



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102821781 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 12

(21) 申请号 201180017401. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 04. 01

A61K 38/18 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 38/17 (2006. 01)

61/320, 654 2010. 04. 02 US

A61K 35/54 (2006. 01)

C12N 15/861 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61P 25/28 (2006. 01)

2012. 09. 29

A61P 25/00 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/031027 2011. 04. 01

(87) PCT申请的公布数据

W02011/123842 EN 2011. 10. 06

(71) 申请人 赛拉基因公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 R·T·巴尔图斯 J·斯费尔特

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 赵蓉民 陆惠中

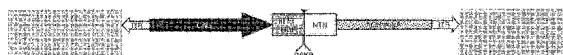
权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 1 页

(54) 发明名称

治疗帕金森氏病和脑多巴胺能神经元的其它病症的方法

(57) 摘要

用于治疗哺乳动物脑中缺陷型、患病和受损的神经元的特定临床方案,其对于神经变性状况诸如帕金森氏病的治疗特别有用。该方案通过直接将一定浓度的神经生长因子经由蛋白质的递送、可操作地编码神经生长因子的表达载体递送或将含有这种表达载体的供体细胞移植到黑质中,优选达纹状体中来实施。该方法刺激目标神经元的生长和被治疗的神经变性疾病伴随的功能缺陷的恢复。



1. 将治疗用神经生长因子递送到人对象脑中目标缺陷型、患病或受损的多巴胺能神经元的方法,所述方法包括直接将编码神经生长因子的表达载体递送到黑质中和纹状体中,以改善响应表达的神经生长因子的缺陷、疾病或损伤。

2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述直接递送到纹状体是到壳核的至少一个区域。

3. 权利要求 1 所述的方法,其中递送到所述纹状体的编码神经生长因子的表达载体的总单位剂量大于递送到所述黑质中的编码神经生长因子的表达载体的单位剂量。

4. 权利要求 3 所述的方法,其中递送到所述壳核的单位剂量多达递送到所述黑质的单位剂量的 10 倍。

5. 权利要求 1 所述的方法,其中所述疾病通过刺激多巴胺能神经元修复或活性而被改善。

6. 权利要求 1 所述的方法,其中所述疾病通过恢复帕金森氏病伴随的运动功能缺陷而被改善。

7. 权利要求 1 所述的方法,其中所述神经生长因子来自 GDNF 家族,其选自以下分子: GDNF、神经秩蛋白、persephin 和 artemin。

8. 权利要求 7 所述的方法,其中所述神经生长因子是神经秩蛋白。

9. 权利要求 1 所述的方法,其中所述表达载体是腺相关病毒载体。

10. 权利要求 9 所述的方法,其中所述 AAV 载体是 AAV 血清型 2 型载体。

11. 权利要求 1 所述的方法,其中所述递送用泵进行。

12. 权利要求 1 所述的方法,其中向所述黑质的逆向运输在所述对象中被削弱。

13. 权利要求 4 所述的方法,其中递送到所述壳核的单位剂量是递送到所述黑质的单位剂量的 4 倍。

14. 权利要求 6 所述的方法,其中所述对象患有晚期帕金森氏病。

15. 权利要求 6 所述的方法,其中所述对象患有早期帕金森氏病。

16. 权利要求 6 所述的方法,其中所述改善在治疗后 1 个月或之后可观察到。

17. 权利要求 6 所述的方法,其中所述改善在治疗后 12 个月或之后可观察到。

18. 权利要求 6 所述的方法,其中所述改善在治疗后 18 个月或之后可观察到。

19. 权利要求 6 所述的方法,其中所述改善在治疗后 24 到 48 个月或之后可观察到。

20. 权利要求 1 所述的方法,其中所述神经生长因子在所述黑质的胞体中表达。

21. 权利要求 1 所述的方法,其中 TH 上调发生在所述纹状体中。

22. 权利要求 1 所述的方法,其中 TH 上调发生在所述黑质中。

23. 权利要求 1 所述的方法,其中在所述纹状体中的递送是到脑的每侧的至少 1 个部位。

24. 权利要求 1 所述的方法,其中递送到所述黑质是到脑的每侧的至少 1 个部位。

25. 将治疗用神经生长因子递送到人对象脑中目标缺陷型、患病或受损的多巴胺能神经元的方法,所述方法包括直接将所述神经生长因子递送到黑质中和纹状体中,以改善响应表达的神经生长因子的缺陷、疾病或损伤。

26. 将治疗用神经生长因子递送到人对象脑中目标缺陷型、患病或受损的多巴胺能神经元的方法,所述方法包括直接将编码神经生长因子的表达载体递送到黑质中,以改善响应表达的神经生长因子的缺陷、疾病或损伤。

27. 将治疗用神经生长因子递送到人对象脑中目标缺陷型、患病或受损的多巴胺能神经元的方法,所述方法包括直接将所述神经生长因子递送到黑质中,以改善响应表达的神经生长因子的缺陷、疾病或损伤。

28. 将治疗用神经生长因子递送到人对象脑中目标缺陷型、患病或受损的多巴胺能神经元的方法,所述方法包括直接将供体细胞中包含的神经生长因子移植到黑质中和纹状体中,以改善响应表达的神经生长因子的缺陷、疾病或损伤。

29. 将治疗用神经生长因子递送到人对象脑中目标缺陷型、患病或受损的多巴胺能神经元的方法,所述方法包括直接将供体细胞中包含的神经生长因子移植到黑质中和纹状体中,以改善响应表达的神经生长因子的缺陷、疾病或损伤。

治疗帕金森氏病和脑多巴胺能神经元的其它病症的方法

[0001] 发明背景

发明领域

[0002] 本发明一般涉及通过将治疗用神经生长因子施用到哺乳动物脑中来治疗神经变性疾病诸如帕金森氏病的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 帕金森氏病是常见的神经变性病症,临床特征为运动过慢、僵硬、震颤和步态异常,而病理特征为黑质致密部(黑质)多巴胺神经元的变性和投射到(projection to)纹状体(包括壳核)。目前的疗法为大部分患者,尤其是处于早期阶段的患者提供令人满意的疾病控制。然而,没有治疗保护免受这些神经元的继续变性,并且,随着时间的推移,所有疗法均失败。

[0005] 例如,慢性左旋多巴治疗伴随有运动并发症,不能潜在地控制失能特征诸如跌倒和痴呆,而且无法防止疾病发展。Olanow 等,Neurology 72:suppl4:S1 - S136(2009)。因此,迫切需要提高临床疾病控制和减缓发展的更有效的治疗。

[0006] 神经营养因子可能提高神经元功能并保护免受神经变性。胶质细胞衍生神经营养因子(GDNF)在体外和帕金森氏病的动物模型中保护多巴胺神经元。Lin 等,Science 260:1130-1132(1993)和Gash 等,Nature 380:252255(1996)。神经秩蛋白(Neurturin)(NRTN)是天然存在的GDNF的结构和功能类似物(Kotzbauer 等,Nature 384:467 - 470(1996)),其已被证明在年老的猴子中提高多巴胺能活性(Herzog 等,Mov Disord 22:1124 - 1132(2007))并在帕金森氏病的动物模型中保护多巴胺神经元。Horger 等,JNeurosci 18:4929 - 4937(1998);Gasmi 等,Neurobiol Dis 27:67 - 76(2007);Gasmi 等,Mol Ther 15:62-68(2007);和Kordower 等,Ann Neurol 60:706715(2006)。

