



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103338784 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 02

(21) 申请号 201180057562. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 11. 22

A61K 38/17(2006. 01)

A61P 3/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

PA201070520 2010. 11. 30 DK

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 05. 30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/DK2011/050444 2011. 11. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02012/072082 EN 2012. 06. 07

(71) 申请人 奥菲泽米有限公司

地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 托马斯·基尔克高·延森

安德斯·默克贝里·欣斯贝

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限

公司 72003

代理人 任晓华 吴小瑛

权利要求书6页 说明书59页

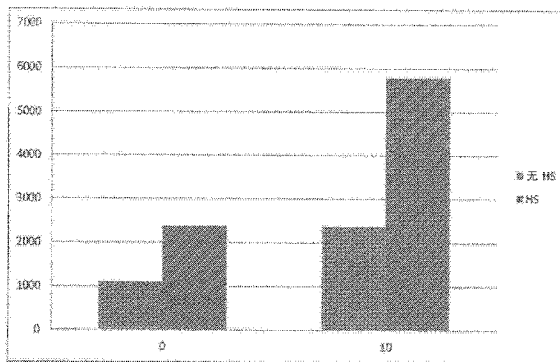
序列表9页 附图19页

(54) 发明名称

用于增加 Hsp70 细胞内活性的方法

(57) 摘要

本发明涉及能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗源于酶缺陷的溶酶体贮积病,所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在不直接相关;所述溶酶体贮积病例如糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酸葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。



1. 一种能够提高 Hsp70 的细胞内浓度和 / 或 Hsp70 活性的生物活性剂,其用于治疗选自以下组成的组的疾病:糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

2. 一种能够提高 Hsp70 的细胞内浓度和 / 或 Hsp70 活性的生物活性剂,其用于治疗溶酶体贮积症,其中所述溶酶体贮积症源于其活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在不直接相关的酶的缺陷。

3. 如权利要求 2 所述的生物活性剂,其中,所述溶酶体贮积症不选自尼曼 - 皮克病、法伯氏病、克拉伯病、I 型唾液酸沉积症、异染性脑白质营养不良、戈谢病、法布里病和鞘脂激活蛋白缺乏病。

4. 根据前述权利要求任一项的生物活性剂,其中所述生物活性剂选自 Hsp70、或其功能片段或变体、阿莫氯醇和艾沙那定。

5. 如权利要求 4 所述的生物活性剂,其中,所述 Hsp70、或其功能片段或变体是人 Hsp70,或其功能片段或变体。

6. 如权利要求 4 或 5 任一项所述的生物活性剂,其中,所述 Hsp70、或其功能片段或变体与人野生型 Hsp70 至少 60% 相同,优选至少 70% 相同,优选至少 75% 相同,优选至少 80% 相同,优选至少 85% 相同,优选至少 90% 相同,优选至少 91% 相同,优选至少 92% 相同,优选至少 93% 相同,优选至少 94% 相同,优选至少 95% 相同,优选至少 96% 相同,优选至少 97% 相同,优选至少 98% 相同,优选至少 99% 相同,优选至少 99.5% 相同,优选至少 99.9% 相同。

7. 如权利要求 5 或 6 所述的生物活性剂,其中,所述野生型 Hsp70 具有选自 SEQ ID NO:1 和 3 组成的组的序列。

8. 如前述权利要求任一项所述的生物活性剂,其中所述生物活性剂选自包含全长 Hsp70 的 Hsp70 ;以及 Hsp70 的功能片段或变体。

9. 如前述权利要求任一项所述的生物活性剂,其中,所述 Hsp70 的功能片段或变体的全长小于 641 个氨基酸,如小于 625 个氨基酸,例如小于 600 个氨基酸,如小于 575 个氨基酸,例如小于 550 个氨基酸,如小于 525 个氨基酸,例如小于 500 个氨基酸,如小于 475 个氨基酸,例如小于 450 个氨基酸,如小于 425 个氨基酸,例如小于 400 个氨基酸,如小于 375 个氨基酸,例如小于 350 个氨基酸,如小于 325 个氨基酸,例如小于 300 个氨基酸,如小于 275 个氨基酸,例如小于 250 个氨基酸,如小于 225 个氨基酸,例如小于 200 个氨基酸,如小于 175 个氨基酸,例如小于 150 个氨基酸,如小于 125 个氨基酸,例如小于 100 个氨基酸,如小于 75 个氨基酸,例如小于 50 个氨基酸,如小于 25 个氨基酸。

10. 如前述权利要求任一项所述的生物活性剂,其中,所述 Hsp70 的功能片段或变体的全长大于 10 个氨基酸,如大于 25 个氨基酸,例如大于 50 个氨基酸,如大于 75 个氨基酸,例如大于 100 个氨基酸,如大于 125 个氨基酸,例如大于 150 个氨基酸,如大于 175 个氨基酸,例如大于 200 个氨基酸,如大于 225 个氨基酸,例如大于 250 个氨基酸,如大于 275 个氨基酸,例如大于 300 个氨基酸,如大于 325 个氨基酸,例如大于 350 个氨基酸,如大于 375 个氨基酸,例如大于 400 个氨基酸,如大于 425 个氨基酸,例如大于 450 个氨基酸,如大于 475 个氨基酸,例如大于 500 个氨基酸,如大于 525 个氨基酸,例如大于 550 个氨基酸,如大于 575

个氨基酸,例如大于 600 个氨基酸,如大于 625 个氨基酸。

11. 如前述权利要求任一项所述的生物活性剂,其中,所述 Hsp70 的功能片段或变体具有的氨基酸取代为 Hsp70 的 0.1-1% 的氨基酸残基,如 1-2% 的氨基酸残基,例如 2-3% 的氨基酸残基,如 3-4% 的氨基酸残基,例如 4-5% 的氨基酸残基,如 5-10% 的氨基酸残基,例如 10-15% 的氨基酸残基,如 15-20% 的氨基酸残基,例如 20-30% 的氨基酸残基,如 30-40% 的氨基酸残基,例如 40-50% 的氨基酸残基,如 50-60% 的氨基酸残基,例如 60-70% 的氨基酸残基,如 70-80% 的氨基酸残基,例如 80-90% 的氨基酸残基,如 90-100% 的氨基酸残基。

12. 如前述权利要求任一项所述的生物活性剂,其中,所述 Hsp70 的功能片段或变体的全长为 5-25 个氨基酸,如 25-50 个氨基酸,例如 50-75 个氨基酸,如 75-100 个氨基酸,例如 100-125 个氨基酸,如 125-150 个氨基酸,例如 150-175 个氨基酸,如 175-200 个氨基酸,例如 200-225 个氨基酸,如 225-250 个氨基酸,例如 250-275 个氨基酸,如 275-300 个氨基酸,例如 300-325 个氨基酸,如 325-350 个氨基酸,例如 350-375 个氨基酸,如 375-400 个氨基酸,例如 400-425 个氨基酸,如 425-450 个氨基酸,例如 450-475 个氨基酸,如 475-500 个氨基酸,例如 500-525 个氨基酸,如 525-550 个氨基酸,例如 550-575 个氨基酸,如 575-600 个氨基酸,例如 600-625 个氨基酸,如 625-640 个氨基酸。

13. 如前述权利要求任一项所述的生物活性剂,其中,所述 Hsp70 的功能片段或变体包含 Hsp70 的 ATPase 结构域的全部或部分。

14. 如前述权利要求任一项所述的生物活性剂,其中,所述 Hsp70 的功能片段或变体在 Hsp70 ATPase 结构域的第 90 位氨基酸位置包含色氨酸。

15. 如前述权利要求任一项所述的生物活性剂,其中,所述 Hsp70 或其功能片段或变体为重组 Hsp70 (rHsp70)。

16. 如前述权利要求任一项所述的生物活性剂,其中,所述 Hsp70 源自哺乳动物,所述哺乳动物选自人 (homo sapiens)、小鼠 (mus musculus)、牛、狗、大鼠、鼬、猪、绵羊和猴。

17. 如权利要求 1 或 2 任一项所述的生物活性剂,其中,所述生物活性剂是 Hsp70 诱导物或辅诱导物。

18. 如权利要求 1 或 2 任一项所述的生物活性剂,其中,所述生物活性剂是 Hsp70 诱导物。

19. 如权利要求 1 或 2 任一项所述的生物活性剂,其中,所述生物活性剂是 Hsp70 辅诱导物。

20. 如权利要求 19 所述的生物活性剂,其中,所述 Hsp70 辅诱导物是羟胺衍生物。

21. 如权利要求 20 所述的生物活性剂,其中,所述羟胺衍生物选自氯吡哌醇 (BRLP-42)、阿莫氯醇 (BRX-220)、BRX-345 和 BGP-15。

22. 如权利要求 20 所述的生物活性剂,其中,所述羟胺衍生物是阿莫氯醇 (BRX-220)。

23. 如权利要求 17 所述的生物活性剂,其中,所述生物活性剂是艾沙那定 (5-(哌啶-1-基甲基)-3-吡啶 3-基-5,6-二氢-2H-1,2,4-噁二嗪)。

24. 如权利要求 18 所述的生物活性剂,其中 Hsp70 诱导物是膜流化剂。

25. 如权利要求 24 所述的生物活性剂,其中,所述膜流化剂选自苯甲醇、庚醇、AL721、二十二碳六烯酸、脂肪醇、油醇、二甲基氨基乙醇、A2C、法尼醇、利多卡因、罗哌卡因、布比卡因和马比佛卡因。

26. 如权利要求 17 所述的生物活性剂,其中,所述 Hsp70 诱导物或辅诱导物选自:依地福新(ET-18-OCH₃ 或 1-十八烷基-2-甲基-rac-甘油-3-磷酸胆碱)、塞来昔布、罗非昔布、乙酰水杨酸、水杨酸钠、吡哌美辛、PGA1、PGj2、2-环戊烯-1-酮、过氧化物酶增殖物激活型受体 γ -激动剂、长春新碱、紫杉醇、吡格列酮、卡铂、多柔比星、氟达拉滨、异环磷酰胺、阿糖胞苷、格尔德霉素、17-AAG、17-DMAG、根赤壳菌素、除莠霉素-A、花生四烯酸、MG132、乳胞素、DCIC、TLCK、TPCK、替普瑞酮(GGA)、瑞巴匹特、甘珀酸、聚普瑞锌(L-肌肽锌)、地塞米松、可卡因、烟碱、醇、 α -肾上腺素激动剂、环戊烯酮前列腺素、芍药苷、甘草甜素、雷公藤红素、二氢雷公藤红素、二氢雷公藤红素二乙酸酯和姜黄素。

27. 如权利要求 1 或 2 任一项所述的生物活性剂,其中,所述生物活性剂是亚致死热疗。

28. 如权利要求 27 所述的生物活性剂,其中,所述亚致死热疗包括提高个体的温度至约 38°C 的核心温度,如约 39°C,例如约 40°C,如约 41°C,例如约 42°C,如约 43°C 的核心温度。

29. 如权利要求 1 或 2 任一项所述的生物活性剂,其中,所述生物活性剂包括 Hsp70 或其功能片段或变体和 Hsp70 诱导物或辅诱导物的组合。

30. 如权利要求 1 或 2 任一项所述的生物活性剂,其中,所述治疗为预防、治愈或改善。

31. 如权利要求 1 或 2 任一项所述的生物活性剂,其中,所述生物活性剂经肠胃外施用于有此需要的个体。

32. 如权利要求 31 所述的生物活性剂,其中,所述肠胃外施用是静脉内、皮下、肌内、动脉内、皮下或腹膜内注射。

33. 如权利要求 31 所述的生物活性剂,其中,所述肠胃外施用是静脉内输注。

34. 如权利要求 33 所述的生物活性剂,其中,所述静脉内输注进行的时间为 10 分钟-20 分钟,如 20-30 分钟,例如 30-40 分钟,如 40-50 分钟,例如 50-60 分钟,如 60-90 分钟,例如 90-120 分钟,如 2 小时-3 小时,例如 3-4 小时,如 4-5 小时,例如 5-6 小时,如 6-7 小时,例如 7-8 小时。

