



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119857100 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 22

(21) 申请号 202411356451.9

A61P 25/00 (2006.01)

(22) 申请日 2024.09.26

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2023/125419 2023.10.19 CN

(71) 申请人 北京脑科学与类脑研究所

地址 102206 北京市昌平区生命科学园路
20号院6号楼0509室

(72) 发明人 戈鹂平 孙文智 李军 陈行军

毕湛迎 封紫嫣

(74) 专利代理机构 北京格旭知识产权代理事务

所(普通合伙) 11443

专利代理师 雒纯丹 况宁宁

(51) Int. Cl.

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

权利要求书1页 说明书33页
序列表(电子公布) 附图16页

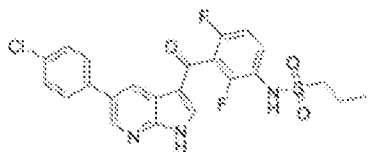
(54) 发明名称

一种小分子药物PLX4032在制备脑动静脉畸形疾病治疗的药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种小分子药物PLX4032在制备脑动静脉畸形疾病治疗的药物中的应用,本发明的小分子药物PLX4032可抑制Braf^{V600E}突变体蛋白Braf-MEK1信号通路的过度激活,从而降低Braf^{V600E}突变体蛋白的激酶活性,进而避免脑动静脉畸形疾病中Braf^{V600E}突变体蛋白的表达,能够直接靶向病变细胞,治疗效果好。

1. 一种小分子药物PLX4032在制备脑动静脉畸形疾病治疗的药物中的应用,其中,所述小分子药物PLX4032的结构如下:



2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述脑动静脉畸形疾病表现在Braf^{V600E}突变体蛋白的表达。

3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于,所述脑动静脉畸形疾病表现在Braf^{V600E}突变体蛋白的激酶活性提升。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的应用,其特征在于,所述脑动静脉畸形疾病表现在Braf-MEK1信号通路的过度激活。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的应用,其特征在于,所述小分子药物PLX4032选自片剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、微囊、微球和注射液中的一种。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的应用,其特征在于,所述小分子药物PLX4032还包含药学上的常规载体。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述的常规载体选自填充剂、粘合剂、湿润剂、吸收促进剂和助溶剂中的一种或两种以上。

一种小分子药物PLX4032在制备脑动静脉畸形疾病治疗的药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,具体涉及一种小分子药物PLX4032在制备脑动静脉畸形疾病治疗的药物中的应用。

背景技术

[0002] 脑动脉静脉畸形(bAVM)是四种主要血管畸形中的一种,其他三种包括静脉畸形、海绵状血管畸形(CCM)和毛细血管扩张。其中动脉静脉畸形是表型最显著的血管畸形类型之一。bAVM于1895年首次被描述,bAVM由动脉供血、动静脉之间具有高流量、低阻力分流的特征。畸形血管由各个方向汇聚的扩张动脉和扭曲搏动的静脉组成,无毛细血管。

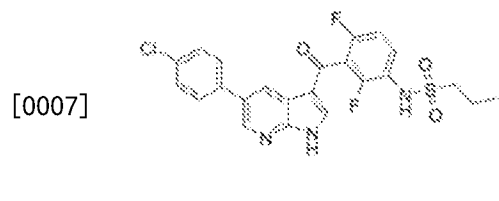
[0003] 对于AVM的疾病治疗,不同级别的AVM有不同的治疗方案,一般情况下,如果被诊断患有颅内AVM,医生会建议先观望病灶发展情况,如果非恶性,可以先等待,用药物控制,不必手术。反之,如果病灶较明显,可手术切除,可考虑栓塞(“胶水治疗”)疗法。如果病变处于不可接近的位置,可以考虑伽玛刀放射外科(GKRS),事实上GKRS是英国大多数动静脉畸形患者的首选治疗方法。治疗性的药物方面,Bevacizumab被报道已到临床一期实验。Bevacizumab是一种抗肿瘤药物,也称为Avastin。它是一种人源化的单克隆抗体,可靶向动静脉畸形血管内皮生长因子(VEGF),从而抑制病灶区的血管生成和生长。由于Avastin是一种蛋白类药物,其较难有效地通过血脑屏障,作用于病变脑区,因此小分子化合物类药物代表了一种更有吸引力的解决方案,如何靶向病变细胞,基于BRAF-MEK1信号通路激酶蛋白作为靶点的小分子抑制剂的设计与筛选则不断成为药物开发的核心方向。

发明内容

[0004] 针对脑动静脉畸形疾病治疗的药物中筛选直接靶向病变细胞的小分子抑制剂药物的问题。本发明提供了一种小分子药物PLX4032在制备脑动静脉畸形疾病治疗的药物中的应用。该药物是直接靶向病变细胞,基于BRAF-MEK1信号通路激酶蛋白作为靶点的小分子抑制剂。

[0005] 具体来说,本发明提供了如下技术方案:

[0006] 第一方面,本发明提供了一种小分子药物PLX4032在制备脑动静脉畸形疾病治疗的药物中的应用,其中,所述小分子药物PLX4032的结构如下:



[0008] 优选的,所述的应用,其特征在于,所述脑动静脉畸形疾病表现在Braf^{V600E}突变体蛋白的表达。

[0009] 优选的,表现在Braf^{V600E}突变体蛋白的激酶活性提升。

- [0010] 优选的,表现在Braf-MEK1信号通路的过度激活。
- [0011] 优选的,所述的应用,其特征在于,所述小分子药物PLX4032选自片剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、微囊、微球和注射液中的一种。
- [0012] 优选的,所述的应用,其特征在于,所述小分子药物PLX4032还包含药学上的常规载体。
- [0013] 优选的,所述的应用,其特征在于,所述的常规载体选自填充剂、粘合剂、湿润剂、吸收促进剂和助溶剂中的一种或两种以上。
- [0014] 本发明的有益效果:
- [0015] 本发明的小分子药物PLX4032可抑制Braf^{V600E}突变体蛋白Braf-MEK1信号通路的过度激活,从而降低Braf^{V600E}突变体蛋白的激酶活性,进而避免脑动静脉畸形疾病中Braf^{V600E}突变体蛋白的表达,能够直接靶向病变细胞,治疗效果好。

附图说明

[0016] 图1所示为Tek基因在人与小鼠脑血管系统单细胞与混合细胞转录组中的表达量数据,其中,a为Tek基因在人脑血管系统单细胞转录组中的表达谱;其中,ART:动脉;CAP:毛细血管;VEN:静脉;aSMC:动脉血管平滑肌细胞;aaSMC:小动脉平滑肌细胞;T-PC:溶质转运-周细胞;M-PC:胞外基质调节-周细胞;P.FB:周围纤维细胞;M.FB:脑膜纤维细胞;TC:T细胞;EPEN:室管膜细胞;AST-HPc:海马星形胶质细胞;AST-Ctx:皮层星形胶质细胞;PM:周围巨噬细胞;MG:小胶质细胞;OL:少突胶质细胞;OPC:少突胶质前体细胞;NEU:神经元;b为Tek基因在小鼠脑血管系统单细胞转录组中的表达谱;其中,PC:周细胞;vSMC:静脉平滑肌细胞;aaSMC:小动脉平滑肌细胞;aSMC:动脉平滑肌细胞;MG:小胶质细胞;FB1:一型成纤维细胞样;FB2:二型成纤维细胞样;OL:少突胶质细胞;EC1:一型内皮细胞;EC2:二型内皮细胞;EC3:三型内皮细胞;vEC:静脉内皮细胞;capilEC:毛细血管内皮细胞;aEC:动脉内皮细胞;AC:星型胶质细胞;c为Tek基因在小鼠脑细胞类型特异的混合细胞转录组中的表达谱。

[0017] 图2所示为Tek-Cre转基因小鼠可以高效且特异地标记脑血管各个节段的内皮细胞,其中,a为Tek-Cre;Ai47转基因小鼠出生后第42天脑冠状切片的荧光显微成像图;b为皮层区域单个感兴趣区域的共聚焦荧光显微成像图,H0:Hoechst 33342细胞核染料,EGFP:表明特异在Tek-Cre阳性小鼠脑血管内皮细胞表达的报告基因EGFP信号,H0/EGFP:H0与EGFP两个通道合并后的成像结果图,白色箭头指示脑血管内皮细胞;c为Tek-Cre;Ai47双转基因鼠在大脑皮层、纹状体和丘脑区域标记的血管内皮细胞分布情况,白色箭头指示脑血管内皮细胞。

[0018] 图3所示为多物种序列比对确定Tek基因启动子中序列保守的区域,其中,a为包括人,恒河猴,狨猴,猪,牛,大鼠,小鼠多物种基因组上对应Tek基因所在的启动子区域与5'端非编码区(5' UTR)的DNA多序列比对分析;b为各物种来源序列的进化树分析,猪和牛,人和恒河猴与狨猴,小鼠和大鼠对应的启动子区域与5'端非编码区序列分别在进化上更相近。

[0019] 图4所示为多物种序列比对确定Tek基因第一内含子序列保守的区域,其中,a为包括人,恒河猴,狨猴,猪,牛,大鼠,小鼠多物种基因组上对应Tek基因第一内含子所在的区域的DNA多序列比对分析;b为各物种来源序列的进化树分析,猪和牛,人和恒河猴与狨猴,小鼠和大鼠对应的第一内含子序列分别在进化上更相近。

[0020] 图5所示为本发明采用的技术路线,一种启动子与顺势调控元件功能区段分离与活体测试的方法流程示意图。

[0021] 图6所示为Tek基因启动子区段的截短与转导效率分析,其中,a为Tek基因启动子区段的截短策略示意图;b为各个截短版本启动子在多个脑区的介导的病毒转导效率统计柱状图;c为各个截短版本启动子介导重组AAV病毒的体内转导荧光成像示意图,比例尺为100 μ m。

[0022] 图7所示为Tek基因中第一内含子区段的顺势调控元件的截短与转导效率分析,其中,a为顺势调控元件截短策略示意图;b为各种截短版本介导重组AAV病毒的体内血管内皮细胞转导效率;c为各种截短版本的顺势调控元件介导重组AAV病毒的体内转导荧光成像示意图,比例尺为100 μ m。

[0023] 图8所示为rAAV-miniBEND系统可以高效并特异地转导并标记全脑范围的脑血管内皮细胞,a为小鼠大脑的矢状切面展示最佳优化mPro723-mCis700截短版本rAAV-miniBEND系统的在全脑范围转导脑血管内皮细胞的代表图,转基因荧光报告小鼠Ai14 (Rosa26-CAG-LSL-tdTomato),经尾静脉注射80 μ L病毒AAV-PhP.eB-mPro723-Cre-mCis700;b为rAAV-miniBEND系统在多个脑区与Glut1免疫荧光共定位成像图,图中皮层,海马,丘脑组的实验条件为AAV-PhP.eB-miniBEND (mPro723) -Cre-mCis400注射入Ai47转基因报告小鼠后的鼠脑样本切片染色结果,小脑组的实验条件为AAV-PhP.eB-miniBEND-Cre-mCis303注射入Ai47转基因报告小鼠后的鼠脑切片染色结果;EGFP信号表明通过rAAV-miniBEND系统标记的脑血管内皮细胞,Glut1通道信号表示Glut1蛋白的表达定位;H0:Hoechst 33342,是一种细胞核染料;Merge通道为Glut1与EGFP信号的共定位情况。

[0024] 图9所示为鼠源Tek基因启动子区域5'端序列的持续截短可以降低miniBEND系统在小脑中神经元的非特异标记,其中,a为每组使用的病毒都为AAV-PhP.eB血清型,分别使用的重组AAV载体是CAG-mScarlet,mPro973-Cre,mPro760-Cre,mPro723-Cre,其中后三组中重组载体上使用的Tek顺式调控元件均为mCis700,并分别注射到C57BL/6J,Ai47,Ai47,Ai14转基因报告小鼠中。各组使用的病毒滴度信息见附录A(表A.1),图中比例尺为100 μ m;b为除内皮细胞之外的非特异标记比例,以标准化的标记密度(每10¹¹个病毒颗粒对一只小鼠进行体内转导实验,在每mm²面积内标记的细胞数目)为指标进行评估,各组测试的实验动物都为n=2,分别在每只小鼠的切片中选取5个视野进行细胞计数与统计分析。图中比例尺为100 μ m。

[0025] 图10所示为人源Tek基因启动子与顺势调控元件的截短与转导效率分析,其中,a为人源Tek基因启动子截短策略示意图;b为人源Tek基因顺势调控元件的截短策略示意图;c为小鼠体内的转导效率评估。

[0026] 图11所示为Tek基因对应的顺势调控元件在不同物种中的保守序列同样可以介导内皮细胞特异的基因转录;Marmo-Cis700:狨猴(Marmoset)源的Tek基因顺式调控元件Cis700截短版本,Pig-Cis700:猪(Pig)源的Tek基因顺式调控元件Cis700截短版本,Rat-Cis737:大鼠源的Tek基因顺式调控元件Cis737截短版本,该组对应使用的重组载体上启动子是Rat-Pro1600。

[0027] 图12所示为结合tTA/TRE的miniBEND过表达系统的载体设计与体内测试结果,其中,a为结合tTA/TRE的miniBEND的过表达系统的载体设计示意图,双AAV载体策略和单AAV

载体策略;b为实验小鼠品系为C57BL/6J,双AAV策略组:AAV-PhP.V1-mPro1576-tTA-mCis700+AAV-PhP.V1-TRE-EGFP-WPRE-pA,双病毒共同转导;单AAV载体策略组:AAV-PhP.eB-TRE-EGFP-mPro723-tTA-mCis303-pA单病毒转导,病毒滴度信息见附录A(表A.1),图中比例尺为100 μ m。

[0028] 图13所示为基于miniBEND-globin融合启动子的过表达系统的载体设计与体内表征,其中,a为基于miniBEND的过表达系统的载体设计示意图,嵌合体内含子包括glo566与glo228两个版本,图中GOI为外源目的基因;b为图a中四种过表达系统包装成AAV-PhP.eB血清型病毒后在C57BL/6J小鼠体内测试的荧光成像结果;c为图b皮层脑区对应的统计结果,纵坐标表示标准化后内皮细胞的标记密度(n/mm²),标准化方法为每10¹¹个病毒颗粒对应的内皮细胞标记密度。各组使用的小鼠数目与统计视野数分别为:miniBENDv1组(4只小鼠,其中包括使用AAV-PhP.V1的一只,使用AAV-PhP.eB的三只,22个统计视野);miniBENDv1(glo566)组(3只小鼠,18个统计ROI);miniBENDv2(glo566)组(3只小鼠,18个统计视野);miniBENDv2(glo228)组(3只小鼠,18个统计视野)。

[0029] 图14所示为基于Braf-CA转基因小鼠构建局灶性bAVM疾病模型的方法;a为Braf-CA转基因小鼠的工作原理(Dankort等人,2007);b为实验示意图;c为小鼠模型的死亡曲线,表明局灶性bAVM模型具有一定致死率;共统计了12只造模成功的小鼠(n=12);d为Braf-CA小鼠经过bAVM造模后的激光散斑血流成像图,其中展示的是两只模型小鼠的代表结果图。其中,Exon表示外显子,Exon 1表示该基因的第一号外显子,Exon 14,Exon 15,Exon 16表示第14号,第15号,第16号外显子。

[0030] 图15所示为核磁共振成像表明基于Braf体细胞突变的bAVM发展早期有脑出血,后期会有类似肿瘤的侵袭与占位效应,其中,a为核磁共振成像(MRI)示意图,使用Biorender在线软件绘制得;b为其中一只造模成功的小鼠,分别在病毒注射后第5天,第15天,第22天,第41天进行MRI成像的结果图,白色箭头指示病灶区;c为bAVM病灶生长曲线,为共成像并统计14只成功造模的小鼠,AP Diameter(Diameter in Anterior-Posterior direction,在前后方向上的直径)表示病灶所占位置的大小;PID:Post injection days(病毒注射后天数)。

[0031] 图16所示为脑内皮细胞的Braf^{V600E}基因突变能够诱发血管畸形,其中,a为Laminin抗体免疫荧光实验后在正常脑区与病灶区的血管荧光成像代表图;b为血管直径统计箱线图;c为血管直径统计频度分布图;图中比例尺为50 μ m。

[0032] 图17所示为构建的Braf-bAVM疾病小鼠模型用于评估小分子药物的治疗效果,其中,a为BRAF^{V600E}激酶选择性抑制剂PLX4032分子结构图与实验流程示意图,给药浓度为75mg/kg;对照组腹腔注射等量DMSO(Vehicle,载体);b为给药组与对照组的病灶大小对比柱状图,纵坐标表示bAVM病灶区在前后方向上病灶直径大小(Nidus,AP diameter),误差棒表示平均值标准差,非配对T检验,**表示p<0.01,实验组(n=9),对照组(n=7);c为部分实验小鼠的MRI T2序列扫描结果代表图。处理组小鼠编号:#73、#78和#85;对照组小鼠编号:#68、#83和#90。MRI扫描的Z轴间隔为0.5mm。

[0033] 图18所示为构建的Braf-bAVM疾病小鼠模型给药组与对照组H&E组织学染色结果。a为经局部注射AAV-miniBEND(mPro723-mCis700)-Cre后,Braf V600E-f1/f1小鼠大脑皮层脑切片的H&E染色代表性图像,a左半部分显示对照组(DMSO)结果,而a右半部分显示给药组

结果,a显示了对照组和治疗组的两个代表性区域;b显示了对照组和给药组中畸形血管的密度;c显示了对照组和给药组中畸形血管的直径。

具体实施方式

[0034] 本发明涉及一种小分子药物PLX4032在制备脑动静脉畸形疾病治疗的药物中的应用,提供了小分子药物PLX4032的新用途,下面结合附图和实施例对本发明做进一步详细说明,以下实施例仅限于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所描述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。所有实验数据均采用GraphPad Prism8软件(GraphPad Software,USA)进行统计分析,所有数据采用平均值标准差的形式表示误差棒,采用非参数组间t-test分析。

[0035] 实验材料与方法

[0036] 1Tek基因

[0037] Tek基因编码一个属于蛋白酪氨酸激酶Tie2家族的受体,编码的蛋白质具有独特的胞外区域,包含两个免疫球蛋白样结构域、三个表皮生长因子(EGF)样结构域和三个纤连蛋白III型重复序列。配体血管生成素-1与该受体结合并介导一个信号通路,在胚胎血管发育中起作用。该基因具有在血管内皮细胞广泛特定表达。

[0038] Tek基因存在两部分的核转录调控序列,除了常规的启动子区域(Tek Promoter)外,还有第一内含子(Tek intron1)的非编码序列。

[0039] 查询GenBank数据库及文献,确定Tek基因的启动子区域与第一内含子区域。

[0040] 2截短序列与重组质粒构建

[0041] 本发明构建的重组质粒为:AAV-miniTek-Cre-bGFP-A-Cis-element,其中miniTek为Tek基因不同截短大小的启动子区域(Tek Promoter区域),Cis-element为Tek基因不同截短大小的第一内含子区域(Tek intron1区域)。该重组质粒中miniTek两端引入了SpeI与AgeI酶切位点,Cis-element两端引入了KpnI与NotI酶切位点。该重组质粒所采用的标准化质粒骨架来源为从Addgene网站购买的质粒pAAV-CBA-cre-U6-sgRNA(货号为Addgene#60229),Tek-Cre转基因小鼠基因组DNA上的转基因区段包括鼠源Tek基因启动子区域的2.1kb序列和Tek基因第一内含子的10kb序列可供作模板使用(Schlaeger et al.,1997;Kisanuki等人2001)。使用Tek基因启动子区域的2.1kb序列和Tek基因第一内含子区段的10kb序列进行截短实验,小鼠源的不同截短长度大小的Tek启动子区域(包括mPro1576、mPro973、mPro723、mPro760、mPro583、mPro471)是以Tek-Cre转基因小鼠的基因组DNA为模板,在对应区域上下游设计引物,通过PCR获得。小鼠源的不同截短长度大小的第一内含子区域(mCis1349、mCis700、mCis400、mCis303、mCis200和mCis103)是以Tek-Cre转基因小鼠的基因组DNA为模板,在对应区域上下游设计引物,通过PCR获得。PCR引物两端包含与重组AAV载体粘性末端同源的20bp序列,随后通过同源重组的方法可以获得目的重组质粒。引物的详细信息如下表1所示。

