

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61M 31/00 (2006.01)

A61M 25/10 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580009480.7

[43] 公开日 2007 年 3 月 21 日

[11] 公开号 CN 1933868A

[22] 申请日 2005.3.29

[21] 申请号 200580009480.7

[30] 优先权

[32] 2004.3.25 [33] GB [31] 0406728.6

[86] 国际申请 PCT/GB2005/001243 2005.3.29

[87] 国际公布 WO2005/092425 英 2005.10.6

[85] 进入国家阶段日期 2006.9.25

[71] 申请人 流体力学基因递送有限公司

地址 英国伦敦

[72] 发明人 安德鲁·佩西

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 顾晋伟 刘继富

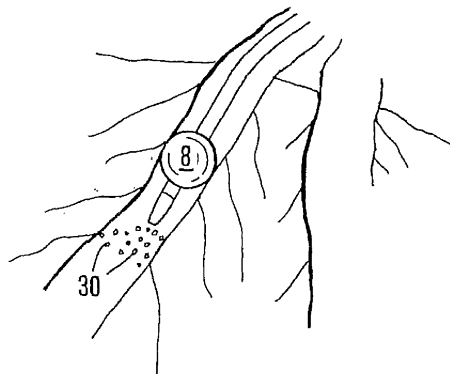
权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 11 页

[54] 发明名称

基因

[57] 摘要

本发明提供了一种将核酸(30)导入人或动物体的一个区域的细胞中的方法,该方法包括基本上阻塞从所述身体区域流出的脉管和通过所述流出脉管在压力下将所述核酸导入该身体区域,还提供将核酸导入身体一个区域的细胞中的装置,该装置包括:保持包含所述核酸的液体制剂的贮器;与所述贮器液体连通的导管,用于将所述液体制剂通过所述身体区域的流出脉管传输到所述身体区域;用于对导管传输的液体进行加压的压力发生装置;和用于基本上阻塞所述流出脉管的阻塞装置(8)。



1. 一种向人或动物身体区域的细胞中导入核酸的方法，该方法包括基本上阻塞所述身体区域的流出脉管并在压力下经由所述流出脉管将所述核酸导入该身体区域。
2. 用于向身体区域的细胞中导入核酸的装置，该装置包括：用于保持含所述核酸的液体制剂的贮器；与所述贮器液体连通的导管，用于将所述液体制剂通过所述身体区域的流出脉管传输到所述身体区域；用于对导管传输的液体进行加压的压力发生装置；用于基本上阻塞所述流出脉管的阻塞装置。
3. 权利要求 1 或 2 的方法或装置，其中所述身体区域是身体器官。
4. 权利要求 3 的方法或装置，其中所述器官选自包括以下的列表：肾脏、心脏、脾脏、胰腺、肺、肾上腺、胃、前列腺和卵巢。
5. 权利要求 4 的方法或装置，其中所述器官是肝脏。
6. 前述权利要求中任意一项的方法或装置，其中所述核酸是在 10-80 mmHg 的压力下导入的，或者将压力发生装置调节到产生 10-80 mmHg 的压力。
7. 前述权利要求中任意一项的方法或装置，其中所述核酸以质粒的形式存在。
8. 前述权利要求中任意一项的方法或装置，其中通过一个或更多囊来实现阻塞，或者阻塞装置包含一个或更多个囊。
9. 前述权利要求中任意一项的方法或装置，其中在少于 60 秒的时间内将核酸导入所述身体区域。
10. 前述权利要求中任意一项的方法或装置，其中含有所述核酸的液体制剂总体积为 50—1300 ml。
11. 权利要求 10 的方法或装置，其中含有所述核酸的液体制剂总体积为 75—350 ml。
12. 权利要求 2 到 11 中任意一项的装置，其中所述贮器包括一条或更多个注射管。
13. 权利要求 2 到 12 中任意一项的装置，其中所述压力发生装置包括一支或更多支注射器。
14. 权利要求 2 到 13 中任意一项的装置，其中所述导管包括一个或更多个径向注射

口。

15. 权利要求 2 到 14 中任意一项的装置，其中所述导管包括两个腔。
16. 权利要求 15 的装置，其中一个腔被设置用于接导引线。
17. 权利要求 14 或 15 的装置，其中一个腔被设置用于使阻塞装置膨胀。
18. 权利要求 16 的装置，其中液体制剂沿导引线腔向下传递。
19. 权利要求 15 到 18 中任意一项的装置，其中所述导管包括两个用于使阻塞装置膨胀的腔。
20. 核酸分子在制造药物中的用途，用于在压力下通过所述身体区域的基本阻塞的流出脉管向对象的身体区域导入核酸，以便通过基因治疗来处理所述对象。

基因

本发明涉及用于将核酸导入人或非人动物靶器官尤其是肝脏中的装置和方法。

虽然基因治疗在治疗遗传和获得性疾病中有着巨大的潜在好处，但是目前基因治疗技术的主要障碍之一是临床中遇到的转染水平低下。基因治疗有赖于动物细胞摄取掺入治疗性核酸的载体，因为转染是有效基因表达的必要先决条件。即使所施用核酸是调节序列而非编码序列，也必须被细胞摄取以便发挥对细胞产生蛋白质的影响。

肝脏于体内在蛋白质生产中的中心作用和肝癌的流行使得该器官成为基因治疗的关键靶标。然而，系统性注射，如注射入臂的静脉（肘正中静脉），并不能引起肝脏肝细胞的显著转染（**Habib et al., Human Gene Therapy 12:219-226 [2001]**）。肝细胞是肝脏的主要细胞类型，它们负责合成、分解以及贮藏广泛围的物质，包括合成除抗体以外的所有血浆蛋白质，如果提议的治疗涉及任何正常肝功能，就必须实现对这些细胞的转染。

已经尝试了对肝动脉的局部注射（**Habib et al. supra and Reid et al., Cancer Research 62: 6070-6079 [2002]**）但是肝细胞的转染率依然非常不满意。

当建议的治疗是癌症治疗时，经常提议直接对肿瘤进行注射；然而在手术或放射疗法后复发的大多数癌症是多病灶的，所以在这些情况下，肿瘤内注射是不可行的。

因此需要转染肝脏细胞的新方法，其转染效率要能实现有效的基因治疗。

在小鼠中流体力学注射已被用于转染肝脏细胞（**Liu et al., Gene Therapy 6: 1258-1266 [1999]**）。该情况下，将含编码感兴趣基因的质粒载体的大量液体强力快速注射到动物尾静脉中。所用体积为 1-2 ml，这与小鼠总循环量相当。质粒的盐水制剂沿腔静脉直达心脏。小鼠的心脏无法处理这样大的体积，因而迫使携带有质粒的液体进入肝脏的肝静脉。依照该技术，由于细胞膜的流动性，施加的压力能使肝细胞成功地摄取质粒。

然而，这种技术不能应用于较大的动物，如人，向循环系统强力注射大体积的

液体可导致心脏衰竭。

本发明致力于解决这些问题，并且利用流体力学原理，在足以用于基因治疗而不损伤心脏的水平，实现细胞转染。

因此，一方面，本发明提供将核酸导入人或动物体某区域的细胞中的方法，该方法包括基本上阻塞从所述身体区域流出的脉管，并且通过所述流出脉管在压力下将所述核酸导入该身体区域。

身体区域优选是器官，但也可以是能够通过阻塞流出静脉而整体或部分地从正常血液循环中有效分离的任何部分，即：阻塞该区域的流出脉管。各种器官以及身体的其他部分（如肢体）的流出脉管的实例如下：肾脏的肾静脉、肾上腺的肾上静脉、肺的肺静脉、心脏的冠状静脉或静脉窦、脾脏的脾静脉、下肢的股静脉、胰脏的胰静脉。

应该知道，当提及“身体”或“患者”时，这包括人和非人动物，非人动物包括牲畜和伴侣动物以及研究用动物；尽管如此，人是优选的对象。

更为具体的是，本发明提供将核酸导入身体器官的细胞中的方法，该方法包括基本上阻塞所述器官的流出脉管，并且通过所述流出脉管在压力下将所述核酸导入该器官。在一个具体实施方案中，本发明提供将核酸导入肝脏细胞的方法，该方法包括基本上阻塞肝静脉，并且通过所述肝静脉在压力下将所述核酸导入肝脏。

另一方面，本发明提供将核酸导入身体区域细胞的装置，包括：保持包含所述核酸的液体制剂的贮器；与所述贮器液体连通的导管，用于将所述液体制剂通过所述身体区域的流出脉管传送到所述身体区域；用于对导管传送的液体进行加压的压力发生装置，和用于基本上阻塞所述流出脉管的阻塞装置。

