

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910207728.0

[51] Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月31日

[11] 公开号 CN 101683533A

[22] 申请日 1996.2.27

[21] 申请号 200910207728.0

分案原申请号 96190363.5

[30] 优先权

[32] 1995. 2. 28 [33] US [31] 08/396,207

[32] 1995. 6. 7 [33] US [31] 08/485,472

[71] 申请人 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

弗兰克·J·乔达诺

沃尔夫冈·H·迪尔曼

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 罗天乐

权利要求书3页 说明书28页 附图6页

[54] 发明名称

基因转移介导的血管形成疗法

[57] 摘要

已插入转移基因的复制缺陷型腺病毒载体可被有效地用于活体内基因疗法，以治疗外周血管疾病和心脏病，包括心肌缺血。载体通过股动脉或冠状动脉内注射，直接注入一支或两支股动脉或冠状动脉(或移植血管)深部，注射量应足以转染目的区域的细胞。

1、经过滤的可注射型腺病毒载体制品，包含：重组腺病毒载体，该载体不含野生型病毒，并包含：

部分腺病毒序列，其中缺失了 E1A/E1B 基因；和
编码血管形成蛋白或肽的转基因，由一种旁侧为部分腺病毒序列的启动子启动；和
药学上可接受的载体。

2、权利要求 1 的制品，其中腺病毒载体通过 0.3 微米滤器进行过滤。

3、根据权利要求 1 的可注射腺病毒载体制品，其中所述血管形成蛋白为 FGF - 5。

4、根据权利要求 1 的可注射腺病毒载体制品，其中所述启动子选自由 CMV 启动子，心肌细胞特异性启动子和肌球蛋白重链启动子组成的组中。

5、含重组载体的病毒贮存液的生产方法，该载体能够在活体内心脏中表达血管形成蛋白或肽，该方法包括以下步骤：

将编码血管形成蛋白或肽的转基因克隆至质粒中，该质粒含有旁侧为复制缺陷型人类腺病毒基因组左侧末端部分腺病毒序列的启动子和多克隆位点；

用该质粒与另一质粒共转染被腺病毒复制必需基因转化过的哺乳动物细胞，后一质粒含有人类腺病毒全部基因组和额外的插入片段，该插入片段使质粒过大，无法被包装，转染后细胞内发生补救重组，重组发生在已插入了转基因的质粒和含有腺病毒全部基因组的质粒之间，所得重组基因组含有转基因，缺少一个或多个复制必需基因，该重组基因组较小，可被包装；

在细胞培养物中鉴别成功的重组子；

在被缺少的复制必需基因转化过的哺乳动物细胞中增殖所得重组子；

纯化增殖的重组子，使其中含重组子载体，不含野生型病毒；和

使纯化重组子通过 0.1 - 0.5 微米的滤器。

6、根据权利要求 5 生产病毒贮存液的方法，其中克隆转基因的质粒为质粒 pAC1 或质粒 ACCMVPLPA。

7、根据权利要求 5 生产病毒贮存液的方法，其中鉴别过程包含如下步

骤:

监视转染细胞是否出现细胞病变效应;

将出现细胞病变效应的细胞培养物的上清液用蛋白酶 K 处理, 随后用酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀;

使用 PCR 鉴别成功的重组子, 所用引物分别与 CMV 启动子和腺病毒序列互补; 和

进行两轮噬斑纯化。

8、根据权利要求 5 生产病毒贮存液的方法, 其中所述纯化过程包括如下步骤:

在被复制必需基因转化过的细胞中增殖所得重组子至效价为 $10^{10} - 10^{12}$ 个病毒粒子;

采用双 CsCl 梯度超离心纯化增殖的重组子; 和

将纯化重组子通过 Sepharose 柱。

9、一种重组载体, 包括:

已插入了转基因的复制缺陷型腺病毒质粒, 它不含 E1A/E1B 序列; 编码 FGF-5 的转基因, 转基因通过与其相连的 CMV 启动子启动。

10、权利要求 9 的载体, 其中所述载体包括与转基因相连的多聚腺苷酸化序列。

11、根据权利要求 9 的重组载体, 其中已插入了转基因的复制缺陷型腺病毒质粒为人类腺病毒 5 型, 它位于 CMV 启动子和 SV40 多聚腺苷酸化信号旁侧, 转基因克隆至其中。

12、根据权利要求 9 的重组载体, 其中含腺病毒全部基因组的质粒含有人类腺病毒 5 全部基因组和载体 pBR322 的部分序列, 该序列中包括氨苄西林抗性基因。

13、根据权利要求 9 的重组载体与含人类腺病毒全部基因组的质粒的联合。

14、一种宿主细胞, 含有权利要求 13 的联合载体。

15、根据权利要求 14 的宿主细胞, 其中所述的细胞为人 293 细胞。

16、获得根据权利要求 9 的重组腺病毒载体的方法, 包括:

用两种质粒共转染被腺病毒早期基因 1 区(E1)转化过的细胞, 一种质粒为已插入了转基因的复制缺陷型腺病毒质粒, 另一种质粒含腺病毒全部基

基因组；和

在被腺病毒早期基因 1 区(E1)转化过的细胞中增殖腺病毒载体,细胞可与共转染步骤中的细胞相同或不同。

基因转移介导的血管形成疗法

本申请是申请日为1996年2月27日,申请号为200310114966.X,发明名称为“基因转移介导的血管形成疗法”的发明申请的分案申请。

可参考的相关申请

本申请为1995年6月7日提交的美国申请流水号08/485,472的部分继续申请,而后者为1995年2月28日提交的美国申请流水号08/396,207的部分继续申请。

关于官方资助研究的声明

本发明在政府资助下进行,资助号为HL 0281201和HL 1768218,拨款来自国立卫生研究所。政府拥有本发明某些权利。

技术领域

本发明涉及基因疗法,更确切地说,涉及病毒介导的基因疗法和其他形式的基因疗法以及可用于导入所需基因的某些腺病毒构建物(constructs)。更具体地说,本发明涉及腺病毒介导的基因转送,可用于促进心脏中血管形成,还涉及到使用这些媒介体对外周血管疾病和心肌缺血等心脏病进行治疗的方法。

背景技术

据美国心脏协会报道(1995年统计学增刊),在美国,大约有六千万成年人患有心血管疾病,其中一千一百万患有冠状动脉性心脏病,心血管疾病每年大约造成一百万美国人死亡,超过所有死亡人数的40%。1995年,一百五十万美国成年人被诊断为心绞痛,经历过短时心肌缺血导致的胸痛。在美国,每年大约有三十五万例初发心绞痛。

当心肌血液供应不足,造成心肌必需的氧和营养物质供应缺乏时,会发生心肌缺血。心肌缺血最常见的原因是动脉粥样硬化,这会导致供应心肌血液的血管(冠状动脉)阻塞。现在的治疗方法包括药物治疗。冠状动脉旁路成形术和采用气囊血管成形术等技术进行经皮血管再造。标准药物治疗法基于以下策略:增加心肌的供血量或者降低心肌对氧和营养物质的需求。增加心肌的供血量可用钙离子通道阻断剂或硝酸甘油等药物达到,这些药

物被认为通过舒张动脉管壁平滑肌，增加病变动脉的直径。降低心肌对氧和营养物质需求可通过如下方法达到：使用如动脉血管舒张药降低心脏血液动力负荷，或使用如 β -肾上腺素能受体拮抗剂降低心脏在既定血液动力负荷下的收缩反应。缺血性心脏病的手术疗法多采用策略性放置的旁路移植物(通常为隐静脉或哺乳动物体内动脉移植物)使病变动脉部分形成旁路。经皮血管再造系采用导管降低病变冠状动脉的狭窄度。使用上述策略都是为了减少心肌缺血的次数或使之不再发生，但都存在着一些局限。

已有文献报道，通过直接注射血管形成蛋白或肽，在心脏中形成新血管，以治疗心肌缺血。成纤维细胞生长因子(FGF)家族的一些成员(即酸性成纤维细胞生长因子，aFGF；碱性成纤维细胞生长因子，bFGF；成纤维细胞生长因子-5，FGF-5和其它因子)已被用于调控生长发育过程中的血管形成。例如，最近的一篇报道主要探讨了aFGF蛋白在促进成年动物血管形成中的作用。该报道称，包被了胶原蛋白的基质中的aFGF蛋白置于成年大鼠的腹膜腔中，形成血管化良好的正常灌流结构(Thompson, et al, PNAS, 86: 7928-7932, 1989)。另据报道，在成年犬冠状动脉闭塞期间，向冠状动脉中注入bFGF蛋白，会减少心肌机能障碍的发生，减少心肌梗塞，增加危险区域(bed)的血管分布(Yanagisawa - Miwa, et al., Science, 257: 1401-1403, 1992)。在心肌缺血的动物模型中使用bFGF蛋白也有类似结果报道(Harada, et al., J. Clin. Invest., 94: 623-630, 1994, Unger et al., Am. J. Physiol., 266: H1588-H1595, 1994)。

然而，采用这些蛋白达到血管形成必需有重复的或长期的蛋白供给，这限制了这些刺激血管形成的蛋白在临床处置中的应用。换言之，在人体中的成功的治疗需要持续和长期地注入一种或多种这些血管形成肽或蛋白，这些肽或蛋白本身价格昂贵，还必需通过置于冠状动脉内的导管将其导入，这进一步增加了治疗的费用和难度。

近来，许多出版物主张使用基因转移治疗或预防疾病，包括心脏病。可参见Mazur等的《冠状动脉再狭窄和基因疗法》(Molecular and Cellular Pharmacology, 21: 104-111, 1994); French的《基因转移和心血管功能失调》(Herz, 18: 222-229, 1993); Williams的《缺血性心脏病的基因疗法展望》(American Journal of Medical Sciences, 306: 129-136, 1993), Schneicler和French的《腺病毒的出现：心血管病的基因疗法》

(Circulation, 88: 1937 - 1942, 1993)。其它出版物包括 Leiden 等的国际专利申请号 PCT/US 93/11133, 名称为《以腺病毒为介导将基因转移至心脏和血管平滑肌》, 该申请报道了应用以腺病毒为介导的转移基因方法调控心血管平滑肌细胞的功能。Leiden 等宣称, 含有编码基因产物的 DNA 序列的重组腺病毒, 可被转移至心脏或血管平滑肌细胞中, 这种细胞可持续至基因产物得到表达。根据 Leiden 等的报道, 可通过改变基因转录和如多聚核苷酸或多肽等基因转录产物的生产来调控肌细胞功能。Leiden 等报道这种多聚核苷酸或多肽与心脏或平滑肌细胞发生反应, 从而调控细胞功能。Leiden 等宣称, 无论细胞在体外、原位还是体内, 这种调控均可完成。Leiden 等人描述了一种基因转移方法, 包括将已插入一种基因产物的复制缺陷型腺病毒 5 型 (带有 CMV 启动子), 与携有完整的腺病毒基因组的质粒, 如 JM 17 质粒一起, 共转染 293 细胞, 以获得含有基因产物的腺病毒构建物, 在 293 细胞中增殖所得腺病毒构建物; 将载体直接注入细胞, 使腺病毒构建物转移至心肌和血管平滑肌细胞。

使用腺病毒载体成功地向心脏进行基因转移, 存在一些妨碍因素。例如, 转移基因插入迅速分裂的细胞群体实际上会缩短转移基因表达的时间。这类细胞的实例包括: 内皮细胞, 它们组成所有血管的内层, 和成纤维细胞, 它们分布于整个心脏。定向导入转移基因, 以使只有目的细胞接受和表达转移基因, 转移基因不会全身分布, 也是相当重要的。如果不能做到这样, 转移基因就会全身表达, 随之而来会引起一些问题。例如, 已经证实, 以腺病毒为介导在肝脏中进行基因转移, 可引起炎症性浸润 (Yang, et al., Proc, Natl, Acad. Sci (U.S.A), 91: 4407, 1994)。最后, 关于以腺病毒为介导转入 FGF - 5 基因以在体内刺激血管形成, 我们已发现注入的病毒物质, 能引起严重的、通常是危及生命的心律失常。

