



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108310396 B

(45) 授权公告日 2022. 07. 15

(21) 申请号 201810214134.1  
(22) 申请日 2013.02.13  
(65) 同一申请的已公布的文献号  
    申请公布号 CN 108310396 A  
(43) 申请公布日 2018.07.24  
(30) 优先权数据  
    61/598,772 2012.02.14 US  
(62) 分案原申请数据  
    201380019909.5 2013.02.13  
(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会  
    地址 美国加利福尼亚州  
(72) 发明人 H·K·哈蒙德 高美华  
(74) 专利代理机构 青岛联智专利商标事务所有  
    限公司 37101  
    专利代理师 阎斌斌 刘丹丹  
(51) Int. Cl.  
    A61K 48/00 (2006.01)  
    A61K 31/436 (2006.01)

A61K 31/65 (2006.01)  
A61K 38/22 (2006.01)  
A61K 38/25 (2006.01)  
A61K 38/30 (2006.01)  
A61K 38/52 (2006.01)  
A61K 47/69 (2017.01)  
C07K 14/075 (2006.01)  
C07K 14/575 (2006.01)  
C07K 14/65 (2006.01)  
C12N 15/86 (2006.01)  
C12N 15/861 (2006.01)  
A61P 9/04 (2006.01)  
A61P 3/10 (2006.01)  
A61P 3/04 (2006.01)

(56) 对比文件  
M Johnson-Saliba等.Gene therapy:  
optimising DNA delivery to the nucleus.  
《Curr. Drug. Targets》.2001,第2卷(第4期),  
第371-399页.

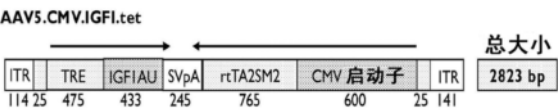
审查员 王冠男

权利要求书1页 说明书44页 附图12页

(54) 发明名称  
用于心血管疾病和其它病况的旁分泌基因的  
全身性递送和受调节的表达

(57) 摘要  
本发明提供了用于治疗、改善或防止(预防)  
个体或患者的对体内升高的旁分泌多肽水平有  
反应的疾病、感染或病况的方法,所述方法包括:  
提供可操作地连接到转录调节序列的编码旁分  
泌多肽的核酸或基因;或其中已含有编码旁分泌  
的核酸或基因的表达运载体、载体、重组病毒或  
等同物,并且所述表达运载体、载体、重组病毒或  
等同物能够在细胞中或体内表达所述编码旁分  
泌的核酸或基因;以及向有需要的个体或患者施  
用或递送可操作地连接到转录调节序列的所述  
编码旁分泌多肽的核酸或基因,或所述表达运  
载体、载体、重组病毒或等同物,从而治疗、改善或

防止(预防)所述个体或患者的对升高的旁分泌  
多肽水平有反应的所述疾病、感染或病况。



1. 其中已含有操作性地连接到肝脏特异性启动子的编码尿皮质素-2的核酸的腺相关病毒AAV8或AAV9载体在制备用于在患者或个体中增强或改善心脏功能或治疗充血性心力衰竭,或在II型糖尿病患者或个体中降低血糖的药物中的用途,

其中所述AAV载体被制备为通过静脉内注射被施用或递送至有需要的个体或患者,从而在所述患者或个体中增强或改善心脏功能、治疗充血性心力衰竭、或降低血糖。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述启动子是鸡 $\beta$ -肌动蛋白启动子。

3. 如权利要求1所述的用途,其中所述编码尿皮质素-2的核酸操作性地连接到受调节的启动子或可诱导的启动子。

4. 如权利要求3所述的用途,

其中,转录和/或翻译的正调控因子激活子和/或负调控因子阻遏子操作性地连接到所述编码尿皮质素-2的核酸。

5. 如权利要求1所述的用途,其中将所述AAV载体配制成药物或配制成无菌的。

6. 如权利要求1所述的用途,其中所述患者或个体患有2型糖尿病;2型糖尿病和心力衰竭或受损的左心室功能;充血性心力衰竭;或受损的左心室功能。

## 用于心血管疾病和其它病况的旁分泌基因的全身性递送和受调节的表达

[0001] 本申请是申请日为2013年2月13日、申请人为加利福尼亚大学董事会、发明名称为“用于心血管疾病和其它病况的旁分泌基因的全身性递送和受调节 的表达”的中国专利申请201380019909.5的分案申请。

[0002] 关于对根据联邦政府资助的研究作出的本发明的权利的声明

[0003] 本发明是在政府支持下根据国家卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 的DHHS授予的拨款号HL088426作出的。政府拥有本发明的某些权利。

### 技术领域

[0004] 本发明涉及细胞和分子生物学以及医学。本发明提供了组合物以及体外和 离体方法。在替代性实施方案中,本发明提供了用于治疗、改善或防止(预防) 个体或患者的对体内升高或持续的旁分泌多肽水平有反应的疾病、感染或病况 的方法,所述方法包括:提供可操作地连接到转录调节序列的编码旁分泌多肽 的核酸或基因;或其中已含有编码旁分泌的核酸、基因、转录物或信使的表达 运载体(vehicle)、载体、重组病毒或等同物,并且所述表达运载体、载体、重 组病毒或等同物能够在细胞中或体内表达所述编码旁分泌的核酸、基因、转录 物或信使;以及向有需要的个体或患者施用或递送可操作地连接到转录调 节序 列的所述编码旁分泌多肽的核酸、基因、转录物或信使,或所述表达运载体、载体、重 组病毒或等同物,从而治疗、改善或防止(预防)所述个体或患者的对升 高的旁分泌多肽水 平有反应的所述疾病、感染或病况。

### 背景技术

[0005] 最近,已显示,静脉内注射编码血友病B中缺乏的人类因子IX的病毒载体 使得患有血友病B的受试者的血清中因子IX的浓度升高到降低了所述受试者对 外源性因子IX输 注的需求的程度。然而:1) 这种蛋白质并不处在受调节的表达 之下,并且因此,不能够对血 清中所述转基因的水平进行最佳的调控;2) 这种系 统未提供在不希望或出乎意料的作用 的情况下关闭转基因表达的手段;以及3) 所述基因,即因子IX不是旁分泌基因,并且不具 有有益的心血管作用,并且因 此,不能用于治疗心脏病。

### 发明内容

[0006] 本发明提供了用于治疗、改善或防止(预防)个体或患者的对体内升高的旁分 泌多肽水平有反应的任何疾病、感染或病况的方法。在替代性实施方案中,本 发明提供了用 于治疗、改善或防止(预防)对体内升高或持续的肽或旁分泌多肽水 平有反应的疾病、感染 或病况的方法,所述方法包括:

[0007] (a) (i) 提供可操作地连接到转录调节序列的编码旁分泌多肽的核酸或基因; 或其中已含有编码旁分泌的核酸或基因或者表达旁分泌多肽的核酸、转录物或 信使的表达 运载体、载体、重组病毒或等同物,并且所述表达运载体、载体、重组病毒或等同物能够在

细胞中或体内表达所述编码旁分泌的核酸、基因、转录物或信使；以及

[0008] (ii) 向所述细胞或者有需要的个体或患者施用或递送可操作地连接到转录调节序列的所述编码旁分泌多肽的核酸、基因、转录物或信使、或者所述表达运载体、载体、重组病毒或等同物，

[0009] 从而治疗、改善或防止(预防)所述个体或患者的对升高或持续的旁分泌多肽水平有反应的所述疾病、感染或病况；

[0010] (b) (a) 的方法，其中所述表达运载体、载体、重组病毒或等同物是或包括：

[0011] 腺相关病毒(AAV)、慢病毒载体或腺病毒载体，

[0012] AAV血清型AAV5、AAV6、AAV8或AAV9，

[0013] 源自恒河猴的AAV、或源自恒河猴的AAV AAVrh.10hCLN2，

[0014] AAV衣壳突变体或AAV杂合体血清型，

[0015] 嗜器官性AAV、或嗜心性AAV、或嗜心性AAVM41突变体，

[0016] 其中任选地，将所述AAV工程化以提高靶向对野生型(wt) AAV不许可的特定细胞类型的效率和/或提高仅感染所关注的细胞类型的功效，

[0017] 并且任选地，通过一种或多种修饰将杂合体AAV重新定向或工程化成杂交体血清型，所述一种或多种修饰包括：1) 衣壳转移；2) 使双特异性抗体吸附至衣壳表面；3) 将镶嵌型衣壳工程化；和/或4) 将嵌合型衣壳工程化；

[0018] (c) (a) 的方法，其中所述编码旁分泌的核酸、基因、转录物或信使被可操作地连接到受调节的或可诱导的转录调节序列；

[0019] (d) (c) 的方法，其中所述受调节的或可诱导的转录调节序列是受调节的启动子或可诱导的启动子，

[0020] 其中任选地，转录和/或翻译的正调控因子(激活子)和/或负调控因子(阻遏子)可操作地连接到所述编码旁分泌多肽的核酸、基因、转录物或信使；

[0021] (e) (a) 至(d) 中任一项的方法，其中向有需要的个体或患者施用可操作地连接到转录调节序列的所述编码旁分泌多肽的核酸、基因、转录物或信使、或所述表达运载体、载体、重组病毒或等同物使得旁分泌蛋白被释放到血流或周身循环中，或使得所述旁分泌蛋白在细胞中的表达增加或持续，

[0022] 其中任选地，所述旁分泌蛋白的释放或者所述旁分泌蛋白的表达增加或持续是依赖于可诱导的启动子的激活或阻遏子的去阻遏，所述可诱导的启动子和阻遏子可操作地连接到所述编码旁分泌多肽的核酸、基因、转录物或信使；或

[0023] (f) (a) 至(e) 中任一项的方法，其中对体内升高的旁分泌多肽水平有反应的所述疾病、感染或病况是心脏收缩功能障碍；充血性心力衰竭(CHF)；心脏纤维化(cardiac fibrosis)；心肌细胞疾病、功能障碍或细胞凋亡；肺动脉高压；心脏、皮肤、肝脏、肺、肌肉、神经、脑或肾脏疾病、癌症或功能障碍；癌症或瘤形成；或者血友病或血友病B。

[0024] 在本发明的方法的替代性实施方案中：

[0025] (a) 通过口服、肌内(IM)注射、通过静脉内(IV)注射、通过皮下(SC)注射或真皮内注射、通过鞘内注射、通过动脉内(IA)注射、通过冠状动脉内注射、通过吸入或通过生物射弹粒子递送系统、或使用“基因枪”、气手枪或HELIOS™基因枪(加利福尼亚州赫拉克勒斯的伯乐实验室公司(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA))向有需要的个体或患者施用或

递送可操作地连接到所述转录调节序列的所述编码旁分泌的核酸或基因;或者所述表达运载体、载体、重组病毒或等同物;或者

[0026] (b) 通过引入到体内靠近血流或由血流引流的任何组织或体液间隙中向有需要的所述个体或患者施用或递送可操作地连接到所述转录调节序列的所述编码旁分泌的核酸或基因;或所述表达运载体、载体、重组病毒或等同物,从而使 得该所编码的蛋白质可以由所述组织中的细胞分泌并且被释放到所述血流中。

[0027] 在本发明的方法的替代性实施方案中:所述旁分泌多肽或肽是或包括:哺乳动物强心肽、生长因子、重组人松弛素-2 (Serelaxin)、松弛素-2、尿皮质素-2 (Urocortin-2, UCN-2)、尿皮质素-1 (UCN-1)、尿皮质素-3 (UCN-3)、脑利钠肽、前列环素合酶、生长激素、胰岛素样生长因子-1或其任何组合;或人强心肽、人生长因子、重组人松弛素-2、松弛素-2、尿皮质素-2、尿皮质素-1、尿皮质素-3、脑利钠肽、前列环素合酶、生长激素、胰岛素样生长因子-11或其任何组合。

[0028] 在本发明的方法的替代性实施方案中:所述旁分泌多肽是尿皮质素、尿皮质素-2、尿皮质素-1、尿皮质素-3、松弛素-2或脑利钠肽,并且所述疾病或病况是充血性心力衰竭(CHF);或所述旁分泌多肽是前列环素合酶并且所述疾病或病况是肺动脉高压,以及所述疾病或病况是充血性心力衰竭(CHF);或所述旁分泌多肽是前列环素合酶并且所述疾病或病况是肺动脉高压。

[0029] 在本发明的方法的替代性实施方案中:

[0030] (a) 向所述个体、患者或受试者施予刺激或信号,所述刺激或信号诱导所述表达旁分泌的核酸或基因表达,或者诱导或激活诱导所述表达旁分泌的核酸或基因表达的启动子(例如可操作地连接到所述旁分泌表达核酸或基因);

[0031] (b) 向所述个体、患者或受试者施予刺激或信号,所述刺激或信号诱导启动子,任选地表达旁分泌的核酸或基因特异性启动子(例如可操作地连接到所述表达旁分泌的核酸或基因),的激活子的合成;

[0032] (c) 向所述个体、患者或受试者施予刺激或信号,所述刺激或信号诱导所述表达旁分泌的核酸或基因或者所述表达旁分泌的核酸或基因特异性启动子的天然激活子或合成激活子的合成,

[0033] 其中任选地,所述天然激活子是内源性转录因子;

[0034] (d) (c) 的方法,其中所述合成激活子是被设计成特异性并且选择性地启动内源性或外源性靶标基因的锌指DNA结合蛋白,其中任选地,所述内源性靶标是表达基因旁分泌的核酸或基因、或者表达旁分泌的核酸或基因的激活子、或者可操作地连接到表达旁分泌的核酸或基因的启动子的激活子;

[0035] (e) (a) 至 (c) 中任一项的方法,其中所述刺激或信号包括生物刺激或信号、光刺激或信号、化学品刺激或信号或药物刺激或信号;

[0036] (f) 向所述个体、患者或受试者施予刺激或信号,所述刺激或信号刺激或诱导表达旁分泌的核酸或基因的转录后激活子的表达或可操作地连接到表达旁分泌的核酸或基因的启动子的激活子的表达,或

[0037] (g) 向所述个体、患者或受试者施予刺激或信号,所述刺激或信号抑制表达旁分泌的核酸或基因的转录阻遏子或转录后阻遏子或诱导对表达旁分泌的核酸或基因的转录

阻遏子或转录后阻遏子的抑制。

[0038] 在本发明的方法的替代性实施方案中:诱导所述表达旁分泌的核酸或基因 表达,或者诱导可操作地连接到所述表达旁分泌的核酸或基因的所述受调节启动子或可诱导的启动子表达的化学品或药物是口服抗生素、多西环素 (doxycycline) 或雷帕霉素 (rapamycin);或使用利用多西环素的tet调节系统来诱导所述表达旁分泌的核酸或基因或者其等同物的表达。

[0039] 在本发明方法的替代性实施方案中:将所述表达旁分泌的核酸或基因或者 所述表达运载体、载体、重组病毒或等同物配制成液体、凝胶、水凝胶、粉剂 或水性制剂。

[0040] 在本发明方法的替代性实施方案中:将所述表达旁分泌的核酸或基因或者 所述表达运载体、载体、重组病毒或等同物或者所述尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多 肽配制于囊泡、脂质体、纳米粒子或纳米脂质粒子 (NLP) 或等同物中,或者将其 配制用于使用囊泡、脂质体、纳米粒子或纳米脂质粒子 (NLP) 或等同物递送。

[0041] 在本发明方法的替代性实施方案中:将所述表达旁分泌的核酸或基因或者 所述表达运载体、载体、重组病毒或等同物配制于、或插入或转染到分离的或 培养的细胞中,并且任选地,所述细胞是哺乳动物细胞、心脏细胞、或人细胞、非人灵长类动物细胞、猴细胞、小鼠细胞、大鼠细胞、豚鼠细胞、兔细胞、仓 鼠细胞、山羊细胞、牛细胞、马细胞、绵羊细胞、犬科动物 (canine) 细胞或猫 科动物 (feline) 细胞。

[0042] 在本发明方法的替代性实施方案中:将所述表达旁分泌的核酸或基因或者 所述表达运载体、载体、重组病毒或等同物或者所述尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多 肽配制成药物或无菌制剂。

[0043] 在本发明方法的替代性实施方案中:将所述表达旁分泌的核酸或基因或者 所述表达运载体、载体、重组病毒或等同物或者所述尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多 肽与制品、人工器官或植入物一起、在所述制品、人工器官或植入物上或者联 同所述制品、人工器官或植入物来配制或递送。

[0044] 在本发明方法的替代性实施方案中:所述表达旁分泌的核酸或基因或者所 述表达运载体、载体、重组病毒或等同物在体外或离体表达旁分泌多肽。

[0045] 在替代性实施方案中,本发明提供了用于治疗、改善或防止(预防)个体或患 者的旁分泌反应性病变、感染、疾病、病症或病况的方法,所述方法包括实施 本发明的方法。

[0046] 在替代性实施方案中,本发明提供了用于治疗、改善或防止(预防)以下疾病 的方法:心脏收缩功能障碍;充血性心力衰竭 (CHF);心脏纤维化;心肌细胞疾 病、功能障碍或细胞凋亡;肺动脉高压;心脏、皮肤、肝脏、肺、肌肉、神经、脑或肾脏的疾病、癌症或功能障碍; 癌症或瘤形成;或者血友病或血友病B,所 述方法包括实施本发明的方法。

[0047] 在替代性实施方案中,本发明提供了治疗、改善或防止(预防)患者或个体的 糖尿病或糖尿病前期的方法,所述方法包括:

[0048] (a) 实施本发明的方法,其中所述旁分泌多肽或肽包含尿皮质素-2 (UCn-2) 或 由尿皮质素-2 (UCn-2) 组成;以及

[0049] (b) 向有需要的个体或患者施用尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽,或者编码尿皮 质素-2 (UCn-2) 的核酸、基因、信使或转录物,

[0050] 其中任选地,所述尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽是分离的、重组的、合成的 和/或

拟肽(peptidomimetic)的肽或多肽或者其变体,

[0051] 从而治疗、改善或防止(预防)所述患者或个体的糖尿病或糖尿病前期。

[0052] 在替代性实施方案中,本发明提供了治疗、改善或防止(预防)患者或个体的肥胖症的方法,所述方法包括:

[0053] (a)实施本发明的方法,其中所述旁分泌多肽或肽包含尿皮质素-2 (UCn-2) 或由尿皮质素-2 (UCn-2) 组成;以及

[0054] (b)向有需要的个体或患者施用尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽,或者编码尿皮质素-2 (UCn-2) 的核酸、基因、信使或转录物,

[0055] 其中任选地,所述尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽是分离的、重组的、合成的和/或拟肽的肽或多肽或者其变体,

[0056] 从而治疗、改善或防止(预防)所述患者或个体的肥胖症。

[0057] 在替代性实施方案中,本发明提供了在患者或个体中抑制体重增加、或抑制食欲、或刺激或引发体重减轻的方法,所述方法包括:

[0058] (a)实施本发明的方法,其中所述旁分泌多肽或肽包含尿皮质素-2 (UCn-2) 或由尿皮质素-2 (UCn-2) 组成;以及

[0059] (b)向有需要的个体或患者施用尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽,或者编码尿皮质素-2 (UCn-2) 的核酸、基因、信使或转录物,

[0060] 其中任选地,所述尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽是分离的、重组的、合成的和/或拟肽的肽或多肽或者其变体,

[0061] 从而在所述患者或个体中抑制体重增加、或抑制食欲、或刺激或引发体重减轻。

[0062] 在替代性实施方案中,将所述尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽配制于囊泡、脂质体、纳米粒子或纳米脂质粒子(NLP)中或配制成囊泡、脂质体、纳米粒子或纳米脂质粒子(NLP),或者将其配制用于:口服施用、肌肉(IM)注射、静脉内(IV)注射、皮下(SC)注射或真皮内注射、鞘内注射、动脉内(IA)注射、冠状动脉内注射、吸入或通过气溶胶施用。

[0063] 本发明的一个或多个实施方案的细节阐述于附图和以下的说明中。根据所述说明和附图以及权利要求书,本发明的其它特征、目的以及优势将是显而易见的。

[0064] 本文引用的所有公布、专利、专利申请在此以引用的方式明确并入本文用于所有目的。

## 附图说明

[0065] 图1图示了如以下实施例2中所述的包含编码IGF1的AAV5的本发明的示例性构建体。

[0066] 图2中的A和B图示了来自如以下实施例2中所述的如下研究的数据,在所述研究中,使用本发明的示例性AAV5.IGF1.tet构建体感染培养的新生大鼠心肌细胞,并且对IGF1进行诱导、表达,然后进行测量。

[0067] 图3以图表方式图示了如以下实施例2中所述在培养的新生大鼠心肌细胞中,在使用示例性AAV5.IGF1-tet进行基因转移后,在添加多西环素(doxicillin)以及将多西环素去除的情况下IGF1 mRNA表达的受调节的表达。

[0068] 图4A图示了显示出在AAV5.EGFP基因在大鼠中转移后的3周时,在单侧胫骨前肌

中的EGFP表达的显微照片;并且图4B是表4,其汇总了来自对骨骼肌IGFI表达在CHF中的作用进行测量的超声心动描记术的数据,如以下实施例2中所述。

[0069] 图5图示了如以下实施例2中所述用于本发明的示例性AAV5.IGFI.tet在CHF中在骨骼肌中进行基因转移的实验方案。

[0070] 图6图示了AAV5.IGFI-tet基因转移对心脏凋亡和纤维化的作用:图6中的A以图表方式图示了来自TUNEL染色的数据,所述数据指示IGFI表达的激活(IGF启动型)与减少的心肌细胞凋亡有关;图6中的B图示了来自IGF关闭型和IGF启动型大鼠的未梗塞的室间隔的经过苦味酸天狼猩红染色的切片,其示出了心脏纤维化减少,并且胶原面积分数减小;并且图6中的C以图表方式图示了来自所述IGF关闭型和IGF启动型大鼠的这一数据,如以下实施例2中所述。

[0071] 图7以图表方式图示了如以下实施例2中所述在如下施用本发明的示例性AAV5构建体时:向小鼠静脉内递送,向大鼠肌肉内递送,静脉内施用在使IGFI的血清水平升高方面给出的结果优于肌肉内施用

[0072] 图8以图表方式并且通过图像图示了如下数据,如以下实施例2中所述,所述数据显示出在使用肝脏和心脏中的拷贝数和转基因表达作为终点的情况下,静脉内递送本发明的示例性AAV5和AAV9构建体的相对功效。

[0073] 图9图示了如以下实施例2中所论述,在实施本发明的方法时,用于确定和测试用于所需的或具体的适应症的最适当载体的示例性方案。图中所示策略为:

[0074] 1.目的2A:选择最好的AAV载体(在第6周的血清IGF);

[0075] 2.目的2B:选择Rap调节或Tet调节(在第12周的血清IGFI);

[0076] 3.目的3:在大鼠CHF中测试(血清IGFI、LV功能、死亡率);

[0077] 4.目的4:在正常的猪中进行的可行性和剂量确定。

[0078] 图10中的A、B、C、D、E以及F图示了如以下实施例2中所述的本发明的示例性载体构建体。

[0079] 图11以图表方式图示了如下的数据,如以下实施例3中所述,所述数据显示静脉内AAV8对于旁分泌方法来说是最优的载体和递送途径以达到持续升高的血清尿皮质素-2(UCn-2)水平。

[0080] 图12A以图表方式图示了在静脉内施用示例性AAV8.CBA.UCn2构建体之后,UCn2 mRNA在肝脏中表达的时间过程;并且图12B以图表方式图解了如下的数据,所述数据显示了在静脉内施用AAV8.CBA.UCn2后的6周时,LV中UCn2 mRNA的表达,如以下实施例3中所述。

[0081] 图13A-图13B以图表方式图示了来自如下研究的数据,所述研究通过以静脉内(IV)递送向正常小鼠递送本发明的示例性AAV8.UCn2构建体来确定UCn2基因转移是否增强LV功能:图13A以图表方式图示了如下的数据,所述数据显示UCn2基因转移增强了LV的收缩功能;图13B以图表方式图示了如下的数据,所述数据显示 $-dP/dt$ 也降低,这指示增强的LV舒张,如以下实施例3中所述。

