



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101778934 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 22

(21) 申请号 200880100100. 4

(22) 申请日 2008. 05. 20

(30) 优先权数据

60/931, 622 2007. 05. 24 US

61/003, 050 2007. 11. 14 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 01. 22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/006434 2008. 05. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02008/150368 EN 2008. 12. 11

(73) 专利权人 埃普塞斯有限责任两合公司

地址 德国慕尼黑

(72) 发明人 R·胡斯 P·尼尔森 M·拉吉

M·斯坦格

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C12N 5/08 (2006. 01)

A61K 45/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1423563 A, 2003. 06. 11, 全文.

Cooper R. N., 等. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. 《J Cell Sci》. 1999, 第 112 卷 2895 — 2901.

Ferrara N, 等. The biology of VEGF and its receptors. 《Nature Medicine》. 2003, 第 9 卷 (第 6 期), 669 — 676.

DePalma M, 等. Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. 《Nature Medicine》. 2003, 第 9 卷 (第 6 期), 789 — 795.

Anderson C, 等. The Mouse Dystrophin Muscle Promoter/Enhancer Drives Expression of Mini-dystrophin in Transgenic mdx Mice and Rescues the Dystrophy in These Mice. 《Molecular Therapy》. 2006, 第 14 卷 (第 5 期), 724 — 734.

Khalil PN, 等. Nonmyeloablative Stem Cell Therapy Enhances Microcirculation and Tissue Regeneration in Murine Inflammatory Bowel Disease. 《Gastroenterology》. 2007, 第 132 卷 (第 3 期), 944 — 954.

Torrente Y, 等. Identification of a putative pathway for the muscle homing of stem cells in a muscular dystrophy model. 《J. Cell. Bio.》. 2003, 第 162 卷 (第 3 期), 511 — 520.

Conrad C, 等. Adult Stem Cell Lines in Regenerative Medicine and Reconstructive Surgery. 《J Surg Res》. 2005, 第 124 卷 (第 2 期), 201 — 208.

审查员 宋智刚

权利要求书1页 说明书31页 附图10页

(54) 发明名称

CD34 干细胞相关方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供了用于治疗许多状况的新的基于干细胞的方法。此类方法利用 CD34⁺ 干细胞, 并且具有许多有利方面, 因为它们不需要在待治疗的受试者中进行骨髓清除。取决于待治疗的障碍, 可对本方法中所使用的 CD34⁺ 干细胞进行或不进行遗传修饰。

1. 经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞在制备用于治疗患有肿瘤的受试者的药物中的用途, 其中每一个经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞包含外源核酸, 所述外源核酸包含 (i) 编码细胞毒性蛋白的区域, 所述区域与 (ii) 内皮特异性启动子或启动子 / 增强子组合有效连接, 由此当所述经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞邻近正在经历血管生成的肿瘤组织和在其邻近分化成内皮样细胞时, 选择性表达所述细胞毒性蛋白, 并且其中所述受试者未进行骨髓清除。

2. 权利要求 1 的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞的用途, 其中受试者是人。

3. 权利要求 1 或 2 的任一项目的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞的用途, 其中所述肿瘤选自前列腺肿瘤、胰腺肿瘤、鳞状细胞癌、乳腺肿瘤、黑色素瘤、基底细胞癌、肝细胞癌、睾丸癌、神经母细胞瘤、神经胶质瘤或恶性星形细胞肿瘤、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肺癌、卵巢肿瘤、宫颈肿瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤 / 平滑肌肉瘤、滑膜肉瘤、血管肉瘤、尤文氏肉瘤 / PNET 和恶性淋巴瘤。

4. 权利要求 3 的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞的用途, 其中所述肿瘤是胰腺肿瘤。

5. 权利要求 3 的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞的用途, 其中所述肿瘤是乳腺肿瘤。

6. 权利要求 2 的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞的用途, 其中所述肿瘤是已形成血管的肿瘤。

7. 权利要求 2 的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞的用途, 其中所述肿瘤是原发性肿瘤。

8. 权利要求 2 的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞的用途, 其中所述肿瘤是转移性肿瘤。

9. 权利要求 1 或 2 的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞的用途, 其中所述启动子 / 增强子组合是 Tie2 启动子 / 增强子, 所述细胞毒性蛋白是单纯疱疹病毒胸苷激酶, 并且以允许所述单纯疱疹病毒胸苷激酶产生更昔洛韦细胞毒性的方式用更昔洛韦治疗所述受试者。

10. 权利要求 1 或 2 的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞的用途, 其中所述经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞对于所述受试者来说是同种异体的。

11. 权利要求 1 或 2 的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞的用途, 其中所述经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞对于所述受试者来说是自体的。

12. 权利要求 1 或 2 的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞的用途, 其中治疗有效数量的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞是 1×10^3 至 1×10^7 个细胞 / kg 体重。

13. 权利要求 12 的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞的用途, 其中治疗有效数量的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞是 1×10^4 至 1×10^6 个细胞 / kg 体重。

14. 权利要求 13 的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞的用途, 其中治疗有效数量的经遗传修饰的 CD 34⁺ 间充质干细胞是 1×10^5 个细胞 / kg 体重。

15. 权利要求 1 或 2 的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞的用途, 其中经由单次注射施用所述经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞。

16. 权利要求 1 或 2 的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞的用途, 其中经由在一段时间内的重复注射施用所述经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞。

17. 权利要求 3 的经遗传修饰的 CD34⁺ 间充质干细胞的用途, 其中所述肿瘤是多形性胶质母细胞瘤。

CD34 干细胞相关方法和组合物

[0001] 相关应用

[0002] 本申请要求 2007 年 5 月 24 日提交的美国临时专利申请系列号 60/931,622 和 2007 年 11 月 14 日提交的美国临时专利申请系列号 61/003,050 的优先权。

[0003] 发明背景

发明领域

[0004] 在整个本申请中,引用了各种出版物。这些出版物以及上面所述的临时申请的公开内容,通过引用合并入本申请以更全面地描述本发明所属领域的状态。

[0005] 干细胞介导再生和遗传信息至后来细胞世代的传递。它们可自我更新和产生分化的后代。近年来,在我们对干细胞与它们的组织微生态环境 (tissue niche) 之间的相互作用背后的分子机制的理解中已取得了进步。这已导致对在干细胞中起作用的分子调控机制有了更好的理解。

[0006] 虽然基因疗法仍然是试验性方法,但该技术有希望对人健康产生重大影响。在过去数年中,基因疗法的范围和定义已发生了变化并且得到扩展。除了矫治遗传的遗传性障碍例如囊性纤维化、血友病和其他实体 (entities) 外,基因治疗法还已发展至抵抗获得性疾病例如癌症、AIDS、慢性血管缺血 (chronic vascular ischemia)、骨关节炎、糖尿病、帕金森病和阿尔茨海默病。

[0007] 目前,种系基因疗法由于其复杂技术性质和伦理考虑而未被涉及。然而,只对单个个体有益的 (不能代代相传的) 体细胞基因疗法是干细胞研究的主要焦点。从至鼠类造血干细胞内的成功基因转移的最初描述至先天患有 x- 连锁联合免疫缺陷 (SCID) 和腺苷脱氨酶缺陷 (ADA) - 缺陷的患者中的第一例明确成功的临床试验花费了 15 年以上的时间 (Aiuti 等人, 2002 ;Cavazzana-Calvo 等人, 2000 ;Gaspar 等人, 2004)。干细胞疗法的许多方面正在研究中。例如,逆转录病毒载体在许多情况下已被用于将基因转移入干细胞中以修复突变的或不完善的基因。此类情况包括严重联合免疫缺陷、范可尼贫血 (Fanconi anemia) 和其他血红蛋白病 (Herzog 等人, 2006)。

[0008] 干细胞工程的中心议题是用于将治疗性基因导入祖细胞的特殊方法学。因为逆转录病毒倾向于插入活性基因 (据认为凝缩的染色质在这些区域是打开的), 有人提出,它们的使用还可能增加癌症的风险 (Young 等人, 2006), 因为逆转录病毒载体插入参与细胞增殖的基因附近在理论上可产生前体癌干细胞 (precursor cancer stem cell)。然而,该类型事件的总体风险难以确定。现在有许多在慢性肉芽肿病 (CGD) 患者中取得完全成功的实例,其中 NADPH 氧化酶的活性在输注经遗传改变的血液干细胞后得到恢复 (Barese 等人, 2004)。

[0009] 富有成效的基因疗法的最低要求是在矫治生物学背景中治疗性基因产物的持续产生,同时有害副作用最小。为了达到该目的,基因疗法中干细胞的应用将需要发展调节治疗性基因表达的新策略以及用于将外源基因有效递送至干细胞的方法。通过在确定的组织环境中分化干细胞来选择性控制治疗性基因的表达是干细胞工程的重要目标。该方法可以

例如帮助控制干细胞分化成特定的谱系、维持它们的未分化状态以待日后移植、增殖,以及调控治疗性基因例如自杀基因、细胞因子或生长因子在确定的组织环境中的表达。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供了用于治疗患有胃肠障碍的受试者的方法,该方法包括将治疗有效数量的 CD34⁺ 干细胞导入受试者的血流,其中 (a) CD34⁺ 干细胞未被遗传修饰, (b) 在导入 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除 (myeloablation), 和 (c) 胃肠障碍以胃肠内皮中需要细胞增殖为特征。

[0012] 本发明还提供了用于治疗糖尿病受试者或前驱糖尿病受试者的方法,该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的 CD34⁺ 干细胞,其中 (a) CD34⁺ 干细胞未被遗传修饰, 和 (b) 在导入 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0013] 本发明还提供了用于治疗患有肌营养不良 (muscular dystrophy) 的受试者的方法,该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的非自体 CD34⁺ 干细胞,其中 (a) CD34⁺ 干细胞未被遗传修饰, 和 (b) 在导入 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0014] 本发明还提供了用于改善将要经历、正在经历或已经经历手术 (surgery) 的受试者的微循环和 / 或急性伤口愈合的方法,该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的 CD34⁺ 干细胞,其中 (a) 在即将经历手术之前、手术期间和 / 或手术后立即向受试者的血流中导入 CD34⁺ 干细胞, (b) CD34⁺ 干细胞未被遗传修饰, 和 (c) 在导入 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0015] 本发明还提供了用于改善将要经历、正在经历或已经经历身体创伤 (physical trauma) 的受试者的微循环和 / 或急性伤口愈合的方法,该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的 CD34⁺ 干细胞,其中 (a) 在即将经历身体创伤之前、身体创伤期间和 / 或身体创伤之后立即向受试者的血流中导入 CD34⁺ 干细胞, (b) CD34⁺ 干细胞未被遗传修饰, 和 (c) 在导入 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0016] 本发明还提供了用于治疗患有肿瘤的受试者的方法,该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞,其中 (a) 每一个经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞包含外源核酸,所述外源核酸包含 (i) 编码细胞毒性蛋白的区域 (其与 (ii) 启动子或启动子 / 增强子组合有效连接), 由此当经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞接近正在经历血管生成的肿瘤组织和在其邻近分化时,选择性表达细胞毒性蛋白, 和 (b) 在导入经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0017] 本发明提供了用于治疗患有胃肠障碍的受试者的方法,该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞,其中 (a) 每一个经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞包含外源核酸,所述外源核酸包含 (i) 编码增进内皮细胞生长的蛋白质的区域,该区域与 (ii) 内皮特异性启动子或启动子 / 增强子组合有效连接, (b) 在导入经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除, 和 (c) 胃肠障碍以胃肠内皮中需要细胞增殖为特征。

[0018] 本发明还提供了用于治疗糖尿病受试者或前驱糖尿病受试者的方法,该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞,其中 (a) 每一个经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞包含外源核酸,所述外源核酸包含 (i) 编码增进内皮细胞生长的蛋白质的区域,该区域与 (ii) 内皮特异性启动子或启动子 / 增强子组合有效连接, 和 (b)

在导入经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0019] 本发明提供了用于治疗患肌营养不良的受试者的方法,该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞,其中 (a) 每一个经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞包含外源核酸,所述外源核酸包含 (i) 编码在受试者的肌肉细胞中不存在的或表达不足的或其在受试者的肌肉细胞中过表达是期望的蛋白质的区域,该区域与 (ii) 肌肉特异性启动子或肌肉特异性启动子 / 增强子组合有效连接,和 (b) 在导入经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0020] 本发明还提供了用于改善将要经历、正在经历或已经经历手术的受试者的微循环和 / 或急性伤口愈合的方法,该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞,其中 (a) 每一个经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞包含外源核酸,所述外源核酸包含 (i) 编码增进内皮细胞生长的蛋白质的区域,该区域与 (ii) 内皮特异性启动子或启动子 / 增强子组合有效连接,和 (b) 在导入经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0021] 最后,本发明还提供了用于改善将要经历、正在经历或已经经历身体创伤的受试者的微循环和 / 或急性伤口愈合的方法,该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞,其中 (a) 每一个经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞包含外源核酸,所述外源核酸包含 (i) 编码增进内皮细胞生长的蛋白质的区域,该区域与 (ii) 内皮特异性启动子或启动子 / 增强子组合有效连接,和 (b) 在导入经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0022] 根据结合附图考虑的下列详细描述,本发明的其他目的和特征将变得明显。然而,应理解,附图只用于举例说明目的而不是对本发明的界限的界定,关于本发明的界限应当参考所附的权利要求。应当进一步理解,附图不必按照比例绘制,并且除非另外指明,否则它们只用于概念性地说明本文中描述的结构和方法。

[0023] 附图概述

[0024] 在附图中:

[0025] 图 1

[0026] 顶行:在四氧嘧啶 (ALX) 处理之前 (左) 和之后 (右) (胰岛素几乎完全耗尽),胰岛素在正常鼠的 β -胰岛中的表达。底行:不同放大倍数 (20x ;40x) 下的正常的产生胰岛素的 β -胰岛的大小 ;用 CD34⁻ 阴性干细胞 (SC) 治疗 ALX 处理后的胰岛素耗尽的 β -胰岛完全恢复胰岛素的产生,同时产生肥大的迹象 (20x 和 40x)。

[0027] 图 2

[0028] 来自在 ALX 诱导糖尿病后并且通过 SC 恢复胰岛素产生的鼠胰腺的分离细胞。用组成型表达的绿色荧光蛋白标记移植的 CD34⁻ 阴性干细胞,产生胰岛素的细胞显示红色荧光。不存在两种标记的共表达,这表明移植的干细胞本身不表达胰岛素而是促进内源性再生。

[0029] 图 3

[0030] 左图:在经过 ALX 处理后,无 SC 移植 (上)、具有 SC 移植但未矫正血糖水平 (中) 的小鼠和在 SC 移植后具有正常化的血糖水平 (下) 的小鼠的血糖水平。右图:只有显示在它们的胰腺 (经匀浆用于 FACS 分析和绿色荧光的检测) 中存在干细胞的小鼠 (E3 ;红圈)

显示正常化的血糖水平,这表明移植的细胞在矫正胰岛素的产生中的中枢作用。

[0031] 图 4

[0032] 上皮恶性肿瘤从原位癌发展至侵袭性癌并连接至内源血管系统的示意图。CD34- 阴性干细胞归巢至此处显示的新血管形成部位,从而可用作递送细胞毒性剂或免疫调节剂的特洛伊木马。

[0033] 图 5

[0034] 检测乳腺肿瘤中的 RFP- 阳性细胞。Tie2-RFP 转染的干细胞分化成内皮并且转录 RFP。(A) 用 DAPI 复染。(B) 形成血管的 RFP- 阳性细胞。

[0035] 图 6

[0036] 在 GCV 处理下减少的肿瘤进展。(A) 干细胞 -GCV 应用方案。如所示分别施用细胞悬浮液(第 0 天)和 GCV- 溶液(第 5-8 天)。在小鼠的治疗过程中体重的增加反映总的肿瘤负荷,因为所有乳腺都被涉及。在每一轮治疗的第 0 和第 5 天以及解剖的当天测量体重。(B) 小鼠的组,治疗始于第 22 周,显示标准差的平均数。将小鼠分选在一个治疗组和两个对照组中,第一对照组接受 1xPBS 而不接受干细胞悬浮液并且无药物注射(虚线);第二对照组接受用 Tie2-RFP 转染的干细胞悬浮液但不接受 GCV(点线)。治疗组如图 A 中所示接受干细胞和 GCV(实线)。(C) 治疗始于第 18 周的组,平均值和标准差。

[0037] 图 7

[0038] 解剖时的年龄。在第 22 周开始治疗的小鼠的对照组对治疗组。注意达到相似的肿瘤大小的时间的显著差异(参见表 1)和在用 MSC TK- 媒介物和 GCV 成功治疗后小鼠的延长的寿命。

[0039] 图 8

[0040] 肿瘤再生长模型:在第 18 周切除原发性乳腺肿瘤和在肿瘤的再生长期间起始 MSC/tk 治疗。

[0041] 图 9

[0042] 表达绿色荧光蛋白(GFP)的 MSC 归巢至正在生长的胰腺肿瘤。在平行实验中,经工程改造表达处于 Tie2 启动子/增强子的控制之下的红色荧光蛋白(RFP)的 MSC 显示在肿瘤血管系统中的定向表达。上行:经工程改造表达处于 CMV 启动子的控制之下的 GFP 的 MSC 在 i. v. 注射后归巢至肿瘤。下行:经工程改造表达处于 Tie2 的控制之下的 RFP 的 MSC。

[0043] 图 10

[0044] 然后在注射 C57B1/6MSC(Tie2-tk) 细胞后评估 tk/GCV 治疗的效果。

[0045] 治疗方案基本上与对于乳腺癌研究所述的一样。在第一天注射 500,000 个细胞,在之后的 3 天,让所述细胞募集至正在生长的肿瘤并且分化成表达内皮样 Tie2 的细胞,从而表达 TK 自杀基因。然后用 GVC 治疗小鼠,进行 4 天。在 1 天的休息后,在实验的持续时间中重复循环。

