



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101970051 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 09

(21) 申请号 200880125234. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 12. 23

A61P 9/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 15/63 (2006. 01)

61/018, 326 2007. 12. 31 US

C07H 21/02 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 07. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/088248 2008. 12. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02009/088786 EN 2009. 07. 16

(71) 申请人 纳诺科尔治疗公司

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 罗杰·J·哈贾

沃尔夫冈·Ch. ·波尔

亨利·费克纳

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 陶贻丰 郑霞

权利要求书 3 页 说明书 30 页 序列表 1 页

附图 18 页

(54) 发明名称

用于治疗心力衰竭的 RNA 干扰

(57) 摘要

本发明涉及通过调节缺陷的心脏 Ca^{2+} 稳态而治疗心力衰竭的靶向 RNAi, 所述调节是经由使用腺伴随病毒 (AAV) 转染心肌细胞来降低受磷蛋白 (PLB) 的表达或活性。还公开了在受治疗者中降低室性心律失常的方法, 以及全面改善心力衰竭存活的方法。此外, 本发明提供了可用于诊断对 RNAi 治疗的易感性的方法, 并包括包含 RNAi 序列的药物组合物、试剂盒和载体。

1. 一种治疗受治疗者心力衰竭的方法,包括向有相应需要的受治疗者施用有效治疗所述受治疗者的心力衰竭的量的包含 RNAi 表达盒的载体,其中所述盒包含 RNAi 序列,所述 RNAi 序列的表达产物降低受磷蛋白 (PLB) 的表达或活性。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述 RNAi 表达盒包含 SEQ ID NO :1 所列的核苷酸序列,由此与施用所述载体之前相比改善所述受治疗者的收缩功能。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述载体是病毒体。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述载体是质粒。

5. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述病毒体是细小病毒。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述细小病毒是腺伴随病毒 (AAV)。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述 AAV 是血清型 9。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中 PLB mRNA 的表达被抑制。

9. 根据权利要求 2 所述的方法,其中 SEQ ID NO :1 的侧翼为 AAV 末端重复序列。

10. 根据权利要求 3 所述的方法,其中病毒体载体的基因组是自互补的。

11. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述受治疗者是哺乳动物。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述受治疗者是人类。

13. 一种药物组合物,包含重组的腺伴随病毒 (AAV) 载体和药学可接受的载运体,其中所述载体包含其 RNA 表达产物导致受磷蛋白 (PLB) 的表达或 PLB 活性降低的 RNAi 表达盒。

14. 根据权利要求 13 所述的药物组合物,其中所述 RNAi 表达盒的 RNA 表达产物包含在严格条件下与 PLB 基因 mRNA 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

15. 根据权利要求 13 所述的药物组合物,其中所述 RNAi 表达盒包含 SEQ ID NO :1 所列的核苷酸序列。

16. 根据权利要求 13 所述的药物组合物,其中所述 RNA 表达产物还包含 SEQ ID NO :2 所列的靶序列。

17. 根据权利要求 13 所述的药物组合物,其中所述组合物适于静脉内施用。

18. 根据权利要求 13 所述的药物组合物,其中所述组合物适于动脉内施用。

19. 根据权利要求 13 所述的药物组合物,其中所述组合物适于心室内施用。

20. 根据权利要求 13 所述的药物组合物,其中所述组合物适于心瓣膜灌注。

21. 根据权利要求 13 所述的药物组合物,其中所述 AAV 是血清型 9。

22. 一种腺伴随病毒 (AAV) 载体,包含至少一个 AAV 末端重复序列,其中所述载体包含其 RNAi 表达产物导致受磷蛋白 (PLB)mRNA 的表达或 PLB 活性降低的 RNAi 表达盒。

23. 根据权利要求 22 所述的腺伴随病毒,其中所述 RNAi 表达盒的 RNA 表达产物包含在严格条件下与 PLB 基因 mRNA 核苷酸序列杂交的核苷酸序列,由此转导心肌细胞。

24. 根据权利要求 22 所述的 AAV 载体,其中所述 RNAi 表达盒包含 SEQ ID NO :1 所列的核苷酸序列。

25. 根据权利要求 22 所述的 AAV 载体,其中所述 RNA 表达产物还包含 SEQ ID NO :2 所列的靶序列。

26. 根据权利要求 22 所述的 AAV 载体,其中所述 AAV 是血清型 9。

27. 一种增加肌质网 (SR) 的钙摄取的方法,包括使肌肉组织样品与腺伴随病毒 (AAV) 载体接触,其中所述载体包含编码 RNAi 表达产物的多核苷酸序列,由此增加 SR 中的钙摄

取。

28. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述 RNAi 包含在严格条件下与 PLB 靶基因 mRNA 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列,由此与接触所述载体之前的收缩性相比增强心肌细胞的收缩性。

29. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述载体还包含 SEQ ID NO:1 所列的核苷酸序列。

30. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述 RNAi 包含 SEQ ID NO:2 所列的靶序列。

31. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述 RNAi 表达盒的 RNA 编码区的表达造成 PLB 基因的表达下调。

32. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述 RNAi 载体包含与 PLB 靶基因的 RNA 编码区具有至少约 90%同一性的序列。

33. 根据权利要求 27 所述的方法,其中 PLB 基因表达被抑制至少 10%。

34. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述 AAV 基因组是自互补的。

35. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述 AAV 是血清型 9。

36. 一种试剂盒,包含:

i) 腺伴随病毒 (AAV) 载体,其中所述载体包含编码导致受磷蛋白 (PLB) 的表达或 PLB 活性降低的 RNAi 表达产物的多核苷酸序列;

ii) 一种或多种缓冲液;

iii) 使用 (i) 和 (ii) 组成部分的说明;以及

iv) 包含 (i)、(ii) 和 (iii) 组成部分的容器。

37. 根据权利要求 36 所述的试剂盒,其中所述 RNAi 包含在严格条件下与 PLB 靶基因 mRNA 转录物的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

38. 根据权利要求 36 所述的试剂盒,其中所述载体包含 SEQ ID NO:1 所列的核苷酸序列。

39. 根据权利要求 36 所述的试剂盒,其中所述 RNAi 还包含 SEQ ID NO:2 所列的靶序列。

40. 根据权利要求 36 所述的试剂盒,其中所述 AAV 是血清型 9。

41. 一种诊断受治疗者对所述受治疗者胞内钙失调所致的慢性心力衰竭 (HF) 的 RNAi 治疗的易感性的方法,该方法包括:

(a) 使受治疗者的肌肉组织样品与腺伴随病毒 (AAV) 载体接触,其中所述载体包含编码导致受磷蛋白 (PLB) mRNA 的表达或活性降低的 RNAi 表达产物的多核苷酸序列;和

(b) 确定所述肌肉组织样品与 AAV9 载体接触之前和之后所述组织样品中肌质网钙 ATP 酶泵 (SERCA) 的活性,其中 SERCA 活性的增加与受治疗者对 HF 的 RNAi 治疗的易感性相关。

42. 根据权利要求 41 所述的方法,其中所述 RNAi 包含在严格条件下与 PLB 靶基因 mRNA 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

43. 根据权利要求 41 所述的方法,其中所述载体包含 SEQ ID NO:1 所列的核苷酸序列。

44. 根据权利要求 41 所述的方法,其中所述 RNAi 还包含 SEQ ID NO:2 所列的靶序列。

45. 根据权利要求 41 所述的方法,其中所述受治疗者是人类。

46. 一种改善具有慢性心力衰竭的受治疗者的存活的方法,该方法包括施用载体,其中所述载体包含编码导致受磷蛋白 (PLB) mRNA 的表达或 PLB 活性降低和收缩功能改善的 RNAi

表达产物的多核苷酸序列,由此改善所述受治疗者的存活。

47. 根据权利要求 46 所述的方法,其中所述 RNAi 包含在严格条件下与 PLB 靶基因 mRNA 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

48. 根据权利要求 46 所述的方法,其中所述载体是病毒体或质粒。

49. 根据权利要求 48 所述的方法,其中所述病毒体是细小病毒。

50. 根据权利要求 49 所述的方法,其中所述细小病毒是腺伴随病毒 (AAV)。

51. 根据权利要求 50 所述的方法,其中所述 AAV 是血清型 9。

52. 根据权利要求 48 所述的方法,其中所述病毒体包含 SEQ ID NO :1 所列的核苷酸序列。

53. 根据权利要求 52 所述的方法,其中 SEQ ID NO :1 的侧翼为 AAV 末端重复序列。

54. 根据权利要求 46 所述的方法,其中所述 RNAi 还包含 SEQ ID NO :2 所列的靶序列。

55. 根据权利要求 46 所述的方法,其中所述受治疗者是人类。

56. 一种降低受治疗者的室性心律失常的方法,该方法包括施用包含编码 RNAi 表达产物的多核苷酸序列的载体,其中所述 RNAi 包含改善心室功能的核苷酸序列,由此降低所述受治疗者的室性心律失常。

57. 根据权利要求 56 所述的方法,其中所述载体是病毒体或质粒。

58. 根据权利要求 57 所述的方法,其中所述病毒体是细小病毒。

59. 根据权利要求 58 所述的方法,其中所述细小病毒是腺伴随病毒 (AAV)。

60. 根据权利要求 59 所述的方法,其中所述 AAV 是血清型 9。

61. 根据权利要求 57 所述的方法,其中所述病毒体包含 SEQ ID NO :1 所列的核苷酸序列。

62. 根据权利要求 56 所述的方法,其中所述 RNAi 还包含 SEQ ID NO :2 所列的靶序列。

63. 根据权利要求 56 所述的方法,其中所述受治疗者是人类。

用于治疗心力衰竭的 RNA 干扰

[0001] 发明背景

发明领域

[0002] 本发明总体涉及治疗心脏疾病的方法,并且更具体地,涉及使用 RNAi 降低受磷蛋白 (PLB) 以治疗慢性心力衰竭的方法,包括通过靶向 AAV9 载体腺伴随病毒 (AAV) 递送,和诊断对慢性心力衰竭的 RNAi 治疗的易感性的方法。

[0003] 背景信息

[0004] 心力衰竭目前影响超过两百万美国人,并且其经济和人员损失将随着人口的老龄化而继续增加。对于 65 岁和以上的患者,充血性心力衰竭是最常见的住院患者诊断,每年报道超过 400,000 新病例。预后差,5 年内死亡率 60%,并且 23-52% 的死亡可归因于致死性心律失常 (心源性猝死 ;SCD)。

[0005] 心力衰竭是心输出量不能满足生理需求。因此心力衰竭不是特殊病,而是代表大多数心脏疾病的终点的综合征,所述心脏疾病包括缺血性心脏病、心肌疾病 (舒张性、限制性、或肥大性)、瓣膜性心脏病以及慢性高血压和糖尿病。另外,在如急性心肌梗死、心脏手术后 (心肌顿抑、心肌冬眠 (hybernation)) 或再血管化治疗后 (即再灌注损伤、溶栓后、经皮穿刺冠状动脉成形术或冠状动脉旁路移植术) 的情形中,心力衰竭的症状也可急性呈现 (即急性心力衰竭、或心源性休克)。

[0006] 降低的收缩性是充血性心力衰竭的关键特征,而储存心肌细胞中的钙的肌质网 (SR) 在心脏收缩性以及兴奋和收缩的偶联中起关键作用。收缩性力的形成依赖于 SR 中积累的 Ca^{2+} 的量。肌质网钙 ATP 酶 (SERCAa) 丰度的增加或受磷蛋白 (PLB) 磷酸化的增加和 / 或 PLB 丰度的降低可促进 SR 的 Ca^{2+} 摄取的增加,由此增强心肌细胞的收缩性。

[0007] PLB 是 53 氨基酸、肌肉特异性磷蛋白。去磷酸化的 PLB 与 SERCA2a 结合并调节进入心脏组织的 SR 中的钙的量。当被蛋白激酶 A 磷酸化时, SERCA2a 的 PLB 抑制被复活,增加进入 SR 的钙流量和增强肌肉的收缩性。

[0008] 心肌基因治疗可用于许多心血管疾病的治疗,所述心血管疾病包括缺血性心肌疾病、充血性心力衰竭和恶性心律失常。用于心肌基因递送的有用载体将允许在直接心肌内注射或输注到冠状动脉或窦中之后有效和稳定地向心肌细胞转导许多转基因。例如,直接注射到左心室心肌的质粒 DNA 载体已被邻近注射区域的心肌细胞表达 6 个月。然而,此方法的治疗有用性受到心肌细胞转导效率低 (注射区域中 0.1% 至 1.0% 的心肌细胞) 的限制。

[0009] 复制缺陷型腺病毒 (RDAd) 载体的心肌内注射和冠状动脉内输注两种方法已被用于在体内有效转导啮齿动物、兔和猪中的心肌细胞。然而,腺病毒介导的基因转移的可行性受到对病毒和外源转基因蛋白的免疫应答的限制,所述免疫应答引起严重的心肌炎症,感染 30 天内病毒转导细胞的消除,并由此造成在免疫活性宿主中短暂的重组基因表达。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明涉及通过调节缺陷的心脏 Ca^{2+} 稳态而治疗严重心力衰竭的靶向 RNAi,所述

调节是经由使用腺伴随病毒 (AAV) 转染心肌细胞来降低受磷蛋白 (PLB) 的表达。该方法还涉及使用所公开的方法在受治疗者中降低室性心律失常、以及全面改善心力衰竭的存活。此外,本发明提供可用于诊断对 RNAi 治疗的易感性的方法,并包括基本上由降低 PLB 活性的 RNAi 组成的药物组合物、试剂盒和载体。

[0012] 同样地,本发明提供用于治疗受治疗者的心力衰竭的方法。该方法包括向有相应需要的受治疗者施用包括 RNAi 表达盒的载体,其中所述盒包含其表达产物降低受磷蛋白 (PLB) 活性的 RNAi 序列,所述载体的施用是以与施用载体之前相比,有效治疗所述受治疗者的心力衰竭和改善所述受治疗者的收缩功能的量。在一种实施方案中,所述载体是病毒体。在另一种实施方案中,所述载体是质粒。在另一种实施方案中,所述病毒体是细小病毒。在另一种实施方案中,所述细小病毒是腺伴随病毒 (AAV),包括 AAV 血清型 9。在又一种实施方案中,所述 RNAi 表达盒包括 SEQ ID NO :1 所列的核苷酸序列。在相关的实施方案中,SEQ ID NO :1 的侧翼为 AAV 末端重复序列。在另一种实施方案中,PLB 基因表达被抑制至少 10%。在另一种实施方案中,所述 RNAi 序列包括 SEQ ID NO :2 所列的靶序列。同样地,所述 RNAi 表达盒编码至少一个 RNA,包括在严格条件下与 PLB 基因的核苷酸序列杂交的第一核苷酸序列,和为所述第一核苷酸序列的互补反向重复序列并与所述第一核苷酸序列杂交形成发夹结构的第二核苷酸序列。在一种实施方案中,所述两种核苷酸序列通过 RNA 环状结构连接。在另一种实施方案中,所述受治疗者是哺乳动物,诸如人类。

[0013] 本发明进一步提供药物组合物,该药物组合物包括重组的腺伴随病毒 (AAV) 载体和药学可接受的载体,其中所述载体包含其 RNA 表达产物导致受磷蛋白 (PLB) 的表达和/或活性的降低的 RNAi 表达盒。在一种实施方案中,所述 RNAi 表达盒的 RNA 表达产物包括在严格条件下与 PLB 基因 mRNA 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列,其中严格条件包括但不限于,在 42°C 下在包含 50% 甲酰胺、5x SSC 和 1% SDS 的溶液中杂交,并在 65°C 下在包含 0.2x SSC 和 0.1% SDS 的溶液中清洗。在另一种实施方案中,所述 RNAi 表达盒包括 SEQ ID NO :1 所列的核苷酸序列。在另一种实施方案中,所述 RNA 表达产物包括 SEQ ID NO :2 所列的靶序列。在另一种实施方案中,所述组合物适于静脉内施用、动脉内施用、心室内施用、或心瓣膜灌注。

[0014] 本发明还提供一种腺病毒伴随病毒 (AAV) 载体,该载体包括至少一个 AAV 末端重复序列,其中所述载体包含其 RNAi 表达产物导致受磷蛋白 (PLB) mRNA 的表达或 PLB 活性降低的 RNAi 表达盒。在实施方案中,所述 RNAi 表达盒的 RNA 表达产物包括在严格条件下与 PLB 基因 mRNA 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。在另一种实施方案中,所述 RNAi 表达盒包括 SEQ ID NO :1 所列的核苷酸序列。在另一种实施方案中,所述 RNA 表达产物包括 SEQ ID NO :2 所列的靶序列。

[0015] 本发明还提供增加肌质网 (SR) 的钙摄取的方法。该方法包括使肌肉组织样品与腺伴随病毒 (AAV) 载体接触,其中所述载体包括编码 RNAi 表达产物的多核苷酸序列,由此增加 SR 中的钙摄取,并与和载体接触之前的收缩性相比增强心肌细胞的收缩性。在一种实施方案中,所述 RNAi 包括在严格条件下与 PLB 靶基因 mRNA 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。在另一种实施方案中,所述载体包括 SEQ ID NO :1 所列的核苷酸序列。在另一种实施方案中,所述 RNAi 包括 SEQ ID NO :2 所列的靶序列。在另一种实施方案中,所述 RNAi 表达盒的 RNA 编码区造成 PLB 基因的表达下调。在另一种实施方案中,所述 RNAi 载体包括与

PLB 靶基因的 RNA 编码区具有至少约 90% 同一性的序列。

[0016] 本发明进一步提供试剂盒,该试剂盒包括腺伴随病毒 (AAV) 载体,其中所述载体包含编码导致受磷蛋白 (PLB)mRNA 的表达或 PLB 活性降低的 RNAi 表达产物的多核苷酸序列,一种或多种缓冲液,使用这些组成部分的说明,和包含这些组成部分的容器。在实施方案中,所述 RNAi 包括在严格条件下与 PLB 靶基因 mRNA 转录物的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

[0017] 本发明还提供诊断受治疗者对所述受治疗者中的胞内钙失调所致的慢性心力衰竭 (HF) 的 RNAi 治疗的易感性的方法。该方法包括使受治疗者的肌肉组织样品与腺伴随病毒 (AAV) 载体接触,其中所述载体包括编码导致受磷蛋白 (PLB)mRNA 的表达或活性降低的 RNAi 表达产物的多核苷酸序列,和确定所述肌肉组织样品与 AAV 载体接触之前和之后所述组织样品中钙 ATP 酶泵 (SERCA) 的活性,其中 SERCA 活性的增加与受治疗者对 HF 的 RNAi 治疗的易感性相关。

[0018] 本发明还提供改善具有慢性心力衰竭的受治疗者的存活的方法。该方法包括施用腺伴随病毒 (AAV) 载体,其中所述载体包括编码导致受磷蛋白 (PLB)mRNA 的表达降低和细胞中的 PLB 蛋白的量减少的 RNAi 表达产物的多核苷酸序列,并且所述 RNAi 包括在严格条件下与 PLB 靶基因 mRNA 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。在一种实施方案中,所述载体改善收缩功能,由此改善受治疗者的存活。在另一种实施方案中,所述 AAV 是血清型 9。

[0019] 本发明还提供降低受治疗者的室性心律失常的方法。该方法包括施用包含编码导致受磷蛋白 (PLB)mRNA 的表达或 PLB 活性降低的 RNAi 表达产物的多核苷酸序列的病毒体,改善心室功能,由此降低所述受治疗者的室性心律失常。在一种实施方案中,所述病毒体是 AAV9。

[0020] 附图简述

[0021] 图 1A 是显示 Northern 印迹图的图像图示,所述 Northern 印迹图展示在开发用于心力衰竭 (HF) 治疗的 RNA 干扰 (RNAi) 载体中通过不同载体的靶向沉默。所示为原代新生大鼠心肌细胞 (primary neonatal rat cardiomyocyte, PNCM) 中 shRNA 表达载体的靶向沉默效力。分别在用在泳道上方给出的以颗粒 / 细胞 (p/c) 计的剂量的相应载体治疗后 5 天 (上面部分) 或 10 天 (下面部分) 收获细胞。然后使用大鼠 PLB- 特异性探针进行 Northern 印迹。为了确保等量的 RNA 上样,剥离印迹并使其与 β -肌动蛋白-特异性探针重新杂交。泳道 1 至 18 显示基于腺伴随病毒 (AAV) 的载体 AAV-shPLB (泳道 1-6)、AAV-shPLB-CMV- β -内含子 (泳道 7-12) 和 AAV-shPLB-CMV-GFP (泳道 13-18) 的 RNAi-介导的 PLB-mRNA 下调的剂量依赖性。泳道 19-24 显示引起用 AAV-shGFP 治疗后的 PLB-mRNA 表达的非特异性 shRNA 的对照,其产生 shRNA 序列靶向的绿色荧光蛋白 (GFP) (泳道 19-24)。为了与 AAV 进行比较,使用了腺病毒载体 AdV-shPLB (泳道 25-28)。至第 10 天, > 98% 的 PLB-mRNA 被 4×10^3 p/c 的最低剂量的 rAAV-shPLB 除去 (泳道 1, 2), 类似于 AdV-shPLB (泳道 25-28)。在 rAAV-shPLB 载体中并入 CMV-GFP 表达盒 (泳道 7-12) 以向此载体提供被体内成像易于检测的标签,导致感染细胞中的强 GFP 表达 (未显示),但意外地消除了其 PLB 基因沉默效应。并入 CMV- β -内含子盒 (泳道 12-18) 具有相似但较不显著的效应。

[0022] 图 1B 是显示图 1A 的载体产生的细胞 shRNA 水平的图形图示。在 CMV-GFP 盒存在下, shPLB 产生被消除 (泳道 13-18), 而不具有其它序列的 U6-shPLB 载体显示 5 天 (泳道

1-3) 和 10 天 (泳道 4-6) 的稳定表达。在 NRCM 中, AdVshPLB 在第 5 天产生非常高的 shPLB 水平, 然后该水平相当迅速地下降。

[0023] 图 1C 是显示腺病毒和 AAV 载体的详细图谱的图像图示。AAV-shPLB 具有与 AdV-shPLB 和它们对应的 shGFP 对照载体相同的 U6-shRNA 表达系统。此外, 四种含有 CMV 的载体携带盒, CMV-GFP 盒或 CMV- β - 内含子盒与 U6-shRNA 序列处于头接头方向, 并且它们被牛生长激素 (bgh) 末端信号隔开。

[0024] 图 1D 是图像和图形图示, 左图显示治疗 NRCM 过程中的 PLB 蛋白的 Western 印迹, 而右图显示加入载体后第 3、5 和 7 天的 PLB 蛋白定量。在第 7 天, AdV-shPLB 和 rAAV6-shPLB 造成细胞内 PLB 分别下调至基线的 9% 和 13%。

[0025] 图 1E 是显示以下的图形图示: 与具有与未治疗细胞不可分辨的 $[Ca^{2+}]_i$ 瞬变 (transient) 的 AAV9-shGFP 组相比, AAV9-shPLB 治疗过程中 NRCM 中的 $[Ca^{2+}]_i$ 瞬变显示显著更高的振幅和加快的瞬变动力学 (缩短的 TTP 和 τ)。AdV-shPLB 治疗还造成比 AdV-shGFP 对照显著更高的振幅。与 AAV9 组相反, AdV-shPLB 和 AdV-shGFP 组的 TTP 被延长, 该组未显示 τ 的差异。

[0026] 图 1F 是显示图 1E 中所示的 $[Ca^{2+}]_i$ 瞬变的统计评估的图形图示。* 表示 $p < 0.05$ 和 ** $p < 0.01$ 。

[0027] 图 2A 是说明体内 RNAi 治疗 HF 的方案流程图。最初将用于体内 RNAi 治疗的动物分成两组: 一组为大动脉被绑扎 (TAB) 的 56 只动物, 第二组是 12 只进行模拟手术的动物。在 TAB 动物中, 在心脏 RNAi 载体转移之前, 经过 25-30 周以允许它们形成左心室 (LV) 舒张和允许缩短分数 (FS) 下降 25%, 如通过连续超声波心动描记术所评估的。在经历 TAB 的初始的 56 只动物中, 40 只动物存活, 并进一步分组以接受 Ad-shGFP ($n = 10$) 或 Ad-shPLB ($n = 10$), 或对照载体 AAV9-shGFP ($n = 10$) 或 AAV9-shPLB ($n = 10$)。载体注射经由含有 $200 \mu l$ 腺病毒 (3×10^{10} pfu) 或 AAV9 (5×10^{11} 载体基因组) 载体溶液的 22G 导管进行。使导管从 LV 尖前进至主动脉根, 在远离导管位点的一端将主动脉和肺动脉主干夹住 40 秒钟并注射溶液。腺病毒载体组在一个月后、AAV 载体治疗组在三个月后通过超声波心动描记术、尖端导管 (tip catheter)、形态测定法和组织学进行结果评估 (参见, 图 3A-3F)。在 AdV 组, 8/10 和 9/10 的动物在 1 个月存活。3 个月后, rAAV-shPLB 组中 9/10 的动物存活, rAAV-shGFP 组中 6/10 的动物存活。同时对这些组中心脏表达的微 RNA 进行了进一步研究。

[0028] 图 2B 是显示 i. v. 注射表达绿色荧光蛋白的 rAAV9-GFP 载体 (下) 或盐水 (上) 的大鼠心脏的图像图示。注射后一个月, 摘除心脏并通过 GFP 成像显现, GFP 成像显示在 rAAV9-GFP 组中有心脏横截面大致均匀的信号, 而在盐水组中则没有信号。