35. 如权利要求 31 所述的生物活性剂,其中,所述肠胃外施用是经粘膜递送。

36. 如权利要求 35 所述的生物活性剂,其中,所述经粘膜递送是舌下递送。

37. 如权利要求 35 所述的生物活性剂,其中,所述经粘膜递送是口含递送。

38. 如权利要求 35 所述的生物活性剂,其中,所述经粘膜递送是吹入递送。

39. 如权利要求 35 所述的生物活性剂,其中,所述经粘膜递送是鼻内递送。

40. 用于治疗选自以下组成的组的疾病的方法:糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑髓性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病,其包括向有此需要的个体施用根据权利要求 1-39 任一项的生物活性剂。

41. 用于治疗由酶缺陷引起的溶酶体贮积症的方法,其中,所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在不直接相关,所述方法包括向有此需要的个体施用根据权利要求 1-39 任一项的生物活性剂。

42. 如权利要求 41 所述的方法,其中,所述溶酶体贮积症不选自尼曼-皮克病、法伯氏病、克拉伯病、I 型唾液酸沉积症、异染性脑白质营养不良、戈谢病、法布里病和鞘脂激活蛋

白缺乏病。

43. 如权利要求 41 或 42 任一项的方法,其中,所述治疗为预防、治愈和 / 或改善。

44. 如权利要求 41 或 42 任一项所述的方法,其中,相对于对照,所述治疗延长了所述个体的预期寿命。

45. 如权利要求 44 所述的方法,其中,所述预期寿命延长了 6 个月-1 年,如 1 年-2 年,例如 2-3 年,如 3-4 年,例如 4-5 年,如 5-6 年,例如 6-7 年,如 7-8 年,例如 8-9 年,如 9-10 年,例如 10-12 年,如 12-14 年,例如 14-16 年,如 16-18 年,例如 18-20 年,如 20-25 年,例如 25-30 年,如 30-40 年,例如 40-50 年,如 50-60 年,例如 60-70 年,如 70-80 年,例如 80-90 年,如 90-100 年。

46. 如权利要求 44 或 41 任一项所述的方法,其中,所述生物活性剂被配制为药物组合物。

47. 如权利要求 1 或 2 任一项所述的生物活性剂,或如权利要求 40 或 41 任一项所述的方法,其中所述疾病选自心脏糖原贮积病、安德森病、科里病(或福布斯氏病)、赫斯氏症、麦卡德尔氏病、庞贝氏症、塔瑞氏病(Tauri disease 或 Tarui disease)和冯吉尔克氏病组成的组。

48. 如权利要求 1 或 2 任一项所述的生物活性剂,或如权利要求 40 或 41 任一项所述的方法,其中所述疾病选自以下组成的组:桑德霍夫病(或 II 型 GM2 神经节苷脂贮积病)、典型婴儿型桑德霍夫病、青少年型桑德霍夫病、成人 / 晚发型桑德霍夫病、泰伊-萨克斯二氏病(或 I 型 GM2 神经节苷脂贮积病)、婴儿型泰伊-萨克斯二氏病、青少年型泰伊-萨克斯二氏病、成人 / 晚发型泰伊-萨克斯二氏病、AB 变异型 GM2-神经节苷脂贮积病、GM1 神经节苷脂贮积病、早发性婴儿型 GM1 神经节苷脂贮积病、迟发性婴儿型 GM1 神经节苷脂贮积病、成人型 GM1 神经节苷脂贮积病、GM3 神经节苷脂贮积病和 IV 型粘多糖贮积症。

49. 如权利要求 1 或 2 任一项所述的生物活性剂,或如权利要求 40 或 41 任一项所述的方法,其中所述疾病选自贝敦氏症(或斯皮尔梅伊尔·沃格特病)、比-扬病、库夫斯病和桑-哈病组成的组。

50. 如权利要求 1 或 2 任一项所述的生物活性剂,或如权利要求 40 或 41 任一项所述的方法,其中所述疾病选自脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病组成的组。

51. 如权利要求 1 或 2 任一项所述的生物活性剂,或如权利要求 40 或 41 任一项所述的方法,其中所述疾病选自以下组成的组:I 型粘多糖贮积症、II 型粘多糖贮积症、III 型粘多糖贮积症、IV 型粘多糖贮积症、VI 型粘多糖贮积症、VII 型粘多糖贮积症、VIII 型粘多糖贮积症和 IX 型粘多糖贮积症。

52. 如权利要求 1 或 2 任一项所述的生物活性剂,或如权利要求 40 或 41 任一项所述的方法,其中所述疾病选自以下组成的组:贺勒氏症、贺勒氏-施艾氏症、施艾氏症、亨特氏综合征、迪·费兰特综合征、马-拉氏综合征(轻微或严重)、莫基奥综合征(典型或莫奎样)和沙费利波综合征(A、B、C 或 D 型)。

53. 如权利要求 1 或 2 任一项所述的生物活性剂,或如权利要求 40 或 41 任一项所述的方法,其中所述疾病选自粘多糖贮积症 II(I-细胞疾病)和粘多糖贮积症 III(假胡尔勒氏多种营养不良)组成的组。

54. 如权利要求 1 或 2 任一项所述的生物活性剂,或如权利要求 40 或 41 任一项所述的

方法,其中所述疾病选自天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病、 α -甘露糖贮积病、I型 α -甘露糖贮积病、II型 α -甘露糖贮积病、 β -甘露糖贮积病和II型唾液酸贮积病(粘多糖贮积症I)组成的组。

55. 如权利要求1或2任一项所述的生物活性剂,或如权利要求40或41任一项所述的方法,其中所述疾病涉及酶缺陷。

56. 如权利要求1或2任一项所述的生物活性剂,或如权利要求40或41任一项所述的方法,其中所述疾病涉及酶翻译后修饰的缺陷。

57. 如权利要求1或2任一项所述的生物活性剂,或如权利要求40或41任一项所述的方法,其中所述疾病涉及非酶蛋白的缺陷。

58. 如权利要求1或2任一项所述的生物活性剂,或如权利要求40或41任一项所述的方法,其中所述疾病涉及膜运输蛋白的缺陷。

59. 如权利要求1或2任一项所述的生物活性剂,或如权利要求40或41任一项所述的方法,其中所述疾病涉及酶保护性蛋白的缺陷。

60. 如权利要求1或2任一项所述的生物活性剂,或如权利要求40或41任一项所述的方法,其中所述疾病涉及跨膜蛋白的缺陷。

61. 如权利要求1或2任一项所述的生物活性剂,或如权利要求40或41任一项所述的方法,其中所述疾病涉及非跨膜蛋白的缺陷。

62. 用于治疗选自以下组成的组的疾病的方法:糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑髓性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和II型唾液酸贮积病,其包括施用权利要求1至39任一项的生物活性剂和至少一种其它治疗形式的组合。

63. 用于治疗溶酶体贮积症的方法,其中所述溶酶体贮积症源于酶缺陷,所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体BMP的存在不直接相关,其包括施用权利要求1至39任一项的生物活性剂和至少一种其它治疗形式的组合。

64. 如权利要求63所述的方法,其中所述溶酶体贮积症不选自尼曼-皮克病、法伯氏病、克拉伯病、I型唾液酸沉积症、异染性脑白质营养不良、戈谢病、法布里病和鞘脂激活蛋白缺乏病。

65. 如权利要求62或63任一项所述的方法,其中,所述至少一种其它治疗形式同时或序贯施用。

66. 如权利要求62或63任一项所述的方法,其中,所述至少一种其它治疗形式是酶替代疗法(ERT)。

67. 如权利要求62或63任一项所述的方法,其中,所述至少一种其它治疗形式是止痛物品。

68. 如权利要求62或63任一项所述的方法,其中,所述至少一种其它治疗形式是皮质类固醇。

69. 如权利要求62或63任一项所述的方法,其中,所述至少一种其它治疗形式是移植。

70. 权利要求62或63任一项所述的方法,其中,所述移植选自骨髓移植、脐带血移植和干细胞移植。

71. 如权利要求 62 或 63 任一项所述的方法,其中,所述至少一种其它治疗形式是底物减少疗法。

72. 如权利要求 62 或 63 任一项所述的方法,其中,所述至少一种其它治疗形式是对症治疗和支持疗法,如物理疗法。

73. 用于增强 Hsp70 的细胞内浓度和 / 或活性的方法,所述方法包括想细胞施用治疗有效量的阿莫氯醇和 / 或艾沙那定。

74. 用于增强 Hsp70 的细胞内浓度和 / 或活性的体外方法,所述方法包括想细胞施用治疗有效量的阿莫氯醇和 / 或艾沙那定。

用于增加 Hsp70 细胞内活性的方法

[0001] 本申请为要求 2010 年 11 月 30 日提交的丹麦专利申请 PA201070520 的优先权的 PCT 申请。在本申请中引用的所有专利文献和非专利文献通过引用整体并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及能够增加 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,其用于治疗源于酶缺陷的溶酶体贮积病,所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在不直接相关;所述溶酶体贮积病例如糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症 (neuronal ceroid lipofuscinoses)、脑腱性胆固醇贮积病 (cerebrotendinous cholesterosis)、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

背景技术

[0003] 分子伴侣见于发生蛋白构象重排的细胞的所有区室中,虽然蛋白合成是细胞内不折叠肽的主要来源,但当面临高温或可能使蛋白结构易变并由此易于不折叠和集聚的其它刺激物的冲击时,细胞利用包括产生保护蛋白在内的特定细胞反应进行应对。这种反应是可以在从原核生物至真核生物的各种细胞类型中观察到的现象,被称为热休克反应或热应激反应。由这种反应诱导的蛋白被称为热休克蛋白 (HSP),其具有几个家族。

[0004] 伴侣分子家族的主要实例是 Hsp70 蛋白。除了作为伴侣分子外,最近还发现该家族参与细胞稳态的其它方面——最明显地通过其抗凋亡性质,其在免疫中的功能以及癌细胞对 Hsp70 上调的明显依赖性。此外,Hsp70 还可以在保护溶酶体完整性方面发挥作用。

[0005] 溶酶体贮积病是一类罕见疾病,特征是物质在溶酶体区室中集聚并引起溶酶体区室不稳定,由此对受影响的个体具有破坏性作用。由于物质代谢中涉及的酶缺陷而使该物质在溶酶体区室中集聚。迄今为止,对于多数溶酶体贮积病还没有可用的治疗方法。针对这些疾病的亚组采用,已通过向患者提供缺陷酶的重组酶的酶替代疗法 (ERT)。然而,ERT 是一种费用非常昂贵的治疗形式,这可能限制了其在某些领域的应用,并且 ERT 还仅对已经产生重组酶的特定类型的疾病有效。

[0006] 国际专利申请 WO 2009/155936 旨在提供用于治疗溶酶体贮积病的新方法,其通过利用 Hsp70 与溶酶体磷脂二(单酰基甘油)磷酸酯 (BMP) 之间新确定的相互作用来促进溶酶体稳定。该相互作用显示逆转源于酶缺陷的溶酶体贮积病理,所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在相关;例如尼曼 - 匹克病和法伯氏病。

[0007] 本发明人现已惊奇地发现 HSP70 在逆转源于酶缺陷的溶酶体贮积病理中也是有益的,所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在不直接相关;例如糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0008] 发明概述

[0009] 由文献已知 Hsp70 可以在保护溶酶体完整性中发挥作用,然而其分子机制仍不清楚。在本发明中,进一步检测了 Hsp70 促进溶酶体膜稳定性的分子基础,并涉及其逆转溶酶体贮积病理的效果;具体而言,当所述溶酶体贮积病不是源于其活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在相关的酶的缺陷。