本发明的说明和权利要求注意并克服了现有技术存在的这些和其它问题。

发明内容

本发明涉及一种基因疗法, 可用于治疗心脏病 (优选用于治疗心肌缺血) 和外周血管疾病。本发明的目的之一是提供一种治疗心脏病的方法, 该方法包括将含有所说血管形成蛋白或肽的基因的载体构建物定向导入至心

脏，在连续的期间内使心肌中持续产生显著治疗量的血管形成蛋白或肽。血管形成蛋白或肽优选 FGF-5，载体构建物优选复制缺陷型的腺病毒构建物，载体导入采用冠状动脉内注射，优选导管深插入(通常至少约 1 cm)一支或两支冠状动脉或一支或多支隐静脉或哺乳动物体内动脉移植物内。

另一方面，本发明提供了一种治疗心肌缺血病人的心脏病的方法。该方法包括导入已插入了转移基因的复制缺陷型腺病毒载体至病人心肌中，以转染受到影响的心肌细胞。转移方法采用冠状动脉内注射，优选载体的单次注射，直接注入一支或两支冠状动脉(或移植物)内。所述载体含有转移基因，该基因编码血管形成蛋白或肽，如 FGF-5、aFGF、bFGF 或 VEGF(血管内皮生长因子)，载体还能在心脏中表达转移基因，从而促进心肌受作用区域的血管形成。将不含野生型病毒的载体贮存液注入一支或两支冠状动脉(或移植物)腔内深部，优选同时注入左右两支冠状动脉(或移植物)，注入量优选光密度测定法测定为 $10^7 - 10^{13}$ 个病毒粒子(更优选 $10^9 - 10^{11}$ 个病毒粒子)，这样就有可能在受作用的心肌中用编码血管形成蛋白或肽的基因局部转染既定数量的细胞，尤其是心肌细胞，从而使基因转移的治疗效果最好，最大限度减少心外部位不必要的血管形成和对病毒蛋白产生炎症反应的可能性。例如，如果使用心室肌细胞特异性启动子，就能更确定地使表达局限于心肌细胞，以避免在例如视网膜等心外组织中形成血管的潜在有害作用。

另一方面，本发明提供了经过滤的、可注射腺病毒载体制品，包括重组腺病毒载体，优选最终病毒效价(titer)为 $10^7 - 10^{13}$ 个病毒粒子的载体。该载体不含野生型病毒，它包括部分腺病毒序列，该序列缺失了一个或多个腺病毒复制必需基因，如 E1A/E1B 基因；载体也包括转移基因，转移基因编码血管形成蛋白或肽，如促进血管形成的 aFGF、bFGF 和 VEGF，它通过旁侧为部分腺病毒序列的启动子启动；该载体还包括药学上可接受的载体。使用这种可注射的腺病毒载体制品，有可能有效地进行以腺病毒为介导的 FGF-5 基因转移，以临床治疗心肌缺血或外周血管疾病，而无任何不良反应。

再者，本发明提供了一种生产病毒贮存液的方法，所述病毒贮存液中含有能够在活体心肌中表达血管形成蛋白或肽的重组载体。该方法包括如下步骤：克隆转移基因至含有启动子和多克隆位点的质粒中，转移基因优

选编码 FGF-5、aFGF、bFGF 和 VEGF 等血管形成蛋白或肽的基因，启动子和多克隆位点旁侧为人类腺病毒 5 基因组的左侧末端部分腺病毒序列，该序列中缺失了一个或多个腺病毒复制必需基因，如 E1A/E1B 基因；另一种质粒含有人类腺病毒 5 全部基因组和额外的插入片段—该插入片段使质粒过大而无法被包装；用上述两种质粒共转染哺乳动物细胞，该细胞被载体中缺少的复制必需基因转化过。在被转染的细胞内发生补救重组，重组发生在已插入了转移基因的质粒和含有腺病毒全部基因组的质粒之间，从而产生一个重组基因组，该重组基因组含有不具备复制必需基因的转移基因，所说重组基因组足够小因而能被包装；在细胞培养物中鉴别成功的重组子；在被所缺少的复制必需基因转化过的哺乳动物细胞中增殖所得重组子；纯化增殖的重组子以使其中只含重组载体不含野生型病毒，将纯化载体通过滤器过滤，优选 0.1-0.5 微米滤器，更优选 0.3 微米滤器。

另外，表达血管形成蛋白或肽的重组腺病毒，可通过导管导入一侧或双侧股动脉近端部分，从而使基因转入由股动脉供血的骨骼肌细胞，这将会提供促进血管形成的刺激物，促使腿部骨骼肌中形成血管，从而治疗以腿部肌肉供血不足为特征的外周血管疾病。

还需指出，除心脏和腿部之外，本发明提供的以腺病毒为载体的转移基因导入和表达也可用于其它器官和组织，以定点方式将基因转移至目的器官和组织。因而由本发明可期待以腺病毒为介导将基因定向转移至任何组织或器官，只要该组织或器官由特定动脉供血。例如，通过对目的动脉腔内的深部注射(如约为 1 cm)，可导入含有转移基因的腺病毒，这些动脉可以是一支或多支向肾脏供血的肾动脉或者是肝脏的肝动脉，这样可以使基因转移局限于这些器官。这种方法的应用极其广泛，包括血管形成、器官或组织特异性肿瘤的治疗、遗传性代谢病的治疗等。根据靶组织或器官的情况、病人的动脉解剖学和本领域的其它已知因素，注射深度可以改变。选择注射深度和部位优选使局部而非全身导入重组腺病毒。本领域的技术人员无需过多试验即可确定该深度。

因此，本发明涉及刺激心肌缺血的病人冠状动脉并行血管发育的方法，包括通过冠状动脉内注射直接注入一支或两支冠状动脉将复制缺陷型腺病毒载体导入病人心肌中，所说载体含有编码血管形成蛋白或肽的转移基因，

并能够在心肌中表达转移基因，从而促进冠状动脉并行血管发育。

如上所述的方法，其中载体的导入采用单次注射。

如上所述的方法，其中通过注射导入的腺病毒载体粒子约为 $10^7 \sim 10^{13}$ 个。

如上所述的方法，其中通过注射导入的腺病毒载体粒子约为 $10^9 \sim 10^{12}$ 个。

如上所述的方法，其中通过注射导入的腺病毒载体粒子约为 10^{11} 个。

如上所述治疗心脏病的方法，其中所说转移基因由载体所含的 CMV 启动子启动。

如上所述治疗心脏病的方法，其中所说转移基因由载体所含的心室肌细胞特异性启动子启动。

如上所述治疗心脏病的方法，其中所说心室肌细胞特异性启动子含有心室肌浆球蛋白轻链-2的序列。

如上所述治疗心脏病的方法，其中所说心室肌细胞特异性启动子含有肌浆球蛋白重链启动子的序列。

如上所述治疗心脏病的方法，其中所说血管形成蛋白或肽选自由 aFGF、bFGF、FGF-5 和 VEGF 组成的组中。

如上所述方法，其中所说血管形成蛋白为 FGF-5。

如上所述的方法，其中所说血管形成蛋白为 aFGF。

如上所述的方法，其中所说血管形成蛋白为 bFGF。

如上所述的方法，其中所说血管形成肽为 VEGF。

如上所述治疗心脏病的方法，其中所说冠状动脉内注射系以导管插入冠状动脉左支或右支腔内约 1 cm。

如上所述治疗心脏病的方法，其中所说冠状动脉内注射系以导管插入一支冠状动脉和一支隐静脉移植物和/或一支哺乳动物深部动脉移植物腔内约 1 cm。

本发明还涉及经过滤的可注射腺病毒载体制品，包含：重组腺病毒载体，该载体不含野生型病毒，并包含：

部分腺病毒序列，其中缺失了 E1A/E1B 基因；和

编码血管形成蛋白或肽的转移基因，由旁侧为部分腺病毒序列的启动子启动；和

药学上可接受的载体。

如上所述的制品，其中腺病毒载体通过 0.3 微米滤器进行过滤。

如上所述的可注射腺病毒载体制品，其中所说血管形成蛋白为 FGF - 5。

如上所述的可注射腺病毒载体制品，其中所说启动子选自由 CMV 启动子，心肌细胞特异性启动子和肌浆球蛋白重链启动子组成的组中。

本发明还涉及含重组载体的病毒贮存液的生产方法，该载体能够在活体内心脏中表达血管形成蛋白或肽，该方法包括以下步骤：

将编码血管形成蛋白或肽的转移基因克隆至质粒中，该质粒含有旁侧为复制缺陷型人类腺病毒基因组左侧末端部分腺病毒序列的启动子和多克隆位点；

用该质粒与另一质粒共转染被腺病毒复制必需基因转化过的哺乳动物细胞，后一质粒含有腺病毒全部基因组和额外的插入片段，该插入片段使质粒过大，无法被包装，转染后细胞内发生补救重组，重组发生在已插入了转移基因的质粒和含有腺病毒全部基因组的质粒之间，所得重组基因组含有转移基因，缺少一个或多个复制必需基因，该重组基因组较小，可被包装；

在细胞培养物中鉴别成功的重组子；

在被缺少的复制必需基因转化过的哺乳动物细胞中增殖所得重组子；

纯化增殖的重组子，使其中含重组子载体，不含野生型病毒；和

使纯化重组子通过 0.1 - 0.5 微米的滤器。

如上所述生产病毒贮存液的方法，其中克隆转移基因的质粒为质粒 pAC1 或质粒 ACCMVPLPA。

如上所述生产病毒贮存液的方法，其中鉴别过程包含如下步骤：

监视转染细胞是否出现细胞病变效应；

将出现细胞病变效应的细胞培养物的上清液用蛋白酶 K 处理，随后用酚/氯仿抽提，乙醇沉淀；

使用 PCR 鉴别成功的重组子，所用引物分别与 CMV 启动子和腺病毒序列互补；和

进行两轮噬斑纯化。

如上所述生产病毒贮存液的方法，其中所说纯化过程包括如下步骤：

在被复制必需基因转化过的细胞中增殖所得重组子至效价为 $10^{10} - 10^{12}$

个病毒粒子;

采用双 CsCl 梯度超离心纯化增殖的重组子; 和
将纯化重组子通过 Sepharose 柱。

本发明还涉及一种重组载体, 包括:

已插入了转移基因的复制缺陷型腺病毒质粒, 它不含 E1A/E1B 序列;
编码 FGF-5 的转移基因, 转移基因通过与其相连的 CMV 启动子启动。

如上所述的载体, 其中所说载体包括与转移基因相连的多聚腺苷酸化
序列。

如上所述的重组载体, 其中已插入了转移基因的复制缺陷型腺病毒质
粒为人类腺病毒 5 型, 它位于 CMV 启动子和 SV40 多聚腺苷酸化信号旁侧,
转移基因克隆至其中。

如上所述的重组载体, 其中含腺病毒全部基因组的质粒含有人类腺病
毒 5 全部基因组和载体 pBR322 的部分序列, 该序列中包括氨苄西林抗性基
因。

如上所述的重组载体与含人类腺病毒全部基因组的质粒的联合。

本发明所述的一种宿主细胞, 含有如上所述的联合载体。

如上所述的宿主细胞, 其中所说的细胞为人 293 细胞。

如上所述获得重组腺病毒载体的方法, 包括:

用两种质粒共转染被腺病毒早期基因 1 区 (E1) 转化过的细胞, 一种质
粒为已插入了转移基因的复制缺陷型腺病毒质粒, 另一种质粒含腺病毒全
部基因组; 和

在被腺病毒早期基因 1 区 (E1) 转化过的细胞中增殖腺病毒载体, 细胞
可与共转染步骤中的细胞相同或不同。

本发明还涉及刺激患有缺陷性外周血管疾病的病人血管发育的方法,
包括通过股动脉内注射直接注入一侧或双侧股动脉将复制缺陷型腺病毒载
体导入病人的外周血管系统, 所说载体包括编码血管形成蛋白或肽的转移
基因, 并能够在外周血管系统中表达转移基因, 从而促进外周血管发育。

