(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102573924 A
(43)申请公布日 2012.07.11

(21)申请号 201080038715.6
(22)申请日 2010.08.30
(30)优先权数据
2009-200900 2009.08.31 JP
(85)PCT申请进入国家阶段日
2012.02.29
(86)PCT申请的申请数据
PCT/JP2010/005321 2010.08.30
(87)PCT申请的公布数据
WO2011/024480 JA 2011.03.03
(71)申请人 福田惠一
地址 日本东京都
申请人 川上崇史
田边忠
(72)发明人 福田惠一 川上崇史 田边忠
(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
代理人 刘新宇 李茂家
(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
A61K 31/5585(2006.01)
A61K 35/76(2006.01)
A61K 38/22(2006.01)
A61K 38/43(2006.01)
A61P 7/02(2006.01)
A61P 9/00(2006.01)
A61P 9/08(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)

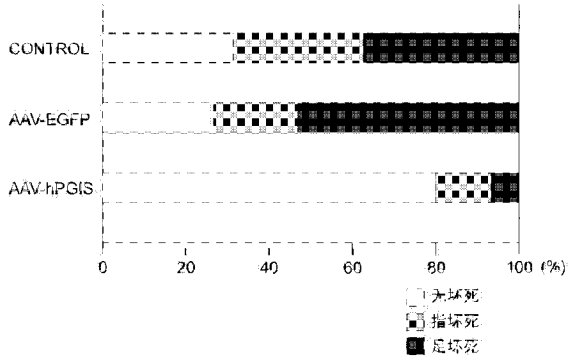
权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 4 页

(54)发明名称

血管生成疗法用医药组合物

(57)摘要

本发明涉及一种对于周围动脉疾病的治疗或预防有用的血管生成疗法用医药组合物，该医药组合物具有腺相关病毒(AAV)，腺相关病毒(AAV)含有人前列环素合成酶(hPGIS)基因，该hPGIS基因生成具有血管扩张作用和/或血小板凝集抑制作用的物质前列腺素I2(PGI2)，此外腺相关病毒(AAV)还含有编码血管生成因子的基因。通过在治疗目标部位给药该医药组合物，实现AAV type 1-hPGIS向骨骼肌内的基因导入，在骨骼肌细胞内产生显著的人PGIS基因表达，通过该基因表达而使由肌细胞产生并分泌的PGI2引起血管保护作用、血管生成诱导作用，使血管的缺血得到改善。



CN 102573924 A

1. 一种用于周围动脉疾病的治疗或预防的血管生成疗法用医药组合物，其特征在于，其含有腺相关病毒 (AAV) 作为有效成分，该腺相关病毒 (AAV) 导入了生成前列腺素 I2(PGI2) 的 PGIS 基因，前列腺素 I2(PGI2) 是具有诱导血管扩张作用、血小板凝集抑制作用、血管生成作用中的任意一种作用的物质。

2. 根据权利要求 1 所述的血管生成疗法用医药组合物，其特征在于，上述腺相关病毒 (AAV) 中还导入了编码血管生成因子的基因。

3. 一种用于周围动脉疾病的治疗或预防的血管生成疗法用医药组合物，其特征在于，其含有导入了人 PGIS 基因的腺相关病毒 (AAV) 和导入了编码血管生成因子的基因的腺相关病毒 (AAV) 作为有效成分，人 PGIS 基因生成前列腺素 I2，前列腺素 I2 是具有诱导至少血小板凝集抑制、血管扩张作用、血管生成作用中的任意一种作用的物质。

4. 根据权利要求 1 ～ 3 中任一项所述的血管生成疗法用医药组合物，其特征在于，上述腺相关病毒 (AAV) 是类型 1、2、5、8 中的任意一种。

5. 根据权利要求 1 ～ 3 中任一项所述的血管生成疗法用医药组合物，其特征在于，上述腺相关病毒 (AAV) 是类型 1 或类型 2。

6. 根据权利要求 2 或 3 所述的血管生成疗法用医药组合物，其特征在于，上述编码血管生成因子的基因是编码能够诱导新血管的形成的蛋白质、多肽、它们的一部分的基因中的任意一种。

7. 根据权利要求 6 所述的血管生成疗法用医药组合物，其特征在于，上述编码血管生成因子的基因是血管内皮生长因子 (VEGF)。

8. 根据权利要求 1 ～ 7 中任一项所述的血管生成疗法用医药组合物，其特征在于，其具有包含上述腺相关病毒 (AAV) 的医药学上可接受的载体。

血管生成疗法用医药组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及对于血管生成疗法有用的医药组合物、增强血管生成作用的增强剂。

背景技术

[0002] 在西方化的生活方式和高龄化社会的背景下，周围动脉疾病 (peripheral arterial disease ;PAD) 患者的增加逐渐显著。该 PAD 是以动脉硬化为基础的疾病，年龄、吸烟、糖尿病、高血压、脂质代谢异常等成为该 PAD 的危险因子。另外，根据美国心脏协会的报道，随着检测出 PAD 的无创性检查的普及，至 50 岁为止 PAD 的患病率为约 2 ～ 3%，75 岁以上为约 20%。另外，据说 PAD 患者中的约 40%是无症状的。

[0003] 现在，作为该 PAD 的治疗法，有 :以抗血小板剂 (anti-platelets)、血管扩张剂 (vasodiator)、前列腺素类 (prostanoid) 为中心的药物疗法、血管内支架治疗、外科性旁路术。但是，药物疗法的效果有限，血管内支架治疗和外科性旁路术是针对重病例的首选治疗，但不适于治疗的情况也多。作为对这样的现有治疗法具有排斥性的 PAD，有严重下肢缺血 (critical limbischemia ;CLI)。CLI 被定义为伴随有慢性缺血性静息痛或缺血性皮肤病变 (溃疡、坏疽) 的状态。CLI 的预后是悲观的，据报道发病 1 年后约 25%丧失下肢，约 25%死亡。

[0004] 近年来，在临床研究中，作为针对 PAD 的血管生成疗法，较多尝试了细胞疗法 (cell therapy) 和基因治疗 (gene therapy)。细胞疗法中使用了骨髓单核细胞或末梢血单核细胞。基因治疗中使用了重组血管生成因子。作为用于基因治疗的重组血管生成因子，例如，使用血管内皮生长因子 (VEGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、肝实质细胞生长因子 (HGF)。关于这些血管生成因子，通过在缺血组织表达血管生长因子，从而使血管生成增加。另外，通过使用这种血管生成因子，确认到能够促进和 / 或增进心肌和下肢缺血症的动物模型中的侧支循环 (collateralcirculation) 的发达 (Circulation 90, II-228-II-234(1994)。

[0005] 将使用上述那样的血管生成因子来治疗血管障碍的治疗法称为“血管生成疗法”。特别是，最近正在利用如上所述的血管生成因子的基因积极研究针对缺血性疾病或动脉疾病的血管生成疗法。

[0006] 另外，作为用于血管生成疗法的医药组合物，有记载于国际公开第 2002/000258 号公报 (专利文献 1) 中的医药组合物。专利文献 1 中记载的医药组合物是含有 HGF 基因或 VEGF 基因与前列环素合成酶基因作为有效成分的血管生成疗法用医药组合物。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献 1 :国际公开第 2002/000258 号

发明内容

[0010] 发明要解决的问题

[0011] 然而，使用上述那样的血管生成因子的治疗法并不是对于 PAD 的全部病例有效，而且长期的有效性和有害事项也不明。特别是，关于使用了生长因子的基因治疗，不能否定肿瘤发生和增大的风险。因此，期望开发出能够解决上述问题的新型治疗法。

