[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
C12N 15/85
A61K 48/00 C12N 15/86

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95195134.3

[43]公开日 1997 年 8 月 27 日

[11] 公开号 CN 1158144A

[22]申请日 95.8.25

[30]优先权

[32]94.8.26 [33]GB[31]9417366.3

[32]95.3.29 [33]GB[31]9506466.3

[86]国际申请 PCT/EP95/03370 95.8.25

[87]国际公布 WO96/06940 德 96.3.7

[85]进入国家阶段日期 97.3.18

[71]申请人 赫彻斯特股份公司

地址 联邦德国法兰克福

[72]发明人 H·H·塞德拉斯克 K·伯斯莱特 R·穆勒

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 李 瑛

权利要求书 4 页 说明书 23 页 附图页数 7 页

[54]发明名称 利用内皮细胞特异性的、细胞周期依赖性的活性化合物对肿瘤进行基因治疗

[57]摘要

本发明描述了用于肿瘤的基因治疗的 DNA 序列，所述 DNA 的基本组成元件包括激活物序列、启动子组件和编码活性物质的基因。

所述激活物序列在增生的内皮细胞或在与所述细胞邻接的细胞中以细胞特异性的方式被激活。

该激活过程以细胞周期特异性方式受启动子组件的调节。所述活性物质是血管生成的抑制剂或细胞生长抑制分子或细胞毒性分子。所述 DNA 序列插入到病毒或非病毒载体中，所述载体已增加了与激活的内皮细胞具有亲和力的配体。

权 利 要 求 书

1. 一种预防或治疗肿瘤疾病的活性化合物，含有由激活物序列、启动子组件和编码抗肿瘤物质之 DNA 序列组成的 DNA 构建体。

2. 如权利要求 1 所述的活性化合物，其中的启动子组件具有元件 CDE－CHR－Inr，并含有 cdc25C 启动子区的位置≤－20 至≥＋30 部分（核苷酸序列 GGCTGGCGGAAGGTTTGAATGGTCAACGCCTGCGGCTGTTGATATTCTTG）、CDE 表示细胞周期依赖性元件的序列 2（核苷酸序列 TGGCGG）、CHR 表示细胞周期基因同源区（核苷酸序列 GTTTGAA）和 Inr 表示起始位点（位置＋1）的序列 3 以及对于抑制作用很重要的邻近序列。

3. 如权利要求 1 所述活性化合物，其含有受转录因子调节的激活物序列（启动子序列或增强子序列），所述转录因子在内皮细胞或在与增生的内此细胞紧邻的细胞中形成。

4. 如权利要求 3 所述活性化合物，含有 CMV 启动子、CMV 增强子或 SV40 启动子，或下列因子的启动子序列：内皮细胞葡萄糖－1 运输因子，endogolin, VEGF 受体 1 或 2、受体酪氨酸激酶 til-1 或 til-2、B61 受体、B61 配体、内皮缩血管肽，尤其是内皮缩血管肽 B 或 1、甘露糖－6－磷酸受体、IL－1α 或 IL－1β、IL－1 受体、VCAM－1 或 von Willebrand 因子，或

合成的激活物序列，其由寡聚的转录因子结合位点组成，例如结合位点为 5'－TTATCT－3'的 GATA－2，在内皮细胞内具有优先的或选择活性，或

VEGF 启动子序列或 VEGF 的增强子序列，或 c-SRC 或 v-SRC 的 cDNA 序列，能够调控 VEGF 基因，或

小鼠乳腺肿瘤病毒的启动子序列，或甾族化合物受体的启动子序列。

5. 如权利要求 1－4 所述的活性化合物，其中抗肿瘤物活性化合物的 DNA 序列编码：

成视网膜细胞瘤蛋白 p110 或 p107 和 p130 蛋白，或

p53 蛋白，或

p21 蛋白、p16 蛋白或其它细胞周期蛋白依赖性激酶（cdK）抑制剂，或

GADD45 蛋白，或

bak 蛋白，或

抑制血管生成的蛋白，或

具有细胞生长抑制作用的蛋白，或

刺激炎症形成的蛋白，或

裂解细胞生长抑制剂前体从而形成细胞生长抑制剂的酶。

6. 如权利要求 5 所述化合物，

其中的成视网膜细胞瘤蛋白（pRb/p110）通过在 246、350、601、605、780、786、787、800 和 804 位上进行不丧失与主要 T 抗原结合活性的氨基酸取代而使之不再磷酸化，例如，用 Ala 取代 Thr-246、Ser-601、Ser-605、Ser-780、Ser-786、Ser-787 和 Ser-800，用 Arg 取代 Thr-350，用 Glu 取代 Ser-804，或

其中的 p107 蛋白以类似于 pRb/110 的方式突变，或

其中的 p130 蛋白以类似于 pRb/110 的方式突变。

7. 如权利要求 5 所述活性化合物，其中的 p53 蛋白通过去除 Ser-392 而在 C 端截平。

8. 如权利要求 1 - 4 的活性化合物，其中的抗肿瘤物质是纤溶酶原激活物抑制剂（PAI - 1）、PAI - 2、PAI - 3、angiostatin、血小板因子 4、TIMP - 1、TIMP - 2 或 TIMP - 3。

9. 如权利要求 1 - 4 的活性化合物，其中的抗肿瘤物质是穿孔素、granzyme、IL - 2、IL - 4、IL - 12、干扰素，如 IFNα、IFNβ、IFNγ、TNFα 或 TNFβ、制瘤素 M、RANTES、MCAF、IL - 8、MIP - 1α、MIP - 1β、NAP - 2、IL - 3、IL - 5、LIF、IL - 11 或 IL - 13。

10. 如权利要求 9 所述活性化合物，其中的抗肿瘤物质是含免疫球蛋白 Fc 段的融合蛋白。

11. 如权利要求 1 – 4 所述活性化合物，其中的抗肿瘤物质是一种酶，包括单纯疱疹病毒胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、带状水痘病毒胸苷激酶、硝基还原酶、β – 葡糖醛酸糖苷酶（尤其是人、植物或细菌性的）、羧肽酶（优选来源于假单胞菌）、内酰胺酶（优选来源于蜡状芽胞杆菌）、焦谷氨酸氨基肽酶、D – 氨基肽酶、氧化过氧化物酶、磷酸酶、羟基腈裂解酶、蛋白酶、酯酶或糖苷酶。

12. 如权利要求 11 所述活性化合物，其中因所述酶 DNA 序列发生点突变而使溶解体的贮备减少，其胞外分泌增加。

13. 如权利要求 11 所述活性化合物，其中为了改善胞外分泌作用，用异源信号序列替代了所述酶的信号序列。

14. 如权利要求 1 – 13 的活性化合物，含有数种相同或不同抗肿瘤物质的 DNA 序列，在各种情况下，两个 DNA 序列借助内核糖体进入位点的 DNA 序列彼此连接。

15. 如权利要求 1 – 13 所述活性化合物，其被插入载体中。

16. 如权利要求 15 的活性化合物，其中的载体是病毒。

17. 如权利要求 16 所述活性化合物，其中的病毒是逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、单纯疱疹病毒或牛痘病毒。

18. 如权利要求 1 – 14 的活性化合物，其被插入质粒中。

19. 如权利要求 15 – 18 的活性化合物，其在胶体分散系统中制备。

20. 如权利要求 19 的活性化合物，其中脂质体是胶体分散系统。

21. 如权利要求 20 的活性化合物，其中聚赖氨酸/配体是胶体分散系统。

22. 如权利要求 15 – 21 的活性化合物，其中增加了能够与内皮细胞膜结构结合的配体。

23. 如权利要求 22 的活性化合物，其中的配体

是多克隆或单克隆抗体，或其片段，通过可变区与内皮细胞的膜结构结合，

是细胞因子或生长因子，或其片段或组成序列，或与平滑肌细胞上的受体结合，或

是粘着分子，如 SLeX 、 LFA － 1 、 MAC － 1 、 LECAM － 1 或 VLA － 4 。

24. 如权利要求 23 的活性化合物，其中内皮细胞的膜结构是指甘露糖、 IL － 1 或生长因子如 PDGF 、 FGF 、 VEGF 或 TGFβ 的受体。

25. 如权利要求 1 － 24 所述的活性化合物，是适于经静脉内、动脉内、腔内注射至组织或组织间隙或适于局部施用的药物制剂。

说 明 书

利用内皮细胞特异性的、细胞周期依赖性的活性化合物对肿瘤进行基因治疗

技术领域

本发明描述了用于肿瘤基因治疗的DNA序列。所述DNA序列的基本组成元件包括激活物序列、启动子组件和编码活性物质的基因。

激活物序列在增生的内皮细胞或与所述内皮细胞毗连的细胞中以细胞特异性方式被激活。

该激活过程以细胞周期特异性方式受到启动子组件的调节。

所述活性物质是血管生成的抑制剂，或是细胞生长抑制分子或细胞毒性分子。将所述DNA序列插入病毒或非病毒载体中，所述载体已被增加了一个与激活的内皮细胞有亲和力的配体。