[0029] 图 2C 是显示 rAAV9-GFP- 治疗的大鼠的心脏的 GFP 荧光在一个月时达到 90% 表面面积的概况的图像图示。

[0030] 图 2D 是显示向大鼠 i. v. 注射 rAAV9-GFP 后一个月不同器官中的 GFP 免疫组织化学染色的图像图示。但在 i. v. 注射腺病毒载体 (AdV-GFP) 后, 未在心脏中检测到 GFP (a), rAAV9-GFP 治疗造成强烈的 GFP 表达 (b) 和 (c), 该表达是大致均匀的。少数区域全无 GFP 免疫反应性 (已圈出), 其他区域显示均匀的细胞质染色 (已圈出)。在一个月的高表达已明显造成在细胞中稳定的 GFP 的沉淀 (箭头) 形成的部位, 染色尤其致密, 这与 RNAi 载体产生的 shRNA 相反。平均 70% 的心肌细胞是免疫组织化学阳性的, 而个体细胞之间的表达

有差异。(e) 显示一部分细胞具有微弱的染色的骨骼肌,而肝显示仅个别细胞的显著信号(d)。肺中没有可见的信号。关于 AAV9 分布的进一步数据在图 2J 中给出,其中 GFP 通过 Western 印迹分析定量,记录心脏的 rAAV9-GFP 表达的最高亲和性。肝和骨骼肌显示低表达,而肺仅显示非常微弱的表达。

[0031] 图 2E 是显示 i. v. 注射 rAAV9-GFP 后 1 周和 4 周的肝苏木精-曙红染色的图像图示,显示无毒性证据。rAAV-shRNA 载体也未造成肝毒性。

[0032] 图 2F 是显示 Northern 印迹图的图像图示,所述 Northern 印迹图展示,与 shGFP 对照组相比,AdV-shPLB 治疗后 1 个月和 rAAV9-shPLB 治疗后 3 个月的心脏 PLB 蛋白显著减少。NCX 和 GAPDH 蛋白保持不变。与模拟(sham)组相比,处于心力衰竭的 shGFP 组中 SERCA2a 降低,而两个 shPLB 组的 SERCA2a 均显著增加。

[0033] 图 2G 是显示不同治疗组的 Western 印迹的统计评估的图形图示。* 表示与 AdV-shGFP 相比 $p < 0.05$, # 表示与 rAAV9-shGFP 相比 $p < 0.05$ 。

[0034] 图 2H 是显示静脉内 rAAV9-GFP 注射后一个月的心脏 GFP 表达的图像图示。左侧的四个图(rAAV9-GFP)显示有初级 GFP 抗体,而右侧的两个图(对照)显示没有。关于 AAV9 分布的进一步数据证明心脏的 rAAV9-GFP 表达的最高亲和性。肝和骨骼肌显示低表达,而肺仅显示非常微弱的表达。

[0035] 图 2I 是显示静脉内 rAAV9-GFP 注射后 1 个月其他器官中的 GFP 表达的图像图示。左侧的图(rAAV9-GFP)显示有初级 GFP 抗体,而右侧图(对照)显示没有。

[0036] 图 2J 是显示静脉内 rAAV9-GFP 注射后不同器官中通过免疫印迹的 GFP 定量的图像和图形图示。

[0037] 图 3A 是展示 RNAi 治疗对 HF 的功能和形态效应的系列图形图示。其中总结了 RNAi 治疗对舒张期 LV 功能的血液动力学参数的影响。与 shGFP 对照(泳道 2,4)相比,TAB 后大鼠中高 LV 充盈压(LVEDP)被 shPLB 载体显著降低(泳道 3,5)。最大压力下降速率(maximal rate of pressure fall)($-dp/dt$)以及等容松弛时间常数(isovolumetric relaxation time constant)Tau 被 shPLB 治疗显著增加。rAAV-shPLB 治疗(泳道 5)后 3 个月值被恢复到正常范围(泳道 1)。

[0038] 图 3B 是显示与图 3A 类似的对收缩期 LV 功能的治疗效应的图形图示。超声波心动描记术显示 rAAV-shPLB 治疗后 3 个月的标准化的缩短分数(FS),而 AdV-shPLB 的 FS 改善虽然是明显的,但较不显著。与对照相比,最大压力上升速率(maximal rate of pressure rise)($+dp/dt$)以及收缩期压力(LVSP)得到改善。

[0039] 图 3C 是显示死后形态测定法的系列图形图示,显示 TAB 诱导的显著的 LV 肥大(泳道 2,4),LV 重量和 LV/体重(LV/BW)比 $\approx 2/3$ 三分之一高于基线(thirds above baseline)(泳道 1)。后者在用 AdV-shPLB 或 rAAV9-shPLB(泳道 3,5)治疗 1 或 3 个月后被降低至正常的范围内。两种载体类型均显著减低心脏肥大。

[0040] 图 3D 是总结心脏形态学的超声波心动描记术数据的系列图形图示,这与确证形态测定发现的图 3C 相似。

[0041] 图 3E 是显示 RNAi 治疗后的 HF 动物中的心脏胶原蛋白含量的图形图示。3 个月时,rAAV9-shRNA 治疗造成显著降低的纤维化。对照载体则无效果。

[0042] 图 3F 是显示两种治疗模式均诱导心肌细胞直径的显著下降的图形图示。

[0043] 图 3G 是显示 RNAi 治疗过程中心脏 BNP mRNA 水平的图形图示。‡表示对于 AAV9-shGFP 比 AAV9-shPLB, $p < 0.05$; ¶表示对于 AdV-shGFP 比 AdV-shPLB, $p < 0.05$ 。

[0044] 图 4A 是显示 RNAi 治疗过程中细胞微 RNA 的评估的系列图形图示。如所示的,在用稍后将用于体内治疗的载体 (AAV-shPLB、AAV-shGFP、AdV-shPLB) 进行治疗的过程中,与未治疗的 PNCM 相比,五种心脏表达的微 RNA (miR) 的细胞水平未发生变化,而含有 CMV 启动子的载体改变了这些水平。

[0045] 图 4B 是显示以下的系列图形图示:与在标准 PNCM 的培养条件下获得的图 4A 的数据相反,在肥大诱导药物存在下,细胞 miRNA 水平发生显著改变。

[0046] 图 4C 是显示 RNAi 治疗过程中的心脏 miRNA-1 和 miRNA-133 水平的系列图形图示。‡表示对于 AAV9-shGFP 比 AAV9-shPLB, $p < 0.05$; ¶表示对于 AdV-shGFP 比 AdV-shPLB, $p < 0.05$ 。

[0047] 图 5A 是显示 CMV 启动子对 shRNA 产生的干扰的图形图示。如所示的,除了图 1A 和 1B 中分析的不同 AAV 载体之外,还直接比较了载体 AAV-ShPLB-CMF-GFP (具有功能性 GFP 盒) 与 AAV-shPLB-GFP (无 CMV 启动子),以及 AAV-shPLB-CW- β -内含子与 AAV-shPLB- β -内含子 (无 CMV)。

[0048] 图 5B 是显示与 AAV6shPLB-CMF-GFP 标记载体孵育后第 5 天培养的心肌细胞单层的图像图示,符合 AAV6 假型的非常高的转导率。

[0049] 图 5C 是表明在从 MCV 经由终止信号通读至极短的 shRNA 序列中 U6-shPLB-bGH 方向上扰乱的 shRNA 产生的可能原因的图像图示,随后其影响了介导 RNAi 的短发夹的正确形成。

[0050] 图 5D 是显示 RNAi 治疗过程中 NRCM 中的钙稳态变化的系列图形图示。

[0051] 图 5E 是显示 RNAi 治疗过程中 NRCM 中的钙稳态变化的系列图形图示。

[0052] 图 6 是显示具有心力衰竭并用 AAV9/PL-RNAi 治疗的大鼠中改善的存活的图形图示。其显示与使用单独的载体或具有 GFP 的载体的对照相比,通过使用 AAV9/PL-RNAi 的表达的 RNAi 基因转移的受磷蛋白抑制对具有转变为心力衰竭的压力过大性肥大的大鼠的存活的效应。

[0053] 图 7 是显示猪缺血性再灌注模型中降低的室性心律失常结果的图形图示。与使用 GFP 的对照载体相比,该实验使用 AAV9/PL-RNAi 的表达。

[0054] 图 8 是显示猪缺血性再灌注模型中改善的心室功能结果的图形图示。与使用单独的载体或具有 GFP 的载体的对照相比,该实验使用 AAV9/PL-RNAi 的表达。

[0055] 发明详述

[0056] 在描述本发明组合物、方法和治疗方法之前,应理解,此发明不限于所述的特定组合物、方法和实验条件,因为此类组合物、方法和条件可进行变化。还应理解,本文所用的术语仅是为了描述特定实施方案的目的,而不意图为限制,因为本发明的范围将仅在所附权利要求中限制。

[0057] 如本说明书和所附权利要求中所用,除非上下文另外清楚地指明,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数含义。因此,例如,“该方法”的含义包括在本领域技术人员阅读本公开等等之后将变得明显的一种或多种方法和/或本文所述类型的步骤。

[0058] 除非另外指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与此发明所属领域的普通技

术人员通常理解的含义相同的含义。虽然与本文描述的方法和材料相似或等价的任何方法和材料可用于本发明的实践或检验,但是现在描述非限制性方法和材料。

[0059] 除非另外说明,本发明的实践将利用本领域技术内的病毒学、微生物学、分子生物学和重组 DNA 技术的常规方法。此类技术在文献中有详尽说明,参见,如 Sambrook 等人 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆实验室手册) (现行版); *DNA Cloning: A Practical Approach* (DNA 克隆实用方法), 第 I&II 卷 (D. Glover, 编辑); *Oligonucleotide Synthesis* (寡核苷酸合成) (N. Gait 编辑, 现行版); *Nucleic Acid Hybridization* (核酸杂交) (B. Hames & S. Higgins 编辑, 现行版); *Transcription and Translation* (转录和翻译) (B. Hames & S. Higgins 编辑, 现行版); *CRC Handbook of Parvoviruses*, (CRC 细小病毒手册), 第 I&II 卷 (P. Tijessen 编辑); *Fundamental Virology* (基础病毒学), 第 2 版, 第 I&II 卷 (B. N. Fields 和 D. M. Knipe 编辑)。

[0060] 本发明成功展示了使用与心脏 Ca^{2+} 稳态的关键调节物 PLB 互补的 RNAi 治疗受治疗者中的心力衰竭 (HF)。合成的小干扰 RNA 介导 RNAi, 但是它们的体内使用受到在血浆中不稳定和进入靶细胞的低转移的限制。申请人已展示, 腺病毒短发夹 RNA 载体 (AdV-shRNA) 沉默心肌细胞 (PNCM) 中的 PLB, 并在体内改善 HF 动物的血液动力学。申请人还开发了携带 RNAi 的向心脏的腺伴随病毒 (AAV) 载体, 其实现了心脏功能的恢复、心脏舒张和肥大的逆转, 并改善了存活。在 PNCM 中, 苯肾上腺素诱导的肥大相关的微 RNA 失调被所述 RNAi 载体校正。除了它们对收缩功能的效应外, RNAi 靶向改变微 RNA 水平, 由此在不存在血液动力学因子或神经体液活化下直接改变细胞内转录程序。

[0061] 在一种实施方案中, 公开了治疗心力衰竭的方法, 包括向有相应需要的受治疗者施用治疗有效量的 RNAi 表达盒, 其中所述盒包括病毒载体和其表达产物降低受磷蛋白 (PLB) 的表达和 / 或活性的 RNAi 序列, 所述施用以有效转导所述受治疗者的心肌细胞的量进行, 由此造成所述 RNAi 表达盒的表达并治疗所述受治疗者中的心力衰竭。

[0062] 本发明公开了通过局部诱导的 RNAi 治疗心脏疾病的策略。HF 仍是发达国家中死亡的主要因素。目前的药物治疗效力有限, 而在晚期 HF 中, 左心室辅助设备或心脏移植是最终的选择。虽然 HF 可由多种病因学引起, 但是缺陷的心脏 Ca^{2+} 稳态已被鉴定为重要的最终共同途径。衰竭的心脏的机能失调部分是由于降低的 SERCA2a 表达和 / 或 PLB 磷酸化造成的 PLB- 控制的肌质网 Ca^{2+} ATP 酶泵 (SERCA2a) 的功能不良 (Schmidt 等人, *Am J Physiol* (1999) 277 :H474 ~ 480)。未磷酸化的 PLB 保持 SERCA2a 的低 Ca^{2+} 亲和力, 造成降低的 SR Ca^{2+} 摄取、缓慢的松弛和降低的 SR Ca^{2+} 负荷, 而响应于 β -肾上腺素能刺激的 PLB 磷酸化解除这一抑制 (MacLennan, D. H. & Kranias, E. G. *Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility* (受磷蛋白: 心脏收缩性的关键调节物). *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 566-77 (2003))。PLB 基因的种系切除 (Luo 等人, *Circ Res* (1994) 75 :401-409)、和显性阴性 PLB 突变体的体细胞基因转移 (Hoshijima 等人, *Mature Medicine* (2002) 8 :864-871; Iwanaga 等人, *J Clin Invest* (2004) 113 :727-736)、PLB- 反义 -RNA (Eizema 等人, *Circulation* (2000) 101 :2193-2199; He 等人, *Circulation* (1999) 100 :974-980)、或细胞内抑制性 PLB 抗体被用于增加 SERCA2a 活性、收缩功能和拯救心力衰竭模型 (Dieterle 等人, *Cardiovasc Res* (2005) 67 :678-688; Meyer 等人, *FASEB J* (2004) 18 :1312-1314; Minamisawa, S. 等人,

Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy(慢性受磷蛋白-肌质网钙 ATP 酶相互作用是舒张性心肌病中的关键钙循环缺陷 .Cell 99、313-22(1999))。心肌细胞中由化学合成的短干扰 RNA(siRNA) 介导的 RNAi 甚至在体外也显示低效力和低稳定性 (Watanabe 等人, J Mol Cell Cardiol(2004) 37 :691-698)。

[0063] 合成 siRNA 的两个基本限制是它们在血浆和靶细胞中的快速降解,以及在体内实现足够的转移和靶向的问题。病毒载体具有克服这些限制的潜能。在本发明中,其他心脏蛋白包括 Ca^{2+} 调控蛋白 (Ca^{2+} handling protein) 的表达未发生改变,表明高度的靶特异性。同样地,功能表征一系列载体和它们的效力决定因素后,在严重 HF 的动物模型中沿传统的腺病毒载体确定了优化的细小病毒 (即 AAV),并确定了 RNAi 治疗过程中的心肌细胞微 RNA(miR) 途径。因此,本文呈现的数据展示心脏功能的体内恢复以及病理性肥大和扩张的降低。

[0064] 本文使用的术语“细小病毒”涵盖细小病毒科 (Parvoviridae),包括自主复制的细小病毒和依赖病毒。自主细小病毒包括以下属的成员:细小病毒属 (Parvovirus)、红细胞病毒属 (Erythrovirus)、浓核病毒属 (Densovirus)、重复病毒属 (Iteravirus) 和康特拉病毒属 (Contravirus)。示例性自主细小病毒包括但不限于,小鼠细小病毒、牛细小病毒、犬细小病毒、鸡细小病毒、猫全白细胞缺乏症病毒、猫细小病毒、鹅细小病毒、H1 细小病毒、番鸭 (muscovy duck) 细小病毒、B19 病毒和任何其他细小病毒。其他自主细小病毒是本领域技术人员已知的。参见,如 BERNARD N. FIELDS 等人, VIROLOGY(病毒学),第 2 卷,第 69 章 (第 4 版, Lippincott-Raven Publishers)。

[0065] 细小病毒科是小的单链无包膜 DNA 病毒科,基因组长大约 5000 核苷酸。该科的成员包括腺病毒 (Ad) 和腺伴随病毒 (AAV)。腺病毒代表感染呼吸道、眼睛、肠和泌尿道的膜的一组病毒。腺病毒代表最大的无包膜病毒,因为它们是能够通过核内体运输的最大尺寸 (即包膜融合不是必需的)。病毒体还具有与衣壳的每个五邻体基质有关的独特的“刺突” (spike) 或纤维 (fibre),所述“刺突”或纤维有助于附着宿主细胞。AAV 是依赖性细小病毒,根据定义,其需要与另一病毒 (通常是腺病毒或疱疹病毒) 共感染以启动和维持有生产能力的感染周期。不存在这样的辅助病毒时,AAV 仍能通过受体介导的结合和内化、刺入非分裂细胞和分裂细胞的核而感染或转导靶细胞。

[0066] 进入核以后,病毒脱壳并从许多不同的形式表达转基因,其中最持久的形式是环状单体。AAV 将整合到稳定转导的细胞中的 1-5% 的细胞的基因组 (Nakai 等人, J. Virol. 76 :11343-349, 2002)。转基因的表达可以是特别稳定的,在一个用 AAV 递送因子 IX 的研究中,狗模型在用该病毒进行单次直接输注后 4.5 年持续表达治疗水平的该蛋白。因为在辅助病毒不存在时 AAV 感染不产生后代病毒,所以转导的范围仅限于用 AAV 感染的初始细胞。这一特征使得 AAV 成为用于本发明的合适的基因治疗载体。此外,与逆转录病毒、腺病毒和单纯疱疹病毒不同,AAV 显示缺乏人类致病性和毒性 (Kay 等人, Nature 424 : 251, 2003 和 Thomas 等人, Nature Reviews, Genetics 4 :346-58, 2003)。

[0067] 通常, AAV 的基因组仅含有两个基因。“rep”基因编码 DNA 复制中使用的至少四种单独的蛋白。“cap”基因产物被差异剪接以产生构成病毒衣壳的三种蛋白。当将基因组包装成新生病毒时,只有反向末端重复序列 (ITR) 是必需的序列;rep 和 cap 可被从基因组

中缺失,并被替换为选择的异源序列。然而,为了产生复制和将基于 AAV- 的异源构建体包装成新生病毒体需要的蛋白,必需以反式提供 rep 和 cap 蛋白。通常由与辅助病毒诸如腺病毒或疱疹病毒共感染提供的辅助功能也可以一种或多种 DNA 表达质粒的形式反式提供。由于基因组通常仅编码两个基因,因此,作为递送运载体 AAV 的包装能力限制为 4.5 千碱基(kb) 单链也就不足为奇。不过,虽然此尺寸限制可能限制可以被递送以替换基因治疗的基因,但是它并不有害地影响较短序列诸如 RNAi 的包装和表达。

[0068] AAV 对于 RNAi 应用的功效已在使用 AAV 体外递送 shRNA 以抑制 p53 和半胱天冬酶 8 表达的实验中展示 (Tomar 等人, *Oncogene* 22 :5712-15, 2003)。将适当的序列克隆到空壳 (gutted) AAV-2 载体之后,在 HEK293 细胞中产生了感染性 AAV 病毒体,并将该病毒体用于感染 HeLa S3 细胞。展示了内源半胱天冬酶 8 和 p53 水平的剂量依赖性减少。Boden 等人还使用 AAV 体外递送 shRNA 以抑制组织培养系统中的 HIV 复制 (Boden 等人, *J. Virol.* 77 (21) : 115231-35, 2003), 如通过耗尽的培养基中的 p24 产生所评估的。

[0069] 但是,必须解决使用 AAV 作为用于 RNAi 表达构建体的运载体的技术障碍。例如,人口的不同百分比可拥有针对某些 AAV 血清型的中和抗体。不过,由于存在若干种 AAV 血清型,含有其中一些血清型的中和抗体的个体百分比大大降低,可使用其他血清型,或可采用假分型 (pseudo-typing)。存在至少九种不同的已表征的血清型,还有数十种其他血清型已被分离但是描述较不充分。另一限制是由于对 AAV 的可能的免疫应答,基于 AAV 的治疗可能仅施用一次;不过,使用替代的、非人类来源的血清型可允许重复施用。施用路径、血清型和所递送的基因组的组成均影响组织特异性。

[0070] 将未修改的 AAV 系统用于 RNAi 表达构建体的另一限制是转导可能是效率低下的。体内稳定转导可限于 5-10% 的细胞。不过,本领域已知加强稳定转导水平的不同的方法。一种方法是采用假分型,其中使用其他血清型来源的 cap 蛋白包装 AAV-2 基因组。例如,通过用 AAV-5cap 基因置换其 AAV-2 对等物, Mingozzi 等人使稳定转导增加至大约 15% 的肝细胞 (Mingozzi 等人, *J. Virol.* 76 (20) :10497-502, 2002)。Thomas 等人使用 AAV8 衣壳基因体内转导了超过 30% 的小鼠肝细胞 (Thomas 等人, *J. Virol.*, 发行中)。Grimm 等人 (*Blood*. 2003-02-0495) 详尽地用 AAV-1、AAV-3B、AAV-4、AAV-5 和 AAV-6 将 AAV-2 假分型以用于组织培养研究。转基因表达的最高水平由用 AAV-6 假分型的病毒体诱导;产生比 AAV-2 高接近 2000% 的转基因表达。因此,本发明包括使用假分型 AAV 病毒来实现高转导水平, RNAi 多启动子表达构建体的表达相应增加。

[0071] 如本文所用,术语“腺伴随病毒”(AAV),包括但不限于, AAV 1 型、AAV 2 型、AAV 3 型 (包括 3A 型和 3B 型)、AAV 4 型、AAV 5 型、AAV 6 型、AAV 7 型、AAV 8 型、AAV 9 型、AAV 10 型、AAV 11 型、禽 AAV、牛 AAV、犬 AAV、马 AAV、羊 AAV 和现在已知的任何其他 AAV。参见,如 BERNARD N. FIELDS 等人, *VIROLOGY* (病毒学), 第 2 卷, 第 69 章 (第 4 版, Lippincott-Raven Publishers)。最近,许多推定的新的 AAV 血清型和进化枝已被鉴定 (参见,如 Gao 等人, (2004) *J. Virology* 78 :6381-6388; Moris 等人, (2004) *Virology* 33- :375-383)。在一种实施方案中,所述 AAV 是 AAV9 型。

[0072] AAV 的各种血清型的基因组序列和自主细小病毒的基因组序列,以及末端重复序列 (TR)、Rep 蛋白和衣壳亚基的序列是本领域已知的。此类序列可在文献或公共数据库诸如 GenBank 中找到,包括但不限于, GenBank 登录号 NC_002077、NC_001401、NC_001729、

NC_001863、NC_001829、NC_001862、NC_000883、NC_001701、NC_001510、NC_006152、NC_006261、AF063497、U89790、AF043303、AF028705、AF028704、J02275、J01901、J02275、X01457、AF288061、AH009962、AY028226、AY028223、NC_001358、NC_001540、AF513851、AF513852、AY530579；其公开内容通过引用并入本文以教导细小病毒和 AAV 核酸和氨基酸序列。另参见，如 Srivistava 等人，(1983) J. Virology 45:555；Chiorini 等人，(1998) J. Virology 71:6823；Chiorini 等人，(1999) J. Virology 73:1309；Bantel-Schaal 等人，(1999) J. Virology 73:939；Xiao 等人，(1999) J. Virology 73:3994；Muramatsu 等人，(1996) Virology 221:208；Shade 等人，(1986) J. Virol 58:921；Gao 等人，(2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99:11854；Moris 等人，(2004) Virology 33-:375-383；国际专利公布 WO 00/28061、WO 99/61601、WO 98/11244；和美国专利第 6,156,303 号，通过引用并入本文。

[0073] 如本文所用的术语“趋向性”指病毒优先进入某些细胞或组织，任选地接着在所述细胞中表达（如转录和，任选地，翻译）病毒基因组携带的序列，如，对于重组的病毒，表达异源核苷酸序列。本领域技术人员将理解，在不存在反式作用因子时，异源核酸序列从病毒基因组的转录可能不被启动，如对于诱导型启动子或以其他方式调节的核酸序列。在 rAAV 基因组的情形中，病毒基因组的基因表达可来自稳定整合的原病毒、来自未整合的附加体以及病毒在细胞内可采取的任何其他形式。

[0074] 如本文所用，除非另外说明，术语“多肽”涵盖肽和蛋白质（包括天然存在的或非天然存在的）。

[0075] 如本文所用，“分离的”多肽（如，“分离的肽”或“分离的蛋白质”）意指多肽至少部分地与天然存在的有机体或病毒的至少一些其他组分分开，所述其他组分例如，细胞或病毒结构组分或通常被发现与所述多肽缔合的其他多肽或核酸。

[0076] “多核苷酸”是核苷酸碱基的序列，并且可以是 RNA、DNA 或 DNA-RNA 杂种序列（包括天然存在的和非天然存在的核苷酸），但在代表性实施方案中，其为单链或双链 DNA 序列。

[0077] 如本文所用，“分离的”多核苷酸（如“分离的 DNA”或“分离的 RNA”）意指多核苷酸至少部分地与天然存在的有机体或病毒的至少一些其他组分分开，所述其他组分例如，细胞或病毒结构组分或通常被发现与所述多核苷酸缔合的其他多肽或核酸。

[0078] 如本文所用，“分离”或“纯化”（或语法等同物）病毒载体意指使病毒载体至少部分地与起始材料中的至少一些其他组分分开。

[0079] “治疗多肽”是可缓解或减轻细胞或受治疗者中由蛋白质的缺乏或缺陷造成的症状的多肽。可选地，“治疗多肽”是以另外方式赋予受治疗者益处、如抗心律失常效应或从心力衰竭中存活的能力的改善的多肽。

[0080] “转染”用于指细胞对核酸组合物的摄取。当外源核酸组合物穿过细胞膜时，细胞即被“转染”。许多转染技术是本领域通常已知的。参见，如 [69, 70]，Sambrook 等人 (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual (分子克隆实验室手册)，Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis 等人 (1986) Basic Methods in Molecular Biology (分子生物学基本方法)，Elsevier，和 [71]。此类技术可用于将一种或多种核酸组合物诸如质粒载体和其他核酸分子引入合适的宿主细胞。该术语指遗传物质的稳定摄取和瞬时摄取两方面。对于此发明目的，“转导”是经由病毒载体的特殊“转染”形式。