[0012] 在 PAD 的病状中，已知血管内皮受到损伤，作为血管扩张因子 (vasodilator) 的一氧化氮 (nitric oxide)、前列腺素 (prostaglandin)、内皮细胞依赖性超极化因子 (endothelium-derived hyperpolarizing factor ;EDHF)、血管内皮生长因子 (VEGF) 等减少，作为血管收缩因子 (vasoconstrictor) 的血管紧张素 (angiotensin)-2、内皮素 (endothelin)-1 等增加。这些血管因子对于 PAD 的治疗有用的可能性高。实际上，对于 PAD、肺动脉高血压症 (Pulmonary arterial hypertension)，正在临床使用前列腺素类 (Prostanoid)。

[0013] 因此，在这些之中，本申请发明人等着眼于具有血小板凝集抑制、血管扩张、血管生成作用的前列腺素 (Prostaglandin)I2 的合成酶即前列环素合成酶 (PGIS)。

[0014] PGIS 是生物合成据报道在实验上在肺动脉高压或颈动脉内皮伤害模型中具有高有效性的治疗药的基因，作为代谢产物的 PGI2 具有诱导血小板凝集抑制、血管扩张作用、血管生成作用的作用。基因治疗由于在病变局部引起长期的基因表达，因此经常存在产生物质 (products) 所致的有害事项的发生的问题。在临床研究中使用的生长因子中，具有肿瘤发生、发展等风险，但迄今为止在临床例中并没有 PGI2 治疗药导致的肿瘤发生等的报道，并且 PGI2 是血管扩张和血管保护因子，因而安全性明显较高。同样地，作为可比较长期地得到安全且有效的基因表达的载体，可知腺相关病毒 (adeno-associated virus ;AAV) 载体是最适合的。

[0015] 在上述严重下肢缺血的临床研究中使用了质粒或腺病毒等，但质粒难以得到强力且长期的基因表达，需要多次的给药。另外，腺病毒虽然可以得到强力的基因表达，但效果期间短且病原性强，是安全方面令人担忧的载体。以往，病毒载体具有高基因导入效率，但就对人的病原性等在用于人体时存在许多争议。但是，AAV 载体在肌细胞和神经细胞等非分裂细胞中能够以高效率实现长期的基因表达，并且对人是非病原性的，因而为受到瞩目的载体。

[0016] 因此，本申请发明人等使用 AAV 作为载体，向小鼠的骨骼肌中基因导入合成前列腺素 I2(PGI2) 的人前列环素合成酶基因 (PGIS 基因)，由此确认到肺动脉高血压症小鼠的改善例。该实验时，在进行了基因导入的小鼠的局部骨骼肌内确认到强力的 PGIS 基因的表达。由该实验可知，在下肢缺血治疗中能够充分期待 PGIS 基因的导入。

[0017] 另外，通常对于基因治疗而言，不仅是治疗基因的选择，基因导入时使用的载体也对基因导入效率、即治疗效果产生很大影响。

[0018] 关于基因治疗中使用的载体，期望尽可能地在病变部的治疗基因的表达高、并且长期持续。但是，在过去的基因治疗研究中大多使用了质粒 (plasmid) 或非病毒性载体 (non viralvector)，难以得到强力且长期的治疗基因的表达。

[0019] 然而，若为作为病毒性载体的腺相关病毒 (adeno-associatedvirus ;AAV)，则对于骨骼肌细胞具有强亲和性 (tropism)，因此能够实现强力且长期的治疗基因表达。该腺相关病毒 (AAV) 还用于人的血友病 (hemophilia)、囊性纤维化 (cystic fibrosis)、帕金森病 (Parkinson disease) 的基因治疗，被证明具有高安全性和有效性。通过使用对于骨骼

肌能够实现强力且长期的基因表达效率的腺相关病毒，可以得到治疗基因的长期表达，能够期待在人的临床应用的可能性。

[0020] 本申请发明人等基于上述见解完成了本发明。

[0021] 用于解决问题的方案

[0022] 本发明涉及一种用于周围动脉疾病的治疗或预防的血管生成疗法用医药组合物，其含有腺相关病毒 (AAV) 作为有效成分，该腺相关病毒 (AAV) 导入了生成前列腺素 I2 的人 PGIS 基因，前列腺素 I2 是具有诱导至少血小板凝集抑制、血管扩张作用、血管生成作用中的任意一种作用的物质。

[0023] 本发明涉及一种血管生成疗法用医药组合物，其特征在于，腺相关病毒 (AAV) 中还导入了编码血管生成因子的基因。

[0024] 另外，本发明涉及一种用于周围动脉疾病的治疗或预防的血管生成疗法用医药组合物，其含有导入了人 PGIS 基因的腺相关病毒 (AAV) 和导入了编码血管生成因子的基因的腺相关病毒 (AAV) 作为有效成分，人 PGIS 基因生成前列腺素 I2，前列腺素 I2 是具有诱导至少血小板凝集抑制、血管扩张作用、血管生成作用中的任意一种作用的物质。

[0025] 这里，作为腺相关病毒，使用类型 (type)1 或类型 (type)2 是有效的。

[0026] 本发明的血管生成疗法用医药组合物具有包含腺相关病毒的医药学上可接受的载体，该腺相关病毒导入了人前列环素合成酶基因、或人前列环素合成酶基因与编码血管生成因子的基因。

[0027] 本发明的血管生成疗法用医药组合物中使用的编码血管生成因子的基因可以使用编码能够诱导新血管的形成的蛋白质、多肽、它们的一部分的基因中的任意一种。

[0028] 特别是，作为编码血管生成因子的基因，期望为血管内皮生长因子基因。

[0029] 如上所述，本发明提供一种对于周围动脉疾病的治疗或预防有用的血管生成疗法用医药组合物，该血管生成疗法用医药组合物具有腺相关病毒 (AAV)，腺相关病毒 (AAV) 含有人前列环素合成酶 (hPGIS) 基因，该 hPGIS 基因生成前列腺素 I2(PGI2)，前列腺素 I2(PGI2) 是具有血管扩张作用和 / 或血小板凝集抑制作用的物质，此外腺相关病毒 (AAV) 还含有编码血管生成因子的基因。

[0030] 这里在血管生成疗法中使用的、腺相关病毒 (AAV) 中含有的“编码血管生成因子的基因”包括编码具有诱导与 hPGIS 基因同样的血小板凝集抑制、血管扩张作用、血管生成作用中的任意一种作用、且能够诱导新血管的形成的蛋白质、多肽、或它们的一部分的基因。具体而言，可列举出编码血管内皮生长因子 (VEGF)、VEGF-2、酸性 FGF(aFGF)、碱性 FGF(bFGF)、FGF-4、EGF、TGF-α、TGF-β、血小板源性内皮细胞生长因子 (PD-ECGF)、血小板源性生长因子 (PDGF)、肿瘤坏死因子 -α (TNF-α)、胰岛素样生长因子、血管生成素 -1 等的基因。另外，还可列举出编码控制 VEGF 等的基因表达的 HIF-1、或者包含 ets-1 的 ets 家族等转录因子的基因。优选可列举出 VEGF 基因。这些基因的基因序列注册在公共的数据库中，本领域技术人员可以通过利用这些基因序列而容易地克隆上述的基因。

[0031] 以下，以 VEGF 基因为例进行说明。本发明中，“VEGF 基因”是指编码 VEGF 蛋白质的基因。另外，有时将为了能够表达该 VEGF 基因而重组到表达质粒中的基因简称为“VEGF 基因”。具体而言，可例示出将 VEGF 的 cDNA 作为表达载体重组到后述的病毒载体中的基因。据报道，VEGF 基因在人中通过转录时的选择性剪切而存在四种亚型 (VEGF121、VEGF165、

