



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111542334 B
(45) 授权公告日 2024. 01. 23

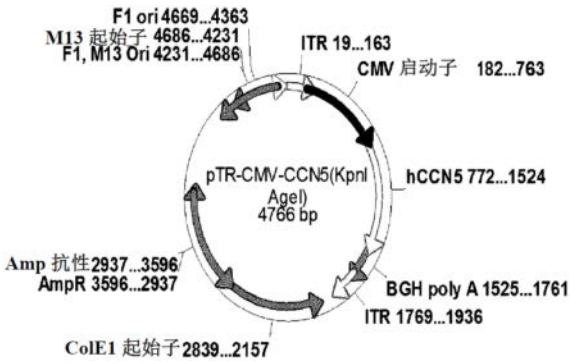
(21) 申请号 201880077650.2
(22) 申请日 2018.09.28
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111542334 A
(43) 申请公布日 2020.08.14
(30) 优先权数据
 10-2017-0127550 2017.09.29 KR
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.05.29
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/KR2018/011529 2018.09.28
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02019/066556 KO 2019.04.04
(73) 专利权人 贝特基因
 地址 韩国光州
(72) 发明人 李旻娥 郭泰焕 朴佑镇
(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224
 专利代理师 黄爱娇
(51) Int. Cl.
 A61K 38/17 (2006.01)
 A61K 48/00 (2006.01)

(56) 对比文件
SG 165423 A1,2010.10.28
US 2018369324 A1,2018.12.27
CN 105452458 A,2016.03.30
WO 2017082701 A1,2017.05.18
US 2013345130 A1,2013.12.26
US 2009239940 A1,2009.09.24
Min-Ah Lee等.The matricellular protein CCN5 prevents adverse atrial structural and electrical remodelling.J Cell Mol Med .2020,第24卷(第20期),第11768-11778页.
Robert G Gourdie等.Novel therapeutic strategies targeting fibroblasts and fibrosis in heart disease.《Nat Rev Drug Discov》.2016,第15卷(第9期),第620-638页.
Jin Hee Kim等.High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice.《PLOS One》.2011,第6卷(第4期),第e18556页. (续)
审查员 朱兵

权利要求书2页 说明书22页
序列表15页 附图47页

(54) 发明名称
用于预防或治疗心律失常的药物组合物

(57) 摘要
本发明涉及用于预防或治疗心律失常的药物组合物。特别地,本发明涉及含有CCN5蛋白质或编码CCN5蛋白质的核苷酸作为活性成分的药物组合物。本发明的用于预防或治疗心律失常的药物组合物抑制引起房性心律失常和心室性心律失常的主要原因心脏电异常的CaMKII的病理活性,从而恢复电功能,并且抑制引起结构性异常的肌成纤维细胞的活性。因此,本发明的药物组合物可有效用于预防或治疗心律失常。



CN 111542334 B

[接上页]

(56) 对比文件

Dongtak Jeong等.Matricellular Protein

CCN5 Reverses Established Cardiac

Fibrosis.《J Am Coll Cardiol》.2016,第67卷
(第13期),第1556-1568页.

1. 药物组合物在制备用于预防或治疗心律失常的药物上的用途,所述药物组合物包含以下作为活性成分:

基因构建体,所述基因构建体含有编码CCN5蛋白质的核苷酸序列。

2. 权利要求1的用途,其特征在于,所述CCN5蛋白质的氨基酸序列由SEQ ID NO: 1表示。

3. 权利要求1的用途,其特征在于,所述编码CCN5蛋白质的核苷酸序列是由SEQ ID NO: 2表示的序列。

4. 权利要求1的用途,其特征在于,所述基因构建体含有与其可操作相连的启动子序列。

5. 权利要求4的用途,其特征在于,所述启动子是选自由以下各项组成的组的任一种: CMV启动子、腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV tk启动子、RSV启动子、EF1 α 启动子、金属硫蛋白启动子、 β -肌动蛋白启动子、人IL-2基因启动子、人IFN基因启动子、人IL-4基因启动子、人淋巴毒素基因启动子和人GM-CSF基因启动子。

6. 权利要求1的用途,其特征在于,所述基因构建体还含有编码SERCA2a蛋白质的核苷酸序列。

7. 权利要求6的用途,其特征在于,在所述基因构建体中,在5'至3'方向上,以所述编码SERCA2a蛋白质的核苷酸序列-所述编码CCN5蛋白质的核苷酸序列的次序,含有所述编码SERCA2a蛋白质的核苷酸序列。

8. 权利要求7的用途,其特征在于,所述基因构建体含有位于所述编码SERCA2a蛋白质的核苷酸序列和所述编码CCN5蛋白质的核苷酸序列之间的自剪切序列。

9. 权利要求8的用途,其特征在于,所述自剪切序列是编码源自猪捷申病毒-1、Thosesigna病毒、马鼻肺炎A病毒或口蹄疫病毒的2A肽的核苷酸序列。

10. 权利要求8的用途,其特征在于,所述自剪切序列是编码源自猪捷申病毒-1的2A肽的核苷酸序列。

11. 权利要求8的用途,其特征在于,所述自剪切序列是由SEQ ID NO: 6表示的核苷酸序列。

12. 权利要求1的用途,其特征在于,所述心律失常是房性心律失常或室性心律失常。

13. 药物组合物在制备用于预防或治疗心律失常的药物上的用途,所述药物组合物包含以下作为活性成分:

表达载体,所述表达载体载有编码CCN5蛋白质的核苷酸序列。

14. 权利要求13的用途,其特征在于,所述表达载体还载有编码SERCA2a蛋白质的核苷酸序列。

15. 权利要求14的用途,其特征在于,在所述表达载体中,在5'至3'方向上,以所述编码SERCA2a蛋白质的核苷酸序列-所述编码CCN5蛋白质的核苷酸序列的次序,包含所述编码SERCA2a蛋白质的核苷酸序列。

16. 权利要求15的用途,其特征在于,所述表达载体还含有位于所述编码SERCA2a蛋白质的核苷酸序列和所述编码CCN5蛋白质的核苷酸序列之间的自剪切序列。

17. 权利要求13的用途,其特征在于,所述表达载体是选自由以下各项组成的组的任一种: 质粒载体和粘粒载体。

18. 药物组合物在制备用于预防或治疗心律失常的药物上的用途,所述药物组合物包含以下作为活性成分:

重组病毒,所述重组病毒含有编码CCN5蛋白质的核苷酸序列。

19. 权利要求18的用途,其特征在于,所述病毒是选自由以下各项组成的组的任一种:腺病毒、腺相关病毒(AAV)、反转录病毒、慢病毒、单纯疱疹病毒和牛痘病毒。

20. 权利要求18的用途,其特征在于,所述重组病毒还含有编码SERCA2a蛋白质的核苷酸序列。

21. 药物组合物在制备用于预防或治疗心律失常的药物上的用途,所述药物组合物包含CCN5蛋白质。

22. 权利要求21的用途,其特征在于,所述药物组合物还包含SERCA2a蛋白质。

用于预防或治疗心律失常的药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于预防或治疗心律失常的药物组合物。具体地,本发明涉及包含CCN5蛋白质或编码其的核苷酸序列作为活性成分的药物组合物。

背景技术

[0002] 心律失常是规律的心脏节律和有效的心脏收缩的异常引起的心脏疾病,其由于与心脏中的电信号问题而发生。通过定义,取决于其发作位置,心律失常被分类为房性心律失常和心室性心律失常。具体地,房性心律失常被分类为心房颤动,房性心动过速,和窦房结功能障碍;而心室性心律失常被分类为心室性心动过速和心室颤动(Swarminathan PD等, Circ Res 2012;110:1661-1677)。

[0003] 心律失常导致相当大的发病率和死亡率,尤其是在发达国家,并且心搏停止是发达国家中主要死因之一(Mozaffarian D等, Circulation 2015;131:e29-e322)。特别地,心室性心律失常是心源性猝死的主要原因,并且心脏疾病的其他风险因素加速并放大心室性心律失常(Roberts-Thomson KC等, Nat Rev Cardiol 2011;8:311-321)。此外,在心律失常中,心房颤动是最常见的心律失常,并且发生率渐增,并且极大地提高疾病如心律失常和卒中的发生率(Andrada D等, Circ Res 2014;114:1453-1458)。

[0004] 用于治疗心律失常的疗法包括抗心律失常药、导管消融术、用于治疗心室性心律失常的可植入式复律除颤器。然而,这些疗法展现有限的疗效。离子通道阻滞作为抗心律失常治疗的主要机制表现出在慢性治疗和预防心律失常方面的限制。在涉及心律失常抑制的临床试验中,在心室早发性收缩的治疗期间,抗心律失常药已表现出增加心肌梗死患者的心血管死亡率。目前使用的抗心律失常药的常见副作用包括导致促进心律失常的风险(Camm J, Int Cardiol 2012;155:363-371)。

[0005] 同时,研究报道了CaMKII (Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白质激酶II)在心律失常的电方面起关键作用。提高的CaMKII活性导致离子通道的超活化、细胞内 Ca^{2+} 内稳态缺陷以及组织损伤,由此促进心律失常。因此,抑制CaMKII活性可以用作治疗心律失常的有效方式。

[0006] 为了开发用于心律失常的有效治疗,有必要通过理解其病理机制和发现其新的上游治疗靶标来开发此种治疗。

[0007] 因此,本发明意在提供用于开发同时解决电功能紊乱的关键靶标CaMKII和结构性功能紊乱的主要原因纤维化的治疗的解决方案,作为用于心律失常的发作和保持及用于心律失常症状的持续恶化的治疗。

发明内容

[0008] 技术问题

[0009] 关于此,本发明人进行研究从而开发了用于心律失常的有效治疗,并且因此确定包含编码CCN5蛋白质或其片段的基因的藥物组合物,抑制CaMKII的病理活性并且抑制肌成纤维细胞的活性,由此完成本发明。此外,本发明人确定,包含编码CCN5蛋白质和SERCA2a蛋

白质的基因的药物的组合物,在使用心律失常的动物模型的实验中展现对电功能紊乱的协同治疗效果,由此完成本发明。

[0010] 问题的解决方案

[0011] 在本发明的一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的药物组合物,所述药物组合物包含基因构建体作为活性成分,所述基因构建体含有编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列。

[0012] 在本发明的另一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的药物组合物,所述药物组合物包含表达载体作为活性成分,所述表达载体载有编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列。

[0013] 在本发明的又另一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的药物组合物,所述药物组合物包含重组病毒作为活性成分,所述重组病毒含有编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列。

[0014] 在本发明的仍又另一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的方法,所述方法包括向对象施用本发明的药物组合物的步骤。

[0015] 在本发明的仍又另一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的药物组合物,所述药物组合物包含CCN5蛋白质作为活性成分。

[0016] 在本发明的仍又另一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的方法,所述方法包括向对象施用CCN5蛋白质的步骤。

[0017] 在本发明的仍又另一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的方法,所述方法包括向对象施用含有编码CCN5蛋白质的核苷酸序列的基因构建体的步骤。

[0018] 在本发明的仍又另一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的方法,所述方法包括向对象施用载有编码CCN5蛋白质的核苷酸序列的表达载体的步骤。

[0019] 在本发明的仍又另一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的方法,所述方法包括向对象施用含有编码CCN5蛋白质的核苷酸序列的重组病毒的步骤。

[0020] 发明的有利效果

[0021] 本发明的用于预防或治疗心律失常的药物组合物抑制引起作为房性心律失常和心室性心律失常的主要原因的心脏电功能紊乱的CaMKII的病理活性,从而恢复心脏电功能,并且抑制引起结构性功能紊乱的肌成纤维细胞的活性。因此,本发明的药物组合物可有效用于预防或治疗心律失常。

[0022] 附图简述

[0023] 图1显示pTR-CMV-CCN5载体的结构示意图。

[0024] 图2显示pTR-CMV-SERCA2a-P2A-CCN5载体的结构示意图。

[0025] 图3a显示使用野生型小鼠和CCN5 TG小鼠以鉴定CCN5蛋白质的纤维化抑制效果的动物实验的概念图。

[0026] 图3b显示通过向野生型小鼠或CCN5 TG小鼠施用血管紧张素II达14天,提取其心房组织,并且利用Masson三色染色对心房组织进行染色获得的照片。

[0027] 图3c显示通过向野生型小鼠或CCN5 TG小鼠施用血管紧张素II达14天,提取其心房组织,利用Masson三色染色对心房组织进行染色,并且量化染色的心房组织的纤维化程度获得的结果(*:p<0.05;**p<0.01)。

[0028] 图3d显示通过向野生型小鼠或CCN5 TG小鼠施用血管紧张素II达14天,提取其心房组织,并且通过qRT-PCR测量心房组织中 α -SMA的mRNA表达水平获得的结果(**:p<0.01)。

[0029] 图3e显示通过向野生型小鼠或CCN5 TG小鼠施用血管紧张素II达14天,提取其心房组织,并且通过qRT-PCR测量心房组织中胶原I的mRNA表达水平获得的结果(*:p<0.05;**p<0.01)。

[0030] 图3f显示通过向野生型小鼠或CCN5 TG小鼠施用血管紧张素II达14天,提取其心房组织,并且通过qRT-PCR测量心房组织中TGF- β 1的mRNA表达水平获得的结果(*:p<0.05;**p<0.01)。

[0031] 图3g显示通过向野生型小鼠或CCN5 TG小鼠施用血管紧张素II达14天,提取其心房组织,并且通过qRT-PCR测量心房组织中IL-1 β 的mRNA表达水平获得的结果(*:p<0.05)。

[0032] 图3h显示通过向野生型小鼠或CCN5 TG小鼠施用血管紧张素II达14天,提取其心房组织,并且通过qRT-PCR测量心房组织中RANTES的mRNA表达水平获得的结果(*:p<0.05;**p<0.01)。

[0033] 图3i显示通过向野生型小鼠或CCN5 TG小鼠施用血管紧张素II达14天,提取其心房组织,并且通过qRT-PCR测量心房组织中F4/80的mRNA表达水平获得的结果(**:p<0.01)。

[0034] 图3j显示通过向野生型小鼠或CCN5 TG小鼠施用血管紧张素II达14天,提取其心房组织,并且通过qRT-PCR测量心房组织中MCP-1的mRNA表达水平获得的结果(**:p<0.01)。

[0035] 图4a显示使用野生型小鼠和CCN5 TG小鼠以鉴定CCN5蛋白质对心房颤动的抑制效果的动物实验的概念图。

[0036] 图4b显示通过向野生型小鼠或CCN5 TG小鼠施用血管紧张素II达14天,提取其心脏,向其施加电刺激以诱发心房颤动,并且测量心电图获得的结果。

[0037] 图4c显示通过向野生型小鼠或CCN5 TG小鼠施用血管紧张素II达14天,提取其心脏,并且测量当向心脏施加电刺激以诱发心房颤动诱发的心房颤动的频率获得的结果。

[0038] 图5a显示使用HL-1细胞以鉴定CCN5蛋白质对心房颤动的抑制效果的实验的概念图。

[0039] 图5b显示通过用血管紧张素II并且同时用CM-Con或CM-CCN5对HL-1细胞进行处理,进行培养达48小时,然后通过蛋白质印迹法鉴定HL-1细胞中蛋白质p-CaMKII (Thr286)、CaMKII、pRyR2 (Ser2808)、pRyR2 (Ser2814)、RyR2、肌钙集蛋白2(calsequestrin2)、Na⁺/Ca⁺交换蛋白2(Na⁺/Ca⁺exchanger 2, NCX2)、和GAPDH的表达获得的结果。

[0040] 图5c显示通过用血管紧张素II并且同时用CM-Con或CM-CCN5对HL-1细胞进行处理,进行培养达48小时,然后计算HL-1细胞中的p-CaMKII (Thr286)/CaMKII值获得的结果(**:p<0.01)。

[0041] 图5d显示通过用血管紧张素II并且同时用CM-Con或CM-CCN5对HL-1细胞进行处理,进行培养达48小时,然后计算HL-1细胞中的pRyR2 (Ser2808)/RyR2值获得的结果(**:p<0.01)。

[0042] 图5e显示通过用血管紧张素II并且同时用CM-Con或CM-CCN5对HL-1细胞进行处理,进行培养达48小时,然后计算HL-1细胞中的pRyR2 (Ser2814)/RyR2值获得的结果(*:p<0.05;**p<0.01)。

[0043] 图5f显示通过用血管紧张素II并且同时用CM-Con或CM-CCN5对HL-1细胞进行处

理,进行培养达48小时,然后计算HL-1细胞中的肌钙集蛋白2/GAPDH值获得的结果(*:p<0.05;**p<0.01)。

[0044] 图5g显示通过用血管紧张素II并且同时用CM-Con或CM-CCN5对HL-1细胞进行处理,进行培养达48小时,然后计算HL-1细胞中的NCX2/GAPDH值获得的结果(**:p<0.01)。

[0045] 图6a显示使用大鼠心房成纤维细胞以鉴定CCN5蛋白质对心房颤动的抑制效果的实验的概念图。

[0046] 图6b显示通过用血管紧张素II并且同时用CM-Con或CM-CCN5对大鼠心房成纤维细胞进行处理,进行培养达48小时,然后用荧光免疫化学对培养的大鼠心房成纤维细胞进行染色获得的照片。

[0047] 图6c显示通过用血管紧张素II并且同时用CM-Con或CM-CCN5对大鼠心房成纤维细胞进行处理,进行培养达48小时,然后通过蛋白质印迹法鉴定心房成纤维细胞中蛋白质 α -SMA、胶原I、TGF- β 1和 α -微管蛋白的表达获得的结果。

[0048] 图6d显示通过用血管紧张素II并且同时用CM-Con或CM-CCN5对大鼠心房成纤维细胞进行处理,进行培养达48小时,然后计算心房成纤维细胞中的 α -SMA/ α -微管蛋白值获得的结果(*:p<0.05;**p<0.01)。

[0049] 图6e显示通过用血管紧张素II并且同时用CM-Con或CM-CCN5对大鼠心房成纤维细胞进行处理,进行培养达48小时,然后计算心房成纤维细胞中的胶原I/ α -微管蛋白值获得的结果(*:p<0.05;**p<0.01)。

[0050] 图6f显示通过用血管紧张素II并且同时用CM-Con或CM-CCN5对大鼠心房成纤维细胞进行处理,进行培养达48小时,然后计算心房成纤维细胞中的TGF- β 1/ α -微管蛋白值获得的结果(*:p<0.05;**p<0.01)。

[0051] 图6g显示通过用血管紧张素II并且同时用CM-Con或CM-CCN5对大鼠心房成纤维细胞进行处理,进行培养达48小时,然后通过qRT-PCR测量心房组织中 α -SMA的mRNA表达水平获得的结果(*:p<0.05)。

[0052] 图6h显示通过用血管紧张素II并且同时用CM-Con或CM-CCN5对大鼠心房成纤维细胞进行处理,进行培养达48小时,然后通过qRT-PCR测量心房组织中胶原I的mRNA表达水平获得的结果(**:p<0.01)。

[0053] 图6i显示通过用血管紧张素II并且同时用CM-Con或CM-CCN5对大鼠心房成纤维细胞进行处理,进行培养达48小时,然后通过qRT-PCR测量心房组织中TGF- β 1的mRNA表达水平获得的结果(*:p<0.05;**p<0.01)。

[0054] 图7a显示使用心房纤维化诱发小鼠以鉴定AAV-CCN5蛋白质对心房纤维化的治疗效果的概念图。

[0055] 图7b显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-CCN5,注射后4周提取其心房组织,并且通过蛋白质印迹法鉴定CCN5的蛋白质表达获得的结果。

[0056] 图7c显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-CCN5,注射后4周提取其心房组织,并且鉴定CCN5的蛋白质和mRNA表达水平获得的结果。

[0057] 图7d显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-CCN5,注射后4周提取其心房组织,并且利用Masson三色染色对心房组织进行染色获得的照

片。

[0058] 图7e显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-CCN5,注射后4周提取其心房组织,利用Masson三色染色对心房组织进行染色,并且量化染色的心房组织中的纤维化程度获得的结果(*:p<0.05)。

[0059] 图7f显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-CCN5,注射后4周提取其心房组织,并且通过qRT-PCR计算心房组织中的 α -SMA/18s rRNA值获得的结果(*:p<0.05)。

[0060] 图7g显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-CCN5,注射后4周提取其心房组织,并且通过qRT-PCR计算心房组织中的胶原I/18s rRNA值获得的结果(*:p<0.05;**p<0.01)。

[0061] 图7h显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-CCN5,注射后4周提取其心房组织,并且通过qRT-PCR计算心房组织中的TGF- β 1/18s rRNA值获得的结果(**:p<0.01)。

[0062] 图7i显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-CCN5,注射后4周提取其心房组织,并且通过qRT-PCR计算心房组织中的IL-1 β /18s rRNA值获得的结果(*:p<0.05)。

[0063] 图7j显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-CCN5,注射后4周提取其心房组织,并且通过qRT-PCR计算心房组织中的RANTES/18s rRNA值获得的结果(**:p<0.01)。

[0064] 图7k显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-CCN5,注射后4周提取其心房组织,并且通过qRT-PCR计算心房组织中的F4/80/18s rRNA值获得的结果(*:p<0.05;**p<0.01)。

[0065] 图7l显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-CCN5,注射后4周提取其心房组织,并且通过qRT-PCR计算心房组织中的MCP-1/18s rRNA值获得的结果(**:p<0.01)。

[0066] 图8a显示使用心房颤动诱发小鼠以鉴定AAV-CCN5蛋白质的心房颤动抑制效果的动物实验的概念图。

[0067] 图8b显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-CCN5,并且在注射后4周测量心电图获得的心电图结果。

[0068] 图8c显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-CCN5,并且在注射后4周观察利用电刺激的心律失常的发生率获得的结果。

[0069] 图8d显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-CCN5,并且在注射后4周观察诱发心律失常所需的电刺激的强度获得的结果。

[0070] 图8e显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-CCN5,并且在注射后4周测量Ca²⁺的动作电位获得的结果。

[0071] 图8f显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-CCN5,并且在注射后4周测量动作电位时程50 (APD₅₀) 和动作电位时程75 (APD₇₅) 获得的结果。

[0072] 图8g显示通过向野生型小鼠施用血管紧张素II达14天,向其注射AAV-对照或AAV-

CCN5,并且在注射后4周测量去极化速度获得的结果(*:p<0.05)。

[0073] 图9a显示野生型小鼠和心室性心律失常诱发小鼠中在6周内的缩短分数和体重变化。

[0074] 图9b显示通过向野生型小鼠和心室性心律失常诱发小鼠的右心室(RV)施加10Hz的电刺激并且拍摄照片获得的光学图谱。

[0075] 图9c显示通过向野生型小鼠和心室性心律失常诱发小鼠的右心室(RV)施加20Hz的电刺激并且拍摄照片获得的光学图谱。

[0076] 图9d显示通过测量野生型小鼠和心室性心律失常诱发小鼠中 Ca^{2+} 的动作电位获得的结果。

[0077] 图9e显示通过测量野生型小鼠和心室性心律失常诱发小鼠中的动作电位时程50(APD_{50})和动作电位时程75(APD_{75})获得的结果(*:p<0.05)。

[0078] 图9f显示通过测量野生型小鼠和心室性心律失常诱发小鼠中动作电位时程的分散获得的结果(*:p<0.05)。

[0079] 图9g显示野生型小鼠和心室性心律失常诱发小鼠中的传导速度和去极化速度(**p<0.001)。

[0080] 图10a显示野生型小鼠和心室性心律失常诱发小鼠中取决于ISO处理的 Ca^{2+} 的动作电位的变化。

[0081] 图10b显示野生型小鼠和心室性心律失常诱发小鼠的右心室中取决于ISO处理的 Ca^{2+} 复极化模式的变化。

[0082] 图10c显示野生型小鼠和心室性心律失常诱发小鼠中取决于ISO处理的动作电位时程75(APD_{75})的变化。

[0083] 图10d显示在用ISO对野生型小鼠和心室性心律失常诱发小鼠进行处理后获得的 Ca^{2+} 光学图谱。

[0084] 图10e显示在用ISO对野生型小鼠和心室性心律失常诱发小鼠进行处理并且然后测量动作电位时程75(APD_{75})后获得的结果(*:p<0.05)。

[0085] 图10f显示野生型小鼠和心室性心律失常诱发小鼠中取决于ISO处理的去极化速度的变化(**p<0.001)。

[0086] 图11a显示野生型小鼠、用AAV9-对照注射的心室性心律失常诱发小鼠、用AAV9-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠、和用AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠中在6周内的缩短分数。

[0087] 图11b显示野生型小鼠、用AAV9-对照注射的心室性心律失常诱发小鼠、用AAV9-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠、和用AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠中在6周内左心室壁厚的变化。

[0088] 图11c显示用AAV9-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠和用ISO和AAV9-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠的 Ca^{2+} 光学图谱。

[0089] 图11d显示用AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠和用ISO和AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠的 Ca^{2+} 光学图谱。

[0090] 图11e显示用AAV9-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠和用AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠中取决于ISO处理的 Ca^{2+} 的动作电位的变化。

[0091] 图11f显示野生型小鼠、用AAV9-对照注射的心室性心律失常诱发小鼠、用AAV9-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠、和用AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠中左心室中的Ca²⁺复极化模式。

[0092] 图11g显示野生型小鼠、用AAV9-对照注射的心室性心律失常诱发小鼠、用AAV9-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠、和用AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠中取决于ISO处理的动作电位时程75 (APD₇₅) 的变化 (*:p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001)。

[0093] 图11h显示野生型小鼠、用AAV9-对照注射的心室性心律失常诱发小鼠、用AAV9-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠、和用AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠中取决于ISO处理的传导速度 (*:p<0.05; ***:p<0.001)。

[0094] 图11i显示野生型小鼠、用AAV9-对照注射的心室性心律失常诱发小鼠、用AAV9-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠、和用AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠中取决于ISO处理的去极化速度 (**:p<0.01; ***:p<0.001)。

[0095] 图12a显示在向野生型小鼠、用AAV9-对照注射的心室性心律失常诱发小鼠、用AAV9-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠、和用AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠施加电刺激的情况下观察到的心电图变化。

[0096] 图12b显示在野生型小鼠、用AAV9-对照注射的心室性心律失常诱发小鼠、用AAV9-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠、和用AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠中诱发心律失常所需的电刺激的强度。

[0097] 图12c显示在野生型小鼠、用AAV9-对照注射的心室性心律失常诱发小鼠、用AAV9-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠、和用AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠中进行电刺激的情况下心律失常的发生率。

[0098] 图13a显示通过从野生型小鼠、用AAV9-对照注射的心室性心律失常诱发小鼠、用AAV9-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠、和用AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠提取心脏,并且用Masson三色染色对心脏进行染色获得的照片。

[0099] 图13b显示通过经由蛋白质印迹法鉴定在野生型小鼠、用AAV9-对照注射的心室性心律失常诱发小鼠、用AAV9-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠、和用AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5注射的心室性心律失常诱发小鼠的心脏组织中蛋白质Nav 1.5、FAP、连接蛋白43、MsrA、Kir2.1、微管蛋白、SERCA2a、Smad7和CCN5的表达获得的结果。

具体实施方式

[0100] 下文中,将详细描述本发明。

[0101] 在本发明的一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的药物组合物,所述药物组合物包含基因构建体作为活性成分,所述基因构建体含有编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列。

[0102] 当在本文中使用时,术语“CCN5蛋白质”是指属于CCN家族的基质细胞蛋白质,其在细胞功能如血管疾病诱发、新生血管形成、肿瘤发生、纤维化疾病诱发、细胞分化和存活的调节中起多种作用。CCN5蛋白质,不同于其他CCN家族蛋白质,不具有C-端结构域并且也被称为WISP-2、HICP、Cop1、CTGF-L等。此外,CCN5蛋白质由250个氨基酸的序列的单个多肽链

组成。由于N-末端的22个氨基酸的分泌前导序列,CCN5蛋白质被分泌到细胞外并且作为信号转导蛋白质发挥功能。因此,当在细胞中表达所述核苷酸序列时,CCN5蛋白质可以被分泌到细胞外。此处,所述核苷酸序列可以是mRNA的形式。

[0103] 具体地,CCN5蛋白质可以具有由SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列。此外,编码CCN5蛋白质的核苷酸序列可以由SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:41表示的序列。

[0104] 此外,CCN5蛋白质的片段可以通过截短野生型CCN5的N-末端和/或C-末端的部分获得的片段,只要所述片段保持CCN5蛋白质的活性即可。具体地,CCN5蛋白质的片段可以通过自N-末端或C-末端截短1至30、1至20、1至10、或1至5个氨基酸获得的片段。

[0105] 此外,所述基因构建体可以含有与其可操作相连的启动子序列。

[0106] 当在本文中使用时,术语“可操作相连的”是指核苷酸表达调节序列(如启动子、信号序列、或一系列转录因子结合位点)和其他核苷酸序列之间的功能性连接。所述调节序列调节所述其他核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0107] 具体地,与编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列相连的启动子可以,优选地在动物细胞中,并且更优选地在哺乳动物细胞中操作,以调控CCN5基因的转录。所述启动子包括来源于哺乳动物病毒的启动子和来源于哺乳动物细胞基因组的启动子。所述启动子可以具体地在心脏细胞中操作。

[0108] 所述启动子可以是选自由以下各项组成的组的任一种:巨细胞病毒(CMV)启动子、腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV tk启动子、RSV启动子、EF1 α 启动子、金属硫蛋白启动子、 β -肌动蛋白启动子、人IL-2基因启动子、人IFN基因启动子、人IL-4基因启动子、人淋巴毒素基因启动子和人GM-CSF基因启动子。然而,所述启动子不限于此。具体地,所述启动子可以是CMV启动子。

[0109] 所述基因构建体还可以含有编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列。此处,所述核苷酸序列可以是mRNA的形式。

[0110] 此处,在所述基因构建体中,可以在5'至3'方向上,以编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列-编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列的次序,包含编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列。此处,编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列可以含有终止密码子。

[0111] 此外,在所述基因构建体中,可以在5'至3'方向上,以编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列-编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列的次序,包含编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列。此处,编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列可以含有终止密码子。

[0112] 此外,所述基因构建体还可以含有在编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列和编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列之间的自剪切序列。

[0113] 当在本文中使用时,术语“SERCA2a蛋白质”是指功能是引起使用ATP能量的钙到肌质网中的再摄入的蛋白质。据报道,在射血分数降低的心力衰竭(HFrEF)患者中观察到SERCA2a蛋白质的表达水平显著下降。由SERCA2a蛋白质表达减少引起的钙到肌质网的再摄入减少,使细胞质中的钙浓度异常增加,减弱心肌细胞的收缩-舒张功能,并且由于钙流入线粒体中而引起有害氧的产生、能量代谢功能的破坏等,从而成为心肌细胞死亡的直接原因。

[0114] 具体地, SERCA2a蛋白质可以具有由SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列。此外, 编码SERCA2a蛋白质的核苷酸序列可以是由SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:42表示的序列。

[0115] 此外, SERCA2a蛋白质的片段可以通过截短野生型SERCA2a的N-末端和/或C-末端的部分获得的片段, 只要所述片段保持SERCA2a蛋白质的活性即可。具体地, SERCA2a蛋白质的片段可以通过自N-末端或C-末端截短1至100、1至50、1至20、或1至10个氨基酸获得的片段。

[0116] 所述自剪切序列可以是编码来源于猪捷申病毒-1 (porcine teschovirus-1)、Thosea asigna病毒、马鼻炎A病毒或口蹄疫病毒的2A肽的核苷酸序列。具体地, 所述自剪切序列可以是编码来源于猪捷申病毒-1的2A肽的核苷酸序列。此外, 所述自剪切序列可以是由SEQ ID NO:6表示的核苷酸序列。

[0117] 编码来源于猪捷申病毒-1的2A肽的核苷酸序列可以是编码由SEQ ID NO:5表示的氨基酸序列的核苷酸序列。此外, 编码由SEQ ID NO:5表示的氨基酸序列的核苷酸序列可以是由SEQ ID NO:6表示的核苷酸序列。

[0118] 编码来源于Thosea asigna病毒的2A肽的核苷酸序列可以是编码由SEQ ID NO:7表示的氨基酸序列的核苷酸序列。此外, 编码由SEQ ID NO:7表示的氨基酸序列的核苷酸序列可以是由SEQ ID NO:8表示的核苷酸序列。

[0119] 编码来源于马鼻炎A病毒的2A肽的核苷酸序列可以是编码由SEQ ID NO:9表示的氨基酸序列的核苷酸序列。此外, 编码由SEQ ID NO:9表示的氨基酸序列的核苷酸序列可以是由SEQ ID NO:10表示的核苷酸序列。

[0120] 编码来源于口蹄疫病毒的2A肽的核苷酸序列可以是编码由SEQ ID NO:11表示的氨基酸序列的核苷酸序列。此外, 编码由SEQ ID NO:11表示的氨基酸序列的核苷酸序列可以是由SEQ ID NO:12表示的核苷酸序列。

[0121] 当在细胞中表达作为基因构建体的一个实施方案的SERCA2a-P2A-CCN5时, SERCA2a蛋白质可以被插入到肌质网膜中, 并且CCN5蛋白质可以被分泌到细胞外。此外, 当在细胞中表达作为本发明的基因构建体的一个实施方案的CCN5-P2a-SERCA2a时, SERCA2a蛋白质可以被插入到肌质网膜中, 并且CCN5蛋白质可以被分泌到细胞外。

[0122] 当在本文中使用时, 术语“心律失常”是指这样的疾病, 其中由于心脏中不良的电刺激产生或不良的刺激传输, 心脏无法继续规律收缩, 并且心搏变得异常地快、慢或无规律。

[0123] 取决于其发作位置, 心律失常被分类为房性心律失常和心室性心律失常。房性心律失常可以包括心房颤动, 房性心动过速, 或窦房结功能障碍。心室性心律失常可以包括心室性心动过速或心室颤动。

[0124] 此外, 可以使用脂质体将本发明的基因构建体递送到细胞中。脂质体由分散在水相中的磷脂自动形成, 并且含有编码CCN5蛋白质的核苷酸序列和/或编码SERCA2a蛋白质的核苷酸序列的脂质体允许通过机制如内吞作用、吸附至细胞表面、或与浆细胞膜融合将编码CCN5蛋白质的核苷酸序列和/或编码SERCA2a蛋白质的核苷酸序列递送到细胞中。

[0125] 在本发明的另一个方面, 提供用于预防或治疗心律失常的药物组合物, 所述药物组合物包含表达载体作为活性成分, 所述表达载体载有编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列。

[0126] CCN5蛋白质是如以上针对包含基因构建体作为活性成分的用于预防或治疗心律失常的药物组合物所述的。

[0127] 当在本文中使用时,术语“表达载体”是指能够在目标宿主细胞中表达目标蛋白质的重组载体,重组载体是含有与基因插入物可操作相连的必要调控元件以使基因插入物被表达的基因构建体。

[0128] 此外,所述表达载体可以含有用于融合多肽的分泌的信号序列从而促进蛋白质自细胞培养物的分离。特定的起始信号可能也是插入的核酸序列的有效翻译所需的。这些信号含有ATG起始密码子和连续序列。在一些情况中,必须提供外源翻译调控信号,所述信号可以含有ATG起始密码子。这些外源翻译调控信号和起始密码子可以具有多种天然和合成来源。可以通过引入合适的转录或翻译增强元件来提高表达效率。

[0129] 此外,所述表达载体还可以载有编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列。此处,在所述表达载体中,可以在5'至3'方向上,以编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列-编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列的次序,包含编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列。

[0130] 所述表达载体还可以含有在编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸和编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸之间的自剪切序列。所述自剪切序列是如以上针对包含基因构建体作为活性成分的用于预防或治疗心律失常的药物组合物所述的。

[0131] 所述表达载体可以载有本发明的编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列和/或编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列。此处,使用的载体不受具体限制,只要其可以产生本发明的CCN5蛋白质和/或SERCA2a蛋白质即可。所述表达载体可以是选自由以下各项组成的组的任一种:质粒载体和粘粒载体。

[0132] 质粒载体可以包括,但不限于,可商购的质粒如pUC18、pBAD和pIDTSAMRT-AMP。

[0133] 心律失常是如以上针对包含基因构建体作为活性成分的用于预防或治疗心律失常的药物组合物所述的。

[0134] 在本发明的又另一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的药物组合物,所述药物组合物包含重组病毒作为活性成分,所述重组病毒含有编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列。

[0135] CCN5蛋白质是如以上针对包含基因构建体作为活性成分的用于预防或治疗心律失常的药物组合物所述的。

[0136] 所述病毒可以是选自由以下各项组成的组的任一种:腺病毒、腺相关病毒(AAV)、反转录病毒、慢病毒、单纯疱疹病毒、牛痘病毒等。具体地,所述病毒可以是,但不限于,腺相关病毒。

[0137] 由于腺病毒的基因组大小中等、易于操作、滴度高、靶细胞范围广泛以及传染性优异,腺病毒被广泛用作基因递送载体。其基因组两侧有100bp至200bp的反向末端重复(ITR),该反向末端重复(ITR)是DNA复制和包装的必要顺势元件。所述基因组的E1区(E1A和E1B)编码参与病毒DNA复制的蛋白质。

[0138] 在腺病毒载体中,缺少E1区的没有复制能力的腺病毒被广泛使用。另一方面,从常规腺病毒载体除去E3区从而提供外源基因的插入位点。

[0139] 因此,本发明的CCN5基因可以被插入到缺失的E1区(E1A区和/或E1B区,优选E1B

区)或E3区中。具体地,CCN5蛋白质基因可以被插入到E3区中。

[0140] 同时,要被递送到细胞中的目标核苷酸序列可以被插入到缺失的E1区(E1A区和/或E1B区,优选E1B区)或E3区,优选E3区中。此外,也可以通过由内部核糖体进入位点(IRES)连接的双顺反子表达系统如启动子-目标核苷酸序列-poly A序列-IRES-CCN5蛋白质基因表达目标核苷酸序列。

[0141] 此外,因为在腺病毒中可以包装高达约105%的野生型基因组,所以在腺病毒中可以额外地包装约2kb。因此,要被插入到腺病毒中的外源序列可以被额外地连接至腺病毒基因组。