如上所述的方法, 其中载体的导入采用单次注射。

如上所述的方法, 其中通过注射导入的腺病毒载体粒子约为 10^7 - 10^{13}
个。

如上所述的方法, 其中通过注射导入的腺病毒载体粒子约为 10^9 - 10^{12}

个。

如上所述的方法，其中通过注射导入的腺病毒载体粒子约为 10^{11} 个。

如上所述治疗心脏病的方法，其中血管形成蛋白或肽选自由 aFGF、bFGF、FGF-5 和 VEGF 组成的组中。

本发明还涉及使转移基因导入和表达局限于单个器官或结构的方法，包括通过在向所说的器官或结构供血的动脉内插入导管约 1 cm，注入重组腺病毒。

附图简述

图 1 为通过补救重组构建编码转移基因的腺病毒的示意图。

图 2 显示右心房起搏期间 (HR = 200 bpm) 缺血床壁增厚百分比 (%WTh)，其计算方法如下：在以 lacZ (对照基因) 和 FGF-5 基因进行基因转移前和基因转移后的 14 ± 1 天，测量舒张期末壁厚 (EDWTh) 和收缩期末壁厚 (ESWTh)。局部缺血床功能在转入 FGF-5 基因 ($P = 0.0001$) 之后增加了 2.6 倍。而对照基因转入不影响其功能。

图 3 显示峰对照比 (与血流量有关)，表示为缺血区 (LCx bed) 峰视频密度与室间隔 (IVS) 峰视频密度之比。峰视频密度系来用计算机视频分析程序由视频图像测得，测量在以 lacZ (对照基因) 和 FGF-5 基因进行基因转移前和基因转移后 14 ± 1 天于心房起搏 (200 bpm) 期间进行。缺血床的血流量，在转入 FGF-5 基因 ($P = 0.0018$) 之后较正常值增加了两倍，但转入对照基因后，仍只有正常值的 50%。

图 4 为心肌对照超声波心动图 (未示出) 的图解。白色区域表明反差增强 (血流量增加)，暗色区域表明血流量减少。图 4A 显示正常猪中快速 (acute) LCx 闭合。图 4B 显示转入 lacZ 基因 14 ± 1 天后的情况，图 4C 显示转入 FGF-5 基因 14 ± 1 天后的情况。

图 5 显示毛细血管数与纤维数之比，其定量方法是在转入 FGF-5 和 lacZ 基因后，以显微镜对缺血区和非缺血区进行分析。FGF-5 基因转入后 ($P < 0.038$)，血管形成增加。

图 6 为治疗组动物区域收缩功能的图解。

图 7 为治疗组动物区域心肌血流量的图解。

图 8 为治疗组动物估计血管数的图解。

发明详述

编码血管形成蛋白和肽的转移基因

本发明中可以使用多种蛋白质或肽生长因子。它们能增加心脏(或在外周血管疾病时为骨骼肌)缺血区的心肌流量。当血管形成蛋白或肽得以表达时,例如 aFGF、bFGF 和 FGF-5 为血管形成蛋白或肽的实例。FGF 家族的促血管形成活性,在用蛋白质注入治疗时,已得到了科学的认识(Yanagisawa-Miwa, et al., Science, 257: 1401-1403, 1992, Harada, et al., J. Clin. Invest., 94: 623-630, 1994, Unger, et al., Am. J. Physiol., 266: H1588-H1595, 1994)。VEGF(血管内皮生长因子)可能也能刺激新血管生长,也可使用它的基因。成功地进行基因转移需有基因产物的合成,也需要基因产物由被转染的细胞中分泌出来。根据这种观点,优选编码 FGF-5 的基因,而且其中最好包括编码信号肽的序列,从而保证一旦基因产物得到表达,即能进入心脏(或骨骼肌)间质组织,诱导血管形成。

不依赖于辅助病毒的复制缺陷型人类腺病毒 5 系统

一般而言,目的基因被转移至活体内心脏(或骨骼肌),包括心肌细胞(或骨骼肌细胞)中,就可以使基因编码的蛋白质持续地产生。几种不同的基因转移方法都是适用的,优选不依赖于辅助病毒的复制缺陷型人类腺病毒 5 系统。我们已证实使用该系统只须单次冠状动脉内注射,即可转染体内 60% 以上的心肌细胞(Giordano and Hammond, Clin. Res., 42: 123A, 1994)。在冠状动脉内注射后转染冠状动脉内皮细胞和心肌细胞从而获得高效转染时,非复制型重组腺病毒载体特别有用。同样,在转染外周血管系统的目的细胞时,该载体也特别有用。

基于人类腺病毒 5 的重组腺病毒载体(Virology, 163: 614-617, 1988)缺失了腺病毒基因组中的必需早期基因(通常为 E1A/E1B),因而只有在能提供反式作用的缺失基因产物的相容细胞系中生长时,才能够复制。目的转移基因可被克隆,并在复制缺陷型的被腺病毒感染的组织/细胞中表达以代替缺失的腺病毒基因组序列。尽管基于腺病毒的基因转移不能使转移基因整合进宿主基因组(不到 0.1% 的以腺病毒为载体的转染使转移基因整合进宿主 DNA),因而是稳定的,但腺病毒载体能以高效价增殖并能转染非复

制细胞。尽管转移基因不能传递到子细胞中，但对不分裂的成人骨骼肌和心肌细胞来说，这种转移基因方法是可以接受的。逆转录病毒载体可提供稳定的基因转移，通过假型逆转录病毒现在可获得高效价的逆转录病毒载体 (Burns, et al., Proc. Natl. Acad. Sci (U. S. A), 90: 8033 - 8037, 1993)，但现在的逆转录病毒载体不能有效地转导非复制型细胞 (成人骨骼肌和心肌细胞)。而且，如果短期基因转移是有效的，就没有理由冒着风险使转移基因整合进宿主 DNA 中。确实，我们已发现血管形成蛋白的短时表达足以形成相当数量的血管。对心血管病和外周血管疾病的治疗来说，短时的基因转移即已足够。

人 293 细胞是被腺病毒 E1A/E1B 基因转化过的人胚肾细胞，为典型的有用的相容细胞系。然而，也可使用其它允许复制缺陷型的腺病毒载体在其中增殖的细胞系，包括 HeLa 细胞。

重组腺病毒载体的构建

本发明使用的所有腺病毒载体均可通过补救重组技术构建，该技术由 Graham 在 1988 年的 *Virology* 163 卷 614 - 617 页中介绍过。简单地说，目的转移基因被克隆至穿梭载体中，该载体含启动子、多克隆位点 (pdylinker) 和部分旁侧腺病毒序列，所述序列中缺失了 E1A/E1B 基因。穿梭载体的实例如下：质粒 pAC1 (*Virology* 163: 614 - 617, 1988) (或其类似物)，编码人类腺病毒 5 基因组的左侧末端部分 (*Virology* 163: 614 - 617, 1988)，缺少编码早期蛋白的 E1A/E1B 序列，这两个序列对病毒复制是必需的；质粒 ACCMVPLPA (*J. Biol. Chem.*, 267: 25129 - 25134, 1992)，含有多克隆位点，CMV 启动子和 SV40 多聚腺苷酸化信号，上述结构旁侧为部分腺病毒序列，其中缺失了 E1A/E1B 基因。使用质粒 pAC1 或 ACCMVPLA 可促进克隆过程。另一种质粒含有人类腺病毒 5 的全部基因组，其长度过大，无法被包装。将该质粒与上述穿梭载体共同转染 293 细胞。可用磷酸钙沉淀或脂转染法 (lipofection) 进行共转染 (*Biotechniques*. 15: 868 - 872, 1993)。质粒 JM17 编码人类腺病毒 5 全部基因组和载体 pBR322 的部分序列，包括氨苄西林抗性基因 (4.3 kb)。尽管 JM17 编码病毒粒子成熟必需的全部腺病毒蛋白，但它的长度过大，因而无法被包装 (40 kb，而野生型为 36 kb)。在一小部分共转染细胞中发生补救重组，重组发生在例如质粒 pAC1 等含有

转移基因的穿梭载体和另一质粒之间，该质粒含有人类腺病毒 5 的全部基因组，如 pJM17。重组的结果产生一个重组基因组，其中 E1A/E1B 序列发生了缺失，所述重组基因组含有目的转移基因，但在重组中它丢失了另外的序列，如 pBR322 序列，因而重组基因组小到足以能够被包装(见图 1)。关于上述方法，我们已有成功的结果报道(Giordano, et al., Circulation, 88: 1-139, 1993, and Giordano and Hammond, Clin. Res., 42: 123A, 1994)。用 x-gal 处理时，使用 CMV 启动的编码 β -半乳糖苷酶的腺病毒 HCMVSP1 lacZ，可用来评价基因转移的效率。

使用腺病毒载体进行基因转移的初始模式如上所述，这些载体的优点如下：能够进行高效基因转移(60%以上的靶器官细胞在体内被转染)，容易获得高效价病毒贮存液以及能够使基因转入心肌细胞等不分裂的细胞。

组织特异性启动子

本发明也考虑过不仅使用细胞导向注入，例如将转移基因导入冠状动脉或股动脉，而且考虑过使用组织特异性启动子。例如，将左心室肌浆球蛋白轻链 - Z (MLC_{2v}) 或肌浆球蛋白重链 (MHC) 的组织特异性转录控制序列，与腺病毒构建物内的 FGF - 5 基因等转移基因融合，转移基因表达即局限于心室肌细胞。使用本发明的重组腺病毒系统，已经确定了带有 lacZ 的 MLC_{2v} 和 MHC 启动子决定的基因表达效力和特异性程度。心脏特异性表达已由 lee 等报道过(J. Biol. Chem., 267; 15875-15885, 1992)。MLC_{2v} 启动子由 250 bp 组成。很容易被装入腺病毒 5 包装压缩物。已知肌浆球蛋白重链启动子为活跃的转录启动子。它是另一种理想的可选择的心脏特异性启动子，由不到 300 bp 组成。其他启动子，如肌钙蛋白 - C 启动子，尽管高效并足够小，但组织特异性较差。可以相信，通过使用 MLC_{2v} 或 MHC 启动子并在体内导入转移基因，只有心肌细胞充分表达例如 FGF - 5 等血管形成蛋白(即无心脏内的内皮细胞，平滑肌细胞和成纤维细胞的同时表达)，从而促进血管形成。从基因转移用于治疗临床缺血的可行性来看，局限于心肌细胞的表达也有优越之处。通过局限于心脏的表达，可以避免在视网膜等心外组织形成血管的潜在有害作用，而且，作为心脏中的细胞，心肌细胞可能使转移基因表达持续最长的时间，因为这些细胞不会被迅速代换掉，因而不会象在内皮细胞中那样，基因表达由于细胞有丝分裂和死亡而下降。为上述