[0042] 人源的不同截短长度大小的Tek基因启动子区域序列(包括hPro1612、hPro762,通过多物种同源序列比对找到并确定)与Tek内含子区域序列(包括hCis700、hCis400、hCis200,通过多物种同源序列比对找到并确定)是以HEK293T细胞系的基因组DNA为模板进

行PCR反应克隆得到,在对应区域上下游设计引物,通过PCR获得。大鼠源,猪源,狨猴源的Tek基因顺式调控元件(Cis-element)的DNA材料是通过金唯智公司基因合成获得。其他在本文使用的质粒载体信息如表2所示。

[0043] 表1引物序列表

目的片段	引物名称	序列(5'到3')	序列号 (SEQ ID)
mPro1 576	hg-SpeI-mPro1 576-F	5'-TGACATTGATTATTGACTAGTCC TCAGTGTCTGCTCTTGACCTGTT -3'	SEQ ID NO.16
	hg-AgeI-mPro 1576-R	5'-CTTGGGCATGGTGGCACCGGTA CTAGCTTTCAACAACCTCACAACTT TGCGAC -3'	SEQ ID NO.17
mPro9 73	hg-SpeI-mPro9 73-F	5'-TGACATTGATTATTGACTAGTGG AGGCTGAGGGAGCATCGTTATCA-3 ,	SEQ ID NO.18
	hg-AgeI-mPro 973-R	5'-CTTGGGCATGGTGGCACCGGTA CTAGCTTTCAACAACCTCACAACTT TGC-3'	SEQ ID NO.19
mPro7 23	hg-SpeI-mPro7 23-F	5'-TGACATTGATTATTGACTAGTGT ATATTTGGGCTCAGGGCCAACAGG -3'	SEQ ID NO.20
	hg-AgeI-mPro 723-R	5'-CTTGGGCATGGTGGCACCGGTA CTAGCTTTCAACAACCTCACAACTT TGC-3'	SEQ ID NO.21
mPro7 60	hg-SpeI-mPro7 60-F	5'-TGACATTGATTATTGACTAGTGA GCTCCAGGCTAGTTCCAGGC-3'	SEQ ID NO.22
	hg-AgeI-mPro 760-R	5'-CTTGGGCATGGTGGCACCGGTA CTTTAAAGGCACTTGGTAT-3'	SEQ ID NO.23
mPro5	hg-SpeI-mPro5	5'-TGACATTGATTATTGACTAGTGG	SEQ ID

[0045]

83	83-F	AGGCTGAGGGAGCATCGTTATCAT- 3'	NO.24
	hg-AgeI-mPro 583-R	5'-CTTGGGCATGGTGGCACCGGTA CTGAATAACAAGCCCTCCACCTAT GTATGG-3'	SEQ ID NO.25
mPro4 71	hg-SpeI-mPro4 71-F	5'-TGACATTGATTATTGACTAGTGG AGGCTGAGGGAGCATCGTTATCAT- 3'	SEQ ID NO.26
	hg-AgeI-mPro 471-R	5'-CTTGGGCATGGTGGCACCGGTA CTGGGAGCAGCACTTGCTCTCCTG -3'	SEQ ID NO.27
mCis13 49	hg-KpnI-mCis 1349-F	5'-CAGGCATGCTGGGGAGGTACCC ATAGATATCTTAATAGTCAAGGAA -3'	SEQ ID NO.28
	hg-NotI-mCis1 349-R	5'-ACTAGGGGTTTCCTGCGGCCGCA TTATTGTTTTACTTGGGAGGCTGG -3'	SEQ ID NO.29
mCis70 0	hg-KpnI-mCis 700-F	5'-CAGGCATGCTGGGGAGGTACCA TTTTATAAAAGTTTATTTACCGCC-3 ,	SEQ ID NO.30
	hg-NotI-mCis7 00-R	5'-CACTAGGGGTTTCCTGCGGCCGCG GCCAAGGTACGCCGGTTCACCAT C-3'	SEQ ID NO.31
mCis40 0	hg-KpnI-mCis 400-F	5'-CAGGCATGCTGGGGAGGTACCC CCCCAAGATTGTGGAAGCTGGAC- 3'	SEQ ID NO.32

[0046]

	hg-NotI-mCis4 00-R	5'-CACTAGGGGTTTCCTGCGGCCGC TCTAGAGGAAAGTGGCTGCTCATT GTCTTCC-3'	SEQ ID NO.33
mCis30 3	hg-KpnI-mCis 303-F	5'-CAGGCATGCTGGGGAGGTACCC CATGGGGACATGGCTGTCATGG-3'	SEQ ID NO.34
	hg-NotI-mCis3 03-R	5'-CACTAGGGGTTTCCTGCGGCCGC TCTAGAGGAAAGTGGCTGCTCATT GTCTTCC-3'	SEQ ID NO.35
mCis20 0	hg-KpnI-mCis 200-F	5'-CAGGCATGCTGGGGAGGTACCT TTGCTCTCTGCTTGTCACAGCCTC- 3'	SEQ ID NO.57
	hg-NotI-mCis2 00-R	5'-CACTAGGGGTTTCCTGCGGCCGC TCTAGAGGAAAGTGGCTGCTCATT G-3'	SEQ ID NO.58
mCis10 3	hg-KpnI-mCis 103-F	5'-CAGGCATGCTGGGGAGGTACCC CATGGGGACATGGCTGTCATGGTG -3'	SEQ ID NO.59
	hg-NotI-mCis1 03-R	5'-CACTAGGGGTTTCCTGCGGCCCA GTGGCCACCCACACACCCA-3'	SEQ ID NO.60
hPro16 12	hg-SpeI-hPro1 612-F	5'-GCCTCTAGACTCGAGACTAGTC CAGGCCCACTGTTTTTGTTTTTTTT TTTCGTG-3'	SEQ ID NO.36
	hg-AgeI-hPro1 612-R	5'-CTTGGGCATGGTGGCACCGGTA AGGATCCTTTCAAAAACCCAGCGG TT-3'	SEQ ID NO.37
hPro76	hg-SpeI-hPro7	5'-TGACATTGATTATTGACTAGTTT	SEQ ID

[0047]

2	62-F	GCTCTCATGAGCACCATTTTTATCC CAATCT-3'	NO.38
	hg-AgeI-hPro7 62-R	5'-CTTGGGCATGGTGGCACCGGTT TAAAGGCATTTGGTATCAGCAGGG CTG-3'	SEQ ID NO.39
hCis70 0	hg-KpnI-hCis7 00-F	5'-CAGGCATGCTGGGGAGGTACCC TTTCAGGAAAGGGAATGTCTAAAG TTGCCTCC-3'	SEQ ID NO.40
	hg-NotI-hCis7 00-R	5'-CACTAGGGGTTCTGCGGCCGC GCCAAGGTTAAGCTGGTTCACCAT CTGAC-3'	SEQ ID NO.41
hCis40 0	Hg-KpnI-hCis4 00-F	5'-CAGGCATGCTGGGGAGGTACCA AGTACATACCCATTGCTTGGTGGTT TCA-3'	SEQ ID NO.42
	hg-NotI-hCis4 00-R	5'-cactaggggttctcgccgccaaggttaagc tggttcaccatctgac-3'	SEQ ID NO.43
hCis20 0	hg-KpnI-hCis2 00-F	5'-caggcatgctggggagggtaccggggttgaagg catcgtggg-3'	SEQ ID NO.44
	hg-NotI-hCis2 00-R	5'-cactaggggttctcgccgctctggaggaaagt ggccgagcat-3'	SEQ ID NO.45

[0048] 表2相关质粒载体信息

[0049]

质粒名称	来源	备注
rAAV-Efla-Cre-P2A-mCherry-WPR E	本专利自主构建	从 Addgene 网站购买质粒 (货号为#100056)后, 将 ChR2-YFP 元件替换为

[0050]

		Cre-P2A-mCherry 元件
rAAV-CAG-mScarlet-WPRE-pA	本专利自主构建	从 Addgene 网站购买质粒 (货号为#37825) 后将 EGFP 替换为 mScarlet 荧光蛋白, 在图 6 与图 9 中使用
rAAV-CAG-EGFP	从 Addgene 网站购买获得(货号为#37825)	广谱型启动子 CAG
rAAV-CAG-mGL	本专利自主构建	将 rAAV-CAG-EGFP 质粒的 EGFP 元件替换为 mGL(mGreenLantern)荧光蛋白基因元件(Campbell 等人, 2020)
rAAV-mPro1576-EGFP	本专利自主构建	直接过表达 EGFP, 详见实施例 2
rAAV-mPro1576-Cre-mCis1349	本专利自主构建	部分截短 5'启动子临近区序列, 详见实施例 2
rAAV-mPro973-Cre-mCis700	本专利自主构建	部分截短 5'启动子临近区序列, 详见实施例 2
rAAV-mPro723-d224-Cre-mCis700	本专利自主构建	部分截短 5'启动子临近区序列, 详见实施例 2
rAAV-mPro583-Cre-mCis700	本专利自主构建	部分截短 5'UTR 序列, 详见实施例 2
rAAV-mPro471-Cre-mCis700	本专利自主构建	部分截短 5'UTR 序列, 详见实施例 2
rAAV-mPro973-Cre-mCis400	本专利自主构建	部分截短了内含子保守区

[0051]

	建	序列, 详见实施例 2
rAAV-mPro973-Cre-mCis303	本专利自主构建	部分截短了内含子保守区序列, 详见实施例 2
rAAV-mPro973-Cre-mCis200	本专利自主构建	部分截短了内含子保守区序列, 详见实施例 2
rAAV-mPro973-Cre-mCis103	本专利自主构建	部分截短了内含子保守区序列, 详见实施例 2
rAAV-TRE-EGFP-hGHpA	本专利自主构建	Dual AAV, Tet-off 系统启动子(Loew 等人, 2010), 详见实施例 3
rAAV-mPro723-globin-EGFP	本专利自主构建	嵌合启动子, 详见实施例 3
rAAV-mPro1576-globin-EGFP	本专利自主构建	嵌合启动子, 详见实施例 3
rAAV-miniBEND-hMAP3K3 ^{I441M}	本专利自主构建	过表达人源 MAP3K3 突变体蛋白, 将质粒 rAAV-mPro723-globin-EGFP 的 EGFP 元件替换为 hMAP3K3 ^{I441M} , 详见实施例 4

[0052] 3小鼠

[0053] 本专利所用的实验动物(小鼠)都符合中国政府关于动物保护和使用的相关规定, 并且经过本单位动物管理和使用委员会批准, 符合管理政策。Ai9、Ai47小鼠来自艾伦研究所曾红葵博士的实验室。Tek-Cre(货号为008863)、NG2DsRedBACtg(货号为008241)、Ai14(货号为007914)小鼠购买自美国杰克逊实验室。Braf-CA^{f1/f1}, 也称Conditional activation Braf^{V600E}转基因小鼠, 购于美国杰克逊实验室, 货号为017837。野生型小鼠C57BL/6J(SPF级别)经由维通利华购买, 部分C57BL/6J小鼠购买于本单位实验动物平台。C57BL/6J小鼠, Braf-CA^{f1/f1}转基因小鼠, Ai14和Ai47转基因小鼠等被用于AAV病毒注射。动物的使用和照料都在北京脑科学与类脑研究所动物伦理委员会的指导下完成。

[0054] 4AAV病毒包装与纯化

[0055] AAV病毒的包装: (1) 将9cm细胞培养皿中的细胞传代至15cm的细胞培养皿中。(2) 转染前, 用吸液泵吸除15cm细胞培养皿内的培养液, 重新加入20mL完全培养基(DMEM+10% FBS+PS/双抗)后, 将培养皿放回CO2培养箱中进行培养。扩大培养后, 若要隔天传代, 可以在扩大培养的第二天给细胞更换培养液(DMEM+10% FBS+PS/双抗), 使细胞生长得更好。(3) 按表3配制转染混合液(1皿)。

[0056] 表3AAV病毒包装质粒转染体系

[0057]	组分	体系
	DMEM (无 FBS and PS/双抗)	5 mL
	质粒 (携带目的基因)	15 μ g
	质粒 (p-helper)	45 μ g
	质粒 (PRC)	45 μ g
	Neofect DNA 转染试剂	110 μ L

[0058] (4) 将混合的转染试剂在震荡仪上充分震荡混匀后,放在生物安全柜中静置30分钟。(5) 将混合液加入15cm细胞培养皿中,盖上皿盖,在操作台上轻晃培养皿使细胞均匀分布在皿中。(6) 将细胞培养皿放入CO₂培养箱中进行培养,8小时后,将培养液吸除,加入30mL DMEM培养液(无FBS,有PS/双抗)。(7) 再次将细胞培养皿放入CO₂培养箱中,转染48-72小时后,即可收集细胞进行病毒纯化。

[0059] AAV病毒的纯化:(1) 收集细胞:用5mL移液器将细胞从细胞培养皿中的壁上吹下来,收集到50mL离心管中。(2) 加入1/10体积的氯仿(3mL)。(3) 放入摇床中,37°C摇1小时。(4) 加入1.928g NaCl,放入摇床中,25°C摇20分钟。(5) 离心:4°C,12000rcf,20分钟。(6) 将上清液转至做好标记的、新的50mL离心管中。(7) 加入10%上清液体积的PEG8000。(8) 放入摇床中,25°C摇20分钟。(9) 冰浴1小时,若实验需暂停,可以冰浴过夜。(10) 离心:4°C,12000rcf,30分钟。(11) 轻柔的将上清弃掉,将管子倒扣在吸水纸上。(12) 加入600 μ L经过过滤的PBS、1 μ L DNase、1 μ L RNase,充分溶解病毒。(13) 放入37°C水浴锅或37°C细菌培养箱中,孵育30分钟。(14) 将孵育后的产物转至新的1.5mL离心管中,加入按1:1加入600 μ L氯仿,震荡并充分混匀。(15) 离心:4°C,12000rcf,10分钟。(16) 取上清至新的1.5mL离心管中,经蛋白纯化柱浓缩。(注:本发明中AAV病毒的包装与纯化实验由北京脑科学与类脑研究所(CIBR)载体中心提供服务完成。)

[0060] 5AAV病毒注射

[0061] 小鼠的AAV病毒体内转导是通过眼眶静脉丛注射的方式实现的。首先将蘸有液体异氟烷棉球装入50mL离心管,制备一个简易的小鼠麻醉诱导盒,其次使用40U胰岛素针吸取稀释好的,特定滴度的AAV病毒,将小鼠的头部伸入简易麻醉诱导盒,待小鼠呼吸速率减缓,四肢无力后,捏住头部,暴露右侧眼球,将装有AAV病毒(100 μ L左右)的胰岛素针插入眼眶静脉丛并注射病毒。快速拔出后,将小鼠取出诱导盒,让其尽快苏醒。如拔针后有出血迹象,应使用棉签拭去。本实验室中AAV病毒与滴度信息请见附表(表A.2)。

[0062] 6免疫荧光染色实验

[0063] 小鼠经心肌灌注无菌生理盐水,待肝变白后更换4% (w/v) 多聚甲醛(PFA) 进行灌注。灌注完毕后,解剖小鼠大脑,转移到15mL离心管中,放置于冷PFA(4°C) 中固定2小时,在PBS中清洗3遍,室温摇床摇晃,每遍10分钟。最后换为30%的蔗糖放置在4°C摇床进行脱水

处理,1-2天后,鼠脑沉底,表明脱水完毕。用低温恒温器(CM3050S型,徕卡)将固定的大脑切片40-60 μ m,或用振动切片机(VT1000S,徕卡)切片60-70 μ m。按照我们以前的描述对切片进行染色。简单地说,切片用0.25% Triton X-100透化,然后用5% BSA和3%正常山羊血清与0.25% Triton X-100封闭2小时。将PDGFR β (1:300,大鼠,eBioscience,14-1402-81)或NG2(1:300,AB5320,兔,多克隆,Millipore)、Glut1(1:300,兔,Thermofisher,RB-9052-P0)和CD31(1:50,大鼠,BD550274)初级抗体在4 $^{\circ}$ C下与脑切片培养24~48小时。在PBS中与Hoechst33342或DAPI(Life Technologies)一起洗三次后,将切片与Alexa 488、Alexa 546或Alexa 633/647(1:500,Life Technologies)共轭的二级抗体在RT(22-25 $^{\circ}$ C)下孵育2小时。在PBS中清洗三次后,用抗荧光淬灭的封片剂Vectorlab(或定制的(60%甘油和Hoechst33342))进行封片。

[0064] 7磁共振成像和三维重建

[0065] 核磁共振成像(magnetic resonance imaging,MRI)由一台7.0T的扫描仪器(Bruker Pharmascan 70/16,Bruker,德国)完成,同时配备了23mm的表面线圈和直径12cm的自屏蔽梯度系统,该系统可以用于小鼠与大鼠的小动物核磁共振扫描。实验员通过Paravision 5.1软件(Bruker BioSpin)和一台运行Topspin 2.0的Linux电脑与扫描仪器进行交互。实验操作步骤如下:首先用含有5%异氟烷和95%氧气的混合气体对小鼠进行气体麻醉,将小鼠转移放置到成像舱体内,同时切换气体麻醉的阀门,使成像过程中继续用2%的异氟烷和98%的氧气进行麻醉维持。该系统还配备了呼吸检测模块,有一个小的呼吸频率检测贴片放在成像舱体的小鼠腹部一下,实验员可以通过观察小鼠的呼吸频率(一般控制在30~50次/分钟之间)反馈来调节麻醉机开关阀门进而调节麻醉强度。本研究采用松弛增强(RARE)的方法对小鼠的大脑进行T2加权(T2W)成像,使用的参数如下:重复时间(repetition time,TR)/回波时间(echo time,TE)为3500ms/33ms,4RARE factor,21 $\times$ 21mm扫描视野(field of view,FOV),256 $\times$ 256矩阵(matrix),25张切面以及0.5mm切面厚度。成像中的高信号区域为脑水肿病变与脑出血病变。成像数据使用3D slicer 4.11.20210226软件进行目标病灶的三维重建,并量化病灶区域的体积。

[0066] 8荧光显微成像

[0067] 宽场显微镜成像,脑片荧光信号采集和拍照采用Olympus玻片扫描仪VS120。使用步骤如下:首先选择荧光扫描模式,其次载入目标载玻片,输入目标载玻片的标记信息与数据保存路径,点击预览,明场模式选择2X物镜扫描,荧光模式选择10X物镜扫描,圈选扫描区域,采用多点聚焦的方式,5点法覆盖目标成像的脑片。接下来进行照明设置,Hoechst或DAPI染色的样本使用FL Blue通道,表达EGFP蛋白的样本使用FL Green通道,表达DsRed, Tdtomato, mRuby3等红色荧光蛋白的样本使用FL Cy3通道,一般情况下是FL Blue与FL Green双通道成像,FL Blue与FL Cy3双通道成像,或FL Green与FL Cy3双通道成像。最后以排序靠前的通道为基准进行多点聚焦的检查,点击下一步后即可开始全区域扫描。

[0068] 体式显微成像,体式显微镜(Leica M205 FA),1x物镜。AAV局部注射鼠脑样本使用该显微镜确定表面EGFP的荧光表达。小鼠双光子成像的颅窗手术最后一步检验颅窗清晰度使用的是该显微镜。

[0069] 共聚焦显微镜成像,用共聚焦显微镜(Leica SP8)的翻转扫描功能拍摄全脑切片图像,相邻片段有10%的重叠,用于自动拼接。脑血管样本的成像参数一般为:20倍空气镜,

