

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480013998.3

[51] Int. Cl.

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61K 31/407 (2006.01)

A61K 31/4425 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 8 月 2 日

[11] 公开号 CN 1812776A

[22] 申请日 2004.5.19

[21] 申请号 200480013998.3

[30] 优先权

[32] 2003.5.21 [33] US [31] 60/472, 298

[86] 国际申请 PCT/US2004/015715 2004.5.19

[87] 国际公布 WO2004/112763 英 2004.12.29

[85] 进入国家阶段日期 2005.11.21

[71] 申请人 得克萨斯州大学系统董事会

地址 美国得克萨斯州

共同申请人 莫埃根股份有限公司

[72] 发明人 T·A·麦克金西 E·奥尔森

R·B·维加

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 范 征

权利要求书 7 页 说明书 75 页 附图 8 页

[54] 发明名称

抑制蛋白激酶 C - MU (PKD) 用作心脏肥大和心力衰竭的疗法

[57] 摘要

本发明提供了治疗和预防心脏肥大和心力衰竭的方法。MEF-2 和 II 类 HDAC 显示出在心脏肥大和心力衰竭中起到重要作用,抑制 II 类 HDAC 显示出有益的、抗肥大效应。本发明提供 MEF-2 和 II 类 HDAC,称作 PKD 的激酶之间的联系。本发明还证明 PKD 的抑制剂通过部分抑制胎儿心脏基因表达和在 MEF-2 依赖性转录被抑制时发生的细胞改组来抑制心脏肥大和心力衰竭。

1. 一种治疗病理性心脏肥大或心力衰竭的方法，该方法包括：
 - (a) 鉴定患有心脏肥大或心力衰竭的病人；和
 - 5 (b) 给予所述病人蛋白激酶 D(PKD) 抑制剂。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 PKD 抑制剂选自白藜芦醇、吲哚咔唑、Godecke 6976(Gö6976)、星孢素、K252a、包括[d-Arg(1)、d-Trp(5, 7, 9)、Leu(11)]SP 的物质 P(SP)类似物、PKC 抑制剂 109203X(GF-1)、PKC 抑制剂 Ro31-8220、G07874、染料木黄酮、特异性 Src 抑制剂 PP-1 和 PP-2、白屈菜季铵碱、粗糠柴毒素、10 PKD RNAi 分子、PKD 反义分子、PKD 核酶分子或 PKD 结合单链抗体，或编码 PKD 结合单链抗体的表达构建物。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，通过静脉内或直接注入心脏组织给予 PKD 抑制剂。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，给药包括口服、透皮、缓释、控释、15 延迟释放、栓剂或舌下给药。
5. 如权利要求 1 所述的方法，还包括给予所述病人第二种心脏肥大治疗。
6. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述第二种治疗选自 β 阻断剂、离子剂、利尿剂、ACE-I、AII 拮抗剂、BNP、 Ca^{++} 阻断剂或 HDAC 抑制剂。
7. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述第二种治疗与所述 PKD 抑制剂20 同时给予。
8. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述第二种治疗在所述 PKD 抑制剂之前或之后给予。
9. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，治疗包括改善病理性心脏肥大的一种或多种症状。
- 25 10. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，治疗包括改善病理性心力衰竭的一种或多种症状。
11. 如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述一种或多种改善的症状包括运动能力增强、心排出血量增加、左心室末期舒张压降低、肺毛细血管嵌入压降低、心脏输出或心脏指数提高、肺动脉压降低、左心室末期收缩和舒张尺度降低、左右30 心室壁压力降低、壁张力降低、生活质量提高以及疾病相关发病率或死亡率降低。

12. 一种预防病理性心脏肥大或心力衰竭的方法，该方法包括：

- (a) 鉴定有发生病理性心脏肥大或心力衰竭风险的病人；和
- (b) 给予所述病人 PKD 抑制剂。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述 PKD 抑制剂选自白藜芦醇、
5 吲哚咔唑、Godecke 6976 (Go6976)、星孢素、K252a、包括[d-Arg(1)、d-Trp(5, 7, 9)、
Leu(11)]SP 的物质 P (SP) 类似物、PKC 抑制剂 109203X (GF-1)、PKC 抑制剂 Ro 31-8220、
PKC 抑制剂 GO 7874、染料木黄酮、特异性 Src 抑制剂 PP-1 和 PP-2、白屈菜季铵碱、
粗糠柴毒素、PKD RNAi 分子、PKD 反义分子、PKD 核酶分子或 PKD 结合单链抗体，或
编码 PKD 结合单链抗体的表达构建物。

10 14. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，通过静脉内或直接注射入心脏组织给予 PKD 抑制剂。

15. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，给药包括口服、透皮、缓释、控释、延迟释放、栓剂或舌下给药。

16. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述危险病人可具有一系列危险
15 因素的一种或多种，包括长时间未得到控制的高血压、未纠正的心瓣膜疾病、慢性心绞痛、近期心肌梗塞、先天性易患心脏病或病理性心脏肥大的体质。

17. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，可以诊断出所述危险病人具有易患心脏肥大的遗传体质。

18. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述危险病人可具有心脏肥大家
20 族史。

19. 一种评价 PKD 抑制剂治疗心脏肥大或心力衰竭的功效的方法，该方法包括：

- (a) 提供 PKD 抑制剂；
- (b) 用所述 PKD 抑制剂处理细胞；和
- (c) 测定一种或多种心脏肥大参数的表达，

25 其中，与没有用所述 PKD 抑制剂处理的细胞中一种或多种心脏肥大参数相比，所述一种或多种心脏肥大参数的变化将鉴定所述 PKD 抑制剂是心脏肥大或心力衰竭的抑制剂。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述细胞是肌细胞。

21. 如权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述细胞是分离的肌细胞。

30 22. 如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述肌细胞是心肌细胞。

23. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述肌细胞包含在分离的完整组

织中。

24. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 所述肌细胞是新生大鼠心室肌细胞。

25. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述细胞是 H9C2 细胞。

5 26. 如权利要求 22 所述的方法, 其特征在于, 所述心肌细胞在体内位于工作的完整心肌中。

27. 如权利要求 26 所述的方法, 其特征在于, 对所述工作的完整心肌进行刺激, 以触发肥大反应的一种或多种心脏肥大参数。

10 28. 如权利要求 27 所述的方法, 其特征在于, 所述刺激是主动脉结扎、快速心脏起搏、诱导心肌梗塞或转基因表达。

29. 如权利要求 27 所述的方法, 其特征在于, 所述刺激是化学剂或药剂。

30. 如权利要求 29 所述的方法, 其特征在于, 所述化学剂或药剂包括血管紧张素 II、异丙肾上腺素、苯肾上腺素、内皮缩血管肽-I、血管收缩药和抗利尿剂。

15 31. 如权利要求 27 所述的方法, 其特征在于, 所述一种或多种心脏肥大参数包括右心室射血分数、左心室射血分数、心室壁厚度、心脏重/体重比、右或左心室重/体重比或心脏重标准化度量。

32. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 对所述肌细胞进行刺激, 以引发肥大反应的一种或多种心脏肥大参数。

33. 如权利要求 32 所述的方法, 其特征在于, 所述刺激是转基因表达。

20 34. 如权利要求 32 所述的方法, 其特征在于, 所述刺激是用药物治疗。

35. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述一种或多种心脏肥大参数包括所述肌细胞中一种或多种靶基因的表达水平, 其中所述一种或多种靶基因的表达水平是心脏肥大的指标。

25 36. 如权利要求 35 所述的方法, 其特征在于, 所述一种或多种靶基因选自 ANF、 α -MyHC、 β -MyHC、 α -骨架肌动蛋白、SERCA、细胞色素氧化酶亚基 VIII、小鼠 T-复合蛋白、胰岛素生长因子结合蛋白、Tau-微管结合蛋白、泛素羧基端水解酶、Thy-1 细胞表面糖蛋白或 MyHC I 型抗原。

37. 如权利要求 35 所述的方法, 其特征在于, 用可操作性连接于靶基因启动子的报道蛋白编码区测定表达水平。

30 38. 如权利要求 37 所述的方法, 其特征在于, 所述报道蛋白是荧光素酶, β -gal 或绿色荧光蛋白。

39. 如权利要求 35 所述的方法, 其特征在于, 用核酸探针与靶 mRNA 或扩增的核酸产物的杂交测定表达水平。

40. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述一种或多种心脏肥大参数包括细胞形态的一个或多个方面。

5 41. 如权利要求 40 所述的方法, 其特征在于, 所述细胞形态的一个或多个方面包括肌节组装、细胞大小或细胞收缩性。

42. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述一种或多种心脏肥大参数包括总蛋白合成。

43. 如权利要求 19 所述的方法, 还包括测量细胞毒性。

10 44. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述细胞表达缺少一个或多个磷酸化位点的突变的 II 类 HDAC 蛋白。

45. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述测定包括测定选自心钠素基因、 β -肌球蛋白重链基因、心脏肌动蛋白基因和 α -骨架肌动蛋白基因的基因的表达。

15 46. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述测定包括测定 II 类 HDAC 的磷酸化。

47. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述测定包括测定 II 类 HDAC 的核输出。

20 48. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述测定包括测定 II 类 HDAC 和 Mef-2 的结合。

49. 如权利要求 48 所述的方法, 所述测定还包括测定 II 类 HDAC 与 MEF-2 结合的增强。

50. 如权利要求 49 所述的方法, 其特征在于, 通过 Mef-2 依赖性转录的增加测定所述增强。

25 51. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述处理在体外进行。

52. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述处理在体内进行。

53. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述细胞是转基因的非人哺乳动物的部分。

54. 一种鉴定心脏肥大或心力衰竭抑制剂的方法, 该方法包括:

30 (a) 提供 PKD;

(b) 使 PKD 与候选抑制剂物质接触; 和

(c) 测定所述 PKD 的激酶活性，

其中，PKD 激酶活性的降低鉴定所述候选抑制剂物质为心脏肥大或心力衰竭的抑制剂。

55. 如权利要求 54 所述的方法，其特征在于，所述 PKD 是从全细胞中纯化得到的。

56. 如权利要求 55 所述的方法，其特征在于，所述细胞是心脏细胞。

57. 如权利要求 54 所述的方法，其特征在于，所述 PKD 位于完整细胞中。

58. 如权利要求 57 所述的方法，其特征在于，所述完整细胞是肌细胞。

59. 如权利要求 58 所述的方法，其特征在于，所述肌细胞是心肌细胞。

10 60. 如权利要求 54 所述的方法，其特征在于，通过 HDAC 的磷酸化降低测定激酶活性的降低。

61. 如权利要求 60 所述的方法，其特征在于，所述 HDAC 是 II 类 HDAC。

62. 如权利要求 54 所述的方法，其特征在于，所述候选抑制剂物质是干扰 RNA。

63. 如权利要求 54 所述的方法，其特征在于，所述候选抑制剂物质是抗体制剂。

15 64. 如权利要求 63 所述的方法，其特征在于，所述抗体制剂包括单链抗体。

65. 如权利要求 54 所述的方法，其特征在于，所述候选抑制剂物质是反义构建物。

66. 如权利要求 54 所述的方法，其特征在于，所述抑制剂是酶、化学品、药品或小分子化合物。

20 67. 如权利要求 54 所述的方法，其特征在于，所述 PKD 抑制剂选自白藜芦醇、吲哚咔唑、Godecke 6976 (Go6976)、星孢素、K252a、包括[d-Arg(1)、d-Trp(5, 7, 9)、Leu(11)]SP 的物质 P (SP)类似物、PKC 抑制剂 109203X (GF-1)、PKC 抑制剂 Ro 31-8220、GO7874、染料木黄酮、特异性 Src 抑制剂 PP-1 和 PP-2、白屈菜季铵碱或粗糠柴毒素。

25 68. 如权利要求 54 所述的方法，其特征在于，所述抑制剂阻断 PKD 与 II 类 HDAC 的结合。

69. 如权利要求 68 所述的方法，其特征在于，通过免疫共沉淀来测定所述阻断结合的方法。

30 70. 如权利要求 54 所述的方法，其特征在于，所述抑制剂阻断 PKD 磷酸化 II 类 HDAC。

71. 如权利要求 54 所述的方法，其特征在于，所述抑制剂增强 HDAC 与 Mef-2

或其它 II 类 HDAC 调节的转录因子的结合。

72. 一种转基因的非人哺乳动物，它的细胞包含在真核细胞中具有活性的启动子控制下的异源 PKD 基因。

73. 如权利要求 72 所述的转基因哺乳动物，其特征在于，所述哺乳动物是小鼠。

5 74. 如权利要求 72 所述的转基因哺乳动物，其特征在于，所述异源性 PKD 基因是人源的。

75. 如权利要求 72 所述的转基因哺乳动物，其特征在于，所述启动子是组织特异性启动子。

10 76. 如权利要求 75 所述的转基因哺乳动物，其特征在于，所述组织特异性启动子是肌肉特异性启动子。

77. 如权利要求 75 所述的转基因哺乳动物，其特征在于，所述组织特异性启动子是心肌特异性启动子。

15 78. 如权利要求 75 所述的转基因哺乳动物，其特征在于，所述肌肉特异性启动子选自肌球蛋白轻链-2 启动子、 α 肌动蛋白启动子、肌钙蛋白 1 启动子、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换子启动子、抗肌萎缩蛋白启动子、肌酸激酶启动子、 $\alpha 7$ 整合素启动子、脑钠尿肽启动子、肌球蛋白重链启动子、ANF 启动子和 αB -晶体蛋白/小热激蛋白启动子。

79. 如权利要求 72 所述的转基因哺乳动物，其特征在于，所述激酶是组成性活化的。

20 80. 如权利要求 72 所述的转基因哺乳动物，其特征在于，所述激酶是显性失活的。

81. 一种转基因的非人哺乳动物，它的细胞包含在所述非人哺乳动物细胞中有活性的异源性启动子控制下的 PKD 基因。

82. 如权利要求 81 所述的转基因哺乳动物，其特征在于，所述哺乳动物是小鼠。

25 83. 如权利要求 81 所述的转基因哺乳动物，其特征在于，所述 PKD 基因是人源的。

84. 如权利要求 83 所述的转基因哺乳动物，其特征在于，所述启动子在真核细胞中具有活性。

85. 如权利要求 84 所述的转基因哺乳动物，其特征在于，所述启动子是组织特异性启动子。

30 86. 如权利要求 85 所述的转基因哺乳动物，其特征在于，所述组织特异性启动子是肌肉特异性启动子。

87. 如权利要求 85 所述的转基因哺乳动物，其特征在于，所述组织特异性启动子是心肌特异性启动子。
88. 一种转基因的非人哺乳动物，它的细胞缺少一个或两个天然 PKD 等位基因。
89. 如权利要求 88 所述的哺乳动物，其特征在于，通过同源重组敲除了一个或多个基因。
90. 一种治疗心肌梗塞的方法，该方法包括在对象心脏细胞中降低 PKD 的活性。
91. 一种预防心脏肥大和扩张性心肌症的方法，该方法包括在对象心脏细胞中降低 PKD 的活性。
92. 一种抑制心脏肥大发展的方法，该方法包括在对象心脏细胞中降低 PKD 的活性。
93. 一种治疗心力衰竭的方法，该方法包括在对象心脏细胞中降低 PKD 的活性。
94. 一种抑制心力衰竭发展的方法，该方法包括在对象心脏细胞中降低 PKD 的活性。
95. 一种提高心力衰竭或心脏肥大患者运动耐量的方法，该方法包括在对象心脏细胞中降低 PKD 的活性。
96. 一种减少心力衰竭或心脏肥大对象住院的方法，该方法包括在对象心脏细胞中降低 PKD 的活性。
97. 一种改善心力衰竭或心脏肥大患者生活质量的方法，该方法包括在对象心脏细胞中降低 PKD 的活性。
98. 一种降低心力衰竭或心脏肥大对象发病率的方法，该方法包括在对象心脏细胞中降低 PKD 的活性。
99. 一种降低心力衰竭或心脏肥大对象死亡率的方法，该方法包括在对象心脏细胞中降低 PKD 的活性。

抑制蛋白激酶 C- μ (PKD) 用作心脏肥大和心力衰竭的疗法

5

发明背景

本发明要求 2003 年 5 月 21 日提交的美国临时专利序列号 60/472,298 的优先权, 将其整体内容引入本文作为参考。由于国立卫生研究院基金编号 P01HL61544 的资助, 美国政府拥有本发明的权利。

1. 发明领域

10

本发明总的涉及发育生物学和分子生物学领域。更具体说, 它涉及心肌细胞中的基因调控和细胞生理学。具体地, 本发明涉及采用蛋白激酶 C- μ (PKD) 抑制剂来阻断组蛋白脱乙酰酶的磷酸化。也涉及用 PKD 抑制剂治疗心脏肥大和心力衰竭。

2. 相关领域描述

15

心脏肥大是对强加于心脏的工作负荷增加反应中的一种基础性适应机制。它反映了由于神经、内分泌或机械刺激之一或它们的组合作用使心脏细胞大小和质量(而不是细胞数量)增加的一种特定过程。高血压, 另一种涉及心脏肥大的因素, 经常是充血性心力衰竭的先兆。当发生心力衰竭时, 左心室通常肥大并扩张, 心脏收缩功能指数如心射血分数降低。已清楚, 心脏肥大反应是一种复杂的综合征, 阐明导致心脏肥大的途径将有益于各种刺激所致心脏病的治疗。

20

转录因子亚家族, 肌细胞增强子因子-2 家族(MEF2)参与了心脏肥大的发生。例如, 各种刺激可提高细胞内钙水平, 导致细胞信号转导系统或途径, 包括钙调磷酸酶、CAM 激酶、PKC 和 MAP 激酶的级联反应。所有这些信号都激活 MEF2, 导致心脏肥大。然而, 人们仍然没有完全了解各种信号系统是如何行使它们对 MEF2 的作用并调节其肥大信号转导的。已知某些组蛋白脱乙酰酶蛋白(HDAC)涉及调节 MEF2 活性。

25

已经克隆了脊椎生物的十一种不同的 HDAC。所有 HDAC 的催化区域都有同源性。组蛋白乙酰化酶和脱乙酰酶在控制基因表达中起到重要作用。组蛋白乙酰化酶, 通常称为乙酰基转移酶(HAT)和脱乙酰酶(HDAC)活性之间的平衡决定了组蛋白的乙酰化水平。因而, 乙酰化的组蛋白引起染色质松弛和基因转录激活, 而脱乙酰化的染色质通常无转录活性。在先前的报道中, 本发明者的实验室证明了 HDAC4 和 5 与 MEF2

30

二聚化而抑制 MEF2 的转录活性, 而且, 该相互反应需要存在 HDAC4 和 5 蛋白的 N 末

端(McKinsey 等, 2000a, b)。

近年来, 已阐明和描述了 HDAC 与 MEF2 之间的联系(McKinsey 等, 2002)。表明 HDAC 和 MEF2 之间的结合受磷酸化控制, 和一种未鉴定的激酶介导此结合。缺少磷酸化位点的突变 HDAC 对心肌细胞肥大起着信号转导抗性抑制剂作用, 使 HDAC 敲除小鼠对心力衰竭和肥大超敏感(Zhang 等, 2002)。也已证明, 某些 HDAC 抑制剂是抗肥大的。在其他文章中, 近年的研究也突出了 HDAC 在癌生物学中的重要作用。实际上, 测试了各种 HDAC 抑制剂在诱导癌细胞分化和/或调亡的能力(Marks 等, 2000)。这些抑制剂包括 N-辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA)(Butler 等, 2000; Marks 等, 2001)、间-羧基肉桂酸双-羟酰胺(Coffey 等, 2001)和焦酰胺(pyroxamide)(Butler 等, 2001)。

所有这些发现证明 HDAC 在疾病发展中的重要作用, 具体数据证明 HDAC-MEF2 结合是心脏病的关键因素。因此, 负责介导该结合的激酶是导致肥大的级联反应的焦点, 是潜在的治疗靶。迄今, 仍未鉴定到负责该结合的激酶。

发明概述

因此, 本发明提供了一种治疗病理性心脏肥大和心力衰竭的方法, 该方法包括(a)鉴定患有心脏肥大或心力衰竭的病人; 和(b)给予病人 PKD 抑制剂。给药可包括静脉内、口服、透皮、缓释、延迟释放、控释、栓剂、舌下给药, 或直接注入心脏组织给药。

该方法还可包括给予第二种治疗方案, 如 β 阻断剂、变力药物(ionotrope)、利尿剂、ACE-I、AII 拮抗剂、BNP、 Ca^{2+} 阻断剂或 HDAC 抑制剂。可以在给予 PKD 抑制剂的同时, 或给予 PKD 抑制剂之前或之后给予第二治疗方案。该治疗可改善病理性心脏肥大或心力衰竭的一种或多种症状, 如运动能力增强、心排出血量增加、左心室舒张末期压降低、肺毛细血管嵌入压降低、心脏输出或心脏指数提高、肺动脉压降低、左心室收缩和舒张末期尺度降低、左右心室壁压力降低、壁张力和壁厚度降低、生活质量提高和疾病相关发病率和死亡率降低。

在另一实施方式中, 提供了一种预防病理性心脏肥大或心力衰竭的方法, 该方法包括(a)鉴定处于发生病理性心脏肥大或心力衰竭危险的病人; 和(b)给予病人 PKD 抑制剂。给药可包括静脉内、口服、透皮、缓释、延迟释放、控释、栓剂、舌下给药, 或直接注入心脏组织。危险病人可出现一系列危险因素的一种或多种, 包括长时间未得到控制的高血压、未纠正的心瓣膜疾病、慢性心绞痛或近期心肌梗塞。危险病人也可能有先天性、家族性或遗传性易患心脏病、心力衰竭或心脏肥大的体质。

心力衰竭或其症状可包括局部缺血、心肌病变、主动脉狭窄、或其它心肌疾病。

根据前述的实施方式,PKD 抑制剂可以是任何降低 PKD 活性或抑制 II 类 HDAC PKD 磷酸化的分子。这包括蛋白、肽、DNA 分子(包括反义)、RNA 分子(包括 RNAi、反义和核酶)、抗体(包括单链抗体)、编码抗体的表达构建物和小分子。该小分子可包括
5 但不限于白藜芦醇、吡啶唑啉、Godecke6976 (Gö6976)、星孢素、K252a、包括 [d-Arg(1)、d-Trp(5,7,9)、Leu(11)]SP 的物质 P(SP) 类似物、PKC 抑制剂 109203X(GF-1)、PKC 抑制剂 Ro31-8220、G07874、染料木黄酮、特异性 Src 抑制剂 PP-1 和 PP-2、白屈菜季铵碱或粗糠柴毒素。

HDAC 抑制剂可包括但不限于,曲古抑菌素 A、trapoxin B、MS275-27、间-羧基
10 肉桂酸双-羟酰胺、depudecin、oxamflatin、apicidin、N-辛二酰苯胺异羟肟酸、Scriptaid、焦酰胺、2-氨基-8-氧-9,10-环氧-癸酰酯、3-(4-芳酰基-1H 吡咯-2-基)-N-羟基-2-亚克力酰胺和 FR901228。此外,下面的参考文献描述了可选择用于本发明的组蛋白脱乙酰酶抑制剂:AU9,013,101; AU9,013,201; AU9,013,401; AU6,794,700; EP1,233,958; EP1,208,086; EP1,174,438; EP1,173,562; EP1,170,008;
15 EP1,123,111; JP2001/348340; U. S. 2002/103192; U. S. 2002/65282; U. S. 2002/61860; W002/51842; W002/50285; W002/46144; W002/46129; W002/30879; W002/26703; W002/26696; W001/70675; W001/42437; W001/38322; W001/18045; W001/14581; Furumai 等(2002); Hinnebusch 等(2002); Mai 等(2002); Vigushin 等(2002); Gottlicher 等(2001); Jung(2001); Komatsu 等(2001); Su 等(2000)。

20 在另一实施方式中,提供了评价 PKD 抑制剂治疗心脏肥大或心力衰竭的功效的方法,该方法包括(a)提供 PKD 抑制剂;(b)用 PKD 抑制剂处理细胞;和(c)测定一种或多种心脏肥大参数的表达,与没有用 PKD 抑制剂处理的细胞中一种或多种心脏肥大参数相比,其中若有一种或多种心脏肥大参数变化将鉴定该 PKD 抑制剂是心脏肥大或心力衰竭的抑制剂。

25 所述细胞可以是肌细胞,包含在分离的完整组织中的分离肌细胞如心肌细胞,初生大鼠心室肌细胞,H9C2 细胞,体内位于完整心肌中,或转基因的非人哺乳动物的心肌细胞。可以刺激该肌细胞或完整心肌,以触发肥大反应的一种或多种心脏肥大参数。所述刺激可以是主动脉结扎,快速心脏起搏,诱导心肌梗塞,转基因表达,用化学品、药剂或药物处理。化学剂或药剂可包括但不限于血管紧张素 II、异丙肾
30 上腺素、苯肾上腺素、内皮缩血管肽-I、血管收缩药和抗利尿剂。治疗可以在体内或体外进行。

一种或多种心脏肥大参数可包括右心室射血分数、左心室射血分数、心室壁厚、心脏重/体重比、右或左心室重/体重比或心脏重标准化度量。所述参数还可包括所述肌细胞或完整心肌中一种或多种靶基因的表达水平，其中所述一种或多种靶基因的表达水平是心脏肥大的指标。

- 5 一种或多种靶基因可选自 ANF、 α -MyHC、 β -MyHC、 α -骨架肌动蛋白、心脏肌动蛋白、SERCA、细胞色素氧化酶亚基 VIII、小鼠 T-复合体蛋白、胰岛素生长因子结合蛋白、Tau-微管结合蛋白、泛素羧基端水解酶、Thy-1 细胞表面糖蛋白或 MyHCI 型抗原。可用操作性连接于靶基因启动子的报道蛋白编码区，如荧光素酶、 β -gal 或绿色荧光蛋白来测定表达水平。可以用核酸探针与靶 mRNA 或扩增的核酸产物杂交来
- 10 测定表达水平。

- 一种或多种心脏肥大参数也包括细胞形态的一个或多个方面，如肌节组装、细胞大小、细胞收缩性、总蛋白合成或细胞毒性。该细胞还可表达缺少一个或多个磷酸化位点的突变的 II 类 HDAC 蛋白，其中所述测定包括测定 II 类 HDAC 的磷酸化、II 类 HDAC 的核输出或 II 类 HDAC 与 MEF-2 的结合。测定还可包括测定 II 类 HDAC 与
- 15 MEF-2 结合的增加或 MEF-2 依赖性转录的降低。

- 在另一实施方式中，提供了一种鉴定心脏肥大或心力衰竭抑制剂的方法，该方法包括(a)提供 PKD；(b)使 PKD 与候选抑制剂物质接触；和(c)测定 PKD 的活性，其中 PKD 激酶活性的大大降低可将候选抑制剂物质鉴定为心脏肥大或心力衰竭抑制剂。可以从完整细胞或心脏细胞中纯化得到 PKD，或 PKD 可位于完整细胞中。该细胞可以
- 20 是肌细胞，如心肌细胞。

- 可通过测定 HDAC，更具体说是 II 类 HDAC 磷酸化的降低来测定激酶活性的降低。所述候选抑制剂物质可包括但不限于干扰 RNA、抗体制剂、单链抗体、RNA 或 DNA 反义构建物、酶、化学品、药物或药剂，或小分子。该候选抑制剂还可为白藜芦醇、吲哚咔唑、Godecke6976(Gö6976)、星孢素、K252a、包括[d-Arg(1)、d-Trp(5, 7, 9)、
- 25 Leu(11)]SP 的物质 P(SP)类似物、PKC 抑制剂 109203X(GF-1)、PKC 抑制剂 Ro31-8220、G07874、染料木黄酮、特异性 Src 抑制剂 PP-1 和 PP-2、白屈菜季铵碱或粗糠柴毒素。

测定激酶活性的降低还可通过免疫共沉淀测定 PKD 与 II 类 HDAC 结合的抑制，或通过测定 II 类 HDAC 磷酸化的阻断。PKD 抑制剂可增强 II 类 HDAC 与 MEF-2 或其它 II 类 HDAC 调节的转录因子的结合。

- 30 在本发明的另一实施方式中，提供了一种转基因的非人哺乳动物，其细胞含有在真核细胞中具有活性的启动子控制下的异源性 PKD 基因。在另一实施方式中，提

供了一种转基因的非人哺乳动物，其细胞含有在所述非人哺乳动物细胞中具有活性的异源性启动子控制下的 PKD 基因。在另一实施方式中，提供了一种转基因的非人哺乳动物，其细胞缺少一个或两个天然 PKD 等位基因，还可通过同源重组敲除这些等位基因。该转基因的非人哺乳动物可以是小鼠。该启动子可以是组织特异性的，也可对肌肉组织具有特异性，还可对心肌组织具有特异性。

PKD 基因可以是人源的。该基因还可编码该蛋白的组成性活化形式或该蛋白的显性失活形式。该启动子可以是在真核细胞中具有活性的。肌肉特异性启动子可选自：肌球蛋白轻链-2 启动子、 α 肌动蛋白启动子、肌钙蛋白 1 启动子、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换蛋白启动子、肌营养不良蛋白启动子、肌酸激酶启动子、 $\alpha 7$ 整合素启动子、脑钠肽启动子、肌球蛋白重链启动子、ANF 启动子和 αB -晶体蛋白/小热激蛋白启动子。

在本发明另一实施方式中，使患者心脏细胞的 PKD 活性降低，能治疗心肌梗塞、预防心脏肥大和扩张性心肌病变、抑制心脏肥大的发展、治疗心力衰竭、抑制心力衰竭的发展、提高心力衰竭或心脏肥大患者的运动耐量、减少心力衰竭或心脏肥大患者的住院治疗、改善心力衰竭或心脏肥大患者的生活质量和降低心力衰竭或心脏肥大患者的发病率和死亡率。

附图简要说明

下面的附图构成本说明书的一部分，包括附图是为了进一步展示本发明的某些方面。通过参考这些附图中一幅或多幅，结合本文所述具体实施方式的详述，可以更好地理解本发明。

图 1A-D—HDAC5 的 PKC 依赖性核输出。图 1A. 在六孔板中培养 COS 细胞，用 GFP-HDAC5 表达载体 (1 微克) 转染，用所示化合物刺激，如材料和方法中所述。加入化合物六十分钟后，用荧光显微镜测定 GFP-HDAC5 的分布。PMA 刺激导致 GFP-HDAC5 从核中全部重定位至胞浆，而伊屋诺霉素引发了部分反应。图 1B. 用编码 HDAC5 或由丙氨酸替代丝氨酸 259 和 498 的 HDAC5 突变体 (HDAC5S259/498A) 的 FLAG-标记的表达载体 (各 1 微克) 转染 COS 细胞。用 PMA 刺激细胞 60 分钟，用抗 FLAG 第一抗体和偶联荧光素的第二抗体作间接免疫荧光测定 HDAC5 分布。HDAC5259/498A 能抵抗 PMA 的刺激。图 1C. 用编码 GFPHDAC5 的表达载体 (1 微克) 转染 COS 细胞，并用 PMA 刺激所示时间。图 1D. 用编码 HDAC5 或 HDAC5S259/498A 的 FLAG-标记的表达载体 (各 1 微克) 瞬时转染 COS 细胞。用 PKC 抑制剂双吡啶马来酰亚胺 (Bis I; $10 \mu\text{M}$) 预处理细胞 30 分钟，用 PMA 刺激 30 分钟，如图所示。依次进行免疫沉淀和免疫印迹检测 FLAG-HDAC5

