

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03807181.9

[51] Int. Cl.

A61K 31/715 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 4 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1309392C

[22] 申请日 2003.2.14 [21] 申请号 03807181.9

[30] 优先权

[32] 2002. 2. 15 [33] US [31] 60/357,485

[86] 国际申请 PCT/US2003/004571 2003. 2. 14

[87] 国际公布 WO2003/070256 英 2003. 8. 28

[85] 进入国家阶段日期 2004. 9. 27

[73] 专利权人 研究发展基金会

地址 美国内华达州

[72] 发明人 S·R·昌德胡里

R·L·赫特维茨 M·Y·赫维茨

V·赫尔科比 K·T·马库斯

[56] 参考文献

CA2131130A 1996. 3. 1

US6258791A 2001. 7. 10

审查员 陈晏晏

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 2 页 说明书 32 页 附图 15 页

[54] 发明名称

透明质酸介导的腺病毒转导

[57] 摘要

本发明提供治疗腺病毒介导疾病的方法，用腺病毒和相关载体转导细胞的改进方法，和利用此类方法作基因治疗的改进方法。

1. 含有透明质酸的腺病毒抑制剂在制备用于治疗患者腺病毒疾病的药物中的应用。
2. 如权利要求 1 所述的应用, 其中所述腺病毒抑制剂包含低分子量透明质酸。
3. 如权利要求 2 所述的应用, 其中所述透明质酸的平均分子量小于 750,000 Da。
4. 如权利要求 2 所述的应用, 其中所述透明质酸的平均分子量在 50,000 Da 至 750,000 Da 范围之间。
5. 如权利要求 4 所述的应用, 其中所述透明质酸的平均分子量在 50,000Da 至 300,000 Da 范围之间。
6. 如权利要求 1 所述的应用, 其中所述腺病毒抑制剂包含高分子量透明质酸的降解产物或玻璃体的降解产物。
7. 如权利要求 1 所述的应用, 其中所述腺病毒抑制剂进一步定义为用裂解酶或透明质酸酶处理高分子量透明质酸而获得的产物。
8. 如权利要求 1 所述的应用, 其中所述患者是人。
9. 含有透明质酸的腺病毒抑制剂的组合物在制备用于抑制腺病毒感染的药物中的应用。
10. 如权利要求 9 所述的应用, 其中所述腺病毒抑制剂包含低分子量透明质酸。
11. 含透明质酸的腺病毒介导转基因表达的调节剂在制备用于调节经腺病毒或腺病毒载体转导的细胞的转基因表达的制剂中的应用。
12. 如权利要求 11 所述的应用, 其中所述调节剂包含高分子量透明质酸或玻璃体。
13. 如权利要求 11 所述的应用, 其中所述调节剂含有低分子量透明质酸或高分子量透明质酸的降解产物或玻璃体降解产物。
14. 如权利要求 13 所述的应用, 其中所述调节剂进一步定义为用裂解酶或透明质酸酶处理高分子量透明质酸而获得的产物。
15. 一种制造治疗腺病毒感染药物的方法, 其特征在于, 该方法包括获得含透明质酸的腺病毒抑制剂并与药学上可接受的运载体配制成所述抑制剂。
16. 含透明质酸的腺病毒介导转基因表达增强剂在制备提高经腺病毒载体转导的细胞中转基因表达的制剂中的应用。
17. 如权利要求 16 所述的应用, 其中所述增强剂包含玻璃体。

18. 如权利要求 17 所述的应用, 其中所述组合物中的玻璃体浓度在 0.5%-5% (v/v) 范围之内。
19. 如权利要求 16 所述的应用, 其中所述增强剂包含高分子量透明质酸。
20. 如权利要求 19 所述的应用, 其中所述组合物中透明质酸的浓度在从 10 微克/100 微升至 240 微克/100 微升的范围之内。
21. 如权利要求 20 所述的应用, 其中所述组合物中透明质酸的浓度在从 10 微克/100 微升至 100 微克/100 微升的范围之内。
22. 如权利要求 16 所述的应用, 其中所述增强剂含玻璃体和高分子量透明质酸的混合物。
23. 如权利要求 16 所述的应用, 其中所述腺病毒载体衍生自腺病毒 5 或腺病毒 2 或是腺病毒。
24. 如权利要求 16 所述的应用, 其中所述载体进一步定义为包含转基因。
25. 如权利要求 24 所述的应用, 其中所述转基因可用于治疗癌症。
26. 如权利要求 25 所述的应用, 其中所述癌症是成视网膜细胞瘤。
27. 如权利要求 26 所述的应用, 其中所述转基因是成视网膜细胞瘤基因或胸苷激酶基因。
28. 如权利要求 24 所述的应用, 其中所述转基因是肿瘤抑制基因。
29. 如权利要求 28 所述的应用, 其中所述肿瘤抑制基因编码 p53。
30. 如权利要求 24 所述的应用, 其中所述转基因编码一报告基因。
31. 腺病毒载体和抗 CD44 特异性抗体的组合在制备用于调节转基因表达的制剂中的应用。
32. 如权利要求 31 所述的应用, 所述组合还包括高分子量透明质酸或玻璃体。
33. 如权利要求 31 所述的应用, 其中所述抗体是单克隆抗体。
34. 如权利要求 31 所述的应用, 其中所述抗体是 KM114。
35. 一种提高转基因表达的试剂盒, 其特征在于, 该试剂盒包括高分子量的透明质酸或玻璃体, 以及用于腺病毒载体转染的组分。

透明质酸介导的腺病毒转导

发明背景

本申请要求 2002 年 2 月 15 日提交的美国临时专利申请系列第 60/357,485 号的权益，该申请的所有内容纳入本文作参考。

发明领域

本发明涉及分子生物学、基因治疗和病毒疾病治疗领域。更明确的讲，本发明涉及治疗腺病毒感染和疾病的方法，涉及用腺病毒和相关载体导入细胞中的转基因表达的改进方法，和应用这种方法改进基因治疗（效果）的方法。

相关专业的描述

野生型腺病毒和许多种人类疾病相关，包括呼吸道、眼睛和胃肠道感染。这些感染是儿童学校缺课和成人丧失劳动力的主要原因。在免疫损害的个体中，对腺病毒感染目前还没有有效的抗病毒疗法，通常是致命的。因此，腺病毒感染对于已经接受化疗、骨髓移植、其他器官移植或患有 AIDS 的免疫损害病人来说，也许是致命的。小儿骨髓移植病人特别易感，有 10-30%发生腺病毒感染。

没有能有效抵抗腺病毒感染的抗病毒化合物。因此，该领域需要开发一种治疗腺病毒感染的有效方法，尤其是对于免疫损害的个体。

相比之下，无-致病性复制缺陷性腺病毒载体可用于许多临床前和临床基因治疗。人类基因治疗是治疗人类疾病的一种方法，它的基础是修饰病人细胞中的基因表达。在过去十年中，已经变得明显的是，作为治疗遗传性疾病、癌症和其他遗传功能障碍策略的基因疗法获得成功的一个最显著障碍，是（需要）开发有用的基因转移和表达的运载体。真核性病毒已经用作人体基因治疗的运载体。通常用于基因治疗研究的病毒载体是腺病毒。

修饰的没有复制能力的因此没有致病性的腺病毒，正在许多代谢和肿瘤疾病中用作输送治疗基因的运载体。这些腺病毒载体可能特别适合的疾病，例如最好是通过瞬时治疗基因表达而能治疗的癌症，因为 DNA 不必整合入宿主基因组，而使转基因

的表达有限。腺病毒载体在基因替代治疗中也是特别有意义的，其中遗传或代谢缺陷或缺乏可通过提供替代基因的表达而纠正，该替代基因编码的产物可纠正此种缺陷或缺乏。

可以修饰腺病毒而将治疗性或报告转基因有效输送给多种类型的细胞。导致人类呼吸道疾病的重组腺病毒类 2 型和 5 型(分别是 Ad2 和 AdV5)，是目前正在开发作基因治疗的那些腺病毒。Ad2 和 AdV5 均属于腺病毒的亚类，与人类恶性肿瘤不相关。近来，已开发了杂交腺病毒载体 AdV5/F35，并证明其在基因治疗和相关研究中有重大意义(Yotnda 等，2001)。

重组腺病毒能够提供极高水平的转基因输送。此系统在纠正遗传不平衡的体内输送治疗性转基因中的效果已经在各种疾病的动物模型中得到证明(Watanabe, 1986; Tanzawa 等, 1980; Golasten 等, 1983; Ishibashi 等, 1993; 以及 S. Ishibashi 等, 1994)。事实上，编码囊性纤维化跨膜调节剂(CFTR) cDNA 的重组复制缺陷性腺病毒已经被批准在至少两个人类 CF 临床试验中使用(Wilson, 1993)。Hurwitz 等, (1999) 已证明了腺病毒介导的基因治疗在小鼠癌症(成视网膜细胞瘤)模型中的治疗效果。

不幸的是，腺病毒载体虽然转导靶细胞有效，但不一定在靶细胞和组织中产生理想水平的转基因表达。已注意到在眼内环境中观察到的相对高水平的转基因表达是一个例外。

因此需要有效的治疗野生型腺病毒感染的个体，尤其是在免疫损害个体中的感染。也需要有能有效提高导入多种细胞类型和组织中的转基因表达的方法和组合物。

发明概述

本发明涉及可用于腺病毒介导疾病和腺病毒感染治疗的组合物和方法，以及利用腺病毒和相关载体提高输入细胞内的转基因表达的组合物和方法。

因此，本发明一优选的实施方案是一种治疗腺病毒疾病的方法，该方法包括鉴定需要治疗腺病毒疾病的对象，以及给予该对象一种含有腺病毒抑制剂的组合物，基团量足以抑制或预防腺病毒疾病。另一优选的实施方案是一种抑制腺病毒感染的方法，该方法包括给予细胞一种含有腺病毒抑制剂的组合物，其用量足以抑制腺病毒感染的发展。

一相关实施方案是治疗腺病毒疾病的方法，该方法包括鉴定需要治疗腺病毒感染的对象，以及给予该对象的细胞一种含腺病毒抑制剂的组合物，其用量足以抑制腺病毒感染的发展，从而抑制腺病毒的感染。另一优选的实施方案是治疗腺病毒疾病

的方法，该方法包括鉴定需要治疗的对象，以及给予该对象的腺病毒载体转导细胞腺病毒介导转基因表达的抑制剂。

一优选实施方案是一种抑制转基因表达的方法，该方法包括获得用腺病毒或腺病毒载体转导的细胞，并使该细胞与腺病毒-介导转基因表达的抑制剂接触。在一优选方面，所述细胞是组织的一部分。其他优选的实施方案包括所述细胞是脊椎动物细胞，哺乳动物细胞，灵长动物细胞或人类细胞的那些方案。当然，所述细胞也可以是非-人类的。在特别优选的实施方案中，治疗的对象是人。在其他方案中，治疗的对象是非-人类。

在特别优选的实施方案中，所述腺病毒抑制剂包含低分子量透明质酸。认为低分子量的透明质酸是平均分子量范围从少于 750,000Da 至透明质酸的最低分子量，例如一个重复单位的透明质酸。因此，据认为低分子量透明质酸酶的平均分子量可低于 750,000; 650,000; 550,000; 500,000; 450,000; 400,000; 350,000; 300,000; 250,000; 200,000; 150,000; 100,000; 50,000 Da 或更低，或任何可从中推论出的范围。

本发明实施方案中考虑低分子量透明质酸的另外方法是表现出比高分子量透明质酸低得多分子量的低分子量透明质酸。在具体实施方案中，当通过琼脂糖凝胶电泳作比较时，该低分子量透明质酸表现出比高分子量透明质酸低得多的分子量。

在本发明其他的实施方案中，所述腺病毒抑制剂包含高分子量透明质酸的降解产物。这些降解产物可通过许多方法获得。在一实施方案中，所述降解产物包括过时的透明质酸。过时的透明质酸定义为过期的透明质酸，它作为临床组合物或用作高分子量的透明质酸是不可接受的。这种过时通常由制造者在透明质酸商业样品上提供，但也可用常规实验确定。相似的，在另一实施方案中，所述抑制剂包括玻璃体的降解产物。在一种这样的实施方案中，该降解产物是过时的玻璃体。

在其他实施方案中，所述腺病毒抑制剂包括用裂解酶或透明质酸酶处理高分子量透明质酸获得的产物。相似的，在一实施方案中，所述抑制剂包括用裂解酶或透明质酸酶处理的玻璃体。

在其它优选实施方案中，将要处理的细胞在含有该抑制剂的溶液中培育。在其具体实施方案中，所述抑制剂是低分子量的透明质酸。低分子量透明质酸的浓度范围可从大约 30mg/100ml 溶液至 240mg 以上/100ml。因此，低分子量透明质酸的浓度可以是 30mg/100ml, 60mg/100ml, 120mg/100ml 或 240mg/100ml 或从中可推论出的任何浓度。另外，在具体实施方案中，低分子量透明质酸的浓度可接近饱和。

由于本发明的范围包括提高腺病毒介导的转基因表达的方法和组合物，一优选实施方案是提高细胞中转基因表达的方法，该方法包括获得用腺病毒载体转导的细胞并使该细胞与腺病毒介导转基因表达的增强剂相接触。

在某些实施方案中，可使所述细胞在转导后 2-20 小时或任何可从中推论的时间范围内与增强剂接触。优选的实施方案包括使所述细胞在转导后 2-4、6 或 8 小时或其中任何更短的时间，与该增强剂接触。在某些实施方案中，使所述细胞在转导 2 小时后与增强剂接触。当然，在其他某些实施方案中，使所述细胞基本上在转导的同时与增强剂接触。在其他优选的实施方案中，使所述细胞从转导起持续与增强剂接触。

在与腺病毒介导的转基因表达增强相关的本发明优选实施方案中，所述增强剂包括玻璃体、高分子量透明质酸，或它们的混合物。在具体实施方案中，所述增强剂包括低分子量的透明质酸联合玻璃体。在其他具体实施方案中，所述增强剂是玻璃体。在其他某些优选实施方案中，所述增强剂是高分子量的透明质酸。

优选的相关实施方案包括将腺病毒或腺病毒载体转导的细胞在含增强剂的组合物中培育的步骤。当增强剂是玻璃体时，具体的实施方案包括组合物中的玻璃体浓度在 0.5%-5%(v/v) 范围之间的那些方案。具体实施方案包括组合物中的玻璃体浓度大约是 0.5%、2.5% 或 5% 的那些方案。

在其他优选实施方案中，所述增强剂包括高分子量的透明质酸。高分子量透明质酸的分子量考虑是透明质酸的平均分子量范围从大于 750,000Da 至透明质酸的最高分子量，例如超过数百万 Da 或更大。因此，考虑高分子量透明质酸的平均分子量可大于 650,000; 750,000; 1,000,000 Da 或更高，或任何可从中推论的范围。

在本发明的实施方案中，所考虑的高分子量透明质酸的另外方法是该高分子量透明质酸表现出比低分子量透明质酸高得多的分子量。在具体实施方案中，当通过琼脂凝胶电泳作比较时，所述高分子量的透明质酸表现出大大高于低分子量透明质酸的分子量。

当所述增强剂是高分子量透明质酸时，某些实施方案包括在细胞温育的组合物中高分子量透明质酸的浓度范围从 10 微克/100 微升至 100 微克以上/100 微升。

本发明的实施方案不受所用的具体腺病毒或腺病毒载体的限制。本发明人发现了一种方法，可增强或抑制腺病毒感染以及该腺病毒和载体通常所引起的转基因表达。当然，在具体实施方案中，是使所述增强剂与腺病毒感染的细胞相接触。在其他具体实施方案中，考虑所述腺病毒载体衍生自腺病毒 5 型或腺病毒 2 型以及它们的相

关者。当然，当将腺病毒构建物配制入载体时，可包含能在细胞内表达的转基因。

考虑可通过本发明的方法和组合物来增强或抑制其表达的具体转基因，它们包括但不限于在癌症治疗中所应用的转基因。在其他具体实施方案中，所述转基因是成视网膜细胞瘤(RB)基因或胸苷激酶(TK)基因。在其他实施方案中，所述转基因是肿瘤抑制基因。在具体实施方案中，所述肿瘤抑制基因编码 p53。在其他优选的实施方案中，所述转基因编码一报告基因。报告基因是该专业技术人员熟知的，报告基因的选择不限于本发明(所用的)。实施方案包括转基因是荧光素酶、绿荧光蛋白质，或 β -半乳糖苷酶基因的那些方案。

