

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07H 21/02 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780012006.9

[43] 公开日 2009 年 5 月 20 日

[11] 公开号 CN 101437833A

[22] 申请日 2007.2.9

[21] 申请号 200780012006.9

[30] 优先权

[32] 2006.2.10 [33] US [31] 60/772,327

[86] 国际申请 PCT/US2007/003470 2007.2.9

[87] 国际公布 WO2007/100465 英 2007.9.7

[85] 进入国家阶段日期 2008.10.6

[71] 申请人 辛辛那提大学

地址 美国俄亥俄州

[72] 发明人 E·克拉尼亚斯 P·罗德里格斯
B·米顿

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 梁 谋 付 磊

权利要求书 6 页 说明书 60 页 附图 23 页

[54] 发明名称

作为心脏功能调节剂的磷酸酶抑制剂蛋白-1

[57] 摘要

本发明涉及编码新突变形式的抑制剂蛋白-1(I-1)的新型核酸。具体地说, I-1 突变形式包含改变的 PKC- α 磷酸化位点。另外, 本发明涉及调节心脏收缩性和功能的方法, 以及用于治疗心脏病和心力衰竭的方法, 所述方法使用所述新核酸和多肽。还提供含有所述新核酸的载体、针对新蛋白的抗体以及与其相关的诊断和筛选方法。

1. 一种编码组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段的分离的核酸分子, 其中所述核酸分子编码与 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 而且其中所述核酸分子编码在 75 位的组成型非磷酸化氨基酸。

2. 权利要求1的分离的核酸分子, 所述核酸分子选自含有 SEQ ID NO: 3 的核苷酸序列的核酸分子; 以及与 SEQ ID NO: 3 的核苷酸序列至少 90%相同的核苷酸分子。

3. 一种编码组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段的分离的核酸分子, 其中所述核酸分子编码与 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 而且其中所述核酸分子编码在 75 位的组成型非磷酸化氨基酸。

4. 权利要求3的分离的核酸分子, 所述核酸分子选自含有 SEQ ID NO: 4 的核苷酸序列的核酸分子; 以及与 SEQ ID NO: 4 的核苷酸序列至少 90%相同的核苷酸分子。

5. 一种含有 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列的分离多肽或其组成型非磷酸化片段。

6. 一种含有 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的分离多肽或其组成型非磷酸化片段。

7. 一种降低患者心肌收缩性的方法, 所述方法包括: 将有效量的权利要求1或3的分离的核酸分子导入该患者的心脏细胞中, 由此降低该患者的心肌收缩性。

8. 一种降低患者心脏收缩性的方法, 所述方法包括: 给予有效量的权利要求5或6的分离的多肽, 由此降低该患者的心脏收缩性。

9. 一种治疗心力衰竭患者的方法, 所述方法包括: 将含有编码突变形式的磷酸酶抑制剂-1蛋白的序列的核酸分子以有效降低磷酸酶活性的量导入患者的心脏细胞中, 其中所述突变形式在为野生型磷酸酶

抑制剂-1 蛋白中的 PKC- α 磷酸化位点的位置包含至少一个组成型非磷酸化氨基酸，由此治疗心力衰竭患者。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述至少一个组成型非磷酸化氨基酸为所述突变形式的磷酸酶抑制剂-1 蛋白中的 67 位的丙氨酸(A)、天冬氨酸(D)或半胱氨酸(C)，或 75 位的丙氨酸(A)、天冬氨酸(D)或半胱氨酸(C)。

11. 权利要求 9 的方法，其中所述核酸分子与含有选自 SEQ ID NO: 3、4、9、10、15 和 17 的序列的核酸分子具有至少 90%的同一性，并且其中所述核酸分子编码在 67 或 75 位的组成型非磷酸化氨基酸。

12. 权利要求 9 的方法，其中突变形式的磷酸酶抑制剂-1 蛋白包含选自 SEQ ID NO: 5、6、11、12、16 和 18 的氨基酸序列。

13. 权利要求 9 的方法，其中所述核酸分子包含选自 SEQ ID NO: 3、4、9、10、15 和 17 的序列。

14. 权利要求 9 的方法，所述方法还包括以有效降低磷酸酶活性的量导入含有编码突变形式的磷酸酶抑制剂-1 蛋白的序列的核酸分子，其中所述突变形式在为野生型磷酸酶抑制剂-1 蛋白中的 PKA 磷酸化位点的位置包含至少一个组成型磷酸化氨基酸，由此治疗心力衰竭患者。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述至少一个组成型磷酸化氨基酸为所述突变形式的磷酸酶抑制剂-1 蛋白中 35 位的天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述核酸分子与包含 SEQ ID NO: 19 的核酸分子具有至少 90%的同一性，并且其中所述核酸分子编码 35 位的组成型磷酸化氨基酸。

17. 权利要求 14 的方法，其中所述突变形式的磷酸酶抑制剂-1 蛋白包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列。

18. 权利要求 14 的方法，其中所述核酸分子包含 SEQ ID NO: 19。

19. 权利要求 9 的方法，其中所述突变形式的磷酸酶抑制剂-1 蛋

白为全长蛋白或其组成型非磷酸化片段。

20. 权利要求 14 的方法, 其中所述突变形式的磷酸酶抑制剂蛋白为全长蛋白或其组成型磷酸化片段。

21. 一种治疗心力衰竭患者的方法, 所述方法包括将编码含有 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列或其片段的多肽的核酸分子以有效降低磷酸酶活性的量导入患者的心脏细胞中, 由此治疗心力衰竭患者。

22. 权利要求 21 的方法, 其中所述核酸分子包含编码含有 SEQ ID NO: 21 的至少 1-65 位氨基酸的多肽的序列, 并且其中所述多肽在 SEQ ID NO: 21 中的 PKC- α 磷酸化位点的位置被截短。

23. 权利要求 22 的方法, 其中所述多肽在 SEQ ID NO: 21 的约 67 或 75 位被截短。

24. 权利要求 21 的方法, 其中所述核酸分子包含 SEQ ID NO: 22。

25. 权利要求 9 的方法, 其中所述核酸分子还包含与编码序列有效连接的启动子。

26. 权利要求 25 的方法, 其中所述启动子为组成型启动子。

27. 权利要求 25 的方法, 其中所述启动子在多种组织中表达, 其中所述组织之一为心肌组织。

28. 权利要求 25 的方法, 其中所述启动子包含来自以下任一成员的调节序列: 巨细胞病毒(CMV)、心脏特异性肌钙蛋白 T、肌球蛋白重链和肌球蛋白轻链。

29. 权利要求 9 的方法, 其中所述核酸分子通过给予含病毒颗粒的病毒传递系统而被导入。

30. 权利要求 29 的方法, 其中所述病毒颗粒包含慢病毒颗粒或腺相关病毒(AAV)颗粒。

31. 权利要求 9 的方法, 其中所述核酸分子以有效导致选自以下状况的量导入: 肌细胞缩短、降低松弛时间常数和加速钙信号衰减及其组合。

32. 权利要求 9 的方法, 其中所述核酸分子以有效改善收缩末压

力尺度关系的量导入。

33. 权利要求 9 的方法，其中所述心力衰竭患者除了心力衰竭之外还具有选自以下的病症：缺血、心律不齐、心肌梗塞、异常的心脏收缩性和异常的 Ca^{2+} 代谢及其组合。

34. 权利要求 9 的方法，其中所述患者为人。

35. 权利要求 9 的方法，其中通过患者心脏的冠状血管的血流被限制，所述核酸分子被导入到该患者的冠状动脉腔内。

36. 权利要求 35 的方法，其中在限制冠状静脉流出的同时心脏正在泵动。

37. 权利要求 35 的方法，其中通过冠状血管的血流被完全限制。

38. 权利要求 37 的方法，其中所述受限的冠状血管包括以下的任一血管：左前降支动脉(LAD)、远端回旋支动脉(LCX)、大冠状静脉(GCV)、心中静脉(MCV)和前心室间静脉(AIV)。

39. 权利要求 35 的方法，其中在冠状血管的缺血预适应后进行所述核酸分子的导入。

40. 权利要求 35 的方法，其中在限制流出心脏的主动脉血流的同时将所述核酸分子注射入患者心脏中，由此使核酸分子流入心脏。

41. 权利要求 39 的方法，其中所述给药包括以下步骤：限制流出心脏的主动脉血流，使得血流改变方向至冠状动脉中；将核酸分子注射至心脏、主动脉或冠状动脉口的腔内，以向冠状动脉提供核酸分子；在限制流出心脏的主动脉血流的同时使心脏泵动；并恢复主动脉血流。

42. 权利要求 41 的方法，其中用导管将所述核酸分子注射入心脏中。

43. 权利要求 41 的方法，其中所述核酸分子被直接注射入心脏的肌肉中。

44. 权利要求 41 的方法，所述方法还包括评价患者的心脏功能参数。

45. 权利要求 44 的方法, 其中所述心脏功能参数选自: 心率、心脏代谢、心脏收缩性、心室功能、 Ca^{2+} 代谢和肌质网 Ca^{2+} ATP 酶活性及其组合。

46. 一种诊断或预后心力衰竭患者的方法, 所述方法包括: 由患者获得心脏磷酸酶抑制剂-1 蛋白样品; 并检测至少一个磷酸化 PKC- α 磷酸化位点的存在情况, 由此诊断或预后心力衰竭患者。

47. 权利要求 46 的方法, 其中所述至少一个磷酸化 PKC- α 磷酸化位点为在所述心脏磷酸酶抑制剂-1 蛋白的 75 位的苏氨酸(T)残基或 67 位的丝氨酸(S)残基。

48. 一种重组载体, 其包含权利要求 1 或 3 的分离的核酸分子。

49. 一种药物组合物, 其包含权利要求 5 或 6 的分离的多肽或其组成型非磷酸化片段和药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

50. 一种药物组合物, 其包含权利要求 1 或 3 的分离的核酸分子或其组成型非磷酸化片段和药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

51. 权利要求 50 的药物组合物, 其中所述分离的核酸分子存在于选自以下的病毒载体中: 重组逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒和单纯疱疹病毒-1。

52. 一种抗体, 其为针对权利要求 5 或 6 的分离的多肽而产生的抗体。

53. 一种诊断试剂, 其包含权利要求 52 的抗体。

54. 权利要求 9-47 中任一项的方法, 所述方法还包括获得所述核酸分子。

55. 一种用于治疗心力衰竭患者的药盒, 所述药盒包含分离的核酸分子, 以及按照权利要求 9 的方法治疗心力衰竭患者的说明书, 所述分离的核酸分子编码含有 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段。

56. 权利要求 55 的药盒, 所述药盒还包含编码含有 SEQ ID NO:

20 的氨基酸序列的突变形式的磷酸酶抑制剂-1 蛋白的分离的核酸分子, 以及按照权利要求 14 的方法治疗心力衰竭患者的说明书。

57. 一种治疗心力衰竭患者的药盒, 所述药盒包含编码 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列或其片段的分离的核酸分子, 以及按照权利要求 21 的方法治疗心力衰竭患者的说明书。

58. 一种分离的核酸分子, 其编码组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段, 其中所述核酸分子编码的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列具有至少 90% 的同一性, 并且其中所述核酸分子编码在 75 位的组成型非磷酸化氨基酸。

59. 权利要求 58 的分离的核酸分子, 所述核酸分子选自包含 SEQ ID NO: 10 的核苷酸序列的核酸分子; 以及与 SEQ ID NO: 10 的核苷酸序列至少 90% 相同的核苷酸分子。

60. 一种分离的核酸分子, 其编码组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段, 其中所述核酸分子编码的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列具有至少 90% 的同一性, 并且其中所述核酸分子编码在 67 和 75 位的组成型非磷酸化氨基酸。

61. 权利要求 60 的分离的核酸分子, 所述核酸分子选自包含 SEQ ID NO: 15 的核苷酸序列的核酸分子; 以及与 SEQ ID NO: 15 的核苷酸序列至少 90% 相同的核苷酸分子。

62. 一种分离的核酸分子, 其编码组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段, 其中所述核酸分子编码的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列具有至少 90% 的同一性, 并且其中所述核酸分子编码在 67 和 75 位的组成型非磷酸化氨基酸。

63. 权利要求 62 的分离的核酸分子, 所述核酸分子选自包含 SEQ ID NO: 17 的核苷酸序列的核酸分子; 以及与 SEQ ID NO: 17 的核苷酸序列至少 90% 相同的核苷酸分子。

作为心脏功能调节剂的磷酸酶抑制剂蛋白-1

相关申请/专利和引入作为参考

本申请要求 2006 年 2 月 10 日申请的美国临时申请序号 60/772,327 的优先权, 该临时申请的内容在此引入作为参考。

本文中所引用的每篇申请和专利以及每篇申请和专利中所引用的每篇文件或参考文献(包括在每篇公开专利的起诉过程中; “申请引用的文件”), 对应于和/或享有这些申请和专利中任一优先权的每篇 PCT 和外国申请或专利, 和每篇申请引用文件中引用或参考的每篇文件, 都特地在此引入作为参考。更一般地说, 本文中所引用的文件或参考文献, 或者在权利要求之前的参考文献列表中, 或者在正文本身中; 并且, 这些文件或参考文献(“在此引用的参考文献”)中的每一篇, 以及每篇在此引用的参考文献中引用的每篇文件或参考文献(包括任何制造商的技术说明、说明书等), 都特地在此引入作为参考。

政府资助声明

以下发明部分地使用美国政府机构资助的资金开发。因此, 美国政府对本发明主题具有一定的所有者权益。资金赞助机构为国立卫生研究院, 资金按照合同号 HL-64018、HL-26057 和 HL-77101 授予。

发明背景

先前已确认(美国专利申请公开号 20050066381), 蛋白激酶 C α (“PKC- α ”)活性在心力衰竭病理状态中增加。磷酸酶抑制剂蛋白-1 (I-1) 是心肌收缩性的一种关键的调节剂。已知 I-1 通过抑制蛋白磷酸酶-1 (“PP-1”)的活性调节心肌收缩性。还已知 I-1 抑制 PP-1 的能力受磷酸化调节。当 I-1 的苏氨酸 35 被蛋白激酶 A (PKA)磷酸化时, PP-1 活

性受到抑制,心肌收缩性增强(Pathak, A.等, 2005 *Circ Res* 15: 756-66)。先前表明,丝氨酸 67 (S67)是 PKC α 磷酸化位点,模拟组成型非磷酸化状态的 S67 I-1 突变体(例如 S67A)相对于野生型 I-1 显示出磷酸化降低。然而,体外测试条件不能揭示出对 PP-1 活性的任何抑制作用。

心力衰竭也称为充血性心力衰竭,是一种心肌收缩性降低并且心脏失去其有效泵血能力的疾病。估计单在美国患者就超过 1000 万人。心力衰竭几乎总是慢性的、长期的病症,耗费了过多的医疗干预和人力物力。具体地说,心力衰竭对其它身体器官的影响在患者的生产性生活全面下降和治疗费用两方面都是毁灭性的。该病症可影响心脏的右侧、左侧或两侧。因为心脏的泵血作用被损害,所以血液开始退回到机体的其它区域中。许多器官和器官系统由于缺乏氧分和营养物质而开始承受累积损伤。

可能有多种潜在的病因,心力衰竭随着年龄增长而变得更常见。问题在于某些心力衰竭患者没有明显可察觉的症状,使得表现出严重的外周病症,而没有早期干涉的利益来防止或减轻严重的器官损伤率。常规筛查和早期检测能够使患者决定生活方式和饮食的改变,这种改变将减慢该疾病的发展。在发生重要器官损伤之前,显然需要用于大规模筛查、早期和精确检测以及预测心力衰竭的发展的方法。另外,特别是对于老年患者,需要额外的长期治疗选择,其不完全依赖于与药物摄入时间表的相适性。

发明概述

因此,本发明提供新核苷酸序列,其编码含有新形式的磷酸酶抑制剂蛋白-1 的多肽及其功能性片段,可用于在包括人的动物中调控心肌收缩性的方法中。可将核苷酸序列导入心脏细胞中,并可以使用本领域已知的技术触发表达条件。导入遗传物质可能是为了针对长期表达能力而掺入宿主遗传物质中的目的,或者是为了较短的瞬时表达需要的目的。另外,为含有新形式 I-1 的新多肽形式的表达产物自身可

作为调控物直接或间接给予,尤其是在更急性发作的情况下。

一方面,本发明提供分离的核酸分子,其编码含有 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列的组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段。在本发明的一个实施方案中,分离的核酸分子包含 SEQ ID NO: 3。

又一方面,本发明提供分离的核酸分子,其编码组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段,其中所述核酸分子编码的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列具有至少 90% 的同一性(例如 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性),其中所述核酸分子在 75 位编码组成型非磷酸化氨基酸。在本发明的一个实施方案中,分离的核酸分子包含 SEQ ID NO: 3 或者与 SEQ ID NO: 3 的核苷酸序列至少 90% 相同的核苷酸分子。

另一方面,本发明提供分离的核酸分子,其编码含有 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段。在本发明的一个实施方案中,分离的核酸分子包含 SEQ ID NO: 4。

另一方面,本发明提供分离的核酸分子,其编码组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段,其中所述核酸分子编码的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列具有至少 90% 的同一性(例如 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性),其中所述核酸分子在 75 位编码组成型非磷酸化氨基酸。在本发明的一个实施方案中,分离的核酸分子包含 SEQ ID NO: 4 或者与 SEQ ID NO: 4 的核苷酸序列至少 90% 相同的核苷酸分子。

又一方面,本发明提供包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列的分离多肽或其组成型非磷酸化片段。

又一方面,本发明提供包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的分离多肽或其组成型非磷酸化片段。

另一方面,本发明提供分离的核酸分子,其编码含有 SEQ ID NO:

12 的氨基酸序列的组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段。在本发明的一个实施方案中,分离的核酸分子包含 SEQ ID NO: 10。

又一方面,本发明提供分离的核酸分子,其编码组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段,其中所述核酸分子编码的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列具有至少 90%的同一性(例如 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性),其中所述核酸分子在 75 位编码组成型非磷酸化氨基酸。在本发明的一个实施方案中,分离的核酸分子包含 SEQ ID NO: 10 或者与 SEQ ID NO: 10 的核苷酸序列至少 90%相同的核苷酸分子。

另一方面,本发明提供分离的核酸分子,其编码含有 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列的组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段。在本发明的一个实施方案中,分离的核酸分子包含 SEQ ID NO: 15。

又一方面,本发明提供分离的核酸分子,其编码组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段,其中所述核酸分子编码的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列具有至少 90%的同一性(例如 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性),其中所述核酸分子在 67 和 75 位编码组成型非磷酸化氨基酸。在本发明的一个实施方案中,分离的核酸分子包含 SEQ ID NO: 15 或者与 SEQ ID NO: 15 的核苷酸序列至少 90%相同的核苷酸分子。

另一方面,本发明提供分离的核酸分子,其编码含有 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列的组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段。在本发明的一个实施方案中,分离的核酸分子包含 SEQ ID NO: 17。

又一方面,本发明提供分离的核酸分子,其编码组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段,其中所述核酸分子编码的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列具有至少 90%的同一

性(例如 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100% 的同一性),其中所述核酸分子在 67 和 75 位编码组成型非磷酸化氨基酸。在本发明的一个实施方案中,分离的核酸分子包含 SEQ ID NO: 17 或者与 SEQ ID NO: 17 的核苷酸序列至少 90%相同的核苷酸分子。

另一方面,本发明提供降低患者的心肌收缩性的方法,该方法包括将有效量的分离的核酸分子导入患者的心脏细胞中,所述分离的核酸分子编码包含 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段,由此降低患者的心肌收缩性。

另一方面,本发明提供降低患者的心肌收缩性的方法,该方法包括给予有效量的含有 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的分离多肽或其组成型非磷酸化片段,由此降低患者的心肌收缩性。

另一方面,本发明提供治疗心力衰竭患者的方法,该方法包括:将核酸分子以有效降低磷酸酶活性的量导入患者的心脏细胞中,所述核酸分子含有编码突变形式的磷酸酶抑制剂-1 蛋白的序列,其中突变形式在为野生型磷酸酶抑制剂-1 蛋白中的 PKC- α 磷酸化位点的位置包含至少一个组成型非磷酸化氨基酸,由此治疗心力衰竭患者。在另一个实施方案中,至少一个组成型非磷酸化氨基酸为在所述突变形式的磷酸酶抑制剂-1 蛋白中的 67 位的 A (丙氨酸)、D (天冬氨酸)或 C (半胱氨酸)或 75 位的 A、D 或 C。在又一个实施方案中,核酸分子与含有选自 SEQ ID NO: 3、4、9、10、15 和 17 的序列的核酸分子具有至少 90%的同一性,其中所述核酸分子在 67 或 75 位编码组成型非磷酸化氨基酸。在又一个实施方案中,突变形式的磷酸酶抑制剂-1 蛋白包含选自 SEQ ID NO: 5、6、11、12、16 和 18 的氨基酸序列。编码突变形式的蛋白的核酸分子可以选自 SEQ ID NO: 3、4、9、10、15 和 17。突变形式的磷酸酶抑制剂-1 蛋白可为全长蛋白或其组成型非磷酸化片段。在另一个实施方案中,该方法还包括获得所述核酸。

在另一个实施方案中,本发明的方法还包括将核酸分子以有效降

低磷酸酶活性的量导入,所述核酸分子含有编码突变形式的磷酸酶抑制剂-1蛋白的序列,其中突变形式在为野生型磷酸酶抑制剂-1蛋白中的 PKA 磷酸化位点的位置包含至少一个组成型非磷酸化氨基酸,由此治疗心力衰竭患者。又一方面,至少一个组成型非磷酸化氨基酸为在所述突变形式的磷酸酶抑制剂-1蛋白中的 35 位的 D (天冬氨酸 GAC,但也包括 GAT)或 E (谷氨酸 GAG,但也包括 GAA)。在又一个实施方案中,核酸分子与含有 SEQ ID NO: 19 的核酸分子具有至少 90%的同一性,所述核酸分子在 35 位编码组成型磷酸化氨基酸。在又一个实施方案中,突变形式的磷酸酶抑制剂-1蛋白包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列。编码突变形式的蛋白的核酸分子可以包含 SEQ ID NO: 19。突变形式的磷酸酶抑制剂蛋白可为全长蛋白或其组成型非磷酸化片段。

另一方面,本发明提供治疗心力衰竭患者的方法,该方法包括:将核酸分子以有效降低磷酸酶活性的量导入患者的心脏细胞中,由此治疗心力衰竭患者,所述核酸分子编码含有 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列或其片段的多肽。在另一个实施方案中,核酸分子含有的序列所编码的多肽包含 SEQ ID NO: 21 的至少 1-65 位的氨基酸,其中所述多肽在为 SEQ ID NO: 21 中的 PKC- α 磷酸化位点的位置被截短。在又一个实施方案中,所述多肽还可以在 SEQ ID NO: 21 的 67 或 75 位被截短。这些截短形式的 I-1 保留其抑制 PP-1 的功能性。

在本发明的另一个实施方案中,所述核酸分子还包含有效连接编码序列的启动子。在又一个实施方案中,启动子为组成型启动子。在再一个实施方案中,启动子在多种组织中表达,其中一种所述组织为心肌组织。启动子可以包含来自以下任一成员的调节序列:巨细胞病毒(CMV)、心脏特异性肌钙蛋白 T、肌球蛋白重链和肌球蛋白轻链。

在本发明方法的另一个实施方案中,通过给予含有病毒颗粒的病毒传递系统导入核酸分子。在又一个实施方案中,病毒颗粒包含慢病毒颗粒或腺相关病毒(AAV)颗粒。

在本发明方法的另一个实施方案中，以有效导致选自以下的状态的量导入核酸分子：肌细胞缩短、降低松弛时间常数和加速钙信号衰减及其组合。在又一个实施方案中，以有效改善收缩末压力尺度关系的量导入核酸分子。

在本发明方法的另一个实施方案中，心力衰竭患者除了心力衰竭之外还具有选自以下的情形：缺血、心律不齐、心肌梗塞、异常心脏收缩性和异常 Ca^{2+} 代谢及其组合。在又一个实施方案中，所述患者为人。

在本发明方法的另一个实施方案中，限制血液通过患者心脏的冠状血管流动，并将核酸分子导入到患者冠状动脉的腔内。在又一个实施方案中，在限制冠状静脉流出的同时心脏正在泵动。在又一个实施方案中，血液通过冠状血管的流动被完全限制。受限制的冠状血管可包括但不限于：左前降支动脉(left anterior descending artery, LAD)、远端回旋支动脉(distal circumflex artery, LCX)、大冠状静脉(great coronary vein, GCV)、心中静脉(middle cardiac vein, MCV)或前心室间静脉(anterior interventricular vein, AIV)。在又一个实施方案中，在冠状血管的缺血预适应后进行核酸分子的导入。在再一个实施方案中，在限制血液流出心脏的主动脉流的同时将核酸分子注射入患者心脏中，由此使核酸分子流入心脏中。

在本发明方法的另一个实施方案中，给药包括以下步骤：限制血液流出心脏的主动脉流，使得血流改变方向至冠状动脉中；将核酸分子注射至心脏、主动脉或冠状动脉口(coronary ostia)的腔内，以向冠状动脉提供核酸分子；在限制血液流出心脏的主动脉流的同时使心脏泵动；并恢复主动脉血流动。在又一个实施方案中，用导管将核酸分子注射入心脏中。在再一个实施方案中，将核酸分子直接注射入心肌中。在再一个实施方案中，该方法还包括评价患者心脏功能的参数。心脏功能的参数可为但不限于以下的一项或多项：心率、心脏代谢、心脏收缩性、心室功能、 Ca^{2+} 代谢和肌质网 Ca^{2+} ATP 酶活性。