与内源性 14-3-3 的结合。

图 2A-D—PKC 抑制阻断心肌细胞中 PE-介导的 HDAC5 的核输出。图 2A. 定量测定 HDAC5 核输出的代表方案。在 96 孔板中培养 NRVM, 用编码 GFP-HDAC5 的腺病毒感染。血清饥饿细胞, 用激动剂和抑制剂处理, 固定并用 Hoechst 染料染色。用 Cellomics
5 High Content 摄像系统定量核中与胞浆中 GFP-HDAC5 的相对丰度, 根据 Hoechst 荧光区别细胞核, 根据这些核的尺寸确定周围的胞浆。测得的值代表细胞核减去胞质荧光强度差的平均数。图 2B. 试验验证。用编码 GFP-HDAC5 的腺病毒感染 NRVM, 使之接触 0.1 至 20 μ M 浓度范围内的 PE。刺激 2 小时后, 准备细胞进行 Cellomics 分析。测定 8 孔/条件每孔至少 50 个细胞(总共 400 个细胞)的细胞核减去胞质荧光强度差的平均值。将未处理细胞的值设为 100%。PE 引发了剂量依赖性的 HDAC5 核输出。
10 图 2C. 用腺病毒 GFP-HDAC5 感染 NRVM, 用激酶抑制剂(材料和方法中所述抑制剂的浓度)预处理 NRVM。用 PE (20 μ M) 刺激 2 小时后定量测定 HDAC5 的亚细胞分布。测定 8 孔/条件每孔至少 50 个细胞(总共 400 个细胞)的细胞核减去胞质荧光强度差的平均值。较高值表明核中 HDAC5 丰度较高。显示了孔与孔间的标准差。只有星孢素和 PKC
15 抑制剂 Bis I 有效阻断了 HDAC5 的核输出。图 2D 中显示了代表性图片。

图 3A-C—通过信号抗性 HDAC5 抑制 PKC-介导的心脏肥大。在 6 孔板中培养 NRVM, 用腺病毒(MOI=10)转染, 该腺病毒编码 LacZ 对照(Ad-LacZ)或由丙氨酸替代丝氨酸 259 和 498 的 FLAG-标记的 HDAC5(Ad-HDAC5S/A), 为 14-3-3 介导的核输出所必需。分析前, 用 PE (20 μ M) 或 PMA (100nM) 处理细胞 24 小时。图 3A. 固定细胞, 用特异性
20 抗 α -肌动蛋白的第一抗体和偶联荧光素的第二抗体作间接免疫荧光使肌节显色。图 3B. 用抗 ANF 第一抗体作间接免疫荧光检测 ANF 蛋白。图 3C. 从细胞中收集总 RNA, 用放射标记的所示转录物的特异性寡核苷酸进行斑点印迹分析。用磷光摄像仪定量测定 RNA 水平, 表示为相对于感染 Ad-LacZ 而未受刺激细胞所含量的变化倍数。将数值标准化到 GAPDH 对照。

25 图 4A-F—在激动剂-介导的 HDAC5 的核输出中对 PKC 的不同要求。图 4A. 在 96 孔板中培养 NRVM, 用腺病毒 GFP-HDAC5 感染, 如上所述。血清饥饿细胞 4 小时后, 用 PE (20 μ M)、ET-1 (50nM) 或 FBS (10%) 刺激两小时。如图 4A 中所述地那样准备细胞。血清饥饿后, 用 Bis I (10 μ M) 预处理感染的 NRVM 30 分钟, 用所示激动剂刺激 2 小时。如上所述, 用 Cellomics 摄像系统定量测定 HDAC5 的核输出。较高值表明核中 HDAC5
30 丰度较高。图 4C. 如图 4B 所示进行实验, 除了细胞在激动剂处理前接受 Gö6983 (10 μ M)。图 4D. 如图 4B 所示进行实验, 除了细胞激动剂处理前接受增加剂量的 Gö6976。

图 4E. 用配有数字相机的荧光显微镜拍摄各治疗组的代表性图片。图 4F. 用编码 GFP-HDAC5 的腺病毒感染 NRVM, 在 10 厘米平皿中培养。感染后二十四小时, 血清饥饿细胞四小时, 用 Bis I (10 μ M) 或 Gö6976 (10 μ M) 预处理一小时, 然后用 PE (20 μ M) 或 ET-1 (50nM) 刺激一小时。制备全细胞蛋白裂解物, 如上所述依次进行免疫沉淀和免疫印迹。

图 5A-E—蛋白激酶 D 是一种 HDAC5 激酶。图 5A. II 类 HDAC 的调控性磷酸化位点周围的氨基酸序列。NLS:核定位信号; HDAC 结构域:脱乙酰酶催化域。显示了 PKD 的共有序列靶位点。相对于磷酸化位点-5 位置的亮氨酸是 PKD-定向其它蛋白最佳磷酸化所必需的。图 5B. 用编码融合于由甘氨酸替代亮氨酸 254 和 493 的 HDAC5 (L254/493G) 的 GFP 的表达载体 COS 转染细胞。转染后二十四小时, 不处理细胞(对照)或用 PMA 刺激 30 分钟。图 5C. 用编码 GFP-HDAC5 或 GFPHDAC5S/A 的表达载体(各 1 微克)和 PKD 的组成性活化(S/E)或催化失活(K/W)形式共转染 COS 细胞。转染后 24 小时测定 HDAC5 的定位。图 5D. COS 细胞用编码 FLAGHDAC5 和野生型、组成性活化(S/E)或催化失活(K/W)的 PKD 的 HA-标记的表达载体(各 1 微克)共转染。转染后二十四小时, 用 PMA 或空载体对照处理细胞 30 分钟。如上所述, 免疫沉淀全细胞蛋白裂解物中的 FLAG-HDAC5, 加入到体外激酶试验(IVK)中或通过 SDS-PAGE 分离作 Western 印迹分析, 以测定结合的 PKD。通过 SDS-PAGE 分离磷酸化的 HDAC5, 放射自显影检测。图 5E. 哺乳动物双杂交试验。将编码融合于 HDAC5 的 GAL4 DNA 结合域(Gal4-HDAC5)的表达载体或所示的 HDAC5 丙氨酸取代的突变体, 与编码融合于 VP16 转录激活域的 14-3-3(14-3-3-VP16)的质粒、Gal4-依赖性荧光素酶报道物和编码组成性活化 PKD(S/E)的载体共转染入 COS 细胞中。PKD 激发 HDAC5 和 14-3-3 之间的结合, 这取决于 259 和 498 位置的磷酸化受体。

图 6A-B—心肌细胞中内源性 PKD 与 HDAC5 的结合。图 6A. 在 10 厘米平皿中培养 NRVM, 用编码 FLAG-HDAC5 的腺病毒感染。转染后二十四小时, 用 PMA 刺激细胞 30 分钟, 制备全细胞蛋白裂解物。在 PMA 刺激之前, 用 Bis I 预处理一些细胞 (pre-Bis I; 10 μ M) 30 分钟。如上所述, 免疫沉淀 FLAG-HDAC5, 将其加入到含有 Bis I (post-Bis I; 10 μ M) 或 Gö6976 (post-Gö6976; 10 μ M) 的体外激酶反应中。当用 Bis I (pre-Bis I) 预处理细胞时, HDAC5 的磷酸化被阻断。当直接加入激酶反应混合物中时, Gö6976, 而非 Bis I 阻断了磷酸基转移到 HDAC5 上。图 6B. 用编码 GFP-HDAC5 的腺病毒感染 NRVM, 在 10 厘米平皿中培养。感染后二十四小时, 血清饥饿细胞 4 小时, 用 Bis I (10 μ M) 预处理 30 分钟, 然后用 PE (20 μ M) 刺激一小时。免疫沉淀全细胞裂解物的 HDAC5,

通过免疫印迹检测结合的总 PKD 或丝氨酸 916(p-916)处的自磷酸化 PKD。用 GFP-特异性抗体再检测印迹，以测定免疫沉淀的 HDAC5 总量。

图 7A-D—心脏表达激活的 PKD 导致扩张性心肌病。图 7A. 如材料和方法中所述产生在心脏特异性 α -肌球蛋白重链(α MHC)启动子控制下表达组成性活化 PKD 的转基因小鼠。显示了四周龄的野生型和 α MHC-PKD 转基因(小鼠)心脏的 H&E 切片。也显示 4 个月的 α MHC-PKD 转基因心脏，出现扩张性心肌病。图 7B. 四周龄野生型和 α MHC-PKD 转基因小鼠的心脏重与体重之比。图 7C. 对心脏裂解物的野生型、 α MHC-PKD 和 α MHC-钙调磷酸酶(CnA)作 Western 印迹分析。测定了总的和活化(P-916)PKD 蛋白的水平。箭头标识出与 PKD1 相应的条带。图 7D. 对 4 周龄野生型、CnA 或 PKD 转基因小鼠心脏的总 RNA 进行斑点印迹，分析胚胎基因标记。CnA 和 PKD 印迹下方的数字代表标准化到 GAPDH 水平后相对于野生型样品的增加倍数。

图 8—调节 II 类 HDAC 的核输出和心脏肥大的激酶-依赖性信号转导途径的模型。用 α -肾上腺素能激动剂苯肾上腺素(PE)或内皮缩血管肽-1(ET-1) 刺激心肌细胞导致 HDAC 通过激活 PKD 而磷酸化和核输出。PE 激活 PKD 是通过 PKC 依赖性途径，主要是钙非依赖性的新 PKC(nPKC)途径而发生。然而，心肌细胞 ET-1 中激活 PKD 似乎是 PKC 非依赖性的。随后 PKD 使 HDAC5 磷酸化导致其通过与 14-3-3 结合和激活 MEK2 与肥大性遗传程序而核输出。

示例性实施方式的详述

心力衰竭是全世界发病和致死的主要原因之一。仅在美国，估计显示三百万人目前有心肌病，另外每年还诊断到 400,000 病例。扩张性心肌病变(DCM)，也称为“充血性心肌病”，是最常见的心肌病形式，估计发病率接近每 100,000 人中 40 人(Durand 等，1995)。虽然引起 DCM 有其它原因，但是据显示，家族性扩张性心肌病占“特发性”DCM 的约 20%。大约一半的 DCM 病例是特发性，其余的病例与已知的疾病过程相关。例如，癌症化疗中使用的某些药物(例如阿霉素和柔红霉素)引起严重心肌损伤。此外，很多 DCM 病人是长期酗酒者。幸运的是，如果这些病人在病程早期减少或停止饮酒，心肌功能障碍的发展可以停止或逆转。分娩前后心肌病是另一类型的特发性 DCM，与感染性后遗症有关。总之，包括 DCM 在内的心肌病是重要的公众健康问题。

心脏病及其表现，包括冠状动脉疾病、心肌梗塞、充血性心力衰竭和心脏肥大，无疑是当今美国的主要健康风险。诊断、治疗和支持这些疾病患者的费用达好几万美元。心脏病中两种尤其严重的表现是心肌梗塞和心脏肥大。就心肌梗塞而言，一

般是冠状动脉粥样硬化引起的急性血小板性冠状动脉闭塞，导致心肌细胞死亡。因为心肌细胞，即心脏肌肉细胞是终末分化细胞，通常不能细胞分裂，所以当它们在急性心肌梗塞过程中死亡时，常被疤痕组织代替。疤痕组织不具有收缩性，无助于心脏功能，但经常由于在心脏收缩期扩张或由于心室大小和有效半径增大，例如

5 变肥大而对心脏功能起到有害作用。就心脏肥大而言，一种理论认为它类似于发育异常疾病，并由此提出了心脏中的发育信号可否促使肥大疾病发生的问题。心脏肥大是心脏对基本上所有心脏病，包括由高血压、机械载荷、心肌梗塞、心律失常、内分泌紊乱和心脏收缩蛋白基因中的遗传突变引起的心脏病的适应性反应。虽然肥大反应刚开始是增加心输出的补偿机制，但是持续性肥大可导致 DCM、心力衰竭和猝

10 死。在美国，每年将近五十万人被诊断为心力衰竭，死亡率接近 50%。

心脏肥大的原因和结果已有广泛记载，但还未阐明其背后的分子机制。对这些机制的理解主要关系到预防和治疗心脏病，并将成为设计特异性靶向心脏肥大和心力衰竭的药物中的主要治疗方式。因为病理性心脏肥大一般不产生任何症状，直到心脏损伤严重到足以产生心力衰竭，伴随心力衰竭的心肌病症状。这些症状包括呼

15 吸急促、运动疲劳、不变成急促呼吸就不能躺平(端坐呼吸)、阵发性夜间呼吸困难、心脏尺寸增大和/或小腿水肿。病人经常伴有血压升高、额外心音、心脏杂音、肺和全身血栓、胸痛、肺充血和心悸。此外，DCM 引起射血分数(即一种固有心脏收缩功能和重建的心脏收缩功能的测量方法)降低。该疾病的特征还有心室扩张和因心肌收缩力减弱而使心脏收缩功能严重受损，这在很多病人中导致扩张性心力衰竭。由于

20 肌细胞/心肌功能障碍，患病的心脏也进行细胞/腔室重建，这导致“DCM 表型”。随着疾病的发展，这些症状也不断发展。DCM 病人发生威胁生命的心律不齐，包括心室心动过速和心室肌纤维震颤的发病率也大大增加。在这些病人中，昏厥发作(头昏)被认为是猝死的先兆。

扩张性心肌病的诊断一般依赖于证明胸腔尺寸扩大，尤其是心室扩大。通常可

25 以在胸部 X 光片上观察到扩大，但用超声心动图评价更准确。DCM 常难以与急性心肌炎、瓣膜性心脏病、冠状动脉疾病和高血压性心脏病相区分。一旦作出扩张性心肌病的诊断，利用各种方法鉴定和治疗有可能逆转病原，并防止进一步心脏损伤。例如，必须排除冠状动脉疾病和瓣膜性心脏病。需要关注和控制贫血、异常心动过速、营养不良、酗酒、甲状腺病和/或其它问题。

30 如上所述，用药物治疗仍然代表了减少或消除心力衰竭表现的主要机制。利尿剂构成轻度至中度心力衰竭的一线治疗药物。不幸的是，很多常用的利尿剂(如噻嗪

类)具有很多副作用。例如,某些利尿剂可增加血清胆固醇和甘油三酯。而且,利尿剂对严重心力衰竭病人通常是无效的。

如果利尿剂无效,则可用血管舒张剂;血管紧张素转化(ACE)抑制剂(例如,依那普利和赖诺普利)不仅能使症状缓解,也有报道称它们能降低死亡率(Young 等, 1989)。然而,ACE 抑制剂也伴有副作用,导致它们禁忌用于某些疾病(例如,肾动脉狭窄)的患者。类似地,变力剂药物治疗(即通过增加心肌肌肉收缩力而提高心脏输出的药物)伴有不良反应,包括胃肠道不良反应和中枢神经系统功能障碍。

因此,当前使用的药物在特定病人群体中具有严重的缺点。取得新的安全有效的药物无疑将使不能使用现有药物治疗方式或不能从这些方式获得充分缓解的病人受益。DCM 病人的预后是可变的,取决于心室功能障碍的程度,多数死亡发生在诊断后五年内。

I. 本发明的内容

本发明者先前已经证明,通过 MAP 激酶磷酸化 MEF2 羧基端活化结构域中的三个保守位点可活化 MEF2(参见, Katoh 等 1998)。CaMK 信号也通过磷酸化 II 类 HDAC 而激活 MEF2,而 II 类 HDAC 在成人心中高水平表达,它们可以抑制心脏的 MEF2 活性。一旦磷酸化,这些 HDAC 就与 14-3-3 结合,并与 MEF2 分离,导致移位到细胞核中,激活 MEF2 依赖性转录。不能被磷酸化的 II 类 HDAC 突变体不能从 MEF2 上解离,从而不可逆地阻断 MEF2 靶基因的表达。

也证明,在体外对各种信号转导途径反应中,编码 HDAC5 的不可磷酸化突变体的腺病毒能够防止心肌细胞肥大(Lu 等, 2000)。这些发现提示 II 类 HDAC 中这些保守位点的磷酸化是引起心脏肥大的必需步骤。发现还提示通过隔离和靶向负责磷酸化 II 类 HDAC 的激酶而抑制 II 类 HDAC 的磷酸化,从而阻断肥大和后续心力衰竭的发展。

本发明者在本文中描述了 PKD 作为负责磷酸化 II 类 HDAC、介导它们与 MEF-2 的相互作用和部分控制 II 类 HDAC 的核或胞浆定位的激酶的特征。本发明还提出通过抑制 PKD 治疗性干预心脏肥大和心力衰竭,以及筛选用于治疗心脏肥大和心力衰竭治疗药物的方法。

II. 蛋白激酶

激酶通过将磷酸基团加入蛋白调节很多不同细胞的增殖、分化和信号转导过程。不受控制的信号转导与各种疾病,包括炎症、癌症、动脉粥样硬化、牛皮癣和心脏

疾病和肥大有关。可逆性蛋白磷酸化是控制真核细胞活性的主要策略。据估计, 在典型的哺乳动物细胞中, 10,000 个活性蛋白中有 1000 个以上是磷酸化的。通常, 蛋白激酶驱动激活的高能磷酸根从三磷酸腺苷分子(ATP)转移到某特定蛋白上, 而蛋白磷酸酶从该蛋白去除高能磷酸。在对胞外信号(激素、神经递质、生长和分化因子等)、
5 细胞周期检查点、和环境或营养应激反应中发生的磷酸化, 大概类似于打开分子开关。当开关打开时, 合适的蛋白激酶即激活代谢酶、调节蛋白、受体、细胞骨架蛋白、离子通道或离子泵, 或转录因子。

激酶是最大的已知蛋白群体, 是具有很大的不同功能和特异性的酶超家族。它们通常按它们的底物、它们调节的分子或突变表型的某些方面来命名。按照底物,
10 可以将蛋白激酶粗略地分成两组: 磷酸化酪氨酸残基的激酶(蛋白酪氨酸激酶, PTK)和磷酸化丝氨酸或苏氨酸残基的激酶(丝氨酸/苏氨酸激酶, STK)。一些蛋白激酶具有双重特异性, 磷酸化苏氨酸和酪氨酸残基。几乎所有激酶都含有类似的 250-300 个氨基酸的催化域。含有亚域 I-IV 的 N-末端域通常折叠成双叶结构, 该结构能结合 ATP(或 GTP)供体分子, 并确定其方向。含有亚域 V IA-XI 的较大 C 末端叶, 能与蛋
15 白底物结合, 并将 γ 磷酸根从 ATP 转移到丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基的羟基上。亚域 V 跨越两叶。

可根据位于激酶域任一侧或插入激酶域环中的不同氨基酸序列(通常 5 至 100 个残基)将激酶分类为家族。这些加入的氨基酸序列可以调节各激酶, 因为它识别靶蛋白并与其相互作用。激酶域的一级结构保守, 可以进一步再分成 11 个亚域。这 11
20 个亚域各自含有特异性残基和基序, 或氨基酸模式, 它们是该亚域的特征并高度保守(Hardie 和 Hanks, 1995)。

第二信使依赖性蛋白激酶主要介导第二信使如环化 AMP(cAMP)、环化 GMP、三磷酸肌醇、磷脂酰肌醇、3,4,5-三磷酸、环化 ADP 核糖、花生四烯酸、甘油二酯和钙-钙调蛋白的作用。环化 AMP 依赖性蛋白激酶(PKA)是 STK 家族的重要成员。在所有已经研究的原核和动物细胞中, 环化 AMP 都是激素作用的胞内介质。这些激素诱导的
25 细胞反应包括甲状腺激素分泌、皮质醇分泌、孕酮分泌、糖原降解、骨再吸收及心率和心肌收缩力的调节。在所有动物细胞中都发现了 PKA, 认为它是环化 AMP 在大多数这些细胞中起作用的原因。PKA 表达的改变与各种不适和疾病, 包括癌症、甲状腺机能障碍、糖尿病、动脉粥样硬化和心血管疾病相关(Isselbacher 等, 1994)。

30 钙-钙调蛋白(CaM)依赖性蛋白激酶也是 STK 家族的成员。钙调蛋白是钙受体, 它在对钙结合的反应中通过结合于靶蛋白而介导了很多钙调节过程。这些过程中的

主要靶蛋白是 CaM 依赖性蛋白激酶。CaM-激酶参与平滑肌收缩(MLC 激酶)、糖原降解(磷酸化酶激酶)和神经传递(CaM 激酶 I 和 CaM 激酶 II)的调节。CaM 激酶 I 能磷酸化各种底物,包括神经递质相关的蛋白突触蛋白 I 和 II、基因转录调节蛋白、CREB 和囊性纤维化传导调节蛋白、CFTR(Haribabu 等、1995)。CaMII 激酶也在不同位点磷酸化突触蛋白,并通过磷酸化和激活酪氨酸羟化酶控制脑中儿茶酚胺的合成。除了结合于 CAM 以外,很多 CaM 激酶被磷酸化激活。激酶可自身磷酸化,或被另一激酶磷酸化,作为“激酶级联反应”的一部分。

另一配体活化的蛋白激酶是 5'-AMP-活化的蛋白激酶(AMPK)(Gao 等,1996)。哺乳动物 AMPK 通过磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶和羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶调节脂肪酸和甾醇合成,并介导这些途径对细胞应激,如热激和葡萄糖和 ATP 消耗的反应。AMPK 是一种异质三聚复合物,由催化 α 亚基和两个非催化性 β 和 γ 亚基构成,这两个非催化亚基被认为能调节 α 亚基的活性。AMPK 的亚基比预期的更广泛分布于非生脂组织,如脑、心脏、脾和肺。此分布提示,它的作用可能不仅是调节脂类代谢。

有丝分裂原-活化的蛋白激酶(MAP)也是 STK 家族的成员。MAP 激酶也调节胞内信号转导途径。它们通过磷酸化级联反应介导信号从细胞表面转导到核中。已经鉴定到几个亚群,各自表现出不同的底物特异性和对不同胞外刺激的反应(Egan 和 Weinberg,1993)。MAP 激酶的信号转导途径存在于哺乳动物细胞和酵母中。激活哺乳动物途径的胞外刺激物包括表皮生长因子(EGF)、紫外光、高渗透压培养基、热激效应、内毒性脂多糖(LPS)和促炎症细胞因子,如肿瘤坏死因子(TNF)和白介素-1(IL-1)。

PRK(增殖相关激酶)是一种血清/细胞因子可诱导的 STK,参与人巨核细胞细胞周期和细胞增殖的调节(Li 等,1996)。PRK 涉及 STK 的 polo(获自人 polo 基因)家族,与细胞分裂相关。PRK 在肺肿瘤组织中下调,可能是在正常组织中表达下调导致癌转化的原癌基因。MAP 激酶表达的改变与各种疾病,包括癌症、炎症、免疫失调和影响生长和发育的疾病相关。

细胞周期蛋白-依赖性蛋白激酶(CDK)是另一组 STK,它们通过细胞周期控制细胞发展。细胞周期蛋白是小调节蛋白,通过结合于或激活 CDK 起作用,然后 CDK 通过磷酸化和活化参与有丝分裂过程的选择蛋白而触发细胞周期各期。CDK 的独特之处在于它们需要多次输入才能被激活。除了与细胞周期蛋白结合之外,CDK 活化还需要特定苏氨酸残基的磷酸化和特定酪氨酸残基的去磷酸化。

蛋白酪氨酸激酶 PTK,特异性磷酸化它们靶蛋白上的酪氨酸残基,它们可以分

为跨膜的、受体 PTK 和非跨膜的、非受体 PTK。跨膜的蛋白-酪氨酸激酶是大多数生长因子的受体。生长因子与该受体的结合激活磷酸基团从 ATP 转移到该受体和其它特异性蛋白所选酪氨酸侧链上。与受体 PTK 结合的生长因子(GF)包括：表皮 GF、血小板衍生 GF、纤维母细胞 GF、肝细胞 GF、胰岛素和胰岛素样 GF、神经 GF、血管内皮 GF、和巨噬细胞集落刺激因子。

非受体 PTK 缺少跨膜区，而能与细胞表面受体的胞内区形成了复合物。此受体通过非受体 PTK 发挥作用，包括细胞因子、激素(人生长激素和促乳素)受体和 T 和 B 淋巴细胞上的抗原-特异性受体。

很多这些 PTK 都先鉴定为癌细胞突变癌基因的产物，在癌细胞中它们的活化不再受正常细胞的控制。实际上，大约三分之一的已知癌基因编码 PTK，细胞转化(癌发生)经常伴有酪氨酸磷酸化活性升高(Carbonneau 和 Tonks, 1992)是公知的。因此，在控制一些癌症类型中，调节 PTK 活性是一种重要的策略。

A. 蛋白激酶 C 家族

蛋白激酶 C(PKC)蛋白是 STK 家族的成员。蛋白激酶 D(PKD)蛋白与佛波酯和甘油二酯结合，与 PKC 紧密相关(Valverde 等, 1994)。蛋白激酶 C 在调节多种胞外受体-介导的信号转导途径细胞反应中，和在调节多种细胞的分化和增殖中起着关键作用。

蛋白激酶 C 基因/蛋白可能在多种癌症中起重要作用，因此可以用于药物开发和筛选、诊断、预防和/或治疗各种癌症。例如，已在黑色素瘤细胞系的 α -型蛋白激酶 C 基因内鉴定到了肿瘤特异性缺失(Linnenbach 等, 1988)。在某些肿瘤细胞系中观察到 PKC 表达水平升高，这提示 PKC 在涉及生长控制的信号转导途径中起重要作用(Johannes 等, 1994)。

激酶蛋白，特别是蛋白激酶 C 亚家族成员是药物作用和开发的主要靶。因此，对于药物开发领域，鉴定并表征该激酶蛋白亚家族先前未知的成员是有价值的。本发明通过提供与蛋白激酶 C 亚家族成员同源并与心血管疾病相关的人激酶蛋白提高了本领域技术水平。在下文中引入作为参考的以下参考文献都描述了可用于本发明的蛋白激酶 C 抑制剂：美国专利 6,528,294；美国专利 6,441,020；美国专利 6,080,784；美国专利 6,043,270；美国专利 5,955,501。

B. 蛋白激酶 D

PKD 家族包括 PKD1(小鼠 PKD、人 PKC μ)、PKD2 和 PKD3(也称为 PKC)。它们是

丝氨酸/苏氨酸激酶的 AGC 家族成员，但共有独特的分子架构，该架构与其它 AGC 家族成员不同。PKD1 有多个结构域：含有高频率无极性氨基酸、主要是丙氨酸和脯氨酸的 N-末端区；两个富含半胱氨酸的锌指区（也称为 C1a 和 C1b）、一个富含带负电氨基酸的区域、一个血小板-白细胞 C 激酶底物-同源 (PH) 域和一个蛋白 Ser/Thr 激酶催化域 (VanLint 等, 2002)。在 PKD2 和 PKD3 中发现了相似的模块结构。

AGC 家族包括各种亚类：环化核苷酸-调节的蛋白激酶、PKC、PKB/Akt、G-蛋白偶联的受体激酶 (GRK) 和核糖体蛋白 S6 激酶。可以将 PKD 归类于全新 AGC 亚类中，因为它看来组合了该家族不同亚类的特征，损害了它在现有亚类之一中的分类地位 (VanLint 等, 2002)。例如，PKD 家族的富含半胱氨酸结构域与经典和全新 PKC 的该结构域类似，而 PH 域更类似于 PKB 或 GRK 家族，而这并未在任何 PKC 酶中发现。该催化域在结构和功能上如几个标准所判断，都不同于 PKC 家族和其它 AGC 家族成员 (Hayashi 等, 1999; Nishikawa 等, 1997; Sturany 等, 2001; Valverde 等, 1994)。首先，与所有其它已知蛋白激酶催化域相比，PKD 催化域的氨基酸序列与网原虫 (*Dictyostelium*) 的肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 最相似 (41%)，与各 PKC 仅 30-35% 相似。第二，PKD1 具有独特的底物特异性：它并不偏好含有 PKC 家族优选的基本残基的底物位点，而磷酸化相对于丝氨酸靶位点-5 位置上具有亮氨酸的底物 (VanLint 等, 2002)。第三，PKD1 对 PKC 抑制剂 GFI 和 Ro31-8220 不敏感。第四，PKD1 不具有自身抑制性假底物序列，而 PKC 家族的大多数成员中都可以发现该序列。因此，虽然历史上将 PKD 分类为 PKC 家族成员，但单独分类可能更加合适。

有趣的是，已显示 14-3-3 蛋白能够调节 PKD (VanLint 等, 2002)，HDAC 磷酸化后结合于 14-3-3 蛋白。而且，在成年大鼠心脏组织中发现了 PKD (Haworth 等, 2000)。最后，如上所述，已显示 PKD 能够磷酸化相对于丝氨酸-5 位置上具有亮氨酸的底物 (VanLint 等, 2002)，它正好与本发明者在 II 类 HDAC 中发现的磷酸化位点位置相对应 (未发表)。可以在登录号 NM002742 处找到人 PKD 序列。

25

C. 激酶抑制剂

如上所述，蛋白激酶是人类基因组的重要组成部分，是最基础的胞内信号转导机制之一。因此，控制很多类型细胞中的激酶活性 (或缺乏激酶活性) 是很多疾病的主要因素，尤其是涉及增生反应炎症的疾病。即使有各种各样的激酶靶 (已知道大约 500 个激酶的序列)，但是直到最近，特别为抑制激酶设计的药物才进入市场。即使认识到胞内激酶信号转导非常重要已经有很长时间，但是直到最近，才积累了关于

激酶活性和相应的催化机制性质的足够知识，得以开发安全和选择性的激酶抑制药物。例如，Gleevec™(Novartis)和 Iressa™(AstraZeneca)是新的和令人振奋的治疗剂类型的开拓性成员，它们现在已经成熟地用于临床。本领域技术人员会理解，有很多蛋白激酶 C 抑制剂，上述公司具有制造和筛选这些抑制剂的标准方法。因此，
5 在下文中将这些方法和可用于这些系统的已知激酶或化合物引入，作为参考。

D. PKD 抑制剂

有报道说白藜芦醇可以抑制 PKD(Haworth 等, 2001)，因此可用于本发明的一个实施方式中。其它可能的抑制剂包括但不限于吡啶唑啉、Godecke6976(Gö6976)、星孢素、K252a、包括[d-Arg(1)、d-Trp(5, 7, 9)、Leu(11)]SP 的物质 P(SP)类似物、
10 PKC 抑制剂 109203X(GF-1)、PKC 抑制剂 Ro31-8220、PKC 抑制剂 G07874、染料木黄酮、特异性 Src 抑制剂 PP-1 和 PP-2、白屈菜季铵碱、粗糠柴毒素。除了上述的之外，还有抑制基因的普通、非药理方法，下面进行讨论。

I. 核酸

15 a. 反义构建物

反义方法利用了核酸倾向于与“互补”序列配对的优点。互补指那些能够按标准的 Watson-Crick 互补规则进行碱基配对的那些聚核苷酸。即，较大的嘌呤将与较小的嘧啶进行碱基配对，形成鸟嘌呤配对胞嘧啶(G:C)和在 DNA 情况下腺嘌呤配对胸腺嘧啶(A:T)、或在 RNA 情况下腺嘌呤配对尿嘧啶(A:U)的组合。杂交序列中包括的
20 不常见碱基如次黄嘌呤核苷、5-甲基胞嘧啶、6-甲基腺嘌呤、次黄嘌呤和其它碱基不干扰配对。

