



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03818347.1

[43] 公开日 2005 年 9 月 21 日

[11] 公开号 CN 1671734A

[22] 申请日 2003.5.30 [21] 申请号 03818347.1

[30] 优先权

[32] 2002. 5. 31 [33] US [31] 60/384,855

[32] 2002. 5. 31 [33] US [31] 60/384,856

[86] 国际申请 PCT/US2003/016896 2003. 5. 30

[87] 国际公布 WO2003/102140 英 2003. 12. 11

[85] 进入国家阶段日期 2005. 1. 31

[71] 申请人 儿童医院医疗中心

地址 美国俄亥俄州

[72] 发明人 杰弗里·A·惠蔡特

布鲁斯·J·阿罗诺

琼·C·京拉克

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 8 页 说明书 37 页 序列表 11 页
附图 8 页

[54] 发明名称 用于治疗囊性纤维化的 CFTR 修饰基因和表达的多肽以及检测和/或鉴定它们的方法和产品

[57] 摘要

本发明发现 CFTR 修饰基因，特别是 Kir4.2 基因，表达的多肽，及其遗传和多肽调节物，可用于治疗囊性纤维化(CF)，或至少引起 CF 的症状。还公开了检测和/或鉴定 CFTR 修饰基因，其各自表达的多肽，该 CFTR 修饰基因的遗传调节物，和其各自表达的多肽的调节物的方法和产品。还公开了使用这些 CFTR 修饰基因，其各自表达的多肽，这些 CFTR 修饰基因的遗传调节物，和/或 CFTR 修饰多肽调节物达到治疗 CF，或至少引起 CF 的症状的目的组合物和方法。

1. 治疗具有 CF-影响的细胞的受试者中的囊性纤维化的方法，包括步骤：给具有 CF-影响的细胞的受试者施用治疗有效量的选自由 CFTR 修饰多肽；CFTR 修饰基因的遗传调节物；CFTR 修饰多肽的调节物；或其组合组成的组中的一个成员。

2. 权利要求 1 的方法，包括给受试者施用由鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 α 亚基，膜糖蛋白，ras-相关性地塞米松诱导型蛋白(DEXRAS1)，ATP-敏感性输入矫正钾通道 14，锌指蛋白(Peg3)，分泌卷曲相关蛋白 sFRP-2，连接蛋白 37 间隙连接膜通道蛋白 $\alpha 4$ ，和人的造血特异性蛋白 1(GenBank 登录号 X84797)组成的组中的 CFTR 修饰多肽；选自由 Kir4.2，EST Affymetrix ID#92319，Repetin，SWAP-70，vq96e09.41，uo89c05.x1，Preproapelin，Caspase-12，胰岛细胞自身抗原 1，钠尿肽前体 A 型，U[-M-BH1-ang-b-04-0-U].s1，C88243，U[-M-BH0-ajq-h-03-0-U].s1，丁酰胆碱酯酶，同源框 A5，Wnt10a，囊性纤维化跨膜传导调节蛋白同源物，以及表 1 和 2 所列 CFTR 修饰基因组成的组中的 CFTR 修饰基因表达的 CFTR 修饰多肽；选自由表达鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 α 亚基，膜糖蛋白，ras-相关性地塞米松诱导型蛋白(DEXRAS1)，ATP-敏感性输入矫正钾通道 14，锌指蛋白(Peg3)，分泌卷曲相关蛋白 sFRP-2，连接蛋白 37 间隙连接膜通道蛋白 $\alpha 4$ ，和人的造血特异性蛋白 1(GenBank 登录号 X84797)，和那些被选自由 Kir4.2，EST Affymetrix ID#92319，Repetin，SWAP-70，vq96e09.41，uo89c05.x1，Preproapelin，Caspase-12，胰岛细胞自身抗原 1，钠尿肽前体 A 型，U[-M-BH1-ang-b-04-0-U].s1，C88243，U[-M-BH0-ajq-h-03-0-U].s1，丁酰胆碱酯酶，同源框 A5，Wnt10a，囊性纤维化跨膜传导调节蛋白同源物，以及表 1 和 2 所列 CFTR 修饰基因组成的组中的 CFTR 修饰基因所表达的 CFTR 修饰多肽的那些基因组成的组中的 CFTR 修饰基因的遗传调节物；选自鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 α 亚基，膜糖蛋白，ras-相关性地塞米松诱导型蛋白(DEXRAS1)，ATP-敏感性输入矫正钾通道 14，锌指蛋白(Peg3)，分泌卷曲相关蛋白 sFRP-2，连接蛋白 37 间隙连接膜通道蛋白 $\alpha 4$ ，和人的造血特异性蛋白 1(GenBank 登录号 X84797)，选自由 Kir4.2，EST Affymetrix ID#92319，Repetin，SWAP-70，vq96e09.41，uo89c05.x1，Preproapelin，Caspase-12，

胰岛细胞自身抗原 1, 钠尿肽前体 A 型, mSox7, U[-M-BH1-ang-b-04-0-U].s1, C88243, U[-M-BH0-ajq-h-03-0-U].s1, 丁酰胆碱酯酶, 同源框 A5, Wnt10a, 囊性纤维化跨膜传导调节蛋白同源物, 以及表 1 和 2 所列 CFTR 修饰基因组成的组中的 CFTR 修饰基因所表达的 CFTR 修饰多肽中的 CFTR 修饰多肽的调节物, 或其组合。

5 3. 权利要求 2 的方法, 包含给受试者施用 CFTR 修饰基因表达的 CFTR 修饰多肽, 所述 CFTR 修饰基因选自由 Kir4.2; 钾输入矫正通道, 成员 15; 亚家族 J, 成员 15; 溶质载体家族 38, 成员 4, 蛋白酶体(前体, macropain) 26S 亚基, ATPase 3; 和谷氨酸受体, 离子化, NMDA2D (ϵ 4)组成的组。

10 4. 权利要求 2 的方法, 包含给受试者施用 CFTR 修饰基因的遗传调节物, 所述 CFTR 修饰基因选自由 Kir4.2; 钾输入矫正通道, 成员 15; 亚家族 J, 成员 15; 溶质载体家族 38, 成员 4, 蛋白酶体(前体, macropain) 26S 亚基, ATPase 3; 和谷氨酸受体, 离子化, NMDA2D (ϵ 4), 囊性纤维化跨膜传导调节蛋白同源物和小鼠间隙连接蛋白基因连接蛋白 37 组成的组。

15 5. 权利要求 2 的方法, 包含给受试者施用 CFTR 修饰基因表达的 CFTR 修饰多肽的调节物, 所述 CFTR 修饰基因选自由 Kir4.2; 钾输入矫正通道, 成员 15; 亚家族 J, 成员 15; 溶质载体家族 38, 成员 4, 蛋白酶体(前体, macropain) 26S 亚基, ATPase 3; 和谷氨酸受体, 离子化, NMDA2D (ϵ 4), 囊性纤维化跨膜传导调节蛋白同源物和小鼠间隙连接蛋白基因连接蛋白 37
20 组成的组。

6. 权利要求 2 的方法, 包含给受试者施用 Kir4.2 基因表达的 CFTR 修饰多肽; Kir4.2 基因的遗传调节物; 或 Kir4.2 基因表达的 CFTR 修饰多肽的调节物。

25 7. 用于检测和/或鉴定选自由 CFTR 修饰基因, CFTR 修饰多肽, CFTR 修饰基因的遗传调节物, CFTR 修饰多肽的调节物及其组合组成的组中的一个成员的方法, 它包含步骤: 将含有潜在的 CFTR 修饰基因, CFTR 修饰多肽, CFTR 修饰基因的遗传调节物, CFTR 修饰多肽的调节物或其组合的样品与当样品中存在潜在的 CFTR 修饰基因, CFTR 修饰多肽, CFTR 修饰基因的遗传调节物, CFTR 修饰多肽的调节物, 或其组合时可识别的指示剂接
30 触。

8. 权利要求 7 的方法, 包含将含有潜在的 CFTR 修饰基因或 CFTR 修饰多肽的样品与上述指示剂接触。
9. 用于检测和鉴定 CFTR 修饰基因的方法, 包括步骤:
- 5 a. 提供 CFTR 突变型小鼠或不存在 CFTR 的小鼠;
- b. 从 CFTR 突变型小鼠分离编码 CFTR 突变多肽的遗传物质或从不存在 CFTR 的小鼠分离不编码 CFTR 的遗传物质; 和
- c. 使用该分离的遗传物质鉴定可补偿 CFTR 突变或 CFTR 缺乏时的基因表达的改变。
10. 检测和鉴定怀疑具有 CFTR 突变或可能不存在 CFTR 的人体中潜在的 CFTR 修饰基因的方法, 包括步骤:
- a. 从怀疑的人体分离可能编码 CFTR 突变型多肽的遗传物质或从可能不存在 CFTR 的人体分离不编码 CFTR 的遗传物质; 和
- b. 使用分离的遗传物质鉴定基因表达中与囊性纤维化或 CFTR 缺乏相关的任何潜在改变。
- 15 11. 用于筛选潜在的 CFTR 修饰基因, CFTR 修饰多肽, CFTR 修饰基因的遗传调节物, CFTR 修饰多肽的调节物, 和其组合的阵列, 该阵列包含具有附着到不同区域表面的多数生物学物质的基质, 所述生物学物质能够鉴定潜在的 CFTR 修饰基因, CFTR 修饰多肽, CFTR 修饰基因的遗传调节物, CFTR 修饰多肽的调节物或其组合。
- 20 12. 权利要求 11 的阵列, 其中所述生物学物质是选自由表达鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 α 亚基, 膜糖蛋白, ras-相关性地塞米松诱导型蛋白 (DEXRAS1), ATP-敏感性输入矫正钾通道 14, 锌指蛋白(Peg3), 分泌卷曲相关蛋白 sFRP-2, 连接蛋白 37 间隙连接膜通道蛋白 α 4, 和人的造血特异性蛋白 1(GenBank 登录号 X84797)的 CFTR 修饰基因组成的组中的 CFTR 修
- 25 基因; 选自由 Kir4.2, EST Affymetrix ID#92319, Repetin, SWAP-70, vq96e09.41, uo89c05.x1, Preproapelin, Caspase-12, 胰岛细胞自身抗原 1, 钠尿肽前体 A 型, mSox7, U[-M-BH1-ang-b-04-0-U].s1, C88243, U[-M-BH0-ajq-h-03-0-U].s1, 丁酰胆碱酯酶, 同源框 A5, Wnt10a, 囊性纤维化跨膜传导调节蛋白同源物, 表 1 和 2 所列的 CFTR 修饰基因组成的组
- 30 中的 CFTR 修饰基因; 或由任何这些 CFTR 修饰基因表达的 CFTR 修饰多肽; 和其组合。

13. 权利要求 12 的阵列，其中该生物学材料是 CFTR 修饰基因。

14. 权利要求 13 的阵列，其中该生物学材料是选自由表达鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 α 亚基，膜糖蛋白，ras-相关性地塞米松诱导型蛋白 (DEXRAS1)，ATP-敏感性输入矫正钾通道 14 的那些基因组成的组中的
5 CFTR 修饰基因；Kir4.2，EST Affymetrix ID#92319，Repetin，SWAP-70，
vq96e09.41，和 uo89c05.x1，表 1 所列的 CFTR 修饰基因，和其组合。

15. 权利要求 13 的阵列，其中该生物学材料是选自由表达分泌卷曲相关蛋白 sFRP-2，连接蛋白 37 间隙连接膜通道蛋白 α 4，和人的造血特异性蛋白 1(GenBank 登录号 X84797)的那些基因组成的组中的 CFTR 修饰基因；
10 Preproapelin，Caspase-12，胰岛细胞自身抗原 1，钠尿肽前体 A 型，mSox7，
U[-M-BH1-ang-b-04-0-U].s1，C88243，U[-M-BH0-ajq-h-03-0-U].s1，丁酰胆碱酯酶，同源框 A5，Wnt10a，囊性纤维化跨膜传导调节蛋白同源物，表 2 所列的 CFTR 修饰基因，和其组合。

16. 用于筛选潜在的 CFTR 修饰基因，CFTR 修饰多肽，CFTR 修饰基因的遗传调节物，CFTR 修饰多肽的调节物，或其组合的方法，该方法包含
15 步骤：将权利要求 10 的阵列与含有潜在的 CFTR 修饰基因，CFTR 修饰多肽，CFTR 修饰基因的遗传调节物，CFTR 修饰多肽的调节物或其组合的样品接触，该阵列具有与其相联的指示剂，该指示剂用于鉴定样品中是否存在潜在的 CFTR 修饰基因，CFTR 修饰多肽，CFTR 修饰基因的遗传调节物，
20 CFTR 修饰多肽的调节物，或其组合。

17. 用于筛选潜在的 CFTR 修饰基因的遗传调节物的方法，它包含步骤：将含有潜在的 CFTR 修饰基因的遗传调节物的样品与能够鉴定 CFTR 修饰基因的遗传调节物的报道基因转染的细胞培养物接触。

18. 权利要求 17 的方法，它包含接触样品的步骤，其中该报道基因
25 能够鉴定选自由表达鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 α 亚基，膜糖蛋白，ras-相关性
地塞米松诱导型蛋白(DEXRAS1)，ATP-敏感性输入矫正钾通道 14，锌指蛋白(Peg3)，分泌卷曲相关蛋白 sFRP-2，连接蛋白 37 间隙连接膜通道蛋白 α 4，和人的造血特异性蛋白 1(GenBank 登录号 X84797)的 CFTR 修饰基因组成的组中的 CFTR 修饰基因的遗传调节物；选自由 Kir4.2，EST Affymetrix
30 ID#92319，Repetin，SWAP-70，vq96e09.41，uo89c05.x1，Preproapelin，
Caspase-12，胰岛细胞自身抗原 1，钠尿肽前体 A 型，mSox7，

U[-M-BH1-ang-b-04-0-U].s1, C88243, U[-M-BH0-ajq-h-03-0-U].s1, 丁酰胆碱酯酶, 同源框 A5, Wnt10a, 囊性纤维化跨膜传导调节蛋白同源物, 以及表 1 和 2 所列的 CFTR 修饰基因组成的组中的 CFTR 修饰基因; 或由任何这些 CFTR 修饰基因表达的 CFTR 修饰多肽; 和其组合。

5 19. 权利要求 18 的方法, 它包含接触样品的步骤, 其中该报道基因能够鉴定选自由表达鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 α 亚基, 膜糖蛋白, ras-相关性地塞米松诱导型蛋白(DEXRAS1), ATP-敏感性输入矫正钾通道 14 的 CFTR 修饰基因组成的组中的 CFTR 修饰基因的遗传调节物; Kir4.2, EST Affymetrix ID#92319, Repetin, SWAP-70, vq96e09.41, 和 uo89c05.x1, 表
10 1 所列的 CFTR 修饰基因, 和其组合。

20. 权利要求 18 的方法, 它包含接触样品的步骤, 其中该报道基因能够鉴定选自由表达分泌卷曲相关蛋白 sFRP-2, 连接蛋白 37 间隙连接膜通道蛋白 $\alpha 4$, 和人的造血特异性蛋白 1(GenBank 登录号 X84797)的那些基因组成的组中的 CFTR 修饰基因的遗传调节物; Preproapelin, Caspase-12, 胰
15 岛细胞自身抗原 1, 钠尿肽前体 A 型, mSox7, U[-M-BH1-ang-b-04-0-U].s1, C88243, U[-M-BH0-ajq-h-03-0-U].s1, 丁酰胆碱酯酶, 同源框 A5, Wnt10a, 囊性纤维化跨膜传导调节蛋白同源物, 表 2 所列的 CFTR 修饰基因, 和其组合。

21. 筛选潜在的 CFTR 修饰多肽调节物的方法, 包括步骤: 将含有潜
20 在的 CFTR 修饰多肽的样品与能够鉴定 CFTR 修饰多肽的含有 CFTR 修饰基因的表达载体转染的细胞培养物接触。

22. 权利要求 21 的方法, 包含接触样品的步骤, 其中该表达载体含有选自由表达鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 α 亚基, 膜糖蛋白, ras-相关性地塞米松诱导型蛋白(DEXRAS1), ATP-敏感性输入矫正钾通道 14, 锌指蛋白
25 (Peg3), 分泌卷曲相关蛋白 sFRP-2, 连接蛋白 37 间隙连接膜通道蛋白 $\alpha 4$, 和人的造血特异性蛋白 1(GenBank 登录号 X84797)的那些基因组成的组中的 CFTR 修饰基因; 选自由 Kir4.2, EST Affymetrix ID#92319, Repetin, SWAP-70, vq96e09.41, uo89c05.x1, Preproapelin, Caspase-12, 胰岛细胞自身抗原 1, 钠尿肽前体 A 型, mSox7, U[-M-BH1-ang-b-04-0-U].s1, C88243,
30 U[-M-BH0-ajq-h-03-0-U].s1, 丁酰胆碱酯酶, 同源框 A5, Wnt10a, 囊性纤维化跨膜传导调节蛋白同源物, 表 1 和 2 所列的 CFTR 修饰基因组成的组

中的CFTR修饰基因;或由任何这些CFTR修饰基因表达的CFTR修饰多肽;和其组合。

23. 权利要求 22 的方法, 它包含接触样品的步骤, 其中该表达载体含有选自由表达鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 α 亚基, 膜糖蛋白, ras-相关性地塞米松诱导型蛋白(DEXRAS1), ATP-敏感性输入矫正钾通道 14 的那些基因组成的组中的 CFTR 修饰基因; Kir4.2, EST Affymetrix ID#92319, Repetin, SWAP-70, vq96e09.41, 和 uo89c05.x1, 表 1 所列的 CFTR 修饰基因, 和其组合。

24. 权利要求 22 的方法, 它包含接触样品的步骤, 其中该表达载体含有选自由表达分泌卷曲相关蛋白 sFRP-2, 连接蛋白 37 间隙连接膜通道蛋白 $\alpha 4$, 和人的造血特异性蛋白 1(GenBank 登录号 X84797)的那些基因组成的组中的 CFTR 修饰基因; Preproapelin, Caspase-12, 胰岛细胞自身抗原 1, 钠尿肽前体 A 型, mSox7, U[-M-BH1-ang-b-04-0-U].s1, C88243, U[-M-BH0-ajq-h-03-0-U].s1, 丁酰胆碱酯酶, 同源框 A5, Wnt10a, 囊性纤维化跨膜传导调节蛋白同源物, 表 2 所列的 CFTR 修饰基因, 和其组合。

25. 治疗具有 CF-影响的细胞的受试者中的囊性纤维化的方法, 包括步骤: 给具有 CF-影响的细胞的受试者施用治疗有效量的 CFTR 修饰基因的遗传调节物。

26. 权利要求 25 的方法, 包括施用选自由转录因子, 增强转录的原癌基因, 干扰素 γ 和其类似物, NF- κ B 及其类似物, 活化细胞的核因子, 钙通道激活剂, ets 因子试剂, GM-CSF; IL-6, IL-1 α , IL-1 β , INF- γ 和其类似物, cAMP 类似物, 腺苷酸环化酶激活剂, cAMP 磷酸二酯酶抑制剂, 视网膜样, 孤儿受体激活剂; 视黄酸受体激动剂, 视黄醇, 视黄酸和其类似物; 类固醇生成因子, 糖皮质激素, 糖皮质激素类似物, 盐皮质激素, 雌激素, 孕酮, 和其类似物; 倍他米松, Decadron, 和其混合物组成的组中的遗传调节物。

27. 权利要求 26 的方法, 其中给哺乳动物施用该遗传调节物。

28. 权利要求 27 的方法, 其中给人施用该遗传调节物。

29. 治疗具有 CF-影响的细胞的受试者中的囊性纤维化的方法, 包括步骤: 给具有 CF-影响的细胞的受试者施用治疗有效量的 CFTR 修饰多肽的多肽调节物。

- 并咪唑; 5-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-5-甲基-2-吡啶甲基)亚磺酰基]-(1H)-苯并咪唑和 5-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶甲基)亚磺酰基]-(1H)-苯并咪唑; 2-[2-(4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-乙酰基-6-甲基)-苯并咪唑; 2-[2-(4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(4,6-二甲基)-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-乙酰基-6-甲基)-苯并咪唑; 2-[2-(4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲酯基-6-甲基)-苯并咪唑; 2-[2-(4-乙氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲酯基-6-甲基)-苯并咪唑; 2-[2-(3-甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲酯基-6-甲基)-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲酯基-6-甲基)-苯并咪唑; 2-[2-(4-甲氧基-5-甲基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲酯基)-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-5-甲酯基)-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-乙酰基)-苯并咪唑; 2-[2-(4-甲氧基-5-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲氧基)-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲氧基)-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲基)-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-氯)-苯并咪唑; 2-[2-[3-甲基-4-(2,2,2-三氟乙氧基)吡啶基]甲基亚磺酰基]苯并咪唑(兰索拉唑); 2-[2-[3-甲基-4-(2,2,3,3-四氟丙氧基)吡啶基]甲硫基]苯并咪唑; 2-[(2-吡啶基)甲基亚磺酰基]苯并咪唑(thioprazole); 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶基)甲基亚磺酰基]-5-甲氧基-1H-苯并咪唑(奥美拉唑); 2-[2-[4-(3-甲氧基丙氧基)-3-甲基吡啶基]甲基亚磺酰基]-1H-苯并咪唑; 2-[2-(3,4-二甲氧基吡啶基)甲基亚磺酰基]-5-二氟甲氧基-1H-苯并咪唑(pantoprazole); 4-甲基-3-(2,2,2-三氟乙氧基)-5H-吡啶并[1',2':4,5][1,2,4]thiaziano[2,3-a] 苯并咪唑-13-鎓四氟硼酸盐, 其可药用的盐, 和其混合物组成的组中。
- 25 33. 权利要求 32 的方法, 其中给哺乳动物施用该多肽调节物。
34. 权利要求 33 的方法, 其中给人施用该多肽调节物。
35. 权利要求 32 的方法, 包含施用选自由毛喉素和 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤组成的组中的多肽调节物。

用于治疗囊性纤维化的 CFTR 修饰基因和表达的多肽
以及检测和/或鉴定它们的方法和产品

5

技术领域

本申请涉及用于治疗囊性纤维化(CF)，或至少引起 CF 的症状的 CFTR 修饰基因，及其表达的多肽。本申请还涉及使用调节该 CFTR 修饰基因的遗传调节物，以及使用多肽调节物影响各表达多肽的功能和/或活性。本申请还涉及检测和/或鉴定该 CFTR 修饰基因，各表达多肽的方法和产品，调节该修饰基因的表达的遗传调节物，和影响各表达多肽的功能和/或活性的多肽调节物。

背景技术

囊性纤维化(CF)是人类最常见的致命性遗传疾病。参见 Boat 等, *The Metabolic Basis of Inherited Diseases* (Scriver, C. R.等编, McGraw-Hill, New York (1989))。目前, 在美国有成千上万个 CF 病人。尽管现在有标准疗法, 但是存活平均年龄只有 26 岁。肺呼吸道疾病是发病的主要原因且导致 95 % 的死亡率。尽管在 CF 中许多器官受到影响, 但是该疾病的发病率和死亡率主要与肺内的粘液积聚, 复发性感染和过多炎症相关。