[0007] 然而,神经营养因子作为治疗用于神经变性疾病已经被证明极其困难,大部分是由于妨碍将足够和持续水平的蛋白质靶向递送到变性的神经元的障碍。随后的开放性标记试验的结果显示将GDNF连续输注到患有晚期帕金森氏病的患者的壳核中的益处。Gill 等,NatMed 9:589 - 595(2003)和Slevin 等,JNeurosurg 102:216222(2005)。然而,这些结果并未在双盲研究中得到证实,(Nutt 等,Neurology 60:69-73(2003)和Lang 等,Ann Neurol 59:459 - 466(2006)),可能是由于营养因子没有充分分布在目标区域中。Kordower 等,Ann Neurol 46:419 - 424(1999)和Salvatore 等,Exp Neurol 202:497 - 505(2006)。

[0008] 然而,蛋白质输注(protein infusion),尤其是基因递送,具有在一个外科手术中提供治疗用蛋白质扩散分布和持久表达的潜力。腺相关2型(AAV2)-神经秩蛋白是已经遗传改造成表达和分泌神经秩蛋白人基因的载体。Gasmi 等,Mol Ther 15:62 - 68(2007)。AAV2载体并不诱发炎症反应,已被安全地用于临床试验,并且提供持久的转基因表达。Bankiewicz 等,Mol Ther 14:564 - 570(2006)。在患有晚期帕金森氏病的患者中双侧趋实体壳核内注射(bilateral stereotactic intraputaminial injection)AAV2-神经秩蛋白的开放性标记、12个月1期试验显示,治疗是安全的、耐受性良好,并且伴随运动功能的益

处。Marks Jr 等, Lancet Neurol 17:400 - 408 (2008)。

[0009] 然而,在 2 期试验中治疗的疗效并没有充分实现疗法的希望,因为就所有主要目标而言,没有以统计学上显著的程度超过安慰剂反应。因此,仍然迫切需要针对帕金森氏病的临床上有效的基因疗法。

发明内容

[0010] 本发明提供临床有用的系统和方案,将神经生长因子递送到哺乳动物脑中。本发明尤其用于治疗灵长类动物的神经变性状况,在所述灵长类动物中,根据本发明递送的神经生长因子刺激神经元生长和神经功能恢复。

[0011] 在一个方面中,本发明包括将治疗用神经生长因子递送到人对象脑中的目标缺陷型、患病或受损的多巴胺能神经元诸如在帕金森氏病中损伤的那些中的方法。该方法包括直接将神经生长因子、编码神经生长因子的表达载体递送或者将含有这种表达载体的供体细胞移植到黑质中,优选还到纹状体中,以改善响应神经生长因子的缺陷、疾病或损伤。在一个实施方式中,纹状体递送是向壳核的至少一个区域中。

[0012] 在各种实施方式中,递送到纹状体的编码神经生长因子的表达载体的总单位剂量大于递送到黑质中的编码神经生长因子的表达载体的单位剂量。例如,递送到壳核的单位剂量可以高达递送到黑质的单位剂量的 3、4、5、6、7、8 或 9 倍。

[0013] 在一些实施方式中,疾病通过刺激多巴胺能神经元的修复或活性而得以改善。在相关实施方式中,疾病通过恢复帕金森氏病伴随的运动功能缺陷而得以改善。

[0014] 在一些实施方式中,神经生长因子是 GDNF 家族分子;例如, GDNF、神经秩蛋白、persephin 或 artemin。

[0015] 在进一步的实施方式中,用于将神经生长因子递送到细胞进行表达的重组表达载体是 AAV 载体。

附图简介

[0016] 图 1 提供 AAV2- 神经秩蛋白重组表达载体的图示。在载体基因组中, AAV2 ITR 在 NTN 表达盒的侧翼,所述 NTN 表达盒由 CAG 启动子、前原神经生长因子 -NTN 杂交 cDNA (pre-pro-NGF-NTN hybrid cDNA) 和人生长激素基因多腺苷酸化信号组成。显示了源自 NGF 前域的规范 RXXR 序列的位置和切割位点。

[0017] 发明详述

[0018] 一般说明

[0019] 尽管本文使用了特定术语,但它们仅在一般性和描述性的意义上被使用,而不是为了限制的目的。除非另有说明,本文使用的所有技术术语和科学术语具有与当前描述的主题所属领域的普通技术人员通常理解的不同含义。

[0020] 为了本说明书和所述权利要求书的目的,除非另有说明,所有表示量、大小、尺寸、比例、形状、配方、参数、百分比、参数、数量、特性的数字和本说明书和权利要求书中使用的其它数值均将理解为在所有情况下均被术语“约”修饰,即使术语“约”可能没有与值、量或范围明确出现。因此,除非有相反说明,以下说明书和所附权利要求书中阐述的数字参数不是并且不需要是精确的,但是,基于本公开主题请求获得的期望性能,可以根据需要是近似

的和 / 或更大或更小的,反映公差、换算因子、四舍五入、测量误差等以及本领域技术人员已知的其它因素。例如,当指值时,术语“约”可意为包括指定量的以下变化:在一些实施方式中, $\pm 100\%$; 在一些实施方式中, $\pm 50\%$; 在一些实施方式中, $\pm 20\%$; 在一些实施方式中, $\pm 10\%$; 在一些实施方式中, $\pm 5\%$; 在一些实施方式中, $\pm 1\%$; 在一些实施方式中, $\pm 0.5\%$; 和在一些实施方式中, $\pm 0.1\%$, 因为这些变化适当执行公开的方法或应用公开的组合物。

[0021] 此外,当结合一个或多个数字或数字范围使用时,术语“约”应该理解为是指所有这些数字,包括范围内的所有数字,并且通过将界限延伸到所阐述数值之上和之下来修改该范围。借助端点对数字范围的叙述包括在该范围包含的所有数字,例如全部整数,包括其分数(例如,1 到 5 的叙述包括 1、2、3、4 和 5 以及其分数,例如 1.5、2.25、3.75、4.1 等等)和该范围内的任何范围。

[0022] 发明概述

[0023] 本发明是基于这样的发现:即,将神经生长因子递送至神经元损害的大脑深处,诸如帕金森氏病(人)大脑的黑质中,可以使变性的神经元增强。本发明提供有效的方法来克服迄今为止未被认识的沿晚期帕金森氏病(人)黑质纹状体神经元轴突运输的缺陷,其通过限制暴露于胞体的蛋白质出乎意料地降低递送的神经生长因子的生物活性。这提供对目标特异性组织的了解,以确保实现最大益处。

[0024] 更具体而言,在测试 AAV2- 神经秩蛋白基因疗法在患有晚期帕金森氏病的患者中的疗效和安全性的 2 期临床试验过程中,两个治疗的患者死于不相关的事件,从而能够以尸体解剖分析治疗后脑组织。这两个病例均接收了在背腹平面中以 4mm 间隔开的 4 次大丸剂壳核内注射。在所有检查的半球中均鉴定神经秩蛋白-免疫标记。利用两种不同的方法独立地进行定量容积分析,每一种方法均显示,壳核的平均覆盖率大约 15%,其中在半球之间存在一些差异。