1. 肿瘤生长与血管生成

许多抗肿瘤活性化合物抗肿瘤的活性不足至少在某种程度上可以从下列事实得到解释：肿瘤块中的肿瘤细胞不能与抗肿瘤活性化合物，尤其是高分子量的活性物质接近（Burrows等人，药物治疗 64, 155 (1994), Baxter等人，微血管研究 41, 5 （1991））。这类活性化合物为了能接触到每个肿瘤细胞，它们必须通过血管内皮和基底膜及通过肿瘤基质和肿瘤实质进行扩散。这一扩散程度基本上取决于活性化合物的浓度或浓度梯度及其理化特性。然而，由肿瘤内部高压所导致的向外对流作用（Burrows等人，微血管研究41，5（1991））正好与上述扩散作用方向相反。

因为即使是对于高分子量活性化合物而言肿瘤血管也是可以接近的，所以早期就有人提出利用肿瘤诱导的血管生成进行肿瘤治疗（Denekamp，应用微循环进展4，28，1984，Denekamp，癌症主题 6，6 1986，Denekamp，癌转移评论 9，267，1990，Denekamp，英国放射学杂志，66，181，1993）。

因此，人们试图利用抑制血管生成的物质抑制肿瘤生长（Bicknell 癌症生物学研讨会，3，399（1992））。动物研究实验表明，全身性施用抑制血管生成的物质也能够抑制肿瘤增生。这可以应用于例如苏拉明（Gagliardi 等人，癌症研究 52，5073（1992））、肝素/甾族化合物共轭物（Thorpe 等人，癌症研究 53，3000（1993））、O－（氯乙酰甲氨酰基）烟曲霉醇（fumigillol)（Yamaoka 等人，癌症研究 53，4262（1993））、抗血管生成素的单克隆抗体（Olson 等人，癌症研究 54，4576（1994））和血管抑制素（angiostatin）（O'Reilly 等人，细胞 79，315（1994））。

然而，上述方法具有血管生成抑制剂全身性、非肿瘤特异性作用的缺陷，一旦出现副作用和新的肿瘤生长的危险，治疗就得中止。

作为另一种选择，设想通过损害内皮细胞来阻止对肿瘤的血流供应，使得肿瘤坏死（Denekamp，英国放射学杂志，66，181（1993））。根据上述设想提出施用与抗体偶联的毒素、细胞生长抑制剂或同位素。这些抗体对与肿瘤相关性的血管内皮是有特异性的。其目的在于所述抗体共轭物可以内皮细胞特异性方式损害肿瘤相关性血管，并因此诱导肿瘤坏死（Burrows 等人，药物治疗 64，155（1994））。

所提出的更进一步的建议是通过特异性抗体方式将血栓形成物质、细胞因子或化学因子与肿瘤相关性内皮细胞结合，并通过籍此引发的血凝作用、炎症或免疫调节作用对肿瘤生长施加影响。类似的效果在通过带有转导内皮细胞之 DNA 的内皮细胞特异性抗体的方式将 DNA 导入内皮细胞，以分泌炎性物质或免疫调节物质或影响肿瘤生长的物质的方案中也观察得到（Burrows 等人，药物治疗 64，155（1994））。

内皮细胞表面上的膜抗原被提议作为制备具有所述特性之抗体的抗原。这些抗原包括例如 endoglin、内皮唾酸蛋白、p96 二体、VEGF 受体、PDGF 受体、尿激酶（uPA）受体及多种粘着分子（Burrows 等人，药物治疗 64，155（1994））。

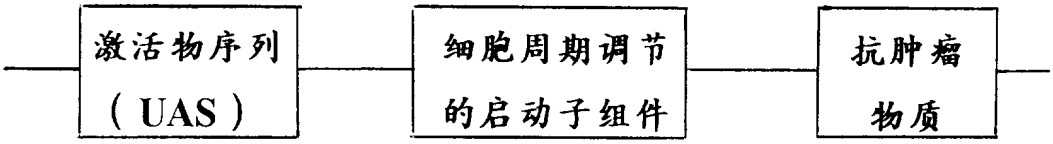
然而，所有这些膜抗原所具有的一个特性是其至少以相对低的浓度还存在于非增生性内皮细胞上。由于即使在患肿瘤的生物体中非增生性内皮

细胞的数量远远超过增生性内皮细胞，因此这并不足以保证通过施用抗体共轭物所寻求的肿瘤特异性效果的要求。

2. 活性化合物的描述

本发明涉及一种活性化合物（即一种药物），它可以经局部和全身施用于肿瘤患者，并在肿瘤生长部位即使不是完全地也是主要地引起内皮细胞的增生，并在相对长的一段时期内使血管生成受抑，诱导炎症形成，或直接或间接地产生细胞生长抑制物，藉此抑制肿瘤生长。

所述活性化合物的中心成分是一个由下列元件组成的 DNA 构建体：



（在本申请全文中，DNA 是包括互补 DNA（cDNA）和基因组 DNA 序列的通用术语）。

2.1 激活物序列的选择

激活物序列应理解为与转录因子发生相互作用的一段核苷酸序列（启动子序列或增强子序列），所述作用在内皮细胞中或者另外在与增生的内皮细胞紧邻的细胞中产生或激活。

a)在内皮细胞中激活的激活物序列

CMV 增强子、CMV 启动子（EP0173177B1）、SV40 启动子或本领域技术人员已知的任何其它启动子序列或增强子序列都可以用作激活物序列。

然而，在本发明所包括的含义范围内，优选的激活物序列包括那些来自基因的基因调节序列或元件，所述基因编码尤其是在内皮细胞中可以检测的（或者另外也在与增生的内皮细胞紧邻的细胞中也可以检测到的）蛋白质。

Burrows 等人（药物治疗 64，155（1994））和 Plate 等人（脑病理

4，207（1994））已描述过上述的一些蛋白质，这些内皮细胞特异性蛋白质的具体例子有：

－脑特异性内皮细胞葡萄糖－1转运因子

脑的内皮细胞因能很强地表达所述转运因子以将D－葡萄糖有效地经内皮细胞转入脑中而引人注意（Gerhart等人，神经科学研究杂志22，464（1989）），该启动子序列已由Murakami等人描述过（生物化学杂志267，9300（1992））。

－ endoglin

endoglin似乎是TGFβ的非信号传递受体（Gougos等人，生物化学杂志265，8361(1990)，Cheifetz,生物化学杂志267，19027（1992），Moren等人，BBRC 189，356（1992））。其少量地存在于正常内皮细胞上，而在增生的内皮细胞上表现为一定增强程度（Westphal等人，皮肤研究杂志100, 27 (1993), Burrows等人，药物治疗65，155（1994））。Bellon等人(欧洲免疫学杂志23，2340（1993））和Ge等人(基因 138，201（1994））已描述了该启动子序列。

－ VEGF受体

有两种不同的受体（Plate等人，国际癌症杂志，59，520（1994））：

*VEGF受体1（flt-1）

（de Vries 等人，科学 255，989（1992）

（在胞质部分含有fms样酪氨酸激酶）

*VEGF受体2（flk-1,KDR）

（Terman等人，BBRC 187，1579（1992））

（在胞质部分含有酪氨酸激酶）

两种受体几乎无一例外地存在于内皮细胞上（Senger等人，癌转移评述12，303（1993））。

－其它的内皮细胞特异性受体酪氨酸激酶

*til-1 或 til-2

(Partanen 等人，分子细胞生物学 12， 1698 （ 1992 ），

Schnürch 和 Risau,开发 119， 957 （ 1993 ），

Dumont 等人，致癌基因 7， 1471 （ 1992））

*B61 受体(Eck 受体)

(Bartley 等人，自然 368， 558 （ 1994 ）， Pandey 等人，科学 268，567 （ 1995 ）， van der Geer 等人，细胞生物学年鉴 10， 251 （ 1994））

- B61

B61 分子表示 B61 受体的配体。（ Holzman 等人，美国 Nephrol 学会杂志 4， 466 （ 1993 ）， Bartley 等人，自然 368， 558 （ 1994 ））

- 内皮缩血管肽，尤其是:

*内皮缩血管肽 B

（ Oreilly 等人，心血管药物， 22， 18 （ 1993 ）, Benatti 等人，临床研究杂志 91， 1149 （ 1993 ）， O'Reilly 等人， BBRC 193，834 （ 1993 ））。

该启动子序列已由 Benatti 等人描述过（ J. Clin. Invest. 91，1149(1993))。

*内皮缩血管肽 1

（ Yanasigawa 等人，自然 332， 411 （ 1988 ）。

该启动子序列已由 Wilson 等人描述（分子细胞生物学 10， 4654 （ 1990 ））。

-内皮缩血管肽受体，尤其是内皮缩血管肽 B 受体。

（ Webb 等人，分子药物学 47， 730 （ 1995 ）， Haendler 等人，心血管药物 20， 1 （ 1992 ））。

- 甘露糖 - 6 - 磷酸受体

（ Perales 等人，欧洲生物化学杂志 226， 225 （ 1994 ）。

该启动子序列已被描述过（ Ludwig 等人,基因 142， 311 （ 1994 ），

Oshima 等人，生物化学杂志 263，2553（1988）和 Pohlmann 等人，PNAS 美国 84，5575（1987））。

- von Willebrand 因子

该启动子序列已被描述过（Jahroudi and Lynch 分子细胞生物学，14，999（1994），Ferreira 等人，生物化学杂志 293，641（1993）和 Aird 等人，PNAS 美国 92，4567（1995））。

