用去污剂也可增强基因传递。去污剂包括阴离子、阳离子、两性离子和非离子去污剂。示例性去污剂包括但不限于牛磺胆酸盐、脱氧胆酸盐、牛磺脱氧胆酸盐、鲸蜡基苯基偶氮二氨基吡啶、苯扎氯铵、ZWITTERGENT™ 3-14 去污剂、CHAPS(3-((3-胆胺基丙基)二甲基铵)-1-丙磺酸盐水合物, Aldrich)、Big CHAP、脱氧 Big CHAP、TRITON™-X-100 去污剂、C12E8、辛基-B-D-葡萄糖吡喃糖苷、PLURONIC™-F68 去污剂、TWEEN™ 20 去污剂和 TWEEN™ 80 去污剂 (CALBIOCHEM™ Biochemicals)。

[0082] 传递增强剂的浓度取决于本领域普通技术人员已知的多种因素，例如使用的具体传递增强剂、缓冲液、pH、靶组织或器官以及给予方式。传递增强剂的浓度为 1% -50%（体积 / 体积），优选为 10% -40%（体积 / 体积），最优选为 15% -30%（体积 / 体积）。

[0083] 磷酸缓冲盐水（PBS）是这些化合物的一种可能增溶剂。但是，本领域普通技术人员会认识到，可能需要某些其它的赋形剂和添加物，以实现这些物质在各种药物制剂中的溶解度特性。例如，可以合适的浓度加入众所周知的增溶剂，例如去污剂、脂肪酸酯、表面活性剂，以利于化合物在各种待使用溶剂中的溶解。当溶剂为 PBS 时，优选的增溶剂为浓度约 0.15% 的 Tween 80。

[0084] 这些传递增强剂可单独使用、相互联合使用或与其它传递增强剂组合使用。

[0085] 实施例

[0086] 实施例 1

[0087] 我们证实，rAd-p21^{WAF1/Cip1} 可有效减弱人初级成纤维细胞增殖和 I 型前胶原蛋白沉积。另外，我们还证实 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 在大鼠 PAV 海绵伤口愈合模型中减弱肉芽组织和 ECM 沉积。我们的成果提示，外源性表达 p21^{WAF1/Cip1} 是调节过多瘢痕形成的一个治疗选择。

[0088] 方法和材料

[0089] 重组腺病毒载体构建和纯化。先前已描述了含人 p21^{WAF-1/Cip-1} 的重组腺病毒 (Perkins, T.W. 等, Arch Ophthalmol. 120(7):941-9(2002))。简而言之，使用 Wills 等, Hum Gene Ther. 5(9):1079-88(1994) 描述的方法，将在组成型巨细胞病毒立即早期启动子 (CMV) 控制之下的 p21^{WAF-1/Cip-1} 编码区克隆入 E1/ 部分 E3 缺失的重组腺病毒中。以和 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 相似的方式构建 rAd- 空白对照腺病毒载体，例外之处是转基因没有被工程改造为表达盒。rAd-PDGF-B 是 E1/ 部分 E3 缺失、含克隆在 E1- 缺失位点的 CMV-PDGF-B 表达盒的腺病毒载体。PDGF-B cDNA 由人胎盘 cDNA 文库 (Clontech, Palo Alto, CA) 经 PCR 扩增，通过序列比对证实其与 Genbank 克隆 M12738100% 同源。将该 cDNA 克隆入含 CMV 启动子和 E1BpIXpoly-A 表达盒的腺病毒 E1 转移质粒中。利用 Chartier 等的方法在大肠杆菌菌株 BJ5183 中进行同源重组，产生感染性病毒 DNA，随后将其转染入人肾 293 细胞中，以

产生和增殖病毒 (Chartier, C. 等, J Virol, 70 (7) :4805-10 (1996))。病毒颗粒通过柱层析纯化 (Shabram, P. W. 等, Hum Gene Ther. 8 (4) :453-65 (1997)), 定量, 并以基于 FDA 指引 (Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy, Center for Biologics Evaluation and Research, March 1998) 的颗粒数 (PN) 给药。

[0090] 细胞。正常成人皮肤成纤维细胞得自 Cambrex Bio Science (Rutherford, NJ), 并保持在推荐的生长培养基中。用传代数 ≤ 4 的细胞进行实验。

[0091] 腺病毒感染和溴脱氧尿苷脉冲标记细胞。通过无牛血清白蛋白 (FBS) 的培养基中平板接种两天, 使细胞同步在 G0/G1 期, 随后用无 FBS 培养基中的各种剂量 ($1 \times 10^8 - 3 \times 10^9$ PN/ml) 的 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 或 rAd- 空白处理细胞。24 小时后, 去除培养基, 加入含 20% FBS 的培养基, 以使细胞解除 G0/G1 停滞。在解除后 24 小时, 用 $10 \mu\text{M}$ 溴脱氧尿苷 (BrdU; Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) 脉冲标记细胞 4 小时, 收集细胞, 通过固定在 70% 乙醇中, 接着用 0.08% 胃蛋白酶于 37°C 消化 30 分钟, 进行双变量 BrdU/DNA 流式细胞分析。以 1500RPM 离心细胞, 重悬浮在 2N HCl 中, 于 37°C 温育 20 分钟。加入 1M 硼酸钠, 以 IFA/Tween 20 (0.01M HEPES, 0.005% 叠氮化钠, 0.5% Tween 20, 5% FBS, 0.15M NaCl) 洗涤细胞, 并与无 Tween 20, 1:10 稀释的抗-BrdU 抗体 (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 温育 30 分钟。最后, 以 IFA/Tween 20 洗涤细胞, 在 IFA/Tween 20/RNA 酶中于 37°C 温育 15 分钟, 用碘化丙锭 ($50 \mu\text{g/ml}$) 染色, 通过 FACS can 型流式细胞仪 (Becton Dickinson), 使用 Cell Quest (Becton Dickinson) 软件, 用 FL-1 通道分析。

[0092] 酶联免疫吸附测定检测人 I 型前胶原蛋白 C-肽 (PIP)。将细胞平板接种在含 10% FBS 的完全培养基中, 生长至融合, 用无 FBS 培养基中的腺病毒构建物感染 24 小时。然后洗涤细胞, 在无 FBS 的培养基中培养 24 小时, 然后进行 PIP 分析。按照生产商的说明, 通过对具有 1×10^6 细胞的细胞裂解物进行 ELISA (TaKaRa Bio Inc., Japan), 评价 PIP 的检测。

[0093] 通过 FACS 检测 p21^{WAF-1/Cip-1}。于 4°C 将细胞在 75% 乙醇/PBS 中固定 30 分钟, 于 37°C 用 0.1% BSA/PBS 封闭非特异性抗体结合 30 分钟。将与 FITC (Ab-1, Oncogene, San Diego, CA) 缀合的 $2 \mu\text{g/ml}$ 抗-p21^{WAF-1/Cip-1} 抗体和细胞于室温温育 60 分钟。用 0.1% BSA 洗涤细胞, 重悬浮在 PBS 中, 通过 FACS 用 FL-1 通道分析。