[0046] 图 11

[0047] 图显示用治疗性干细胞和 GCV 一起治疗原位胰腺肿瘤的效果的另外的实例。与未治疗组相比较,观察到肿瘤大小的显著减小(50%)以及减少的腹膜癌病(peritoneal carcinosis)。

[0048] 目前优选的实施方案的详述

[0049] 术语

[0050] 在本申请中,使用具有如下所示的意义的某些术语。

[0051] 如本文中所使用的,“急性伤口愈合”将包括,但不限于,在生物学和机械信号的控制下被激活以从受伤的时刻开始修复组织的细胞和分子过程。当贯穿临时基质的负荷与修复的细胞的反馈之间达到动态平衡时,发生成功的急性伤口愈合。

[0052] 如本文中所使用的,细胞对于受试者来说是“同种异体的”,如果其或任何其前体细胞来自相同物种的另一个受试者的话。

[0053] 如本文中所使用的,细胞相对于所述受试者是“自体的”,如果其或其前体细胞来自该相同的受试者的话。

[0054] 如本文中所使用的,“CD34⁺ 干细胞”表示在其表面上不存在 CD34 的干细胞。例如,在 Lange C. 等人, Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. J. Cell Physiol. 2007, Apr. 25 [在印刷之前电子公开] 中描述了 CD34⁺ 干细胞和用于分离其的方法。

[0055] 如本文中所使用的,“细胞增殖”应指细胞的分裂、大小上的生长和 / 或分化。

[0056] 如本文中所使用的,“细胞毒性蛋白”应表示当存在于细胞中、细胞上和 / 或与细胞邻近时,直接和 / 或间接引起该细胞死亡的蛋白质。细胞毒性蛋白包括例如自杀蛋白 (例如 HSV-tk) 和细胞凋亡诱导剂。细胞毒性基因包括用于基因抑制的零基因 (null gene), siRNA 或 miRNA (例如 CCR5^{-/-})。许多自杀基因系统已被鉴定,包括单纯疱疹病毒胸苷激酶基因、胞嘧啶脱氨酶基因、水痘 - 带状疱疹病毒胸苷激酶基因、硝基还原酶基因、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) gpt 基因和大肠杆菌 Deo 基因。胞嘧啶脱氨酶;细胞色素 P450;嘌呤核苷磷酸化酶;羧肽酶 G2;硝基还原酶。如在:Yazawa K, Fisher WE, Brunicardi FC: Current progress in suicide gene therapy for cancer. World J Surg. 2002 Jul; 26(7): 783-9 中所详细描述。细胞毒性因子包括下列因子:(i) 归巢因子 (homing factor) 例如趋化因子和粘蛋白趋化因子 GPI 融合物 (趋化因子衍生的试剂 (chemokine derived agent) 可用于促进经工程改造的干细胞的定向募集,参见,例如, PCT 国际申请号 PCT/EP2006/011508, 关于用 GPI 锚定的粘蛋白融合物);(ii) 作为细胞毒性蛋白的病毒抗原 (麻疹, 禽痘); 和 (iii) 可在经工程改造的干细胞的表面上呈递的 Her2/neu 抗原, 然后施用 her-2/neu 抗体, 和抗 CD52 表位的 **CamPath[®]** (阿仑珠单抗)。

[0057] 如本文中所使用的,“内皮细胞”应包括但不限于在称为血管生成的过程期间或之后形成血管中的内膜的衬里的细胞。控制该过程的因子称为血管生成因子。内皮细胞还通过受体 - 配体相互作用与循环血细胞发生作用。

[0058] 如本文中所使用的,“内皮特异性启动子或启动子 / 增强子组合”分别是当在内皮细胞中或在内皮细胞邻近时,引起有效连接的编码区的表达 (多于其在受试者的任何其他微环境中引起的表达) 的启动子或启动子 / 增强子组合。

[0059] 如本文中所使用的,核酸对于细胞来说是“外源的”,如果其已被人工导入该细胞或任何该细胞的前体细胞的话。

[0060] 如本文中所使用的,“胃肠障碍”应表示胃、小肠和 / 或大肠的任何障碍。

[0061] 如本文中所使用的,干细胞是“经遗传修饰的”,如果其或任何其前体细胞已具有

人工导入其的核酸的话。用于产生经遗传修饰的干细胞的方法包括病毒或非病毒基因转移（例如，质粒转移、噬菌体整合酶、转座子、AdV、AAV 和慢病毒）的使用。

[0062] 如本文中所使用的，“在即将经历事件之前”包括例如在所述事件之前 5、10 或 30 分钟之内或在所述事件之前 1、2、6、12 或 24 小时之内。“在事件之后立即”包括例如在所述事件之后 5、10 或 30 分钟之内或在所述事件之后 1、2、6、12 或 24 小时之内。

[0063] 如本文中所使用的，核酸至细胞内的“整合”可以是瞬时的或稳定的。

[0064] 如本文中所使用的，将 CD34⁺ 干细胞“导入受试者的血流”应包括但不限于通过注射将此类细胞导入受试者的静脉或动脉之一。这样的施用还可进行例如一次或多次，和/或持续一个或多个延长的时期。单次注射是优选的，但在一段时间内（例如，每季、每半年或每年）的重复注射在一些情况下可能是必需的。还优选使用 CD34⁺ 干细胞和药学上可接受的载体的混合物来进行这样的施用。药学上可接受的载体对于本领域内技术人员来说是熟知的，包括但不限于 0.01–0.1M 和优选 0.05M 的磷酸盐缓冲液或 0.8% 的生理盐溶液。此外，此类药学上可接受的载体可以是水性的或非水性的溶液、悬浮液和乳剂。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油和可注射的有机酯类例如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液、乳剂和悬浮液，包括生理盐溶液和经缓冲的介质。胃肠外媒介物包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸盐林格氏溶液和不挥发性油。静脉内媒介物包括流体和营养补充剂、电解质补充剂例如林格氏葡萄糖、基于林格氏葡萄糖的补充剂等。常用于 i.v. 施用的流体见于例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版, 第 808 页, Lippincott Williams & Wilkins (2000) 中。还可存在防腐剂和/或其他添加剂，例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

[0065] 如本文中所使用的，“微循环”应包括但不限于从微动脉至毛细血管或窦状隙 (sinusoid) 至小静脉的血液流动。在某些情况下，术语微循环也用于淋巴管。

[0066] 如本文中所使用的，“骨髓清除”应表示因例如高剂量的化疗或放射治疗的施用而引起的骨髓细胞的严重或完全耗尽。骨髓清除是标准方法，且描述于例如 Deeg HJ, Klingemann HG, Philips GL, A Guide to Bone Marrow Transplantation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1992 中。

[0067] 如本文中所使用的，干细胞是“未被遗传修饰的”，如果其和任何其前体细胞都不具有人工导入其的核酸的话。

[0068] 如本文中所使用的，“核酸”应表示任何核酸分子，包括但不限于 DNA、RNA 和其杂交体 (hybrid)。形成核酸分子的核酸碱基可以是碱基 A、C、G、T 和 U 以及其衍生物。此类碱基的衍生物在本领域内是熟知的，并且在 PCR Systems, Reagents and Consumables (PerkinElmer Catalogue 1996–1997, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, N. J., USA) 中进行了举例说明。

[0069] 如本文中所使用的，编码细胞毒性蛋白的核酸区域“有效连接”至启动子或启动子/增强子组合，如果这样的启动子或启动子/增强子组合引起所述细胞毒性蛋白的表达的话。

[0070] 如本文中所使用的，“多肽”表示氨基酸残基的聚合物。“肽”通常指较短的多肽（例如，10 个氨基酸残基），“蛋白质”通常指较长的多肽（例如，200 个氨基酸残基）。氨基酸残基可以是天然存在的或其化学类似物。多肽还可包括修饰例如糖基化、脂质附着、硫酸

化、羟基化和 ADP- 核糖基化。

[0071] 如本文中所使用的,“前驱糖尿病”受试者包括但不限于具有标志其将可能发生胰岛素依赖型糖尿病的症候群的受试者。前驱糖尿病受试者具有比正常胰岛素水平更高的胰岛素水平。

[0072] 如本文中所使用的,“启动子”包括但不限于内皮素-1 启动子、前内皮素原-1 (pre-proendothelin-1) 启动子、myoD 启动子、NeuroD 启动子、CD20 启动子、胰岛素启动子、Pdx-1 启动子、VEGF 启动子、VEGF-R 启动子、SCL 启动子、Sca1 启动子、BDNF (-R) 启动子、NGF (-R) 启动子和 EGF-R 启动子。

[0073] 如本文中所使用的,“启动子/增强子”包括但不限于 Tie2 启动子增强子以及 Flk1 启动子和内含增强子 (intronic enhancer)。

[0074] 如本文中所使用的,与组织“邻近”包括例如在组织的 1mm 内,在组织的 0.5mm 内以及在组织的 0.25mm 内。

[0075] 如本文中所使用的,当编码毒性蛋白的经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞邻近正在进行血管生成的肿瘤组织,以及在其邻近分化时,如果所述细胞毒性蛋白在该微环境中的表达超过其在该受试者中的任何其他微环境中的表达,那么所述细胞毒性蛋白被“选择性表达”。优选,细胞毒性蛋白在该微环境中的表达比其在受试者的任何其他微环境中的表达多至少 10 倍。

[0076] 如本文中所使用的,“受试者”应表示任何动物,例如人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、豚鼠或兔。

[0077] 如本文中所使用的,“治疗有效数量的 CD34⁺ 干细胞”包括但不限于下列量和量的范围:(i) 大约 1×10^2 至大约 1×10^8 个细胞/kg 体重;(ii) 大约 1×10^3 至大约 1×10^7 个细胞/kg 体重;(iii) 大约 1×10^4 至大约 1×10^6 个细胞/kg 体重;(iv) 大约 1×10^4 至大约 1×10^5 个细胞/kg 体重;(v) 大约 1×10^5 至大约 1×10^6 个细胞/kg 体重;(vi) 大约 5×10^4 至大约 0.5×10^5 个细胞/kg 体重;(vii) 大约 1×10^3 个细胞/kg 体重;(viii) 大约 1×10^4 个细胞/kg 体重;(ix) 大约 5×10^4 个细胞/kg 体重;(x) 大约 1×10^5 个细胞/kg 体重;(xi) 大约 5×10^5 个细胞/kg 体重;(xii) 大约 1×10^6 个细胞/kg 体重;和 (xiii) 大约 1×10^7 个细胞/kg 体重。设想的人体重包括但不限于大约 50kg、大约 60kg、大约 70kg、大约 80kg、大约 90kg 和大约 100kg。这些数目基于临床前动物实验和 CD34⁺ 造血干细胞移植的标准方案。单核细胞 (包括 CD34⁺ 细胞) 通常包含 1 : 23,000 至 1 : 300,000 的 CD34⁺ 细胞。

[0078] 如本文中所使用的,“治疗”患有障碍的受试者表示减慢、终止或逆转障碍的进程。在优选实施方案中,治疗患有障碍的受试者表示逆转障碍的进程,理想地达到消除障碍本身的点。如本文中所使用的,改善障碍和治疗障碍是等同的。

[0079] 如本文中所使用的,“肿瘤”应包括但不限于形成血管的肿瘤例如前列腺肿瘤、胰腺肿瘤、鳞状细胞癌、乳腺肿瘤、黑色素瘤、基底细胞癌、肝细胞癌、睾丸癌、神经母细胞瘤、神经胶质瘤或恶性星形细胞肿瘤例如多形性胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme)、结肠直肠肿瘤、子宫内膜癌、肺癌、卵巢肿瘤、宫颈肿瘤 (cervical tumor)、骨肉瘤、横纹肌肉瘤/平滑肌肉瘤、滑膜肉瘤、血管肉瘤、尤文氏肉瘤/PNET 和恶性淋巴瘤。此类肿瘤包括原发性肿瘤以及转移性疾病。

[0080] 如本文中所使用的,细胞相对于受试者是“异种的”,如果其或任何其前体细胞来

自不同物种的另一个受试者的话。

[0081] 本发明的实施方案

[0082] 本发明提供了用于治疗某些状况的新型的基于干细胞的方法。此类方法使用 CD34⁺ 干细胞（与更晚期干细胞相反）并且具有众多有利方面，因为它们对于待治疗的受试者不需要进行骨髓清除。用于本方法的 CD34⁺ 干细胞可被遗传修饰或可不被遗传修饰，取决于治疗的障碍。下面详细描述本方法，从使用未经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞的方法开始，然后是使用经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞的方法。

[0083] 具体地，本发明提供了用于治疗患胃肠障碍的受试者的方法，该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的 CD34⁺ 干细胞，其中 (a) CD34⁺ 干细胞未被遗传修饰，(b) 在导入 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除，和 (c) 胃肠障碍以胃肠内皮中需要细胞增殖为特征。

[0084] 在本方法中，胃肠障碍包括但不限于结肠炎、溃疡性结肠炎、炎性肠障碍、克罗恩病、由于急性和慢性肠缺血引起的结肠炎、乳糜泻 (celiac disease)、惠普尔病 (Whipple disease) 或干细胞移植后的移植物抗宿主病。

[0085] 本发明还提供了用于治疗糖尿病受试者或前驱糖尿病受试者的方法，该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的 CD34⁺ 干细胞，其中 (a) CD34⁺ 干细胞未被遗传修饰，和 (b) 在导入 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0086] 在本方法的一个实施方案中，受试者是 I 型糖尿病或 II 型糖尿病的前驱糖尿病患者。在另一个实施方案中，受试者是遭受 I 型糖尿病或 II 型糖尿病的糖尿病患者。

[0087] 本发明还提供了治疗患肌营养不良的受试者的方法，该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的非自体 CD34⁺ 干细胞，其中 (a) CD34⁺ 干细胞未被遗传修饰，和 (b) 在导入 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0088] 在本方法的优选实施方案中，受试者患有杜兴肌营养不良 (Duchenne muscular dystrophy) 或贝克肌营养不良 (Becker's muscular dystrophy)，并且 CD34⁺ 干细胞对于受试者是同种异体的。

[0089] 本发明还提供了用于改善将要经历、正在经历或已经经历手术的受试者的微循环和 / 或急性伤口愈合的方法，该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的 CD34⁺ 干细胞，其中 (a) 在即将经历手术之前、手术期间和 / 或手术后立即向受试者的血流中导入 CD34⁺ 干细胞，(b) CD34⁺ 干细胞未被遗传修饰，和 (c) 在导入 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0090] 本方法适合用于任何类型的手术，包括但不限于腹部手术、胸部手术 (thoracic surgery)、神经外科手术 (neurosurgery)、整型手术或创伤手术 (trauma surgery)。此外，手术可以是腹腔镜手术或开放手术 (open surgery)。

[0091] 本发明还提供了用于改善将要经历、正在经历或已经经历身体创伤的受试者的微循环和 / 或急性伤口愈合的方法，该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的 CD34⁺ 干细胞，其中 (a) 在即将经历身体创伤之前、身体创伤期间和 / 或身体创伤后立即向受试者的血流中导入 CD34⁺ 干细胞，(b) CD34⁺ 干细胞未被遗传修饰，和 (c) 在导入 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0092] 本方法适合于任何类型的身体创伤。特别预期的是 (i) 分娩，其中在即将经历该

事件之前、该事件期间或该事件之后立即向受试者的血流中导入 CD34⁺ 干细胞, (ii) 由剧烈动作引起的皮肉伤, 其中在身体创伤后立即向受试者的血流中导入 CD34⁺ 干细胞, 和 (iii) 烧伤, 其中在身体创伤后立即向受试者的血流中导入 CD34⁺ 干细胞。

[0093] 在使用未经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞的上述方法中, 治疗的受试者可以是任何受试者。在优选实施方案中, 受试者是人。此外, 在使用未经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞的方法中, 除非另外说明或指出, 否则 CD34⁺ 干细胞对于受试者来说可以是同种异体的、自体的或异种的。

[0094] 本发明提供了用于治疗患有肿瘤的受试者的方法, 该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞, 其中 (a) 每一个经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞包含外源核酸, 所述外源核酸包含 (i) 编码细胞毒性蛋白的区域 (其与 (ii) 启动子或启动子 / 增强子组合有效连接), 由此当经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞接近正在经历血管生成的肿瘤组织和在其邻近分化时, 选择性表达细胞毒性蛋白, 和 (b) 在导入经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0095] 预期该方法可用于所有肿瘤类型, 包括例如前列腺肿瘤、胰腺肿瘤、鳞状细胞癌、乳腺肿瘤、黑色素瘤、基底细胞癌、肝细胞癌、睾丸癌、神经母细胞瘤、神经胶质瘤或恶性星形细胞肿瘤例如多形性胶质母细胞瘤、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肺癌、卵巢肿瘤、宫颈肿瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤 / 平滑肌肉瘤、滑膜肉瘤、血管肉瘤、尤文氏肉瘤 / PNET 和恶性淋巴瘤。

[0096] 还预期许多启动子 / 增强子组合和细胞毒性蛋白可用于该方法。在一个实施方案中, 启动子 / 增强组合是 Tie2 启动子 / 增强子, 细胞毒性蛋白是单纯疱疹病毒胸苷激酶, 并且以允许单纯疱疹病毒胸苷激酶呈递更昔洛韦® (ganciclovir®) 细胞毒性的方式用更昔洛韦® 治疗受试者。更昔洛韦® 和其使用方法在本领域内是熟知的。

