



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105263507 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201480021728. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 03. 15

A61K 38/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 38/16(2006. 01)

61/793, 462 2013. 03. 15 US

A61K 48/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/029960 2014. 03. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/145236 EN 2014. 09. 18

(71) 申请人 尤文塔斯医疗公司

地址 美国俄亥俄州

申请人 克利夫兰临床医学基金会

(72) 发明人 M·S·佩恩 M·肯卓斯基

R·阿拉斯 J·帕斯托

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 赵蓉民 张全信

权利要求书2页 说明书21页

序列表7页 附图6页

(54) 发明名称

使用 SDF-1 减轻瘢痕形成

(57) 摘要

本发明公开了通过增加皮肤创伤中或其附近的 SDF-1 浓度, 来抑制或减轻皮肤创伤瘢痕形成的方法。如本文所述, 可通过提供治疗有效量的 SDF-1 蛋白质或 SDF-1 表达载体, 来将 SDF-1 蛋白质或 SDF-1 表达载体施用到创伤或创伤附近区域。

1. 一种抑制和 / 或减轻皮肤创伤瘢痕组织形成的方法, 包括向所述创伤和 / 或所述创伤附近的区域施用治疗有效量的 SDF-1 蛋白质或 SDF-1 表达载体, 由此增加所述创伤中或所述创伤附近的 SDF-1 浓度。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述皮肤的所述创伤为急性创伤, 所述急性创伤选自高温灼伤、化学灼伤、辐射灼伤、过度暴露于紫外线辐射导致的灼伤、医疗过程中持续造成的损伤、切口、外伤性损伤、割口或撕裂伤。

3. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述皮肤的所述创伤为慢性创伤, 所述慢性创伤选自压疮、褥疮、糖尿病或血液循环不良的相关创伤、或皮炎或粉刺引发的创伤。

4. 根据权利要求 1 所述的方法, 包括向所述创伤和 / 或所述创伤附近的区域施用 SDF-1 蛋白质。

5. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法, 包括向所述创伤和 / 或所述创伤附近的区域施用 SDF-1 表达载体。

6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中所述 SDF-1 表达载体为病毒载体。

7. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中所述 SDF-1 表达载体为非病毒载体。

8. 根据权利要求 7 所述的方法, 其中所述非病毒载体为具有 SEQ ID NO:6 序列的 DNA 质粒。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述 SDF-1 蛋白质或 SDF-1 表达载体是以包含 SDF-1 蛋白质或 SDF-1 表达载体和药学上可接受的载体的药物组合物形式施用的。

10. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中所述药物组合物为可注射制剂。

11. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中所述可注射制剂通过直接注射进所述创伤或所述创伤附近的区域施用。

12. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法, 其中所述 SDF-1 蛋白质或 SDF-1 表达载体以局部制剂的形式施用。

13. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法, 其中所述 SDF-1 蛋白质或 SDF-1 表达载体被置于基质中或基质上、固相支撑物中或固相支撑物上、或者创伤敷料中或创伤敷料上施用。

14. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中所述 SDF-1 蛋白质或 SDF-1 表达载体被置于基质中或基质上施用, 并且所述基质是可生物吸收植入物的形式。

15. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法, 其中所述 SDF-1 蛋白质或 SDF-1 表达载体被置于创伤敷料中或创伤敷料上施用。

16. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法, 其中所述 SDF-1 蛋白质或 SDF-1 表达载体被施用到所述创伤的外表面。

17. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法, 其中所述 SDF-1 蛋白质或 SDF-1 表达载体作为外科手术程序的一部分施用。

18. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法, 其中所述 SDF-1 蛋白质或 SDF-1 表达载体在所述创伤出现 24 小时内施用。

19. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法, 其中所述 SDF-1 蛋白质或 SDF-1 表达载体在所述创伤出现后超过 24 小时再施用。

20. 根据前述任一项权利要求所述的方法,其中所述创伤在医疗过程自始至终都是闭合的。

使用 SDF-1 减轻瘢痕形成

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2013 年 3 月 15 日提交的美国临时专利申请 No. 61/793, 462 的权益, 该专利申请全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及促进受试对象的创伤愈合的组合物及方法。

背景技术

[0004] 哺乳动物组织的创伤（即撕裂伤或开口）会导致创伤面处的组织破坏和微脉管系统凝血。这样的组织修复表现出伤口处细胞有序受控的应答反应。所有软组织创伤, 无论其大小如何, 均以类似的方式愈合。组织生长和组织修复都是生物系统的生理过程, 其中细胞增殖与血管生成会在存在氧梯度的情况下发生。已靠研究详尽阐明了组织修复期间相继出现的组织形态结构变化, 在某些情况下还将这些变化量化 (Hunt, T. K., et al., “Coagulation and macrophage stimulation of angiogenesis and wound healing,” in *The Surgical Wound*, pp. 1-18, ed. F. Dineen&G. Hildrick-Smith (Lea&Febiger, Philadelphia:1981) (Hunt, T. K. 等人, “血管生成和创伤愈合期间的凝血作用和巨噬细胞刺激效应”, 《手术创伤》, 第 1-18 页, F. Dineen 和 G. Hildrick-Smith 编辑, 费城 Lea&Febiger 出版社, 1981 年)。

[0005] 细胞形态由三个明显不同的区域组成。没有血管的中央创伤区域处于缺氧和酸中毒状态以及高碳酸血, 而且乳酸水平较高。与创伤区域相邻的是局部贫血（局部缺血）的梯度区域, 该区域由正在分裂的成纤维细胞构成。梯度区域是最重要的区域, 后面为合成活性胶原蛋白的区域, 该合成区域的特征是有成熟的成纤维细胞和大量新生毛细血管（即新血管化）。尽管新血管生长（血管新生）是创伤组织愈合过程中必不可少的一步, 然而天然的血管生成因子通常不能长期支持组织修复的额外生物合成效应。尽管有时需要创伤（即重度烧伤、手术切口、撕裂伤和其他外伤）更快愈合, 但迄今为止, 使用药剂加速创伤愈合只获得了有限的进展。

发明内容

[0006] 本发明涉及治疗受试对象的创伤并 / 或促进创伤愈合的方法和组合物。在此方法中, 将 SDF-1 以能有效促进创伤愈合的用量直接施用于创伤或创伤附近的细胞。所述创伤可包括受试对象身体任意部位的任何损伤。可使用本发明方法治疗的创伤的例子包括: 急性病症或创伤, 例如高温灼伤、化学灼伤、辐射灼伤、过度暴露于紫外线辐射导致的灼伤（如晒伤）; 身体组织损伤, 例如分娩生产过程造成的会阴损伤; 医疗过程（例如外阴切开术）中持续造成的损伤; 外伤性损伤, 包括割口、切口、擦伤; 意外事故造成的持续性损伤; 术后损伤与慢性病症, 例如压疮、褥疮、糖尿病和血液循环不良的相关病症, 以及所有类型的痤疮。此外, 创伤还可包括皮炎, 例如脓疱疮、间擦疹、毛囊炎和湿疹; 口腔手术创伤; 牙

周病 ; 外伤性创伤 ; 以及肿瘤相关创伤。

[0007] 在本发明的一方面中,施用于创伤或创伤附近细胞的 SDF-1 用量可有效促进或加速创伤闭合和创伤愈合、减轻创伤瘢痕形成和 / 或创伤周围瘢痕形成、抑制创伤周围或附近的细胞凋亡,并 / 或促进受伤组织血管再生。SDF-1 可施用于创伤附近的细胞,这些细胞因组织损伤和 / 或外伤而含有上调的 SDF-1 受体。在本发明的一方面中, SDF-1 受体可包括 CXCR4 和 / 或 CXCR7, 并且 SDF-1 的施用量可有效增强细胞的 Atk 磷酸化效应。

[0008] 在本发明的另一方面, SDF-1 的施用方式可为在创伤附近的细胞中表达 SDF-1 和 / 或向创伤提供包含 SDF-1 的药物组合物。可用编码 SDF-1 的载体对创伤附近的细胞进行基因改造,让这些细胞表达 SDF-1。可用编码 SDF-1 的质粒对创伤附近的细胞进行基因改造,让这些细胞表达 SDF-1。在一些实施例中,可使用具有 SEQ ID NO:6 序列的 DNA 质粒在创伤附近的细胞中表达 SDF-1。

[0009] 本发明还涉及在受试对象创伤愈合期间抑制瘢痕形成的方法与组合物。在此方法中,将 SDF-1 以能有效减轻创伤瘢痕形成和 / 或创伤周围瘢痕形成的用量直接施用于创伤或创伤附近的细胞。所述创伤可包括受试对象身体任意部位的任何损伤。可使用本发明方法治疗的创伤的例子包括:急性病症或创伤,例如高温灼伤、化学灼伤、辐射灼伤、过度暴露于紫外线辐射导致的灼伤(如晒伤);身体组织损伤,例如分娩生产过程造成的会阴损伤;医疗过程(例如外阴切开术)中持续造成的损伤;外伤性损伤,包括割口、切口、擦伤;意外事故造成的持续性损伤;术后损伤与慢性病症,例如压疮、褥疮、糖尿病和血液循环不良的相关病症,以及所有类型的痤疮。此外,创伤还可包括皮炎,例如脓疱疮、间擦疹、毛囊炎和湿疹;口腔手术创伤;牙周病;外伤性创伤;以及肿瘤相关创伤。

[0010] 在本发明的一方面中,施用于创伤或创伤附近细胞的 SDF-1 用量可有效促进或加速创伤闭合和创伤愈合、减轻创伤组织瘢痕纤维化和 / 或创伤周围组织瘢痕纤维化、抑制创伤周围或附近的细胞凋亡,并 / 或促进受伤组织血管再生。SDF-1 可施用于创伤附近的细胞,这些细胞因组织损伤和 / 或外伤的正调节而具有 SDF-1 受体。在本发明的一方面中, SDF-1 受体可包括 CXCR4 和 / 或 CXCR7, 并且 SDF-1 的施用量可有效增强细胞的 Atk 磷酸化效应。

[0011] 在本发明的另一方面, SDF-1 的施用方式可为在创伤附近的细胞中表达 SDF-1 和 / 或向创伤提供包含 SDF-1 的药物组合物。可选用载体、质粒 DNA、电穿孔和表达 SDF-1 的纳米粒子中至少一种,对创伤附近的细胞进行基因改造,让这些细胞表达 SDF-1。在一些实施例中,可使用具有 SEQ ID NO:6 序列的 DNA 质粒在创伤附近的细胞中表达 SDF-1。

[0012] 本发明还涉及促进或加速受试对象的创伤闭合的方法和组合物。在此方法中,将 SDF-1 以能有效促进创伤闭合的用量直接施用于创伤或创伤附近的细胞。所述创伤可包括受试对象身体任意部位的任何损伤。可使用本发明方法治疗的创伤的例子包括:急性病症或创伤,例如高温灼伤、化学灼伤、辐射灼伤、过度暴露于紫外线辐射导致的灼伤(如晒伤);身体组织损伤,例如分娩生产过程造成的会阴损伤;医疗过程(例如外阴切开术)中持续造成的损伤;外伤性损伤,包括割口、切口、擦伤;意外事故造成的持续性损伤;术后损伤与慢性病症,例如压疮、褥疮、糖尿病和血液循环不良的相关病症,以及所有类型的痤疮。此外,创伤还可包括皮炎,例如脓疱疮、间擦疹、毛囊炎和湿疹;口腔手术创伤;牙周病;外伤性创伤;以及肿瘤相关创伤。

[0013] 在本发明的一方面中,施用于创伤或创伤附近细胞的 SDF-1 用量可有效促进或加速创伤闭合和创伤愈合、减轻创伤瘢痕形成和 / 或创伤周围瘢痕形成、抑制创伤周围或附近的细胞凋亡,并 / 或促进受伤组织血管再生。SDF-1 可施用于创伤附近的细胞,这些细胞因组织损伤和 / 或外伤的正调节而具有 SDF-1 受体。在本发明的一方面中,SDF-1 受体可包括 CXCR4 和 / 或 CXCR7,并且 SDF-1 的施用量可有效增强细胞的 Atk 磷酸化效应。

[0014] 在本发明的另一方面,SDF-1 的施用方式可为在创伤附近的细胞中表达 SDF-1 和 / 或向创伤提供包含 SDF-1 的药物组合物。可选用载体、质粒 DNA、电穿孔和表达 SDF-1 的纳米粒子中至少一种,对创伤附近的细胞进行基因改造,让这些细胞表达 SDF-1。在一些实施例中,可使用具有 SEQ ID NO:6 序列的 DNA 质粒在创伤附近的细胞中表达 SDF-1。

[0015] 本发明还涉及用于促进受试对象的创伤愈合的局部用和 / 或局限性制剂。将该制剂施用于创伤后,其中包含的 SDF-1 用量能有效促进创伤闭合并抑制创伤瘢痕化。

[0016] 所述创伤可包括受试对象身体任意部位的任何损伤。可使用本发明方法治疗的创伤的例子包括:急性病症或创伤,例如高温灼伤、化学灼伤、辐射灼伤、过度暴露于紫外线辐射导致的灼伤(如晒伤);身体组织损伤,例如分娩生产过程造成的会阴损伤;医疗过程(例如外阴切开术)中持续造成的损伤;外伤性损伤,包括割口、切口、擦伤;意外事故造成的持续性损伤;术后损伤与慢性病症,例如压疮、褥疮、糖尿病和血液循环不良的相关病症,以及所有类型的痤疮。此外,创伤还可包括皮炎,例如脓疱疮、间擦疹、毛囊炎和湿疹;口腔手术创伤;牙周病;外伤性创伤;以及肿瘤相关创伤。

[0017] 创伤中的 SDF-1 量也可有效促进或加速创伤愈合、减轻创伤瘢痕形成和 / 或创伤周围瘢痕形成、抑制创伤周围或附近的细胞凋亡,并 / 或促进受伤组织血管再生。在本发明的一方面中,SDF-1 可为蛋白质形式,也可为施用于创伤附近细胞后可促进细胞表达 SDF-1 的质粒形式。

附图说明

[0018] 在参照附图阅读下面的具体实施方式后,本发明相关领域的技术人员应当能够理解本发明的上述特征及其他特征。

[0019] 图 1 示出了释放 SDF-1 支架加速创伤愈合的照片。

[0020] 图 2 示出了使用 SDF-1 蛋白质支架、SDF-1 血浆支架、盐水支架处理猪组织创伤一段时间后,以及未使用支架处理的猪组织创伤在同样一段时间后的创伤愈合百分率图。

[0021] 图 3 示出了在受试对象出现创伤后使用 JVS-100 处理创伤 28 天,得到的瘢痕总体积 (A)、瘢痕最大高度 (B) 和瘢痕表面积 (C) 的数据图示。