目的，现在已有了内皮细胞特异性启动子 (Lee et al., J. Biol. Chem., 265: 10446 - 10450, 1990)。

本发明中，关于心脏病的治疗，现在优选通过冠状动脉内注射将高效价载体定向导入心脏，并转染各种类型的细胞。

腺病毒载体的增殖和纯化

成功的重组载体可根据标准方法进行噬斑 (plaque) 纯化。所得病毒载体在 293 细胞中增殖至效价达到优选范围： $10^{10} - 10^{12}$ 个病毒粒子/ml，所述细胞可提供 E1A 和 E1B 的反式作用。在 80% 汇合时感染细胞，48 小时后收获细胞，经 3 次冻融后，离心收集细胞碎片，采用 CsCl 梯度超离心 (优选双 CsCl 梯度超离心) 纯化病毒。在体内注射之前，采用例如 G₂₅ Sephadex 等 Sepharose 柱经凝胶过滤使病毒贮存液脱盐。所得产物经 0.3 微米滤器过滤，因而减小了冠状动脉内注射未过滤病毒的有害作用 (危及生命的心律失常)，并促进了有效的基因转移。所得病毒贮存液最终效价为 $10^{10} - 10^{12}$ 个病毒粒子/ml。重组腺病毒需高度纯化，不得含有野生型 (可能复制的) 病毒，不纯的构建物会引起宿主动物的强烈免疫反应。根据这种观点，进行增殖和纯化以排除污染物和野生型病毒可通过诸如以下的方式完成：选用合适的引物，用 PCR 鉴定成功的重组子；进行两轮噬斑纯化，再进行双 CsCl 梯度超离心。另外，我们发现，向病人注入腺病毒载体引起的心律失常所带来的问题，可通过在冠状动脉内注射前采用大小合适的滤器过滤重组腺病毒而得以避免，这种做法似乎也能明显促进基因转移和表达。

重组腺病毒载体的导入

病毒贮存液可以是可注射的制品形式，如有必要可含有如盐水等药理学上可接受的载体。可注射载体制品的最终效价范围优选 $10^7 - 10^{13}$ 个病毒粒子，这个效价范围使基因转移能有效地进行。其它药物载体、制剂和剂量在以下将要谈到。腺病毒转移基因构建物通过直接冠状动脉 (或移植血管) 内注射导入至心肌，注射系以标准经皮导管方法在荧光镜引导下进行，注射量应足以使转移基因表达而能够进行有效治疗的程度，注射时应使导管深入冠状动脉 (或移植血管) 腔内 (至动脉腔内约 1 cm)，优选两支冠状动脉同时注射，因为在个体病人体内并行血管的生长是高度可变的。通过冠状

动脉导管将材料直接注入冠状动脉腔内，有可能非常有效地定向导入基因，并尽量减少注射期间重组载体向主动脉近端的丢失。我们已发现，采用这种方式导入，在肝细胞内没有基因表达，冠状动脉内注射后任何时间，均未发现尿中存在有病毒 RNA。冠状动脉导管的任何变化形式或如 Stack 灌流导管均可用于本发明，而且本领域的普通技术人员已知的其它技术均可用于向动脉管壁转移基因。

为治疗外周血管疾病—该病特征在于腿部供血不足，通过导管导入表达血管形成肽或蛋白的重组腺病毒，导管插入至一侧或双侧股动脉的近端，因而使基因转移至由股动脉供血的骨骼肌细胞内，这将提供促进血管形成的刺激物，从而使腿部骨骼肌中形成血管。

为治疗其他器官或组织特异性疾病，通过导管或类似装置导入表达例如血管形成蛋白或肽等治疗用肽或蛋白的重组腺病毒，导管或装置应深插入向器官或组织供血的动脉近端，以使基因基本上只转入靶器官或组织的细胞。

心肌缺血动物模型

成功地进行有关基因疗法的研究的重要前提包括：(a) 用于模拟临床心肌缺血的动物模型的体质，通过对心肌缺血进行处置，可以提供有关血管形成机制的有用数据；和 (b) 正确地评价基因转移的效果。根据这种观点，现有技术均存在着一些缺憾。我们已使用过心肌缺血的猪模型，该模型模拟了临床冠状动脉性疾病。在冠状动脉左旋 (circumflex) 冠状动脉 (LCx) 周围放置 ameroid 缩窄器 (constrictor)，使冠状动脉逐渐阻塞 (放置后 7 天内)，而只有极小的梗塞形成 (左心室为 1%，LCx 床为 $4 \pm 1\%$) (Roth, et al., *Circulation*, 82: 1778, 1990; Roth, et al., *Am. J. Physiol.*, 235: H1279, 1987; White, et al., *Circ. Res.*, 71: 1490, 1992; Hammond, et al., *Cardiol.*, 23: 475, 1994; and Hammond, et al., *J. Clin. Invest.*, 92: 2644, 1993)。由于并行血管的发育，原来由阻塞动脉灌流的区域 (即所称的局部缺血区)，在静息状态下，心肌功能和血流量正常，但当心肌氧需求增加时，血流储备不足以能阻止局部缺血的发生，因而 LCx 床发生暂时性缺血，类似于临床上的心绞痛。在 ameroid 放置后 21 天内，并行血管发育和流量 - 功能关系稳定下来，并在四个月内保持不变 (Koth, et al.,

Circulation, 82: 1778, 1990; Roth, et al., Am. J. Physiol., 235: H1279, 1987; White, et al., Circ. Res., 71: 1490, 1992)。遥测法证实, 在一天中的危险时刻, 动物的床部位发生暂时性缺血, 从而引起功能异常, 危险时刻与进食或工作人员干扰等引起心率迅速增加有关(数据未发表)。因而该模型的一个床部位具有稳定但不充分的并行血管, 所以模型会发生暂时性缺血。该模型的另一明显优点是, 它具有一个正常灌注的功能正常区(LAD床)和一个不正常灌注的功能异常区(LCx床), 两个功能区相邻, 因而在每一动物体内均有一对照床。

心肌造影超声心动术被用来估计区域心肌灌注量。造影材料包括半乳糖微聚集体, 它能增强图像的回声效果(白度), 微聚集体在冠状动脉和心肌壁的分布与血流量成比例(Skyba, et al., Circulation, 90: 1513-1521, 1994)。而且造影材料的峰密度与根据微球体测得的心肌血流量密切相关(Skyba, et al., Circulation, 90: 1513-1521, 1994)。为证实本发明中使用的超声心动图像能准确地标示 LCx 床, 以及心肌造影超声心动术可用来估计心肌血流量, 沿邻近 ameroid 的 LCx 近端放置水压套咬合器。

本发明中, 处死动物时, 心脏采用灌注固定(戊二醛, 生理压力下原位固定)以在显微镜下确定毛细血管生长量。采用 PCR 由接受了转移基因的动物中测定血管形成蛋白 DNA 和 mRNA。而且, 如以下所述, 基因转移后两周, 来自所有五只被 lacZ 感染的动物的心肌样品, 在进行组织学观察时均显示明显的 β -半乳糖苷酶活性。最后, 使用血管形成蛋白的多克隆抗体证实, 接受了转移基因的动物心肌和细胞中有血管形成蛋白表达。

治疗研究的策略包括转移基因的导入时机、导入路径和血管形成基因的选择。在心肌缺血的 ameroid 模型中, 当并行血管发育已稳定下来但尚不充分时, 进行基因转移。先前采用 ameroid 模型的研究包括在 ameroid 闭合期间, 并行血管发育和局部缺血发生之前导入血管形成肽。然而, 由于以下几个原因, 这一策略未被采用: 首先, 先前研究不适合于临床治疗心肌缺血时的情况, 治疗行进性心肌缺血时要进行基因转移。先前研究的情况类似于: 预计到局部缺血发生时即提供肽, 因而相关性较低; 其次, 根据先前在细胞培养物中的研究可以推测, 局部缺血刺激和肽的存在是刺激血管形成的最佳条件, 当心肌缺血已经存在时导入转移基因能最佳地达到上述条件。与这些决定有关的是选择转移基因导入的方法, 由于该技术

应当可用来对患有冠状动脉疾病的病人进行治疗，使得几种方法难获支持（持续将肽注入冠状动脉内，将质粒定向注入心脏，以含肽树脂包覆心脏以使肽长期缓慢释放）；最后，猪模型提供了极好的方法来监视基因导入前后区域血流量和功能。使用对照动物能为这些研究提供对照，对照动物获得了同样的重组腺病毒构建物，但带有报道基因。本技术领域的技术人员可以理解，由以下所述猪模型中的结果可预计人类中的结果，猪的天然冠状动脉循环非常接近于人的冠状动脉循环，包括缺少天然冠状动脉并行血管。

治疗应用

本发明中的复制缺陷型重组腺病毒载体可使体内基因转移高效进行，而在基因表达区域无细胞病变效应和炎症。根据这些结果，以下实施例中将近一步谈到，可以看到只要体内基因转移水平足够高，即可造成体内的功能改变。

治疗心脏病时，通过冠状动脉内注射转入血管形成蛋白基因会促进血管形成。因而一旦观察到存在短时缺血后，即可着手治疗局部缺血。而且基因转入后，缺血区毛细血管数目、血流量和功能会有提高。这些技术在临床上会有广泛用途，特别是初次用于不可手术治疗的冠状动脉疾病和病残的心绞痛患者。本发明的数据证实，表达成纤维细胞生长因子-5 (FGF-5) 的重组腺病毒载体的转入，能大大缓减心肌缺血。

本发明的组合物或产品可以适合于冠状动脉内给药的制剂形式方便地提供。合适的给药方式最好由执业医师根据每个病人的情况分别确定。合适的药学上可接受的载体及其制剂在标准制剂专题中论及，如 E. W. Martin 的《Remington 药学》，也可参见 Wang, Y. J. 和 Hanson, M. A. 的《蛋白质和肽的母剂：稳定性和稳定剂》(Journals of Parental Sciences and Technology 技术报告第 10 期，增补本 42: 2S (1988))。本发明的载体应在中性 pH 下配制成溶液，优选 pH 为约 6.5 - 8.5，更优选 pH 为约 7 - 8。用赋形剂使溶液达到等渗点，例如赋形剂可用 4.5% 甘露醇或 0.9% 氯化钠，pH 缓冲采用本技术领域熟知的缓冲溶液，如磷酸钠，一般认为它们是安全的，同果还可使用可接受的防腐剂，如 0.1% - 0.75% 的间甲酚，间甲酚浓度优选为 0.15% - 0.4%，使用氯化钠或其他药学上可接受的试剂使溶液达到等渗点。这些试剂包括葡萄糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇、多元醇(如甘

露醇和山梨醇)或其他有机或无机试剂,优选氯化钠,尤其是使用含钠离子的缓冲液时。如有必要,可制备上述组合物的溶液,以提高保存寿命和稳定性。以常规方式混合各成分即可制备本发明的治疗用组合物。例如,混和选出的成分可制得浓缩混合物,该浓缩物通过加入水和/或控制 pH 的缓冲液或控制张力的其他溶液调整至最终浓度和粘度。

为了方便内科医生使用,该组合物可以一定的剂量包装,其中含有一定量的本发明的载体,以一倍或几倍量使用时,能使血管形成达到选定水平。正如本领域的技术人员认识到的那样,治疗剂的有效用量受很多因素影响,这些因素包括:病人的年龄和体重、病人的身体状况和欲达到的血管形成水平以及其他一些因素。

本发明的复合物的有效剂量一般为至少约 10^7 个病毒粒子,优选约 10^9 个病毒粒子,更优选约 10^{11} 个病毒粒子,但病毒粒子数目最好不要超过 10^{13} 个。应注意的是,准确的使用剂量应由住院医师确定,但病毒粒子最好溶于 1 ml 磷酸盐缓冲液中。

目前,治疗心脏病时优选的给药方式是冠状动脉内注射。这种方法是采用合适的冠状动脉导管,向一支或两支冠状动脉(或一支或多支隐静脉或哺乳动物深部动脉移植物)注射。治疗外周血管疾病时,优选的给药方式是采用合适的动脉导管注入一侧或两侧股动脉近端。治疗其它器官或组织特异性疾病时,优选的给药方式也是采用合适的动脉导管。

定向基因表达

本发明中一个未曾预料到的发现是:在其遇到的第一个血管床中,重组腺病毒的吸收非常好。事实上,在实施例 4 的动物模型中,冠状动脉注射后心脏中病毒吸收率为 98%,即病毒首次通过心肌血管床后,血液中的病毒减少了 98%。而且取自注射期间的动物血清稀释 200 倍后,才能形成病毒噬斑(Graham, Virology 163: 614 - 617, 1988),这表明其中存在抑制病毒增殖的血清因子(或结合蛋白)。上述两种因素(病毒首次通过时的有效吸收和可能存在血清结合蛋白)可能共同起作用,使基因表达局限于病毒首次遇到的血管床。