1024×1024, z轴步进为1 μ m(很多时候使用软件优化的数值);或者是40倍油镜, 1024×1024, z轴步进为0.5 μ m, zoom因子为1.25。

[0070] 9H&E染色

[0071] (1)取材:小鼠经心肌灌注无菌生理盐水,待肝变白后更换4%(w/v)多聚甲醛(PFA)进行灌注。灌注完毕后,解剖小鼠大脑,转移到15mL离心管中,放置于冷PFA(4℃)中固定24h以上。将组织从固定液取出在通风橱内用手术刀将目的部位组织修平整,将修切好的组织和对应的标签放于脱水盒内。(2)脱水浸蜡:将脱水盒放进吊篮里于脱水机内依次梯度酒精进行脱水。75%酒精4h-85%酒精2h-90%酒精2h-95%酒精1h-无水乙醇I 30min-无水乙醇II 30min-醇苯5-10min-二甲苯I 5-10min-二甲苯II 5-10min-65°融化石蜡I 1h-65°融化石蜡II 1h-65°融化石蜡III 1h。(3)包埋:将浸好蜡的组织于包埋机内进行包埋。先将融化的蜡放入包埋框,待蜡凝固之前将组织从脱水盒内取出按照包埋面的要求放入包埋框并贴上对应的标签。于-20°冻台冷却,蜡凝固后将蜡块从包埋框中取出并修整蜡块。(4)切片:将修整好的蜡块置于石蜡切片机切片,厚4 μ m。切片漂浮于摊片机40℃温水上将组织展平,载玻片将组织捞起,60℃烘箱内烤片。水烤干蜡烤化后取出常温保存备用。(5)石蜡切片脱蜡至水:依次将切片放入二甲苯I 15min-二甲苯II 15min-二甲苯III 15min-无水乙醇I 5min-无水乙醇II 5min-95%酒精5min-85%酒精5min,自来水洗。(6)苏木素染色:切片入苏木素染液染1-2min,自来水洗,分化液分化,自来水洗,返蓝液返蓝,流水冲洗。(7)伊红染色:伊红染液中染色2-3min。(8)脱水封片:切片依次放入无水乙醇(5分钟),无水乙醇(5分钟),无水乙醇(5分钟),二甲(5分钟),二甲苯(5分钟)透明,中性树胶封片。(9)显微镜镜检,图像采集分析。

[0072] 实施例1

[0073] 从小鼠和人对应大脑细胞类型特异的混合细胞转录组测序与单细胞转录组测序数据中挖掘出那些在脑血管内皮细胞中特异高表达的基因,我们确定了Tek基因同时在人和小鼠的脑血管各个节段的内皮细胞中特异高表达,满足我们的需求。(如图1所示),其中,a为Tek基因在人脑血管系统单细胞转录组中的表达谱;b为Tek基因在小鼠脑血管系统单细胞转录组中的表达谱;c为Tek基因在小鼠脑细胞类型特异的混合细胞转录组中的表达谱。

[0074] 基于Tek-Cre;Ai47双转基因小鼠中的切片结果,我们发现Tek基因标记的血管内皮细胞十分全面,基本覆盖了100%的血管内皮细胞,且具有动静脉毛细血管三节段分布的广泛性(如图2所示)。其中,a为Tek-Cre;Ai47转基因小鼠出生后第42天脑冠状切片的荧光显微成像图。b为皮层区域单个感兴趣区域的共聚焦荧光显微成像图,H0:Hoechst 33342细胞核染料,EGFP:表明特异在Tek-Cre阳性小鼠脑血管内皮细胞表达的报告基因EGFP信号,H0/EGFP:H0与EGFP两个通道合并后的成像结果图,箭头表示单个脑血管内皮细胞。c为Tek-Cre;Ai47双转基因鼠在大脑皮层、纹状体和丘脑区域标记的血管内皮细胞分布情况。

[0075] 由于Tek基因都特异表达在小鼠和人的脑血管内皮细胞中,说明该基因在进化上的基因表达调控机制是保守的,相应地在基因组上存在保守的核心调控序列。为了锁定其调控转录的核心序列,我们对该基因的启动子区域和第一内含子区域进行多物种序列比对分析,(物种包括人(*Homo sapiens*),猕猴(*Macaca mulatta*),狨猴(*Callithrix jacchus*),猪(*Sus domesticus*),牛(*Bos taurus*),大鼠(*Rattus norvegicus*),小鼠(*Mus musculus*)),确定了在多物种之间保守的序列。

[0076] 多序列比对的结果表明,猪和牛的Tek基因启动子区域调控序列相似度更高,人和狨猴相似度更高,小鼠与大鼠相似度更高,如图3所示,a为包括人,恒河猴,狨猴,猪,牛,大鼠,小鼠多物种基因组上对应Tek基因所在的启动子区域与5'端非编码区(5' UTR)的DNA多序列比对分析;b为各物种来源序列的进化树分析,猪和牛,人和恒河猴与狨猴,小鼠和大鼠对应的启动子区域与5'端非编码区序列分别在进化上更相近。在内含子区域的多序列比对结果也是如此(图4),其中,a为包括人,恒河猴,狨猴,猪,牛,大鼠,小鼠多物种基因组上对应Tek基因第一内含子所在的区域的DNA多序列比对分析;b为各物种来源序列的进化树分析,猪和牛,人和恒河猴与狨猴,小鼠和大鼠对应的第一内含子序列分别在进化上更相近。

[0077] 得到的多物种之间调控转录的核心序列的保守序列如下:

[0078] 启动子区域如SEQ ID NO.1所示(以小鼠源的序列为例,字母“N”指该位置的碱基在多个物种之间具有多样性,不是保守的):

[0079] 5'-AAGGNTGGTCNTCATCGCATACCATACATAGGTGGAGGGCTTGT TATTCNANTTNCNGCCTATG
AGAGGATACCCCTATTGTTNCTGAAAATGCTGACCAGGNCNACTTNAACAAANATNCCTCTNCCCCNANCNAGN
AANGCAGNAGCAGNAGCNANCNAGCANAGATAAGNTTNGATGAANGCAAGATGGATAGGGCTNGCNTGCCCCNAGC
CCTGCTGATACCAANTGCCTTTAA-3'

[0080] 内含子区域如SEQ ID NO.15所示(以小鼠源的序列为例,字母“N”指该位置的碱基在多个物种之间具有多样性,不是保守的):

[0081] 5'-GTGTGTGTGNGTGGTCACACCCATCTCAGCAGATCTGTCAGCTT TCCCGCTTTTGTAGAGGGT
GATATCATGCTTCCTGGGGGAGCNCCTGGAAGACAATGNCNGCCACTTTCCTCNAGATACAATAGGCGGAGTCAGG
AAGGNAGTATTGACATTGCTGGGGCCNGGAGNACTCACTGCTCNGNGGCCGTCAGATGGTGAACCNGCNTAACCTT
GGCACACAGNGCCTGGGNTGTNCAAGGCGTCTGGCTGCAGNGCCAAAGNGGACTCCACCCTNGGGACAGGAGTNCT
TNAGACATCTGGGAATCTGGGATGGGTTNAAA-3'

[0082] 实施例2介导脑血管内皮细胞基因特异表达的微型启动子与顺势调控元件的开发与功能测试

[0083] 为了能够系统地对各种截短版本的启动子序列与顺式调控元件进行功能分析,我们设计了一种标准化的重组AAV表达载体(如图5),其中启动子上下游分别引入了酶切位点SpeI与AgeI,Kozak序列后连接的是NLS-Cre-HA基因的表达式,随后连接的是polyA元件bGHpA,polyA元件下游是待插入的顺式调控元件序列,该元件两端有单一酶切位点KpnI与NotI,便于分子克隆操作。

[0084] 首先收集从人到小鼠多个物种的Tek基因组序列,基于多序列比对BLAST分析启动子,5'-UTR区域与第一内含子区域的序列,得到同源区段后,分别对核心启动子区与5'-UTR区的截短克隆,以及第一内含子内保守的顺式调控元件的双向截短克隆。获得克隆片段后,将其亚克隆进入我们已经设计并标准化好的重组AAV2载体中,使用AAV-PhP.eB衣壳血清型进行常规三质粒系统进行AAV病毒的包装,下游基于转基因荧光报告小鼠Ai14^{Rosa26}-CAG-LSL-Tdtomato或者Ai47^{Rosa26-CAG-LSL-3XGFP}进行病毒体内转导实验,最后结合解剖,切片,荧光成像分析得出转导效率与特异性。

[0085] (1) Tek基因启动子区段的截短分析

[0086] 确定了以Tek基因为目的基因后,我们下一步是对其进行启动子的功能研究,目标是锁定其调控Tek基因转录的核心序列。首先我们从Tek-Cre转基因小鼠的耳朵组织中提取

了其基因组DNA,根据我们前面序列比对的结果,在保留所有保守序列的基础上,尽可能截取非必需的启动子5'远端序列。我们在顺式调控元件的序列选择中,同理。我们预实验首先构建了最长版本mPro1576+mCis1349与顺式调控元件的第二截短版本mPro1576+mCis700(其中的编号分别代表它们各自的碱基长度),并对二者进行活体功能分析,发现mCis700与mCis1349组的标记效率是一致的,说明它们在位置脑血管内皮细胞特异基因表达上的作用一致,进一步也表明Tek基因的顺式调控元件可以从mCis1349进一步截短到mCis700同时不影响其正常功能。于是我们将顺式调控元件控制为mCis700版本,开始逐步截短启动子区域的序列长度。我们进一步分别构建了带有mPro973(截短启动子区5'远端序列,保留完整的5'UTR区域),mPro723-d224(在mPro973基础上进一步截短5'远端序列224bp),mPro760(截短部分5'UTR序列),mPro583(5'UTR序列只保留+1-+113区段),mPro471(截短全部5'UTR序列)。Tek基因启动子区段的截短策略示意图如图6的a所示。

[0087] mPro723-d224是在mPro973的基础上截短了启动子5'远端序列224bp,被删除的区域包括两个转录因子结合基序(Octopus region I and Octopus region II)(Fadel等人,1999),结果表明mPro723能很好的保持该启动子的有效活性,并相对于mPro973的启动子活性有一定提升(图6的b,c)。mPro583是截短了部分5'UTR序列的miniTek版本,mPro583的实验结果显示全脑范围内只有稀疏地内皮细胞被标记上了荧光(图6的c),说明5'UTR区域的截短会影响启动子的整体转录活性,全脑范围内大部分内皮细胞内的mPro583启动子失去了基本活性。mPro471是截短了所有5'UTR序列的miniTek版本,mPro471实验结果显示全脑范围内只有零星的内皮细胞表达了EGFP蛋白(图6的c),说明mPro471版本失去了90%以上的转录活性。综上,我们认为mPro723(del 224bp,删除224bp)是最优的miniBEND截短版本。

[0088] 其中,mPro1576的基因序列如SEQ ID NO.2所示:

[0089] cctcagtgtctgtctcttgacctgttaacagctgagtcagggtctgccctcagctgtgcctgaggacagagctgagctat

[0090] ctaccctgcagattggaagcattacaggcactcaagatcagccctgaagtgataaaacctaaggcagaaatccacc

[0091] aagactagcagtgccctccgtgtctcttctgtggctggtgggaaagagaggggcagtccttccttgatgcaaggtcgt

[0092] gtgtctagtggcacgcttccttcattcccagtgagagcaagtgatcacctgggtaaggaaggttcaggtagcctgagct

[0093] cgctggagaattcatcactcatccatcactctgtctctgtagacataatcacttctgttgggtctttagagatgatttata

[0094] actttgtttgtttatagtttttatgaatgtgtgtattcatttaggtcacatgggaggtacacattttcaggtgtctgtctttccatc

[0095] acacgggctttgaattaaactcagtcttggttttaccggctgagccatctcacctgacctgattatttaaaaatctccggagt

[0096] aatccaggagtgtggtttatgattgtagtatcaacactcgggaggtgaggagcatcggttatcatgagctccaggcta

[0097] gttccaggcttgccctaagctgtagagcaagtcactctcttaaaaagtgccctctcccatatttttgtatataatttgcatctga

[0098] aattctgtttgccataactatgaaattattcacattactaaaatcttcctgtgccagttctccaac
gaattagatcacact

[0099] cagatgaaatgctaataaaaattaaagctgtagccagtagcatgcgtatatttgggctcagggccaac
aggcaggcg

[0100] atctgggtgtaagaaaataggctaattggctgtggaatctggctctctagtggctccgctgagagctgac
ctcaaccacg

[0101] ctccctcaaattgattgccttcagggttatgatttctcatcacaggaaactttgttgcccaattcaaa
ccctgtgagtga

[0102] acaaaaacaggagagcaagtgtctccccgtgccccaaagcccccttctgtcagggatcccaa

[0103] gaacagcttagcctgcaagggtggtcctcatcgcataccatacataggtggagggttgttattcaa
ttcctggcctat

[0104] gagaggataccccctattgttcctgaaaatgctgaccaggaccttacttgaacaaagatccctctgcc
ccacaatccag

[0105] ttaaggcaggagcaggagccggagcaggagcagaagataagccttggtgaagggaagatggatagg
gctcg

[0106] ctctgccccaaagccctgtgataccaagtgcctttaagatacagcctttcccatcctaattctgcaaag
gaaacaggaaa

[0107] aaggaacttaaccctccctgtgctcagacagaaatgagactgttaccgctgcttctgtggtgtttct
ccttgccgcaa

[0108] cttgtaacaagagcgagtgaccatgcgagcggaagtcgcaaagttgtgagttgttgaaagct

[0109] mPro973的基因序列如SEQ ID NO.3所示:

[0110] ggaggctgaggagcatcggtatcatgagctccaggctagttccaggcttgccctaagctgtagagcaa
gtcactctct

[0111] taaaaagtgcctctcccatatTTTTGTATATAATTTGCATCTGAAATCTGTTTGCCAATAACTATGA
AATTATTCACATTACTAA

[0112] aatcttcctgtgccagttctccaacgaattagatcacactcagatgaaatgctaataaaaattaaag
ctgtagccagta

[0113] gcatgcgtatatttgggctcagggccaacaggcaggcgatctgggtgtaagaaaataggctaattggct
gtggaatct

[0114] ggtctctagtggctccgctgagagctgacctcaaccacgtccctcaaattgattgccttcagggtta
tgatttctcatca

[0115] caggaaactttgttgcccaattcaaaccctgtgagtgaacaaaaaacaggagagcaagtgtgctcc
ccgtgcccc

[0116] aaagcccccttctgtcagggatcccaa

[0117] catacataggtggagggttgttattcaattcctggcctatgagaggataccccctattgttcctgaaa
atgctgaccagg

[0118] accttacttgaacaaagatccctctgccccacaatccagttaaggcaggagcaggagccggagcagg

agcagaa

[0119] gataagccttgatgaagggcaagatggatagggtcgctctgccccagccctgctgataccaagtg
cctttaaga

[0120] tacagcctttcccatcctaattctgcaaaggaaacaggaaaaaggaacttaaccctccctgtgctcaga
cagaaatgag

[0121] actgttaccgcctgcttctgtggtgtttctccttgccgccaacttgtaaacaagagcgagtggacat
gcgagcgggaa

[0122] gtcgcaaagttgtgagttgttgaaagct

[0123] mPro723的基因序列如SEQ ID NO.4所示:

[0124] gtatatattgggctcaggccaacaggcaggcgatctgggtgtaagaaaataggctaattggctgtggaa
tctggtctct

[0125] agtggctccgctgagagctgacctcaaccacgctccctcaaattgattgccttcaggttatgatttc
tcatacaggaa

[0126] actttgttgcccaattcaaaccctgtgagtgaacacaaaaacaggagagcaagtgtgctccccgtgc
cccaaagcc

[0127] ccttctgtcagggatcccaatgcacccagagaacagcttagcctgcaagggtggtcctcatcgca
taccatacat

[0128] aggtggagggttgttattcaattcctggcctatgagaggatacccctattgttcctgaaaatgctga
ccaggaccttac

[0129] ttgtaacaaagatccctctgccccacaatccagttaaggcaggagcaggagccggagcaggagcagaa
gataagc

[0130] cttggatgaagggcaagatggatagggtcgctctgccccagccctgctgataccaagtgccttta
gatacgcct

[0131] ttcccatcctaattctgcaaaggaaacaggaaaaaggaacttaaccctccctgtgctcagacagaaatg
agactgttac

[0132] cgcctgcttctgtggtgtttctccttgccgccaacttgtaaacaagagcgagtggaccatgcgagcgg
gaagtcgcaa

[0133] agttgtgagttgttgaaagct

[0134] mPro760的基因序列如SEQ ID NO.5所示:

[0135] gagctccaggtagttccaggttgccctaagctgtagagcaagtcactctcttaaaaagtgcctctcc
catatTTTTGTAT

[0136] ataatttgcattctgaaattctgtttgccaataactatgaaattattcacattactaaaatcttctgt
gccaaagttctccaacg

[0137] aattagatcacactcagatgaaatgctaataaaaattaaagctgtagccagtagcatgcgtatatttg
ggctcagggcc

[0138] aacaggcaggcgatctgggtgtaagaaaataggctaattggctgtggaatctggtctctagtggctccg
ctgagagct

[0139] gacctcaaccacgctccctcaaattgattgccttcaggttatgatttctcatcacaggaaactttgt
tgcccaattcaaa

