[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480026694.0

[43] 公开日 2006 年 10 月 25 日

[11] 公开号 CN 1852741A

[22] 申请日 2004.7.15
[21] 申请号 200480026694.0
[30] 优先权
[32] 2003.7.16 [33] US [31] 60/487,659
[86] 国际申请 PCT/CA2004/001036 2004.7.15
[87] 国际公布 WO2005/007199 英 2005.1.27
[85] 进入国家阶段日期 2006.3.16
[71] 申请人 RVX 治疗公司
地址 加拿大艾伯塔省
[72] 发明人 K·米哈拉 N·C·W·黄
K·勒比奥达 J·塔克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 李 波 王景朝

权利要求书 2 页 说明书 45 页 附图 10 页

[54] 发明名称

下调 TGF－β 效应的化合物和方法

[57] 摘要

提供了治疗包括癌症在内的与 TGF－β 的存在相关的疾病和健康状况的方法，包括给予治疗有效的作为 TGF－β 拮抗物和组织蛋白酶 B 抑制剂的试剂、或者给予用基因转化了的表达这样的试剂的淋巴细胞，用于克服 TGF－β 的淋巴细胞逃避效应。

1. 治疗患有癌症的患者的方法，包括步骤：提供从具有至少一种肿瘤的动物分离的淋巴细胞，修饰所述淋巴细胞以表达 TGF-β 拮抗物，并给予所述患者治疗有效量的所述经修饰的淋巴细胞。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述具有肿瘤的动物与所述患者是相同的，所述修饰包括通过引入能够表达 AHSG 的 DNA 转化所述淋巴细胞。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述转化包括通过使用腺伴随病毒载体引入所述 DNA。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述给药步骤包括经静脉、体液内、肌内或皮下注射所述经修饰的淋巴细胞。

5. 治疗患有癌症的患者的方法，包括：从所述患者分离淋巴细胞；修饰所述分离的淋巴细胞，由此所述淋巴细胞能够表达 AHSG 蛋白；并给予所述患者治疗有效量的所述经修饰的淋巴细胞。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述给药步骤包括经静脉、体液内、肌内或皮下注射所述经修饰的淋巴细胞。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述修饰步骤包括用编码 AHSG 的 DNA 转化所述分离的淋巴细胞。

8. 权利要求 6 的方法，其中所述淋巴细胞用于富集表达 CD8 的淋巴细胞。

9. 权利要求 6 的方法，其中所述经修饰的淋巴细胞被悬浮在药学上可接受的载体中。

10. 权利要求 7 的方法，其中所述转化步骤包括：将所述分离的淋巴细胞与包含编码 AHSG 的 DNA 的 AAV 载体接触。

11. 增强淋巴细胞免疫能力的方法，包括修饰所述淋巴细胞以表达 AHSG。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述修饰步骤包括用编码 AHSG 的核酸转化所述淋巴细胞。

13. 权利要求 11 的方法，其中所述方法额外包括步骤：从动物分离所述淋巴细胞，在所述修饰步骤后将所述淋巴细胞重新引入同一动物或者另一动物。

14. 治疗患有与 TGF-β 的存在相关的疾病或医学状况的患者的方

法，包括给予所述患者治疗有效量的试剂，该试剂通过抑制组织蛋白酶 B 的活性以及阻断 TGF-β 与 TGF-β 受体的结合来抑制 TGF-β 。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述疾病或医学状况选自影响所述患者的一种或多种组织的癌症、移植、自身免疫失调、伤口愈合、瘢痕形成、以及炎症。

16. 权利要求 15 的方法，其中一种或多种组织选自眼、肾脏、肝脏、腺体、心血管、肺、以及心肌。

17. 权利要求 14 的方法，其中该试剂通过该试剂竞争性结合于 TGF-β 而抑制 TGF-β 。

18. 权利要求 14 的方法，其中该试剂包括编码生物活性化合物的核酸，当所述化合物通过所述核酸的作用被表达时就抑制了 TGF-β 的活性。

19. 权利要求 14 的方法，其中核酸编码 AHSG。

20. 权利要求 14 的方法，其中试剂是 AHSG。

21. 权利要求 18 的方法，其中化合物是 AHSG。

22. 治疗患有与 TGF-β 的存在相关的疾病或医学状况的患者的方法，包括给予所述患者治疗有效量的能够表达试剂的淋巴细胞，该试剂通过抑制组织蛋白酶 B 的活性以及阻断 TGF-β 与 TGF-β 受体的结合来抑制 TGF-β 。

23. 权利要求 22 的方法，其中淋巴细胞是通过将编码所述试剂的核酸引入所述淋巴细胞中而被修饰的。

24. 权利要求 22 的方法，其中核酸编码 AHSG。

25. 权利要求 23 的方法，其中淋巴细胞是通过体内基因治疗而被修饰的。

26. 权利要求 23 的方法，其中淋巴细胞是通过离体基因治疗而被修饰的。

27. 权利要求 22 的方法，其中核酸进一步包括药学上可接受的载体。

28. 权利要求 22 的方法，其中核酸进一步包括病毒载体。

29. 权利要求 28 的方法，其中核酸编码 AHSG。

30. 权利要求 28 的方法，其中病毒载体包括 AAV。

下调 TGF-β 效应的化合物和方法

相关申请

本申请要求 2003 年 7 月 16 日提交的美国临时申请 No. 60/487,659 的权益。

发明领域

本发明涉及增强对癌症的免疫反应和治疗癌症的细胞治疗方法的领域，特别涉及用于下调 TGF-β 生物效应的诸如 AHSG 的化合物和方法。

发明背景

转化生长因子-β(“TGF-β”)是二聚体多肽生长因子家族的成员，在调节细胞增殖和分化、胚胎发育、伤口愈合以及血管生成的信号途径方面起着基本作用。几乎体内所有的细胞都产生 TGF-β 并具有结合生长因子的受体。TGF-β 的作用涉及许多疾病状态，包括动脉硬化症；肺、肝脏、肾脏和心血管系统的纤维化疾病；广泛创伤愈合；以及癌症。

(a) 眼

TGF-β 是体内最有效的促进伤口愈合的生长因子。眼的许多失调和疾病涉及到由于对损伤的瘢痕形成反应而导致的渐进性失明。这种天然的瘢痕形成反应是由 TGF-β 介导的，是几种因此被证明远非无效的治疗策略的目标。

由 TGF-β 诱导的伤口愈合而引起的瘢痕形成导致了失明或视力下降，这种失调的例子包括青光眼外科手术后的瘢痕形成，以及角膜、白内障和后囊膜的瘢痕形成。此外，TGF-β 在增生性玻璃体视网膜病变、黄斑变性和眼的其它增生性疾病中起作用。

增生性玻璃体视网膜病变是在十分之一的外科治疗视网膜脱落中发生的疾病过程；这种疾病可导致失明。在这种失调中，过量的眼内纤维化与 TGF-β 活性的明显增加相关联，表明降低眼内 TGF-β 水平的有效策略可能会限制或终止这种疾病的进展。

在眼内抑制 TGF-β 活性的方法作为一种治疗方法由于各种问题而很少取得成功。在用于增生性疾病的方法方面，使用了诸如那些用

于癌症治疗的的抗增殖药物(例如丝裂霉素和氟尿嘧啶)，但是由于药物引起疱疹的毒副作用所导致的失明感染和压力过低极大的限制了实用性。涉及伤口愈合的特异性靶因子的方法迄今在获得普遍认可方面还远未成功。已经发展出了特异于 TGF-β 的抗体 lerdelimumab，到目前为止已经到了眼失调的晚期人体临床试验。将抗体送递到眼限制了它作为治疗的有效性，因为它在该组织内滞留的时间是有限的，需要重复施用；也因为抗体本身可能介导免疫原性和不适当的靶向。靶向 TGF-β 活性(体内)的反义寡核苷酸也正在被发展来治疗眼的术后瘢痕形成失调，但是这些试剂面临许多挑战，包括那些所有反义方法所普遍具有的，尤其是诸如核酸酶稳定性、反义效能以及靶向特异性。

本发明的方面是提供治疗眼的失调包括特别是那些由 TGF-β 介导的失调的改进的治疗试剂，以及选择同样试剂的方法。

（b）肝脏

TGF-β 是参与调节肝纤维发生的关键细胞因子，在诸如中毒、胆汁郁积、酒精中毒(例如肝硬化)、炎症以及其它类型的肝损伤的人体失调中，也在这些失调的动物模型中。TGF-β 活性的增加在这些失调的发展和进展中起着重要作用，因此降低 TGF-β 活性是很有吸引力的治疗目标。

晚期肝纤维化的唯一祛病疗法就是移植，但是供体数量和患者的临床状态限制了这种治疗方法。其它疗法尝试减轻纤维化症状，或阻断导致了纤维增殖病理的肝脏损害的潜在原因。然而，迄今为止没有疗法直接治疗肝纤维化。

本发明进一步的方面是提供改进的治疗肝纤维化的治疗方法。

(c) 肾脏

肾脏内的纤维化疾病与肝脏内的具有许多类似之处，由 TGF-β 活性介导的许多疾病进展是特别难以攻克的。血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂可延缓糖尿病性肾脏疾病的进展，血管紧张素受体阻断剂(ARBs)显示出在减缓 II 型糖尿病性肾病中的肾功能丧失方面是有益的。两种药物种类的效果据信主要源自输出动脉的收缩以及它们介导的肾小球内压力的释放，但是也可能部分地是由两种药物介导的血管紧张素的 TGF-β 活化细胞因子活性的减少所引起的。然而，ACE-抑制剂和 ARBs 都不能完全使病态肾脏中的 TGF-β 水平正常化，也不能预防或延缓所

有患者中的晚期肾病。

本发明进一步的方面是提供改进的治疗肾病的治疗方法，特别是那些由 TGF-β 介导的肾病。

(d) 肺纤维化疾病

肺纤维化的特征是肺中胞外基质的增强的合成和沉积；该疾病的发病部分地是由增加了的 TGF-β 活性所推动的。先天性肺纤维化的标准治疗是类固醇和免疫抑制剂。由于这种疾病的 5 年生存率小于 50%，当前的疗法明显不合适。目前没有直接抑制或下调 TGF-β 活性以终止或逆转疾病进展的疗法来治疗肺纤维化。

提供改进的治疗肺纤维化的治疗方法仍然是本发明进一步的方面。

(e) 心肌纤维化

心脏舒张的功能失调是高血压性心脏病和心肌病的共同特征。纤维组织的过度沉积是肥大性心脏以及许多其它心室功能失调中降低泵送能力的主要原因。不幸的是，还没有改善左心室心脏舒张功能的特异疗法，根据本发明的另一方面就是提供这样的方法。

TGF-β 是心脏中控制成纤维细胞增殖以及随后的胞外基质沉积的基本细胞因子，胞外基质部分地是由形成疾病症状的纤维组织块组成的。动物实验证明了在压力超负荷心脏中 TGF-β 的过量表达和致病的纤维化之间的因果联系。此外，人体研究已经证实在心脏肥大和纤维化中增加了的 TGF-β 表达的存在。已经提出使用抗 TGF-β 的单克隆抗体，但是还未证明在人体治疗中是有效的；无论如何都将受到为了治疗效果而将注射的抗体蛋白质以未降解状态保持在体内必要部位的有限持续时间的限制。

本发明进一步的另一方面是提供心脏舒张功能失调的治疗。

用更受关注的治疗方法处理心肌纤维化仍然是本发明进一步的另一方面。

(f) 基因治疗

基因疗法寻求通过将编码有益产物、反义 DNA 或 RNA、RNA 引诱物或核酶转移到靶组织基因上来改善疾病。通常，基因疗法具有克服蛋白质和 RNA 靶送递所面临障碍的潜能，在提供更长持续效果的同时也提高疗效，甚至可能更加安全。动物基因治疗显示出在诸如风湿

性关节炎、多发性硬化、糖尿病和红斑狼疮这样的模型中是有效的。超过 400 例的人体临床研究已经完成或正在进行，但是还没有基因疗法被证实可以用于这里提到的任何纤维化失调。

提供利用基因疗法的治疗试剂，这仍然是本发明的另一方面。

尽管存在与肿瘤细胞相关的免疫原性，但它们仍然具有不可思议的能力逃避身体的监视系统；细胞毒性淋巴细胞(“CTL”)和天然杀伤(“NK”)细胞都是免疫监视的关键成分。

提供克服据信是某些癌细胞固有特征的掩蔽机制的方法，这仍然是本发明的另一方面。

增强细胞毒性淋巴细胞和天然杀伤细胞的功能来提供癌症治疗的很有吸引力的方法，这仍然是本发明进一步的另一方面。

本发明进一步的方面是提供新颖的适合转导或转化淋巴细胞以表达 AHSG 的 cDNA，由此这样的蛋白质通过竞争结合到 TGF-β 受体上提供双功能作用，从而拮抗 TGF-β 的作用并作为组织蛋白酶 B 活性的有力抑制剂。

更常规的方法依靠增强肿瘤细胞的免疫原性。例如，曾经尝试研究使肿瘤细胞能够表达诸如干扰素(IL-2、IL-12) 和粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子 (“GM-CSF”)这样的细胞因子。这些蛋白质的任何一种的表达都会增强免疫系统监测癌细胞的能力(Smith, I.J.等 J Immunother 26:130 (2003))。这些基因的任何一种的表达都可导致癌细胞在体外的生长衰退或阻滞(Rosenberg, S.A. Nature 411: 380 (2001))。不幸的是，尽管干扰素在体外很好地起作用，但是人体临床试验的结果让人失望，体外研究预期的成功并没有实现(de Visser, K. E.等 Leukemia 13: 1188 (1999); Wojtowicz-Praga, S. J. Immunother20 : 165 (1997))。

使肿瘤细胞对免疫系统更敏感的另一方法涉及诸如 B7-1 和 B7-2 的所谓的辅助分子的表达。其中任何一个基因插入癌细胞将诱导主要组织相容性复合物(“MHC”)的表达。这种复合物在肿瘤细胞上的存在推动了淋巴细胞对靶细胞的识别(de Visser, K.E. 等 Leukemia 13: 1188 (1999); Wojtowicz-Praga, S. J. Immunother 20: 165 (1997))。治疗研究的另一潜在方法是依靠先天免疫系统一部分的 NK 细胞的特性。从这些研究得到的信息将使得在将来能够发展新方法来激活 NK 细胞

(Colucci, F.等 Nat Rev Immunol 3: 413 (2003))。以前增加免疫活性的尝试经常伴随着炎症反应，例如使用 IL-2 的研究。

抑制免疫细胞功能的因子包括例如 TGF-β；它是抑制免疫细胞功能的生长因子的典型例子。表达 TGF-β 的癌细胞利用这种蛋白质来抑制所选择细胞的免疫监视功能，从而逃避检测(Colucci, F.等 Nat Rev Immunol 3 : 413 (2003))。许多研究已经并且将继续证明 TGF-β mRNA 在各种癌细胞中的关系；或者生长因子在来自患有恶性肿瘤包括神经胶质瘤、黑素瘤、乳腺、结肠、胃以及前列腺癌的患者血清中的存在(Teicher, B. A. Cancer Metastasis Rev. 20: 133 (2001); Wieser, R. Corr Opin Oncol 13 : 70 (2001) ; Pasche, B. J Cell Physiol 186 : 153 (2001))。

TGF-β 作用导致恶性潜在癌症的机制已经被评述过(Wojtowicz-Praga, S.J Immunother 20: 165 (1997); de Visser, K. E.等 Leukemia 13: 1188 (1999); Derynck, R.等 Nat Genet 29: 117 (2001)。TGF-β 在肿瘤发生中的重要性的很好证明来自于基因敲除小鼠的研究，其中 II 型 TGF-β 受体的表达在 T-细胞淋巴细胞中不明显。取自这些小鼠的细胞有能力在同源的小鼠模型中根除表达 TGF-β 的肿瘤(Gorelik, L. 等 Nature Rev Immunol 2 : 46 (2002))。

在 Sporn (Sporn, M. B. Microbes Infect 1: 1251 (1999))的论文中评述了 TGF-β 的特征，这个因子的信号转导活性在其它评述中也有详述(Roberts, A. B. Microbes Infect 1: 1265 (1999); Massague, J. Nat Rev Mol Cell Biol 1:169 (2000))。简要地说，TGF-β 是以潜伏形式由细胞分泌的，血清含有大量水平的潜伏形式的因子。潜伏 TGF-β 不会结合到 TGF-β 受体上。潜伏性相关蛋白质(“LAP”)的 110kD 同型二聚体是这种 TGF-β 前体的一部分。LAP 结合到至少四种不同的特定载体蛋白质的一种上，称为大 TGF-β 结合蛋白质(“LABP”)。LTBP 涉及潜伏 TGF-β 的激活和储存。活性 TGF-β 是由潜伏形式的 TGF-β 裂解而来的 25kD 的同型二聚体。潜伏形式的 TGF-β 在血清中循环，它可以被多种蛋白酶激活。这些蛋白酶中的一组是基质金属蛋白酶(“MMP”)，它可以激活潜伏形式的 TGF-β。活性 TGF-β 抑制 MMP 抑制剂的表达，例如金属蛋白酶的组织抑制剂(“TIMP”)。这些蛋白酶对 TGF-β 激活的参与是与肿瘤细胞入侵能力的增加有关的

(Stamenkovic, I. Semin Cancer Biol 10: 415 (2000))。蛋白酶介导的激活机制的抑制也可作为阻断 TGF-β 作用的潜在目标。

TGF-β 在细胞表面与 I 型和 II 型受体的结合作为介导由生长因子起始的信号转导的第一步。TGF-β 通过结合到由 I 型和 II 型同种型组成的跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体的异种多聚体复合物上来诱导它的效应。在 TGF-β I 型受体(“TbR-I”)募集并磷酸化之后，TGF-β II 型受体(“TbR-II”)直接结合到 TGF-β 上，这又触发了信号转导途径。因此，模拟或抑制 TbR-II 的试剂提供了另一拮抗 TGF-β 作用的有希望的方法。

其它人已经尝试使用诸如 TGF-β 结合蛋白质的核心蛋白聚糖这样的 TGF-β 拮抗物来激发肿瘤免疫(Monz, C.等 Eur J Immunol 29: 1032 (1999); Stander, M.等 Gene Ther 5:1187(1998))；或使用胞外结构域 TbR-II 融合到人免疫球蛋白的 F_c 区域的嵌合分子，但取得的成功很有限(Won J.等 Cancer Res 59: 1273 (1999); Komesli, S.等 Eur J Biochem 254: 505 (1998))。其它人显示了 α2-巨球蛋白蛋白质也有拮抗 TGF-β 作用的能力(Harthun, N. L.等 J Immunother 21: 85 (1998))。但是要使用这种蛋白质是非常困难的，因为它的分子量大(720kD)且这种蛋白质是以四聚体形式存在的。另一研究提出蛋白质的 20 个氨基酸的肽碎片具有 TGF-β 结合活性(Webb, D. J.等 Protein Sci 9: 1986 (2000))。