[0094] PVA 海绵模型。按照国立卫生研究院 (NIH) 的实验动物照顾及使用指引 (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals), 进行动物照顾和实验, 并获得了适当审查委员会的批准。用氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉重 350-400g 的雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (Harlan, Indianapolis, IN), 在各个大鼠的腹部表面制造 6 个全层 5mm 直线切口。将单个无菌聚乙烯醇 (PVA) 海绵 (3 级; $12.7\text{mm} \times 3\text{mm}$; M-PACT, Eudora, KS) 皮下植入各个切口中, 用缝合夹密封。海绵植入后 4 天, 将配制在 $200 \mu\text{l}$ 胶原蛋白溶液 (Cohesion Technologies, Palo Alto, CA) 中的 1×10^9 PN rAd-PDGF-B 或 rAd- 空白或 $200 \mu\text{l}$ 载体对照注射入各个海绵的内部。首次注射后 3 天, 向各个海绵中注射配制在 $100 \mu\text{l}$ vPBS (PBS, 3% 蔗糖 (体积/体积)) 中的 1×10^9 、 1×10^{10} 或 5×10^{10} PN rAd-p21^{WAF1/Cip1}。在第 2 次注射后 5 天, 使动物安乐死, 收集各个海绵的中央部分, 固定在 4% 多聚甲醛中, 石蜡包埋, 制成 $6 \mu\text{m}$ 厚度切片。对于增殖指数研究, 在安乐死前 24 小时, 将 50mg/kg BrdU (Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA) 腹膜内注射入大鼠中。

[0095] 免疫组化。对于 p21^{WAF1/Cip1} 蛋白检测, 将 $6 \mu\text{m}$ 的 PVA 海绵石蜡切片浸入 -20°C 乙醇

/ 乙酸 (2 : 1) 中 10 分钟,接着在高 pH 缓冲液 (Dako, Carpinteria, CA) 中用蒸汽进行 20 分钟抗原修复。通过与 3% (体积 / 体积) H_2O_2 温育猝灭内源过氧化物酶。在 20% (体积 / 体积) 山羊血清中封闭载玻片,然后与小鼠单克隆抗人 p21^{WAF-1/Cip-1} (1 : 100, BD-PharMingen, San Diego, CA) 抗体温育 1 小时。在用 PBS 洗涤 (3×5 分钟) 后,将载玻片与生物素化山羊抗小鼠 IgG 二抗 (1 : 200, Zymed, San Francisco, CA) 温育 30 分钟。用 PBS 淋洗载玻片 (3×5 分钟),将载玻片与链霉抗生物素蛋白 / HRP 缀合物 (Dako) 温育 10 分钟,并用 AEC 显色原 (chromagen) / 底物 (Dako) 显色,接着进行苏木精复染。对于 BrdU 检测,使用来自 Zymed 的 BrdU 染色试剂盒和 Vectastain Elite ABC 试剂盒 (Vector Labs, Burlingame, CA) 的组合方案和试剂。简言之,将组织切片放置在唾液酸化的玻璃载玻片上,以 50% 功率微波加热 5 分钟。切片在预热的柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中蒸汽加热 20 分钟,淋洗,用 3% H_2O_2 (体积 / 体积) 猝灭内源过氧化物酶 10 分钟。接着实施 Zymed 试剂盒方案,包括与生物素化小鼠抗 BrdU 一抗温育。随后,载玻片用 PBS 淋洗,与 Vectastain Elite ABC 试剂温育 30 分钟,再淋洗,用 Vector Nova 红显色原 / 底物 (Vector Labs) 显色 5-15 分钟。对于 Ki67 检测,以最大功率微波加热在 10mM 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中的石蜡组织切片,用 PBS 洗涤 (3×5 分钟),用 20% (体积 / 体积) 山羊血清封闭 30 分钟。切片与小鼠抗人 Ki67 (1 : 100 ; PharMingen) 一抗温育 1 小时,用 PBS 淋洗 (3×5 分钟),与 1 : 200 稀释度的生物素化山羊抗小鼠 IgG (PharMingen) 反应 30 分钟。按照试剂盒说明书,使用二氨基联苯胺 (DAB ; Vector Labs) 显色检测 Ki67 阳性细胞,接着用苏木精复染。

[0096] 图象定量分析。为评价肉芽组织填充的程度,使用 Masson 三色染色法处理 PVA 海绵的组织学切片。用由 Nikon E600 显微镜和 4xPlan-Fluor 物镜 (Nikon USA, Melville, NY) 获取的已校准数码照片,使用 Image Pro PlusTM 软件 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) 进行计算机辅助定量分析。分析由以下组成:定量海绵内部的肉芽组织面积,用其除以内部整个海绵面积,乘以 100,得到肉芽组织填充百分率。样品数量由每个处理组平均 6 块海绵组成。对于体内增殖指数,用 40x 或 4x 显微镜物镜获取 BrdU 和 Ki67 免疫组化切片的数码影象,将其输入 Adobe Photoshop 5.0 软件 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA)。记录每个所观测视野的阳性细胞计数 (红色或褐色) 和总细胞计数 (紫色细胞核)。对于 BrdU,计数每个组的每个组织切片的 3 个 400X 视野 (最少 1500 个细胞)。对于 Ki67,评价每组的 3 个完整组织切片 (最少 13,000 个细胞 / 切片)。核染色的 BrdU 或 Ki67 被认为是阳性的,与染色强度无关。通过将红色或褐色细胞群计数除以红色或褐色 + 紫色细胞群计数,并乘以 100,计算增殖指数百分率。

[0097] 统计分析。标出的数据以算术平均值 $\pm$ SD 或 $\pm$ SEM 提供。使用不成对 student t- 检验 (StatView, SAS Institute Inc, Cary, NC) 对数据进行统计学分析。p $\leq$ 0.05 时差异被认为是显著的。

[0098] 结果

[0099] 人皮肤成纤维细胞表达外源 p21^{WAF-1/Cip-1} 蛋白,并响应 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 表现出细胞周期停滞

[0100] 用剂量逐渐增加的 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 或 rAd- 空白处理人初级皮肤成纤维细胞 48 小时,评价其中 p21^{WAF-1/Cip-1} 基因的表达。根据 FACS 分析测定,响应 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 而不是 rAd- 空白, p21^{WAF-1/Cip-1} 表达以剂量依赖性方式增加 (图 1A)。响应 1×10^8 PN/ml, p21^{WAF1/Cip1}

表达超过未处理细胞,由 4.1 ± 1.0 (未处理) 增加至 6.0 ± 0.2 ($p = 0.005$)。响应最高剂量 1×10^9 PN rAd-p21^{WAF1/Cip1}/ml,表达超过未处理细胞,由 4.1 ± 1.0 增加至 35.1 ± 1.5 ($p = 0.001$)。因此,p21^{WAF-1/Cip-1} 可以以剂量依赖性方式在初级皮肤成纤维细胞中有效表达。

[0101] 接着,我们进行体外剂量反应研究,以确定外源 p21^{WAF-1/Cip-1} 表达是否可在人皮肤成纤维细胞中诱发细胞周期停滞。根据 BrdU 掺入和 FACS 分析的检测,用 1×10^7 – 1×10^9 PN rAd-p21^{WAF1/Cip1}/ml 处理的细胞表现出细胞增殖的剂量依赖性降低(图 1B)。S-期细胞百分率由未处理细胞群中的平均 $64.4 \pm 5.7\%$,减少至响应 1×10^8 PN/ml rAd-p21^{WAF1/Cip1} 的 $20.6 \pm 2.6\%$ 。在 1×10^9 PN/ml 的最高 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 剂量下,观察到 S 期细胞百分率下降至仅检出 $0.6 \pm 0.1\%$ 的阳性细胞。用两个最高剂量的 rAd-空白观测到可检测的细胞周期抑制。具体地说,在 1×10^8 PN/ml rAd-空白时, $56.9 \pm 1.0\%$ 的细胞掺入 BrdU,而在 1×10^9 PN/ml 时, $34.4 \pm 10.7\%$ 的细胞掺入 BrdU。先前已描述了响应高剂量对照腺病毒的增殖减弱 (Brand, K. 等, Gene Ther. 6(6):1054–63(1999))。当将 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 和 rAd-空白于 1×10^8 PN/ml 和 1×10^9 PN/ml 对比时, BrdU 掺入显著下降 ($p < 0.05$)。这些数据提示,尽管高剂量的重组腺病毒处理诱发一般的抗增殖作用,但我们已证明,响应伤口靶细胞中的 rAd-p21^{WAF1/Cip1},增殖以 p21^{WAF1/Cip1} 特异性剂量依赖性降低。

