(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110770249 B
(45)授权公告日 2024.03.29

(21)申请号 201880039742.1
(22)申请日 2018.04.20
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110770249 A
(43)申请公布日 2020.02.07
(30)优先权数据
62/488,207 2017.04.21 US
62/512,382 2017.05.30 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/028551 2018.04.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/195410 EN 2018.10.25
(73)专利权人 英特瑞克斯顿股份有限公司
地址 美国弗吉尼亚州
(72)发明人 D•托马斯 J•马斯洛斯基
A•马尔亚拉
(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
专利代理师 陶家蓉 杨昀
(51)Int.Cl.
C07K 14/435(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61K 35/36(2015.01)
A61K 38/17(2006.01)
C12N 9/50(2006.01)
C12N 9/64(2006.01)
C12N 5/07(2010.01)
(56)对比文件
WO 2010102262 A1,2010.09.10
WO 2015138628 A1,2015.09.17
WO 2016048903 A1,2016.03.31
CN 103038343 A,2013.04.10
Anonymous.FCX-013 Gene Therapy for Localized Scleroderma.《FIBROCELL.COM》.2016,1-2.
GenBank.interstitial collagenase isoform 1 preproprotein [Homo sapiens].《NCBI》.2016,NP_002412.1. (续)
审查员 张英朔

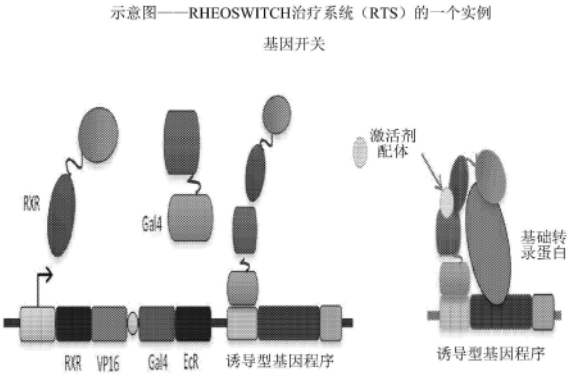
权利要求书1页 说明书28页
序列表6页 附图6页

(54)发明名称

递送包含基质金属蛋白酶的自体细胞用于治疗硬皮病

(57)摘要

本发明涉及通过将基质金属蛋白酶(MMP)递送至有需要的患者,以治疗硬皮病的方法,优选在基因开关的控制下。以这种方式,使用配体激活剂激活MMP的表达或失活MMP的表达以控制所述基因开关。在另一个实施例中,本发明涉及在通过使用激活剂配体而可激活的基因开关的控制下,递送由编码MMP的多核苷酸转染/转导的自体基因修饰细胞以治疗硬皮病。



CN 110770249 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

S Charrier等.Quantification of lentiviral vector copy numbers in individual hematopoietic colony-forming cells shows vector dose-dependent effects on the frequency and level of transduction.《Gene Therapy》.2010,第18卷(第5期),479-487.

1.一种表达载体,其包含编码SEQ ID NO:3的氨基酸序列的多核苷酸。

2.如权利要求1所述的表达载体,其中所述表达载体是病毒载体。

3.如权利要求2所述的表达载体,其中所述病毒载体衍生自选自慢病毒、腺病毒和腺相关病毒的病毒。

4.如权利要求3所述的表达载体,其中所述病毒载体衍生自慢病毒载体。

5.如权利要求1所述的表达载体,其中所述多核苷酸与基因开关系统可操作地连接。

6.如权利要求5所述的表达载体,其中所述基因开关系统包含可操作地连接至配体诱导型转录因子的诱导型启动子。

7.如权利要求6所述的表达载体,其中所述基因开关系统在存在激活剂配体的情况下被激活,并且在不存在所述激活剂配体的情况下被失活。

8.如权利要求7所述的表达载体,其中所述激活剂配体是veledimex。

9.一种药物组合物,其包含从患有硬皮病的患者获得的经载体转导或转染的成纤维细胞,其中载体编码SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

10.一种用如权利要求1所述的表达载体体外或离体转导的细胞。

11.一种基因修饰细胞,其包含编码SEQ ID NO:3的氨基酸序列的多核苷酸,所述多核苷酸可操作地连接至基因开关系统。

12.如权利要求11所述的基因修饰细胞,其中所述多核苷酸存在于所述细胞中,或整合到所述细胞基因组中,平均每个细胞的拷贝数小于6个拷贝。

13.如权利要求11所述的基因修饰细胞,其中所述多核苷酸存在于所述细胞中,或整合到所述细胞基因组中,平均每个细胞的拷贝数为5个或更少。

14.一种包含编码SEQ ID NO:3的氨基酸序列的多核苷酸的细胞的用途,用于制备治疗硬皮病的药物。

15.如权利要求14所述的用途,其中所述硬皮病选自线状硬皮病、斑块状硬斑病、泛发性硬斑病、全硬化性硬斑病和混合性硬斑病。

递送包含基质金属蛋白酶的自体细胞用于治疗硬皮病

[0001] 序列表的引用

[0002] 本申请包含已经以ASCII格式电子提交的序列表,并且特此将其通过引用以其全文结合。创建于2018年4月20日的所述ASCII副本名称为“INX00372WO_Sequence_Listing_20180420.txt”,并且大小为11,691字节(磁盘上12,288字节大小)。

技术领域

[0003] 本发明涉及通过将编码基质金属蛋白酶(MMP)或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸递送至有需要的患者,以治疗硬皮症的方法和组合物。在另一个实施例中,本发明涉及将在载体中将编码MMP的多核苷酸递送至从患有硬化症的患者中分离的细胞,其通过使用基因开关表达系统有条件地表达。所述细胞优选从患者中分离,用编码MMP的多核苷酸转染,在体外或离体培养,并且然后给予至患者。此外,向患者给予配体激活剂以激活MMP的表达,或停止给予以失活MMP的表达。在另一个实施例中,本发明涉及用于递送MMP或其片段的构建体。

背景技术

[0004] 局限性硬皮病是皮肤硬结的自身免疫性炎性硬化性障碍,其可能导致永久性功能残疾和毁容。术语“硬斑病(morphea)”是局限性硬皮病的同义词。局限性硬皮病有几种亚型,包括线状硬皮病、斑块状硬斑病、泛发性硬斑病、全硬化性硬斑病和混合性硬斑病。局限性硬皮病是罕见的皮肤和下层组织纤维化障碍,不涉及血管或内脏受累,并且涵盖根据病变深度和模式分类的几种亚型。经专家们一致同意,传统的分类系统(Peterson等人,1997)最近得到了修改,以提供更适用于临床的分类。修改后的分类系统称为“Padua标准”(Laxer和Zulian,2006)。局限性硬皮病的发病机制可能是多因素的,包括遗传因素和环境暴露,最终导致小血管损伤,释放纤维化细胞因子,以及打破胶原蛋白合成与破坏之间的平衡。胶原蛋白的过度生产和积累是该疾病的标志。线状亚型是儿童中最常见的局限性硬皮病亚型(Fett和Werth,2011),其特征是线状斑块,这些线状斑块累及真皮和皮下组织,有时还累及皮下肌肉、肌腱和骨骼(Laxer和Zulian,2006)。线状硬皮病通常仅限于皮肤和皮下组织,例如脂肪组织、肌肉,并且有时还包括皮肤损害下的骨骼。局限性硬皮病通常是自我限制的问题,其中皮肤增厚的线状区域可能延伸到儿童的皮下组织和肌肉,这可能会损害患病腿部或手臂的生长。实际上,最常见的受累部位是腿,其次是手臂、额头和躯干。四肢病变可能导致包括肌肉在内的软组织萎缩,由于生长受损和关节挛缩导致四肢长度差异。关节间病变会损害运动能力,并且可能是永久性的。

[0005] 关于局限性硬皮病的发生率和患病率的描述很少。据估计,局限性硬皮病的发病率约为十万分之0.4至2.7(Peterson等人,1997)(Fett和Werth,2011)、(Kelsey和Torok,2013)。系统性和局限性硬皮病在临床上是不同的疾病(Lipsker等人,2015)。根据硬皮病基金会和NIH(美国国立卫生研究院),美国硬皮病的患病人数(系统性和局限性形式)约为300,000,并且2/3的个体(或大约200,000)估计患有局限性硬皮病(GARD,2012)(基金会,

2015)。

[0006] 目前可获得的信息表明,尚无治愈疗法,并且也没有专门针对局限性硬皮病的治疗的疗法。目前的治疗旨在控制体征和症状并减缓疾病的扩散。甲氨蝶呤、皮质类固醇和霉酚酸酯在疾病早期为许多患者带来益处,但常常无法提供长期疗效,尤其是当病变已经硬化时。因此,就疾病进展而言,局限性硬皮病可被认为有两个组成部分:1)活跃(发炎)阶段,2)损伤(硬化)阶段。甲氨蝶呤等目前的治疗方法可以解决活跃阶段的问题;然而,迄今为止,一旦病变处于损伤阶段,没有任何一种疗法是有效的。

[0007] 鉴于局限性硬皮病的稀有性,仅存在很少的循证治疗方法。通常,治疗选择可分为局部治疗和全身治疗,以及紫外线(UV)光疗。

[0008] 尽管研究提供了证据证明甲氨蝶呤是有效的治疗,但必须多年给予低剂量以抑制病症,直到疾病活动性出现自发性改善,但不能治愈该病症(Christen-Zaech等人,2008)。平均5.4年疾病持续后才获得稳定。患者有时会长期处于疾病静止期,然后重新复发;10年后有31%的患者报告了活动性疾病。大多数患者有美学后遗症,其中38%具有功能限制。尽管甲氨蝶呤和全身性皮质类固醇的组合在疾病的早期阶段是有效的,但它并不能长期预防长期活动性疾病或复发(Piram等人,2013)。

[0009] UVA1光疗可能有效;然而,治疗工作可能很繁重(每周2-3次,持续30-40次),并且治疗后的复发率为46%(Piram等人,2013)。尽管大多数研究人员都认为UVA1是局限性硬皮病的有效治疗,但在给药方案或频率和总暴露量方面尚缺乏共识。

[0010] 因此,需要新的和改进的疗法来治疗硬皮病。

附图说明

[0011] 当结合随后的详细描述考虑时,通过参考附图可以获得对本发明的更完整的理解。附图中示出的实施例仅旨在举例说明本发明,而不应被解释为将本发明限制于所示实施例。

[0012] 图1描绘了可以在本发明中使用的基因开关系统。

[0013] 图2描绘了慢病毒载体的构建体图,其包含基于蜕皮激素受体的配体诱导型基因开关和编码MMP1蛋白的基因(“LV-RTS-MMP1”)。表1列出了构建体的元件和功能。

[0014] 图3提供了在本发明范围内的慢病毒转导过程的示意图。

[0015] 图4提供了图表,所述图表显示了使用具有和不具有veledimex的不同稀释度的LV-RTS-MMP1转导正常人真皮成纤维细胞,以及此类转导的平均拷贝数。

[0016] 图5A-5B提供了图示,所述图示显示了在硬皮病的博来霉素模型中减小的真皮厚度(图5A)和减小真皮下肌肉厚度(图5B)。第1组对应于博莱霉素小鼠模型,所述博莱霉素小鼠模型注射了经LV-RTS-MMP1转导的人真皮成纤维细胞(HDF)(“HDF-RTS-MMP1”),其中服给予了模拟赋形剂。第2组对应于注射了HDF-RTS-MMP1细胞并口服给予了veledimex的博来霉素小鼠模型。第3组对应于博莱霉素小鼠模型,所述博莱霉素小鼠模型注射了非基因修饰的人真皮成纤维细胞(非GM HDF),其中口服给予了veledimex。第4组对应于对照小鼠,所述对照小鼠注射了盐水(非博来霉素)、未注射任何类型细胞,并口服给予了veledimex。误差线代表标准差。

[0017] 图6提供了皮内注射了HDF-RTS-MMP1细胞的小鼠中MMP1的血清水平的图表。在研

究第28、33和39天(注射成纤维细胞后-1天[即放血前]、第4天和第10天),从每只小鼠上收集血清。血清以1:2稀释,并且使用灵敏的MMP1 ELISA(LLOD＝22pg/mL)测定MMP1表达。误差线代表标准差。

[0018] 图7提供了来自第1-4组每组中小鼠的经苏木精和伊红(H&E)染色的组织切片的代表性体内药理图像。

[0019] 图8显示了示例性预期治疗进度的概况。

发明内容

[0020] 本发明涉及通过将基质金属蛋白酶(MMP)递送至有需要的患者,以治疗硬皮病的方法,优选在诱导型基因开关的控制下。以这种方式,例如使用配体激活剂激活MMP的表达或失活MMP的表达以控制所述基因开关(即分别通过给予或停止给予基因表达激活配体)。在另一个实施例中,本发明涉及在通过使用激活剂配体的基因开关表达的控制下,递送由编码MMP的多核苷酸转染或转导的自体基因修饰细胞以治疗硬皮病。

[0021] 本发明的实施例包括但不限于:

[0022] 治疗硬皮症的方法,其包括向有需要的患者给予已被表达载体转染的细胞,所述表达载体包含编码基质金属蛋白酶(MMP)蛋白或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸。治疗硬皮症的方法,其进一步包括使用在转染之前从患有硬皮病的患者中分离的转染的自体细胞。治疗硬皮症的方法,其进一步包括使用离体培养的转染细胞。治疗硬皮症的方法,其进一步包括使用成纤维细胞。治疗硬皮症的方法,其进一步包括使用和表达编码MMP或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸,所述多核苷酸与基因开关表达系统可操作连接。治疗硬皮症的方法,其中所述基因开关表达系统在存在激活剂配体的情况下被激活(即,被诱导或被“打开”),并且在不存在所述激活剂配体的情况下被失活(即,被减少或被“关闭”)。治疗硬皮症的方法,其中基因开关表达系统包含与配体诱导型转录因子可操作连接的诱导型启动子,当与所述激活剂配体结合时,所述启动子被激活。治疗硬皮症的方法,其中所述基因开关表达系统进一步包括共激活伴侣。治疗硬皮症的方法,其中所述表达载体是病毒载体。治疗硬皮症的方法,其中所述病毒载体衍生自选自慢病毒、腺病毒和腺相关病毒的病毒。治疗硬皮症的方法,其中所述病毒载体是慢病毒载体。治疗硬皮症的方法,其中所述慢病毒载体是INXN-2005。治疗硬皮症的方法,其中所述基因表达系统激活剂配体是非甾体类化合物。治疗硬皮症的方法,其中所述激活剂配体是非甾体类二酰基肼化合物。治疗硬皮症的方法,其中所述激活剂配体是veledimex。治疗硬皮症的方法,其中所述细胞被表达载体转染,所述表达载体包含编码MMP或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸,所述多核苷酸与基因开关系统可操作地连接。治疗硬皮症的方法,其中所述转染细胞通过注射给予至有需要的患者。治疗硬皮症的方法,其中给予是通过皮内注射进行的。治疗硬皮症的方法,其中在注射所述转染细胞后向所述患者给予激活剂配体(例如但不限于veledimex)。治疗硬皮症的方法,其中给予激活剂配体(例如但不限于veledimex)以激活基因开关,以在所述患者体内诱导编码所述MMP或其胶原蛋白降解片段的所述多核苷酸的表达。治疗硬皮症的方法,其中在给予所述转染细胞后,递送激活剂配体(例如但不限于veledimex),持续至少五天。治疗硬皮症的方法,其中在给予所述转染细胞后,每天或以其他间隔递送激活剂配体(例如但不限于veledimex),持续7天或更长时间、10天或更长时间、14天或更长时间、21天或更长时间、28

天或更长时间、30天或更长时间、60天或更长时间、90天或更长时间、或最多100天或更长时间。治疗硬皮症的方法,其中所述硬皮症是局限性硬皮病。治疗硬皮症的方法,其中所述局限性硬皮病选自线状硬皮病、斑块状硬斑病、泛发性硬斑病、全硬化性硬斑病和混合性硬斑病。

[0023] 治疗硬皮症的方法,其包括向有需要的患者给予皮内注射,所述皮内注射包括用编码基质金属蛋白酶(MMP)蛋白或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸转导的自体细胞,所述多核苷酸与诱导所述基因开关的激活剂配体组合可操作地连接至基因开关。治疗硬皮症的方法,其中所述基因开关的激活剂配体是veledimex。治疗硬皮症的方法,其中不给患者使用veledimex以使所述基因开关失活。治疗硬皮症的方法,其中所述硬皮症是局限性硬皮病。治疗硬皮症的方法,其中所述局限性硬皮病选自线状硬皮病、斑块状硬斑病、泛发性硬斑病、全硬化性硬斑病和混合性硬斑病。

[0024] 慢病毒载体,其包含编码基质金属蛋白酶(MMP)或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸,所述多核苷酸与基因开关系统可操作地连接。

[0025] 慢病毒载体,其包含编码基质金属蛋白酶(MMP)或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸,其中所述基因开关系统包含与配体诱导型转录因子可操作连接的诱导型启动子,当与所述激活剂配体结合时,所述启动子被激活。慢病毒载体,其中所述基因开关系统在存在激活剂配体的情况下被激活,并且在不存在所述激活剂配体的情况下被失活。一种慢病毒载体,其包含所述SEQ ID NO:1序列。药物组合物,其包含从患有硬皮病的患者获得的经慢病毒载体转导的成纤维细胞,所述慢病毒载体名为INXN-2005包含如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。药物组合物,其包含从患有硬皮病的患者获得的经慢病毒载体转导的成纤维细胞,所述慢病毒载体名为INXN-2005。用慢病毒载体在体外或离体转导的细胞,所述慢病毒载体包含编码基质金属蛋白酶(MMP)或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸。用包含SEQ ID NO:1序列的慢病毒载体在体外或离体转导的细胞。来自患有硬皮病的患者的自体基因修饰的成纤维细胞,其包含功能性MMP基因,并表达基质金属蛋白酶1。

