

具有闭环再循环的原位心脏隔离： 最佳心脏基因转移的黄金标准？

迈克尔·G·卡茨，安东尼·法尼奥利罗杰·J·哈贾尔，查尔斯·R·布里奇斯
西奈山伊坎医学院 心脏病学系 心血管研究中心 纽约 美国
通讯作者：迈克尔·G·卡茨

摘要：将编码治疗基因的核酸材料输送到心脏的概念已经从假设转变为各种高潜力的临床应用。然而，尽管有希望，但由于临床中存在的几个问题，尚未实现所取得的成果。这些已确定的问题之一是需要一种有效的递送方法，以促进完全的强心作用并最大限度地减少附带效应。影响基因传递的最需要改进的其他参数已确定如下：（1）增加载体在冠状动脉循环中的接触时间以允许转移，（2）维持血管内流速和灌注压力以促进适当的动力学，（3）调节细胞通透性以提高摄取效率，并且一旦进入细胞，（4）增强转染心脏细胞内的转录和翻译，以及，（5）获得全局基因分布以获得最大功效。最近有人假设，使用心肺分流术可以促进心脏选择性基因转移，并允许在孤立的“闭环”再循环模型中将载体递送到停滞的心脏中。该系统被命名为具有再循环递送的分子心脏手术（MCARD）。这种方法的关键组成部分包括：将心脏与全身器官隔离，通过冠状脉管系统的载体多次循环再循环，以及从冠状动脉循环中去除残余载体以最大限度地减少侧支表达。MCARD等手术方法特有的这些属性可以有效提高冠状动脉血管系统中的载体转导效率。

关键词：基因治疗；循环输送的分子心脏手术；心脏隔离

In Situ Heart Isolation Featuring Closed Loop Recirculation: The Gold Standard for Optimum Cardiac Gene Transfer?

Michael G Katz, Anthony S Fargnoli, Roger J Hajjar and Charles R Bridges
Cardiovascular Research Center, Department of Cardiology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA
Corresponding author: Michael G. Katz

Abstract: The concept of delivering nucleic material encoding a therapeutic gene to the heart has arduously moved from hypothesis to a variety of high potential clinical applications. Despite the promise however, the results achieved have yet to be realized due to several problems that persist in the clinic. One of these identified problems is the need for an efficient delivery method which facilitates complete cardiotropism and minimizes collateral effects. Additional parameters impacting gene delivery that most need to be improved have been identified as follows: (1) Increasing the contact time of vector in coronary circulation permitting transfer, (2) Sustained intravascular flow rate and perfusion pressure to facilitate proper kinetics, (3) Modulation of cellular permeability to increase uptake efficiency, and once in the cells (4) Enhancing transcription and translation within the transfected cardiac cells, and (5) Obtaining the global gene distribution for maximum efficacy. Recently it was hypothesized that use of cardio pulmonary bypass may facilitate cardiac-selective gene transfer and permit vector delivery in the arrested heart in isolated “closed loop” recirculating model. This system was named molecular cardiac surgery with recirculating delivery (MCARD). The key components of this approach include: isolation of the heart from systemic organs, multiple pass recirculation of vector through the coronary vasculature, and removing the residual vector from the coronary circulation to minimize collateral expression. These attributes unique to a surgical approach such as MCARD can effectively increase vector transduction efficiency in coronary vasculature.