[0142] 腺病毒具有42种不同的血清型和亚组A至F。其中,属于C亚组的5型腺病毒适合用于获得本发明的腺病毒载体。关于5型腺病毒的生化 and 遗传信息是已知的。

[0143] 要通过腺病毒递送的外源基因以与附加体相同的方式复制,并且因此,对宿主细胞具有非常低的遗传毒性。

[0144] 因为反转录病毒能够将其基因插入宿主基因组中并且递送大量的外源遗传物质,并且反转录病毒能感染的细胞谱广泛,所以反转录病毒被广泛用作基因递送载体。

[0145] 为了构建反转录病毒载体,将CCN5基因和要被递送的目标核苷酸序列插入到反转录病毒基因组中代替反转录病毒序列以产生没有复制能力的病毒。为了产生病毒粒子,构建含有gag、pol和env基因并且缺少长末端重复(LTR)和 Ψ 序列的包装细胞系。当将含有CCN5基因、要被递送的目标核苷酸序列、LTR和 Ψ 序列的重组质粒引入所述细胞系中时, Ψ 序列使得能够产生重组质粒的RNA转录本。该转录本被包装到病毒中,并且病毒被分泌到培养基中。将含有重组反转录病毒的培养基收集、富集、并用作基因递送系统。

[0146] 因为腺相关病毒(AAV)能够感染非分裂细胞并且具有感染多种类型的细胞的能力,所以腺相关病毒(AAV)适合用作本发明的基因递送系统。美国专利号5,139,941和4,797,368中公开了AAV载体的构建和使用的细节。

[0147] 通常,通过共转化含有两侧有两个AAV末端重复的目标基因序列(CCN5基因和要被递送的目标核苷酸序列)的质粒和含有缺少末端重复的野生型AVV编码序列的表达质粒来制备AAV病毒。

[0148] 来源于牛痘病毒、慢病毒或单纯疱疹病毒的载体也可以被用于向细胞中递送CCN5基因和要被递送的目标核苷酸序列。

[0149] 此外,所述病毒还可以含有与所述核苷酸序列可操作相连的启动子序列。可操作相连的启动子序列是如以上针对包含基因构建体作为活性成分的用于预防或治疗心律失常的药物组合物所述的。

[0150] 此外,所述重组病毒还可以载有编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列。此处,在所述重组病毒中,可以在5'至3'方向上,以编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列-编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列的次序,包含编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列。

[0151] 此外,所述重组病毒可以含有在编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列和编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列之间的自剪切序列。所述自剪切序列是如以上针对包含基因构建体作为活性成分的用于预防或治疗心律失常的药物组合物所述的。

[0152] 心律失常是如上所述的。

[0153] 在本发明中,可以根据本领域中已知的病毒感染方法进行施用药物组合物的方法,所述药物组合物包含含有基因构建体的病毒作为活性成分。此外,在本发明中,当作为活性成分的基因构建体被包含在裸(naked)重组DNA分子或质粒中时,显微注射法、脂质体介导的转染方法、DEAE-葡聚糖处理法、以及基因轰击法(gene bombardment method)可被用于将基因引入细胞中。

[0154] 要被包含在本发明的药物组合物中的药学上可接受的载体是常规用于制剂的药学上可接受的载体,并且其实例包括,但不限于,乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油。

[0155] 除了以上成分外,本发明的药物组合物还可以包含润滑剂、湿润剂、增甜剂、调味剂、乳化剂、助悬剂、防腐剂等。Remington药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences,第19版,1995)中详细描述了合适的药学上可接受的载体和制剂。

[0156] 药物组合物的剂型可以根据使用方法而变化,并且可以被制成注射剂。

[0157] 考虑患者年龄、性别、状况、活性成分在体内的吸收程度、失活率、以及组合使用的药物来合理地确定本发明的药物组合物的剂量;并且所述药物组合物可以以基于CCN5蛋白质的0.0001mg/kg(体重)至100mg/kg(体重)的量施用。

[0158] 考虑患者年龄、性别、状况、活性成分在体内的吸收程度、失活率、以及组合使用的药物来合理地确定本发明的药物组合物的剂量;并且当所述药物组合物是病毒时,在成人基础上,所述药物组合物可以以 1.0×10^3 至 1.0×10^{20} 病毒基因组/天的量施用。具体地,在成人基础上,本发明的药物组合物可以以 1.0×10^3 至 1.0×10^{20} , 1.0×10^8 至 1.0×10^{16} , 1.0×10^{12} 至 1.0×10^{15} ,或 1.0×10^{13} 至 1.0×10^{14} 病毒基因组/天的量施用。

[0159] 此外,当所述药物组合物是质粒载体时,在成人基础上,所述药物组合物可以以0.1 μ g/1 μ l至1mg/1 μ l/天的浓度施用。此外,当所述药物组合物是质粒载体时,所述剂量可以包括0.1ml、1ml、2ml、3ml、4ml、5ml、6ml、7ml、8ml、9ml、10ml或更高,并且包括其间的所有值和范围。

[0160] 在本发明的仍又另一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的药物组合物,所述药物组合物包含CCN5蛋白质作为活性成分。所述药物组合物还可以包含SERCA2a蛋白质。CCN5蛋白质和SERCA2a蛋白质是如上所述的。

[0161] 本发明的药物组合物经肠道外施用,并且肠道外施用包括静脉内注射、皮下注射、肌肉内注射、腹膜内注射、经皮施用、直接注射到组织中的方法等。

[0162] 当在本文中使用时,术语“可接受的载体”是指以下物质中的一些或全部并且包括适用于特殊剂量的那些:溶剂、稀释剂、液体载体、分散剂、悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂、乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等。Alfanzo R.Gennaro的Remington药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences,第19版,1995,Macna Publishing Co.Easton, PA)呈现了在已知技术和组合物的情况下用于药物组合物的多种载体。药物组合物的药学上可接受的载体的实例包括,但不限于以下:葡萄糖,蔗糖,淀粉如玉米淀粉和马铃薯淀粉,纤维素及其衍生物如羧甲基纤维素钠,乙基纤维素和纤维素乙酸酯;粉末形式的黄芪胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂如可可脂,栓剂蜡,花生酱,棉籽油,红花油,芝麻油,橄榄油和大豆油;二醇如丙二醇;酯如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂如氢氧化镁和氢氧化铝;藻

酸;无热原蒸馏水;等渗盐水;林格氏溶液(Ringer's solution);乙醇和磷酸盐缓冲水,十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,着色剂,着色剂,释放剂,涂布剂,增甜剂,调味剂和芳香剂,抗氧化剂等可以根据化合物制造者的判断而包含。

[0163] 在本发明的仍又另一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的方法,所述方法包括向对象施用本发明的药物组合物的步骤。

[0164] 所述药物组合物可以是用于预防或治疗心律失常的药物组合物,所述药物组合物包含基因构建体作为活性成分,所述基因构建体含有编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列。此外,所述药物组合物可以是用于预防或治疗心律失常的药物组合物,所述药物组合物包含表达载体作为活性成分,所述表达载体载有编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列。此外,所述药物组合物可以是用于预防或治疗心律失常的药物组合物,所述药物组合物包含重组病毒作为活性成分,所述重组病毒含有编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列。

[0165] 此处,对象可以是哺乳动物,优选为人。具体地,对象可以是患有心律失常或可能处于心律失常的风险中的人或另一种哺乳动物。

[0166] 在本发明的仍又另一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的方法,所述方法包括向对象施用CCN5蛋白质。此外,所述方法还可以包括向对象施用SERCA2a蛋白质。

[0167] 此处,对象可以是哺乳动物,优选为人。具体地,对象可以是患有心律失常或可能处于心律失常的风险中的人或另一种哺乳动物。

[0168] 在本发明的仍又另一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的方法,所述方法包括向对象施用含有编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列的基因构建体和含有编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列的基因构建体。

[0169] 此处,对象可以是哺乳动物,优选为人。具体地,对象可以是患有心律失常或可能处于心律失常的风险中的人或另一种哺乳动物。

[0170] 在本发明的仍又另一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的方法,所述方法包括向对象施用载有编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列的表达载体和载有编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列的表达载体。

[0171] 此处,对象可以是哺乳动物,优选为人。具体地,对象可以是患有心律失常或可能处于心律失常的风险中的人或另一种哺乳动物。

[0172] 在本发明的仍又另一个方面,提供用于预防或治疗心律失常的方法,所述方法包括向对象施用含有编码SERCA2a蛋白质或其片段的核苷酸序列的重组病毒和含有编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列的重组病毒。

[0173] 此处,对象可以是哺乳动物,优选为人。具体地,对象可以是患有心律失常或可能处于心律失常的风险中的人或另一种哺乳动物。

[0174] 在本发明的仍又另一个方面,提供本发明的药物组合物用于预防或治疗心律失常的用途。

[0175] 在本发明的仍又另一个方面,提供本发明的药物组合物用于制备用于预防或治疗心律失常的药物的用途。

[0176] 所述药物组合物可以是用于预防或治疗心律失常的药物组合物,所述药物组合物包含基因构建体作为活性成分,所述基因构建体含有编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列。此外,所述药物组合物可以是用于预防或治疗心律失常的药物组合物,所述药物组合物

包含表达载体作为活性成分,所述表达载体载有编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列。此外,所述药物组合物可以是用于预防或治疗心律失常的药物组合物,所述药物组合物包含重组病毒作为活性成分,所述重组病毒含有编码CCN5蛋白质或其片段的核苷酸序列。

[0177] 本发明的方式

[0178] 下文中,将通过实施例来详细描述本发明。然而,以下实验例和实施例仅用于说明本发明,并且本发明不限于以下制备例和实施例。

[0179] 制备例1. 构建AAV9-CCN5和AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5

[0180] pTR-CMV-CCN5基因构建体被构建成表达CCN5蛋白质。此外,pTR-CMV-SERCA2a-P2A-CCN5基因构建体被构建成同时表达CCN5蛋白质和SERCA2a蛋白质(图1和2)。

[0181] 在所述基因构建体中,SERCA2a部分由人SERCA2a蛋白质的cDNA序列组成。接着连接的P2A部分是来源于猪捷申病毒-1的自剪切位点并且由编码22个氨基酸的核苷酸序列组成。最后,CCN5部分由人CCN5蛋白质的cDNA序列组成。

[0182] 通过自pTR-CMV-荧光素酶载体除去荧光素酶部分并且在其原位插入SERCA2a-P2A-CCN5基因构建体来构建pTR-CMV-SERCA2a-P2A-CCN5重组质粒。由所述重组质粒产生的蛋白质通过在处于P2A位点的第21个氨基酸甘氨酸和第22个氨基酸脯氨酸之间的自剪切分成SERCA2a部分和CCN5部分。SERCA2a部分可以保留在内质网膜中并且执行其固有功能。此外,CCN5部分可以迁移到内质网中然后以切除信号肽的形式被分泌到细胞外,由此执行其固有功能。

[0183] 将人CCN5基因克隆到pds-AAV2-EGFP载体中以构建腺相关病毒(AAV,血清型9)。为了提高病毒包装和病毒递送效率,在AAV载体构建期间去除eGFP序列。使用293T细胞构建重组AAV。收集细胞培养物中的AAV颗粒并用硫酸铵沉淀。使用碘克沙醇梯度通过超速离心来纯化所得物。以利用离心将碘克沙醇替换为乳酸盐林格氏溶液的方式通过若干稀释和富集工序富集AAV颗粒。使用定量RT-PCR和SDS-PAGE量化AAV浓度。

[0184] 实验方法1. 实验模型的制备和基因引入

[0185] 实验方法1.1. 通过将血管紧张素II输注到CCN5过表达小鼠模型中来制备心房颤动小鼠模型

[0186] 针对实验,使用雄性C57BL/6 WT(野生型,毛色为黑色)小鼠和转基因(TG)小鼠,其中CCN5心脏特异性过表达。

[0187] 通过在含有引起基因的心脏特异性表达的 α -MHC启动子的pNC载体(Clontech, USA)中进行小鼠CCN5基因亚克隆,并且使用显微注射技术将所得物引入C57BL/6受精卵中来产生CCN5-TG小鼠。此外,为了获得并维持显著的小鼠品系,将测序委托给一家名为Macrogen Inc. (韩国)的公司。使用DNA印迹法来鉴定小鼠基因组上CCN5转基因的存在。

[0188] 使用的所有小鼠是20g至25g重的8至10周龄小鼠。通过腹膜内注射克他命(ketamine) (95mg/kg) 和甲苯噻嗪(xylazine) (5mg/kg) 将小鼠麻醉,并且通过皮下输注血管紧张素II诱发心房颤动。此处,使用小型渗透泵(Alzet 1002, Alzet) 以3.0mg/kg/天的浓度皮下输注血管紧张素II达14天。

[0189] 实验方法1.2. 通过输注血管紧张素II和病毒注射来产生心房颤动小鼠模型

[0190] 通过腹膜内注射克他命(95mg/kg) 和甲苯噻嗪(5mg/kg) 将8至10周龄的B6C3F1(毛色为灰色)小鼠麻醉,并且通过皮下输注血管紧张素II诱发心房颤动。此处,使用小型渗透

泵以3mg/kg/天的浓度皮下输注血管紧张素II达2周。利用血管紧张素II输注诱发心房颤动后2周,经由尾静脉给每只小鼠注射 1×10^{11} 病毒基因组(vgs)的AAV9-对照或AAV9-CCN5。

[0191] 实验方法1.3.通过输注血管紧张素II和病毒基因引入来产生心室性心律失常小鼠模型

[0192] 通过腹膜内注射克他命(95mg/kg)和甲苯噻嗪(5mg/kg)将8至10周龄的B6C3F1小鼠麻醉,并且通过皮下输注血管紧张素II诱发心室性心律失常。使用小型渗透泵以3mg/kg/天的浓度皮下输注血管紧张素II达2周。利用血管紧张素II输注诱发心室性心律失常后2周,经由尾静脉给每只小鼠注射 1×10^{11} vgs的AAV9-对照,AAV9-CCN5,或AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5。

[0193] 实验方法2.组织染色

[0194] 从动物模型取出心脏组织然后在室温用10% (w/v) 福尔马林固定5天。然后,用PBS进行洗涤。将各样品包埋在石蜡中并将组织块切成7 μ m厚的切片。

[0195] 进行Masson三色染色以测量纤维化程度。纤维化进展位点处的组织被染成蓝色而正常组织被染成红色。通过计算整个组织中发生纤维化的部分来表示纤维化程度。在光学显微镜下对此进行观察并且使用Aperio Imagescope(Leica Biosystems)程序进行分析。

[0196] 实验方法3.通过实时PCR确定mRNA表达水平

[0197] 从动物模型取出心脏组织然后从其中提取mRNA以进行qRT-PCR。使用QuantiTect SYBR Green实时PCR试剂盒(Qiagen Ltd)进行实时PCR。通过此,分析其转录水平。使用Trizol(Gibco BRL)从心脏组织分离RNA,并且由所述RNA合成cDNA。定量实时PCR条件如下:94℃持续10秒,57摄氏度持续15秒,72℃持续5秒,37个循环。关于实验中所用引物的信息显示在表1中。

[0198] [表1]

引物	序列信息	SEQ ID NO
小鼠 α -SMA-F	5'-CCCACCCAGAGTGGAGAA-3'	SEQ ID NO: 13
小鼠 α -SMA-R	5'-ACATAGCTGGAGCAGCGTCT-3'	SEQ ID NO: 14
小鼠胶原 I-F	5'-CATGTTCAGCTTTGTGGACCT-3'	SEQ ID NO: 15
小鼠胶原 I-R	5'-GACGCTGACTTCAGGGATGT-3'	SEQ ID NO: 16
小鼠 TGF- β 1-F	5'-TGGAGCAACATGTGGAAGTC-3'	SEQ ID NO: 17
小鼠 TGF- β 1-R	5'-CAGCAGCCGGTTACCAAG-3'	SEQ ID NO: 18

[0200]

小鼠 IL-1 β -F	5'-TCCAGGATGAGGACATGATGAGCA-3'	SEQ ID NO: 19
小鼠 IL-1 β -R	5'-GAACGTACACACACCAGCAGGTTA-3'	SEQ ID NO: 20
小鼠 RANTES-F	5'-TGCAGAGGACTCTGAGACAGC-3'	SEQ ID NO: 21
小鼠 RANTES-R	5'-GAGTGGTGTCCGAGCCATA-3'	SEQ ID NO: 22
小鼠 F4/80-F	5'-CCTGGACGAATCCTGTGAAG-3'	SEQ ID NO: 23
小鼠 F4/80-R	5'-GGTGGGACCACAGAGAGTTG-3'	SEQ ID NO: 24
小鼠 MCP-1-F	5'-CATCCACGTGTTGGCTCA-3'	SEQ ID NO: 25
小鼠 MCP-1-R	5'-GATCATCTTGCTGGTGAATGAGT-3'	SEQ ID NO: 26
小鼠 CCN5-F	5'-ATACAGGTGCCAGGAAGGTG-3'	SEQ ID NO: 27
小鼠 CCN5-R	5'-GTTGGATACTCGGGTGGCTA-3'	SEQ ID NO: 28
小鼠 GAPDH-F	5'-CTCATGACCACAGTCCATGC-3'	SEQ ID NO: 29
小鼠 GAPDH-R	5'-TTCAGCTCTGGGATGACCTT-3'	SEQ ID NO: 30
小鼠 18s rRNA-F	5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3'	SEQ ID NO: 31
小鼠 18s rRNA-R	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'	SEQ ID NO: 32
大鼠 α -SMA-F	5'-TCTGTCTCTAGCACACAACCTGTGAATG-3'	SEQ ID NO: 33
大鼠 α -SMA-R	5'-TTGACAGGCCAGGGCTAGAAGGG -3'	SEQ ID NO: 34
大鼠胶原 I-F	5'-AATGCACTTTTGGTTTTTGGTCACGT-3'	SEQ ID NO: 35
大鼠胶原 I-R	5'-CAGCCCACCTTGCCCCAACCC-3'	SEQ ID NO: 36
大鼠 TGF- β 1-F	5'-TGTTGCGCTCTCGGCAGTG -3'	SEQ ID NO: 37
大鼠 TGF- β 1-R	5'-CGGATGGCCTCGATGCGCTT-3'	SEQ ID NO: 38
大鼠 GAPDH-F	5'-ACCCAGCCCAGCAAGGATACTG-3'	SEQ ID NO: 39
大鼠 GAPDH-R	5'-ATTGAGAGAAGGGAGGGCTCCC-3'	SEQ ID NO: 40

[0201] 实验方法4.电生理实验方法

[0202] 实验方法4.1.对使用CCN5 TG小鼠的心房颤动模型的心电图测量

[0203] 为了心房电生理学研究,通过将取出的小鼠心脏与Langendorff系统连接进行离体实验。用Krebs-Henseleit缓冲液(118mM NaCl,4.7mM KCl,1.2mM MgSO₄,1.25mM CaCl₂,1.2mM KH₂PO₄,25mM NaHCO₃,11mM葡萄糖)灌注取出的心脏,并且保持95%O₂/5%CO₂气体,37℃的温度,和60mmHg的压力。在施加电刺激前,通过与Langendorff系统相连接将取出的心脏稳定10分钟。然后,将特氟龙(Teflon)涂覆的银双极电极置于右心房、左心房和左心室中。为了诱发心房颤动,使用自动刺激器进行2秒爆发起搏(burst pacing)达3次。在第一次的2秒的爆发起搏中,以40ms的周期长度和5ms脉冲持续时间施加刺激。在施加刺激后,进行稳定化达3分钟。以20ms的周期长度和5ms脉冲持续时间施加第二次的2秒爆发,并且再次进行稳定化达3分钟。以20ms的周期长度和10ms脉冲持续时间施加最后一次的2秒爆发。显示不规律R-R间隔达至少1秒并且显示不规律的、快速的节奏的心房被确定为具有心房颤动。

[0204] 实验方法4.2.对注射有AAV9-CCN5的心房颤动小鼠的心电图测量

[0205] 如在实验方法4.1中进行的,通过将取出的小鼠心脏连接至Langendorff系统进行离体实验。具体地,首先将肝素施用于小鼠以防止血凝固,并且使用100%异氟烷(Forane, USP, Baxter Healthcare Corporation)将小鼠麻醉。之后,提取小鼠心脏并连接至Langendorff系统。将心脏经由主动脉安装至套管,以1.5min⁻¹至2.0min⁻¹的流速用Tyrode溶液(NaCl 130mM,NaHCO₃ 24mM,KCl 4mM,MgCl₂ 1mM,CaCl₂ 1.8mM,KH₂PO₄ 1.2mM,C₆H₁₂O₆ 5.6mM,1%清蛋白)灌注,并且保持95%O₂/5%CO₂气体,38±1℃的温度,pH 7.3至pH 7.5,以及60mmHg至70mmHg的压力(压力监测器BP-1,World Precision Instruments)。使用电-机械去耦器(5mM Blebbistatin,Sigma Aldrich,USA)使心脏的机械收缩最小化。

[0206] 将订制的Ag-AgCl起搏电极置于右心房中,并且将另一个电极固定至心外膜表面和心隔两者。(Mightex BioLED Light,Source Control Module,BLS Series)心脏的前表

面用于对半直立方式的左心房中的电活性进行连续绘图。

[0207] 进行体积心电图描记法以确定心律失常。使用电子放大器以150Hz进行放大和低通滤波以连续记录心脏的体积心电图。此外,以1kHz的速率进行数字采样(BioPac Systems MP150)。为了利用电信号和光信号确定持续性心律失常的发生,在右心房中以7Hz的基础频率(PCL=140ms)开始起搏,逐渐提高频率同时在2Hz至3Hz的频率下施加2ms刺激持续时间。

[0208] 实验方法4.3.用于在心房颤动和心室性心律失常小鼠模型中进行光学绘图(mapping)的实验方法

[0209] 当对心脏开始背面灌注后20至30分钟心搏达到4Hz至5Hz的稳态时,通过在主动脉附近注射0.3ml的15 μ M电压敏感型染料(Di-4-ANEPPS, Invitrogen, Thermofisher Scientific)将心脏染色。使用单色光(Mightex, BioLED)以530nm的波长激发荧光团。将发射的波长通过长通带滤波器(>590nm)滤波并且以87.5 μ m的空间分辨率,1kHz的帧频,以及80x80像素CCD芯片(SciMeasure, SciMeasure Analytical Systems, USA)以3 \times 的总放大率进行投影。

[0210] 通过在MATLAB(The Mathworks, Inc.)中编写的通过选择帧针对小鼠心脏优化的订制软件处理收集的原始数据。为了提高信噪比并减小伴随心搏的变化性,计算起搏节律中8至10次连续搏动的平均值。在各像素处使用5 \times 5均匀内核对图像进行空间平均,并且从其中减去基线。然后,将结果归一化至最大幅度并倒置。膜电位阈值超过0.5达至少连续10帧的点被确定为激活时间。

[0211] 实验方法5.蛋白质印迹法

[0212] 使用补充有广谱蛋白酶抑制剂混合物(Calbiochem)的均质化的RIPA缓冲液(0.1% (w/v) SDS, 50mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 1% (w/v) NP-40, 0.5% (w/v) 脱氧胆酸钠)预备本实验中使用的细胞和获得的心脏。使用SDS-PAGE凝胶通过大小来分离蛋白质并转移至PVDF膜(Millipore)。在用5% (w/v) 脱脂奶封闭1小时并用TBST洗涤后,使准备好的膜与p-CaMKII、CaMKII、Na⁺/Ca⁺交换蛋白2(NCX2)、RyR2(Santa Cruz)、pRyR2(Ser2808)、pRyR2(Ser2814)(Badrilla)、GAPDH(实验室制备)、 α -微管蛋白、TGF- β 1、 α -SMA(Sigma)、胶原I(Rockland)、NaV 1.5、连接蛋白43、Kir2.1(Alomone labs)、成纤维细胞激活蛋白质(FAP)、线粒体肽甲硫氨酸亚砷还原酶(MsrA)、微管蛋白(Abcam)、SERCA2a(21st Century Biochemicals)、Smad7(Invitrogen)以及CCN5(Genescript)抗体反应。然后将所述膜与辣根过氧化物酶缀合的二抗(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)反应并使用化学发光底物(Dogen)显影。扫描印迹并使用LAS软件量化。

[0213] 实验方法6.心房成纤维细胞的分离和培养

[0214] 将Sprague Dawley(SD)白色大鼠的心脏用于从白色大鼠的心房分离成纤维细胞。通过使用胶原酶溶液消化组织将左心房分解成单个细胞。首先将从心房收集的细胞以50 \times g离心3分钟。收集由此获得的上清并以500 \times g再次离心10分钟。使用含有10%胎牛血清(FBS)和1%抗生素的DMEM培养基培养由此获得的细胞层。2至3天后,用100nM血管紧张素II并且同时用对照条件培养基(CM-Con)或含CCN5的条件培养基(CM-CCN5)对培养物进行处理。48小时后,终止实验。为了清楚的实验结果,仅将获得自第一通路的左心房成纤维细胞用作左心房成纤维细胞。

[0215] 实验方法7.制备CM-CCN5

[0216] 为了制备CM-CCN5,使用pcDNA3.1-CCN5HA质粒。以 5×10^5 个细胞将HEK293细胞分配在60-mm培养皿中并稳定化一天。然后,使用lipofectamine (Invitrogen) 进行pcDNA3.1-CCN5HA的转染。4小时后,进行培养基交换以除去lipofectamine。然后,进行培养达24小时,并且将获得的培养基命名为CM-CCN5。

[0217] 实验方法8. 荧光免疫化学

[0218] 将15,000个细胞分配在16-mm盖玻片上并且孵育过夜以进行稳定化。然后,用100nM血管紧张素II并且用CM-Con或CM-CCN5对细胞进行处理,并且进行孵育。将所得的细胞用4% (w/v) 多聚甲醛溶液固定,使用0.5% Triton X-100溶液使得细胞膜具有渗透性,然后用5% (w/v) BSA溶液封闭。然后,利用抗- α -SMA (Sigma) 抗体使得反应进行,并且将Alexa Fluor 488-缀合的抗体 (Invitrogen) 用作二抗。使用Hoechst染料将细胞核染色。对于已经进行免疫化学的细胞,使用Fluoview FV 1000共聚焦显微镜。

[0219] 实验方法9. 通过超声波心动描记术测量心肌功能

[0220] 通过腹膜内注射克他命 (95mg/kg) 和甲苯噻嗪 (5mg/kg) 将小鼠麻醉,并且进行超声波心动描记术。通过2维成像和M-模式跟踪功能进行记录,并且测定缩短分数和心室尺寸比 (GE Vivid Vision)。

[0221] 实验例1. 确定CCN5蛋白质在心房颤动小鼠模型中的治疗效果

[0222] 实验例1.1. 确定CCN5蛋白质的心房纤维化抑制效果

[0223] 使用小型渗透泵 (Alzet 1002, Alzet) 以3.0mg/kg/天的浓度将血管紧张素II皮下输注到WT小鼠和通过实验方法1.1中所述的方法制备的CCN5 TG小鼠中,持续14天。2周后,提取小鼠心脏。通过实验方法2中所述的方法进行组织染色,以确定纤维化程度 (图3a)。

[0224] 结果,在用血管紧张素II注射的对照小鼠组中,观察到胶原在约8%的心房组织中积累;另一方面,在用血管紧张素II注射的CCN5 TG小鼠组中,在约4%的心房组织中观察到胶原积累,显示显著的下降 (图3b和3c)。

[0225] 此外,为了确定mRNA表达中发生的变化,从小鼠左心房提取mRNA并且通过实验方法3中所述的方法进行qRT-PCR。

[0226] 结果,对于心脏纤维化标志基因 α -SMA、胶原I和TGF- β 1、以及炎症响应标志基因IL-1 β 、RANTES (调节激活正常T-细胞表达分泌)、F4/80、单核细胞化学引诱物蛋白质1 (MCP-1),其mRNA表达在用血管紧张素II注射的对照小鼠组中增加;另一方面,这些标志基因的表达在用血管紧张素II注射的CCN5 TG小鼠组中显著减少 (图3d至3j)。从这些结果,确定CCN5有效抑制血管紧张素II引起的心房纤维化。

[0227] 实验例1.2. 确定CCN5的心房颤动抑制效果

[0228] 为了心房电生理学研究,通过以与实验4.1中相同的方式将取出的小鼠心脏连接至Langendorff系统进行离体实验。结果,在用血管紧张素II注射的WT小鼠中,6只动物中有4只诱发心房颤动。然而,在用血管紧张素II注射的CCN5 TG小鼠中,所有4只动物即使在电刺激后仍显示正常的心电图结果 (图4b和4c)。由这些结果,确定CCN5抑制由血管紧张素II引起的心房颤动。

[0229] 实验例1.3. 确定CCN5对细胞内Ca²⁺浓度的调控

[0230] 使用小鼠心房心肌细胞系HL-1细胞 (Sigma) 研究CCN5调控心肌细胞中的Ca²⁺的推测。此外,使用蛋白质印迹法确定其对培养的HL-1细胞中的Ca²⁺浓度的调控作用。

[0231] 在细胞水平实验中,为了确定CCN5的作用,使用通过实施例8中描述的方法制备的CM-CCN5。用血管紧张素II并且同时用CM-Con(对照)或CM-CCN5(实验组)对HL-1细胞进行处理。48小时后,利用蛋白质印迹法监测蛋白质水平的变化(图5a)。

[0232] 结果,发现当用400nM血管紧张素II对HL-1细胞进行处理时,CaMKII磷酸化(Thr287)增加,而在用CM-CCN5进行同时处理的细胞中CaMKII磷酸化减少。在用血管紧张素II进行处理的HL-1细胞中,引起肌质网利阿诺定(ryanodine)受体2(RyR2)在Ser2808和Ser2814处的过磷酸化;然而,此种过磷酸化被CCN5抑制。由血管紧张素II引起的 Na^+/Ca^+ 交换蛋白2(NCX2)的增加的表达也被CCN5降低。肌钙集蛋白2(肌质网中的钙结合蛋白质)的表达水平被血管紧张素II降低,而其表达在用CM-CCN5进行同时处理的细胞中增加(图5b至5g)。由这些结果,确定CCN5直接调控心肌细胞并且因此涉及到心房颤动中。

[0233] 实验例1.4. 确定CCN5对心房纤维化体外抑制效果

[0234] 将Sprague Dawley(SD)白色大鼠的心脏用于从心房分离成纤维细胞。通过实验方法6中描述的方法分离心房成纤维细胞。2至3天后,用100nM血管紧张素II同时用实施例8中制备的对照条件培养基(CM-Con)或含CCN5的条件培养基(CM-CCN5)对分离的心房成纤维细胞进行处理。48小时后,终止实验(图6a)。用血管紧张素II并用CM-Con或CM-CCN5进行处理的成纤维细胞以与实验方法8中相同的方式进行荧光免疫细胞化学。

[0235] 结果,用100nM血管紧张素II进行处理的成纤维细胞分化为肌成纤维细胞并且表达肌成纤维细胞特异性标志蛋白质 α -SMA,而用CM-CCN5进行同时处理的成纤维细胞根本不表达 α -SMA(图6b)。

[0236] 此外,根据实验方法5中描述的方法对培养的心房成纤维细胞进行蛋白质印迹法,以确定心房纤维化抑制效果。结果,用血管紧张素II进行处理的成纤维细胞显示蛋白质 α -SMA、胶原I和TGF- β 1的表达增加,而用CM-CCN5进行同时处理的成纤维细胞显示这些蛋白质的表达显著减少(图6c至6f)。

[0237] 此外,为了确定培养的心房成纤维细胞的mRNA表达水平,经由qRT-PCR监测心房纤维化抑制效果。结果,确定在用血管紧张素II并且同时用CM-CCN5进行处理的成纤维细胞中, α -SMA、胶原I和TGF- β 1的mRNA表达水平降低至对照水平(图6g至6i)。由这些结果,确定CCN5不仅调控纤维化并且因此抑制心房颤动,而且还直接调控心肌细胞并且因此涉及到心房颤动中。

[0238] 实验例1.5. 确定AAV-CCN5在心房颤动小鼠模型中的心房纤维化抑制效果

[0239] 以与实验方法1.2相同的方式,以3mg/kg/天的浓度将血管紧张素II输注到8至10周龄小鼠中。在2周的时间点,以 5×10^{11} 病毒基因组(vgs)的量将AAV9-对照(对照)或AAV9-CCN5(比较组)注射到尾静脉中。4周后,对心房组织进行Masson三色染色和分子分析(图7a)。

[0240] 首先,为了确定AAV9病毒是否以心脏特异性的方式良好表达,使用蛋白质印迹法以确定CCN5在心房组织中的表达。结果,确定CCN5蛋白质在用AAV9-CCN5注射的小鼠组中过表达。此外,由通过确定CCN5在心房组织中的mRNA表达水平获得的结果,发现通过注射AAV9-CCN5类似地增加了CCN5的mRNA(图7b和7c)。

[0241] 由通过三色染色确定心房胶原积累的程度获得的结果,确定在用血管紧张素II注射并继之以AAV9-对照注射的小鼠中,胶原在约6%的心房组织中积累,而在用AAV9-CCN5注

射的小鼠组中,胶原积累的程度下降至约3% (图7d和7e)。

[0242] 此外,以与实验方法3中相同的方式使用心房组织进行qRT-PCR,以确定纤维化相关的标志基因 α -SMA、胶原I和TGF- β 1,以及炎症相关的标志基因IL-1 β 、RANTES、F4/80和MCP-1的mRNA表达水平。结果,发现AAV9-CCN5显著减少了表达水平被血管紧张素II提高的这些标志基因 (图7f至7l)。由这些结果,确定即使在使用AAV9-CCN5以心脏特异性方式过表达CCN5的小鼠模型中,血管紧张素II诱发的心房纤维化仍被有效抑制。

[0243] 实验例1.6. 确定AAV9-CCN5展示的心房颤动抑制效果

[0244] 以与在实验方法4.2中相同的方式制备小鼠模型,并且在第6周结束时进行心脏生理学实验 (图8a)。首先,检查心电图,并且作为结果,确定在用AAV9-对照注射的小鼠组中,心房功能被血管紧张素II弱化并且因此在电刺激后心房颤动被持续性诱发。另一方面,观察到在用AAV9-CCN5注射的小鼠组中,在电刺激后心搏回到正常节奏。即使在测量Ca²⁺的动作电位 (光信号) 的实验中,用AAV9-对照注射的组在刺激后持续性地显示传导不规则,而用AAV9-CCN5注射的组在刺激后显示正常的心房激活 (图8b和8c)。

[0245] 作为心电图分析的结果,在用AAV9-对照注射的小鼠组中,在电刺激后在5只小鼠中有4只诱发心房颤动,而在用AAV9-CCN5注射的小鼠组中,5只小鼠中有2只显示心房异常而剩余的显示正常的心房激活 (图8d)。

[0246] 在进行心电图实验的同时,当施加电刺激以诱发心房颤动时,对照 (Sham) 小鼠组需要约28Hz的刺激以诱发心房颤动;然而,在用血管紧张素II和AAV9-对照注射的对照小鼠组中,即使以低至约20Hz的刺激也足以诱发心房颤动。另一方面,发现在用血管紧张素II和AAV9-CCN5注射的小鼠组中,仅当刺激提高到约25Hz (与Sham组类似的水平) 时才诱发心房颤动 (图8e)。

[0247] 如实验方法4.2中提及的,将左心房中的电话性绘图以用图表方式表示Ca²⁺的动作电位。在该图表上的动作电位时程50 (APD₅₀) 和动作电位时程75 (APD₇₅) 的各时间点对该图表进行分析。结果,确定与用AAV9-对照注射的组相比,在用AAV9-CCN5注射的组中,动作电位时程以与Sham组相似的速率出现 (图8f)。

[0248] 针对各组,分析图8e中图表的斜率。这指示动作电位去极化所需的速度,并且发现在用AAV9-CCN5注射的小鼠组中,被血管紧张素II减慢的去极化所需的速度被恢复至与Sham相似的水平 (图8g)。由这些结果,确定即使在通过注射AAV9-CCN5而过表达CCN5的小鼠组中,由血管紧张素II诱发的心房颤动仍被可靠地抑制。

[0249] 实验例2. 确定AAV-CCN5和AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5在心室性心律失常小鼠模型中的治疗效果

[0250] 实验例2.1. 制备心室性心律失常小鼠模型

[0251] 通过实验方法1.3中描述的方法制备心室性心律失常小鼠模型。使用的雄性B6C3F1 WT (野生型,毛色为灰色) 小鼠是重20g至25g的8至10周龄小鼠。以3mg/kg的浓度皮下注射血管紧张素II达2周。2周后,通过超声波心动描记术鉴定心脏功能的变化。随机选择经鉴定的小鼠并用单独的CCN5载体 (AAV9-CCN5) 或CCN5和SERCA2a载体组合 (AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5) 以5x 10¹¹病毒基因组 (vgs) 的量注射。然后,将这些小鼠再保持4周以用于最后的功能评估。

[0252] 首先,为了确定已经通过血管紧张素II良好制备了心室性心律失常小鼠模型,通

过超声波心动描记术检查对照小鼠组 (Sham) 和比较小鼠组 (AngII) 中的心脏功能。结果,与对照 (Sham) 相比,皮下注射了血管紧张素II的小鼠组显示缩短分数减小。然而,这两组在小鼠重量方面没有显示大的差异 (图9a)。

[0253] 为了确定心室性心动过速,以与实验方法4.3中类似的方式,通过向右心室 (RV) 施加10Hz的电刺激 (图9b) 或20Hz的电刺激 (图9c) 进行光学绘图 (optical mapping)。电刺激越大,实验组和对照之间观察到的差异就越显著。在用血管紧张素II注射的小鼠组中,当施加20Hz的电刺激时,钙离子通道等局部没有恢复至其原始状态,并且因此观察到刺激传递的不连续性。钙的动作电位以图表方式表示并且显示在图9d中。在该图表上的动作电位时程50 (APD_{50}) 和动作电位时程75 (APD_{75}) 的各时间点对图表进行分析。结果,发现通过注射血管紧张素II实现了更快的动作电位时程 (图9e)。此外,在血管紧张素II组中观察到动作电位时程分散率的显著下降 (图9f)。作为分析传导速度和动作电位去极化所需速度的结果,发现此种速度被血管紧张素II极大地减小 (图9g)。由这些结果,确定通过血管紧张素II可靠地制备了心室性心律失常小鼠模型。

