



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106177992 A

(43) 申请公布日 2016. 12. 07

(21) 申请号 201510232415. 6

(22) 申请日 2015. 05. 08

(71) 申请人 上海泽生科技开发有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园
区居里路 68 号

(72) 发明人 周明东

(51) Int. Cl.

A61K 48/00(2006. 01)

A61P 9/04(2006. 01)

权利要求书1页 说明书19页
序列表24页 附图3页

(54) 发明名称

cMLCK 基因导入

(57) 摘要

本发明涉及用于 cMLCK 基因导入的组分和方法。在某一方面,本发明提供了通过 cMLCK 基因导入治疗重度心衰的组分和方法,特别的,通过对个体施用有效剂量的编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体,该多核苷酸载体在个体的心脏细胞内编码 cMLCK 蛋白,从而提高心脏的心室功能。在另一方面,本发明提供了在个体体内表达 cMLCK 蛋白的组分和方法。特别的,通过为个体施用一种能够编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体,且该载体能够在个体心脏细胞内表达 cMLCK 蛋白,其中个体患重度心衰。

1. 一种治疗严重心力衰竭患者的方法,包含注射有效剂量的编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸质粒,在心脏细胞中表达 cMLCK 蛋白并提高心脏的心室功能。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述患者是 NYHA III 级心力衰竭。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述患者是 NYHA IV 级心力衰竭。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述患者的血浆 NT-proBNP 水平高于 4000 fmol/ml。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述患者对纽兰格林治疗没有应答。
6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述 cMLCK 蛋白氨基酸序列包含 SEQ ID NO:1。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述多核苷酸质粒局部注射于患者。
8. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述腺相关病毒是腺相关病毒 9 (AAV9)。
9. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,患者的左心室 EF 值至少提高 5%。
10. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,患者的左心室 LVEDV 或 LVESV 至少减少 5%。

cMLCK 基因导入

1. 技术领域

[0001] 本发明涉及用于 cMLCK 基因导入的组分和方法。在某一方面,本发明提供了通过 cMLCK 基因导入治疗重度心衰的组分和方法,特别的,通过对个体施用有效剂量的编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体,该多核苷酸载体在个体的心脏细胞内编码 cMLCK 蛋白,从而提高心脏的心室功能。在另一方面,本发明提供了在个体体内表达 cMLCK 蛋白的组分和方法。特别的,通过为重度心衰个体施用一种能够编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体,且该载体能够在个体心脏细胞内表达 cMLCK 蛋白。

2. 背景技术

[0002] 心衰影响了约 500 万的美国人口,并以每年 55 万人的速度在增长。目前对心力衰竭的治疗主要是血管紧张素转换酶 (ACE) 抑制剂,其主要作用是扩张血管,降低血压以减轻心脏负荷。虽然 ACE 抑制剂对死亡率下降的影响具有统计学差异,但实际的下降比例仅为 3% -4%,同时还可能伴有副作用。其它的心衰治疗方法同样也具有限制性,比如心脏移植手术由于价格昂贵、创伤性大以及缺乏供体等原因而受到限制。医疗器械装置的使用,比如双心室起搏器同样受到了创伤性和价格的限制。基于以上原因,有必要开发一种新的治疗心衰的方法。

[0003] 对患有心衰或者可能发生心衰的病人给予 neuregulin(以下简称 NRG) 的摄入可能是一种有前途的治疗方法。NRGs 是 EGF 样生长因子家族,由结构上相似的生长及分化因子 NRG1, NRG2, NRG3, NRG4 以及它们的亚型组成,并涉及一系列的生物反应:刺激乳腺癌细胞分化和乳汁蛋白分泌,诱导神经嵴细胞分化成 Schwann 细胞;刺激骨骼肌细胞合成乙酰胆碱受体;并且促进心肌细胞成活和 DNA 合成。用纽兰格林基因严重缺陷的纯合子小鼠胚胎做活体研究证明纽兰格林对于心脏和神经发育是必须的。

[0004] NRGs 与 EFG 受体家族的成员结合,该受体家族包括 EGFR、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4,其中每一个受体在多种细胞功能中都发挥重要的作用,包括细胞生长、分化和存活。它们都是蛋白酪氨酸激酶受体,由一个胞外配体结合域、跨膜激酶域和胞浆的酪氨酸激酶结构域组成。NRG 结合至 ErbB3 或 ErbB4 的细胞外结构域后,能够诱导构象改变从而引起 ErbB3、ErbB4 和 ErbB2 之间形成异二聚体,或者 ErbB4 自身形成同源二聚体,这样就会导致受体细胞内 C-末端结构域的磷酸化。然后磷酸化的胞内结构域与细胞内其他的信号蛋白结合,活化相应的下游 AKT 或 ERK 信号传导途径,并诱导一系列的细胞反应,比如刺激或抑制细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡、细胞迁移或细胞粘附。在这些受体中,ErbB2 和 ErbB4 主要在心脏表达。

[0005] 已有研究表明 NRG-1 的 EGF 类似区,约 50 至 64 个氨基酸,足以结合并活化这些受体。以前的研究表明纽兰格林-1 β (NRG-1 β) 能以高亲和力直接结合 ErbB3 和 ErbB4。孤儿受体 ErbB2 能与 ErbB3 或 ErbB4 形成异源二聚体并且其亲和力比 ErbB3 或 ErbB4 同源二聚体要高。神经发育的研究结果提示交感神经系统的形成需要完整的 NRG-1 β 、ErbB2 和 ErbB3 信号传导系统。靶向破坏 NRG-1 β 、或 ErbB2 或 ErbB4 后由于心脏发育缺陷而导致胚

胎致死。最近的研究也突显了 NRG-1 β 、ErbB2 和 ErbB4 在心血管发育以及维持成年正常心脏功能方面具有重要作用。研究表明 NRG-1 β 能增强成年心肌细胞的肌小节的组织结构。通过静脉滴注持续释放 NRG 能显著改善或防御不同心衰动物模型的心肌功能恶化。这些结果使得 NRG-1 有望成为一种治疗心衰的先导化合物。

[0006] 泽生公司已经报道了 NRG 提高心肌肌球蛋白轻链激酶 (cMLCK) 表达和心肌肌球蛋白调节 (RLC) 磷酸化水平,从而增强收缩时肌动蛋白-肌球蛋白的相互作用,因此 cMLCK 能够作为一种潜在的治疗心衰的药物作用靶点(例如参见 W008/28405)。在顾等人的文章中 (Cardiovascular Research, 88:334-343(2010)),泽生公司报道了 cMLCK 的上调能够促进肌小节重组,增强心衰的收缩力。然而, cMLCK 基因治疗心肌梗死大鼠的效果并未好于 NRG 治疗。另外,泽生公司在临床实验中发现一些重度心衰患者对 NRG 治疗并不响应,这些患者迫切需要另一种治疗心衰的方法。

[0007] 3. 发明概述

[0008] 本发明提供了用于 cMLCK 基因导入的组合物和方法。在某一方面,本发明提供了通过 cMLCK 基因导入治疗重度心衰的组分和方法,包含对个体施用有效剂量的编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体,该多核苷酸载体在个体的心脏细胞内编码 cMLCK 蛋白,从而提高心脏的心室功能。在某一实施例中,个体是人。

[0009] 在某一方面中,本发明提供了在个体中表达 cMLCK 蛋白的方法,包含对个体施用编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体,该载体在个体的心脏细胞中表达 cMLCK 蛋白,其中个体为重度心衰。在某一实施例中,个体是人类。在某一实施例中,个体的心室功能改善。

[0010] 在某一实施例中,编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体被系统地施用于人体。在另一实施例中,编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体被局部地施用于人体。

[0011] 在某一实施例中,编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体通过冠状动脉注射被局部施用于个体心脏。在某一实施例中,编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体被局部施用于个体的左心室腔。在另一实施例中,编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体通过手术被局部施用于个体的心脏(如,通过直接向个体的心脏引入载体或转染细胞)。在另一实施例中,编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体通过脂质体被施用于心脏。

[0012] 本发明需要对个体心室功能的改善进行评估。在某一实施例中,个体左心室的 EF 值提高了至少 5%。在某一实施例中,个体左心室的 EF 值提高了至少 10%。在某一实施例中,个体左心室的 EF 值提高了至少 5%。在某一实施例中,个体左心室的 EF 值提高了至少 20%。在某一实施例中,个体的左室舒张末期容积 (LVEDV) 或者左室收缩末期容积 (LVESV) 降低了至少 5%。在某一实施例中,个体的左室舒张末期容积 (LVEDV) 或者左室收缩末期容积 (LVESV) 降低了至少 10%。在某一实施例中,个体的左室舒张末期容积 (LVEDV) 或者左室收缩末期容积 (LVESV) 降低了至少 20%。

[0013] 在某一实施例中,多核苷酸载体编码一个多肽,该多肽包含与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 至少 70% 相同的氨基酸序列。在某一实施例中,多核苷酸载体编码一个多肽,该多肽包含与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 至少 75%, 80%, 85%, 90% 或 95% 相同的氨基酸序列。在某一特别的实施例中,多核苷酸载体编码一个多肽,该多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3。

[0014] 在其他实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4、SEQ

ID NO:5、SEQ ID NO:6 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 70% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 70% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 75% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 75% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 80% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 80% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 85% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 85% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 90% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 90% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 95% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 95% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列包含选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 或其补体的至少约 500 个连续的核苷酸。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列包含选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 或其补体的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个核苷酸。在某一特殊的实施例中,在某一实施例中,多核苷酸包含 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 或其补体的核苷酸序列。

[0015] 在某一实施例中,个体为 NYHA 心功能分级 III 级心衰患者。在另一实施例中,个体为 NYHA 心功能分级 IV 级心衰患者。在其他实施例中,个体的 N 末端脑钠肽前体 (NT-proBNP) 血浆水平高于 4000fmol/ml。在另一实施例中,个体对 NRG 治疗不响应。

[0016] 在某一实施例中,多核苷酸载体是病毒载体。在进一步的实施例中,病毒载体是一个腺相关病毒载体 (AVV)。在另一实施例中,AVV 是腺相关病毒 9 (AVV9)。

[0017] 在某一实施例中,本发明公布的剂量约为 $1 \times 10^{10} - 1 \times 10^{15}$ gc/ 人。在某一实施例中,剂量约为 $1 \times 10^{10} - 5 \times 10^{14}$ gc/ 人。在某一实施例中,剂量约为 $1 \times 10^{11} - 1 \times 10^{14}$ gc/ 人。在某一实施例中,剂量约为 $1 \times 10^{10} - 5 \times 10^{13}$ gc/ 人。在某一实施例中,剂量约为 $5 \times 10^{10} - 5 \times 10^{11}$ gc/ 人。在某一实施例中,剂量约为 $2 \times 10^{11} - 5 \times 10^{11}$ gc/ 人。在某一实施例

中,剂量约为 1×10^{10} gc/ 人。在另一实施例中,剂量约为 2×10^{10} gc/ 人。在某一实施例中,剂量约为 5×10^{10} gc/ 人。在某一实施例中,剂量约为 1×10^{11} gc/ 人。在另一实施例中,剂量约为 2×10^{11} gc/ 人。在某一实施例中,剂量约为 5×10^{11} gc/ 人。在某一实施例中,剂量约为 1×10^{12} gc/ 人。在另一实施例中,剂量约为 2×10^{12} gc/ 人。在另一实施例中,剂量约为 5×10^{12} gc/ 人。在某一实施例中,剂量约为 1×10^{13} gc/ 人。在另一实施例中,剂量约为 2×10^{13} gc/ 人。在另一实施例中,剂量约为 2×10^{14} gc/ 人。在另一实施例中,剂量约为 5×10^{14} gc/ 人。

[0018] 在另一方面,本发明提供了用于 cMLCK 基因治疗的组分。在某一实施例中,该组分为能够编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体。在某一实施例中,多核苷酸载体是病毒载体。在某一实施例中,病毒载体是一个腺相关病毒载体 (AVV)。在另一实施例中,AVV 是腺相关病毒 9 (AVV9)。

[0019] 在另一方面,本发明提供了药物组分。该组分包含有效剂量的编码 cMLCK 的多核苷酸载体和药物可接受的介质。在某一实施例中,多核苷酸载体是病毒载体。在某一实施例中,病毒载体是一个腺相关病毒载体 (AVV)。在另一实施例中,AVV 是腺相关病毒 9 (AVV9)。在某一实施例中,水是药物可接受的介质。在某一实施例中,盐溶液、葡萄糖溶液和甘油溶液作为介质,特别用于注射溶液。

[0020] 在另一方面,本发明提供了用于不同方法的组分。在某一实施例中,此中公布的组分用于治疗个体的重度心衰,包含对个体施用有效剂量的编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体,在个体的心脏细胞内编码 cMLCK 蛋白,从而提高心脏的心室功能。在某一实施例中,多核苷酸载体是病毒载体。在某一实施例中,病毒载体是一个腺相关病毒载体 (AVV)。在另一实施例中,AVV 是腺相关病毒 9 (AVV9)。

[0021] 某一实施例中,此中公布的组分用于在个体中表达 cMLCK 蛋白,包含对个体施用编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体,在个体的心脏细胞内编码 cMLCK 蛋白,其中个体为重度心衰。在某一实施例中,组分是编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体。在某一实施例中,多核苷酸载体是病毒载体。在某一实施例中,病毒载体是一个腺相关病毒载体 (AVV)。在一特定的实施例中,多核苷酸载体是腺相关病毒 9 (AVV9)。

4. 附图说明

[0022] 图 1. AAV9. cMLCK 的基因组结构。一个编码 cMLCK 的多核苷酸 (SEQ ID NO:4) 嵌入 AVV9 载体。ITR:反转的末端复制;CMV:巨细胞病毒;SVpA,源自 SV40 基因病毒的多聚腺苷酸。