α2-Heremans-Schmidglycoprotein (“AHSG”)是球蛋白样蛋白质，它是牛蛋白胎球蛋白的人同源物。胎球蛋白被确定为胎儿血清的主要蛋白质成分(Pedersen, K. Nature 154: 570 (1944))。胎球蛋白的功能可能与造血和免疫系统的发展和成熟有关(Dziegielewska, K.等 Histochem Cell Biol 106 : 319 (1996))。和胎球蛋白一样，AHSG 是作为阴性急性期蛋白质由肝脏分泌的 (Lebreton J. P.等 J Clin Invest 64: 1118 (1979))。AHSG 的蛋白质结构显示它属于半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族的成员。这个蛋白质超家族的特有特征是它们拥有两个衔接排列的半胱氨酸蛋白酶抑制剂结构域以及第三个富含脯氨酸和甘氨酸的结构域。蛋白质的二级修饰包括 N-糖基化、O-糖基化(Hayase, T.等 Biochemistry 31: 4915 (1992); Edge, A. S. 等 J Biol Chem 262: 16135 (1987))以及丝氨酸磷酸化(Jahnen-Dechant, W.等 Eur J. Biochem

226:59 (1994))。已经描述过来自各种物种的胎球蛋白的这些修饰。AHSG 含有两个半胱氨酸蛋白酶抑制剂结构域(Elzanowski, A.等 FEBS Lett 227: 167 (1988))。半胱氨酸蛋白酶抑制剂结构域在半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族中是保守的。这种结构域的特征是至少一个含有带保守序列基序的结构域的 100-200 个氨基酸残基的重复。

人 AHSG 的成熟形式有两条多肽链，它们在半胱氨酸残基之间通过二硫键连接。这两条多肽链是通过蛋白水解从单一多肽裂解产生的(Jahnen-Dechant, W.等 Eur J Biochem 226: 59 (1994))。AHSG 可能的功能是多种的：调理、脂转运、细胞增殖、胰岛素受体的酪氨酸激酶抑制、蛋白酶抑制以及造血细胞归巢(Brown, W. M. 等 Protein Sci 6: 5 (1997))。具有 63-kDa 分子量的大鼠磷酸化 N-糖蛋白 pp63 是大鼠胎球蛋白的磷酸化形式。已经报导了这种修饰形式的胎球蛋白结合到肝细胞生长因子(“HGF”)上从而抑制其活性(Ohnishi, T.等 Eur J Biochem 243: 753 (1997))。AHSG 也被报导过通过竞争结合到 TGF-β 受体上来拮抗 TGF-β 的作用(Demetriou, M 等 J Biol Chem 271: 12755 (1996))。

某些肿瘤是由于对 TGF-β 的依赖性而产生的，因为这种因子在肿瘤细胞中的存在使得它们避免了免疫系统的检测(Derynck, R.等，Nat Genet 29: 117 (2001))。也报导了来自“基因敲除”小鼠的不表达 II 型 TGF-β 受体的淋巴细胞会抵抗 TGF-β 的作用，这种小鼠细胞有能力在其它小鼠体内根除肿瘤细胞[(9)]。

现有技术教导了两种拮抗 TGF-β 活性的方法。第一种是利用基质结合型蛋白质，它的例子是核心蛋白聚糖(Hausser, H.等，FEBS Lett 353: 243 (1994))。这种特别的拮抗物围绕在肿瘤组织周围，从而降低能到达细胞的活性 TGF-β 的浓度。将核心蛋白聚糖引入到恶性神经胶质瘤细胞系中，成功地降低了它的恶性能力(Stander, M. 等 Gene Ther 5: 1187 (1998))。拮抗 TGF-β 作用的第二种方法是使用诸如 AHSG、TbRII-Fc 或 α2-巨球蛋白这样的分泌蛋白质。

授予 Read 等的美国专利 No.5,543,143 描述了给予动物 TGF-β 拮抗物来激活巨噬细胞以治疗感染性疾病，然而没有披露使用 TGF-β 拮抗物来治疗癌症。最近，用作 TGF-β 抑制剂的 TGF-β 可溶形式和相关的反义方法在 Koteliansky 等的美国专利申请 No. 09/734,300 以及

Sclingensiepende 等的美国专利申请 No. 10/146, 058 中公开。血清蛋白质 AHSG 有能力通过 AHSG 中与 TGF-β受体共有结合基序同源的肽结构域与 TGF-β竞争结合到 TGF-β受体上。

本发明进一步的方面是增加 TGF-β的抗肿瘤效果。

本发明进一步的方面是利用 AHSG 与 TGF-β竞争结合到 TGF-β受体上。

本发明进一步的方面是提供新的治疗方法来增强淋巴细胞的免疫能力以识别并破坏癌细胞，从而提供治疗癌症的改进方法。

发明概述

根据本发明的各种方面和原理，提供了新方法使淋巴细胞能更活跃地抗肿瘤生长，包括用能够表达 AHSG 的 DNA 转化这种细胞，然后用这种细胞治疗患有癌症或受癌症威胁的患者。已经发现这种转化细胞在体内和体外增加了对抗癌细胞的活性。不希望被限制于任何特定的理论或解释，据信这是通过围绕在癌细胞周围微环境中的作为 TGF-β拮抗物的 AHSG 的效应而发生的。

AHSG 是称为胎球蛋白的牛肝蛋白质的人同源物。尽管 AHSG 的功能没有被完全确定，但是怀疑它在阻断属于包括 TGF-β在内的蛋白质家族的蛋白质的作用方面起着作用。

据报导，成年人体内的 AHSG 的血液浓度范围从 0.3 到 0.6 mg/ml (Lebreton, J. P.等 J Clin Invest 64: 1118 (1979))。尽管血清中的 AHSG 浓度很高，但也不足以阻断使用 TGF-β激发机制的肿瘤细胞的作用，这使得它们可逃避免疫反应。要克服肿瘤细胞的这种存活机制，我们在淋巴细胞中表达 AHSG 并在体内和体外增加这些细胞的细胞毒性活性。这些结果指向淋巴细胞周围的微环境的重要性，TGF-β拮抗物 AHSG 分泌到这个环境中使得它以自分泌方式起作用，从而改变淋巴细胞的功能。

在替代的实施方案中，本发明提供新方法来攻击使用基于细胞的方式的肿瘤和肿瘤病变。很明显，血液中相当水平的 AHSG 靠它本身不足以阻断肿瘤的发生或生长，然而提高蛋白质的局部水平可抑制肿瘤部位的 TGF-β活性。

由于 T-淋巴细胞和 NK 细胞在对癌症的宿主免疫反应中起着关键作用，TGF-β在这个免疫反应中作为强抑制剂起作用，诸如 AHSG 这

种细胞因子的拮抗物或抑制剂的新用途可能用于癌细胞治疗中是非常有利的。本发明提供的新方法结合使用 AHSG 与取自人、小鼠的淋巴样细胞以及 $CD8^+$细胞或其它细胞系。没有进行修饰，对 TGF-β 的暴露就抑制了细胞掺入 ^{3}[H]-胸苷的能力。相反，用载体 pSR-AHSG 转染或转化的导致了 AHSG 表达的细胞没有显示出在 TGF-β 的存在下对生长的抑制。

当 AHSG cDNA 被克隆进腺病毒相关载体(“AAV”)时，这些效果也在本发明的另一实施方案中得到证实。来自载体的 AAV-AHSG 病毒粒子的产物用于转化淋巴样细胞。被转化的淋巴细胞表达 AHSG mRNA，从而合成 AHSG 蛋白质。AAV 有利地提供高效的基因转移和 AHSG 的持久表达。但是用 TGF-β 处理未经修饰的细胞很大程度上抑制了细胞增殖能力，用 AAV-AHSG 感染或转化的细胞的生长与那些未经处理的细胞相比没有明显不同。这些研究显示 TGF-β 起到抑制野生型不表达 AHSG 的细胞的生长的作用。相反，表达 AHSG 的细胞防止了 TGF-β 的作用，因此就像那些未经处理的细胞一样，生长不受 TGF-β 的抑制。

测试了感染 AAV-AHSG 的细胞对 Lewis 肺癌细胞(“LLC1”)的细胞毒性活性效果，它是源自小鼠 C57BL 品系的恶性细胞系。从含有 LLC1 的小鼠的脾中分离 T-细胞淋巴细胞，培养，扩增，感染 AAV-AHSG。当与感染了 AAV-AHSG 的淋巴细胞接触时，在体外观察到了明显的诱导对 LLC1 细胞的细胞毒性活性。当感染了 AAV-AHSG 的 T 细胞淋巴细胞与 LLC1 的混合物一起注射进小鼠时，体内对 LLC1 的细胞毒性活性也得到了证实。被注射的小鼠用于监测肿瘤生长。在用 LLC1 和携带 AHSG 的淋巴细胞注射的小鼠中，60％的小鼠防止了肿瘤生长。这种作用是特异性的，在其它携带 B16-Fl 肿瘤的动物中没有发现。因此从含有 LLC1 的小鼠分离的淋巴细胞拥有找出癌症的能力，但是没有杀死癌症的能力，因为癌细胞分泌 TGF-β 以躲过淋巴细胞。从含有 LLC1 肿瘤的小鼠分离的淋巴细胞用 AAV-AHSG 修饰，使它们具备表达 TGF-β 拮抗物的能力。这样修饰的细胞不但具有找出癌细胞的能力，也能够破坏它们，因为它们具有拮抗或克服癌细胞表达的 TGF-β 保护效应的能力。

采用了两种不同技术来测试修饰的和未经修饰的淋巴细胞杀死

LLC1 细胞的能力。在第一种技术中，进行体外混合研究，将 LLC1 和淋巴细胞混合起来然后注射。在注射了 LLC1 混合物外加表达 TGF-β的总淋巴细胞的小鼠中，60％没有肿瘤。相反，没有或 0％的注射了 LLC1 的和未经修饰的淋巴细胞的小鼠没有肿瘤。在第二种技术中，一组单独的小鼠用 LLC1 细胞注射，然后通过尾静脉注射修饰或未经修饰的淋巴细胞。在那些得到 $CD8^+$淋巴细胞的小鼠中，62.5％仍然没有肿瘤，反之那些得到未经修饰的淋巴细胞中 0％仍然没有肿瘤。也测试了对于 B16-F1 肿瘤细胞的这些活性。在这些实验中，从具有 B16-F1 肿瘤(其生长也依赖 TGF-β)的小鼠分离的淋巴细胞被分成修饰表达 AHSG 的一批以及不修饰的一批。然后测试这些淋巴细胞对 LLC1 癌症的抵抗。来自未暴露于 LLC1 细胞的小鼠的这些淋巴细胞的加入，没有导致任何一批给予了 LLC1 癌的小鼠对 LLC1 癌症生长的任何影响，任何一组中都没有小鼠仍然保持没有肿瘤。这些结果显示当在暴露于 TGF-β生长因子的细胞中表达时，AHSG 能够阻断 TGF-β的作用。

本发明的优选实施方案提供修饰免疫系统的方法，用于给予有效的癌细胞治疗的目的。

其它优选实施方案还采用富含 CD8 的淋巴细胞群，它们用 AHSG 基因转化。

除了 AHSG 结合 TGF-β受体的能力 (Demetriou, M.等 J Biol Chem 271: 12755 (1996)) 之外，AHSG 也可抑制酶组织蛋白酶 B 的蛋白水解活性。组织蛋白酶 B 也是 TGF-β潜伏形式的激活剂。由于 TGF-β以更大的潜伏或隐匿形式存在，但是转化为活性的更小形式需要蛋白水解裂解，已知许多癌细胞都表达细胞周围组织蛋白酶 B；癌细胞能够将潜伏 TGF-β转化为活性形式，从而使细胞能够躲过免疫系统。

在正常淋巴细胞中，没有可检测到的组织蛋白酶 B 活性，这和过去的观察一致；由于组织蛋白酶 B 压力可导致存在的转变，因此它将潜伏 TGF-β转变为活性形式，引起淋巴细胞活性的自动抑制。然而在利用 TGF-β逃避免疫监视的癌细胞中，细胞周围组织蛋白酶 B 使得这些细胞用活性 TGF-β围绕在自身周围。最近发现 AHSG 具有组织蛋白酶 B 活性，这在确定 AHSG 阻断 TGF-β作用的机制方面非常重要。这已经使用改变来表达 AHSG 的淋巴细胞所证实了，它可能是由细胞

分泌的；一旦在细胞外，就以自分泌方式起到阻断 TGF-β 作用的作用。尽管对潜在机制的精确了解对于实施本发明是不必要的，AHSG 阻断 TGF-β 作用的能力似乎来自 AHSG 抑制组织蛋白酶 B 和竞争性结合到 TGF-β 受体上的联合作用，从而防止 TGF-β 结合到它的受体上。简要地说，在淋巴细胞中表达的 AHSG 具有防止由癌细胞产生的 TGF-β 激活的能力。淋巴细胞具有定位癌细胞的固有能力，但当它们到达这个部位时，癌细胞分泌的 TGF-β 的存在阻断了野生型淋巴细胞的作用。然而，由本发明的方法制备的淋巴细胞，一旦它们迁移到由于 TGF-β 作用而免疫缺乏的肿瘤的微环境内就产生 AHSG，克服了癌症逃避这种淋巴细胞的免疫作用的能力。

其它属于半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族的蛋白质包含这种结构域，已知抑制半胱氨酸蛋白酶。组织蛋白酶 B 是半胱氨酸蛋白酶家族成员。但是，很多包含半胱氨酸蛋白酶抑制剂结构域同源性的蛋白质没有显示具有组织蛋白酶 B 的抑制活性。AHSG 具有半胱氨酸蛋白酶抑制剂基序的衔接重复，我们发现 AHSG 是组织蛋白酶 B 的抑制剂。AHSG 抑制组织蛋白酶 B 功能的能力对调节细胞生长具有重要意义，因为已知细胞表面的组织蛋白酶 B 可以激活潜伏形式的 TGF-β (Fu, S. Q. 等 Blood 89: 1460 (1997); Wroblewski, J. M.等 Blood 89 : 4664 (1997))。

由于腺病毒很难将转基因插入淋巴细胞中 (Fu, S. Q.等 Blood 89:1460 (1997); Wroblewski, J. M. 等 Blood 89:4664(1997))，本发明的一个实施方案提供了改进的方法用于 AAV 病毒转化淋巴细胞。这个基因送递系统另外的有吸引力的特征来自于它能在诱导低的宿主免疫反应的同时感染大范围的宿主细胞，呈现低毒性以及持续表达，从而允许高水平生产期望的蛋白质。

本发明进一步的实施方案提供了具备表达 AHSG 能力的淋巴细胞，具有从注射部位迁移到给药远端并定位 LLC1 细胞的能力。这种方法完全不同于那些计划使用 TGF II 型受体的基因靶向来阻断 TGF-β 信号的方法(Gorelik, L.等 Nature Rev Immunol 2:46(2002))。淋巴细胞具有找出并迁移到含有癌细胞的部位的天然能力。根据本发明的表达 AHSG 的淋巴细胞具有克服癌细胞用来逃脱免疫系统的掩蔽机制的能力。

本发明进一步的实施方案提供了治疗性给予患者试剂来抑制组织蛋白酶 B 的活性并且也阻断 TGF-β 与其受体的结合。这种试剂可以是直接起作用达到上述效果的化合物或者是编码达到期望效果的蛋白质的核酸。这种核酸可以是 DNA 或 RNA，可以存在于象脂质体或病毒载体的载体中，载体自身可以进一步包括操作元件，例如增强子、启动子及类似物。

本发明进一步的实施方案提供了治疗方法，特别适于通过处理患者的淋巴细胞以使它们能表达可抑制组织蛋白酶 B 活性并干扰 TGF-β 结合到其受体上的试剂来治疗癌症。这种治疗可以通过体内基因疗法来完成或在体外通过用编码期望试剂的核酸转染患者分离的淋巴细胞，然后将这种转化的淋巴细胞给予患者。

引入并构成本说明书一部分的附图图解了本发明的优选实施方案，并且和说明书一起用来解释本发明的原理。

附图简要说明

可以通过参考附图进一步理解本发明的各种原理和方面，其中：

图 1. 显示了人 AHSG 对淋巴细胞或淋巴细胞衍生细胞系摄取 ^{3}[H]-胸苷的拮抗效应。如 DNA 合成反映的 TGF-β 在细胞增殖上的影响是用细胞 ^{3}[H]-胸苷摄取来测定的。使用后面将描述的标准转染方法，将包含由 SR-α 启动子驱动的人 AHSG cDNA 的 pSRα-AHSG 质粒引入所感兴趣的细胞(图 A、B 和 C: 分别是来自周围血液和小鼠总淋巴细胞的人 $CD8^{+}$ 细胞系 T8-IIM、人 $CD8^{+}$ 淋巴细胞)里。检测引入 DNA 的 ^{3}[H]-胸苷摄取的相对量，然后表达为相对的固定蛋白质量。转染了携带 AHSG 的载体或空载体的细胞暴露于对照培养基或含有 TGF-β 的培养基;

图 2.显示了在不同细胞中使用 AAV 的 AHSG 基因转移效果，其中，图 A 显示了 AHSG 阻断人 T 细胞系 Jurkat 中的 TGF-β 生长抑制效应的能力。细胞用 AAV-lacZ (阴影柱)或 AAV-AHSG (阴影柱)感染，然后用 2 ng/ml 的 TGF-β 处理。图 B 显示了小鼠总淋巴细胞的类似研究。图 C 包含了显示用 AAV-AHSG 感染的 Jurkat 细胞中 AHSG RNA 在收获前的持续表达数据。AHSG mRNA 的相对量用 RT-PCR 检测，结果显示了 AAV-AHSG 感染后高达 30 天的持续表达。GAPDH 基因的表达用作内部对照。图 D 显示了用酶活性监测的 Lac Z 表达以类似的

方式表现;

图 3. 显示了用来自肿瘤小鼠的小鼠 $CD8^+$细胞由 AAV-AHSG 诱导的细胞毒性活性。图 A 显示了用 AAV-AHSG 或 AAV-LacZ 感染的靶向 LLC1 细胞的淋巴细胞的细胞毒性活性。淋巴细胞溶解 LLC1 细胞的能力在不同的效应物“E”与靶“T”比例下进行测定。用于感染淋巴细胞的 AAV 的 M.O.I 是 1。由 LLC1 细胞释放的 LDH 作为细胞毒性的标志。图 B 显示了增加 M.O.I 以获得在固定 E/T 比下更有效的溶解能力。细胞毒性活性是相对于用于感染淋巴细胞的病毒量来测定的。增加的病毒量导致了在相同 E/T 比下更多的溶解。图 C 显示了增强的细胞毒性活性对 LLC1 的特异性，但是对 B16-F10 细胞不是。在这个实验中，淋巴细胞是从注射了 LLC1 的小鼠分离的。M.O.I 是 1，E/T 比是 2.5;

图 4 显示了体内模型中的细胞毒性活性。图 A 反映了 LLC1 和来自具有 LLC1 的小鼠淋巴细胞的混合物，将混合物注射到小鼠肩胛内区域。图 B 反映了 LLC1 细胞被注射到小鼠肩胛内区域，然后分离来自具有 LLC1 的小鼠淋巴细胞。在尾静脉注射之前用 AAV-AHSG 或-LacZ 感染这些细胞。图 C 显示了用图 A 中的方案注射的动物的肿瘤。注意小鼠中的 2 只没有肿瘤。图 D 显示了来自注射了 LLC1 和表达 AAV-LacZ (左图)或 AAV-AHSG (右图)的淋巴细胞的小鼠肿瘤的组织特征;

图 5.显示了 pSRα-AHSG 质粒的示意图;

图 6.显示了 pAAV-AHSG 质粒的示意图;

图 7.显示了用 AHSG 表达载体转化的 LLC 细胞的细胞表面上的相对组织蛋白酶 B 活性;

图 8.显示了部分纯化的 AGST 对细胞外周组织蛋白酶 B 活性的影响;

图 9.显示了证明来自克隆 Al、A2、Cl 和 C2 的 AHSG 和 GAPDH 的 mRNA 表达的 RT-PCR 产物的凝胶;