[0026] 来自患有硬皮病的患者的自体基因修饰的成纤维细胞,其包含功能性MMP基因,并表达基质金属蛋白酶。

具体实施方式

[0027] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语以及任何首字母缩写具有与本发明领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管用于传递与本文描述的那些类似或等同的信息的任何组合物、方法、试剂盒和装置可用于实施本发明,但本文描述了用于传递信息的优选组合物、方法、试剂盒和手段。

[0028] 本文引用的所有参考文献在法律允许的全部范围内通过引用并入本文。对这些参考文献的讨论仅仅是为了总结其作者所作的主张。不承认任何参考文献(或任何参考文献的一部分)是相关的现有技术。申请人保留质疑任何引用的参考文献的准确性和针对性的权利。如果在参考文献中引用的任何内容中出现的任何陈述、结论、假设、数据或其他信息与本披露相冲突或相矛盾,则本披露应否决并且取代所引用参考文献的冲突或矛盾部分。

[0029] 为了使本发明可更容易理解,本文定义某些术语。另外的定义贯穿详细说明而阐述。

[0030] 在权利要求书和/或说明书中,当结合术语“包含(comprising)”使用时,词语“一个(a)”或“一种(an)”的使用可以指“一个/一种(one)”,但是还与“一个或多个/一种或多种(one or more)”、“至少一个/至少一种(at least one)”、以及“一个或多于一个/一种或多于一种(one or more than one)”一致。

[0031] 在整个本申请中,术语“约”用于表示值包括对于用于测定值的装置、方法的固有的误差变化,或研究对象之间存在的变化。通常,根据情况,所述术语意在涵盖约或小于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%可变性。

[0032] 权利要求中术语“或”用于意指“和/或”,除非明确指出仅指替代方案或替代方案是相互排斥的,但本披露支持仅指替代方案的定义以及“和/或”。

[0033] 如在本说明书和权利要求中所使用的,词语“包含”(和任何形式的包含,如“包括”和“包含”)、“具有”(和任何形式的具有,如“具有”和“含有”)、“包括”(以及任何形式的包括,如“包括”和“包含”)或“含有”(以及任何形式的含有,如“包含”和“含有”)是包容性的或开放性的并且不排除其他未列举的元素或方法步骤。预期可以关于本发明的任何方法或组合物来实施本说明书中讨论的任何实施例,反之亦然。此外,本发明的组合物可用于实现本发明的方法。

[0034] 术语“核酸”、“核酸分子”、“寡核苷酸”和“多核苷酸”可互换使用,可指RNA或DNA,以及合成核苷酸类似物或其他分子,所述合成核苷酸类似物或其他分子可能存在于序列并且不会阻止多核苷酸与具有互补序列的第二分子杂交。这些分子可以是单链或双链的。

[0035] 当核酸、核酸序列、寡核苷酸和多核苷酸天然地或人工地衍生自共同的祖先核酸或核酸序列时,它们是“同源的”。当蛋白质和/或蛋白质序列的编码DNA天然地或人工地衍生自共同的祖先核酸或核酸序列时,它们是同源的。同源分子可称为同源物。例如,如本文所述的任何天然存在的蛋白质可以通过任何可用的诱变方法进行修饰。当表达时,该诱变的核酸编码与原始核酸编码的蛋白质同源的多肽。通常从两种或更多种核酸或蛋白质(或其序列)之间的序列一致性推断同源性。可用于建立同源性的序列之间的精确一致性百分比随所讨论的核酸和蛋白质而变化,但是通常使用仅仅25%序列一致性来建立同源性。更高水平的序列一致性,例如30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%或更高也可用于建立同源性。用于确定序列一致性百分比的方法(例如,使用默认参数的BLASTP和BLASTN)在本文中进行了描述并且通常是可获得的。

[0036] 在两个核酸序列或多肽的氨基酸序列的上下文中,术语“相同”或“序列一致性”是指当在指定的比较窗口上比对以获得最大对应性时两个序列中的残基是相同的。如本文所用,“比较窗口”是指至少约20个连续位置的片段,通常为约50至约200,更通常为约100至约150,其中在两个序列最佳比对后序列可与相同连续位置数的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法是本领域公知的。用于比较的序列的最佳比对可以通过以下来进行:Smith和Waterman(1981)Adv.Appl.Math.[应用数学进展]2:482的局部同源性算法;通过Needleman和Wunsch(1970)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:443的比对算法;通过Pearson和Lipman(1988)Proc.Nat.Acad.Sci U.S.A.[美国国家科学院院刊]85:2444的相似度搜索法;通过这些算法的计算机化实现(包括但不限于加利福尼亚州山景城智能学(Intelligentics,Mountain View Calif.)的PC/基因项目中的CLUSTAL,Wisconsin

Genetics Software Package[威斯康星遗传学软件包](遗传学计算机集团(Genetics Computer Group)(GCG),575科学博士(Science Dr.),麦迪逊市(Madison),威斯康星州(Wis.),美国)中的GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA);所述CLUSTAL程序在Higgins和Sharp(1988)Gene[基因]73:237-244,以及Higgins和Sharp(1989)CABIOS 5:151-153;Corpet等人(1988)Nucleic Acids Res.[核酸研究]16:10881-10890;Huang等人(1992)Computer Applications in the Biosciences[生物科学计算机应用]8:155-165;以及Pearson等人(1994)Methods in Molecular Biology[分子生物学方法]24:307-331中进行了详细描述。比对通常还通过检查和手动比对来进行。

[0037] 在一类实施例中,本文的多肽(例如MMP片段,如MMP-1蛋白)与参考多肽或其片段是至少70%,通常至少75%,可任选地至少80%、85%、90%、98%或99%或更大程度一致的,例如,如使用默认参数通过BLASTP(或CLUSTAL或任何其他可获得的比对软件)测量的。类似地,核酸也可以参考起始核酸来描述,例如,它们可以与参考核酸或其片段是50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、98%、99%或更大程度一致的,例如,如使用默认参数通过BLASTN(或CLUSTAL或任何其他可获得的比对软件)测量的。当一个分子与较大分子具有一定百分比的序列一致性时,这意指当两个分子最佳比对时,根据两个分子最佳比对时的顺序较小分子中所述残基百分比在较大分子中找到匹配残基。

[0038] 应用于核酸或氨基酸序列的术语“基本上一致”意指核酸或氨基酸序列包含与使用标准参数的上述程序(优选BLAST)的参考序列相比,具有至少90%序列一致性或更高,优选至少95%,更优选至少98%且最优选至少99%的序列。例如,BLASTN程序(对于核苷酸序列)使用字长(W)为11,期望值(E)为10,M=5,N=-4,以及两条链的比较作为默认值。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用字长(W)为3,期望值(E)为10和BLOSUM62评分矩阵作为默认值(参见Henikoff&Henikoff,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]89:10915(1992))。通过在比较窗口上比较两个最佳比对的序列来确定序列一致性的百分比,其中比较窗口中的多核苷酸序列的部分可以包含与参考序列(不包含添加或缺失)相比的添加或缺失(即,缺口)以使两个序列最佳比对。通过确定在两个序列中出现一致核酸碱基或氨基酸残基的位置数来计算百分比,以得到匹配位置数,将匹配位置数除以比较窗口中的位置总数,并将结果乘以100以得到序列一致性的百分比。优选地,在序列的区域上存在基本一致性,所述序列长度为至少约50个残基,更优选至少约100个残基的区域,并且最优选序列在至少约150个残基上基本一致。在最优选的实施例中,序列在编码区域的整个长度上基本一致。

[0039] 本文披露的蛋白质的“功能变体”可以例如包含参考蛋白(例如MMP,如MMP-1)的氨基酸序列,其具有至少或约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个保守氨基酸取代。短语“保守氨基酸取代”或“保守突变”是指将一种氨基酸用另一种具有共同特性的氨基酸替换。定义单独氨基酸之间共同特性的功能性方法是分析同源生物的相应蛋白质之间氨基酸变化的标准化频率(Schulz,G.E.和Schirmer,R.H.,Principles of Protein Structure[蛋白质结构的原理],柏林斯普林格出版社(Springer-Verlag),纽约(1979))。根据这样的分析,可以定义氨基酸组,其中组内的氨基酸彼此优先交换,因此它们对总体蛋白质结构的影响最相似(Schulz,G.E.和Schirmer,R.H.,同上)。保守突变的实例包括上述亚组内的氨基酸的氨基酸取代,例如精氨酸取代赖氨酸,反之亦然,使得可以保持

正电荷;谷氨酸置换天冬氨酸,反之亦然,使得可以保持负电荷;丝氨酸置换苏氨酸,使得可以保持游离的-OH;以及谷氨酰胺置换天冬酰胺,使得可以保持游离的-NH_2。

[0040] 可替代地或另外地,功能变体可包含具有至少一个非保守氨基酸取代的参考蛋白的氨基酸序列。"非保守突变"涉及不同基团之间的氨基酸取代,例如,赖氨酸取代色氨酸,或苯丙氨酸取代丝氨酸等。在这种情况下,优选非保守氨基酸取代不干扰或抑制功能变体的生物活性。非保守氨基酸取代可以增强功能变体的生物活性,使得与参考序列相比,功能变体的生物活性增加。

[0041] MMP的"胶原蛋白降解"片段是MMP的片段,其能够切割或降解I、II和/或III型胶原蛋白。该功能用于预防或抑制细胞外基质的积累和/或提供抗纤维化作用。

[0042] "基因开关系统"是指有条件的基因表达系统,其允许参考蛋白例如MMP或其片段的表达被打开和关闭。本发明的基因开关系统是指包含多核苷酸序列的系统,所述多核苷酸序列包含至少一个诱导型启动子,配体诱导型转录因子,以及配体诱导型转录因子的共激活伴侣,所述启动子与治疗性蛋白质(例如MMP-1)或其片段可操作地连接。在本发明的一方面,"诱导型启动子"与编码MMP或其片段的多核苷酸可操作地连接。基因开关系统包括"激活剂配体"的使用,当其与"配体诱导型转录因子"复合时,触发诱导型启动子启动治疗性蛋白或其片段的转录。因此,本发明进一步涉及"激活复合物",其包含配体诱导型转录因子和激活剂配体,以触发患者中MMP或其片段的表达。在那种情况下,激活复合物将包含配体诱导型转录因子以及与激活剂配体络合的共激活伴侣,以触发诱导型启动子。基因开关系统在存在所述激活剂配体的情况下被"激活"或"打开",在不存在所述激活剂配体的情况下被"失活"或"关闭"。因此,可以根据需要,通过存在或不存在激活剂配体来打开和关闭基因开关。在某些实施例中,本发明中利用的优选的基因开关表达系统是基于蜕皮激素受体的配体诱导型基因开关,例如在PCT/US2002/005090(2002年2月20日提交)和美国专利号8,715,959(2014年5月6日发布)和/或PCT/US 2008/011270和美国专利号9,402,919中所描述的,将其通过引用并入本文。

[0043] 术语"患者"或"受试者"是指哺乳动物,包括人和动物。

[0044] 术语"治疗"是指减轻或缓解症状,和/或预防硬皮症的复发和/或进展。例如,硬皮病的治疗涉及胶原蛋白的降解,或抑制或预防细胞外基质或胶原蛋白形成,其在硬皮症中起重要作用。治疗可以涉及结合、阻断、抑制或中和ECM产生或胶原蛋白形成,或减少、预防或抑制由硬皮病导致的ECM产生或胶原蛋白形成。可以使用本文所述的方法和组合物治疗的适应症包括但不限于:1)系统性硬皮病(SSc)(特别是指端硬化和内脏纤维化);2)皮肤纤维化包括:a)局限性皮肤型SSc(lSSc)和b)弥漫性皮肤型SSc(dSSc);3)系统性硬皮病并间质性肺疾病(ILD)(SSc-ILD);4)水肿性纤维硬化性脂膜病(橘皮组织);5)粘连性关节囊炎(肩周炎综合征);6)雷诺现象(RP);7)牛皮癣;8)肝纤维化(包括非酒精性脂肪性肝炎);9)肾纤维化(包括局灶节段性肾小球硬化);10)心脏纤维化;11)类风湿关节炎;12)克罗恩病;13)溃疡性结肠炎;14)骨髓纤维化;15)系统性红斑狼疮(SLE);16)骨骼肌纤维化(急性损伤后或由于慢性神经退行性肌肉疾病引起);17)先天性眼外肌纤维化(CFEOM1、CFEOM2、CFEOM3和Tukel综合征);18)慢性移植物抗宿主疾病;19)肥厚性疤痕;20)特发性肺纤维化;21)带状硬皮病;22)掌腱膜挛缩症;23)佩罗尼氏病;24)增生性疤痕;25)硬皮病相关的手功能障碍;26)放射纤维化综合征;以及27)其他硬皮症。

[0045] 术语“自体细胞”是指衍生自相同个体或涉及一个个体同时作为供体和受体的细胞。根据本发明,首先从患有硬皮病的患者中采集自体细胞。根据本发明,对这些细胞进行了基因修饰,并且随后重新引回同一位患者以治疗硬皮症。

[0046] 术语“转染”是指向哺乳动物细胞中的递送基因。插入这种遗传物质能够使细细胞自身的机制表达或产生蛋白质。根据本发明,转染还可以指通过使用病毒载体转导或通过使用多核苷酸的化学或电传递来转染细胞。

[0047] 术语“转导”意指通过病毒感染而不是通过转染使用病毒或逆转录病毒载体递送一种或多种基因。

[0048] 术语“腺相关病毒载体”是指细小病毒家族的成员,并且是具有单链线性DNA基因组的小型非包膜二十面体病毒。所述腺相关病毒基因组包含反向末端重复序列(ITR),可将转导的基因整合到宿主细胞基因组中。

[0049] 术语“转导载体”是指传染性病毒或病毒样载体,例如疱疹病毒,杆状病毒,牛痘病毒,腺病毒,慢病毒或腺相关病毒载体颗粒,它们是用具有以下项的包装细胞系共转染而形成:包含MMP基因或编码其胶原蛋白降解MMP片段的基因的表达/转移质粒载体、包装载体和包膜载体。转染后,从生产细胞培养物的上清液中采集所述转导载体。合适的包装细胞系是本领域已知的,并且包括例如293T细胞系。

[0050] 术语“转基因”是指引入细胞或基因组中的任何异源基因(即,任何非天然存在或非正常存在的基因)。

[0051] 术语“慢病毒载体”是指含有主要衍生自慢病毒的LTR外部的结构和功能遗传元件的载体。

[0052] 如本文所用,基质金属蛋白酶或“MMP”是钙依赖性的含锌内肽酶,包括阿达马霉素、塞拉溶菌素和抗衡蛋白。MMP属于一个较大的蛋白酶家族,称为二甲双胍超家族。胶原蛋白酶MMP能够将三螺旋状原纤维胶原蛋白降解为独特的3/4和1/4片段。优选地,MMP包括但不限于MMP-1、MMP-2、MMP-4、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-11、MMP-13和MMP-14。

[0053] 总的来说,这些酶能够降解所有种类的细胞外基质蛋白,但也可以处理许多生物活性分子。已知它们参与细胞表面受体的裂解、凋亡配体(例如FAS配体)的释放以及趋化因子/细胞因子的失活。MMP也被认为在细胞行为中起主要作用,例如细胞增殖、迁移(粘附/分散)、分化、血管生成、凋亡和宿主防御。

[0054] 特别地,MMP1消化纤维疤痕组织中的主要组成型蛋白,即天然I型和III型原纤维胶原蛋白,同时保留IV型胶原蛋白,后者是基底膜的组成部分。MMP1还能通过作用于细胞表面、基质和非基质底物(例如IGF结合蛋白、L-选择素和TNFα)而在ECM重塑和细胞信号传导中发挥重要作用(Pardo和Selman,2005)。MMP1表示为酶原(其“前体(pro)”形式),其中需要逐步进行蛋白水解裂解才能激活。通过结合至催化位点内的锌离子(称为“半胱氨酸开关”),将MMP1保持在非活性状态需要前域内的保守半胱氨酸。具体而言,MMP1在距N端分子长度约四分之三的三重螺旋域中的一个位点切割I、II和III型胶原蛋白。

[0055] 本发明涉及向患有硬皮症的患者递送用编码MMP或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸转染或转导的细胞。在本发明的实施例中,在病毒载体中递送编码MMP或其片段的多核苷酸。优选地,所述病毒载体是慢病毒载体。在另一个实施例中,病毒载体(例如慢病毒载体)包括基因开关系统,其允许在存在激活剂配体的情况下有条件地表达MMP或其胶原蛋白降

解片段。在使用基因开关系统时,在给予MMP载体之前、同时或之后,给予激活剂配体。激活剂配体可以周期性地(在连续时间内),以足以允许打开或关闭基因开关以及进而表达MMP或胶原蛋白降解片段的方式,给予或不给予至患者。在本发明的另一方面,将从硬皮症患者采集的细胞用慢病毒载体转导,所述慢病毒载体包含编码MMP或其片段的多核苷酸序列以及基因开关系统,所述基因开关系统可操作地连接至所述多核苷酸序列,并且培养所述被转导的细胞,并将其给予至同一位硬皮症患者。在使用基因开关系统时,配体激活剂被给予以激活基因开关或不给予以使基因开关失活。

[0056] 一般而言,本文中,"MMP或其胶原蛋白降解片段"是(i)MMP;(ii)MMP的功能变体;(iii)与MMP基本相同的蛋白质;(iv)MMP的胶原蛋白降解片段;或(v)(i)、(ii)、(iii)或(iv)的生物活性片段。