[0010] 本发明提供了通过提供 Hsp70 或其功能片段或变体,或者通过提供 Hsp70 诱导物或辅诱导物 (co-inducer) 而直接或间接提高有此需要的个体中 Hsp70 的细胞内浓度和/或活性来治疗溶酶体贮积病的方法。

[0011] 一方面,本发明涉及能够提高 Hsp70 细胞内浓度和/或活性的生物活性剂,其用于治疗溶酶体贮积病,所述溶酶体贮积病不源于其活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在相关的酶的缺陷。

[0012] 一方面,本发明涉及能够提高 Hsp70 的细胞内浓度和/或活性的生物活性剂,其用于治疗选自以下组成的组的疾病:糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0013] 另一方面,本发明提供能够提高 Hsp70 的细胞内浓度和/或活性的生物活性剂,其用于治疗溶酶体贮积病,其中所述溶酶体贮积病不选自尼曼-皮克病、法伯氏病、克拉伯病、唾液酸沉积症 I 型、异染性脑白质营养不良、戈谢病、法布里病和鞘脂激活蛋白缺乏病 (saposin-deficiency)。

[0014] 在一个实施方式中,所述生物活性剂为 Hsp70 或其功能片段或变体。在另一个实施方式中,所述生物活性剂为 Hsp70 诱导物或辅诱导物。

[0015] 另一方面,本发明提供了治疗溶酶体贮积病的方法,其包括向有此需要的个体施用本发明的生物活性剂。所述治疗为预防、治愈或改善性的。

[0016] 本发明还涉及提高化合物的摄取的方法,所述方法包括施用所述化合物和 Hsp70 或其功能片段或变体的步骤。在一个实施方式中,所述 Hsp70 或其功能片段或变体与所述化合物共价结合。在另一个实施方式中,所述 Hsp70 或其功能片段或变体与所述化合物非共价结合。

[0017] 本发明还涉及治疗溶酶体贮积病的方法,其包括与至少一种其他治疗方式联合施用根据本发明的生物活性剂。

[0018] 在本发明的一个实施方式中,在溶酶体贮积症的治疗中同时施用 Hsp70 和酶替代疗法。

[0019] 在另一个实施方式中,使用 Hsp70 促进酶替代疗法中酶的摄取,由此提高被相关细胞摄取的酶量。

[0020] 定义

[0021] 溶酶体贮积症 (LSD):所使用的术语“溶酶体贮积症”和“溶酶体贮积病”同义。

[0022] Hsp70 的功能片段:术语“Hsp70 的功能片段”解释为表示 Hsp70 的具有预期功能的任何片段。在一个实施方式中,功能片段是如本文所说明的能够逆转溶酶体贮积病理的片段。在另一个实施方式中,功能片段是能够引起自噬的片段。与提高物质的摄取有关时,

Hsp70 的功能片段是能够提高所述物质的摄取的片段。应该理解,所述功能片段的精确量化作用可能与全长分子的作用不同。在一些情况下,所述功能片段可能确实比全长分子更有效。此外,从片段的较小尺寸考虑,使用片段代替全长分子可能是有利的。

[0023] Hsp70 的功能变体:术语“Hsp70 的功能变体”解释为表示 Hsp70 的具有预期功能的任何变体。在一个实施方式中,功能片段是如本文所说明的能够逆转溶酶体贮积病理的片段。在另一个实施方式中,功能变体是能够引起自噬的片段。与提高物质的摄取有关时,Hsp70 的功能变体是能够提高所述物质的摄取的片段。应该理解,所述功能变体的精确量化作用可能与全长分子的作用不同。在一些情况下,所述功能变体可能确实比全长分子更有效。

[0024] “生物活性剂”(即在生物学上具有活性的物质/试剂)是提供可以通过体内或体外证明的某些药理学作用(通常为有益作用)的任何试剂、药物、化合物、物质组分或组合物。在本文中使用的该术语进一步包括在个体中产生局部或全身作用的任何生理学或药理学活性物质。生物活性剂的另外实例包括,但不限于包含寡糖或由寡糖组成的试剂,包含多糖或由多糖组成的试剂,包含任选糖基化的肽或由任选糖基化的肽组成的试剂,包含任选糖基化的多肽或由任选糖基化的多肽组成的试剂,包含核酸或由核酸组成的试剂,包含寡核苷酸或由寡核苷酸组成的试剂,包含多核苷酸或由多核苷酸组成的试剂,包含脂质或由脂质组成的试剂,包含脂肪酸或由脂肪酸组成的试剂,包含脂肪酸酯或由脂肪酸酯组成的试剂,以及包含次级代谢物或由次级代谢物组成的试剂。在个体(例如人和其它任何动物)的治疗中,生物活性剂可以用于预防疾病、治疗疾病。本文使用的生物活性剂是能够提高 Hsp70 的细胞内浓度和/或活性的物质。

[0025] 本文使用的术语“药”或“药物”包括作用于人或动物体局部或全身的在生物学上、生理学上或药学上具有活性的物质。

[0026] 本文使用的术语“治疗”和“疗法”等同地表示治愈性治疗、预防性治疗和改善性治疗或减轻性治疗。该术语包括用于获得可以在临床上建立的有益的或期望的生理学结果的方法。出于本发明的目的,有益的或预期的临床效果包括,但不限于缓解症状,减小疾病的程度,稳定(即不恶化)病况,延迟或减慢病况/症状的发展或恶化,改善或减轻病况或症状,以及不论可测与否的缓和(部分或完全)。本文使用的术语“减轻”及其变式表示,与不施用本发明组合物相比,生理病况或症状的程度和/或有害表现减少和/或发展时间减慢或延长。

[0027] 如果根据构成术语“治疗”和“疗法”的定义的标准测定,所治疗的病况有变化,则“治疗效果”或“疗效”是明显的。如果有至少 5% 的改善,优选 10% 的改善,更优选至少 25%,甚至更优选至少 50%,如至少 75%,最优选至少 100% 的改善,则所治疗的病况有“变化”。所述变化可基于所治疗个体病况的严重程度的改善,或者基于利用生物活性剂或生物活性剂和本发明的药物组合物治疗和不治疗的个体群病况改善频率的差异。

[0028] “生物活性剂”的“药理学上的有效量”、“药学上的有效量”或“生理学上的有效量”是在使用本发明所述药物组合物时,为在所治疗的个体血流中或作用部位(即肺、胃系统、结肠系统、前列腺等)提供预期水平的活性剂以产生预期的生理反应所需要的此组合物中存在的活性剂的量。准确的量将取决于多种因素,例如活性剂、组合物的活性、所采用的递送装置、组合物的物理特征、计划的患者用法(即每天施用的剂量数)和患者因素等,并且

可以由本领域技术人员根据本文提供的信息而容易地确定。可以在一次给药中,或者通过多次施用总和为有效量的量(优选在 24 小时的时间内)而施用“有效量”的生物活性剂。可以通过用于测定合适量和给药时间的标准临床方法确定有效量。应该理解,“有效量”可以是由医疗专家和/或个人确定的经验性和/或个性化(根据个案)结果。

[0029] 本文使用的术语“增强”和“提高”有益效果及其变式是指,与安慰剂相比生物活性剂的治疗效果,或者本发明的药物治疗的治疗效果高于通常利用不含本发明生物活性剂的药物组合物所获得的治疗效果的提高。作为施用生物活性剂的结果,当治疗效果的强度和/或程度得到促进和/或提高时,“治疗效果的提高”是明显的。“治疗效果的提高”还包括治疗益处的时间得到延长。它还可以表现为,与施用不含生物活性剂的较高量的药物组合物相比,当共同施用所述药物组合物和本发明提供的生物活性剂时获得相同益处和/或效果所需要的所述药物组合物的量较低。优选但不必需地,所述效果的增强引起对所述药物组合物单独不能有效治疗或者治疗效果较小的急性症状的治疗。与单独施用药物组合物相比,当本发明的生物活性剂与药物组合物共同施用治疗时治疗效果具有至少 5% 的提高,例如治疗效果具有至少 10% 的提高,则实现了增强(提高)。优选地,所述提高为至少 25%,更优选至少 50%,甚至更优选至少 75%,最优选至少 100%。

[0030] 本文使用的“共同施用”、“同时施用”或“一起施用”生物活性剂或者生物活性剂和现有药物是指,在一定时间内施用本发明的一种或多种生物活性剂,或者施用本发明的一种或多种生物活性剂和现有药物组合物。所述时间优选小于 72 小时,例如小于 48 小时,例如小于 24 小时,例如小于 12 小时,例如小于 6 小时,如小于 3 小时。然而,所述术语还表示可以一起(同时或基本上同时)施用所述生物活性剂和治疗性组合物。

[0031] 术语“个体”指脊椎动物,尤其是哺乳动物中的一种,优选包括人在内的灵长类。在优选的实施方式中,本文使用的个体为任意年龄的人,男性或女性。

[0032] “有此需要的个体”是指可以从本发明受益的个体。在一个实施方式中,所述有此需要的个体为患病个体,其中所述疾病为溶酶体贮积病。

[0033] 术语“天然核苷酸”或“核苷酸”是指在自然界中发现的任意四种脱氧核苷酸 dA、dG、dT 和 dC(DNA 的组分)和四种核苷酸 A、G、U 和 C(RNA 的组分)。各种天然的核苷酸包括糖部分(核糖或脱氧核糖)、磷酸部分和天然/标准的碱基部分或基本由上述部分组成。天然核苷酸根据熟知的碱基配对原则(Watson 和 Crick)与互补核苷酸结合,其中腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U)配对,鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)配对,其中相应的碱基对是互补且反向平行的核苷酸链的一部分。碱基配对引起预定的互补核苷酸之间的特异杂交。碱基配对是酶能够催化合成与模板寡核苷酸互补的寡核苷酸的基础。在这种合成中,结构单元(通常为 A、T、U、C 或 G 的核糖衍生物或脱氧核糖衍生物)的三磷酸酯在模板寡核苷酸的指导下形成具有正确的互补序列的互补寡核苷酸。互补序列对其寡核苷酸序列的识别由形成碱基对的相应相互作用碱基介导。实质上,导致碱基配对的具体相互作用由碱基的大小以及碱基的氢键供体和受体的模式控制。大的嘌呤碱基(A 或 G)与小的嘧啶碱基(T、U 或 C)配对。此外,碱基之间的碱基配对识别还受碱基之间形成的氢键的影响。在 Watson-Crick 碱基配对几何中,利用连接两个环原子的中间氢键和在任意一侧结合附加于各所述环的官能基团的氢键,利用与受体基团配对的供体基团,使六元环(天然寡核苷酸中的嘧啶)与由稠合六元环和五元环(天然寡核苷酸中的嘌呤)构成的环系统并列。

[0034] 本文使用的“核酸”或“核酸分子”是指多核苷酸,例如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA),寡核苷酸,通过聚合酶链式反应(PCR)产生的片段和通过连接、剪切、核酸内切酶作用和核酸外切酶作用中任何一种产生的片段。核酸分子可以由天然存在的核苷酸(例如DNA和RNA)或天然存在的核苷酸的类似物(例如天然存在的核苷酸的 α -对映体形式)或二者的组合的单体构成。修饰核苷酸可以在糖部分和/或嘧啶或嘌呤碱基部分具有变化。糖修饰包括,例如利用卤素、烷基基团、胺和叠氮基团取代一个或多个羟基基团,或者可以使糖官能化作醚或酯。此外,还可以用空间上和电子上相似的结构,例如氮杂-糖和碳环糖类似物取代完整的糖部分。碱基部分的修饰的实例包括烷基化嘌呤和嘧啶,酰化嘌呤或嘧啶或者其它熟知的杂环取代物。核酸单体可以通过磷酸二酯键或这些连接的类似物进行连接。磷酸二酯键连接的类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯(phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯(phosphorodiselenoate)、phosphoroaniloithioate、phosphoranilidate和氨基磷酸酯等。术语“核酸分子”也包括,例如包含连接至聚酰胺骨架上的天然存在的或修饰的核酸碱基的所谓的“肽核酸”。核酸可以为单链或双链。