另一方面，本发明提供将核酸导入肝脏细胞的装置，包括：保持包含所述核酸的液体制剂的贮器；与所述贮器液体连通的导管，用于将所述液体制剂通过肝静脉传输到患者肝脏；压力发生装置，用于对导管传输的液体进行加压；和阻塞装置，用于基本上阻塞所述肝静脉。

另一方面，发明提供了将核酸导入身体器官的细胞中的装置，包括：保持包含所述核酸的液体制剂的贮器；与所述贮器液体连通的导管，用于将所述液体制剂通过

所述器官的流出脉管传输到患者器官；用于对导管传输的液体进行加压的压力发生装置；用于基本上阻塞所述流出脉管的阻塞装置。

该技术可用于将遗传物质导入除脑以外的任何身体器官。肝脏尤为优选，并且用于随后的讨论中以举例说明该技术。尽管如此，其他适合的器官还包括肾脏、心脏、脾脏、胰脏、肺、肾上腺、胃、前列腺、卵巢等。身体的器官或区域要求流出脉管（流出静脉）被阻塞的血液循环系统，使器官或区域暂时性地全部或部分地与正常血液循环分离。应该知道，当提及肝脏、肝静脉等时，相同的技术和原理经必要修改也适用于身体的其他器官和区域。

当根据发明的方法处理肢体时，欲转染的细胞可以是其脉管中的细胞，如可通过转染表达 **VEGF** 的质粒而实现在局部缺血中增加血流。作为替代，可将编码生长因子的质粒转染肌肉细胞或者作为对肌营养不良的治疗。心脏是个特例，当想要转染心脏细胞时，如心肌细胞，不能阻塞心脏本身，但是可以阻塞冠状静脉或静脉窦以进行基因递送和转染。

根据正常循环系统，血液通过肝动脉和肝门静脉进入肝脏，然后交汇于三条肝静脉中的一条（右、中和左），并于此流向心脏。所以通过阻塞其中一支肝静脉，可以暂时地、部分地与正常循环分离。重要的是，阻塞装置的作用在于，当把包含欲转染肝细胞的核酸的液体制剂在高压下导入肝脏时，心脏基本上与该液体分离。这意味着心脏不会因暴露于高压液体而受到损伤，还意味着在肝脏递送位点处的压力使得肝细胞摄入的核酸足以实现成功的基因治疗。根据本发明优选阻塞左肝静脉和通过左肝静脉递送。阻塞身体其他器官和区域的流出脉管具有相似的隔离和保护效果，心脏也是如此。

阻塞装置可以采取任何合适的已知形式。例如，构想一种机械扩张结构，如可以采用伞型。尽管如此，优选的阻塞装置包括囊，其设置成可以膨胀而与静脉壁相吻合，例如当用液体优选生理盐水填充时。典型地，囊由四种基本材料类型制成，硅酮、聚氨酯（**PU**）、聚酰胺（**PA**）和橡胶。**PU** 可以用于制作非常吻合的囊。这些可以在低压下膨胀，并具有高膨胀率（可超过直径的 **300** 倍）。囊倾向于依从脉管的形状，而不是迫使脉管符合囊的形状。

PA 可用于制作较高压和较低顺应性的囊。这些倾向于膨胀形成硬囊。这提供了稳固的定位和递送。也可以使用硅酮和橡胶。硅酮和橡胶能提供高膨胀比率并且可以通过浸涂法制作。橡胶和硅酮倾向于比 PU 和 PA 的惰性更低。可以将导管与阻塞装置分开提供，但优选将二者集成在一起提供。

在有些实施方案中，可以应用两个或更多个阻塞装置。例如，这将基本上隔离导入核酸位点处上游和下游的肝静脉。作为替代，可以使用两个阻塞装置，使得第一个（靠近贮器）作为压力障，第二个起到阻塞作用。所以更为顺应的第一个阻塞装置，如更为顺应的囊，吸收注射过程中会诱导的部分压力波；第二个囊仅作为阻塞装置，并使渗漏最小化。当注射过量的 200 或 300 ml 液体时，这样的体系尤其值得采用。

压力发生装置可以采取任何方便的形式，但优选与贮器可操作性连接以便给液体制剂施加压力到预定压力。在一个简便的实例中，贮器包含普通注射器，而压力发生装置包含普通的注射器驱动器。之后可以设定注射器驱动器在预定速率下递送液体制剂，该预定速率将确定在给定导管腔孔、孔径大小等条件下向肝脏施用制剂处的压力。当然也可以构想更为复杂的布局安排，例如可以包括压力传感器来形成反馈回路。贮器可以包括软袋，例如就像生理盐水滴注中所用的，可以向该软袋提供一个护套，可以通过压力发生装置在可控方式下排出液体制剂。可以人工排出液体制剂。

贮器优选采取一或更多注射器的形式。单支注射器可以递送如 300 ml 的较大体积，但在预期压力下采用 2 或 3 支注射器递送液体可能会更加方便，例如每支分别递送 150 ml 或 100 ml。分离的注射器方便核酸和其他物质如治疗活性剂的同时施用。因此优选多个贮器隔室。典型情况下，这些隔室中的液体将被混合，使得沿导管递送的是所有隔室中液体的混合物。因此优选将贮器隔室同时排空，但可以连续排空。将注射器连接到集合装置（manifold）上有助于控制不同液体类型的递送。

优选将压力发生装置调整到能够在足以引起肝细胞摄入核酸的压力下向肝脏递送包含核酸的制剂。适宜的压力包括 10 - 80 mmHg，如 15 - 50 mmHg，优选压力包括 20 - 60 或 30 - 50 mmHg。

可以设置导管基本上沿轴向、基本沿径向、以中间角度或以上方式的任意组合向静脉导入核酸。目前优选采取径向导入，因为这允许将阻塞装置置于导管上导入位

点的上下游,从而使导入位点能够基本上完全隔离出来而不受正常血流的影响。这些注射口的优选部位也有赖于欲转染的细胞的位置。导管的合适尺寸有赖于靶器官或身体区域以及待阻塞的静脉,但方便起见,可以在 **5-10 mm** 范围内,如 **7mm**。

如图所示的导引线,可以方便地如导引导管一样用于定位导管。使用导引导管和导引线在心血管 **PTCA** 和其它囊应用中属于公知技术。导引导管可由编织 **Pebex**、**PU** 或尼龙制成。导引导管在跨心脏交叉 (**transcardio crossing**) 中特别有用。

优选使用超声来提高转染程度。超声源可以设置在处理动物外部,但超声的应用优选在局部,尤其是通过放置超声源在肝脏内,并且优选将其结合在导管内。所以在有些优选实施方案中,导管提供有超声振荡器结构,用它在核酸递送区产生超声震动。例如导管可提供有压电换能器或其阵列。优选超声振荡器设置成产生定向振荡,以便使其定向到靶肝细胞,因而降低了所需能量。

上述装置适用于所有类型的基因治疗,因此期望转入肝脏细胞的核酸可以是适于体内递送核酸至细胞的载体的形式或者可以包含任意的这种载体。适合的载体可以仅仅是裸露的核酸或包裹核酸的脂质体。裸露的核酸,如以质粒的形式,尤为适合细胞转染,并根据本发明优选使用。基于 **Liu** 等人(同上)所用测试质粒的质粒是合适的,正如 **Liu et al.**所示,不需要肝脏特异性启动子,但它可以用于增强基因表达的特异性。

更为复杂但是同样适用于向肝脏递送核酸并因而转染肝脏细胞的载体是病毒载体。病毒非常适合用于基因治疗,因为外来或异源基因或者编码序列可以插入到病毒基因组中。当病毒感染细胞之后,外来核酸被递送到细胞核。尽管病毒能够主动感染细胞,本发明的流体力学核酸递送方法导致“感染”率的显著增强,因而实现增加转染率和基因治疗效率。有至少 **5** 类临床可用的病毒载体,来源于(肿瘤)逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺伴随病毒和疱疹病毒。需要在分裂细胞中保持稳定的遗传改变时优选这些病毒载体,其基因组可以整合到宿主细胞 **DNA** 中(肿瘤逆转录病毒和慢病毒)。提及的其他病毒作为染色体外的附加体保持在细胞核中但能够在非增殖性细胞中介导持续性转基因表达。最为合适的载体有赖于待尝试的具体基因治疗。

方便起见,此处所用术语“基因”用于描述核酸区域,不仅仅是指那些可转录

成 mRNA 并翻译成多肽（结构基因）的核酸区域，也包括那些可转录成 RNA（如 rRNA、tRNA）的核酸区域以及具有调节前两种类型表达的功能的核酸区域。递送到肝脏的核酸优选编码与给定医疗状况治疗（直接或间接）相关的结构基因，但掺入调节区域也是适当的，所述调节区域与细胞中已存在的基因组合能提供治疗利益。