[0022] 图 4 示出了在受试对象出现创伤后使用 JVS-100 处理创伤 28 天,得到的瘢痕颜色 (A)、瘢痕纹理 (B) 和曼彻斯特瘢痕分级评定 (C) 的数据图示(从这些评估中排除了开裂程度超过 70% 的创伤)。

[0023] 图 5 示出了在受试对象出现开裂程度超过 60% 的创伤后使用 JVS-100 处理创伤 28 天,得到的曼彻斯特瘢痕分级评定结果 (A)、瘢痕纹理分数 (B) 和瘢痕轮廓分数 (C)。

[0024] 图 6 示出了在受试对象出现创伤后使用 JVS-100 处理创伤 90 天,得到的瘢痕纹理 (A)、瘢痕轮廓 (B)、瘢痕颜色 (C)、瘢痕畸变 (D) 和总体曼彻斯特瘢痕分级 (E) 的数据图示。

[0025] 示例性实施例的详细描述

[0026] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术术语具有的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。通常所理解的分子生物学术语的定义可见于例如:Rieger et al.,Glossary of Genetics:Classical and Molecular,5th edition, Springer-Verlag:New York,1991(Rieger 等人,《经典分子遗传学词汇表》,第5版,纽约斯普林格出版社,1991年);和 Lewin,Genes V,Oxford University Press:New York,1994(Lewin,《基因5》,纽约牛津大学出版社,1994年)。

[0027] 本文描述了涉及常规分子生物学技术的方法。此类技术是本领域众所周知的,在以下方法学专著中有详细描述,例如 Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd ed.,vol.1-3,ed.Sambrook et al.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989(《分子克隆实验指南》,第二版,第1-3卷,Sambrook 等人编辑,纽约冷泉港,冷泉港实验室出版社,1989年);和 Current Protocols in Molecular Biology,ed.Ausubel et al.,Greene Publishing and Wiley-Interscience,New York,1992(《现代分子生物学实验技术》,Ausubel 等人编辑,纽约格林出版协会和威利出版社,1992年)(定期更新)。核酸的化学合成方法则论述于例如 Beaucage and Carruthers,Tetra.Letts. 22:1859-1862,1981(Beaucage 和 Carruthers,《四面体通讯》,第22卷第1859至1862页,1981年),和 Matteucci et al.,J. Am. Chem. Soc. 103:3185,1981(Matteucci 等人,《美国化学学会期刊》第103卷第3185页,1981年)。核酸的化学合成可利用(例如)商购的自动化低聚核苷酸合成仪完成。免疫学方法(例如,抗原特异性抗体制备法、免疫沉淀法和免疫印迹法)论述于例如 Current Protocols in Immunology,ed.Coligan et al.,John Wiley&Sons,New York,1991(《现代免疫学实验技术》,Coligan 等人编辑,纽约约翰威利父子出版公司,1991年),和 Methods of Immunological Analysis,ed.Masseyeff et al.,John Wiley&Sons,New York,1992(《免疫学分析方法》,Masseyeff 等人编辑,纽约约翰威利父子出版公司,1992年)。基因转移和基因治疗的常规方法也可适用于本发明。参见例如 Gene Therapy:Principles and Applications,ed.T.Blackenstein, Springer Verlag,1999(《基因治疗:原理与应用》,T.Blackenstein 编辑,施普林格出版社,1999年); Gene Therapy Protocols(Methods in Molecular Medicine),ed.P.D.Robbins, Humana Press,1997(《基因治疗方案(分子医学方法)》,P.D.Robbins 编辑,休曼出版社,1997年);以及 Retro-vectors for Human Gene Therapy,ed.C.P.Hodgson, Springer Verlag,1996(《用于人类基因治疗的逆转录载体》,C.P.Hodgson 编辑,施普林格出版社,1996年)。

[0028] 本发明涉及通过向哺乳类受试对象的创伤和/或创伤附近的细胞施用其用量能有效促进创伤愈合、减轻细胞凋亡并/或减轻或抑制创伤瘢痕形成的 SDF-1,来治疗该哺乳类受试对象的创伤并/或促进其创伤愈合或闭合。本发明还涉及通过向创伤和/或创伤附近的细胞或组织施用其用量能有效促进创伤愈合、减轻细胞凋亡并/或减轻或抑制创伤瘢痕形成的 SDF-1,来抑制创伤或创伤附近组织瘢痕形成和/或瘢痕纤维化的方法。本发明还涉及用于治疗创伤的含有 SDF-1 或能上调创伤中细胞内 SDF-1 表达的药剂的局部用和/或局限性制剂。

[0029] 可用本发明的方法和/或组合物治疗的创伤可包括受试对象身体任意部位的任何损伤(例如内部创伤或外部创伤),包括:急性病症或创伤,例如高温灼伤、化学灼伤、辐

射灼伤、过度暴露于紫外线辐射导致的灼伤（如晒伤）；身体组织损伤，例如分娩生产过程造成的会阴损伤；医疗过程（例如外阴切开术）中持续造成的损伤；外伤性损伤，包括割口、切口、擦伤；意外事故造成的持续性损伤；溃疡，例如压迫溃疡、糖尿病溃疡、膏药性溃疡和褥疮性溃疡；以及术后损伤。创伤还可包括慢性病症或创伤，例如压疮、褥疮、糖尿病和血液循环不良的相关病症，以及所有类型的痤疮。此外，创伤还可包括皮炎，例如脓疱疮、间擦疹、毛囊炎和湿疹；口腔手术创伤；牙周病；以及肿瘤相关创伤。

[0030] 应当理解，本申请不限于前述创伤或损伤，其他创伤或组织损伤，无论是急性还是 / 或是慢性，都可用本发明的组合物和方法进行治疗。

[0031] 如本文所用，术语“促进创伤愈合”是指增强、改善、加快或诱导创伤闭合、愈合或修复。

[0032] 如本文所用，术语“治疗”是指减小症状强度和 / 或频率、消除症状和 / 或基本病因、防止症状和 / 或其基本病因出现，以及改善或修复损伤。因此，举例来说，“治疗”创伤包括加快创伤部位愈合、促进创伤闭合并减轻创伤瘢痕化。

[0033] 可用本发明的方法和组合物治疗的哺乳类受试对象可包括任一种哺乳动物，如人类、大鼠、小鼠、猫、狗、山羊、绵羊、马、猴、类人猿、兔、牛等。这些哺乳类受试对象可处于任何发育阶段，包括成年期、幼年期和新生儿期。哺乳类受试对象也可包括处于发育胎儿期的那些对象。

[0034] 根据本发明的一方面，可将 SDF-1 施用于创伤附近的细胞，旨在减轻细胞凋亡、促进创伤愈合、促进创伤闭合并 / 或减轻创伤瘢痕形成和 / 或创伤周围瘢痕形成。此类细胞包括表达 SDF-1 受体的细胞，此类细胞中的 SDF-1 受体因外伤和 / 或组织损伤而上调。上调的 SDF-1 受体可包括（例如）CXCR4 和 / 或 CXCR7。据发现，向因组织损伤导致 SDF-1 受体上调的细胞持续局部施用 SDF-1 增强了这些细胞内的 Akt 磷酸化效应，继而能够减轻细胞凋亡。另外，向组织长期局部施用 SDF-1 有利于正被治疗的创伤部位中的干细胞和 / 或祖细胞（例如内皮祖细胞）复原，这些复原的干细胞和 / 或祖细胞能够表达 CXCR4 和 / 或 CXCR7，有利于创伤周围和 / 或附近的组织血管再生。

[0035] 在一个实例中，向创伤和 / 或创伤附近的细胞施用 SDF-1 的时期可以是大致从出现创伤和 / 组织损伤起，直到其后数天、数周或数月。在一些实施例中，在创伤闭合前将编码 SDF-1 的质粒（例如通过缝合、粘合或其他物理手段）施用于创伤。据发现，利用蛋白质或质粒将 SDF-1 以局部和 / 或局限性方式递送到创伤足以加快创伤愈合和创伤闭合的速度。此外，用 SDF-1 处理过的创伤的纤维化程度往往比未用 SDF-1 处理过的创伤轻，表明 SDF-1 可减轻创伤瘢痕化。研究还发现，一旦组织发生损伤，创伤组织中的细胞或创伤外围或边界四周的细胞会立刻上调 SDF-1 表达。大约 24 小时后，细胞表达的 SDF-1 减少。可以在 SDF-1 减少后施用 SDF-1，以便减轻细胞凋亡。

[0036] 依照本发明的 SDF-1 可具有与哺乳动物天然 SDF-1 的氨基酸序列基本上类似的氨基酸序列。多种不同哺乳动物（包括人、小鼠和大鼠）的 SDF-1 蛋白质的氨基酸序列是已知的。人和大鼠的 SDF-1 氨基酸序列的同源性为约 92%。SDF-1 可包括两种同种型 SDF-1 α 和 SDF-1 β ，除非另外指明，否则本文将这两种同种型都称为 SDF-1。

[0037] SDF-1 的氨基酸序列可基本上等同于 SEQ ID NO:1。过表达的 SDF-1 也可具有与前述哺乳动物 SDF-1 蛋白质之一基本类似的氨基酸序列。例如，过表达的 SDF-1 可具有与

SEQ ID NO:2 基本类似的氨基酸序列。SEQ ID NO:2,基本上由 SEQ ID NO:1 构成,是人类 SDF-1 的氨基酸序列,GenBank 登记号为 NP954637。过表达的 SDF-1 还可具有与 SEQ ID NO:3 基本上等同的氨基酸序列。SEQ ID NO:3 包括大鼠 SDF 的氨基酸序列,GenBank 登记号为 AAF01066。

[0038] 依照本发明的 SDF-1 还可为哺乳动物 SDF-1 的变体,例如哺乳动物 SDF-1 的片段、类似物和衍生物。此类变体包括(例如)天然 SDF-1 基因的天然存在等位变体(即,编码天然存在的哺乳动物 SDF-1 多肽的天然存在核酸)所编码的多肽、天然 SDF-1 基因的另选拼接形式所编码的多肽、天然 SDF-1 基因的同源物或直系同源物所编码的多肽,以及天然 SDF-1 基因的非天然存在变体所编码的多肽。

[0039] SDF-1 变体的肽序列与天然 SDF-1 多肽在一个或多个氨基酸上有所不同。此类变体的肽序列的特征可为 SDF-1 变体上存在一个或多个氨基酸缺失、增加或取代。氨基酸插入优选地为约 1 至 4 个连续氨基酸,氨基酸缺失优选地为约 1 至 10 个连续氨基酸。变体 SDF-1 多肽基本上保留了天然 SDF-1 的功能活性。SDF-1 多肽变体的例子可通过表达本发明中具有沉默改变或保守改变特征的核酸分子获得。SDF-1 变体的一个例子列于美国专利 No. 7, 405, 195 中,该专利全文以引用方式并入本文。

[0040] 对应一个或多个特定基序和/或结构域或对应任意大小的 SDF-1 多肽片段均在本发明的范围之内。SDF-1 的孤立肽基部分可通过对编码此类肽的核酸对应片段的重组肽产物进行筛选获得。举例来说,本发明的 SDF-1 多肽可按所需长度任意分为多个片段,这些片段彼此之间不重叠;也可优选地按照所需长度分为多个重叠的片段。可采用重组方式制得这些片段,随后可检测这些片段,识别出可充当天然 CXCR-4 多肽激动剂的那些肽基片段。

[0041] SDF-1 多肽的变体还可包括 SDF-1 多肽的重组形式。重组多肽在本发明中为除了 SDF-1 多肽以外的优先选择,其编码核酸与编码哺乳动物 SDF-1 的基因的核酸序列相比,序列同一性至少可能为 70%。

[0042] SDF-1 变体可包括该蛋白质的激动剂形式,这些激动剂形式组成型表达天然 SDF-1 的功能活性。其他 SDF-1 变体可包括耐蛋白水解裂解的变体,例如,由于突变导致蛋白酶靶向序列发生变化的变体。肽的氨基酸序列变化是否能让变体具备天然 SDF-1 的一种或多种功能活性,可通过检测变体的天然 SDF-1 功能活性轻易确定。

[0043] 编码 SDF-1 蛋白质的 SDF-1 核酸可为天然或非天然的核酸,而且可为 RNA 形式或 DNA 形式(例如,cDNA、基因组 DNA 以及合成 DNA)。DNA 可为双链或单链,如果为单链,则可为编码链(正义链)或非编码链(反义链)。编码 SDF-1 的核酸编码序列可与 SDF-1 基因的核苷酸序列(例如 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 所示的核苷酸序列)基本类似。SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 分别为人类 SDF-1 和大鼠 SDF-1 的核酸序列,它们与 GenBank 登记号 NM199168 和 GenBank 登记号 AF189724 的核酸序列基本类似。由于遗传密码具有冗余性或称简并性,SDF-1 的核酸编码序列还可为编码与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 相同多肽的不同编码序列。

[0044] 本发明中编码 SDF-1 的其他核酸分子为天然 SDF-1 的变体,例如编码天然 SDF-1 的片段、类似物和衍生物的变体。此类变体可为(例如)天然 SDF-1 基因的天然存在等位变体、天然 SDF-1 基因的同源物或直系同源物,或天然 SDF-1 基因的非天然存在变体。这些变体具有的核苷酸序列与天然 SDF-1 基因在一个或多个碱基上有所不同。例如,此类变体

的核苷酸序列的特征可为天然 SDF-1 基因上存在一个或多个核苷酸缺失、增加或取代。核苷酸插入优选地为约 1 至 10 个连续核苷酸,核苷酸缺失优选地为约 1 至 10 个连续核苷酸。

[0045] 在其他应用中,结构发生明显改变的变体 SDF-1 可通过进行核苷酸取代获得,其中核苷酸取代导致所编码多肽的变化小于保守改变。此类核苷酸取代的例子可引起如下改变:(a) 多肽主链的结构变化,(b) 多肽的电荷或疏水性变化,或者(c) 氨基酸侧链的位阻变化。通常情况下,预期可导致蛋白质性质发生最剧烈变化的核苷酸取代为导致密码子非保守改变的核苷酸取代。可能导致蛋白质结构发生重大变化的密码子改变的例子为可导致下列取代的那些改变:(a) 亲水性残基(例如丝氨酸或苏氨酸)取代疏水性残基(例如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸或丙氨酸)或被其取代;(b) 半胱氨酸或脯氨酸取代其他残基或被其他残基取代;(c) 具有正电性侧链的残基(例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)取代具有负电性侧链的残基(例如谷氨酰胺或天冬酰胺)或被其取代;或(d) 具有大体积侧链的残基(例如苯丙氨酸)取代没有侧链的残基(例如甘氨酸)或被其取代。