另一方面，本发明提供诊断或预后心力衰竭患者的方法，该方法包括：由患者获得心脏磷酸酶抑制剂-1 蛋白样品；并检测至少一个磷酸化 PKC- α 磷酸化位点的存在情况，由此诊断或预后心力衰竭患者。在另一个实施方案中，至少一个磷酸化 PKC- α 磷酸化位点为在心脏磷酸酶抑制剂-1 蛋白的 75 位的苏氨酸(T)残基或 67 位的丝氨酸(S)残基。

另一方面，本发明提供包含分离的核酸分子的重组载体，所述核酸分子编码包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列的组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段。又一方面，本发明提供包含分离的核酸分子的重组载体，所述核酸分子编码包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段。

另一方面，本发明提供一种药物组合物，其包含含有 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列的分离多肽或其组成型非磷酸化片段以及药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。又一方面，本发明提供一种药物组合物，其包含含有 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的分离多肽或其组成型非磷酸化片段以及药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

另一方面，本发明提供包含分离的核酸分子和药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物，所述分离的核酸分子编码含有 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列的组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段。又一方面，本发明提供包含分离的核酸分子和药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物，所述分离的核酸分子编码含有 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段。在又一个实施方案中，核酸分子存在于选自以下的病毒载体中：重组逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒和单纯疱疹病毒-1。

另一方面，本发明提供针对含有 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列的分离多肽或其组成型非磷酸化片段产生的抗体。另一方面，本发明提供针对含有 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的分离多肽或其组成型非磷

酸化片段产生的抗体。再一方面,本发明提供含有该抗体的诊断试剂。

另一方面,本发明提供用于治疗心力衰竭患者的药盒,所述药盒含有分离的核酸分子以及按照本发明方法使用的说明书,所述分离的核酸分子编码包含 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其组成型非磷酸化片段。该药盒还可以含有这样的分离核酸分子: 其编码包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列的突变形式的磷酸酶抑制剂-1 蛋白。

另一方面,本发明提供治疗心力衰竭患者的药盒,该药盒含有分离的核酸分子和按照本发明方法治疗心力衰竭患者的说明书,所述分离的核酸分子包含的序列编码含有 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列或其片段的多肽。

本发明的其它方面在以下的公开内容中描述,属于本发明的范围。

附图简述

可以结合附图来理解通过实施例给出的以下详述,但不是将本发明限于所述的特定实施方案,附图在此引入作为参考。现在将通过非限制性实施例和参照附图来描述本发明的各种优选特征和实施方案,其中:

图 1. 重组 I-1 蛋白— (A) I-1 重组蛋白的示意图。将人 I-1 cDNA 克隆入 pGEX-6P3 载体中,作为 GST 融合蛋白进行表达。(B)依照出现顺序分别为 SEQ ID No: 34-38, 和(C)依照出现顺序分别为 SEQ ID No: 34、39、38 和 40。(B)和(C)显示了展现 I-1 野生型与重组突变体(S67A、T75A、S67A/T75A、S67D、T75D 和 S67D/T75D)比对的序列比对。

图 2. PKC- α 和 PKA 对重组人抑制剂-1 的磷酸化作用—放射自显影表明了 PKC- α 或 PKA (即放射性标记的磷蛋白)对 I-1 的磷酸化。对于 PKC- α 测定,对照样品(C)没有 PKC- α 、 Ca^{2+} (存在 EGTA)、1,2-二

酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸和磷脂酰丝氨酸,但含有所有其它的测定组分。对于 PKA 测定,对照样品(C)没有 PKA 和 cAMP,但含有测定的所有其它组分。通过加入 0.25 mM [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP (0.4 mCi/nmol)启动反应。

图 3. 重组腺病毒载体—表达 I-1 的重组腺病毒科的示意图。将 cDNA 由 pGEX-6P-3 亚克隆入 pSHUTTLE-IRES-hrGFP-1 载体中,并通过同源重组插入 AdEasy-1 病毒骨架中。

图 4. PKC- α 磷酸化 I-1 和 I-1 (S67A)的时程—PKC- α 用于在体外磷酸化 I-1 和 I-1 (S67A)。在所示时间,由每种混合物取出 20 μl ,在 12% SDS-PAGE 凝胶上分离,并转移至硝酸纤维素膜。A)表明放射性标记的磷蛋白的放射自显影。B)用 AC1 抗体(1:1000)探测相同的膜,用于检测总 I-1 和 I-1 (S67A)蛋白。C)该图显示了在不同时间每个蛋白(在 B 中存在时在两个条带中)的 ^{32}P 掺入比率(在 A 的两个条带中),该比率通过密度测定法定量,并对背景校正。数据代表 4 个独立实验的平均值 $\pm$ S.D.。在某些情况下, S.D. 小于符号尺寸。**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 。

图 5. 磷酸化位点的确定—(A)反相 HPLC 显示了以 HPLC 级分编号的胰蛋白酶肽的分离,峰 50 和 51 含有由柱子洗脱下来的大部分放射性。(B) MALDI-TOF MS 质谱显示了具有 1366.90 Da 质量的磷酸化肽,对应于人 I-1 序列(SEQ ID NO: 33)的氨基酸 73-82。(C)洗脱下来的放射性对每轮 Edman 降解中的氨基酸位置的图,表明洗脱下来的大部分同位素都具有第四个氨基酸。这与在 MALDI-TOF 数据中检测的肽 $^{72}\text{KKMTRITPTMK}^{82}$ (SEQ ID NO: 23)匹配。线图显示了平均值 $\pm$ S.D. ($n = 3$ 轮计数的 cpm)。在大部分情况下, S.D. 小于符号尺寸。(D)在所鉴定序列(SEQ ID NO: 33)的第三个氨基酸中的同位素的 Edman 降解检测。

图 6. 体外 PKC- α 磷酸化表明, Ser-67 和 Thr-75 是在纯化的人 I-1 上的主要 PKC- α 位点—纯化的人 I-1、I-1 (S67A)、I-1 (T75A)和 I-1

(S67A/T75A)蛋白于不同的时间被外源 PKC- α 磷酸化。(A)显示放射性标记的磷蛋白的放射自显影。(B)使用 AC1 抗体(1:1000)使用相同的膜检测 I-1 和 I-1 突变蛋白。(C)该图显示了 I-1 和 I-1 突变蛋白中的 ^{32}P 掺入量,该掺入量通过密度测定法定量,针对在 A 中所示的对应磷酸化时间点的背景校正。(D)条图显示了在 45 分钟时与 I-1 及其突变体相关的放射性,该放射性通过密度测定法定量,并对 I-1 水平标准化来表示。条棒显示了 3 个独立实验的平均值 $\pm$ S.D.。**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 。

图 7. 通过双向电泳分析纯化的人抑制剂-1 的磷酸化状态—双向凝胶图示了向具有 4.9 和 4.7 的 pI 值(从右向左)的蛋白斑点左侧的迁移位移(由 I-1 的 PKC- α 磷酸化诱导)。去磷酸化的 I-1 的 pI 为 5.1 ($n=3$)。显示了 I-1 样品的 2-D 凝胶图像的代表性部分。

图 8. 2-D 凝胶电泳证实, Ser-67 和 Thr-75 是人 I-1 上的两个主要的 PKC- α 磷酸化位点—显示了 I-1 样品的双向凝胶的相关区域的放大。(A)磷酸化的 I-1 野生型显现为具有 pI 值 5.1、4.9 和 4.7 (由右向左)的 3 个独立蛋白斑点。(B)和(C)在 I-1 上的 Ser-67 或 Thr-75 被丙氨酸取代时观察到 pI 为 5.1 和 4.9 的两个斑点。(D) Ser-67 和 Thr-75 的同时突变消除了蛋白的任何 pI 迁移位移。pI 为 5.1 的单个斑点显现在 2-D 凝胶中。虚线圆表示与野生型相比在每个 I-1 突变体中的磷酸化类型的预期位置。每个 2-D 凝胶都使用来自不同磷酸化测定的纯化蛋白进行 3 次。

图 9. I-1 或 I-1 突变体的 PKC- α 和 PKC 磷酸化对 PP1 活性的作用—该图图示了在存在以下几项时监测的 I-1 对 PP1 的抑制活性: (A) 去磷-I-1 (实心方块)、PKC- α -磷-I-1 (实心三角)、PKA-磷-I-1 (空心方块)和 PKC- α + PKA-磷-I-1 (空心三角); (B) PKC- α 磷酸化的: I-1 (S67A)(实心方块)、I-1 (T75A)(实心三角)和 I-1 (S67A/T75A)(实心圆形); 和 PKA 磷酸化的: I-1 (S67A)(空心方块)、I-1 (T75A)(空心三角)和 I-1 (S67A/T75A)(空心圆形)。在没有 I-1 或其突变体的情况下,将

与每种 I-1 类型相关的活性(nmol/分钟/ml)对 PP1 活性标准化。定量值代表以双份进行的 7 个独立实验的平均值(平均值 $\pm$ S.D.)。

图 10. 在体内的 I-1 的双向蛋白质印迹—双向蛋白质印迹图示了基于 pI (等电点)和分子量分离的蛋白。在图下方显示了 2-D 凝胶的方形区域的放大。

图 11. 基础心肌细胞收缩性(T75D 突变)一条图图示了由于 I-1 中的 T75D 突变而导致的心肌收缩性改变(随时间变化)。肌细胞收缩速率被称为 $+dL/dt_{max}$; 肌细胞松弛速率被称为 $-dL/dt_{max}$; 产生的收缩力被称为 FS。

图 12. 基础心肌细胞收缩性(S67D 突变)一条图图示了由于 I-1 中的 S67D 突变而导致的心肌收缩性改变(随时间变化)。肌细胞收缩速率被称为 $+dL/dt_{max}$; 肌细胞松弛速率被称为 $-dL/dt_{max}$; 产生的收缩力被称为 FS。

图 13. I-1 在 Thr-75 的 PKC- α 磷酸化抑制心肌细胞收缩性—(A)在以 MOI 500 感染后 24 小时大鼠心肌细胞的图像。右侧图像显示了绿色荧光蛋白(GFP)表达。(B)在用 Ad.I-1WT 和 Ad.I-1(T75D)感染的心肌细胞裂解物中 I-1 抗体(AC1; 1:1000)检测的蛋白过表达。剥下该膜,并探测 PP1 (santa Cruz, 1:1000)。该凝胶的上方部分的考马斯染色证实相等的蛋白载荷和条带模式。(C)在 Ad.GFP (连续黑线)、Ad.I-1WT (不连续线)和 Ad.I-1(T75D)(连续的灰线)中心肌细胞力学的代表性示踪。以条图形式显示了至 90%松弛的时间、缩短分数(FS%)以及收缩和松弛的最大速率(dL/dt_{max})。6 个心脏的总细胞数为: 121 (Ad.GFP)、90 (Ad.I-1 WT)和 91 (Ad.I-1(T75D))。这些值表示平均值 $\pm$ SEM。

图 14. 在 Ser-67 和/或 Thr-75 磷酸化 I-1 减弱肌细胞心脏功能—(A)在以 MOI 500 进行腺病毒感染后 24 小时成年大鼠心肌细胞的图像。使用 I-1 特异性抗体(AC1; 1:1000)检测用以下几项感染的肌细胞中的蛋白过表达: 1) GFP; 2) I-1WT; 3) I-1(S67D); 4) I-1(T75D); 和 5) I-1(S67D/T75D)。凝胶的上层部分用考马斯蓝染色,以证实同等的蛋

白载荷。(B)以条图形式显示了腺病毒感染的心肌细胞的缩短分数(FS%)以及最大收缩和松弛速率(dL/dt_{max} , $\mu m/秒$)。

图 15. PKA 活化对用 Ad.I-1(S67D)、Ad.I-1(T75D)和 Ad.I-1(S67D/T75D)感染的肌细胞的作用—以条图形式显示了用 0.1 μM 法司可林(forskolin)处理的感染心肌细胞的缩短分数(FS%)以及最大收缩和松弛速率(dL/dt_{max} , $\mu m/秒$)。

图 16. 在 Thr-75 磷酸化 I-1 对 SR Ca^{2+} 转运的 Ca^{2+} 亲和力的作用—(A)该图图示了针对在培养的心肌细胞中表达的 I-1 野生型、I-1(T75D)和 GFP 蛋白检测的在广泛范围的 $[Ca^{2+}]$ 内的 SR Ca^{2+} 转运初速度。数据对 Ad.I-1WT、Ad.I-1(T75D)和 Ad.GFP 样品的理论 V_{max} 标准化。曲线代表通过 OriginLab 5.1 程序获得的 S 曲线拟合。符号代表用 Ad.GFP (实心方块)、Ad.I-1WT (空心圆形)和 Ad.I-1(T75D)(实心圆形)感染的、每个以双份测定的 3 个独立匀浆化肌细胞的平均值。(B)免疫印迹图示了总 SERCA2a (Affinity Bioreagents, 1:1000)、总 PLN 和集钙蛋白(作为内部载荷对照(Affinity Bioreagents; 1:1000))。

图 17. 在 Ser-67 和/或 Thr-75 磷酸化抑制剂-1 对 SR Ca^{2+} 转运的 Ca^{2+} 亲和力的作用—该图显示了用以下几项感染的心肌细胞中 SERCA Ca^{2+} 转运的初始速率的评价结果: (A) Ad.GFP; (B) Ad.I-1WT; (C) Ad.I-1(S67D); (D) Ad.I-1(T75D); 和(E) Ad.I-1(S67D/T75D)。符号代表在基础或法司可林处理下、每个以双份测定的 3 个来自单个心脏的匀浆肌细胞的平均值。(F)该图显示了在基础或法司可林处理下每组的 EC_{50} 平均值。***, $p < 0.001$ 代表了在基础之下每组对 GFP 的对比。#, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$, 代表了在法司可林之下每组对 GFP 的对比。

图 18. 在 Thr-75 PKC- α 磷酸化 I-1 增强 PP1 活性—(A)条图表明在用 Ad.GFP (实心条棒)、Ad.I-1WT (空心条棒)或 Ad.I-1(T75D)(灰色条棒)感染的心肌细胞裂解物(1 μg)中测定的总磷酸酶活性。将冈田酸(10 nM)加入细胞裂解物,以分化 1 型和 2A 型磷酸酶活性。定量值代表以双份测定并对 Ad.GFP 标准化的 4 个独立细胞裂解物的平均值(平均值

± SEM)。 (B)条图表示对纯化的重组 I-1 野生型(实心条棒)、PKC- α 磷酸化 I-1(S67A)(空心条棒)和 I-1(T75D)(灰色条棒)检测的 PP1c (0.5 ng)活性。这些值对 I-1 野生型标准化。误差棒表示每个为双份的 5 个独立试验的 SEM 值。

图 19. 在 PKA 刺激时在腺病毒感染的肌细胞中抑制蛋白磷酸酶-1 活性的百分率—条图显示了在过表达以下几项的法司可林处理的肌细胞裂解物中测定的总磷酸酶活性: Ad.GFP (黑色条棒); Ad.I-1WT (白色条棒); Ad.I-1(S67D)(浅灰色条棒); Ad.I-1(T75D)(中等灰色条棒); 和 Ad.I-1(S67D/T75D)(深灰色条棒)。条棒代表每个以双份测定的 3 个独立肌细胞裂解物的平均值(平均值 ± SEM)。

发明详述

定义

本文使用的术语“核酸分子”或“核酸序列”意指包含编码多肽的可读框的多核苷酸,其还可以包含非编码序列,例如内含子和所需的调节序列(例如启动子、增强子、转录终止子等)。本发明的核酸序列可以编码用于选定目的特定基因。该基因对宿主细胞可为内源的,或者可被重组导入到宿主细胞中,例如作为游离保持的质粒或稳定整合入基因组中的质粒(或其片段)。

本文使用的术语“分离的”是指所提到的物质由一般发现其的环境中取出来。因此,分离的生物材料可以没有细胞组分,即其中存在或产生该材料的细胞组分。就核酸分子而言,分离的核酸包括 PCR 产物、凝胶上的 mRNA 条带、cDNA 或限制性片段。分离的核酸包括插入到质粒、粘粒、人工染色体等中的序列。因此,重组核酸可组成分离的核酸。分离的蛋白可与其它蛋白或核酸或这二者结合,与它们在细胞中结合,或者如果其是膜结合蛋白的话则与细胞膜结合。分离的材料可为但不一定是纯化的。

本文使用的术语核酸(核苷酸)序列的“互补物”是指可通过匹配

碱基对形成双链结构的碱基序列。例如 G-T-A-C 的互补序列为 C-A-T-G。

本文使用的“磷酸酶抑制剂-1 蛋白”或“I-1 蛋白”为一种蛋白质，例如描述于 GenBank 登录号 NM_006741，其通过抑制蛋白磷酸酶-1 的活性调节心肌收缩性。

在磷酸酶抑制剂-1 蛋白或 I-1 蛋白的背景下，术语“野生型”是指编码磷酸酶抑制剂蛋白-1 (I-1) 的 SEQ ID NO: 7 的核苷酸序列、亚单位 1A 和 SEQ ID NO: 8 的多肽序列，以及编码 I-1 蛋白的任何其它核苷酸序列(与前述多肽序列具有相同的功能特性和结合亲和力)，例如等位基因变体。

野生型 I-1 包括所谓的蛋白“功能性衍生物”。所述“功能性衍生物”是指本发明的多肽或核酸的“化学衍生物”、“片段”、“多态性”或“变体”。功能性衍生物保留至少一部分蛋白功能，这允许其可用于本发明的用途。在本领域众所周知，由于遗传密码子的简并性，众多不同的核酸序列可编码相同的氨基酸序列。在本领域还众所周知的是，可对氨基酸实施保守改变，以得到保留原始功能性的蛋白或多肽。在这两种情况下，所有的排列都被本文的公开内容所涵盖。

本文所述的分离核酸分子的功能等同物包含在本发明范围内。遗传密码的简并性允许某些密码子被指定相同氨基酸的其它密码子置换，因此会产生相同蛋白。核酸序列可显著改变，因为除了甲硫氨酸和色氨酸之外的已知氨基酸可由一个以上的密码子编码。但是，其编码氨基酸序列应被保留。

另外，核酸序列可包含由 5'末端和/或 3'末端的至少一个核苷酸的添加、缺失或取代产生的核苷酸序列，只要其添加、缺失或取代不改变本文所述的由该核苷酸序列编码的氨基酸序列。例如，本发明的核酸分子可在其 5'末端和/或 3'末端加入限制性内切核酸酶识别位点。

此外，有可能缺失密码子，或用非简并密码子的密码子取代一个或多个密码子，以产生结构改变的多肽，但该多肽与未改变的核酸分

子产生的多肽具有基本相同的用途或活性。本领域公认两种多肽是功能等同的，产生它们的两种核酸分子也是功能等同的，即便核酸分子之间的差异与遗传密码的简并性并不相关。

I-1 的“化学衍生物”包含一般不是该蛋白的组成部分的其它化学部分。可使肽的靶向氨基酸残基与能够和选定的侧链或末端残基反应的有机衍生物反应，将蛋白或肽的共价修饰导入到分子中。

术语“片段”用于表示来源于 I-1 的氨基酸序列的多肽，该氨基酸序列的长度低于全长多肽，并得自该全长多肽。这样的片段例如可以通过蛋白剪切全长蛋白产生。这样的片段还可以如下重组获得：适宜地修饰编码该蛋白的 DNA 序列，以在天然序列的 C-末端、N-末端和/或之中的一个或多个位点缺失一个或多个氨基酸。这样的片段保留了天然 I-1 的功能部分。

另一个属于本发明范围的功能性衍生物是“变体”多肽，相对于天然多肽，其没有多个氨基酸，或者包含添加的或取代的氨基酸。这些具有添加、取代和/或附加氨基酸的变体保留了天然 I-1 的功能性部分。具有缺失、插入和/或取代的氨基酸残基的蛋白的功能性衍生物可以使用本领域一般技术人员众所周知的标准技术制备(例如使用定点诱变(Adelman 等, 1983, DNA 2:183)。或者，具有氨基酸缺失、插入和/或取代的蛋白可使用本领域众所周知的方法通过直接化学合成便利地制备。

本文使用的术语“突变体”是指由包含遗传突变的基因翻译的 I-1 多肽，所述突变导致氨基酸序列相比于野生型序列被改变，并导致 I-1 多肽的功能被改变。

本文使用的术语“磷酸酶活性”是指对常用的模式蛋白底物 MyBP 的磷酸酶活性。在本文中，使用髓鞘碱性蛋白(MyBP)(用 ^{32}P 标记)作为底物(结合配偶体)检测蛋白磷酸酶活性的改变。

本文使用的短语“组成型非磷酸化的”，如在“组成型非磷酸化磷酸酶抑制剂 I-1 蛋白”或“磷酸酶抑制剂 I-1 蛋白的组成型非磷酸化

片段”中一样，是指在所有生理条件下在至少一个特定氨基酸位置持续地非磷酸化的磷酸酶抑制剂-1 蛋白或其片段。在一个特定实施方案中，该片段保留氨基酸位置 67 或 75 中的至少一个或这二者，并包含去除或取代在该特定残基处的可磷酸化羟基的突变。“磷酸酶抑制剂-1 蛋白的组成型非磷酸化氨基酸”是指 I-1 蛋白或其片段的多肽链中的氨基酸，其在所有生理条件下都是非磷酸化的，即通过突变氨基酸残基去除或取代在该特定残基处的可磷酸化羟基。

本文使用的术语“PKC- α 磷酸化位点”是指被蛋白激酶 C 同种型 α (PKC- α)磷酸化的特定氨基酸。同 PKA 一样，PKC 为丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶。其磷酸化在其底物中的丝氨酸或苏氨酸残基(具体地说，其磷酸化所述残基中的 OH 基)。

本文使用的术语“PKA 磷酸化位点”是指被蛋白激酶 A (PKA，也称为 cAMP 依赖性蛋白激酶)磷酸化的特定氨基酸。每个 PKA 都是由两个调节性亚单位和两个催化性亚单位组成的全酶。在低水平的 cAMP 下，全酶保持完整，并是催化失活的。当 cAMP 浓度升高时(例如通过某些 G 蛋白偶联受体活化腺苷酸环化酶、抑制降解 cAMP 的磷酸二酯酶)，cAMP 结合调节亚单位上的两个结合位点，然后其经历释放催化性亚单位的构型变化。然后游离的催化性亚单位可催化 ATP 末端磷酸酯向蛋白底物的丝氨酸或苏氨酸残基的转移。

本文使用的术语“治疗”是指给予药剂，给药的量、方式和/或模式有效改善与疾病相关的病症、症状或参数，或者统计学显著程度地或本领域技术人员可检测程度地有效防止疾病发展。有效的量、方式或模式可随患者而变，并可适应于患者。例如，给药模式可包括通过病毒或病毒样颗粒传递。通过防止疾病发展，治疗可在受侵袭的或被诊断的患者中或在怀疑患有疾病的患者中防止疾病恶化，而且治疗可在面临疾病风险或疑似患有疾病的患者中防止疾病或疾病症状的发作。

本文使用的术语“心力衰竭”是指其中心脏适当泵动以满足身体

需要的能力有缺陷的任何疾病。在许多情况当中，心力衰竭是心肌细胞的兴奋-收缩偶联的各种步骤中于细胞水平的一种或多种异常的结果。其最经常地缘于心肌收缩的缺陷，该缺陷可因为许多原因而发生，最常见的原因包括：对心肌的缺血损伤、对血液由心脏外流的过度力阻、由于瓣膜功能缺陷而导致的心室过载、心肌感染或炎症或者先天性心肌收缩功能不良。(Braunwald, E. 2001 *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 第 15 版, 1318-29 页)。

本文使用的术语“心肌症”是指心肌(即心脏肌肉)功能的退化。心肌症可为外在的(例如其中原发性病症存在于心肌自身的外部, 例如由缺血引起)或内在的(例如其中心肌虚弱不是缘于可鉴定的外部病因)。

本文使用的术语“收缩性”(如在心肌收缩性中一样)是指心肌的效能。其经常被定义为：心肌纤维在给定的纤维长度收缩的内在能力。

本文使用的术语“收缩末压力尺度关系”(也称为收缩末压力容积关系)是指以下的线性关系(Grossman, W.等, 1977 *Circulation* 56:845-52):

$$P_{ES} = mV_{ES} + b,$$

其中 P_{ES} 和 V_{ES} 分别为收缩末压力和容积, m 为描述它们的关系的直线的斜率, b 为 $V_{ES} = 0$ 时的压力。该等式还可以表示为:

$$P_{ES} = m(V_{ES} - V_0),$$

其中 $V_0 = -b/m$, 为 $P_{ES} = 0$ 时的容积。收缩末压力-尺度关系一般被视为人的心室收缩性的有效指数。

本文使用的术语“心脏细胞”是指可为以下几项的细胞: (a)存在于患者中的心脏的一部分, (b)离体维持的心脏的一部分, (c)心脏组织的一部分, 或(d)从患者心脏分离的细胞。例如, 细胞可以是肌细胞, 例如心脏肌细胞(心肌细胞)或平滑肌细胞。本发明的心脏细胞还可以包括心脏中的内皮细胞, 例如毛细血管、动脉或其它血管的细胞。

本文使用的术语“心脏”是指存在于患者中的心脏器官或在患者

外部离体维持的心脏器官。

本文使用的术语“心脏组织”是指来源于患者心脏的组织。

本文使用的术语“限制血流”是指基本上阻断通过血管的血流，例如进入远端主动脉及其分支的血流。例如，流出心脏的血液的至少约 50%被限制，优选约 75%和更优选地约 80%、90%或 100%的血液被限制由心脏流出。可以通过例如用夹钳阻塞主动脉和肺动脉来限制血流。