为更准确地评价冠状动脉内基因转移局限于心脏的程度,在两只治疗组动物中进行基因转移两周后,采用聚合酶链式反应(PCR)来验证心外是否

存在着病毒 DNA (见以下的实施例 4)。结果表明, 动物心脏中存在病毒 DNA, 而视网膜、骨骼肌和肝脏中均不存在病毒 DNA。PCR 的敏感性保证每 5,000,000 个细胞中存在一个 DNA 序列, 即可被检测, 因而这些数据表明, 基因转移两周后心外组织中不存在病毒 DNA。这一发现极其重要, 因为它与转移基因定向的概念有关, 转移基因定向就是使基因表达局限于心脏, 而其他任何部位均无表达。这使本发明相当安全, 使其在对病人的治疗中更为有用。因为它利用了腺病毒的一个未曾预料到的生物学特性, 即允许定位的基因转移, 这些都是重要的发现, 因为就申请人所知, 以前没有人谈到过这些, 而且因为它们使本领域的技术人员不太了解的这种方法较为安全。这个未曾预料到的发现可以推广运用于其它血管床, 因而使转移基因能以相对局限性的方式导入由特定动脉供血的特定器官和组织。

具体实施方式

为便于理解本发明, 提供了以下实施例, 它们记述了一系列试验的结果。当然, 与本发明有关的试验不应被理解为特意限制本发明。现在所知的和以后发展出来的本发明的变化形式, 只要其为本领域的技术人员能够预见得到的, 均属于本发明此处和下文所述要求的保护范围。

实施例 1: 腺病毒构建物

采用不依赖于辅助病毒的复制缺陷型人类腺病毒 5 系统, 目的基因为 LacZ 和 FGF-5。人 FGF-5 的全长 cDNA 为来自质粒 pLTR122E (Zhen, et al, Mol. Cell. Biol., 8: 3487, 1988) 的 1.1 kb ECOR1 片断, 其中包括 981bp 基因开放阅读框, 将该 cDNA 克隆至质粒 ACCMVPLPA 的多克隆位点, 该质粒含有 CMV 启动子和 SV40 多聚腺苷酸化信号和部分旁侧腺病毒序列, 该序列中缺失了 E1A 和 E1B 基因 (病毒复制必需基因)。将该质粒与 JM17 质粒一起共转染 (脂转染法) 293 细胞, 质粒 JM17 含有人类腺病毒 5 的全部基因组和额外的 4.3 kb 插入片断, 这使得 pJM17 过大而无法被包装。同源补救重组形成缺少 E1A/E1B 序列的含有转移基因的腺病毒载体。尽管这些重组子在哺乳动物细胞中不能复制, 但它们能在 293 细胞中增殖, 293 细胞已被 E1A/E1B 转化过, 能提供反式作用的必需基因产物。转染细胞处于监视之下, 看其是否产生通常在转染后 10~14 天出现的细胞病变效应。为鉴别成功的重组子, 将显示细胞病变效应的培养皿中的细胞上清液用蛋白酶 K (50

mg/ml, 含 0.5% 十二烷基硫酸钠和 20 mM EDTA) 于 56°C 下处理 60 分钟, 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀。用 PCR 鉴别成功的重组子以扩增插入片段(预期的 1.1kb 片段), 所述 PCR 使用的引物(Biotechniques, 15: 868-872, 1993) 与 CMV 启动子和 SV40 多聚腺苷酸化序列互补, PCR 引物(Biotechniques, 15: 868-872, 1993) 设计为可伴随扩增腺病毒序列。成功的重组子随后进行两轮噬斑纯化。病毒贮存液于 293 细胞中增殖至效价为 $10^{10} \sim 10^{12}$ 个病毒粒子, 使用前采用双 CsCl 梯度离心进行纯化。采用全长 cDNA 构建编码 β -半乳糖苷酶或 FGF-5 的重组腺病毒。用来生产重组腺病毒的系统要求插入的转移基因小于 5 kb 才能被包装, 所用的基因由 CMV 启动子启动并带有 SV40 多聚腺苷酸化序列, 其长度小于 4 kb, 完全能被包装。重组载体以标准方法进行噬斑纯化, 所得病毒粒子于 293 细胞中增殖至效价为 $10^{10} \sim 10^{12}$ 个病毒粒子, 在 80% 汇合时转染细胞, 36~48 小时后收获细胞, 冻融循环后细胞碎片以标准离心沉淀, 病毒采用双 CsCl 梯度超离心(不连续 1.33/1.45 CsCl 梯度, 铯溶于 5 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 7.8); 90,000 xg (2 hr), 105,000 xg (18 hr) 进一步纯化。体内注射前, 病毒贮存液以凝胶过滤脱盐, 脱盐采用例如 G25 Sephadex 等的 Sepharose 柱, 所得病毒贮存液最终效价为 $10^{10} \sim 10^{12}$ 个病毒粒子。腺病毒构建物是高度纯化的, 不含野生型(可能复制的)病毒。

实施例 2: 细胞培养物中的成年鼠心肌细胞

采用含有胶原酶的灌注液, 根据标准方法进行 Langendorff 灌注可制备成年鼠心肌细胞。杆状细胞于层粘连蛋白被覆的平板上培养 24 小时, 用上述实施例 1 所得编码 β -半乳糖苷酶的腺病毒感染, 感染复数(multiplicity)为 1:1, 再经 36 小时, 细胞以戊二醛固定, 与 X-gal 一起温育。与前述结果非常吻合的是 70~90% 成年鼠心肌细胞被重组腺病毒感染后, 表达 β -半乳糖苷酶, 感染复数为 1-2:1 时未观察到细胞毒性作用。

实施例 3: 活体内猪心肌

根据实施例 1 的方法, 将实施例 1 中所得的编码 β -半乳糖苷酶的腺病毒载体在相容性 293 细胞中增殖, 以 CsCl 梯度超离心纯化, 至最终病毒效价为 1.5×10^{10} 个病毒粒子。对一麻醉的接上呼吸机(ventilated)的 40 kg 的猪进行开胸手术, 一只 26 号(gauge)蝶形针插入至冠状动脉左前降支(LAD)

中间,以 2 ml 体积量注入载体 (1.5×10^{10} 个病毒粒子),缝合胸部让动物恢复。在注入载体后第四天处死动物,心脏以戊二醛固定,切片后与 X-gal 一起温育 16.5 小时,包埋和切片后组织以伊红复染。

组织切片(冠状动脉内注射含 lacZ 的腺病毒 96 小时后的 LAD 床全层组织切片)的显微镜观察表明,冠状动脉 LAD 床有明显的基因转移,许多组织切片中 50~60% 以上的细胞因含有 β -半乳糖苷酶而阳性着色,远离 LAD 循环床的心肌区未见 X-gal 着色,可作为阴性对照。在心肌细胞和内皮细胞中可观察到基因的扩散表达,大多数心肌细胞显示 β -半乳糖苷酶活性(染成蓝色)。随后的研究中采用了闭胸冠状动脉内注射,基因转移后 14 天出现类似活性 ($n=8$),基因表达区域未见炎症及坏死。

实施例 4: 猪局部缺血模型

实验动物包括 18 只家猪 (30~40 kg),按照外科无菌操作规程行左侧开胸手术 (Hammond, et al, J. Clin. Invest., 92: 2644~2652, and Roth, et al., J. Clin. Invest., 91: 939-949, 1993),导管置于左心房和主动脉中,以测量区域血流量和监视压力;导线缝合于左心房上,以进行 ECG 记录和心房起搏。最后,将 ameroid 放置于 LCx 近端周围,当稳定的局部缺血形成后,治疗组 ($n=11$) 接受含 FGF-5 (血管形成基因) 的腺病毒构建物,腺病毒构建物由 CMV 启动子启动。对照组动物 ($n=7$) 用含报道基因 lacZ 的腺病毒构建物进行基因转移,所述腺病毒构建物由 CMV 启动子启动。

Ameroid 放置后 35 ± 3 天开始观察,此时并行血管发育和起搏引起的机能异常趋于稳定 (Roth, et al., Am. J. Physiol., 253: H1279-1288, 1987, and Roth, et al., Circulation, 82; 1778-1789)。在动物清醒时,将其悬挂于吊索上,以数字格式线的方式记录 LV 压、LA 压和主动脉压以及心电图 (静息状态和 200 bpm 心房起搏期间),以 Hewlett Packard 超声成像系统获得二维和 M-mode 图像,成像部位为胸骨右侧乳头肌中间处,图像记录于 VHS 磁带上。动物处于基态和右心房起搏 (HR = 200 bpm) 期间记录图像,基因转移前一天进行上述观察, 14 ± 1 天后再次观察,在基因转移前后两组的心率-压力结果和左心房压接近,表明它们的心肌氧需求和负荷情况接近。超声心动测量以标准方式进行 (Sahn, et al., Circulation, 58: 1072, 1978),舒张期末壁厚 (EDWTh) 和收缩期末壁厚 (ESWTh) 根据心脏五次连续跳动测得并取平均值,壁增厚百分比 (%WTh) 根据下式计算 [(EDWTh -

ESWTh)/EDWTh] × 100, 分析数据时不标明动物接受何种基因。为证实超声心动测量的重复性, 连续两天对动物 (n = 5) 进行成像, 结果显示高相关性 ($r^2 = 0.09$; $P = 0.005$)。

Ameroid 放置后 35 ± 3 天, ameroid 阻塞早已形成但尚未进行基因转移, 使用造影材料 (Levovist) 进行造影超声心动观察。造影材料在心房起搏 (200 bpm) 期间注入左心房, 基因转移后 14 ± 1 天再次观察, 峰对照密度使用计算机视频分析程序 (Color Vue II, Nova Microsonics, Indianapolis, Indiana) 由视频图像测得, 所用程序能准确测量视频密度。分析造影观察结果时不标明动物接受何种基因。

完成上述观察后, 将动物麻醉沿中线行开胸手术, 分离出短头动脉, 插入插管, 结扎其他大血管。通过静脉给动物注入肝素 (10,000 IU) 和罂粟碱 (60 mg), 加入氯化钾诱导舒张期心动停止, 将主动脉用动脉夹夹住, 通过短头动脉插管导入盐水 (120 mmHg 压力), 以对冠状动脉进行灌流。用戊二醛溶液 (6.25%, 0.1M 二甲胍酸盐缓冲液) 灌流至心脏被固定 (10~15 分钟), 然后移出心脏, 采用注入的有色染料标示床部位, 染料注入后依次经过冠状动脉左前降支 (LAD)、左旋支 (LCx) 及右支, 观察 ameroid 以证实存在阻塞, 来自正常灌流区和局部缺血区的样品分成三份, 心内膜部分和心外膜部分的三份用塑料包埋, 采用前述方法 (Mathieu - Costello, et al., Am. J. Physiol., 359: H204, 1990) 进行显微镜观察, 以确定毛细血管数量, 4 个 $1 \mu\text{m}$ 厚的横切切片来自每个次分样品 (每一区域的心内膜和心外膜), 在 400 X 档以点计数确定毛细血管数与纤维数之比, 每一分样计数 20~25 个高倍视野。结果表明, 每一区域内心外膜与心内膜部分毛细血管数与纤维数之比接近, 所以取每一区域内的 40~50 个视野的平均数, 得到全层毛细血管数与纤维数之比。