本发明提供了细胞中腺病毒-介导的转基因表达的增强。在具体实施方案中，所述细胞是一种组织的一部分。在其他实施方案中，所述细胞是脊椎动物细胞，哺乳动物细胞，灵长动物细胞或人类细胞。

本发明人还发现 CD44 蛋白质在透明质酸或玻璃体存在时调节转基因表达的作用。因此，一实施方案是调节转基因表达的一种方法，该方法包括使转染的细胞与腺病毒载体以及至少一种抗 CD44 特异性抗体接触。相关的实施方案包括的步骤为使所述细胞与至少一种抗 CD44 特异性抗体接触之前、接触时或之后与高分子量透明质酸或玻璃体相接触。在某些实施方案中，所述抗体包括至少一种单克隆抗体。在其他实施方案中，所述抗体是 KM114。

本发明其它实施方案包括一种增加转基因表达的试剂盒，其包括高分子量透明质酸或玻璃体，以及用于腺病毒载体转染的组分。

其它实施方案包括筛选透明质酸形式的方法。如该专业那些技术人员所知道的，透明质酸的形式可根据它们的化学结构、化学特性、物理特性以及本文中它们对腺病毒-介导的转基因表达的作用分类。这些形式的非限制性实例是高分子量透明质酸、低分子量的透明质酸、能有效抑制腺病毒-介导的转基因表达的透明质酸，和能有效增强腺病毒-介导的转基因表达的透明质酸，以及能有效治疗腺病毒疾病的透明质酸。

因此；某些实施方案包括获得透明质酸的第一样品(a)；获得已知形式透明质酸的第二样品(b)；并且比较(a)中获得的样品与(b)中获得的样品对腺病毒介导的转基因表达的作用，其中增强了转基因表达表明是表达增强形式的透明质酸，抑制了转基因表达表明是表达抑制形式的透明质酸。相似的，某些实施方案包括通过凝胶电泳比较样品(a)和(b)的步骤，以及将样品(a)和(b)的电泳移动度与它们对腺病毒介导的转基因表达作用相关的步骤。特别优选的实施方案包括琼脂糖凝胶电泳。

遵照长期的专利条款，在权利要求书和说明书中单词“a”和“an”，当和单词“包括”一起应用时，代表一个或多个。

附图的简要说明

下面的附图组成了本说明书的一部分，并包括在本说明书中以进一步阐明本发明的某些方面。通过这里提供的具体实施方案的详细描述并联合参考这些附图的一个或多个图可更好的了解本发明。

图 1. 玻璃体增加了腺病毒介导的转基因表达。直方图代表平均值的标准误差。

图 2. 透明质酸裂解酶消除了玻璃体增强的腺病毒介导的转基因表达。

图 3. 增强的转基因表达不依赖于腺病毒的结合或内化。

图 4A、4B、4C 和 4D. 玻璃体增强了用另一种腺病毒受体转导的细胞中腺病毒介导的转基因表达。将 WERI-Rb 细胞(1×10^4 细胞/孔)培育在没有血清的介质中，含有(C, D)或不含有(A, B)0.5%的玻璃体。所述细胞用嵌合的腺病毒(AdV5/F35)以 5vp/细胞的比率转导，该嵌合腺病毒中 AdV35 的纤维/球节结构域替代了 AdV5 的纤维/球节结构域。显示了代表性区域的明亮区(A, C)和荧光区(B, D)图。

图 5. 玻璃体介导的转基因表达增强：玻璃体加入的时间依赖性。参考线显示了在缺少玻璃体时的基线转基因表达。

图 6. 玻璃体介导的转基因表达增强：玻璃体加入的时间依赖性。参考线表示在整个 20 小时培育期间连续接触 0.5%玻璃体的细胞中转基因的表达。

图 7. 透明质酸激活腺病毒介导的转基因表达。直方图代表平均值的标准误差。

图 8. “废弃”的透明质酸抑制腺病毒介导的转基因表达。直方图代表平均值的标准误差。

图 9. PMA-激活的 CD44 对于增强腺病毒介导的转基因表达十分重要。直方图代表平均值的标准误差，用配对 Student t 检验测定是否有意义。

图 10. 抗 CD-44 抑制了腺病毒介导的转基因表达。直方图代表平均值的标准误差。

图 11. 煮沸的玻璃体对于增强腺病毒介导的转基因表达的作用。

图 12. 结合的玻璃体和低分子量透明质酸对增强腺病毒介导的转基因表达的作用。

图 13. 玻璃体对人结膜外植体中腺病毒介导的转基因表达的作用。

图 14. 高分子量(HMW)透明质酸的裂解酶消化。

图 15. 裂解酶消化的透明质酸酶对腺病毒介导的转基因表达的作用。

发明详述

本发明人惊奇地发现，眼睛玻璃体的一种重要成分，透明质酸，能调节通过腺病毒载体导入细胞的转基因的表达以及野生型腺病毒的传染性。本发明人惊奇地发现，高分子量的透明质酸本身或作为玻璃体的一种成分，在体内和体外能增强通过腺病毒载体从眼外环境导入细胞的功能性转基因的表达。这种表达的增强不依赖于腺病毒载体附着和进入细胞。

更令人惊奇和有意义的是，本发明人发现低分子量透明质酸能抑制腺病毒感染和腺病毒载体的转导。最有意义的是，低分子量的透明质酸，或通过酶促反应或其他处理已经过修饰或降解的低分子量透明质酸，都可用来治疗腺病毒感染疾病。因此，低分子量或修饰的透明质酸或玻璃体可作为治疗腺病毒感染的预防性或治疗性组合物。

抑制作用指一种制剂部分或完全阻止、限制、减慢、减少、延迟、降低、抑制、压制或干扰某生物学过程，以任何程度，部分或完全。因此，抑制剂是能够部分或完全阻止、限制、减慢、减少、延迟、约束、降低、抑制、压制或干扰某生物学过程，例如生物化学反应，病毒或细胞生长或其他生理过程，包括但不限于感染或疾病过程，疾病或生命循环过程，器官功能或性能等等的制剂。

本发明人还发现，透明质酸通过与 CD44 作用可激活一系列细胞内活动，CD44 是许多类型细胞上常见的粘附分子家族的一个成员。因此，能特异性结合于透明质酸结合功能域并阻断 CD44 的透明质酸激活的抗体，同时抑制了玻璃体-增强的和基线腺病毒介导的转基因表达。经工程改进而能表达 CD44 的 Jurkat 细胞，但不是已知不表达 CD44 或任何其他透明质酸结合受体的野生型 Jurkat 细胞，可能显示在存在玻璃体或高分子量透明质酸时能抑制腺病毒载体输送的转基因表达的增强。佛波醇酯大大增强了玻璃体所产生的作用。以前的报导显示 PMA 可导致 CD44 的寡聚化和激活。可以用裂解酶培育来产生(或用过时的或降解的透明质酸)的低分子量透明质酸，不仅不能增强腺病毒介导的转基因表达，而且令人吃惊和出乎意料地抑制了基线腺病毒载体介导的转基因表达。

上述增强效应不依赖所用的启动子或转基因，但对腺病毒载体来说是特异的，即使它们利用不同的结合性或内化受体。这种效应的时间进程提示透明质酸对于腺病毒介导转基因表达的增强发生在病毒结合和内化之后。

以前的报导已经证明高分子量的透明质酸可结合和激活 CD44 信号转导，但低分子量透明质酸可结合但不激活相同的机制。因此低分子量透明质酸起了 CD44 功能抑

制剂的作用。高分子量透明质酸增强了腺病毒介导转基因的表达，然而低分子量的透明质酸酶抑制了基线腺病毒转导。形成透明质酸基本单元的葡萄糖醛酸-N-乙酰葡萄糖胺双糖可激活 CD44 但仅仅在细胞内注射时。CD44 有许多复杂的细胞功能，包括起细胞转运蛋白的功能，控制细胞骨架结构和运动性，并且通过控制微管和肌动蛋白的装配调节细胞内蛋白质的转运。通过低分子量 G-蛋白介导的 CD44 调节性级联反应可能影响到许多这些功能。

1. 腺病毒

腺病毒包含线性双链 DNA，基因组的大小为 30-35kb (Reddy 等, 1998; Morrison 等, 1997; Chillon 等, 1999)。存在 50 种以上的血清型的人类腺病毒，以及 80 种以上的相关形式，它们可根据免疫、分子和功能标准分为 6 个家族 (Wadell 等, 1980)。物理学上，腺病毒是一种中等大小的二十面体病毒，含有一个双链线性 DNA 基因组，例如腺病毒 5 型，有 35,935 个碱基对 (Chroboczek 等, 1992)。腺病毒需要进入宿主细胞并且将病毒基因组转移至细胞核才能感染细胞并复制病毒。

腺病毒基因组的显著特征是一个早期区域 (E1、E2、E3 和 E4 基因)，一个中间区域 (pIX 基因、Iva2 基因)，一个晚期区域 (L1、L2、L3、L4 和 L5 基因)，一个主要晚期启动子 (MLP)，倒置-末端-重复区 (ITRs) 以及一个 Ψ 序列 (Zheng 等, 1999; Robbins 等, 1998; Graham 和 Prevec, 1995)。所述早期基因 E1、E2、E3 和 E4 在感染后从病毒表达，其编码的多肽能调节病毒基因的表达、细胞基因的表达、病毒复制并且抑制细胞凋亡。进一步在病毒感染期间，MLP 被激活，这导致了晚期 (L) 基因的表达，编码的多肽的腺病毒衣壳化所需。所述的中间区编码腺病毒衣壳组分。腺病毒倒置的末端重复区 (ITRs; 100-200bp 长度)，是顺式元件，起着复制起始的作用，为病毒 DNA 复制所必需。所述 Ψ 序列是腺病毒基因组包装所必需的。

腺病毒，特别是腺病毒血清 2 型和 5 型感染的机制已经受到广泛研究。已鉴定到一种宿主细胞表面蛋白质命名为 CAR (柯萨厅腺病毒受体) 是这些腺病毒的主要结合受体。CAR 的细胞内源性功能还没有阐明。纤维球节和 CAR 之间的相互作用足以使腺病毒结合至细胞表面。然而，随后腺病毒的五邻体碱基和其他细胞表面蛋白质， α_v 整联蛋白家族的成员之间的相互作用是病毒有效内化所必需的。腺病毒 (组分) 的解离在内化期间开始；纤维蛋白质留在细胞表面结合于 CAR，腺病毒的其余组分随着病毒颗粒被转运通过细胞质以逐步方式解离在核膜处形成孔复合体。病毒 DNA 排出通过核膜进入核，病毒 DNA 在核中复制，表达病毒蛋白质，装配成新的病毒颗粒。

腺病毒感染机制中的特殊步骤可作为调节病毒感染和基因表达的潜在靶标。

2. 基因工程改进的腺病毒和腺病毒载体

在具体实施方案中，考虑用腺病毒表达载体来输送表达构建物。“腺病毒表达载体”或“腺病毒载体”包括那些足以(a)支持所述构建物的包装以及(b)最终表达的含腺病毒序列的构建物，已被克隆在组织或细胞特异性结构中。因此，腺病毒载体可包括任何含腺病毒序列的工程发行发行改造的载体。

本发明的腺病毒表达载体包含腺病毒的基因工程改造形式。腺病毒载体的性质不认为是成功实施本发明的关键。腺病毒可以是任何所知的血清型和/或亚群 A-F 之一。为了获得可用于本发明中腺一种病毒载体，亚群 C 的腺病毒 5 型是优选的起始材料。这是因为腺病毒 5 型是一种人腺病毒，关于其的大量生物化学和遗传信息已经知道，并且它在历史上已经被用于大多数采用腺病毒作为载体的结构中。

腺病毒基因转移的优点有：能够感染范围广泛的细胞类型（包括非分裂性细胞），中等大小的基因组，操作简单，高感染性，以及它们能够以高滴度增殖(Wilson, 1996)。另外，宿主细胞的腺病毒感染不会导致染色体整合，因为腺病毒 DNA 可以游离方式复制，没有与其他病毒载体相关的潜在基因毒性。腺病毒在结构上也是稳定的(Marienfeld 等, 1999)，并且在大量扩增后没有测到基因组的重排(Parks 等, 1997; Bett 等, 1993)。

腺病毒的生长和操作是该领域技术员知道的，并显示有着广阔的体外和体内宿主范围(美国专利 5,670,488；美国专利 5,932,210；美国专利 5,824,544)。此群病毒可以高滴度获得，例如 10^9 - 10^{11} 空斑形成单位/ml，它们具有高度感染性。腺病毒的生命周期不需要整合入宿主细胞基因组中。腺病毒载体输送的外来基因是游离基因，因此对于宿主细胞是低基因毒性。

虽然腺病毒载体和其他载体系统相比提供了数种独特的优点，但它们的应用经常受到载体的免疫原性、重组基因插入的大小约束，复制水平低、以及转基因表达水平低的限制。应用腺病毒载体的一个主要关心点是在包装细胞系中载体产生期间或基因治疗个体期间，是否产生了复制活性病毒。复制活性病毒的产生可能会对病人造成未预计到的病毒感染和病理结果的严重威胁。Armentano 等描述了复制缺陷性病毒载体的制备，声称能消除复制活性腺病毒无意中产生的潜在可能性(美国专利第 5,824,544 号)。此种复制缺陷腺病毒的方法包括删除 E1 区域和重置蛋白质 IX 基因，其中所述载体能表达异源哺乳动物基因。

一种产生可用作基因转移载体腺病毒的常用方法是删除 E1 基因(E1)，这涉及 E2、E3 和 E4 启动子的诱导(Graham 和 Prevec, 1995)。然后将治疗基因重组插入取代 E1 基因，其中治疗性基因的表达受 E1 启动子或异源启动子驱动。接着在“辅助手”细胞系中增殖 E1⁻复制缺陷性病毒，该辅助细胞系可提供反式 E1 多肽(例如人胚胎肾细胞系 293)。或者，可删除 E3 区域，部分 E4 区域或两者，将可在真核细胞中操作的启动子控制下的异源核酸序列插入到腺病毒基因组中，用于基因转运(美国专利第 5,670,488 号；美国专利第 5,932,210 号)。

当然，在本发明具体实施方案中，考虑可将低分子量的或经修饰的透明质酸或玻璃体用于治疗这种不经意下产生的复制活性腺病毒。如上所述，考虑本发明应采用的载体是复制缺陷性的。然而，也考虑到含有复制活性腺病毒载体的方法可能会导致所谓的扩增。因此，考虑具体的实施方案是，可通过应用低分子量或经修饰的透明质酸或玻璃体来调节复制活性病毒载体的扩增程度和速率。

已经产生了一类嵌合性腺病毒载体(AdV5/F35，例如)，它们能够将转基因输送给造血祖代细胞。AdV5/F35 载体将转基因转运给原始祖代细胞时十分有效(Yotnda 等, 2001)。这些载体也能够感染骨髓细胞的烟酸己可碱阴性‘副群’。由这些载体输送的免疫调节基因能够转导并以一定水平表达大约 5 天以上。在本发明一优选实施方案中，用透明质酸处理通过这种嵌合腺病毒载体导入的转基因(例如但不限于 AdV5/F35)，能充分增强转基因的表达。

3. 用腺病毒和腺病毒相关载体进行基因治疗

在某些实施方案中，本发明人考虑用透明质酸或玻璃体以及相关化合物来增强导入细胞中的转基因的表达，从而达到基因治疗的目的。

基因治疗通常包括将转基因导入细胞，转基因的表达结果是减轻或治疗了疾病或遗传疾病。所包括的转基因可以是那些编码蛋白质、结构性或酶活性 RNAs、抑制产物例如反义 RNA 或 DNA，或其他任何基因产物。表达是这种基因产物的产生过程或是这种基因产物产生所发生的效应。因此，增强表达包括产生更多的某转基因产物或促进该产物在限定的细胞、组织、器官内或机体状态中的作用。通过腺病毒载体输送转基因包括被称为的细胞转导。如本文所用，转导定义为通过腺病毒或相关载体将转基因或转基因构建物导入细胞。