图 10.显示了证明皮下注射了含有 pcDNA3(对照)或 pcDNA- AHSG (AHSG-LLC)的 LLC 细胞的 C57BL 小鼠中肿瘤生长的时间依赖性的图; 和

图 11. 显示了证明皮下注射了含有 pcDNA3 (对照)或 pcDNA-AHSG (AHSG-LLC)的 LLC 细胞的 C57BL 小鼠中第 20 天时的肿瘤大

小的图。

发明详述和最佳方式

根据本发明期望的目标，我们第一步是鉴别 TGF-β作用的抑制剂。为这个目的，我们选择使用人 AHSG，因为它具有通过竞争结合到 TGF-β受体上来阻断 TGF-β作用的潜在能力。

在使用人 AHSG 来发展修饰免疫系统细胞的疗法之前，我们必须确认它阻断 TGF-β作用的能力。要确认这种活性，我们在正常不表达该基因的细胞中表达人 AHSG。第一步是用 RT-PCR 扩增总 HepG2 RNA 的 AHSG 序列，将该 cDNA 克隆到由 SRα启动子驱动的表达载体中。所得到的表达载体称为 pSRα-AHSG (见图 1)。然后将 pSRα-AHSG 构建体插入正常不表达 AHSG 蛋白质的造血细胞中。第一组试验使用 T8-IIM 细胞，因为公已知这些细胞的生长受到 TGF-β的抑制(Miyamoto, K. 等 Jpn J Concer Res 82:1178 (1991))。结果（图 1A）显示，由测定 ^{3}[H]-胸苷摄取所确定的，野生型细胞的生长受到 TGF-β暴露的抑制。相反，用 pSRα-AHSG 转染的细胞能抵抗 TGF-β的抑制效应。这些发现表明给予表达人 AHSG 能力的细胞免受 TGF-β的生长抑制作用。

在最优选的实施方案中，本发明提供了使用表达治疗有效水平的 AHSG 的人淋巴细胞来治疗人癌症的方法。在特别有利的实施方案中，淋巴细胞富含 $CD8^{+}$细胞。使用磁珠可有利地将这种细胞从人周围淋巴细胞中分离出来，然后用 pSRα-AHSG 转化。和 T8-IIM 细胞一样，用人 AHSG cDNA 转染的 $CD8^{+}$淋巴细胞也免受 TGF-β的生长抑制效应（图 1B）。相反，携带对照质粒的淋巴细胞和未转染的野生型细胞的表现完全一样，当暴露于 TGF-β时显示出降低的 ^{3}[H]-胸苷摄取。作为本发明的结果，AHSG 的功能能够转移到人淋巴细胞中，AHSG 的作用能阻断 TGF-β对细胞生长的抑制作用。该方法在动物模型中的有效性得到了证实（图 1C）。

人 AHSG 的克隆

为了获得编码人 AHSG 的 cDNA，从表达该基因的细胞类型(HepG2)中分离 RNA。人肝脏组织或培养的细胞系都适合总 RNA 的提取。人胎儿骨髓细胞据报导也表达 AHSG(Dziegielewska, K.等 Histochem Cell Biol 106:319 (1996))。将分离的总 RNA 用于逆转录酶(RT)反应，

然后用聚合酶链式反应 PCR 扩增（下文有利地称为 RT-PCR）。AHSG cDNA 是用从肝细胞瘤细胞系 HepG2 中提取的总 RNA 制备的，所得的总 RNA 用作 RT-PCR 中的模板。来自细胞的 RNA 是用酸性硫氰酸胍方法提取的。用于 RT-PCR 的引物序列是 5'-ggggtacccatgaagtccctcgtcctgctc-3'和 5'-cgggatccttctgtgccaaacctcctcatc-3'。这些引物的 5'端含有被限制酶 Kpn I 和 Bam HI 识别的额外序列。这些限制位点的加入使 cDNA 产物能插入克隆载体 pCDL81 以产生 pSR-AHSG(见图 6)。当质粒插入细胞时，这种载体使得能够由 SRα 启动子驱动的 AHSG 蛋白质的表达(Takebe, Y.等 Mol Cell Biol 8 : 466 (1988))。AHSG 编码的编码区域通过核苷酸序列分析确认，发现与所报导的序列一致(Swiss-Prot: P02765)。

AAV-AHSG 的构建和生产

AAV 靶向表达这种病毒的受体的细胞类型。这种受体由硫酸肝素和成纤维细胞生长因子 FGF 受体的复合物组成(Qing, K.等 Nat Med 5: 71(1999))。AAV 受体的表达在 $CD34^+$造血祖细胞中很低，这个特征可以有助于解释为什么小鼠淋巴细胞的 AAV 感染的效率少于在 Hela 细胞中的感染率的 10% (数据未显示)。AAV 介导的基因转移具有通过修饰其衣壳基因而增加抗某些类型靶细胞的感染效率的潜能(Shi, W.等 Hum Gene Ther 12: 1697(2001))。使用 AAV 的额外特征是病毒粒子的更高滴度可能是观察在造血细胞中的更强效应所必需的。AAV 的这些特征使它成为将 AHSG 引入靶细胞的有用载体。

在测试 AHSG 表达之前，感染效率是用转染了 LacZ 基因的两种细胞类型（非淋巴细胞和淋巴细胞）的对比确定的，其后利用原位染色和噬斑形成活性来测定β-半乳糖苷酶活性（数据未显示）。尽管用 AAV 将基因转移进淋巴细胞的效率更低，我们的数据（图 2）显示了 AAV-AHSG 的明显表达。在 Jurkat 细胞中，用 AAV-AHSG 感染的源自人 T 淋巴细胞的细胞系免受 TGF-β的抑制效应（图 2A 和 2B），但是用 AAV-LacZ 感染的则不会。在分别感染了 AAV-AHSG 或-LacZ 后，AHSG mRNA 和β-半乳糖苷酶活性的表达至少会持续 30 天（图 2C 和 2D）。这些结果支持了在期望的靶细胞中诱导 AHSG 来发展癌症的细胞治疗方面对 AAV 的选择。

AAV 载体的使用描述于美国专利号码 5,622, 856; 5,945, 335; 6,001,

650; 6,004, 797 和 6,027, 931 中，它们的公开内容在这里被完整引入作为参考。Kpn I 和 Bam HI 片段是从 pSR-AHSG 上切下的，该片段包含 AHSG 的编码区域。将该片段亚克隆入 pCMV-MCS 中以产生 pAAV-AHSG（见图 7）。所有含有产生 AAV 粒子所需元件的质粒 DNAs 都是用标准碱性 SDS 方法提取和纯化的(Sambrook, J.等 Molecular Cloning : A Laboratory. Manual (Second Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))，然后用氯化铯超速离心法纯化。用这种方法纯化的质粒 DNAs; pAAV-AHSG 或 pAAV-lacZ, pHelper 和 pRC 被混合到一起并共转染到 HEK293（来自 ATCC）细胞中以产生期望的病毒粒子。用于转染 DNA 的方法是常规的磷酸钙沉淀。简要地说，HEK293 细胞在 Dulbecco's 改良的 Eagle's 培养基，即补充了 5％FCS 的 DMEM 中培养 3 到 5 天。这些细胞是通过刮下培养器皿中的细胞而收集的，然后重悬浮在每皿 1 毫升的 PBS-MK (添加了 1mM $MgCl_2$ 和 1mM KCl 的 PBS)中。

要从细胞释放 AAV 粒子，利用两个循环的-80℃和 20℃的冷冻和融化破坏细胞膜。分别使用最终浓度为 50 μg/ml 和 10μg/ml 的 RNase A 和 DNAse I 的组合消化掉细胞 RNA 和溶解的 DNA。细胞碎片在 1500g 和 4℃下通过离心去除。澄清的上清液过滤 2 次。第一次过滤使用 5-μm 孔径的过滤器(Millipore, SLSV R25 LS Bedford, MA)，其后使用 8-μm 孔径的过滤器(Millipore, SLAA 025 LS)。然后使用离心过滤设备浓缩滤液中的 AAV 粒子(Millipore Biomax-lOOK NMWL, UFV2BHK40)。AAV 粒子浓缩保持在器皿上部。这种物质通过加入 pH 7.4 的 PBS-MK 清洗一次以稀释 AAV 浓度，然后再次倒置旋转以除去低分子量组分。病毒原液的质量足够用来感染包括淋巴细胞在内的培养细胞。额外的纯化可使用预先形成的 iodixanol 梯度超离心、接着在肝素-琼脂糖柱上的 HPLC 来实现。进行这个额外的步骤使我们纯化 AAV 超过 20 倍。所得到的病毒制剂分成小份在-80℃下冷冻以备后面的实验使用。要测定病毒滴度，使用 AAV-LacZ 感染 Hela 细胞并表征 LacZ 表达的丰度。典型的制剂在每毫升 $2x10^7$ 到 $5x10^7$ 噬斑形成单位(PFU)的 AAV 之间。AAV-AHSG 和-lacZ 的制备和分离是同步进行的。因为没有内部报导基因来测定 AAV-AHSG 的滴度，就假定 AAV-AHSG 和 AAV-lacZ 的滴度是相同的，因为它们是同步制备的。

周围血液的人淋巴细胞的分离

含有 T 淋巴细胞的人周围血液单核细胞(PBMC)是在知情同意的情况下从健康成人获得的。用标准的 Ficoll-Hypaque 梯度离心法将富含 T 淋巴细胞的细胞期望部分分离。使用对期望的淋巴细胞表面标志特异的抗体包被的铁珠，淋巴细胞的特定群可从 PBMC 有利地分开。对肿瘤免疫性最重要的细胞之一的细胞毒性 T-细胞表达称为 CD8 的表面标志蛋白质。$CD8^+$细胞使用表面包被了直接抗人 CD8 的抗体的 Dynabeads(Dynal Inc, NY)从总 PBMC 富集。结合到珠上的淋巴细胞通过使用磁体收集，并通过使用 DNaseI 消化掉连接铁珠和特定 IgG 的 DNA 连接分子使其从铁珠上分离。在细胞释放之后，使用磁体将残余铁珠去除。这个方法有助于富集$CD8^+$细胞，以便在使用 FACS 分析时，群中含有 90％到 95％的这种细胞。所得到的细胞群称为富含$CD8^+$的细胞。总淋巴细胞和富含$CD8^+$的细胞在含有 2 μg/ml PHA-L、5%热灭活 FCS、200 单位/ml IL-2、5μg/ml 胰岛素、10 μg/ml 转铁蛋白和 50 μM β-巯基乙醇的 RPMI 中培养 3 天。将来自 Phaseolus vulga 的凝集素 PHA-L——已知的淋巴细胞促分裂剂添加到培养基中刺激初始生长。这样，活化的淋巴细胞能够在没有 PHA-L 的相同培养基中增殖达 14 天。

小鼠脾淋巴细胞的分离

在人体内，PBMC 提供淋巴细胞来源，但是在小鼠体内，脾是这种细胞更实际的来源。用平顶镊子将 C57BL 小鼠的脾切除、切碎、挤压，然后悬浮在 10ml 含有 10％ FCS 的 RPMI 中。细胞悬浮液在室温下放置 5 分钟，使大片脾脏与单细胞悬浮液分开。上清液产生单细胞淋巴细胞悬浮液，将其小心转移到另一试管中。淋巴细胞单细胞悬浮液是通过在 150xg 离心 5 分钟收获的。使用 Ficoll-Hypaque 不连续梯度离心除去红血球。通过从梯度上取下感兴趣的条带来收集淋巴细胞，然后用含有 5％热灭活 FCS 的 RPMI 清洗。这些细胞在含有 4μg/ml 伴刀豆球蛋白 A、5%热灭活 FCS、200 单位/ml IL2、5 μg/ml 胰岛素、10μg/ml 转铁蛋白和 50μM β-巯基乙醇的 RPMI 中培养 3 到 5 天。伴刀豆球蛋白 A 是淋巴细胞促分裂剂。

^{3}[H]-胸苷掺入分析

将 TGF-β1 的活性形式(R&D Systems Inc.或 BioShop Canada Inc)

加入到每孔 $5x10^5$ 淋巴细胞的 24 孔板中，孵育 24 小时。TGF-β1 的浓度在大约 0.5 到 10 ng/ml 的范围，如附图说明中所标明的。接下来将 1 μCi 的[^{3}H]-胸苷加入到培养基的每 1ml 的培养物中，并将细胞孵育 4 小时。将放射性标记的细胞用 0.4 ml PBS 清洗三次，然后悬浮在同样体积的 10％三氯乙酸中。将 TCA 固定的细胞用 0.4ml 5％的三氯乙酸清洗三次、用 0.4ml 70％的乙醇清洗两次。沉淀的细胞溶解在 0.1ml 的 0.1N 氢氧化钠中，用等量的 0.1N 盐酸中和。掺入到细胞中的 ^{3}H-胸苷的量通过液体闪烁计数器来记数。

AHSG mRNA 表达的检测

为检测 AHSG 是否表达，在暴露于病毒后 3 天收获感染了 AAV-AHSG 的细胞。用上述方法将总细胞 RNA 从细胞分离。来自感染细胞的总 RNA 的 RT-PCR 被用来分析 AHSG 的表达。在反应中发现 AHSG cDNA 表示存在表达。用于这个反应的引物序列是 5'-tccaaacacagcccgtgacctc-3'和 5'- ctcatctctgccatgtctagcc-3'。这组引物特异于人 AHSG mRNA。GAPDH 被作为内部对照的靶，用来检测人 GAPDH mRNA 的引物是 5'-caccaactgcttagcacccc-3' 和 5'-tgaagtcagaggagaccacc-3'。

细胞毒性分析

Lewis 肺癌(LLC1)是小鼠中最具癌性的细胞类型。LLC1 细胞在 C57BL 小鼠中是致瘤的。当 $5x10^4$ 的 LLC1 细胞被注入小鼠肩胛内区域时，这些细胞能够长出直径超过 5mm 的肿瘤。在注射后的 10 到 14 天，LLC1 肿瘤可以通过检查注射区域而被检测到。这种肿瘤模型以前就被描述过(Budzynski, W. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 30: 363 (1982))。

为确定感染了 AAV-LacZ 或-AHSG 的淋巴细胞影响 LLC1 肿瘤生长的能力，我们将淋巴细胞的任一类型与 $5x10^4$ LLC1 细胞混合，然后将混合物注射进小鼠肩胛内区域。在这些实验中，我们使用了由具有肿瘤(LLC1)的小鼠脾脏分离的总淋巴细胞或富含 $CD8^+$的淋巴细胞。如前所述培养这些细胞。培养感染了 AAV-AHSG 或 AAV-lacZ 的淋巴细胞 3 天以使病毒表达 LacZ 或 AHSG。在第 3 天末，分离感染的细胞，然后在注射之前与 $5x10^4$ 的 LLC1 细胞混合。

这些研究的目标是检测淋巴细胞溶解靶细胞的细胞毒性能力。我

们将细胞毒性细胞称为“效应物”，将肿瘤细胞称为“靶”。体外和体内研究都进行了。对于体外研究，淋巴细胞的细胞毒性活性通过跟踪乳酸脱氢酶 LDH 从暴露于效应物的细胞释放而测定的。

在这些研究中，将淋巴细胞与 LLC1 细胞混合，一旦癌细胞在体外溶解时，LDH 被释放，使用标准比色分析进行测定。将靶 LLC1 细胞维持在补充了 5% FCS 的 DMEM 中。将靶 LLC1 细胞以 100μl 体积中 $1x10^4$ 的细胞数量接种在 v-形 96 孔板上。将淋巴细胞加入到每个孔中并在 1,OOOxg 离心 3 分钟以确保效应物细胞接触到靶细胞。效应物与靶的比或 E/T 比对于大多数研究来说在 1 到 200 的范围，但是优选 1 到 10 的更小范围。为分析效应物在靶细胞上的相互作用，将这些细胞在 5％CO_2 培养箱中 37℃下孵育 4 小时，培养基中的 LDH 活性用 CytoTox96®试剂盒(Promega 公司) 根据厂商手册来测定。

除了体外分析之外，也希望检测淋巴细胞在体内的细胞毒性活性。对于这些体内研究，我们将效应物和靶细胞注射进 C57BL 小鼠中。$5xlO^5$/ml 的淋巴细胞用 $1x10^6$PFU 的 AAV-AHSG 或 AAV-lacZ 感染。培养注射细胞三天，然后加入含有 200 u/ml IL2 和 2 μg/ml ConA 的新鲜培养基。$2xlO^5$ 淋巴细胞在皮下注射到肩胛内区域之前与 $2x10^4$ 的 LLC1 细胞混合。至少监测肿瘤生长 14 天，然后在最后一天将小鼠处死。肿瘤大小用卡尺测定并记录直径。没有生长肿瘤的小鼠在注射 LLC1 细胞后额外监测达 2 个月以确认不长肿瘤。

人造血细胞中 AHSG 表达的 TGF-β 拮抗效应

预测牛胎球蛋白具有 TGF-β 拮抗活性。要检查这种可能性是否与人 AHSG 有关，我们利用 SRα 启动子来表达编码 AHSG 蛋白质的 cDNA。SRα 由猿病毒 40 早期启动子和人 T-细胞白血病病毒 1 型 长末端重复的 R-U5 片段组成(Takebe, Y.等 Mol Cell Biol 8 : 466 (1988))。我们选择这个启动子是因为当使用它来驱动 IL-2 的表达时，与另一经常使用的序列 CMV 启动子相比，IL-2 的表达多了 10 倍(Tsang, T. C.等 Int J Mol Med 5 : 295 (2000))。建立由人 AHSG cDNA 融合到 SRα 启动子上构成的克隆以产生 pSRα-AHSG(见图 6)。

我们将编码 AHSG 的 cDNA 插入到正常不表达该基因的造血细胞系中。为有效作为基于细胞的癌症治疗，AHSG 的细胞表达必须具有拮抗 TGF-β 效应的能力。对这些实验，我们选择了 T8-IIM 细胞，因

为这是 $CD8^+$细胞系并且它的免疫功能依赖于 TGF-β。当与对照比较，未修饰的 T8-IIM 暴露于 TGF-β 抑制了它们掺入 3[H]-胸苷的能力到 79±4%。相反，转染了 pSR-AHS 的 T8-IIM 细胞的暴露完全消除了 TGF-β 的生长抑制效应（图 1A）。在这些细胞中，^{3}[H]-胸苷的结合与没有暴露于 TGF-β 的细胞的一样。这个发现意味着 AHSG 的表达阻断了 TGF-β 的抑制效应。因为表达 TGF-β 的癌细胞使用这种机制逃避免疫系统细胞的检测，所以这个观察结果支持了我们改变 CTLs 的固有活性以因此绕过癌细胞使用的掩蔽机制的目标。

接下来我们在由人周围淋巴细胞所富集的 $CD8^+$细胞中检测了 pSRα-AHSG 的表达。在这些实验中我们使用了包被抗 $CD8^+$的抗体的磁珠从周围血液中富集 $CD8^+$细胞。与对照处理细胞相比，天然 $CD8^+$细胞暴露于 TGF-β 降低了它们掺入 ^{3}[H]-胸苷的能力到 63 +/-2 %。相反，当 pSR-AHSG 被转染进 $CD8^+$细胞时，它增加了这些细胞摄取 ^{3}[H]-胸苷的能力（图 1B），与不表达 AHSG 或暴露于 TGF-β 的对照细胞相同。