[0097] 本发明还提供了用于治疗患有胃肠障碍的受试者的方法, 该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞, 其中 (a) 每一个经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞包含外源核酸, 所述外源核酸包含 (i) 编码增进内皮细胞生长的蛋白质的区域, 该区域与 (ii) 内皮特异性启动子或启动子 / 增强子组合有效连接, (b) 在导入经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除, 和 (c) 胃肠障碍以胃肠内皮中需要细胞增殖为特征。

[0098] 在该方法中, 胃肠障碍优选是结肠炎、溃疡性结肠炎、炎性肠障碍或克罗恩病。

[0099] 预期许多启动子 / 增强子组合和增进内皮细胞生长的蛋白可用于该方法。在一个实施方案中, 启动子 / 增强子组合是 Tie2 启动子 / 增强子, 增进内皮细胞生长的蛋白是血管内皮生长因子 (VEGF)。除了 VEGF 外, 还预期其他血管生成因子例如 HIF-1a 和碳酸酐酶 IX。

[0100] 本发明还提供了用于治疗糖尿病受试者或前驱糖尿病受试者的方法, 该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞, 其中 (a) 每一个经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞包含外源核酸, 所述外源核酸包含 (i) 编码增进内皮细胞生长的蛋白质的区域, 该区域与 (ii) 内皮特异性启动子或启动子 / 增强子组合有效连接, 和 (b) 在导入经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0101] 在本方法的一个实施方案中, 受试者是 I 型糖尿病或 II 型糖尿病的前驱糖尿病患者

者。在另一个实施方案中,受试者是遭受 I 型糖尿病或 II 型糖尿病的糖尿病患者。

[0102] 预期许多启动子/增强子组合和增进内皮细胞生长的蛋白可用于该方法。在一个实施方案中,启动子/增强子组合是 Tie2 启动子/增强子,增进内皮细胞生长的蛋白是与血管生成相关的血管内皮生长因子 (VEGF)。

[0103] 本发明还提供了用于治疗患肌营养不良的受试者的方法,该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞,其中 (a) 每一个经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞包含外源核酸,所述外源核酸包含 (i) 编码在受试者的肌肉细胞中不存在的或表达不足的或其在受试者的肌肉细胞中过表达是期望的蛋白质的区域,该区域与 (ii) 肌肉特异性启动子或肌肉特异性启动子/增强子组合有效连接,和 (b) 在导入经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0104] 在本方法的优选实施方案中,受试者患有杜兴肌营养不良或贝克肌营养不良,并且 CD34⁺ 干细胞对于受试者是同种异体的或自体的。

[0105] 预期许多肌肉特异性启动子/增强子组合可用于该方法。在一个实施方案中,肌肉特异性启动子/增强子组合是 MyoD 启动子/增强子。在杜兴肌营养不良的优选实施方案中,受试者的肌肉细胞中不存在的蛋白质是肌养蛋白 (dystrophin)。

[0106] 本发明还提供了用于改善将要经历、正在经历或已经经历手术的受试者的微循环和/或急性伤口愈合的方法,该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞,其中 (a) 每一个经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞包含外源核酸,所述外源核酸包含 (i) 编码增进内皮细胞生长的蛋白质的区域,该区域与 (ii) 内皮特异性启动子或启动子/增强子组合有效连接,和 (b) 在导入经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0107] 该方法适合于任何类型的手术,包括但不限于腹部手术、胸部手术、神经外科手术或整形手术。此外,手术可以是腹腔镜手术或开放手术。

[0108] 预期许多启动子/增强子组合和增进内皮细胞生长的蛋白可用于该方法。在一个实施方案中,启动子/增强子组合是 Tie2 启动子/增强子,增进内皮细胞生长的蛋白是与血管生成相关的血管内皮生长因子 (VEGF)。

[0109] 最后,本发明提供了用于改善将要经历、正在经历或已经经历身体创伤的受试者的微循环和/或急性伤口愈合的方法,该方法包括向所述受试者的血流中导入治疗有效数量的经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞,其中 (a) 每一个经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞包含外源核酸,所述外源核酸包含 (i) 编码增进内皮细胞生长的蛋白质的区域,该区域与 (ii) 内皮特异性启动子或启动子/增强子组合有效连接,和 (b) 在导入经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞之前、同时或之后未进行骨髓清除。

[0110] 本方法适合于任何类型的身体创伤。特别预期的是 (i) 分娩, (ii) 由剧烈动作引起的皮肉伤,其中在身体创伤后立即向受试者的血流中导入 CD34⁺ 干细胞,和 (iii) 烧伤,其中在身体创伤后立即向受试者的血流中导入 CD34⁺ 干细胞。

[0111] 预期许多启动子/增强子组合和增进内皮细胞生长的蛋白可用于该方法。在一个实施方案中,启动子/增强子组合是 Tie2 启动子/增强子,增进内皮细胞生长的蛋白是与血管生成相关的血管内皮生长因子 (VEGF)。

[0112] 在使用经遗传修饰的 CD34⁺ 干细胞的上述方法中,治疗的受试者可以是任何受试

者。在优选实施方案中,受试者是人。此外,在使用经遗传修饰的 CD34⁻ 干细胞的方法中,除非另外说明或指出,否则 CD34⁻ 干细胞对于受试者来说可以是同种异体的、自体的或异种的。

[0113] 在使用经遗传修饰的 CD34⁻ 干细胞的本方法中,当干细胞 (i) 邻近靶组织中的适当细胞, (ii) 分化和 / 或 (iii) 与靶组织中的适当细胞融合时,外源基因表达,即“打开”。

[0114] 用于本发明的各种蛋白质和调控序列可由本领域技术人员容易地获得。例如, Tie2 启动子增强子的内皮细胞特异性示于 Schlaeger TM, Bartunkova S, Lawitts JA, Teichmann G, Risau W, Deutsch U, Sato TN. Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1997 94 :3058-63 中。对于胸苷激酶,可使用 HSV TK-V00467 疱疹基因 (ATP:胸苷 5' 磷酸转移酶, e. c. 2. 7. 1. 21) (I 型株系 CL101)。

[0115] 通过参考下面的实验细节可更好地理解本发明,但本领域技术人员将容易地理解,所述的特定实验只是在其后的权利要求中更详尽描述的本发明的举例说明。

[0116] 实验细节 (Experimental Detail)

[0117] 第 I 部分

[0118] 用于治疗性基因递送的经遗传工程改造的转基因 CD34⁻ 阴性干细胞

[0119] 概述

[0120] 干细胞和基因疗法极有希望用于开发治疗许多威胁生命的疾病的新工具。干细胞疗法与选择性基因疗法的结合增加了患病或丢失的细胞的再生或替代的治疗选择。CD34⁻ 阴性、体外贴壁生长的干细胞的分化背景中的组织特异性基因表达可用于产生转基因 CD34⁻ 阴性祖细胞,这将导致细胞的选择性以及基因表达的可诱导性 (也出于安全原因)。病毒和非病毒基因递送技术已获得详细地描述,同样地也详细描述了用于在干细胞募集和分化的背景中调节基因表达的技术。该新治疗策略的潜在临床应用描述为,将转基因祖细胞导入癌症或组织再生的部位,从而诱导抗肿瘤治疗或促进组织改建 (remodeling) 和伤口愈合。转基因祖细胞用作有效的基因递送媒介物。

[0121] 作为基因递送媒介物的干细胞

[0122] 干细胞提供了为其他疗法难以治疗的疾病提供细胞疗法的潜能。对于每一种类型的干细胞,最终目标是一样的:所述细胞应当表达特定的基因库 (repertoire of gene),从而改变细胞身份以维持、替代或拯救特定组织。为了帮助支持特定组织环境中的分化,正在尝试改变干细胞的“细胞核编程 (nuclear programming)”。

[0123] 多能干细胞、间充质干细胞和多能成体祖细胞 (multipotent adult progenitor cell, MAPC) 代表有希望的干细胞群体,因为它们能够沿着不同的谱系分化。它们代表驱动成年哺乳动物组织的更新的“细胞引擎”。此类细胞在整个生命周期中连续分裂而产生经历分化和成熟的程序的新后代细胞来取代更老的死亡的组织细胞。在一些情况下,所述细胞更新程序被认为提供了用于成体组织的修复和再生的细胞源。不同干细胞类型的再生潜能构成了当前使人们对使此类细胞适用于细胞替代疗法 (replacement therapy) 产生兴趣的基础。

[0124] 用于治疗干细胞的潜在来源包括骨髓、外周血、CNS、肝、胰腺、肌肉、皮肤、肺、肠、心脏和脂肪 (Koerbling M, Estrov Z, Adult stemcells for tissue repair-anew

therapeutic concept?)NEJM2003349:570-582)。对于临床应用,干细胞的来源应当容易得到和容易收获(同时对于患者风险最小)并且提供充足的细胞。在这点上,脂肪组织代表了很有希望的组织来源。(Adipose derived stem cells for the regeneration of damaged tissue Parker M, Adam K, Expert Opin Biol Therap, 2006, 567-568)。脂肪来源的干细胞和骨髓来源的干细胞共有相似的生长动力学、细胞衰老的特征、基因转导效率、CD 表面标记表达和基因转录特征谱 (Cells Tissues Organs. 2003;174(3):101-9. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH, Mol Biol Cell. 2002 Dec;13(12):4279-95. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH)。

[0125] 还对不同来源的干细胞用作用于抵抗疾病的细胞和基因特异疗法的潜在媒介物进行了评价。它们的高自我更新潜能使它们成为恢复或替代器官系统和 / 或递送基因产物的极有希望的候选物。虽然祖细胞在体外可显示良好的增殖和分化潜能,但它们在体内的生物学特性仍不明确。体外扩增的干细胞代表异质群体,其包括缺乏大多数分化标记如 CD34 的表达的多代间充质(基质)细胞后代。此类群体可能仍然保留有限的增殖潜能和对沿着间充质和非间充质细胞谱系的终末分化和成熟的应答性。将来,多能干细胞群体的更好的标记将有望提高区分此类干细胞与其他祖细胞群体的能力。

[0126] 用于在矫治生物学背景中递送治疗性基因表达的组织特异性启动子。

[0127] 干细胞介导的治疗最终需要进行核重编程 - 改变不同组织和器官中的细胞类型的独特的基因表达模式。在许多遗传性干细胞疾病中,遗传缺陷将存活的不利方面赋予受影响的干细胞群体。在此类疾病中,“矫正的”干细胞群体的移植据认为在不存在任何外加的选择压力的情况下进行自发的体内选择。例如,在 X-连锁 SCID 中,治疗性转基因的导入为经转导的细胞群体提供了持续增殖和存活有利方面 (Neff 等人, 2006)。然而,相似的体内选择作用在大部分疾病中通常不是直接可能的。在其中治疗性基因的过表达不提供存活有利方面的情况下,可将第二选择基因(理想地处于药物调控之下的)整合入载体 (Tirona 和 Kim, 2005)。允许受药物调控的选择的系统包括使用所谓的“二聚化的化学诱导剂”(chemical inducers of dimerization, CID) 的可逆蛋白质 - 蛋白质相互作用。此类系统依赖于两个组分。第一组分是配体或药物,第二组分是结合配体结合蛋白结构域和效应结构域(通常为生长因子受体的细胞内部分)的融合蛋白。效应结构域通过药物结合而被激活,从而导致蛋白质二聚化。从而,信号融合用作在 CID 存在时打开和在 CID 撤出后关闭的开关。将象这样的系统整合入干细胞群体可以使得能够药物依赖性地控制所转导的细胞群体的增殖 (Neff 等人, 2006; Neff and Blau, 2001)。

[0128] 可以看到,干细胞作为治疗性基因的递送媒介物的用途提供了一系列有利方面。干细胞通常被活跃地募集至损伤的组织,在组织修复过程中它们在该处进行分化。例如 CD34+ 骨髓来源的祖细胞通过分化成内皮细胞、血管平滑肌细胞、造血细胞和可能地其他细胞类型来促成组织修复。然而,循环祖细胞归巢至改建组织的机制仍然不清楚。Jin 等人已证明整联蛋白 $\alpha 4 \beta 1$ (VLA-4) 可促进循环祖细胞归巢至在活跃改建的新生血管上表达的 $\alpha 4 \beta 1$ 配体 VCAM 和细胞纤连蛋白。已显示,表达整联蛋白 $\alpha 4 \beta 1$ 的祖细胞归巢至活跃的

肿瘤新血管形成位置,但不归巢至正常组织。整联蛋白 $\alpha 4 \beta 1$ 但非其他整联蛋白的拮抗剂可阻断此类细胞与内皮的粘附和发展成分化的细胞类型。(Jin 等人,2006)

[0129] 除了整联蛋白外,趋化因子和它们的受体也显示在干细胞的组织特异性归巢中起着中心作用。基于它们的趋化因子受体表达谱,预测 CD34⁺MSC 将归巢至次级淋巴器官 (CCR7)、皮肤 (CCR4, CCR10)、小肠 (CCR10) 和唾液腺 (CCR10)。在用 CMFDA 短暂地标记 CD34⁺MSC 或稳定地导入绿色荧光蛋白 (GFP) 表达质粒后,将细胞注射入同基因型健康小鼠,然后在 1、3 和 7 天后测定细胞的组织分布。有趣地,干细胞不回归至骨髓,而是根据它们的趋化因子受体表达谱迁移至次级淋巴器官、唾液腺、肠和皮肤。

[0130] 假定干细胞在正常以及患病情况下可显示至不同组织微环境的选择性迁移,那么在理论上可使用与在被募集的干细胞中启动的分化途径相关的组织特异性启动子来驱动治疗性基因只在确定的生物学背景中选择性表达。被募集至其他组织微生态环境,但不进行相同的分化程序的干细胞将不表达所述治疗性基因。该方法允许在显著的程度潜在地控制治疗性基因在确定的微环境中选择性表达并且已成功地用于在新血管形成过程中调节治疗性基因表达。

[0131] 许多启动子已就它们的组织特异性表达进行了表征。该信息的详细来源可见于转基因文献,或例如见于各种数据库,所述数据库列出了 CRE 转基因表达 (用于驱动小鼠的组织特异性 CRE/Lox 靶向基因缺失模型) 的组织特异性启动子活性 (例如: <http://www.mshri.on.ca/nagy/Cre-works.htm>)。可导入在炎症或新血管形成的背景中被选择性调控的启动子。在这点上,已就内皮特异性表达研究了 Tie2- 启动子、Flk1 启动子和内含启动子、内皮素 -1 启动子和前内皮素原 -1 启动子 (Huss 等人,2004)。特定报告基因和新成像技术的应用可用于确定候选启动子在干细胞移植背景中的组织特异性表达。关于基因递送的其他选择包括将内部核糖体进入位点 (IRES) 信号用于从单个启动子表达多个基因 (Jackson, 2005),例如,可将与报告基因连接的治疗性基因用于在实验背景下更好地跟踪治疗性基因表达的分布。

[0132] 重要地,许多启动子可显示在其他组织类型中的表达“渗漏”或在经工程改造的细胞中的低水平基础表达。启动子工程改造是项新技术,其可允许人们“调节”启动子特异性以限制跨组织活性,从而允许将表达更好地限制至特定细胞类型 (Fessele 等人,2002; Werner 等人,2003)。

[0133] 基因递送方法

[0134] 目前可用于干细胞工程的各种基因递送方法包括病毒和非病毒载体以及转染的生物学或化学方法。所述方法可在所使用的系统中产生稳定的基因表达或瞬时基因表达。

[0135] 病毒基因递送系统

[0136] 由于经遗传修饰的病毒的高转染效率,它们已被广泛用于将基因递送至干细胞内。

[0137] DNA 病毒载体

[0138] (i) 腺病毒

[0139] 腺病毒是双链、无包膜二十面体病毒,其包含 36kb 的病毒基因组 (Kojaoghlanian 等人,2003)。取决于其表达是在 DNA 复制之前还是之后发生,它们的基因被分类为早期 (E1A、E1B、E2、E3、E4)、延迟 (delayed) (IX, IVa2) 和主要晚期 (L1、L2、L3、L4、L5) 基因。

迄今为止,已描述了 51 个可在多种器官中感染和复制的人腺病毒血清型。病毒被分类为下列亚型:A-以高频率和短潜伏期诱导肿瘤,B-具有微弱的致癌性,和 C-是不致癌的(Cao 等人,2004;Kojaoghlanian 等人,2003)。

[0140] 此类病毒已用于产生一系列用于基因转移细胞工程的载体。第一代腺病毒载体是通过缺失 E1 基因(病毒复制所必需的),从而产生具有 4kb 克隆容量(cloning capacity)的载体来产生的。E3(负责宿主免疫应答)的额外缺失提供了 8kb 的克隆容量(Bett 等人,1994;Danthinne 和 Imperiale,2000;Danthinne 和 Werth,2000)。第二代载体是通过缺失 E2 区域(病毒复制所必需的)和/或 E4 区域(参与宿主细胞细胞凋亡的抑制)以及缺失 E1 或 E3 来产生的。所得的载体具有 10-13kb 的克隆容量(Armentano 等人,1995)。第三“guttet”代的载体是通过缺失除了反向末端重复(ITRs)和顺式作用包装信号外的全部病毒序列来产生的。此类载体具有 25kb 的克隆容量(Kochanek 等人,2001)并且保留它们在静止和分裂细胞中的高转染效率。

[0141] 重要地,腺病毒载体通常不整合入宿主细胞的基因组,但它们已显示将基因瞬时递送入成体干细胞的功效。此类载体具有一系列有利和不利方面。重要的有利方面是它们可以以高滴度扩增并且可感染多种细胞(Benihoud 等人,1999;Kanerva and Hemminki,2005)。一般地,载体由于它们在各种贮存条件下的稳定性而容易操作。腺病毒 5 型(Ad5)已被成功用于递送基因至人和小鼠干细胞中(Smith-Arica 等人,2003)。腺病毒不整合入宿主细胞遗传物质在许多情况下可视为不利方面,因为其使用只允许治疗性基因的瞬时表达。

[0142] 例如在评估当 TGF- β 1 和骨形态发生蛋白-2(BMP-2)通过腺病毒介导的表达递送时,间充质干细胞进行软骨形成的能力的研究中,发现软骨形成与瞬时表达的蛋白质的水平和持续时间密切相关。所有聚集体(aggregate)中转基因表达是高度短暂的,显示在 7 天后显著减少。软骨形成在经修饰表达 > 100ng/ml TGF- β 1 或 BMP-2 的聚集体中被抑制;然而,这部分是由于暴露于高腺病毒负荷的抑制作用(Mol Ther. 2005Aug;12(2):219-28. Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro. Palmer GD, Steinert A, Pascher A, Gouze E, Gouze JN, Betz O, Johnstone B, Evans CH, Ghivizzani SC.)。在使用携带重组人骨形态发生蛋白-7(BMP-7)基因的腺病毒转导的大鼠脂肪来源的干细胞的第二模型中,显示了干细胞的自体来源用于 BMP 基因治疗的极具前景的结果。然而,通过体外测量碱性磷酸酶来估量的活性是短暂的,其在第 8 天达到峰值。因此结果与在软骨形成模型中发现的结果相似(Cytherapy. 2005;7(3):273-81)。

[0143] 因此,对于不需要稳定的基因表达的治疗或实验,腺病毒载体可以是良好的选择。使用腺病毒载体的另外的重要问题是它们可在经工程改造的细胞转移入宿主后引起针对所述经工程改造的细胞的强免疫应答。显然,当考虑在治疗情况下应用经工程改造的细胞时,这可以是重要的问题。(J. N. Glasgow 等人, Transductional and transcriptional targeting of adenovirus for clinical applications. Curr Gene Ther. 2004Mar;4(1):1-14). In vitro and in vivo induction of bone formation based on ex vivo gene therapy using rat adipose-derived adult stem cells expressing BMP-7, Yang M, Ma QJ, Dang GT, Ma K, Chen P, Zhou CY.)