用聚核苷酸靶向双链(ds)DNA 导致三螺旋形成；靶向 RNA 将导致双螺旋形成。当将反义聚核苷酸引入靶细胞中时，与它们的靶聚核苷酸特异性结合，并干扰转录、RNA 加工、转运、翻译和/或稳定性。可采用反义 RNA 构建物，或编码反义 RNA 的 DNA
25 体内外抑制宿主细胞的基因转录或反义或二者，如在宿主动物，包括人中。

可以设计出能与启动子和其它控制区域、外显子、内含子或甚至基因的外显子-内含子边界结合的反义构建物。考虑到大多数有效的反义构建物将包括与内含子/外显子剪接点互补的区域。因此提议，优选实施方式包括与内含子-外显子剪接点
30 50-200 碱基内的区域互补的反义构建物。观察到可将一些外显子序列包括在该构建物中，而并不严重影响它的靶选择性。所包括的外显材料量将因所用具体外显子和内含子序列而不同。人们可以简单地通过体外测试这些构建物，来确定正常的细胞

功能是否受到影响或具有互补序列的相关基因的表达是否受到影响，而容易地测试是否包括了过多外显子 DNA。

如上所述，“互补”或“反义”指基本上全长互补和只有极少数碱基错配的聚核苷酸序列。例如，当长十五个碱基的序列在十三个或十四个位置上是互补核苷酸时，
5 可称为互补。在自然界，完全互补的序列是在其整个全长上完全互补且没有错配的序列。也考虑其它具有较低同源程度的序列。例如，可以设计具有有限的高度同源区，但也包含非同源区的反义构建物(如核酶；见下)。这些分子，虽然同源性小于50%，仍能在合适的条件下与靶序列结合。

将部分基因组 DNA 与 cDNA 或合成序列组合以产生特异性构建物是有益的。例如，
10 最终构建物中需要其内含子时，将需要采用基因组克隆。cDNA 或合成的聚核苷酸可为此构建物的剩余部分提供更方便的限制性位点，因此，将用于剩余序列。

ii. 核酶

虽然传统上将蛋白用于催化核酸，但发现了另一类可用于该用途的大分子。核酶是以位点特异性方式切割核酸的 RNA-蛋白复合物。核酶具有特异性催化域，该域
15 具有核酸内切酶活性(Kim 和 Cook, 1987; Gerlach 等, 1987; Forster 和 Symons, 1987)。例如，大量核酶能以高度特异性方式加速磷酸转移反应，通常切割寡核苷酸底物中的几种磷酸之一(Cook 等, 1981; Michel 和 Westhof, 1990; Reinhold-Hurek 和 Shub, 1992)。该特异性归因于底物在化学反应之前，需要通过碱基特异性配对相互作用与核酶的内部指导序列(“IGS”)结合。

起初，核酶的催化作用被视为是涉及核酸的序列-特异性切割/连接反应的一部分(Joyce, 1989; Cook 等, 1981)。例如，美国专利 5,354,855 报道，某些核酶可充
20 当核酸内切酶，其序列特异性高于已知的核糖核酸酶，接近 DNA 限制性酶的特异性。因此，序列特异性核酶-介导的基因表达抑制可能尤其适合于治疗应用(Scanlon 等, 1991; Sarver 等, 1990)。最近报道，在加入核酶的某些细胞系中，核酶引起遗传改变；被改变的基因包括癌基因 H-ras、c-fos 和 HIV 基因。这些工作的大部分涉及基
25 于特异性核酶切割的特异性突变密码子，所发生的靶 mRNA 修饰。

iii. RNAi

RNA 干扰(也称为“RNA-介导的干扰”或 RNAi)是一种降低或消除基因表达的机制。据观察，双链 RNA(dsRNA)介导此种降低，它是一个多步过程。dsRNA 激活转录
30 后基因表达监督机制，它的功能是保护细胞免受病毒感染和转位子活性(Fire 等，

1998; Grishok 等, 2000; Ketting 等, 1999; Lin 和 Avery 等, 1999; Montgomery 等, 1998; Sharp 和 Zamore, 2000; Tabara 等, 1999)。这些机制的活化靶向成熟的 dsRNA-互补 mRNA, 使其破坏。RNAi 对研究基因功能提供了大量实验优点。这些优点包括非常高的特异性、容易通过细胞膜和靶基因下调时间长(Fire 等, 1998; Grishok 等, 2000; Ketting 等, 1999; Lin 和 Avery 等, 1999; Montgomery 等, 1998; Sharp 等, 1999; Sharp 和 Zamore, 2000; Tabara 等, 1999)。而且, dsRNA 显示能使广大系统, 包括植物、原生生物、真菌、秀丽新小杆线虫、锥虫(*Trypanasoma*)、果蝇和哺乳动物中的基因沉默(Grishok 等, 2000; Sharp 等, 1999; Sharp 和 Zamore, 2000; Elbashir 等, 2001)。广泛接受的是, RNAi 在转录后起作用, 靶向 RNA 转录物使其降解。看来核和胞浆 RNA 都可能是其靶(Bosher 和 Labouesse, 2000)。

必须设计 siRNA 使其特异性和有效地抑制感兴趣基因的表达。选择靶序列的方法, 即 siRNA 将降解机器导向感兴趣基因中存在的那些序列的方法, 涉及避免可能干扰 siRNA 导向功能的序列同时包括对所述基因具有特异性的序列。一般, siRNA 靶序列长约 21 至 23 核苷酸是最有效的。该长度反映了上述长得多的 RNA 加工产生的消化产物的长度(Montgomery 等, 1998)。

主要通过直接化学合成; 通过与果蝇胚胎裂解物接触加工较长的双链 RNA; 或通过获自 S2 细胞的体外系统制备 siRNA。细胞裂解物或体外加工的用途还可包括后来从裂解物中分离短的 21-23 个核苷酸 siRNA, 实施该过程有些麻烦和昂贵。化学合成过程是制备两种单链 RNA-寡聚物, 然后使这两种单链寡聚物退火成为双链 RNA。化学合成方法是不同的。特意引入本文作为参考的美国专利 5, 889, 136、4, 415, 723 和 4, 458, 066 和 Wincott 等(1995)中提供了非限制性例子。

提出对 siRNA 序列进行几种进一步修饰, 以改变其稳定性或提高其有效性。提出含有双-核苷酸突出端(即 19 个互补核苷酸+3' 非互补二聚物)的合成性互补 21-merRNA 可提供最高的抑制水平。这些方法主要采用两个(2'-脱氧)胸腺嘧啶核苷酸的序列作为双-核苷酸突出端。这些双核苷酸突出端经常写作 dTdT, 以使其区别于掺入 RNA 中的典型核苷酸。文献表明, 降低化学合成 RNA 成本的需要从根本上推动了 dT 突出端的使用。也提出 dTdT 突出端应该比 UU 突出端更稳定, 虽然可得到的数据显示, 与含有 UU 突出端的 siRNA 相比, dTdT 突出端仅有轻微提高(<20%)。

据发现, 当化学合成的 siRNA 在细胞培养中浓度为 25-100nM 时, 它们工作得最好, 但浓度为约 100nM 可达到有效抑制哺乳动物细胞哺乳动物的表达。在哺乳动物细胞培养中约 100nM 的 siRNA 最为有效。然而, 在几种情况下, 使用了较低浓度的

化学合成 siRNA (Caplen, 等, 2000; Elbashir 等, 2001)。

W099/32619 和 W001/68836 提出 siRNA 中所用的 RNA 可以化学或酶学合成。此二专利内容引入本文作为参考。这些参考文献中所述的酶学合成是, 通过用细胞 RNA 聚合酶或噬菌体 RNA 聚合酶(例如, T3, T7, SP6)如本领域已知地使用和生产表达构建物。例如, 参见美国专利 5, 795, 715。所考虑的构建物提供了产生 RNA 的模板, 该 RNA 含有与靶基因一部分相同的核苷酸序列。这些参考文献提供的相同序列的长度至少是 25 个碱基, 可长达 400 个或更多个碱基。该参考文献的一个重要方面是作者考虑用体内的内源性核酸酶复合物将较长 dsRNA 消化成 21-25mer 长度, 从而将长的 dsRNA 转变为 siRNA。它们没有描述或提供体外合成和使用转录的 21-25mer dsRNA 的资料。在 RNA 干扰应用中, 化学或酶学合成制备的 dsRNA 所期望的性能没有任何差别。

类似地, 引入本文作为参考的 W000/44914 提出, 可通过酶学或通过部分/全有机合成产生 RNA 单链。宜从 DNA 模板的, 优选克隆的 cDNA 模板的 PCR 产物酶学合成单链 RNA, RNA 产物是该 cDNA 的完整转录物, 可包含几百个核苷酸。引入本文作为参考的 W001/36646 对 siRNA 合成的方式没有设任何限制, 提出 RNA 可在体外或体内用手动和/或自动步骤合成。该参考文献还提出体外合成可以是化学方法或酶学方法合成, 例如用克隆的 RNA 聚合酶(例如, T3、T7、SP6)转录内源性 DNA(或 cDNA)模板, 或二法的混合方法。对于 RNA 干扰应用来说, 化学或酶学合成制备的 siRNA 之间在所需性能上没有差别。

美国专利 5, 795, 715 报道了在一种反应混合物中同时转录两个互补 DNA 序列链, 该反应中这两个转录物立刻发生杂交。所用模板优选 40-100 碱基对, 两端都装配有启动子序列。该模板能优先附着到固体表面上。用 RNA 聚合酶转录后, 可用产生的 dsRNA 片段检测和/或测定核酸靶序列。

25 III. 组蛋白脱乙酰酶和抑制剂

核小体, 染色质折叠的基本支架, 是动态大分子结构, 影响染色质溶液的构象 (Workman 和 Kingston, 1998)。核小体核心由组蛋白、H2A、HB、H3 和 H4 组成。组蛋白乙酰化产生核小体和使核小体重排, 表现为生物物理性质的改变。组蛋白乙酰基转移酶 (HAT) 和脱乙酰酶 (HDAC) 的活性之间的平衡决定组蛋白的乙酰化水平。乙酰化的组蛋白引起染色质松弛和激活基因转录, 而脱乙酰化的染色质通常无转录活性。

已克隆了脊椎生物的十一种不同 HDAC。最先鉴定的三种人 HDAC 是 HDAC1、HDAC2

和 HDAC3(称为 I 类人 HDAC), HDAC8(Vanden Wyngaert 等, 2000)也加入此列。近年来, 克隆并鉴定了(Grozinger 等, 1999; Zhou 等 2001; Tong 等, 2002)II 类人 HDAC: HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC9 和 HDAC10(Kao 等, 2000)。此外, 已经鉴定了 HDAC11, 但尚未将其归为 I 类或 II 类(Gao 等, 2002)。所有这些 HDAC 的催化区都有
5 同源性。然而, HDAC4、5、7、9 和 10 具有独特的氨基端延伸, 这在其它 HDAC 中并未发现。该氨基端区域包含 MEF2-结合域。已显示 HDAC4、5 和 7 参与心脏基因表达的调节, 在具体实施方式中, 抑制 MEF2 转录活性。还不完全了解 II 类 HDAC 抑制 MEF2 活性的确切机制。一种可能性是 HDAC 与 MEF2 的结合竞争性地或通过使天然的有转录活性的 MEF2 构象不稳定而抑制 MEF2 转录活性。也可能 II 类 HDAC 需要与 MEF2 二
10 聚化, 以将 HDAC 定位于或置于组蛋白附近, 以进行脱乙酰化。

已经鉴定到各种组蛋白脱乙酰酶的抑制剂。建议广泛应用, 但主要集中在癌症治疗上。Saunders 等(1999); Jung 等(1997); Jung 等(1999); Vigushin 等(1999); Kim 等(1999); Kitazomo 等(2001); Vigusin 等(2001); Hoffmann 等(2001); Kramer 等(2001); Massa 等(2001); Komatsu 等(2001); Han 等(2001)。这些疗法是 NIH 负
15 责的 I 期临床试验的主题, 用于实体瘤和非霍金奇氏淋巴瘤。HDAC 也提高转基因的转录, 因此构成了可能的基因治疗辅助方法。Yamano 等(2000); Su 等(2000)。

可通过各种不同机制-蛋白、肽和核酸(包括反义和 RNAi 分子)抑制 HDAC。本领域技术人员广泛知晓克隆、转移和表达遗传构建物的方法, 包括病毒和非病毒载体, 以及脂质体。病毒载体包括腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、痘苗病毒和疱疹病
20 毒。

也考虑到了小分子抑制剂。最广泛知晓的 HDAC 的小分子抑制剂也许是曲古抑菌素 A, 一种羟肟酸。据显示, 它诱导过乙酰化并使 ras 转化的细胞逆转为正常形态(Taunton 等, 1996)和在小鼠模型中诱导免疫抑制(Takahashi 等, 1996)。它可从 BIOMOL Research Labs, Inc., Plymouth Meeting, PA 购得。

以下引入本文作为参考的参考文献都描述了可用于本发明的 HDAC 抑制剂: AU9, 013, 101; AU9, 013, 201; AU9, 013, 401; AU6, 794, 700; EP1, 233, 958; EP1, 208, 086; EP1, 174, 438; EP1, 173, 562; EP1, 170, 008; EP1, 123, 111; JP2001/348340; 美国申请 2002/103192; 美国申请 2002/65282; 美国申请 2002/61860; W002/51842; W002/50285; W002/46144; W002/46129; W002/30879; W002/26703; W002/26696; W001/70675; W001/42437; W001/38322; W001/18045; W001/14581; Furumai 等(2002); Hinnebusch 等(2002); Mai 等(2002); Vigushin 等(2002);
30

Gottlicher 等(2001); Jung(2001); Komatsu 等(2001); Su 等(2000)。

IV. 治疗心脏肥大的方法

A. 治疗方案

5 当前在处理心血管疾病中治疗心脏肥大的医学方法包括使用至少两类药物:肾素-血管紧张素系统的抑制剂和 β -肾上腺素能阻断剂(Bristow, 1999)。在处理心力衰竭中治疗病理性肥大的治疗剂包括血管紧张素 II 转化酶(ACE)抑制剂和 β -肾上腺素能受体阻断剂(Eichhorn 和 Bristow, 1996)。其它已公开用于治疗心脏肥大的药剂包括血管紧张素 II 受体拮抗剂(美国专利 5,604,251)和神经肽 Y 拮抗剂
10 (W098/33791)。尽管当前有可用的药化学合物,但预防和治疗心脏肥大,以及随后的心力衰竭仍然是一种治疗挑战。

非药物治疗主要用作辅助药物治疗。非药物治疗的一种方法包括减少食物中的钠盐。此外,非药物治疗还需要清除某些沉淀性药物,包括负变力剂(例如,某些钙通道阻断剂和抗心律失常药如双异丙吡胺)、心脏毒素(如安非他明)和血浆容量扩充
15 药(例如,非甾体抗炎药和糖皮质激素)。

在本发明的一个实施方式中,提供了利用 PKD 抑制剂治疗心脏肥大或心力衰竭的方法。对于本申请目的,治疗包括减少心脏肥大的一种或多种症状,如运动能力降低,心射血量降低,左心室舒张末期压增高,肺毛细血管嵌入压增高,心脏输出、心脏指数降低,肺动脉压增高,左心室收缩和舒张末期尺度增大和左心室壁压力、
20 壁张力和壁厚度升高-同样对于右心室。此外,PKD 抑制剂可用于预防心脏肥大及其相关症状的发生。

治疗方案应根据临床情况而不同。然而,在大多数情况下,长期维持用药是合适的。也可能需要用 PKD 抑制剂间歇性治疗肥大,如在疾病进展期间短暂的治疗窗。

25 B. 联合疗法

在另一实施方式中,预想将 PKD 抑制剂与其它治疗方式联合使用。因此,除了上述疗法,也可以给病人提供更“标准的”心脏药物治疗。其它疗法的实例包括但不限于:所谓的“ β 阻断剂”、抗高血压药、强心剂、抗血栓剂、血管舒张剂、激素拮抗剂、变力药物、利尿剂、内皮缩血管肽拮抗剂、钙通道阻断剂、磷酸二酯酶
30 抑制剂、ACE 抑制剂、血管紧张素 2 型拮抗剂和细胞因子阻断剂/抑制剂、和 HDAC 抑制剂。

可通过使心脏细胞与一种组合物或包括两种药物的药物制剂接触，或通过使细胞与两种不同组合物或制剂同时接触实现联合治疗，其中一种组合物包含表达构建物，另一组合物包含药物。或者，可在给予其它药剂之前或之后数分钟至数周间隔时，进行 PKD 抑制剂治疗。在其它药物和表达构建物分别应用于细胞的实施方式中，通常应保证每种药物递送之间有相当长的时间间隔，以使药物和表达构建物仍能对细胞施加有利的联合效应。在这种情况下通常考虑使细胞与两种方式的接触彼此相隔约 12-24 小时，更优选彼此相隔 6-12 小时，最优选延迟时间仅为约 12 小时。在一些情况下，可能需要显著延长治疗时间，然而，分别给药之间的间隔也可达数天(2、3、4、5、6 或 7)至数周(1、2、3、4、5、6、7 或 8)。

也可想见，将需要给予 PKD 抑制剂或其它药物一次以上。在这点上，可采用各种组合。为了说明，PKD 抑制剂是“A”，其它药剂是“B”，下面的排列是根据总共给药 3 和 4 次的范例：

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B
A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A
A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B
同样考虑了其它组合。

C. 药理治疗剂

药理治疗剂和给药方法、剂量等是本领域技术人员熟知的(参见例如，“医生桌面参考书(Physicians Desk Reference)”、Klaassend 的“治疗的药理学基础”、“雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)”和“莫克指数(The Merck Index)，第十一版”，本文引入它们的相关部分作为参考)，可根据本文公开的内容结合本发明。必须待治疗患者的情况对剂量作出某些改变。负责给药的人必须为患者个体确定合适的剂量，确定患者个体的合适剂量是本领域普通技术人员的技术能力之内。

本发明中可使用的药物治疗剂的非限制性例子包括：抗高脂蛋白药、抗动脉硬化药、抗血栓/溶纤维蛋白药、血凝促进药、抗心律不齐药、抗高血压药、血管加压药、充血性心力衰竭治疗剂、防心绞痛药、抗菌药或它们的组合。

此外，应该注意，可利用以下任何一种药物来发展新的心脏疾病治疗的靶基因，如本发明实施例中所用的 β -阻断剂(见下)。虽然预计很多这些基因可能重叠，但很可能开发出新的靶基因。

i. 抗高脂蛋白药

在某些实施方式中，可将给予能降低一种或多种血脂和/或脂蛋白浓度的药物，本文中称为“抗高脂蛋白药”与本发明的心血管治疗药物，具体是治疗动脉粥样硬化和血管组织增厚或阻塞的药物相结合。在某些方面，抗高脂蛋白药可包括：芳氧基链烷酸/纤维酸衍生物、树脂/胆汁酸螯合剂、HMGCoA 还原酶抑制剂、烟酸衍生物、甲状腺激素或甲状腺激素类似物、其它药物或它们的组合。

a. 芳氧基链烷酸/纤维酸衍生物

芳氧基链烷/纤维酸衍生物的非限制性例子包括：苜蓿贝特、enzafibrate、比尼贝特、环丙贝特、克利贝特、氯贝特(atromide-S)、氯贝酸、依托贝特、非诺贝特、吉非罗齐(lobid)、尼可贝特、吡贝特、氯烟贝特、双贝特和羟乙茶碱贝特。

b. 树脂/胆汁酸螯合剂

树脂/胆汁酸螯合剂的非限制性例子包括：消胆胺（消胆胺、降胆敏），降脂树脂(考来替泊)和降胆葡胺。

c. HMG CoA 还原酶 抑制剂

HMG CoA 还原酶 抑制剂的非限制性例子包括：洛伐他汀 (mevacor)、普伐他汀 (普拉固)或辛伐他汀 (舒降之)。

d. 烟酸 衍生物

烟酸 衍生物的非限制性例子包括：烟酸苄酯、阿西莫司、戊四烟酯、尼可氯酯、烟酸环己醇酯和氧烟酸。

e. 甲状腺激素和类似物

甲状腺激素及其类似物的非限制性例子包括：etoroxate、甲状丙酸和甲状腺素。

f. 其它抗高脂蛋白药

其它抗高脂蛋白药的非限制性例子包括：阿昔咪唑、阿扎胆醇、苯氟雷司、 β -苜蓿丁酰胺、卡尼汀、硫酸软骨素、氯雌酮甲醚、detaxtran、右旋糖酐硫酸钠、

5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸、香菇嘌呤、夫拉扎勃、美格鲁托、甲亚油酰胺、双甲雌三醇、鸟氨酸、 γ -谷维素、泛硫乙胺、四乙酸季戊四醇酯、 α -苯基丁酰胺、吡扎地尔、丙丁酚（普罗布考片剂）、 β -谷甾醇、磺托酸-哌嗪盐、硫癸二乙醇、三苯乙醇和联苯丁酸。

5

ii. 抗动脉硬化药

抗动脉硬化药的非限制性例子包括吡醇氨酯。

iii. 抗血栓/溶纤维蛋白药

10 在某些实施方式中，可以将给予能帮助去除或防止血液凝块的药物与给予调节剂相结合，尤其是治疗动脉粥样硬化和和脉管系统(如动脉)阻塞。抗血栓和/或溶纤维蛋白药的非限制性例子包括：抗凝血药、抗凝血剂拮抗剂、抗血小板药、血栓溶解剂、血栓溶解剂拮抗剂或它们的组合。

15 在某些方面，可以口服给予抗血栓药，例如，优选阿司匹林和华法林（丙酮香豆素钠）。

a. 抗凝血药

20 抗凝血药的非限制性例子包括：醋硝香豆酮、安克洛酶、茴茛二酮、溴茛二酮、氯茛二酮、库美香豆素、环香豆素、右旋糖酐硫酸钠、双羟香豆素、二苯茛酮、双香豆乙酯、亚乙基双羟香豆素、氟茛二酮、肝素、水蛭素、阿朴酸钠、奥沙二酮、木聚硫钠、苯茛二酮、苯丙香豆素、卵黄高磷蛋白、吡考酰胺、噻氯香豆素和华法林。

b. 抗血小板药

25 抗血小板药的非限制性例子包括：阿司匹林、右旋糖酐、双嘧啶胺醇(潘生丁)、肝素、苯磺唑酮(anturane)和噻氯匹定(ticlid)。

c. 血栓溶解剂

30 血栓溶解剂的非限制性例子包括：组织纤溶酶原激活剂(激活酶)、纤溶酶、尿激酶原、尿激酶(abbokinase)、链激酶(链酶)、阿尼普酶/APSAC(依米那酶)。

iv. 血凝促进药

在某些实施方式中，病人患有出血症(hemorrhage)或出血的可能性增加，可采用能促进血液凝结的药物。血凝促进药的非限制性例子包括血栓溶解剂拮抗剂和抗凝血剂拮抗剂。

5

a. 抗凝血剂拮抗剂

抗凝血剂拮抗剂的非限制性例子包括鱼精蛋白和维生素 K1。

b. 血栓溶解剂拮抗剂和抗血栓剂

10 血栓溶解剂拮抗剂的非限制性例子包括氨基己酸(亮氨酸)和氨甲环酸(凝血酸)。抗血栓剂的非限制性例子包括：阿那格雷、阿加曲班、cilstazol、达曲班、去纤苷、依诺肝素、速避凝、吲哚布芬、lamoparan、奥扎格雷、吡考酰胺、普拉贝脉、替地肝素、噻氯匹定和三氟柳。

15 v. 抗心律不齐药

抗心律不齐药的非限制性例子包括 I 类抗心律不齐药(钠通道阻断剂)，II 类抗心律不齐药(β -肾上腺素能阻断剂)；II 类抗心律不齐药(复极化延长药物)，IV 类抗心律不齐药(钙通道阻断剂)和其它抗心律不齐药。

20 a. 钠通道阻断剂

钠通道阻断剂的非限制性例子包括 IA 类、IB 类和 IC 类抗心律不齐药。IA 类抗心律不齐药的非限制性例子包括：双吡嗪酰胺(双异丙吡胺)、普鲁卡因胺(百浪斯剔)和奎尼丁(硫酸奎尼丁)。IB 类抗心律不齐药的非限制性例子包括：利多卡因(赛罗卡因)、妥卡胺(tonocard)和脉律定(美西律)。IC 类抗心律不齐药的非限制性例
25 子包括恩卡胺(enkaid)和氟卡胺(tambocor)。

b. β 阻断剂

β 阻断剂，也称为 β -肾上腺素能阻断剂、 β -肾上腺素能拮抗剂或 II 类抗心律不齐药的非限制性例子包括：醋丁洛尔(醋丁酰心安)、阿普洛尔、氨磺洛尔、
30 arotinolol、阿替洛尔、苯呋洛尔、倍他索洛尔、贝凡洛尔、比索洛尔、波吡洛尔、布库洛尔、布非洛尔、丁呋洛尔、布尼洛尔、布拉洛尔、盐酸布替君、丁非洛尔、

卡拉洛尔、卡替洛尔、卡维地洛、塞利洛尔、塞他洛尔、氯拉洛尔、地来洛尔、依
泮洛尔、艾司洛尔(brevibloc)、茛诺洛尔、拉贝洛尔、左布诺洛尔、甲吖洛尔、美
替洛尔、美托洛尔、莫普洛尔、纳多洛尔、萘呋洛尔、硝苯洛尔、尼普地洛、氧烯
洛尔、喷布洛尔、吖啶洛尔、普拉洛尔、丙萘洛尔、丙诺洛尔(propanolol)(心得安)、
5 索他洛尔(betapace)、硫氧洛尔、他林洛尔、特他洛尔、噻吗洛尔、托利洛尔和
xibinolol。在某些方面, β 阻断剂包括芳氧基丙醇胺衍生物。芳氧基丙醇胺衍生物
的非限制性例子包括: 醋丁洛尔、arotinolol、阿替洛尔、倍他索洛尔、贝凡洛尔、
比索洛尔、波吖洛尔、布尼洛尔、丁非洛尔、卡拉洛尔、卡替洛尔、卡维地洛、塞
利洛尔、塞他洛尔、依泮洛尔、茛诺洛尔、甲吖洛尔、美替洛尔、美托洛尔、莫普
10 洛尔、纳多洛尔、尼普地洛、氧烯洛尔、喷布洛尔、吖啶洛尔、丙诺洛尔、他林洛
尔、特他洛尔、噻吗洛尔和托利洛尔。

c. 复极化延长药

复极化延长药, 也称为 III 类抗心律不齐药的非限制性例子包括胺碘酮(安律酮)
15 和右索他洛尔(心得怡)。

d. 钙通道 阻断剂/拮抗剂

钙通道 阻断剂, 也称为 IV 类抗心律不齐药的非限制性例子包括: 芳基烷基胺
(如苄丙洛、地尔硫草、芬地林、戈洛帕米、普尼拉明、特罗地林、维拉帕米)、二
20 氢吡啶衍生物(非洛地平、伊拉地平、尼卡地平、硝苯地平、尼莫地平、尼索地平、
尼群地平)、哌嗪衍生物(例如, 桂利嗪, 氟桂利嗪, 利多氟嗪)或其它钙通道阻断剂
如茚环烷, 依他苯酮, 镁, 米贝拉地尔或米贝拉地尔。在某些实施方式中, 钙通道
阻断剂包括长效 二氢吡啶(硝苯吡啶型)钙拮抗剂。

25 e. 其它抗心律不齐药

其它抗心律不齐药的非限制性例子包括: 阿糖腺苷(adenocard)、地高辛(拉诺
辛)、乙酰卡尼、阿义马林、克冠吗啉、阿普林定、托西溴苄铵、丁萘夫汀、布托苯
定、卡泊酸、西苯唑啉、双异丙吡胺、双氢奎尼丁、英地卡尼、溴化 ipatropium、
利多卡因、劳拉义明、劳卡尼、甲氧苯汀、莫雷西嗪、吡美诺、prajmaline、普罗
30 帕酮、吡诺林、多聚半乳糖醛酸奎尼丁酯、硫酸奎尼丁酯和维喹地尔。

vi. 抗高血压药

抗高血压药的非限制性例子包括：交感神经阻滞药、 α/β 阻断剂、 α 阻断剂、抗血管紧张素 II 药、 β 阻断剂、钙通道 阻断剂、血管舒张剂和其它抗高血压药。

5 a. α 阻断剂

α 阻断剂，也称为 α -肾上腺素能阻断剂或 α -肾上腺素能拮抗剂的非限制性例子包括：氨磺洛尔、阿罗洛尔、达哌唑、多沙唑嗪、甲磺酸麦角固醇酯(ergoloid mesylates)、芬司匹利、吲哚拉明、拉贝洛尔、尼麦角林、哌唑嗪、特拉唑嗪、妥拉唑林、曲马唑嗪和育亨宾。在某些实施方式中， α 阻断剂可包括喹唑啉衍生物。

10 喹唑啉衍生物的非限制性例子包括：阿夫唑嗪、布那唑嗪、多沙唑嗪、哌唑嗪、特拉唑嗪和曲马唑嗪。

b. α/β 阻断剂

在某些实施方式中，抗高血压药是 α 和 β 肾上腺素能拮抗剂。 α/β 阻断剂的非限制性例子包括拉贝洛尔(柳胺心定，柳胺苄心定)。

c. 抗血管紧张素 II 药

抗血管紧张素 II 药的非限制性例子包括血管紧张素转化酶抑制剂和血管紧张素 II 受体拮抗剂。血管紧张素转化酶抑制剂(ACE 抑制剂)的非限制性例子包括：阿拉普利、依那普利(vasotec)、卡托普利、西拉普利、地拉普利、依那普利拉、福辛普利、赖诺普利、moveltopril、培哌普利、喹那普利和雷米普利。血管紧张素 II 受体阻断剂，也称为血管紧张素 II 受体拮抗剂、ANG 受体阻断剂或 ANG-II 的 1 型受体阻断剂(ARBs) 的非限制性例子包括：血管坎地沙坦、依普罗沙坦、厄贝沙坦、氯沙坦和缬沙坦。

25

d. 交感神经阻滞药

交感神经阻滞药的非限制性例子包括：作用于中枢的交感神经阻滞药或作用于外周的交感神经阻滞药。作用于中枢的交感神经阻滞药，也称为中枢神经系统(CNS)交感神经阻滞药的非限制性例子包括：可乐定(氯压定)、胍那苄(氯压胍)、胍法辛(盐酸胍法辛)和甲基多巴(爱道美)。作用于外周的交感神经阻滞药的非限制性例子包括：神经节阻断剂、肾上腺素能神经元阻断剂、 β -肾上腺素能阻断剂或 $\alpha 1$ -肾上

30

腺素能阻断剂。神经节阻断剂的非限制性例子包括美卡拉明(美加明)和三甲噻方(阿方那特)。肾上腺素能神经元阻断剂的非限制性例子包括胍乙啶(依斯米林)和利舍平(色巴息)。β-肾上腺素能阻断剂的非限制性例子包括: acenitolo1(醋丁酰心安)、阿替洛尔(氨酰心安)、倍他洛尔(卡尔仑)、卡替洛尔(盐酸卡替洛尔)、拉贝洛尔(柳胺心定、柳胺羟胺)、美托洛尔(美多洛尔)、蔡丁乐(康加尔多)、喷布洛尔(levatol)、
5 吲哚洛尔(心得静)、普蔡洛尔(蔡心安)和噻吗洛尔(噻吗心安)。α1-肾上腺素能阻断剂的非限制性例子包括: 哌唑嗪(盐酸哌唑嗪)、多沙唑嗪(doxazocin)(甲磺酸多沙唑嗪)和特拉唑嗪(高特灵)。

