



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105636614 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 01

(21) 申请号 201480057130. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 09. 09

A61K 48/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/875, 509 2013. 09. 09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 04. 18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/054804 2014. 09. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/035395 EN 2015. 03. 12

(71) 申请人 菲格内有限责任公司

地址 美国得克萨斯

(72) 发明人 P·奥西伦

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李瑛

权利要求书2页 说明书23页

(54) 发明名称

用于软骨细胞或软骨型细胞再生的基因治疗

(57) 摘要

本发明的实施方案涉及软骨细胞和软骨型细胞的再生。在某些实施方案中,将一个或多个基因用于软骨细胞和软骨型细胞的再生。在特定实施方案中,将一个或多个基因治疗方案用于软骨细胞和软骨型细胞的再生。在特定方面中,实施方案涉及软骨修复,如关节软骨修复。更特别地,用于公开内容的实施方案涉及使用基因治疗,用于软骨细胞或其他软骨型细胞的吸引、产生和/或再生和/或软骨组织的再生和/或修复。在公开内容的具体实施方案中,提供了能够在体内吸引和/或产生所需细胞的基因治疗。

1. 在需要的个体的关节中产生软骨细胞或软骨型细胞的方法,包括将编码一个或多个治疗性多核苷酸的表达载体递送至个体关节的步骤,其中在递送时,关节中的细胞分化成软骨细胞或软骨型细胞和/或其中递送刺激关节中的软骨细胞产生另外的细胞。

2. 权利要求1的方法,其中所述治疗性多核苷酸编码全长基因产物或全长基因产物的生物活性片段。

3. 权利要求1的方法,其中所述治疗性多核苷酸编码选自胶原、胶原形成基因产物、软骨形成基因产物、结缔组织形成基因产物、转录因子、软骨基质基因、受体基因或信号分子的基因产物。

4. 权利要求1的方法,其中所述治疗性多核苷酸选自COL1A1、COL1A2、COL2A1、COL3A1、COL4A1、COL4A2、COL4A3、COL4A4、COL4A5、COL4A6、COL5A1、COL5A2、COL5A3、COL6A1、COL6A2、COL6A3、COL6A4、COL6A5、COL7A1、COL8A1、COL8A2、COL9A1、COL9A2、COL9A3、COL10A1、COL11A1、COL11A2、COL12A1、COL13A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL17A1、COL18A1、COL19A1、COL20A1、COL21A1、COL22A1、COL23A1、COL24A1、COL25A1、COL26A1、COL27A1、COL28A1、Gata4、Mef2C、Tbx5、Sox5、Sox6、Sox9、FGFR2、VEGF、MMP14、叉头、CD10、MMP13、WNT11、BAPX1、IL-1R1、IGFBP5、MMP16、BMP2、ALK1、BMP5、IGF1、MMP13、ADAMTS5、BCL10、MCOLN2、LRRC8C、PTGFR、RLF、MATN1、PDPN、TNFRSF18、ITGA10、THBS3、SCYL1BP1、KCNT2、244533_at、ARF1、222348_at、SLC4A5、HSPC159、RHOQ、MATN3、SULT1C2、236289_at、BCL2L11、FLJ16008、KLF7、NRP2、SERPINE2、FN1、B3GNT7、ADAMTS9、ANKRD28、GALNTL2、IRAK2、SETD5、FNDC3B、B3GNT5、CYTL1、IBSP、229221_at、PET112L、EDNRA、1563414_at、OSMR、C1QTNF3、ZFYVE16、225611_at、MAST4、EDIL3、230204_at、230895_at、HAPLN1、PDLIM4、cr5q35SQSTM1、SCUBE3、CMAH、236685_at、BMP6、ULBP2、LRP11、SOD2、SYNJ2、WTAP、HIG2、KIAA1718、FAM62B、UBE3C、TNFRSF10D、SLC25A37、ChGn、RB1CC1、C8orf72、EIF2C2、HAS2、TRPS1、WISP1、235821_at、PTK2、ZCCHC7、RPS6、GLIS3、SLC28A3、1555841_at、MGC17337、EDG2、229242_at、ITGB1、C10orf49、YME1L1、AKR1C2、CHST3、LOXL4、SFXN3、228910_at、CD44、FOSL1、RELA、MMP12、MMP13、MMP3、KIAA0999、ASAM、LOC399959、ETNK1、SOX5、CHST11、ATF1、SRGAP1、DSPG3、LOC338758、KIAA0701、SLC41A2、RHOF、FZD10、NUPL1、USP12、UFM1、LECT1、GPC6、ER01L、BDKRB1、SEMA6D、LACTB、ARIH1、CSPG4、AGC1、LOC283824、VASN、WWP2、NOS2A、LOC201181、MSI2、PITPNC1、TGIF、1552288_at、1552289_a_at、ZNF146、RELB、MIA、ZNF160、SNX5、BMP2、RNF24、HSUP1、MATN4、BIC、RUNX1、LIF、RP4-756G23.1、RPS6KA3、TNMD、RP6-213H19.1及其组合。

5. 权利要求1的方法,其中所述递送步骤在体内进行。

6. 权利要求1的方法,其中所述关节中的细胞是成纤维细胞、脂肪细胞、干细胞、现有软骨细胞或可以分化成软骨型细胞的其他细胞。

7. 权利要求1的方法,其中所述一个或多个治疗性多核苷酸存在于至少一个表达载体上。

8. 权利要求1的方法,其中所述表达载体是病毒载体或非病毒载体。

9. 权利要求8的方法,其中所述非病毒载体是质粒。

10. 权利要求8的方法,其中所述病毒载体是慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体或逆转录病毒载体。

11. 权利要求1的方法,其中当存在两个或更多个治疗性多核苷酸时,它们存在于相同的表达载体上。

12. 权利要求1的方法,其中当存在两个或更多个治疗性多核苷酸时,它们存在于两个或更多个不同的表达载体上。

13. 权利要求1的方法,其中通过适用于在无血管、无神经和低氧环境中活动的启动子来指引所述一个或多个治疗性多核苷酸的表达。

14. 将所需位置中之前分化的细胞或干细胞分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞的方法,包括将一个或多个基因提供给所述所需位置上的之前分化的细胞或干细胞以产生软骨细胞或软骨细胞样细胞的步骤。

用于软骨细胞或软骨型细胞再生的基因治疗

[0001] 本申请要求2013年9月9日提交的美国临时专利申请系列No.61/875,509的优先权,将其全部按引用并入本文中。

发明领域

[0002] 本发明总地涉及至少医学、外科手术、解剖学、生物学、细胞生物学和/或分子生物学的领域。

[0003] 发明背景

[0004] 软骨再生

[0005] 关节和关节软骨损伤常常发生;美国每年超过6百万人为了各种膝关节、腕关节和踝关节问题而就诊。关节软骨的渐进性磨损和撕裂可以导致渐进性软骨组织丢失,进一步暴露骨端,使其没有保护。这最终恶化成最常见的关节炎-骨关节炎(或退行性关节病)。

[0006] 已经报道了在美国,骨关节炎影响了33.6%(12.4百万)65岁和更大年龄的成人。美国骨科医生研究会(AAOS)报道了骨关节炎是2004年的主要诊断,占据了67%的短期停留和非致命的住院治疗。鉴于日增的人群,尤其是在具有较长寿命预期的老年人中,损伤和骨关节炎的发生将毫无疑问地增加,不仅是在美国,而是全世界的。

[0007] 在人体中存在三种类型的软骨:透明软骨(例如,在动关节内)、纤维软骨(例如,膝半月板和TMJ盘)和弹性软骨(例如,耳朵)。具体地,覆盖骨表面的关节软骨是软且专化透明软骨,其呈现出较好的润滑、磨损和低摩擦特性;其还降低关节中的应力。

[0008] 关节软骨由少量软骨细胞组成,而致密的胞外基质(ECM)防止软骨细胞迁移。此外,关节软骨缺乏血管、神经和淋巴网络,以及各种局部祖细胞。还被描述为具有高水平的蛋白酶抑制剂,其可能抑制有效的组织修复。

[0009] 出于这些原因,目前挑战恢复受损或患病关节软骨中的全部组织功能。尽管传统方法,如自体移植和同种异体移植,已经在临床上用于治疗关节软骨损伤,但仍然存在与这些治疗相关的许多缺陷。自体移植,其需要将来自病人的一小部分低负重软骨植入缺陷部位中,具有如供体部位不健全和有限的软骨组织可供性这样的缺陷。同种异体移植,从组织库获得软骨片,可能潜在地引起免疫应答。

[0010] 对于具有严重关节损伤和骨关节炎的病人,需要全关节置换手术。然而,在关节置换后常常发生许多并发症,如发炎、感染和植入物松动,并且可能导致植入失败,迫使将来进行修正手术。实际上,由于失败的髋关节和膝关节置换,2003年美国的328,000例髋关节置换有近36,000例修正(11%),418,000膝关节置换有33,000例修正(8%)。

[0011] 因此,希望研发一种有效且简单的方法来成功修复和再生关节软骨组织。作为快速扩张的领域,组织工程化可以通过产生生物模拟组织替代物来提供用于关节软骨修复和再生的替换解决方法。通常,关节软骨是一旦损伤不可自然再生的组织。最近,已经尝试通过在实验室中再生一部分受损组织来重建受损的生物组织。这种定义为“组织工程化”的方法已经引起了极大的关注。

[0012] 组织工程化涉及产生能够特异性地与生物组织相互作用来产生功能性组织等价

物的生物相容性材料。组织工程化具有从病人收集所需组织、从组织样本收集细胞、使细胞增殖以及将这些细胞重新引回体内的基本概念。

[0013] 在特定的情况下,将基因用作用于生物组织再生的治疗组合物。在某些情况下,如心脏生物组织的再生,基因Gata4、Mef2C和Tbx5已经显示出在一些病人中产生心肌细胞。已经研究这些基因来吸引成纤维细胞并诱导它们分化成心肌细胞。然而,没有通用的科学证据来支持在软骨再生中使用基因治疗。实际上,心脏和关节环境完全不同。心肌细胞存在于心脏组织中,其是有血管的并且准备通向营养流和氧。另一方面,认为软骨无血管、无神经并且更少接近氧。出于这些原因,认为两个环境是截然不同的并且因此将需要不同的生物方法来再生组织。