[0081] “转导”表示经由病毒或病毒载体诸如经由重组的 AAV 病毒体,在体内、体外或活体外(ex vivo)递送核酸组合物到达、进入受体细胞或在受体细胞内。转导是转染的特殊形式,即术语转染包括术语转导。

[0082] 术语“治疗”,包括其语法等同物,意指受治疗者的病症的严重度得到减轻或至少部分改善或缓解,和/或实现至少一种临床症状的某种程度的缓解、缓和或降低,和/或病症的进展有延迟,和/或阻止或延迟了疾病或疾患的发作。因此,术语“治疗”指预防性方案和治疗性方案两方面。

[0083] “异源核苷酸序列”或“异源核酸”是指不是病毒中天然存在的序列。通常,异源核酸包含感兴趣的多肽或非翻译 RNA 的开放阅读框(如,用于递送到细胞或受治疗者)。

[0084] 如本文所用,术语“病毒载体”、“载体”或“基因递送载体”指充当核酸递送运载体的病毒(如,AAV)颗粒,以及包含包装到 AAV 衣壳内的载体基因组(如,病毒 DNA[vDNA])的病毒颗粒。可选地,在一些上下文中,术语“载体”可用于指单独的载体基因组/vDNA。

[0085] “rAAV 载体基因组”或“rAAV 基因组”是包含一种或多种异源核苷酸序列的 AAV 基因组(即 vDNA)。rAAV 载体通常只需要顺式的 145 碱基末端重复序列(TR)来产生病毒。所有其它序列是非必须的,并可以反式提供(Muzyczka, (1992)Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158 :97)。通常,rAAV 载体基因组将仅保留最小 TR 序列以使可被载体有效包装的转基因的尺寸最大。结构和非结构蛋白质编码序列可以反式提供(如,从载体,诸如质粒,或通过将序列稳定地整合到包装的细胞中)。rAAV 载体基因组包含至少一个 TR 序列(如,AAV TR 序列)、任选地两个 TR(如,两个 AAV TR),其通常在异源核苷酸序列的 5' 和 3' 端,但不需与所述异源核苷酸序列邻接。TR 可以彼此相同或不同。

[0086] “AAV 末端重复序列”或“AAV TR”可来自任何 AAV,包括但不限于血清型 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 11。AAV 末端重复序列不需要具有野生型末端重复序列序列(如,野生型序列可通过插入、缺失、截短或错义突变而被改变),只要该末端重复序列介导所需的功能,如复制、病毒包装、整合、和/或原病毒拯救和类似功能。

[0087] 术语“末端重复序列”或“TR”包括形成发夹结构并充当反向末端重复序列的任何病毒末端重复序列和合成序列,诸如授予 Samulski 等人的美国专利第 5,478,745 号中描述的“双-D 序列”。自主细小病毒和 AAV 的衣壳结构更详细地描述于 BERNARD N. FIELDS 等人,VIROLOGY(病毒学),第 2 卷,第 69&70 章(第 4 版,Lippincott-Raven Publishers)。另参见对以下的晶体结构的描述:AAV2(Xie 等人,(2002)Proc. Nat. Acad. Sci. 99 :10405-10)、AAV4(Padron 等人,(2005)J Virol. 79 :5047-58)、AAV5(Walters 等人,(2004)J Virol. 78 :3361-71)和 CPV(Xie 等人,(1996)J Mol. Biol. 6 :497-520 和 Tsao 等人,(1991)Science 251 :1456-64)。“AAV 小基因”指至少包含 AAV ITR 和异源核酸组合物的构建体。对于根据本发明的 rAAV 产生,小基因可被携带在任何适合的载体包括病毒载体、质粒载体和类似载体上。

[0088] 本发明的病毒载体还可以是如国际专利公布 WO 00/28004 和 Chao 等人,(2000)Molecular Therapy 2 :619 中所述的“靶向”病毒载体(如,具有定向的趋向性)和/或“杂种”细小病毒(即,其中 rAAV 基因组和病毒衣壳来自不同的细小病毒)。

[0089] 本发明的病毒载体还可以是如国际专利申请公布第 WO 01/92551 号中所述的双链体细小病毒颗粒。因此,在一些实施方案中,可将双链(双链体)基因组包装到本发明的

病毒衣壳中。

[0090] 此外,病毒衣壳或基因组可含有其它修饰,包括插入、缺失和 / 或置换。

[0091] 因此,如本文所用,术语“病毒载体”涵盖细小病毒和 AAV 的杂种、靶向和双链体病毒颗粒,以及其他修饰形式。

[0092] 如本文所用,术语“脊椎动物”涵盖哺乳动物、禽类物种、鱼或爬行动物。例如,脊椎动物可以是哺乳动物。术语“哺乳动物”包括人类和非人灵长类、农畜类动物(如绵羊、牛、山羊、猪、驴、马)、实验室测试动物(如大鼠、小鼠、兔、豚鼠、仓鼠)、伴侣动物(如狗、猫)或捕获的野生动物。哺乳动物包括但不限于、人类和鼠科哺乳动物。

[0093] 本发明部分是基于应用促进经由 RNAi 的基因沉默的试剂下调或沉默一种或多种转录活性基因区域作为治疗心力衰竭的方法,所述转录活性基因区域与心脏细胞中的钙流量调节直接或间接相关。在一种实施方案中,公开了治疗心力衰竭的方法,包括向有相应需要的受治疗者施用治疗有效量的 RNAi 表达盒,其中所述盒包括病毒体载体和其表达产物降低受磷蛋白 (PLB)mRNA 的表达的 RNAi 序列,所述施用以有效转导所述受治疗者的心肌细胞的量进行,由此造成所述 RNAi 表达盒的表达并治疗所述受治疗者中的心力衰竭。

[0094] 术语“RNA 干扰”通常指双链 RNA 分子改变与双链或短发夹分子具有大致的或完全的同源性的核酸序列的表达的过程。虽然不受理论束缚,作用的机制可包括但不限于,PLB 基因的表达的直接或间接下调,PLBmRNA 的减少,和 / 或 PLB 活性的降低。术语“RNAi”指引发 RNA 干扰并从载体转录的 RNA 序列。术语“短发夹 RNA”或“shRNA”指具有双链体区域和环状区域的 RNA 结构。该术语还应被理解为特别包括具有茎-环或锅柄样二级结构的 RNA 分子。在本发明的一些实施方案中, RNAi 最初被表达为 shRNA。

[0095] 术语“RNAi 表达盒”指根据本发明的实施方案具有至少一个 [启动子-RNAi-终止子] 单元的盒。术语“多启动子 RNAi 表达盒”指包含两个或多个 [启动子-RNAi-终止子] 单元的 RNAi 表达盒。术语“RNAi 表达构建体”或“RNAi 表达载体”指含有至少一个 RNAi 表达盒的载体。

[0096] RNAi 通常通过靶和 RNAi 之间的相同序列优化。RNA 干扰现象可在低于 100% 同源性下观察到,但是互补区域必须彼此足够同源以形成特异性双链区域。尚未完全鉴定得到有效造成 RNA 干扰的双链区域的精确结构规则,但是大约 70% 的同一性通常是足够的。因此,在本发明的一些实施方案中, RNAi 和 PLB 之间的同源性是至少 70% 核苷酸序列同一性,并且可以是至少 75% 核苷酸序列同一性。同源性包括但不限于,至少 80% 核苷酸序列同一性,和至少 85% 或甚至 90% 核苷酸序列同一性。在一种实施方案中,靶序列和 RNAi 的有义链之间的序列同源性是至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 核苷酸序列同一性。

[0097] 另一考虑因素是 RNA 中的碱基配对与 DNA 中的略有不同,即在 RNA 双链体中 G 将与 U 配对,虽然不如与 C 的强烈。而且,对于 RNAi 效力,反义链与靶序列同源更为重要。在一些情况中,已知 21 个核苷酸中有 17 个同源足以启动 RNAi,但在其他情况中,需要 21 个核苷酸中有 19 或 20 个核苷酸具有同一性。虽然不受理论束缚,在通常的水平,双链区域的中央部分比其末端需要更大同源性。在仅寻求一定程度的沉默的情况中,可向特定构建体中设计入完美同源性的某种预定程度的缺乏,以降低其 RNAi 活性,这将造成靶基因产物的部分沉默或抑制。在此类情形中,反义序列中仅有一个或两个碱基可被改变。另一方面,有义链

对突变更具耐受性。虽然不受理论束缚,这可能是因为反义链是具有催化活性的那个。因此,有义链和靶基因的区域转录物之间较低的同源性未必会降低 RNAi 活性,特别是当反义链与该转录物完美杂交时。有义链中的突变(从而使它与靶基因的区域转录物不同)可用于辅助发夹构建体的测序并可能用于其它目的,诸如调节发夹转录物的切酶(dicer)加工或 RNAi 途径的其他方面。

[0098] 术语“杂交”和“退火”,包括其语法等同物,在本说明书中涉及核苷酸序列时可互换使用,并指由于其互补性而能够形成 Watson-Crick 碱基对的核苷酸序列。本领域技术人员将理解,非 Watson-Crick 碱基配对也是可能的,尤其是在 RNA 序列环境中。例如,在 RNA 中的鸟嘌呤核苷和尿嘧啶残基之间可形成所谓的“摆动配对”。

[0099] RNAi 表达盒的 RNA 表达产物导致双链 RNA(dsRNA)复合体的产生以诱导 RNA 干扰并由此下调或降低哺乳动物基因的表达。“dsRNA”指包含两条 Watson-Crick 碱基配对的互补 RNA 链的核糖核酸复合体。dsRNA 复合体包含在严格条件下,包括在 65°C 的 0.2x SSC 清洗步骤,与至少一个哺乳动物基因的核苷酸序列杂交的第一核苷酸序列和与所述第一核苷酸序列互补的第二核苷酸序列。所述第一核苷酸序列可通过第三核苷酸序列(如 RNA 环)与所述第二核苷酸序列连接,从而使所述第一核苷酸序列和所述第二核苷酸序列成为同一 RNA 分子的部分;可选地,第一核苷酸序列可以是一个 RNA 分子的部分,而第二核苷酸序列可以是另一 RNA 分子的部分。因此,dsRNA 复合体可通过分子内杂交或退火形成,或者 dsRNA 复合体通过分子间杂交或退火形成。

[0100] “互补”在本文以其通用方式使用以指 Watson-Crick 碱基配对,而“非互补”用于指非 Watson-Crick 碱基配对,即使此类非互补序列可形成摆动配对或其他相互作用。然而,在本发明的上下文中,“非配对”序列的含义具体地指其间不形成 Watson-Crick 碱基对的序列。因此,根据本发明的间隔或鼓泡(bubble)序列的实施方案在本文被描述和阐明为非配对序列,无论理论上或实际上是否可发生 Watson-Crick 碱基配对。

[0101] 用于描述两个或多个多核苷酸之间的序列关系的术语包括“参考序列”、“比较窗”、“序列相似性”、“序列同一性”、“序列相似性百分比”、“序列同一性百分比”、“大致相似的”和“大致同一性”。“参考序列”长度为至少 10 个但常常 15 至 25 个、经常大于 25 或以上诸如 30 个单体单元,包括核苷酸。因为两个多核苷酸可各自包含(1)在所述两个多核苷酸之间相似的序列(即,仅为完整多核苷酸序列的一部分)和(2)在所述两个多核苷酸之间差异的序列,所以两个(或多个)多核苷酸之间的序列比较通常通过在“比较窗”比较两个多核苷酸以鉴定和比较序列相似性的局部区域来进行。“比较窗”指与参考序列进行比较通常至少约 10 连续残基的概念区段。与参考序列(其不包含添加或缺失)相比,比较窗可包含约 20%或更少的添加或缺失(即,缺口)以最优地比较两个序列。用于对比较窗进行比对的序列的最优比对可通过算法的计算机化实现来实施(如, Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Wis, USA)或通过目测和由选择的多种算法中的任何算法产生的最佳比对(即,在比较窗上产生最高同源性百分比)来实施。也可参考 BLAST 程序家族,如,例如由 Altschul 等人所公开的。序列分析的详细讨论可在 Ausubel 等人的单元 19.3 中找到。例如,“序列同一性百分比”可通过以下来计算:在比较窗上比较两个最优比对的序列,确定两个序列中出现相同核酸碱基(如, A、T、C、G、I)的位置的数目以产生

匹配位置数,将匹配位置数除以比较窗中的位置总数(即,窗尺寸),将结果乘以 100 以产生序列同一性百分比。对于本发明目的,“序列同一性”将被理解为意指通过 DNASIS 计算机程序(用于 windows 的版本 2.5;可获自 Hitachi Software engineering Co, Ltd, South San Francisco、Calif, USA),使用软件随附的参考手册中使用的标准默认值计算的“匹配百分比”。

[0102] 可选地,多核苷酸的同源性/同一性可通过杂交实验确定。如本文所用,认为第一核酸序列或片段(诸如例如,引物或探针)与第二核酸序列选择性杂交,因此,如果在以下条件下,此第二序列能够与所述第一序列或变体特异性杂交或能够特异性引发聚合酶链式反应,即表明“大致同源性”:(i) 在典型的杂交和清洗条件下,诸如,例如在 Maniatis, (Molecular Cloning: A Laboratory Manual(分子克隆实验室手册),第 2 版,1989) 中描述的那些,其中杂交条件可以是具有更低严格性或更高严格性的那些;或(ii) 使用允许至多约 25-30% 碱基对错配的严格清洗条件,例如,在 2x SSC、0.1% SDS、室温下清洗两次,每次 30 分钟;然后,在 2x SSC、0.1% SDS、37℃ 下清洗一次 30 分钟;在 2x SSC、室温下清洗两次,每次 10 分钟,或(iii) 在标准 PCR 条件下或在“降落(touch-down)”PCR 条件下。

[0103] 如本文所用的术语“杂交条件”将指允许广义地核酸的两条互补链之间和特别地具有至少七个核苷酸长度的 RNA 的两条互补链之间杂交的条件。杂交条件是本领领域公知的,包括但不限于,生理条件,诸如但不限于胞内生理条件。

[0104] 本发明的 RNAi 可包含在正常的哺乳动物细胞中无毒的短的、双链或部分双链(如,锅柄、茎-环和发夹)RNA。对本发明的 RNAi 的长度没有特别限制,只要它们不显示细胞毒性。RNAi 可以是,例如,约 10 至 71bp 长、约 15 至 49bp 长、约 15 至 35bp 长和约 19 至 29bp 长或约 19 至 21bp 长。RNAi 的双链 RNA 部分可以是完全同源的,或可由于序列错配(每条链上的对应核苷酸不互补)、凸出(一条链上缺乏对应的互补核苷酸)和类似原因而含有非配对的部分。在非配对的部分不显著干扰 RNAi 双链体形成或效力的程度,此类非配对的部分可被耐受。

[0105] “siRNA”或短干扰 RNA 可通过本领领域已知的方法诸如通过典型的寡核苷酸合成来制造,并且经常包括化学修饰以增加 siRNA 的半衰期和/或效力、和/或以允许更强的递送制剂。寡核苷酸的许多修饰是本领域已知的。例如,美国专利第 6,620,805 号公开了与具有净正电荷的大环诸如卟啉化合的寡核苷酸;美国专利第 6,673,611 号公开了各种式;美国专利申请公布第 2004/0171570、2004/0171032 和 2004/0171031 号公开包括包含多环糖代用品的修饰的寡聚体;诸如环丁基核苷、环戊基核苷、脯氨酸核苷、环己烯核苷、己糖核苷或环己烷核苷;和包括不含磷的核苷间连接的寡聚体;美国专利申请公布第 2004/0171579 号公开了其中修饰为糖部分上的 2' 组成基团不是 H 或 OH 的修饰寡核苷酸;美国专利申请公布第 2004/0171030 号公开了用于结合相反链上的胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶碱基的修饰碱基,该相反链包含具有选自以下组成的组的含硼取代基的膨化的 C 和 U 或 T 修饰的结合碱基: $-BH_2CN$ 、 $-BH_3$ 和 $-BH_2COOR$, 其中 R 是 C1 至 C18 烷基;美国专利申请公布第 2004/0161844 号公开了具有氨基磷酸酯核苷间连接诸如 3' 氨基氨基磷酸酯、氨基烷基氨基磷酸酯或氨基烷基硫代氨基磷酸酯核苷间连接的寡核苷酸;美国专利申请公布第 2004/0161844 号公开了其它修饰的糖和/或主链修饰,其中在一些实施方案中,所述修饰是肽核酸、肽核酸模拟物、吗啉代核酸、具有酰胺连接的己糖、环己烯基核酸(CeNA)或无环

主链部分；美国专利申请公布第 2004/0161777 号公开了具有 3' 末端帽基团的寡核苷酸；美国专利申请公布第 2004/0147470 号公开了包括一种或多种交联的寡聚化合物，所述交联改善所述寡聚化合物的核酸酶抗性，或者修改或增强所述寡聚化合物的药物动力学性质和药效学性质，其中此类交联包含二硫化物、酰胺、胺、肼、羟基胺、氧亚胺 (oxyimine)、吗啉代、硫醚、脲、硫脲或磺酰胺部分；美国专利申请公布第 2004/0147023 号公开了包含具有第一类型的核苷酸的两个末端 RNA 区段和具有第二类型的核苷酸的内部 RNA 区段的 gapmer，其中所述第一类型的核苷酸独立地包括至少一个糖取代基，其中所述糖取代基包含卤素、氨基、三氟烷基、三氟烷氧基、叠氮基、氨基氧、烷基、烯基、炔基、O—、S— 或 N(R*)- 烷基；O—、S— 或 N(R*)- 烯基；O—、S— 或 N(R*)- 炔基；O—、S— 或 N- 芳基、O—、S— 或 N(R*)- 芳烷基基团；其中所述烷基、烯基、炔基、芳基或芳烷基可以是取代的或未取代的烷基、烯基、炔基、芳烷基；并且其中，如果取代，所述取代是烷氧基、硫代烷氧基、酞酰亚胺基、卤素、氨基、酮、羧基、硝基、亚硝基、氰基、三氟甲基、三氟甲氧基、咪唑基、叠氮基、胍基、氨基氧、异氰酸基、亚砷、砷、二硫化物、甲硅烷基、杂环或碳环基团或嵌入剂、报告基团、轭合物、聚胺、聚酰胺、聚亚烷基二醇或式 $(-O-烷基)_m$ 的聚醚，其中 m 是 1 至约 10；和 R* 是氢、或保护基团；或美国专利申请公布第 2004/0147022 号公开了具有修饰的糖和 / 或主链修饰的寡核苷酸，诸如糖部分上的 2' -OCH₃ 取代基。

[0106] 因此，在一方面，本发明公开了用于治疗心力衰竭的方法，包括向有相应需要的受治疗者施用治疗有效量的 RNAi 表达盒，其中所述盒包括病毒载体和其表达产物降低受磷蛋白 (PLB)mRNA 的表达的 RNAi 序列，所述施用以有效转导所述受治疗者的心肌细胞的量进行，由此造成所述 RNAi 表达盒的表达并治疗所述受治疗者中的心力衰竭。

[0107] “启动子”或“启动子序列”在本文取其最广泛背景下的含义，并包括能够在细胞中结合 RNA 聚合酶和启动转录多核苷酸或多肽编码序列的 DNA 调节区域，所述编码序列诸如信使 RNA、核糖体 RNA、小核核仁 RNA (small nuclear or nucleolar RNA) 或由任何 RNA 聚合酶的任何类型转录的任何种类的 RNA。本文预期的“启动子”还可包括经典基因组基因的转录调节序列，包括真核细胞中精确的转录起始所需的 TATA 框，含或不含 CCAAT 框序列和其它的调节元件（即，上游激活序列、增强子和沉默子）。

[0108] 启动子通常，但不是必须地，位于其所调节的序列的上游或 5'。而且，包含启动子的调节元件通常位于要被调节的序列的转录起始位点的 2kb 以内。

[0109] 在本发明背景中，术语“启动子”还用于描述赋予、激活或增强分离的核酸分子在哺乳动物细胞中的表达的合成或融合分子或衍生物。还可需要另一或同一启动子以在植物、动物、昆虫、真菌、酵母或细菌细胞中行使功能。启动子可含有进一步增强结构基因的表达的一种或多种特异性调节元件的另外拷贝，其转而调节和 / 或改变基因的空间表达和 / 或时间表达。例如，赋予结构基因的表达式可诱导性的调节元件可被置于与驱动核酸分子的表达的异源启动子序列相邻。

[0110] 将序列置于启动子序列的调节控制下意指放置所述分子以使得表达受到启动子序列的控制。启动子通常被放置在它们控制的基因的 5'（上游）。在构建异源启动子 / 结构基因组合中，通常启动子位置距基因转录起始位点的距离可以与启动子和它在其天然背景下控制的基因，即启动子衍生自的基因，之间的距离大约相同。如本领域已知的，可调整此距离的一些变化而不丧失启动子功能。相似地，调节序列元件相对于置于其控制下的

异源基因的位置由该元件在其天然背景,即其所衍生自的基因的位置确定。同样,如本领域已知的,此距离也可发生一些变化。

[0111] 启动子可组成地调节序列的表达,或就表达发生的细胞、组织或器官而言差异地调节序列的表达,或就表达发生的发育阶段而言差异地调节序列的表达,或响应于诸如生理应激、调节蛋白质、激素、病原体或金属离子以及其它的刺激而差异地调节序列的表达。

[0112] 在本发明的一些实施方案中有用的启动子可以是组织特异性的或细胞特异性的。术语“组织特异性”在应用于启动子时指能够指导感兴趣的核苷酸序列在特定类型的组织(如,肌肉组织)中的选择性表达,而相对不存在感兴趣的相同核苷酸序列在不同类型的组织(如,心脏)中的表达的启动子。术语“细胞特异性”在应用于启动子时指能够指导感兴趣的核苷酸序列在特定类型的细胞中的选择性表达,而相对不存在感兴趣的相同核苷酸序列在相同组织的不同类型的细胞中的表达的启动子(参见,如 Higashibata 等人, J. Bone Miner. Res. 19(1):78-88, 2004; Hoggatt 等人, Circ. Res. 91(12):1151-59, 2002; Sohal 等人, Circ. Res. 89(1):20-25, 2001; 和 Zhang 等人, Genome Res. 14(1):79-89, 2004)。术语“细胞特异性”在应用于启动子时还意指启动子能够促进感兴趣的核苷酸序列在单个组织内的区域中的选择性表达。可选地,启动子可以是组成型的或可调节的。另外,启动子可被修改以便拥有不同的特异性。

[0113] 术语“组成型”在用于提及启动子时意指启动子能够在不存在特异刺激(如,热激、化学物、光和类似刺激)下指导可操作地连接的核酸序列的转录。通常,组成型启动子能够指导编码序列在几乎任何细胞和任何组织中的表达。用于转录 RNAi 的启动子可以是组成型启动子,诸如 RNA 聚合酶 II 控制的泛素、CMV、 β -肌动蛋白、组蛋白 H4、EF-1 α 或 pgk 基因启动子,或 RNA 聚合酶 I 控制的启动子元件。在其它实施方案中,采用 Pol II 启动子,诸如 CMV、SV40、U1、 β -肌动蛋白或杂种 Pol II 启动子。在其它实施方案中,使用 RNA 聚合酶 III 控制的启动子元件,诸如 U6 启动子(如, U6-1、U6-8、U6-9)、H1 启动子、7SL 启动子、人类 Y 启动子(hY1、hY3、hY4(参见 Maraia 等人, Nucleic Acids Res 22(15):3045-52, 1994)和 hY5(参见 Maraia 等人, Nucleic Acids Res 24(18):3552-59, 1994)、人类 MRP-7-2 启动子、腺病毒 VA1 启动子、人类 tRNA 启动子、5s 核糖体 RNA 启动子以及这些启动子中任何启动子的功能杂种和组合。

[0114] 可选地,在一些实施方案中,选择允许 RNAi 的可诱导表达的启动子可能是最优的。使用此类启动子的可诱导表达的许多系统是本领域已知的,包括但不限于四环素响应系统和 lac 操纵子-阻遏物系统(参见 W003/022052 A1; 和 US 2002/0162126 A1)、蜕化素调节系统或受糖皮质激素、孕酮、雌激素、RU-486、类固醇、甲状腺激素、环式 AMP、细胞因子、钙化醇家族调节物调节的启动子或金属硫蛋白启动子(受无机金属调节)。

[0115] 一种或多种增强子也可存在于病毒多启动子 RNAi 表达构建体以增加感兴趣的基因的表达。适合用于本发明的实施方案的增强子包括 Apo EHCR 增强子、最近已描述的 CMV 增强子(参见, Xia 等人, Nucleic Acids Res 31-17, 2003) 和本领域技术人员已知的其他增强子。

[0116] 在本发明中,启动子可以能够调节核酸分子在哺乳动物细胞中的表达,至少在靶基因在其中表达期间,以及在靶基因在所述细胞中的可检测的表达即将开始之前。启动子可以是组成型的、诱导型的或发育调节的。

[0117] 在本发明上下文中,术语“与…可操作地连接”或“可操作地处于…的控制下”或相似的诸如“可操作地连接于”将被视为表明细胞中结构基因的表达处于与其空间连接的启动子序列的控制下。

[0118] 在一些实施方案中,可在 RNAi 表达盒内或包含多个 RNAi 表达盒的 RNAi 表达载体的不同盒之间采用不同强度的启动子。例如,使用两个或更多个强启动子(诸如 Pol III-型启动子)可通过,如耗尽可利用的核苷酸库或转录所需的其它细胞组分,而使细胞承受重负。此外或可选地,使用数个强启动子可造成细胞中毒性水平的 RNAi 表达。因此,在一些实施方案中,多启动子 RNAi 表达盒中的一个或多个启动子可以比盒中的其它启动子更弱,或盒中的所有启动子可以低于最大速率的速率表达 RNAi。启动子还可以或可以不使用分子技术或以其他方式如通过调节元件进行修改以实现较弱的转录水平。