VEGF189、VEGF206)(Science,219,983(1983)、J.Clin.Invest.,84,1470(1989)、Biochem.Biophys.Res.Commun.,161,851(1989))。本发明中,能够使用这些基因中的任意一种 VEGF 基因,但从生物学活性最强的观点出发,更优选 VEGF165 基因。此外,即使是对这些 VEGF 的基因实施了突变等的基因,只要是编码具有血管生成作用的蛋白质的基因,则也包含在本发明的 VEGF 基因的范畴内。

[0032] 本领域技术人员可以根据文献(例如 Science,246,1306(1989))中记载的序列和数据库中注册的序列信息,容易地对该 VEGF 基因进行克隆,另外还能够容易地对其进行突变等。

[0033] 关于以上的 VEGF 基因、或者编码它们的突变体的基因具有血管生成作用,例如能够在体外调查对于国际公开第 97/07824 号公报中记载的血管内皮细胞的增殖效果。

[0034] 编码以上的血管生成因子的基因在本发明的血管生成疗法中可以单独使用,或者也可以多种组合使用。

[0035] 这里,由 hPGIS 合成的 PGI2 如上所述具有血管扩张作用、血管通透性增加作用、血小板凝集抑制作用。并且,通过合用该 PGI2 和编码血管生成因子的基因,可以得到更显著的合用效果。

[0036] 另外,本发明中,作为“具有血管扩张作用的物质”,使用 PGI2,更优选使用 PGI2 衍生物。另外,还使用 PGI2 作为“具有血小板凝集抑制作用的物质”,更优选使用 PGI2 衍生物。

[0037] 本发明中,“生成具有血管扩张作用和/或血小板凝集抑制作用的物质的物质”是指合成、产生或诱导具有血管扩张作用和/或血小板凝集抑制作用的 PGI2 的物质。具体而言,指合成、产生或诱导使前列腺素上升的物质的物质。该物质可以是基因、蛋白质、低分子化合物等中的任意一种物质,作为合成 PGI2 的合成酶的物质,使用 PGIS 基因。PGIS 基因的基因序列注册在公共的数据库中,本领域技术人员可以通过利用这些基因序列而容易地进行克隆。

[0038] 以下,以 hPGIS 基因为例进行说明。本发明中,“PGIS 基因”是指编码 PGIS 蛋白质的基因。另外,有时将为了能够表达 PGIS 基因而重组到表达质粒中的基因简称为“PGIS 基因”。具体而言,可例示出 B.B.R.C,Vol.200,No.3,p1728-1734(1994) 和国际公开第 95/30013 号公报中记载的将 PGIS 的 cDNA 重组到适当的表达载体中而成的基因。此外,与上述 VEGF 基因的情况同样地,即使是对这些 PGIS 的基因实施了突变等的基因,只要是编码具有作为 PGIS 的作用的蛋白质的基因,则也包含在本发明的 PGIS 基因的范畴内。

[0039] 对于该 PGIS 基因,也与 VEGF 基因同样地,本领域技术人员可以根据上述文献中记载的序列和数据库中注册的序列信息,容易地对该 PGIS 基因进行克隆,另外还能够容易地对其进行突变等。对于由该基因编码的蛋白质具有所期望的 PGIS 活性,例如,可以通过使用了 6-酮前列腺素 F1α 酶免疫检测试剂盒 (Cayman 公司制造、目录编号 #515211) 的酶免疫测定、或利用薄层色谱法 (TLC) 检测前列环素合成酶的代谢产物的方法等进行测定。

[0040] 以上的具有血管扩张作用和/或血小板凝集抑制作用的物质 PGI2、或者生成 PGI2 的物质在使用了血管生成因子的基因的血管生成疗法中可以单独使用,或者也可以多种组合使用。

[0041] 以下,记载本发明的血管生成疗法用医药组合物的导入方法、导入形态和导入量

等。

[0042] 1) 使用具有血管扩张作用和 / 或血小板凝集抑制作用的 PGI2、及生成该物质的 PGIS 基因和编码血管生成因子的基因时，合用编码血管生成因子的基因和上述的 PGIS 基因时，即合用 2 种以上的基因时，需要全都采用基因治疗剂的形态。具体而言，可列举出 VEGF 基因和 PGIS 基因的组合。

[0043] 对患者给药该基因治疗剂时，作为其给药形态，可列举出使用病毒载体的例子，实验指南书等上详细解说了其制备法、给药法（附册实验医学，基因治疗的基础技术，羊土社，1996、附册实验医学，基因导入和表达分析实验法，羊土社，1997、日本基因治疗学会编基因治疗开发研究手册、N・T・S、1999）。以下，进行具体说明。

[0044] 另外，本发明中，通过将目标基因导入到腺相关病毒 (AAV) 中，将导入了该基因的腺相关病毒 (AAV) 作为载体，使重组病毒感染靶细胞，由此能够将基因导入靶细胞内。这里，作为腺相关病毒 (AAV)，可以使用类型 (type)1、2、5、8 中的任意一种，希望使用类型 (type)1 或类型 (type)2。

[0045] 本发明中，为了向目标病变部位等基因导入部位导入基因，使用腺相关病毒 (AAV) 载体。这是因为，腺相关病毒 (AAV) 能够在肌细胞、神经细胞、肝细胞等非分裂细胞中高效地进行基因导入，因而在将这样的细胞作为靶细胞时，能够长时间持续基因表达。

[0046] 另外，本发明的基因治疗剂构成血管生成疗法用医药组合物，在腺相关病毒 (AAV) 中，希望使用能够在肌细胞、神经细胞、肝细胞等非分裂细胞中高效地进行基因导入的类型 (type)1 或类型 (type)2。

[0047] 另外，作为本发明的基因治疗剂对患者的导入法，有下述方法 ：将基因治疗剂直接导入体内的体内 (in vivo) 法 ；和，从人体中取出某种细胞并在体外将基因治疗剂导入该细胞中，然后使该细胞返回体内的回体 (ex vivo) 法（日経サイエンス，1994 年 4 月号，20-45 页、月刊药事，36(1)，23-48，1994、实验医学增刊，12(15)，1994、日本基因治疗学会编基因治疗开发研究手册，N・T・S，1999）。本发明中，优选体内法。利用体内法给药时，可以通过与治疗目标疾病、目标脏器等对应的适当的给药途径进行给药。例如，可以对静脉、动脉、皮下、皮内、肌肉内等进行给药，或者可以对确认病变的组织本身进行直接局部给药。

[0048] 作为制剂形态，可以采用与上述各给药形态对应的各种制剂形态，例如可以采用液剂等。例如，在制成含有有效成分基因的注射剂时，该注射剂可以通过常规方法制备，例如溶解于适当的溶剂 (PBS 等缓冲液、生理盐水、灭菌水等）中后，根据需要用过滤器等进行过滤灭菌，接着填充到无菌的容器中，从而能够制备该注射剂。也可以根据需要在该注射剂中加入惯用的载体等。另外，在 HVJ- 脂质体等脂质体中，可以制成悬浮剂、冷冻剂、离心分离浓缩冷冻剂等脂质体制剂的形态。

[0049] 另外，为了使疾病部位的周围容易存在基因，还可以制备缓释性的制剂（微型颗粒制剂等）并埋入患部附近，或者也可以使用渗透泵等连续且缓慢地给药到患部。

[0050] 需要说明的是，制剂中的基因的含量可以根据治疗目标疾病、患者的年龄、体重等适当调节，通常，作为各基因，为 0.0001-100mg、优选为 0.001-10mg，优选几天或几个月一次将其进行给药。