[0014] 本发明公开内容提供了为了软骨修复或再生领域中长期需要的解决方法。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明的实施方案涉及软骨细胞和软骨型细胞的再生。在某些实施方案中,将一个或多个基因用于软骨细胞和软骨型细胞的再生。在特定实施方案中,将一个或多个基因治疗方案用于软骨细胞和软骨型细胞的再生。在特定方面中,实施方案涉及软骨修复,如关节软骨修复。更特别地,本公开内容的实施方案涉及使用基因治疗,用于软骨细胞或其他软骨型细胞的吸引、产生和/或再生,和/或软骨组织的产生和/或修复。在本公开内容的具体实施方案中,提供了能够在体内吸引和/或产生所需细胞的基因资料。在特定情况下,将基因治疗用于吸引成纤维细胞,所述成纤维细胞被直接或间接刺激分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞或软骨型细胞。在某些实施方案中,在将一种或多种基因治疗组合物递送至关节时,关节中的成纤维细胞或关节中的其他类型的细胞存在于关节中,并且在递送后,成纤维细胞或一种或多种其他类型的细胞分化成软骨细胞或软骨样细胞或软骨型细胞。在一些情况下,关节中的一种或多种基因治疗组合物的递送(如在关节中存在垂死软骨细胞的情况下)作为用于分化关节中的一种或多种类型的细胞再生软骨细胞和/或软骨型细胞或导致至少部分软骨细胞具有相同功能性的其他细胞的催化剂。在特定方面中,在关节中存在垂死软骨细胞的情况下,一种或多种基因治疗组合物的递送作为用于关节中结缔组织再生(包括软骨组织的再生)的催化剂。在一些情况下,将来自垂死软骨细胞的一个或多个分子用于关节中的一种或多种类型的细胞分化成软骨细胞,并且这样的分化可以利用或不利用来自一个或多个基因治疗组合物的基因产物。本发明的实施方案涉及所有形式的软骨以及可以在一个位置形成并且如同它们是软骨那样起作用的任何其他细胞;在具体方面中,通过本发明的方法产生疤痕组织。在其中产生疤痕组织的特定情况下,所述疤痕组织作为关节中的衬垫。

[0017] 在一些情况下,通过一种或多种类型的已经在体内存在于关节中的细胞来吸收基因治疗组合物,尽管在其他情况下,通过递送至关节和/或已经存在于关节中的细胞来吸收基因治疗组合物。递送至关节的细胞可以在递送至关节前或递送至关节后分化,并且可以将基因治疗组合物在细胞递送至关节前或递送至关节后暴露于递送至关节的细胞。根据本公开内容,细胞分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞可以以任何合适的方式发生,包括,例如,在基因治疗植入个体前细胞在体外分化或基因治疗植入个体前体外分化并且还在植入后在体内分化。分化成软骨细胞或软骨细胞氧细胞的细胞可以是任何特定的种类,但在具体实施方案中,分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞的细胞是成纤维细胞。在一些实施方案

中,将成纤维细胞、脂肪细胞、干细胞、源自成纤维细胞的干细胞和/或间质干细胞用于本发明的任一种方法中。

[0018] 成纤维细胞可以在暴露于一种或多种基因治疗组合物之前、之中和/或之后分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞。在特定方面中,将成纤维细胞在体内递送前在体内或体外暴露于机械应力并且还暴露于一种或多种基因治疗组合物。在其中基因治疗组合物递送至关节的情况下,关节上的压力可以作为机械应力,以至少部分引起细胞(包括干细胞和/或成纤维细胞)的分化。

[0019] 在本公开内容的方面中,为了软骨再生和/或修复的目的,产生软骨细胞或软骨细胞样细胞或软骨型。任何基因或基因的组合可以用于本公开内容的目的。例如, COL11A2, 或其他,可以用于软骨细胞产生,软骨型细胞产生和/或软骨再生和/或修复。在某些实施方案中,将TGF- β 和FGF-2用于软骨再生中。在具体方面中,将COL11A2、TGF- β 和/或FGF-2用于从周围的成纤维细胞在体内产生软骨。在一些情况下,将本文中提及的其他基因用于本发明的组合物和方法中。

[0020] 实施方案涉及某些基因,如胶原形成基因的治疗递送(如通过注射、静脉内治疗(IV)、口服摄入、血管放置,如血管造影术,乃至局部方法),包括使用或未用营养基质和/或血管。更具体地,但不是排他地,实施方案涉及使用软骨形成基因和/或将吸引周围成纤维细胞开始软骨修复的基因混合物的递送来用于软骨生物修复的方法和/或组合物。在特定实施方案中,这种治疗作为用于软骨恢复的体内工作站。在特定方面中,存在体外启动的软骨产生,如通过使用自体软骨细胞和/或同种异体软骨细胞和/或成纤维细胞,如真皮成纤维细胞。在特定实施方案中,这种混合物可以递送(如通过注射)至一个或多个关节中或一个或多个关节的附近,并且这将吸引其他非捕获的成纤维细胞(例如)至软骨再生过程中。在某些实施方案中,可以引入基质或支架,然后在体外或体内接种基因治疗组合物、成纤维细胞和/或软骨细胞,以给软骨再生过程提供结构。

[0021] 在公开内容的方面中,帮助软骨产生的基因的引入吸引正经受退化的软骨区域中的成纤维细胞或其他合适的细胞来分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞,用于补充和/或停止软骨退化的目的。因为软骨通常具有低血流和接近营养素,认为是体内难以再生的组织。为此,在一些方面中,可以将除了基因以外的其他元素加入治疗基因组合物中。例如,适用于关节活动的调节元素可以用于本发明中。在某些方面中,组合物包含营养素,并且在特定方面中,组合物A具有包含氧和/或营养素的吸收存储器。在具体方面中,蛋白质/氨基酸、磷酸盐、钙、钠、脂质、铁、糖/淀粉,和/或维生素可以用于本发明的一个或多个方法中。

[0022] 在特定实施方案中,基因治疗组合物包含表达载体。可以使用任何合适的表达载体,但在一些情况下,表达载体适用于关节中活动,包括无血管、无神经和/或低氧环境。在具体情况下,表达载体包含在无血管、无神经和/或低氧环境中具有活性的启动子。

[0023] 之前已经相当宽泛地列出了本发明的特征和技术优点,以便可以更好地理解以下的本发明的详述。下文中将描述本发明的其他特征和优点,其形成本发明权利要求的主题。本领域技术人员应当了解所公开的概念和特定实施方案可以容易地用作改变或设计用于实施本发明相同目的的其他结构的基础。本领域技术人员还应当认识到这样的等价构造没有脱离所附权利要求列出的本发明的精神和范围。当结合附图考虑时,从以下描述将更好地理解认为是本发明特征性的新特征,关于其组织或操作方法,与更多目的和优点一起。然

而,特别理解提供每张附图只是用于说明和描述的目的,并不是打算作为本发明的限制。本申请涉及各种参考文献和文件,将其全部按引用并入本文中。

[0024] 发明详述

[0025] 如说明书中使用的,“一个(a)”或“一个(an)”可以表示一个或多个。如权利要求中使用的,结合词语“包含”使用时,词语“一个(a)”或“一个(an)”可以表示一个或超过一个。如本文中使用的,“另一个”表示至少第二个或更多个。在特定实施方案中,例如,本发明的方面可以“基本上由本发明的一个或多个序列组成”或“由本发明的一个或多个序列组成”。本发明的一些实施方案可以由本发明的一个或多个元素、方法步骤和/或方法组成,或基本上由本发明的一个或多个元素、方法步骤和/或方法组成。考虑本文中所述的任何方法或组合物可以相对于本文中所述的任何其他方法或组合物来实施。

[0026] I. 定义

[0027] 如本文中使用的术语“软骨型细胞”是指可以存在并以软骨细胞相同的能力起作用的任何细胞。

[0028] 如本文中使用的术语“软骨样细胞”是指不是初级软骨细胞但源自干细胞(如间质干细胞)的细胞或来自其他世系(如成纤维细胞)的细胞。软骨细胞样细胞具有软骨细胞(软骨的细胞)的表现型。这表示它们不仅具有软骨细胞的形态(例如,多边形和/或偏菱形细胞),而且在某些情况下,至少它们能够聚集和产生软骨基质成分,如,例如,硫酸化蛋白聚糖和II型胶原。因此,软骨细胞样细胞的示例性标记包括例如软骨蛋白聚糖(aggrecan)(其是硫酸软骨素和硫酸角质素蛋白聚糖)、II型胶原、Sox-9蛋白、软骨连接蛋白和基底膜聚糖(perlecan)(其是硫酸乙酰肝素蛋白聚糖)中的一种或多种。

[0029] 如本文中使用的术语“缺氧”是指氧不足。在具体方面中,是指低于约20%的氧张力。

[0030] 如本文中使用的术语“关节”是指其中骨骼的两块骨连接的身体区域。

[0031] 如本文中使用的术语“再生”限定为恢复受损关节软骨正常功能的过程,并且在至少某些情况下,还导致与天然软骨不可区分的新组织的形成。

[0032] 如本文中使用的术语“接种”是指将细胞植入支架中。细胞将粘附于支架,并且随后在支架中生长和分化。

[0033] 如本文中使用的,术语“支架”是在其上形成细胞基质的机械装置。

[0034] 如本文中使用的,术语“基质”将随后提供强度和结构的几何形状。

[0035] II. 一般性实施方案

[0036] 本发明涉及用于治疗需要的个体的系统、方法和组合物,包括需要软骨修复的个体的治疗。本发明涉及用于任何种类的软骨的生物修复的方法和组合物,例如,包括椎骨间软骨和关节软骨。在特定方面中,本发明涉及软骨修复的领域,如关节软骨修复。

[0037] 在某些方面中,例如,本发明在体内(或在体外或在体外和体内)如从成纤维细胞产生天然组织。更特别地,但不是排他地,例如,本发明涉及一种用于人成纤维细胞生长并分化成软骨细胞样细胞的方法。在某些实施方案中,所述细胞可以是自体的或同种异体的或其混合物。

[0038] 在具体实施方案中,本发明使用特定细胞分化成软骨细胞样细胞。在特定实施方案中,人真皮成纤维细胞(HDF),例如,在使用一个或多个基因的基因治疗的特定条件下分

化成软骨细胞样细胞。细胞分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞可以以任何合适的方式进行,包括植入后在体内分化或使用天然存在的细胞(包括成纤维细胞)在体内分化。

[0039] 在具体实施方案中,本发明提供了一种用于体内关节再生的方法,所述关节如椎间盘、肘关节、膝关节、肩关节、髋关节、颞下颌关节、踝关节、跖骨、掌骨等。

[0040] 本发明公开内容的示例性目的是提供一种修复关节(如退化的椎间盘)的方法,例如,恢复椎间盘解剖组织构造并提高其功能。在本发明的特定方面中,存在修复个体关节(如椎间盘)中受损软骨的方法,包括使接受根据本发明的基因治疗的成纤维细胞递送至个体的接受关节(如椎间盘)或在体内提供使用基因治疗的成纤维细胞或其他细胞(包括垂死的软骨细胞)。在本发明的具体实施方案中,将基因治疗组合物或成纤维细胞和基因治疗组合物递送至关节;在用于椎间盘的具体实施方案中,在不存在除去部分或全部退化椎间盘的情况下,递送基因治疗组合物或成纤维细胞和基因治疗组合物。

[0041] 在本发明的某些方面中,除了本发明的方法,给个体提供另一种治疗。例如,在基因治疗组合物或基因治疗组合物和成纤维细胞递送之前、之中和/或之后,个体可以接受一种或多种药物。示例性的另外的治疗按照需要包括抗生素、非甾体抗炎药(NSAID)、单一止痛剂(镇痛剂)、肌肉松弛剂和/或功能恢复。在具体实施方案中,可以给个体提供抗生素、抗真菌剂、抗病毒剂、营养物注射、IV或口服片。

