

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 48/00

C12N 13/00 C12N 15/00

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98804010.7

[43]公开日 2000年5月3日

[11]公开号 CN 1252006A

[22]申请日 1998.3.9 [21]申请号 98804010.7

[30]优先权

[32]1997.3.10 [33]US[31]08/815,402

[86]国际申请 PCT/US98/04551 1998.3.9

[87]国际公布 WO98/40105 英 1998.9.17

[85]进入国家阶段日期 1999.10.9

[71]申请人 研究发展基金会

地址 美国内华达州

[72]发明人 C·J·戈梅尔 S·K·S·翁

A·F·内默 M·C·卢纳

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 陈文青

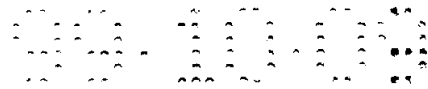
权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图页数 10 页

[54]发明名称 用光动力学治疗产生的氧化应激来暂时性、选择性表达异源基因

[57]摘要

本发明描述了一种选择性、暂时性表达异源基因的方法。本发明包括获得靶组织中异源基因的选择性和暂时性表达的方法。在加热或光动力学治疗(PDT)诱导的氧化应激的条件下,用可被光动力学治疗或加热诱导的启动子来表达感兴趣的基因。异源基因(如细胞因子、毒素、肿瘤抑制基因、反义分子和抗血管生成因子)的选择性和暂时性表达在治疗肿瘤、血管增生和组织肥大中有显著的治疗效果。由激光诱导加热、其它加热源(如微波、超声或射频诱导的电流)、或 PDT 靶向的基因治疗,通过以可控制的局部化方式诱导治疗性基因表达而增强了治疗效果。

ISSN 1000-8427



## 权 利 要 求 书

1. 一种在个体体内靶组织中增强基因表达的方法，该方法包括下列步骤：  
将表达载体输送至所述个体的靶组织，其中所述载体在一个启动子的控制下  
5 表达治疗性异源基因，该启动子可被光动力学治疗或加热诱导，其中所述基因对于所述启动子来说是异源的； 和  
将所述靶组织暴露在所述光动力学治疗或加热下，其中所述光动力学治疗或  
热量增强了所述基因的表达。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中全身性给予所述载体。
- 10 3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中局部给予所述载体。
4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述载体是逆转录病毒载体、腺伴随病毒载体或脂质体 DNA 载体。
5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述启动子是热休克蛋白 hsp 启动子或葡萄糖调节蛋白启动子。
- 15 6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述异源基因是免疫调节基因、肿瘤抑制基因、反义 DNA、或抗血管生成基因。
7. 根据权利要求 6 所述的方法，其中所述免疫调节基因是细胞因子基因。
8. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述启动子可被反应性氧种类诱导。
9. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述靶组织是肿瘤、组织生长异常的区域  
20 域或血管生长异常的区域。
10. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述加热由产热激光、微波、超声波或射频波产生。
11. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述产生热在 44.5 至 45 °C 之间。
12. 一种增强个体体内靶组织中的基因表达的方法，该方法包括下列步骤：  
25 将光动力学治疗的光敏剂给予所述个体；  
将表达载体输送至所述个体的所述靶组织，其中所述载体在光动力学治疗可  
诱导的启动子控制下表达治疗性异源基因，其中所述基因对于所述启动子来说是  
异源的；  
使所述光敏剂和所述表达载体被所述靶组织吸收； 和  
30 将所述靶组织暴露在光照下，其中所述光照与所述光敏剂结合会产生反应性  
氧种类来诱导可被光动力学治疗诱导的所述启动子，增强所述治疗性异源基因的  
表达。



13. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述光敏剂选自光卟啉、锡本紫红素、单-1-天冬酰胺基二氢卟酚 e6、苯并卟啉衍生物、内消旋-四-(羟基苯基)二氢卟酚和 5-氨基乙酰丙酸。

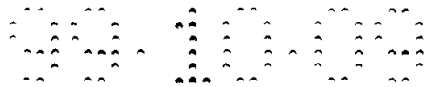
5 14. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述启动子是热休克蛋白 hsp 启动子或葡萄糖调节蛋白启动子。

15. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述载体是逆转录病毒载体、腺伴随病毒载体或脂质体 DNA 载体。

16. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述异源基因是免疫调节基因、肿瘤抑制基因、反义 DNA 或抗血管生成基因。

10 17. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中所述免疫调节基因是细胞因子基因。

18. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述光由激光器产生。



# 说明书

用光动力学治疗产生的氧化应激来  
暂时性、选择性表达异源基因

5

## 发明背景

本发明部分利用了通过国立卫生研究院转授而获得的资金得以完成。因此，联邦政府在本发明中享有一定的权利。

10

## 发明领域

本发明总地涉及实体肿瘤的临床治疗。更具体地说，本发明涉及以可控制的局限性方式诱导治疗性基因的表达。

## 相关技术领域的描述

15

光动力学治疗(PDT)是一种实体恶性肿瘤的临床治疗方法(Fisher, A.M.R.等人, *Laser Surgery Medicine* 17:2-31(1995); Marcus, S.L.和 Dugan, M.H., *Laser Surgery Medicine*, 12:318-24(1992);以及 Henderson, B.W.和 Dougherty, T.J., *Photochem. Photobiol.*, 55:931-48(1992))。将光敏剂在肿瘤组织中的定位性质和光化学产生反应性氧种类与激光器产生的光的精确传递相结合,产生了赋予有效局部杀肿瘤活性的方案(Henderson, B.W., *Photodermatology* 6:200-11(1989);和 Wilson, B.C.和 Jeeves, W.P. *PHOTOMEDICINE*(Ben Hur, E.,和 I. Rosenthal 编辑) 2:127-67 (1987))。一种称为光卟啉(photofrin)的血卟啉衍生物是用于大多数临床实验的光敏剂。光卟啉介导的 PDT 最近已经得到 FDA 批准用于治疗食管癌,且该化合物也已经在加拿大、荷兰和日本得到当局批准。PDT 在治疗支气管、膀胱、  
20 皮肤、头/颈和子宫颈癌以及非恶性肿瘤疾病(如牛皮癣和与年龄有关的黄斑变性)中显示了相当好的前景。

25

对于表现出改善的药理、光化学和光物理学性质的新光敏剂的开发和临床评价的兴趣也日益增长(Gomer, C.J. *Yearly Review: Photochem. Photobiol.*, 54:1093-1107(1991))。正在经受临床实验的第二代光敏剂包括锡本紫红素(SnET2)、单-1-  
30 天冬酰胺基二氢卟吩 e6(NPe6)、苯并卟啉衍生物(BPD)、内消旋-四-(羟基苯基)二氢卟吩(mTHPC)和 5-氨基乙酰丙酸(ALA)。这些化合物表现出许多认为与光卟啉相当或比其更好的性质,包括化学纯度、在较长波长下光子吸收增加、改进的肿

瘤组织生长停滞作用、迅速从正常组织中清除、反应性氧种类的高光量子产量以及最少的暗毒性(dark toxicity)(Dougherty, T.J., *Photochem. Photobiol.* 58:895-900(1993); Moan, J.和 Berg, K., *Photochem. Photobiol.* 55:931-48(1992); 和 Kessel, *Photochem. Photobiol.*, 50:169-74(1989)). ALA 是内源性原卟啉 IX 的代谢前体。