[0082] 图14图示了显示出UCn2转移对衰竭心脏的作用的数据:A图示了研究方案;并且B和C图示了显示出UCn2转移对衰竭心脏的作用的数据,如以下实施例3中所述。

[0083] 图15A-图15B图示了数据,图15A通过图表图示了所述数据,图15B通过免疫印迹

图示了所述数据,其中正常小鼠接受示例性AAV8.CBA.UCn2的静脉内递送;并且在四周后,来自UCn2基因转移组的LV样本显示SERCA2a蛋白质表达增加到2倍,如以下实施例3中所述。

[0084] 图16A-16B示出了在UCn2基因转移后 $\text{Ca}^{2+}$ 瞬变的数据:图16A以图表方式图示了UCn2基因转移使得 $\text{Ca}^{2+}$ 下降的速率增大;图16B以图表方式图示了在来自4周前已接受UCN2基因转移的小鼠的心肌细胞中 $\text{Ca}^{2+}$ 瞬变衰减的时间缩短,如以下实施例3中所述。

[0085] 图17A-17B示出了如下的数据,UCn2保护培养的新生大鼠心肌细胞免遭缺氧性损伤:图17A图示了在 $\text{NaN}_3$ 处理后的24小时之时,UCn2维持了形态正常性;图17B以图表方式图示了UCn2减少了在 $\text{NaN}_3$ 处理后LDH的释放,如以下实施例3中所述。

[0086] 图18A-18B以图表方式图示了如以下实施例3中所述,在静脉内递送本发明的示例性UCn2.CBA.UCn2构建体后的4周,在LV样本中检测到CREB(图18A)和 $\beta$ -联蛋白(图18B)这两者的磷酸化。

[0087] 图19A-19B图示了如下的数据,所述数据显示UCn2影响葡萄糖调节:小鼠接受示例性AAV8.CBA.UCn2的静脉内递送:图19A图示了在UCn2组中观测到空腹血糖小幅降低;图19B图示了如下的结果,所述结果指示UCn2基因转移促进了葡萄糖的利用并且防止了饮食诱发的高血糖症,如以下实施例3中所述。

[0088] 图20中的A、B、C、D、E以及F图示了如以下实施例3中所述的本发明的示例性构建体。

[0089] 在各个附图中同样的附图标记指示同样的元件。

## 具体实施方式

[0090] 本发明提供了组合物以及体内和离体方法,所述方法包括施用编码旁分泌的核酸、基因、转录物或信使以治疗、改善或防止(作为预防)个体的对体内升高的旁分泌水平有反应的疾病、感染或病况。在替代性实施方案中,本发明提供了用于体内或原位递送和/或体内表达以及受控表达任何旁分泌多肽或肽的组合物和方法,所述旁分泌多肽或肽例如哺乳动物强心肽、重组人松弛素-2、松弛素-2、尿皮质素-2、尿皮质素-1、尿皮质素-3、脑利钠肽、前列环素合酶、生长激素、胰岛素样生长因子-1或其任何组合;或者人强心肽、重组人松弛素-2、松弛素-2、尿皮质素-2、尿皮质素-1、尿皮质素-3、脑利钠肽、前列环素合酶、生长激素、胰岛素样生长因子-1或其任何组合。

[0091] 在替代性实施方案中,本发明提供了用于递送和受控表达编码旁分泌的核酸或基因或者包含(其中已含有)编码旁分泌的核酸或基因的表达运载体(例如载体、重组病毒等)以使得旁分泌蛋白被释放到血流或周身循环中的组合物和方法,在所述血流或周身循环中所述旁分泌蛋白对身体(例如像在治疗心血管疾病的情况下的心脏,或者肺或肾脏,或者其它靶标)可以具有有益的作用。

[0092] 在替代性实施方案中,本发明提供了用于体内表达编码旁分泌的核酸或基因以实施本发明的方法的表达运载体、载体、重组病毒等。在替代性实施方案中,例如作为门诊病人,例如在诊室看病期间,表达所述编码旁分泌的核酸或基因的所述表达运载体、载体、重组病毒等可以通过肌内(IM)注射、静脉内(IV)注射、皮下注射、吸入、生物射弹式粒子递送系统(例如所谓的“基因枪”)等来递送。

[0093] 在替代性实施方案中,这种“外周式”递送方式,例如肌肉注射或静脉内注射 的表达运载体、载体、重组病毒等可以规避在使基因或核酸直接在器官(例如心脏、肺或肾脏)本身当中表达时所遇到的问题。所需的一种或多种旁分泌蛋白在 血流或周身循环中的持续分泌也规避了通过输注施用蛋白质的困难和费用,所述通过输注施用蛋白质对于表现出非常短的体内半衰期的许多蛋白质来说可能 特别成问题,如下表1中所汇总:

[0094]

表1: 肽静脉内输注相比于基因转移

[0095]

| 特征                              | 静脉内输注 | 基因转移     |
|---------------------------------|-------|----------|
| 需要住院治疗                          | 最经常   | 否        |
| 留置导管                            | 经常    | 否        |
| 感染风险                            | 高     | 无        |
| 血栓形成风险                          | 高     | 无        |
| 费用                              | 高     | 低        |
| 易用性                             | 低     | 高        |
| 疗法的“机动性”                        | 低     | 高        |
| 在CHF中的功效                        | 有     | 未测试      |
| 剂量调节                            | 严格    | 经由受调节的表达 |
| “机动性”指的是在远离家(旅行等)时的易用性;         |       |          |
| 受调节的: 患者服用提供所需水平的转基因表达的剂量的口服药剂。 |       |          |

[0096] 在替代性实施方案中,本发明提供了能够容易地并且有效地启动和关闭旁分泌表达核酸或基因表达以进行调控的治疗和确保最佳安全性的方法。

[0097] 在替代性实施方案中,由一种或多种旁分泌表达核酸或基因表达的一种或多种旁分泌蛋白即使被分泌到与它们的一个或多个作用部位相距一段距离的(例如在解剖学上远端的)血液或周身循环中,也会对组织或器官,例如心脏、血管、肺、肾脏或其它靶标具有有益的或有利的的作用(例如治疗性或防治性作用)。

[0098] 在本发明的一个示例性实施方案中,使用编码尿皮质素-2的旁分泌表达核酸或基因,但其它旁分泌表达核酸或基因也可以用于实施本发明的方法,例如对于治疗充血性心力衰竭(CHF)或肺动脉高压,包括但不限于:尿皮质素-1和尿皮质素-3、脑利钠肽(用于CHF)、前列环素合酶(用于肺动脉高压)、生长激素和/或胰岛素样生长因子-1或其任何组合。

[0099] 在替代性实施方案中,本发明为受调节的表达系统提供了应用和组合物以及方法,所述受调节的表达系统提供旁分泌型基因的受控表达以治疗心脏疾病或肺病,例如充血性心力衰竭(CHF)或肺动脉高压。

[0100] 举例来说,在替代性实施方案中,例如作为门诊病人,例如在医师的诊室中,重组病毒(例如长期病毒或病毒载体)、或载体、或表达运载体等可以被注射到例如全身静脉内(例如静脉内),或通过肌肉(IM)注射、通过吸入或通过生物射弹式粒子递送系统(例如所

谓的“基因枪”)来被注射。在替代性实施方案中,在数天或数周以后(例如四周以后),向个体、患者或受试者施用(例如吸入、被注射或吞咽)诱导所述旁分泌表达核酸或基因表达的化学品或药物;例如,每天一次(或者以更高或更低的频率)施用口服抗生素(例如多西环素或雷帕霉素),这将激活所述基因的表达。在替代性实施方案中,在“激活”或诱导(例如通过可诱导的启动子)所述核酸或基因表达之后,旁分泌蛋白被合成并且被释放到受试者的循环中(例如血液中),并且随后具有有益于个体或患者(例如有益于心脏、肾脏或肺功能)的有利的生理作用,例如治疗性或防治性作用,这取决于所表达的一种或多种旁分泌蛋白。当医师或受试者期望中止治疗时,所述受试者只需停止服用激活性化学品或药物(例如抗生素)即可。

[0101] 本发明人已使用编码尿皮质素-2的AAV载体并且使用静脉内递送向小鼠施用所述载体。结果显示:1)在静脉内递送所述载体后的4至6周时,转基因的血清水平升高到17倍;2)对心脏收缩(contractile)功能(收缩(systolic)功能)有显著有利的作用;并且3)对心脏舒张(relaxation)(舒张(diastolic)功能)有显著有利的作用。

[0102] 在替代性实施方案中,本发明的应用包括:治疗严重的低射血分数心力衰竭;治疗肺动脉高压;治疗射血分数正常的心力衰竭;替代需要住院治疗和持续静脉内输注血管活性肽以治疗肺动脉高压和心力衰竭的当前疗法;以及治疗其中可以使用旁分泌型基因的受控表达在体内相距一段距离处促进有利作用的其它病况。

#### [0103] 产生和操作核酸

[0104] 在替代性实施方案中,为了实施本发明的方法,本发明提供了编码旁分泌多肽的分离的、合成的和/或重组的核酸或基因。在替代性实施方案中,为了实施本发明的方法,本发明提供了处于(例如被剪接到)用于体内表达的表达载体,例如处于载体或重组病毒中的呈重组形式的旁分泌表达核酸或基因。在其它替代性实施方案中,本发明提供了例如编码抑制性核酸(例如siRNA、微小RNA、反义核酸、核糖酶)的分离的、合成的和/或重组的核酸,所述抑制性核酸可以抑制如下的基因或信使(mRNA)的表达,所述基因或信使(mRNA)抑制所需的旁分泌基因表达。

[0105] 在替代性实施方案中,通过例如cDNA文库的克隆和表达、经由PCR的信使或基因组DNA的扩增等来制备、分离和/或操作本发明的核酸。包括DNA、RNA、iRNA、反义核酸、cDNA、基因组DNA、载体、病毒或其杂合体在内的用于实施本发明的核酸和基因可以从多种来源中被分离、被遗传工程化、被扩增、和/或被重组表达/产生。由这些核酸产生的重组多肽(例如用于实施本发明的旁分泌嵌合蛋白质)可以被单独地分离或克隆并且针对所需活性进行测试。可以使用任何重组表达系统或基因疗法递送载体,包括例如病毒(例如AAV构建体或杂合体)、细菌、真菌、哺乳动物、酵母、昆虫或植物细胞的表达系统或表达载体。

[0106] 或者,可以在体外通过如例如以下文献中所述的公知的化学合成技术来合成用于实施本发明的核酸:Adams(1983)J. Am. Chem. Soc. 105:661;Belousov(1997)Nucleic Acids Res. 25:3440-3444;Frenkel(1995)Free Radic. Biol. Med. 19:373-380;Blommers(1994)Biochemistry 33:7886-7896;Narang(1979)Meth. Enzymol. 68:90;Brown(1979)Meth. Enzymol. 68:109;Beaucage(1981)Tetra. Lett. 22:1859;美国专利号4,458,066。

[0107] 例如像亚克隆、标记探针(例如使用克列诺聚合酶(Klenow polymerase)进行的随机引物标记、切口平移、扩增)、测序、杂交等用于操作用于实施本发明的核酸的技术充

分描述于科学文献和专利文献中,参见例如Sambrook编著, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (《分子克隆:实验室手册》)(第2版),第1-3卷,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory), (1989);CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (《最新分子生物学实验方法汇编》),Ausubel编著,约翰威立父子出版公司(John Wiley&Sons, Inc.),纽约(New York) (1997);LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY:HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES (《生物化学和分子生物学实验室技术:核酸探针杂 交》),Part I.Theory and Nucleic Acid Preparation (第I部分:理论和核酸制备), Tjissen编著,爱思唯尔出版公司(Elsevier),纽约(1993)。

[0108] 另一种获得和操作用于实施本发明的方法的核酸的有用手段是从基因组样本中克隆,并且如果需要的话,对从例如基因组克隆或cDNA克隆中分离或扩增的插入物进行筛选和重新克隆。用于本发明的方法中的核酸的来源包括例如 以下各项中所含的基因组或cDNA文库:哺乳动物人工染色体(MAC),参见例 如美国专利号5,721,118、6,025,155;人类人工染色体,参见例如Rosenfeld(1997) Nat.Genet.15:333-335;酵母人工染色体(YAC);细菌人工染色体(BAC);P1人工染色体,参见例如Woon(1998) Genomics 50:306-316;P1衍生的载体(PAC), 参见例如Kern(1997) Biotechniques 23:120-124;粘粒、重组病毒、噬菌体或质粒。

[0109] 在替代性实施方案中,为了实施本发明的方法,使用旁分泌融合蛋白和编码它们的核酸。可以使用任何旁分泌多肽来实施本发明,例如尿皮质素-1、尿皮质素-2、尿皮质素-3、脑利钠肽、前列环素合酶、生长激素、胰岛素样生长因子-1蛋白质。在替代性实施方案中,旁分泌蛋白可以与异源性肽或多肽融合,所述异源性肽或多肽诸如用于使多肽靶向所需的细胞类型(如心肌细胞或肺细胞)的肽。

[0110] 在替代性实施方案中,与用于实施本发明的蛋白质接合或融合的异源性肽或多肽可以是赋予所需的特征,如荧光检测、增强的稳定性和/或简化的纯化的N端识别肽。用于实施本发明的肽和多肽还可以融合蛋白形式合成和表达,所述融合蛋白具有与其连接的一个或多个另外的结构域,以例如产生更具免疫原性的肽、更容易地分离重组合成的肽、识别和分离抗体和抗体表达B细胞等。有助于检测和纯化的结构域包括例如允许在固定的金属上进行纯化的金属螯合肽,如多聚组氨酸束(polyhistidine tract)和组氨酸-色氨酸模块;允许在固定的免疫球蛋白上进行纯化的蛋白质A结构域;以及在FLAGS延伸/亲和力纯化系统(华盛顿州西雅图的英姆纳克斯公司(Immunex Corp,Seattle WA))中所用的结构域。在纯化结构域与包含基序的肽或多肽之间纳入可切割的接头序列,如因子Xa或肠激酶(加利福尼亚州圣地亚哥的英杰公司(Invitrogen,San Diego CA)),以有助于纯化。举例来说,表达载体可以包括表位编码核酸序列,所述表位编码核酸序列与六个组氨酸残基连接,之后是硫氧还蛋白和肠激酶切割位点(参见例如Williams(1995) Biochemistry 34:1787-1797;Dobeli(1998) Protein Expr.Purif. 12:404-414)。这些组氨酸残基有助于检测和纯化,同时该肠激酶切割位点提供了用于从融合蛋白的其余部分中纯化表位的手段。与编码融合蛋白的载体有关的技术和融合蛋白的应用充分描述于科学文献和专利文献中,参见例如Kroll(1993) DNA Cell.Biol.,12:441-53。

[0111] 用于实施本发明的核酸或核酸序列可以是寡核苷酸、核苷酸、多核苷酸或这些中任一种的片段、可以是单链或双链并且可以表示有义链或反义链的基因组或合成来源的

DNA或RNA、肽核酸(PNA)、或天然或合成来源的任何DNA样或RNA样物质。用于实施本发明的化合物包括“核酸”或“核酸序列”,包括寡核苷酸、核苷酸、多核苷酸或这些中任一种的任何片段;并且包括可以是单链或双链并且可以有义链或反义链的基因组或合成来源的DNA或RNA(例如mRNA、rRNA、tRNA、iRNA);或肽核酸(PNA)、或天然或合成来源的任何DNA样或RNA样物质,包括例如iRNA、核糖核蛋白(例如双链iRNA,例如iRNP)。用于实施本发明的化合物包括含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,即寡核苷酸。用于实施本发明的化合物包括具有合成骨架的核酸样结构,参见例如Mata (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144: 189-197; Strauss-Soukup (1997) Biochemistry 36:8692-8698; Samstag (1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6:153-156。用于实施本发明的化合物包括可以化学合成的包括单链多脱氧核苷酸或两条互补的多脱氧核苷酸链在内的“寡核苷酸”。用于实施本发明的化合物包括不具有5'磷酸的合成寡核苷酸,并且因此在不添加磷酸的情况下,将不会通过ATP在激酶存在下连接到另一个寡核苷酸上。合成寡核苷酸可以连接到未经过去磷酸化的片段上。

[0112] 在替代性方面,用于实施本发明的化合物包括牵涉到产生旁分泌多肽(例如尿皮质素-1、尿皮质素-2、尿皮质素-3、脑利钠肽、前列环素合酶、生长激素、胰岛素样生长因子-1蛋白质)的基因或任何DNA片段;它可以包括在编码区之前和之后的区域(前导区和尾随区)以及在适当的情况下,处于单个编码段(外显子)之间的间插序列(内含子)。“可操作地连接”可以指两个或更多个核酸(例如DNA)片段之间的功能关系。在替代性方面,它可以指转录调节序列与所转录的序列的功能关系。举例来说,如果启动子刺激或调控编码序列在适当的宿主细胞或其它表达系统中的转录,那么所述启动子能够可操作地连接到所述编码序列(如用于实施本发明的核酸)。在替代性方面,启动子转录调节序列可以可操作地连接到所转录的序列,其中它们与所转录的序列可以是物理上连续的,即它们可以起顺式作用。在替代性方面,诸如增强子之类的转录调节序列无需与由它们增强转录的编码序列是物理上连续的或位于紧邻所述编码序列处。

[0113] 在替代性方面,本发明包括“表达盒”的使用,所述“表达盒”包含用于实施本发明的核苷酸序列,所述“表达盒”能够影响例如(例如编码旁分泌蛋白的)结构基因或转录物的核酸在与这些序列相容的宿主中的表达。表达盒可以包括至少一个启动子,所述至少一个启动子与多肽编码序列或抑制性序列可操作地连接;以及在一个方面,所述至少一个启动子与例如转录终止信号的其它序列可操作地连接。还可以使用在实现表达方面必需的或有帮助的额外因子,例如增强子。

[0114] 在替代性方面,用于实施本发明的表达盒还包括质粒、表达载体、重组病毒、任何形式的重组“裸DNA”载体等。在替代性方面,用于实施本发明的“载体”可以包含可以感染、转染、瞬时或永久转导细胞的核酸。在替代性方面,用于实施本发明的载体可以是裸核酸或者与蛋白质或脂质复合的核酸。在替代性方面,用于实施本发明的载体可以包含病毒或细菌核酸和/或蛋白质和/或膜(例如细胞膜、病毒脂质包膜等)。在替代性方面,用于实施本发明的载体可以包括但不限于复制子(例如RNA复制子、噬菌体),DNA的片段可以与所述复制子连接并且被复制。载体因此包括但不限于RNA、自主自我复制的环状或线性DNA或RNA(例如质粒、病毒等,参见例如美国专利号5,217,879),并且可以包括表达质粒和非表达质粒这两者。在替代性方面,用于实施本发明的载体可以作为自主结构由细胞在有丝分

裂期间被稳定地复制,或可以被并入到宿主的基因组内。

[0115] 在替代性方面,用于实施本发明的“启动子”包括能够驱动编码序列在细胞中 转录的所有序列,所述细胞例如哺乳动物细胞,如心脏细胞、肺细胞、肌肉细 胞、神经细胞或脑细胞。因此,用于本发明的构建体中的启动子包括牵涉到调 节或调控基因转录的发生时间和/或速率的顺式作用转录控制元件和调节序列。举例来说,用于实施本发明的启动子可以是牵涉到转录调节的顺式作用转录控 制元件,包括增强子、启动子、转录终止子、复制起点、染色体整合序列、5' 端和3'端非翻译区或内含子序列。这些顺式作用序列典型地与蛋白质或其它生 物分子相互作用以执行(启动/关闭、调节、调控等)转录。

[0116] 在替代性实施方案中,用于实施本发明的“组成型”启动子可以是在发育或细 胞分化的大部分环境条件和状态下连续驱动表达的启动子。在替代性实施方案 中,用于实施本发明的“可诱导的”或“受调节的”启动子可以在环境条件、所施用 的化学剂或发育条件的影响下引导本发明的核酸表达。

[0117] 基因疗法和基因递送载体

[0118] 在替代性实施方案中,本发明的方法包括使用核酸(例如基因或多肽编码核 酸)递送系统例如作为基因疗法递送载体在体外、离体或体内向一个或多个细胞 递送有效负 载量的编码旁分泌的核酸或基因或者旁分泌多肽表达核酸、转录物 或信使。

[0119] 在替代性实施方案中,用于实施本发明的方法的表达运载体、载体、重组 病毒或等同物是或包括:腺相关病毒(AAV)、慢病毒载体或腺病毒载体;AAV 血清型AAV5、AAV6、AAV8或AAV9;源自恒河猴的AAV或源自恒河猴的AAV AAVrh.10hCLN2;嗜器官性AAV、或嗜心 性AAV、或嗜心性AAVM41突变体;和/或AAV衣壳突变体或AAV杂合体血清型。在替代性实施 方案中,将AAV工 程化以提高靶向对野生型(wt)AAV不许可的特定细胞类型的效率和/或提 高仅感 染所关注的细胞类型的功效。在替代性实施方案中,通过一种或多种修饰将杂 合体AAV重新定向或工程化为杂合体血清型,所述一种或多种修饰包括:1)衣 壳转移;2)使双 特异性抗体吸附至衣壳表面;3)将镶嵌型衣壳工程化;和/或4) 将嵌合型衣壳工程化。如何将腺相关病毒(AAV)衣壳工程化以提高靶向对野生型 (wt)病毒不许可的特定细胞类型的 效率以及提高仅感染所关注的细胞类型的功 效是本领域公知的;参见例如Wu等, Mol. Ther., 2006年9月;14(3):316-27. 2006 年7月7日电子出版;Choi等, Curr. Gene Ther., 2005年6月;5(3):299-310。

[0120] 举例来说,可以使用源自恒河猴的AAV AAVrh.10hCLN2或其等同物,其 中所述源 自恒河猴的AAV可以不受人体内任何预先存在的免疫力抑制;参见例 如Sondhi等, Hum Gene Ther. Methods. 2012年10月;23(5):324-35, 2012年11月 6日电子出版;Sondhi等, Hum Gene Ther. Methods. 2012年10月17日;所述文 献教导了以可针对人类按比例缩放的剂量 向大鼠和非人灵长类动物的CNS直接 施用AAVrh.10hCLN2具有可接受的安全性特征并且在 CNS中介导显著有效负 载量的表达。

[0121] 举例来说,还可以使用被特别设计用于心脏基因转移的AAV载体(嗜心性 AAV),例 如在心肌中具有提高的转导效率和特异性的AAVM41突变体,参见 例如Yang等, Virol J. 2013年2月11日;10(1):50。

[0122] 由于腺相关病毒(AAV)是灵长类动物的常见感染因子,并且因而,健康的灵 长类 动物携带有大量的AAV特异性中和抗体(NAb),所述AAV特异性中和抗 体会抑制AAV介导的

基因转移治疗策略,因此本发明的方法包括在治疗之前,特别是在使用常用的AAV8衣壳元件治疗之前,针对AAV特异性NAb对患者 候选者进行筛选以促进个体化治疗设计和增强治疗功效;参见例如Sun等,J. Immunol.Methods.2013年1月31日;387(1-2):114-20,2012年10月11日电子出版。

#### [0123] 试剂盒和说明书

[0124] 本发明提供了包含本发明的组合物和方法的试剂盒,所述试剂盒包括其使用说明书。因而,还可以提供试剂盒、细胞、表达运载体(例如重组病毒、载体)等。

[0125] 举例来说,在替代性实施方案中,本发明提供了试剂盒,所述试剂盒包含用于实施本发明的组合物,例如包含尿皮质素-2(UCn-2)肽或多肽;或者编码旁分泌的核酸;(b)本发明的液体或水性制剂;或(c)本发明的囊泡、脂质体、纳米粒子或纳米脂质粒子。在一个方面,所述试剂盒进一步包括用于实施本发明的任何方法的说明书,所述方法例如用于提高血流中所需的旁分泌水平、或用于保护细胞(例如心脏细胞或肺细胞);或用于治疗、预防或改善糖尿病或糖尿病前期的体外或离体方法。

#### [0126] 制剂

[0127] 在替代性实施方案中,本发明提供用于提高体内旁分泌水平的组合物和方法。在替代性实施方案中,这些组合物包含被配制用于这些目的的编码旁分泌的核酸,例如被配制在缓冲液、盐水溶液、粉剂、乳液、囊泡、脂质体、纳米粒子、纳米脂质粒子等中的表达运载体或编码旁分泌的核酸。