[0102] 人皮肤成纤维细胞在 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 作用下降低 PIP 的产生

[0103] 为测定 PIP 肽在传递 p21^{WAF1/Cip1} 后是否减少,用剂量递增的 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 或 rAd-空白处理人成纤维细胞 48 小时(图 1C)。对细胞数相等的裂解物进行 ELISA,以定量胞内 PIP 水平。数据表明,和对照组相比,用 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理人皮肤成纤维细胞后,PIP 减少超过 1/2。和未处理细胞相比,最高浓度 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理 (3.0×10^9 PN/ml) 时检测到的 PIP 减少,分别为 165.1 ± 9.0 ng/ml 蛋白对 60.0 ± 6.3 ng/ml 蛋白。最高剂量的 rAd-空白处理显示为 170.2 ± 10.3 ng/ml 胞内 PIP,与未感染细胞没有变化。我们先前的研究已经表明,经 FACS 分析评价,在该检测系统中人皮肤成纤维细胞 100% 为转基因表达阳性(数据未列出)。利用 Annexin V 染色和 FACS 进行凋亡检测,以测定细胞存活力,数据表明,细胞未凋亡(数据未列出)。这些数据表明,在 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理后胞外相关肽减少。

[0104] 在体内 rAd-PDGF-B 刺激后 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 减少肉芽组织

[0105] 为确定 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 对体内肉芽组织的作用,使用大鼠 PVA 海绵模型 (Buckley, A. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(21):7340–4(1985))。用 1×10^9 PN/海绵的 rAd-PDGF-B 作为肉芽组织刺激剂注射到大鼠中的 PVA 海绵 (Liechty, K. W. 等, J Invest Dermatol, 113(3):375–83(1999)), 3 天后以 5.0×10^{10} PN/海绵给予 rAd-p21^{WAF1/Cip1} (图 2)。另以和 rAd-PDGF-B 以及 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 相同的剂量水平将 rAd-空白病毒传递至海绵,以用作重组腺病毒可对该模型系统产生的一般性作用的对照。根据在 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 传递后第 5 天通过三色染色 PVA 海绵进行的评价, rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理海绵中的肉芽组织在量和细胞密度上均有下降(图 3)。载体/载体(图 3)和 rAd-空白/rAd-空白组(未列出)具有与 rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理组(图 3)相似的肉芽组织形态。在 rAd-PDGF-B/载体处理组中观察到的肉芽组织填充最高(77%,图 3),这与公开的报道一致,这表明,刺激剂 PDGF-B 在该模型中增强生长反应 (Liechty, K. W. 等, J Invest Dermatol, 113(3):375–83(1999))。我们观测到的肉芽组织填充在 rAd-PDGF-B/rAd-空白组中为 53%,在 rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 组中为 28%,在载体/载体组中为 24%,在 rAd-空白/rAd-空

白组中为 18% (图 3)。和 rAd-PDGF-B/载体和 rAd-PDGF-B/rAd-空白处理相比, rAd-PDGF-B 后接 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理分别诱导肉芽组织填充降低至 1/2.7 和 1/1.9 ($p < 0.001$ 和 $p = 0.05$)。相比之下, 在载体/载体、rAd-空白/rAd-空白和 rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理组之间未观测到显著差异 ($p > 0.3$)。载体/载体、rAd-PDGF-B/载体和 rAd-PDGF-B/rAd-空白处理组相互之间均有显著差异 (分别为 $p < 0.001$ 和 $p = 0.01$)。在另一个研究中, 用 1×10^9 – 5×10^{10} PN/ml 的 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 进行剂量反应 (表 1)。与 rAd-PDGF-B/载体处理的最大填充相比, 肉芽含量在 1×10^9 PN/ml 时下降 23%, 在 1.0×10^{10} PN/ml 时下降 37%, 在 5×10^{10} PN/ml 时下降 47%。这些数据表明, 在 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理后肉芽组织定量和定性地减少。

[0106]

表 1. 在 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理后 PVA 海绵中肉芽组织填充的剂量反应性下降百分率。

	处理组			
	rAd-PDGF-B	rAd-PDGF-B	rAd-PDGF-B	rAd-PDGF-B
第 1 次注射				
第 2 次注射	vPBS	rAd-p21 ^{WAF1/Cip1}	rAd-p21 ^{WAF1/Cip1}	rAd-p21 ^{WAF1/Cip1}
		(1×10^9)	(1×10^{10})	(5×10^{10})
肉芽面积 ^a (填充百分率)	100%	77%	63%	54%

通过计算机辅助图象分析, 分析三色染色的 PVA 海绵切片的海绵中肉芽组织面积。以肉芽组织面积/分析总面积 $\times 100$ 计算填充百分率。注射时间表参见图 2。所有的 rAd-PDGF 处理都以 1×10^9 PN/海绵给予。每个处理组代表 6 块单个海绵的平均值, 每组最少进行 22 次检测。数据代表两个独立实验。

^a 归一化为最大填充处理的百分率(77%, rAd-PDGF-B/vPBS 处理)。

[0107] 体内的 p21^{WAF1/Cip1} 蛋白表达

[0108] 为验证体内转导以及关联 p21^{WAF1/Cip1} 表达和肉芽组织减少, 我们使用抗人 p21^{WAF1/Cip1} 特异性抗体鉴别大鼠 PVA 海绵模型中表达 p21^{WAF1/Cip1} 的细胞。用 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理后 5 天, 定位肉芽组织细胞中的 p21^{WAF1/Cip1} 蛋白, 肉芽组织细胞在形态学上类似于炎性细胞 (图 5C, 小箭头) 和成纤维样细胞。我们在载体/载体或 rAd-PDGF-B/载体处理组中均未观测到 p21^{WAF1/Cip1} 阳性染色的细胞。尽管主要的 p21^{WAF1/Cip1} 表达细胞群在给予 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 后 5 天表现出强烈染色, 但我们目前还没有在该模型中确定 p21^{WAF1/Cip1} 蛋白表达的峰反应和时程。然而, 在兔青光眼滤过手术模型中, 经 RT-PCR 评测, rAd-p21^{WAF1/Cip1} 表达在 1 周内达到峰值, 并持续 30 天以上 (Perkins, T. W. 等, Arch Ophthalmol 120(7): 941-9 (2002))。这些数据支持肉芽组织减少和体内 p21^{WAF1/Cip1} 表达之间的关联。