- IL-1α 和 IL - 1β

IL - 1 由激活的内皮细胞产生（Warner 等人，免疫学杂志 139，1911（1987））。

该启动子序列已被描述过（Hangen 等人，分子心脏学 2，68（1986），Turner 等人，免疫学杂志 143，3556（1989），Fenton 等人，免疫学杂志 138，3972（1987），Bensi 等人，细胞生长系统，1，491（1990），Hiscott 等人，分子细胞生物学 13，6231（1993）和 Mori 等人，血液 84，1688（1994））。

- IL - 1 受体

该启动子序列已被描述过（Ye 等人，PNAS 美国 90，2295（1993））。

- 血管细胞粘着分子（VCAM - 1）

VCAM - 1 在内皮细胞中的表达受下列因子激活：

脂多糖，TNF - α（Neish 等人，分子细胞生物学 15，2558（1995）），IL - 4（lademarco 等人，临床研究杂志 95，264（1995）），IL - 1（Marni 等人，临床研究杂志 92，1866（1993））。

VCAM - 1 的启动子序列已被描述过（Neish 等人，分子细胞生物学 15，2558（1995），Ahmad 等人，生物化学杂志 270，8976（1995），Neish 等人，实验医学杂志 176，1583（1992），lademarco 等人，生物化学杂志 267，16323（1992）和 Cybulsky 等人，PNAS 美国 88，7859（1991））。

- 合成的激活物序列

作为天然内皮细胞特异性启动子的另一种选择，还可以使用合成的激

活物序列，其由用于结合转录因子的寡聚体化结合位点组成，在内皮细胞中具有优先的或选择活性。这类转录因子的一个例子是转录因子 GATA－2，其在内皮缩血管肽 1 基因中的结合位点是 5'－TTATCT－3'（Lee 等人，生物化学 266，16188（1991），Dorfmann 等人，生物化学杂志 267，1279（1992）和 Wilson 等人，分子细胞生物学 10，4854（1990））。

b)在与激活的内皮细胞紧邻的细胞中激活的激活物序列

在内皮细胞增生的情况下，邻接细胞可以通过处于开放状态的紧密连接而接近血液大分子。由于功能和结构上的关系，激活的内皮细胞之邻接细胞也是本发明意义上的靶细胞。

－ VEGF

VEGF 由与增生的内皮细胞紧邻的各种细胞（如平滑肌细胞和肿瘤细胞）产生，尤其是在低氧条件下（Ferrara 等人，内分泌评论 13，18（1992），Berse 等人，细胞分子生物学 3，211（1992），Finkenzeller 等人，BBRC 208，432（1995），Tischer 等人，BBRC 165，1198（1989），Leung 等人，科学 246，1306（1989））。

VEGF 基因的基因调节序列是：

*VEGF 基因的启动子序列（5'侧翼区）

（Michenko 等人，细胞分子生物学研究 40，35（1994），Tischer 等人，生物化学杂志 266，11947（1991））或

*VEGF 基因的增强子序列（3'侧翼区）

（Michenko 等人，细胞分子生物学研究 40，35（1994））或

*c-Src 基因

(Mukhopadhyay 等人，自然 375，577（1995），Bonham 等人，致癌基因 8，1973），Parker 等人，分子细胞生物学 5，831（1985），Anderson 等人，分子细胞生物学 5，1122（1985））或

*V - Src 基因

（Mukhodpadhyay 等人，自然 375，577（1995），Anderson 等人，分子细胞生物学 5，1122（1985），Gibbs 等人，病毒学 53，19（1985））

- 类固醇激素受体及其启动子元件（Truss 和 Beato，内分泌评论 14，459（1993）），尤其是：

*鼠乳腺肿瘤病毒启动子

该启动子在大多数细胞中由类固醇激活，例如，由糖皮质激素（Parks，等人，细胞 8，87（1976）或由黄体制剂（Cato 等人，欧洲分子生物学组织杂志 5, 2237(1986)）激活。MMTV 长末端重复区的启动子区 cDNA 序列被描述过(Chalepakis 等人，细胞 53，371（1988）和 Truss 及 Beato 内分泌学评论 14，459（1993））。

2.2 受体组件的选择

作为一个例子，细胞周期调节的启动子组件可以理解为核苷酸序列 CDE - CHR - Inr（参见下文）。该启动子组件的基本功能是抑制细胞周期 G0/G1 期激活物序列的功能，并在 S/G2 期继而在增生的细胞中引起细胞周期特异性的表达。

启动子组件 CDE - CHR - Inr 是在对人 cdc 25c 启动子的 G2 特异性表达的详细研究过程中发现的。最开始的突破点是发现了负责在细胞周期 G1 期关闭启动子的阻遏物元件(细胞周期依赖性元件，CDE）（Lucibello 等人，欧洲生物学组织杂志 14，132（1995））。借助基因组二甲基硫酸（DMS）足迹法和功能分析（图 1 和图 2），有可能证明 CDE 以 G1 特异性方式结合阻遏物（CDE 结合因子，CDF），并籍此在非增生（G0）细胞中对转录产生抑制作用。在其阻遏功能中，位于基础启动子区的 CDE 依赖于上游激活序列（UAS）。由此得出结论，CDE 结合因子以细胞周期依赖性方式在非增生细胞中和处于细胞周期的 G1 期细胞中抑制 5'结合激活物蛋白的转录激活作用（图 3）。

上述结论通过下面进一步的实验得到证实，将非细胞周期调节的病毒早期 SV40 增强子与 cdc25 最小的启动子（含有 CDE 和位于 3'端的起始位

点）融合将对所得嵌合启动子产生明确的细胞周期调节作用（图 4）。随后对 cdc 25C 增强子的研究表明，以细胞周期依赖性方式受到 CDF 调节的转录因子是 NF－Y（同义词 CBF，Dorn 等人，细胞 50，863（1987），van Hujisduijnen 等人，欧洲生物学组织杂志 9，3119（1990），Coustry 等人，生物化学杂志，270，468（1995））、Sp1（Kadonage 等人，TIBS 11，10，（1986））和可能是新的并与 CBS7 结合的一种因子（CIF）。该研究其它令人感兴趣的结果是观察到 cdc25C 增强子中的 NF－Y 与至少一种另外的 NF－Y 复合物或与 CIF 有效地合作只能激活转录。NF-Y 和 Sp1 两者都属于富含谷氨酰胺的一类激活物，能提供有关阻遏机理的重要信息（例如与特定的基础转录因子或 TAF 的相互作用或干扰）。

对 cdc 25C、细胞周期蛋白 A 和 cdc2 的启动子序列进行比较，证明在数个区域存在同源性（图 5）。不仅仅 CDE 在所有 3 个启动子中都是保守的（所存在的趋异不具有功能相关性），而且邻近的 Y_c 盒也是保守的。正如所预料的，所有这些区域都抑制在体的蛋白质结合，而这一蛋白质结合过程在是 CDE 情况下为细胞周期依赖性的。另外，有可能证明所有 3 个启动子通过 CDE 突变而去调节（表 1）。在对 cdc 25C、细胞周期蛋白质 A 和 cdc2 序列进行比较时发现，在 CDE 紧接 3'的区域也存在明显的相似性（细胞周期基因同源性区，CHR）（图 5）。尽管该区在功能上与 CDE 同样重要（表 1），但在在体的 DMS 足迹法实验中尚未观察到。对此有一个可能的解释是该因子与所述 DNA 小沟之间的相互作用。电泳迁移率移位测定（EMSA）实验的结果表明，CDE 和 CHR 一起结合蛋白质复合物 CDF。这些观测结果表明，富含谷氨酰胺的激活物通过 CDF 介导的阻遏作用是经常存在的细胞周期调节的转录作用的机理。

但是，很显然，不仅 CDE－CHR 区对调节 cdc 25C 启动子具有重要性，而且还包括基础启动子（位置≤-20 至≥+ 30，参见图 1）核苷酸序列中的起始位点（位置＋1）之一。包括 YY-1 体外结合位点在内的该区域突变（Seto 和 Shenk，自然 354，241（1991），Usheva 和 Shenk，细胞，76，1115（1994））将引起完全的去调节作用。鉴于 CDE－CHR 与基

础启动子位置接近，因而就很可能发生CDF与基础转录复合物间的相互作用。

2.3 抗肿瘤物质的选择

a)增生作用的抑制剂

在本发明含义范围内，抗肿瘤物质应理解为能够抑制内皮细胞增生的蛋白质的DNA序列。所述DNA序列的例子包括下文所列参考文献涉及的DNA序列：

－成视网膜细胞瘤蛋白（pRb/p110）或其类似物p107和p120 (La Thangue, 细胞生物学流行观点 6, 443 (1994))

－p53蛋白（Prives等人，基因开发 7, 529 (1993))

－p21蛋白（WAF－1)(El-Deiry等人,细胞 75, 817 (1993))

－p16蛋白（Serrano等人，细胞 366, 704 (1993), Kamb等人,科学 264, 436 (1994), Nobori等人,自然 368, 753 (1994))

－其它的CdK抑制剂（Pines评述，TIBS 19, 143 (1995))

－CADD45蛋白（Papathanasiou等人，分子细胞生物学 11, 1009 (1991), Smith等人，科学 266, 1376 (1994))

