(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111388682 A
(43)申请公布日 2020.07.10

(21)申请号 202010310166.9

(22)申请日 2015.05.08

(62)分案原申请数据
201510232415.6 2015.05.08

(71)申请人 上海泽生科技开发股份有限公司
地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园区居里路68号

(72)发明人 周明东

(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
A61K 38/45(2006.01)
A61P 9/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书18页
序列表12页 附图3页

(54)发明名称

cMLCK基因导入

(57)摘要

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

CN 111388682 A

1.一种用于预防、治疗哺乳动物重度心力衰竭的重组载体,包含编码cMLCK蛋白/其等效突变体的多核苷酸和载体。

2.如权利要求1所述的重组载体,其中所述cMLCK蛋白的氨基酸序列包含SEQ ID NO:1。

3.如权利要求1所述的重组载体,其中所述重组载体被局部施用。

4.如权利要求1所述的重组载体,其中所述载体是腺相关病毒。

5.如权利要求4所述的重组载体,其特征在于,所述腺相关病毒是腺相关病毒9(AAV9)。

6.如权利要求1所述的重组载体,其中所述哺乳动物是人。

7.如权利要求1所述的重组载体,其中所述重度心力衰竭是NYHA III级心力衰竭。

8.如权利要求1所述的重组载体,其中所述重度心力衰竭是NYHA IV级心力衰竭。

9.如权利要求1所述的重组载体,其中所述重度心力衰竭者的血浆NT-proBNP水平高于4000fmol/ml。

10.如权利要求1所述的重组载体,其中所述重度心力衰竭者的左心室EF值至少提高5%。

cMLCK基因导入

1.技术领域

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

2.背景技术

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

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

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

[0005] 已有研究表明NRG-1的EGF类似区，约50至64个氨基酸，足以结合并活化这些受体。以前的研究表明纽兰格林-1β(NRG-1β)能以高亲和力直接结合ErbB3和ErbB4。孤儿受体ErbB2能与ErbB3或ErbB4形成异源二聚体并且其亲和力比ErbB3或ErbB4同源二聚体要高。神经发育的研究结果提示交感神经系统的形成需要完整的NRG-1β、ErbB2和ErbB3信号传导系统。靶向破坏NRG-1β、或ErbB2或ErbB4后由于心脏发育缺陷而导致胚胎致死。最近的研究也突显了NRG-1β、ErbB2和ErbB4在心血管发育以及维持成年正常心脏功能方面具有重要作

用。研究表明NRG-1β能增强成年心肌细胞的肌小节的组织结构。通过静脉滴注持续释放NRG能显著改善或防御不同心衰动物模型的心肌功能恶化。这些结果使得NRG-1有望成为一种治疗心衰的先导化合物。

[0006] 泽生公司已经报道了NRG提高心肌肌球蛋白轻链激酶(cMLCK)表达和心肌肌球蛋白调节(RLC)磷酸化水平,从而增强收缩时肌动蛋白-肌球蛋白的相互作用,因此cMLCK能够作为一种潜在的治疗心衰的药物作用靶点(例如参见WO08/28405)。在顾等人的文章中(Cardiovascular Research,88:334-343(2010)),泽生公司报道了cMLCK的上调能够促进肌小节重组,增强心衰的收缩力。然而,cMLCK基因治疗心肌梗死大鼠的效果并未好于NRG治疗。另外,泽生公司在临床实验中发现一些重度心衰患者对NRG治疗并不响应,这些患者迫切需要另一种治疗心衰的方法。

[0007] 3.发明概述

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

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

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

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

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

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

[0014] 在其他实施例中,多核苷酸包含一个核苷酸序列,该序列与选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6的至少约500个连续的核苷酸有至少70%的同一性。在某一实施例

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

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

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

[0017] 在某一实施例中，本发明公布的剂量约为1x 10^{10}-1x 10^{15}gc/人。在某一实施例中，剂量约为1x10^{10}-5x 10^{14}gc/人。在某一实施例中，剂量约为1x 10^{11}-1x 10^{14}gc/人。在某一实施例中，剂量约为1x 10^{10}-5x10^{13}gc/人。在某一实施例中，剂量约为5x 10^{10}-5x 10^{11}gc/人。在某一实施例中，剂量约为2x 10^{11}-5x 10^{11}gc/人。在某一实施例中，剂量约为1x 10^{10}gc/人。在另一实施例中，剂量约为2x 10^{10}gc/人。在某一实施例中，剂量约为5x 10^{10}gc/人。在某一实施例中，剂量约为1x 10^{11}gc/人。在另一实施例中，剂量约为2x 10^{11}gc/人。在

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

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

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

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

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

4.附图说明

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

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

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

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

[0026] 图5.AAV9.cMLCK基因转入压力超负荷老鼠心脏前后的超声心动图检测。对老鼠实施主动脉缩窄术(TAC)。3周后将老鼠随机分为2组。一组通过冠状动脉注射接受AAVA9.cMLCK基因导入，另一组经同样方式注射PBD。TAC 3周后和AAV9.cMLVK基因导入或PBS注射5周后进行测量。

[0027] 图6.AAV9.cMLCK基因转入压力超负荷老鼠心脏后活体血液动力学测定结果。

AAV9.cMLVK基因导入或PBS注射5周后进行测定

[0028] 5.发明详述

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

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

[0031] 除非特别指明，在此所用“一个”的意思是“至少一个”或“一个或多于一个”。

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

[0033] 此处所用“cMLCK”是指心肌肌球蛋白轻链激酶，包含具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的蛋白质或多肽，和具有相似序列的蛋白，例如，与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列具有70％，75％，80％，85％，90％，95％或更高比例同源性的蛋白或多肽。且上述蛋白或多肽具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的蛋白质或多肽相似的生物学活性，所述生物学活性包括但不受限于抗原交叉反应性，自抑制功能，磷酸化功能等。可以预见的是，在保持生物学功能不变的情况下，可以对SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所示的氨基酸进行单个或多个保守或非保守氨基酸的替换、插入或缺失。“cMLCK”还包括cMLCK基因的不同的突变体，差异剪切体以及具有多态性的序列编码的蛋白质或多肽。cMLCK包括维持一个或多个cMLCK功能的变异体。可以认为，编码cMLCK的基因或cDNA在一定程度上的突变可以在实质上不引起纽激酶的一个或多个功能的变化。首先，由于遗传密码子的退化，不同的密码子可能编码了同一个氨基酸。其次，即使由于基因突变导致了氨基酸的替换，这种替换也有可能是保守性的氨基酸替换并不实质性地影响纽激酶的功能。再次，将纽激酶的一部分氨基酸序列删除也不会使其所有的功能受损或丧失。最后，在纽激酶中插入或增加氨基酸序列抗原表位标签，也可以使其功能不被受损或丧失。其它的一些修饰比如在体内或体外进行化学或生物化学的修饰也可以在实质上不损害其一个或多个功能。举例来说，这种修饰包括乙酰化，羧化，磷酸化，糖基化，泛素化，放射性核素标记以及其它各种在专业领域中

可用的酶的修饰。在本专业领域中众所周知，有多种方法可以对蛋白质进行标记，如放射性同位素，荧光素，化学发光物质，酶以及抗体等。功能性的片段或突变体可以有不同的长度，比如含有至少10，25，50，75，100或200个氨基酸。

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

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

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

[0037] 除非明确指明，此处所用“蛋白”是与“多肽”或“肽”同义。

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

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

[0040] 此处所用“载体”是指用于将外源DNA导入细胞进行表达或复制的不连续的原件。选择和使用此种载体在该领域的技术范围内是广为人知的。表达载体包括能表达DNA的载体，其DNA有效地与调控序列，例如启动子区域连接在一起。调控序列能影响该DNA片段的表达。所以，一个表达载体是指重组DNA或RNA构成物，例如质粒、噬菌体、重组病毒或其它载体，它们一旦导入适当的宿主细胞中，可以导致克隆的DNA表达。合适的表达载体对本领域的技术人员而言十分清楚，包括能在真核细胞和/或原核细胞中复制的载体以及保持游离