[0046] 本发明中天然 SDF-1 基因的天然存在等位变体为从哺乳动物组织分离出的核酸,这些核酸与天然 SDF-1 基因具有至少 70% 的序列同一性,并且所编码的多肽和天然 SDF-1 多肽具有相似的结构。本发明中天然 SDF-1 基因的同源物为从其他物种分离出的核酸,这些核酸与相应的天然基因具有至少 70% 的序列同一性,并且所编码的多肽和天然 SDF-1 多肽具有相似的结构。可搜索公共和/或专有核酸数据库查找其他与天然 SDF-1 基因具有高度序列同一性(例如,序列同一性百分比为 70% 或 70% 以上)的核酸分子。

[0047] 非天然存在的 SDF-1 基因变体为不存在于自然界(例如,人工制作)、与天然 SDF-1 基因至少具有 70% 的序列同一性而且编码具有和天然 SDF-1 多肽相似的结构的多肽的核酸。非天然存在的 SDF-1 基因变体的例子为:编码天然 SDF-1 蛋白质的片段的基因、可在严格条件下与天然 SDF-1 基因杂交或与天然 SDF-1 基因互补的基因,以及与天然 SDF-1 基因至少具有 65% 的序列同一性或天然 SDF-1 基因互补的基因。

[0048] 本发明中编码天然 SDF-1 基因的片段的核酸为编码天然 SDF-1 的氨基酸残基的核酸。可将编码能编码天然 SDF-1 的片段的核酸、或与能编码天然 SDF-1 的片段的核酸杂交的较短寡核苷酸用作探针、引物或反义分子。也可将编码能编码天然 SDF-1 的片段的核酸、或与能编码天然 SDF-1 的片段的核酸杂交的较长多核苷酸用于本发明的多个方面。编码天然 SDF-1 的片段的核酸可通过酶消化(例如,使用限制性酶)或对天然的全长 SDF-1 基因或其变体进行化学降解获得。

[0049] 也可将能在严格条件下与前述核酸之一杂交的核酸用于本发明中。举例来说,此类核酸可为本发明中能在低严格性条件、中等严格性条件或高严格性条件下与前述核酸之一杂交的核酸。

[0050] 编码 SDF-1 融合蛋白的核酸分子也可用于本发明中。此类核酸可通过制备能在引入合适的目标细胞后表达 SDF-1 融合蛋白的构建体(例如,表达载体)获得。例如,这种构建体可通过将融合于框架中且编码 SDF-1 蛋白质的第一多核苷酸与编码另一种蛋白质的第二多核苷酸连接获得,该构建体在合适的表达体系中表达会得到融合蛋白。

[0051] 编码 SDF-1 的核酸可在碱基部分、糖部分或磷酸主链上进行改造,旨在(例如)提高分子稳定性、杂交稳定性等。本发明中的核酸还可包括其他附加的基团,例如肽(例如用于靶向到体内的目标细胞受体)、或促进跨细胞膜转运和杂交触发裂解的试剂。鉴于此,核

酸可与另一分子（例如肽）、杂交触发交联剂、转运剂、杂交触发裂解剂等物质缀合。

[0052] 可将 SDF-1 直接施用于创伤、创伤外围四周或创伤附近的细胞，以便减轻创伤附近细胞的凋亡、促进创伤区域血管生成，并加速创伤闭合、抑制创伤瘢痕化。可通过向创伤或创伤附近细胞施用 SDF-1 蛋白质，或通过向目标细胞引入能导致、加速和 / 或上调 SDF-1 表达的试剂（即 SDF-1 试剂），将 SDF-1 递送至创伤或创伤附近细胞。目标细胞中表达的 SDF-1 蛋白质可为基因改造细胞的表达产物。目标细胞可包括创伤内的细胞或创伤外围四周的细胞，或者包括与受处理组织具有生物相容性的体外细胞。所述生物相容性细胞还可包括从受处理的受试对象身体采集的自体同源细胞和 / 或生物相容的同种异体细胞或同基因细胞，例如自体同源、同种异体或同基因干细胞（例如间充质干细胞）、祖细胞（例如多潜能成熟祖细胞）和 / 或其他能进一步分化且与受处理组织生物相容的细胞。此类细胞可包括可用于皮肤移植、骨移植、工程化组织和其他用于治疗创伤的组织替代疗法的细胞。

[0053] 上述试剂可以是依照本发明和上述内容，能并入重组核酸构建体（通常为 DNA 构建体）中而且能够引入细胞并在细胞中复制的天然或合成核酸。这样的构建体可包括能在给定目标细胞中转录并翻译多肽编码序列的复制体系和序列。

[0054] 还可将其他试剂引入上述细胞中，以便促进上述细胞表达 SDF-1。这些试剂例如为能够增加编码 SDF-1 的基因转录、增加编码 SDF-1 的 mRNA 翻译的试剂，和 / 或能够减轻编码 SDF-1 的 mRNA 降解的试剂，可使用它们提升 SDF-1 蛋白质水平。增大细胞内基因转录的速率可通过在编码 SDF-1 的基因上游引入外源启动子实现。也可采用能够促进异源基因表达的增强子元件。

[0055] 其他试剂还可包括在施用于目标细胞后能够上调目标细胞的 SDF-1 表达的其他蛋白质、趋化因子和细胞因子。此类试剂可包括（例如）：施用于间充质干细胞（MSC）后显示出上调 SDF-1 表达的胰岛素样生长因子（IGF）-1（*Circ. Res.* 2008, Nov. 21 ; 103(11):1300-98）（《循环研究》，2008 年 11 月 21 日，第 103 卷第 11 期，第 1300-1398 页）；施用于成熟成纤维细胞后显示出上调 SDF-1 表达的音猬因子（Shh）（*Nature Medicine*, Volume 11, Number 11, Nov. 23）（《自然医学》，第 11 卷第 11 期，11 月 23 日）；施用于人类腹膜间皮细胞（HPMC）后显示出上调 SDF-1 表达的转化生长因子 β （TGF- β ）；施用于混合了骨髓基质细胞（BMSC）的原代人成骨细胞（HOBS）和人类成骨细胞样细胞系后，显示出上调 SDF-1 表达的 IL-1 β 、PDG-BF、VEGF、TNF- α 和 PTH（*Bone*, 2006, April ; 38(4):497-508）（《骨》，2006 年 4 月，第 38 卷第 4 期，第 497-508 页）；施用于骨髓细胞（BMC）后显示出上调表达的胸腺素 β 4（*Curr. Pharm. Des.* 2007 ; 13(31):3245-51）（《现代药物设计》，2007 年，第 13 卷第 31 期，第 3245-3251 页）；以及施用于骨髓源性祖细胞后显示出上调 SDF-1 表达的缺氧诱导因子 1 α （HIF-1）（*Cardiovasc. Res.* 2008, E. Pub.）（《心血管研究》，2008 年，电子出版）。可使用这些试剂治疗特定创伤或损伤，促使这些特定创伤或损伤处的细胞能够上调 SDF-1 相对于原有的或施用的特定细胞因子的表达。

[0056] 将上述试剂引入目标细胞的一种方法涉及应用基因治疗。根据本发明，可应用基因治疗让体内或体外的目标细胞表达 SDF-1 蛋白质。

[0057] 在本发明的一个方面中，基因治疗可使用包含编码 SDF-1 蛋白质的核苷酸的载体。“载体”（有时称为基因递送“运载体”或基因转移“运载体”）是指含有需递送至体内或体外目标细胞的多核苷酸的大分子或分子复合物。需递送的多核苷酸可具有基因治疗中所

关注的编码序列。载体包括（例如）病毒载体（例如腺病毒（Ad）载体、腺相关病毒（AAV）载体、逆转录病毒载体）、脂质体和其他含脂质的复合物，以及其他能够介导多核苷酸递送至目标细胞的大分子复合物。

[0058] 载体还可具有其他能进一步调节基因递送和 / 或基因表达、或能以其他方式向目标细胞提供有利属性的成分或功能。此类其他成分包括（例如）影响与细胞的结合或对细胞的靶向的成分（包括介导细胞类型或组织特异性结合的成分）；影响细胞对载体核酸的摄取的成分；影响细胞摄取的多核苷酸在细胞内的定位的成分（例如介导核内定位的试剂）；以及影响多核苷酸表达的成分。此类成分还可包括标记，例如可用于检测或选择吸收了载体递送的核酸并正在表达此核酸的细胞的可检测标记和 / 或选择性标记。此类成分可作为载体的天然特征提供（例如，使用具有能介导结合与摄取的成分或功能的某些病毒载体），也可以改造载体提供此类功能。

[0059] 选择性标记可为正向的、反向的或双功能的。正向选择性标记允许选择携带该标记的细胞，而反向选择性标记允许将携带该标记的细胞有选择地消除掉。过往的研究已述及多种此类标记基因，包括双功能（即正向 / 反向）标记（参见例如 Lupton, S. 在 1992 年 5 月 29 日公布的 W0 92/08796；以及 Lupton, S. 在 1994 年 12 月 8 日公布的 W0 94/28143）。此类标记基因可提供额外的对照测量标准，这在基因治疗过程中可能有好处。各种各样的上述载体是本领域已知的，而且它们通常易于获得。

[0060] 本发明中使用的载体包括病毒载体、基于脂质的载体和其他能够根据本发明将核苷酸递送至目标细胞的非病毒载体。载体可为靶向性载体，尤其是优先结合到创伤附近细胞的靶向性载体。本发明使用的病毒载体可包括对目标细胞只有低毒性、并且可采用组织特异性方式诱导产生治疗有效量的 SDF-1 蛋白质的病毒载体。

[0061] 病毒载体的例子为衍生自腺病毒（Ad）或腺相关病毒（AAV）的那些载体。人类病毒载体和非人类病毒载体都可用，并且重组病毒载体在人体内可能有复制缺陷。如果载体为腺病毒，那么该载体可能包含具有有效连接到编码 SDF-1 蛋白质的基因的启动子的多核苷酸，并且在人体内有复制缺陷。

[0062] 可根据本发明使用的其他病毒载体包括基于单纯性疱疹病毒（HSV）的载体。缺失了一个或多个即刻早期基因（IE）的 HSV 载体是有利的，因为其通常无细胞毒性，在目标细胞中保持处于类似潜伏期的状态，并提供有效的目标细胞转导。重组 HSV 载体可整合约 30kb 的异源核酸。

[0063] 逆转录病毒（例如 C 型逆转录病毒和慢病毒）也可用于本发明。例如，逆转录病毒载体可能基于鼠白血病病毒（MLV）。参见例如 Hu and Pathak, *Pharmacol. Rev.* 52:493-511, 2000 (Hu 和 Pathak, 《药理学评论》，第 52 卷第 493-511 页, 2000 年) 和 Fong et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 17:1-60, 2000 (Fong 等人, 《医药载体系统评论综述》，第 17 卷第 1-60 页, 2000 年)。基于 MLV 的载体可用多达 8kb 的异源（治疗性）DNA 替换掉病毒基因。异源 DNA 可包含组织特异性启动子和 SDF-1 核酸。在递送至创伤附近细胞的方法中，也可编码组织特异性受体的配体。

[0064] 其他可用的逆转录病毒载体是基于慢病毒的复制缺陷型载体，包括基于人类免疫缺陷病毒（HIV）的载体。参见例如 Vigna and Naldini, *J. Gene Med.* 5:308-316, 2000 (Vigna 和 Naldini, 《基因医学杂志》，第 5 卷第 308-316 页, 2000 年) 和 Miyoshi et al., *J.*

Viol. 72:8150-8157, 1998 (Miyoshi 等人,《病毒学杂志》,第 72 卷第 8150-8157 页,1998 年)。慢病毒载体是有利的,因为其不仅能够感染活跃分裂的细胞,还能够感染没有分裂的细胞。这种载体还高效地转导人类上皮细胞。

[0065] 本发明使用的慢病毒载体可源自人类慢病毒和非人类慢病毒(包括 SIV)。慢病毒载体的例子包括载体增殖需要的核酸序列和有效连接至 SDF-1 基因的组织特异性启动子。前述载体可包含病毒 LTR、引物结合位点、多嘌呤区段、att 位点和壳体化位点。

[0066] 慢病毒载体可被封装到任何恰当的慢病毒衣壳中。一种颗粒蛋白质被来自不同病毒的另一种颗粒蛋白质取代时,称之为“假型化”。载体衣壳可包含来自其他病毒的病毒包膜蛋白,包括鼠白血病病毒(MLV)或水疱性口炎病毒(VSV)。使用 VSV G 蛋白质产生了高载体滴度,并致使载体病毒颗粒的稳定性较高。

[0067] 基于 α 病毒的载体(例如由塞姆利基森林病毒(SFV)和辛德毕斯病毒(SIN)制成的那些载体)也可用于本发明。 α 病毒的应用在 Lundstrom, K., Intervirology 43:247-257, 2000 (Lundstrom, K.,《国际病毒学》,第 43 卷第 247-257 页,2000 年)和 Perri et al., Journal of Virology 74:9802-9807, 2000 (Perri 等人,《病毒学杂志》,第 74 卷第 9802-9807 页,2000 年)中有描述。

[0068] 重组的复制缺陷型 α 病毒载体是有利的,因为其能够进行高水平的异源(治疗性)基因表达,而且可以感染许多目标细胞。 α 病毒复制子可通过在其病毒体表面上显示功能性异源配体或结合结构域,从而允许选择性地结合至表达同源结合伙伴的目标细胞,来靶向特定的细胞类型。 α 病毒复制子可建立潜伏期,因此在目标细胞中建立长期的异源核酸表达。这些 α 病毒复制子也可在目标细胞中呈现短暂的异源核酸表达。

[0069] 在与本发明的方法相容的众多病毒载体中,需要在其中包含一种以上启动子,才能由该载体表达多于一种异源基因。此外,所述载体可包含编码信号肽或促进目标细胞分泌 SDF-1 基因产物的其他部分的序列。

[0070] 如需组合两种病毒载体系统的有利特性,可使用嵌合型病毒载体将 SDF-1 核酸递送至目标组织。构建嵌合型载体的标准技术是本领域技术人员熟知的。此类技术可以在例如 Sambrook, et al., In Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y. (Sambrook 等人,《分子克隆实验指南》,纽约冷泉港出版社)或任意多种论述重组 DNA 技术的实验手册中找到。包含 AAV 和腺病毒 ITR 组合的腺病毒衣壳中的双链 AAV 基因组可用于转导细胞。在另一种变型中,AAV 载体可置于“无内容”、“依赖辅助病毒”或“大容量”的腺病毒载体中。腺病毒/AAV 嵌合型载体在 Lieber et al., J. Virol. 73:9314-9324, 1999 (Lieber 等人,《病毒学杂志》,第 73 卷第 9314-9324 页,1999 年)中述及。逆转录病毒/腺病毒嵌合型载体在 Zheng et al., Nature Biotechnol. 18:176-186, 2000 (Zheng 等人,《自然生物技术》,第 18 卷第 176-186 页,2000 年)中述及。腺病毒内包含的逆转录病毒基因组可整合在目标细胞基因组内,并实现稳定的 SDF-1 基因表达。