CF 相关性基因的蛋白产物称为囊性纤维化跨膜传导调节物(CFTR)。参见 Riordan 等, *Science* (1989) 245:1066-1073。CFTR 是由两个重复元件组成的大约 1480 个氨基酸的蛋白质, 其中每个元件包含 6 个跨膜片段和一个核苷酸结合结构域。两个重复元件被一个大型极性含有多个潜在的磷酸化位点的所谓 R-结构域分开。根据其预期的结构域结构, CFTR 是包括多药抗性(MDR)或 P-糖蛋白, 牛腺苷环化酶, 酵母 STE6 蛋白, 以及几个细菌氨基酸转运蛋白的一类相关蛋白质中的一个成员。参见 Riordan 等, *Science* (1989) 245:1066-1073; Hyde 等, *Nature* (1990) 346:362-365。这组蛋白质的特征在于与分子泵入或者泵出细胞相关。

已推定 CFTR 与通过环 AMP (cAMP)-依赖型蛋白激酶或蛋白激酶 C 的磷酸化响应调节阴离子流出上皮细胞。参见 Riordan 等, *Science* (1989) 245:1066-1073; Frizzell 等, *Science* (1986) 233:558-560; Welsh 等, *Nature*

(1986) 322:467; Li 等, *Nature* (1988) 331:358-360; Hwang 等, *Science* (1989) 244:1351-1353。尽管 CF 的发病机理不完全了解,但是据认为与 CFTR 缺陷相关的上皮细胞的环 AMP 依赖型氯化物分泌异常和过多的钠再吸收改变了呼吸道表面液体(ASL)的液体体内平衡,导致其脱水,粘膜纤毛清除率受损和感染。参见 Tarran 等, *Molecular Cell*, (2001) 8:149-58。由于阐明了 CFTR 的一级结构,已经将许多功能和许多与其它细胞蛋白的相互作用归因于 CFTR。因此,除了 CFTR 在调节 cAMP-依赖型氯运输中的作用外,该蛋白质通过与细胞骨架,膜转运蛋白,以及受体,蛋白途径选择和降解机制相互作用在许多细胞过程中发挥多效作用。参见 Welsh 等,“Cystic Fibrosis,” *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (8th Ed. 2001), 第 5121-88 页。

许多研究也支持在 CF 肺中发生过多炎症反应的观点,但是这些异常包含的机理尚不清楚。IL-8 和介导炎症信号的其它蛋白质,包括 NF κ B 和 iNOS 水平的改变与 CF 相关,不论是否存在感染,导致很可能在 CFTR 中的异常可组成型改变介导炎症的途径。参见 Khan 等, *Am J. Respir. Crit. Care Med.*, (1995) 151:1075-82; DiMango 等, *J. Clin. Invest.*, (1998) 101:2598-2605; Elmer 等, *Am. J. Physiol.*, (1999) 276:L466-73。

对 CF 染色体的 CFTR 基因进行序列分析揭示了各种引起疾病的突变。参见 Cutting 等, *Nature* (1990) 346:366-369; Dean 等, *Cell* (1990) 61:863:870; 和 Kerem 等, *Science* (1989) 245:1073-1080; Kerem 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87:8447-8451。事实上,在 CFTR 基因中超过 800 个不同的突变与 CF 的临床疾病特征相关。参见 Welsh 等,“Cystic Fibrosis,” *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (8th Ed. 2001), 第 5121-88 页。群体研究表明最常见的 CF 突变,即编码 CFTR 氨基酸序列第 508 位苯丙氨酸的 3 个核苷酸缺失(Δ F508),与大约 70% 的囊性纤维化病例相关。该突变导致与 cAMP 反应的上皮细胞氯离子通道失效。参见 Frizzell 等, *Science* (1986) 233:558-560; Welsh *Science* (1986) 232:1648-1650; Li 等, *Nature* (1988) 331:358-360; Quinton, *Clin. Chem.* (1989) 35:726-730。在呼吸道细胞中,这导致离子和液体运输不平衡。普遍认为这引起粘液分泌异常,并最终导致肺感染和上皮细胞损伤。

在肺部，CFTR主要分布在呼吸道顶端区域和粘膜下层腺体上皮细胞中。参见Engelhardt等，*J. Clin. Invest.*, (1994) 93:737-49。CFTR表达的丰度和细胞位点受发育，空间，和体液因素的强烈影响，支持了CFTR的表达和功能在转录和转录后水平上都受到调节的观点。尽管进行了广泛的研究，

5 但是对CFTR在CF疾病发病机理中的精确作用所知甚少。在临床水平上，CF疾病的严重性即使在带有相同突变的个体中也是高度变化的，这支持了环境和遗传因素可影响该疾病严重性的观点。参见Welsh等，“Cystic Fibrosis,” *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (8th Ed. 2001)，第5121-88页。这些临床观察结果，和证实在小鼠中CFTR基因靶向或突变后存在CF表

10 型严重性的品系差异的观察结果(参见Rozmahel等，*Nat. Genet.*, (1996), 12:280-87)，支持了CFTR的表达及其在细胞过程中的功能受到各种器官中加重或减轻CF疾病的许多基因或途径的影响的观点。

根据对 CF 基因的已有知识，目前采用三种全身性矫正方案(相对于致力于改善该症状的疗法)来逆转 CF 呼吸道中异常减少的氯(Cl⁻)分泌和增加的钠(Na⁺)吸收。据认为呼吸道上皮的电解质转运缺陷可改变呼吸分泌物和粘液的组成。参见 Boat 等，*The Metabolic Basis of Inherited Diseases* (Scriver, C. R.等编，McGraw-Hill, New York (1989)); Quinton, *FASEB J.* (1990) 4:2709-2717。因此，采用药理学治疗致力于矫正电解质转运的异常。用雾化形式的药物氨氯吡嗪脒，即一种抑制钠(Na⁺)通道，从而抑制钠吸收的利尿剂，进行的试验已有进展。初步结果表明该药物是安全的且表明通过肺功能检测测量的疾病进展速率略有改变。参见 Knowles 等，*N. Eng. J. Med* (1990) 322:1189-1194; App, *Am. Rev. Respir. Dis.* (1990) 141-605。诸如 ATP 或 UTP 的核苷酸刺激呼吸道上皮中的嘌呤能(purinergic)受体。因此，它们打开不同于 CFTR 氯(Cl⁻)通道的一类氯(Cl⁻)通道。体外试验表明 ATP 和 UTP

20 可刺激氯(Cl⁻)分泌。参见 Knowles 等，*N. Eng. J. Med.* (1991) 325-533。测试核苷酸刺激体内分泌，从而矫正电解质转运异常的能力的初步试验正开始进行。

对于所有药理学试剂，诸如药物毒性和给药的问题在开发治疗 CF 的合适药理学试剂中是重要的。对于 CF 治疗的药理学方案更基本的考虑是与

30 CFTR 相关的氯(Cl⁻)通道活性是否是导致该疾病状态的决定性特性。已有推测存在另一尚未鉴定的 CFTR 系统成份，它是一种关键性调节物，且如果

是这样,可能基于氯(Cl⁻)转运的药学方案可成功调节离子平衡,但仍然不能减轻基本生理学问题。参见美国专利号 5,639,661(Welsh 等),1997年6月17日出版。如果事实如此,那么可能基于氯(Cl⁻)转运的药学方案可成功调节离子平衡,但仍然不能减轻基本生理学问题。

- 5 治疗囊性纤维化的第二个方案,即“蛋白质取代”寻求给 CF 突变细胞递送有功能的重组 CFTR 直接增加缺少的 CFTR 活性。CF 的蛋白质取代疗法概念简单:即将在一些融合脂质体或重组病毒载体中配制的高纯度重组 CFTR 制品通过滴注法或气溶胶给药到呼吸道。然而,配制 CF 蛋白取代治疗剂的尝试遇到了许多困难。例如,CFTR 不是用于以前的蛋白质取代疗法或其它治疗用途的可溶性蛋白质类型。对于可在重组细胞中表达的具有生化活性的膜蛋白量也有限制。例如,文献中有报导 10^5 - 10^6 个分子/细胞代表其上限(参见 Wang 等,*J. Biol. Chem* (1989) 264:14424),相比之下,诸如 EPO, 胰岛素,生长激素,和 tPA 的分泌蛋白报导为 2000 个分子/秒/细胞。

- 10 除了表达能力有限外,CFTR,即一种膜结合蛋白的纯化比可溶性蛋白质的纯化更困难。膜蛋白需要在去污剂中溶解。然而,在去污剂存在下纯化 CFTR 表示是一个比可溶性蛋白所需的纯化过程更低效的过程。蛋白质取代方案的其它潜在的障碍包括:(1)由粘液堵塞和 CF 呼吸道中的环境有害特性引起的呼吸道上皮难以接近;(2)潜在的免疫原性;和(3)CFTR 与接受细胞的融合可能无效。

- 20 囊性纤维化治疗的第三个方案是基因治疗方案,其中将编码 CFTR 的 DNA 转移到 CF 缺陷型细胞(例如,呼吸道的细胞)。然而,将 DNA 导入细胞的方法一般是无效的。由于病毒以非常有效的方式将其核酸导入细胞,因此许多基因治疗方案利用改造的缺陷型病毒。然而,病毒载体接纳外源基因的空间有限。例如,尽管腺伴随病毒(AAV)在许多方面是一个有吸引力的基因治疗载体,但是它仅有 4.5 Kb 可用于接纳外源性 DNA。编码全长 CFTR 基因的 DNA 代表了其上限。另外,CF 的基因治疗方案与蛋白质治疗一样会面临许多相同的临床挑战。

- 25 尽管基于目前对编码 CFTR 的基因,表达的蛋白产物和作用机制的知识在开发治疗 CF 的疗法中有了重要进展,但是治疗 CF 的每一种方案都仍有障碍。CF 病人的发病率和死亡率与粘液积聚,炎症和感染引起的肺病强烈相关。然而,在小鼠中缺失 CFTR 并不引起明显的肺病,表明有替代通

道或其它补充基因表达来维持小鼠的肺部内环境稳定。事实上，已发现 CF 小鼠模型中的肺病是高度可变的。一般来说，在 CFTR 突变型小鼠中肺病可以是轻微或不存在的。这表明在肺内表达的其它基因强烈影响 CFTR 的功能。

5 尽管开发了许多体外和体内模型用于研究 CFTR，但是分析 CFTR 存在与否的基因组反应由于细胞模型的异质性和可独立于 CFTR 影响细胞功能和基因表达的培养条件而复杂化。对患有 CF 的人肺组织的直接 RNA 分析由于几乎普遍存在的严重肺感染而复杂化，该感染可再次修改细胞反应和基因表达，使得鉴定体内 CFTR 的反应复杂化。

10 因此，仍然需要揭示和鉴定可修饰或增强离子转运，氯(Cl⁻)转运或其它协同转运离子，以及 CFTR 影响的其它活性的基因或试剂。这样可提供鉴定 CF 的治疗靶，以及潜在的新基因，试剂和治疗 CF 的疗法的能力。具体地说，需要揭示或鉴定在治疗 CF 中更有效的影响离子转运，特别是氯(Cl⁻)转运的替代途径。

15 发明简述

本发明涉及发现 CFTR 修饰基因，且特别是 Kir4.2 基因，及其表达的多肽，可用于通过给缺乏表达 CFTR 的能力，或表达提供无效或低效 CFTR 功能和/或活性的突变 CFTR 的 CF-影响的细胞(CF-affected cell)提供补偿功能和/或活性来治疗囊性纤维化(CF)疾病。本发明还涉及发现了可调节该

20 CFTR 修饰基因表达的遗传调节物，以及影响各表达多肽的功能和/或活性的多肽调节物。

因此，本发明提供了检测和/或鉴定 CFTR 修饰基因，各自表达的 CFTR 修饰多肽，调节该 CFTR 修饰基因表达的遗传调节物，和影响各自表达的 CFTR 修饰多肽的功能和/或活性的调节物的方法和产品。本发明的检测/鉴定方法和产品的一些实施方案包括：(1)Kir4.2 基因和其它 CFTR 修饰基因及其表达的多肽作为筛选或测定可调节基因表达(即，基因调节物)，或可影响表达多肽的功能特性(即多肽调节物)的潜在试剂(例如，药物)的用途；

25 (2)CFTR-缺陷型转基因非人哺乳动物(例如，小鼠)用于鉴定潜在的 CFTR 修饰基因，及其各自表达的 CFTR 修饰多肽的用途；和(3)将含有 CFTR 修饰

30 基因和/或基因启动子的合适载体导入哺乳动物(人和非人)，酵母，或昆虫细胞或细胞系以便可在测定系统中使用基因表达或多肽功能和/或活性的改

变来检测和/或鉴定潜在的遗传和/或多肽调节物。

本发明还提供了使用这些 CFTR 修饰基因，其各自表达的多肽，以及其它试剂用于治疗 CF 的组合物和方法，包括：在含有或没有其它治疗或试剂的条件下，(1)使用遗传调节物调节 CF 影响的细胞中的 CFTR 修饰基因表
5 达；(2)使用多肽调节物影响(例如，增强)CF 影响的细胞中 CFTR 修饰多肽的功能和/或活性；(3)将 CFTR 修饰多肽递送到 CF 影响的细胞中；和/或(4)将 CFTR 修饰基因递送到 CF 影响的细胞中。

令人惊奇的是发现 Kir4.2，以及其它 CFTR 修饰基因意外地能够补偿 CFTR 缺乏，或存在低效或无效的突变 CFTRs(例如 CFTR Δ F508)以致于治
10 疗 CF，或至少引起 CF 的症状。具体地说，发现 Kir4.2 基因通过提供钾(K⁺)通道作为替代途径而意外地影响和加强氯(Cl⁻)离子转运。另外，惊奇地发现提供这些钾(K⁺)通道的 Kir4.2 基因表达的多肽可与诸如通过 CFTR-依赖型通道刺激氯(Cl⁻)离子转运的环 AMP (cAMP)刺激剂(例如，毛喉素和 IBMX)的各种试剂反应受到激活和/或调节。因此，由于 Kir4.2 激活也加强氯(Cl⁻)
15 离子转运，因此调节 Kir4.2 表达(在转录时或转录后)，或影响表达的 Kir4.2 多肽的功能和/或活性的药理学试剂也可有益地影响钾(K⁺)离子转运，从而影响氯(Cl⁻)离子转运。事实上，本发明的优势在于治疗 CF 的能力，它通过调节内源性 CFTR 修饰基因的表达和/或影响内源性 CFTR 修饰多肽的功能/活性通过替代途径(例如，对于 Kir4.2，通过钾(K⁺)通道)有益地影响离子转
20 运。

附图说明

图 1 是从 FABP-hCFTR/mCFTR(-/-) CFTR-缺陷型肠-矫正小鼠肺收获的 mRNAs 相对于野生型 CFTR (+/+)小鼠的差别表达筛选(p-值<0.05)模式图(相对强度在 y-轴,小鼠对的年龄增加在 x-轴绘图),显示 27 个基因,包括 Kir4.2
25 基因,它们是潜在的 CFTR 修饰基因。

图 2 是柱形图,显示 CFTR 缺陷型肠-矫正小鼠相对于野生型对照小鼠肺中的 Kir4.2 mRNA 增加。

图 3 是相对于对照的克隆化钾(K⁺)通道活性图,所述活性是 Kir4.2 基因对 cAMP 刺激剂(毛喉素与 IBMX 的组合)反应所表达的 (pA/pF 在 y-轴,以 mV 表示的 V_m 在 x-轴)。
30

图 4 显示 CFTR (-/-)和 CFTR (+/+)小鼠各 RNAs 分布图,左侧一组是 log 比率和基因频率的直方图,右侧一组是异常值方框图,其中以 x 和 y 标记表示的虚线末端是从其各自的四分值(quartile)鉴定的异常值。

图 5 是针对存在或不存在 CFTR 而明显改变的 315 个基因/表达序列标签(ESTs)的二维级系聚类(dimensional hierarchial clustering)图。

图 6 针对不存在 CFTR 而稳定改变的 54 个选定 RNAs 的表达谱图。

图 7 是图 6 的 54 个选定 RNAs 的各自级系聚类图。

图 8, 9, 10 和 11 分别代表显示对 Grind2d(图 8), Kir4.2(图 9), CEBP δ (图 10)和 TNFAIP3(图 11)的 mRNAs 进行实时 PCR 分析的柱形图。

图 12, 13, 14 和 15 分别是三月龄的 iFABP-hCFTR, CFTR (-/-)小鼠(图 13, 15)和 iFABP-hCFTR, CFTR (+/+)同窝小鼠(图 12, 14)固定后获得的肺组织的照片。

序列表的简要描述

SEQ ID NO:1 显示小鼠 Kir4.2 基因 cDNA 的核苷酸序列。

SEQ ID NO:2 显示小鼠 Kir4.2 基因表达的 Kir4.2 多肽。

SEQ ID NO:3 显示人 Kir4.2 基因 cDNA 的核苷酸序列。

SEQ ID NO:4 显示人 Kir4.2 基因 cDNA 的核苷酸序列变异体。

SEQ ID NO:5 显示人 Kir4.2 基因 cDNA 的核苷酸序列的另一变异体。

SEQ ID NO:6 显示 SEQ ID NOs. 3-5 的人 Kir4.2 基因表达的 Kir4.2 多肽。

SEQ ID NO:7 显示人 Kir4.2 基因 cDNA 的核苷酸序列的另一变异体。

SEQ ID NO:8 显示 SEQ ID NO. 7 的人 Kir4.2 基因表达的 Kir4.2 多肽。

发明详述

1. 定义

本文使用的术语“基因”是指携带编码多肽(例如,蛋白质)的信息的遗传物质的序列(例如, DNA 和 RNA)。

本文使用的术语“RNA”可互换地指 RNA, mRNA 或 tRNA。

除非本文另有说明,术语“多肽”是指蛋白质,多肽或肽。

本文使用的术语“载体”是指含有能够将核酸序列导入细胞,导致在该细胞中表达该核酸序列的 DNA 或 RNA,基本上由其组成,或由其组成的介质。

本文使用的术语“表达载体”是指携带可导入合适宿主细胞并在其中指导所编码的多肽表达或合成的基因或 cDNA 的修饰质粒或病毒。

本文使用的术语“质粒”和“克隆载体”可互换使用，是指能够在细胞中自主复制的，环形的，一般较小的染色体外 DNA 分子。

5 本文使用的术语“囊性纤维化跨膜传导调节多肽(Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator polypeptide)”或“CFTR 多肽”是指含有两个跨膜结构域(MSDs)，两个核苷酸结合域(NBDs)和单个 R 结构域的大约 1480 个氨基酸的蛋白质，其充当受磷酸化和核苷三磷酸调节的氯(Cl⁻)通道。术语“CFTR 多肽”也可指保留 CFTR 基因功能域的那些 CFTR 基因的部分。

10 本文使用的术语“CFTR Δ508”和“CFTR ΔF508”可互换使用，是指不能编码 CFTR 氨基酸序列第 508 位的苯丙氨酸产生的 CFTR 突变多肽。

本文使用的术语“囊性纤维化跨膜传导调节物(CFTR)功能或活性”是指一般由野生型 CFTR 完成的功能。该功能可包括介导，调节或控制离子，
15 (例如，氯(Cl⁻)离子)转运穿过细胞膜。

本文使用的术语“囊性纤维化(CF)-缺陷型或影响的细胞”是指由于缺少 CFTR，或者由于 CFTR 突变多肽不能提供 CFTR 功能和/或活性，或者提供的 CFTR 功能和/或活性低效而缺乏囊性纤维化跨膜传导调节功能的细胞。该细胞的例子包括至今鉴定的 1300 个不同变异体的 CFTR 突变体(例如，
20 CFTR ΔF508)。参见，例如，Kunzelmann 等，“Pharmacotherapy of the Ion Transport Defect in Cystic Fibrosis,” *Clin. Exper. Pharm. Phys.* (2001) 28:857-67; Welsh 等，“Molecular Mechanisms of CFTR Chloride Channel Dysfunction in Cystic Fibrosis,” *Cell* (1993) 73:1251-54。

本文使用的术语“CFTR 修饰基因”和“CFTR 补偿(compensatory)基因”可互换使用，是指能够补偿 CF-影响的细胞中的 CFTR 活性或功能，包括表达能够补偿 CF-影响的细胞中 CFTR 的功能和/或活性的多肽的基因。
25 CFTR 修饰基因的例子包括下列正调节基因：EST Affymetrix ID#92319 (可介导蛋白质运输的遍在蛋白家族成员)；鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 α 亚基(G 蛋白偶联的受体途径蛋白)；Repetin (GenBank 登录号 X99251)；膜糖蛋白 (GenBank 登录号 Z22552)；ras-相关性地塞米松诱导型蛋白
30 (DEXRAS1)mRNA；SWAP-70 mRNA；vq96e09.41 cDNA；锌指蛋白(Peg3)

mRNA; uo89c05.x1 cDNA; 和 ATP-敏感性输入校正钾通道 14(ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 14, GenBank 登录号 AI314692)。CFTR 修饰基因的例子还包括下列负调节基因: Preproapelin(GenBank 登录号 AB023494); Caspase-12(GenBank 登录号 Y13090); 胰岛细胞自身抗原 1(GenBank 登录号 U37186); 钠尿肽前体 A 型(Natriuretic peptide precursor type A, GenBank 登录号 K02781); mSox7(GenBank 登录号 AB023419); 分泌卷曲相关蛋白 (secreted frizzled related protein)sFRP-2(Sfrp2) mRNA(GenBank 登录号 U88567); U[-M-BH1-ang-b-04-0-U].s1 cDNA (GenBank 登录号 AW050325); C88243 cDNA(GenBank 登录号 C88243); U[-M-BH0-ajq-h-03-0-U].s1(GenBank 登录号 AI853682); IB3(GenBank 登录号 X79131); 丁酰胆碱酯酶(Butyrylcholinesterase) mRNA(GenBank 登录号 M99492); 同源框 A5(homeo box A5, GenBank 登录号 Y00208); 连接蛋白 37 间隙连接膜通道蛋白 α 4 (Connexin 37 Gap junction membrane Channel protein α 4, GenBank 登录号 X57971); Wnt10a mRNA(GenBank 登录号 U61969); 钙联接蛋白(Calnexin, GenBank 登录号 L18888); 囊性纤维化跨膜传导调节蛋白同源物(GenBank 登录号 M60493); 和相似于人的造血特异性蛋白 1 的 mRNA(GenBank 登录号 X84797)。补偿存在失效和/或低效 CFTR 突变体的 CF 疾病状态的基因本文也称为 CFTR 修饰基因。

下表是相对于 mCFTR (+/+)小鼠在 mCFTR (-/-)小鼠中发现受到正调节的其它基因:

表 1 受正调节的基因

基因	代号	比率	P-值	分类	登录号
包膜蛋白(env)基因, 3 末端	Env	4.02	1.19E-03	抗原	M90535
X-连接的淋巴细胞调节的 3b	X1r3b	2.25	1.48E-02	抗原	NM_011727
多肌炎/硬皮病自身抗原 2	Pmsc12	2.53	2.59E-02	抗原	NM_016699
钙结合蛋白-D9K	Calb3	1.77	3.33E-02	钙结合	NM_009789
磷酸甘油酸变位酶 2	Pgam2	2.09	9.10E-04	糖酵解代谢	NM_018870
钠尿肽受体 3	Npr3	2.37	4.85E-03	炎症反应	NM_008728
几丁质酶, 酸性	Chia-未决	1.50	8.75E-03	炎症反应	NM_023186
集落刺激因子 3 受体(粒细胞)	Csf3r	1.84	2.86E-02	炎症反应	NM_007782
肿瘤坏死因子, α -诱导蛋白 3	Tnfaip3	5.07	2.96E-02	炎症反应	NM_009397
小鼠(Mus musculus) 白介素 4(I1-4)mRNA, 完整编码区	I14	1.32	3.85E-02	炎症反应	U01310