[0144] 已显示,基于 Ad 5 型的腺病毒载体通过主受体(primary receptor)柯萨奇病毒

和腺病毒受体 (CAR) 有效且短暂地导入外源基因。然而,一些类型的干细胞例如 MSC 和造血干细胞因为不存在 CAR 表达而明显不能用基于 Ad 血清型 5(Ad5) 的常规腺病毒载体来有效转导。为了克服该问题,已开发了纤维修饰 (fiber-modified) 腺病毒载体和基于另一种腺病毒血清型的腺病毒载体。(Mol Pharm. 2006Mar-Apr ;3(2) :95-103. Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells. Kawabata K, Sakurai F, Koizumi N, Hayakawa T, Mizuguchi H. Laboratory of Gene Transfer and Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan.)

[0145] (ii) 腺伴随病毒

[0146] 腺伴随病毒 (AAV) 是细小病毒科的 ssDNA 动物病毒的普遍存在的、非致细胞病变的、不能复制的成员 (G. Gao 等人, New recombinant serotypes of AAV vectors. Curr Gene Ther. 2005 Jun ;5(3) :285-97)。AAV 是具有 4.7kb 基因组的小二十面体病毒。此类病毒具有由折叠成发夹结构的回文重复组成的特征末端。它们在辅助病毒的帮助下复制,所述辅助病毒通常是腺病毒的许多血清型之一。在辅助病毒不存在的情况下,它们在第 19 号染色体的特定基因座 (AAVS1) 上整合入人基因组并且保持潜伏态直至辅助病毒感染发生 (Atchison 等人, 1965, 1966)。AAV 可转导来自不同物种包括小鼠、大鼠和猴子的细胞类型。在血清型中, AAV2 的研究最详尽并且被广泛用作基因递送载体。其基因组编码两个巨大的开放读框 (ORF) rep 和 cap。Rep 基因编码在病毒生命周期的不同阶段 (例如 DNA 复制、转录控制、位点特异性整合、用于病毒包装的单链基因组的积累) 起着重要作用的 4 种蛋白 Rep78、Rep68、Rep52 和 Rep40。cap 基因编码 3 种病毒壳体蛋白 VP1、VP2、VP3 (Becerra 等人, 1988 ; Buning 等人, 2003)。基因组 3' 末端用作第二链合成的引物并且具有用作病毒的整合序列的末端断裂位点 (terminal resolution site, TRS), 因为该序列与第 19 号染色体上的序列相同 (Young 和 Samulski, 2001 ; Young 等人, 2000)。

[0147] 此类病毒与腺病毒的相似之处在于它们能够感染广泛的分裂和非分裂细胞。与腺病毒不同, 它们具有在人基因组的特定位置整合入宿主基因组的能力。不幸的是, 由于它们的基因组相当大, 因此 AAV 载体具有有限的转移外源基因插入物的容量 (Wu 和 Ataai, 2000)。

[0148] RNA 病毒载体

[0149] (i) 逆转录病毒

[0150] 逆转录病毒基因组由两个相同的单链有义 RNA 拷贝组成, 其长度为 7-10kb, 编码 3 个基因 : gag、pol 和 env, 侧翼有长末端重复 (LTR) (Yu 和 Schaffer, 2005)。gag 基因编码包含基质和核壳体元件 (其为 gag 前体蛋白的切割产物) 的核心蛋白壳体。pol 基因编码来源于 gag-pol 前体基因的病毒蛋白酶、逆转录酶和整合酶。env 基因编码介导病毒进入的包膜糖蛋白。逆转录病毒基因组的重要特征是在基因组的每一末端存在 LTR。此类序列有助于病毒 DNA 合成的起始、调节前病毒 DNA 至宿主基因组的整合以及用作病毒基因转录调控中的启动子。逆转录病毒被细分为 3 个大组 : 致癌逆转录病毒 (莫洛尼鼠白血病病毒, MoMLV)、慢病毒 (HIV) 和泡沫病毒 (spumavirus) (泡沫病毒 (foamy virus)) (Trobridge 等人, 2002)。

[0151] 基于逆转录病毒的载体是最常使用的基因治疗整合载体。此类载体通常具有大约 8kb 的克隆容量, 且通常通过完全缺失除了 LTR 和顺式作用包装信号外的病毒序列来产生。

[0152] 逆转录病毒载体在基因组的随机位置上整合。与此相关的问题包括潜在的插入诱变和由 LTR 驱动的潜在的致癌活性。LTR 的 U3 区域具有启动子和增强子元件,因此该区域,当从载体缺失时,可导致其中 LTR 驱动的转录被阻止的自失活载体 (self-inactivating vector)。内部启动子然后可用于驱动转基因的表达。

[0153] 小鼠干细胞基因转移的初步研究产生了这样的希望,即至人中的基因转移将同样是有有效的 (O' Connor 和 Crystal,2006)。不幸的是,使用可获得的逆转录病毒载体系统转染多谱系长期再生的干细胞的基因转移在小鼠中仍然显著更有效率。逆转录病毒载体在人中基因转移功效的减少以及不受控制的整合代表了在干细胞工程背景中将此类载体用作治疗手段的重要障碍。

[0154] (ii) 慢病毒

[0155] 慢病毒是病毒的逆转录病毒科的成员 (M. Scherr 等人, Genetransfer into hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. Curr Gene Ther. 2002Feb ;2(1) : 45-55.)。它们具有与致癌逆转录病毒相比较更复杂的基因组和复制周期 (Beyer 等人, 2002)。它们与较简单的逆转录病毒的不同之处在于它们具有额外的调控基因和元件,例如介导病毒转录的反式激活的 tat 基因 (Sodroski 等人,1996) 和介导未剪接的病毒 RNA 的细胞核输出的 rev (Cochrane 等人,1990 ;Emerman 和 Temin,1986)。

[0156] 通过除去病毒复制所必需的基因 (而使病毒无活性) 来从人免疫缺陷病毒 (HIV-1) 获得慢病毒载体。尽管它们缺乏复制基因,但载体仍然能够有效整合入宿主基因组,从而使得转基因能够稳定表达。此类载体具有额外的有利方面,低细胞毒性和感染不同细胞类型的能力。也已从猿猴、马科和猫科动物来源开发出慢病毒载体,但来源于人免疫缺陷病毒 (HIV) 的载体是最常用的 (Young 等人,2006)。

[0157] 慢病毒载体通过缺失除了 LTR 和顺式作用包装信号外的全部病毒序列来产生。所得的载体具有大约 8kb 的克隆容量。此类载体与逆转录病毒载体的一个不同的特征是它们转导分裂和非分裂细胞以及终末分化的细胞的能力 (Kosaka 等人,2004)。慢病毒递送系统能够在人间充质和胚胎干细胞中具有高感染率。在由 Clements 等人进行的研究中,慢病毒的主链经改造表达单和双顺反子转基因,并且还可用于递送用于在人干细胞中特异性沉默基因表达的短发夹核糖核酸。(TissueEng. 2006Jul ;12(7) :1741-51. Lentiviral manipulation of geneexpression in human adult and embryonic stem cells. ClementsMO, Godfrey A, Crossley J, Wilson SJ, Takeuchi Y, Boshoff C.)

[0158] 表 1 概述了上述病毒载体。

[0159]

载体	插入容量 (kb)	向性	载体基因组形式	表达	炎症潜力	效率
包膜的						

[0160]

逆转录病毒	8	仅分裂细胞	整合型	稳定	低	高
慢病毒	8	分裂和非分裂细胞	整合型	稳定	低	高
无包膜的						
腺伴随病毒	< 5	分裂和非分裂细胞	附加型和整合型	稳定	低	高
腺病毒	4-25	分裂和非分裂细胞	附加型	瞬时	高	高

[0161] 非病毒基因递送系统

[0162] (i) 用于促进基因整合的方法

[0163] 除了上面论述的基于病毒的载体外,目前正在开发缺乏病毒序列的其他载体系统。备选策略包括常规质粒转移和利用整合酶或转座酶技术进行的靶向基因整合的应用。这些策略代表了用于载体整合的重要的新方法并且在它们的整合中具有有效和通常位点特异性的有利方面。目前3种重组酶系统可获得用于遗传工程:来自噬菌体P1的cre重组酶(Lakso等人,1992;Orban等人,1992)、来自酵母2微米质粒的FLP(翻转酶)(Dymecki, 1996;Rodriguez等人,2000)和从链霉菌噬菌体(streptomyses phage) $\hat{\mathbf{I}}$ C31分离的整合酶(Ginsburg and Calos, 2005)。这些重组酶的每一种识别特异性靶整合位点。Cre和FLP重组酶分别在称为lox P(用于交换的基因座)和FRT(FLP重组酶的靶)的34bp回文序列上催化整合。噬菌体整合酶催化哺乳动物基因组中的两个短att识别位点之间的位点特异性单向重组。重组导致整合(当att位点存在于两个不同的DNA分子上时)和缺失或倒位(当att位点存在于相同分子上时)。已发现其在组织培养细胞(体外)和小鼠(体内)中起作用。

[0164] 睡美人(Sleeping Beauty, SB)转座子由两个各自340个碱基对的反向末端重复组成(Izsvak等人,2000)。该系统指导特定构建体从供体质粒精确转移至哺乳动物染色体。转座子从质粒载体至染色体位点的切割和整合由SB转座酶介导,该转座酶可以以顺式或反式方式被递送至细胞(Kaminski等人,2002)。染色体整合的转座子中的基因可在细胞中终生表达。SB转座酶随机地在TA-二核苷酸碱基对上整合,虽然侧翼序列可影响整合。虽然迄今为止的结果不表明SB转座子的随机整合代表了相同的对于病毒载体所观察到的风险水平,但在该系统可安全地用于人试验之前需要更多的数据。

[0165] 将载体导入细胞的物理方法

[0166] (i) 电穿孔

[0167] 电穿孔依赖于通过克服膜电容在膜上产生瞬间小孔的短暂的、高电压电脉冲的使

用。该方法的一个有利方面是其可用于大多数细胞类型的稳定和瞬时基因表达。该技术依赖于磷脂膜中疏水和亲水相互作用的相对弱的性质以及其在扰乱后恢复其原始状态的能力。当膜被击穿时,极性分子可以以高的效率被递送入细胞。大的带电荷分子如 DNA 和 RNA 通过由它们的电泳梯度驱动的过程移入细胞。脉冲的振幅控制细胞表面上被击穿的总面积,脉冲的持续时间确定击穿的程度 (Gabriel 和 Teissie,1997)。细胞的穿透状态取决于脉冲的强度。强脉冲可导致对细胞的不可逆的击穿、不可修复的损伤和最终细胞死亡。为此,电穿孔可能是最剧烈的基因递送方法,其通常需要更大数量的 DNA 和细胞。该方法的效率取决于许多至关重要的因素如细胞的大小、脉冲应用期间的重复次数 (replication) 和温度 (Rols 和 Teissie,1990)。

[0168] 该技术最有利的方面是可将 DNA 直接转移入细胞核,从而增加其整合入宿主基因组的概率。甚至难以转染的细胞也可使用该方法稳定地转染 (Aluigi 等人,2005 ;Zernecke 等人,2003)。电穿孔期间使用的转染方法的改进已导致称为核转染 (nucleofection) 的有效的基因转移法的开发。Nucleofector™ 技术是非病毒的基于电穿孔的基因转移技术,已证明该技术是转染难以转染的细胞系和原代细胞 (包括 MSC) 的有效工具 (Michela Aluigi, Stem Cells 第 24 卷, No. 2, February 2006, pp. 454-461)。

[0169] 基于生物分子的方法

[0170] (i) 蛋白质转导结构域 (PTD)

[0171] PTD 是不利用胞吞途径或蛋白质通道而被运送入细胞的短肽。它们进入细胞的机制还不十分清楚,但其即使在低温下亦可发生 (Derossi 等人 1996)。两种最常用的天然存在的 PTD 是人免疫缺陷病毒转录结构域的反式激活蛋白 (TAT) 和触角足基因 (Antennapedia) 转录因子的同源域。除了此类天然存在的 PTD 外,存在许多具有自发穿过细胞膜的能力的人工肽 (Joliot 和 Prochiantz,2004)。这些肽可共价连接至 PNA (肽核酸) 的假肽主链以帮助将它们递送入细胞。

[0172] (ii) 脂质体

[0173] 脂质体是与细胞膜相似的合成媒介物。当用水搅动脂质分子时,它们自发地形成围绕水性中心的球形双层膜区室,从而形成脂质体。它们可与细胞融合并且允许“包装的”物质转移入细胞。脂质体已成功地用于将基因、药物、报告蛋白和其他生物分子递送入细胞 (Felnerova 等人,2004)。脂质体的有利方面是它们由天然的生物分子 (脂质) 制造并且无免疫原性。

[0174] 可在形成期间将不同的亲水分子整合入其中。例如,当将具有带正电荷的头部基团 (head group) 的脂质与重组 DNA 混合时,它们可形成其中带负电荷的 DNA 与脂质分子的带正荷的头部基团复合的脂质体复合物 (lipoplexe)。此类复合物然后可利用胞吞途径进入细胞并且将 DNA 递送入溶酶体区室。DNA 分子可在二油酰乙醇胺 (DOPE) 的帮助下逃离该区室并且被运送入细胞核,在细胞核中它们可进行转录 (Tranchant 等人,2004)。

[0175] 尽管它们非常简单,但脂质体遭受低转染效率的诟病,因为它们因血浆蛋白的吸附而被网状内皮系统快速清除。已使用许多稳定脂质体的方法,包括用寡糖修饰脂质体表面,从而在立体上稳定脂质体 (Xu 等人,2002)。

[0176] (iii) 免疫脂质体

[0177] 免疫脂质体是具有插入它们的膜的特异性抗体的脂质体。抗体选择性结合靶细胞

上的特定表面分子以促进吸收。被抗体靶向的表面分子是优选被细胞内化的表面分子,从而在结合后,整个复合物被吸收。该方法通过增强脂质体组分的细胞内释放来增加转染效率。可将此类抗体插入脂质体表面(通过不同的脂质锚)或附着在脂质体表面上接枝的聚乙二醇末端上。除了提供基因递送的特异性外,抗体还可为脂质体提供在吸收后帮助限制它们被内源性 RNA 酶或蛋白酶降解的防护层(protective covering)(Bendas, 2001)。为了进一步防止脂质体和它们的内容物在溶酶体区室中被降解,可使用 pH 敏感性免疫脂质体(Torchilin, 2006)。此类脂质体通过与细胞器内的内体膜融合来增加脂质体内容物至细胞溶胶的释放,因为它们在酸性 pH 下变得不稳定且易于融合。

[0178] 一般来说,非病毒基因递送系统不如病毒基因递送系统一样被广泛用作将基因递送入干细胞的工具。然而,在着眼于成体神经干细胞/祖细胞的转染成活力、增殖和至 3 种神经谱系神经元的分化的研究中显示了富有希望的结果。非病毒、非脂质体基因递送系统(ExGen500 和 FuGene6)具有 16% (ExGen500) 至 11% (FuGene6) 的细胞转染效率。FuGene6- 处理的细胞在它们的成活力或增殖率上与未转染的细胞不同,然而此类特征在 ExGen500 转染后显著减少。重要地,没有一种试剂在转染后影响分化的模式。两种试剂都可用于遗传标记细胞,从而在离体移植入器官型海马脑切片(organotypic hippocampal slice)培养物后追踪它们至 3 种神经谱系的分化(J Gene Med. 2006Jan ;8(1) :72-81. Efficient non-viral transfection of adult neuralstem/progenitor cells, without affecting viability, proliferation or differentiation. Tinsley RB, Faijerson J, Eriksson PS)。