[0057] 根据本发明,编码MMP1的载体的核苷酸序列包含与所述SEQ ID NO:1的核苷酸序列至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%一致的核苷酸序列。在SEQ ID NO:1中,所述MMP1 cDNA的序列衍生自人pro-MMP1的共有序列,其中天然MMP1信号肽被人色素上皮衍生因子(PEDF)的信号肽序列(SEQ ID NO:2)替换,以提供更有效地从成纤维细胞分泌MMP1。所述cDNA(1410bp)被生成并克隆到标准表达质粒中进行初始分析。值得注意的是,也可以使用其他信号肽序列代替(替代)所述PEDF信号肽。然后,对该载体的所述MMP1 cDNA进行工程改造,去除潜在的拼接位点,并将其克隆到pFUGW SIN-LV主链中(参见例如Miyoshi等人,J.Virol.[病毒学杂志],72(10):8150-8157(1998年10月)和WO 2017161180A1(PCT PCT/US 2017/022800)),所述pFUGW SIN-LV主链与诱导型基因开关表达盒(即基于蜕皮激素受体的基因开关)相邻,以使用veledimex(激活剂配体)控制MMP1表达,以产生LV-RTS-MMP1载体(也称为INXN-2005)。

[0058] 由LV-RTS-MMP1载体表达的MMP1的氨基酸序列具有SEQ ID NO:3序列,其中SEQ ID NO:4序列对应于人PEDF信号肽,其中SEQ ID NO:5序列对应于初前MMP1序列,其在激活时被切割以形成成熟的(具有酶活性的)、包含SEQ ID NO:6氨基酸序列的MMP1蛋白。图2提供了LV-RTS-MMP1的图示。

[0059] 注意,LV-RTS-MMP1载体也被称为载体"INXN-2005"。本发明设想了与LV-RTS-MMP1载体基本一致和/或同源的载体。所述INXN-2005载体利用了包含基因开关系统的慢病毒载体(LV)。所述LV是非复制型的水疱性口炎病毒-G(VSV-G)假型、自灭活(第3代)慢病毒(SIN-LV)。特别地,INXN-2005(LV-RTS-MMP1)利用与基于蜕皮激素受体的配体诱导型基因开关表达系统(例如在PCT/US 2002/005090和美国专利号8,715,959和/或在PCT/US 2008/011270和美国专利号9,402,919中描述的)相结合的慢病毒平台,有条件表达所述MMP-1蛋白。慢病毒主链包含转录重组LV基因组以将其包装至病毒所需的最少的必需元件。在LV主干中编码的是veledimex配体诱导型基因开关控制的MMP1的表达所需要的元件。在一些实施例中,构建本发明的转导慢病毒载体的起始材料选自慢病毒表达质粒载体pSMPUW(细胞生物实验室公司(Cell Biolabs,Inc.),圣地亚哥(San Diego),加利福尼亚州(CA))和pFUGW(阿德基因(Addgene),剑桥(Cambridge),马萨诸塞州(MA))。

[0060] LV-RTS-MMP1的元件及其功能在下表1中列出。

[0061] 表1-LV-RTS-MMP1组分的说明

[0062]

缩写	元件	目的
慢病毒主链		
CMV	巨细胞病毒立即早期启动子	驱动转录以产生 LV mRNA 基因组
5'LTR: R 5 ψ cPPT	5'长末端重复区域： HIV 重复区域 HIV 5'非翻译区域 包装信号 中央多嘌呤区	促进 LV mRNA 基因组转录、基因表达、包装到病毒颗粒以及整合到宿主基因组中
RRE	Rev 响应元件	促进 LV mRNA 转运至细胞核
WPRE	土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件	增加基因表达和病毒滴度
3'LTR	3'长末端重复区域	包含 HIV1 基因组的截断的（SIN）U3 区域、R 和 U5 区域。U3 的截断除去了天然存在于 HIV1 3'LTR 的 U3 区域的启动子和增强子，从而产生了自灭活的 LV
bGH 聚 A	衍生自牛生长激素基因的聚 A 尾序列	提供给 LV mRNA 基因组转录物

[0063]

LV-RTS-MMP1 组分		
IP	诱导型启动子	仅在存在激活剂配体的情况下下驱动 MMP1（目的治疗基因）的表达
RPL6-5' 拼接单元	衍生自 60S 核糖体蛋白 L5 5'调节元件的 5'非翻译区	5'调控元件，以增强转录
S100A6	衍生自人 S100 钙结合蛋白 A6 基因的 3'非翻译区	3'调节元件，以增强转录物稳定性
Const. P.	组成型启动子，例如人延伸因子 1 α（EF-1 α）启动子	驱动基于蜕皮激素受体的基因开关多肽组分的表达
VP16-RxR Gal4 BD-EcR	单纯疱疹病毒（HSV）蛋白 16 与类视黄醇 X 受体融合 酵母 Gal4 DNA 结合域融合与经修饰的蜕皮激素受体	这两种融合蛋白在存在激活剂配体的情况下形成异源二聚体，从而形成从诱导型启动子（IP）驱动基因表达的活性转录因子
2Xrbm3 IRES	衍生自 RNA 结合基序蛋白 3 的内部核糖体进入位点	允许在单个 mRNA 转录物上翻译两种蛋白质
HSV TK V3 3'	衍生自 HSV 胸苷激酶基因的 3'非翻译区	增强基于蜕皮激素受体的基因开关 mRNA 转录物的稳定性

[0064] 本发明的一个实施例包括通过使用配体和基因开关系统来控制患者中MMP或其胶原蛋白降解片段的表达的能力。基因开关系统可以是通过添加或去除激活剂配体来调节治疗性蛋白质的基因表达的任何系统。基因开关系统的组分包括至少一个诱导型启动子,其与可操作地与其连接的治疗性蛋白质的表达相关,所述配体诱导型转录因子的共激活伴侣,以及激活剂配体。诱导型启动子可以是适合于驱动MMP基因表达的任何启动子。

[0065] 配体诱导型转录因子通过其与特定(小分子)激活剂配体的相互作用来调节基因表达,并且包括将在存在或不存在其相应激活剂配体的情况下受到控制的任何已知转录因子。举例来说,配体诱导型转录因子包括核受体超家族成员,其被它们各自的配体(例如,糖皮质激素、雌激素、孕激素、类视黄醇A、蜕皮激素、维生素D及其类似物和模拟物)和被四环素激活的四环素控制的反式激活因子(tTA)激活。在本发明的一方面,所述基因开关是基于蜕皮激素受体(EcR)的基因开关,所述基因开关包含异源二聚体蛋白复合物,其包含来自核受体家族的至少两个成员的多肽序列,例如蜕皮激素受体(EcR)和超气门(USP)核受体蛋白家族。

[0066] 激活剂配体是与配体诱导型转录因子形成复合物的特异性配体,此后触发基因开关以刺激MMP的表达。该配体可以包括例如糖皮质激素、雌激素、孕激素、类视黄醇A、四环素、维生素D、蜕皮激素、20-羟基蜕皮酮、松甾酮A、米乐甾酮A等,9-顺式视黄酸、视黄酸的合成类似物、N,N'-二酰基肼、噁二唑啉、二苯甲酰基烷基氰肼、N-烷基-N,N'-二酰基酰肼;N-酰基-N-烷基羰基肼;N-芳酰基-N-烷基-N'-芳酰基肼;酰胺酮;3,5-二叔丁基-4-羟基-N-异丁基-苯甲酰胺、8-O-乙酰哈巴苷、氧固醇、22(R)羟基胆固醇、24(S)羟基胆固醇、25-环氧胆固醇、T0901317、5-α-6-α-环氧胆固醇-3-硫酸盐(ECHS)、7-酮胆固醇-3-硫酸盐、法呢醇、胆汁酸、1,1-二膦酸酯,少年激素III等。可用于本发明的二酰基肼配体的实例包括RG-115819(3,5-二甲基-苯甲酸N-(1-乙基-2,2-二甲基-丙基)-N'-(2-甲基-3-甲氧基-苯甲酰基)-酰肼),RG-115932(3,5-二甲基-苯甲酸N-(1-叔丁基-丁基)-N'-(2-乙基-3-甲氧基-苯甲酰基)-酰肼)和RG-115830(3,5-二甲基-苯甲酸N-(1-叔丁基-丁基)-N'-(2-乙基-3-甲氧基-苯甲酰基)-酰肼)。如本领域技术人员所理解的,激活剂配体可任选地需要其他共激活伴侣或配体来形成触发基因开关所需的复合物。

[0067] 此类系统的实例包括但不限于美国专利号6,258,603、7,045,315,美国公开专利申请号2006/0014711、2007/0161086和国际公开申请号WO 01/70816中所描述的系统。在本发明的一方面,基因开关是基于EcR的基因开关。此类系统的实例包括但不限于以下描述的系统:PCT/US 2001/009050(WO 2001/070816);美国专利号7,091,038;7,776,587;7,807,417;8,202,718;PCT/US 2001/030608(WO 2002/029075);美国专利号8,105,825;8,168,426;PCT/US 2002/005235(WO 2002/066613);美国申请号10/468,200(美国公开号20120167239);PCT/US 2002/005706(WO 2002/066614);美国专利号7,531,326;8,236,556;8,598,409;PCT/US 2002/005090(WO 2002/066612);美国申请号10/468,193(美国公开号20060100416);PCT/US 2002/005234(WO 2003/027266);美国专利号7,601,508;7,829,676;7,919,269;8,030,067;PCT/US 2002/005708(WO 2002/066615);美国申请号10/468,192(美国公开号20110212528);PCT/US 2002/005026(WO 2003/027289);美国专利号7,563,879;8,021,878;8,497,093;PCT/US 2005/015089(WO 2005/108617);美国专利号7,935,510;8,076,454;PCT/US 2008/011270(WO 2009/045370);美国申请号12/241,018(美

国公开号20090136465);PCT/US 2008/011563(WO 2009/048560);美国申请号12/247,738(美国公开号20090123441);PCT/US 2009/005510(WO 2010/042189);美国申请号13/123,129(美国公开号20110268766);PCT/US 2011/029682(WO 2011/119773);美国申请号13/636,473(美国公开号20130195800);PCT/US 2012/027515(WO 2012/122025);以及,美国公开号9,402,919;其每一个均通过引用整体并入。

[0068] 在本发明的另一方面,基因开关可以基于FK506结合蛋白(FKBP)与FKBP雷帕霉素相关蛋白(FRAP)的异二聚化,并且通过雷帕霉素或其非免疫抑制类似物来调节。这种系统的实例包括但不限于ARGENT转录技术(阿瑞雅德制药公司(ARIAD Pharmaceuticals),剑桥(Cambridge),马萨诸塞州(MA))和美国专利号6,015,709、6,117,680、6,479,653、6,187,757和6,649,595中描述的系统。

[0069] 在本发明的另一方面,本发明的基因表达盒可以掺入通过CymR阻遏物起作用的cumate开关系统,所述CymR阻遏物以高亲和力结合所述cumate操纵基因序列(例如,SPARQ cumate开关(系统生物科学有限公司(System Biosciences,Inc.)))。抑制作用是通过添加与CymR结合的cumate无毒小分子减轻的。该系统具有动态可诱导性,可以进行微调、并且可逆且可诱导。

[0070] 在本发明的另一方面,本发明的基因表达盒可以掺入核糖开关,其是与效应子结合的信使RNA分子的调节区段,导致由mRNA编码的蛋白质的产生的改变。含有核糖开关的mRNA会直接响应其效应分子的浓度来调节其自身的活性。效应子可以是衍生自嘌呤/嘧啶、氨基酸、维生素或其他小分子辅助因子的代谢物。这些效应子充当核糖开关传感器或适体的配体。Breaker,RR.Mol Cell.[分子细胞],(2011)43(6):867-79。

[0071] 在本发明的另一方面,本发明的基因表达盒可以结合基于生物素的基因开关系统,其中细菌阻遏蛋白TetR与链霉亲和素融合,其与合成的生物素化信号相互作用,与VP16融合以激活基因表达。合成肽的生物素化受到细菌生物素连接酶BirA调控,从而实现配体响应。Weber等人(2007)Proc.Natl.Acad.Sci.[美国国家科学院院刊]104,2643-2648;Weber等人(2009)Metabolic Engineering[代谢工程],11(2):117-124。

[0072] 适用于本发明的其他基因开关系统是本领域已知的,包括但不限于在Auslander和Fussenegger,Trends in Biotechnology[生物技术趋势](2012),31(3):155-168中描述的那些,其通过引用并入本文。

[0073] 激活剂配体是与配体诱导型转录因子形成复合物的特异性配体,触发基因开关以刺激MMP的表达。该配体可以包括例如糖皮质激素、雌激素、孕激素、类视黄醇A、四环素、维生素D、蜕皮激素、20-羟基蜕皮酮、松甾酮A、米乐甾酮A等,9-顺式视黄酸、视黄酸的合成类似物、N,N'-二酰基肼,例如在美国专利号6,013,836、5,117,057、5,530,028和5,378,726,以及美国公开申请号2005/0209283和2006/0020146中披露的那些;如美国公开申请号2004/0171651中所述的噁二唑啉;二苯甲酰基烷基氰肼,例如欧洲申请号461,809中披露的那些;N-烷基-N,N'-二酰基酰肼,例如美国专利号5,225,443中披露的那些;N-酰基-N-烷基羰基肼,例如欧洲申请号234,994中披露的那些;N-芳酰基-N-烷基-N'-芳酰基肼,例如在美国专利号4,985,461中描述的那些;炔诺酮,例如美国公开申请号2004/0049037中描述的那些;其每一个均通过引用整体并入和其他类似材料包括3,5-二叔丁基-4-羟基-N-异丁基-苯甲酰胺、8-O-乙酰基庚二酸酯、氧甾醇、22I羟基胆固醇、24(S)羟基胆固醇、25-环氧胆固

醇、T0901317、5-α-6-α-环氧胆固醇-3-硫酸盐(ECHS)、7-酮胆固醇-3-硫酸盐、法呢醇、胆汁酸、1,1-二膦酸酯、少年激素III等。可用于本发明的二酰基肼配体的实例包括RG-115819(3,5-二甲基-苯甲酸N-(1-乙基-2,2-二甲基-丙基)-N'-(2-甲基-3-甲氧基-苯甲酰)-酰肼)、RG-115932(3,5-二甲基-苯甲酸I-N-(1-叔丁基-丁基)-N'-(2-乙基-3-甲氧基-苯甲酰)-酰肼)和RG-115830(3,5-二甲基-苯甲酸N-(1-叔丁基-丁基)-N'-(2-乙基-3-甲氧基-苯甲酰基)酰肼)。参见,例如美国专利申请系列号12/155,111和PCT申请号PCT/US 2008/006757,其全部内容通过引用整体并入本文。

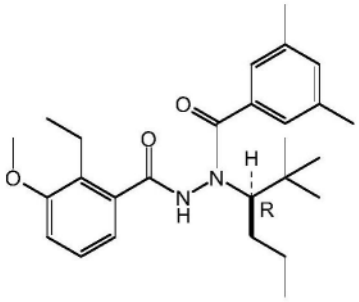
[0074] 如本领域技术人员所理解的,激活剂配体可任选地需要其他共激活伴侣或配体来形成触发基因开关所需的复合物。

[0075] 本发明的诱导型启动子可以是能够驱动治疗性基因表达的任何启动子,其激活是通过在配体诱导型转录因子和配体激活剂(以及任选的共激活伴侣)之间形成的激活复合物的形成来触发。适合表达的启动子包括例如CMV立即早期启动子、HSV胸苷激酶启动子、热休克启动子、SV40早期和晚期启动子、来自逆转录病毒的LTR和金属硫蛋白-I启动子。还可以使用已知控制基因在原核或真核细胞或其病毒中表达的其他启动子。

[0076] 用于本发明的优选的基因开关系统是基于蜕皮激素受体的配体诱导型基因开关,其允许在小分子激活剂配体例如但不限于veledimex的控制下调节转基因表达。基于蜕皮激素受体的基因开关含有三种基本组分:(1)诱导型启动子;(2)配体诱导转录因子和共激活伴侣;以及(3)激活剂配体(AL)(例如但不限于veledimex)。在不存在配体的情况下,基因开关蛋白复合物会提供"关闭"信号并限制基因转录。相反,在存在配体的情况下,复合物为靶基因(GOI)表达提供了剂量依赖性的"打开"信号。基于蜕皮激素受体的调节转基因表达的控制示意图示于图1中。

[0077] 基于蜕皮激素受体的基因开关的一个实例包括两种融合蛋白:Gal4/EcR和VP16/RXR。这两种融合蛋白(Gal4-EcR和VP16-RXR)的编码序列已插入无复制能力的慢病毒载体中,并且可在转导后在宿主细胞中表达并进行描述。基于蜕皮激素受体的基因开关融合蛋白的实例在PCT/US 2002/005090、美国专利号8,715,959、PCT/US 2008/011270、美国专利号9,402,919和WO2009/045370中进一步描述,其通过引用并入本文。

[0078] 在使用基于蜕皮激素受体的情况下,根据本发明的方法还可包括给予小分子激活剂配体,例如但不限于veledimex。Veledimex是激活剂配体的二酰基肼化学类别(DAH)中的化合物。Veledimex(其USAN名称)的化学名称为:3,5-二甲基-苯甲酸I-N-(1-叔丁基-丁基)-N'-(2-乙基-3-甲氧基-苯甲酰基)-酰肼;或,N-[(1R)-1-(1,1-二甲基乙基)丁基]-N'-(2-乙基-3-甲氧基苯甲酰基)-3,5-二甲基苯甲酰肼;并且,也被标识为INXN-1001和RG-115932。Veledimex具有式I的结构式:

[0079] 

[0080] 这种配体可以提高在基因和细胞疗法中控制转基因表达时间和水平的安全性。在本发明中,veledimex通过与Gal4-EcR配体结合融合蛋白结合而起作用,该蛋白结合共激活伴侣融合蛋白(例如VP16/嵌合RxR/USP)一起激活治疗基因转录(MMP1)的mRNA表达,导致MMP1蛋白的合成和生产(Palli等人,2003)(Karzenowski等人,2005)。