白介素 1 β	I11b	1.67	5.38E-02	炎症反应	BC013644
S100 钙结合蛋白 A8 (钙粒蛋白 A)	S100a8	1.92	9.48E-03	炎症反应 / 钙结合	NM_013650
S100 钙结合蛋白 A9 (钙粒蛋白 B)	S100a9	2.39	1.93E-02	炎症反应 / 钙结合	NM_009114
钾输入矫正通道, 亚家族 J, 成员 15	Kcnj15	3.28	1.59E-02	离子转运	NM_019664
推定的衔接蛋白结合 Rho 亚家族的单体 GTPases	Mig-6/ 基因 33	2.12	2.16E-02	RHO GTPase 激活剂 / 炎症反应	NM_133753
父本表达的 3	Peg3	1.74	3.22E-02	信号转导	AB003040
分泌粒神经内分泌蛋白 1, 7B2 蛋白	Sgne1	6.76	4.33E-02	信号转导	NM_009162
claudin 8	Cldn8	2.86	4.16E-02	紧密连接 / 转运	BC003868
小鼠 c-fos 癌基因	c-Fos	1.75	3.87E-03	转录调节	V00727
时期同系物(果蝇)	Per	1.76	1.90E-02	转录调节	NM_011065
Kruppel-样因子 1 (红色)	K1fl	2.63	3.84E-02	转录调节	NM_010635
RARG-1:视黄酸可抑制蛋白	RARG-1	1.50	3.86E-02	转录调节	NM_023554
CCAAT/增强子结合蛋白 (C/EBP), δ	Cebpd	1.61	4.15E-02	转录调节	NM_007679
溶质载体家族 38, 成员 4	S1c38a4	2.03	1.95E-04	转运	NM_027052
蛋白酶体(前体, macropain) 26S 亚基, ATPase 3	Psmc3	1.54	2.45E-02	转运	NM_008948
EST, 肺内表达		3.92	2.98E-02	未知	BG869733
谷氨酸受体, 离子化, NMDA2D (ϵ 4)	Grin2d	3.50	4.46E-02	转运/受体	NM_008172
小鼠膜糖蛋白基因		1.62	5.73E-03	未知	Z22552
RIKEN cDNA 1100001G20	1100001G20Rik	1.56	1.74E-02	未知	AV006463

下表是相对于 mCFTR (+/+)小鼠在 mCFTR (-/-)小鼠中发现受到负调节的其它基因:

表 2 受负调节的基因

基因	代号	比率	P-值	分类	登录号
SA 大鼠高血压相关性同系物	Sah	-4.44	8.69E-04	血压调节	NM_016870
腺苷酸环化酶 4	Adcy4	-1.34	3.72E-02	CAMP 生物合成	NM_080435
形成素样	Fmnl	-2.21	1.04E-03	细胞生长	NM_019679
胰岛素样生长因子结合蛋白 2	Igfbp2	-1.23	6.99E-04	细胞生长	NM_008342
胰岛素样生长因子结合蛋白 7	Igfbp7	-1.38	4.23E-02	细胞生长	NM_008048
前胶原, XV 型	Col15a1	-2.07	4.30E-02	胶原	NM_009928
RAD51-样 1 (啤酒糖酵母)	Rad5111	-1.56	1.32E-02	DNA 重组/	NM_009014

				细胞生长	
神经丝, 重多肽	Nfh	-1.92	4.69E-05	中间丝体	M35131
衔接蛋白复合物 AP-2, $\alpha 1$ 亚基	Ap2a1	-1.52	3.72E-02	细胞内蛋白质运输	NM_007458
驱动蛋白家族成员 3a	Kif3a	-1.48	3.72E-02	细胞内蛋白质运输	NM_008443
ADP-核糖基化因子 5	Arf5	-1.34	1.06E-02	细胞内蛋白质运输	NM_007480
脂肪酶, 激素敏感性	Lipe	-2.34	1.82E-02	脂类代谢/细胞生长	NM-010719
Ki 抗原; PA28 γ 亚基的 Psme3 基因	Psme3	-1.57	5.44E-06	蛋白质降解	NM_011192
金属羧肽酶 1	CPX-1	-3.60	4.44E-03	蛋白质降解	NM_019696
卵黄囊基因 2	Ysg2	-3.21	1.38E-02	蛋白质降解	NM_011734
甲状旁腺激素前体(Pth)基因	Pth	-2.13	2.68E-03	信号转导	NM_020623
色氨酸 2,3-双加氧酶	Tdo2	-2.01	2.15E-02	信号转导	NM_019911
β -3-肾上腺素能受体	Adrb-3	-2.01	1.31E-02	信号转导	NM_013462
Janus 激酶 3	Jak3	-1.49	1.24E-02	信号转导	NM_010589
核受体亚家族 2, F 组, 成员 1	Nr2fl	-1.46	3.28E-03	信号转导	NM_010151
干扰素调节因子 1	Irf1	-1.19	8.51E-03	转录调节	NM_008390
囊性纤维化跨膜传导调节同系物	Cftr	-2.80	3.63E-07	转运	NM_021050
小鼠间隙连接蛋白基因连接蛋白 37	GJA4	-1.81	2.12E-02	转运/细胞-细胞通信	NM_008120
DNA 片段, Chr 4, ERATO Doi 13	D4Erttd13e	-2.07	4.45E-02	未知	AI842362
Riken cDNA 2700022J23 基因	2700022j2 3Rik	-1.45	3.72E-02	未知	AI853682

本文使用的术语“治疗囊性纤维化(CF)”, “囊性纤维化(CF)治疗”和类似术语包括给 CF 影响的细胞提供任何可检测的减小, 减轻, 改善, 受益或其它正面效果(直接或间接)的治疗, 以及对于引起 CF 或与 CF 相关的任何症状, 包括离子转运进出 CF 影响的细胞方面的缺陷, 提供任何可检测的减小, 减轻, 改善, 受益或其它正面改进的任何治疗。

本文使用的短语“CF 修饰基因治疗”是指将编码补偿 CFTR 功能和/或活性的遗传物质(例如, DNA 或 RNA)转移进 CF-影响的细胞以减小, 减轻, 或改善囊性纤维化(CF)的症状, 或者肯定地治疗囊性纤维化。

本文使用的术语“CFTR(+/-)”是指野生型 CFTR 小鼠。

本文使用的术语“CFTR(-/-)”是指 CFTR 缺陷型小鼠。

本文使用的术语“FABP-hCFTR”是指在转基因小鼠肠道表达的人 CFTR。

5 本文使用的术语“FABP- hCFTR/mCFTR(-/-)”是指 CFTR 缺陷型肠矫正的转基因小鼠。

本文使用的术语“CHO”是指中国仓鼠卵巢。

本文所用的术语“cAMP”是指环腺苷单磷酸。

本文所用的术语“SP-C”是指表面活性剂蛋白-C,位于哺乳动物和其它呼吸动物呼吸道的肺表面活性液体的主要成份。

10 本文所用的术语“SPC-h Δ 508”是指在 SP-C 启动子序列调节下在肺上皮细胞中表达人 CFTR Δ 508 的转基因小鼠。

本文所用的术语“Kir4.2 基因”是指输入矫正钾(K⁺)通道基因(inward rectifying potassium (K⁺) channel), 它表达充当钾(K⁺)通道的多肽且以前发现在发育期间的肾和肺中和在包括肾和脑的一些成人组织中表达。Kir4.2 基因

15 也称为 KIR4.2 或 KCNJ15, 且位于人第 21 号染色体上。参见 Gosset 等, “A New Inward Rectifier Potassium Channel Gene (KCNJ15) Localized on Chromosome 21 in the Down Syndrome Chromosome Region 1 (DCR 1),” *Genomics* (1997) 44:237-41, 引用该文献以供参考。与许多基因一样, 等位基因变异体可产生基本上相似的多肽, 且本文提供了来自人类的例子。小

20 鼠 Kir4.2 基因的 cDNA 具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列(GenBank 登录号 AF 085696), 而人 Kir4.2 基因的 cDNA 具有 SEQ ID NO:3(GenBank 登录号 NM_170737), SEQ ID NO:4 (GenBank 登录号 NM_170736), SEQ ID NO:5 (GenBank 登录号 NM_002243)或 SEQ ID NO:7 (GenBank 登录号 Y10745)所示的核苷酸序列。在不存在正常 CFTR, 和在存在 CFTR Δ 508 且无正常 CFTR

25 的条件下 Kir4.2 基因的表达水平升高。已发现 Kir4.2 可在肺呼吸道上皮的有关区域表达, 从而增加各 Kir4.2 多肽(小鼠如 SEQ ID NO:2 所示, 人如 SEQ ID NOs: 6 和 8 所示)的表达或增强该多肽的活性以绕过氯(Cl⁻)转运和细胞功能的 CFTR-依赖型缺陷。分析 Kir4.2 和 CFTR 基因的调控区显示出有许多相似性, 将其潜在的功能联系起来且证实了 Kir4.2 是一种 CFTR 修饰

30 基因的意外发现。对于与 Kir4.2 基因相关的其它基因家族成员参见 Durell 等, “A Family of Putative Kir Potassium Channels in Prokaryotes,” *BMC*

Evolutionary Biology (2001), 第 1-9 页; Fakler 等, “Heterooligomeric Assembly of Inward-Rectifier K⁺ Channels from Subunits of Different Subfamilies: Kir2.1 (IRK1) and Kir 4.1 (BIR10),” *Pflugers Arch- Eur. J. Physiol.* (1996) 433:77-83 (本文引用以供参考)。

5 本文使用的术语“基因启动子”是指调节, 控制或调整(例如, 刺激或抑制)特定基因表达的该基因的部分核苷酸序列。例如, 基因启动子可增强该基因的转录和/或翻译, 从而增加从该基因转录的 mRNA 水平。

本文所用的术语“基因表达”和“基因转录”可互换使用, 是指在 DNA 分子水平导致产生基因多肽产物的起始步骤。因此, 基因转录在本文中应
10 理解为结果是基因表达, 或者产生由所转录或表达的基因编码的多肽。

本文所用的术语“报道基因”是指导入细胞中的遗传物质, 通常是 DNA, 该报道基因在有利条件下在该细胞中表达, 以便指示达到了满足这些有利条件的标准。这些有利条件可包括, 但不限于, pH, 离子流, 存在合适的转录因子库, 或者其它细胞内分子或因子。

15 本文使用的术语“转录因子”是指在基因转录加工之前, 期间, 或者之后结合 DNA 或者导致其它多肽结合 DNA 的广泛细胞内多肽。

本文所用的术语“遗传调节物”是指调节基因表达的物质。在本发明中, 遗传调节物通常是指特别是在 CF 影响的细胞中增加或减少 CFTR 修饰基因表达的至少一种细胞多肽(例如, 蛋白质)的细胞内水平的物质。遗传调
20 节物可包括内源性细胞多肽, 药物试剂或其它生物学活性分子。

本文使用的术语“多肽调节物”是指在 CF 影响的细胞中能够影响(例如, 提高或降低)至少一种 CFTR 修饰多肽的细胞功能和/或活性的物质。多肽调节物可刺激, 增强, 或增加该多肽的功能和/或活性, 以及抑制或减小该功能或活性。本文所用的在 CF 影响的细胞中 CFTR 修饰多肽的功能和/或活性受多肽调节物影响以便直接或间接有益地调节, 控制或调整离子转
25 运(例如, 氯(Cl⁻), 钾(K⁺), 等)或者其它 CFTR 功能和/或活性, 以便减轻或者肯定地治疗 CF。

本文使用的术语“可药用的盐”是指化合物的无毒性盐(一般通过将游离酸与合适的有机或无机碱反应制备)且包括, 但不限于, 乙酸盐, 苯磺酸盐, 苯甲酸盐, 碳酸氢盐, 重硫酸盐, 重酒石酸盐, 硼酸盐, 溴化物, 钙,
30 camsylate, 碳酸盐, 氯化物, 棒酸盐, 柠檬酸盐, 二氢氯化物, 乙二胺四

乙酸盐, edisylate, estolate, esylate, 延胡索酸盐, gluceptate, 葡萄糖酸盐, 谷氨酸盐, glycolylarsanilate, hexylresorcinate, hydrabamine, 氢溴化物, 盐酸盐, 羧基甲酸盐, 碘化物, isothionate, 乳酸盐, 乳糖酸盐, 月桂酸盐, 苹果酸盐, 马来酸盐, mandlate, mesylate, 甲基溴化物, 甲基硝酸盐, 甲
5 基磺酸盐, 粘酸盐, napsylate, 硝酸盐, 油酸盐, 草酸盐, pamaote, 棕榈
酸盐, panthothenate, 磷酸盐, diphospate, 聚半乳糖醛酸盐, 水杨酸盐, 硬
脂酸盐, 次醋酸盐, 琥珀酸盐, 单宁酸盐, 酒石酸盐, teoclate, 甲苯磺酸
盐, triethiodide, 和戊酸盐, 以及这些盐的混合物。

本文使用的术语“试剂”, “药物”, 和“药品”可互换使用, 是指药学
10 组合物, 配制品或化合物, 包括用作遗传和/或多肽调节物的物质。

本文使用的术语“哺乳动物”是指人和非人哺乳动物, 包括灵长目(例
如, 人, 猴, 狒狒, 猕猴), 狗, 猫, 兔, 大鼠, 沙土鼠, 仓鼠, 小鼠, 马,
奶牛, 山羊, 和统称为哺乳动物的其它种类。

本文使用的术语“受试者”是指包括对 CF 易感的哺乳动物。该术语“受
15 试者”还试图包括转基因非人哺乳动物。“受试者”也称为本文可互换的“患
者”。

本文使用的术语“包含”是指在本发明中可结合使用的各种试剂, 组
合物, 化合物, 基因, 多肽, 成份, 步骤等。因此, 术语“包含”包括更
限制性的术语“基本上由其组成”和“由其组成”。

20 本文使用的所有量, 部分, 比率和百分数均按重量计, 除非另有说明。

2. CFTR 修饰基因, 遗传调节物和多肽调节物的检测和鉴定

本发明涉及发现了尽管缺乏 CFTR 基因表达, 或者表达不能提供或低
效提供 CFTR 功能或活性的突变 CFTR, 例如在患有 CF 疾病的受试者中发
现的情况, 但是在非人哺乳动物(例如, 小鼠)中可改变许多基因(即, 诸如
25 Kir4.2 基因的 CFTR 修饰基因)的表达以提供表面正常的肺功能。已发现这
些 CFTR 修饰基因的表达改变是一种代偿适应。由于丧失 CFTR 功能和/
活性在人类和其它非人哺乳动物(例如, 小鼠)中一般产生疾病, 因此该 CFTR
修饰基因可能补偿 CFTR 的作用, 特别是补偿 CFTR 表达的丧失。结果, 这
些补偿性 CFTR 修饰基因, 及其表达的多肽可恢复肺的内环境稳定且可用
30 于治疗 CF。

因此, 本发明涉及用于检测和/或鉴定 CFTR 修饰基因, 包括诸如表 1 所列的正调节基因, 以及诸如表 2 所列的负调节基因, 其表达的 CFTR 修饰多肽, 调节该修饰基因表达的遗传调节物, 和影响其各自表达的多肽的功能和/或活性的调节物的方法和产品。可使用各种生物学材料和方法检测和/或鉴定潜在的 CFTR 修饰基因及其各自表达的多肽, CFTR 修饰基因的潜在遗传调节物, 以及影响各自表达的多肽的功能和/或活性的潜在多肽调节物, 包括药物筛选; 试验; 生物学分子(例如, 核苷酸或多肽)的阵列和/或探针; 以及小鼠和其它非人哺乳动物模型。这些检测和鉴定方法和产品一般包括将含有潜在的 CFTR 修饰基因, CFTR 修饰多肽, CFTR 修饰基因的遗传调节物和/或 CFTR 修饰多肽的调节物的样品与一种指示剂接触, 当样品中存在潜在的 CFTR 修饰基因, CFTR 修饰多肽, CFTR 修饰基因的遗传调节物和/或 CFTR 修饰多肽的调节物时该指示剂可以识别出来。

用于检测和/或鉴定 CFTR 修饰基因, CFTR 修饰多肽, CFTR 修饰基因的遗传调节物和 CFTR 修饰多肽的调节物的合适的产品, 试剂盒, 和试验可以是阵列的形式; 探针; 杂交试验; 夹心试验; 使用 DNA 测序和通过杂交鉴定(包括使用不连续的多个探针的分析); 使用核苷酸和多肽的测序, 指纹法和作图; 和多肽(例如, 蛋白质)捕获试剂阵列。参见, 例如, 1995 年 8 月 29 日发布的美国专利号 5,445,934(Fodor 等); 2000 年 2 月 22 日发布的美国专利号 6,027,800(Cronin 等); 2000 年 4 月 4 日发布的美国专利号 6,045,996(Cronin 等); 美国专利号 6,077,673(Chenchik 等); 2001 年 7 月 31 日发布的美国专利号 6,268,210(Baier 等); 2001 年 8 月 7 日发布的美国专利号 6,270,961(Drmanac); 2002 年 3 月 12 日发布的美国专利号 6,355,432(Fodor 等); 且引用所有这些文献以供参考。例如, 对于阵列, 将表面包含多数(或更典型的是多样)生物学活性物质的基质附着到不同区域的表面, 该生物学物质能够鉴定潜在的 CFTR 修饰基因, CFTR 修饰多肽, CFTR 修饰基因的遗传调节物和/或 CFTR 修饰多肽的调节物。于是该阵列可用于筛选潜在的 CFTR 修饰基因, CFTR 修饰多肽, CFTR 修饰基因的遗传调节物和/或 CFTR 修饰多肽的调节物。例如, 该阵列可与含有潜在的 CFTR 修饰基因, CFTR 修饰多肽, CFTR 修饰基因的遗传调节物和/或 CFTR 修饰多肽的调节物的样品接触, 该阵列还具有与其相联的指示剂, 用于鉴定样品中是否存在潜

在的 CFTR 修饰基因, CFTR 修饰多肽, CFTR 修饰基因的遗传调节物和/或 CFTR 修饰多肽的调节物。

a. CFTR 修饰基因和多肽

5 检测和/或鉴定 CFTR 修饰基因的方法一般是寻找补偿 CFTR 表达或活性改变的基因。例如, 在具有转基因操作 CFTR 表达的非人哺乳动物(例如, 小鼠)中基因表达的改变可揭示出补偿 CFTR 表达或活性丧失(或减少)的那些基因。用于检测和/或鉴定 CFTR 修饰基因的方法和产品包括使用转基因非人哺乳动物作为测定 CF 疾病中基因表达改变的 RNA 来源。这些方法和产品一般包含将含有潜在 CFTR 修饰基因混合物的样品, 优选 mRNA 或总
10 细胞 RNA 的分离物与当样品中存在潜在的 CFTR 修饰物 mRNA 时可进行识别的指示剂接触。这些方法和产品包括, 但不限于 RT-PCR, Northern 印迹, 微阵列, 实时 PCR, 或诸如 Affymetrix 的基因芯片技术。例如, 可从具有全身性或肺特异性 CFTR 基因突变的转基因小鼠分离含有未知 mRNAs 混合物的 mRNA 样品, 然后测定可改善 CF 疾病影响的基因表达的改变。该转
15 基因小鼠可包括具有转基因肠特异性表达 CFTR 使得 CFTR-无效突变型小鼠活过成年期的 CFTR-无效突变小鼠。还包括使用具有肺特异性转基因表达人 $\Delta 508$ -突变型 CFTR 基因的 CFTR 无效突变型小鼠。在包含使用 CFTR-缺陷型转基因小鼠鉴定可补偿 CFTR 表达或活性改变, 例如在 CF 疾病中出现的
20 那些改变或突变的 CFTR 修饰基因的方法中, 从患有 CF 疾病的任何器官或组织, 包括但不限于, CFTR-缺陷型小鼠的上呼吸道上皮, 肺, 胰腺, 和肠收获 RNA。

该检测和/或鉴定方法的一个实施方案包括如下步骤: (1)提供 CFTR 突变型小鼠或不存在 CFTR 的小鼠(例如, 通过转基因表达 CFTR 突变基因或者通过 CFTR 基因的基因定向突变);(2)从 CFTR 突变型小鼠分离编码 CFTR
25 突变型多肽的遗传物质(通常是 RNA)或从小鼠分离不编码 CFTR 的遗传物质; 和(3)使用该分离的遗传物质鉴定可补偿 CFTR 突变或 CFTR 缺乏时的基因表达的改变。

优选的是该突变 CFTR 基因在缺少内源性 CFTR 或者具有 CFTR-缺陷型的非人哺乳动物(例如, 小鼠)中表达, 以便该突变基因是感兴趣的组织,
30 例如肺中的唯一 CFTR 来源。使用 Affymetrix 或其它基因芯片可分析来自具有突变 CFTR 的转基因小鼠的样品中的 mRNA 表达水平并与野生型小鼠该

样品中的 mRNA 表达水平(即, 对照)进行比较以测定那些基因具有潜在可补偿受损的 CFTR 功能和/或活性的表达水平改变。然后进一步分析这些潜在的 CFTR 修饰基因以证实它们通过补偿 CFTR 功能和/或活性的丧失(或受损)改变肺的内环境稳定。该验证通常包括在该基因的表达低下或不可检测的细胞类型中表达该基因, 并测定它编码的多肽的功能和/或活性。验证也可包括产生具有缺失, 错误表达, 或过量表达所述基因的转基因小鼠以证实其作为 CFTR 修饰基因的推定作用。

也可使用本领域的技术人员已知的任何蛋白微阵列(proteomic)测定系统测定基因表达的定性和定量改变。参见, 例如, 2002 年 4 月 2 日发布的美国专利 6,365,418(Wagner 等)(本文引用以供参考)中可用于该测定系统的多肽(例如, 蛋白质)捕获试剂阵列。可从本文所述的人或非人哺乳动物收获组织或器官, 分级分离以分离蛋白质混合物, 并用于测定多肽功能和/或活性的定性和/或定量改变。转基因非人哺乳动物, 例如, CFTR-缺陷型肠-矫正小鼠或表达突变 CFTR 的 CFTR-缺陷型小鼠, 以及具有对 CFTR 基因的其他突变, 包括基因定向突变的小鼠, 可用于使用蛋白微阵列方法检测和/或鉴定 CFTR 修饰基因。用于该分析的蛋白微阵列技术的一个例子是 CypherGen 系统。可匀浆从诸如 FABP-hCFTR/mCFTR(-/-)小鼠的小鼠收获的组织或器官并分级分离以分离多肽混合物; 然后将具有多肽结合表面的芯片与多肽混合物接触, 然后使用生物信息分析测定与芯片表面结合的多肽特性。

b. CFTR 修饰基因和多肽的调节物

本领域称为基因启动子的基因区域可用于测定系统中以检测和/或鉴定哪些试剂可潜在调节特定 CFTR 修饰基因的表达。一般来说, 基因启动子包含被细胞内产生的反式作用因子识别且随后结合的一组顺式元件。这些反式作用因子的 DNA 结合活性调节任何细胞内所有基因的表达。一般来说, 反式作用因子是称为转录因子的多肽。一些转录因子是刺激型且提高基因表达的水平, 而另一些是抑制型且降低表达水平。各细胞类型与其它细胞类型相比表达细胞特异性的一组特有或重叠的因子。各基因启动子需要特异性的一组转录因子。因此, 细胞的表型很大一部分依赖于该细胞内表达的一组转录因子。