状态或整合到宿主细胞基因组的载体。

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

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

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

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

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

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

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

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

重度心衰的病人。更具体地说，“治疗”是指给心脏病患者以有效且有益的效应。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0058] 在另一实施例中，编码cMLCK蛋白的多核苷酸载体通过脂质体被施用于心脏。在本发明中编码cMLCK蛋白的多核苷酸载体都可通过已知的不同的传送系统给药，例如，封装在脂质体、微粒、微胶囊、受体介导的胞吞(如，见Wu and Wu,J.Biol.Chem.262:4429-4432(1987))，胶束生物相容性聚合物，包含天然聚合物和合成聚合物;脂蛋白，多肽，多糖，脂多糖，人工病毒包膜，金属离子和细菌，病毒，如杆状病毒，腺病毒和逆转录酶病毒，噬菌体，粘粒，质粒，真菌载体和其他复合载体等。在某一特定的实施例中，编码cMLCK蛋白的多核苷酸载体能在囊泡，特别是脂质体中传送(见Langer,Science 249:1527-1533(1990);Treat et al.,in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer,Lopez-Berestein and Fidler(eds.),Liss,New York,pp.317-372,353-365(1989))。

[0059] 本发明需要用许多参数对个体心室功能的改善进行评估，包括但不限于，左心室

的EF值，左室舒张末期容积(LVEDV)，左室收缩末期容积(LVESV)，左室舒张末压(LVEDP)，左心室收缩压(LVSP)。这些参数可能用本领域公知的方法监测，例如，超声波心动描记术。在某一实施例中，个体左心室的EF值提高了至少5％。在某一实施例中，个体左心室的EF值提高了至少10％。在某一实施例中，个体左心室的EF值提高了至少20％。在某一实施例中，个体的左室舒张末期容积(LVEDV)或者左室收缩末期容积(LVESV)降低了至少5％。在某一实施例中，个体的左室舒张末期容积(LVEDV)或者左室收缩末期容积(LVESV)降低了至少10％。在某一实施例中，个体的左室舒张末期容积(LVEDV)或者左室收缩末期容积(LVESV)降低了至少20％。

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

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

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

[0063] 在其他实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:4或其补足物的至少约500个连续的核苷酸有至少70％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:4的至少约500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000或2400个连续的核苷酸有至少70％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:4的至少约500个连续的核苷酸有至少75％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:4的至少约500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000或2400个连续的核苷酸有至少75％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:4的至少约500个连续的核苷酸有至少80％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:4的至少约500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000或2400个连续的核苷酸有至少80％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:4的至少约500个连续的核苷酸有至少85％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:4的至少约500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000或2400个连续的核苷酸有至少85％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:4的至少约500个连续的核苷酸有至少90％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:4的至少约500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000或2400个连续的核苷酸有至少90％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核

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

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

[0065] 在其他实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:5或其补足物的至少约500个连续的核苷酸有至少70％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:5的至少约500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000或2400个连续的核苷酸有至少70％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:5的至少约500个连续的核苷酸有至少75％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:5的至少约500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000或2400个连续的核苷酸有至少75％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:5的至少约500个连续的核苷酸有至少80％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:5的至少约500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000或2400个连续的核苷酸有至少80％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:5的至少约500个连续的核苷酸有至少85％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:5的至少约500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000或2400个连续的核苷酸有至少85％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:5的至少约500个连续的核苷酸有至少90％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:5的至少约500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000或2400个连续的核苷酸有至少90％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:5的至少约500个连续的核苷酸有至少95％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列与选自SEQ ID NO:5的至少约500，600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000或2400个连续的核苷酸有至少95％的同一性。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列包含选自SEQ ID NO:5或其补体的至少约500个连续的核苷酸。在某一实施例中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该序列包含选自SEQ ID NO:5或其补体的至少约500,600,700,800,900,1000,1100,1200,1500,2000或2400个核苷酸。在某一特殊的实施例中，在某一实施例中，多核苷酸包含SEQ ID NO:5或其补体的核苷酸序列。

[0066] 在某一实施例中，多核苷酸载体编码一个多肽，该多肽包含与SEQ ID NO:3至少

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

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

[0068] WO08/28405公开了编码cMLCK的多核苷酸的克隆方法，该内容通过引用合并于此。DNA可以通过本技术领域中标准的程序从克隆的DNA(比如DNA文库)中获得，也可以通过化学合成法，cDNA克隆，基因组克隆，从目标细胞中分离以及PCR扩增和克隆获得。比如可以参照Sambrook等人，Molecular Cloning,A Laboratory Manual,3d.ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York(2001);Glover,D.M.(ed.),DNA Cloning:APractical Approach,2d.ed.,MRL Press,Ltd.,Oxford,U.K.(1995)。从基因组DNA获得的DNA含有除编码序列之外的调控序列以及内含子。从cDNA获得的DNA则只包含外显子。不管来源如何，获得的基因需要克隆到一个合适的载体进行复制。

[0069] 编码cMLCK的多核苷酸能够插入合适的克隆载体。大量的本技术领域中熟知的载体和宿主细胞系统可以使用。可选用的载体包括但不限于质粒或改良的病毒载体。构建表

达载体的技术在本领域是众所周知的，见Sambrook等人,2001,Molecular Cloning—A Laboratory Manual,3rd edition,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY,和Ausubel等,eds.,Current Edition,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates and Wiley Interscience,NY。基因的插入可以通过将DNA片段与具有互补粘性末端的载体连接来完成。但是如果DNA片段的粘性末端并不存在于相应的载体上，那么该DNA片段的末端需要进行酶的修饰。或者，所需的位点可以通过结合一个连接序列来导入。这些连接序列可以包含化学合成的含有特定限制性酶切位点的寡核苷酸序列。或者，被酶切的载体以及编码cMLCK的多核苷酸序列可以经过同聚物加尾的修饰。

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

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

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

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

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

[0075] 此处所用基因传递，基因导入，转换等诸如此类的名词，是指将一个外源性的多核苷酸(有时是指转基因)引入宿主细胞，不考虑引出所使用的方法。这种方法包括很多公知的技术比如促进裸露多核苷酸递送的技术(例如电穿孔，“基因枪”递送和各种其他用于引入多核苷酸的技术)，还有载体介导的基因导入(例如，通过病毒性感染/转染，或者其他基于蛋白或基因脂质的基因传递复合物)。引入的多核苷酸能够稳定或瞬时地维持在宿主细胞中。稳定维持要求引入的多核苷酸或者包含一个与宿主细胞相容的复制起点，或者合并一个宿主细胞的复制子，例如一个染色体外的复制子(如，一个质粒)或一个细胞核或线粒体的染色体。本领域已知有很多载体能够介导基因转入哺乳细胞。

[0076] 一个病毒载体是指包含一个被传送入一个宿主细胞的多核苷酸的重组产生的病毒或病毒颗粒。比如病毒载体包含RNA病毒如逆转录病毒载体，疱疹病毒载体，牛痘载体，腺

病毒载体,腺相关病毒载体,甲病毒属载体等。甲病毒属载体,例如基于森林病毒的载体和基于辛德毕斯病毒的载体,也已经被研制用于基因治疗和免疫治疗(见Schlesinger and Dubensky,Curr.Opin.Biotechnol.5:434-439(1999)and Ying,et al.Nat.Med.5(7):823-827(1999))。

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

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

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

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

[0081] AAV作为一种非常有吸引力的载体系统,应用于目前公开的细胞转导。由于其作为游离型多联体持久性几率高,并且能够感染非分裂细胞,因此可用于向哺乳动物细胞(比如组织培养和体内)中传递基因。研究表明在基因传递中使用AAV包括Flotte等,

Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:10613-10617(1993)和Walsh等,J.Clin.Invest.94:1440-1448(1994)。重组AAV载体已经成功用于体内和体外标记基因及涉及人类疾病的基因的转导(见Walsh等,J.Clin.Invest.94:1440-1448(1994))。AAV有一个宽泛的感染宿主范围。美国专利US5,139,941和4,797,368详细描述了生成和使用rAAV载体的细节。