[0025] 在神经秩蛋白免疫标记最密集的区域中,可以观察到酪氨酸羟化酶 (TH)- 免疫反应纤维的增加。然而,这些纤维常常完全包含在神经秩蛋白信号范围内。与所有以动物进行的现有研究形成对比,既没有神经秩蛋白从纹状体逆向运输到黑质的明确证据,也没有在黑质中 TH 诱导的证据。这些数据要求本发明提供的帕金森氏病基因疗法的不同方法。

[0026] 在描述本发明方法和方法学之前,应该理解,本发明并不限于描述的具体方法,因为这些方法可以变化。还应该理解,本文使用的术语仅用于描述具体实施方式的目的,而并不意图是限制性的,因此本发明的范围将仅在所附权利要求书中进行限制。

[0027] 目标组织。

[0028] 本发明鉴定和定义了利用神经生长因子成功再生脑中神经元,尤其是其在黑质中的丢失与神经变性状况诸如帕金森氏病有关的神经元的方法需要的参数。

[0029] 本发明定义的第一方法参数是选择合适的目标组织。选择对神经营养因子保持响应的脑区域。在人类中,保持响应神经营养因子到成年期的 CNS 神经元包括胆碱能基底前脑神经元、黑质多巴胺能神经元、纹状体区域、壳核、内嗅皮质神经元、丘脑神经元、基因座控制区神经元、脊感觉神经元和脊运动神经元。黑质神经元功能的丧失原因与帕金森氏病发作有关。

[0030] 黑质是相对小的深部脑结构,位于大得多的纹状体下面。考虑到直接接近黑质所涉及的手术风险,已经试图经由表达的神经生长因子的运输从纹状体递送到黑质。然而,在

以上其它地方描述的 2 期研究中,将 AAV- 神经秩蛋白构建物递送到纹状体出乎意料地不能提供足够的蛋白质给黑质,以在人中实现可与在帕金森氏病的非人灵长类动物模型中利用相同方法显示的那些结果比较的治疗结果。据信,在人帕金森病患中,黑质纹状体途径可能比之前理解的更加变性。

[0031] 如在实施例中进行进一步定义的,根据本发明的神经生长因子的递送靶向黑质(还优选纹状体)。对于纹状体递送,可以靶向纹状体的不同区域,包括例如壳核、苍白球和尾状核。

[0032] 可以同时靶向脑的多个区域,诸如壳核和黑质。另外,可以靶向特定区域的多个位置,例如均沿一个或两个半球的壳核和 / 或黑质的 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个区域。在人患者中,在每个半球或每侧对黑质的一次或多次注射,而且优选,在每个半球或每侧对纹状体的一次或多次注射,被认为足以实现疾病的治疗改善。

[0033] 递送到纹状体的表达载体的剂量也可以大于递送到黑质的表达载体的剂量。例如,在单个疗程中,递送到纹状体的总剂量可以是递送到黑质的剂量的 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5 或 10 倍。更优选地,提供给纹状体的总剂量为提供给黑质的总剂量的 5 至 10 倍。

[0034] 如本公开内容中所使用的,“单位剂量”一般指每毫升被制备用于本发明的神经营养药物组合物的神经生长因子浓度。对于经由病毒载体的递送(体内或先体外后体内(ex vivo)),神经生长因子浓度由每毫升神经营养组合物的病毒颗粒数定义。最佳地,对于利用病毒表达载体的神经生长因子递送,神经生长因子的每个单位剂量将包括至少 2.5 μ l 的神经营养组合物,根据临床指示多达 25、60、100、200、300 μ l 或更多,其中组合物包括药学上可接受液体中的病毒表达载体并提供每毫升神经营养组合物从 10^6 多达 10^{20} 个表达病毒颗粒。对于神经生长因子蛋白质的递送,本领域的普通技术人员将能够容易地沿着这些思路将剂量方案转换成合适的单位剂量。

[0035] 按照本发明定义的方案,神经生长因子的直接递送可以通过本领域技术人员熟悉的手段来实现,包括通过手术切口的微注射(见,例如 Capecchi, Cell, 22:479-488(1980))、输注、与目标分子或共沉淀剂(例如,脂质体、钙)的化学络合、电穿孔(见,例如,Andreason 和 Evans, Biotechniques, 6:650-660(1988)),以及,对于编码神经生长因子的表达载体组合物的递送,目标组织的微粒轰击(Tang 等, Nature, 356:152-154(1992))。

[0036] 本领域的技术人员将理解,尤其为了用于基因治疗中,本发明应用的直接递送方法消除了与基因治疗有关的限制风险因素;即,用携带编码神经生长因子的转基因的载体转染非目标细胞的可能。在本发明中,递送是直接的,并且递送部位被选择,以便分泌的神经生长因子的扩散发生在脑的受控和预定区域,最优化与目标神经元的接触,同时最小化与非目标细胞的接触。此外,在灵长类动物和人中,已经证明具有可操作的编码神经生长因子的转基因的病毒载体在递送到脑若干年后表达人神经生长因子。因此,本发明在脑中提供长期可用的神经生长因子来源。

[0037] 用于实施本发明的材料

[0038] 在本发明方法中有用的材料包括体内相容的重组表达载体、包装细胞系、辅助细胞系、体内合成的基因治疗载体、可调控的基因表达系统、封装材料、药学上可接受的

载体和编码感兴趣的神经系统生长因子的多核苷酸。

[0039] 神经生长因子

[0040] 已知的神经系统生长因子包括神经生长因子 (NGF)、脑衍生神经营养因子 (BDNF)、神经生长因子 -3 (NT-3)、神经生长因子 -4/5 (NT-4/5)、神经生长因子 -6 (NT-6)、睫状神经营养因子 (CNTF)、胶质细胞系衍生神经营养因子 (GDNF) 和 GDNF 分子家族 (GDNF 的天然存在的类似物、神经秩蛋白以及 persephin 和 artemin) 的其它成员、成纤维细胞生长因子家族 (FGF 1-15)、白血病抑制因子 (LIF)、胰岛素样生长因子家族的某些成员 (例如, IGF-1)、骨形态发生蛋白质 (BMP)、抑免蛋白、生长因子的转化生长因子 (TGF) 家族、神经调节蛋白、表皮生长因子 (EGF)、血小板衍生长因子 (PDGF) 和其它。

[0041] 生长因子可以被纯化、合成或重组产生。“神经生长因子”意为任意来源的生长因子,其基本上与本文所提及的神经生长因子同源,并且与本文所提及的神经生长因子在生物学上等同。这些基本上同源的生长因子对于任何组织或物种可以是天然的,并且,类似地,生物学活性可以在任意一些生物学分析系统中被表征。例如,“神经生长因子”也可以包括杂交或修饰形式的分子,包括融合蛋白和片段以及其中某些氨基酸已经缺失或置换的杂交或修饰形式和诸如其中一个或多个氨基酸已经变成修饰的氨基酸或稀有氨基酸的修饰及诸如糖基化的修饰,只要杂交或修饰形式保持对象神经生长因子的生物学活性。保持生物学活性意指实现神经元修复或提高活性,尽管不一定以与分离和纯化形式的神经生长因子或者已经被重组产生的神经生长因子相同的效价水平。