载体的核酸分子典型情况下是 DNA，但也可以是 RNA，例如当载体是 RNA 病毒时。反义分子和 iRNA 可适用于某些治疗方案。非病毒载体可含有 cDNA，核酸可以是线性的也可以是环状的，如与质粒 DNA 一起。DNA 可以是单链也可以是双链。

当核酸编码期望在转染细胞中表达的蛋白质时，典型情况下核酸分子还包含可操作性连接的启动子以及可能的其它调控序列。对于某些载体而言，尤其是病毒载体，核酸也编码结构蛋白质以及参与产生更多载体的其他蛋白质，这些载体继续转染其他细胞，如腺病毒的 gag、pol 和 env 基因。表达载体的设计和构建是本领域技术人员所熟知的，并且在文献中也有详尽描述。

载体（carrier）或制剂化合物可以在治疗之前注射以便冲洗血液或帮助扩张毛细血管，合适的化合物是本领域已知的。

在 Liu 等人（同上）描述的方法中，本方法以及用在这种方法中的装置可以被认为是核酸递送的流体力学方法。换言之，相当大体积的含核酸液体制剂（如 DNA 溶液）被快速导入到静脉中。因此，对于人和大小相当的其他动物而言，100 ml 到 1300 ml 之间的液体制剂可以通过单次、连续或基本连续施用来导入。根据对象的年龄、性别和体质来确定体积，例如一位健康青年男性可接受 800-1300 ml，而一位老年女性可接受 200-600 ml。如实例所示也可使用更小的体积。典型情况下用于人类对象的体积是 50 ml 或以上，优选 75 ml 或以上，更优选 100 或以上，如 150-350 ml。

除了质粒或其它载体以外，液体制剂还可包含任何生理可接受的载体，尤为优选盐水。待递送的核酸浓度将根据建议的治疗而变化，且容易为本领域技术人员所优化。合适的剂量包括每 500 ml 盐水 5 至 50 mg 的质粒，如 10-30 mg；适用于大多数患者的典型剂量是每 500 ml 生理盐水中含有 20 mg 质粒。如实施例所示，更小剂量和体积也是适用的，前面所述体积中优选有 5 mg 或以上，如 5-20 mg。

注射速度取决于所要获得的压力。典型情况下，使用基于注射器的体系，500 ml

含有质粒的盐水可以用 1/2-8 分钟来注射，如 1-3 分钟。明显更大的体积通常需要更长的时间，但比递送时间更重要的是核酸递送时的压力。在如此处所述的封闭液体体系中，贮器中监测的压力将对应肝脏中递送位点处的压力。如实施例所示，特别是使用更小体积时，注射时间可以缩短，如 10-60 秒，优选 15-30 秒，如约 20 秒。

快速递送核酸后，肝静脉在典型情况下维持 2 到 20 分钟的阻塞状态，优选 5-15 分钟，如约 10 分钟。优选逐步减少阻塞，如缓慢将囊排空。

根据另一方面，本发明提供核酸分子在制造药物中的用途，所述药物用于在压力下通过所述身体区域的基本阻塞的流出脉管导入对象的身体区域，以便通过基因治疗来治疗所述对象。

更为具体的是，本发明提供核酸分子在制造药物中的用途，所述药物用于在压力下通过基本阻塞的肝静脉导入对象的肝脏。合适的药物如前所述，典型情况下包含盐水。如此处所论述的，所述核酸可以是裸露的核酸，如质粒或包含在脂质体中的核酸，病毒或其他载体。导入核酸以及含有核酸的药物以便达到给所述对象进行基因治疗的目的，如对象的细胞（如肝细胞）。有很多具体的疗法可按此法进行，包括治疗癌症（一般地，不限于肝脏）、肝硬化和其它肝脏疾病以及那些虽没有通过肝脏显现出来但是可以从转染到肝细胞中核酸所编码的蛋白质在肝脏中产生而获益的疾病。影响其他身体器官和其他身体区域的疾病也可以依照本发明进行治疗。

本发明某些优选实施方案将仅以举例的方式进行描述，并参考如下附图：

图 1 是根据本发明的导管和相连导引线的透视图；

图 2 是穿过图 1 导管的截面图；

图 3 是与图 2 相似但稍有不同实施方案的视图；

图 4 是与图 2 相似的视图，展示膨胀的囊；

图 5a 至 5c 是不同放大水平下展示所用导管的示意截面图；

图 6a 与图 4 相似，展示核酸的加压导入（方便地用圆圈表示）；

图 6b 包括肝细胞转染的一系列三个示意截面图；和

图 7 是穿过根据本发明另一个实施方案的导管的截面图；

图 8a 和 8b 是穿过根据本发明另一实施方案的另一导管的截面图；

图 9a 和 9b 是部分图 8a 和 8b 的放大截面图；

图 10 是根据本发明的注射系统的截面图；

图 11 是经过根据本发明并且如实施例 4 所述的操作之后 7 位患者血清血小板计数的图表；

图 12 的图表基于与图 11 相同的数据，但展示了与基线相比血小板计数的百分比变化。

首先看图 1，可见根据本发明一个实施方案的导管 2，相应的导引线 4 沿轴向穿过其中。导管 2 通常含有外套 6，它被可膨胀的囊 8 沿径向分开。图 1 所示的未膨胀状态下，导管和囊可以轻松地从心脏和上行腔静脉通过下腔静脉。

在最前的体节 6 周围提供标记带 10 以辅助在体内的定位。因此标记带 10 的材料将依赖于所用的成像系统。

图 2 更加详细地显示导管 2，为了清楚略去了导引线。由此可以看出导管 2 包括两个共轴腔 12 和 14。中央腔 12 在导管末端 16 处开口，并且使用中接导引线。外腔 14 通过一系列沿圆周分布的孔 18 与囊 8 的内部相连。由此可以通过外腔 14 注入和抽出盐水对囊 8 进行膨胀和压缩。囊 8 的壁是有弹性的，根据插入的盐水体积，对于成年人来说可以将囊膨胀至直径达约 18 mm，对于儿童来说约 8 mm。这比导管所用之处的肝静脉直径要大。图 4 显示囊 8 处于膨胀状态时的透视图。

图 3 与图 2 相似但显示稍有不同的实施方案。该实施方案与图 2 实施方案的不同之处仅仅在于和图 2 中的囊 8 相比，囊 8 沿纵向伸展。在有些情况下这可能是有利的，因为这明显使与静脉壁的接触面积增大了，因此能够承受更高的压力而不会在给定的膨胀程度下发生滑动。

将另外参考图 5a-5c 和 6a-6b 描述在根据本发明的一种方法中使用上述导管。首先参考图 1、2 和 5a，通过插管器 22 将导引线 4 插入下腔静脉 20 中，然后通过心脏 24 进入上行的腔静脉 26 并进入右侧肝静脉 28 中。然后导管 2 沿导引线直至其顶端 16 位于肝静脉 28 中期望位置。实现这一目的可以通过，例如用超声或其它合适的成像系统来监测导管顶端的标记带 10 的进程。

如图 5 所示，一旦导管顶端 16 达到期望位置，便将盐水泵入外腔 14 以膨胀囊 8

直至它能压迫肝静脉 28 的壁。这便固定了导管 2 在静脉中的位置，并且阻塞了流向心脏 24 的血流。然后可以将导引线 4 完全或者部分撤出。此后通过导管的中央腔 12 在控制压力下将含有用于所需基因治疗的核酸物质的液体制剂注入。在该实施方案中，所需压力可通过使用预先编程的注射器驱动器来获得，尽管如此，还可以构想很多合适的能够实现同样效果的方式。

示意描述的核酸 30 的排出如图 5c 和 6a 所示。通过导管囊 8 阻塞肝静脉 28 将核酸 30 在压力下保持在肝脏中而不让它沿上行的腔静脉 26 流向心脏 24。在一个具体实例中，在约 55 mmHg 的压力下将核酸导入，该压力由囊 8 对静脉 28 壁的作用而保持。

该加压的核酸对肝脏该区域中肝脏细胞 32 的作用是迫使核酸 30 通过肝脏细胞的壁 34，如图 6b 所示，这意味着核酸被细胞 32 吸收，使得核酸能对细胞的蛋白质生产发挥影响。

在一个实施例，所述治疗按照此种方式继续进行 10 分钟，优选 1 到 5 分钟，给药体积在 100 ml 至 1 升之间，这有赖于患者的相对体质。

给药结束以后，典型情况下再过 5-20 分钟后，如 10 分钟，便将导引线 4 沿中央腔 12 向下复位，通过排出其中的盐水让囊 8 缩小。这使得血液以及部分导入的液体流向心脏 24。然后让导管 2 沿导引线 4 滑动将导管 2 移除，最终将导引线 4 移除。