本文使用的术语“获得”是指合成、购买或以其它方式取得(核酸或蛋白)。

本文使用的术语“病毒递送系统”是指可以将包括非病毒序列的核酸导入哺乳动物细胞中的病毒颗粒，例如病毒或病毒样颗粒。病毒递送系统自身可以或不可以进行病毒复制。

其它定义在整个本文公开内容的上下文中出现。

本发明的其它实施方案

磷酸酶抑制剂-1 及其突变体

微调性调节蛋白激酶和蛋白磷酸酶活性是控制多种关键磷蛋白底物的磷酸化状态所必需的，所述关键磷蛋白底物调控糖原代谢、蛋白合成、细胞分裂、神经元信号转导和肌肉收缩。第二信使 cAMP 依赖性蛋白激酶(PKA)和 1 型磷酸酶(PP1)之间的串话在内源磷蛋白抑制剂-1 (I-1)水平上发生，允许放大 cAMP 信号转导级联。

I-1 首先在兔骨骼肌中被鉴定，但在哺乳动物组织中广泛表达，在种间是高度保守的。该热稳定性蛋白(分子量 18,700)在被 PKA 于 Thr-35 磷酸化时变成有活性的，有效抑制 PP1，增强 PKA 介导的蛋白磷酸化。抑制剂 1 上的 Thr-35 被 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白 2B (PP-2B，钙调神经磷酸酶)和蛋白磷酸酶 2A (PP-2A)去磷酸化，但 PP-2B 在 Ca^{2+} 存在下起主要作用。抑制剂-1 的这种可逆磷酸化被 cAMP 和钙相反调节，将两种主要的第二信使的作用联系起来，导致调节大量的胞内过

程。

业已表明,在心肌中,I-1对PP1的调节对基础收缩性以及心脏对 β -肾上腺素能刺激的响应均起作用。 β -肾上腺素能激动剂异丙基肾上腺素的正变力作用伴有导致PP1活性抑制的I-1磷酸化,该抑制通过防止涉及心脏收缩状态的重要蛋白的去磷酸化而增强心肌收缩性。令人感兴趣的是,组成型活化形式的I-1(T35D;AA1-65)不仅保护心脏免于出现压力过载诱导的肥大,而且在预先存在心力衰竭的情况下拯救心脏功能,这提示I-1可能是一种有前景的治疗心力衰竭的候选物。

除了I-1上的Thr-35磷酸化以外,还发现Ser-67在体外被显著磷酸化。发现在纹状体脑组织中的脯氨酸定向的激酶Cdk5和神经元cdc2样蛋白激酶NCLK均能够磷酸化I-1上的Ser-67。Cdk5介导的磷酸化对I-1活性没有影响,而NCLK增强抑制活性。最近,发现在小鼠和兔心脏中表达的主要同工酶PKC- α 也磷酸化Ser-67,这可以将I-1与PP1相互作用的能力降低50%,增加PP1活性。

已知在人和实验性心力衰竭中的PKC- α 和PP1活性均显著增加,本发明部分基于以下发现:人I-1在额外的位点(Thr-75)被PKC- α 磷酸化。本文提供的数据表明,该激酶磷酸化Thr-75的程度与其磷酸化Ser-67相同;而且,两个残基均彼此独立地被磷酸化。广泛的动力学分析表明,这些PKC- α 位点没有一个抑制PP1的催化亚单位的活性。此外,这些磷酸化位点没有一个干扰I-1的PKA介导的抑制功能。此新磷酸化位点的发现提供了治疗心力衰竭的新的药剂和疗法,尤其是为基于病理生理条件下增加的PP1、PKA和PKC- α 活性之间的相互影响的疗法提供了新途径。

因此,本发明包括一种治疗心力衰竭患者的方法,该方法包括抑制PKC- α 的磷酸化活性。除了抑制PKC α 的磷酸化活性之外,还包括增强PKA的磷酸化活性。

一种按照本发明实施方案的治疗方法包括将含有编码突变形式

的磷酸酶抑制剂-1 蛋白的序列的核酸导入患者的心脏细胞中，其中突变形式在于野生型中为 PKC- α 磷酸化位点的位置包含至少一个氨基酸，其中所述至少一个氨基酸为组成型非磷酸化的，或者模拟突变形式中的非磷酸化状态。

在一个更具体的实施方案中，突变形式含有的突变去除或取代在所述残基上存在的可磷酸化羟基(例如 S67 和/或 T75)。在一个更具体的实施方案中，T75 和/或 S67 残基可被取代或缺失。

例如，突变形式可在于野生型蛋白中为 PKC- α 磷酸化位点的位置包含至少一个氨基酸，其中所述至少一个氨基酸为组成型非磷酸化的。在一个具体的实施方案中，所述至少一个氨基酸为所述突变形式的磷酸酶抑制剂-1 蛋白的 65 位的丙氨酸(A)、天冬氨酸(D)或半胱氨酸(C)，或者为 75 位的丙氨酸(A)、天冬氨酸(D)或半胱氨酸(C)。可基于类似电荷(无电荷)、选择保守取代和基于大小(没有大的)来选择氨基酸取代。

在另一个具体实施方案中，突变形式在于野生型蛋白中为 PKA 磷酸化位点的位置包含至少一个氨基酸，其中所述至少一个氨基酸为组成型磷酸化的。例如，所述至少一个氨基酸可以为在所述突变形式的磷酸酶抑制剂-1 蛋白中的 35 位的天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)。此外，可基于类似电荷(负电荷)以及大小(没有大的)来选择氨基酸取代。

在其中需要残基来模拟磷酸化状态的实施方案中，例如使用 T35 突变体的情况，设想了含有该残基取代谷氨酸或天冬氨酸的突变。

核酸分子

本发明的核酸分子包括 DNA 分子(例如线性、环形、cDNA 或染色体 DNA)和 RNA 分子(例如 tRNA、rRNA、mRNA)以及使用核苷酸类似物产生的 DNA 或 RNA 的类似物。核酸分子可为单链的或双链的，但最好是双链 DNA。本发明的核酸分子包括这样的核酸分子：其没有核酸所来源的生物的染色体 DNA 中天然侧接核酸分子的序列(即位

于核酸分子的 5'和 3'末端的序列)。此外,分离的核酸分子,例如 cDNA 分子,可在通过重组技术生产时基本上没有其它细胞材料,或者在化学合成时基本上没有化学前体或其它化学物质。

本发明的核酸分子(例如,可使用标准分子生物学技术和本文提供的序列信息分离具有 SEQ ID NO: 3、4、9、10、15 和 17 的核苷酸序列的核酸分子)。例如,核酸分子可使用标准杂交和克隆技术分离(例如描述于 Sambrook, J., Fritsh, E. F.和 Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1989)), 或者可以通过聚合酶链式反应使用基于例如 SEQ ID NO: 3、4、9、10、15 和 17 的序列设计的合成寡核苷酸引物分离。可使用 cDNA、mRNA 或基因组 DNA 作为模板,使用适宜的寡核苷酸引物,按照标准的 PCR 扩增技术扩增本发明的核酸。在另一个实施方案中,本发明的分离的核酸分子包括例如示于 SEQ ID NO: 3、4、9、10、15 和 17 的核苷酸序列的互补物的核酸分子。

本发明同样可以包含本文所述的核酸分子的重组核酸分子(例如重组 DNA 分子)为特征。

多肽

本发明的另一方面以多肽为特征。

要充分认识到的是,本领域技术人员可突变(例如取代)这样的核酸:其由于遗传密码简并性而与天然基因编码相同的氨基酸。这可能是合乎需要的,以便改善要在特定生物中表达的核酸的密码子使用。此外,要充分认识到的是,本领域技术人员可突变(例如取代)编码保守的氨基酸取代的核酸。还要充分认识到的是,本领域技术人员可一定程度地取代、添加或缺失氨基酸,而与天然基因产物相比不显著影响基因产物的功能,其每种情况都包括在本发明的范围内。

在一个实施方案中,本发明的多肽具有示于 SEQ ID NO: 5、6、

11、12、16 和 18 的氨基酸序列。

序列同一性

如下计算序列之间的同源性或序列相似性(这些术语在本文可交互使用)。为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分率,为最佳比较目的比对序列(例如可在第一个和第二个氨基酸或核酸序列的一个或两个中引入空位,用于最佳比对,为比较用途可忽略非同源序列)。在一个优选的实施方案中,为比较目的而比对的参比序列的长度为参比序列长度的至少 30%,优选至少 40%,更优选至少 50%、60%,甚至更优选至少 70%、80%、90%、100%。然后比较在对应的氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一个序列中的位置被与第二个序列中的对应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则分子在该位置相同(本文使用的氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。两个序列之间的同一性百分率在考虑空位数和每个空位长度的情况下随序列共有的相同位置数而变化,需要引入空位进行两个序列的最佳比对。

序列的比较和两个序列之间的同一性百分率的确定可使用数学算法完成。在一个优选的实施方案中,两个氨基酸序列之间的同一性百分率使用 Needleman 和 Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453)算法确定,该算法已加入到 GCG 软件包(可在 <http://www.gcg.com> 获得)中的 GAP 程序中,该程序使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵,空位权重为 16、14、12、10、8、6 或 4,长度权重为 1、2、3、4、5 或 6。在又一个优选的实施方案中,两个核苷酸序列之间的同一性百分率使用 GCG 软件包(可在 <http://www.gcg.com> 获得)中的 GAP 程序确定,该程序使用 NWSgapdna.CMP 矩阵,空位权重为 40、50、60、70 或 80,长度权重为 1、2、3、4、5 或 6。特别优选的参数组(除非另有说明,否则应使用该参数组)是 Blossum 62 记分矩阵,空位罚分为 12,空位延伸罚分为 4,移码空位罚分为 5。

两个氨基酸或核苷酸序列之间的同一性百分率可使用 E. Meyers 和 W. Miller ((1989) CABIOS, 4:11-17)的算法确定, 该算法已被加入到 ALIGN 程序(2.0 版)中, 该程序使用 PAM120 权重残基表, 空位长度罚分为 12, 空位罚分为 4。

基因转移/传递

设想通过已知的或目前未知的任何技术进行导入, 这些技术实现所需的导入结果。可将本文描述的核酸掺入到用作基因治疗方案的组成部分的基因构建体中。用于体内基因转移的方法是本领域已知的。这些方法包括将目标基因插入病毒载体中, 所述病毒载体包括重组逆转录病毒、腺病毒(例如复制缺陷型腺病毒、第一代腺病毒或肠道腺病毒、第二代腺病毒)、腺相关病毒(例如病毒壳体可为 AAV 壳体, 例如 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10 或 AAV11 壳体; 本领域技术人员应知晓, 可能有其它还没有鉴定的变体, 这些变体实施相同或相似的功能; 或者可以包括两个或多个 AAV 壳体的组分, 如在 US 6,491,907 中所述)、慢病毒和单纯疱疹病毒-1, 或者重组细菌或真核质粒。为产生慢病毒颗粒和其它病毒颗粒, 使编码目标物质的核酸与包装信号有效连接。将核酸包装在表达病毒结构蛋白的细胞中。例如, 细胞可包含编码病毒结构蛋白但没有包装信号的核酸。

腺相关病毒是一种非致病性人细小病毒, 能够位点特异性整合入染色体 19 中(Fisher 等, *Nature Medicine* (1997))。然而, 病毒复制需要辅助病毒, 例如腺病毒(Fisher 等, *Nature Medicine* (1997))。AAV 编码区可被非病毒基因取代, 修饰的病毒可用于感染分裂细胞和非分裂细胞(Xiao 等, *J. Virol.* (1996); Kaplitt 等, *Ann. Thorac. Surg.* (1996))。制备和使用 AAV 的示例性方法描述于 Fisher 等, *Nature Medicine* (1997), Xiao 等, *J. Virol.* (1996), Kaplitt 等, *Ann. Thorac. Surg.* (1996)。

不同的重组 AAV 基因组结构描述于 WO 01/092551, 包括双联

(duplexed)细小病毒载体——一种含有细小病毒壳体(例如 AAV 壳体)和编码异源核苷酸序列的载体基因组的细小病毒颗粒,其中载体基因组是自互补的,即该载体基因组是二聚化反向重复序列。

病毒载体直接转染细胞;质粒 DNA 可在例如阳离子脂质体(脂转染试剂)或衍生化(例如抗体缀合的)聚赖氨酸缀合物、短杆菌肽(gramacidin) S、人工病毒包膜或其它这样的胞内载体以及直接注射基因构建体或体内进行的 CaPO_4 沉淀辅助下传递。

使用具有由巨细胞病毒(CMV)或劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子驱动的非组织特异性强基因表达盒的腺病毒(Ad)载体已成功进行了向心血管组织的基因转移。涉及用病毒载体转导心脏细胞以传递血管生成因子的临床试验正在进行,所述血管生成因子例如为血管内皮细胞生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)和肝细胞生长因子(HGF)。已在动物模型中在体内使用大动脉内或冠状动脉内病毒注射。如对囊肿性纤维化的研究所知,改善功能不需要转导组织中的所有细胞。

已使用组织特异性启动子来增加心肌基因表达的特异性(Rothmann 等, *Gene Ther.* (1996))。限制转移基因于心脏表达的另一种策略包括将病毒载体直接注射入心肌中(Gutzman 等, *Circ. Res.* (1993); French 等, (1994), *Circulation.* (1994))。另一种尝试包括心包内病毒载体注射组合蛋白酶处理(Fromes 等, *Gene Ther.* (1999))。这些操作实现了局部基因传递,但由于缺乏强烈的病毒载体扩散而具有某些缺点。

已有文件记载了在体外使用培养的大鼠新生细胞以及在使用大鼠乳头肌浸润的离体系统中通过腺相关病毒(AAV)载体进行心肌细胞基因传递的效力(Maeda 等, *J. Mol. Cell. Cardiol.* (1998))。据报道,离体 AAV 载体转移后接同源心脏移植实现了高效的标记基因表达(Svensson 等, *Circulation.* (1999))。以高度一致性(平均 60-70%的心肌细胞)实现高水平的体内亲心性基因转移的方法描述于例如美国公开申请 20020032167。用于制备和使用病毒载体的其它方法描述于 WO

96/13597、WO 96/33281、WO 97/15679 和 Trapnell 等, *Curr. Opin. Biotechnol.* (1994); Ardehali 等, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* (1995); Dalesandro 等, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* (1996); Sawa 等, *Circ* (1995); Lee 等, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* (1996); Yap 等, *Circ.* (1996); 和 Pellegrini 等, *Transpl. Int.* (1998)。

目标多核苷酸还可以使用非病毒传递载体给予。本文使用的“非病毒传递载体”(在本文也称为“非病毒载体”)意在包括这样的化学制剂:其包含裸多核苷酸或缩聚多核苷酸(例如多核苷酸和阳离子化合物(例如硫酸葡聚糖)的制剂),以及与佐剂(例如病毒颗粒)混合的裸多核苷酸或缩聚多核苷酸(即目标多核苷酸不包含在病毒颗粒中,但转化制剂由裸多核苷酸和病毒颗粒(例如腺病毒颗粒)组成(参见例如 Curiel 等, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1992)。因此,“非病毒传递载体”可以包括由多核苷酸加病毒颗粒组成的载体,其中病毒颗粒不含目标多核苷酸。

“非病毒传递载体”包括细菌质粒、病毒基因组或其部分,其中被传送的多核苷酸未被壳体化或包含在病毒颗粒中,构建体含有部分病毒基因组和部分细菌质粒和/或噬菌体。该术语还包括天然和合成聚合物以及共聚物。该术语还包括基于脂质的载体。基于脂质的载体包括阳离子脂质体,例如由 Felgner 等(美国专利第 5,264,618 和 5,459,127 号; *PNAS* 84:7413-7417, (1987); *Annals N.Y. Acad. Sci.* (1995) 所公开的;它们还可以由中性或负电荷的磷脂或其包含人工病毒包膜的混合物组成,如 Schreier 等(美国专利第 5,252,348 和 5,766,625 号)所公开的。

非病毒传递载体包括基于聚合物的载体。基于聚合物的载体可包括天然和合成聚合物和共聚物。优选地,聚合物是生物可降解的,或者可易于由对象中去除。天然聚合物包括多肽和多糖。合成聚合物包括但不限于聚赖氨酸和聚乙烯亚胺(PEI; Boussif 等, *PNAS* 92: 7297-7301, (1995)), 所述分子还可以用做缩合剂。这些载体可被溶解、

分散或悬浮在分散液中，例如水、乙醇、盐水溶液及其混合物。多种多样的合成聚合物是本领域已知的，并可以使用。

包括病毒传递系统单元的制备物可通过本领域已知的多种方法中的任一种传递至患者的心脏细胞(在体内或离体)。

在临床环境中，可通过众多方法中的任一种将用于治疗基因的基因传递系统导入患者中，其中每个方法都是本领域熟知的。例如，基因传递系统的药物制备物可通过例如静脉内注射系统引入，蛋白在靶细胞中的特异性转导主要由基因传递载体提供的转染特异性、归因于控制报告基因表达的转录调节序列的细胞类型或组织类型表达或其组合产生。在其它实施方案中，重组基因的初始传递在完全定位地导入动物方面更加受限。例如，可通过导管(参见美国专利第 5,328,470 号)或通过立体定位注射(例如 Chen 等, *PNAS* 91: 3054-3057 (1994))导入基因传递载体。

给药途径包括静脉内、皮内、皮下、口服(例如吸入或摄入)、经皮(局部)和经粘膜。还包括注射，例如动脉内、肌内、心包内或静脉内。

在一个代表性的实施方案中，将制备物直接注射到心脏组织中。US 10/914,829 描述了直接注射方案。直接注射或施加病毒载体至心肌中可限制转移基因于心脏的表达(Gutzman 等, *Cric. Res.* (1993); French 等, *Circulation.* (1994))。制备物还可以提供给离体细胞。然后将含有目标蛋白的细胞(例如突变体 I-1)给予患者。

在另一个代表性实施方案中，将制备物导入一个或多个冠状动脉的腔内。可限制血液流出冠状动脉的通道。可以顺行传递制备物，并使其在动脉中停留 1-5 分钟，例如 1-3 分钟。

在另一个代表性的实施方案中，将制备物固定至支持基质(例如缝合线、手术植入材料、移植物等)，以向局部组织和/或血管环境提供受控的或不受控的释放，如 WO 01/091803 所述。

非病毒载体可通过类似方法传递。

药物组合物

可将本发明的分离的核酸分子或多肽加入到适于给予患者如人的药物组合物中。这些组合物通常包括多肽或核酸分子和药学上可接受的载体。本文使用的术语“药学上可接受的载体”用包括与给药相适的任何溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和延迟吸收剂等。这些用于药物活性物质的介质和药剂的用途是已知的。除非任何常规介质或药剂与活性化合物不相适，否则这样的介质可用于本发明的组合物。还可以将补充活性化合物加入组合物中。

药物组合物可配制得与其预期给药途径相适。用于胃肠外、皮内或皮下应用的溶液或混悬液可包括以下组分：无菌稀释剂，例如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂；抗菌剂，例如苄醇或对甲基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂，例如乙二胺四乙酸；缓冲剂，例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；以及用于调整渗透压的试剂，例如氯化钠或葡萄糖。可用酸或碱调整 pH，例如盐酸或氢氧化钠。胃肠外制剂可封装在由塑料或玻璃制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(在水可溶的情况下)或分散液和用于临时制备无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内给药，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ)或磷酸缓冲盐水(PBS)。在所有情况下，组合物应是无菌的，并应当流动至存在易注射性的程度。其在制造和存储条件下应当是稳定的，并应当被防腐，以防止微生物如细菌和真菌的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适混合物的溶剂或分散介质。

例如，可以使用包衣料如卵磷脂、就分散体而言维持最佳粒径和使用表面活性剂来维持合适的流动性。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸甲酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等，

实现对微生物作用的预防。在许多情况中，组合物中优选包含等渗剂，例如糖、多元醇(如甘露醇、山梨糖醇)、氯化钠。通过在组合物中包括延迟吸收的试剂，如单硬脂酸铝和明胶，可使注射组合物的吸收延长。

可通过将活性化合物(例如本文所述的分离的核酸分子)以最佳量掺入含有上述一种或组合的成分的合适溶剂中，接着除菌过滤，制得无菌注射液。一般来说，将治疗剂掺入含有基础分散介质和来自上述那些的其它成分的无菌溶媒中制备分散液。就用于制备无菌注射液的无菌粉末而言，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥，其从之前除菌过滤的活性成分溶液产生活性成分加上任何其他所需成分的粉末。

还可以经粘膜或经皮方式全身给药。对于经粘膜或经皮给药，在制剂中使用适于需要穿透的屏障的渗透剂。这样的渗透剂通常是已知的，对于经粘膜给药包括例如变性剂、胆汁盐和梭链孢酸衍生物。使用鼻喷雾或栓剂来实现经粘膜给药。对于经皮给药，将活性化合物配制成如本领域通常所知的膏剂、油膏、凝胶或霜剂。

将治疗剂与保护治疗剂免于从体内快速消除的载体一起配制，所述载体例如为控释制剂，包括植入物和微胶囊化递送系统。可以使用生物可降解的生物相容性聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这些制剂的方法对本领域技术人员是显而易见的。这些材料也可以从 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc 商购获得。脂质体悬浮剂(包括靶向含有病毒抗原的单克隆抗体的感染细胞的脂质体)也可以用作药学上可接受的载体。可以根据本领域技术人员已知的方法来制备这些脂质体悬浮剂，如在美国专利第 4,522,811 号中所述。

可以将药物组合物和给药说明书一起纳入容器、包装或分配器中。

基因治疗构建体的药物制备物还可以包含其中埋入基因传递载体的缓释基质。重组细小病毒，尤其是重组腺相关病毒(rAAV)，例如

可在脱水或干燥步骤(即部分或完全干燥、冻干)后用于传递核酸序列(即基因和 DNA 序列)来进行基因治疗(如上所述),其中治疗性病毒载体在支持基质上干燥(即固定至支持基质)。有用的支持基质包括可手术植入的材料(即缝合线、手术移植材料、移植装置等),其用于包装或转运给患者,由此允许经固定至支持基质的 rAAV 传递基因治疗。这进一步描述于 WO 01/091803。或者,在可由重组细胞完整产生完整的基因传递系统如逆转录病毒载体的情况下,药物制备物可以包含一种或多种产生基因传递系统的细胞。

待递送的核酸分子还可以配制成 DNA-或 RNA-脂质体复合制剂。这样的复合物包括通过阳离子电荷(静电作用)结合基因材料(DNA 或 RNA)的脂质混合物。可用于本发明的阳离子脂质体包括 3β -[N-(N',N'-二甲基-氨基乙烷)氨基甲酰基]-胆固醇(DC-Chol)、1,2-二(油酰氧基-3-三甲基胺基丙烷(DOTAP))(参见例如 WO 98/07408)、赖氨酰磷脂酰乙醇胺(L-PE)、脂多胺如脂精胺、N-(2-羟乙基)-N,N-二甲基-2,3-二(十二烷基氧基)-1-丙烷溴化铵、二甲基二十八烷基溴化铵(DDAB)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、N(1,2,3-二油酰氧基)丙基-N,N,N-三乙铵(DOTMA)、DOSPA、DMRIE、GL-67、GL-89、脂质转染试剂(Lipofectin)和脂转染胺试剂(Lipofectamine)(Thiery 等, *Gene Ther.* (1997); Felgner 等, *Annals N.Y. Acad. Sci.* (1995); Eastman 等, *Hum. Gene Ther.* (1997))。在美国专利第 5,858,784 号中描述的多核苷酸/脂质制剂也可以用于本文所述方法。这些脂质有许多可由例如 Boehringer-Mannheim 和 Avanti Polar Lipids (Birmingham, Ala.)商购获得。还包括见于美国专利第 5,264,618、5,223,263 和 5,459,127 号的阳离子磷脂。可以使用的其它适合磷脂包括磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、神经鞘磷脂、磷脂酰肌醇等。还可以包括胆固醇。

给药

可将如上所述的药物组合物注射入受侵袭的血管(如动脉)或器官

(如心脏)中。在治疗实施方案的一种方法中,限制通过心脏的冠状血管的血流,并将病毒传递系统导入冠状动脉的腔内。在一个具体实施方案中,允许心脏泵动,同时限制冠状静脉外流。在另一个具体实施方案中,将病毒传递系统注射入心脏中,同时限制血液流出心脏的主动脉流,由此允许病毒传递系统流入并传递至心脏。在其它实施方案中,通过冠状血管的血流被完全限制,在具体的这类实施方案中,受限的冠状血管包括:左前降支动脉(LAD)、远端回旋支动脉(LCX)、大冠状静脉(GCV)、心中静脉(MCV)或前心室间静脉(AIV)。在某些实施方案中,病毒传递系统的导入在冠状血管的缺血预适应之后进行。

在另一个实施方案中,通过含有以下步骤的方法将含有病毒传递系统的载体注射入心脏中:限制血液流出心脏的主动脉流,使得血流改变方向至冠状动脉中;将载体注射入心脏、主动脉或冠状动脉口的腔内,以使载体流入冠状动脉中;在限制主动脉血流出心脏的同时允许心脏泵动;并恢复主动脉血流。在一个更具体的实施方案中,用导管将载体注射入心脏中,在一个甚至更具体的实施方案中,将载体直接注射入心脏的肌肉中。

已知 PKC- α 活性在心力衰竭病症中增加,PKC- α 抑制构成了治疗心力衰竭的药理学靶。因此,给予 PKC- α 拮抗剂或任何组合本发明的核酸或多肽用于抑制 PKC- α 活性的药剂。在可能需要降低心肌收缩性的病症中,另外需要给予 PKC- α 激动剂作用的药剂。

治疗评价

可以通过测定治疗对心脏功能或心肌细胞功能(例如但不限于心率、心脏代谢、心脏收缩性、心室功能、Ca²⁺代谢和肌质网 Ca²⁺ ATP 酶活性)相关参数的作用来评价本发明的治疗方法。

还可以通过其对患者的作用来评价治疗,例如,根据治疗领域技术人员认为与特定治疗相关的参数。例如,在治疗心力衰竭时,示例性参数可涉及心脏和/或肺功能。心脏参数包括脉搏、EKG 信号、内