[0254] 实验例2.2. 在心室性心律失常小鼠模型中对 β -肾上腺素能受体拮抗剂的作用

[0255] 异丙肾上腺素 (ISO) 是临床上作用于 β -肾上腺素能受体并因此增加心肌收缩性 (由此增加心脏输出) 的药物。在血管紧张素II诱发的心室性心律失常小鼠模型中,当使用异丙肾上腺素刺激 β 受体时确定心室中 Ca^{2+} 的动作电位 (图10a)。将20Hz的电刺激施加于右心室,并且所得的 Ca^{2+} 的复极化模式显示在图表中。

[0256] 结果,确定在用血管紧张素II注射的小鼠模型中,即使在ISO处理的情况下,钙的复极化模式仍然更慢 (图10b)。作为分析动作电位时程75 (APD_{75}) 的结果,发现在用血管紧张素II注射的小鼠模型中,ISO处理对动作电位时程速率方面并不产生区别 (图10c)。

[0257] 为了确定心室性心动过速,以与实验方法4.3中类似的方式,通过向右心室 (RV) 施加20Hz的电刺激进行光学绘图。结果,与用ISO处理的对照小鼠组相比,用ISO处理的血管紧张素II小鼠组显示在刺激下传导阻断的不连续性 (图10d)。作为分析动作电位时程75 (APD_{75}) 的结果,与Sham组相比,血管紧张素II处理的小鼠组显示显著增加的动作电位时程,但是在ISO处理的情况下不显示显著的变化 (图10e)。作为分析传导速度的结果,确定与Sham相比,用血管紧张素II注射的小鼠组显示慢得多的速度,并且ISO处理未导致传导速度的恢复 (图10f)。由这些结果,发现注射血管紧张素II使得 β -肾上腺素能受体对刺激不敏感。

[0258] 实验例2.3. 确定AAV9-CCN5和AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5在心室性心律失常小鼠模型中的治疗效果

[0259] 通过如实验例2.3中所述的实验方法可靠地制备心室性心律失常模型。将血管紧张素II注射到小鼠中达2周,并且在第2周末,将AAV9-CCN5或AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5载体注射到小鼠尾静脉中。在总计6周后,终止实验并且进行心室性心律失常相关实验。

[0260] 进行超声波心动描记术以鉴定在血管紧张素II诱发的心室性心律失常小鼠模型中受AAV9-CCN5和AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5影响的心脏功能。注射AAV9-CCN5或AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5导致被血管紧张素II减小的缩短分数展现如同Sham水平的缩短分数。此外,作为分析左心室壁厚 (LVSD) 的结果,确定AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5将被血管紧张素II减小的左心室壁厚恢复至近乎正常水平 (图11a和11b)。

[0261] 使用光学绘图显示 Ca^{2+} 的动作电位。发现当以20Hz的刺激将电刺激施加于心室时,传导有规律地在用AAV9-CCN5或AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5注射的小鼠组中传播,而不管是否有ISO处理(图11c和11d)。钙的动作电位以图表方式表示并且显示在图11e中。

[0262] 对于Sham、AngII、AngII+AAV9-CCN5、AngII+AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5各组,进行利用ISO的处理并且通过绘制复极化图谱(repolarization map)进行分析。结果,确定注射AAV9-CCN5或AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5导致被血管紧张素II的注射减慢的复极化展现与Sham相似模式的复极化(图11f)。

[0263] 作为分析 Ca^{2+} 的动作电位时程75(APD_{75})的结果,发现被血管紧张素II增加的动作电位时程通过注射AAV9-CCN5而减小(图11g),并且通过AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5可靠地减小至Sham水平。此外,确定被血管紧张素II减慢的传导速度和去极化速度通过注射AAV9-CCN5或AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5而正常化(图11h和11i)。由这些结果,确定AAV9-CCN5和AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5有效修复由血管紧张素II诱发的心室性心律失常。

[0264] 此外,在注射血管紧张素II的模型中确认程序化的电刺激(PES)诱发心室性心律失常(图12a)。作为分析诱发心室性心律失常的刺激频率的结果,在AngII小鼠组中即使是低的刺激频率也会诱发心室性心律失常,而在用AAV9-CCN5或AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5注射的小鼠组中,心室性心律失常被等于或大于Sham组水平的刺激频率诱发。作为分析心室性心律失常的发生率的结果,心室性心律失常在AngII小鼠组中以5/5的发生比率(episode rate)发生,在AngII+AAV9-CCN5小鼠组中以1/5的发生比率发生,并且在AngII+AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5小鼠组中以0/5的发生比率发生(图12b和12c)。

[0265] 因为心律失常与心脏纤维化密切相关,所以通过Masson三色染色测量心脏纤维化。结果,发现由血管紧张素II诱发的心脏纤维化在注射了AAV9-CCN5或AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5的心脏中显著减少(图13a)。

[0266] 此外,该现象也与调控心脏电信号的通道相关蛋白质密切相关。因此,通过蛋白质印迹法检测 $\text{Na}_v1.5$ 和连接蛋白43蛋白质在心脏组织中的表达。结果,确定由血管紧张素II引起的通道相关蛋白质 $\text{Na}_v1.5$ 和连接蛋白43的表达减少通过AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5而恢复(图13b)。由这些结果,确定使用单独的CCN5载体或共表达SERCA2A和CCN5的基因疗法也可以抑制由血管紧张素II诱发的心室性心动过速的发生。

[0001]	序列表															
[0002]	<110> 贝特基因															
[0003]	<120> 用于预防或治疗心律失常的药物组合物															
[0004]	<130> PCB807072BPG															
[0005]	<150> KR 2017/127550															
[0006]	<151> 2017-09-29															
[0007]	<160> 42															
[0008]	<170> KoPatentIn 3.0															
[0009]	<210> 1															
[0010]	<211> 250															
[0011]	<212> PRT															
[0012]	<213> 智人(Homo sapiens)															
[0013]	<400> 1															
[0014]	Met	Arg	Gly	Thr	Pro	Lys	Thr	His	Leu	Leu	Ala	Phe	Ser	Leu	Leu	Cys
[0015]	1				5					10					15	
[0016]	Leu	Leu	Ser	Lys	Val	Arg	Thr	Gln	Leu	Cys	Pro	Thr	Pro	Cys	Thr	Cys
[0017]					20					25					30	
[0018]	Pro	Trp	Pro	Pro	Pro	Arg	Cys	Pro	Leu	Gly	Val	Pro	Leu	Val	Leu	Asp
[0019]					35					40					45	
[0020]	Gly	Cys	Gly	Cys	Cys	Arg	Val	Cys	Ala	Arg	Arg	Leu	Gly	Glu	Pro	Cys
[0021]					50					55					60	
[0022]	Asp	Gln	Leu	His	Val	Cys	Asp	Ala	Ser	Gln	Gly	Leu	Val	Cys	Gln	Pro
[0023]	65					70					75					80
[0024]	Gly	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Arg	Gly	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Ala	Glu	Asp
[0025]					85					90						95
[0026]	Asp	Ser	Ser	Cys	Glu	Val	Asn	Gly	Arg	Leu	Tyr	Arg	Glu	Gly	Glu	Thr
[0027]					100					105						110
[0028]	Phe	Gln	Pro	His	Cys	Ser	Ile	Arg	Cys	Arg	Cys	Glu	Asp	Gly	Gly	Phe
[0029]					115					120						125
[0030]	Thr	Cys	Val	Pro	Leu	Cys	Ser	Glu	Asp	Val	Arg	Leu	Pro	Ser	Trp	Asp
[0031]					130					135						140
[0032]	Cys	Pro	His	Pro	Arg	Arg	Val	Glu	Val	Leu	Gly	Lys	Cys	Cys	Pro	Glu
[0033]	145					150						155				160
[0034]	Trp	Val	Cys	Gly	Gln	Gly	Gly	Gly	Leu	Gly	Thr	Gln	Pro	Leu	Pro	Ala
[0035]					165					170						175
[0036]	Gln	Gly	Pro	Gln	Phe	Ser	Gly	Leu	Val	Ser	Ser	Leu	Pro	Pro	Gly	Val
[0037]					180					185						190
[0038]	Pro	Cys	Pro	Glu	Trp	Ser	Thr	Ala	Trp	Gly	Pro	Cys	Ser	Thr	Thr	Cys
[0039]					195					200						205
[0040]	Gly	Leu	Gly	Met	Ala	Thr	Arg	Val	Ser	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Cys	Arg
[0041]					210					215						220

[0042]	Leu Glu Thr Gln Arg Arg Leu Cys Leu Ser Arg Pro Cys Pro Pro Ser
[0043]	225 230 235 240
[0044]	Arg Gly Arg Ser Pro Gln Asn Ser Ala Phe
[0045]	245 250
[0046]	<210> 2
[0047]	<211> 750
[0048]	<212> DNA
[0049]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0050]	<400> 2
[0051]	atgagaggca caccgaagac ccacctcctg gccttctccc tcctctgcct cctctcaaag 60
[0052]	gtgcgtaccc agctgtgccc gacaccatgt acctgccctt gccacactcc ccgatgcccc 120
[0053]	ctgggagtag ccttggtgct ggatggctgt ggctgctgcc gggatatgtc acggcggtctg 180
[0054]	ggggagccct gcgaccaact ccacgtctgc gacgccagcc agggcctggt ctgccagccc 240
[0055]	ggggcaggac ccggtggccg gggggccctg tgcctcttgg cagaggacga cagcagctgt 300
[0056]	gaggtgaacg gccgcctgta tcgggaaggg gagaccttcc agccccactg cagcatccgc 360
[0057]	tgccgtgcg aggacggcgg cttcacctgc gtgccgctgt gcagcgagga tgtgcggtctg 420
[0058]	cccagctggg actgccccca cccagaggag gtcgaggtcc tgggcaagt ctgccctgag 480
[0059]	tgggtgtgcg gccaaaggagg gggactgggg acccagcccc ttccagccca aggaccccag 540
[0060]	ttttctggcc ttgtctcttc cctgccccct ggtgtcccct gcccagaatg gagcacggcc 600
[0061]	tggggaccct gctcgaccac ctgtgggctg ggcatggcca cccgggtgtc caaccagaac 660
[0062]	cgttctgcc gactggagac ccagcggcgc ctgtgcctgt ccaggccctg cccacctcc 720
[0063]	agggtcgca gtccacaaaa cagtgccttc 750
[0064]	<210> 3
[0065]	<211> 997
[0066]	<212> PRT
[0067]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0068]	<400> 3
[0069]	Met Glu Asn Ala His Thr Lys Thr Val Glu Glu Val Leu Gly His Phe
[0070]	1 5 10 15
[0071]	Gly Val Asn Glu Ser Thr Gly Leu Ser Leu Glu Gln Val Lys Lys Leu
[0072]	20 25 30
[0073]	Lys Glu Arg Trp Gly Ser Asn Glu Leu Pro Ala Glu Glu Gly Lys Thr
[0074]	35 40 45
[0075]	Leu Leu Glu Leu Val Ile Glu Gln Phe Glu Asp Leu Leu Val Arg Ile
[0076]	50 55 60
[0077]	Leu Leu Leu Ala Ala Cys Ile Ser Phe Val Leu Ala Trp Phe Glu Glu
[0078]	65 70 75 80
[0079]	Gly Glu Glu Thr Ile Thr Ala Phe Val Glu Pro Phe Val Ile Leu Leu
[0080]	85 90 95
[0081]	Ile Leu Val Ala Asn Ala Ile Val Gly Val Trp Gln Glu Arg Asn Ala
[0082]	100 105 110
[0083]	Glu Asn Ala Ile Glu Ala Leu Lys Glu Tyr Glu Pro Glu Met Gly Lys

[0084]	115	120	125
[0085]	Val Tyr Arg Gln Asp Arg Lys Ser Val Gln Arg Ile Lys Ala Lys Asp		
[0086]	130	135	140
[0087]	Ile Val Pro Gly Asp Ile Val Glu Ile Ala Val Gly Asp Lys Val Pro		
[0088]	145	150	155
[0089]	Ala Asp Ile Arg Leu Thr Ser Ile Lys Ser Thr Thr Leu Arg Val Asp		
[0090]	165	170	175
[0091]	Gln Ser Ile Leu Thr Gly Glu Ser Val Ser Val Ile Lys His Thr Asp		
[0092]	180	185	190
[0093]	Pro Val Pro Asp Pro Arg Ala Val Asn Gln Asp Lys Lys Asn Met Leu		
[0094]	195	200	205
[0095]	Phe Ser Gly Thr Asn Ile Ala Ala Gly Lys Ala Met Gly Val Val Val		
[0096]	210	215	220
[0097]	Ala Thr Gly Val Asn Thr Glu Ile Gly Lys Ile Arg Asp Glu Met Val		
[0098]	225	230	235
[0099]	Ala Thr Glu Gln Glu Arg Thr Pro Leu Gln Gln Lys Leu Asp Glu Phe		
[0100]	245	250	255
[0101]	Gly Glu Gln Leu Ser Lys Val Ile Ser Leu Ile Cys Ile Ala Val Trp		
[0102]	260	265	270
[0103]	Ile Ile Asn Ile Gly His Phe Asn Asp Pro Val His Gly Gly Ser Trp		
[0104]	275	280	285
[0105]	Ile Arg Gly Ala Ile Tyr Tyr Phe Lys Ile Ala Val Ala Leu Ala Val		
[0106]	290	295	300
[0107]	Ala Ala Ile Pro Glu Gly Leu Pro Ala Val Ile Thr Thr Cys Leu Ala		
[0108]	305	310	315
[0109]	Leu Gly Thr Arg Arg Met Ala Lys Lys Asn Ala Ile Val Arg Ser Leu		
[0110]	325	330	335
[0111]	Pro Ser Val Glu Thr Leu Gly Cys Thr Ser Val Ile Cys Ser Asp Lys		
[0112]	340	345	350
[0113]	Thr Gly Thr Leu Thr Thr Asn Gln Met Ser Val Cys Arg Met Phe Ile		
[0114]	355	360	365
[0115]	Leu Asp Arg Val Glu Gly Asp Thr Cys Ser Leu Asn Glu Phe Thr Ile		
[0116]	370	375	380
[0117]	Thr Gly Ser Thr Tyr Ala Pro Ile Gly Glu Val His Lys Asp Asp Lys		
[0118]	385	390	395
[0119]	Pro Val Asn Cys His Gln Tyr Asp Gly Leu Val Glu Leu Ala Thr Ile		
[0120]	405	410	415
[0121]	Cys Ala Leu Cys Asn Asp Ser Ala Leu Asp Tyr Asn Glu Ala Lys Gly		
[0122]	420	425	430
[0123]	Val Tyr Glu Lys Val Gly Glu Ala Thr Glu Thr Ala Leu Thr Cys Leu		
[0124]	435	440	445
[0125]	Val Glu Lys Met Asn Val Phe Asp Thr Glu Leu Lys Gly Leu Ser Lys		

[0126]	450	455	460
[0127]	Ile Glu Arg Ala Asn Ala Cys Asn Ser Val Ile Lys Gln Leu Met Lys		
[0128]	465	470	475 480
[0129]	Lys Glu Phe Thr Leu Glu Phe Ser Arg Asp Arg Lys Ser Met Ser Val		
[0130]		485 490	495
[0131]	Tyr Cys Thr Pro Asn Lys Pro Ser Arg Thr Ser Met Ser Lys Met Phe		
[0132]		500 505	510
[0133]	Val Lys Gly Ala Pro Glu Gly Val Ile Asp Arg Cys Thr His Ile Arg		
[0134]		515 520	525
[0135]	Val Gly Ser Thr Lys Val Pro Met Thr Ser Gly Val Lys Gln Lys Ile		
[0136]	530	535	540
[0137]	Met Ser Val Ile Arg Glu Trp Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Arg Cys		
[0138]	545	550	555 560
[0139]	Leu Ala Leu Ala Thr His Asp Asn Pro Leu Arg Arg Glu Glu Met His		
[0140]		565 570	575
[0141]	Leu Glu Asp Ser Ala Asn Phe Ile Lys Tyr Glu Thr Asn Leu Thr Phe		
[0142]		580 585	590
[0143]	Val Gly Cys Val Gly Met Leu Asp Pro Pro Arg Ile Glu Val Ala Ser		
[0144]		595 600	605
[0145]	Ser Val Lys Leu Cys Arg Gln Ala Gly Ile Arg Val Ile Met Ile Thr		
[0146]	610	615	620
[0147]	Gly Asp Asn Lys Gly Thr Ala Val Ala Ile Cys Arg Arg Ile Gly Ile		
[0148]	625	630	635 640
[0149]	Phe Gly Gln Asp Glu Asp Val Thr Ser Lys Ala Phe Thr Gly Arg Glu		
[0150]		645 650	655
[0151]	Phe Asp Glu Leu Asn Pro Ser Ala Gln Arg Asp Ala Cys Leu Asn Ala		
[0152]		660 665	670
[0153]	Arg Cys Phe Ala Arg Val Glu Pro Ser His Lys Ser Lys Ile Val Glu		
[0154]		675 680	685
[0155]	Phe Leu Gln Ser Phe Asp Glu Ile Thr Ala Met Thr Gly Asp Gly Val		
[0156]	690	695	700
[0157]	Asn Asp Ala Pro Ala Leu Lys Lys Ala Glu Ile Gly Ile Ala Met Gly		
[0158]	705	710	715 720
[0159]	Ser Gly Thr Ala Val Ala Lys Thr Ala Ser Glu Met Val Leu Ala Asp		
[0160]		725 730	735
[0161]	Asp Asn Phe Ser Thr Ile Val Ala Ala Val Glu Glu Gly Arg Ala Ile		
[0162]		740 745	750
[0163]	Tyr Asn Asn Met Lys Gln Phe Ile Arg Tyr Leu Ile Ser Ser Asn Val		
[0164]		755 760	765
[0165]	Gly Glu Val Val Cys Ile Phe Leu Thr Ala Ala Leu Gly Phe Pro Glu		
[0166]	770	775	780
[0167]	Ala Leu Ile Pro Val Gln Leu Leu Trp Val Asn Leu Val Thr Asp Gly		

[0168]	785	790	795	800
[0169]	Leu Pro Ala Thr Ala Leu Gly Phe Asn Pro Pro Asp Leu Asp Ile Met			
[0170]		805	810	815
[0171]	Asn Lys Pro Pro Arg Asn Pro Lys Glu Pro Leu Ile Ser Gly Trp Leu			
[0172]		820	825	830
[0173]	Phe Phe Arg Tyr Leu Ala Ile Gly Cys Tyr Val Gly Ala Ala Thr Val			
[0174]		835	840	845
[0175]	Gly Ala Ala Ala Trp Trp Phe Ile Ala Ala Asp Gly Gly Pro Arg Val			
[0176]		850	855	860
[0177]	Ser Phe Tyr Gln Leu Ser His Phe Leu Gln Cys Lys Glu Asp Asn Pro			
[0178]	865	870	875	880
[0179]	Asp Phe Glu Gly Val Asp Cys Ala Ile Phe Glu Ser Pro Tyr Pro Met			
[0180]		885	890	895
[0181]	Thr Met Ala Leu Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Met Cys Asn Ala Leu			
[0182]		900	905	910
[0183]	Asn Ser Leu Ser Glu Asn Gln Ser Leu Leu Arg Met Pro Pro Trp Glu			
[0184]		915	920	925
[0185]	Asn Ile Trp Leu Val Gly Ser Ile Cys Leu Ser Met Ser Leu His Phe			
[0186]		930	935	940
[0187]	Leu Ile Leu Tyr Val Glu Pro Leu Pro Leu Ile Phe Gln Ile Thr Pro			
[0188]	945	950	955	960
[0189]	Leu Asn Val Thr Gln Trp Leu Met Val Leu Lys Ile Ser Leu Pro Val			
[0190]		965	970	975
[0191]	Ile Leu Met Asp Glu Thr Leu Lys Phe Val Ala Arg Asn Tyr Leu Glu			
[0192]		980	985	990
[0193]	Pro Ala Ile Leu Glu			
[0194]		995		
[0195]	<210> 4			
[0196]	<211> 2991			
[0197]	<212> DNA			
[0198]	<213> 智人 (Homo sapiens)			
[0199]	<400> 4			
[0200]	atggagaacg cgcacaccaa gacggtggag gaggtgctgg gccacttcgg cgtcaacgag 60			
[0201]	agtacggggc tgagcctgga acaggtcaag aagcttaagg agagatgggg ctccaacgag 120			
[0202]	ttaccggctg aagaaggaaa aaccttgctg gaacttgatga ttgagcagtt tgaagacttg 180			
[0203]	ctagttagga ttttattact ggcagcatgt atatcttttg ttttggcttg gtttgaagaa 240			
[0204]	ggtgaagaaa caattacagc cttttagtaa ctttttgtaa ttttactcat attagtagcc 300			
[0205]	aatgcaattg tgggtgtatg gcaggaaaga aatgctgaaa atgccatcga agcccttaag 360			
[0206]	gaatatgagc ctgaaatggg caaagtgtat cgacaggaca gaaagagtgt gcagcggatt 420			
[0207]	aaagctaaag acatagttcc tggtgatatt gtagaaattg ctgttggtga caaagttcct 480			
[0208]	gctgatataa ggtaaacttc catcaaactc accacactaa gagttgacca gtcaattctc 540			
[0209]	acaggtgaat ctgtctctgt catcaagcac actgatcccc tcctgaccc acgagctgtc 600			

[0210]	aaccaagata aaaagaacat gctgttttct ggtacaaaca ttgctgctgg gaaagctatg	660
[0211]	ggagtgggtg tagcaactgg agttaacacc gaaattggca agatccggga tgaaatgggt	720
[0212]	gcaacagaac aggagagaac accccttcag caaaaactag atgaatttgg ggaacagctt	780
[0213]	tccaaagtca tctcccttat ttgcattgca gtctggatca taaatattgg gcacttcaat	840
[0214]	gacccggttc atggagggtc ctggatcaga ggtgctatct actactttaa aattgcagtg	900
[0215]	gccctggctg tagcagccat tcctgaaggt ctgcctgcag tcatcaccac ctgcctggct	960
[0216]	cttggaaactc gcagaatggc aaagaaaaat gccattgttc gaagcctccc gtctgtggaa	1020
[0217]	acccttggtt gtacttctgt tatctgtctc gacaagactg gtacacttac aacaaaccag	1080
[0218]	atgtcagctc gcaggatgtt cattctggac agagtggaa gtgatacttg ttcccttaat	1140
[0219]	gagtttacca taactggatc aacttatgca cctattggag aagtgcataa agatgataaa	1200
[0220]	ccagtgaatt gtcaccagta tgatggctg gtagaattag caacaatttg tgctctttgt	1260
[0221]	aatgactctg ctttggatta caatgaggca aagggtgtgt atgaaaaagt tggagaagct	1320
[0222]	acagagactg ctctcacttg cctagtagag aagatgaatg tatttgatac cgaattgaag	1380
[0223]	ggtctttcta aaatagaacg tgcaaatgcc tgcaactcag tcattaacaa gctgatgaaa	1440
[0224]	aaggaattca ctctagagtt ttcacgtgac agaaagtcaa tgctcggtta ctgtacacca	1500
[0225]	aataaaccac gcaggacatc aatgagcaag atgtttgtga aggggtgctc tgaaggtgtc	1560
[0226]	attgacaggt gacccacat tcgagttgga agtactaagg ttcctatgac ctctggagtc	1620
[0227]	aaacagaaga tcatgtctgt cattcgagag tggggtagtg gcagcgacac actgcgatgc	1680
[0228]	ctggccctgg ccactcatga caaccactg agaagagaag aaatgcacct tgaggactct	1740
[0229]	gccaaacttta ttaaatatga gaccaatctg accttcgttg gctgcgtggg catgctggat	1800
[0230]	cctccgagaa tcgaggtggc ctctccgtg aagctgtgcc ggcaagcagg catccgggtc	1860
[0231]	atcatgatca ctggggacaa caaggcact gctgtggcca tctgtcgccg catcgcatc	1920
[0232]	ttcgggcagg atgaggacgt gacgtcaaaa gctttcacag gccgggagtt tgatgaactc	1980
[0233]	aaccctccg cccagcgaga cgccctcctg aacgcccgtg gttttgctc agttgaacct	2040
[0234]	tcccacaagt ctaaaatcgt agaatttctt cagtcttttg atgagattac agctatgact	2100
[0235]	ggcgatggcg tgaacgatgc tcctgtctg aagaaagccg agattggcat tgctatgggc	2160
[0236]	tctggcactg cgggtggctaa aaccgcctct gagatggtcc tggcgatga caacttctcc	2220
[0237]	accattgtgg ctgccgttga ggagggcgg gcaatctaca acaacatgaa acagttcatc	2280
[0238]	cgtacctca tctcgtccaa cgtcggggaa gttgtctgta ttttctgac agcagccctt	2340
[0239]	ggatttcccg aggtttgat tcctgttcag ctgctctggg tcaatctggt gacagatggc	2400
[0240]	ctgcctgcca ctgcactggg gttcaaccct cctgatctgg acatcatgaa taaacctccc	2460
[0241]	cggaacccaa aggaaccatt gatcagcggg tggctctttt tccgttactt ggctattggc	2520
[0242]	tgttacgtcg gcgtgctac cgtgggtgct gctgcatggt ggttcattgc tgctgacggt	2580
[0243]	ggtccaagag tgccttcta ccagctgagt catttctac agtgtaaaga ggacaacccg	2640
[0244]	gactttgaag gcgtggattg tgcaatctt gaatcccat acccgatgac aatggcgctc	2700
[0245]	tctgttctag taactataga aatgtgtaac gccctcaaca gcttgctcca aaaccagtcc	2760
[0246]	ttgtgagga tgccccctg ggagaacatc tggctcgtg gctccatctg cctgtccatg	2820
[0247]	tactccact tectgacct ctatgtcgaa ccttgccac tcatcttcca gatcacaccg	2880
[0248]	ctgaacgtga ccagtggt gatggtgctg aaaatctcct tgcccgtgat tctcatggat	2940
[0249]	gagacgtca agtttgtggc ccgcaactac ctggaacctg caatactgga	g 2991
[0250]	<210>	5
[0251]	<211>	22

- [0252] <212> PRT
- [0253] <213> 人工序列
- [0254] <220>
- [0255] <223> 来源于猪捷申病毒-1的自剪切序列
- [0256] <400> 5
- [0257] Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
- [0258] 1 5 10 15
- [0259] Glu Glu Asn Pro Gly Pro
- [0260] 20
- [0261] <210> 6
- [0262] <211> 66
- [0263] <212> DNA
- [0264] <213> 人工序列
- [0265] <220>
- [0266] <223> 来源于猪捷申病毒-1的自剪切序列
- [0267] <400> 6
- [0268] ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct 60
- [0269] ggacct 66
- [0270] <210> 7
- [0271] <211> 21
- [0272] <212> PRT
- [0273] <213> 人工序列
- [0274] <220>
- [0275] <223> 来源于Thoseaasigna病毒的自剪切序列
- [0276] <400> 7
- [0277] Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
- [0278] 1 5 10 15
- [0279] Glu Asn Pro Gly Pro
- [0280] 20
- [0281] <210> 8
- [0282] <211> 63
- [0283] <212> DNA
- [0284] <213> 人工序列
- [0285] <220>
- [0286] <223> 来源于Thoseaasigna病毒的自剪切序列
- [0287] <400> 8
- [0288] ggaagcggag agggcagagg aagtctgcta acatgcggtg acgtcgagga gaatcctgga 60
- [0289] cct 63
- [0290] <210> 9
- [0291] <211> 23
- [0292] <212> PRT
- [0293] <213> 人工序列

- [0294] <220>
- [0295] <223> 来源于马鼻炎A病毒 (ERAV) 的自剪切序列
- [0296] <400> 9
- [0297] Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
- [0298] 1 5 10 15
- [0299] Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
- [0300] 20
- [0301] <210> 10
- [0302] <211> 69
- [0303] <212> DNA
- [0304] <213> 人工序列
- [0305] <220>
- [0306] <223> 来源于马鼻炎A病毒 (ERAV) 的自剪切序列
- [0307] <400> 10
- [0308] ggaagcggac agtgtactaa ttatgctctc ttgaaattgg ctggagatgt tgagagcaac 60
- [0309] cctggacct 69
- [0310] <210> 11
- [0311] <211> 25
- [0312] <212> PRT
- [0313] <213> 人工序列
- [0314] <220>
- [0315] <223> 来源于FMDV 2A的自剪切序列
- [0316] <400> 11
- [0317] Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
- [0318] 1 5 10 15
- [0319] Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
- [0320] 20 25
- [0321] <210> 12
- [0322] <211> 75
- [0323] <212> DNA
- [0324] <213> 人工序列
- [0325] <220>
- [0326] <223> 来源于FMDV 2A的自剪切序列
- [0327] <400> 12
- [0328] ggaagcggag tgaacacagac tttgaatttt gaccttctca agttggcggg agacgtggag 60
- [0329] tccaaccctg gacct 75
- [0330] <210> 13
- [0331] <211> 18
- [0332] <212> DNA
- [0333] <213> 人工序列
- [0334] <220>
- [0335] <223> 用于小鼠 α -SMA的正向引物

[0336] <400> 13
[0337] cccacccaga gtggagaa 18
[0338] <210> 14
[0339] <211> 20
[0340] <212> DNA
[0341] <213> 人工序列
[0342] <220>
[0343] <223> 用于小鼠 α -SMA的反向引物
[0344] <400> 14
[0345] acatagctgg agcagcgtct 20
[0346] <210> 15
[0347] <211> 21
[0348] <212> DNA
[0349] <213> 人工序列
[0350] <220>
[0351] <223> 用于小鼠胶原I的正向引物
[0352] <400> 15
[0353] catgttcagc tttgtggacc t 21
[0354] <210> 16
[0355] <211> 20
[0356] <212> DNA
[0357] <213> 人工序列
[0358] <220>
[0359] <223> 用于小鼠胶原I的反向引物
[0360] <400> 16
[0361] gacgctgact tcagggatgt 20
[0362] <210> 17
[0363] <211> 20
[0364] <212> DNA
[0365] <213> 人工序列
[0366] <220>
[0367] <223> 用于小鼠TGF- β 1的正向引物
[0368] <400> 17
[0369] tggagcaaca tgtggaactc 20
[0370] <210> 18
[0371] <211> 18
[0372] <212> DNA
[0373] <213> 人工序列
[0374] <220>
[0375] <223> 用于小鼠TGF- β 1的反向引物
[0376] <400> 18
[0377] cagcagccgg ttaccaag 18

[0378]	<210> 19
[0379]	<211> 24
[0380]	<212> DNA
[0381]	<213> 人工序列
[0382]	<220>
[0383]	<223> 用于小鼠IL-1 β 的正向引物
[0384]	<400> 19
[0385]	tccaggatga ggacatgatg agca 24
[0386]	<210> 20
[0387]	<211> 25
[0388]	<212> DNA
[0389]	<213> 人工序列
[0390]	<220>
[0391]	<223> 用于小鼠IL-1 β 的反向引物
[0392]	<400> 20
[0393]	gaacgtcaca cacaccagca ggtta 25
[0394]	<210> 21
[0395]	<211> 21
[0396]	<212> DNA
[0397]	<213> 人工序列
[0398]	<220>
[0399]	<223> 用于小鼠RANTES的正向引物
[0400]	<400> 21
[0401]	tgcagaggac tctgagacag c 21
[0402]	<210> 22
[0403]	<211> 19
[0404]	<212> DNA
[0405]	<213> 人工序列
[0406]	<220>
[0407]	<223> 用于小鼠RANTES的反向引物
[0408]	<400> 22
[0409]	gagtgggtgtc cgagccata 19
[0410]	<210> 23
[0411]	<211> 20
[0412]	<212> DNA
[0413]	<213> 人工序列
[0414]	<220>
[0415]	<223> 用于小鼠F4/80的正向引物
[0416]	<400> 23
[0417]	cctggacgaa tcctgtgaag 20
[0418]	<210> 24
[0419]	<211> 20

[0420] <212> DNA
[0421] <213> 人工序列
[0422] <220>
[0423] <223> 用于小鼠F4/80的反向引物
[0424] <400> 24
[0425] ggtgggacca cagagagttg 20
[0426] <210> 25
[0427] <211> 18
[0428] <212> DNA
[0429] <213> 人工序列
[0430] <220>
[0431] <223> 用于小鼠MCP-1的正向引物
[0432] <400> 25
[0433] catccacgtg ttggctca 18
[0434] <210> 26
[0435] <211> 23
[0436] <212> DNA
[0437] <213> 人工序列
[0438] <220>
[0439] <223> 用于小鼠MCP-1的反向引物
[0440] <400> 26
[0441] gatcatcttg ctggtgaatg agt 23
[0442] <210> 27
[0443] <211> 20
[0444] <212> DNA
[0445] <213> 人工序列
[0446] <220>
[0447] <223> 用于小鼠CCN5的正向引物
[0448] <400> 27
[0449] atacaggtgc caggaaggtg 20
[0450] <210> 28
[0451] <211> 20
[0452] <212> DNA
[0453] <213> 人工序列
[0454] <220>
[0455] <223> 用于小鼠CCN5的反向引物
[0456] <400> 28
[0457] gttggatact cgggtggcta 20
[0458] <210> 29
[0459] <211> 20
[0460] <212> DNA
[0461] <213> 人工序列

[0462] <220>
[0463] <223> 用于小鼠GAPDH的正向引物
[0464] <400> 29
[0465] ctcacgaccca cagtccatgc 20
[0466] <210> 30
[0467] <211> 20
[0468] <212> DNA
[0469] <213> 人工序列
[0470] <220>
[0471] <223> 用于小鼠GAPDH的反向引物
[0472] <400> 30
[0473] ttcagctctg ggatgacctt 20
[0474] <210> 31
[0475] <211> 20
[0476] <212> DNA
[0477] <213> 人工序列
[0478] <220>
[0479] <223> 用于小鼠18s rRNA的正向引物
[0480] <400> 31
[0481] gtaacccgtt gaacccatt 20
[0482] <210> 32
[0483] <211> 20
[0484] <212> DNA
[0485] <213> 人工序列
[0486] <220>
[0487] <223> 用于小鼠18s rRNA的反向引物
[0488] <400> 32
[0489] ccatccaatc ggtagtagcg 20
[0490] <210> 33
[0491] <211> 27
[0492] <212> DNA
[0493] <213> 人工序列
[0494] <220>
[0495] <223> 用于大鼠 α -SMA的正向引物
[0496] <400> 33
[0497] tctgtctcta gcacacaact gtgaatg 27
[0498] <210> 34
[0499] <211> 23
[0500] <212> DNA
[0501] <213> 人工序列
[0502] <220>
[0503] <223> 用于大鼠 α -SMA的反向引物

[0504] <400> 34
[0505] ttgacaggcc agggctagaa ggg 23
[0506] <210> 35
[0507] <211> 26
[0508] <212> DNA
[0509] <213> 人工序列
[0510] <220>
[0511] <223> 用于大鼠胶原I的正向引物
[0512] <400> 35
[0513] aatgcacttt tggtttttgg tcacgt 26
[0514] <210> 36
[0515] <211> 21
[0516] <212> DNA
[0517] <213> 人工序列
[0518] <220>
[0519] <223> 用于大鼠胶原I的反向引物
[0520] <400> 36
[0521] cagcccactt tgccccaacc c 21
[0522] <210> 37
[0523] <211> 20
[0524] <212> DNA
[0525] <213> 人工序列
[0526] <220>
[0527] <223> 用于大鼠TGF- β 1的正向引物
[0528] <400> 37
[0529] tggtcgcgct ctcggcagt 20
[0530] <210> 38
[0531] <211> 20
[0532] <212> DNA
[0533] <213> 人工序列
[0534] <220>
[0535] <223> 用于大鼠TGF- β 1的反向引物
[0536] <400> 38
[0537] cggatggcct cgatgcgctt 20
[0538] <210> 39
[0539] <211> 22
[0540] <212> DNA
[0541] <213> 人工序列
[0542] <220>
[0543] <223> 用于大鼠GAPDH的正向引物
[0544] <400> 39
[0545] acccagccca gcaaggatac tg 22

[0546]	<210> 40
[0547]	<211> 23
[0548]	<212> DNA
[0549]	<213> 人工序列
[0550]	<220>
[0551]	<223> 用于大鼠GAPDH的反向引物
[0552]	<400> 40
[0553]	attcgagaga agggagggct ccc 23
[0554]	<210> 41
[0555]	<211> 753
[0556]	<212> DNA
[0557]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0558]	<400> 41
[0559]	atgagaggca caccgaagac ccacctctg gccttctccc tcctctgcct cctctcaaag 60
[0560]	gtgcgtaccc agctgtgccc gacaccatgt acctgcccct ggccacctcc ccgatgcccc 120
[0561]	ctgggagtac ccctggtgct ggatggctgt ggctgtctgcc gggatatgtc acggcggtctg 180
[0562]	ggggagccct gcgaccaact ccacgtctgc gacgccagcc agggcctggt ctgccagccc 240
[0563]	ggggcaggac ccggtggccg gggggccctg tgcctcttgg cagaggacga cagcagctgt 300
[0564]	gaggtgaacg gccgcctgta tcgggaagg gagaccttcc agccccactg cagcatccgc 360
[0565]	tgccgtgcg aggacggcg cttcacctgc gtgccgctgt gcagcgagga tgtgcggtctg 420
[0566]	cccagctggg actgccccca ccccaggagg gtcgaggtcc tgggcaagt ctgccctgag 480
[0567]	tgggtgtgcg gccaaaggagg gggactgggg acccagcccc ttccagcccc aggacccag 540
[0568]	ttttctggcc ttgtctcttc cctgccccct ggtgtcccct gcccagaatg gagcacggcc 600
[0569]	tggggaccct gctcgaccac ctgtgggctg ggcattggcca cccgggtgtc caaccagaac 660
[0570]	cgcttctgcc gactggagac ccagcggcgc ctgtgcctgt ccaggccctg cccaccctcc 720
[0571]	agggtcgca gtccacaaaa cagtgccttc tag 753
[0572]	<210> 42
[0573]	<211> 2994
[0574]	<212> DNA
[0575]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0576]	<400> 42
[0577]	atggagaacg cgcacacca gacggtggag gaggtgctgg gccacttcgg cgtcaacgag 60
[0578]	agtacggggc tgagcctgga acaggtcaag aagcttaagg agagatgggg ctccaacgag 120
[0579]	ttaccggtcg aagaaggaaa aaccttctg gaacttgtga ttgagcagtt tgaagacttg 180
[0580]	ctagttagga ttttattact ggcagcatgt atatcttttg ttttggttg gtttgaagaa 240
[0581]	ggtgaagaaa caattacagc cttttagtaa cttttgtaa ttttactcat attagtagcc 300
[0582]	aatgcaattg tgggtgtatg gcaggaaaga aatgctgaaa atgccatcga agcccttaag 360
[0583]	gaatatgagc ctgaaatggg caaagtgtat cgacaggaca gaaagagtgt gcagcggatt 420
[0584]	aaagctaaag acatagtcc tggtgatatt gtagaaattg ctgttggtga caaagttcct 480
[0585]	gctgatataa ggttaacttc catcaaatct accacactaa gagttgacca gtcaattctc 540
[0586]	acaggtgaat ctgtctctgt catcaagcac actgatcccg tccctgacct acgagctgtc 600
[0587]	aaccaagata aaaagaacat gctgttttct ggtacaaaca ttgctgctgg gaaagctatg 660