为确证提高的区域功能和血流量是由于转移基因的表达, PCR 和 RT-PCR 被用来检测转入 FGF-5 基因的动物心肌中的 FGF-5 DNA 和 mRNA, 使用两种引物, 一种为 CMV 启动子的有义引物 [GCAGAGCTCGTTTAGTGAAC] (SEQ ID No: 1), 一种为 FGF-5 内部序列的反义引物 [GAAAATGGGTAGAGATATGCT] (SEQ ID No: 2), PCR 扩增出了预期的 500 bp 片段。RT-PCR 也使用两种引物, 一种为 FGF-5 起始序列的有义引物 [ATGAGCTTGTCCTTCCTCCTC] (SEQ ID No: 3), 一种为 FGF-5 内部序列的反

义引物 [GAAAATGGGTAGAGATATGCT] (SEQ ID No: 2), 结果扩增了预期的 400 bp 片断。

最后使用 FGF-5 的多克隆抗体 (kitaoka, et al., Science, 35: 3189, 1994), 证实在 FGF-5 基因转移 48 小时以及 14 ± 1 天后, 转入 FGF-5 基因的动物心肌和细胞有 FGF-5 蛋白质表达。

实施例 1 中构建的不依赖于辅助病毒的复制缺陷型人类腺病毒 5 系统被用来制备含转移基因的载体, 目的基因为 lac-Z 和 FGF-5, 注入体内的材料是高度纯化的, 不含野生型 (可复制) 腺病毒, 因而最大限度地减少了心脏中的腺病毒感染和炎症浸润。通过冠状动脉导管将材料直接注入冠状动脉腔内, 可以有效地进行基因定向转移, 采用这种方式导入转移基因时, 肝细胞中无转移基因表达, 冠状动脉内注射后任何时间在尿中均未发现病毒 RNA。

向左右两支冠状动脉 (向 LCx 床的并行血流似乎来自两支冠状动脉) 各注入 2.0 ml 构建物 (4.0 ml 含有约 10^{11} 个腺病毒粒子)。将动物麻醉, 通过右颈动脉切开形成动脉通路; 放置 5F Cordis 套。5F 多用途 (A2) 冠状动脉导管被用来紧密插入冠状动脉, 通过造影注射冠状动脉左主干, 证实了 LCx ameroid 阻塞的存在, 导管头置于动脉腔内 1 cm, 以使注射时材料向主动脉近端的丢失尽量减少, 每只猪均用上述方法处理。

进行基因转移后, 三个策略被用来保证基因成功地被掺入和表达: (1) 一些构建物包括报道基因 (lacZ); (2) 以相关床心肌作为样品进行免疫印迹 (immunoblotting), 以对 FGF-5 进行定量; (3) 用 PCR 来检测 FGF-5 mRNA 和 DNA。

图 2 的区域收缩功能数据表明接受了 lacZ 的猪在基因转移前及基因转移后 14 ± 1 天, 缺血区由起搏引起的机能异常的程度接近, 相反, 转入了 FGF-5 基因的猪起搏时 ($P = 0.0001$) 缺血区壁增厚增加了 2.6 倍。这些数据表明, 根据本发明的 FGF-5 基因转移与起搏时缺血区收缩增强有关, 正常灌流区 (室间隔) 的壁增厚在起搏期间正常, 基因转移对其无影响 (% 壁增厚: lacZ 组: 转基因前 $56 \pm 11\%$; 转基因后 $51 \pm 9\%$; FGF-5 组: 转基因前 $63 \pm 7\%$, 转基因后 $58 \pm 5\%$; 无差别存在, 采用双向差异分析), 几次测定所得数据具有高度重复性 (外侧壁增厚: $r^2 = 0.90$, $P = 0.005$), 在同一模型中, 心房起搏期间用胸腔超声心动术测得的功能下降百分比, 与以微

声计测得的数值非常接近(Hammond, et al., J. Clin, Invest., 92: 2644, 1993), 这表明以超声心动术评价缺血机能异常非常准确。图 2 中方块表示平均值, T 形图代表 1 SE, 图 4A - 4C 为心肌造影超声心动图的示意图, 图 4A 显示正常猪中快速 LCx 闭合, 当室间隔(IVS)增强时(白色), LCx 床(黑色)未见血流, 这证实图像准确地标示出了 LCx 床, 反差增强的减少伴随着血流量减少; 图 4B 显示转入 lacZ 后 14 天 IVS 和 LCx 床间反差增强存在着差异, 说明心房起搏(200 bpm)期间两个区域的血流量不同。图 4C 中, 转入 FGF-5 基因后 14 天 IVS 和 LCx 床间反差增强相同, 说明心房起搏期间两个区域的血流量相近。

图 3 总结了所有动物的两个区域视频密度的计算机分析结果, 图 3 中数据表示为缺血区(LCx 床)峰视频密度(与心肌血流量相关)与室间隔(IVS, 由冠状动脉左前降支正常供血区域)峰视频密度之比, 两个区域的血流量相等, 则比值为 1.0, 基因转移前该比值平均为 0.5, 表明 LCx 床中血流量明显小于室间隔中血流量。图 3 显示转入 lacZ 的动物缺血区血流量仍然不足, 转入 FGF-5 基因的动物两个区域的反差增强相同, 缺血区心肌血流量增加了两倍($P = 0.0018$, 双向差异分析), 方块代表平均值, T 形图代表 1 SE。

图 5 的条形图总结了显微镜分析的结果, 结果显示, 与转入 LacZ 的动物相比, 转入 FGF-5 基因的动物的缺血区和非缺血区毛细血管数与纤维数之比均有提高, 方块代表每一组中 5~6 只动物的平均值, T 形图代表 1 SE, P 值为双向差异分析法分析基因作用的结果, 进行分析时不标明哪一组为治疗组。

PCR 扩增的电泳结果证实, 三只转入 FGF-5 基因 14 天后的猪中 LAD 和 LCx 床中存在着 JM17-CMV-FGF-5 DNA(预期的 500 bp 片断)。RT-PCR 扩增的电泳结果证实转入 FGF-5 基因后 14 天, LAD 和 LCx 床中存在心脏 FGF-5 mRNA(预期的 400 bp 片断), 但转入 LacZ 后无此结果, 并且基因转移后两周, 来自所有的五只已转入 LacZ 基因的动物心肌样品在进行组织学观察时实际上均显示出 β -半乳糖苷酶的活性。

最后使用 FGF-5 的多克隆抗体对经培养的成纤维细胞进行细胞介质免疫印迹, 结果表明转入 FGF-5 基因后两天, 即有蛋白质表达和胞外分泌($n = 4$ 只培养皿), 而转入 LacZ 后无表达和分泌。转入 FGF-5 基因后 14 ± 1 天, 心肌样品中也有蛋白质表达, 但转入 lacZ 后无蛋白质表达($n = 4$)。

在更多的家猪中重复以上试验，治疗组(n = 16)接受上述含 FGF - 5 的腺病毒构建物，该构建物由 CMV 启动子启动；对照组(n = 7)接受上述含报告基因 LacZ 的腺病毒构建物，该构建物同样由 CMV 启动子启动，5 只治疗组的家猪在基因转移后饲养 12 周并进行上述观察，结果示于图 6 - 8。

图 6 为治疗组动物区域收缩功能的图解，使用 Hewlett packard 超声成像系统获得的二维和 M - 型图像中，成像部位为右胸骨乳头肌处，图像记录于 VHS 磁带上。在动物清醒时，将其悬挂于舒适的吊索上，以尽量减少身体运动，对悬挂的动物进行观察，在基态和左心房起搏(HR = 200 bpm)期间记录得图像。基因转移前一天进行这些观察，14 ± 1 天后再次观察(图 6a, 左边方块)。基因转移 12 周后对 5 只转入 FGF - 5 的动物再次进行观察，以确定功能的改善是否持久(右边方块，图 6b)。基因转移前后，两组的心率 - 压力结果和左心房压接近，表明心肌氧需求和负荷情况接近，超声心动测量以标准方式进行，舒张期末壁厚(EDWTh)和收缩期末壁厚(ESWTh)根据心脏五次连续的跳动测得，并取平均值，壁增厚百分比(%WTh)根据下式计算： $[(EDWTh - ESWTh) / EDWTh] \times 100$ 。为证实超声心动测量的重复性，治疗组动物(n = 5)连续两天进行成像。几次测得数据重复性良好(外壁增厚： $r^2 = 0.90$ ； $P = 0.005$)。我们实验室对这个模型采用胸腔超声心动术和微声计测得的功能下降百分比非常接近(Hammond, et al., J, Clin, Invest., 92: 2644 - 2652, 1993)，证实用超声心动术评价局部缺血引起的机能异常的准确性。转入 FGF - 5 基因两周后缺血区壁的增厚加快了(左侧条块； $P = 0.0001$ ，双向差异分析)，这种作用可持续 12 周(右侧方块； $P = 0.005$)，方块表示平均值，T 形图表示 1 SE，进行分析时不标明哪一组为治疗组。

图 7 为治疗组动物区域心肌血流量的图解，造影材料(半乳糖微聚合体)能提高左心房注射后图像的回声效果(白度)，微聚合体在冠状动脉和心肌壁中的分布方式与血流量成比例(Skyba, et al., Circulation, 90: 1513 - 1521, 1994)，反差增强的峰密度与根据微球体测得的心肌血流量密切相关(Skyba, et al., Circulation, 90: 1513 - 1521, 1994)，ameroid 放置后 32 ± 7 天，ameroid 阻塞早已形成，但尚未进行基因转移，心房起搏期间(200 bpm)进行造影材料超声心动观察。基因转移 14 ± 1 天后再次观察，5 只动物在转入 FGF - 5 基因 12 周后再次观察。峰对照密度使用计算机视频分析程序(Color Vue II. Nova Microsonics, Indianapolis, Indiana)，

由视频图像测得，该程序能客观地测量视频密度，数据表示为缺血区(LCx床)峰视频密度与室间隔(IVS，由未闭合的冠状动脉左前降支正常供血区域)峰视频密度之比，分析对照观察结果时不注明动物接受的为何种基因。在我们实验室的同一模型中，由造影超声心动术测得的心房起搏期间区域血流量的差异与微球体测得的血流量的差异相近(Hammond, et al., J. Clin. Invest., 92: 2644 - 2652, 1993)，这证实超声心动术能评价区域心肌血流量的准确性。

转入 LacZ 的动物缺血区仍然供血不足，转入 FGF - 5 基因的动物两个区域的反差增强相同，表明缺血区血流量增加 ($P = 0.0001$ ，双向差异分析)，这种效果持续 12 周 ($P = 0.001$)，方块代表平均值，T 形图表示 1 SE，在 4 只转入 FGF - 5 基因的动物中未进行造影材料超声心动测量，分析时不注明哪一组为治疗组。

图 8 为治疗组动物估计血管数的图解，观察完毕后将动物麻醉，沿中线行开胸术，分离出短头动脉，插入插管，结扎其他大血管，静脉内给药肝素(10,000 IU)和罂粟碱(60 mg)，加入氯化钾诱导舒张期心动停止，将主动脉用动脉夹夹住，通过短头动脉插管导入盐水，对冠状动脉进行灌注，用戊二醛溶液(6.25%，0.1M 二甲胍酸盐缓冲液)在 120 mmHg 压力下进行灌注，直至心脏被固定(10 - 15 分钟)，然后移出心脏，采用注入的有色染料标示床部位，染料注入后依次通过冠状动脉左前降支、左旋支和右支，观察 ameroid 以证实存在阻塞。来自正常灌注区和缺血区的样品分成三份，心内膜部分和心外膜部分的三份以塑料包埋，采用前述方法(poole, et al., Am. J. Physiol., 259: H204 - H201, 1990)进行显微镜观察，以确定毛细血管数量。四个 1 μm 厚的横切切片来自不同次分样品(每一区域的心内膜和心外膜)，采用点计数确定每一肌纤维周围的毛细血管数量，每一次分样品计数 20 - 25 个高倍视野(400 \times)。左侧方块(图 8a)总结了这些数据，结果表明：同转入的 LacZ 的动物心脏的相同区域相比，转入 FGF - 5 基因的动物缺血区和非缺血区毛细血管数均有增加，转入 FGF - 5 基因易于增加较大内径的血管，这一效果局限于缺血区(右侧方块，图 8b)，T 形图表示 1 SE，P 值为双向差异分析 FGF - 5 基因作用的结果，进行上述分析时不标明哪一组为治疗组。

序列表

(1) 一般信息

(i) 申请人: 加利福尼亚大学董事会

(ii) 发明名称: 基因转移介导的血管形成疗法

(iii) 序列数: 3

(iv) 通讯地址:

(A) 联系人: Robbins. Berliner & Carson

(B) 街道: N. Figueroa 街 201 号 5 楼

(C) 城市: 洛杉矶

(D) 州: CA

(E) 国家: U. S. A.