[0081] 在本发明的另一方面,从患有硬皮症的患者中分离或采集细胞并且用编码MMP蛋白或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸转染或转导。此后,将被转染或转导的细胞离体培养,并且然后给予至它们最初收集自的患者。如果编码MMP1蛋白的多核苷酸表达盒包括基因开关,那么硬皮症患者也可以被给予激活剂配体以激活基因开关。

[0082] 在另一个实施例中,可通过递送方法,例如在硬化性病变内注射,将转基因表达基本上限制在所需的作用位点。与配体激活相结合,这使得效应子在具有治疗作用的患病组织中的表达基本上受到限制,从而使全身性暴露降至最低并且因此减少了安全隐患。

[0083] 通过已知方法从硬皮症患者中提取细胞,并进行培养,以使其能够被编码所述MMP蛋白或其胶原蛋白降解片段或具有胶原蛋白酶活性的另一种蛋白质(例如,破坏胶原蛋白中肽键的酶)的多核苷酸转染或转导;优选通过使用病毒载体来完成。可以使用任何适用于基因治疗递送的病毒载体。在本发明中,所述病毒载体是腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)或慢病毒载体。优选地,病毒载体是慢病毒载体。

[0084] 用于构建本发明的转导载体的慢病毒载体经由转染或感染引入包装细胞系中。包装细胞系产生含有载体基因组的转导载体颗粒。将包装载体,转移载体和包膜载体共转染至包装细胞系后,从培养基中回收重组病毒,并通过本领域技术人员使用的标准方法进行滴定。因此,包装构建体可以通过磷酸钙转染、脂转染或电穿孔引入人细胞系中,任选地与显性可选择标志物(例如卡那霉素、新霉素、DHFR、谷氨酰胺合成酶或ADA)一起引入,然后在存在适当的药物情况下进行选择并分离克隆。可选择的标志基因可以与构建体中的包装基因物理连接。

[0085] 其中包装功能被配置为由合适的包装细胞表达的稳定细胞系是已知的。例如,参见美国专利号5,686,279;和Ory等人,(1996),其描述了包装细胞。包装细胞与在其中并入的慢病毒载体形成生产细胞。因此,生产细胞是可以产生或释放携带感兴趣治疗基因的包装的感染性病毒颗粒的细胞或细胞系。合适的慢病毒载体包装细胞系的实例包括293细胞。

[0086] 可以使用任何已知方法评估整合转基因的拷贝数。例如,拷贝数可以通过定量PCR、多重连接依赖性探针扩增、荧光原位杂交(FISH)、基于微阵列的拷贝数筛选和常规核型分析来确定。整合至每个细胞中的转基因的拷贝数可以通过在生产期间给予细胞的病毒剂量来调节。用含有MMP的载体转导的硬皮症采集细胞中每个细胞的整合转基因拷贝数是剂量依赖性的。

[0087] 在一个实施例中,细胞中MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数正好、大约、至少或不大于:每个细胞0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4或5个。

[0088] 在一个实施例中,整合到细胞基因组中的MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数正好、大约、至少或不大于:每个细胞0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4或5个。

[0089] 在某些实施例中,细胞中MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数大于每个细胞1个拷贝。

[0090] 在某些实施例中,细胞中MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数小于每个细胞5个拷贝。

[0091] 在某些实施例中,细胞中MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数大于每个细胞1个拷贝且小于每个细胞5个拷贝。

[0092] 在某些实施例中,细胞中MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数大约在每个细胞1至5个拷贝之间。

[0093] 在某些实施例中,细胞中MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数大约在每个细胞2至5个拷贝之间。

[0094] 在某些实施例中,细胞中MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数大约在每个细胞3至5个拷贝之间。

[0095] 在某些实施例中,细胞中MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数大约在每个细胞4至5个拷贝之间。

[0096] 在某些实施例中,细胞中MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数大约是每个细胞5个拷贝。

[0097] 在某些实施例中,整合到细胞基因组中的MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数大于每个细胞1个拷贝。

[0098] 在某些实施例中,整合到细胞基因组中的MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数小于每个细胞5个拷贝。

[0099] 在某些实施例中,整合到细胞基因组中的MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数大于每个细胞1个拷贝且小于每个细胞5个。

[0100] 在某些实施例中,整合到细胞基因组中的MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数大约在每个细胞1至5个拷贝之间。

[0101] 在某些实施例中,整合到细胞基因组中的MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数大约在每个细胞2至5个拷贝之间。

[0102] 在某些实施例中,整合到细胞基因组中的MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数大约在每个细胞3至5个拷贝之间。

[0103] 在某些实施例中,整合到细胞基因组中的MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数大约在每个细胞4至5个拷贝之间。

[0104] 在某些实施例中,整合到细胞基因组中的MMP或其他降解胶原蛋白的转基因数大约是每个细胞5个拷贝。

[0105] 在本发明的另一个实施例中,LV-RTS-MMP载体可以用于转导从硬皮症患者的活检中采集的人真皮细胞,例如成纤维细胞。将这些转导的人真皮细胞(HDF)进行离体培养,并且然后再次引入同一名患者。以这种方式,可以分阶段产生经基因修饰的携带MMP基因的自体细胞。阶段1可能涵盖活检、酶消化法和初始细胞扩增以及活检细胞原液冷冻。阶段2始于冷冻细胞原液的解冻、LV-RTS-MMP转导的细胞扩增、额外的细胞扩增、细胞采集和冷冻以产生被转导的细胞,然后将其重新给予回患者。优选地,用LV-RTS-MMP转导从硬皮症患者的活检中采集的细胞,并且将这些转导的细胞给予回同一位硬皮症患者。在一个实施例中,转导的细胞被称为“FCX-013”药物。图3显示了本发明范围内的用于生产FCX-013药物的高水平工艺流程图。

[0106] 根据本发明,在使用veledimex的情况下,皮内给予FCX-013将局部增加MMP水平,以降解存在于硬化区域的过量胶原蛋白。机械转导领域的工作表明,降低组织的硬度可能会通过在前馈回路中增加MMP和如前列腺素等的抗纤维化剂的产生来提升环境的抗纤维化,从而影响正在进行的纤维化(Carver和Goldsmith,2013)。

[0107] 当基因开关需要使用veledimex作为配体激活剂时,可以将包含veledimex的组合物配制成任何合适的浓度。Veledimex制剂可以以各种强度,包括例如5mg、10mg、20mg、30mg、40mg、50mg或100mg的强度封装,用于口服给予。在一些实施例中,使用veledimex制剂以每胶囊5mg、10mg、20mg、30mg、40mg或50mg的veledimex封装,用于口服给予。可以每天给予Veledimex,持续至少一周、两周、三周、一个月、两个月、三个月或六个月。在一些实施例中,veledimex以每天一次5mg、10mg、20mg或30mg的量给予。在另一个优选的实施例中,veledimex以每天一次40mg的量给予。Veledimex的给予剂量可以是每天两次、每天一次、每两天一次、每三天一次或其他时间间隔,持续至少7天、10天、14天、21天、28天、30天、60天、90天或更长时间。

[0108] Veledimex通过稳定两个融合蛋白之间的异源二聚作用来形成活性转录因子而起作用。该活性转录因子诱导靶标转基因的表达,该靶标转基因被置于配体诱导型基因表达系统的控制下(Kumar等人,2004)、(Lapenna等人,2008)、(Kumar等人,2002)、(Palli,2003)、(Shea和Tzertzinis,2010)、(Weis等人,2009)、(Katakam等人,2006)。

[0109] 在某些实施例中,其中将基因开关整合到基因表达系统中,激活剂配体(例如但不限于veledimex)的存在或不存在可分别起到打开或关闭MMP或其胶原蛋白降解片段的表达的作用。例如,开展一项体外研究以确定随着时间改变veledimex给予的小鼠中参考蛋白表达的长期动力学。可操作地连接至以veledimex为配体激活剂的参考基因开关的蛋白的打开/关闭组的持续时间已显示与veledimex的存在或不存在直接相关。特别地,例如,表3、以及图5和图6直接表明与给予用LV-RTS-MMP1转导的自体细胞相结合,veledimex的存在或不存在与MMP-1蛋白的受控表达直接相关,所述蛋白可操作地连接至基于蜕皮激素受体的基因开关。如本领域普通技术人员所已知和理解的,“关闭”的表达不一定意味着零(0)个可检测的基因表达。事实上,“关闭”表达意指与“打开”、或配体激活的基因表达状态相比,基因表达已大大降低。

[0110] 本发明涉及治疗和/或预防与过量胶原蛋白有关的硬皮症和疾病。此类病症和疾病包括硬斑病和局限性硬皮病,包括线状硬皮病、斑块状硬斑病、泛发性硬斑病、全硬化性硬斑病和混合性硬斑病,以及1)系统性硬皮病(SSc)(特别是指端硬化和内脏纤维化);2)皮肤纤维化包括:a)局限性皮肤型SSc(lSSc)和b)弥漫性皮肤型SSc(dSSc);3)系统性硬皮病并间质性肺疾病(ILD)(SSc-ILD);4)水肿性纤维硬化性脂膜病(橘皮组织);5)粘连性关节囊炎(肩周炎综合征);6)雷诺现象(RP);7)牛皮癣;8)肝纤维化(包括非酒精性脂肪性肝炎);9)肾纤维化(包括局灶节段性肾小球硬化);10)心脏纤维化;11)类风湿关节炎;12)克罗恩病;13)溃疡性结肠炎;14)骨髓纤维化;15)系统性红斑狼疮(SLE);16)骨骼肌纤维化(急性损伤后或由于慢性神经退行性肌肉疾病引起);17)先天性眼外肌纤维化(CFEOM1、CFEOM2、CFEOM3和Tukel综合征);18)慢性移植物抗宿主疾病;19)肥厚性疤痕;20)特发性肺纤维化;21)带状硬皮病;22)掌腱膜挛缩症;23)佩罗尼氏病;24)增生性疤痕;25)硬皮病相关的手功能障碍;26)放射纤维化综合征;以及27)其他硬皮症。

[0111] 编码MMP或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸的给予是通过适合将基因直接递送至患者皮肤的已知方法来递送。多核苷酸可以通过注射、局部或可植入装置来递送。每次给予之前都可以对患病组织进行清创术。

[0112] 在一个实施例中,给予是通过以下来进行:1)直接病变内施用(注射或局部);2)将成纤维细胞包埋在胶原蛋白基质中;3)将成纤维细胞包埋在水凝胶或网眼中;4)将成纤维细胞包封在聚合物胶囊中;5)动脉内注射成纤维细胞到肝脏;以及6)一般的局部给予。

[0113] 在一个实施例中,多核苷酸通过注射递送。在另一个实施例中,通过病毒载体与基因开关相结合递送多核苷酸。在另一个实施例中,将多核苷酸递送至采集的自体细胞,将其用包含编码MMP的多核苷酸的病毒载体转导,并将转导的细胞给予至患者。在一个实施例中,一次给予包含MMP或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸的载体。在另一个实施例中,在治疗过程中将载体给予1-2次、1-3次、1-4次或1-5次。在另一个实施例中,在治疗过程中将包含MMP基因(或编码其胶原蛋白降解片段)的自体转导细胞给予1-2次、1-3次、1-4次或1-5次。

[0114] 以足以转导细胞以表达MMP蛋白或其胶原蛋白降解片段的量递送编码MMP或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸。在本发明的一方面,将INXN-2005或LV-RTS-MMP载体递送到从硬皮症患者的活检中收集的细胞中,并将转导的细胞给予至所述硬化性疾病患者。包含MMP或其胶原蛋白降解片段多核苷酸的载体的剂量足以转导细胞以表达有效诱导胶原蛋白降解作用的MMP基因产物,如通过减少胶原蛋白I、II和/或III所示,或抗纤维化作用。例如,包含编码MMP或其胶原蛋白降解或抗纤维化片段的多核苷酸的载体的剂量可以是有效达到所需效果的任何合适的量。可替代地,有效量可以是减少、抑制或预防纤维化作用、ECM积累或胶原蛋白形成作用所需的量,或者是减少或抑制硬皮症所需的量。例如,对于用包含基于蜕皮激素受体的基因表达系统并且包含MMP转基因(例如INXN-2005)的载体与veledimex相结合治疗的患者,相较于治疗前的硬皮症或相较于用INXN-2005治疗但未使用veledimex的患者或相较于未经治疗的患者,可以发现硬皮症患者的ECM积聚减少了10%、20%、30%、35%、40%、45%、50%或甚至55%。优选地,对于用包含基于蜕皮激素受体的基因表达系统并且包含MMP转基因(例如INXN-2005)的载体与veledimex相结合治疗的患者,胶原蛋白降解作用导致胶原蛋白形成或ECM积聚减少了至少50%,或至少55%。可替代地,对于用包含基于蜕皮激素受体的基因表达系统和MMP-1转基因(例如INXN-2005)的自体细胞与veledimex相结合治疗的患者,相较于治疗前的硬皮症或相较于用INXN-2005治疗但未使用veledimex的患者或相较于未经治疗的患者,可以发现由治疗硬皮病产生的胶原蛋白降解作用将胶原蛋白I、II和/或III或胶原蛋白形成减少了10%、20%、30%、35%、40%、45%、50%或甚至55%。优选地,对于用包含基于蜕皮激素受体的基因表达系统并且包含MMP转基因(例如INXN-2005)的自体细胞与veledimex相结合治疗的患者,胶原蛋白降解作用导致胶原蛋白形成减少至少50%或至少55%。在一些方面,硬皮症的治疗或胶原蛋白形成的减少与胶原蛋白I、胶原蛋白III和/或TGFβ的浓度降低相关。在本发明的另一方面,抑制胶原蛋白形成以IFN-γ的增加为代表。

[0115] 当通过基因开关系统有条件地表达编码MMP或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸时,在给予编码MMP或胶原蛋白降解多肽的多核苷酸之前、同时和/或之后,向患者给予配体激活剂。可以以适合于激活基因开关的任何方式给予配体激活剂,包括通过注射,局部地用

药,通过可植入的装置,或全身性地,例如口服、静脉注射、皮下或肌内注射、肠胃外注射、皮肤递送或鼻腔递送。优选地,配体激活剂是口服给予的。配体激活剂可以存在于任何合适的药物载体中或可以以设计用于持续释放系统的药物组合物递送。编码MMP或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸的给予时间优选在配体激活剂给予之前。在本发明的一些方面,配体激活剂可以在注射编码MMP或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸后,或注射用编码MMP或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸转染或转导的细胞后给予持续1、2、3、4或5天。配体激活剂可以进一步每天、每周或每月连续或间歇给予,以激活MMP或其胶原蛋白降解片段的表达。在本发明的一方面,在给予编码MMP或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸或包含此种多核苷酸的转导细胞后,每天给予配体激活剂持续至少20、至少30、至少40、至少50或至少100天,所述多核苷酸可操作地连接至基因开关系统。当希望终止MMP或其胶原蛋白降解片段的表达时,不再向患者给予配体激活剂,从而有效率地关闭基因开关。优选地,配体激活剂是veledimex。可以想象,如果连续给予配体激活剂,MMP或其胶原蛋白降解片段的表达可能会在患者的整个生命周期中发生。

[0116] 以足以激活基因开关的量递送配体激活剂持续所需的时间。例如,在每天给予激活剂配体(例如但不限于veledimex)的情况下,所述剂量可以以10-100mg、25-75mg、30-50mg或40-50mg的强度来给予。本领域技术人员将能够基于递送系统和激活基因开关的期望有效持续时间来调节配体激活剂的剂量。

[0117] 本披露的药物组合物可以包括任何合适的药学上可接受的载体。合适的载体包括但不限于水、右旋糖、甘油、盐水、乙醇及其组合。载体可以含有另外的试剂,例如润湿剂或乳化剂,pH缓冲剂或增强制剂效力的佐剂。局部用载体包括液体石油、棕榈酸异丙酯、聚乙二醇、乙醇(95%)、在水中的聚氧乙烯单月桂酸酯(5%)或在水中的月桂基硫酸钠(5%)。可以根据需要添加其他材料,例如抗氧化剂,保湿剂,粘度稳定剂和类似试剂。

[0118] 本披露的药物组合物可以包括或与以下物质共同给予(同时、治疗前或治疗后):1)肉毒杆菌毒素(例如肉毒杆菌毒素);2)抗IL6生物制剂(例如托珠单抗(tocilizumab));3)抗CD20生物制剂(例如利妥昔单抗(rituximab));4)选择性共刺激调节剂(例如阿巴西普(abatacept));5)可溶性鸟苷酸环化酶刺激剂;充当血管扩张剂和抗纤维化剂(例如BAY63-2521);6)β聚糖肽;抑制TGF-β信号传导(例如P144乳膏);7)CB2受体激活剂;抑制免疫响应;8)抗BlyS生物制剂;抑制B细胞的存活/分化)(例如贝利木单抗(belimumab));9)抗纤维化的PPAR激活剂(例如IVA-337);10)吡啶酮衍生物(例如吡非尼酮(pirfenidone));11)凝血因子XIII;12)梭菌胶原蛋白酶;13)沙利度胺衍生物-抗血管生成和免疫调节剂(例如CC-4047);14)β-连环蛋白/CBP调节剂;抗纤维化剂(例如C-82);15)IL1-TRAP(例如IL1-TRAP);16)制抑素M mAb;抗纤维化/免疫调节剂(例如GSK-2330811);17)含氘的吡非尼酮(例如SD-560);18)miR-29类似物(例如MRG-201);以及19)来源于脂肪的再生细胞(例如ECCCS-50)。

[0119] 适用于治疗硬化性疾病的药物治疗试剂盒或系统也在本发明的范围内。本发明的药物治疗系统或试剂盒可包括注射用组合物,其包含包含编码MMP蛋白或其胶原蛋白降解片段的多核苷酸的载体,所述多核苷酸连接于基因开关系统,以及分别地,用于激活基因开关系统的激活剂配体。