[0588]	ggagtgggtgg tagcaactgg agttaacacc gaaattggca agatccggga tgaaatgggtg	720
[0589]	gcaacagaac aggagagaac accccttcag caaaaactag atgaatttgg ggaacagctt	780
[0590]	tccaaagtca tctcccttat ttgcattgca gtctggatca taaatattgg gcacttcaat	840
[0591]	gacccggttc atggagggtc ctggatcaga ggtgctatit actactttaa aattgcagtg	900
[0592]	gccctggctg tagcagccat tcctgaaggt ctgcctgcag tcatcaccac ctgcctggct	960
[0593]	cttggaaactc gcagaatggc aaagaaaaat gccattgttc gaagcctccc gtctgtggaa	1020
[0594]	acccttgggt gtacttctgt tatctgetca gacaagactg gtacacttac aacaaaccag	1080
[0595]	atgtcagtct gcaggatgtt cattctggac agagtgaag gtgatacttg ttcccttaat	1140
[0596]	gagtttacca taactggatc aacttatgca cctattggag aagtgcataa agatgataaa	1200
[0597]	ccagtgaatt gtcaccagta tgatggctcg gtagaattag caacaatttg tgctctttgt	1260
[0598]	aatgactctg ctttggatta caatgaggca aagggtgtgt atgaaaaagt tggagaagct	1320
[0599]	acagagactg ctctcacttg cctagtagag aagatgaatg tatttgatac cgaattgaag	1380
[0600]	ggtctttcta aaatagaacg tgcaaatgcc tgcaactcag tcattaaaca gctgatgaaa	1440
[0601]	aaggaattca ctctagagtt ttcacgtgac agaaagtcaa tgtcggttta ctgtacacca	1500
[0602]	aataaaccaa gcaggacatc aatgagcaag atgtttgtga aggggtgctc tgaagggtgc	1560
[0603]	attgacaggt gcaccacatc tcgagttgga agtactaagg ttcttatgac ctctggagtc	1620
[0604]	aaacagaaga tcatgtctgt cattcgagag tggggtagtg gcagcgacac actgcgatgc	1680
[0605]	ctggccctgg ccactcatga caaccactg agaagagaag aaatgcacct tgaggactct	1740
[0606]	gccaaacttta ttaaatatga gaccaatctg accttcgttg gctgcgtggg catgctggat	1800
[0607]	cctccgagaa tcgaggtggc ctctccgtg aagctgtgcc ggcaagcagg catccgggtc	1860
[0608]	atcatgatca ctggggacaa caagggcact gctgtggcca tctgtcgccg catcggtc	1920
[0609]	ttcgggcagg atgaggacgt gacgtcaaaa gctttcacag gccgggagtt tgatgaactc	1980
[0610]	aaccctccg cccagcgaga cgcctgctg aacgccgct gttttgctg agttgaacct	2040
[0611]	tcccacaagt ctaaaatcgt agaatttctt cagtcttttg atgagattac agctatgact	2100
[0612]	ggcgatggcg tgaacgatgc tcctgtctg aagaaagccg agattggcat tgctatgggc	2160
[0613]	tctggcactg cgggtggctaa aaccgcctct gagatggtcc tggcgatga caacttctcc	2220
[0614]	accattgtgg ctgccgttga ggaggggcgg gcaatctaca acaacatgaa acagttcatc	2280
[0615]	cgctacctca tctcttcaa cgtcggggaa gttgtctgta ttttctgac agcagccctt	2340
[0616]	ggatttcccg aggtttgat tcctgttcag ctgctctggg tcaatctggt gacagatggc	2400
[0617]	ctgcctgcca ctgcaactgg gttcaaccct cctgatctgg acatcatgaa taaacctccc	2460
[0618]	cggaaaccaa aggaaccatt gatcagcggg tggctctttt tccgttactt ggctattggc	2520
[0619]	tgttacgtcg gcgctgctac cgtgggtgct gctgcatggt gggttcattgc tgctgacggt	2580
[0620]	ggtccaagag tgtccttcta ccagctgagt catttcttac agtgtaaaga ggacaacccg	2640
[0621]	gactttgaag gcgtggattg tgcaatcttt gaatcccat acccgatgac aatggcgctc	2700
[0622]	tctgttctag taactataga aatgtgtaac gccctcaaca gcttgtccga aaaccagtcc	2760
[0623]	ttgtgagga tgccccctg ggagaacatc tggctcgtgg gctccatctg cctgtccatg	2820
[0624]	tactccact tcctgacct ctatgtcgaa cccttgccac tcatcttcca gatcacaccg	2880
[0625]	ctgaacgtga cccagtggct gatgggtgctg aaaatctcct tgcccgtgat tctcatggat	2940
[0626]	gagacgtca agtttgggc ccgcaactac ctggaacctg caatactgga gtag	2994