10 e. 血管舒张剂

在某些实施方式中, 心血管治疗剂可包括血管舒张剂(例如, 脑血管舒张剂, 冠状血管舒张剂或外周血管舒张剂)。在某些优选实施方式中, 血管舒张剂是冠状血管舒张剂。冠状血管舒张剂的非限制性例子包括: 胺氧三苯、阿苯达唑、琥珀苯呋地尔、苯碘达隆、氯吩嗪、卡波罗孟、氯苄呋醇、氯硝甘油、克冠二氮卓、双噻达莫、
15 氢普拉明、乙氧黄酮、四硝酸赤癬醇酯、依他苯酮、芬地林、夫洛地尔、更利芬、herestrol 双(β-二乙氧基乙基醚)、海索苯定、硝乙醇胺、凯林、利多氟嗪、六硝酸己烷醇酯、美地巴嗪、烟酰甘油(nicorglycerin)、四硝酸季戊四醇酯、戊硝醇、哌克昔林、匹美茶碱、曲匹地尔、甲色酮、曲美他嗪、磷酸三硝乙醇胺和维司那定。

在某些方面, 血管舒张剂可包括慢性疗法血管舒张剂或紧急高血压血管舒张剂。
20 慢性疗法血管舒张剂的非限制性例子包括双肼屈嗪(肼苯哒嗪)和米诺地尔(降压定)。紧急高血压血管舒张剂的非限制性例子包括: 硝普钠(亚硝基铁氰化钠)、二氮嗪(降压嗪 IV)、双肼屈嗪(肼苯哒嗪)、米诺地尔(降压定)和维拉帕米。

f. 其它抗高血压药

25 其它抗高血压药的非限制性例子包括: 阿义马林、γ-氨基丁酸、丁苯碘胺、西氯他宁、环西多明、丹宁酸绿藜安酯、非诺多泮、氟司喹南、酮色林、美布氨酯、美卡拉明、甲基多巴、甲基 4-吡啶基酮缩氨基硫脲、莫唑胺、帕吉林、潘必啶、吡那地尔、哌罗克生、普立哌隆、原藜芦碱、萝巴新、瑞西美托、利美尼定、沙拉新、sodiumnitrorusside、替尼酸、右旋樟脑磺酸三甲噻方酯、酪氨酸酶和乌拉地尔。

30 在某些方面, 抗高血压药可包括: 芳基乙醇胺衍生物、苯丙噻二嗪衍生物、N-羧基烷基(肽/内酰胺)衍生物、二氢吡啶衍生物、胍衍生物、肼/酞嗪、咪唑衍生物、

季铵化合物、利血平衍生物或磺胺类衍生物。

芳基乙醇胺衍生物。芳基乙醇胺衍生物的非限制性例子包括：氨磺洛尔、丁呋洛尔、地来洛尔、拉贝洛尔、丙萘洛尔、索他洛尔和硫氧洛尔。

5 苯丙噻二嗪衍生物。苯丙噻二嗪衍生物的非限制性例子包括：阿尔噻嗪、苄氟噻嗪、苄噻嗪、苄基氢氯噻嗪、布噻嗪、氯噻嗪、氯噻酮、环戊噻嗪、环噻嗪、二氮噻、依匹噻嗪、乙噻嗪、芬喹唑、氢氯噻嗪、氢氟噻嗪、甲氯噻嗪、美替克仑、美托拉宗、对氟噻嗪、聚噻嗪、四氯噻嗪和三氯噻嗪。

10 N-羧基烷基(肽/内酰胺)衍生物。N-羧基烷基(肽/内酰胺)衍生物的非限制性例子包括：阿拉普利、卡托普利、西拉普利、地拉普利、依那普利、依那普利拉、福辛普利、赖诺普利、莫维普利、培哚普利、喹那普利和雷米普利。

二氢吡啶衍生物。二氢吡啶衍生物的非限制性例子包括：氨氯地平、非洛地平、伊拉地平、尼卡地平、硝苯地平、尼伐地平、尼索地平和尼群地平。

胍衍生物。胍衍生物的非限制性例子包括：苄二甲胍、异喹胍、胍那苄、胍那克林、胍那决尔、胍那佐定、胍乙啶、胍法辛、胍氯、胍诺沙苄和胍生。

15 胍/酞嗪。胍/酞嗪的非限制性例子包括：布屈嗪、卡屈嗪、双胍屈嗪、恩屈嗪、胍卡巴嗪、胍屈嗪、苯异丙胍、匹尔屈嗪和托屈嗪。

咪唑衍生物。咪唑衍生物的非限制性例子包括：吡可乐定、右洛非西定、酚妥拉明、噻甲尼定和托洛尼定。

20 季铵化合物。季铵化合物的非限制性例子包括：阿扎溴铵、松达氯铵、六甲溴铵、喷他双甲硫铵、喷他溴铵、酒石酸喷托铵、芬托氯铵和甲硫曲美替定。

利血平衍生物。利血平衍生物的非限制性例子包括：比舍舍平、地舍平、瑞西那明、利舍平和昔洛舍平。

磺胺类衍生物。磺胺类衍生物的非限制性例子包括：氨丁磺酰胺、氯哌胺、利尿磺胺、茛磺苯酰胺、喹噻酮、曲帕胺和氯磺水杨胺。

25

g. 血管加压药

30 血管加压药通常用于在外科手术休克期间提高血压。血管加压药，也称为抗低血压药的非限制性例子包括：甲硫阿美铵、血管紧张素 酰胺、二甲福林、多巴胺、双苄次甲丁胺、依替福林、氨苄福林、间羟胺、甲氧胺福林、去甲肾上腺素、福勒德林和脱氧肾上腺素。

vii. 充血性心力衰竭的治疗药

充血性心力衰竭的治疗药的非限制性例子包括：抗血管紧张素 II 药、后载-预载降低治疗、利尿剂和变力药物。

5 a. 后载-预载降低

在某些实施方式中，可以用联合疗法治疗不能耐受血管紧张素拮抗剂的患病动物。该疗法可联合给予肼屈嗪(肼苯哒嗪)和二硝酸异山梨醇酯(硝异梨醇，消心痛)。

b. 利尿剂

- 10 利尿剂的非限制性例子包括：噻嗪类或苯丙噻二嗪衍生物(如阿尔噻嗪、苯氟噻嗪、苄噻嗪、苄基氢氯噻嗪、异丁噻嗪、氯噻嗪、氯噻酮、环戊噻嗪、依匹噻嗪、乙噻嗪、乙噻酮、芬喹唑、氢氯噻嗪、氢氟噻嗪、甲氯噻嗪、美替克仑、美托拉宗、对氟噻嗪、聚噻嗪、四氯噻嗪、三氯噻嗪)、有机汞制剂(如氯汞君、美拉鲁利、mercamphamide、硫汞林钠、mercumallylic acid、汞香豆林钠、氯化亚汞、
- 15 汞撒利)、蝶啶(如呋氨蝶啶、氨苯蝶啶)、嘌呤(如茶碱、7-吗啉代甲基茶碱、pamobrom、丙可可碱、可可碱)、包括醛固酮拮抗剂的类固醇(如坎利酮、夹竹桃苷、螺内酯)、磺胺类衍生物(如乙酰唑胺、氨丁磺酰胺、阿佐寒米、布美他尼、布他唑胺、氯米非那胺、双氯非那胺、氯哌胺、氯索隆、二苯基甲烷-4,4'-二磺胺、二磺法胺、依索唑胺、利尿磺胺、茛磺苯酰胺、美夫西特、醋甲唑胺、吡咯他尼、喹噻酮、托拉塞
- 20 米、曲帕胺、氯磺水杨胺)、尿嘧啶(如氨美啶、阿米美啶)、钾轻微(sparing)拮抗剂(如阿米洛利、氨苯蝶啶)或其它利尿剂，如 aminozine、熊果苷、氯拉扎尼、依他尼酸、依托唑啉、肼卡巴嗪、异山梨醇、甘露醇、美托查酮、莫唑胺、哌克昔林、ticrnafen 和脲。

25 c. 变力药物

- 正变力剂，也称为强心剂的非限制性例子包括：茶碱、乙酰基洋地黄毒苷、2-氨基-4-甲基吡啶、氨利酮、半琥珀酸琥珀呋酯、布拉地辛、黄花夹竹桃次苷 B(cerberosine)、樟吡他胺、铃兰毒苷、磁麻苷、地诺帕明、去乙酰毛花苷、洋地黄苷、洋地黄、洋地黄毒苷、地高辛、多巴酚丁胺、多巴胺、多培沙明、依诺昔酮、
- 30 格木碱、非那可明、吉他林、羟基洋地黄毒苷、胍基乙酸、辛胺醇、白毛茛分碱、异波帕胺、毛花苷、甲氧酚酰胺(metamivamn)、米力农、黄夹次苷乙、夹竹桃苷、

毒毛花苷 G、奥昔非君、普瑞特罗、次海葱苷、残余蟾蜍配基、海葱苷、海葱苷宁、毒毛旋花苷(strophanthin)、硫马唑、可可碱和扎莫特罗。

- 在具体方面，变力药物是强心苷、 β -肾上腺素能激动剂或磷酸二酯酶抑制剂。强心苷的非限制性例子包括：地高辛(拉诺辛)和洋地黄毒苷(crystodigin)。 β -肾上腺素能激动剂的非限制性例子包括：沙丁胺醇，班布特罗，比托特罗，卡布特罗，克仑特罗，氯丙那林，地诺帕明，双羟乙麻黄碱，多巴酚丁胺(杜丁胺)，多巴胺(intropin)，多培沙明，麻黄碱，乙非君，乙基去甲肾上腺素，非诺特罗，福莫特罗，海索那林，异波帕胺，新异丙肾上腺素，异丙肾上腺素，马布特罗，奥西那林，甲氧那明，奥昔非君，吡布特罗，丙卡特罗，普罗托醇，瑞普特罗，利米特罗，利托君，索特瑞醇，特布他林，曲托啶酚，妥洛特罗和扎莫特罗。

磷酸二酯酶抑制剂的非限制性例子包括氨利酮(强心隆)。

d. 防心绞痛药

防心绞痛药可包括有机硝酸盐、钙通道阻断剂、 β 阻断剂及它们的组合。

- 有机硝酸盐，也称为硝基血管舒张剂的非限制性例子包括：硝酸甘油(贴保宁，三硝酸甘油)，二硝酸异山梨醇酯(硝异梨醇，消心痛)和硝酸戊酯(aspirol，亚硝酸异戊酯)。

D. 外科治疗

- 在某些方面，第二种治疗可包括一些类型的外科治疗，其包括，例如，预防、诊断或进程、治愈性和姑息性外科治疗。外科手术，具体说是治愈性外科手术，可与其它疗法，如本发明和一种或多种其它药物联合使用。

- 本领域技术人员熟知用于血管和心血管疾病和失调的外科治疗方法、这些治疗方法包括但不限于、对生物体进行外科手术、提供心血管机械修复假体、血管重建术、冠状动脉再灌注、导管摘除术、为患者提供可植入的心脏电复律器除颤器、机械性循环支持或它们的组合。可用于本发明的机械性循环支持的非限制性例子包括主动脉内气囊对抗搏动法、左心室辅助装置或它们的组合。

E. 药物制剂和向病人给药的途径

- 考虑到临床应用，将药物组合物制备成适合于应用的形式。通常，这需要制备基本无热原质和其它对人或动物可能有害的杂质的组合物。

通常，需要采用合适的盐和缓冲液来产生稳定的和可以被靶细胞摄取的递送载体。当将重组细胞引入病人时，也使用缓冲液。本发明的水相组合物包含有效量的溶解或分散于药学上可接受运载体或水相介质中的载体或细胞。术语“药学上或药理上可接受的”指当给予动物或人时，不产生不良的、过敏或其它不利反应的分子实体和组合物。本文所用的“药学上可接受的运载体”包括可用于配制药物，如适于给予人的药物的溶剂、缓冲液、溶液、分散介质、包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。用于药学活性物质的这些介质和制剂的用途是本领域公知的。除了迄今已知与本发明活性成分不相容的任何常规介质或制剂外，也考虑用于治疗组合物中。也可将补充的活性成分掺入该组合物中，只要它们不使组合物的载体或细胞失活。

本发明的活性组合物可包括经典的药制剂。可通过任何常规途径给予本发明的这些组合物，只要通过该途径可到达靶组织。这包括口服、鼻腔或含服。或者，可以皮内、皮下、肌肉内、腹腔内或静脉内注射，或直接注射入心脏组织给药。如上所述，通常以药学上可接受的组合物给予这些组合物。

也可经胃肠道外或腹腔内给予该活性化合物。为了说明，可用适当混有表面活性剂，如羟丙基纤维素的水制备该活性化合物的游离碱或药理上可接受的盐溶液。也可用甘油、液体聚乙二醇和它们的混合物以及用油制备分散液。在普通的储存和使用条件下，这些制剂通常含有防腐剂，以防止微生物生长。

适合注射用的药物形式包括，例如，无菌水溶液或分散液和可用于即时制备的无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。通常，这些制剂应无菌，其流动性易于注射。在制造和储存的条件下，制剂应稳定，应能抵抗微生物，如细菌和真菌的污染作用。合适的溶剂或分散介质可包括，例如水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)，它们的合适混合物和植物油。可通过，例如使用包衣剂，如卵磷脂维持合适的流动性，对于分散液可用表面活性剂维持所需粒度。可通过各种抗菌剂和抗真菌剂，如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等防止微生物的作用。在很多情况下，将优选包括等渗剂，如糖或氯化钠。通过与延迟吸收剂，如单硬脂酸铝和明胶组合，可以实现可注射组合物的延长吸收。

可通过将合适量的活性化合物与任何其它所需成分(例如，上述所列)一起掺入溶剂中，然后过滤除菌来制备无菌注射液。通常，通过将各种无菌活性成分掺入含有基本分散介质和所需其它成分(如上述所列)的无菌载体来制备分散液。在用于制备无菌注射液的无菌粉末时，优选的方法包括真空干燥和冻干技术，以此从之前

过滤除菌的溶液中产生活性成分加任意附加所需成分的粉末。

对于口服给药来说，通常可将本发明多肽与赋形剂掺和，以不可消化的漱口水和洁齿剂的形式使用。可通过将所需量的活性成分掺入合适的溶剂，如硼酸钠溶液 (Dobell's 溶液) 中制备漱口水。另外，可将活性成分掺入含有硼酸钠、甘油和碳酸氢钾的消毒水中。也可将活性成分分散到洁齿剂，包括：凝胶、膏、粉和浆中。可以将治疗有效量的活性成分加入牙膏中，牙膏可包括水、粘合剂、研磨剂、调味剂、发泡剂和湿润剂。

通常可将本发明组合物制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括，例如，获自无机酸(如盐酸或磷酸)或有机酸(如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等)的酸加成盐(与蛋白的游离氨基形成)。与蛋白的游离羧基形成的盐也可获自无机碱(如氢氧化钠、钾、铵、钙或铁)或有机碱(如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等)。

关于剂型，优选以剂型相容形式和治疗有效量给予溶液。该剂型可以容易地以各种剂型，如注射液、药物释放胶囊等给予。对于水溶液的胃肠道外给药来说，例如，通常合适地缓冲该溶液，先使用，例如足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等。可以将这些水溶液用于，例如，静脉内、肌内、皮下和腹腔内给药。优选地，如本领域技术人员所知，尤其是依照本发明公开的内容来使用无菌水相介质。为了说明，可将单剂溶解在 1 毫升等渗 NaCl 溶液中，然后加入到 1000 毫升皮下灌注液体中或在计划的注入位点注射，(参见例如，“雷明顿药物科学”第 15 版，第 1035-1038 和 1570-1580 页)。有必要根据受试者的情况对剂量作出某些改变。负责给药的人一定要为个体受试者确定合适的剂量。而且，对于人的给药，制剂的无菌性、致热性、总的安全性和纯度标准应该满足 FDA 生物制品标准办公室的要求。

V. 筛选方法

本发明还包括鉴定用于预防或治疗或逆转心脏肥大或心力衰竭的 PKD 抑制剂的方法。这些测定可包括随机筛选候选物质的大文库；另外，该测定可用于集中在通过结构属性选择的具体类别的化合物上，据信该结构属性使它们更可能抑制 PKD 功能。

为鉴定 PKD 抑制剂，人们通常将确定在存在和不存在候选物质的情况下 PKD 的功能。例如，方法通常包括：

- (a) 提供候选调节剂；
- (b) 将候选调节剂与 PKD 混合；

(c) 测量 PKD 激酶活性；和

(d) 比较步骤(c)中的活性和不存在候选调节剂的情况下的活性，

其中测量到的活性差异说明候选调节剂实际上是该化合物、细胞或动物的调节剂。

5 也可在分离的细胞、器官或在活生物中进行测定。一般地，通过提供未磷酸化的 II 类 HDAC 和测量由 PKD 加入的标记量来测量 PKD 的激酶活性。

当然应该理解，尽管可能没有找到有效的候选物，但本发明的所有筛选方法本身是有用的。本发明提供了筛选这些候选物的方法，而不仅是找到它们的方法。

10 A. 调节剂

本文使用的术语“候选物质”指可能抑制 PKD 的激酶活性或细胞功能的任何分子。候选物质可以是蛋白或其片段、小分子，或甚至是核酸。可以证明，药理上最有效的化合物是与已知 PKC 抑制剂结构相关的化合物，在本申请中的其它位置列出。用先导化合物帮助开发改进的化合物被称为“理性药物设计”，不仅包括与已知抑

15 制剂和激活物比较，还包括靶分子结构的预测。

理性药物设计的目标是产生生物活性多肽或靶化合物的结构类似物。通过建立这些类似物，就可能形成比天然分子活性更高或更稳定的药物，它对变化具有不同的易感性，或可能影响各种其它分子的功能。在一个方法中，人们将生成靶分子或其片段的三维结构。这可通过 X 射线晶体学、计算机建模或通过两种方法的组合来

20 完成。

也可能用抗体确证靶化合物、激活物或抑制剂的结构。原则上，该方法产生一个药核心，后续的药物设计可以此为基础进行。可能通过生成功能、药理活性抗体的抗-独特型抗体而完全回避蛋白晶体学。作为镜像的镜像，预计抗独特型抗体的结合位点是原始抗原的类似物。然后，抗-独特型抗体可用于从化学或生物学生产的肽

25 库中鉴定和分离肽。然后，选择的肽将用作药核心。可用本文中描述的生产抗体的方法，将抗体用作抗原，生成抗-独特型抗体。

另一方面，人们可以简单地从各种商业资源中购得据信满足有用药物基本标准的小分子文库，以“强力进行”有用化合物的鉴定。筛选这些文库，包括组合产生的文库(例如，肽文库)，是快速有效地筛选大量相关(和不相关)化合物活性的方法。

30 组合方法也通过建立第二、第三和第四代化合物帮助其自身快速发展出潜在药物，这些化合物模拟(modeled)具有活性、却不需要的化合物。

候选化合物可包括天然存在的化合物的片段或部分，或也可能是没有活性的已知化合物的活性组合。建议可将分离自天然来源，如动物、细菌、真菌、包括树叶和树皮的植物来源和海洋样品的化合物作为候选物测定可能有用药剂的存在。应理解，待筛选药剂也可获自或合成自化学组合物或人造化合物。因此，应理解本发明

5 鉴定的候选物质可能是从已知抑制剂或刺激物通过理性药物设计的肽、多肽、聚核苷酸、小分子抑制剂或任何其他化合物。

其它合适的调节剂包括反义分子、核酶和抗体(包括单链抗体)，各自对靶分子具有特异性。在本文中的其它地方更详细地描述了这些化合物。例如，结合到翻译或转录起始位点、或剪接接头的反义分子是理想的候选抑制剂。

10 除了最初鉴定的调节化合物，本发明者也考虑到可能设计其它空间排列类似的化合物，以模仿调节剂结构核心部分。可包括肽调节剂的肽模拟物的这些化合物可以相同方式用作起始调节剂。

B. 体外测定

15 进行的快速、廉价和容易的测定是体外测定。这些测定通常使用分离的分子，可以迅速和大量地完成，从而提高在短时间内可获得的信息量。各种器皿均可用于进行这些测定，包括试管、板、皿和其它表面如标尺或珠子。

WO 84/03564 中描述了高通量筛选化合物的技术。在固体底材，如塑料杆或其它表面上合成大量小肽测试化合物。可以根据它们结合和抑制 PKD 的能力快速筛选

20 这些肽。

C. 细胞内测定

本发明也考虑到根据化合物在细胞内调节 PKD 的能力筛选化合物。各种细胞系均可用于这些筛选测定，包括专门为此目的设计的细胞。

25

D. 体内测定

体内测定包括使用各种心脏病动物模型，包括转基因动物，它们被设计具体特定的缺陷，或载有可用于测量候选化合物在生物体内到达和影响不同细胞的能力的标记。由于它们的大小、容易操作和它们生理和遗传构成信息，小鼠是优选的实施方式，尤其适于转基因。然而，其它动物也是合适的，包括大鼠、家兔、仓鼠、豚鼠、沙鼠、土拨鼠、猫、狗、绵羊、山羊、猪、牛、马和猴(包括黑猩猩、长臂猿和

30

狒狒)。可以使用获自这些种的任一动物模型进行抑制剂的测定。

用测试化合物处理动物将包括以合适形式将化合物给予动物。将通过可用于临床目的的任一途径给药。确定化合物在体内的有效性可包括各种不同标准，包括但不限于。也可以通过比体外或细胞内测定更有意义的方式在动物中进行毒性和剂量反应的测定。

VI. 纯化蛋白

需要纯化 PKD。蛋白纯化技术是本领域技术人员熟知的。这些技术在一个水平上包括，将细胞整体粗分成多肽和非-多肽部分。将多肽与其它蛋白分离后，可用层析或电泳技术将感兴趣的多肽进一步纯化，以达到部分或完全纯化(或纯化至同质)。尤其适用于纯肽制备的分析方法是离子交换层析，排阻层析；聚丙烯酰胺凝胶电泳；等电点聚焦。尤其有效的纯化肽的方法是快速蛋白液相层析或甚至 HPLC。

本发明某些方面涉及编码蛋白或肽的纯化，在具体实施方式中，是基本纯化。本文中使用的术语“纯化的蛋白或肽”意指可分离自其它组分的组合物，其中该蛋白或肽相对于其天然可获得状态纯化至任意程度。因此，纯化蛋白或肽也指从其天然存在的环境中游离出的蛋白或肽。

通常，“纯化的”将指已进行分级以去除各种其它组分的蛋白或肽组合物，组合物基本保持其表达的生物活性。其中使用术语“基本纯化”，该术语指一种组合物，其中蛋白或肽形成该组合物的主要组分，如占组合物中蛋白的约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 95%或更多。

本领域技术人员根据本公开，将知晓定量蛋白或肽纯化程度的各种方法。这些方法包括，例如，确定活性部分的特异活性，或通过 SDS/PAGE 分析在某部分内评价多肽量。评价某部分纯度的优选方法是计算该部分的特异活性，将其与最初抽提物的特异活性比较，从而计算纯度，本文评价为“纯化倍数”。当然，用于代表活性量的实际单位将取决于根据纯化和是否表达的蛋白或肽表现出可检测的活性而选择的具体测定技术。

各种适用于蛋白纯化的技术是本领域技术人员所熟知的。这些技术包括，例如，用硫酸铵、PEG、抗体等或通过加热变性而沉淀，然后离心；层析步骤如离子交换、凝胶过滤、反向、羟磷灰石和亲核层析；等电点聚焦；凝胶电泳；和这些和其它技术的组合。如本领域所公知的，相信进行各种纯化步骤的顺序可以改变，或某些步骤可以省略，仍然产生用于制备基本纯化的蛋白或肽的合适方法。

并没有总的要求总是以最纯化状态提供蛋白或肽。实际上,考虑了在某些实施方式中可使用基本纯化的更少产物。可以通过在组合中使用更少的纯化步骤,或通过使用相同总纯化方案的不同形式来完成部分纯化。例如,应理解用 HPLC 设备进行的阳离子交换柱层析通常将导致比用低压层析系统的相同技术的纯化“倍数”更高。

- 5 具有较低相关纯化程度的方法在总的蛋白产物回收方面,或在维持表达蛋白的活性方面会具有优势。

已知在不同的 SDS/PAGE 条件下多肽的迁移可改变,有时还很明显(Capaldi 等, 1977)。因此应理解,在不同电泳条件下,显示出的纯化或部分纯化表达产物的分子量可能改变。

- 10 高效液相色谱(HPLC)以快速分离并具有出色的峰分辨率为特征。这通过使用非常精细的颗粒和高压,以维持足够流速来实现。大约几分钟、或最多一小时内就可完成分离。而且,仅需要很小体积的样品,因为该颗粒是很小且紧密封装的,使空隙体积占柱床体积的很小部分。样品浓度也不需要很高,因为其条带很窄,样品几乎没有稀释。

- 15 凝胶层析或分子筛层析是基于分子量的特殊分配层析类型。凝胶层析背后的理论是,用含有小孔的惰性物质的微小颗粒制备的柱子,在分子通过或传送到小孔时,根据它们的大小从较小分子中分离较大分子。只要制成颗粒的材料不吸收该分子,那么确定流速的唯一因素是大小。因此,只要其形状是相对不变的,分子就以大小降低的方式从柱中洗脱出来。对于分离不同大小的分子,凝胶层析是非常卓越的,
- 20 因为分离不依赖于所有其它因素,如 pH、离子强度、温度等。实质上也没有吸收,更小的区域扩展和洗脱体积简单地与分子量相关。

- 亲和层析是依赖待分离物质和它可特异性结合的分子之间特异性亲和力的层析过程。这是受体-配体类型的相互作用。通过将结合对的一方共价偶联到不溶性基质上合成该柱材料。然后,该柱材料能够从溶液中特异性吸收该物质。通过将条件改变为不会发生结合的条件(改变 pH、离子强度、温度等)进行洗脱。
- 25

- 用于纯化含有碳水化合物的亲和层析具体类型是凝集素亲和层析。凝集素是一类与各种多糖和糖蛋白结合的物质。凝集素通常通过溴化氰与琼脂糖偶联。与琼脂糖偶联的伴刀豆球蛋白(Concanavalin) A 是第一个使用的这类材料,已经广泛用于分离多糖和糖蛋白。其它凝集素包括小扁豆凝集素、已用于纯化 N-乙酰基葡萄糖胺残基的小麦胚芽凝集素和勃艮第蜗牛(*Helix pomatia*)凝集素。用使用碳水化合物配体的亲和层析纯化凝集素本身。用半乳糖从蓖麻子和花生中纯化凝集素;麦芽糖
- 30

用于从小扁豆和刀豆中抽提凝集素；N-乙酰基-D 葡萄糖胺用于从黄豆中纯化凝集素；N-乙酰葡萄糖胺基与来自小麦胚芽的凝集素结合；D-葡萄糖胺用于从蛤中获得凝集素，L-海藻糖将结合莲中的凝集素。

5 基质应该是本身不以任何明显程度吸收分子的物质，并且具有较宽的化学、物理和热稳定性范围。配体应该以不影响其结合性质的方式偶联。配体也应提供相对紧密的结合。应可能在不破坏样品或配体的情况下洗脱物质。最常见的亲和层析形式之一是免疫亲和层析。下面描述适用于本发明的抗体的产生。

VII. 克隆载体、基因转移和表达

10 在某些实施方式中，用表达载体表达 PKD 多肽产物，然后纯化该产物。在其它实施方式中，该表达载体可用于基因治疗。表达需要载体中提供合适的信号，包括各种调节元件，如来自病毒和哺乳动物来源的在宿主细胞中驱动感兴趣基因表达的增强子/启动子。也定义了设计用于使信使 RNA 稳定性和在宿主细胞中的可翻译性最优化的元件，使信使 RNA 稳定性最优化，也确定在宿主细胞中的可翻译性。也提供了为建立表达该产物的永久、稳定的细胞克隆，使用很多显性药物选择标记的条件，或者说是将药物选择标记的表达与多肽表达相联系的元件。

A. 调节元件

20 该申请全文中的术语“表达构建物”意于包括含有编码基因产物的核酸的任意类型遗传构建物，其中编码序列的部分或全部核酸能够被转录。可将转录物翻译成蛋白，但不必如此。在某些实施方式中，表达包括基因转录和 mRNA 翻译成基因产物。在其它实施方式中，表达仅包括转录编码感兴趣基因的核酸。

在某些实施方式中，编码基因产物的核酸在启动子的转录控制下。“启动子”指细胞合成机器或引入的合成机器识别的 DNA 序列，需要它起始特异的基因转录。术语“在转录控制下”指相对于该核酸，启动子在正确位置和方向上，以控制 RNA 聚合酶起始和表达该基因。

30 这里用术语启动子指簇集在 RNA 聚合酶 II 起始位点周围的转录控制模块群。关于启动子如何组织的很多想法得自对几个病毒启动子的分析，包括对 HSV 胸腺嘧啶激酶(tk)和 SV40 早期转录单位的分析。这些研究，加上最近的很多工作，显示出启动子由不连续的功能模块构成，这些功能模块各自由约 7-20bp 的 DNA 组成，并含有一个或多个转录激活或抑制蛋白的识别位点。

各启动子中至少一个模块的功能是为 RNA 合成定位起始位点。最为熟知的实例是 TATA 框，但是在一些缺少 TATA 框的启动子中，如哺乳动物末端脱氧核苷酸转移酶基因的启动子和 SV40 后期基因的启动子，位于起始位点本身上的不连续元件帮助固定起始的位置。

5 附加启动子元件调节转录起始的频率。一般地，这些元件定位于起始位点上游 30-110bp 的区域，虽然最近很多启动子显示出在起始位点下游也含有功能元件。启动子元件之间的间隔经常是可变的，以致在元件被反转或互相移动时保持启动子功能。在 tk 启动子中，活性开始下降前，启动子元件之间的间隔可增加到 50bp 远。根据启动子来看，似乎单个元件可合作地或独立地用作激活转录。

10 在某些实施方式中，将使用天然 PKD 启动子驱动相应的 PKD 基因、异源 PKD 基因、可筛选或可选择性的标记基因、或任何其它感兴趣基因的表达。

在其它实施方式中，可使用人巨细胞病毒 (CMV) 立即早期基因启动子、SV40 早期启动子、劳氏肉瘤病毒长末端重复、大鼠胰岛素启动子和甘油醛-3-磷酸脱氢酶以
15 获得感兴趣编码序列的高水平表达。也考虑了使用本领域公知的其它病毒或哺乳动物细胞或噬菌体启动子来完成感兴趣编码序列的表达，只要表达水平足够给定目的之需。

通过使用具有公知性质的启动子，可使转染或转化后感兴趣蛋白的表达水平和模式最优化。而且，选择响应于具体生理信号而进行调节的启动子，可允许基因产物的诱导表达。在本发明内容中，表 1 和 2 列出了几个可以使用的调节元件，以调
20 节感兴趣基因的表达。该列表并未详尽地列举涉及启动基因表达的所有可能元件，而仅是它们的范例。

增强子是从位于相同 DNA 分子上较远位置的启动子增加转录的遗传元件。增强子的组织方式和启动子很相似。即，它们由很多单个元件组成，各自与一个或多个转录蛋白结合。

25 增强子和启动子之间的基本差别是操作上的。增强子区，作为一个整体必须能够在远处促进转录；对于启动子区或其组成元件则不需如此。另一方面，启动子必须有一个或多个元件，将 RNA 合成的起始导向具体位点和具体方向，然而增强子缺少这些特性。启动子和增强子经常是重叠和邻接的，它们经常看上去具有非常类似的模块组织结构。