[0071] 还构思了促进 SDF-1 基因表达和载体克隆的其他核苷酸序列元件。举例来说,启动子上游存在增强子或编码区下游存在终止子可以促进表达。

[0072] 根据本发明的另一方面,组织特异性启动子可融合至 SDF-1 基因。在腺病毒构建体内融合这种组织特异性启动子后,转基因表达被限定于特定组织。组织特异性启动子提

供的基因表达效力和特异性程度可利用本发明的重组腺病毒体系测定。

[0073] 除基于病毒载体的方法外,也可使用非病毒方法将 SDF-1 核酸引入目标细胞。对非病毒基因递送方法的评述在 Nishikawa and Huang, *Human Gene Ther.* 12:861-870, 2001 (Nishikawa 和 Huang,《人类基因治疗》,第 12 卷第 861-870 页,2001 年)中提供。根据本发明的非病毒基因递送方法的例子利用质粒 DNA 将 SDF-1 核酸引入细胞。基于质粒的基因递送方法是本领域众所周知的。

[0074] 可设计合成基因转移分子,使其与质粒 DNA 形成多分子聚集体。可将这些聚集体设计为结合至目标细胞。可使用阳离子亲水脂分子(包括脂多胺和阳离子脂质)提供向目标细胞(例如心肌细胞)的非受体依赖性 SDF-1 核酸转移。此外,预先形成的阳离子脂质体或阳离子脂质可与质粒 DNA 混合,生成细胞转染复合物。涉及阳离子脂质制备的方法在 Feigner et al., *Ann N. Y. Acad. Sci.* 772:126-139, 1995 (Feigner 等人,《纽约科学院纪事》,第 772 卷第 126-139 页,1995 年)和 Lasic and Templeton, *Adv. Drug Delivery Rev.* 20:221-266, 1996 (Lasic 和 Templeton,《先进药物递送评论》,第 20 卷第 221-266 页,1996 年)中有评述。在基因递送过程中, DNA 也可偶联到两亲性阳离子肽 (Fominaya et al., *J. Gene Med.* 2:455-464, 2000) (Fominaya 等人,《基因医学杂志》,第 2 卷第 455-464 页,2000 年)。

[0075] 根据本发明,可使用涉及基于病毒和非病毒的成分两者的方法。例如,用于治疗性基因递送的基于 EB 病毒 (EBV) 的质粒在 Cui et al., *Gene Therapy* 8:1508-1513, 2001 (Cui 等人,《基因治疗》,第 8 卷第 1508-1513 页,2001 年)中有描述。此外,涉及偶联到腺病毒的 DNA/配体/多阳离子助剂的方法在 Curiel, D. T., *Nat. Immun.* 13:141-164, 1994 (Curiel, D. T.,《自然免疫学》,第 13 卷第 141-164 页,1994 年)中有描述。

[0076] 此外, SDF-1 核酸可利用电穿孔技术通过转染目标细胞而引入目标细胞中。电穿孔技术是众所周知的,可用于促进利用质粒 DNA 的细胞转染。

[0077] 如有需要,编码 SDF-1 表达的载体可采用含有药学上可接受载体的可注射制剂(例如盐水)的形式被递送至目标细胞。根据本发明,也可使用其他药用载体、制剂和剂型。在一些实施例中,可将具有 SEQ ID NO:6 序列且编码 SDF-1 的 DNA 质粒递送至目标细胞。

[0078] 如果目标细胞包括正被处理的创伤附近的细胞,那么可直接注射足量载体,让 SDF-1 蛋白质的表达程度能够实现高效治疗,用这样的方式来递送所述载体。把载体直接注射到创伤内或创伤外围四周,就可非常有效地靶向载体转染,并将重组载体的损耗降至最低。这类注射方法能局部转染所需数量的细胞,尤其是创伤周围的细胞,从而极大改善基因转移的治疗效果,并最大程度降低机体对病毒蛋白作出炎症应答的可能性。在一些实施例中,注射可用针头完成。在一些实施例中,注射过程可为无针皮肤注射。

[0079] 倘若目标细胞是稍后要移植到创伤中(例如,需进行组织移植)的培养细胞,那么可通过直接注射到培养基中的方式递送上述载体。转染到细胞中的 SDF-1 核酸可有效连接至调控序列。

[0080] 然后,可采用熟知的移植技术(例如接枝移植)将转染的目标细胞移植到创伤处。相比于直接把载体注射到创伤附近的细胞中,首先在体外转染目标细胞,再将转染的目标细胞移植到创伤处这一方法可最大程度降低创伤附近组织发生炎症反应的可能性。

[0081] SDF-1 能在目标细胞内表达任意合适的时长,包括瞬时表达和长期稳定表达。在本发明的一个方面中,SDF-1 核酸将在规定的一段时间内持续表达治疗量,能有效减轻创伤附近细胞的凋亡并 / 或促进干细胞或祖细胞归巢于创伤处。这段时间可以是能有效促进创伤愈合、加速创伤闭合并 / 或抑制瘢痕形成的一段时间。

[0082] 治疗量是能够对受治疗的动物或人产生理想的医学结果的药物用量。如医疗领域所熟知,用于任一种动物或人的药物剂量取决于多种因素,包括受试对象的体型大小、体表面积、年龄、所施用的特定组合物、性别、给药时间和给药途径、总体健康状况,以及同时施用的其他药物。本领域的技术人员可使用下文所述的实验方法轻易确定蛋白质和核酸的具体剂量。

[0083] SDF-1 蛋白质或试剂可增强和 / 或上调目标细胞内的 SDF-1 表达,所以可将其单独施加于、或以药物组合物的形式施加于创伤中的细胞、创伤附近的细胞或即将施用于创伤的细胞(例如,受转染而表达 SDF-1 的间充质干细胞)。所述药物组合物可将 SDF-1 或 SDF-1 试剂局部释放到创伤附近细胞、正被治疗的细胞或即将施用于创伤的细胞。根据本发明的药物组合物包含的一定量 SDF-1 或 SDF-1 试剂通常与药学上可接受的稀释剂或赋形剂混合在一起(例如呈无菌水溶液的形式),以便根据预期用途调整最终浓度范围。制备所述药物组合物的技术通常为本领域所熟知,例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed. Mack Publishing Company, 1980(《雷氏药学大全》第 16 版,麦克出版公司,1980 年)中所述的技术,这些技术以引用方式并入本文。此外,对人给药时,制备的药物组合物应当符合无菌性、致热原性、一般安全性和 FDA 生物标准部门规定的纯度标准。

[0084] 所述药物组合物可以是单位剂量的可注射形式(例如,溶液剂、混悬剂和 / 或乳剂)。可用于注射的药物制剂的例子包括无菌水溶液或分散液,以及用于重构无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。载体可以是溶剂或分散介质,包括例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液态聚乙二醇等)、它们的合适混合物,和植物油。

[0085] 可例如利用包衣(例如卵磷脂)、就分散液而言通过维持所需的粒径、利用表面活性剂来维持适当的流动性。无水运载体例如棉籽油、芝麻油、橄榄油、大豆油、玉米油、葵花籽油或花生油和酯(例如肉豆蔻酸异丙酯)也可用作化合物组合物的溶剂体系。

[0086] 另外,可添加提高组合物稳定性、无菌性和等渗性的各种添加剂,包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、酚、山梨酸等可确保防止微生物的作用。在很多情况下,还期望包含等渗剂,例如糖、氯化钠等。可注射药物形式的延长吸收可利用延迟吸收剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现。然而,根据本发明,所用的任何运载体、稀释剂或添加剂必须与上述化合物相容。

[0087] 根据需要,可通过将实践本发明所用的化合物与不同量的其他成分合并到所需量的适当溶剂中,来制备无菌可注射溶液。

[0088] 可使用药物的“缓慢释放”胶囊或“持续释放”组合物或制剂,而且它们一般是适用的。缓慢释放制剂一般被设计成长期提供恒定的药物水平,并可递送 SDF-1 或 SDF-1 试剂。缓慢释放制剂通常被植入创伤部位附近,例如,创伤中或创伤四周表达 CXCR4 和 / 或 CXCR7 的细胞部位处。

[0089] 持续释放制剂的例子包括含有 SDF-1 或 SDF-1 试剂的固态疏水性聚合物的半透性基质,该基质是成形物品的形式,例如膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯;水

凝胶,例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸羟乙酯)或聚(乙烯醇);聚交酯,例如美国专利 No. 3, 773, 919 ;L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物;不可降解的乙烯-醋酸乙烯;可降解的乳酸-乙醇酸共聚物,例如 LUPRON DEPOT(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球);和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0090] 虽然聚合物例如乙烯-醋酸乙烯和乳酸-乙醇酸共聚物能释放分子超过 100 天,但某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。SDF-1 或 SDF-1 试剂在被包封后,可长期保持在机体内,并且可由于在 37°C 下暴露于水分而变性或聚集,从而降低生物活性并 / 或改变免疫原性。取决于所涉及的机制,有多种合理的策略可用于稳定 SDF-1 或 SDF-1 试剂。举例来说,倘若聚集机制涉及通过硫-二硫化物交换形成分子内 S-S 键,则可通过改造巯基残基,由酸性溶液冻干、控制含水量,使用合适添加剂,开发特定的聚合物基质组合物等方法实现稳定。

[0091] 在某些实施例中,脂质体和 / 或纳米粒子也可与 SDF-1 或 SDF-1 试剂一起应用。形成和使用脂质体的方法为本领域的技术人员所熟知,如下文所概述。

[0092] 脂质体由分散于水介质中的磷脂形成,并自发地形成多层同心双层小泡(也称为多层小泡(MLV))。MLV 的直径通常为 25nm 至 4 μ m。超声处理 MLV 会形成单层小泡(SUV),SUV 的直径在 200 埃至 500 埃的范围内,核心含有水溶液。

[0093] 磷脂在分散于水中后,取决于脂质与水的摩尔比,还可形成除脂质体外的多种结构。摩尔比较低时,脂质体是优选的结构。脂质体的物理特征取决于 pH、离子强度,以及是否存在二价阳离子。脂质体可显示对离子和极性物质的低渗透性,但在高温下经历相变,该相变会显著改变脂质体的渗透性。相变包括从被称为凝胶状态的紧密堆积的有序结构变为被称为流体状态的松散堆积的无序结构。该过程在特征性相变温度下发生,并导致对离子、糖和药物的渗透性增大。

[0094] 脂质体与细胞通过如下四种不同的机制相互作用:网状内皮系统的吞噬细胞如巨噬细胞和中性粒细胞的内吞作用;通过非特异性弱疏水力或静电力,或通过与细胞表面组分特异性相互作用而吸附至细胞表面;通过将脂质体的脂质双层插入质膜中与质膜融合,同时将脂质体内含物释放到细胞质中;将脂质体的脂质转移至细胞膜或亚细胞膜,或反之亦然,而与脂质体内含物没有任何关联。改变脂质体制剂可改变作用机制,但同时可能有不止一种作用机制起效。

[0095] 纳米胶囊一般能够以稳定和可再生的方式包埋化合物。为避免细胞内聚合物过载引起副作用,应当利用能够体内降解的聚合物设计这些超微粒子(尺寸在 0.1 μ m 左右)。考虑将符合这些要求的可生物降解的聚烷基-氰基丙烯酸酯纳米粒子用于本发明,这些粒子可容易制得。

[0096] 利用本发明的化合物制备药物组合物时,药学上可接受的载体可以是任何合适的形式(例如,固体、液体、凝胶等)。固体载体可以是一种或多种物质,这些物质也可用作稀释剂、矫味剂、粘结剂、防腐剂和 / 或封装材料。

[0097] 在本发明的另一方面,SDF-1 或 SDF-1 试剂可配制用于局部给药,以治疗表面创伤。局部制剂包括可通过口(口腔)递送到皮肤,以便让至少一层皮肤(即表皮层、真皮层和 / 或皮下层)与 SDF-1 或 SDF-1 试剂接触的那些制剂。可使用局部递送体系来给予本发明的局部制剂。

[0098] 用于皮肤局部给药的制剂可包括含有使用药理学上可接受的载体给药的 SDF-1 或 SDF-1 试剂的膏剂、霜剂、凝胶和糊剂。局部制剂可使用本领域技术人员所熟知的油质软膏基质或水溶性软膏基质制备。例如,此类制剂可包含植物油、动物脂,更优选地包括从石油中获得的半固体烃类。使用的特定组分可包括白色膏剂、黄色膏剂、十六烷基酯蜡、油酸、橄榄油、石蜡、凡士林、白凡士林、鲸蜡、淀粉甘油、白蜡、黄蜂蜡、羊毛脂、无水羊毛脂和单硬脂酸甘油酯。也可使用各种水溶性软膏基质,包括例如乙二醇醚及其衍生物、聚乙二醇、聚乙二醇 40 硬脂酸酯和聚山梨醇酯。

[0099] 在本发明的另一方面,可将 SDF-1 或 SDF-1 试剂置于基质、固相支撑物和 / 或创伤敷料中和 / 或其上,再将所述基质、固相支撑物和 / 或创伤敷料递送至创伤处。如本文所用,术语“基质”、“固相支撑物”和“创伤敷料”广义上指在制备好后被施加于创伤处,用于保护、吸收、引流等的任何底层。本发明可包括多种类型可商购的基质和 / 或背衬中的任一种,包括膜(例如聚氨酯膜)、亲水胶体(束缚于聚氨酯泡沫的亲水胶粒)、水凝胶(至少约含 60% 水的交联聚合物)、泡沫(亲水性或疏水性)、藻酸钙(藻酸钙纤维的非织造复合材料)和玻璃纸(含塑化剂的纤维素)。可测定创伤的形状和大小,然后根据测量数据定制该创伤专用的精确部位的创伤敷料。由于创伤部位的机械强度、厚度、敏感度等方面可能存在差异,所以可模制基质,以便特定地满足创伤部位的机械要求和 / 或其他需求。例如,如果基质将用于神经分布密集的创伤部位(例如指尖),则可最大程度削减基质厚度。其他创伤部位例如手指、脚踝、膝关节、肘关节等可能承受较大的机械应力,故需要使用多层基质。