[0119] 载体还可含有其它的基因元件。载体中可包括的元件的类型不受任何形式的限制,并可由本领域技术人员选择。例如,其他基因元件可包括报告基因,诸如一个或多个以下基因:荧光标记蛋白诸如 GFP 或 RFP;容易测定的酶诸如 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、 β -葡萄糖醛酸酶、氯霉素乙酰转移酶或分泌的胚胎碱性磷酸酶;或易于进行免疫测定的蛋白质诸如激素或细胞因子。可用于本发明的实施方案的其它基因元件包括编码赋予细胞选择性生长优势的蛋白质诸如腺苷脱氨酶、氨基糖苷磷酸转移酶、二氢叶酸还原酶、潮霉素-B-磷酸转移酶、药物抗性的那些基因,或编码提供营养缺陷型中缺失的生物合成能力的蛋白质的那些基因。如果 RNAi 表达盒中包括了报告基因,则可包括内部核糖体进入位点(IRES)序列。其它的基因元件可与独立的启动子/增强子可操作地连接并受其控制。此外,可采用用于在细菌中繁殖载体的合适的复制起点。复制起点的序列通常与 RNAi 和将在靶细胞、组织和/或器官中表达的其它基因序列隔开。此类复制起点是本领域已知的,并包括 pUC、ColE1、2-微米或 SV40 复制起点。

[0120] 本文描述的载体或其部分还可进行修改以整合到表达其的细胞的基因组。本领域技术人员将理解,为了实现基因序列或表达盒与宿主细胞基因组的整合,可能需要某些其它的基因序列。

[0121] 在一种实施方案中,所述载体的效应是降低 PLB 的功能表达而不显著降低 PLB 的转录水平。可选地或此外,包括合成基因的基因构建体不造成总 RNA 的稳态水平的显著下降。

[0122] 因此,在另一方面,本发明包括以下 RNAi 表达载体,其中所述 RNAi 表达载体包含如本文所定义的一个或多个 RNAi 表达盒。

[0123] 本发明的 RNAi 造成或以其它方式促进靶转录物翻译成表达产物的改变的翻译能力。虽然表达产物通常是蛋白质,但是本发明进一步包括参与基因调节的转录的非编码 RNA、eRNA 或从转录物中剪接下来的内含子形式的表达产物。

[0124] “改变的能力”的含义包括但不限于相对于未进行遗传修饰的细胞的翻译水平的下降,诸如约 10%至约 100%和约 20%至约 90%。在一种实施方案中,对应于靶内源序列的基因基本上没有被翻译为蛋白质产物。方便地,改变的翻译能力通过表型的任何变化确定,其中在未进行遗传修饰的细胞中,所述表型由编码 PLB 的基因的表达促成。携带本发明的遗传因子的任何细胞被称为是“遗传修饰的”。遗传修饰可以是永久的或瞬时的。瞬时的遗传修饰发生于,例如,当细胞摄取遗传因子并允许产生其转录物时。可选地,该遗传因子

直接降低翻译的水平,诸如通过施用反义寡核苷酸或更大的核酸分子。在任一种情况下,该分子促进基因沉默机制,该机制可随着细胞分裂被移除。永久的基因沉默更可能发生当该遗传因子整合到细胞的基因组并且该因子被传递给子代细胞时。

[0125] 可使用标准方法将 RNAi 或 RNAi 表达构建体施用至细胞、组织或器官,目的是调节靶基因的表达。施用的有用方法包括脂质体介导的转染或转化、用减毒的病毒颗粒或细菌细胞转化细胞、细胞接合、本领域技术人员已知的或由 Ausubel 等人 (1992) 描述的转化或转染程序。例如,核酸分子可以作为裸 DNA 或 RNA、任选地封装在脂质体中、在作为减毒病毒的病毒颗粒中或以与病毒外壳或运输蛋白质或惰性载体诸如金缔合的形式或作为重组的病毒载体或细菌载体或作为构建体、以及其它形式引入。

[0126] 在一种实施方案中,可使用基于任何合适的病毒的病毒递送系统来递送本发明的 RNAi 表达构建体。此外,杂种病毒系统也可能是有用的。病毒递送系统的选择将取决于多种参数,诸如递送至心肌细胞或其它靶组织的效率、系统的转导效率、致病能力、免疫和毒性考虑因素和类似参数。显然不存在适于所有应用的单一病毒系统。当选择用于本发明的病毒递送系统时,重要的是选择其中含有 RNAi 表达构建体的病毒颗粒具有以下性质的系统: 1) 重复和稳定地繁殖; 2) 能够纯化至高滴度; 和 3) 能够介导靶向递送(将多启动子 RNAi 表达构建体递送至靶组织(如,心肌细胞)而不广泛传染)。

[0127] 此外,可使用杂种病毒系统以组合两种或更多种病毒系统的有用性质。例如,野生型 AAV 的位点特异性整合机制可与腺病毒的有效内化和核靶向性质偶联。AAV 在腺病毒或疱疹病毒存在下经历生产复制周期;然而,在不存在辅助功能时,AAV 基因组整合到染色体 19 的特异性位点。AAV 基因组的整合需要 AAV rep 蛋白质的表达。因为常规的 rAAV 载体缺失了包括 rep 在内的所有基因,所以它们不能特异性地整合到染色体 19。但是,在合适的杂种系统中可利用这一特征。另外,可在病毒递送系统中使用非病毒基因元件以实现期望的性质,诸如允许位点特异性重组的基因元件。

[0128] 将 RNAi 表达构建体包装到病毒颗粒中。可使用本领域已知的任何方法来产生感染性病毒颗粒,其基因组包含病毒 RNAi 表达构建体的拷贝。包装细胞系可以是能够表达病毒蛋白质的任何细胞系,包括但不限于 293、HeLa、A549、PerC6、D17、MDCK、BHK、Cf2Th 或本领域技术人员已知或开发的任何其它系。一种包装细胞系描述于,例如美国专利第 6,218,181 号,通过引用并入本文。

[0129] 可选地,可将未稳定表达必需的病毒蛋白质的细胞系用两种或更多种构建体共转染以实现有效的功能颗粒产生。一种构建体包含病毒 RNAi 表达盒,而其它的质粒包含编码允许细胞产生功能病毒(复制和包装构建体)以及其它辅助功能的蛋白质的核酸。

[0130] 包装细胞系或复制和包装构建体可不表达包膜基因产物。在这样的实施方案中,编码包膜基因的基因可在与病毒 RNAi 表达构建体共转染的单独的构建体上提供。因为包膜蛋白质部分负责病毒颗粒的宿主范围,病毒可以被假分型。“假分型的”病毒是具有来自与基因组所衍生自的病毒不同的病毒的包膜蛋白质的病毒颗粒。本领域技术人员可针对使用的病毒递送系统和要靶向的细胞而选择适当的假型。除了赋予特异的宿主范围外,选择的假型可允许病毒被浓缩至非常高的滴度。可选地,可用将感染限制于特定物种的亲嗜性包膜蛋白质(如,亲嗜性包膜仅允许感染例如鼠细胞,而双嗜性包膜允许感染如人类和鼠细胞两者)假分型病毒。另外,遗传修饰的配体可用于细胞特异性靶向,诸如去唾液酸糖蛋

白用于肝细胞,或转铁蛋白用于受体介导的结合。

[0131] 在包装细胞系中产生之后,纯化并定量(滴定)含有 RNAi 表达盒的病毒颗粒。纯化策略包括但不限于密度梯度离心或柱层析方法。

[0132] 本文公开的 RNAi 或 RNAi 表达盒可通过经由但不限于注射或灌注应用于心脏而引入到心肌细胞。

[0133] 在一种实施方案中,可在体外或活体外将 RNAi 表达盒引入靶细胞,然后接着置于动物内以实现治疗,或可通过体内施用将 RNAi 表达盒直接施用于有机体、器官或细胞。通过病毒感染递送可以是一种递送方法。可使用任何方便的方案将包含盒的载体施用于哺乳动物宿主,其中许多不同的此类方案是本领域已知的。

[0134] 通过使 AAV 载体溶解、悬浮或乳化在适当的、药学可接受的载体或稀释剂中,可将它们配置成用于注射或施用的制品。此类药学可接受的载体或稀释剂的实例包括含水或不含水的溶剂诸如油、合成的脂肪酸甘油酯、高级脂肪酸酯或丙二醇;并且,如果需要,含有常规的添加剂诸如助溶剂、等渗剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂。

[0135] 在一种实施方案中,公开了包括重组的腺伴随病毒(AAV)载体和药学可接受的载运体的药物组合物,其中所述载体包括 RNAi 表达盒,其 RNA 表达产物导致细胞中受磷蛋白(PLB)mRNA 的表达的下降和 PLB 蛋白质的量的下降,并且其中所述 RNAi 表达盒的 RNA 表达产物包括在严格条件下与 PLB 基因 mRNA 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

[0136] 在一方面, RNAi 表达盒包括核苷酸序列 5' GGATCCCGTACCTTACTCGCTCGGCTATTCAA GAGATAGCCGAGCGAGTAAGGTATTTTTTGGAAAAGCTT 3' (SEQ ID NO:1)。在另一方面, RNA 表达产物包括靶序列 5' UACCUUACUCGCU CGGCUA 3' (SEQ ID NO:2)。

[0137] 在又一方面,本发明考虑了包括 RNAi 表达构建体的药物组合物,其中所述 RNAi 构建体包括各自包含 RNAi 靶向序列的一种或多种 RNAi 表达盒,所述 RNAi 靶向序列包括与包括 PLB 或其衍生物、直系同源物或同源物的核苷酸序列的至少部分具有至少 70% 同一性的核苷酸序列。

[0138] 本发明的方法和组合物涉及施用有效量的 RNAi 或 RNAi 盒以实现预定的或期望的基因表达调节结果。这通常是在表型上测量的。设想在一些情况下,一定程度的常规试验和误差,如药学领域公知的,可能是确定施用的最有效的量所必需的。

[0139] “遗传治疗”在本文的含义包括基因治疗。本发明预期的遗传治疗还包括体细胞基因治疗,由此细胞被取出、进行遗传修饰然后再放回个体中。基因治疗可以是瞬时的或永久的。优选地,所述动物是人类。

[0140] 在另一方面,本发明还扩展至包含如本文所述的 ddRNAi 表达盒或基因组整合形式或其部分的遗传修饰的细胞。在一方面,所述细胞是哺乳动物细胞。在相关的方面,所述细胞是灵长类动物细胞或啮齿动物细胞,并可包括人类或小鼠细胞。

[0141] 还公开了含有在用于施用的合适药物悬浮液中的 AAV 载体的药物试剂盒。在这一方面,本发明提供用于递送所述重组的腺伴随病毒载体或病毒体的药物试剂盒。所述试剂盒可含有用于施用预定剂量的容器。所述试剂盒还可含有用于递送预定剂量的含有基因转移载体或病毒体的悬浮液,所述悬浮液包含 (a) 包含 RNAi 表达盒的 AAV 基因转移载体或病毒体 (b) 生理学相容的载体。

[0142] 本发明还提供编码能够形成双链 RNA 复合体并因此能够诱导 RNA 干扰的 RNA 分子

的 RNAi 表达盒。此类 RNAi 表达盒可以是作为 rAAV 基因组的部分的单一 DNA 分子,该 DNA 分子在被引入细胞中时产生能够形成分子内 dsRNA 复合体的单一 RNA 分子。然而,应理解,根据下列描述,可同时或顺序向细胞中引入多于一个 rAAV 基因组或 RNAi 表达盒或 RNA 编码区以产生能够形成分子内 dsRNA 复合体的两个或更多个 RNA 分子。通常,能够形成无论是分子内或分子间 dsRNA 复合体的两个 RNA 部分是其表达要被下调或降低的基因或核酸序列的至少部分正义序列和至少部分反义序列。

[0143] RNAi 表达盒的设计不限制本发明的范围。可应用设计 RNAi 表达盒的不同策略,并且基于不同设计的 RNAi 表达盒将能够在体内诱导 RNA 干扰。所有 RNAi 表达盒共同的特征是它们包含编码能够通过形成分子内或分子间双链 RNA 复合体而单独或与另一 RNA 分子组合来诱导 RNA 干扰的 RNA 分子的 RNA 编码区。

[0144] 可使用不同的设计原理来实现相同的目标,这些设计原理是本领域技术人员已知的。例如, RNAi 表达盒可编码一种或多种 RNA 分子。在 RNA 从 RNAi 表达盒表达过程中或之后,可由单一的、自互补的 RNA 分子或两个互补 RNA 分子形成双链 RNA 复合体。dsRNA 复合体的形成可在细胞核内或细胞核外启动。

[0145] 在一方面,提供了双链 RNA 复合体,其包含能够在生理条件下与 mRNA 分子的至少一部分杂交的第一 RNA 部分,和第二 RNA 部分,其中所述第二 RNA 部分的至少一部分能够在生理条件下与所述第一部分杂交。在一方面,所述第一部分和第二部分是同一 RNA 分子的部分,并且能够在生理条件诸如细胞内存在的条件下杂交,杂交后,所述第一部分和第二部分形成双链 RNA 复合体。

[0146] 在另一方面,提供形成双链 RNA 复合体的线性 RNA 分子,该 RNA 包含能够与细胞内 mRNA 分子的至少一部分杂交的第一部分,和第二部分,其中所述第二部分的至少一部分能够与所述第一部分杂交以形成发夹 dsRNA 复合体。

[0147] 在又一方面,所述方法包括具有部分或完全体内双链性状的 AAV- 介导的 RNA 的表达。

[0148] 在某些实施方案,本发明可采用含有核酶的 RNA 分子以产生 dsRNA 复合体,由此克服与产生 dsRNA 相关的某些已知的困难。例如,可使用核酶功能来移除聚腺苷酸化信号,由此阻止或最小化 RNA 分子从细胞核的释放。在其他实施方案中,本发明是基于 RNA 分子的部分编码增强 dsRNA 的比活性的 RNA 或蛋白质的能力。RNA 分子的此比活性增强部分的一个实例是抑制细胞内 dsRNA 复合体降解的编码 HIV Tat 蛋白质的分子的部分。

[0149] 本发明还提供通过抑制受治疗者心脏中的 PLB 表达治疗受治疗者中的心力衰竭、或降低室性心律失常、或增加心力衰竭后的受治疗者存活的方法,包括向所述受治疗者施用治疗有效量的包含 rAAV 病毒体的药物组合物,所述 rAAV 病毒体包含编码能够形成 dsRNA 复合体的至少一个 RNA 分子的一种或多种 RNAi 表达盒,其中在杂交条件下,所述 dsRNA 复合体的部分能够与 PLB 基因编码的 mRNA 的至少一部分杂交。

[0150] 在另一实施方案中,公开了增加肌质网 (SR) 的钙摄取的方法,包括使肌肉组织样品与腺伴随病毒 (AAV) 载体接触,其中所述载体包括编码 RNAi 表达产物的多核苷酸序列,其中所述 RNAi 包括在严格条件下与 PLB 靶基因 mRNA 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列,由此增加 SR 中的钙摄取。

[0151] 对于本发明目的,“哺乳动物受治疗者”意指哺乳动物类别的任何成员,包括但不

限于人类和非人灵长类诸如黑猩猩以及其他猿和猴类物种；农畜诸如牛、绵羊、动物、山羊和马；家养哺乳动物诸如狗和猫；实验室动物包括啮齿动物诸如小鼠、大鼠、仓鼠、兔和豚鼠以及类似动物。该术语不指明具体年龄或性别。因此，成年和新生受治疗者以及胎儿，无论是雄性或雌性，均意欲涵盖在内。

[0152] 对于本发明目的，如本文所用的术语“个体”或“受治疗者”或“患者”指脊椎动物，特别是哺乳动物物种的成员，包括但不限于家养动物、体育动物 (sports animal)、灵长类和人类；更特别地，该术语指人类。

[0153] 本发明的病毒体可悬浮在药学可接受的递送运载体（即生理相容的载体）中以施用于人类或非人类哺乳动物患者。合适的载体可由本领域技术人员容易地选择，并可取决于选择的核酸转移载体的性质。药物组合物将包含足够的遗传物质以产生治疗有效量的 dsRNA 复合物。药物组合物还将含有药学可接受的赋形剂。此类赋形剂包括自身不诱导对接受组合物的个体有害的免疫应答并且其施用不造成过多毒性的任何药剂。药学可接受的赋形剂包括但不限于，液体诸如水、盐水、甘油和乙醇。其中可包括药学可接受的盐，例如矿物酸盐诸如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐和类似矿物酸盐；和有机酸盐诸如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、安息香酸盐和类似有机酸盐。另外，此类载体中可存在辅助物质，诸如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质和类似辅助物质。其他示例性载体包括乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、葡聚糖、琼脂、果胶、花生油、芝麻油和水。载体的选择不是本发明的限制因素。任选地，本发明的组合物可在 AAV 病毒体和运载体之外含有其它常规的药物成分，诸如防腐剂或化学稳定剂。合适的示例性成分包括微晶纤维素、羧甲基纤维素钠、聚山梨酯 80、苯乙醇、氯丁醇、山梨酸钾、山梨酸、二氧化硫、没食子酸丙酯、对羟基苯甲酸酯类、乙基香草醛、甘油、苯酚、对氯酚、明胶和白蛋白。药学可接受的赋形剂的详尽讨论可在 REMINGTON' S PHARMACEUTICAL SCIENCES (雷明顿药物科学) (Mack Pub. Co, NJ, 1991) 中获得。

[0154] 可重建的递送系统的溶液、悬浮液和粉末包括运载体，诸如悬浮剂（如树胶类、黄原胶类 (xanthans)、纤维素类和糖类）、湿润剂（如山梨醇）、助溶剂（如乙醇、水、PEG 和丙二醇）、表面活性剂（如硫酸月桂酯钠、司盘 (Spans)、吐温和十六烷基吡啶）、防腐剂和抗氧化剂（如对羟基苯甲酸酯类、维生素 E 和 C、以及抗坏血酸）、抗结块剂、包衣剂和螯合剂（如 EDTA）。

[0155] 在此发明中，施用本发明药物组合物可使用本领域技术人员已知的多种方法和递送系统中的任何方法和递送系统来实现或执行。施用可例如静脉内、口服、经由植入物、跨黏膜、经皮、肌肉内和皮下进行。组合物可适于静脉内施用、动脉内施用、心室内施用或心瓣膜灌注。此外，本发明药物组合物理想地含有一种或多种常规使用的药学可接受的载体。此类载体是本领域技术人员公知的。采用多种常规使用的载体的下列递送系统仅是设想用于施用本发明组合物的许多实施方案的代表性实施方案。

[0156] 可注射药物递送系统包括溶液、悬浮液、凝胶、微球和聚合物注射剂 (polymeric injectables)，并可包含赋形剂诸如改变溶解性剂（如乙醇、丙二醇和蔗糖）和聚合物（如聚己内酯 (polycaprylactone) 和 PLGA）。可植入系统包括棒 (rod) 和盘 (disc)，并可含有赋形剂诸如 PLGA 和聚己内酯。

[0157] 确定本发明药物组合物的治疗或预防有效量可基于使用常规计算方法的动物数据进行。适当的剂量将取决于不限于以下的因素：选择的转移载体的特异性，施用路径，受

治疗的哺乳动物（如人类或非人灵长类或其它哺乳动物），所治疗的受治疗者的年龄、体重和一般状况，治疗的疾患的严重度、治疗的区域在心脏内的位置和施用模式。因此，适当的剂量可根据患者不同而变化。适当的有有效量可由本领域技术人员容易地确定。

[0158] 用于根据本发明的所述载体的体内递送的治疗有效的人类剂量认为是在约 20 至约 50ml 盐水溶液中含有约 10^{10} 至 10^{14} 功能载体 /ml 溶液的浓度范围。将调整剂量以平衡针对任何副作用的治疗益处。在又一实施方案中，药学有效的 AAV 剂量通常在约 1×10^5 至 1×10^{50} 基因组 rAAV、约 10^8 至 10^{20} 基因组 AAV、约 10^{10} 至约 10^{16} 基因组或约 10^{11} 至 10^{16} 基因组 AAV 的浓度范围内。人类剂量可以是约 1×10^{13} AAV 基因组 AAV。此类浓度可在约 0.001ml 至 100ml、0.05 至 50ml 或 10 至 25ml 载体溶液递送。其它有效剂量可由本领域普通技术人员通过常规试验建立剂量响应曲线而容易地建立。

[0159] 剂量治疗可以是单一剂量方案或多剂量方案。而且，受治疗者可接受适当的多剂量施用。本领域技术人员可容易地确定适当的剂量数。然而，剂量可能需要调整以考虑可选的施用路径、或平衡针对任何副作用的治疗益处。此类剂量可根据重组载体所用于的治疗应用而变化。

[0160] 以充足的量施用载体颗粒以进入期望的细胞和保证转移的核酸组合物的足够的功能水平，以提供治疗益处而无过多的不利的效应或具有医学可接受的生理效应，其可由医学领域技术人员确定。

[0161] 任选地，在具体实施方案中，根据本发明的 AAV- 介导的递送可与通过其它病毒和非病毒载体的递送组合。此类其他病毒载体，包括但不限于腺病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、单纯疱疹病毒 (HSV) 载体和杆状病毒载体，可以容易地选择，并可根据本领域已知的方法产生。相似地，非病毒载体，包括但不限于脂质体、基于脂质的载体、多聚物 (polyplex) 载体、分子轭合物、多胺和聚阳离子载体，可以容易地选择，并可根据本领域已知的方法产生。当通过这些可选的路径施用时，剂量需要在上述范围内。

[0162] 动物（包括人类）拥有针对具有 dsRNA 基因组的病原体的天然防御机制：dsRNA 在胞质溶胶中的存在诱导干扰素相关途径的激活，这些途径抑制 RNA 干扰。因此，为了避免激活这些途径，dsRNA 复合体长度不应超过 30 碱基对—设计 siRNA 构建体的首要规则。

[0163] 在某些实施方案中，dsRNA 复合体的长度是至少 20、21 或 22 碱基对，如对应于切酶依赖的切割产生的 RNA 产物的尺寸。

[0164] 下列实施例意欲说明而不是限制本发明。

[0165] 实施例 1

[0166] 材料和方法

[0167] 重组的腺病毒载体和 AAV 载体的开发

[0168] 开发重组的腺伴随病毒 (rAAV) 载体，假分型 rAAV2.6 用于体外研究，而 rAAV2.9 用于体内工作。二者含有相同的 AAV2 载体基因组以及所示的 shRNA 表达盒，并进行相同的加工，只是分别使用质粒 AAV6cap 用于 rAAV2.6，使用 AAV9cap 用于 rAAV2.9。在所有的体外和体内研究中，仅使用自互补的（“二聚的”）rAAV 基因组，因为与单链（“单体的”）rAAV 载体相比它们具有增强的表现。从腺病毒 (AdV) 载体 AdV-shPLB 中先前使用的 shRNA 表达盒开始，该 shRNA 表达盒有效和稳定地沉默了培养的原代新生大鼠心肌细胞 (PNCM) 中的 PLB 表达，试图开发共表达 shRNA 和作为标记的 GFP 的 AdV 和 rAAV 载体，这允许在使用心力衰

竭 (HF) 动物的实验中通过体内成像跟踪载体。但是, 构建体 rAAV-shPLB-CMV-GFP 与不含 CMV-GFP 组件的原始 AdV-shPLB 载体相比显示非常低的沉默活性 (图 1A)。rAAV 载体在 CMV 的控制下产生 GFP, CMV-GFP 盒中的转录与 U6-启动子-shRNA 盒以相反的方向运行。为了检验是否 CMV 启动子本身和 / 或 GFP 序列造成了沉默活性的损失, 使用内含子“填充”序列代替 GFP 构建了载体 rAAV-shPLB-CMV- β -内含子。rAAV-shPLB-CMV-GFP (尺寸为 2.30kb) 和 rAAV-shPLB-CMV- β -内含子 (尺寸为 2.55kb) 二者均具有包装入衣壳的视为必要的尺寸。不含 CMV 也不含 GFP 或 β -内含子, 而仅含有来自 AdV-PLB 的原始 U6-shPLB 盒的第三载体赋予了 1.15kb 的总载体基因组尺寸。虽然如此, 这一“极小化”rAAV-shPLB 在标准方案中被有效包装, 很可能是作为多联体。载体图谱显示于图 1C。

[0169] 病毒载体产生和纯化

[0170] rAAV9-shGFP 和 rAAV9-shPLB 使用由 Zolotukin 等人 (Gen Ther (1999) 6(6): 973-985) 描述的双质粒方案产生, 方案有以下修改: 在添加磷酸钙沉淀之前, 在三个烧瓶中培养 293-T 细胞 (ATCC, Manassas, VA) 24h (DMEM, 10% FBS)。72 小时后, 经碘克沙醇密度梯度 (Optiprep, Greiner Bio-One Inc, Longwood, FL)、然后是肝素-琼脂糖 I 型亲和层析 (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO) 从 benzonase 处理的细胞粗裂解物中纯化病毒。最后, 使用 Vivaspinn 20 离心浓缩机 50K MWC0 (Vivascience Inc, Carlsbad, CA) 浓缩病毒并将其配制成乳酸林格氏液 (Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL), 储存在 -80°C 。

[0171] 载体质量评估和滴定

[0172] 通过电泳后的银染色评估载体贮液的生物化学纯度 ($> 95\%$)。含有基因组的颗粒 (gcp) 通过实时 PCR 方法 (LightCycler, Roche Diagnostics) 确定, 使用 SYBRTM GREEN TAQ READYMIXTM (SIGMA, Saint-Louis, MO) 和引物 CMV-F 和 CMV-R。