30 下面是病毒启动子、细胞启动子/增强子和诱导启动子/增强子的列表，可将它们与表达构建物中编码感兴趣基因的核酸结合使用(表 1 和表 2)。此外，也可使用任

何启动子/增强子组合(按照真核启动子数据库 EPDB)来驱动基因表达。如果提供合适的细菌聚合酶,真核细胞可以支持从某些细菌启动子进行胞浆转录,作为部分输送复合物或作为附加遗传表达构建物。

表 1 启动子和/或增强子	
启动子/增强子	参考文献
免疫球蛋白重链	Banerji 等, 1983; Gilles 等, 1983; Grosschedl 等, 1985; Atchinson 等, 1986, 1987; Imler 等, 1987; Weinberger 等, 1984; Kiledjian 等, 1988; Porton 等, 1990
免疫球蛋白轻链	Queen 等, 1983; Picard 等, 1984
T 细胞受体	Luria 等, 1987; Winoto 等, 1989; Redondo 等, 1990
HLA DQa 和/或 DQ β	Sullivan 等, 1987
β - 干扰素	Goodbourn 等, 1986; Fujita 等, 1987; Goodbourn 等, 1988
白介素-2	Greene 等, 1989
白介素-2 受体	Greene 等, 1989; Lin 等, 1990
II 5 型 MHC	Koch 等, 1989
II HLA-DRa 型 MHC	Sherman 等, 1989
β -肌动蛋白	Kawamoto 等, 1988; Ng 等, 1989
肌肉肌酸激酶(MCK)	Jaynes 等, 1988; Horlick 等, 1989; Johnson 等, 1989
前清蛋白(甲状腺素运载蛋白)	Costa 等, 1988
弹性蛋白酶 I	Ornitz 等, 1987
金属硫蛋白(MTII)	Karin 等, 1987; Culotta 等, 1989
胶原酶	Pinkert 等, 1987; Angel 等, 1987a
清蛋白	Pinkert 等, 1987; Tronche 等, 1989, 1990
α -胎蛋白	Godbout 等, 1988; Campere 等, 1989
t-球蛋白	Bodine 等, 1987; Perez-Stable 等, 1990
β -球蛋白	Trudel 等, 1987

c-fos	Cohen 等, 1987
c-HA-ras	Triesman, 1986; Deschamps 等, 1985
胰岛素	Edlund 等, 1985
神经细胞粘着分子 (NCAM)	Hirsh 等, 1990
α_1 -抗胰蛋白酶	Latimer 等, 1990
H2B (TH2B) 组蛋白	Hwang 等, 1990
小鼠和/或 I 型胶原	Ripe 等, 1989
葡萄糖-调节的蛋白 (GRP94 和 GRP78)	Chang 等, 1989
大鼠生长激素	Larsen 等, 1986
人血清淀粉状蛋白 A (SAA)	Edbrooke 等, 1989
肌钙蛋白 I (TNI)	Yutzey 等, 1989
血小板衍生生长因子 (PDGF)	Pech 等, 1989
迪谢内肌营养不良	Klamut 等, 1990
SV40	Banerji 等, 1981; Moreau 等, 1981; Sleight 等, 1985; Firak 等, 1986; Herr 等, 1986; Imbra 等, 1986; Kadesch 等, 1986; Wang 等, 1986; Ondek 等, 1987; Kuhl 等, 1987; Schaffner 等, 1988
多瘤病毒	Swartzendruber 等, 1975; Vasseur 等, 1980; Katinka 等, 1980, 1981; Tyndell 等, 1981; Dandolo 等, 1983; de Villiers 等, 1984; Hen 等, 1986; Satake 等, 1988; Campbell 和/或 Villarreal, 1988
逆转录病毒	Kriegler 等, 1982, 1983; Levinson 等, 1982; Kriegler 等, 1983, 1984a, b, 1988; Bosze 等, 1986; Miksicek 等, 1986; Celander 等, 1987; Thiesen 等, 1988; Celander 等, 1988; Choi 等, 1988; Reisman 等, 1989
乳头瘤病毒	Campo 等, 1983; Lusk 等, 1983; Spandidos 和/或 Wilkie,

	1983; Spalholz 等, 1985; Lusky 等, 1986; Cripe 等, 1987; Gloss 等, 1987; Hirochika 等, 1987; Stephens 等, 1987
乙肝病毒	Bulla 等, 1986; Jameel 等, 1986; Shaul 等, 1987; Spandau 等, 1988; Vannice 等, 1988
人体免疫缺陷病毒	Muesing 等, 1987; Hauber 等, 1988; Jakobovits 等, 1988; Feng 等, 1988; Takebe 等, 1988; Rosen 等, 1988; Berkhout 等, 1989; Laspia 等, 1989; Sharp 等, 1989; Braddock 等, 1989
巨细胞病毒 (CMV)	Weber 等, 1984; Boshart 等, 1985; Foecking 等, 1986
长臂猿白血病病毒	Holbrook 等, 1987; Quinn 等, 1989

表 2 诱导元件

元件	诱导物	参考文献
MTII	佛波酯 (TFA) 重金属	Palmiter 等, 1982; Haslinger 等, 1985; Searle 等, 1985; Stuart 等, 1985; Imagawa 等, 1987, Karin 等, 1987; Angel 等, 1987b; McNeall 等, 1989
MMTV (小鼠乳腺瘤病毒)	糖皮质激素	Huang 等, 1981; Lee 等, 1981; Majors 等, 1983; Chandler 等, 1983; Ponta 等, 1985; Sakai 等, 1988
β -干扰素	聚(rI)x 聚(rc)	Tavernier 等, 1983
腺病毒 5 <u>E2</u>	E1A	Imperiale 等, 1984
胶原酶	佛波酯 (TPA)	Angel 等, 1987a
溶基质素	佛波酯 (TPA)	Angel 等, 1987b
SV40	佛波酯 (TPA)	Angel 等, 1987b

鼠 MX 基因	干扰素, 新城疫病毒	Hug 等, 1988
GRP78 基因	A23187	Resendez 等, 1988
α -2-巨球蛋白	IL-6	Kunz 等, 1989
波形蛋白	血清	Rittling 等, 1989
I 类 MHC 基因 H-2 κ b	干扰素	Blanar 等, 1989
HSP70	E1A, SV40 大 T 抗原	Taylor 等, 1989, 1990a, 1990b
多育曲菌素	佛波酯-TPA	Mordacq 等, 1989
肿瘤坏死因子	PMA	Hensel 等, 1989
促甲状腺激素 α 基因	甲状腺激素	Chatterjee 等, 1989

具体感兴趣的是肌肉特异性启动子, 更具体说是心脏特异性启动子。这些包括肌球蛋白轻链-2 启动子(Franz 等, 1994; Kelly 等, 1995)、 α 肌动蛋白启动子(Moss 等, 1996)、肌钙蛋白 1 启动子(Bhavsar 等, 1996); $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换子启动子(Barnes 等, 1997)、抗肌萎缩蛋白启动子(Kimura 等, 1997)、 α 7 整合素启动子(Ziober 和 Kramer, 1996)、脑促尿钠排泄肽启动子(LaPointe 等, 1996)和 α B-晶体蛋白/小热激蛋白启动子(Gopal-Srivastava, 1995)、 α 肌球蛋白重链启动子(Yamauchi-Takihara 等, 1989)和 ANF 启动子(LaPointe 等, 1988)。

在使用 cDNA 插入物的地方, 一般会需要包括聚腺苷酸化信号, 以影响基因转录物的合适聚腺苷酸化。相信对本发明实践来说, 聚腺苷酸化信号的性质并不重要, 可以使用任何这些序列, 如人生长激素和 SV40 聚腺苷酸化信号。也认为终止子是表达盒的元件。这些元件可用于增加信息水平并使从盒到其它序列的连读最小化。

B. 可选择性标记

在本发明的某些实施方式中, 细胞含有本发明的核酸构建物, 可通过在表达构建物中包括标记以在体外或体内鉴定细胞。这些标记会赋予细胞可鉴定的改变, 以允许容易地鉴定含有表达构建物的细胞。通常, 包含药物选择标记有助于克隆和选择转化子, 例如, 赋予耐新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、零霉素和组氨酸的基因是有用的可选择性标记。另外, 可使用酶, 如单纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶(*tk*)或氯霉素乙酰基转移酶(CAT)。也可使用免疫标记。相信所用可选择性标记并不重要, 只要它能够与编码基因产物的核酸同时表达。可选择性标记的其它实例是本领域技

术人员所熟知的。

C. 多基因构建物和 IRES

在本发明的某些实施方式中，用内部核糖体结合位点(IRES)元件建立多基因、
5 或多顺反子信息。IRES 元件能够绕过 5' 甲基化帽依赖性翻译的核糖体扫描模型，并在内部位点开始翻译(Pelletier 和 Sonenberg, 1988)。已描述了来自 picano 病毒科中两个成员(脊髓灰质炎和脑心肌炎病毒)的 IRES 元件(Pelletier 和 Sonenberg, 1988)，以及来自哺乳动物信息的 IRES(Macejak 和 Sarnow, 1991)。IRES 元件可以与异源开放阅读框连接。多开放阅读框可一起转录，各自被 IRES 分开，建立多顺反子信息。依靠 IRES 元件，核糖体可到达各开放阅读框，以有效翻译。可以用单个启动子/增强子有效表达多个基因，转录成单条信息。

可将任何异源开放阅读框与 IRES 元件连接。这包括分泌蛋白，多亚基蛋白、独立基因编码的、胞内或膜结合蛋白和可选择性标记的基因。以这种方式，可用单个构建物和单个可选择性标记将几种蛋白的表达同时工程改造到一个细胞中。

15

D. 表达载体的递送

有多种方式可将表达载体引入细胞。在本发明的某些实施方式中，表达构建物包含病毒或获自病毒基因组的工程改造构建物。某些病毒通过受体介导的胞吞作用进入细胞，以掺入宿主细胞基因组并稳定和有效地表达病毒基因的能力使它们成为
20 将外源基因转入哺乳动物细胞的诱人的候选物(Ridgeway, 1988; Nicolas 和 Rubenstein, 1988; Baichwal 和 Sugden, 1986; Temin, 1986)。首先用作基因载体的病毒是 DNA 病毒，包括乳头状多瘤空泡病毒(猿病毒 40，牛乳头瘤病毒和多瘤病毒)(Ridgeway, 1988; Baichwal 和 Sugden, 1986)和腺病毒(Ridgeway, 1988; Baichwal 和 Sugden, 1986)。这些病毒对外源性 DNA 序列的容量较低，具有受限的宿主谱。而且，它们在感受态细胞中的致癌可能性和引起细胞病变的效果引起了人们对安全性的关注。它们仅可容纳长至 8kB 的外源性遗传物质，但可容易地引入各种细胞系和实验动物中(Nicolas 和 Rubenstein, 1988; Temin, 1986)。

用于体内递送的优选方法之一包括使用腺病毒表达载体。“腺病毒表达载体”意
于包括含有足够(a)支持构建物包装和(b)表达其中克隆的反义聚核苷酸的腺病毒序
30 列的构建物。在本文中，表达不需要合成基因产物。

表达载体包含腺病毒的遗传工程改造形式。所知的腺病毒的遗传结构是 36kB、

线性、双链 DNA 病毒，这允许用长达 7kB 的外源性序列取代大段的腺病毒 DNA (Grunhaus 和 Horwitz, 1992)。与逆转录病毒相反，腺病毒感染宿主细胞并不产生染色体整合，因为腺病毒 DNA 可以游离基因(episomal)的方式复制，而没有潜在的基因毒性。腺病毒也是结构稳定的，在大量扩增后，并没有检测到基因组重排。

- 5 腺病毒实质上可感染所有上皮细胞，不管其处于哪个细胞周期阶段。迄今，腺病毒感染似乎仅与轻微的疾病有关，如人类的急性呼吸道疾病。

- 腺病毒因为其中等大小的基因组、容易操纵、高滴度、靶细胞范围宽和高感染活性，尤其适于用作基因转移载体。病毒基因组的两端都包含 100-200 个碱基对的反向重复序列(ITR)，它是病毒 DNA 复制和包装必需的顺式元件。基因组的早期(E)和后期(L)区含有不同的转录单元，它们被病毒 DNA 复制的开始处分开。E1 区(E1A 和 E1B)编码负责调节病毒基因组和几个细胞基因的转录的蛋白。E2 区(E2A 和 E2B)的表达导致病毒 DNA 复制蛋白的合成。这些蛋白涉及 DNA 复制、后期基因表达和宿主细胞中断(shut-off) (Renan, 1990)。包括大部分病毒衣壳蛋白的后期基因的产物仅在单个初级转录物明显加工之后表达，初级转录物由主要后期启动子(MLP)产生。
- 15 MLP(位于 16.8m. u.)在感染后期尤其有效，所有该启动子产生的 mRNA 都具有 5'-三分先导(TPL)序列，这使它们成为进行翻译的优选 mRNA。

在当前系统中，由穿梭载体和前病毒载体之间的同源重组产生重组腺病毒。由于两种前病毒载体之间可能重组，可通过该方法产生野生型腺病毒。因此，从单独的噬菌斑中分离单个病毒克隆并检查其基因组结构是重要的。

- 20 产生和增殖现有的复制缺陷的腺病毒载体，取决于独特的协助细胞系，称为 293，它由 Ad5DNA 片段转化人胚肾细胞而得，连续表达 E1 蛋白(Graham 等, 1977)。因为 E3 区是腺病毒基因组中非必需的(Jones 和 Shenk, 1978)，所以现有的腺病毒载体，在 293 细胞的协助下，在 E1、D3 或这两个区域中携带外源性 DNA (Graham 和 Prevec, 1991)。实际上，腺病毒可包装约 105%的野生型基因组(Ghosh-Choudhury 等, 1987)，
- 25 提供的 DNA 容量约多 2kb。与 E1 和 E3 区中约 5.5kb 的可替代 DNA 结合时，现有腺病毒载体的最大容量低于 7.5kb，或约占载体总长的 15%。多于 80%的腺病毒病毒基因组保留在载体骨架上，这是载体-产生的细胞毒性的来源。E1-缺失病毒的复制缺陷也是不完全的。

- 协助细胞系可获自人细胞，如人胚肾细胞、肌肉细胞、造血细胞或其它人胚间叶细胞或上皮细胞。另外，协助细胞可获自可感受人腺病毒的其它哺乳动物种的细胞。这些细胞包括，例如，Vero 细胞或其它猴胚间叶细胞或上皮细胞。如上所述，
- 30

优选的协助细胞系是 293。

Racher 等(1995)公开了培养 293 细胞和增殖腺病毒的改进方法。在一种形式中，通过将单个细胞接种到含有 100-200 毫升培养基的 1 升硅化旋转烧瓶中生长获得天然细胞集合(Techno, Cambridge, UK)。以 40rpm 搅拌后，用台盼蓝估计细胞活力。

- 5 在另一种形式中，如下所述地使用 Fibracel 微运载体(BibbySterlin, Stone, UK) (5 克/升)。将重悬于 5 毫升培养基中的细胞接种体加入到 250 毫升锥形烧瓶中的运载体(50 毫升)中并静置，偶尔搅拌，1 至 4 小时。然后用 50 毫升新鲜培养基替换培养基，开始振荡。对于病毒生产来说，允许细胞长至约 80%汇合，然后更换培养基(至最终体积的 25%)，以 MOI0.05 加入腺病毒。将培养物静置过夜，然后将体积增加到
- 10 100%，开始再次振荡 72 小时。

- 不同于要求腺病毒载体是复制缺陷的，或至少是条件缺陷的，相信腺病毒载体的性质对本发明的成功实践并不重要。腺病毒可以是 42 个不同的已知血清型或 A-F 亚组中任意一种。亚组 C 的 5 型腺病毒是优选的起始材料，以获得用于本发明的条件复制缺陷型腺病毒载体。这是因为 5 型腺病毒是人腺病毒，大量关于它的生化和
- 15 遗传信息是已知的，它在历史上已用于腺病毒用作载体的大部分构建物。

- 如上所述，根据本发明的典型载体是复制缺陷型，不会有腺病毒 E1 区。因此，从去除了 E1-编码序列的位置上引入编码感兴趣基因的聚核苷酸将是最方便的。然而，腺病毒序列内插入构建物的位置对于本发明来说并不重要。也可将编码感兴趣基因的聚核苷酸插入 E3 替代载体中缺失 E3 区的地方，如 Karlsson 等(1986)所述，
- 20 或插入协助细胞系或协助病毒补足 E4 缺失的 E4 区中。

- 在体外和体内，腺病毒容易培养和操纵，并显示出宽宿主范围。可以高滴度，例如，每毫升 10^9 - 10^{12} 噬斑形成单位获得该群病毒，它们具有高感染性。腺病毒的生命周期不需要掺入宿主细胞基因组中。腺病毒载体递送的基因是游离的，因此对宿主细胞的基因毒性低。用野生型腺病毒接种疫苗的研究中未报道副作用(Couch 等，
- 25 1963; Top 等，1971)，证明其作为体内基因转移载体的安全性和治疗潜力。

- 腺病毒载体已用于真核基因表达(Levrero 等，1991; Gomez-Foix 等，1992)和疫苗开发(Grunhaus 和 Horwitz，1992; Graham 和 Prevec，1991)。最近，动物研究提示重组腺病毒可用于基因治疗(Stratford-Perricaudet 和 Perricaudet，1991; Stratford-Perricaudet 等，1990; Rich 等，1993)。将重组腺病毒给予不同组织的研究包括气管滴注(Rosenfeld 等，1991; Rosenfeld 等，1992)、肌肉注射(Ragot 等，
- 30 1993)、外周静脉内注射(Herz 和 Gerard，1993)和定向接种到脑中(Le Gal La Salle

等, 1993)。

逆转录病毒是一组单链 RNA 病毒, 其特征为在感染细胞中能够通过逆转录过程将它们的 RNA 转化成双链(Coffin, 1990)。然后, 产生的 DNA 作为前病毒稳定地掺入细胞染色体, 指导病毒蛋白的合成。整合导致病毒基因序列保留在受体细胞和它的后代中。逆转录病毒基因组含有三个基因, gag、pol 和 env, 它们分别编码衣壳蛋白、聚合酶和包膜组件。在 gag 基因上游发现的序列包含将基因组包装到病毒粒子中的信号。在病毒基因组的 5' 和 3' 末端存在两个长末端重复(LTR)序列。它们包含强力启动子和增强子序列, 也是掺入宿主细胞基因组所必需的(Coffin, 1990)。

为了构建逆转录病毒载体, 将编码感兴趣基因的核酸插入病毒基因组中, 代替某些病毒序列, 产生复制缺陷型病毒。为了产生病毒粒子, 构建含有 gag、pol 和 env 基因但不含 LTR 的包装细胞系和包装组件(Mann 等, 1983)。当将含有 cDNA 与逆转录病毒 LTR 和包装序列的重组质粒引入该细胞系时(例如通过磷酸钙沉淀), 包装序列允许将重组质粒的 RNA 转录物包装到病毒颗粒中, 然后病毒颗粒被分泌到培养基中(Nicolas 和 Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann 等, 1983)。然后收集含有重组逆转录病毒的培养基, 任选地浓缩, 并用于基因转移。逆转录病毒载体能够感染很多种细胞类型。然而, 整合和稳定表达需要宿主细胞进行分裂(Paskind 等, 1975)。

最近, 根据通过将乳糖残基化学加成到病毒包膜上而化学修饰逆转录病毒, 开发了设计用于特异性靶向逆转录病毒载体的全新方法。该修饰可允许通过唾液酸糖蛋白受体特异性感染肝细胞。

设计了一个不同的靶向重组逆转录病毒的方法, 该方法中使用抗逆转录病毒包膜蛋白和抗特异性细胞受体的生物素化抗体。通过生物素组件用抗生物素蛋白链菌素偶联这些抗体(Roux 等, 1989)。用抗主要组织相容性复合体 I 类和 II 类抗原的抗体, 他们证明了亲嗜性病毒体外感染各种带有那些表面抗原的人细胞(Roux 等, 1989)。

在本发明的所有方面, 对逆转录病毒载体的用途有某些限制。例如, 逆转录病毒载体通常整合入细胞基因组中的随机位点。这可导致通过中断宿主基因或通过插入可干扰侧翼基因功能的病毒调节序列进行插入诱变(Varmus 等, 1981)。使用缺陷型逆转录病毒载体中另一引人关注的问题是在包装细胞中可能出现野生型复制竞争型病毒。这可能是由重组事件引起, 该事件中将来自重组病毒的完整序列插入到掺入宿主细胞基因组的 gag、pol、env 序列上游。然而, 现在可用新包装细胞系, 它应该能够大大降低重组的可能(Markowitz 等, 1988; Hersdorffer 等, 1990)。

其它病毒载体可在本发明中用作表达构建物。可使用获自病毒，如牛痘病毒 (Ridgeway, 1988; Baichwal 和 Sugden, 1986; Coupar 等, 1988) 腺相关病毒 (AAV) (Ridgeway, 1988; Baichwal 和 Sugden, 1986; Hermonat 和 Muzycska, 1984) 和疱疹病毒的载体。它们具有适用于各种哺乳动物细胞的几种诱人特征 (Friedmann, 5 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal 和 Sugden, 1986; Coupar 等, 1988; Horwich 等, 1990)。通过识别缺陷型乙肝病毒，我们对不同病毒序列的结构-功能关系有了新的认识。体外研究显示，尽管病毒缺失了多达 80% 的基因组，它仍可保留依赖协助的包装和逆转录能力 (Horwich 等, 1990)。这提示可用外源性遗传物质替换大部分基因组。对于肝脏-导向的基因转移来说，嗜肝性和持续性(整合)是尤其吸引人的特性。Chang 10 等将氯霉素乙酰基转移酶 (CAT) 基因引入鸭乙肝病毒基因组代替聚合酶、表面和前表面编码序列。将该病毒与野生型病毒共转染到禽肝细胞系中。含有高滴度重组病毒的培养基用于感染初级小鸭肝细胞。转染后至少 24 天，检测到稳定的 CAT 基因表达 (Chang 等, 1991)。为了实现正义或反义基因构建物的表达，必须将表达构建物递送到细胞中。可体外如在转染细胞系的实验室程序中，或体内或离体如在某些病症的 15 治疗中完成递送。一种递送机制是通过病毒感染，其中将表达构建物包裹在感染性病毒颗粒中。

本发明也考虑了几种将构建物转移到培养的哺乳动物细胞中的非病毒方法。这些方法包括磷酸钙沉淀 (Graham 和 VanDerEb, 1973; Chen 和 Okayama, 1987; Rippe 等, 1990) DEAE-葡聚糖 (Gopal, 1985)、电穿孔 (Tur-Kaspa 等, 1986; Potter 等, 20 1984)、直接显微注射 (Harland 和 Weintraub, 1985)、载有 DNA 的脂质体 (Nicolau 和 Sene, 1982; Fraley 等, 1979) 和 lipofectamine-DNA 复合物、细胞超声波降解法 (Fechheimer 等, 1987)、用高速微粒进行基因轰击 (Yang 等, 1990) 和受体介导的转染 (Wu 和 Wu, 1987; Wu 和 Wu, 1988)。这些技术中的一部分可成功用于体内或离体用途。

25 一旦将表达构建物递送到细胞中，编码感兴趣基因的核酸在该细胞中可能位于和表达于不同位点。在某些实施方式中，可以将编码该基因的核酸稳定地整合入细胞基因组中。该掺入可能通过同源重组发生在关联位置和方向上(基因替换)或可能掺入随机、非特异性位置(基因增加)。在另一实施方式中，核酸可在细胞中稳定地维持为单独、游离节段的 DNA。这些核酸节段或“游离基因”编码足够独立于或同步 30 于宿主细胞周期进行维持和复制的序列。怎样将表达构建物递送到细胞中和核酸保留在细胞何处取决于所用表达构建物的类型。

在本发明另一实施方式中,表达构建物可简单地由裸重组 DNA 或质粒构成。可通过任何上述方法进行构建物的转移,该方法可以物理或化学地使细胞膜通透。这尤其可用于体外转移,但它也可应用于体内用途。Dubensky 等(1984)成功地以磷酸钙沉淀的形式将多瘤病毒 DNA 注射到成年和新生小鼠的肝脏和脾脏中,证明了活性病毒复制和急性感染。Benvenisty 和 Neshif (1986)也证明直接腹腔内注射磷酸钙沉淀的质粒导致转染基因的表达。可以想像,也可将编码感兴趣基因的 DNA 以类似的方式向体内转移,并表达基因产物。

在本发明另一实施方式中,将裸 DNA 表达构建物转移到细胞中可包括颗粒轰击。该方法依赖于将包裹 DNA 的微粒加速到允许它们刺穿细胞膜并进入细胞而不会杀死细胞的高速(Klein 等,1987)。已经开发了几种加速小颗粒的装置。该设备依赖于高压放电以产生电流,它反过来提供原动力(Yang 等,1990)。所用微粒由生物学惰性物质,如钨或金珠组成。

体内轰击选择器官,包括大鼠和小鼠的肝脏、皮肤和肌肉组织(Yang 等,1990; Zelenin 等,1991)。这可能需要对组织或细胞进行外科处理,以消除枪和靶组织之间的任何介入组织,即离体处理。编码具体基因的 DNA 也可通过该方法递送,并仍通过本发明整合。

在本发明的另一实施方式中,可将表达构建物包裹到脂质体中。脂质体是泡囊状结构,其特征为磷脂双层膜和内部水相介质。多层脂质体具有被水相介质分开的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量水溶液中时,它们自发形成。在形成闭合结构之前,脂质组分进行自重排,将水和溶解的溶质包裹在脂质双层之间(Ghosh 和 Bachhawat, 1991)。也考虑到 lipofectamine-DNA 复合物。

脂质体介导的核酸递送和外源性 DNA 的体外表达已经是非常成功的。Wong 等,(1980)证明了脂质体介导的递送和在培养的鸡胚、HeLa 和肝细胞中表达外源性 DNA 的可行性。Nicolau 等,(1987)在大鼠中完成了静脉注射后成功的脂质体介导的基因转移。

在本发明的某些实施方式中,可将脂质体与红细胞凝集病毒(HVJ)复合。结果显示它有助于与细胞膜的融合并促进脂质体-包裹的 DNA 进入细胞(Kaneda 等,1989)。在其它实施方式中,脂质体可与核非组蛋白染色体蛋白(HMG-1)复合或与其联合使用(Kato 等,1991)。在另外的实施方式中,该脂质体可与 HVJ 和 HMG-1 复合或与其联合使用。由于这些表达构建物已成功用于在体外和体内转移和表达核酸,所以它们适用于本发明。如果将细菌启动子用于 DNA 构建物,那么也将需要在脂质体中包括

合适的细菌聚合酶。

其它可用于将编码具体基因的核酸递送到细胞中的表达构建物是受体介导的递送载体。这些载体利用了在所有真核细胞中通过受体介导的胞吞作用对大分子的选择性摄取。因为各种受体的细胞类型特异性分布，所以递送可以是高度特异性的(Wu 和 Wu, 1993)。

受体介导的基因靶向载体通常由两个组件构成：细胞受体特异性配体和 DNA 结合剂。几种配体已用于受体介导的基因转移。最广泛表征的配体是脱唾液酸血清类粘蛋白(ASOR)(Wu 和 Wu, 1987)和转铁蛋白(Wagner 等, 1990)。最近，已将与 ASOR 识别相同受体的合成新糖蛋白用作基因递送载体(Ferkol 等, 1993; Perales 等, 1994)，也已将表皮生长因子(EGF)用于将基因递送到鳞状癌细胞中(Myers, EP00273085)。

在其它实施方式中，递送载体可包括配体和脂质体。例如，Nicolau 等, (1987)用乳糖基-神经酰胺，一种末端为半乳糖的脱唾液酸神经节苷脂，掺入脂质体中，观察到肝细胞对胰岛素基因的摄取增加。因此，通过任意数量受体-配体系统用或不用脂质体将编码具体基因的核酸特异性递送到细胞类型中是可行的。例如，表皮生长因子(EGF)可用作将核酸介导递送到细胞中的受体，该类细胞显示出 EGF 受体上调。可将甘露糖用于靶向肝细胞上的甘露糖受体。抗 CD5(CLL)、CD22(淋巴瘤)、CD25(T-细胞白血病)和 MAA(黑色素瘤)的抗体也可类似地用作靶向部分。

在某些实施方式中，在离体条件下可能更容易进行基因转移。离体基因治疗指从动物分离细胞，将核酸体外递送到细胞中，然后将修饰的细胞送回动物体内。这可包括从动物或细胞和组织的原代培养物中手术去除组织/器官。

VIII. 制造转基因小鼠的方法

本发明的具体实施方式提供了在启动子的控制下表达异源 PKD 基因的转基因动物。在诱导型或组成型启动子的控制下表达 PKD 编码核酸的转基因动物，获自该动物的重组细胞系和转基因胚胎可用于确定 PKD 在心肌细胞的发育和分化以及病理性心脏肥大和心力衰竭发展中起到的确切作用。而且，这些转基因动物可提供对心脏发育的认识。使用组成型表达的 PKD 编码核酸提供过表达或表达下调的模型。也考虑到“敲除”PKD 的一个或两个等位基因的转基因动物。

在一个总的方面，通过给定转基因以允许转基因表达的方式整合入基因组中生产转基因动物。Wagner 和 Hoppe (美国专利 4,873,191; 引入本文作为参考)以及以

整体引入本文作为参考的 Brinster 等, 1985 总地描述了生产转基因动物的方法。

通常, 通过显微注射把侧翼连有基因组序列的基因转移到受精卵中。将该显微注射的卵移植到雌性宿主动物体内, 筛选其后代中转基因的表达。可由许多动物, 包括但不限于爬虫、两栖动物、鸟类、哺乳动物和鱼类的受精卵生产转基因动物。

- 5 可通过任何本领域已知手段制备用于显微注射的 DNA 克隆。例如, 可用适用于去除细菌质粒序列的酶切割用于显微注射的 DNA 克隆, 用标准技术在 TBE 缓冲液中在 1%琼脂糖凝胶上电泳 DNA 片段。用溴化乙锭染色使 DNA 条带显色, 切下含有表达序列的条带。然后将切下的条带置于含有 0.3 M 乙酸钠、pH 7.0 的透析袋中。将 DNA 电洗脱到透析袋中, 用 1:1 的苯酚:氯仿溶液抽提 DNA, 并用两倍体积的乙醇沉淀。
- 10 将 DNA 再溶解于 1 毫升低盐缓冲液(0.2 M NaCl、20 mM Tris、pH 7.4 和 1 mM EDTA)中, 在 Elutip-DTM 柱上纯化。首先用 3 毫升高盐缓冲液(1 M NaCl、20 mM Tris、pH 7.4 和 1 mM EDTA)灌柱, 然后用 5 毫升低盐缓冲液洗涤。将 DNA 溶液过柱三次, 以使 DNA 结合到柱基质上。用 3 毫升低盐缓冲液洗涤一次后, 用 0.4 毫升高盐缓冲液洗脱 DNA, 用两倍体积的乙醇沉淀。通过紫外分光光度计中 260 纳米处的吸光度测
- 15 量 DNA 浓度。对于显微注射, 在 5 mM Tris、pH 7.4 和 0.1 mM EDTA 中将 DNA 浓度调整到 3 微克/毫升。Palmiter 等 (1982)和 Sambrook 等 (2001)中描述了用于显微注射的其他 DNA 纯化方法。