[0051] 2) 使用具有血管扩张作用和 / 或血小板凝集抑制作用的 PGI2、及生成该物质的 PGIS 基因和编码血管生成因子的基因的情况。

[0052] 合用编码血管生成因子的基因和低分子化合物或蛋白质、肽等时，关于编码血管生成因子的基因，采用上述的基因治疗剂的形态。另一方的低分子化合物等采用一般的医药组合物的形态，以经口或非经口的方式给药。作为代表性的组合，可列举出 VEGF 基因和 PGI2 衍生物的组合等。

[0053] 以下，对将上述低分子化合物或蛋白质等作为有效成分的医药组合物进行说明。

[0054] 上述低分子化合物或蛋白质中，只要是已经作为血管扩张剂或血小板凝集抑制剂（抗血小板剂）市售的物质，则能够根据其药物说明书设定给药方法和给药量等，通常可列举出以下的给药形态、给药方法。

[0055] 即，口服给药时，可以利用通常该领域中使用的给药形态进行给药。非口服给药时，可以利用局部给药剂（经皮剂等）、直肠给药剂、注射剂、经鼻剂等给药形态进行给药。

[0056] 作为口服剂或直肠给药剂，可列举出例如胶囊、片剂、丸剂、散剂、糖球、栓剂、液剂等。作为注射剂，可列举出例如无菌的溶液或悬浮液、乳剂等，具体而言，可列举出水、水 - 丙二醇溶液、缓冲液、0.4％的生理盐水等。作为局部给药剂，可列举出例如膏、软膏、洗剂、经皮剂等。

[0057] 以上剂型可以通过通常该领域中进行的方法与药学上可接受的赋形剂、添加剂一起制剂化。作为药学上可接受的赋形剂、添加剂，可列举出载体、结合剂、香料、缓冲剂、增稠剂、着色剂、稳定剂、乳化剂、分散剂、悬浮化剂、防腐剂、pH 调节剂、张力调节剂 (tonicity adjusting agent)、浸润剂等。另外，作为药学上可接受的载体，可列举出例如碳酸镁、乳糖、果胶、淀粉、甲基纤维素等。

[0058] 这样的医药组合物可以通过对应于治疗目标疾病、目标脏器等的适当的给药途径进行给药。例如，可以对静脉、动脉、皮下、皮内、肌肉内等进行给药，或者可以对确认病变的组织本身进行直接局部给药。另外，还可以为口服给药或作为栓剂的给药。给药量、给药次数根据症状、年龄、体重、给药形态等而异，通常对于成人而言，可以每天将约 0.0001 ～约 500mg 的范围、优选为约 0.001 ～约 100mg 的范围以一次或分多次进行给药。

[0059] 将以上的低分子化合物或蛋白质作为有效成分的医药组合物只要与含有编码血管生成因子的基因的基因治疗剂同时给药，则也可以设置时间间隔来分别给药。

[0060] 发明的效果

[0061] 以上，对本发明的血管生成疗法用医药组合物进行了说明，该医药组合物被有效地用于需要血管生成疗法的周围动脉疾病的治疗或预防中。

附图说明

[0062] 图 1 示出通过激光多普勒血流测定法和光学照相机对 AAV-hPGIS 给药组、对照 (CONTROL) 组、AAV-EGFP 给药组的缺血性肢体的灌注状态进行拍摄的图像。

[0063] 图 2 是定量分析 (n = 12) 并示出将 AAV-hPGIS 给药组、对照 (CONTROL) 组、AAV-EGFP 给药组的缺血性肢体与未发症的非缺血性肢体（右脚）比较时的缺血性肢体（左脚）的血流量灌注速度的图。

[0064] 图 3 是比较并示出 AAV-hPGIS 给药组、对照 (CONTROL) 组、AAV-EGFP 给药组的坏死的改善状况的图。

[0065] 图 4 是示出在 AAV-hPGIS 给药组、对照 (CONTROL) 组、AAV-EGFP 给药组中使用了

基于定量 RT-PCR 法和蛋白质印迹法的分析的 hPGIS 的表达状况的图，(A) 为示出从外部向骨骼肌给药 hPGIS 并对 PGIS 的表达状况进行定量 RT-PCR 分析 (n ＝ 5) 的图，(B) 为示出对小鼠体内的大腿肌肉给药 hPGIS 并对 PGIS 的表达状况进行定量 RT-PCR 分析 (n ＝) 的图，(C)、(D)、(E) 为示出对小鼠的大腿肌肉分别给药 VEGF、FLK-1、FLT 时的表达状况进行定量 RT-PCR 分析 (n ＝ 5) 的图。

[0066] 图 5 是示出 AAV-hPGIS 给药组、对照 (CONTROL) 组、AAV-EGFP 给药组的利用蛋白质印迹法的分析结果的图。

[0067] 图 6 是示出对 AAV-hPGIS 给药组、对照 (CONTROL) 组、AAV-EGFP 给药组分别给药 AAV type 1-hPGIS 载体时的左大腿肌肉内的 hPGIS 的表达状态的显微镜照片，A 是示出利用免疫组织化学染色法进行了染色的状态的显微镜照片，B 是示出对各组的左大腿肌肉内的血管性血友病因子 (vWF) 进行了染色的状态的代表模型的显微镜照片，C 是示出关于 vWF 的进行了免疫荧光染色的左大腿肌肉内的微血管密度的定量分析的图。

具体实施方式

[0068] 以下，通过实施例对本发明进行具体说明，但本发明不受这些实施例的任何限定。

[0069] 质粒和腺相关病毒 (AAV) 载体的构筑

[0070] 对人 PGIS 表达载体的构筑法进行简单说明：将全长人 PGIS 的 cDNA 的限制性内切酶 HindIII/BamHI 片段平滑化，所得到的片段与 pUC-CAGGS 表达质粒的用 XhoI 消化并平滑化的部位连接。为了确认该 pUC/PGIS 构筑物编码生物学活性的 PGIS 蛋白质，将 pUC/PGIS 载体转染到 NIH3T3 细胞中，测定 [14C]-PGH2 向 6- 酮 -[14C]-PGF1α 的变换。使用未插入的 pUC-CAGGS 载体作为对照载体。接着，将人 PGIS 基因插入到 AAV-CAG 质粒中，构筑 AAV-hPGIS 载体。另外，制作用于对象实验的高活性绿色荧光蛋白 (enhancd green fluorescent protein；AAV-EGFP)。

[0071] 小鼠后肢缺血模型

[0072] 准备周龄的雄性 BALB/c 裸小鼠 (日本 CLEA 制) 或雄性 C57/BL6(8 周龄)，将该裸小鼠置于二乙醚麻醉下，将皮肤切开至位于左后肢的中心部的大腿动脉。缓慢地分离大腿动脉，用 7-0 结扎丝线对动脉的近端部分进行结扎。所使用的动物实验方法和计划书被庆应义塾大学医学部的关于动物爱护和使用的委员会调查承认，它们依据的关于实验动物爱护和使用的 NIH 准则。

[0073] 实验

[0074] 将所准备的小鼠分成 AAV-hPGIS 给药组、对照 (CONTROL) 组、AAV-EGFP 给药组这 3 组。这里，在 AAV-hPGIS 给药组中，对左大腿肌给药在类型 1 的腺相关病毒 (AAV type1) 中导入了生成前列腺素 I2(PGI2) 的 hPGIS 基因而成的腺相关病毒 (AAV type1-hPGIS) 载体 (1.0×10^{11}(v.g./body))。在对照 (CONTROL) 组中，对左大腿肌给药介质 (0.9％生理盐水)。在作为阴性对照的 AAV-EGFP 给药组中，对左大腿肌给药 AAV type1-EGFP 载体 (1.0×10^{11}(v.g./body))。基因导入 1 周后，对小鼠的左大腿动脉进行结扎，制作后肢缺血。结扎 2 周后评价后肢坏死的发生。利用激光多普勒灌注成像 (LDPI) 系统测定小鼠的血液灌注率。上述小鼠的左大腿肌被摘除，用于之后的分析。