[0042] 在本文中提及神经生长因子的前原 (pre-pro) 序列意欲被解释为包括前原生长因子,其包含前或前导或信号序列区域、原序列区域和成熟蛋白质。前和 / 或原区域的核苷酸序列也可以用于构建具有其它生长因子或蛋白质的编码序列的嵌合基因,并且,类似地,嵌合基因可以由与来自其它生长因子或蛋白质的基因的编码前和 / 或原区域的序列结合的、对象神经生长因子的编码序列构建 (Booth 等, Gene 146:303-8(1994); Ibanez, Gene 146:303-8(1994); Storici 等, FEBS Letters 337:303-7(1994); Sha 等, J Cell Biol 114:827-839(1991), 其通过引用被并入)。这些嵌合蛋白质可以表现活性蛋白质种类的改变的生产量或表达。

[0043] 用于本发明的具体示例性神经生长因子包括 GDNF 家族的 GDNF、神经秩蛋白 (NRTN)、persephin 和 artemin (例如, 用于治疗帕金森氏病)。这些神经生长因子的编码序列对于本领域普通技术人员来说是悉知的, 或者可容易地被本领域普通技术人员确定, 而不需要在此复述。

[0044] 对于 GDNF 家族, 例如, 可以参考以下核苷酸序列:

[0045] www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2668 (基因 ID 2668, 人 GDNF)、

[0046] www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4902 (基因 ID 4902, 人神经秩蛋白—也参见美国专利号 6,090,778)、

[0047] www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5623 (基因 ID 5623; 人 persephin) 和 www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9048 (基因 ID 9048; 人 artemin)

[0048] 以及其它来源。

[0049] 对于 GDNF 家族, 例如, 可以参考以下多肽序列:

[0050] www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAG46721.1 (登录号 CAG46721; 人 GDNF);

[0051] www.ncbi.nlm.nih.gov/protein / EAW69140.1(登录号 EAW69140 ;人神经秩蛋白一也参见美国专利号 6,090,778) ;

[0052] www.ncbi.nlm.nih.gov/protein / AAC39640.1(登 录 号 AAC39640 ; 人 persephin)、

[0053] www.ncbi.nlm.nih.gov/protein / AAD13109.1(登 录 号 AAD13109.1 ; 人 artemin)、

[0054] 以及其它来源。

[0055] 根据本发明,人神经生长因子优选用于人疾病的治疗,这是由于与同种异型生长因子相比它们相对低的免疫原性。然而,已知其它神经生长因子通过本文所述种类的充分检验,也可适合于本发明。

[0056] 重组表达载体

[0057] 将基因体内转移到目标细胞中的策略包括以下基本步骤:(1) 选择其表达与 CNS 疾病或机能障碍相关的合适转基因(一个或多个);(2) 选择并开发合适且有效的载体,用于基因转移;(3) 证明目标细胞的体内转导和转基因表达稳定且有效地发生;(4) 证明体内基因治疗程序不引起严重的有害作用;和(5) 证明在宿主动物中期望的表型效应。

[0058] 尽管可以使用其它载体,但用于本发明方法的优选载体是病毒和非病毒载体,诸如 DNA 载体(例如,腺相关病毒(AAV)和腺病毒,尤其是前者)。选择的载体应该满足以下标准:1) 载体必须能够感染目标细胞,因而必须选择具有合适宿主范围的病毒载体;2) 转移的基因应该能够在细胞中持久保留并长期表达(而不引起细胞死亡),以在细胞中维持稳定和表达;和 3) 载体对目标细胞的损害应该非常小,如果存在的话。

[0059] 因为成年哺乳动物脑细胞是不分裂的,所以选择的重组表达载体必须能够转染并在不分裂细胞中表达。已知具有这种能力的载体包括 DNA 病毒,诸如腺病毒、腺相关病毒(AAV),以及某些 RNA 病毒,诸如基于 HIV 的慢病毒、猫免疫缺陷病毒(FIV)和马免疫缺陷病毒(EIV)。具有这种能力的其它载体包括单纯疱疹病毒(HSV)。

[0060] 构建重组表达用于本发明的神经系统生长因子的载体可以利用不需要对本领域普通技术人员详细说明了的常规技术来完成。构建在本发明中有用的 AAV 载体的具体方案在实施例中说明。AAV2 血清型的使用被例示;然而,也可以使用其它已知 AAV 血清型。关于载体构建的一般技术的进一步评述,本领域普通技术人员可以希望参考 Maniatis 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (NY 1982)。

[0061] 也已经描述了一些病毒和非病毒启动子的启动子和增强子区域(例如,对于非病毒启动子, Schmidt 等, Nature 314:285(1985); Rossi 和 de Crombrughe, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5590-5594(1987))。维持和提高转基因在休眠细胞中表达的方法包括使用启动子,包括胶原蛋白 I 型(1 和 2)(Prockop 和 Kivirikko, N. Eng. J. Med. 311:376(1984); Smith 和 Niles, Biochem. 19:1820(1980); de Wet 等, J. Biol. Chem., 258:14385(1983))、SV40、鸡 β -肌动蛋白和 LTR 启动子。

[0062] 利用细胞因子调节启动子活性,也可以提高转基因表达,用于长期稳定的表达。例如,转化生长因子(TGF)、白细胞介素(IL)-1、和干扰素(INF)下调由各种启动子诸如 LTR 驱动的转基因表达。肿瘤坏死因子(TNF)和 TGF1 上调由启动子驱动的转基因表达,并且可

用于控制由启动子驱动的转基因表达。可以证明有用的其它细胞因子包括碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和表皮生长因子 (EGF)。

[0063] 具有胶原蛋白增强子序列 (Col1(E)) 的胶原蛋白启动子通过进一步抑制对载体的任何免疫应答——可能在治疗的脑中产生, 虽然其免疫保护状态——也可用于提高转基因表达。此外, 抗炎剂, 包括类固醇, 例如地塞米松, 可在载体组合物递送后立即施用给治疗的宿主, 并且, 优选持续到任何细胞因子介导的炎症反应减退。免疫抑制剂诸如环孢菌素也可以被施用, 以减少干扰素的产生, 这下调 LTR 启动子和 Col1(E) 启动子-增强子并降低转基因表达。

[0064] 含有人神经秩蛋白 cDNA 序列的 AAV2 病毒载体的构建描述在图 1 中和 Gasmi 等, Mol Ther 15:62-68(2007) 中, 其公开内容通过该引用被并入本文。前原形式的神经秩蛋白被切割, 形成成熟蛋白质和含有前原区域的人前原形式。为了增强成熟神经秩蛋白分子的分泌, 除了前原神经秩蛋白以外, 还可以使用信号肽序列, 如在美国专利号 6, 090, 778 中所描述的; 例如, 获自 NGF 的信号肽序列 (Gasmi, 等, *ibid.*)。