[0128] 在替代性实施方案中,本发明提供如下的方法,所述方法包括施用尿皮质素-2(UCn-2)肽或多肽或者UCn-2编码核酸,以治疗、改善或预防糖尿病(包括1型糖尿病和2型糖尿病或成年发病型糖尿病)或糖尿病前期、或者肥胖症或过重;或刺激体重减轻、或充当食欲抑制剂。因此,本发明提供了用于同样目的的尿皮质素-2(UCn-2)肽或多肽或者UCn-2编码核酸的适当制剂和剂量。

[0129] 在替代性实施方案中,所述组合物(包括尿皮质素-2(UCn-2)肽或多肽或者编码旁分泌(例如编码UCn-2)的核酸的制剂)可以通过任何方式配制并且可以多种浓度和形式施用,这取决于所需的体外、体内或离体条件,包括所需的体内或离体施用方法等。关于体外、体内或离体制剂和施用的技术细节充分描述于科学文献和专利文献中。

[0130] 用于实施本发明的编码旁分泌的核酸或者尿皮质素-2(UCn-2)肽或多肽的制剂和/或承载体(carrier)是本领域公知的。用于实施本发明的制剂和/或承载体可以呈适用于体内或离体施用的形式诸如片剂、丸剂、粉剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆体、混悬液等。

[0131] 在替代性实施方案中,用于实施本发明的编码旁分泌的核酸或者尿皮质素-2(UCn-2)肽或多肽可以呈与水溶液和/或缓冲溶液的混合物形式或呈水性混悬液和/或缓冲混悬液形式,所述混悬液例如包括助悬剂,诸如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶以及阿拉伯树胶;和分散剂或湿润剂,如天然存在的磷脂(例如卵磷脂)、环氧烷与脂肪酸的缩合产物(例如聚氧乙烯硬脂酸酯)、环氧乙烷与长链脂族醇的缩合产物(例如十七碳亚乙基氧基鲸蜡醇(heptadecaethylene oxycetanol))、环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合产物(例如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯)、或环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合产物(例如聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯)。水性混悬液还可以含有一种或多种防腐剂,如对羟基苯甲酸

乙酯或对 羟基苯甲酸正丙酯。可以例如通过使用适当的缓冲剂对制剂的渗透压 (osmolality) 进行调节。

[0132] 在实施本发明中,本发的化合物(例如制剂)可以包括编码旁分泌的核酸或 基因或者尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽溶解于药学上可接受的承载体中的溶液, 所述药学上可接受的承载体例如可以使用的可接受的媒介物和溶剂,包括水和 林格氏溶液(Ringer's solution)——一种等渗氯化钠。此外,还可以使用无菌不挥 发性油作为溶剂或悬浮介质。为了实现这个目的,可以使用任何不挥发性油, 包括合成的甘油单酯或甘油二酯、或脂肪酸,如油酸。在一个实施方案中,用 于实施本发明的溶液和制剂是无菌的并且可以被制造为一般不含不需要的物 质。在一个实施方案中,通过常规的公知的灭菌技术对这些溶液和制剂进行灭 菌。

[0133] 用于实施本发明的溶液和制剂根据需要可以包含辅剂物质以接近生理条 件,如 pH值调节剂和缓冲剂、毒性调节剂,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯 化钙、乳酸钠等。这些制剂中活性剂(例如编码旁分泌的核酸或基因)的浓度可以 广泛不同,并且可以主要基于流体体积、粘度等,根据所选的具体的体内或离 体施用方式和所需的结果(例如提高体内旁分泌表达)来选择。

[0134] 用于实施本发明的溶液和制剂可以被冻干;举例来说,本发明提供一种稳 定的冻干制剂,所述制剂包含编码旁分泌的核酸或基因或者尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽。在一个方面,这种制剂是通过将包含编码旁分泌的核酸或基因或者 尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽和增量剂的溶液冻干来制备的,所述增量剂例如甘 露醇、海藻糖、棉子糖以及蔗糖或其混合物。用于制备稳定的冻干制剂的方法 可以包括将约2.5mg/mL的蛋白质、约15mg/mL的蔗糖、约19mg/mL的NaCl 以及pH值大于5.5但小于6.5的柠檬酸钠缓冲液的溶液冻干。参见 例如美国专 利申请号20040028670。

[0135] 本发明的组合物和制剂可以通过使用脂质体来递送(还参见以下论述内容)。通 过使用脂质体,特别是在脂质体表面带有靶细胞特异性的配体或以其它方式 优先地针对特定的组织或器官类型的情况下,可以在体内或离体施用中将活性 剂集中递送到靶细胞 中。

[0136] 纳米粒子、纳米脂质粒子以及脂质体

[0137] 本发明还提供包含用于实施本发明的方法的化合物(例如编码旁分泌的核酸 或基因或者尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽)的纳米粒子、纳米脂质粒子、囊泡以及 脂质体膜,以例如体内或离体向个体、患者或哺乳动物细胞递送编码旁分泌的 核酸或基因或者尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽。在替代性实施方案中,这些组合 物被设计成靶向特定的分子,包 括生物分子,如多肽,包括细胞表面多肽,例 如用于靶向所需的细胞类型,例如哺乳动物心 脏细胞、肾脏细胞、肺细胞、神 经细胞等。

[0138] 本发明提供包含用于实施本发明的化合物的多层脂质体,例如如Park等的美 国专利公开号20070082042中所述。所述多层脂质体可以使用油相组分的混合物 被制备为约 200nm至5000nm的粒度,以例如来包封编码旁分泌的核酸或基因, 所述油相组分包含角鲨 烷、甾醇、神经酰胺、中性脂质或油类、脂肪酸以及卵 磷脂。

[0139] 脂质体可以使用例如如Park等的美国专利公开号20070042031中所述的任何 方法来制备,所述任何方法包括通过封装活性剂(例如编码旁分泌的核酸或基因 或者尿皮质

素-2 (UCn-2) 肽或多肽) 来制备脂质体的方法, 该方法包括在第一贮器 中提供水溶液; 在第二贮器中提供有机脂质溶液, 然后将该水溶液与该有机脂 质溶液在第一混合区中混合以产生脂质体溶液, 其中该有机脂质溶液与该水溶 液混合以基本上即刻产生封装所述活性剂的脂质体; 以及然后立即将该脂质体 溶液与缓冲溶液混合以产生稀释了的脂质体溶液。

[0140] 在一个实施方案中, 用于实施本发明的脂质体组合物包含取代的铵和/或聚 阴离子, 例如用于将用于实施本发明的化合物 (例如编码旁分泌的核酸或基因) 靶向递送到所需的细胞类型中, 如例如美国专利公开号20070110798中所述。

[0141] 本发明还提供包含用于实施本发明的化合物 (例如编码旁分泌的核酸或基因 或者尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽) 的纳米粒子, 所述纳米粒子呈含有活性剂的纳 米粒子 (例如次级纳米粒子) 的形式, 如例如美国专利公开号20070077286中所述。在一个实施方案中, 本发明提供下述的纳米粒子, 所述纳米粒子包含本发明的 脂溶性活性剂或脂肪溶解的水溶性活性剂, 以与二价或三价金属盐起作用。

[0142] 在一个实施方案中, 可以使用固体脂质混悬液来配制并且体内或离体向患 者、个体或哺乳动物细胞递送用于实施本发明的编码旁分泌的核酸或基因或者 尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽, 如例如美国专利公开号20050136121中所述。

[0143] 递送载体

[0144] 在替代性实施方案中, 可以使用任何递送载体以实施本发明的方法或组合 物, 例如以递送编码旁分泌的核酸或基因或者尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽, 以 体内或离体实施本发明的方法。举例来说, 可以使用包含聚阳离子、阳离子聚 合物和/或阳离子肽 (如聚乙烯亚胺衍生物) 的递送载体, 例如如例如美国专利公 开号20060083737中所述。

[0145] 在一个实施方案中, 使用干燥的多肽-表面活性剂复合体来配制本发明的组 合物, 其中表面活性剂经由非共价键与核酸缔合, 例如如例如美国专利公开号 20040151766 中所述。

[0146] 在一个实施方案中, 用于实施本发明的核酸或多肽可作为聚合水凝胶或水 溶性共聚物形式向细胞施用, 例如如美国专利号7,413,739中所述; 例如, 可以 通过强亲核体与共轭不饱和键或共轭不饱和基团之间的反应, 通过亲核加成来 使核酸或蛋白质聚合, 其中每一种前体组分均包含至少两个强亲核体或至少两 个共轭不饱和键或共轭不饱和基团。

[0147] 在一个实施方案中, 使用具有细胞膜穿透性肽缀合物的载体向细胞施用核 酸或蛋白质, 例如如美国专利号7,306,783、6,589,503中所述。在一个方面, 核 酸本身与细胞膜穿透性肽缀合。在一个实施方案中, 核酸、蛋白质和/或递送载 体与介导转运的肽缀合, 例如如美国专利号5,846,743中所述, 该美国专利描述 了高度碱性并且与多磷酸肌醇结合的介导转运的肽。

[0148] 在一个实施方案中, 使用电通透作为主要或辅助手段以例如使用如例如美 国专利号7,109,034、6,261,815、5,874,268中所述的任何电穿孔系统向细胞递送 编码旁分泌的核酸或基因。

[0149] 制品、植入物以及人工器官

[0150] 本发明还提供制品, 所述制品包含本发明的细胞 (例如经过修饰以表达旁分 泌蛋白或尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽从而实施本发明的方法的细胞) 和由本发 明的方法所制备的细胞实施本发明的用途, 包括例如包含经过修饰以表达旁分 泌蛋白从而实施本发明

的方法的细胞的植入物和人工器官、生物反应器系统、细胞培养系统、板、皿、管、瓶以及烧瓶。可以使用任何植入物、人工器官、生物反应器系统、细胞培养系统、细胞培养板、皿(例如皮氏培养皿(petri dish))、细胞培养管和/或细胞培养烧瓶(例如滚瓶)。

[0151] 在替代性实施方案中,本发明提供包含经过修饰以表达旁分泌蛋白从而实施本发明的方法的生物反应器、植入物、支架、人工器官或类似装置;例如,包括如以下专利中所述的植入物:USPN 7,388,042;7,381,418;7,379,765; 7,361,332;7,351,423;6,886,568;5,270,192;以及美国专利申请公开20040127987; 20080119909(描述了耳部植入物); 20080118549(描述了眼部植入物); 20080020015(描述了生物活性创口敷料); 20070254005(描述了心脏瓣膜生物假体、血管移植物、半月板植入物);20070059335; 20060128015(描述了肝植入物)。

[0152] 在体内植入细胞

[0153] 在替代性实施方案中,本发明的方法还包括植入或移植细胞,例如心脏细胞、肺细胞或肾脏细胞,所述细胞包含或表达用于实施本发明的编码旁分泌的核酸或基因或者尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽;并且在一个方面,本发明的方法包括将编码旁分泌的核酸或基因(或表达它们的细胞)或者尿皮质素-2 (UCn-2) 肽或多肽离体或体内植入或移植到血管、组织或器官中,或将重新程序化的分化的细胞植入或移植到有需要的个体中。

[0154] 可以将细胞从个体体内取出,使用本发明的组合物和/或方法处理,并且使用任何已知的技术或方案重新插入(例如注射或移植)到组织、器官中或个体内。举例来说,可以使用例如如美国专利号7,442,389中所述的微球体重新植入(例如注射或移植)去分化的重新程序化的细胞或重新程序化的分化的细胞;例如在一个方面,细胞载体包含含有被预先加载到混合和递送系统内的圆形并且光滑的聚甲基丙烯酸甲酯微粒的增量剂和含有这些细胞的自体载体。在另一个实施方案中,将细胞于生物相容性交联基质中向有需要的组织、器官和/或个体重新施用,如例如美国专利申请公开号20050027070中所述。

[0155] 在另一个实施方案中,将本发明的细胞(例如通过实施本发明的方法所制备的细胞)在生物相容性非免疫原性包衣内或在所述生物相容性非免疫原性包衣的保护下向有需要的组织、器官和/或个体重新施用(例如注射或移植),所述包衣例如位于合成植入物的表面上,例如如美国专利号6,969,400中所述,该美国专利号6,969,400描述了例如以下方案,在所述方案中,可以将非cAMP活性 AC(cAMP-incompetent AC)与已经过修饰以含有多个亲核基团(如伯氨基或硫醇基)的聚乙二醇缀合。

[0156] 在一个实施方案中,使用如例如由美国专利号7,442,390、5,733,542所述的移植方法将本发明的细胞(例如通过实施本发明的方法所制备的细胞)向有需要的组织、器官和/或个体重新施用(例如注射或移植)。

[0157] 可以使用用于向组织或器官(例如肺、肾脏、心脏)递送多肽、核酸和/或细胞的任何方法,并且这些方案是本领域公知的,例如如美国专利号(USPN) 7,514,401中所述,该美国专利号7,514,401描述了例如利用多肽、核酸和/或细胞至心脏原位的冠状动脉内(IC)递送、静脉内(IV)递送和/或局部递送(心肌注射)。举例来说,在替代性实施方案中,可以使用进入到肺中和血流中的气溶胶药物粒子、基因疗法、连续输注、重复注射和/或持续释放聚合物向组织或器官(例如肺、肾脏、心脏)递送多肽、核酸和/或细胞。在替代性实施方案中,核酸和/或细胞可以通过进入到冠状动脉中的导管或通过经由有限胸廓切开术

(limited thoracotomy)的至左心房或心室肌的直接注射来给予;或经由在心导管插入术期间穿过的导管被递送到心肌中;或被递送到心包腔中。

[0158] 在替代性实施方案中,用于实施本发明的核酸或蛋白质、或包含用于实施本发明的核酸的载体(例如AAV或腺病毒基因治疗载体)、或本发明的囊泡、脂质体、纳米粒子或纳米脂质粒子(NLP)等向组织或器官(例如肺、肾脏、心脏)递送;例如如USPN 7,501,486中所述,例如包含氨基酸序列CRPPR(SEQ ID NO:1)、氨基酸序列CARPAR(SEQ ID NO:2)或其拟肽、或氨基酸序列CPKRPR(SEQ ID NO:3)或其拟肽的本发明多肽。

[0159] 用于实施本发明的组合物可以与其它治疗剂组合使用,所述其它治疗剂例如血管生成剂、抗血栓形成剂、抗炎剂、免疫抑制剂、抗心律失常剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素、抗病毒剂以及病毒载体。

[0160] 用于实施本发明的组合物可以用于改善或治疗多种心脏病和心血管疾病中的一种,例如心脏病和心血管疾病,例如冠状动脉疾病(CAD);动脉粥样硬化;血栓形成;再狭窄;血管炎,包括自身免疫性血管炎和病毒性血管炎,如结节性多动脉炎、变应性肉芽肿性血管炎(Churg-Strass syndrome)、高安氏动脉炎(Takayasu's arteritis)、川崎氏病(Kawasaki Disease)以及立克次体性血管炎;动脉粥样硬化性动脉瘤;心肌梗死;先天性心脏病(CHD);缺血性心脏病和心绞痛;获得性瓣膜/心内膜疾病;原发性心肌疾病,包括心肌炎;心律失常;以及移植排斥反应;代谢性心肌疾病和心肌病,如充血性心肌病、肥厚性心肌病以及限制性心肌病、和/或心脏移植。在替代性实施方案中,用于实施本发明的组合物,例如尿皮质素-2(UCn-2)肽或多肽用于治疗、改善或防止(预防)患者或个体的糖尿病或糖尿病前期;或抑制患者或个体的体重增加、或抑制食欲、或刺激或引发体重减轻;或治疗、改善或防止(预防)患者或个体的糖尿病。

[0161] 将参考以下实施例进一步描述本发明;然而,应当理解的是,本发明不限于这些实施例。

[0162] 实施例

[0163] 实施例1:静脉内递送编码尿皮质素-2的AAV9会增强正常小鼠的心脏功能

[0164] 这个实施例证实本发明的一个示例性实施方案的有效性:静脉内递送AAV9/尿皮质素-2(或AAV9/UCn2)使得血清UCn2和LV收缩功能持续提高,这表明本发明的这一示例性实施方案治疗心力衰竭的有效性。

[0165] 在这项研究中,我们研发了两种编码尿皮质素-2(UCn-2)的腺相关病毒(AAV)血清型(AAV5和AAV9)并且对它们的相对功效进行测试,所述尿皮质素-2是促肾上腺皮质激素释放因子家族中对患有心力衰竭的动物和患者具有多种多样有益作用的一种血管活性肽。通过静脉内注射(IV)来递送AAV5.Ucn-2和AAV9.Ucn-2( $5 \times 10^{11}$ 个基因组拷贝,gc)。在基因转移后的四周(wk),AAV的DNA(qPCR)在肝脏(AAV5.Ucn2:2,601,839个拷贝/ $\mu$ g; AAV9.Ucn2:30,121,663个拷贝/ $\mu$ g)和心脏(AAV5:87,635gc/ $\mu$ g; AAV9:300,529个拷贝/ $\mu$ g)中升高,并且mRNA同样升高(AAV5.Ucn-2:68 $\pm$ xx倍; AAV9.Ucn-2:8,575),与内源性UCn2相比。

[0166] 左心室样本显示Ucn2 mRNA仅在AAV9.Ucn2的情况下升高,与内源性mRNA相比,增加到28倍。血浆Ucn-2提高(AAV5.Ucn2:从之前的2.7ng/ml提高到3.6ng/ml,  $p < 0.0001$ ; AAV9.Ucn2)。最终,与血清UCn2水平提高相关的是LV收缩功能增强。

[0167] 实施例2:用于治疗心血管疾病的基因转移

[0168] 这个实施例证实了本发明的一个示例性实施方案在以能够容易地并且安全地施用的方式在心脏中获得高产率的转基因表达方面的有效性。

[0169] 在替代性实施方案中,本发明提供使用编码旁分泌型转基因的表达运载体(例如载体)的方法。在这个实施方案中,该转基因作为激素起作用,在从远处部位释放到循环中之后具有心脏作用(cardiac effect)。在替代性实施方案中,这种方法可以规避实现高产率心脏基因转移的问题并且使患者能够在诊室看病期间通过全身性注射来治疗患者。

[0170] 我们检验了多种AAV血清型载体和递送方法,并且成功地完成了对旁分泌基因转移的概念验证性(proof-of-concept)研究。患有严重的扩张性CHF的大鼠接受在四环素(tetracycline)调节下的编码胰岛素样生长因子I(IGFI)的腺相关病毒5(AAV5)载体的骨骼肌递送。这使得能够在将多西环素添加到大鼠的供水中之后激活IGFI表达。该系统使得IGFI的血清水平持续升高并且使得衰竭心脏的功能得到改善。

[0171] 在替代性实施方案中,a)使用IGFI基因转移来增强收缩功能;b)使用AAV载体和启动子进行静脉内递送以在最小的脱靶效应的情况下提供最大程度的转基因表达;c)使用受调节的转基因表达以使得能够对血清转基因水平进行微调,并且允许根据需要关闭和启动表达;d)例如在大鼠CHF模型中使用旁分泌表达基因的基因转移;以及e)例如在正常的猪中,使用血清旁分泌(例如IGFI)作为终点,使用有效剂量的AAV,并且在静脉内递送载体之后使用转基因表达的激活剂。

[0172] 在替代性实施方案中,静脉内注射具有受调节的选择性肽表达的AAV载体将经由旁分泌介导的作用对衰竭的心脏具有有利的作用。

[0173] 载体选择:在替代性实施方案中,使用腺相关病毒(AAV)载体,从而使得能够进行优于腺病毒的长期转基因表达,同时避免了与慢病毒载体有关的插入诱变的可能性。在单次注射AAV载体后的数年,已在狗和非人灵长类动物中证实血清中因子IX、促红细胞生成素以及 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶持续升高<sup>1-4</sup>,以及我们已经在我们的实验室中确认,使用AAV5.IGFI-tet对大鼠进行肌肉注射后血清IGFI持续(>1年)升高<sup>5</sup>。虽然最近的临床试验已经发现一些AAV血清型激发免疫应答<sup>6,7</sup>,但是新一代的AAV载体没有显示在灵长类动物的临床前研究中具有类似的问题。

[0174] AAV血清型:在替代性实施方案中,使用AAV血清型AAV2,但在一些实施方案中,“假型化(pseudotyped)”AAV载体是优选的。包括AAV5、AAV6、AAV8以及AAV9在内的这些AAV血清型是杂合型构建体,所述杂合型构建体包括AAV2的衣壳以及赋予它们特定命名的独特的复制元件。在替代性实施方案中,使用AAV6、AAV8以及AAV9的静脉内递送;这些在心脏、肝脏、骨骼肌以及别处显示出大量分布和转基因表达。

[0175] 我们发现在使IGFI的血清水平升高方面,静脉内AAV5优于肌肉内AAV5,如图7中所示,该图7以图表方式示出了在静脉内AAV5.IGFI.tet基因转移相比肌肉内AAV5.IGFI.tet基因转移的3个月后,游离IGFI血清水平的数据:向小鼠静脉内递送(每组n=3)在使用多西环素激活IGFI表达后(启动)使得血清IGFI增加到2倍;向大鼠肌肉内递送(每组n=9)在激活IGFI表达后的5周时使血清IGFI增加到>1.3倍。P值位于条柱上方:组内比较(t检验,双侧)。在静脉内递送AAV5.IGFI.tet后,血清IGFI的变化更大(p<0.001)。

[0176] 当静脉内给予时,在转基因在肝脏和心脏中的表达方面,AAV9优于AAV5,如图8中

以图表方式并且通过图像所阐明,其阐明如下的数据,所述数据显示 出在使用肝脏和心脏中的拷贝数和转基因表达作为终点的情况下静脉内递送本 发明的示例性AAV5和AAV9构建体的相对功效,如图8中所阐明。

[0177] 在替代性实施方案中,AAV8如同AAV9一样提供了全身性表达,但在肝脏 中的比例高于在其它器官中——一个我们提出的与肝脏特异性启动子结合利用 的性质。

[0178] 在替代性实施方案中,使用自身互补型AAV载体 (scAAV) 载体;与它们的单 链 (ssAAV) 类似物相比,它们可以提供更高的转基因表达<sup>8</sup>。使用ssAAV载体 (插 入容量: 4.7kb) 的转基因表达延迟4至6周直到互补DNA链被合成。通过在载体 内针对互补DNA链编码,scAAV (插入容量:3.3kb) 使得能够在2周内进行转基因 表达并且相比于它的ssAAV类似物,引起更高的转基因表达<sup>8</sup>。

[0179] 只有一种受调节的表达载体 (AAV8.TBG.IGFI.tet) 可适合于进行scAAV建构, 其它载体过大,如图10中所示。然而,如果选择这种载体用于猪研究,那么可 以使用ssAAV以为制造所需的大的量提供更佳的产率。scAAV类似物可以被用于 人类使用,其利用优越的表达,使得剂量要求降低成为可能以及提高在临床试 验中的安全性。

**表2: 四环素调节相比于雷帕霉素调节**

| [0180] | 特征   | 四环素         | 雷帕霉素    |
|--------|--|-------------|---------|
|        | 激活剂  | 多西环素        | AP22594 |
|        | 基础表达(“渗漏”)   | 非常低/无       | 无       |
|        | 线性剂量-响应  | 是           | 是       |
|        | 激活剂副作用   | 低(在妊娠期避免使用) | 免疫抑制    |
|        | 细菌/病毒蛋白  | 是           | 否       |
|        | 用于临床试验中  | 尚未          | 尚未      |
|        | TG: 转基因; AP22594, 口服雷帕霉素类似物, 免疫抑制性是雷帕霉素的1/100。 <sup>14</sup> |             |         |