许多实验、新发明、临床前期研究和临床试验目前正处于采用腺病毒作为基因输送载体的研究阶段。例如，正在开发以腺病毒基因输送为基础的基因疗法用于治疗

肝病(Han 等,1999),精神疾病(Lesch,1999),神经疾病(Smith,1998; Hermens 和 Verhaagen,1998),冠状动脉疾病(Feldman 等,1996),肌肉疾病(Petrof,1998),以及各种癌症例如结肠直肠癌(Dorai 等,1999),膀胱癌(Irie 等,1999),前列腺癌(Mincheff 等,2000),头颈癌(Blackwell 等,1999),乳腺癌(Stewart 等,1999),肺癌(Batra 等,1999)以及卵巢癌(Vanderkwaak 等,1999)。在本发明具体实施方案中,采用高分子量透明质酸或玻璃体来提高腺病毒载体输送的转基因的表达。

因此,本发明的目标可以通过提高包含在基因输送系统中的治疗性基因的表达而实现,该输送系统例如是重组腺病毒载体输送系统,制备的该系统能使被转导细胞接触表达增强剂,例如高分子量透明质酸或玻璃体,并导致该治疗性基因的增强表达。

所述被转导细胞可存在于细胞培养物中或体内。在体内,如本发明所考虑的那样,细胞可位于相关机体的任何组织或器官中。组织可包含宿主细胞或待转的细胞或与核酸输送组合物和/或其他制剂接触的细胞。所述组织可以是机体的一部分或从其分离得到的。在某些实施方案中,组织和它的组成细胞可包括但不限于,血液(例如造血细胞(例如人造血祖代细胞、人造血干细胞、CD34⁺细胞、CD4⁺细胞),淋巴细胞和其他血谱系细胞),骨髓、脑、干细胞、血管、肝、肺、骨、乳房、软骨、子宫颈、结肠、角膜、胚胎、子宫内膜、内皮、上皮、食管、筋膜、成纤维细胞、滤泡、神经节细胞、神经胶质细胞、杯状细胞、肾、淋巴结、肌肉、神经元、卵巢、胰腺、外周血管、前列腺、皮肤、小肠、脾、胃、睾丸。

在某些实施方案中,所述宿主细胞或组织包含在至少一个机体中。在某些实施方案中,该机体可是人、灵长动物或小鼠。在其他实施方案中,该机体可以是任何易受腺病毒和相关病毒或腺病毒载体感染的或转导的真核生物或真核细胞。该领域的技术人员会进一步明白应在什么条件下培育上述宿主细胞,从而保存它们并使得它们分裂形成代。

已开发了用于癌症治疗的基因治疗策略。已开发了根据基因转动方法的不同方法来治疗肿瘤。已开发了方法来纠正所确定的基因位点的特殊损害,这种损害可使肿瘤转化和发展(Spandidos 等,1990; Banerjee 等,1992)。可采用技术使显性致癌基因过度表达以抑制转化基因或基因产物。肿瘤抑制基因功能的丧失可采用方法来恢复野生型肿瘤抑制基因的功能。除了这些实现突变补偿的方法外,已经开发了遗传技术来特异性和选择性根除肿瘤细胞。这些分子化学治疗方法依赖于肿瘤细胞中毒素基因的特异性表达(Abe 等,1993)。最后,基因转移方法已经被用来实现抗肿瘤

免疫接种。这些遗传性免疫增强方法采用了遗传调节技术，来提高对肿瘤的免疫识别。结果，已开发了多种不同方法来实现癌症的基因治疗，所有的方法都采用腺病毒载体转导细胞。

Hurwitz 等(1999)描述了一种含有单纯疱疹(病毒)胸苷激酶基因的腺病毒载体，当将其体外转导入 Y79Rb 人成视网膜细胞瘤细胞中用前体药物丙氧鸟苷治疗时，能有效促进对那些成视网膜细胞瘤细胞的杀伤。一种通过玻璃体内注射 Y79Rb 细胞制造的成视网膜细胞瘤的小鼠模型，也对转导和治疗有反应。因此，基因治疗可有效降低人成视网膜细胞瘤小鼠模型中的肿瘤负荷。显然，腺病毒载体输送的转基因的增强表达会进一步增加此疗法的杀伤效果。具体说，在眼内环境即玻璃体中，腺病毒载体的表达增强是有利的。更普遍的是，AdV-TK/丙氧鸟苷自杀基因治疗已经显示在动物模型中治疗多种肿瘤是有效的。见例如 Eastham 等,1996(前列腺); Chen 等,1994(脑);Chen 等,1995(肝);O'Malley 等,1995 和 Goebel 等,1996(颈);Behbakht 等,1996 和 Rosenfeld 等,1996(卵巢); Esandi 等,1997(间皮瘤)。本发明的具体实施方案包括采用透明质酸来增强或促进 AdV-TK/丙氧鸟苷基因治疗的(效果)。

腺病毒载体输送的具体转基因没有限制包括那些可用于各种治疗和研究目的转基因，以及报告基因和报告基因系统，和用来跟踪转基因表达和腺病毒与腺病毒载体转导有效性的构建物。因此，作为实例，下面是可能用本发明的组合物和方法来增强表达的可能的基因类型：发育基因(例如粘附分子、细胞周期调节蛋白激酶抑制剂、Wnt 家族成员、Pax 家族成员、Winged 螺旋家族成员、Hox 家族成员、细胞因子/淋巴因子和它们的受体，生长或分化因子和它们的受体，神经递质和它们的受体)，致癌基因(例如 ABL1、BLC1、BCL6、CBFA1、CBL、CSF1R、ERBA、ERBB、EBR2、ETS1、ETV6、FGR、FOX、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、LCK、LYN、MDM2、MLL、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIM1、PML、RET、SRC、TAL1、TCL3 和 YES)，肿瘤抑制基因(例如 APC; BRCA1、BRCA2、MADH4、MCC、NF1、NF2、RB1、TP53 和 WT1)，酶(例如 ACP 去饱和酶和羟化酶，ADP-葡萄糖焦磷酸化酶、ATP 酶、醇脱氢酶、淀粉酶、淀粉葡萄糖苷酶、过氧化氢酶、纤维素酶、环加氧酶、脱羧酶、糊精酶、酯酶、DNA 和 RNA 聚合酶、透明质酸合成酶、半乳糖苷酶、葡聚糖酶、葡萄糖氧化酶、GTP 酶、解旋酶、半纤维素酶、透明质酸酶、整合酶、转化酶、异构酶、激酶、乳糖酶、脂酶、脂氧合酶、裂解酶、溶菌酶、果胶酯酶、过氧化物酶、磷酸酶、磷脂酶、磷酸化酶、多聚半乳糖醛酸酶、蛋白酶和肽酶、支链淀粉酶、重组酶、反转录酶、拓扑异构酶、木聚糖酶)，以及报告基因(例如绿荧光蛋白质和它的多种颜色变异体，荧光素酶、

CAT 报告系统, β -半乳糖苷酶等等)。

肿瘤抑制基因的功能是抑制过度的细胞增殖。这些基因的灭活破坏了它们的抑制活性, 导致了无节制的增殖。肿瘤抑制剂 p53、p16 和 C-CAM 在下面描述。

目前认为 p53 是肿瘤抑制基因。已发现高水平的 p53 突变体存在于许多经化学致癌作用、超声放射和多种病毒包括 S40 转化的细胞中。p53 基因常常是各种各样人肿瘤中突变灭活的目标, 并已证明为常见人癌症中最频繁突变的基因。它在超过 50% 的人 NSCLC 中 (Hollstein 等, 1991) 和广范的其他肿瘤中发生突变。

p53 基因编码一种 393-氨基酸磷蛋白, 能与宿主蛋白质, 例如大-T 抗原和 Elb 形成复合物。该蛋白质见于正常组织和细胞中, 但与转化细胞或肿瘤组织相比, 浓度是极低。令人感兴趣的是, 野生型-p53 看来在调节细胞生长和分裂中是重要的。在一些病例中已经显示野生型-p53 的过度表达在人肿瘤细胞系中具有抗增殖性。因此, p53 可能起着细胞生长负调节剂的作用 (Weinberg, 1991), 可能直接抑制失控性细胞生长或间接激活抑制这种生长的基因。因此, 野生型-p53 基因的缺乏或失活可能导致转化。然而, 一些研究表明 p53 突变体的存在可能是该基因转化潜能完全表达所必需的。

野生型-p53 被认为是许多细胞类型中的一种重要生长调节剂。错义的突变常见于 p53 基因, 是致癌基因转化能力所必需的。由点突变引起的单个基因改变可产生致癌性 p53。然而, 不象其他的致癌基因, 据所知 p53 点突变至少发生在 30 个不同的密码子中, 常产生显性等位基因而发生细胞表型的改变, 但不会还原为纯合性。此外, 许多这些显性负等位基因看来可被机体耐受并在种系中传代。各种突变体等位基因似乎范围从最小的功能障碍到强烈的外显显性负等位基因之间 (Weinberg, 1991)。

Casey 和同事们报导将编码野生型-p53 的 DNA 转染入两种人类乳腺癌细胞系中, 恢复了这种细胞生长抑制的控制 (Casey 等, 1991)。也已证明野生型而不是突变体 p53 转染进入人肺癌细胞系具有相似作用 (Takahasi 等, 1992)。看来 p53 优于突变基因, 当用突变基因转染细胞时将会选择它来抵抗增殖。转染 p53 的正常表达不会影响含有内源性 p53 细胞的生长。因此, 这样的构建物可被正常细胞摄取而没有副作用。因此, 提出用野生型 p53 治疗 p53 相关癌症将减少恶性细胞的数量或降低它们的生长速率。

真核细胞周期的主要过渡受依赖细胞周期调节蛋白的激酶或 CDK 的触发。一种 CDK, 细胞周期调节蛋白依赖性激酶 4 (CDK4) 通过 G1 调节其发展。CDK4 的活性受活性亚单位、D-型细胞周期调节蛋白和抑制性亚单位 p16^{INK4} 的控制。p16^{INK4} 经生物化

学特性鉴定为一种能够特异性结合并抑制 CDK4 的蛋白质, 因此可调节 Rb 的磷酸化 (Serrano 等, 1993; Serrano 等, 1995)。由于 p16^{INK4} 蛋白是 CDK4 抑制剂 (Serrano, 1993), 这种基因的缺失会增加 CDK4 的活性, 导致 Rb 蛋白质的高磷酸化。也知道 P16 能调节 CDK6 的功能。

p16^{INK4} 属于一类新近描述的 CDK-抑制性蛋白质, 也包括 p15^{INK4B}、p21^{WAF1} 和 p27^{KIP1}。p16^{INK4} 基因图位于 9p21, 一个在许多类型肿瘤中经常缺失的染色体区域。p16^{INK4} 基因的纯合性缺失和突变在人肿瘤细胞系中常见。这种事实提示 p16^{INK4} 基因是一种肿瘤抑制基因。然而, 这种解释已经受到了挑战, 因为观察到 p16^{INK4} 基因在原代未培养肿瘤中的改变频率比在培养的细胞系中低得多 (Caldas 等, 1994; Cheng 等, 1994; Hussussian 等, 1994; Kamb 等, 1994; Mori 等, 1994; Okamoto, 1994; Nobori 等, 1995; Orlow 等, 1994; Arap 等, 1995)。然而, 后来显示虽然 p16 基因在许多原代肿瘤中是完整的, 但存在其他机制阻止 p16 蛋白质在一些肿瘤类型的大多数中表达。P16 启动子的高甲基化是这些机制中的一个 (Merlo 等, 1995; Herman, 1995; Gonzalez-Zulueta, 1995)。通过质粒表达载体转染恢复野生型 p16^{INK4} 的功能可减少一些人癌细胞系的集落形成 (Okamoto, 1994; Arap, 1995)。用腺病毒载体输送 p16 可抑制一些人癌细胞系的增殖并降低人肿瘤异种移植物的生长。

C-CAM 实际上在所有上皮细胞中都有表达 (Odin 和 Obrink, 1987)。C-CAM, 表观分子量 105kD, 通过与能中和细胞凝集的特异性抗体反应 (Obrink, 1991) 最初分离自大鼠肝细胞的胞质膜。近来的研究表明, 在结构上, C-CAM 属于免疫球蛋白 (Ig) 超家族, 它的序列与癌胚抗原 (CEA) 高度同源 (Lin 和 Guidotti, 1989)。采用杆状病毒表达系统 (Cheung 等, 1993) 表明 C-CAM 的第一 Ig 区域是细胞粘附活性至关重要的。

已知细胞粘附分子, 或 CAM's 参与在分子间相互作用的复杂网络, 此网络调节器官发育和细胞分化 (Edelman, 1985)。最近的数据表明 CAM's 的异常表达可能参与数种肿瘤的发生过程; 例如, 主要在上皮细胞中表达的 E-钙粘着蛋白表达的降低, 与数种肿瘤的发展相关 (Edelman 和 Crossin, 1991; Frixen 等, 1991; Bussemakers 等, 1992; Matsura 等, 1992; Umbas 等, 1992)。同样, (Giancotti 和 Ruoslahti, 1990) 证明体内通过基因转移提高 $\alpha 5\beta 1$ 整合素的表达可降低中国仓鼠卵巢细胞的肿瘤发生。现已证明 C-CAM 能抑制体外和体内的肿瘤生长。

黑色素瘤分化相关 (MDA) 基因与人黑色素瘤细胞生长和分化相关, 或直接影响它们 (Su 等, 1998)。近来研究证明 MDA 家族成员的抗-致肿瘤活性不限于黑色素瘤。MDA-7 的表达抑制了体外成胶质细胞瘤、骨肉瘤、结直肠癌、乳腺癌、子宫颈癌和鼻咽癌

的生长(Jiang 等, 1996)。MDA-7 的表达通过诱导调亡作用抑制了体外人乳腺癌细胞的生长, 和体内异种移植物模型的生长(Su 等, 1998)。

本发明其他可采用的肿瘤抑制剂包括 BRCA1、BRCA2、*zac1*、p73、MMAC-1、ATM、HIC-1、DPC-4、FHIT、NF2、APC、DDC、PTEN、ING1、NOEY1、NOEY2、PML、OVCA1、MADR2、WT1、53BP2 和 IRF-1。

本发明其他可采用的基因包括 Rb、APC、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-I、MEN-II、*zac1*、p73、VHL、MMAC1/PTEN、DBCCR-1、FCC、*rsk-3*、p27、p27/p16 融合物、p21/p27 融合物、抗血栓形成基因(例如 COX-1、TFPI), PGS、Dp、E2F、*ras*、*myc*、*neu*、*raf*、*erb*、*fms*、*trk*、*ret*、*gsp*、*hst*、*abl*、E1A、p300, 参与血管发生的基因(例如 VEGF、FGF、血小板反应素、BAI-1、GDAIF 或它们的受体)以及 MCC。

4. 透明质酸

透明质酸有许多特性, 它们在其他医学治疗和生物过程中可能是有利的。实际上, 透明质酸酶在疾病、感染的治疗以及其他应用是普遍的。这些应用的范围从简单的润滑, 到药物的输送, 到逆转录酶病毒感染的治疗。例如见, 美国专利第 6, 194, 392 号、第 6, 218, 373 号、第 6, 271, 216 号、第 4, 840, 941 号。同样见 Hoekstra, (1999) 和 Lee 和 Spicer, (2000)。

透明质酸、透明质烷或透明质酸是一种天然存在多聚糖(氨基葡聚糖), 由葡萄糖醛酸和 N-乙酰-葡萄糖胺通过 β 1-3 糖苷键连接的重复单元而形成。这些单元通过 β 1-4 糖苷键连接形成没有分支的分子链。当葡萄糖醛酸的羧基电离时此链负电荷。它发生在生理 pH 值下产生透明质酸钠。透明质酸非常擅长保持水分。

眼睛玻璃体中透明质酸的分子量和浓度是可不同, 取决于它存在的机体物种, 眼睛中透明质酸的部位, 以及分析分子量的方法。因此, 透明质酸的分子量可以从 50, 000 Da 以上不同, 它可形成高粘度的溶液。它是人体最丰富的化合物之一, 通常用于细胞外基质中以支持和保护细胞。它存在于所有的体液中, 但在眼睛的玻璃体液, 关节骨液和脐带中特别多。透明质酸是亲水性并且十分润滑。

Merck 指数确定了透明质酸的分子量在 50, 000 至 8×10^6 道尔顿(Da)范围之内, 取决于来源、制备方法和测定方法。Merck 出版物将透明质酸讲授为一种眼外科的辅助物。美国专利第 4, 801, 619 号揭示了关节内给予的透明质酸分子量大约是 3×10^6 Da 或更高。