[0173] 心肌细胞培养物中的载体评估

[0174] 原代新生心肌细胞 (NRCM) 适于在决定性的体内检验之前预检验任何基于 RNAi 的心脏治疗, 这是因为虽然 SERCA2a/PLB 系统是发育调节的, 但是其在 NRCM 中功能正常, 而且靶向 SERCA2a/PLB 系统的腺病毒基因转移策略在新生和成年心肌细胞二者中都取得了成功。虽然两种细胞类型都非常适于体外预检验, 但是培养的心肌细胞和体内完整的心脏之间的许多其他差异使得培养细胞中对基于 RNA 的治疗的任何体外研究都是相当初步的。

[0175] 细胞培养物: 原代心肌细胞 (PNCM) 和原代新生心肌细胞 (NRCM) 从 1-3 天大的 Wistar 大鼠幼仔的心室组织制备。将 PNCMs 在 6-孔皿中培养。

[0176] 受磷蛋白沉默的评估: NRCM 和大鼠心脏中的 PLB、TnI、NCX 和 SERCA2a mRNA 和蛋白表达水平、以及大鼠心脏中的 SERCA2a 和 NCX 蛋白质通过所述的 Northern 印迹分析确定 (Fechner 等人, Gene Therapy (2006); 发行中)。

[0177] RNAi 治疗过程中的钙瞬变: 用 $8\mu\text{M}$ Fluo-4/AM 加载 NRCM 20 分钟后, 测量 1Hz 电刺激过程中的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬变 (120Hz、8.3ms/图像下的图像捕获)。研究了五个 NRCM 治疗组 (细胞数目): AAV9-shPLB ($n = 26$)、AAV9-shGFP ($n = 26$)、AdV-shPLB ($n = 71$)、AdV-shGFP ($n = 49$) 和未治疗的对照细胞 ($n = 32$)。测量了瞬变振幅 (收缩期 $[\text{Ca}^{2+}] (F/F_0)$)、其到达峰值的时间 (TTP) (ms) 和其衰变的时间常数 τ (ms)。AAV9-shPLB 治疗 NRCM 过程中的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬变的测量 (图 1E 和 1F) 显示, 与 AAV9-shGFP 组相比, 此载体导致显著更高的振幅和加快的瞬变动力学 (具有缩短的 TTP 和 τ), AAV9-shGFP 组具有与未治疗的细胞不可分辨的瞬

变。与 AdV-shGFP 组相比,AdV-shPLB 治疗还造成显著更高的振幅。不过,与 AAV9 组相反,AdV-shPLB 和 AdV-shGFP 中的 TTP 被延长,而 τ 则无差异。因此,AdV 组中的肌质网 (SR) Ca^{2+} 负荷的其他研究 (图 1D) 如下进行:在用 $8\ \mu\text{M}$ Fluo-4/AM 加载 NRCM 20min、但接着迅速加入阻断经由 SERCA2a 的 Ca^{2+} 进入 SR 的再摄取的 20mM 咖啡因后,再次测量 1Hz 电刺激过程中的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬变。比较电刺激的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬变和咖啡因诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬变,并计算 Ca^{2+} 的释放分数 (参见 Kockskämper 等人 Endothelin-1 enhances nuclear Ca^{2+} transients in atrial myocytes through Ins(1,4,5)P3-dependent Ca^{2+} release from perinuclear Ca^{2+} stores (内皮缩血管肽-1 通过核周 Ca^{2+} 存储的 Ins(1,4,5)P3-依赖性的 Ca^{2+} 释放增强心房肌细胞中的核 Ca^{2+} 瞬变). Journal of Cell Science. 2008 ;121 :186-195,和其中引用的参考文献)。

[0178] 肥大的诱导:在部分体外研究中采用浓度为 $100\ \mu\text{M}$ 的苯肾上腺素 (PE)、 $10\ \mu\text{M}$ 的血管紧张素 II (Ang-II) 和 100nM 的内皮缩血管肽-1 (ET-1) 作为肥大性刺激。定量细胞内 miR 的 TAQMAN™ 测定在 PNCM/NRCM 中在基线条件下 (图 4A) 或在肥大性剂存在下 (图 4B-4D) 进行。肥大性剂在培养的第 2 天添加,其单独或与相应的 RNAi 载体一起添加。小 RNA 测定:使用下列引物通过 TAQMAN™ 测定来确定短发夹 RNA (shRNA) 表达水平。在探究载体来源的 shRNA 对心脏细胞内 miRNA 途径的可能的载体剂量依赖性影响中,采用 TAQMAN™ 测定定量已知在心脏中表达的以下 miR:miRNA-1、miRNA-24、miRNA-133a、miRNA-208 和 miRNA-195。

[0179] 通过 Taqman 测定定量基因表达和 shRNA 产生

[0180] 微 RNA 测定:在探究载体来源的 shRNA 对心肌细胞 miRNA 的可能影响中,使用 TAQMAN™ 测定来定量 (图 4A-4C) 已知在心脏中功能表达的两种 miRNA (miRNA-1、miRNA-133a)。BNP 测定:通过 TAQMAN™ 同样地定量载体治疗的大鼠的心脏中的心脏 BNP 基因表达 (图 3G)。shPLB 产生:不同 RNAi 载体的短发夹 RNA 转录的定量 (图 1B) 按先前公布的方案进行 (Fechner 等人, Highly Efficient and Specific Modulation of Cardiac Calcium Homeostasis by Adenovector-Derived short hairpin RNA Targeting Phospholamban (靶向受磷蛋白的腺病毒载体来源的短发夹 RNA 对心脏钙稳态的高效和特异性调节). Gene Therapy. 2007 ;14 :211-218 ;和 Fechner 等人, Cocksackievirus B3 and adenovirus infections of cardiac cells are efficiently inhibited by vector-mediated RNA interference targeting their common receptor (靶向柯萨奇病毒 B3 和腺病毒的共同受体的载体介导的 RNA 干扰有效抑制它们对心脏细胞的感染). Gene Ther. Jun 2007 ;14(12) :960-971)。

[0181] 主动脉绑扎

[0182] 用腹膜内戊巴比妥 (65mg/kg) 麻醉四周龄 Sprague Dawley 大鼠 ($70\text{--}80\text{g}$) 并将其置于通气机上。进行胸骨切口以暴露主动脉根,并将内径 0.58mm 的钼夹 (Week, Inc.) 夹在升主动脉上。模拟组中的动物经历相似的程序但不插入夹子。然后闭合锁骨切口,并将大鼠放回它们的笼子。进行锁骨方法是因为在基因递送过程中,开胸术是必需的,而通过在初始的主动脉绑扎中不打开胸腔,避免了进行基因递送时的粘连。

[0183] 将动物初始地分为两组:一组 56 只动物进行主动脉绑扎,第二组 12 只动物进行模拟手术 (模拟手术动物中有 10 只存活)。在进行主动脉绑扎的动物中,在进行心脏基因转移之前,我们等待了 25-30 周来让动物发展左心室舒张和使射血分数降低 25%。在经历压

力超负荷肥大 (pressure overload hypertrophy) 的初始的 56 只动物中, 仅有 40 只动物存活, 将它们进一步分为接受 Ad-shGFP (n = 10) 或 Ad-shPLB (n = 10), 或 AAV9-shGFP (n = 10) 或 AAV9-shPLB (n = 10)。

[0184] 连续超声波心动描记评估

[0185] 在绑扎二十二周后, 在轻微麻醉的动物 (戊巴比妥 40mg/kg, 腹膜内) 中每周一次进行连续超声波心动描记图。使用 GE Vivid-7 超声机和 12MHz 宽频转换器进行经胸 M- 模式和二维超声波心动描记术。使用中乳头水平左心室短轴视图, 并采集后壁厚度、左心室舒张期内径和缩短分数测量。在检测到与绑扎后 12 周的缩短分数 (FS) 相比 FS 下降 > 25% 的 3 天内所有动物中进行基因转移。在模拟手术的大鼠中, 基因递送在第 27 周进行。

[0186] 静脉内注射后的 AAV9 载体的心脏分布

[0187] 向大鼠静脉内 (i. v.) 注射表达标记蛋白质 GFP 的载体 rAAV9-GFP 或注射盐水。递送 rAAV9-GFP 或盐水后一个月, 摘除心脏, 并在 510nm 在荧光系统下显现 (Maestro In Vivo Imaging, Woburn, MA), 490nm 蓝光处的单激发峰 (图 2B 和 2C) 显示观察到的图像。

[0188] 除了宏观水平的此 GFP 表达显现外, 还在 i. v. 注射 rAAV9-GFP 后一个月进行 GFP 免疫组织化学染色以在微观水平评估其分布 (图 2D、2H 和 2I)。30% 过氧化氢阻断内源过氧化物酶之后, 在 PBS 缓冲液中清洗, 以 1 : 1000 稀释度加入多克隆兔抗 hrGFP 抗体 (VITALITY™, 目录号 240142, Stratagene) 120min。清洗后, 作为二级抗体, 以 1 : 50 稀释度使用多克隆山羊抗兔免疫球蛋白 /HRP 抗体 (目录号 P0448, Dako, Glostrup, Denmark) 60min。使用 haemalaun 的染色和复染如所述地进行 (Noutsias 等人, Human Cocksackie-Adenovirus-Receptor is Co-Localized with Integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ on the Cardiomyocyte Sarcolemma and Upregulated in Dilated Cardiomyopathy-Implications for Cardiotropic Viral Infections (人类柯萨奇 - 腺病毒 - 受体与整合蛋白 $\alpha v \beta 3$ 和 $\alpha v \beta 5$ 共定位于心肌细胞肌膜并在舒张性心肌病中上调 - 对亲心性病毒感染的暗示). Circulation. 2001 ;104 :275-280)。

[0189] 对于不同器官中 GFP 表达的 Western 印迹分析, 以 1 : 5000 稀释度使用多克隆兔抗 hrGFP 抗体 (VITALITY™, 目录号 240142 Stratagene) 在 4℃ 过夜。作为二级抗体, 以 1 : 2000 稀释度使用多克隆山羊抗兔免疫球蛋白 /HRP 抗体 (目录号 P0448, Dako, Glostrup, Denmark) 在室温 60min。然后将 GFP Western 印迹对 X- 光胶片曝光 5min。这些胶片的定量在图 2J 中给出。

[0190] 体内 RNAi 治疗的实验方案

[0191] 腺病毒递送系统是本领域公知的。简而言之, 在麻醉大鼠和进行开胸术后, 将含有 200 μ l 腺病毒 (3×10^{10} pfu) 溶液的 22G 导管从左心尖前进至主动脉根。在距导管部位的远端夹住主动脉和肺动脉主干 40sec 并注射溶液, 然后闭合胸腔, 让动物恢复。对于使用 rAAV9 的实验, 使用 5×10^{11} 个任一种 rAAV9shRNA 的载体基因组进行简单的尾静脉注射。模拟组的动物注射盐水。

[0192] RNAi 治疗过程中的血液动力学评估

[0193] 将不同治疗组和处于腺病毒基因转移的不同阶段的大鼠用 40mg/kg 戊巴比妥麻醉和机械通气。然后通过中线切口打开胸腔, 暴露出心脏。然后在左心尖开一小口, 向左心室引入 2.0Fr. 高保真压力转换器 (MILAR Instruments, TX)。压力测量在 1KHz 下进行数字

化并储存用于进一步的分析。测量或获得了不同组的左心室收缩压 (LVSP)、舒张末期左心室压力 (LVDP)、最大压力上升速率 ($+dP/dt$) 和最大压力下降速率 ($-dP/dt$) 和松弛时间常数 (t)。使用以下等式测量了等容松弛的时间过程: $V = P_0 e^{-t/t} + P_b$, 其中 P 是左心室等容压力, P_0 是达到峰值 $-dP/dt$ 时的压力, P_b 是残余压力。

[0194] RNAi 治疗后的心脏组织学

[0195] 心肌细胞尺寸和心脏纤维化: 对动物子集进行组织学分析以评估肌细胞尺寸 (CMD) 和胶原蛋白含量 (CAP)。将 LV 样本用 10% 福尔马林固定并在石蜡中包埋。切片 ($3\mu m$ 厚) 用苏木精-曙红染色以确定 CMD 或用 Azan-Mallory 染色以评估 CAP。在纵向定向的心肌细胞中, 跨核宽度测量为 CMD (图 3F)。在每个 Azan-Mallory 切片的六个部位拍摄数码照片。使用 NIH 成像仪通过计数计算机化的像素分别确定间隙/血管周围胶原蛋白面积和肌细胞面积 (图 3E)。

[0196] 统计分析

[0197] 数据表示为平均值 $\pm$ SD。使用 STATVIEW (Abacus Concepts, Berkeley, CA) 通过 ANOVA 进行多重比较。接受 $P < 0.05$ 水平的统计显著性。进行双因子 ANOVA 以比较不同组之间的不同血液动力学参数。对于回波数据, 其中以不同的区间检查变量, 进行重复测量的 ANOVA。接受 $p < 0.05$ 水平的统计显著性。

[0198] 实施例 2

[0199] RNAi 载体系统的优化

[0200] 研究了病毒 RNAi 载体沉默效力的决定因素, 因为观察到具有显然很小结构差别的 AAV-shPLB 载体在体外在 PNCM 中显示显著不同的 shRNA 产生速率和靶沉默 (图 1)。对于 PNCM 中的这些初始研究, 使用了 AAV2.6 假型, 其在体外具有比 AAV2.9 更高的转导效力。对于图 2 和 3 中报告的稍晚的 RNAi 治疗研究, 仅使用了 AAV2.9, 其显示更好的体内心脏转导。体外实验显示共表达向含有 shPLB 载体的细胞加标签的 GFP 标记蛋白质几乎消除了 shPLB 产生 (图 1B) 和 PLB 沉默 (图 1A)。如果 GFP 由 CMV 驱动, 以及如果 CMV 连接于 β -内含子, 含有用于 shRNA 转录的 U6 启动子的表达盒中 CMV 启动子的存在强烈降低 shRNA 产生 (图 5A)。图 1 显示到目前为止, 最高的效力是由以前认为太短而无法进行有效包装的 AAV 构建体展示的。PNCM 中 AdV-shPLB 与 AAV6-shPLB 的 shRNA 转录的比较显示, 到第 10 天腺病毒的表达下降了三分之一, 而 AAV 载体的表达则不变 (图 1B)。 4×10^3 p/c 剂量下, 两种载体的 PLB 表达消除都 $> 98\%$ 。令人感兴趣的是, 允许通过体内成像进行检测的 CMV-GFP 盒的并入意外地导致载体不能沉默其靶标。CMV 启动子驱动标记基因表达显然不适合用于 U6-shRNA 载体, 因此仅有最简单和有效的 U6-shRNA 载体 (图 1) 被选择用于体内 RNAi。

[0201] 由于 rAAV9-shRNA 与 AdV-shPLB 相比的高度稳定的 shRNA 产生和长期的体内稳定性, 因此将其用于长期体内治疗。对于短期治疗, 使用腺病毒载体。在体外, 蛋白质水平的 PLB 消除比 mRNA 水平的 PLB 消除滞后数天, 在第 7 天, 蛋白质水平分别下降了基线的 9% (AdV-shPLB) 和 12% (rAAV6-shPLB) (图 1D)。与 AAV9-shGFP 组相比, 对 AAV9-shPLB 治疗 NRCM 过程中的 $[Ca^{2+}]_i$ 瞬变的测量 (图 1E 和 1F) 显示此载体导致显著更高的振幅和加快的瞬变动力学 (缩短的 TTP 和 τ), AAV9-shPLB 组具有与未治疗的细胞不可分辨的瞬变。与 AdV-shGFP 相比, AdV-shPLB 治疗还造成显著更高的振幅。与 AAV9 组相反, AdV-shPLB 和 AdV-shGFP 中的 TTP 被延长, 而 τ 则无差异。AdV 组中的肌质网 (SR) Ca^{2+} 负荷研究显示

AdV-shPLB 和 AdV-shGFP 组中增加的 SR Ca^{2+} 负荷和自 SR 的 Ca^{2+} 释放分数 (FR) (图 5D)。关于体外转导的细胞间差异,图 5B 显示用 rAAV-GFP 标记载体治疗的 NRCM 中大致均匀的 GFP 表达,其可充当对体外均匀的 shPLB 表达的直接展示的最佳可能逼近。使用现有的技术,均匀的 shPLB 表达可能无法直接显现,原因是 GFP 与 shPLB 的共表达消灭了其沉默能力(图 1B 和 1C)。所述 RNAi 载体在体内在大鼠心脏中均匀的空间和时间分布还由与用于 RNAi 治疗(图 3A-3D)的相同类型的 GFP 载体(rAAV9)的荧光成像(图 2B 和 2C)间接推断出来。图 2D 和图 2H-2J 显示 i. v. 注射 rAAV9-GFP 后心脏和其它器官的 GFP 免疫组织化学染色。心脏中强烈和大致均匀的表达与肝和骨骼肌中的微弱染色以及肺中的无可见染色形成对比(定量参见图 2J)。

[0202] 实施例 3

[0203] 体内 RNAi 治疗的效力

[0204] 跨主动脉的缢痕在 30 周后导致大鼠中严重的 HF。体内 RNAi 治疗的实验方案概述于图 2。与用于 RNAi 治疗的相同类型(rAAV9)的 GFP 载体的荧光成像和免疫组织学分析在宏观和微观水平显示了 i. v. 注射后一个月大致均匀的心脏 GFP 表达,并可被假定为接近 RNAi 载体产生的心脏 shRNA 表达水平(图 2B-2D)。现有技术难以实施体内 shPLB 产生的直接测量。图 2F 和 2G 显示用 AdV-shPLB 或 rAAV9-shPLB 治疗后显著下降的心脏 PLB 蛋白质。SERCA A2a 蛋白质在衰竭的心脏中是降低的,而 shPLB 治疗伴有心脏 SERCA2a 蛋白质的增加。NCX 未发生显著变化。

[0205] 与 AdV-shGFP 对照载体(产生针对 GFP 的 shRNA 序列)相比,通过主动脉根注射 AdV-shPLB 的治疗充当严重 HF 的短期治疗模型。注射后一个月,AdV-shPLB 中的舒张功能(图 3A)显著($p < 0.05$)好于对照组:左心室舒张末期压力(LVEDP) $10 \pm 3 \text{ mmHg}$ 对比 $14 \pm 4 \text{ mmHg}$, LV 压力下降速率($-\text{dp}/\text{dt}$) 5215 ± 540 对比 $4017 \pm 471 \text{ mmHg/sec}$, 等容松弛时间常数 $\text{Tau}(\tau)$ 17 ± 3 对比 $24 \pm 4 \text{ msec}$ 。收缩功能(图 3B)同样得到改善, LV 收缩压(LVSP) 90 ± 5 对比 $78 \pm 4 \text{ mmHg}$, LV 压力上升速率($+\text{dp}/\text{dt}$) 7.448 ± 659 对比 $5.624 \pm 698 \text{ mmHg/sec}$, 和缩短分数(FS) 46.1 ± 3.2 对比 $39.1 \pm 3.7\%$ 。除了对血液动力学的有益效应之外, TAB 后 LV 重量和舒张的大幅增加在一个月时也被显著降低: LV 重量 1.34 ± 0.22 对比 $1.87 \pm 0.21 \text{ g}$, LV/ 体重(LV/BW) 比 2.4 ± 0.2 对比 $3.2 \pm 0.2 \times 10^{-3}$, LV/ 胫骨长度(LV/TL) 比 29.3 ± 4 对比 43.3 ± 5 (图 3C)。这些死亡后形态测定数据与超声波心动描记术相关(图 3D)。存活率为 8/10 对比 9/10。

[0206] 与 AAV9-shGFP 载体相比,通过尾静脉注射最有效 AAV9-shPLB 的治疗充当慢性严重 HF 的长期治疗模型。注射后三个月,与对照组相比, AAV9-shPLB 治疗中的舒张功能(图 3A)得到显著改善,并且不再显著不同于模拟手术的(无主动脉绑扎)非 HF 组: LVEDP 为 $8 \pm 3 \text{ mmHg}$ 对比 18 ± 4 (非 HF: 6 ± 2) mmHg , $-\text{dp}/\text{dt}$ 5.722 ± 503 对比 3.877 ± 643 (非 HF: 6.032 ± 344) mmHg/sec , Tau 16 ± 3 对比 23 ± 4 (非 HF: 14 ± 3) msec 。收缩功能(图 3B)也得到恢复,尽管逊色于舒张功能参数: LVSP 92 ± 4 对比 80 ± 3 (非 HF: 98 ± 4) mmHg , $+\text{dp}/\text{dt}$ 7.851 ± 803 对比 4.997 ± 766 (非 HF: 8.772 ± 832) mmHg/sec , FS 50.1 ± 2.1 对比 $35.2 \pm 5.1\%$ (非 HF: 52.2 ± 4.1)。除了血液动力学之外,这一治疗在 3 个月时降低了 LV 肥大和舒张: LV 重量 1.34 ± 0.12 对比 $1.76 \pm 0.27 \text{ g}$ (非 HF: 1.11 ± 0.09), LV/BW 2.2 ± 0.1 对比 $3.1 \pm 0.2 \times 10^{-3}$ (非 HF: 1.8 ± 0.2), LV/TL 27.2 ± 4 对比 45.3 ± 5 (非 HF: 24.5 ± 4)(图 3C)。超

声波心动描记术确证了 LV 壁厚和舒张的降低 (图 3D)。组织学显示 rAAV9-shRNA 治疗 3 个月后心肌细胞尺寸和心脏胶原蛋白二者均有降低 (图 3E 和 3F)。3 个月后 AAV9-shPLB 治疗的动物的存活率为 9/10, 对比对照组中的 6/10。

[0207] 实施例 4

[0208] 心力衰竭的 RNAi 治疗

[0209] 这些数据表明, 对于中间时间尺度, 腺病毒载体可能是足够的, 甚至可提供超过长期稳定的 AAV 的优点 (Wang 等人, *Nat Biotechnol* (2005) 23 :321-328 ;Gregorevic 等人, *Nature Medicine* (2004) 10 :828-834 ;Inagaki 等人, *Mol Ther* (2006) 14 :45-53 ;Pacak 等人, *CirRes* (2006) 99 :e3-9), 原因是在急性和可能逆转的 HF 中仅短暂地需要 RNAi。事实上, AdV-shPLB 治疗后一个月舒张和收缩功能以及 LV 形态学的显著改善证明了腺病毒系统的至少功能性治疗益处。先前显示的用于经典基因转移治疗的内容 (delMonte 等人, *Proc Natl AcadSci USA* (2004) 101 :5622-5627 ;Sakata 等人, *J Mol Cell Cardiol* (2007) 42 :852-861 ;Sakata 等人, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2007) 292 :H1204-1207 ;Sakata 等人, *Mol Ther* (2006) 13 :387-996) 显然也可适用于基于 RNAi 的策略, 尽管存在对 RNAi 载体结构的其他限制因素以避免损失治疗效力 (图 1A 和 1B) 和扰乱 miRNA 途径。

[0210] 虽然从 AAV 产生 shRNA 在几个方面不同于经典的基因转移 (图 1), 但是来自本发明 AAV 组的数据提供了基于 AAV 的 shRNA 产生在能够改善心脏功能和可能的存活水平保持稳定数月的一手证据。本文使用的 AAV9 载体实现了应用于人类 HF 的一个首要要求, 因为在灵长类中它是亲心性的 (Pacak 等人, (2006))。与啮齿动物相反, 可调节的 PLB 调节是人类中最可能需要的, 因为已将由基因组突变造成的永久性 PLB 缺乏或 PLB 功能失调与心肌疾病关联 (Schmitt 等人, *Science* (2003) 299 :1410-1413 ;Haghighi 等人, *Proc Natl AcadSci USA* (2006) 103 :1388-1393 ;Zhao 等人, (2006) 113 :995-1004)。然而, 药物可调节的 RNAi 显示在现有载体平台上是可能的。

[0211] RNAi 治疗后, 发现与 HF 组相比, SERCA2a 表达增加, 这与 RNAi 治疗使 LV 功能正常化的事实一致。因为 SERCA2a 表达是 HF 程度的公知标志物, 其通过 shPLB 的 RNAi 治疗后 SERCA2a 的增加反映了改善的心脏功能状态。

[0212] 实施例 5

[0213] RNAi 治疗过程中的心肌细胞微 RNA 表达

[0214] RNAi 的细胞机器经过数百万年的进化, 是已知用于特异性基因沉默的最有效和通用的机制。shRNA 采用这一机器通过模拟内源过程介导治疗效应, 在远低于反义 RNA 的浓度下实现沉默, 但可扰乱细胞 miRNA 途径 (Grimm 等人, *Nature* (2006) 441 :537-541)。因为 miR 在心脏形态发生 (Zhao 等人, *Cell* (2007) 129 :303-317)、肥大 (Care 等人, *Nature Medicine* (2007) 13 :613-618 ;van Rooij 等人, *Science* (2007) 316 :575-579)、心律失常发生 (Yang 等人, *Nature Medicine* (2007) 13 :486-491) 和衰竭 (Thum 等人, *Circulation* (2007) 116 :258-267 ;van Rooij 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* (2006) 103 :18255-18260) 中起重要作用, 在 PNCM/NRCM 中在 miRNA 水平探究了 RNAi 载体的可能副作用。首先, 在标准培养条件下, 然后在肥大诱导药物苯肾上腺素 (PE) 存在下。在无此肥大性刺激时, 体内使用的载体无一对在心脏中具有已知的功能重要性的细胞 miR 1、21、133a、195、208 具有任何显著效应 (图 4B)。在 PE 存在下, 在培养的第 5 天, 几种心肌细胞 miRNA