- [0140] ccctgtgagtgaaaacaaaaacaggagagcaagtgtgtctccccgtgccccaaagccccttctgtcag
ggatccca
- [0141] aatgcacccagagaaacagcttagcctgcaagggtgtgtcctcatcgcataccatacataggtggagg
gcttggttatt
- [0142] caattcctggcctatgagaggatacccctattgttcctgaaaatgtgtgaccaggaccttacttgtaac
aaagatccctct
- [0143] gcccacaaatccagtttaaggcaggagcaggagccggagcaggagcagaagataagccttggtgaagg
gcaag
- [0144] atggatagggtcgtctctgccccaaagcctgtgtataccaagtgcctttta
- [0145] mPro583的基因序列如SEQ ID NO.6所示:
- [0146] ggaggctgaggagcatcggtatcatgagctccaggctagtccaggcttgccctaagctgtagagcaa
gtcactctct
- [0147] taaaaagtgcctctcccatatTTTTGTATATAATTTGCATCTGAAATTCTGTTTGCCAATAACTATGA
AATTATTCACATTACTAA
- [0148] aatcttcctgtgccaaagttctccaacgaattagatcacactcagatgaaatgctaataaaaattaaag
ctgtagccagta
- [0149] gcatgcgtatatttgggctcagggccaacaggcaggcgatctgggtgtaagaaaataggctaattggct
gtggaatct
- [0150] ggtctctagtggctccgctgagagctgacctcaaccacgtccctcaaattgattgccttccaggtta
tgatttctcatca
- [0151] caggaaactttgttgcccaattcaaaccctgtgagtgaaaacaaaaacaggagagcaagtgtgtctcc
ccgtgcccc
- [0152] aaagccccttctgtcagggatcccaaatgcacccagagaaacagcttagcctgcaagggtgtgtcctc
atcgcatac
- [0153] catacataggtggagggttgtttattc
- [0154] mPro471的基因序列如SEQ ID NO.7所示:
- [0155] ggaggctgaggagcatcggtatcatgagctccaggctagtccaggcttgccctaagctgtagagcaa
gtcactctct
- [0156] taaaaagtgcctctcccatatTTTTGTATATAATTTGCATCTGAAATTCTGTTTGCCAATAACTATGA
AATTATTCACATTACTAA
- [0157] aatcttcctgtgccaaagttctccaacgaattagatcacactcagatgaaatgctaataaaaattaaag
ctgtagccagta
- [0158] gcatgcgtatatttgggctcagggccaacaggcaggcgatctgggtgtaagaaaataggctaattggct
gtggaatct
- [0159] ggtctctagtggctccgctgagagctgacctcaaccacgtccctcaaattgattgccttccaggtta
tgatttctcatca
- [0160] caggaaactttgttgcccaattcaaaccctgtgagtgaaaacaaaaacaggagagcaagtgtgtctcc
- [0161] (2) Tek基因中第一内含子区段的顺势调控元件的截短分析
- [0162] 为了进一步探索顺式调控元件中必要的功能序列,我们进一步分别构建了带有

mCis400、mCis303、mCis200、mCis103这四种截短长度版本的顺式调控元件的重组AAV载体,为了控制变量,这些重组AAV载体在启动子区域都是mPro1576版本的序列,且都包装成PhP.eB衣壳的AAV病毒颗粒。首先设计特定引物克隆Tek基因的内含子一区域上进化保守区段的不同截短长度的序列版本(如图7的a),mCis1349包含最完整的调控元件,CACA重复基序,GATA基序,Ets-1转录因子结合基序等。mCis700在5'端删除了一段包含一个CACA重复基序的序列,同时在3'端也删除了一小段序列。mCis400版本同样在双端进一步截短,5'端进一步删除了包含CACA重复基序的序列,3'端进一步删除了临近Ets-1基序的多余序列。mCis303版本相对mCis400版本则是在5'端进一步删除了临近GATA基序的多余序列。mCis200版本与mCis103版本的设计是为了通过mCis303版本进行了分拆,单独分析单个调控基序的必要性。mCis200保留了Ets-1基序,mCis103保留了CACA重复基序与GATA基序。最后mCis0版本是在重组载体上只使用了mPro1576启动子序列,删除了所有Intron1区段的顺势调控元件序列(图7的a)。我们发现相对于mCis1349、mCis700、mCis400、mCis303版本都能很有效的保留整体转录活性,但是mCis200与mCis103版本对应的转录活性是受到强烈抑制的,说明该段序列丢失了能够激活启动子区段发生正常转录的调控序列。其中mCis200保留了部分转录活性,说明Ets-1基序可以只能部分抑制启动子区的转录活性,而mCis103则几乎丢失了所有转录活性,说明GATA与CACA重复基序对启动子区的转录抑制作用更强(图7的b,c)。mCis0(Pro-only)组的结果显示当只有启动子序列的时候,Cre基因无法在脑血管内皮细胞中限制表达,而是广泛表达在神经元,星型胶质细胞,脑血管内皮细胞中(图7的c),因此我们认为Tek基因在Intron1区段的顺势调控元件的作用是通过转录抑制限制外源基因只在脑血管内皮细胞中表达,也就是说,在非内皮细胞中,如神经元与星型胶质细胞,mCis元件对启动子区是起到转录抑制作用的。我们可以合理地认为,存在一个特异表达在脑血管内皮细胞中的转录因子解除了mCis元件对Tek基因启动子区的转录抑制,下游基因从而得以表达。

[0163] 为了最后确定Tek基因启动子区截短版本mPro723与Intron1区段的顺势调控元件阶段版本mCis700联合时候还能保持较高的转录活性与细胞类型特异性,我们构建了rAAV-mPro723-Cre-mCis700重组质粒并包装成AAV-PhP.eB病毒,在Ai14^{Rosa26-CAG-LSL-tdTomato}小鼠中进行了体内转导实验。矢状切面的荧光成像实验结果表明最佳优化截短版本的rAAV-miniBEND系统可以高效并特异地转导全脑范围的脑血管内皮细胞(包括嗅球、皮层、纹状体、海马、丘脑、下丘脑、中脑、小脑、脑桥、延髓等),而且许多大动脉与静脉中的内皮细胞都有标记信号(图8中a,b)。

[0164] 为了全面地评估rAAV-miniBEND系统标记的细胞类型特异性,我们对各个截短版本标记的鼠脑进行全脑范围的间隔切片实验,保证覆盖大部分脑区,在仔细检查所有脑区的荧光标记信号后,我们发现AAV-PhP.eB-CAG-mScarlet病毒组在小脑区域有严重的神经元非特异荧光标记信号,AAV-PhP.eB-mPro973-Cre组则是在小脑区域的浦肯野细胞中都有非特异标记荧光标记信号(图9,其中图9的a每组使用的病毒都为AAV-PhP.eB血清型,分别使用的重组AAV载体是CAG-mScarlet,mPro973-Cre,mPro760-Cre,mPro723-Cre,其中后三组中重组载体上使用的Tek顺式调控元件均为mCis700,并分别注射到C57BL/6J,Ai47,Ai47,Ai14转基因报告小鼠中。各组使用的病毒滴度信息见附录A表A.1)图中比例尺为100μm。图9的b除内皮细胞之外的非特异标记比例,以标准化的标记密度-每10¹¹个病毒颗粒对一

只小鼠进行体内转导实验,在每 mm^2 面积内标记的细胞数目-为指标进行评估,各组测试的实验动物都为 $n=2$,分别在每只小鼠的切片中选取5个ROI进行细胞计数与统计分析。图中比例尺为 $100\mu\text{m}$)。说明miniBEND调控序列尽管能限制外源基因在大部分神经元中的表达,但是在浦肯野细胞中还是会有泄露表达的现象。我们进一步对比mPro760-Cre组与mPro723-Cre组的结果,发现这两组的浦肯野细胞非特异标记信号密度显著减少了,尤其是mPro723-Cre组,其非特异标记信号已接近零,在全脑范围多个小脑切片也只能找到1个非特异标记的细胞,且信号很弱。这说明鼠源Tek基因启动子区域5'端序列的持续截短可以降低miniBEND系统在小脑中神经元的非特异标记,而且我们获得的最优截短版本mPro723具有最高的细胞类型特异性。

[0165] 其中,mCis1349的基因序列如SEQ ID NO.8所示:

[166] catagatatcttaatagtcaaggaatTTTTTTTTTTTTTTgaagagttagcagtcaggggatggta
gaaactgcaaaacca

[0167] atccgtattctttcttgagatTTTTtagacagttgatgctactagccacaaaaagagttttaagtggga
ggagagtaagatg

[0168] caggcaccaaggtgacaggctccaggctctgtagcattagcttacagatgagattctttacagagagcc
aggcagctg

[0169] cattggctaaagcagatctgggagggggccaggagatcagctggcggcactcccagcctccaggaaag
gcaacc

[0170] cttatttctggaatttttaaactgataaccecaattcccaccagcctggccaggetcttcttagctcac
atcacaacacag

[0171] aaggattgttttagatggagtcattgattctttctatacctacttccaagaccaattttataaaa
gtttattttaccgccgt

[illegible]

[0173] tgcaagtgtggctcttagagattgaactcagatcatgagcaagcaccttgctgcctgctatgtccctcc
agcagttctgac

[0174] catgttccttcccccaagattgttgaagctggactgaagatcacaatctgccagatgggcagaatctt
tactcttttggca

[0175] catttgctgctgatggggagtgaatacccatggggacatggctgtcatgggttggaagtatagaaat
gaaaacatgt

[0176] atggatctgtcacaggagctggtgaggctgatgggtgtgtgggtggccactgtttgctctctgcttgcacagcctcttg

[0177] ttcagggttgatcagggaggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtcac
accatctcagca

[0178] gatctgtcagctttcccgtttttgttagagggtgatatcatgcttcctggggggagctctggaagaca
atgagcagcca

[0179] ctttcctctagataacaataggcggagtcaggaaggtagtattgacattgctggggcctaggagctact
cactgctcgggt

[0180] ggccgtcagatgggtgaaccggcgtaaccttggcacacaggcctgggctgtacaaggcgtctggctgca

[0201] gctgatgggtgtgtgggtggccactgtttgtctctctgcttgtcacagcctcttgttcagggttgatc
agggaggtgtgt

tttaatgagaaccttcaaagaactaggcatagtagtaccaaatggttttatatatttttaaacctcatttattcctctcaa
aacacctgggaaggagatatattttgccatttcacagctgttgaaactgaggctcaaaaagactaagtaacctttct
cagctacacatgtggctgagccagttttgaaccagttctgtttgcagacagaacctgggctttttcacacctgc
aaactggaacattaattgggttcttaagatcatcatcgatgtgataaaacctgggacagaaattagtcagactag
ctgcatctgccttttctctggtgggtaggaaaaggaggagtataatgatttctcaggcatgaaggctgatgatg
agcaaagtgtatactctctaataatgtcataattcatattgtggagtaattatctggataagtgtagggtctct
gacctcattctagatatgttacattccatggctattttcattttgggtccatgaactctctttgctctcatgagcac
catttttateccaatctaatacctgtatgtttgtgtttttacacagattagtttttaaatgtttatatataatttgc
tctgaaacaccattgctcaatgactaccaaatctttctcattaccaaaatccttctatgccaaacttcttcaagaaa
tttgatcaccttttagatgaattgttaatgaaaattaaagctatagccggcaacatgggtatctttgggctaattggc
caaccaacaggccatctgtgtgaaagaaaacaggctaacaattttggactctgggtctcttggggctacattgagca
ttgacctcacgggtgctcactgaaattaattgcttttcaggttgattttctcatcacggaaaccttcttctccca
attcaaacatgtgggttaaaatgagaaaacaaaagccaaaacggcttccacacccaaaagctccttctgtcaga
gateccagtagccccgggagagctgttagaagcttgagaaggattgggtcatcatcgcataccatacataggtggag
ggcttgttattctcagtttcccgcttatgagaggatacccctattgtttctgaaaatgctgaccgggacccacact
tccaacaaaaattcctctgcccctacagcagcagcaaaagcagcagcagaagcaacagcaacagataagtgttttg
atgaattgcgagatggatagggttgagtgtccccagccctgctgataccaaatgcctttaagatacagcctttcc
catcctaattctacaaaggaaacaggaaaaaggaacttaaaactccctgtgctcagacagaaatgagactgttacag
cctgtctctgtgctgttcttcttgccctctaacttgtaacaagacgtagtaggacgatgctaattggaaagtcaca
aacgctgggtttttgaaaggatc

[0216] hPro762的基因序列如SEQ ID NO.48所示:

[0217] ttgctctcatgagcaccatttttatcccaatctaatacctgtatgtttgtgtttttacacagattagtt
tttaaatgtttatatataatttgcctctgaaacaccattgctcaatgactaccaaatctttctcattaccaaaatcc
ttctatgccaaacttcttcaagaaatttgatcaccttttagatgaattgttaatgaaaattaaagctatagccggcaa
catgggtatctttgggctaattggccaaccaacaggccatctgtgtgaaagaaaacaggctaacaattttggactct
gggtctcttggggctacattgagcattgacctcacgggtgctcactgaaattaattgcttttcaggttgattttct
catcacggaaaccttcttctcccaattcaaacatgtgggttaaaatgagaaaacaaaagccaaaacggcttccca
cacccaaaagctccttctgtcagagatcccagtagccccgggagagctgttagaagcttgagaaggattgggtcatc
atcgcataccatacataggtggagggttggtattctcagtttcccgcttatgagaggatacccctattgtttctg
aaaatgctgaccgggacccacacttccaacaaaaattcctctgcccctacagcagcagcaaaagcagcagcagaag
caacagcaacagataagtgttttgatgaattgcgagatggatagggttgagtgtccccagccctgctgataccaa
atgcctttaa

[0218] hCis700的基因序列如SEQ ID NO.49所示:

[0219] ctttcaggaaagggaatgtctaaagttgcctcccttatttttggaaatttgaaactgataaccctattc
ttacccatctggccagacgattccttaactcgtgttacacctgcagaatgagtttttagatctagctgtgacctctt
ccccagccccacccccattgtcccttgtgtgccttcaggaaatctgatcattcttctctctctgctccttcccaaa
ggctgcaggagcaggtgtgaagacgtggatgtccagatgcagagtcctgacacttttcaacacatctgcatatta
gaggaagtacataccattgcttgggtgtttcatgtctaatgtgggtatgagtgtagacaaagagaggagaaaaattt
ggactagccaaagaagccagtcaggcgtgggtttgaagggcacgtgggcggctgtcatttgcctctctgcttgc

acagcccccttgcccagggttgaccagtgtgaggtgtatgtgtgctgggtcacacccatctcagcagatctgtcagctttc
ccgctttttgttaaagggtgatatcatgtcttctggggggagcactggaagacaatgtctcgggcacttttctccaga
tacaatagggcgagtcaggaaggcagttattgacattgctggggctggggaggcactcactgctctgcggccgtcag
atggtgaaccagcttaaccttggc

[0220] hCis400的基因序列如SEQ ID NO.50所示:

[0221] aagtacataccattgcttggtggtttcatgtctaattgtggtatgagtgtgacaaagagaggagaaaa
atttgactagccaaagaagccagtcaggcgtggggtttgaaggcatcgtgggcggctgtcatttgcctctgtctgt
tgtcacagcccccttgcccagggttgaccagtgtgaggtgtatgtgtgctgggtcacacccatctcagcagatctgtcagc
tttcccgtttttgttaaagggtgatatcatgtcttctggggggagcactggaagacaatgtctcgggcacttttctc
cagatacaatagggcgagtcaggaaggcagttattgacattgctggggctggggaggcactcactgctctgcggccg
tcagatggtgaaccagcttaaccttggc

[0222] hCis200的基因序列如SEQ ID NO.51所示:

[0223] ggggtttgaagggcactcgtgggcggctgtcatttgcctctgtctgtgtcacagcccccttgcccagggt
tgaccagtgtgaggtgtatgtgtgctgggtcacacccatctcagcagatctgtcagctttcccgtttttgttaaagggtga
tatcatgtcttctggggggagcactggaagacaatgtctcgggcacttttctccaga

[0224] Marmo-Cis700的基因序列如SEQ ID NO.52所示:

[0225] Caggaaagtgaatgtctaaagttgtctcccttacttttggaaattttaactgataacctattctttac
ccatctggccagactattccttaacttgcttcacacatgcagaatgagttttagatttagctatggctgtctcccc
ctaagccccaccgcactttgcctccttttgccttcaggaaatctgataattcttctctcatggttcttgccaaa
gattgcaggagcaggtgtgaagacgtggatatgccagatgggcagagtccttatgcttctcaacacatctgtgaa
tagaggggagcgcataccattccctgatggtttcatgtcttatgtggtgtgggtgtgacaaagagaggagaaaatg
tgactagccaaaggagccagtcaggcttggggttgagaggcatcgtgggcagctgccatttgcctctgtgtctgtc
acagcccccttgcccagggtcttgaccagtgtgaggtgtgtgtcctgggtcacacccatctcagcagatctgtcagctttc
ccgctttttgttaaagggtgatatcatgtcttctggggggagcactagaagacaatgtctcgggcacttttctccaga
tacaatagggcgagtcaggaaggcagttattgacattgctggggctggggaggcgctcactgctctgcagccgtcag
agggtgaaccagcttaaccttggc

[0226] Pig-Cis700的基因序列如SEQ ID NO.53所示:

[0227] Cagctggcatcactcccagccttcaggaaagggaatgtctaaagttgcctcccttatttctgaatttt
aaactgataacceaatcccaccggtctagccagtgtattccttacttgcatcacatgcagagcatttttccaga
ccgagccttgccctgtctgcctctacatccctcccccaaggcctcctttgtcctgaccttctcctctgtatccc
ttcccaaagactgcagggggcaggtgtggagacagggatctgccagatgagcagagtcctgactctttttaacacag
ctggtggtgagagcggggatattctgccttgcctgtgtgtgtctaccatggaacacatggagcaaagagaacaaa
cctaaacatgagccaaaggagcccatcaggcagcaacctgaggggcactgttgaggcactgttggtttctgtctg
gtcacagccccctgcctggggttgaccagtgtgaggtgtatatggcagtcacacccatctcagcagatctgtcagct
ttcccgtttttgttagagggtgatatcatgtcttctggggggagcgtggaagacaatgccgggccacttgccctc
agatacagtgggcgagtcaggaaggcagttattgacattgccggggccaggggggtactcactgctccagcgggtcag
atggtgaaccagcttaaccttggc

[0228] Rat-Pro1600的基因序列如SEQ ID NO.54所示:

[0229] accccctcaggttggaagcattacgaattctcagtgtgctcttgagctgttatggctgaggtagtgt

tctgccccaggtgtgcctgaggacagagctgagctatctacctctgcaggttggaaggattgtggactctcaaga
tcagccctgaagtataaaacctagggcgagcaatctgtcaagactagcagcactgtgcatcctcctggggttcatg
ggaaagggaggagcaaacctttcttcgagcgaagtgcaggtggagaacttgcctgcattcgcaactgagaacaaataat
cacctgtgtgaaggttcaggggcttgcaggagacttcattatccgctccttctctctgtctgttagacacaatcact
tttgtcaggtctttatagaggtgatttgtatctttgttggtttatatTTTTTatggatgtgtgtgtatatactttaggc
cacgtgtgaggtacacattttcaggtatctgtctttccatcacatgggcttttgattaaactcagtcttggcttta
cctgctaagccgtctcgactgcctgattctttaagatctctggaataatccagggtgttggtttatgattgcagta
tcaacactcaggaggctgaggaagcattgttaacatgcactcacggctacctccaggcttgcctaagcttagagca
agtcactcgctcaaaaagttcctcccccatatTTTTTgtttgtatTTTtgcactctgaaatcctgtttgccaataact
atgaaatttattcgtattactaaactcttccctctgccaaattctccaacaaattagatcactctcagatgaaatgct
aataggaatcaaagctgcagccagtagcatgcgtatatttgggctcaggggccaacaggcaggccatctgggtgtaa
gaaaataggctaattggctgtggaatctgggtctctgggtggctccgctgagagctgacctcaaccacgctccctcaga
ttgattgccttccaggttatgagctctcatcgaggaacacctctttccagttcaaacctgtgagtgaaaaaaaac
gcaacaagagagtaaatgccgctccccatgtcccaaagccccTTTTTgtcagggatcccaaacgcacccagagaa
ctgcctagcctgctaagggctgggtcctcatcgcataccatacataggtggagggttgttattcaattcctggcct
atgagaggatacccctattgtttcctgaaaatgctgaccaggaccttaccttgtaacaaagattcctctgccccaaa
tccagtcaaggcgaggagcaggagcagataagcgtttggatgaaggggcaagatggatagggtcactctgccccaa
ccctgctgataccaagtgcctttaagatacagcctttcgcatectaatactacaaaggaaacaggaaaaaggaactt
aaaactccctgtgctcagacagaaatgagactgttaccgctgtcttctgttggtgttccctccttgcctccaacttgt
aaacaagagcgagtagaccatgcgagtggggaagtggcaaagtTgttggggtTTTtgaaaggctcccggggacctcatg
ctcatctgtgga

[0230] Rat-Cis737的基因序列如SEQ ID NO.9所示:

[illegible]

[0232] 实施例3基于miniBEND的过表达系统的优化

[0233] 为了检测实施例2中(1)得到的miniBEND启动子的强度,我们首先构建了AAV-mPro1576-EGFP-mCis700质粒,包装成AAV-PhP.eB,通过眼眶静脉注射的方式将病毒注射到C57BL/6J野生型小鼠的血液循环中,使其转导全脑范围的血管内皮细胞,切片结果显示其EGFP荧光强度要比普通ef1a-EGFP病毒表达的荧光要更弱很多(图13),这表明mPro1576版本启动子的启动强度要比常规广谱型中等启动强度的启动子ef1a还要弱,属于弱启动子。显然,miniBENDv1(是第一个版本mPro1576的统称,区别于截短的最优版本mPro723)内在弱

启动子的特性限制了其在外源基因过表达的应用场景中的广泛应用,因此我们需要进一步改造优化,提高miniBEND启动子的启动强度,优化目标是能够达到ef1a启动子的启动水平,即能满足体内过表达的使用需求。