5 PDT 时光化学产生的反应性氧种类会对脂质、蛋白和核酸造成破坏(Moan, J., *Photochem. Photobiol.* 43:681-90(1986)). 实际上, 在许多正常和恶性细胞中, 对于细胞膜、细胞器、酶和 DNA 的伤害都已有记载(Prinze, C.等, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1038:152-57(1990); 和 Hilf, R.,等, *Cancer Res.*, 44:1483-88(1984)). 对于所有这些部位的氧化破坏足以导致细胞死亡. 然而, PDT 诱导的死亡的确切机制以及作用的靶尚待阐明。

10 PDT 诱导早期应答基因(c-fos, c-jun, c-myc, egr-1)以及属于热休克蛋白(HSP)、葡萄糖调节蛋白(GRP)和亚铁原卟啉加氧酶家族的应激蛋白基因的表达(Luna, M.C.等, *Cancer Res.*, 54:1374-80(1990); Gomer, C.J.,等, *Photochem. Photobiol.*, 53:275-279(1991); Gomer, C.J.,等, *Cancer Res.*, 51:6574-79(1991);和  
15 Gomer, C.J.,等, *Cancer Res.* (在出版)(1997)). 应激基因的诱导处于转录水平, 但是特异性靶和/或信号传导途径上负责诱导应激应答基因表达的信息却是未知的. PDT 还诱导了凋亡, 凋亡看来包含了从细胞膜开始的信号转导途径(Agarwal, M.L.等, *Cancer Res.*, 51:5993-96(1991); He, X.Y.,等, *Photochem. Photobiol.* 59:468-73(1994)和 Zaidi, S.I.A.,等, *Photochem. Photobiol.* 58:771-76(1993)). 在光  
20 敏化的细胞中观察到特征性的 DNA 片段化、染色质浓缩以及一种组成型内源核酸酶的激活. 凋亡也已被认为是经 PDT-处理肿瘤中的体内早期行为。

细胞有不同应激应答. 这些应答的每一个由一种或多种环境危害或应激来引发, 该诱导的主要后果是增加了应激耐受水平. 热休克应答是这些应激应答中最具有特征的一种应答. 据 1962 年的报道, 暴露在不致死的高温(热休克)以及某些  
25 化学物质下会使果蝇(*Drosophila busckii*)唾液腺上出现新的胀泡(puff). 这些在光学显微镜下清晰可见的胀泡表示热休克可诱导基因有高转录活性, 以及产生热休克蛋白的信使 RNA 的 RNA 合成. 最近, 已经表明, 从细菌到高等脊椎动物的广大生物在基因表达上因热休克而出现类似的显著变化。

对热休克的应答不仅强烈地诱导了热休克蛋白(HSP)的基因, 而且还阻遏了  
30 该诱导前正在表达的大多数基因. 基因转录方式以及细胞的蛋白合成机制选择 mRNA 进行翻译的方式均有显著变化。

热休克导致的转录变化是由于热休克基因启动子中有热休克元件存在, 该元



件是在热休克应答中特异性诱导转录所需的 DNA 序列。在大肠杆菌的热可诱导启动子中，热休克元件的共有序列是 CTGCCACCC，位于相对于转录起始位点的核苷酸-44 至-36 位。在真核细胞的热可诱导启动子中，它毗邻 5bp 序列 NGAAN 的重复序列，以任意取向排列位于 TATA 盒元件的上游。

5 对于实验目的，热休克应答通常用温度上升来诱导。诱导的最适温度取决于(动物)种类，但是它通常比允许生长的最高温度高 1 或 2 °C。同样，应答通常是暂时性的。

除了热应激外，热休克蛋白合成还有其它诱导物。它们包括可能会产生高活性自由基的几种潜在的细胞毒性化学物质和生理状态。这些诱导物可能都能在高温下导致细胞内积累异常或部分变性的蛋白。

10 葡萄糖调节蛋白(即 GRP)的分子量为 78,000 和 94,000，它们具有与热休克蛋白同源的序列。GRP 家族的蛋白由葡萄糖饥饿、缺氧、胞内钙质的改变、暴露在抑制剂或糖基化下以及由 PDT-介导的氧化应激协同诱导(Gomer, C.J.,等, *Cancer Res.* 51:6574-79(1991);和 Li, L-J.,等, *J.Cell Physiol.* 153:575-82(1992))。分子量为 15 78,000 的 GRP 的序列与免疫球蛋白重链结合蛋白的序列相同,且 GRP78 和 GRP94 位于内质网(ER)中。GRP78 与新生的、分泌的和跨膜蛋白瞬时结合,与 ER 中异常折叠或加工过的蛋白永久性结合。当 ER 中的蛋白加工被干扰时,认为 GRP78 在细胞应激时及应激后有保护性功能。Lee 等表明,通过肿瘤缺氧使 grp78 转录激活可用于定向基因治疗。大多数基础元件被除去的截短的 grp78 启动子显示出 20 有效地推动了报道基因在低氧小鼠肿瘤中的高水平表达(Gazit, G.,等, *Cancer Res.* 55:1660-63(1995))。

本发明证实了 PDT-介导的氧化应激是应激蛋白(特别是属于热休克蛋白族的那些蛋白)的强转录转导体。因此,本发明涉及一种定向基因治疗方法,该方法用具有 HSP-或 GRP-可诱导启动子的重组构建物来推动细胞毒素或免疫调节剂的高水平局部表达,以增强 PDT 杀肿瘤作用。

25 因此,已有技术中还没有能产生高水平局部表达细胞毒素或免疫调节剂的方法。本发明满足了本领域中长期以来这一需求和希望。

### 发明概述

30 本发明的一个目的是提供一种提高 PDT 局部杀肿瘤(或抗血管生成)性质的新方法,该方法用这些治疗方式作为基因在空间和时间上表达的分子开关,以增强 PDT 的直接效应或与该效应协同作用。本发明优于目前已有的策略,已有策略试



图用组成型作用启动子来递送局部化细胞毒性基因治疗，即病毒传递系统采用了将基因转录限制在选定的细胞内的组织特异性受体或组织特异性增强物。用组成型作用的启动子不可能从时间上调节基因表达，因为正常细胞和组织中细胞毒性基因产物有高基础性表达。本发明(将可诱导基因治疗和 PDT 或加热相结合)增强了局部性肿瘤控制，而不增加正常的组织毒性(增加治疗获益)。PDT 或热可诱导的启动子的转录激活被控制在给定的组织体积中和特定时间内。因此，该步骤既利用了 PDT 或热诱导的直接细胞毒性，又利用了 PDT 或热的靶向潜力来诱导细胞毒性基因转录在空间和时间上的调节。

PDT 或热靶向基因治疗采用含有 PDT 或热可诱导的启动子的构建物来增强局部细胞毒性，该启动子在编码 PDT 或热处理区域内被转录激活的异源基因的 cDNA 的上游。Weichselbaum 等人已经报道了采用电离辐射的类似程序(Weichselbaum, R.R., 等人, *Cancer Res.* 54:4266-69(1994))。

本发明的一个目的是提供一种暂时性局部处理个体中靶组织的方法，该方法包括下列步骤：给予所述个体一种表达载体，其中所述载体在光动力学治疗或加热可诱导的启动子控制下表达治疗性异源基因，并使所述靶组织暴露在所述光动力学治疗或加热下。本发明的这一特定目的的各种实例包括通过热能激光、微波、超声波或射频波来产热。