[0109] 在体内 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理后增殖指数下降

[0110] 为确定 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 传递后肉芽组织的增殖状态,对 PVA 海绵组织进行 BrdU 和 Ki67 免疫组化染色。图 4 提供了载体 / 载体组、rAd-PDGF-B / 载体组、rAd-PDGF-B / rAd- 空白组和 rAd-PDGF-B / rAd-p21^{WAF1/Cip1} 组中的 BrdU 和 Ki67 阳性细胞百分率。在 rAd-PDGF-B / 载体组和 rAd-PDGF-B / rAd- 空白组中观测到的 BrdU 染色最高 (分别为 25% 和 24%), 这表明 rAd-PDGF-B 促进组织增殖,还提示 rAd- 空白处理对体内增殖状态的影响最小。在 rAd-PDGF-B / rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理组中鉴别出的 BrdU 染色细胞百分率最低 (9%)。和 rAd-PDGF-B / 载体和 rAd-PDGF-B / rAd- 空白相比, rAd-PDGF-B / rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理组中的 BrdU 掺入明显较低 (两个对比均为 $p < 0.01$)。另外,载体 / 载体处理组的 BrdU 阳性细胞数比 rAd-PDGF-B / rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理组高出 1 倍 (分别为 18% 对 9%)。

[0111] 尽管 BrdU 掺入需要 S 期启动,但 Ki67 或 Mib1 抗原在 G₀ 期以外的所有细胞周期阶段都表达 (Barnard, N. J. 等, J Pathol, 152(4) :287-95(1987))。Ki67 染色分析显示出与 BrdU 染色相似的阳性细胞百分率 (图 4B)。载体 / 载体处理组和 rAd-PDGF-B / 载体处理组的增殖指数分别为 22% 和 34%。相比之下, rAd-PDGF-B / rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理组表现出的增殖细胞百分率 (11%) 明显比 rAd-PDGF-B / 载体和载体 / 载体处理组低 (全部对比都为 $p < 0.001$)。这些数据表明, rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理通过降低细胞增殖减少体内肉芽组织。

[0112] 总结

[0113] 增生性瘢痕和瘢痕疙瘩的病因还未知晓,但似乎由正常伤口愈合反应中的失调引起。正常伤口愈合由于纤维增生反应而演进,发展成纤维化瘢痕。重要之处在于,即使是在最佳情况下,受伤部位也是“修补”而不是“复原”,形式和功能都受到与组织再生相对的负责替换的机制影响。正常伤口愈合的级联由 3 个时间上重叠的反应组成,包括炎症、增殖和重建阶段。在所有阶段中,在涉及生长促进因子和负责下调增殖反应的因子的分解代谢和合成代谢过程之间存在着平衡。尽管在阐述参与刺激伤口愈合的因素方面已获得显著进展,但关于分子过程 (包括涉及正常伤口愈合反应的细胞周期调节和程序性细胞死亡) 的进展则少得多。本文提供的数据强调了细胞周期调节对涉及伤口修复和瘢痕形成的过程所具有的重要作用。

[0114] 我们的研究表明,经重组腺病毒传递的 p21^{WAF-1/Cip-1} 在人初级皮肤成纤维细胞中可有效抑制人初级皮肤成纤维细胞的细胞周期。我们表明,经体外 BrdU 染色证实, p21^{WAF-1/Cip-1} 蛋白表达的剂量依赖性增加与增殖状态的剂量依赖性下降有关联。用最高剂量的对照腺病毒处理观测到可检测的抗增殖作用,但碘化丙锭染色揭示,这些细胞在 G2/M 而不是 G1 期累积,这和用 rAd-p21^{WAF-1/Cip-1} 处理的细胞的情况一样 (数据未列出)。先前已描述了用单独的高剂量重组腺病毒载体转导使细胞增殖降低的观测结果,几个报道了含报告基因的高剂量重组腺病毒的抗肿瘤作用 (Erhardt, J. A. 和 R. N. Pittman, Oncogene, 16(4) : 443-51(1998) ;Pierce, G. F. 等, J Exp Med. 167(3) :974-87(1988) ;Teramoto, S. 等, Hum Gene Ther. 6(8) :1045-53(1995))。在人皮肤初级成纤维细胞中,细胞 p21^{WAF-1/Cip-1} 蛋白水平增加与增殖反应下降相互关联。

[0115] 胞外基质 (即胶原蛋白) 的过量累积和结构破坏是瘢痕疙瘩和增生性瘢痕的特征 (Rockwell, W. B. 等, Plast Reconstr Surg, 84(5) :827-37(1989))。已有报道指两种化疗剂丝裂霉素 C 和阿霉素以包括 ECM 和细胞毒性降低的作用机制抑制伤口愈合反应 (Saika, S. 等, Ophthalmic Res. 29(2) :91-102(1997))。我们的研究表明,皮肤初级成纤维细胞中的

p21^{WAF-1/Cip-1} 水平升高降低了体外 PIP 水平。令人感兴趣的是, PIP 水平被减弱但未被消除, 这提示在活细胞群中保持了基础水平的 PIP 生产。相比之下, 尽管丝裂霉素 C 和阿霉素减少了 PIP 分泌, 但观察到细胞存活的剂量依赖性下降, 这有可能是在伤口愈合动物模型中观察到的伤口开裂的成因 (Saika, S. 等, *Ophthalmic Res.* 29(2) :91-102(1997))。此外, PIP 水平未受 rAd- 空白处理的影响, 提示 PIP 降低是 p21^{WAF-1/Cip-1} 特异性的。转导的细胞是转录活性的 (数据未列出), 这表明 PIP 降低不是细胞中一般转录阻抑的结果。我们推测, 由于外源表达 p21^{WAF-1/Cip-1} 而引起的胞外基质生产减少对体内肉芽组织产生有弱化作用。

[0116] 不存在精确模拟人瘢痕疙瘩和增生性瘢痕的生化参数和病理生理学参数的动物模型。在本报道中, 我们使用一种动物模型系统来研究 p21^{WAF-1/Cip-1} 升高对体内肉芽组织的作用。肉芽组织由成纤维细胞、新微血管、炎性细胞和胞外基质组成, 是伤口修复的必要和必需元件。肉芽组织的正常时空形成的破坏被认为在增生性瘢痕和瘢痕疙瘩中起病因作用。PDGF-BB 是肉芽组织形成的有效刺激剂, 最近的报道已证明了其在伤口损伤模型中的有效促伤口愈合作用 (Liechty, K. W. 等, *J Invest Dermatol* 113(3) :375-83(1999) ;Pierce, G. F. 等, *J Exp Med.* 167(3) :974-87(1988) ;Pierce, G. F. 等, *J Cell Biochem.* 45(4) :319-26(1991) ;Doukas, J. 等, *Hum Gene Ther.* 12(7) :783-98(2001))。令人感兴趣的是, 将 PDGF-BB 加入到无瘢痕胎儿模型中引起伤口纤维化, PDGF-BB 的水平升高与肝硬化有关联 (Haynes, J. H. 等, *J Pediatr Surg.* 29(11) :1405-8(1994) ;Peterson, T. C. 和 R. A. Isbrucker, *Hepatology* 15(2) :191-7(1992))。我们使用 rAd-PDGF-B 增强细胞流入、增殖和肉芽组织沉积, 接着在大鼠 PVA 海绵模型中进行 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理, 以确定 rAd-p21^{WAF-1/Cip-1} 是否可弱化体内的这些刺激作用。