[0042] 在本发明的某些方面中,细胞分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞,如其中软骨细胞或软骨细胞样细胞分泌选自软骨蛋白聚糖、II型胶原、Sox-9蛋白、软骨连接蛋白、基底膜聚糖及其组合的分子。在特定情况下,细胞从成纤维细胞分化,并且示例性成纤维细胞包括真皮成纤维细胞、腱成纤维细胞、韧带成纤维细胞、滑液成纤维细胞、包皮成纤维细胞或其混合物。

[0043] 在具体实施方案中,可以存在或不存在提供给个体的生长因子,包括如骨形态生成蛋白2(BMP-2)、BMP-4、BMP-6、BMP-7、软骨衍生的形态生成蛋白(CDMP)、转化生长因子 β (TGF- β)、胰岛素生长因子1(IGF-I)、成纤维细胞生长因子(FGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、FGF-2、血小板衍生的生长因子(PDGF),及其混合物。可以在基因治疗组合物递送之时、之前和/或之后,递送生长因子。在其中存在在体外增殖细胞并随后递送细胞的情况下,可以在递送细胞的同时提供一种或多种生长因子。

[0044] 在进一步的实施方案中,存在一种包含一种或多种基因治疗组合物的试剂盒,并且还可以包括特定细胞,如成纤维细胞,其中将试剂盒的任何组分容纳在一个或多个合适的容器中。在具体实施方案中,试剂盒进一步包含一种或多种适用于增强成纤维细胞在体内分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞的试剂。在一些实施方案中,本发明的试剂盒包括一个或多个用于将基因治疗组合物和/或成纤维细胞递送至个体的装置。

[0045] 在本发明的一些实施方案中,存在涉及将基因治疗组合物和/或成纤维细胞递送至需要个体的体内部位的方法和组合物。在具体实施方案中,所述部位是在体内并且需要软骨细胞,包括需要软骨。例如,需要软骨细胞的部位包括关节,例如软骨性关节(例如,脊椎)。在一些实施方案中,成纤维细胞源自需要软骨的个体。在特定实施方案中,将成纤维细胞递送至个体中的至少一个椎间盘。

[0046] 在特定情况下,将基因治疗组合物递送至关节。在一些情况下,将基因治疗组合物在椎间盘之间递送。在某些情况下,将基因治疗组合物在内纤维环中的髓核和裂缝之间或

之中递送。例如,基因治疗组合物可以在椎间盘之间递送,包括内纤维环中的髓核和裂缝。

[0047] 在一些实施方案中,存在一种在个体关节中产生纤维组织和/或软骨组织的方法,包括将一种或多种基因治疗组合物递送至个体关节的步骤。

[0048] 在特定实施方案中,将一种或多种基因治疗组合物在体内递送至关节并且关节中存下的细胞吸收组合物。然而,在某些实施方案中,在一种或多种基因治疗组合物递送之前、之中和/或之后,将细胞提供给关节。在这样的情况下,可以使用任何细胞,只要细胞能够分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞。然而,在具体实施方案中,例如,细胞是成纤维细胞,如真皮成纤维细胞、腱成纤维细胞、韧带成纤维细胞或滑液成纤维细胞。可以利用同种异体细胞,尽管在可替换的实施方案中,使用自体细胞;在具体实施方案中,已经针对疾病测试了自体细胞,并且认为适用于人递送。在本发明的某些方面中,一个或多个细胞是同种异体的,尽管在可替换的实施方案中,细胞是自体的。在其中细胞不是自体的情况下,在用于本发明之前,可以通过本领域的标准方法来处理细胞,以除去潜在有害物质、病原体等。

[0049] III. 治疗基因

[0050] 在本发明的实施方案中,将一个或多个基因用作治疗组合物。组合物可以用于促进成纤维细胞分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞,或一旦成纤维细胞已经分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞,可以用于增强来自治疗组合物的基因产物的水平。在一些情况下,一个或多个提供的基因结合关节中存在的来自垂死软骨细胞的分子,以促进关节中软骨细胞或软骨细胞型细胞或软骨组织的产生。

[0051] 在特定方面中,包括一种或多种治疗剂的多核苷酸包含全长基因,尽管在一些方面中,利用基因片段,尽管片段仍然具有治疗活性或编码具有治疗活性的肽或多肽。基因本质上可以是哺乳动物的,包括人、小鼠、大鼠等等。

[0052] 在特定方面中,一个或多个治疗基因例如是胶原形成基因(包括任何类型)、软骨形成基因、结缔组织形成基因、转录因子、软骨基质基因、受体基因,或信号分子。在具体实施方案中,一个或多个治疗基因不是转化生长因子(TGF) β 超家族的成员。

[0053] 在具体实施方案中,基因治疗组合物编码一个或多个基质分子,如胶原I、胶原II、蛋白聚糖或其组合。在具体实施方案中,胶原包含I型和II型胶原。在一些情况下,蛋白聚糖之一是软骨蛋白聚糖。

[0054] 在具体实施方案中,将以下基因中的一个或多个用于本发明中:COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6, COL5A1, COL5A2, COL5A3, COL6A1, COL6A2, COL6A3, COL6A4, COL6A5, COL7A1, COL8A1, COL8A2, COL9A1, COL9A2, COL9A3, COL10A1, COL11A1, COL11A2, COL12A1, COL13A1, COL14A1, COL15A1, COL16A1, COL17A1, COL18A1, COL19A1, COL20A1, COL21A1, COL22A1, COL23A1, COL24A1, COL25A1, COL26A1, COL27A1和COL28A1。

[0055] 示例性基因包括软骨基质基因,如蛋白聚糖和COL2、-9、-10和-11;受体基因[纤维细胞生长因子2(FGFR2);甲状旁腺激素-相关肽受体(PTHrP-R)];一种或多种转录因子(SOX5、-6和-9);SOX4;血管内皮生长因子(VEGF);基质金属蛋白酶14(MMP14);叉头;CD10;MMP13;胶原(如COL3A1和COL16A1);信号分子(WNT11);同源框同系物(BAPX1);受体(IL-1R1);IGF调节子(IGFBP5);和/或金属蛋白酶(MMP16)(参见Sekiya等,2002)。在某些方面中,可以使用以下基因:已知的软骨生成能力的标记(胶原II、FGFR3、BMP2、ALK1)、合成代谢

生长因子(BMP5和IGF1)或基质降解酶(MMP13和ADAMTS5)(参见Hellingman等,2011)。

[0056] 在特定方面中,利用以下的一个或多个:GREM1,BMP6,COL10A1,或MMP13(见Funari等,2007)。BMC Genomics 2007,8:165在具体方面中,人们可以利用以下的一个或多个:COL11A1,BCL10,MCOLN2,LRRRC8C,PTGFR,RLF,COL9A2,MATN1,PDPN,TNFRSF18,ITGA10,THBS3,SCYL1BP1,KCNT2,244533_at,ARF1,222348_at,SLC4A5,HSPC159,RHOQ,MATN3,SULT1C2,236289_at,BCL2L11,FLJ16008,KLF7,NRP2,SERPINE2,FN1,B3GNT7,ADAMTS9,ANKRD28,GALNTL2,IRAK2,SETD5,FNDC3B,B3GNT5,CYTL1,IBSP,229221_at,COL25A1,PET112L,EDNRA,1563414_at,OSMR,C1QTNF3,ZFYVE16,225611_at,MAST4,EDIL3,230204_at,230895_at,HAPLN1,PDLIM4,cr5q35SQSTM1,COL11A2,SCUBE3,CMAH,236685_at,BMP6,COL9A1,COL10A1,ULBP2,LRP11,SOD2,SYNJ2,WTAP,HIG2,KIAA1718,FAM62B,UBE3C,TNFRSF10D,SLC25A37,ChGn,RB1CC1,C8orf72,EIF2C2,HAS2,TRPS1,WISP1,235821_at,PTK2,ZCCHC7,RPS6,GLIS3,SLC28A3,1555841_at,MGC17337,EDG2,229242_at,COL27A1,ITGB1,C10orf49,YME1L1,AKR1C2,CHST3,LOXL4,SFXN3,228910_at,CD44,FOSL1,RELA,MMP12,MMP13,MMP3,KIAA0999,ASAM,LOC399959,ETNK1,SOX5,CHST11,ATF1,SRGAP1,DSPG3,LOC338758,KIAA0701,SLC41A2,RHOF,FZD10,NUPL1,USP12,UFM1,LECT1,GPC6,ER01L,BDKRB1,SEMA6D,LACTB,ARIH1,CSPG4,AGC1,LOC283824,VASN,WWP2,NOS2A,LOC201181,MSI2,PITPNC1,TGIF,1552288_at,1552289_a_at,ZNF146,RELB,MIA,ZNF160,SNX5,BMP2,RNF24,HSUP1,MATN4,BIC,RUNX1,LIF,RP4-756G23.1,RPS6KA3,TNMD,RP6-213H19.1(参见Funari等,2007)。

[0057] 尽管在具体实施方案中,在本发明中没有使用TGF β 超家族的成员,但在可替换的实施方案中,利用了TGF β 超家族的一个或多个成员,包括TGF β 、TGF- β 3、TGF- β 2、TGF- β 4、TGF- β 1、TGF- β 5(Xenopus)、BMP-2、BMP-4、Drosophila DPP、BMP-5、BMP-6、Vgr1、OP-1/BMP-7、Drosophila 60A、GDF-1、Xenopus Vgf、BMP-3、抑制素-BA、抑制素-BB、抑制素- α 和MIS(参见美国专利No.7,338,655,将其全部按引用并入本文中)。

[0058] 在具体实施方案中,在所述方法和/或组合物的实施方案中使用部分或全部基因。可以使用针对基因的所有或部分编码区,并且可以利用针对特定基因的一个或多个调控区。在具体实施方案中,人们可以利用基因片段,包括编码区片段,并且所述片段将保留治疗活性。在具体情况下,利用特定基因的野生型序列,并且本领域技术人员认识到可以在各种数据库中鉴别基因序列,如National Center for Biotechnology Information's **GenBank**[®]数据库。在具体情况下,多核苷酸组合物中利用的序列与野生型序列不同,但序列的差异在于一个或多个核苷酸或编码的基因产物的一个或多个氨基酸。组合物中利用的序列可以与相应的野生型DNA序列为99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%等等,或当与编码的野生型多肽的多肽序列相比时,与编码的基因产物这样的百分比相同。

[0059] IV. 基因治疗实施方案

[0060] 实施方案包括使用一个或多个能够编码用于软骨细胞再生、软骨产生和/或软骨修复的治疗基因产物的多核苷酸。在特定实施方案中,基因产物被关节中的成纤维细胞或其他类型的细胞利用,来促进成纤维细胞分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞和/或被从成