因此，根据所述装置及方法，公开了一种改进的基因治疗方法，该方法在肝脏细胞中表现出显著提高的转染效率。

图 7 表示本发明另一个实施方案。该实施方案中，导管 36 包括三个腔。除了中央导引线腔 38 以外，还有上下侧腔 40、42。下侧腔 40 通过相应的侧孔 48、50 与一对共轴分布的囊 44、46 相通。上侧腔 42 通过一系列侧孔 52 沿径向开口，侧孔 52 与两个囊 44、46 共轴，并且位于二者之间。

图 7 所示导管 36 的使用与先前的实施方案相似，以下除外：由于核酸不是通过导引线腔 38 来给药的，所以没有必要在操作过程中撤出导引线(为了清楚没有示出)。此外，提供两个囊 44、46 可以使得一段肝静脉在上游和下游都被液体隔离，这意味着基因递送完全不受血流影响，并可能意味着与先前的实施方案相比可以安全地使用

更高的给药压力。

本发明的另外实施方案如图 8a 和 b 以及 9a 和 b 所示。在图 9a 和 9c 中，第一个囊 53 可以作为压力障，而第二个囊 54 起阻塞作用。腔被盖以标准止血阀 Y 型连接 (junction) 55。Y 型连接可以插入导引线 and 膨胀口。阀是硅酮密封或“O”环，当端帽缠绕时，其向下关闭到锥上，从而关闭腔。阀阻断了血液和液体沿着用于导引线和核酸递送的中央腔流失。如图 9a 所清楚显示的，双重膨胀腔 56 允许不同的膨胀压力。

图 10 表示根据本发明的一种注射系统 57 的实施方案，其可以在 12 秒内递送 300 ml 液体。提供一个接三个注射器 59 的汇流器 58。

本领域技术人员将会认识到，此处仅仅描述了本发明某些优选的实施方案，在本发明范围内还存在很多可能的变换和改进。例如中央引导导管不是必需的，例如可以使用单轨导管替代。还可以构想，可以用超声波或者其他合适的辐射形式来处理经受所述治疗的细胞，以便增强核酸对它的转染。出于此目的，可以在导管上提供超声波振荡器，如压电振荡器。

在如下实施例中进一步对本发明进行描述：

实施例 1

在重约 40kg 的猪上进行如下操作方案：

将猪进行全身麻醉。将导管插入颈静脉（外颈静脉）。导管有两条通道；一条可带有插管器（如导引线）的中央通道，另一条可以用于膨胀囊的通道。

在图像增强器下将导管沿颈静脉向下推向上腔静脉、右侧心脏、肝上腔静脉直到导管到达三条肝静脉之一为止。出于该试验的目的，左侧肝静脉最为适合。

插入至导管不能进一步前进为止。

然后使囊膨胀以完全封闭肝静脉的腔。

然后除去插管器，在压力下、在一或两分钟之内快速注射核酸。注射体积为 500—1000 ml。

保持处于膨胀状态约 10 分钟，然后缓慢将其压缩并移除导管。

然后停止麻醉，动物苏醒。连续验血 3 周来检查任何毒性、肝损害以及基因表达。

这些试验已经表明该技术是安全的。肝功能测试保持正常并且动物保持良好健康。还观察到了显著的基因表达。

实施例 2

在本试验中，质粒 pDERM II 在肝特异性启动子控制下表达大鼠 TPO（血小板生成素），在下腔静脉（IVC）阻塞之后将该质粒注射到大鼠肝静脉中，和静脉注射入大鼠尾静脉内（对照）。给 400 g 重的大鼠注射 100 µg 质粒。在肝静脉与 IVC 连接处或紧接的上方钳住 IVC。

TPO 通常在肝脏中产生并且对骨髓发挥作用，在骨髓中它刺激巨核细胞产生血小板。在 7 只大鼠中对 1 ml 体循环的血液中血小板（PLT）和白细胞（WBC）进行计数，并计算每组的平均值。结果如下面表 1 所示，所有值以千计。

表1

第7天	对照		pDERM TPO	
	PLT	WBC	PLT	WBC
	1239	5, 5	1416	7, 8
	895	6, 7	1388	7, 9
	926	6, 8	1449	7, 4
			1411	7, 4
	987	6	1416	7, 6

这些结果表明当应用肝静脉流体力学注射时 TPO 水平，即质粒转染效率，更高。

实施例 3

背景

患有丙型肝炎、肝硬化的患者遭受血小板减少（即血小板计数偏低）。血小板生成素（TPO）由肝脏分泌并随循环到达骨髓，促使巨核细胞成熟并引起血小板的释放。

患有肝硬化的患者 **TPO** 生成低下，建议用基因治疗来增强 **TPO** 生成以便让血小板计数水平回复到正常水平。

开始临床研究之前，我们应用本发明的流体力学技术在猪中研究了该方法的可行性。

动物和方法

研究中使用了四只猪（体重中值为 **50 kg**）。基因治疗注射之前它们经过了血液学、生化（肝功能检验、尿素、电解质以及血清甲胎蛋白测量）、以及放射检查（超声波扫描）。

在全省麻醉和气管内插管条件下，导管沿着颈内静脉插入肝静脉。为了确认导管囊完全阻塞肝静脉并且不允许流向腔静脉的回流，在囊膨胀之后向导管注射造影剂。

给三只猪注射溶于普通盐水的在肝特异性启动子控制下编码人 **TPO** 的质粒。经 **20** 秒注射入已阻塞的肝区段。将 **TPO** 质粒按照 **200 ml** 普通盐水中溶解 **10 mg TPO** 质粒的剂量注射。给第四只猪注射编码 **lac Z** 的质粒，用 **beta** 半乳糖染色法时可以产生蓝色。

对每一例进行单次注射。为了评价血液学、生化和肝脏参数，进行注射后的血液检测。

结果

表2

猪A		第0天	第2天	第3天	第3天	第7天	第13天
血小板	10.9/L	280			355	330	340
白细胞	10.9/L	8			22	18	18
总胆红素	umol/L	16.8	10.1	10.7	6		
胆红素	umol/L	4.2	7	3.7	2.6		
ASAT (TGO)	umol/L	47	44	70	55		
ALAT (TGP)	umol/L	38	45	46	46		
γ GT	UI/L	20	24	34	26		
Ph. Alc.	UI/L	128	113	91	78		
总蛋白质	g/L	58	64	64	64		
白蛋白	g/L	21	23	23	23		
淀粉酶	UI/L	1097	1148	1022	1082		
钠	mmol/L	141	141	141	139		
钾	mmol/L	3	3.8	3.7	3.6		
氯	mmol/L	98	101	102	101		
葡萄糖	mmol/L-(gr/L)	5 (0.9)	5.8(1.04)	4.9(0.88)	4.9(0.88)		
尿素	mmol/L	3.2	4.5	2.7	2.6		
肌酸	umol/L-(mg/L)	67 (7.6)	89(10.1)	95(10.7)	91(10;3)		

表3

猪B		第0天	第0天	第3天	第3天	第7天	第13天
血小板	10.9/L	560	340	424	402	622	413
白细胞	10.9/L	9.9	10.2	26.5	25.8	15.1	19.6
红细胞	10.12/L	4.93	5.11	5.03	5.06	5.63	5.38
血细胞比容	%	26	27	27	26	29	28
血红蛋白	g/dl	8.8	9.1	9	9.1	10.2	9.6
凝血酶原	%	98	98	100	ND	ND	ND
纤维蛋白原	g/L	2.05	2.17	2.63	ND	ND	ND
总胆红素	umol/L	8.7	8.6	ND	5.6	ND	ND
胆红素(结合)	umol/L	2.8	2.8	ND	2.5	ND	ND
ASAT (TGO)	umol/L	29	29	ND	42	ND	ND
ALAT (TGP)	umol/L	31	31	ND	39	ND	ND
γ GT	U/L	19	20	ND	80	ND	ND
Ph. Alc.	U/L	157	159	ND	106	ND	ND
总蛋白质	g/L	58	58	ND	71	ND	ND
白蛋白	g/L	19	19	ND	21	ND	ND
淀粉酶	U/L	910	914	ND	998	ND	ND

表4

猪B	第0天	第0天	第3天	第3天	第7天	第13天
血小板 10.9/L	520	528	474	431	679	617
白细胞 10.9/L	14.4	14.4	32.3	27.6	27.8	25
红细胞 10.12/L	5.5	5.55	5.56	5.59	5.92	5.94
血细胞比容 %	26	27	26	27	29	28
血红蛋白 g/dl	8.8	8.8	8.9	8.8	9.6	9.6
凝血酶原 %	100	100	100	ND	ND	ND
纤维蛋白原 g/L	2.41	2.44	3.74	ND	ND	ND
总胆红素 umol/L	9.8	9.5	ND	5.8	ND	ND
胆红素(结合) umol/L	2.9	3	ND	2.4	ND	ND
ASAT (TGO) umol/L	26	25	ND	35	ND	ND
ALAT (TGP) umol/L	29	32	ND	36	ND	ND
γ GT UI/L	22	22	ND	30	ND	ND
Ph. Alc. UI/L	180	182	ND	106	ND	ND
总蛋白质 g/L	63	62	ND	69	ND	ND
白蛋白 g/L	19	18	ND	19	ND	ND
淀粉酶 UI/L	1692	1672	ND	1541	ND	ND