[0181] 启动子相对于靶标组织:在替代性实施方案中,在AAV载体中被选用于转 基因表达的启动子具有某种组织依赖性。在替代性实施方案中,用于实施本发 明的启动子包括: 鸡β-肌动蛋白 (CBA) 启动子;甲状腺激素结合球蛋白 (TBG,肝 脏特异性) 启动子;以及劳氏肉瘤病毒 (Rous Sarcoma Virus,RSV) 启动子。在这 方面,CMV始终被证实为骨骼肌和心肌中优越的启动子。最近的研究表明CMV 启动子在肝脏中易被甲基化,从而最终中断转基因表达。肝脏表达丧失将降低 转基因的血清水平,我们因此选择不使用CMV启动子,而是选择 以下同样稳健 的 (robust) 并且更不易被甲基化的启动子:鸡β-肌动蛋白 (CBA) 启动子;甲 状 腺激素结合球蛋白 (TBG,肝脏特异性) 启动子;以及劳氏肉瘤病毒 (RSV) 启动子, 如图10 中所示。

[0182] 受调节的表达:在替代性实施方案中,在使用由AAV介导的基因转移所赋 予的长期表达的情况下,如果意识到出乎意料的不良作用,则对转基因表达进 行调节以关闭表达。受调节的表达还将使得能够间歇性递送而非恒定的递送。在替代性实施方案中,该系

统可以经过配置以使得激活剂关闭或启动转基因表达。在需要几乎恒定的转基因表达的情况下,“关闭型”系统是理想的(例如,只有在不需要转基因表达时,例如在出现不良作用的情况下,才服用口服激活剂)。在替代性实施方案中,在需要间歇性转基因表达的情况下,“启动型”系统是理想的(例如,只有在需要转基因表达的那些时候才服用口服激活剂)。

[0183] 这些替代性实施方案使得能够进行严格的控制,并且在被调控用于所治疗的特定疾病时,提供了一种服用最少量激活剂的手段。在替代性实施方案中,使用受调节的表达系统,例如蜕皮激素(ecdysone)、他莫昔芬(tamoxifen)、四环素、雷帕霉素<sup>9-12</sup>;大尺寸的蜕皮激素系统可能需要双载体策略,所述双载体策略由于调节限制而难以研发用于临床基因转移。他莫昔芬系统虽然并非同样难处理,但需要较四环素系统耐受性低的激活剂(他莫昔芬对比多西环素)。在替代性实施方案中,只有两种可供使用的选择方案(四环素调节和雷帕霉素调节)可能是合适的,并且这些选择方案是仅有的已经在大型动物模型中经过测试的系统<sup>3,4</sup>。这两种系统具有类似的特征(上表2):所关注的基因受可由激活药物(四环素或雷帕霉素类似物)诱导的工程化的转录因子控制。

[0184] 受四环素调节的表达:在替代性实施方案中,本发明在基因转移的背景下使用受四环素调节的表达:

[0185] a) 转基因的基础表达(“渗漏”):不同于先前的rtTA构建体,较新型的rtTA变体,如我们提出并且已经在最近的研究中使用的rtTA变体(rtTA2<sup>S</sup>-M2)提供稳健的四环素依赖性表达,无基础活性<sup>13</sup>。

[0186] b) 相关于患者耐受性和脱靶效应的四环素的长期使用:

[0187] • tet调节系统已经被深入地研究<sup>11</sup>;体外研究显示由多西环素刺激的转基因表达在0.001ng/ml下开始并且在0.1μg/ml下达到最大限度,与第一代系统相比,EC<sub>50</sub>降低至1/10<sup>13</sup>。在人类中,200mg多西环素的单次口服剂量在24小时提供1.5μg/ml的平均血浆和组织浓度<sup>14</sup>,是最大限度表达所需的浓度的15倍。10-20mg多西环素的单次日剂量可满足在人类受试者中完全激活转基因表达<sup>15</sup>。在针对痤疮和慢性感染长期使用口服多西环素的情况下,200mg/d的剂量是患者良好耐受的<sup>14,16</sup>。

[0188] • ORACEA<sup>®</sup> (40mg多西环素,每天口服一次)由FDA批准用于连续使用以治疗酒渣鼻<sup>16</sup>。这一剂量比治疗感染所需的200mg剂量低80%,提供了治疗酒渣鼻的抗炎作用,但不具有抗微生物作用,并且不会引起抗生素抗性生物体的产生(11年的临床数据)。每个胶囊含有40mg无水多西环素,为30mg立即释放型珠粒和10mg延迟释放型珠粒。对四环素过敏的受试者、光敏感性增大的受试者、怀孕或哺乳的女性或不到9岁的儿童(牙齿变色、长骨生长可能减少)不应当使用多西环素。在5年的临床使用中,最常见的副作用是轻度胃肠道不适<sup>16</sup>。

[0189] • 四环素可削弱基质金属蛋白酶的表达和活性,并且在心肌梗塞(MI)后的前几天内施用时对左心室(LV)重构有影响<sup>17</sup>。然而,在所提出的临床前研究中,在MI后的5周时,当LV腔扩张和瘢痕形成稳定并且在各组间相同时,施用多西环素。我们先前已经证实在所提出的MI诱发的鼠类CHF模型中,多西环素不影响LV重构、TIMP或MMP表达<sup>18</sup>。在临床环境下,在MI的急性期内将不会使用四环素。

[0190] c) 对rtTA系统的组分的免疫应答:在于非人灵长类动物中使用AAV4.tet和

AAV5.tet基因转移(视网膜内)的长期研究中,未发现对tet调节剂的免疫应答<sup>3,15</sup>,在该研究中,他们在2.5年的研究持续时间内观测到持续的四环素依赖性转基因表达。我们在表达高水平的rtTA的小鼠心脏中未观测到炎症<sup>18,19</sup>,或在使用rtTA2<sup>S</sup>-M2调节元件进行AAV5介导的受调节的IGFI表达后的小鼠和大鼠中未观测到炎症<sup>5</sup>。看来不同于视网膜内或血管内递送,向非人灵长类动物肌内递送AAV.tet的确会因对转录激活子融合蛋白的细菌和病毒组分的免疫应答而引起受调节的表达减弱<sup>20</sup>。可以测定对tet调节剂的免疫应答,并且可以同时测定对雷帕霉素调节系统的免疫应答,该雷帕霉素调节系统不具有细菌蛋白或病毒蛋白并且与免疫应答的激发无关<sup>7</sup>。关于tet调节和雷帕霉素调节的强度和限制,参见表2。

[0191] 受雷帕霉素调节的表达:在替代性实施方案中,使用大环内酯西罗莫司(sirrolimus)(雷帕霉素),所述西罗莫司是细菌吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)的产物:它最初作为抗真菌剂被研发,但已发现它具有抗增殖性和免疫抑制作用。当前,它在临床上被用于以下用途:a)用于预防器官移植的排斥反应(2mg P.O.(经口,口服),每天一次,提供 $12 \pm 6$ ng/ml的平均血清水平);以及b)由于它的抗增殖性作用而在药物洗脱支架中用以减轻血管成形术后的再狭窄。雷帕霉素延长了小鼠的寿命,似乎防止了衰老的有害影响<sup>21</sup>,并且在治疗多形性成胶质细胞瘤中被用作佐剂<sup>22</sup>。雷帕霉素结合胞质的FK-结合蛋白12(FKBP12)并且抑制雷帕霉素(mTOR)信号转导通路的哺乳动物靶标。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶mTOR影响细胞生长和增殖,并且促进细胞存活。雷帕霉素在基因疗法方面的有用性在于它的二聚化特性,这一特征在雷帕霉素调节的表达系统中被加以利用。在这种系统中,工程化的转录因子的DNA结合域和激活域被分开地表达为融合蛋白,它们在添加二价“二聚化”药物的情况下交联并且进而被激活,所述二价“二聚化”药物在这种情况下是雷帕霉素或雷帕霉素类似物<sup>12</sup>。表达是剂量依赖性的、可逆性的,并且由纳摩尔浓度的激活剂触发<sup>12</sup>。该雷帕霉素系统不含病毒蛋白或细菌蛋白,并且因此不太可能激发免疫应答。在猕猴中,肌内注射编码促红细胞生成素的AAV1在促红细胞生成素的水平不下降并且对调节元件无免疫应答的情况下提供了长达6年(yr)的Rap调节的表达(26个单独的诱导周期)<sup>4</sup>。免疫抑制作用是雷帕霉素潜在的缺点。然而,这个问题可以通过使用口服雷帕霉素类似物(AP22594)来规避,所述口服雷帕霉素类似物与雷帕霉素同样有效地激活转基因表达,表现出最低限度的免疫抑制作用,并且不抑制mTOR<sup>4</sup>。此外,作为激活剂,每周一次而非每天一次给药具有有效性,从而进一步减少脱靶效应。可以在猪中从有效用于猕猴的口服剂量(0.45mg,每周一次)开始,确定口服施用的AP22594的剂量-响应关系和它的最大给药时间间隔<sup>4</sup>。

#### [0192] 胰岛素样生长因子I (IGFI)

[0193] IGFI的选择。生长激素(GH)经由IGFI的激活来发挥它的许多作用。IGFI经由Akt发挥它的许多作用。由于从GH经由IGFI向Akt进行信号转导的汇聚性(convergence),因此必须支持优先于GH或Akt的对IGFI的选择。预测GH表达增加会使血清葡萄糖和血压升高,这些有害影响通过选择IGFI来避免。预期Akt的表达增加会使细胞凋亡减少,但具有并非由Akt提供的其它潜在有利的作用,如血管生成增加。我们因此选择了IGFI基因转移用于我们的最初临床前CHF研究,并且最近已表明IGFI基因转移改善衰竭的大鼠心脏的功能<sup>5</sup>(参见图1-8以及表4和5)。

[0194] IGF1信号转导。IGF最初被称为生长调节素,是介导GH的许多合成代谢活性和促有丝分裂活性的肽的家族。与胰岛素具有结构和代谢相似性的两种生长调节素在1978年从人类血浆中分离出并且被命名为IGFI和IGFII。IGFI (生长调节素C) 随后被证实为由循环GH调节的IGF。IGFI在具有3个二硫桥键的单链中具有70个氨基酸并且具有7.6kD的分子量。最初认为它仅由肝脏产生,然而已显示,它由包括肠、脑、肾脏、肺以及心脏在内的多种组织产生。IGFI基因在大鼠中的肝脏特异性缺失并未改变正常的生长和发育<sup>23</sup>,这表明在包括心脏在内的其它组织中广泛表达的IGFI以旁分泌方式经由局部组织释放来调节生长和发育。

[0195] IGF1属于包括配体(IGFI、IGFII、胰岛素)、六种已知的结合蛋白(IGFBP 1-6) 以及(包括IGFI受体和胰岛素受体在内的)细胞表面受体在内的蛋白质家族<sup>24</sup>。IGFI被翻译成前原肽(pre-pro peptide),所述前原肽包括氨基端信号肽、A、B、C和D结构域以及可变羧基端E肽。在人类中存在三种已知的不同之处仅在于可变E肽的氨基酸组成的原IGFI亚型(原IGFIa、原IGFIb以及原IGFIc)。IGF结合蛋白(IGFBP)充当载体蛋白并且通过抑制降解来延长IGF的半衰期<sup>24</sup>。几乎所有(98%)的IGFI以主要(80%)与IGFBP-3结合的形式循环<sup>24</sup>。

[0196] IGF1和IGFII对除肝脏之外的所有组织中的IGFI受体显示出高亲和力结合作用。IGF受体与胰岛素受体共有60%的同源性并且含有酪氨酸激酶结构域。IGFI与受体结合引起酪氨酸残基的自体磷酸化。这激活受体,引起包括胰岛素受体底物在内的底物磷酸化,这激活多个信号转导级联,所述多个信号转导级联包括PI3激酶/Akt通路和丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)通路以及其它级联,它们当中有许多具有有益的心血管作用(参见以下部分和表3)。

[0197] 增加的IGFI的作用。血清IGFI增加降低血清胰岛素水平,提高胰岛素敏感性并且改善脂质特征<sup>24</sup>。然而,输注IGFI蛋白可能引起低血压和低血糖症<sup>25</sup>。对抗胰岛素活性的GH使血清葡萄糖水平升高。IGFI提高心脏中葡萄糖摄取的能力可以在IGFI施用后在LV功能的缺血后恢复中起作用。IGFI经由受体依赖性作用和非受体依赖性作用以及一氧化氮的产生而使肌肉血流增加并且具有血管扩张剂活性<sup>26</sup>。高剂量静脉内IGFI输注在人体内组合的代谢作用和血管扩张剂作用可能会引起头昏和潮红——较低剂量增强心脏功能,不影响血压或血清葡萄糖并且与症状无关<sup>25,27</sup>。

[0198] IGF1受体激活引起许多细胞反应,包括调节基因表达、刺激肌细胞生成、细胞周期进程、免疫调控以及类固醇生成。在心脏中,IGFI和IGFI受体/PI3K/Akt信号转导通路对心肌细胞的功能、生长以及存活具有有益的作用。此外,IGF表现出血管生成作用<sup>28</sup>,增强正常心脏<sup>25,29,30</sup>和衰竭心脏<sup>27,29,30-33</sup>的心脏收缩功能,并且抑制细胞凋亡<sup>34,35,38</sup>。这些特征使得IGFI对于CHF疗法来说是有吸引力的(表3)。

表 3: IGF1: 有益的心血管作用

| 特征                | 机制                            | 物种    | 参考文献         |
|-------------------|-------------------------------|-------|--------------|
| ↓SVR              | 经由 NO 的血管扩张                   | R、P、H | 25、26、32、39* |
| ↑LV dP/dt、EF 或 CO | 肌肉收缩剂 (inotrope); 血管扩张        | R、D、H | 25、29、30、36  |
| ↑CHF 中的 LV 功能     | 肌肉收缩; ↑Ca <sup>2+</sup> 调控    | R、D、P | 27、29-33、39* |
| ↑心脏保护             | ↓经由 Akt 的细胞凋亡                 | M、R   | 34、35、38     |
| ↑LV 质量            | CM 增殖 (prolif); ↓经由 Akt 的细胞凋亡 | M、R   | 31、36、45、46  |
| ↑血流               | 血管生成                          | R     | 28           |

SVR: 全身血管阻力; CO: 心输出量; EF: 射血分数; LV: 左心室; prolif: 增殖; M: 小鼠; R: 大鼠; D: 狗; P: 猪; H: 人; 39\*使用 GH, 所述 GH 使得 IGF1 升高到 2 倍。

[0200] 治疗心脏病方面的 IGF1 蛋白 (表 3)

[0201] 临床前研究。已对施用重组人 IGF1 或 GH 蛋白在动物心脏病模型中的作用 进行研究。IGF1 在分离的大鼠心脏和白鼬乳头肌中是一种正性肌肉收缩剂 (inotrope); GH 在相同的组织中不具有肌肉收缩的作用<sup>29</sup>。在从患有起搏诱发 性心力衰竭的狗分离的乳头肌中发现 IGF1 的类似的肌肉收缩的作用<sup>30</sup>。向正常 大鼠施用 IGF1 四周增强了心脏功能并且引起向心性 LV 肥厚<sup>31</sup>。将 IGF1 和 GH 一起施用两周与正常大鼠中的 LV dP/dt 增加和 LV 肥厚有关<sup>36</sup>。在心肌缺血和再 灌注之前向大鼠施用 IGF1 使得肌酸激酶释放减少并且使得细胞凋亡减少<sup>34</sup>。在 MI 后的四周时将 IGF1 与 GH 组合施用<sup>32</sup>或单独施用 IGF1<sup>33</sup>增强了大鼠的 LV 功 能。在 MI 后向大鼠给予 GH 四周增强了 LV 的收缩功能<sup>37</sup>, 减少了心脏纤维化、心肌细胞的细胞凋亡 并且提高了存活率<sup>38</sup>。在猪的 CHF 的起搏模型中, GH 使 血清 IGF1 增加, 使 LV 功能增强并且使 LV 壁应力降低<sup>39</sup>。

[0202] 临床研究。在临床上使用 GH 或 IGF1 蛋白已经受到了相当大的关注, 尽管 缺乏大的安慰剂对照研究。在对 CHF 患者 (n=8) 进行的盲法安慰剂对照交叉研究 中对 IGF1 输注的急性血液动力学作用进行了研究。IGF1 的四小时输注使心输出 量增加, 血管阻力减小并且使右心房压力和楔压降低<sup>27</sup>。未在患有 CHF 的患者 中对 IGF1 蛋白的长期施用进行评价。在患有 CHF 的患者中使用 GH 蛋白产生不 明确的结果。在总共 14 名患有 CHF 的患者中进行的两项小的非对照并且非盲 法的研究报道进行 GH 蛋白疗法三个月提高了血清 IGF1、LV 功能以及临

床状态<sup>40,41</sup>。向患有CHF的患者给予GH(蛋白质)长达3个月的随机安慰剂对照试验并未改变LV的功能或临床状态<sup>42,43</sup>。关于GH蛋白疗法的最新的文献综述得出结论认为或许是由于肽施用的动力学而缺少证据表明在缺血性和特发性临床CHF中的功效<sup>44</sup>。因此,在替代性实施方案中,本发明的基因转移方法通过提供持续的IGFI表达而可优于IGFI蛋白疗法。

[0203] 心脏IGFI或GH的表达增加。人类IGFI在大鼠中的心脏定向性表达在使心肌细胞IGFI产生随之增加的同时几乎使血清IGFI水平加倍。这些大鼠的心脏重量增加,伴有心肌细胞增生,但心肌细胞体积没有增加<sup>35,45</sup>。在MI后,发现心肌细胞的细胞凋亡减少以及Akt的磷酸化增加<sup>35</sup>。IGFI的心脏定向性表达会减缓年龄相关的细胞衰老,伴有端粒酶活性、端粒缩短以及DNA损伤的减少。与年龄匹配的转基因阴性同窝出生仔畜相比,这些大鼠在22个月大时显示出Akt激活增加和LV功能增强<sup>46</sup>。在心肌病背景(杂交育种模式)下心脏IGFI的共表达似乎防止心脏凋亡、LV重构以及LV功能障碍<sup>47</sup>。然而,由于CHF从未存在,因此这一策略不等同于治疗已经存在的CHF,治疗已经存在的CHF的方法是当前建议的中心主题。

[0204] 为了确定GH基因转移是否会影响MI后的LV重构,在冠状动脉闭塞时向大鼠心肌直接注射编码GH的腺病毒(Ad.GH)<sup>48</sup>。在受损心肌与存活心肌之间的边界区中进行注射。在MI和基因转移后的六周时,在舒张末期左室内径(LV end-diastolic dimension)、LV dP/dt以及梗塞区的壁厚方面观测到有利的作用。这些科学家们随后证实在冠状动脉闭塞后的三周时将Ad.GH注射到大鼠的梗塞边界区中,在注射后的三周时,使得LV dP/dt增加并且减少了LV扩张和壁变薄<sup>49</sup>。在MI期间或在MI后的3周时的进行GH基因转移似乎对LV重构具有有益的作用。

[0205] 当在即将发生冠状动脉闭塞之前将编码IGFI的腺病毒(Ad.IGFI)注射到大鼠的受损灌注床中时,梗塞程度减轻50%,这一作用被认为主要是细胞凋亡减少的结果<sup>50</sup>。这项研究并未涉及IGFI基因转移对MI后的LV重构的作用。已显示,腺病毒介导的IGFI基因转移在体外减少缺氧诱导的肌细胞凋亡,以及在大鼠缺血再灌注模型中,预先注射编码IGFI的腺病毒使梗塞面积减少约50% ( $p < 0.003$ ),但该转基因仅在约15%的缺血区域中表达,这与区域性旁分泌作用相符。并未对使IGFI在整体衰竭的心脏中表达的作用进行探究。

#### [0206] 潜在的IGFI不良作用

[0207] 存活率。破坏GH/IGFI系统似乎会延长而非缩短具有正常心脏功能的大鼠的寿命<sup>51</sup>。然而,我们打算在严重CHF的背景下使IGFI表达增加,这预示着短期死亡率会显著增加。没有数据表明在CHF中抑制IGF会延长寿命。相反,人中血清IGFI增加降低CHF的发病率和死亡率<sup>52,53</sup>。流行病学研究已经显示血清IGFI低的人产生缺血性心脏病的风险增大。在弗雷明汉研究(Framingham study)中,血清IGFI高于中值的个体与低于中值的个体相比CHF的发病率降低50%<sup>52,53</sup>。最近的报道显示在CHF中延长寿命的血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)使IGFI信号转导增加<sup>54</sup>。我们的数据显示IGFI基因转移增强了衰竭的大鼠心脏的功能,并且我们打算确定是否还存在存活率方面的益处。

[0208] 癌症。临床流行病学研究报道了血清IGFI水平升高(>2倍的升高)与前列腺癌和绝经前乳腺癌之间的相关性<sup>55</sup>,但没有表明这种相关性是因果相关的。值得注意的是,前列腺癌的发病率随年龄而增加,而血清IGFI浓度降低<sup>55</sup>。在癌症患者中,血清IGFI升高可能源于肿瘤。实际上,大鼠的前列腺上皮中IGFI表达增加会使得血清IGFI浓度升高并且会导致前列腺瘤形成<sup>56</sup>。血清IGFI浓度升高还可能由癌症患者的营养状况改变所引起。可以推测

IGFI可能经由血管生成和 细胞凋亡减少来增进肿瘤生长。使与伴随的血清IGFI持续升高的IGFIb的心脏 定向性表达与前列腺癌或乳腺癌无关,并且血清IGFI和GH的组合增加不提高 患有肢端肥大症的患者的前列腺癌、乳腺癌或肺癌的发病率<sup>54</sup>。IGFI在癌症发 生或进展中的作用是理论性的。看来谨慎的是,使IGFI表达增加的疗法应当限 制IGFI的血清浓度,并且还提供如果需要停止表达的手段。我们打算通过使用 受调节的表达载体的基因转移来实现这些目标,其使血清中的IGFI浓度升高并 且从而具有有益的心血管作用。

[0209] 研究的新颖性。这些研究侧重于研发用于临床CHF的IGFI基因转移。在临 床CHF中尚未使用IGFI (或GH) 基因转移。在CHF中对GH/IGFI蛋白进行的双 盲安慰剂对照临床试验还未成功,这或许是因为GH/IGFI蛋白的生物半衰期相 对较短,这一问题将通过基因转移来克服。虽然已经在动物研究中在冠状动脉 闭塞之前使用GH和IGFI的心脏基因转移来减小梗塞面积,但并没有先前研究 对用于CHF本身的IGFI基因转移进行研究。此外,所提出的使用长期并且受调 节的表达载体的全身性递送进行的旁分泌方法是新颖的,并且可以应用于其它 基于旁分泌的肽来治疗多种心血管疾病。

[0210] 总结。由于临床前和临床研究关于IGFI的肽施用在治疗严重CHF方面的可 预测的益处的局限性以及IGFI的基于旁分泌的基因转移在理论上的前景,我们 在我们的实验室中着手进行研究(参见初步数据),所述研究设计为规避连续或长 期间歇性静脉内肽输注的障碍和不足。

[0211] 其它有益的肽。虽然IGFI的使用是引人注目的,但应当强调的是,本发明 的旁分泌基因治疗方法还适用于具有有益的心血管作用的任何循环肽。举例来 说,尿皮质素-2是在促肾上腺皮质激素释放因子家族中新近发现的一种血管活 性肽,所述血管活性肽经由促肾上腺皮质激素释放因子2型受体起作用,所述 受体稳健地表达于心脏和血管结构中。输注尿皮质素-2肽在患有心力衰竭的动 物和患者中具有多种多样有益的作用<sup>57</sup>。BNP是可以类似方式递送的另一种用 于治疗临床CHF的生物有效性肽。此外,在肺动脉高压中,前列 环素类似物能 够有效治疗肺动脉高压,但当前的药剂(依前列醇(epoprostenol)和曲前列 尼尔(trepstinil))需要恒定的全身注射,并且该治疗本身与高发病率有关<sup>58</sup>。在替代 性实施方案中,本发明的方法提供了一种编码前列环素合酶的受调节的表达载 体作为肺动脉高压的旁分泌型基因疗法。实际上,需要延长的或长期的间歇性 静脉内输注的任何当前肽治疗剂均将适用于这种激素样基因转移方法。