尽管我们期望 AHSG 的表达不会影响 ^{3}[H]-胸苷的结合，我们推测这个观察结果可能是由于来自 $CD8^+$ T 细胞的 TGF-β 内源性分泌。这样，AHSG 表达将导致内源性 TGF-β 表达的抑制就可解释观察结果。TGF-β 的加入抑制了它们掺入 ^{3}[H]-胸苷的能力，AHSG 的过量表达拮抗生长因子的这个效应。然而，^{3}[H]-胸苷的结合并未恢复到转染了 AHSG 而未用 TGF-β 处理的细胞的水平。对这些发现有两种可能解释。一，外源 TGF-β 可能会触发诸如 IL-10 的其它抑制性细胞因子 (Fiorentino, D. F. 等 J Immunol 147 : 3815 (1991); Taga, K.等 Blood 81:2964(1993))。AHSG 作用是特异性的，似乎限于对 TGF-β 作用的干扰，但是不会影响其它细胞因子的作用。二，另一可能的解释就是 TGF-β 诱导了细胞凋亡，在 ^{3}[H]-胸苷的结合分析期间成碎片的细胞没有被清除。然而，不管机制如何，很显然 AHSG 允许淋巴细胞在 TGF-β 存在的情况下生长。

小鼠脾细胞中 AHSG 表达拮抗 TGF-β 的效应

接下来，我们想将来自使用人细胞系和原代培养的人淋巴细胞的观察结果延伸到动物模型。在准备这些研究时，我们选择将小鼠用作方便的动物模型来检测 AHSG 对 TGF-β 信号的抑制是否可能对癌症治疗有用。下面的研究的目的是要检查动物免疫细胞中的人 AHSG 活

性是否与人细胞中的表现一样。因此，我们在源自小鼠的淋巴样细胞中表达了人 AHSG cDNA 以检查它作为 TGF-β 效应的拮抗物的有效性。

在这些研究中，用 IL-2 和伴刀豆球蛋白 A 处理小鼠脾细胞以刺激 T 细胞淋巴细胞的增殖。利用这些活化的 T 细胞淋巴细胞检查了 AHSG 的作用。如图 1C 所示，与未处理的细胞相比，对照细胞暴露于 TGF-β 将它们掺入 ^{3}[H]-胸苷的能力降低到了 79%（比较柱 1 和 3）。但是，高浓度 TGF-β 的加入不会进一步抑制它们摄取胸苷的能力（图 1C，奇数柱）。在转染了 pSRα-AHSG 的小鼠 T 细胞淋巴细胞中，与未转染的对照相比，基因的表达使 ^{3}[H]-胸苷掺入增加到了 118%（图 1C，比较柱 1 和 2）。此外，表达 AHSG 的转染细胞不具有 TGF-β 作用的预期效果。与对照细胞相比，这些细胞暴露于渐进地更高剂量的 TGF-β 未能使 ^{3}[H]-胸苷摄取到 100%以下（图 1C，比较偶数和奇数道）。注意在表达 AHSG 的细胞中，胸苷的摄取总是比用相同剂量的 TGF-β 处理的对照细胞的摄取更高。这些结果共同显示出，在它们对 TGF-β 的反应上，小鼠脾 T 细胞淋巴细胞与人 $CD8^{+}$ 细胞系和周围 CTLs 的表现非常相似。同等重要的是使这些细胞具有表达 AHSG 的能力同时也阻断它们对 TGF-β 的反应的观察结果。

AAV 介导的 AHSG 基因转移

尽管以前的实验提供了用 AHSG cDNA 瞬时转染的人细胞和小鼠细胞的有用结果，但是可以采用更有效的机制在宿主细胞中表达外源蛋白质。例如，最近感兴趣于腺伴随病毒（AAV）用于基因运送的用途。我们最近的研究结果表明，与腺病毒载体相比，先天免疫反应是暂时的和最小程度的(Zaiss, A. K.等 J Virol 76:4580(2002))。AAV 的另一公知的特征就是它感染大范围宿主和细胞类型的能力。另外，AAV 载体在转导淋巴细胞方面具有很高的效率(Zhou, S. Z.等 J Exp Med 179:1867(1994))。同样吸引人的是，使用 AAV 的基因表达会持续很长时间，因为它具有插入到宿主基因组中的潜在能力(Lebowski, J. S.等 Mol Cell Biol 8:3988(1988))。

人 AHSG cDNA 被克隆进 AAV 载体以产生 pAAV-AHSG（见图 7）。从这种构建体产生的病毒粒子用于感染 Jurkat 细胞。Jurkat 细胞是源自急性 T 细胞白血病的人 T 淋巴细胞系，用作方便的宿主细胞来测试

AHSG 抑制 TGF-β 活性的能力，也用来估计在感染 AAV-AHSG 后基因表达的持续时间。

结果（看图 2A）显示对照细胞暴露于 TGF-β 将它们掺入 ^{3}[H]-胸苷的能力降低到了 57%（比较柱 5 和 6）。类似地，感染了携带半乳糖苷酶基因 lacZ 的 AAV 的 Jurkat 细胞与对照细胞的表现相似。LacZ 的作用应该不会影响 Jurkat 细胞的功能或 TGF-β 的作用。当感染了 AAV-LacZ 的 Jurkat 细胞暴露于 TGF-β 时，当与不暴露于 TGF-β 的感染 AAV-LacZ 的细胞摄取相比较，^{3}[H]-胸苷摄取的 46%（图 2A，比较柱 3 和 4）被阻断了。和其它转染了 AHSG cDNA 的细胞一样，感染了 AAV-AHSG 的 Jurkat 细胞对 TGF-β 的作用没有反应。感染了 AAV-AHSG 的 Jurkat 细胞暴露于 TGF-β 未影响 ^{3}[H]-胸苷的摄取（图 2A，比较柱 1 和 2）。这些结果共同显示出，在它们对 TGF-β 的反应上，Jurkat 细胞与人 $CD8^{+}$细胞系、周围 CTLs 以及小鼠总淋巴细胞的表现非常相似。我们意外地观察到了具有表达 AHSG 能力的 equipping Jurkat 或者任何一个我们所测试过的细胞都阻断了这些细胞对 TGF-β 的反应。

下面的实验研究是设计来确定 Jurkat 细胞上的 TGF-β 作用是否是剂量依赖性的。另外，我们也检查了用 AAV 表达 AHSG 是否提供了使这些细胞能够免受 TGF-β 剂量增加的影响。首先，我们让一组 Jurkat 细胞感染 AAV-lacZ，将它们作为对照（图 2B）。当表达 lacZ 的细胞暴露于从 0 到 5 ng/ml 逐渐增加剂量的 TGF-β 的培养基时，具有的 ^{3}[H]-胸苷摄取的剂量依赖性抑制达到相当于对照细胞 60%的底线（1 ng/ml 的 TGF-β 剂量）。

接下来在感染了 AAV-AHSG 的小鼠脾 T 细胞淋巴细胞中重复这个试验。AHSG 在这些细胞中的表达与 ^{3}[H]-胸苷摄取的增加达到表达 lacZ 的对照细胞 125％以上有关。另外，在表达 AHSG 的细胞中，TGF-β 的加入不但未能抑制 ^{3}[H]-胸苷摄取，而且 ^{3}[H]-胸苷摄取有了很小的剂量依赖性增加，在 TGF-β 剂量为 1 ng/ml 时达到表达 lacZ 的对照细胞的 155％以上的最大值。表达 AHSG 的细胞中胸苷摄取的增加与上述在小鼠总淋巴细胞中所观察到的相似。

AAV 介导的基因转移的持续性

为确定 AHSG 的表达随着时间过去的持续性，我们用 RT-PCR 测

定了 AHSG mRNA 在感染了携带 lacZ 或 AHSG 基因的 AAV 的 Jurkat 细胞中的存在。结果（图 2C 和 D）显示 AHSG 的表达在感染后持续到 30 天的最终检测时间。相对表达程度在感染后第 4 天最高然后似乎大约有 15 天的峰值。第 30 天的表达与第 15 天的表达没有很大不同。这些发现显示了使用 AAV 是使细胞能够表达 AHSG 的有效途径，那种表达看来在感染后至少持续 30 天。更重要的是，AHSG 在这些细胞中的表达给予了它们克服 TGF-β 的生长抑制效应的能力。因此我们已经意外地发现了当人 AHSG 在 Jurkat 细胞中表达时，能够拮抗 TGF-β 的效应。

用 AAV-AHSG 激活细胞毒性活性

前面的数据显示 AHSG 具有阻断 TGF-β 作用的能力，从而允许来自人和小鼠的淋巴细胞的增殖。并不知道 AHSG 在 T 细胞中的表达是否改变它们的细胞毒性，这是对发展抗癌治疗来说必不可少的活性。为进行这些研究，我们选择了 Lewis 肺癌（LLC1）细胞，已知它分泌与细胞恶性潜力直接相关的 TGF-β (Perrotti, D.等 Anticancer Res 10:1587(1990))。

如果肿瘤细胞是致免疫的，那么来自具有肿瘤的小鼠的淋巴细胞应该显示对癌细胞的细胞毒性活性。但是，因为肿瘤细胞是致瘤的，它们具有逃脱免疫监测的机制。为了说明的目的，我们在以下的实验中将淋巴细胞标为“效应物（E）”细胞，因为它们有细胞毒性活性，最初的肿瘤细胞标为“靶（T）”细胞。为确定 E 细胞溶解 T 细胞的效率，我们用 E 细胞比 T 细胞的比也就是 E/T 比来比较细胞毒性活性。在低 E/T 比的相对细胞毒性活性表明淋巴细胞在溶解 T 细胞方面是有效的。淋巴细胞的特异性是通过使用不同靶细胞比较细胞毒性活性而确定的。在当前实验中，淋巴细胞是由携带 LLC 肿瘤的小鼠分离的，因此淋巴细胞或 E 细胞应该特异于靶或 LLC 细胞。E 细胞应该具有对 LLC1 但不对其它靶细胞的细胞毒性活性，如果被证实，那么细胞毒性活性就是特异于靶细胞的。

在第一系列实验中，我们在小鼠的肩胛内区域皮下植入 LLC1 细胞。这个过程将被注射小鼠的免疫系统暴露于了 LLC1 细胞。当处死 LLC1 暴露的小鼠后，它可以作为淋巴细胞的来源，淋巴细胞从这些小鼠的脾脏分离。源自脾脏的细胞作为 E 细胞，LLC1 作为这些细胞的

靶。为估计这些淋巴细胞的细胞毒性活性，将它们用下述方式处理。将淋巴细胞从脾脏分离，用 AAV-Lac Z 或 AAV-AHSG 转化，然后如下所述培养 3 天。在分析前 4 小时收获培养的淋巴细胞并与 LLC1 混合。在孵育结束时，LDH 释放到培养基中的量根据厂商程序 (CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega Corporation)来测定。

正如所期望的，当更多感染了 AAV-lacZ 或-AHSG 的 E 细胞与 LLC1 细胞混合时，靶细胞释放了更多的 LDH（图 3A）。意料之外的发现是，与用 E/T 比为 1 的 AAV-lacZ 转化的对照淋巴细胞相比，使用任何 E/T 比感染了 AAV-AHSG 的 E 细胞都具有极高的细胞毒性活性，即释放更多 LDH (图 3A, 顶行是表达 AHSG 的细胞的)。这意味着当相同数量的淋巴细胞和 LLC1 混合时，E/T 比为 1，AAV-AHSG 在 4 小时内将致死活性从 14.2+/- 1.8%增强到 20.6 +/- 0.9 %。此外，细胞毒性活性似乎与 AAV-AHSG 在使用这里所测试的 E/T 比的淋巴细胞中的表达数量有关（图 3B）。

与用 AAV-lacZ 转化的对照淋巴细胞相比（图 3A，顶行是表达 AHSG 的细胞的），LDH 释放的 E/T 比为 1。这意味着当等量的淋巴细胞和 LLC1 混合到一起时（E/T 比为 1），感染 AAV-LacZ 的淋巴细胞在 4 小时内杀死了 14.2+/-1.8%的 LLC1。另一方面，感染 AAV-AHSG 的对应淋巴细胞在 4 小时内杀死了 20.6+/-0.9%的 LLC1。在各种 E/T 比的情况下观察到了细胞毒性活性的增加。此外，细胞毒性活性似乎与 AAV-AHSG 在使用了所测试的 E/T 比的淋巴细胞中的表达数量有关（图 3B）。

由于 T 细胞源自注射了 LLC1 的小鼠，它们都被期望具有识别这种类型的肿瘤细胞而不是其它肿瘤细胞的专一性。为了证实这一点，我们测定了来自注射了 LLC1 小鼠的暴露于 LLC1 的淋巴细胞或者来自相同小鼠品系的恶性黑素瘤细胞系的 B16-F1 细胞的细胞毒性活性（图 3C）。结果显示出源自注射了 LLC1 的并被给予了表达 lacZ 能力的小鼠 T 细胞证明了对 LLC1 的细胞毒性活性水平类似于对 B16-F1 细胞的水平。AHSG 在这些 T 细胞中的表达未能增加它们攻击 B16-F1 细胞的能力，但是这种修饰增加了它们对靶 LLC1 细胞的细胞毒性活性，以致它比在对照基因 lacZ 中高 2 倍。这些结果清楚地证实了 AAV-AHSG 具有甚至在相对低的 E/T 比时就增强淋巴细胞的特异性细胞毒

性活性能力的意外发现。更为重要的是，当 AHSG 表达增加了 T 细胞对 LLC1 或注射细胞类型的细胞毒性活性时，它不会对不相关的癌细胞类型这样。

淋巴细胞具备表达 AHSG 能力就增强了它们的细胞毒性活性，这是用 LDH 从肿瘤细胞的释放来进一步证明的。这些实验使用的是从注射了 LLC1 的小鼠脾脏分离的淋巴细胞。将这些来自小鼠的淋巴细胞用促细胞分裂剂处理，然后在与 LLC1 或非相关的 B16-F1 癌细胞混合前感染 AAV- AHSG 或 AAV-LacZ。结果(图 3)显示感染了 AAV-AHSG 的淋巴细胞增强了它们的细胞毒性活性。AHSG 的作用甚至在低 E/T 比时都是显著的。此外，增强的细胞毒性活性特异性靶向最初的癌 LLC1 细胞，与注射进获取淋巴细胞的小鼠的细胞相同。但是，这种细胞毒性活性没有扩展到 B16-F1 癌细胞。炎症反应可能发生的一种途径据信是非特异性的免疫反应。这种方便的方法特异性增强了淋巴细胞对最初的癌细胞细胞毒性的事实，使它成为自身免疫治疗有吸引力的方法。

体内细胞毒性活性

据报导 LLC1 细胞是极易发生肿瘤的，但是这些细胞在小鼠体内的转移潜能很弱。我们测试了按照步骤转染了 AAV-AHSG 的 T 细胞淋巴细胞抗 LLC1 细胞的体内细胞毒性能力。第一步是在皮下注射之前通过将这两种类型的细胞混合在一起使 T 细胞淋巴细胞与 LLC1 细胞的相互作用最大化。为进行这些研究，将 $2x10^4$ 的 LLC1 细胞与 $5x10^5$ 转染了 AAV-LacZ 或 AAV-AHSG 的 T 细胞混合然后皮下注射到小鼠肩胛间的区域。

在以前的研究中，给药后 7 到 10 天内 LLC1 细胞的注射会在注射部位产生肿瘤(Budzynski, W. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 30: 363 (1982))。我们的第一个目标就是要确定转染了 AAV-LacZ 或 AAV-AHSG 的 T 细胞淋巴细胞的细胞毒性活性是否存在差异以及这种活性是否影响 LLC1 肿瘤生长（表 I)。六只小鼠注射了 LLC1 细胞和携带 AAV-lacZ 的淋巴细胞。在第 14 天末，所有小鼠(6/6 或 100%)都有明显的肿瘤生长（其中 3 个在图 4 中显示)。相反，6 只注射了 LLC1 细胞和携带 AAV-AHSG 的淋巴细胞的小鼠中的 4 只(或 67%)没有肿瘤生长（6 个中的 1 个在图 4C 中显示)。此外，在那两只有肿瘤生长的小鼠之

一的肿瘤很小（<5mm，与对照小鼠的 15mm 相比）。肿瘤的颜色是白色的，这可能反应了肿瘤周围的产生血管的组织的低丰度。小肿瘤的组织分析表明它是更良性的表型，因为有丝分裂指数低且染色体密度更低（图 4D）。在其它生长肿瘤的小鼠中的病变大小与对照细胞的没有区别。这些结果共同证明了 T 细胞淋巴细胞的 AAV-AHSG 转染增强了它们的细胞毒性活性并且可降低 LLC1 细胞的体内肿瘤发生可能性。LLC1 和淋巴细胞混合在一起确保了这两种不同的细胞类型相互直接接触。

表 1，使用 LLC1 肿瘤和注射给小鼠的总或 $CD8^+$细胞的体内研究。

肿瘤	淋巴细胞和肿瘤细胞注射方式	LacZ	AHSG	注射了感染 AHSG 的淋巴细胞的小鼠的存活率	备注
LLC1	与 LLC1 混合的总淋巴细胞&注射，皮下	0/8	6*[1]/10	60%	一只小鼠在第 18 天仅有很小的肿瘤
	i.v.注射总淋巴细胞，SQ 注射肿瘤，同一天	0/4	3*[2]/12	25%	一只小鼠的肿瘤要长到 5 mm 大小还需要 10 天
	与 LLC1 混合的 $CD8^+$淋巴细胞&注射，皮下	0/4	2/4	50%	
	i.v.注射 $CD8^+$淋巴细胞，SQ 注射肿瘤，同一天	0/6	5/8	62.5%	

结果显示 10 天后没有产生肿瘤的小鼠数量和小鼠百分比。

LLC1；$2x10^4$ 细胞/小鼠，淋巴细胞；$5x10^5$ 细胞/一次注射

皮下注射 LLC1 细胞和静脉注射淋巴细胞

之前的试验显示了 AAV-AHSG 在改变淋巴细胞的细胞毒性活性和

增强它们破坏 LLC1s 细胞的能力方面的效力。这个实验的设计模仿最有利的情况，因为它使得淋巴细胞破坏早期肿瘤。为建立更加真实地反映肿瘤发展模型的方案，我们将 $2x10^4$LLC1 细胞皮下注射给小鼠，然后在 4 天后通过小鼠的尾静脉注射 $5xlO^5$ 的转染了 AAV- lacZ 或 AAV-AHSG 的 T 细胞淋巴细胞。在第一组试验中，用总淋巴细胞（意为不仅仅是富含 $CD8^+$的淋巴细胞）注射。这些研究的结果显示所有首先注射 LLC1 然后注射转染了 AAV-lacZ 的淋巴细胞的 4 个动物(100%)都产生了肿瘤。不象之前的实验，注射了 LLC1 和转染了 AAV-AHSG 的淋巴细胞的 12 只小鼠中的 8 只(75%)在第 14 天产生肿瘤。这个发现意味着只有 25％的小鼠受到保护未产生肿瘤。

我们假定在这个实验设计中低水平的抗肿瘤生长是由至少两种可能性中的一种引起的。一种可能的解释就是细胞毒性细胞不能到达肿瘤部位，第二种可能的解释就是具有增强的细胞毒性活性的细胞的数量不足以达到治疗效果。为了增加注射细胞的相对细胞毒性活性来处理这种情形，我们用磁珠将 $CD8^+$细胞从总淋巴细胞分离，将这些分离的细胞用于注射中。6 只注射了 LLC1 和 $5xlO^5$ 转染了 AAV-lacZ 的 $CD8^+$淋巴细胞的对照小鼠中，所有 6 只都产生肿瘤。相反，8 只注射了 AAV-AHSG 转化的淋巴细胞的动物中，5 只(62.5%)未产生任何肿瘤。这意外地证明了富含 $CD8^+$的淋巴细胞看来似乎增加了由 AAV-AHSG 的转化所诱导的细胞毒性活性。