[0120] 实例

[0121] 实例1

[0122] LV-RTS-MMP1慢病毒的构建和表征

[0123] 使用重组慢病毒载体(LV)LV-RTS-MMP1将MMP1基因导入培养的成纤维细胞。所述LV是非复制型的水疱性口炎病毒-G(VSV-G)假型、自灭活(第3代)慢病毒(SIN-LV)。LV-RTS-MMP1具有对应于SEQ ID NO:1的核苷酸序列,并且氨基酸序列具有SEQ ID NO:3的序列。

[0124] 人MMP1基因的来源

[0125] MMP1 cDNA的序列(SEQ ID NO:1)衍生自人pro-MMP1的共有序列,其中天然MMP1信号肽被人色素上皮衍生因子(PEDF)的信号肽序列(SEQ ID NO:2)替换,以提供更有效地从成纤维细胞分泌MMP1。所述cDNA(1410bp)被生成并克隆到标准表达质粒中进行初始分析。然后,对所述MMP1cDNA进行工程改造,以去除潜在的拼接位点,并且克隆到与基于蜕皮激素受体的表达盒相邻的pFUGW SIN-LV主链中,以使用激活剂配体(例如但不限于veledimex)控制MMP1的表达,从而产生LV-RTS-MMP1载体。图2提供了LV-RTS-MMP1的图示。

[0126] 实例2:FCX-013和Veledimex背景

[0127] 2.1体外研究

[0128] Veledimex诱导的MMP1的表达在通过用LV-RTS-MMP1转导而进行了基因修饰的原代成纤维细胞中进行了评估。用研究级LV-RTS-MMP1原液的不同稀释度转导原代正常人真皮成纤维细胞(NHDF)。转导后两代后,将转导的NHDF(HDF-RTS-MMP1)接种到24孔板中,并且用100nM的veledimex或0.1%的DMSO(媒介物)处理。研究还包括未用LV-RTS-MMP1(“模拟物”)转导的NHDF。添加veledimex或DMSO后72小时收集细胞上清液,并且通过ELISA(R&D系统公司(R&D Systems)DuoSet)分析MMP1表达水平。收集细胞,并且使用引物和对LV-RTS-MMP1构建体具有特异性的探针通过qPCR分析整合的LV-RTS-MMP1拷贝数(每个细胞的平均值)。三个转导研究的结果在下表2中详细列出,并且在图4中以图形方式显示。在存在veledimex的情况下观察到高水平的MMP1表达。未诱导的水平类似于模拟的转导水平,具有更高的LV-RTS-MMP1稀释度(MOT较低)。平均整合拷贝数随LV-RTS-MMP1剂量变化,并且实现拷贝数高达5.7个拷贝/细胞。

[0129] 表2-不同剂量的两个研究级LV-RTS-MMP1批次的NHDF传导:用和不用Veledimex的表达水平和平均综合拷贝数

[0130]

转导研究号	LV-RTS-MMP1	稀释度	MOT	ng/mL MMP1 (±SD)		平均拷贝数(±SD)
				无 AL	+AL	
1	研究批次1 (3.47e7 TU/mL)	1 : 4	144.6	6.8 ± 1.6	190 ± 204	nd**
		1 : 16	36.1	9.2 ± 1.2	810 ± 24.7	1.01 ± 1.53
	模拟物	--	--	nd	11.9 ± 16.8	--
2	研究批次1 (3.47e7 TU/mL)	1 : 16	36.1	12.2 ± 1.7	56.1 ± 29.8	0.29 ± 0
		1 : 64	9.0	6.1 ± 1.1	56.7 ± 37.8	0.35 ± .32
		1 : 128	4.5	5.1 ± 0.9	36.8 ± 4.9	nd
	研究批次2 (3.59e7 TU/mL)	1 : 16	37.4	10.9 ± 3.8	80.5 ± 25.0	1.19 ± 1.02
		1 : 64	9.3	10.0 ± 2.6	43.9 ± 10.3	0.95 ± 0.71
		1 : 128	4.7	9.53 ± 2.0	27.9 ± 3.1	0.50 ± 0.25

[0131]

	模拟物	--	--	8.6 ± 5.0	9.0 ± 5.3	--
3	研究批次 2 (3.59e7 TU/mL)	1 : 16	37.4	19.9 ± 1.2	1571 ± 54	5.71 ± 0.69
		1 : 64	9.3	14.7 ± 1.3	1421 ± 36	1.6 ± 0.36
		1 : 128	4.7	8.6 ± 2.4	1380 ± 371	0.05 ± 0.05
	模拟物	--	--	6.1 ± 0.6	6.5 ± 0.7	--

[0132] TU＝转导单位

[0133] MOT＝转导的倍数(TU/mL×体积÷稀释因子÷细胞数)

[0134] **nd＝未确定

[0135] 2.2体内研究

[0136] 目前尚不存在能完全概括局限性硬皮病/硬斑病的疾病表型的啮齿动物模型。此外,非常接近的啮齿动物模型具有免疫能力,因此无法评估基因修饰的人细胞。为了解决FCX-013是否具有治疗潜力,选择博来霉素诱导的硬皮病模型,利用NOD/SCID小鼠以评估GM成纤维细胞表达的MMP1是否可以逆转皮肤纤维化。以1:16剂量转导的HDF-RTS-MMP1细胞,其中平均值为5.7个整合的拷贝/细胞(上表2中的转导号3),并且模拟物转导的细胞(非GM)进一步扩增(至转导后第6代)以获得足够的细胞数用于体内研究,并且然后冷冻保存。将每个小瓶解冻、培养,并在存在veledimex(+AL)或0.1％DMSO(无AL)的情况下通过ELISA重新验证诱导型MMP1表达。结果示于下表3中。

[0137] 表3-LV-RTS-MMP1转导的NHDF在另外的传代后在存在Veledimex的情况下继续表达高水平MMP1

[0138]

	无 AL（ng/mL）	+AL （ng/mL）
非 GM HDF（模拟物）	5.7	3.8
HDF-RTS-MMP1	15.6	1714

[0139] 如下表4的体内研究设计所详述的,NOD/SCID小鼠每隔一天接受真皮注射博来霉素(或盐水;第4组),持续4周。在最后一次博来霉素治疗后的第二天,在博来霉素注射的相同位置向小鼠注射HDF-RTS-MMP1细胞(第1组和第2组),或未修饰的细胞(第3组)或无细胞(无注射,第4组)。从细胞注射的同一天开始,小鼠通过口服管饲法接受veledimex(第2、3和4组)或赋形剂(丙二醇辛酸酯90/三醋精;第1组)持续连续10天。细胞注射后第10天,对注射位点进行活检并保存以进行组织学检查。将组织学切片用H&E染色,成像,并且使用ImageJ软件测量皮肤厚度(每只小鼠5个载玻片,每个载玻片5张图像;10X放大倍率,1像素＝0.8686μm换算)。图7显示了每组每只小鼠随机选择的图像。在研究第28、33和39天(注射成纤维细胞后-1天{即放血前}、第4天和第10天),从每只小鼠上收集血清,并且测定其循环MMP1(图6)。

[0140] 表4-检测HDF-RTS-MMP1在博莱霉素诱导的硬皮病模型中在NOD/SCID小鼠中的作用机理的体内研究设计

[0141]

Grp	N	性别	治疗号 1	治疗号 2	治疗号 3		治疗天数（号 2 &号 3）	
			测试品	测试品（50 μL）	测试品	剂量（100 μL）	HDF 给药日	AL 给药日
1	8	F	皮内，BLM，qod，d0-28	口服丙二醇辛酸酯 90/三醋精	HDF-RTS-MMP1	5e5 细胞	第 29 天	天数 29-39
2	9	F	皮内，BLM，qod，d0-28	口服 Veledimex	HDF-RTS-MMP1	5e5 细胞	第 29 天	天数 29-39
3	6	F	皮内，BLM，qod，d0-28	口服 Veledimex	HDF（非 GM）	5e5 细胞	第 29 天	天数 29-39
4	7	F	皮内，盐水，qod，d0-28	口服 Veledimex	--	--	--	天数 29-39

[0142] Qod＝每隔一天

[0143] 图5所示的图显示,通过皮内注射HDF-RTS-MMP1细胞治疗博来霉素诱导的病变可减少真皮层(图5A)和真皮下肌肉层(图5B)的厚度。此外,通过口服递送veledimex诱导MMP1表达可将真皮厚度降低至与非博来霉素(盐水)治疗的皮肤相似的水平(图5A),并进一步降低皮下肌层的厚度(图5B)。数据表明,即使在没有veledimex激活的情况下,即使在体外测得的MMP1表达水平较低,也可能是由于高整合LV-RTS-MMP1拷贝数导致的假象,也会对真皮和皮下肌肉厚度产生影响。

[0144] 通过本研究中所用细胞以足以被系统检测到的水平在体内表达MMP1(图6)。尽管在载体加veledimex治疗的动物的血清中检测到高水平的MMP1,但在没有veledimex的载体的动物血清中未检测到MMP1。这表明低水平的MMP1可能足以减少真皮厚度。

[0145] 实例3:在NOD/SCID小鼠中的研究

[0146] 本实例描述了在NOD/SCID小鼠中使用博来霉素诱导的(BLM诱导的)疾病模型的研究。图8显示了治疗进度的概况。

[0147] 表5提供了研究组的描述。

[0148] 本研究的设计以实验数据(数据未显示)为基础,该实验数据显示:

[0149] 在给予FCX-013加veledimex的NOD/SCID小鼠中,MMP1表达(蛋白质和mRNA)在第24小时至第3天之间最大,并且在注射FCX-013后第28天无法检测到。

[0150] 与非BLM治疗的动物相比,BLM治疗的动物的蛋白表达更高。

[0151] 观察到的全身毒性归因于博来霉素治疗。

[0152] 没有确定的毒性与2x 10^6FCX-013细胞相关

[0153] 注射FCX-013后第10天,DNA拷贝数和MMP1表达迅速下降

[0154] 为了确保足够的MMP1表达,拷贝数靶标应优选高于每个细胞1个拷贝,并且为了治

疗诸如硬皮病等障碍的安全性和有效性,每个细胞应约为5个拷贝或更少。

[0155] 本实例研究的目的是评估皮下注射的FCX-013细胞的毒性、载体生物分布、载体的持久性和MMP1表达,以及在NOD/SCID小鼠中观察在BLM诱导的硬皮病模型的正常和硬化皮肤中的作用。

[0156] 该研究是在博莱霉素诱导的硬皮病模型中利用NOD/SCID小鼠进行的。NOD/SCID小鼠每隔一天(D或d)接受博莱霉素或盐水的真皮注射,持续4周(研究的第1天(D1)代表开始用BLM治疗)。在最后一次博来霉素治疗后的第二天,在与博来霉素注射相同的位置向小鼠注射FCX-013细胞、未修饰的细胞,或无细胞。从细胞注射的同一天开始,小鼠通过口服管饲法接受veledimex或赋形剂持续连续30天。在某些组中,有14天的恢复期。在注射媒介物、FCX-013或非GM-HDF细胞后的第3、10、30(以及恢复组中的45)天进行最终评估。在注射细胞后3天和10天从每只小鼠上收集血清,并测定循环MMP1。具体地,在d3(在细胞注射后)收集小鼠血清,并在d10将其处死;并且在d10(在细胞注射后)收集小鼠血清,所述小鼠在d30被处死。

[0157] 研究治疗组如下所示。

[0158] 表5(a):治疗组

[0159]

组号	试验材料	目标总剂量(细胞)	每个位点的目标剂量(细胞)	总剂量体积(μL)[a]	目标剂量浓度(细胞/mL)	BLM剂量(μg)(qod)[b]	Veledimex剂量(μg/小鼠)[c]
1	对照(媒介物)	0	0	200	0	0	0
2	对照(媒介物)	0	0	200	0	10	1000
3	FCX-013	6×10^6	3×10^6	200	1×10^7	0	1000
4	FCX-013	6×10^6	3×10^6	200	1×10^7	10	0
5	FCX-013	6×10^5	3×10^5	200	1×10^6	10	1000
6	FCX-013	2×10^6	1×10^6	200	1×10^7	10	1000
7	FCX-013	6×10^6	3×10^6	200	1×10^7	10	1000

[0160] 表5(b):治疗组(上接表)

[0161]

组号	试验材料	小鼠数目							
		第32天（d3）：		第39天（d10）		第59天（d30）		第74天（d45）	
		M	F	M	F	M	F	M	F
1	对照（媒介物）	10	10	10	10	10	10	--	--
2	对照（媒介物）	10	10	10	10	10	10	--	--
3	FCX-013	10	10	10	10	10	10	--	--
4	FCX-013	10	10	10	10	10	10	--	--
5	FCX-013	10	10	10	10	10	10	5	5
6	FCX-013	10	10	10	10	10	10	5	5
7	FCX-013	10	10	10	10	10	10	5	5

[0162]

[0163] --＝不适用。

[0164] [a]第29天在2个单独的背侧位点(100μL/位点)给予一次

[0165] [b]在第1至27天,对第2-8组qod(每隔一天)给予,通过皮内注射到两个单独的背侧位点(100μL/位点)

[0166] [c]在第29至39天或第29至59天,每天口服50μL/剂(50μL的20mg/mL溶液是1000μg/小鼠的剂量,对20g的小鼠来说相当于约50mg/kg的剂量。

[0167] [d]恢复小鼠:在第59天后,停止给予veledimex。

[0168] 选择博来霉素试剂的皮内给予途径、剂量和方案以诱导皮肤硬化模型。选择veledimex的口服给予途径、剂量和方案,因为veledimex是口服给药,并且最大剂量涵盖了可以在临床上给药的剂量。选择测试品的皮内给予途径,因为这可能是人给予途径。

[0169] 在先前的研究中,在博来霉素治疗的NOD/SCID小鼠中,在存在veledimex的情况下,用携带每个细胞5.7±0.69平均拷贝数的LV-RTS-MMP1修饰的HDF的治疗,在体外表达1571±54ng/mL MMP1蛋白,并且导致真皮和皮下肌肉厚度均显著减少。此外,在不存在veledimex的情况下,真皮和皮下肌肉厚度有中等但明显的减少。在不存在veledimex的情况下,这些5.7个拷贝数细胞体外表达19.9±1.2ng/mL MMP1蛋白,这与对于在另一研究中使用的较低0.83个拷贝数细胞在体外表达的MMP1的水平相似。基于体外转导研究中的MMP1表达水平,复制率和MMP1表达之间可能存在线性相关。此外,观察到约1个拷贝/细胞d LV-RTS-MMP1显示对小鼠没有明显的毒性,但在减少真皮厚度和真皮纤维化方面却表现出明显降低的效果。因此,选择约5个拷贝/细胞的拷贝数目标作为本研究中要测试的剂量,其中各组具有3个不同的细胞总数(3x 10^5、1x 10^6、3x 10^6)。

[0170] 程序,观察和测量

[0171] 可行性检查

[0172] 频率:在整个研究过程中,每天进行两次,一次在早上,一次在下午。

[0173] 临床观察结果

[0174] 频率:在适应期间至少一次,在给药当天至少在剂量给予前一次,并且此后每天一次。

[0175] 给药后

[0176] 频率:剂量给予后1至2小时之间以及一天结束时记录临床观察结果。给药后观察的时间可能会延长。每天记录给药后剩余时间的临床观察结果。

[0177] 体重

[0178] 频率:在适应期间至少每周一次。在剂量给予当天以及给药后期间至少每周两次,包括计划的安乐死的那天。

[0179] 临床病理学

[0180] 血液学

[0181] 频率:在细胞注射后第3、10和30天。

[0182] PCR的组织收集和保存

[0183] 使用无菌技术收集在PCR组织收集表中鉴定的代表性组织样品,以进行细胞特异性定量聚合酶链反应(qPCR)分析。打开腹部,并且从腔静脉收集血液以进行血液学评估。如果可能,从器官切下一小部分组织,包括肉眼可见的病变/肿块,并记录组织切片的重量。称重后立即将样品在干冰/酒精浴中速冻,放置在含有干冰的冷却器中,直到放置于被设置保持(<-60℃)的冰箱中,直至装运进行分析。

[0184] 载体/mRNA qPCR

[0185] 通过qPCR评估载体和MMP1特异性mRNA的注射位点和组织和主要器官的选择列表。

[0186] 实例4:NOD/SCID小鼠的研究-通过FCX-013表达MMP1

[0187] 在非肥胖型糖尿病/重度联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠中评估FCX-013细胞的生物分布和MMP-1的表达动力学。通过使用合格的定量PCR分析法评估LV构建体DNA和MMP-1特异性mRNA表达,确定FCX-013加veledimex的生物分布和表达。使用市售试剂盒进行MMP-1蛋白定量。皮内注射FCX-013细胞后评估MMP-1的生物分布和表达。将细胞皮内注射到雄性和雌性免疫缺陷型NOD/SCID小鼠背部的两个位点(1x 106细胞/位点)中,然后在注射FCX-013后每天口服veledimex(48mg/kg),持续最多28天。

[0188] 使用用于测量整合的INXN-2005(LV-RTS-MMP1)拷贝数(代表FCX-013细胞)和构建体特异性MMP-1mRNA表达水平的定量PCR方法来评估表达水平。DNA拷贝数的检测和定量下限分别为每100ng总DNA 5个和12.5个拷贝。

[0189] MMP-1蛋白的定量是通过市售的试剂盒进行的(来自MesoScale Discovery的人MMP 3-Plex超灵敏试剂盒(MSD;罗克维尔,马里兰州,美国));用于根据制造商的建议准备的血清样品和皮肤裂解物以进行MMP-1的定量(动态范围为11-100000pg/mL)。

[0190] 通过高效液相色谱(HPLC)和紫外(UV)检测验证了给药溶液和给药悬浮液中veledimex的测定。在分析期间,对方法的特异性、线性、准确性、精确性和稳定性进行了验证。