[0212] 在临床研究中的AAV和免疫应答。在肌肉或血管内递送AAV载体后长期 的转基因表达在啮齿动物中一直是规律而不是例外。然而,在患者中进行的研 究一直受到因对转基因以及有时对AAV载体本身的免疫应答所造成的有限表达 所困扰<sup>6</sup>。从这些研究和其它研究中得出两个结论。1)肌肉(与血管内相比)AAV 递送一般会激发对转基因和AAV衣壳的增强的免疫应答;以及2)由于啮齿动物 的相对免疫耐受性,因此在啮齿动物中的成功并不总是预示着在人类中的成功。可以在着眼于人类的情况下对啮齿动物和猪的研究进行设计:

[0213] 可以选择AAV血清型(AAV8和AAV9),所述AAV血清型最不可能与人类 受试者的预先存在的中和抗体有关<sup>59</sup>。举例来说,AAV8与抗AAV中和抗体的 最低阳性率有关(19%,相对而言,AAV1是59%并且AAV2是50%)。此外,在 具有AAV8/9抗体的少数人受试者当中,那些受试者中的75%-90%具有低滴度,从而使得AAV8和AAV9成为当前在预期的免疫应答方面 最佳的选择<sup>59</sup>。人血 清对源自恒河猴的AAV载体(如AAVrh.32.33)几乎不具有血清阳性<sup>60</sup>,

从而在 AAV8和AAV9被证明不合适 的情况下提供一种替代的载体,尽管使用 AAVrh.32.33 的临床前和临床经验是有限的。

[0214] 可以避免肌内注射AAV载体,这是因为它们在大型动物体内可能激发免疫 应答<sup>6</sup>。

[0215] 可以使用两种物种特异性IGFI蛋白:大鼠和猪。可以使用大鼠IGFI和猪 IGFI这两者。使用物种特异性IGFI将减少对转基因的免疫应答。可以使用编码 人IGFI的最佳载体来进行临床试验。

[0216] 静脉内递送AAV8和AAV9是吸引人的,这是因为它的简易性并且因为它 有可能在最低的可能的AAV剂量下达到治疗性转基因的最高血清水平。虽然对 这些AAV载体的血清阳性率在猪和包括人在内的灵长类动物中是重要的,但它 在啮齿动物中并非是一个重要的因素。对来自我们的供应商的猪进行初步取样 显示在所测试的9头猪中的7头中没有 AAV8抗体或AAV9抗体的迹象。

[0217] 在替代性实施方案中,本发明的转基因的表达局限于单个器官,例如如果 这种策略提供了该转基因的治疗性血清水平。举例来说,本发明的示例性载体 是具有肝细胞特异性启动子(TBG,人甲状腺激素结合球蛋白)的AAV8。

[0218] 使用IGFI进行的基于旁分泌的基因转移。

[0219] 虽然我们选择IGFI进行这些概念验证性研究,但在替代性实施方案中,本 发明包括使用本文所概述的候选基因中的任一种,并且这些基因中的任一种将 有效达到预期效果。举例来说,本发明提供有效递送任何旁分泌多肽的方法和 组合物,所述任何旁分泌多肽例如哺乳动物强心肽、重组人松弛素-2、松弛素-2、尿皮质素-2、尿皮质素-1、尿皮质素-3、脑利钠肽、前列环素合酶、生长激素、胰岛素样生长因子-1或其任何组合;或者人尿皮质素-2、尿皮质素-1、尿皮质素 -3、脑利钠肽、前列环素合酶、生长激素、胰岛素样生长因子-1或其任何组合。

[0220] 我们将处于四环素反应元件(TRE)控制下的编码大鼠IGFI(A型)的示例性 AAV5载体工程化:图1阐明了包含编码IGFI的AAV5的本发明的示例性构建 体;这种示例性AAV5载体提供IGFI的受调节的表达:ITR:反向末端重复序 列;TRE:四环素反应元件;IGFIAU1:胰岛素样生长因子-I;SVpA:来自SV40 病毒基因组的多聚腺苷酸(双向);rtTA2<sup>S</sup>M2:反向四环素控制的转录激活子; CMV:人类巨细胞病毒早期基因启动子。2823bp的总插入大小适合于 scAAV5 载体(容量:3.3kb)。

[0221] 编码序列包括信号肽以确保IGFI的细胞外分泌。我们已在基因转移实验中 在培养的心肌细胞中使用这种载体(AAV5.IGFI.tet):图2中的A阐明了来自以下 研究的数据,在所述研究中,使用AAV5.IGFI.tet(10,000gc/细胞,2天)感染培养 的新生大鼠心肌细胞;所示的凝胶表明IGFI的表达由多西环素(+Dox)(2μg/ml, 3天)所诱导,但在不存在多西环素(-Dox)的情况下不表达。通过免疫印迹法由抗 AU1抗体在培养基中检测到IGFI。图2中的B阐明了如下的数据,其中在同样 的实验中,将心肌细胞在Akt裂解缓冲液中裂解(10分钟, 4℃)并且离心(12,000×g,10分钟);通过抗Akt抗体和抗磷酸化T308-Akt抗体来检测总 Akt 和磷酸化Akt。IGFI表达与Akt激活有关。在感染后,转基因的表达不可检出(无“渗漏”)直到使用多西环素激活为止(图2中的A)。

[0222] 我们的载体(图1)含有较新的rtTA变体(rtTA2<sup>S</sup>-M2),不同于先前的rtTA构 建体,这种rtTA变体提供稳健的dox依赖性表达并且提供低的基础活性或不提 供基础活性<sup>13</sup>。

[0223] 在培养的心肌细胞中受调节的IGFI表达

[0224] 使用AAV5.IGFI-tet ( $10^4$ gc/细胞, 2天) 对培养的新生大鼠心肌细胞进行基因转移。如在图3中以图表方式所阐明, 随后, 将多西环素 ( $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 添加至培养基中, 并且使用实时RT-PCR对IGFI的mRNA表达进行定量。IGFI的mRNA表达在30分钟内增加到1.5倍 (相比于(vs) 未刺激的), 并且到第24小时达到升高到14倍的峰值。在第48小时, IGFI mRNA略微减少 (10倍), 反映出多西环素降解。为了关闭IGFI表达, 使用四次连续的PBS洗涤将多西环素去除 (“洗去”, 参见图3)。在撤除多西环素后, IGFI mRNA迅速减少。

[0225] 骨骼肌递送AAV5.IGFI.tet改善衰竭心脏的功能

[0226] 骨骼肌基因转移。我们最初在鼠类心力衰竭中在间接冠状动脉内递送AAV5.IGFI.tet (图1) 后进行研究, 发现在心脏靶向递送后衰竭心脏的功能得到了大幅改善。然而, 用于证实基于旁分泌的转移的功效的概念验证性研究将需要骨骼肌递送该载体。对于这些关键的研究, 我们在大鼠的胫骨前肌中使用肌内递送AAV5.IGFI.tet<sup>5</sup>。选择AAV5的原因在于其在骨骼肌中肌内注射后的众所周知的高表达水平。在所有情况下, 我们已在培养基中发现了IGFI的表达 (细胞培养实验), 并且在心脏中 (鼠类CHF模型) 和血清中 (肌内注射后的大鼠模型、静脉内注射后的小鼠) 发现了长期IGFI表达, 并且发现衰竭心脏的功能得到了相应的改善<sup>5</sup>。

[0227] 在大鼠研究中, 我们首先对骨骼肌注射AAV5.EGFP以提供长期的转基因表达的可行性进行研究, 如图4A中所阐明: 图4A阐明了显示出在AAV5.EGFP基因转移后的3周时在大鼠的单侧胫骨前肌中的EGFP表达的显微照片。来自同一动物的对侧未经过注射的胫骨前肌未显示出EGFP的表达。图4B是表4, 汇总了来自对骨骼肌IGFI表达在CHF中的作用进行测量的超声心动描记术的数据。

[0228] CHF的MI模型和实验方案

[0229] 通过近端左侧冠状动脉闭塞, 从而引起大面积透壁性梗塞和严重的LV功能损伤来诱发大鼠的MI。在MI后的后的一周时, LV功能受损的大鼠在胫骨前肌中接受 $2 \times 10^{12}$ 个基因组拷贝 (gc) 的AAV5.IGFI.tet。在四周以后 (在MI后的5周时), 将LV射血分数 (EF)  $< 35\%$  的大鼠随机分配到两组中: 一组接受饮用水中的多西环素以激活IGFI表达 (IGF启动型;  $n=10$ ), 而另一组不接受多西环素 (IGF关闭型;  $n=9$ )。在MI后的十周时 (在激活IGFI表达后的5周时), 通过超声心动描记术和血液动力学研究对LV大小和功能进行评估; 图5阐明了用于在CHF中进行AAV5.IGFI.tet骨骼肌基因转移的实验方案。

[0230] 结果。IGF启动型大鼠显示出LV射血分数增加 ( $p=0.02$ ) 和收缩末期左室内径减小 ( $p=0.03$ ) (表4, 参见图4B)。此外, 通过多巴酚丁胺 (dobutamine) 输注期间压力上升的速率 ( $\text{LV} + \text{dP}/\text{dt}$ ) 所评估的LV收缩功能在引发IGFI表达后增强 ( $p=0.001$ ) (表5, 下一页)。此外, 观测到在心输出量 ( $p=0.007$ ) 和每搏作功 ( $p=0.003$ ) 方面的有利变化 (表5)。在转基因激活后的5周时, 血清IGFI增加 (IGF关闭型:  $164 \pm 24\text{ng}/\text{ml}$ ; IGF启动型:  $218 \pm 11\text{ng}/\text{ml}$ ;  $p=0.008$ ; 每组 $n=9$ )。这些数据指示骨骼肌注射AAV5.IGFI.tet使得能够进行四环素激活的表达, 使血清IGFI水平升高, 并且改善了衰竭心脏的功能<sup>5</sup>。在替代性实施方案中, 可以使用具有较小免疫原性的AAV载体, 并且可以通过静脉内注射而非肌内注射来使用它们以避免激发免疫应答, 并且对两种受调节的表达系统进行测试。

表 5: 激活骨骼肌 IGF1 表达在 CHF 中的作用

|                       |             | IGF 关闭型<br>(n=10)          | IGF 启动型<br>(n=10)          | p       |
|-----------------------|-------------|----------------------------|----------------------------|---------|
| HR(次/min)             | 基础<br>多巴酚丁胺 | 377±42<br>373±29           | 364±83<br>395±10           | 0.79    |
| CO<br>(ml/min)        | 基础<br>多巴酚丁胺 | 10.3±2.2<br>15.8±2.4       | 16.3±1.8<br>23.2±2.8       | 0.007   |
| SW(ml·mmHg)           | 基础<br>多巴酚丁胺 | 1.6±0.4<br>3.8±0.8         | 4.1±0.6<br>6.4±1.2         | 0.003   |
| LV +dP/dt<br>(mmHg/s) | 基础<br>多巴酚丁胺 | 4,237±630<br>6,842±913     | 6,337±687<br>12,974±1,061  | <0.0001 |
| LV -dP/dt<br>(mmHg/s) | 基础<br>多巴酚丁胺 | -3,453±494<br>-6,036±1,197 | -4,564±409<br>-8,518±1,056 | 0.030   |
| 收缩压<br>(mmHg)         | 基础<br>多巴酚丁胺 | 104±12<br>113±9            | 143±11<br>163±8            | 0.011   |
| 平均压<br>(mmHg)         | 基础          | 82±13                      | 110±8                      | 0.07    |
| SVR(伍德单位 (Wood        | 基础          | 7.5±1.3                    | 6.8±0.5                    | 0.23    |

Unit))

HR: 心率; CO: 心输出量; SW: 每搏做功。

数据表示平均值±SE。

概率值来自双因素 ANOVA, 显示出 IGF1 作用。参考文献 5

[0233] 心脏细胞凋亡和纤维化(图6)

[0234] 图6阐明了AAV5-IGF1-tet基因转移对心脏细胞凋亡和纤维化的作用。图6 中的A以图表方式阐明了来自TUNEL染色的数据,所述数据表明激活IGF1表达(IGF启动型)与心肌细胞的细胞凋亡减少有关(p<0.0001;双因素ANOVA),所述心肌细胞的细胞凋亡在边界区中比在远端区中减少更多。图6中的B阐明了来自IGF关闭型和IGF启动型大鼠的未梗塞的室间隔的经过苦味酸天狼猩红染色的切片,示出了心脏纤维化减少,并且胶原切面面积减小(p=0.048);图6中的C以图表方式阐明了来自IGF关闭型和IGF启动型大鼠的这一数

据。

[0235] AAV5.IGF1.tet的静脉内递送对比肌内递送:在初步研究中,我们确定了静脉内基因转移是否可以提高循环IGF1水平。在静脉内递送AAV5.IGF1.tet(每只小鼠 $5 \times 10^{10}$ gc,尾静脉)后的一周时,将小鼠随机分配到两组中的一组中:一组接受饮用水中的多西环素以激活IGF1表达(IGF启动型)而另一组不接受多西环素(IGF关闭型)。由于大部分循环IGF1以高亲和力与IGF结合蛋白(IGFBP)结合并且是生物上不活化的,因此我们对游离血清IGF1(生物活性IGF1形式)进行测量,在激活IGF1表达后的3个月,在IGF启动型小鼠中的游离血清IGF1是在IGF关闭型小鼠中的2倍(图7,下一页)。使用在第2.2.1.2.部分中所概述的肌内 AAV5.IGF1.tet(每只大鼠 $2 \times 10^{12}$ gc)基因转移策略,我们发现在激活IGF1表达后的5周时,IGF启动组中的游离血清IGF1是IGF关闭组中的1.3倍(图7)。这些数据表明在血清IGF1浓度方面,静脉内递送AAV5.IGF1.tet比肌内递送更有效。

[0236] 此外,静脉内策略有可能避免激发免疫应答,所述免疫应答的激发已在肌内递送AAV之后被观测到<sup>6</sup>。这些实验提供了对于我们的研究来说关键的可行性数据。

[0237] 静脉内递送:AAV5对比AAV9。

[0238] 我们接下来使用在肝脏和心脏中的拷贝数和转基因表达作为终点来确定静脉内递送AAV5对比AAV9的相对功效,如图8中所阐明。我们使用自身互补型(sc)AAV载体,使得与单链(ss)AAV载体相比能够更早表达。小鼠接受静脉内 scAAV5.CMV.EGFP或scAAV9.CMV.EGFP( $5 \times 10^{11}$ gc)并且在21天后被处死。使用针对这两种载体中的共有序列的PCR引物来比较肝脏和心脏中AAV的DNA拷贝数。在肝脏中,AAV9(相比于AAV5)使得AAV的DNA拷贝和EGFP表达这两者增加到3倍;在心脏中,观测到AAV的DNA拷贝增加到5倍并且EGFP表达增加到8倍。这些数据显示与静脉内AAV5相比,AAV9可以提供更高血清水平的转基因。

[0239] 方法

[0240] 图10阐明了本发明的示例性载体和载体设计:通过使用根据初步研究和生物特征所选择的三种载体的静脉内递送,可以确定广泛分布和表达的AAV8和 AAV9(图10的A)以及具有肝脏特异性启动子的AAV8(图10的B)的相对优点。有效性的标准可以是在递送后6周(w)时的IGF1血清水平。使用最佳的AAV载体产生两种受调节的表达载体(Tet和Rap),可以在对大鼠进行静脉内递送后对这两种受调节的表达载体进行比较,如图10的C-F中所示。有效性的标准可以是IGF1的血清水平,这次是在激活转基因表达后的16周时(递送后的20周时)进行研究。

[0241] 图10的A和B。用于在大鼠中进行最初研究以确定用于后续研究的最好的 AAV血清型的AAV载体。这些载体在CBA(AAV8和AAV9)或TBG(AAV8)的驱动下编码大鼠IGF1(未受调节)。基于血清IGF1水平和表达持续时间,这些中最好的载体可用来进行后续的研究以确定最佳的调节系统。

[0242] 图10的C-F。用于在大鼠中进行研究以确定最佳的受调节的表达系统的候选载体。使用来自最初的研究(上述)最好的AAV载体,产生并测试2种受调节的表达载体:一种受四环素调节,另一种受雷帕霉素调节。这些载体在 RSV(AAV8和AAV9)或TBG(AAV8)的驱动下编码大鼠IGF1的受调节的表达。CBA启动子对于雷帕霉素调节载体来说过大,因此使用RSV来替代。这两种调节系统中的较好者被选用于产生用于在正常猪中进行的后续研究的

最佳载体, 编码猪IGFI的受调节的表达。ITR:反向末端重复序列;TRE:四环素反应元件;IGFI:胰岛素样生长因子-I;SVpA:来自SV40病毒基因组的多聚腺苷酸(双向);rtTA2<sup>S</sup>M2:反向四环素控制的转录激活子;SV40en:猿猴病毒40增强子;TBG Prom:甲状腺激素结合球蛋白启动子;RSV Prom:劳氏肉瘤病毒启动子;FRB-p6:FRAP(雷帕霉素相互作用蛋白)的一部分,与转录因子NF- $\kappa$ B的亚单位(p65)相结合;IRE:内部转录重新进入位点;ZF:锌指HD1 DNA结合域;FKBP: FK506结合蛋白;pA:最小多聚腺苷酸化片段;ZBD:锌指HD DNA结合域(8个拷贝)。

[0243] 我们预计对AAV的免疫应答将不会在大鼠中起重要作用,尽管这些应答在狗、猪、人以及其它灵长类动物中是重要的。应当仔细地对免疫应答进行评估。可以对AAV的生物分布(例如利用qPCR使用扩增所有载体中的共有序列的引物)和毒性(例如使用组织学分析)进行定量。

[0244] 组大小。成功的主要标准可以是IGFI的血清水平,所述血清水平具有20%的变异系数。为了检测出各组之间血清IGFI的30%的差异,在假定 $\alpha$ 错误为0.05并且 $\beta$ 错误为0.10的情况下,将需要 $n=10$ 的组大小。

[0245] 实施例3:递送编码尿皮质素-2的AAV8增强心脏功能

[0246] 这个实施例证实在本发明的方法的替代性实施方案中,旁分泌转基因充当激素并且在从远处部位被释放到循环中之后具有心脏作用。这种示例性方法可以规避实现高产率心脏基因转移的问题并且使患者能够在诊室看病期间通过全身性注射被治疗。此外,这种示例性方法可以消除对静脉内(IV)递送治疗性肽的需要并且从而避免了反复和长时间住院治疗、高发病率以及巨大的经济成本。在替代性实施方案中,实现这些目标的最适合的载体是8型腺相关病毒(AAV8),所述8型腺相关病毒在啮齿动物、猪以及灵长类动物中静脉内递送之后提供长期并且广泛的表达。

[0247] 在方法的替代性实施方案中,使用尿皮质素-2,一种新近发现的促肾上腺皮质激素释放因子家族血管活性肽,作为治疗性转基因。尿皮质素-2可以经由促肾上腺皮质激素释放因子2型受体起作用,所述受体稳健地表达于心脏和血管结构中。在患有充血性心力衰竭的动物和患者中进行的研究已证实尿皮质素-2肽输注的有利的血液动力学作用,包括收缩功能得到增强而与加载量无关,这表明直接的心脏作用。我们确认静脉内递送使用鸡 $\beta$ -肌动蛋白启动子的AAV8提供持续的高的UCn2血清水平并且增强了衰竭的小鼠心脏的功能。

[0248] 为了选择最好的具体实施方案来实施本发明的这一方面,可以在小鼠和猪中进行研究,例如使用这种示例性的基于旁分泌的方法,在本领域接受的动物模型(小鼠CHF模型)中:a)确定受调节的转基因表达以使得能够对血浆转基因水平进行微调,并且允许根据需要关闭和启动表达;以及b)确定尿皮质素-2基因转移的安全性、功效以及作用机制。同样,可以使用正常的猪来确定:a)提高血清UCn2所需的最低有效载体剂量;b)载体和转基因的生物分布;以及c)毒性。

[0249] 本发明的旁分泌基因转移方法优于静脉内肽输注的潜在优势示于表1(上文)中。在替代性实施方案中,实施本发明的方法允许避免感染并且减少反复和长时间住院治疗,从而降低了成本。在替代性实施方案中,全身性载体递送由于在任何给定的AAV剂量下均提供最高水平的表达而是旁分泌基因转移的一种优势。这种方法的潜在安全性和功效最

近在对患有血友病B的患者进行的早期基因疗法临床试验中被证实<sup>2</sup>,这一研究重新建立起对基因疗法的信心。在替代性实施方案中,本发明的旁分泌基因转移方法可以适用于具有有益的心血管作用的任何循环肽。

[0250] 在替代性实施方案中,使用AAV,从而使得能够进行与腺病毒相比更长时间的转基因表达,并且避免了与反转录病毒有关的插入诱变。在单次注射AAV载体之后的数年,在大型动物体内仍显示出持续的转基因表达<sup>6-10</sup>。我们已在小鼠<sup>11</sup>和大鼠中对此加以确认。虽然最近的临床试验已经发现一些AAV血清型在IM注射之后激发免疫应答<sup>12,13</sup>,但较新一代的AAV载体(AAV5、AAV6、AAV8和AAV9)在灵长类动物中不存在类似的问题<sup>14</sup>。IV AAV递送在血清转基因水平方面优于IM递送,并且AAV9和AAV8优于AAV5<sup>15</sup>(和未公布的数据)。此外,预先存在的抗AAV8抗体(19%)并不像包括AAV1和AAV2(50%-59%)在内的其它AAV血清型一样普遍存在于人类中<sup>16</sup>。以图表方式阐明于图11中的我们的数据表明IV AAV8对于旁分泌方法来说是最优的载体和递送途径以达到持续升高的血清UCn2水平。图11阐明了来自以下的数据:IV递送 AAV9.CMV.UCn2(9.CMV)、AAV9.CBA.UCn2(9.CBA)对比 AAV8.CBA.UCn2(8.CBA);其中所述数据表明所有载体均与6周后血清UCn2大幅增加有关。条柱中的数字表示每组的样本量;p值来自ANOVA。ITR:反向末端重复序列;SVpA:来自SV40病毒基因组的polyA(多腺苷酸);UCn2:尿皮质素-2;CBA:鸡β-肌动蛋白启动子;CMV增强子:人类巨细胞病毒增强子。

[0251] 虽然CMV启动子在横纹肌中是稳健的,但它在肝脏中易被甲基化而失活<sup>17</sup>,并且我们的数据表明更不易被甲基化的启动子是优良的。实际上,虽然在IV载体递送之后,CMV使得UCn2持续增加到2倍,但使用鸡β-肌动蛋白(CBA)启动子使得血清UCn2增加到15.7倍,如图11中所阐明。还可以使用肝细胞特异性甲状腺激素结合球蛋白(TBG)启动子。

[0252] 在替代性实施方案中,本发明的构建体和方法允许受调节的表达,例如关闭表达。由于有可能通过AAV基因转移赋予长期的表达,因此在产生不良作用的情况下,能够关闭表达是理想的。受调节的表达还使得间歇性转基因递送(而非恒定的转基因递送)的灵活性成为可能。在替代性实施方案中,本发明的构建体和方法使用受调节的表达系统,例如像蜕皮激素、他莫昔芬、四环素、雷帕霉素<sup>18-21</sup>。蜕皮激素系统的大小需要双载体策略并且他莫昔芬存在毒性方面的问题。四环素调节系统和雷帕霉素调节系统(表2)已在大型动物模型中进行了测试<sup>9,10,22-26</sup>。

表2: 四环素调节相比于雷帕霉素调节

| [0253]  | 特征         | 四环素         | 雷帕霉素    |
|---|------------|-------------|---------|
|   | 激活剂        | 多西环素        | AP22594 |
|   | 基础表达(“渗漏”) | 非常低/无       | 无       |
|   | 线性剂量-响应    | 是           | 是       |
|   | 激活剂副作用     | 低(在妊娠期避免使用) | 免疫抑制    |
|   | 细菌/病毒蛋白    | 是           | 否       |
|   | 用于临床试验中    | 尚未          | 尚未      |
| TG: 转基因; AP22594, 口服雷帕霉素类似物, 免疫抑制性是雷帕霉素的1/100。 <sup>1</sup> |            |             |         |