本发明的另一个目的是提供一种暂时性局部处理个体中靶组织的方法，该方法包括下列步骤：给予所述个体光敏剂作光动力学治疗；给予所述个体一种表达载体，其中所述载体在光动力学治疗可诱导的启动子控制下表达治疗性异源基因；使所述光敏剂和所述表达载体被所述靶组织吸收；和使所述靶组织暴露在光照下，其中所述光照与所述光敏剂的结合会产生反应性氧种类来诱导可被光动力学治疗诱导的所述启动子，导致所述治疗性异源基因表达。本发明这一目的的一个特定实例包括：光敏剂选自光卟啉、锡本紫红素、单-1-天冬酰胺基二氢卟吩 e6、苯并卟啉衍生物、内消旋-四-(羟基苯基)二氢卟吩和 5-氨基乙酰丙酸。

本发明方法的两个目的的各种实例包括全身或局部给予载体。本发明载体的较佳实例包括所述载体是逆转录病毒载体、腺伴随病毒载体或脂质体 DNA 载体等例子。

本发明两个目的的特别佳的实例是，所述启动子是热休克蛋白(hsp)启动子或葡萄糖调节蛋白启动子。更佳的实例包括其中所述异源基因是免疫调节基因，特别是细胞因子。另外，实例包括其中所述异源基因是肿瘤抑制基因、一种反义 DNA、或一种抗血管生成基因。



在本发明两个目的任一个目的中，较佳的实例包括其中所述靶组织是肿瘤或组织生长异常的区域。

本发明的其它方面、特征和优点可从本发明较佳实例的下列描述中明显看出。给出这些实例的目的是为了公开。

5

### 附图简述

所附附图已经包括在本文中，这样就能清楚详细地了解本发明的上述特征、优点和目的。这些附图构成了说明书的一部分。然而应注意，附图描述了本发明的较佳实例，不应认为这些附图限制了本发明的范围。图 1-5 显示了β-半乳糖苷酶(β-gal)报道基因在暴露于热或 PDT 下的 RIF HB-3 细胞中的选择性和暂时性表达：

图 1：经热(45 °C)处理 1.5, 10, 20, 30 和 40 分钟后转染的 RIF HB-3 细胞中的β-半乳糖苷酶活性(用 ONPG(邻-硝基苯-吡喃半乳糖)作为底物测得)。高热作用 6 小时后收集样品。每个数据点用至少三次独立实验的平均值±标准误差表示。

15 图 2。经 NPe6-介导的 PDT(剂量为 600-5400 焦耳/cm<sup>2</sup>)处理后 RIF HB-3 细胞中的β-半乳糖苷酶活性(用 ONPG 作为底物测得)。光照 6 小时后收集样品。每个数据点用至少三次独立实验的平均值±标准误差表示。

图 3。经 45 °C 处理 20 分钟后 RIF HB-3 细胞中的β-半乳糖苷酶表达的动力学图谱(用 ONPG 作为底物测得)。每个数据点用至少三次独立实验的平均值±标准误差表示。在热处理 3 小时后检测酶活性(19 毫单位/毫克蛋白)。在热暴露下 6 小时和 12 小时时，β-gal 活性达到峰值(100 和 125 毫单位/毫克蛋白)。

20 图 4。经 NPe6-PDT 处理(光剂量为 3000 焦耳/cm<sup>2</sup>)后 RIF HB-3 细胞中的β-半乳糖苷酶表达的动力学图谱(用 ONPG 作为底物测得)。每个数据点用至少三次独立实验的平均值±标准误差表示。在处理 3 小时后检测酶活性的最小水平。在 NPe6 介导的 PDT 后 6 小时和 12 小时之间，达到峰值活性。

图 5。在 C3H/HeJ 小鼠中生长并用热或 NPe6-PDT 处理过的 RIF HB-3 肿瘤的β-半乳糖苷酶活性(用 ONPG 作为底物测得)。热处理包括在 45 °C 下暴露 20 分钟。测试 PDT 的三种光照剂量。每个条图表示 5 次不同测定的平均值±标准误差。在高热处理后发现最大应答(8.25 毫单位/毫克蛋白)。NPe6-PDT 诱导的β-gal 酶活性在 1.08-3.48 毫单位/毫克蛋白之间。对照肿瘤或只用光照或 NPe6 处理的肿瘤得到的是无可检测水平的记录(用 PH 和 Sn ET2 作 PDT 处理获得的结果相当)。

30 图 6 至 12 显示了氯霉素乙酰转移酶(CAT)报道基因在暴露于热或 PDT 下的





氧种类(如单质氧), 从而诱导出对亚细胞目标(膜、细胞器、酶和 DNA)的氧化破坏作用。在临床上, PDT 用来治疗各种实体肿瘤(食管、支气管、膀胱、脑、眼、头/颈、皮肤和子宫颈)以及非恶性肿瘤疾病(如与年龄有关的黄斑变性以及牛皮癣)。在 PDT 中采用了各种光敏剂, 包括光卟啉(PH)、锡本紫红素(SnET2)、单-  
5 1-天冬酰胺基二氢卟吩 e6(NPe6)、苯并卟啉衍生物(BPD)、内消旋-四-(羟基苯基)二氢卟吩(mTHPC)和 5-氨基乙酰丙酸(ALA)。

本文所用的术语“热休克基因”指在对升高的温度应答中以高水平转录的基因。

10 本文所用的术语“CAT”或“CAT 试验”指用来测定真核启动子序列体内效应的试验。CAT 基因编码的 CAT 通过使抗生素氯霉素的两个羟基中的一个或两个乙酰化来灭活该药物。由于真核细胞不合成 CAT, 因此该基因用作分析启动子的报道基因, 尤其是在哺乳动物细胞中。CAT 用根据薄层层析的方法来测定, 该方法将<sup>[14C]</sup>氯霉素与仅仅在 CAT 酶存在时才合成的乙酰化失活衍生物分开。

15 本文所用的术语“β-gal”或“β-半乳糖苷酶试验”指用于测定真核启动子序列体内效应的试验。β-半乳糖苷酶是一种通过水解末端非还原性β-半乳糖残基将β-半乳糖苷(如乳糖)水解成组分糖的酶。在启动子作用的研究中, 用大肠杆菌 LacZ 基因作为报道基因, 在感兴趣基因与 LacZ 基因之间的翻译框内融合使得 lacZ 在受研究启动子控制下表达。然后用邻-硝基苯-吡喃半乳糖作为底物测定β-半乳糖  
20 苷酶活性, 就可测定启动子的活性。

本文所用的术语“葡萄糖调节蛋白”或“GRP”指由葡萄糖饥饿、缺氧、胞内钙质的改变、暴露在抑制剂或糖基化下以及由 PDT-介导的氧化应激条件协同诱导的蛋白质家族。

25 本文所用的术语“肿瘤抑制基因”指认为参与细胞生长和分裂正常控制的不同方面的一类基因。这些基因的共同特征是它们的失活(通常通过遗传方式)会导致产生肿瘤。

本文所用的术语“免疫调节基因”指一种基因, 该基因的表达调节针对特异性刺激或多种刺激的免疫反应的进程。例子包括白细胞介素 4、白细胞介素 10、肿瘤坏死因子α等。