径减损、心率、心脏收缩性、心室功能,例如,左心室末端舒张压(LVEDP)、左心室收缩压(LVSP)、 Ca^{2+} 代谢(例如胞内 Ca^{2+} 浓度或峰 Ca^{2+} 或静止 Ca^{2+})、力量输出、心脏的松弛和压力、力量频率关系、心脏细胞存活或凋亡或离子通道活性,例如钠钙交换、钠通道活性、钙通道活性、钠钾 ATP 酶泵活性,以及肌球蛋白重链、肌钙蛋白 I、肌钙蛋白 C、肌钙蛋白 T、原肌球蛋白、肌动蛋白、肌球蛋白轻链激酶、肌球蛋白轻链 1、肌球蛋白轻链 2 或肌球蛋白轻链 3、IGF-1 受体、PI3 激酶、AKT 激酶、钠-钙交换蛋白、钙通道(L 和 T)、集钙蛋白或钙网蛋白的活性。评价可以包括进行血管造影术(例如定量血管造影术)和/或血管内超声(IVUS),例如在治疗之前、之后或之中。

诊断/预后心力衰竭的方法

本文另外包括如下诊断或预后患者的心力衰竭:由患者获得心脏磷酸酶抑制剂-1 蛋白的样品,并检测至少一个磷酸化 PKC α 磷酸化位点的存在情况,更具体地说,其中至少一个磷酸化 PKC α 磷酸化位点包含 T75 或 S67。诊断试剂可以包含本发明的分离的核酸或其互补物或片段。

药盒

本发明的分离的核酸分子或多肽可以药盒提供。该药盒可以包括但不限于:(a)核酸分子或多肽,例如包括该核酸分子或多肽的组合物,和(b)信息材料。该信息材料可为与本文所述方法和/或本发明的核酸分子或多肽对本文所述方法的用途相关的描述性、说明性、销售或其它材料。例如,信息材料可涉及心力衰竭。

在一个实施方案中,信息材料可以包括以适于实施本文所述方法的方式给予本发明的核酸分子或多肽的说明书,例如以适宜的剂量、剂型或给药方式(例如本文所述的剂量、剂型或给药方式)。在另一个实施方案中,信息材料可包括将本发明的核酸分子或多肽给予适宜患

者的说明书，所述患者例如为人，例如患有心力衰竭或有心力衰竭风险的人。例如，该材料可以包括将本发明的核酸分子或多肽给予患有心肌病或有心肌病风险的患者的说明书。

除了本发明的分离的核酸分子或多肽以外，药盒的组合物可以包括其它成分，例如溶剂或缓冲剂、稳定剂、防腐剂 and/或治疗心力衰竭的第二种药剂。或者，药盒中可包含其它成分，但在与本发明的核酸分子或多肽不同的组合物或容器中。在这些实施方案中，药盒可以包括用于混合本发明的核酸分子或多肽和其它成分的说明书，或者连同其它成分一起使用本发明的核酸分子或多肽的说明书。

本发明的核酸分子或多肽可以任何形式提供，例如液体、无水或冻干形式。优选本发明的核酸分子或多肽是大致纯化的和/或无菌的。当本发明的核酸分子或多肽以液体溶液提供时，液体溶液优选为水性溶液，优选为无菌水性溶液。当本发明的核酸分子或多肽以无水形式提供时，一般通过加入适宜的溶剂重配。溶剂例如为无菌水或缓冲液，任选地可在药盒中提供。

药盒可以包括一个或多个用于含有本发明的核酸分子或多肽的组合物的容器。在某些实施方案中，药盒包含单独的容器、分配器或间隔，用于组合物和信息材料。例如，组合物可以包含在瓶、小瓶或注射器中，信息材料可包含在塑料套或塑料袋中。在其它实施方案中，药盒的独立元件包含在一个未分开的容器中。例如，组合物包含在贴附标签形式的信息材料的瓶、小瓶或注射器中。在某些实施方案中，药盒包括多个(例如一包)单个容器，每个容器均含有一个或多个单位剂型(例如本文所述的剂型)的药剂。例如，药盒含有多个注射器、安瓿、锡纸袋或泡罩包装，每个均含有一个单位剂量的本发明的核酸分子或多肽。药盒的容器可为气密性的和/或防水的。药盒任选地包含适于给予组合物的装置，例如支架、注射器或任何有用的传递装置。

抗体

同样包括选择性结合分离的多肽或其组成型非磷酸化片段的抗体,所述多肽含有 SEQ ID NO: 5 或 6 的氨基酸序列。制备抗体的方法是免疫科学领域的一般技术人员众所周知的。本文使用的术语“抗体”不仅是指完整的抗体分子,而且是指保留了免疫原结合能力的抗体分子片段。这些片段也是本领域众所周知的,在体外和体内均可常规使用。因此,本文使用的术语“抗体”不仅是指完整的免疫球蛋白分子,而且是指众所周知的活性片段 $F(ab')_2$ 和 Fab。 $F(ab')_2$ 和没有完整抗体的 Fc 片段的 Fab 片段更快速地由循环中清除,并可以具有极低的完整抗体的非特异性组织结合(Wahl 等, *J. Nucl. Med.* 24:316-325 (1983)。本发明的抗体包含完整的天然抗体、双特异性抗体、嵌合抗体、Fab、Fab'、单链 V 区片段(scFv)、融合多肽和非常规抗体。

在一个实施方案中,结合含有 SEQ ID NO: 5 或 6 的氨基酸序列的分离多肽或其组成型非磷酸化片段的抗体是单克隆抗体。或者,该抗体可以为多克隆抗体。多克隆抗体的制备和使用也是技术人员已知的。本发明还涉及杂种抗体,其中一对重链和轻链得自第一个抗体,而另一对重链和轻链得自不同的第二个抗体。这样的杂种还可以使用人源化重链和轻链形成。这样的抗体经常被称为“嵌合”抗体。

一般而言,完整抗体被认为含有“Fc”和“Fab”区。Fc 区参与补体活化,但不参与抗原结合。Fc'区已被酶裂解的抗体或产生没有 Fc'区的抗体称为“ $F(ab')_2$ ”片段,其保留了完整抗体的两个抗原结合位点。同样,Fc 区已被酶裂解或产生没有 Fc 区的抗体称为“Fab”片段,其保留了完整抗体的其中一个抗原结合位点。Fab'片段由共价结合的抗体轻链和一部分抗体重链组成,称为“Fd”。Fd 片段是抗体特异性的主要决定簇(单个 Fd 片段可以与多达 10 个不同轻链结合,而不改变抗体特异性)。分离的 Fd 片段保留了特异性结合免疫原性表位的能力。

可以使用含有 SEQ ID NO: 5 或 6 的氨基酸序列的分离多肽、或其组成型非磷酸化片段、或其免疫原性片段作为免疫原,通过本领域

已知的任何方法制备抗体。一种获得抗体的方法是用免疫原免疫适宜的宿主动物，并执行标准的多克隆或单克隆抗体生产方法。免疫原有利于该免疫原在细胞表面上提呈。适宜宿主的免疫可以多种方式进行。可以宿主免疫细胞吸收的传递载体将编码分离多肽、或其组成型非磷酸化片段、或其免疫原性片段的核酸序列提供给宿主，所述分离多肽含有 SEQ ID NO: 5 或 6 的氨基酸序列。细胞又在宿主中产生免疫应答的细胞表面上表达受体。或者，可在体外在细胞中表达编码分离多肽、或其组成型非磷酸化片段、或其免疫原性片段的核酸序列，所述分离多肽含有 SEQ ID NO: 5 或 6 的氨基酸序列，之后分离受体，并将受体给予其中产生抗体的适宜宿主。

或者，如有需要，抗分离多肽或其组成型非磷酸化片段的抗体可来源于抗体噬菌体展示文库，所述分离多肽含有 SEQ ID NO: 5 或 6 的氨基酸序列。噬菌体能够感染细菌并在细菌中增殖，所述噬菌体可被改造得在与人抗体基因组合时展示人抗体蛋白。噬菌体展示是使噬菌体在其表面上‘展示’人抗体蛋白的过程。将来自人抗体基因文库的基因插入噬菌体群。每个噬菌体均携带不同抗体的基因，由此在其表面上展示不同的抗体。

然后可由宿主纯化通过本领域任何已知方法制备的抗体。抗体纯化方法可包括盐沉淀(例如用硫酸铵)、离子交换层析(例如在阳离子或阴离子交换柱上优选以中性 pH 层析，并用离子强度渐增的分步梯度洗脱)、凝胶过滤层析(包括凝胶过滤 HPLC)和在亲和树脂上层析，所述亲和树脂例如为 A 蛋白、G 蛋白、羟磷灰石和抗免疫球蛋白。

抗体可便利地由被工程为表达该抗体的杂交瘤细胞生产。制备杂交瘤的方法在本领域众所周知。杂交瘤细胞可在适宜的培养基中培养，并可以使用支架培养基作为抗体来源。编码目标抗体的多核苷酸又可由产生该抗体的杂交瘤获得，然后可由这些 DNA 序列合成或重组生产抗体。为生产大量抗体，一般来说更便利的是获得腹水。产生腹水的方法一般包括将杂交瘤细胞注射入未免疫敏化的组织相容性

或免疫耐受哺乳动物中，尤其是小鼠。哺乳动物可通过预先给予适宜的组合物(例如降植烷)而对产生的腹水初免。

通过本发明方法产生的单克隆抗体(Mab)可通过本领域已知的方法“人源化”。“人源化”抗体是这样的抗体：其中至少部分序列已由其初始形式改变，使其更象人免疫球蛋白。在产生非人动物(例如鼠类)抗体时，人源化抗体的技术特别有用。人源化鼠抗体的方法的实例在美国专利 4,816,567、5,530,101、5,225,539、5,585,089、5,693,762 和 5,859,205 中提供。

参考以下的支持性实验和实施例可更全面地理解本发明。然而，要理解的是，这些实施例意在阐述本发明的某些方面，不应被解释为限制由权利要求所限定的本发明的范围。

实施例

本发明人使用纯化的蛋白对 PKC- α 介导的 I-1 磷酸化进行检验。克隆并表达编码人 I-1 或在 Ser-67 具有丙氨酸取代的 I-1 突变体的 cDNA。纯化所获得的重组蛋白，并去除 GST-标签。纯蛋白的 PKC- α 磷酸化表明，突变体的 ^{32}P -掺入降低，但与 I-1 野生型相比未被完全清除，提示可能有另一个 PKC- α 磷酸化位点。为鉴定该推定的 PKC- α 位点，对磷酸化的人 I-1 实施与 Edman 降解组合的基质辅助激光解吸离子化质谱。这些分析揭示，苏氨酸-75 为人 I-1 上的新 PKC- α 位点。为证实该数据，产生在 Thr-75 (T75A)以及 Ser-67 加 Thr-75 (S67A/T75A) 具有丙氨酸取代的 I-1 突变体。

I-1 及其突变体的 PKC- α 处理表明，S67A 或 T75A 中的 ^{32}P -掺入降低，而在 S67A/T75A 突变体中没有 ^{32}P -掺入。通过双向电泳进一步分析证实：1) Thr-75 为 PKC- α 位点；2) Ser-67 和 Thr-75 是人 I-1 上仅有的被 PKC- α 磷酸化的残基。为确定 Thr-75 磷酸化的功能意义，进行蛋白磷酸酶测定。PKA 对 I-1 或 I-1 突变体的磷酸化与 PP1 的抑制有关。然而，I-1 的 PKC- α 磷酸化对其活性没有作用。此外，PKC- α 磷

酸化对 PKA 介导的 I-1 的抑制功能没有影响。

材料

PKC- α 、PKA 和 cAMP 购自 Upstate Biotechnology。磷脂酰丝氨酸得自 Avanti Polar-Lipids。pGEX 6P-3 质粒、谷胱甘肽 Sepharose 4B、PreScission 蛋白酶和 Immobiline DryStrips、IPG Buffer pH 4-7 得自 Amersham Biosciences。Quick-Change II 定点诱变试剂盒和 BL21 CodonPlus (DE3)-RIPL 感受态细胞得自 Stratagene。二酰甘油、氨苄青霉素和 IPTG 得自 Sigma-Aldrich。SYPRO Ruby 蛋白凝胶染色得自 Cambrex。T4 连接酶、EcoRI 和 Not I 限制酶购自 New England Biolabs。蛋白脱盐离心柱和 B-PER GST 融合蛋白纯化试剂盒购自 Pierce。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 得自 Perkin Elmer。抗-AC1 是定制(Affinity Bioreagents)的针对小鼠 I-1 的 N-末端序列($^1\text{MEPDNSPRKIQFTVP}^{15}$)(SEQ ID NO: 24)的兔多克隆亲和纯化抗体。抗-GST 兔多克隆抗体得自 Affinity Bioreagents。

方法

抑制剂-1 突变蛋白的产生

将人 I-1 cDNA (GenBank 登录号#U48707)按读框并在谷胱甘肽-S-转移酶(GST)基因的 C-末端侧克隆入 pGEX-6P-3 载体(图 1A)。正向克隆引物为: 5'-CAGA GAATTC C ATG GAG CAA GAC AAC AGC CC-3' (SEQ ID NO: 25)(EcoR I 限制酶位点加下划线; 用于读框表达的间隔核苷酸加阴影; 起始密码子采用斜体), 反向克隆引物为: 5'-CAGA GCGGCCGC TCA GAC CGA GTT GGC TCC CT-3' (SEQ ID NO: 26)(Not I 限制酶位点加下划线; 终止密码子采用斜体)。PreScission 蛋白酶剪切位点位于 GST 和 I-1 基因之间, 以利于随后去除 GST 标签。使用 QuikChange II 定点诱变试剂盒在 pGEX-6P3 载体中获得 I-1 cDNA 突变。

用于将 Ser-67 诱变为 Ala 的引物为: 5'-TCC ACT TTG GCA ATG GCA CCA CGG CAA CGG AAG AA-3' (SEQ ID NO: 27)(丙氨酸密码

子加下划线)及其互补物(图 1B)。为将 Thr-75 诱变为 Ala, 引物为 5'-CGG CAA AAG AAG ATG GCA AGG ATC ACA CCC AC-3' (SEQ ID NO: 28)(丙氨酸密码子加下划线)及其互补物。通过使用 I-1 (S67A) 作为将 Thr-75 诱变为 Ala 的模板产生 I-1 (S67A/T75A); 使用以上对 I-1 (T75A)所述的相同引物组(图 1B)。用于将 Ser-67 诱变为 Asp 的引物为: 5'-TCC ACT TTG GCA ATG GAC CCA CGG CAA CGG AAG AA-3' (SEQ ID NO: 29)(天冬氨酸密码子加下划线)及其互补物(图 1C)。为将 Thr-75 诱变为 Asp, 引物为: 5'-CGG CAA CGG AAG AA ATG GAC AGG ATC ACA CCC AC-3' SEQ ID NO: 30)(天冬氨酸密码子加下划线)及其互补物(图 1C)。如上所述以分步方式产生 I-1 (S67D/T75D) (图 1C)。

这些质粒中的每一个都被转染入 BL21 CodonPlus (DE3)-RIPL 感受态细胞中, 并在 LB-琼脂氨苄青霉素(150 $\mu\text{g/ml}$)平板上生长。将单个菌落接种入 3-ml LB-氨苄青霉素(50 $\mu\text{g/ml}$)起始培养物, 并于 37°C 生长 16 小时。将 1 ml 的这些培养物接种入 100 ml LB-氨苄青霉素中, 并于 25°C 生长 2 小时。此时, 加入无菌 IPTG 至 0.1 μM 终浓度, 使培养物于 25°C 再生长 4 小时。然后沉淀细胞, 使用 B-PER GST 融合蛋白纯化试剂盒纯化 GST-I-1 融合蛋白。GST 融合蛋白对 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)彻底透析, 并与 PreScission 蛋白酶于 4°C 温育 4 小时。在蛋白酶剪切后, 使用预洗涤的谷胱甘肽 Sepharose 4B 于 4°C 达 4 小时或过夜由培养基中去除 PreScission 酶和 GST 标签。如 Laemmli (24)所述使用 15%聚丙烯酰胺凝胶通过 SDS-PAGE 分析样品, 以估计纯化后的剪切程度和蛋白收率。蛋白浓度通过 Micro BC 测定(Pierce)来测定。

体外磷酸化测定

在 150 μl 含 7 μg I-1 或 I-1 突变体蛋白的缓冲液中于 35°C 进行反应。重组 I-1 或 I-1 (S67A)、I-1 (T75A)、I-1 (S67A/T75A)突变体被 PKC- α

磷酸化。对于 PKC- α (3 $\mu\text{g/ml}$)磷酸化, 终浓度为 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、5 mM MgCl_2 、5 mM NaF、0.5 mM CaCl_2 、0.3 mM 磷脂酰丝氨酸和 0.02 mM 1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸。加入 0.25 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (0.4 mCi/nmol)启动磷酸化反应。于所示时间, 由每种混合物取出 20 μl , 向培养基加入 4 μl SDS 样品缓冲液(5-强度)终止反应。对于双向电泳, 如上所述用 PKC- α (4 $\mu\text{g/ml}$)的 100 μl 缓冲液于 35 $^\circ\text{C}$ 对 25 μg (在某些情况下为 35 μg)蛋白磷酸化 45 分钟(或者在某些情况下过夜)。加入 400 μM ATP 启动反应。在所有情况下, 对于对照样品都由混合物中省去 Ca^{2+} (存在 1 mM EGTA)、磷脂酰丝氨酸、二酰甘油和 PKC- α 。

通过 PKA 磷酸化重组 I-1 或 I-1 (S67D/T75D)突变体(7 μg)。在 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、5 mM MgCl_2 、5 mM NaF、1 mM EGTA、1 μM cAMP 和 0.25 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (0.4 mCi/nmol)或 400 μM ATP 存在下进行 PKA (0.1 μg)磷酸化。在 1 小时后, 向培养基加入 SDS 样品缓冲液终止反应。对于对照样品, 由反应培养基中省去 PKA 和 cAMP。经 SDS-PAGE 和放射自显影或通过三氯乙酸(20%, 重量/体积)沉淀继之以透析确定 I-1 物质中的 ^{32}P -磷酸量。使用 ImageQuant 5.2 软件进行数据的密度分析。

在初始实验中, 观察到 PKC- α 磷酸化的 I-1 在放射自显影中作为磷蛋白双峰迁移。其它研究揭示, 这仅在 PKC- α 磷酸化而非 PKA 磷酸化时发生(图 2)。在两个 PKC- α 磷酸化位点中的每一个都突变为 Ala 时仍观察到该双峰(图 4 和 6)。令人感兴趣的是, I-1 双峰与 PKC- α 活化剂 1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(DAG)在磷酸化缓冲液中的存在情况有关(未显示数据)。这一事实可归因于蛋白净电荷的改变, 并由此降低了 SDS 的结合。

鉴定抑制剂-1 上的额外磷酸化位点

为鉴定新 PKC- α 磷酸化位点, 如上所述, 在痕量 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 存在

下, 将 10 μg GST-I-1 (纯化的 I-1) 在 50 μl PKC- α 磷酸化缓冲液中于 37°C 温育 4 小时。对反应混合物进行 12% SDS-PAGE, 凝胶用 SYPO Ruby 于室温过夜染色。鉴定 ^{32}P -标记的 GST-I-1 条带, 将其由凝胶切离, 并进行胰蛋白酶消化。使用 Vydac C18 反相 HPLC 柱分离胰蛋白酶化肽, 并立即通过 Cerenkov 计数测定分离级分的 ^{32}P 。对放射性峰进行基质辅助激光解吸电离/飞行时间(MALDI-TOF)质谱和 Edman 降解。使用 GPMAW 程序针对来源于 I-1 人序列的预测肽匹配实验肽质量。

免疫印迹分析

使用 12% 聚丙烯酰胺凝胶通过 SDS-PAGE 分离 I-1 物质。在分离后, 通过湿转移(180 mA, 3 小时)将蛋白转移至硝酸纤维素膜(孔径 0.1 μm)(Schleicher & Schuell Bioscience)。使用 5% 干奶粉在含 0.1% 吐温 20 的 Tris 缓冲盐水(pH 7.4)中的溶液于室温封闭非特异性结合位点 1-2 小时。用 I-1 的一抗 ACI (1:1000) 或抗 GST (1:1000) 于室温探测膜 3 小时, 或于 4°C 过夜探测膜。将过氧化物酶标记的二抗(Amersham Biosciences)与增强的化学发光检测系统(Supersignal West Pico Chemiluminescent, Pierce)组合使用, 以显现一抗。条带的光密度通过 ImageQuant 5.2 软件分析。

双向电泳

将纯化的 I-1 或 PKC- α 磷酸化的或 PKA-磷酸化的 I-1 和突变体(使用蛋白脱盐离心柱脱盐 1 次)溶解在由 7 M 尿素、2 M 硫脲、4% CHAPS、10 mM DTT、1% IPG 4-7 缓冲液和 0.01% 溴酚蓝组成的再水合缓冲液中。将溶解的蛋白加至 18 cm ImmobilineTM Drystrips (pH 4-7NL), 并于室温过夜温育。在 Genomic Solutions Investigator 2-D 电泳系统上以每个条带 50 mA 进行 60,000 V-小时的再水合等电聚焦(IEF)。第二向于 12.5% 平板凝胶上以 500 V 进行 14 小时。固定凝胶,

并用荧光染色(SYPRO Ruby)于室温过夜染色。使用 FLA-3000 Imager (Fuji Medical Systems, Stamford, CT)以 475 nm 荧光激光和黄色 520 nm 滤光片扫描 SYPRO 染色凝胶。为比较目的, 平行处理 2-D 凝胶, 随后使用 ProImage 软件将斑点定位于标准坐标系。因此, 凝胶可彼此对比, 并可以容易地检测实验操作时蛋白斑点的迁移模式的改变。

将三氯乙酸沉淀的小鼠心脏匀浆物蛋白样品溶解在 DeStreak 溶解缓冲液中, 随后加至用于等电聚焦的 11 cm IPG 条带(pH 3-10)。在使用 SDS-PAGE 12.5%以第二向分离蛋白后, 以湿转移(180 mA, 3 小时)将蛋白转移至硝酸纤维素膜(孔径 0.1 μm)。在此应用以上对 1-D 凝胶的免疫印迹分析所描述的不同方法。

抑制剂-I 的分离

按照修改的 Shenolikar 等(25)所述方法由小鼠心肌分离 I-1。简而言之, 用研钵在液氮中将冷冻组织(1.5 g)研磨成粉, 并用 Polytron 匀浆器在 2 ml 冰冷的磷酸缓冲盐水(pH 7.2)中匀浆。立即加入 5 ml 1.5% (重量/体积)三氯乙酸, 匀浆物于 4°C 旋转 1 小时, 之后以 9,000 rpm 进行 30 分钟的离心。将上清液调整至 15% (重量/体积)三氯乙酸, 于 4°C 过夜旋转, 并以 18,000 rpm 离心 30 分钟。将沉淀重悬浮在 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0 (1/20 原始提取体积)中, 煮沸 10 分钟, 如上离心。使用 1 M NaOH 将上清液的 pH 调整至约 7, 对样品进行 2-D 凝胶电泳。

蛋白磷酸酶活性测定

蛋白磷酸酶活性测定在含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、0.1 mM Na_2EDTA 、5 mM DTT、0.01% Brij 35 和任选的 0.5 ng PP1 (New England BioLabs)的 50 μl 反应混合物中进行。加入 10 μl 标准底物 ^{32}P -标记的髓鞘碱性蛋白(MyBP)(终浓度 50 μM)启动反应。为产生 ^{32}P -MyBP 底物, 按照制造商的说明(New England BioLabs)用 PKA 预先磷酸化市售的纯化 MyBP 至 2-4 mol 磷酸/mol 的化学计量, 并于 4°C

储存。在 30°C、10 分钟后，加入 200 μ l 的 20%三氯乙酸终止反应，在冰上冷却，并离心。测定中释放的 $[^{32}\text{P}]$ 量通过对 200 μ l 上清液闪烁计数确定。平行进行空白反应，其中混合物中省去 PP1。

为检测 I-1 对 PP1 的抑制活性，在加入 PP1 活性测定之前，如上所述在 400 μ M ATP 存在下于 30°C 用 PKC- α 或 PKA 磷酸化 I-1 野生型及其突变体(0.1 mg/ml) 1 小时或过夜，由测定培养基中省去 NaF。如下分步利用两种激酶 PKA 和 PKC- α 进行双重磷酸化。在 PKC- α 温育后，由混合物中取出等份试样，并向培养基加入 EGTA (1 mM)、cAMP (1 μ M)、PKA (0.1 μ g)和 ATP (400 μ M)。将 PKA 磷酸化反应于 30°C 温育与 PKC- α 处理所用相同的时间。随后，在去磷酸化或磷酸化的 I-1 或几种 I-1 突变体存在下监测 PP1 去磷酸化 $[^{32}\text{P}]$ MyBP。

I-1 腺病毒科的产生

为产生用于评价特定位点的 I-1 磷酸化的功能作用的离体表达载体，首先将携带特定突变(例如 Thr-75 至 Asp 突变(T75D))的 I-1 cDNA 克隆入 pShuttle-IRES-hrGFP-1 载体中。使该载体与 AdEasy-1 腺病毒骨架载体同源重组(图 3)。因此，使用 Ad-Easy XL 系统在 Ad-293 细胞中产生编码 I-1 野生型(Ad. I-1WT)、I-1 突变体 I-1(S67D)、I-1 (T75D)、I-1 (S67D/T75D)或绿色荧光蛋白(Ad.GFP)的腺病毒。这产生复制缺陷型重组腺病毒，其可以表达 I-1 (例如 T75D 突变体)和绿色荧光蛋白(GFP)。扩增腺病毒科，纯化(使用腺病毒小型纯化试剂盒(Virapur))，并按照标准方法滴定(使用 Adeno-X Rapid Titer Kit (Clontech))。