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

[0083] AAV天然存在多种血清亚型,目前已知有至少12个血清亚型(AAV1-AAV12)。尽管具有高度同源性,不同的血清亚型对不同的的组织具有趋向性。AAV1的受体是未知的,然而,已知AAV1能够比AAV2更有效地转导骨骼肌和心肌。针对假病毒载体已做了很多研究,两侧为AAV2 ITR的DNA载体被包在可替换血清型的衣壳中,显然生物活性的差异与衣壳有关,并非与基因组有关。最近的研究表明,包在AAV1衣壳中的DNA表达组件转导心肌细胞的能力比包在AAV2衣壳中的高至少1log10。在某一实施例中,在个体中使用的是不产生免疫应答的AAVs。在某一实施例中,本发明的AAV是腺相关病毒载体9(AAV9)。此处所用的AAV9.cMLCK载体是指基于重组AAV9的cMLCK基因导入载体。

[0084] 可以用标准临床技术来确定本发明所公开的编码cMLCK的多核苷酸载体的剂量,该剂量能够有效治疗重度心衰。也可以通过临床疗效来确定本发明公开的用于表达cMLCK蛋白的多核苷酸载体的剂量。另外,可以视情况采用体外分析来确定最佳的剂量范围。在剂型中采用的准确剂量也取决于给药途径和心衰的严重程度,应当按照医生的判断和每个病人的状况来决定。在某一实施例中,本发明公布的剂量约为1x 10^{10}-1x 10^{15}gc/人。在某一实施例中,剂量约为1x 10^{10}-5x 10^{14}gc/人。在某一实施例中,剂量约为1x10^{11}-1x 10^{14}gc/人。在某一实施例中,剂量约为1x 10^{11}-5x 10^{13}gc/人。在某一实施例中,剂量约为5x 10^{10}-5x10^{11}gc/人。在某一实施例中,剂量约为2x 10^{11}-5x 10^{11}gc/人。在某一实施例中,剂量约为1x 10^{10}gc/人。在另一实施例中,剂量约为2x 10^{10}gc/人。在某一实施例中,剂量约为5x 10^{10}gc/人。在某一实施例中,剂量约为1x 10^{11}gc/人。在另一实施例中,剂量约为2x 10^{11}gc/人。在某一实施例中,剂量约为5x 10^{11}gc/人。在某一实施例中,剂量约为1x 10^{12}gc/人。在另一实施例中,剂量约为2x 10^{12}gc/人。在另一实施例中,剂量约为5x 10^{12}gc/人。在某一实施例中,剂量约为1x 10^{13}gc/人。在另一实施例中,剂量约为2x 10^{13}gc/人。在另一实施例中,剂量约为5x 10^{13}gc/人。在另一实施例中,剂量约为1x 10^{14}gc/人。在另一实施例中,剂量约为2x 10^{14}gc/人。在另一实施例中,剂量约为5x 10^{14}gc/人。

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

[0086] 在另一方面,本发明提供了用于药物的组分。该组分包含有效治疗剂量的编码

cMLCK蛋白的多核苷酸载体和药学可接受的介质。在某一实施例中，病毒载体是一个腺相关病毒载体(AVV)。在一个特定的实施例中，多核苷酸是腺相关病毒9(AVV9)。

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

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

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

[0090] 在某一实施例中，此处所公开的组分用于在个体中表达cMLCK蛋白，包含对个体施用编码cMLCK蛋白的多核苷酸载体，该载体在个体的心脏细胞中表达cMLCK蛋白，其中个体为重度心衰。在某一实施例中，组分是编码cMLCK蛋白的多核苷酸载体。在某一实施例中，多核苷酸载体是病毒载体。在一个实施例中，病毒载体是腺相关病毒载体(AAV)。在一个特定的实施例中，多核苷酸载体是AAV9。

[0091] 本发明通过以下例子来阐明，但本发明所保护的范围并不限于此。

[0092] 实施例1

[0093] AAV9.cMLCK病毒颗粒的构建、生产工艺及质量控制

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

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

位点SV40的调控。

[0096] 293细胞被顺式质粒pZac2.1-cMCLK、含有AAV2 rep基因和AAV9衣壳蛋白基因的反式质粒pAAV2/9和腺病毒辅助质粒pAdΔF6转染。这些细胞是通过增加碘克沙醇的浓度从15％,25％,40％,和54％进行梯度超速离心的方式来纯化,并进行了SDS-PAGE和内毒素的纯度分析(放行标准是用于大动物研究内毒素小于5单位/毫升)。图2显示了顺式质粒pZac2.1-cMCLK的构建和质量控制。质粒DNA的纯度和浓度由260nm和280nm下的吸光度来判断,cMLCK cDNA和调控元件(ITR,CMV增强子和启动子,内含子,和SV40多腺苷化信号)的确认是通过双条带的全长序列和限制性酶解达到的。人源化cMCLK的转基因表达是由pZac2.1-cMLCK转染后的人胚肾293细胞(HEK293细胞)进行的蛋白免疫印迹来进一步确认的。

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

[0098] 实施例2

[0099] cMLCK体外基因表达

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

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

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

[0103] 实施例3

[0104] AAV9.cMLCK心脏基因导入的条件优化

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

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

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

中分离获得。cMLCK的mRNA水平由定量的RT-PCR检测，cMLCK的蛋白水平由左心室匀浆的蛋白免疫印迹测定。

[0108] 注射了0,$5x10^{10}$,$2x10^{11}$,and $5x10^{11}$ gc/小鼠AAV9.cMLCK后的2,5,10周，小鼠心脏中cMLCK和mRNA的转基因表达水平进行了比较。图4显示间接冠脉基因导入AAV9.cMLCK五周后，左心室样品中cMLCK转基因mRNA的定量表达。间接冠脉基因导入AAV9.cMLCK $5x10^{11}$ gc/小鼠五周后，每微克总RNA中有$1.41x10^{5}$ cMLCK转基因mRNA分子。

[0109] 冠脉基因输入后，在左心室样品中发现了剂量依赖的cMLCK转基因表达。这个结果表明在注射$5x10^{11}$ gc/小鼠AAV9.cMLCK后会发生适量的cMLCK转基因表达。

[0110] 实施例4

[0111] AAV9.cMLCK的基因导入可提高压力超负荷老鼠的心脏功能

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

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

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

[0115] 体重，左心室重量，肺的重量，肝的重量和胫骨的长度在解剖时被测定。心脏舒张遏止的左心室样品被分成3份：短轴的左心室环间隔壁用马尔福林固定后测定心肌细胞尺寸，心肌细胞凋亡和纤维化，另外两份用液氮快速冻存在-80℃用于生化和分子生物方面的研究。

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

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

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

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

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

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

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

[0123] 实施例5

[0124] 使用cMLCK基因导入治疗重度的心力衰竭患者

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

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

[0127] AAV9.cMLCK以1x 10^{11}gc/人到5x 10^{13}gc/人的剂量通过冠状动脉局部输入患者的心脏。皮下冠状动脉输入是通过标准的导管和MEDRAD Mark V ProVis血管造影注射系统(Indianola,PA)。在造影术后的心脏导管插入实验中十分钟内输入药物。采用常规造影术确认同轴的位置,标准的导管插入在冠状动脉中顺利进行,确保输入顺利前行到冠状循环中去。180天后,对这些患者的左心室功能通过心超进行检测,如左心室的EF值,左心室的舒张末期体积(LVEDV),或左心室的收缩末期体积(LVEDV)。通过这些参数对患者的左心室功能的改善进行评价。