透明质酸可分离自脊椎动物组织(例如人脐带、公鸡鸡冠)或产生菌株的培养物

中。各种级别的透明质酸可从商业上获得。例如见 Sigma 的透明质酸目录条目。一种高纯度、非炎性形式描述于美国专利第 4,141,973 号。一种商业产品, Healon™ 可从 Pharmacia AB(Uppsala, Sweden) 获得。此制剂中的透明质酸据说分子量超过 750,000 Da(可进一步超过 1,200,000Da), 并提出可应用于各种关节情况的治疗。

全世界有许多透明质酸制造商。这些包括 Anika(Woburn, MA), Biomatrix Inc. (Ridgefield, NJ), Bio-Technology General Corp. (Iselin NJ), Fidia Advanced Biopolymers(Brindisi, Italy), Genzyme Corp. (Framingham MA), Kibun Food Chemifa Co. (Tokyo, Japan), Lifecore Biomedical(Chaska, MN) 和 Seikagaku Corp. (Tokyo, Japan)。

高分子量聚合透明质酸的低分子量前体的天然合成认为是由玻璃体细胞产生的。高分子量的透明质酸形成于细胞外间隙, 大多数情况下是通过透明质酸合成酶的作用。存在着多种透明质酸合成酶, 可用于产生从低分子量前体到高分子量形式的透明质酸(Spicer 和 Mcdonald, 1998)。透明质酸合成酶的活性可以很容易测定(Spicer, 2001)。

高分子量透明质酸可以用酶处理, 通过透明质酸酶或裂解酶(EC4.2.2.1) 导致回收其衍生物或低分子量形式。见美国专利第 6,258,791 号。透明质酸酶综述见 Kreil (Protein Sci, 1995, 4:1666-1669)。透明质酸酶可以是来自哺乳动物、爬行动物或膜翅目昆虫透明质酸聚糖水解酶, 来自水蛭唾液腺的透明质酸聚糖水解酶, 或来自细菌, 特别是链球菌、肺炎球菌和梭状芽胞杆菌透明质酸裂解酶。透明质酸酶从商业供应商广泛获得。例如见, Sigma-Aldrich 中的透明质酸酶条目(2002)。

5. 用透明质酸或玻璃体调节腺病毒介导的基因表达和在腺病毒感染中的应用

本发明人取得了令人惊奇和出乎预料的发现, 高分子量透明质酸的衍生物即低分子量透明质酸, “过期的” 高分子量透明质酸, 用裂解酶或透明质酸酶处理的高分子量透明质酸, 或经过这样处理的玻璃体, 能显著抑制腺病毒和腺病毒载体的细胞转导。这些组合物出乎意料特性使得能够治疗腺病毒感染, 复制活性腺病毒载体的感染和调节腺病毒载体的转导。

低分子量透明质酸, 正本发明中所考虑, 包含接触过能降解高分子量形式或玻璃体环境的高分子量透明质酸的产物。这种降解可以通过酶处理或通过使高分子量形式的透明质酸或玻璃体接触空气足够长的时间而实现, 或者选择比临床应用许可日期更老化的透明质酸或玻璃体。这种降解产物可通过用凝胶电泳方法分析完整的、

未修饰的或新鲜的透明质酸与降解产物的比较而识别。

具体说，这种比较的一种非限制性实例包括进行相关样品的电泳，通过 1X Tris 醋酸 EDTA 缓冲液配的 0.5% 琼脂糖 (TAE, 见 Sambrook 2001)。可将样品加入琼脂糖凝胶的孔中，用 7 体积样品加入到 1 体积的 8x 加样缓冲液中 (2M 蔗糖；1.5M NaCl) 并暴露于 80-100 伏特 4-6 小时。电泳后，在黑暗中用 50% 乙醇配的 0.005% StainsAll™ (4, 5, 4', 5'-二苯-3, 3'-二乙基-9-甲基-硫代羰氰溴化物；3, 3'-二乙基-9-甲基-4, 5, 4', 5'-二苯硫代羰氰；1-乙基-2-[3-(3-乙基萘[1, 2-d]噻唑啉-2-亚烯基)-2-甲丙烯基]萘[1, 2-d]噻唑啉溴化物, Sigma-Adrich Co., Inc.) 处理 12 小时或过夜。接着用水清洗凝胶去除未结合染料。可通过将这样处理的凝胶暴光 30 分钟而显现透明质酸。正如该领域技术人员所知到的，其他比较透明质酸酶样品的分子量和其他特性的方法是该领域技术人员熟知的，可用于本发明的上下文中，以鉴定那些能有效抑制腺病毒感染或腺病毒载体介导的转基因表达的样品。

具体说，本发明人在这里提供了筛选合适的透明质酸酶样品的方法，用作腺病毒感染或腺病毒介导转基因表达的抑制剂或增强剂。因此，可以筛选高分子量透明质酸，或接触或处理过的高分子量透明质酸因而产生了低分子量透明质酸或其它衍生物的样品，它们的抑制腺病毒介导转基因表达或腺病毒感染的能力。进行这种筛选过程通常是通过将这种样品与已知对于腺病毒介导的转基因表达或感染有效的组合物作比较，已知有效的组合物将在本说明书和实施例中提供。

一种典型但非-限制性的实施例包括使含有怀疑样品的组合物与腺病毒载体或腺病毒转导的或被腺病毒感染的细胞接触，同样使含有已知对腺病毒介导转基因表达或感染有效的样品 (如本文提供的高分子量透明质酸或玻璃体) 与相同的细胞接触。比较与所述样品接触的效果，可采用一些可得到的方法来测定感染性、转导率或基因表达水平的方法。腺病毒感染或转基因表达的抑制可通过怀疑样品中感染或基因表达水平的下降而显示。同样，可以测定样品增强转基因表达的能力。

转基因表达的水平可通过特异性测定所涉及的具体转基因存在的方法来测定，例如抗体、酶试验等等。

在具体实施方案中，腺病毒感染的治疗包括用足量的腺病毒抑制剂处理细胞、组织、器官或各个机体，从而抑制存在的感染，防止感染扩散到其它细胞，或预防任何细胞的原发感染。所述抑制剂可包括透明质酸衍生物、低分子量透明质酸、“过时的”透明质酸、“过时的”玻璃体或经透明质酸酶处理过的玻璃体等等。

所述细胞与低分子量透明质酸或高分子量的透明质酸或玻璃体衍生物的接触可

发生在细胞与载体或病毒接触后的一段时间之后，因为细胞先与载体或病毒接触，或基本上与细胞感染同时。细胞与载体或病毒接触后可经过一段时间，使细胞与低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体的衍生物接触的时间范围可从几秒钟至数分钟至数小时。因此，所经过的时间可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、56、57、58、59 或 60 秒钟或更少。相似的，所经过的时间可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、56、57、58、59 或 60 分钟或更少。同样，所经过的时间可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 小时，以及可从中推论出的任何时间范围。

细胞与低分子量透明质酸或高分子量的透明质酸或玻璃体衍生物接触时间的范围可从几分钟或更少至数小时或更长。因此，所述细胞接触的时间可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、56、57、58、59 或 60 秒钟或更少。相似的，这段时间可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、56、57、58、59 或 60 分钟或更少。同样，此接触时间可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 小时或更长，以及可从中推论出的任何时间范围。特别考虑细胞与低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体衍生物的接触时间可以是一天或许多天。

所应用的低分子量透明质酸或高分子量的透明质酸或玻璃体衍生物的浓度范围可以从小于 10 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 到至少 240 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 或更高。因此，低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体衍生物每 100 μl 溶液中的量可以是 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、

68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、150、200、240 μg 或更高，以及可从中推论出的任何浓度范围。

显然，当目的是治疗腺病毒感染或复制活性腺病毒载体产生的感染时，所述治疗的具体时间和治疗开始的时间将由适当的医学实践和经验决定。

为了增强低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体衍生物的有效性，理想的是将本发明的这些组合物和方法与治疗其它疾病和病症有效的制剂联用。在一些实施方案中，考虑可将常规的治疗或制剂包括但不限于药物治疗剂、外科治疗药物(例如外科手术)或它们的联合，与给予低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体衍生物联合。因此，在某些实施方案中，本发明的治疗方法可包括联合其他治疗药物给予本发明的低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体衍生物。

这个过程包括将细胞同时与某药物和低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体衍生物接触，或者在一段时间内，分别将低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体衍生物以及某药物给予细胞、组织或机体，从而产生理想的治疗效果。术语“接触”和“暴露”，当用于细胞、组织或机体时，用来描述治疗性构建物或治疗药物输送给靶细胞、组织或机体的过程，或者是将它们与靶细胞、组织或机体直接并置的过程。可使细胞、组织或机体(例如通过给药)与一种组合物或，含有低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体衍生物以及一种或多种药物的药物制剂接触，或通过使细胞与两种或多种不同的组合物或制剂接触，其中一种组合物包含低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体衍生物，其它组合物包含一种或多种药物。

低分子量透明质酸或高分子量的透明质酸或玻璃体衍生物可在其他药物之前、同时和/或之后给药，间隔几分钟到几周。在低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体衍生物以及其他药物分别应用于细胞、组织或机体的实施方案中，通常应保证在每次输送之间不会明显过期，这样低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体衍生物以及药物仍能对细胞、组织或机体发挥有利的联合作用。例如，在这样的实例中，考虑一可使细胞、组织或机体，基本上同时接触二、三、四种或更多种药物(例如在不到1分钟内)，与低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体衍生物。在其他方面，一种或多种药物的给药时间从基本同时至大约1钟，大约5钟，大约10分钟，大约20分钟，大约30分钟，大约45分钟，大约60分钟，大约2小时，大约3小时，大约4小时，大约5小时，大约6小时，大约7小时，大约8小

时, 大约 9 小时, 大约 10 小时, 大约 11 小时, 大约 12 小时, 大约 13 小时, 大约 14 小时, 大约 15 小时, 大约 16 小时, 大约 17 小时, 大约 18 小时, 大约 19 小时, 大约 20 小时, 大约 21 小时, 大约 22 小时, 大约 23 小时, 大约 24 小时, 大约 25 小时, 大约 26 小时, 大约 27 小时, 大约 28 小时, 大约 29 小时, 大约 30 小时, 大约 31 小时, 大约 32 小时, 大约 33 小时, 大约 34 小时, 大约 35 小时, 大约 36 小时, 大约 37 小时, 大约 38 小时, 大约 39 小时, 大约 40 小时, 大约 41 小时, 大约 42 小时, 大约 43 小时, 大约 44 小时, 大约 45 小时, 大约 46 小时, 大约 47 小时, 大约 48 小时, 大约 1 天, 大约 2 天, 大约 3 天, 大约 4 天, 大约 5 天, 大约 6 天, 大约 7 天, 大约 8 天, 大约 9 天, 大约 10 天, 大约 11 天, 大约 12 天, 大约 13 天, 大约 14 天, 大约 15 天, 大约 16 天, 大约 17 天, 大约 18 天, 大约 19 天, 大约 20 天, 大约 21 天, 大约 1 周, 大约 2 周, 大约 3 周, 大约 4 周, 大约 5 周, 大约 6 周, 大约 7 周, 大约 8 周, 大约 1 个月, 大约 2 个月, 大约 3 个月, 大约 4 个月, 大约 5 个月, 大约 6 个月, 大约 7 个月, 大约 8 个月, 大约 9 个月, 大约 10 个月, 大约 11 个月或大约 12 个月, 和可从其推论出的任何时间范围, 在给予低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体衍生物之前和/或之后。

可采用多种低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体衍生物与一种或多种药物的联合疗法。这种联合的非限制性例子显示如下, 其中包含低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体衍生物的组合是“A”, 药物为“B”:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B
 B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

将包含低分子量透明质酸或高分子量透明质酸或玻璃体衍生物给予细胞、组织或机体可遵循治疗给药的通用方案, 如果有的话要考虑到毒性。预计如果需要可重复治疗周期。在具体实施方案中, 考虑多种其他药物可与本发明联合应用。

调节转基因表达的组合物包含各种联合的透明质酸或玻璃体溶液。透明质酸或玻璃体可与各种相容性介质组合输入细胞、组织等等。这些介质包括但不限于无血清细胞培养基和水。所考虑的实施方案包括其他任何与透明质酸相容的合适稀释剂或介质, 或其他与玻璃体相容的介质或稀释剂。如下面所述, 这种组合物可包括因为各种目的加入的其他成分, 例如防腐剂等等, 只要它们不损害其中所提供的活性成分的作用。

本发明人取得了令人惊奇和出乎预料的发现高分子量透明质酸或玻璃体能明显

增强腺病毒和腺病毒载体导入的转基因的表达。这些组合物的未料到的特性使得可以调节腺病毒和腺病毒相关载体导入的基因。在具体实施方案中，细胞与高分子量透明质酸或玻璃体接触，这样增强了腺病毒转基因的表达。

细胞与高分子量透明质酸或玻璃体接触可发生在细胞与载体或病毒接触一段时间之后，因为细胞先与载体或病毒接触，或基本上与细胞转导同时。细胞与载体或病毒接触后经过一段时间后，使细胞与高分子量透明质酸或玻璃体接触，该时间范围可从几秒钟至数分钟或至数小时。因此，这段时间可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、56、57、58、59 或 60 秒钟或更少。相似的，这段时间可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、56、57、58、59 或 60 分钟或更少。同样，这段时间可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 小时，以及可从中推论出的任何时间范围。

细胞与高分子量透明质酸或玻璃体接触的时间可从几分钟或更少至几个小时或更多。因此，细胞的接触时间可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、56、57、58、59 或 60 秒钟或更少。相似的，这段时间可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、56、57、58、59 或 60 分钟或更少。同样，这段时间可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 小时或更长，以及可从中推论出的任何时间范围。

高分子量透明质酸或玻璃体所应用的浓度范围从小于 10 μ g/100ml 到至少 100 μ g/100ml 或更高。因此，高分子量透明质酸或玻璃体在每 100ml 溶液中的含量可以是 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、56、57、58、

59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100 μg 或更高。相似的，这些浓度可以表达为百分数、重量/体积。

调节转基因表达的组合物包含各种组合的高分子量透明质酸或玻璃体溶液。当高分子量透明质酸或玻璃体与各种相容性介质组合提供时，可将它们输入细胞、组织等等。包括但不限于无血清细胞培养基和水。考虑的实施方案包括其他任何与透明质酸相容的合适稀释剂或介质，或者其他与玻璃体相容的介质或稀释剂。如下面所述，这样的组合物可包括为了各种目的而加入的其他成分，例如防腐剂等，只要它们不损害其中提供的活性成分的作用。

6. 药物制剂

药物治疗剂以及给药的方法，剂量等等是该领域技术人员所熟知的(例如见，“Physicians Desk Reference”，Goodman 和 Gilman 的“The Pharmacological Basis of Therapeutics”，“Remington’s Pharmaceutical Sciences”和“The Merk Index, 第 11 版”，本文纳入相关部分作参考)，可以根据本文公开的内容和本发明相结合。一些剂量变化将是必然的，这取决于待治疗者的情况。负责给药的人无论如何要确定各患者的合适剂量，这种个体剂量的确定是该专业普通技术人员的技术范围之内。

本发明的药物组合物仅包含有效量的透明质酸或玻璃体，或存在的其他药物(例如，腺病毒载体)溶解或分散在药学上可接受的运载体中。词组“药物的或药学上可接受的”指分子实体以及不会产生副反应、过敏或其他不良反应的组合物，当它们给予动物例如人类来说是合适的。包含至少一种腺病毒载体、透明质酸、玻璃体或其他活性成分的药物组合物的制备根据本发明揭示的内容是该专业那些技术人员知道的，例子见 Remington’s Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Mack Printing Company, 1990。而且，对于动物(例如人)给药，应该明白所述制剂应符合 FDA 当局生物学标准所要求的无菌、致热原性、总体安全和纯净的标准。

如本文所用，“药学上可接受的运载体”包括任何和所有的溶剂、分散介质、包衣剂、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如抗菌剂、抗真菌剂)，等渗剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料等类似物质和它们的组合，如该专业普通技术人员所知道的(见，例如 Remington’s Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Mack Printing Company,

1990, 1289-1329 页)。除了迄今与该活性成分不相容的任何常规运载体, 均考虑其在治疗性和药物组合物中的应用。

本发明的组合物可包括不同类型的运载体, 取决于它是以固体、液体还是气溶胶形式给药, 以及给药途径如注射时它是否需要无菌。本发明的给药途径可以是静脉内、皮内、动脉内、腹膜内、病损内、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、气管内、鼻腔内、玻璃体内、阴道内、直肠内、局部、肿瘤内、肌肉内、腹膜内、皮下、结膜下、囊内、粘膜、心包内、脐带内、眼内、口服、局部、吸入(例如气溶胶吸入), 注射、滴注、连续滴注、局部灌注直接淋浴靶细胞, 通过插管、灌洗、以乳剂, 以脂质组合物(例如脂质体), 或通过其他方法或上述方法的组合, 如该领域普通技术人员所知那样(见, 例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Mack Printing Company, 1990)。