纤维细胞、干细胞或脂肪细胞分化的软骨细胞或软骨细胞样细胞利用。

[0061] 多核苷酸可以编码或可以不编码完整基因产物。在其中编码少于完整基因产物的情况下,片段仍然是生物学上有活性的并且能够具有用于软骨细胞产生和/或软骨修复和/或软骨再生的活性。在一些情况下,包含治疗基因产物或其生物活性片段的表达载体包含选择标记。

[0062] 本发明的再一个实施方案包括使用能够编码治疗基因产物或其生物活性衍生物或片段的多核苷酸,并且将本领域普通技术人员已知在递送时能够在靶细胞或组织内稳定维持的任何载体用作表达载体,与利用的递送方法无关。一种这样的方法是将载体分子直接递送至靶细胞或组织,不管是病毒或是非病毒载体。

[0063] 本发明的另一个实施方案提供了用于将至少一个编码产物的基因引入至少一个用于治疗哺乳动物宿主的细胞中的方法。该方法包括使用病毒或非病毒方式(包括质粒),用于将编码产物的基因引入所需细胞中。更具体地,特定方法包括脂质体包裹、磷酸钙共沉淀、电穿孔或DEAE-葡聚糖介导,并且包括使用能够编码治疗基因产物的成员或其生物活性衍生物或片段和任意的选择标记的基因作为所述基因。

[0064] 本发明的另一个实施方案提供了用于将至少一个编码产物的基因引入至少一个用于治疗哺乳动物宿主的所需细胞中的方法。该方法包括使用利用病毒的生物方式或其他方式来将载体分子递送至靶细胞或组织。优选,病毒是假-病毒,基因组已经被改变,使得假病毒只能够递送以及在靶细胞内稳定维持,而没有保留在靶细胞或组织内复制的能力。改变的病毒基因组通过重组DNA技术来进一步操控,使得病毒基因组作为DNA载体分子,其含有待在靶细胞或组织内表达的目标异源基因。病毒载体可以例如是逆转录病毒载体、腺病毒载体、慢病毒载体或腺相关病毒载体。

[0065] 本发明的一个实施方案是通过将编码产物的多核苷酸递送至所需的哺乳动物宿主的位置,将所需治疗基因产物递送至靶关节空间的方法。例如,将编码部分或全部治疗基因产物的目标DNA序列亚克隆至选择的载体中,然后将重组载体用于感染在体外培养的所需细胞,并且将转导的结缔组织细胞(如自体移植的细胞)移植至目标位置中,如通过关节内注射;在可替换的实施方案中,将重组载体递送至体内的目标位置,其中载体感染体内细胞,如,例如,关节中的体内成纤维细胞。

[0066] 本发明的一个方法涉及通过使用腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体或单纯疱疹病毒(HSV)载体,将治疗基因在体内直接递送至所需的哺乳动物宿主的组织。换句话说,将编码功能性蛋白或蛋白片段的目标DNA序列亚克隆至相应的病毒载体中。然后使含有基因产物的病毒载体生长至合适的滴定度并引入所需的空间中,优选通过关节内注射。

[0067] 将含有目标基因的DNA分子直接关节内注射至关节中导致了受体结缔组织细胞(包括在该部位的成纤维细胞)的转染,并且因此避开了取出、体外培养、转染、选择以及移植含成纤维细胞的载体来促进目标异源基因稳定表达的需求。

[0068] 将DNA分子呈递给关节中的靶细胞的方法包括,但不限于,将DNA分子包裹至阳离子脂质体中,亚克隆逆转录病毒或质粒载体中的目标DNA序列,或将DNA分子自身直接注射至关节中。DNA分子,与呈递给关节的形式无关,优选作为DNA载体分子来呈现,作为重组病毒DNA载体分子或重组DNA质粒载体分子。通过将真核细胞中有活性的启动子片段直接插在异源基因编码区的上游来确保目标异源基因的表达。本领域技术人员可以利用已知的载体

构建策略和技术来确保DNA分子侵入结缔组织后合适的表达水平。

[0069] 在优选实施方案中,将从关节收集的成纤维细胞在体外培养,用于随后用作用于基因治疗的递送系统。将认识到申请人没有限于使用所公开的具体结缔组织。可以利用其它组织来源,用于体外培养技术。使用本发明基因的方法可以预防性地使用或用于治疗性处理中。可以预防性地或治疗性地利用本文中的教导来治疗任何易受影响的或已经受影响的关节。

[0070] 在本发明的另一个实施方案中,提供了治疗有效量的用于非肠道给药于病人的化合物,其含有编码TGF- β 超家族蛋白的基因和合适的药物载体。

[0071] 本发明的另一个实施方案提供了用于以预防有效量非肠道给药于病人的化合物,其包括编码TGF- β 超家族蛋白的基因和合适的药物载体。

[0072] 本发明的再一个实施方案包括如上所述的方法,包括将基因在体外引入细胞中。这种方法还包括随后将感染的细胞植入哺乳动物宿主中。这种方法包括在实现结缔组织细胞转染后但在将传染的细胞植入哺乳动物宿主前,储存转染的结缔组织细胞。例如,本领域技术人员将认识到可以将感染的结缔组织细胞在10%DMSO中液氮冷冻储存。实施方案包括使用一种方法来基本上防止具有产生关节病或损伤高易感性的哺乳动物宿主的关节病损伤的发生。

[0073] 本发明的另一个实施方案包括将至少一个编码产物的基因引入哺乳动物宿主的至少一个结缔组织细胞中的方法,如上所述用于治疗哺乳动物宿主,包括通过将含有编码产物的基因的病毒载体直接引入哺乳动物宿主中来实现细胞的体内感染。更优选,这种方法包括通过关节内注射来实现直接引入哺乳动物宿主中。所述方法包括对用于治疗使用的哺乳动物使用所述方法。此外,如之前限定的,这种方法还包括使用所述方法来修复和再生结缔组织。

[0074] 本领域技术人员将认识到,使用脂质体的病毒载体不受细胞分裂的限制,因为逆转录病毒需要细胞分裂来实现结缔组织细胞的感染和整合。这种使用按照之前所述的非病毒方式的方法包括使用能够编码属于TGF- β 超家族的成员和选择标记基因(抗生素抗性基因)的基因作为所述基因。

[0075] 本发明的另一个实施方案是通过本说明书内公开的任一种方法将编码TGF- β 超家族成员的DNA序列递送至哺乳动物宿主的结缔组织中,使得实现胶原的体内表达,以再生结缔组织,如软骨。

[0076] 在作为实施例公开的,并且不是作为本发明限制的特定方法中,在金属硫蛋白启动子的下游连接含有TGF- β 编码序列的DNA质粒载体。

[0077] V. 基于核酸的表达系统

[0078] A. 载体

[0079] 术语“载体”用于指载体核酸分子,其中插入了用于引入可在其中复制的细胞中的核酸序列。核酸序列可以是“外源性的”,这表示对于其中引入了载体的细胞是外来的,或序列对于细胞中的序列是同源的,但在宿主细胞核酸内的位置不是通常发现序列的位置。载体包括质粒、粘粒、病毒(噬菌体、动物病毒和植物病毒)和人工染色体(例如,YAC)。本领域技术人员有充分能力通过标准重组技术来构建载体(参见,例如,Maniatis等,1988和Ausubel等,1994,将两篇都按引用并入本文中)。

[0080] 术语“表达载体”是指任何类型的包含编码能够转录的RNA的核酸的遗传构建体。在一些情况下,然后将RNA分子翻译成蛋白质、多肽或肽。在其他情况下,例如,在反义分子或核糖酶的生产中,这些序列没有被翻译。表达载体可以含有各种“控制序列”,这是指可操作连接编码序列在特定宿主细胞中转录和可能的翻译需要的核酸序列。除了调控转录和翻译的控制序列,载体和表达载体可以含有起到其他作用的核酸序列并且下文中有描述。

[0081] a. 启动子和增强子

[0082] “启动子”是在其控制启动和转录速率的一段核酸序列的控制序列。其可以含有在其可以结合调控蛋白和分子的遗传元件,如RNA聚合酶和其他转录因子,以启动核酸序列的特定转录。短语“可操作地放置”、“可操作地连接”、“在……控制下”和“在转录控制下”表示启动子相对于核酸序列处于正确的功能位置和/或方向中,来控制该序列的转录启动和/或表达。

[0083] 启动子通常包含用来放置用于RNA合成的起始位点的序列。最公知的实例是TATA盒,但在一些启动子中,缺少TATA盒,如,例如,用于哺乳动物末端脱氧核苷酸转移酶基因的启动子和用于SV40晚期基因的启动子,覆盖起始位点的分离元件帮助固定启动的位置。其他启动子元件调控转录启动的频率。通常,这些位于起始位点的30-110bp上游区域中,尽管各种启动子已经显示出也含有起始位点下游的功能性元件。为了使得编码序列在启动子的“控制下”,在选择启动子“下游”(即,3')放置转录阅读框的转录起始位点的5'端。“上游”启动子刺激DNA的转录并促进编码的RNA的表达。

[0084] 启动子元件之间的间隔常常是灵活的,使得当元件相对于彼此颠倒或移动时,保留启动子功能。在tk启动子中,启动子元件之间的间隔在活性开始之前可以增加至50bp间隔。根据启动子,显然单独的元件可以共同地或独立地起作用来激活转录。启动子可以结合或不结合“增强子”来使用,增强子是指核酸序列转录激活中涉及的顺式作用调控序列。

[0085] 启动子可以是天然与核酸序列相关的启动子,如可以通过分离位于编码区段上游的5'非编码区和/或外显子来获得。这样的启动子可以称为“内源性的”。相似地,增强子可以是天然与核酸序列相关的增强子,位于该序列的下游或上游。或者,通过将编码核酸区段放置在重组或异源启动子的控制下,将获得特定的优势,重组或异源启动子是指不是天然与其天然环境中的核酸序列相关的启动子。重组或异源增强子也是指不是通常与其天然环境中的核酸序列相关的增强子。这样的启动子或增强子可以包括其他基因的启动子或增强子,从任何其他病毒,或原核或真核细胞分离的启动子或增强子,以及不是“天然产生的”启动子或增强子,即,含有不同转录调控区的不同元件,和/或改变表达的突变。例如,重组DNA构建中最常用的启动子包括 β -内酰胺酶(青霉素酶)、乳糖酶和色氨酸(trp)启动子系统。除了合成产生启动子和增强子的序列,可以使用重组克隆和/或核酸扩增技术,包括PCRTM,结合本文中公开的组合物,来产生序列(参见美国专利4,683,202和5,928,906,将每篇都按引用并入本文中)。此外,考虑了还可以使用指引序列在无核细胞器(如线粒体、叶绿体等)内转录和/或表达的控制序列。

[0086] 当然,使用有效地指引DNA区段在选择用于表达的细胞器、细胞类型、组织、器官或生物体中表达的启动子和/或增强子是重要的。分子生物学领域的技术人员通常已知启动子、增强子和细胞类型组合对蛋白质表达的用途(参见,例如,Sambrook等,1989,按引用并