Keywords: Gene therapy; Molecular cardiac surgery with recirculating delivery; Cardiac isolation



成功的心肌基因治疗的传递概念

在过去的 25 年中,人们对基因治疗的目的、各种疾病的转基因模型的开发以及在各种生物治疗中合成包装核酸材料的认识有了很大的提高。最近在临床开发的同时,已经有许多组织的努力来改进专门为心血管基因治疗量身定制的基因传递技术。从先前公布的数据中得出的三个主要结论如下:(1)即使是最好的工程载体,例如那些含有心脏特异性启动子的载体,也不能限制病毒衣壳向心脏侧支器官或非靶组织的传递,(2)在较大的物种中,基因转移的给药途径与载体或启动子系统同等或更重要,并且(3)最佳基因转移可以根据与靶器官的转移比率与无意的侧枝转移来评估效率来定义。因此,随着额外的心脏基因疗法进入临床试验,基因疗法特有的药物递送方面蓬勃发展,开辟了全新的设备领域。

然而,尽管对优化递送有很大的兴趣和投资,但不存在具有完全强心性且无附带效应的理想心脏基因递送途径。血管内和心肌内递送已被证明可以限制对心脏的转导,结果各不相同,因为在单程基因转移的情况下,全身性渗漏是不可避免的。此外,通常会观察到非常快速的稀释,其特征是通过更大的循环血量显著降低载体浓度。此外,生物利用度的降低是一个问题,因为随后的基因治疗产品不能到达心脏,要么被侧支器官吸收,要么被免疫系统灭活。因此,解决这些问题的递送系统将为整体治疗提供实质性改进,重点关注几个参数。

评估各种心脏基因传递方法的关键参数

影响递送最需要改进的基因治疗参数已确定如下:

- (1) 增加载体在冠状动脉循环中允许转移的接触时间,
- (2) 维持血管内流速和灌注压力以促进适当的动力学,
- (3) 调节细胞通透性以提高摄取效率,并且一旦进入细胞
- (4) 增强转染心脏细胞内的转录和翻译,以及(5) 获得全局基因分布以获得最大功效。

临床相关心脏基因递送的技术挑战

逆行递送的选择性冠状动脉导管插入首先在兔模型中进行了测试^[1]。今天,它是心力衰竭基因治疗临床试验中广泛使用的技术^[2]。这种方法的好处包括重复载体递送至具有同源基因表达的整个心肌的可能性及其在提供微创、高通量系统方面的安全记录。然而,有限的转导和全身渗漏导致显著侧支器官摄取的不同结果使研究人员确定了影响冠状动脉内转移效率的参数。例如,如果通过选择性逆行冠状动脉给药的基因递送流量是正常冠状动脉血流流速的 20%,那么只有 20% 的注入载体会在第二次通过系统时再循环,而只有 0.8% 会在第四

遍循环。因此,每种病毒平均通过冠状动脉循环 <1.3 次或基本上是一次通过动力学。据估计,使用简单的选择性逆行冠状动脉灌注技术,超过 99% 的载体消失在体循环中^[3]。为了解决这个明显的问题,出现了许多新的附加技术来优化选择性逆行冠状动脉基因传递,包括冠状动脉血流的暂时中断^[4]、基因转移期间的冠状静脉阻塞^[5]、灌注压力和流量的变化^[6]和短暂的心脏骤停和药物增强的内皮通透性^[7]。然而,所有这些方法都没有临床相关性,因为它们在操纵解剖结构或在受损的高风险血管中充气装置方面具有侵略性。

下一个进步是通过冠状窦进行选择性冠状动脉内逆行递送^[8]。由于几个因素,与选择性逆行冠状动脉内技术相比,这种技术的使用无疑是一个进步。首先,它可以更容易地应用于冠状动脉系统中弥漫性动脉粥样硬化斑块的患者。其次,它允许延长载体与心脏内皮的粘附时间并克服动脉阻力。最后,它可以减轻心肌再灌注损伤^[9]。由于冠状动脉通过时间增加^[10],压力调节逆行输注到心脏前静脉显著增加了目标区域的基因表达。另一个优点是提高了毛细血管床静脉部分的毛细血管过滤率,并能够克服位于动脉毛细血管之前的毛细血管前括约肌的阻力^[11]。然而,尽管有这些优点,但这种方法仍然不能防止循环血液中的载体快速稀释,然后传播到侧支器官。