[0035] 术语“核酸分子的互补物”是指与参考核苷酸序列相比具有互补核苷酸序列并且为反方向的核酸分子。例如,序列5' ATGCACGGG 3'与5' CCCGTGCAT 3'互补。

[0036] “分离的核酸分子”是指没有整合在生物体的基因组DNA中的核酸分子。例如,已经从细胞的基因组DNA分离的编码生长因子的DNA分子即为分离的DNA分子。分离的核酸分子的另一个实例是没有整合在生物体的基因组中的化学合成的核酸分子。已经从特定物种分离的核酸分子小于该物种的染色体的完整DNA分子。

[0037] “核酸分子构建体”是已经通过人为介入进行修饰从而包含以天然不存在的排列结合或并列的核酸片段的单链或双链核酸分子。

[0038] “线性DNA”是指具有游离5'和3'末端的非环状DNA分子。可以通过酶促降解或物理断裂由闭合的环状DNA分子(例如质粒)制备线性DNA。

[0039] “互补DNA(cDNA)”是反转录酶由mRNA模板形成的单链DNA分子。通常,采用与部分mRNA互补的引物起始反转录。本领域技术人员还使用术语“cDNA”表示由此类单链DNA分子及其互补DNA链组成的双链DNA分子。术语“cDNA”还表示由RNA模板合成的cDNA分子的克隆。

[0040] “异源DNA”是指在给定宿主细胞中天然不存在的DNA分子或DNA分子群。异源于具体宿主细胞的DNA分子可以包含源自所述宿主细胞的物种的DNA(内源DNA),只要宿主DNA与非宿主DNA(即异源DNA)结合。例如,可以将包含非宿主DNA片段的DNA分子认为是异源DNA分子,其中所述非宿主DNA片段编码可操作地与包含转录启动子的宿主DNA片段连接的多肽。相反,异源DNA分子可以包含可操作地与外源启动子相连的内源基因。作为另一个示例,如果DNA分子被引入到缺乏野生型基因的突变细胞内,则也可以将包含源自野生型细胞的所述基因的该DNA分子认为是异源DNA。

[0041] “多肽”是天然产生的或合成的氨基酸残基聚合物,优选其仅通过肽键相连。通过非宿主DNA分子表达产生的多肽为“异源”肽或多肽。本文使用的术语“多肽”涵盖了蛋白、肽和多肽,其中所述蛋白、肽或多肽可以已经经过翻译后修饰或可以不经过翻译后修饰。翻译后修饰可以为,例如磷酸化、甲基化和糖基化。

[0042] 术语“表达”是指基因或基因产物的生物合成。

[0043] “杂交”表示不同来源的核酸链的退火；即，在初始时没有配对的两条 DNA 链的互补区之间形成碱基对。根据 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Laboratory Press (1989), 1.101-1.104, 对术语“在严格条件下的杂交”进行定义。优选地，在严格条件下的杂交表示，利用 $1 \times \text{SSC}$ 和 $0.1\% \text{SDS}$ 在 50°C 、优选在 55°C 、更优选在 62°C 且最优选在 68°C 洗涤 1 小时后，尤其是在 $0.2 \times \text{SSC}$ 和 $0.1\% \text{SDS}$ 中在 50°C 、优选在 55°C 、更优选在 62°C 且最优选在 68°C 洗涤 1 小时后，观察到阳性杂交信号。

[0044] “完全同源”的延长 (stretch) 定义为配对核苷酸沿着相互作用的核苷酸的序列的匹配；例如在天然存在的 RNA 中，A 与 U 配对，G 与 C 配对。

[0045] “启动子”为指导结构基因转录的核苷酸序列。通常，启动子位于基因的 5' 非编码区，与结构基因的转录起始位点相邻近。在转录起始中发挥作用的启动子内的序列元件通常以共有核苷酸序列为特征。如果启动子为诱导型启动子，则在对诱导剂的应答中提高转录速率。相反，如果启动子为组成型启动子，则诱导剂不能调节转录速率。还已知有阻遏型启动子。

[0046] “调控元件”是调节启动子活性的核苷酸序列。例如，调控元件可以包含与能够排他地或优先地在特定细胞、组织或器官中进行转录的细胞因子结合的核苷酸序列。这些类型的调控元件通常与以“细胞特异性”、“组织特异性”或“器官特异性”的方式表达的基因结合。

[0047] “增强子”是一种类型的调控元件，其能够提高转录效率，而不论增强子相对于转录起始位点的距离或方向。

[0048] “克隆载体”为具有能够在宿主细胞中自主复制的能力的核酸分子，例如质粒、粘粒或细菌噬菌体。克隆载体通常包含一个或少数几个限制性内切酶识别位点，该位点允许以可确定的方式插入核酸分子，而不使载体丧失主要的生物功能；和编码标记基因的核苷酸序列，该序列适合用于转化有所述克隆载体的细胞的鉴别和筛选。标记基因通常包括提供四环素或氨苄青霉素抗性的基因。

[0049] “表达载体”是编码在宿主细胞中表达的基因的核酸分子。通常，表达载体包含转录启动子、基因和转录终止子。基因表达常常处于启动子的控制之下，将此类基因称为“可操作地连接至”所述启动子上。类似地，如果调控元件调节核心启动子的活性，则调控元件和核心启动子被可操作地连接。被称作“转录载体”的较简单载体仅能够转录但不能翻译；它们能够在靶细胞中复制但不能表达，其与表达载体不同。转录载体用于扩增其插入物。

[0050] “重组宿主”是包含异源核酸分子，例如克隆载体或表达载体的细胞。

[0051] 转染描述的是将外来物质引入真核细胞中。用于非病毒方法的术语“转染”最常用于指哺乳动物细胞，而术语“转化”优选用于描述非病毒 DNA 转移至细菌和非动物真核细胞，例如真菌、藻类和植物。化学方法和物理方法均可以用于转染细胞。

[0052] “多肽”是天然产生的或合成的氨基酸残基聚合物，其优选仅通过肽键连接。通过非宿主 DNA 分子表达产生的多肽为“异源”肽或多肽。本文使用的术语“多肽”涵盖了蛋白、肽和多肽，其中所述蛋白、肽或多肽可以已经经过翻译后修饰或可以不经过翻译后修饰。翻译后修饰可以为，例如磷酸化、甲基化和糖基化。

[0053] “氨基酸残基”可以为肽键或不同于肽键的键连接的天然或非天然氨基酸残基。氨基酸残基可以为 D- 构型或 L- 构型。氨基酸残基包括被包含碳原子或碳原子链的中心部分分开的氨基末端部分 (NH₂) 和羧基末端部分 (COOH), 它们的至少之一包括至少一个侧链或官能团。NH₂ 是指存在于氨基酸或肽的氨基末端的氨基基团, COOH 是指存在于氨基酸或肽的羧基末端的羧基基团。常用术语氨基酸包括天然的或非天然的氨基酸。J. Biol. Chem., 243:3552-59(1969) and adopted in 37 C.F.R., section 1.822(b)(2) 中列出的标准命名法的天然氨基酸属于下表中列出的氨基酸组。非天然氨基酸是未列在下表中的氨基酸。非天然氨基酸的实例是, 例如 37 C.F.R. section 1.822(b)(4) 中列出的氨基酸, 其均通过引用并入本文。此外, 非天然氨基酸残基包括, 但不限于经修饰的氨基酸残基、L- 氨基酸残基和 D- 氨基酸残基的立体异构体。

[0054] 天然氨基酸及其各自的代号

[0055]

符号		氨基酸
1 个字母	3 个字母	
Y	Tyr	酪氨酸
G	Gly	甘氨酸
F	Phe	苯丙氨酸
M	Met	蛋氨酸
A	Ala	丙氨酸
S	Ser	丝氨酸
I	Ile	异亮氨酸
L	Leu	亮氨酸
T	Thr	苏氨酸
V	Val	缬氨酸
P	Pro	脯氨酸
K	Lys	赖氨酸
H	His	组氨酸
Q	Gln	谷氨酰胺
E	Glu	谷氨酸
W	Trp	色氨酸
R	Arg	精氨酸
D	Asp	天冬氨酸
N	Asn	天冬酰胺
C	Cys	半胱氨酸

[0056] “等价氨基酸残基”是指能够取代多肽中的另一个氨基酸残基而基本不改变该多肽的结构和 / 或功能的氨基酸残基。因此, 等价氨基酸具有类似的性质, 例如侧链的体积

(bulkiness)、侧链极性（极性或非极性）、疏水性（疏水或亲水）、pH（酸性、中性或碱性）和（芳族/脂肪族）碳分子的侧链构造。因此，可以将“等价氨基酸残基”认为是“保守氨基酸取代”。

[0057] 在一个实施方式中，等价氨基酸的分类是指以下类：1)HRK, 2)DENQ, 3)C, 4)STPAG, 5)MILV 和 6)FYW。

[0058] 在一个实施方式中，在本文使用的术语“等价氨基酸取代”的含义内，以下所指的氨基酸组中的一个氨基酸可以被另一个氨基酸取代。

[0059] i) 具有极性侧链的氨基酸 (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr 和 Cys)

[0060] ii) 具有非极性侧链的氨基酸 (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, 和 Met)

[0061] iii) 具有脂肪族侧链的氨基酸 (Gly, Ala, Val, Leu, Ile)

[0062] iv) 具有环形侧链的氨基酸 (Phe, Tyr, Trp, His, Pro)

[0063] v) 具有芳族侧链的氨基酸 (Phe, Tyr, Trp)

[0064] vi) 具有酸性侧链的氨基酸 (Asp, Glu)

[0065] vii) 具有碱性侧链的氨基酸 (Lys, Arg, His)

[0066] viii) 具有酰胺侧链的氨基酸 (Asn, Gln)

[0067] ix) 具有羟基侧链的氨基酸 (Ser, Thr)

[0068] x) 具有含硫侧链的氨基酸 (Cys, Met),

[0069] xi) 中性、弱疏水性氨基酸 (Pro, Ala, Gly, Ser, Thr)

[0070] xii) 亲水性、酸性氨基酸 (Gln, Asn, Glu, Asp), 和

[0071] xiii) 疏水性氨基酸 (Leu, Ile, Val)

[0072] 本发明还涉及 Hsp70 的变体或其片段，其中已经通过计算机分析设计了取代，该计算机分析利用序列同源性以预测取代是否影响蛋白功能（例如，Pauline C. Ng and Steven Henikoff, *Genome Research*, Vol. 11, Issue 5, 863-874, May 2001）。

[0073] 由于标准分析方法的不精确性，聚合物的分子量和长度被理解为近似的数值。应当理解，当此数值被表示为“约”X 或“近似于”X 时，所指的数值 X 精确至 +/-20%，例如 +/-10%，如 +/-5%。

附图说明

[0074] **图 1**：主要的鞘脂水解和相关疾病的示意图。具有短亲水性头部基团的鞘脂类的外水解断裂需要非酶促辅因子鞘脂激活因子蛋白 (SAP 或鞘脂激活蛋白)。各酶以及相应激活蛋白的遗传性缺乏引起溶酶体脂质贮积，并导致各种鞘脂贮积病的出现。Ferlantz et al., *Chem. Phys. Lipids*, (102)35-43, 1999。虚线圈标记了与 BMP 相互作用的酶的缺陷有关的疾病；没有用虚线圈标记的疾病因此与 BMP- 依赖性酶不相关。