[0023] 图 2. 质粒 pZac2. 1-cMLCK 的构造和质量控制 (A)pZac2. 1-cMLCK 的质粒图谱 (B)pZac2. 1-cMLCK 的限制性酶切 (C)pZac2. 1-cMLCK 转染入 HEK293 细胞后 cMLCK 转基因表达的蛋白质免疫印迹

[0024] 图 3. cMLCK 在 (A)HEK293 细胞内的转基因表达和 (B) 在分离的心肌细胞内的转基因表达。不同的剂量被用于感染细胞和心肌细胞。GAPDH 作为内参。

[0025] 图 4. AAV9. cMLCK 间接冠状基因导入 5 周后,左心室样品中 cMLCK 转基因 mRNA 表达的定量。通过间接冠状注射对小鼠给予不同剂量的 AAV9. cMLCK。PBS 作为空白对照。

[0026] 图 5. AAV9. cMLCK 基因转入压力超负荷老鼠心脏前后的超声心动图检测。对老鼠

实施主动脉缩窄术 (TAC)。3 周后将老鼠随机分为 2 组。一组通过冠状动脉注射接受 AAV9. cMLCK 基因导入, 另一组经同样方式注射 PBD。TAC 3 周后和 AAV9. cMLVK 基因导入或 PBS 注射 5 周后进行测量。

[0027] 图 6. AAV9. cMLCK 基因转入压力超负荷老鼠心脏后活体血液动力学测定结果。AAV9. cMLVK 基因导入或 PBS 注射 5 周后进行测定

[0028] 5. 发明详述

[0029] 本发明在某种程度上是基于发现一些重度心衰患者对 NRG 治疗并不响应。在本发明的范围内, 向重度心衰患者的心脏给予外源性的 cMLCK、外源性的 cMLCK 在其中表达对改善心血管功能、治疗心衰有效。因此, 本发明提供了重度心衰的治疗方法。

[0030] 除另有定义, 这里使用的所有科技术语与本发明所属技术领域的普通技术人员理解含义相同。所有专利文献、专利申请文献、公开的专利文献和其它出版物均作为参考。如本节阐述的定义与上述参考文献所述的定义不一致或相反时, 以本节阐述的定义为准。

[0031] 除非特别指明, 在此所用“一个”的意思是“至少一个”或“一个或多个”。

[0032] 在此所用“生长因子神经调节蛋白”或“neuregulin”或“NRG”的意思是指与 ErbB2, ErbB3, ErbB4 或它们的组合物结合, 可以激活上述受体的蛋白质或多肽, 包括但不限于所有 NRG 的亚型, EGF 样结构域, 包含 EGF 样结构域的多肽, NRG 突变体或衍生物, 以及其它可以激活上述受体的 NRG 样分子。在优选的实施方案中, NRG 可以识别并激活 ErbB2/ErbB4 或 ErbB2/ErbB3 异源二聚体。NRG 也包括 NRG-1, NRG-2, NRG-3 和 NRG-4 蛋白, 多肽, 片段以及可以模拟 NRG 激活功能的复合物。NRG 可以激活上述受体并调控它们的生物学活性, 比如刺激乳腺癌细胞分化和乳蛋白的分泌; 诱导神经脊细胞分化为 Schwann 细胞; 刺激骨骼肌细胞内乙酰胆碱受体的合成; 以及促进心肌细胞的分化、成活以及 DNA 合成。在这里, NRG 也包括保留 NRG 保守氨基酸序列, 且其生物学活性不变的突变体。适当的氨基酸替换不影响其生物学功能, 这在本领域的技术人员中是被广泛认可的。一般情况下, 对多肽的非功能区域的单个氨基酸的改变对其功能无影响 (参见 Watson 等, *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p. 224)。NRG 蛋白包含 NRG 的一个蛋白或者多肽。NRG 核酸包含编码 NRG 的核酸或寡核苷酸片段。

[0033] 此处所用“cMLCK”是指心肌肌球蛋白轻链激酶, 包含具有 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列的蛋白质或多肽, 和具有相似序列的蛋白, 例如, 与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列具有 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 或更高比例同源性的蛋白或多肽。且上述蛋白或多肽具有 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列的蛋白质或多肽相似的生物学活性, 所述生物学活性包括但不限于抗原交叉反应性, 自抑制功能, 磷酸化功能等。可以预见的是, 在保持生物学功能不变的情况下, 可以对 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸进行单个或多个保守或非保守氨基酸的替换、插入或缺失。“cMLCK”还包括 cMLCK 基因的不同的突变体, 差异剪切体以及具有多态性的序列编码的蛋白质或多肽。cMLCK 包括维持一个或多个 cMLCK 功能的变异体。可以认为, 编码 cMLCK 的基因或 cDNA 在一定程度上的突变可以在实质上不引起纽激酶的一个或多个功能的变化。首先, 由于遗传密码子的退化, 不同的密码子可能编码了同一个氨基酸。其次, 即使由于基因突变导致了氨基酸的替换, 这种替换也有可能是保守性的氨基酸替换并不实质性地影响纽激酶的功能。再次, 将纽激酶的

一部分氨基酸序列删除也不会使其所有的功能受损或丧失。最后,在纽激酶中插入或增加氨基酸序列抗原表位标签,也可以使其功能不被受损或丧失。其它的一些修饰比如在体内或体外进行化学或生物化学的修饰也可以在实质上不损害其一个或多个功能。举例来说,这种修饰包括乙酰化,羧化,磷酸化,糖基化,泛素化,放射性核素标记以及其它各种在专业领域中可用的酶的修饰。在本专业领域中众所周知,有多种方法可以对蛋白质进行标记,如放射性同位素,荧光素,化学发光物质,酶以及抗体等。功能性的片段或突变体可以有不同的长度,比如含有至少 10, 25, 50, 75, 100 或 200 个氨基酸。

[0034] 此处所用“cMLCK 的功能性片段或突变体”是指可以被具有一个或多个 cMLCK 功能的片段或突变体。可以认为,编码 cMLCK 的基因或 cDNA 在一定程度上的突变可以在实质上不引起纽激酶的一个或多个功能的变化。首先,由于遗传密码子的退化,不同的密码子可能编码了同一个氨基酸。其次,即使由于基因突变导致了氨基酸的替换,这种替换也有可能是保守性的氨基酸替换并不实质性地影响纽激酶的功能。再次,将纽激酶的一部分氨基酸序列删除也不会使其所有的功能受损或丧失。最后,在纽激酶中插入或增加氨基酸序列抗原表位标签,也可以使其功能不被受损或丧失。其它的一些修饰比如在体内或体外进行化学或生物化学的修饰也可以在实质上不损害其一个或多个功能。举例来说,这种修饰包括乙酰化,羧化,磷酸化,糖基化,泛素化,放射性核素标记以及其它各种在专业领域中可用的酶的修饰。在本专业领域中众所周知,有多种方法可以对蛋白质进行标记,如放射性同位素,荧光素,化学发光物质,酶以及抗体等。功能性的片段或突变体可以有不同的长度,比如含有至少 10, 25, 50, 75, 100 或 200 个氨基酸。

[0035] 此处所用“肌球蛋白轻链”是指与肌球蛋白重链相关的分子量约 18kDa 的蛋白,其生物学功能是参与调节肌球蛋白的 ATP 酶活性。肌球蛋白轻链存在两种类型:MLC1,也被成为基本肌球蛋白轻链,简称为 ELC;和 MLC2,也被成为调节肌球蛋白轻链,简称为 RLC。RLC 是肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 的底物——调停磷酸化。当 RLC 被 MLCK 磷酸化后,其磷酸化形式简称为 RLC-P。ELC 和 RLC 的亚型已经被发现存在于骨骼肌、平滑肌和心肌细胞中。比如 Macera 等人 (Genomics 13:829-31 (1992)) 报道了人心肌细胞 RLC 的基因和 cDNA 序列 (GeneBank No. NM00432)。

[0036] 此处所用“肌球蛋白轻链激酶生物活性”是指某一蛋白或多肽所具有的能在体内或体外将一个磷酸根离子共价结合到 RLC 上的功能。它包含了各种亚型的肌球蛋白轻链激酶(比如平滑肌,骨骼肌和心肌中的肌球蛋白轻链激酶亚型)和它们的片段和突变体(比如天然存在的突变体,重组 DNA 技术介导的突变、插入或缺失以及蛋白水解导致的各种片段)所具有的酶的活性。

[0037] 除非明确指明,此处所用“蛋白”是与“多肽”或“肽”同义。

[0038] 此处所用的“核酸”“核苷酸”“多核苷酸”是指脱氧核苷酸,脱氧核糖核苷酸,核糖核苷酸和核糖核酸,以及它们的聚合形式,包括单链和双链形式。在某一实施例中,该术语指脱氧核糖核酸(如 cDNA 或 DNA)。在某一实施例中,该术语指核糖核酸(如 mRNA 或 RNA)。

[0039] 此处所用的“个体”或“患者”可交换使用,是指哺乳动物如非灵长动物(例如牛,猪,马,猫,大鼠等)和灵长动物(例如猴和人),最优选指人。

[0040] 此处所用“载体”是指用于将外源 DNA 导入细胞进行表达或复制的不连续的原件。

选择和使用此种载体在该领域的技术范围内是广为人知的。表达载体包括能表达 DNA 的载体,其 DNA 有效地与调控序列,例如启动子区域连接在一起。调控序列能影响该 DNA 片段的表达。所以,一个表达载体是指重组 DNA 或 RNA 构成物,例如质粒、噬菌体、重组病毒或其它载体,它们一旦导入适当的宿主细胞中,可以导致克隆的 DNA 表达。合适的表达载体对本领域的技术人员而言十分清楚,包括能在真核细胞和 / 或原核细胞中复制的载体以及保持游离状态或整合到宿主细胞基因组的载体。

[0041] 此处所用“射血分数”是指每搏输出量占左心室舒张末期最大容积的百分比,可以用以下公式计算: $(\text{左心室舒张末期容积} - \text{左心室收缩末期容积}) / \text{左心室舒张末期容积}$ 。

[0042] 此处所用“心室短轴缩短率”是指心室舒张末期到心室收缩末期时左心室直径的变化,可以用以下公式计算: $(\text{左心室舒张末期直径} - \text{左心室收缩末期直径}) / \text{左心室舒张末期直径}$ 。

[0043] 此处所用“心力衰竭”是指心功能异常,表现为心脏不能以组织代谢所需的速度供血。心力衰竭包括范围广泛的疾病状态如充血性心力衰竭、心肌梗死、快速心律不齐、家族性肥大性心肌病、缺血性心脏病、自发扩张型心肌病、心肌炎。许多因素可导致心力衰竭,包括但不限于缺血性、先天性、风湿性以及自发性。慢性心肌肥大是充血性心力衰竭和心脏停跳前的明显的疾病状态。

[0044] 此处所用的“重度心衰”是指至少有一个以下特征的心衰: (1) 疾病级数为 NYHA 心功能分级 III 和 IV,尤其是 IV 级, (2) 发作时有液体潴留和 / 或外周低灌注等临床症状, (3) 表现出至少一个以下严重心功能障碍的客观证据: 左心室射血分数少于 30%; 超声心动图假性正常或限制性二尖瓣流入模式; 左心室和 / 或右心室灌注压高; 血浆中 NT-proBNP 或 BNP 水平提高; (4) 无力行走, 6 分钟行走试验距离少于 300m 或耗氧量最高值低于 12-14ml/kg/min, 显示功能能力严重损伤; (5) 过去六个月有至少一次的心衰入院治疗史或 (6) 尽管有常规的心脏治疗或症状控制策略, 仍表现以上五个特征中的任何一个。

[0045] 众所周知根据症状的严重程度患者的心衰能够分级。最常见的分类系统是纽约心脏协会 (NYHA) 心脏功能分级。它根据患者身体活动能力的限制程度将患者分为如下 4 类: I 级, 患有心脏疾病但活动量不受限制, 日常的身体活动不会引起过度疲劳, 心悸, 呼吸困难或心绞痛; II 级, 患有心脏疾病并且身体活动受到轻度的限制, 休息时无症状, 日常的身体活动引起疲劳, 心悸, 呼吸困难或心绞痛; III 级, 患有心脏疾病并且身体活动显著受限制, 休息时无症状, 在少于正常活动量的情况下, 引起疲劳, 心悸, 呼吸困难或心绞痛; IV, 患有心脏疾病导致不能从事任何身体活动, 即使在休息时也有心衰或心绞痛的症状。从事任何身体活动都会增加不适。

[0046] 此处所用的“N-末端脑利钠肽前体”或“NT-proBNP”是指无活性的 N 端脑利钠肽 (BNP) 前体片段, pro-BNP 是 BNP 的前体, BNP 是一种与激素有关的活性钠尿肽, 主要由左心室壁的心肌细胞释放。在心肌壁的伸缩作用下, 前激素 proBNP 经过蛋白酶切, 分裂成 BNP 和无活性的 NT-proBNP。血浆中的 NT-proBNP 水平可以由商业化药盒分析。不同的药盒所测的结果可能相反。在本发明的例子中, NT-proBNP 数值是由 Biomedica 公司 (奥地利, 产品认证号: Q1530510) 的商业药盒检测的。

[0047] 此处所用治疗特定疾病的活性剂的“有效剂量”是指能够改善或在某种程度上减少与症状有关的药物剂量。该剂量可能治愈疾病, 但是典型的, 能够改善疾病症状。