[0100] 在一个实例中,所述基质可以是可生物吸收的植入物,该植入物含有聚合物基体和分散于该基体中的 SDF-1 或 SDF-1 试剂。聚合物基体可以是膜、海绵或凝胶的形式,或其他任何期望的构造。聚合物基体可由可生物降解的聚合物形成。然而应当理解,聚合物基体还可包含无机或有机复合材料。聚合物基体可包含已知材料的任一种或它们的组合,所述已知材料包括例如脱乙酰壳多糖、聚(环氧乙烷)、聚(乳酸)、聚(丙烯酸)、聚(乙醇醇)、聚(氨基甲酸酯)、聚(N-异丙基丙烯酰胺)、聚(乙烯基吡咯烷酮)(PVP)、聚(甲基丙烯酸)、聚(对苯乙烯羧酸)、聚(对苯乙烯磺酸)、聚(乙烯基磺酸)、聚(乙撑亚胺)、聚(乙烯胺)、聚(酸酐)、聚(L-赖氨酸)、聚(L-谷氨酸)、聚(γ -谷氨酸)、聚(己内酯)、聚交酯、聚(乙烯)、聚(丙烯)、聚(乙交酯)、聚(丙交酯-共-乙交酯)、聚(酰胺)、聚(羟基酸)、聚砜、聚胺、多糖、聚(HEMA)、聚(酸酐)、胶原、明胶、粘多糖(GAG)、聚(透明质酸)、聚(海藻酸钠)、藻酸盐、透明质酸、琼脂糖、聚羟基丁酸酯(PHB)等等。

[0101] 应当理解,本领域的普通技术人员可制作出具有任何期望构造、结构或密度的聚合物基体。通过改变例如聚合物浓度、溶剂浓度、加热温度、反应时间和其他参数,本领域的普通技术人员可制作出具有任何期望的物理特性的聚合物基体。例如,可将聚合物基体成型为各种密度的海绵样结构。还可将聚合物基体成型为随后可包裹在创伤上或以其他方式适形于创伤的膜或薄板。也可将聚合物基体构造为凝胶、网片、板材、螺钉、塞子或棒状物。任何想得到的聚合物基体形状或形式都在本发明的范围之内。在本发明的一个实例中,聚合物基体可包含藻酸盐基质。

[0102] 在本发明的另一方面中,可在聚合物基体中提供至少一种祖细胞。祖细胞的例子可选自但不限于全能干细胞、多能干细胞、多潜能干细胞、间充质干细胞、神经干细胞、造血干细胞、胰腺干细胞、心脏干细胞、胚胎干细胞、胚胎生殖细胞、神经嵴干细胞、肾脏干细胞、

肝脏干细胞、肺干细胞、成血管细胞和内皮祖细胞。祖细胞的额外例子可选自但不限于去分化的成软骨细胞、肌源性细胞、骨原细胞、腱细胞、韧带原性细胞、生脂细胞和皮肤抗原细胞。

[0103] 本发明的聚合物基体可与至少一种祖细胞和 SDF-1 或 SDF-1 试剂一起接种。SDF-1 或 SDF-1 试剂可分散于聚合物基体中并且 / 或者由接种的祖细胞表达。祖细胞可包括自体同源细胞 ; 然而应当理解, 也可使用异基因细胞、同种异体细胞或同基因细胞。在细胞不是自体同源的情况下, 可能有利的是施用免疫抑制剂以便最小化免疫排斥。采用的祖细胞可以是原代细胞、外植体或细胞系, 而且可能为分裂细胞或非分裂细胞。可先在体外扩增祖细胞, 再将其引入聚合物基体。如果不能从宿主采集足量活细胞, 那么优选地采用这种方式扩增自体同源细胞。

[0104] 也可在用于处理内部和 / 或外部创伤的医疗设备表面中或表面上提供 SDF-1 或 SDF-1 试剂。医疗设备可以是包括以下组件或部件、或配件的任何器械、工具、机器、机械装置、植入物或其他类似或相关物件, 这些组件或部件、或配件例如由美国国家处方集、美国药典或它们的任何增刊认可 ; 旨在用于诊断人类或其他动物的疾病或其他症状, 或治愈、减轻、治疗或预防人类或其他动物的疾病 ; 或旨在影响人类或其他动物的身体结构或任何功能 ; 并且不通过人体或其他动物体内或身体上的化学作用实现其任何主要预期目的, 也不依赖代谢实现其任何主要预期目的。

[0105] 医疗设备还可包括例如血管内医疗设备, 比如冠状动脉内医疗设备。冠状动脉内医疗设备的例子可包括用于受试对象脉管系统的支架、药物递送导管、移植物和药物递送球囊。当医疗设备为支架时, 该支架可包括外周支架、外周冠状动脉支架、可降解的冠状动脉支架、不可降解的冠状动脉支架、自膨式支架、由球囊扩展的支架和食道支架。上述医疗设备还可包括动静脉移植物、旁路移植物、阴茎植入物、血管植入物和移植物、静脉内导管、小直径移植物、人工肺导管、电生理学导管、骨针、缝合锚、血压和支架移植物的导管、乳房植入物、良性前列腺增生和前列腺癌的植入物、骨修复 / 增强装置、乳房植入物、整形外科关节植入物、牙科植入物、植入的药物输液管、肿瘤植入物、疼痛管理植入物、神经导管、中心静脉通路导管、导管套囊、血管通路导管、泌尿系统导管 / 植入物、斑块旋切术导管、凝块抽吸导管、PTA 导管、PTCA 导管、通管丝 (血管和非血管)、药物输注导管、血管造影导管、血液透析导管、神经血管气囊导管、胸腔负压引流导管、电生理学导管、中风治疗导管、脓肿引流导管、胆汁引流产品、透析导管、中心静脉通路导管和肠胃外给养导管。

[0106] 上述医疗设备此外可包括植入式起搏器或去纤颤器、血管移植物、括约肌装置、尿道装置、膀胱装置、肾装置、消化道装置和吻合装置、脊椎盘、止血屏障、夹具、外科钉 / 缝合线 / 螺丝 / 板 / 丝 / 夹、葡萄糖传感器、血液充氧管、血液充氧膜、血袋、节育器 / 宫内节育器及相关的妊娠控制装置、软骨修复装置、整形外科骨折修复装置、组织支架、脑脊液分流器、牙体折断修复装置、玻璃体内药物递送装置、神经再生导管、电刺激导线、脊柱 / 整形外科修复装置、创伤敷料、栓塞保护过滤器、腹主动脉瘤移植物和装置、神经瘤治疗线圈、血液透析设备、子宫出血补片、吻合口闭合装置、动脉瘤排除装置、神经补片、腔静脉滤器、泌尿器官扩张器、内窥镜手术和伤口引流器、外科组织摘出器、过渡鞘和扩张器、冠状动脉和外周导丝、循环支持系统、鼓膜造孔通气管、脑脊液分流器、去纤颤器引线、经皮闭合装置、引流管、支气管导管、血管线圈、血管保护装置、包括血管过滤器及远端支撑装置和栓塞过滤器 /

卡压助剂的血管介入装置、AV 接入移植物、外科棉塞、心脏瓣膜和组织工程化构建体（例如骨移植物和皮肤移植物）。

[0107] 以下实例仅用于说明目的，并不意欲限制本文所附权利要求的范围。

[0108] 实例 1- 藻酸盐支架中基质细胞衍生因子-1 的释放：加速创伤愈合的特性及能力

[0109] 我们假设 SDF-1 蛋白质或质粒的缓慢释放递送将会提高其促进创伤愈合的功效。因此，我们采用临床相关递送体系藻酸盐支架，随时间推移向猪急性手术创伤模型递送 SDF-1。我们首先在体外表征了使用藻酸盐支架递送 SDF-1 的效果，然后通过使用该支架递送 SDF-1 蛋白质和质粒至急性手术创伤，展示了其在活的有机体内的潜在治疗有益效果。

[0110] 体内应用支架的制备

[0111] 对于体内应用，采用与上述相同的方法定制了 1cm×6cm 藻酸盐支架。通过下述过程向支架填充 SDF-1 质粒 (n = 6)、SDF-1 蛋白质 (n = 10) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS) (n = 4)。

[0112] 对于 SDF-1 质粒支架，通过向 pcDNA3.1 主链（美国加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰公司 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif.)）中插入编码人 SDF-1 的基因，制得了质粒。将 3.5mg SDF-1 质粒混合到 2.33mL PBS 中生成 1.5mg/mL 溶液，制备得到装载溶液。在无菌条件下移取装载溶液，等距滴六滴 60 μL 装载溶液（共计 360 μL）到每个支架上，让每滴装载溶液覆盖支架上 1cm×1cm 的区域。

[0113] 对于 SDF-1 蛋白质支架，将 10 μg 无载体 SDF-1 蛋白质（美国明尼苏达州明尼阿波利斯 R&D systems 公司 (R&D systems, Minneapolis, Minn.)）与 5mL PBS 和 3mL 1000IU/mL 的肝素注射液（美国伊利诺伊州迪尔菲尔德百特医疗用品公司 (Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, Ill.)）混合生成 1.5 μg/mL 的溶液，制备得到装载溶液。在无菌条件下移取装载溶液，等距滴六滴 60 μL 装载溶液到每个支架上。

[0114] 以 PBS 支架作为阴性对照。混合 1.35mL PBS 和 0.45mL 1000IU/mL 的肝素注射液，制备得到装载溶液。在无菌条件下移取装载溶液，等距滴六滴 60 μL 装载溶液到支架上。

[0115] 将所有装载支架在 4°C 温度下存放 12 小时，再施用至创伤。

[0116] 猪手术创伤愈合模型和宰前跟踪检验

[0117] 对 2 只约克郡家猪行全身麻醉。将管口翻边的气管内插管置入猪体内，通过带辅助呼吸机的氧气再呼吸系统递送的异氟烷保持全身麻醉。使用急性手术创伤的标准模型。在每只猪身上间隔约 7.5cm 切出十二 (12) 个 5cm 长全厚度切口（脊柱每侧各 6 个）。每个切口都与脊柱垂直，切割起始位置距脊柱 7.5cm，从表皮朝腹腔切入。将纱布放入切口吸血，直到出血停止。取出纱布，缝合切口。

[0118] 创伤闭合后，紧挨创伤放置支架并拍照（图 1）。每头猪身上的支架放置顺序是随机的，分布如下：

[0119] • SDF-1 蛋白质支架 (n = 5)

[0120] • SDF-1 质粒支架 (n = 3)

[0121] • PBS 支架（对照，n = 2）

[0122] • 未使用支架（伪对照，n = 2）

[0123] 将支架置于创伤上方（伪对照组除外），用 Tegaderm™ 补片将每个创伤盖好。

[0124] 为了确定 SDF-1 对创伤愈合速率的影响，由同一名兽医在第 0 天（放置支架前）

和猪死前测量创伤长度。根据以下关系,将创伤长度转化为愈合百分率:

[0125] $(\text{初始创伤长度} - \text{最终创伤长度}) / \text{初始创伤长度} * 100\%$

[0126] 为了监测 SDF-1 对创伤愈合的急性效应和慢性效应,使用第 4 天处死的第一头猪评估急性效应,并使用第 9 天处死的第二头猪评估慢性效应。

[0127] 宰后跟踪检验

[0128] 在处死猪后,从每个伤口部位的中部切下一个切片,执行组织病理学和免疫组织化学分析。使用标准苏木精-伊红(H&E)染色评估第 4 天的纤维增生、炎症和坏死程度,以及第 9 天的坏死、纤维化和肉芽肿性炎症程度。由一名组织病理学家在不知情的情况下随机对每种参数进行定性分级:无(不存在)、轻微、轻度、中度或重度。对同一块组织切片执行了免疫组织化学染色。通过波形蛋白染色检测了 SDF-1 对浸润创伤的成纤维细胞的作用。通过 CD31 确定了 SDF-1 对血管形成有效,并通过平滑肌肌动蛋白染色检测到了存在平滑肌。由同一名病理学家使用同上的定性等级将每个样品的每种染色的程度分级(轻微…重度)。

[0129] 图 1 和图 2 还示出了释放 SDF-1 支架对创伤愈合的影响。图 1 示出了用对照(PBS)支架、SDF-1 蛋白质支架和 SDF-1 质粒支架处理的创伤在第 0 天(上图)和第 9 天(下图)的代表性实例。所有全切口创伤(中间)的长度为 $5.0 \pm 0.1\text{cm}$ 。

[0130] 在第 9 天,使用对照支架处理的创伤仍很明显,愈合百分率为 0%。相比之下,用 SDF-1 蛋白质支架和 SDF-1 质粒支架处理的创伤在第 9 天不再可见,各自的愈合百分率都为 100%。

[0131] 图 2 汇总了所有经处理创伤的愈合百分率数据。第 4 天的数据来自第一头猪,第 9 天的数据来自第二头猪。在第 9 天,使用 SDF-1 质粒支架或 SDF-1 蛋白质支架处理的创伤(实心标记和实线)与对照组或伪对照组(空心标记和虚线)相比,愈合程度更高。值得注意的是,3 个用 SDF-1 质粒支架处理的创伤中有 1 个,5 个用 SDF-1 蛋白质支架处理的创伤中有 2 个在第 9 天 100% 愈合;而对照组创伤和伪对照组创伤在第 9 天都没有愈合超过 20% 的情况。

[0132] 我们使用波形蛋白、CD31 和平滑肌肌动蛋白的免疫组织化学染色,分别研究了 SDF-1 对成纤维细胞浸润、新血管形成和平滑肌的影响。组间任一种染色的程度无显著差异。H&E 分析表明,在其他所有参数都相似的情况下,与对照组和伪对照组相比,用 SDF-1 蛋白质支架和 SDF-1 质粒支架处理的创伤的纤维化程度略有下降。结果在下方的表格中示出。

[0133] 结果示于下表。

[0134] 创伤愈合 H/E 数据 - 第 9 天

[0135]

处理组	创伤数目	纤维化程度				低于轻微的创伤百分比
		无	轻微	轻度	中度	
伪对照组(无补片)	2	0	1	1	0	50%
对照组(盐水补片)	2	0	1	0	1	50%
SDF-1 蛋白质补片	5	0	4	1	0	80%
SDF-1 质粒补片	3	0	3	0	0	100%

[0136] 创伤愈合 H/E 数据 - 第 9 天

[0137]

处理组	创伤数目	肉芽肿性炎症			低于轻微的创伤百分比
		无	轻微	重度	
伪对照组	2	0	0	0	100%
对照组	2	0	0	1	50%
SDF-1 蛋白质补片	5	0	1	0	50%
SDF-1 质粒补片	3	0	0	0	100%

[0138] 创伤愈合 H/E 数据 - 第 9 天

[0139]

处理组	总计	坏死		低于轻微的创伤百分比
		轻微	轻度	
伪对照组 (无补片)	2	1	0	50%
对照组 (盐水补片)	2	0	0	100%
SDF-1 蛋白质补片	5	1	1	80%
SDF-1 质粒补片	3	1	0	100%