[0179] (iv) 基于聚合物的方法

[0180] 多聚 L- 赖氨酸(PLL) 的质子化的 ϵ - 氨基与带负电荷的 DNA 分子相互作用,从而形成可用于基因递送的复合物。此类复合物相当不稳定并且显示聚集的倾向(Kwoh 等人, 1999)。聚乙二醇(PEG) 的缀合经发现导致增加的复合物的稳定性。(Lee 等人, 2005, Harada-Shiba 等人, 2002)。为了提供一定程度的组织特异性,还利用了靶向性分子例如组织特异性抗体(Trubetskoy 等人, 1992, Suh 等人, 2001)。

[0181] 已用于转染细胞的另外的基因载体是也与 DNA 形成复合物的聚乙烯亚胺(PEI)。由于存在具有不同 pKa 值的胺,其具有逃脱内体区室的能力(Boussif 等人, 1995)。发现接枝至 PEI 复合物上的 PEG 减少了此类复合物的细胞毒性和聚集。还可将其与缀合的抗体组合使用以提供组织特异性(Mishra 等人, 2004, Shi 等人, 2003, Chiu 等人, 2004, Merdan 等人, 2003)。

[0182] 用于药物的暗示 (Implications for medicine)

[0183] 干细胞不仅具有分化成不同组织的能力,而且由于它们固有的归巢至受损组织的能力,它们具有将治疗性基因的表达递送至特定组织环境的潜能。通过使用分子工程方法,干细胞可用作在缺陷或需要的区域中选择性表达基因,从而只在需要其的地方释放转染的治疗性产物的媒介物。其中经遗传工程改造的干细胞在将来可能起重要作用的疾病是其中蛋白质或整个酶丢失或无功能或其中某些因子在特定的组织中提供改善的功能的疾病。

[0184] 对于许多疾病包括癌症、神经变性障碍例如帕金森病或阿尔茨海默病,缺血性心脏病和肌营养不良的治疗,已进行了一系列在治疗背景中使用干细胞的研究。

[0185] 药物抗性基因至造血干细胞的转移显示,其有希望用于治疗许多遗传疾病。此类

遗传疾病包括：X-连锁严重联合免疫缺陷、腺苷脱氨酶缺陷、地中海贫血。

[0186] 联合的干细胞和基因疗法有可能进行定制以用于获得性障碍例如乳腺癌、淋巴瘤、脑瘤和睾丸癌的治疗。在这点上，已开始了使用联合疗法治疗癌症的研究。这些研究的范围从提高移植的造血干细胞的药物抗性至使用经遗传修饰的干细胞靶向癌症。

[0187] 将药物抗性基因转移入造血干细胞以提供抗化学治疗诱导的骨髓抑制的骨髓保护作用 (myeloprotection) 或选择用矫治遗传性障碍的另一种基因共同转导的造血干细胞。(Cancer Gene Ther., 2005 Nov ;12(11) :849-63. Hematopoietic stem cell gene therapy with drugresistance genes :an update. Budak-Alpdogan T, Banerjee D, Bertino JR)。

[0188] 使用干细胞靶向癌症的实例包括通过使用经遗传工程改造的神经干细胞治疗神经胶质瘤，和使用携带核糖核酸酶抑制剂基因的造血干细胞靶向黑色素瘤的血管系统来增强旁观者效应介导的基因疗法。

[0189] 用于癌症的另外的方法利用干细胞被募集至肿瘤血管系统并且分化成内皮样细胞的能力。取决于肿瘤类型，肿瘤中大约 30% 的新血管内皮细胞可来源于骨髓祖细胞 (Hammerling 和 Ganss, 2006)。因此，从外周循环募集的经遗传修饰的祖细胞的使用可代表用于肿瘤的基因治疗的潜在媒介物 (Reyes 等人, 2002)。已将单纯疱疹病毒 1 (HSV) 胸苷激酶 (tk) 自杀基因和更昔洛韦® (GCV) 一起成功地用于各种实体瘤的体内治疗 (Dancer 等人, 2003 ;Pasahen 等人, 2003)。内皮细胞在新血管形成过程中对 HSV-tk 的选择性表达与 GCV 的 tk 修饰一起产生了增殖细胞的致死环境。已鉴定了一系列启动子，所述启动子在新血管形成过程中被诱导，从而使得在经工程改造的前体细胞被募集和分化后能够选择性激活自杀基因。

[0190] “旁观者效应”被描述为细胞介导对远距离细胞的细胞损伤的能力。在 Li 等人进行的最近的研究中，检查到用 HSV-tk 基因转导的神经干细胞 (NSCtk) 对大鼠神经胶质瘤细胞的旁观者效应。无胸腺裸小鼠或 Sprague-Dawley 大鼠中的颅内共植入实验显示，用 NSCtk 和神经胶质瘤细胞共植入，然后用更昔洛韦® (GCV) 治疗的动物显示无颅内肿瘤并且存活 100 天以上，而用生理盐水 (PS) 治疗的动物死于肿瘤进展。(Cancer Gene Ther., 2005Jul ;12(7) :600-7. Bystandereffect-mediated gene therapy of gliomas using geneticallyengineered neural stem cells. Li S, Tokuyama T, Yamamoto J, Koide M, Yokota N, Namba H)。

[0191] 人核糖核酸酶抑制剂 (hRI) 可抑制胰腺 RNA 酶 (RNA 酶 A) 的活性，已表明 RI 可用作潜在的抗血管生成剂。Fu 等人检查了将 RI 基因转染入鼠类造血细胞，然后诱导表达以阻断实体瘤中的血管生成的可行性。将人胎盘的 RI 克隆和插入逆转录病毒载体 pLNCX。然后用 pLNCX-RI 逆转录病毒载体感染鼠骨髓造血细胞。然后将感染的细胞注射入经致死性辐射处理的小鼠。在施用携带 RI 基因的造血细胞后，将 B16 黑色素瘤植入小鼠并让肿瘤生长 21 天。对照组的肿瘤变得很大并且形成丰富的血管。相反地，用携带 RI 基因的造血细胞处理的小鼠的肿瘤较小并且具有密度相对低的血管。(Cancer Gene Ther. 2005Mar ; 12(3) :268-75. Anti-tumor efect of hematopoietic cellscarrying the gene of ribonuclease inhibitor. Fu P, Chen J, TianY, Watkins T, Cui X, Zhao B.)

[0192] 聚焦在帕金森病上的许多研究利用细胞移植或基因疗法 (GeneTher., 2003Sep ;

10(20):1721-7. Gene therapy progress and prospects: Parkinson's disease. Burton EA, Glorioso JC, Fink DJ)。然而,迄今为止,少数研究组合这两种方法。Liu 等人使用骨髓来源的基质细胞来递送治疗性基因至大脑。作者使用腺伴随病毒 (AAV) 载体来递送酪氨酸羟化酶 (TH) 基因至骨髓基质细胞。然后将表达 TH 基因的 MSC 移植入帕金森病大鼠的纹状体 (striatum)。发现基因表达效率为大约 75%。在经 TH 工程改造的骨髓基质细胞植入后检测到患病大鼠的功能性改善。组织学检查显示, TH 基因在移植点周围表达,并且大鼠的受损纹状体中多巴胺水平比对照中高。观察到动物的功能性改善 (Brain Res Brain Res Protoc., 2005 May; 15(1): 46-51. Epub 2005, Apr 22. Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease. Lu L, Zhao C, Liu Y, Sun X, Duan C, Ji M, Zhao H, Xu Q, Yang H.)。

[0193] 缺血性心血管疾病是经工程改造的干细胞治疗的另外的靶。Chen 等人使用从人脐带血获得的纯化的 CD34(+) 细胞,然后使用 AAV 载体用人血管生成素-1 (Ang1) 和 VEGF (165) 基因进行转染。将经工程改造的细胞和 VEGF 一起在左前游离壁进行心肌内注射,这导致治疗后减少的梗塞面积和显著增加的毛细血管密度,以及在心肌梗塞后 4 周使用超声心动图测得的改善的长期心功能。(Eur J Clin Invest., 2005 Nov; 35(11): 677-86. Combined cord blood stem cells and gene therapy enhances angiogenesis and improves cardiac performance in mouse after acute myocardial infarction. Chen HK, Hung HF, Shyu KG, Wang BW, Sheu JR, Liang YJ, Chang CC, Kuan P.)

[0194] 肌营养不良代表了特征在于进行性肌肉萎缩的神经肌肉障碍的异质群体。迄今为止,对于此类患者没有适当的治疗方案。已就其矫治营养不良表型的能力对包括 MSC 在内的成体干细胞群体以及胚胎干细胞进行了评估。迄今为止,所述方法未显现多大希望。解释失败的理由例证了当使用经遗传修饰的干细胞时研究者遭遇的困难:负责干细胞的生肌潜能的背后机制仍然未完全阐明,供体群体至肌肉的归巢通常不足,以及受者中未被充分理解的免疫应答可导致有限的治疗成功 (Stem cell based therapies to treat muscular dystrophies. Price, Kuroda, Rudnicki)。用于治疗杜兴肌营养不良 (DMD) 的一个方法利用已用治疗性表达盒转导的生肌干细胞 (myogenic stem cell) 的自体细胞移植。该方法的发展受到一系列问题的阻碍,包括:低频率的细胞植入、跟踪移植的细胞的困难、携带标记基因的自体细胞的快速丢失以及将肌养蛋白基因稳定转移入生肌干细胞中的困难。

[0195] 通过用 eGFP 编码序列替代肌养蛋白 C 末端结构域 (DeltaCT) 和除去大部分肌养蛋白中心柱结构域 (DeltaH2-R19) 来对 mini Dys-GFP 融合基因进行工程改造。在表达处于骨骼肌特异性启动子控制之下的 miniDys-GFP 融合蛋白的转基因 mdx (4Cv) 小鼠中,绿色融合蛋白定位在肌纤维膜上,其在该处装配肌养蛋白-糖蛋白复合物并且阻止营养不良在转基因 mdx (4Cv) 小鼠肌肉中发生。(Hum Mol Genet., 2006 May 15; 15(10): 1610-22. Epub 2006 Apr 4. A highly functional mini-dystrophin/GFP fusion gene for cell and gene therapy studies of Duchenne muscular dystrophy. Li S, Kimura E, Ng R, Fall BM, Meuse L, Reyes M, Faulkner JA, Chamberlain JS.)

[0196] 维-奥二氏综合征 (Wiskott-Aldrich-Syndrome) 特征在于血小板减少、失调和在生命更晚期朝向淋巴瘤发展的倾向,其代表了经工程改造的干细胞治疗的潜在靶 (Dupre 等人, 2006)。范可尼贫血被认为是“干细胞疾病”并且已成为有关使用基因疗法的治疗的

深入研究的主题。该疾病代表了详尽表征的造血干细胞的先天性缺陷。其是以骨髓衰竭和发育异常、高发病率的骨髓发育不良 (myelodysplasia)、急性非淋巴细胞性白血病和实体瘤为特征的罕见遗传性疾病。范可尼贫血的遗传学基础在于任何一个已知的范可尼贫血基因中的选择性突变,这使该疾病成为基因疗法的候选物。但该疾病非常复杂,因为已描述了至少 12 个遗传亚型 (FA-A, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, -G, -I, -J, -L, -M),并且除了 FA-I 以外所有亚型都与独特的基因相关联。大多数 FA 蛋白形成通过单泛素化激活 FANCD2 蛋白的复合物,而 FANCI 和 FANCD1/BRCA2 在该步骤下游起作用。除了 FANCI/BRIP1 和 FANCD1 (其为 DNA 解旋酶) 以及 FANCL (其可能为 E3 泛素缀合酶) 外,FA 蛋白通常缺乏功能性结构域。基于对交联剂的超敏感性,FA 蛋白被认为在阻止 DNA 复制叉前进的 DNA 链内交联的修复中起作用。(Cell Oncol. 2006 ;28(1-2) :3-29. The Fanconi anemia pathway of genomic maintenance. Levitus M, Joenje H, de Winter JP.)

[0197] 作为基因治疗的潜在候选对象的另外的遗传性干细胞缺陷包括无巨核细胞性血小板减少症 (amegakaryocytic thrombocytopenia)、先天性角化不良 (dyskeratosis congenita) 和舒-戴二氏综合征 (Shwachman-Diamond syndrome)。地中海贫血和镰状细胞病 (Sickle Cell disease) 属于遗传性溶血性贫血群体,其代表了世界上最常见的遗传性疾病,从而是干细胞基因治疗的重要候选对象 (Persons and Tisdale, 2004)。

[0198] 在临床情况下使用经遗传修饰的间充质干细胞的良好实例是对系带骨病 (bridled bone disease) 成骨不全中的遗传突变的矫治。成骨不全因编码 I 型胶原的基因 COL1A1 或 COL1A2 中的突变而引起骨质脆弱。Chamberlain 等人从成骨不全患者的骨中获得间充质干细胞 (MSC) 并且鉴定了 COL1A1 基因中的点突变 (Chamberlain 等人, 2004)。已用腺伴随病毒成功地感染了 MSC 以靶向并且使突变的 COL1A1 基因失活。然后将经矫治的 MSC 移植入免疫缺陷型小鼠,受损细胞显示提高的稳定性和胶原加工。

实施例

[0199] 实施例 1

[0200] 从患者或供体的骨髓和其他来源分离多能成体干细胞,利用体外贴壁生长来测定细胞活性和生物学功能。在该体外阶段,贴壁生长的细胞不表达“干细胞标记”CD34,从而在体外培养期间被认为是 CD34⁻ 阴性的。在该阶段,利用病毒或非病毒技术瞬时或稳定地转染 CD34⁻ 阴性、贴壁生长的干细胞,并在体内应用之前进行体外选择性扩增。为了产生转基因 CD34⁻ 阴性祖细胞,将 2 个启动子用于治疗性基因的选择和器官/靶特异性可诱导性。基于其转染和整合 (如果期望的话) (与粘附选择性组合) 来选择基因转移系统。如本实施例, tie2⁻ 启动子增强子驱动只在内皮分化 (其在肿瘤新血管生成期间发生) 的背景中表达的 HSV-TK 基因。当循环内源性干细胞以及全身性施用的干细胞被生理性募集至肿瘤生长部位参与肿瘤新血管生成 (无论是原发性肿瘤部位还是转移灶部位) 时,干细胞分化成肿瘤内皮细胞。在该器官特异性分化过程中,干细胞表达通过血管生成相关 tie2 激活来驱动的 HSV-TK 基因。现在可对患者施用前体药物更昔洛韦[®],该前体药物在肿瘤血管生成部位被 HSV-TK 转化成细胞毒性物质。该方法在乳腺癌、转移性结肠直肠癌、胰腺癌和胶质母细胞瘤的临床前模型中显示是成功的。预期该方法可应用于依赖于肿瘤新血管生成的任何 (恶性) 瘤。该方法的目的是破坏肿瘤血管生成。

[0201] 实施例 2

[0202] 如实施例 1 中一样,但本实施例不表达 HSV-TK,而是表达凝血物质 (clotting substance) 作为细胞毒性蛋白。

[0203] 实施例 3

[0204] 血管生成也是组织改建和伤口愈合的关键生物学过程。其不仅用于皮肤或粘膜的损伤而且还用于其他组织,如胰腺中产生胰岛素的 β 细胞的缺乏 (其导致胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM))。转基因 CD34- 阴性祖细胞的全身性施用还可在胰腺中诱导静息的胰岛祖细胞的活化,从而补充内分泌胰腺,矫治 IDDM 患者的高血糖状态。tie-2 增强子启动子激活血管活性物质如 VEGF 的基因,从而促进组织改建和伤口愈合。

[0205] 实施例 4

[0206] 如实施例 3 中一样,但如果内源性再生不再充足,则与同种异体胰岛细胞的移植结合。

[0207] 实施例 5

[0208] 如实施例 1 中一样,但转基因细胞具有增强的至肿瘤生长、组织改建或伤口愈合的部位的归巢能力 (利用趋化因子生物学)。使用 GPI- 粘蛋白 - 趋化因子对 CD34- 阴性、贴壁生长的干细胞进行工程改造。此类试剂将使得能够选择性表达与获自 CX3CL1 或 CXCL16 的融合至 GPI 锚的粘蛋白 - 结构域连接的特定趋化因子。此类趋化因子 - 粘蛋白试剂的表达将募集表达趋化因子受体的互补白细胞。例如,在肿瘤治疗背景中处于 tie2 启动子增强子控制之下的 CXCL10- 粘蛋白 - GPI 的表达将促进效应 T 细胞募集至肿瘤环境。该试剂将用作肿瘤免疫疗法的佐剂。相同的方法还可用于组织改建以促进选择的白细胞群体的平行募集。

[0209] 实施例 6

[0210] 如实施例 1 中一样,但经遗传工程改造的 CD34- 阴性干细胞在同种异体骨髓 / 干细胞移植后可在例如自身免疫性障碍如慢性炎性肠病或移植物抗宿主病中调节炎性环境。这可通过抗炎物质如白细胞介素 (IL-10) 的位点特异性表达来促进。

[0211] 实施例 7

[0212] 如实施例 1 中一样,但使用普通病毒抗原 (例如其在肿瘤生长的部位诱导内部加强免疫,例如麻疹或禽痘) 的位点特异性表达。

[0213] 实施例 8

[0214] 如在实施例 1 中一样,但治疗性基因的激活被早期发育阶段的基因 (例如 Noggin) 抑制,其最终在肿瘤或组织改建 / 再生部位的成熟组织中被转基因祖细胞的分化过程中被下调。

[0215] 第 II 部分

[0216] 乳腺和胰腺肿瘤模型

[0217] 概述

[0218] 肿瘤血管发生代表了癌症治疗剂的选择性递送的很有前景的靶。开发骨髓来源的间充质干细胞以将外源基因选择性靶向肿瘤血管生成环境。此类实验的结果显示,外源加入的 MSC 归巢至它们在其中经历分化的肿瘤。基因例如 RFP 报告基因以及自杀基因 HSV-tk 在 Tie2 启动子 / 增强子的控制之下在分化期间选择性表达。前体药物更昔洛韦®与 tk 表