－bak蛋白（Farrow等人,自然 374, 731 (1995), Chittenden等人,自然 374, 733 (1995), Kiefer等人,自然 374, 736 (1995))

为了防止所述细胞周期抑制剂在细胞内迅速失活，应该优先使用具有被表达蛋白质的失活位点发生突变而并不因此损害蛋白质功能的那些基因。

成视网膜细胞瘤蛋白（pRb）及其相关的p107和p130蛋白经磷酸化作用失活。结果，所使用的pRb/p110、p107或p130 cDNA序列是有点突变的，以使被编码蛋白质的磷酸化位点用不能被磷酸化的氨基酸取代。

根据Hamel等人的描述（分子细胞生物学 12, 3431 (1992))，当成视网膜细胞瘤蛋白（pRb/p110)氨基酸的246、350、601、605、780、786、787、800和804位被取代后其不再被磷酸化，而且，这些替代并不损害其与主要T抗原结合的活性。例如，在pRb/p110蛋白质中，

用氨基酸 Ala 取代氨基酸 Thr-256、Ser-601、Ser-605、Ser-780、Ser-786、Ser-787 和 Ser-800，用氨基酸 Arg 取代氨基酸 Thr-350 和用氨基酸 Glu 取代氨基酸 Ser-804。

p107 蛋白或 p130 蛋白的 DNA 序列以类似的方式进行突变。

p53 蛋白是通过 C 末端 392 位丝氨酸的脱磷酸化的方式经与特定蛋白质（如 MDM2）结合或经 p53 的寡聚而在细胞内失活（Schikawa 等人，Leukemia 和 Lymphoma 11，21（1993）和 Brown，肿瘤学年刊 4，623（1993））。结果，优先使用的 p53 cDNA 序列是通过去掉 392 位丝氨酸而将 C 端截平。

b)血管生成抑制剂

抗肿瘤药物进一步可理解为编码可抑制血管生成之蛋白质的 DNA 序列。这些蛋白质（有关的 DNA 序列参考所引用的文献）的具体例子有：

－纤溶酶原激活物抑制剂 1（PAI－1）

（Reilly 等人，生物化学杂志 265，9570（1990），Bosma 等人，生物化学杂志 253，9219（1988））

－PAI－2

（Steven 等人，欧洲生物化学杂志 196，431（1991））

－PAI－3

（Meijers 等人，生物化学杂志 266，15028（1991））

－血管抑制素

（O'Reilly 等人，细胞 79，315（1994），Bicknell 等人，癌生物学研讨会 3，399（1992））

－干扰素

（Dorr，药物 45，177（1993），今日药物 22，597（1986），US 45 185 84，US 45 88 585），

*IFNα

(Henco 等人，分子生物学杂志 185，227（1985），Pestka 等人，生物化学年鉴 56，727（1987），Weissmann 等人，伦敦皇家学会哲学学报 B299，7（1982），Goeddel 等人，自然 290，20（1981））

*IFNβ

(Sen 等人，生物化学杂志 267，5017（1992），Mark 等人，欧洲专利 192 811，欧洲专利 234 599，美国专利 45 88 585）

*IFNγ

(Gray 等人，自然 295，503（1982），Yip 等人，PNAS 美国 79，1820（1982），Rinderknecht 等人，生物化学杂志 259，6790（1984））

－血小板因子 4

（Mc Manus 等人，免疫学杂志 123，2835（1979）；Brindley 等人，临床研究杂志 72，1218（1983）；Deuel 美国国家学术科学汇编 78，4584，1981））

－ IL － 12

（Voest 等人，国家癌症研究所 87，581（1995），Wolf 等人，免疫学杂志 146，3074（1991），Gubler 等人，PNAS 美国 88，4143（1991），Kobayashi 等人，实验医学杂志 170，827（1989），Gabler 等人，PNAS 88，4143（1991），Gately 等人，免疫学杂志 147，874（1991），Schoenhaut 等人，免疫学杂志 148，3433（1992），Wolf 等人，免疫学杂志 146，3074（1991））

－ TIMP － 1

（Kolkenbrock 等人，欧洲生物化学杂志 198，775（1991），Faucher 等人，病理生物学 37，199（1989））

－ TIMP － 2

（Kolkenbrock 等人，欧洲生物化学杂志 198，775（1991））

－ TIMP － 3

（Wick 等人，生物化学杂志 269，18953（1994））

－白血病抑制因子（LIF）

（Pepper 等人，细胞科学杂志 108，73（1995），Gough 等人，Ciba 基金会座谈会，167，24（1992），PNAS 美国 85，5971（1988），Stahl 等人，生物化学杂志 265，8833（1990），Rathjan 等人，细胞 62，1105（1990））

c)细胞生长抑制蛋白和细胞毒性蛋白

然而，抗肿瘤物质还可以理解为编码一种直接或间接显示对肿瘤具有细胞生长抑制作用之蛋白质的DNA序列。这些蛋白质尤其包括:

－穿孔素

（Lin等人，今日免疫学 16，194（1995））

－粒酶

（Smyth等人，今日免疫学 16，202（1995））

－IL－2

（Fletscher等人，淋巴细胞活素研究 6，45（1987），Matsui等人，淋巴细胞活素 12，1（1985），Tanaguchi等人，自然 302，305（1983））

－IL－4

（Lee 等人，PNAS 83，2061（1986）；Paul，血液 77，1859（1991），Yokota等人，PNAS 美国 83，5894（1986），van Leuven等人，血液 73，1142（1989），Arai等人，免疫学杂志 42，274（1989））

－IL－12

（Kobayashi等人，实验医学杂志 170，827（1989），Gabler等人，PNAS 88，4143（1991），Gately等人，免疫学杂志 147，874(1991),Schoenhaut等人，免疫学杂志 148，3433（1992），Wolf等人，免疫学杂志 146，3074（1991））

－干扰素，例如:

*IFN－α

（Henco等人，分子生物学 185，227（1985），Pestka等人，生物化学年鉴 56，727（1987），Weissmann等人，伦敦皇家学会哲学学报 B299，7（1982），Goeddel等人，自然 290，20（1981））

*IFNβ

（Sen等人，生物化学杂志 267，5017（1992），Mark等人欧洲专利 192 811，欧洲专利 234 599，美国专利 45 88 585）

*IFNγ

(Gray 等人, 自然 295, 503 (1982), Yip 等人, PNAS 美国 79, 1820 (1982), Rinderknecht 等人, 生物化学杂志 259, 6790 (1984))

-TNF

(Porter TiBTech 9, 158(1991); Sidhu 等人, 药物治疗 57, 79 (1993)), 尤其是:

*TNFα

(Beutler 等人, 自然 320, 584 (1986), Kriegler 等人, 细胞 53, 45 (1988))

*TNFβ

(Gray 等人, 自然 312, 721 (1984), Li 等人, 免疫学杂志 138, 4496 (1987), Aggarwal 等人, 生物化学杂志 260, 2334 (1985))

-制瘤素 M

(Brown 等人, 免疫学杂志 147, 2175 (1991); Grove 等人, 生物化学杂志 266, 18194 (1991); Hamilton 等人, 生物化学、生物物理通讯 180, 652 (1991), Malik 等人, 分子细胞生物学 9, 2847 (1989), Kallstad 等人, 生物化学杂志 266, 8940 (1991))

d) 炎症诱导剂

抗肿瘤物质进一步可以理解为编码在适当的时候除了抗肿瘤作用外还刺激形成炎症, 藉此消除肿瘤细胞之蛋白质的 DNA 序列。这些蛋白质的具体例子有:

- RANTES (MCP - 2)

(Schall 等人, 免疫学杂志 141, 1018 (1988), 细胞 61, 361 (1990))

-单核细胞趋化和活化因子 (MCAF)

(Zachariae 等人, 实验医学杂志 171, 2177 (1990); Rollins 等人, 血液 78, 1112 (1991); Mukaida 等人, 免疫学杂志 146, 1212 (1991); Sica 等人, 免疫学杂志 144, 3034 (1990))

- IL - 8

（Lotz 等人，免疫学杂志 148，466（1992）；Clore 等人，生物化学 29，1689（1990），Matsushima 等人，实验医学杂志 167，1883（1988），Baglioni 等人，临床研究杂志 84，1045（1989），国际免疫药物杂志 17，103（1995），Carre 等人，临床研究杂志 88，1802（1991））

－巨噬细胞炎性蛋白 1（MIP－1α 和 MIP－1β）

（Broxmeyer 等人，免疫学杂志 147，2586（1991）；Oh 等人，免疫学杂志 147，2978（1991）；Graham 等人，自然 344，442（1990））

－中性粒细胞活化蛋白 2（NAP－2）

（Walz，风湿性关节炎，伦敦（1991），Chang 等人，生物化学杂志 269，25277（1994））

－IL－3

（Otsuka 等人，免疫学杂志 140，2288（1988）；de Vries 等人，茎细胞 11，72（1993），Yang 等人，血液 71，958（1988），细胞 47，3（1986），Philips 等人，基因 84，501（1989））

－IL－5

（Azuma 等人，核酸研究 14，9149（1986）；Yokota 等人，PNAS 84，7388（1987）；Campbell 等人，PNAS 84，6629（1987），Azuma 等人，核酸研究 14，9149（1986））