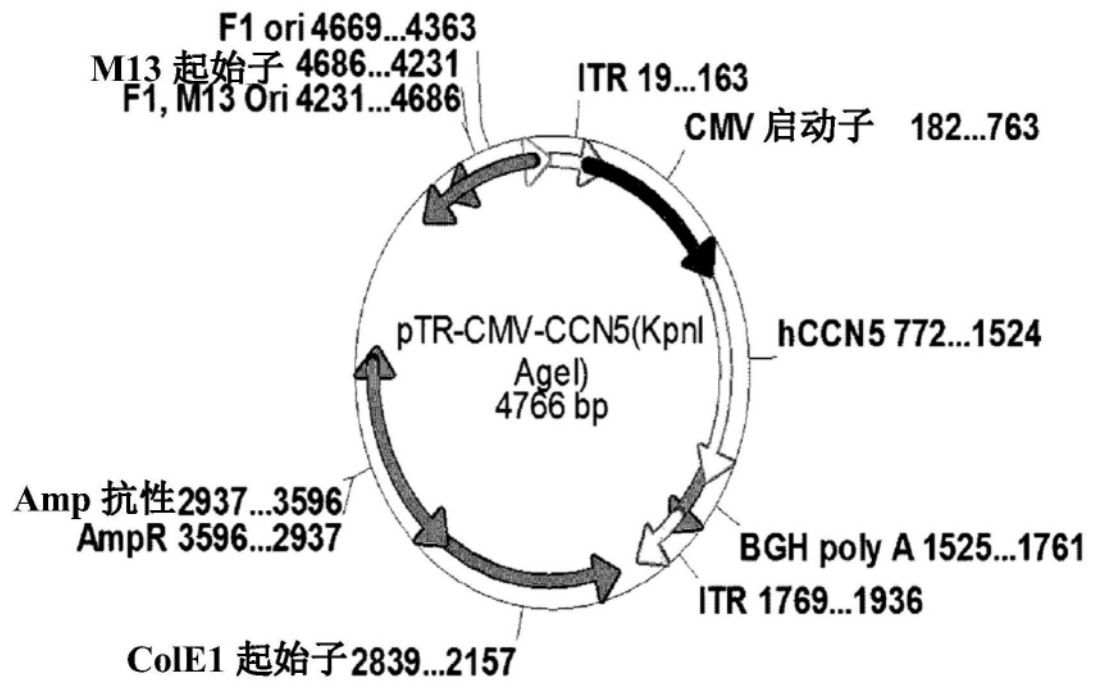


图1

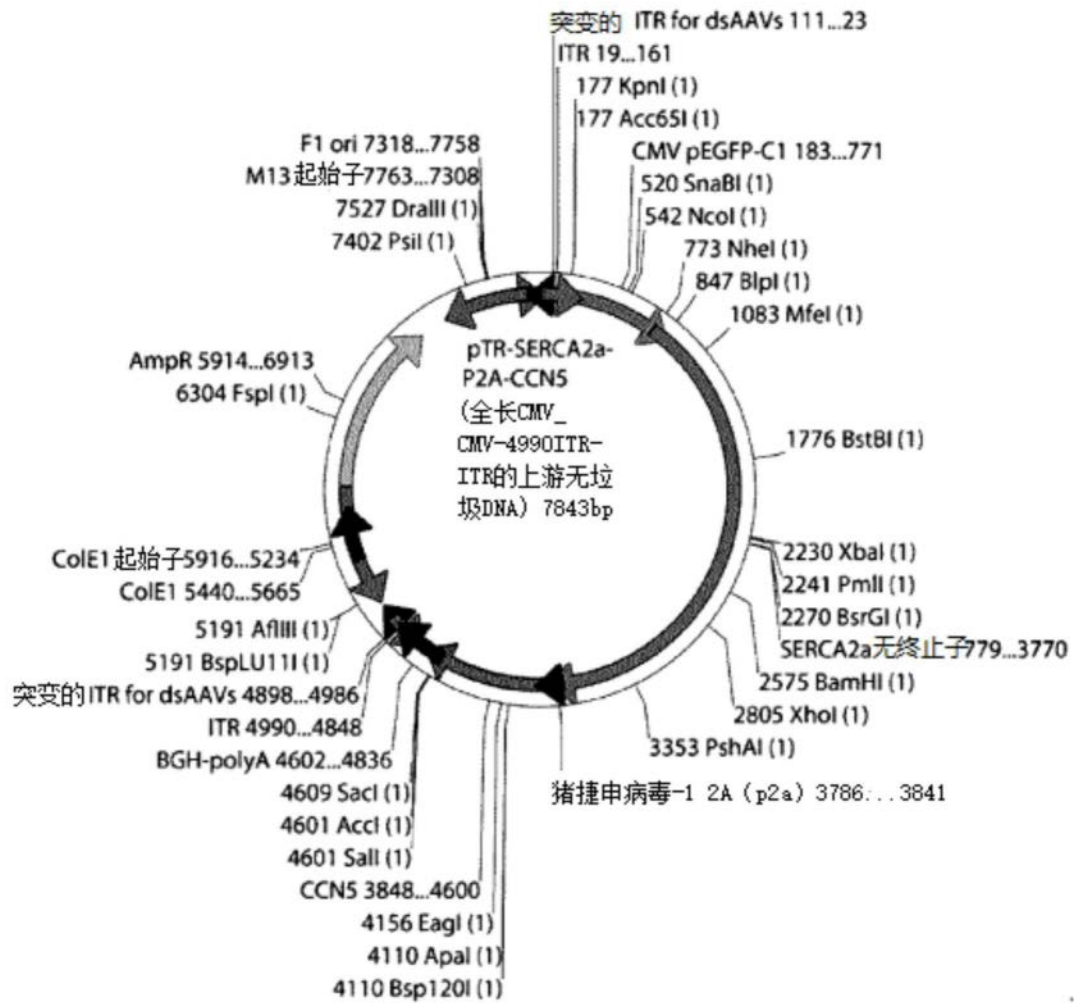


图2



图3a

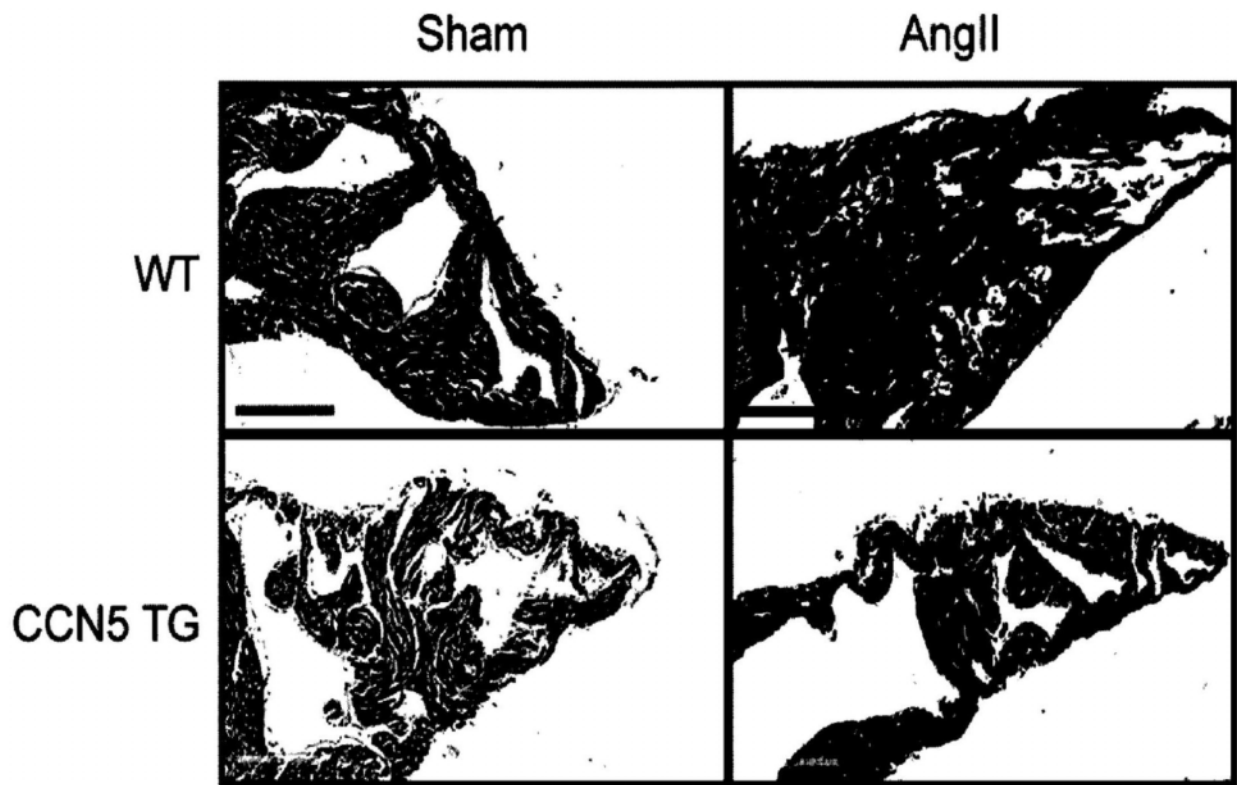


图3b

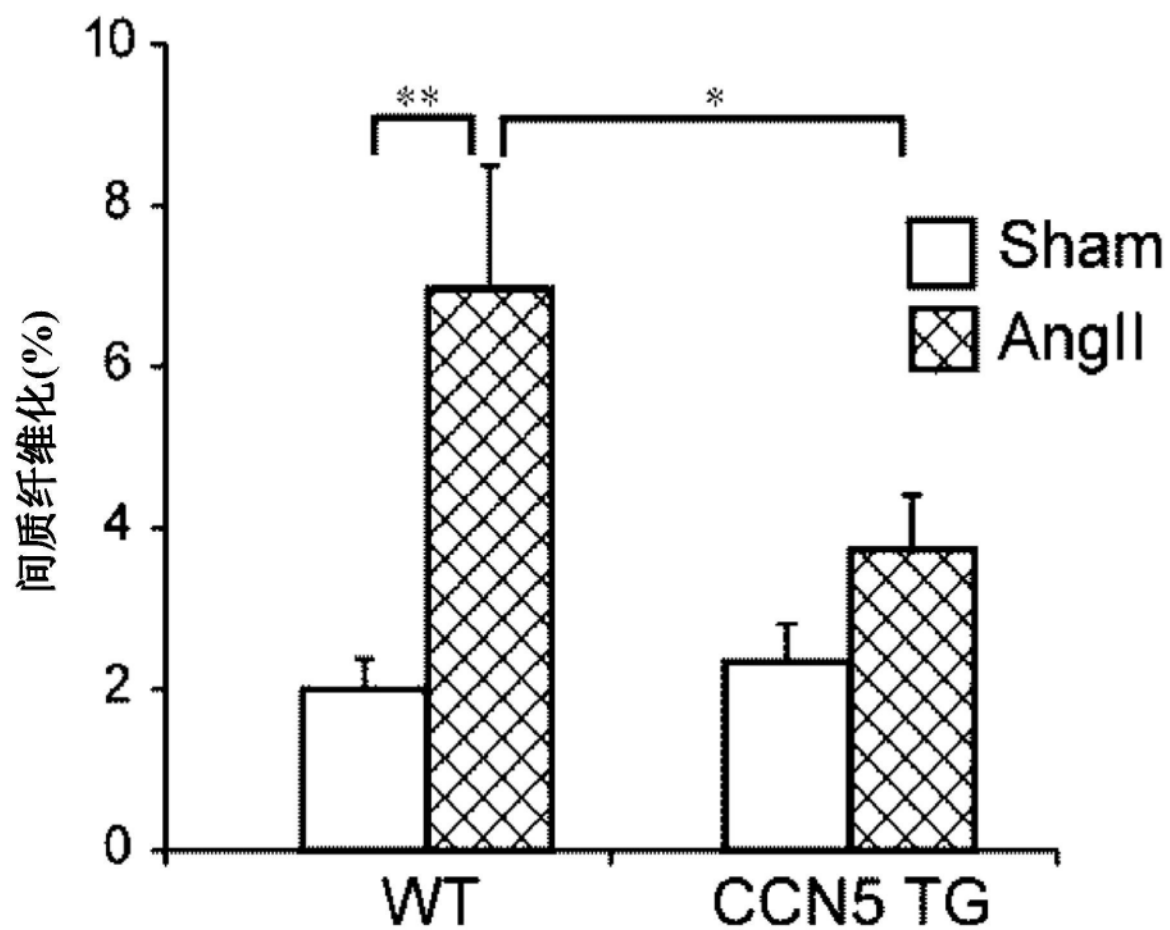


图3c

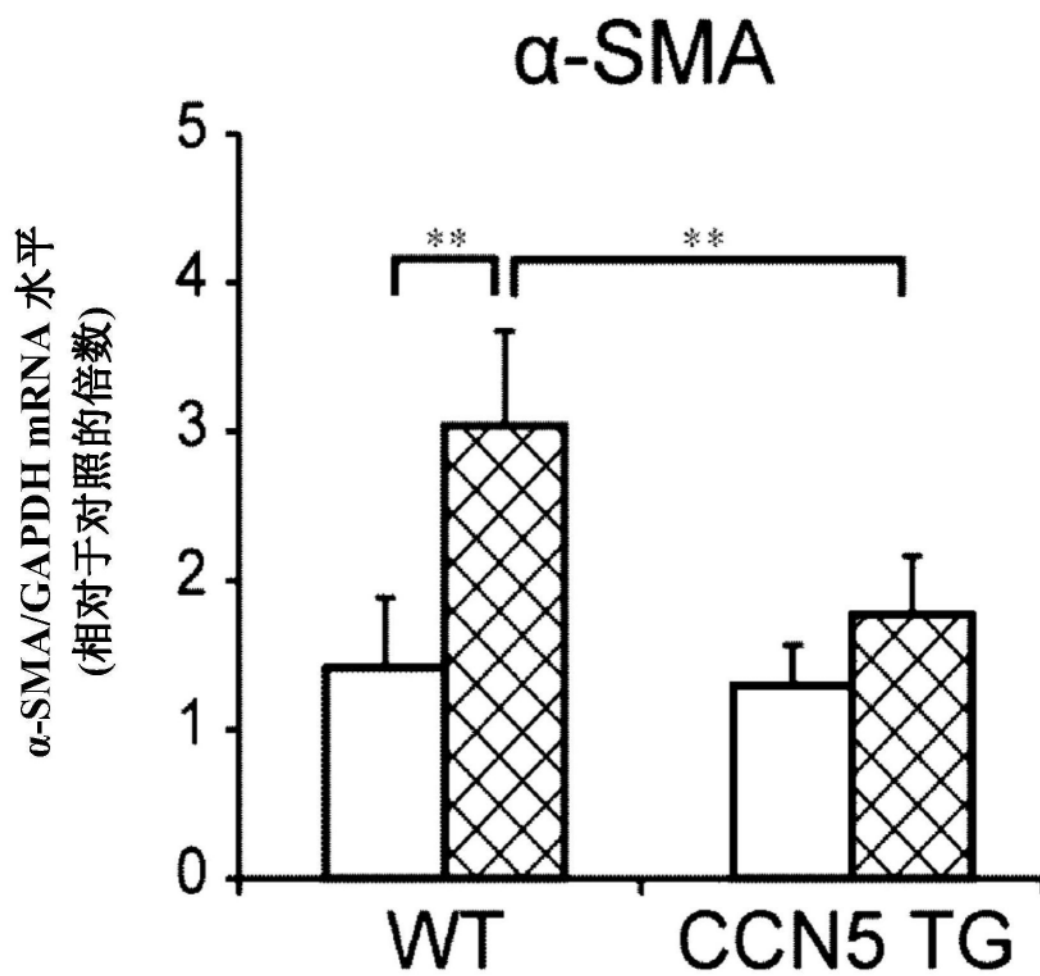


图3d

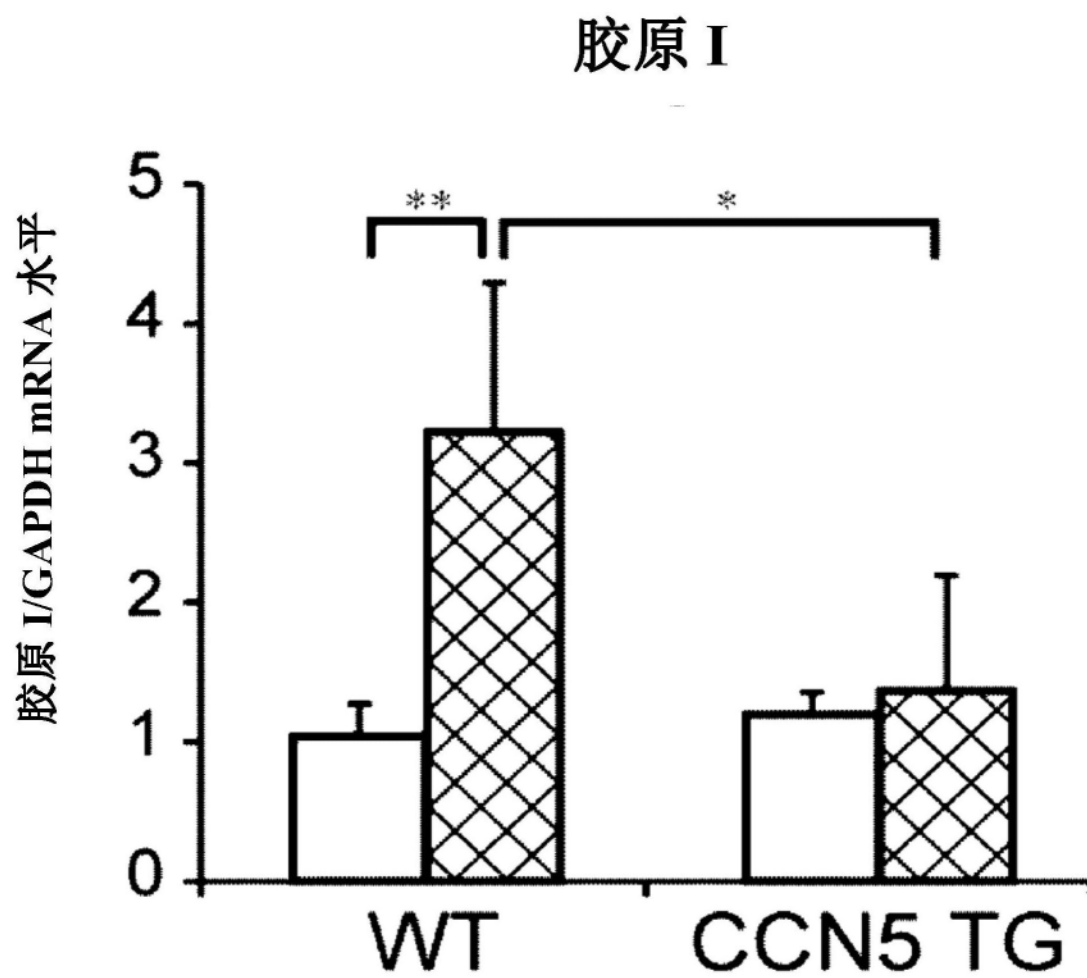


图3e

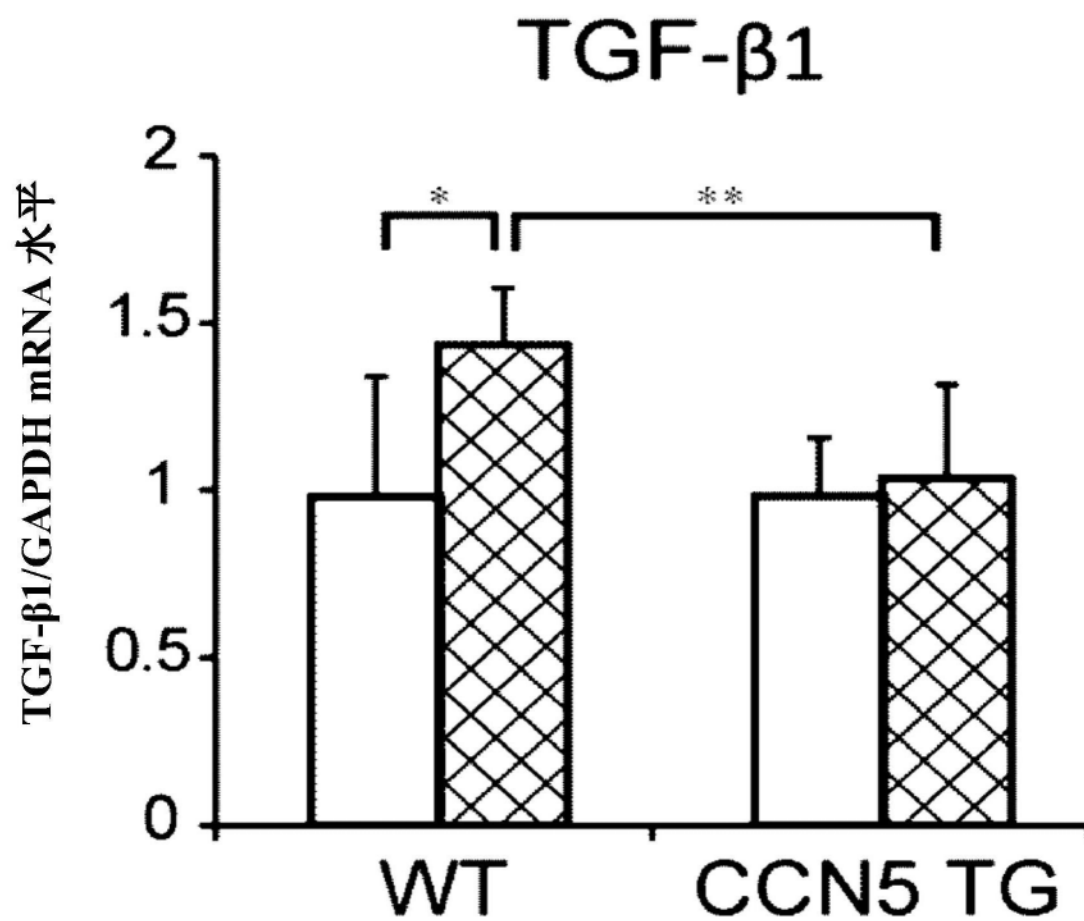


图3f

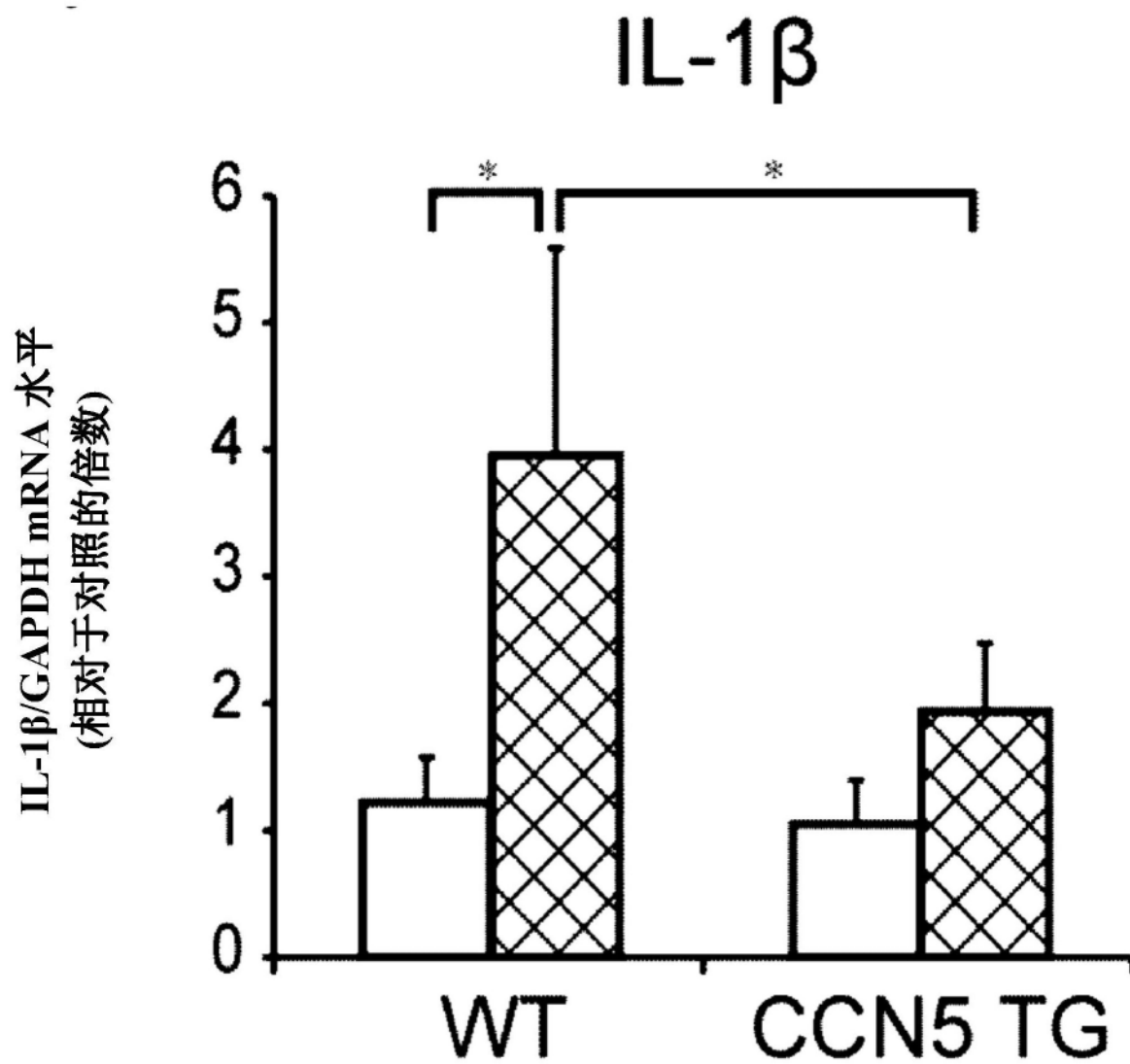


图3g

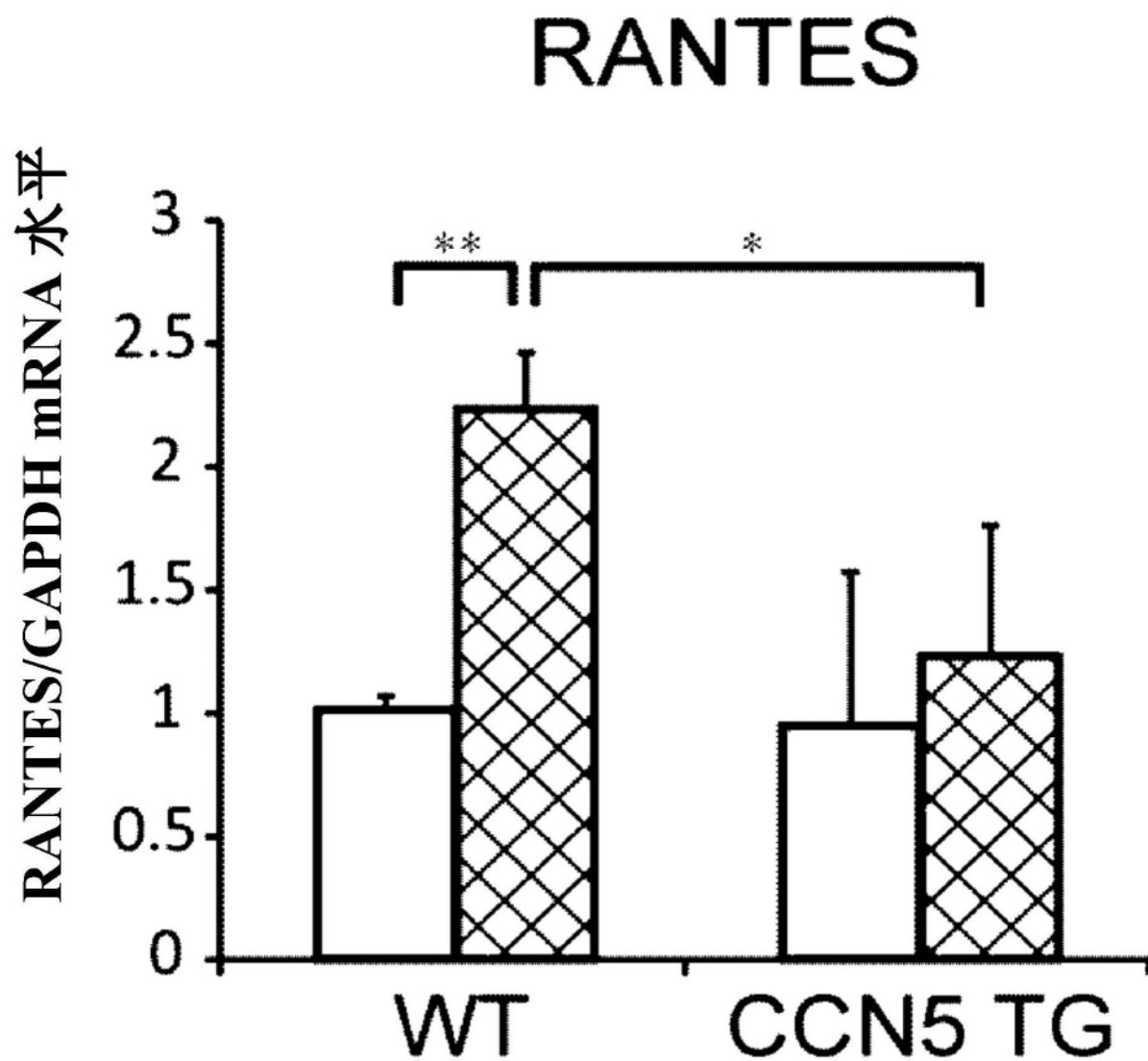


图3h

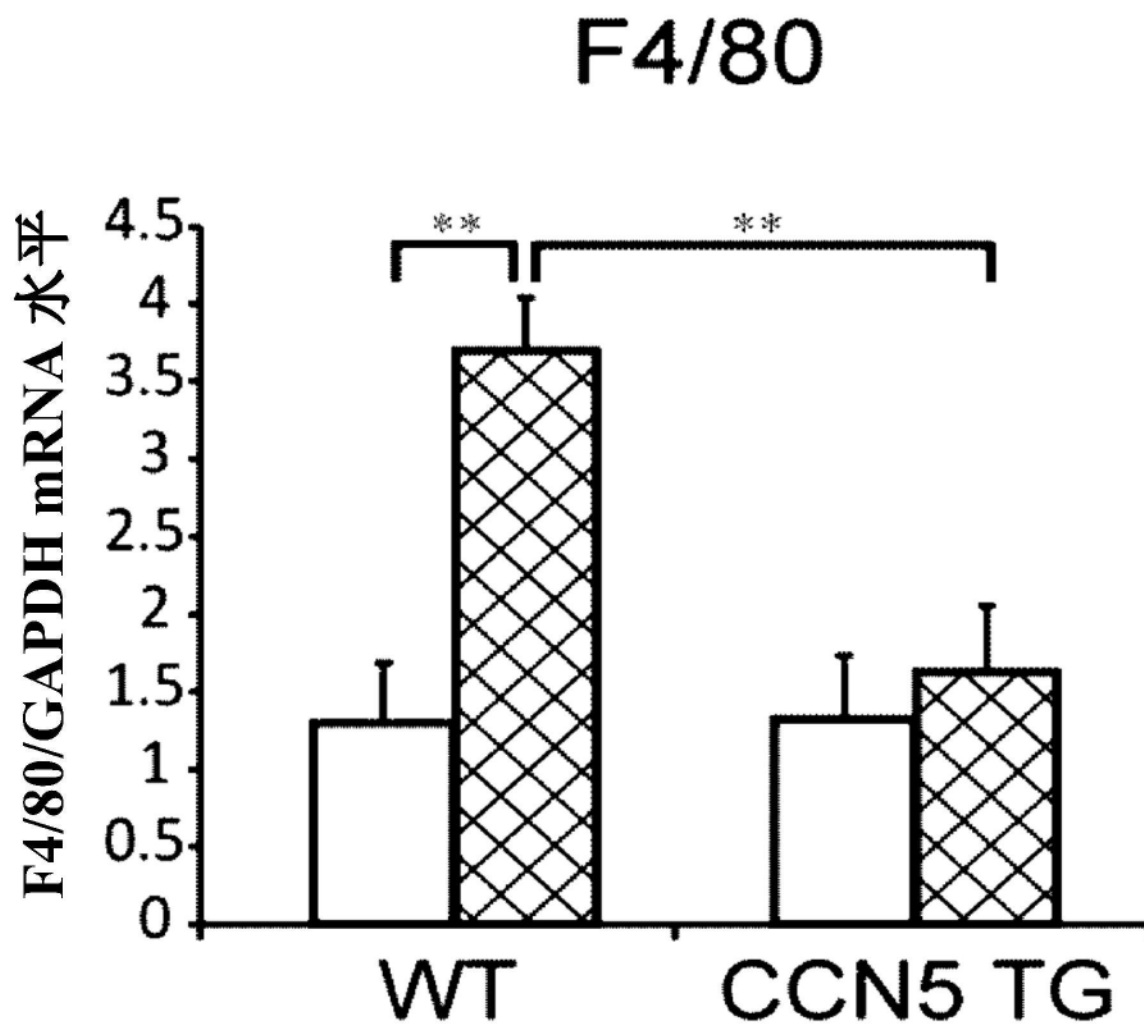


图3i

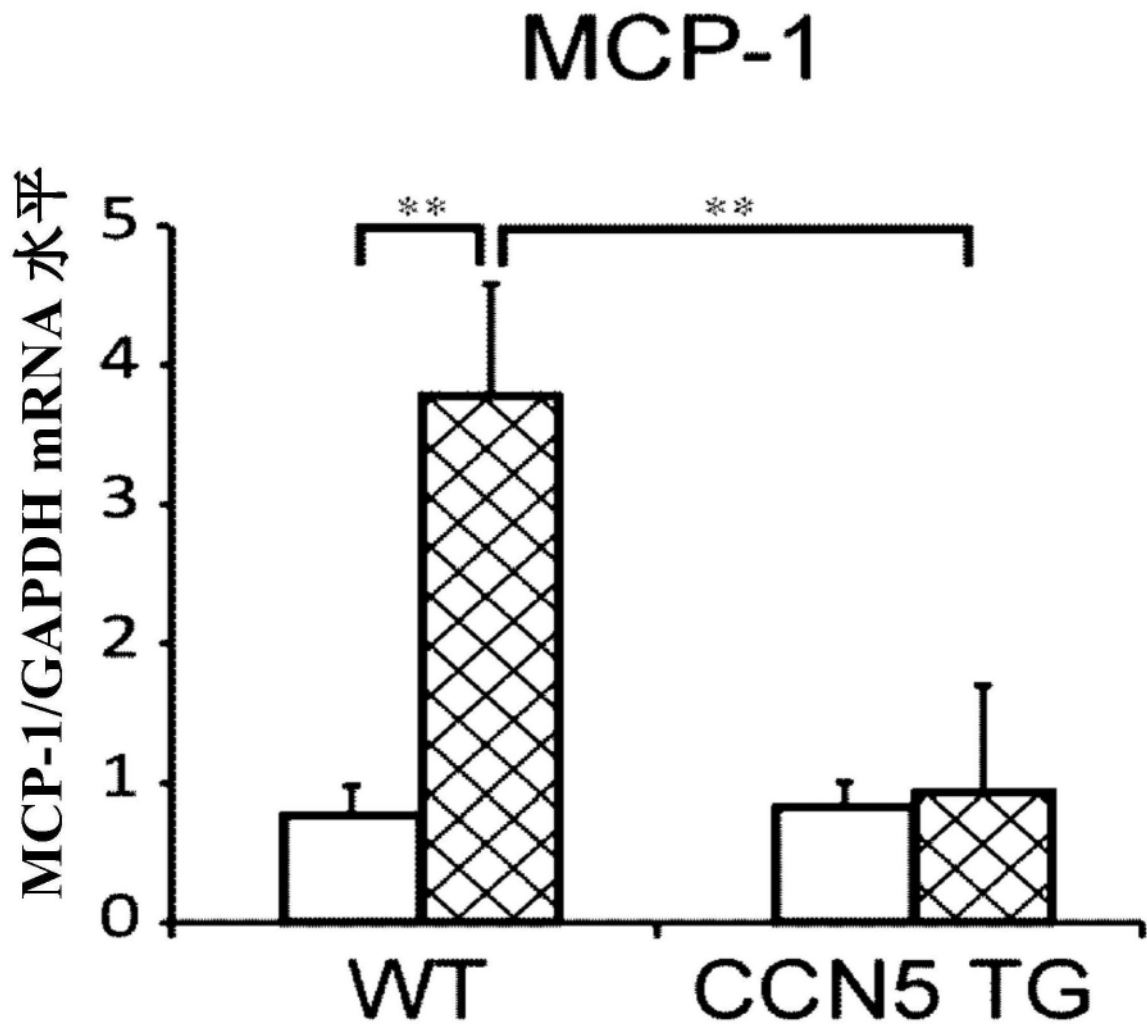


图3j



图4a

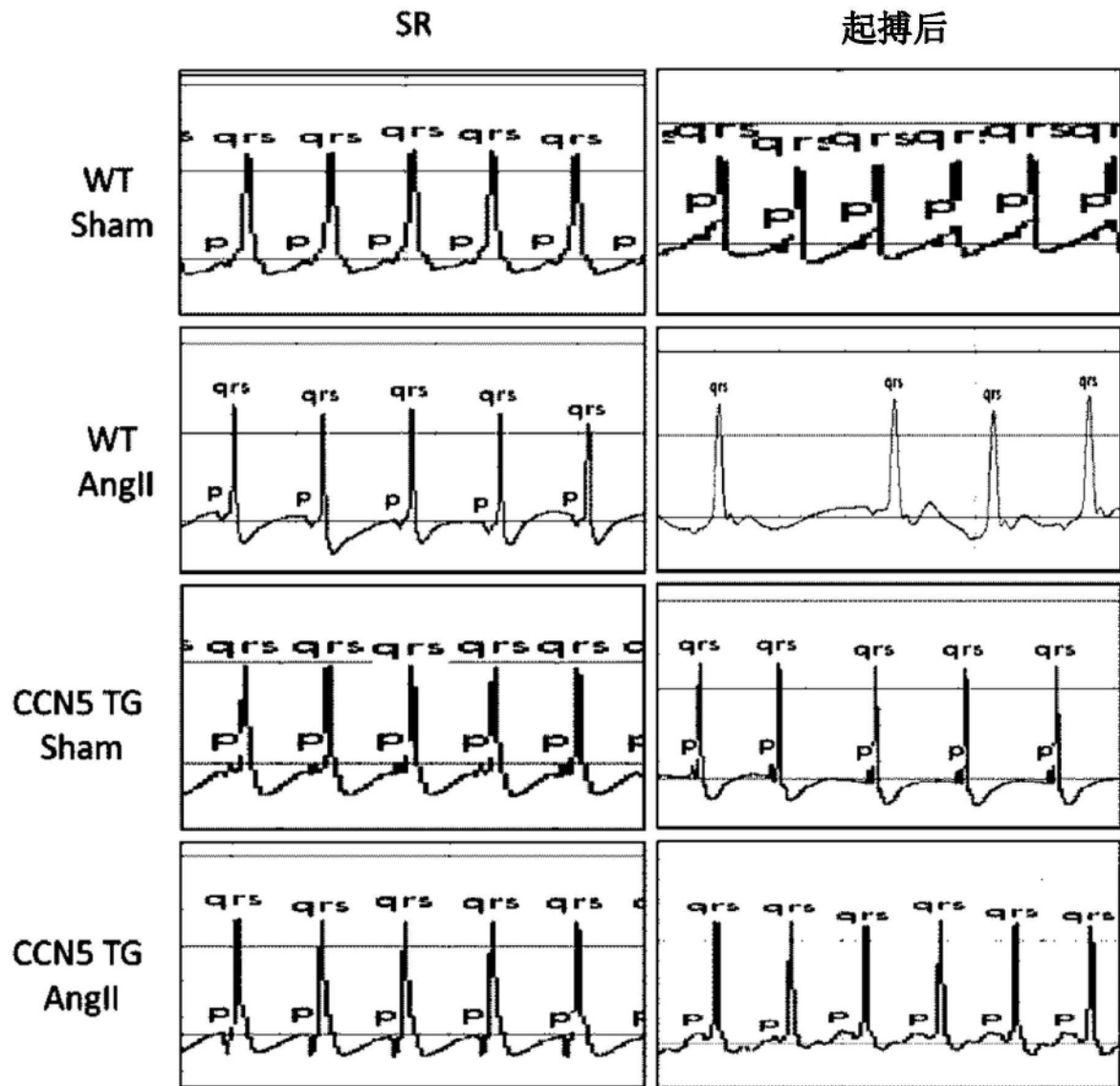


图4b

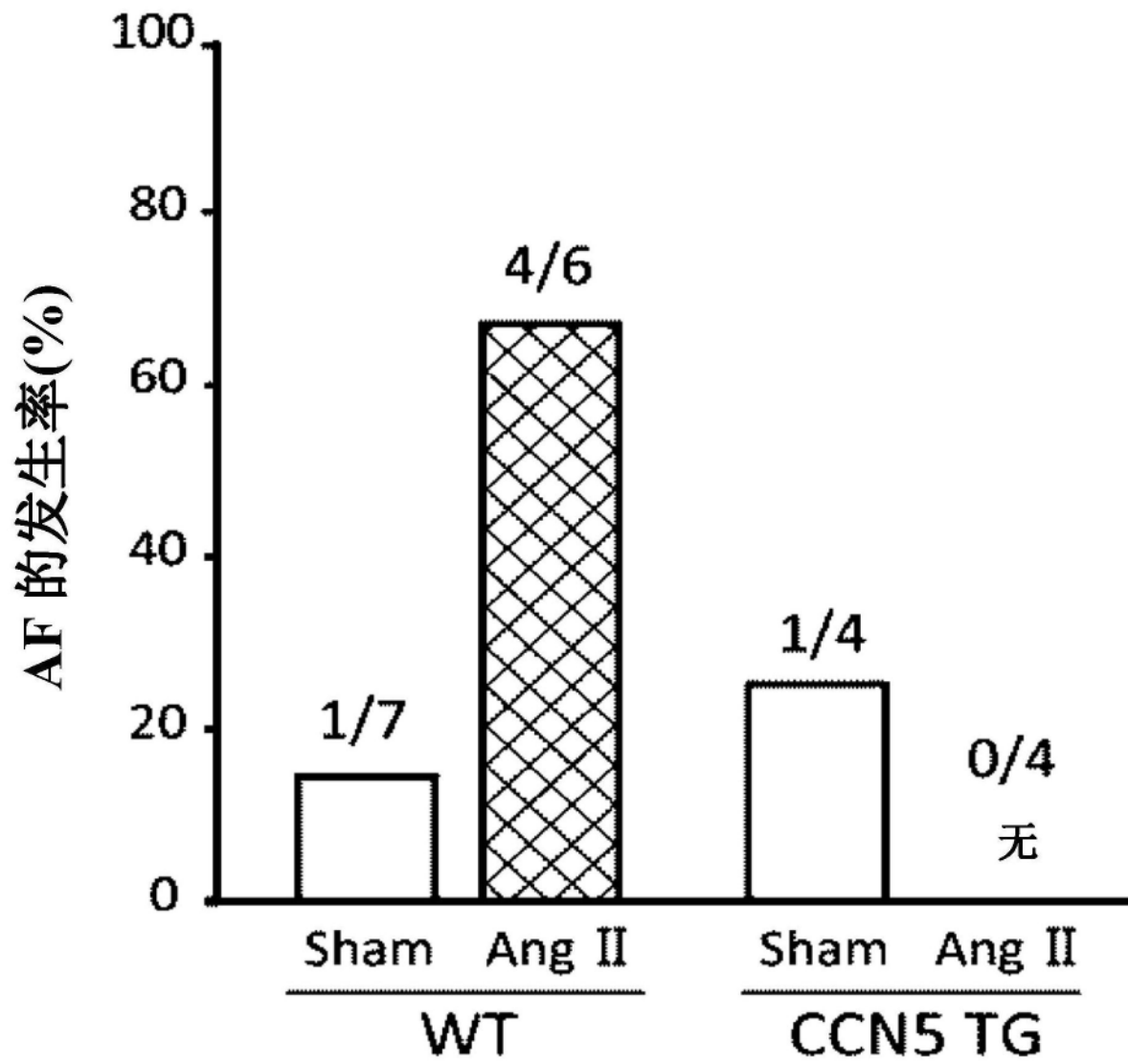


图4c



图5a

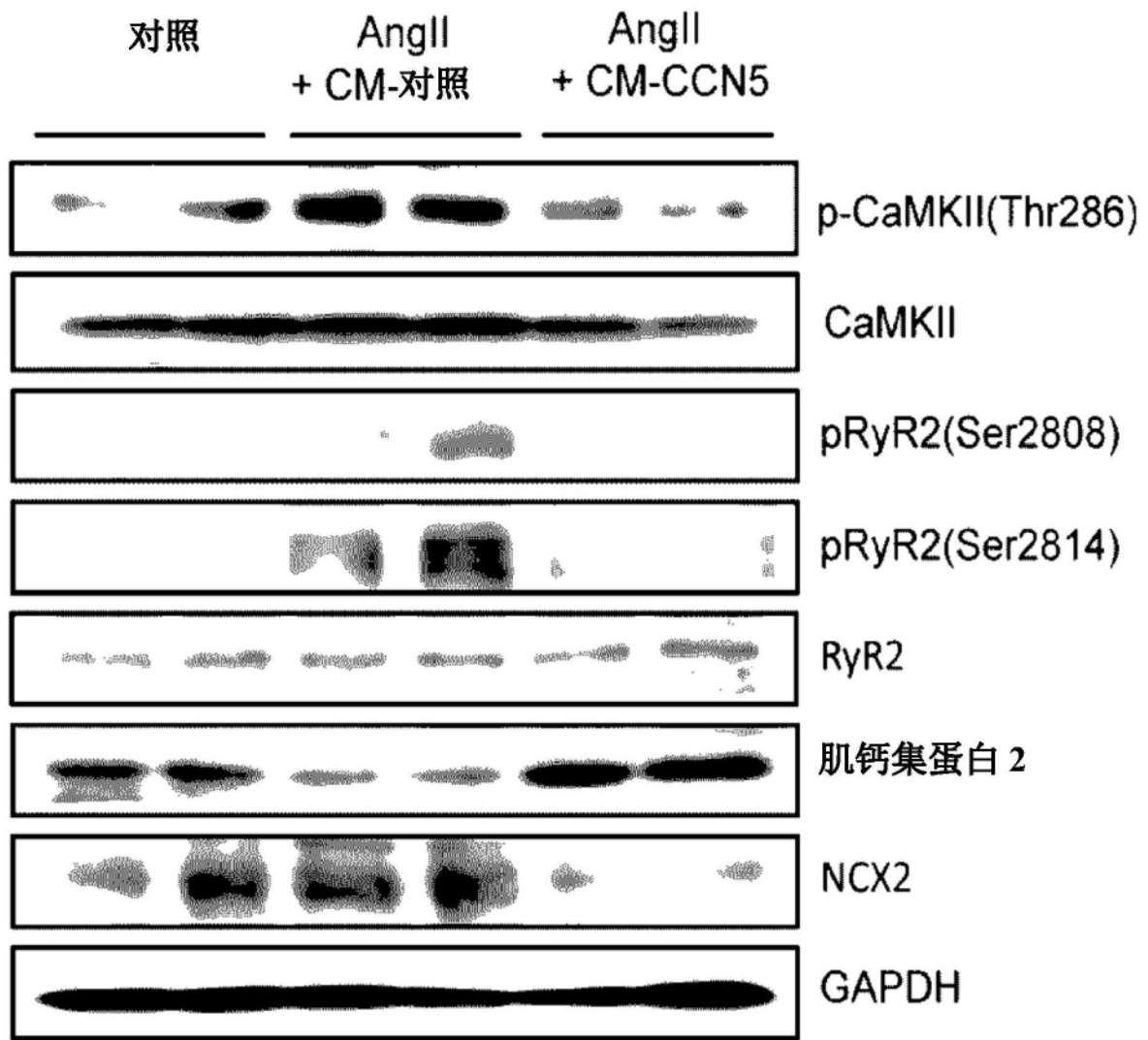


图5b

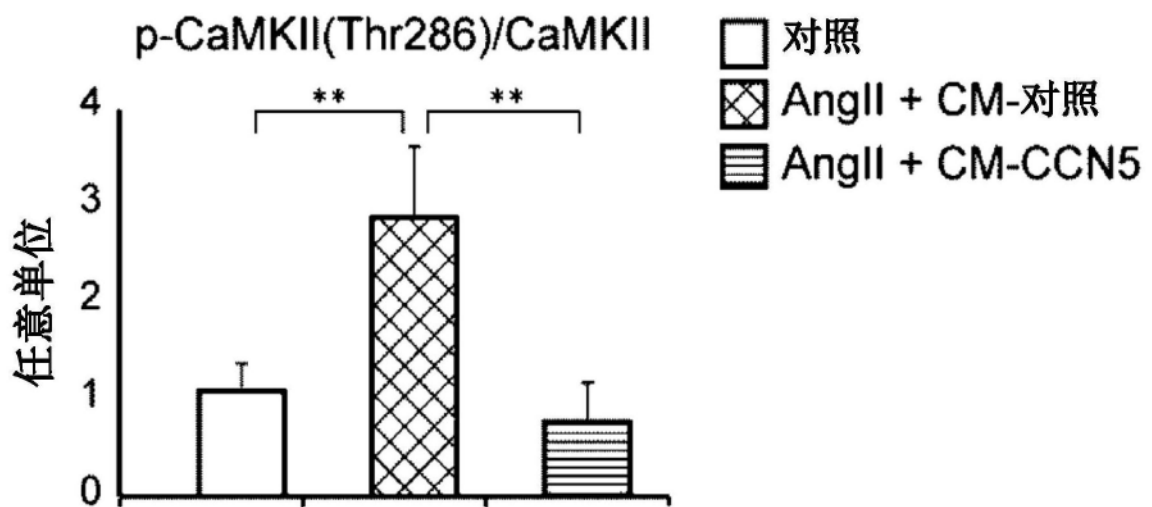


图5c

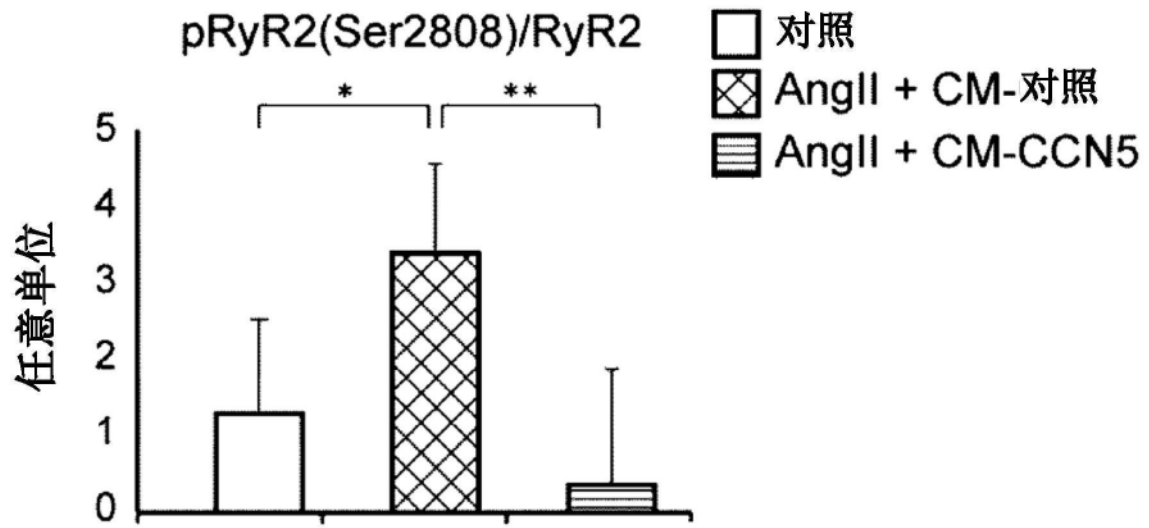


图5d

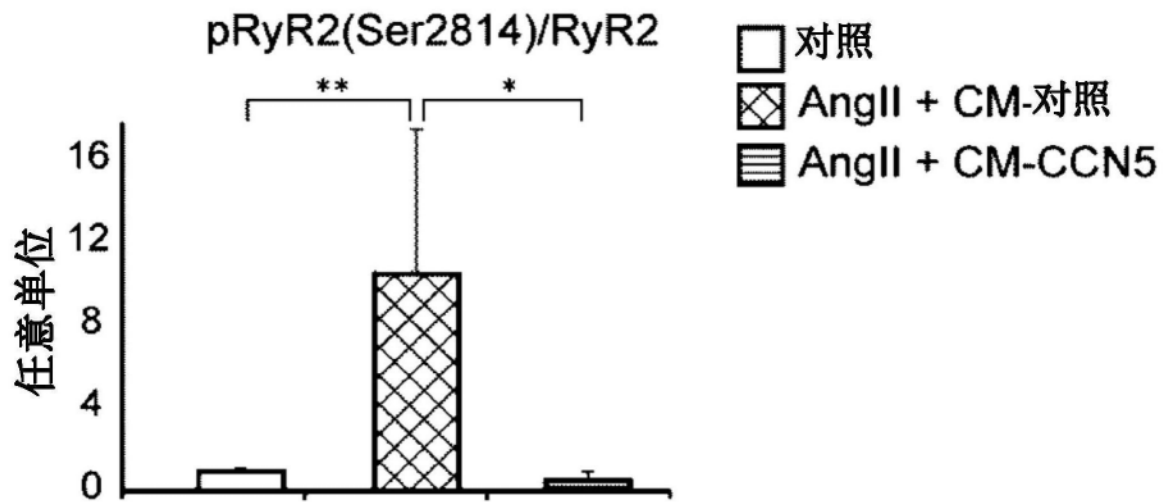


图5e

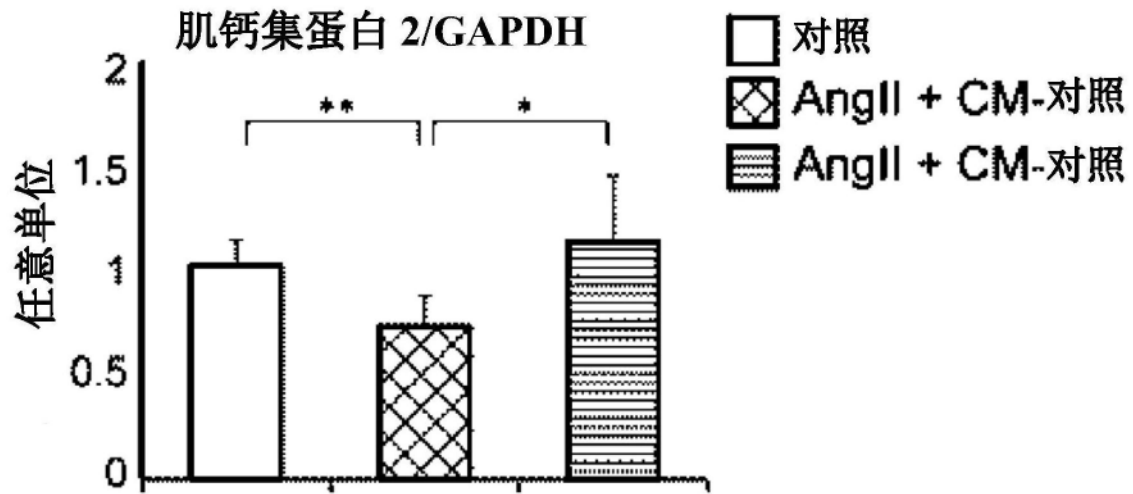


图5f