[0075] **图 2**：溶酶体 Hsp70 稳定了溶酶体膜。(a) 利用 300nM rHsp70-AF488 (绿色) 温育，固定并用溶酶体膜整合蛋白 -1 (LIMP-1; 红色) 染色的 U-2-OS 细胞的代表性共聚焦图像。对于用其它细胞器标记物的共定位，参见图 3。(b) 在对通过反复冻融循环和离心轻膜部分 (LMF) 获得的膜 (memb.) 中和上清液 (sup.) 中的 rHsp70-AF488 定量前，利用 300nM rHsp70-AF488 温育 U-2-OS 细胞 24 小时。溶酶体相关膜蛋白 2 (LAMP-2) 和组织蛋白酶 B (Cat B) 的免疫印迹分析证明了分级方法的可行性。(c) 暴露于光致氧化下的 U-2-OS 细胞的代

表性静止图像（吖啶橙和蓝光）。通过红色染色降低和绿色染色增加使溶酶体完整性的丢失可视化。（d 和 e）用所示的重组蛋白（300nM）温育 U-2-OS 细胞 24 小时，并在光致氧化后分析溶酶体的完整性。如所示，在加入重组蛋白之前用所示 siRNA 处理细胞 48 小时。数值表示的是 3 个（d）或 5 个（e）独立试验的平均值 \pm SD（标准差）。来自未处理的或用对照 siRNA 或 Hsp70siRNA 处理的 U-2-OS 细胞的所示蛋白的代表性免疫印迹结果示于右侧。比例尺：20 μ m（a 和 c）。

[0076] **图 3**：细胞内吞的 rHsp70-AF488 和溶酶体的共定位。利用 300nM rHsp70-AF488（绿色）温育，固定并用以下细胞器标记物（红色）染色的 U-2-OS 细胞的代表性聚焦图像。溶酶体相关膜蛋白 -1（LAMP-1；溶酶体），LAMP-2（溶酶体），LBPA/BMP（6C4；内容酶体区室），Cyt c（线粒体），SERCA（ER）和 golgin-97（高尔基体蛋白 97）。比例尺：20 μ m（LAMP-1、LAMP-2 和 BMP）或者 10 μ m（Cyt c、SERCA 和 Golgin-97）。

[0077] **图 4**：Hsp70 提高了对其它分子的内吞摄取。A 图：野生型的（WT）或者 Hsp70 转基因（TG）的永生化小鼠胚胎成纤维细胞（iMEF，用 20 μ g/mL Alexa Fluor-488- 标记的 BSA（BSA*）温育 24 小时）。通过荧光显微照片（未显示）证明了内吞摄取。然后收集细胞，并分析 BSA* 的摄取。由图明显看出，Hsp70- 转基因 iMEF 的 BSA* 摄取量显著高于野生型 iMEF。B 图：如所示，用含或不含 3000nM rHsp70 的 20 μ g/mL BSA* 温育 24 小时的 U2OS 骨肉瘤细胞。通过荧光显微照片（未显示）证明了内吞摄取。然后收集细胞，并分析 BSA* 的摄取量。由图明显看出，同时加入 BSA* 和 rHsp70 的 U2OS 细胞的 BSA* 摄取量显著高于单独用 BSA* 温育的细胞。

[0078] **图 5**：脉搏追踪实验。在 T=0 时，将 rhHSP70（重组人 HSP70）添加至来自 A 型尼曼 - 皮克病患者（患者 id：83/24）的原代成纤维细胞，在施加后 24h、48h、72h 和 1 周时测定溶酶体横断面面积。上图 A 显示原始数据，下图 B 显示在相同时间点归一化至非处理细胞的由 rhHSP70 处理的细胞。结论：rhHSP70 的效果是可逆的，并且持续约 1 周。

[0079] **图 6**：阿莫氯醇剂量滴定实验。将各种浓度的阿莫氯醇（“Ari”）加入至来自 A 型自尼曼 - 皮克病患者（患者 id：83/24）的原代成纤维细胞 48h。读数：溶酶体横断面面积。结论：小分子 HSP70 诱导物阿莫氯醇以剂量依赖方式有效地逆转溶酶体主要病理（溶酶体积聚）。

[0080] **图 7**：在非鞘脂贮积症中检测 rhHSP70。将标记 Alexa Fluor 488（用于可视化摄取）的 rhHSP70 添加至来自 C1 型尼曼 - 皮克病患者的原代成纤维细胞（卡瑞尔细胞库 id：GM17918）48h。读数：溶酶体横截面面积（主要的细胞病理），由激光共聚焦显微镜完成。结论：rhHSP70 有效逆转 C1 型尼曼 - 皮克病中的溶酶体主要病理（即溶酶体体积聚）。

[0081] **图 8**：在非鞘脂贮积症中检测 rhHSP70。将标记 Alexa Fluor 488（用于可视化摄取）的 rhHSP70 添加至来自 IIIA 型粘多糖贮积病（IIIA 型山菲利普病（aka Sanfilippo））患者的原代成纤维细胞（卡瑞尔细胞库 id：GM00879）48h。读数：溶酶体横截面面积（主要的细胞病理），由激光共聚焦显微镜完成。结论：rhHSP70 有效逆转 IIIA 型粘多糖贮积病中的溶酶体主要病理（即溶酶体体积聚）。

[0082] **图 9**：在非鞘脂贮积症中检测 rhHSP70。将标记 Alexa Fluor 488（用于可视化摄取）的 rhHSP70 添加至来自 IVA 型粘多糖贮积病（IVA 型莫奎欧氏症（aka Morbus Morquio））患者的原代成纤维细胞（卡瑞尔细胞库 id：GM00958）48h。读数：溶酶体横截面

面积（主要的细胞病理），由激光共聚焦显微镜完成。结论：rhHSP70 有效逆转粘 IVA 型多糖贮积病中的溶酶体主要病理（即溶酶体体积聚）。

[0083] 图 10：在非鞘脂贮积症中检测 rhHSP70。将标记 Alexa Fluor 488（用于可视化摄取）的 rhHSP70 添加至来自桑德霍夫病和 IIIA 型粘多糖贮积病（IIIA 型山菲利普病）患者的原代成纤维细胞（卡瑞尔细胞库 id：桑德霍夫病：GM11098，MPSIIIA：GM00879）48h。Ctrl= 正常对照成纤维细胞。读数：酸性区室的体积（VAC）（主要的细胞病理），由 FACS 完成。结论：rhHSP70 有效逆转桑德霍夫病和粘多糖贮积病 IIIA 的原代成纤维细胞中的溶酶体主要病理（即溶酶体体积聚）。

[0084] 图 11：rhHSP70 在 MCF-7-LC3-EGFP 细胞中诱导自噬。在培养基中添加 20 μ g/mL rhHSP70 引起 LC3-EGFP（大自噬的标记物）的迁移和积聚。

[0085] 图 12：对照 NPC^{-/-} 小鼠（A）具有比 HSP70 处理小鼠（B）更浅和更零星生长的模式。生长曲线突然停止的点表示被处死以获得器官的小鼠。在图 A 中，系列 1 和 3 是雌性；系列 2 和 5-8 是雄性。在图 B 中，系列 2 和 4-7 是雌性；系列 1、3 和 8 是雄性。

[0086] 图 13：（A）典型震颤频率分布表示处理小鼠中的平均增长，尤其是在较低频率范围。（n=5 表示处理 & 对照。Wt n=1）。侧直立尝试（B）相对均等，然而对照小鼠没有成功完成任何一个（C）。对于中央直立的情况是类似的（D），尽管对照小鼠完成这些的 50%（E）。（n=5，处理，n=4，对照）。

[0087] 图 14：在对照和处理动物中，7 周（图 A）和 9 周（图 B）后测定的胆固醇。

[0088] 图 15：在对照和处理动物中，7 周（图 A）和 9 周（图 B）后测定的 GSL。

[0089] 图 16：在对照和处理动物中，7 周和 9 周后测定的鞘氨醇。

[0090] 图 17：阿莫氯醇在 C 型尼曼 - 皮克病患者细胞中诱导提高的 HSP70 表达。图 A：在 42 度由 60min HS 处理的 NPC GM18453 患者细胞。图 B：NPC GM18453 患者细胞 - 无 HS。

[0091] 图 18：艾沙那定在尼曼 - 皮克病 A 型患者细胞中诱导提高的 HSP70 表达。NPDA 细胞（B534 R496L），40 度热激 60min。纵轴：热休克蛋白 70 诱导（A. U.）。

[0092] 图 19：阿莫氯醇在法布里病患者细胞中诱导提高的 HSP70 表达。由阿莫氯醇处理的法布里病患者细胞。纵轴：热休克蛋白 70 诱导（A. U.）。

[0093] 发明详述

[0094] 本发明人证明，Hsp70 有益于逆转溶酶体贮积病的病理；包括源于酶缺陷的那些溶酶体贮积病，所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在不直接相关；例如糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酸葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0095] 溶酶体

[0096] 自 de Duve 在 1955 年发现溶酶体以来，对该细胞器的认识一直被“溶酶体是独立的动物细胞内吞途径的终点——容纳大量如果释放至胞质中将引起坏死和组织炎症的水解酶的区室”的理论所统治。由于近来的发现为溶酶体及其内容物的更多特异任务提供了证据，因此对溶酶体的这种认识（最好的认识是垃圾处理单元，最差的认识是非特异的“自杀袋”）已经发生巨大变化。

[0097] 溶酶体水解酶

[0098] 作为细胞内降解和随后的细胞组分回收的主要区室,溶酶体接受异源的和自噬的物质,所述物质在溶酶体细胞器的内腔中找到其最终命运。降解由能够消化所有主要细胞大分子的多种酸性水解酶(磷酸酶、核酶、糖苷酶、蛋白酶、肽酶、硫酸酯酶、脂酶等)实现。其中,研究的最透彻的溶酶体蛋白酶为组织蛋白酶家族。根据其活性位点的氨基酸可以将组织蛋白酶分成三个亚组,即半胱氨酸(B、C、H、F、K、L、O、S、V、W和X/Z)、天冬氨酸(D和E)和丝氨酸(G)组织蛋白酶。虽然组织蛋白酶在溶酶体外的中性pH仍能够发挥作用(虽然稳定性降低和/或特异性改变),但优选在溶酶体的酸性pH(pH4-5)发挥作用。

[0099] 直至最近仍认为组织蛋白酶的功能限于溶酶体内蛋白的转换,以及在分泌后对细胞外基质的降解。然而,在过去的几年中,已经公认一些组织蛋白酶具有更特异的功能,包括在骨重建、抗原提呈、表皮稳态、激素原加工、保护细胞毒性淋巴细胞在脱粒后不受自身的破坏、保持小鼠的中枢神经系统、血管生成、癌细胞的侵袭以及程序性细胞死亡(PCD)中的作用。

[0100] 除了蛋白断裂之外,溶酶体以及晚期内涵体还通过一系列的内吞溶酶体酶和辅酶(其正常功能依赖于溶酶体内膜的脂质组成)负责细胞脂质(例如鞘糖脂)的代谢。可以容易地通过在鞘脂代谢的任何阶段的功能失常的情况下临床疾病明显,产生诸如泰-萨氏病(Tay-Sachs disease)、桑德霍夫病(Sandhoff disease)、法伯氏病、法布里病(Fabry disease)、戈谢病(Gaucher disease)、克拉伯病和尼曼-皮克病的疾病的事实,理解功能性内溶酶体脂质代谢的重要性。

[0101] 向溶酶体的运输和从溶酶体的运输

[0102] 内吞膜的运送作用通过向多种细胞内区室递送膜组分、各种溶质分子和受体相关的配体而在哺乳动物细胞中发挥重要作用。然而多种内吞途径(主要途径集中于溶酶体,在溶酶体中发生降解并可能回收至质膜)直至目前似乎都很简单,但最近的证据表明这些途径比之前想象的更复杂。