[0234] 我们首先想到的是引入Tet-off系统(Loew等人,2010),通过tTA/TRE系统的转录级联放大的策略实现目的基因的过表达,该策略有两种具体实现方案,首先第一种方案是双AAV载体,需要构建质粒载体AAV-mPro1576-tTA-mCis700与AAV-TRE-EGFP-WPRE-pA。该方案将外源基因的表达空间分摊给另外一个AAV载体,大大增大了可插入外源基因的限制碱基长度大小,约为小于或等于4kb。第二种方案是单AAV载体,将miniBEND启动子与tTA/TRE两个表达系统整合在同一个rAAV载体上,但是该方案的荧光表达强度类似于双AAV载体组,荧光细胞标记密度较低(图12)。另一方面,该策略的载体容量方面远小于双AAV载体,只有1.5kb,在递送许多大于1.5kb的基因的应用上有一定局限性。因此,我们还需要新的单AAV载体策略。

[0235] 我们通过添加额外的调控元件增加启动子的启动强度,或者增加外源mRNA的稳定性进而提高外源基因的表达水平。我们发现内含子调控序列可以提高启动子启动强度,于是我们尝试引入内含子调控序列构建嵌合型启动子的方式来提高miniBEND启动子的启动强度,但是该方案有一个可能失败风险是,新的嵌合型启动子可能不能保持内皮细胞的细胞类型特异性。我们设计了一组实验,分别构建了AAV-mPro1576-glo566-EGFP-pA-mCis700质粒,AAV-mPro723-glo566-EGFP-pA-mCis700质粒,AAV-mPro723-glo228-EGFP-pA-mCis700(图13的a)。发现新的嵌合型启动子不仅不会影响其在内皮细胞特异表达的特性,顺式调控元件还能正常工作,而且嵌合启动子的启动强度还得到的增强,说明该方法是可行的。而且截短版的嵌合启动子(mPro723-glo566,mPro723-glo228)也同样工作(图13的b,c),mPro723-glo228版本的嵌合启动子长度是978bp(小于1kb),给外源基因腾出了更大的空间。

[0236] 其中,mPro723-glo566的基因序列如SEQ ID NO.46所示:

[0237] gtatatattgggctcagggccaacaggcaggcgatctgggtgtaagaaaataggctaattggctgtggaa
tctggtctctagtggctccgctgagagctgacctcaaccacgctccctcaaattgattgccttccaggttatgatt
tctcatcacaggaaactttgttgcccaattcaaaccctgtgagtgaaaacaaaaacaggagagcaagtgtgctcc
ccgtgccccaaagcccccttctgtcagggatcccaatgcaccccagagaacagcttagcctgcaagggtgtgctcc
catgcataccatacataggtggagggtgtgtattcaattcctggcctatgagaggatacccctattgttccctga
aaatgctgaccaggaccttacttgttaacaaagatccctctgccccacaatccagttaaggcaggagcaggagccgg
agcaggagcagaagataagccttggtgaagggaagatggatagggtcgctctgccccaaagcctgtgatacc
aagtgcctttaagatacagcctttcccatcctaattctgcaaaggaaacaggaaaaaggaacttaaccctccctgtg
ctcagacagaaatgagactgttaccgctgcttctgtggtgtttctccttgccgccaacttgtaaacagagcgag
tggaacctgcgagcggaagtgcgaaagttgtgagttgttgaaagctagtagcggttagttcggttagtgaaaccgtc
agatgccttgagacgccatccacgtgttttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctccgcggatt
cgaatcccgccgggaacggtgcattggaacgcggattccccgtgccaagagtgcgtaagtaccgcctatagagt
ctataggccccacaaaaaatgctttcttcttttaataactttttgtttatcttatttctaatactttccctaate
tctttcttttcagggaataatgatacaatgtatcatgcctctttgcaccattctaaagaataacagtataatttc
tgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaatgttaactgatgtaagaggtttcat

attgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatgggtgggataaggctggattattctgag
tccaagctaggcccttttgctaatacatgttcataacctcttatcttctccacagctcctgggcaacgtgctggtc
tgtgtgctggcccatcactttggcaaagaatt

[0238] 其中,mPro723-glo228的基因序列如SEQ ID NO.55所示:

[0239] Gtatatttgggctcagggccaacaggcaggcgatctgggtgtaagaaaataggctaattggctgtggaa
tctggctctctagtggctccgctgagagctgacctcaaccacgctccctcaaattgattgccttccaggttatgatt
tctcatcacaggaaactttgttgcccaattcaaaccctgtgagtgaaaacaaaaacaggagagcaagtgctgctcc
ccgtgccccaaagccccctctgtcagggatcccaatgcaccccagagaacagcttagcctgcaagggctggctct
catcgcataccatacataggtggagggttgttattcaattcctggcctatgagaggatacccctattgttctga
aaatgctgaccaggaccttacttgaacaaagatccctctgccccacaatccagttaaggcaggagcaggagccgg
agcaggagcagaagataagccttggatgaagggaagatggatagggtcgctctgccccaaagcctgctgatacc
aagtgcctttaagatacagcctttcccatcctaattctgcaaaggaaacaggaaaaaggaaacttaacctccctgtg
ctcagacagaaatgagactgttaccgctgcttctgtgggtgtttctcttggcgccaacttgtaaacagagcgag
tggaccatgcgagcgggaagtcgcaaagttgtgagttgttgaaagctagtaccggtAgTTCGTTTAGTGAACCGgg
agtcgctgcgcgctgccttcgccccgtgccccgctccgcgcgcgcctcgcgccgccccgccccggctctgactgacc
gcgttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctcctccgggctgtaattagctgagcaagaggttaagggt
ttaagggtatggttgggtgggttattaatgtttaattacctggagcacctgcctgaaatcactttttttcag

[0240] 其中,mPro1576-glo566的基因序列如SEQ ID NO.56所示:

[0241] cctcagtgctctgctcttgacctgttaacagctgagtcagggtctgcccctcagctgtgcctgaggacag
agctgagctatctaccctgcagattggaagcattacaggcactcaagatcagccctgaagtataaaacctaaagg
cagaaatccaccaagactagcagtgccctcctgtctcttctctgtggctgggtgggaaagagaggggcagtccttct
tgatgcaaggctcgtgtgtctagtggcacgcttcttctcattcccagtgagagcaagtgatcacctgggtaaggaagg
ttcaggtgcctgagctcgctggagaattcatcactcatccatcactctgctcctgtagacataatcacttctgttg
ggcttttatagagatgatttataactttgttgtttatagtttttatgaatgtgtgtattcatttaggtcacatggg
aggtacacattttcaggtgtctgtctttccatcacacgggctttgaattaaactcagtccttggttttaccggctga
gccatctcacctgcctgattatttaaaaatctccggagtaatccaggagtgtggtttatgattgtagtatcaacac
tcgggaggtgaggagcatcgttatcatgagctccaggctagttccaggcttgccctaagctgtagagcaagtcac
tctcttaaaaagtgccctctcccatattttgtatataatttgcatctgaaattctgtttgccaataactatgaaat
tattcacattactaaaatcttctgtgccaagttctccaacgaattagatcacactcagatgaaatgctaataaaa
attaaagctgtagccagtagcatgcgtatatttgggctcagggccaacaggcaggcgatctgggtgtaagaaaata
ggctaattggctgtggaatctggctctctagtggctccgctgagagctgacctcaaccacgctccctcaaattgattg
ccttccaggttatgatttctcatcacaggaaactttgttgcccaattcaaaccctgtgagtgaaaacaaaaacagg
agagcaagtgtgctccccgtgccccaaagcccccttctgtcagggatcccaatgcaccccagagaacagcttagc
ctgcaagggctggctctcatcgcataccatacataggtggagggttgttattcaattcctggcctatgagaggat
accttattgttctgaaaatgtgaccaggaccttacttgaacaaagatccctctgccccacaatccagttaag
gcaggagcaggagccggagcaggagcagaagataagccttggatgaagggaagatggatagggtcgctctgccc
caagccctgctgataccaagtgcctttaagatacagcctttcccatcctaattctgcaaaggaaacaggaaaaagga
acttaacctccctgtgctcagacagaaatgagactgttaccgctgcttctgtgggtgtttctccttggcgccaac
ttgtaaacagagcgagtgaccatgcgagcgggaagtcgcaaagttgtgagttgttgaaagctagtaccggtagt

tcgttttagtgaaccgtcagatcgcttgagacgccatccacgctgttttgacctccatagaagacaccgggaccga
tccagcctccgcggattcgaatcccggccgggaacggtgcattggaacgcggattccccgtgccaagagtgcgta
agtaccgcctatagagtctataggccacaaaaaatgctttcttcttttaataatactttttgtttatcttatttc
taatactttccctaatactctttctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgcctctttgcaccattctaaaga
ataacagtgataatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaataatttctgcatataaattgtaact
gatgtaagaggtttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatggttgggataa
ggctggattattctgagtgccaagctaggcccttttgctaatacatgttcataacctcttatcttctccacagctcc
tgggcaacgtgctggtctgtgtgctggcccatcacttttgcaaaagaatt

[0242] 实施例4构建的脑动静脉畸形 (bAVM) 局灶性病理小鼠模型

[0243] 脑动静脉畸形 (bAVM) 是除海绵状血管畸形 (CCM) 外的另一大类颅内血管畸形疾病,我们对脑动静脉畸形的致病基因展开调查分析,发现最新有课题组报道在临床上发现一例bAVM病人存在Braf基因的体细胞突变 (Hong等人,2019),说明Braf基因突变与bAVM疾病的发生与发展有密切关系。因此,我们购买了携带Braf基因点突变的条件性敲入小鼠 (Braf-CA) (Dankort等人,2007),期望可以在小鼠上模拟临床上人bAVM的病理表型,同时我们的研究结果也能证明Braf基因是否是真正的致病基因。

[0244] Braf-CA小鼠是一种人源BRAF基因片段敲入的小鼠,其设计原理是基于人源BRAF激酶蛋白与鼠源BRAF激酶蛋白的氨基酸序列是高度保守的,在设计同源重组敲入载体时,为了保证不破坏内源Braf基因的正常表达以及正常Braf蛋白的序列,敲入载体中间使用了双端侧翼是LoxP位点的人源BRAF基因的Exon15-Exon18的DNA片段,3'端下游是Poly A元件与Neo筛选基因。敲入载体上第二个LoxP位点的下游是鼠源基因组Braf基因座Exon15上的编码区的第1799位的T碱基被突变为A碱基 (c.1799T to A),相应地在编码蛋白质序列的第600位的缬氨酸 (V) 会突变为谷氨酸 (E)。

[0245] 在Cre重组酶的作用下,Braf基因座上的LoxP位点会被切除,小鼠内源Braf基因的Exon14后的人源的Exon15-Exon18片段会被切除,相应地下游的携带V600E点突变的片段得以正常转录与翻译,最终在目的细胞中表达BrafV^{600E}突变体蛋白 (图14的a)。我们设计了一组实验,选取了纯合子的Braf-CA小鼠,在P30-P50的年龄段小鼠的单侧大脑皮层原位注射AAV-miniBEND-Cre (AAV-PhP.eB-mPro723-Cre-pA-mCis700) 病毒,在局部脑区诱导内皮细胞过表达BrafV^{600E}突变体蛋白 (图14的b),正常饲养的纯合子的Braf-CA小鼠是可存活且能正常生育的。我们长期观察了12只造模后小鼠,发现局灶性bAVM模型小鼠在注射病毒后的第20天后会陆续死亡,最后存活率小于50% (图14的c),造模成功的小鼠可以通过激光散斑血流成像仪透过颅骨观察到病灶区异常结构的血管 (图14的d)。

[0246] 期间,我们使用核磁共振成像 (MRI) 观察小鼠颅内bAVM病灶的发展 (图15的a)。结果显示在病毒注射后第15天 (PID15) 的时候开始有发现基于有脑出血现象,在第22天的时候,观察到小鼠颅内水肿面积扩展,表明bAVM病灶逐渐有类似肿瘤的侵袭效应。到第41天的时候,bAVM病灶区已经出现组织坏死与压迫海马区,表明bAVM病灶已有类似肿瘤的占位效应 (图15的b,c)。基于Braf-CA转基因小鼠构建的局灶性bAVM疾病模型与临床上人颅内动静脉畸形在影像学上的表型很相似,同时我们观察到的小鼠偏瘫与偶发癫痫的表型 (有视频记录) 也与临床bAVM病人的行为表现一致。为了进一步确认bAVM病灶区中脑血管形态结构的变化,我们进一步使用Laminin抗体对样本进行免疫荧光实验,并对正常脑区与病灶区的

血管直径进行了统计分析。我们发现bAVM病灶区几乎没有毛细血管大小的微血管,都是增粗的畸形血管(图16的a),统计结果也显示bAVM病灶区的血管直径显著大于正常脑区的血管直径(图16的b,c)。

[0247] 实施例5PLX4032小分子化合物可以有效抑制小鼠脑动静脉畸形疾病模型病灶的发展

[0248] 基于实施例4基于Braf-CA转基因小鼠构建脑血管动静脉畸形的疾病模型,我们已经能够确认,Braf^{V600E}突变体蛋白能够诱发bAVM病灶区畸形血管形成,由于Braf^{V600E}突变体蛋白的激酶活性相对野生型Braf蛋白有了500多倍的提升(参考文献如下:Wan PT,Garnett MJ,Roe SM,Lee S,Niculescu-Duvaz D,Good VM,Jones CM,Marshall CJ,Springer CJ,Barford D,Marais R;Cancer Genome Project.Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF.Cell.2004Mar19;116(6):855-67.doi:10.1016/s0092-8674(04)00215-6),我们猜测血管畸形主要原因是Braf-MEK1信号通路的过度激活。接下来,我们进一步探索bAVM发生与发展的信号通路调控机制。经查阅文献,我们找到PLX4032(Vemurafenib)小分子药物是Braf^{V600E}突变体蛋白特异的激酶活性抑制剂,在活体小鼠上能够有效地抑制Braf^{V600E}突变体蛋白的激酶活性(Bollag et al.,2010)。如果在bAVM模型小鼠上抑制Braf^{V600E}突变体蛋白的激酶活性,能够阻碍bAVM病灶的发展,可以证明Braf^{V600E}突变体蛋白的高激酶活性与对下游信号通路的激活对bAVM疾病的发展是充分的。为了进一步确认bAVM疾病发生的分子机制以及检验我们的猜想,我们设计了一组药理学抑制实验,并以核磁共振成像后的病灶占位前后直径作为检测指标。在造模病毒注射后第7天开始给药,对照组给予等量的药物溶剂载体DMSO。第22天开始核磁共振成像(图17的a)。实验结果显示,给药实验组的病灶区的前后直径显著小于对照组的测量值(图17的b和c),说明Braf^{V600E}的特异抑制剂PLX4032(Vemurafenib)可阻碍bAVM疾病进程的发展。进一步的H&E组织学染色结果表明,经PLX4032小分子药物治疗后的病灶区异常血管数目显著降低,实验组病灶区的面积与对照组相比显著减小,如图18所示,a左半部分显示对照组(DMSO)结果,而a右半部分显示给药组结果;b显示了对照组和给药组中畸形血管的密度;c显示了对照组和给药组中畸形血管的直径。

[0249] 上述虽然对本发明的具体实施方式进行了描述,但并非对本发明保护范围进行限制,在本发明技术方案的基础上,本领域技术人员不需要付出创造性劳动即可做出的各种修改或变形仍在本发明的保护范围以内。

[0250] 附录A本说明使用的AAV病毒信息

[0251] 表A.1AAV病毒与滴度信息

	病毒名称	血清型 (衣壳类型)	滴度 (qPCR 检测, gc/mL)
	AAV-cf1a-Cre-p2a-mCherry	AAV2/PhP.eB	3.7×10^{12}
	AAV-mPro1576-EGFP-pA-mCis700	AAV2/PhP.V1	16×10^{12}
	AAV-mPro1576-Cre-pA-mCis700	AAV2/PhP.V1	2.3×10^{12}
	AAV-mPro1576-Cre-pA-mCis700	AAV2/PhP.eB	2.4×10^{12}
	AAV-mPro973-Cre-pA-mCis700	AAV2/PhP.eB	15×10^{12}
	AAV-mPro723-d224-Cre-pA-mCis700	AAV2/PhP.eB	11×10^{12}
	AAV-mPro760-Cre-pA-mCis700	AAV2/PhP.eB	13×10^{12}
	AAV-mPro583-Cre-pA-mCis700	AAV2/PhP.eB	12×10^{12}
	AAV-mPro471-Cre-pA-mCis700	AAV2/PhP.eB	12×10^{12}
	AAV-mPro973-Cre-pA-mCis1349	AAV2/PhP.eB	12×10^{12}
[0252]	AAV-mPro973-Cre-pA-mCis400	AAV2/PhP.eB	4.7×10^{12}
	AAV- mPro973-Cre-pA-mCis303	AAV2/PhP.eB	4.8×10^{12}
	AAV- mPro973-Cre-pA-mCis200	AAV2/PhP.eB	37×10^{12}
	AAV- mPro973-Cre-pA-mCis103	AAV2/PhP.eB	32×10^{12}
	AAV-mPro1576-Cre-pA(Cis0, Pro-only)	AAV2/PhP.eB	16×10^{12}
	AAV-CAG-EGFP	AAV2/PhP.eB	3.3×10^{12}
	AAV-CAG-mGreenLantern	AAV2/PhP.eB	5.4×10^{12}
	AAV-ef1a-EGFP	AAV2/BR1	3.3×10^{12}
	AAV-ef1a-EGFP	AAV2/BI30	5.4×10^{12}
	AAV-CAG-mScarlet	AAV2/PhP.eB	10×10^{12}
	AAV-ef1a-Cre-p2a-mCherry	AAV2/BI30	15×10^{12}
	AAV-mPro1576-V1-Cre-pA-mCis700	AAV2/BR1	3.8×10^{12}
	AAV-mPro1576-V1-Cre-pA-mCis700	AAV2/rh10	11×10^{12}
	AAV-mPro1576-V1-Cre-pA-mCis700	AAV2/DJ8	3×10^{12}
	AAV-mPro723-d224-Cre-pA-mCis700	AAV2/BI30	1.14×10^{12}
[0253]	AAV-cf1a-Cre-p2a-mCherry	AAV2/9P13	1.2×10^{12}
	AAV-mPro723-d224-Cre-pA-mCis700	AAV2/9P13	0.82×10^{12}
	AAV-ef1a-Cre-p2a-mCherry	AAV2/9P36	1.1×10^{12}

[0254] 表A.2AAV病毒与滴度信息

	病毒名称	血清型 (衣壳类型)	滴度 (qPCR 检测, gc/mL)
	AAV-hPro-Cre-pA-hCis700	AAV2/PhP.eB	10×10^{12}
	AAV-hPro762-Cre-pA-hCis700	AAV2/PhP.eB	19×10^{12}
	AAV-hPro-Crc-pA-hCis400	AAV2/PhP.cB	45×10^{12}
	AAV-hPro-Cre-pA-hCis303	AAV2/PhP.eB	16×10^{12}
	AAV-hPro-Cre-pA-hCis200	AAV2/PhP.eB	37×10^{12}
	AAV-hPro-Crc-pA-pig-Cis700	AAV2/PhP.cB	9.7×10^{12}
	AAV-hPro-Cre-pA-marmCis700	AAV2/PhP.eB	12×10^{12}
[0255]	AAV-hPro-Cre-pA-Rat-Cis737	AAV2/PhP.eB	30×10^{12}
	AAV-mPro1576-tTA-mCis700	AAV2/PhP.V1	24×10^{12}
	AAV-TRE-EGFP-hGHpA	AAV2/PhP.V1	15×10^{12}
	AAV-miniBENDv1-globin-EGFP-pA	AAV2/PhP.eB	5.9×10^{12}
	AAV-miniBENDv2-globin-EGFP-pA	AAV2/PhP.cB	5.3×10^{12}
	AAV-mPro723-glo-Cre-P2A-mScarlet	AAV2/PhP.eB	20×10^{12}
	AAV-miniBENDv2-hMAP3K3 ^{I441M}	AAV2/PhP.eB	10×10^{12}
	AAV-miniBEND-hMAP2K1 ^{Q56P}	AAV2/PhP.cB	19×10^{12}
	AAV-mPro723-iCreER ^{T2} -mCis700	AAV2/PhP.eB	20×10^{12}

[0256] 附录B参考文献

[0257] 本专利说明书的描述中出现的以作者名字描述的上述文献具体出处汇总记录于下面的:

[0258] 1.Schlaeger, Thorsten M, Bartunkova, et al. Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997.