AHSG cDNA 修饰的淋巴细胞特异于 LLC1 但非特异于 B16-Fl。

在当前基于细胞模型的 TGF-β依赖的 LLC1 疗法中，我们发现 AHSG 在 T 细胞淋巴细胞中的表达给予这种细胞识别用 TGF-β逃避免疫系统的癌细胞的特异性。用如上同样的方法证实了这一点，在小鼠的肩胛内区域注射 B16-F1 癌细胞，接着在同一天静脉注射转染了 AAV-lacZ 或 AAV-AHSG 的 T 细胞淋巴细胞。这些研究的结果显示所有注射了 B16-F1 并转染了 AAV-lacZ 的 T 细胞产生了肿瘤。另外，所有注射了 B16-F1 并转染了 AAV-AHSG 的 T 细胞淋巴细胞的小鼠也产生了肿瘤。进一步的实验使用磁珠技术，其使用富含 $CD8^+$的淋巴细胞，然后将它们用 AAV-lacZ 或 AAV-AHSG 转化，没有显示出肿瘤生长速度的变化。注射 T 细胞淋巴细胞任何一种类型的所有小鼠都产生肿瘤。这些发现表明，转化表达 AHSG 的 T 细胞淋巴细胞的细胞毒性活

性似乎限于象 LLC1 细胞这样的 TGF-β依赖性细胞，但不限于诸如 B16-F1 癌细胞的那些非 TGF-β依赖性的细胞。

AHSG 对组织蛋白酶 B 活性的影响

在这个实施例中我们使用称为 z-Arg-Arg-AMC 的荧光底物。这种肽不会进入细胞并且对分析组织蛋白酶 B 活性是特异的。这种底物保持在细胞外的能力使我们能够测定细胞周围组织蛋白酶 B 的酶活性。许多人和小鼠癌细胞系在细胞表面具有组织蛋白酶 B 活性。

为测定 AHSG 对组织蛋白酶 B 活性的影响，我们使用了用来转染 Lewis 肺癌(LLC)细胞的表达载体 pAAV-AHSG 或 pCDNA-AHSG 来表达 AHSG。这些细胞正常表达组织蛋白酶 B(Hulkower, K. 1.等 Eur J Biochem 267: 4165 (2000))。所以将这种底物加入到转染了非特异性载体的细胞上导致了肽的裂解，将所得到的组织蛋白酶 B 活性的水平任意设为 100（图 7，左柱）。转染 pAAV-AHSG 后的组织蛋白酶 B 活性大约比对照细胞低 25％（图 7，第二柱）。接下来将 25 nM 已知的组织蛋白酶 B 抑制剂 CA 074 加入到分析物中。这种试剂的存在导致了所期望的组织蛋白酶 B 活性的抑制（图 7，第三柱）。毫无意外地，组织蛋白酶 B 的最高抑制与转染了 pAAV-AHSG 同时也暴露于 CA-074 的细胞有关（图 7，第四柱）。尽管 LLC 细胞的转染效率很低，当用β-半乳糖苷酶活性的原位染色测定时，转染效率在 10 到 20%的范围，在 AHSG 存在时观察到的组织蛋白酶 B 的降低支持了本发明的 AHSG 的表达抑制细胞表面上的组织蛋白酶活性。

用另一表达载体 pcDNA（购自 Invitrogen, Carlsbad, CA）来表达 AHSG 的单独一组研究（图 7，柱 5 到 9）显示了相似的结果。结果显示来自转染空载体 pCDNA 的细胞的耗尽培养基不会抑制组织蛋白酶 B 的活性。相反，pAAV-AHSG 构建体的使用抑制了组织蛋白酶 B 活性大约 25％（图 7，柱 6），在来自转染 pcDNA-AHSG 的细胞中观察到了相似的抑制（图 7，柱 7）。正如所期望的一样，25 nM CA-074 的存在抑制了组织蛋白酶 B 活性（图 7，柱 8），pcDNA-AHSG 和 CA-074 两者的结合进一步降低了组织蛋白酶 B 的活性（图 7，柱 9）。因为在这个实验中荧光的可变背景，与柱 3 和 4 相比，柱 8 和 9 显示更少的抑制。背景水平的些微差别是因为不同的细胞制剂。这些研究共同显示出 AHSG 在这些细胞中的表达具有组织蛋白酶 B 的阻断活性。

为确定这个观察结果不限于 LLC 细胞，我们也估计了 AHSG 对包含在感染了 AAV-AHSG 的 HEK293 细胞上清液中的组织蛋白酶 B 的抑制活性。在这个实验中，我们收集了来自表达和不表达 AHSG 的 HEK293 细胞的耗尽培养基。使用 AAV 病毒的原因是因为它能够使 HEK293 细胞中的 AHSG 表达更有效率。HEK293 细胞典型地用于病毒生产，应该也表达包含在载体中的转基因。结果（图 8）显示在感染了 pAAV-LacZ 的细胞中，组织蛋白酶 B 抑制活性是不存在的并设为 100（“对照”柱）。和上述研究所显示的一样，CA-074 的存在抑制组织蛋白酶 B 的活性。使用感染了 AAV-AHSG 或-LacZ 的 HEK293 细胞的耗尽培养基进行 AHSG 抑制活性分析。如所期望的一样，所购买的部分地由人血浆纯化的 AHSG(Sigma, St Louis, MO)具有所预期的抑制活性（图 8，柱 9）。将来自感染了 AAV-AHSG 的 HEK293 的耗尽培养基部分纯化并浓缩。含有来自感染了 AAV-AHSG 病毒的 HEK293 细胞的 AHSG 的浓缩培养基的加入（图 2，柱 5 和 6）以及购自 Sigma 的 AHSG 显示了细胞周围组织蛋白酶 B 活性的明显抑制（图 8，柱 9）。此外，培养基浓度加倍会使 TGF-β 抑制活性增加 2 倍。也就是说，含有 62.5 或 125 μg/ml AHSG 的培养基的存在导致组织蛋白酶 B 活性分别降低 23%和 46%（图 8，柱 5 和 6）。

感染 AAV-lac Z 的阴性对照细胞中观察到的组织蛋白酶 B 的轻微抑制（图 8，柱 3 和 4）可能是由于培养基成分牛血清中包含的内源性胎球蛋白。每批购买的 AHSG 有不同的细胞周围组织蛋白酶 B 抑制活性。然而其中一批 AHSG 完全抑制了组织蛋白酶 B 活性，但是所需的蛋白质的量小于 AHSG 在成人血液中的浓度(0.3 到 0.6mg/ml)的 10%。AHSG 经糖基化和磷酸化修饰。有可能这些修饰会影响组织蛋白酶 B 的抑制活性，蛋白质上的这些修饰在一种提取的 AHSG 制剂中可能与后一种制剂中的不同。

材料和方法

细胞的制备

检测细胞周围组织蛋白酶 B 的最佳条件是在快速生长的细胞中。要达到这个条件，将 $4x10^6$ 个细胞接种到 60mm 皿中，在第二天用于组织蛋白酶 B 分析。LLC 细胞的转染是根据厂商手册，使用 Superfect(Qiagen N. V., KJ Venlo, The Netherland) 在悬浮液条件下进

行的。60mm 皿中的单层细胞用含有 1mM EDTA 的 PBS 清洗 2 次，然后悬浮在 0.8 ml 的正常培养基中(补充了 10% FCS 的 D-MEM)。将细胞放置 5 分钟以沉淀细胞聚集体的大块，然后将 0.6ml 上层细胞悬浮液转移到 5ml 的聚苯乙烯管中。Superfect-DNA 复合物是通过将 30μl 的 Superfect 加入 150μl 含有 5 μg 质粒 DNA 的 D-MEM 中制备的。使这种悬浮液在室温下放置 10 分钟然后加入到 0.6ml 的单细胞悬浮液中。将 DNA 和细胞混合物在 CO_2 培养箱中孵育 3 小时，之后用 PBS 清洗 2 次，然后在正常培养基（补充了 10% FCS 的 D-MEM）中培养过夜。第二天，细胞进行传代培养，将 $4x10^6$ 个细胞接种到 60mm 皿上并在用于组织蛋白酶 B 分析之前将这些转染细胞培养过夜。通过用含有 4ml PAB 缓冲液(没有碳酸氢钠的 Hank's 平衡盐溶液，0.6mM $MgCl_2$, 0.6mM $CaCl_2$, 2mM 1-半胱氨酸和 25mM PIPES，调节 pH 到 7.0)的移液管将 60mm 皿上的细胞取出。将细胞悬浮液转移到聚苯乙烯试管中。为去除细胞聚集体的大块，将试管在室温下放置 5 分钟然后将 3ml 上层细胞悬浮液小心取出用于分析。

组织蛋白酶 B 分析

将 50μl 细胞悬浮液加入黑壁 96 孔板(ThermoLabsystems, Part No. 8220, Vantaa, Finland)。组织蛋白酶 B 抑制剂、纯化 AHSG 或浓缩培养基的最适浓度，在 5μl 的 PAB 中稀释，然后加入 96 孔每个孔中的细胞悬浮液中。将平板在 40℃下预保温 30 分钟。通过加入 50μl 由组织蛋白酶 B 裂解的 200μM 荧光肽 z-Arg-Arg-AMC(EMD Biosciences Inc, Darmstadt, Germany)溶液起始反应。这种底物溶解于 PAB 中，使用之前在 40℃下预保温。组织蛋白酶 B 的水解活性从底物肽产生的自由 AMC 引起了增加的荧光。荧光强度用具有 355nm 激发滤器和 420nm 发射滤器的 ThermoLabsystems Fluoroskan microplate 阅读器来测定。z-Arg-Arg-AMC 原液以 10 mM 的浓度溶解于 DMSO 中并在-80℃下储存。组织蛋白酶 B 特异的抑制剂 CA-074 和 Ac-LVK-CHO (EMD Biosciences Inc., Darmstadt, Germany)以 lOmM 的浓度溶解在 H_2O 中，分成小份并在-80℃下储存。

来自感染了 AAV-AHSG 的 HEK293 的 AHSG

在研究当天的早上将 HEK 293 细胞在 40%汇合的细胞密度时传代培养。生长 6 小时后，细胞用 AAV-AHSG 或携带 M.O.I.为 3 的 AAV

的阴性对照 AAV-lacZ 进行感染。第二天用补充了 5% FCS 的新鲜 D-MEM 替换培养基，再培养两天。将培养基通过孔径为 0.22 微米的过滤器然后在-80℃下储存。AHSG 具有 55kD 的分子量。我们部分纯化并浓缩了分子量在 100kD 到 30kD 之间的耗尽培养基。运用离心过滤设备 NanoSep 100 (Pall Corporation, Ann Arbor, MI)来收集分子量小于 100kD 的。将 0.4 ml 由 NanoSep 100 流过的组分加到 Nanosep30 上，将滤膜上剩余的蛋白质重悬浮于 40μl PAB 中(不含碳酸氢钠的 Hank's 平衡盐溶液, 0.6mM $MgCl_2$, 0.6mM $CaCl_2$, 2mM 1-半胱氨酸和 25mM PIPES，调节 pH 到 7.0)。蛋白质浓度用 Bradford 试剂 (Bio-Rad, Hercules, CA) 确定。蛋白质溶液的等分试样经液氮快速冷冻，使用之前在-80℃下储存。

治疗方法不限于基因疗法，也包括给予蛋白质、小分子、化合物或类似物，它们通过活性组分替换方法对急需的患者提供期望的功能活性。

实施例 1

眼

因为许多原因，眼被认为是基因疗法潜在的理想器官。现在许多眼疾都在分子水平上被很好的确定了，经常可以得到合适的动物模型，确定眼的形态和功能非常简单，眼的免疫优先性质对基因疗法是有利的并且在动物模型疗法的发展和测试期间第二只眼经常可以作为对照。

根据本发明的原理和方面，通过给眼提供具有下调组织蛋白酶活性和 TGF-β 受体结合的能力而提供了治疗眼失调的方法。这可以通过例如向眼提供例如 AHSG 的具有组织蛋白酶抑制活性和 TGF-β 受体阻断活性的蛋白质来实现。类似地，也具有降低组织蛋白酶活性和 TGF-β 活性能力的肽和类似物被认为是等同物并提供在本发明中。

在本发明的优选实施方案中，本发明的试剂，例如但不限于诸如 AHSG 的蛋白质，可以通过各种方式提供给眼，包括例如局部提供或眼内提供。

本发明提供的期望活性，例如由 AHSG 提供的，也可以以核酸形式送递，例如通过 DNA、RNA、合成寡核苷酸或类似物的送递。一种特别期待的方法包括送递编码诸如 AHSG 或其变异体的蛋白质的

DNA。所述 DNA 可作为基因疗法的一部分完美提供，或以病毒载体的形式或通过非病毒的转移技术的方式。

非病毒的核酸转移技术包括电穿孔、经基因枪转运、通过脂质体包囊或裸 DNA 的简单注射的送递。病毒核酸转移技术能够有利地将选自几种不同病毒家族中的任何一种用作载体，包括逆转录病毒(例如，诸如莫洛尼氏(Moloney)鼠白血病毒的致癌逆转录病毒；慢病毒,诸如人或猿免疫缺陷病毒，或水泡性口炎病毒)以及腺病毒(例如腺病毒；腺伴随病毒;疱疹病毒,诸如单纯疱疹病毒 1 型、巨细胞病毒或 Epstein-Barr 病毒)。

本发明的优选实施方案包括利用腺伴随病毒（AAV）作为载体送递核酸的选择。AAV 特别适用于作为将核酸送递到眼的载体，因为它具有：病原性的相对缺乏，诱导长期转基因表达的能力，并显示出转染各种眼细胞类型，包括光感受器、视网膜色素上皮细胞、Muller 细胞、视网膜神经节细胞、小梁网细胞以及角膜内皮细胞。AAV-DNA 载体可在不同位置注射到眼内，包括视网膜下空间或玻璃体内。

AAV-DNA 载体可进一步有利地包含各种对驱动提供给眼的转基因表达有用的启动子。特别地，本发明的优选实施方案包括巨细胞病毒(CMV)和鸡β-肌动蛋白(CBA)启动子。其它也可用于驱动眼中的表达的启动子包括那些与血小板衍生生长因子和神经细胞特异性烯醇化酶有关的启动子。在优选实施方案中，提供给患者的腺伴随病毒载体中编码蛋白质的核酸编码 AHSG 或其变异体。

本发明也有利地提供了与免疫功能失调、伤口愈合、瘢痕形成和感染有关的眼疾的治疗。免疫功能失调有关的眼部失调包括自身免疫失调和移植。本发明的应用对其特别有益的自身免疫失调是自身免疫葡萄膜炎，它可以以预防性方式治疗以及进行长期治疗。本发明对其有益的另一自身免疫失调是干眼综合征，它的特征在于泪腺发炎。

与移植有关的后遗症特别易受本发明治疗的作用。可以利用本发明的核酸的基因疗法在离体处理要移植到患者中的组织。为了使移植组织对宿主免疫系统的刺激更小，这种处理优选在移植前发生。作为替代，或是另外，为了减少这种后遗症，可以在移植之前、期间和/或之后将本发明的试剂直接提供给宿主。穿透角膜移植术（角膜移植）是特别受益于本发明的移植方法，因为由于移植排斥引起的 5 年失效

率是大约 50%，目前的标准护理是使用有毒的、全身免疫抑制药物。

眼感染性疾病也可用本发明的试剂和方法有利地治疗。本发明对其特别有效的主要眼感染性疾病是 I 型疱疹病毒引起的角膜炎。这种疾病经常复发，同样特别受益于来自本发明试剂的核酸送递的长期功效，这导致核酸的长期保留，因此导致了同时给予 TGF-β 活性下调和组织蛋白酶活性下调的肽或蛋白质的长期表达。

另外，眼伤口愈合失调也可有利地受益于本发明方法和试剂的治疗。本发明的优选实施方案包括调节青光眼滤过外科手术后的伤口愈合。因为青光眼外科手术后的伤口愈合的主要部分发生在手术后的两周内，又因为 TGF-β 活性是参与眼内纤维增生性瘢痕形成反应的主要细胞因子，本发明的试剂将会在这个时期之前和/或期间理想地提供给眼。这些试剂可以用或不用其它疗法来提供，诸如丝裂霉素、5-氟尿嘧啶和其它抗代谢物。可以提供给青光眼外科手术患者的本发明提供的试剂包括但不限于编码 AHSG 或者有利提供组织蛋白酶下调活性和 TGF-β 抑制活性类似作用的其它多肽、肽或蛋白质的核酸。这种核酸可以有利地以病毒包膜或裸露的形式直接提供给眼，或者提供给其它离体细胞然后接着引入眼。

另一能够受益于本发明方法和试剂治疗的眼伤口愈合失调是增生性玻璃体视网膜病变(PVR)。PVR 是视网膜重附着手术失败的主要原因，并与胞外基质蛋白质沉淀和维管膜的形成有关，这些事件部分地是由 TGF-β 活性介导的。为了预防或治疗 PVR 而可提供给视网膜重附着患者的本发明的试剂包括但不限于编码 AHSG 或者有利提供组织蛋白酶下调活性和 TGF-β 抑制活性类似作用的其它多肽、肽或蛋白质的核酸。当核酸以病毒包膜或裸露形式提供给眼时，核酸可以有利地直接提供给眼，或首先将它们加到其它离体细胞然后接着引入眼。

实施例 2

肝脏

TGF-β 对涉及炎症和/或纤维化以及纤维发生的肝脏失调的进展很重要。因此降低 TGF-β 活性和组织蛋白酶活性提供了非常受益的治疗方法。本发明提供的各种试剂和方法适用于治疗肝脏失调，包括中毒、胆汁郁积、酒精中毒（例如肝硬化）、炎性失调以及其它类型的肝损伤，诸如胆道闭锁。

本发明的一个实施方案包括提供本发明的治疗试剂给肝脏以降低TGF-β和组织蛋白酶的生物活性。这样的试剂可以有利地作为多肽或以核酸的形式送递，它可以由病毒或非病毒载体提供，它可以直接提供给患者，或者提供给其它细胞然后由这些细胞提供给患者。在优选的实施方案中，当将本发明的试剂直接提供给患者并用于肝脏时，它们通过门静脉途径给药。在另一优选实施方案中，试剂可以通过注射到患者循环中来提供给患者。

肝脏自身是体内基因送递的良好靶，因为通过与肝脏毛细血管关联的大孔很容易接近它，通过注射试剂到患者的循环中可以很容易接近它们。合适的基因送递载体可包括脂质体、DNA（或RNA）-蛋白质复合物、病毒载体、含有转基因的细胞（例如肝细胞）、裸DNA、RNA或类似物。在本发明优选的实施方案中，送递的核酸是DNA。在本发明最优选的实施方案中，核酸由病毒载体送递。在另一优选实施方案中，核酸编码AHSG或另一提供组织蛋白酶和TGF-β下调活性的多肽。在另一特别优选的实施方案中，病毒载体包括腺伴随病毒，最优选地进一步包括选自白蛋白基因、前早期巨细胞病毒基因、人磷酸甘油酸激酶基因、莫洛尼氏鼠白血病病毒的5'-LTR以及鸡β-肌动蛋白基因相关启动子的驱动核酸表达的启动子。