[0065] 供体细胞

[0066] 虽然本公开内容关注优选的体内递送方法, 但本领域的普通技术人员将认识到, 宿主细胞诸如成纤维细胞和干细胞 (包括但不限于胚胎干细胞和成体诱导的多能干细胞或全能干细胞) 也可用于先体外后体内将编码神经生长因子的表达载体递送到脑。含有编码神经生长因子转基因的表达载体的供体细胞的制备详细地描述在共同转让的美国专利号 5, 650, 148 中, 其内容被并入本文。制备通过导入含有编码神经生长因子蛋白质的转基因 (一个或多个) 的载体修饰供体细胞来完成, 这些细胞进而被移植到目标组织上。

[0067] 供体细胞的制备对于本领域普通技术人员是已知的。简而言之, 将基因体外转移到供体细胞中的策略包括以下基本步骤: (1) 选择其表达与 CNS 疾病或机能障碍相关的合适转基因 (一个或多个); (2) 选择并开发合适且有效的载体, 用于基因转移; (3) 制备供体细胞 (例如, 从初级培养物或从确立的细胞系); (4) 证明表达新功能的供体植入的细胞能存活并可以稳定、有效地表达转基因产物; (5) 证明移植没有引起严重的有害作用; 和 (6) 证明在宿主动物中期望的表型效应。

[0068] 药制剂

[0069] 在本发明中优选使用编码神经生长因子的表达载体的直接体内递送。为此, 可将编码神经生长因子的表达载体放入药学可接受的悬浮液、溶液或乳液中。类似的运载体可用于递送神经生长因子蛋白质。

[0070] 更具体而言, 药学可接受的运载体可以包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油诸如橄榄油和可注射有机酯诸如油酸乙酯。水性运载体包括水、醇 / 水溶液、乳液或悬浮液, 包括盐水和缓冲介质。肠胃外运载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏油或固定油。静脉内运载体包括液体和营养补充剂、电解质补充剂 (如基于林格氏葡萄糖的那些) 等等。

[0071] 本发明的药物组合物可通过本领域中已知的任何合适的路径进行施用, 包括例如静脉内、皮下、肌肉内、经皮、鞘内或脑内。施用可以是快速的, 如通过注射, 或经历一段时间, 如通过缓慢输注或施用缓释制剂。为了治疗中枢神经系统中的组织, 施用可以通过注射或输注到脑脊液 (CSF) 中。当意图将神经生长因子施用给中枢神经系统中的细胞时, 施

用可以与一种或多种能够促进分子渗透跨过血脑屏障的剂一起。

[0072] 运载体也可以含有其它药学上可接受的赋形剂,用于改变或维持制剂的 pH、摩尔渗透压浓度、粘性、透明度、颜色、无菌性、稳定性、溶解速率或气味。类似地,运载体还可含有其它药学上可接受的赋形剂,用于改变或维持跨过血脑屏障的释放或吸收或渗透。这些赋形剂是这样的物质,其通常和习惯被用于配制以单位剂型或多剂量形式肠胃外施用或者通过连续或定期输注直接输注到脑脊液的剂型。也可以存在防腐剂和/或其它添加剂,如例如抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等等。此外,神经生长因子转基因组合物可以利用本领域中熟知的手段冻干,用于随后的重构和根据本发明的应用。

[0073] 根据剂量配方的药代动力学参数和采用的施用途径,可以重复施用剂量。根据患者的大概体重或体表面积或者待被占用的身体空间体积,计算特定的剂量。也将根据选择的具体施用途径来计算剂量。本领域普通技术人员按照常规来进一步精确确定治疗用合适剂量所必需的计算。根据本文在目标细胞的分析制备中所公开的活性,本领域技术人员可以进行这些计算而不用进行过多的实验。结合标准剂量-响应研究确定准确的剂量。应该理解,从业者将根据相关情况,包括待治疗的状况(一个或多个)、待施用的组合物的选择、个体患者的年龄、体重和响应、患者症状的严重性和选择的施用途径,确定实际施用的组合物的量。

[0074] 胶体分散体系也可用于靶向基因递送。胶体分散体系包括高分子复合物、纳米胶囊、微球体、珠和脂类基体系,包括水包油乳剂、微团、混合微团和脂质体。脂质体是人造膜性泡囊,其用作体外和体内的递送运载体。已经显示,大单层泡囊(LUV),大小范围为0.2-4.0 μm ,可包封相当百分比的含有大的高分子的水性缓冲液。RNA、DNA 和完整的病毒体可被包封在水性内部中,并以生物学活性形式递送到细胞(Fraley, 等, Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981)。

[0075] 为使脂质体成为有效的基因转移运载体,应该呈现以下特性:(1) 高效包封编码反义多核苷酸的基因而不损害其生物学活性;(2) 与非目标细胞相比,优先并充分结合目标细胞;(3) 将泡囊的水性内容物高效递送到目标细胞的细胞质;和(4) 精确、有效地表达遗传信息(Mannino, 等, Biotechniques, 6:682, 1988)。

[0076] 脂质体的组成通常是磷脂特别是高相变温度磷脂通常与类固醇尤其是胆固醇的组合。也可以使用其它磷脂或其它脂类。脂质体的物理特性取决于 pH、离子强度和二价阳离子的存在。

[0077] 在脂质体生产中有用的脂类的实例包括磷脂酰化合物,诸如磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘脂、脑苷脂和神经节苷酯。特别有用的是二酰基磷脂酰甘油,其中脂类部分含有 14-18 个碳原子,尤其是 16-18 个碳原子,并且是饱和的。示例性磷脂包括卵磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰胆碱。

[0078] 基于解剖学和力学因素,可以对脂质体的靶向分类。解剖学分类是基于选择性的水平,例如,器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性。可以基于其是被动的还是主动的来区分力学靶向。被动靶向利用脂质体的自然趋向分布到含有窦状隙毛细管的器官中的网状内皮系统(RES)的细胞。另一方面,主动靶向涉及通过将脂质体连接到特定的配体诸如单克隆抗体、糖、糖脂或蛋白质,或者通过改变脂质体的组成或大小来改造脂质体,以实现除天然存在的定位位点之外的器官和细胞类型的靶向。

[0079] 目标基因递送系统的表面可以以各种方式进行修饰。在脂质体靶向递送系统的情况下,脂类基团可以并入到脂质体的脂双层中,以便维持靶向配体与脂质体双层稳定结合。各种连接基团可用于连接脂类链与靶向配体。

[0080] 动物模型和临床评价

[0081] 在非人灵长类动物对象中,老化的过程刺激经历老化的人脑中的神经学变化。以高度完整性模拟帕金森氏病的非年老动物模型是 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)处理的猴子(见,例如,Kordower等,Exp. Neurology, 160:1-16(1999))。这种处理导致黑质中的多巴胺能神经元广泛变性,同时伴随行为改变和运动缺陷(实施例 2)。证明本发明方法在年老的灵长类动物以及 MPTP 处理的动物中的用途和疗效的数据之前已经被展示。此外,如在实施例中所论述的,证明本发明方法在人的用途的数据也被展示。

[0082] 治疗的临床评价和监测可以利用上述体内成像技术以及通过对处理组织的活组织检查和组织学分析来进行。在后者方面中,就例如 TH 免疫反应性而言,可以在组织样品中对神经元数目定量。