[0191] 这项研究旨在确定用FCX-013加口服veledimex治疗的小鼠中MMP-1表达的发生、

高峰和平稳期,为关键的GLP毒理学研究提供最佳的收集时间点。使用打算用于拟议的临床研究的FCX-013制造方法生成的细胞,经皮内注射到雄性和雌性免疫缺陷NOD/SCID小鼠背部的两个位点(100万个细胞/位点)。这些细胞的特征示于表3。在FCX-013注射后,小鼠然后每天接受口服veledimex(48mg/kg;第1组)或赋形剂(丙二醇单辛酸酯90/三醋精;第2组),持续最多28天。在6h、24h、以及第3、7、10、14、21和28天,对每组小鼠的一个亚组进行安乐死以进行评估。收集皮肤活检样品并进行处理,以通过MSD ELISA进行MMP-1蛋白定量或通过qPCR和RT-qPCR进行INXN-2005DNA和mRNA测量。还收集血清并经MSD ELISA测试是否存在任何全身性MMP-1蛋白。表4总结了治疗组和终止时间点。

[0192] 表6:表达动力学研究中所用细胞的特征

[0193]

	整合的 INXN-2005 拷贝数 [1]	体外 MMP-1 表达水平（ng/mL）	
		加 veledimex	无 veledimex
FCX-013	6.98[2]	162.9 ± 17.1	9.31 ± 2.18
非 GMHDF	未检测到	1.79 ± 0.16	1.62 ± 0.50

[0194] [1]用INXN-2005的试生产批次转导细胞

[0195] [2]FCX-013的整合的INXN-2005(LV-RTS-MMP1)拷贝数

[0196] 在皮肤活检中,INXN-2005拷贝数(代表FCX-013细胞)在24小时内开始下降,但在注射后第28天仍可检测到,男性和女性之间以及经veledimex和赋形剂处理的动物之间没有显著差异(数据未显示)。将MMP-1mRNA表达计算为每个样品的持家基因标准化Ct值与未使用veledimex治疗的注射后28天标准化的Ct值平均值的比值。结果在图2中表示为第28天(无veledimex;Al)时间点的倍数。与DNA表达相似,在口服veledimex激活剂配体治疗的小鼠中,mRNA表达更早达到峰值(在注射FCX-013后3天),且在注射后10天几乎无法检测到。

[0197] 讨论:在NOD/SCID小鼠中皮内给予FCX-013并每日口服veledimex可导致皮肤中MMP-1mRNA和蛋白质的表达在24小时至3天达到峰值。注射后10天未检测到MMP-1表达水平。随着时间,表达水平的下降与INXN-2005DNA拷贝数(代表FCX-013细胞数)的丢失一致,其在注射后28天仍可测量到。此外,非临床研究评估了通过veledimex对其他靶蛋白表达的控制,表明口服给予一定剂量的veledimex后可使组织中veledimex的水平达到约为250ng/mL,实现靶蛋白的最大表达。

[0198] 缩略语和首字母缩略词

[0199] (缩写或首字母缩写-定义)

[0200] BLM-博来霉素

[0201] Cmax-观察到的最大浓度

[0202] CYP-细胞色素

[0203] DMSO-二甲基亚砜

[0204] ECM-细胞外基质

[0205] EcR-蜕皮激素受体

[0206] FCX-013-基因修饰的人真皮成纤维细胞,在基于有条件的(调节的)蜕皮激素受体基因表达系统的控制下,表达和分泌人基质金属蛋白酶1(MMP-1)

[0207] FXR-法尼醇X受体

[0208] Gal4-EcR-包含来自云杉芽虫(Choristoneura fumiferana)的诱变EcR的DEF结构域与酵母Gal4转录因子的DNA结合结构域融合

[0209] GM-基因修饰

[0210] GM-HDF-基因修饰的人皮肤成纤维细胞

[0211] INXN-1001-Veledimex激活剂配体

[0212] INXN-2005-含有MMP-1基因构建体的慢病毒载体(也称为LV-RTS-MMP-1)

[0213] IP-腹膜内

[0214] IV-静脉注射

[0215] LV-慢病毒

[0216] LV-RTS-MMP-1-含有MMP-1基因构建体的慢病毒载体(也称为INXN-2005)

[0217] LTR-长末端重复

[0218] MMP-1-基质金属蛋白酶1

[0219] MTD-最大耐受剂量

[0220] NA-不适用

[0221] NOD/SCID-非肥胖型糖尿病/严重合并免疫缺陷症(NOD/SCID)

[0222] RAR-视黄酸受体

[0223] RXR-类视黄醇X受体

[0224] SD-斯泼累格·多雷大鼠(Sprague Dawley)

[0225] USAN-美国采用的名称

[0226] USP-超螺旋

[0227] VP16-RXR-由与HSV-1的VP16蛋白的转录激活域融合的嵌合RXR的EF域(即人和蝗虫序列)组成的编码序列。

[0228] 参考文献

[0229] Asano,et al.,“Involvement of alphavbeta5 integrin in the establishment of autocrine TGF-beta signaling in dermal fibroblasts derived from localized scleroderma,”J Invest Dermatol,vol.126,no.8,pp.1761-9,2006.

[0230] Bedair,et al.,“Matrix metalloproteinase-1therapy improves muscle healing,”J Appl Physiol,vol.102,no.6,pp.2338-45,2007.

[0231] Carver,et al.,“Regulation of Tissue Fibrosis by the Biomechanical Environment,”BioMed Research International,vol.2013,pp.1-10,2013.

[0232] Christen-Zaech,et al.,“Pediatric morphea(localized scleroderma):review of136patients,”J Am Acad Dermatol,vol.59,no.3,pp.385-96,2008.

[0233] El-Mofty,et al.,“Suggested mechanisms of action of UVA phototherapy in morphea:a molecular study,”Photodermatol Photoimmunol Photomed,vol.20,no.2,pp.93-100,2004.

[0234] Fett,et al.,“Update on morphea:part I.Epidemiology,clinical presentation,and pathogenesis,”J Am Acad Dermatol,vol.64,no.2,pp.217-28,2011.

[0235] G.A.R.D.I.C.(GARD),“Localized Scleroderma,”2012.[Online].

[0236] Giannandrea,et al.,“Diverse functions of matrix metalloproteinases

during fibrosis.",Dis Model Mech.2014Feb;7(2):193-203.

[0237] Grabbe,et al.,"High-dose ultraviolet A1(UVA1),but not UVA/UVB therapy,decreases IgE-binding cells in lesional skin of patients with atopic eczema,"J Invest Dermatol,vol.107,no.3,pp.419-22,1996.

[0238] Grundmann-Kollmann,et al.,"PUVA-cream photochemotherapy for the treatment of localized scleroderma,"J Am Acad Dermatol,vol.43,no.4,pp.675-8,2000.

[0239] Gruss,et al.,"Induction of interstitial collagenase(MMP-1)by UVA-1phototherapy in morphea fibroblasts,"Lancet,vol.350,no.9087,pp.1295-6,1997.

[0240] Iimuro,et al.,"Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat,"Gastroenterology,vol.124,no.2,pp.445-58,2003.

[0241] Kaar,et al.,"Matrix metalloproteinase-1 treatment of muscle fibrosis,"Acta Biomater,vol.4,no.5,pp.1411-20,2008.

[0242] Kelsey,et al.,"The Localized Scleroderma Cutaneous Assessment Tool: responsiveness to change in a pediatric clinical population,"J Am Acad Dermatol,vol.69,no.2,pp.214-20,2013.

[0243] Kerscher,et al.,"Treatment of localized scleroderma by UVA1 phototherapy,"The Lancet,vol.346,no.1166,pp.91843-4,1995.

[0244] Kroft,et al.,"Period of remission after treatment with UVA-1 in sclerodermic skin diseases,"J Eur Acad Dermatol Venereol,vol.22,no.7,pp.839-44,2008.

[0245] Kumar,et al.,"A single point mutation in ecdysone receptor leads to increased ligand specificity:Implications for gene switch applications,"Proc Natl Acad Sci U S A,p.14710-14715,2002.

[0246] Kumar,et al.,"Highly flexible ligand binding pocket of ecdysone receptor:a single amino acid change leads to discrimination between two groups of nonsteroidal ecdysone agonists,"J Biol Chem,vol.279(26),pp.27211-8,2004.

[0247] Lapenna,et al.,"Ecdysteroid ligand-receptor selectivity--exploring trends to design orthogonal gene switches,"FEBS J,pp.5785-809,2008.

[0248] Laxer,et al.,"Localized Sclerodmera,"Curr Opin Rheumatol,vol.18,no.6,pp.606-13,2006.

[0249] Lipsker,et al.,"Prospective evaluation of frequency of signs of systemic sclerosis in 76 patients with morphea,"Clin Exp Rheumatol,vol.33,no.4 Suppl 91,pp.S23-5,2015.

[0250] Morita,et al.,"Ultraviolet A1(340-400 nm)phototherapy for scleroderma in systemic sclerosis,"J Am Acad Dermatol,vol.43,no.4,pp.670-4,2000.

[0251] Page-McCaw,et al.,"Matrix metalloproteinases and the regulation of

tissue remodelling."Nat Rev Mol Cell Biol.2007 Mar;8(3):221-33.

[0252] Palli,et al.,"Improved ecdysone receptor-based inducible gene regulation system.,"European journal of biochemistry,pp.1308-15,2003.

[0253] Pardo,et al.,"MMP-1:the elder of the family,"Int J Biochem Cell Biol, vol.37,no.2,pp.283-8,2005.

[0254] Pascual-Le,et al.,"Effects of simulated solar radiation on type I and type III collagens,collagenase(MMP-1)and stromelysin(MMP-3)gene expression in human dermal fibroblasts cultured in collagen gels,"J Photochem Photobiol B, vol.42,no.3,pp.226-32,1998.

[0255] Peterson,et al.,"The epidemiology of morphea(localized scleroderma)in Olmsted County 1960-1993,"J Rheumatol,pp.73-80,1997.

[0256] Piram,et al.,"Short-and long-term outcome of linear morphoea in children,"Br J Dermatol,vol.169,no.6,pp.1265-71,2013.

[0257] Shea,et al.,"Controlled expression of functional miR-122 with a ligand inducible expression system,"BMC biotechnology,vol.10,p.76,2010.

[0258] Stege,et al.,"High-dose UVA1 radiation therapy for localized scleroderma,"J Am Acad Dermatol,vol.36,no.6,pp.938-44,1997.

[0259] T.S.Foundation,"Localized Scleroderma,"2015.[Online].

[0260] Takeda,et al.,"Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts,"J Invest Dermatol,vol.103,no.3,pp.359-63,1994.

[0261] Weiss,et al.,"Inducible mutant huntingtin expression in HN10 cells reproduces Huntington's disease-like neuronal dysfunction.Molecular neurodegeneration,"Mol Neurodegener,pp.1-12,2009.

[0262] Yamamoto,"The bleomycin-induced scleroderma model:what have we learned for scleroderma pathogenesis?"Arch Dermatol Res.2006 Feb;297(8):333-44.Epub 2006 Jan 10.

[0263] Yamamoto,et al.,"Animal model of sclerotic skin.I:Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma."J Invest Dermatol.1999Apr;112(4):456-62.

[0264] Yamamoto,et al.,"Animal model of sclerotic skin.IV:induction of dermal sclerosis by bleomycin is T cell independent."J Invest Dermatol.2001 Oct;117(4):999-1001.

[0265] Yamamoto,et al.,"Animal model of systemic sclerosis."J Dermatol.2010Jan;37(1):26-41.

[0266] Zheng,et al.,"UVA-induced ultrastructural changes in hairless mouse skin:a comparison to UVB-induced damage,"J Invest Dermatol,vol.100,no.2, pp.194-9,1993.

[0001] 序列表

[0002] <110> 英特瑞克斯顿股份有限公司(Intrexon Corporation)

[0003] Thomas, Darby

[0004] Maslowski, John

[0005] Malyala, Anna

[0006] <120> 递送包含基质金属蛋白酶的自体细胞用于治疗硬皮病

[0007] <130> INX00372WO

[0008] <140> TBD

[0009] <141> 2018-04-20

[0010] <150> US 62/488,207

[0011] <151> 2017-04-21

[0012] <150> US 62/512,382

[0013] <151> 2017-05-30

[0014] <160> 6

[0015] <170> PatentIn版本3.5

[0016] <210> 1

[0017] <211> 1410

[0018] <212> DNA

[0019] <213> 人工序列

[0020] <220>

[0021] <223> 将来自人PEDF(丝氨酸蛋白酶抑制剂F1,PEDF-1)和人MMP1

[0022] (基质金属蛋白酶1)基因的编码信号蛋白序列的核苷酸序列融合

[0023] <220>

[0024] <221> 信号肽

[0025] <222> (1)..(57)

[0026] <400> 1

[0027] atgcaggccc tggtgctact cctctgcatt ggagccctcc tcgggcacag cagctgcttc 60

[0028] ccagcgactc tagaaacaca agagcaagat gtggacttag tccagaaata tttggaaaaa 120

[0029] tactacaacc tgaagaatga tgggcgccag gttgaaaagc ggagaaatag tggcccagtg 180

[0030] gttgaaaaat tgaagcaaat gcaggaattc tttgggctga aagtgactgg gaaaccagat 240

[0031] gctgaaaccc tgaaggtgat gaagcagccc agatgtggag tgcctgatgt ggctcagttt 300

[0032] gtcctcactg aggggaaccc tcgctgggag caaacacatc tgacctacag gattgaaaat 360

[0033] tacacgccag atttgccaag agcagatgtg gaccatgcca ttgagaaagc cttccaactc 420

[0034] tggagtaatg tcacacctct gacattcacc aaggtctctg agggtcaagc agacatcatg 480

[0035] atcagctttg tcaggggaga tcatcgggac aactctcctt ttgatggacc tggaggaaat 540

[0036] cttgctcatg cttttcaacc aggcccaggt attggagggg atgctcattt tgatgaagat 600

[0037] gaaaggtgga ccaacaattt cagagagtac aacttacatc gtgttgcagc tcatgaactc 660

[0038] ggccattctc ttggactctc ccattctact gatatcgggg ctttgatgta ccctagctac 720

[0039] accttcagtg gtgatgttca gctagctcag gatgacattg atggcatcca agccatatat 780

[0040] ggacgttccc aaaatcctgt ccagcccatc ggcccacaaa ccccaaaagc gtgtgacagt 840

[0041] aagctaacct ttgatgctat aactacgatt cggggagaag tcatgttctt caaagacaga 900

[0042] ttctacatgc gcacaaatcc cttctacccg gaagttgagc tcaatttcat ttctgttttc 960

[0043] tggccacaac tgccaaatgg gcttgaagct gcttacgaat ttgccgacag agatgaagtc 1020

[0044] cggtttttca aagggaataa gtactgggct gttcagggac agaatgtgct acacggatac 1080

[0045] cccaaagaca tttacagctc ctttggcttc cctagaactg tgaaacacat tgatgctgct 1140

[0046] ctttctgagg aaaacactgg aaaaacctac ttctttgttg ctaacaaata ctggaggtat 1200

[0047] gatgaatata aacgatctat ggatccaggt tatcccaaaa tgatagcaca tgactttcct 1260

[0048] ggaattggcc acaaagttga tgcagttttc atgaaagatg gatttttcta tttctttcat 1320

[0049] ggaacaagac aatacaaatt tgatcctaaa acgaagagaa ttttgactct ccagaaagct 1380

[0050] aatagctggt tcaactgcag gaaaaattaa 1410

[0051] <210> 2

[0052] <211> 57

[0053] <212> DNA

[0054] <213> 智人

[0055] <220>

[0056] <221> 信号肽

[0057] <222> (1)..(57)

[0058] <223> 人PEDF信号肽的核苷酸序列

[0059] <400> 2

[0060] atgcaggccc tggtgctact cctctgcatt ggagccctcc tcgggcacag cagctgc 57

[0061] <210> 3

[0062] <211> 469

[0063] <212> PRT

[0064] <213> 人工序列

[0065] <220>

[0066] <223> 人PEDF信号肽和人MMP1融合蛋白

[0067] <220>

[0068] <221> 信号

[0069] <222> (1)..(19)

[0070] <220>

[0071] <221> 前肽

[0072] <222> (20)..(99)

[0073] <223> 切割掉以允许酶促激活成熟多肽的MMP1的初前部分

[0074] <400> 3

[0075] Met Gln Ala Leu Val Leu Leu Leu Cys Ile Gly Ala Leu Leu Gly His

[0076] 1 5 10 15

[0077] Ser Ser Cys Phe Pro Ala Thr Leu Glu Thr Gln Glu Gln Asp Val Asp

[0078] 20 25 30

[0079] Leu Val Gln Lys Tyr Leu Glu Lys Tyr Tyr Asn Leu Lys Asn Asp Gly

[0080] 35 40 45

[0081] Arg Gln Val Glu Lys Arg Arg Asn Ser Gly Pro Val Val Glu Lys Leu

[0082] 50 55 60

[0083] Lys Gln Met Gln Glu Phe Phe Gly Leu Lys Val Thr Gly Lys Pro Asp

[0084] 65 70 75 80

[0085] Ala Glu Thr Leu Lys Val Met Lys Gln Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp

[0086] 85 90 95

[0087] Val Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu Gly Asn Pro Arg Trp Glu Gln Thr