实施例3

肾脏

肾小球中胞外基质的堆积对导致晚期肾衰竭的基本上所有渐进性肾病的发病机理来说是共同的和主要的原因。目前没有治疗或预防肾纤维化进展的特异性并有效的治疗方法。TGF-β在肾纤维化疾病进展方面起着必须的作用，例如肾小球性肾炎和糖尿病性肾病。虽然不希望被任何理论限制，但是我们相信TGF-β受体结合和组织蛋白酶活性的下调将降低纤维化沉积并抑制肾病的继发进展。

本发明的治疗处理实施方案包括向肾脏提供治疗有效量的试剂以降低其中的TGF-β和组织蛋白酶活性。作为肝脏治疗，这种试剂可作为多肽或核酸形式有利地送递，它们可由或不由病毒或非病毒载体携带，直接施加给患者，或施加给其它细胞然后再提供给患者。

例如，AHSG可以理想地提供给患者以治疗或预防纤维化肾病。在本发明的另一实施方案中，提供TGF-β下调和组织蛋白酶下调活性

的治疗有效量的多肽可以提供给患者。在本发明的另一实施方案中，提供 TGF-β 下调和组织蛋白酶下调活性的 AHSG 或多肽可以通过静脉注射被提供。在本发明的另一实施方案中，提供 TGF-β 下调和组织蛋白酶下调活性的 AHSG 或多肽可以通过将核酸直接引入给患者来提供给患者。这种核酸可以是 RNA 或 DNA，它们理论上将编码 AHSG 或其它具有可比活性的多肽，由此，蛋白质在有生命的患者中的表达将产生提供给患者的 AHSG 或多肽的治疗有益的活性。在本发明的另一实施方案中，核酸可以在体外给予哺乳动物（优选人）细胞群，接着将这些转化细胞随后提供给患者，然后它们将在其中表达 AHSG 或其它多肽，并下调 TGF-β 和组织蛋白酶，从而产生患者的治疗。在优选的实施方案中，核酸是 DNA。在另一优选的实施方案中，通过病毒载体的使用在体内或体外将核酸送递到细胞。在仍然更为优选的实施方案中，病毒载体包括腺伴随病毒。在另一优选的实施方案中，核酸送递可以通过注射到循环中，直接进入肾脏或肾实质。在另一优选的实施方案中，AAV 病毒载体中的核酸送递可以通过加入增强剂来有利地增强。这种增强剂可以从一列试剂中选择(1) 破坏 DNA (诸如顺铂或电离辐射，(2)耗尽细胞核苷库(诸如羟基脲，(3) 抑制拓扑异构酶活性(诸如依托泊甙（etoposide）或喜树碱) 或 (4)阻抑细胞周期 (诸如阿非迪霉素(aphidicolin))。

实施例 4

肺

TGF-β 的过量表达是胞外基质沉淀的主因和促成者，这是肺纤维化发病机理的特征。类固醇和其它惯常用于先天性肺纤维化的免疫抑制剂比理想的效果要差，通常的结果是 5 年还幸存的不到 50%。本发明提供了有利地下调 TGF-β 活性和组织蛋白酶活性的方法和试剂，从而提供了肺纤维化的改进的治疗和预防。

本发明提供的一个实施方案包括将具有下调 TGF-β 活性和组织蛋白酶活性能力的蛋白质送递到肺以治疗或预防肺纤维化疾病。蛋白质可通过各种方法送递，例如作为蛋白质、作为表达时编码蛋白质的核酸、或作为携带编码蛋白质的核酸的细胞。核酸可以作为裸 DNA 或携带于载体中而被有利地送递。这样的载体可包括例如病毒，诸如腺伴随病毒或 AAV。无论什么形式的蛋白质的送递都可经例如气管内、

静脉或气管内途径发生。当经静脉或气管内途径来送递时，可以经例如注射来送递。当通过静脉途径送递时，发现所感兴趣的蛋白质在肝脏、肺和肾脏中累积，这使静脉给药对治疗许多与这些器官有关的纤维化失调特别有效。当经气管内或鼻途径送递时，依照本领域技术人员公知的方法，送递可以有利地配制成粉雾剂形式用粉雾剂装置进行送递。

实施例 5

心肌

TGF-β是心脏中成纤维细胞增殖、成纤维细胞到肌成纤维细胞和胞外基质产物的表型转变的主要刺激物。这种纤维组织在心脏中的堆积导致了肥大心脏中的硬度和泵送能力受损以及各种心室功能失调，并最终导致心脏舒张功能失调和心力衰竭。在本发明之前，没有通过下调 TGF-β活性和降低组织蛋白酶活性来阻断 TGF-β的刺激。

本发明优选的实施方案包括送递给心脏具有下调 TGF-β活性和组织蛋白酶活性能力的蛋白质以治疗或预防诸如心脏舒张功能失调的心血管纤维化疾病。本发明的蛋白质可经静脉、肌内、或腹膜内或者其它注射途径来送递，或者可直接注射到心脏组织中或附近的细胞组织中。在本发明另一实施方案中，蛋白质可以以核酸的形式送递，可以是 DNA 或 RNA，可以是裸露的或携带在病毒或非病毒载体中的。在本发明最优选的实施方案中，蛋白质包含 AHSG，经注射直接提供，或者它的编码基因类似地提供在 AAV 载体或腺病毒载体中。

实施例 6

为眼部应用选择活性化合物以及鉴别合适剂量的的眼部应用和方法

使用增生性玻璃体视网膜病变(PVR)的兔模型

根据常规技术，在兔中诱导实验 PVR，注射假定的治疗试剂，监测 PVR 的发展来确定治疗试剂的疗效水平。期望的治疗试剂可以是化学个体，诸如具有 TGF-β受体阻断活性和组织蛋白酶抑制活性的蛋白质或肽。这种蛋白质的例子是 AHSG。治疗试剂也可以通过它的编码核酸来送递，只要表达的蛋白质或肽证明了 TGF-β受体阻断活性和组织蛋白酶抑制活性。根据公知技术，核酸的施用可以不进行包装、由病毒载体携带、由诸如脂质体的转染增强剂携带、或者由自身就要送递给患者的细胞携带。合适的病毒载体包括腺伴随病毒，或其它公知

的适用于送递编码序列到所感兴趣的细胞的病毒或病毒组分。用于识别编码显示出具有抗PVR活性的蛋白质或肽的基因的遗传技术是公知的，将它们剪接到适当的病毒载体中的技术也是公知的，不需要在这里容纳。这些方面适用于这里所述的所有测试模型。

PVR 的兔模型由 Oshima 描述(Oshima 等 Gene Ther 9:1214 (2002)，在这里完整引入作为参考)，其用于证明了眼中 TGF-β 表达的降低引起了 PVR 临床标志的减少。作者提出在试验兔子眼中减少 PVR 临床标志的试剂（在该论文中特别地是由病毒载体送递的基因）是用于人眼中治疗 PVR 的（基因）治疗法的模型。

简要概括一下，在 Oshima 的兔 PVR 模型中，肌内注射盐酸氯胺酮(14 mg/kg)和盐酸甲苯噻嗪 (14 mg/kg)使成年兔麻醉。用一滴 10%的盐酸苯肾上腺素、1%托品酰胺和 1%硫酸阿托品使瞳孔放大。在睫状环玻璃体切除后，每只兔子的一只眼通过睫状环注射具有 500,000 成纤维细胞的 0.1 mL BSS 溶液到玻璃体腔中。其后，眼立即接受单独的玻璃体内注射治疗试剂，所述治疗试剂要通过标准活性滴定技术筛选确定其剂量。同样数量的眼只接受成纤维细胞和平衡盐溶液作为对照。在手术之后所有的眼每天都要用检眼镜检查法检查达 1 个月，PVR 的发展用 Fastenberg 临床标准来分类。

选择病毒载体将基因带进眼对疗法结果具有重大影响。重组腺伴随病毒提供了几种比其它病毒载体更关键的优势来送递给眼，特别是相对缺少致病性以及诱导长期转基因表达的能力(评述于 Martin, K. R. 等 Methods 28 : 267 (2002)). 六种 AAV 亚型的研究证明了在眼中的最大表达是使用亚型 AAV4 和 AAV5 来实现的 (Rabinowitz, J. E. 等 J Virol 76 : 791 (2002))。

由 Oshima 发现的编码可溶性 TGF-β 受体的病毒载体携带基因对兔眼的有效剂量是 0.1 ml 中 10^3PFU，这对 AHSG 的效力来说是类似的，因为它阻断 TGF-β 与其受体结合的能力。从这些作者的工作得出结论，用于治疗人眼的合适的起始剂量为 0.1 ml 稀释液（优选无菌盐水）中 10^4 PFU，直接经玻璃体内注射(Oshima, Y, 等 Gene Ther 9: 1214 (2002))，因为兔眼是人眼质量的大约 1/10。但是，眼内的 AAV 病毒滴度研究证明更高的滴度提供了更好的基因转移效率，在小鼠眼内最好的结果是用每毫升 10^{10}PFU 的浓度提供的 10^7PFU 而获得的(Sarra, G.

M.等 Vision Res 42:541(2002))。这意味着最佳基因转导效率在用 0.1ml 的浓度为 10^{10}PFU 每毫升的大约 10^{9}PFU 的剂量时更可能达到，假定人眼是小鼠眼大小的大约 100 倍。因此优化人剂量的起始范围将是 10^{4} 到 10^{9}PFU，具有改善的转导效率并因此有更高的范围末端值可期望更好的治疗效果。最初，每月将病毒经玻璃体内注射一次，用 Fastenberg 的临床标准检查 PVR 的进展来确定重复注射的需要(Fastenberg, D. M. 等 Am J Ophthalmol 93 : 565 (1982))。经玻璃体内注射方法的详细描述由 Martin 和他的合作者披露 (Martin, K. R.等 Methods 28: 267 (2002))，在这里完整引入作为参考。在 Fastenberg 尺度上的任何疾病进展都将表明需要重复给予治疗。

使用眼压过高的灵长类模型

另一有用的筛选和剂量滴定技术涉及灵长类模型，其中在猴子中诱导眼压过高，此后进行外科青光眼小梁切开术并送递要识别的治疗试剂或要确定其治疗剂量的治疗试剂。然后监测伤口愈合过程以确定治疗试剂的疗效水平。所述的治疗试剂将证明 TGF-β 受体阻断活性和组织蛋白酶抑制活性，诸如通过 AHSG 可证明的。

眼压过高的灵长类模型由 Heatley 和他的合作者描述过 (Heatley, G.等 Gene Therapy 11: 949 (2004))，那时候，提出将其作为人青光眼外科手术后纤维化伤口愈合失调的精确模型。据信在这个灵长类模型上的成功治疗与对人患者的成功治疗干预相关。期望的最佳剂量范围（即 PFU 和浓度）、病毒载体选择以及在人患者中优选的给药途径（如上面对兔模型的描述，而不是对人类疾病的灵长类模型的描述）是检查眼内压(IOP)利用的标准临床方法，包括 Goldman 压平眼压测量法，它是已知适用于猴和人眼的(Kaufman, P. L.等 Arch Opthalmol 98:542 (1980))。检查青光眼外科手术后的术后瘢痕形成阳性结果的方法，以及将那些方法与人患者中的阳性结果联系起来的探讨，是由 Mead 等披露的 (Mead, A. L.等 Invest Ophthalmol Vis Sci 44: 3394 (2003))，人体临床试验标准是由 Cordeiro 等披露的(Cordeiro, M. F. 等 Invest Ophthalmol Vis Sci 40:2225(1999))。在如所述治疗人患者并用标准基准检查临床成功后，瘢痕形成进展或 IOP 增长将表明需要重复给予治疗。

在 Heatley 模型中，用盐酸氯胺酮(10 mg/kg)将猕猴麻醉，将修饰

的晶状体放置在一只眼上。利用激光 180 度切除小梁网，每天监测眼内压(IOP)上升。一旦它们显示明显减少的外流通畅性并具有持续上升的 IOP，动物就接受小梁切开术外科手术。对于外科手术，用肌内注射氯胺酮使动物麻醉，接着静脉注射戊巴比妥钠(15mg/kg)，在上部进行常规的小梁切开术。在从上角膜边缘切开结膜和 Tenon 被膜大约 8mm 后，致密贴壁的 Tenon 被膜的溶解在边缘界限进行，巩膜床被充分麻木。将用治疗试剂或对照试剂浸湿的 Weck-Cel 海绵放置在结膜下空间 5 分钟。移除海绵，用 BSS 冲洗该区域，2x2 mm 半厚度的巩膜小梁切除瓣就形成了。使用 Kelly Descemet 打孔机形成更宽的口，并进行部分虹膜切除。在每个角用两次尼龙缝合将巩膜瓣封闭。用 NSS 通过边缘穿刺术使前房膨胀来确定流过了瓣，用 Vicryl 连续缝合术将结膜切口单层封闭。手术后局部施用抗生素和类固醇。手术后用裂隙灯检查对动物进行评估，对细胞前房和闪光、角膜和晶状体的透明度、结膜发炎、虹膜和瘘的状态、以及外科手术起泡的形态进行评分。IOP 测定是使用 Haag-Streit 裂隙灯经微型场 Goldman 压平眼压测量法进行的。

实施例 7

肝应用

使用肝纤维化的大鼠模型

持续肝纤维化的二甲基亚硝胺大鼠模型已经描述作为与人肝硬化的病理生理学非常类似的既定模型(Jenkins, S. A.等 J Hepatol 1 : 489 (1985) ; Jezequel, A. M. 等 J Hepatol 5 : 174 (1987), 两者都被完整引入作为参考)。期望大鼠中的这种实验性失调进展的成功治疗干预与用于诸如肝硬化的人持续肝纤维化失调的成功治疗干预方式相关(Qi, Z.等 Proc Nat Acad Sci 96: 2345 (1999))。

根据这个公知的动物模型，在大鼠体内诱导肝纤维化并送递要筛选的或要确定剂量的治疗试剂。然后检查肝纤维化来确定治疗试剂的疗效水平。在这个动物模型中，从门静脉向大约 10 周龄、重约 350 克的雄性 Sprague-Dawley 大鼠一次注射 1ml 治疗试剂或盐水。或者，治疗试剂可以经肌内注射提供。然后每只大鼠每周接受腹膜内注射二甲基亚硝胺(DMN, 10 微克/克)三次，这就引起了不可逆的肝纤维化。在 3 周时期末，收集静脉血并处死大鼠。使用标准方法测定生化参数，诸

如透明质酸盐、天冬氨酸转氨酶和丙氨酸转氨酶。用 4%多聚甲醛固定肝脏用于组织学检查。用 Masson 三色法染色组织切片或者用抗 I 型胶原、纤连蛋白、α-平滑肌肌动蛋白、TGF-β、或单核细胞/巨噬细胞的抗体进行免疫组织染色。用生物素化的抗小鼠（或抗兔）IgG 抗体、标记过氧化物酶的链霉抗生物素和二氨基联苯胺来显现免疫反应物质。对于纤维化的半定量分析，Masson 三色染色切片的蓝变区域可以用数字图像分析仪在其显示屏上显示测定。

提供了体内治疗基因送递方式作为人体内肝纤维化疾病治疗方法的选择，因为肝脏是极好的靶，它容易接近通过肝毛细血管大孔注射到循环中的载体(Fraser, R.等 Hepatology 3: 863 (1997))。腺伴随病毒可能是将治疗基因送递给人肝细胞的的最好手段，因为与非病毒基因送递或腺病毒载体送递相比，它显示了有效的、稳定的表达并产生最小的免疫反应(评述于 Xiao, W.等 J Virol 72:10222 (1998))。用于肝脏中体内表达的高效启动子是长末端重复(LTR)启动子或白蛋白启动子(Snyder, R. O.等 Nat Genet 16: 270 (1997); Xiao, W.等 J Virol 72: 10222 (1998))。基于观察到的小鼠剂量反应曲线图，有效基因转导的最佳小鼠剂量 10^{11} 感染单位和已知的小鼠到人的剂量:剂量换算，期望用于人治疗用途的病毒剂量在大约 $5x10^{14}$ 感染单位时最佳(Xiao, W. 等 J Virol 72:10222 (1998))。携带转基因的病毒载体的人体给药是简单的，只需要注入门脉循环中(Snyder, R. O. 等 Nat Genet 16: 270 (1997); Xiao, W. 等 J Virol 72 : 10222 (1998))。可提供几种检查治疗给药疗效的方法。肝样本可以由患者活组织检查获得，使用 Masson 三色染色对纤维化进行组织学分类(Ferrell, L. Mod Pathol 13:679 (2000)。纤维化的缺少证明治疗的有效，而纤维化进展则表明需要额外给药和/或更高剂量的治疗试剂。

实施例 8

肾应用

使用肾小球性肾炎的大鼠模型

注射抗胸腺细胞血清诱导肾小球性肾炎的大鼠模型，这已经由 Okuda 作为反映人肾纤维化而描述过(Okuda, S.等 J Clin Invest 86: 453 (1990),在此完整引入作为参考)。期望在这种大鼠体内引起纤维化减少的治疗方式在用于治疗人纤维化肾脏失调时也是有效的(Border, W. A.