达的协同施用有效地靶向肿瘤并且导致对肿瘤生长的抑制。

[0219] 内源小鼠乳腺癌模型

[0220] Dr.Christoph Klein 使用之前建立的鼠乳腺癌模型研究经工程改造的 MSC 在肿瘤血管生成中的用途。该模型可广泛用于人乳腺癌。在该模型中,将携带处于 MMTV 启动子的转录控制之下的激活的大鼠 c-neu 癌基因的转基因小鼠与 BALB/c 小鼠回交,目的是产生用于癌症治疗的可广泛应用的模型。表达非转化大鼠原癌基因的雌性 HER-2/neu(neu-N) 转基因小鼠在 5 至 6 月龄时开始产生自发性局灶性乳腺癌 (spontaneous focal mammary adeno-carcinomas)。此类肿瘤的发生和组织学与在乳腺癌患者中观察到的相似。

[0221] 在肿瘤血管生成的背景中处于内皮特异性启动子控制之下的 RFP 和 GFP 基因在 imMSC 中的表达

[0222] 为了评估在肿瘤血管生成的背景中对组织特异性表达的基因在 imMSC 中的表达的控制,以及通过显微镜追踪 imMSC 在更长时期内的分布,已将红色和绿色荧光蛋白 (RFP, GFP) 基因克隆入经修饰的表达载体以进行体内检测。

[0223] 小鼠

[0224] 已知表达非转化大鼠原癌基因的雌性 HER-2/neu(neu-N) 转基因小鼠在 5 至 6 月龄时发生自发性局灶性乳腺癌。按照 Agreement to the European Union Guidelines 维持 BALB-neuT 转基因小鼠。筛选半合子 (neuT⁺/neuT⁻) 小鼠。每周检查 Balb-neuT 雌性小鼠的乳腺 2 次,并且测量出现的肿瘤。

[0225] 在手术切除原发性肿瘤后,将经遗传修饰的细胞注射入乳腺癌模型小鼠。当残余的肿瘤长大时,外源加入的 imMSC 提供用于新血管形成的前体细胞。发现 Tie-2-RFP(内皮特异性启动子驱动红色荧光蛋白) 稳定转染的 imMSC 易于归巢至肿瘤,分化成内皮细胞,并且表达 RFP 报告基因(图 5)。在此类实验中,评估间充质细胞至 Balb-neuT 小鼠的原发性乳房肿瘤内的整合。在应用 3 次 RFP 转染后,可在所有切片的血管样区域中检测到表达 RFP 的细胞。该结果显示,细胞归巢至新血管形成的部位并且通过活化的 Tie2 启动子/增强子表达标记基因。

[0226] 通过靶向内皮中的自杀基因来抑制肿瘤生长

[0227] 然后改变实验方案以评估自杀基因 HSV-tk 的作用。与前体药物更昔洛韦® (GCV) 组合的 tk 基因产物产生了影响复制性细胞的有效毒素。用携带由血管内皮 Tie2 启动子/增强子驱动的单纯疱疹病毒-胸苷激酶(tk) 基因的质粒稳定地转染 ImMSC。为此目的,再次使用乳腺癌血管生成的鼠模型来在抗血管生成治疗中评估经工程改造的 MSC。

[0228] 方法 I. 在 18 或 22 周龄时在肿瘤生长指数期进行的经工程改造的 MSC 的注射和更昔洛韦®治疗

[0229] Balb-neuT trsg 的治疗

[0230] 在第 0 天(第 22 周)开始用 0.2ml 细胞(500,000 个细胞)和 0.2ml PBS(作为对照)注射小鼠。在第 5 至 8 天,以 30 μg/g BW 的日剂量(例如对于 21g BW 的小鼠使用 100 μl)施用更昔洛韦®。在第 9 天后,重复小鼠的治疗循环直至解剖。在治疗期间,记录肿瘤进展、体重(在各治疗循环的第 0 和 6 天进行测量)和行为。

[0231] 为了获得关于用 Tie2-Tk-as- 转染的细胞和 GCV 进行治疗的效果的总体印象(分别与两个对照组相比较),在治疗过程中记录宏观(macroscopic)体重值直至解剖。测量时

间点是各治疗循环的第 0 天和第 5 天以及解剖当天。实验包括 1 个治疗组和 2 个对照组小鼠,并且始于 2 个不同的时间点,18 周龄和 22 周龄。

[0232] 表 2. 解剖后治疗组的数据,包括体重、绝对和相对肿瘤负荷。

[0233] 方法 II. 在手术切除后在肿瘤再生的背景中对治疗的评估

[0234] 在手术切除肿瘤后的患者中,在手术中遗漏的残余肿瘤通常会生长,从而导致癌症的复发。为了检测经工程改造的 MSC/tk 疗法在该背景中的功效,在 18 周龄时切除 Balb/cneu-N 转基因小鼠的乳腺组织,从而导致原发性肿瘤的延迟发作。在手术后,用如上所述的 MSC-tk 和 GCV 方案治疗小鼠。治疗导致肿瘤生长在被治疗的小鼠中的显著减小(图 8)。

[0235] 胰腺肿瘤模型

[0236] 然后在 C57B1/6 小鼠中建立原位胰腺癌模型以评估基于 MSC 的疗法在不同肿瘤系统中的功效。所述系统之前由 Christiane Bruns 和 Claudius Conrad 建立(Surgery Department, LMU)。在该模型中,将与 C57B1/6 小鼠同基因型的 Panc02 胰腺癌细胞被膜下(subcapsularly)注射入正好位于脾脏下方的胰腺区域以建立原发性胰腺肿瘤。将具有处于 CMV 启动子控制之下的 GFP 以及处于 Tie2 启动子/增强子的控制之下的 RFP 和 tk 的构建体导入从 C57B1/6 小鼠分离的 MSC。通过 i. v. 注射全身性施用转染的干细胞。在预实验中,将经工程改造以组成型表达 GFP(处于 CMV 启动子的控制之下)的 MSC 注射入具有正在生长的肿瘤的小鼠中。发现所述细胞有效地归巢至肿瘤(图 9)。

[0237] 在平行实验中,用经 Tie2-RFP 工程改造的 MSC 注射具有正在生长的肿瘤的小鼠。5 天后,杀死动物,就 RFP 的表达检查肿瘤。结果显示,RFP 在肿瘤背景中强烈上调(图 9)。在其他器官(脾、淋巴结和胸腺)中未检测到 RFP。

[0238] 参考文献

[0239] Aiuti, A, Slavin, S, Aker, M, Ficara, F, Deola, S, Mortellaro, A, Morecki, S, Andolfi, G, Tabucchi, A, Carlucci, F, Marinello, E, Cattaneo, F, Vai, S, Servida, P, Miniero, R, Roncarolo, MG, Bordignon, C(2002) Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. Science 296 :2410-2413.

[0240] Aluigi, MG, Angelini, C, Falugi, C, Fossa, R, Genever, P, Gallus, L, Layer, PG, Prestipino, G, Rakonczay, Z, Sgro, M, Thielecke, H, Trombino, S(2005) Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during development. Chem Biol Interact 157-158 :305-316. Armentano, D, Sookdeo, CC, Hehir, KM, Gregory, RJ, StGeorge, JA, Prince, GA, Wadsworth, SC, Smith, AE(1995) Characterization of an adenovirus gene transfer vector containing an E4 deletion. Hum Gene Ther 6 : 1343-1353.

[0241] Atchison, RW, Casto, BC, Hammon, WM(1965) Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. Science 149 :754-756.

[0242] Atchison, RW, Casto, BC, Hammon, WM(1966) Electron microscopy of adenovirus-associated virus(AAV) in cell cultures. Virology 29 :353-357.

[0243] Baekelandt, V, De Strooper, B, Nuttin, B, Debyser, Z(2000) Gene therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. Curr Opin Mol Ther 2 :540-554.

[0244] Barese, CN, Goebel, WS, Dinauer, MC(2004) Gene therapy for chronic

granulomatous disease. *Expert Opin Biol Ther* 4:1423-1434.

[0245] Becerra, SP, Koczot, F, Fabisch, P, Rose, JA (1988) Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript. *J Virol* 62: 2745-2754.

[0246] Eondas, G (2001) Immunoliposomes: a promising approach to targeting cancer therapy. *BioDrugs* 15: 215-224.

[0247] Benihoud, K, Yeh, P, Perricaudet, M (1999) Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 10: 440-447.

[0248] Bett, AJ, Haddara, W, Prevec, L, Graham, FL (1994) An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8802-8806.

[0249] Beyer, WR, Westphal, M, Ostertag, W, von Laer, D (2002) Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *J Virol* 76: 1488-1495.

[0250] Bradfute, SB, Goodell, MA (2003) Adenoviral transduction of mouse hematopoietic stem cells. *Mol Ther* 7: 334-340.

[0251] Buning, H, Nicklin, SA, Perabo, L, Hallek, M, Baker, AH (2003) AAV-based gene transfer. *Curr Opin Mol Ther* 5: 367-375.

[0252] Cao, H, Koehler, DR, Hu, J (2004) Adenoviral vectors for gene replacement therapy. *Viral Immunol* 17: 327-333. Cavazzana-Calvo, M, Hacein-Bey, S, de Saint Basile, G, Gross, F, Yvon, E, Nusbaum, P, Selz, F, Hue, C, Certain, S, Casanova, JL, Bousso, P, Deist, FL, Fischer, A (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288: 669-672.

[0253] Chamberlain, JR, Schwarze, U, Wang, PR, Hirata, RK, Hankenson, KD, Pace, JM, Underwood, RA, Song, KM, Sussman, M, Byers, PH, Russell, DW (2004) Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science* 303: 1198-1201.

[0254] Cochrane, AW, Chen, CH, Rosen, CA (1990) Specific interaction of the human immunodeficiency virus Rev protein with a structured region in the env mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1198-1202.

[0255] Dancer, A, Julien, S, Bouillot, S, Pointu, H, Vernet, M, Huber, P (2003) Expression of thymidine kinase driven by an endothelial-specific promoter inhibits tumor growth of Lewis lung carcinoma cells in transgenic mice. *Gene Ther* 10: 1170-1178.

[0256] Danthinne, X, Imperiale, MJ (2000) Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther* 7: 1707-1714.

[0257] Danthinne, X, Werth, E (2000) New tools for the generation of E1- and/or E3-substituted adenoviral vectors. *Gene Ther* 7: 80-87.

- [0258] Derossi, D, Calvet, S, Trembleau, A, Brunissen, A, Chassaing, G, Prochiantz, A(1996)Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* 271:18188-18193.
- [0259] Dupre, L, Marangoni, F, Scaramuzza, S, Trifari, S, Hernandez, RJ, Aiuti, A, Naldini, L, Roncarolo, MG(2006)Efficacy of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome using a WAS promoter/cDNA-containing lentiviral vector and nonlethal irradiation. *Hum Gene Ther* 17:303-313.
- [0260] Dymecki, SM(1996)Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6191-6196.
- [0261] Emerman, M, Temin, HM(1986)Quantitative analysis of gene suppression in integrated retrovirus vectors. *Mol Cell Biol* 6:792-800.
- [0262] Felnerova, D, Viret, JF, Gluck, R, Moser, C(2004)Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr Opin Biotechnol* 15:518-529.
- [0263] Fessele, S, Maier, H, Zischek, C, Nelson, PJ, Werner, T(2002)Regulatory context is a crucial part of gene function. *Trends Genet* 18:60-63.
- [0264] Flierl, A, Chen, Y, Coskun, PE, Samulski, RJ, Wallace, DC(2005)Adeno-associated virus-mediated gene transfer of the heart/muscle adenine nucleotide translocator (ANT) in mouse. *Gene Ther* 12:570-578.
- [0265] Gabriel, B, Teissie, J(1997)Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetric interaction with the electroporabilized cell membrane. *Biophys J* 73:2630-2637.
- [0266] Gaspar, HB, Parsley, KL, Howe, S, King, D, Gilmour, KC, Sinclair, J, Brouns, G, Schmidt, M, Von Kalle, C, Barington, T, Jakobsen, MA, Christensen, HO, Al Ghoni, A, White, HN, Smith, JL, Levinsky, RJ, Ali, RR, Kinnon, C, Thrasher, AJ(2004)Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364:2181-2187.
- [0267] Ginsburg, DS, Calos, MP(2005)Site-specific integration with phiC31 integrase for prolonged expression of therapeutic genes. *Adv Genet* 54:179-187.
- [0268] Giordano, FA, Fehse, B, Hotz-Wagenblatt, A, Jonnakuty, S, del Val, C, Appelt, JU, Nagy, KZ, Kuehlcke, K, Naundorf, S, Zander, AR, Zeller, WJ, Ho, AD, Fruehauf, S, Laufs, S(2006)Retroviral vector insertions in T-lymphocytes used for suicide gene therapy occur in gene groups with specific molecular functions. *Bone Marrow Transplant* 38:229-235.
- [0269] Grill, RJ, Blesch, A, Tuszynski, MH(1997)Robust growth of chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells. *Exp Neurol* 148:444-452.
- [0270] Hagan, M, Wennersten, A, Meijer, X, Holmin, S, Wahlberg, L, Mathiesen, T(2003)

Neuroprotection by human neuralprogenitor cells after experimental contusion in rats. *Neurosci Lett* 351:149-152.

[0271] Hammerling, GJ, Ganss, R(2006)Vascular integration of endothelial progenitors during multistep tumor progression. *Cell Cycle* 5:509-511.

[0272] Heegaard, ED, Brown, KE(2002)Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev* 15:485-505.

[0273] Heng, BC, Haider, HK, Sim, EK, Cao, T, Tong, GQ, Ng, SC(2005)Comments about possible use of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes to direct autologous adult stem cells into the cardiomyogenic lineage. *Acta Cardiol* 60:7-12.

[0274] Herzog, RW, Cao, O, Hagstrom, JN, Wang, L(2006)Gene therapy for treatment of inherited haematological disorders. *Expert Opin Biol Ther* 6:509-522.

[0275] Huss, R, von Lutichau, I, Lechner, S, Notohamiprodjo, M, Seliger, C, Nelson, P(2004)[Chemokine directed homing of transplanted adult stem cells in wound healing and tissue regeneration]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 88:170-173.

[0276] Izsvak, Z, Ivics, Z, Plasterk, RH(2000)Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J Mol Biol* 302:93-102.

[0277] Jackson, RJ(2005)Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem Soc Trans* 33:1231-1241.

[0278] Jin, H, Aiyer, A, Su, J, Borgstrom, P, Stupack, D, Friedlander, M, Varner, J(2006)A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *J Clin Invest* 116:652-662.

[0279] Joliot, A, Prochiantz, A(2004)Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol* 6:189-196.

[0280] Kaminski, JM, Huber, MR, Summers, JB, Ward, MB(2002)Design of a nonviral vector for site-selective, efficient integration into the human genome. *Faseb J* 16:1242-1247.

[0281] Kanerva, A, Hemminki, A(2005)Adenoviruses for treatment of cancer. *Ann Med* 37:33-43.

[0282] Kochanek, S, Schiedner, G, Volpers, C(2001)High-capacity 'gutless' adenoviral vectors. *Curr Opin Mol Ther* 3:454-463.

[0283] Kojaoghlanian, T, Flomenberg, P, Horwitz, MS(2003)The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol* 13:155-171.

[0284] Kosaka, Y, Kobayashi, N, Fukazawa, T, Totsugawa, T, Maruyama, M, Yong, C, Arata, T, Ikeda, H, Kobayashi, K, Ueda, T, Kurabayashi, Y, Tanaka, N(2004)Lentivirus-based gene delivery in mouse embryonic stem cells. *Artif Organs* 28:271-277.

[0285] Lakso, M, Sauer, B, Mosinger, B, Jr., Lee, EJ, Manning, RW.

[0286] Yu, SH, Mulder, KL, Westphal, H(1992)Targeted oncogene activation by

site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 6232-6236.

[0287] Neff, T, Beard, BC, Kiem, HP (2006) Survival of the fittest : in vivo selection and stem cell gene therapy. *Blood* 107 : 1751-1760.

[0288] Neff, T, Blau, CA (2001) Pharmacologically regulated cell therapy. *Blood* 97 : 2535-2540.

[0289] O' Connor, TP, Crystal, RG (2006) Genetic medicines : treatment strategies for hereditary disorders. *Nat Rev Genet* 7 : 261-276.

[0290] Orban, PC, Chui, D, Marth, JD (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 6861-6865.

[0291] Pasanen, T, Hakkarainen, T, Timonen, P, Parkkinen, J, Tenhunen, A, Loimas, S, Wahlfors, J (2003) TK-GFP fusion gene virus vectors as tools for studying the features of HSV-TK/ganciclovir cancer gene therapy in vivo. *Int J Mol Med* 12 : 525-531.

[0292] Persons, DA, Tisdale, JF (2004) Gene therapy for the hemoglobin disorders. *Semin Hematol* 41 : 279-286.

[0293] Reyes, M, Dudek, A, Jahagirdar, B, Koodie, L, Marker, PH, Verfaillie, CM (2002) Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 109 : 337-346.

[0294] Rodriguez, CI, Buchholz, F, Galloway, J, Sequerra, R, Kasper, J, Ayala, R, Stewart, AF, Dymecki, SM (2000) High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25 : 139-140.

[0295] Rols, MP, Teissie, J (1990) Electroporation : permeabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. *Biophys J* 58 : 1089-1098.

[0296] Shindo, T, Matsumoto, Y, Wang, Q, Kawai, N, Tamiya, T, Nagao, S (2006) Differences in the neuronal stem cell survival, neuronal differentiation and neurological improvement after transplantation of neural stem cells between mild and severe experimental traumatic brain injury. *J Med Invest* 53 : 42-51.