[0259] 2.Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. Cold spring harbor laboratory press, 1989.

[0260] 3.Kisanuki Y Y, Hammer R E, Miyazaki J I, et al. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo[J]. Developmental Biology, 2001, 230(2): 230-42.

[0261] 4.Fadel B M, Boutet S C, Quertermous T. Octamer-dependent in vivo expression of the endothelial cell-specific TIE2 gene[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(29): 20376-83.

[0262] 5.Loew R, Heinz N, Hampf M, et al. Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression[J]. BMC Biotechnology, 2010, 10(1): 81.

[0263] 6.Albright B H, Storey C M, Murlidharan G, et al. Mapping the Structural Determinants Required for AAVrh.10 Transport across the Blood-Brain Barrier

[J].Mol Ther,2018,26(2):510-23.

[0264] 7.Hong T,Xiao X,Ren J,et al.Somatic MAP3K3 and PIK3CA mutations in sporadic cerebral and spinal cord cavernous malformations[J].Brain,2021,144(9):2648-58.

[0265] 8.Hong T,Yan Y,Li J,et al.High prevalence of KRAS/BRAF somatic mutations in brain and spinal cord arteriovenous malformations[J].Brain,2019,142(1):23-34.

[0266] 9.Huo R,Yang Y,Sun Y,et al.Endothelial hyperactivation of mutant MAP3K3 induces cerebral cavernous malformation enhanced by PIK3CA GOF mutation [J].Angiogenesis,2023.

[0267] 10.Bollag G,Hirth P,Tsai J,et al.Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma[J].Nature,2010,467(7315):596-9.

[0268] 11.Dankort D,Filenova E,Collado M,et al.A new mouse model to explore the initiation,progression,and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors[J].Genes Dev,2007,21(4):379-84.

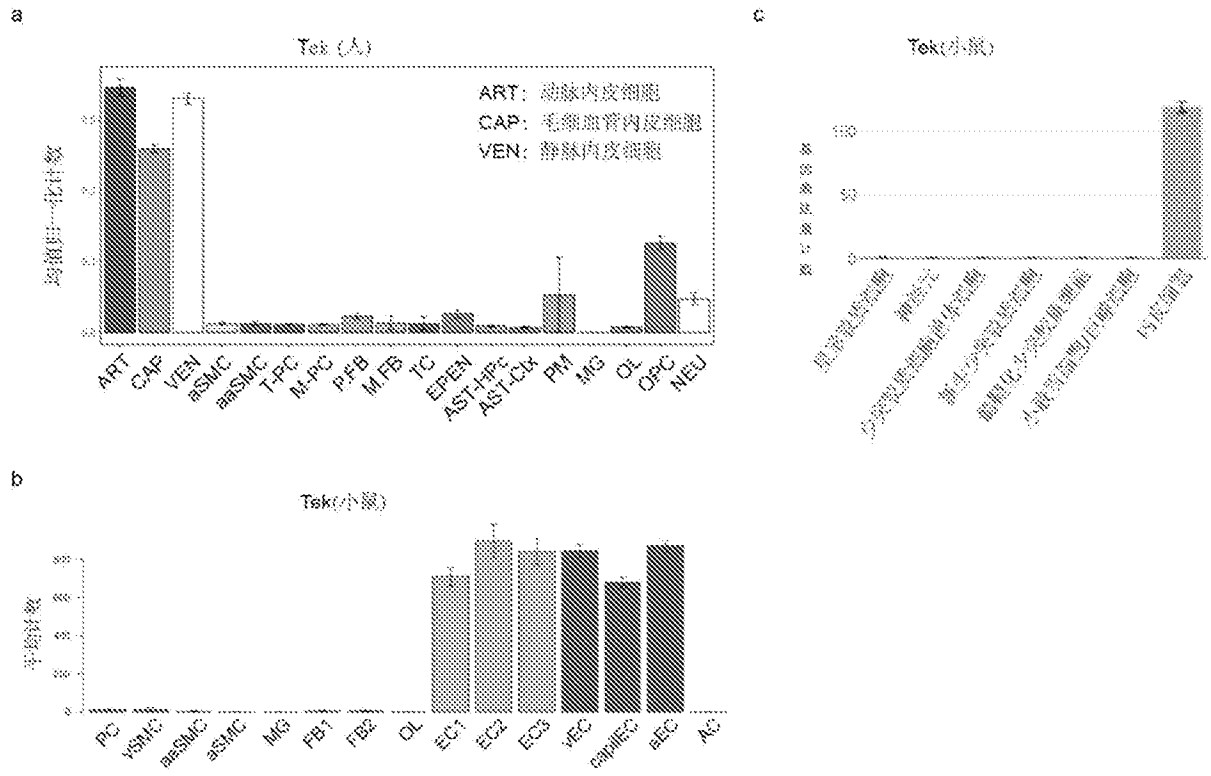


图1

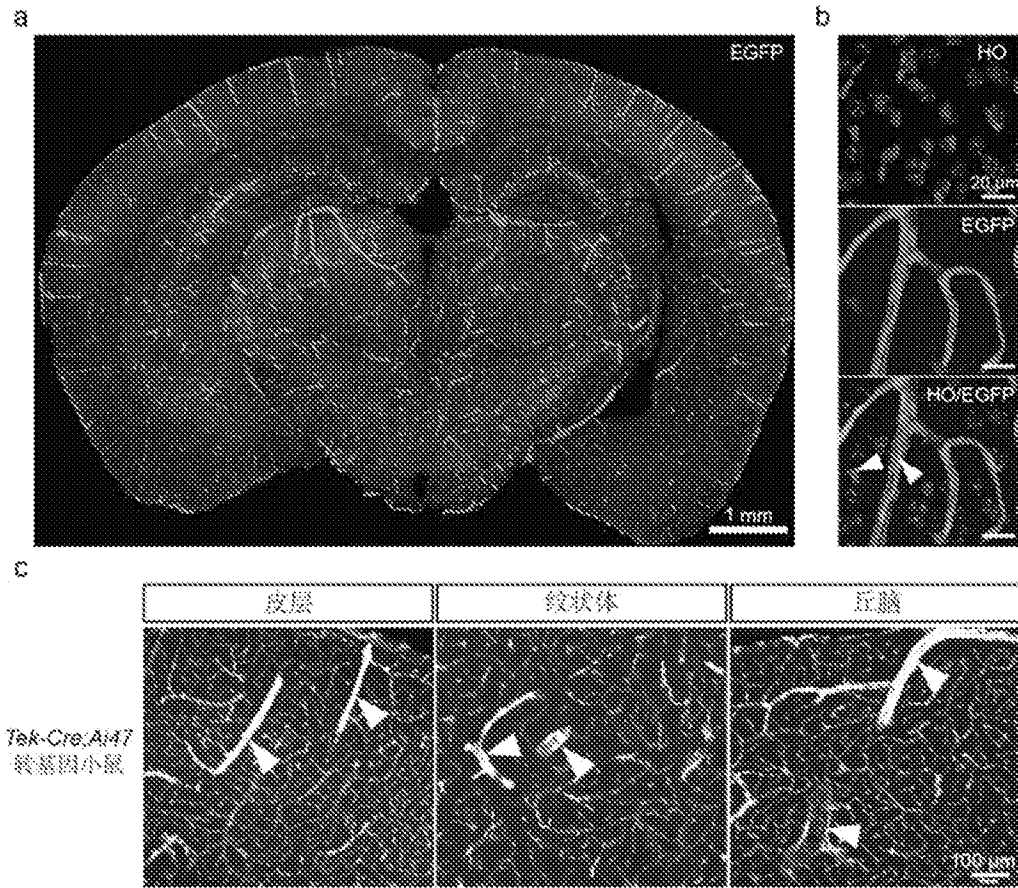


图2

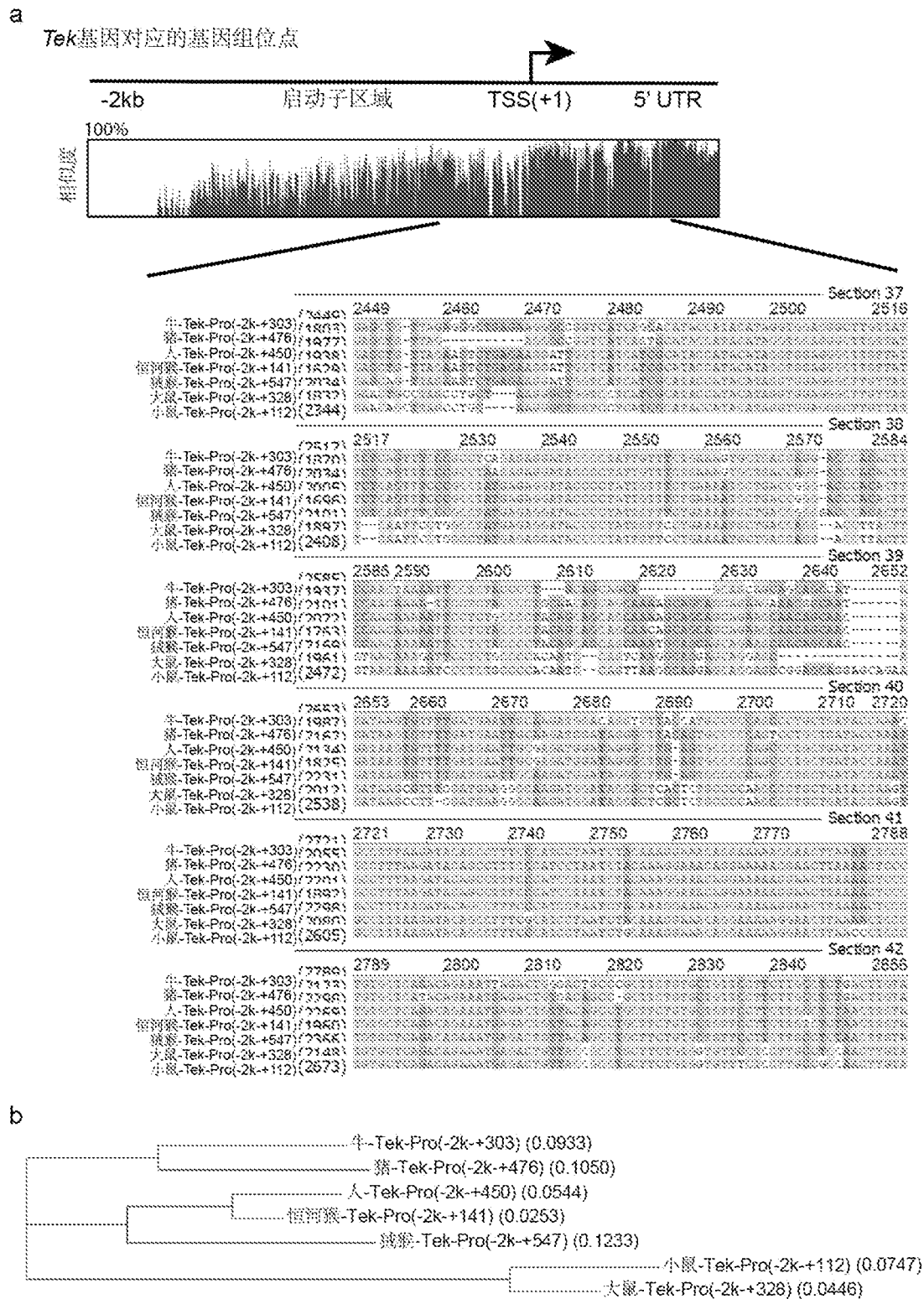
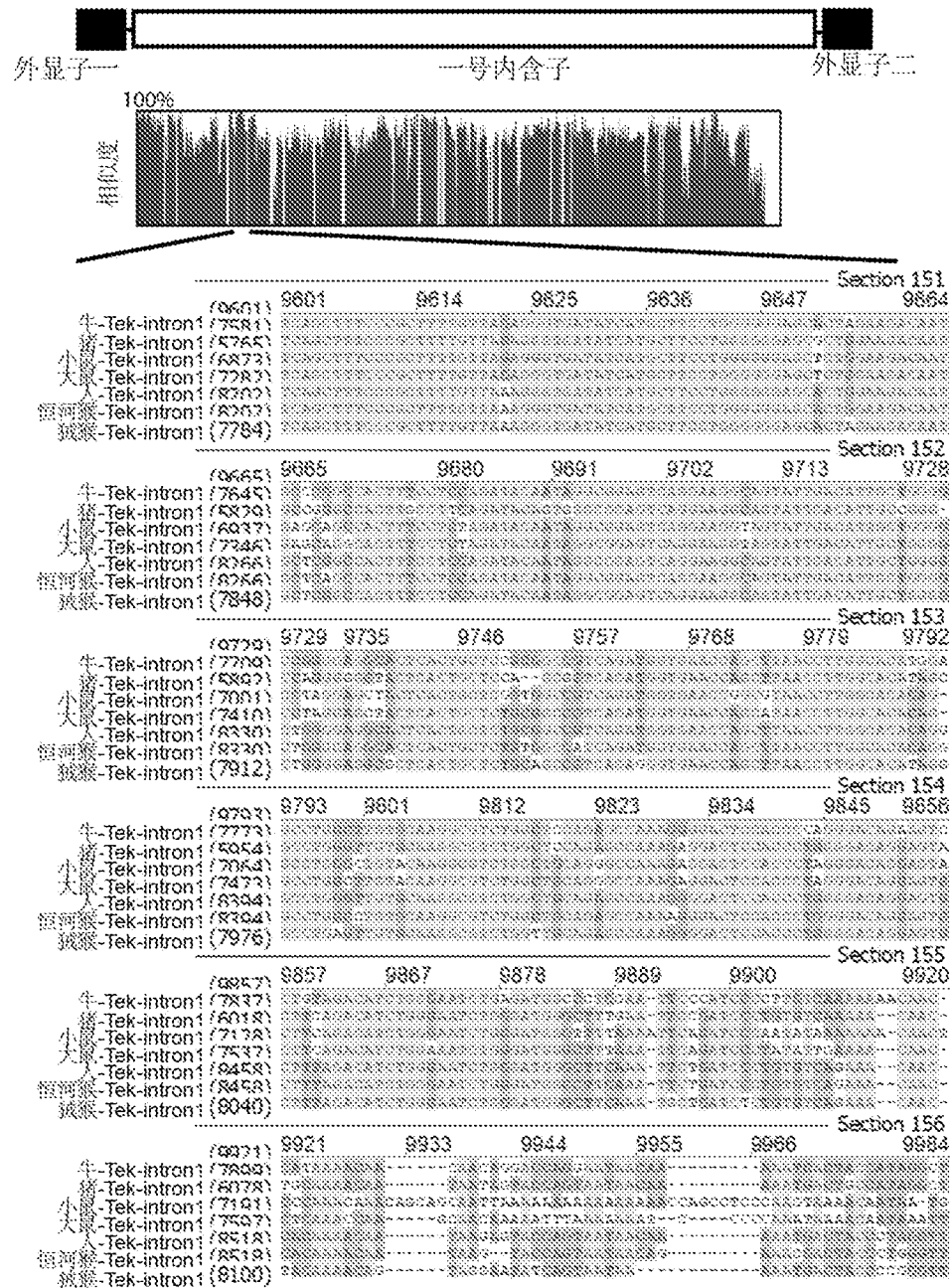