[0088] 100 105 110

[0089] His Leu Thr Tyr Arg Ile Glu Asn Tyr Thr Pro Asp Leu Pro Arg Ala

[0090] 115 120 125

[0091] Asp Val Asp His Ala Ile Glu Lys Ala Phe Gln Leu Trp Ser Asn Val

[0092] 130 135 140

[0093] Thr Pro Leu Thr Phe Thr Lys Val Ser Glu Gly Gln Ala Asp Ile Met

[0094] 145 150 155 160

[0095] Ile Ser Phe Val Arg Gly Asp His Arg Asp Asn Ser Pro Phe Asp Gly

[0096] 165 170 175

[0097] Pro Gly Gly Asn Leu Ala His Ala Phe Gln Pro Gly Pro Gly Ile Gly

[0098] 180 185 190

[0099] Gly Asp Ala His Phe Asp Glu Asp Glu Arg Trp Thr Asn Asn Phe Arg

[0100] 195 200 205

[0101] Glu Tyr Asn Leu His Arg Val Ala Ala His Glu Leu Gly His Ser Leu

[0102] 210 215 220

[0103] Gly Leu Ser His Ser Thr Asp Ile Gly Ala Leu Met Tyr Pro Ser Tyr

[0104] 225 230 235 240

[0105] Thr Phe Ser Gly Asp Val Gln Leu Ala Gln Asp Asp Ile Asp Gly Ile

[0106] 245 250 255

[0107] Gln Ala Ile Tyr Gly Arg Ser Gln Asn Pro Val Gln Pro Ile Gly Pro

[0108] 260 265 270

[0109] Gln Thr Pro Lys Ala Cys Asp Ser Lys Leu Thr Phe Asp Ala Ile Thr

[0110] 275 280 285

[0111] Thr Ile Arg Gly Glu Val Met Phe Phe Lys Asp Arg Phe Tyr Met Arg

[0112] 290 295 300

[0113] Thr Asn Pro Phe Tyr Pro Glu Val Glu Leu Asn Phe Ile Ser Val Phe

[0114] 305 310 315 320

[0115] Trp Pro Gln Leu Pro Asn Gly Leu Glu Ala Ala Tyr Glu Phe Ala Asp

[0116] 325 330 335

[0117] Arg Asp Glu Val Arg Phe Phe Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Ala Val Gln

[0118] 340 345 350

[0119] Gly Gln Asn Val Leu His Gly Tyr Pro Lys Asp Ile Tyr Ser Ser Phe

[0120] 355 360 365

[0121] Gly Phe Pro Arg Thr Val Lys His Ile Asp Ala Ala Leu Ser Glu Glu

[0122] 370 375 380

[0123] Asn Thr Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Val Ala Asn Lys Tyr Trp Arg Tyr

[0124] 385 390 395 400

[0125] Asp Glu Tyr Lys Arg Ser Met Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Met Ile Ala

[0126] 405 410 415

[0127] His Asp Phe Pro Gly Ile Gly His Lys Val Asp Ala Val Phe Met Lys

[0128] 420 425 430

[0129] Asp Gly Phe Phe Tyr Phe Phe His Gly Thr Arg Gln Tyr Lys Phe Asp

[0130] 435 440 445

[0131] Pro Lys Thr Lys Arg Ile Leu Thr Leu Gln Lys Ala Asn Ser Trp Phe

[0132] 450 455 460

[0133] Asn Cys Arg Lys Asn

[0134] 465

[0135] <210> 4

[0136] <211> 19

[0137] <212> PRT

[0138] <213> 智人

[0139] <400> 4

[0140] Met Gln Ala Leu Val Leu Leu Leu Cys Ile Gly Ala Leu Leu Gly His

[0141] 1 5 10 15

[0142] Ser Ser Cys

[0143] <210> 5

[0144] <211> 80

[0145] <212> PRT

[0146] <213> 智人

[0147] <220>

[0148] <221> 肽

[0149] <222> (1)..(80)

[0150] <223> 初前MMP1;切割掉以允许酶促激活成熟多肽的序列的部分

[0151] <400> 5

[0152] Phe Pro Ala Thr Leu Glu Thr Gln Glu Gln Asp Val Asp Leu Val Gln

[0153] 1 5 10 15

[0154] Lys Tyr Leu Glu Lys Tyr Tyr Asn Leu Lys Asn Asp Gly Arg Gln Val

[0155] 20 25 30

[0156] Glu Lys Arg Arg Asn Ser Gly Pro Val Val Glu Lys Leu Lys Gln Met

[0157] 35 40 45

[0158] Gln Glu Phe Phe Gly Leu Lys Val Thr Gly Lys Pro Asp Ala Glu Thr

[0159] 50 55 60

[0160] Leu Lys Val Met Lys Gln Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Val Ala Gln

[0161] 65 70 75 80

[0162] <210> 6

[0163] <211> 370

[0164] <212> PRT

[0165] <213> 智人

[0166] <220>

[0167] <221> 成熟肽

[0168] <222> (1)..(370)

[0169] <223> 成熟(活性)MMP1蛋白

[0170] <400> 6

[0171] Phe Val Leu Thr Glu Gly Asn Pro Arg Trp Glu Gln Thr His Leu Thr

[0172] 1 5 10 15

[0173] Tyr Arg Ile Glu Asn Tyr Thr Pro Asp Leu Pro Arg Ala Asp Val Asp

[0174] 20 25 30

[0175] His Ala Ile Glu Lys Ala Phe Gln Leu Trp Ser Asn Val Thr Pro Leu

[0176] 35 40 45

[0177] Thr Phe Thr Lys Val Ser Glu Gly Gln Ala Asp Ile Met Ile Ser Phe

[0178] 50 55 60

[0179] Val Arg Gly Asp His Arg Asp Asn Ser Pro Phe Asp Gly Pro Gly Gly

[0180] 65 70 75 80

[0181] Asn Leu Ala His Ala Phe Gln Pro Gly Pro Gly Ile Gly Gly Asp Ala

[0182] 85 90 95

[0183] His Phe Asp Glu Asp Glu Arg Trp Thr Asn Asn Phe Arg Glu Tyr Asn

[0184] 100 105 110

[0185] Leu His Arg Val Ala Ala His Glu Leu Gly His Ser Leu Gly Leu Ser

[0186] 115 120 125

[0187] His Ser Thr Asp Ile Gly Ala Leu Met Tyr Pro Ser Tyr Thr Phe Ser

[0188] 130 135 140

[0189] Gly Asp Val Gln Leu Ala Gln Asp Asp Ile Asp Gly Ile Gln Ala Ile

[0190] 145 150 155 160

[0191] Tyr Gly Arg Ser Gln Asn Pro Val Gln Pro Ile Gly Pro Gln Thr Pro

[0192] 165 170 175

[0193] Lys Ala Cys Asp Ser Lys Leu Thr Phe Asp Ala Ile Thr Thr Ile Arg

[0194] 180 185 190

[0195] Gly Glu Val Met Phe Phe Lys Asp Arg Phe Tyr Met Arg Thr Asn Pro

[0196] 195 200 205

[0197] Phe Tyr Pro Glu Val Glu Leu Asn Phe Ile Ser Val Phe Trp Pro Gln

[0198] 210 215 220

[0199] Leu Pro Asn Gly Leu Glu Ala Ala Tyr Glu Phe Ala Asp Arg Asp Glu

[0200] 225 230 235 240

[0201] Val Arg Phe Phe Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Ala Val Gln Gly Gln Asn

[0202] 245 250 255

[0203] Val Leu His Gly Tyr Pro Lys Asp Ile Tyr Ser Ser Phe Gly Phe Pro

[0204] 260 265 270

[0205] Arg Thr Val Lys His Ile Asp Ala Ala Leu Ser Glu Glu Asn Thr Gly

[0206] 275 280 285

[0207] Lys Thr Tyr Phe Phe Val Ala Asn Lys Tyr Trp Arg Tyr Asp Glu Tyr

[0208] 290 295 300

[0209] Lys Arg Ser Met Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Met Ile Ala His Asp Phe

[0210] 305 310 315 320

[0211] Pro Gly Ile Gly His Lys Val Asp Ala Val Phe Met Lys Asp Gly Phe

[0212] 325 330 335

[0213] Phe Tyr Phe Phe His Gly Thr Arg Gln Tyr Lys Phe Asp Pro Lys Thr

[0214] 340 345 350

[0215] Lys Arg Ile Leu Thr Leu Gln Lys Ala Asn Ser Trp Phe Asn Cys Arg

[0216] 355 360 365

[0217] Lys Asn

[0218] 370

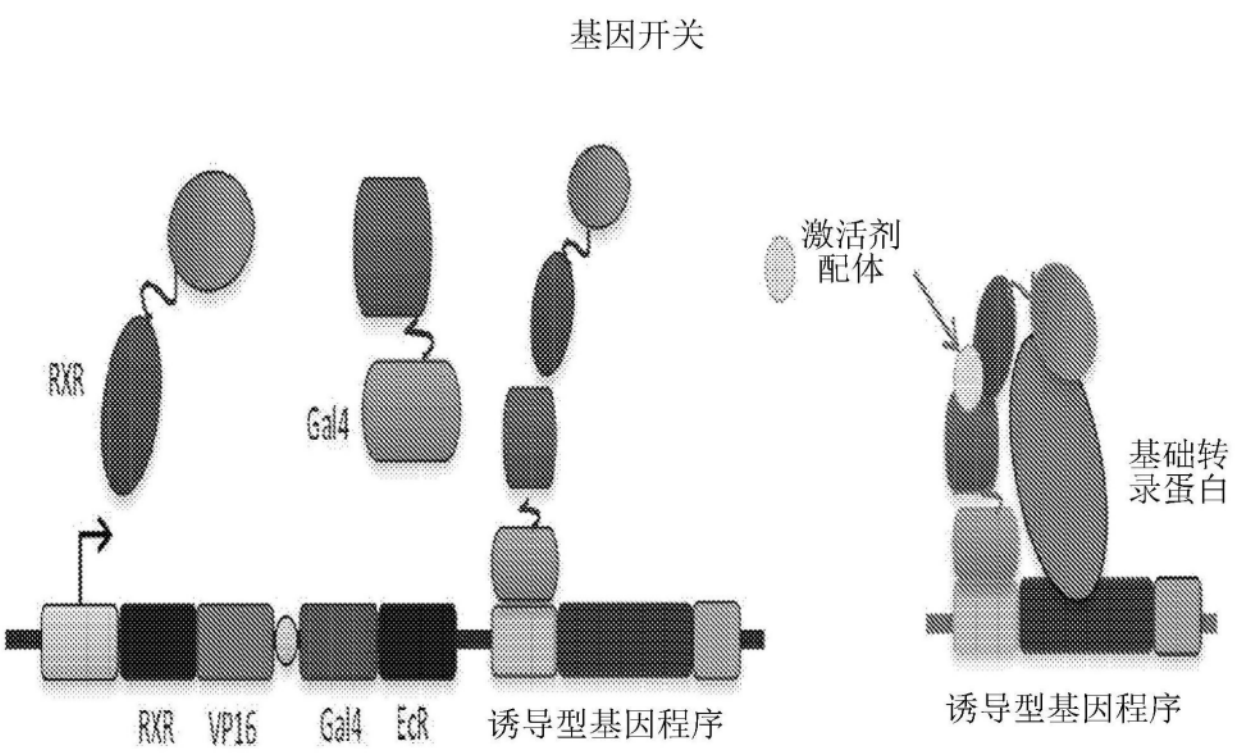

示意图——RHEOSWITCH治疗系统（RTS）的一个实例
基因开关
RXR
Gal4
激活剂
配体
基础转
录蛋白
RXR VP16 Gal4 EcR 诱导型基因程序
诱导型基因程序

图1

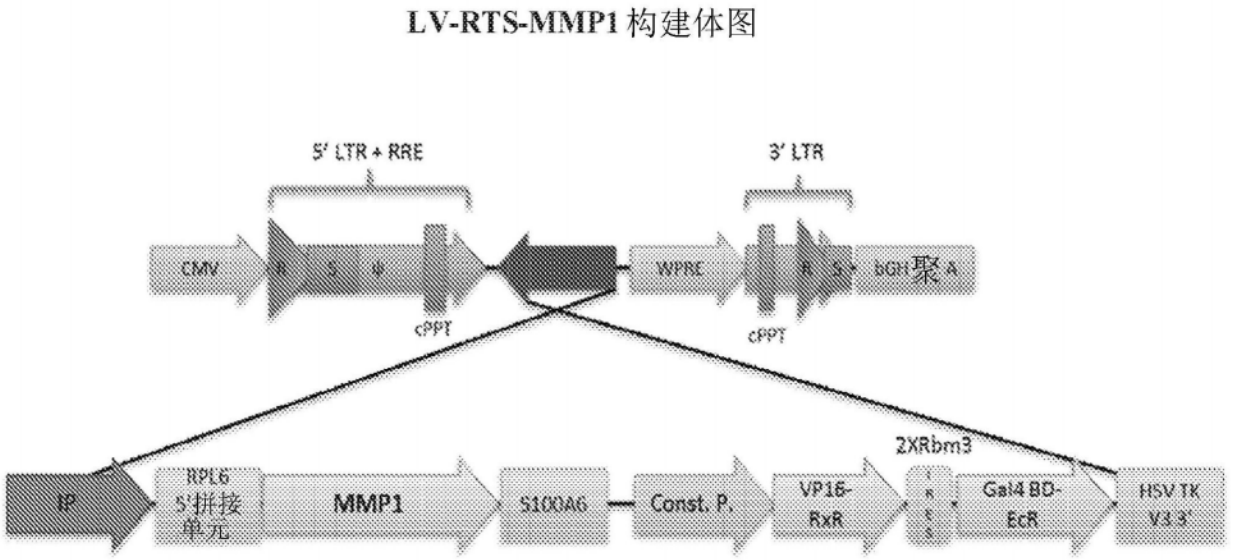

LV-RTS-MMP1 构建体图
5' LTR + RRE
3' LTR
CMV
R U5 ψ
cPPT
WPRE
R U5
bGH聚A
cPPT
2XRbm3
IP
RPL6
5'拼接
单元
MMP1
S100A6
Const. P.
VP16-
RxR
Gal4 BD-
EcR
HSV Tk
V3 3'

图2

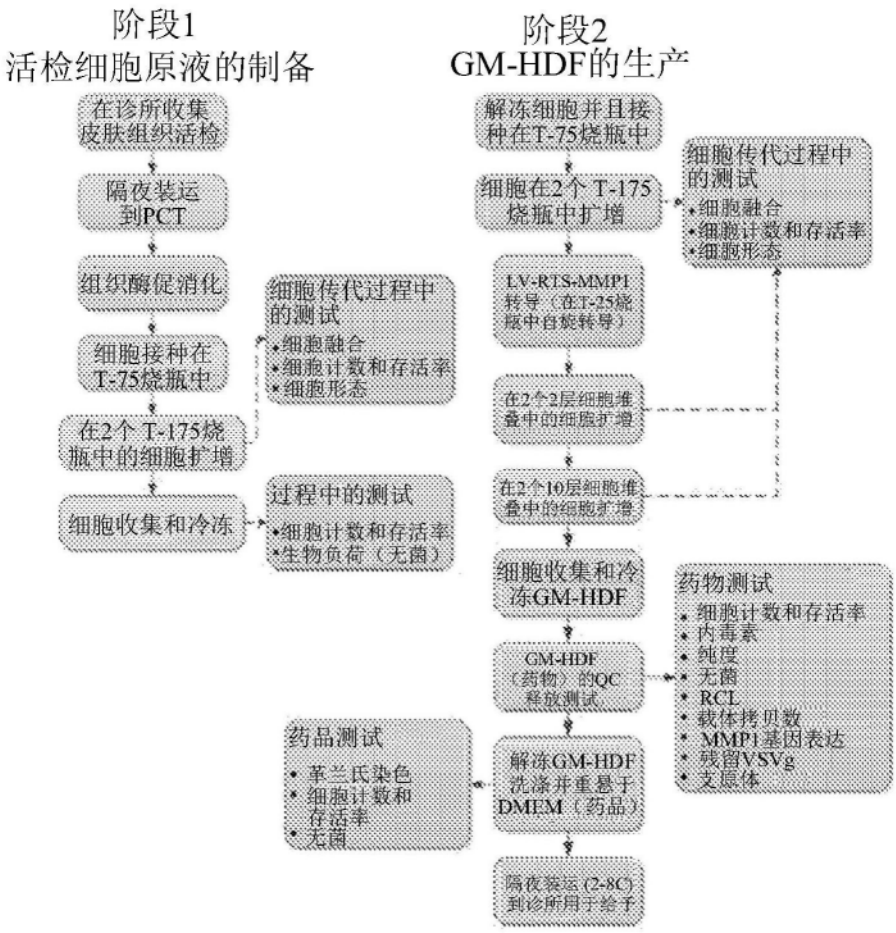

阶段1
活检细胞原液的制备
在诊所收集皮肤组织活检
隔夜装运到PCT
组织酶促消化
细胞接种在T-75烧瓶中
在2个 T-175烧瓶中的细胞扩增
细胞收集和冷冻
细胞传代过程中的测试
•细胞融合
•细胞计数和存活率
•细胞形态
过程中的测试
•细胞计数和存活率
•生物负荷（无菌）
阶段2
GM-HDF的生产
解冻细胞并且接种在T-75烧瓶中
细胞在2个 T-175烧瓶中扩增
LV-RTS-MMP1转导（在T-25烧瓶中自旋转导）
在2个2层细胞堆叠中的细胞扩增
在2个10层细胞堆叠中的细胞扩增
细胞收集和冷冻GM-HDF
GM-HDF（药物）的QC释放测试
解冻GM-HDF洗涤并重悬于DMEM（药品）
隔夜装运(2-8C)到诊所用于给予
细胞传代过程中的测试
•细胞融合
•细胞计数和存活率
•细胞形态
药物测试
• 细胞计数和存活率
• 内毒素
• 纯度
• 无菌
• RCL
• 载体拷贝数
• MMP1基因表达
• 残留VSVg
• 支原体
药品测试
• 革兰氏染色
• 细胞计数和存活率
• 无菌