[0083] 疾病症状改善的临床评价和监测可以在治疗后各个时间点进行评定和观察。在各个实施方式中,在治疗后 30 天、60 天、90 天、180 天、12 个月、18 个月、24 个月、48 个月、72 个月和更长之后可观察到改善。

[0084] 可以用 UPRDRS 评价处于实际关闭状态 (practically-defined off state) (在最后服用抗帕金森药物后约 12h) 和处于最佳开启状态 (best on state) (对早晨服用抗帕金森药物的最佳响应) 的患者。Fahn 等, Recent Developments in Parkinson's disease, Macmillan Healthcare Information, Florham Park, NJ 2:153-163 (1987)。也可以在 12 个月后的每次回访时在实际关闭状态中进行 UPDRS 的运动评分 (subscale) (第 3 部分)。可以定期进行运动状态、计时运动测试、运动障碍分级和临床总体印象评价的家庭日记评价 (Home diary assessment), 例如在基线时、6 个月时和在其后的每次回访时。可以用帕金森氏病调查表 (PDQ)-39 (Jenkinson 等, Age Ageing 26:353-357 (1997)) 和简表 (SF)-36 (Ware 等, Med Care 30:473-483 (1992)) 定期评价生活质量;例如,在基线时及其随后。

[0085] 本发明已经被充分描述,下面阐述说明其实施的实施例。然而,这些实施例不应该被认为限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书限定。

[0086] 实施例 1

[0087] AAV2-神经核蛋白基因疗法 (AAV-神经核蛋白) 的生物活性:帕金森氏病 (人) 和非人灵长类动物脑的差异

[0088] 12 个中度晚期帕金森氏病患者的 1 期试验没有鉴定出安全问题,同时表明运动功能的若干测量上的可能改进。Marks 等, Lancet Neurol 7:400-408 (2008)。如在上面别处所述,随后 58 个对象的双盲控制 2 期试验进一步支持 AAV-神经核蛋白的安全性,但与初级终点 (在 12 月时 UPDRS-运动“关闭”) 上的假手术相比,不能辨别任何益处。然而,若干次级终点表明适度的临床益处,而没有测量结果支持假对照。而且,对来自在 15 到 18 个月时保持盲处理的患者 (n=30) 的所有数据进行的方案规定的分析 (protocol-prescribed analysis) 表明,用 AAV-神经核蛋白 (AAV2-NTRN) 在初级和次级终点上的显著益处,没有测量结果支持假的。

[0089] 在 2 期试验中两个帕金森氏病患者死于非 AAV2-NTRN 相关事件,并且通过组织学

方法检查他们的脑。将 AAV2-NRTN 递送到这些患者壳核的效果、比较 NRTN 在壳核和黑质中的表达和黑质纹状体神经元中的 TH- 诱导与遵循相同处理的年轻的、年老的和帕金森猴子的那些,在下面详细说明。

[0090] 载体设计和构建

[0091] 利用 AAV- 神经秩蛋白,其是被遗传改造成仅表达人 NRTN 的 AAV2 载体。Gasmi 等, Mol Ther 15:62 - 68(2007)。

[0092] 帕金森尸体解剖病例

[0093] 之前满足入围标准并签署 IRB 认可的知情同意书的患者接受 AAV- 神经秩蛋白 (5.4×10^{11} vg),其通过每个半球 4 个单独的针道和每个道两个贮库 (deposit) 进行分布。一个对象 (#1802) 是 59 岁的男性,在 10.2 年之前已被确诊,并在 AAV- 神经秩蛋白治疗后第 90 天死于肺栓塞。第二个对象 (#1904) 是 73 岁的男性,已经在 9.5 年前被确诊,在 AAV- 神经秩蛋白后第 47 天遭受致命的心肌梗塞。对象 #1904 的基线 UPDRS 运动关闭 / 开启分数为 34/21 和自报告日记关闭时间 (off time) 为 1.33hr/ 天。对象 #1802 的基线 UPDRS 运动关闭 / 开启分数为 51/34 和自报告日记关闭时间为 4.7hr/ 天。

[0094] 分别在 6 和 13 个小时的死后间隔时间后用改进的 Zamboni 溶液固定脑,并以 $40 \mu\text{m}$ 进行切片。从第二个对象中仅可用一个半球。针对 NRTN 和酪氨酸羟化酶 (TH) 对脑染色,利用非帕金森氏病年老的人作为阳性对照。两个脑均显示帕金森氏病的典型病理学特征,同时黑质中细胞显著损失,这与多个 α - 突触核蛋白 - 染色的路易体有关。

[0095] 非人灵长类动物病例

[0096] 基于相对的纹状体体积,在施用给帕金森氏病患者的范围内,施用壳核内剂量的 AAV2-NRTN 给 10 只恒河猴 (Macaca mulatta),除了有意接受实质上较低剂量 (人剂量的 $\sim 4\%$,按纹状体体积计) 的两只年轻猴子并且它们的脑仅在 28 天后被评价以外。所有居住条件 (housing) 和试验均是 IACUC 认可的。Kordower 等, Ann Neurol 60:706 - 715(2006); Herzog 等, Mov Disord 22:1124 - 1132(2007); Herzog 等, Mol Ther 16:1737 - 1744(2008); 和 Herzog 等, Neurosurgery 64:602 - 612(2009)。在 AAV- 神经秩蛋白施用之后,将猴子麻醉,用 0.9% 盐水经心灌注,接下来是改进的 Zamboni 固定,并将脑进行切片。这些猴子中的一些是之前的出版物的部分,虽然本文呈现的具体数据未被之前公布。Kordower 等, Ann Neurol 60:706 - 715(2006); Herzog 等, Mov Disord 22:1124 - 1132(2007); Herzog 等, Mol Ther 16:1737 - 1744(2008)。

[0097] 以纹状体内总体积 $25 \mu\text{L}$ 的两个贮库对两只年轻的猴子 (~ 5 岁大) 施用每个半球 0.5×10^{11} vg 的 AAV- 神经秩蛋白,1 个月后将它们无痛处死,并且另外的年轻猴子接受每个半球 1.0×10^{11} vg 的 AAV- 神经秩蛋白,在 3 个月后将它们无痛处死。

[0098] 经由分布在纹状体内的 5 个贮库 (每个 $30 \mu\text{L}$) 对三只年老的猴子 (22 - 25 岁大) 单侧施用 3×10^{11} vg 的 AAV- 神经秩蛋白,在 8 个月后将它们无痛处死。

[0099] 五只猴子 (年龄范围: 6 - 10 岁) 接受单侧、颈动脉内输注导致运动功能障碍的 MPTP。然后,4 天后,经由分布在纹状体内的 5 个贮库 (每个 $15 \mu\text{L}$) 以及单次 $10 \mu\text{L}$ 注射到黑质 (0.2×10^{11} vg 剂量) 中对它们施用 1.5×10^{11} vg 的 AAV- 神经秩蛋白,并在 10.5 个月后将它们无痛处死。