[0075] 另外，为了调查人 PGIS mRNA 的表达的持续性，对于 AAV-hPGIS 给药组、对照

(CONTROL) 组、AAV-EGFP 给药组的各组，向 4 或 5 只的 C57/BL6(8 周龄) 的左大腿肌给药 AAV type1-hPGIS 载体 (1.0×10^{11}(v.g./body))。

[0076] 激光多普勒灌注分析

[0077] 使上述的 AAV-hPGIS 给药组、对照 (CONTROL) 组、AAV-EGFP 给药组这 3 组的各小鼠的后肢的左脚 (L) 缺血，右脚 (R) 正常，利用激光多普勒灌注成像 (LDPI) 系统 (商品名 : ムーア LDPI、美国・ムーア・インスツルメンツ公司制) 测定上述小鼠的后肢的激光多普勒灌注率。该测定通过利用 LDPI 系统对各组小鼠的缺血性肢体的灌注状态进行拍摄来进行。该结果示于图 1。

[0078] 另外，图 1 中，与利用 LDPI 系统拍摄的图像 (LDP) 对应地示出利用光学照相机对各组小鼠的缺血性肢体的灌注状态进行拍摄的图像 (Macro)。

[0079] 图 1 中，利用激光多普勒血流测定法拍摄的图像是彩色图像，与该彩色图像对应地，表示灌注状态的指标由彩色表示。从左侧向右侧，该指标的着色由藏青色变化为红色。指标左侧的着色 (藏青色) 所表示的区间为低灌注或全无灌注的区间，右侧的着色 (红至白的部分) 所表示的区间表示最高的灌注区间。

[0080] 另外，图 2 中，示出进行了与 AAV-hPGIS 给药组、对照 (CONTROL) 组、AAV-EGFP 给药组中的非缺血对照肢即右脚比较的、缺血性肢体即左脚的血液灌注速度的定量分析 (n = 12) 的结果。

[0081] 图 2 中，数据为平均值 ±SD，*P < .05 ;ns 表示无显著性差异。

[0082] 定量 RT-PCR

[0083] 实施 RNA 的提取和定量 RT-PCR。定量 RT-PCR 中，作为 TaqMan 指标物质 (Applied Biosystems)，与 hPGIS(Hs00168766-m1)、小鼠 PGIS(Mm00447271-m1)、小鼠 VEGF(Mm01281449_m1)、FLK-1(Mm0122219-m1)、FLT-1(Mm00438971-m1)) 和啮齿类 GAPDH 比较并标准化，mRNA 水平与 GAPDH mRNA 比较并标准化。其结果示于图 4。图 4 中，数据为平均值 ±SD，*P < .05 ;ns 表示无显著性差异。

[0084] 蛋白质印迹分析

[0085] 骨骼肌的膜组分通过在冰冷的缓冲液中将大腿肌均质化而制备。关于免疫学检测，对从人得到的膜组分提取物进行检测。其结果示于图 5。

[0086] 组织学分析

[0087] 用 10％福尔马林固定试样，包埋在石蜡中，切断成 4μm 的切片。所切断的切片用苏木精和曙红染色。另外，大腿肌用抗 hPGIS 抗体染色。该染色结果示于图 6。由图 6 可知，在给药了 AAV-hPGIS 载体的 AAV-hPGIS 给药组中，hPGIS mRNA 在导入肌中显著表达，有助于血管生成。

[0088] 另外，图 6 中，(A) 是示出对 AAV-hPGIS 给药组、对照 (CONTROL) 组、AAV-EGFP 给药组分别给药 AAV type 1-hPGIS 载体时的左大腿肌肉内的 hPGIS 的表达状态的显微镜照片，A 是示出利用免疫组织化学染色法进行了染色的状态的显微镜照片，(B) 是示出对各组的左大腿肌肉内的血管性血友病因子 (vWF) 进行了染色的状态的代表模型的显微镜照片，(C) 是示出关于 vWF 的进行了免疫荧光染色的左大腿肌肉内的微血管密度的定量分析结果的图。图 6 的 (C) 的数据中，平均值 ±SD.*P < .05 ;ns 表示无显著性差异。

[0089] 微细血管的密度

[0090] 在麻醉下杀死动物，利用 4％多聚甲醛进行灌注固定。大腿肌被摘除，包埋在 OTC 混合物中。从组织试样中切出冷冻切片 (7μm)。利用抗血管性血友病因子 (vWF) 抗体 (DAKO) 进行血管内皮细胞的免疫荧光染色。核用 TOTO-3(Molecular Probes) 染色。微细血管的密度由 vWF 阳性细胞的数量计算。全部的共聚焦显微镜利用 LSM510 META(Carl Zeiss，Jena，Germany) 进行。毛细血管密度为由 Image J 软件测定的毛细血管的总面积相对于骨骼肌的总面积的比例。各小鼠的数据由 30 个连续切片计算。

[0091] 统计分析

[0092] 全部数据用平均值 ± 标准偏差值表示。统计学的显著性使用未配对学生 t 检验进行评价。通过方差分析进行 3 组以上的比较。P ＜ .05 视为显著。

[0093] [实验结果]

[0094] AAV type 1-hPGIS 载体给药后的表达持续

[0095] 本申请发明人等利用 8 周龄的对照小鼠 (C57/BL6) 调查了 AAV type 1-hPGIS 载体的效果持续期间。向小鼠的左大腿肌给药 AAV type 1-hPGIS 载体，在分析中，使用载体给药前、给药 2 周后、4 周后、8 周后、12 周后的左大腿肌。其结果，通过定量 RT-PCR 从给药 2 周后确认到人 PGIS mRNA 的强力表达，即使在 12 周后强力的表达也持续。其结果示于表 1。

[0096] 由表 1 所示的结果可知，骨骼肌中的 AAV type 1-hPGIS 的给药在骨骼肌内显示出强力且长期的 mRNA 的表达。另外，该长期的 mRNA 的表达通过单次的肌肉内给药实现。

[0097] [表 1]

[0098] 表 1AAV1- 人 PGIS 载体 (1.0×10^{11}(v.g./body)) 左大腿肌给药后的表达变化

[0099]

给药期间	给药小鼠数	人 PGIS mRNA 表达量 *1
给药前	8	0.003±0.005*2
AAV-hPGIS 给药 2 周后	4	1220±4880
AAV-hPGIS 给药 4 周后	5	6310±9470
AAV-hPGIS 给药 8 周后	5	4648±2640
AAV-hPGIS 给药 12 周后	5	3370±1980

[0100] *1 相对于小鼠 GAPDH mRNA 的相对 mRNA 量

[0101] *2 平均值 ±SD

[0102] *3AAV1- 人 PGIS 载体 (1.0×10^{11}(v.g./body)) 给药

[0103] 下肢缺血的改善

[0104] 为了治疗下肢缺血小鼠，本申请发明人等向患侧的左大腿肌给药 AAV type 1-hPGIS，对在下肢缺血处置 2 周后改善的程度进行了讨论。讨论时，将下肢缺血的严重度区分成足坏死、指坏死、无坏死这三个阶段。其结果，如图 3 所示，对照组的 63％确认到足坏死或指坏死，给药了 AAV type 1-EGFP 的 AAV-EGFP 给药组的 69％确认到足坏死或指坏死。

但是，给药了AAV type1-hPGIS的AAV-hPGIS给药组的坏死的比例显著降低并改善为19％。另外，关于最严重的足坏死的频率，AAV type 1-hPGIS给药组在3组间也是最低的。由此表明，AAV type 1-hPGIS的肌肉内给药对于下肢缺血有效。