腺病毒介导的基因转移和肌细胞收缩性

为表征特定位点的抑制剂-1 磷酸化对心肌收缩性的影响，如前所述(Fan 等, *Circ. Res.* (2004))通过胶原酶消化由成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠(约等于 300 克)分离心室肌细胞。按照辛辛那提大学动物看护与使用委员会批准处理大鼠。将肌细胞重悬浮在改良培

培养基(M199, Gibco)中, 计数, 接种在包被层粘连蛋白的玻璃盖玻片或培养皿上, 用腺病毒以感染复数 500 在湿润的 5% CO₂ 培养箱中于 37°C 感染 2 小时。在感染后 24 小时, 使用 Grass S5 刺激器(0.5 Hz, 方波)于基础水平和任选在法司可林(100 nM)(Sigma-Aldrich)处理下进行肌细胞收缩。使用视频边缘运动检测器(Crescent Electronics)计算缩短分数(FS%)、至 90% 松弛的时间(%基线)以及收缩和松弛的最大速率(dL/dT_{max})。对于免疫印迹, 收集培养的心肌细胞, 并如前所述在裂解缓冲液中于 4°C 裂解 30 分钟(Fan 等, *Circ. Res.* (2004))。

对于免疫印迹, 收集培养的心肌细胞, 并使用 Polytron 在含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、10 mM NaF、1mM EDTA、0.3 mM 蔗糖、0.3 mM PMSF、0.5 mM DL-二硫苏糖醇(DTT)和蛋白酶抑制剂混合物(1 ml/20 g 组织)(Sigma)的溶解缓冲液中匀浆。对于蛋白磷酸酶活性的检测, 由缓冲液中省去 NaF。

在培养的大鼠心肌细胞中的肌质网 Ca²⁺摄取

在感染分离的大鼠心肌细胞 24 小时后, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 收集, 并在 50 mM 磷酸钾缓冲液(pH = 7.0)、10 mM NaF、1 mM EDTA、0.3 M 蔗糖、0.3 mM PMSF 和 0.5 mM DTT 中于 4°C 匀浆。如前所述(Kiss 等, *Circ. Res.* (1995))使用 Millipore 过滤技术和 ⁴⁵CaCl₂ 在匀浆物中确定初始 SR Ca²⁺摄取速率。简而言之, 将 100-250 µg 匀浆物在含有 40 mM 咪唑(pH = 7.0)、95 mM KCl、5 mM NaN₃、5 mM MgCl₂、0.5 mM EGTA 和 5 mM K₂C₂O₄ 的反应缓冲液中于 37°C 温育。在广泛的钙值(pCa 5-8)内确定初始摄取速率。加入 5 mM ATP 启动心肌细胞的钙摄取, 在 0、30、60 和 90 秒后通过 0.45 µm Millipore 滤器过滤等份试样, 以终止反应。使用 OriginLab 5.1 程序分析特定的 ⁴⁵Ca²⁺摄取值(最大 Ca²⁺摄取速率 V_{max} 和半最大 Ca 摄取浓度 EC₅₀)。

放射自显影和数据分析

如上简述, 通过放射自显影测定 I-1 物质中的 ^{32}P 掺入量。在湿转移后, 使硝酸纤维素膜对 Blue Lite Autorad Films (IsBioExpress) 曝光 24 或 48 小时, 使用 Image Quant 5.2 软件进行数据的密度分析。

统计

所有的值都以 n 个实验的平均值 $\pm$ SEM 表示。视情况通过针对不成对数据的 Student t 检验或单因素 ANOVA 评价比较。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 。

实施例 1. 利用 PKC- α 磷酸化 I-1 和 I-1 突变体

如所指出的, 先前的工作表明, PKC- α 于 Ser-67 磷酸化抑制剂-1 (I-1)。为检验在 I-1 上是否可能存在额外的 PKC- α 磷酸化位点, 如上所述用 PKC- α 在体外磷酸化其中 Ser-67 被丙氨酸取代的 I-1 突变体。图 4A 表明, 尽管突变体 I-1 (S67A) 的 PKC- α 磷酸化与野生型 I-1 相比被极大降低, 但没有被完全消除。每个蛋白掺入的 ^{32}P 的密度分析揭示, 在稳态时(20-45 分钟), I-1 (S67A) 掺入了野生型中存在的放射性水平(100%)的 $40 \pm 8.6\%$ (图 4C)。在某些实验中, 单一的额外条带出现在 78 Kda, 其对应于 PKC- α 自磷酸化。在任何试验中都没有检测到其它的放射性条带。特异性抗体(AC1, 1:1000)将磷-条带识别为抑制剂-1 (图 4B)。因此, 这些结果表明, 在 I-1 上存在至少一个额外的 PKC- α 磷酸化位点。

实施例 2. 磷酸化位点测定

为确定 I-1 上额外的 PKC- α 位点的位置, 纯化重组纯化的 I-1, 并在 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 存在下通过 PKC- α 进行体外磷酸化。 ^{32}P -标记的 I-1 通过 SDS-PAGE 纯化, 并用胰蛋白酶消化。在通过反相 HPLC 纯化胰蛋白酶化肽后, 由 Vydac 柱洗脱下来的两个峰 50 和 51 (图 5A) 含有 62% 的放射性。两个级分都进行 MALDI-TOF 质谱分析。级分 51 的质量匹配分析产生 3 个潜在的磷酸化肽。检测的质量(预测的质量加磷酸基团)

为 1226.44、1494.45 和 1572.68 Da, 其对应于以下的每个 I-1 序列:
 $^{62}\text{STLAMSPRQR}^{71}$ (SEQ ID NO: 31)、 $^{72}\text{KKMTRITPTMK}^{82}$ (SEQ ID NO: 23)和 $^{135}\text{KTAECIPKThER}^{146}$ (SEQ ID NO: 32)(未显示数据)。平行进行的峰 50 分析检测到质量为 1366.46 Da 的肽, 其对应于序列 $^{73}\text{KMTRITPTMK}^{82}$ (SEQ ID NO: 33)(该序列存在于峰 51 中, 少第一个赖氨酸)(未显示数据)。

为了鉴定磷酸基团的氨基酸位置, 对级分 51 进行 Edman 降解, 因为其与峰 50 相比包含更多的放射性。对该级分进行 15 个循环的放射性测序, 表明洗脱出来的大部分放射性信号具有第 4 个氨基酸(背景以上约 370 cpm)(图 5C)。随后针对 MALDI 质量匹配解读该结果表明, 只有肽 $^{72}\text{KKMTRITPTMK}^{82}$ (SEQ ID NO: 23)才在位置 4 具有可磷酸化的氨基酸(图 5B 和 5C; 磷氨基以阴影框突出显示)。洗脱出少量具有第 3 个氨基酸的同位素(120 cpm), 但这可能归因于 I-1 的赖氨酸 72 和 73 之间的可变胰蛋白酶剪切($^{73}\text{KMTRITPTMK}^{82}$ (SEQ ID NO: 33))。在 5 位检测的同位素量是缘于前一位点的转移, 是该技术的常见人工产物(通常约 50%)。在 4 轮后, 一轮至另一轮的 cpm 降低约相同的百分率。发现对应于序列 $^{73}\text{KMTRITPTMK}^{82}$ (SEQ ID NO: 33)的肽在其第三个氨基酸 Thr-75 被磷酸化(图 5D)。因此, 苏氨酸-75 (Thr-75)被鉴定为人 I-1 上的新 PKC- α 磷酸化位点。

为进一步证实 Thr-75 为 PKC- α 的磷酸化位点的身份, 以及为确定 Ser-67 和 Thr-75 是否为人 I-1 的仅有 PKC- α 位点, 如上所述于 Thr-75 [I-1 (T75A)]和 Ser-67 加 Thr-75 [I-1 (S67A/T75A)]产生丙氨酸取代突变。如在图 6 (A 和 C)中所示, 与 I-1 野生型相比, I-1 (T75A)突变体在 PKC- α 温育时掺入明显较少的 ^{32}P 。ACI 抗体将所有这些磷-条带都识别为抑制剂-1 (图 6B)。在 45 分钟时每个蛋白掺入的 ^{32}P 的密度分析揭示, I-1 (T75A)掺入了野生型水平(100%)的 $33.8 \pm 12.7\%$ (图 6D)。I-1 野生型被 PKC- α 磷酸化 45 分钟, 达到 0.88 mol Pi/mol 蛋白的化学计量, 而 I-1(S67A)和 I-1(T75A)的 Pi 掺入分别降低至 0.35 和 0.30 mol

Pi/mol 蛋白。图 6A、6C 和 6D 显示了在体外时程反应中以密度单位表示的 I-1 野生型和突变体的 ^{32}P 掺入。

结果表明, Thr-75 的确是 I-1 上的 PKC- α 位点。尽管 Thr-75 突变为 Ala 与 I-1 (S67A) 突变体相比 ^{32}P 掺入的较大降低相关, 但该差异没有统计学显著性(图 6D)。因此, PKC- α 在体外于 Thr-75 磷酸化 I-1 的程度似乎与其磷酸化 Ser-67 相同。而且, Ser-67 和 Thr-75 均突变为 Ala 消除了 I-1 的 ^{32}P 掺入(图 6A、6C 和 6D)。这些数据表明, 在本文所述条件下, 这二者是纯化的人 I-1 蛋白上的两个主要 PKC- α 磷酸化位点。

实施例 3. 通过双向电泳分析 I-1 的 PKC- α 磷酸化

为进一步确证放射自显影结果, 使用 2-D 凝胶电泳分析检测由于 PKC- α 磷酸化而可能导致的 I-1 迁移率变化。2-D 凝胶电泳基于蛋白的等电点(pI)和分子量分离蛋白。磷酸化使蛋白的 pI 值变为更酸性的, 但对其分子量的影响可忽略不计。非磷酸化的 I-1 凝胶图像分析表明, 该蛋白在 2-D 凝胶中以单个斑点迁移, pI 为 5.1, 分子量约为 30 kD (图 7A)。在 PKC- α 磷酸化样品中, 可见 3 个斑点, pI (由右至左)为: 5.1、4.9 和 4.7, 分别对应于非磷酸化的、单磷酸化的和双磷酸化的蛋白(图 7B)。进行 2D 凝胶电泳的较高浓度的磷酸化 I-1 (35 μg) 没有显示出任何额外的磷酸化迁移(未显示数据)。通过增加 PKC- α 、ATP 的浓度或温育时间长度增加抑制剂-I 磷酸化程度的尝试没有揭示出任何额外的磷酸蛋白斑点。在样品中没有检测到其它蛋白斑点。

因为以上的研究表明 Thr-75 为新的 PKC- α 磷酸化位点, 所以将纯化的人 I-1 野生型、I-1 (S67A)、I-1 (T75A) 和 I-1 (S67A/T75A) 蛋白与 PKC- α 温育, 并平行进行 2-D 凝胶电泳。当 Ser-67 或 Thr-75 中的任一个突变为 Ala 时, 在凝胶中仅检测到两个 pI 值为 5.1 和 4.9 的斑点(图 8B 和 8C)。这些数据表明, 封闭两个 PKC- α 位点中的一个阻止磷酸掺入蛋白中, 产生双斑点模式, 相比之下在磷酸化的 I-1 野生型

中观测到 3 斑点(图 8A)。此外, Ser-67 和 Thr-75 同时突变完全消除了 I-1 向左侧的任何迁移(图 8D), 这进一步确认: 1) Thr-75 为 PKC- α 位点; 和 2) Ser-67 和 Thr-75 是人 I-1 上的主要 PKC- α 位点。

实施例 4. PKC- α 磷酸化对 I-1 功能的影响

先前的研究已报道, I-1 仅在被 PKA 磷酸化时抑制 PP1 (6-8)。基于 PKC- α 独立地于两个位点 Ser-67 和 Thr-75 磷酸化 I-1 至相同程度的本发明的发现, 检验 PKC- α 磷酸化对 I-1 功能的影响。在这些研究中, 未被处理的 I-1 野生型或被 PKC- α 、PKA 或 PKC- α + PKA 磷酸化的 I-1 野生型用于蛋白磷酸酶测定(图 9A)。脱磷 I-1 和 PKC- α -磷-I-1 在任何测试浓度(0-15 nM)均不抑制 PP1 活性。然而, PKA-磷 I-1 以 3.2 ± 0.08 nM 的 IC₅₀ 值抑制 PP1, 与先前报道(7-9)一致。

为研究 PKC- α 磷酸化是否可以影响 PKA-磷-I-1 的抑制功能, I-1 野生型首先被 PKC- α 磷酸化, 然后如上所述被 PKA 磷酸化。如在图 9A 中所示, 被 PKC- α 预磷酸化对 PKA 介导的 I-1 抑制功能没有影响(IC₅₀ 值为 4.9 ± 0.74 nM)。此外, I-1(S76A)、I-1 (T75A)或 I-1 (S67-A/T75A)中的任何一个突变体在被 PKC- α 磷酸化之后对 PP1 功能都没有任何抑制作用(图 9B)。

为进一步确证这些结果, 如上所述于 Thr-75 [I-1 (T75D)]和 Ser-67 加 Thr-75 [I-1 (S67D/T75D)]产生模拟 I-1 (9,12)磷酸化的天冬氨酸取代突变。这些突变没有一个对 PP1 活性具有任何抑制作用。因此, 尽管 PKC- α 可以于两个不同位点磷酸化 I-1, 但这些磷酸化不抑制 PP1 活性。然而, 在 PKA 磷酸化时, 所有这些 I-1 物质都能够完全抑制 PP1 活性(图 9B)。

实施例 5. 来自小鼠心脏组织的抑制剂-1 的磷酸化状态的分析

先前有报道指抑制剂-1 在体内仅于两个位置 Thr-35 和 Ser-67 被磷酸化。在研究 Thr-75 在体内是否也被磷酸化的工作中, 如上所述由

小鼠心肌(1.5 g)分离 I-1 富集的级分。对最终的沉淀(约 0.25%的初始蛋白)进行 2-D 凝胶电泳。在第 2 向电泳后,将蛋白电印迹到硝酸纤维素膜上,并与针对 I-1 的抗体 AC1 (1:1000)温育。如在图 10 中所示,鉴定出 4 个 pI 值为 5.1、4.9、4.7 和 4.5 (由右至左)的蛋白斑点。在膜的右侧部分检测到的条纹归因于蛋白的不完全等电聚焦,观察到该条纹是缘于增加的免疫印迹敏感性。

使用 ProImage 软件分析该图像表明, pI 为 5.1 的斑点对应于去磷酸化的重组 I-1。这些结果表明, I-1 在基础条件下在体内被翻译后修饰 3 次。假定已知 Thr-35 和 Ser-67 在体内被磷酸化, 以及 I-1 的等电点迁移等于使用重组蛋白观察到的等电点迁移, 则 4 个斑点可能代表去磷酸化的 I-1 和在 1、2 和 3 个位点(Thr-35、Ser-67 和 Thr-75)磷酸化的 I-1。

实施例 6. I-1 突变和心肌收缩性

为测试 I-1 突变对心肌收缩性的影响, 用在 CMV 启动子控制下表达野生型 I-1、I-1 或 T75D 的重组腺病毒感染成年大鼠心肌细胞。空载体用作对照。肌细胞收缩和肌细胞延伸的速率在通过 Grass S5 刺激器(0.5 Hz, 方波)刺激后确定。I-1 T75D 的表达显著降低肌细胞收缩速率(+dL/dtmax 降低 29%)和肌细胞松弛速率(-dL/dtmax 降低 33%)(图 11)。此外, 表达突变蛋白的肌细胞产生的总收缩力降低 35%以上。数据表明, 于 T75 磷酸化抑制心脏的收缩功能。

为测试 S67D 突变对心肌收缩性的影响, 用在 CMV 启动子控制下表达野生型 I-1 或 I-1 S67D 的重组腺病毒感染成年大鼠心肌细胞。空载体用作对照。肌细胞收缩和肌细胞延伸的速率在通过 Grass S5 刺激器(0.5 Hz, 方波)刺激后确定。I-1 S67D 的表达显著降低肌细胞收缩速率(+dL/dtmax 降低 24%)和肌细胞松弛速率(-dL/dtmax 降低 28%)(图 12)。此外, 表达该突变蛋白的肌细胞产生的总收缩力降低 35%以上(38%, 图 12)。数据表明, 于 S67 磷酸化负向影响心脏的收缩功能。

接着,用 I-1 野生型腺病毒、Ad.I-1WT 或于 Thr-75 的组成型磷酸化 I-1 Ad.I-1(T75D)感染成年大鼠心肌细胞。仅表达 GFP 的腺病毒 Ad.GFP 用作对照。根据绿色荧光的评价,感染效力在 24 小时后达到接近 100% (图 13A)。Ad.I-1WT 和 Ad.I-1 (T75D)表现出预期的 I-1 过表达,而内源 I-1 在用 Ad.GFP 感染的细胞中不可检测(图 13B)。

于 Thr-75 组成型磷酸化 I-1 诱导肌细胞缩短(dL/dt_{max} ; 31%)和再延伸(dL/dt_{max} ; 36%)的最大速率以及缩短分数(33%)相比于 I-1 感染的野生型或 GFP 感染的细胞显著降低(图 13C)。至 90%松弛的时间在 Ad.I-1(T75D)感染的肌细胞中被显著降低(达 22%)。这些发现表明,于 Thr-75 磷酸化 I-1 显著降低肌细胞收缩性。

接着,用 Ad.GFP、Ad.I-1WT、Ad.I-1(S67D)、Ad.I-1(T75D)和 Ad.I-1(S67D/T75D)感染成年大鼠心肌细胞。24 小时后通过绿色荧光和蛋白质印迹免疫检测评价腺病毒转染效力。如在图 14A 中所示, I-1 表达水平在所有组别中都是类似的,而内源 I-1 在用 Ad.GFP 感染的细胞中不可检测,类似于先前的观测结果(Rodriguez 等, *J. Biol. Chem.* (2006), El-Armouche 等, *Cardiovasc. Res.* (2001))。与最近的发现(Rodriguez 等, *J. Biol. Chem.* (2006))相一致的是,相比于表达 Ad.I-1WT 的肌细胞,在培养的肌细胞中的 Ad.I-1 (T75D)表达显著降低收缩和松弛速率(分别为 29%和 35.5%)以及缩短分数(29%)(图 14B)。以下列每组的总心脏数分析 15-20 个肌细胞/心脏: 12 (Ad.GFP)、6 (Ad.I-1 WT)、5 (Ad.I-1(S67D))、8 (Ad.I-1(T75D))和 5 (Ad.I-1(S67D/T75D))。

Ad.I-1(S67D)的表达诱导类似的肌细胞收缩速率(22.1%)和松弛速率(27%)以及缩短分数(25.3%)的下降(图 14B)。尽管表达 Ad.I-1 (T75D)的肌细胞的功能效力趋向于比表达 Ad.I-1 (S67D)的那些肌细胞更弱,但这些值在统计学上没有差异。令人感兴趣的是,于 S67D 和 T75D 的组成型双磷酸化 I-1 Ad.I-1(S67D/T75D)的表达产生的结果类似于由单突变体的每一个激发的结果。Ad.I-1 (S67D/T75D)分别将最大收缩和松弛速率降低 30%和 34.5%。缩短分数相比于 Ad.I-1WT 被降

低 26.1% (图 2B)。这些结果表明, I-1 上 Ser-67 或 Thr-75 的磷酸化使肌细胞收缩性产生类似的降低, 当两个位点同时被磷酸化时, 没有使收缩参数进一步降低。

为评价刺激 cAMP 依赖性激酶途径是否能够逆转表达组成型磷酸化的 I-1 突变体的肌细胞的被抑制的功能, 用 10 nM-1 μ M 的一系列法司可林浓度处理腺病毒感染的心肌细胞。令人惊奇的是, 高剂量的法司可林仅在表达组成型磷酸化位点(Ser-67 和/或 Thr-75)的肌细胞中而不在 I-1WT 或 GFP 中激发心律不齐。因此, 0.1 μ M 被确定为诱导收缩性刺激而不激发心律不齐的最高浓度。法司可林处理表达 Ad.GFP 的肌细胞使收缩速率(38%)和松弛速率(51%)以及缩短分数(8.5%)相比于基础水平显著增加(图 15)。总心脏数如下: 10 (Ad.GFP)、5 (Ad.I-1 WT)、5 (Ad.I-1(S67D))、6 (Ad.I-1(T75D))和 6 (Ad.I-1(S67D/T75D)), 每个心脏 15-20 个肌细胞。

在表达 Ad.I-1WT 的细胞中的效力增加类似于对照细胞(收缩和松弛速度以及缩短分数分别为 36.5%、49%和 15.5%)。重要的是, 用 Ad.I-1(S67D)、Ad.I-1(T75D)或 Ad.I-1(S67D/T75D)感染的肌细胞的心脏功能在药物处理时也提升, 但心脏参数没有达到在 Ad.I-1WT 或 Ad.GFP 中观测到的最大作用(图 15)。要指出的是, 在法司可林用于组成型磷酸化 I-1 感染的肌细胞时收缩速率的增加百分率, 近似于对 Ad.GFP 和 Ad.I-1WT 感染发现的增加百分率, 表明 PKA 信号转导途径没有改变。因此, 尽管表达磷酸化的 I-1 突变体的肌细胞的心肌收缩性可以类似于法司可林处理时 I-1 WT 和 GFP 感染细胞的增量而被改善, 但总体功能相比于对照细胞仍被抑制。

实施例 7. 在腺病毒感染的心肌细胞中的肌质网 Ca^{2+} 摄取

为确定与在 Thr-75 的 I-1 磷酸化相关的受抑制的收缩性是否对应于肌质网钙转运功能的改变, 相对于广泛的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 评价 Ca^{2+} 转运的初始速率, 其类似于在松弛和收缩过程中在体内存在的速率。反应条件

如下: 37°C, 使用 5 mM ATP 在 40 mM 咪唑(pH = 7.0)、95 mM KCl、5 mM NaN₃、5 mM MgCl₂、0.5 mM EGTA 和 5 mM K₂C₂O₄ 中的溶液。相比于 Ad.I-1WT ($0.33 \pm 0.01 \mu\text{M}$; $n = 3$)或 Ad.GFP ($0.28 \pm 0.006 \mu\text{M}$; $n = 3$), 在用 Ad.I-1 (T75D)感染的肌细胞中转运系统对 Ca²⁺的表观亲和力和力显著降低(EC_{50} 值 = $0.67 \pm 0.01 \mu\text{M}$; $n = 3$; *** $p < 0.001$)(图 16A)。然而, Ca²⁺摄取的 V_{max} 在全部 3 个组别中是类似的。此外, 在这些组别中, 肌浆钙泵(SERCA2a)和受磷蛋白(PLN)的蛋白水平没有差异(图 16B)。这些数据表明, PKC- α 于 Thr-75 磷酸化 I-1 可通过降低 SERCA2a 的 Ca²⁺亲和力和激发被抑制的心肌收缩性。

在 Ca 摄取限于 SR 的条件下, 在用作为对照的表达 GFP 的腺病毒和 I-1 物质(I-1WT、I-1(S67D)、I-1(T75D)或 I-1(S67D/T75D))感染的肌细胞产生的匀浆物中评价基础 SR Ca²⁺摄取速率。与最近的研究[10]相一致的是, 用表达 GFP 或野生型 I-1 的腺病毒感染表现出类似的 SERCA EC_{50} 值(分别为 $0.294 \pm 0.001 \mu\text{M}$ 和 $0.336 \pm 0.013 \mu\text{M}$)(图 17A 和 17C)。然而, SERCA 对钙的表观亲和力在表达 I-1(S67D)、I-1(T75D)和 I-1(S67D/T75D)突变体的肌细胞中被显著降低(分别为 $0.457 \pm 0.012 \mu\text{M}$ 、 $0.664 \pm 0.014 \mu\text{M}$ 和 $0.611 \pm 0.005 \mu\text{M}$)(图 17A 和 17C)。图 17 中显示的数据对每组的理论 V_{max} 标准化, 并使用 OriginLab 5.1 程序拟合为 S 形曲线。

因此, 业已表明, 磷酸化人 I-1 同种型上的 Ser-67 和/或 Thr-75 减轻了随后的 PKA 刺激在心肌细胞中的作用。任一个或两个位点的磷酸化同时降低 I-1 在 PKA 活化后完全抑制 PP1 活性的能力, 导致 SERCA 2a 转运功能和心肌收缩性整体受损。

正如所料, 法司可林的 PKA 刺激与表达 GFP 的肌细胞中针对 Ca²⁺ 的 SR Ca²⁺摄取 EC_{50} 的显著下降相关($\text{EC}_{50} = 0.17 \pm 0.029 \mu\text{M}$), 这种下降类似于在表达野生型 I-1 的心肌细胞($\text{EC}_{50} = 0.147 \pm 0.005 \mu\text{M}$)中所观察到的(图 17B 和 17C)。然而, 尽管法司可林处理表达组成型磷酸化 I-1 突变体的心肌细胞能够将 EC_{50} 值由其对应的基础值改善, 但钙

摄取速率相比于 I-1WT 和 GFP 感染细胞仍受抑制。在法司可林处理后表达 I-1(S67D)、I-1(T75D)和 I-1(S67D/T75D)的心肌细胞的 EC_{50} 值分别为: $0.234 \pm 0.005 \mu\text{M}$ 、 $0.342 \pm 0.016 \mu\text{M}$ 、 $0.334 \pm 0.053 \mu\text{M}$ (图 17A 和 17C)。

因此, 于 Ser-67 和/或 Thr-75 组成型磷酸化 I-1 的结果与降低的 SR 钙摄取速率和心肌细胞功能相关。降低的 SR 钙摄取速率反映了在基础条件和法司可林刺激条件下显著较高的 SERCA EC_{50} 值。尽管法司可林的 PKA 活化在表达磷酸化 Ser-67 和/或 Thr-75 I-1 的肌细胞中改善 Ca^{2+} -ATP 酶功能的程度与表达 I-1WT 或 GFP 的肌细胞不同, 但 EC_{50} 值的降低百分率似乎在所有组别中都是类似的, 表明 PKA 信号转导途径未被改变。