[0048] 此处所用的“治疗”或“处理”和诸如此类的词语一般指的是指处于患病状态的个体获得积极的药理和 / 或生理学效应。其效应可以是完全或部分治疗某一疾病或其症状,也可以部分或完全治愈某一疾病和 / 或该疾病引起的不利影响。“治疗”一词涵盖了用于哺乳动物尤其是人类的任何治疗疾病的方法,包括对疾病的抑制,比如阻止疾病的发展,或者缓解疾病,又比如引起疾病的消退。举例来说,“治疗”是指治疗患有或者可能患有心脏疾病比如重度心衰的病人。更具体地说,“治疗”是指给心脏病患者以有效且有益的效应。

[0049] 此处所用“预防”是指一般意义上的针对具有患某种疾病倾向的个体,在疾病发生之前,防止疾病的发生。因此,“预防”可以是指阻止或者推迟心脏肥大的发生。

[0050] 此处所用“重组表达载体”是指能够在真核生物或原核生物中编码多肽的多核苷酸系统。

[0051] 此处所用“药学上可接受的”是指被国家管理部门认证的或者药典或其它被普遍认可的处方汇编中记载的可以用于动物特别是人的(载体或赋形剂等)。

[0052] 此处所用“介质”是指将药物摄入人体时所用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介。这些药用的介质可以是灭菌的液体,比如水和油类。其中油类可以来自石油、动物油、植物油以及合成来源的油类,比如花生油,大豆油,矿物油,芝麻油等等。

[0053] 在某一方面,本发明提供了治疗重度心衰的方法,包括对个体施用有效剂量的能够编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体,该多核苷酸载体在心脏细胞中表达 cMLCK 蛋白,改善心脏功能。在某一实施例中,个体指人。

[0054] 在某一方面,本发明提供了治疗重度心衰的方法,包括对个体施用有效剂量的能够编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体,该多核苷酸载体在心脏细胞中表达 cMLCK 蛋白,改善心脏功能。在某一实施例中,个体指人。

[0055] 在某一方面,本发明提供了在个体内表达 cMLCK 蛋白的方法,包括对个体施用能够编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体,该多核苷酸载体在心脏细胞中表达 cMLCK 蛋白,其中个体患重度心衰。在某一实施例中,个体指人。在某一实施例中,个体心室功能改善。

[0056] 在某一实施例中,编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体被系统地施用于人体。在另一实施例中,编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体被局部地施用于人体。给药方法包括但不限于静脉注射,冠状动脉注射,心室内注射。多核苷酸载体可能通过任何方便的途径给药,例如,通过输注或快速浓注,并且可能和其他生物活性剂共同给药。

[0057] 在某一实施例中,编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体可能被局部施用于个体心脏。可能通过,例如但不限于,冠状动脉输注,手术中局部输注,通过注射,通过导管,或者依靠植入,所设植入指渗透的、非渗透的或凝胶状的材料,包括膜,如 sialastic 膜或纤维。冠状动脉输注可能通过冠状动脉导管,例如,附着于一个泵。在某一实施例中,编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体被局部施用于个体的 LV 腔。在另一实施例中,编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体通过手术被局部施用于个体的心脏(如,通过直接向个体的心脏引入载体或转染细胞)。

[0058] 在另一实施例中,编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体通过脂质体被施用于心脏。在本发明中编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体都可通过已知的不同的传送系统给药,例如,封装在脂质体、微粒、微胶囊、受体介导的胞吞(如,见 Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432(1987)), 胶束生物相容性聚合物,包含天然聚合物和合成聚合

物；脂蛋白，多肽，多糖，脂多糖，人工病毒包膜，金属离子和细菌，病毒，如杆状病毒，腺病毒和逆转录酶病毒，噬菌体，粘粒，质粒，真菌载体和其他复合载体等。在某一特定的实施例中，编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体能在囊泡，特别是脂质体中传送（见 Langer, Science 249:1527-1533(1990) ; Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler(eds.), Liss, New York, pp. 317-372, 353-365(1989)）。

[0059] 本发明需要用许多参数对个体心室功能的改善进行评估，包括但不限于，左心室的 EF 值，左室舒张末期容积 (LVEDV)，左室收缩末期容积 (LVESV)，左室舒张末压 (LVEDP)，左心室收缩压 (LVSP)。这些参数可能用本领域公知的方法监测，例如，超声波心动描记术。在某一实施例中，个体左心室的 EF 值提高了至少 5%。在某一实施例中，个体左心室的 EF 值提高了至少 10%。在某一实施例中，个体左心室的 EF 值提高了至少 20%。在某一实施例中，个体的左室舒张末期容积 (LVEDV) 或者左室收缩末期容积 (LVESV) 降低了至少 5%。在某一实施例中，个体的左室舒张末期容积 (LVEDV) 或者左室收缩末期容积 (LVESV) 降低了至少 10%。在某一实施例中，个体的左室舒张末期容积 (LVEDV) 或者左室收缩末期容积 (LVESV) 降低了至少 20%。

[0060] 编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体包括那些能够编码与天然的 cMLCK 相同氨基酸序列的多核苷酸载体，和那些能够编码因非功能区氨基酸替换而与天然的 cMLCK 氨基酸序列不同的多核苷酸载体。例如，将一个基本残基替换为另一个（如 Arg 与 Lys 替换），将一个疏水残基替换为另一个（如 Leu 和 Ile 替换），或者将一个芳香残基替换为另一个（如 Phe 与 Tyr 替换）。

[0061] 多核苷酸载体编码的 cMLCK 蛋白也包括 cMLCK 片段。本发明的多核苷酸包括人类基因和其他物种的相关基因（同系物）。在某些实施例中，多核苷酸序列来自脊椎动物，或更特别的，来自哺乳动物。在某些实施例中，多核苷酸序列是鼠源的。在某些实施例中，多核苷酸序列是人源的。

[0062] 在某一实施例中，多核苷酸载体编码一个多肽，该多肽包含与 SEQ ID NO:1 至少 70% 相同的氨基酸序列。在某一实施例中，多核苷酸载体编码一个多肽，该多肽包含与 SEQ ID NO:1 至少 75%，80%，85%，90% 或 95% 相同的氨基酸序列。在某一特别的实施例中，多核苷酸载体编码一个多肽，该多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1。

[0063] 在其他实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自 SEQ ID NO:4 或其补足物的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 70% 的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自 SEQ ID NO:4 的至少约 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 70% 的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自 SEQ ID NO:4 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 75% 的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自 SEQ ID NO:4 的至少约 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 75% 的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自 SEQ ID NO:4 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 80% 的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自 SEQ ID NO:4 的至少约 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1500, 2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 80% 的同一性。在某一实施例中，

多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 85% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 85% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 90% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 90% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 95% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:4 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 95% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列包含选自 SEQ ID NO:4 或其补体的至少约 500 个连续的核苷酸。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列包含选自 SEQ ID NO:4 或其补体的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个核苷酸。在某一特殊的实施例中,在某一实施例中,多核苷酸包含 SEQ ID NO:4 或其补体的核苷酸序列。

[0064] 在某一实施例中,多核苷酸载体编码一个多肽,该多肽包含与 SEQ ID NO:2 至少 70% 相同的氨基酸序列。在某一实施例中,多核苷酸载体编码一个多肽,该多肽包含与 SEQ ID NO:2 至少 75%,80%,85%,90% 或 95% 相同的氨基酸序列。在某一特别的实施例中,多核苷酸载体编码一个多肽,该多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2。

[0065] 在其他实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:5 或其补足物的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 70% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:5 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 70% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:5 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 75% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:5 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 75% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:5 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 80% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:5 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 80% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:5 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 85% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:5 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 85% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:5 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 90% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:5 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 90% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO:5 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 95% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ

ID NO :5 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 95% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列包含选自 SEQ ID NO :5 或其补体的至少约 500 个连续的核苷酸。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列包含选自 SEQ ID NO :5 或其补体的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个核苷酸。在某一特殊的实施例中,在某一实施例中,多核苷酸包含 SEQ ID NO :5 或其补体的核苷酸序列。

[0066] 在某一实施例中,多核苷酸载体编码一个多肽,该多肽包含与 SEQ ID NO :3 至少 70% 相同的氨基酸序列。在某一实施例中,多核苷酸载体编码一个多肽,该多肽包含与 SEQ ID NO :3 至少 75%,80%,85%,90% 或 95% 相同的氨基酸序列。在某一特别的实施例中,多核苷酸载体编码一个多肽,该多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO :3。

[0067] 在其他实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO :6 或其补足物的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 70% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO :6 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 70% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO :6 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 75% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO :6 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 75% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO :6 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 80% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO :6 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 80% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO :6 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 85% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO :6 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 85% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO :6 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 90% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO :6 的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个连续的核苷酸有至少 90% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自 SEQ ID NO :6 的至少约 500 个连续的核苷酸有至少 95% 的同一性。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列包含选自 SEQ ID NO :6 或其补体的至少约 500 个连续的核苷酸。在某一实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列包含选自 SEQ ID NO :6 或其补体的至少约 500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000 或 2400 个核苷酸。在某一特殊的实施例中,在某一实施例中,多核苷酸包含 SEQ ID NO :6 或其补体的核苷酸序列。

[0068] W008/28405 公开了编码 cMLCK 的多核苷酸的克隆方法,该内容通过引用合并于此。DNA 可以通过本技术领域中标准的程序从克隆的 DNA (比如 DNA 文库) 中获得,也可以通过化学合成法,cDNA 克隆,基因组克隆,从目标细胞中分离以及 PCR 扩增和克隆获得。比如

可以参照 Sambrook 等人, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3d. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); Glover, D. M. (ed.), DNA Cloning: A Practical Approach, 2d. ed., MRL Press, Ltd., Oxford, U. K. (1995)。从基因组 DNA 获得的 DNA 含有除编码序列之外的调控序列以及内含子。从 cDNA 获得的 DNA 则只包含外显子。不管来源如何, 获得的基因需要克隆到一个合适的载体进行复制。

[0069] 编码 cMLCK 的多核苷酸能够插入合适的克隆载体。大量的本技术领域熟知的载体和宿主细胞系统可以使用。可选用的载体包括但不限于质粒或改良的病毒载体。构建表达载体的技术在本领域是众所周知的, 见 Sambrook 等人, 2001, Molecular Cloning—A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 和 Ausubel 等, eds., Current Edition, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY。基因的插入可以通过将 DNA 片段与具有互补粘性末端的载体连接来完成。但是如果 DNA 片段的粘性末端并不存在于相应的载体上, 那么该 DNA 片段的末端需要进行酶的修饰。或者, 所需的位点可以通过结合一个连接序列来导入。这些连接序列可以包含化学合成的含有特定限制性酶切位点的寡核苷酸序列。或者, 被酶切的载体以及编码 cMLCK 的多核苷酸序列可以经过同聚物加尾的修饰。

[0070] 在某一实施例中, 本发明公开的个体为 NYHA 心功能 III 级心衰患者。在另一实施例中, 个体为 NYHA 心功能 IV 级心衰患者。NYHA 心功能 III 级和 IV 级心衰患者定义如下。

[0071] 在另一实施例中, 个体的 NT-proBNP 的血浆水平高于 4000fmol/ml。在怀疑或确定心衰的日常管理中, BNP 和 NT-proBNP 的血浆水平是一种有前景的工具。大多数关于 BNP 和 NT-proBNP 应用于临床实践的研究表明了他们的诊断性能, 并且已有越来越多的证据支持 BNP 和 NT-proBNP 的预后价值。由于 NT-proBNP 在血液中的半衰期为 BNP 的 6 倍, 它作为心衰的诊断和预后指标应用的更广泛。NT-proBNP 血浆水平能够通过商业药盒分析。同一样品用不同的商业药盒可能得出不同的结果, 然而, 不同的药盒得出的结果可能相反。

[0072] BNP 和 NT-proBNP 的血浆水平都能够用于筛选和诊断心衰, 并且对建立心衰预后非常有用, 因为当患者病情恶化时, 这两个标记物水平典型升高。因此, 当发现 BNP 和 NT-proBNP 的血浆水平显著升高时, 表明患者适合用 cMLCK 基因导入来治疗心衰。本发明的组分和方法适合重度心衰患者, 例如, 用 Biomedica, Austria (CE No. Q1530510) 的商业药盒检测 NT-proBNP 血浆水平高于 4000fmol/ml 的患者。

[0073] 在另一实施例中, 个体对纽兰格林治疗不敏感。当用 NRG 治疗病情并未改善或在某种程度上与之相关的症状并未减少时, 个体对 NRG 治疗不敏感。可以通过本领域的技术人员所熟知的标准临床技术来确定个体是否对 NRG 治疗敏感, 包括但不限于, 通过检查相关的症状或参数, 例如 NYHA 心功能分级, 左心室的 EF 值, LVESV, LVEDV, 6 分钟行走距离, BNP 或 NT-proBNP 血浆水平, 生活质量分析 (堪萨斯市心肌病调查问卷), 全因死亡率, 全因住院治疗。

[0074] 在某一实施例中, 多核苷酸载体是病毒载体。在某一实施例中, 病毒载体是一个腺相关病毒载体 (AVV)。在另一实施例中, AVV 是腺相关病毒 9 (AVV9)。

[0075] 此处所用基因传递, 基因导入, 转换等诸如此类的名词, 是指将一个外源性的多核

核苷酸（有时是指转基因）引入宿主细胞，不考虑引出所使用的方法。这种方法包括很多公知的技术比如促进裸露多核苷酸递送的技术（例如电穿孔，“基因枪”递送和各种其他用于引入多核苷酸的技术），还有载体介导的基因导入（例如，通过病毒性感染/转染，或者其他基于蛋白或基因脂质的基因传递复合物）。引入的多核苷酸能够稳定或瞬时地维持在宿主细胞中。稳定维持要求引入的多核苷酸或者包含一个与宿主细胞相容的复制起点，或者合并一个宿主细胞的复制子，例如一个染色体外的复制子（如，一个质粒）或一个细胞核或线粒体的染色体。本领域已知有很多载体能够介导基因转入哺乳细胞。