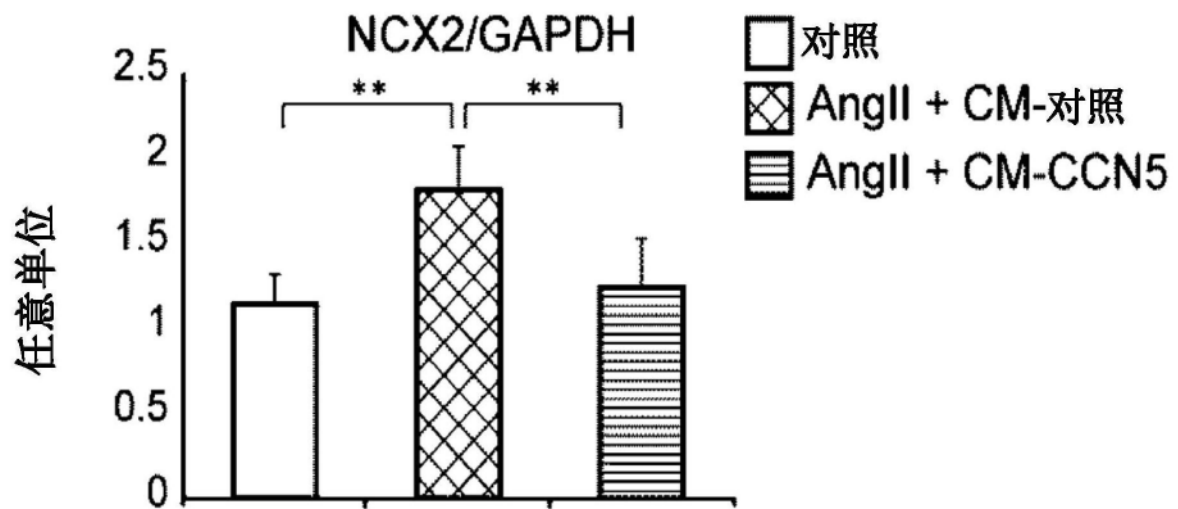


图5g

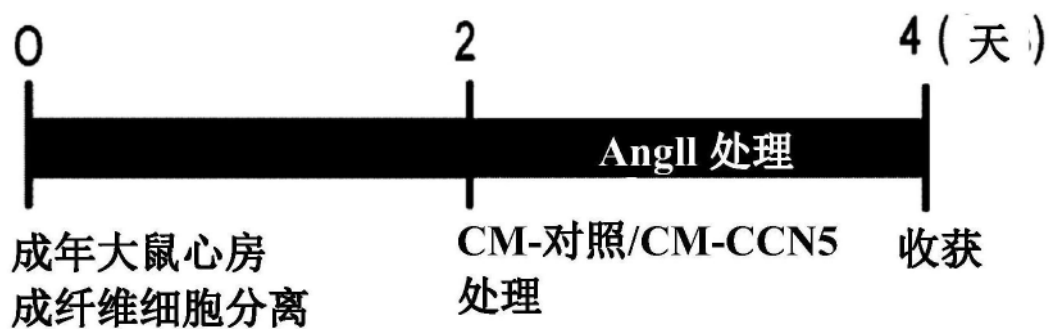


图6a

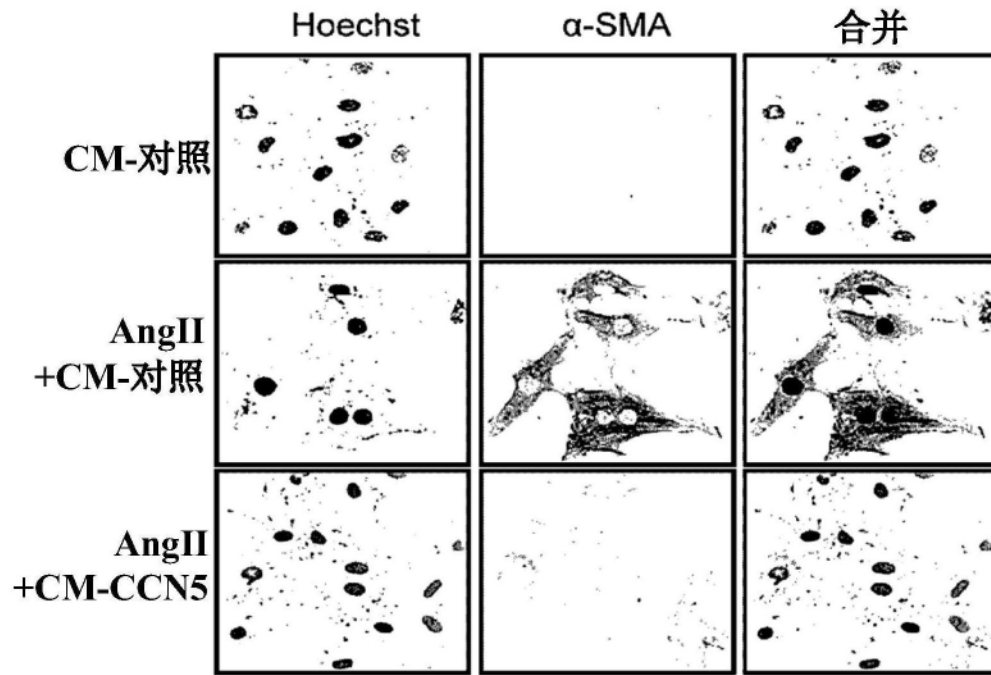


图6b

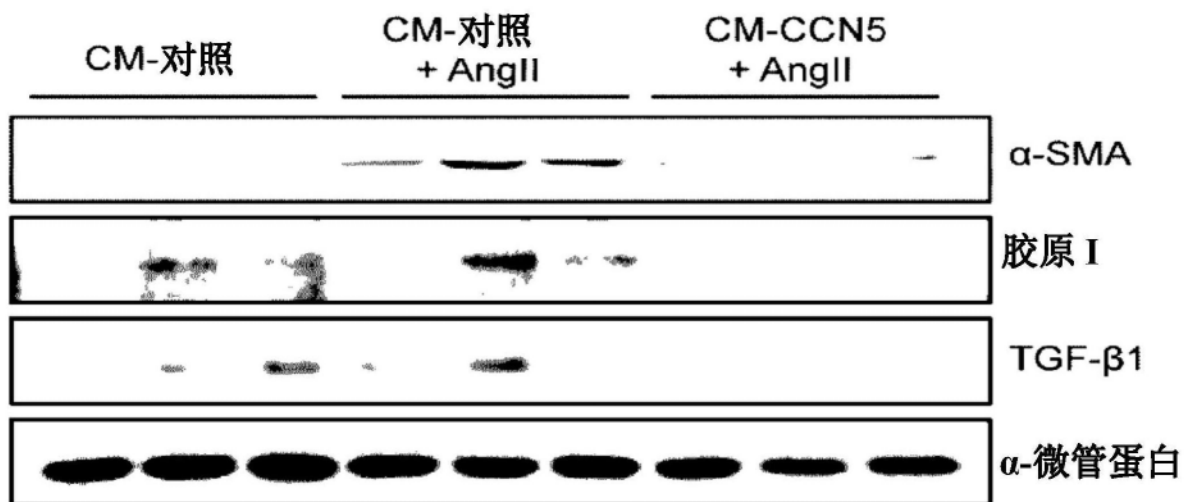


图6c

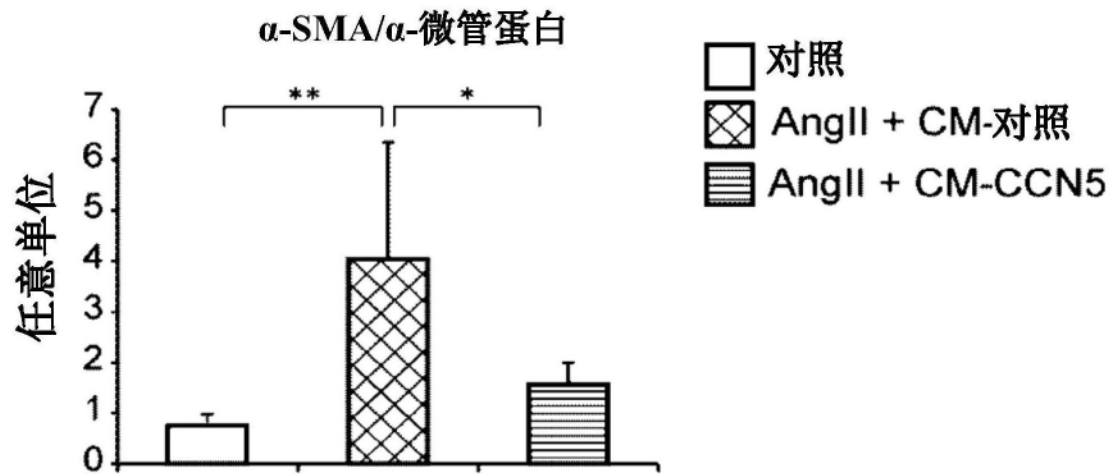


图6d

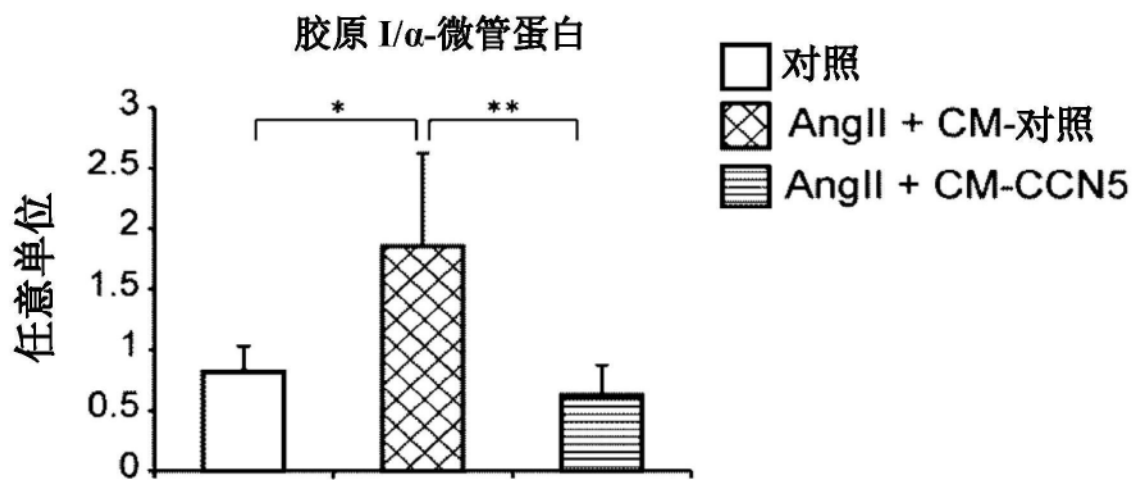


图6e

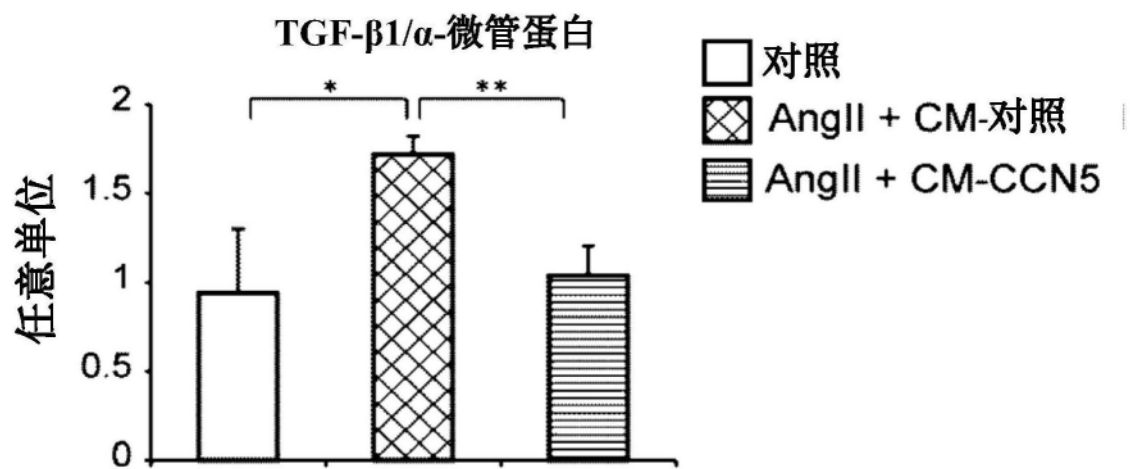


图6f

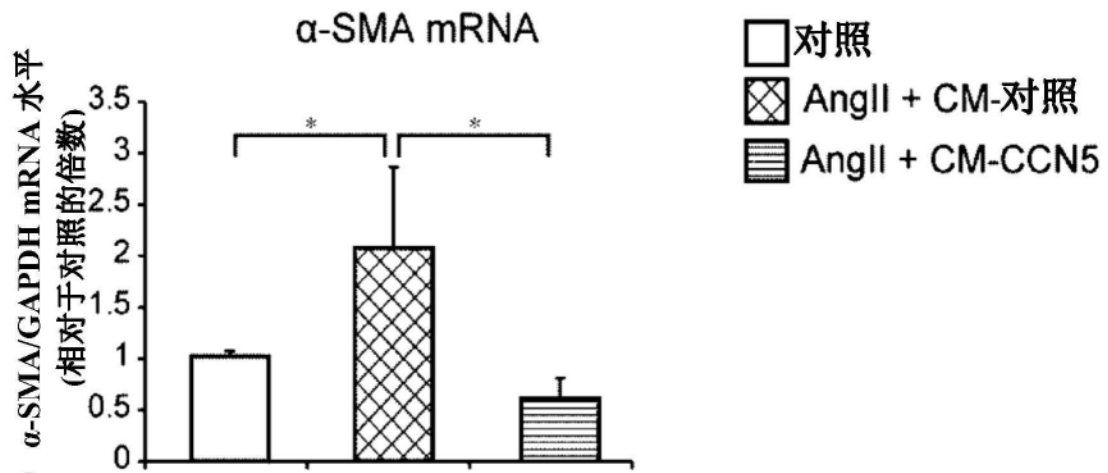


图6g

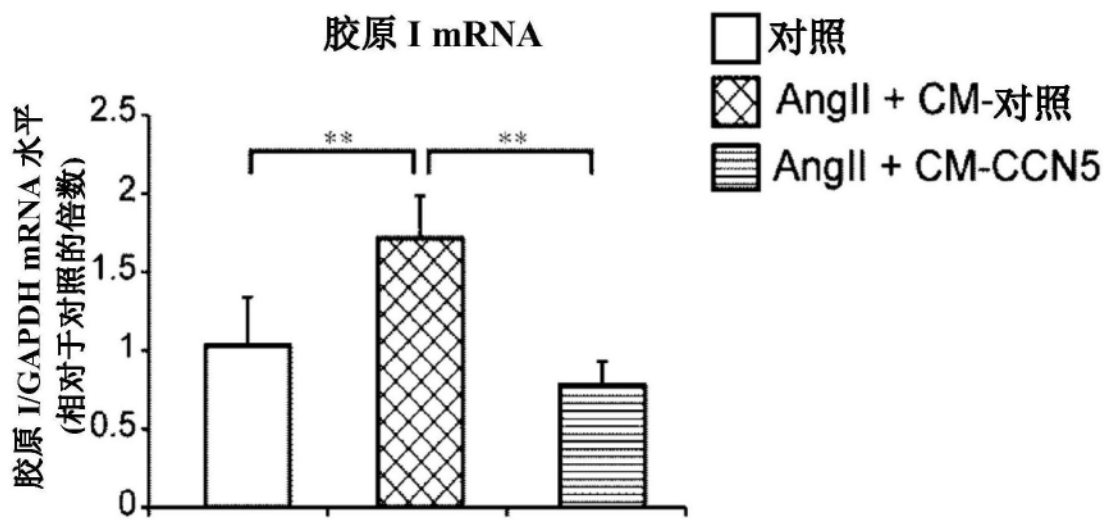


图6h

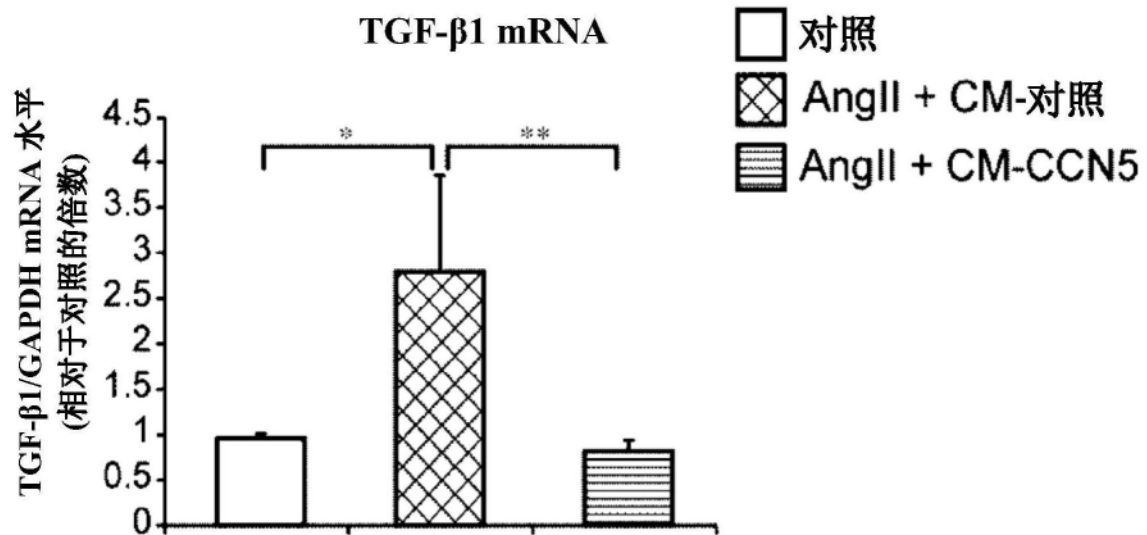


图6i

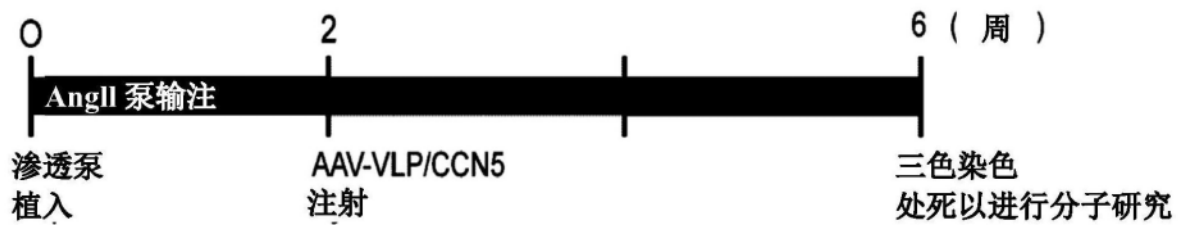


图7a

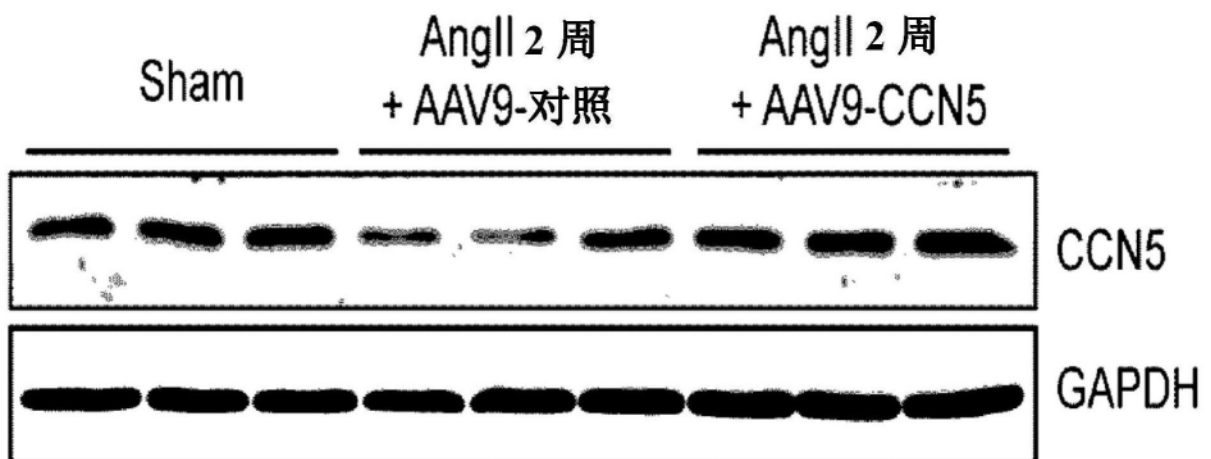


图7b

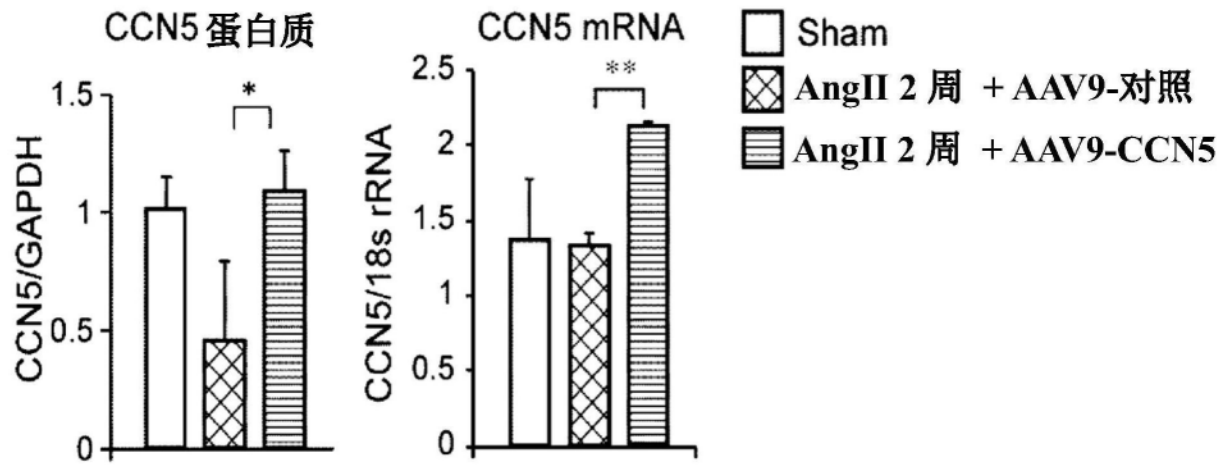


图7c

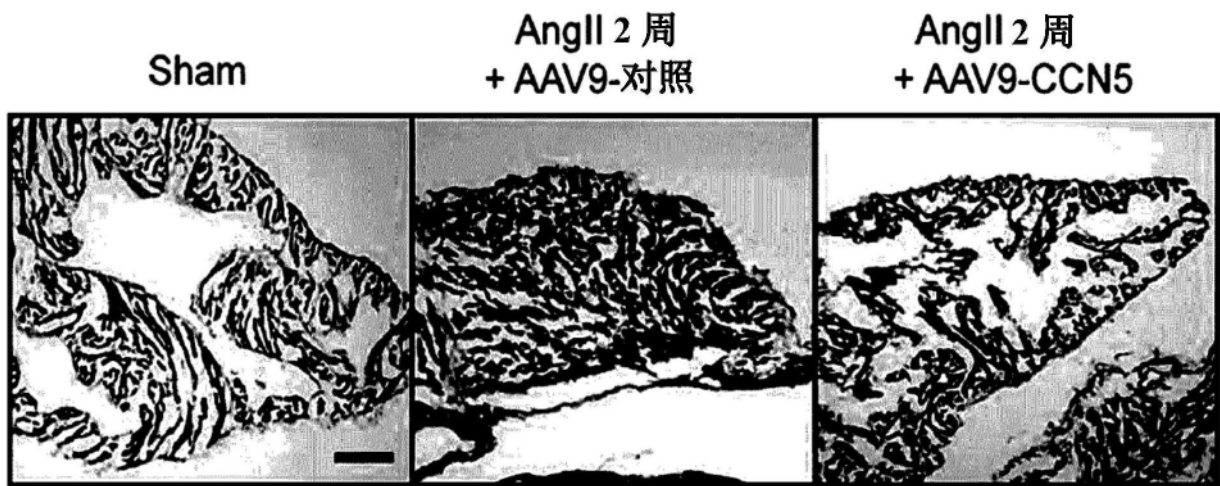


图7d

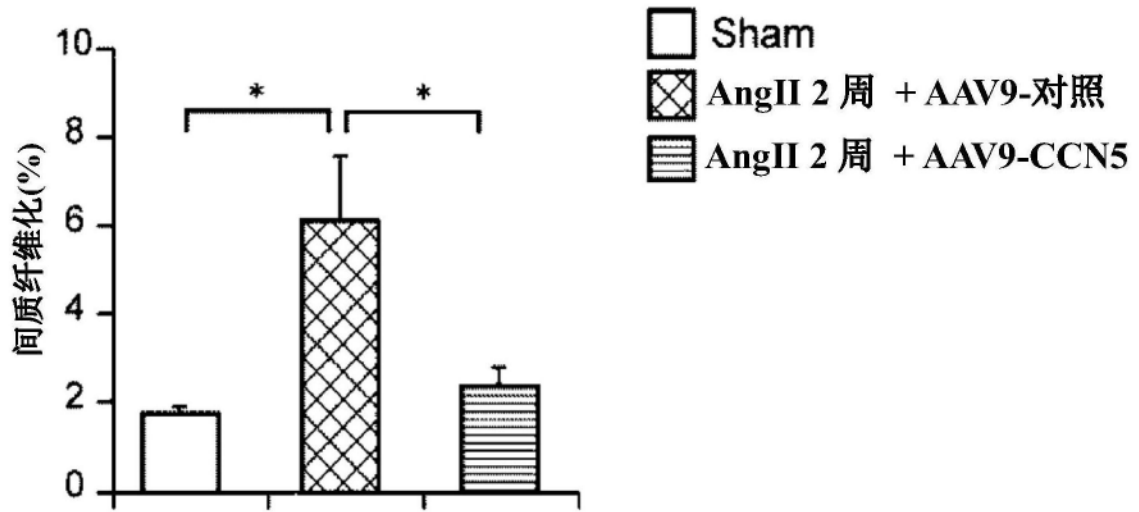


图7e

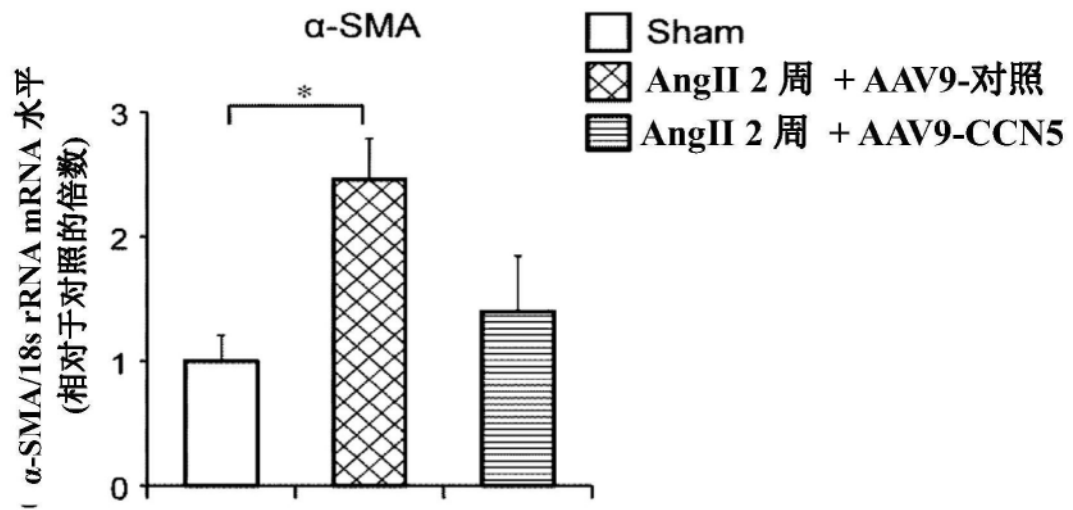


图7f

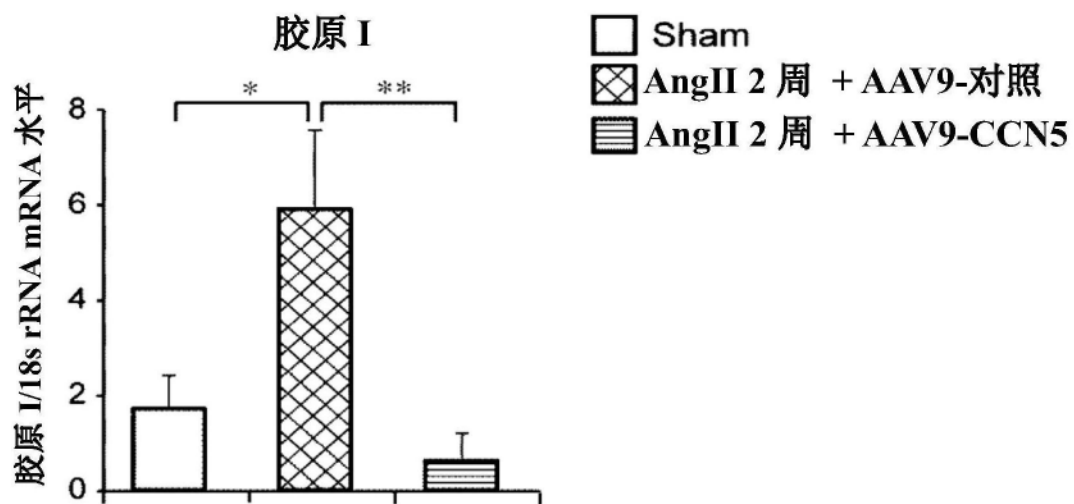


图7g

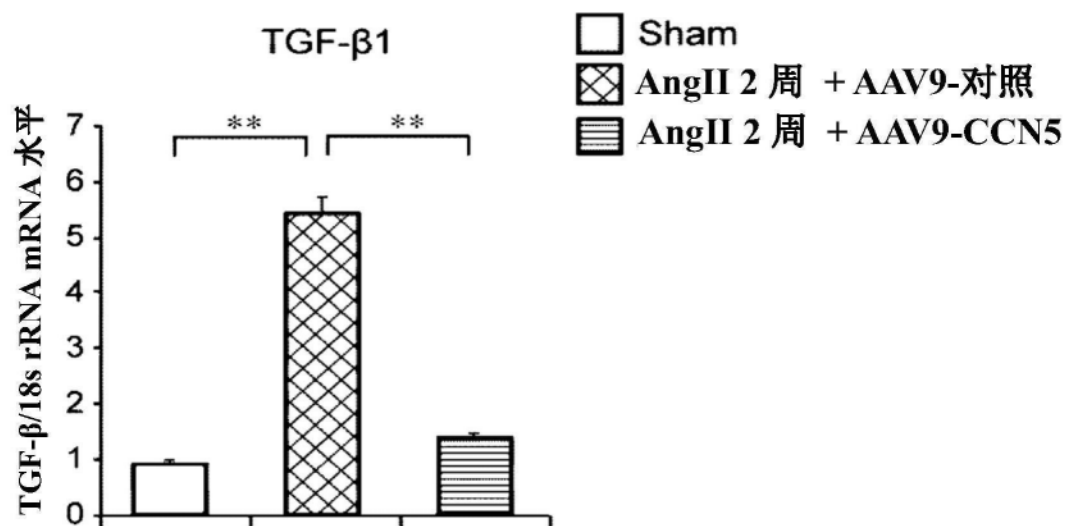


图7h

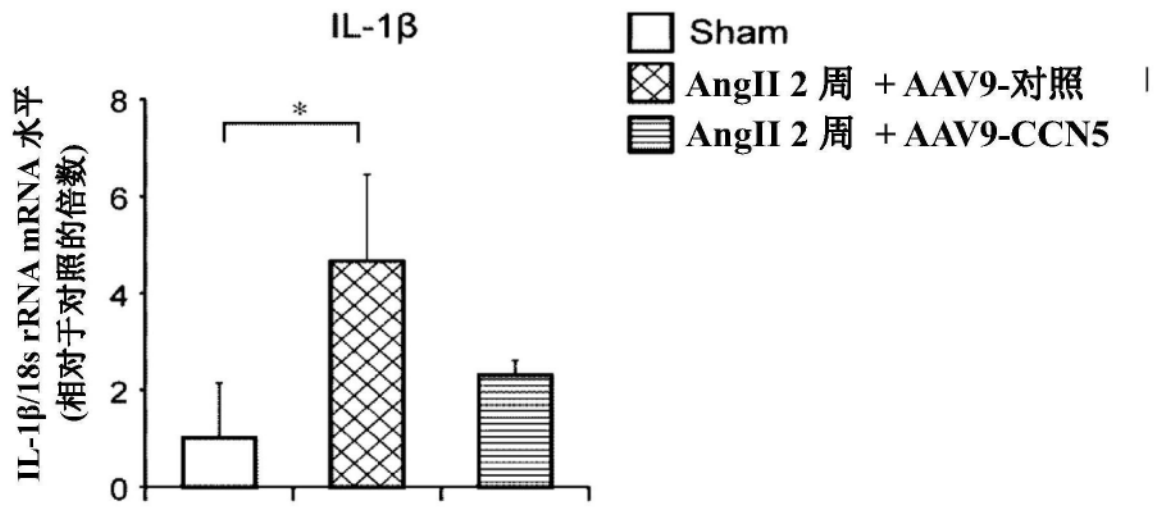


图7i