可用报道基因构建体开始分析基因启动子中的启动子元件，其中基因启动子与表达载体内的报道基因相连。可将报道基因构建体导入培养细胞的同源群体中，例如永生哺乳动物细胞系或其它合适的细胞系或类型的群体中。如果该细胞表达足够量的报道基因构建体中启动子所需的转录因子，那么该启动子将引起报道基因表达。然后可测量报道基因表达的多肽量以测定由：(1)转录因子的量或活性；和(2)启动子序列中存在所需的顺式元件，产生的启动子活性水平。

由于转录因子是多肽，其活性可通过多肽调节剂调节或影响。因此，可将基因启动子放在报道基因构建体中，转染进合适的细胞类型，并用于鉴定通过首先影响结合待测基因启动子顺式元件的转录因子活性而间接调节报道基因表达的试剂。这样提供了开发用于检测和/或鉴定可调节 CFTR 修饰基因表达的潜在遗传调节物的方法和产品的能力。

为了构建报道基因，可使用质粒克隆载体构建包含与报道基因编码序列可操作地连接的待测基因启动子的 DNA 分子。该载体中还包括哺乳动物内含子和 SV-40 Poly A 序列。报道基因可包括氯霉素转移酶，LacZ，绿色荧光蛋白(GFP)，萤光素酶，或任何其它合适的报道基因。使用包括磷酸钙或氯化钙共沉淀，DEAE 葡聚糖介导的转染，脂转染，或电穿孔的任一本领域的技术人员熟知的各种技术可将该构建体导入细胞中。细胞可用单一试剂处理，或扩增并接种在 96-或 384-孔平板上用于大规模筛选。这样允许筛选药物文库或组合文库以检测和/或鉴定潜在的用作遗传调节物的试剂，该试剂用于活化内源性转录因子或调节基因转录的其它细胞过程。也可测序基因启动子序列并使用生物信息学分析以确定启动子序列中编码的潜在顺式元件。

在一个实施方案中，将启动子区域，例如 Kir4.2 基因的启动子区域与 CFTR 和肺表面活性蛋白-D 的启动子区域进行了比较。与小鼠中的 Kir4.2 和 CFTR 共有元件的例子包括 cAMP 反应元件结合蛋白(CREBP)，C-Ets-1，cut-iMe 同源域蛋白，肝核因子 1，慢病毒 Poly A 信号结合蛋白，活化 T-细胞的核因子(NFAT)，ocatmer-结合因子 1，Pax-3，PU.1，逆转录病毒 Poly A 下游元件结合蛋白，STAT，和 RFX1。因此，这些转录因子是可调节 Kir4.2 表达的试剂的靶子。

在另一实施方案中，也可将包含诸如 Kir4.2 的 CFTR 修饰基因启动子区域的报道基因构建体转染进培养的细胞中以提供鉴定 CFTR 修饰基因遗传调节物的测定法。可从本文所述的小鼠收获肺上皮细胞或来自其它器官的细胞的原代培养物并用于一种测定法，该测定法用于鉴定可充当 CFTR 5 修饰基因的遗传调节物和/或充当 CFTR 修饰多肽的调节物的试剂。可使用包括磷酸钙或氯化钙共沉淀，DEAE 葡聚糖介导的转染，脂转染，或电穿孔的任一本领域的技术人员熟知的各种技术将该构建体导入细胞中。转染的细胞可包括但不限于原代的，转化的，或永生化的细胞。转染的细胞的来源可包括，但不限于哺乳动物(人和非人)，酵母，或昆虫细胞。细胞可用单 10 一试剂处理，或扩增并接种在 96-或 384-孔平板上用于大规模筛选。这样允许筛选药物文库或组合文库以检测和/或鉴定潜在的用于激活内源性转录因子或促进 CFTR 修饰基因转录的其它细胞过程的试剂。

在测定系统中可使用 CFTR 修饰基因的多肽编码区，或多肽本身以检测和/或鉴定潜在充当多肽调节物的试剂。使用 CFTR 修饰基因(例如，Kir4.2 15 基因)及其表达的多肽检测和/或鉴定多肽调节物的方法和产品包括：(1)用于筛选潜在试剂的细胞培养物测定检测系统；和(2)用潜在的试剂进行实验处理后表达的 CFTR 修饰多肽的蛋白微阵列测定法。

在细胞培养物测定检测系统中，可将 CFTR 修饰基因导入任何广泛的细胞类型中并在其中表达。然后可使用表达 CFTR 修饰基因的细胞筛选组 20 合文库或独立的化合物或药物中可影响该表达多肽的功能和/或活性的物质(即，是多肽调节物)。转染的细胞可包括但不限于原代的，转化的，或永生化的细胞。转染的细胞的来源可包括但不限于哺乳动物(人和非人哺乳动物)，酵母，或昆虫细胞。转染方法可以是包括磷酸钙或氯化钙共沉淀，DEAE 葡聚糖介导的转染，脂转染，或电穿孔的任一本领域的技术人员熟知的各 25 种技术。转染的细胞可用单一试剂处理，或扩增并接种在 96-或 384-孔平板上用于大规模筛选。可通过使用指示剂染料，荧光，化学发光，或反映离子浓度改变的其它指示剂方法测量或测定 CFTR 修饰多肽的活性。指示剂染料，荧光，化学发光，用于该目的的其它指示剂方法的使用是本领域的技术人员熟知的。

30 在该检测和/或鉴定方法的一个实施方案中，将诸如小鼠 Kir4.2 cDNA 核苷酸序列的 CFTR 修饰基因 cDNA 核苷酸序列放在含有人巨细胞病毒启

5 动子, 哺乳动物内含子, 和 SV-40 poly-A 序列的表达载体中。将含有 Kir4.2 的表达载体稳定转染进 CHO 细胞中。Kir4.2 mRNA 可通过 RT-PCR 检测, 且 Kir4.2 多肽可通过 Western 印迹检测, 从而证实表达了 Kir4.2 cDNA。用诸如毛喉素和/或 IBMX 的 cAMP-刺激剂处理该细胞。实验处理后, 通过与未转染的细胞进行比较可测定钾(K⁺)离子流的增加。

使用本领域的技术人员已知的任一蛋白微阵列测定系统也可测定 CFTR 修饰多肽表达水平的定性和定量改变。在上述细胞培养物测定检测系统中鉴定的试剂可用于进一步的体外或体内处理。细胞可来自本文所述的任何细胞培养物测定系统, 或者来自任何本文所述的动物。可收获细胞或组织, 分级分离以分离蛋白质混合物, 并测定反映实验处理的 CFTR 修饰多肽功能和/或活性的改变。检测和/或鉴定潜在多肽调节物的方法包括使用转基因非人哺乳动物, 例如, 肠-矫正的 CFTR-缺陷型小鼠, FABP-hCFTR/mCFTR(-/-)或表达突变 CFTR 的 CFTR-缺陷型小鼠, 用于蛋白微阵列试验的 SPC-hΔ508/FABP-hCFTR/mCFTR(-/-), 以及具有对 CFTR 基因
10 15 15 的其它突变, 包括基因定向突变的小鼠作为按本发明方法进行实验处理的模型系统。另外, 野生型小鼠和其它非人哺乳动物物种也可用作试验动物以测定影响 CFTR 修饰多肽功能和/或活性的试剂的效力。该试剂经实验给药后, 可收获这些动物的器官和组织并测定 CFTR 修饰多肽表达的改变。

3. CFTR 修饰基因, 多肽和调节物的用途

20 本发明还涉及使用 CFTR 修饰剂基因, 包括表 1 所列的正调节基因, 以及表 2 所列负调节基因, 其各自表达的多肽, CFTR 修饰基因的遗传调节物, 和/或 CFTR 修饰多肽的多肽调节物治疗 CF, 或至少 CF 引起的症状, 包括调节, 控制或调整 CF-影响的细胞的离子转运。CFTR 修饰基因, 各自表达的多肽, 遗传调节物和多肽调节物可单独用于治疗 CF, 或者可结合用于治疗
25 25 治疗 CF。例如, 可使用遗传和多肽调节物联合治疗 CF。

a. CFTR 修饰基因表达的遗传调节物

用于本发明的 CFTR 修饰基因, 且特别是 Kir4.2 基因, 的合适遗传调节物包括转录因子(例如, AP1, PU.1); 增强转录的原癌基因; 干扰素 γ 和其类似物; 巴比妥盐及其类似物; NF- κ B 及其类似物; 活化细胞的核因子
30 30 和钙通道激活剂; PU.1, 例如 ets 因子试剂和 GM-CSF; IL-6, IL-1 α , IL-1 β , INF- γ 和其类似物; cAMP 类似物, 腺苷酸环化酶激活剂和 cAMP 磷酸二酯

酶抑制剂；视网膜样和孤儿受体(orphan recaptor)激活剂，视黄酸受体激动剂，视黄醇，视黄酸和其类似物；类固醇生成因子(steriodogenic factor)，糖皮质激素和糖皮质激素类似物，盐皮质激素，雌激素，孕酮，和其类似物；倍他米松(betamethasone)，Decadron；和其混合物。

- 5 已经发现 CFTR 修饰基因，且特别是 Kir4.2 基因，可直接或间接影响细胞，特别是 CF 影响的细胞，的离子转运进出，具体地说，可影响 CF 影响的细胞的氯(Cl⁻)离子运出。具体地说，已经发现影响基底外侧钾(K⁺)离子运输的 Kir4.2 基因也可加强(直接或间接)顶端氯(Cl⁻)离子运输。这意味着 Kir4.2 基因的刺激或表达增加可增强正常的且特别是 CFTR-受损的细胞中的氯(Cl⁻)离子运输，且因此可绕过据信引起 CF 的氯(Cl⁻)转运和细胞功能的 CFTR-依赖型缺陷。

- 10 CFTR 修饰基因调节物可配制成治疗组合物或包装药品用于治疗患有 CF 的受试者。治疗组合物包括治疗有效量的至少一种上述遗传调节物和任选一种可药用的载体。包装药品包括至少一种上述遗传调节物，任选一种可药用的载体，和施用该遗传调节物治疗患有 CF 的受试者的说明书。说明书可书写或打印在纸片上，可与包装药品包装在一起，可以是能够加载，安装(直接或者通过远程下载，例如通过 LAN，WAN 或互联网)，或者能通过计算机，个人数字助手(PDA)或其它电子装置读取的电子介质或软件的形式(例如，软盘或 CD ROM 磁盘)，或者是提供如何施用该遗传调节物治疗患有 CF 的受试者的说明的任何其它方法。

- 20 尽管上述遗传调节物可单独给药，但是它们优选作为药用配制品的一部分给药。该配制品可包含本领域的技术人员已知的可药用的载体，以及其它治疗剂。也可预期本发明的遗传调节物可以各种可药用的形式，例如，作为其可药用的盐给药。

- 25 根据本发明给药的遗传调节物和配制品的合适剂量依赖于 CFTR 突变或缺陷的类型，和所治疗的症状的严重性，且也可根据不同的受试者而变化。测定可接受的或最佳的剂量一般包含平衡治疗效益的水平与本发明的剂量和治疗的任何危险或有害副作用。对于“治疗有效”的剂量，必须具有所需效果，即，调节本文限定的 CFTR 修饰多肽的表达，从而导致受试者的有益改善，例如用该剂量治疗的 CF-影响的细胞离子转运(例如，Cl⁻分
- 30

泌)改善。最佳剂量可以是当给患有 CF 的受试者给药时, 导致例如, 离子转运(例如, 氯(Cl⁻)分泌)改善到或接近野生型 CFTR 水平的剂量。

除了该遗传调节物, 本发明的药用配制品也可包含也帮助缓解 CF 症状的其它化合物和/或组合物, 包括下文所述的 CFTR 修饰多肽调节物。本发明提供了治疗 CF 的药用配制品, 它包含安全且治疗有效量的上述合适遗传调节物, 可药用的载体, 和安全且治疗有效量的下述 CFTR 修饰多肽调节物。该遗传调节物可与一个以上的多肽调节物组合。遗传调节物与多肽调节物的比例依赖于各单个化合物所需的剂量。优选的是, 该多肽调节物可作为可药用的水溶液给药, 其中该药用配制品包含: (1)从大约 0.001%到大约 10%的遗传调节物; (2)从大约 10%到大约 99%的可药用的载体; 和(3)从大约 0.001%到大约 10%的下文所述的多肽调节物。

含有或不含有可药用的载体和/或其它多肽调节物的遗传调节物的给药可以通过任何合适的途径, 包括口, 鼻, 局部(包括颊和舌下), 肠胃外(包括皮下, 肌内, 静脉内和真皮内), 阴道或直肠, 优选口和鼻给药。因此该配制品包括适合于通过该途径给药的那些配制品。可预料到优选途径可随例如, 受试者的状况和年龄而变化。该配制品适合于以单位剂量形式提供, 例如, 片剂和持续释放的胶囊, 且可通过药学领域的技术人员熟知的任何方法制备和给药, 包括脂质体传递系统。

适合于口服给药的本发明的配制品可以为分离的单位, 例如胶囊, 扁囊剂或片剂, 为粉末或颗粒, 或者为溶液, 悬液或乳剂。片剂形式可包括一种或多种乳糖, 甘露醇, 玉米淀粉, 马铃薯淀粉, 微晶纤维素, 阿拉伯胶, 明胶, 二氧化硅胶体, croscarmellose sodium, 滑石粉, 硬脂酸镁, 硬脂酸, 和其它赋形剂, 着色剂, 稀释剂, 缓冲剂, 加湿剂, 防腐剂, 调味剂和药用上相容的载体。适合于口腔局部给药的配制品还包括在合适的基质或液体载体中给药的锭剂, 糖锭, 漱口剂和吸入雾剂。锭剂形式可包含在诸如蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶中的活性成份, 以及含有在诸如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶乳剂, 凝胶的惰性基质中的活性成份的糖锭和含有除了活性成份外的诸如本领域已知的载体的类似物。适合于局部施用于皮肤的配制品可作为含有待给化合物和可药用的载体的软膏, 乳膏, 凝胶和糊剂, 或者以经皮肤的膏药提供。

适合于鼻给药的配制品如果载体是固体则包括颗粒大小为，例如大约 20 至 500 微米，可通过鼻通道迅速吸入给药的粉末。如果载体是液体则合适的配制品可作为，例如，鼻喷雾剂或滴剂给药。适合于通过吸入给药的配制品包括放入加压的诸如二氯二氟甲烷，三氯氟甲烷，丙烷，氮等的可接受的推进剂中的气溶胶配制品。该活性剂可用合适的赋形剂烟雾化。为了吸入给药，该配制品优选以这样的浓度溶于或分散于诸如水或盐水的液体形式中，即在该浓度下该组合物充分溶解且在可吸入的体积内可给药合适的剂量。合适的剂量应为每天将每升大约 0.001 至大约 5.0 mmol 的组合物放在呼吸道表面大约 4 次。给药可一天重复几次，依赖于选择的特定剂量和选择的组合物从呼吸道清除的速率，目的是维持呼吸道上皮细胞的通透性。可通过喷雾器或标明剂量的吸入器给药。用于遗传调节物的气溶胶给药的合适方法也在 1996 年 8 月 6 日发布的美国专利 5,543,399 (Riordan 等); 1997 年 6 月 24 日发布的美国专利 5,641,662 (Debs 等); 1998 年 10 月 27 日发布的美国专利 5,827,703 (Debs 等); 1998 年 5 月 26 日发布的美国专利 5,756,353(Debs); 1999 年 1 月 12 日发布的美国专利 5,858,784 (Debs 等); 1999 年 9 月 7 日发布的美国专利 5,948,681 (Scanlin 等); 和 1999 年 12 月 14 日发布的美国专利 6,001,644 (Debs 等)中公开，引用所有这些文献以供参考。

适合于肠胃外给药的配制品包括可含有抗氧化剂，缓冲剂，制菌剂和导致该配制品与目的接受者血液等渗的溶质的含水和无水的无菌注射溶液；和可包含悬浮剂和增稠剂的含水和无水无菌悬液。适合于静脉内和腹膜内给药的配制品可包括，例如，可含有抗氧化剂，缓冲剂，制菌剂和导致该配制品与目的接受者血液等渗的溶质的含水和无水的，等渗无菌注射溶液和可包含悬浮剂，增溶剂，增稠剂，稳定剂，和防腐剂的含水和无水无菌悬液。该配制品可以在单位容器或多剂量容器中，例如，密封的安培和小瓶中，且可以是冻干的，仅需要在使用前临时加入诸如注射水的无菌液体载体。可从前面所述类型的无菌粉末，颗粒和片剂制备临时注射溶液和悬液。

适合于阴道给药的配制品可作为子宫托，栓塞，乳膏，凝胶，糊剂，泡沫剂或喷雾剂给药。直肠给药的配制品可作为含有合适基质的栓剂提供。

b. CFTR 修饰多肽的功能或活性的调节物

CFTR 修饰多肽，且特别是 Kir4.2 多肽，的功能和/或活性的合适调节物包括本领域的技术人员已知的对于缓解 CF 症状有用的剂量的激活靶细胞中腺苷酸环化酶的试剂，例如，肾上腺素能试剂，catalamines，cAMP 激动剂和 cAMP 添加剂，例如毛茛素，异丙肾上腺素和沙丁胺醇(albuterol)，
5 cAMP 及其类似物；各种多肽激素，例如，刺激 cAMP 的血管升压素；抑制 cAMP 降解的 cAMP 磷酸二酯酶抑制剂，例如烷基黄嘌呤，茶叶碱和氨茶碱；cAMP-特异性抑制剂，例如 Rolipram (Shearing AG)，糖皮质激素，TGF- β (SMAD₃)；钾 K_{ATP} 通道开启剂，例如 cromakalim，吡那地尔(pinacidil)，尼可地尔(nicorandil)，硫酸米诺地尔(nimoxidil sulphate)，aprikalim，二氮嗪
10 (diazoxide)；钾 BK_{Ca} 通道开启剂，例如 NS004，苯并咪唑酮，例如 1-乙基-2-苯并咪唑酮(1-EBIO)，fenamates，dehydroxoyasaponin-I (DHS-I)，maxikdiol，cromakalim，niredipine，和根皮素；UTP，8-氧化补骨脂素 (Methoxsalen, 8-MOP)，和染料木黄酮；钙离子激动剂，例如离子霉素，A23187，碳酰胆碱，缓激肽，耐久霉素和毒胡萝卜素；人 DNase 1；钠通道
15 抑制剂，例如阿米洛利(amiloride)和三氨蝶呤(triamterene)；胰酶添加剂；及其混合物。

用于本发明的合适的烷基黄嘌呤包括甲基黄嘌呤，例如 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMX)和 1,3-二甲基黄嘌呤(茶叶碱)和其它黄嘌呤，例如罌粟碱，己酮可可豆碱和咖啡碱。也可参见 1994 年 11 月 22 日发布的美国专利
20 5,366,977(Pollard 等)(本文引用以供参考)，其中公开了本文适用的拮抗 A₁-腺苷细胞受体而不拮抗 A₂-腺苷细胞受体的化合物且包括 8-环戊基-1,3-二丙基黄嘌呤(CPX)，黄嘌呤氨基同系物(8-[4-[2-氨基乙基氨基羰基甲氧基]-苯基]-1,3-二丙基黄嘌呤，XAC)，或其治疗上有效的衍生物。

用于本发明的合适的苯并咪唑或苯并咪唑衍生物在 2000 年 12 月 12 日
25 发布的美国专利 6,159,968(Cuppoletti)(本文引用以供参考)中公开的那些物质，特别是 2-[(吡啶基)-甲基亚磺酰基或甲硫基]苯并咪唑衍生物和其盐，例如奥美拉唑(omeprazole)，兰索拉唑(lansoprazole)，thioprazole 和 pantoprazole，以及下列例证性的化合物：4-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-2-吡啶甲基)硫基]-(1H)-苯并咪唑；4-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-3-甲基-2-吡啶甲基)硫基]-(1H)-苯并咪唑；4-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-5-甲基-2-吡啶甲基)硫基]-(1H)-
30 苯并咪唑；4-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶甲基)硫基]-(1H)-苯并咪

唑; 5-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-2-吡啶甲基)硫]-(1H)-苯并咪唑; 5-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-3-甲基-2-吡啶甲基)硫]-(1H)-苯并咪唑; 5-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-5-甲基-2-吡啶甲基)硫]-(1H)-苯并咪唑; 5-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶甲基)硫]-(1H)-苯并咪唑; 4-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-2-吡啶甲基)-亚磺酰基]-(1H)-苯并咪唑; 4-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-3-甲基-2-吡啶甲基)亚磺酰基]-(1H)-苯并咪唑; 4-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-5-甲基-2-吡啶甲基)亚磺酰基]-(1H)-苯并咪唑; 4-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶甲基)亚磺酰基]-(1H)-苯并咪唑; 5-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-2-吡啶甲基)亚磺酰基]-(1H)-苯并咪唑; 5-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-3-甲基-2-吡啶甲基)亚磺酰基]-(1H)-苯并咪唑; 5-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-5-甲基-2-吡啶甲基)亚磺酰基]-(1H)-苯并咪唑和 5-三氟甲基-2-[(4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶甲基)亚磺酰基]-(1H)-苯并咪唑; 2-[2-(4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-乙酰基-6-甲基)-苯并咪唑; 2-[2-(4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(4,6-二甲基)-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-乙酰基-6-甲基)-苯并咪唑; 2-[2-(4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲酯基-6-甲基)-苯并咪唑; 2-[2-(4-乙氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲酯基-6-甲基)-苯并咪唑; 2-[2-(3-甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲酯基-6-甲基)-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲酯基-6-甲基)-苯并咪唑; 2-[2-(4-甲氧基-5-甲基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲酯基)-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲酯基)-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-5-甲酯基)-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-乙酰基)-苯并咪唑; 2-[2-(4-甲氧基-5-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲氧基)-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲氧基)-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-甲基)-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-苯并咪唑; 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基)-吡啶甲基亚磺酰基]-(5-氯)-苯并咪唑; 2-[2-[3-甲基-4-(2,2,2-三氟乙氧基)吡啶基]甲基亚磺酰基]苯并咪唑(兰索拉唑); 2-[2-[3-甲基-4-(2,2,3,3-四氟丙氧基)吡啶基]甲基硫]苯并咪唑; 2-[(2-吡啶基)甲基亚磺酰基]苯并咪唑(thimoprazole); 2-[2-(3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶基)甲基亚磺酰基]-5-甲氧基-1H-苯并咪唑(奥美拉唑); 2-[2-[4-(3-甲氧基丙氧基)-3-甲基吡啶基]甲基亚磺酰基]-1H-苯并咪唑; 2-[2-(3,4-二甲氧基吡啶基)甲基亚磺酰基]-5-二氟甲氧基-1H-苯并咪唑(pantoprazole); 4-甲基-3-(2,2,2-三氟乙氧

基)-5H-吡啶并[1',2':4,5][1,2,4]thiaziano[2,3-a] 苯并咪唑-13-鎓四氟硼酸盐或其可药用的盐。

与 CFTR 遗传调节物一样, CFTR 修饰多肽调节物可配制成治疗组合物或包装药品用于治疗患有 CF 的受试者。该治疗组合物包括治疗有效量的至少一种上述多肽调节物和一种可药用的载体。该包装药品包括至少一种上述多肽调节物和施用该多肽调节物治疗患有 CF 的受试者的说明书。说明书可书写或打印在纸片上, 可与包装药品包装在一起, 可以是能够加载, 安装(直接或者通过远程下载, 例如通过 LAN, WAN 或互联网), 或者能通过计算机, 个人数字助手(PDA)或其它电子装置读取的电子介质或软件的形式(例如, 软盘或 CD ROM 磁盘), 或者是提供如何施用该遗传调节物治疗患有 CF 的受试者的说明的任何其它合适的方法。