－人白血病抑制因子（LIF）

（Gough 等人，Ciba 基金会座谈会 167，24（1992），PNAS 美国 85，5971（1988），Stahl 等人，生物化学杂志 265，8833（1990），Rahtjan 等人，细胞 62，1105（1990））

－IL－7

（Matzuda 等人，白淋巴细胞 5，231（1991），Lupton 等人，免疫学杂志 144，3592（1990），Goodwin 等人，PNAS 美国 86，302（1989），Swatherland 等人，人体遗传学 82，371（1989））

－IL－11

（Paul 等人，美国国家学术科学汇编 87，7512（1990），Teramura 等人，血液 79，327（1992），Kawashima 等人，欧洲生物化学学会联合会通信 283，199（1991））

- IL - 13

（McKenzie 等人，免疫学杂志 150，5436（1993），Muzio 等人，血液 83，1738（1994），McKenzie 等人，PNAS 90，3735（1993），Minty 等人，自然 362，248（1993））

- GM - CSF

（Wong 等人，科学 228, 810（1985），Gough 等人，自然 309，763（1984），Nicola 等人，生物化学杂志 254，5290（1979））

- G - CSF

（Nagata 等人，欧洲分子生物学组织杂志 5，575（1986），Nagata 等人，自然 319, 415 (1986), Souza 等人，科学 232，61（1986））

- M - CSF

（Welte 等人，PNAS 82，1526（1985），Lu 等人，生物化学，生物物理档案 268，81（1989），Kawasaki 等人，科学 230，291（1985），Suzu 等人，生物化学杂志 267，4345（1992），Wong 等人，科学 235，1504（1987））

可以用作本发明意义上的活性物质的还有所列细胞因子和人免疫球蛋白之间形成的融合蛋白的 DNA 序列。具有这种特性的 DNA 序列及其制备方法已在欧洲专利 0 464 633 A1 中描述过。

e) 激活细胞生长抑制剂前体的酶类

但是，抗肿瘤物质还可以理解为可以将抗肿瘤活性化合物前体转化为抗肿瘤活性化合物之酶的 DNA 序列。

已有综述文献报道了能够裂解无活性的前体物质（原药）并藉此形成活性细胞生长抑制剂（药物）的酶，以及在各种情况下有关的原药和药物（Deonarain 等人，英国癌症研究杂志 70，786（1994），Mullen，药物治疗 63，199（1994）和 Harris 等人，基因治疗，1，170（1994））。

例如，将利用编码下列酶之一的DNA序列：

－单纯疱疹病毒胸苷激酶

（Garapin等人，PNAS美国 76，3755（1979），Vile等人，癌症研究 53，3860（1993），Wagner等人，PNAS美国78，1441（1981），Moelten等人，癌症研究 46，5276（1986），国家癌症研究所杂志 82，297（1990））

－带状水痘病毒胸苷激酶

（Huber等人，PNAS美国 88，8039（1991），Snoeck国际抗微生物试剂杂志 4，211（1994））

－细菌硝基还原酶

（Michael等人，FEMS微生物通信 124，195（1994），Bryant等人，生物化学杂志 266，4126（1991），Watanabe等人，核酸研究 18，1059（1990））

－细菌β－葡糖醛酸糖苷酶

(Jefferson等人，PNAS美国，83，8447（1986）

－黑麦的植物β－葡糖醛酸糖苷酶

（Schulz等人，植物化学 26，933（1987））

－人β－葡糖醛酸糖苷酶

（Bosslet等人，英国癌症研究杂志 65，234（1992），Oshima等人，PNAS美国 84，685（1987））

－人羧肽酶（CB），例如：

*肥大细胞CB－A

（Reynolds等人，临床研究杂志 89，273（1992））

*胰CB－B

（Yamamoto等人，生物化学杂志 267，2575（1992），Catasus等人，生物化学杂志 270，6651（1995））

*细菌羧肽酶

（Hamilton等人，细菌杂志 174，1626（1992），Osterman等人，蛋白质化学杂志 11，561（1992））

－细菌β－内酰胺酶

（Rodrigues 等人，癌症研究 55，63（1995），Hussain 等人，细菌杂志 164，223（1985），Coque 等人，胚胎杂志 12，631（1993）

－细菌胞嘧啶脱氨酶

（Mullen 等人，PNAS 美国 89，33（1992），Austin 等人，分子药物学 43，380（1993），Danielson 等人，分子微生物学 6，1335（1992））

－人过氧化氢酶或过氧化物酶

（Ezurum 等人，核酸研究 21，1607（1993））

－磷酸酶，尤其是：

*人碱性磷酸酶

（Gum 等人，癌症研究 50，1085（1990））

*人酸性前列腺磷酸酶

（Sharieff 等人，美国人体遗传学杂志 49，412（1991），Song 等人，基因 129，291（1993），Tailor 等人，核酸研究 18，4928（1990））

*5 型酸性磷酸酶

（基因 130，201（1993））

－氧化酶，尤其是：

*人赖氨酰氧化酶

（Kimi 等人，生物化学杂志 270，7176（1995））

*人酸性 D－氨基氧化酶

（Fukui 等人，生物化学杂志 267，18631（1992））

－过氧化物酶

*人谷胱甘肽过氧化物酶

（Chada 等人，基因组 6，268（1990），Ishida 等人，核酸研究 15，10051（1987））

*人嗜酸性过氧化物酶

（Ten 等人，实验医学杂志 169，1757（1989），Sahamaki 等人，

生物化学杂志 264，16828（1989））

*人甲状腺素过氧化物酶

（Kimura, PNAS 美国 84，5555（1987））

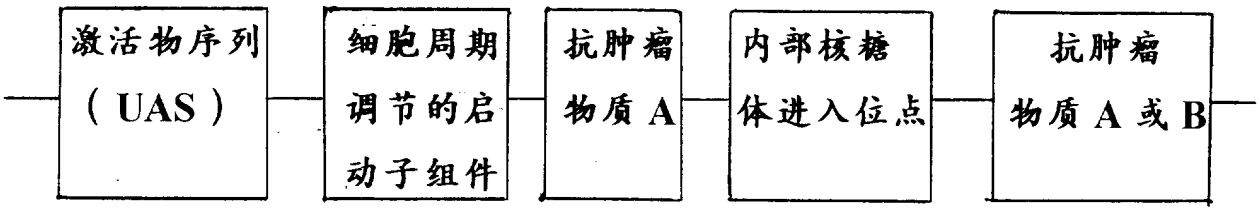
为了促进分泌所列出的酶类，可以用改善了胞内分泌作用的异源信号序列替代各种情况下于所述 DNA 序列中包含的同源信号序列。

因此，例如可以用免疫球蛋白的信号序列（DNA 位置≤63 至≥107；Riechmann 等人，自然，332，323（1988））替代β－葡糖醛酸糖苷酶的信号序列（DNA 位置≤27 至 93；Oshima 等人，PNAS 84，685（1987））。

另外，优先选择的 DNA 是编码那些经过点突变后较少地贮存于溶酶体中并提高了分泌能力的酶类。具有所述性质的点突变已有描述，例如，对于β－葡糖醛酸糖苷酶（Shiplex 等人，生物化学杂志 268，12193（1993））。

2.4 几种抗肿瘤物质的联合

本发明进一步涉及一种活性化合物，其中结合了几种相同抗肿瘤物质（A，A）或几种不同抗肿瘤物质（A，B）的 DNA 序列。为了表达两种 DNA 序列，内部核糖体进入位点（IRES）的 cDNA 优选提出作为调节元件



这类 IRES 已被描述过（例如参见 Mountford 和 Smith,TIG 11, 179 (1995), Kaufman 等人，核酸研究 19，4485（1991），Morgan 等人，核酸研究 20，1293（1992），Dirks 等人，基因 128，247（1993），Pelletier 和 Sonenberg，自然 334，320（1988）和 Sugitomo 等人，生物技术 12，694（1994））。

因此，脊髓灰质炎病毒 IRES 序列的 cDNA（位置在 5'UTR 的≤140至≥630；Pelletier 和 Sonenberg，自然 334，320（1988））可用于连接抗炎物质 A 的 DNA（在 3'端）和抗炎物质 B 的 DNA（在 5'端）。

根据结合的情况不同（A + A，A + B1），所述性质的活性化合物表现出本发明意义上的相加或协同作用。

2.5 载体的构建

用本领域技术人员熟悉的方式将新的 DNA 构建体制备成完整的载体。该载体可以来源于病毒或非病毒。例如，新的 DNA 构建体可以被插入病毒载体（这方面的信息可参见 D. Jolly,癌症基因治疗 1，51（1994））或还可用作质粒。病毒载体或质粒可与胶体分散体，例如与质脂体复合（Farhood 等人，纽约科学院年刊 716，23（1994）），或者另外也可以与聚赖氨酸/配体共轭物（Curiel 等人，纽约科学院年刊 716，36（1994））或与常规的辅剂配制成药物。

2.6 配体的选择

可以给病毒性载体和非病毒性载体增加一个配体。能够与增生的内皮细胞表面结合的物质优选作为配体，例如以聚赖氨酸/配体共轭物形式。所述物质包括针对内皮细胞膜结构的抗体或抗体片段（例如参见 Burrows 等人，药物治疗 64，155（1994），Hughes 等人，癌症研究 49，6214（1989）和 Maruyama 等人，PNAS－美国 87，5744（1990））。所述物质特别包括抗 VEGF 受体的抗体。