[0100] 神经秩蛋白和酪氨酸羟化酶的免疫组织化学分析

[0101] 免疫过氧化物酶标记被用于显现人和非人灵长类动物纹状体和黑质中的 NRTN 和 TH, 如在 Kordower 等, *Ann Neurol.*, 60:706-715 (2006) 中所描述的。立体学取样方法, 结合计算机辅助成像软件, 并且 Cavalieri 方法被用于对灵长类动物纹状体中 NRTN 表达的体积定量。对于人病例, 两种不同的方法被独立地用于计算壳核中 NRTN 表达的体积。一种方法基于对每个壳核中 6 到 11 个切片的立体学取样应用定容分析。第二种方法对发现包含壳核的所有切片取样 (每个病例 19 - 29 个切片)。

[0102] 然后, 基于整体目标的体积, 利用来自内部 (in-house) 人和灵长类动物组织学切片和 MRI 扫描的值以及公布的值, 计算在每个目标结构中表达的 NRTN 的百分比, 以提供对 $\sim 1200\text{mm}^3$ / 半球的非人灵长类动物尾状 / 壳核和 $\sim 4000\text{mm}^3$ / 半球的人壳核的评估。

[0103] 结果

[0104] NRTN 表达

[0105] 对于这两个帕金森氏病病例, 在死于不相关的原因之后, 于 AAV2-NRTN 处理后 7 周或 3+ 个月的三个可得的半球中定量神经秩蛋白表达。在所有半球中均看到 NRTN- 免疫反应性, 其限于目标壳核中。两个独立的盲分析保守地估计 NRTN 蛋白质按体积计覆盖整体壳核的 $\sim 15\%$ 。AAV- 神经秩蛋白应用的剂量给药范例意图尽可能广泛地将 AAV2-NRTN 分布在壳核中, 同时限制扩散到周围部位, 以降低可能的副作用。Kordower 等, *Ann Neurol* 46:419 - 424 (1999); Nutt 等, *Neurology* 60:69 - 73 (2003); 和 Eriksdotter 等, *Dement Geriatr Cogn Disord* 9:246 - 257 (1998)。在三个研究的半球的每一个中, 在所有分析的壳核切片的 93%、58% 和 80% 中看到了可检测的 NRTN 蛋白质。

[0106] 与壳核 (即, 多巴胺黑质神经元的末梢区域) 中强的 NRTN 表达形成对比, 在黑质 (即, 这些相同神经元的神经元胞体) 中见到非常少的 NRTN 染色——尽管看得出, 使多巴胺能的黑色素 - 阳性神经元得以存活。

[0107] 两只年轻的猴子被施用特别低剂量的 AAV- 神经秩蛋白 (小于人帕金森氏病剂量的 4%, 按每一目标结构的相对体积计), 并在 1 月后就将其无痛处死, 以提供对具有低 NRTN 表达水平的 AAV- 神经秩蛋白的早发型生物活性的保守估计。在这两只猴子中纹状体 NRTN 表达的体积估计为仅 5.6% 和 1.8%。尽管这种低水平的纹状体 NRTN 表达, 并且与帕金森氏病 (人) 形成对比, 但是 NRTN 逆向标记在黑质核周体中容易看到, 并且顺向输送的 NRTN⁺ 纤维在整个苍白球和黑质网状部中被看到。

[0108] 对于这三只在 8 个月前施用 AAV2-NRTN 的年老的猴子, 估计 NRTN 覆盖按体积计整个纹状体的 4、19 和 25% (平均 16%)。尽管纹状体 NRTN 覆盖率的变化, 但始终在黑质中观察到 NRTN, 这与帕金森氏病 (人) 组织不同。

[0109] 对于 5 只 MPTP 处理的猴子 (在 MPTP 处理后施用 AAV2-NRTN 4 天, 10 个月 after 无痛处死), 按体积计整个壳核的平均 $\sim 13\%$ 针对 NRTN 被染色 (分别为 8%、8%、13%、15% 和 23%)。类似于其它灵长类动物研究, 分别在黑质致密部和网状部中观察到逆向和顺向运输的 NRTN 的大量证据。

[0110] 酪氨酸羟化酶免疫组织化学

[0111] 对人帕金森氏病尸体解剖组织的检查仅发现在 AAV- 神经秩蛋白之后 TH 诱导的不足的证据。在目标纹状体中观察到 TH 诱导的最明确的证据, 其完全在 NRTN 染色的一些最密集部位的边界内。该信号——仅反映稀少的 TH- 阳性纤维——平均在 50% 的 NRTN- 阳性壳

核部位（即，分别为 0%、62% 和 80%）被观察到。帕金森氏病（人）脑的黑质中没有发现 TH 诱导的证据，尽管存在许多含黑色素的、TH+ 多巴胺能神经元。

[0112] 与帕金森氏病病例中稀少的 TH 诱导信号形成对比，在猴子中 AAV2-NRTN 处理后的 TH 诱导始终在黑质纹状体神经元中被观察到，其一般是强有力的，并通常反映在纹状体和黑质中 NRTN 表达的程度和强度。与帕金森氏病病例相比，这甚至在剂量给药后 28 天也是明显的，并且剂量实质上越低，NRTN 表达越少。最后，进一步与帕金森氏病（人）脑中的 TH 应答形成对比，猴子纹状体中 TH 诱导的面积始终超过邻近切片中 NRTN 染色的面积。

[0113] 通过以上数据，显示了基因疗法可以在神经变性患者脑深部产生潜在有效的治疗用蛋白质的靶向表达。将 AAV2-NRTN（AAV-神经秩蛋白）施用到帕金森氏病（人）脑中的壳核导致 NRTN 在目标壳核中的明确表达，保守估计覆盖按体积计结构的 ~15%。虽然不知道在帕金森氏病患者中对于临床益处需要多大覆盖率，但该量明显在若干非人灵长类动物模型中提供生物学益处的范围内，并且积累的动物和人的安全性数据现在提供进一步可靠地扩展该覆盖率的正当理由。Kordower 等, *Ann Neurol* 60:706 - 715(2006) ;Herzog 等, *Mov Disord* 22:1124 - 1132(2007) ;Herzog 等, *Mol Ther* 16:1737 - 1744(2008) ; 和 Herzog 等, *Neurosurgery* 64:602 - 612(2009)。

[0114] 然而，与所有现有动物研究形成对比，在帕金森氏病（人）壳核中的 NRTN 表达并不导致黑质中神经元胞体的标记，尽管壳核覆盖率多得足以在年轻的、年老的和 MPTP- 帕金森病猴子中产生这种应答。该区别表明，晚期帕金森氏病（人）与用于帕金森氏病转换研究的典型动物模型中黑质纹状体神经元状况和功能的深层次差异。如在以下实施例中阐明的，本发明已经考虑到该差异。

[0115] 同样感兴趣的是适度的 AAV2-NRTN 介导的 TH 诱导，在 AAV2-NRTN 施用和随后的 NRTN 表达后可见于壳核中（TH 是用于多巴胺合成的主要酶和用于变性多巴胺神经元功能增强的代用品）。在非人灵长类动物中响应 AAV-NRTN 的强的 TH 信号与帕金森氏病（人）中有限的信号在许多重要方面形成鲜明对比，包括：(1) TH 信号强度远小于帕金森氏病（人）中的 TH 信号强度，(2) 它以较低的频率和可靠性发生，和 (3) 它发生在壳核的小得多的部分中，完全在 NRTN 表达的区域中。