图3

a

Tek基因对应的基因组位点



b

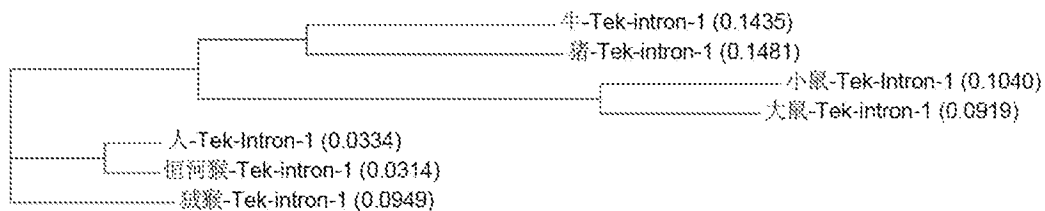


图4

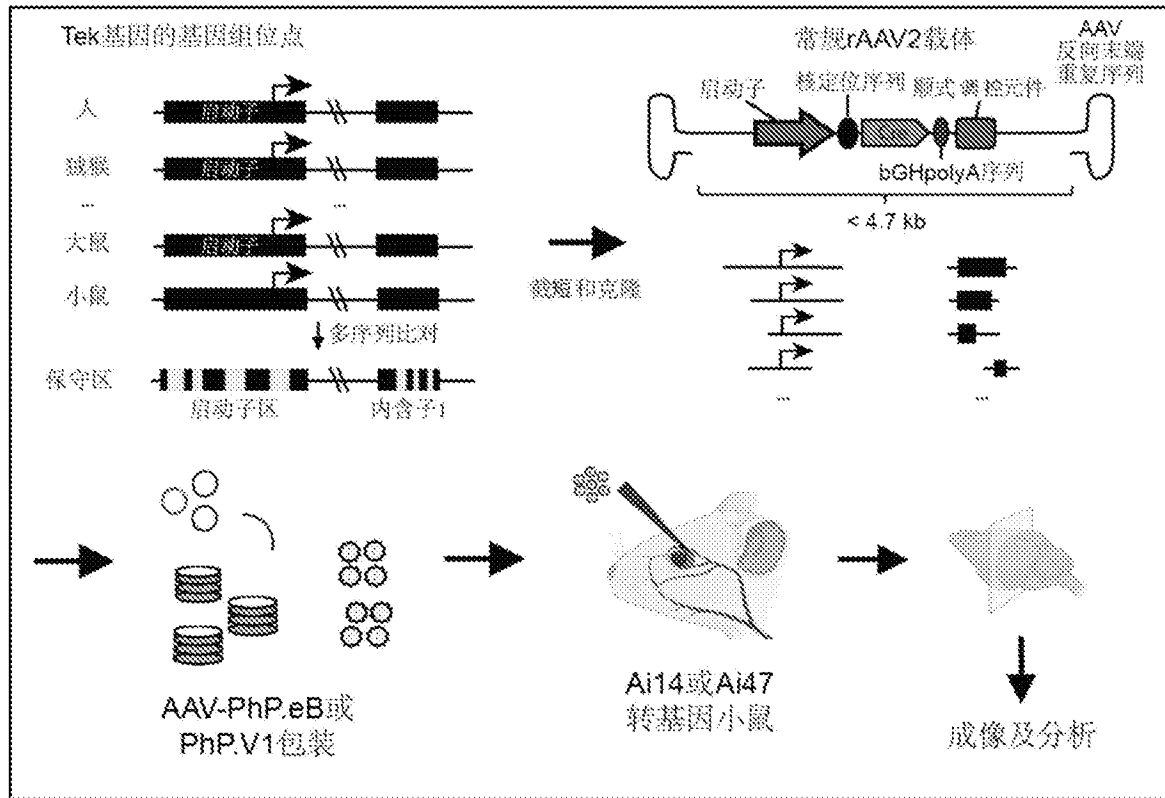


图5

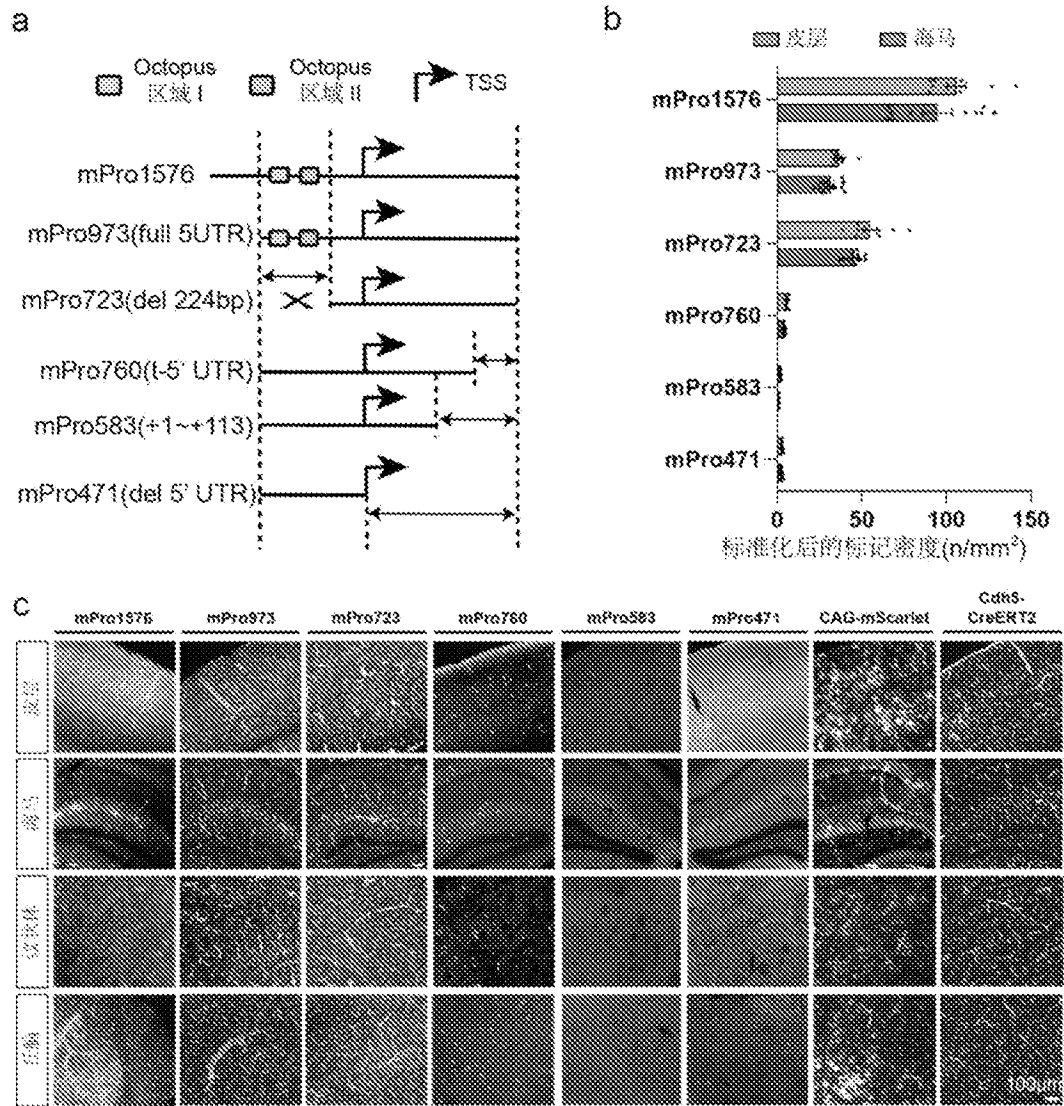


图6

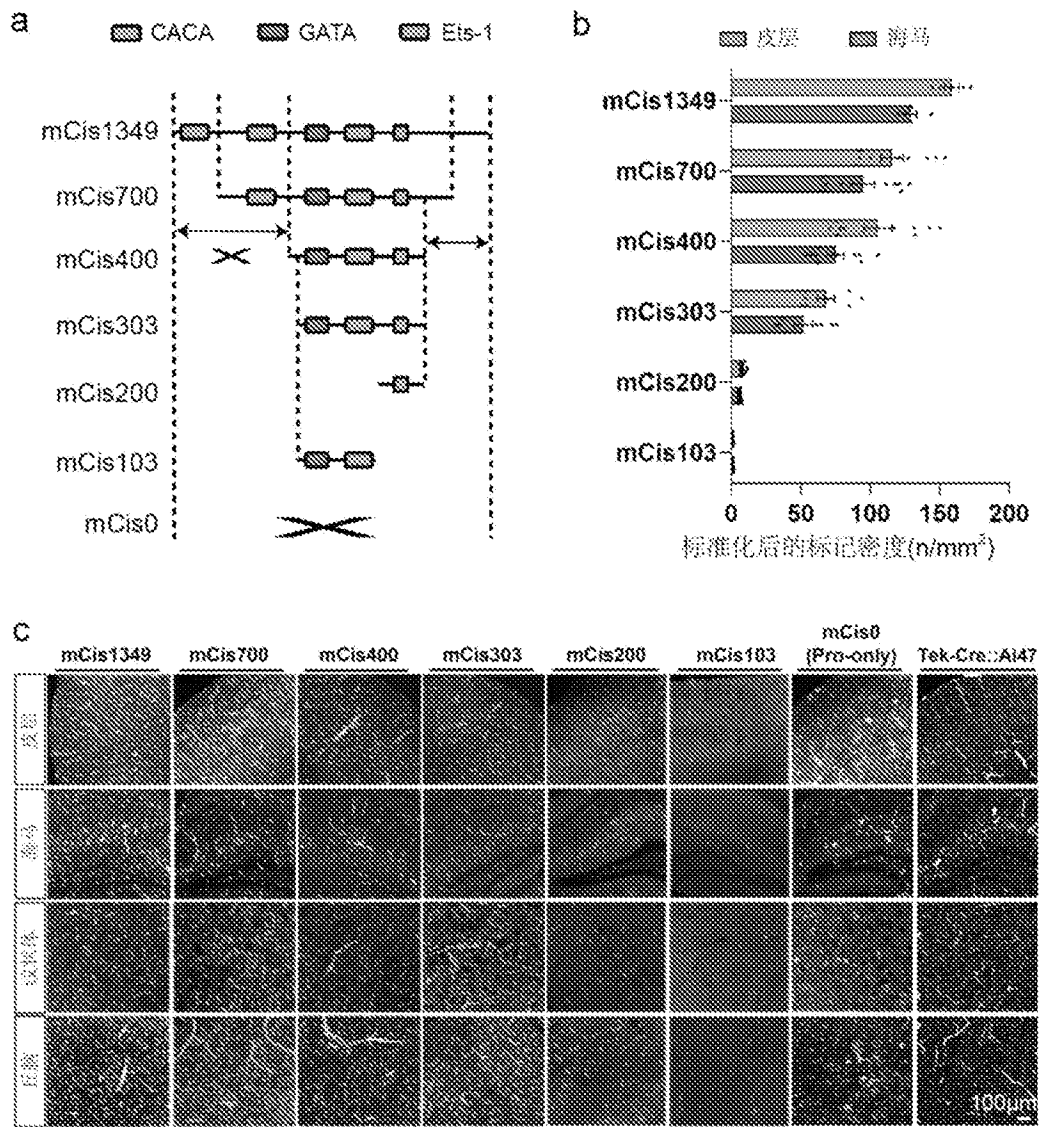
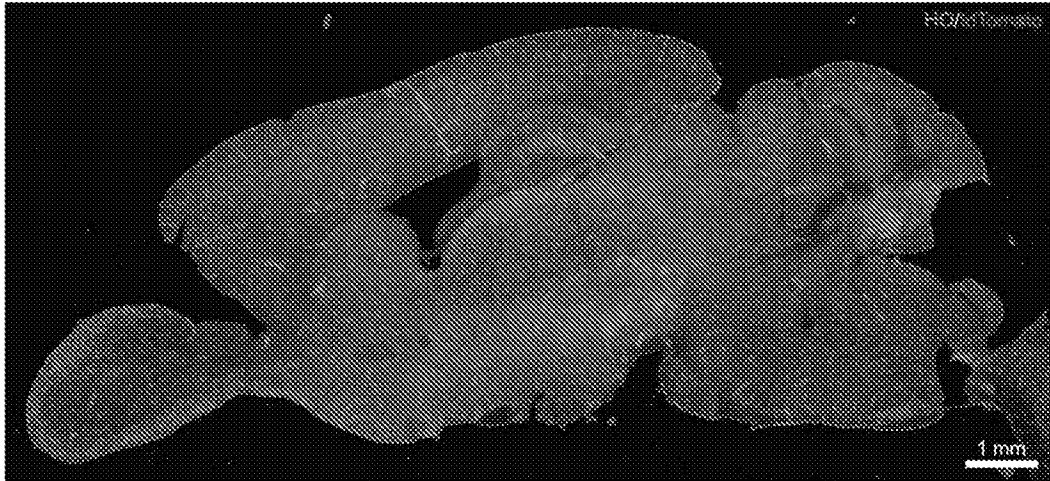


图7

a



b

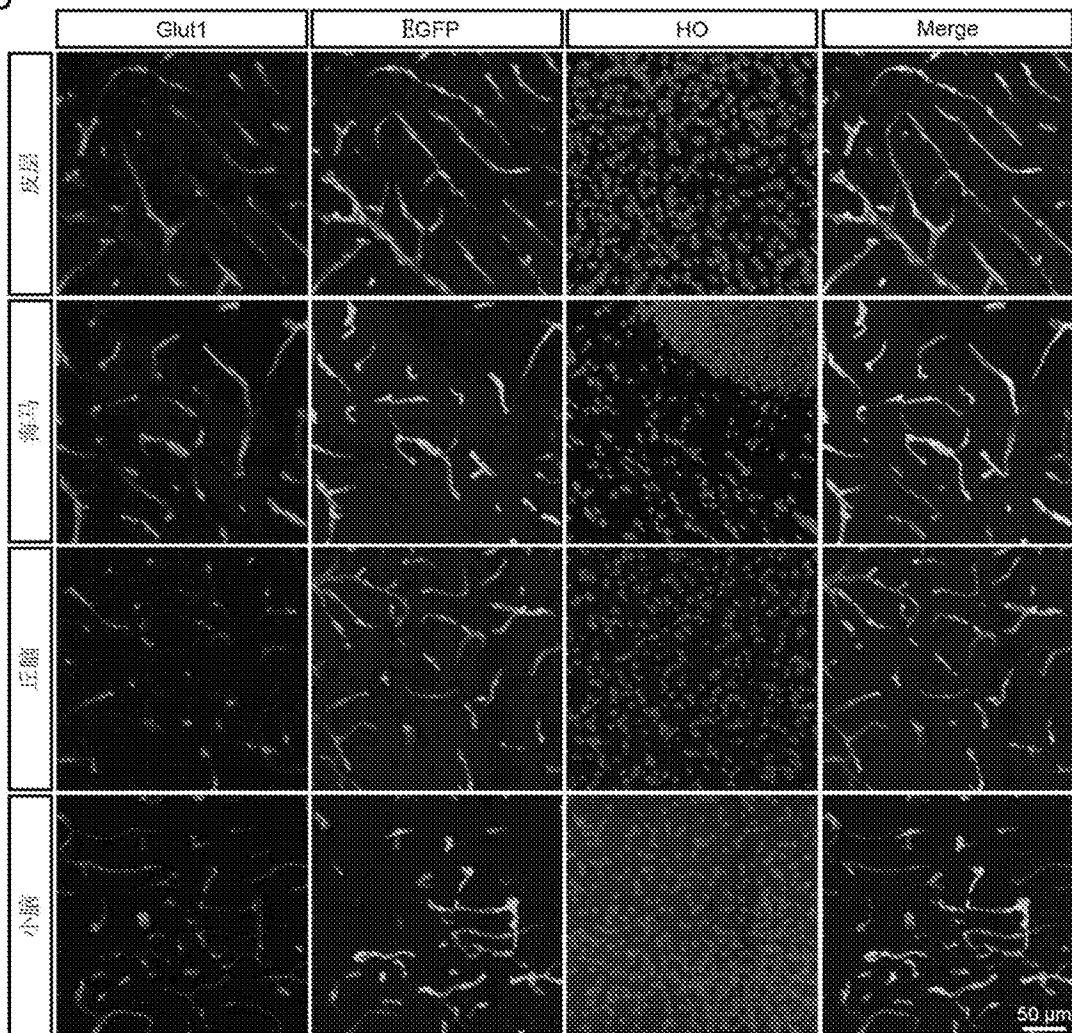


图8

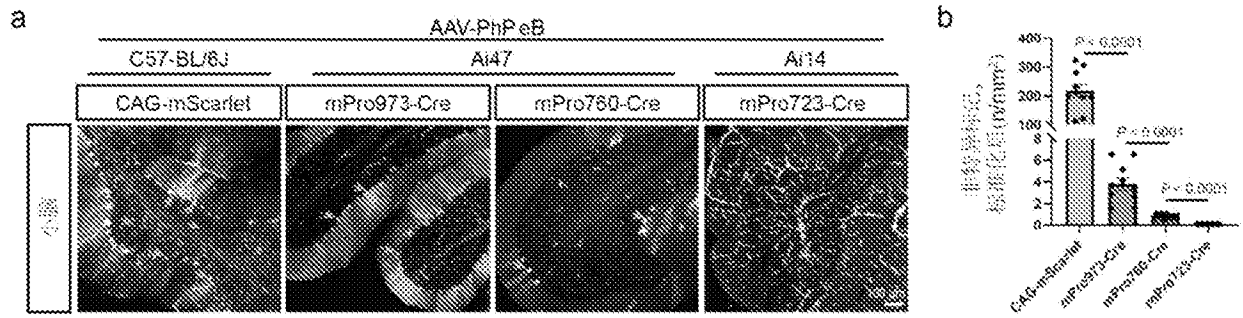


图9

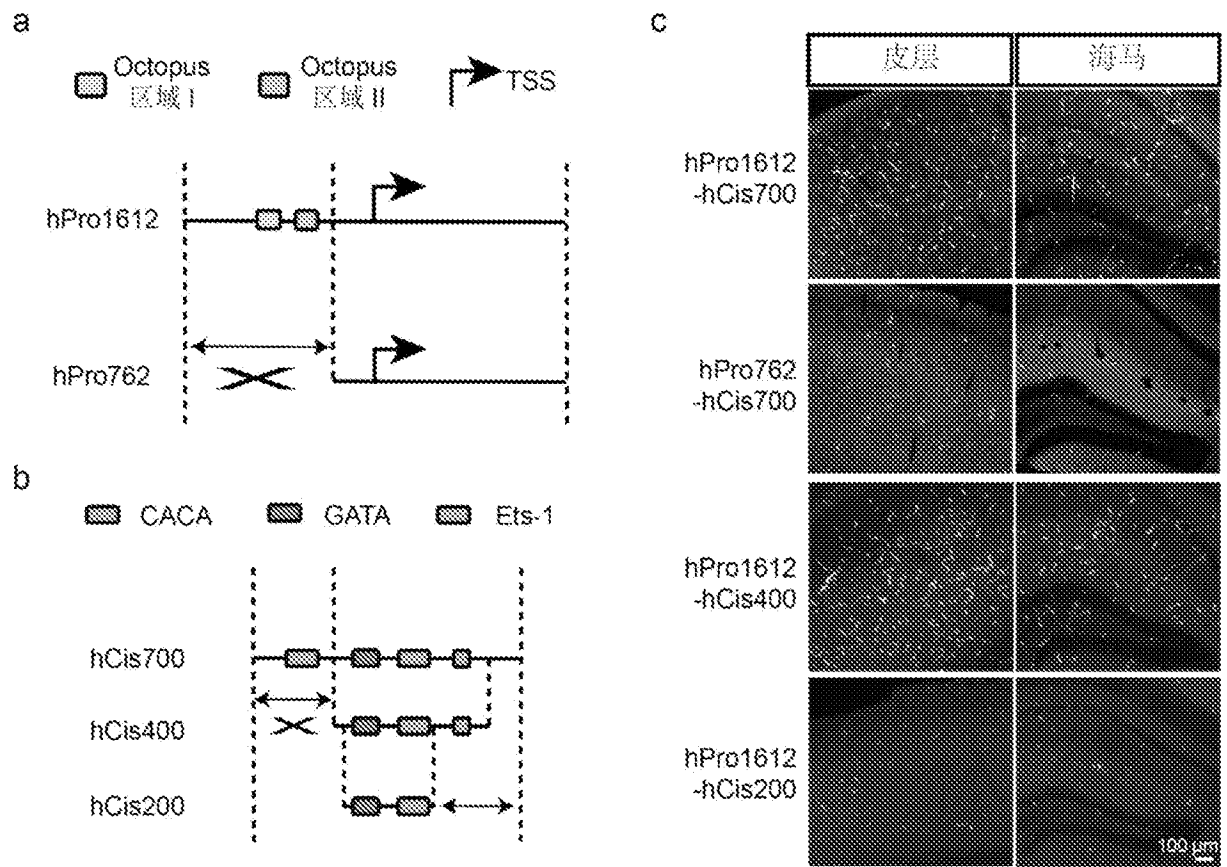


图10

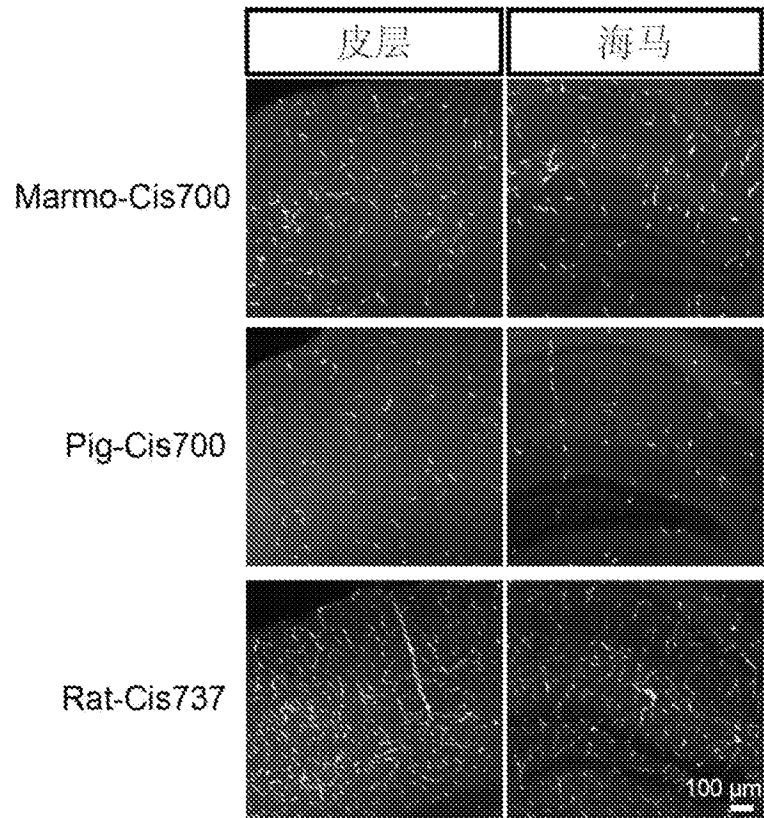
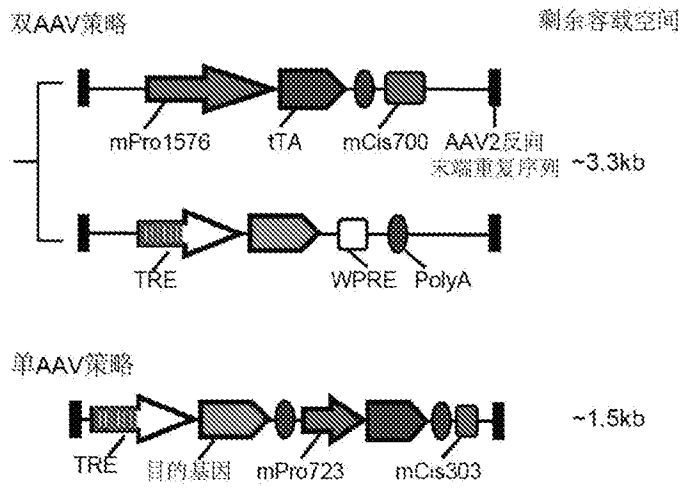