[0103] 内吞途径

[0104] 对内吞作用的最佳理解是通过形成披网格蛋白小窝的受体介导的分子内吞作用,不过还鉴定出多种非网格蛋白(non-clathrin)介导的细胞内吞途径(例如巨胞饮作用、吞噬作用、通过形成细胞小窝和形成披非网格蛋白小窝的摄取)。内吞系统的命名还没有完全标准化,通常使用的术语“早期内涵体”实际上描述了两种不同的内涵体区室——分选内涵体和内吞再循环区室(ERC)。在常规的受体介导的细胞内吞途径中,诸如转铁蛋白受体、低密度脂蛋白受体和甘露糖-6-磷酸受体(MPR)的受体通过披网格蛋白小窝的胞质末端序列基序和网格蛋白层中元件(element)之间的相互作用而集中于质膜表面的披网格蛋白小窝内。在其网格蛋白层脱落后,新形成的内涵体与其它内涵体以及预存在的分选内涵体融合,以成为分选内涵体。如名称所揭示的,分选内涵体的主要任务是将新获取的组分分选到其正确的位置。已知的三种目的地包括质膜、晚期内涵体和ERC。随着分选内涵体的成熟,其pH降低,从而促进了受体结合的配体向内涵体腔内的释放。然而,在分选内涵体完全成熟为晚期内涵体前,必须将去往再循环的分子分选出来。该过程被认为是通过夹断狭窄小管(有利于从溶质分子分选出膜蛋白的过程)而发生,原因是小管的表面积-体积比大于由小泡组成的分选内涵体。夹断的小管可以使膜蛋白直接返回质膜(直接归还途径)或至ERC。ERC主要是一类管状细胞器,其位置随细胞类型而不同。虽然ERC能够将分子分选至

数种不同的目的地,但通过 ERC 运输的分子多数返回质膜。

[0105] 随着分选内涵体的成熟,主要由于空泡型质子 ATPase(V-ATPase) 的作用而使腔内 pH 稳定下降,同时还发生膜脂质和蛋白组成的转移。从分选内涵体至晚期内涵体以及进一步进入溶酶体的膜运输存在一些争议。争议在于通过小泡运输或通过分选内涵体的成熟能否对这种运输作出最佳解释。提出的分选内涵体和晚期内涵体之间的中间体的模型有两种。虽然成熟模型派认为到达晚期内涵体的小泡是在从前分选内涵体除去组分后所留下的,但预存在分隔模型派认为分子向晚期内涵体的分子运输通过内吞载体小泡(ECV,预存分选内涵体区室和晚期内涵体区室之间的特异运输小泡)而发生。认为分选内涵体区室和晚期内涵体区室两者的结构均比运输小泡复杂且具有更特异的功能。然而,由于从早期内涵体动态网产生的小泡可以经历释放小的 GTPaseRAB5 并募集 RAB7(晚期内涵体标记)的转变,最近的活细胞成像研究对两种模型的机械方面进行了协调。虽然在功能上很好地定义了内涵体途径的机体组成,但其命名可能仍令人困扰。利用通过早期内涵体/分选内涵体(在此发生受体-配体解偶联)但不通过晚期内涵体(在此可以发生蛋白水解)回收的管家受体(例如转铁蛋白受体)以及其它脂质和蛋白在功能上对细胞内吞途径进行了定义。然而在这些功能性定义之外,当面对命名时所述描绘图则变得较为模糊,当在早期内涵体中开始并且在向晚期内涵体的成熟过程中变得越来越明显的腔内小泡的产生形成了所谓的“多泡体”(MVB)时尤其如此。术语多泡体一直与用于 ECV 和晚期内涵体以及用于包含多泡区或元件的所有内吞小泡的另一个名称交换使用,其包括当溶酶体与晚期内涵体(包含多泡结构)融合时形成的杂细胞器。然而,晚期内涵体包含的腔膜小泡多于早期内涵体,并因此常常用术语“多泡体”描述该区室。

[0106] 最后,该领域的大量混淆来自晚期内涵体相对于溶酶体的定义,或者甚至是缺乏此定义。两个区室酸性相当且多数(如非所有)存在于溶酶体的蛋白也可以在晚期内涵体中发现。根据成熟模型,晚期内涵体是溶酶体的前体,但考虑到逐步发育(如理论所提示),很难获得严格的分类。然而,最近的证据提出溶酶体和晚期内涵体为独立的区室,其在经历“接吻”事件(短暂融合)和完全融合事件之后,可由所述杂合细胞器重新形成溶酶体。

[0107] 生物合成途径

[0108] 除细胞内吞作用之外,晚期内涵体还通过 MPR 途径接受来自高尔基体外侧网络(TGN)的物质(生物合成途径)。阳离子依赖性 MPR 和非阳离子依赖性 MPR/胰岛素样生长因子-II(IGF-II)受体共同完成向溶酶体递送来自 TGN 的新合成的酸性水解酶的任务。MPR 对酸性水解酶的识别需要向内质网中加入碳水化合物以及随后碳水化合物残基对高尔基体内侧甘露糖-6-磷酸部分的修饰和磷酸化。结合有 MPR 的水解酶首先被递送至内涵体中,在此其由于腔内 pH 的下降而从受体解离,由此使受体重新被回收至 TGN。虽然定位于高尔基体的含 γ -耳 ADP 核糖基化因子结合蛋白(γ -ear-containing ADP ribosylation factor-binding proteins,GGA)也发挥作用,但披网格蛋白小窝中主要负责将 MPR 分选至 TGN 处的蛋白为衔接蛋白-1(AP-1)。AP-1 和 GGA 是否为共同作用或者实际上将两种 MPR 靶向不同的亚细胞定位,目前还不知道。AP-1 是由四个成员(均为广泛用在分泌和内吞途径中的杂四聚体蛋白)组成的接合蛋白家族的一部分。AP-1 除了在 TGN 中形成的披网格蛋白小窝内的上述作用外,质膜的内吞过程中在披网格蛋白小窝中也使用 AP-1 和 AP-2,同时 AP-3 和 AP-4 在溶酶体相关的膜蛋白(LAMP)的运输中发挥作用。

[0109] 自噬途径

[0110] 自噬作用是大分子到达溶酶体的第三个被很好表征的途径。自噬作用是进化保守性途径,其涉及长寿命蛋白和细胞器的转换。其通常在低基础水平上发挥作用,不过可以在例如营养饥饿的条件下诱导自噬作用。在这些条件下,巨自噬是负责向溶酶体递送物质的主要途径。巨自噬的特征在于包裹胞质细胞器的扁平膜池和/或由此形成闭合的双膜结合空泡(自噬体)的胞质部分。自噬体最终与溶酶体融合形成自噬溶酶体/自溶酶体,在此发生所吞噬的大分子的降解和回收。自噬体膜的来源仍未阐明。内质网、高尔基体、被称为吞噬核心的没有被很好表征的膜区室以及从头合成(*de novo synthesis*)都被认为自噬体膜的来源。通过酵母基因组学的新进展和后来的哺乳动物同源物的发现迅速增强了对自噬过程的理解,并且还有望在不久后阐明自噬体膜的来源。

[0111] 还有其它的溶酶体接受自噬物质的途径。被称为巨自噬作用的相当难区分的过程的特征在于溶酶体通过溶酶体膜的内陷吞没胞质。除了存在于所吞没的胞质中的大分子外,该过程还可能涉及细胞器(例如过氧化物酶体)的摄取。最后,分子伴侣介导的胞质蛋白至溶酶体腔内的运输代表了自噬作用的更直接的选择形式。该途径依赖于溶酶体膜两侧存在的热休克蛋白 70 家族的组成型表达成员 Hsc70。该过程还依赖于 LAMP-2a 对目标蛋白内的 KDEL 序列基序的识别。

[0112] 本发明人先前已表明 rhHSP70 结合 BMP,且有利于依赖于辅因子 BMP 的那些酶的增强的酶活性。表明对于逆转与 BMP 相互作用的酶有关的 LSDs 的病理,HSP70-BMP 相互作用是重要的(WO 2009/155936)。

[0113] 本发明人现已进一步表明 rhHSP70 是自噬的潜在诱导物(参见图 11)。预期由于作为自噬途径最后一个步骤的自噬体与溶酶体的融合,增强的自噬流可影响溶酶体。还预期根据 HSP70 的自噬诱导导致具有由于 LSD 而造成的病理性底物积聚的溶酶体的自噬清除提高。

[0114] 溶酶体的重新形成和溶酶体分泌

[0115] 在溶酶体与晚期内涵体或自噬体融合后,通过酶蛋白的扣押和腔内容物的凝缩由所产生的杂合细胞器重新形成溶酶体。在需要从杂合细胞器除去或回收的膜蛋白中,最明显的是 MPR,原因是根据定义其是不存在于溶酶体中的。然而,不能将溶酶体看作是细胞内吞途径的终点,原因是溶酶体也能够通过与分泌颗粒融合而形成分泌溶酶体,这是一个 Ca^{2+} - 依赖性过程并首先在造血来源的分泌细胞中被认可。然而,也存在 Ca^{2+} - 调节的接近膜的溶酶体区室负责非分泌细胞的胞吐作用的证据。胞吐的过程依赖于蛋白 Rab27a,其为具有大于 60 个成员的 Rab 蛋白家族的成员。Rab 是在大多数膜转运步骤(包括小泡形成、运动、停靠和融合)中具有重要调节作用的小 GTPases。在细胞内吞途径中为了确定各种细胞内吞分子及其小泡的命运,至少使用了 13 种 Rab。

[0116] 程序性细胞死亡

[0117] 调节总细胞数以及构成不同组织的细胞数并需要用于清除不需要的细胞的机制,这在多细胞生物体中都非常重要。程序性细胞死亡是实现这种目的的一种方式,其使多细胞生物体具有自身除去不需要的细胞而不泄漏细胞组分,并由此避免与坏死(与程序性细胞死亡在概念上相似)相关的炎症的潜能。

[0118] 凋亡

[0119] 术语凋亡使用的是希腊语,用以描述花瓣从花上或者树叶从树上“脱落”或“掉落”,并且在 1972 年由 Currie 及其同事首次创造,用以描述作者在多种组织和细胞类型中观察到的程序性细胞死亡的通用类型。作者注意到他们观察到的事件具有明显的形态相似性,其不同于表征细胞经历病理的坏死性死亡的形态特征,并提出这些共同的形态特征可能是由于经历了一个共同的过程。

[0120] 当细胞通过凋亡死亡时,其经历一系列的转变事件 (transforming event)。在这些事件中且对特征性凋亡表型至关重要是 caspase (半胱氨酸天冬氨酸特异的蛋白酶) 的激活, caspase 是半胱氨酸肽链内切酶家族,其在特异的天冬氨酸残基处切割底物,由此得名。caspase 的激活导致其它 caspase 的蛋白水解加工以及细胞内总蛋白活性的其它一些变化,最终产生与 caspase 激活相关的典型的形态特征,并由此被定义为凋亡。典型的凋亡特征包括细胞收缩和胞质膜起泡,核内染色质凝聚为清晰的几何形状, DNA 片段化为 ~200bp 的部分,所谓的核小体梯度,细胞从其相邻细胞脱离和细胞被瓦解成所谓的凋亡体的小的封闭小泡。在多细胞环境中,这些凋亡体最终被巨噬细胞或相邻细胞吞噬,由此实现不利细胞的清除。