因为 SR 中的钙摄取代表心肌细胞收缩性被调控的节点, 所以用磷酸化的 Ser-67 和/或 Thr75 I-1 感染的心肌细胞的机械效能反映了 SR 钙摄取的测量结果。在 Ser-67 和/或 Thr-75 中的任一个磷酸化 I-1 激发了对 SERCA 转运功能的显著抑制, 这些值甚至在法司可林处理后仍受抑制。实际上, 在感染肌细胞的这些组别中的 PKA 刺激仅将 SR Ca^{+2} 摄取值改善至 I-1WT 组别的基础水平。这些发现表明, PKA 的作用在心肌细胞中被于 Ser-67 或 Thr-75 组成型磷酸化的 I-1 突变体减弱。在所有样品中获得的最大 Ca^{+2} 摄取速率($V_{\max}$)值都类似。

实施例 8. 感染的心肌细胞中的蛋白磷酸酶活性

心肌细胞收缩性和 SR Ca^{2+} 转运系统对 Ca^{2+} 的表观亲和力的降低促进了在用 Ad.I-1WT、Ad.I-1(T75D)和 Ad.GFP 感染的成年大鼠心肌细胞中的蛋白磷酸酶活性水平的研究。在用 Ad.GFP、Ad.I-1 WT 或 Ad.I-1(T75D)感染的心肌细胞裂解物($1 \mu\text{g}$)中测定总磷酸酶活性。反应混合物含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、0.1 mM Na_2EDTA 、5 mM DTT、0.01% Brij35 和放射性标记的髓鞘碱性蛋白($50 \mu\text{M}$)。相比于表达 I-1 野生型的细胞或对照细胞, 在表达 I-1(T75D)的肌细胞中的总磷酸酶活

性增加 16% (图 18A)。在冈田酸以更有效地抑制 PP2A 的浓度(10 nM)存在时, 测定两种主要类型的细胞蛋白磷酸酶 PP1 和 PP2A 的相对分布(Neumann 等, *J. Mol Cell. Cardiol* (1997))。用 Ad.I-1(T75D)感染的心肌细胞显示出比 Ad.I-1WT 和 Ad.GFP 增加 27% 的 1 型磷酸酶活性, 而 2A 型磷酸酶活性没有改变(图 18A)。如在图 13B 中所示, PP1 的蛋白水平在所有情况下都是相同的。

在重组 I-1 野生型或被 PKC- α 预磷酸化的组成型磷酸化 I-1、I-1(T75D)或 I-1(S67A)存在下, 通过检测纯化的 PP1 催化亚单位(PP1c)的活性, 进一步证实于 Thr-75 的 I-1 磷酸化对 1 型磷酸酶活性的影响。与 I-1 野生型相比, 两种突变 I-1 蛋白将 PP1c 活性分别显著增加 23% 和 25% (图 18B)。总之, 这些数据表明, PKC- α 于 Thr-75 磷酸化 I-1 在分离的肌细胞和体外系统中均增加 PP1 活性。

在通过法司可林进行 PKA 刺激后, 尽管总蛋白磷酸酶抑制的百分率在所有组别中似乎都相似(图 19), 但据使用 10 nM 冈田酸作为 PP2A 抑制剂(Rodriguez 等 *J. Biol. Chem.* (2006) Neumann 等 *J. Mol Cell Cardiol.* (1997))通过表达 Ad.I-1WT 的肌细胞评价, 选择性 PP1 抑制在法司可林处理时显著高于用 Ad.GFP 感染的细胞。将冈田酸(10 nM)加入细胞裂解物, 以区分 1 型和 2A 型磷酸酶活性。结果表明, 内源 I-1 的水平没有高得足以完全抑制 PP1 活性。相反, 3 种组成型磷酸化的 I-1 突变体 I-1(S67D)、I-1(T75D)和 I-1(S67D/T75D)相比于对照或野生型感染细胞在法司可林下提供显著较低的 PP1 抑制。因此, Ser-67 或 Thr-75 的组成型磷酸化降低了在心肌细胞中于 PKA 刺激后 PP1 被抑制的程度。

这两个位点在激发该作用方面似乎是等效的, 在两个位点均被磷酸化时未观察到加合作用。实际上, 两个或任一个这些位点的组成型磷酸化均使 PP1 活性在 PKA 刺激后仍为约 2 倍高。这些数据表明, 在衰竭的心脏中, 减弱的 β -肾上腺素能信号转导和增加的 PKC 信号转导应起双重损伤作用, 有利于较高的 PP1 活性。在表达 I-1 双突变体

(S67D/T75D)的肌细胞中的 PP1 抑制百分率类似于 S67D 或 T75D I-1 突变体所表现出来的抑制百分率,表明这两个位点的同时磷酸化在 PKA 刺激后没有表现出对 PP1 活性抑制的加合作用。

实施例 9. 于 Ser-67 和 Thr-75 的 I-1 磷酸化对其作为 PKA 底物的能力的作用

为分析于 Ser-67 和 Thr-75 同时磷酸化 I-1 是否降低 PKA 于 Thr-35 磷酸化 I-1 的能力,在 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 存在下将重组 I-1 野生型和 I-1(S67D/T75D)蛋白与 PKA 在体外温育。如在图 20 中所示,双突变体掺入的放射性比野生型少 29%,表明突变体中的 Thr-35 不能被磷酸化至相同的程度。因此,在 Ser-67 和 Thr-75 均被预磷酸化时,PKA 磷酸化 I-1 的能力可能被改变。

总之,本文描述的数据表明,在心脏中,人 I-1 同种型上的 Ser-67 和/或 Thr-75 的磷酸化可能用于部分抑制 β -肾上腺素能信号转导,并因此通过维持异常增强的 PP1 活性降低对收缩性的刺激作用。

实施例 10. 密码子优化的截短 I-1

发现野生型 I-1 基因以高频率使用罕见密码子,并包含几个负顺式作用基序,这些基序可能妨碍动物中的表达。因此,使用标准密码子优化(基于以下的人密码子选择表,如在 <http://bip.weizmann.ac.il/index.html> 中公开,并描述于例如“Genetic Databases”, M.J. Bishop 编辑, Academic Press, (1999)),以合成由以下 SEQ ID NO: 13 编码的截短突变人 I-1 蛋白(T35D)。截短的 I-1 cDNA 编码该蛋白的前 65 个氨基酸。

密码子选择适于人(*Homo sapiens*)基因的密码子偏好,产生较高的密码子适应指数(CAI)值(0.99)。密码子优化的(截短)蛋白具有增加的 GC 含量(相对于天然人序列),以便更有效地进行 AAV 包装(未显示数据)。避免某些顺式作用序列基序(例如剪接位点、polyA 信号)。

导入 Kozak 序列，以增强翻译起始。加入两个终止密码子，以确保有效终止。

人密码子选择表															
Gly	GGG	17.08	0.23	Arg	AGG	12.09	0.22	Trp	TGG	14.74	1.00	Arg	CGG	10.40	0.19
Gly	GGA	19.31	0.26	Arg	AGA	11.73	0.21	End	TGA	2.64	0.61	Arg	CGA	5.63	0.10
Gly	GGT	13.66	0.18	Ser	AGT	10.18	0.14	Cys	TGT	9.99	0.42	Arg	CGT	5.16	0.09
Gly	GGC	24.94	0.33	Ser	AGC	18.54	0.25	Cys	TGC	13.86	0.58	Arg	CGC	10.82	0.19
Glu	GAG	38.82	0.59	Lys	AAG	33.79	0.60	End	TAG	0.73	0.17	Gln	CAG	32.95	0.73
Glu	GAA	27.51	0.41	Lys	AAA	22.32	0.40	End	TAA	0.95	0.22	Gln	CAA	11.94	0.27
Asp	GAT	21.45	0.44	Asn	AAT	16.43	0.44	Tyr	TAT	11.80	0.42	His	CAT	9.56	0.41
Asp	GAC	27.06	0.56	Asn	AAC	21.30	0.56	Tyr	TAC	16.48	0.58	His	CAC	14.00	0.59
Val	GTG	28.60	0.48	Met	ATG	21.86	1.00	Leu	TTG	11.43	0.12	Leu	CTG	39.93	0.43
Val	GTA	6.09	0.10	Ile	ATA	6.05	0.14	Leu	TTA	5.55	0.06	Leu	CTA	6.42	0.07
Val	GTT	10.30	0.17	Ile	ATT	15.03	0.35	Phe	TTT	15.36	0.43	Leu	CTT	11.24	0.12
Val	GTC	15.01	0.25	Ile	ATC	22.47	0.52	Phe	TTC	20.72	0.57	Leu	CTC	19.14	0.20
Ala	GCG	7.27	0.10	Thr	ACG	6.80	0.12	Ser	TCG	4.38	0.06	Pro	CCG	7.02	0.11
Ala	GCA	15.50	0.22	Thr	ACA	15.04	0.27	Ser	TCA	10.96	0.15	Pro	CCA	17.11	0.27
Ala	GCT	20.23	0.28	Thr	ACT	13.24	0.23	Ser	TCT	13.51	0.18	Pro	CCT	18.03	0.29
Ala	GCC	28.43	0.40	Thr	ACC	21.52	0.38	Ser	TCC	17.37	0.23	Pro	CCC	20.51	0.33

对于每个密码子，该表都显示了人编码区(第一列)中每个密码子的使用频率(每千个)和同义密码子(第二列)中每个密码子的相对频率。

SEQ ID NO: 13 如下:

GGGCGAATTGGGTACCGCCACCATGGAACAGGACAACAGCCCCGGAAGATCCAGTTCACCGTGCCCCCT
GCTGGAACCCACCTGGACCCCGAGGCCGCCGAGCAGATCCGGCGGAGAAGGCCCGACCCGCCACCCCT
GGTGCTGACCAGCGACCAGAGCAGCCCCGAGATCGACGAGGACCGGATCCCCAACCCCACTGAAGAG
CACCCTGGCCTGATGAGAGCTCCAGCTTTTGTTC

由 SEQ ID NO: 13 编码的氨基酸序列如以下的 SEQ ID NO: 14 所示:

MEQDNSPRKIQFTVPLLEPHLDPEAAEQIRRRRPDPATLVLTSDQSSPEIDEDRIPNPHLKSTLA

由 SEQ ID NO: 13 编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示。

同样包括本文所述的 I-1 突变体的密码子优化。

序列信息

应当理解的是，为了描述、定义和保护本发明，所提到的“SEQ ID NO:”包括与其具有至少 90% 的同一性并保留任何特定突变的所有序列。在更具体的实施方案中，其被理解为包括与其具有至少 95% 的同一性并保留任何特定突变的所有序列。在还更具体的实施方案中，其包括与其具有至少 99%-100% 的同一性并保留任何特定突变的序列。

以下显示了人蛋白磷酸酶 I 的野生型序列、抑制剂亚单位 1A (PP1I1A) mRNA (SEQ ID NO:7)。按照基于 cDNA 的该编号程序，突变体的核苷酸变化位于 361 位和 400 位之间。编码序列中的第一个 A 可标为 1 (而不是 172)。

```

1 AGTGTCCCCG GAGCCGCGAG CTGGGAGCGC TGTGCCGGGA GCCGGGAGCC GAGCGCGCCC
61 GGCTGGGGCC GGGGCCGGAG CGGAGCGGAG AGGGAGCGCG CCCGCCCCAG CCCCAGATCC
121 CGCCGCCTTC CCTCCGCGCG CAGCGCGGGC CCACCGGCCG CCGCCCCAGC CATGGAGCAA
181 GACAACAGCC CCCAAAGAT CCAGTTCACG GTCCCGCTGC TGGAGCCGCA CCTTGACCCC
241 GAGGCGGCGG AGCAGATTCG GAGGCGCCGC CCCACCCCTG CCACCCTCGT GCTGACCAGT
301 GACCAGTCAT CCCCAGAGAT AGATGAAGAC CGGATCCCCA ACCCACATCT CAAGTCCACT
361 TTGGCAATGT CTCCACGGCA ACGGAAGAAG ATGACAAGGA TCACACCCAC AATGAAAGAG
421 CTCCAGATGA TGGTTGAACA TCACCTGGGG CAACAGCAGC AAGGAGAGGA ACCTGAGGGG
481 GCCGCTGAGA GCACAGGAAC CCAGGAGTCC CGCCACCTG GGATCCCAGA CACAGAAGTG
541 GAGTCAAGGC TGGGCACCTC TGGGACAGCA AAAAAACTG CAGAATGCAT CCCTAAACT
601 CACGAAAGAG GCAGTAAGGA ACCCAGCACA AAAGAACCCT CAACCCATAT ACCACCACTG
661 GATTCCAAGG GAGCCAATC GGTCTGAGAG AGGAGGAGGT ATCTTGGGAT CAAGACTGCA

```

由 SEQ ID NO: 7 编码的氨基酸序列如以下的 SEQ ID NO: 8 所示，

```

1 MEQDNSPQKIQFTVPLLEPHLDPEAAEQIRRRRPTPATLVLTSDQSSPEI
51 DEDRIPNPHLKSTLAMSPRQRKKMTRITPTMKELQMMVEHHLGQQQ
101 QGEEPEGAAESTGTQESRPPGIPDTEVESRLGTSGTAKKTAECIPKThER
151 GSKEPSTKEPSTHIPPLDSKGANSV

```

氨基酸位置 35、67 和 75 用粗体和下划线突出显示。

应当理解的是，人野生型 PP-1 以已知的和可能未知的多态性存在。例如，存在两个基于氨基酸位置 8 的多态性，其可包含天冬氨酸或赖氨酸残基。前者在本领域被称为 Q 变体，而后者在本领域被称为

K 变体。如在以上“定义”部分中所提及的，对本领域一般技术人员显而易见的是，任一个变体都是适合的，为了实施和限定本发明，所述变体基本上可交互使用。同样显而易见的是，可存在其它这样的多态性，其同样属于本发明的范围。

应当指出的是，为了描述本文的序列，以上 SEQ ID NO: 7 的核苷酸位置 172 等于位置 1。相关的编码序列在位置 688 终止。对应于多肽的氨基酸位 67 的密码子位置为：371、372、373 位，(TCT)，所述多肽由以上的本发明的 172-688 位限定的核苷酸序列编码，同样，对应于氨基酸位 75 的密码子位置为 394、395、396 (ACA)。

突变体 “I-1 S67A” 以 GCA 置换密码子 TCT，其示于 SEQ ID NO: 1。突变体 “I-1 S67D” 以 GAC 置换密码子 TCT，示于 SEQ ID NO: 2。突变体 “I-1 T75D” 以 GAC 置换密码子 ACA，示于 SEQ ID NO: 3。突变体 “I-1 T75A” 以 GCA 置换密码子 ACA，示于 SEQ ID NO: 4。

由 SEQ ID NO: 3 编码的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 5。由 SEQ ID NO: 4 编码的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 6。由 SEQ ID NO: 7 编码的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 8。

突变体 “I-1 S67C” 以密码子 TGT 或 TGC 置换密码子 TCT，示于 SEQ ID NO: 9。突变体 “I-1 T75C” 以密码子 TGT 或 TGC 置换密码子 ACA，示于 SEQ ID NO: 10。由 SEQ ID NO: 9 编码的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 11。由 SEQ ID NO: 10 编码的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 12。

还设想单个核酸分子可在两个位置包含突变。突变体 “I-1 S67A/T75A” 以 GCA 置换的密码子 67 (TCT)，并以 GCA 置换密码子 75 (ACA)，示于 SEQ ID NO: 15。由 SEQ ID NO: 15 编码的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 16。突变体 “I-1 S67D/T75D” 以 GAC 置换密码子 67 (TCT)，并以 GAC 置换密码子 75 (ACA)，示于 SEQ ID NO: 17。由 SEQ ID NO: 17 编码的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 18。

突变体 “I-1 T35D” 以密码子 GAC 置换密码子 ACC，示于 SEQ ID

NO: 19.

由 SEQ ID NO: 19 编码的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 20。突变体 “I-1 S67A/T35D” 以 GCA 置换密码子 TCT (371-373), 并以 GAC 置换密码子 ACC (277-279), 示于 SEQ ID NO: 22。由 SEQ ID NO: 22 编码的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 21。

SEQ ID NO: 1:

					ATGGAGCAA
181	GACAACAGCC	CCCAAAAGAT	CCAGTTCACG	GTCCCGCTGC	TGGAGCCGCA CCTTGACCCC
241	GAGGCGGCGG	AGCAGATTCG	GAGGCGCCGC	CCCACCCCTG	CCACCCTCGT GCTGACCAGT
301	GACCAGTCAT	CCCCAGAGAT	AGATGAAGAC	CGGATCCCCA	ACCCACATCT CAAGTCCACT
361	TTGGCAATGG	CACCACGGCA	ACGGAAGAAG	ATGACAAGGA	TCACACCCAC AATGAAAGAG
421	CTCCAGATGA	TGGTTGAACA	TCACCTGGGG	CAACAGCAGC	AAGGAGAGGA ACCTGAGGGG
481	GCCGCTGAGA	GCACAGGAAC	CCAGGAGTCC	CGCCCACCTG	GGATCCCAGA CACAGAAGTG
541	GAGTCAAGGC	TGGGCACCTC	TGGGACAGCA	AAAAAAACTG	CAGAATGCAT CCCTAAAAC
601	CACGAAAGAG	GCAGTAAGGA	ACCCAGCACA	AAAGAACCCT	CAACCCATAT ACCACCACTG
661	GATTCCAAGG	GAGCCAAC	GGTCTGA		

SEQ ID NO: 2:

					ATGGAGCAA
181	GACAACAGCC	CCCAAAAGAT	CCAGTTCACG	GTCCCGCTGC	TGGAGCCGCA CCTTGACCCC
241	GAGGCGGCGG	AGCAGATTCG	GAGGCGCCGC	CCCACCCCTG	CCACCCTCGT GCTGACCAGT
301	GACCAGTCAT	CCCCAGAGAT	AGATGAAGAC	CGGATCCCCA	ACCCACATCT CAAGTCCACT
361	TTGGCAATGG	ACCCACGGCA	ACGGAAGAAG	ATGACAAGGA	TCACACCCAC AATGAAAGAG
421	CTCCAGATGA	TGGTTGAACA	TCACCTGGGG	CAACAGCAGC	AAGGAGAGGA ACCTGAGGGG
481	GCCGCTGAGA	GCACAGGAAC	CCAGGAGTCC	CGCCCACCTG	GGATCCCAGA CACAGAAGTG
541	GAGTCAAGGC	TGGGCACCTC	TGGGACAGCA	AAAAAAACTG	CAGAATGCAT CCCTAAAAC
601	CACGAAAGAG	GCAGTAAGGA	ACCCAGCACA	AAAGAACCCT	CAACCCATAT ACCACCACTG
661	GATTCCAAGG	GAGCCAAC	GGTCTGA		

SEQ ID NO: 3:

					ATGGAGCAA
181	GACAACAGCC	CCCAAAAGAT	CCAGTTCACG	GTCCCGCTGC	TGGAGCCGCA CCTTGACCCC
241	GAGGCGGCGG	AGCAGATTCG	GAGGCGCCGC	CCCACCCCTG	CCACCCTCGT GCTGACCAGT
301	GACCAGTCAT	CCCCAGAGAT	AGATGAAGAC	CGGATCCCCA	ACCCACATCT CAAGTCCACT
361	TTGGCAATGT	CTCCACGGCA	ACGGAAGAAG	ATGGACAGGA	TCACACCCAC AATGAAAGAG
421	CTCCAGATGA	TGGTTGAACA	TCACCTGGGG	CAACAGCAGC	AAGGAGAGGA ACCTGAGGGG
481	GCCGCTGAGA	GCACAGGAAC	CCAGGAGTCC	CGCCCACCTG	GGATCCCAGA CACAGAAGTG
541	GAGTCAAGGC	TGGGCACCTC	TGGGACAGCA	AAAAAAACTG	CAGAATGCAT CCCTAAAAC
601	CACGAAAGAG	GCAGTAAGGA	ACCCAGCACA	AAAGAACCCT	CAACCCATAT ACCACCACTG
661	GATTCCAAGG	GAGCCAAC	GGTCTGA		

SEQ ID NO: 4:

					ATGGAGCAA
181	GACAACAGCC	CCCAAAAGAT	CCAGTTCACG	GTCCCGCTGC	TGGAGCCGCA CCTTGACCCC
241	GAGGCGGCGG	AGCAGATTCG	GAGGCGCCGC	CCCACCCCTG	CCACCCTCGT GCTGACCAGT
301	GACCAGTCAT	CCCCAGAGAT	AGATGAAGAC	CGGATCCCCA	ACCCACATCT CAAGTCCACT
361	TTGGCAATGT	CTCCACGGCA	ACGGAAGAAG	ATGGCAAGGA	TCACACCCAC AATGAAAGAG
421	CTCCAGATGA	TGGTTGAACA	TCACCTGGGG	CAACAGCAGC	AAGGAGAGGA ACCTGAGGGG
481	GCCGCTGAGA	GCACAGGAAC	CCAGGAGTCC	CGCCCACCTG	GGATCCCAGA CACAGAAGTG
541	GAGTCAAGGC	TGGGCACCTC	TGGGACAGCA	AAAAAAACTG	CAGAATGCAT CCCTAAAAC
601	CACGAAAGAG	GCAGTAAGGA	ACCCAGCACA	AAAGAACCCT	CAACCCATAT ACCACCACTG
661	GATTCCAAGG	GAGCCAAC	GGTCTGA		

SEQ ID NO: 5:

1 MEQDNSPQKIQFTVPLLEPHLDPEAAEQIRRRRPTPATLVLTSDQSSPEI
51 DEDRIPNPHLKSTLAMSPQRKKMDRITPTMKELQMMVEHHLGQQQ

101 QGEEPEGAAESTGTQESRPPGIPDTEVESRLGTSGTAKKTAECIPK THER
151 GSKEPSTKEPSTHIPPLDSKGANSV

SEQ ID NO: 6:

1 MEQDNSPQKIQFTVPLLEPHLDPEAAEQIRRRRPTPATLVLTSDQSSPEI
51 DEDRIPNPHLKSTLAMSPRQRKKMARITPTMKELQMMVEHHLGQQQ
101 QGEEPEGAAESTGTQESRPPGIPDTEVESRLGTSGTAKKTAECIPK THER
151 GSKEPSTKEPSTHIPPLDSKGANSV

SEQ ID NO: 9:

ATGGAGCAA
181 GACAACAGCC CCCAAAAGAT CCAGTTCACG GTCCCGCTGC TGGAGCCGCA CCTTGACCCC
241 GAGGCGGCGG AGCAGATTCTG GAGGCGCCGC CCCACCCCTG CCACCCTCGT GCTGACCAGT
301 GACCAGTCAT CCCAGAGAT AGATGAAGAC CGGATCCCCA ACCCACATCT CAAGTCCACT
361 TTGGCAATGT G(T/C)CCACGGCA ACGGAAGAAG ATGACAAGGA TCACACCCAC AATGAAAGAG
421 CTCCAGATGA TGGTTGAACA TCACCTGGGG CAACAGCAGC AAGGAGAGGA ACCTGAGGGG
481 GCCGCTGAGA GCACAGGAAC CCAGGAGTCC CGCCACCTG GGATCCCAGA CACAGAAGTG
541 GAGTCAAGGC TGGGCACCTC TGGGACAGCA AAAAAAACTG CAGAATGCAT CCCTAAAACT
601 CACGAAAGAG GCAGTAAGGA ACCCAGCACA AAAGAACCCT CAACCCATAT ACCACCACTG
661 GATTCCAAGG GAGCCAAC TC GGTCTGA

SEQ ID NO: 10:

ATGGAGCAA
181 GACAACAGCC CCCAAAAGAT CCAGTTCACG GTCCCGCTGC TGGAGCCGCA CCTTGACCCC
241 GAGGCGGCGG AGCAGATTCTG GAGGCGCCGC CCCACCCCTG CCACCCTCGT GCTGACCAGT
301 GACCAGTCAT CCCAGAGAT AGATGAAGAC CGGATCCCCA ACCCACATCT CAAGTCCACT
361 TTGGCAATGT CTCCACGGCA ACGGAAGAAG ATGTG(T/C)AGGA TCACACCCAC AATGAAAGAG
421 CTCCAGATGA TGGTTGAACA TCACCTGGGG CAACAGCAGC AAGGAGAGGA ACCTGAGGGG
481 GCCGCTGAGA GCACAGGAAC CCAGGAGTCC CGCCACCTG GGATCCCAGA CACAGAAGTG
541 GAGTCAAGGC TGGGCACCTC TGGGACAGCA AAAAAAACTG CAGAATGCAT CCCTAAAACT
601 CACGAAAGAG GCAGTAAGGA ACCCAGCACA AAAGAACCCT CAACCCATAT ACCACCACTG
661 GATTCCAAGG GAGCCAAC TC GGTCTGA

SEQ ID NO: 11:

1 MEQDNSPQKIQFTVPLLEPHLDPEAAEQIRRRRPTPATLVLTSDQSSPEI
51 DEDRIPNPHLKSTLAMCPQRQRKKMTRITPTMKELQMMVEHHLGQQQ
101 QGEEPEGAAESTGTQESRPPGIPDTEVESRLGTSGTAKKTAECIPK THER
151 GSKEPSTKEPSTHIPPLDSKGANSV

SEQ ID NO: 12:

1 MEQDNSPQKIQFTVPLLEPHLDPEAAEQIRRRRPTPATLVLTSDQSSPEI
51 DEDRIPNPHLKSTLAMSPRQRKKMCRTITPTMKELQMMVEHHLGQQQ
101 QGEEPEGAAESTGTQESRPPGIPDTEVESRLGTSGTAKKTAECIPK THER
151 GSKEPSTKEPSTHIPPLDSKGANSV

SEQ ID NO: 15:

ATGGAGCAA
181 GACAACAGCC CCCAAAAGAT CCAGTTCACG GTCCCGCTGC TGGAGCCGCA CCTTGACCCC
241 GAGGCGGCGG AGCAGATTCTG GAGGCGCCGC CCCACCCCTG CCACCCTCGT GCTGACCAGT
301 GACCAGTCAT CCCAGAGAT AGATGAAGAC CGGATCCCCA ACCCACATCT CAAGTCCACT
361 TTGGCAATGG CACCACGGCA ACGGAAGAAG ATGGCAAGGA TCACACCCAC AATGAAAGAG
421 CTCCAGATGA TGGTTGAACA TCACCTGGGG CAACAGCAGC AAGGAGAGGA ACCTGAGGGG
481 GCCGCTGAGA GCACAGGAAC CCAGGAGTCC CGCCACCTG GGATCCCAGA CACAGAAGTG
541 GAGTCAAGGC TGGGCACCTC TGGGACAGCA AAAAAAACTG CAGAATGCAT CCCTAAAACT
601 CACGAAAGAG GCAGTAAGGA ACCCAGCACA AAAGAACCCT CAACCCATAT ACCACCACTG
661 GATTCCAAGG GAGCCAAC TC GGTCTGA

SEQ ID NO: 16:

1 MEQDNSPQKIQFTVPLLEPHLDPEAAEQIRRRRPTPATLVLTSDQSSPEI
 51 DEDRIPNPHLKSTLAMAPRQRKKMARITPTMKELQMMVEHHLGQQQ
 101 QGEEPEGAAESTGTQESRPPGIPDTEVESRLGTSGTAKKTAECIPKOTHER
 151 GSKEPSTKEPSTHIPPLDSKGANSV

SEQ ID NO: 17:

ATGGAGCAA
 181 GACAACAGCC CCCAAAAGAT CCAGTTCACG GTCCCGCTGC TGGAGCCGCA CCTTGACCCC
 241 GAGGCGGCGG AGCAGATTCG GAGGCGCCGC CCCACCCCTG CCACCCTCGT GCTGACCAGT
 301 GACCAGTCAT CCCAGAGAT AGATGAAGAC CGGATCCCCA ACCCACATCT CAAGTCCACT
 361 TTGGCAATGG ACCCACGGCA ACGGAAGAAG ATGGACAGGA TCACACCCAC AATGAAAGAG
 421 CTCCAGATGA TGGTTGAACA TCACCTGGGG CAACAGCAGC AAGGAGAGGA ACCTGAGGGG
 481 GCCGCTGAGA GCACAGGAAC CCAGGAGTCC CGCCACCTG GGATCCCAGA CACAGAAGTG
 541 GAGTCAAGGC TGGGCACCTC TGGGACAGCA AAAAAAACTG CAGAATGCAT CCCTAAAACT
 601 CACGAAAGAG GCAGTAAGGA ACCCAGCACA AAAGAACCCT CAACCCATAT ACCACCCTG
 661 GATTCCAAGG GAGCCAATC GGTCTGA

SEQ ID NO: 18:

1 MEQDNSPQKIQFTVPLLEPHLDPEAAEQIRRRRPTPATLVLTSDQSSPEI
 51 DEDRIPNPHLKSTLAMDPQRKKMDRITPTMKELQMMVEHHLGQQQ
 101 QGEEPEGAAESTGTQESRPPGIPDTEVESRLGTSGTAKKTAECIPKOTHER
 151 GSKEPSTKEPSTHIPPLDSKGANSV

SEQ ID NO: 19:

ATGGAGCAA
 181 GACAACAGCC CCCAAAAGAT CCAGTTCACG GTCCCGCTGC TGGAGCCGCA CCTTGACCCC
 241 GAGGCGGCGG AGCAGATTCG GAGGCGCCGC CCCGACCCTG CCACCCTCGT GCTGACCAGT
 301 GACCAGTCAT CCCAGAGAT AGATGAAGAC CGGATCCCCA ACCCACATCT CAAGTCCACT
 361 TTGGCA

SEQ ID NO: 20:

1 MEQDNSPQKIQFTVPLLEPHLDPEAAEQIRRRRPDPATLVLTSDQSSPEI
 51 DEDRIPNPHLKSTLA

SEQ ID NO: 21:

1 MEQDNSPQKIQFTVPLLEPHLDPEAAEQIRRRRPDPATLVLTSDQSSPEI
 51 DEDRIPNPHLKSTLAMAPRQRKKMTRITPTMKELQMMVEHHLGQQQ
 101 QGEEPEGAAESTGTQESRPPGIPDTEVESRLGTSGTAKKTAECIPKOTHER
 151 GSKEPSTKEPSTHIPPLDSKGANSV

SEQ ID NO: 22:

ATGGAGCAA
 181 GACAACAGCC CCCAAAAGAT CCAGTTCACG GTCCCGCTGC TGGAGCCGCA CCTTGACCCC
 241 GAGGCGGCGG AGCAGATTCG GAGGCGCCGC CCCGACCCTG CCACCCTCGT GCTGACCAGT
 301 GACCAGTCAT CCCAGAGAT AGATGAAGAC CGGATCCCCA ACCCACATCT CAAGTCCACT
 361 TTGGCAATGG CACCACGGCA ACGGAAGAAG ATGACAAGGA TCACACCCAC AATGAAAGAG
 421 CTCCAGATGA TGGTTGAACA TCACCTGGGG CAACAGCAGC AAGGAGAGGA ACCTGAGGGG
 481 GCCGCTGAGA GCACAGGAAC CCAGGAGTCC CGCCACCTG GGATCCCAGA CACAGAAGTG
 541 GAGTCAAGGC TGGGCACCTC TGGGACAGCA AAAAAAACTG CAGAATGCAT CCCTAAAACT
 601 CACGAAAGAG GCAGTAAGGA ACCCAGCACA AAAGAACCCT CAACCCATAT ACCACCCTG
 661 GATTCCAAGG GAGCCAATC GGTCTGA

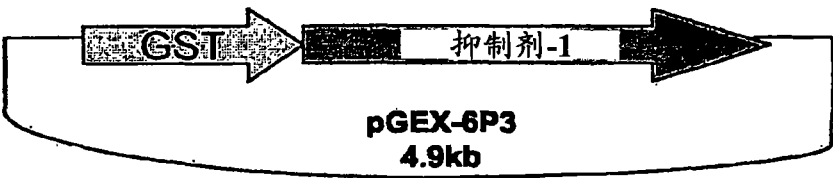


图 1A

GCA ATG TCT CCA CGG CAA CGG AAG AAG ATG ACA AGG ATC	I-1 WT
GCA ATG GCA CCA CGG CAA CGG AAG AAG ATG ACA AGG ATC	I-1 (S67A)
GCA ATG TCT CCA CGG CAA CGG AAG AAG ATG GCA AGG ATC	I-1 (T75A)
GCA ATG GCA CCA CGG CAA CGG AAG AAG ATG GCA AGG ATC	I-1 (S67A/T75A)
GCA ATG TCT CCA CGG CAA CGG AAG AAG ATG GAC AGG ATC	I-1 (T75D)
Ser-67	Thr-75

图 1B

GCA ATG TCT CCA CGG CAA CGG AAG AAG ATG ACA AGG ATC	I-1 WT
GCA ATG GAC CCA CGG CAA CGG AAG AAG ATG ACA AGG ATC	I-1 (S67D)
GCA ATG TCT CCA CGG CAA CGG AAG AAG ATG GAC AGG ATC	I-1 (T75D)
GCA ATG GAC CCA CGG CAA CGG AAG AAG ATG GAC AGG ATC	I-1 (S67D/T75D)
Ser-67	Thr-75

图 1C

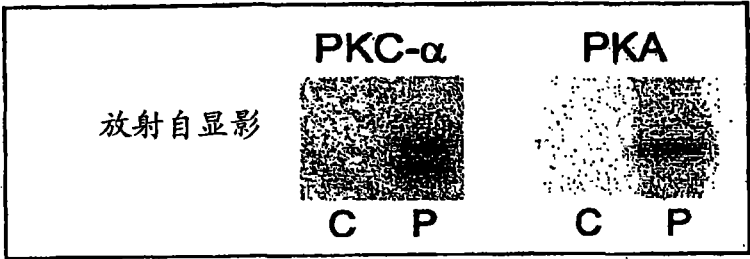


图 2

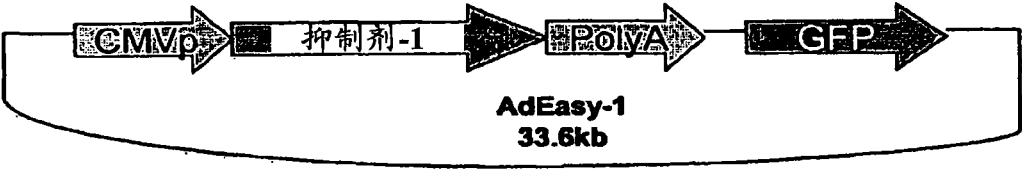


图 3

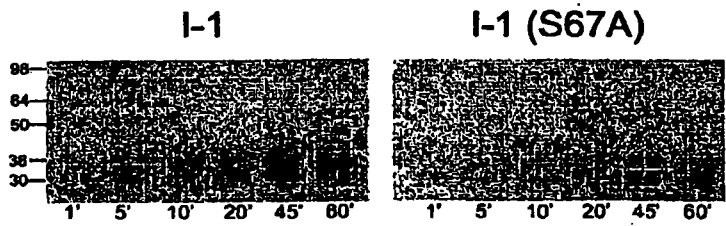


图 4A

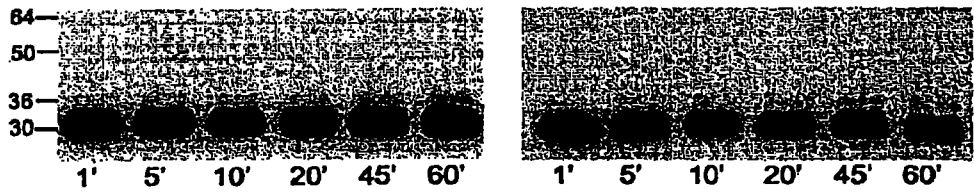


图 4B

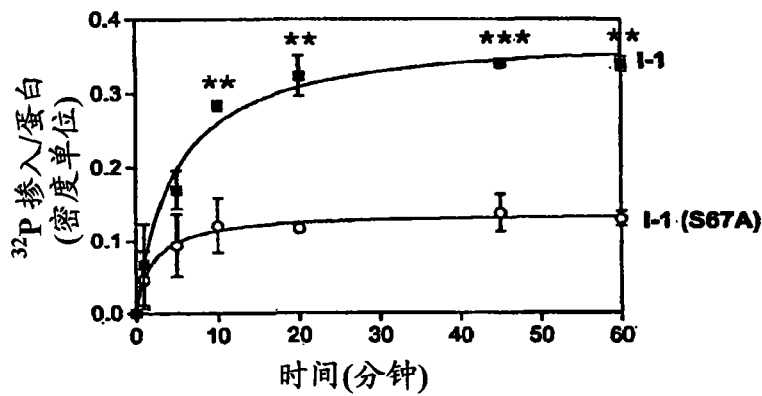


图 4C

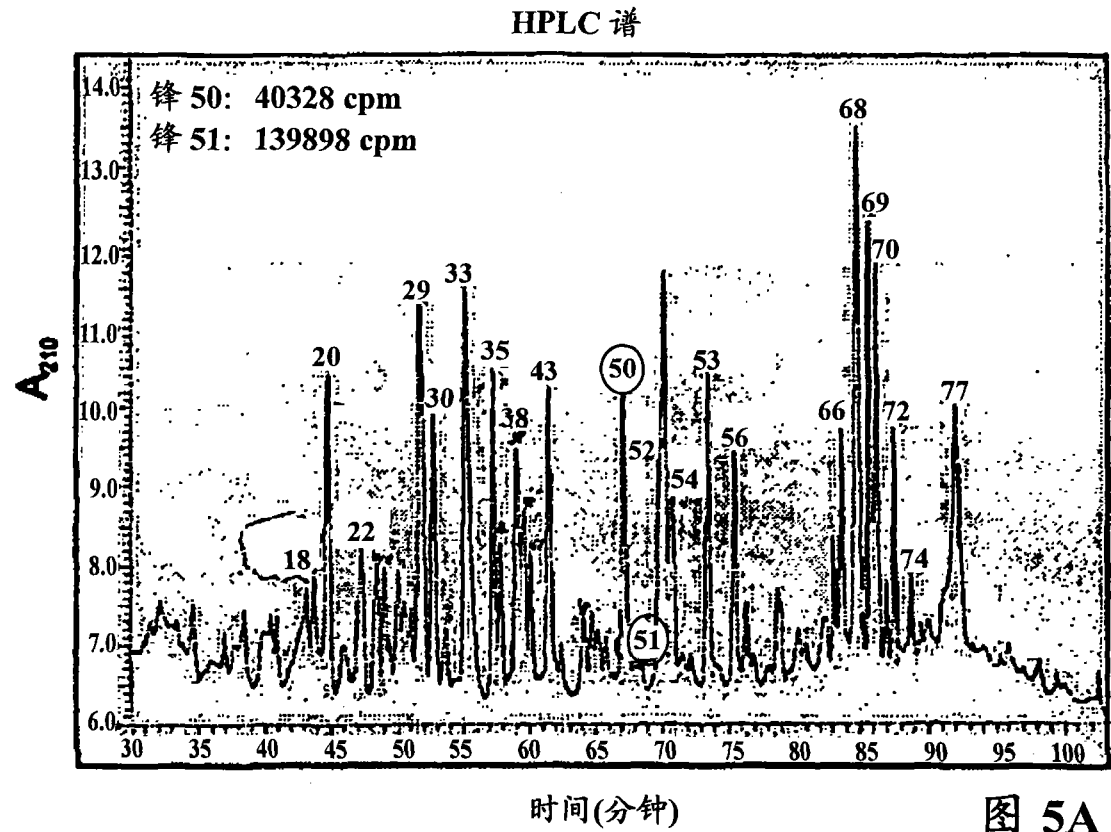


图 5A

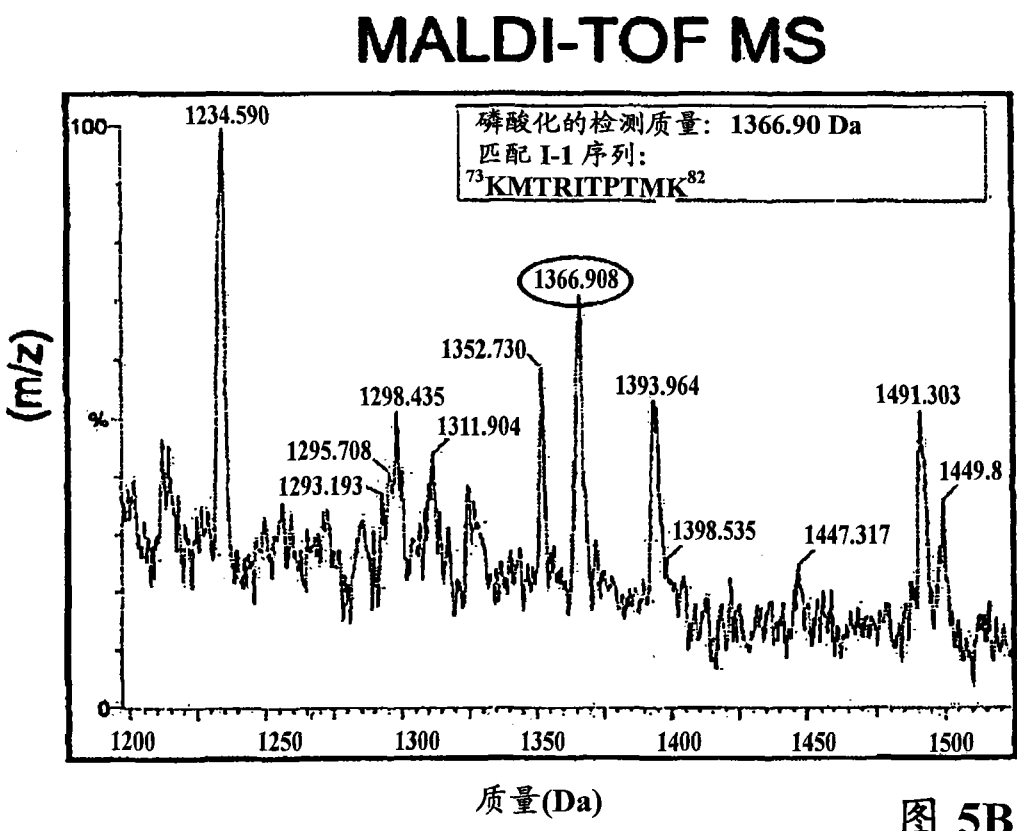


图 5B

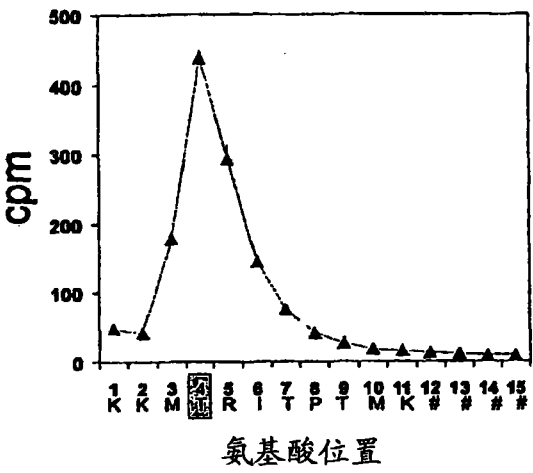


图 5C

Edman 降解



图 5D

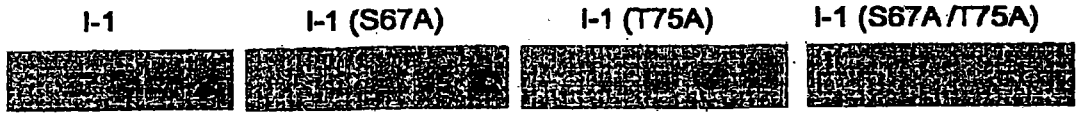


图 6A

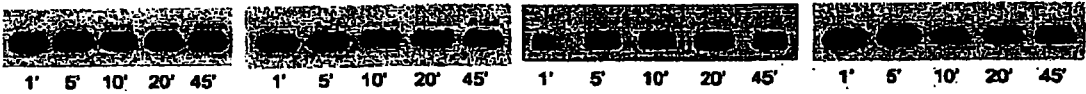


图 6B

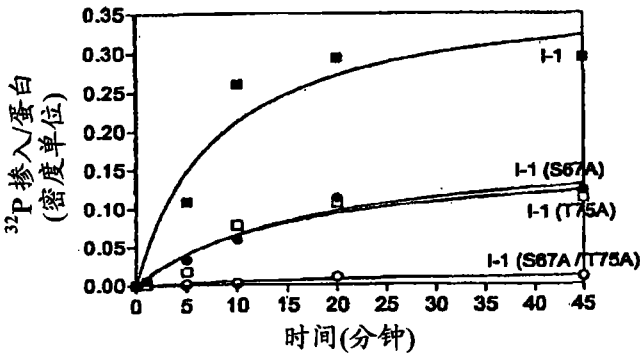


图 6C

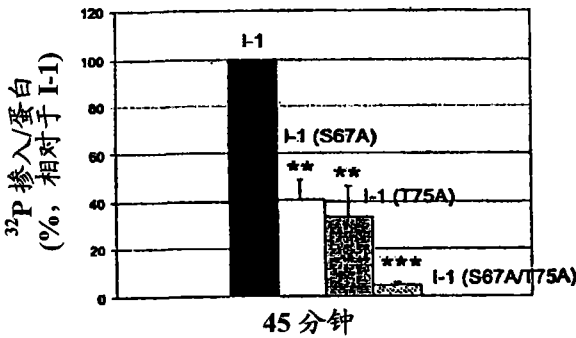


图 6D

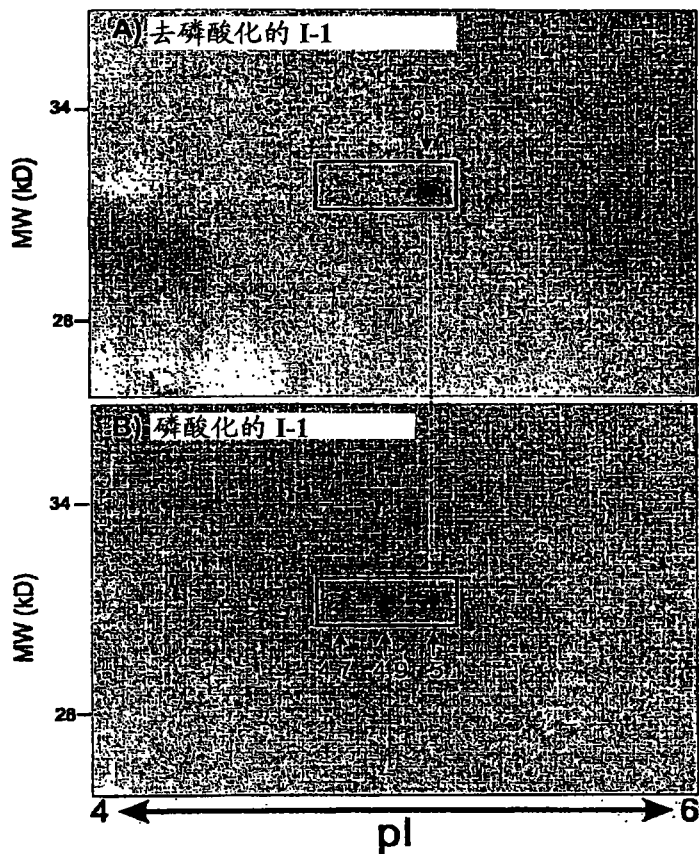


图 7

I-1 WT

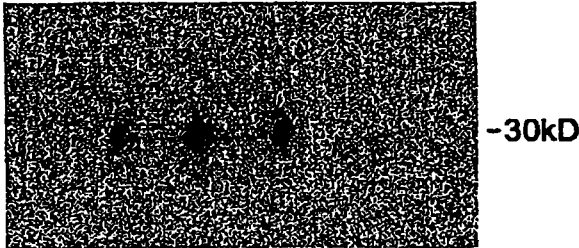


图 8A

I-1(S67A)

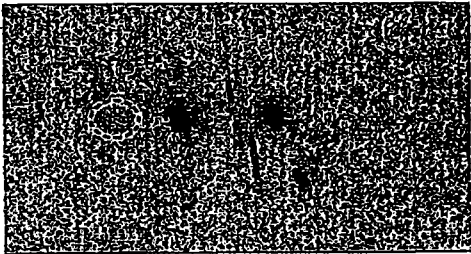


图 8B

I-1(S67A)