具有闭环再循环系统的分子心脏手术: 心脏手术基因递送方法的案例研究

为了解决基于导管的系统的缺点,研究人员假设利用先进的设备概念利用一致的流动灌注将提供更好的方法来提高生物利用度和减少首过效应。该提议的最终设备概念是“闭环”再循环系统,它允许将冠状血管床与全身血管床分开^[12]。最近有人假设,使用心肺转流术(CPB)可以促进心脏选择性基因转移,并允许在停止的心脏中进行载体递送^[13]。

最终,心脏基因传递领域的一个领导小组开发了一种孤立的“闭环”再循环模型。这个系统被命名为具有再循环递送的分子心脏手术(MCARD),并在允许载体再循环 20 分钟的大型动物中证明了有效性^[14]。这种方法的关键组成部分包括将心脏与其他器官隔离、通过冠状动脉管系统的载体多次再循环以及从冠状动脉循环中清洗残余载体以最大限度地减少侧支表达。从本质上讲,“闭环”再循环方法利用了两个独立的充氧回路,用于心脏和全身循环(图 1)。该系统独有的一个关键优势是对灌注流量和压力的控制,允许载体多次通过心脏。这在理

论上和实际目的上优化了许多变量, 这些变量已被证明是血管内心脏基因递送效率的重要决定因素。此外, 尽管与其他系统相比它具有侵入性, 但该方法在临床上是可转化的, 并且可以用作其他使用体外循环的心脏外科手术的辅助治疗, 前提是给定的治疗将证明长期的有利益处^[15]。

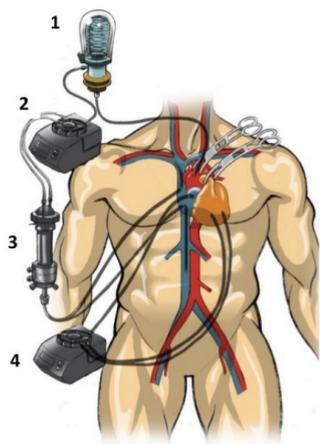


图 1: 基于体外循环的技术, 例如循环输送分子心脏手术 (MCARD)。启动全身旁路后, 将通气插管放入左右心室并连接到回路的静脉分支。动脉肢体连接到冠状窦导管。用心脏停搏停止心脏后, 再循环开始 20 分钟, 然后冠状动脉回路闪烁。(1: 膜氧合器, 2: 体循环第一滚子泵, 3: 热交换器, 4: 心脏循环第二滚子泵)。

结论和未来发展

总而言之, 已经证明, 使用 CPB 和高压逆行冠状窦输注以及通过心脏的载体多次循环再循环, 在原位完全手术隔离心脏导致心脏标志物基因活性增加几个数量级与对照组相比, 接受逆行腺病毒输注而不进行 CPB 和心脏隔离^[16]。该技术的主要优势包括转导效率的显著提高 (>1000 倍)、载体停留时间的延长、控制内皮通透性的能力、避免对载体的免疫反应和冲洗载体的能力基因传递后限制侧枝器官暴露^[17]。诸如 MCARD 之类的“闭环”系统可以提供稳健的基因表达, 而不会检测到心脏外转移, 也不会对主要器官功能产生不利影响。尽管有这些优势, 但 MCARD 在适用性方面的地位仅适用于选择的辅助心脏手术程序, 并且由于其侵入性而不是独立的。因此, 一个新的尚未解决的市场正在适应微创机器人手术工具以用于交付目的。

微创心脏手术和/或图像引导介入技术和工具将有助于扩大可能受益于心脏基因治疗的潜在患者的基础。目前, 心脏手术发生了一场革命, 其特点是先进的机器人应用程序以最小的切口和接入点进入心脏。此外, 微创

移植、瓣膜置换和其他支持设备将提供一种整合“基因洗脱”或其他应用于患者的受启发的组合设备的方法。

参考文献:

1. Barr E, Carroll J, Kalynych AM, Tripathy SK, Kozarsky K, et al. (1994) (efficient catheter-mediated gene transfer into the heart using replicationdefective adenovirus. *Gene Ther* 1: 51-58.
2. Hajjar RJ, Zsebo K, Deckelbaum L, Hompson C, Rudy J, et al. (2008) Design of a phase 1/2 trial of intracoronary administration of AAV1/ SERCA2a in patients with heart failure. *J Card Fail* 14: 355-367.
3. Bridges CR (2009) 'Recirculating cardiac delivery' method of gene delivery should be called 'non-recirculating' method. *Gene Ther* 16: 939-940.
4. Logeart D, Hatem SN, Heimburger M, Le Roux A, Michel JB, et al. (2001) How to optimize in vivo gene transfer to cardiac myocytes: mechanical or pharmacological procedures? *Hum Gene Ther* 12: 1601-1610.
5. Hayase M, Del Monte F, Kawase Y, Macneill BD, McGregor J, et al. (2005) Catheter-based antegrade intracoronary viral gene delivery with coronary venous blockade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2995-3000.
6. Emani SM, Shah AS, Bowman MK, Emani S, Wilson K, et al. (2003) Catheter-based intracoronary myocardial adenoviral gene delivery: Importance of intraluminal seal and infusion flow rate. *Mol Ther* 8: 306-313.
7. Donahue JK, Kikkawa K, Homas AD, Marban E, Lawrence JH (1998) Acceleration of widespread adenoviral gene transfer to intact rabbit hearts by coronary perfusion with low calcium and serotonin. *Gene Ther* 5: 630-634.
8. Boekstegers P, Kupatt C (2004) Current concepts and applications of coronary venous retroinfusion. *Basic Res Cardiol* 99: 373-381.
9. Katz MG, Swain JD, White JD, Low D, Stedman H, et al. (2010) Cardiac gene therapy: Optimization of gene delivery techniques in vivo. *Hum Gene Ther* 21: 371-380.
10. Raake PW, Hinkel R, Müller S, Delker S, Kreuzpointner R, et al. (2008) Cardio-specific long-term gene expression in a porcine model after selective pressure-regulated retroinfusion of adeno-associated viral (AAV) vectors. *Gene Ther* 15: 12-17.
11. Katz MG, Fargnoli AS, Pritchette LA, Bridges CR

(2012) Gene delivery technologies for cardiac applications. *Gene Ther* 19: 659–669.

12. Swain JD, Katz MG, White JD, Hesier DM, Henderson A, et al. (2011) A translatable, closed recirculation system for AAV6 vector-mediated myocardial gene delivery in the large animal. *Methods Mol Biol* 709: 331–354.

13. Davidson MJ, Jones JM, Emani SM, Wilson KH, Jagers J, et al. (2001) Cardiac gene delivery with cardiopulmonary bypass. *Circulation* 104: 131–133.

14. Katz MG, Fargnoli AS, Williams RD, Steuerwald NM, Isidro A, et al. (2014) Safety and efficacy of high-dose adeno-associated virus 9 encoding sarcoplasmic reticulum Ca(2+) adenosine triphosphatase delivered by molecular

cardiac surgery with recirculating delivery in ovine ischemic cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 148: 1065–1073.

15. Katz MG, Swain JD, Tomasulo CE, Sumaroka M, Fargnoli A, et al. (2011) Current strategies for myocardial gene delivery. *J Mol Cell Cardiol* 50: 766–776.

16. White JD, Hesier DM, Swain JB, Katz MG, Tomasulo C, et al. (2011) Myocardial gene delivery using molecular cardiac surgery with recombinant adeno-associated virus vectors in vivo. *Gene Ther* 18: 546–552.

17. Katz MG, Fargnoli AS, Kendle AP, Bridges CR (2017) Molecular cardiac surgery with recirculating delivery (MCARD): Procedure and vector transfer. *Methods Mol Biol* 1521: 271–289.