[0297] Smith-Arica, JR, Thomson, AJ, Ansell, R, Chiorini, J, Davidson, B, McWhir, J (2003) Infection efficiency of human and mouse embryonic stem cells using adenoviral and adeno-associated viral vectors. *Cloning Stem Cells* 5 : 51-62.

[0298] Sodroski, J, Wyatt, R, Olshevsky, U, Olshevsky, V, Moore, J (1996) Conformation of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein. *Antibiot Chemother* 48 : 184-187.

[0299] Suhr, ST, Gage, FH (1993) Gene therapy for neurologic disease. *Arch Neurol* 50 : 1252-1268.

[0300] Tirion, RG, Kim, RB (2005) Nuclear receptors and drug disposition gene regulation. *J Pharm Sci* 94 : 1169-1186. Torchilin, VP (2006) Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu Rev Biomed Eng* 8 : 343-375.

- [0301] Tranchant, I, Thompson, B, Nicolazzi, C, Mignet, N, Scherman, D(2004) Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids. *J Gene Med* 6 Suppl 1 :S24-35.
- [0302] Trobridge, G, Vassilopoulos, G, Josephson, N, Russell, DW(2002) Gene transfer with foamy virus vectors. *Methods Enzymol* 346 :628-648.
- [0303] von Lüttichau, I, Notohamiprodjo, M, Wechselberger, A, Peters, C, Henger, A, Seliger, C, Djafarzadeh, R, Huss, R, Nelson, PJ(2005) Human Adult CD34-Progenitor Cells Functionally Express the Chemokine Receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5 and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells Dev*, *Stem Cells Dev* 14 :329-336, 2005.
- [0304] Wennersten, A, Meier, X, Holmin, S, Wahlberg, L, Mathiesen, T(2004) Proliferation, migration, and differentiation of human neural stem/progenitor cells after transplantation into a rat model of traumatic brain injury. *J Neurosurg* 100 :88-96.
- [0305] Werner, T, Fessele, S, Maier, H, Nelson, PJ(2003) Computer modeling of promoter organization as a tool to study transcriptional coregulation. *Faseb J* 17 :1228-1237.
- [0306] Wu, N, Ataai, MM(2000) Production of viral vectors for gene therapy applications. *Curr Opin Biotechnol* 11 :205-208.
- [0307] Young, LS, Searle, PF, Onion, D, Mautner, V(2006) Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol* 208 :299-318.
- [0308] Young, SM, Jr., Samulski, RJ(2001) Adeno-associated virus (AAV) site-specific recombination does not require a Rep-dependent origin of replication within the AAV terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 :13525-13530.
- [0309] Young, SM, Jr., Xiao, W, Samulski, RJ(2000) Site-specific targeting of DNA plasmids to chromosome 19 using AAV cis and trans sequences. *Methods Mol Biol* 133 :111-126.
- [0310] Yu, JH, Schaffer, DV(2005) Advanced targeting strategies for murine retroviral and adeno-associated viral vectors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 99 :147-167.
- [0311] Zerneck, A, Erl, W, Fraemohs, L, Lietz, M, Weber, C(2003) Suppression of endothelial adhesion molecule up-regulation with cyclopentenone prostaglandins is dissociated from IkappaB-alpha kinase inhibition and cell death induction. *Faseb J* 17 :1099-1101.
- [0312] Deeg HJ, Klingemann HG, Philips GL, A Guide to Bone Marrow Transplantation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1992.
- [0313] Remington : The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., p. 808, Lippincott Williams & Wilkins(2000).
- [0314] Yazawa K, Fisher WE, Brunicardi FC : Current progress in suicide gene therapy for cancer. *World J Surg.* 2002 Jul ;26(7) :783-9.

- [0315] Schlaeger TM, Bartunkova S, Lawitts JA, Teichmann G, Risau W, Deutsch U, Sato TN. Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* ;1997;94:3058-63.
- [0316] J. Cell Physiol. 2007, Apr. 25[Epub ahead of print].