如表所示，该操作过程中没有伴随并发症。肝功能检验中没有显著变化，血小板和白细胞计数都有所升高。

注射质粒 **lac Z** 后，肝脏中显示的蓝色进一步证实转染成功。

根据本发明方法以 **50 mg** 剂量和超过 **50 ml** 体积中注射的质粒 **TPO** 可导致血清血小板和白细胞的计数增加。建议此方法可用于所有形式的肝脏基因治疗。

实施例 4

背景

在前面的临床前模型中我们已经表明，不使用本发明的流体力学技术很难显著提高 **TPO** 水平。实施例 3 表明我们的流体力学技术可以在大动物如猪（体重超过 **50kg**）中显著提高 **TPO** 生成。

所以启动了对患有血小板减少症的患者进行临床研究，用以揭示通过本发明的流体力学技术注射质粒 **TPO** 基因治疗是否能够提高血小板计数。

患者和方法

对七位患者（两位男性和五位女性）进行研究，年龄的中值为 **52** 岁。基因治疗注射前，他们要经过血液学（全血计数）、生化（肝功能检测、尿素、电解质以及血清甲胎蛋白）以及放射检查（超声波和 **CT** 扫描）。

签署知情同意后，在局部麻醉条件下，沿股静脉将导管插入肝静脉。为了确认导管囊已经完全阻塞肝静脉并且没有流向腔静脉的回流，在囊膨胀之后向导管注射造影剂。

用 **20** 秒的时间将溶于普通盐水的质粒 **TPO** 注射入已阻塞的肝区段。手工进行快速、强力的注射。患者 **1**、**2** 和 **3** 的 **TPO** 质粒注射剂量为 **1 mg**，溶液体积分别为 **50 ml**、**75 ml** 和 **100 ml**。给患者 **4** 注射 **2 mg**，体积为 **150 ml**。给患者 **5** 和 **6** 注射 **5 mg**，体积分别为 **150 ml** 和 **200 ml**。给第七位患者注射 **10 mg**，体积为 **200 ml**；给第八位患者注射 **10 mg**，体积为 **250 ml**。注射之后 **5** 分钟将囊排空，随后移除导管。患者在完成该操作 **2** 小时之后就回家了。对每一例进行单次注射。

为了评价血液学、生化和肝脏参数，进行注射后的血液检测。

结果

该操作没有伴随并发症。没有发生发热或发冷。仅在插入导管过程中腹股沟处有轻微疼痛。肝功能检测中没有变化。图 **11** 表示前七位患者的血清血小板计数。图 **12** 表示与基线相比的血小板计数的百分比变化。这些结果表明前四位接受 **1** 或 **2 mg** 质粒 **TPO** 的患者的血小板计数没有变化。另一方面非常清楚地表明，接受 **5** 和 **10 mg** 的患者 **5**、**6** 和 **7** 的血小板计数增加了 **40%** 到 **60%**，且这一增长持续 **3** 周以上。

结论

根据本发明方法以 **5 mg** 及以上剂量和超过 **50 ml** 体积注射的质粒 **TPO** 可导致血清血小板计数增加。此方法潜在性地可用于所有形式的肝脏基因治疗。