等 Nature 361: 361 (1992), 在此完整引入作为参考)。

在 Oduda 动物模型中，在大鼠体内诱导肾小球性肾炎，之后送递要筛选或要确定剂量的治疗试剂。然后检查纤维化肾病的进展来确定治疗试剂的疗效水平。肾小球性肾炎是通过在 4-6 周龄的 Sprague-Dawley 大鼠中静脉注射抗胸腺细胞血清而诱导的。在注射抗胸腺细胞后 1 小时，给大鼠静脉注射 0.5ml 治疗试剂或作为对照的磷酸盐缓冲盐水，每天一次进行 6 天。在第 7 天，从所有的大鼠收集尿液，测定尿蛋白和肌酸酐。将动物处死并量化肾小球中的纤连蛋白以估计治疗试剂阻断肾小球性肾炎中的基质沉淀的能力。也可以用抗纤连蛋白和肌腱蛋白的额外结构域 A 的抗体染色肾小球来检测 TGF-β 活性或用酸性希夫染色进行组织分析。尿蛋白与尿肌酸酐的比值将表征蛋白尿的发展。

当要被送递给动物的治疗试剂是在诸如腺伴随病毒的病毒载体中被提供时，替代地可以通过用侧面切割暴露肾脏并在几个部位给每个肾脏注射磷酸盐缓冲盐水中的病毒而将试剂直接送递给肾脏。

作为治疗人体内肾病方法的基因疗法需要仔细考虑送递系统。脂质体复合的 DNA 可在体内肾细胞中表达，表达是瞬时的且不多的(Tomita, N. 等 Biochem Biophys Res Commun 186: 129 (1992); Isaka, Y. 等 J Clin Invest 92: 2597 (1993); 评述于 Lien, Y. H.等 Kidney Int 52: S85 (1997); 它们都被完整引入作为参考)。逆转录病毒载体导致肾脏的转导效率低，因为只有分裂细胞才容易转导(Bosch, R. J.等 Exp Nephrol 1 : 49 (1993))，腺病毒载体产生的表达只持续几周(Moullier. P. 等 Kidney Int 45: 1220 (1994))。重组腺伴随病毒是治疗人肾病的最具吸引力的载体，因为 AAV 不会激活细胞介导的免疫，能转导分裂和非分裂细胞，驱动长期表达，在共转染的辅助病毒不存在的情况下是复制缺陷的(评述于 Lipkowitz, M. S. 等 Am J Kidney Dis 28: 475 (1996))。适于人的剂量可以由有效转导小鼠肾脏的 AAV 剂量来估计。直接注射进肾脏的小鼠每个肾脏用 80μl 磷酸盐缓冲盐水中的 106 感染单位转导的效率很高，因此当通过直接注射给药时，可以估计适于人的起始剂量大约是每个人肾 10^{10} 感染单位(Lipkowitz, M. S.等 J Am Soc Nephrol 10 : 1908 (1999))。对于人来说最好的给药途径适合肾动脉灌注(Daniel, C 等 Am J Pathol 163 : 1185 (2003)或在肾脏自身的几个部位直

接注射(Lipkowitz, M. S. 等 J Am Soc Nephrol 10 : 1908 (1999))。要确定治疗效果和额外给药的需要，可使用标准临床方法监测纤连蛋白，因为纤连蛋白在人肾小球膜增生性肾小球性肾炎中极大增加(Oomura, A. 等 Virchows Archs A Pathol Anat Histopatho 415: 151 (1989) ; Courtoy, P. J.等 J Cell Biol 87 : 691 (1980); Courtoy, P. J. 等 J Histochem Cytochem 30: 874 (1982); Border, W. A. Kidney Int 34: 419 (1988))。稳定的纤连蛋白表征有效的人体治疗，而纤连蛋白水平的增加则表征疾病的进展。

实施例 9

肺应用

使用肺纤维化的小鼠模型

肺纤维化的小鼠模型已经由 Shimizukawa 描述过(Shimizukawa, M. 等 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284: L526 (2003); Swiderski, R. E. 等 Am J Pathol 152 : 821 (1998), 两者在此都被完整引入作为参考)，这个模型被认为模拟了人先天性肺纤维化的症状和发病机理。提出了在这个小鼠模型中的成功治疗干预与用于人肺纤维化的成功治疗干预形式有关(Swiderski, R. E.等 Am J Pathol 152: 821 (1998) ; Onuma, K. 等 Tohoku J Exp Med 194: 147 (2001), 两者在此都被完整引入作为参考)。

根据这种常规模型，在小鼠体内诱导肺纤维化，其后送递治疗试剂。然后检查肺纤维化进展来确定治疗试剂的疗效水平。肺纤维化诱导是在 12 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠中通过隔天腹膜内滴注 0.1ml 含有 0.75mg 博莱霉素氯酸盐的盐水，总共 7 天。治疗试剂的送递经气管内途径直接在低于 2.5%的三溴乙醇麻醉下注射到气管中或是经静脉途径通过 29 规格的针注射到颈静脉中。一个月之后，将动物处死，通过气管注入了 10%缓冲液福尔马林的肺在室温下静置 26 小时。通过 HPLC 分析肺的羟基脯氨酸含量，或制备植入石蜡和苏木精中的、伊红和弹性 Masson 染色的片段。发现相对于用有效治疗试剂治疗的动物的阳性对照，羟基脯氨酸含量减少，组织分析显示相对于阳性对照动物，在用有效治疗试剂治疗的动物的胸膜下区域的纤维增殖和微型蜂巢样损伤减少了。

尽管已经证明静脉注射给予携带 DNA 的病毒载体引起了在肺部的

表达(Border, W. A. 等 Nature 360: 361 (1992)，但是充分表达被证明只有通过气管内给药 (Shimizukawa, M. 等 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284 : L526 (2003))。期望向处于麻醉状态的气管直接注射溶于无菌盐水中的病毒能够得到最好的结果，因为这是被证明在病毒基因送递到肺的小鼠模型中有效的方法。如之前所探讨的，重组腺伴随病毒是治疗人体疾病最具吸引力的载体，因为 AAV 不会激活细胞介导的免疫，能转导分裂的和未分裂的细胞，驱动长期表达并且在没有共感染辅助病毒的情况下是复制缺陷的。要实现期望蛋白质在人患者肺中的治疗有效的表达，合适的人剂量可以从小鼠中的最佳剂量来估计，后者当经气管内途径给药时发现 30μl 无菌盐水中含有 10^9 感染单位 (Shimizukawa, M. 等 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284: L526 (2003))。由于人肺是小鼠肺质量的大约 5000 倍，合适的起始剂量大约是 $5xl0^{12}$ 感染单位，直接经气管内注射给药。要确定对人的治疗的疗效，可对人肺进行 X 光或 CAT 扫描以确定异常瘢痕形成，优选的测定人肺纤维化疾病进展的显影方案是 HRCT (Muller, N. L. 等 Radiology 165: 731 (1987))。疾病的稳定表明治疗有效，而疾病的进展表明需要额外给予试剂。

实施例 10

心血管应用：使用心肌纤维化的大鼠模型

心肌纤维化的大鼠模型已经由 Kuwahara 和他的合作者们描述过 (Kuwahara, F. 等 Circulation 106: 130 (2002)，在此完整引入作为参考)，据认为它反映了人体心脏舒张的心脏功能失调和最终的衰竭。据信在这个大鼠模型中的成功治疗表征了对人患者的成功治疗干预。在这个模型中，在大鼠中诱导心肌纤维化并送递治疗试剂。然后检查心肌纤维化的进展以确定要筛选的和要确定剂量的治疗试剂的疗效水平。平均动脉压上升是由戊巴比妥（50 mg/kg 腹膜内注射）麻醉的 8 周龄的雄性 Wistar 大鼠的肾上腺腹部主动脉收缩引起的。主动脉收缩 7 天后，测试动物的左心室肥大逐渐增加。将治疗试剂通过静脉注射到骨骼肌中或通过冠状内给药提供给大鼠。在没有接受有效治疗试剂的动物中观察到了心肌纤维化、I 型和 III 型胶原的诱导、成纤维细胞和肌成纤维细胞的增殖，但是在接受了有效治疗试剂的动物中未观察到。可进一步用超声心动图显象和血液动力学研究来检查治疗试剂的

疗效。

将基因体内送递到成人肌细胞已经通过注射质粒 DNA 来证实，但是受限于转导和表达的低效率 (Lin, H.等 Circulation 82 : 2217 (1990))。经腺病毒的 DNA 病毒送递已经在啮齿类动物中成功地证实了，并以高 10-50 倍的表达持续达 1 个月，但是在那以前是更低水平的(Guzman, R. J.等 Circ Res 73: 1202 (1993); Kass-Eisler, A. 等 Proc Natl Acad Sci 90: 11498 (1993))。将基因送递到人心脏作为治疗方式的优选方法是直接经冠状内给药(Guzman, R. J. Circ Res 73: 1202 (1993))，其源自在啮齿动物心脏中的成功证明。腺伴随病毒是优选的送递载体，因为它产生了长期表达并且不会引起明显的细胞介导的免疫反应(Chirmule, N. 等 Hum Gen Ther 10: 259 (1999); Chu, D.等 J Thor Card Surg 126: 671 (2003))。病毒送递到心脏中已经通过直接肌内注射和将病毒注入冠状动脉中而被证实了(Muhlhauser, J.等 Gene Ther 3: 145 (1996))。已经通过如下的直接心肌注射实现了 DNA 病毒送递给人：在离心肌患病区域 1-1.5cm 的部位进行 10 次注射，每次注射包括溶于 100μl 无菌盐水的 $4x10^8$ 到 $4x10^{12}$ 感染单位(Rosengart, T. K. 等 Circulation 100: 468 (1999))。因此优选的治疗如 Rosengart 描述的一样，利用携带我们所感兴趣的基因（例如编码 AHSG 的基因）的 AAV 载体。治疗的成功是通过如常规理解的通常的心肌纤维化人体临床标志来确定的。

实施例 11

当提供 AHSG 作为治疗时减少了癌细胞的增殖。

用于确定疗法抑制癌细胞生长的能力的适当模型是将待测试的疗法提供给已经接受了皮下注射 Lewis 肺癌(LLC)细胞的 C57BL 小鼠，然后测定所得肿瘤随时间的生长(Kimura, Y.等 Planta Med 70: 211 (2004))。当疗法提供给皮下注射了 LLC 细胞的 C57BL 小鼠时抑制肿瘤生长的话，该疗法就被认为是治疗人癌症患者的有前景的疗法。

通过用商业获得的 pcDNA3 载体转染将 AHSG DNA 提供给 LLC 细胞。含有 AHSG 的 pcDNA3 载体(pcDNA-AHSG)的构建使用标准重组 DNA 技术进行。根据厂商手册用 Superfect 试剂来改善转染到 LLC 细胞中的效率(Qiagen NV, KJ Venlo, The Netherlands)。作为对照，不含 AHSG DNA 的 pcDNA3 载体被转染到 LLC 细胞的对照培养基中。

用浓度为 600μg/mL 的 G418 对转染的 LLC 细胞选择 2 周，之后挑选克隆，在培养基中扩展并保存在含有 5% DMSO 的液氮里。分离到两个转染 pcDNA3 的 LLC 细胞的克隆(C1 和 C2)，也分离到两个转染 pcDNA-AHSG 的 LLC 细胞的克隆(A1 和 A2)。用 RT-PCR 分析 Al、A2、Cl 和 C2 克隆的 AHSG 表达，接着凝胶电泳，如图 9 所示。为确保从转染的 LLC 细胞分离 RNA 的一致，也进行了甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)的 RT-PCR。

将 $5x10^4$ 转染 pcDNA3-AHSG 的 LLC 细胞(克隆 Al)悬浮在 100 μl D-MEM 中，皮下注射到八只 C57BL 小鼠的尾部区域。作为对照，将 $5x10^4$ 转染不含 AHSG 的 pcDNA3 的 LLC 细胞(克隆 C1)悬浮在 100 μl D-MEM 中，皮下注射到两只 C57BL 小鼠的尾部区域。用卡钳在第 0、10、14 和 20 天时确定注射部位的肿瘤生长的进展。在第 0、10、14 和 20 天时的平均肿瘤大小示于图 10 中。对照小鼠（含有 pcDNA3 但不含 AHSG 基因）在第 20 天的平均肿瘤大小为 12.15 mm +/-0.15 mm，如图 11 所示。接受了转染 pcDNA-AHSG 的 LLC 细胞的小鼠在第 20 天的平均肿瘤大小为 2.6 mm +/-2.6 mm，如图 11 所示。这些结果证明 AHSG 对癌症治疗是治疗有益的。

尽管以上公开内容描述并阐明了本发明的各种实施方案，但要理解的是本发明不限于这些特定的实施方案。本领域技术人员将立即想到许多变化和更改。为完整定义本发明的范围，参考所附的权利要求。

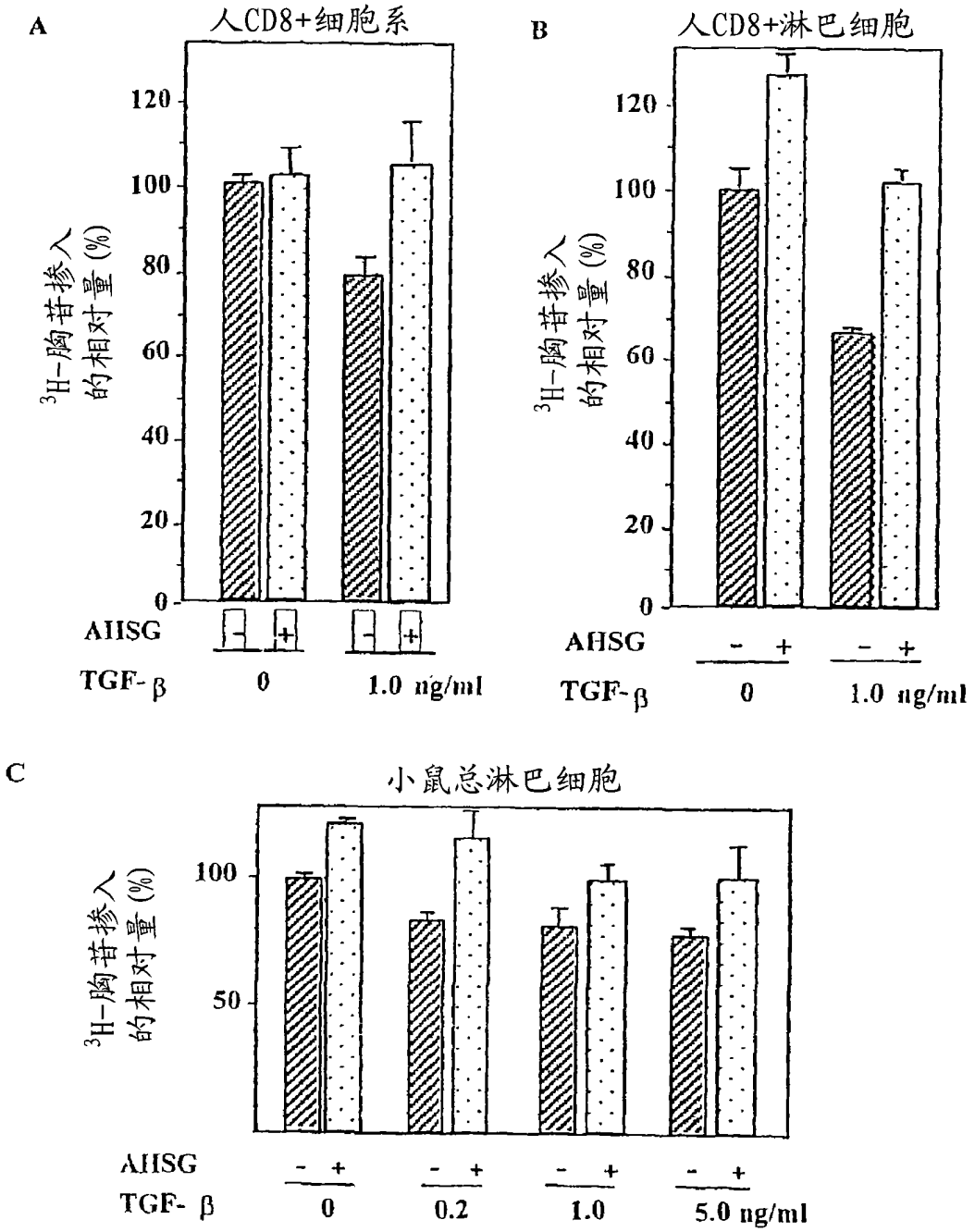

A
人CD8+细胞系
^{3}H-胸苷掺入的相对量(%)
120
100
80
60
40
20
0
AHSG
TGF-β
0
1.0 ng/ml
B
人CD8+淋巴细胞
^{3}H-胸苷掺入的相对量(%)
120
100
80
60
40
20
0
AHSG
- + - +
TGF-β
0
1.0 ng/ml
C
小鼠总淋巴细胞
^{3}H-胸苷掺入的相对量(%)
100
50
AHSG
- + - + - + - +
TGF-β
0
0.2
1.0
5.0 ng/ml

图 1

A
3H-胸苷掺入的相对量
TGF-β
AHSG
LacZ
对照
B
3H-胸苷掺入的相对量
AAV-AIISG
AAV-LacZ
TGF-β (ng/ml)
C
LacZ
AIISG
M
2
2
4
10
15
30 天
AIISG
GAPDH
D
b-半乳糖苷酶的相对活性
感染AAV-lacZ后的天数

图 2

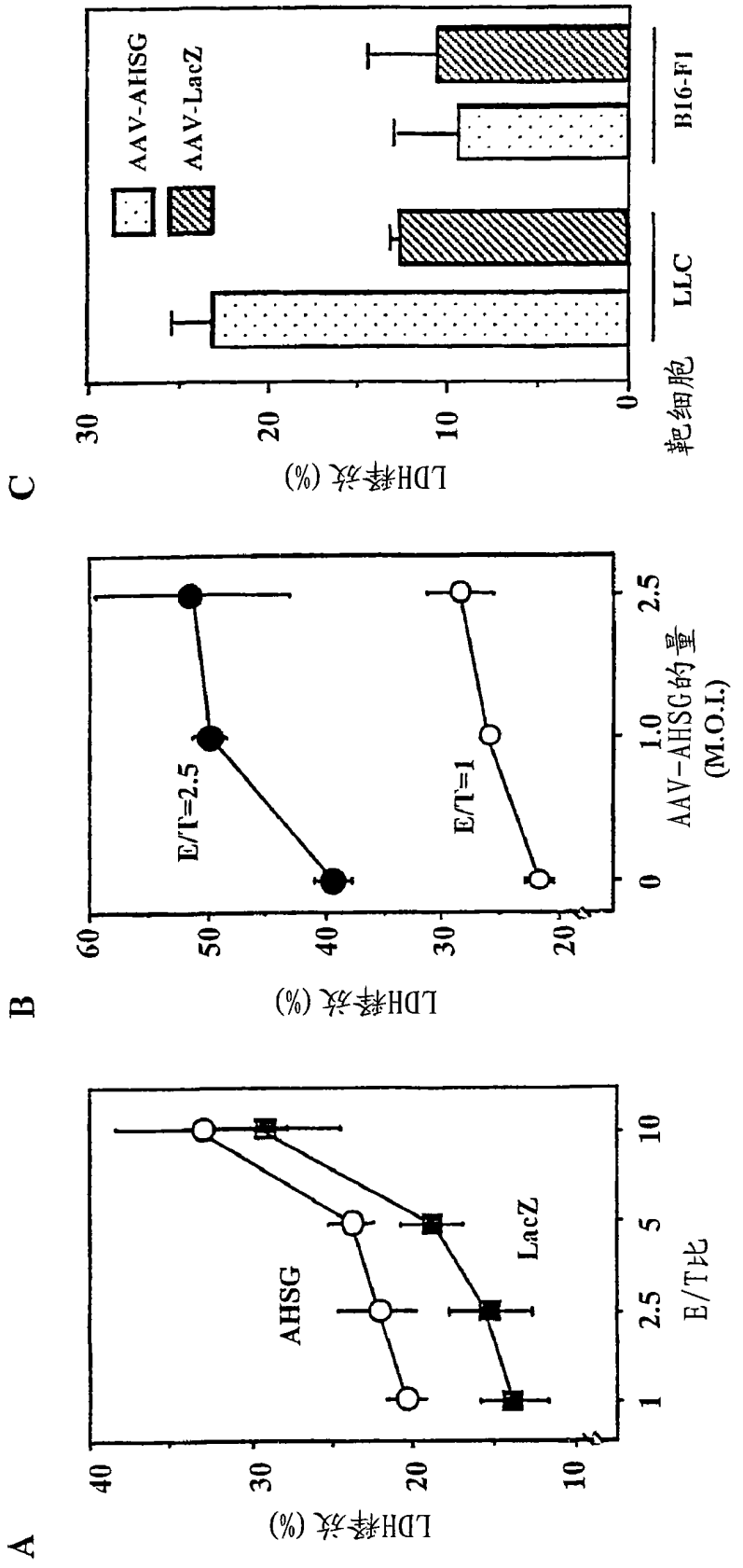

A
LDH释放 (%)
40
30
20
10
AHSG
LacZ
1
2.5
5
10
E/T比
B
LDH释放 (%)
60
50
40
30
20
E/T=2.5
E/T=1
0
1.0
2.5
AAV-AHSG的量
(M.O.I.)
C
LDH释放 (%)
30
20
10
0
AAV-AHSG
AAV-LacZ
靶细胞
LLC
B16-F1