[0117] 我们的结果表明, 与单独的 rAd-PDGF-B 处理相比, rAd-p21^{WAF1/Cip1} 定性和定量地减少肉芽填充。rAd- 空白处理后的肉芽填充减少与我们的体外结果一致, 在作用上比 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理逊色。最初, 我们假定单独的 rAd- 空白处理可通过已由文件证明的 rAd 传递载体对宿主的免疫调节作用干扰肉芽组织的数量 (Nielsen, L. L., *Oncol Rep* 7 :151-5(2000) ;Kajiwara, K. 等, *Hum Gene Ther.*, 8(3) :253-65(1997) ;St George, J. A. 等, *Gene Ther.*, 3(2) :103-16(1996) ;Brody, S. L. 等, *Hum Gene Ther.*, 5(7) :821-36 页(1994))。我们重复地发现, PDGF-BB 和 p21^{WAF-1/Cip-1} 的刺激和抑制作用分别调节肉芽组织活性, 超过了源自重组腺病毒的反应。此观察结果的关键之处在于我们证明了体内肉芽组织的 p21^{WAF1/Cip1} 剂量依赖性减少, 这进一步支持了在该模型系统中的基因特异性活性。

[0118] 我们能够证明 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 处理的海绵中人 p21^{WAF-1/Cip-1} 蛋白的表达, 因此将人 p21^{WAF-1/Cip-1} 和肉芽组织减少联系在一起。我们还通过两个独立实验表明 p21^{WAF-1/Cip-1} 处理的海绵中增殖减少, 这支持 p21^{WAF-1/Cip-1} 在体内的直接抗增殖作用。在这些研究中没有确定细胞特异性蛋白表达, 但在形态学上, 我们的结果提示巨噬细胞和成纤维细胞均可表达外源 p21^{WAF1-1/Cip-1} 蛋白。

[0119] 皮肤是机体最大的器官, 其以有限的系统暴露提供局部区域传递, 易到达并可非侵入性检查。病毒和非病毒途径均已证实基因转移 (Khavari P. A. 等, *J Intern Med.* 252(1) :1-10(2002))。我们在本文提供了以下证据 :经重组腺病毒传递的外源表达的细胞周期调节剂 p21^{WAF-1/Cip-1} 减弱与过多瘢痕形成相关的增殖反应。使用合适的设计和应用方案, p21^{WAF-1/Cip-1} 在皮肤病 (例如其中病理生理学源自增殖反应失调的瘢痕疙瘩和增生性瘢

痕)中具有处理用途。

[0120] 实施例 2

[0121] 本实施例阐述了伤口中的 rAd-p21 传递和 p21^{WAF-1/Cip-1} 表达。

[0122] 如下在单次皮内注射后的兔耳过多瘢痕模型中表征 rAd-p21 基因传递和随时间的表达：

[0123]

组别	处理 (皮内剂量)	终点分析	分析时间点
1	vPBS	PCR、RT-PCR、形态学	第 8 小时 ; 第 1、3、5、7、10 和 14 天
2	rAd- 空白 (2×10^{10} PN/ 伤口)	形态学	第 1、3 和 10 天
3	rAd-p21 (2×10^6 PN/ 伤口)	PCR、RT-PCR、形态学	第 8 小时 ; 第 1、3、5、7、10 和 14 天
4	rAd-p21 (2×10^{10} PN/ 伤口)	PCR、RT-PCR、形态学	第 8 小时 ; 第 1、3、5、7、10 和 14 天

[0124] 方法：

[0125] 对每只兔耳诱生 2-4 个 6mm 直径的伤口。待分析的样品数量由每个处理组 3-8 个伤口组成。将两只耳相同受伤部位的两个伤口合并,并放在单个试管中,以满足 RT-PCR 和 PCR 实验的组织要求。该试管代表两个伤口的平均值和一个检测样品。对于 PCR 和 RT-PCR 实验,在第 8 小时、第 1、3、5、7 和 10 天的收集时间点进行,N = 1 或 4 代表总共 2 或 8 个伤口。对于第 14 天,将一个伤口放在单个试管中作为一个样品,因此 N = 1 或 4 代表每组共 1 或 4 个伤口。对于形态学评价,一个伤口代表 1 个样品,每组评价 2-4 个样品。

[0126] vPBS 处理组同时用作 PCR/RT-PCR 实验和形态学评价的载体对照。rAd- 空白处理在本研究中用作腺病毒作用的对照。

[0127] 检测试剂制备 :rAd-p21 和 rAd- 空白 :在研究的第 0 天用 vPBS 稀释液稀释病毒母液,并保持在冰上。在皮内注射入动物前半小时,将稀释的病毒升至室温。

[0128] 兔准备 :肌肉注射 70mg/kg 氯胺酮、5mg/kg 甲苯噻嗪和 0.1mg/kg 布托啡诺,麻醉雌性新西兰白兔。用脱毛器 (Nair™) 脱耳毛,用温自来水淋洗耳,用聚维酮碘和异丙醇擦洗手术部位。将动物由预手术室转移至手术室。

[0129] 手术方法和处理 :在无菌条件下,用环钻在每只耳的腹面上制造 2-4 个深达软骨的 6mm 伤口。用止血钳去除每个伤口的软骨和上皮。用 **Mastisol®** 准备伤口周边部位,用 **OpSite®** 绷带覆盖伤口,以防止干燥。在研究过程中绷带保留在伤口上。用 28G^{1/2} 胰岛素注射器,在每个伤口周边部位周围皮内注射 2×10^6 或 2×10^{10} PN/ 伤口的 rAd-p21,总体积为 100 μ l/ 伤口。伤口上的注射部位在 3、6、9 和 12 点位置,并在伤口周边部位的 2-3mm 内。对组 1、3 和 4 的所有兔的两只耳重复以上步骤。对 rAd- 空白处理组,在第 1、3、10 天的时间点使每只兔的一只耳受伤。使动物返回笼中,允许随意进食和饮水。

[0130] 终点分析：在规定的处死时间点，用过量的 Euthasol CIII 200mg/kg 静脉内麻醉动物，在底部切除兔耳。用 10mm 活组织检查穿孔器切除全层伤口，并放置在含 250 μ l QIAGEN RNeasyTM (RNA 稳定试剂) 的微量离心管中。所有组织都浸入 RNA 稳定试剂中，并储存在 4℃，用于 PCR 和 RT-PCR 分析。在第 14 天的时间点，所有的步骤都和上述相同，除了将来自相同耳伤口部位的一个伤口放置在微量离心管中代表一个样品以外。对于形态学评价，将伤口切开两半，一半伤口冷冻在 OCT 化合物 (Optimum Cryosection TemperatureCompound) 中，剩余的一半于 4℃ 在 4% 多聚甲醛中固定 4 小时，转移至 70% EtOH 中，进行三色染色处理。对伤口组织切片进行炎性和伤口愈合反应的形态学检查。

[0131] 定量 PCR/ 定量 RT-PCR 和标准曲线的制备：如先前 Wen. 等, ExpEye Res. 77 (3) : 355-65 (2003) 的描述，使用定量 PCR 和 RT-PCR (QPCR 和 QRT-PCR) 方法定量 rAd-p21DNA 和转基因的表达。使用 Tri-Reagent[®] 由约 50-100mg 组织中共提取 DNA 和 RNA。

[0132] 结果：

[0133] 在兔耳过多瘢痕模型中，在受伤后立即传递单次皮内剂量，以此表征随时间变化的 rAd-p21 传递和人 p21^{WAF-1/Cip-1} 基因表达。实施 QPCR 和 QRT-PCR 技术，以定量伤口部位中的 rAd-p21DNA 和人 p21^{WAF-1/Cip-1} 基因表达。

[0134] QPCR 和 QRT-PCR 评价通过皮内单剂注射至兔耳伤口，以 2×10^6 或 2×10^{10} PN/ 伤口传递 rAd-p21。每个 rAd-p21 分析样品为每个伤口 2×10^6 或 2×10^{10} PN 的两个伤口的合并，因此总共分别为 4×10^6 或 4×10^{10} PN。在第 14 天，每个样品仅为一个伤口。