给予动物病人本发明组合物的实际剂量可由物理和生理因素所决定, 例如体重、疾病的严重性、待治疗疾病的类型、先前或同时的治疗干预, 病人的特发病以及给药的途径。负责给药的医生无论如何将要确定组合物中活性成分的浓度, 以及该个体的合适剂量。

在某些实施方案中, 药物组合物可包含, 例如至少 0.1% 的活性化合物。在其他实施方案中, 每次给药可含有活性化合物大约 2%-75% 重量单位, 或者大约在 25%-60% 之间, 以及可从中推论出的任何范围。在其他非限制性实例中, 一个剂量可含有大约 1 微克/kg/体重、大约 5 微克/kg/体重、大约 10 微克/kg/体重、大约 50 微克/kg/体重、大约 100 微克/kg/体重、大约 200 微克/kg/体重、大约 350 微克/kg/体重、大约 500 微克/kg/体重、大约 1mg/kg/体重、大约 5mg/kg/体重、大约 10mg/kg/体重、大约 50mg/kg/体重、大约 100mg/kg/体重、大约 200mg/kg/体重、大约 350mg/kg/体重、大约 500mg/kg/体重, 至大约 1000mg/kg/体重或更高, 以及可从中推论出的任何范围。在非限制性的实例中, 从这里列出的数量衍生的给药范围是, 大约 5mg/kg/体重至大约 100mg/kg/体重、大约 5 微克/kg/体重至大约 500mg/kg/体重等等, 可根据上面描述的数量给药。

在任何情况下, 所述组合物可含有各种抗氧化剂以延缓一种或多种成分的氧化。此外, 微生物作用的预防可通过应用防腐剂, 例如各种抗菌和抗真菌剂, 包括但不限于对羟苯甲酸酯类(例如甲基对羟苯甲酸酯、丙基对羟苯甲酸酯), 三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞或它们的组合。

本发明的透明质酸可配制入自由碱、中性或盐形式的组合物中。药学上可接受的

盐包括酸加成盐，例如那些与蛋白质组合物的自由氨基形成的，或与无机酸（例如盐酸或磷酸）形成的，或与有机酸（如醋酸、草酸、酒石酸或苦杏仁酸）形成的盐。与自由羧基形成的盐也可衍生自无机碱，例如钠、钾、铵、钙或铁氢氧化物；或有机碱如异丙基胺、三甲基胺、组胺或普鲁卡因。

在所述组合物是液体形式的实施方案中，运载体可以是一种溶剂或分散介质，包括但不限于水、乙醇、多元醇（例如丙三醇、丙烯二醇、液体聚乙烯二醇等等），脂类（例如甘油三酯、植物油、脂质体）以及它们的组合。维持适当的流动性可通过应用包衣，例如卵磷脂；通过分散在运载体例如液态多元醇或脂质中，维持所需的微粒大小；通过应用表面活性剂，例如羟丙基纤维素；或这些方法的联合。在许多情况下，优选包含等渗剂，例如糖、氯化钠或它们的组合。

在其他实施方案中，可在本发明中应用眼滴液、滴鼻溶液或喷雾，气溶胶或吸入剂。这种组合物通常设计为与靶组织类型相容。在非限制性实例中，滴鼻溶液通常是水溶液，设计为以滴液或喷雾施加到鼻道。滴鼻溶液应配制，成在许多方面与鼻分泌物相似，这样可保留正常的纤毛运动。因此，在优选的实施方案中，含水的滴鼻溶液通常是等渗的或轻微缓冲的以保持大约 5.5-6.5 的 pH 值。此外，和那些应用于眼科制剂中相似的抗菌防腐剂，药物或合适的药物稳定剂，如果需要也可包含在所述制剂中。例如，各种商品化滴鼻制剂已为人所知，包含有诸如抗生素或抗组胺等药物。

在某些实施方案中，制备的本发明组合物可通过口服途径给药。在这些实施方案中，所述固体组合物可包括，例如溶液、悬浮液、乳剂、片剂、药丸、胶囊（例如硬或软的明胶壳胶囊），持续释放的制剂，口含剂组合物、片剂、糖锭、酞剂、悬浮液、糖浆剂、糯米纸囊剂或它们的组合。口服组合物可直接掺入膳食中的食物。口服给药的优选运载体包括惰性稀释剂、可同化可食用运载体或它们的组合。本发明的其他方面，可将口服的组合物配制为糖浆剂或酞剂。糖浆剂或酞剂，也可包含例如至少一种活性药物、增甜剂、防腐剂、调味剂、染料、防腐剂或它们的组合。

在某些优选的实施方案中，口服组合物可包含一种或多种粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、调味剂和它们的组合。在某些实施方案中，组合物可包含一种或多种以下物质：粘合剂例如西黄蓍胶、阿拉伯胶树、玉米淀粉、明胶或它们的组合；赋形剂例如磷酸二钙、甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁或它们的组合；崩解剂例如玉米淀粉、土豆淀粉、褐藻酸或它们的组合；润滑剂，例如硬脂酸镁；增甜剂，例如蔗糖、乳糖、糖精或它们的组合；调味剂例如薄荷、冬

青油、樱桃调味剂、橙调味剂等等；或上述的组合。当剂量单位形式是胶囊时，除了上述类型的材料，还可包含运载体，例如液体运载体。其他多种材料可以包衣的形式存在，或修饰所述剂量单位的物理形式。例如，片剂、药丸或胶囊可用虫胶、糖或两者包裹。

适合其他给药方式的制剂包括栓剂。栓剂是多种重量和形状的固体剂量形式，通常加入药物，插入直肠、阴道或尿道。在插入之后，栓剂在体腔液中变软、融化或溶解。对于栓剂，通常传统的运载体包括例如聚烷撑二醇、甘油三酯或它们的组合。在某些实施方案中，栓剂可通过含有例如活性成分的混合物形成，活性成分的范围是大约 0.5%-10%，优选大约 1%-2%。

无菌注射溶液的配制是通过将所需量的活性化合物加入到合适的溶剂中，该溶剂含有以上列举的各种其他成分，如果需要随后过滤除菌。通常，分散液是通过将各种无菌活性成分加入到含有基础分散介质和/或其他成分无菌运载体中而配制的。在用无菌粉末配制无菌可注射溶液、悬浮液或乳剂的情况中，配制的优选方法是真空干燥或冷冻干燥技术，可生产活性成分加来自前面无菌过滤后液体介质的其他所需成分的粉末。如果需要该液体介质应该适当缓冲，在注射前用足够的盐水或葡萄糖先使得该液体稀释液等渗。也考虑配制用作直接注射的高浓度组合物，其中采用 DMSO 作为溶剂预想能导致十分快速的渗透，将高浓度的活性药物输入一块小区域。

美国专利第 4,808,576 号提示了透明质酸，一种众所周知的当直接应用于受伤组织时能减少哺乳动物关节组织中创伤结局的制剂，如果将它应用于远离受伤组织的部位，它将通过哺乳动物的自然过程运输到该受伤组织。因此，根据该专利，可以任何治疗上可接受的形式通过通常的远离途径给予透明质酸，包括静脉内、肌肉内、皮下和局部。这种特性使得透明质酸的应用大为方便和有吸引力。例如，根据该专利利用透明质酸治疗马或人关节炎时，不再需要更困难的关节内注射。

在制造和存储条件下，所述组合物必须是稳定的，并能受到保护不受微生物例如细菌和真菌的污染。应知道内毒素污染应该保持最小，在安全的水平，例如低于 0.5ng/mg 蛋白质。

在具体实施方案中，可通过在该组合物中应用延迟吸收的制剂使可注射组合物延长吸收，例如胶原、单硬脂酸铝、白明胶或它们的组合。

实施例

下面的实施例包括显示本发明优选的实施方案。本领域那些技术人员应知道实施

例中公开的技术，遵循了本发明人发现的代表性技术，在实施本发明中运作良好，因此可以认为构成了实施本发明优选方式。然而，本领域的那些技术员，根据本文公开的内容，应该知道可在所公开的具体实施方案中做许多变化，仍能获得同样的或相似的结果，而不背离本发明的思路和范围。

实施例 1-5 中采用的材料和方法学

细胞系

将 WERI-Rb 细胞(来自人成视网膜细胞瘤)，Jurkat 细胞(人急性 T-细胞淋巴瘤)，经基因工程改造而能表达 CD44，以及将 HeLa 细胞(人子宫颈上皮样癌)保存在培养基中，采用添加了 5%FCS 的 Minimal Essential 培养基。通过用含有 CD44 微小基因(Brian Seed, Harvard University)的质粒转染(用 CellFECTIN™, GibcoBRL) Jurkat 细胞建立 Jurka-CD44 细胞系。72 小时后，用 G418(800µg/ml)选择表达 CD44 的细胞，并通过稀释克隆建立稳定的细胞系。将 EpH4 细胞(由 L. Huber, IMP, Vienna, Austria 提供的小鼠上皮细胞)培养于添加有 10%FBS 和葡萄糖(4.5g/l)的 Dulbecco's Minimal Essential 培养基中。可显示血清对于腺病毒介导的转基因表达有作用，然而这种作用不如玻璃体强，血清的作用也不受裂解酶消化的抑制。这里报导的实验是用培养于无血清或 0.5%血清的细胞进行，以分辨玻璃体的作用。所有细胞培养物维持在 37 °C 5%的 CO₂ 中。

腺病毒构建物

含有萤火虫荧光素酶(AdV-Iuc)或绿荧光蛋白质(AdV-GFP)报告基因或表达腺病毒 35(AdV5/F35)纤维结构域的腺病毒 5(AdV)构建物由 Baylor 医学院的细胞和基因治疗中心提供。表达突变纤维/球节或五邻体碱基结构域的构建物由 T. Wickham 提供(Gen Vec Corp)。

抗体和试剂

抗小鼠 CD44 的透明质酸酶结合位点的 KM114 单克隆抗体获自 BD Biosciences PharMingen。玻璃体可从新鲜或冷冻的牛眼睛中收获(Ladpak Slaughterhouse, Needville, TX)。用 19-号针头剪切玻璃体降低其粘度，离心澄清，然后用无血清培养基稀释。透明质酸裂解酶和胶原酶从 SIGMA™ 购买(Sigma-Aldrich Co., Inc.)。高分子量透明质酸(Healon™, 1%透明质酸钠)获自 Pharmacia, Corp。用荧光素酶试验系统™(Promega)定量测定表达的荧光素酶活性。

实施例 1: 玻璃体增强腺病毒-介导的转基因表达

当采用 AdV-Iuc, 一种含报告基因--萤火虫荧光素酶基因的腺病毒载体来转导成视网膜细胞瘤细胞系时, 低浓度的玻璃体显著增强了腺病毒-介导的转基因表达。将 WERI-Rb 细胞(1×10^4 细胞/孔)与 AdV-Iuc(200 病毒微粒(vp/细胞))以及 0%(对照)、0.1%、0.5%、2.5%和 5%新鲜配制的牛玻璃体一起培育 18 小时。收获细胞并测定荧光素酶活性。培养物分成一式三份进行试验。图 1 显示转基因表达的增加是玻璃体浓度的直接函数。这种增强比存在血清时观察到的要高。

实施例 2: 透明质酸裂解酶消除了玻璃体的增强作用

为了考察玻璃体的两种主要成分: 胶原或透明质酸的潜在作用, 在与成视网膜细胞瘤细胞和病毒载体培育之前用胶原酶或透明质酸裂解酶消化玻璃体。将玻璃体或血清以无血清培养液稀释至 1%, 接着用透明质酸裂解酶(Streptolysin A, 10 单位)37°C 处理 1 小时。将处理过的玻璃体或血清在无血清加入在无血清培养液中的 WERI-Rb 细胞(1.2×10^4 细胞/孔), 至最终浓度为 0.5%。加入 AdV-luc(500vp/细胞), 培养细胞 18 小时。收获细胞并测定荧光素酶活性。

用胶原酶消化玻璃体对报告基因表达的增强没有作用。然而, 用透明质酸裂解酶消化(500 微升 1%的玻璃体中有 10 单位裂解酶)消除了玻璃体的作用(图 2)。煮沸灭活裂解酶不会抑制玻璃体增强的腺病毒介导的荧光素酶表达(没显示数据)。

实施例 3: 增强表达不依赖于腺病毒结合或内化

为了测定玻璃体是否能增强腺病毒的结合或内化, 用 ^{35}S -蛋氨酸标记腺病毒载体, 接着在存在或缺少 0.5%玻璃体的情况下与 HeLa 细胞(已知有 CAR 和 α_v 整合素, 并且容易被腺病毒感染)一起培育。培育后, 洗涤细胞并测定总的放射活性。6 小时后, 定量测定的 ^{35}S 量没有差异, 这表明增强不发生在结合和内化阶段, 而是在转基因表达的一些后续步骤(没有显示数据)。

采用的腺病毒载体中的纤维/球节蛋白质或五邻体碱性蛋白质是突变的, 从而强化了这些结论。将 WERI-Rb 细胞(1×10^4 细胞/孔)在无血清培养液中与野生型腺病毒突变五邻体或纤维突变体(1000vp/细胞), 在存在或缺少 0.5%的玻璃体时, 一起培育 18 小时。收获细胞并测定荧光素酶的活性。腺病毒结合(突变的纤维/球节)或内化(突变的五邻体碱基)结构域的破坏降低了腺病毒进入细胞的能力, 但不抑制玻璃体增强荧光素酶转基因表达的能力(图 3)。

用另外一种修饰的腺病毒载体进一步确认这些观察。AdV 血清 5 型需要用作结合

的 CAR 受体以及用作内化的 α_v 整合素；AdV 血清 35 型利用一种不同的机制。通过基因工程改造而含 AdV35 纤维蛋白质的 AdV5 (AdV5F35) 输入成视网膜细胞瘤细胞的 GFP 表达，在 0.5% 玻璃体存在下也增加了。

将 WERI-Rb 细胞 (1×10^4 细胞/孔) 在无血清培养液中，和 (C, D) 或不和 (A, B) 0.5% 的玻璃体一起培育。用嵌合的腺病毒 (AdV5/F35) 以 5vp/细胞的比率转导细胞，该嵌合病毒中 AdV35 的纤维/球节区域替代了 AdV5 的纤维/球节区域。显示了代表性区域的明亮区 (A, C) 和荧光区 (B, D) 图 (图 4)。因此，只要腺病毒可结合和内化，玻璃体即可增强转基因的表达而不论所用的受体。

实施例 4：玻璃体增强作用的时间依赖性

将 WERI-Rb 细胞和 AdV-luc (200vp/细胞) 一起在无血清培养液中培育 2 小时，使得有时间让病毒结合和内化。洗涤细胞，重悬浮在新鲜的无血清培养液中，并以 1×10^4 细胞/孔等分的入 96-孔微滴定平板的孔中。在所示时间加入玻璃体，使得最终浓度为 0.5%。加入 AdV-luc 20 小时后进行荧光素酶测定。如果在去除腺病毒后至少 6 小时加入玻璃体可获得腺病毒-介导转基因表达的最大增强 (图 5)。

相反，当人人培养物去除腺病毒时加入玻璃体，然后通过洗涤细胞在随后的不同时间间隔去除玻璃体，能够增强转基因的表达至少 6 小时。将 WERI-Rb 细胞和 AdV-luc (200vp/细胞) 一起在无血清培养液中培育 2 小时，使得有时间让病毒结合和内化。清洗所述细胞，重悬浮在新鲜的无血清培养液加 0.5% 的玻璃体中，继续培育。在所示时间，回收细胞、洗涤并以无血清培养液中重悬浮，然后以 1×10^4 细胞/孔等分加入 96-孔微滴定平板的孔中。在加入 AdV-luc 20 小时后进行荧光素酶测定 (图 6)。

实施例 5：透明质酸增强了腺病毒介导的转基因表达

高分子量透明质酸增强了腺病毒输送的转基因表达。将 WERI-Rb 细胞 (1×10^4 细胞/孔) 和 AdV-luc (200vp/细胞) 以及浓度从 0-100 微克透明质酸/100 微升的新鲜稀释的高分子量透明质酸 (平均 M. W. 650, 000kDa) 一起培育 18 小时。收集细胞并测定荧光素酶活性。将培养物分为三等份进行 (图 7)。转基因表达可增强高达 20 倍。