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

序列表

<110> 上海泽生科技开发股份有限公司

<120> cMLCK基因导入

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 819

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Gln Gly Asp Gly Val Pro Gly Pro Ala Gln Ala Phe Pro Gly His Leu
225 230 235 240
Pro Leu Pro Thr Lys Val Glu Ala Lys Ala Pro Glu Thr Pro Ser Glu
245 250 255
Asn Leu Arg Thr Gly Leu Glu Leu Ala Pro Ala Pro Gly Arg Val Asn
260 265 270
Val Val Ser Pro Ser Leu Glu Val Ala Pro Gly Ala Gly Gln Gly Ala
275 280 285
Ser Ser Ser Arg Pro Asp Pro Glu Pro Leu Glu Glu Gly Thr Arg Leu
290 295 300
Thr Pro Gly Pro Gly Pro Gln Cys Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro Ala
305 310 315 320
Gln Ala Arg Ala Thr His Ser Gly Gly Glu Thr Pro Pro Arg Ile Ser
325 330 335
Ile His Ile Gln Glu Met Asp Thr Pro Gly Glu Met Leu Met Thr Gly
340 345 350
Arg Gly Ser Leu Gly Pro Thr Leu Thr Thr Glu Ala Pro Ala Ala Ala
355 360 365
Gln Pro Gly Lys Gln Gly Pro Pro Gly Thr Gly Arg Cys Leu Gln Ala
370 375 380
Pro Gly Thr Glu Pro Gly Glu Gln Thr Pro Glu Gly Ala Arg Glu Leu
385 390 395 400
Ser Pro Leu Gln Glu Ser Ser Ser Pro Gly Gly Val Lys Ala Glu Glu
405 410 415
Glu Gln Arg Ala Gly Ala Glu Pro Gly Thr Arg Pro Ser Leu Ala Arg
420 425 430
Ser Asp Asp Asn Asp His Glu Val Gly Ala Leu Gly Leu Gln Gln Gly
435 440 445
Lys Ser Pro Gly Ala Gly Asn Pro Glu Pro Glu Gln Asp Cys Ala Ala
450 455 460
Arg Ala Pro Val Arg Ala Glu Ala Val Arg Arg Met Pro Pro Gly Ala
465 470 475 480
Glu Ala Gly Ser Val Val Leu Asp Asp Ser Pro Ala Pro Pro Ala Pro
485 490 495
Phe Glu His Arg Val Val Ser Val Lys Glu Thr Ser Ile Ser Ala Gly
500 505 510
Tyr Glu Val Cys Gln His Glu Val Leu Gly Gly Gly Arg Phe Gly Gln
515 520 525
Val His Arg Cys Thr Glu Lys Ser Thr Gly Leu Pro Leu Ala Ala Lys

530 535 540

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Phe Pro Thr Asp Met Trp Ser Val Gly Val Ile Thr Tyr Met
690 695 700

Leu Leu Ser Gly Leu Ser Pro Phe Leu Gly Glu Thr Asp Ala Glu Thr
705 710 715 720

Met Asn Phe Ile Val Asn Cys Ser Trp Asp Phe Asp Ala Asp Thr Phe
725 730 735

Glu Gly Leu Ser Glu Glu Ala Lys Asp Phe Val Ser Arg Leu Leu Val
740 745 750

Lys Glu Lys Ser Cys Arg Met Ser Ala Thr Gln Cys Leu Lys His Glu
755 760 765

Trp Leu Asn Asn Leu Pro Ala Lys Ala Ser Arg Ser Lys Thr Arg Leu
770 775 780

Lys Ser Gln Leu Leu Leu Gln Lys Tyr Ile Ala Gln Arg Lys Trp Lys
785 790 795 800

Lys His Phe Tyr Val Val Thr Ala Ala Asn Arg Leu Arg Lys Phe Pro
805 810 815

Thr Ser Pro

<210> 2

<211> 795

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Thr Lys Leu Asn Met Leu Asn Glu Lys Val Asp Gln Leu Leu
1 5 10 15
His Phe Gln Glu Asp Val Thr Glu Lys Leu Gln Ser Met Cys Arg Asp
20 25 30
Met Gly His Leu Glu Arg Gly Leu His Arg Leu Glu Ala Ser Arg Ala
35 40 45
Pro Gly Pro Gly Gly Ala Asp Gly Val Pro His Ile Asp Thr Gln Ala
50 55 60
Gly Trp Pro Glu Val Leu Glu Leu Val Arg Ala Met Gln Gln Asp Ala
65 70 75 80
Ala Gln His Gly Ala Arg Leu Glu Ala Leu Phe Arg Met Val Ala Ala
85 90 95
Val Asp Arg Ala Ile Ala Leu Val Gly Ala Thr Phe Gln Lys Ser Lys
100 105 110
Val Ala Asp Phe Leu Met Gln Gly Arg Val Pro Trp Arg Arg Gly Ser
115 120 125
Pro Gly Asp Ser Pro Glu Glu Asn Lys Glu Arg Val Glu Glu Glu Gly
130 135 140
Gly Lys Pro Lys His Val Leu Ser Thr Ser Gly Leu Gln Ser Asp Ala
145 150 155 160
Arg Glu Pro Gly Glu Glu Ser Gln Lys Ala Asp Val Leu Glu Arg Thr
165 170 175
Ala Glu Arg Leu Pro Pro Ile Arg Ala Ser Gly Leu Gly Ala Asp Pro
180 185 190
Ala Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Gln Gly Asp Gly Val Pro Gly Pro
195 200 205
Ala Gln Ala Phe Pro Gly His Leu Pro Leu Pro Thr Lys Val Glu Ala
210 215 220
Lys Ala Pro Glu Thr Pro Ser Glu Asn Leu Arg Thr Gly Leu Glu Leu
225 230 235 240
Ala Pro Ala Pro Gly Arg Val Asn Val Val Ser Pro Ser Leu Glu Val
245 250 255
Ala Pro Gly Ala Gly Gln Gly Ala Ser Ser Ser Arg Pro Asp Pro Glu
260 265 270
Pro Leu Glu Glu Gly Thr Arg Leu Thr Pro Gly Pro Gly Pro Gln Cys
275 280 285
Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro Ala Gln Ala Arg Ala Thr His Ser Gly

290 295 300

Gly Glu Thr Pro Pro Arg Ile Ser Ile His Ile Gln Glu Met Asp Thr
305 310 315 320
Pro Gly Glu Met Leu Met Thr Gly Arg Gly Ser Leu Gly Pro Thr Leu
325 330 335
Thr Thr Glu Ala Pro Ala Ala Ala Gln Pro Gly Lys Gln Gly Pro Pro
340 345 350
Gly Thr Gly Arg Cys Leu Gln Ala Pro Gly Thr Glu Pro Gly Glu Gln
355 360 365
Thr Pro Glu Gly Ala Arg Glu Leu Ser Pro Leu Gln Glu Ser Ser Ser
370 375 380
Pro Gly Gly Val Lys Ala Glu Glu Glu Gln Arg Ala Gly Ala Glu Pro
385 390 395 400
Gly Thr Arg Pro Ser Leu Ala Arg Ser Asp Asp Asn Asp His Glu Val
405 410 415
Gly Ala Leu Gly Leu Gln Gln Gly Lys Ser Pro Gly Ala Gly Asn Pro
420 425 430
Glu Pro Glu Gln Asp Cys Ala Ala Arg Ala Pro Val Arg Ala Glu Ala
435 440 445
Val Arg Arg Met Pro Pro Gly Ala Glu Ala Gly Ser Val Val Leu Asp
450 455 460
Asp Ser Pro Ala Pro Pro Ala Pro Phe Glu His Arg Val Val Ser Val
465 470 475 480
Lys Glu Thr Ser Ile Ser Ala Gly Tyr Glu Val Cys Gln His Glu Val
485 490 495
Leu Gly Gly Gly Arg Phe Gly Gln Val His Arg Cys Thr Glu Lys Ser
500 505 510
Thr Gly Leu Pro Leu Ala Ala Lys Ile Ile Lys Val Lys Ser Ala Lys
515 520 525
Asp Arg Glu Asp Val Lys Asn Glu Ile Asn Ile Met Asn Gln Leu Ser
530 535 540
His Val Asn Leu Ile Gln Leu Tyr Asp Ala Phe Glu Ser Lys His Ser
545 550 555 560
Cys Thr Leu Val Met Glu Tyr Val Asp Gly Gly Glu Leu Phe Asp Arg
565 570 575
Ile Thr Asp Glu Lys Tyr His Leu Thr Glu Leu Asp Val Val Leu Phe
580 585 590
Thr Arg Gln Ile Cys Glu Gly Val His Tyr Leu His Gln His Tyr Ile
595 600 605