图 3

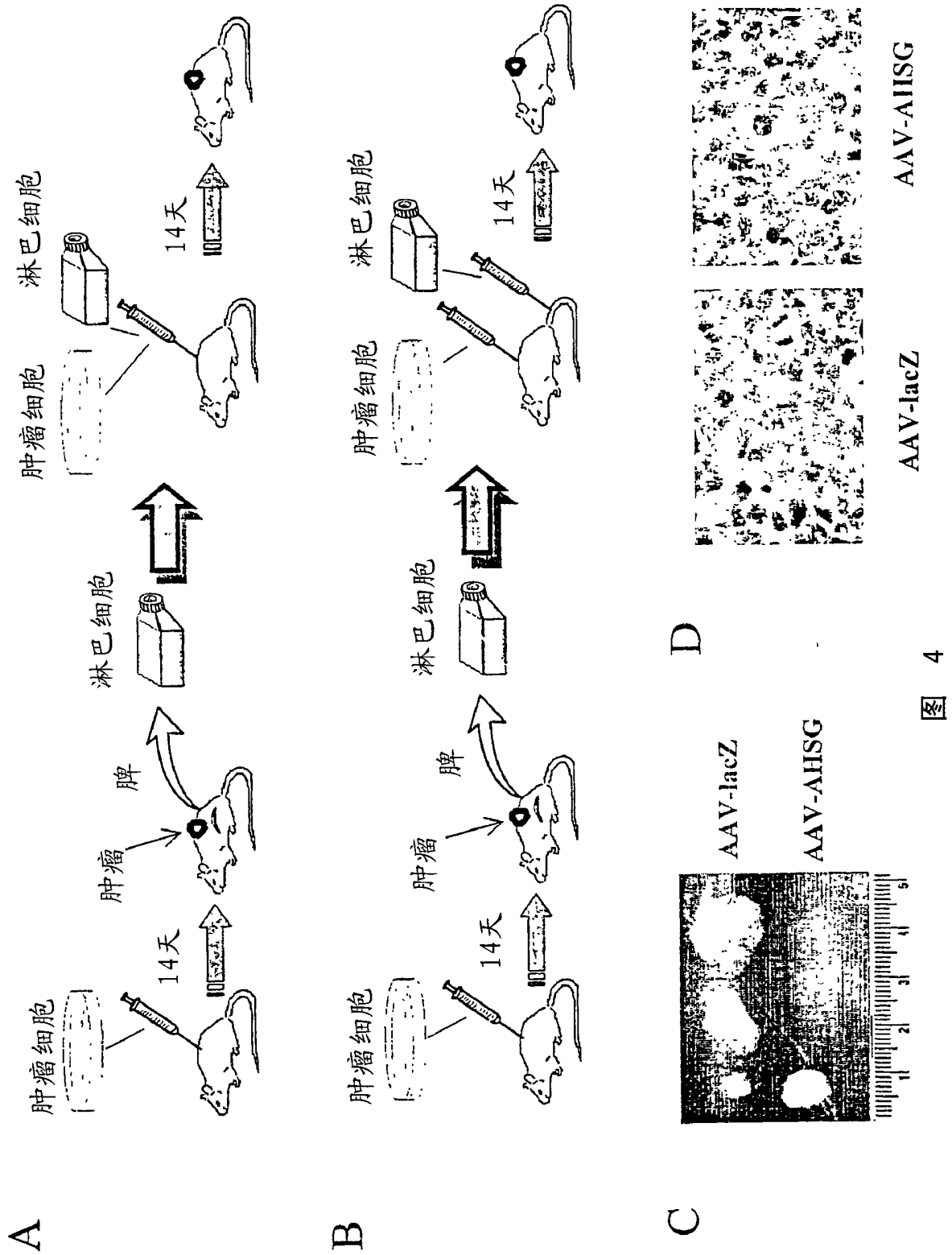

A
肿瘤细胞
14天
肿瘤
脾
淋巴细胞
肿瘤细胞
淋巴细胞
14天
B
肿瘤细胞
14天
肿瘤
脾
淋巴细胞
肿瘤细胞
淋巴细胞
14天
C
AAV-lacZ
AAV-AHSG
D
AAV-lacZ
AAV-AIISG

图 4

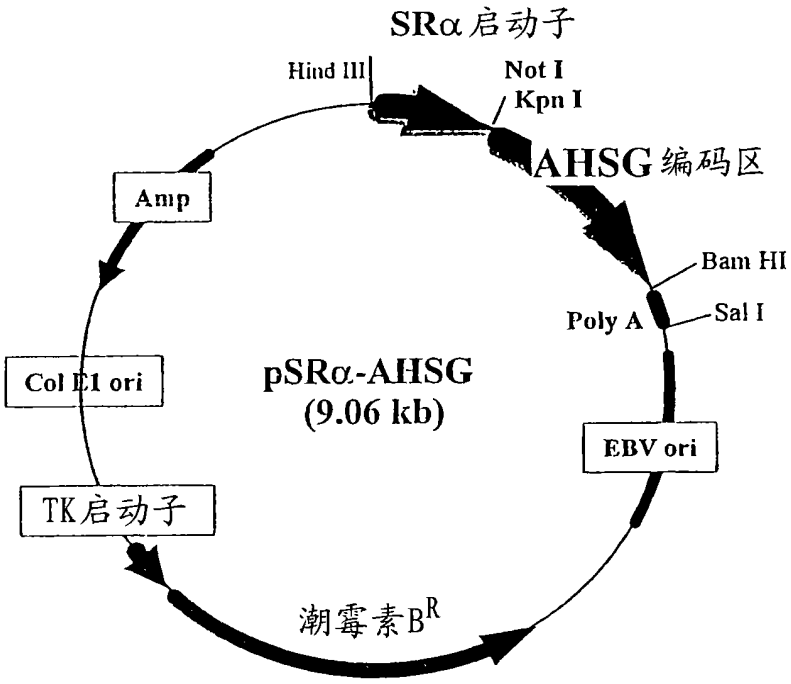

SRα启动子
Hind III
Not I
Kpn I
AHSG编码区
Amp
Bam HI
Poly A
Sal I
Col E1 ori
pSRα-AHSG
(9.06 kb)
EBV ori
TK启动子
潮霉素B^R

图 5

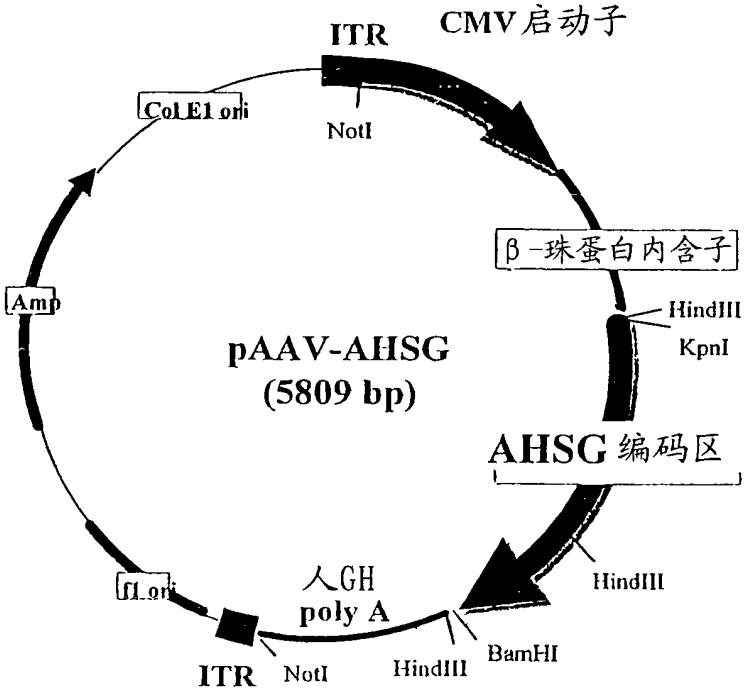

ITR
CMV启动子
ColE1 ori
NotI
β-珠蛋白内含子
HindIII
KpnI
Amp
pAAV-AHSG
(5809 bp)
AHSG 编码区
HindIII
人GH
poly A
f1 ori
ITR
NotI
HindIII
BamHI

图 6

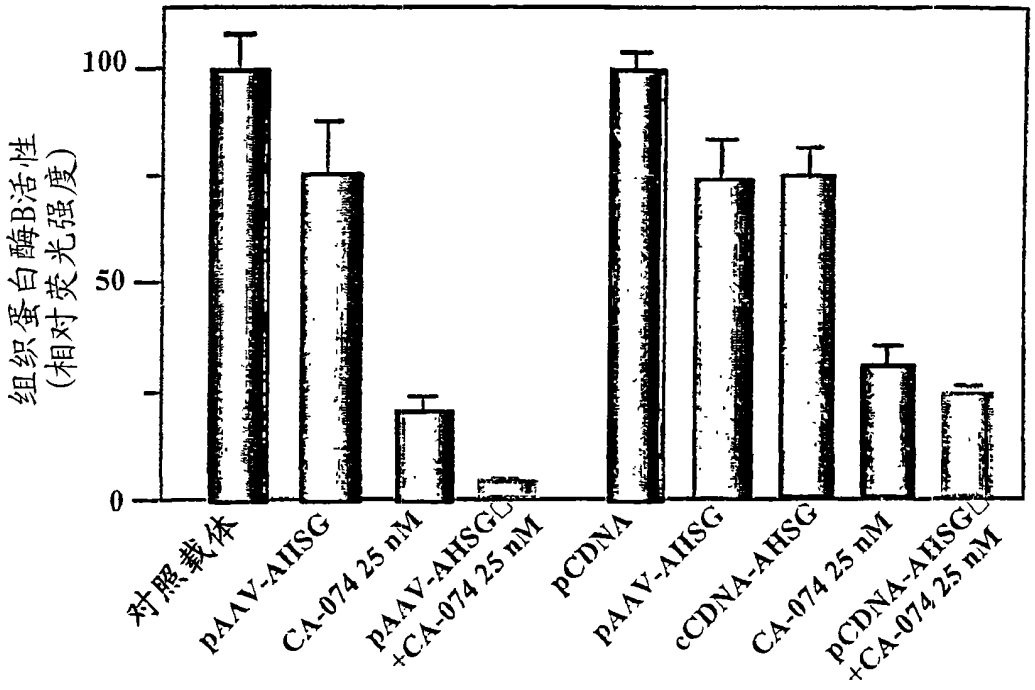

组织蛋白酶B活性
(相对荧光强度)
100
50
0
对照载体
pAAV-AHSG
CA-074 25 nM
pAAV-AHSG
+CA-074 25 nM
pCDNA
pAAV-AHSG
cCDNA-AHSG
CA-074 25 nM
pCDNA-AHSG
+CA-074 25 nM

图 7

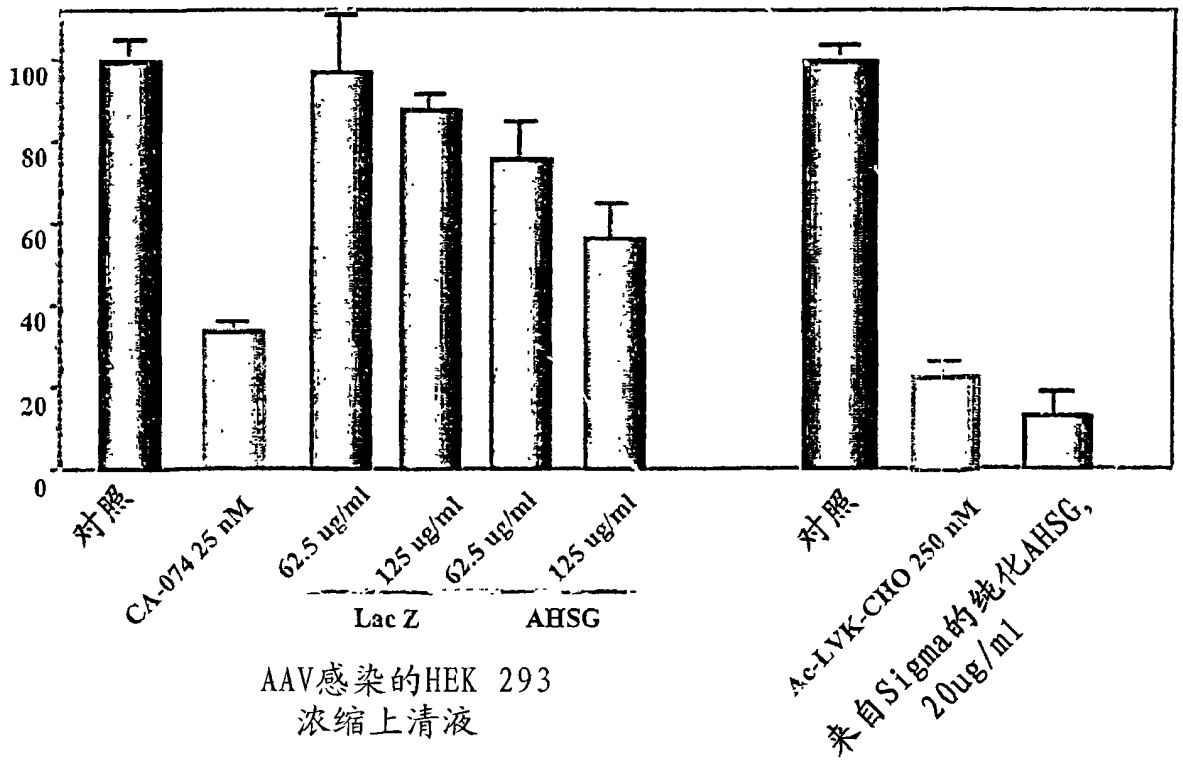

100
80
60
40
20
0
对照
CA-074 25 nM
62.5 ug/ml
125 ug/ml
62.5 ug/ml
125 ug/ml
Lac Z
AHSG
对照
Ac-LVK-CHO 250 nM
来自Sigma的纯化AHSG,
20ug/ml
AAV感染的HEK 293
浓缩上清液

图 8

RT-PCR结果,显示了AHSG在G418选择的LLC克隆中的表达,
所述克隆是用pCDNA-AHSG转染的

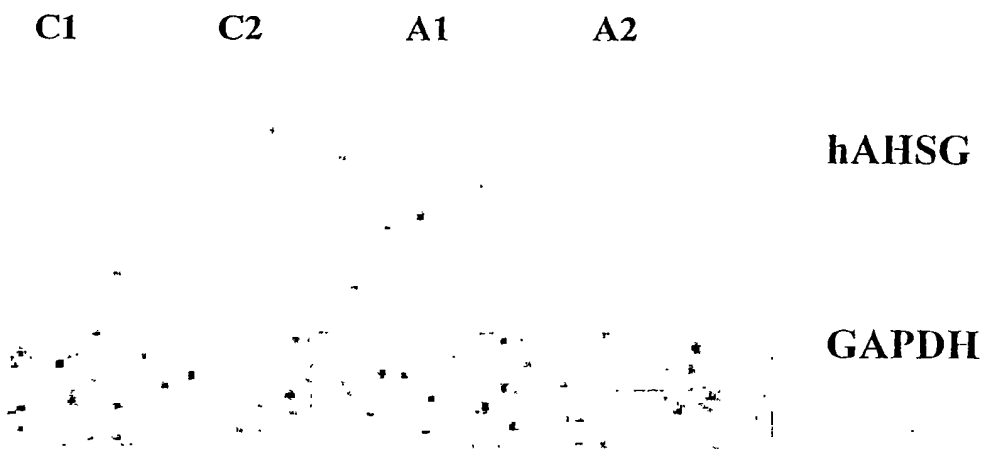


图 9

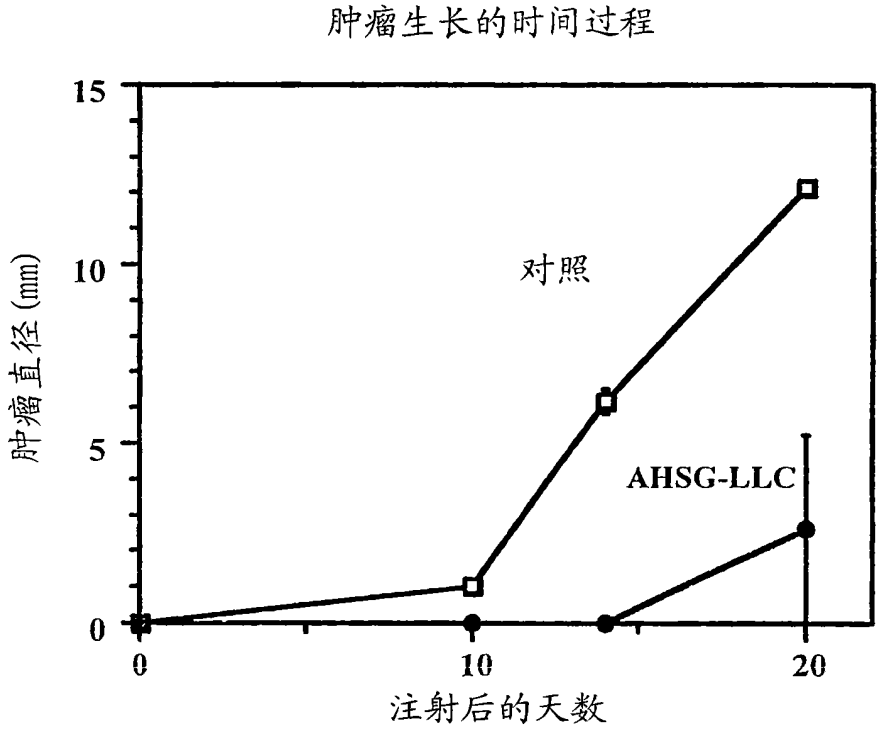


图 10

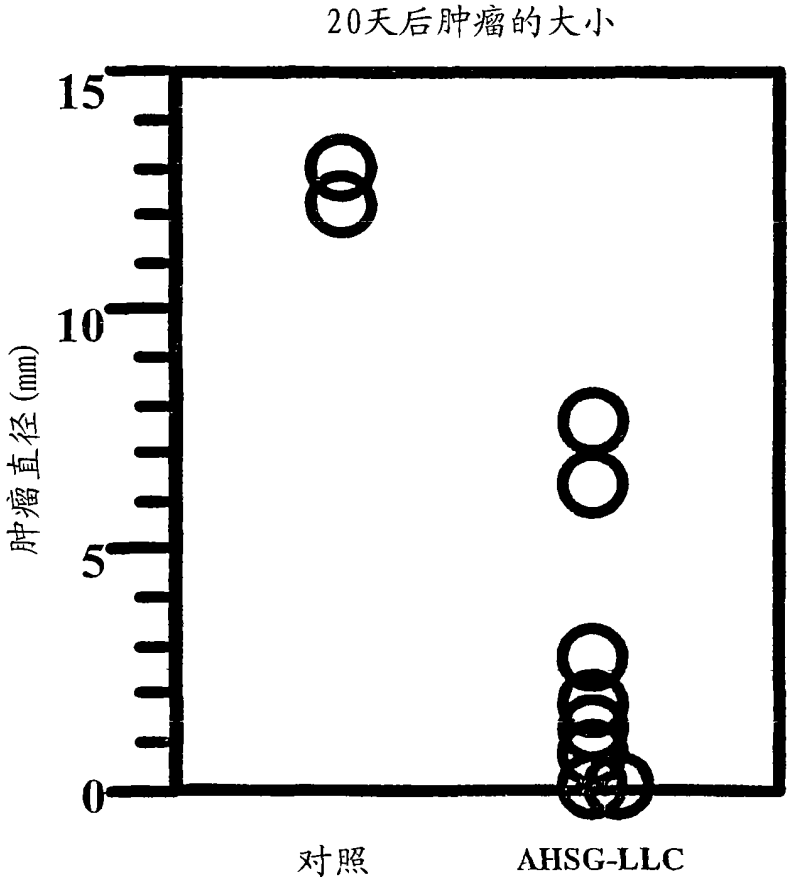


图 11