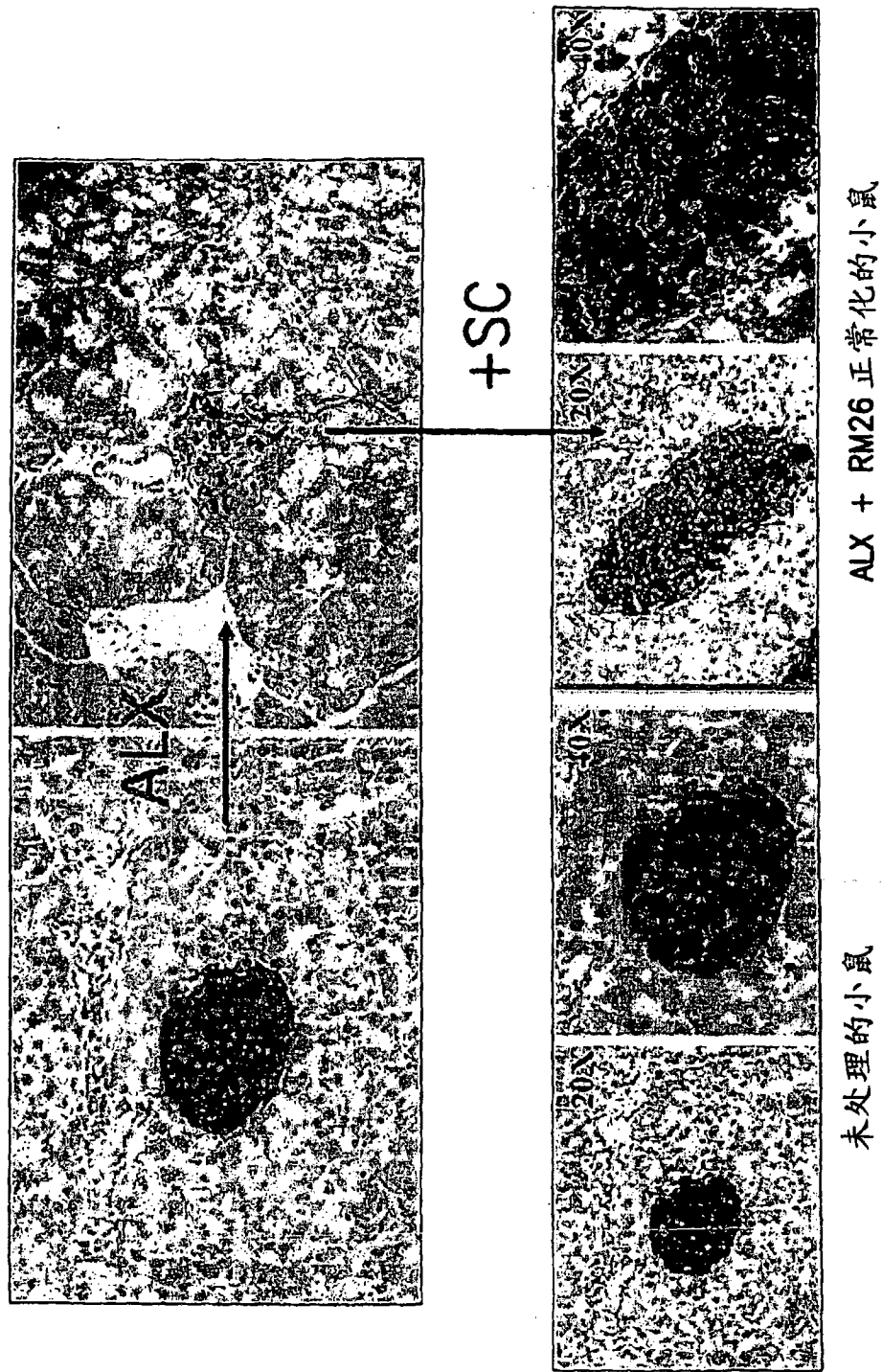


图 1

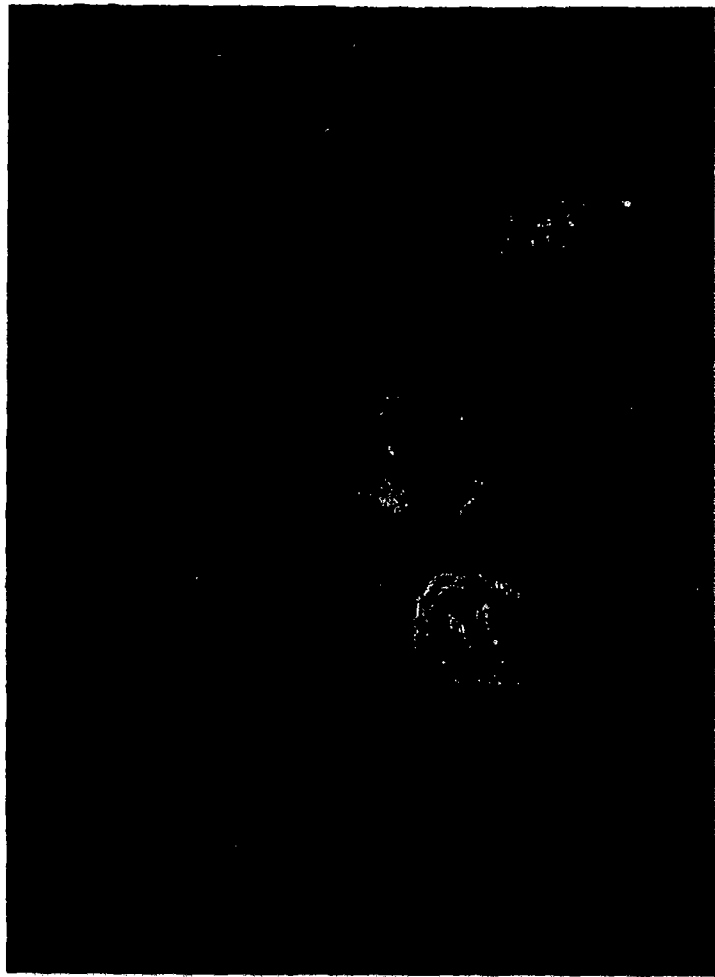


图 2

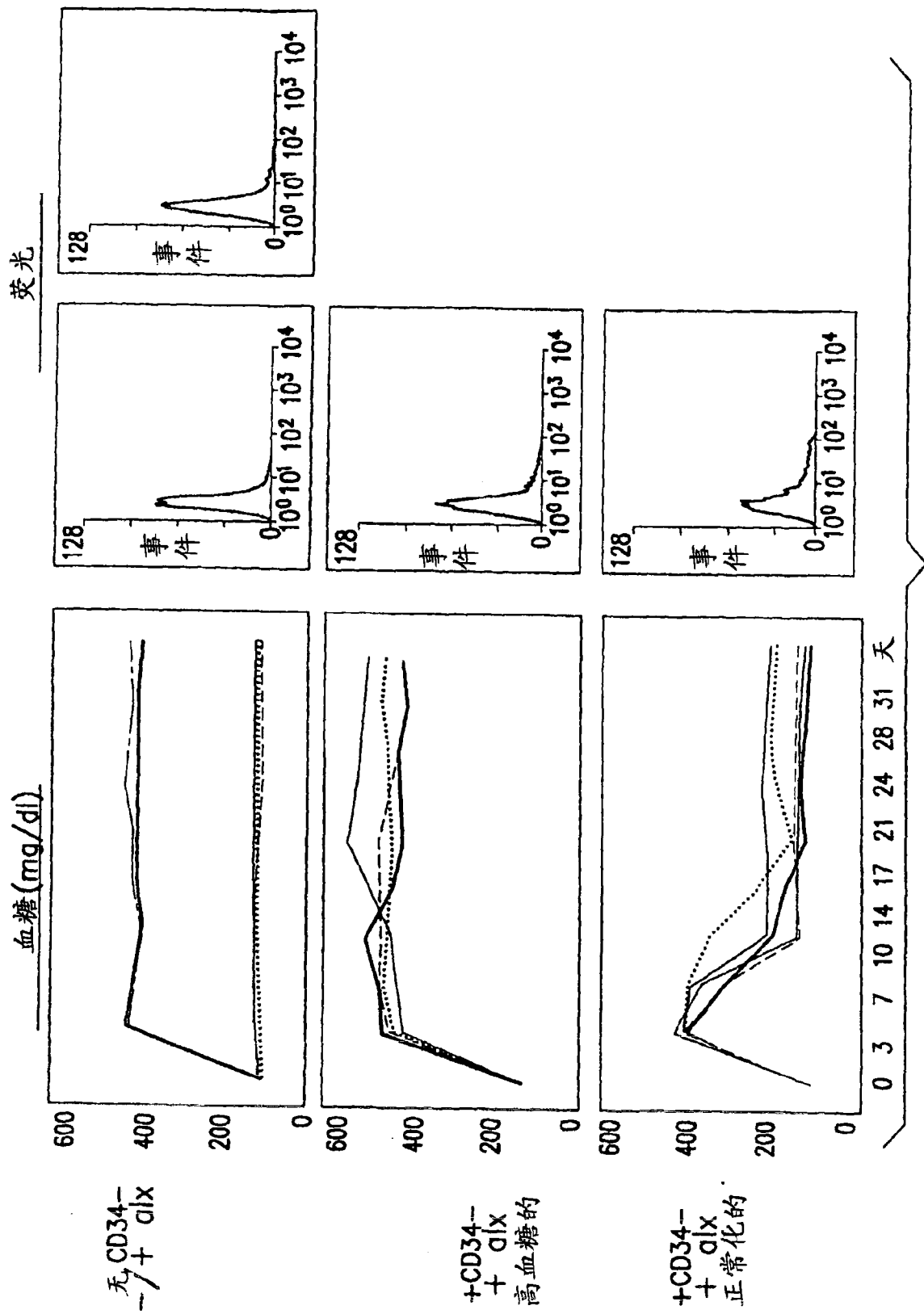


图 3

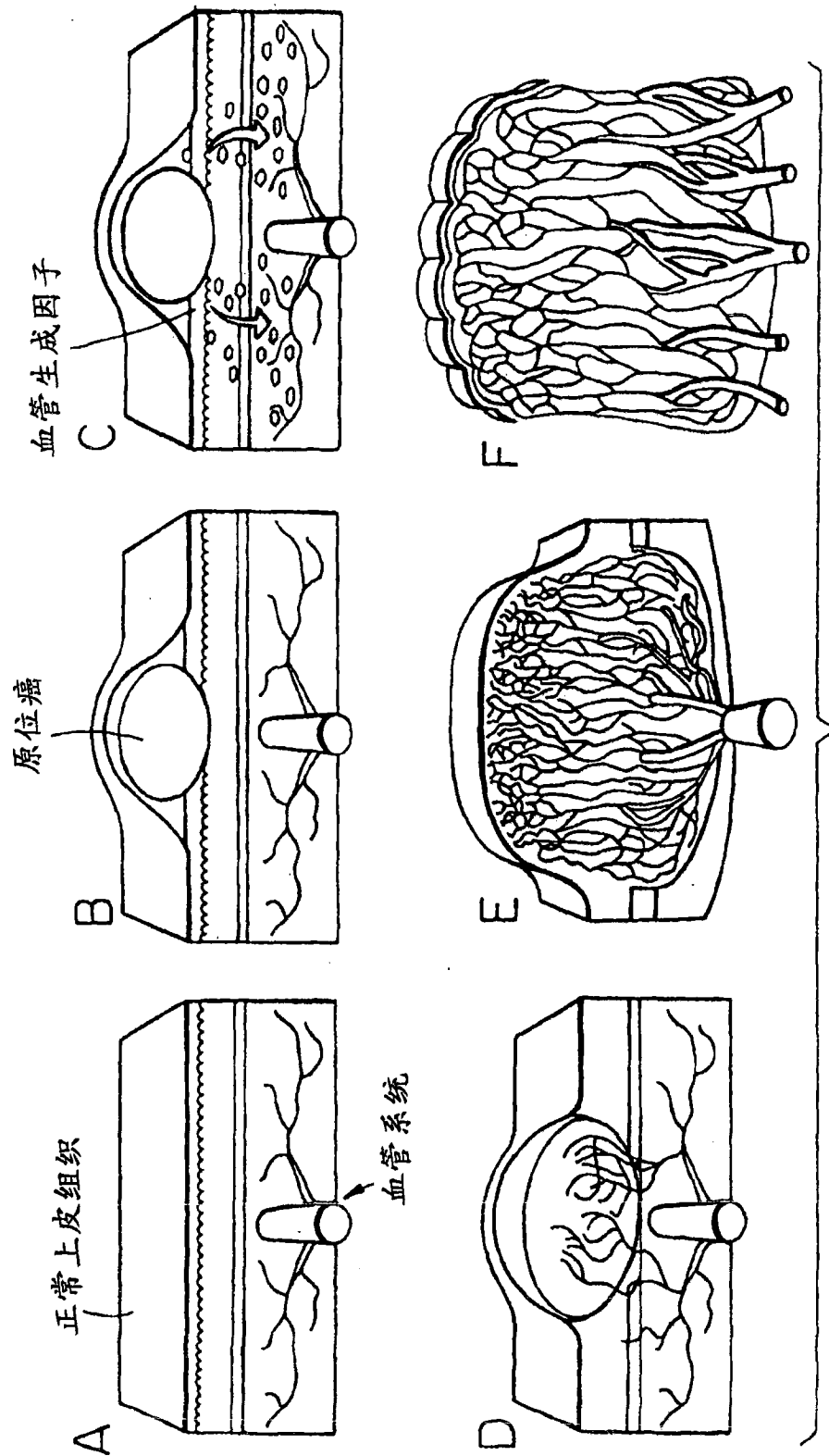


图 4

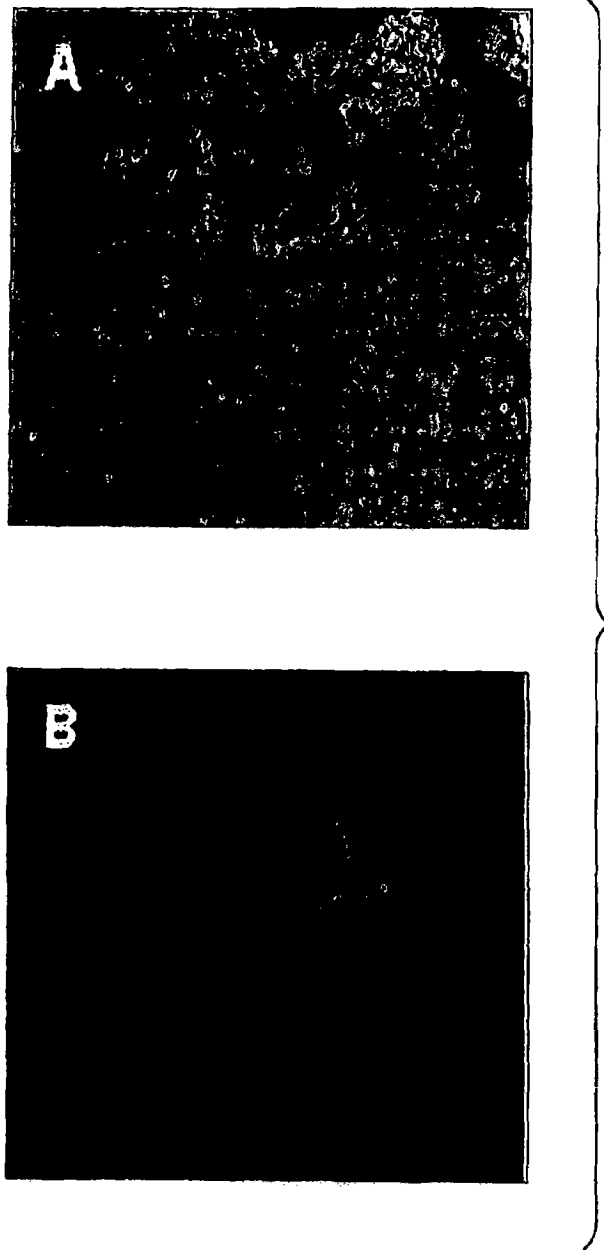


图 5

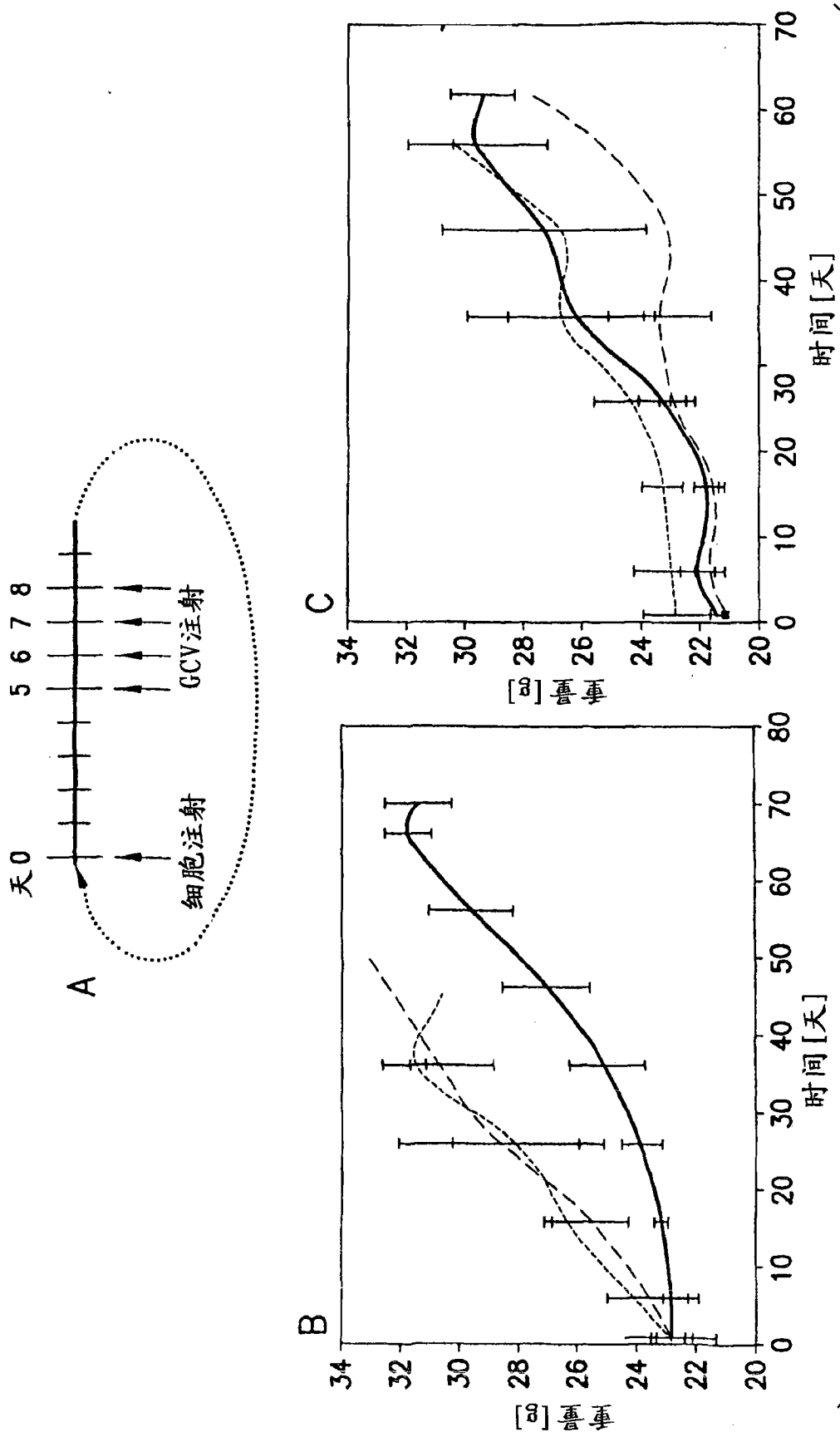


图 6

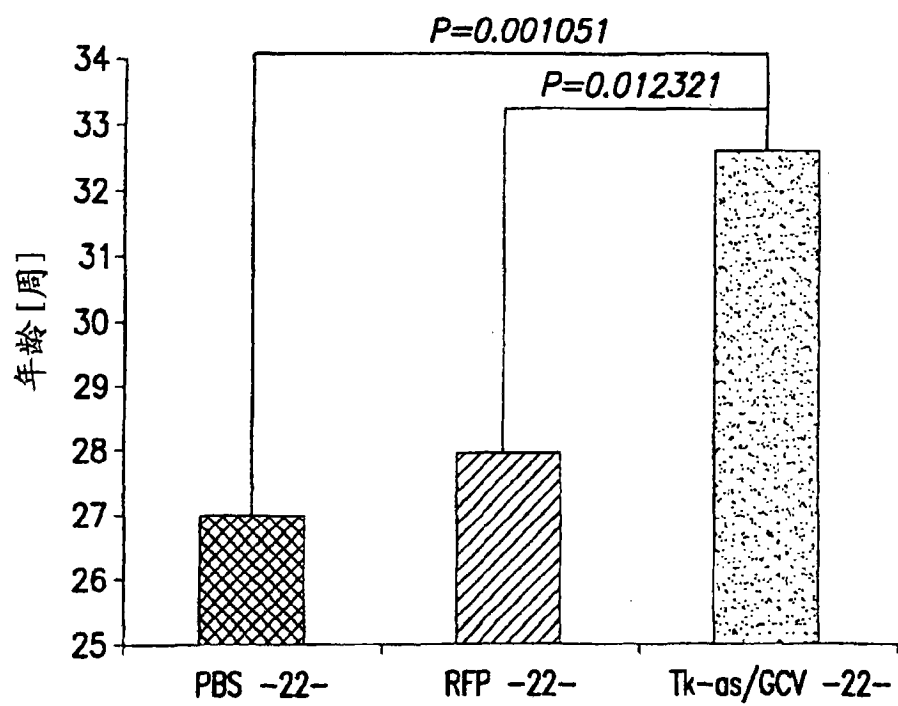


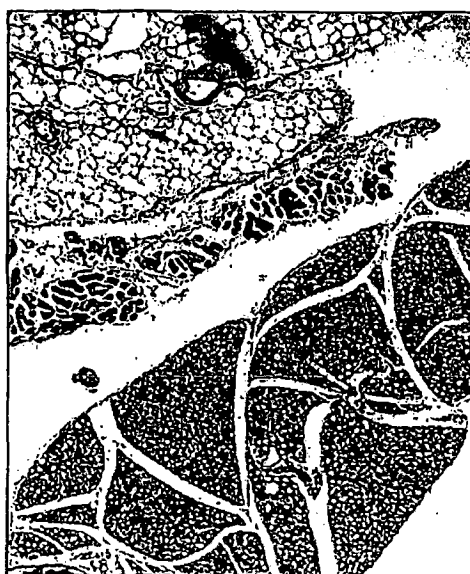
图 7



乳腺肿瘤对照



用iMSC/Tk+GV I.V. 治疗 4 周 (18-22)



正常乳腺对照



对照肿瘤-加入对照iMSC

图 8

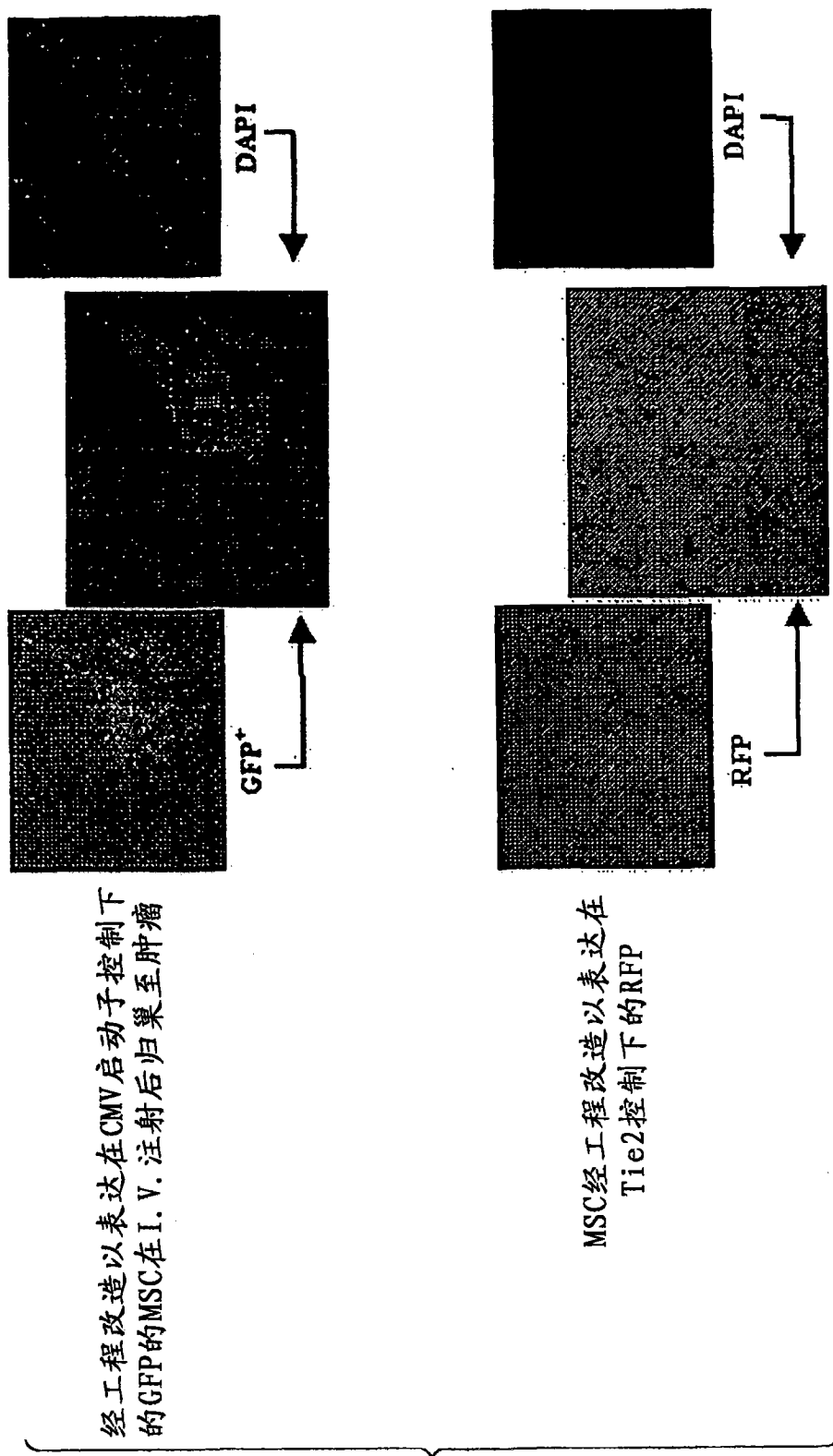


图 9

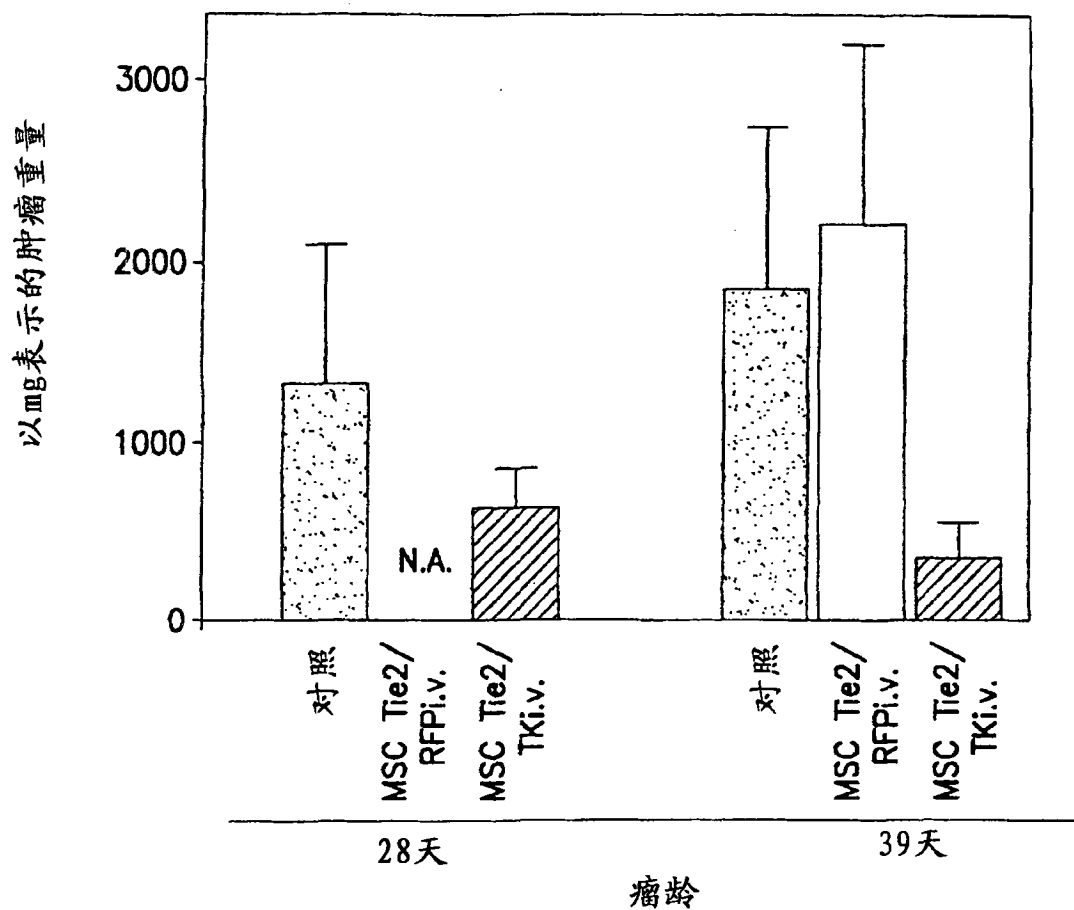


图 10

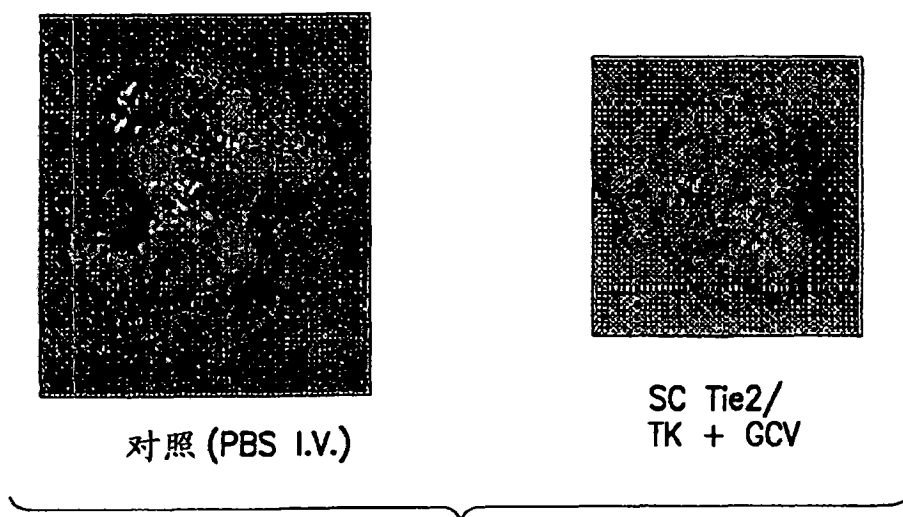
原位Panc02肿瘤模型第48天

图 11