[0076] 一个病毒载体是指包含一个被传送入一个宿主细胞的多核苷酸的重组产生的病毒或病毒颗粒。比如病毒载体包含 RNA 病毒如逆转录病毒载体，疱疹病毒载体，牛痘载体，腺病毒载体，腺相关病毒载体，甲病毒属载体等。甲病毒属载体，例如基于森林病毒的载体和基于辛德毕斯病毒的载体，也已经被研制用于基因治疗和免疫治疗（见 Schlesinger and Dubensky, Curr. Opin. Biotechnol. 5:434-439(1999) and Ying, et al. Nat. Med. 5(7):823-827(1999)）。

[0077] 在一个实施例中，基因导入通过逆转录病毒载体介导，一个载体构建是指包含或部分包含逆转录病毒的多核苷酸和一个治疗基因。此处所用的逆转录病毒介导的基因导入或逆转录病毒转导是同样的意思，是指基因或核苷酸序列稳定转入宿主细胞的过程，该过程中基因或核苷酸通过病毒进入宿主细胞并将其基因整合入宿主细胞基因组。病毒可以通过正常的感染机制进入宿主细胞，也可以经修饰后结合不同的宿主细胞表面或配体进入细胞。此处所用的逆转录病毒载体是指通过病毒或类病毒的进入机制向细胞内引入外源核苷酸的病毒颗粒。逆转录病毒以 RNA 的形式携带遗传信息，然而，一旦病毒感染细胞，RNA 逆转录成 DNA，与受感染细胞的基因组 DNA 合并。合并的 DNA 形式称为前病毒。单个外源基因能够嵌入的逆转录病毒载体包括但不限于莫洛尼鼠白血病病毒 (MoMuLV) 载体，小鼠肉瘤病毒 (HaMuSV) 载体，鼠乳腺肿瘤病毒 (MuMTV) 载体和劳斯氏肉瘤病毒 (RSV) 载体。很多额外的逆转录病毒载体可以合并一个基因作为能识别和生成转导细胞的选择性标记物。

[0078] 在某一实施例中，基因导入通过 DNA 病毒载体来介导，比如腺病毒 (Ad) 或腺相关病毒 (AAV)，一个载体构建是指包含或部分包含病毒基因组的多核苷酸和一个转基因。腺病毒 (Ads) 是一组具有特点的，同源的病毒，包括超过 50 种血清型（见 WO 95/27071）。腺病毒不要求整合入宿主细胞基因组。重组的腺病毒衍生载体，特别是那些降低了重组和传代潜能的野生型病毒，也能够被构建（见 WO 95/00655 和 WO 95/11984）。

[0079] 野生型的 AAV 并入宿主细胞组后具有很强的感染能力和特异性（见 Hermonat 和 Muzyczka, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470(1984) ; Lebkowski 等, Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996(1988)）。此处所用的腺相关病毒或 AAV 包含所有的亚型，血清型和假型，也包括天然产生的和重组型。本领域公知有各种 AAV 血清型和菌株，并能够公开获得，例如从 ATCC、学院或商业来源获得。可选择的，已公布和/或从各种数据库获得的 AAV 血清型和菌株的序列能够被已知的技术合成。腺相关病毒属于依赖病毒属的细小病毒。他们是小的，无包膜的单链 DNA 病毒，需要一个辅助病毒来复制。形成功能性完整的 AAV 病毒体必须有辅助病毒（如腺病毒，疱疹病毒或牛痘病毒）的协同感染。在体外，没有辅助病毒的协同感染，AAV 处于一个潜伏状态，基因组以游离形式存在，而传染性病毒粒子并不产生。随后辅助病毒感染“救出”基因组，使其复制并包入病毒衣壳中。因此重新组装成感染病毒粒

子。最近的数据表明,在体内野生型 AAV 和重组型 AAV 主要以大的游离多联体存在。

[0080] AAVs 与任何已知的人类疾病都没有关系,一般不考虑其致病性,并且似乎不改变整合后宿主细胞的生理特性。AAV 能够感染许多不同的宿主细胞,包含非分裂细胞,并且能够感染不同种类的细胞。与一些被细胞或体液应答而清除或失活的载体不同,AAV 能够在体内不同组织中持久表达。AAV 载体在体内非分裂细胞内的持久性可能归因于缺乏天然 AAV 病毒基因和形成游离型多联体的能力。

[0081] AAV 作为一种非常有吸引力的载体系统,应用于目前公开的细胞转导。由于其作为游离型多联体持久性几率高,并且能够感染非分裂细胞,因此可用于向哺乳动物细胞(比如组织培养和体内)中传递基因。研究表明在基因传递中使用 AAV 包括 Flotte 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10613-10617(1993) 和 Walsh 等, *J. Clin. Invest.* 94:1440-1448(1994)。重组 AAV 载体已经成功用于体内和体外标记基因及涉及人类疾病的基因的转导(见 Walsh 等, *J. Clin. Invest.* 94:1440-1448(1994))。AAV 有一个宽泛的感染宿主范围。美国专利 US5,139,941 和 4,797,368 详细描述了生成和使用 rAAV 载体的细节。

[0082] 典型的,重组 AAV(rAAV) 通过共转染一个含兴趣基因的质粒获得,该基因两侧是两个 AAV 末端重复序列和/或一个无末端重复序列的含野生型 AAV 编码序列的表达质粒,比如 pIM45。细胞和可以用腺病毒和/或携带需要 AAV 辅助功能的腺病毒基因的质粒感染和/或转染。用这种方式制得的 rAAV 病毒被腺病毒污染,需要通过物理方法从 rAAV 颗粒中分离(比如,通过氯化铯密度离心分离或柱色谱法)。作为选择,可以使用包含 AAV 编码区的病毒载体和/或包含 AAV 编码区的细胞系和/或一些或所有腺病毒辅助基因。也可以使用携带 rAAV DNA 的细胞系。

[0083] AAV 天然存在多种血清亚型,目前已知有至少 12 个血清亚型(AAV1-AAV12)。尽管具有高度同源性,不同的血清亚型对不同的组织具有趋向性。AAV1 的受体是未知的,然而,已知 AAV1 能够比 AAV2 更有效地转导骨骼肌和心肌。针对假病毒载体已做了很多研究,两侧为 AAV2 ITR 的 DNA 载体被包在可替换血清型的衣壳中,显然生物活性的差异与衣壳有关,并非与基因组有关。最近的研究表明,包在 AAV1 衣壳中的 DNA 表达组件转导心肌细胞的能力比包在 AAV2 衣壳中的高至少 $11\log_{10}$ 。在某一实施例中,在个体中使用的是不产生免疫应答的 AAVs。在某一实施例中,本发明的 AAV 是腺相关病毒载体 9(AAV9)。此处所用的 AAV9.cMLCK 载体是指基于重组 AAV9 的 cMLCK 基因导入载体。

[0084] 可以用标准临床技术来确定本发明所公开的编码 cMLCK 的多核苷酸载体的剂量,该剂量能够有效治疗重度心衰。也可以通过临床疗效来确定本发明公开的用于表达 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体的剂量。另外,可以视情况采用体外分析来确定最佳的剂量范围。在剂型中采用的准确剂量也取决于给药途径和心衰的严重程度,应当按照医生的判断和每个病人的状况来决定。在某一实施例中,本发明公布的剂量约为 $1 \times 10^{10} - 1 \times 10^{15}$ gc/人。在某一实施例中,剂量约为 $1 \times 10^{10} - 5 \times 10^{14}$ gc/人。在某一实施例中,剂量约为 $1 \times 10^{11} - 1 \times 10^{14}$ gc/人。在某一实施例中,剂量约为 $1 \times 10^{11} - 5 \times 10^{13}$ gc/人。在某一实施例中,剂量约为 $5 \times 10^{10} - 5 \times 10^{11}$ gc/人。在某一实施例中,剂量约为 $2 \times 10^{11} - 5 \times 10^{11}$ gc/人。在某一实施例中,剂量约为 1×10^{10} gc/人。在另一实施例中,剂量约为 2×10^{10} gc/人。在某一实施例中,剂量约为 5×10^{10} gc/人。在某一实施例中,剂量约为 1×10^{11} gc/人。在另一实施例

中,剂量约为 2×10^{11} gc/ 人。在某一实施例中,剂量约为 5×10^{11} gc/ 人。在某一实施例中,剂量约为 1×10^{12} gc/ 人。在另一实施例中,剂量约为 2×10^{12} gc/ 人。在另一实施例中,剂量约为 5×10^{12} gc/ 人。在某一实施例中,剂量约为 1×10^{13} gc/ 人。在另一实施例中,剂量约为 2×10^{13} gc/ 人。在另一实施例中,剂量约为 5×10^{13} gc/ 人。在另一实施例中,剂量约为 1×10^{14} gc/ 人。在另一实施例中,剂量约为 2×10^{14} gc/ 人。在另一实施例中,剂量约为 5×10^{14} gc/ 人。

[0085] 在另一方面,本发明提供了 cMLCK 基因治疗的药物组分。在某一实施例中,该组分是包含编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体。在某一实施例中,多核苷酸载体是病毒载体。在某一实施例中,病毒载体是一个腺相关病毒载体 (AVV)。在某一特定实施例中,多核苷酸载体是腺相关病毒 9 (AVV9)。

[0086] 在另一方面,本发明提供了用于药物的组分。该组分包含有效治疗剂量的编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体和药学可接受的介质。在某一实施例中,病毒载体是一个腺相关病毒载体 (AVV)。在一个特定的实施例中,多核苷酸是腺相关病毒 9 (AVV9)。

[0087] 某一实施例中,此中公布的组分用于在个体中表达 cMLCK 蛋白,包含对个体施用编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体,在个体的心脏细胞内编码 cMLCK 蛋白,其中个体为重度心衰。在某一实施例中,组分是编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体。在某一实施例中,多核苷酸载体是病毒载体。在某一实施例中,病毒载体是一个腺相关病毒载体 (AVV)。在一特定的实施例中,多核苷酸载体是腺相关病毒 9 (AVV9)。在某一实施例中,水是药物可接受的介质。在某一实施例中,盐溶液、葡萄糖溶液和甘油溶液作为介质,特别用于注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉,葡萄糖,乳糖,蔗糖,明胶,麦芽,大米,面粉,滑石粉,硅胶,硬脂酸钠,单硬脂酸甘油酯,云母,氯化钠,脱脂乳粉,甘油,丙烯,乙二醇,水,乙醇等。如果需要,药物的组分还可以加入少量的润湿剂或乳化剂,或 pH 缓冲剂。这些组分可以是溶液,悬浮液,乳剂,缓释剂等形式。适当的药物介质在 E. W. Martin 编写的 Remington's Pharmaceutical Sciences 中有描述。这种组分包含治疗有效剂量,更可取的是以净化形式,和适当剂量的介质,以便以适当的剂型为病人给药。剂型应当与给药方式相符。

[0088] 在某一特定的实施例中,根据常规方法将药物组分调剂成适合人类静脉给药或冠状动脉输注的剂型。典型的,用于静脉给药或冠状动脉输注的组分为无菌生理盐水缓冲液。一般来说,在单位剂量形式中成分可以分开或者混合在一起。例如,作为冻干粉或水溶液封存于密闭的容器中,如表明活性剂含量的安瓿或容器。当组分通过输注给药时,无需含无菌药用级水或生理盐水的输注瓶。当组分通过注射给药时,需要提供一安瓿无菌的注射用水或生理盐水用于给药之前溶解成分。

[0089] 在另一方面,本发明所公开的组分能够用于各种已公开的方法。在某一实施例中,此处所公开的组分用于治疗重度心衰的个体,包含对个体施用有效剂量的编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体,该多核苷酸载体在个体的心脏细胞内编码 cMLCK 蛋白,从而提高心脏的心室功能。在某一实施例中,组分是编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体。在某一实施例中,多核苷酸载体是病毒载体。在一个实施例中,病毒载体是腺相关病毒载体 (AAV)。在一个特定的实施例中,多核苷酸载体是 AAV9。

[0090] 在某一实施例中,此处所公开的组分用于在个体中表达 cMLCK 蛋白,包含对个体施用编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体,该载体在个体的心脏细胞中表达 cMLCK 蛋白,其中个

体为重度心衰。在某一实施例中,组分是编码 cMLCK 蛋白的多核苷酸载体。在某一实施例中,多核苷酸载体是病毒载体。在一个实施例中,病毒载体是腺相关病毒载体 (AAV)。在一个特定的实施例中,多核苷酸载体是 AAV9。

[0091] 本发明通过以下例子来阐明,但本发明所保护的范围并不限于此。

[0092] 实施例 1

[0093] AAV9. cMLCK 病毒颗粒的构建、生产工艺及质量控制

[0094] 本实施例描述了编码 cMLCK 的多核苷酸在 AAV9 载体中的构建、生产和质量控制。

[0095] 构建的顺式质粒 pZac2. 1-cMLCK 中,编码人源 cMLCK (hcMLCK) 的多核苷酸 (SEQ ID NO:4) 是由人源的巨细胞病毒 (CMV) 作为启动子转基因表达的。图 1 显示了 AAV9 载体中编码 cMLCK 多核苷酸的基因组结构。人源化的编码 cMLCK 的 DNA (SEQ ID No:4) 被克隆进 AAV9 顺式质粒 pZac2. 1-CMV 的 Kpn I/Not I 位点。cMLCK 的表达受 CMV 启动子 / 增强子和多腺苷酰作用位点 SV40 的调控。