根据本发明给药的 CFTR 修饰多肽调节物和配制品的合适剂量依赖于 CFTR 突变或缺陷的类型, 和所治疗的症状的严重性, 且也可根据受试者的不同而变化。测定可接受的或最佳的剂量一般包含平衡治疗效益的水平与本发明的剂量和治疗的任何危险或有害副作用。对于“治疗有效”的剂量, 必须具有所需效果, 即, 影响本文限定的 CFTR 修饰多肽的功能和/或活性, 从而导致受试者的有益改善, 例如, 用该剂量治疗的 CF-影响的细胞离子转运(例如, 氯(Cl⁻)分泌)改善。最佳剂量可以是当给患有 CF 的受试者给药时, 导致例如, 离子转运(例如, 氯(Cl⁻)分泌)改善到或接近野生型 CFTR 水平的剂量。

用于这些 CFTR 修饰多肽调节物的合适的给药方法, 药用配制品, 可药用的载体, 等可与前面所述的遗传调节物所用的相同或相似。用于 CFTR 修饰多肽调节物的气溶胶给药的合适方法也在 1996 年 8 月 6 日发布的美国专利 5,543,399 (Riordan 等); 1997 年 6 月 24 日发布的美国专利 5,641,662 (Debs 等); 1998 年 10 月 27 日发布的美国专利 5,827,703 (Debs 等); 1998 年 5 月 26 日发布的美国专利 5,756,353(Debs); 1999 年 1 月 12 日发布的美国专利 5,858,784 (Debs 等); 1999 年 9 月 7 日发布的美国专利 5,948,681 (Scanlin 等); 和 1999 年 12 月 14 日发布的美国专利 6,001,644 (Debs 等)中公开, 引用所有这些文献以供参考。

30 c. CFTR 修饰多肽治疗

通过将 CFTR 修饰多肽有效导入 CF-影响的细胞膜给这些细胞提供 CFTR 修饰物功能和/或活性的任何方法可实现多肽治疗。CFTR 修饰多肽的有效量(即, 足以减小, 减轻, 改善, 或改良与 CF 相关的症状的量)可单独或与帮助穿过(例如, 经过融合或胞吞)细胞膜的试剂联合给药到 CF 受试者
5 (即, 具有 CF 缺陷型细胞的受试者)。本领域的技术人员根据诸如所治疗的症状的类型和严重性, 受试者的体重和/或年龄, 受试者以前的病历, 该试剂选择的给药途径的因素可确定什么是“有效量”。

重组或天然 CFTR 修饰多肽可使用诸如离子交换色谱, 凝胶过滤色谱, 电泳和亲和色谱的已知方法从宿主细胞中纯化。参见 Tilly 等, *J. Biol. Chem.*,
10 (1992) 267(14):9470-73; Anderson 等, *Science* (1991) 251:679-682)。纯化方法的一个实施方案包含在非变性去污剂存在下首先溶解该蛋白质。

为了用于蛋白质治疗, 一般将 CFTR 修饰多肽与诸如去污剂或其它两亲性分子团的脂类, 膜泡囊, 脂质体, 病毒体, 或微粒体相联。特别优选天然融合或者可改造成融合(例如, 通过将融合蛋白掺入脂类中)的脂类组合物。
15 融合蛋白可从病毒, 例如副流感病毒 1-3, 呼吸道合胞病毒(RSV), 流感 A, 仙台病毒, 和披膜病毒的融合蛋白获得。非病毒融合蛋白包括介导细胞-细胞融合的正常细胞蛋白。其它非病毒融合蛋白包括精子蛋白 PH-30, 它是位于精细胞表面的膜内在蛋白, 据信它介导精子和卵之间的融合。参见 Blobel 等, *Nature* (1992) 356:248-251。还有其它的非病毒融合蛋白包括
20 诸如 PH-30 与流感病毒血凝素结合成份和 PH-30 与分解蛋白(disintegrin)(例如, bitistatin, barbourin, 蝮蛇毒素, 和锯鳞血抑肽)的嵌合 PH-30 蛋白。此外, 可使用诸如聚乙二醇(PEG)的传统化学融合剂融合脂膜。

与 CFTR 遗传调节物一样, CFTR 修饰多肽可配制成治疗组合物或包装药品用于治疗患有 CF 的受试者。该治疗组合物包括治疗有效量的至少一种
25 上述 CFTR 修饰多肽和一种可药用的载体。该包装药品包括至少一种上述 CFTR 修饰多肽和施用该多肽调节物治疗患有 CF 的受试者的说明书。说明书可书写或打印在纸片上, 可与包装药品包装在一起, 可以是能够加载, 安装(直接或者通过远程下载, 例如通过 LAN, WAN 或互联网), 或者能通过
30 过计算机, 个人数字助手(PDA)或其它电子装置读取的电子介质或软件的形式(例如, 软盘或 CD ROM 磁盘), 或者是提供如何施用该遗传调节物治疗患有 CF 的受试者的说明的任何其它合适的方法。

根据本发明给药的 CFTR 修饰多肽和配制品的合适剂量依赖于 CFTR 突变或缺陷的类型，和所治疗的症状的严重性，且也可根据受试者的不同而变化。测定可接受的或最佳的剂量一般包含平衡治疗效益的水平与本发明的剂量和治疗的任何危险或有害副作用。对于“治疗有效”的剂量，必须具有所需效果，即，给受试者提供有益改善，例如，用该剂量治疗的 CF-影响的细胞离子转运(例如，氯(Cl⁻)分泌)改善。最佳剂量可以是当给患有 CF 的受试者给药时，导致例如，离子转运(例如，氯(Cl⁻)分泌)改善到或接近野生型 CFTR 水平的剂量。

用于这些 CFTR 修饰多肽的合适的给药方法，药用配制品，可药用的载体，等可与前面所述的遗传和多肽调节物所用的相同或相似。用于 CFTR 修饰多肽的气溶胶给药的合适方法也在 1996 年 8 月 6 日发布的美国专利 5,543,399 (Riordan 等); 1997 年 6 月 24 日发布的美国专利 5,641,662 (Debs 等); 1998 年 10 月 27 日发布的美国专利 5,827,703 (Debs 等); 1998 年 5 月 26 日发布的美国专利 5,756,353(Debs); 1999 年 1 月 12 日发布的美国专利 5,858,784 (Debs 等); 1999 年 9 月 7 日发布的美国专利 5,948,681 (Scanlin 等); 和 1999 年 12 月 14 日发布的美国专利 6,001,644 (Debs 等)中公开, 引用所有这些文献以供参考。

d. CFTR 修饰基因治疗

本发明还涉及含有或不合其它试剂或治疗的 CFTR 修饰基因的给药，作为治疗 CF 的疗法。参见，例如，1993 年 8 月 31 日发布的美国专利 5,240,846 (Collins 等)，和 1999 年 9 月 28 日发布的美国专利 5,958,893(Welsh 等)(本文引用以供参考)，其中描述了给药根据本发明的 CFTR 修饰基因的合适方法。重组逆转录病毒载体以及其它 CFTR 基因转移方案可用于本发明的实践中。可使用 CF 上皮细胞和携带转导或转移进其中的 CFTR 修饰基因的细胞系。

在治疗 CF 的疗法中使用的 CFTR 修饰基因可通过诸如 DNA 克隆，人工构建或其它方式的常规方法获得。用于该疗法的基因转移可通过本领域熟知的各种方法实现，包括使用磷酸钙共沉淀的转染，靶细胞与携带该 CFTR 修饰基因的脂质体，红细胞血影或原生质球的融合，质粒和病毒载体介导的转移和 DNA 蛋白复合物介导的基因转移。

作为选择，可将编码 CFTR 修饰多肽的基因制品掺入合适的载体中用于将该基因传递进 CF 受试者的 CF 影响的细胞中。可使用标准技术(例如，

经过磷酸钙或氯化钙共沉淀, DEAE 葡聚糖介导的转染, 脂转染, 或电穿孔) 将编码合适多肽的 CFTR 修饰基因(例如, 在下文所述的合适表达序列盒中) 导入培养的细胞中。然后以允许表达 CFTR 修饰多肽的方式体外培养重组细胞。优选的产生 CFTR 修饰多肽的宿主细胞包括例如, 哺乳动物(人和非人哺乳动物)细胞, 酵母细胞和昆虫细胞。

用于该疗法的重组病毒载体包含能够感染靶细胞的逆转录病毒基因组的至少一部分和与其可操作地相连的 CFTR 修饰基因的 DNA。“感染”一般是指病毒将遗传物质转移给其宿主或靶细胞的过程。优选的是在本发明的载体构建中使用的逆转录病毒还引起复制缺陷以去掉病毒复制对靶细胞的影响。在这种情况下, 可按照常规技术用辅助病毒包装该复制缺陷型病毒基因组。一般来说在本发明的实践中可采用满足上述传染性和 CFTR 基因转移能力的条件的任何逆转录病毒。可预料到当病毒载体方案用于 CFTR 修饰基因转移时, 使用减毒的或烈性的病毒也是可预期的。如果在本发明的实践中适用, 也可使用 CFTR 修饰基因的扩增来增强正常表达水平。

根据本发明转导或基因转移靶向的细胞包括需要传递 CFTR 修饰基因的任何细胞。一般来说, 该细胞是具有 CFTR 基因缺陷或不足的那些细胞, 例如 CF 影响的细胞。靶向的 CF 影响的细胞优选是上皮细胞, 包括胰腺, 汗腺, 肝, 肠, 肾细胞, 且甚至更优选呼吸道上皮细胞, 例如肺细胞。

根据本发明可在体内或体外治疗细胞或细胞群。例如, 在体内治疗中, 可给受试者施用本发明的 CFTR 修饰物载体, 优选在生物学相容的溶液或可药用的给药载体中通过吞食, 注射, 吸入或许多其它方法给药。给药剂量随受试者的不同而变化且可通过平衡 CFTR 功能增强的水平与任何危险或有害副作用来测定。监测转导水平, CFTR 修饰物表达和/或 CFTR 修饰多肽的出现或水平可帮助选择和调整给药剂量。本发明也包含体外转导。可从受试者取出或者提供具有缺陷型 CFTR 基因的细胞群体, 根据本发明的原理用 CFTR 修饰基因转导, 然后(再)导入受试者。

尽管可用本发明的基因转移方法和载体靶向诸如胰腺和汗腺细胞的任何 CF-影响的上皮细胞, 但是由于 CF 最严重的并发症通常与肺有关, 因此呼吸道上皮细胞是本发明的基因治疗最可取的靶细胞。另外, 鉴于已经发现呼吸道上皮细胞容易被重组逆转录病毒感染, 因此对这些细胞进行根据本发明的基因转移是完全可行的。

用于 CFTR 修饰基因的气溶胶给药的合适方法，以及转染细胞的方法也在 1996 年 8 月 6 日发布的美国专利 5,543,399 (Riordan 等); 1997 年 6 月 24 日发布的美国专利 5,641,662 (Debs 等); 1998 年 10 月 27 日发布的美国专利 5,827,703 (Debs 等); 1998 年 5 月 26 日发布的美国专利 5,756,353 (Debs); 5 1999 年 1 月 12 日发布的美国专利 5,858,784 (Debs 等); 1999 年 9 月 7 日发布的美国专利 5,948,681 (Scanlin 等); 和 1999 年 12 月 14 日发布的美国专利 6,001,644 (Debs 等) 中公开，引用所有这些文献以供参考。

可构建包含与转录和翻译调控元件(例如，启动子，核糖体结合位点，操纵子，或增强子)可操作地相连或在其调控下的编码合适多肽的 CFTR 修饰基因的“表达序列盒”并用于体外或体内表达 CFTR 修饰多肽。所用的 10 调控元件的选择可根据，例如转染的宿主细胞和所需的表达水平而变化。用于哺乳动物细胞的一些基因启动子是本领域已知的且包括，例如，肺特异性表达的表面活性蛋白-C(SP-C)启动子，磷酸甘油酸(PGK)启动子，猿猴病毒 40 (SV 40)早期启动子，劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子，腺病毒主要晚期 15 启动子(MLP)和人巨细胞病毒(CMV)立即早期 1 启动子。然而，在本发明中可使用产生合适表达水平的任何基因启动子。诱导型基因启动子，(例如，从热激基因，金属硫蛋白基因， β 干扰素基因，或类固醇激素应答性基因获得的启动子)可用于根据外部刺激调节转录。

4. 鉴定包括 Kir4.2 基因的 CFTR 修饰基因

20 本发明还涉及检测和鉴定 CFTR 修饰基因，包括鉴定受到体内存在或不存在 CFTR 的影响的 RNAs，以鉴定包括类似于表 1 所列的那些正调节基因和类似于表 2 所列的那些负调节基因的基因，并鉴定与 CFTR 相互作用或补偿 CFTR 以维持或正常化肺功能的途径。在无感染或疾病的肺组织中观察到对缺乏 CFTR 的定型化基因组反应。

25 在一个实施方案中，使用 Affymetrix 小鼠基因阵列检测从年龄匹配的野生型和 CFTR-缺陷型小鼠，特别是 CFTR(+/+)与 FABP-hCFTR/mCFTR(-/-)或 CFTR(-/-)小鼠分离的肺 mRNAs 的差异表达(相对强度标示在 y-轴，而小鼠对年龄的增加在 x-轴)。以相同的方式还分析了表达突变 CFTR 的 CFTR 缺陷型小鼠，即 SPC-h Δ 508/FABP-hCFTR/mCFTR(-/-)，以及具有对 CFTR 30 基因的其它突变，包括强力霉素(doxycycline)-诱导的突变的小鼠。生物信息筛选分析(即，使用 p-值<0.02)揭示了在统计学上与 CFTR-缺陷型表型相关

的 341 个基因。CFTR 本身的表达在 CFTR(-/-)小鼠中显著下降,证实了该小鼠模型。用进一步的筛选,该 341 个基因中有 27 个符合统计学检验(p-值 <0.05),证实在 CFTR-缺陷型小鼠中与野生型相比它们存在差异,表明这些基因可潜在地修饰 CFTR-依赖型途径,且因此修饰 CF 疾病过程(见图 1)。该 27 个基因之一,即 Kir4.2 的补偿活性的根据是,在试验的所有 CFTR-缺陷型小鼠中都增加。通过 LightCycler PCR 评定与野生型小鼠肺相比在 CFTR-缺陷型小鼠中 Kir4.2 mRNA 也增加,证实了该基因阵列数据结果(见图 2)。参见 Gosset 等,“A New Inward Rectifier Potassium Channel Gene (KCNJ15) Localized on Chromosome 21 in the Down Syndrome Chromosome Region 1 (DCR 1),” *Genomics* (1997) 44:237-41。在 CHO 细胞中表达小鼠 Kir4.2 cDNA,然后用 cAMP-刺激剂,例如毛喉素和 IBMX 的组合,进行处理,这样可增加钾(K⁺)离子流(见图 3)。由于基底外侧钾(K⁺)转运加强顶端氯(Cl⁻)转运,这表明 Kir4.2 的刺激或表达增加可能增强正常的或 CFTR-受损的细胞或肺中的氯(Cl⁻)离子转运。由于 Kir4.2 在肺呼吸道上皮相关区域表达,因此 Kir4.2 的表达增加可用于绕过氯(Cl⁻)转运和细胞功能的 CFTR-依赖型缺陷。

涉及检测和鉴定CFTR修饰基因的另一实施方案如下:在肠脂肪酸结合蛋白基因启动子(iFABP)控制下在肠上皮中表达人CFTR cDNA,可完全矫正小肠病变并支持CFTR (-/-)转基因小鼠的正常产后存活。iFABP-hCFTR, CFTR (-/-)小鼠可在混合的FVB/N, C57BL/6背景中维持而没有GI或肺病的迹象。组织学和生化研究鉴定了与表达CFTR的窝型匹配的对照相比在这些小鼠的肺组织中无明显病变。参见Zhou等, *Science*, (1994), 266:1705-8; Chroneos, *J. Immunol.*, (2000) 165:3941-50。小鼠居住在小型分隔笼中。成年 iFABP-hCFTR, CFTR(-/-)和对照小鼠的肺通过在血液琼脂板上定量培养肺匀浆组织评定无细菌病原体或建群。

将FABP-hCFTR (+/+)/mCFTR (-/-)小鼠与野生型FVB/N-mCFTR (+/+)小鼠交配,用于产生F1 FABP-hCFTR (+/-)/mCFTR (-/+)小鼠。杂交这些小鼠以产生F2后代窝型匹配小鼠,然后确定其基因型。确定基因型使用下列引物进行:用于mCFTR PCR的引物是正向引物(内含子9): 5'-AGG GGC TCG CTC TTC TTT GTG AAC, -3', 反向引物(内含子10): 5'- TGG CTG TCT GCT TCC TGA CTA TGG, -3', 用于新霉素抗性基因PCR的正向引物是: 5'-CAC

AAC AGA CAA TCG GCT GCT, -3', 反向引物是: 5'-ACA GTT CGG CTG GCG CGA G, -3', 用于hCFTR PCR的正向引物(外显子9)是: 5'-AAA CTT CTA ATG GTG ATG ACA G-3'。反向引物(外显子11)是: 5'-AGA AAT TCT TGC TCG TTG AC-3'。鉴定 FABP-hCFTR(+)/mCFTR (-)和 hCFTR (+)/mCFTR (+)小鼠。所有CFTR (+)小鼠的靶mCFTR基因都是杂合型。

在下面实施例中, 成对进行cDNA合成和微阵列分析以最小化与RNA分离和杂交条件相关的技术变异性。从性别匹配的窝型匹配小鼠小心分离肺并去掉输导气管和纵隔结构。在TRIzol试剂(Life Technologies)中使用厂商建议的方法匀浆肺。为了最小化在小鼠群体中品种差异的潜在影响, 可从3, 6, 和11周龄的性别匹配的窝型匹配小鼠中分离肺RNA。还从3周龄的存活CFTR (-)/hCFTR (-)和CFTR (+)窝型匹配小鼠肺中分离了RNA用于与携带iFABP-hCFTR转基因的小鼠进行比较。

实施例 1:

使用带有T7启动子序列的寡聚dT对总RNA进行逆转录, 接着进行第二链cDNA合成。然后使用T7 RNA聚合酶扩增并生物素标记抗血清cRNA, 之后使用Affymetrix建议的方法与Affymetrix基因芯片小鼠U74aV2杂交。Affymetrix MicroArray Suite 5.0版用于使用默认扫描设置扫描和定量基因芯片。从各芯片收集强度数据, 定标到1500的靶强度并使用MicroArray Suite和GeneSpring 5.0 (Silicon Genetics, Inc., Redwood City, CA)分析结果。cDNAs与U74aV2芯片(Affymetrix Inc.)杂交。杂交数据在2-步加工中正态化以去掉或最小化芯片和基因水平的系统差异来源。具体地说, 正态化各芯片中所有基因在芯片上的分布以控制样品间的差异。mCFTR (-)小鼠的各RNA样品相对于其特定的对照(即, 性别和年龄匹配的mCFTR (+)窝型匹配小鼠)正态化。将数据进一步转化成对数比率用于分布的分析和对称。通过结合分布分析(JMP4, SAS Institute, Inc.)和Welch ANOVA来鉴定RNA水平的改变。使用异常值框和四分值框绘图来鉴定符合超高异常值 \geq 上级四分值+1.5(中间四分值范围), 和超低异常值 \leq 下级四分值-1.5(中间四分值范围)定义的异常值。通过Welch t-检验以 p 值 ≤ 0.05 计算显著改变。通过Westfall和Young置换(permutation)计算调整的P-值以校正假阳性(GeneSpring 4.2.1, Silicon Genetics)。使用单向ANOVA进行各基因型和年龄组之间的比较。为了鉴定不分年龄因CFTR基因型而差异表达的基因, 使用分级和k-方式聚类

来鉴定在所有三个时间点与CFTR缺乏反应的基因表达的一致改变。根据再现性和绝对强度进一步筛选候选RNAs。计算各平行测定的平均值，标准误差和系数差异。从分析中删除CV \geq 50%的平行测定。表达在检测水平之下的基因作为实验噪声被排除。

5 结果:

为了鉴定与CFTR反应的基因，比较了3、6或11周龄的iFABP-hCFTR, mCFTR (-/-), iFABP-hCFTR, mCFTR (+/+); mCFTR (-/-) 和mCFTR (+/+) 窝型匹配小鼠的肺RNAs。在3和6周龄分离的RNA以一式两份进行微阵列分析。正态化10个Affymetrix鼠基因组U74Av2芯片的数据并鉴定在CFTR缺陷型(CFTR -)和对照(CFTR+)小鼠之间的统计学差异。通过异常值分析和/或不配对的t-检验鉴定与年龄相关的差异。正态化后，观察到从所有年龄获得的肺组织的强度数据为正态分布。来自3周龄CFTR (+/+)和CFTR (-/-)小鼠(无iFABP-hCFTR转基因)的肺RNA数据与携带FABP-hCFTR基因的数据分布相似且因此在分析中包括。

15 为了鉴定不分年龄与CFTR反应而差异表达的RNAs，将CFTR (-/-)和CFTR (+/+)数据分成两组。图4表示对数比率分布和组合数据组的异常值绘图。从分析的12442个基因/ESTs鉴定了共1977个异常值。848个RNAs的丰度增加；1129个减少。Welch t-检验与Westfall和Young的逐步降低置换(step-down permutation)一起将差异表达的RNAs数目进一步缩小到315。使用

20 分级聚类来观察和分类该数据组。参见图5。以2D矩阵表示数据以鉴定具有相似表达模式的基因群且显示315个选定基因的明显分级的基因表达模式。芯片水平上(树状图顶部)受CFTR影响的RNAs形成两个不同的组。在每组内，从年龄匹配的小鼠对收集的样品比来自不同年龄的样品更接近，表明年龄也影响基因表达。在RNA水平上(左侧的树状图)，基因明显分成两个主要的组：

25 在mCFTR (-/-)小鼠中mRNAs增加或减少的组。以在所有时间点表达水平差异一致(CV \leq 50%)和其绝对强度超过243(通过Affymetrix软件90%的基因该数据组 \leq 243，称为阴性)进一步筛选基因。进一步的筛选将RNAs数目减少到54个，其中29个与其mCFTR (+/+)窝型匹配的小鼠相比在mCFTR(-/-)中一致增加且25个减少。见表1(正调节基因)和表2(负调节基因)。

30 这54个基因的表达模式在图6和7中表示，证实了CFTR反应性RNAs的表达模式不分年龄具有一致性。

差异表达的基因根据其已知的或推测的功能进一步分类。评定和指定每个基因的功能类型。为了简化计算，假定每一类型中的基因满足二项分布。使用全部U74Av2作为参考数据组计算每一类型的二项概率。“炎症性反应”是mCFTR (-/-)小鼠中RNAs增加的基因最具代表性的类型。在因缺乏CFTR而增加其丰度的RNAs中，最具代表性的是其影响炎症，转录，和运输且由与mCFTR (-/-)小鼠中其表达减少的那些基因完全不同的功能类型的组组成。见表1(正调节基因)和表2(负调节基因)。在三个年龄组使用Welch t-检验还评估了FABP-hCFTR转基因对RNA表达的潜在影响。在GI-矫正小鼠的分析中鉴定的差异调节的RNAs在mCFTR (-/-)小鼠中受到同样的影响，表明iFABP-hCFTR对该基因亚组无影响。其表达不依赖iFABP-hCFTR转基因而改变的基因包括7个减少的和11个增加的RNAs。它们的表达水平的差异不显著(不超过1.5-倍)，如下表所示：

表 3 fabp-hCFTR (+/+)对肺基因表达的影响

基因	P-值	比率	共有	GeneBank	生物过程
跨膜 9 超家族成员 2	0.0381	-1.13	Tm9sf2	NM_080556	运输
线粒体核糖体蛋白 S24	0.03333	-1.19	Mrps24	AA543858	未知
制癌蛋白(oncostatin)受体	0.02857	-1.26	Osmr	NM_011019	信号转导
RIKEN cDNA 4432409D24 基因	0.02857	-1.17	4432409D24Rik	AK014481	未知
RIKEN cDNA 5730533P17 基因	0.02857	-1.32	5730533P17Rik	NM_027492	未知
表达的序列 AI323512	0.02857	-1.22	AI323512	AI323512	未知
核因子 I/B	0.02857	-1.17	Nfib	NM_008687	转录调控
冷休克域蛋白 A	0.02381	-1.25	Csda	NM_139117	转录调控
醛脱氢酶 9, 亚家族 A1	0.02857	-1.20	Aldh9a1	NM_019993	氧化还原酶
热休克蛋白, 105 kDa	0.04762	-1.40	Hsp105	NM_013559	热激反应
RIKEN cDNA 2610318I15 基因	0.02381	-1.14	2610318I15Rik	AK012045	丝氨酸/苏氨酸 激酶
caspase 3, 凋亡相关性半 胱氨酸蛋白酶	0.04762	1.13	Casp3	NM_009810	凋亡
遍在蛋白偶联酶 8	0.02857	1.68	Ubce8	NM_019949	蛋白修饰
T-细胞受体 α 链	0.02857	1.49	Tcra	U07662	细胞防御反应
蛋白酪氨酸激酶 2 β	0.02857	1.31	Ptk2b	BF579309	激酶
胸腺嘧啶 DNA 糖基化酶	0.02857	1.17	Tdg	NM_011561	DNA 修复
caspase 7	0.02381	1.23	Casp7	NM_007611	凋亡
趋化因子(C-C)受体 7	0.02381	1.47	Cmkbr7	NM_007719	趋化性

比较 iFABP-hCFTR,CFTR(-/-)(即, 肠矫正, GC)的肺 RNA 样品与 CFTR(+/-)(无 iFARP-hCFTR 转基因, 即肠未矫正的, NGC)的样品

比率定义为: $R = GC/NGC$ if $(GC > NGC)$; 如果 $(GC < NGC)$ 则 $R = -NGC/GC$.