30 本文所用的术语“细胞因子”指由免疫系统细胞产生的一种小的蛋白质, 它能影响和指导对特异性刺激的免疫应答的进程。

本文所用的术语“抗血管生成基因”指编码减少或终止血管形成的蛋白质的

基因。

5 本文所用的术语“反义 DNA”指编码反义 RNA 的 DNA。这些反义 RNA 具有与其基因的天然“有义” mRNA 转录物形成 RNA-RNA 双链体的能力，从而阻止了“有义” RNA 的翻译。反义 RNA 提供了一种灭活特异性基因表达的方式，它适用于简单和复杂的真核细胞。

10 根据本发明，可能会采用本领域技术人员所知的常规分子生物学、微生物学和 DNA 重组技术。这些技术在下列文献中有充分地描述，例如参见 Maniatis, Fritsch & Sambrook, "分子克隆：实验手册"(1982); "DNA 克隆：实用方法" 第 I 和 II 卷(D.N. Glover 编辑, 1985); "寡核苷酸合成"(M.J. Gait 编辑, 1984); "核酸杂交"(B.D. Hames & S.J. Higgins 编辑, (1985)); "转录和翻译"(B.D. Hames & S.J. Higgins 编辑(1984)); "动物细胞培养"(R.I. Freshney 编辑, (1986)); "固定化细胞和酶"(IRL Press,(1986)); B.Perbal, "分子克隆实用指南"(1984)。

因此，如果在本文出现，下列术语应当有下述定义。

15 “载体”是一种复制子，例如质粒、噬菌体或粘粒，它能与另一 DNA 节段连接，从而使连接节段产生复制。如果哺乳动物受体能够耐受给予的该载体，则称该载体是“药理上可接收的”。如果给药量在生理上有明显作用，则称这种制剂是以“治疗有效量”给予。如果试剂的存在导致哺乳动物受体生理学发生变化，则该制剂有生理学意义。例如，在治疗逆转录病毒感染时，能降低感染程度或减少由感染而引起的生理性伤害的化合物将被认为是在治疗上有效的。

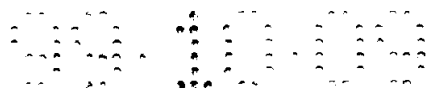
20 “DNA 分子”指以单链形式或双链螺旋形式的脱氧核糖核苷酸(腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或胞嘧啶)的聚合物形式。该术语仅仅指分子的初级和二级结构，而限于任何特定的三级形式。因此，该术语包括尤其是在线性 DNA 分子(如限制性片段)、病毒、质粒和染色体中发现的双链 DNA。在讨论本文的结构时，根据常规，只给出了沿 DNA 非转录链(即序列与 mRNA 同源的链)5'至 3'方向的序列。

“复制起始位点”指参与 DNA 合成的那些 DNA 序列。

30 DNA “编码序列”是当置于合适调控序列控制下能在体内转录并翻译成多肽的双链 DNA 序列。编码序列的边界由 5'(氨基)端起始密码子和 3'(羧基)端翻译终止密码子确定。编码序列可包括(但不局限于)原核序列、真核 mRNA 的 cDNA、来自真核(例如哺乳动物)DNA 的基因组 DNA 序列，甚至是合成的 DNA 序列。聚腺苷酸化信号和转录终止序列通常位于编码序列的 3'端。

转录和翻译控制序列是 DNA 调控序列，例如为编码序列在宿主细胞内表达





动力学治疗或热下。

对于基因治疗的应用，分子生物学和肿瘤学领域的普通技术人员无需过多实验就可确定本发明新方法中采用的合适剂量和给药途径。

5 本发明描述了选择性和暂时性表达异源基因的方法。本发明包括两种方法使培养生长的细胞和体内生长的细胞(如实体肿瘤)中的异源基因选择性和暂时性表达。用人热休克蛋白(hsp)启动子在激光诱导加热或光动力学治疗(PDT)诱导的氧化应激下表达感兴趣的基因。异源基因(如细胞因子、毒素、肿瘤抑制基因、反义分子和抗血管生成因子)的选择性和暂时性表达在治疗肿瘤、血管增生和组织肥大中有明显的治疗效果。激光诱导加热、其它加热源(如微波、超声或射频诱导的电流)10 靶向的基因治疗通过以受控制的局部化方式诱导治疗性基因的表达而增强了治疗效果。

给出下列实施例目的是描述本发明的各个实例，但并不是以任何方式限制本发明：

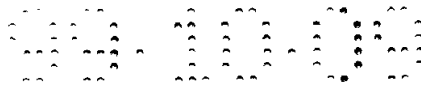
## 15 实施例 1

细胞系：

用辐射诱导的纤维肉瘤细胞(RIF)作为亲代对照细胞，并作为用 hsp 启动子报道基因构建物转染或转导的受体细胞。建立三个 hsp 启动子报道基因细胞系并进行测试。两个细胞系用表达质粒转染，一个细胞系用可诱导表达逆转录病毒载体20 转导。使 StressGen Biotech Corp.的质粒 p2500-CAT(在 hsp70 启动子的控制下提供氯霉素乙酰转移酶(CAT)的可诱导表达)和 p173OR(在 hsp70 启动子的控制下提供 $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -gal)的可诱导表达)，以及来自 Stratagene 的质粒 pMC1Neo(在胸苷激酶启动子的控制下提供新霉素抗性基因的组成型表达)生长在超感受态(supercompetent)大肠杆菌中，在碱裂解和纯化后分离获得。用磷酸钙 DNA 沉淀25 技术将每个 StreeGen 表达质粒与 pMC1Neo(比例为 5:1)共转染到 RIF-1 细胞中。使细胞在 600 $\mu$ g/ml G418 中生长，用克隆环挑取所得克隆。使 G418 抗性克隆扩展(expand)，并用加热作为阳性诱导剂测定 $\beta$ -gal 或 CAT 活性。然后在 PDT 后测试阳性克隆的活性。获得在 PDT 后表达 $\beta$ -gal 或 CAT 活性的个别 RIF-1 克隆。

用来证明加热或 PDT 可用作“启动”异源报道基因的开关的 3 个细胞系是：

- 30 1. RIF HC-2 细胞，它在 2.5kb hsp 启动子的控制下表达 CAT；
2. RIF HB-3 细胞，它在 2.5kb hsp 启动子的控制下表达 $\beta$ -半乳糖苷酶；和
3. RIF RHC-7 细胞，它通过转导经修饰的 GINA 逆转录病毒载体(含有 300bp



hsp 启动子，启动子与氯霉素乙酰转移酶基因以及组成型表达自 5' LTR 的磷酸转移酶(neo 抗性)基因相连)来获得。通过在 G-418 中生长，建立起稳定的转染子，然后筛选加热诱导表达的氯霉素乙酰转移酶的活性。

所有这三个细胞系均有稳定整合的表达载体，将所有细胞系注入 C3H/HeJ 小鼠的肋部以产生实体纤维肉瘤肿块。

## 实施例 2

处理条件:

培养的细胞的高热处理:

10 热处理前 24 小时，将细胞( $2 \times 10^6$ )接种到 T-75 瓶中，使细胞暴露在 45 °C 的控温水浴中来传递过热量。

培养的细胞的光敏剂处理(PDT):