[0140] 创伤愈合 H/E 数据 - 第 9 天

[0141]

处理组	总计	亚急性/慢性炎症				低于轻微的创伤百分比
		无	轻微	轻度	中度	
伪对照组 (无补片)	2	0	1	1	0	50%
对照组 (盐水补片)	2	0	0	0	0	100%
SDF-1 蛋白质补片	5	3	0	1	1	60%
SDF-1 质粒补片	3	1	1	0	1	67%

[0142] 实例 2- 红杜洛克猪的创伤愈合和瘢痕减轻评估

[0143] 研究评估了 SDF-1 促进红杜洛克猪 (肥厚性瘢痕的公认模型) 的创伤愈合和瘢痕修复的能力。在每只猪背中线的每一侧切出 5 至 6 个全厚度切除创伤。使用紧固件闭合创伤, 然后在创伤四周皮下注射编码 SDF-1 的质粒 (JVS-100) 或对照运载体。如图 3 所示, 出现创伤后使用 JVS-100 处理创伤 28 天的受试对象的瘢痕总体积 (A)、瘢痕最大高度 (B) 和瘢痕表面积 (C) 全部下降。此外, 瘢痕颜色、瘢痕纹理及曼彻斯特瘢痕分级 (MSS) 平均分数都有所改善 (图 4 和图 5)。出现创伤 90 天后评估创伤的对应结果显示, 用 SDF-1 处理的创伤改善了大约 40% (图 6(A-E))。

[0144] 实例 3- 在手术闭合后立即过表达 SDF-1 最大程度减轻了人类患者的瘢痕形成

[0145] 进行了随机盲法剂量递增试验, 以确定将编码 SDF-1 的质粒递送至开放式心脏手术后的胸骨创伤边缘是否能够改善患者创伤愈合并减轻瘢痕形成。26 名患者随机在胸骨创伤处接受 JVS-100 治疗或安慰剂治疗。在每个群组中, 通过无针皮肤注射向 2 名患者注射安慰剂, 向 6 名患者注射 JVS-100。1 个月后进行安全性评估, 在患者接受注射后 6 个月内持续使用 3D 成像及针对患者和医生的问卷调查评估创伤闭合与美容效果。截至目前, 所有研究人员仍不清楚受试对象的分组和处置情况。对接受 6 个月随访的患者 (第一群组和半数

第二群组)的完整数据组进行最小二乘法拟合的期中分析表明,术后6个月的瘢痕宽度与瘢痕缺陷体积的剂量依赖性都下降:瘢痕宽度(相对于群组1的18.5mm,安慰剂为35.9mm, $P < 0.0001$),瘢痕缺陷体积(相对于1.4mL,安慰剂为13.9mL, $P < 0.0001$)。患者评估瘢痕得到的综合视觉模拟评分表明,与安慰剂组相比,群组1的切口外观显著改善($p < 0.0001$);然而,医师和患者作出的曼彻斯特瘢痕分级评估未展示瘢痕外观显著改善。这些结果表明,JVS-100可显著改善人类受试对象的手术切口愈合情况并最大程度减轻瘢痕形成。

[0146] 本领域的技术人员阅读本发明上文的说明后,将认识到各种改进、变更和修改。在本技术领域内的这些改进、变更和修改旨在涵盖于所附权利要求中。本文引用的所有专利、专利申请和公开均以引用的方式全文并入本文。

[0147] 所关注序列:

[0148] SEQ ID NO:1

[0149] KPVSLLYRCP RFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK

[0150] SEQ ID NO:2

[0151] MNAKVVVVLV LVTALCLSDGKPVSLSYRCP RFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK

[0152] SEQ ID NO:3

[0153] MDAKVAVLALVLAALCISDGKPVSLSYRCP RFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKSNNNRQVCIDPKLKWIQEYLDKALNK

[0154] SEQ ID NO:4

[0155] GCCGACTTTACTCTCCGTCAGCCGCAATTGCCGCTCGGCGTCCGGCCCCGACCCGCGCTCGTCCGC
 CCGCCCCGCCCCGCCCCGCGCCATGAACGCCAAGGTCGTGGTGGTGGTCCCTCGTGTGACCGCGCTCTGCCTC
 AGCGACGGGAAGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGTTGCCAGAGCCAACGT
 CAAGCATCTCAAAATTCTCAACTCCAACTGTGCCCTTCAGATTGTAGCCCGGCTGAAGAACAACAACAGACAAG
 TGTGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGATTCAGGAGTACCTGGAGAAAAGCTTTAAACAAGTAAGCACAACAGCCAAAA
 AGGACTTTCCGCTAGACCCACTCGAGGAAAACTAAAACCTTGTGAGAGATGAAAGGGCAAAGACGTGGGGGAGGGGG
 CCTTAACCATGAGGACCAGGTGTGTGTGTGGGGTGGGCACATTGATCTGGGATCGGGCCTGAGGTTTGCCAGCATTT
 AGACCCTGCATTTATAGCATACGGTATGATATTGCAGCTTATATTCATCCATGCCCTGTACCTGTGCACGTTGGAAC
 TTTTATTACTGGGGTTTTTCTAAGAAAGAAATGTATTATCAACAGCATTTTCAAGCAGTTAGTTCCTTCATGATCA
 TCACAATCATCATCATTCTCATTCTCATTTTTTAAATCAACGAGTACTTCAAGATCTGAATTTGGCTTGTTTGGAGC
 ATCTCCTCTGCTCCCCTGGGGAGTCTGGGCACAGTCAGGTGGTGGCTTAACAGGGAGCTGGAAAAAGTGTCCTTTCT
 TCAGACACTGAGGCTCCCGCAGCAGCGCCCTCCCAAGAGGAAGGCCTCTGTGGCACTCAGATACCGACTGGGGCTG
 GCGCGCCCACTGCCTTCACCTCCTCTTCAACCTCAGTGATTGGCTCTGTGGGCTCCATGTAGAAGCCACTATTAC
 TGGGACTGTGCTCAGAGACCCCTCTCCAGCTATTCCTACTCTCTCCCCGACTCCGAGAGCATGCTTAATCTTGCTT
 CTGCTTCTCATTTCTGTAGCCTGATCAGCGCCGACCAGCCGGGAAGAGGGTGATTGCTGGGGCTCGTGCCCTGCAT
 CCCTCTCCTCCAGGGCCTGCCCCACAGCTCGGGCCCTCTGTGAGATCCGTCTTTGGCCTCCTCCAGAATGGAGCTG
 GCCCTCTCCTGGGGATGTGTAATGGTCCCCCTGCTTACCCGAAAAGACAAGTCTTTACAGAATCAAATGCAATTTT
 AAATCTGAGAGCTCGCTTTGAGTGACTGGGTTTTGTGATTGCCTCTGAAGCCTATGTATGCCATGGAGGCACTAACA
 AACTCTGAGGTTTTCCGAAATCAGAAGCGAAAAAATCAGTGAATAAACCATCATCTTGCCACTACCCCTCCTGAAGC
 CACAGCAGGGTTTTCAGGTTCCAATCAGAACTGTTGGCAAGGTGACATTTCCATGCATAAATGCGATCCACAGAAGGT

CCTGGTGGTATTTGTAACCTTTTTGCAAGGCATTTTTTTATATATATTTTTGTGCACATTTTTTTTTACGTTTCTTTA
 GAAAACAAATGTATTTCAAATATATTTATAGTCGAACAATTCATATATTTGAAGTGGAGCCATATGAATGTCAGTA
 GTTTATACTTCTCTATTATCTCAAACACTACTGGCAATTTGTAAAGAAATATATATGATATATAAATGTGATTGCAGCT
 TTTCAATGTTAGCCACAGTGTATTTTTCACTTGTACTAAAATTTGTATCAAATGTGACATTATATGCACTAGCAATA
 AAATGCTAATTGTTTCATGGTATAAACGTCCTACTGTATGTGGGAATTTATTTACCTGAAATAAAATTCATTAGTTG
 TTAGTGATGGAGCTTAAAAAAAAA

[0156] SEQ ID NO:5

[0157] CATGGACGCCAAGGTCGTCGCTGTGCTGGCCCTGGTGTGCTGGCCGCGCTCTGCATCAGTGACGGTAAGCC
 AGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCTGCCGATTCTTTGAGAGCCATGTCGCCAGAGCCAACGTCAAACATCTGAAAA
 TCCTCAACACTCCAAACTGTGCCCTCAGATTGTTGCAAGGCTGAAAAGCAACAACAGACAAGTGTGCATTGACCCG
 AAATTAAGTGGATCCAAGAGTACCTGGACAAAGCCTTAAACAAGTAAGCACAAACAGCCCAAAGGACTT

[0158] SEQ ID NO:6

[0159] AGATCTCCTAGGGAGTCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCC
 CGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGA
 GTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG
 ACGGTAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTA
 TTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGG
 ATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTC
 GTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTA
 GTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCT
 CCGCGGCCGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATA
 GGCCACCCCTTGGCTTCTTATGCATGCTATACTGTTTTTGGCTTGGGGTCTATACACCCCGCTTCCCTCATGTTA
 TAGGTGATGGTATAGCTTAGCCTATAGGTGTGGGTTATTGACCATTATTGACCACTCCCCTATTGGTGACGATACTT
 TCCATTAATAATCCATAACATGGCTCTTTGCCACAACCTCTCTTTATTGGCTATATGCCAATACACTGTCCCTCAGAG
 ACTGACACGGACTCTGTATTTTTACAGGATGGGGTCTCATTTATTATTTACAAATTCACATATAACAACACCACCGTC
 CCCAGTGCCCGCAGTTTTTATTAACATAACGTGGGATCTCCACGCGAATCTCGGGTACGTGTTCCGGACATGGGCT
 CTTCTCCGGTAGCGGCGGAGCTTCTACATCCGAGCCCTGCTCCCATGCCTCCAGCGACTCATGGTCGCTCGGCAGCT
 CCTTGCTCCTAACAGTGGAGGCCAGACTTAGGCACAGCACGATGCCACCACCACCAGTGTGCCGCACAAGGCCGTG
 GCGGTAGGGTATGTGTCTGAAAATGAGCTCGGGGAGCGGGCTTGACCCGCTGACGCATTTGGAAGACTTAAGGCAGC
 GGCAGAAGAAGATGCAGGCAGCTGAGTTGTTGTGTTCTGATAAGAGTCAGAGGTAACCTCCCGTTGCGGTGCTGTTAA
 CGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGCCACCAGACATAATAGCTGACAGACTAAC
 AGACTGTTCCCTTTCCATGGGTCTTTTCTGCAGTCACCGTCCCTGCCATCGGTGACCACTAGTGGCTCGCATCTCTCC
 TTCACGCGCCCGCCGCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCTCCCGCCTGTGGTG
 CCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTGG
 AGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCCTGACCCCTGCTTGTCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTC
 TGTTCTGCGCCGTTACAGATCGGTACCAAGCTTGCCACCACCATGAACGCCAAGGTCGTGGTCGTGCTGGTCCTCGT
 GCTGACCGCGCTCTGCCTCAGCGACGGGAAGCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCTTCGAAAGCC
 ATGTTGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCTCAAAAATCTCAACACCCCAAACCTGTGCCCTCAGATTGTAGCCCGGCTG
 AAGAACAACAACAGACAAGTGTGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGATTTCAGGAGTACCTGGAGAAAGCCTTAAACAA

GTAATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGT
TGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCCTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCCTTCCCTA
ATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCA
AGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGAAAGAACC
AGGGCCGCGGTGGCCATCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAA
GATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAG
CGGTGGTTTTGTTTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCA
AATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTCT
GCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTAC
CGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGA
ACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTA
AGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCG
GGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGC
AACGCGGCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTTGCTCACATGAATTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGC
GATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTGAGCCATTTCGCCGCCA
AGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGAT
GAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTGACGACGAGATCCTCGC
CGTCGGGCATGCTCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTTCGGCTGGCGGAGCCCCGTATGCTCTTCGTCCAGATCATCC
TGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTGAATGGGCAGGT
AGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATG
ACAGGAGATCCTGCCCCGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCT
GCGCAAGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTTGCAGTTCATTCAGGGCACCGGACAG
GTCGGTCTTGACAAAAAGAACCAGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCT
GTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCCGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCATC
ATGCGAAACGATCCTCATCCTGTCTCTTGATC

[0001]

<110> 尤文塔斯医疗公司

M·S·佩恩

M·肯卓斯基

<120>使用SDF-1减轻瘢痕形成

<130> 101431.000020

<140>

<141>

<150> 61/793,462

<151> 2013-03-15

<160> 6

<170> PatentIn. 3.5版

<210> 1

<211> 68

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列说明：合成多肽

<400> 1

Lys Pro Val Ser Leu Leu Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
 20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
 35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
 50 55 60

Ala Leu Asn Lys

65

<210> 2

<211> 89

<212> PRT

<213>智人

[0002]

<400> 2
 Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu
 1 5 10 15

 Cys Leu Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
 20 25 30

 Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
 35 40 45

 Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
 50 55 60

 Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
 65 70 75 80

 Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys
 85

 <210> 3
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> 褐家鼠

 <400> 3
 Met Asp Ala Lys Val Val Ala Val Leu Ala Leu Val Leu Ala Ala Leu
 1 5 10 15

 Cys Ile Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
 20 25 30

 Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
 35 40 45

 Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
 50 55 60

 Ser Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
 65 70 75 80

 Glu Tyr Leu Asp Lys Ala Leu Asn Lys

[0003]