Leu His Leu Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile Leu Cys Val Asn Gln Thr
610 615 620
Gly His Gln Ile Lys Ile Ile Asp Phe Gly Leu Ala Arg Arg Tyr Lys
625 630 635 640
Pro Arg Glu Lys Leu Lys Val Asn Phe Gly Thr Pro Glu Phe Leu Ala
645 650 655
Pro Glu Val Val Asn Tyr Glu Phe Val Ser Phe Pro Thr Asp Met Trp
660 665 670
Ser Val Gly Val Ile Thr Tyr Met Leu Leu Ser Gly Leu Ser Pro Phe
675 680 685
Leu Gly Glu Thr Asp Ala Glu Thr Met Asn Phe Ile Val Asn Cys Ser
690 695 700
Trp Asp Phe Asp Ala Asp Thr Phe Glu Gly Leu Ser Glu Glu Ala Lys
705 710 715 720
Asp Phe Val Ser Arg Leu Leu Val Lys Glu Lys Ser Cys Arg Met Ser
725 730 735
Ala Thr Gln Cys Leu Lys His Glu Trp Leu Asn Asn Leu Pro Ala Lys
740 745 750
Ala Ser Arg Ser Lys Thr Arg Leu Lys Ser Gln Leu Leu Leu Gln Lys
755 760 765
Tyr Ile Ala Gln Arg Lys Trp Lys Lys His Phe Tyr Val Val Thr Ala
770 775 780
Ala Asn Arg Leu Arg Lys Phe Pro Thr Ser Pro
785 790 795

<210> 3
<211> 786
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 3

Met Ser Gly Val Ser Glu Glu Asp Pro Glu Gly Leu Gly Pro Gln Gly
1 5 10 15
Leu Pro Ala Leu Gly Gly Ala Cys Leu Val Thr Val Asp Lys Lys Leu
20 25 30
Asn Val Leu Thr Glu Lys Val Asp Arg Leu Leu His Phe Gln Glu Asp
35 40 45
Val Thr Glu Lys Leu Gln Cys Val Cys Gln Gly Met Asp His Leu Glu
50 55 60
Gln Gly Leu His Arg Leu Glu Ala Ser Gln Glu Leu Gly Leu Ala Gly
65 70 75 80

Pro Gly Ser Thr Ser Pro Ala Ala Ala Gln Ala Ala Trp Pro Glu Val
85 90 95
Leu Glu Leu Val Arg Ala Val Arg Gln Glu Gly Ala Gln His Gly Ala
100 105 110
Arg Leu Glu Ala Leu Phe Lys Met Val Val Ala Val Asp Arg Ala Ile
115 120 125
Thr Leu Val Gly Ser Thr Ile Gln Asn Ser Lys Val Asp Asp Phe Ile
130 135 140
Leu Gln Gly Thr Val Pro Trp Arg Lys Gly Ser Leu Ala Asp Gly Pro
145 150 155 160
Glu Glu Asn Lys Glu Gln Ala Glu Val Ala Gly Val Lys Pro Lys His
165 170 175
Val Leu Asn Thr Gly Ser Val Gln Ala Ala Thr Ser Arg Ala Leu Trp
180 185 190
Glu Glu Ser Gln Lys Gln Asp Thr Pro Val Gly Thr Val Glu Gly Leu
195 200 205
Pro Leu Ile Ile Asp Thr Ser Leu Lys Gly Ala Asp Leu Thr Gln Ala
210 215 220
Gly Ala Ser Leu Arg Gln Gly Val Glu Ala Leu Asp Pro Gly Gln Glu
225 230 235 240
Pro Pro Pro Thr Glu Ala Glu Ser Arg Leu Pro Ala Leu Ala Ser Glu
245 250 255
Asp Thr Gly Thr Thr Leu Glu Leu Ser Val Ala Ile Asp Arg Ile Ser
260 265 270
Glu Val Leu Thr Ser Leu Arg Met Ser Gln Ser Ala Gly Glu Gly Thr
275 280 285
Ser Ser Ser Lys Pro Asp Cys Ser Glu Pro Gly Pro Gln Pro Leu Gly
290 295 300
Pro Leu Thr Thr Asp Ser Asp Ile His Ser Asp Glu Gly Leu Pro Arg
305 310 315 320
Ile Ser Val Arg Met Arg Glu Met Thr Thr Pro Glu Glu Leu Phe Glu
325 330 335
Thr Gln Gly Gly Ser Pro Ile Gly Ser Ala Glu Ala Pro Gly Pro Gly
340 345 350
Thr Val Leu Glu Asp Gln Ile Pro Lys Gly Ala Arg Pro Phe Pro Pro
355 360 365
Leu Pro Lys Arg Ser Cys Asn Asn Gly Gly Ala Ser Ala Glu Glu Ala
370 375 380
Thr Gly Pro Gly Ala Glu Pro Ile Arg Gly Pro Ser Leu Val Thr Arg

385 390 395 400
Asp Trp Arg Asp Glu Pro Val Gly Thr Thr Asp Leu Gln Gln Gly Arg
405 410 415
Asp Pro Gly Ala Val Ser Pro Glu Pro Gly Lys Asp His Ala Ala Gln
420 425 430
Gly Pro Gly Arg Thr Glu Ala Gly Arg Arg Val Ser Ser Ala Ala Glu
435 440 445
Ala Ala Ile Val Val Leu Gly Asp Ser Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe
450 455 460
Glu His Arg Val Val Ser Ile Lys Asp Thr Leu Ile Ser Thr Ser Tyr
465 470 475 480
Thr Val Ser Gln His Glu Val Leu Gly Gly Gly Arg Phe Gly Gln Val
485 490 495
His Arg Cys Thr Glu Arg Ser Thr Gly Leu Ala Leu Ala Ala Lys Ile
500 505 510
Ile Lys Val Lys Asn Ile Lys Asp Arg Glu Asp Val Lys Asn Glu Ile
515 520 525
Asn Ile Met Asn Gln Leu Ser His Val Asn Leu Ile Gln Leu Tyr Asp
530 535 540
Ala Phe Glu Ser Lys Asn Ser Phe Thr Leu Ile Met Glu Tyr Val Asp
545 550 555 560
Gly Gly Glu Leu Phe Asp Arg Ile Thr Asp Glu Lys Tyr His Leu Thr
565 570 575
Glu Leu Asp Val Val Leu Phe Thr Arg Gln Ile Cys Glu Gly Val His
580 585 590
Tyr Leu His Gln His Tyr Ile Leu His Leu Asp Leu Lys Pro Glu Asn
595 600 605
Ile Leu Cys Val Ser Gln Thr Gly His Gln Ile Lys Ile Ile Asp Phe
610 615 620
Gly Leu Ala Arg Arg Tyr Lys Pro Arg Glu Lys Leu Lys Val Asn Phe
625 630 635 640
Gly Thr Pro Glu Phe Leu Ala Pro Glu Val Val Asn Tyr Glu Phe Val
645 650 655
Ser Phe Pro Thr Asp Met Trp Ser Val Gly Val Ile Thr Tyr Met Leu
660 665 670
Leu Ser Gly Leu Ser Pro Phe Leu Gly Glu Thr Asp Ala Glu Thr Met
675 680 685
Asn Phe Ile Val Asn Cys Ser Trp Asp Phe Asp Ala Asp Thr Phe Lys
690 695 700

Gly Leu Ser Glu Glu Ala Lys Asp Phe Val Ser Arg Leu Leu Val Lys
705 710 715 720
Glu Lys Ser Cys Arg Met Ser Ala Thr Gln Cys Leu Lys His Glu Trp
725 730 735
Leu Asn His Leu Ile Ala Lys Ala Ser Gly Ser Asn Val Arg Leu Arg
740 745 750
Ser Gln Leu Leu Leu Gln Lys Tyr Met Ala Gln Arg Lys Trp Lys Lys
755 760 765
His Phe His Val Val Thr Ala Val Asn Arg Leu Arg Lys Phe Pro Thr
770 775 780
Cys Pro
785