有显著的下降(图 4A)。显著地,具有抗肥大(Care 等人(2007)MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy(微 RNA-133 控制心脏肥大).Nat Med 13,613-8;和 van Rooij 等人(2007)Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a MicroRNA(微 RNA 控制应激依赖的心脏生长和基因表达).Science 316,575-9)和抗心律失常发生(Yang 等人(2007)The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2(肌肉特异性微 RNA miR-1 通过靶向 GJA1 和 KCNJ2 调节心脏心律失常发生潜能).Nat Med 13,486-191)潜能的 miRNA 的水平的一下降在用 AdV-shPLB 或 AAV6-shPLB 治疗的 PNCM 中被反转,AdV-shPLB 或 AAV6-shPLB 将这些 miRNA 的水平恢复至基线。

[0215] 在 PE 存在下,在培养的第 5 天,心肌细胞 miR 有显著的下降(图 4B)。显著地,具有抗肥大(Zhao 等人,(2007);Care 等人,(2007))和抗心律失常发生(Yang 等人,(2007))潜能的 miR 的一下降在用 AdV-shPLB 或 AAV6-shPLB 治疗的 PNCM 中被反转,AdV-shPLB 或 AAV6-shPLB 将这些 miRNA 的水平恢复至基线,其中特别值得关注的是 miRNA-133 和 miRNA-1。由于恶性心律失常是 HF 中重要的并发症,新颖治疗对任何心律失常相关的微 RNA 诸如 miRNA-1 的脱调节(Yang 等人,(2007))应被视为可能的严重有害作用。然而,体外数据显示 PE-诱导的 miRNA-1 降低被 shPLB 治疗抵消(图 4A-4C)。结合 AAV-shPLN 治疗组中存活改善的趋势,目前为止没有此治疗的心律失常发生的副作用的证据。用 shPLB 载体治疗的大鼠心脏具有比 shGFP 组更高的 miRNA 水平(图 2H-2J)。关于 RNAi 载体的可能副作用,载体注射后肝(图 2E)和其他器官的 HE 染色揭示无病理学发现。

[0216] miRNA-133 在控制心肌细胞尺寸中起关键作用(Care 等人,(2007)),并且在通过 RNAi 治疗降低肥大方面值得关注。不管体外 shPLB 治疗恢复 miRNA-133 水平的分子机制如何,必须承认它们的升高具有抗肥大效应。虽然 RNAi 治疗过程中改善的收缩和舒张功能是由其对经由总体 Ca^{2+} 瞬变的兴奋-收缩偶联(ECC)的影响直接造成的,观察到的 LV 肥大和舒张的显著降低(图 3C、3D 和 3F)是不容易推断的,原因是 RNAi 治疗主要仅靶向总体 Ca^{2+} 循环的单个组分。意外的是,这一狭窄靶向的干预仍然将几种 PE 诱导的 miRNA 抑制恢复到正常水平(图 4A)。由于在体外,无论是血液动力学应激,还是像体内 HF 中那样的细胞因子活化的神经体液,都不能起任何作用,因此这一恢复显然是由细胞水平的 Ca^{2+} 稳态调节造成的。因为无法假定 PLB 消除对细胞内 miRNA 的直接效应,所以 RNAi 诱导的 Ca^{2+} 稳态变化显然不仅影响收缩相关的总体 Ca^{2+} 瞬变,而且还影响核周腔中产生的单独的和隔离的 Ca^{2+} 信号(Wu 等人,J Clin Invest(2006)116:675-682;Molkentin J,J Clin Invest(2006)116:623-626),这些 Ca^{2+} 信号决定肥大过程中的转录变化。被 PE 诱导并且被 RNAi 校正的 miRNA 抑制可能仅反映改变的 Ca^{2+} 稳态引起的细胞调节网络的间接变化。可选地,后者可作为第一靶标直接影响 miRNA 表达。

[0217] 基于这些结果,开发了针对心脏疾病的高效的局部化 RNAi 治疗策略。当使用优化的 RNAi 载体和主动脉根载体注射将 RNAi 限于心脏时,不存在毒性或扰乱 miRNA 途径的证据。不被理论束缚,载体 miRNA 对肥大相关的 miRNA 的脱调节的矫正表明 miRNA 参与治疗过程。虽然通过腺病毒载体的短期的 RNAi-介导的 PLB 沉默在 1 个月后改善了心脏功能,但是来自优化的亲心性 AAV9 载体的长期 RNAi 在 3 个月的时间段内改善 HF 大鼠中的功能、形态和存活。

[0218] 此外,使用所公开的载体在缺血灌注模型中造成降低的心室心律失常以及心室功能的改善。而且,PLB 的抑制增加了具有转变为心力衰竭的压力超负荷肥大的动物的存活。

[0219] 虽然已参考上述实施例描述了本发明,但是应理解,修改和变化涵盖在本发明的精神和范围内。因此,本发明仅受下列权利要求的限制。

[0001]

序列表

<110>	纳诺科尔治疗公司 罗杰·J·哈贾 沃尔夫冈·Ch. ·波尔 亨利·费克纳	
<120>	用于治疗心力衰竭的 RNA 干扰	
<130>	NAN01100-1W0	
<150>	US 61/018, 326	
<151>	2007-12-31	
<160>	2	
<170>	PatentIn 版本 3.5	
<210>	1	
<211>	71	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成构建体	
<400>	1	
	ggatcccgta ccttactcgc tcggctattc aagagatagc cgagcgagta aggtatTTTT	60
	tggaaaagct t	71
<210>	2	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成构建体	
<400>	2	
	uaccuuacuc gcucggcua	19