[0096] 293 细胞被顺式质粒 pZac2. 1-cMLCK、含有 AAV2rep 基因和 AAV9 衣壳蛋白基因的反式质粒 pAAV2/9 和腺病毒辅助质粒 pAd Δ F6 转染。这些细胞是通过增加碘克沙醇的浓度从 15%, 25%, 40%, 和 54% 进行梯度超速离心的方式来纯化,并进行了 SDS-PAGE 和内毒素的纯度分析 (放行标准是用于大动物研究内毒素小于 5 单位 / 毫升)。图 2 显示了顺式质粒 pZac2. 1-cMLCK 的构建和质量控制。质粒 DNA 的纯度和浓度由 260nm 和 280nm 下的吸光度来判断,cMLCK cDNA 和调控元件 (ITR, CMV 增强子和启动子,内含子,和 SV40 多腺苷化信号) 的确认是通过双条带的全长序列和限制性酶解达到的。人源化 cMLCK 的转基因表达是由 pZac2. 1-cMLCK 转染后的人胚肾 293 细胞 (HEK293 细胞) 进行的蛋白免疫印迹来进一步确认的。

[0097] AAV9. cMLCK 成功获得,其中一批的数据如下:基因滴度 1.68×10^{13} GC/ml;收率 3.19×10^{13} GC;纯度 100%;内毒素 <1EU/ml。

[0098] 实施例 2

[0099] cMLCK 体外基因表达

[0100] 本实施例描述了 cMLCK 的体外转基因表达,其中包括在 HEK293 细胞, H9C2 细胞 (一种心肌细胞系) 和新生大鼠的心肌细胞。

[0101] cMLCK 的转基因表达在 HEK293 细胞和 H9C2 细胞的 mRNA 和蛋白水平得到了确认。cMLCK 的 mRNA 水平由定量的 RT-PCR 检测,cMLCK 的蛋白水平由细胞裂解液的蛋白免疫印迹测定。

[0102] 在确认了 HEK293 细胞和 H9C2 细胞的 cMLCK 转基因表达后, cMLCK 转基因表达也在分离的心肌细胞中进行了进一步地测定。心肌细胞是从新生大鼠中分离得到的,如 Lai et al., Hum Gene Ther, 23(3):255-261 (2012) 中描述的那样。总 RNA 通过使用 STAT-60 (Tel-Test, TX), RNeasy 试剂盒 (Qiagen) 纯化和 DNase 处理消除残余的 DNA 步骤从细胞中分离获得。cMLCK 的 mRNA 水平由定量的 RT-PCR 检测,cMLCK 的蛋白水平由细胞裂解液的蛋白免疫印迹测定。图 3 显示了在 HEK293 细胞和 H9C2 细胞中 cMLCK 转基因的表达 (图 3A) 和 AAV9. cMLCK 基因转入后分离的心肌细胞 (图 3B, Lot#1AAV9. cMLCK)。不同剂量的 AAV9. cMLCK 用于感染细胞和心肌细胞, GAPDH 用于内部控制。

[0103] 实施例 3

[0104] AAV9. cMLCK 心脏基因导入的条件优化

[0105] 本实施例描述了一系列的研究用于优化 AAV9. cMLCK 基因导入的条件

[0106] 间接冠脉注射被用于在小鼠中输送 AAV9. cMLCK。10-12 周龄的雄性 C57BL/6J 小鼠（杰克逊实验室，巴尔港，美国缅因州），被麻醉和插管。在第二和第三个肋骨之间进行胸廓切开术，邻近的主动脉和肺动脉被分开并用血管钳闭塞（Roth et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol, 287(1):H172-177(2004)）。AAV9. cMLCK 被注射入左心室腔。血管钳在闭塞 60 秒后取走。

[0107] 病毒颗粒的生物分布和 cMLCK 的转基因由 PCR 和 RT-PCR 进行评估。从不同的组织器官（左心室、肺、肝、骨骼肌、脾、肠、肾、胃和生殖腺）中用 DNeasy 试剂盒（Qiagen）分离基因 DNA。在每个器官组织中，用定量的 PCR 确定 DNA 的拷贝数。总 RNA 通过使用 STAT-60 (Tel-Test, TX)，RNeasy 试剂盒（Qiagen）纯化和 DNase 处理消除残余的 DNA 步骤从不同的器官组织中分离获得。cMLCK 的 mRNA 水平由定量的 RT-PCR 检测，cMLCK 的蛋白水平由左心室匀浆的蛋白免疫印迹测定。

[0108] 注射了 $0, 5 \times 10^{10}, 2 \times 10^{11}$, and 5×10^{11} gc/ 小鼠 AAV9. cMLCK 后的 2, 5, 10 周，小鼠心脏中 cMLCK 和 mRNA 的转基因表达水平进行了比较。图 4 显示间接冠脉基因导入 AAV9. cMLCK 五周后，左心室样品中 cMLCK 转基因 mRNA 的定量表达。间接冠脉基因导入 AAV9. cMLCK 5×10^{11} gc/ 小鼠五周后，每微克总 RNA 中有 1.41×10^5 cMLCK 转基因 mRNA 分子。

[0109] 冠脉基因输入后，在左心室样品中发现了剂量依赖的 cMLCK 转基因表达。这个结果表明在注射 5×10^{11} gc/ 小鼠 AAV9. cMLCK 后会发生适量的 cMLCK 转基因表达。

[0110] 实施例 4

[0111] AAV9. cMLCK 的基因导入可提高压力超负荷老鼠的心脏功能

[0112] 本实施例描述了 AAV9. cMLCK 的基因导入在提高压力超负荷老鼠心脏功能方面的作用。慢性压力负荷，比如持久高血压与临床性心力衰竭的高风险相关。虽然整个过程对患者来说需要几十年，与横向的主动脉缩窄（TAC）相关的严重的左心室压力负荷可使小鼠在几周内使左心室肥大并产生左心室功能损伤。压力负荷为研究 AAV9. cMLCK 在压力紧张的心脏中进行基因导入提供了一个有效的模型。

[0113] 在一组 C57BL/6N 上进行主动脉缩窄手术。小鼠用 5% 异氟烷 (1L/min) 麻醉，插管和通气（压力控制的）。用 1% 异氟烷维持麻醉。胸部在左上部胸部边缘的第二个肋间隙的位置打开，在无名和左颈动脉之间的主动脉弓被切开。用 7-0 丝线和 27 号针进行结扎，最后完成主动脉缩窄手术。

[0114] 在主动脉缩窄后的 3 周，心超被用来检测存活小鼠的心腔尺寸和左心室功能。这些小鼠被随机分成两组。一组小鼠通过间接冠状动脉输入接受 AAV9. cMLCK 基因导入，另一组小鼠通过同样的方式接受磷酸缓冲液的注射。基因导入后的五周，小鼠的心腔尺寸和左心室功能用心超再一次检测。被麻醉的小鼠进行一系列的心超检测，左心室腔尺寸、左心室射血分数 (LVEF)、圆周纤维缩短速率 (Vcf) 被测定。另外，通过体内血流动力学测定左心室收缩和舒张功能。一个 1.4F 微压计导管 (Millar Instruments) 通过右颈动脉插入到被麻醉小鼠的左心室。左心室压力，左心室 $\pm dP/dt$ ，收缩压力和体积关系 (ESPVR)，心搏量，心输出量，系统血管阻力被测定。

[0115] 体重，左心室重量，肺的重量，肝的重量和胫骨的长度在解剖时被测定。心脏舒张

遏止的左心室样品被分成 3 份:短轴的左心室环间隔壁用马尔福林固定后测定心肌细胞尺寸,心肌细胞凋亡和纤维化,另外两份用液氮快速冻存在 -80°C 用于生化和分子生物方面的研究。

[0116] 左心室的截面用苏木精和曙红染色。隔膜和左心室游离壁的随机区域用观察镜拍照,心肌细胞的横断面积用 NIH 图像软件测定。

[0117] 通过 CardioTACS 原位凋亡检测试剂盒,在左心室截面使用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 末端标记法。细胞凋亡速率的变化用 DNA 碎片法测定。用 Caspase-Glo 3/7 试剂盒测定细胞凋亡蛋白酶的活性。

[0118] 左心室截面用天狼猩红染色。胶原沉淀区域用 NIH 图像软件量化并且部分胶原区域被计算。胶原 I,胶原 III,骨膜蛋白,基质金属蛋白酶 (MMPs) 和基质金属蛋白酶的抑制剂 (TIMPs) 用定量 RT-PCR 和蛋白免疫印迹测定。

[0119] 总 RNA 通过使用 STAT-60 (Tel-Test, TX), RNeasy 试剂盒 (Qiagen) 纯化和 DNase 处理消除残余的 DNA 步骤从左心室样品中分离获得。各类调节剂如钙离子处理 (PLN, SERCA2a, 肌集钙蛋白, RyR2, FKBP12, L-type 钙离子通道和 NCX), 收缩性 (cTnI, cTnC, cTnT 和原肌球蛋白), 肥大 (ANF, BNP, α -SK actin, β -MHC, FHL1 和 MEF2D), 凋亡 (Pim1, sFRP1, Bcl2, Bax, and caspase 3) 和纤维化 (collagen I, collagen III, periostin, MMPs and TIMPs) 的 mRNA 水平由定量的 RT-PCR 检测。

[0120] 左心室匀浆中各类调节剂如钙离子处理 (PLN, phospho-PLN, SERCA2a, 肌集钙蛋白, RyR2, phospho-RyR2, FKBP12, L-type 钙离子通道和 NCX), 收缩性 (cTnI, phospho-cTnI, cTnC, cTnT 和原肌球蛋白), 肥大 (FHL1 和 MEF2D), 凋亡 (Pim1, sFRP1, Wif1, Bcl2, Bax, and caspase 3) 和纤维化 (胶原和骨膜蛋白) 的蛋白水平由蛋白免疫印迹测定。

[0121] 图 5 显示了 AAV9. cMLCK 基因导入前后的心超检测。如图 5 显示的, AAV9. cMLCK 基因导入组与磷酸缓冲液注射组相比平均 FS 值显著升高 ET 值降低, 这说明 AAV9. cMLCK 基因导入可提高主动脉缩窄后有心衰临床症状小鼠的左心室收缩功能。

[0122] 图 6 显示了 AAV9. cMLCK 基因导入后的体内血液动力学测定。如图 6 显示的, AAV9. cMLCK 基因导入组与磷酸缓冲液注射组相比平均 $+dP/dt$ 有显著升高, 这说明 AAV9. cMLCK 基因导入可提高主动脉缩窄后有心衰临床症状小鼠的左心室收缩功能。显著升高的平均 $-dP/dt$ 说明 AAV9. cMLCK 基因导入可提高主动脉缩窄组小鼠的左心室舒张功能。AAV9. cMLCK 基因导入后平均 LV/BW 降低说明 AAV9. cMLCK 基因导入可部分改善临床性心衰导致的心肌肥厚。

[0123] 实施例 5

[0124] 使用 cMLCK 基因导入治疗重度的心力衰竭患者

[0125] 本实施例描述了用 AAV9. cMLCK 基因导入治疗重度的心力衰竭患者

[0126] NYHA III 级或 IV 级心衰患者或 NT-proBNP 血浆水平大于 4000fmol/ml 或对纽兰格林治疗没有响应的患者可用 AAV9. cMLCK 基因导入治疗。

[0127] AAV9. cMLCK 以 $1 \times 10^{11}\text{gc/人}$ 到 $5 \times 10^{13}\text{gc/人}$ 的剂量通过冠状动脉局部输入患者的心脏。皮下冠状动脉输入是通过标准的导管和 MEDRAD Mark V ProVis 血管造影注射系统 (Indianola, PA)。在造影术后的导管插入实验中十分钟内输入药物。采用常规造影术确认同轴的位置, 标准的导管插入在冠状动脉中顺利进行, 确保输入顺利前行到冠状循

环中去。180 天后,对这些患者的左心室功能通过心超进行检测,如左心室的 EF 值,左心室的舒张末期体积 (LVEDV),或左心室的收缩末期体积 (LVEDV)。通过这些参数对患者的左心室功能的改善进行评价。

[0128] 本说明书中提及的全部出版物,专利和专利申请通过引用并入本文,如各独立性出版物或专利申请特异性地及个别通过应用并入一样。虽然为了更清楚地描述和理解,本发明通过举例的方式进行了详细地描述。但显而易见的是,本技术领域普通技术人员可以在不背离权利要求的精神和范围的前提下,对本发明做出适当的改变或修改。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> Zensun (Shanghai) Science and Technology Ltd.