<210> 4
<211> 2457
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 4

atgtcaggaa cctccaagga gagtctgggg catgggggc tgccagggtt gggcaagacc 60
tgcttaacaa ccatggacac aaagctgaac atgctgaacg agaaggtgga ccagctcctg 120
cacttccaag aagatgtcac agagaagttg cagagcatgt gccgagacat gggccacctg 180
gagcggggcc tgcacaggct ggaggcctcc cgggcaccgg gcccgggcgg ggctgatggg 240
gttccccaca ttgacaccca ggctgggtgg cccgaggtcc tggagctggt gagggccatg 300
cagcaggatg cggcccagca cggtgccagg ctggaggccc tcttcaggat ggtggctgcg 360
gtggacaggg ccatcgcttt ggtgggggcc acgttccaga aatcaaaggt ggcggatttc 420
ctcatgcagg ggcgtgtgcc ctggaggaga ggcagcccag gtgacagccc tgaggagaat 480
aaagagcgag tggaagaaga gggaggaaaa ccaaagcatg tgctgagcac cagtggggtg 540
cagtctgatg ccagggagcc tggggaagag agccagaagg cggacgtgct ggaggggaca 600
gcggagaggc tgccccccat cagagcgtca gggctgggag ctgaccccgc ccaggcagtg 660
gtctcaccgg gccagggaga tggtgttcct ggcccagccc aggcattccc tggccacctg 720
cccctgccca caaaggtgga agccaaggct cctgagacac ccagcgagaa cctcaggact 780
ggcctggaat tggctccagc acccggcagg gtcaatgtgg tctccccgag cctggaggtt 840
gcaccaggtg caggacaagg agcatcgtcc agcaggcctg accctgagcc cttagaggaa 900
ggcacgaggc tgactccagg gcctggccct cagtgcccag ggcctccagg gctgccagcc 960
caggccaggg caacccacag tggtggagaa acacctccaa ggatctccat ccacatacaa 1020
gagatggata ctcctgggga gatgctgatg acaggcaggg gcagccttgg acccaccctc 1080
accacagagg ctccagcagc tgcccagcca ggcaagcagg gcccacctgg gaccgggcgc 1140
tgcctccaag ccctgggac tgagcccgga gaacagaccc ctgaaggagc cagagagctc 1200
tccccgctgc aggagagcag cagccccggg ggagtgaagg cagaggagga gcaaagggct 1260
ggggccgagc ctggcacgag accaagcttg gccaggagtg acgacaatga ccacgaggtt 1320

ggggccctgg gcctgcagca gggcaaaagc ccaggggcgg gaaaccctga gcctgagcag 1380
gactgtgcag ccagggctcc ggtgagagct gaagcagtaa ggaggatgcc cccaggcgcc 1440
gaggctggca gcgtggttct ggatgacagt ccggccccac cagctccttt tgaacaccgg 1500
gtagtgagcg tcaaggagac ctccatctct gcgggttacg aggtgtgcca gcacgaagtc 1560
ttgggagggg gtcggtttgg ccaggtccac aggtgcacag agaagtccac aggcctccca 1620
ctggctgcca agatcatcaa agtgaagagc gccaaggacc gggaggacgt gaagaacgag 1680
atcaacatca tgaaccagct cagccacgtg aacctgatcc agctctatga cgccttcgag 1740
agcaagcaca gctgcaccct tgtcatggag tacgtggacg ggggtgagct cttcgaccgg 1800
atcacagatg agaagtacca cctgactgag ctggatgtgg tcctgttcac caggcagatc 1860
tgtgagggtg tgcattacct gcaccagcac tacatcctgc acctggacct caagccggag 1920
aacatattgt gcgtcaatca gacaggacat caaattaaga tcattgactt tgggctggcc 1980
agaaggtaca agcctcgaga gaagctgaag gtgaacttcg gcactcctga gttcctggcc 2040
ccagaagtcg tcaattatga gtttgtctca ttccccacag acatgtggag tgtgggagtc 2100
atcacctaca tgctactcag tggcttgtcc ccatttctag gggaaacaga tgcagagacc 2160
atgaatttca ttgtaaactg tagctgggat tttgatgctg acacctttga agggctctcg 2220
gaggaggcca aggactttgt ttcccggttg ctggtcaaag agaagagctg cagaatgagt 2280
gccacacagt gcctgaaaca cgagtggctg aataatttgc ctgccaaagc ttcaagatcc 2340
aaaactcgtc tcaaatccca actactgctg cagaaataca tagctcaaag aaaatggaag 2400
aaacatttct atgtggtgac tgctgccaac aggttaagga aatttccaac ttctccc 2457

<210> 5
<211> 2385
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 5

atggacacaa agctgaacat gctgaacgag aaggtggacc agctcctgca cttccaagaa 60
gatgtcacag agaagttgca gagcatgtgc cgagacatgg gccacctgga gcggggcctg 120
cacaggctgg aggcctcccg ggcaccgggc ccgggcgggg ctgatggggt tccccacatt 180
gacacccagg ctgggtggcc cgaggtcctg gagctggtga gggccatgca gcaggatgcg 240
gcccagcacg gtgccaggct ggaggccctc ttcaggatgg tggctgcggt ggacagggcc 300
atcgctttgg tgggggccac gttccagaaa tcaaaggtgg cggatttcct catgcagggg 360
cgtgtgccct ggaggagagg cagcccaggt gacagccctg aggagaataa agagcgagtg 420
gaagaagagg gaggaaaacc aaagcatgtg ctgagcacca gtggggtgca gtctgatgcc 480
agggagcctg gggaagagag ccagaaggcg gacgtgctgg aggggacagc ggagaggctg 540
ccccccatca gagcgtcagg gctgggagct gaccccgccc aggcagtggt ctcaccgggc 600
cagggagatg gtgttcctgg cccagcccag gcattccctg gccacctgcc cctgcccaca 660
aaggtggaag ccaaggctcc tgagacaccc agcgagaacc tcaggactgg cctggaattg 720
gctccagcac ccggcagggt caatgtggtc tccccgagcc tggaggttgc accaggtgca 780
ggacaaggag catcgtccag caggcctgac cctgagccct tagaggaagg cacgaggctg 840
actccagggc ctggccctca gtgcccaggg cctccagggc tgccagccca ggccagggca 900

acccacagtg gtggagaaac acctccaagg atctccatcc acatacaaga gatggatact 960
cctggggaga tgctgatgac aggcaggggc agccttggac ccaccctcac cacagaggct 1020
ccagcagctg cccagccagg caagcagggc ccacctggga ccgggcgctg cctccaagcc 1080
cctgggactg agcccggaga acagacccct gaaggagcca gagagctctc cccgctgcag 1140
gagagcagca gccccggggg agtgaaggca gaggaggagc aaagggctgg ggccgagcct 1200
ggcacgagac caagcttggc caggagtgac gacaatgacc acgaggttgg ggccctgggc 1260
ctgcagcagg gcaaaagccc aggggcggga aaccctgagc ctgagcagga ctgtgcagcc 1320
agggctccgg tgagagctga agcagtaagg aggatgcccc caggcgccga ggctggcagc 1380
gtggttctgg atgacagtcc ggccccacca gctccttttg aacaccgggt agtgagcgtc 1440
aaggagacct ccatctctgc gggttacgag gtgtgccagc acgaagtctt gggaggggggt 1500
cggtttggcc aggtccacag gtgcacagag aagtccacag gcctcccact ggctgccaag 1560
atcatcaaag tgaagagcgc caaggaccgg gaggacgtga agaacgagat caacatcatg 1620
aaccagctca gccacgtgaa cctgatccag ctctatgacg ccttcgagag caagcacagc 1680
tgcacccttg tcatggagta cgtggacggg ggtgagctct tcgaccggat cacagatgag 1740
aagtaccacc tgactgagct ggatgtggtc ctgttcacca ggcagatctg tgagggtgtg 1800
cattacctgc accagcacta catcctgcac ctggacctca agccggagaa catattgtgc 1860
gtcaatcaga caggacatca aattaagatc attgactttg ggctggccag aaggtacaag 1920
cctcgagaga agctgaaggt gaacttcggc actcctgagt tcctggcccc agaagtcgtc 1980
aattatgagt ttgtctcatt ccccacagac atgtggagtg tgggagtcat cacctacatg 2040
ctactcagtg gcttgtcccc atttctaggg gaaacagatg cagagaccat gaatttcatt 2100
gtaaactgta gctgggattt tgatgctgac acctttgaag ggctctcgga ggaggccaag 2160
gactttgttt cccggttgct ggtcaaagag aagagctgca gaatgagtgc cacacagtgc 2220
ctgaaacacg agtggctgaa taatttgcct gccaaagctt caagatccaa aactcgtctc 2280
aaatcccaac tactgctgca gaaatacata gctcaaagaa aatggaagaa acatttctat 2340
gtggtgactg ctgccaacag gttaaggaaa tttccaactt ctccc 2385