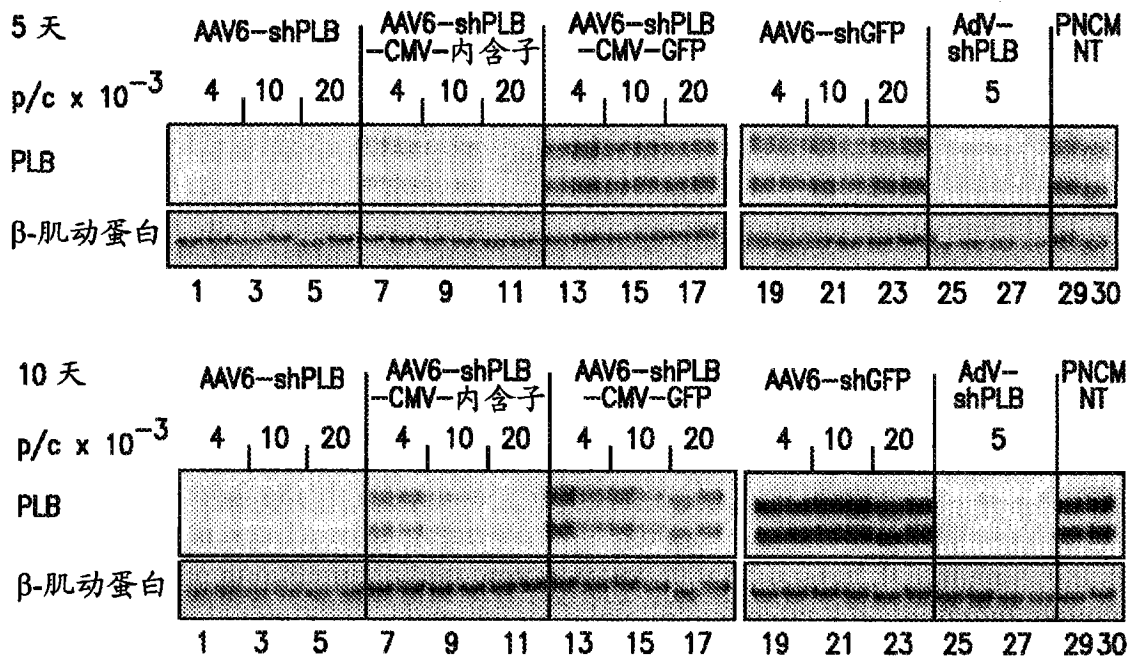


图 1A

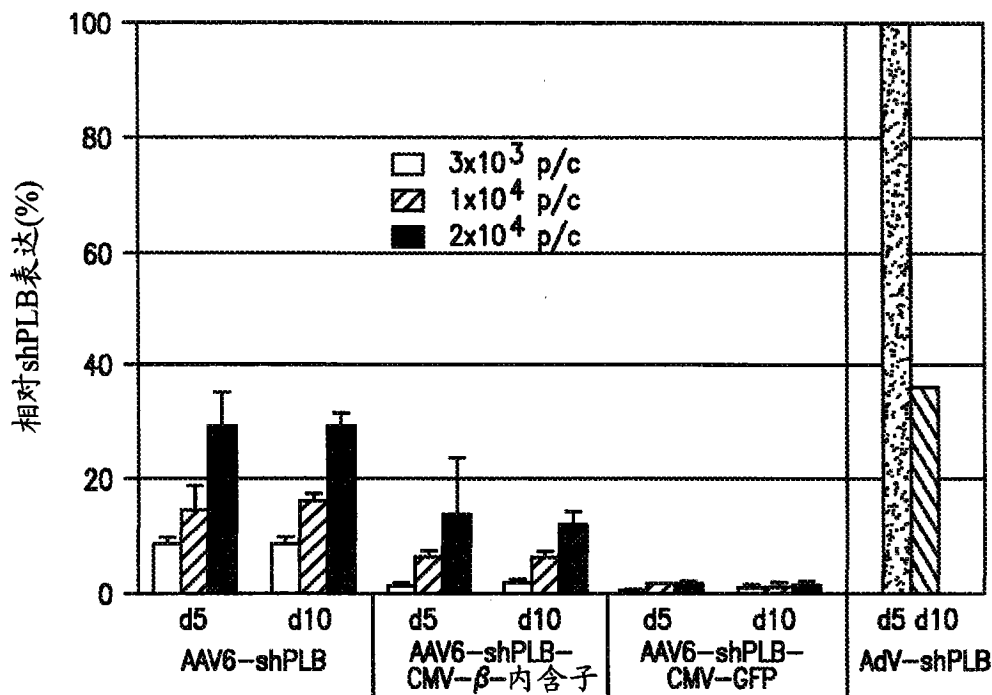


图 1B

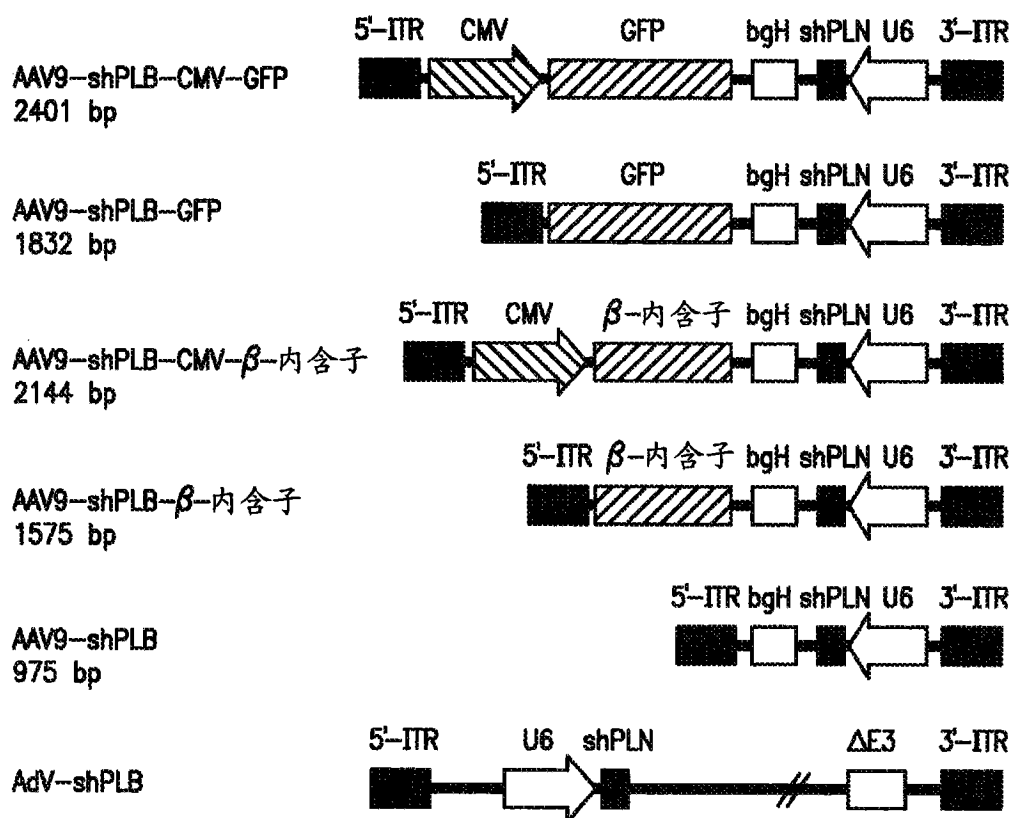


图 1C

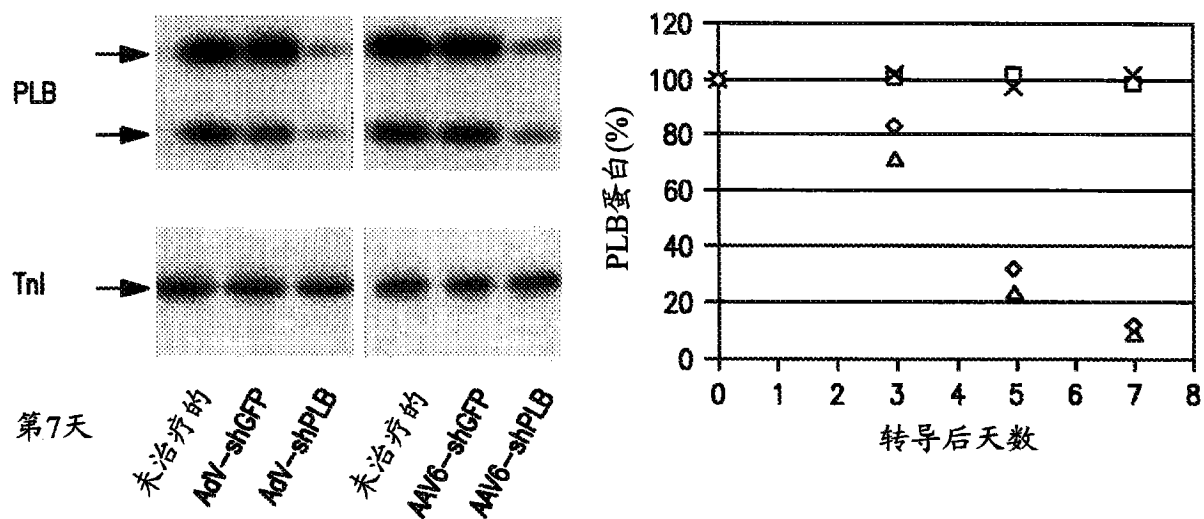


图 1D

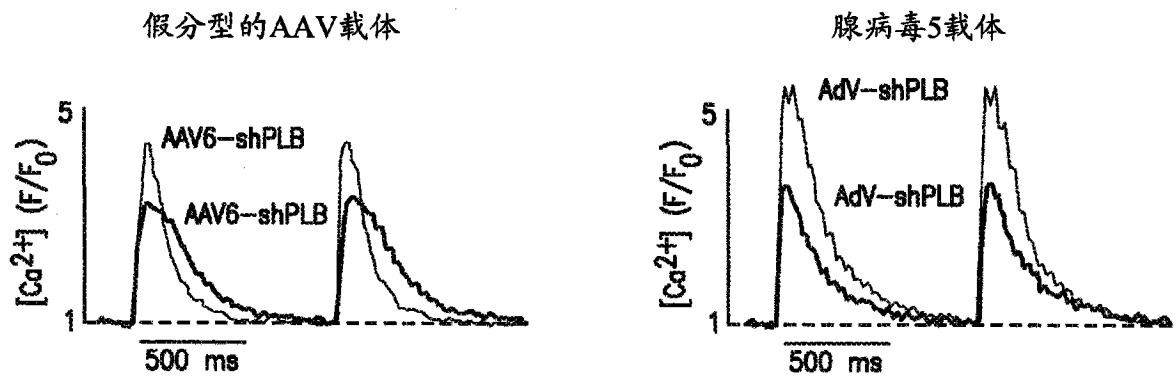


图 1E

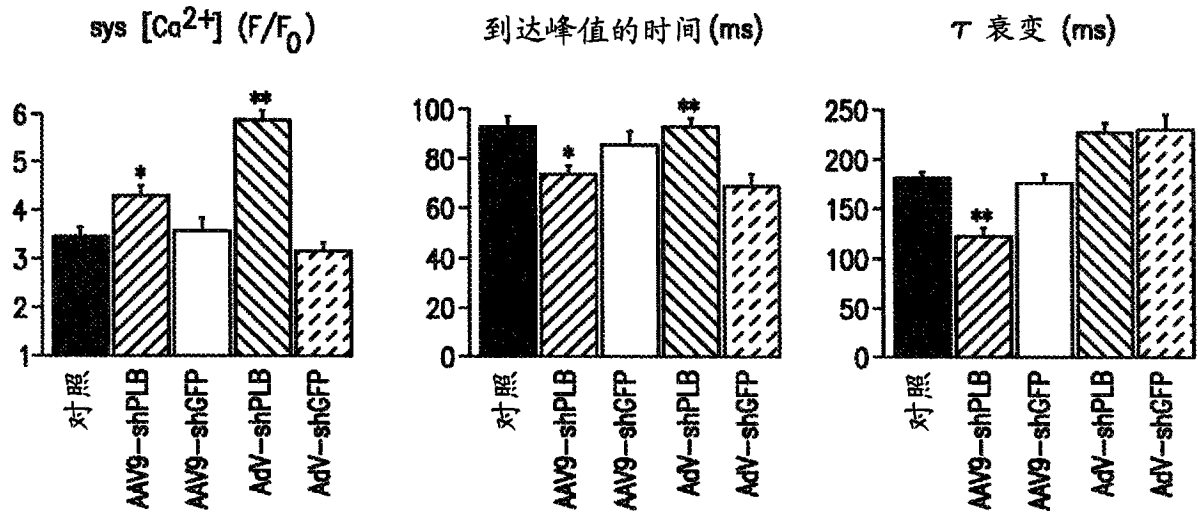


图 1F

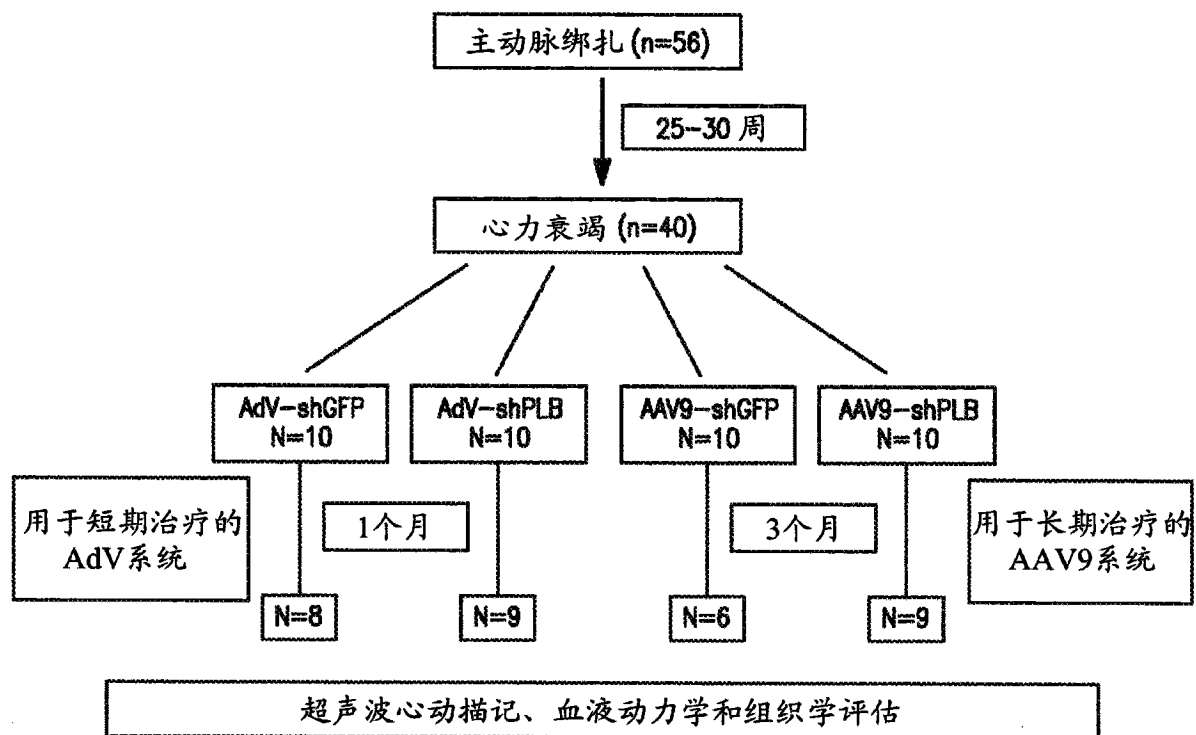


图 2A

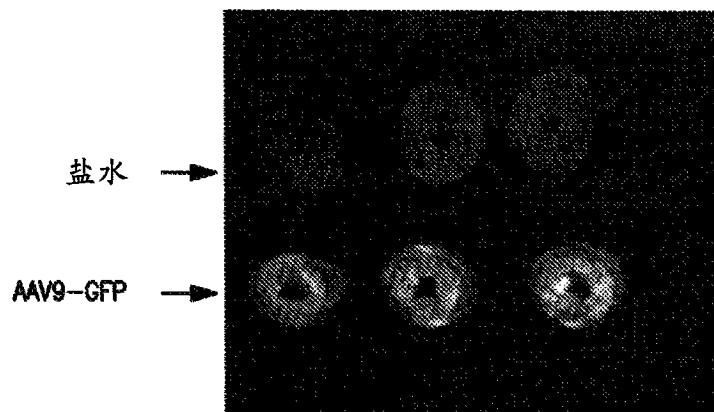


图 2B

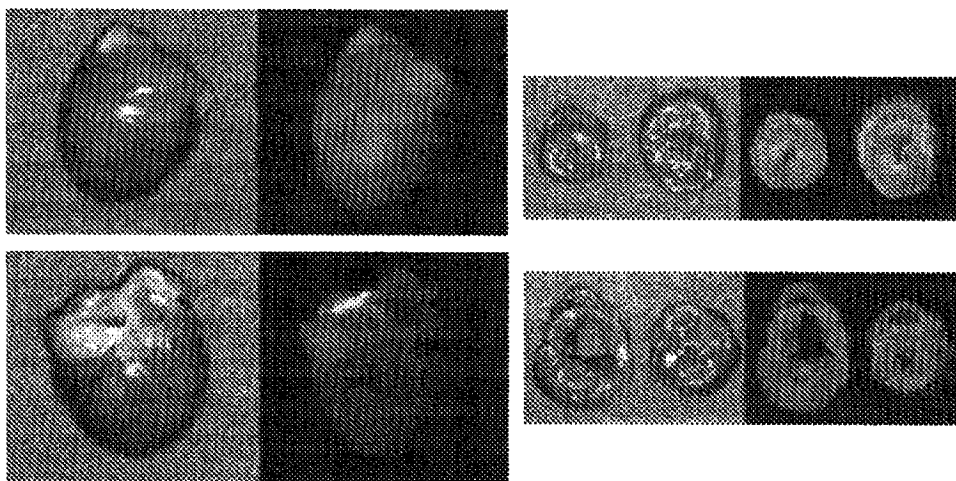


图 2C

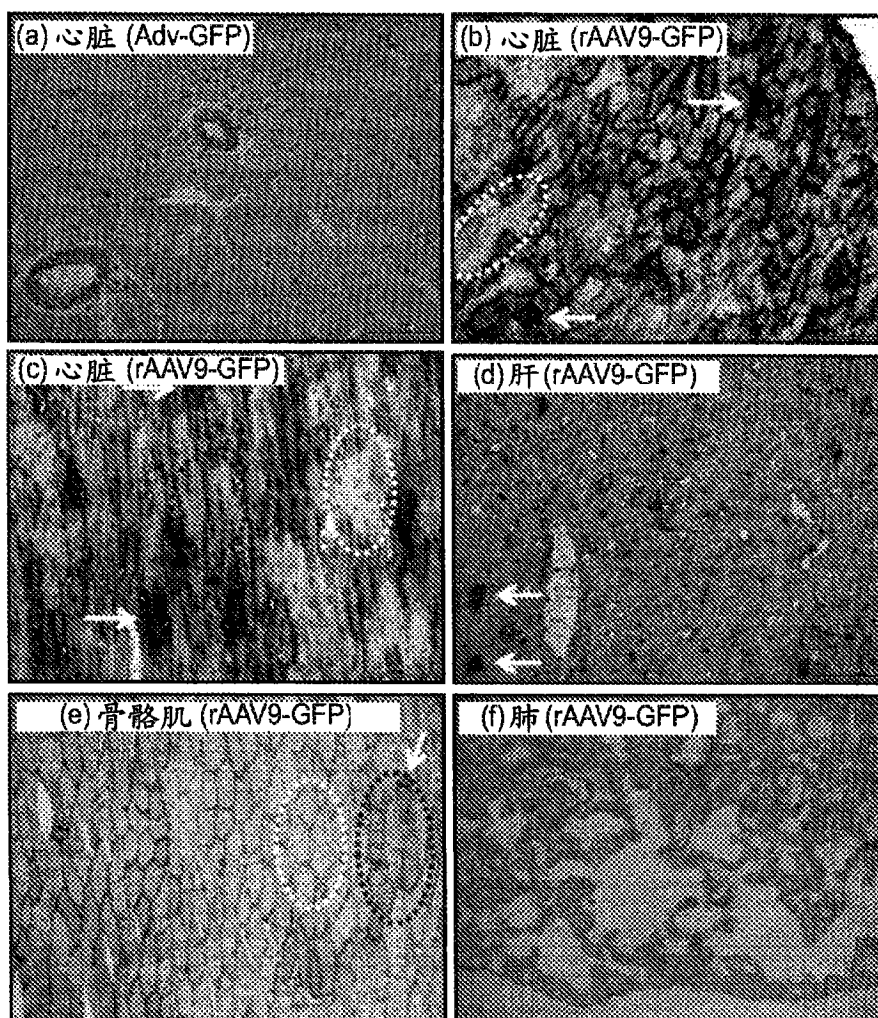


图 2D

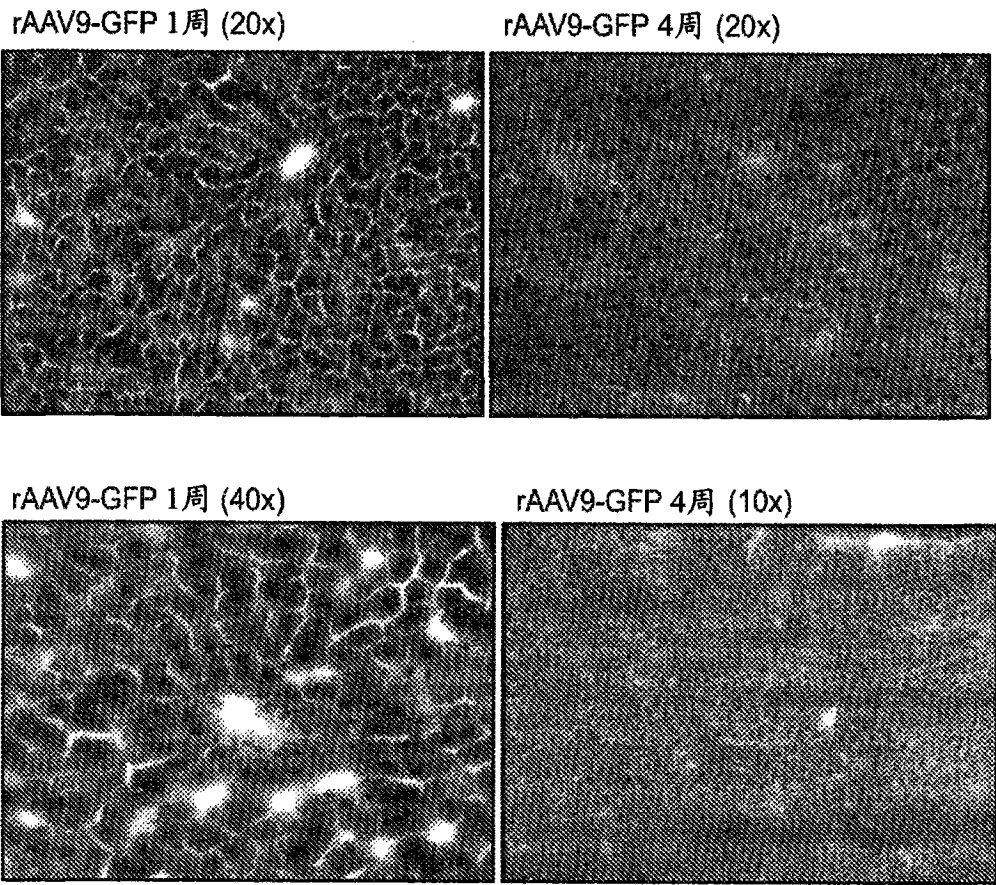


图 2E

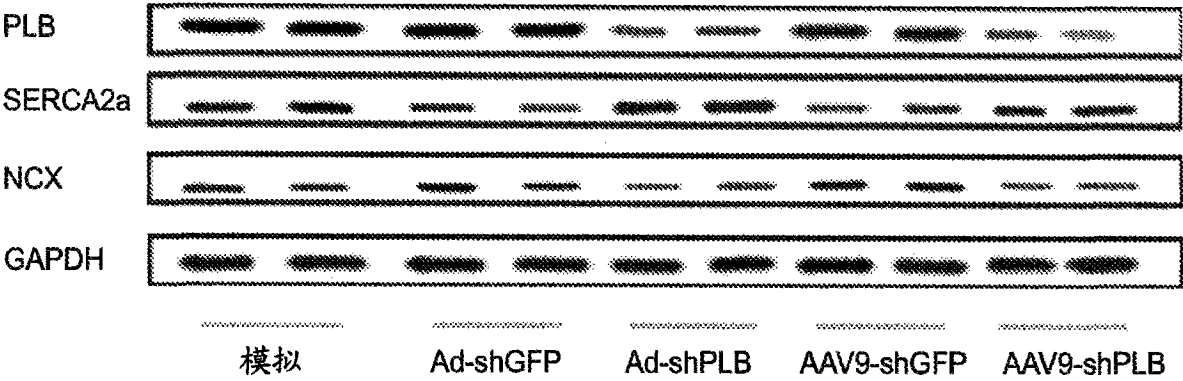


图 2F

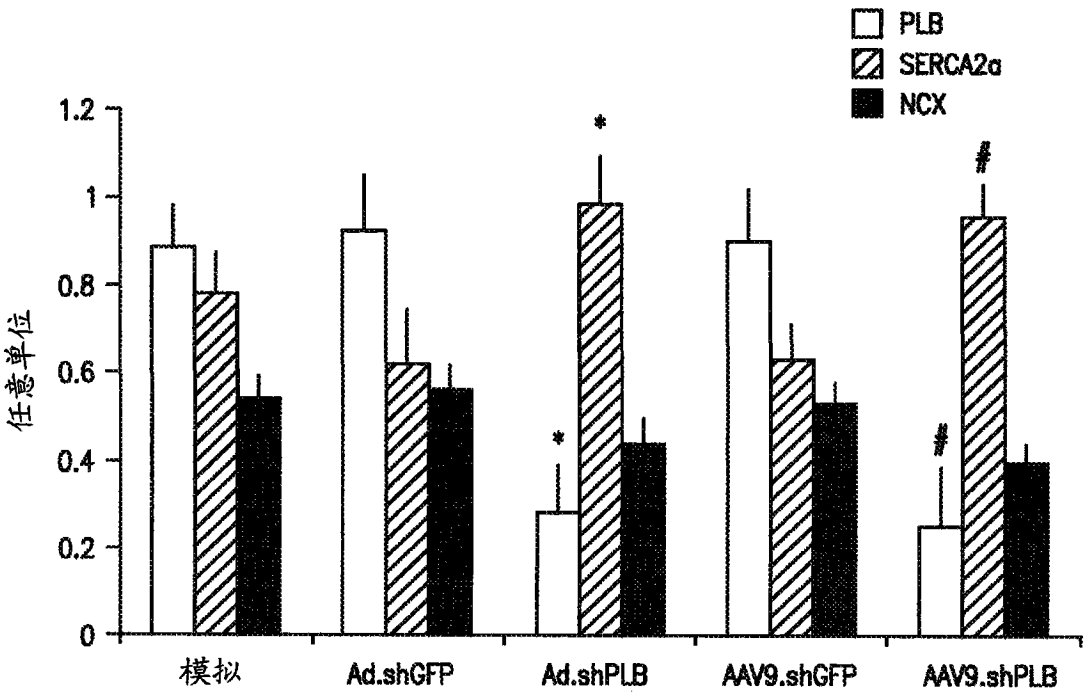


图 2G

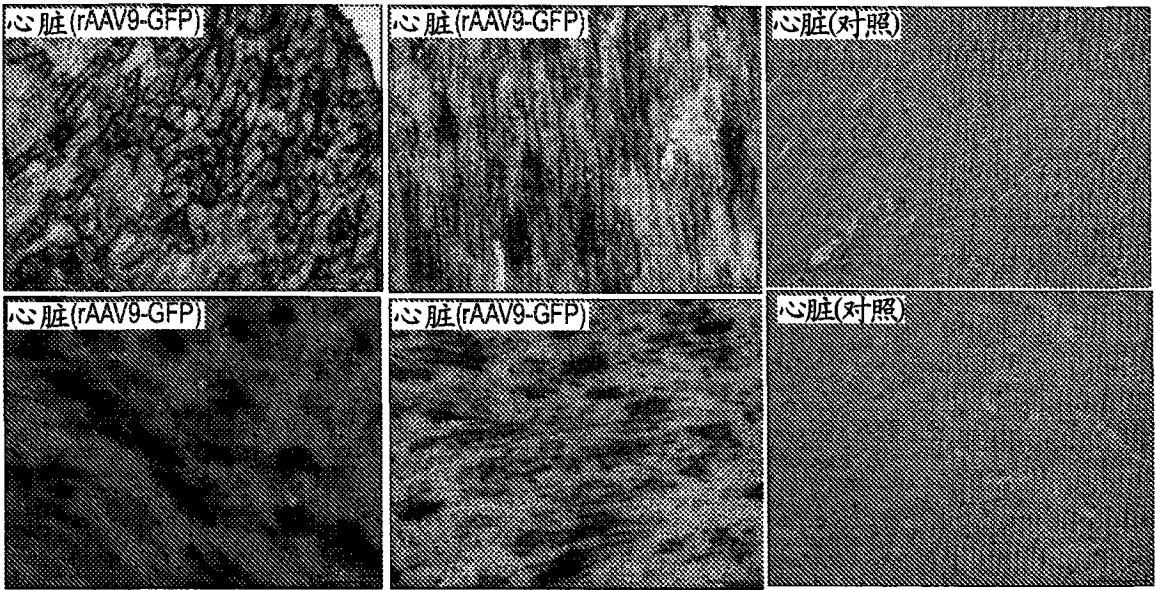


图 2H

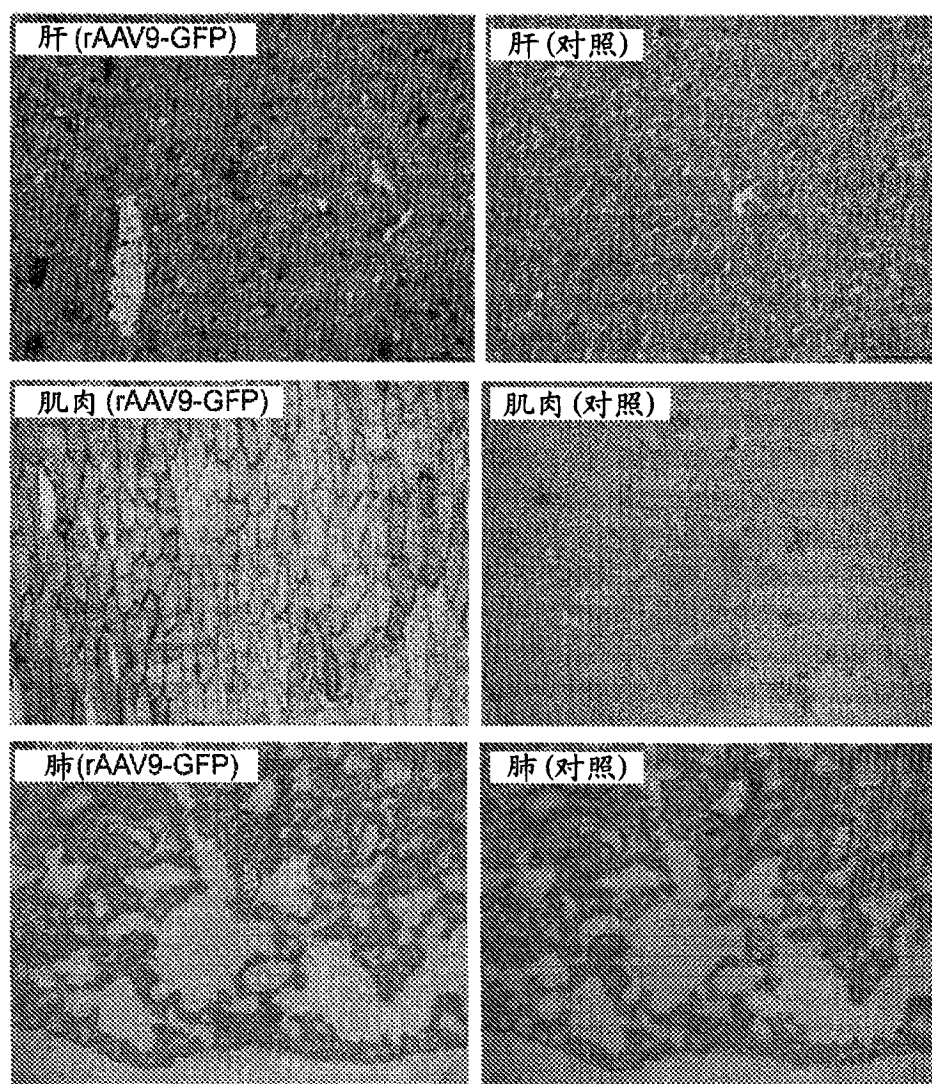


图 21

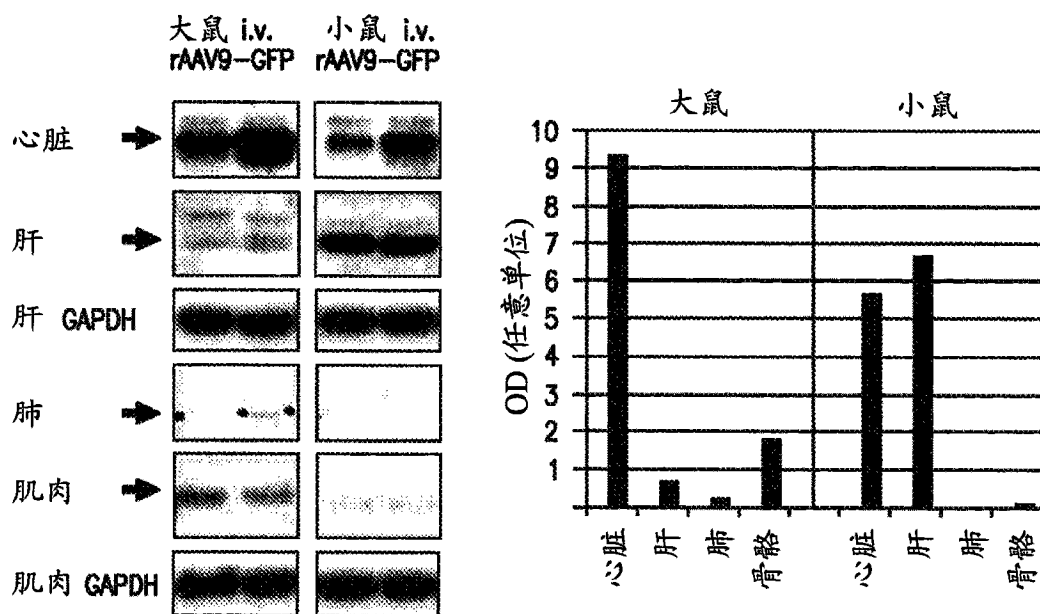
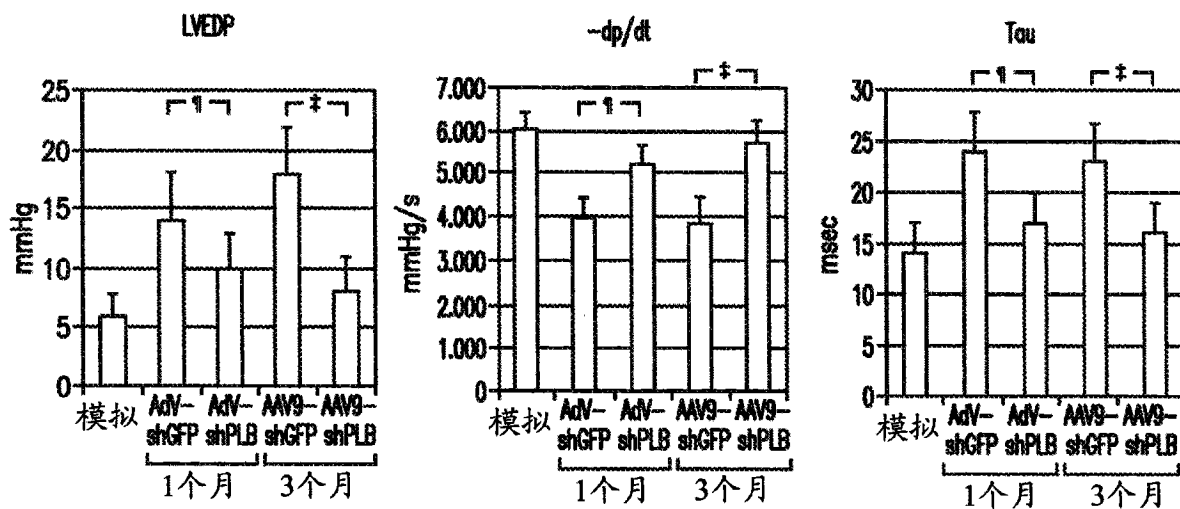


图 2J



*: 对于AAV9-shGFP比AAV9-shPLB, $p < 0.05$

#: 对于AdV-shGFP比AdV-shPLB, $p < 0.05$

图 3A

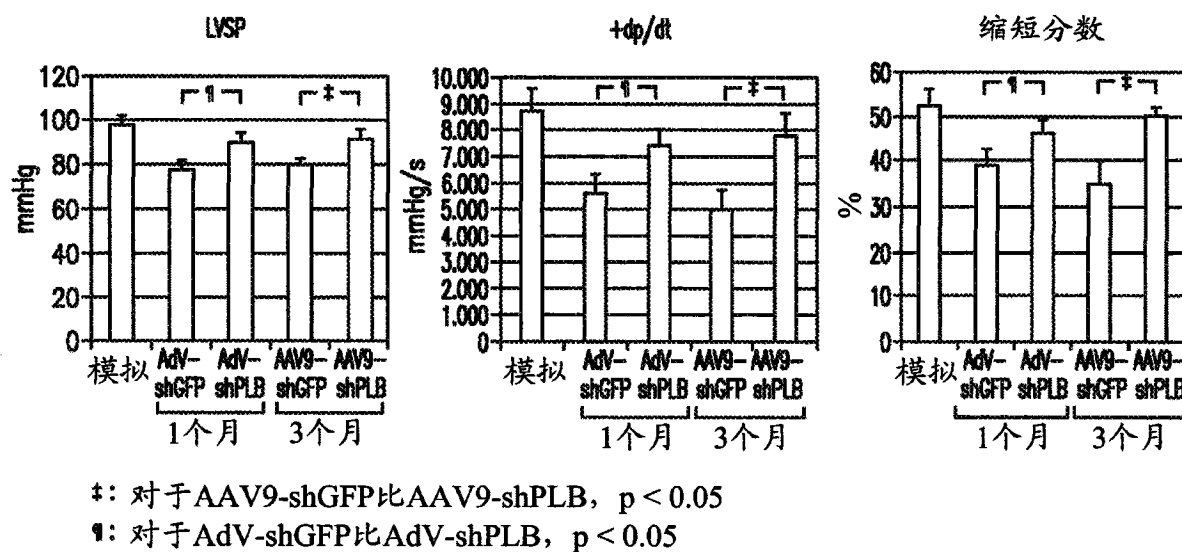


图 3B

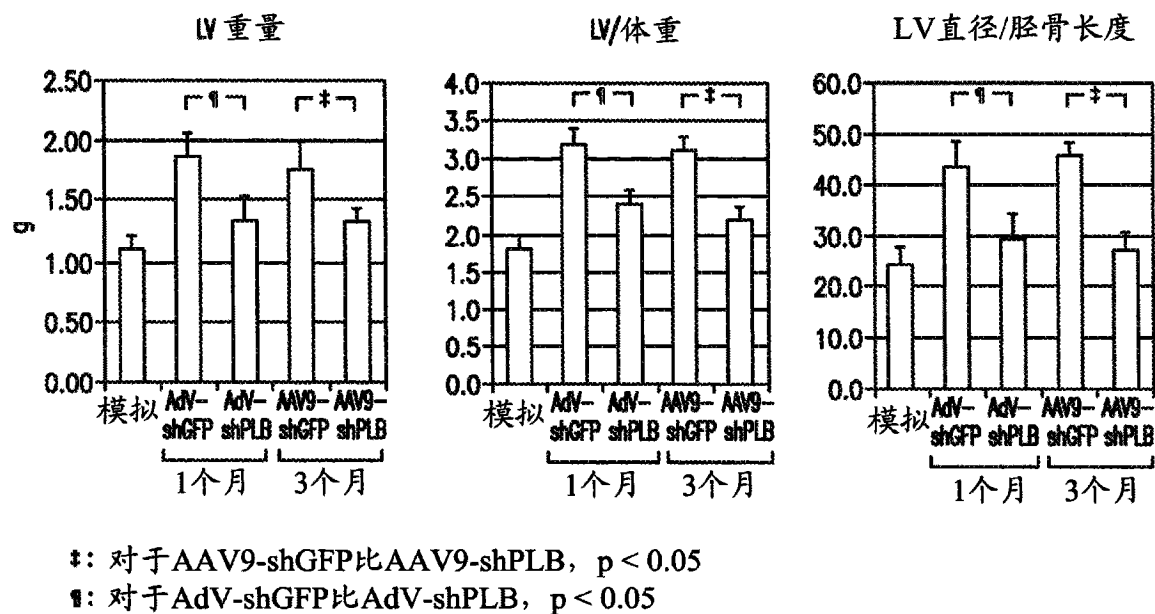
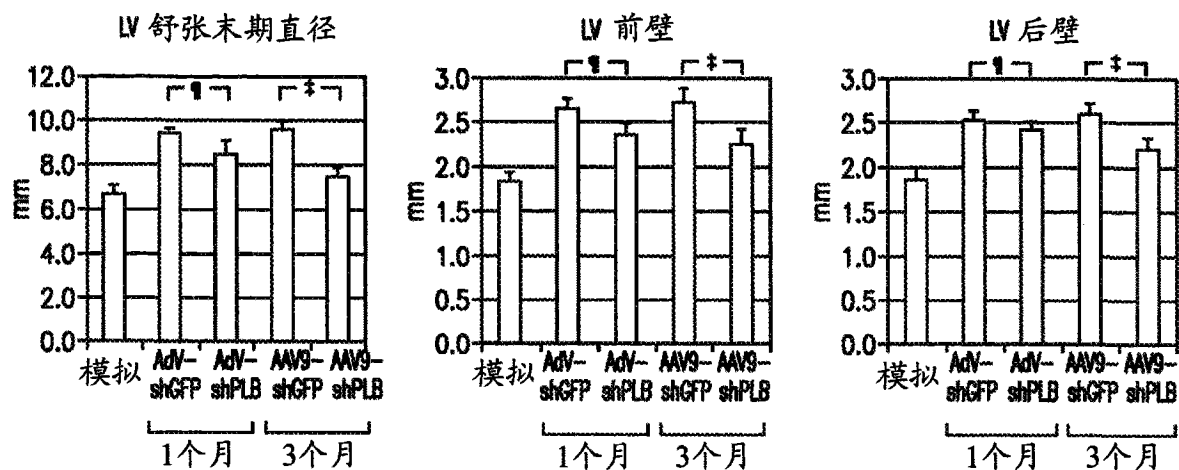