<120> cMLCK for Gene Transfer

<130> 11748-0056-888

<140> to be assigned

<141> to be filed

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 819

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Gly Thr Ser Lys Glu Ser Leu Gly His Gly Gly Leu Pro Gly

1 5 10 15

Leu Gly Lys Thr Cys Leu Thr Thr Met Asp Thr Lys Leu Asn Met Leu

20 25 30

Asn Glu Lys Val Asp Gln Leu Leu His Phe Gln Glu Asp Val Thr Glu

35 40 45

Lys Leu Gln Ser Met Cys Arg Asp Met Gly His Leu Glu Arg Gly Leu

50 55 60

His Arg Leu Glu Ala Ser Arg Ala Pro Gly Pro Gly Gly Ala Asp Gly

[0002]

65	70	75	80
Val Pro His Ile Asp Thr Gln Ala Gly Trp Pro Glu Val Leu Glu Leu			
85	90	95	
Val Arg Ala Met Gln Gln Asp Ala Ala Gln His Gly Ala Arg Leu Glu			
100	105	110	
Ala Leu Phe Arg Met Val Ala Ala Val Asp Arg Ala Ile Ala Leu Val			
115	120	125	
Gly Ala Thr Phe Gln Lys Ser Lys Val Ala Asp Phe Leu Met Gln Gly			
130	135	140	
Arg Val Pro Trp Arg Arg Gly Ser Pro Gly Asp Ser Pro Glu Glu Asn			
145	150	155	160
Lys Glu Arg Val Glu Glu Glu Gly Gly Lys Pro Lys His Val Leu Ser			
165	170	175	
Thr Ser Gly Val Gln Ser Asp Ala Arg Glu Pro Gly Glu Glu Ser Gln			
180	185	190	
Lys Ala Asp Val Leu Glu Gly Thr Ala Glu Arg Leu Pro Pro Ile Arg			
195	200	205	
Ala Ser Gly Leu Gly Ala Asp Pro Ala Gln Ala Val Val Ser Pro Gly			
210	215	220	

[0003]

Gln Gly Asp Gly Val Pro Gly Pro Ala Gln Ala Phe Pro Gly His Leu
225 230 235 240

Pro Leu Pro Thr Lys Val Glu Ala Lys Ala Pro Glu Thr Pro Ser Glu
245 250 255

Asn Leu Arg Thr Gly Leu Glu Leu Ala Pro Ala Pro Gly Arg Val Asn
260 265 270

Val Val Ser Pro Ser Leu Glu Val Ala Pro Gly Ala Gly Gln Gly Ala
275 280 285

Ser Ser Ser Arg Pro Asp Pro Glu Pro Leu Glu Glu Gly Thr Arg Leu
290 295 300

Thr Pro Gly Pro Gly Pro Gln Cys Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro Ala
305 310 315 320

Gln Ala Arg Ala Thr His Ser Gly Gly Glu Thr Pro Pro Arg Ile Ser
325 330 335

Ile His Ile Gln Glu Met Asp Thr Pro Gly Glu Met Leu Met Thr Gly
340 345 350

Arg Gly Ser Leu Gly Pro Thr Leu Thr Thr Glu Ala Pro Ala Ala Ala
355 360 365

Gln Pro Gly Lys Gln Gly Pro Pro Gly Thr Gly Arg Cys Leu Gln Ala
370 375 380

[0004]

Pro Gly Thr Glu Pro Gly Glu Gln Thr Pro Glu Gly Ala Arg Glu Leu			
385	390	395	400
Ser Pro Leu Gln Glu Ser Ser Ser Pro Gly Gly Val Lys Ala Glu Glu			
	405	410	415
Glu Gln Arg Ala Gly Ala Glu Pro Gly Thr Arg Pro Ser Leu Ala Arg			
	420	425	430
Ser Asp Asp Asn Asp His Glu Val Gly Ala Leu Gly Leu Gln Gln Gly			
	435	440	445
Lys Ser Pro Gly Ala Gly Asn Pro Glu Pro Glu Gln Asp Cys Ala Ala			
	450	455	460
Arg Ala Pro Val Arg Ala Glu Ala Val Arg Arg Met Pro Pro Gly Ala			
465	470	475	480
Glu Ala Gly Ser Val Val Leu Asp Asp Ser Pro Ala Pro Pro Ala Pro			
	485	490	495
Phe Glu His Arg Val Val Ser Val Lys Glu Thr Ser Ile Ser Ala Gly			
	500	505	510
Tyr Glu Val Cys Gln His Glu Val Leu Gly Gly Gly Arg Phe Gly Gln			
	515	520	525
Val His Arg Cys Thr Glu Lys Ser Thr Gly Leu Pro Leu Ala Ala Lys			
	530	535	540

[0005]

Ile Ile Lys Val Lys Ser Ala Lys Asp Arg Glu Asp Val Lys Asn Glu
545 550 555 560

Ile Asn Ile Met Asn Gln Leu Ser His Val Asn Leu Ile Gln Leu Tyr
565 570 575

Asp Ala Phe Glu Ser Lys His Ser Cys Thr Leu Val Met Glu Tyr Val
580 585 590

Asp Gly Gly Glu Leu Phe Asp Arg Ile Thr Asp Glu Lys Tyr His Leu
595 600 605

Thr Glu Leu Asp Val Val Leu Phe Thr Arg Gln Ile Cys Glu Gly Val
610 615 620

His Tyr Leu His Gln His Tyr Ile Leu His Leu Asp Leu Lys Pro Glu
625 630 635 640

Asn Ile Leu Cys Val Asn Gln Thr Gly His Gln Ile Lys Ile Ile Asp
645 650 655

Phe Gly Leu Ala Arg Arg Tyr Lys Pro Arg Glu Lys Leu Lys Val Asn
660 665 670

Phe Gly Thr Pro Glu Phe Leu Ala Pro Glu Val Val Asn Tyr Glu Phe
675 680 685

Val Ser Phe Pro Thr Asp Met Trp Ser Val Gly Val Ile Thr Tyr Met

[0006]

690	695	700	
Leu Leu Ser Gly Leu Ser Pro Phe Leu Gly Glu Thr Asp Ala Glu Thr			
705	710	715	720
Met Asn Phe Ile Val Asn Cys Ser Trp Asp Phe Asp Ala Asp Thr Phe			
	725	730	735
Glu Gly Leu Ser Glu Glu Ala Lys Asp Phe Val Ser Arg Leu Leu Val			
	740	745	750
Lys Glu Lys Ser Cys Arg Met Ser Ala Thr Gln Cys Leu Lys His Glu			
	755	760	765
Trp Leu Asn Asn Leu Pro Ala Lys Ala Ser Arg Ser Lys Thr Arg Leu			
	770	775	780
Lys Ser Gln Leu Leu Leu Gln Lys Tyr Ile Ala Gln Arg Lys Trp Lys			
	785	790	795
			800
Lys His Phe Tyr Val Val Thr Ala Ala Asn Arg Leu Arg Lys Phe Pro			
	805	810	815
Thr Ser Pro			
<210> 2			
<211> 795			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			

[0007]

<400> 2

Met Asp Thr Lys Leu Asn Met Leu Asn Glu Lys Val Asp Gln Leu Leu

1 5 10 15

His Phe Gln Glu Asp Val Thr Glu Lys Leu Gln Ser Met Cys Arg Asp

20 25 30

Met Gly His Leu Glu Arg Gly Leu His Arg Leu Glu Ala Ser Arg Ala

35 40 45

Pro Gly Pro Gly Gly Ala Asp Gly Val Pro His Ile Asp Thr Gln Ala

50 55 60

Gly Trp Pro Glu Val Leu Glu Leu Val Arg Ala Met Gln Gln Asp Ala

65 70 75 80

Ala Gln His Gly Ala Arg Leu Glu Ala Leu Phe Arg Met Val Ala Ala

85 90 95

Val Asp Arg Ala Ile Ala Leu Val Gly Ala Thr Phe Gln Lys Ser Lys

100 105 110

Val Ala Asp Phe Leu Met Gln Gly Arg Val Pro Trp Arg Arg Gly Ser

115 120 125

Pro Gly Asp Ser Pro Glu Glu Asn Lys Glu Arg Val Glu Glu Glu Gly

130 135 140

[0008]

Gly Lys Pro Lys His Val Leu Ser Thr Ser Gly Leu Gln Ser Asp Ala			
145	150	155	160
Arg Glu Pro Gly Glu Glu Ser Gln Lys Ala Asp Val Leu Glu Arg Thr			
	165	170	175
Ala Glu Arg Leu Pro Pro Ile Arg Ala Ser Gly Leu Gly Ala Asp Pro			
	180	185	190
Ala Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Gln Gly Asp Gly Val Pro Gly Pro			
	195	200	205
Ala Gln Ala Phe Pro Gly His Leu Pro Leu Pro Thr Lys Val Glu Ala			
	210	215	220
Lys Ala Pro Glu Thr Pro Ser Glu Asn Leu Arg Thr Gly Leu Glu Leu			
225	230	235	240
Ala Pro Ala Pro Gly Arg Val Asn Val Val Ser Pro Ser Leu Glu Val			
	245	250	255
Ala Pro Gly Ala Gly Gln Gly Ala Ser Ser Ser Arg Pro Asp Pro Glu			
	260	265	270
Pro Leu Glu Glu Gly Thr Arg Leu Thr Pro Gly Pro Gly Pro Gln Cys			
	275	280	285
Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro Ala Gln Ala Arg Ala Thr His Ser Gly			
	290	295	300

[0009]

Gly Glu Thr Pro Pro Arg Ile Ser Ile His Ile Gln Glu Met Asp Thr
305 310 315 320

Pro Gly Glu Met Leu Met Thr Gly Arg Gly Ser Leu Gly Pro Thr Leu
325 330 335

Thr Thr Glu Ala Pro Ala Ala Ala Gln Pro Gly Lys Gln Gly Pro Pro
340 345 350

Gly Thr Gly Arg Cys Leu Gln Ala Pro Gly Thr Glu Pro Gly Glu Gln
355 360 365

Thr Pro Glu Gly Ala Arg Glu Leu Ser Pro Leu Gln Glu Ser Ser Ser
370 375 380

Pro Gly Gly Val Lys Ala Glu Glu Glu Gln Arg Ala Gly Ala Glu Pro
385 390 395 400

Gly Thr Arg Pro Ser Leu Ala Arg Ser Asp Asp Asn Asp His Glu Val
405 410 415

Gly Ala Leu Gly Leu Gln Gln Gly Lys Ser Pro Gly Ala Gly Asn Pro
420 425 430

Glu Pro Glu Gln Asp Cys Ala Ala Arg Ala Pro Val Arg Ala Glu Ala
435 440 445

Val Arg Arg Met Pro Pro Gly Ala Glu Ala Gly Ser Val Val Leu Asp
450 455 460

[0010]

Asp Ser Pro Ala Pro Pro Ala Pro Phe Glu His Arg Val Val Ser Val			
465	470	475	480
Lys Glu Thr Ser Ile Ser Ala Gly Tyr Glu Val Cys Gln His Glu Val			
	485	490	495
Leu Gly Gly Gly Arg Phe Gly Gln Val His Arg Cys Thr Glu Lys Ser			
	500	505	510
Thr Gly Leu Pro Leu Ala Ala Lys Ile Ile Lys Val Lys Ser Ala Lys			
	515	520	525
Asp Arg Glu Asp Val Lys Asn Glu Ile Asn Ile Met Asn Gln Leu Ser			
	530	535	540
His Val Asn Leu Ile Gln Leu Tyr Asp Ala Phe Glu Ser Lys His Ser			
545	550	555	560
Cys Thr Leu Val Met Glu Tyr Val Asp Gly Gly Glu Leu Phe Asp Arg			
	565	570	575
Ile Thr Asp Glu Lys Tyr His Leu Thr Glu Leu Asp Val Val Leu Phe			
	580	585	590
Thr Arg Gln Ile Cys Glu Gly Val His Tyr Leu His Gln His Tyr Ile			
	595	600	605
Leu His Leu Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile Leu Cys Val Asn Gln Thr			

[0011]

610	615	620	
Gly His Gln Ile Lys Ile Ile Asp Phe Gly Leu Ala Arg Arg Tyr Lys			
625	630	635	640
Pro Arg Glu Lys Leu Lys Val Asn Phe Gly Thr Pro Glu Phe Leu Ala			
	645	650	655
Pro Glu Val Val Asn Tyr Glu Phe Val Ser Phe Pro Thr Asp Met Trp			
	660	665	670
Ser Val Gly Val Ile Thr Tyr Met Leu Leu Ser Gly Leu Ser Pro Phe			
	675	680	685
Leu Gly Glu Thr Asp Ala Glu Thr Met Asn Phe Ile Val Asn Cys Ser			
	690	695	700
Trp Asp Phe Asp Ala Asp Thr Phe Glu Gly Leu Ser Glu Glu Ala Lys			
705	710	715	720
Asp Phe Val Ser Arg Leu Leu Val Lys Glu Lys Ser Cys Arg Met Ser			
	725	730	735
Ala Thr Gln Cys Leu Lys His Glu Trp Leu Asn Asn Leu Pro Ala Lys			
	740	745	750
Ala Ser Arg Ser Lys Thr Arg Leu Lys Ser Gln Leu Leu Leu Gln Lys			
	755	760	765

[0012]

Tyr Ile Ala Gln Arg Lys Trp Lys Lys His Phe Tyr Val Val Thr Ala
770 775 780

Ala Asn Arg Leu Arg Lys Phe Pro Thr Ser Pro
785 790 795

<210> 3

<211> 786

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Ser Gly Val Ser Glu Glu Asp Pro Glu Gly Leu Gly Pro Gln Gly
1 5 10 15

Leu Pro Ala Leu Gly Gly Ala Cys Leu Val Thr Val Asp Lys Lys Leu
20 25 30

Asn Val Leu Thr Glu Lys Val Asp Arg Leu Leu His Phe Gln Glu Asp
35 40 45

Val Thr Glu Lys Leu Gln Cys Val Cys Gln Gly Met Asp His Leu Glu
50 55 60

Gln Gly Leu His Arg Leu Glu Ala Ser Gln Glu Leu Gly Leu Ala Gly
65 70 75 80

Pro Gly Ser Thr Ser Pro Ala Ala Ala Gln Ala Ala Trp Pro Glu Val
85 90 95

[0013]