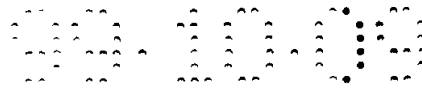
15 检测三种不同的光敏剂: 光卟啉(PH)、单-1-天冬酰胺基二氢卟吩 e6(NPe6)、锡本紫红素(SnET2)。将细胞( $2 \times 10^6$ )接种到 100mm Petri 碟中 24 小时，随后与一种光敏剂一起培育 16 小时。PH 和 Npe6 的光敏剂培育浓度为 25 $\mu$ g/ml，SnET2 为 0.75 $\mu$ g/ml。使细胞与光敏剂一起在含 5%血清的培养基中于暗处培育 16 小时。然后将细胞在含 15%血清的培养基中清洗 30 分钟，再暴露于分级(graded)剂量的红光下。对于 Npe6 和 SnET2，采用剂量率为 2mW/cm<sup>2</sup> 的 664nm 二极管激光。对于和 PH 一起培育的细胞，采用由一组并联的 30W 荧光灯产生的剂量率为 20 0.35mW/cm<sup>2</sup> 的宽谱(570-650nm)红光。

生长在小鼠体内的肿瘤的加热处理:

肿瘤(测得直径为 6-7mm)的高热处理包括在 44.5-45 °C 下暴露 20 分钟。这些温度通过用发射功率密度为 270mW/cm<sup>2</sup> 的 810nm 激光的二极管激光器照射肿瘤来实现。

25 生长在小鼠体内的肿瘤的 PDT 治疗:

光动力学治疗(PDT)处理肿瘤(测得直径为 6-7mm)包括静脉内注射 5mg/kg 的 PH 或 Npe2、或 1.5mg/kg 的 SnET2。给予药物 4-5 小时(对于 Npe6)或 24 小时(对于 PH 和 Sn ET2)后，开始用非发热激光照射肿瘤。对于 PH 介导的 PDT，采用 630nm 的红光，对于 Sn ET2 和 Npe6 介导的 PDT，采用 664nm 的光。光照剂量率为 30 75mW/cm<sup>2</sup>。



### 实施例 3

细胞和组织 $\beta$ -半乳糖苷酶试验:

5 将细胞裂解物(通过培育 RIF HB-3 细胞和报道物裂解缓冲液(Reporter Lysis Buffer)(Promega)获得)或肿瘤裂解物(通过在含有 Polytron 的报道物裂解缓冲液中匀浆化 RIF HB-3 实体瘤来获得)置于微量离心管中 4 °C 离心 2 分钟。取 150 $\mu$ l 上清液, 加入 150 $\mu$ l 含底物 ONPG(邻-硝基苯基-B-D-半乳糖吡喃糖苷)的 Assay 2X 缓冲液(Promega), 37 °C 培育反应 3 小时测试 $\beta$ -半乳糖苷酶活性。加入 500 $\mu$ l 1M 碳酸钠终止反应, 用分光光度计读取 420nm 下的吸光度。 $\beta$ -半乳糖苷酶活性用毫单位/毫克蛋白(蛋白用 BIO-RAD 蛋白试验测定)表示。

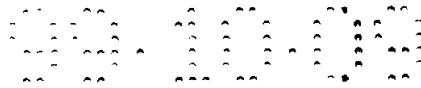
10

### 实施例 4

细胞和组织 CAT 试验:

15 对于细胞, 使 10 $\mu$ g 细胞蛋白(通过细胞冻融获得)与 35 $\mu$ l 1M TrisCl(pH7.8)、10 $\mu$ l 6.0mg/ml 乙酰辅酶 A、2.5 $\mu$ l C-14 氯霉素(ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA, 目录号为 12060)和水混合至最终体积为 75 $\mu$ l。使反应混合物在 37 °C 水浴中培育 30 分钟。加入 1 毫升乙酸乙酯, 涡流振荡 1 分钟, 在最大速度下离心 5 分钟, 从反应混合物中抽提出乙酰化氯霉素。除去乙酸乙酯层并在变速真空(speed vac)中干燥 45 分钟。将样品溶解在 30 $\mu$ l 乙酸乙酯中, 点样在硅胶薄层层析 TLC 板上。使 TLC 平板在含 200 毫升氯仿:甲醇(95:5)的容器中显影 45 分钟, 20 空气干燥, 并曝光 X 射线胶片过夜。切下 TLC 板上乙酰化和未乙酰化的点, 在闪烁计数器中计数, 计算出 CAT 转变的百分数。

25 对于组织样品, CAT 试验根据“分子克隆” Sambrook, Fritsch, Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)中的方法稍加改进进行。使 65.5 $\mu$ g 蛋白样品在 65 °C 下培育 10 分钟以灭活脱乙酰酶。在每份样品中加入 50 $\mu$ l 1M TrisCl(pH7.8)、10 $\mu$ l 6.0mg/ml 乙酰辅酶 A、4.3 $\mu$ l C-14 氯霉素(ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA), 并加入水至最终体积为 130 $\mu$ l。37 °C 培育样品 6 小时, 每隔 2 小时在样品中加入 5 $\mu$ l 新鲜制备的 6.0mg/ml 乙酰辅酶 A 溶液。培育 6 小时后, 在每份样品中加入 1 毫升乙酸乙酯, 涡流振荡 1 分钟, 离心 5 分钟, 除去有机层, 在变速真空下空气干燥, 在每份样品中加入 30 $\mu$ l 乙酸乙酯, 30 将样品点样到 TLC 平板上。使 TLC 平板在含 200 毫升氯仿:甲醇(95:5)的容器中显影 45 分钟, 空气干燥并曝光 X-射线胶片过夜。切下 TLC 板上乙酰化和未乙酰化的点, 在闪烁计数器中计数, 算出 CAT 转变的百分数。



## 实施例 5

PDT 可诱导的启动子/TNF- $\alpha$  表达载体:

5 起始质粒从 StressGen(含有 hsp 启动子的 p2500CAT)和 ATCC(含有完整的 TNF- $\alpha$  编码序列的 pUC-R10173)获得。用 HindIII 和 BamHI 消化, 除去 p2500CAT 的 CAT 基因。用 New England Biolands 的商用衔接子修饰所得到的末端。用前述已退火的衔接子 1105(EcoRI-XmnI)和 1107(HindIII-XmnI)将 HindIII 末端转变成 EcoRI。用衔接子 1105(EcoRI-XmnI)和 1106(BamHI-XmnI)将 BamHI 末端转变成 EcoRI。在插入连接子后, 将载体与纯化的 pUC-R10173 的 EcoRI 片段相连。用  
10 该环化质粒转化感受态大肠杆菌。用 Aval 和 BglII 切割所选菌落的微量制备物, 以确定插入物的取向。扩增具有正确插入物的菌落, 将所得质粒(pHspTNF)和 pMC1Neo 一起转染到 RIF 癌细胞中。分离获得含有稳定整合的 hsp 启动子/TNF- $\alpha$  表达载体 pHspTNF 的肿瘤细胞系。

15 本说明书中提到的所有专利或出版物均说明了本发明所属领域技术人员的水平。而且, 这些专利和出版物均纳入本文作为参考, 正如单独具体地说明每个出版物纳入本文作参考一样。