入本文中)。使用的启动子可以是组成型的、组织特异性的、诱导型的,和/或在合适的条件下能用于指引引入的DNA区段的高水平表达,如在重组蛋白质和/或肽的大规模生产中是有利的。启动子可以是异源的或内源性的。

[0087] 另外,任何启动子/增强子组合(按照,例如,Eukaryotic Promoter Data Base EPDB,<http://www.epd.isb-sib.ch/>)也可以用于驱动表达。使用T3、T7或SP6细胞质表达系统也是另一个可能的实施方案。如果提供了合适的细菌聚合酶,作为递送复合物的一部分或作为另外的遗传表达构建体,真核细胞可以支持从特定细菌启动子的细胞质转录。

[0088] 组织特异性启动子或原件的性质,以及表征其活性的试验,是本领域技术人员公知的。这样的区域的非限制性实例包括人LIMK2基因(Nomoto等,1999)、生长激素抑制素受体2基因(Kraus等,1998)、小鼠附睾视磺酸结合基因(Lareyre等,1999)、人CD4(Zhao-Emonet等,1998)、小鼠 $\alpha 2(XI)$ 胶原(Tsumaki等,1998)、D1A多巴胺受体基因(Lee等,1997)、胰岛素-样生长因子II(Wu等,1997)和人血小板内皮粘附分子-1(Almendro等,1996)。

[0089] b. 起始信号和内核糖体结合位点

[0090] 对于编码序列的有效翻译,还可能需要特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子或邻接序列。可能需要提供外源性翻译控制信号,包括ATG起始信号。本领域普通技术人员将容易地能够确定这并提供需要的信号。公知的是起始信号必须是“框内的”,具有所需编码序列的阅读框,并确保完整插入片段的翻译。外源性翻译控制信号和起始密码子可以是天然的或合成的。可以通过包括合适的转录增强子元件来增强表达的效率。

[0091] 在本发明的某些实施方案中,使用内部核糖体进入位点(IRES)元件来形成多基因或多顺反子信使。IRES元件能够绕过5'甲基化Cap依赖性翻译的核糖体扫描模型并在内部位点开始翻译(Pelletier和Sonenberg,1988)。已经描述了来自小核糖核酸病毒家族(脊髓灰质炎和脑心肌炎)的两个成员的IRES元件(Pelletier and Sonenberg,1988),以及来自哺乳动物信使的IRES(Macejak和Sarnow,1991)。IRES元件可以连接异源开放阅读框。多个开放阅读框可以一起转录,各自通过IRES隔开,形成多顺反子信使。通过IRES元件,每个开放阅读框易接近用于有效翻译的核糖体。可以使用单个启动子/增强子来转录单个信使,以有效表达多个基因(参见美国专利No.5,925,565和5,935,819,各自按引用并入本文中)。

[0092] c. 多个克隆位点

[0093] 载体可以包括多个克隆位点(MCS),其是含有多个限制性酶位点的核酸区,其中任何一个可以结合标准重组技术来使用,以消化载体(参见,例如,Carbonelli等,1999,Levenson等,1998,和Coccea,1997,按引用并入本文中)。“限制性酶消化”是指用只在核酸分子中的特定位置起作用的酶催化分裂核酸分子。这些限制性酶中的许多是商业上可购得的。使用这样的酶是本领域技术人员公知的。通常,使用在MCS内切割的限制性酶将载体线性化或片段化,使得外源性序列连接载体。“连接”是指在两个核酸片段质检形成磷酸二酯键的过程,其可以是或不是彼此邻接的。涉及限制性酶和连接反应的技术是重组技术领域的技术人员公知的。

[0094] d. 剪接位点

[0095] 大部分转录的真核RNA分子将经历RNA剪接来,以从初级转录产物中除去内含子。含有基因组真核序列的载体可能需要供体和/或受体剪接位点来确保转录产物的正确加工,以用于蛋白质表达(参见,例如,Chandler等,1997,按引用并入本文中)。

[0096] e. 终止信号

[0097] 本发明的载体或构建体通常将包含至少一个终止信号。“终止信号”或“终止子”由涉及通过RNA聚合酶特异性终止RNA转录的DNA序列组成。因此,在某些实施方案中,考虑了结束RNA转录产物产生的终止信号。终止子可以是体内必需的,以获得所需信使水平。

[0098] 在真核系统中,终止子区域区域还可以包含允许新转录产物位点特异性分裂的特异性DNA序列,使得暴露聚腺苷酸化位点。这给专化内源性聚合酶发出信号,将约200A残基(poly A)的链添加至转录产物的3'端。用这种poly A尾修饰的RNA分子显示出更稳定并且能更有效地翻译。因此,在涉及真核细胞的其他实施方案中,优选终止子包含用于RNA分裂的信号,并且更优选终止子信号促进信使的聚腺苷酸化。终止子和/或聚腺苷酸化位点元件可以用于增强信使水平和最小化从盒通过至其他序列的阅读。

[0099] 考虑用于本发明中的终止子包括本文中所述的或本领域普通技术人员已知的任何已知的转录终止子,包括但不限于,例如,基因的终止序列,如例如牛生长激素终止子或病毒终止序列,如例如SV40终止子。在某些实施方案中,如由于序列截断,终止信号可以缺乏可转录或可翻译序列。

[0100] f. 聚腺苷酸化信号

[0101] 在表达中,特别是真核表达,通常将包括聚腺苷酸化信号来实现转录产物的正确聚腺苷酸化。认为聚腺苷酸化信号的性质对于本发明的成功实践不是关键的,并且可以使用任何这样的序列。优选的实施方案包括SV40聚腺苷酸化信号或牛生长激素聚腺苷酸化信号,这些是方便的并且已知在各种靶细胞中能很好地起作用。聚腺苷酸化可以提高转录产物的稳定性或可以促进细胞质转运。

[0102] g. 复制起点

[0103] 为了在宿主细胞中繁殖载体,可以含有一个或多个复制起点(常常称为“ori”),其是在其启动复制的特定核酸序列。或者,如果宿主细胞是酵母,可以使用自主复制序列(ARS)。

[0104] h. 选择和筛选标记

[0105] 在本发明的某些实施方案中,可以通过在表达载体中包括标记在体外或体内鉴别含有本发明的核酸构建体的细胞。这样的标记将可鉴别变化给予细胞,以允许容易地鉴别含有表达载体的细胞。通常,选择标记是给予允许选择的特性的标记。阳性选择标记是标记的存在允许其选择的标记,而阴性选择标记是其存在防止其选择的标记。阳性选择标记的实例是药物抗性标记。

[0106] 通常,包括药物选择标记有助于转化子的克隆和鉴别,例如,给予新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、zeocin和组氨酸抗性的基因是有用的选择标记。除了给予允许基于条件实施区分转化子的表型的标记,还可以考虑其他类型的标记,包括筛选标记,如GFP,其的基础是比色分析。或者,可以利用筛选酶,如单纯疱疹病毒胸苷激酶(tk)或氯霉素乙酰基转移酶(CAT)。本领域技术人员也知道怎样使用免疫标记,可以结合FACS分析。认为使用的标记不重要,只要能够与编码基因产物的核酸同时表达。选择和筛选标记的更多实例是本领域技术人员公知的。

[0107] i. 质粒载体

[0108] 在某些实施方案中,考虑使用质粒载体来转化宿主细胞。通常,将含有源自宿主细

胞相容物种的复制子和控制序列的质粒载体结合这些宿主使用。载体通常携带复制位点,以及标记序列,其能够提供转化细胞中的表型选择。在非限制性实例中,常常使用pBR322的衍生物转化大肠杆菌,pBR322是源自大肠杆菌物种的质粒。pBR322含有用于氨苄青霉素和四环霉素抗性的基因,并且因此提供鉴别转化细胞的简单方式。pBR质粒,或其他微生物质粒或噬菌体必须还含有或被修饰来含有例如启动子,其可以被微生物生物体使用,用于其自身蛋白质的表达。

[0109] 此外,含有与宿主微生物相同的复制子和控制序列的噬菌体载体可以结合这些宿主用作转化载体。例如,噬菌体 λ GEMTM-11可以用于制备重组噬菌体载体中,所述载体可以用于转化宿主细胞,如,例如,大肠杆菌LE392。

[0110] 更多有用的质粒载体包括pIN载体(Inouye等,1985);和pGEX载体,用于产生谷胱甘肽S-转移酶(GST)可溶性融合蛋白,用于之后的纯化和分离或分裂。其他合适的融合蛋白是具有 β -半乳糖苷酶、泛素等的那些。

[0111] 将包含表达载体的细菌宿主细胞,例如,大肠杆菌,在多种合适培养基中的任一种中生长,例如LB。如本领域技术人员了解的,通过将宿主细胞接触某些启动子特异性的试剂,例如,通过将IPTG加入介质中或通过将其转至较高温度,来诱导某些载体中的重组蛋白的表达。将细菌再培养一段时间后,通常为2至24小时,通过离心收集细胞并洗涤,以除去残余介质。

[0112] j. 病毒载体

[0113] 特定病毒通过受体介导的胞吞作用感染细胞或进入细胞以及整合至宿主细胞基因组并稳定且有效地表达病毒基因的能力使其成为用于将外源核酸转移至细胞(例如,哺乳动物细胞)中的有吸引力的候选物。以下描述了可以用于递送本发明核酸的病毒载体的非限制性实例。

[0114] 1. 腺病毒载体

[0115] 用于递送核酸的特定方法涉及使用腺病毒表达载体。尽管已知腺病毒载体具有低的整合至基因组DNA中的能力,这种特征通过这些载体提供的高效基因转移得到了平衡。“腺病毒表达载体”用来包括含有足以(a)支持构建体包装和(b)最终表达已经在其中克隆的组织或细胞特异性构建体的腺病毒序列的那些构建体。遗传构成或腺病毒(36kb,线性,双链DNA病毒)的知识允许使用多达7kb的外缘序列亚克隆大片的腺病毒DNA(Grunhaus和Horwitz,1992)。

[0116] 2. AAV载体

[0117] 可以使用腺病毒辅助转染,将核酸引入细胞中。已经报道了使用腺病毒耦合系统提高了细胞系统中的转染效率(Kelleher和Vos,1994;Cotten等,1992;Curiel,1994)。腺相关病毒(AAV)是有吸引力的用于本发明实施方案中的载体系统,因为其具有高的整合频率并且可以感染未分裂细胞,因此使其可用于将基因递送至哺乳动物细胞中,例如,组织培养物(Muzyczka,1992)中或在体内的哺乳动物细胞。AAV对于传染性具有宽的宿主范围(Tratschin等,1984;Laughlin等,1986;Lebkowski等,1988;McLaughlin等,1988)。关于rAAV载体的产生和使用的详细内容描述于美国专利No.5,139,941和4,797,368中,各自按引用并入本文中。

[0118] 3. 逆转录病毒载体

[0119] 由于其将它们基因整合至宿主基因组中,转移大量外源遗传物质,感染宽谱物种和细胞类型以及在特定细胞系中包装的能力,逆转录病毒已经用作递送载体(Miller, 1992)。