[0121] 程序性细胞死亡

[0122] 程序性细胞死亡 (PCD) 与凋亡不同意,虽然由于大量文献不加区别地使用这些术语而可能趋向于认为两者相同。术语 PCD 逐渐接替,但术语凋亡仍然被用于描述由 caspase (尤其是 caspase-3) 的激活而产生的细胞死亡程序。然而,某些细胞在促凋亡 caspase 的激活下存活以及完全没有 caspase 激活的 PCD 和 caspase 激活导致非凋亡 PCD 的能力揭示了细胞死亡程序的显著可塑性,并由此 PCD 可能被更准确地定义为依赖于死亡细胞内的信号或活性的细胞死亡。虽然优选根据在任何导致死亡的给定条件组下参与信号途径来区分 PCD,但已经提议可以根据死亡细胞的细胞核形态将 PCD 分成凋亡、凋亡样 PCD 和坏死样 PCD,所杜撰的每种定义对应于不同的形态特征,主要特征是染色质凝聚的形状或没有染色质凝聚。然而,由于仍在挑选导致不同种类的细胞死亡的线索,所以仍没有可用于区分不同 PCD 模型的方法。

[0123] 坏死

[0124] 坏死是 PCD 的概念相似物,原因是除了除去产生坏死的刺激外不能通过任何其它方式抑制坏死。这种细胞死亡模式通常见于生物体的病理损害过程中。

[0125] 程序性细胞死亡的分子机器

[0126] 凋亡

[0127] 如在之前部分所提及的,通过被称为 caspase 的半胱氨酸肽链内切酶家族成员的激活以及与其激活相关的形态来定义凋亡。Caspase 以未激活的酶原的形式存在于细胞中,蛋白水解加工可迅速激活该酶原。所述加工以级联形式进行,在该级联中,凋亡刺激物激活起始 caspase (例如 caspase-8 和 caspase-9),其进一步激活级联中的下一级——效应 caspase (例如 caspase-3、caspase-6 和 caspase-7)。由于效应 caspase 切割多种底物 (该加工最终导致凋亡相关的表型),其被认为是凋亡的执行者。凋亡程序可以由多种刺激物激活,可以将所述刺激物广义地分为细胞外刺激物和细胞内刺激物,细胞内刺激物参见作为主要参与者的线粒体。所述细胞外刺激物和产生凋亡的以下反应也可以被称为外来信号途径,其包括由多种死亡受体之一 (例如 Fas/Apo-1/CD95、TNFR 或 TRAIL) 的激

活起始的一系列事件。与其适当的配体结合后,这些受体通过与受体中存在的死亡结构域(DD)相互作用而募集包含死亡结构域的衔接分子(adaptor molecule),例如 TRADD(TNFR1 相关死亡结构域蛋白)和 FADD(具有死亡结构域的 Fas 相关蛋白)。然后,这些衔接分子将 caspase-8 招募至受体复合物,在此可能通过接近诱导的自催化加工激活 caspase。然后,在某些细胞(所谓的 I 型细胞)中, caspase-8 直接切割并激活 procaspase-3,然而在 II 型细胞中, caspase-8 的下一级为胞质蛋白 Bid。Bid 的切割产生片段(截短 Bid(tBid)),其诱导两个促凋亡 Bcl-2 家族成员 Bax 和 Bak 的低聚化、转位并插入至线粒体外膜。这种插入介导了电子载体细胞色素 c(CytC) 以及其它一些蛋白从线粒体膜间隙释放,其中在所述其它一些蛋白中,最突出的包括凋亡诱导因子(AIF)、对抗已知的凋亡抑制(IAP)蛋白的作用的 Smac/DIABLO 和内切核酶 G(其为 DNase)。应该注意到,虽然这是通过线粒体激活 caspase 的理论的关键点,但并没有关于 Bax 和 Bak 的插入如何促进细胞色素 c 的释放的决定性证据。从线粒体释放后, CytC 在细胞质中积聚,在此其与蛋白 Apaf-1(凋亡蛋白酶激活因子-1)结合,引起构象变化,从而促进 Apaf-1 的低聚化。然后,该低聚物通过 caspase 募集结构域(CARD)之间的同型相互作用而与 procaspase-9 结合,导致形成所谓凋亡体的复合物。该复合物的形成很大程度上增强了 pro-caspase-9 的酶促活性,从而导致 caspase-3 蛋白水解激活。

[0128] 凋亡还可以由引发线粒体外膜通透化(MOMP,被称为内部途径的过程)的细胞内因素触发。这些因素包括与细胞应激相关的第二信使,例如 Ca^{2+} 、NO 和花生四烯酸以及胆红素、胆汁盐和能够产生蛋白变性以及核 DNA 和线粒体 DNA 受损的刺激物(例如电离辐射、热应激、活性氧(ROS)和化疗剂。在核 DNA 受损事件中,多种蛋白激酶都可感应该事件,但其依赖于 DNA 损害的形式且由 Noxa 引发。这些激酶的活性诱导 p53 的集聚,然后 p53 可以作为转录因子导致促凋亡基因(例如 Bax、Noxa 和 PUMA,均可诱导 MOMP)的转录增强。p53 在线粒体水平上诱导局部产生 ROS 的线粒体酶和线粒体基质蛋白(p53AIP1)的表达,而其过表达则触发线粒体膜电位的丢失和凋亡。

[0129] 上述通过 p53 或在刺激物作用的 MOMP 的诱导是内在途径和外在途径的交汇点,内在途径在已经描述的外在途径之后,具有细胞色素 c 的释放、凋亡体的形成和 caspase-3 的激活,其构成了使不利细胞死亡的最后几个步骤。

[0130] 凋亡的选择

[0131] 在过去十年, caspase 作为 PCD 执行者的排他性作用已经遭到挑战,越来越多的证据表明,对于细胞的生命并且尤其是死亡来说,起作用的不单是 caspase。

[0132] 新开发的 caspase 特异性药理学抑制剂以及诸如能量损耗、硝化/氧化应激和凋亡蛋白抑制物(IAP)家族的因素对 caspase 途径的灭活并不总是阻止步入死亡的进程,其显露出或者甚至增强一些基础的非 caspase 依赖性死亡程序。这些程序包括死亡受体起始的途径和由癌症药物、失去生长因子、星形孢菌素(staurosporine)、Bax 相关蛋白和 Hsp70 缺乏引发的途径。这些非 caspase 依赖性死亡程序的形态特征常常使人想起经典凋亡所观察到的形态特征,诸如组织蛋白酶、需钙蛋白酶和丝氨酸蛋白酶的其它蛋白酶作为 caspase 上游或下游的主要辅因子的作用的实验证据迅速增多。许多非-caspase 蛋白酶能够切割至少一些经典 caspase 底物的发现更加强了该论点,该发现可能能够解释所观察到的 caspase 依赖性死亡程序和非 caspase 依赖性死亡程序之间的一些相似性。

[0133] 尽管由于此类死亡程序被 caspase 的功效所掩蔽而可以争论此类死亡程序的相关性,但证据集中于溶酶体组织蛋白酶在作为对多种刺激物(例如肿瘤坏死因子受体家族的死亡受体、缺氧、氧化应激、渗透应激、热和抗癌药)的反应所起始的细胞死亡程序中的进化保守性作用。

[0134] 溶酶体在程序性细胞死亡中的作用

[0135] 虽然充分确定了溶酶体及其水解酶在 PCD 清除期(即相邻细胞或吞噬细胞对凋亡细胞或凋亡体的吞没)的作用,但认识到溶酶体及溶酶体水解酶在 PCD 的较立即事件中的重要性花费了很长时间。这种延迟的一个原因可能是通常用于评价 caspase 在 PCD 中的作用的甲基酮肽抑制剂(例如 zVAD-fmk、Ac-DEVD-fmk、Boc-D-fmk 等)还抑制包括几个半胱氨酸组织蛋白酶在内的其它半胱氨酸蛋白酶的事实。即使在认识到这种交叉作用后九年,能够抑制非-caspase 蛋白酶的浓度的这些抑制剂的保护性作用仍然常常被理解为是 caspase 介导的死亡途径的证据,因此其它半胱氨酸蛋白酶在 PCD 中的作用仍被低估。由于在电子显微镜分析的凋亡细胞中显示完整的溶酶体超微结构,溶酶体 PCD 的发现可能也一直被延迟。因此,直至最近一直认为溶酶体破裂是不受控的坏死细胞死亡和组织自溶的晚期阶段过程中的全或无开关。然而,可以更准确的评价溶酶体膜完整性的新技术已经揭示,具有正常超微结构的溶酶体可能泄漏了其部分酶,并且部分溶酶体膜通透化(LMP)不仅发生在许多死亡模式的早期,事实上还可以触发凋亡和凋亡样 PCD。

[0136] 溶酶体膜通透化(LMP)及其结果

[0137] 利用直接靶向溶酶体膜完整性的多种化合物(例如 H₂O₂、L-亮氨酸-L-亮氨酸甲酯、渗透应激、鞘氨醇、趋溶酶体抗生素诺氟沙星和环丙沙星和光致氧化溶酶体损害(光分解))的研究已经令人信服地证明了中等溶酶体通透化能够导致 PCD。已经提出用溶酶体破裂量和细胞死亡模式之间的定量关系解释 LMP 之后的差异很大的形态结果。根据该模型,低应激强度触发溶酶体内容物向细胞质的有限释放,之后是凋亡或凋亡样细胞死亡,而高强度应激导致广义的溶酶体破裂和细胞的迅速坏死。因此,低浓度鞘氨醇(在低 pH 具有类似于去污剂的性质的酸性神经酰胺酶产生的神经酰胺的代谢物)诱导部分 LMP 和 caspase 介导的凋亡,而高浓度则导致大量的 LMP 和非 caspase 依赖的坏死性细胞死亡。在该模型中,由部分 LMP 触发的死亡可以被半胱氨酸和天冬氨酸组织蛋白酶的药理学抑制剂所抑制,并且胞质组织蛋白酶活性的提高先于 caspase 的激活和线粒体膜的潜在变化,这提示胞质组织蛋白酶在死亡过程中的直接作用。重要的是,LMP 和组织蛋白酶在细胞死亡中的作用并不局限于采用直接溶酶体破裂物的实验模型。LMP 还参与完成应对多种典型的凋亡刺激物(例如肿瘤坏死因子(INF)受体家族的死亡受体的激活、白介素-1、p53 激活、生长因子饥饿、微管稳定剂、依托泊苷、σ-2 受体激活、合成的类视色素 CD437、B 细胞受体激活、星形孢菌素、渗透应激以及在诱导不依赖于 p53 的凋亡的新型抗癌药的筛选中鉴定的小分子)的细胞死亡。

[0138] 作为线粒体凋亡途径触发器的 LMP

[0139] LMP 的细胞毒性作用常常依赖于(至少部分依赖于)线粒体死亡途径的激活。线虫微注射研究已经证明,当位于胞质中时,与细胞总组织蛋白酶 D 活性的一半对应的细胞剂量的单个溶酶体水解酶(组织蛋白酶 D)足以在人成纤维细胞中触发线粒体外膜通透化和凋亡。然而,组织蛋白酶 D 不足以触发涉及 LMP 的所有细胞死亡模型中的 PCD。其它被文

献充分证明的由 LMP 触发的 PCD 的介质 (mediator) 包括半胱氨酸组织蛋白酶 B 和 L 以及活性氧。然而,应该强调的是,并没有恰当地排除其它溶酶体水解酶、溶酶体来源的第二信使和 LMP- 诱导的胞质的酸化的作用。组织蛋白酶和线粒体膜通透化之间的一个连接可能是 Bid, 其是 Bcl-2 家族的唯 BH3 促凋亡蛋白,其在胞质 pH 下能够被数种半胱氨酸组织蛋白酶加工并激活,但不被组织蛋白酶 D 加工和激活。然而,已经提出组织蛋白酶 D 在 TNF 受体 -1 (TNF-R1) 内在化后在溶酶体区室内的酸性环境中切割并激活 Bid。根据该模型,配体激活的 TNF-R1 的内吞引起酸性鞘磷脂酶介导的神经酰胺的产生,然后神经酰胺与未活化的组织蛋白酶 D 结合并通过自催化加工激活组织蛋白酶 D。如在星形孢菌素处理的 T 细胞中所证明的,组织蛋白酶 D 还可以以不依赖于 Bid 的方式激活 Bax。此外,在用环丙沙星处理的成纤维细胞中,LMP 通过 Bax 和 Bak 的 Bid 非依赖性激活而触发线粒体膜通透化。在该模型系统中,Bax 的激活不依赖于组织蛋白酶 D,而依赖于活性氧。应该注意到,在缺乏 Bax 和 Bak 的细胞中没有完全抑制环丙沙星诱导的线粒体膜通透化。将 LMP 与线粒体膜通透化联系起来的另一个机制可能包括活性氧和 / 或可以以依赖于组织蛋白酶 B 的方式产生的脂质介质 (例如花生四烯酸) 的直接作用。