图11

a



b

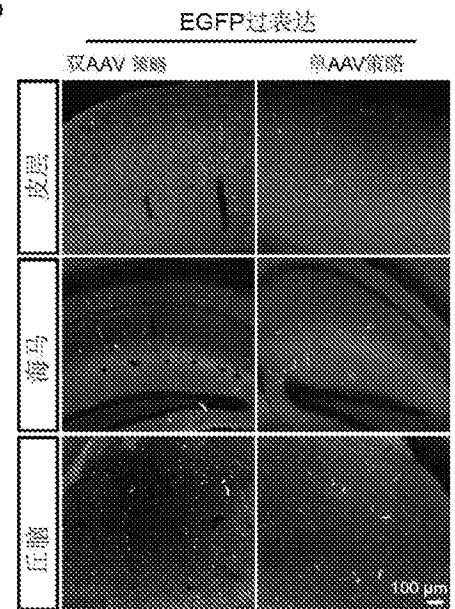


图12

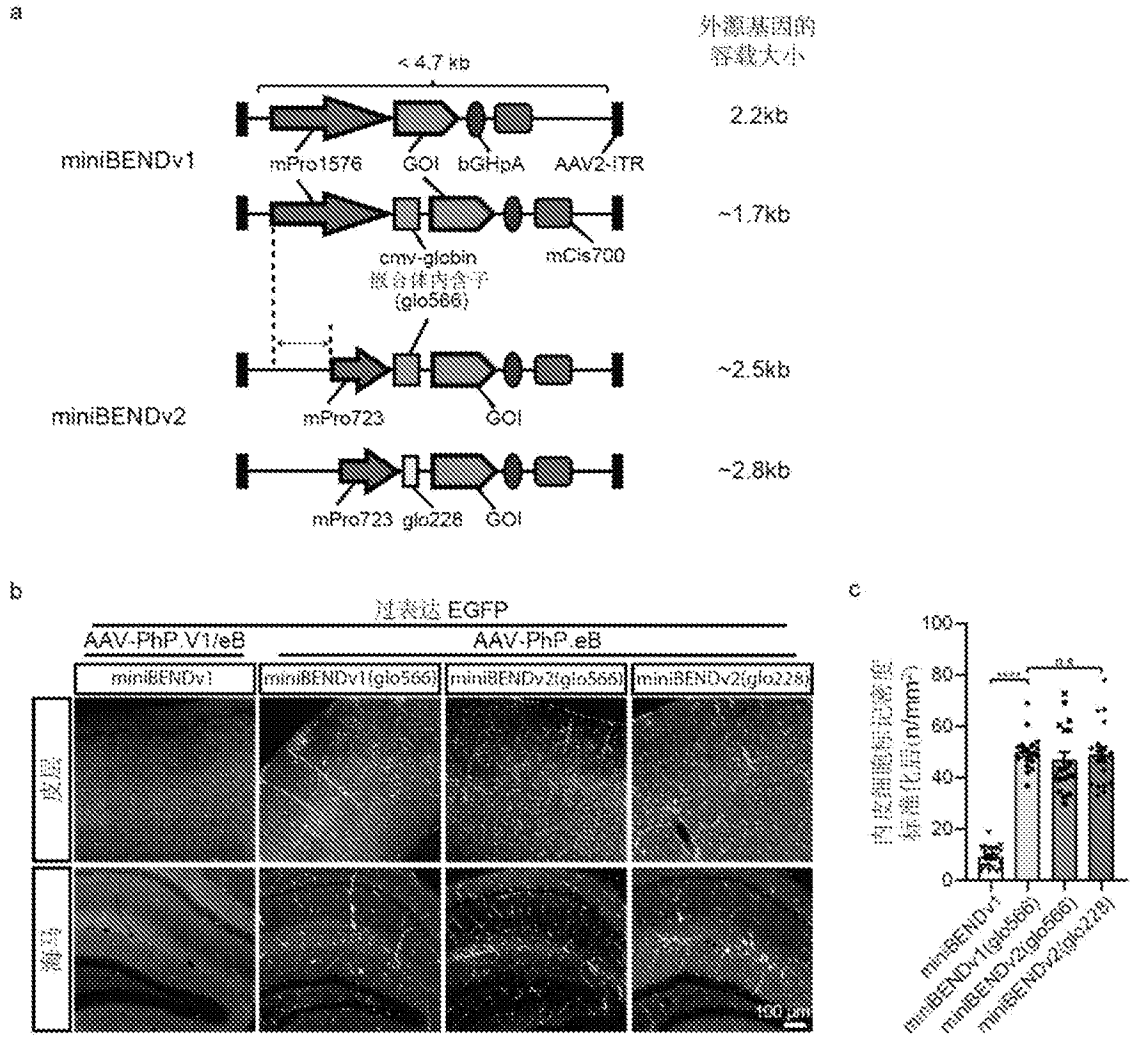


图13

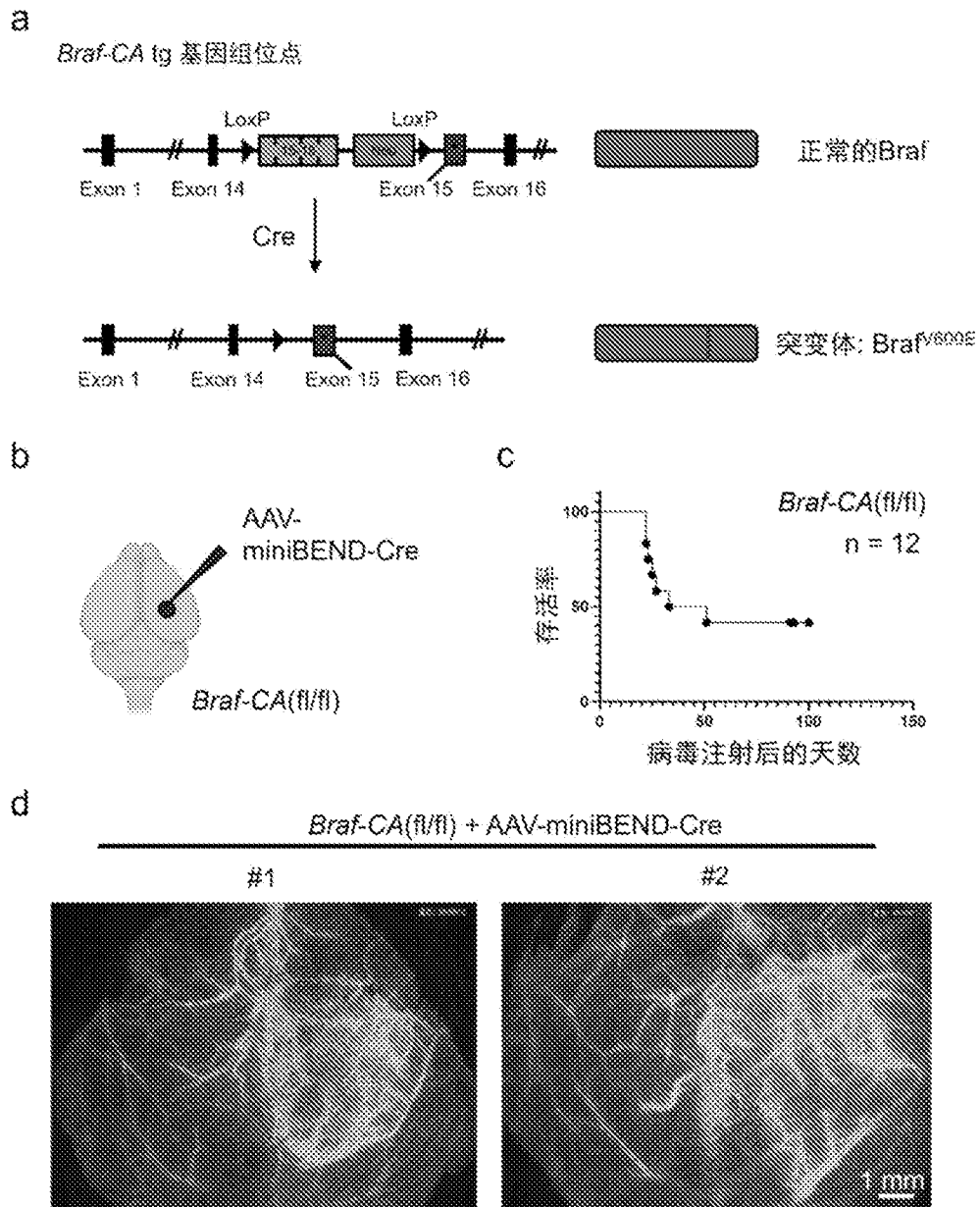


图14

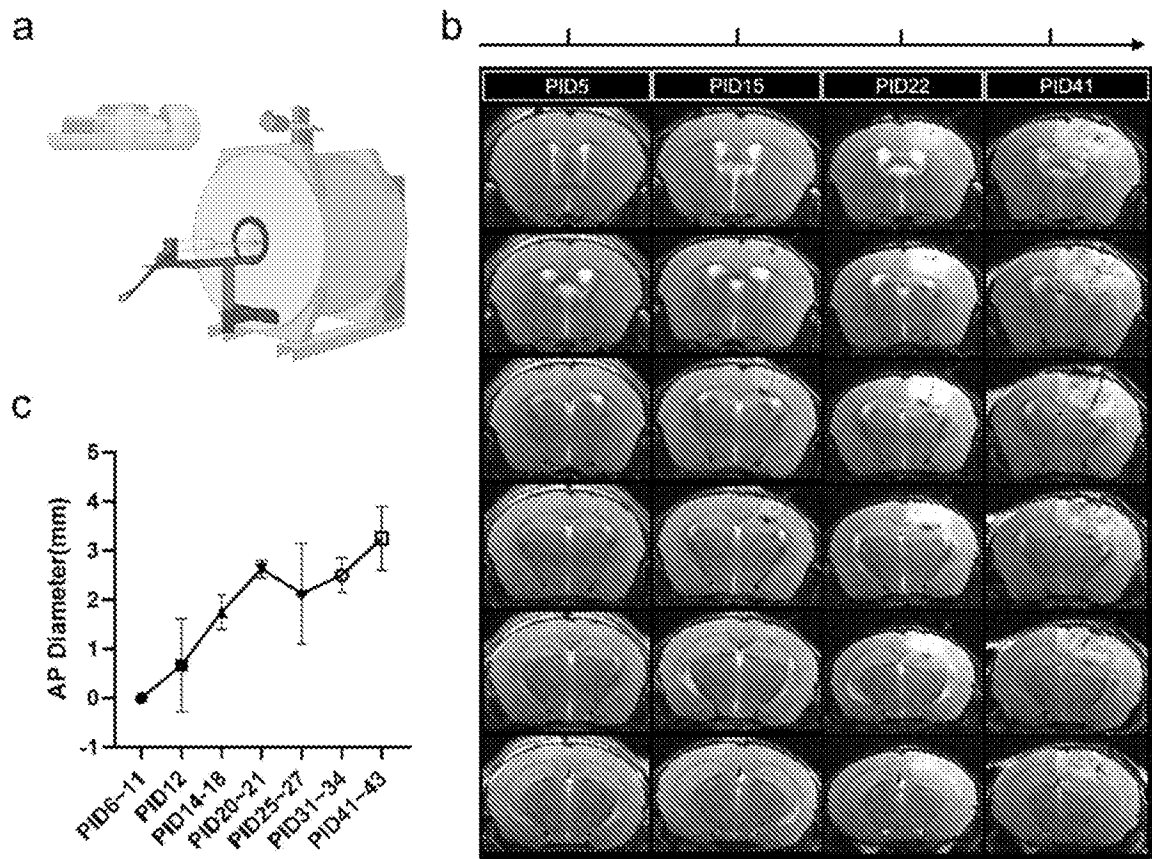


图15

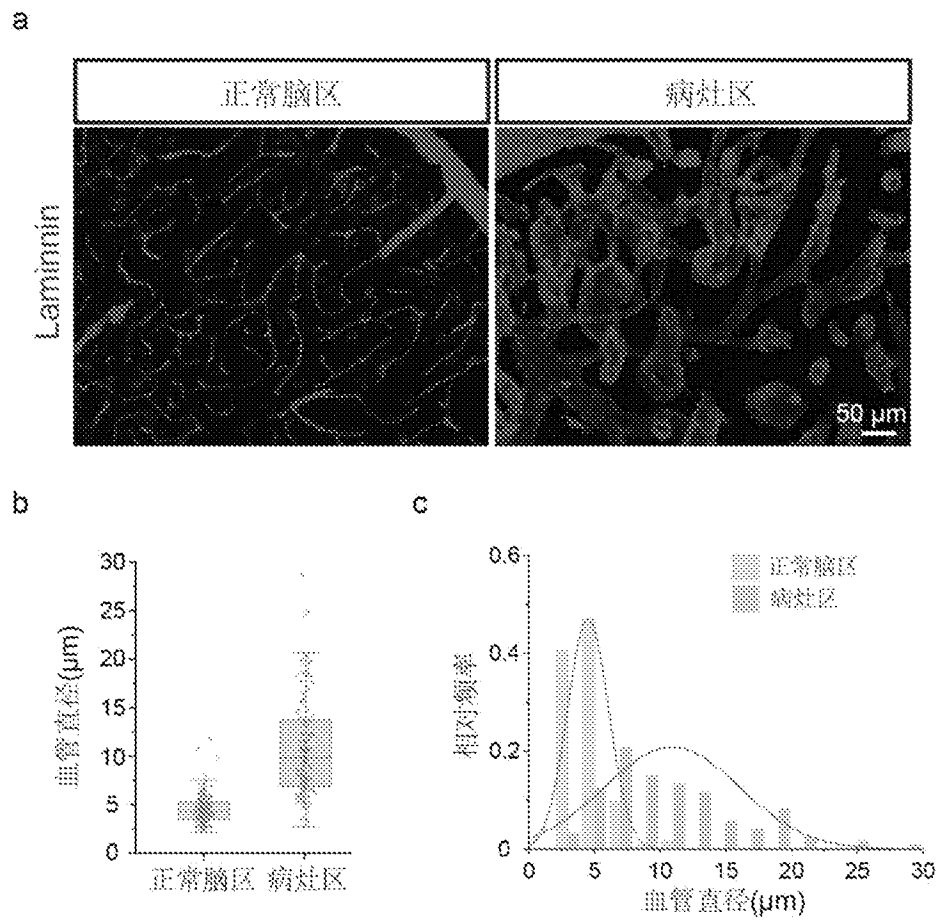


图16

bAVM疾病造模

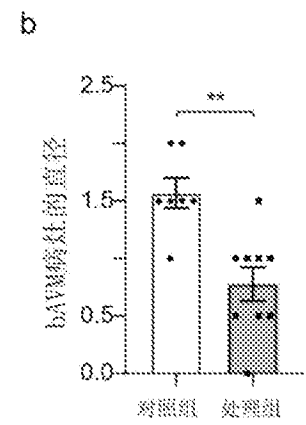
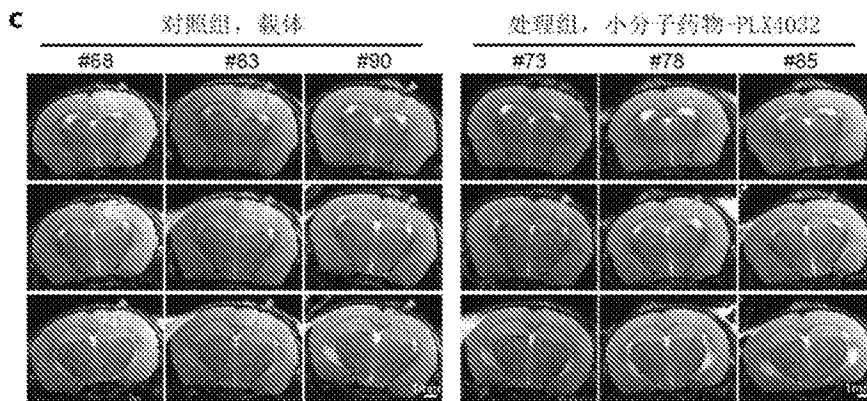
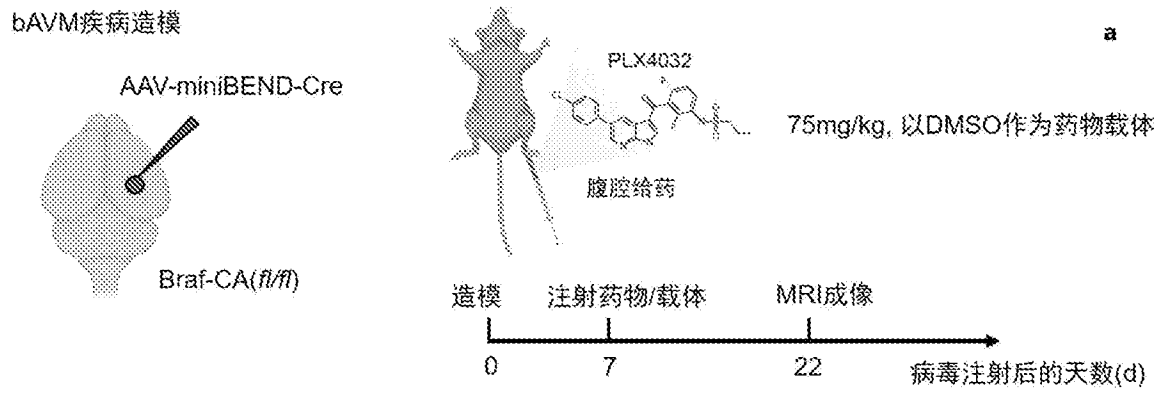


图17

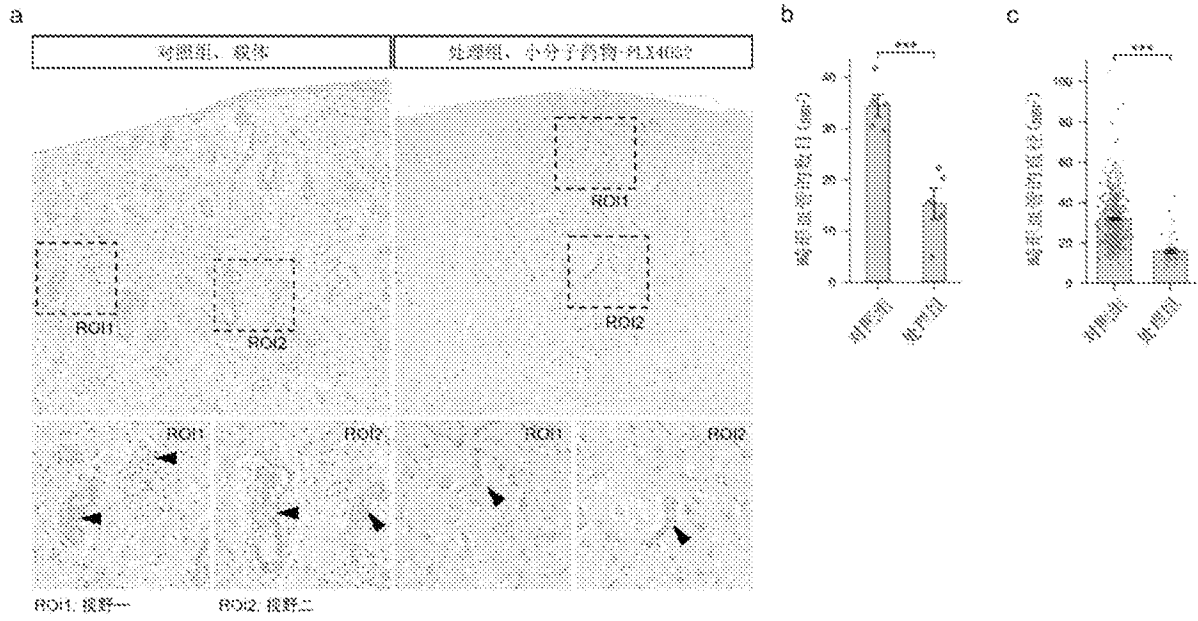


图18