[0120] 为了构建逆转录病毒载体,将核酸插入病毒基因组中,替代某些病毒序列,以产生复制缺陷的病毒。为了产生病毒粒,构建含有gag、pol和env基因但没有LTR和包装成分的包装细胞系(Mann等,1983)。当含有cDNA的重组质粒时,与逆转录病毒LTR和包装序列一起引入特定细胞系中(例如,通过磷酸钙沉淀),包装序列允许重组质粒的RNA转录产物包装至病毒颗粒中,然后其被分泌至培养基中(Nicolas和Rubenstein,1988;Temin,1986;Mann等,1983)。然后收集含有重组逆转录病毒的培养基,任性地浓缩,并用于基因转移。逆转录病毒能够感染多种细胞类型。然而,整合和稳定表达需要宿主细胞的分裂(Paskind等,1975)。

[0121] 慢病毒是复杂的逆转录病毒,其除了通常的逆转录病毒基因gag、pol和env以外,含有其他具有调控或结构功能的基因。慢病毒是本领域公知的(参见,例如,Naldini等,1996;Zufferey等,1997;Blomer等,1997;美国专利No.6,013,516和5,994,136)。慢病毒的一些实例包括人免疫缺陷病毒:HIV-1、HIV-2和猿免疫缺陷病毒:SIV。已经通过多重减弱HIV毒力基因来产生慢病毒载体,例如,删除了基因env、vif、vpr、vpu和nef,制得生物上安全的载体。

[0122] 重组慢病毒载体能够感染非分裂细胞并可以用于体内和体外基因转移和核酸序列的表达。例如,美国专利No.5,994,136中描述了能够感染非分裂细胞的重组慢病毒,其中用两个或多个携带包装功能的载体(即,gag、pol和env,以及rev和tat)转染合适的宿主细胞,按引用并入本文中。可以通过将包膜蛋白连接用于靶向特定细胞类型受体的抗体或特定配体来靶向重组病毒。例如,通过将目标序列(包括调控区)插入病毒载体中,连同另一个编码特定靶细胞上的受体的配体的基因一起,则载体现在是靶特异性的。

[0123] 4. 其他病毒载体

[0124] 其他病毒载体可以用作本发明中的构建体。可以使用源自如牛痘病毒(Ridgeway, 1988;Baichwal和Sugden,1986;Coupar等,1988)、辛德毕斯病毒、细胞巨化病毒和单纯疱疹病毒这样的病毒。它们提供了几个有吸引力的用于各种哺乳动物细胞的特征(Friedmann, 1989;Ridgeway,1988;Baichwal和Sugden,1986;Coupar等,1988;Horwich等,1990)。

[0125] 5. 使用修饰病毒的递送

[0126] 将待递送的核酸装在已经工程化来表达特定结合配体的传染性病毒内。病毒颗粒因此将特异性地结合靶细胞的同源受体并将内含物递送至细胞。基于通过将乳糖残基化学添加至病毒包膜的逆转录病毒的化学修饰,研发了设计的新方法,以允许逆转录病毒载体的特异性靶向。这种修饰可以允许通过唾液酸糖蛋白受体特异性感染肝细胞。

[0127] 设计了另一种重组逆转录病毒靶向的方法,其中使用了对抗逆转录病毒包膜蛋白和对抗特异性细胞受体的生物素化抗体。通过使用抗生物素蛋白链菌素,通过生物素组分结合所述抗体(Roux等,1989)。使用对抗I类和II类主要组织相容性复合物抗原的抗体,他们证明了在体外用同向性病毒感染了带有这些表面抗原的各种人细胞(Roux等,1989)。

[0128] B. 载体递送和细胞转化

[0129] 据认为用于本发明中的用于细胞器、细胞、组织或生物体转化的核酸递送的合适方法实际上包括通过其可以将核酸(例如,DNA)引入细胞器、细胞、组织或生物体中的任何

方法,如本文中所述的或如本领域普通技术人员已知的。这样的方法包括,但不限于,DNA的直接递送,如通过体外转染(Wilson等,1989,Nabel等,1989),通过注射(美国专利No.5,994,624,5,981,274,5,945,100,5,780,448,5,736,524,5,702,932,5,656,610,5,589,466和5,580,859,各自按引用并入本文中),包括微注射(Harlan和Weintraub,1985;美国专利No.5,789,215,按引用并入本文中);通过电穿孔(美国专利No.5,384,253,按引用并入本文中;Tur-Kaspa等,1986;Potter等,1984);通过磷酸钙沉淀(Graham和Van Der Eb,1973;Chen和Okayama,1987;Rippe等,1990);通过使用DEAE-葡聚糖,接着用乙二醇(Gopal,1985);通过直接超声波加载(Fechheimer等,1987);通过脂质体介导的转染(Nicolau和Sene,1982;Fraleay等,1979;Nicolau等,1987;Wong等,1980;Kaneda等,1989;Kato等,1991)和受体介导的转染(Wu和Wu,1987;Wu和Wu,1988);通过微粒轰击(PCT申请No.W094/09699和95/06128;美国专利No.5,610,042;5,322,783,5,563,055,5,550,318,5,538,877和5,538,880,各自按引用并入本文中);通过用碳化硅纤维搅拌(Kaeppler等,1990;美国专利No.5,302,523和5,464,765,各自按引用并入本文中);通过农杆菌介导的转化(美国专利No.5,591,616和5,563,055,各自按引用并入本文中);通过PEG介导的原生质体转化(Omirulleh等,1993;美国专利No.4,684,611和4,952,500,各自按引用并入本文中);通过干燥/抑制介导的DNA吸收(Potrykus等,1985),以及这些方法的任意组合。通过诸如此类的技术的应用,细胞器、细胞、组织或生物体可以稳定或瞬时转化。

[0130] a. 体外转化

[0131] 用于在体外环境中转化取自生物体的细胞和组织的方法是本领域技术人员已知的。例如,已经通过体外的逆转录病毒转移并移植至犬中,在遗传上改变了犬内皮细胞(Wilson等,1989)。在另一个实例中,使用双球导管,通过体外逆转录病毒转染尤卡坦迷你猪内皮细胞并移植至动脉中(Nabel等,1989)。因此,考虑了可以取出细胞或组织并使用本发明的核酸体外转染。在特定方面中,可以将移植的细胞或组织放入生物体中。在优选方面中,在移植的细胞或组织中表达核酸。

[0132] b. 注射

[0133] 在某些实施方案中,可以通过一次或多次注射(即,针注射),如,例如,皮下、皮内、肌内、静脉内、腹膜内等,将核酸递送至细胞器、细胞、组织或生物体。组合物的注射方法是本领域普通技术人员公知的(例如,包含组合物的盐水溶液的注射)。本发明的更多实施方案涉及包括通过直接微注射引入核酸。直接微注射已经用于将核酸构建体引入爪蟾(Xenopus)卵母细胞(Harland和Weintraub,1985)。使用的组合物含量可以根据基因产物或基因的性质以及使用的细胞器、细胞、组织或生物体而改变。

[0134] c. 电穿孔

[0135] 在本发明的某些实施方案中,通过电穿孔,将核酸引入细胞器、细胞、组织或生物体。电穿孔涉及将细胞和DNA的悬浮液暴露于高压放电。在这种方法的一些变化中,使用某些细胞壁降解酶,如果胶降解酶,使得靶受体细胞比未处理的细胞更容易通过电穿孔转化(美国专利No.5,384,253,按引用并入本文中)。或者,可以通过机械伤害,使受体细胞更容易转化。

[0136] 使用电穿孔的真核细胞的转染已经非常成功。以这种方式,已经用人 κ -免疫球蛋白基因转染了小鼠前-B淋巴细胞(Potter等,1984),以及已经用氯霉素乙酰转移酶基因转

染了大鼠肝细胞(Tur-Kaspa等,1986)。

[0137] d. 磷酸钙

[0138] 在本发明的其他实施方案中,使用磷酸钙沉淀,将核酸引入细胞中。已经使用这种技术,用腺病毒5DNA转染了人KB细胞(Graham和Van Der Eb,1973)。还以这种方式,用新霉素标记基因转染了小鼠L(A9)、小鼠C127、CHO、CV-1、BHK、NIH3T3和HeLa细胞(Chen和Okayama,1987),并用各种标记基因转染了大鼠肝细胞(Rippe等,1990)。

[0139] e. DEAE-葡聚糖

[0140] 在另一个实施方案中,使用DEAE-葡聚糖,接着用聚乙二醇,将核酸递送至细胞中。以这种方式,将报告子质粒引入小鼠骨髓瘤和红白血病细胞中(Gopal,1985)。

[0141] f. 超声波加载

[0142] 本发明的另外的实施方案包括通过直接超声波加载的核酸引入。已经通过超声波加载,用胸苷激酶基因转染了LTK⁻成纤维细胞(Fechheimer等,1987)。

[0143] g. 脂质体介导的转染

[0144] 在本发明进一步的实施方案中,可以将核酸捕获在脂质复合物中,例如,脂质体。脂质体是特征在于磷脂双层膜和内部含水介质的囊泡结构。多层脂质体具有由含水介质隔开的多个脂质层。磷脂悬浮于过量水溶液中时,它们自发形成、在闭合结构形成前脂质成分经历自我重排,并将水和溶解的溶质捕获在脂质双层之间(Ghosh和Bachhawat,1991)。还考虑了与Lipofectamine(Gibco BRL)或Superfect(Qiagen)复合的核酸。

[0145] 脂质体介导的核酸递送和外源DNA体外表达已经非常成功(Nicolau和Sene,1982; Fraley等,1979; Nicolau等,1987)。脂质体介导的递送以及培养的鸡胚、HeLa和肝癌细胞中的外源DNA表达的可行性也已经得到了证明(Wong等,1980)。

[0146] 在本发明的某些实施方案中,脂质体可以与凝血病毒(HVJ)复合。这已经显示出有助于与细胞膜的融合并促进脂质体包裹的DNA的细胞进入(Kaneda等,1989)。在其他实施方案中,脂质体可以结合核非-组蛋白染色体蛋白(HMG-1)复合或使用(Kato等,1991)。在再进一步的实施方案中,脂质体可以结合HVJ和HMG-1两者复合或使用。在其他实施方案中,递送载体可以包含配体和脂质体。

[0147] h. 受体介导的转染

[0148] 再进一步,可以通过受体介导的递送载体,将核酸递送至靶细胞。这些利用受体介导的将在靶细胞中发生的胞吞作用的大分子的选择性吸收。鉴于各种受体的细胞类型特异性的分布,这种递送方法给本发明增加了另一个程度的特异性。

[0149] 某些受体介导的基因靶向载体包含细胞受体特异性配体和核酸结合剂。其他包含已经可操作连接的待递送核酸的细胞受体特异性配体。几种配体已经用于受体介导的基因转移(Wu和Wu,1987; Wagner等,1990; Perales等,1994; Myers, EPO 0273085),这确定了技术的可操作性。已经描述了另一种哺乳动物细胞类型内含物的特异性递送(Wu和Wu,1993; 按引用并入本文中)。在本发明的某些方面中,将选择配体以对应于靶细胞群上特异性表达的受体。