5 实施例2:

为了验证微阵列分析鉴定的反应性RNAs, 使用Light cycler®或定时热循环仪进行实时RT-PCR, 接着进行凝胶电泳。按上述分离肺RNAs。通过逆转录产生cDNAs并使用下列引物进行PCR分析: Kir 4.2正向引物为5'-CTT TGA GTT TGT GCC TGT GGT TTC, -3', 反向引物为5'-GCT GTG TGA TTT GGT AGT GCG G, -3'; 人CFTR同上; 小鼠CFTR正向引物为5'-TGC TTC CCT ACA GAG TCA TCA ACGG, -3', 反向引物为5'-CAC AGG ATT TCC CAC AAC GCA GAG -3'; β -肌动蛋白标准化正向引物为5'-TGG AAT CCT GCG GCA TCC ATG AAC; 反向引物为5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G, -3'; GAPDH正向引物为5'-CTT CAC CAC CAT GGA GAA GGC, -3', 反向引物为5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG, -3'; CEBP δ 正向引物为5'-CGC AAC AAC ATC GCT GTG, -3', 反向引物为5'-GGG CTG GGC AGT TTT TTG;-3', TNF-AIP-3正向引物为5'-GCA CGA ATA CAA GAA ATG GCA GG, -3', 反向引物为5'-GGC ATA AAG GCT GAG TGT TCA, -3' CG; Grin 2d 正向引物为5'-CCT TCT TTG CCG TCA, TCT TTC TTG C, -3', 反向引物为5'-AAA CTT CAG GGG TGG GTA TTG CTC C, -3'。

结果:

通过RT-PCR证实了在微阵列分析中鉴定的选定RNA水平的改变。使用 β -肌动蛋白或GAPDH正态化mRNA水平。对于Kir 4.2 (Kcnj15), CEBP δ , TNF-AIP-3和Grin2d, CFTR (-/-)小鼠与对照窝型匹配小鼠相比mRNA明显增加。见图8, 9, 10和11。正如预期, 以RT-PCR在mCFTR (-/-)小鼠中没有检测到鼠CFTR, 在携带iFABP-hCFTR的小鼠肺中也没有检测到hCFTR mRNA。

实施例 3:

对选定的基因进行深入检索以鉴定生物学功能和相关的调节途径。构建所有阵列元件及其相关Genbank登录号的带系统标识符的U74Av2注释(annotation)数据库。标明基因描述, 功能类型, 生物学过程, 分子功能, 细

胞成份，蛋白结构域和文献信息。信息资源包括 NetAffy (<http://www.affymetrix.com>)，来源检索 (<http://genomewww5.stanford.edu/cgi-bin/SMD/source/>)，BLAST NCBI, Locus Link, 小鼠-人同源检索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)，和基因本体数据库 (<http://www.godatabase.org/cgi-bin/go.cgi>)。差异表达的基因根据基因本体论定义分类进功能类型中。为了确定哪一种功能类型总体上代表选定基因表，使用全部U74Av2 (含有12488个小鼠基因)作为参考数据组计算各类型的二项概率。二项概率由如下等式定义：

$$P(k,n,p) = \sum_{k=0}^n \binom{n}{k} p^k (1-p)^{n-k}$$

10 如果在给定群体(U74Av2)中概率为 p 则它产生在 n 次试验中取得 k 次成功的概率。使用公开的文献信息确定潜在的蛋白质/蛋白质或蛋白质/DNA相互作用。

从成对的 mCFTR (-/-) 小鼠和 mCFTR (+/+) 窝型匹配小鼠 (缺少 iFABP-hCFTR 转基因的小鼠) 准备阵列分析，证实了微阵列的发现，表明在 mCFTR (-/-) 肺中缺乏 mCFTR mRNA 和该 RNA 的改变都不依赖于 iFABP-hCFTR 转基因。

实施例 4:

产后动物的肺通过气管插管用4%的低聚甲醛以25 cm H₂O压力充气固定。肺组织根据标准方法加工并包埋于石蜡中。用于免疫染色的程序在 Whitsett等, *J. Biol. Chem.*, (2002) 277:22743-49中描述。抗 110 kDa Mac-3 抗原的兔单克隆抗体以1:40,000用于鉴定肺泡巨噬细胞(PharMingen, San Diego, CA)。

结果:

25 成年 iFABP-hCFTR, CFTR (-/-); iFABP-hCFTR, CFTR (+/+), 和 CFTR (+/+) 对照小鼠的肺组织学无差异。见图11, 12, 13和14。不存在肺炎症, 感染或改型的迹象。使用Mac-3染色鉴定肺泡巨噬细胞。肺泡巨噬细胞的数目和组织学不因mCFTR而改变。组织学分析证实了在这些小鼠的肺中无结构异常, 感染或炎症, 支持了基因表达的改变与CFTR相关而与年龄或肺病不相关的观念。

- mCFTR (-/-)小鼠中肺内环境稳定的维持与基因表达的复杂适应性应答相关。CFTR影响编码转录因子，离子通道，膜受体，细胞因子，和细胞内运输蛋白的RNAs。最终，CFTR通过可能代表对CFTR (-/-)蛋白复合物介导的功能进行转录应答的蛋白质-蛋白质相互作用来改变与CFTR相互作用的
- 5 许多蛋白质的表达。其表达因CFTR而改变的基因的多样性支持了这样的观点，即除了调节Cl⁻转运，CFTR在多种细胞功能中起不同的作用。在CFTR (-/-)小鼠中肺内环境稳定通过对缺乏CFTR的复杂基因组应答来维持而不是通过单一替代性Cl⁻通道的作用来维持。最后，在本发明中鉴定的基因和途径提供了CFTR与可影响CF肺病发病的细胞过程之间的新联系。
- 10 尽管描述了本发明的具体实施方案，但是对本领域的技术人员而言显而易见的是可对其作出各种修改而不偏离所附权利要求书限定的本发明的实质和范围。

<110> 儿童医院医疗中心(Children' s Hospital Medical Center)

<120> 用于治疗囊肿性纤维化的 CFTR 修饰基因和经表达的多肽以及检测和/或鉴定它们的方法和产物

<130> CHM-001PAT

<150> 60/384,856
<151> 2002-05-31

<150> 60/384,855
<151> 2003-05-31

<160> 8

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 1443
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 1

```

gccctctaca tgcatgctcg agcggccgcc agtgtgatgg atatctgcag aattcggcct 60
ggtaagccag gtgggagaag gggagcgagg acgcgccact taccctgcag aagattcctg 120
acctacagag tgagtgacca ggtggtccaa agatggatgc cattcacctt ggcatgtcca 180
gtgccccact ggtgaagcat accaacgggg ttggactcaa ggcccacaga ccccgagtca 240
tgtcaaaggg tgggcacagt aatgtgagaa tcgataaggt agacggaatc tatttactct 300
acctccagga cttgtggaca accgtcatcg acatgaagtg gcgatacaag ctcaccctat 360
ttgctgccac ctttgtgatg acctggtttc tgtttggagt ggtctactat gccatagcct 420
ttattcatgg tgacttaca cttggggaat ctaattccaa ccacacaccc tgcattatga 480
aagtggactc tctcacggga gcattcctct tttccttga atctcagaca accattggct 540
acggggtccg ttccatcaca gaggagtgtc cccatgctat cttcctctta gtcgccaac 600
tggtcatcac cacattgatt gagatcttca ttacggggac ctttctggct aaaattgcaa 660
gacccaaaaa gcgagccgag accattaagt tcagccactg tgctgtcatc agcaagcaga 720
atggaagct atgcctggtc atcagggtgg cgcacatgag gaagagtctc ctgattcagt 780
gccagctctc tggaaaactc ctgcagacac acgtcaccaa agagggagaa cgcattctcg 840
tcaaccaggc cactgtcaaa ttccacgtgg actcctcttc cgagagtccc ttcctcatcc 900
tgcccatgac cttctaccac gtgttggatg agacaagccc cctgcgggac ctcacacccc 960
aaaacgtaaa ggagaaggag ttgagctgg tggacttct caacgccacg gtggagtcta 1020
ccagcgcctg ctgccagagc cgaacgtctt acatcccgga ggagatctac tggggctttg 1080
agtttgtgcc tgtggtttct ctctccaaaa atggaagta tgtggctgat ttcagtcaat 1140

```

ttgagcagat caggaagagc ccgggttgta ccttctactg tgccgattct gagaagcaga 1200
 agcttgaaga acagtacagg caagaggacc agagggagcg ggagctgagg agcctcctgc 1260
 tacagcagag caatgtctga ctccaccggc ctctgggcgt ctccctaacca gggctccttt 1320
 caaaagcaat ggctgccatg aacgtgggat gggtggcccc acgtaccaaa tcacacagac 1380
 gttaagccga attccagcac actggcggcc gttactagtg gatccgagct cggtaccaag 1440
 cca 1443

<210> 2
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 2

Met Asp Ala Ile His Leu Gly Met Ser Ser Ala Pro Leu Val Lys His
 1 5 10 15
 Thr Asn Gly Val Gly Leu Lys Ala His Arg Pro Arg Val Met Ser Lys
 20 25 30
 Gly Gly His Ser Asn Val Arg Ile Asp Lys Val Asp Gly Ile Tyr Leu
 35 40 45
 Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Trp Thr Thr Val Ile Asp Met Lys Trp Arg
 50 55 60
 Tyr Lys Leu Thr Leu Phe Ala Ala Thr Phe Val Met Thr Trp Phe Leu
 65 70 75 80
 Phe Gly Val Val Tyr Tyr Ala Ile Ala Phe Ile His Gly Asp Leu Gln
 85 90 95
 Leu Gly Glu Ser Asn Ser Asn His Thr Pro Cys Ile Met Lys Val Asp
 100 105 110
 Ser Leu Thr Gly Ala Phe Leu Phe Ser Leu Glu Ser Gln Thr Thr Ile
 115 120 125
 Gly Tyr Gly Val Arg Ser Ile Thr Glu Glu Cys Pro His Ala Ile Phe
 130 135 140
 Leu Leu Val Ala Gln Leu Val Ile Thr Thr Leu Ile Glu Ile Phe Ile
 145 150 155 160
 Thr Gly Thr Phe Leu Ala Lys Ile Ala Arg Pro Lys Lys Arg Ala Glu
 165 170 175
 Thr Ile Lys Phe Ser His Cys Ala Val Ile Ser Lys Gln Asn Gly Lys
 180 185 190
 Leu Cys Leu Val Ile Arg Val Ala Asp Met Arg Lys Ser Leu Leu Ile
 195 200 205
 Gln Cys Gln Leu Ser Gly Lys Leu Leu Gln Thr His Val Thr Lys Glu
 210 215 220
 Gly Glu Arg Ile Leu Val Asn Gln Ala Thr Val Lys Phe His Val Asp

225		230		235		240
Ser Ser Ser Glu Ser Pro Phe Leu Ile Leu Pro Met Thr Phe Tyr His		245		250		255
Val Leu Asp Glu Thr Ser Pro Leu Arg Asp Leu Thr Pro Gln Asn Val		260		265		270
Lys Glu Lys Glu Phe Glu Leu Val Val Leu Leu Asn Ala Thr Val Glu		275		280		285
Ser Thr Ser Ala Val Cys Gln Ser Arg Thr Ser Tyr Ile Pro Glu Glu		290		295		300
Ile Tyr Trp Gly Phe Glu Phe Val Pro Val Val Ser Leu Ser Lys Asn		305		310		315
Gly Lys Tyr Val Ala Asp Phe Ser Gln Phe Glu Gln Ile Arg Lys Ser		325		330		335
Pro Gly Cys Thr Phe Tyr Cys Ala Asp Ser Glu Lys Gln Lys Leu Glu		340		345		350
Glu Gln Tyr Arg Gln Glu Asp Gln Arg Glu Arg Glu Leu Arg Ser Leu		355		360		365
Leu Leu Gln Gln Ser Asn Val		370		375		

<210> 3
 <211> 2732
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 3
 cagatctctg ggatcttcag ctgagattgg gccccagcac ctggactcaa ggcagtagca 60
 gaatcccatg gtagccaggt gggatgaagg gagcgaggac gttctacctg ccttgaagaa 120
 gacacctgac ctgctggagt agtgaccagt gtttccagag cctggcaatg gatgccattc 180
 acatcggcat gtccagcacc cccctggatg agcacactgc tggggctggg ctcaaggcca 240
 acagaccccg cgtcatgtcc aagagtgggc acagcaactg gagaattgac aaagtggatg 300
 gcatatacct actctacctg caagacctgt ggaccacagt tatcgacatg aagtggagat 360
 acaaactcac cctgttctgt gccacttttg tgatgacctg gttccttttt ggagtcatct 420
 actatgccat cgcgtttatt catggggact tagaaccggg tgagcccatt tcaaatcata 480
 ccccctgcat catgaaagtg gactctctca ctggggcggt tctcttttcc ctggaatccc 540
 agacaacatg tggctatgga gtccgttcca tcacagagga atgtcctcat gccatcttcc 600
 tgttggttgc tcagttggc atcacacct tgattgagat cttcatcacc ggaaccttcc 660
 tggccaaaat cgcagaccc aaaaagcggg ctgagacat caagttcagc cactgtgcag 720
 tcatcaccia gcagaatggg aagctgtgct tggatgattca ggtagccaat atgaggaaga 780
 gcctcttgat tcagtgccag ctctctggca agctcctgca gaccacgct accaaggagg 840

```

gggagcggat tctcctcaac caagccactg tcaaattcca cgtggactcc tcctctgaga    900
gccccctcct cattctgccc atgacattct accatgtgct ggatgagacg agccccctga    960
gagacctcac accccaaaac ctaaaggaga aggagtttga gcttgtggtc ctctcaatg   1020
ccactgtgga atccaccagc gctgtctgcc agagccgaac atcttatatc ccagaggaaa   1080
tctactgggg ttttgagttt gtgcctgtgg tatctctctc caaaaatgga aaatatgtgg   1140

ctgatttcag tcagttttaa cagattcggg aaagcccaga ttgcacattt tactgtgcag   1200
attctgagaa acagcaactc gaggagaagt acaggcagga ggatcagagg gaaagagaac   1260
tgaggacact tttattacaa cagagcaatg tctgatcaca ggggcgccat ccaggtttaa   1320
ccctgcaagc tgtttcaca tcagaactcc cttcaaacac aaagattgct gtgaaaacga   1380
aaatgtgtag acgcactctc aaaaactgca cggacataca aaatcaatct tttcctttga   1440
tcttgtggct aaaccagcat tctgtgttt gagagatttc ctgttaggtg cttcgtctga   1500
aagtgaactc tcataatica aattgtataa aataaagctc catttctaag agcttgggtg   1560
agggcaattg gaataatgtc ctgttagata aacagacatt tagcaatcct gacattaaaa   1620
ggaaatgtat ttctatacaa gattattagc tgtaatacaa gatatttatt taaccaatga   1680
ccttatggct gagagttgaa ttgtggttca gtattcattg atctcactgc tttaaaacat   1740
gctctttttg ttcaagcagg aaaaatatta tatctaatta tgcctatgtg gtaataccta   1800
aaaagaggta gagagactct atgttcacaa aatatagtaa tttcattttt acctttcttc   1860
agtggactga attgtatgga aggaaattga tcagatctgt aattcacac tgtggaaacc   1920
tacacaaatg gggctgatgc cattgtttcc tctattttat tttatttatt tttgaatcca   1980
ctatctcttt ccattcaaaa tatttcattt caaaatgtgg ttcacagacc cgccacatca   2040
gcaccatccg agagcttatt agtaatgtgt agattctcat gtcccagcca gacttacaga   2100
attggggctc gtatcttaac aagaaccca gatgatttgt gtacaaatga aagttcgaaa   2160
gctgtgctct ggacagtgtt ctcaaagcaa ctttctgaag ccgtgtggaa aactgactct   2220
gtgtgggtcc cgtatccctg tggcatccag acctggcctc tcttcatttc attattattg   2280
gccaatattt ctttcagcca tttcatttct tatctattaa aatggcttgc ccataaagga   2340
actgcatagg attatcccct gacattccaa gagcaaaata aagctcttga gagtaattgt   2400
tgtctcagtc atgcttgctg attacagtta gcacaaaaga aaaattcagc tgcctgacaa   2460
tacaggaaat gttctcagat gctgatgttt gtaaggtccg gtggggccat gaggaagaag   2520
aggagctgaa ggtaagaaac tcataaaca gatgactctt tgatgcatga acaagatttg   2580
aaaatctcaa gccgtgaaag aatacccttg ctattttaa ataaagcicata ccaagaggta   2640
acattttgcc ccgggcaaaa ttcaggggtc tagtgccctg cattcctttg aggcaaaaaa   2700

```

taaatgggct atgactgggtt aaatgtccaa aa 2732

 <210> 4
 <211> 2919
 <212> DNA
 <213> 人

 <400> 4
 ctccctctgcc caatgtctcc caatctcttt cctttctctc ttcagttcct ccaggtaatt 60
 cttactcaaa cttgtaccaa cttgtttttg actgacagtg aacagtgaga gagttttctt 120
 cattttgagg aaccctaaac acctatcttt cccaaggcaa cctgtctgga ctgagcattt 180
 ctctgacttg acataacttc ccatccagcc aggagtctgc actcttcagt ctttgcaggc 240
 agtagcagaa tcccatggta gccagggtggg tgaaggggag cgaggacggt ctacctgcct 300
 tgaagaagac acctgacctg cggagtgagt gaccagtgtt tccagagcct ggcaatggat 360
 gccattcaca tcggcatgic cagcaccccc ctggtgaagc aactgctgg ggctgggctc 420
 aaggccaaca gaccccgct catgtccaag agtgggcaca gcaactgag aattgacaaa 480
 gtggatggca tatacctact ctacctgcaa gacctgtgga ccacagtat cgacatgaag 540
 tggagataca aactcacct gttcgtgcc acttttgtga tgacctggtt ctttttggga 600
 gtcatctact atgccatgc gtttattcat ggggacttag aaccgggtga gccatttca 660
 aatcataccc cctgcatcat gaaagtggac tctctcactg gggcgtttct cttttccctg 720
 gaatcccaga caaccattgg ctatggagtc cgttccatca cagaggaatg tcctcatgcc 780
 atcttctgt tggttgctca gttggtcac acgaccttga ttgagatctt catcaccgga 840
 accttccctg caaaaatgc cagaccctaaa aagcgggctg agaccatcaa gttcagccac 900
 tgtgcagtca tcaccaagca gaatgggaag ctgtgcttgg tgattcaggt agccaatatg 960
 aggaagagcc tcttgattca gtgccagctc tctggcaagc tcctgcagac ccacgtcacc 1020
 aaggaggggg agcggattct cctcaaccaa gccactgtca aattccacgt ggactcctcc 1080
 tctgagagcc ccttctcat tctgcccag acattctacc atgtgctgga tgagacgagc 1140
 ccctgagag acctcacacc ccaaaacctt aaggagaagg agtttgagct tgtggtcctc 1200
 ctcaatgcca ctgtggaatc caccagcgt gtctgccaga gccgaacatc ttatatccca 1260
 gaggaatct actggggttt tgagtttgg cctgtggtat ctctctcaa aaatggaaaa 1320
 tatgtggctg atttcagtc gtttgaacag attcggaaaa gccagattg cacattttac 1380
 tgtgcagatt ctgagaaaca gcaactcgag gagaagtaca ggcaggagga tcagagggaa 1440
 agagaactga ggacactttt attacaacag agcaatgtct gatcacagg ggcgatcca 1500
 ggtttaacc tgcaagctgt ttccacatca gaactccctt caaacacaaa gattgctgtg 1560
 aaaacgaaa tgtttagacg cactctcaaa aactgcacgg acatacaaaa tcaatctttt 1620

cctttgatct tgtggctaaa ccagcatttc tgtgtttgag agatttcctg ttaggtgctt 1680
 cgtctgaaag tgaactctca taattcaaat tgtataaaat aaagctacat ttctaagagc 1740
 ttgggtgtagg gcaattggaa taatgtcctg ttagataaac agacatttag caatcctgac 1800
 attaaaagga aatgtatttc tatacaagat tattagctgt aatacaagat atttatttaa 1860
 ccaatgacct tatggctgag agttgaattg tggttcagta ttcattgatc tcactgcttt 1920
 aaaacatgct cttttgttc aagcaggaaa aatattatat ctaattatgt ctatgtggta 1980
 atacctaaaa agaggtagag agactctatg ttcacaaaaat atagtaattt catttttacc 2040
 tttcttcagt ggactgaatt gtatggaagg aaattgatca gatctgtaat tcacaactgt 2100
 ggaaacctac acaaatgggg ctgatgcat tgtttcctct attttatttt atttattttt 2160
 gaatccacta tctctttcca ttcaaaatat ttccattcaa aatgtggttc acagaccgcg 2220
 cacatcagca ccatccgaga gcttattagt aatgtgtaga ttctcatgtc ccagccagac 2280
 ttacagaatt ggggtctgta tcttaacaag aaccccagat gatttgtgia caaatgaaag 2340
 ttcgaaagct gtgctctgga cagtgttctc aaagcaactt tctgaagccg tgtggaaaac 2400
 tgactctgtg tgggtcccgt atcccgtgg catccagacc tggcctctct tcatttcatt 2460
 attattggcc aatatttctt tcagccattt catttcttat ctattaaat ggcttgccca 2520
 taaaggaact gcataggatt atcccctgac attccaagag caaaataaag ctcttgagag 2580
 taattgttgt ctcagtcagc ctgctgatt acagttagca caaaagaaaa attcagctgc 2640
 ctgacaatac aggaaatgtt ctcagatgct gatgtttgta aggtccgggt gggccatgag 2700
 gaagaagagg agctgaagg t aagaaactca taaacaagat gactctttga tgcatgaaca 2760
 agatttgaat atctcaagcc tgtaaagaat acccctgcta tttaaataaa gctcatacca 2820
 agaggttaaca ttttgccccg ggccaaattc aggggtctag tgccctgcat tcctttgagg 2880
 caaaaaataa atgggctatg actggttaaa tgtccaaaa 2919