优选将鼠源单克隆抗体以人化形式加以利用。用已知的方法将所述抗体人化（Winter 等人，自然 349，293（1991）和 Hoogenbooms 等人，输血生物学译丛 36，19（1993））。所述抗体片段也以本领域现有技术所述方式制备（例如参见 Winter 等人，自然 349，293（1991），Hoogenboom 等人，输血生物学译丛 36，19（1993），Girol，分子免疫 28，1379（1991）或 Huston 等人，国际免疫学评论 10，195（1993））。

所述配体进一步包括能与内皮细胞上的膜结构或膜受体结合的所有活性物质。例如，包括在末端含有甘露糖的物质，以及能够与内皮细胞表达的受体结合的IL－1或生长因子或其片段或其组成序列，例如PDGF、bFGF、VEGF和TGFβ（Pusztain等人，病理学杂志 169，191（1993））。此外，所述配体还包括与激活的和/或增生的内皮细胞结合的粘着分子。具有所述性质的粘着分子例如有SLex、LFA－1、MAC－1、LECAM－1或VLA－4，这些分子都已被描述过（参见综述Augustin-Voss等人，细胞生物学杂志 119，483（1992），Pauli等人，癌转移评论，9，175（1990）和Honn等人，癌转移评论 11，353（1992））。

2.7 活性化合物的制备（实施例）

借助下列实施例将更详细地描述新活性化合物的制备方法。

a)构建嵌合启动子内皮缩血管肽1－CDE－CHR－Inr

人内皮缩血管肽－1启动子（位置≤-170至≥-10）或经除去TATA盒而被截平的变异体在其3'端与人cdc 25C基因CDE－CHR－Inr组件(位置≤-20至≥+121）的5'端连接（图6）。利用本领域技术人员已知且经商业途径可以获得的酶进行有效的连接。

b)构建含活性化合物中心成分的质粒

将已描述过的嵌合内皮缩血管肽－1启动子组件/转录单位以其3'端与人β－葡糖醛酸糖苷酶编码区DNA的5'端（位置≤27至≥1982，Oshima等人，PNAS美国 84，685（1987））连接。该DNA还含有分泌所需的信号序列（22个N端氨基酸）。为了易于从细胞内分泌，该序列最好是由免疫球蛋白信号序列替代（位置≤63至≥107；Riechmann等人，自然 332，323（1988）参见图7）。转录调控单位和编码β－葡糖醛酸糖苷酶的DNA被克隆到pUC 19/19或Bluescript衍生的质粒载体中，其可以直接或于胶体分散体系中应用于体内。另外，嵌合基团可转移至病毒载体或其它适宜载体中，并用于注射。

2.8 活性化合物的活性

在局部施用（例如在肿瘤部位）或颅内或蛛网膜内施用，或经全身，优选经静脉内或动脉内施用后，本发明的活性化合物借助组织特异性激活物序列（UAS）和细胞周期调节的阻遏物组件的结合，能够使得主要是（即使不完全是）仅增生的内皮细胞或其邻接细胞分泌能够抑制增生作用本身或另外能诱导具有抗增生活性或细胞生长抑制作用的物质形成的物质。内此细胞增生的抑制和/或细胞生长抑制物质的释放可引起肿瘤生长的抑制。活性化合物具有良好的耐受性，因为抗肿瘤物质的形成因新活性化合物而限于肿瘤生长部位和由肿瘤引起的血管生成。

既然活性化合物由于其细胞特异性和细胞周期特异性而具有高度安全性，所以所述活性化合物可以大剂量使用，并且如果需要的话，可以数天或数周间隔性重复用于肿瘤疾病的治疗。

附图说明

图 1 表示 cdc 25C 启动子区连同已在体内发现的蛋白质结合位点的核苷酸序列（基因组 DMS 足迹法；（实心圆点）：完全性组成保护作用；○（空圈）：部分性组成保护作用；*（星号）：细胞周期调节的 G1 特异性保护作用）。CBS：组成性结合位点；CDE：细胞周期依赖性元件。以暗色划线的区域表示 Y_c 盒（NF－Y 结合位点）。起始位点以填黑的方形表示。

图 2 表示 cdc 25C 启动子通过 cdc 突变而在 G0 期出现的特异性去阻遏作用。

图 3 图解说明 CDE 对 cdc 25C 增强子的调节作用。

图 4 表示 CDE 对 SV40 增强子的 G_0/G_1 特异性阻遏作用。右边的数字表示 G2 期的诱导作用（与对照＝1 相比）。

图 5 表示 CDE－CHR 区与 cdc 以 25C、细胞周期蛋白 A 和 cdc2 启动子中位于 5'端的 Y_c 盒的同源性。

图 6 表示嵌合构建体，其由人内皮缩血管肽－1 启动子、含 CDE 和 CHR 阻遏物元件的 3'融合启动子组件以及编码作为效应子的β－葡糖醛酸

糖苷酶的 DNA（完整编码区，位置≤239 －≥2194； Oshima 等人， PNAS 美国 84， 685 （ 1987 ））不同部分组成。对于内皮缩血管肽－ 1 基因的位置命名和对于 cdc 25C 所用系统分别参考 Wilson 等（分子生物学 10， 4854 （ 1990 ））和 Lucibello 等（欧洲分子生物学组织 15， 132 （ 1995 ））的描述。

图 7 中对于免疫球蛋白（ HuVHCAMP ）信号序列（ MGWSCIILFLVATAT ）的位置命名参照 Riechmann 等（自然， 332，（ 1988 ））的描述。

另外，为了获得改善的β － 葡糖醛酸糖苷酶之胞外分泌作用，插入 Ig 信号肽（图 7B ）。

表 1： CDE 和 CHR 在 cdc 25C 、细胞周期蛋白 A 和 cdc 2 的细胞周期调节的转录中的作用

表 1

	G_0	生长	因子
wt			
cdc25C	0.8	13.1	17.5
细胞周期蛋白 A	0.7	27.1	41.7
cdc2	1.0	41.2	41.2
mCDE(-13)			
cdc 25C	7.6	11.6	1.5
细胞周期蛋白 A	13.4	23.9	1.8
cdc2	11.3	33.9	3.0
mCHR(-6/-3)			
cdc25C	14.4	21.0	1.5
细胞周期蛋白 A	15.5	28.3	1.8
cdc2	18.6	38.6	2.1

在 HIH3T3 细胞中瞬时转染的结果表示为 RLU/1000 。mCDE:突变的 CDE（位置－ 13： G→T ）；mCHR： 突变的 CHR （位置－ 6 至－ 3 ）。