[0150] 在其他实施方案中,细胞特异性核酸靶向载体的核酸递送载体成分可以包含结合脂质体的特异性结合配体。将待递送的核酸放置在脂质体内,并且特异性的结合配体功能性地结合至脂质体膜中。脂质体因此将特异性地结合靶细胞的受体并将内含物递送至细

胞。这样的系统已经显示出是功能性的,使用其中例如将表皮生长因子(EGF)用于受体介导的核酸递送至呈现出EGF受体上调的细胞中的系统。

[0151] 在再进一步的实施方案中,靶向的递送载体的核酸递送载体成分可以是脂质体自身,其将优选包含一种或多种指引细胞特异性结合的脂质或糖蛋白。例如,乳糖-神经酰胺,一种半乳糖末端asialganglioside,已经结合至脂质体中,并且观察到肝细胞吸收胰岛素基因的提高(Nicolau等,1987)。考虑了本发明的组织特异性转化构建体可以以相似的方式特异性地递送至靶细胞中。

[0152] i. 微粒轰击

[0153] 微粒轰击技术可以用于将核酸引入至少一个细胞器、细胞、组织或生躯体中(美国专利No.5,550,318;美国专利No.5,538,880;美国专利No.5,610,042;和PCT申请W0 94/09699;将每篇按引用并入本文中)。这种方法依赖于将DNA覆盖的微粒加速至高速以允许它们刺穿细胞膜并进入细胞而没有杀灭它们的能力(Klein等,1987)。存在多种本领域已知的微粒轰击技术,其中许多适用于本发明。

[0154] 微粒轰击可以用于转化各种细胞、组织或生物体,如,例如,任何植物物种。已经通过微粒轰击转化的物种的实例包括单子叶植物物种,如玉米(PCT申请W0 95/06128)、大麦(Ritala等,1994;Hensgens等,1993)、小麦(美国专利No.5,563,055,按引用并入本文中)、水稻(Hensgens等,1993)、燕麦(Torbet等,1995;Torbet等,1998)、黑麦(Hensgens等,1993)、甘蔗(Bower等,1992)和高粱(Casas等,1993;Hagio等,1991);以及各种双子叶植物,一般包括烟草(Tomes等,1990;Buising和Benbow,1994)、大豆(美国专利No.5,322,783,按引用并入本文中)、向日葵(Knittel等,1994)、花生(Singsit等,1997)、棉花(McCabe和Martinell,1993)、番茄(VanEck等,1995)和豆类(美国专利No.5,563,055,按引用并入本文中)。

[0155] 在这种微粒轰击中,可以用至少一种核酸涂覆一个或多个颗粒并通过推进力递送至细胞中。已经研发了几种用于小颗粒加速的设备。一种这样的设备依赖于高压放电,以产生电流,其随后提供原动力(Yang等,1990)。使用的微粒由生物惰性物质组成,如钨或金颗粒或珠子。示例性颗粒包括由钨、铂和优选金组成的那些。考虑了在一些情况下,沉淀在金属颗粒上的DNA对于使用微粒轰击将DNA递送至受体细胞不是必需的。然而,考虑到颗粒可以含有DNA,而不是被DNA覆盖。DNA覆盖的颗粒可以提高通过颗粒轰击的DNA递送的水平,但就其自身而言,不是必需的。

[0156] 为了轰击,将悬浮液中的细胞在滤器或固体培养基中浓缩。活着,可以将不成熟的胚胎或其他靶细胞排列在固体培养基上。将待轰击的细胞以合适的距离放置在微粒挡板下。

[0157] 通过加速将DNA递送至细胞(例如,植物细胞)中的方法的说明性实例是生物弹道学颗粒递送系统,其可以用于将覆盖DNA或细胞的颗粒推过筛网,如不锈钢或Nytex筛网,推至覆盖了细胞的滤器表面上,如,例如,悬浮液中培养的单子叶植物细胞。筛网使颗粒分散,使得它们不会以大的聚集物递送至受体细胞。据认为微粒装置和待轰击细胞之间的筛网插入减小了微粒聚集物的大小并且通过降低太大的微粒对受体细胞造成的损伤而有助于较高频率的转化。

[0158] C. 宿主细胞

[0159] 在一些实施方案中,将宿主细胞用于一种或多种基因治疗组合物的产生中。如本文中使用的,术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可以互换使用。所有这些术语还包括它们的后代,其是任何随后的子代。将理解由于故意的或无意的突变,所有后代不可能相同。在表达异源和旋序列的情况下,“宿主细胞”是指原核或真核细胞,并且其包括任何可转化的能够复制载体和/或表达由载体编码的异源基因的生物体。宿主细胞可以并且已经用作载体的受体。宿主细胞可以是“转染的”或“转化的”,其是指通过其将外源核酸转移或引入宿主细胞中的过程。如本文中使用的,术语“工程化的”和“重组的”细胞或宿主细胞旨在表示其中已经引入了外源核酸序列(如,例如,载体)的细胞。因此,重组细胞与不含重组引入的核酸的天然产生的细胞是可区分的。

[0160] 在某些实施方案中,考虑了RNA或蛋白质序列可以与其他选定的RNA或蛋白质序列在相同的宿主细胞中共同表达。可以通过用两个或更多个不同的重组载体共同转染宿主细胞来实现共同表达。或者,可以构建单个重组载体,以包括多个不同的用于RNA的编码区,随后可以在用单个载体转染的宿主细胞中表达所述RNA。

[0161] 组织可以包含用本发明组合物转化的一个或多个宿主细胞。组织可以是部分的或从生物体分离。在某些实施方案中,组织可以包括,但不限于,脂肪细胞、肺泡、成釉细胞、轴突、基细胞、血液(例如,淋巴细胞)、血管、骨、骨髓、脑、乳房、软骨、子宫颈、结肠、角膜、胚胎、子宫内膜、内皮、表皮、食道、筋膜、成纤维细胞、滤泡、神经节细胞、胶质细胞、杯形细胞、肾脏、肝脏、肺、淋巴结、肌肉、神经元、卵巢、胰腺、外周血、前列腺、皮肤、皮肤、小肠、脾脏、干细胞、胃、睾丸、花粉囊、腹水组织、玉米穗轴、耳朵、花、外壳、仁、叶、分生细胞、花粉、根尖、根、抽穗丝、茎,及其所有癌症。

[0162] 在某些实施方案中,宿主细胞或组织可以包含在至少一个生物体中。在特定实施方案中,生物体可以是,但不限于,原核细胞(例如,真细菌、古细菌)或真核细胞,如本领域普通技术人员理解的(参见,例如,网页<http://phylogeny.arizona.edu/tree/phylogeny.html>)。

[0163] 各种细胞系和培养物可用作宿主细胞,并且可以通过美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得,其是承担活的培养物或遗传物质存档的组织(www.atcc.org)。合适的宿主可以由本领域技术人员基于载体构架和所需结果来确定。例如,可以将质粒或粘粒引入原核宿主细胞中,用于许多载体的复制。可用于载体复制和/或表达的细胞类型包括,但不限于,如大肠杆菌(例如,大肠杆菌株RR1、大肠杆菌LE392、大肠杆菌B、大肠杆菌X 1776(ATCC No.31537)以及大肠杆菌W3110(F⁻、λ⁻、原养型、ATCC No.273325)、DH5α、JM109和KC8,杆菌,如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);和其他肠杆菌,如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*),各种假单胞菌属(*Pseudomonas*)种,以及各种商业上可购得的细菌宿主,如**SURE**[®]感受态细胞和**SOLOPACK**[™] Gold细胞(**STRATAGENE**[®], La Jolla)。在某些实施方案中,特别考虑了细菌细胞(如,大肠杆菌LE392)作为用于噬菌体病毒的宿主细胞。

[0164] 用于载体复制和/或表达的真核宿主细胞的实例包括,但不限于,HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、Cos、CHO、Saos和PC12。来自各种细胞类型和生物体的许多宿主细胞可利用并且是本领域技术人员已知的。相似地,病毒载体可以结合真核或原核宿主细胞使用,特别是

允许载体复制或表达的宿主细胞。

[0165] 一些载体可以使用控制序列,以允许其在原核和真核细胞中复制和/或表达。本领域技术人员将进一步了解孵育全部上述宿主细胞来维持并允许载体复制的条件。允许大规模产生载体,以及产生由载体编码的核酸及其同源多肽、蛋白质或肽的技术和条件也是了解和已知的。

[0166] D. 表达系统

[0167] 存在包含至少部分或全部上述组合物的各种表达系统。基于原核生物和/或真核生物的系统可以用于与本发明一起来产生核酸序列,或其同源多肽、蛋白质和肽。许多这样的系统是商业上可购得并广泛使用的。

[0168] 昆虫细胞/杆状病毒系统可以产生异源核酸区段高水平的蛋白质表达,如美国专利No.5,871,986,4,879,236中所述的,将两篇都按引用并入本文中,并且所述系统可以例如依据名称**MAXBAC**[®] 2.0从**INVITROGEN**[®]购得,以及来自**CLONTECH**[®]的**BACPACK**[™]杆菌表达系统。

[0169] 表达系统的其他实例包括**STRATAGENE**[®]'s **COMPLETE CONTROL**[™]诱导型哺乳动物表达系统,其涉及合成的蜕皮激素诱导型受体,或其**pET**表达系统,大肠杆菌表达系统。诱导型表达系统的另一个实例可获自**INVITROGEN**[®],其携带**T-REX**[™](四环素调控的表达)系统,一种使用全长CMV启动子的诱导型哺乳动物表达系统。**INVITROGEN**[®]还提供一种称为甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)表达系统的酵母表达系统,其设计用于在甲基营养型酵母甲醇毕赤酵母中高水平地产生重组蛋白。本领域技术人员将知道怎样表达载体,如表达构建体,来产生核酸序列或其同源多肽、蛋白质或肽。

[0170] 考虑了通过本发明的方法产生的蛋白质、多肽或肽可能是“超表达的”,即,以相对于其在细胞中的天然表达提高的水平表达。这样的超表达可以通过各种方法来评估,包括放射性标记和/或蛋白质纯化。然而,优选简单而直接的方法,例如,涉及SDS/PAGE和蛋白质染色或western印迹的那些,接着定量分析,如所得到的凝胶或印迹的光密度扫描。与天然细胞中水平相比的重组蛋白质、多肽或肽的水平的特异性增加表示超表达,因为是特定蛋白质、多肽或肽相对于宿主细胞产生的其他蛋白质的相对丰度,并且例如在凝胶上是可见的。