[0254] 在替代性实施方案中,本发明的构建体和方法使用tet调节系统,该tet调节系统已被深入地研究<sup>27</sup>。不同于先前的rtTA构建体,本发明的rtTA变体(例如 rtTA2<sup>S</sup>-M2)在不存在基础活性(即无“渗漏”)的情况下提供稳健的tet依赖性表达<sup>11,26,28,29,30</sup>,并且对四环素的敏感性高达10倍(在0.1μg/ml下达到最大限度的转基因表达激活)<sup>30</sup>。10-20mg多西环素的单次日剂量可满足在人类受试者中完全激活转基因表达<sup>26,31</sup>。在针对痤疮和慢性感染长期使用口服多西环素的情况下,200 mg/d的剂量是患者良好耐受的<sup>31,32</sup>。四环素可削弱基质金属蛋白酶(MMP)的活性,并且在MI后的前几天内施用影响LV重构<sup>24</sup>。我们先前已经证实,在所提出的MI诱发的鼠类CHF模型中,多西环素不影响LV重构、TIMP或MMP表达,其中多西环素是在MI后的5周时给予的<sup>25</sup>。在临床环境下,在MI的急性期内将不会使用四环素。

[0255] 在于非人灵长类动物中进行的AAV4.tet和AAV5.tet基因转移(视网膜内)的研究中并未发现对rtTA系统的组分的免疫应答(一个潜在的问题)<sup>9</sup>,其中四环素依赖性转基因表达在2.5年的研究持续时间内持续存在。我们在表达高水平的rtTA的小鼠心脏中未观测到炎症<sup>25,28,29</sup>,或在使用rtTA2<sup>S</sup>-M2调节元件进行AAV5介导的受调节的IGFI表达后的小鼠中未观测到炎症<sup>11</sup>。看来不同于视网膜内或血管内递送,向非人灵长类动物IM递送AAV.tet的确会因对转录激活子融合蛋白的细菌和病毒组分的免疫应答而引起受调节的表达减弱<sup>33</sup>。可以同时测试对tet调节剂和对雷帕霉素调节系统的免疫应答,该雷帕霉素调节系统不具有细菌蛋白或病毒蛋白并且与免疫应答的激发无关<sup>10</sup>。关于tet调节和雷帕霉素调节的强度和限制,参见表2。

[0256] 在雷帕霉素调节系统中,转基因表达由纳摩尔浓度的雷帕霉素或雷帕霉素类似物触发,所述表达是剂量依赖性的并且是可逆性的<sup>21</sup>。雷帕霉素在临床上被用于抑制免疫应答,在小鼠中防止衰老的有害影响<sup>23</sup>,并且通过阻断雷帕霉素(mTOR)信号转导通路的哺乳动物靶标来抑制多形性成胶质细胞瘤<sup>34,35</sup>。口服雷帕霉素类似物AP22594与雷帕霉素同样有效地激活转基因表达,表现出最低限度的免疫抑制作用,并且不抑制mTOR<sup>10,35-37</sup>。可以使用猪,从与有效用于猕猴的口服剂量(0.45mg/kg,每周一次)类似的口服剂量开始,来确定口服施用的AP22594的剂量-响应关系和它所需的给药时间间隔<sup>10</sup>。

[0257] 在替代性实施方案中,本发明的构建体和方法在体内表达尿皮质素-2,包括

UCn1、UCn2以及UCn3 (38-40个氨基酸(aa)), 它们属于促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)家族。这些肽可以刺激促肾上腺皮质激素释放因子受体1和2(CRF1、CRF2)。UCn1结合CRFR1和CRFR2,但UCn2和Ucn3仅结合CRFR2<sup>38-41</sup>,所述受体表达于心肌细胞、血管结构、肠、脑以及骨骼肌中<sup>42,43,44</sup>。虽然UCn1见于LPS诱发的炎症中并且牵涉到组织渗透性<sup>45,46</sup>,但UCn2的作用是不同的,与有利的生物作用有关,这部分归因于它对CRFR2的亲合力。UCn2的作用并不是完全依赖于cAMP。举例来说,CRFR2在结合UCn2后的脱敏经由 $\beta$ -抑制蛋白的易位来诱导PI3K/Akt信号转导。此外,提高的ERK1/2信号转导经由G蛋白的 $\beta$ 亚单位和 $\gamma$ 亚单位解离而发生<sup>47,48</sup>。这些非cAMP依赖性事件促使心肌细胞的细胞凋亡减少。在临床前和临床CHF中进行UCn2的肽输注已经始终地显示对LV功能的有利作用以及减少的交感肾上腺轴的激活<sup>49-51</sup>。

[0258] 如下表3中所列,在多种有益的作用当中,使用本发明的方法和组合物进行的UCn2输注可以增强收缩功能而与加载条件无关,这表明了直接的心脏作用<sup>52</sup>。肌肉收缩的作用机制尚未确定。最新的研究表明对 $\text{Ca}^{2+}$ 调控<sup>53</sup>、动作电位时程<sup>54</sup>、缺血再灌注损伤<sup>55-57</sup>、以及肾素-醛固酮系统具有有益的作用<sup>49</sup>。UCn2输注的安全性和功效已在大型动物CHF模型中<sup>58,59</sup>以及在正常人受试者和患有CHF的患者中被证实<sup>50,51</sup>。最近的一篇评论促进了它在第3级和第4级CHF中的使用<sup>60</sup>。

表 3: 尿皮质激素-2: 有益的心血管作用

| 特征             | 机制                 | 物种      | 参考文献           |
|----------------|--------------------|---------|----------------|
| ↓SVR           | 经由 CRFR2 的血管扩张     | M、S、H   | 44、57-59       |
| ↑CO 和 EF       | 肌肉收缩剂; 血管扩张        | M、S、H   | 44、57-59       |
| ↓心脏作功量         | ↓SVR 和 LAP         | M、S、H   | 44、57-59       |
| ↑LV 舒张功能       | 心肌舒张 (Lusotrope)   | M、R、S、H | 44、52、56       |
| [0259] ↑利尿     | ↑RBF 和 Na 排泄; ↓RAS | S、H     | 49、57-59       |
| ↑CHF 中的 LV 功能  | 上述所有均有报道           | M、R、S、H | 44、49、56、57、59 |
| ↓LV IR 损伤和细胞凋亡 | 未知                 | M、R     | 53-55          |

SVR: 全身血管阻力; CRFR2: 促肾上腺皮质激素释放因子受体-2; CO: 心输出量; EF: 左心室射血分数; LV: 左心室; LAP: 左心房压力; RBF: 肾血流量; RAS: 肾素-血管紧张素系统; CM: 心肌细胞; IR: 缺血再灌注; M: 小鼠; R: 大鼠; S: 绵羊; H: 人类

[0260] 由于UCn2的血浆半衰期是15分钟<sup>51</sup>,因此需要长期输注。相反,在替代性实施方案中,本发明的基于旁分泌的UCn2基因转移可以避免与长期肽输注有关的障碍,如上表1中所指出。通过仅使物种特异性UCn2在所建议的两个物种中表达,将消除对转基因的免疫应答。

[0261] 基于旁分泌的基因转移的概念验证。我们证明经由IM注射编码胰岛素样生长因子-I的AAV5 (AAV5.IGFI) 进行的旁分泌基因转移改善了衰竭的大鼠的功能<sup>11</sup>。我们目前还已经证实IV递送编码UCn2的AAV8不仅提供了持续高水平的血清UCn2(>15倍的提高),还增强了正常心脏和衰竭心脏的功能。

[0262] AAV载体和启动子的选择:根据先前公开的研究清楚的是,与其它AAV血清型相比,IV AAV8或AAV9将提供更高水平的转基因表达,并且一般最为稳健的CMV或CBA启动子将是最佳的。因此,我们将在CMV或CBA的驱动下编码鼠类UCn2的AAV8和两种AAV9载体工程化以确定哪一种载体将最有效地提高血清UCn2,如图11中所阐明。使用可商购获得的UCn2特异性ELISA。AAV9.CMV使血清UCn2升高到2.3倍,这虽然低于其它2种载体,但对于治疗性反应来说可能是充分的。然而,AAV8.CBA与血清UCn2升高到15.7倍有关(AAV8.CBA.UCn2:  $109 \pm 7 \text{ ng/ml}$ ,  $n=9$ ; 对照组:  $7 \pm 1 \text{ ng/ml}$ )。这种高水平的血清UCn2将使得降低AAV8的剂量成为可能。AAV8.CBA和AAV9.CBA相对于AAV9.CMV的优越性可能反映了在肝脏中CBA的相对稳健性或CMV易被甲基化而失活<sup>17</sup>。我们因此选择AAV8.CBA进行另外的研究。

[0263] AAV8.CBA.UCn2在静脉内递送后的分布和表达。在替代性实施方案中,本发明的构建体和方法通过基于旁分泌的基因转移策略在体内表达UCn2,并且可以用于提高UCn2的血清水平。替代性实施方案不需要在心脏本身中存在有UCn2的表达,这是因为循环UCn2的作用以及它对心脏和血管结构的作用将提供所述转基因的治疗作用,这些作用并不需要UCn2在心肌细胞本身当中表达。

[0264] UCn2的肝脏表达:在IV递送AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11} \text{ gc}$ ; 参见图11) 后的6周时所证实的血清UCn2增加到15.7倍与肝脏中UCn2 mRNA表达的时间依赖性增加有关,如图12中所阐明,所述时间依赖性增加在递送后的4-6周时趋于平稳,这与血清UCn2的稳定升高有良好的相关性。图12A以图表方式阐明了在AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11} \text{ gc}$ , IV) 后,UCn2 mRNA在肝脏中的表达的时间过程。肝脏UCn2表达(每个条柱是2只小鼠的平均值)在递送后的4-6周时达到平稳状态,这与对于血清UCn2所观测到平稳状态相关(数据未示)。图12B以图表方式阐明了如下数据,所述数据显示了在AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11} \text{ gc}$ , IV) 后的6周(w),UCn2 mRNA在LV中的表达。在骨骼肌样本中观测到类似的高水平的UCn2 mRNA(数据未示)。

[0265] UCn2的心脏表达。虽然本发明的基于旁分泌的基因疗法的有益作用不要求UCn2的心脏表达,但我们证实在IV递送AAV8.CBA.UCn2后的6周时,UCn2 mRNA在LV样本中的表达大幅增加,参见图12B。在替代性实施方案中,本发明的构建体(包括例如AAV8,包括AAV8 DNA的存在和UCn2 mRNA)可以向任何器官或其它器官递送和/或表达于任何器官或其它器官中,所述任何器官或其它器官包括骨骼肌、肺、脑、肾脏、脾脏、小肠、骨髓。

[0266] 对正常小鼠进行UCn2基因转移。为了确定UCn2基因转移是否增强LV功能,我们通过静脉内(IV)递送向正常小鼠递送了AAV8.UCn2 ( $5 \times 10^{11} \text{ gc}$ ) 或盐水(对照组)。在UCn2基因转移后的五周时,小鼠经历有创性程序,其中将米勒导管(Millar catheter) (1.4F)放入到LV腔中以测量压力上升。在对各组身份不知情的情况下进行数据采集和分析。UCn2基因

转移增强了LV的收缩功能( $LV+dP/dt$ ) (图 13A, 左图);  $-dP/dt$ 也降低, 这表明LV舒张增强 (图13B, 右图)。在LV的质量、组织学或者LV的结构或功能方面未检测到不良作用。图13以图表方式阐明了: 在IV递送AAV8.CBA.UCn2后的6周时正常小鼠的LV功能 (相比于注射盐水的对照小鼠)。图13A: $LV+dp/dt$ ; 图13B: $LV-dP/dt$ 。值表示平均值 $\pm$ SE。条柱中的数字表示组大小。UCn2基因转移增强了收缩功能和心脏舒张作用这两者。

[0267] 对患有CHF的小鼠进行UCn2基因转移。我们使用近端左侧冠状动脉闭塞来诱发小鼠的严重CHF, 这一模型已被我们广泛地使用并且模拟了临床基于缺血的CHF的各个方面<sup>25</sup>。如该方案 (图12A) 中所示, 在冠状动脉闭塞后的3周时, 我们进行超声心动描记术以证实严重的LV功能障碍和腔扩张。然后, 我们将入选对象随机分配以接受AAV8.CBA.UCn2 (每只小鼠 $5 \times 10^{11}$ gc) 或等体积的盐水的IV递送。在随机化后的五周时, 对小鼠进行反复的超声心动描记术并且测量LV压力上升和下降以及它们的一阶导数 $LV+dP/dt$ 。在对各组身份不知情的情况下进行数据采集和分析。尽管在进行UCn2基因转移时存在显著的LV功能障碍, 但LV面积变化分数 (FAC%) (射血分数的替代参数) 增加 (图14的B)。UCn2基因转移还增强了LV的收缩功能 ( $LV+dP/dt$ ) 和舒张功能 ( $LV-dP/dt$ ) (图14的C)。峰值 $LV+dP/dt$ 增加到接近正常的值, 从而证实所提出的策略作为一种用于CHF的新颖性疗法值得被研发。图14的B和C阐明了显示出UCn2转移对衰竭心脏的作用的数据: 图14的A: 在MI和产生CHF后的3周时, 小鼠接受IV AAV8.UCn2或盐水; 在基因转移后的5周时 (MI后的8周时), 评估LV的功能 (盲法研究); 图14的B: UCn2基因转移使LV面积变化分数 (%FAC) 增加; 图14的C: UCn2基因转移使LV的峰值 $+dP/dt$ 和峰值 $-dP/dt$ 增加, 表明对衰竭心脏的LV收缩功能和舒张功能具有显著的益处。

[0268] UCn2基因转移: 对心脏 $Ca^{2+}$ 调控的作用

[0269] C2.5.1. UCn2基因转移会改变SERCA2a的表达。AAV8.CBA.UCn2基因转移 ( $5 \times 10^{11}$ gc, IV) 与在基因转移后的4周时从小鼠获得的LV样本中SERCA2a的mRNA和蛋白质的表达增加有关 (图15A-15B)。这些变化预期会促进肌丝的 $Ca^{2+}$ 利用率, 并且从而增强收缩功能和舒张功能这两者, 如我们已经在UCn2基因转移后在正常心脏和衰竭心脏中所观测到的那样 (图13A-13B和14), 从而提供了UCn2基因转移增强LV功能的似乎合理的机制。UCn2肽在分离的心肌细胞中的类似作用已有所描述<sup>53</sup>。

[0270] 图15A-15B阐明了如下的数据 (图15A通过图表, 图15B通过免疫印迹), 其中正常小鼠接受AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$ gc) 或盐水 (CON (对照)) 的IV递送; 并且在四周后, 来自UCn2基因转移组的LV样本显示SERCA2a蛋白质表达增加到2倍。针对TnI含量将免疫印迹信号归一化。条柱中的数字表示组大小。将预期SERCA2a表达的这些变化促进肌丝对 $Ca^{2+}$ 的利用率, 并且从而增强LV的收缩功能和舒张功能。

[0271] UCn2基因转移和 $Ca^{2+}$ 瞬变。在AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$ gc, IV) 后的4周时从小鼠分离心肌细胞 (CM)。使用已接受IV盐水的小鼠作为对照。在测量期间, 将来自UCn2小鼠的心肌细胞与24nM的UCn2肽一起孵育以模拟体内的血清UCn2水平。来自接受UCn2基因转移的小鼠的心肌细胞显示 $Ca^{2+}$ 瞬变发生改变, 其中 $t_{1/2}$ 缩短, 如图16A-16B中所示: 在UCn2基因转移后的 $Ca^{2+}$ 瞬变: 图16A以图表方式阐明了UCn2基因转移使 $Ca^{2+}$ 下降的速率增加; 图16B以图表方式阐明了在来自己在4周前接受UCN2基因转移的小鼠的心肌细胞中至 $Ca^{2+}$ 瞬变衰减的时间缩短。将实验重复三次。条柱表示平均值 $\pm$ SE; 条柱中的数字表示心肌细胞数;

条柱上方的数字指示p值。

[0272] UCn2具有心脏保护性。为了测试UCn2对缺氧性损伤的作用,我们使用叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )处理培养的新生大鼠心肌细胞,叠氮化钠不可逆地结合细胞色素氧化酶中的血红素辅因子并且抑制线粒体呼吸,从而模拟缺氧诱导的细胞毒性。UCn2处理保护了心肌细胞免受损伤,如在形态学上以及LDH释放减少所反映,如图17A-17B中所阐明。UCn2还保护分离的心肌细胞免受缺氧-复氧损伤( $p<0.001$ ;数据未示)。图17A-17B示出了UCn2保护培养的新生大鼠心肌细胞免遭缺氧性损伤的数据:图17A阐明了在 $\text{NaN}_3$  (10mM) 处理后的24小时之时, UCn2 (60nM) 维持了形态正常性;图17B以图表方式阐明了UCn2减少了在 $\text{NaN}_3$ 处理后的LDH释放( $p<0.001$ )。

[0273] 对CREB和 $\beta$ -联蛋白的作用。在AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$ gc, IV) 后的4周时从小鼠获得LV样本。使用已接受IV盐水的小鼠作为对照。来自已接受UCn2 基因转移的小鼠的LV样本显示CREB的磷酸化增加(增加到3倍,  $p<0.01$ , 图 18A)。CREB是一种使得能够在心脏中进行CRE介导的基因表达的转录因子。此外,UCn2基因转移与LV的 $\beta$ -联蛋白磷酸化增加到2倍有关( $p<0.0001$ , 图 18B)。 $\beta$ -联蛋白磷酸化增加使得 $\beta$ -联蛋白在心肌细胞的闰盘中的积聚减少并且从而减轻了心脏僵硬和舒张功能障碍。这可促使我们观测到UCn2基因转移增强正常心脏和衰竭心脏的LV舒张。图18A-18B以图表方式阐明了在IV递送 UCn2.CBA.UCn2后的4周时,在LV样本中检测到CREB(图18A) 和 $\beta$ -联蛋白(图 18B) 这两者的磷酸化。对照组小鼠接受IV盐水。

[0274] UCn2基因转移的非心脏作用。IV递送AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$ gc) 对葡萄糖代谢具有有利的作用——抗糖尿病作用。举例来说,接受UCn2基因转移的小鼠能抵抗由高脂饮食(HFD)所诱发的高血糖症,所述由高脂饮食诱发的高血糖症是用于临床前研究中的一种2型糖尿病模型(图19A)。葡萄糖水平降低是因为葡萄糖利用率增加,如在HFD喂养的小鼠的葡萄糖耐量测试中所观测到的(图 19B)。图19A-19B阐明了显示UCn2影响葡萄糖调节的数据。小鼠接受 AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$ gc,  $n=8$ ) 或盐水 ( $n=8$ ) 的IV递送并且接受标准饲料3周。在UCn2组中观测到空腹血糖小幅降低。然后,小鼠接受高脂饮食(HFD) 8周。如所预期,在对照中观测到高血糖症,但UCn2小鼠仍维持正常的血糖水平。图 19B: 小鼠接受 AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$ gc,  $n=8$ ) 或盐水 ( $n=8$ ) 的IV递送并且接受HFD 2个月,并且进行葡萄糖耐量测试。禁食的小鼠接受葡萄糖(每克体重2 mg, IP) 并且测量葡萄糖水平。结果指示UCn2基因转移促进了葡萄糖的利用并且防止了饮食诱发的高血糖症。

[0275] 图20阐明了本发明的示例性构建体:缩写: ITR: 反向末端重复序列; TRE: 四环素反应元件; SVpA: 来自SV40病毒基因组的polyA(双向); rtTA2SM2: 反向四环素控制的转录激活子; SV40en: 猿猴病毒40增强子; TBG Prom: 甲状腺激素结合球蛋白启动子; RSV Prom: 劳氏肉瘤病毒启动子; FRB-p6: FRAP(雷帕霉素相互作用蛋白)的一部分,与转录因子NF- $\kappa$ B的亚单位(p65)相结合; IRE: 内部转录重新进入位点; ZF: 锌指HD1 DNA结合域; FKBP: FK506结合蛋白; pA: 最小多聚腺苷酸化片段; ZBD: 锌指HD DNA结合域(8个拷贝)。

[0276] 参考文献:

[0277] 1 Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB等, Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association(心脏病和中风的统计数据--2012年更新:来自美国心脏协会的报

告), *Circulation* 2012;125:e2-e220.PMID:22179539。

[0278] 2 Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC 等, Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B (在血友病B中进行腺病毒相关病毒载体介导的基因转移), *N Engl J Med* 2011; 365: 2357-2365.PMCID:PMC3265081。

[0279] 3 Buchlis G, Podsakoff GM, Radu A, Hawk SM, Flake AW, Mingozi F 等, Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer (在AAV介导的基因转移后的10年严重B型血友病患者的骨骼肌中因子IX的表达), *Blood* 2012; 出版中.PMID:22271447。

[0280] 4 Flotte TR, Trapnell BC, Humphries M, Carey B, Calcedo R, Rouhani F 等, Phase 2 clinical trial of a recombinant adeno-associated viral vector expressing alpha1-antitrypsin: interim results (表达 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶的重组腺相关病毒载体的2期临床试验:中期结果), *Hum Gene Ther* 2011;22:1239-1247.PMCID:PMC3205788。

[0281] 5 Brantly ML, Spencer LT, Humphries M, Conlon TJ, Spencer CT, Poirier A 等, Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 alpha1-antitrypsin (AAT) vector in AAT-deficient adults (向AAT缺陷型成人肌内注射重组血清2型腺相关病毒 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶(AAT)载体的I期试验), *Hum Gene Ther* 2006;17:1177-1186.PMID:17115945。

[0282] 6 De BP, Heguy A, Hackett NR, Ferris B, Leopold PL, Lee J 等, High levels of persistent expression of alpha1-antitrypsin mediated by the nonhuman primate serotype rh.10 adeno-associated virus despite preexisting immunity to common human adeno-associated viruses (由非人类灵长类动物血清型rh.10腺相关病毒介导的 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶高水平持续表达而无需考虑对常见的人类腺相关病毒先前存在的免疫力), *Mol Ther* 2006;13:67-76.PMID:16260185。

[0283] 7 Gao GP, Lu Y, Sun X, Johnston J, Calcedo R, Grant R 等, High-level transgene expression in nonhuman primate liver with novel adeno-associated virus serotypes containing self-complementary genomes (利用自身互补型基因组的新型腺相关病毒血清型在非人类灵长类动物的肝脏中的高水平转基因表达), *J Virol* 2006;80:6192-6194.PMCID:PMC1472562。

[0284] 8 Nathwani AC, Rosales C, McIntosh J, Rastegarlar G, Nathwani D, Raj D 等, Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins (在全身性施用使用血清5型和血清8型衣壳蛋白假型化的编码人类FIX的自身互补型AAV载体后的长期安全性和功效), *Mol Ther* 2011;19: 876-885.PMCID:PMC3098629。

[0285] 9 Stieger K, Le Meur G, Lasne F, Weber M, Deschamps JY, Nivard D 等, Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors (在视网膜下

注射重组AAV载体后非人类灵长类动物的视网膜中受多西环素调节的长期转基因表达), Mol Ther 2006;13:967-975.PMID:16442848。

[0286] 10 Rivera VM,Gao GP,Grant RL,Schnell MA,Zoltick PW,Rozamus LW等, Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer(在AAV介导的基因转移后灵长类动物的促红细胞生成素在药理学上受调节的长期表达),Blood 2005;105:1424-1430。PMID: 15507527。

[0287] 11 Lai NC,Tang T,Gao MH,Saito M,Miyanohara A,Hammond HK.Improved function of the failing rat heart by regulated expression of insulin-like growth factor I via intramuscular gene transfer(通过肌肉基因转移使胰岛素样生长因子I进行受调节的表达能够改善衰竭大鼠心脏的功能)Hum Gene Ther 2012;23:255-261.PMID:22017392。

[0288] 12 Mingozzi F,Meulenberg JJ,Hui DJ,Basner-Tschakarjan E,Hasbrouck NC, Edmonson SA等,AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells(AAV-1介导的向人类的骨骼肌中进行的基因转移引起衣壳特异性T细胞的剂量依赖性激活),Blood 2009; 114: 2077-2086.PMCID:PMC2744569。

[0289] 13 Manno CS,Pierce GF,Arruda VR,Glader B,Ragni M,Rasko JJ等, Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response(在血友病中由AAV-因子IX在肝脏中进行的成功转导以及由宿主免疫应答所施加的限制),Nat Med 2006;12:342-347。PMID:16474400。