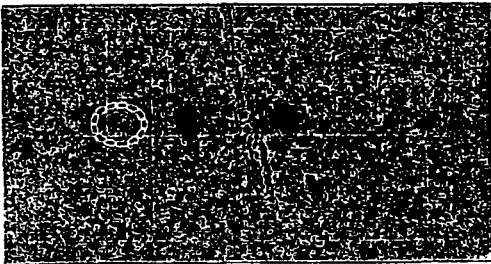


图 8C

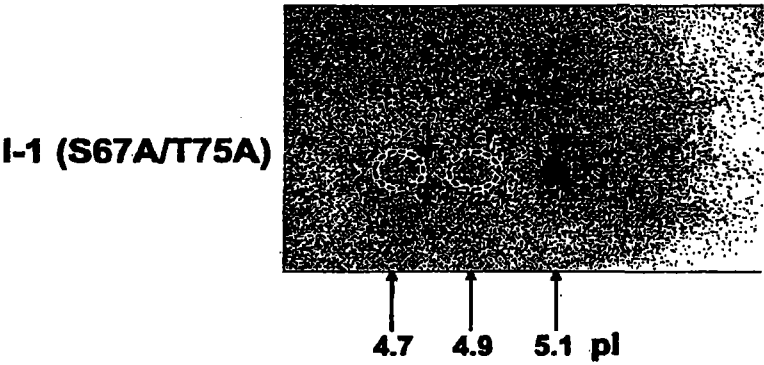


图 8D

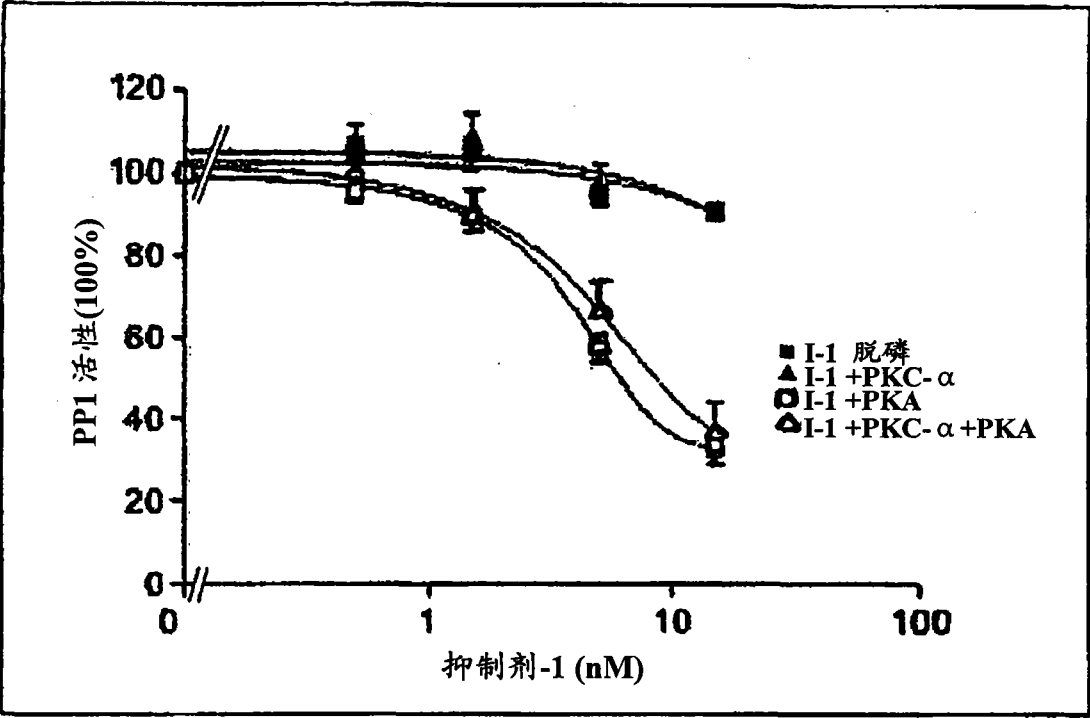


图 9A

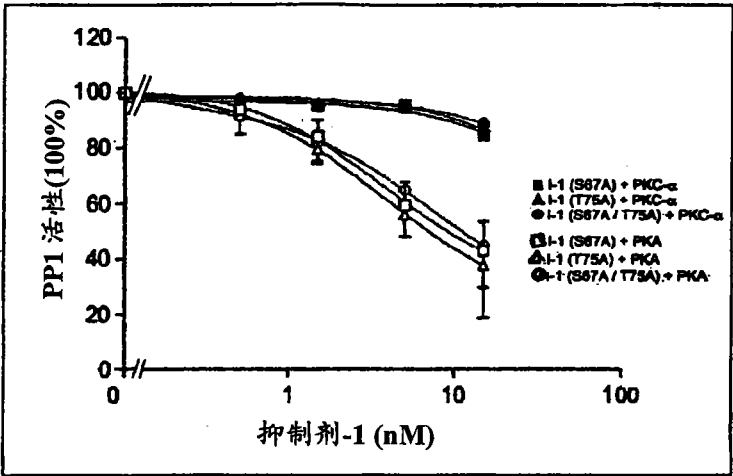


图 9B

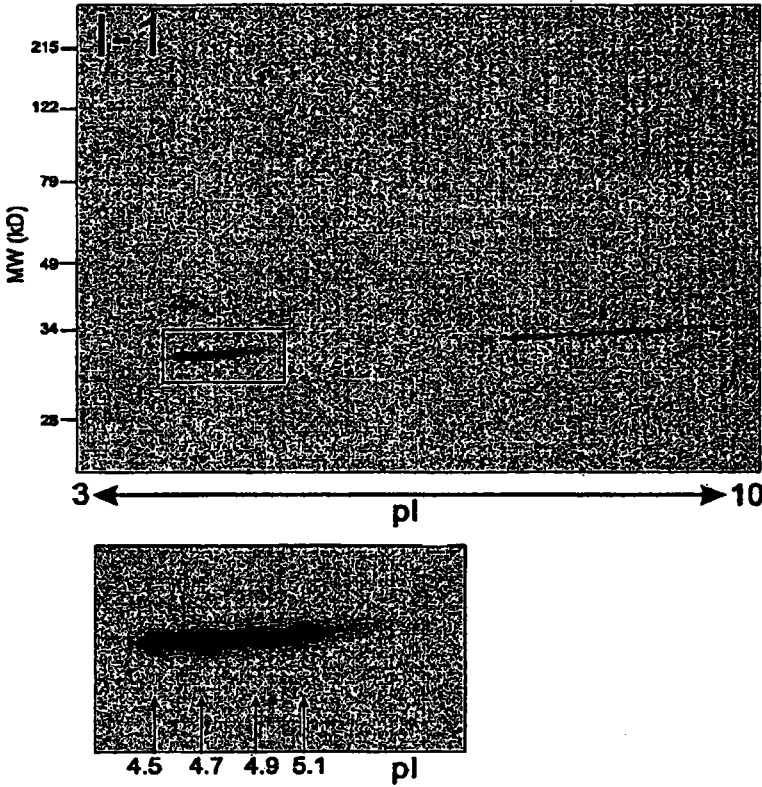


图 10

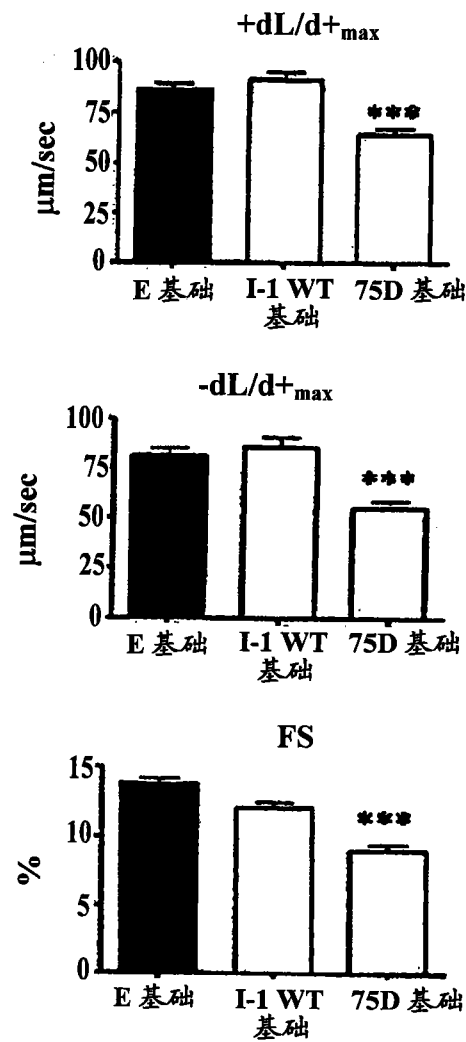


图 11

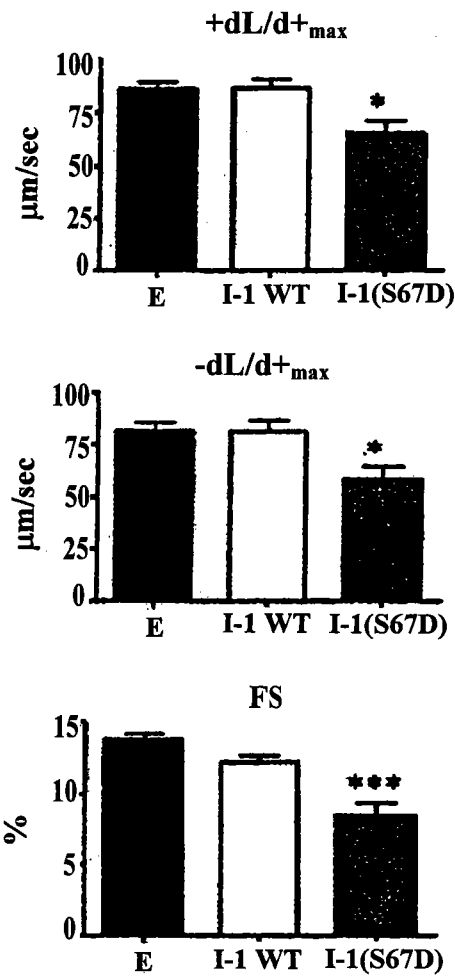


图 12

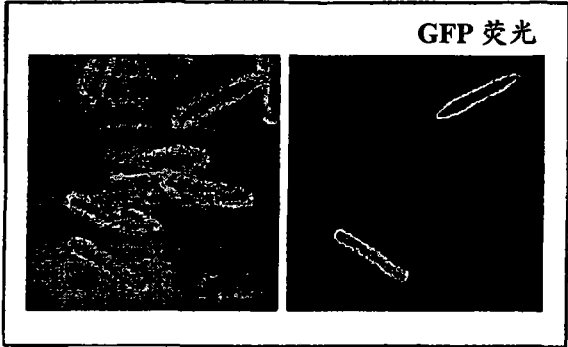


图 13A

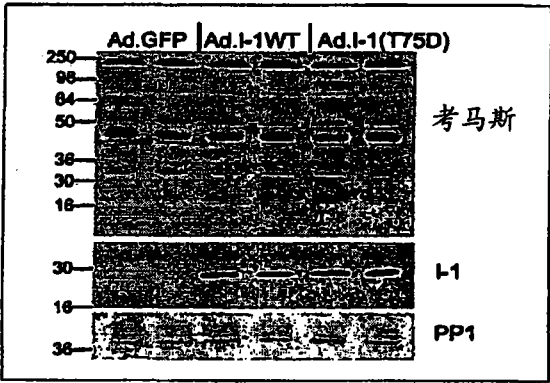


图 13B

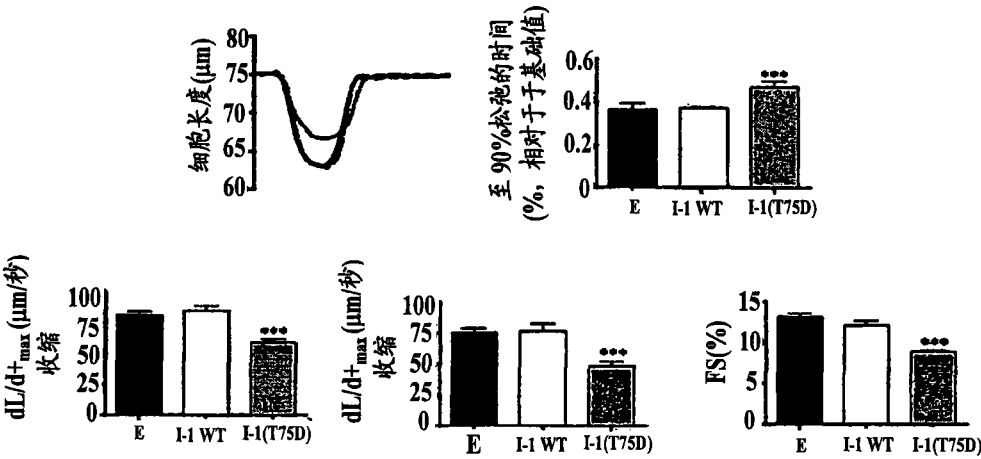


图 13C

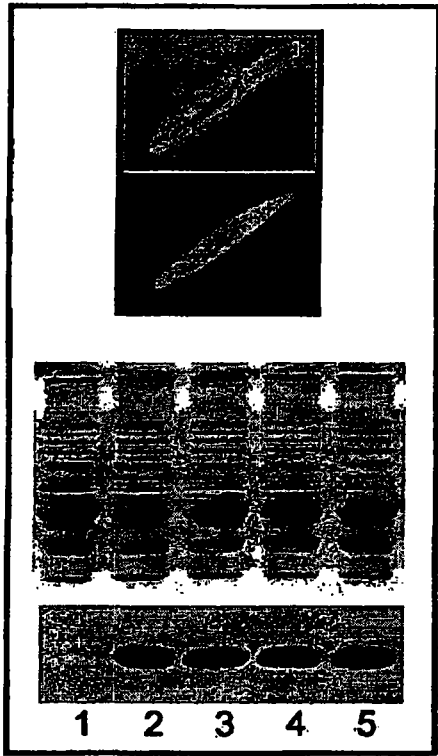


图 14A

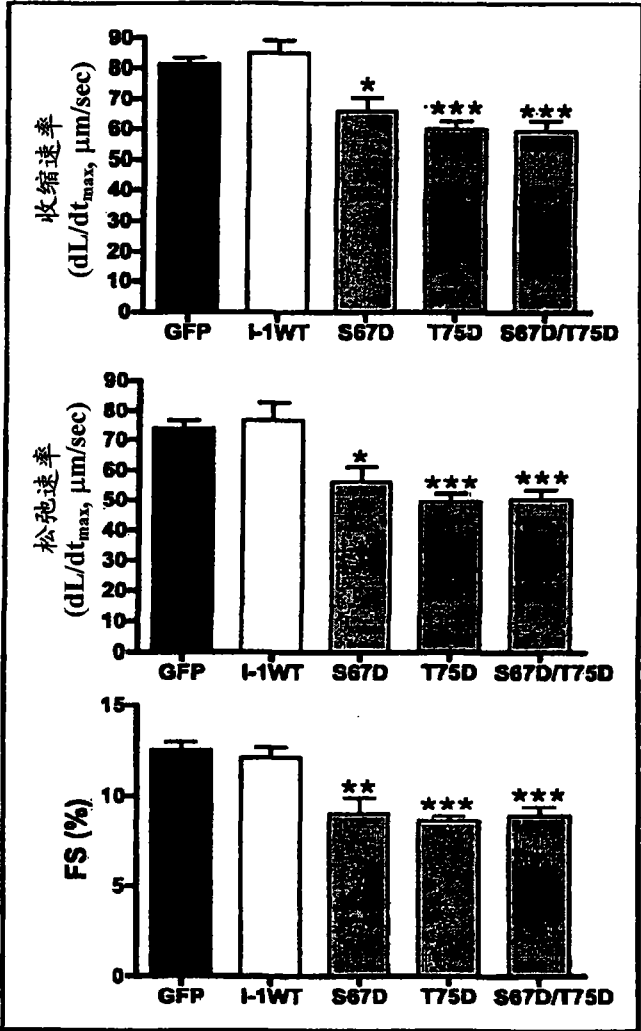


图 14B

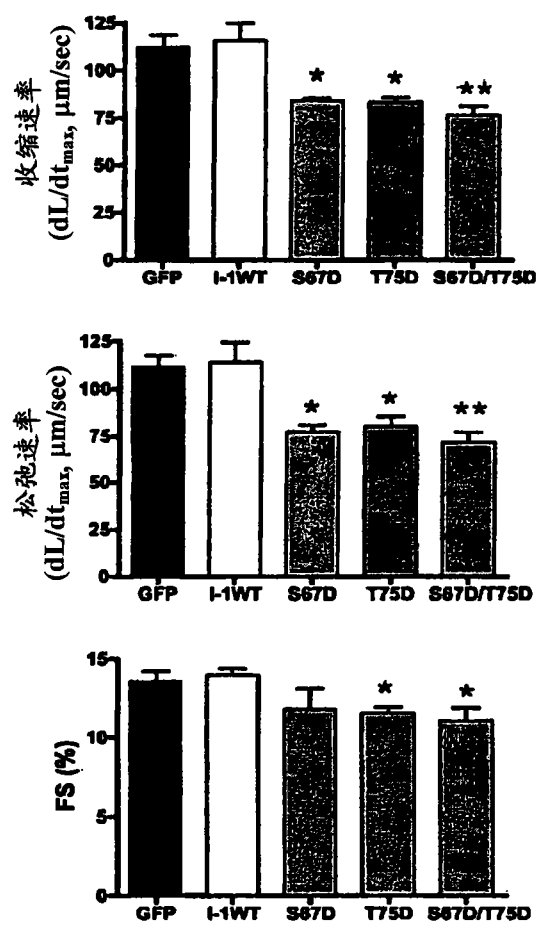


图 15

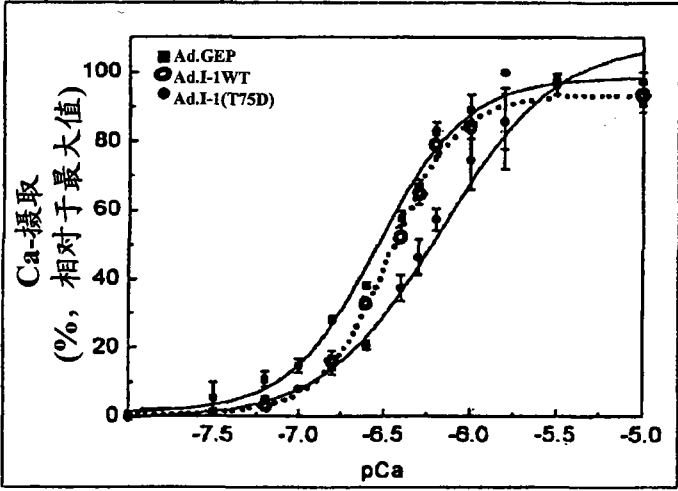


图 16A

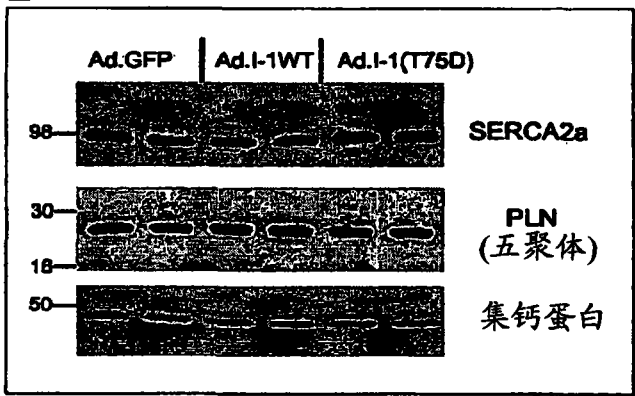


图 16B

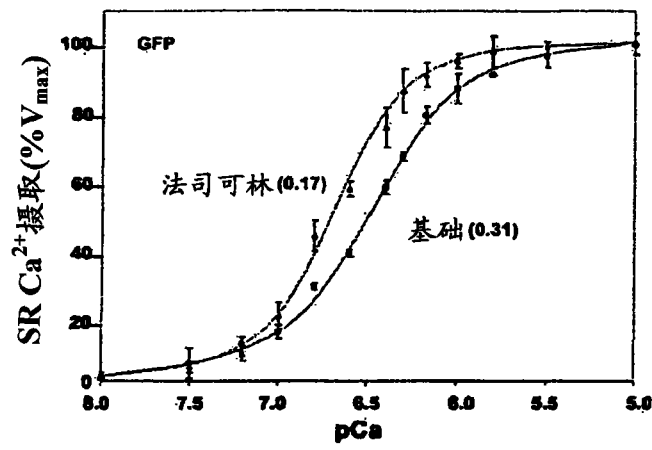


图 17A

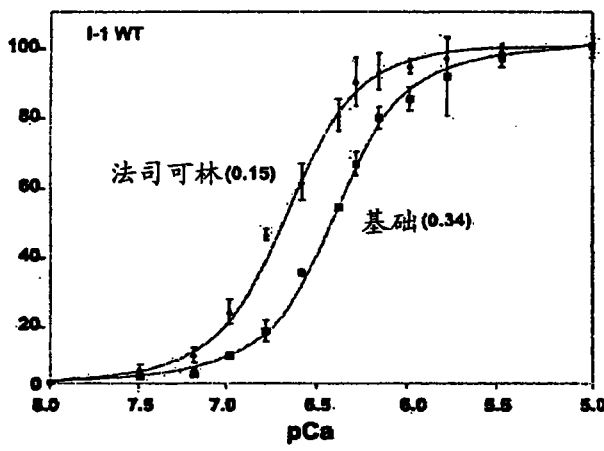


图 17B

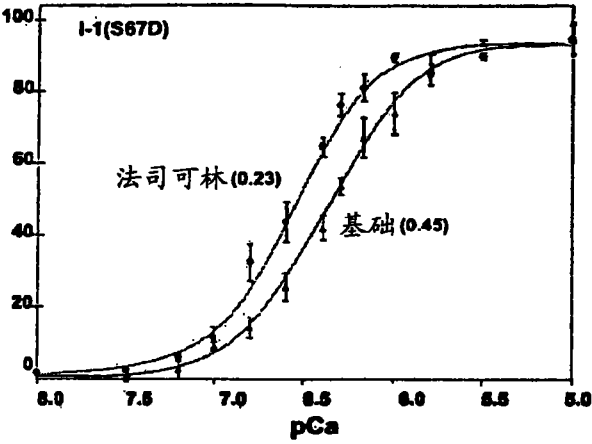


图 17C

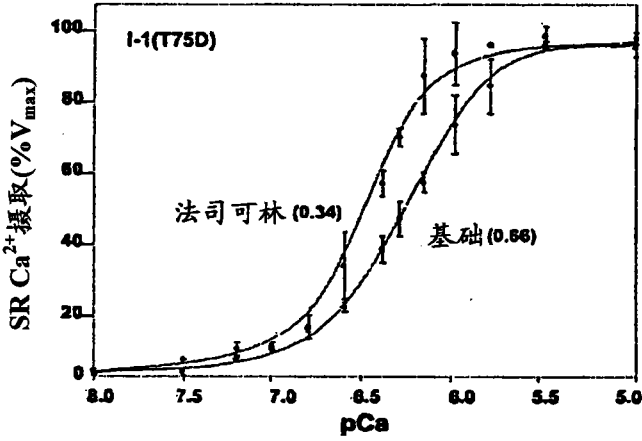


图 17D

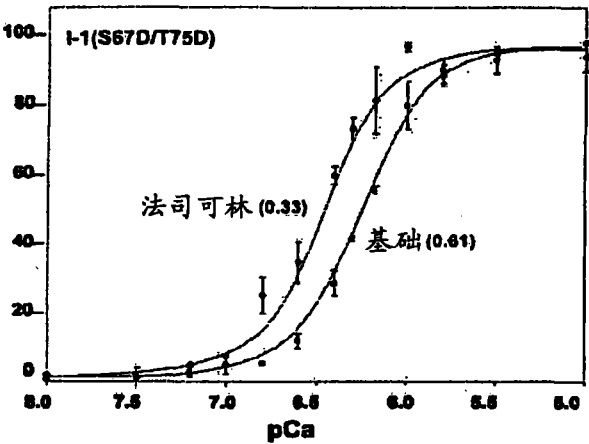


图 17E

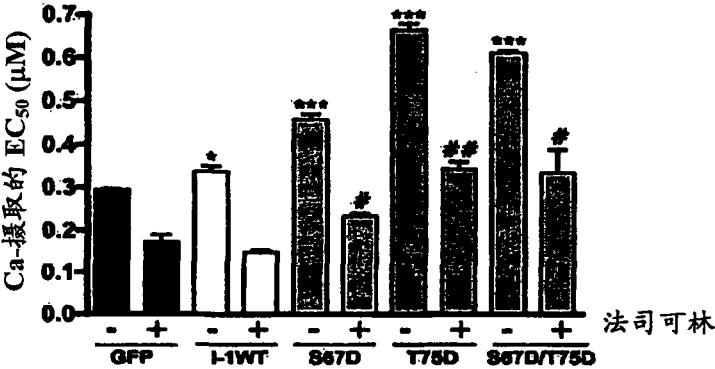


图 17F

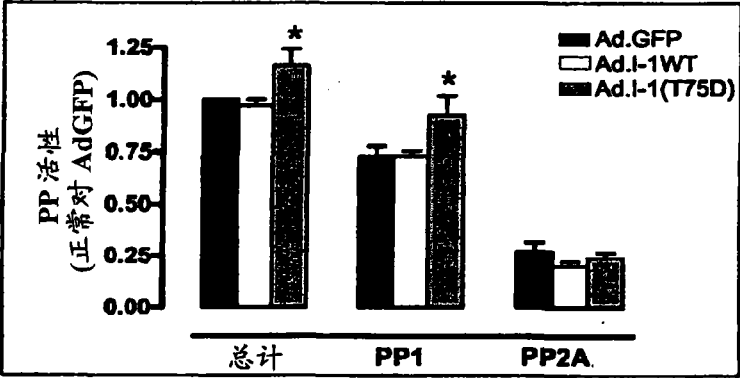


图 18A

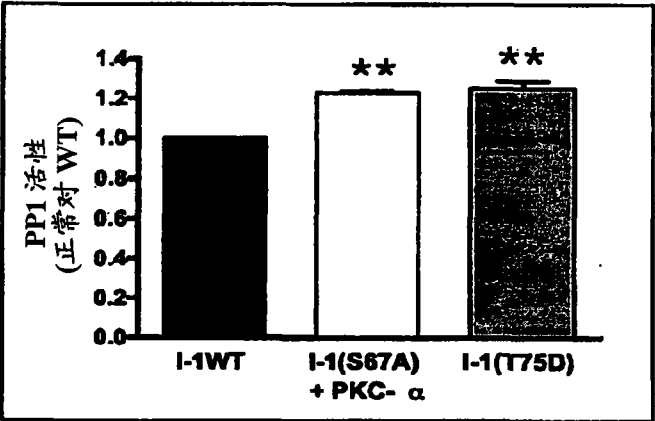


图 18B

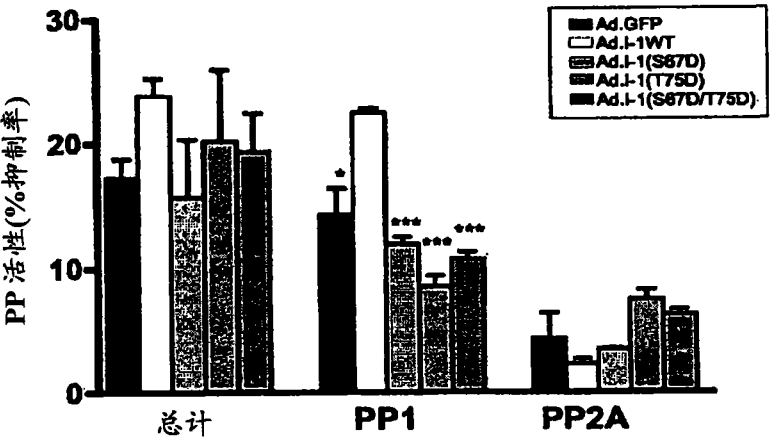


图 19



图 20A

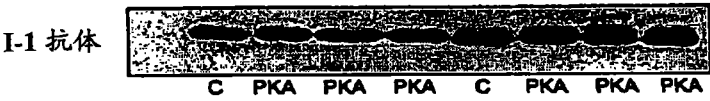


图 20B

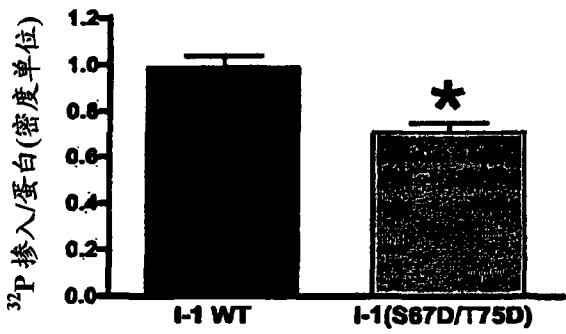


图 20C