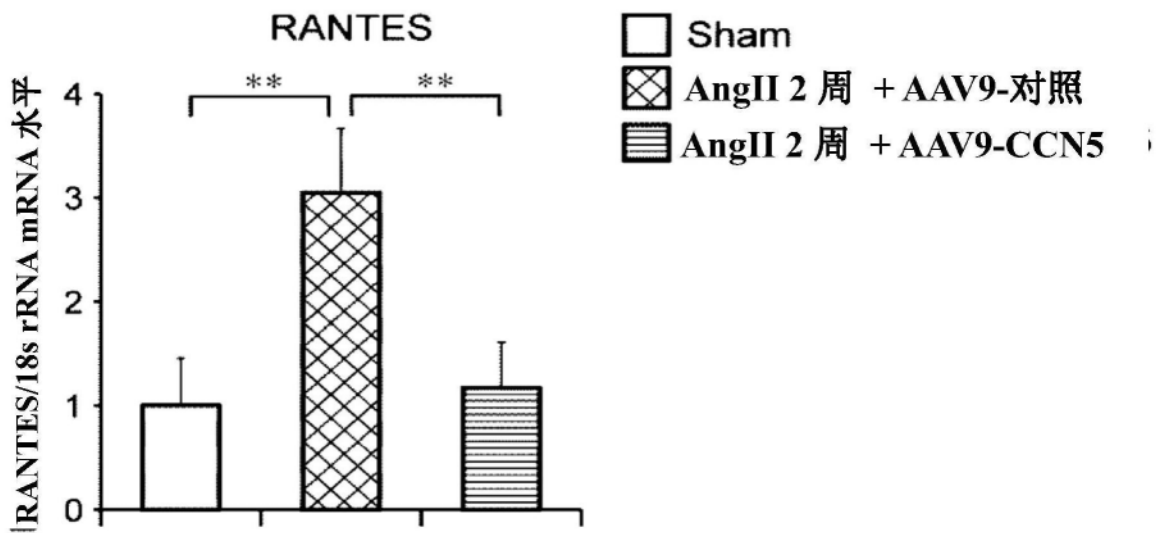


图7j

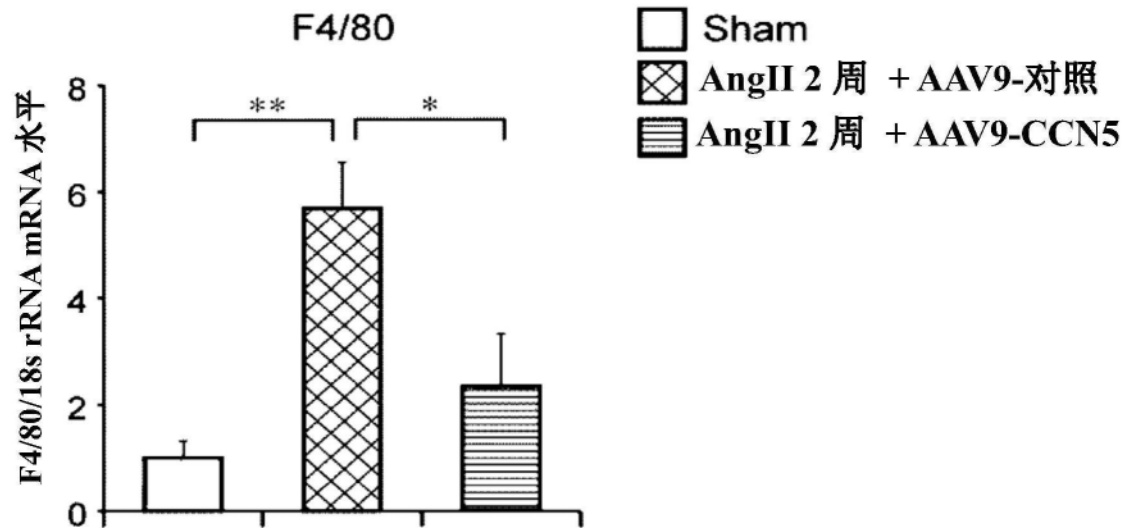


图7k

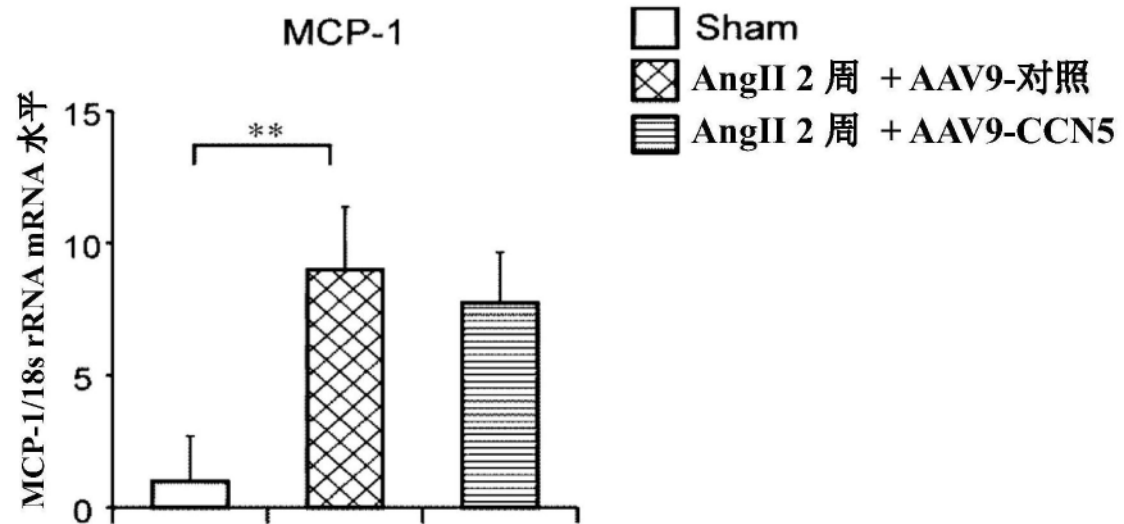


图7l

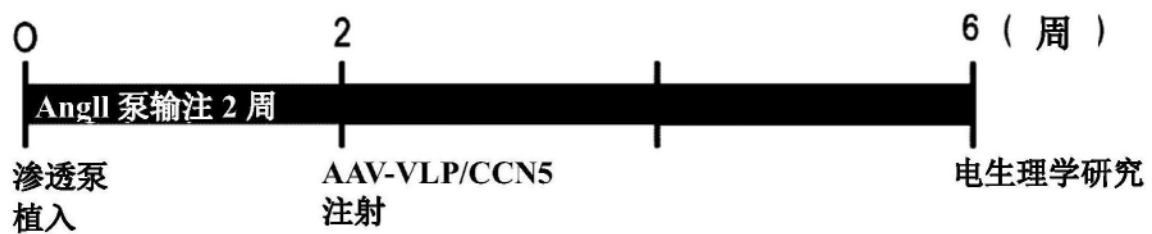


图8a

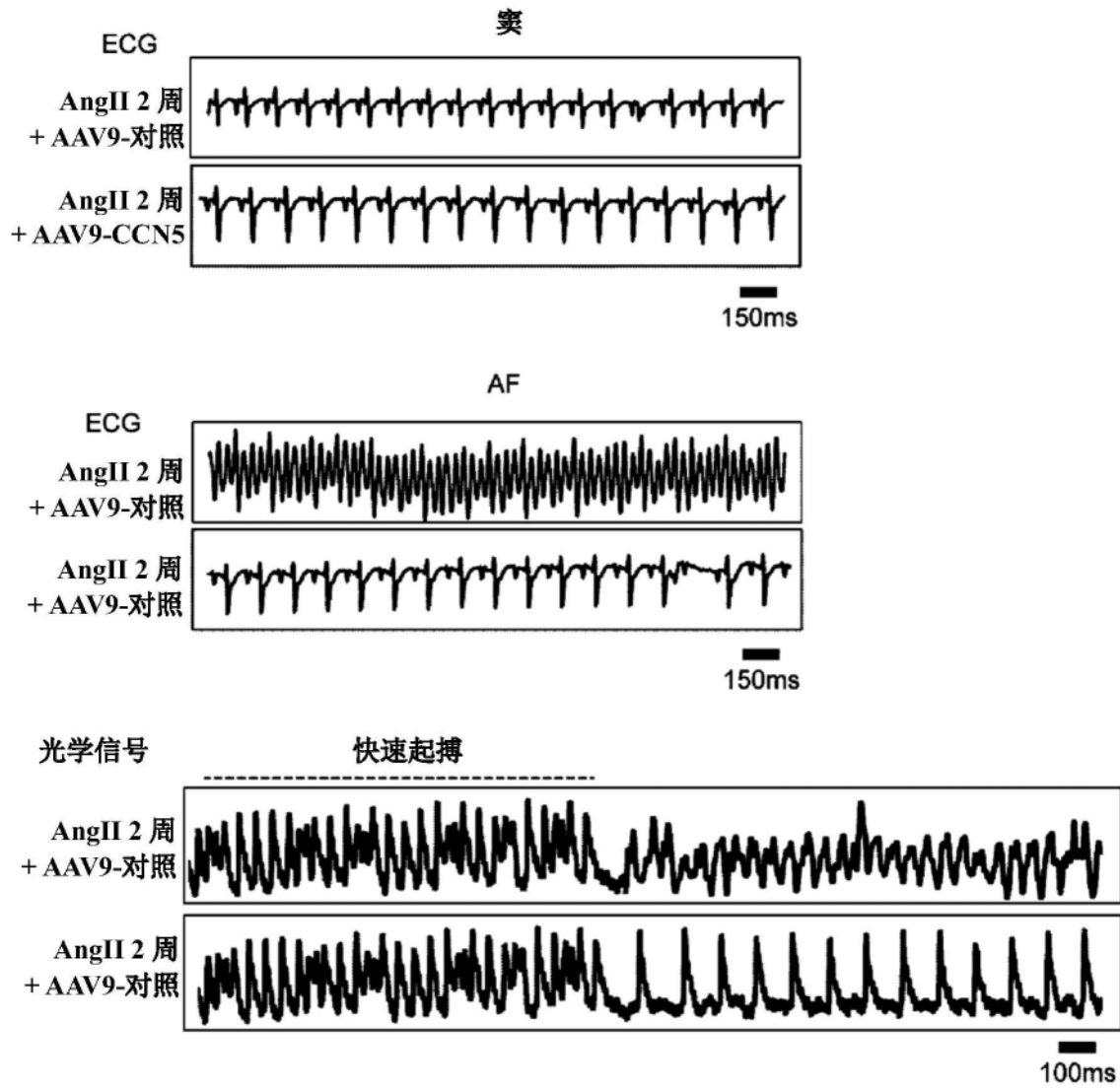


图8b

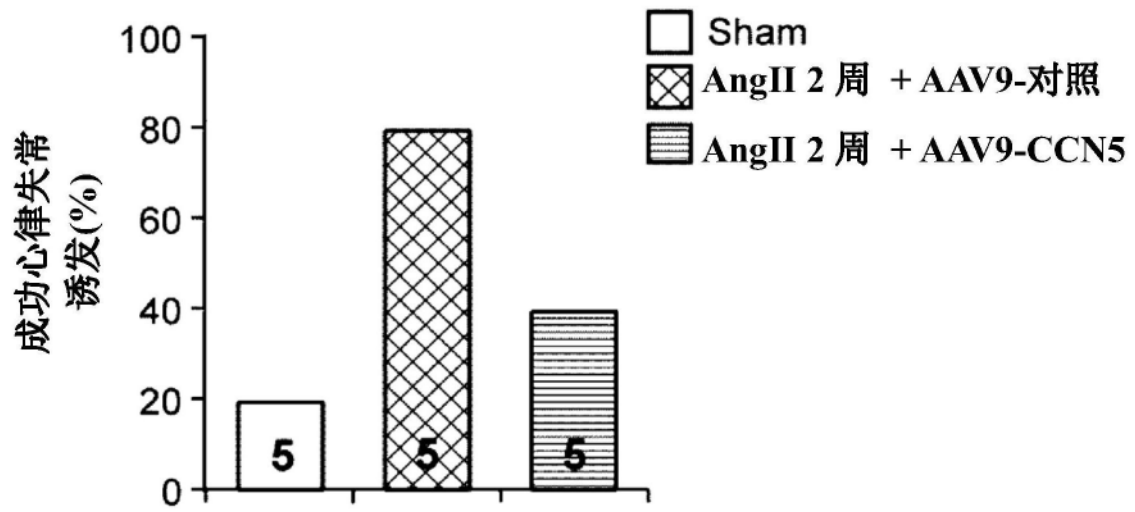


图8c

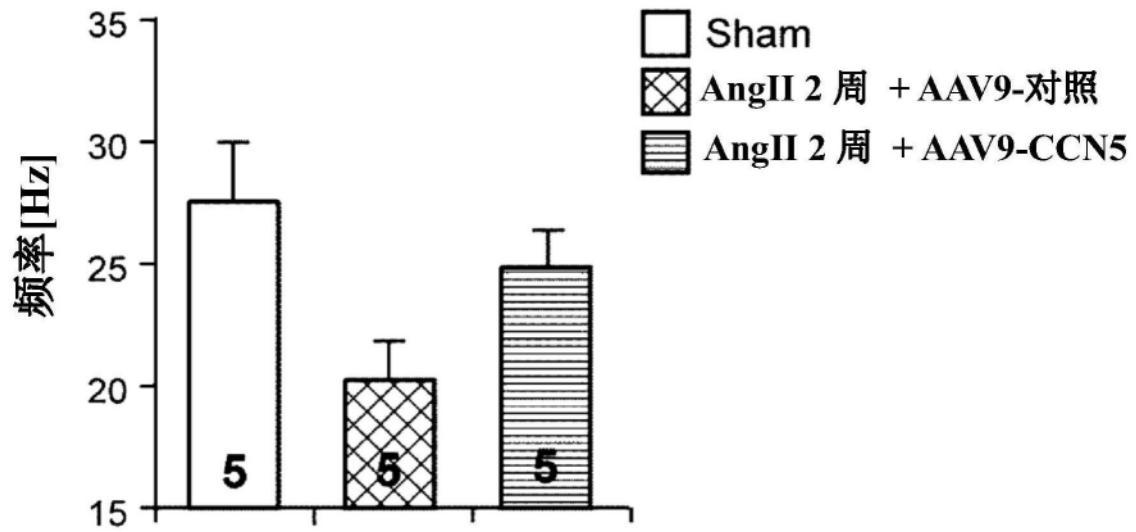


图8d

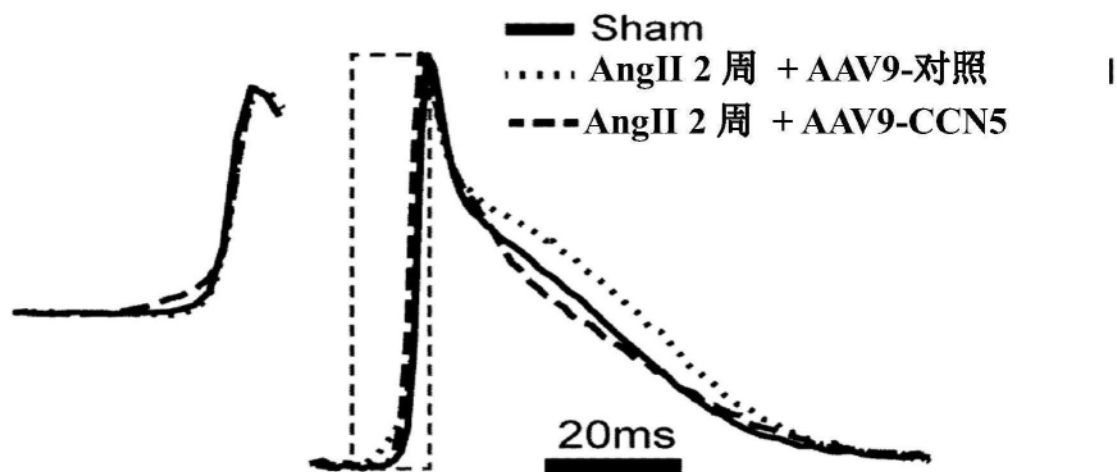


图8e

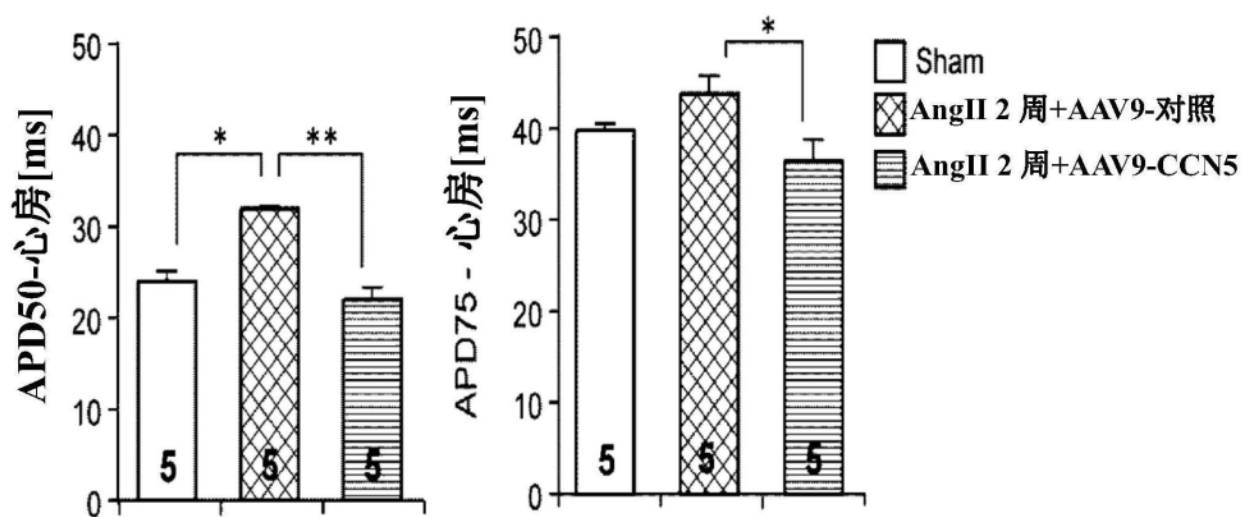


图8f

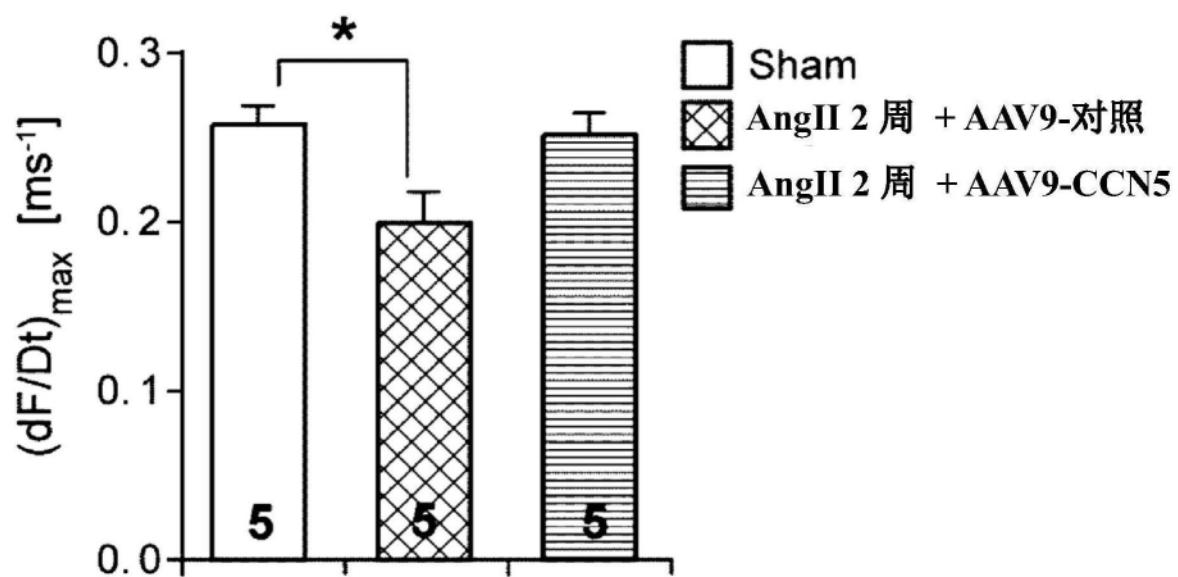


图8g

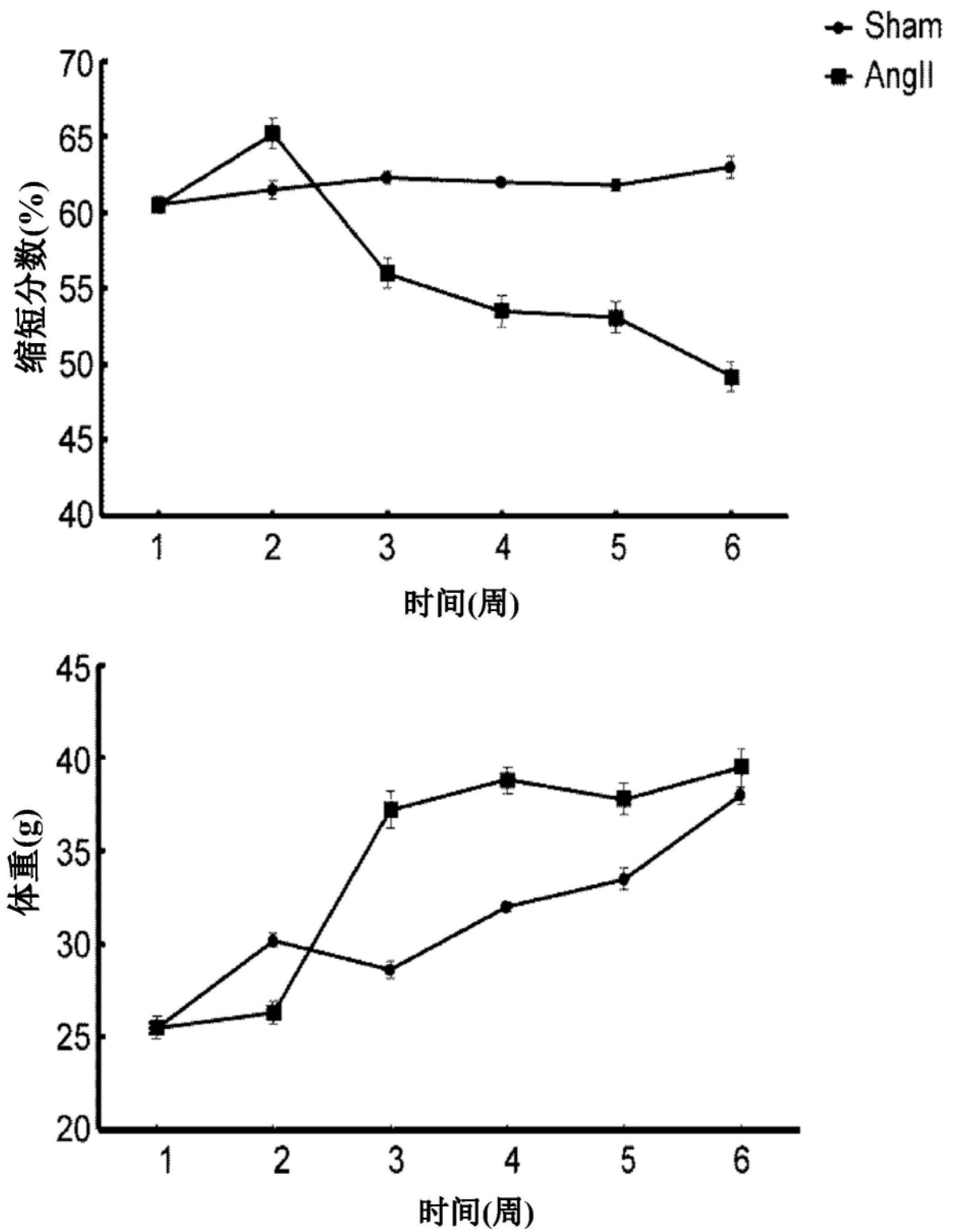


图9a

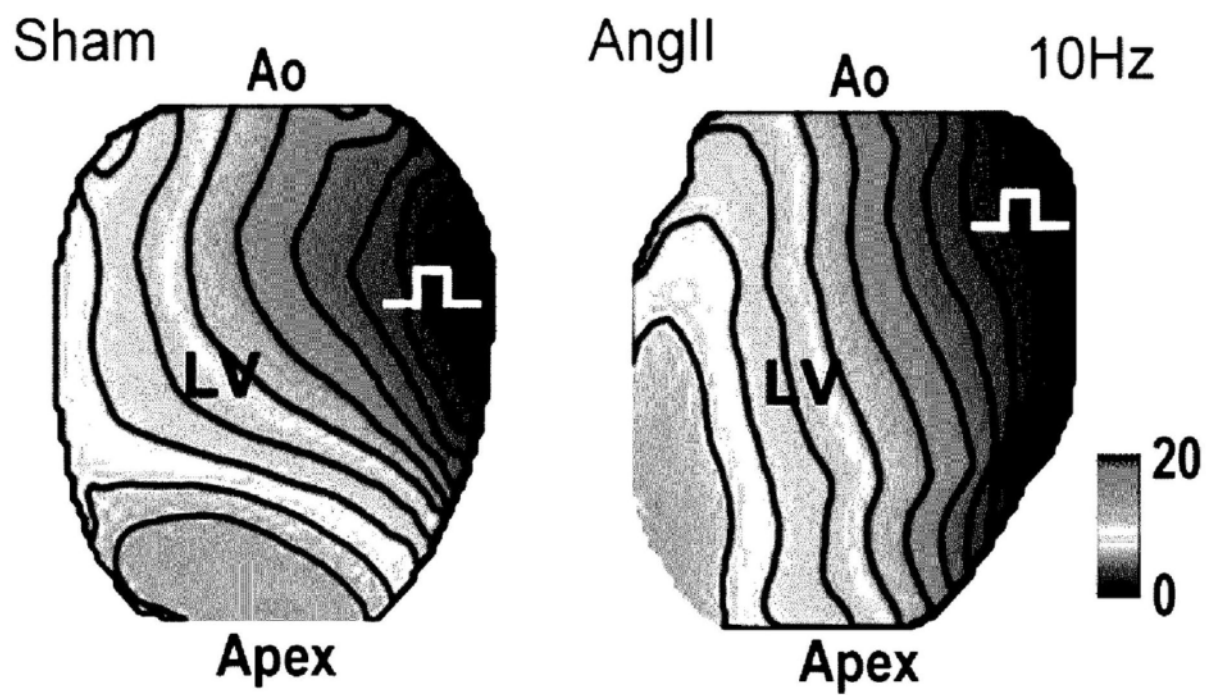


图9b

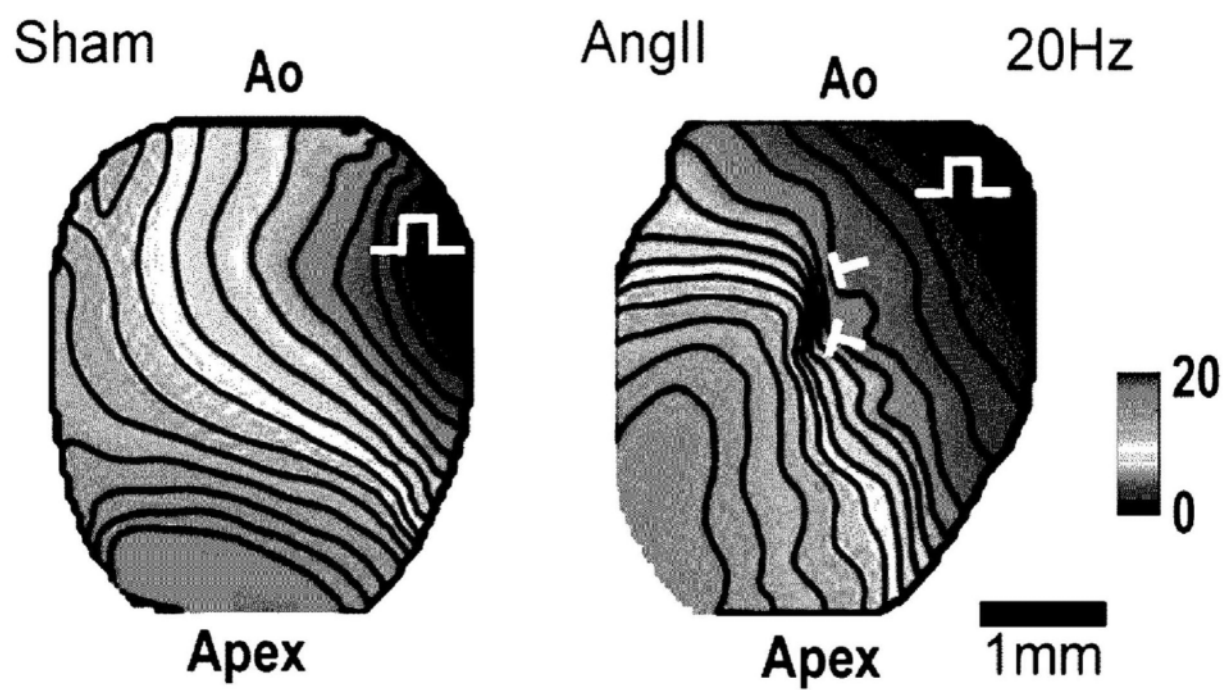


图9c

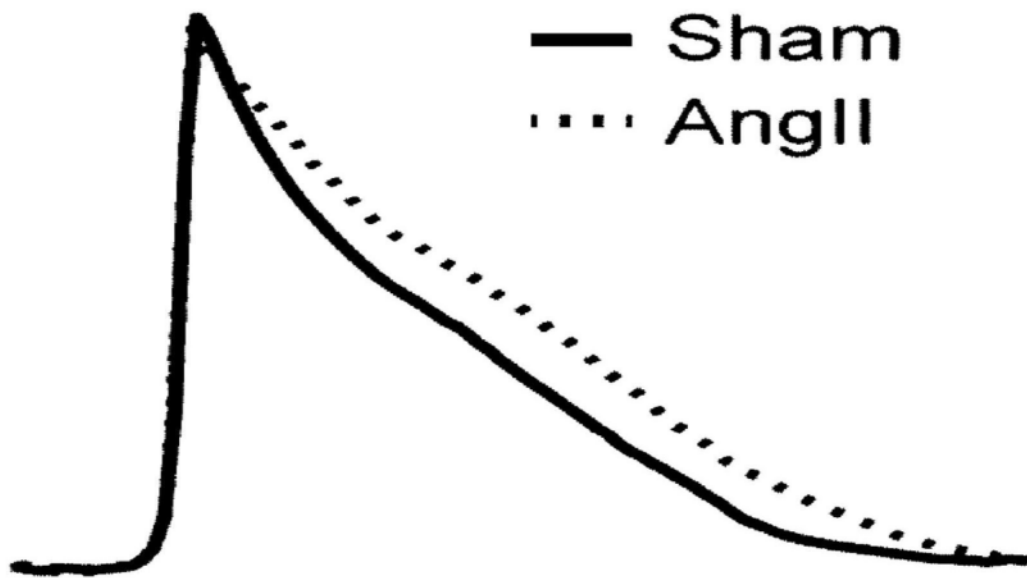


图9d

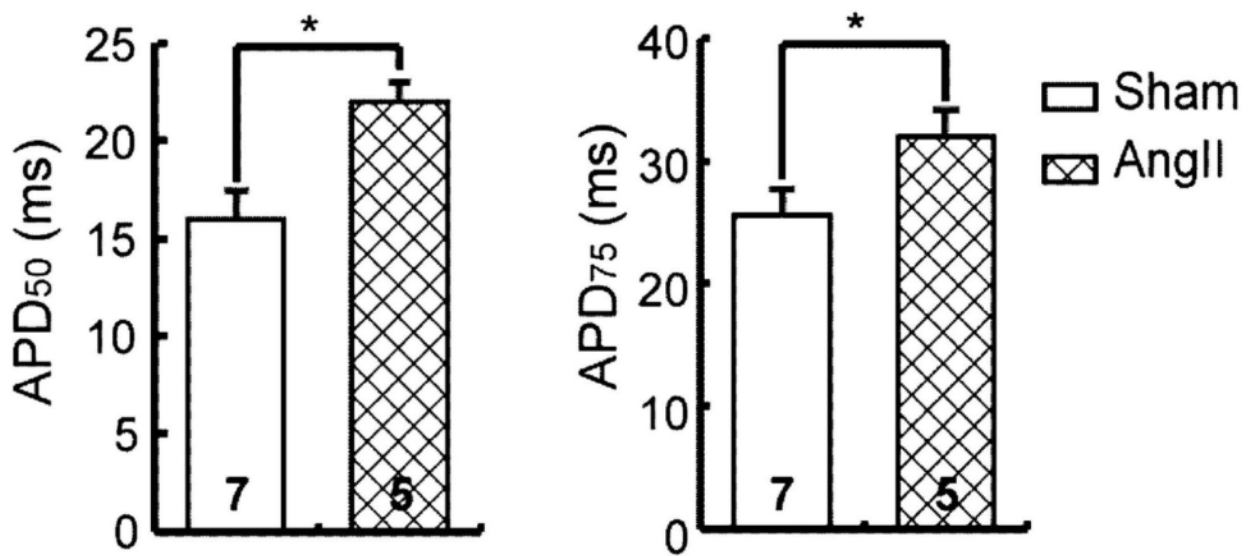


图9e

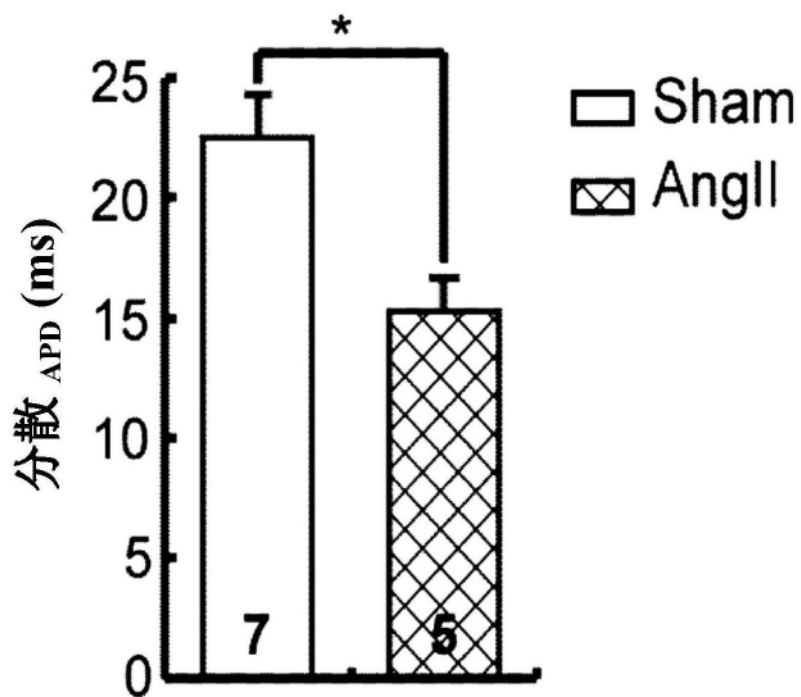


图9f

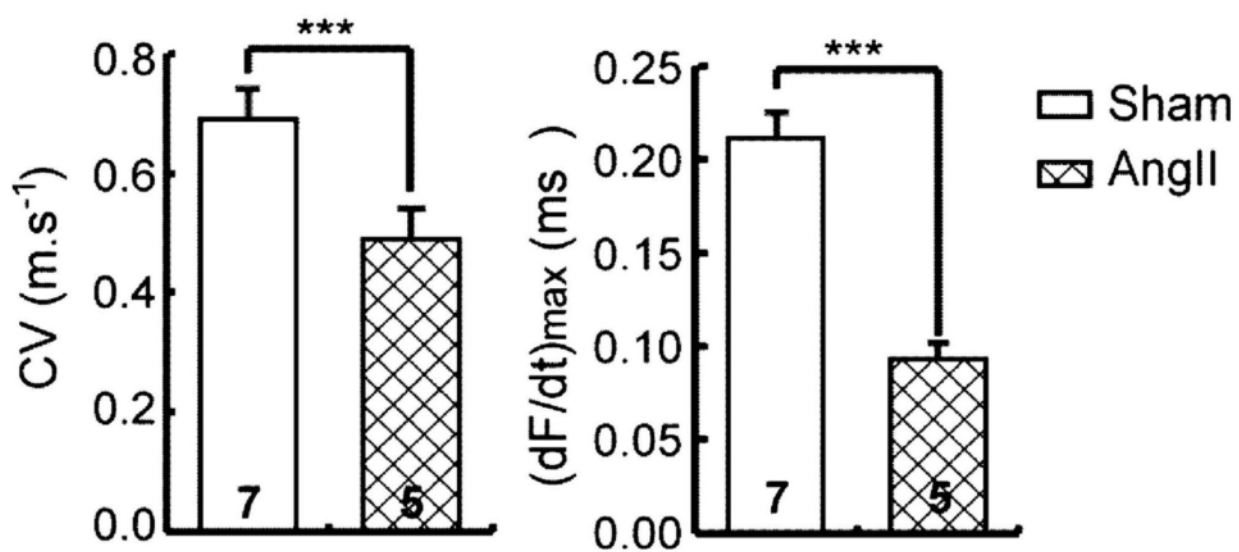


图9g

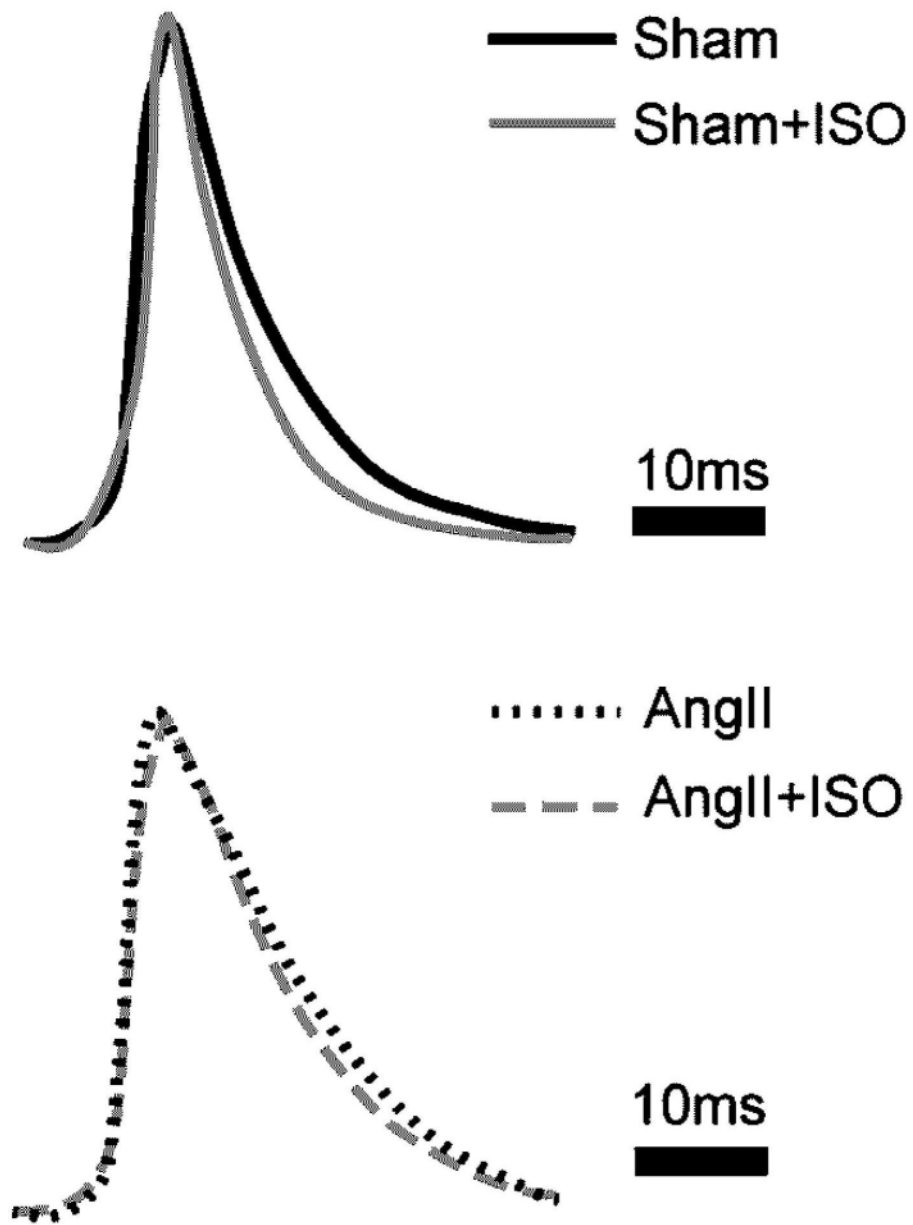


图10a

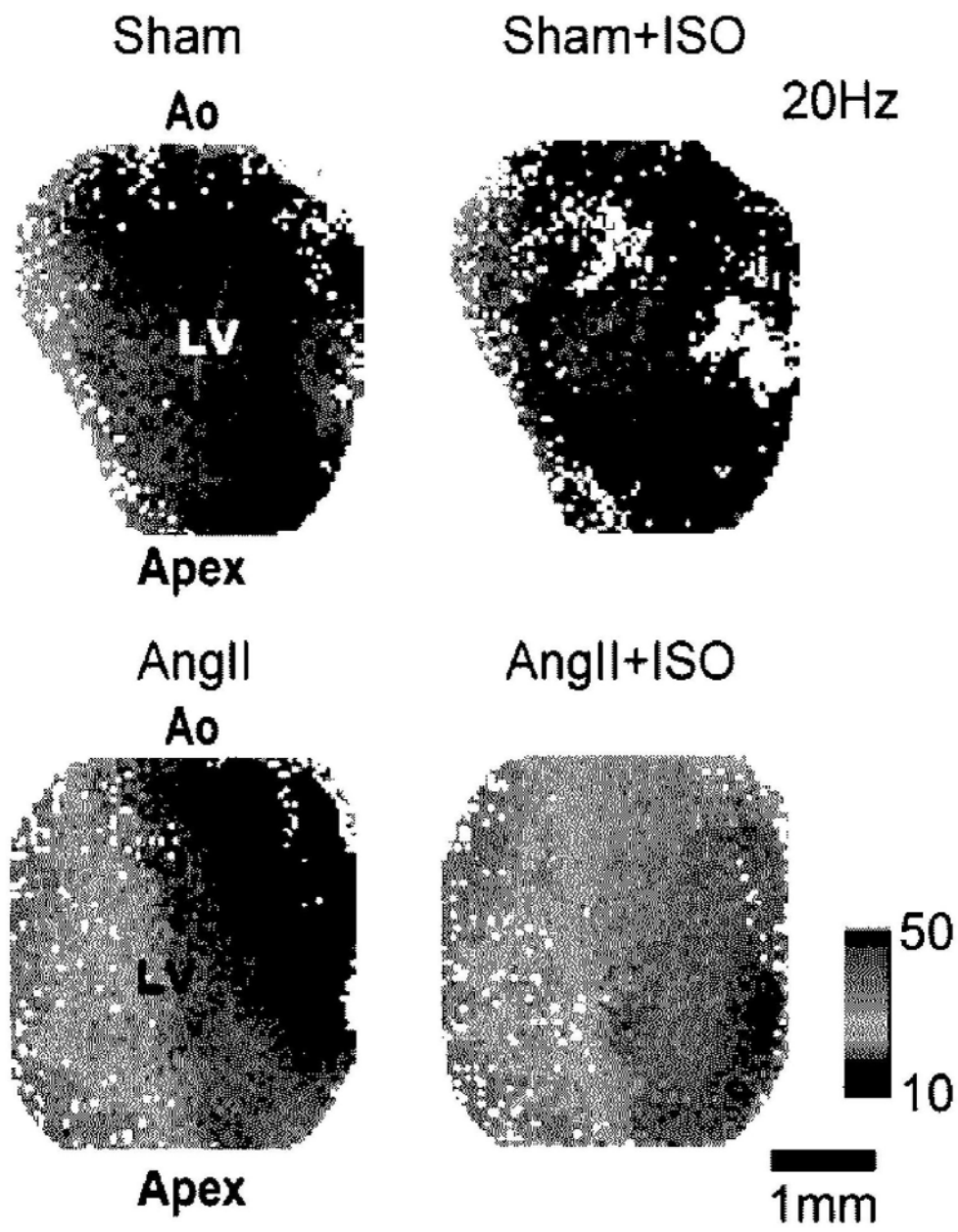