Leu Glu Leu Val Arg Ala Val Arg Gln Glu Gly Ala Gln His Gly Ala
100 105 110

Arg Leu Glu Ala Leu Phe Lys Met Val Val Ala Val Asp Arg Ala Ile
115 120 125

Thr Leu Val Gly Ser Thr Ile Gln Asn Ser Lys Val Asp Asp Phe Ile
130 135 140

Leu Gln Gly Thr Val Pro Trp Arg Lys Gly Ser Leu Ala Asp Gly Pro
145 150 155 160

Glu Glu Asn Lys Glu Gln Ala Glu Val Ala Gly Val Lys Pro Lys His
165 170 175

Val Leu Asn Thr Gly Ser Val Gln Ala Ala Thr Ser Arg Ala Leu Trp
180 185 190

Glu Glu Ser Gln Lys Gln Asp Thr Pro Val Gly Thr Val Glu Gly Leu
195 200 205

Pro Leu Ile Ile Asp Thr Ser Leu Lys Gly Ala Asp Leu Thr Gln Ala
210 215 220

Gly Ala Ser Leu Arg Gln Gly Val Glu Ala Leu Asp Pro Gly Gln Glu
225 230 235 240

Pro Pro Pro Thr Glu Ala Glu Ser Arg Leu Pro Ala Leu Ala Ser Glu
245 250 255

[0014]

Asp Thr Gly Thr Thr Leu Glu Leu Ser Val Ala Ile Asp Arg Ile Ser
260 265 270

Glu Val Leu Thr Ser Leu Arg Met Ser Gln Ser Ala Gly Glu Gly Thr
275 280 285

Ser Ser Ser Lys Pro Asp Cys Ser Glu Pro Gly Pro Gln Pro Leu Gly
290 295 300

Pro Leu Thr Thr Asp Ser Asp Ile His Ser Asp Glu Gly Leu Pro Arg
305 310 315 320

Ile Ser Val Arg Met Arg Glu Met Thr Thr Pro Glu Glu Leu Phe Glu
325 330 335

Thr Gln Gly Gly Ser Pro Ile Gly Ser Ala Glu Ala Pro Gly Pro Gly
340 345 350

Thr Val Leu Glu Asp Gln Ile Pro Lys Gly Ala Arg Pro Phe Pro Pro
355 360 365

Leu Pro Lys Arg Ser Cys Asn Asn Gly Gly Ala Ser Ala Glu Glu Ala
370 375 380

Thr Gly Pro Gly Ala Glu Pro Ile Arg Gly Pro Ser Leu Val Thr Arg
385 390 395 400

Asp Trp Arg Asp Glu Pro Val Gly Thr Thr Asp Leu Gln Gln Gly Arg
405 410 415

[0015]

Asp Pro Gly Ala Val Ser Pro Glu Pro Gly Lys Asp His Ala Ala Gln
420 425 430

Gly Pro Gly Arg Thr Glu Ala Gly Arg Arg Val Ser Ser Ala Ala Glu
435 440 445

Ala Ala Ile Val Val Leu Gly Asp Ser Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe
450 455 460

Glu His Arg Val Val Ser Ile Lys Asp Thr Leu Ile Ser Thr Ser Tyr
465 470 475 480

Thr Val Ser Gln His Glu Val Leu Gly Gly Gly Arg Phe Gly Gln Val
485 490 495

His Arg Cys Thr Glu Arg Ser Thr Gly Leu Ala Leu Ala Ala Lys Ile
500 505 510

Ile Lys Val Lys Asn Ile Lys Asp Arg Glu Asp Val Lys Asn Glu Ile
515 520 525

Asn Ile Met Asn Gln Leu Ser His Val Asn Leu Ile Gln Leu Tyr Asp
530 535 540

Ala Phe Glu Ser Lys Asn Ser Phe Thr Leu Ile Met Glu Tyr Val Asp
545 550 555 560

Gly Gly Glu Leu Phe Asp Arg Ile Thr Asp Glu Lys Tyr His Leu Thr

[0016]

	565	570	575
Glu Leu Asp Val Val Leu Phe Thr Arg Gln Ile Cys Glu Gly Val His			
	580	585	590
Tyr Leu His Gln His Tyr Ile Leu His Leu Asp Leu Lys Pro Glu Asn			
	595	600	605
Ile Leu Cys Val Ser Gln Thr Gly His Gln Ile Lys Ile Ile Asp Phe			
	610	615	620
Gly Leu Ala Arg Arg Tyr Lys Pro Arg Glu Lys Leu Lys Val Asn Phe			
625	630	635	640
Gly Thr Pro Glu Phe Leu Ala Pro Glu Val Val Asn Tyr Glu Phe Val			
	645	650	655
Ser Phe Pro Thr Asp Met Trp Ser Val Gly Val Ile Thr Tyr Met Leu			
	660	665	670
Leu Ser Gly Leu Ser Pro Phe Leu Gly Glu Thr Asp Ala Glu Thr Met			
	675	680	685
Asn Phe Ile Val Asn Cys Ser Trp Asp Phe Asp Ala Asp Thr Phe Lys			
	690	695	700
Gly Leu Ser Glu Glu Ala Lys Asp Phe Val Ser Arg Leu Leu Val Lys			
705	710	715	720

[0017]

Glu Lys Ser Cys Arg Met Ser Ala Thr Gln Cys Leu Lys His Glu Trp
725 730 735

Leu Asn His Leu Ile Ala Lys Ala Ser Gly Ser Asn Val Arg Leu Arg
740 745 750

Ser Gln Leu Leu Leu Gln Lys Tyr Met Ala Gln Arg Lys Trp Lys Lys
755 760 765

His Phe His Val Val Thr Ala Val Asn Arg Leu Arg Lys Phe Pro Thr
770 775 780

Cys Pro
785

<210> 4
<211> 2457
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
atgtcaggaa cctccaagga gagtctgggg catggggggc tgcaggggtt gggcaagacc 60
tgcttaacaa ccatggacac aaagctgaac atgctgaacg agaaggtgga ccagctcctg 120
cactccaag aagatgtcac agagaagttg cagagcatgt gccgagacat gggccacctg 180
gagcggggcc tgcacaggct ggaggcctcc cgggcaccgg gcccgggcgg ggctgatggg 240
gttccccaca ttgacacca ggctgggtgg ccgagggtcc tggagctggt gagggccatg 300
cagcaggatg cggcccagca cgggtgccagg ctggaggccc tcttcaggat ggtggctgcg 360
gtggacaggg ccatcgcttt ggtggggggc acgttcaga aatcaaaggt ggcggatttc 420

[0018]

cicattcagg ggcgtgtgcc ctggaggaga ggcagcccag gtgacagccc tgaggagaat	480
aaagagcgag tggaaagaaga gggaggaaaa ccaaagcatg tgctgagcac cagtggggtg	540
cagtctgatg ccaggagacc tggggaagag agccagaagg cggacgtgct ggaggggaca	600
ggggagaggc tgcccccat cagagcgtca gggtgggag ctgacccgc ccaggcagt	660
gtctaccgg gccagggaga tgggtttct ggcagccc aggcattccc tgccacctg	720
ccccgcca caaagggtga agccaaggt cctgagacac ccagcgagaa cctcaggact	780
ggcctggaat tggctccagc acccggcagg gtcaatgtgg tctccccag cctggagggt	840
gcaccaggtg caggacaagg agcatcgtcc agcaggcctg accctgagcc cttagaggaa	900
ggcacgaggc tgactccagg gcctggcct cagtgccag ggcctccagg gctgccagcc	960
caggccagg caaccacag tggtgagaa acacctcaa ggatctccat ccacatacaa	1020
gagatggata ctctgggga gatgctgatg acaggcagg gcagcctgg accaccctc	1080
accacagagg ctccagcagc tgcccagcca ggcaagcagg gccacctgg gaccgggcgc	1140
tgctccaag cccctgggac tgagcccgga gaacagacc ctgaaggagc cagagagctc	1200
tccccgtgc aggagagcag cagccccggg ggagtgaagg cagaggagga gcaaagggt	1260
ggggccgagc ctggcacgag accaagcttg gccaggagt acgacaatga ccacgaggt	1320
ggggccctgg gcctgcagca gggcaaaagc ccaggggcg gaaacctga gcctgagcag	1380
gactgtgcag ccagggtcc ggtgagagct gaagcagtaa ggaggatgcc ccaggcgcc	1440
gaggctggca gcgtggtct ggatgacagt ccggccccac cagctcctt tgaacaccgg	1500
gtagtgagcg tcaaggagac ctccatctct gcgggttacg aggtgtgcca gcacgaagtc	1560

[0019]

ttgggagggg gtcggfttgg ccaggteccac aggtgcacag agaagteccac aggcctccca	1620
ctggctgcca agatcatcaa agtgaagagc gccaaaggacc gggaggacgt gaagaacgag	1680
atcaacatca tgaaccagct cagccacgtg aacctgatcc agctctatga cgccttcgag	1740
agcaagcaca gctgcaccct tgtcatggag tacgtggacg ggggtgagct cttcgaccgg	1800
atcacagatg agaagtacca cctgactgag ctggatgtgg tctgttcac caggcagatc	1860
tgtgaggggtg tgcattacct gcaccagcac tacatcctgc acctggacct caagccggag	1920
aacatattgt gcgtcaatca gacaggacat caaattaaga tcattgactt tgggttgccc	1980
agaaggtaca agcctcgaga gaagctgaag gtgaacttcg gcactcctga gttcctggcc	2040
ccagaagteg tcaattatga gttgtctca ttcccacag acatgtggag tgtgggagtc	2100
atcacctaca tgctactcag tggcttgtec ccatttctag gggaaacaga tgcagagacc	2160
atgaattica ttglaaactg tagctgggat ttgatgctg acaccttga agggctctcg	2220
gaggaggcca aggactttgt ttcccggttg ctggtcaaag agaagagctg cagaatgagt	2280
gccacacagt gectgaaaca cgagtggctg aataatttgc ctgecaaagc ttcaagatec	2340
aaaactcgtc tcaaatccca actactgctg cagaataaca tagctcaaag aaaatggaag	2400
aaacatttct atgtggtgac tgctgccaac aggttaagga aattccaac ttctccc	2457
<210> 5	
<211> 2385	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 5	
atggacacaa agctgaacat gctgaacgag aaggtggacc agctcctgca cttccaagaa	60

[0020]

gatgtcacag agaagttgca gagcatgtgc cgagacatgg gccacctgga gcggggcctg	120
cacaggctgg aggcctcccg ggcaccgggc ccgggcgggg ctgatgggtg tccccacatt	180
gacaccagg ctgggtggcc cgaggctctg gagctggtga gggccatgca gcaggatgcg	240
gcccagcacg gtgccaggct ggaggccctc ttcaggatgg tggctgcggt ggacagggcc	300
atcgctttgg tggggccac gtccagaaa tcaaaggtgg cggatttct catgcagggg	360
cgtgtccct ggaggagagg cagcccaggt gacagccctg aggagaataa agagcgagt	420
gaagaagg gaggaacc aaagcatgtg ctgagcacca gtgggtgca gtctgatgcc	480
agggagcctg gggaagagag ccagaaggcg gacgtgctgg aggggacagc ggagaggtg	540
cccccatca gagcgtcagg gctgggagct gacccgccc aggcagtgtg ctcaccgggc	600
caggagatg gtgttctgg ccagcccag geattcctg gccacctgcc cctgcccaca	660
aagtggaag ccaaggtcc tgagacccc agcgagaacc tcaggactgg cctggaattg	720
gtccagcac ccggcagggt caatgtggtc tcccagacc tggaggttgc accagtgca	780
ggacaaggag catcgtccag caggcctgac cctgagccct tagaggaagg cacgagctg	840
actecagggc ctggccctca gtgcccagg cctccagggc tgccagcca ggccaggga	900
accacagtg gtggagaaac acctccaagg atctccatcc acatacaaga gatggatact	960
cctggggaga tctgatgac aggcagggc agccttgac ccaccctcac cacagaggt	1020
ccagcagctg ccagccagg caagcagggc ccacctggga ccgggcgctg cctccaagcc	1080
cctgggactg agccgggaga acagaccct gaaggagcca gagagctctc cccgtgcag	1140
gagagcagca gcccggggg agtgaaggca gaggaggagc aaaggctgg gcccgacct	1200
ggcacgagac caagcttggc caggagtga gacaatgacc acgaggttgg ggccctgggc	1260

[0021]

ctgcagcagg gcaaaagccc aggggcggga aaccctgagc ctgagcagga ctgtgcagcc	1320
agggctccgg tgagagctga agcagtaagg aggatgcccc caggcgccga ggctggcagc	1380
gtggttctgg atgacagtcc ggccccacca gtccttttg aacaccgggt agtgagcgtc	1440
aaggagacct ccatctctgc gggttacgag gtgtgccagc acgaagictt gggagggggt	1500
cggtttgccc aggtccacag gtgcacagag aagtcacag gcctcccact ggctgccaag	1560
atcatcaaag tgaagagcgc caaggaccgg gaggacgtga agaacgagat caacatcatg	1620
aaccagctca gccacgtgaa cctgatccag ctctatgacg ccttcgagag caagcacagc	1680
tgcacccttg tcatggagta cgtggacggg ggtgagctct tcgaccggat cacagatgag	1740
aagtaccacc tgactgagct ggatgtggtc ctgttcacca ggcagatctg tgagggtgtg	1800
cattacctgc accagcacta catcctgcac ctggacctca agccggagaa catattgtgc	1860
gtcaatcaga caggacatca aattaagate attgactttg ggctggccag aaggtacaag	1920
cctcgagaga agctgaaggt gaactcggc actcctgagt tctggcccc agaagtcgtc	1980
aattatgagt ttgtctcatt cccacagac atgtggagtg tgggagtcac cacctacatg	2040
ctactcagtg gcttgcccc attctaggg gaaacagatg cagagacat gaattcatt	2100
gtaaactgta gctgggattt tgatgctgac acctttgaag ggctctcgga ggaggccaag	2160
gactttgttt cccggtgct ggtcaaagag aagagctgca gaatgagtgc cacacagtgc	2220
ctgaaacacg agtggctgaa taatttgcct gccaaagctt caagatccaa aactcgtctc	2280
aaatcccaac tactgctgca gaaatacata gctcaaagaa aatggaagaa acatttctat	2340
gtggtgactg ctgccaacag gttaaggaaa ttccaactt cteccc	2385