20 本领域技术人员很容易明白, 本发明非常适合用来实现和获得本文提到的目标、目的与优点, 以及本文内在的目标、目的和优点。本文描述的实施例、以及方法、步骤、处理、分子和具体的化合物是较佳实例的代表, 是列举性的, 并不限制本发明的范围。本领域技术人员对其所作的变化和其它应用均包括在权利要求范围所确定的本发明的思路之中。



# 说明书附图

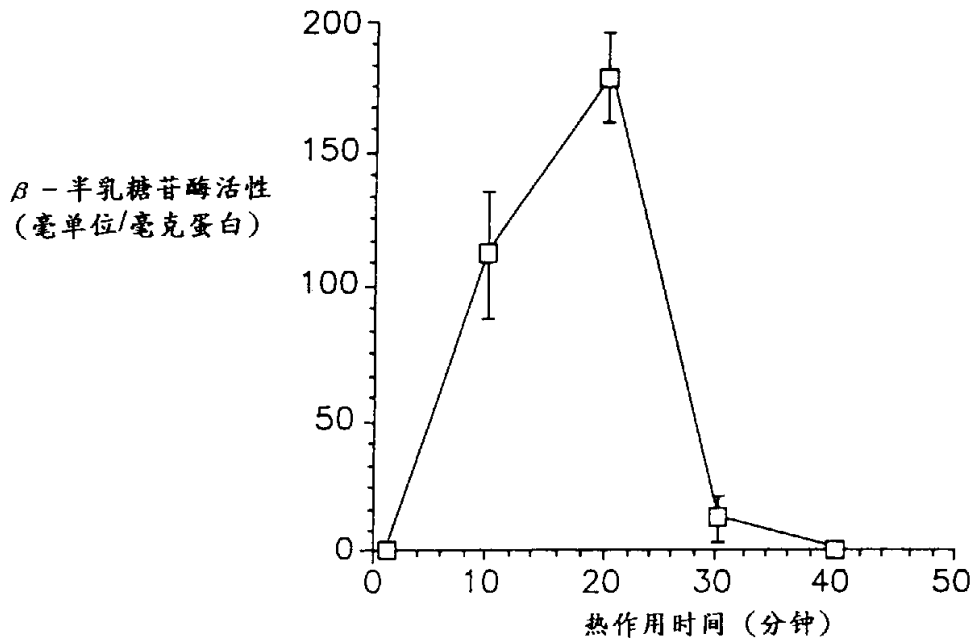


图 1

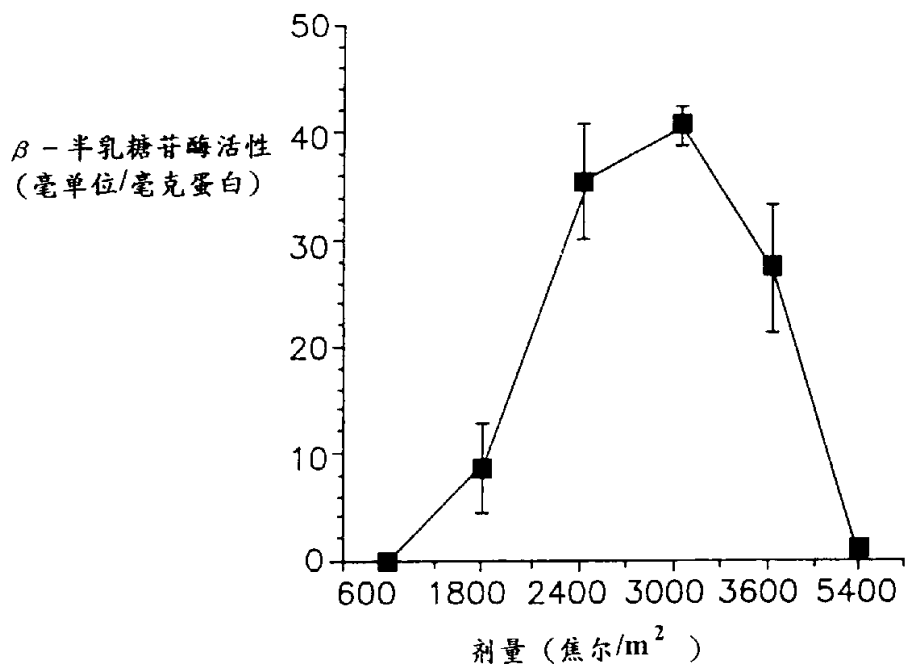


图 2