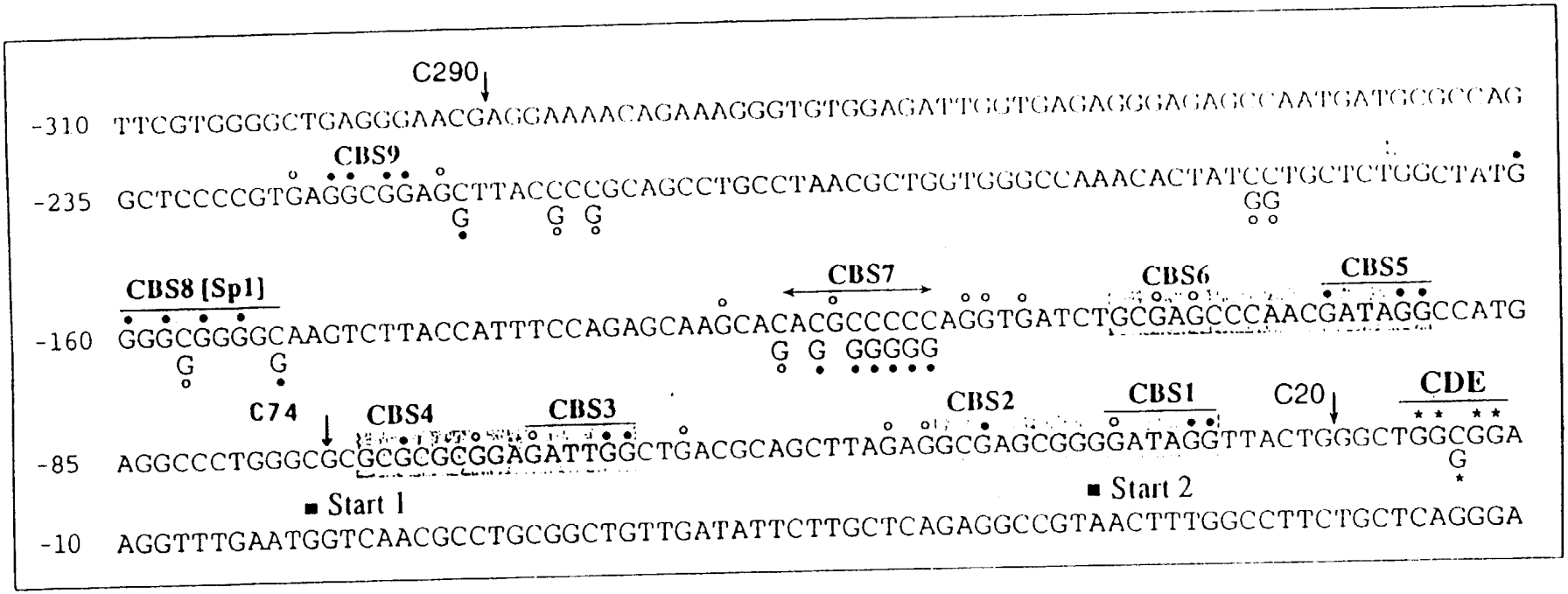

C290
-310 TTCGTGGGGCTGAGGGAACGAGGAAAACAGAAAGGGTGTGGAGATTGGTGAGAGGGAGAGCCAATGATGCGCCAG
CBS9
-235 GCTCCCCGTGAGGCGGAGCTTACCCCGCAGCCTGCCTAACGCTGGTGGGCCAAACACTATCCTGCTCTGGCTATG
CBS8 [Sp1]
CBS7
CBS6
CBS5
-160 GGGCGGGGCAAGTCTTACCATTTCCAGAGCAAGCACACGCCCCCAGGTGATCTGCGAGCCCAACGATAGGCCATG
C74
CBS4
CBS3
CBS2
CBS1
C20
CDE
-85 AGGCCCTGGGCGCGCGCGCGGAGATTGGCTGACGCAGCTTAGAGGCGAGCGGGGATAGGTTACTGGGCTGGCGGA
Start 1
Start 2
-10 AGGTTTGAATGGTCAACGCCTGCGGCTGTTGATATTCTTGCTCAGAGGCCGTAACTTTGGCCTTCTGCTCAGGGA

图 1

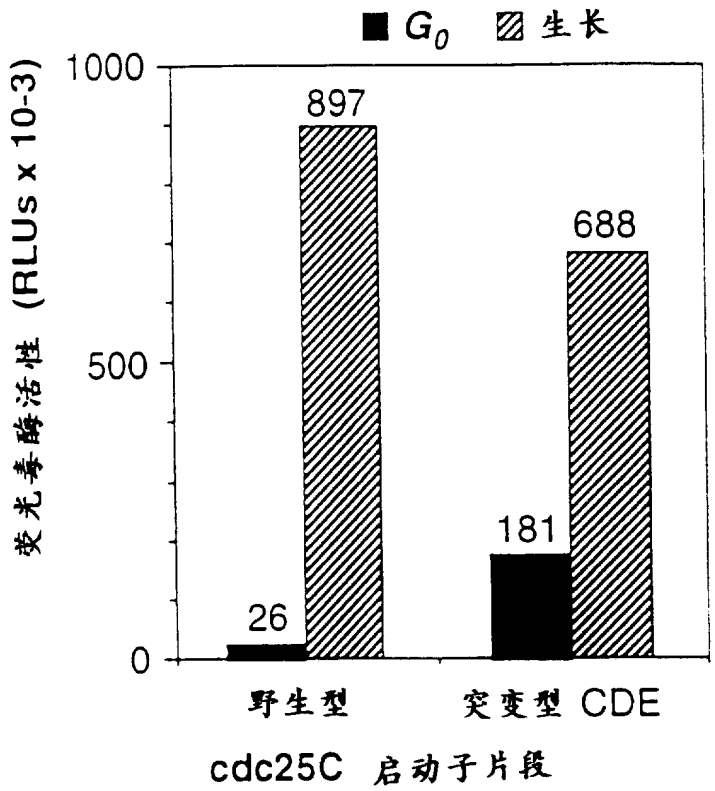

■ G_0 ▨ 生长
荧光素酶活性 (RLUs x 10-3)
1000
500
0
897
688
181
26
野生型
突变型 CDE
cdc25C 启动子片段

图 2

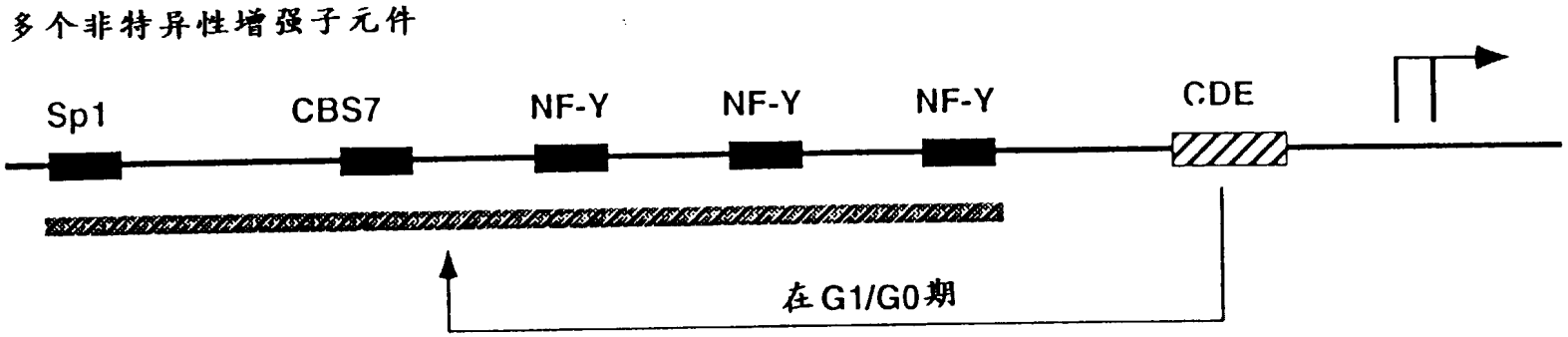


图 3

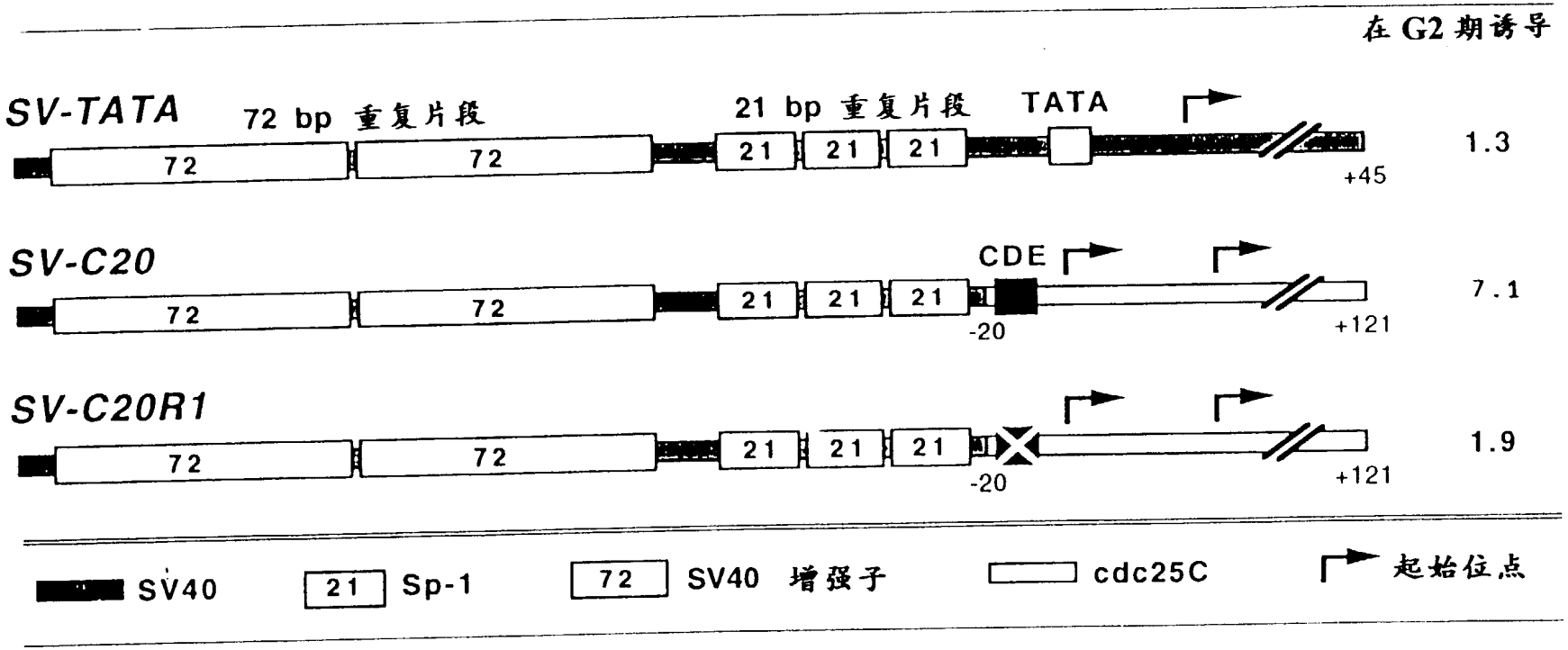

在 G2 期诱导
SV-TATA
72 bp 重复片段
21 bp 重复片段
TATA
72
72
21
21
21
+45
1.3
SV-C20
CDE
72
72
21
21
21
-20
+121
7.1
SV-C20R1
72
72
21
21
21
-20
+121
1.9
SV40
21
Sp-1
72
SV40 增强子
cdc25C
起始位点