[0105] 激光多普勒血液灌注分析

[0106] 使用激光多普勒血液灌注(Laser Doppler Blood perfusion;LDP)法，经皮分析AAV-hPGIS给药组、对照(CONTROL)组、AAV-EGFP给药组这3组间的下肢肌组织的血流。LDP中，如图1所示，对照组、AAV-hPGIS给药组与AAV type 1-EGFP给药组相比确认到病侧的左下肢肌组织的血流降低。另外，在LDP的定量分析（血液灌注率）中，对照组、AAV-EGFP给药组、AAV-hPGIS给药组与健康侧的右下肢组织血流相比，分别为73％、54％、118％（参照图2)。由该LDP的观察结果发现，AAV-hPGIS给药改善了血流。

[0107] 缺血肌肉内的mRNA分析

[0108] 使用QT-PCR，对下肢缺血组织的mRNA表达进行分析。与对照组、AAV-EGFP给药组相比，在AAV-hPGIS给药组中确认到明显显著的人PGIS基因的表达（参照图4的A)。另外，内因性的小鼠PGIS基因的表达在3组间没有确认到显著性差异（参照图4的B)。另外，为了对下肢缺血组织的血管生成进行研究，分析了3组间的小鼠VEGF、小鼠FLK-1、小鼠FLT-1的mRNA表达。结果是，关于小鼠VEGF，在AAV-hPGIS组中与其他2组相比表达2倍左右，是显著的（参照图4的C)。但是，关于小鼠FLK-1、小鼠FLT-1的mRNA表达，AAV-hPGIS给药组与其他2组相比具有增加的倾向，但没有发现统计学的显著性差异（参照图4的D、E)。由此，以mRNA水平在骨骼肌内能够确认强力的hPGIS基因的表达。另外，骨骼肌内的VEGF基因的mRNA表达也增加。

[0109] 缺血肌肉内的蛋白质印迹分析

[0110] 进而，使用蛋白质印迹，对下肢缺血组织内的蛋白质水平的基因表达进行了讨论。通过蛋白质印迹在AAV-hPGIS给药组中能够确认到hPGIS蛋白质表达（参照图5)。

[0111] 骨骼肌内的hPGIS的表达

[0112] 此外，对作为AAV-hPGIS的给药部位的骨骼肌进行组织学讨论。在抗人PGIS抗体的免疫染色中，与对照(CONTROL)组、AAV-EGFP给药组相比，在AAV-hPGIS给药组的肌细胞中确认到明显的hPGIS基因的表达（参照图6)。另外，在AAV-hPGIS给药组、对照(CONTROL)组、AAV-EGFP给药组的3组间没有确认到炎症性细胞浸润等明显的免疫学变化。

[0113] 骨骼肌内的血管生成

[0114] 此外，为了讨论肌细胞水平的改善，用抗vWF抗体对骨骼肌进行免疫染色。利用共聚焦显微镜，与对照组、AAV-EGFP给药组相比，在AAV-hPGIS给药组中观察到vWF阳性细胞的增加（参照图6的A和B)。因此，利用Image J，对vWF阳性范围进行定量性分析。结果是，在AAV-hPGIS给药组中，为对照组、AAV-EGFP给药组的约6.5倍，统计学上显著增加（参照图6的C)。需要说明的是，还进行了骨骼肌的EVG染色，但3组间没有观察到显著的变化。

[0115] 由以上结果可知，在给药了AAV-hPGIS的缺血骨骼肌中产生了毛细血管水平的血管生成，这减轻了缺血伤害。

[0116] 由此，通过对下肢缺血小鼠在缺血骨骼肌内基因导入以AAV type 1为载体的人PGIS基因，能够得到下肢缺血的改善。AAV存在许多的血清型(serotype)，AAV type

1 在骨骼肌内表现出最强力且长期的基因表达。本申请发明人等报道了 AAV type1- 人 PGIS(AAV-PGIS) 在体外和体内的对照实验中显示出强力且长期的基因导入效率。除此之外，AAV type 1 的基因表达范围只是基因导入的局部，在远处器官不表达。该特征减少了对于远处器官的副作用 (side effect)，对于多使其他脏器的动脉硬化性疾病合并的严重下肢缺血患者的治疗有效。

[0117] 由上述实验可以明确，AAV-hPGIS 给药组与非给药组相比，坏死的频率显著降低，最严重的足坏死的频率也是该 AAV-hPGIS 给药组最低。另外，在利用 LDP 的定量分析中，AAV-hPGIS 给药组与非给药组相比，表现出统计学上显著的血流增加。在 LDP image 中，全组能够确认大腿动脉的结扎导致的大腿动脉的血流中断、即主血管的堵塞，因此观察到侧支循环 (collateral vessels) 的发达有助于血流改善。

[0118] 接着，对作为 AAV-hPGIS 的导入部位的骨骼肌进行讨论。利用 QT-PCR 对骨骼肌内的 PGIS 基因表达进行了分析，结果在 AAV-hPGIS 给药组的骨骼肌中确认到外因性的 PGIS 的显著的基因表达，为对照组的 1 万倍左右。另外，骨骼肌内的 VEGF 表达也是在 AAV-hPGIS 给药组中确认到对照组的 2 倍左右的表达的增强。该结果是因为，通过 hPGIS 而诱导了 VEGF。另外，在利用 hPGIS 的免疫染色中，在 AAV-hPGIS 治疗组的肌细胞内确认到显著的表达。并且，完全没有确认到病毒载体给药所引起的肌细胞的炎症性变化和肿瘤形成。这是证明 AAV-hPGIS 的安全性的观察结果，特别是 AAV 在病毒载体中显示出免疫原性最低。

[0119] 此外，关于组织学上血管生成的有无，本申请发明人等利用 vWF 对骨骼肌进行了免疫染色。在 AAV-hPGIS 给药组中，能够以毛细管 (capillary) 水平确认到显著的血管生成。另外，还进行了骨骼肌的 EVG 染色，结果全组中没有观察到显著的变化，因此发现在 AAV-hPGIS 给药组的骨骼肌内发生了毛细血管水平的血管生成。

[0120] 由此，AAV type 1-hPGIS 的骨骼肌内的基因导入在骨骼肌细胞内引起显著的人 PGIS 基因表达，通过该基因表达，由肌细胞产生和分泌的 PGI2 引起血管保护作用、血管生成诱导作用等，使下肢缺血得到改善。并且，以上效果能够通过单次给药而实现。在以往的临床和基础研究的报道中，由于使用了质粒、非病毒载体等无法进行长期表达的载体，因此无法维持强力且持续的基因表达。另外，需要多次的给药。实际上用于人体时，需要比动物实验更多的基因表达。可以说 AAV 载体这样的能够实现长期、强力的基因表达且安全性高的病毒载体是在人体临床应用中理想的载体。