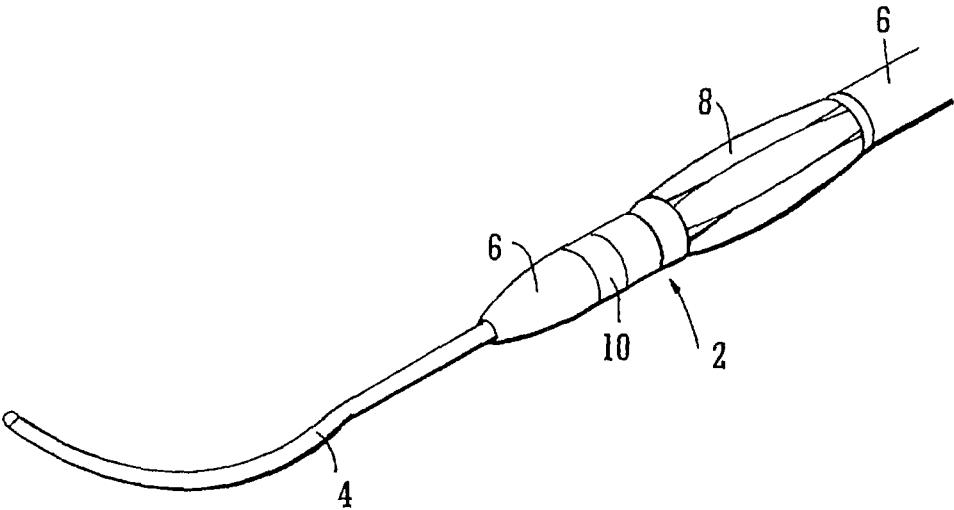


图1

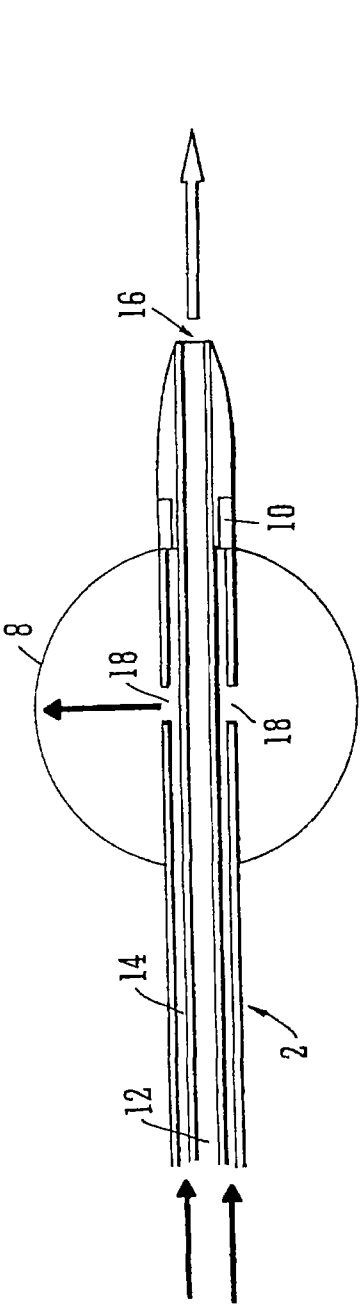


图2

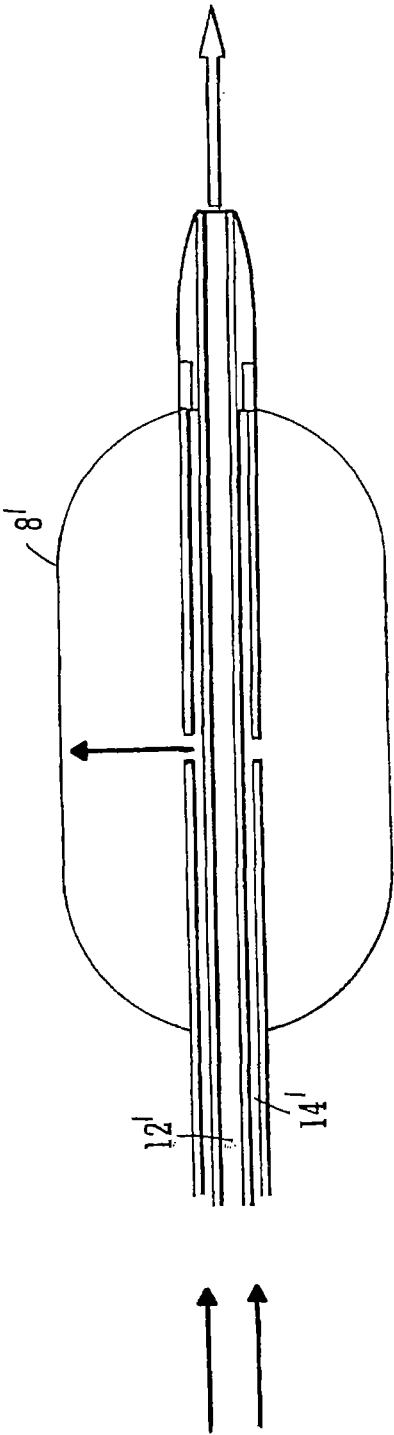


图3

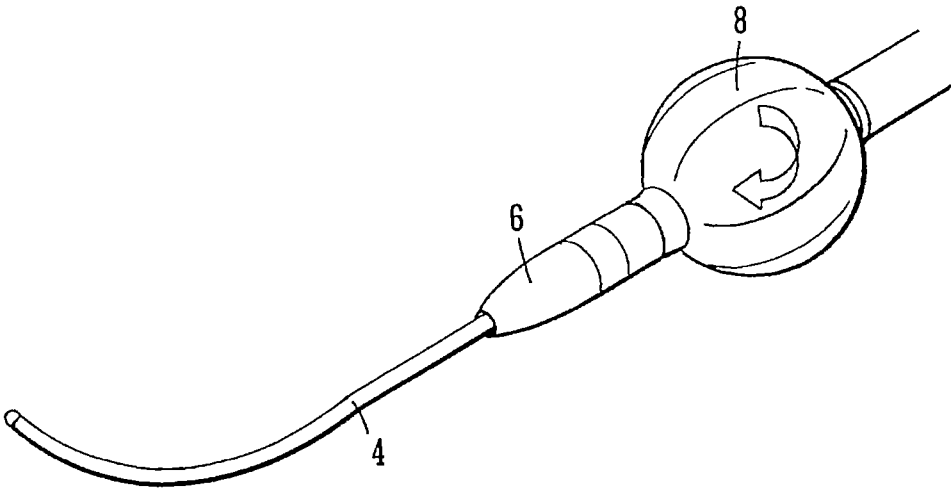


图4

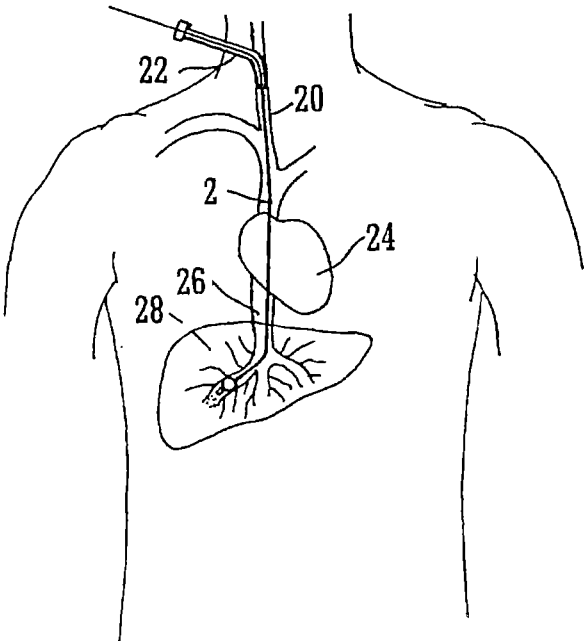


图5A

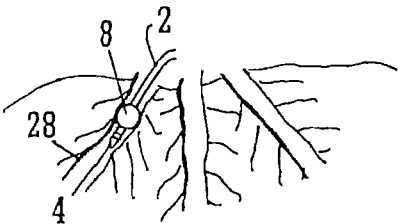


图5B