图3

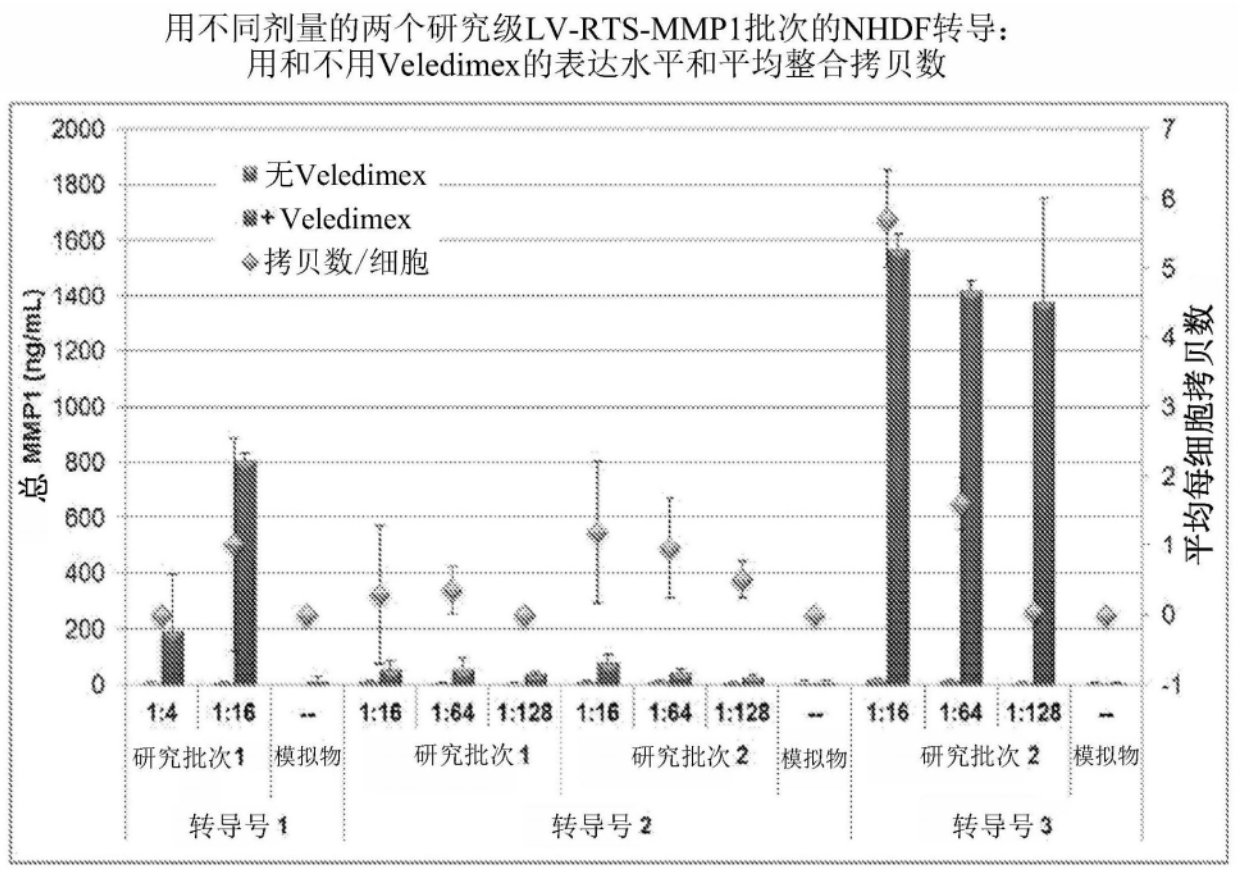

用不同剂量的两个研究级LV-RTS-MMP1批次的NHDF转导：
用和不用Veledimex的表达水平和平均整合拷贝数
无Veledimex
+Veledimex
拷贝数/细胞
总 MMP1 (ng/mL)
平均每细胞拷贝数
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
1:4
1:16
--
1:16
1:64
1:128
1:16
1:64
1:128
--
1:16
1:64
1:128
--
研究批次1
模拟物
研究批次1
研究批次2
模拟物
研究批次2
模拟物
转导号1
转导号2
转导号3

图4

在硬皮病博莱霉素模型中，通过用LV-RTS-MMP1转导的NHDF的MMP1表达降低了真皮厚度 (A)

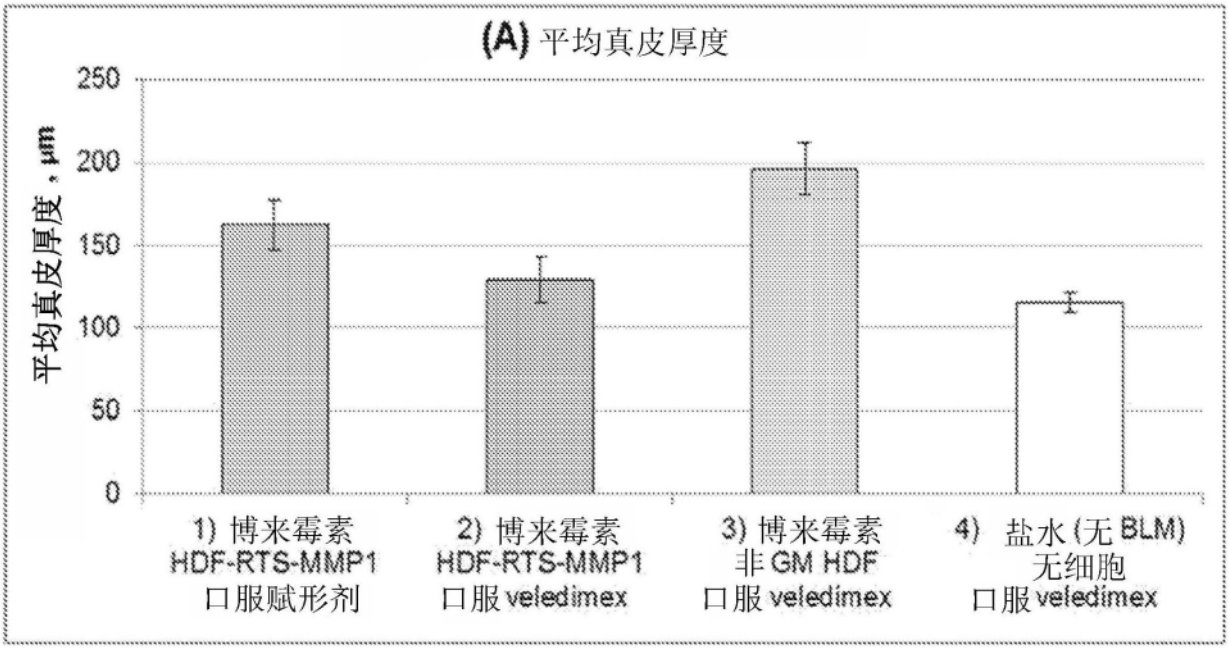


图5A

在硬皮病博莱霉素模型中，通过用LV-RTS-MMP1转导的NHDF的MMP1表达降低了真皮下肌肉厚度 (B)

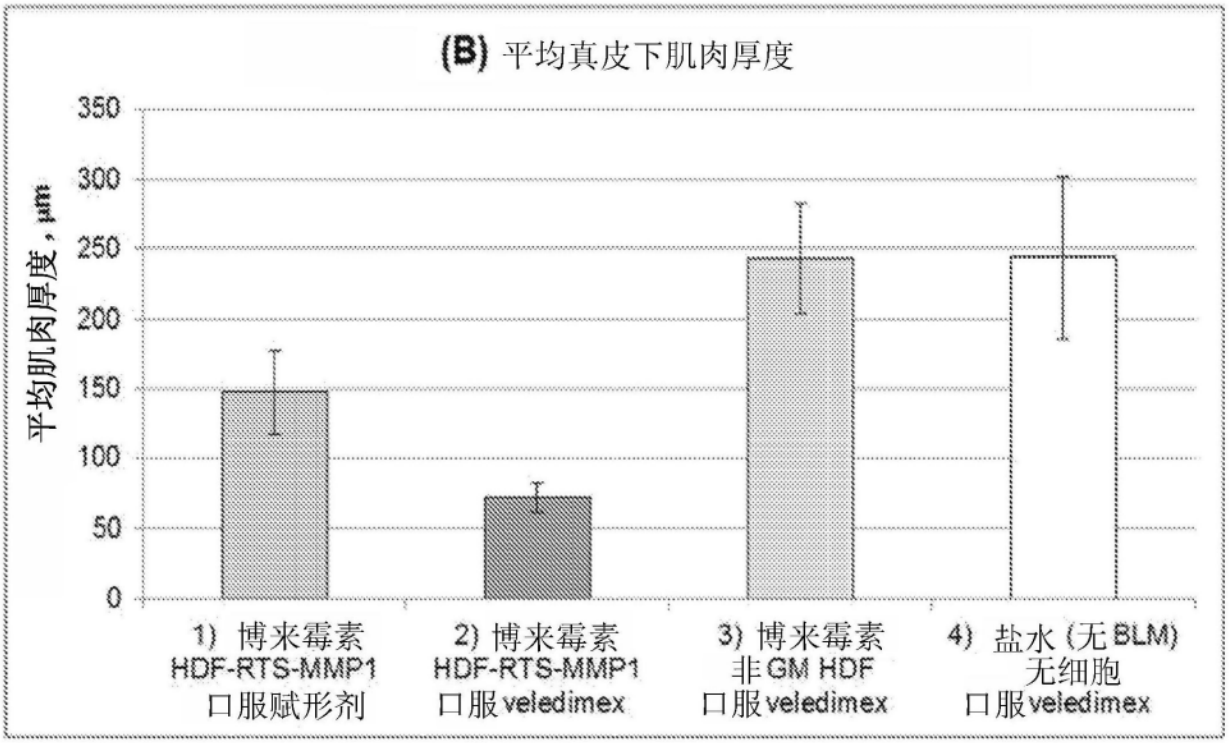


图5B

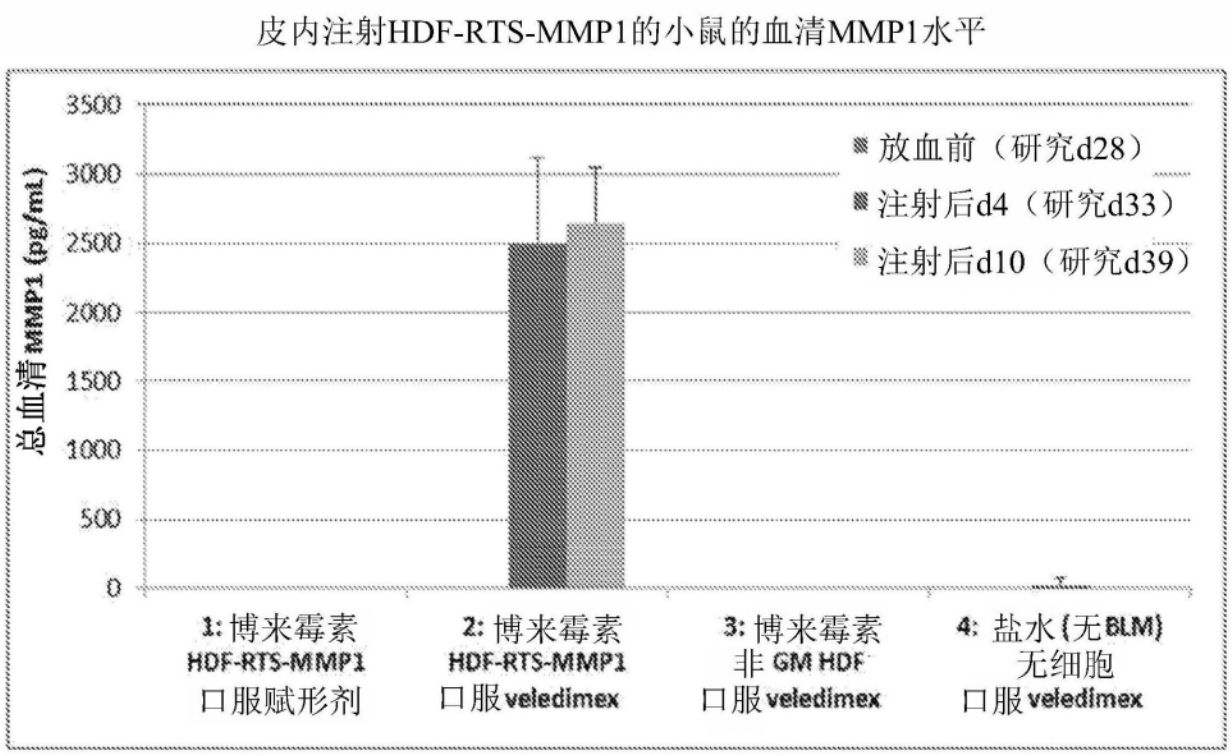

皮内注射HDF-RTS-MMP1的小鼠的血清MMP1水平
总血清MMP1 (pg/ml)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
放血前（研究d28）
注射后d4（研究d33）
注射后d10（研究d39）
1: 博来霉素 HDF-RTS-MMP1 口服赋形剂
2: 博来霉素 HDF-RTS-MMP1 口服veledimex
3: 博来霉素 非GM HDF 口服veledimex
4: 盐水(无BLM) 无细胞 口服veledimex

图6

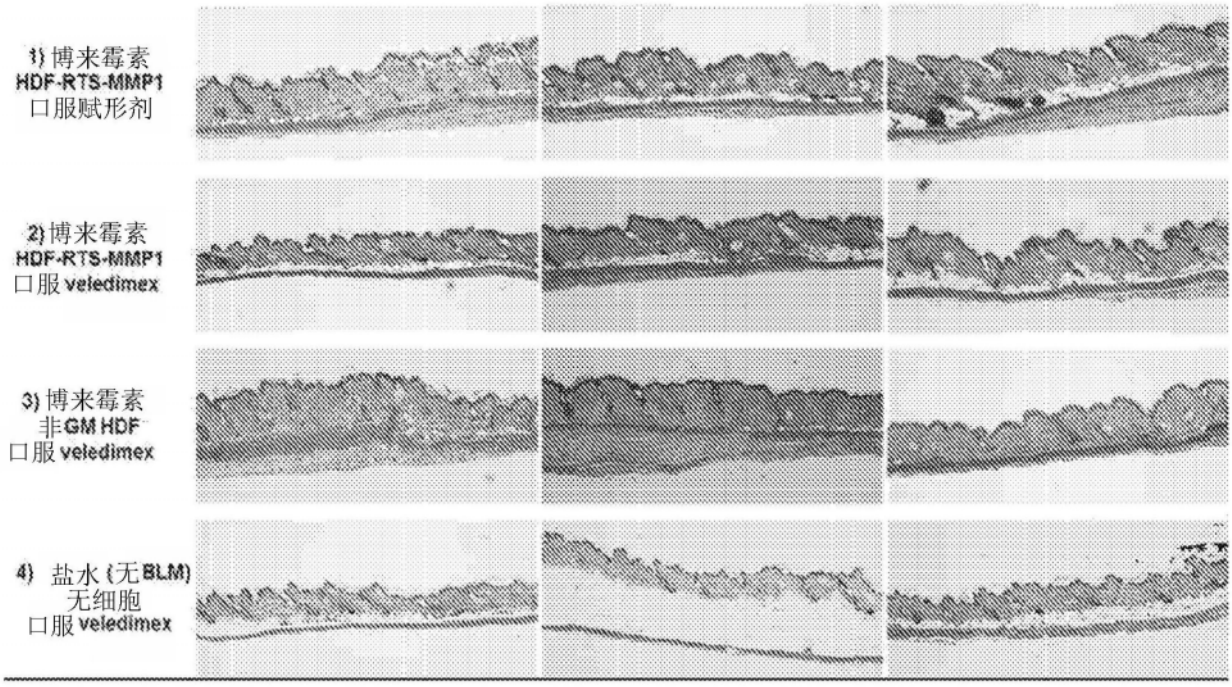

1) 博来霉素 HDF-RTS-MMP1 口服赋形剂
2) 博来霉素 HDF-RTS-MMP1 口服veledimex
3) 博来霉素 非GM HDF 口服veledimex
4) 盐水(无BLM) 无细胞 口服veledimex

图7

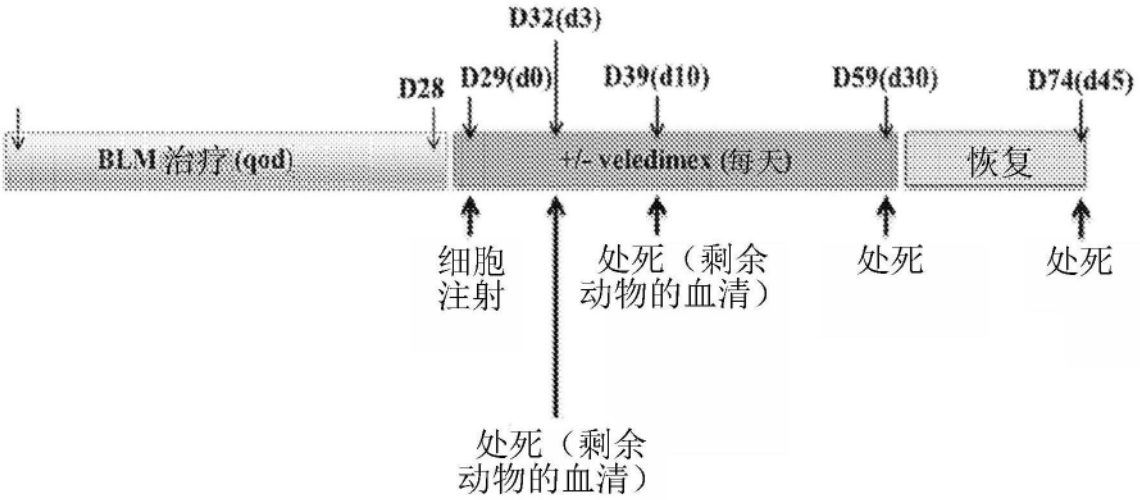

D32(d3)
D28
D29(d0)
D39(d10)
D59(d30)
D74(d45)
BLM治疗(qod)
+/- veledimex (每天)
恢复
细胞注射
处死（剩余动物的血清）
处死
处死
处死（剩余动物的血清）

图8