- 在示例性显微注射步骤中, 通过注射 5IU 的怀孕马血清促性腺激素(PMSG; Sigma)(0.1 毫升, 腹腔内), 48 小时后再注射 5IU 的人绒毛膜促性腺激素(hCG; Sigma)(0.1 毫升, 腹腔内)来诱导六周龄的雌性小鼠排卵过度。hCG 注射后立即将雌性小鼠与雄性放在一起。注射后二十一小时, 用 CO₂窒息或断颈法处死交配过的雌性, 从切下的输卵管中回收胚胎, 置于含有 0.5%牛血清白蛋白(BSA; Sigma)的 Dulbecco 氏磷酸盐缓冲液中。用透明质酸酶(1 毫克/毫升)去除周围的堆积细胞。然后洗涤前核胚胎, 并置于含有 0.5%BSA 的 Earle 氏平衡盐溶液(EBSS)中, 在 37.5°C 的培养箱
- 25 中, 5%CO₂、95%空气的潮湿环境下培养, 直到注射。可以在二细胞期移植胚胎。

- 将成年雌性小鼠的生理周期随机化后, 与切除输精管的雄性配对。可将 C57BL/6 或 Swiss 小鼠或其他相当品系用于此目的。受体雌性与供体雌性同时交配。在转移胚胎的同时, 通过每克体重腹腔内注射 0.015 毫升 2.5%阿佛丁麻醉受体雌性。通过背中单线单切开暴露输卵管。然后在正好位于输卵管之上的体壁上作切口。然后用钟表(warchmaker)钳将卵巢囊撕碎。将待转染胚胎置于 DPBS(Dulbecco 氏磷酸盐缓冲液)中, 并在移液管的顶端(约 10 至 12 个胚胎)。将移液管顶端插入输卵管漏斗, 转
- 30

移胚胎。转移后，缝合两针封闭切口。

IX. 对 PKD 具有活性的抗体

在另一方面，本发明考虑了对本发明的 PKD 分子具有免疫活性的抗体，或其部分。抗体可以是多克隆或单克隆抗体。在优选实施方式中，抗体是单克隆抗体。本领域技术人员熟知制备和表征抗体的方法(参见，例如，Harlow 和 Lane, 1988)。

简要说，通过用含有本发明多肽的免疫原免疫动物，并从免疫的动物中收集抗血清来制备多克隆抗体。很多动物种都可用于生产抗血清。一般地，用于生产抗血清的动物是非人动物，包括家兔、小鼠、大鼠、仓鼠、猪或马。因为家兔的血液体积相对较大，所以家兔是生产多克隆抗体的优选选择。

可用常规免疫技术制备特异性抗抗原同种型的多克隆和单克隆抗体，如本领域技术人员通常所知。含本发明化合物的抗原表位的组合物可用于免疫一种或多种实验动物，如家兔或小鼠，然后进行抗本发明化合物的特异性抗体的生产。在经过产生抗体的时间后，简单地通过给动物放血和从全血中制备血清样品就可获得多克隆抗血清。

据推断，将发现本发明单克隆抗体可应用于标准免疫化学方法，如 ELISA 和 Western 印迹法，和用于免疫组化方法，如组织染色，以及其他可能利用特异性抗 PKD 相关抗原表位的抗体的方法。

总的来说，抗 PKD 的多克隆、单克隆和单链抗体都可用于各种实施方式。这些抗体的具体有用应用是在纯化天然或重组 PKD 中，例如，用抗体亲和柱。根据本公开，本领域技术人员将了解所有接受的免疫学技术的操作。

制备和表征抗体的方法是本领域中公知的(参见，例如，Harlow 和 Lane, 1988; 引入本文作为参考)。下面的实施例中给出了制备单克隆抗体的更具体的实例。

正如本领域中所公知的，给定组合物的免疫原性可以改变。因此，经常有必要强化宿主免疫系统，如通过将肽或多肽免疫原偶联到运载体上所达到的那样。示例性和优选的运载体是钥孔血蓝素(KLH)和牛血清白蛋白(BSA)。其他白蛋白，如卵清蛋白，小鼠血清白蛋白或家兔血清白蛋白也可用作运载体。将多肽共轭到运载体蛋白上的方法是本领域中公知的，该方法包括戊二醛，间马来酰亚胺基苯甲酰基(m-maleimidobencoyl)-N-羟基琥珀酰亚胺酯，碳二亚胺和双二氮化(bis-biazotized)联苯胺。

也如本领域中所公知的那样，可以通过使用称为佐剂的免疫反应非特异性刺激

物,增强具体免疫原组合物的免疫原性。示例性和优选的佐剂包括完全弗氏佐剂(含杀死的结核分支杆菌的免疫反应非特异性刺激物)、不完全弗氏佐剂和氢氧化铝佐剂。

用于生产多克隆抗体的免疫原组合物的量因免疫原性质以及用于免疫的动物而改变。各种途径(皮下、肌内、皮内、静脉内和腹腔内)均可用于给予免疫原。可通过在免疫后不同时间点采集免疫动物的血样来监测多克隆抗体的生产。也可给予第二次加强注射。重复进行加强和测定滴度的过程,直到获得合适的滴度。当获得所需水平的免疫原性时,将免疫动物放血,分离血清并储存,和/或动物可用于产生 mAb。

可以通过使用本领域公知技术,如引入本文作为参考的美国专利 4,196,265 中示例的技术容易地制备 MAb。通常,该技术包括用选择的免疫原组合物,如纯化或部分纯化的 PKD 蛋白、多肽或肽或表达高水平 PKD 的细胞来免疫合适的动物。以有效刺激抗体生产细胞的方式给予该免疫组合物。啮齿类如小鼠和大鼠是优选的动物,然而,使用家兔、绵羊、蛙细胞也是可能的。使用大鼠可提供某些优点(Goding, 1986),但优选小鼠,最优选 BALB/c 小鼠,因为这是最常规使用的动物,通常产生更高百分数的稳定融合。

免疫后,选择具有产生抗体的潜能的体细胞,具体是 B 淋巴细胞(B 细胞)用于 mAb 产生方法。这些细胞可获自活组织检查的脾脏、扁桃体或淋巴结,或获自外周血样。优选脾细胞和外周血细胞,前者是因为它们是富含处于分裂成浆细胞阶段的抗体产生细胞的来源,后者是因为可容易地得到外周血。经常是免疫一系列动物,摘除抗体滴度最高的动物脾,通过用注射器匀浆脾脏获得脾淋巴细胞。一般地,来自免疫小鼠的脾脏含有大约 5×10^7 至 2×10^8 个淋巴细胞。

然后将来自免疫动物的产生抗体的 B 淋巴细胞与永生化的骨髓瘤细胞,通常是与免疫动物种相同的骨髓瘤细胞融合。适用于生产杂交瘤的融合方法的骨髓瘤细胞系优选不生产抗体,具有高融合效率和酶缺陷,酶缺陷使其后来不能在某些选择性培养基中生长,选择性培养基仅支持所需融合细胞(杂交瘤)生长。

如本领域技术人员所知,可用许多种骨髓瘤细胞中的任意一种(Goding, 1986; Campbell, 1984)。例如,免疫动物是小鼠时,人们可使用 P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag4 1、Sp210-Ag14、FO、NS0/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG 1.7 和 S194/5XX0 Bu1;对于大鼠来说,人们可使用 R210.RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983F 和 4B210; U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2 和 729-6 都可用于细胞融合。

产生抗体生产脾脏或淋巴结细胞和骨髓瘤细胞的杂合子的方法通常包括,在一

种或几种促进细胞膜融合药剂(化学或电学)的存在下,按 2:1 的比例将体细胞与骨髓瘤细胞混合,但该比例可分别在约 20:1 至约 1:1 中变化。已经描述了使用仙台病毒的融合方法(Kohler 和 Milstein, 1975; 1976), Gefter 等, (1977)也描述了使用聚乙二醇(PEG), 如 37% (v/v) PEG 的方法。使用电诱导的融合方法也是合适的
5 (Goding, 1986)。

融合方法通常以低频率,大约 1×10^{-6} 至 1×10^{-8} 产生存活杂交子。然而,这并不造成问题,因为存活的融合杂交子是通过在选择性培养基中培养,从母代、未融合细胞(尤其是正常情况下会继续无限分裂的未融合骨髓瘤细胞)分化而来的。该选择性培养基通常在组织培养基中含有阻断核苷酸从头合成的药剂。示例性和优选的药剂是氨基蝶呤、氨甲蝶呤和重氮丝氨酸。氨基蝶呤和氨甲蝶呤阻断嘌呤和嘧啶的从头合成,而重氮丝氨酸仅阻断嘌呤合成。如果使用了氨基蝶呤或氨甲蝶呤,该培养基需补充有次黄嘌呤和胸腺嘧啶作为核苷酸来源(HAT 培养基)。如果使用重氮丝氨酸,该培养基则需补充有次黄嘌呤。
10

优选的选择性培养基是 HAT。只有能进行核苷酸补救途径的细胞才能够在 HAT 培养基中存活。骨髓瘤细胞缺少补救途径的关键酶,如次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT),因此它们不能存活。B 细胞可进行该途径,但它们在培养条件中寿命有限,通常在约两星期内死亡。因此,在选择性培养基中可以存活的细胞只有骨髓瘤和 B-细胞形成的杂合子。
15

该培养提供了一群杂交瘤,从中选择特异性杂交瘤。一般地,通过在微量滴定板上稀释单个克隆以培养细胞进行杂交瘤的选择,然后测试单个克隆上清液(约两至三星期后)中所需的反应性。该测定应该是灵敏、简单和快速的,如放射性免疫测定、酶免疫测定、细胞毒性测定、噬菌斑测定,斑点免疫结合测定等。
20

然后将选择的杂交瘤连续稀释,并克隆到单个抗体生产细胞系中,然后这些克隆可无限传代以提供 mAb,可以两种基本途径使该细胞系进行 mAb 生产。可将杂交瘤的样品注射(经常是腹腔内)到动物内,该动物与用于为最初融合提供体细胞和骨髓瘤细胞的动物类型组织相容。注射的动物发生肿瘤,该肿瘤分泌由融合细胞杂合子生产的特异性单克隆抗体。然后可放出该动物的体液,如血清或腹水,以提供高浓度 mAb。也可在体外培养单个细胞系, mAb 被自然地分泌到培养基中,可容易地从培养基中获得高浓度抗体。如果需要,两种方法生产的 mAb 均可进一步用过滤、离心
25
30 和各种层析方法如 HPLC 或亲和层析来纯化。

X. 定义

本文使用的术语“心力衰竭”广泛用于指降低心脏泵血能力的任何病症。结果是组织内发生充血和水肿。最经常的情况是，心力衰竭由冠状血流减少产生的心肌收缩力降低引起；然而，很多其它因素可导致心力衰竭，包括心脏瓣膜的损伤、维生素缺乏和原发性心肌疾病。虽然我们还不完全了解心力衰竭的精确生理机制，但相信心力衰竭通常涉及几种心脏自律神经作用的紊乱，包括交感神经、副交感神经和压力感受器反应。将术语“心力衰竭表现”广泛用于包括所有与心力衰竭相关的后遗症，如呼吸急促、压痕性水肿、扩大的触痛肝、过饱的颈静脉、肺音等，包括有关心力衰竭的实验室发现。

- 10 术语“治疗”或语法同等成分包括改善和/或逆转心力衰竭的症状(即心脏的泵血能力)。可用本文中描述的任意测量方法评价对心脏“生理功能的改善”(例如，测量射血分数、缩短分数、左心室内尺寸、心率等)，以及对动物存活的影响。在动物模型的使用中，用本文中描述的任一测定比较治疗的转基因动物和未治疗的转基因动物的反应(此外，可以包括治疗和未治疗的非转基因动物作为对照)。因此，
- 15 可将引起本发明筛选方法中使用的任何心力衰竭相关参数的改善的化合物鉴定为治疗化合物。

术语“扩张型心肌病”指一种心力衰竭的类型，其特征为出现对称性扩张的左心室，其心脏收缩功能差，此外，经常包括右心室。

- 20 术语“化合物”指可用于治疗或预防身体功能的疾病或不适的任何化学实体、药剂、药物等。化合物包括已知和可能的治疗化合物。可通过用本发明的筛选方法筛选来确定化合物。“已知治疗化合物”指在这些治疗中已经显示有效(例如，通过动物试验或先前有给予人的经验)的治疗化合物。换句话说，已知治疗化合物并不限于在治疗心力衰竭中有效的化合物。

- 25 本文使用的术语“激动剂”指模拟“天然”或“自然”化合物作用的分子或化合物。激动剂可以与这些天然化合物在构象、电荷或其它特征上同源。因此，激动剂可被细胞表面表达的受体识别。该识别可导致细胞内的生理和/或生化改变，使细胞以相同方式与存在的激动剂发生反应，就像天然化合物存在一样。激动剂可包括与感兴趣分子、受体和/或通路相互作用的蛋白质、核酸、碳水化合物或任何其它分子。

- 30 本文使用的术语“心脏肥大”指成熟的心肌细胞通过肥大生长对应激作出反应的过程。这种生长的特征为，细胞大小增加而不进行细胞分裂，在细胞内组装附加

肌节使产生的力最大化和激活胎心基因程序。心脏肥大经常与发病率和死亡率的风险升高相关，因此针对理解心脏肥大分子机制的研究可对人类健康具有重大影响。

本文使用的术语“拮抗剂”和“抑制剂”指抑制可能涉及心脏肥大的细胞因子作用的分子、化合物或核酸。拮抗剂与这些天然化合物在构象、电荷或其它特征上可以或可以不同源。因此，拮抗剂可被激动剂识别的相同或不同受体识别。拮抗剂可具有变构效应，它防止激动剂的作用。另外，拮抗剂可防止激动剂的功能。与激动剂不同的是，拮抗化合物不导致细胞内的病理性和/或生化改变，从而使细胞以与细胞因子存在时相同的方式与存在的拮抗剂发生反应。拮抗剂和抑制剂可包括与感兴趣受体、分子和/或通路相互作用的蛋白质、核酸、碳水化合物或任何其它分子。

10 本文使用的术语“调节”指生物活性的改变或变化。调节可以是蛋白活性的升高或降低、激酶活性的改变、结合性质的改变或与感兴趣蛋白或其它结构相关的生物学、功能或免疫性质的任何其它改变。术语“调节剂”指能够改变或变化上述生物学活性的分子或化合物。

术语“ β -肾上腺素能受体拮抗剂”指能够部分或完全阻断 β 型肾上腺素能受体(即响应于儿茶酚胺，尤其是去甲肾上腺素的肾上腺素能反应系统的受体)的化学化合物或实体。一些 β -肾上腺素能受体拮抗剂对一个受体亚型(通常是 β_1)显示出一定程度的特异性；此类拮抗剂称为“ β_1 -特异性肾上腺素能受体拮抗剂”和“ β_2 -特异性肾上腺素能受体拮抗剂”。术语“ β -肾上腺素能受体拮抗剂”指选择性和非选择性拮抗剂化学化合物。 β -肾上腺素能受体拮抗剂的实例包括但不限于醋丁洛尔、阿替洛尔、布他沙明、卡替洛尔、艾司洛尔、拉贝洛尔、美托洛尔、纳多洛尔、喷布洛尔、丙诺洛尔和噻吗洛尔。本发明方法包括使用已知 β -肾上腺素能受体拮抗剂的衍生物。实际上，本发明方法包括任何功能上相当于 β -肾上腺素能受体拮抗剂的化合物。

25 术语“血管紧张肽-转化酶抑制剂”或“ACE抑制剂”指能够部分或完全抑制涉及在凝乳酶-血管紧张肽系统中将相对失活的血管紧张肽 I 转化为活性血管紧张肽 II 的酶的化学化合物或实体。此外，ACE抑制剂也伴随地抑制缓激肽的降解，这很可能显著增强ACE抑制剂的抗高血压效果。ACE抑制剂的实例包括但不限于贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、quiapril 和雷米普利。本发明方法包括使用已知ACE抑制剂的衍生物。实际上，本发明方法包括任何功能上相当于ACE抑制剂的化合物。

30 本文使用的术语“基因型”指生物体的实际遗传构成，而“表型”指个体显示

的物理特性。此外，“表型”是基因组选择表达的结果（即它是细胞历史和它对胞外环境反应的表达）。实际上，人类基因组估计含有 30,000-35,000 个基因。在各细胞类型中，只表达了这些基因的一小部分（即 10-15%）。

5 XI. 实施例

包括了下面的实施例，以进一步说明本发明的各个方面。本领域技术人员应该理解，下面的实施例中公开的技术代表本发明者发现的在实践本发明中发挥良好作用的技术和/或组合物，因此可以认为这些技术构成其实践的优选模式。然而根据本公开，本领域技术人员应该了解，可对公开的具体实施方式作出很多改变并仍然获得同样或类似的结果，而不背离本发明精神和范围。

实施例 1：材料和方法

化学试剂和质粒。豆蔻酰 12-佛波醇 13-乙酯(PMA)、8-Br-cAMP、pCPT-cGMP、和茴香霉素购自 Sigma Chemical (St.Louis, MO)。下面的激酶抑制剂购自所示公司：
15 马来酰亚胺 I 和 Gö6976 (A. G. Scientific, San Diego, CA)，KN93、SB216763 和渥曼青霉素(BIOMOL, Plymouth Meeting, PA)，Gö6983、星孢素、PD98059、渥曼青霉素、U1026、Y-27632、雷帕霉素和 DAG 激酶抑制剂 II (Calbiochem)。以 1mM 使用 KN93、渥曼青霉素和星孢素。以 10mM 使用 U1026、HA1077、Y-27632、DAG 激酶抑制剂 II、SB216763 和 Bis I。以 30 纳克/毫升使用雷帕霉素。苯肾上腺素和内皮缩血管肽-1 购自 Sigma。Alex Toker 善意地提供编码 PKD 同种型的哺乳动物表达载体，其它地方有该载体的描述(Storz 和 Toker, 2003)。

细胞培养和转染测定。在含有 FBS(10%)、L-谷氨酰胺(2 mM)和青霉素-链霉素的 DMEM 中培养 COS 细胞。根据生产商的说明书用 Eugene 6(Roche Molecular Biochemicals)进行 COS 细胞的转染。对于 HDAC 定位实验，转染后用 PMA(100 nM)、
25 伊屋诺霉素 (1 mM)、8-Br-cAMP (1 mM)、pCPT-GMP (1 mM)或茴香霉素(1 mM)处理细胞 16-24 小时。注意，在加入任何化学刺激 30 分钟前，加入特异性蛋白激酶抑制剂。用标准荧光显微技术使 GFP-HDAC5 显色。对于 FLAG-HDAC5 的间接免疫荧光来说，将 COS 细胞接种在盖玻片上，转染，然后如上地处理。在特异性处理后，用福尔马林缓冲液(10%)固定细胞，在含有 BSA(3%)和 Nonidet P-40(0.1%)的 PBS 中染色。以
30 1: 200 的浓度使用 Flag M2 抗体(Sigma)。也以 1: 200 的浓度使用第二荧光素共轭抗体(Vector Laboratories)。通过上述间接免疫荧光检测，分别用抗肌节 α -辅肌

动蛋白(Sigma)和 ANF(Peninsula Laboratories)的抗体对心肌细胞中的肌节和心钠素(ANF)进行染色。

心肌细胞培养和腺病毒感染。如之前所述地从 1-2 天龄的 Sprague Dawley 大鼠中分离新生大鼠心肌细胞(NRVM) (Antos 等, 2003)。对于腺病毒生产, 将编码 LacZ 或 FLAG-标记的 HDAC5(S259/498A)的 cDNA 亚克隆化到 pACCMV 载体中, 和 pJM17 共转染到 293 细胞中。将初级裂解物用于再感染 293 细胞, 用琼脂覆盖法获得病毒噬菌斑。将全长人 HDAC5(编码 1122 个氨基酸)的互补 DNA 与编码增强型绿色荧光蛋白(EGFP; Clontech)的序列在 pcDNA3.1+(Invitrogen)内融合。产生的构建物编码框架内融合到 HDAC5 氨基末端的 GFP。以相同方式产生编码 GFP 的构建物, 该 GFP 融合到用丙氨酸代替丝氨酸 259 和 498 的 HDAC5 中。将 GFP-HDAC5 cDNA 亚克隆化到 pACCMV 中, 以进行腺病毒生产。扩增腺病毒的克隆群体并测定其滴度。

免疫共沉淀测定。将 Flag-HDAC5 表达质粒转染到如上述处理的 COS 细胞中。将处理细胞收集到 Tris (50 mM, pH 7.4)、NaCl (150 mM)、EDTA (1 mM)和 Triton X-100 (1%)中。使细胞通过 22 号针头, 以进一步瓦解细胞, 通过离心去除细胞碎片。用 M2-琼脂糖结合体(conjugate) (Sigma)免疫沉淀 Flag-HDAC5, 彻底洗涤。用 SDS-PAGE 解析结合蛋白, 用 Flag M2 (Sigma)或 14-3-3 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)进行 Western 印迹分析。对于用 NRVM 研究来说, 用含有蛋白酶抑制剂混合物(完全; Roche)、PMSF (1 mM)和磷酸酶抑制剂 [焦磷酸钠(1 mM)、氟化钠(2 mM)、b-磷酸甘油(10 mM)、钼酸钠(1 mM)、原钒酸钠(1 mM)]的相同缓冲液从表达 GFP-HDAC5 的细胞中制备全细胞蛋白抽提物。短时超声处理裂解物, 离心以澄清。在免疫沉淀中, 将蛋白裂解物与 HDAC5 特异性抗血清(19)和蛋白 G 琼脂糖珠子 (Amersham Biosciences) 接触。用裂解缓冲液洗涤免疫沉淀物 5 次, SDS-PAGE 解析和用特异性抗 GFP (BD Biosciences; 1:2,500 稀释)或 14-3-3 (Santa Cruz [H-8]; 1:1000 稀释)的小鼠单克隆抗体进行免疫印迹。通过免疫印迹检测结合的 PKD, 所用抗体是抗 PKD-1、丝氨酸 744 和 748 磷酸化的 PKD-1 或丝氨酸 916 磷酸化的 PKD-1 的兔多克隆抗体(Cell Signaling Technologies), 1:1000 稀释。

体外激酶测定。用抗-Flag M2 抗体免疫沉淀 Flag-HDAC5, 如上所述。用激酶缓冲液(Tris(25 mM, pH 7.4)、MgCl₂ (10 mM)、DTT (1 mM))洗涤和平衡结合的 Flag-HDAC5。平衡后, 加入激酶反应混合物(激酶缓冲液加 ATP (0.1 mM)和 50mCi [γ-³²P]-ATP)。在 30℃进行激酶反应 30 分钟, 通过加入等体积的 2xSDS-PAGE 上样缓冲液终止反应。用 SDS-PAGE 解析磷酸化蛋白, 通过放射自显影显色。

GFP-HDAC5 定位研究。为了在 NRVM 中分析 GFP-HDAC5, 在腺病毒存在下(感染复数= ~50-100)将细胞铺板在明胶包被的 96 孔板 (Costar; 1×10^4 细胞/孔)上, 含有胎牛血清(FBS) (10%)、L-谷氨酰胺(2 mM)和青霉素-链霉素的 DMEM 中。培养过夜后, 用无血清培养基洗涤细胞, 在含有 Neutridoma-SP (0.1% ; Roche Applied Science) 的 DMEM (100 毫升)中培养, Neutridoma-SP 含有白蛋白、胰岛素、转铁蛋白和其他明确的有机和无机化合物。在无血清培养基中培养 (3 小时)后, 将细胞与激酶抑制剂接触(30 分钟), 然后用激动剂刺激 2.5 小时。用 PBS 洗涤细胞, 并用含有 Hoechst 染料 33342 (H-3570, Molecular Probes)的 10%福尔马林 PBS 溶液固定。用配有数码相机(Photometrics CoolSNAP HQ)的荧光显微镜 (Nikon Eclipse TS100)40X 放大和 MetaMorph 成像软件捕获图像。用 High Content Imaging System(Cellomics, Inc., Pittsburgh, PA)定量 GFP-HDAC5 在核中与胞浆中的相对丰度, 该系统根据 Hoechst 荧光划分核界限, 根据这些核尺度定义胞浆环。HDAC5 定位值代表来自每个实验条件下最少 200 个细胞的平均值。

RNA 分析。将 NRVM 铺于明胶包被的 10 厘米培养皿上(2×10^6 细胞/皿)。按照指示的处理方法, 用 Trizol 试剂(Gibco/BRL)从心肌细胞中分离 RNA。用 96-孔型斑点印迹仪(Bio-Rad)将总 RNA (2 微克)真空印迹到硝酸纤维素膜(Bio-Rad)上。在含 SDS (1%)、5xDenhardt 氏试剂、焦磷酸钠(0.05%)和 100 微克/毫升超声处理的鲑鱼精子 DNA 的 4xSSC 中封闭膜(500°C 4 小时), 用 32P-末端标记的寡核苷酸探针孵育(1×10^6 cpm/毫升; 500°C 14 小时)。寡核苷酸的序列如下:

ANF, 5'-aatgtgaccaagctgcgtgacacaccacaagggttaggatcttttgcgatctgctcaag-3';
BNP, 5'-tgaactatgtgccatcttgggaatttcgaagtctctctct-3';
 α -SK-肌动蛋白 5'-tgagcaaaacagaatggctggctttaatgcttcaagttttccatttcctttccacaggg-3';
GAPDH 5'-ggaacatgtagaccatgtagttgaggtcaatgaag-3'。

用含 0.1%SDS 的 0.5xSSC 洗涤印迹(500°C 10 分钟)两次, 通过放射自显影分析。

哺乳动物双杂交分析。在 pM1 表达载体(Sadowski)中产生编码融合到人 HDAC5 氨基端(氨基酸 2-664)的 GAL4 DNA 结合域的哺乳动物表达载体。以类似方式构建由丙氨酸代替丝氨酸 259 和/或 498 的 GAL4-HDAC5 融合蛋白。用 pVP16 (Clontech)产生编码融合到 14-3-3 σ 的氨基末端的疱疹病毒 VP16 转录激活域的构建物。在存在或不存在组成性活化的 PKD-1 的构建物的情况下, 在五个拷贝的 GAL4 DNA 结合位点(5xUAS 荧光素酶)的控制下, 用 GAL4-HDAC5、VP16-14-3-3 和荧光素酶报道基因的载体瞬时转染 COS 细胞。转染四十八小时后, 收集细胞, 用荧光素酶测定试剂盒(Promega)

定量荧光素酶的水平。

转基因小鼠的生产。将编码 PKD 组成性活化形式的 cDNA 克隆到心脏特异性 α -肌球蛋白重链启动子的下游。将该载体注射到 B6C3F1 小鼠卵母细胞中，并植入代用的雌性 ICR 小鼠。通过用转基因特异性引物进行 PCR 来鉴定转基因后代。结果显示在图 7A-D 中。

实施例 2：结果

PKC 依赖途径刺激 HDAC5 的核输出。为了进一步确定导致 II 类 HDAC 磷酸化和核输出的信号转导途径，本发明者测试了各种蛋白激酶途径激活物在 COS 细胞中刺激 HDAC5 核输出的能力。HDAC5 主要位于允许用方便系统评价核输出的 COS 细胞核中。测试了 PKA (8-Br- cAMP)、PKG (pCPT-GMP)、PKC (PMA)、CaMK (伊屋诺霉素) 和 Jun-N-末端激酶(茴香霉素)的激活物激活与 GFP 融合的 HDAC5 的核输出能力。在这些化合物中，只有伊屋诺霉素和 PMA 刺激 GFP-HDAC5 的核输出(图 1A)。在测试浓度下，PMA 是比伊屋诺霉素更强效的输出刺激物。

HDAC5 和其他 II 类 HDAC 响应于 CaMK 信号转导的核输出需要位于 HDAC 蛋白的 N-末端区的两个丝氨酸(Grozinger 和 Schreiber, 2000; McKinsey 等, 2000)。由丙氨酸取代这些丝氨酸残基(残基 249 和 498)的 HDAC5 突变体(HDAC5-S/A)不能响应于 PMA 处理而输出(图 1B)，验证了在对 PKC 激活的反应中这些位点的必需角色。加入 PMA 后 15 分钟内起始 HDAC5 的核输出，30 分钟内完成(图 1C)。

HDAC5 中丝氨酸 249 和 498 的磷酸化为 14-3-3 蛋白建立了停靠位点，14-3-3 蛋白护送 HDAC5 到胞浆中(Grozinger 和 Schreiber, 2000; McKinsey 等, 2000)。为进一步确证 PMA 促进这些位点的磷酸化，本发明者在免疫共沉淀测定中分析了 HDAC5 与 14-3-3 的相互作用。如图 1D 所示，在 PMA 存在下，14-3-3 与 HDAC5 的结合增强。相反，HDAC5-S/A 突变体不能响应于 PMA，不与 14-3-3 结合。因此，本发明者得出结论，PKC 信号转导导致 HDAC5 丝氨酸 249 和 498 的磷酸化和随后通过 14-3-3-依赖机制的核输出。

心肌细胞中 HDAC5 的 PKC 依赖性核输出。为了开始研究 PKC 信号转导在心脏肥大过程中控制 HDAC5 运输的作用，本发明人开发了定量测定，用于在原代心肌细胞中测量激动剂依赖性 HDAC5 核输出。该测定使用 Cellomics High Content Imaging System，它快速定量核和胞浆的 GFP 荧光强度，并提供两个亚细胞室之间强度差异的读数(图 2A)。为确认该测定，用表达 GFP-HDAC5 (Ad-GFP-HDAC5)的腺病毒感染新

生大鼠心室心肌细胞(NRVM),并用递增剂量的 α -1-肾上腺素能激动剂苯肾上腺素(PE)(一种促进HDAC5核输出的肥大激动剂)刺激(Bush等,2004)。如图2B所示,PE以浓度依赖方式引发HDAC5的核输出。通过视觉检查这些细胞确证了这些结果(数据未显示)。

- 5 确立定量核输出测定的有效性后,本发明人下一步测试一系列酶的抑制剂阻断PE-诱导的HDAC5易位出核的能力。普通的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶抑制剂星孢素和PKC抑制剂马来酰亚胺I(Bis I)有效阻断HDAC5的PE-依赖性输出(图2C和2D)。相反,CaMK(KN93)、MEK1(U1026)、ROCK(Y-27632)、甘油二酯激酶(DAGK抑制剂II)、PI3-激酶(渥曼青霉素)、S6激酶(雷帕霉素)、GSK(SB216763)的抑制剂或PKG、MLCK
10 和PKA的抑制剂(HA1077)并不显著影响PE-诱导的HDAC5核输出。

- PKC信号转导通过HDAC磷酸化诱导心脏肥大。已显示的激活足够引起心肌细胞肥大,在某些情况下,PKC激活对心肌细胞肥大是必要的(参见Antos,2003;Dunnmon等,1990)。上述结果使PKC-依赖性HDAC5核输出或其它II类HDAC牵连于心肌细胞肥大发展中。为证实该可能性,本发明人检测响应于PKC激活的肥大是否需要II类
15 HDAC的磷酸化和核输出。用编码信号-抗性HDAC5-S/A突变蛋白的腺病毒感染NRVM,或用编码LacZ的腺病毒转染作为对照。如图3A所示,在原代心肌细胞中表达HDAC5-S/A突变体防止响应于PE或PMA的肌节装配和细胞增大。