图 4

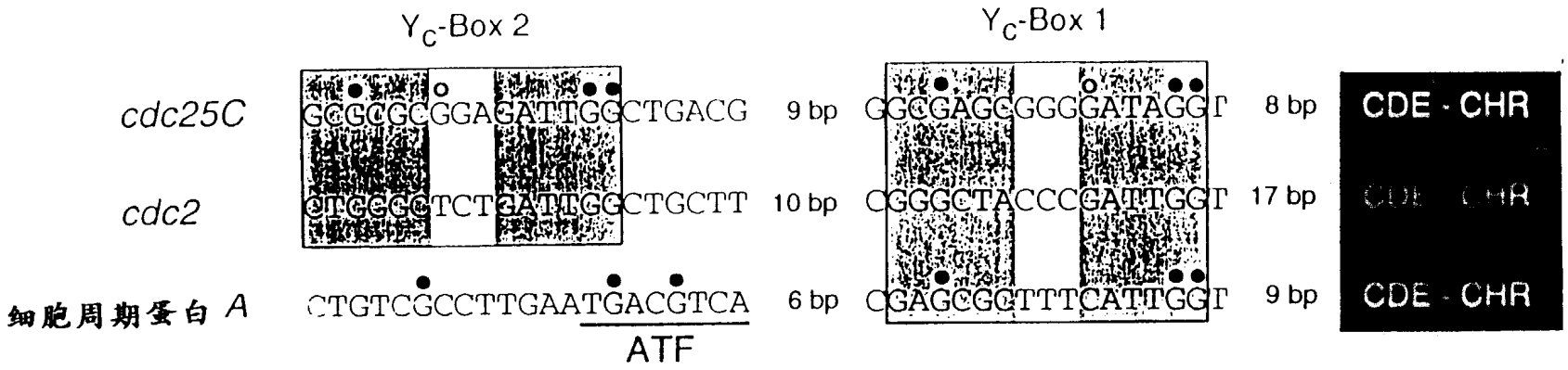

Y_C-Box 2
Y_C-Box 1
cdc25C
GCGCGCGGAGATTGGCTGACG
9 bp
GGCGAGCGGGGATAGGT
8 bp
CDE - CHR
cdc2
CTGCGCTCTGATTGGCTGCTT
10 bp
CGGGCTACCCGATTGGT
17 bp
CDE - CHR
细胞周期蛋白 A
CTGTCGCCTTGAATGACGTCA
6 bp
CGAGCGCTTTCATTGGT
9 bp
CDE - CHR
ATF

图 5

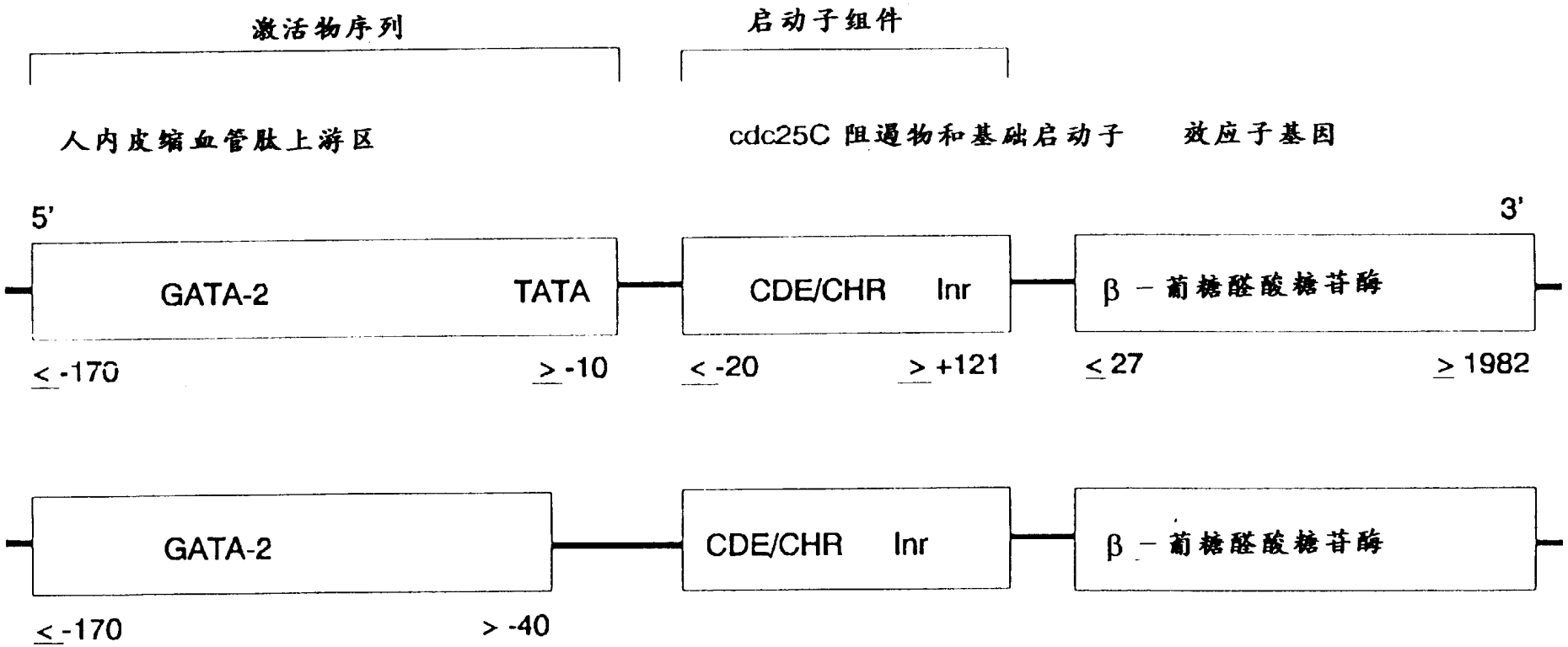

激活物序列
启动子组件
人内皮缩血管肽上游区
cdc25C 阻遏物和基础启动子
效应子基因
5'
3'
GATA-2
TATA
CDE/CHR
Inr
β－葡糖醛酸糖苷酶
≤-170
≥-10
≤-20
≥+121
≤27
≥1982
GATA-2
CDE/CHR
Inr
β－葡糖醛酸糖苷酶
≤-170
>-40

图 6

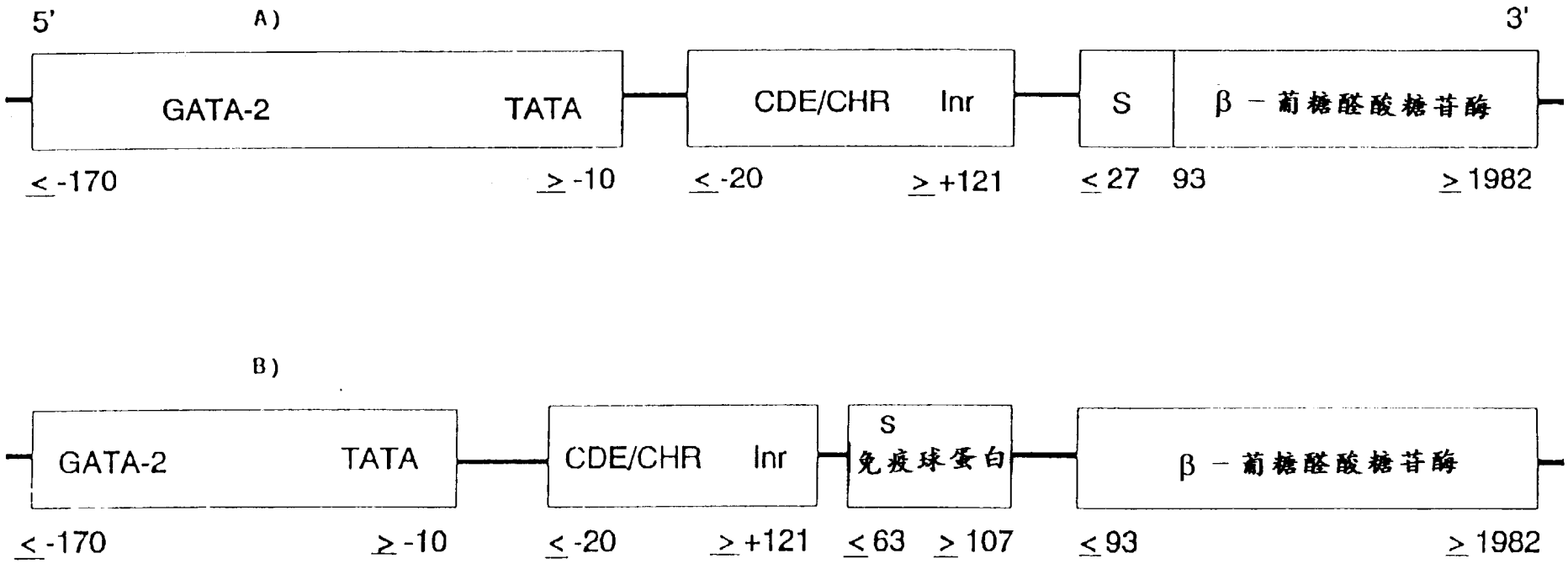

5'
A)
3'
GATA-2
TATA
CDE/CHR
Inr
S
β－葡糖醛酸糖苷酶
≤-170
≥-10
≤-20
≥+121
≤27
93
≥1982
B)
GATA-2
TATA
CDE/CHR
Inr
S
免疫球蛋白
β－葡糖醛酸糖苷酶
≤-170
≥-10
≤-20
≥+121
≤63
≥107
≤93
≥1982

图7