(F) 邮政编码: 90012 - 2628

(v) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: 磁盘

(B) 计算机: IBM 兼容

(C) 操作系统: DOS

(D) 软件: Fast SEQ 1.5 版

(vi) 本申请数据:

(A) 申请号:

(B) 提交日:

(C) 分类:

(vii) 在先申请数据

(A) 申请号: 08/485,472

- (B) 提交日: 1995 年 6 月 7 日
- (C) 申请号: 08/396,207
- (D) 提交日: 1995 年 2 月 28 日

(viii) 代理人/代理机构信息

- (A) 姓名: Berliner, Robert
- (B) 登记号: 20,121
- (C) 参考/案卷号: 5555 - 362C2

(ix) 电信信息:

- 电话: 213 - 977 - 1001
- 电传: 213 - 977 - 1003
- 电报:

(2) SEQ ID NO: 1 信息

(i) 序列特征

- (A) 长度: 20 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线形

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 假定: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型:

(vi) 原始来源:

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 1:

GCAGAGCTCG TTTAGTGAAC

(3) SEQ ID NO: 2 信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 21 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线形

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 假定: 否

(iv) 反义: 是

(v) 片段类型:

(vi) 原始来源:

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 2:

GAAAATGGGT AGAGATATGC T

(4) SEQ ID NO: 3 信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 21 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线形

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 假定: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型:

(vi) 原始来源:

(xi) 序列表述: SEQ ID NO: 3:

ATGAGCTTGT CCTTCCTCCT C

转移基因插入的 XBAL 位点

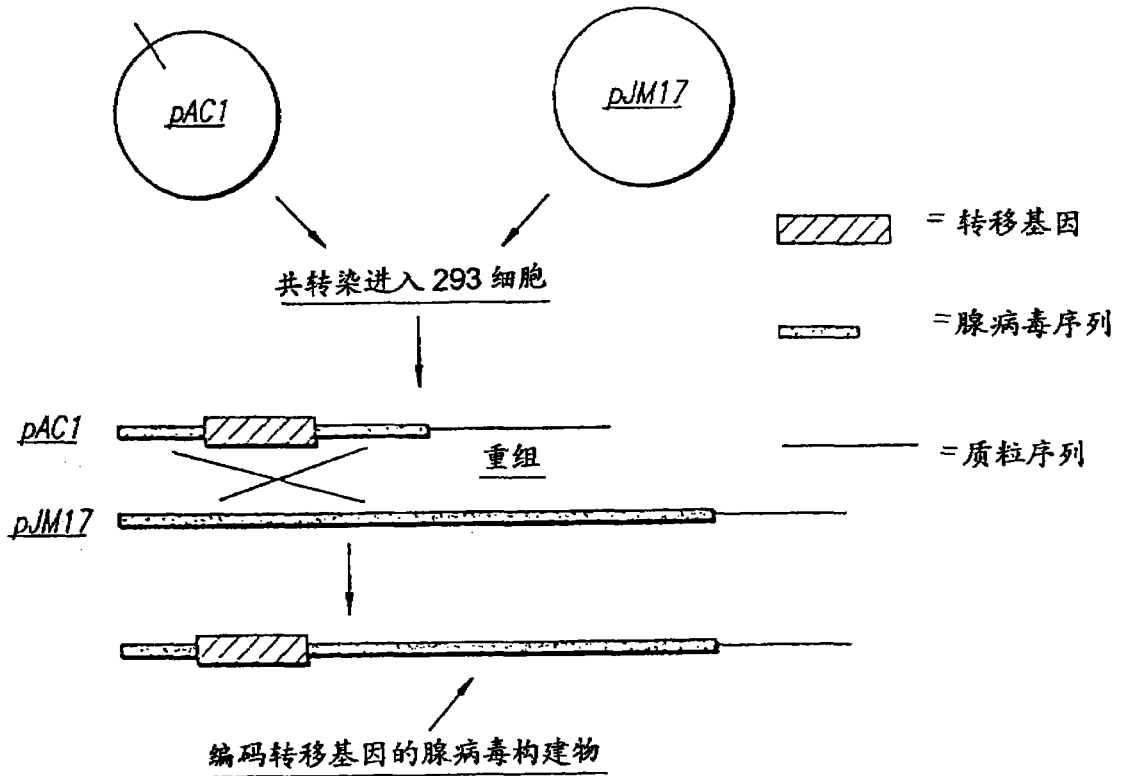


图 1

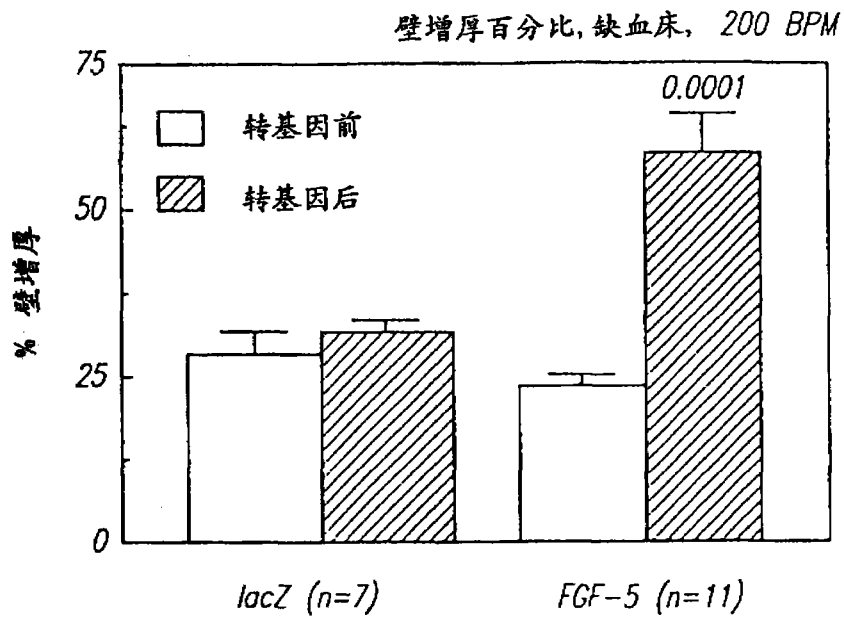


图 2

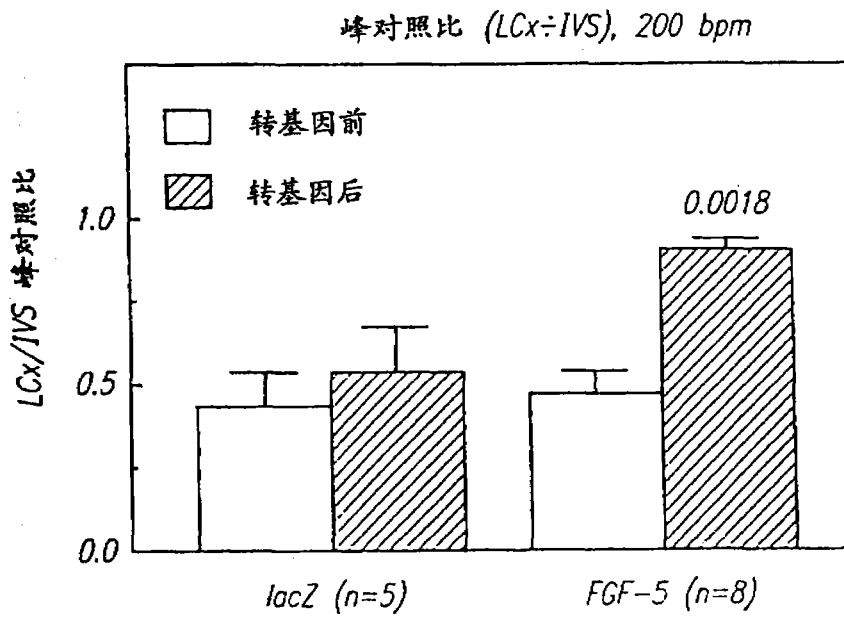


图 3

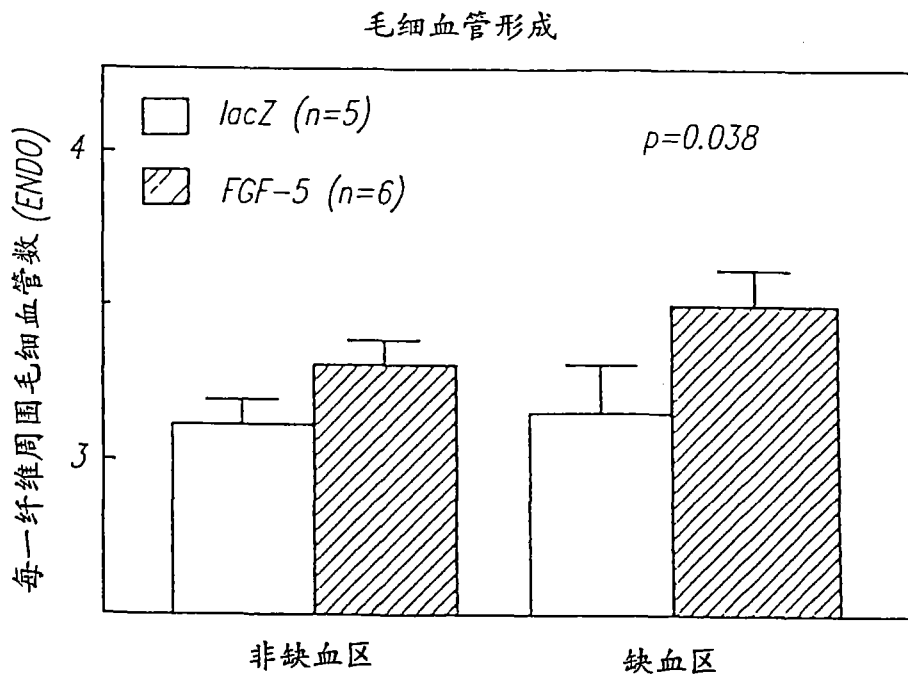
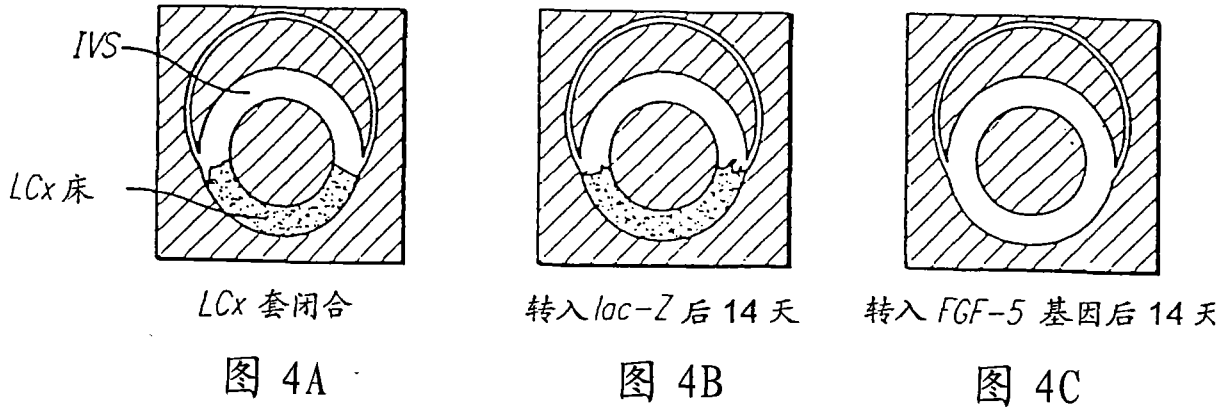