[0135] 在第 8 小时和第 1 天，由低和高 rAd-p21 剂量组都观测到最高的 rAd-p21DNA 水平。在低和高剂量 rAd-p21 组，在 14 天的周期内，DNA 水平分别下降 1.0 和 3.0 个对数。在高剂量组，在皮内注射后 3 天观测到最高的 rAd-p21RNA 水平。和第 3 天的峰值水平相比，第 7、10 和 14 天的 RNA 水平下降约 0.5-1.0 个对数。在处理 8 小时和第 1 天，在低剂量 rAd-p21 组未能检测到 RNA 水平（在可定量水平以下；BQL）。在第 3 天观测到在低剂量 rAd-p21 组出现可检测的 RNA 表达。在第 3 天和第 14 天观测到峰值 RNA 水平，低剂量组中第 3 天和第 14 天的 RNA 水平无显著差异 ($p < 0.5$; Fisher's Post HocANOVA)。在低剂量 rAd-p21 组，与第 3 天和第 14 天的 RNA 水平相比，第 5、7 和 10 天的 RNA 水平降低约 0.5-1.0 个对数。正如所料，所有的 vPBS 样品都是阴性的，证实样品没有交叉污染，或人 p21 引物序列和内源兔序列没有交叉反应性。低剂量时随时间变化的此 RNA 表达模式表现出和高剂量 rAd-p21 组相似的表达趋势。

[0136] 形态学评价：兔伤口的形态学变化发生在典型的急性伤口愈合过程阶段之后。简而言之，在受伤后 8 小时，观察到伤口中的炎性细胞浸润。在第 1 天和第 3 天，所有伤口中的炎性细胞流入都增加。至第 5 天，肉芽组织开始填充伤口，在伤口边缘附近观察到上皮迁移突起 (tongue)。在第 7、10 和 14 天，伤口被肉芽组织填满，并被上皮覆盖。在第 10 天和第 14 天，与其余组相比，在低 rAd-p21 剂量处理组中观察到较薄的肉芽组织和上皮层。但是，在第 14 天，低剂量 rAd-p21 组显示出比高剂量组更密集的细胞结构。此数据提示，rAd-p21 可减小伤口瘢痕的肉芽组织体积和上皮厚度。

[0137] 讨论：

[0138] 在高和低剂量 rAd-p21 处理组，在兔耳伤口中均检测到 rAd-p21DNA 传递和 p21^{WAF-1/Cip-1} RNA 表达。高和低剂量组中 p21^{WAF-1/Cip-1} RNA 水平在 14 天的周期内都得到保持。

[0139] 实施例 3

[0140] 本实施例阐述了 rAd-p21 处理抑制瘢痕厚度。

[0141] 使用过多瘢痕兔模型测定 rAd-p21 处理对瘢痕厚度的作用。如前所述, 通过将 PDGF-BB (2 μ g) 蛋白注射入兔耳伤口诱发增强的瘢痕形成。7 天后第 2 次注射 2×10^{10} PN 的 rAd-p21 或 rAd- 空白。检测响应处理的瘢痕高度, 在 rAd-p21 处理后约 11 天观测到的作用最大。在第 18 天和第 35 天 (初始受伤后) 之间检测瘢痕组织, 在初次注射 PDGF-BB 后第 35 天收集组织。

[0142] 图 5 表明, 在兔耳过多瘢痕模型中, rAd-p21 处理在皮内传递后减小了瘢痕厚度。此数据支持先前的观察结果: 在正常瘢痕环境下, 低剂量的 rAd-p21 (例如 2×10^6 PN/ 伤口 (7×10^6 PN/cm²)) 在该模型中有效降低瘢痕高度。当使用 PDGF-BB 诱发增强的瘢痕形成时, 需要更多的 rAd-p21 来克服这些瘢痕作用。

[0143] 在本说明书中引用的所有出版物和专利申请都通过引用结合到本文中, 如同各单独的出版物或专利申请被明确和个别指出通过引用结合到本文中。

[0144] 尽管为了清楚理解的目的, 已通过说明和实施例的方式详细地描述了前述发明, 但本领域普通技术人员容易理解, 按照本发明的教导, 可对本发明进行某些变化和修改, 而不偏离所附权利要求书的精神或范围。

图 1A

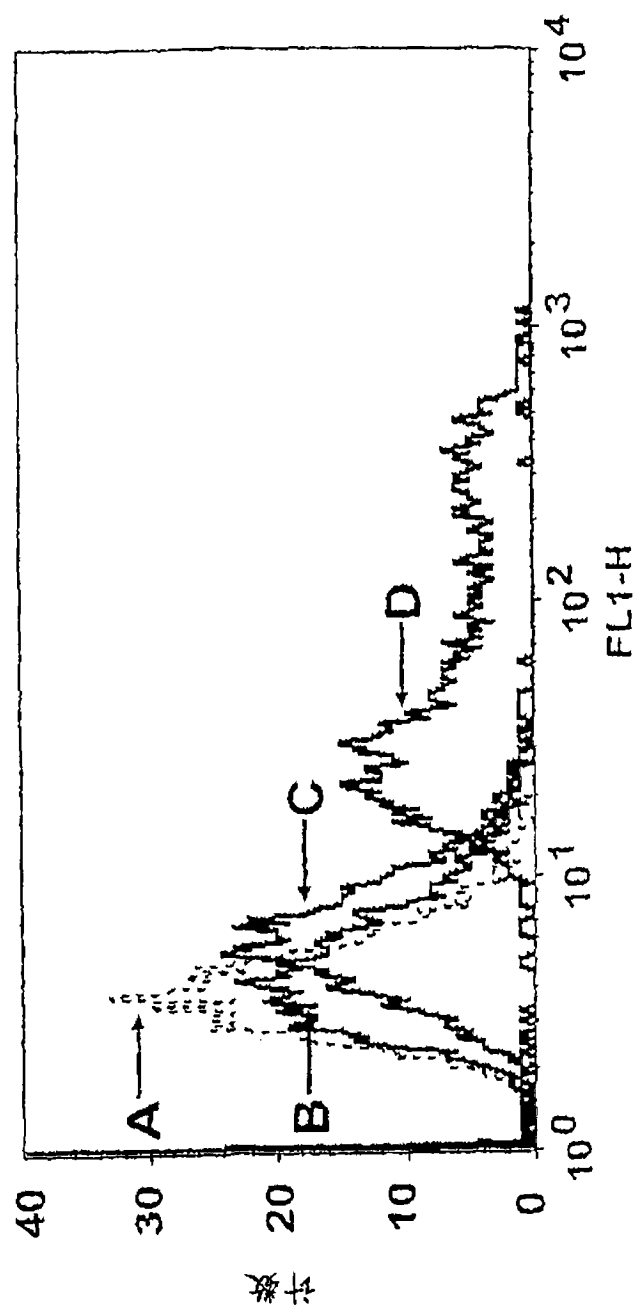
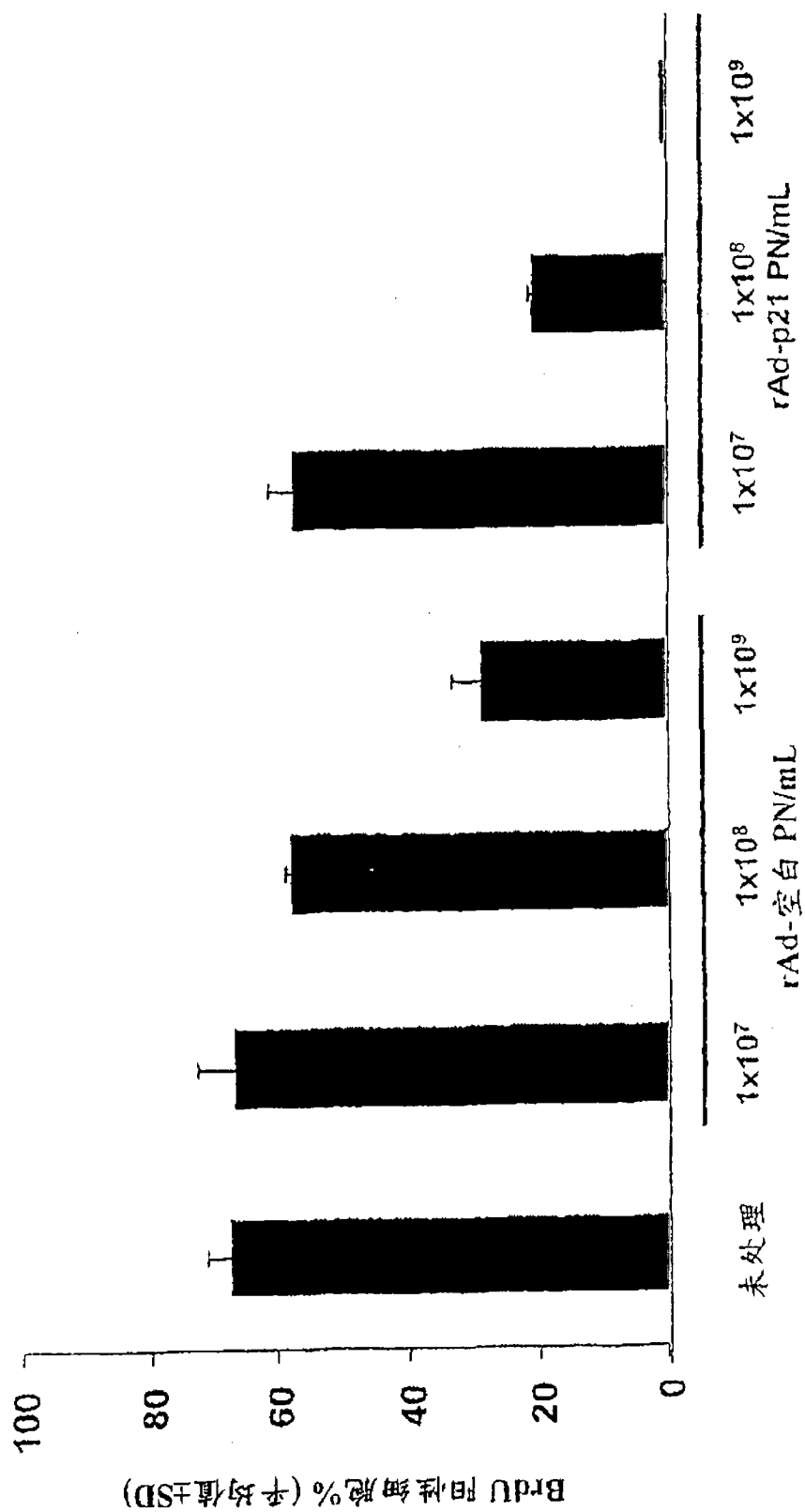