85

<210> 4	
<211> 1940	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 4	
gccgcacttt cactctccgt cagccgeatt gcccgctcgg cgtccggccc ccgaccccg	60
ctcgtccgcc cgeccgeccg cccgcccgeg ccatgaacgc caaggctcgt gtcgtcgtg	120
tectcgtgct gaccgcgtc tgcctcagcg acgggaagcc cgtcagcctg agctacagat	180
gcccattgccc attcttcgaa agccatgttg ccagagccaa cgtcaagcat ctcaaaattc	240
icaaacctcc aaactgtgcc ctccagattg tagcccggtt gaagaacaac aacagacaag	300
tgtgcattga cccgaagcta aagtggattc aggagtacct ggagaaaact ttaaacaagt	360
aagcacaaca gccaaaaagg actttccgct agaccctc gaggaaaact aaaacctgt	420
gagagatgaa agggcaaga cgtgggggag ggggcctaa ccatgaggac caggtgtgtg	480
tgtgggtgg gcacattgat ctgggatcgg gcctgaggtt tgccagcatt tagaccctgc	540
atttatagca tacggtatga tattgcagct tatattcacc catgcccgtt acctgtgcac	600
gttggaactt ttattactgg ggTTTTTcta agaaagaaat tgtattatca acagcatttt	660
caagcagtta gttcctcat gatcaccaca atcaccatca ttctcattct cttttttaa	720
atcaacgagt acttcaagat ctgaatttgg ctgttttga gcattctctc tgetccctg	780
gggagtctgg gcacagtcag gtggtggett aacagggagc tggaaaaagt gtcctttctt	840
cagacactga ggctcccga gcagcgeccc tcccagagg aaggcctctg tggcactcag	900
ataccgactg gggtgggag ccgccactgc ctccacctcc tctttcaacc taagtattg	960
getctgtggg ctccatgtag aagccactat tactgggact gtgctcagag accctctcc	1020
cagctattcc taetctctcc ccgactccga gagcatgctt aatcttgctt ctgctctca	1080
ttctgtagc ctgatcagcg ccgcaccagc cgggaagagg gtgattcctg gggctcgtgc	1140
cttgcattcc tctctctcca gggectgcc cacagctcgg gccctctgag agatccgtct	1200
ttggctctct ccagaatgga gctggcctc tcttgggat gtgtaatggt cccctgctt	1260
accgcacaaa gacaagtctt tacagaatca aatgcaattt taaatctgag agctcgtctt	1320

[0004]

gagtgactgg gtttttgat tgcctctgaa gcctatgtat gccatggagg cactaacaaa 1380
 ctctgaggtt tccgaaatca gaagcgaana aatcagtgaa taaacctca tcttgccact 1440
 acccccctct gaagccacag cagggttcca ggttccaatc agaactgttg gcaaggtgac 1500
 atttccatgc ataaatgca tccacagaag gtcctggfgg tatttgtaac tttttgcaag 1560
 gcattttttt atatataatt ttgtgacat ttttttttac gtttctttag aaaacaaatg 1620
 tatttcaaaa tatatttata gtcgaacaat tcataatatt gaagtggagc catatgaatg 1680
 tcagtagttt ataactctct attatctcaa actactggca atttgtaaag aaatatatat 1740
 gatataataa tgtgattgca gcttttcaat gttagccaca gtgtattttt tcaactgtac 1800
 taaaattgta tcaaatgtga cattatatgc actagcaata aaatgtaat tgtttcatgg 1860
 tataaacgtc ctactgtatg tgggaattta ttacctgaa ataaaattca ttagttgtta 1920
 gtgatggagc ttaaaaaaaaa 1940

<210> 5

<211> 293

<212> DNA

<213>褐家鼠

<400> 5

ccatggagcc caaggtcgtc gctgtgctgg ccctggctgt gcccgctctc tgvatcagtg 60
 aaggtaagcc agtcagcctg agctacagat gccctgccc attctttgag agccatgctc 120
 ccagagccaa cgtcaaacat ctgaaaatcc tcaaacctcc aaactgtgcc cttcagattg 180
 ttgcaaggct gaaaagcaac aacagacaag tgtgcattga cccgaaatta aagtggatcc 240
 aagagtaact ggacaaagcc ttaaacaaat aagcacaaca gcccaagga ctt 293

<210> 6

<211> 3948

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列说明：合成多核苷酸

<400> 6

agatctccta gggagtcctt tacataactt acggtaaatg gcccgcttgg ctgaccgccc 60
 aacgaccccc gccattgac gcaataatg acgtatgttc ceatagtaac gccaataggg 120

[0005]

actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat	180
caagtgtate ataatccaag tacgcccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgc	240
tggcattatg cccagtacat gacottatgg gactttceta cttggcagta catctacgta	300
ttagtcateg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acateaatgg gcgtagatag	360
cggtttgaet cacggggatt tccaagtctc caceccattg acgtcaatgg gagtttgttt	420
tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgiegtaaca actcgcctcc attgacgcaa	480
atgggcggtg ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaacctg	540
cagatcgctt ggagacgcca tccacgtctt ttgacctc atagaagaca ccgggaccga	600
tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga tccccgtgc caagagtac	660
gtaagtaccg cctatagagt ctatagccc accccttgg cttcttatgc atgtatact	720
gtttttggct tggggtctat acaccccgc ttcctcatgt tataggatgat ggtatagctt	780
agcctatagg tgtgggttat tgaccattat tgaccctcc cctattggtg acgatacttt	840
ccattactaa tccataacat ggtctttgc cacaaactc tttattggtt atatgccaat	900
acaactgctt tcagagaetg acaeggaetc tgtattttta caggatgggg tctcatttat	960
tatttaaaaa ttcacatata caacaccacc gtcctcagtg cccgcagttt ttattaaaca	1020
taactgtgga tctccacgag aatctcgggt acgtgttccg gacatgggtt cttctcgggt	1080
agcggcggag ctctacate cgagccctgc tcccatgctt ccagcgactc atggctgctc	1140
ggcagctcct tgctcctaac agtggaggec agacttaggc acagcagat gcccaecacc	1200
accagtgtgc cgcacaagge cgtggcggta gggtagtgt ctgaaaatga gctcggggag	1260
cgggcttgca ccgctgacgc atttgaaga ctttaaggcag cggcagaaga agatgcagge	1320
agctgagttg ttgtgtctg ataagagtc gaggtaactc ccgttgcggg gctgttaacg	1380
gtggagggca gtgtagtctg agcagtaetc gttgctgccc cgccgcccac cagacataat	1440
agctgacaga etaacagaet gttcctttcc atgggttttt tctgcagtc cegtccttgc	1500
catcggtgac cactagtggc tgcctctct ccttaecgc cccgcgcctt tacctgagge	1560
cgccatccac gcgggtttag tccggtctg ccgctcccg cctgtggtgc ctctgaact	1620
gcgtccgccc tetaggttag tttaaagctc aggtcgagac eggcctttg tccggegctc	1680
ccttggagcc tacctagact cagccgctc tccacgtttt gctgacctt gcttgetcaa	1740

[0006]

cctacgtct ttgtttcgtt ttctgtctg cgccgttaca gatcggtacc aagettgcca	1800
ccaccatgaa cgccaaggtc gtggtegtgc tggtectegt gctgaaccgc ctctgectca	1860
ggaaggggaa gcccgtcagc ctgagctaca gatgcccatt ccgattcttc gaaagecatg	1920
ttgcccagagc caagctcaag caftcaaaa ttctcaaac cccaaactgt gcccttcaga	1980
ttgtagcccg gctgaagaac aacaacagac aagtgtgeat tgaecccaag ctaaagtgga	2040
ttcaggagta cctggagaaa gccctaaaca agtaatctag agggccctat tctatagtgt	2100
cacctaaatg ctagagctcg ctgatcagcc tgcactgtgc ctctagtgt ccagccatct	2160
gttgtttgce cctccccgt gccctccttg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt	2220
tcctaataaa atgaggaaat tgcategeat tctctgagta ggtgtcattc tattctgggg	2280
ggtgggggtg ggcaggacag caagggggag gattgggaag acaatagcag gcatgctggg	2340
gatgcgggtg gctctatggc ttctgaggcg gaaagaacca gggcccggt gccatcatg	2400
acaaaaatcc cttaacgtga gtttctctc cactgagcgt cagaccctgt agaaaagatc	2460
aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct gctgcttgea aacaaaaaaa	2520
ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccc gatcaagagc taccaactct tttcccgaag	2580
gtaactgget tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgt gccgtagtta	2640
ggccaccact tcaagaactc tgtagcaacc cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta	2700
ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttgactc aagacgatag	2760
ttaccggata aggcgcagcg gtcgggtga accgggggtt cgtgcacaca gccagcttg	2820
gagcgaacga cctacaccga actgagatcc ctacagcgtg agctatgaga aagcgcacg	2880
cttcccgaag ggagaaagge ggacaggtat ccggttaagc gcagggtcgg aacaggagag	2940
cgcaagagg agcttccagg gggaaacgcc tggatcttt atagtcctgt cgggtttcgc	3000
caactctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgcctgtcag gggggcggag cctatgaaa	3060
aaagccagca acgcggcctt tttacggctc ctggccttt gctggcctt tgcctcatg	3120
aattcagaag aactcgtcaa gaagcgata gaagcgatg cgtgcgaat cgggagcggc	3180
gataccgtaa agcaagagga ageggtcagc ccattcgcg ccaagcttt cagaafatc	3240
acgggtagcc aacgctatgt cctgatagcg gtcccaca cccagccgce cacagtcgat	3300

[0007]

gaatccagaa aageggccat ttccaccat gatattcggc aagcaggeat cgccatgggt	3360
caagacgaga tccctgccgt cgggcattgt cgccttgagc ctggcgaaca gtteggctgg	3420
cgcgagcccc tgatgetett cgteagatc atcctgatcg acaagaccgg cttecatceg	3480
agtacgtgct cgtctgatge gatgtttcgc ttggtggtcg aatgggcagg tagccggatc	3540
aagcgtatge agecgcgca ttgcatacgc catgatggat accttctcgg caggagcaag	3600
gtgagatgac aggagatcct gccccggcac ttgcaccaat agcagccagt ccttcccg	3660
ttcagtgaca acgtcgagca cagctgcgca aggaacgccc gtcgtggcca gccacgatag	3720
ccgcgtgccc tctcttgcga gttcattcag ggcaccggac agtctggctc tgacaaaaag	3780
aaccgggccc cctgcgctg acagccgcaa caaggcggca tcagagcagc cgattgtctg	3840
ttgtgccag tcatagccga atagctctc caaccaagcg gccggagaac ctgcgtgeaa	3900
tcactttgt tcaatcatge gaaacgatcc tcactctgtc tcttgatc	3948