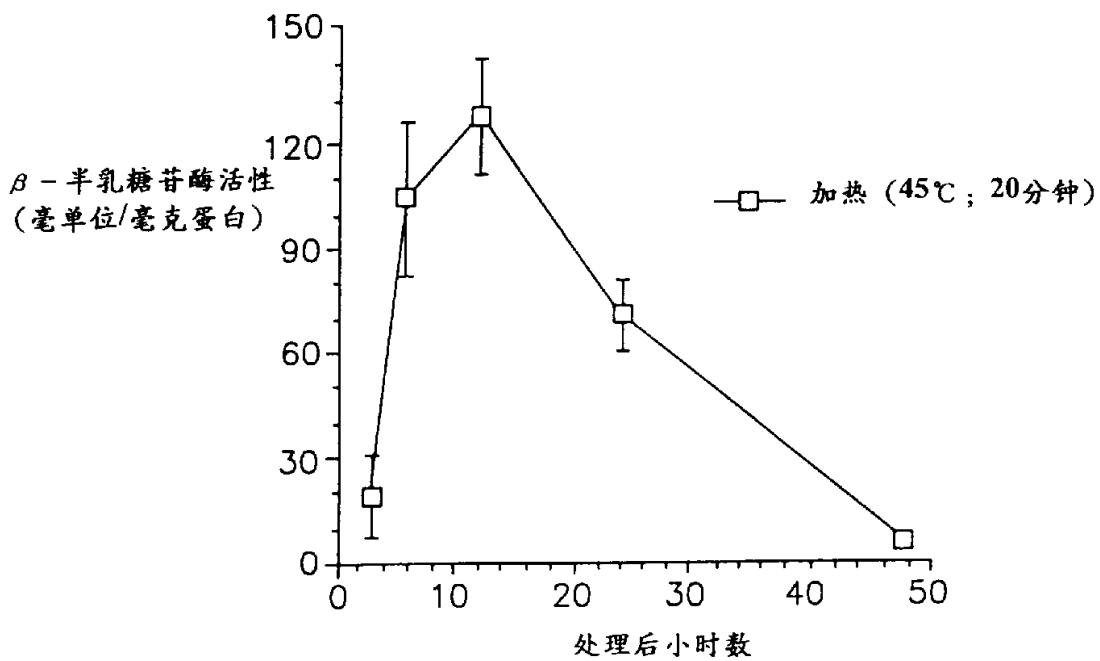


图 3

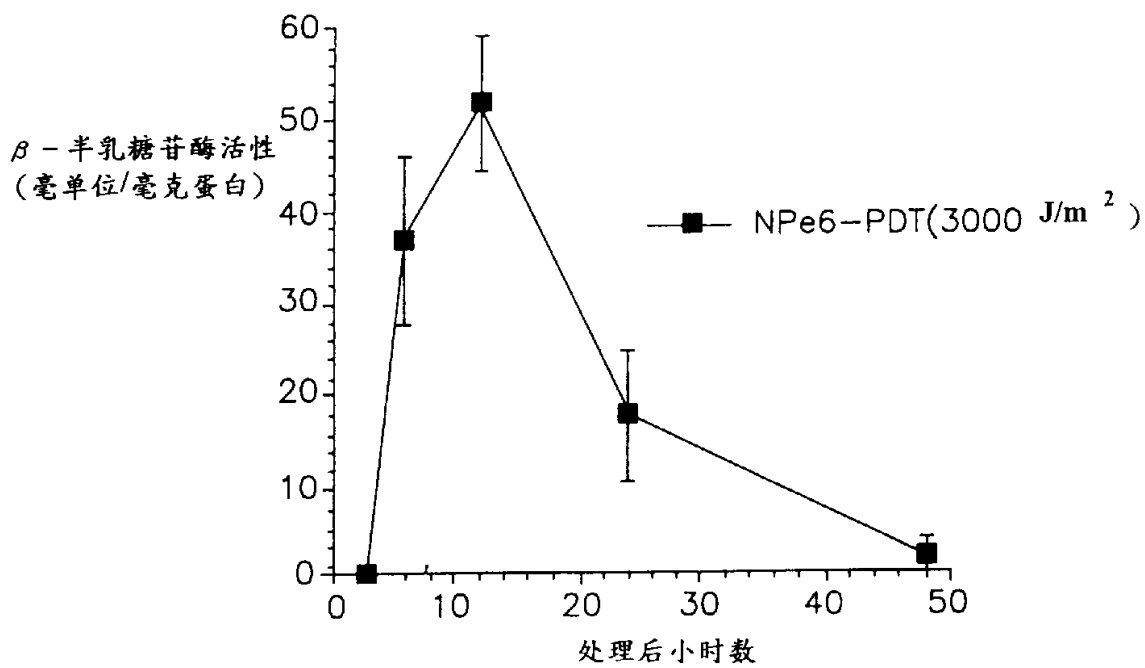


图 4

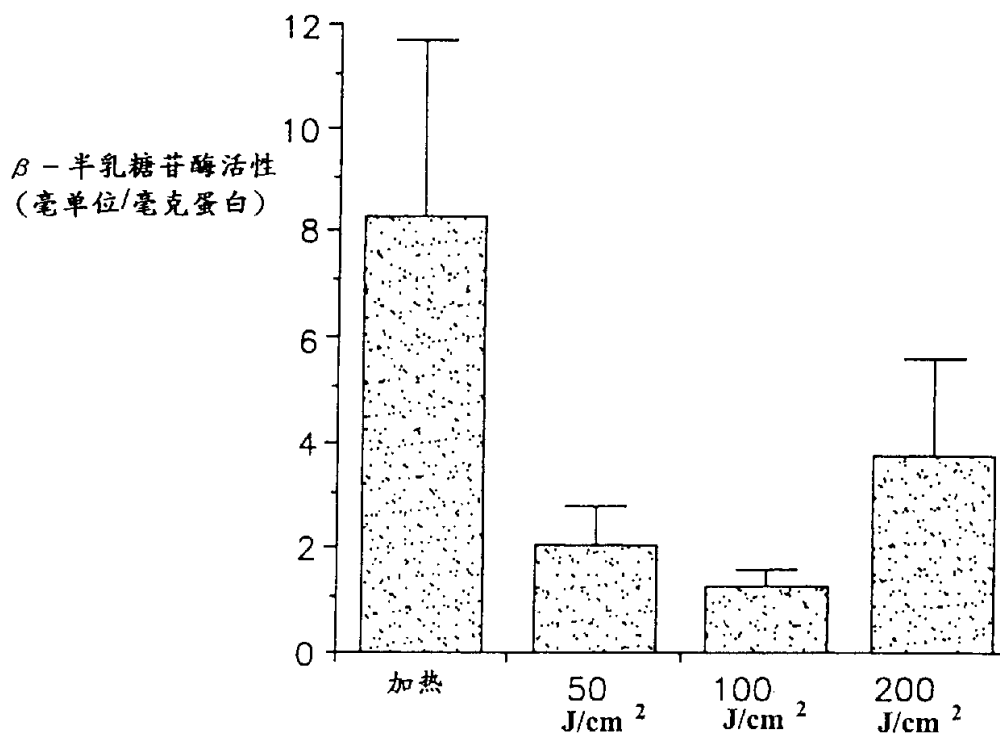


图 5

## HC-2 细胞

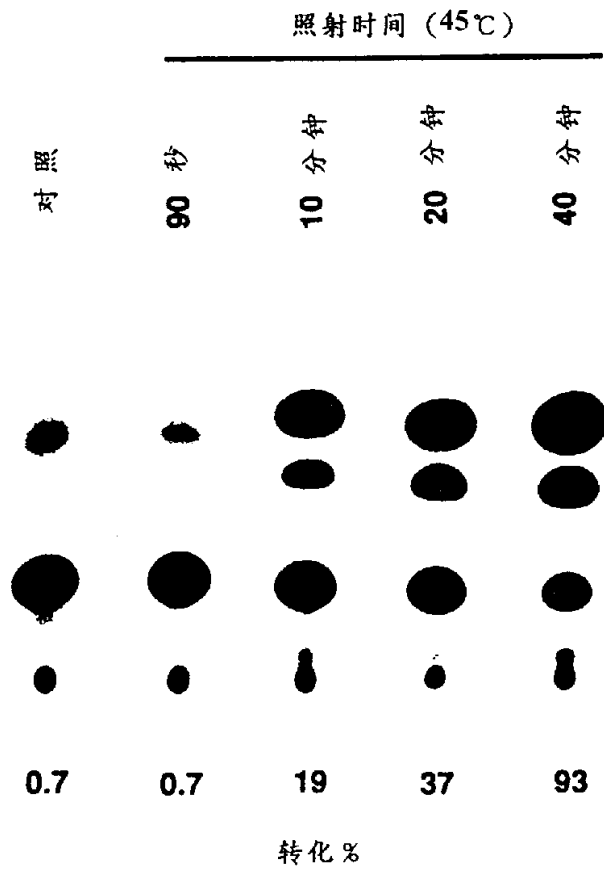


图 6

# RHC-7 细胞

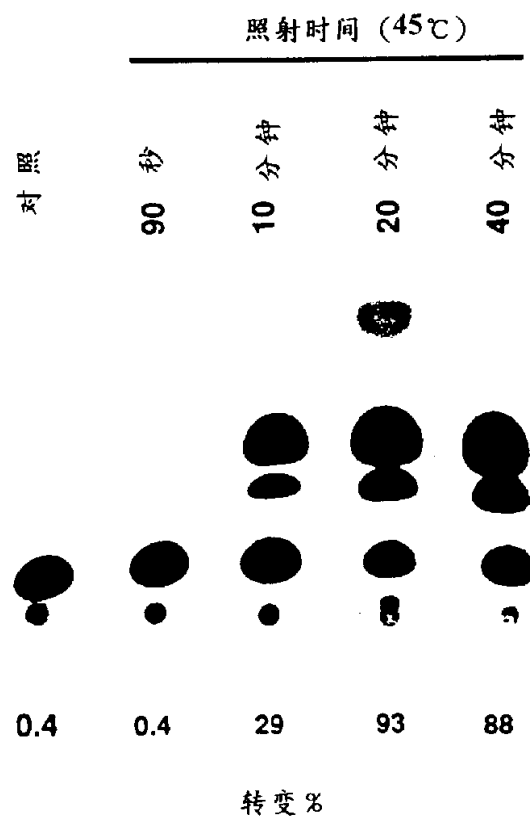


图 7

# HC-2细胞

## NPe6 PDT

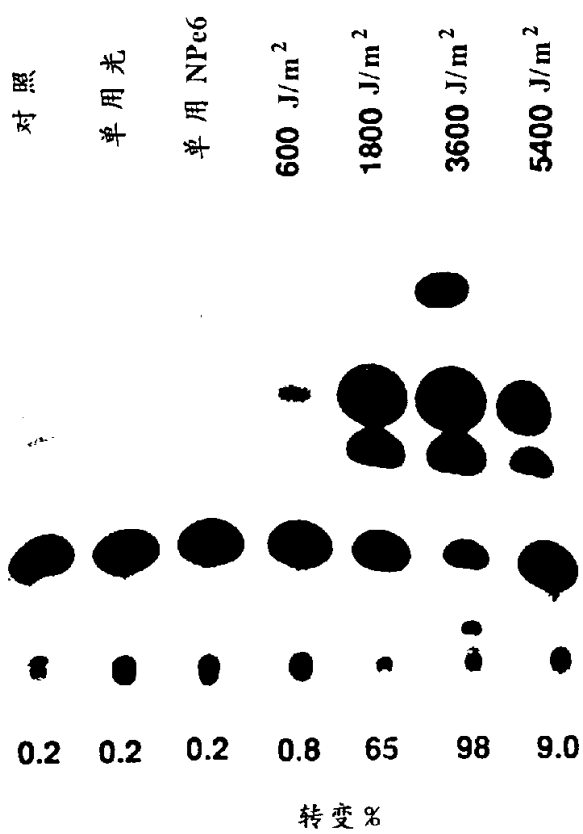