[0290] 14 Hildinger M,Auricchio A,Gao G,Wang L,Chirmule N,Wilson JM.Hybrid vectors based on adeno-associated virus serotypes 2 and 5 for muscle-directed gene transfer(用于肌肉定向性基因转移的基于血清2型和血清5型腺相关病毒的杂合载体),J Virol 2001;75:6199-6203.PMCID:PMC114336。

[0291] 15. Fang H,Lai NC,Gao MH,Miyanohara A,Roth DM,Tang T,Hammond HK.Comparison of adeno-associated virus serotypes and delivery methods for cardiac gene transfer(用于心脏基因转移的腺相关病毒血清型和递送方法的比较), Hum Gene Ther Methods 2012年10月17日[在印刷前的电子出版]。PMID: 23075106。

[0292] 16 Boutin S,Monteilhet V,Veron P,Leborgne C,Benveniste O,Montus MF, Masurier C.Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1,2,5,6,8,and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors(在健康人群中针对1型、2型、5型、6型、8型以及9型腺相关病毒(AAV)的血清IgG和中和因子的普遍性:对使用AAV载体进行的基因疗法的影响),Hum Gene Ther 21:704-712,2010。

[0293] 17 Everett RS,Evans HK,Hodges BL,Ding EY,Serra DM,Amalfitano A. Strain-specific rate of shutdown of CMV enhancer activity in murine liver confirmed by use of persistent[E1(-),E2b(-)]adenoviral vectors(通过使用持续性

[E1(-),E2b(-)] 腺病毒载体所确认的在鼠类肝脏中CMV增强子活性中断的品系特异性速率), Virology 2004;325:96-105.PMID:15231389。

[0294] 18 Hoppe UC,Marban E,Johns DC.Adenovirus-mediated inducible gene expression in vivo by a hybrid ecdysone receptor(由杂合蜕皮激素受体实现的腺病毒介导的体内可诱导的基因表达),Mol Ther 2000;1:159-164.PMID:10933926。

[0295] 19 Sipo I,Wang X,Hurtado Pico A,Suckau L,Weger S,Poller W等,Tamoxifen-regulated adenoviral E1A chimeras for the control of tumor selective oncolytic adenovirus replication in vitro and in vivo(用于在体外和体内控制肿瘤选择性溶瘤腺病毒复制的受他莫昔芬调节的腺病毒E1A嵌合体),Gene Ther 2006; 13:173-186.PMID:16136163。

[0296] 20 Goverdhan S,Puntel M,Xiong W,Zirger JM,Barcia C,Curtin JF等,Regulatable gene expression systems for gene therapy applications:progress and future challenges(用于基因疗法应用的可调节基因表达系统:进展和未来的挑战),Mol Ther 2005;12:189-211.PMCID:PMC2676204。

[0297] 21 Rivera VM,Clackson T,Natesan S,Pollock R,Amara JF,Keenan T等,A humanized system for pharmacologic control of gene expression(用于在药理学上控制基因表达的人源化系统),Nat Med 1996;2:1028-1032.PMID:8782462。

[0298] 22 Stieger K,Belbellaa B,Le Guiner C,Moullier P,Rolling F.In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems(使用四环素调节型系统进行的体内基因调节),Adv Drug Deliv Rev 2009;61:527-541.PMID:19394373。

[0299] 23 Harrison DE,Strong R,Sharp ZD,Nelson JF,Astle CM,Flurkey K等,Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice(在生命晚期喂食雷帕霉素能够延长遗传异质性小鼠的寿命),Nature 2009;460:392-395. PMCID:PMC2786175。

[0300] 24 Villarreal FJ,Griffin M,Omens J,Dillmann W,Nguyen J,Covell J.Early short-term treatment with doxycycline modulates postinfarction left ventricular remodeling(使用多西环素进行早期短期治疗调控梗塞后左心室的重构),Circulation 2003;108:1487-1492。

[0301] 25 Lai NC,Tang T,Gao MH,Saito M,Takahashi T,Roth DM等,Activation of cardiac adenylyl cyclase expression increases function of the failing ischemic heart in mice(激活心脏腺苷酸环化酶表达增强小鼠衰竭的缺血性心脏的功能),J Am Coll Cardiol 2008;51:1490-1497.PMID:18402905。

[0302] 26 Stieger K,Mendes-Madeira A,Meur GL,Weber M,Deschamps JY,Nivard D等,Oral administration of doxycycline allows tight control of transgene expression:a key step towards gene therapy of retinal diseases(口服施用多西环素允许对转基因表达进行严格的控制:实现视网膜疾病的基因疗法的关键步骤),Gene Ther 2007; 14:1668-1673.PMID:17914405。

[0303] 27 Goverdhan S,Puntel M,Xiong W,Zirger JM,Barcia C,Curtin JF,Soffer EB, Mondkar S,King GD,Hu J,Sciascia SA,Candolfi M,Greengold DS,Lowenstein PR,

Castro MG.Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges (用于基因疗法应用的可调节基因表达系统:进展和未来的挑战), *Mol Ther* 12:189-211,2005。

[0304] 28 Gao MH,Bayat H,Roth DM,Yao Zhou J,Drumm J,Burhan J等,Controlled expression of cardiac-directed adenylylcyclase type VI provides increased contractile function (心脏定向性VI型腺苷酸环化酶的受控表达使得收缩功能增强), *Cardiovasc Res* 2002;56:197-204.PMID:12393090。

[0305] 29 Tang T,Hammond HK,Firth A,Yang Y,Gao MH,Yuan JXJ,Lai NC. Adenylyl cyclase 6 improves calcium uptake and LV function in aged heart (腺苷酸环化酶6改善衰老心脏的钙摄取和LV功能), *J Am Coll Cardiol* 2011;57: 1846-1855.PMID: 21527140。

[0306] 30 Urlinger S,Baron U,Thellmann M,Hasan MT,Bujard H,Hillen W. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity (对四环素依赖性转录激活子的序列空间进行探究:新型突变使得范围和敏感性扩大), *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7963-7968,2000。

[0307] 31 Rolain JM,Mallet MN,Raoult D.Correlation between serum doxycycline concentrations and serologic evolution in patients with *Coxiella burnetii* endocarditis (患有贝氏柯克斯体心内膜炎的患者的血清多西环素浓度与血清学变化之间的相关性), *J Infect Dis* 2003;188:1322-1325.PMID:14593588。

[0308] 32 Berman B,Perez OA,Zell D.Update on rosacea and anti-inflammatory-dose doxycycline (关于酒渣鼻和抗炎剂量多西环素的最新报道), *Drugs Today (Barc)* 2007;43:27-34.PMID:17315050。

[0309] 33 Herzog RW,Hagstrom JN,Kung SH,Tai SJ,Wilson JM,Fisher KJ等,Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus (在肌内注射重组腺相关病毒后人类凝血因子IX的稳定基因转移和表达), *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5804-5809.PMCID:PMC20861。

[0310] 34 Minniti G,Muni R,Lanzetta G,Marchetti P,Enrici RM.Chemotherapy for glioblastoma:current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents (成胶质细胞瘤的化学疗法:当前治疗和对细胞毒性和靶向药剂的未来展望), *Anticancer Res* 2009;29:5171-5184.PMID:20044633。

[0311] 35 Zoncu R,Efeyan A,Sabatini DM.mTOR:from growth signal integration to cancer,diabetes and ageing (mTOR:从生长信号整合到癌症、糖尿病以及衰老), *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:21-35.PMID:21157483。

[0312] 36 Yang W,Digits CA,Hatada M,Narula S,Rozamus LW,Huestis CM等, Selective epimerization of rapamycin via a retroaldol/aldol mechanism mediated by titanium tetrakisopropoxide (通过由四异丙醇钛介导的逆向醛醇缩合/醛醇缩合机制的雷帕霉素的选择性差向异构化), *Org Lett* 1999;1:2033-2035.PMID:

10905864。

[0313] 37 Abraham RT,Wiederrecht GJ.Immunopharmacology of rapamycin(雷帕霉素的免疫药理学),Annu Rev Immunol 1996;14:483-510.PMID:8717522。

[0314] 38 Davidson SM,Rybka AE,Townsend PA.The powerful cardioprotective effects of urocortin and the corticotropin releasing hormone (CRH) family (尿皮质素 和促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 家族的有效心脏保护作用),Biochem Pharmacol.2009;77:141-150.PMID:18817752。

[0315] 39 Perrin MH,Vale WW.Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family (促肾上腺皮质激素释放因子受体和它们的配体家族),Ann N Y Acad Sci. 1999;885:312-328.PMID:10816663。

[0316] 40 Eckart K,Radulovic J,Radulovic M,Jahn O,Blank T,Stiedl O,Spiess J. Actions of CRF and its analogs (CRF和它的类似物的作用),Curr Med Chem.1999; 6: 1035-1053.PMID:10519912。

[0317] 41 Wiley KE,Davenport AP.CRF2 receptors are highly expressed in the human cardiovascular system and their cognate ligands urocortins 2 and 3 are potent vasodilators (CRF2受体高表达于人类心血管系统中并且它们的同源配体尿皮质素2和尿皮质素3是强效的血管扩张剂),Br J Pharmacol 2004;143:508-514. PMCID: PMC1575420。

[0318] 42 Imperatore A,Florio P,Torres PB,Torricelli M,Galleri L,Toti P, Occhini R, Picciolini E,Vale W,Petraglia F.Urocortin 2 and urocortin 3 are expressed by the human placenta,deciduas,and fetal membranes (尿皮质素2和尿皮质素3由人类胎 盘、蜕膜以及胎膜表达),Am J Obstet Gynecol.2006;195:288-295.PMID: 16626608。

[0319] 43 Boorse GC,Denver RJ.Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides (促肾上腺皮质激素释放因子和 相关肽的广泛组织分布和不同功能),Gen Comp Endocrinol.2006;146: 9-18. PMID:16413023。

[0320] 44 Wiley KE,Davenport AP.CRF2 receptors are highly expressed in the human cardiovascular system and their cognate ligands urocortins 2 and 3 are potent vasodilators (CRF2受体高表达于人类心血管系统中并且它们的同源配体尿皮质素2和尿皮质素3是强效的血管扩张剂),Br J Pharmacol 143:508-514,2004。

[0321] 45 Singh LK,Boucher W,Pang X,Letourneau R,Seretakis D,Green M, Theoharides TC.Potent mast cell degranulation and vascular permeability triggered by urocortin through activation of corticotropin-releasing hormone receptors (由尿皮 质素经由激活促肾上腺皮质激素释放激素受体所触发的强有力的肥大细胞脱颗 粒和血管通透性),J Pharmacol Exp Ther.1999;288:1349-1356.PMID: 10027877。

[0322] 46 Emoto TI,Moxon JV,Rush C,Woodward L,Golledge J.Relevance of urocortins to cardiovascular disease (尿皮质素与心血管疾病的关联性),J Mol Cell

Cardiol.2011;51:299-307.PMID:21689660。

[0323] 47 Hauger RL,Grigoriadis DE,Dallman MF,Plotsky PM,Vale WW,Dautzenberg FM.,.International Union of Pharmacology.XXXVI.Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands (国际药理学联盟:XXXVI.促肾上腺皮质激素释放因子受体和它们的配体的命名的现状),Pharmacol.Rev.2003;55:21-26.PMID:12615952。

[0324] 48 Perrin MH,Donaldson CJ,Chen R,Lewis KA,Vale WW.Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor(CRF) receptor(大鼠脑促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)受体的克隆和功能性表达),Endocrinology. 1993;133:3058-3061.PMID:8243338。

[0325] 49 Hinkle RT,Donnelly E,Cody DB,Bauer MB,Isfort RJ.Urocortin II treatment reduces skeletal muscle mass and function loss during atrophy and increases nonatrophying skeletal muscle mass and function(尿皮质素II治疗减少骨骼肌在萎缩期间的质量和功能丧失并且增加非萎缩性骨骼肌的质量和功能),Endocrinology 144:4939-4946,2003。

[0326] 50 Davis ME,Pemberton CJ,Yandle TG,Fisher SF,Lainchbury JG,Frampton CM,Rademacher MT,Richards AM.Urocortin 2 infusion in healthy humans: hemodynamic,neurohormonal,and renal responses(在健康人类中进行尿皮质素2 输注:血液动力学、神经激素以及肾脏反应),J Am Coll Cardiol.30:461-741,2007。

[0327] 51 Davis ME,Pemberton CJ,Yandle TG,Fisher SF,Lainchbury JG,Frampton CM,Rademacher MT,Richards M.Urocortin 2 infusion in human heart failure(在人类心力衰竭中进行尿皮质素2输注),Eur Heart J 28:2589-2597,2007。

[0328] 52 Bale TL,Hoshijima M,Gu Y,Dalton N,Anderson KR,Lee KF,Rivier J,Chien KR,Vale WW,Peterson KL.The cardiovascular physiologic actions of urocortin II:acute effects in murine heart failure(尿皮质素II的心血管生理作用:在鼠类心力衰竭中的急性作用),Proc Natl Acad Sci USA 101:3697-3702,2004。

[0329] 53 Yang LZ, **Kockskämper** J,Khan S,Suarez J,Walther S,Doleschal B,Unterer G,Khafaga M, **Mächler** H,Heinzel FR,Dillmann WH,Pieske B,Spiess J.cAMP- and  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinases mediate inotropic,lusitropic and arrhythmogenic effects of urocortin 2 in mouse ventricular myocytes(cAMP依赖性和 $\text{Ca}^{2+}$ /调钙蛋白依赖性蛋白激酶介导尿皮质素2在小鼠心室肌细胞中的肌肉收缩剂、心肌舒张以及致心律失常性作用),Br J Pharmacol 162:544-56,2011。

[0330] 54 Meili-Butz S,Bühler K,John D,Buser P,Vale WW,Peterson KL,Brink M,Dieterle T.Acute effects of urocortin 2 on cardiac function and propensity for arrhythmias in an animal model of hypertension-induced left ventricular hypertrophy and heart failure(在高血压诱发性左心室肥大和心力衰竭的动物模型中尿皮质素 2对心脏功能和心律失常倾向的急性作用),Eur J Heart Fail.12:797-804,2010。

[0331] 55 Brar BK,Jonassen AK,Stephanou A,Santilli G,Railson J,Knight RA,Yellon DM,Latchman DS.Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPK-dependent pathway(尿皮质素经由MAPK依赖性通路防止缺血性和再灌注损伤),J Biol Chem 275:8508-8514,2000。

[0332] 56 Brar BK,Jonassen AK,Egorina EM,Chen A,Negro A,Perrin MH,Mjos OD,Latchman DS,Lee KF,Vale W.Urocortin-II and urocortin-III are cardioprotective against ischemia reperfusion injury:an essential endogenous cardioprotective role for corticotropin releasing factor receptor type 2 in the murine heart(尿皮质素-II和尿皮质素-III具有针对缺血再灌注损伤的心脏保护性:鼠类心脏中2型促肾上腺皮质激素释放因子受体的基本内源性心脏保护作用),Endocrinology 145:24-35,2004。

[0333] 57 Barry SP,Lawrence KM,McCormick J,Soond SM,Hubank M,Eaton S,Sivarajah A,Scarabelli TM,Knight RA,Thiemermann C,Latchman DS,Townsend PA,Stephanou A.New targets of urocortin-mediated cardioprotection(尿皮质素介导的心脏保护作用的新靶标),J Mol Endocrinol 45:69-85,2010。

[0334] 58 Rademaker MT,Charles CJ,Espiner EA,Fisher S,Frampton CM,Kirkpatrick CM,Lainchbury JG,Nicholls MG,Richards AM,Vale WW.Beneficial hemodynamic, endocrine,and renal effects of urocortin in experimental heart failure:comparison with normal sheep(尿皮质素在实验性心力衰竭中有益的血液动力学、内分泌以及肾脏作用:与正常的绵羊进行比较),J Am Coll Cardiol 40:1495-1505,2002。

[0335] 59 Miriam T,Rademaker MT,Charles CJ,Nicholls MG,Richards AM.Urocortin 2 inhibits furosemide-induced activation of renin and enhances renal function and diuretic responsiveness in experimental heart failure(在实验性心力衰竭中尿皮质素 2抑制呋喃苯胺酸诱导的肾素激活并且增强肾脏功能和利尿反应性),Circ Heart Fail 2:532-540,2009。

[0336] 60 Tang WHW,Francis GS.Exploring new drugs for heart failure:the case of urocortin(探索用于心力衰竭的新药:以尿皮质素为例),Eur Heart J 28:2561-2562,2007。

[0337] 61 Haurigot V,Mingozzi F,Buchlis G,Hui DJ,Chen Y,Basner-Tschakarjan E, Arruda VR,Radu A,Franck HG,Wright JF,Zhou S,Stedman HH,Bellinger DA,Nichols TC,High KA.Safety of AAV factor IX peripheral transvenular gene delivery to muscle in hemophilia B dogs(向血友病B狗的肌肉中进行AAV因子IX经外周小静脉基因递送的安全性),Mol Ther 18:1318-1329,2010。

[0338] 62 Roth DA,McKirnan MD,Canestrelli I,Gao MH,Dalton N,Lai NC,Roth DM,Hammond HK.Intracoronary delivery of an adenovirus encoding fibroblast growth factor-4in myocardial ischemia:effect of serum antibodies and previous exposure to adenovirus(在心肌缺血中冠状动脉内递送编码成纤维细胞生长因子-4的腺病毒:血清抗体和先前暴露对腺病毒的影响),Human Gene Ther 17:230-238,2006。

[0339] 63 Kaspar BK,Roth DM,Lai NC,Drumm JD,Erickson DA,McKirnan MD, Hammond HK.Myocardial gene transfer and long-term expression following intracoronary delivery of AAV(在冠状动脉内递送AAV后的心肌基因转移和长期 表达),J Gene Med 7: 316-324,2005。

[0340] 已经对本发明的多个实施方案作出了描述。然而,应了解的是,可以在不 脱离本发明的精神和范围的情况下作出各种改动。因此,其它实施方案也落入 以下权利要求书的范围内。

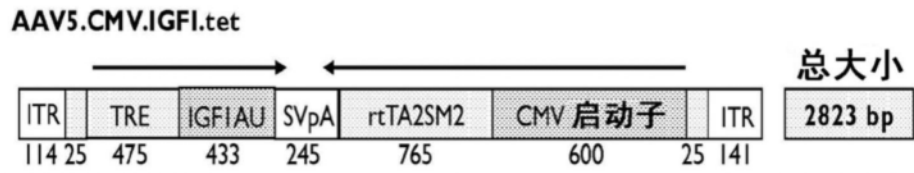


图1

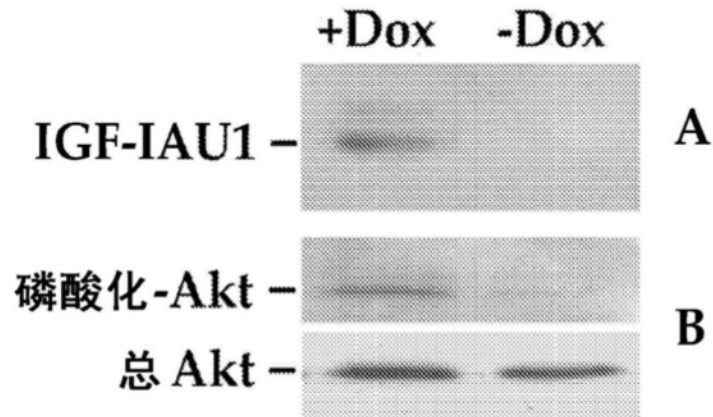


图2

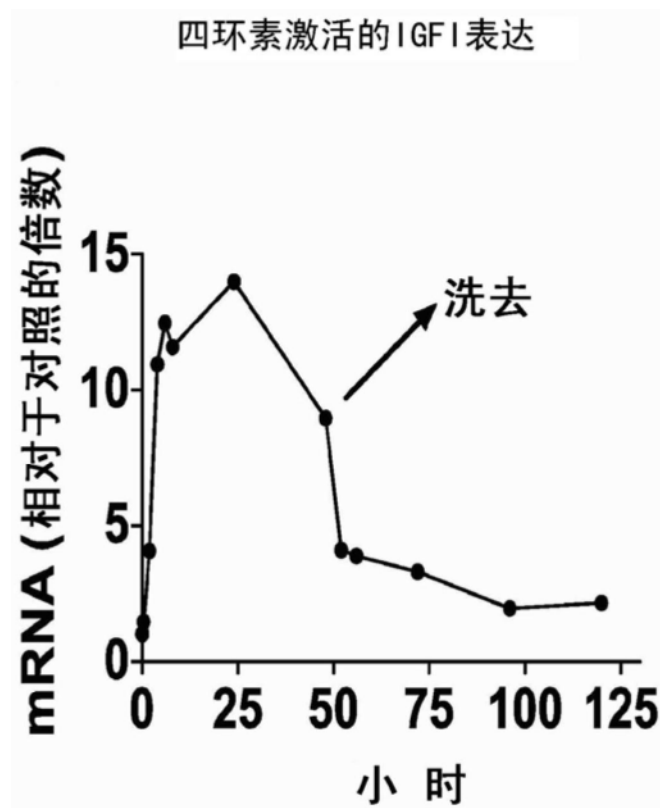


图3

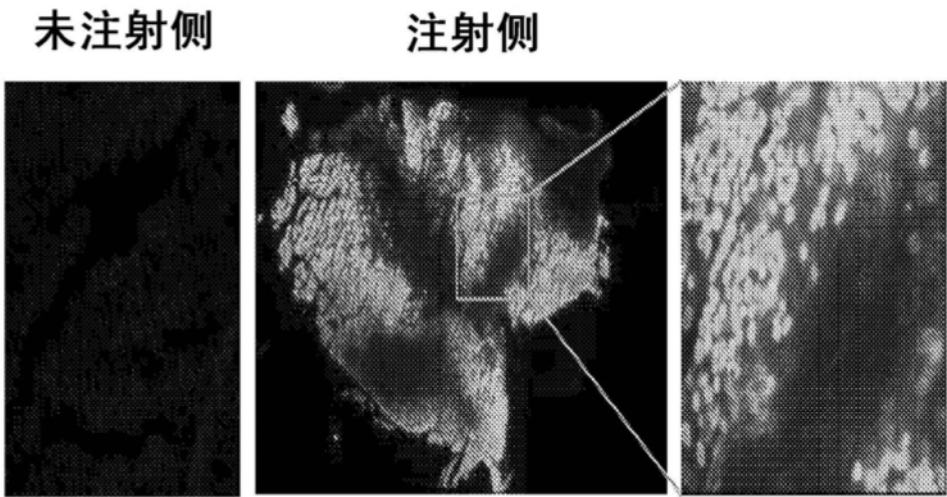


图4A

| 表4.超声心动描记术：骨骼肌IGFⅠ表达在CHF中的作用   |             |            |           |              |            |           |      |
|--|-------------|------------|-----------|--------------|------------|-----------|------|
|  | IGF-关闭型 (9) |            |           | IGF-启动型 (10) |            |           | p    |
|  | MI 后 5 周时   | MI 后 10 周时 | 变化 (%)    | MI 后 5 周时    | MI 后 10 周时 | 变化 (%)    |      |
| HR<br>-bpm-  | 341±16      | 340±9      | -0.7±14.1 | 355±10       | 351±10     | -3.9±10.2 | 0.85 |
| EDD<br>-mm-  | 10.0±0.2    | 9.9±0.4    | -0.1±0.3  | 9.8±0.3      | 9.2±0.3    | -0.1±0.4  | 0.56 |
| ESD<br>-mm-  | 7.9±0.4     | 8.2±0.5    | 0.3±0.3   | 7.9±0.5      | 7.1±0.4    | -0.9±0.4  | 0.03 |
| EF (%)   | 41±3        | 39±3       | -1.4±2.4  | 37±4         | 45±2       | +8.6±3.1  | 0.02 |
| HR， 心率； EDD， 舒张末期内径； ESD， 收缩末期内径； EF， LV射血分数。<br>数据表示平均值±SE。概率值来自双因素ANOVA， 显示出IGFⅠ作用。参考文献5 |             |            |           |              |            |           |      |