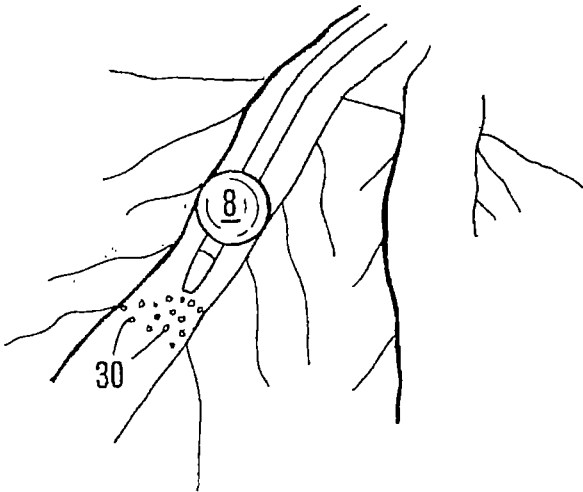


图5C

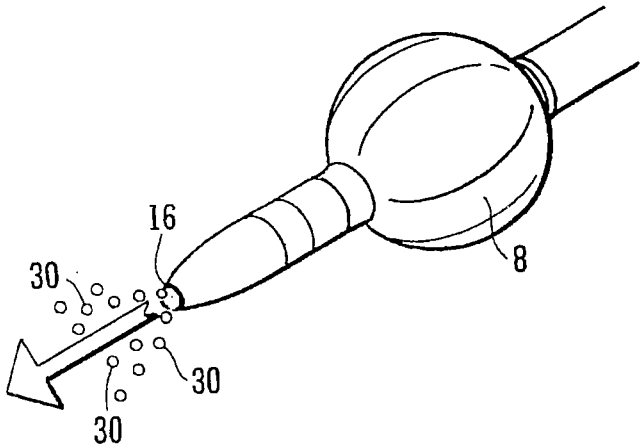


图6A

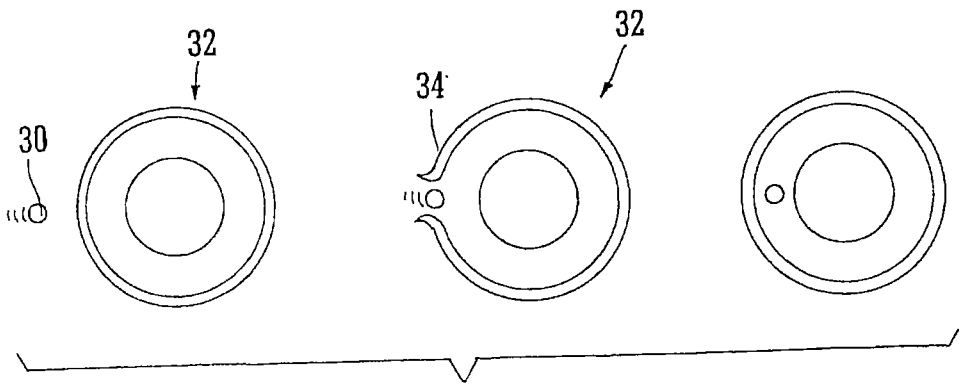


图6B

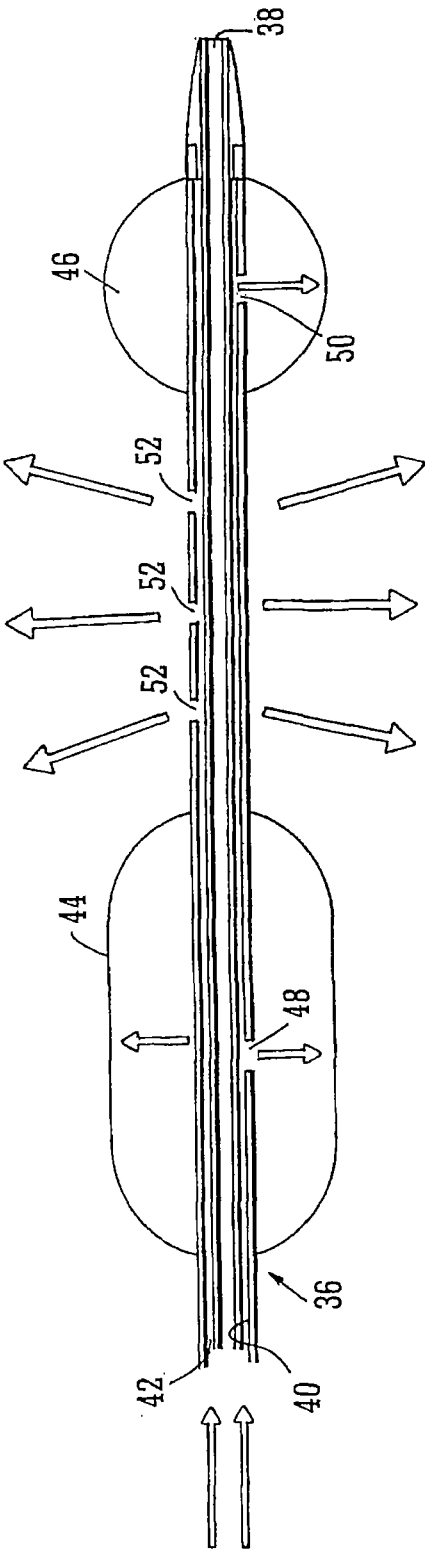
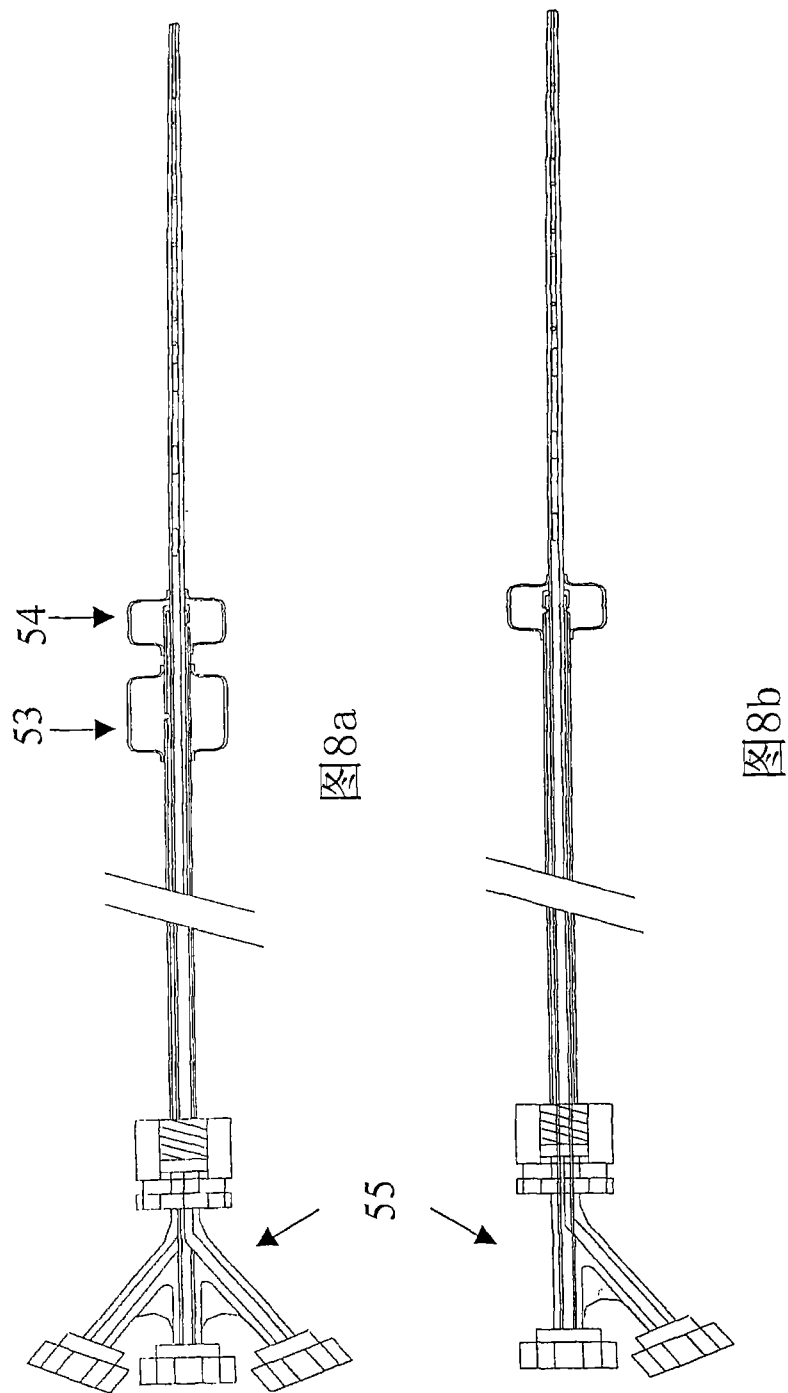
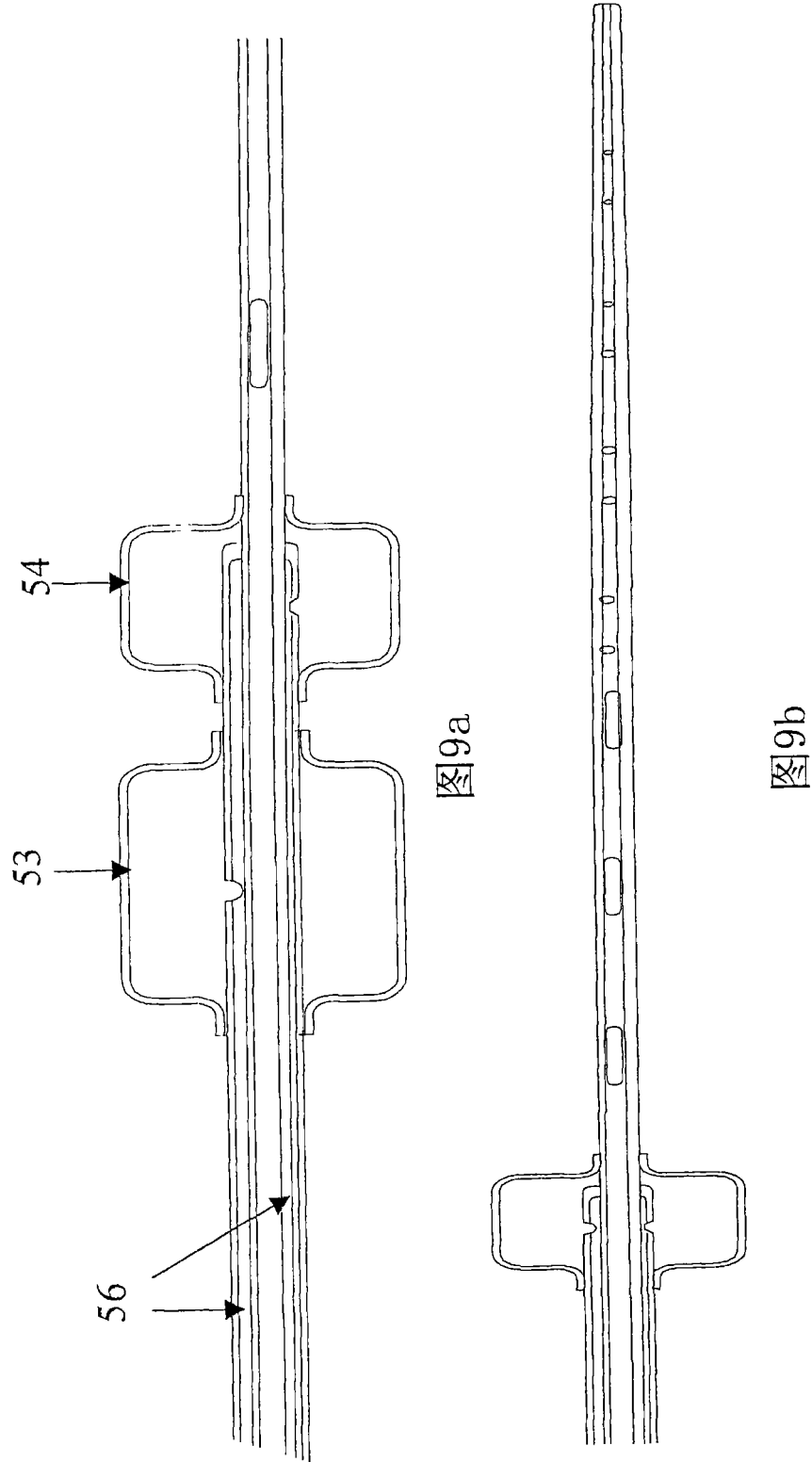
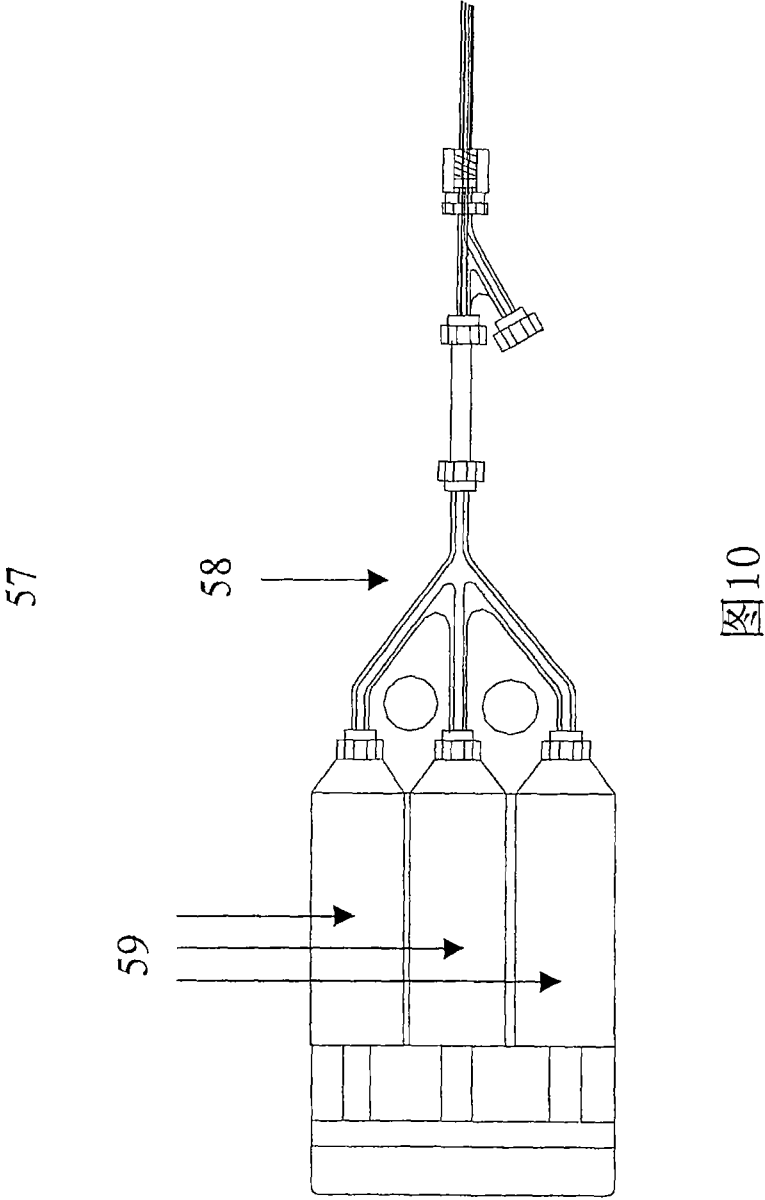