实施例 6：腺病毒介导的转基因表达受到降解的或修饰的透明质酸抑制

已经受到裂解酶有限消化的透明质酸不仅不能激活，而且实际上抑制了基线腺病毒介导的转基因表达。将 WERI-Rb 细胞 (1×10^4 细胞/孔) 和 AdV-luc (200vp/细胞) 以及

浓度 0-240 微克/100 微升的“过时的”透明质酸一起培育 18 小时。收集细胞并测定荧光素酶活性。将培养物分为三等份进行。图 8 显示即使部分被裂解酶消化，也会导致构形改变的透明质酸，其能有效抑制腺病毒介导的转基因表达。

实施例 7: CD44 参与腺病毒介导转基因表达的调节

由于玻璃体诱导的腺病毒介导转基因表达的增强可通过用透明质酸裂解酶消化玻璃体来消除，并可通过纯化的大分子量透明质酸实现，因此检验了透明质酸结合受体 CD44 的潜在作用。将 Jurkat 和 Jurkat-CD44 细胞与 PMA(10ng/ml) 一起培育激活 CD44。洗涤细胞重悬于无血清培养液中，并且以 1×10^4 细胞/孔等分加入 96-孔微滴定平板中。加入 AdV-luc(1000vp/细胞)，在存在或缺乏新鲜稀释的透明质酸(100 微克/孔) 然后测定荧光素酶活性时培育细胞 18 小时。Jurkat 细胞表达 CAR 但不表达 CD44 或其他透明质酸结合受体，也不表达 α_5 整合素，不易被 AdV5 转导，并不受玻璃体的影响(图 9)。然而，用 CD44 表达质粒稳定转染的 Jurkat 细胞可被 AdV5 转导，并且转基因的表达在透明质酸存在时可增强(图 9)。

为了进一步验证 CD44 的作用，检验了能阻断透明质酸结合的小鼠 CD44 抗体(KM114)，以确定它对玻璃体增强的作用。采用 CD44 表达小鼠细胞系 EpH4 作为靶细胞。将小鼠 EpH4 细胞(CD44 阳性)预先培育在存在过量 KM114(一种 CD44 特异性单克隆抗体)或同型-匹配的 IgG1 对照抗体的无血清培养液中。洗涤细胞并重悬于无血清培养液中，以 1×10^4 细胞/孔等分加入 96-孔微滴定平板。加入 AdV-luc(200vp/细胞)并继续培育 18 小时然后测定荧光素酶活性。将培养物分为三等份进行。玻璃体在同型匹配对照抗体存在下增强了转基因表达(图 10)。在 KM114 存在时，不仅仅玻璃体增强的转基因表达受到抑制，而且基线转基因表达也受到抑制(图 10)。这些结果证实了 CD44 和它的配体透明质酸在调节腺病毒介导转基因中的作用。

实施例 8: 透明质酸形式的筛选

通过 1X Tris 醋酸 EDTA 缓冲液(TAE, 见 Sambrook 2001)配的 0.5%琼脂糖进行相关样品的电泳。采用 7 体积样品加 1 体积 8x 加样缓冲液(2M 蔗糖; 1.5M NaCl)将样品加入琼脂糖的孔中，并暴露于 80-100 伏特电压 4-6 个小时。电泳后，在黑暗中用 50%乙醇配的 0.005% StainsAll™(SIGMA™)处理凝胶 12 小时或过夜，接着用水洗涤去除未结合链。将处理过的凝胶暴光 30 分钟使得透明质酸显现。

测定样品对腺病毒介导转基因表达的作用在上述实施例中提供的材料和方法中

进行。即，将 WERI-Rb 细胞和 AdV-luc (200vp/细胞) 以及浓度为 0-100 微克透明质酸/100 微升的受试透明质酸样品一起培育 18 小时。收获细胞并测定荧光素酶活性。

实施例 9：玻璃体可修复低分子量的透明质酸

图 12 显示玻璃体的增强作用修复了低分子量透明质酸。低分子量透明质酸和玻璃体的联合作用是倍增的，导致转基因表达增加将近 1000-倍。将 WERI-Rb 细胞和 AdV-luc (200vp/细胞)，以及对照、新鲜稀释的玻璃体、低分子量的透明质酸酶，联合低分子量透明质酸的玻璃体，以 100 微克透明质酸/100 微升，一起培育 18 小时。收获细胞并测定荧光素酶活性。

图 12 的小插图显示了和大图一样的数据，但其大小可显示玻璃体单独产生的增强作用和低分子量透明质酸单独产生的抑制作用。所有都和表达对照的表达水平明显不同。

将新鲜的人结膜处植物培育于 100 μ l 无血清培养液中，如所示该培养液含有 0.5% 玻璃体或 100 μ g 已用 10 单位裂解酶消化 1 小时的透明质酸。24、48 和 72 小时后在共聚焦显微镜下检查培养物。

实施例 10：玻璃体有效增强了表达，低分子量透明质酸有效抑制了人结膜外植物中腺病毒介导的转基因表达

图 13 显示了结膜组织与玻璃体一起培育增强了人结膜外植物中腺病毒介导的转基因表达。同样显示低分子量透明质酸抑制了腺病毒介导的转基因表达。用裂解酶处理玻璃体消除了玻璃体的作用。和实施例 9 结果相似，玻璃体和低分子量透明质酸联合导致转基因表达的数倍增强。

本文所公开和主张的所有组合物和/或方法无须过多的实验，只根据所提供的公开内容即可进行和实施。虽然本发明的组合物和方法已通过优选的实施方案作了描述，本领域技术人员明白上述组合物和/或方法和步骤，以及本文所述方法步骤的顺序都可以改变，而不背离本发明的概念、思路和范围。更具体说，显然某些化学和生理都相关的制剂可替代本文所述的制剂，而可获得相同或相似的结果。本领域技术人员明白所有这些相似的替代和修改都视为在本发明的思路、范围和概念之内，如附带的权利要求所确定的那样。

参考文献

下面的参考文献纳入本文作参考，它们提供了可仿效的程序或其他细节，作为本文给出的补充。

- 美国专利第 4, 141, 973 号
美国专利第 4, 801, 619 号
美国专利第 4, 808, 526 号
美国专利第 4, 840, 941 号
美国专利第 5, 670, 488 号
美国专利第 5, 824, 544 号
美国专利第 5, 932, 210 号
美国专利第 6, 194, 392 号
美国专利第 6, 218, 373 号
美国专利第 6, 258, 791 号
美国专利第 6, 271, 216 号
Abe 等, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* , 203:354-359, 1993.
Arap 等, *Cancer Res.* , 55(6):1351-1354, 1995.
Banerjee 等 *Cancer Res.* , 52:6297-6304, 1992.
Batra 等, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* , 21(2):238-45, 1999.
Behbakht 等, *Am. J. Obstet. Gynecol.* , 175(5):1260-1265, 1996.
Bett 等, *J. Virol.* , 67(10):5911-5921, 1993.
Blackwell 等, *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* , 125(8)856-863, 1999.
Bussemakers 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 182(1):318-324, 1992.
Caldas 等, *Nat. Genet.* , 8(1):27-32, 1994.
Casey 等, *Oncogene*, 6(10):1791-1797, 1991.
Chen 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(8):3054-7, 1994.
Chen 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(7):2577-2581, 1995.
Cheng 等, *Cancer Res.* , 54(21):5547-5551, 1994.
Cheung 等, *J. Biol. Chem.* , 268(32):24303-24310, 1993.
Chillon 等, *J. Virol.* , 73(3):2537-40, 1999.
Chroboczek 等, *Virology*, 186:280-285, 1992.
Dorai 等, *Int. J. Cancer*, 82(6):846-52, 1999.
Eastham 等, *Hum. Gene Ther.* , 7(4):515-23, 1996.

- Edelman 和 Crossin, *Annu. Rev. Biochem.*, 60:155-90, 1991.
- Edelman, *Ann. Rev. Biochem.*, 54:135-169, 1985.
- Esandi 等, *Gene Ther.*, 4(4):280-7, 1997.
- Evans. *Am. J. Hyg.* 67:256-263, 1958.
- Feldman 等, *Cardiovasc. Res.*, 32(2):194-207, 1996.
- Flomenberg 等, *J. Infect. Dis.*, 169:775-781, 1994.
- Frixen 等, *J. Cell. Biol.*, 113(1):173-185, 1991.
- Giancotti 和 Ruoslahti, *Cell*60(5):849-859, 1990.
- Goebel 等, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 105(7):562-7, 1996.
- Golasten 等, *New Engl. J. Med.*, 309(11983):288-296, 1983.
- Gonzalez-Zulueta 等, *Cancer Res.*, 55(20):4531-4535, 1995.
- Graham 和 Prevec, *Mol Biotechnol.*, 3(3):207-20, 1995.
- Han 等, *Biol. Pharm. Bull.*, 22(5):836-40, 1999.
- Herman 等, *Cancer Res.* 55(20):4525-30, 1995.
- Hermans 和 Verhaagen, *Prog. Neurobiol.*, 55(4):399-432, 1998.
- Hoekstra, 摘自 *Hyaluronan-modified surfaces for medical devices*, *Medical Device and Diagnostic Industry Magazine*, 1999.
- Hollstein 等, *Science*, 253:49-53, 1991.
- Horwitz, 摘自 *Virology*, 第二版, Fields(编), Raven Press, Ltd. New York, 1990.
- Hurwitz 等, *Hum. Gene Ther.*, 10:411-48, 1999.
- Hussussion 等, *Nat. Genet.*, 8(1):15-21, 1994.
- Irie 等, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 9(4):341-9, 1999.
- Ishibashi 等, *J. Clin. Invest.*, 92:883-893, 1993.
- Ishibashi 等, *J. Clin. Invest.*, 93:1885-1893, 1994.
- Jiang 等, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 93:9160-9165, 1996.
- Kemb 等, *Nat. Genet.*, 8(1):23-2, 1994.
- Klaassen, 摘自 *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goodman 和 Gilman 编, Pergamon Press, 第 8 版, 49-61 页, 1990.
- Kreil, *Protein Sci.*, 4(9):1666-9, 1995.
- Lee 和 Spicer, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12, 581-586, 2000.
- Lesch, *Biol. Psychiatry*, 45(3):247-53, 1999.

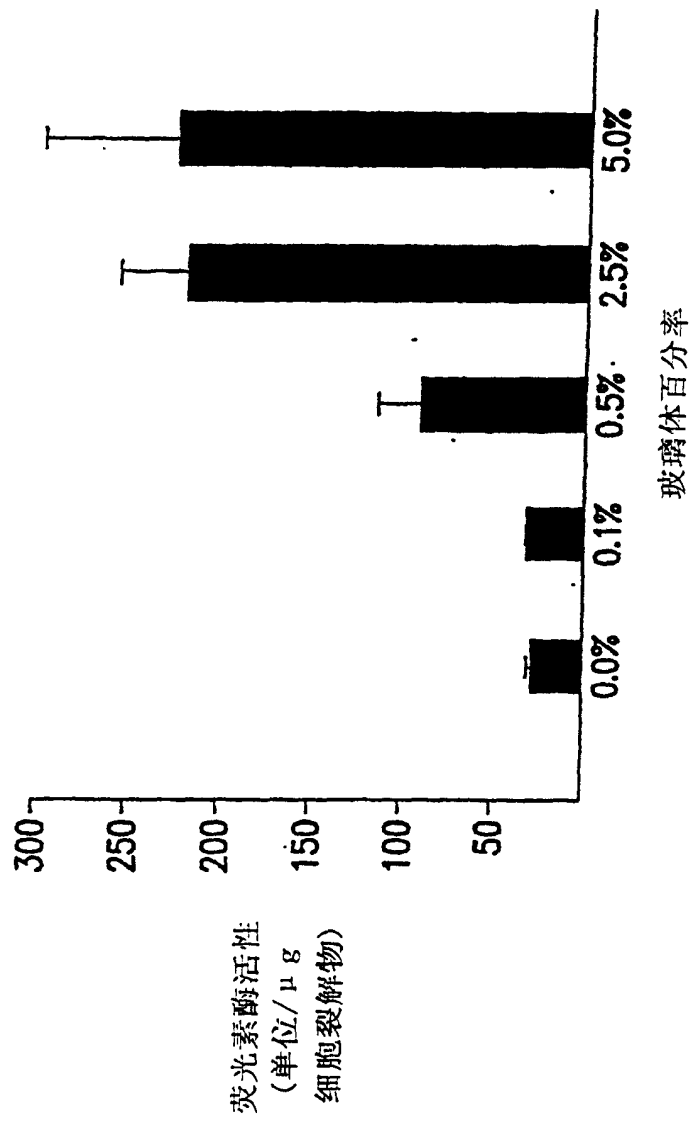


图 1

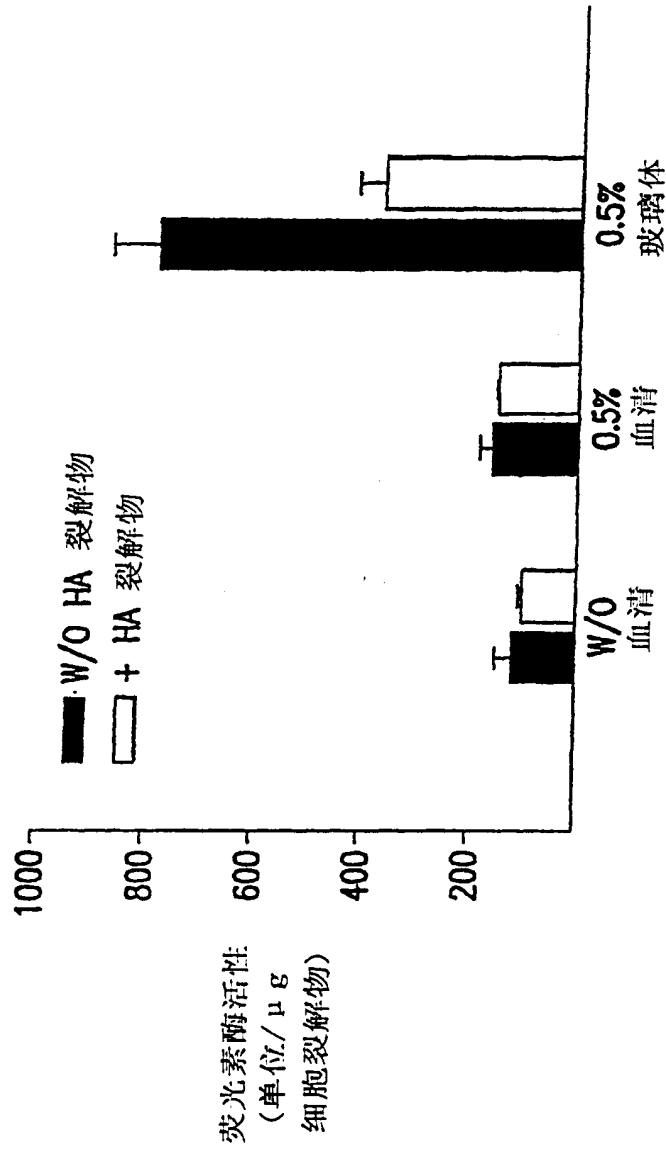
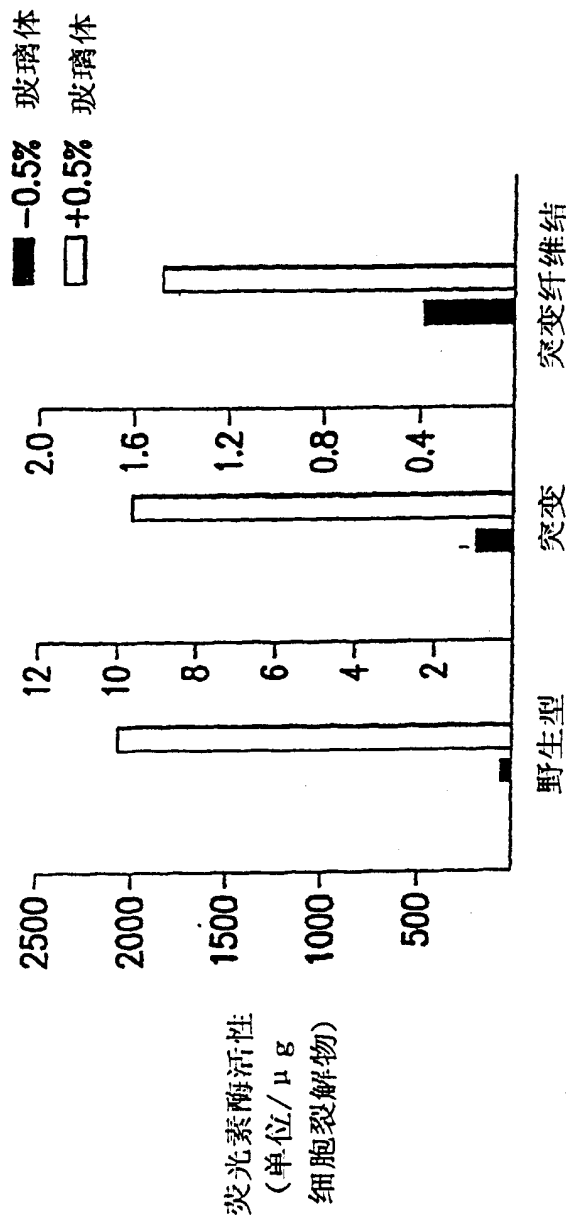