- 心脏肥大与病理性“胎”基因程序的再活化相关,该基因程序包括编码心钠素(ANF)、脑钠尿肽(BNP)和 α -骨架肌动蛋白的基因。也可通过用ANF特异性抗体免疫
20 染色心肌细胞来检测ANF表达的激动剂依赖性升高。如图3B所示,在用PE或PMA处理的NRVM中观察到明显的核周ANF蛋白表达。ANF表达的激动剂依赖性诱导不受LacZ异位表达的影响,但在信号抗性HDAC5的存在下显著降低。此外,不可磷酸化的HDAC5阻断PE-和PMA-介导的ANF转录物诱导,以及BNP和 α -骨架肌动蛋白的转录物诱导。总之,这些结果说明PKC信号转导部分地通过刺激II类HDAC的核输出
25 而引发心脏肥大。

- HDAC5核输出对PKC抑制的差别敏感性。本发明者下一步检查响应于其它肥大信号的HDAC5核输出是否也依赖于PKC信号转导。刺激肥大的内皮缩血管肽-1(ET-1)和胎牛血清(FBS)也有效促进HDAC5核输出(数据未发表)。然而,与其对PE依赖性HDAC5核输出的抑制效果相反,Bis I对响应于ET-1或FBS的HDAC5核输出没有影
30 响(图4A)。这些发现提示,PE引发不同于ET-1和FBS的激酶途径,以促进HDAC5的核输出。

为了进一步检验上述肥大激动剂的蛋白激酶效应子的性质, 本发明者测试了附加 PKC 抑制剂对 HDAC5 核输出的可能影响。Gö6983, 另一普通 PKC 抑制剂的活性, 与 Bis I 的活性类似, 抑制响应于 PE 而非 ET-1 或 FBS 的 HDAC5 核输出(图 4B 和 4D)。相反, Gö6976, 钙依赖性 PKCa 和 b 同功酶的特异性抑制剂, 则有效阻断 PE、ET-1 或 FBS 引发的 HDAC5 核输出(图 4C 和 D)。上述抑制剂对 HDAC5 核输出的不同影响与它们对 14-3-3 与 HDAC5 结合(HDAC5 磷酸化的指示)的影响类似。Gö6976 而非 Bis I 阻断响应于 PE 和 ET-1 的 HDAC5 和 14-3-3 的结合(图 4E)。

Gö6976 而非 Bis I 或 Gö6983 阻断响应于多个激动剂的 HDAC5 核输出的能力似乎是荒谬的, 因为后者化合物与 Gö6976 同样有效地阻断 PKCa 和 b。然而, 该抑制剂性质与其他人用来区分 PKCa 或 b 和 PKD/PKCM 的作用的拟制剂类似(Zugaza 等, 1996), 即对 Gö6976 而不是对 Bis I 或 Gö6983 敏感(Gschwendt 等, 1996)。

蛋白激酶 D 刺激 HDAC5 的核输出。根据上述提示 PKD 可能参与激动剂依赖性 HDAC5 核输出的结果, 本发明者检测了 HDAC5 中信号反应性丝氨酸周围氨基酸序列的潜在 PKD 共有磷酸化位点。PKD 在相对于磷酸化丝氨酸-5 位置上强烈优选亮氨酸残基(Nishikawa 等, 1997)。HDAC5 在相对于两个信号反应性丝氨酸残基的这个位置上含有亮氨酸(图 5A)。有趣的是, II 类 HDAC 4、7 和 9 也在此位置上含有亮氨酸。

为评价-5 位置上亮氨酸的重要性, 本发明者将 HDAC5 中的亮氨酸 254 和 493 突变成甘氨酸, 未改变实际磷酸化位点。该 HDAC5 突变体(L254/493G)构成定位于核, 完全不受 PMA 的控制(图 5B)。转染测定进一步支持 PKD 参与 HDAC5 核输出, 在该测定中 PKD 的激活形式(PKD S/E), 而非催化失活的突变体(PKD K/W), 有效刺激 HDAC5 的核输出(图 5C)。信号反应性丝氨酸残基或 HDAC5 的 254 和 493 位亮氨酸的突变消除了响应于 PKD 的核输出(图 5C)。

为了进一步探索 PKD 作为 HDAC5 核输出激酶的可能作用, 本发明者进行了免疫共沉淀和体外激酶测定。免疫共沉淀 HDAC5 和 PKD 后, 体外激酶测定确证了 PKD 直接磷酸化 HDAC5。如图 5D 所示, PKD 的共转染几乎不导致 HDAC5 的磷酸化。用 PMA 处理细胞使与 PKD 结合同时发生的 HDAC5 磷酸化程度增加。虽然 PMA 处理增加 HDAC5 的磷酸化, 但激活的 PKD S/E 结合和磷酸化 HDAC5 并不需要 PMA, 也许这是由于在免疫复合物中存在内源性 PKD。用催化失活的突变 PKD K/W 没有观察到 HDAC5 的磷酸化。然而有趣的是, 甚至在不存在 PMA 的情况下, PKD K/W 也与 HDAC5 结合。

PKD 也增加 HDAC5 和 14-3-3 之间的相互作用, 如哺乳动物双杂交测定所评价, 该测定中将 HDAC5 与 GAL4 DNA 结合域融合, 并将 14-3-3 与 VP16 转录激活域融合(图

5E)。HDAC5 中任一信号反应性丝氨酸的突变使 HDAC5 和 14-3-3 之间的相互作用显著降低, 同时突变两个信号反应性丝氨酸完全解除了 HDAC5 与 14-3-3 的结合。

PKD 是心脏 HDAC5 激酶。本发明者下一步检查了在心肌细胞中 PKD 是否可以用作 HDAC 激酶。用编码 Flag-HDAC5 的腺病毒感染细胞, 用 PMA 处理细胞。用从 PMA 处理的细胞中免疫沉淀的 FLAG-HDAC5 进行体外激酶测定, 在该测定中观察到 HDAC5 磷酸化增加(图 6A)。加入 PMA 前, 用 Bis I 孵育细胞阻断 HDAC5 的磷酸化。然而当 Gö6976 阻断 HDAC5 的磷酸化时, 将 Bis I 直接加入激酶反应没有效果。这些结果说明, 在心肌细胞中 PKD 能够结合 HDAC5, 和 Bis I 阻断 PMA 诱导的激酶激活, 而 Gö6976 能够直接抑制与 HDAC5 结合的 PKD。

通过连续的免疫沉淀和免疫印迹进一步证明心肌细胞中 PKD 与 HDAC5 相互作用的能力。用编码 GFP-HDAC5 的腺病毒感染 NRVM, 在不存在或存在 Bis.I 的情况下用 PE 处理 NRVM。如图 6A 所示, 内源性 PKD 有效地与 HDAC5 免疫共沉淀。在不存在激动剂的情况下, PKD 与 HDAC5 结合, PE 处理后以 PKC 依赖方式活化。该结果进一步说明 PKD 是心脏 II 类 HDAC 激酶, 并支持图 8 中提出的模型。

根据本公开, 不需过多的实验就可制成和实施本文中公开和要求权利的所有组合物和方法。虽然按照优选实施方式描述了本发明的组合物和方法, 但本领域技术人员将明白, 可以对这些组合物和方法, 以及本文所述方法的步骤或步骤顺序加以改变, 而不背离本发明的概念、精神和范围。更具体说, 应明白, 用某些化学和生理学相关试剂替代本文中描述的试剂也会获得相同或相似的结果。对本领域技术人员来说明显的所有这些类似替代物和修改都被认为是在如所附权利要求所限定的本发明的精神、范围和概念之内。

XII. 参考文献

下面的参考文献，它们提供示例性程序和补充本文所述内容的其它细节，特别引入本文作为参考。

- 美国申请 2002/103192
- 5 美国申请 2002/65282
- 美国申请 2002/61860
- 美国专利 4,196,265
- 美国专利 4,415,723
- 美国专利 4,458,066
- 10 美国专利 4,873,191
- 美国专利 5,354,855
- 美国专利 5,604,251
- 美国专利 5,795,715
- 美国专利 5,889,136
- 15 美国专利 5,955,501
- 美国专利 6,043,270
- 美国专利 6,080,784
- 美国专利 6,441,020
- 美国专利 6,528,294
- 20 Angel 等, Mol. Cell. Biol., 7: 2256, 1987。
- Angel 等, Mol. Cell. Biol., 7: 2256, 1987a。
- Angel 等, Cell, 49: 729, 1987b。
- Antos, 等, 2003. J. Biol. Chem., 278: 28930-28937, 2003。
- Atchison 和 Perry, Cell, 46: 253, 1986。
- 25 Atchison 和 Perry, Cell, 48: 121, 1987。
- AU 6,794,700
- AU 9,013,101
- AU 9,013,201
- AU 9,013,401
- 30 Baichwal 和 Sugden, 基因转移 (Gene Transfer), Kucherlapati (编), NY, Plenum Press, 117-148, 1986。

- Banerji 等, Cell, 27 (2 Pt 1): 299-308, 1981.
- Banerji 等, Cell, 33 (3): 729-740, 1983.
- Barnes 等, J. Biol. Chem., 272 (17): 11510-7, 1997.
- Benvenisty 和 Neshif, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 : 9551-9555, 1986.
- 5 Berkhout 等, Cell, 59: 273-282, 1989.
- Bhavsar 等, Genomics, 35 (1) : 11-23, 1996.
- Blancar 等, EMBO J., 8: 1139, 1989.
- Bodine 和 Ley, EMBO J., 6: 2997, 1987.
- Boshart 等, Cell, 41: 521, 1985.
- 10 Boshier 和 Labouesse, Nat. Cell. Biol., 2: E31-E36, 2000.
- Bosze 等, EMBO J., 5 (7): 1615-1623, 1986.
- Braddock 等, Cell, 58 : 269, 1989.
- Brinster 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 (13): 4438-4442, 1985.
- Bristow, Cardiology, 92: 3-6, 1999.
- 15 Bulla 和 Siddiqui, J. Virol., 62: 1437, 1986.
- Bush 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 101: 2870-2875, 2004.
- Butler 等, Cancer Res., 60: 5165-5170, 2000.
- Butler 等, Clin. Cancer Res., 7: 962-970, 2001.
- Campbell 和 Villarreal, Mol. Cell. Biol., 8: 1993, 1988.
- 20 Campbell 等, J. Mol. Biol., 180 : 1-19, 1984.
- Campere 和 Tilghman, Genes 和 Dev., 3: 537, 1989.
- Campo 等, Nature, 303: 77, 1983.
- Capaldi 等, Biochem. Biophys. Res. Comm., 76: 425-433, 1977.
- Caplen 等, Gene, 252 (1-2): 95-105, 2000.
- 25 Carbonneau 和 Tonks, Annu. Rev. Cell. Biol., 8: 463-93, 1992.
- Celander 和 Haseltine, J. Virology, 61: 269, 1987.
- Celander 等, J. Virology, 62: 1314, 1988.
- Chandler 等, Cell, 33: 489, 1983.
- Chang 等, Hepatology, 14: 124A, 1991.
- 30 Chang 等, Mol. Cell. Biol., 9: 2153, 1989.
- Chatterjee 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 : 9114, 1989.

- Chen 和 Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7: 2745-2752, 1987.
- Choi 等, *Cell*, 53: 519, 1988.
- Coffey 等, *Cancer Res.*, 61: 3591-3594, 2001.
- Coffin, 病毒学(Virology), Fields 等 (编), Raven Press, NY, 1437-1500,
5 1990.
- Cohen 等, *J. Cell. Pliysiol.*, 5: 75, 1987.
- Cook 等, *Cell*, 27: 487-496, 1981.
- Costa 等, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 81, 1988.
- Couch 等, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88: 394-403, 1963.
- 10 Coupar 等, *Gene*, 68 : 1-10, 1988.
- Cripe 等, *EMBO J.*, 6: 3745, 1987.
- Culotta 和 Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1376, 1989.
- Dandolo 等, *J. Virology*, 47 : 55-64, 1983.
- De Villiers 等, *Nature*, 312 (5991): 242-246, 1984.
- 15 Deschamps 等, *Science*, 230: 1174-1177, 1985.
- Dubensky 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 7529-7533, 1984.
- Dunnmon 等, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 22: 901-10, 1990.
- Durand 等, *Ann. Med.*, 27: 311-317, 1995.
- Edbrooke 等, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1908, 1989.
- 20 Edlund 等, *Science*, 230: 912-916, 1985.
- Egan 和 Weinberg, *Nature*, 365: 781-783, 1993.
- Eichhorn 和 Bristow, *Circulation*, 94: 2285-2296, 1996.
- Elbashir 等, *Nature*, 411 (6836): 494-498, 2001.
- EP 0273085
- 25 EP 1,123,111
- EP 1,170,008
- EP 1,173,562
- EP 1,174,438
- EP 1,208,086
- 30 EP 1,233,958
- Fechheimer 等, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 8463-8467, 1987.

- Feng 和 Holland, *Nature*, 334: 6178, 1988。
- Ferkol 等, *FASEB J.* , 7: 1081-1091, 1993。
- Firak 和 Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6: 3667, 1986。
- Fire 等, *Nature*, 391: 806-811, 1998。
- 5 Foecking 和 Hofstetter, *Gene*, 45 (1) : 101-105, 1986。
- Forster 和 Symons, *Cell*, 49: 211-220, 1987。
- Fraley 等, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3348-3352, 1979。
- Franz 等, *Cardoscience*, 5 (4): 235-43, 1994。
- Friedmann, *Science*, 244: 1275-1281, 1989。
- 10 Fujita 等, *Cell*, 49: 357, 1987。
- Furumai 等, *Cancer Res.* , 62: 4916-21, 2002。
- Gao 等, *J. Biol. Chem.* , 277: 25748-55, 2002。
- Gao, 等, *J. Biol Chem.* , 15: 8675-81, 1996。
- Gefter, 等, *Somatic Cell Genet.* , 3: 231-236, 1977。
- 15 Gerlach 等, *Nature (London)*, 328: 802-805, 1987。
- Ghosh 和 Bachhawat, 肝脏疾病、使用特异性受体和配体的靶向诊断和治疗 (Liver Disease, targeted diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands), Wu 等 (编), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991。
- Ghosh-Choudhury 等, *EMBO J.* , 6: 1733-1739, 1987。
- 20 Gilles 等, *Cell*, 33: 717, 1983。
- Gloss 等, *EMBO J.* , 6: 3735, 1987。
- Godbout 等, *Mol. Cell. Biol.*, 8 : 1169, 1988。
- Goding, 单克隆抗体: 原理和实践 (Monoclonal Antibodies : Principles and Practice), 第二版, Orlando, Fla. , Academic Press, 60-61, 65-66, 71-74, 1986。
- 25 Gomez-Foix 等, *J. Biol. Chem.* , 267: 25129-25134, 1992。
- Goodbourn 和 Maniatis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 1447, 1988。
- Goodbourn 等, *Cell*, 45: 601, 1986。
- Gopal, *Mol. Cell Biol.* , 5: 1188-1190, 1985。
- Gopal-Srivastava 等, *J. Mol. Cell. Biol.* , 15 (12): 7081-90, 1995。
- 30 Gottlicher 等, *EMBO J.* , 20: 6969-78, 2001。
- Graham 和 Prevec, 分子生物学方法: 基因转移和表达方法 (Methods in

- Molecular Biology : Gene Transfer and Expression Protocol), Murray (编), Humana Press, Clifton, NJ, 7: 109-128, 1991。
- Graham 和 van der Eb, Virology, 52: 456-467, 1973。
- Graham 等, J. Gen. Virol., 36: 59-72, 1977。
- 5 Greene 等, Immunology Today, 10: 272, 1989 Grishok 等, Science, 287 : 2494-2497, 2000。
- Grosschedl 和 Baltimore, Cell, 41: 885, 1985。
- Grozinger 和 Schreiber, Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S. A., 97: 7835-40, 2000。
- Grozinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 4868-4873, 1999。
- 10 Grunhaus 和 Horwitz, Seminar in Virology, 3: 237-252, 1992。
- Gschwendt 等, FEBS Lett., 392: 77-80, 1996。
- Han 等, Cancer Research, 60: 6068-6074, 2000。
- Hardie 和 Hanks (1995) 蛋白激酶实际读本 (The Protein Kinase Facts Books), 第 1 卷: 7-20 Academic Press, San Diego, Calif.。
- 15 Haribabu 等, EMBO J, 14: 3679-86, 1995。
- Harland 和 Weintraub, J. Cell Biol., 101: 1094-1099, 1985。
- Harlow 和 Lane, 抗体: 实验室手册 (Antibodies: A Laboratory manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 1988。
- Haslinger 和 Karin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 8572, 1985。
- 20 Hauber 和 Cullen, J. Virology, 62: 673, 1988。
- Haworth 等, J. Mol. Cardiol., 32: 1013-1023, 2000。
- Hayashi 等, Biochim. Biophys. Acta, 1450: 99-106, 1999。
- Hen 等, Nature, 321: 249, 1986。
- Hensel 等, Lymphokine Res., 8: 347, 1989。
- 25 Hermonat 和 Muzycska, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 81: 6466-6470, 1984。
- Herr 和 Clarke, Cell, 45: 461, 1986。
- Hersdorffer 等, DNA Cell Biol., 9: 713-723, 1990。
- Herz 和 Gerard, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 2812-2816, 1993。
- Hinnebusch 等, J. Nutr., 132: 1012-7, 2002。
- 30 Hirochika 等, J. Tirol., 61: 2599, 1987。
- Hirsch 等, Mol. Cell. Biol., 10: 1959, 1990。

- Hoffmann 等, *Bioconjugate Chem.*, 12: 51-55, 2001.
- Holbrook 等, *Virology*, 157: 211, 1987.
- Horlick 和 Benfield, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 2396, 1989.
- Horwich 等, *J. Virol.*, 64: 642-650, 1990.
- 5 Huang 等, *Cell*, 27: 245, 1981.
- Hug 等, *Mol. Cell. Biol.*, 8 : 3065, 1988.
- Hwang 等, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 585, 1990.
- Imagawa 等, *Cell*, 51: 251, 1987.
- Imbra 和 Karin, *Nature*, 323: 555, 1986.
- 10 Imler 等, *Mol. Cell. Biol.*, 7: 2558, 1987.
- Imperial 和 Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4: 875, 1984.
- Isselbacher 等, *Harrison 氏内科学原理 (Harrison's Principles of Internal Medicine)*, McGraw-Hill, NY, 416-431, 1994.
- Jakobovits 等, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2555, 1988.
- 15 Jameel 和 Siddiqui, *Mol. Cell. Biol.*, 6: 710, 1986.
- Japanese App. No. 2001/348340.
- Jaynes 等, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 62, 1988.
- Johannes 等, *J. Biol. Chem.*, 269 (8): 6140-8, 1994.
- Johnson 等, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 3393, 1989.
- 20 Jones 和 Shenk, *Cell*, 13: 181-188, 1978.
- Joyce, *Nature*, 338 : 217-244, 1989.
- Jung 等, *J. Med. Chem.*, 42: 4669-4679, 1999.
- Jung 等, *Med. Chem. Lett.*, 7: 1655-1658, 1997.
- Jung, *Curr. Med. Chem.*, 8: 1505-11, 2001.
- 25 Kadesch 和 Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 6: 2593, 1986.
- Kaneda 等, *Science*, 243: 375-378, 1989.
- Kao 等, *Genes Dev.*, 14: 55-66, 2000.
- Karin 等, *Mol. Cell. Biol.*, 7: 606, 1987.
- Karin 等, *Mol. Cell Biol.*, 7: 606, 1987.
- 30 Karlsson 等, *EMBO J.*, 5: 2377-2385, 1986.
- Katinka 等, *Cell*, 20: 393, 1980.

- Kato 等, J. Biol. Chem., 266 (6): 3361-3364, 1991.
- Kato 等, J. Biol. Chem., 273: 1511-18, 1998.
- Kawamoto 等, Mol. Cell. Biol., 8: 267, 1988.
- Kelly 等, J. Cell Biol., 129 (2): 383-96, 1995.
- 5 Ketting 等, Cell, 99: 133-141, 1999.
- Kiledjian 等, Mol. Cell. Biol., 8 : 145, 1988.
- Kim 和 Cook, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 8788-8792, 1987.
- Kim 等, J. Am. Chem. Soc., 121: 2056, 1999.
- Kimura 等, Dev. Growth Differ., 39 (3): 257-65, 1997.
- 10 Kitazomo 等, J. Clinical Endocr. Metabol., 86 (7): 3430-3435, 2001.
- Klamut 等, Mol. Cell. Biol., 10: 193, 1990.
- Klassen, 治疗的药理学基础(The Pharmacological Basis of Therapeutics), Goodman 和 Gilman 编, Pergamon Press, 第 8 版, 49-61, 1990.
- Klein 等, Nature, 327: 70-73, 1987.
- 15 Koch 等, Mol. Cell. Biol., 9: 303, 1989.
- Kohler 和 Milstein, Eur. J. Immunol., 6: 511-519, 1976.
- Kohler 和 Milstein, Nature, 256: 495-497, 1975.
- Komatsu 等, Cancer Res., 61: 4459-4466, 2001.
- Kramer 等, Trends in Endoc. Metabolism, 12) 7): 294-300, 2001.
- 20 Kriegler 和 Botchan, 真核病毒载体(Eukaryotic Viral Vectors), Gluzman (编), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.
- Kriegler 和 Botchan, Mol. Cell. Biol., 3: 325, 1983.
- Kriegler 等, Cell, 38: 483, 1984.
- Kriegler 等, Cell, 53: 45, 1988.
- 25 Kuhl 等, Cell, 50: 1057, 1987.
- Kunz 等, Nucl. Acids Res., 17: 1121, 1989.
- LaPointe 等, J. Biol. Chem., 263 (19): 9075-8, 1988.
- Larsen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83: 8283, 1986.
- Laspias 等, Cell, 59: 283, 1989.
- 30 Latimer 等, Mol. Cell. Biol., 10: 760, 1990.
- Le Gal La Salle 等, Science, 259: 988-990, 1993.

- Lee 等, *Nature*, 294: 228, 1981。
- Lee 等, *Nucleic Acids Res.*, 12: 4191-206, 1984。
- Levinson 等, *Nature*, 295: 79, 1982。
- Levrero 等, *Gene*, 101 : 195-202, 1991。
- 5 Li 等, *J. Biol. Chem.*, 271: 19402-8, 1996。
- Lin 和 Avery, *Nature*, 402: 128-129, 1999。
- Lin 等, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 850, 1990。
- Linnenbach 等, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 85 (1) : 74-8, 1988。
- Lu 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 4070-4075, 2000。
- 10 Luria 等, *EMBO J.*, 6: 3307, 1987。
- Lusky 和 Botchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 3609, 1986。
- Lusky 等, *Mol. Cell. Biol.*, 3: 1108, 1983。
- Macejak 和 Sarnow, *Nature*, 353 : 90-94, 1991。
- Mai 等, *J. Med. Chem.*, 45: 1778-1784, 2002。
- 15 Majors 和 Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 5866, 1983。
- Mann 等, *Cell*, 33: 153-159, 1983。
- Markowitz 等, *J. Virol.*, 62: 1120-1124, 1988。
- Marks 等, *Clin. Cancer Res.*, 7: 759-760, 2001。
- Marks 等, *J. Natl. Cancer Inst.*, 92 (15): 1210-1216, 2000。
- 20 Massa 等, *J. Med. Chem.*, 44: 2069-2072, 2001。
- McKinsey 等, *Nature*, 408: 106-111, 2000b。
- McKinsey 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 14400-14405, 2000a。
- McKinsey 等, *Trends Biochem. Sci.*, 27: 40-47, 2002。
- McNeall 等, *Gene*, 76: 81, 1989。
- 25 Michel 和 Westhof, *J. Mol. Biol.*, 216: 585-610, 1990。
- Miksicek 等, *Cell*, 46: 203, 1986。
- Montgomery 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 155-2-15507, 1998。
- Mordacq 和 Linzer, *Genes and Dev.*, 3: 760, 1989。
- Moreau 等, *Nucl. Acids Res.*, 9: 6047, 1981。
- 30 Moss 等, *J. Gen. Physiol.*, 108 (6): 473-84, 1996。
- Muesing 等, *Cell*, 48: 691, 1987。

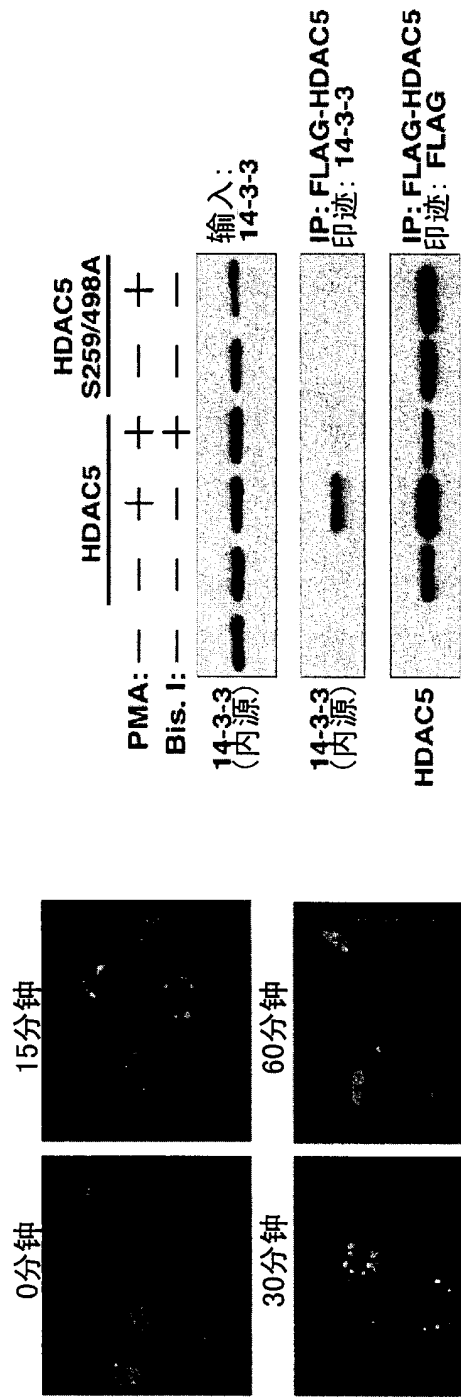
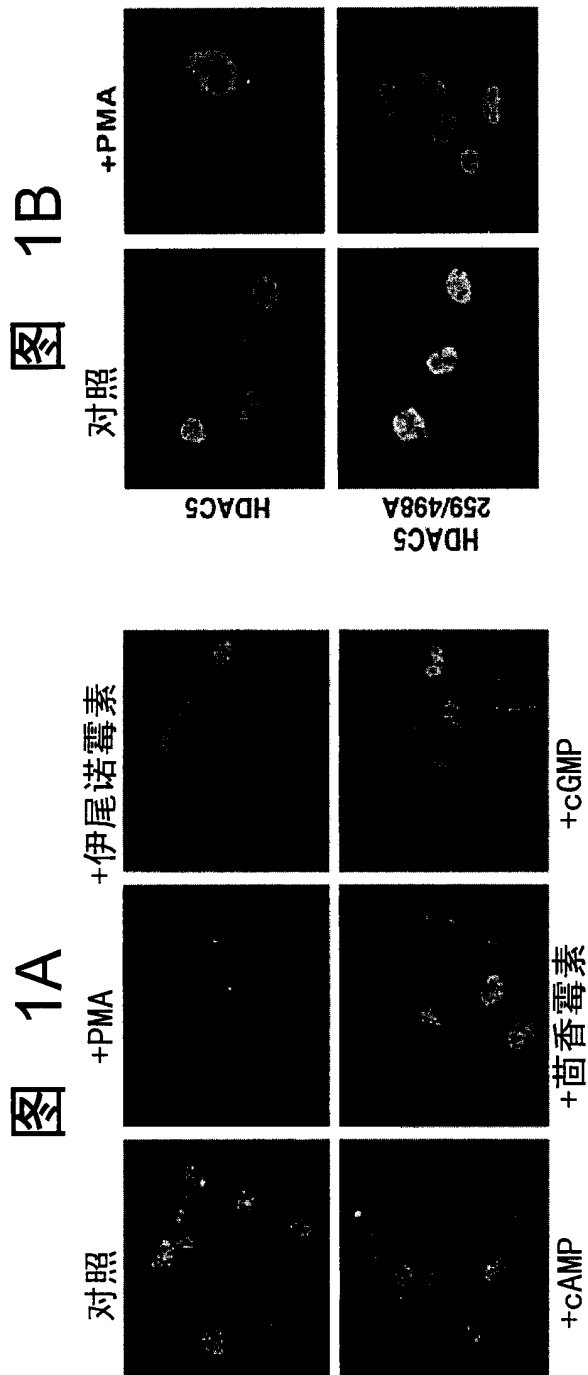
- Ng 等, *Nuc. Acids Res.*, 17: 601, 1989。
- Nicolas 和 Rubinstein, 载体: 分子克隆载体及其用途概览(*Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*), Rodriguez 和 Denhardt (编), Stoneham: Butterworth, 494-513, 1988。
- 5 Nicolau 和 Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721: 185-190, 1982。
Nicolau 等, *Methods Enzymol.*, 149: 157-176, 1987。
Nishikawa 等, *J. Biol. Chem.*, 276: 3310-3318, 1997。
Ondek 等, *EMBO J.*, 6: 1017, 1987。
Ornitz 等, *Mol. Cell. Biol.*, 7: 3466, 1987。
- 10 Palmiter 等, *Cell*, 29: 701, 1982。
Palmiter 等, *Nature*, 300: 611, 1982。
Paskind 等, *Virology*, 67: 242-248, 1975。
Pech 等, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 396, 1989。
Pelletier 和 Sonenberg, *Nature*, 334: 320-325, 1988。
- 15 Perales 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 (9): 4086-4090, 1994。
Perez-Stable 和 Constantini, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 1116, 1990。
医生桌面参考书(*Physicians Desk Reference*)。
Picard 和 Schaffner, *Nature*, 307: 83, 1984。
Pinkert 等, *Genes and Dev.*, 1: 268, 1987。
- 20 Ponta 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 1020, 1985。
Porton 等, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 1076, 1990。
Potter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 7161-7165, 1984。
Queen 和 Baltimore, *Cell*, 35: 741, 1983。
Quinn 等, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 4713, 1989。
- 25 Racher 等, *Biotech. Techniques*, 9: 169-174, 1995。
Ragot 等, *Nature*, 361: 647-650, 1993。
Redondo 等, *Science*, 247: 1225, 1990。
Reinhold-Hurek 和 Shub, *Nature*, 357: 173-176, 1992。
Reisman 和 Rotter, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 3571, 1989。
- 30 雷明顿药物科学(*Remington's Pharmaceutical Sciences*), 第 15 版, 1035-1038
和 1570-1580, Mack Publishing Company, PA, 1980。

- Renan, Radiother. Oncol., 19: 197-218, 1990.
- Resendez Jr. 等, Mol. Cell. Biol., 8: 4579, 1988.
- Rich 等, Hum. Gene Ther., 4: 461-476, 1993.
- Ridgeway, 载体: 分子克隆载体及其用途概览 (Vectors: A survey of molecular
5 cloning vectors and their uses), Stoneham: Butterworth, 467-492, 1988.
- Ripe 等, Mol. Cell. Biol., 9: 2224, 1989.
- Rippe 等, Mol. Cell Biol., 10: 689-695, 1990.
- Rittling 等, Nuc. Acids Res., 17: 1619, 1989.
- Rosen 等, Cell, 41: 813, 1988.
- 10 Rosenfeld 等, Cell, 68: 143-155, 1992.
- Rosenfeld 等, Science, 252: 431-434, 1991.
- Roux 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 : 9079-9083, 1989.
- Sakai 等, Genes and Dev., 2: 1144, 1988.
- Sambrook 等, 分子克隆: 实验室手册 (Molecular Cloning : A Laboratory
15 Manual), 第2版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- Sarver 等, Science, 247: 1222-1225, 1990.
- Satake 等, J. Virology, 62: 970, 1988.
- Saunders 等, Cancer Res., 59-399-409, 1999.
- Scanlon 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 : 10591-10595, 1991.
- 20 Schaffner 等, J. Mol. Biol., 201: 81, 1988.
- Searle 等, Mol. Cell. Biol., 5: 1480, 1985.
- Sharp 和 Marciniak, Cell, 59: 229, 1989.
- Sharp 和 Zamore, Science, 287: 2431-2433, 2000.
- Sharp, Genes Dev., 13: 139-141, 1999.
- 25 Shaul 和 Ben-Levy, EMBO J., 6: 1913, 1987.
- Sherman 等, Mol. Cell. Biol., 9: 50, 1989.
- Sleigh 和 Lockett, J. EMBO, 4: 3831, 1985.
- Spalholz 等, Cell, 42: 183, 1985.
- Spandau 和 Lee, J. Virology, 62: 427, 1988.
- 30 Spandidos 和 Wilkie, EMBO J, 2: 1193, 1983.
- Stephens 和 Hentschel, Biochem. J, 248: 1, 1987.