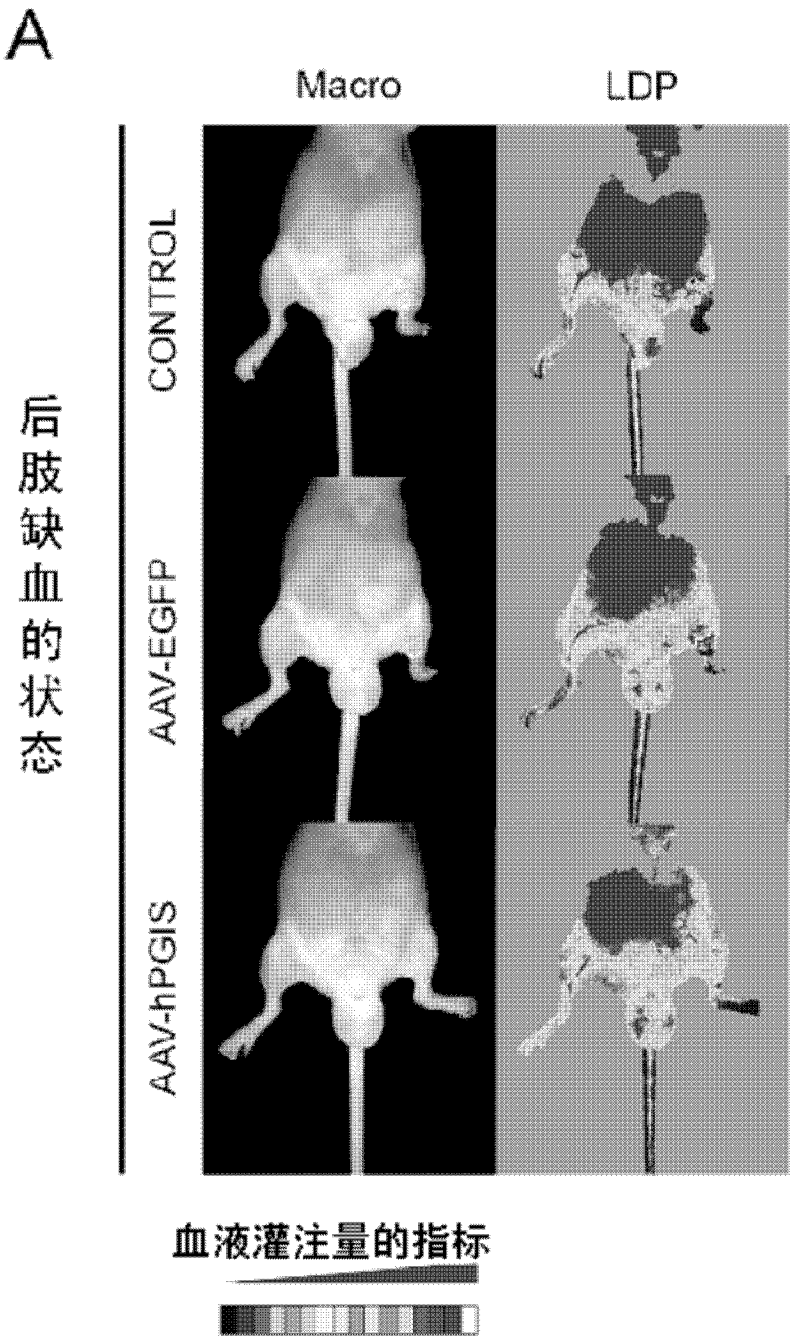


图 1

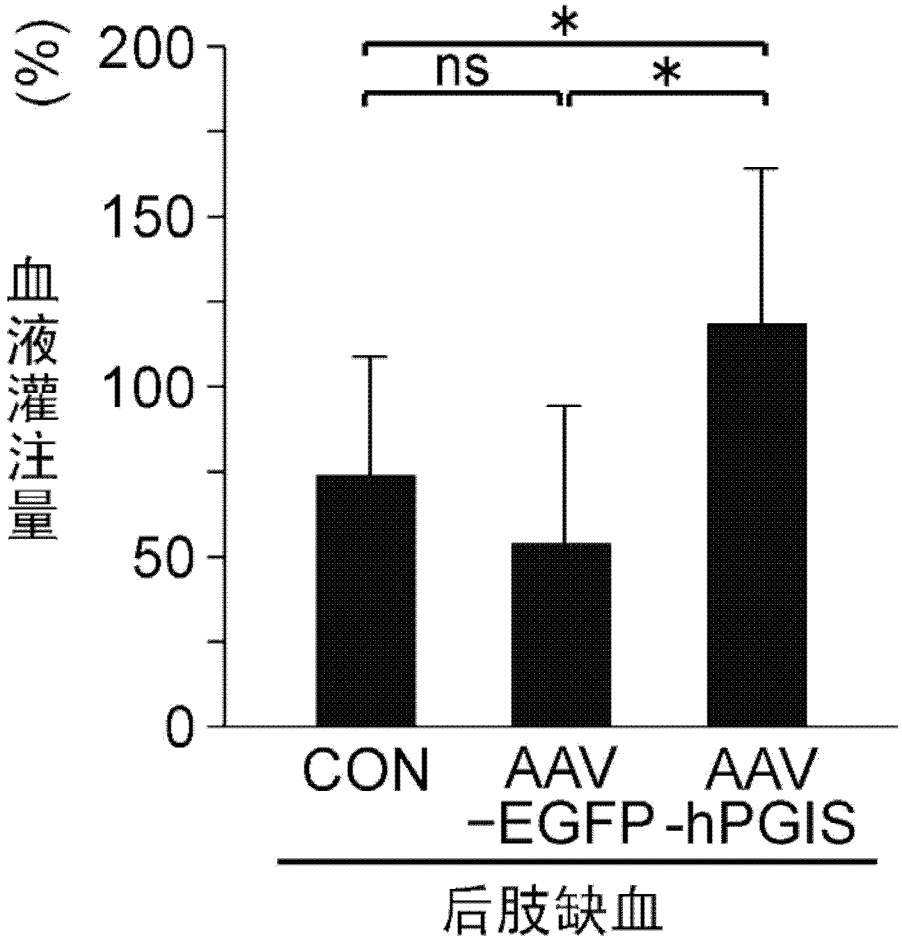


图 2

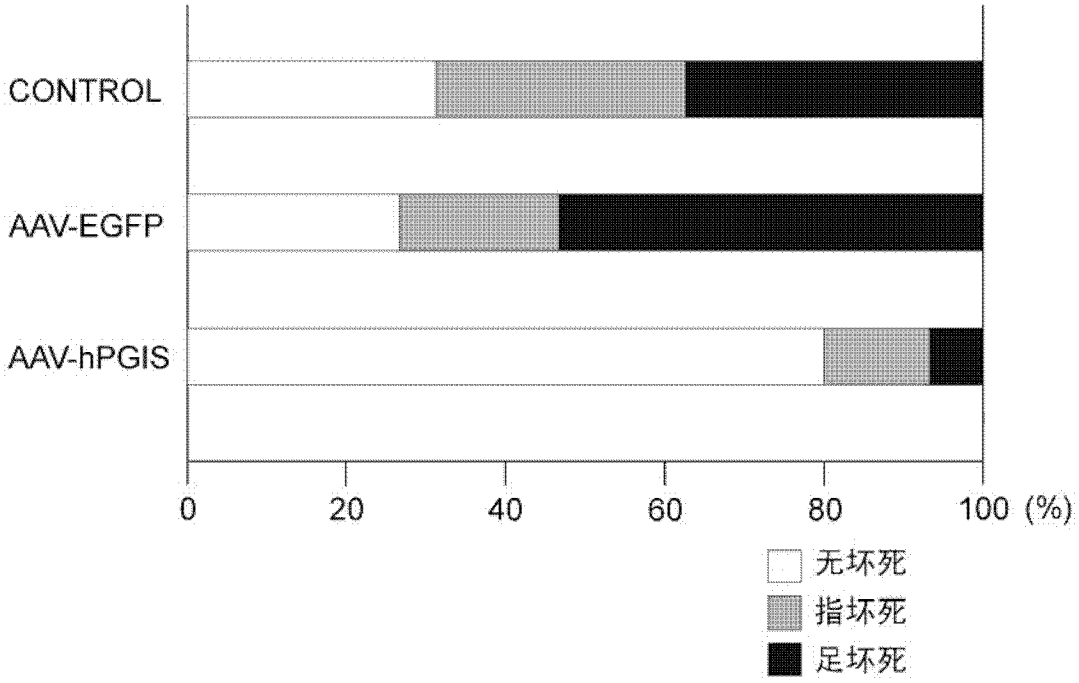

CONTROL
AAV-EGFP
AAV-hPGIS
0
20
40
60
80
100 (%)
无坏死
指坏死
足坏死

图 3

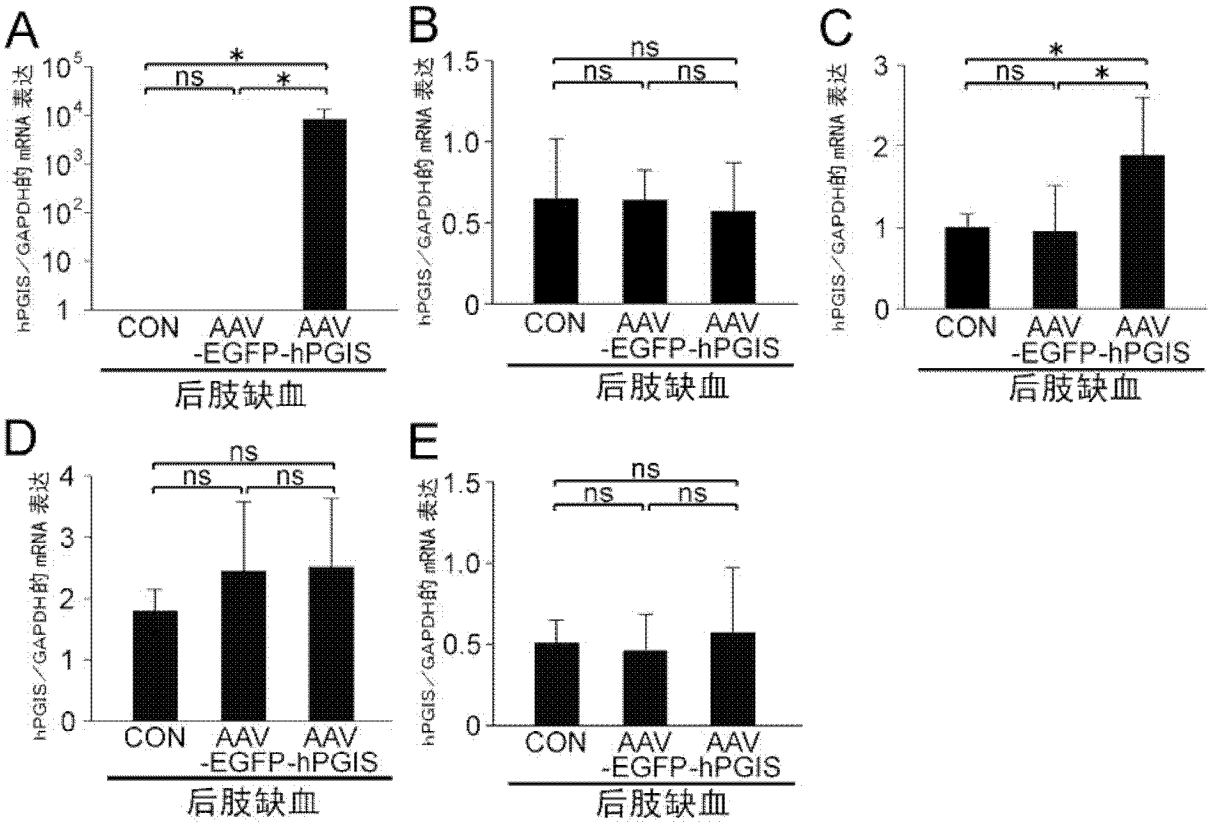

A
B
C
D
E
hPGIS／GAPDH的 mRNA 表达
ns
*
CON
AAV -EGFP-hPGIS