图 2



腺病毒突变体

图 3

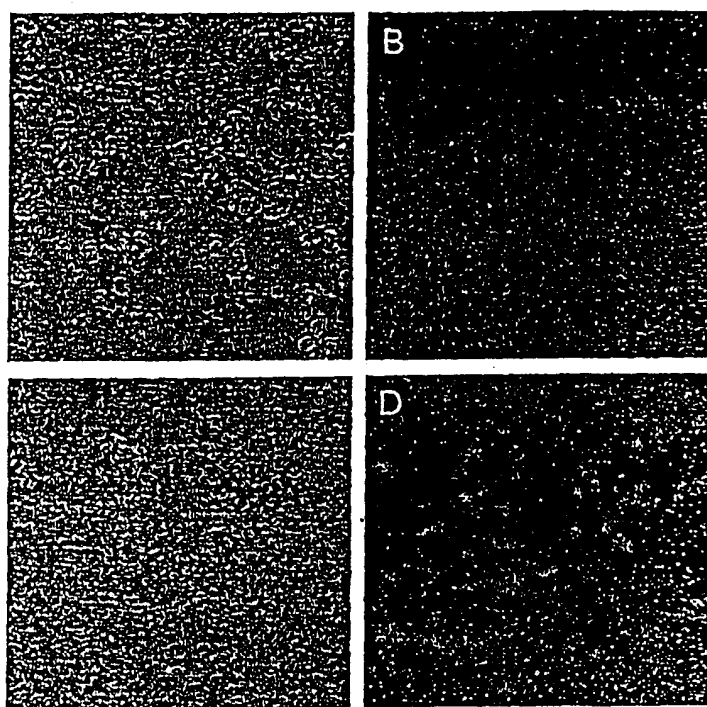


图 4

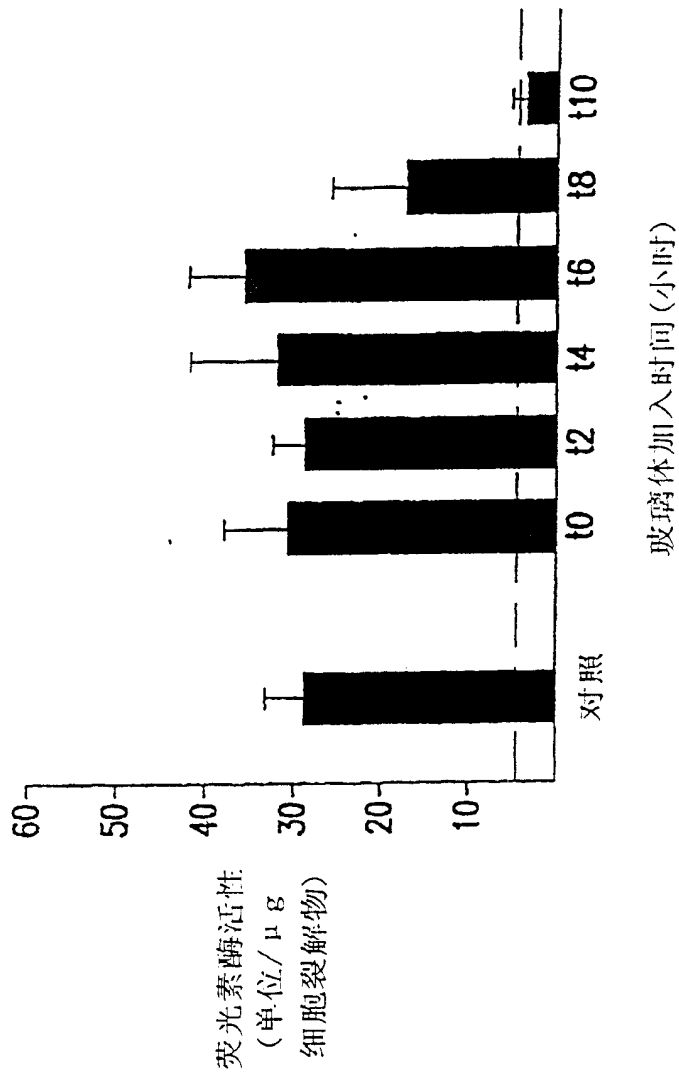


图 5

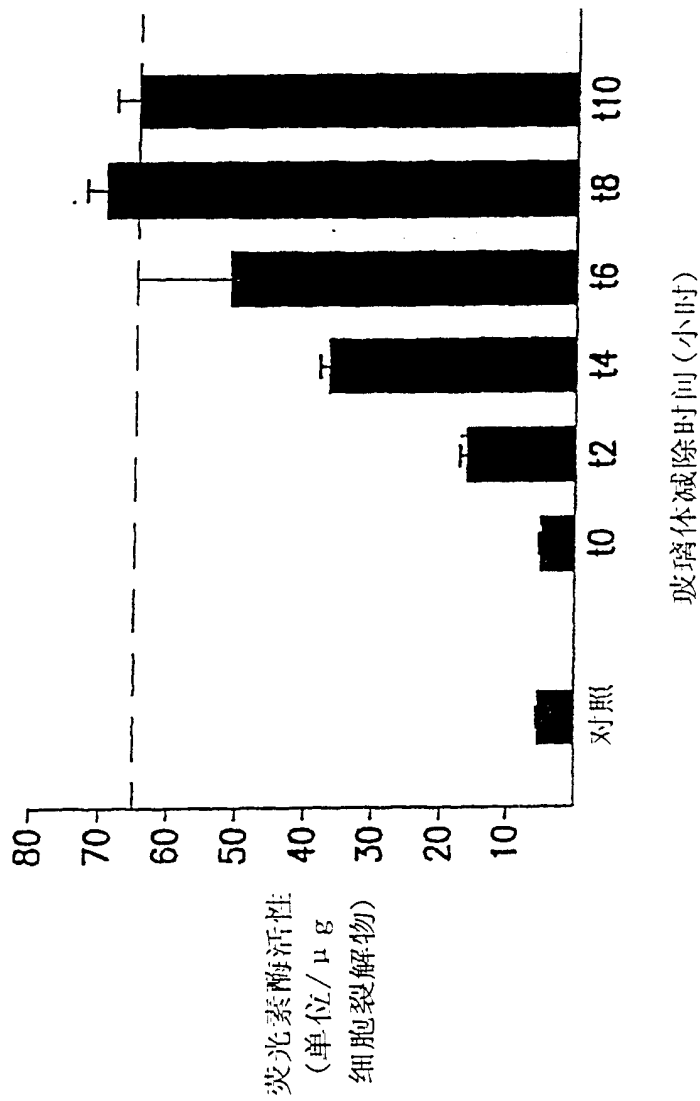


图 6

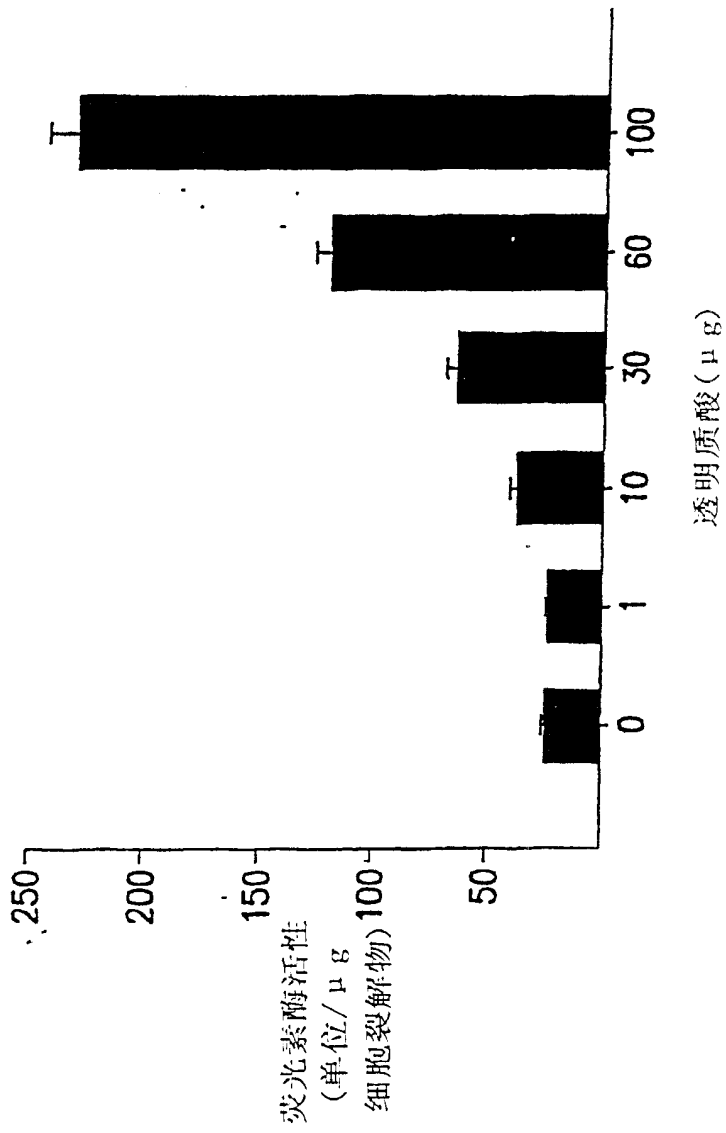


图 7

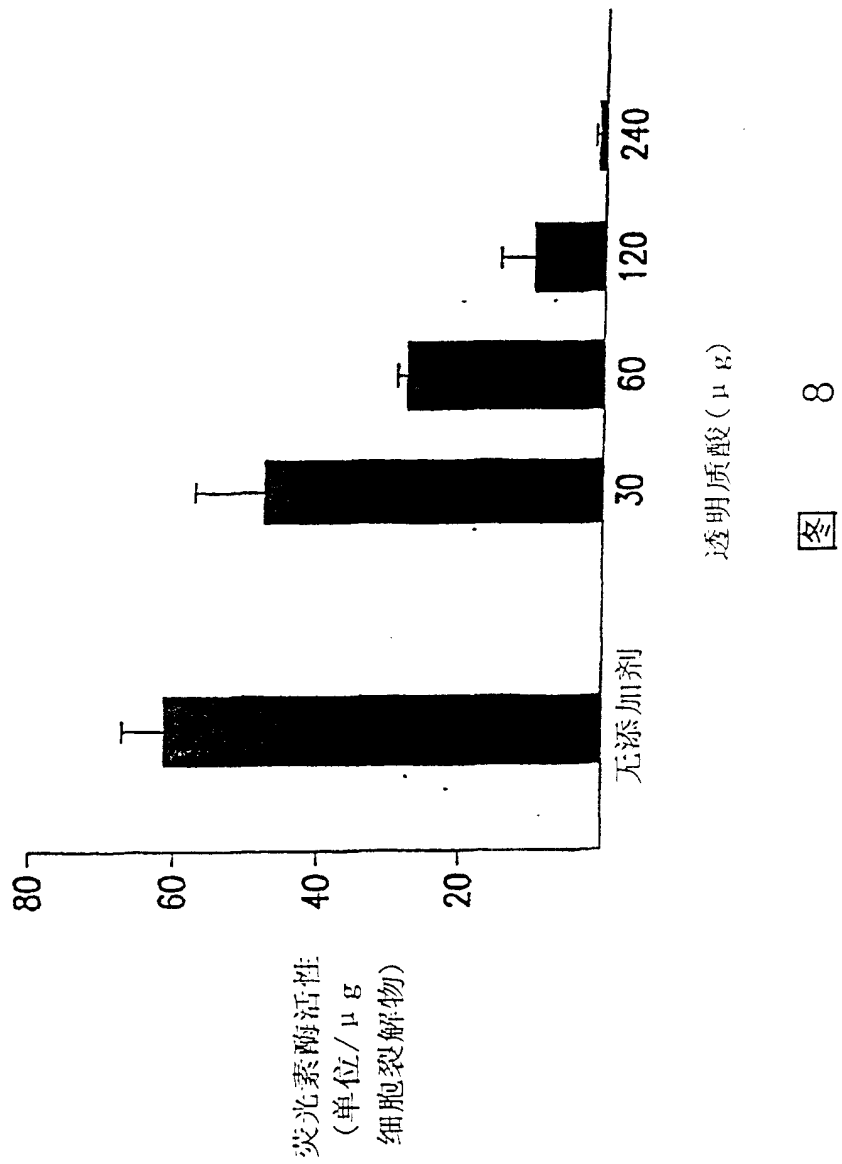


图 8

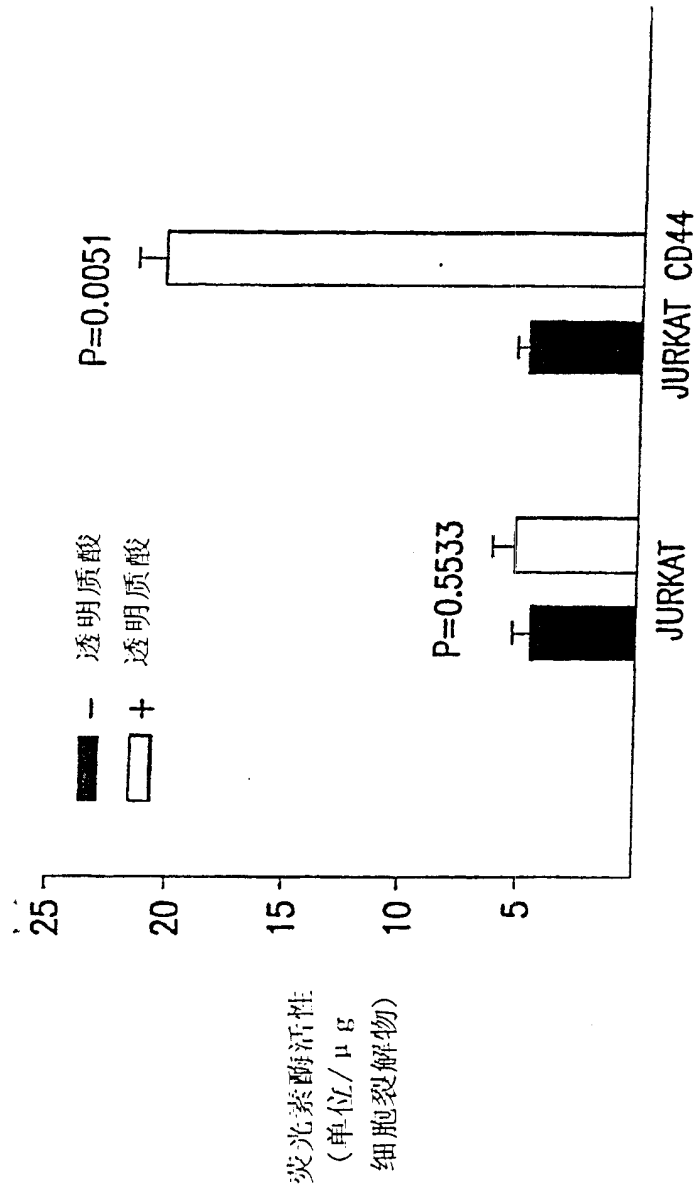


图 9

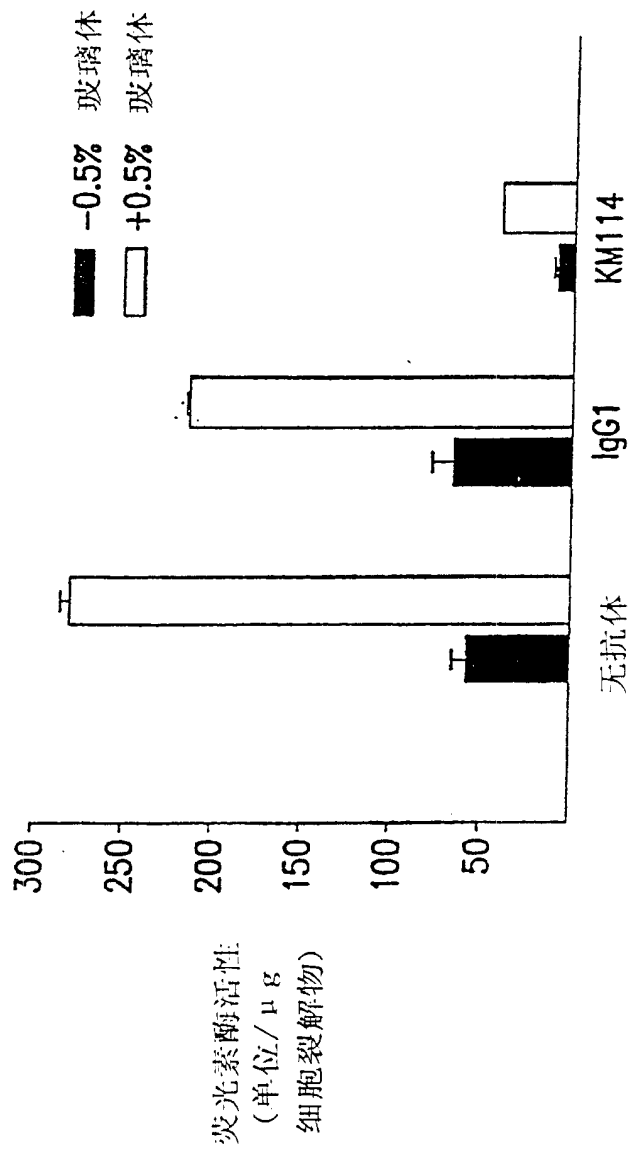


图 10

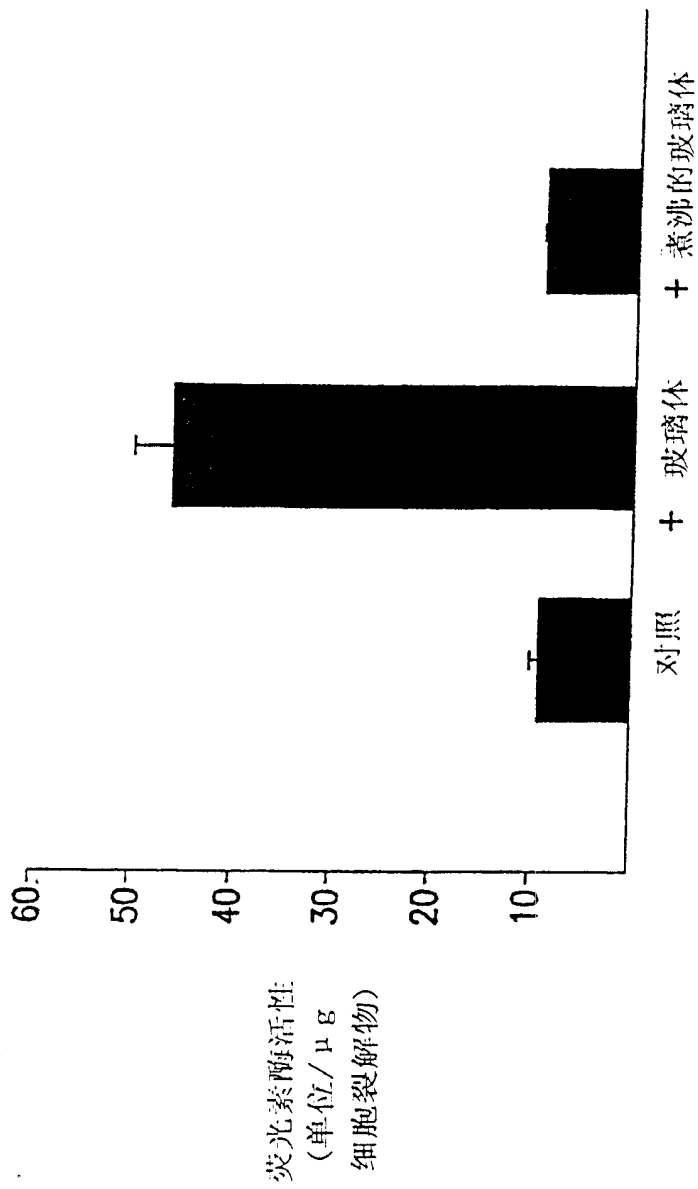


图 11

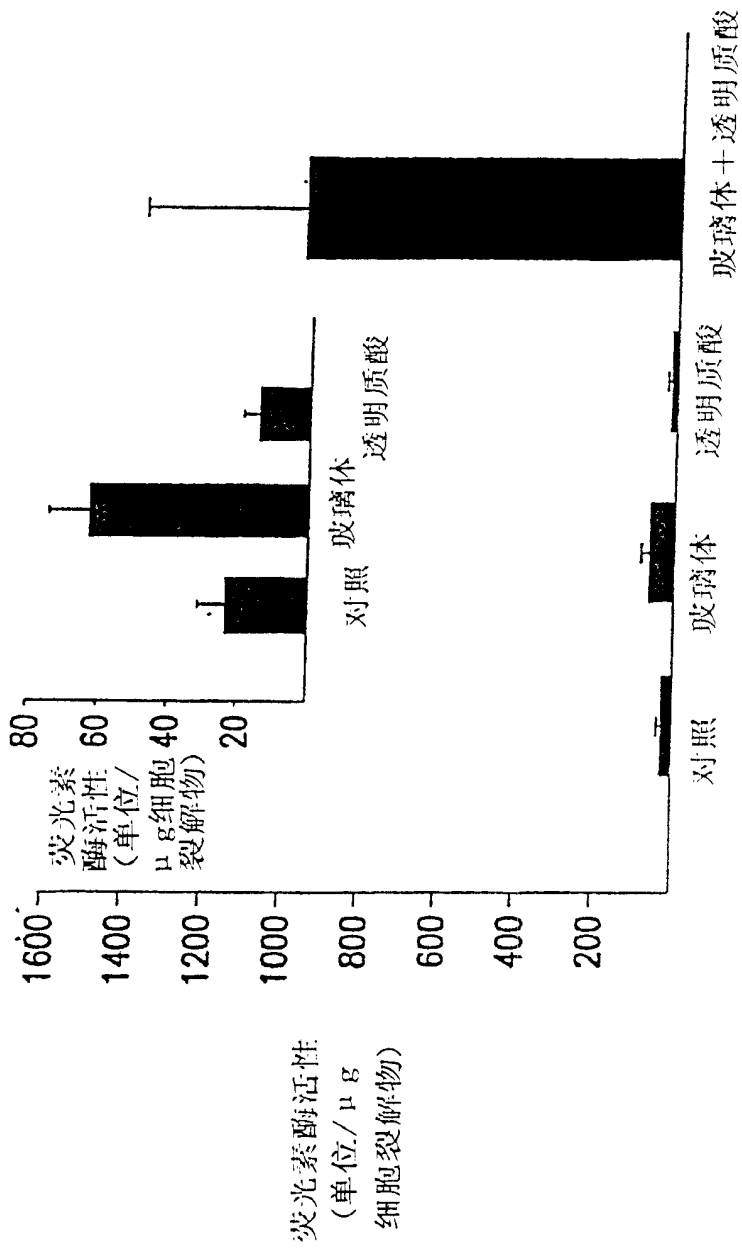
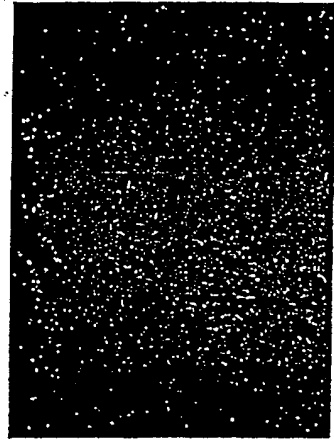
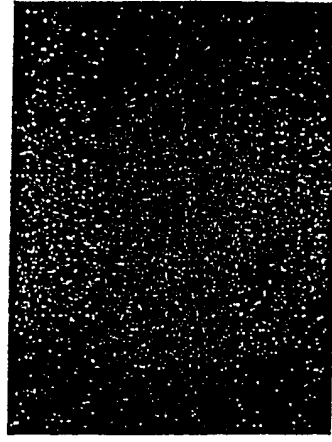


图 12

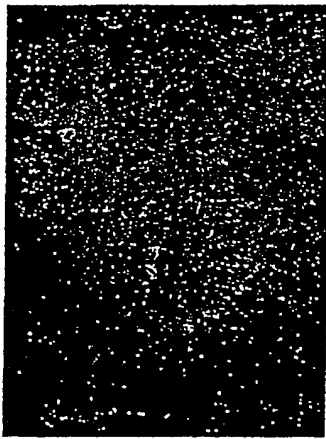
结膜外植体的AV5/F35-GFP转导