图 8

# HC-2细胞

45℃后小时数

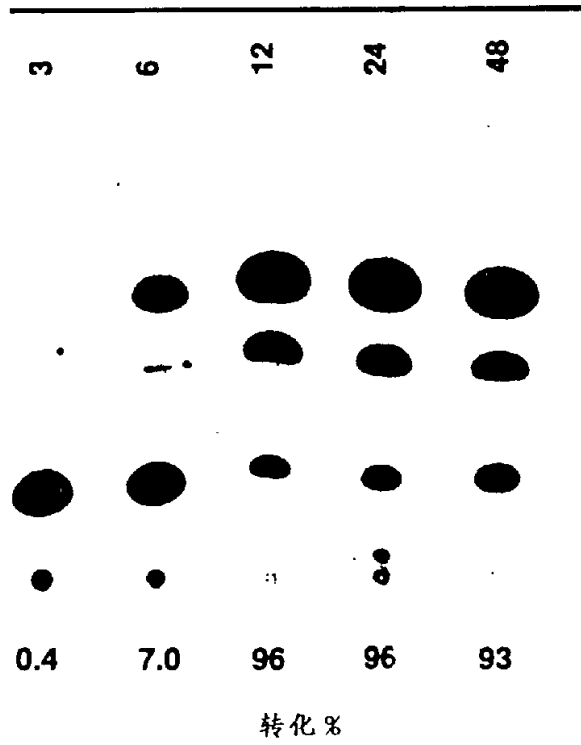


图 9

# RHC-7细胞

45℃后小时数

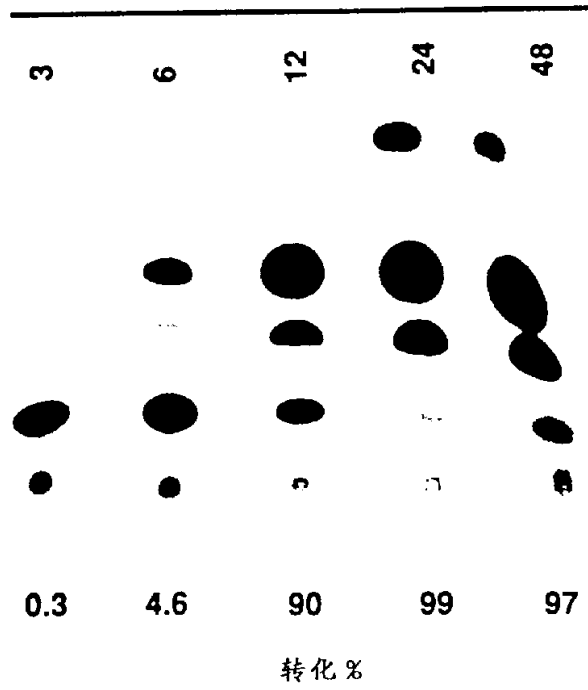
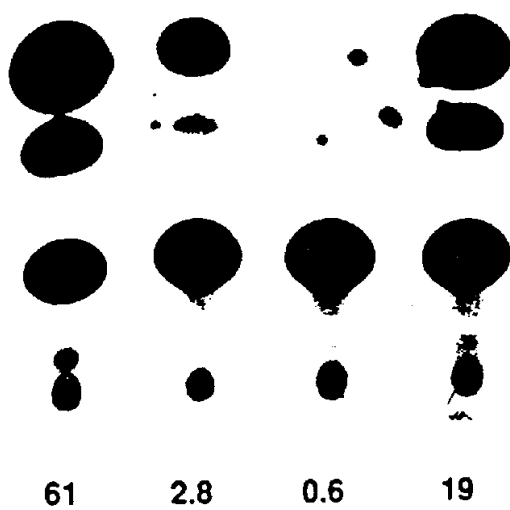


图 10



体外加热	体内加热		
	24 小时	3 小时	6 小时



转变%

图 11

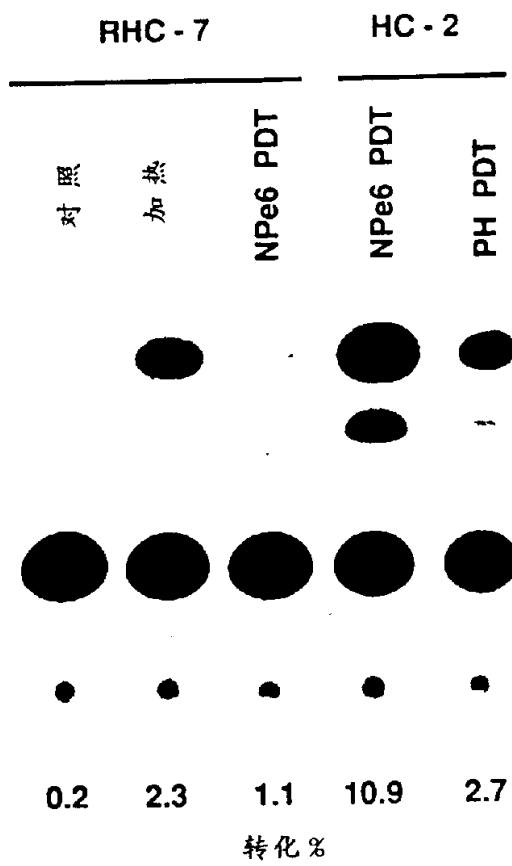


图 12