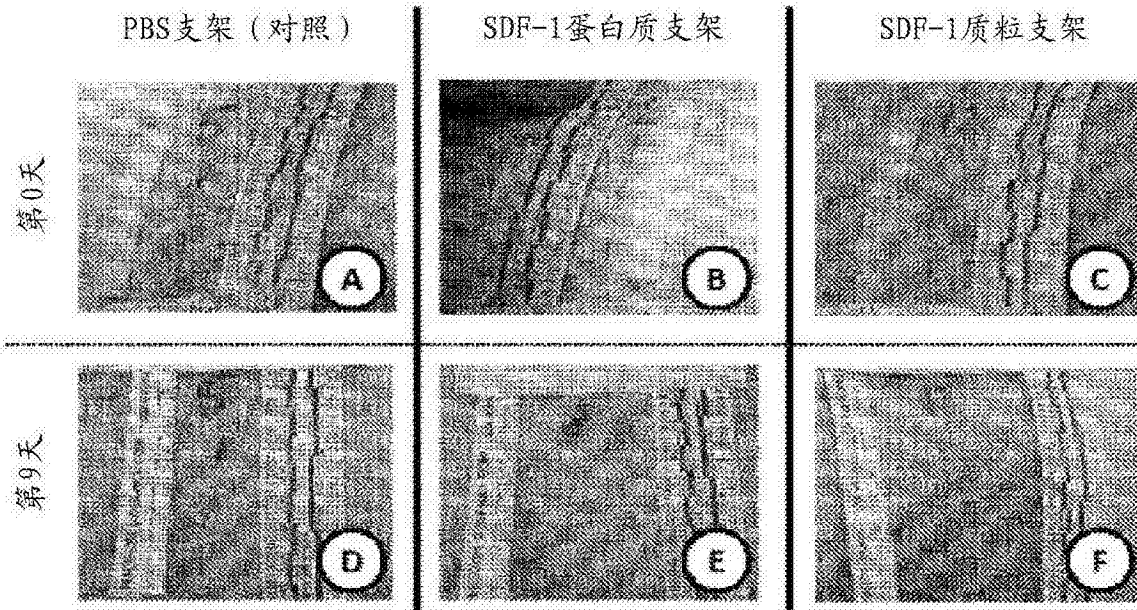


图 1

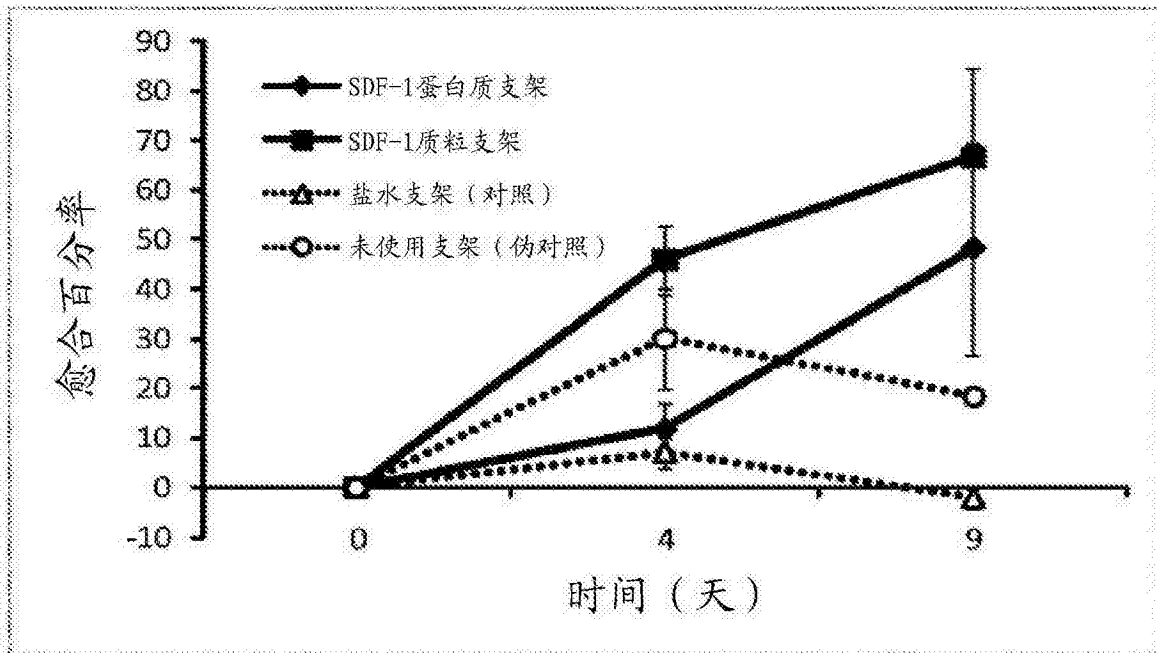


图 2

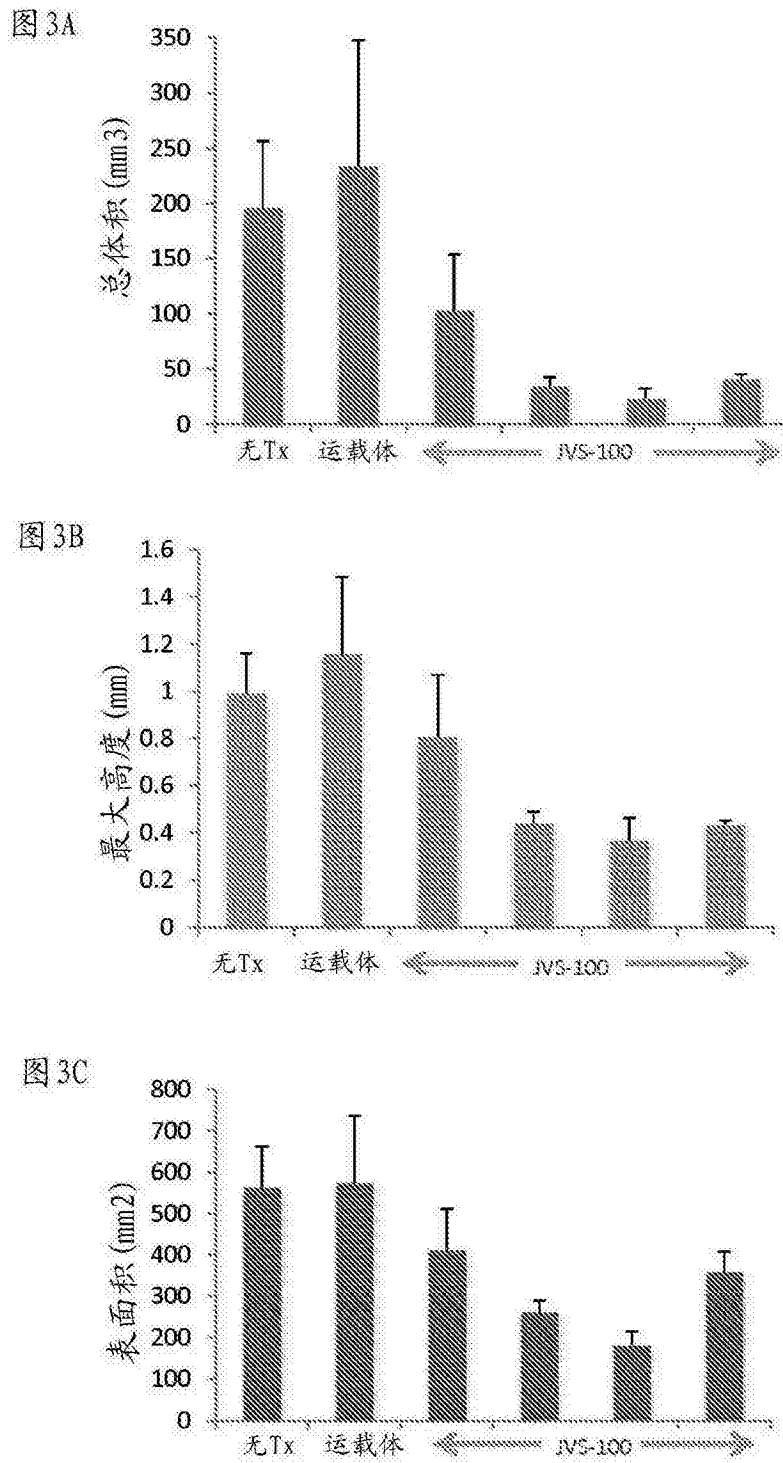


图 3

图4A

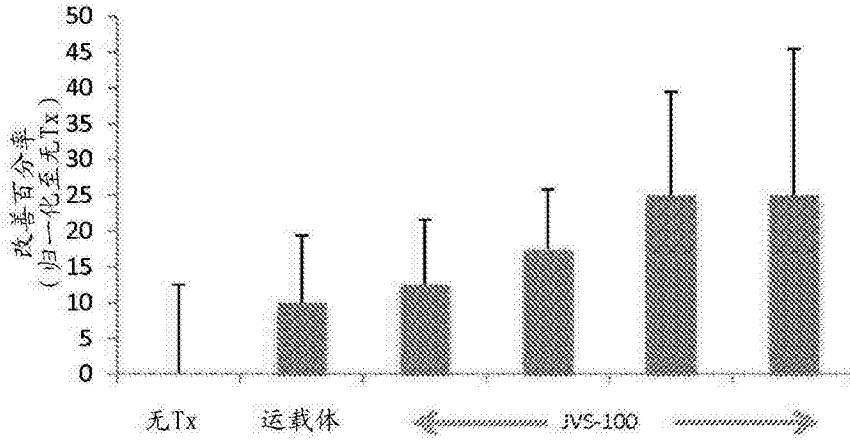


图4B

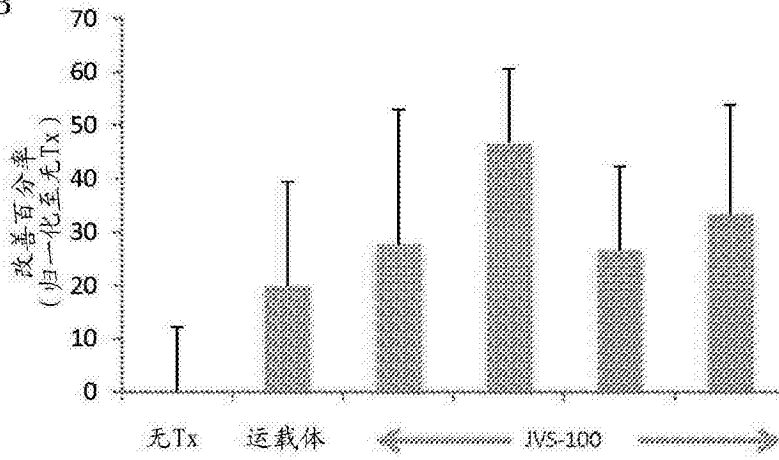


图4C

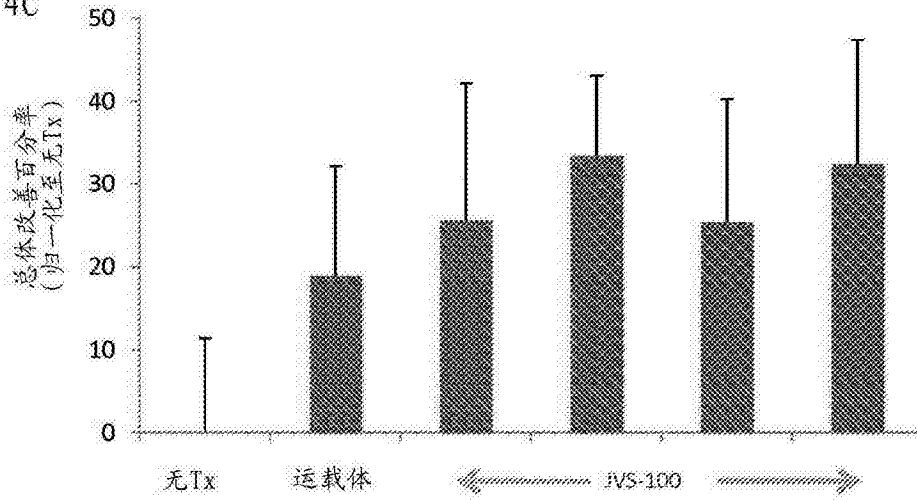


图 4

图5A

MSS分数

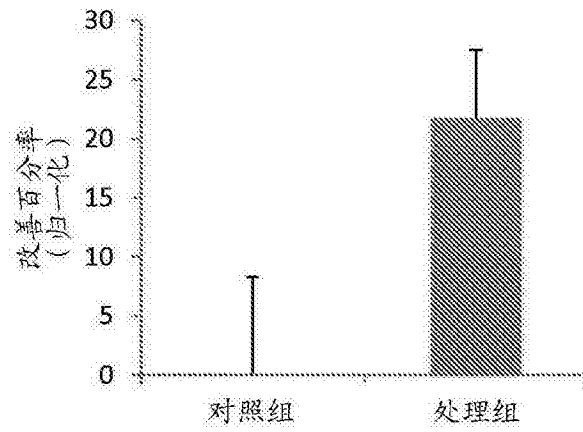


图5B

纹理分数

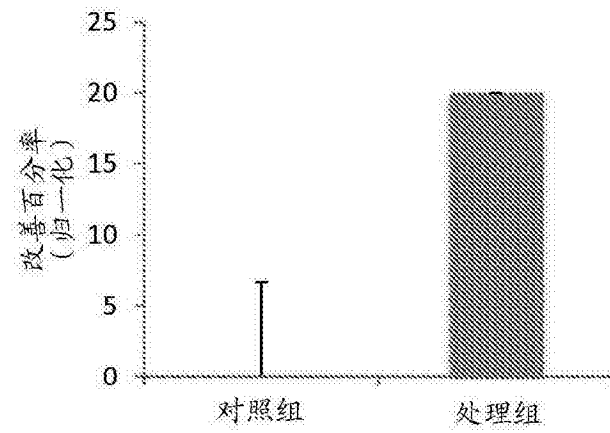


图5C

轮廓分数

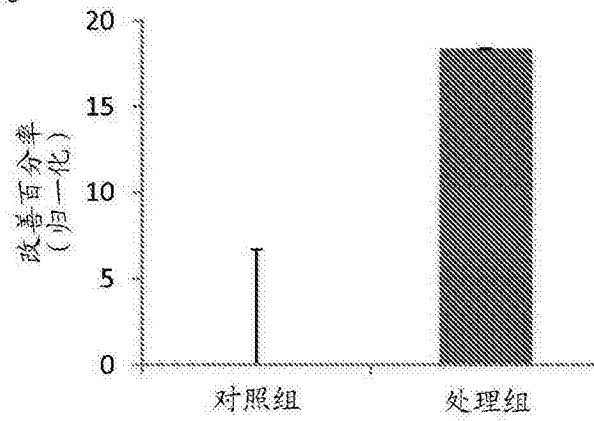


图5

图6A

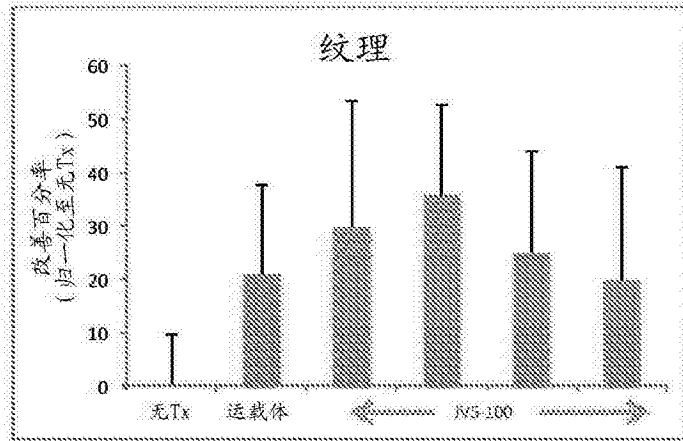


图6B

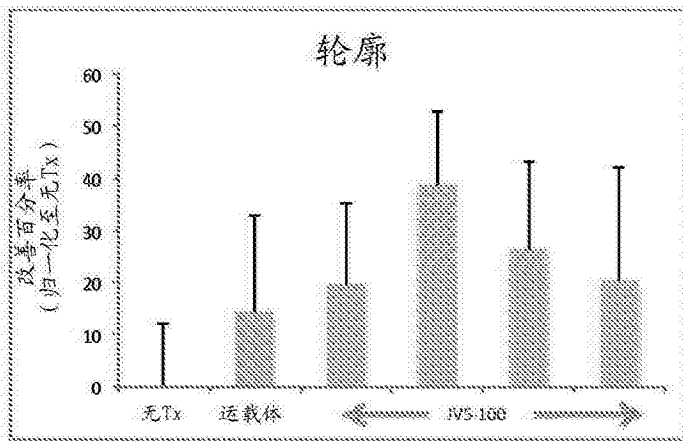


图6C

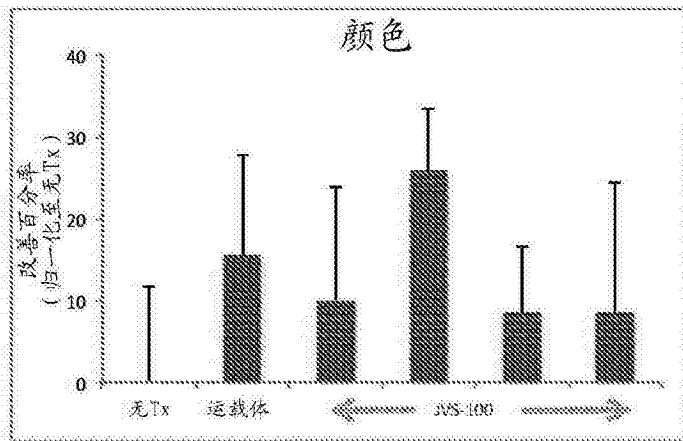


图6D

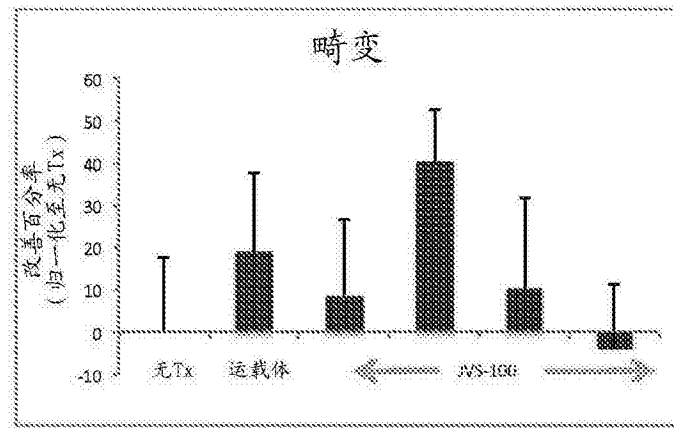


图6E

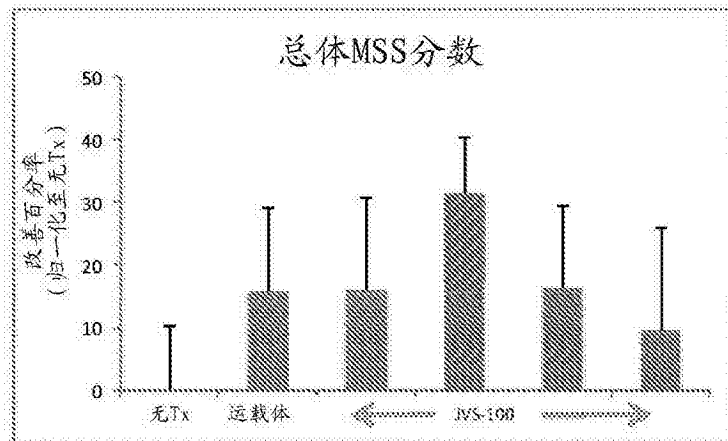


图 6