图 1B



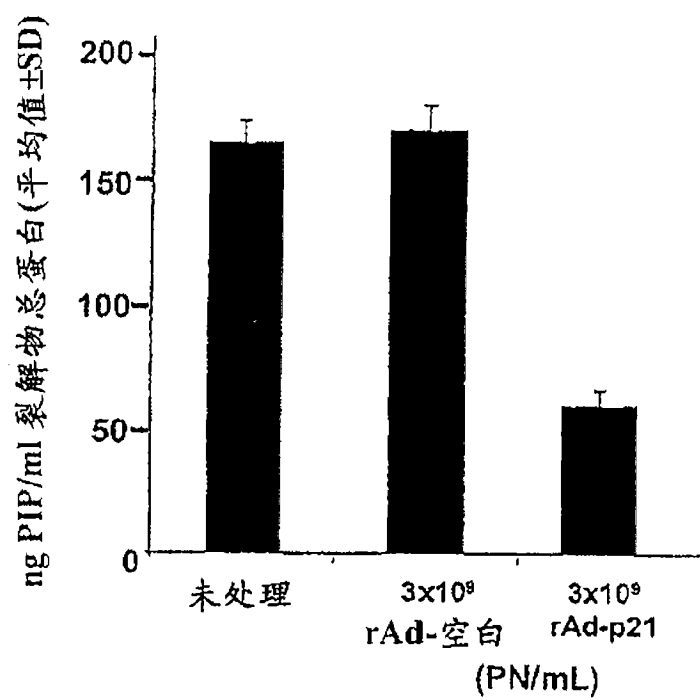


图 1C

图 2

大鼠 PVA 海绵模型注射方案

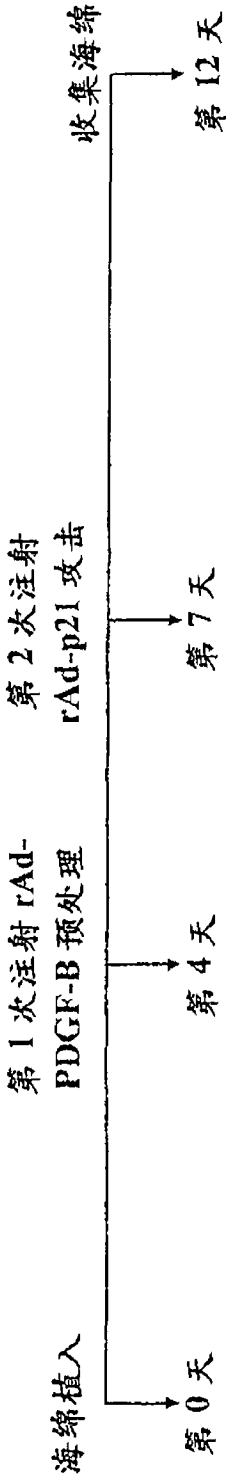


图 3

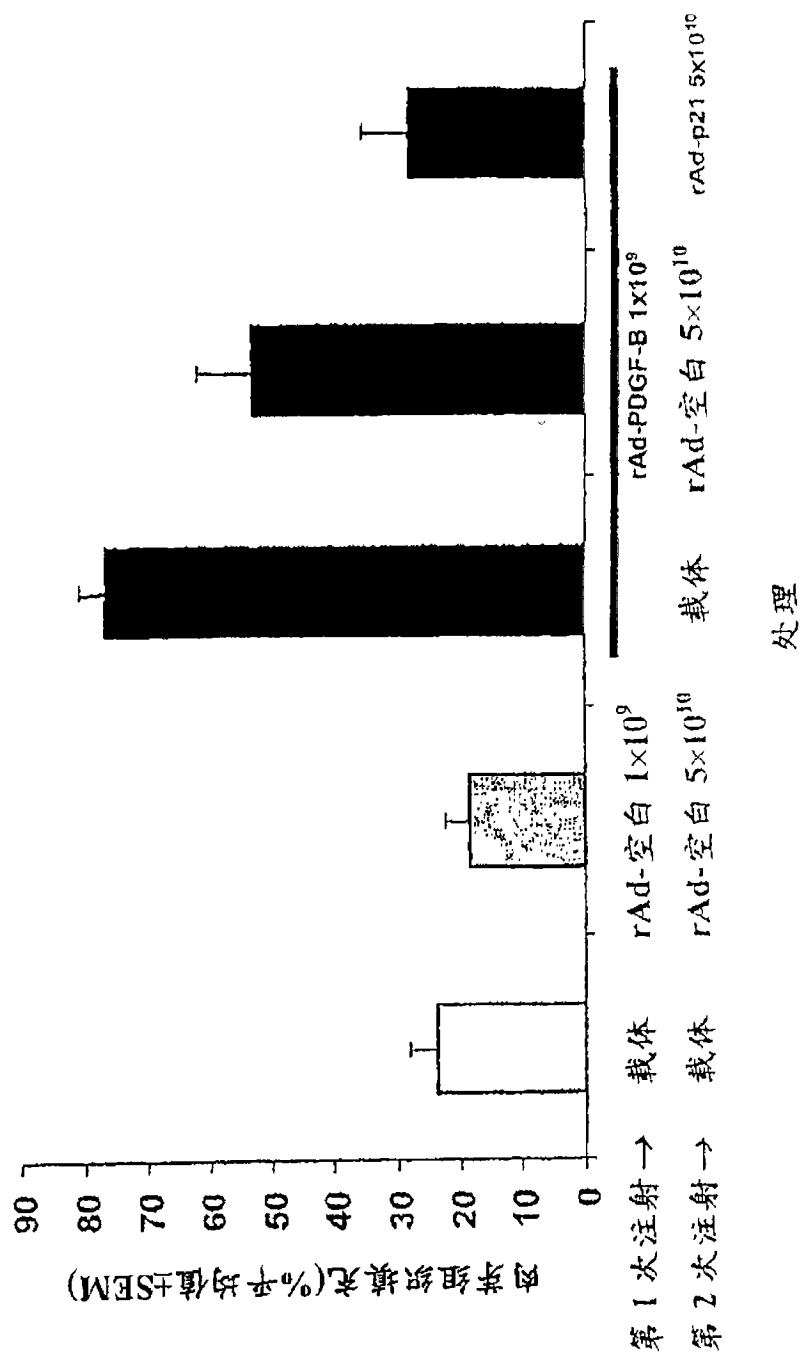