<210> 6
<211> 2358
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 6

atgtcaggag tttcagagga ggatccagag ggtctgggcc cccagggtct gccagcgttg 60
ggcggagcct gcttagtcac cgtggacaaa aaacttaatg tgctgactga gaaggtcgac 120
agactcttgc atttccaaga agatgtcaca gagaagctac agtgtgtgtg ccaaggcatg 180
gatcacctgg aacaaggtct gcatcggctg gaggcctccc aggagttggg tctggcaggg 240
cccggcagca cttccccagc cgctgctcag gccgcatggc ctgaggtcct ggagctggtg 300
agggccgtgc ggcaggaggg tgcccagcac ggtgccaggc tcgaagccct cttcaagatg 360
gtggtggctg tggacagggc tattactttg gtagggtcca caatccagaa ctccaaagtg 420
gatgatttca tcctgcaagg gaccgtgccc tggaggaaag gcagtctggc tgatggccct 480
gaggagaaca aggagcaagc agaagtggct ggagtgaagc caaagcatgt gctgaataca 540

ggaagtgtgc aagctgccac ttctagggcg ctgtgggaag agagccagaa gcaggacaca 600
cccgtgggga cagtggaggg gctgcctctc atcatcgata cgtcactgaa gggagctgac 660
ctcacccagg ctggagcctc actgaggcag ggagttgaag ctcttgaccc aggccaagaa 720
cccccacccg cagaggcaga atccaggctt cctgcactag ccagcgagga cactgggacc 780
accctggaat tgtctgtagc aattgacaga atcagtgagg tcctcactag cctcaggatg 840
tcccaaagtg ctggcgaagg aacctcatcc agcaagcctg actgttcaga gcctggccct 900
cagcccctag ggccactaac tacagacagt gacattcaca gtgatgaagg acttcccagg 960
atctctgtcc gtatgcgaga gatgactact cctgaggagc tgtttgagac ccaaggtggc 1020
agccccattg gctcggcaga agctccaggc cctggaactg tgttagaaga ccagatccct 1080
aaaggagcca gaccatttcc acccctgcca aagaggagct gcaacaatgg tggcgcgagt 1140
gcagaggagg caacagggcc tggggctgag cccatcagag gaccaagctt ggtcacaagg 1200
gactggagag atgaacctgt tgggaccaca gacctgcagc aaggcagaga cccaggagcg 1260
gtgagccctg aacctgggaa ggaccatgca gcccagggcc cagggagaac cgaagctgga 1320
aggagggtgt cttctgctgc agaggctgcc atcgtagttc tagatgacag cgcagcaccc 1380
ccagcccctt ttgaacaccg ggtagtgagc atcaaagaca ccctcatctc gacaagttac 1440
acagtgtccc aacacgaagt cttgggaggg ggccggtttg gccaggtgca caggtgtaca 1500
gagcggtcca caggccttgc actggcagcc aagatcatca aagtgaagaa cataaaggac 1560
cgggaggatg tgaagaatga gatcaacatc atgaaccagc tcagccacgt aaacttgatc 1620
caactttatg atgcttttga gagcaagaac agcttcaccc tgatcatgga gtatgtggat 1680
ggaggtgaac tcttcgaccg gatcacggat gagaagtacc acctgaccga gctggatgtg 1740
gtcttgttca caaggcagat ctgtgagggt gtgcattacc tgcaccagca ctacattctg 1800
cacctggacc tcaagccaga gaacatactg tgtgtcagcc agactgggca tcaaattaag 1860
attattgact ttgggctggc tagaagatat aaacctcggg agaagctaaa ggttaacttt 1920
ggtactccag agttcctggc tccagaagtt gttaactatg agtttgtctc attcccaaca 1980
gacatgtgga gtgtgggagt tatcacctac atgctactca gtggtttgtc cccatttcta 2040
ggggaaacag atgcagagac catgaatttt attgtgaact gcagctggga tttcgatgct 2100
gataccttca aagggctgtc agaggaagcc aaggactttg tttcacggtt gctggtcaaa 2160
gagaagagtt gtaggatgag cgccacacag tgcctgaaac atgagtggtt aaatcacctg 2220
attgccaaag cctcaggctc caacgttcgc ctcagatccc aactactgct gcagaaatat 2280
atggctcagc gtaaatggaa gaaacatttc catgtggtga ctgcagtcaa caggctaaga 2340
aaatttccaa cgtgtccc 2358

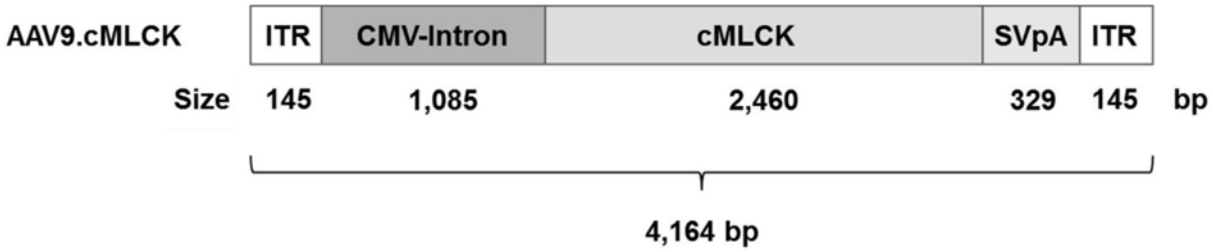

AAV9.cMLCK
ITR
CMV-Intron
cMLCK
SVpA
ITR
Size
145
1,085
2,460
329
145
bp
4,164 bp

图1

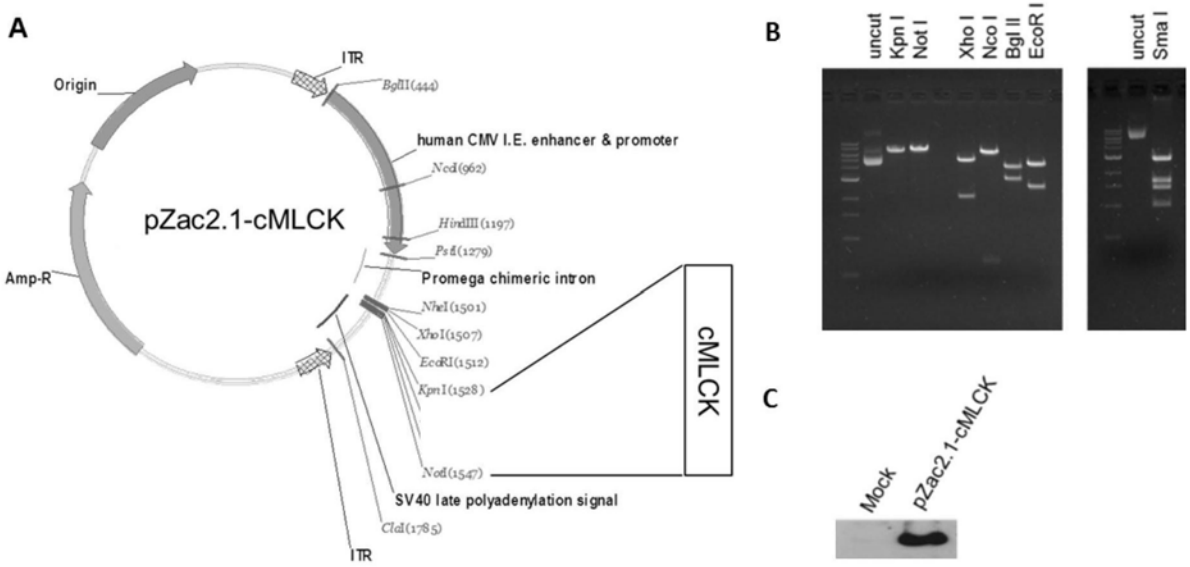

A
Origin
ITR
BglII(444)
human CMV I.E. enhancer & promoter
NcoI(962)
pZac2.1-cMLCK
HindIII(1197)
PstI(1279)
Amp-R
Promega chimeric intron
NheI(1501)
XhoI(1507)
EcoRI(1512)
KpnI(1528)
cMLCK
NotI(1547)
SV40 late polyadenylation signal
ClaI(1785)
ITR
B
uncut
Kpn I
Not I
Xho I
Nco I
Bgl II
EcoR I
uncut
Sma I
C
Mock
pZac2.1-cMLCK