后肢缺血

图 4


后肢缺血
AAV
CON
AAV
-EGFP-hPGIS
hPGIS
55 kDa
辅肌动蛋白

图 5

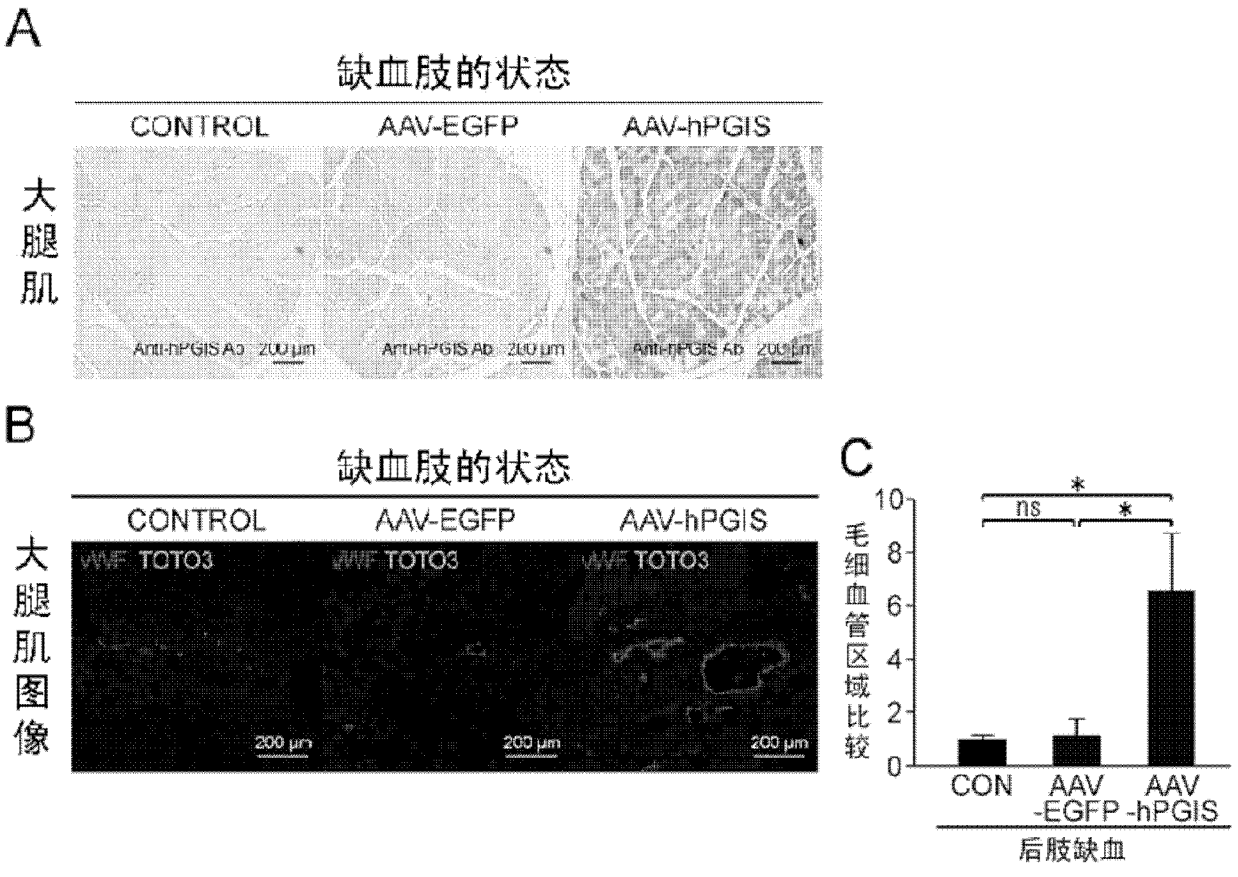

A
缺血肢的状态
CONTROL
AAV-EGFP
AAV-hPGIS
大腿肌
Anti-hPGIS Ab 200 μm
B
缺血肢的状态
CONTROL
AAV-EGFP
AAV-hPGIS
大腿肌图像
vWF TOTO3
200 μm
C
毛细血管区域比较
ns
*
*
10
8
6
4
2
0
CON
AAV -EGFP
AAV -hPGIS
后肢缺血

图 6