图 4B

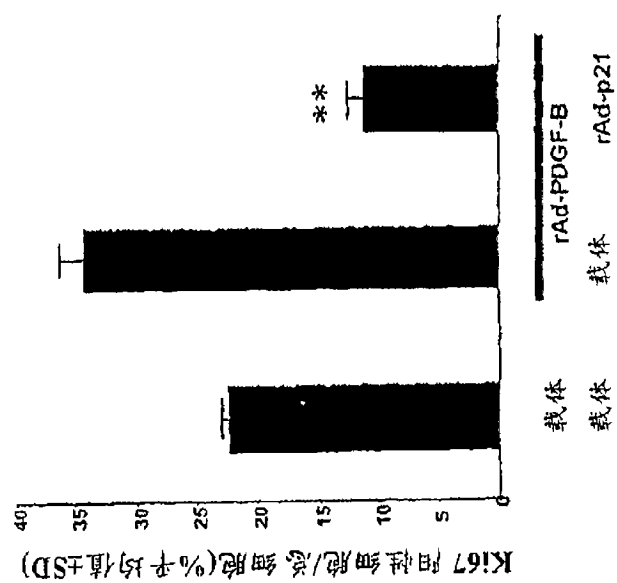
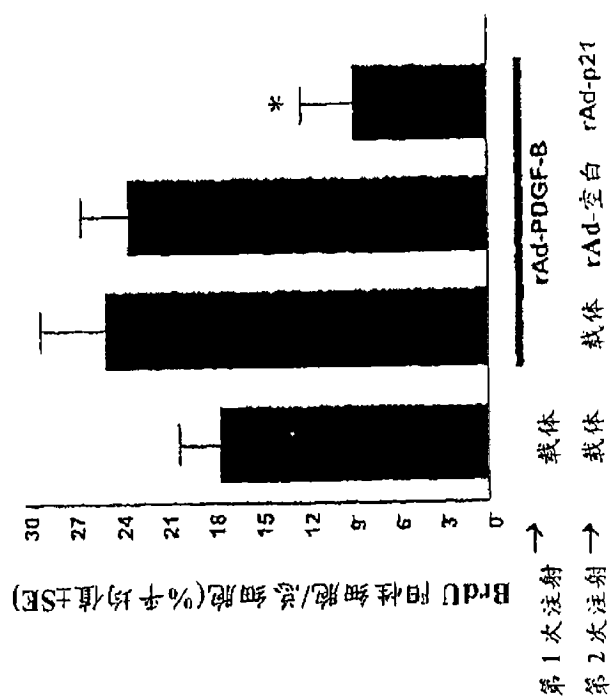


图 4A



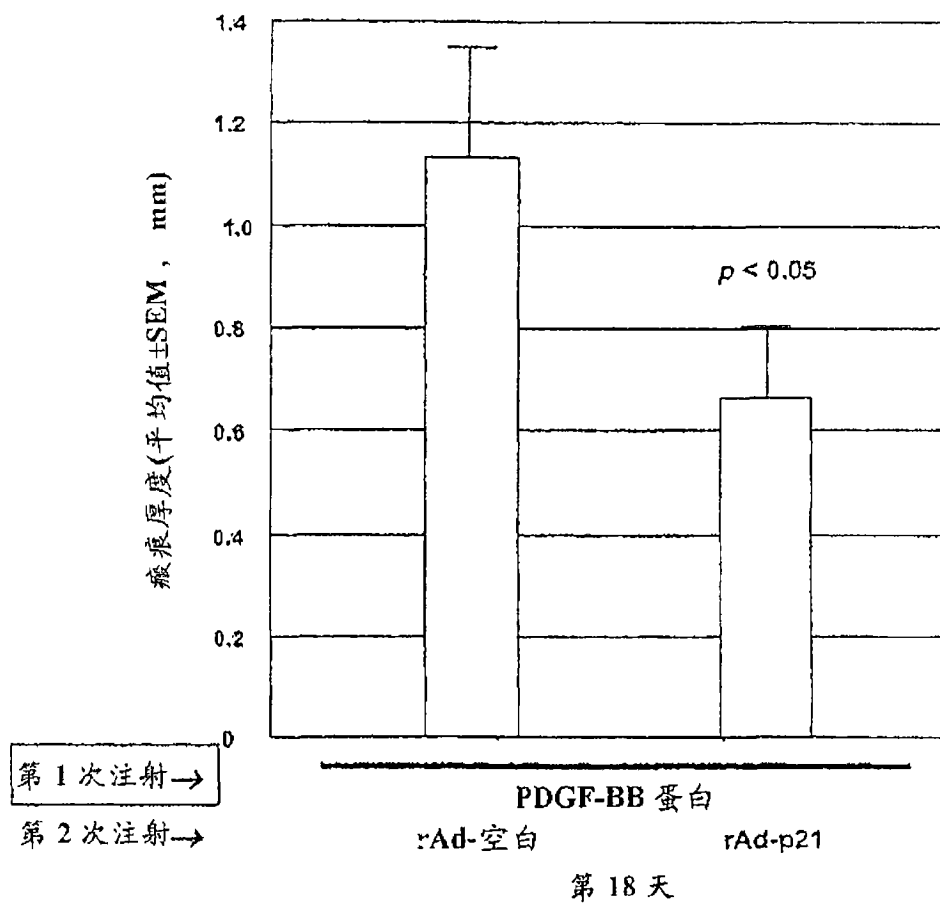


图 5