图2

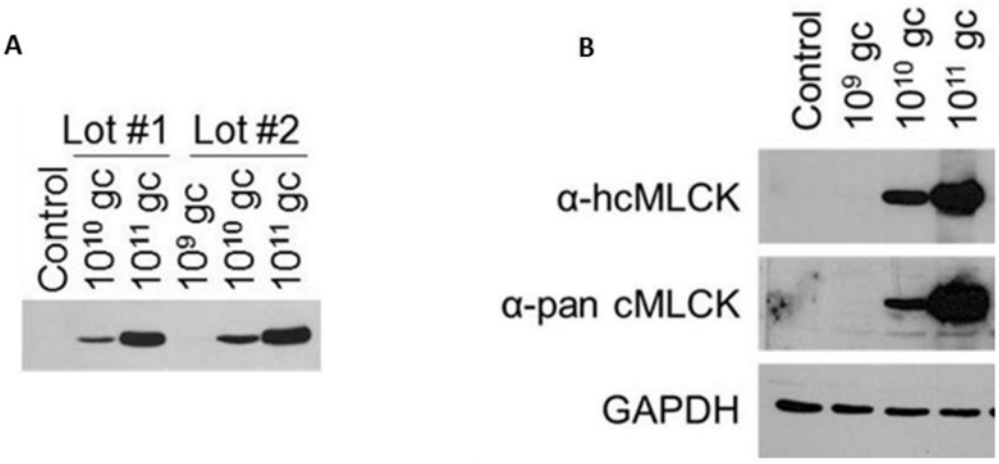

A
Lot #1
Lot #2
Control
10¹⁰ gc
10¹¹ gc
10⁹ gc
10¹⁰ gc
10¹¹ gc
B
Control
10⁹ gc
10¹⁰ gc
10¹¹ gc
α-hcMLCK
α-pan cMLCK
GAPDH

图3

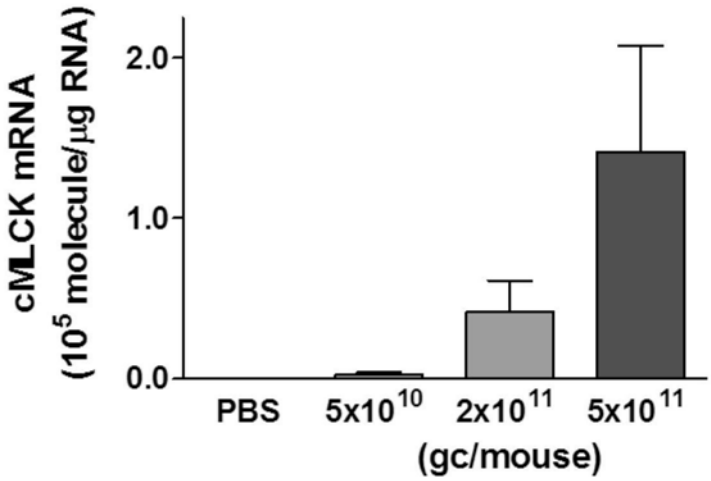

cMLCK mRNA
(10^5 molecule/μg RNA)
2.0
1.0
0.0
PBS
5x10^10
2x10^11
5x10^11
(gc/mouse)

图4

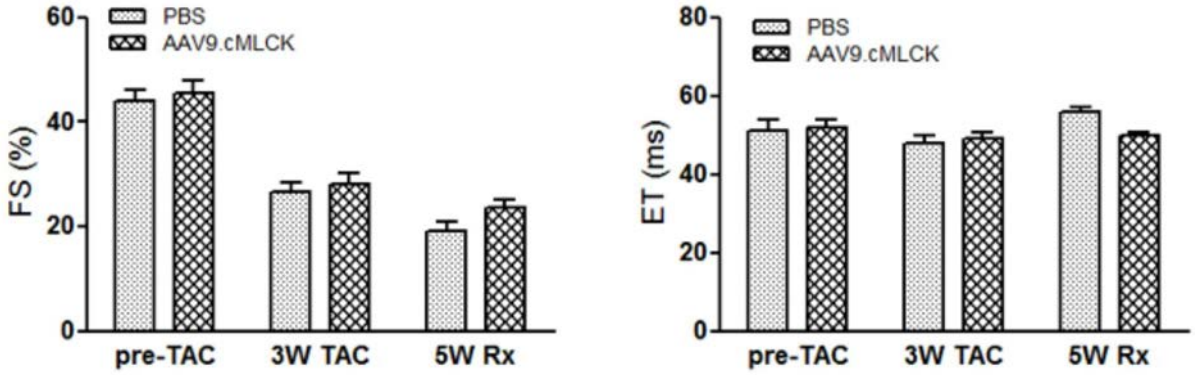

FS (%)
60
40
20
0
PBS
AAV9.cMLCK
pre-TAC
3W TAC
5W Rx
ET (ms)
80
60
40
20
0
PBS
AAV9.cMLCK
pre-TAC
3W TAC
5W Rx

图5

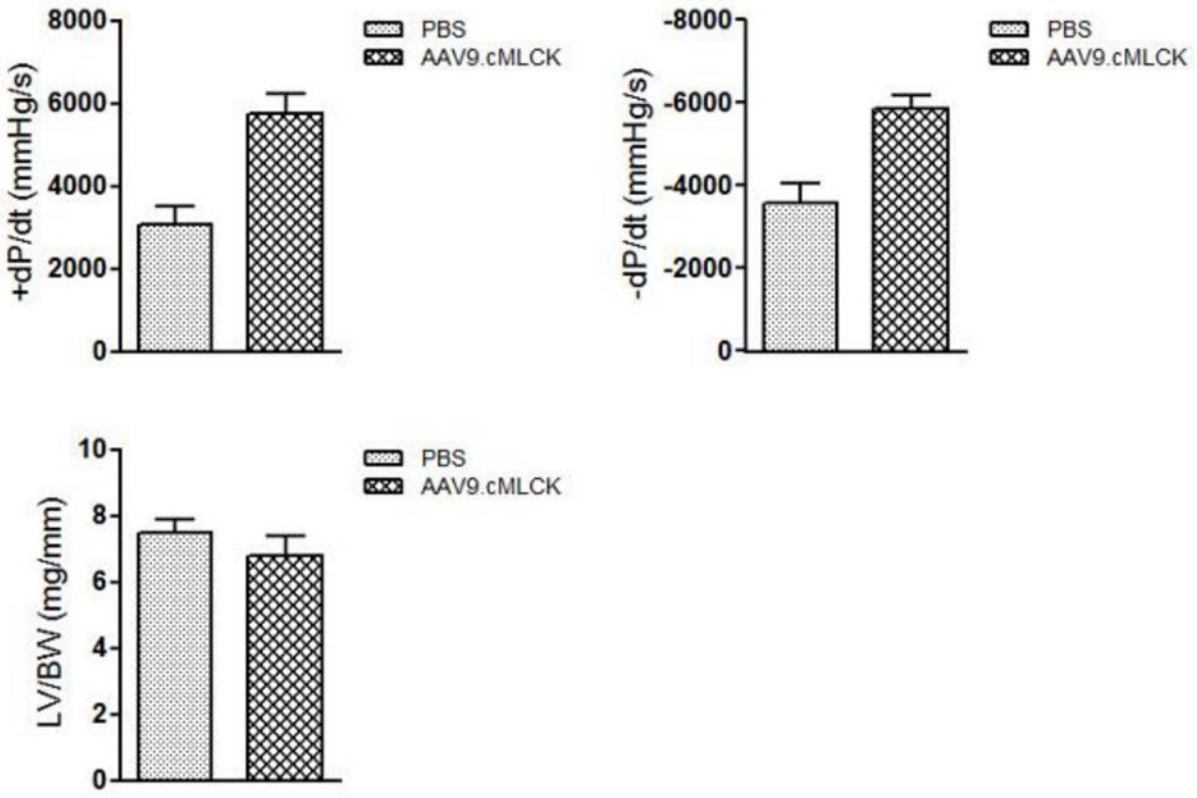

8000
6000
4000
2000
0
+dP/dt (mmHg/s)
PBS
AAV9.cMLCK
-8000
-6000
-4000
-2000
0
-dP/dt (mmHg/s)
PBS
AAV9.cMLCK
10
8
6
4
2
0
LV/BW (mg/mm)
PBS
AAV9.cMLCK

图6