图10b

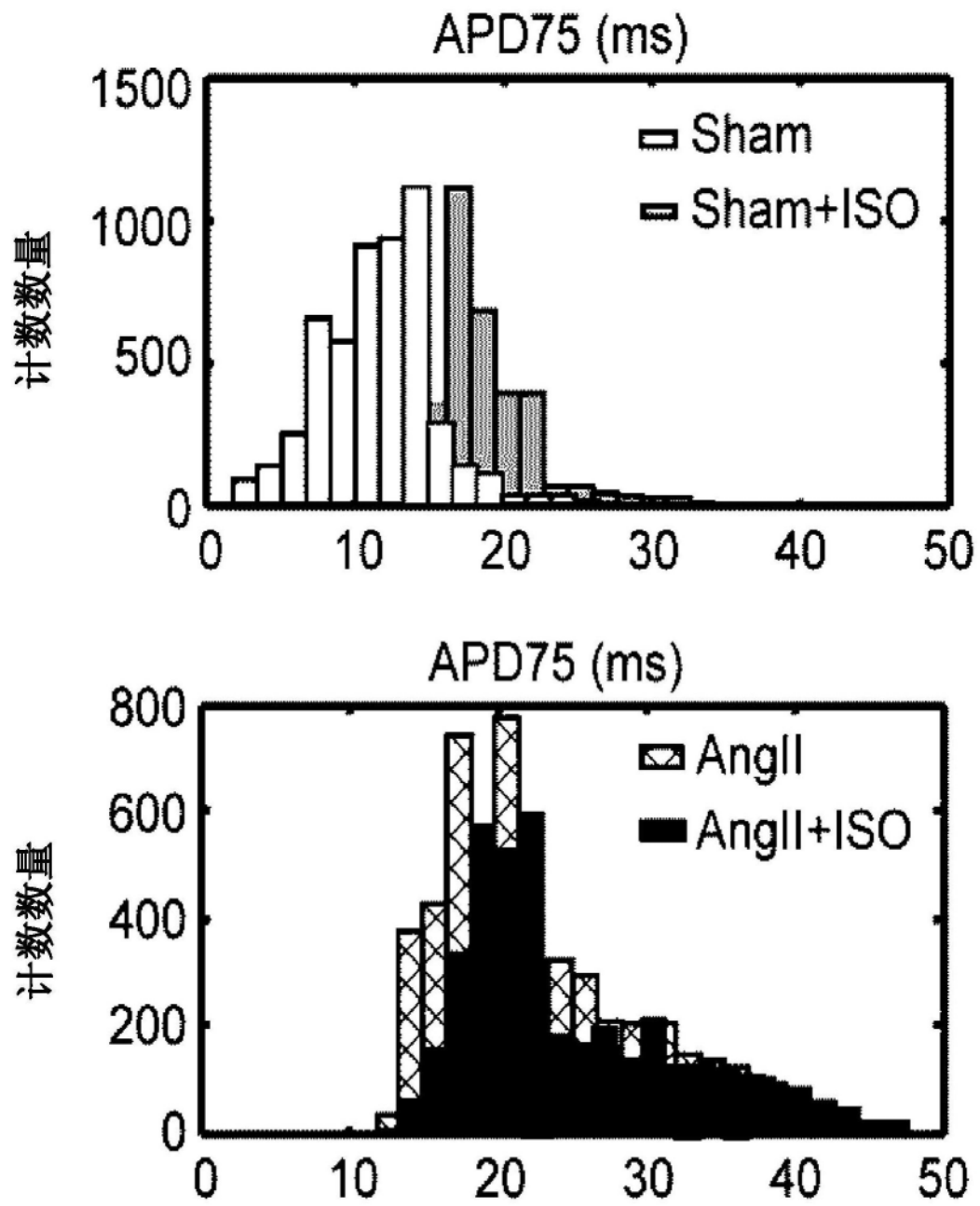


图10c

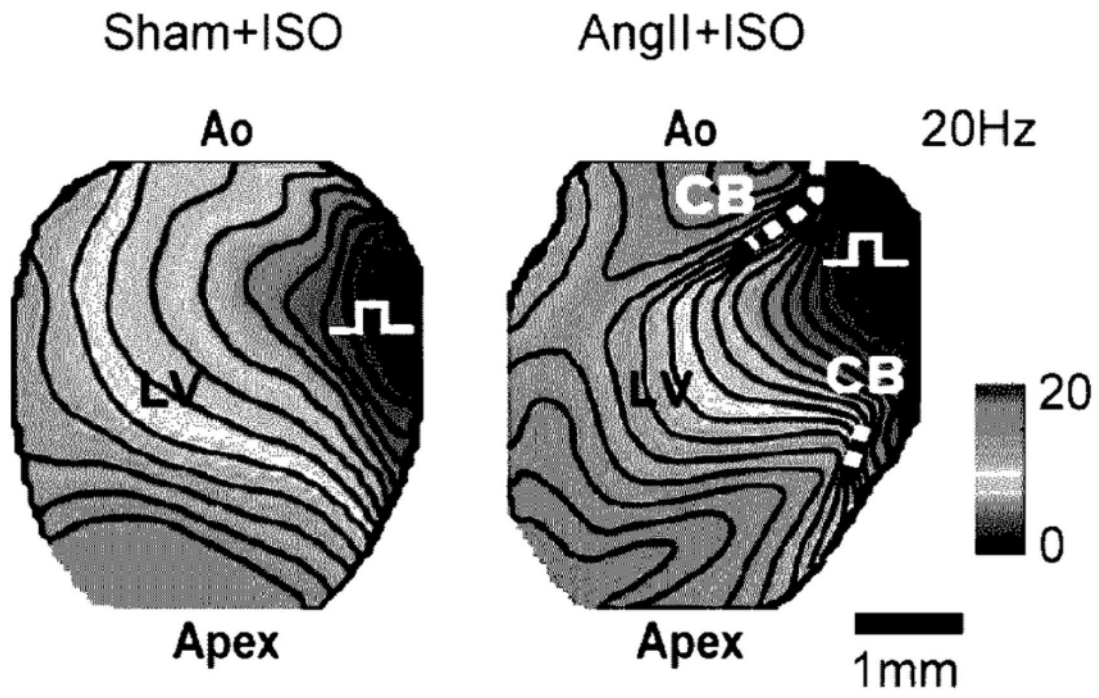


图10d

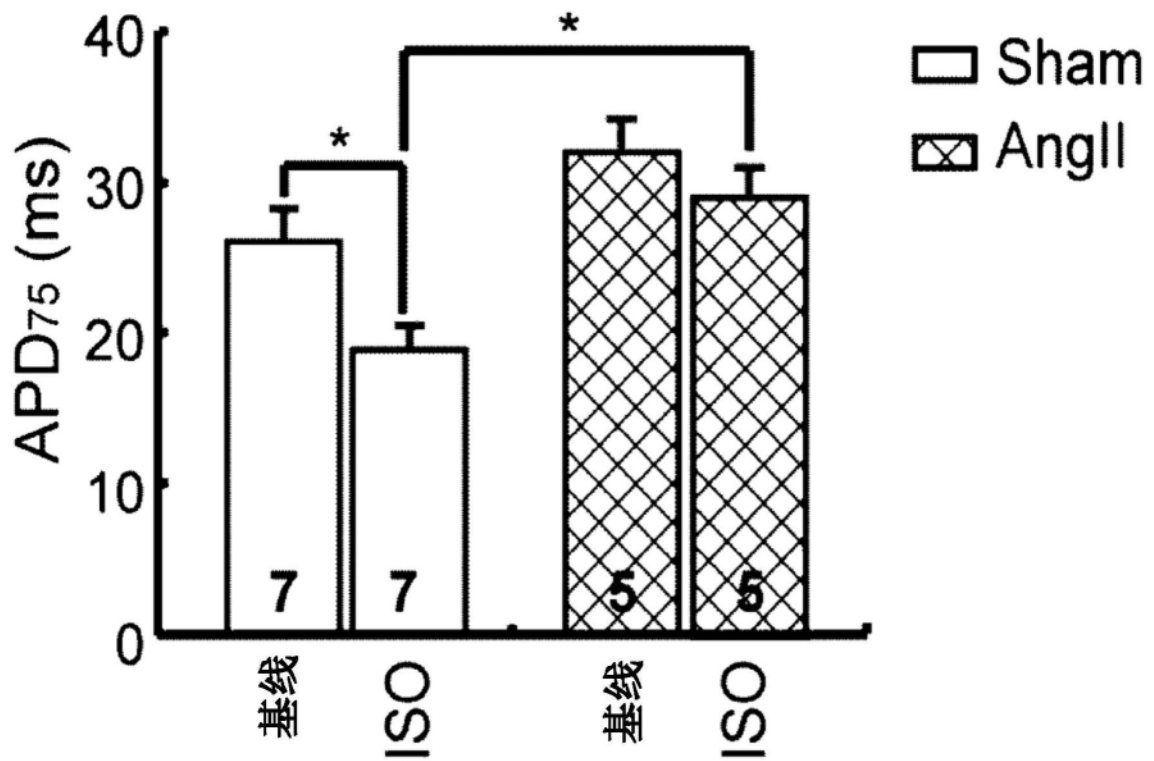


图10e

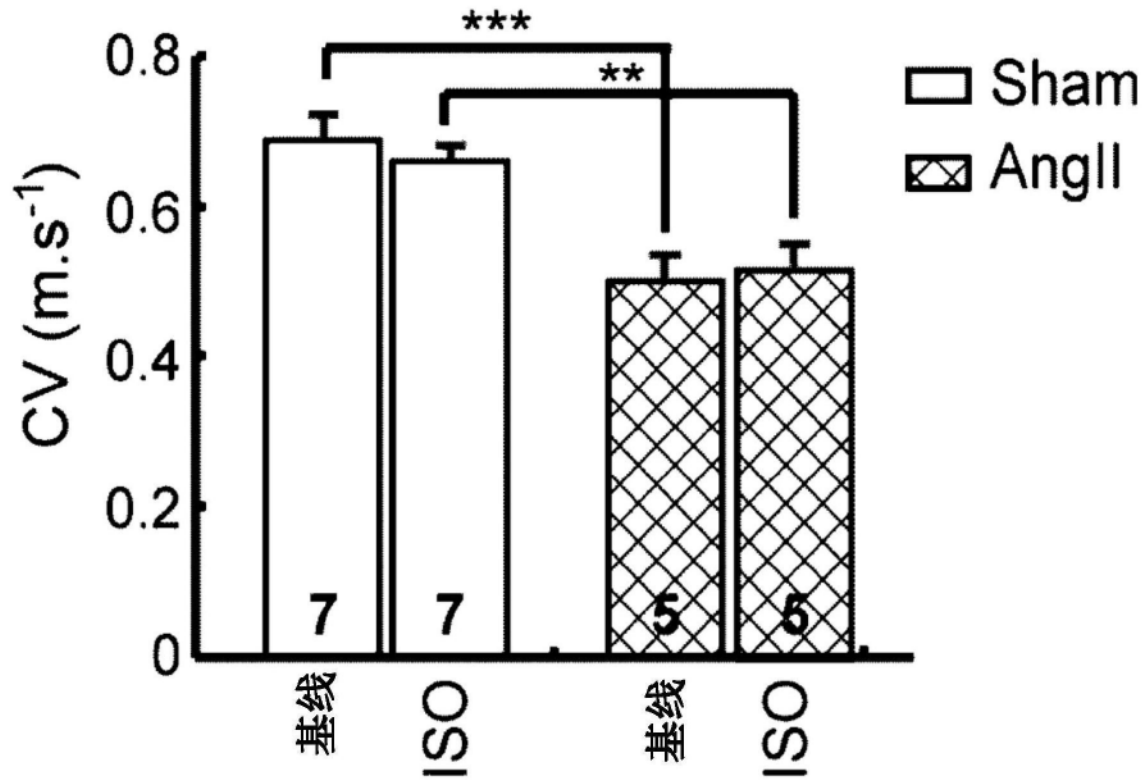


图10f

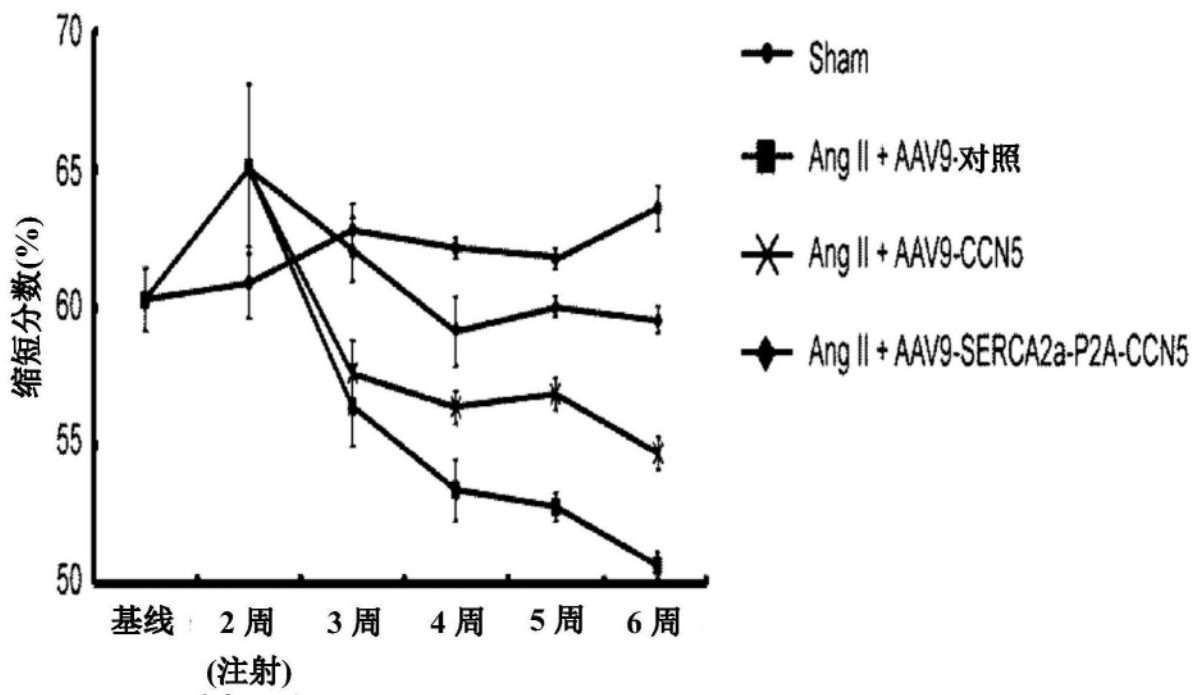


图11a

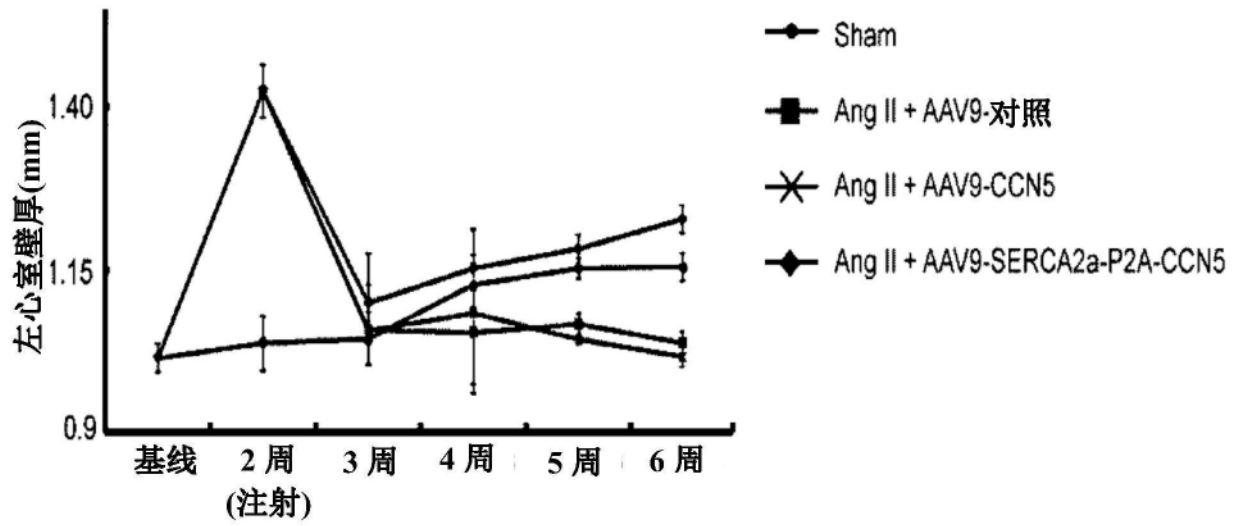


图11b

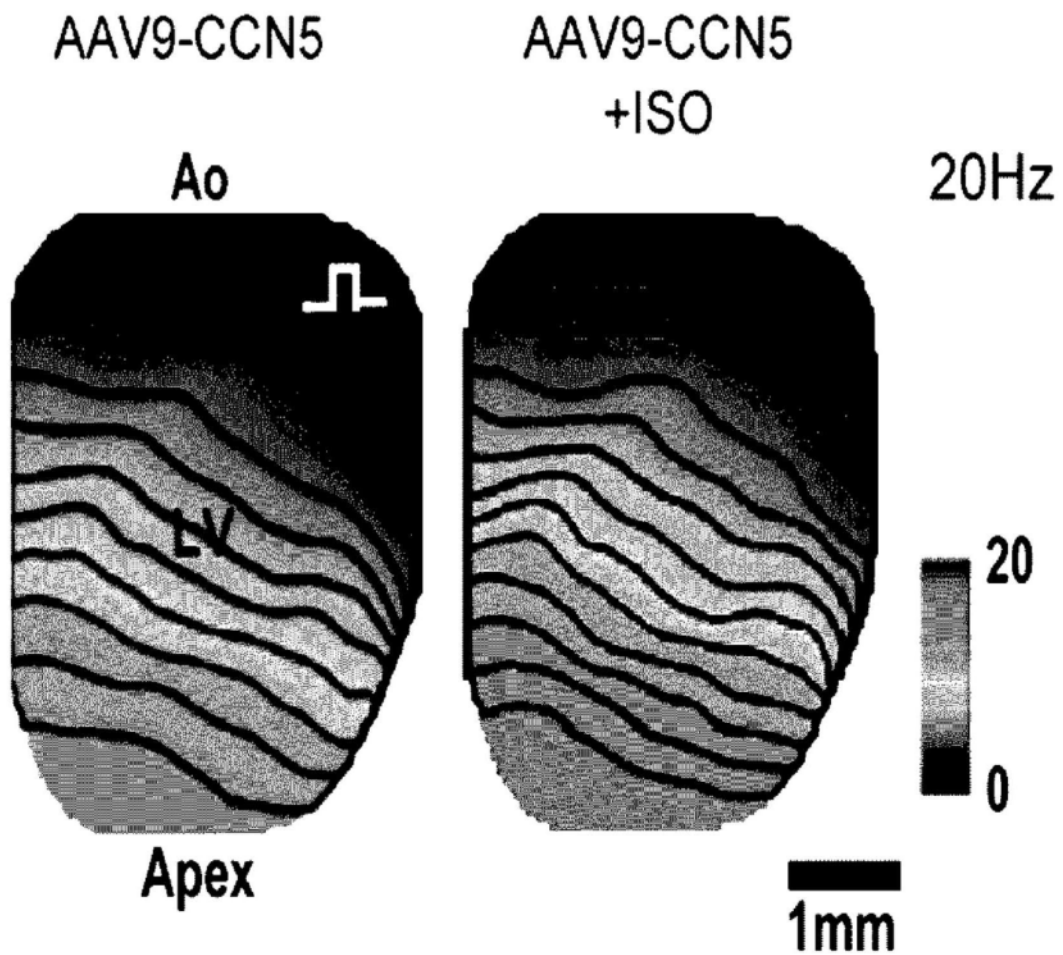


图11c

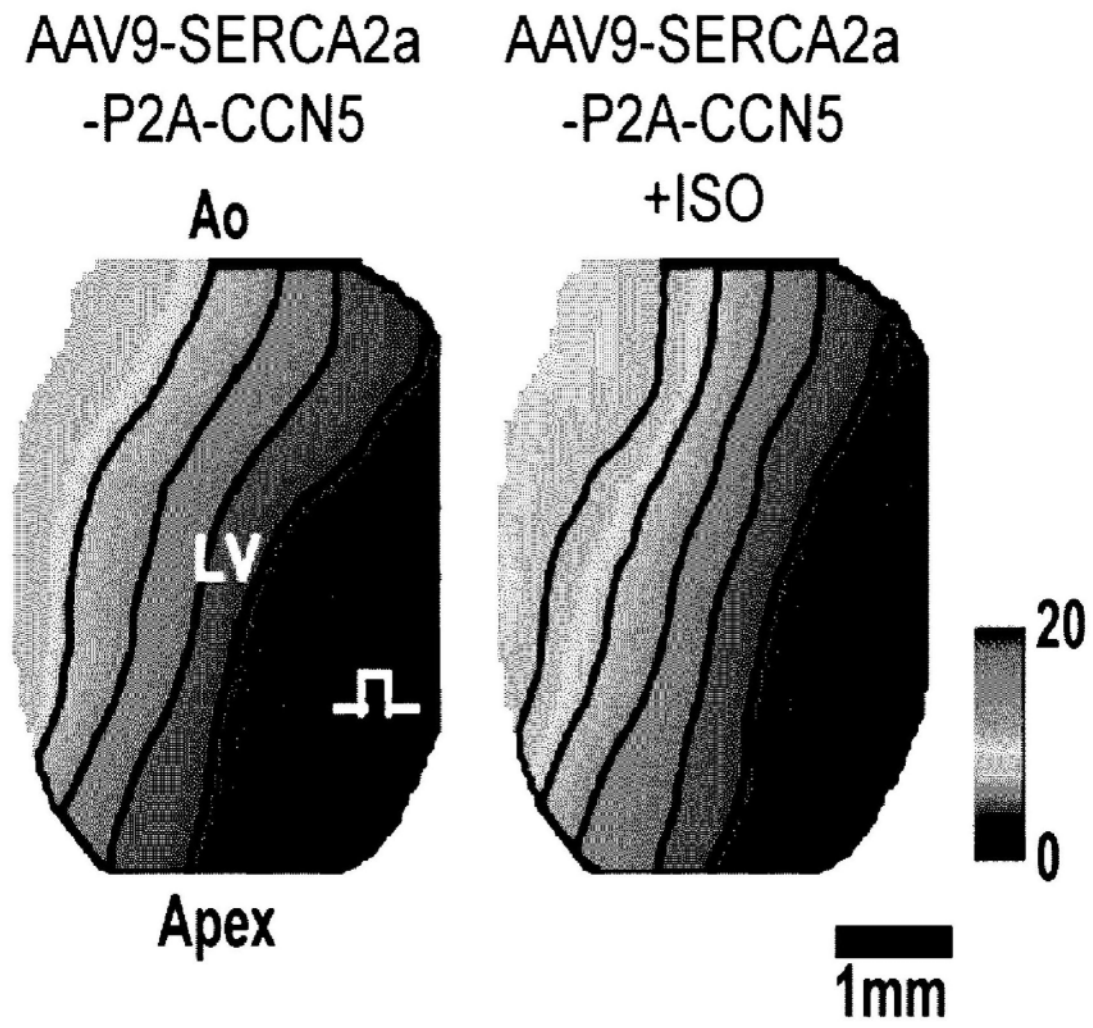


图11d

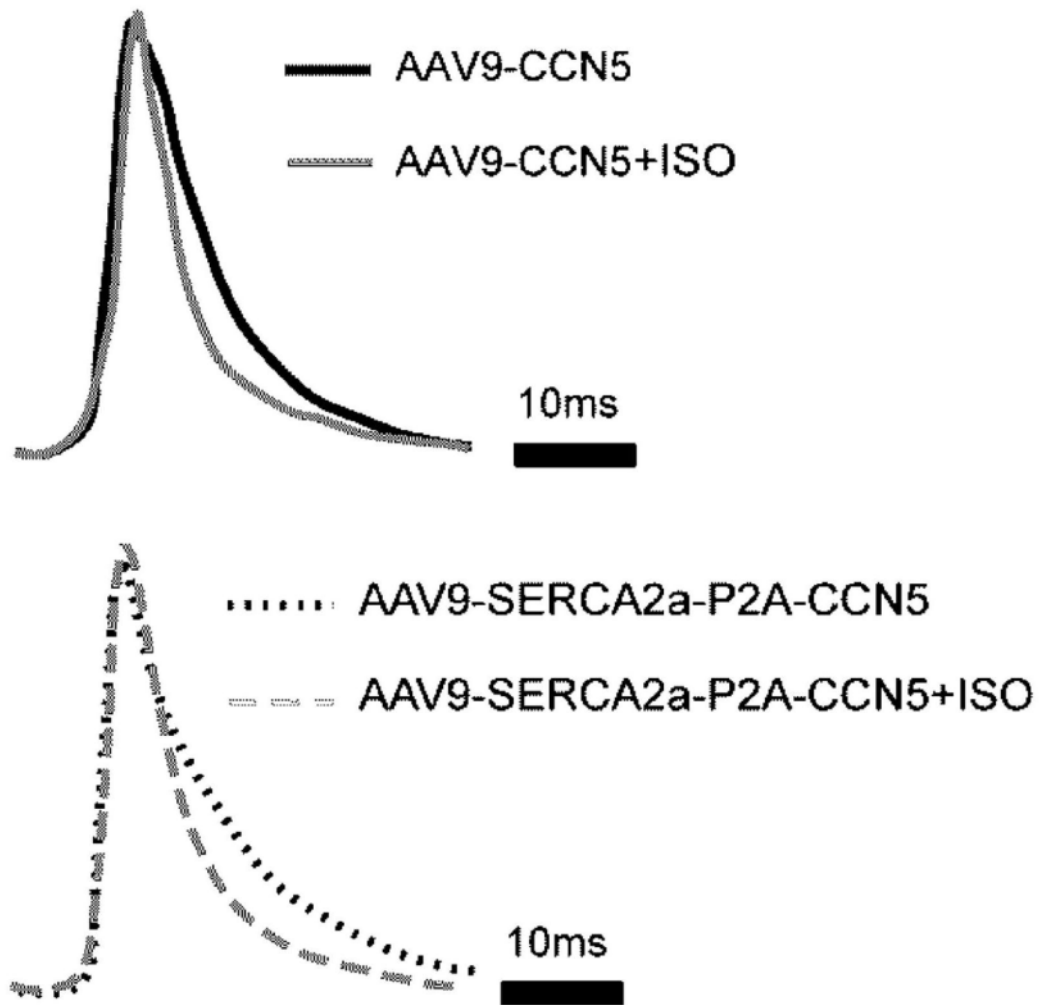


图11e

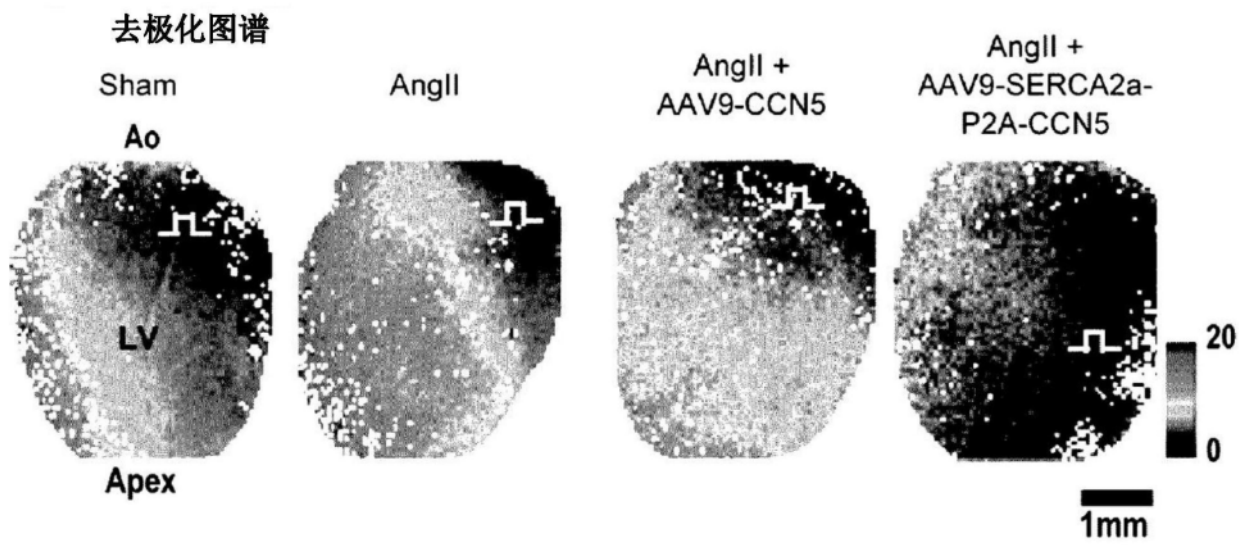


图11f

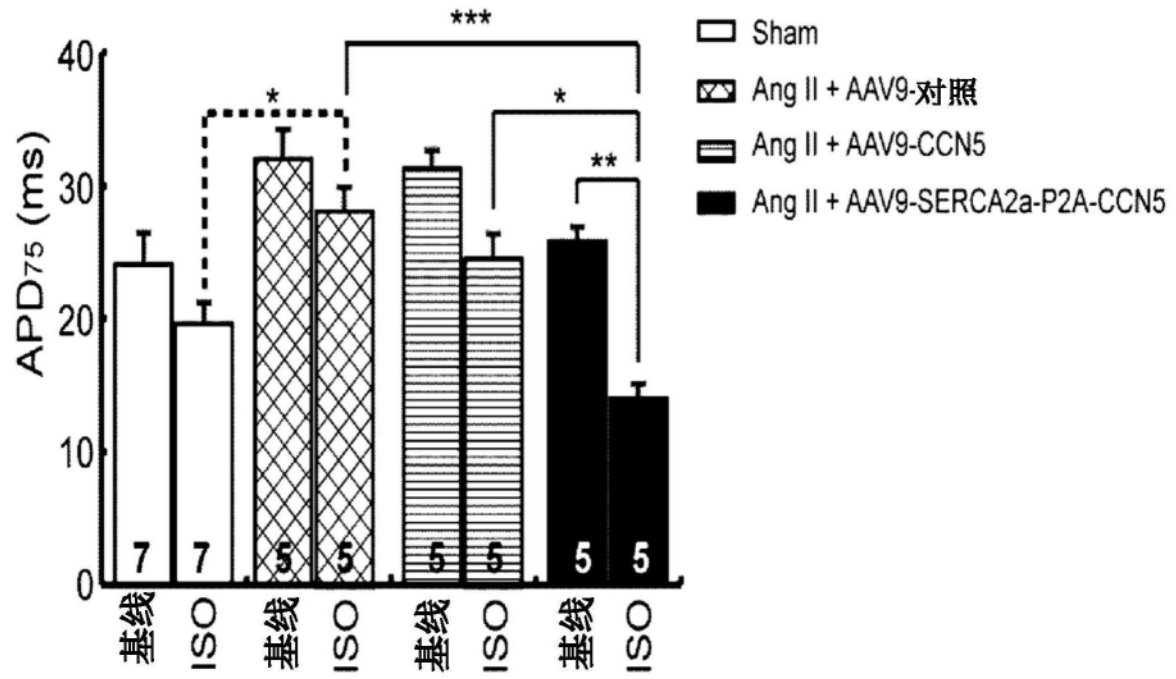


图11g

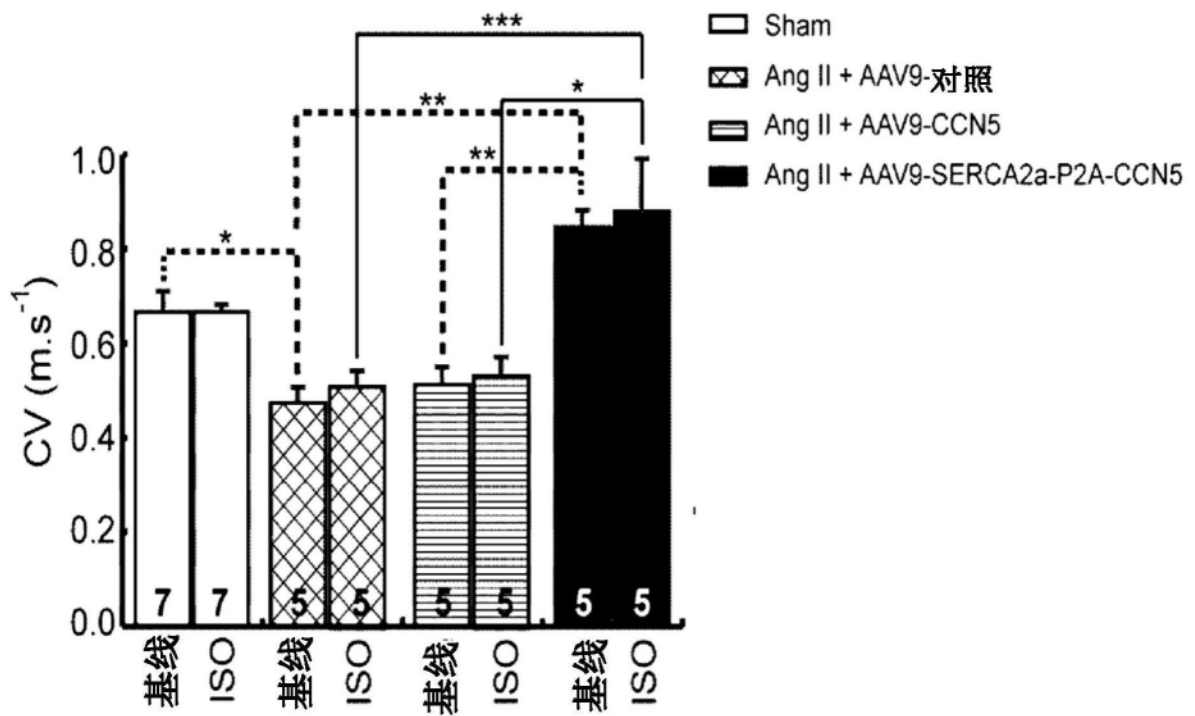


图11h

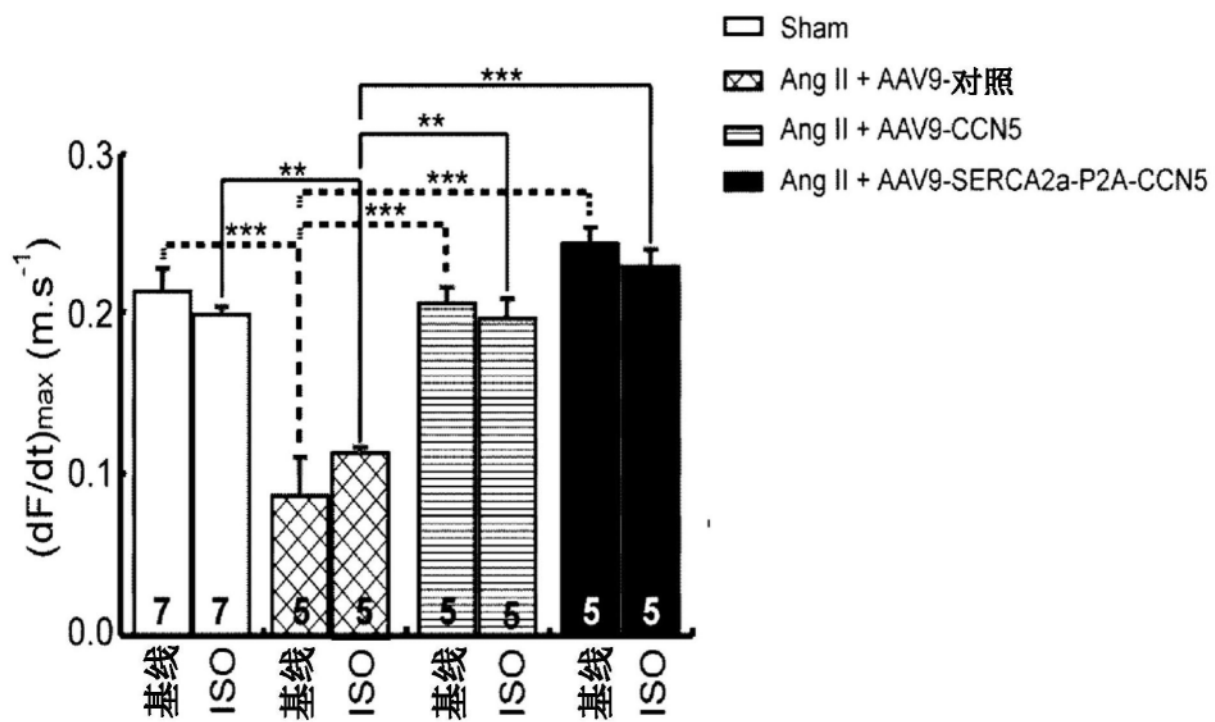


图11i

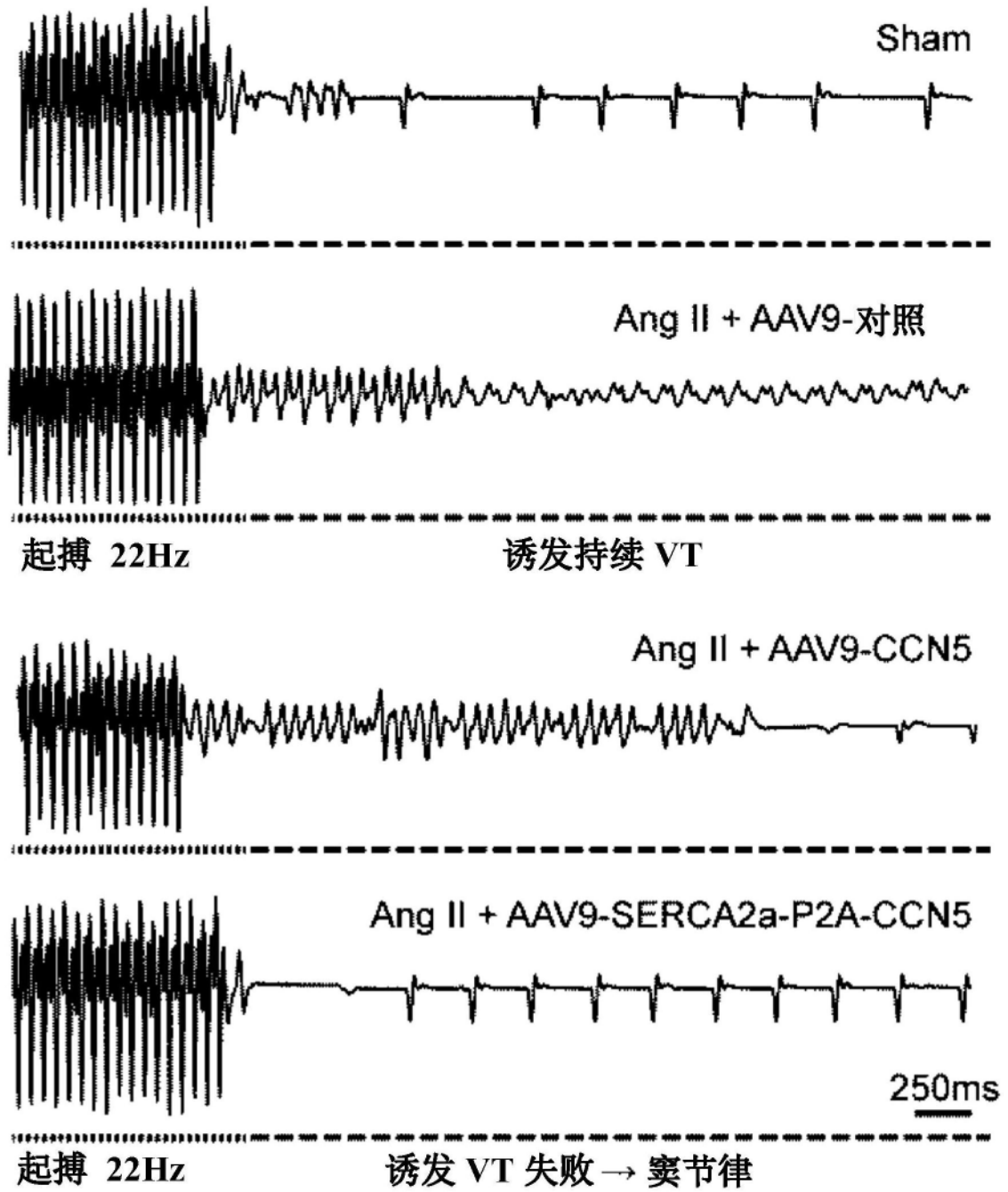


图12a

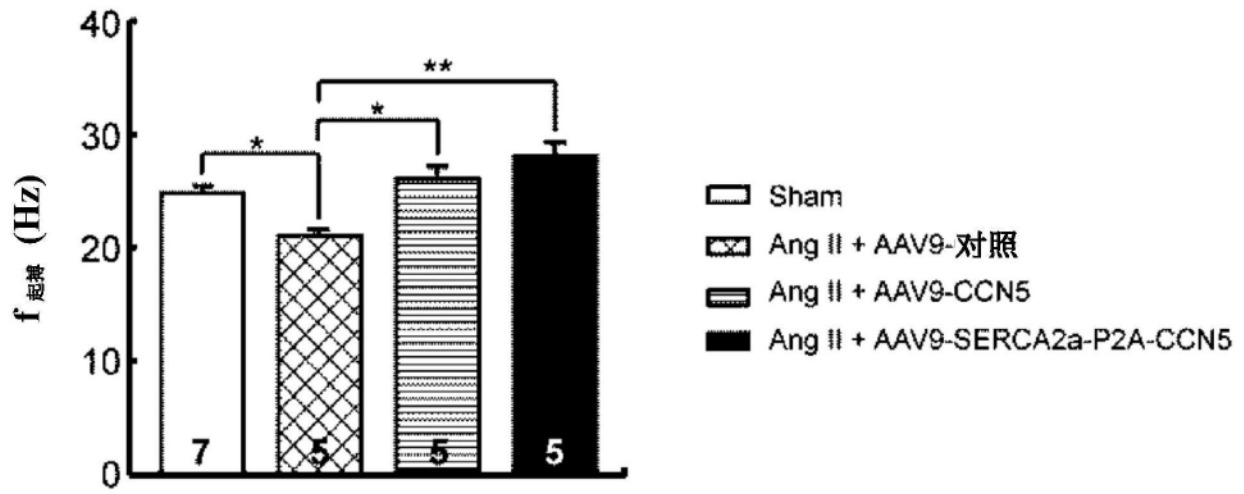


图12b

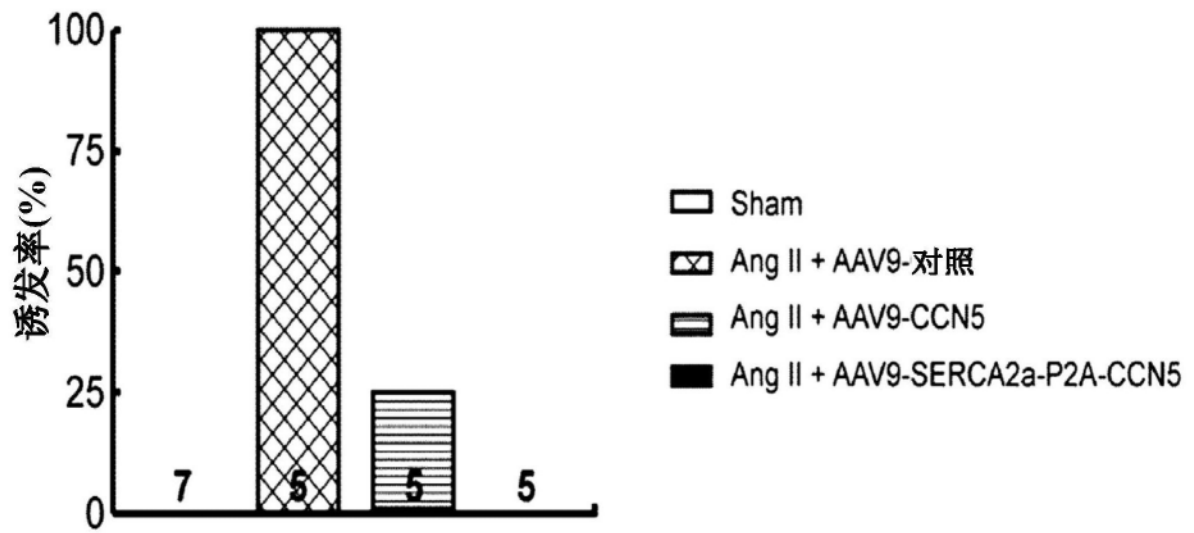


图12c

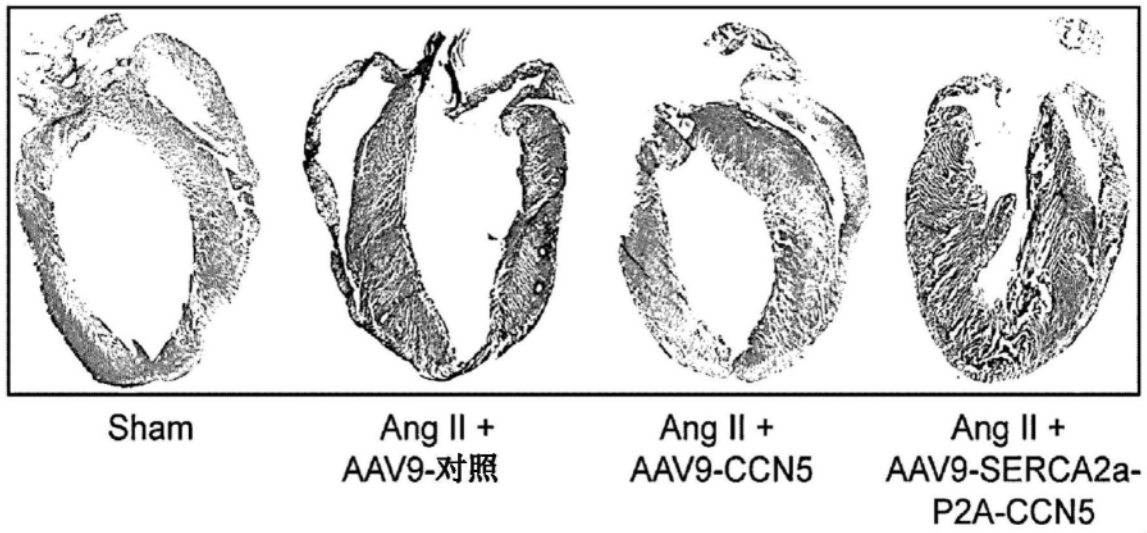


图13a

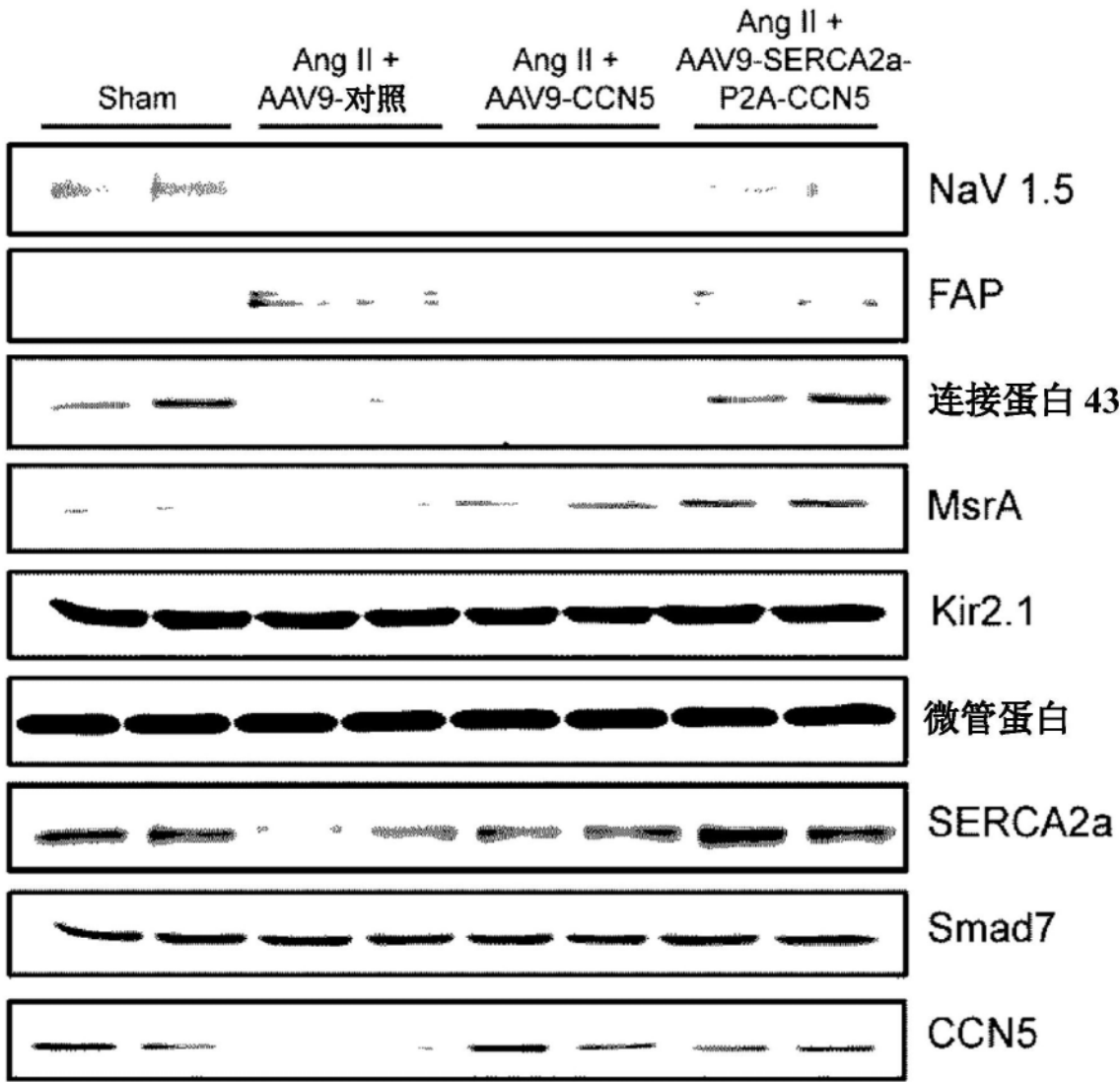


图13b