- Storz 和 Toker, *Embo J.*, 22: 109-20, 2003。
- Stratford-Perricaudet 和 Perricaudet, 人类基因转移 (Human Gene Transfer), Cohen-Haguenauer 和 Boiron (编), John Libbey Eurotext, 法国, 51-61, 1991。
- 5 Stratford-Perricaudet 等, *Hum. Gene. Ther.*, 1: 241-256, 1990。
 Stuart 等, *Nature*, 317: 828, 1985。
 Sturany 等, *J. Biol. Chem.*, 276: 3310-3318, 2001。
 Su 等, *Cancer Res.*, 60: 3137-3142, 2000。
 Sullivan 和 Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7: 3315, 1987。
- 10 Swartzendruber 和 Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85: 179, 1975。
 Tabara 等, *Cell*, 99: 123-132, 1999。
 Takahashi 等, *Antibiotics*, 49: 453, 1996。
 Takebe 等, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 466, 1988。
 Taunton 等, *Science*, 272: 371, 1996。
- 15 Tavernier 等, *Nature*, 301: 634, 1983。
 Taylor 和 Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 165, 1990a。
 Taylor 和 Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 176, 1990b。
 Taylor 等, *J Biol Chem.*, 264: 15160, 1989。
 Temin, 基因转移 (Gene Transfer), Kucherlapati (编), NY, Plenum Press,
- 20 149-188, 1986。
 莫克指数 (The Merck Index), 第 11 版。
 Thiesen 等, *J. Virology*, 62: 614, 1988。
 Tong 等, *Nucleic Acids Res.*, 30: 1114-23, 2002。
 Top 等, *J. Infect. Dis.*, 124: 155-160, 1971。
- 25 Treisman, *Cell*, 42: 889, 1985。
 Tronche 等, *Mol. Biol. Med.*, 7: 173, 1990。
 Trudel 和 Constantini, *Genes and Dev.* 6: 954, 1987。
 Tur-Kaspa 等, *Mol. Cell Biol.*, 6: 716-718, 1986。
 Tyndell 等, *Nuc. Acids. Res.*, 9: 6231, 1981。
- 30 Valverde 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 (18): 8572-6, 1994。
 Van den Wyngaert 等, *FEBS Lett.*, 478 : 77-83, 2000。

- Van Lint 等, Trends in Cell. Biol., 12: 193-200, 2002。
- Vannice 和 Levinson, J. Virology, 62: 1305, 1988。
- Varmus 等, Cell, 25: 23-36, 1981。
- Vasseur 等, Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A., 77: 1068, 1980。
- 5 Vigushin 等, Anticancer Drugs, 13: 1-13, 2002。
- Vigushin 等, Cancer Res., 5 (Suppl), 1999。
- Wagner 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 (9): 3410-3414, 1990。
- Wang 和 Calame, Cell, 47: 241, 1986。
- Weber 等, Cell, 36: 983, 1984。
- 10 Weinberger 等 Mol. Cell. Biol., 8: 988, 1984。
- Wincott 等, Nucleic Acids Res., 23 (14): 2677-2684, 1995。
- Winoto 和 Baltimore, Cell, 59: 649, 1989。
- WO 00/44914
- WO 01/14581
- 15 WO 01/18045
- WO 01/36646
- WO 01/38322
- WO 01/42437
- WO 01/68836
- 20 WO 01/70675
- WO 02/26696
- WO 02/26703
- WO 02/30879
- WO 02/46129
- 25 WO 02/46144
- WO 02/50285
- WO 02/51842
- WO 84/03564
- WO 98/33791
- 30 WO 99/32619
- Wong 等, Gene, 10: 87-94, 1980。

- Workman 和 Kingston, Annu. Rev. Biochem., 67: 545-579, 1998.
- Wu 和 Wu, Adv. Drug Delivery Rev., 12: 159-167, 1993.
- Wu 和 Wu, Biochemistry, 27: 887-892, 1988.
- Wu 和 Wu, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432, 1987.
- 5 Yamano 等, Amer. Soc. Gene Ther., 2000.
- Yamauchi-Takahara 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 (10): 3504-3508, 1989.
- Yang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 9568-9572, 1990.
- Young 等, 应用疗法手册 (Handbook of Applied Therapeutics), 7.1-7. 12
- 10 和 9.1-9. 10, 1989.
- Yutzey 等 Mol. Cell. Biol., 9: 1397, 1989.
- Zelenin 等, FEBS Lett., 280: 94-96, 1991.
- Zhang 等, Cell, 110: 479-488, 2002.
- Zhou 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 10572-10577, 2001.
- 15 Ziober 和 Kramer, J. Bio. Chem., 271 (37): 22915-22922, 1996.
- Zugaza 等, Embo J., 15 : 6220-30, 1996.
- 登录号 NM002742。



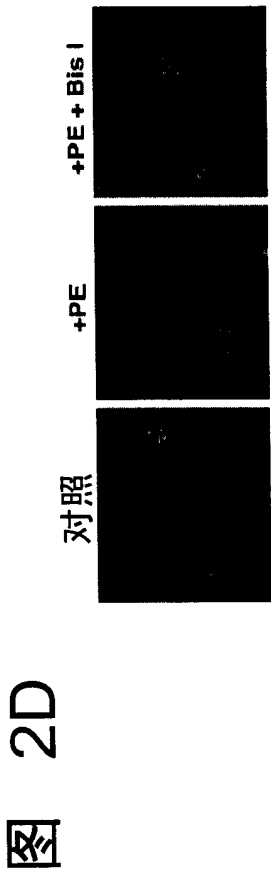
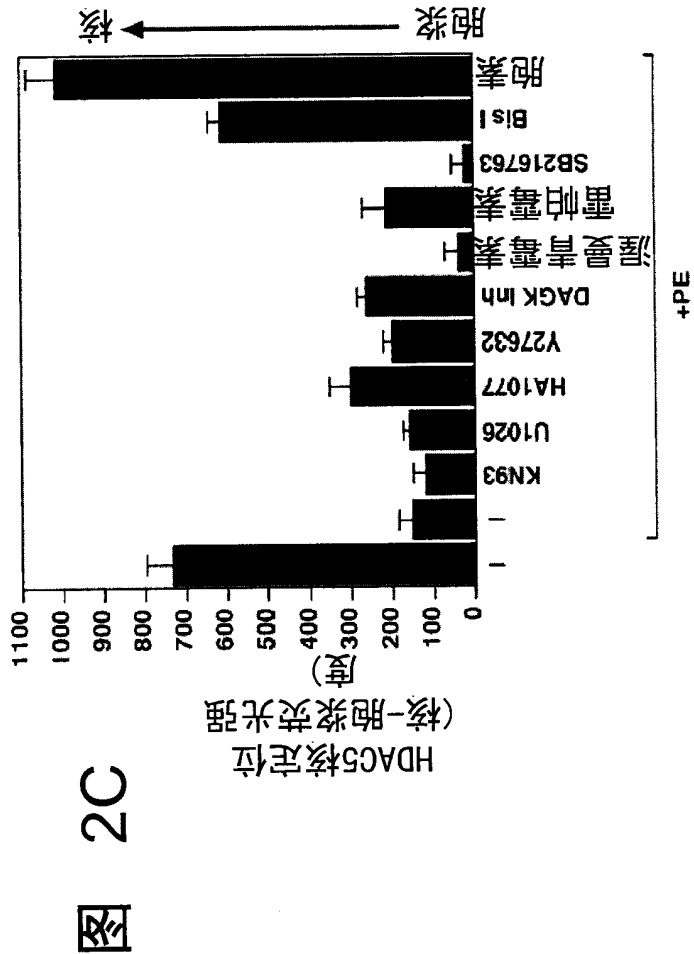
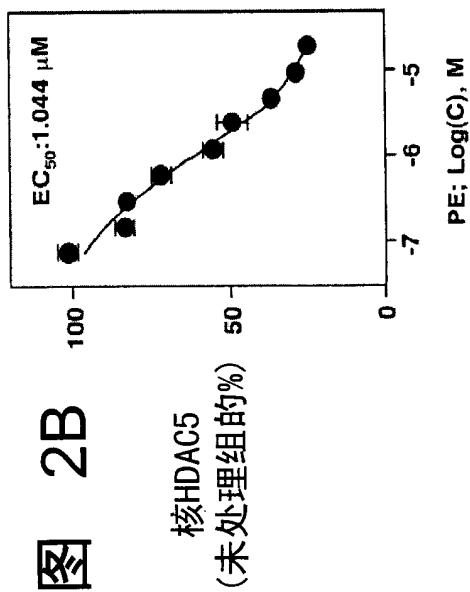
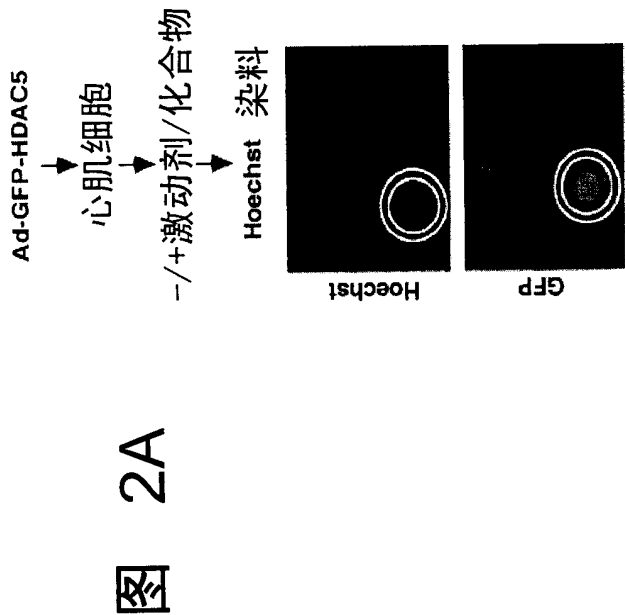


图 3A

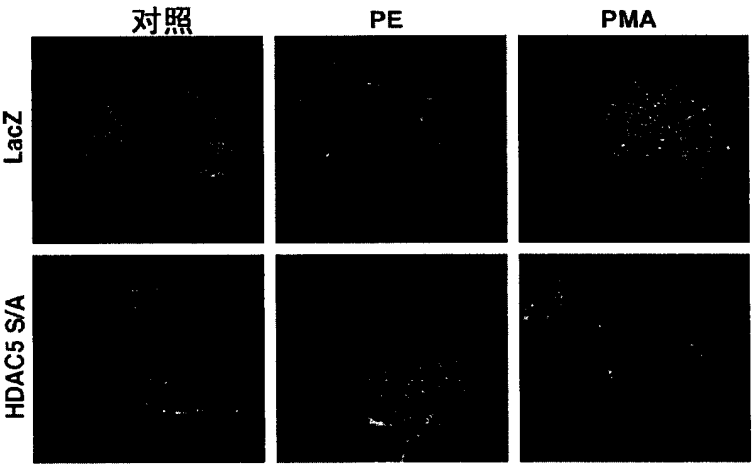


图 3B

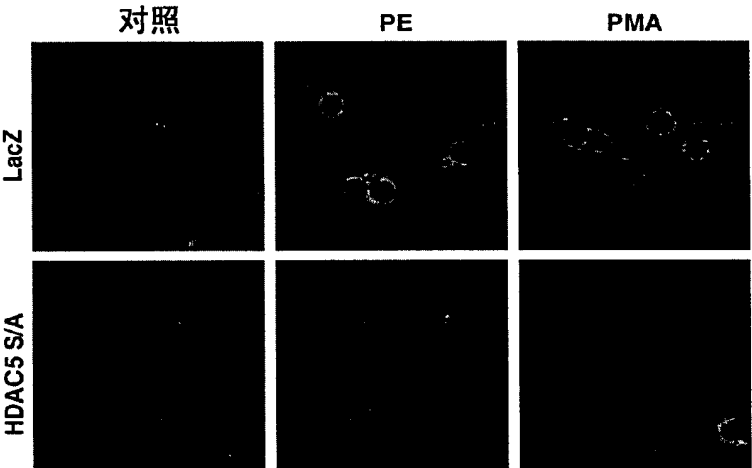
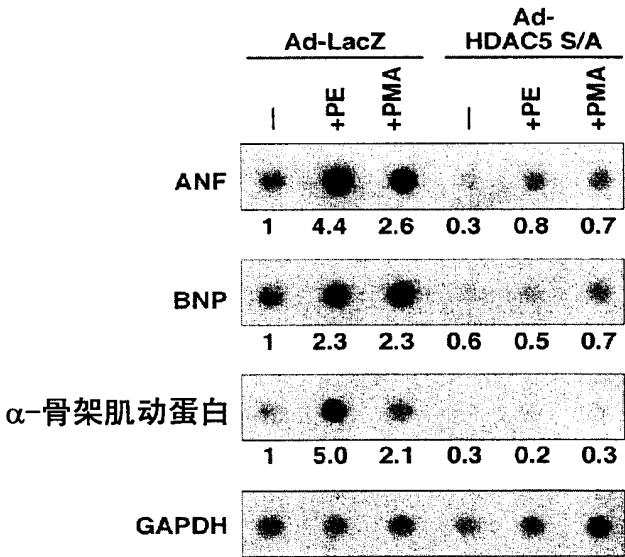
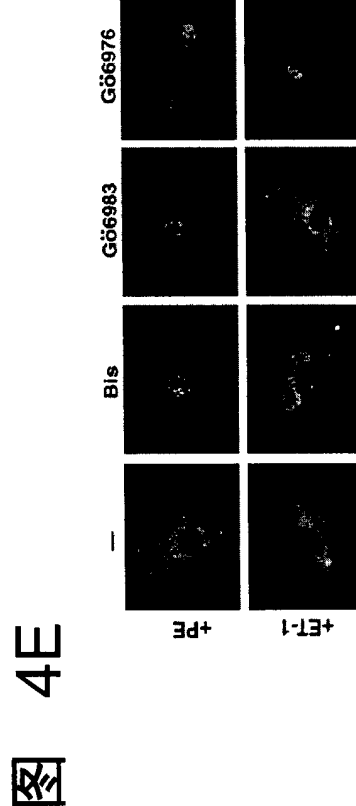
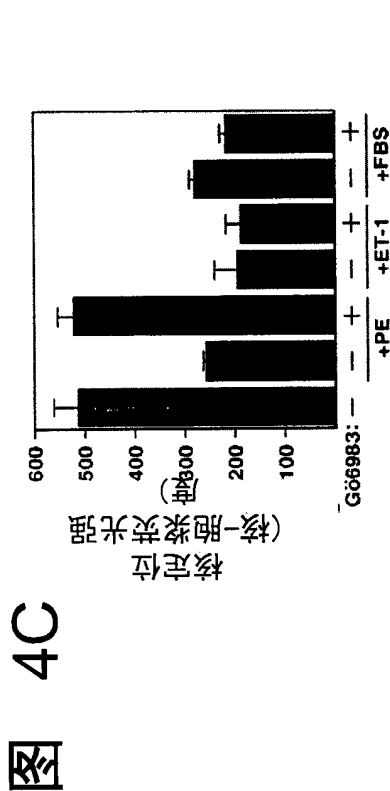
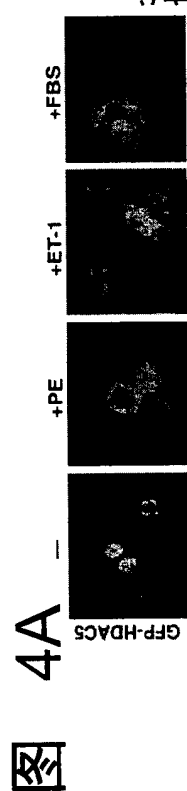
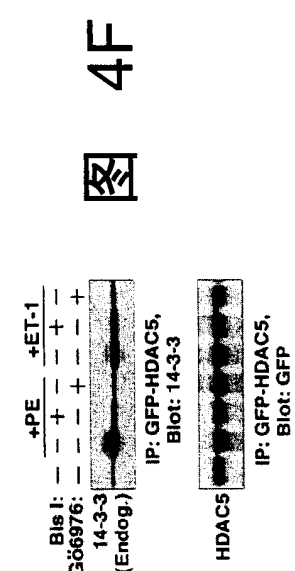
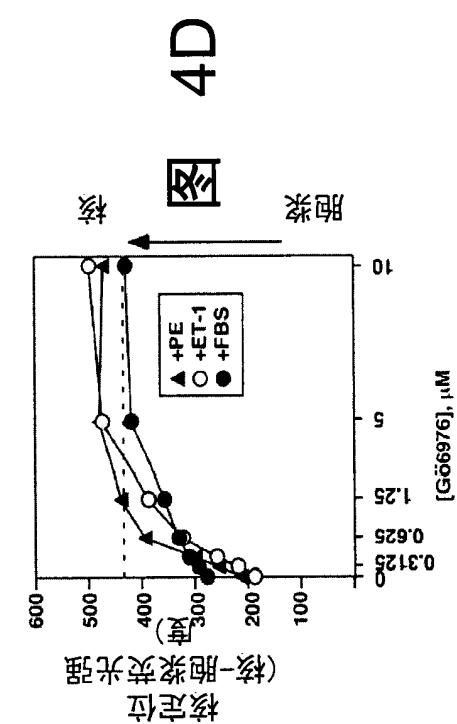
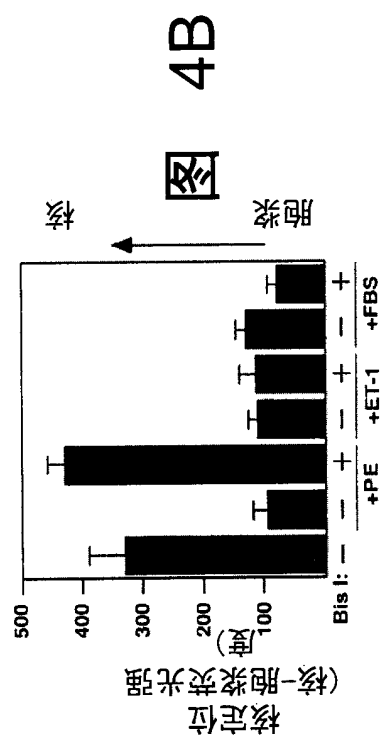


图 3C





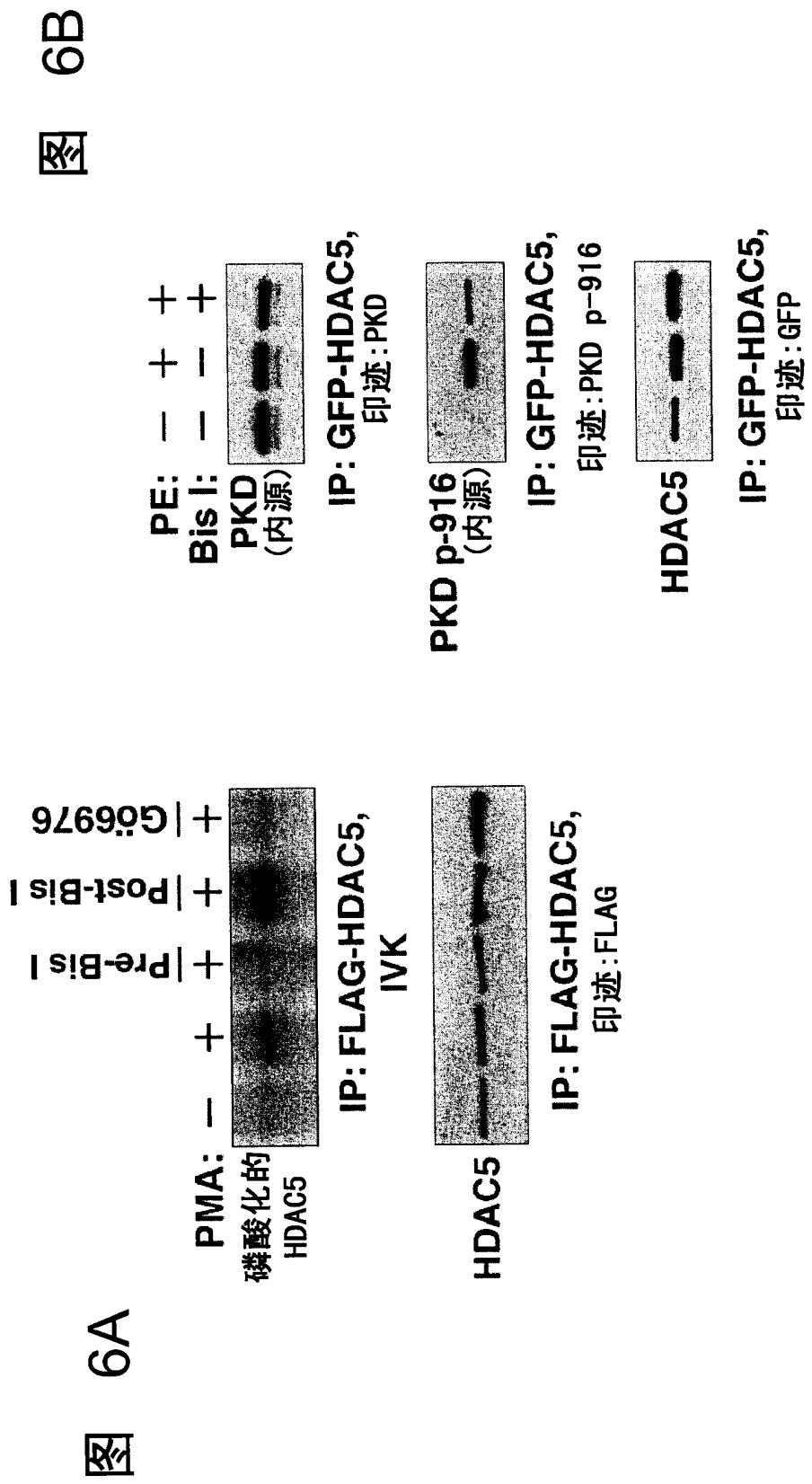


图 7A

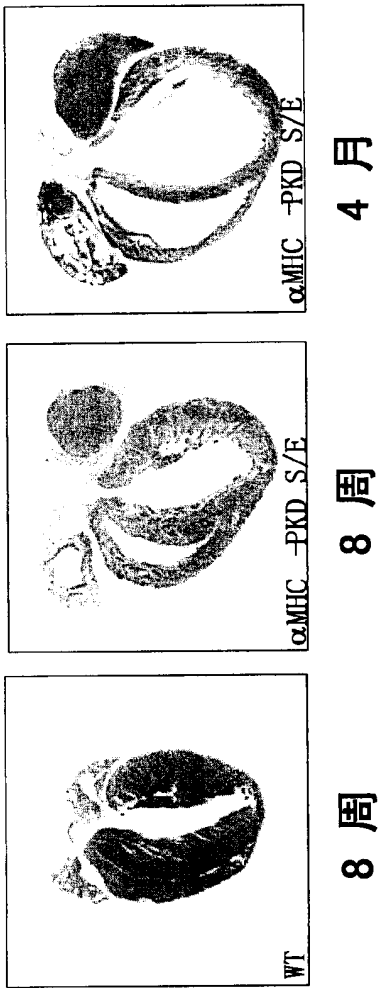


图 7B

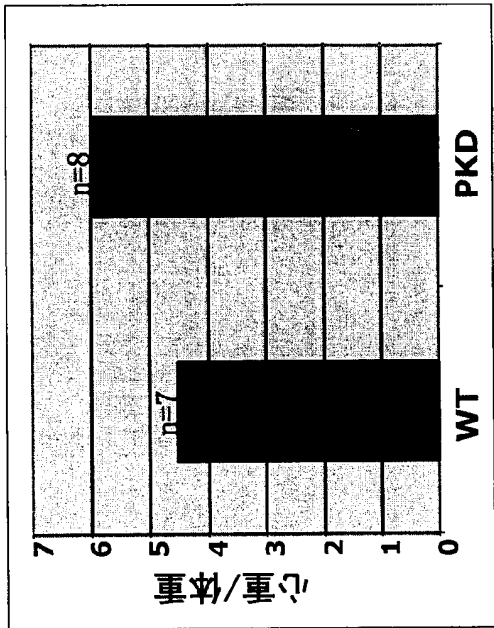


图 7C

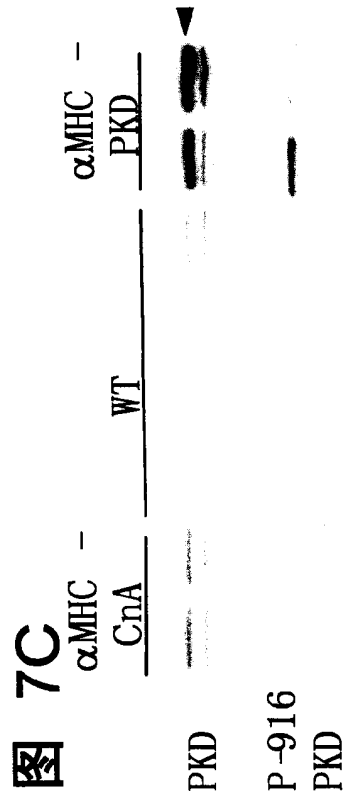
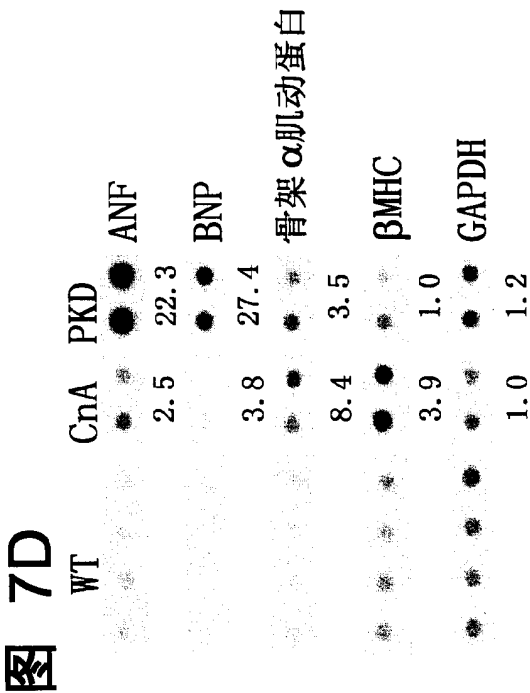


图 7D



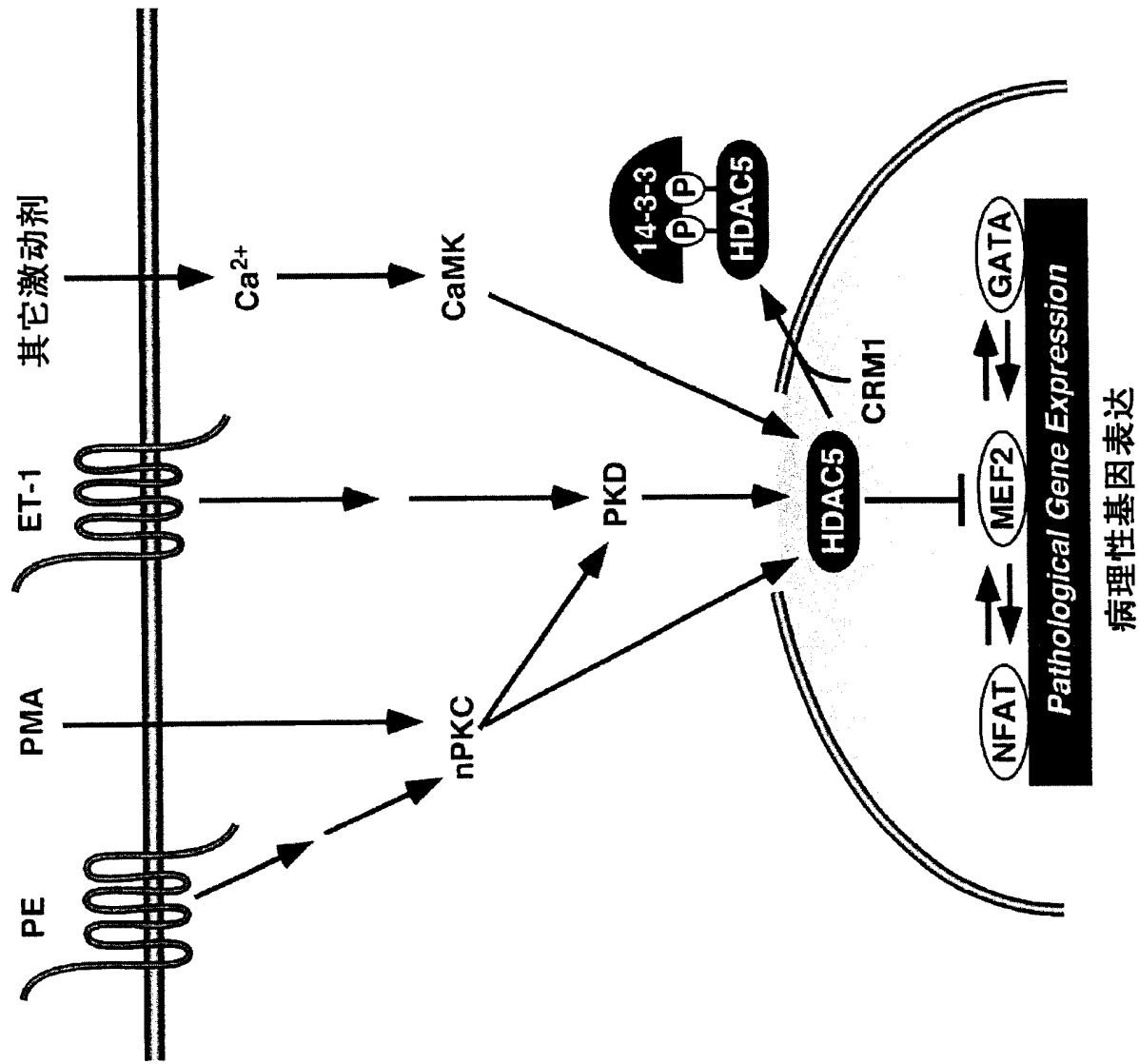


图 8