<210> 5
 <211> 2867
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 5
 ggtgtttgga gagcccggac tggatgcca ctagaatcct gtgctgtgaa cagtgagaga 60
 gttttcttca ttttgaggaa ccctaaacac ctatctttcc caaggcaacc tgtctggact 120
 gagcatttct ctgacttgac ataacttccc atccagccag gagtctgac tcttcagtct 180
 ttgcaggcag tagcagaatc ccatggtagc cagggtgggtg aaggggagcg aggacgttct 240
 acctgccttg aagaagacac ctgacctgag gagtgagtga ccagtgtttc cagagcctgg 300
 caatggatgc cattcacatc ggcatgtcca gcacccccct ggtgaagcac actgctgggg 360

ctgggctcaa ggccaacaga ccccgctca tgtccaagag tgggcacagc aacgtgagaa	420
ttgacaaagt ggatggcata tacctactct acctgcaaga cctgtggacc acagttatcg	480
acatgaagtg gagatacaaa ctaccctgt tcgctgccac ttttgtgatg acctggttcc	540
tttttgagtg catctactat gccatcgctg ttattcatgg ggacttagaa cccggtgagc	600
ccatttcaaa tcatacccc tgcatcatga aagtggactc tctcactggg gcgtttctct	660
ttccctgga atcccagaca accattggct atggagtccg ttccatcaca gaggaatgic	720
ctcatgccat ctctctgttg gttgctcagt tggatcatcac gaccttgatt gagatcttca	780
tcaccggaac ctctctggcc aaaatcgcca gacccaaaaa gcgggctgag accatcaagt	840
tcagccactg tgcagtcatc accaagcaga atgggaagct gtgcttggtg attcaggtag	900
ccaatatgag gaagagcctc ttgattcagt gccagctctc tggcaagctc ctgcagaccc	960
acgtcaccaa ggagggggag cggattctcc tcaaccaagc cactgtcaaa ttccacgtgg	1020
actctctctc tgagagcccc ttctcattc tgcccatgac attctacat gtgctggatg	1080
agacgagccc cctgagagac ctcacacccc aaaacctaaa ggagaaggag tttgagcttg	1140
tggctctct caatgccact gtggaatcca ccagcgtgt ctgccagagc cgaacatctt	1200
atatcccaga ggaaatctac tggggttttg agtttgtgcc tgtggtatct ctctcaaaa	1260
atggaaaata tgtggctgat ttcagtcagt ttgaacagat tcggaaaagc ccagattgca	1320
cattttactg tgcagattct gagaacagc aactcgagga gaagtacagg caggaggatc	1380
agagggaaag agaactgagg acacttttat tacaacagag caatgtctga tcacaggggc	1440
gccatccagg tttaacctg caagctgttt ccacatcaga actcccttca aacacaaaga	1500
ttgctgtgaa aacgaaaatg tgtagacgca ctctcaaaa ctgcacggac atacaaaatc	1560
aatcttttcc tttgatcttg tggctaaacc agcatttctg tgtttgagag atttctgtt	1620
agggtcttcg tctgaaagt aactctcata attcaaattg tataaaataa agctacattt	1680
ctaagagctt ggtgtagggc aattggaata atgtctgtt agataaacag acatttagca	1740
atcctgacat taaaaggaaa tgtatttcta tacaagatta ttagctgtaa tacaagatat	1800
ttatttaacc aatgacctta tggctgagag ttgaattgtg gttcagtatt cattgatctc	1860
actgctttaa aacatgctct tttgttcaa gcaggaaaaa tattatatct aattatgtct	1920
atgtggtaat acctaaaaag aggtagagag actctatgtt cacaaaatat agtaatttca	1980
tttttacctt tcttcagtg actgaattgt atggaaggaa attgatcaga tctgtaattc	2040
acaactgtgg aaacctacac aaatggggct gatgccattg tttctctat tttattttat	2100
ttatttttga atccactatc tctttccatt caaaatattt ccattcaaaa tgtggttcac	2160
agacccgcca catcagcacc atccgagagc ttattagtaa tgtgtagatt ctcatgtccc	2220

```

agccagactt acagaattgg ggtctgiatc ttaacaagaa ccccagatga tttgtgtaca 2280
aatgaaagtt cgaagactgt gctctggaca gtgttctcaa agcaactttc tgaagccgtg 2340
tggaaaactg actctgtgtg ggtcccgtat ccctgtggca tccagacctg gcctctcttc 2400
atrtcattat tattggccaa tatttccttc agccatttca tttcttatct attaaaatgg 2460
cttgcccata aaggaactgc ataggattat ccctgacat tccaagagca aaataaagct 2520
cttgagagta attgttgtct cagtcatgct tgctgattac agttagcaca aaagaaaaat 2580
tcagctgcct gacaatacag gaaatgttct cagatgctga tgtttgtaag gtccgggtgg 2640
gccatgagga agaagaggag ctgaaggtaa gaaactcata aacaagatga ctctttgatg 2700
catgaacaag atttgaaaat ctcaagccig taaagaatac ccctgctatt taaataaagc 2760
tcataccaag aggtaacatt ttgccccggg ccaaattcag gggcttagtg ccctgcattc 2820

ctttgaggca aaaaaataat gggctatgac tggttaaatg tccaaaa 2867

```

```

<210> 6
<211> 375
<212> PRT
<213> 人

```

```
<400> 6
```

```

Met Asp Ala Ile His Ile Gly Met Ser Ser Thr Pro Leu Val Lys His
1           5           10
Thr Ala Gly Ala Gly Leu Lys Ala Asn Arg Pro Arg Val Met Ser Lys
20          25          30
Ser Gly His Ser Asn Val Arg Ile Asp Lys Val Asp Gly Ile Tyr Leu
35          40          45
Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Trp Thr Thr Val Ile Asp Met Lys Trp Arg
50          55          60
Tyr Lys Leu Thr Leu Phe Ala Ala Thr Phe Val Met Thr Trp Phe Leu
65          70          75          80
Phe Gly Val Ile Tyr Tyr Ala Ile Ala Phe Ile His Gly Asp Leu Glu
85          90          95
Pro Gly Glu Pro Ile Ser Asn His Thr Pro Cys Ile Met Lys Val Asp
100         105         110
Ser Leu Thr Gly Ala Phe Leu Phe Ser Leu Glu Ser Gln Thr Thr Ile
115        120        125
Gly Tyr Gly Val Arg Ser Ile Thr Glu Glu Cys Pro His Ala Ile Phe
130        135        140
Leu Leu Val Ala Gln Leu Val Ile Thr Thr Leu Ile Glu Ile Phe Ile
145        150        155        160
Thr Gly Thr Phe Leu Ala Lys Ile Ala Arg Pro Lys Lys Arg Ala Glu
165        170        175

```

Thr Ile Lys Phe Ser His Cys Ala Val Ile Thr Lys Gln Asn Gly Lys
 180 185 190
 Leu Cys Leu Val Ile Gln Val Ala Asn Met Arg Lys Ser Leu Leu Ile
 195 200 205
 Gln Cys Gln Leu Ser Gly Lys Leu Leu Gln Thr His Val Thr Lys Glu
 210 215 220
 Gly Glu Arg Ile Leu Leu Asn Gln Ala Thr Val Lys Phe His Val Asp
 225 230 235 240
 Ser Ser Ser Glu Ser Pro Phe Leu Ile Leu Pro Met Thr Phe Tyr His
 245 250 255
 Val Leu Asp Glu Thr Ser Pro Leu Arg Asp Leu Thr Pro Gln Asn Leu
 260 265 270
 Lys Glu Lys Glu Phe Glu Leu Val Val Leu Leu Asn Ala Thr Val Glu
 275 280 285
 Ser Thr Ser Ala Val Cys Gln Ser Arg Thr Ser Tyr Ile Pro Glu Glu
 290 295 300
 Ile Tyr Trp Gly Phe Glu Phe Val Pro Val Val Ser Leu Ser Lys Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Tyr Val Ala Asp Phe Ser Gln Phe Glu Gln Ile Arg Lys Ser
 325 330 335
 Pro Asp Cys Thr Phe Tyr Cys Ala Asp Ser Glu Lys Gln Gln Leu Glu
 340 345 350
 Glu Lys Tyr Arg Gln Glu Asp Gln Arg Glu Arg Glu Leu Arg Thr Leu
 355 360 365
 Leu Leu Gln Gln Ser Asn Val
 370 375

<210> 7
 <211> 1708
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 7
 gcagtagcag aatcccatgg tagccagggtg ggtgaagggg agcggaggacg ttctacctgc 60
 cttgaagaag acacctgacc tgcggagtga gtgaccagtg tttccagagc ctggcaatgg 120
 atgccattca catcggcatg tccagcacc ccctggtgaa gcacactgct ggggctgggc 180
 tcaaggccaa cagaccccgc gtcattgtcca agagtgggca cagcaacgtg agaattgaca 240
 aagtggatgg catataccta ctctacctgc aagacctgtg gaccacagtt atcgacatga 300
 agtggagata caaactcacc ctgttcgctg ccacttttgt gatgacctgg ttcctttttg 360
 gagtcatcta ctatgccatc gcgtttattc atggggactt agaaccgggt gagccattt 420
 caaatcatac cccctgcatac atgaaagtgg actctctcac tggggcgttt ctcttttccc 480

tggaatccca gacaaccatt ggctatggag tccgttccat cacagaggaa tgcctcatg 540
 ccatcttctt gttggttgct cagttgggtca tcacgacctt gattgagatc ttcacaccg 600
 gaaccttctt ggccaaaatc gccagaccca aaaagcgggc tgagaccatc aagttcagcc 660
 actgtgcagt catcaccaag cagaatggga agctgtgctt ggtgattcag gtagccaata 720
 tgaggaagag cctcttgatt cagtgccagc tctctggcaa gctcctgcag acccacgtca 780
 ccaaggaggg ggagcggatt ctctcaacc aagccactgc caaattccac gtggactcct 840
 cctctgagag ccccttctc attctgccca tgacattcta ccatgtgctg gatgagacga 900
 gccccctgag agacctcaca ccccaaaacc taaaggagaa ggagtttgag ctgtgtgtcc 960
 tctcaatgc cactgtggaa tccaccagcg ctgtctgccca gagccgaaca tcttatatcc 1020
 cagaggaaat ciactgggggt tttagtttg tgcctgtggt atctctctcc aaaaatggaa 1080
 aatatgtggc tgatttcagt cagtttgaac agattcggaa aagcccagat tgcacathtt 1140
 actgtgcaga tctgagaaa cagcaactcg aggagaagta caggcaggag gatcagaggg 1200
 aaagagaact gaggacactt ttattacaac agagcaatgt ctgatcacag gggcgccatc 1260
 caggtttaac cctgcaagct gttccacat cagaactccc ttcaaacaca aagattgctg 1320
 tgaaaacgaa aatgtgtaga cgcactctca aaaactgcac ggacatacaa aatcaatctt 1380
 ttcccttgat ctgtggcta aaccagcatt tctgtgttg agagatttcc tgttaggtgc 1440
 ttcgtctgaa agtgaactct cataattcaa attgtataaa ataaagctac atttctaaga 1500
 gcttgggtga gggcaattgg aataatgtcc tgttgataa acagacattt agcaatgctg 1560
 acattaaaag gaaatgtatt tctatacaag attattagct gtaatacaag atatttattt 1620
 aaccaatgac cttatggctg agagttgaat tgtggttcag tattcattga tctcactgct 1680
 ttaaaacatg ctccctttgt tcaagcag 1708

<210> 8
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 8
 Met Asp Ala Ile His Ile Gly Met Ser Ser Thr Pro Leu Val Lys His
 1 5 10 15
 Thr Ala Gly Ala Gly Leu Lys Ala Asn Arg Pro Arg Val Met Ser Lys
 20 25 30
 Ser Gly His Ser Asn Val Arg Ile Asp Lys Val Asp Gly Ile Tyr Leu
 35 40 45
 Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Trp Thr Thr Val Ile Asp Met Lys Trp Arg
 50 55 60
 Tyr Lys Leu Thr Leu Phe Ala Ala Thr Phe Val Met Thr Trp Phe Leu
 65 70 75 80

Phe Gly Val Ile Tyr Tyr Ala Ile Ala Phe Ile His Gly Asp Leu Glu
 85 90 95
 Pro Gly Glu Pro Ile Ser Asn His Thr Pro Cys Ile Met Lys Val Asp
 100 105 110
 Ser Leu Thr Gly Ala Phe Leu Phe Ser Leu Glu Ser Gln Thr Thr Ile
 115 120 125
 Gly Tyr Gly Val Arg Ser Ile Thr Glu Glu Cys Pro His Ala Ile Phe
 130 135 140
 Leu Leu Val Ala Gln Leu Val Ile Thr Thr Leu Ile Glu Ile Phe Ile
 145 150 155 160
 Thr Gly Thr Phe Leu Ala Lys Ile Ala Arg Pro Lys Lys Arg Ala Glu
 165 170 175
 Thr Ile Lys Phe Ser His Cys Ala Val Ile Thr Lys Gln Asn Gly Lys
 180 185 190
 Leu Cys Leu Val Ile Gln Val Ala Asn Met Arg Lys Ser Leu Leu Ile
 195 200 205
 Gln Cys Gln Leu Ser Gly Lys Leu Leu Gln Thr His Val Thr Lys Glu
 210 215 220
 Gly Glu Arg Ile Leu Leu Asn Gln Ala Thr Ala Lys Phe His Val Asp
 225 230 235 240
 Ser Ser Ser Glu Ser Pro Phe Leu Ile Leu Pro Met Thr Phe Tyr His
 245 250 255
 Val Leu Asp Glu Thr Ser Pro Leu Arg Asp Leu Thr Pro Gln Asn Leu
 260 265 270
 Lys Glu Lys Glu Phe Glu Leu Val Val Leu Leu Asn Ala Thr Val Glu
 275 280 285
 Ser Thr Ser Ala Val Cys Gln Ser Arg Thr Ser Tyr Ile Pro Glu Glu
 290 295 300
 Ile Tyr Trp Gly Phe Glu Phe Val Pro Val Val Ser Leu Ser Lys Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Tyr Val Ala Asp Phe Ser Gln Phe Glu Gln Ile Arg Lys Ser
 325 330 335
 Pro Asp Cys Thr Phe Tyr Cys Ala Asp Ser Glu Lys Gln Gln Leu Glu
 340 345 350
 Glu Lys Tyr Arg Gln Glu Asp Gln Arg Glu Arg Glu Leu Arg Thr Leu
 355 360 365
 Leu Leu Gln Gln Ser Asn Val
 370 375