[0022]

<210>	6	
<211>	2358	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	6	
atgtcaggag tticagagga ggatccagag ggtctgggcc cccagggtct gccagcgttg	60	
ggcggagcct gcttagtcac cgtggacaaa aaacttaatg tgctgactga gaaggfcgac	120	
agactcttgc attccaaga agatgtcaca gagaagctac agtgtgtgtg ccaaggcatg	180	
gateacctgg aacaaggctc gcacggcctg gaggcctccc aggagtggg tctggcaggg	240	
cccggcagca ctccccagc cgtgctcag gccgcatggc ctgaggctct ggagctggtg	300	
agggcctgtc ggcaggaggg tgcccagcac ggtgccagge tcgaagccct ctccaagatg	360	
gtggtggctg tggacagggc tattactttg gtagggcca caatccagaa ctccaaagtg	420	
gatgattca tctgcaagg gacctgccc tggaggaaag gcagtctggc tgatggccct	480	
gaggagaaca aggagcaagc agaagtggct ggagtgaagc caaagcatgt gctgaafaca	540	
ggaagtgtgc aagctgccac ttctagggcg ctgtgggaag agagccagaa gcaggacaca	600	
ccctgggga cagtggaggg gctgcctctc atcatcgata cgtcactgaa gggagctgac	660	
ctcaccagc ctggagcctc actgaggcag ggagtgaag ctcttgacc aggccaagaa	720	
ccccacccg cagaggcaga atccaggctt cctgcactag ccagcgagga cactgggacc	780	
acctggaat tgtctgtagc aattgacaga atcagtgagg tctcactag cctcaggatg	840	
tcaccaagtg ctggcgaagg aaactcatcc agcaagcctg actgttcaga gcctggccct	900	
cagccctag ggccactaac tacagacagt gacattcaca gtgatgaagg acttcccagg	960	

[0023]

atctctgtcc gtatgcgaga gatgactact cctgaggagc tggttagac ccaaggtggc	1020
agccccattg gctcggcaga agctccaggc cctggaactg tgtagaaga ccagatccct	1080
aaaggagcca gaccatttcc acccctgcc aagaggagct gcaacaatgg tggcgcgagt	1140
gcagaggagg caacagggcc tggggctgag cccatcagag gaccaagctt ggtcacaagg	1200
gactggagag atgaacctgt tgggaccaca gacctgcagc aaggcagaga ccaggagcgc	1260
gtgagccctg aacctgggaa ggaccatgca gcccagggcc cagggagaac cgaagctgga	1320
aggagggtgt ctctgctgc agaggctgcc atcgtagttc tagatgacag cgcagcaccc	1380
ccagccctt tgaacaccg ggtagtgagc atcaaagaca cctcatctc gacaagttac	1440
acagtgtccc aacacgaagt ctggggaggg ggccgggttg gccaggtgca caggtgtaca	1500
gagcggcca caggccttgc actggcagcc aagatcatca aagtgaagaa cataaaggac	1560
cgggaggatg tgaagaatga gatcaacatc atgaaccagc tcagccacgt aaacttgatc	1620
caactttatg atgctttga gagcaagaac agcttcaccc tgatcatgga gtatgtggat	1680
ggagggtgaac tcttcgaccg gatcaggatg gagaagtacc acctgaaccg gctggatgtg	1740
gtctgttca caaggcagat ctgtgagggt gtgcattacc tgcaccagca ctacattctg	1800
cacctggacc tcaagccaga gaacatactg tgtgtcagcc agactgggca tcaaattaag	1860
attattgact ttgggctgac tagaagatat aaacctcggg agaagctaaa ggtaacttt	1920
ggtactccag agttcctggc tccagaagtt gtttaactat agtttgtctc attccaaca	1980
gacatgtgga gtgtgggagt tatcacctac atgtactca gtggttgtc cccatttcta	2040
ggggaacag atgcagagac catgaatttt attgtgaact gcagctggga ttcatgct	2100
gataccttca aagggtgtc agaggaagcc aaggactttg ttacacggtt gctggtaaaa	2160

[0024]

gagaagagtt gtaggatgag egccacacag tgcctgaaac atgagtgggtt aaatcacctg	2220
attgccaaag cctcaggctc caacgttcgc ctcatatccc aactactgct gcagaaatat	2280
atggctcagc gtaaatggaa gaaacatttc catgtggtga ctgcagtcaa caggctaaga	2340
aaatttccaa cgtgtccc	2358

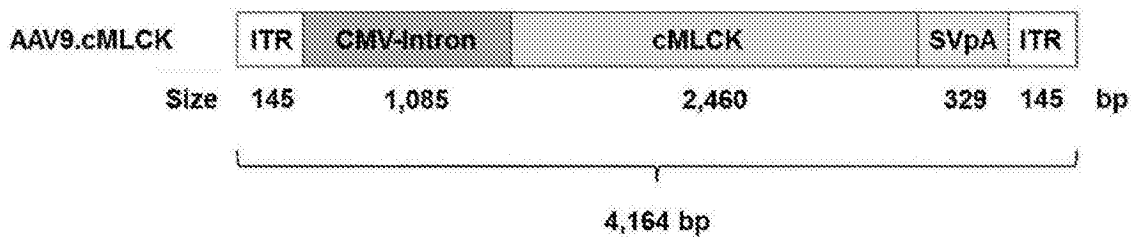


图 1

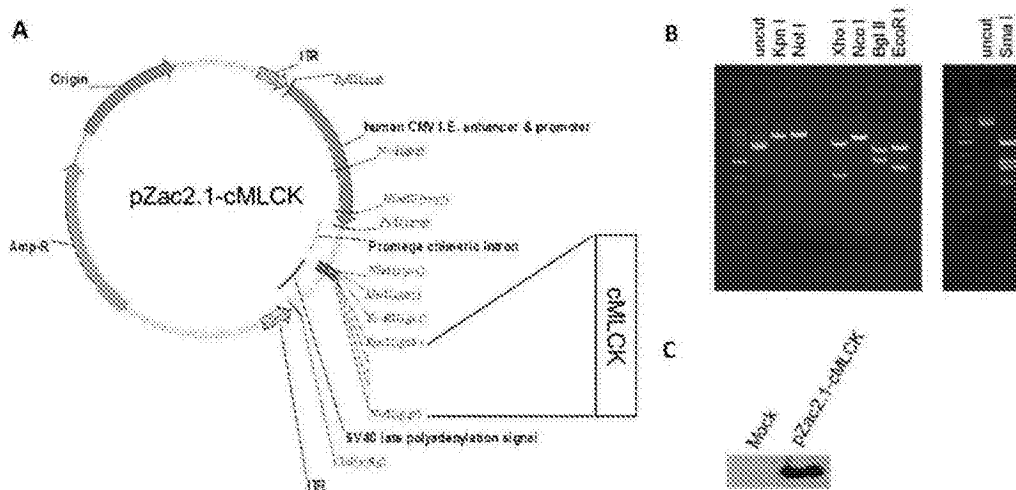


图 2

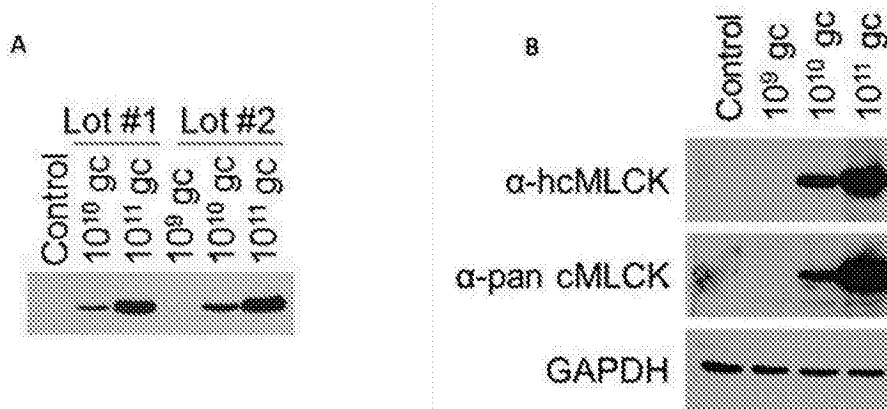


图 3

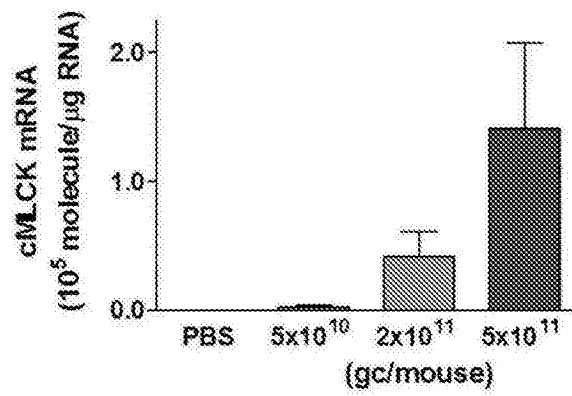


图 4

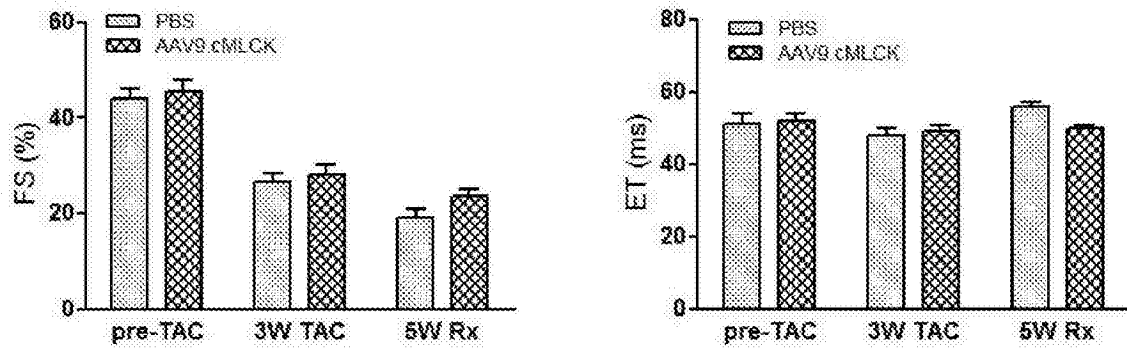


图 5

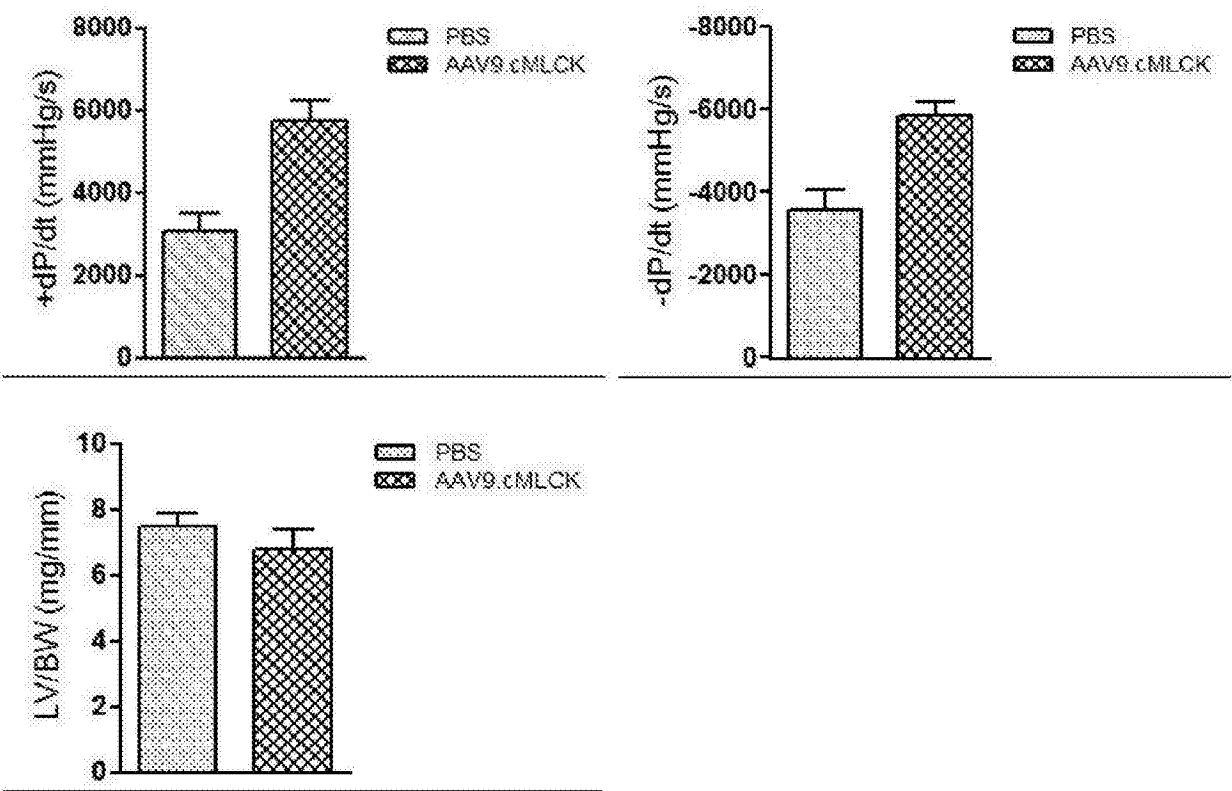


图 6