图 5

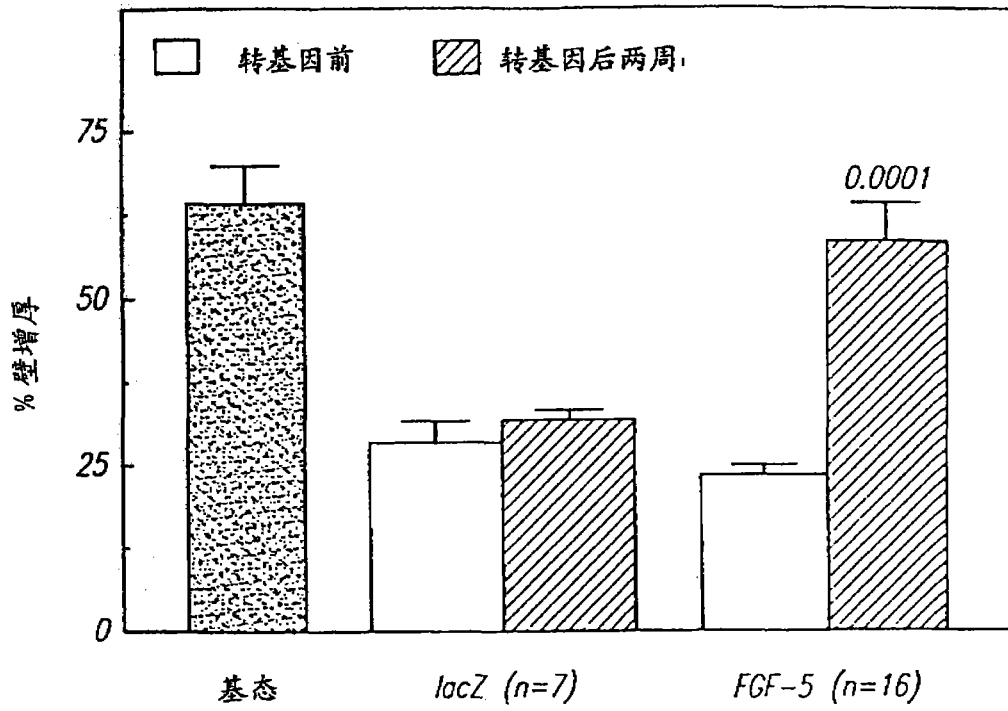


图 6a

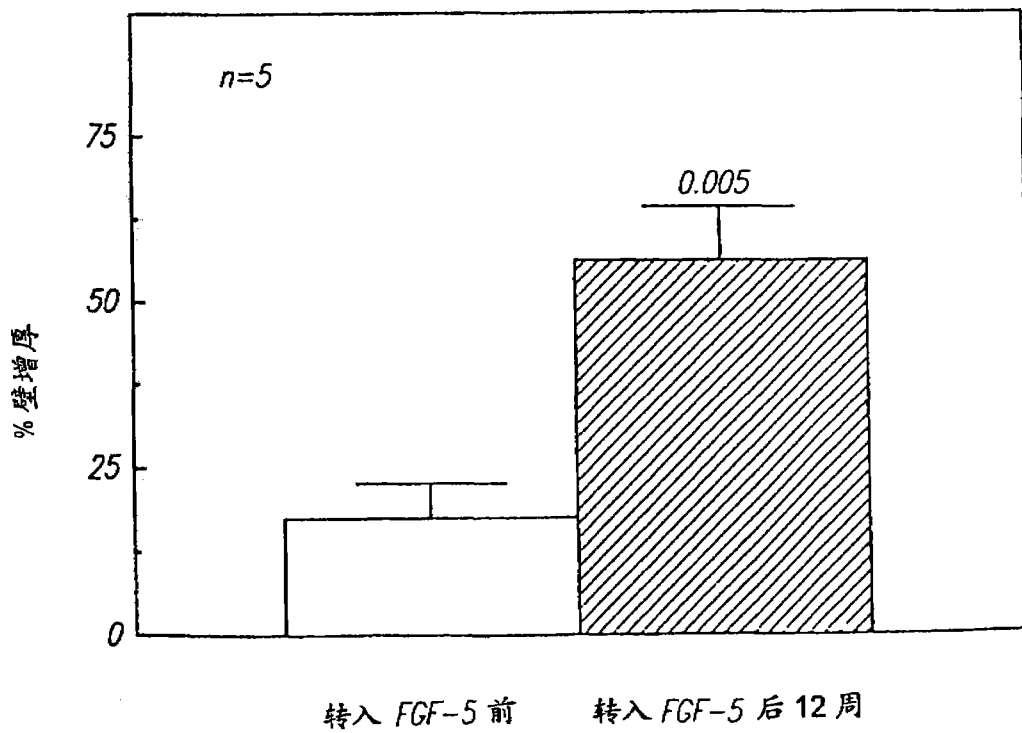


图 6b

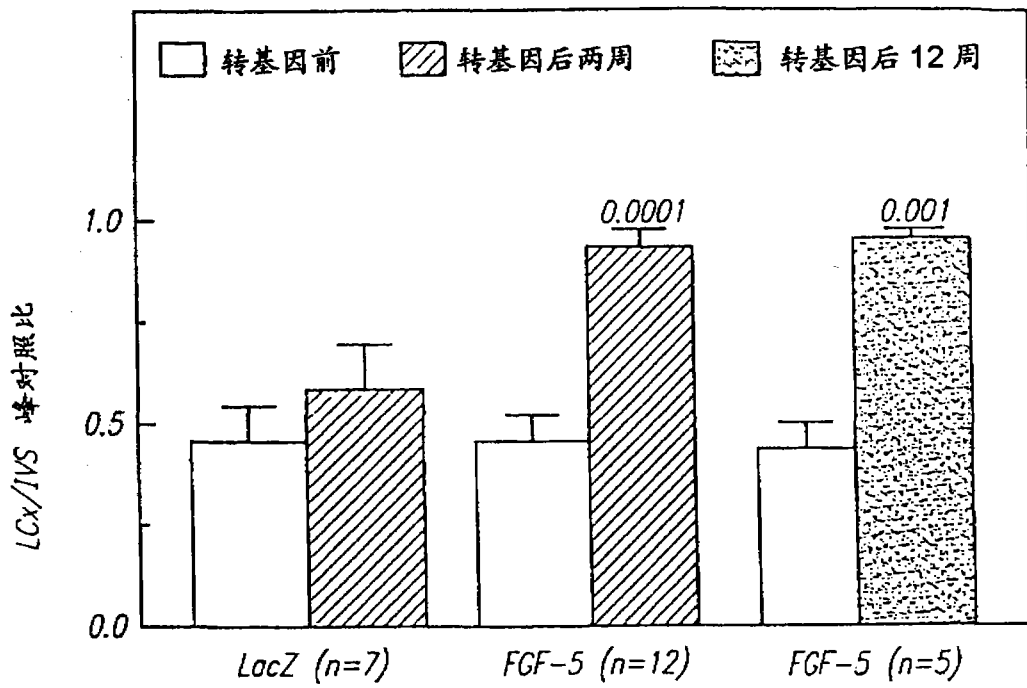


图 7

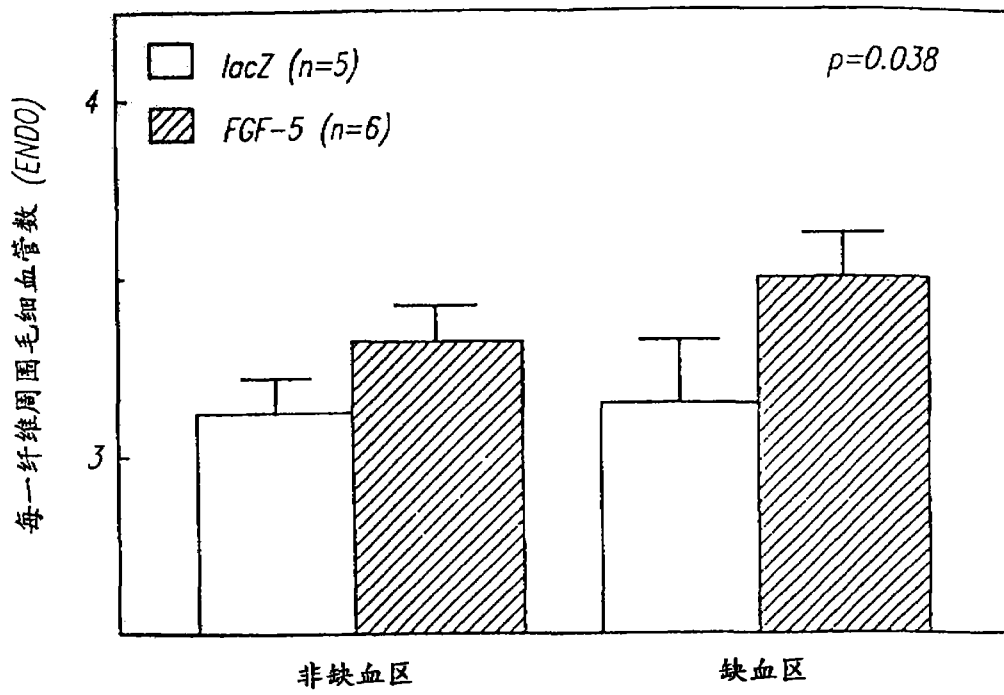


图 8a

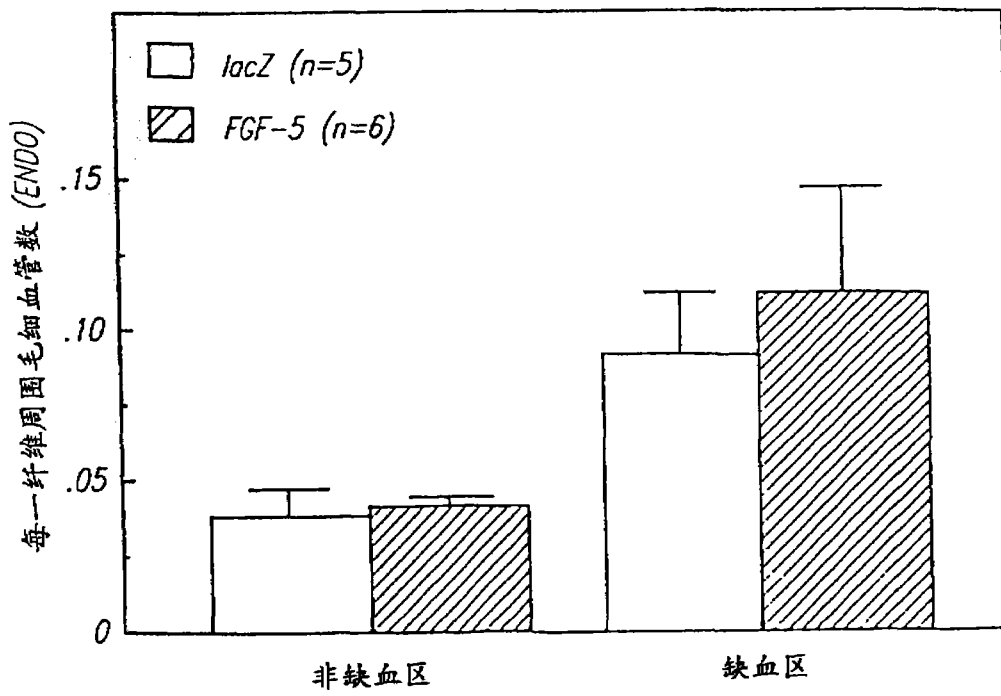


图 8b