[0171] 在一些实施方案中,表达的蛋白质序列形成宿主细胞中的包含体,例如通过细胞均质机的破坏来裂解宿主细胞,洗涤和/或离心,以将稠密包含体和细胞膜与可溶性细胞成分分离。这种离心可以在一定条件下进行,由此通过将糖(如蔗糖)掺入缓冲液中并在选择速度下离心来选择性地富集稠密包含体。包含体可以在还原剂(如 β -巯基乙醇)或DTT(二硫苏糖醇)存在下溶解于含有高浓度脲(例如,8M)或离液剂(如盐酸胍)的溶液中,并重折叠成更理想的构象,如本领域普通技术人员已知的。

实施例

[0172] 包括以下实施例来证明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当知道以下实施例中公开的技术表示发明人发现的在本发明实施中起到很好作用的技术,并且因此可以认为构成了优选的实施方式。然而,根据本发明的公开内容,本领域技术人员应当知道可以

在公开的具体实施方案中形成许多变化,并且仍然获得同样或相似的结果,而没有脱离本发明的精神和范围。

[0173] 实施例1

[0174] 用于软骨细胞或软骨型细胞再生的基因治疗

[0175] 需要软骨细胞或软骨类型细胞再生的个体是本发明公开内容的一种或多种方法的和/或暴露于本发明公开内容的一种或多种组合物的受试者。所述个体可以处于需要软骨细胞或软骨型细胞再生的风险中,或个体可以被诊断为需要软骨细胞或软骨型细胞的再生。处于需要软骨细胞或软骨型细胞再生风险中的个体可以是处于任何原因的风险中,包括正在成为或已经是运动员,具有关节损伤,肥胖的个体,职业或生活方式需要体力劳动的那些,包括过多的抬举,或易于具有有害地影响关节或软骨的医学状况(例如,如具有家族史或具有对医学状况易感的一个或多个已知标记和/或风险因子),出于健康原因锻炼的那些,或作为外伤的结果。已知需要软骨细胞或软骨类型细胞再生的个体包括具有有害地影响关节或软骨的医学状况的个体。示例性医学状况包括椎间盘疾病、软骨营养障碍,包括骨关节炎、软骨发育不全、肋软骨炎、脊椎盘脱出等等。

[0176] 给需要修复或预防修复的个体的关节提供一种或多种基因治疗组合物。可以将基因治疗组合物提供给个体的关节,使用或未用第二种成分,如多个细胞,例如,和/或包含氧和/或营养素的存储器(如可吸收存储器);还可以提供一种或多种药物。在一些实施方案中,提供混合了基因治疗剂和营养素的支架。

[0177] 在一些情况下,在一种或多种基因治疗组合物递送至至少一个关节时,在接受者关节中产生软骨细胞或软骨样细胞或软骨型细胞。在一些情况下,在一种或多种基因治疗组合物递送至至少一个关节时,软骨组织再生。从基因治疗递送产生这些结果的机理可以来自多个原因中的一个或多个,包括1)将成纤维细胞或其他非软骨细胞细胞吸引至关节,其随后分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞或软骨型细胞;2)成纤维细胞或其他非软骨细胞细胞(包括关节中存在的那些)分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞或软骨型细胞;3)一种或多种基因治疗组合物与来自垂死的或存在于垂死组织或需要修复的组织中的软骨细胞的一个或多个分子组合;和/或4)由此引起的有利的或机械上足够的疤痕组织或纤维性疤痕组织的产生。

[0178] 实施例2

[0179] 材料和方法的实例

[0180] 在某些实施方案中,将以下方法用于本发明公开内容中。

[0181] 人Wharton's胶细胞的获得和扩大

[0182] 按照我们之前公开的实验方案,从人脐带的Wharton's胶(Devarajan等,2013)分离人Wharton's胶细胞(hWJC),告知后收集(KU-IRB#15402)。将hWJC在传统hWJC培养基(低葡萄糖DMEM(Life Technologies,Carlsbad,CA)中的10%胎牛血清(FBS-MSQ Qualified)和1%青霉素-链霉素)中培养。每周将hWJC培养基更换三次,并且将hWJC在细胞培养级培养箱中在37°C和5%CO₂下维持。将hWJC在第2代(P2)快速冷冻,直至需要用于实验。将hWJC融化并从P2扩大至P5,然后用于实验。对于每个脐带,所有实验重复进行三份。

[0183] 质粒

[0184] 通过Blue Heron Biotech LLC(Bothel,WA)来合成Sox9基因(NCBI GenBank ID:

NC_000017.11),并在Dendra2序列羧基端克隆至Dendra2-C质粒中(Clontech,Mountain View,CA)。Dendra2是绿色至红色的光可转换的荧光蛋白。Dendra2质粒含有细胞巨化病毒(CMV)启动子,以驱动Dendra2和融合至Dendra2的任何序列的转录。Dendra2质粒另外含有猿猴病毒40(SV40)启动子,以驱动用于细菌选择的卡那霉素抗性盒和用于真核细胞选择的新霉素抗性盒的转录。

[0185] 实验设计和转染

[0186] 根据之前公开的实验方案(Mellott等,2014),使用程序FF-104,用ROCK抑制剂处理hWJC,并通过4D-Nucleofector转染。以每个反应 5×10^5 的浓度转染hWJC。转染后,将hWJC转移至预先覆盖了纤连蛋白(BD Biosciences)的分别含有1.5mL或0.5mL预先温热的37°C的含有10 μ M Y-27632 ROCK抑制剂的传统hWJC培养基的6-孔平板(BD Biosciences, San Jose, CA)或Nunc™ Lab-Tek™ 8-孔室的盖玻片(Thermo Scientific, Wal tham, MA),并放入37°C和5%CO₂的细胞培养级培养箱中。

[0187] 基因表达

[0188] 在转染后第1天和第7天,收集转染的细胞和未处理的对照,并收集用于通过实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)的基因表达分析。分析细胞的软骨生成基因,Sox9和II型胶原。记录循环阈值(Ct)并通过Delta-Delta-Ct方法分析。将数值标准化至第0天未处理的对照样品和内源性对照。在转染后第1天和第7天,获取每个脐带的三个技术重复,用于基因表达分析。

[0189] 活细胞荧光成像

[0190] 收集hWJC,并用Hoechst 33342染料(Life Technologies)染色,用于转染后24小时的活细胞成像。使用Olympus IX81反向旋转圆盘共聚焦显微镜(Olympus America, Center Valley, PA),将hWJC成像。使用获取和分析软件SlideBook(Intelligent Imaging Innovations(3i), Denver, CO)捕获图像。使用汞弧灯,使用以下激发滤器(激发/发射)用于图像收集:Hoechst(387 \pm 11nm/447 \pm 60nm),GFP(494 \pm 20nm/531 \pm 22nm)和RFP(575 \pm 25nm/624 \pm 40nm)。从49个(七乘以七排列)邻近视野产生了装配,所述视野排列在一起产生了样品的一个综合复合图像。

[0191] 免疫化学

[0192] 在转染后1天和7天,收集转染的细胞和对照,用于免疫细胞化学。通过首先在37°C PBS中洗涤细胞来固定细胞,接着用PBS中的4%甲醛固定15分钟。然后用PBS洗涤并孵育5分钟三次。此后,用PBS中的0.25%曲通X-100将细胞渗透,然后在PBS中洗涤5分钟三次。用PBS中的4%牛血清白蛋白(BSA)和10%正常血清(来自二抗宿主)将细胞阻断60分钟。此后,用Sox9(Abcam, Cambridge, MA)和II型胶原(Abcam)一抗将细胞孵育过夜。第二天,将细胞在PBS中洗涤三次,每次15分钟。此后,用Qdot缀合的二抗(对于Sox9,Qdot 565小鼠缀合物,对于II型胶原,Qdot 655(Life Technologies))将细胞孵育过夜。第二天,将细胞在PBS中洗涤三次,每次15分钟。用叠氮溴化乙锭(10nM, Life Technologies)将细胞复染30分钟,然后用分级乙醇脱水,接着两次暴露于100%甲苯。然后将细胞放置在Qmount™ Qdot®安装介质(Life Technologies)中。使用共焦显微镜,使用405nm固态激光用于Qdot激发,488nm固态激光用于叠氮溴化乙锭激发,使细胞成像,并使用以下发射滤光器:叠氮溴化乙锭(531 \pm 22nm)、Qdot(560 \pm 25nm)和Qdot 655(655 \pm 15nm)。

[0193] 统计分析

[0194] 所有数值作为统计学平均与标准偏差来记录,除非另外指出。进行one-way ANOVA,使用post hoc Tukey's测试来评价统计显著性,使用 ≤ 0.05 的p设定,并且 $\alpha > 0.8$ 。使用软件SPSS(IBM)22版来计算所有统计分析。

[0195] 参考文献

[0196] Devarajan K,Forrest ML,Detamore MS,Staecker H.Adenovector-mediated gene delivery to human umbilical cord mesenchymal stromal cells induces inner ear cell phenotype.Cell Reprogram.2013;15(1):43-54.Epub 2013/02/06.doi:10.1089/cell.2011.0097.PubMed PMID:23379581.

[0197] Funari等,Cartilage-selective genes identified in genome-scale analysis of non-cartilage and cartilage gene expression.2007,BMC Genomics 2007,8:165

[0198] Hellingman等,Differences in cartilage-forming capacity of expanded human chondrocytes from ear and nose and their gene expression profiles.2011Cell Transplant.2011;20(6):925-40

[0199] Majumdar MK,Wang E和Morris EA.BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1.J.Cell.Physiol.2001(189):275-284.

[0200] Mellott AJ,Godsey ME,Shinogle HE,Moore DS,Forrest ML,Detamore MS.Improving Viability and Transfection Efficiency with Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Cells Through Use of a ROCK Inhibitor.Cell Reprogram.2014.Epub 2014/02/21.doi:10.1089/cell.2013.0069.PubMed PMID:24552552.

[0201] Seppa,N.Cartilage creation.New joint tissue could keep people moving, reducing need for knee or hip replacements.Science News 2012(189#3):22.

[0202] Sekiya等2002,Proc Natl Acad Sci U S A.2002April 2;99(7):4397-4402.

[0203] Zaslav K.Cole B.等,The American Journal of Sports Medicine.2009;37(1):42-55.

[0204] Zaslav K.Cole B.等,A Prospective Study of Autologous Chondrocyte Implantation in Patients Who Failed Prior Treatments for Articular Cartilage The American Journal of Sports Medicine.2009;37(1):42-55.

[0205] Zhang,Lijie,Jerry Hu,Kyriacos A.Athanasίου The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration Crit Rev Biomed Eng.2009;37(1-2):1-57.

[0206] 尽管已经详细描述了本发明及其优点,但将明白可以在本文中形成各种变化、置换和改变,而没有脱离所附权利要求限定的精神和范围。此外,没有打算将本发明的范围限于说明书中描述的过程、仪器、制造、物质组成、方式、方法和步骤的特定实施方案。如本领域普通技术人员从本发明公开内容容易获知的,根据本发明,可以利用现有的或之后研发的与本文中所述的相应实施方案基本上执行相同功能或基本上获得相同结果的过程、仪

器、制造、物质组成、方式、方法或步骤。因此,所附权利要求的目的在于在其范围内包括这样的过程、仪器、制造、物质组成、方式、方法或步骤。