图7







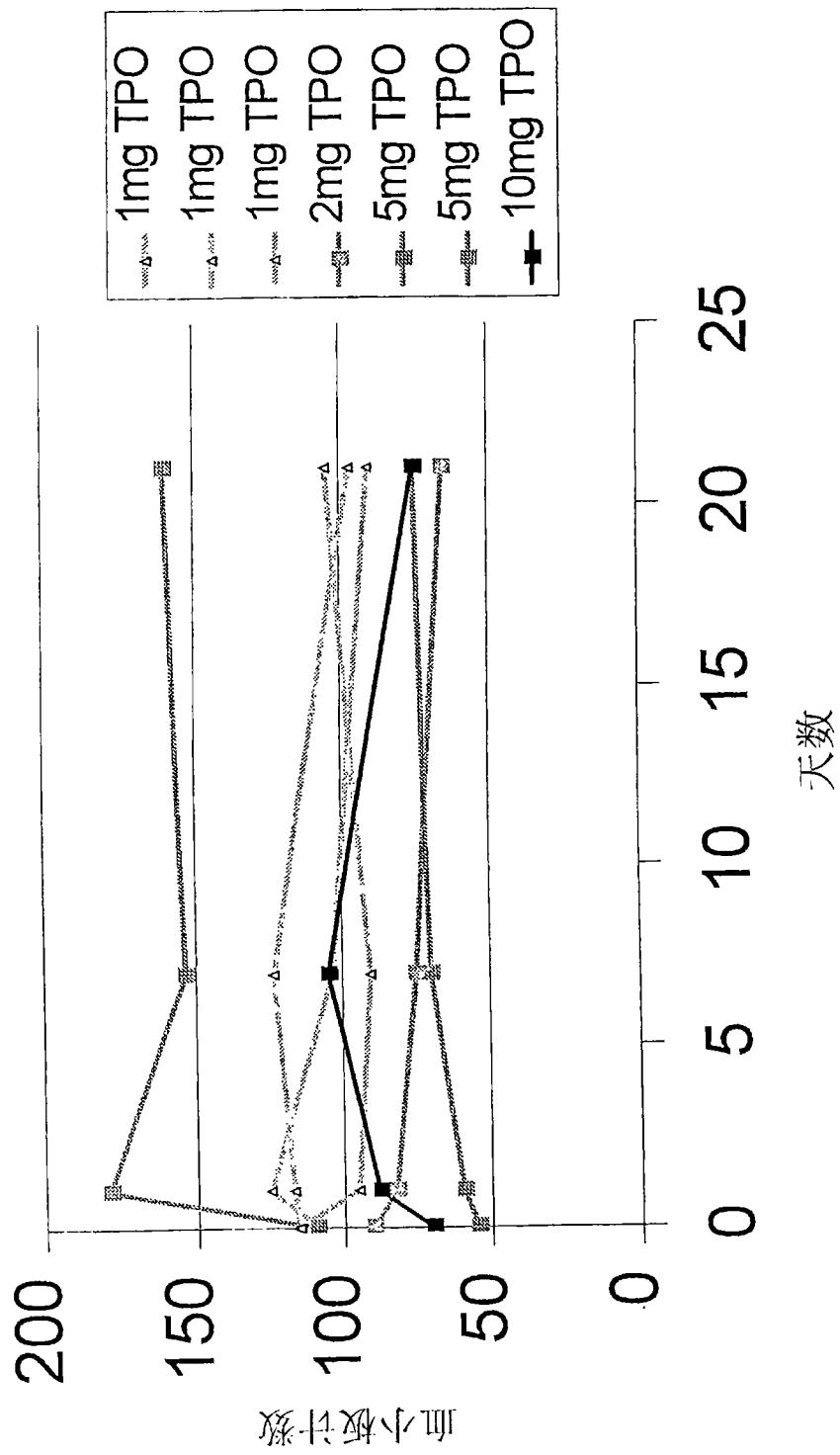
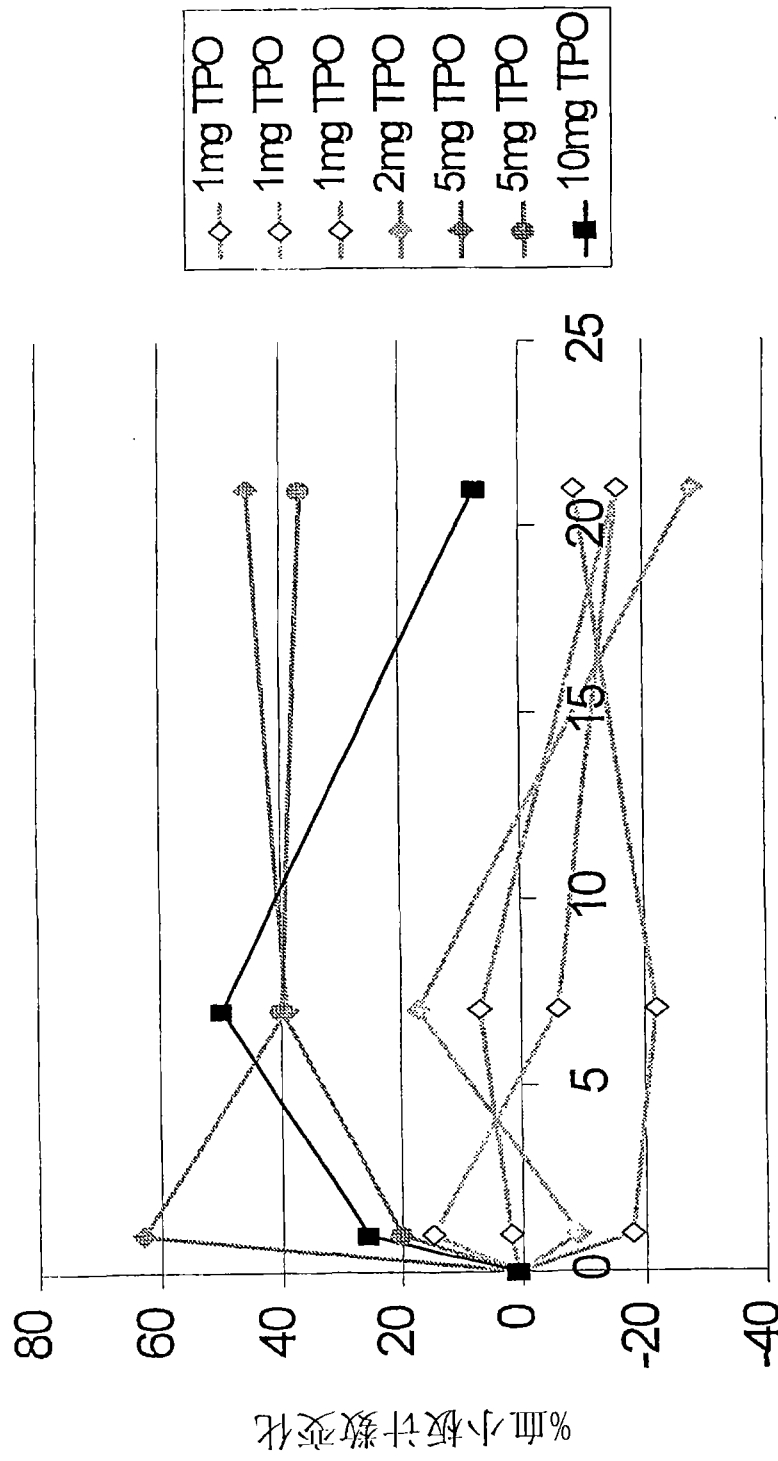


图11



天数

图12