图4B

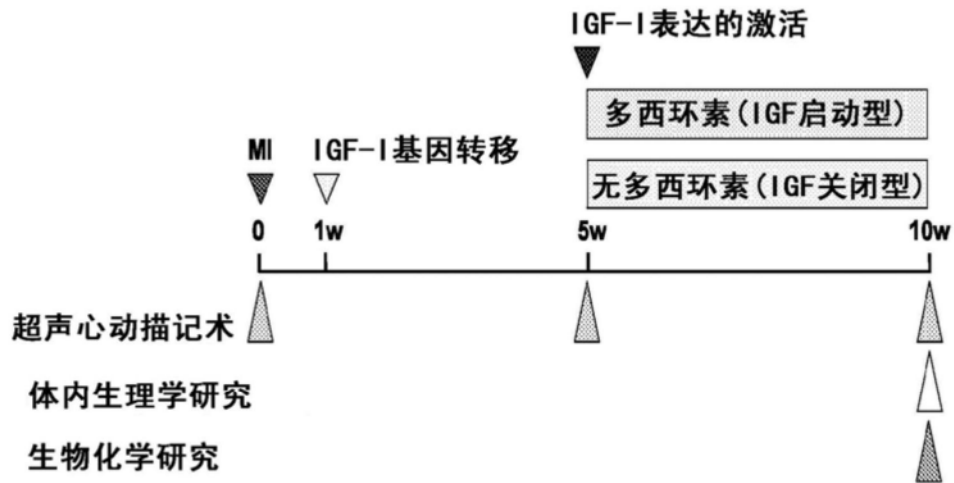


图5

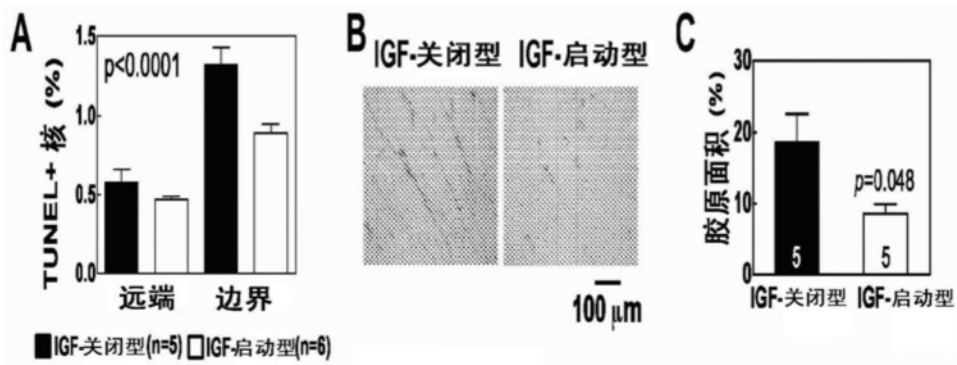


图6

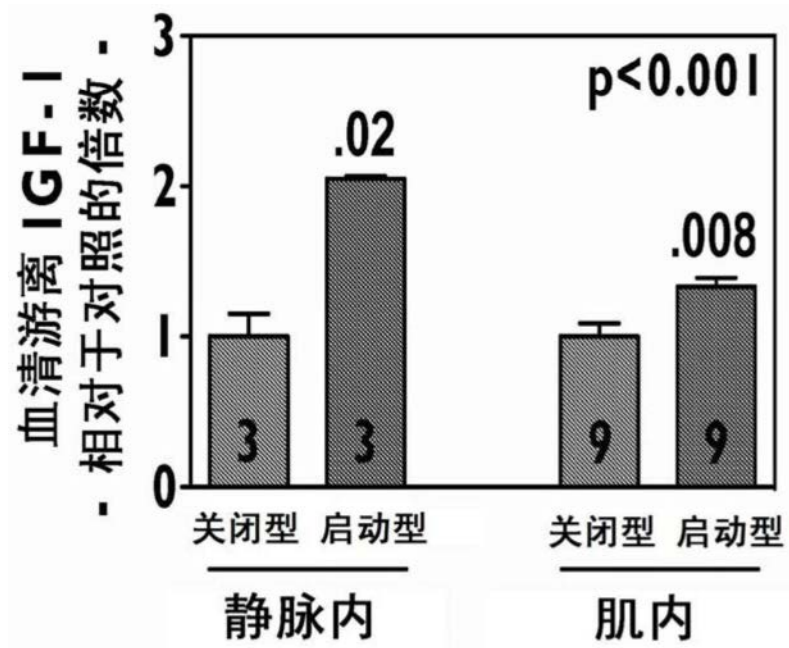


图7

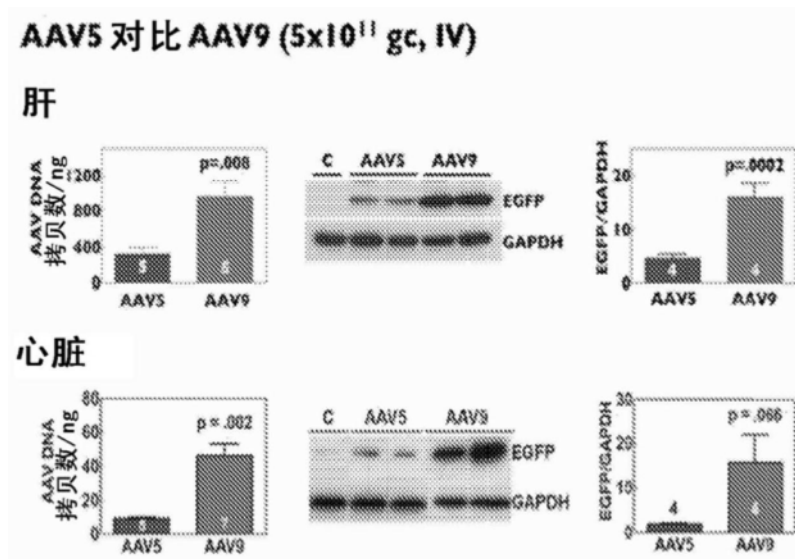


图8

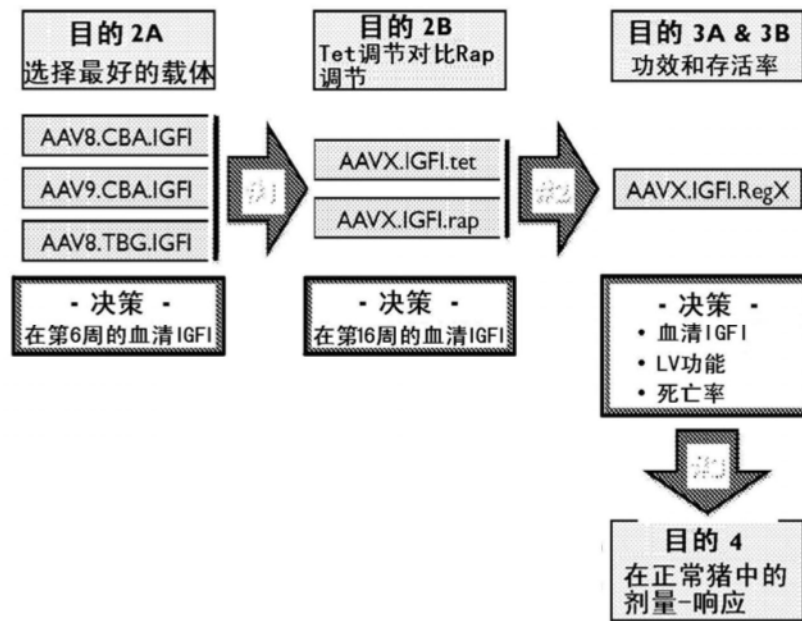


图9

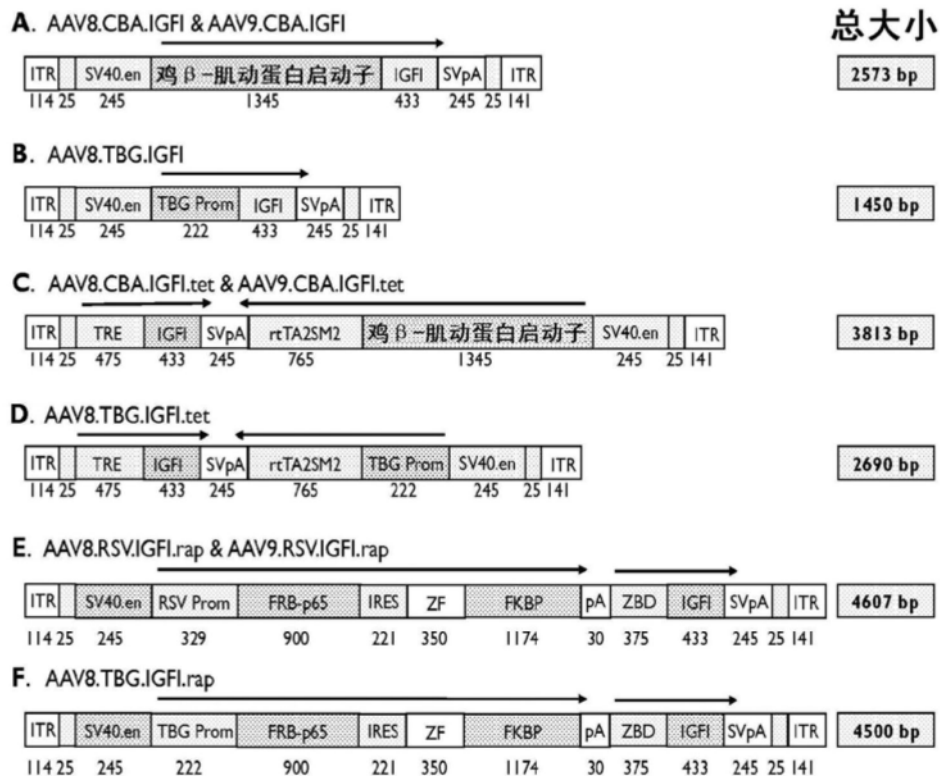


图10

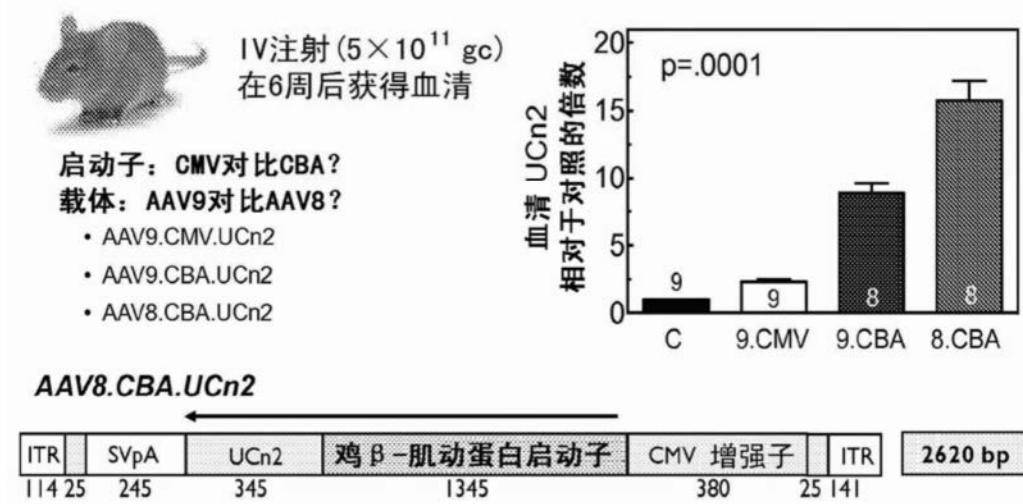


图11

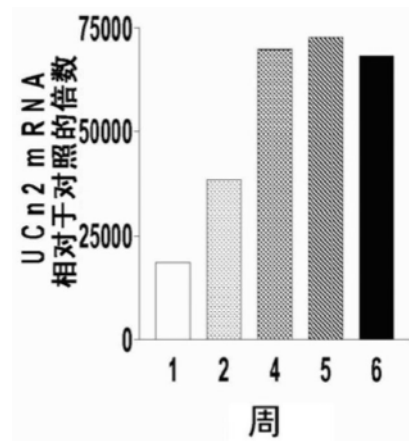


图12A

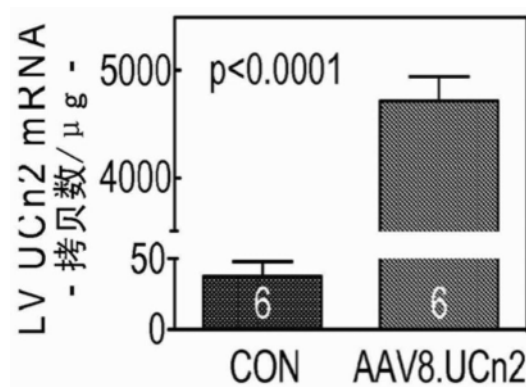


图12B

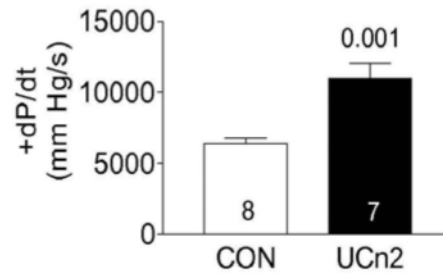


图13A

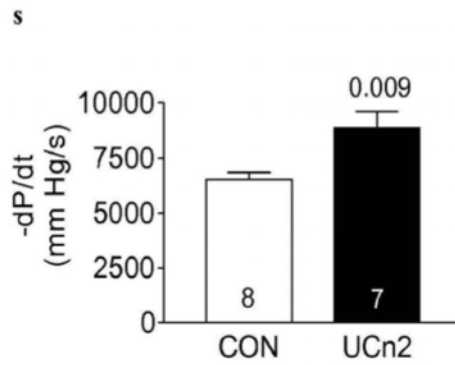


图13B

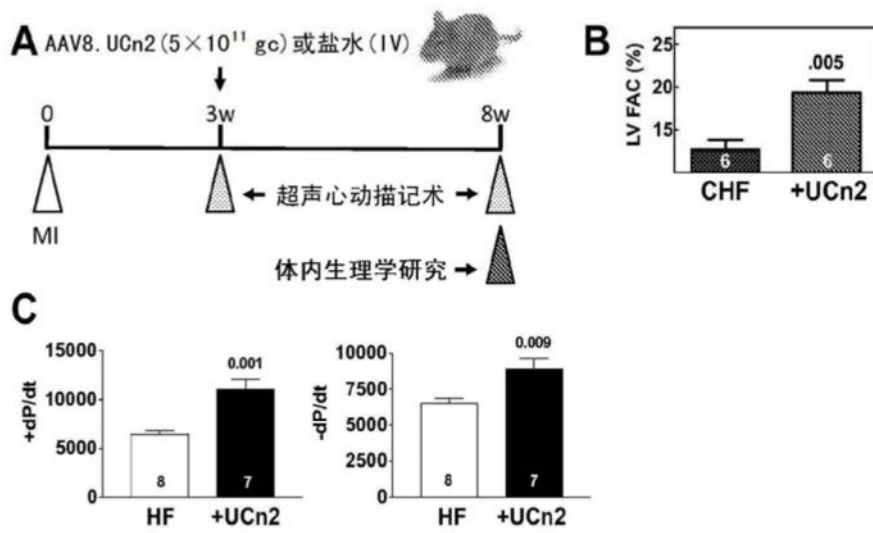


图14

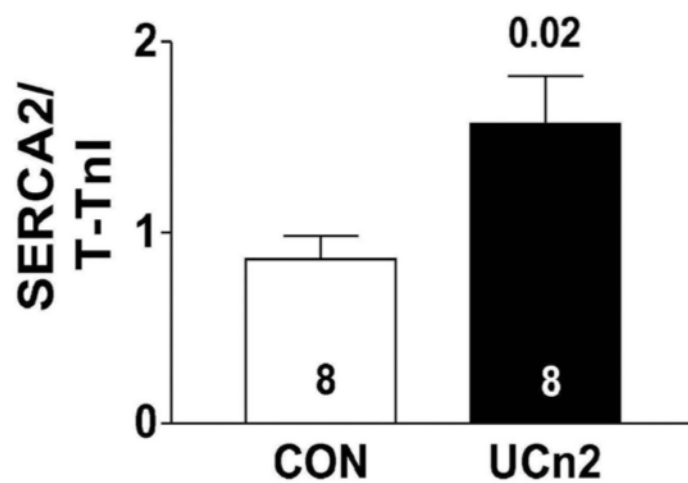


图15A

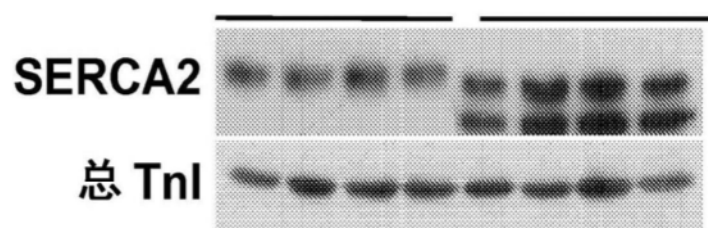


图15B

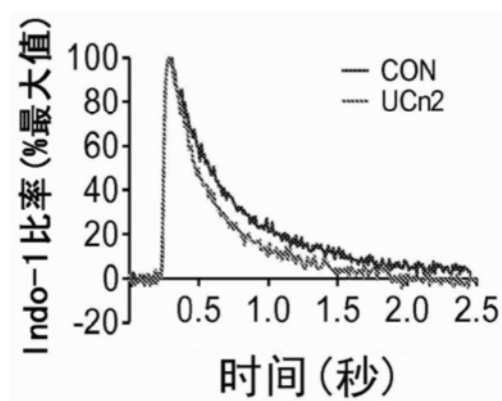


图16A

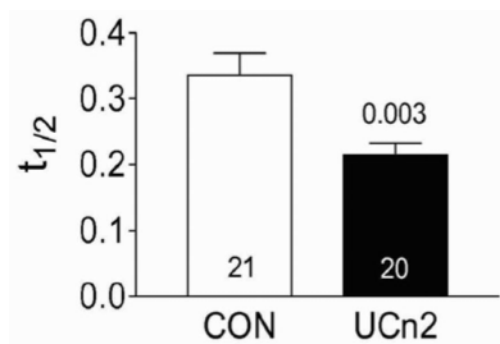


图16B

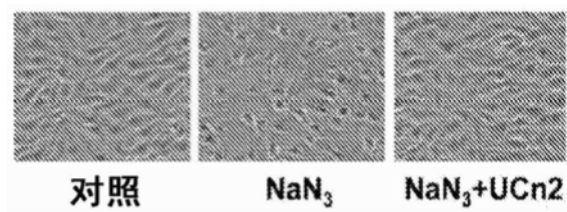


图17A

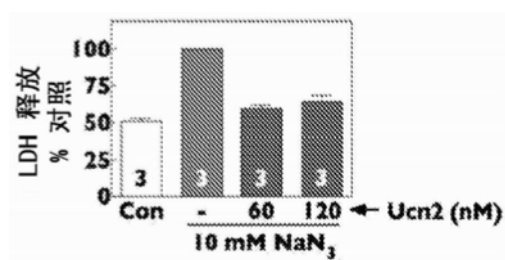


图17B

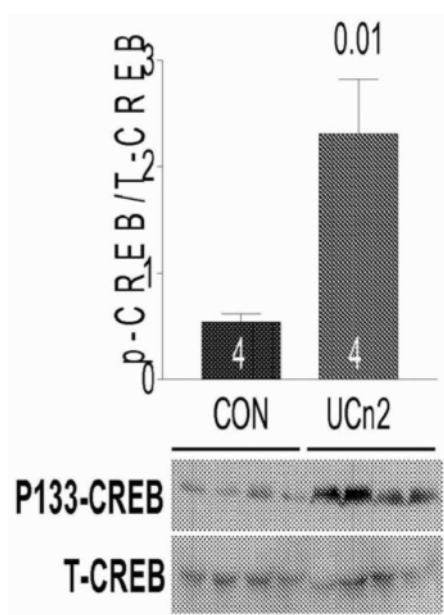


图18A

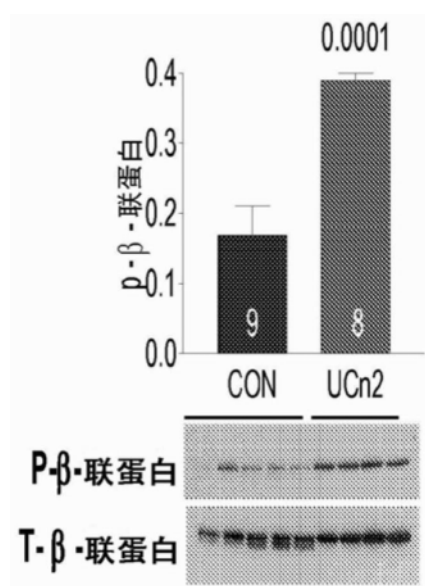


图18B

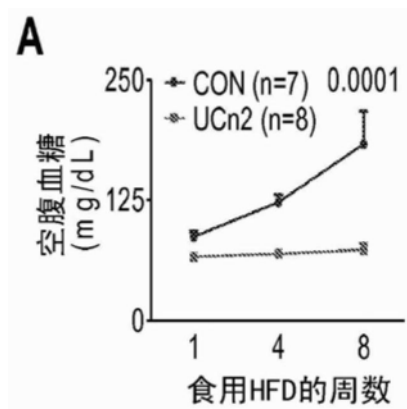


图19A

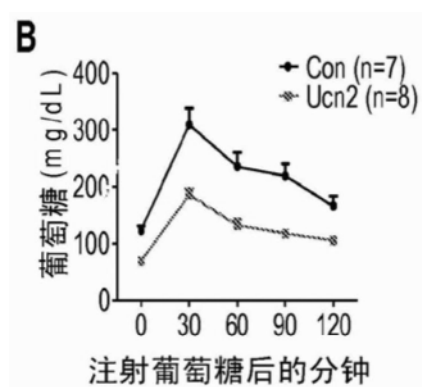


图19B

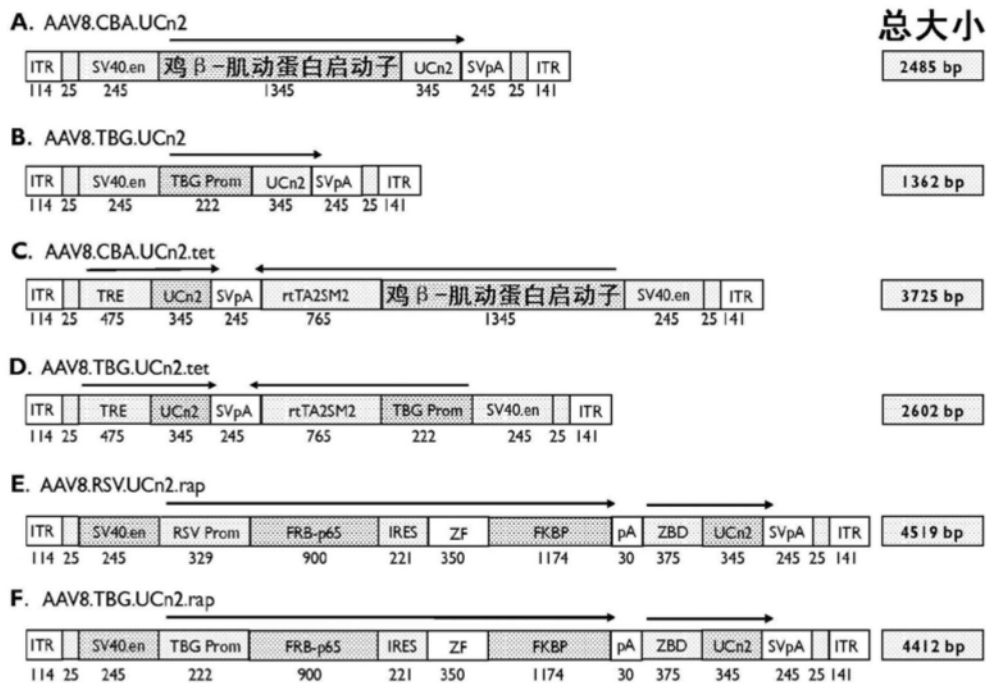


图20