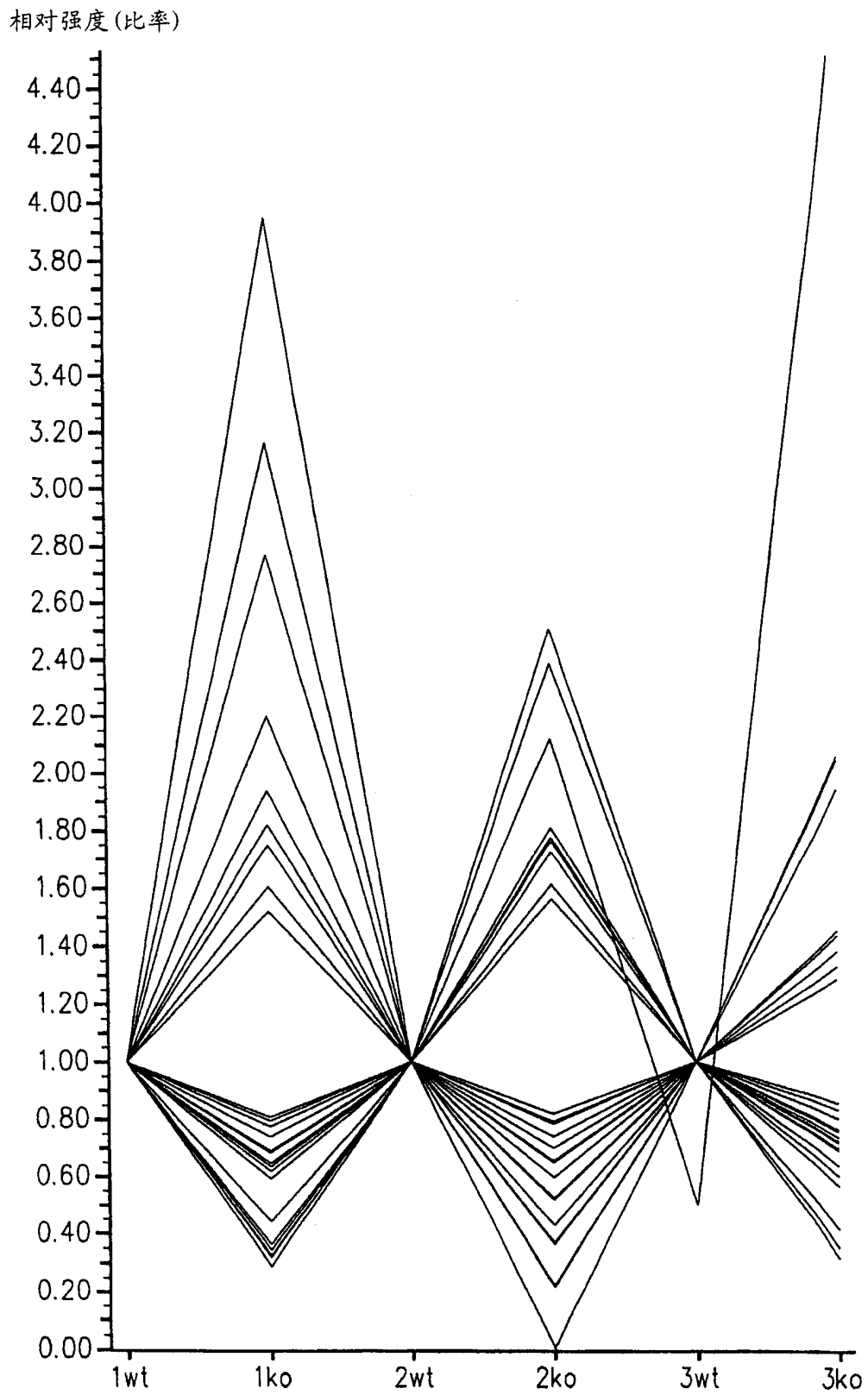


图 1

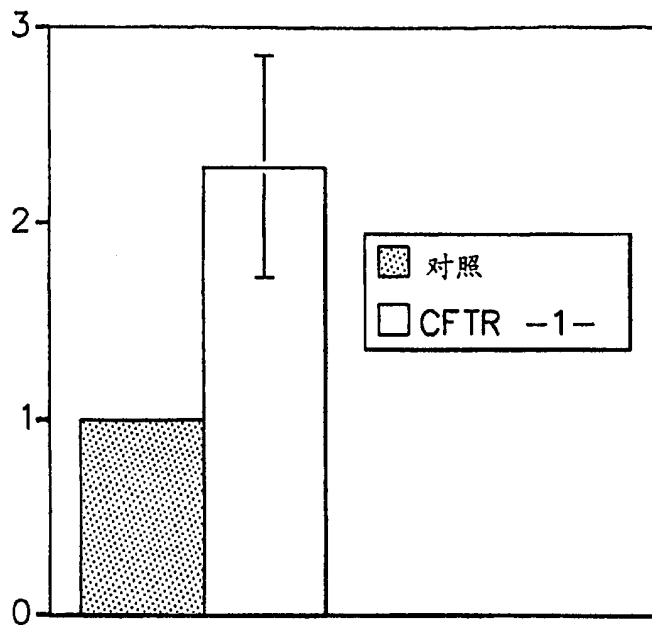


图 2

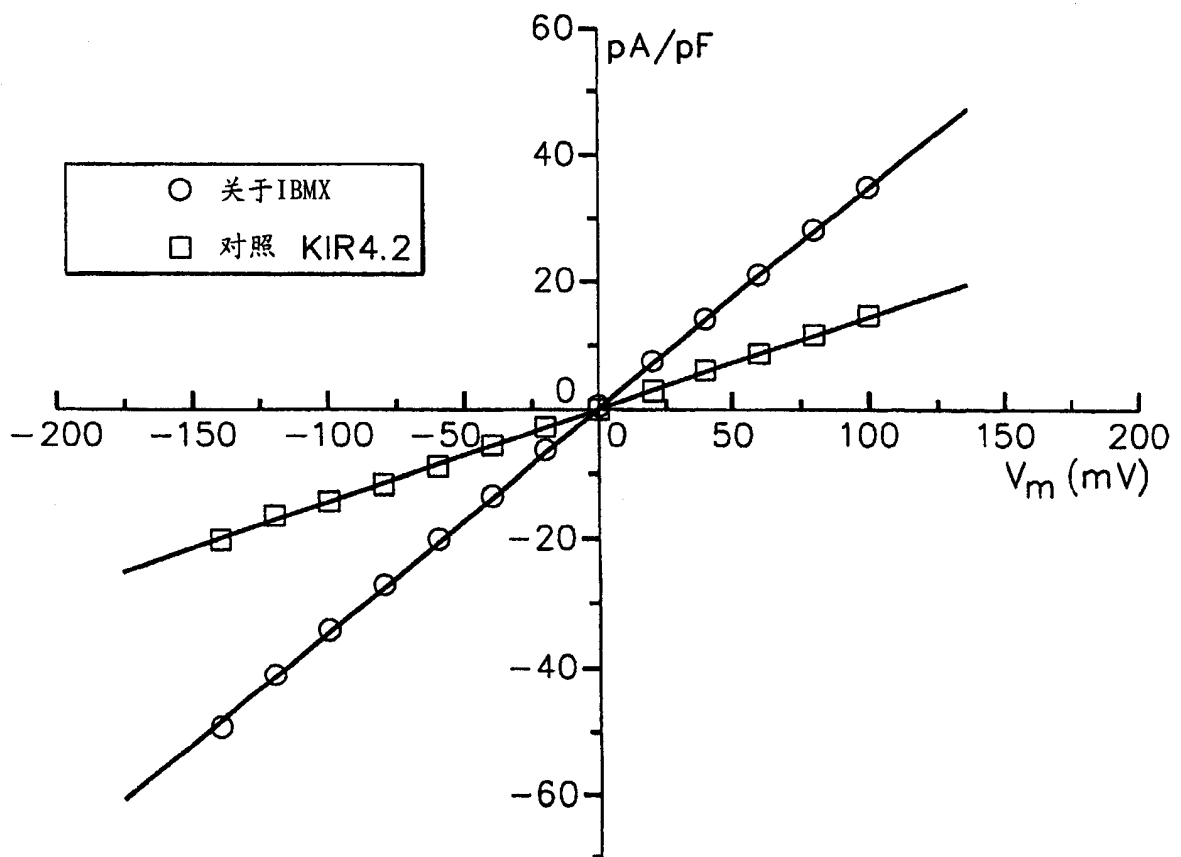


图 3

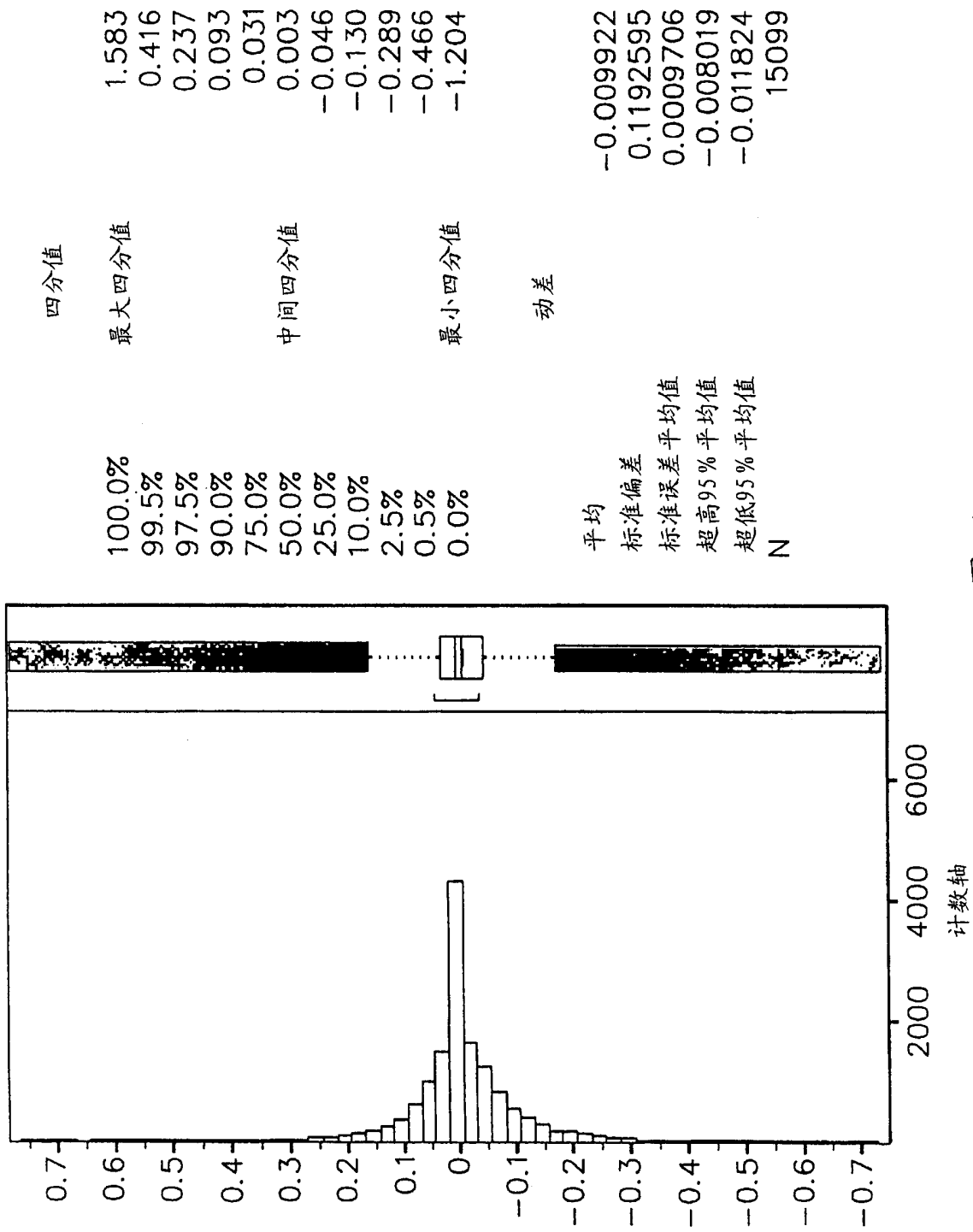


图 4

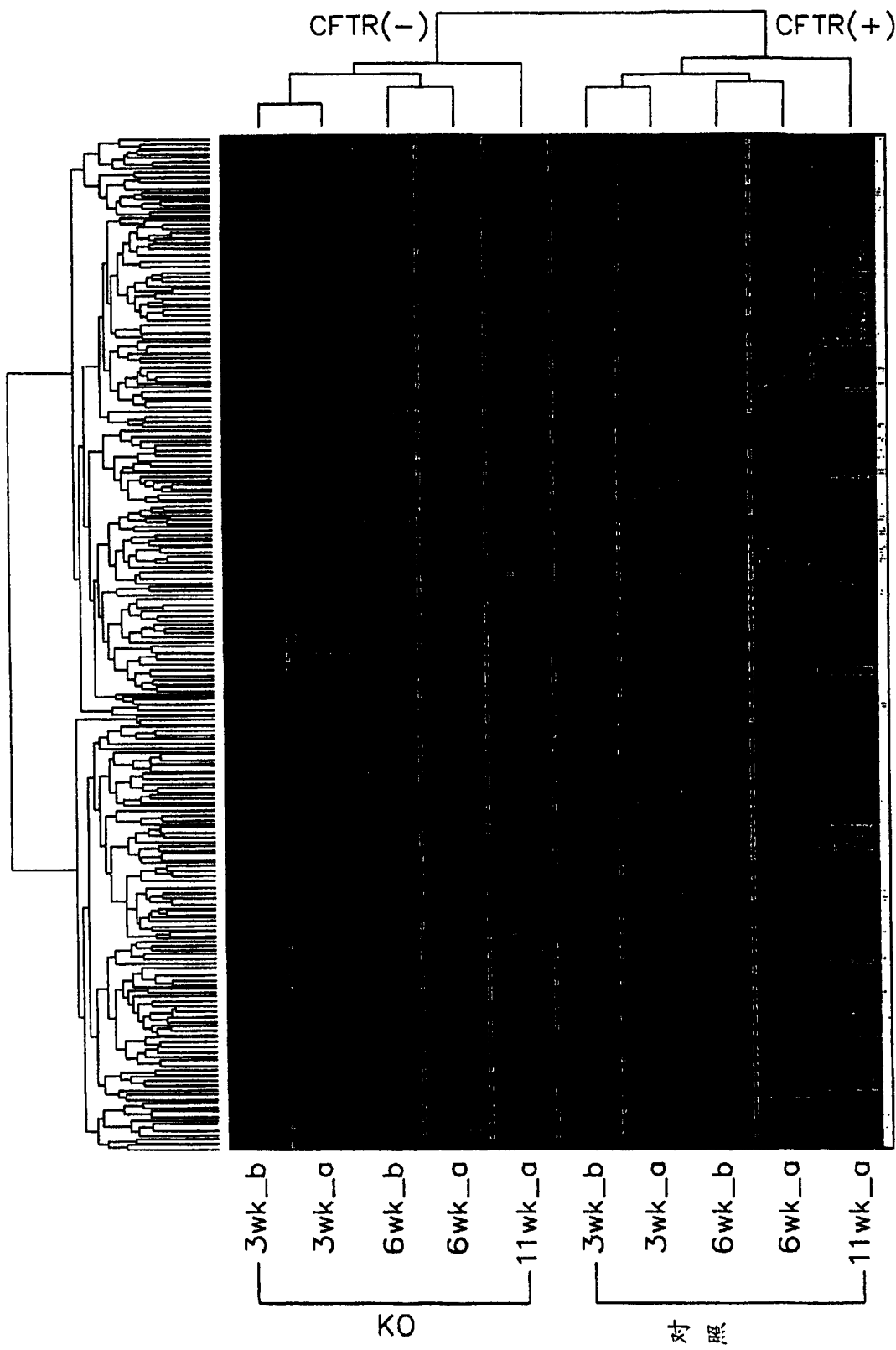


图 5

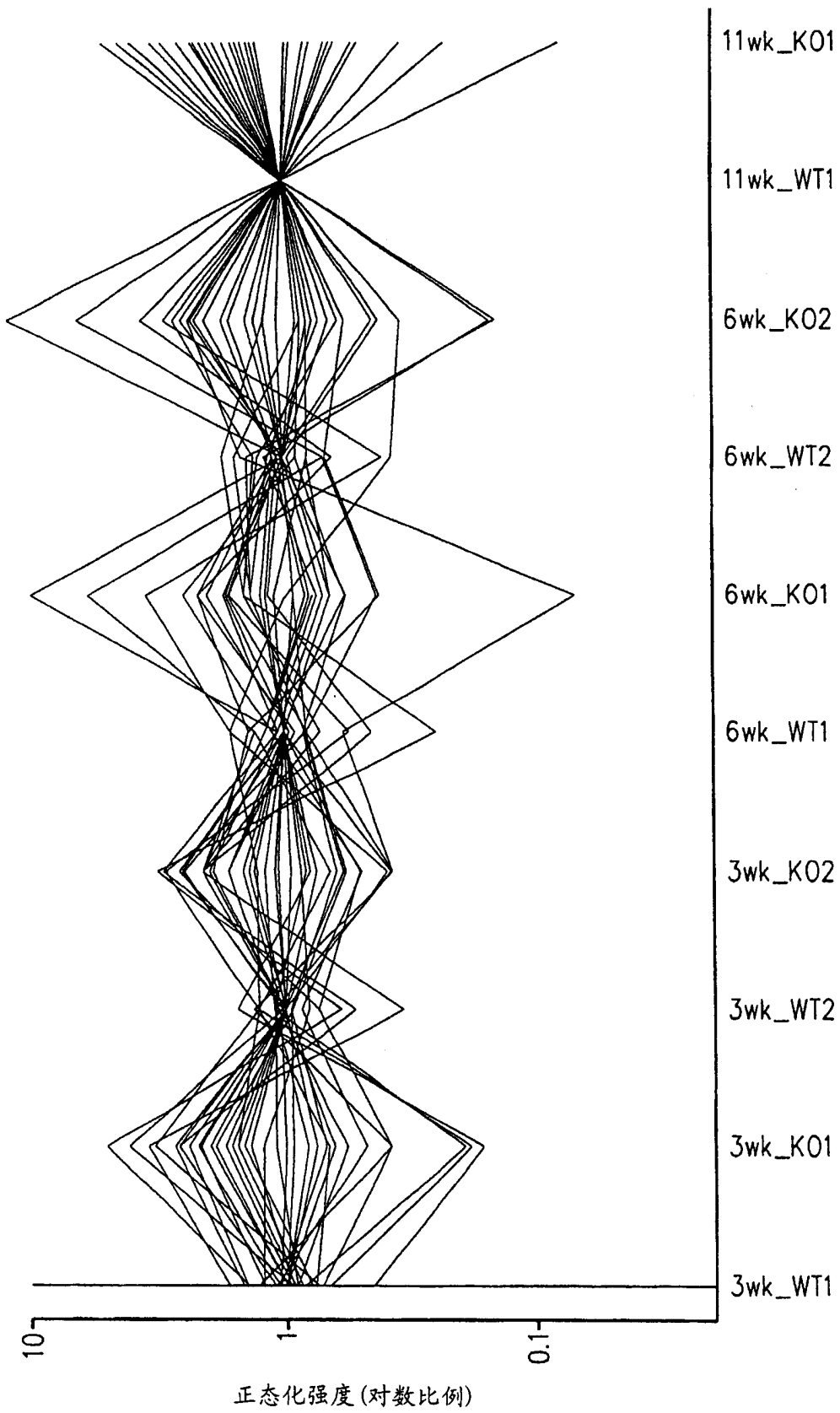


图 6

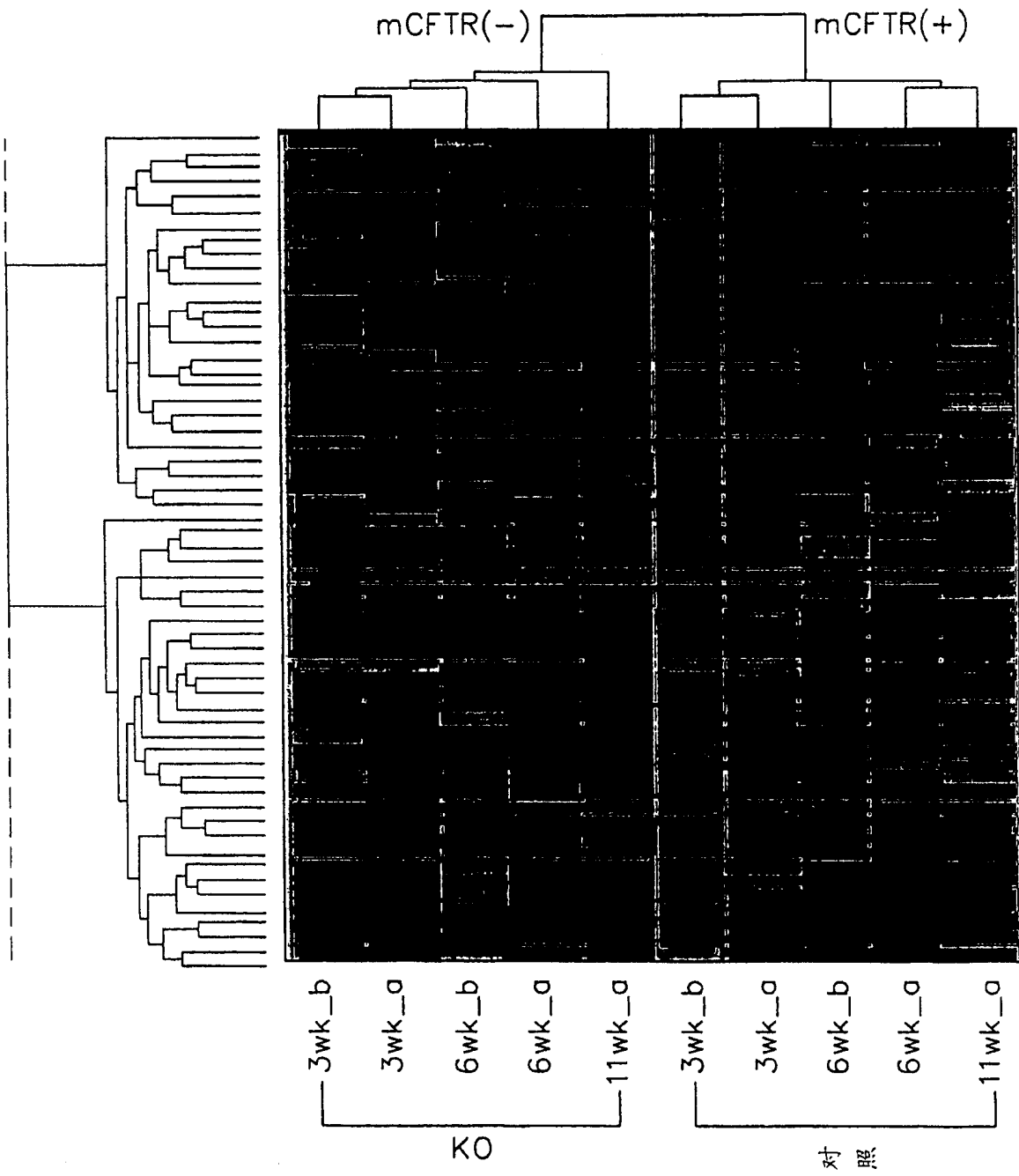


图 7

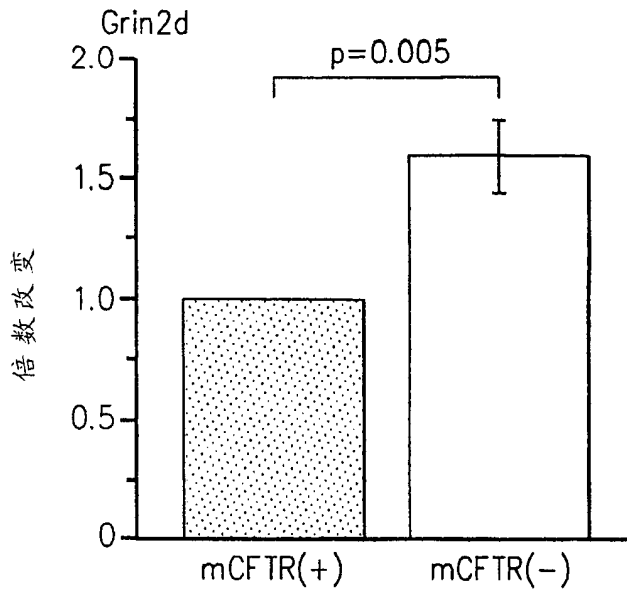


图 8

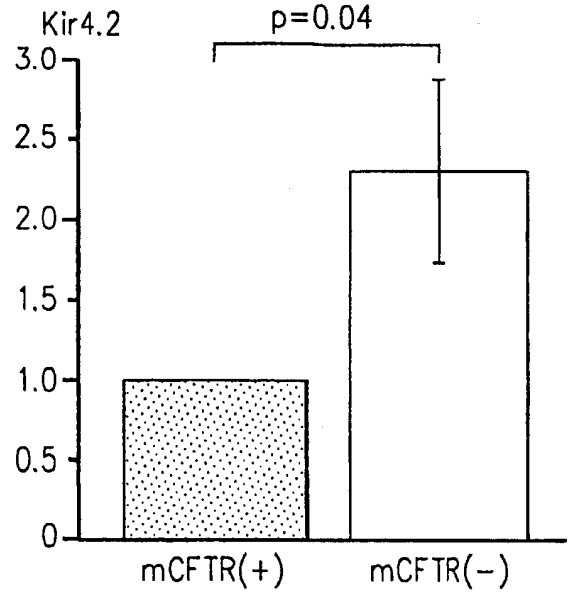


图 9

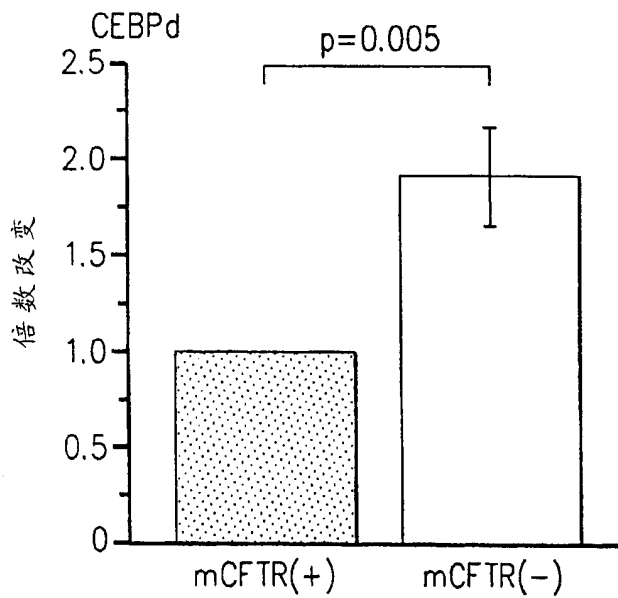


图 10

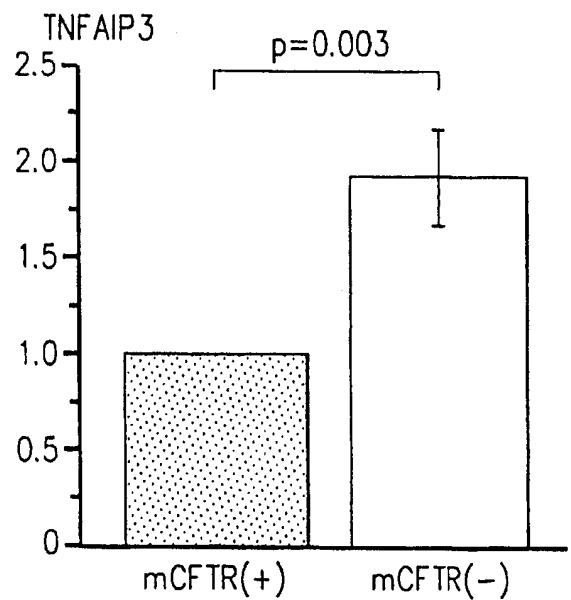


图 11

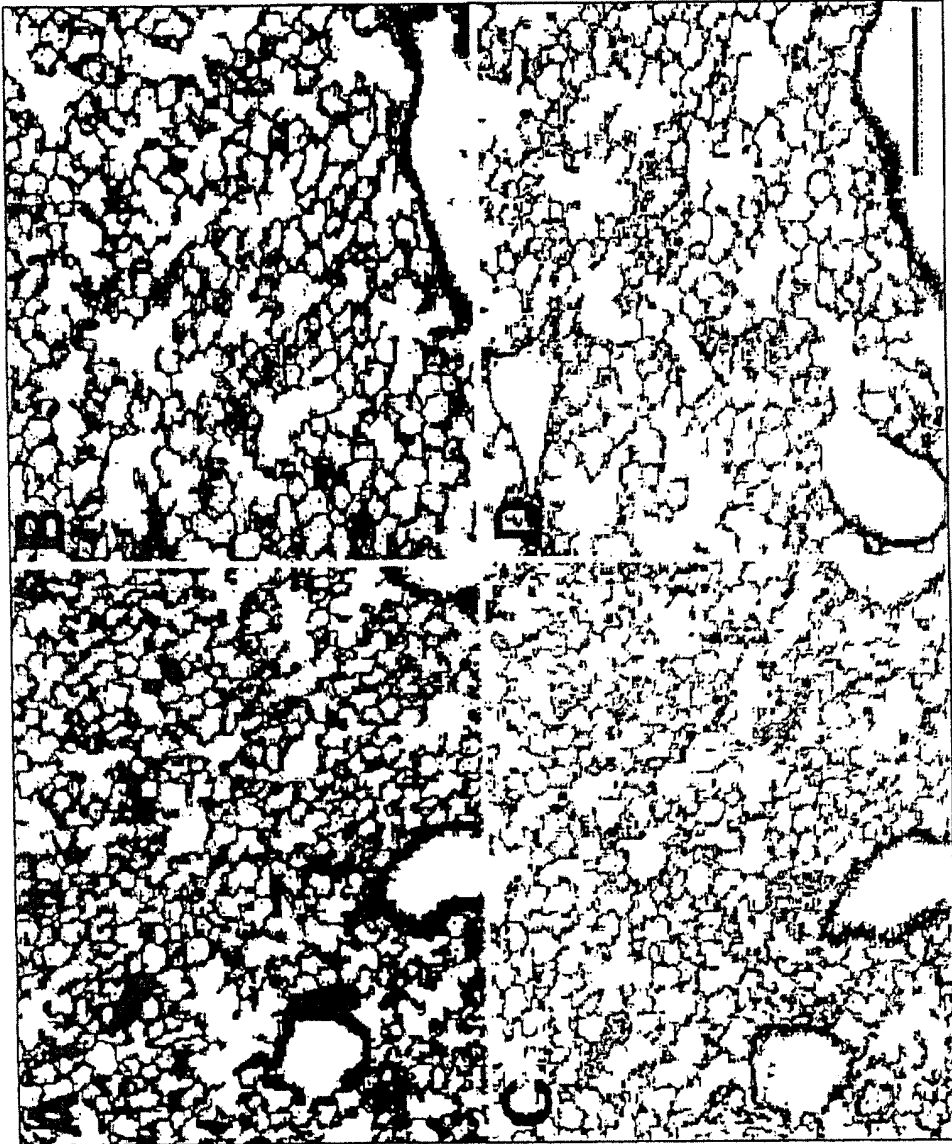


图 13

图 15

图 12

图 14