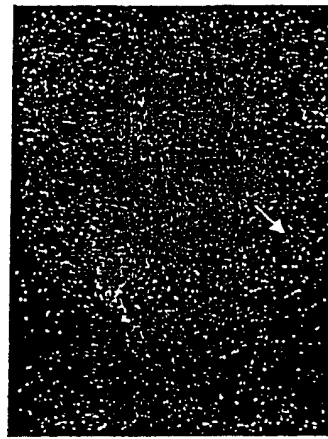
玻璃体+裂解酶



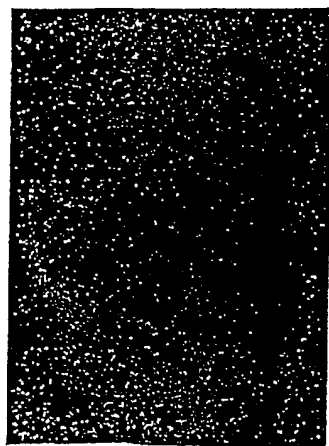
低分子透明质酸



玻璃体

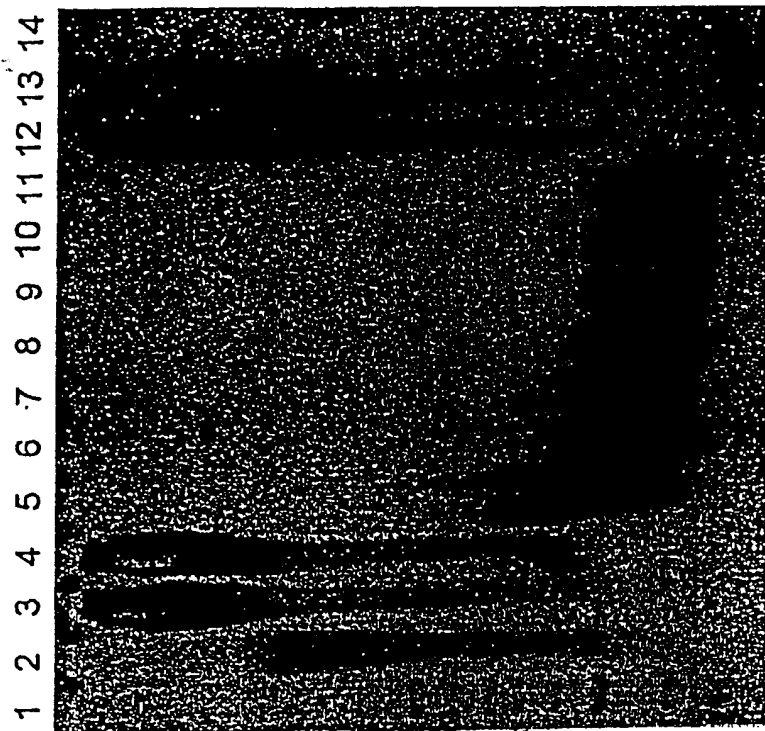


玻璃体+低分子透明质酸



对照

图 13



- 泳道 1: 1 kb DNA 梯
- 泳道 2: Rooster Comb 透明质酸 (低分子量)
- 泳道 3: 未消化的透明质酸 (高分子量)
- 泳道 4: 透明质酸 + 煮沸的裂解酶 t0
- 泳道 5: 透明质酸 + 0.1 mg 裂解酶 t0
- 泳道 6: 透明质酸 + 0.1 mg 裂解酶 t5'
- 泳道 7: 透明质酸 + 0.1 mg 裂解酶 t10'
- 泳道 8: 透明质酸 + 0.1 mg 裂解酶 t15'
- 泳道 9: 透明质酸 + 0.1 mg 裂解酶 t20'
- 泳道 10: 透明质酸 + 0.1 mg 裂解酶 t30'
- 泳道 11: 透明质酸 + 0.1 mg 裂解酶 t60'
- 泳道 12: 透明质酸 + 煮沸的裂解酶 t60'
- 泳道 13: “陈旧”的透明质酸
- 泳道 14: 空白

图 14

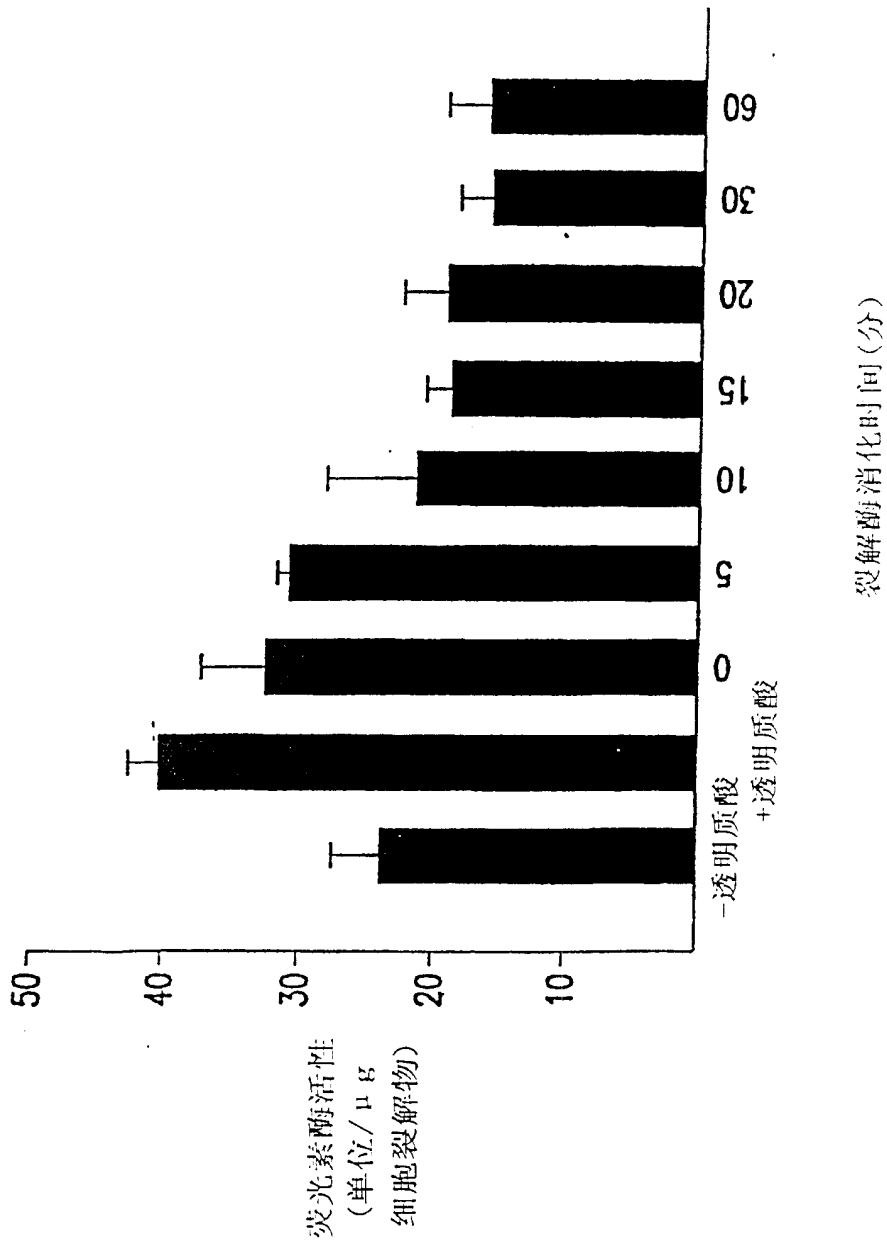


图 15