[0116] 基于在变性黑质纹状体神经元中用神经营养因子（主要为 GDNF）进行的相当的动物研究，常规的常识认为靶向这些神经元的末梢区域（即，纹状体）必需且足以得到最佳神经营养益处，而靶向黑质则不必或者甚至起相反作用。Kirik 等, *NatNeurosci* 7:105-110(2004) ;Bjorklund 等, *NeurobiolDis* 4:186 - 200(1997) ; 和 Kirik 等, *J Neurosci* 20:4686 - 4700(2000)。这种观点进一步得到以神经营养因子进行的生殖研究的支持，该研究显示它们最常通过被神经元末梢吸收并逆向运输到它们的胞体以引起营养作用而起作用。Mufson 等, *Prog Neurobiol* 57:451 - 484(1999) 和 Lindsay 等, *Trends Neurosci* 17:182-190(1994)。事实上，将 GDNF 或 NRTN 递送到纹状体的末梢区域一贯被证明足以通过逆向运输提高 GDNF 和 NRTN 在轴突末梢以及黑质胞体中的水平。Salvatore 等, *Exp Neurol* 202:495-505(2006) ;Ai 等, *J Comp Neurol* 461:250 - 261(2003) ;Su 等, *Human Gene Ther* 20:1627-1640(2009) ;和 Tomac 等, *Nature* 373:335339(1995)。

[0117] 然而，黑质中极小量的 NRTN- 阳性核周体揭示了这并没有以类似的方式发生在晚期帕金森氏病（人）中的本文数据，尽管壳核中明显的 NRTN 和黑质中足够的多巴胺神经

元。壳核递送后在人黑质中类似的弱 NRTN 信号的证据,确保更大的神经营养暴露于黑质中的变性核周体的策略提供更快速和强有力的神经营养应答,从而提供更有意义的临床益处。

[0118] 显示除纹状体外将 GDNF 注射到黑质中没有益处并且可能是有害的相反数据应该谨慎解释。Kirik 等, J Neurosci 20:4686 - 4700 (2000)。这些数据仅显示,当足够的黑质 GDNF 由于纹状体 GDNF 的逆向运输而存在时,对黑质的额外靶向是不必要的。然而,当在晚期帕金森氏病人中黑质纹状体途径的变性阻止 NRTN 从纹状体逆向运输到黑质时,对黑质的靶向是不必要的结论依据无效。

[0119] 实施例 II

[0120] 对晚期帕金森氏病(人)的壳核内 AAV2-Neurtin(AAV-神经秩蛋白)的多中心、随机、双盲、假手术对照的研究

[0121] AAV2 载体被遗传改造成仅表达人神经秩蛋白(NRTN),如在实施例 I 和 Gasmi 等, Mol Ther 15:62 - 68 (2007) 中所论述的。它提供神经秩蛋白(NRTN)向脑细胞的靶向和持续递送。

[0122] 为了利用 AAV2-NRTN 进行多中心、双盲、假手术对照的试验,患者通过中心的、计算机产生的随机编码被随机分配(2:1),以接受双侧注射到壳核的 AAV2-神经秩蛋白(5.4×10^{11} 载体基因组)或假手术。除了神经外科小组之外,所有患者和研究人员均对处理分配不知情。在实际上关闭状态中统一的帕金森氏病分级的运动子项评分的初级终点从基线变为 12 个月。在基线后具有至少一项评价的所有随机分配的患者均包含在初级分析中。

[0123] 在 2006 年 12 月和 2008 年 11 月之间,来自美国 9 个地点的 58 名患者参与了试验。与对照个体相比,用 AAV2-神经秩蛋白治疗的患者的初级终点中没有明显差异(差异 -0.31 [SE 2.63], 95%CI -5.58 至 4.97 ; $p=0.91$)。因此,当在 12 月时利用 UPDRS 运动评分进行功能评价时,壳核内 AAV2-神经秩蛋白并不优于假手术。

[0124] 实施例 III

[0125] 递送 AAV-神经秩蛋白到黑质和壳核

[0126] 自 2010 年 10 月开始的晚期帕金森氏病 2b 期多中心、假手术、双盲对照的试验中,利用 AAV2-神经秩蛋白。晚期患者可预期比处于疾病早期的患者具有更大的黑质纹状体运输途径的变性,其中本发明因此预期容易显示疗效。到该申请时为止,52 个对象中大约 20% 已经进行了 CERE-120 施用或假手术,其中许多其它对象登记并等待手术。该方案根据下面列出的参数应用本发明。

[0127] 利用神经成像进行趋实体手术,以设计注射轨迹。用深度异丙酚镇静使患者麻醉。对于分配到积极治疗的患者,以 AAV2 作为载体将编码神经秩蛋白的 DNA 递送到壳核进行基因转移程序。双侧施用 5.4×10^{11} 载体基因组的总脑剂量的 AAV2-神经秩蛋白。在这些患者中,以每侧两个注射部位(通过钻孔到达)直接靶向黑质,其中较高的剂量根据本发明递送到壳核,以每侧三个注射部位进行壳核递送。

[0128] 在 1 期安全性试验中成功对 6 个患者剂量给药后,开始进行该 2b 期试验,所述 1 期安全性试验首次评价用 AAV-神经秩蛋白靶向黑质以及与之前测试的相比递送较大剂量的可行性和安全性。1 期安全性数据库通常反映每个患者从 7 个月到 13 个月范围的随访

周期,而且在 6 个剂量给药的对象中的任意一个中均没有显示严重的不利事件 (SAE),不包括对体重的影响。按照计划,所有患者均在手术 48 小时内从医院离开。与在 1 期试验中观察到的安全性一致,在进行的 2 期试验中没有观察到 AAV- 神经秩蛋白相关的严重的不利事件。

[0129] 在基线和手术后第 1、3、6、9 和 12 个月评价患者,然后每 3 个月进行一次评价,直到最后入围的患者完成 15 个月的评价,如就人临床方案而言在以上别处所概述的。预期早在治疗后 3 个月可观察到神经变性缺陷的改善。在之前临床试验中进行壳核治疗的患者在 12 月后出现的益处表明,在一年的时间点后进行追踪也可以进一步证明神经秩蛋白信号在黑质纹状体和胞体中的扩大;例如,在治疗后 18、24、48 或 72 个月以及可能更晚。

[0130] 尽管通过参考以上实施例已经描述了本发明,但应该理解,修改和变化包含在本发明的精神和范围内。因此,本发明仅由所附权利要求进行限定。

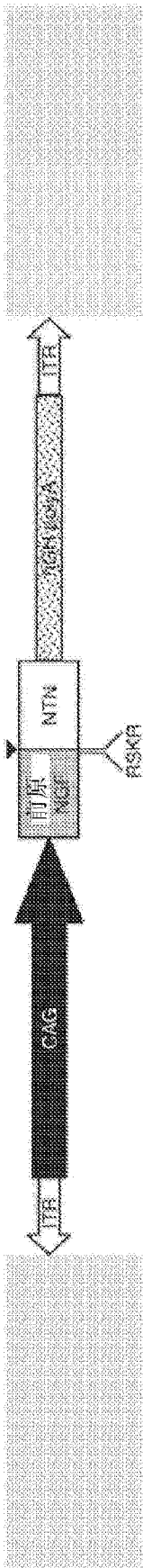


图 1