图 3C



‡: 对于AAV9-shGFP比AAV9-shPLB, $p < 0.05$

†: 对于AdV-shGFP比AdV-shPLB, $p < 0.05$

图 3D

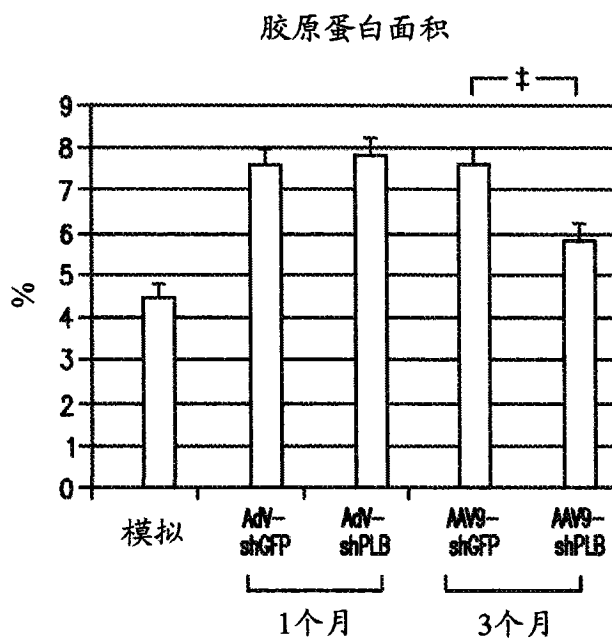


图 3E

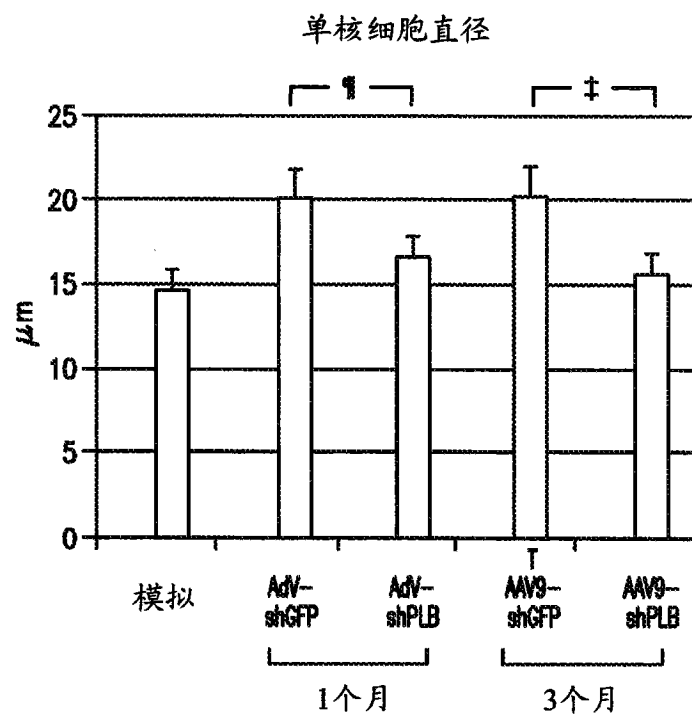


图 3F

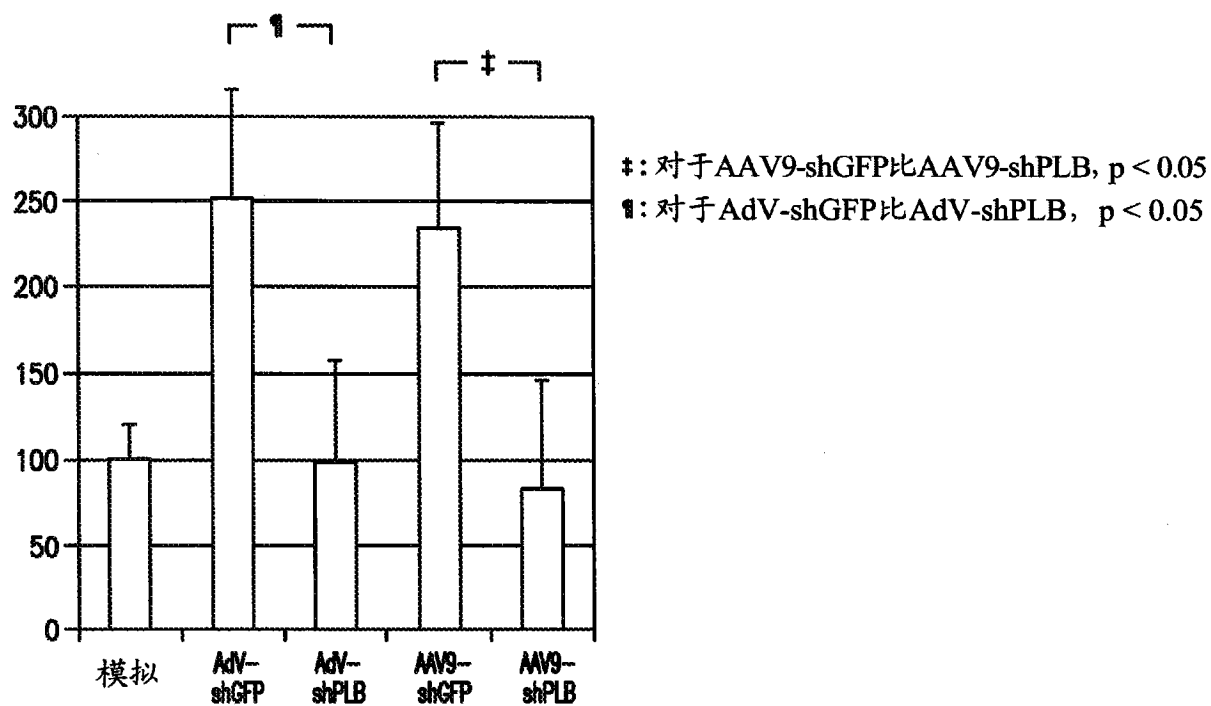


图 3G

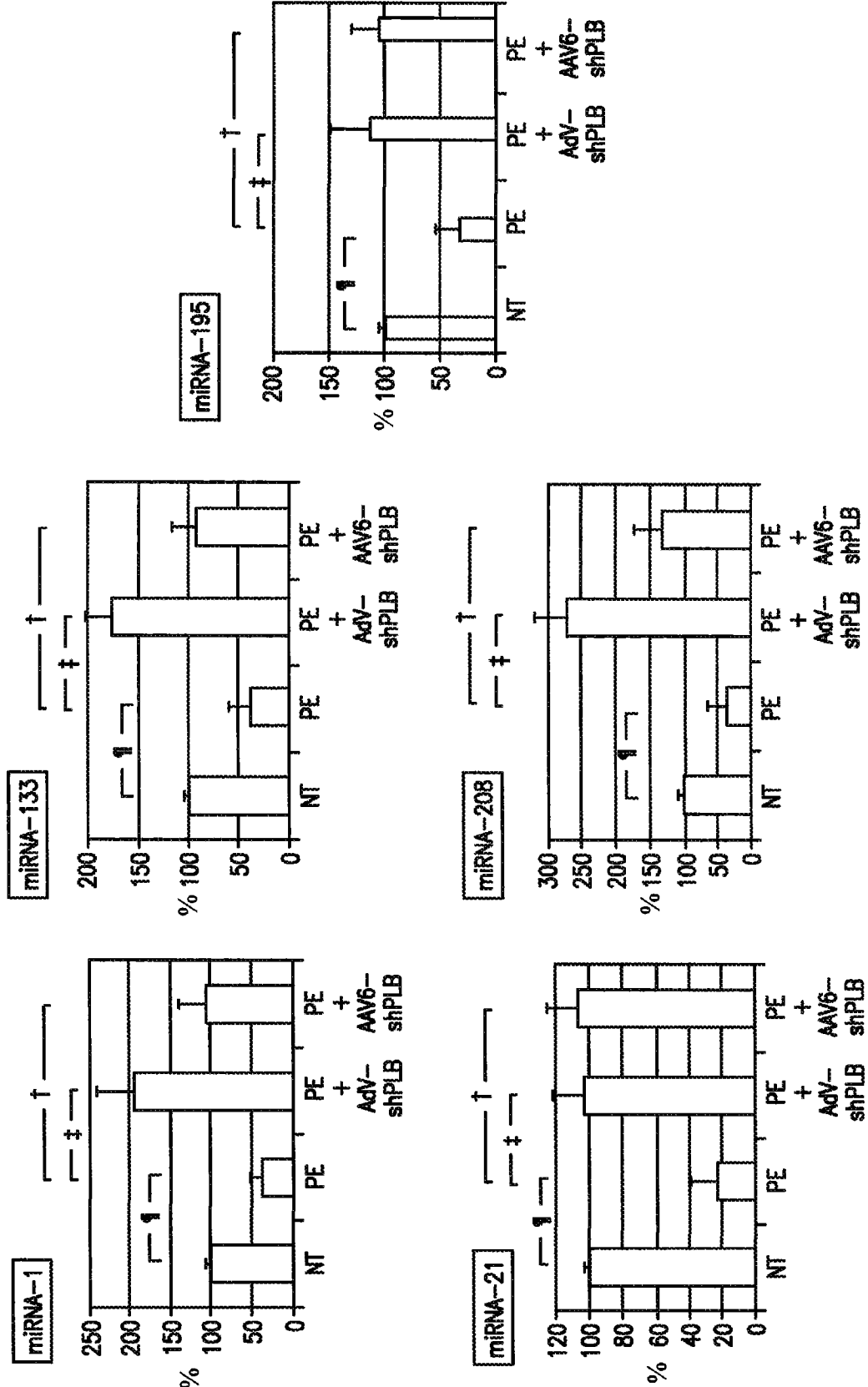


图 4A

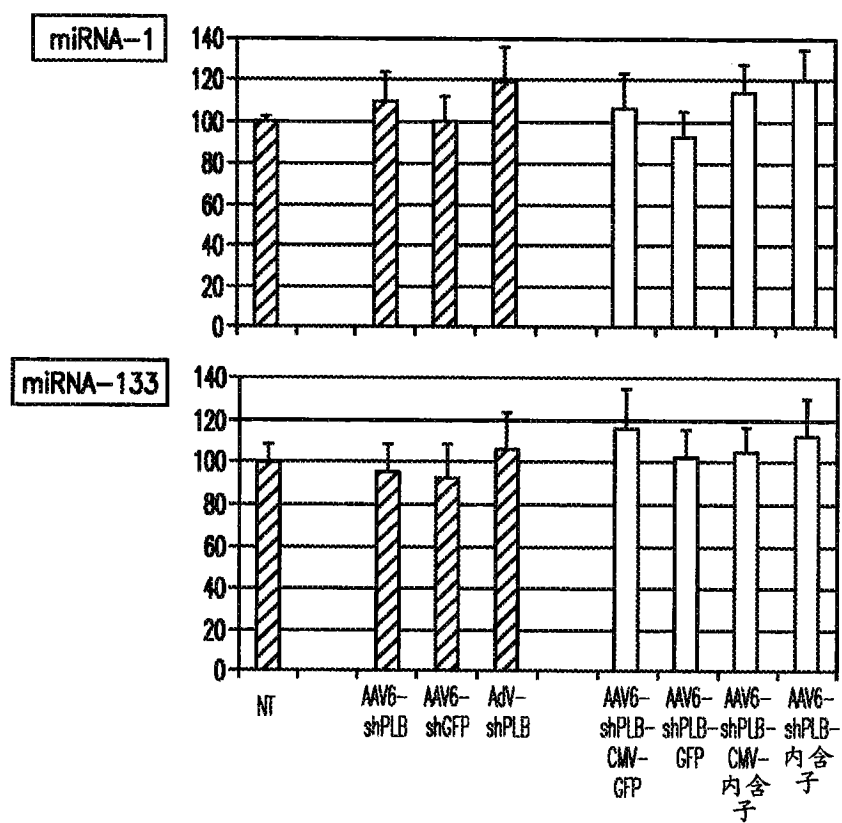
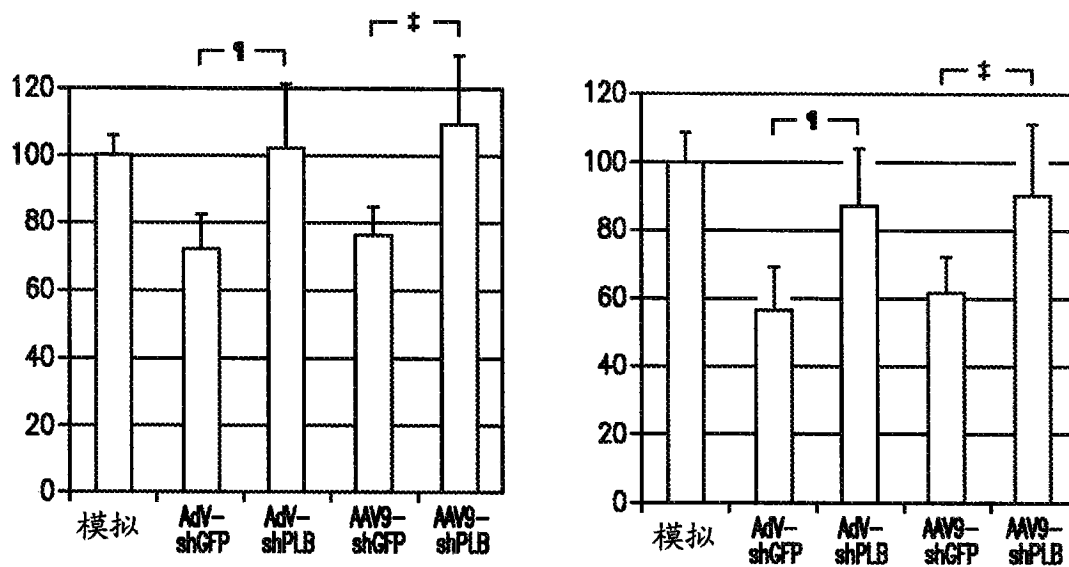


图 4B



#: 对于AAV9-shGFP比AAV9-shPLB, $p < 0.05$

#: 对于AdV-shGFP比AdV-shPLB, $p < 0.05$

图 4C

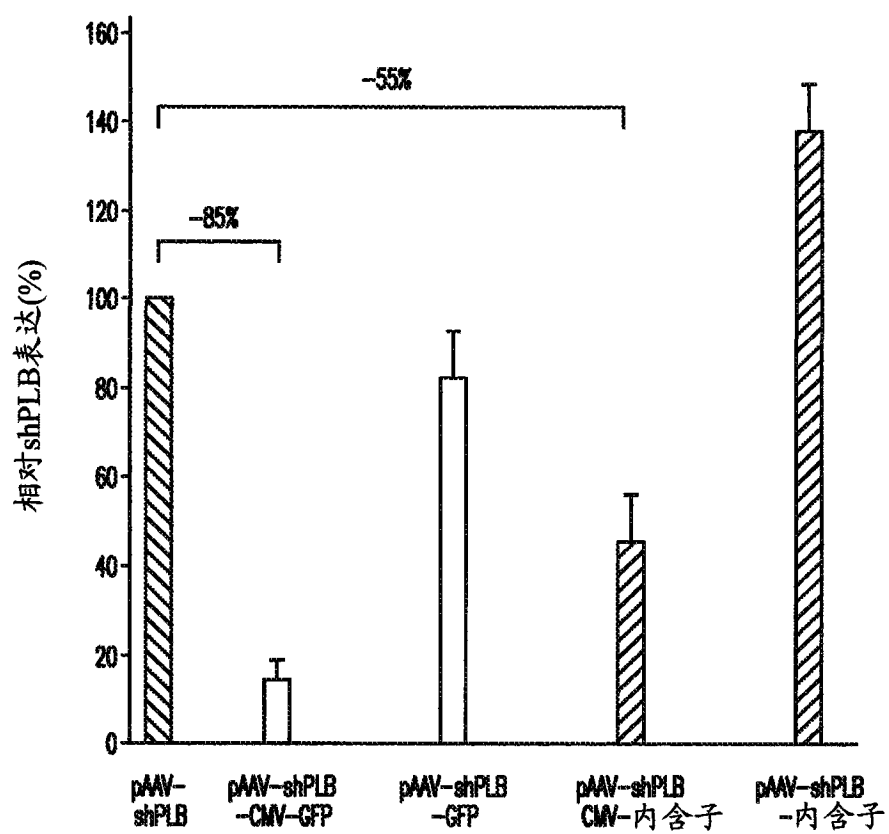


图 5A

第5天

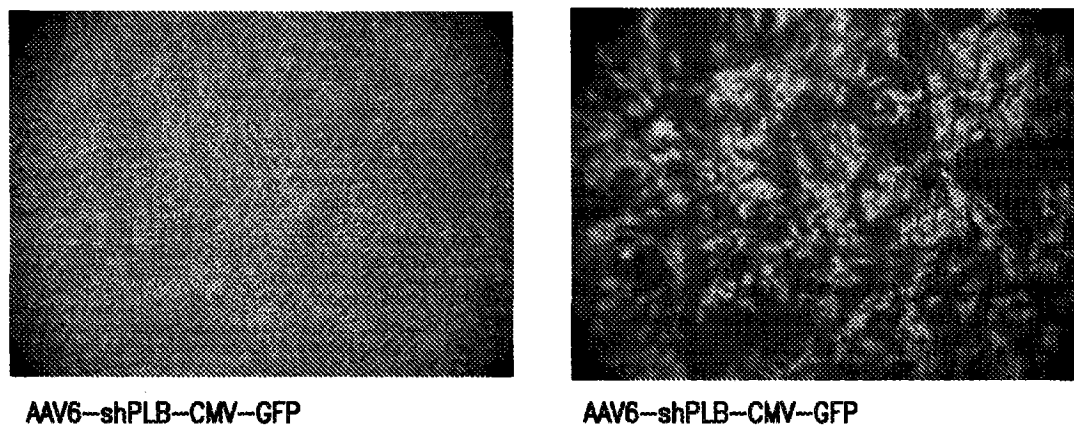


图 5B



图 5C

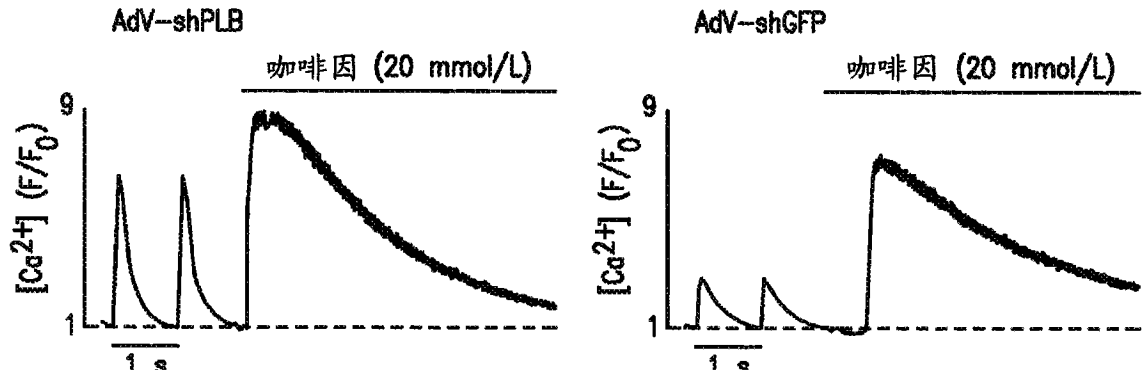


图 5D

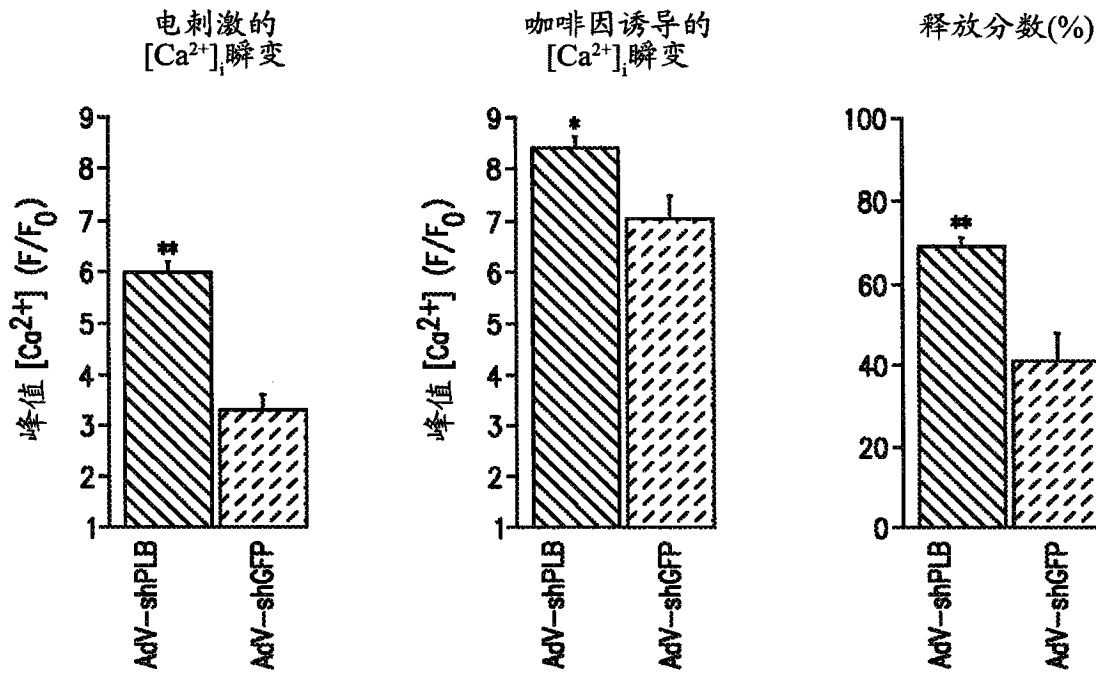


图 5E

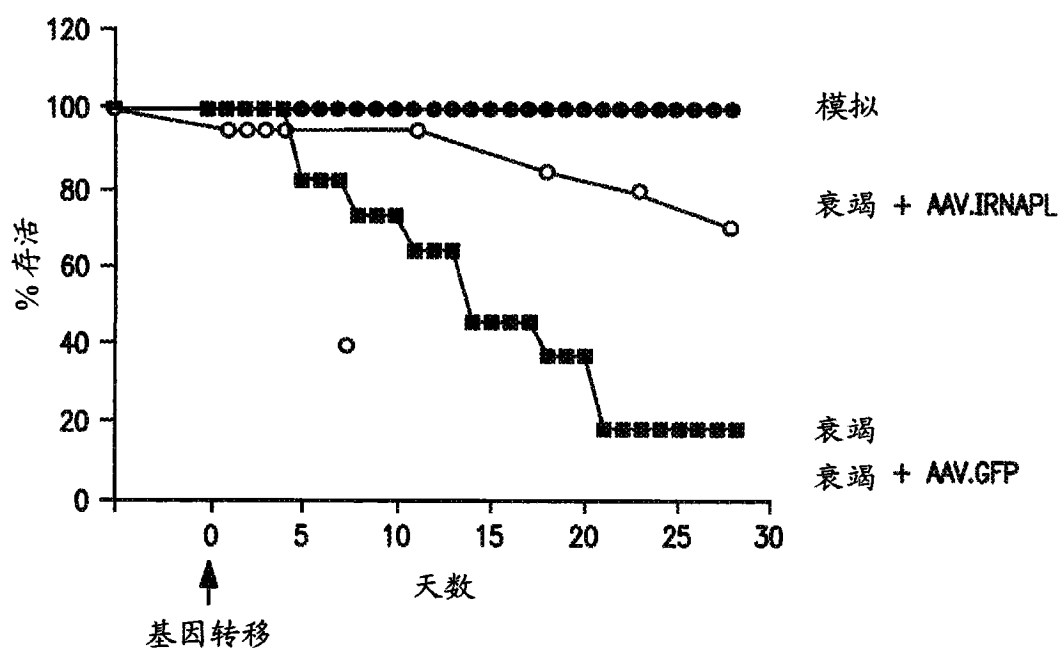


图 6

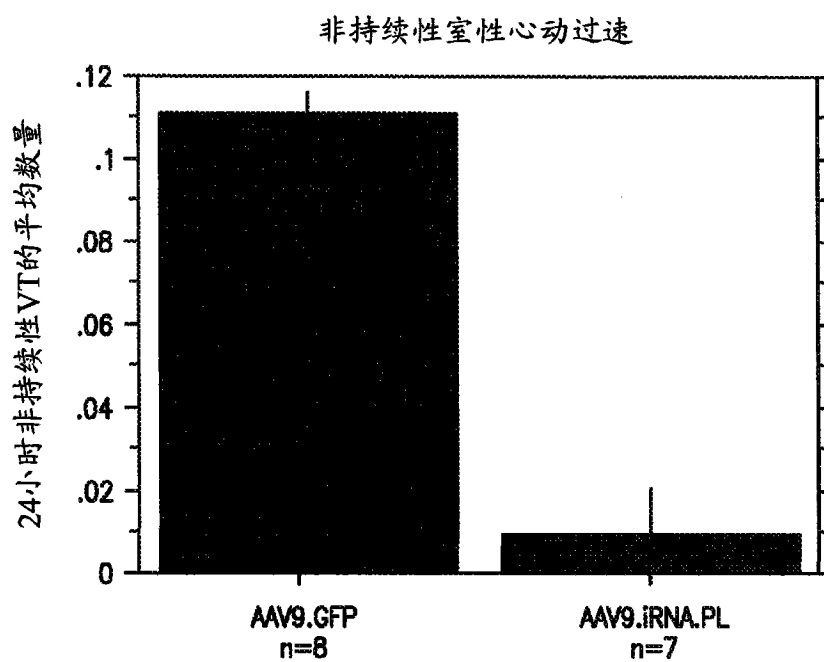


图 7

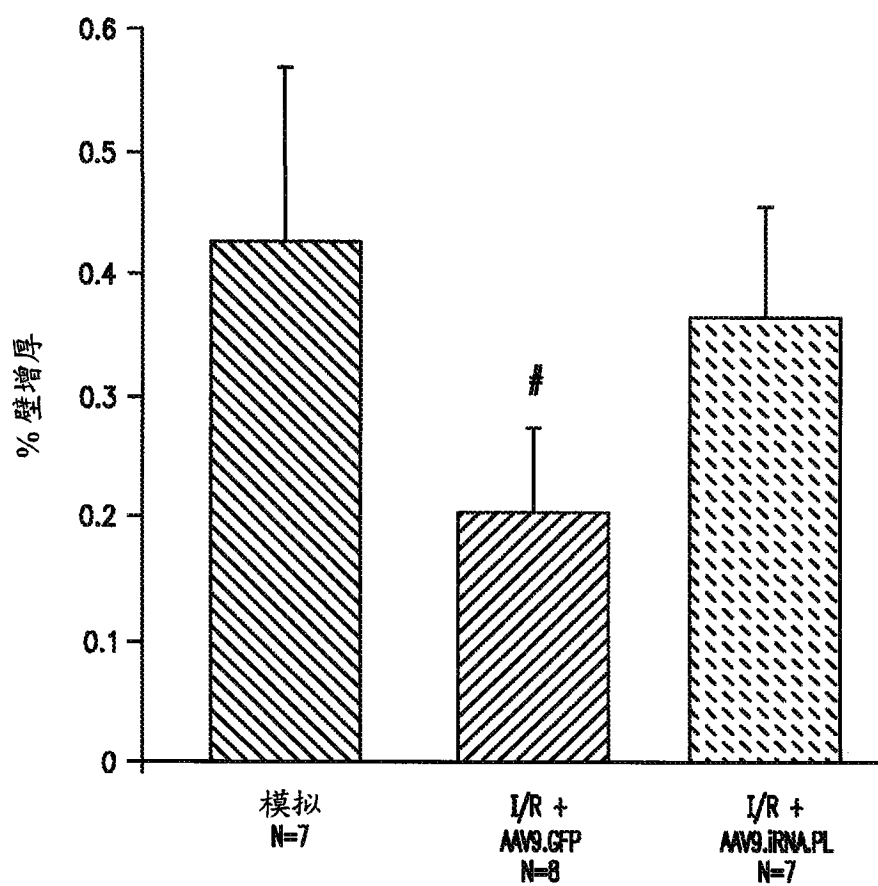


图 8