[0140] 利用来自单个组织蛋白酶缺陷的小鼠的永生化鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 的研究已经清楚的表明,细胞死亡执行根据触发 LMP 的刺激物而由不同的组织蛋白酶参与。来自组织蛋白酶 B 和 L 缺陷小鼠而非组织蛋白酶 D 缺陷小鼠的永生化 MEF 对 TNF 高度耐受,而当用星形孢菌素对所述细胞进行处理后则出现相反的结果。对 TNF 诱导的细胞死亡途径的深入研究进一步揭示了单个组织蛋白酶在 PCD 中的作用取决于所研究的细胞类型。如上所述,TNF 诱导的永生化 MEF 的死亡与半胱氨酸组织蛋白酶有关,而与组织蛋白酶 D 无关。然而,组织蛋白酶 D 的缺失可有效保护 HeLa 宫颈癌细胞不受 TNF- 诱导的和顺铂诱导的细胞毒性。这种区别似乎不是由于人和鼠细胞的一般差别,原因是组织蛋白酶 B 单独或者与其它半胱氨酸组织蛋白酶一起还对在人宫颈癌细胞系 (ME-180) 和乳腺癌细胞系 (MCF-7) 中 TNF 诱导的有效杀伤至关重要。对这种差别的解释仍不为人所知,但不同细胞系中单个组织蛋白酶及其抑制剂的不同表达水平可能起作用。因此,不同死亡刺激物调节单个组织蛋白酶或其抑制剂的表达水平的能力可能解释了对不同刺激物的应答的区别。例如,已知阿霉素和依托泊苷通过 p53 的激活增强组织蛋白酶 D 的表达。或者,多种刺激物诱导的其它信号途径可以与特定的组织蛋白酶协作。

[0141] LMP 诱导的线粒体非依赖性死亡途径

[0142] 重要的是,LMP 和胞质组织蛋白酶的致死作用不限于内在凋亡途径的激活。在用微管稳定药物 (紫杉醇、埃博霉素 B 和盘皮海绵内酯 (discodermolide) 处理的小细胞肺癌细胞中,LMP 在死亡过程的早期发生,并且半胱氨酸组织蛋白酶以不依赖于 caspase 的方式介导微核化和细胞死亡。在 TNF 处理的人癌细胞系中,在线粒体外膜通透化的下游发生 LMP。然而,对半胱氨酸组织蛋白酶活性或表达的抑制可显著保护细胞免受 TNF 诱导的细胞死亡,且没有明显抑制效应子 caspase 的激活。此外,在 TNF 处理的鼠 WEHI-S 纤维肉瘤细胞中,在缺乏 caspase 活性下,组织蛋白酶 B 引起凋亡样变化,例如染色质凝聚、磷脂酰丝氨酸外露和质膜起泡。另外,多种人癌细胞中热休克蛋白 70 (Hsp70) 的缺失和 T 细胞的超最适度激活触发了 LMP 和组织蛋白酶介导的凋亡样 PCD,而没有激活内在凋亡途径。与这些数据相符的是,组织蛋白酶 B 可以在分离的核中诱导核凋亡。因此,取决于刺激物和细胞情

况,组织蛋白酶似乎具有作为程序性细胞死亡的起始物和效应蛋白酶两种能力。特别地,组织蛋白酶在癌细胞(其中,由于例如 Bcl-2 的过表达使线粒体死亡途径被阻断)中介导 PCD 的能力使得有望证明诱导 LMP 的治疗可有效治疗对常规凋亡诱导物耐受的癌症。永生化和转化能使细胞对溶酶体细胞死亡敏感的数据进一步支持了该观点。

[0143] 向 LMP 的信号传导

[0144] 如以上所述, LMP 之后向胞质中释放溶酶体内容物(尤其是组织蛋白酶)被认为是溶酶体死亡途径的主要激活步骤。然而,导致 LMP 的信号途径仍然仅仅开始显现。虽然不同靶细胞中广泛不同的应答已经使向 LMP 的信号传导途径的解释在很大程度上复杂化,但研究的最透彻的机制之一是来自肿瘤坏死因子受体 1 的信号。

[0145] 总之, TNF 可以根据细胞情况诱导 caspase 依赖性 LMP 或 caspase 非依赖性 LMP。此外, TNF 相关配体 FasL、TRAIL 和 TWEAK 也都与具有凋亡或坏死形态的 caspase 非依赖性 PCD 有关。药理学和遗传研究表明, caspase 介导的由 TNF 导向 LMP 的途径依赖于 caspase-8 和 caspase-9, 不过人和鼠细胞中 caspase-9 的激活相差较大。Caspase 和 LMP 之间的关联仍不知晓, 并且虽然已经提出由 TNF 诱导的 caspase-8 介导的 Bid 切割导致 LMP, 但在 Bid 缺乏的 iMEF 中 TNF 诱导的 LMP 不能证实这些发现。进一步提出 Bid 是组织蛋白酶在溶酶体死亡途径中的靶标, 从而提示 Bid 在 LMP 下游而非上游。

[0146] TNF 还通过激活质膜上的中性鞘磷脂酶 (SMase) 以及溶酶体区室内酸的或酸性的 SMase (aSMase) 而刺激鞘磷脂降解为磷酸胆碱和神经酰胺。这两个事件都在 TNF 诱导的细胞死亡途径中有牵连, 但目前仅中性 SMase 通过与中性 SMase (FAN) 相关的因子与 LMP 相连。基于 FAN 缺陷性 iMEF 和表达负显性形式的 FAN 的人成纤维细胞的研究表明, FAN 不仅介导 TNF 诱导的神经酰胺产生, 还参与 caspase-8 加工和细胞死亡。由于鼠肝细胞中 TNF 诱导的 LMP 依赖于 caspase-8, 其加工减少可以解释表达负显性 FAN 的经 TNF 处理的肝细胞中 LMP 的减少。然而, 不能排除神经酰胺及其代谢物的作用。aSMase 缺陷性(其在 caspase-8 下游被激活)小鼠体内 TNF 的降低和 Fas 诱导的肝毒性支持了神经酰胺及其代谢物在 TNF- 诱导的死亡信号传导中的作用。特别地, 在由溶酶体酶酸性神经酰胺酶催化的反应中由神经酰胺生产的鞘氨醇是诱人的候选物, 原因是与神经酰胺相反, 鞘氨醇可以作为去污剂, 直接使溶酶体膜不稳定。除了通过激活 SMases 提高产生的鞘氨醇前体神经酰胺外, TNF 还通过组织蛋白酶 B 介导的鞘氨醇激酶-1 (将促凋亡的鞘氨醇转化为抗凋亡的鞘氨醇-1-磷酸的酶) 的下调而调节鞘氨醇的水平。组织蛋白酶 B 的这种活性可能导致鞘氨醇在溶酶体中的集聚, 并由此可以(至少部分地)解释在经 TNF 处理的肝细胞中, 高效的 LMP 需要组织蛋白酶 B。

[0147] TNF 还可以在存在 caspase 抑制剂的条件下触发 LMP 和细胞死亡。该途径不依赖于 caspase-8, 但需要含死亡结构域的受体相互作用蛋白-1 (RIP-1), 并涉及活性氧的产生。氧化应激可以通过 Fenton 型化学与溶酶体内离子共同产生氧自由基, 并由此可以引起溶酶体膜脂质的氧化, 导致溶酶体膜不稳定和溶酶体内容物的释放。然而, RIP-1、氧化应激和 LMP 之间的分子联系仍然未知。

[0148] 几种典型的凋亡诱导物(例如 p53、依托泊苷和星形孢菌素)对细胞死亡的诱导还涉及 LMP, 之后为组织蛋白酶依赖性线粒体膜通透化。然而, 从这些刺激物至 LMP 的信号途径仍待揭示。

[0149] 抗 LMP 的细胞防御机制

[0150] 考虑到 LMP 的潜在致死结果,细胞已经发展出多种策略,或者通过抑制 LMP 本身,或者通过保护细胞不向胞质泄漏酸性水解酶(LMP 的后果)进行应对并不奇怪。

[0151] 在其多种其它功能中,已经报道磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)保护溶酶体不被去稳定(destabilization)。在人血管内皮细胞中抑制 PI3K 诱导组织蛋白酶 B 向胞质中的释放,这证明了 PI3K 在保持溶酶体膜的完整性中的相当直接的作用。此外,PI3K 抑制剂使细胞对 TNF 诱导的和白介素 -1 诱导的溶酶体死亡途径敏感。癌细胞中溶酶体功能的改变和组织蛋白酶表达水平的增加可能以降低溶酶体稳定性的方式造成威胁。因此,通常在人癌细胞中被激活的 PI3K 还可以促进肿瘤细胞中溶酶体的稳定,并由此提高其细胞死亡抗性。尽管 PI3K 在肿瘤细胞溶酶体稳定性中的作用只是推测性的,但最新的数据支持 Hsp70 在保护溶酶体免受细胞膜破坏性刺激物中的作用。这项工作主要在肿瘤细胞中进行,这也常常证明了 Hsp70 在质膜以及溶酶体内区室中的定位。

[0152] 在 LMP 时向胞质中释放溶酶体蛋白酶的事件中,胞质蛋白酶抑制剂提供了对抗其有害结果的屏障。尽管没有已知的组织蛋白酶 D 的内源性抑制剂,但至少三种胞质蛋白酶抑制剂,即胱抑素 A 和 B 以及丝氨酸蛋白酶抑制剂 2A(Spi2A,最近发现其还具有针对几种半胱氨酸组织蛋白酶(B、H、K、L 和 V)和组织蛋白酶 G 的高效抑制剂活性)可以有效抑制半胱氨酸组织蛋白酶。胱抑素 B 缺陷性小鼠(显示其小脑颗粒细胞的凋亡增加)证明了这些抑制剂在防止生理和病理条件下的 PCD 中的重要性。此外, Spi2A 的表达在 TNF 处理时通过 NF- κ B 途径被诱导,并有效抑制了 TNF 诱导的 MEF 中胞质组织蛋白酶 B 的活性和细胞死亡。有趣的是,已经报道在秀丽线虫(C. Elegans)中,胞质丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpin)-6 可保护对抗来自自由高渗应激和多种其它溶酶体应激引起的溶酶体损伤的诱导和致死效应,这证明对抗 LMP 的保护作用是进化保守性机制。

[0153] 溶酶体贮积病

[0154] 溶酶体贮积病(LSD)是由溶酶体功能缺陷引起的包括大约 40 种罕见的遗传代谢病症的一类疾病。LSD 由通常作为脂质、糖蛋白或粘多糖代谢所需的单个酶的缺陷的结果的溶酶体功能失常所引起。虽然各个病症是由被翻译成酶活性缺陷的不同基因突变引起的,但其具有一个共同的生化特征——所有溶酶体病症源自物质在溶酶体内的异常集聚。

[0155] 单个地,大多数 LSD 的发生率小于 1:100,000,但作为组,其发生率为约 1:5000-1:10,000。这些病症中的大多数是常染色体隐性遗传,然而也有一些是 X-连锁的隐性遗传。粘多糖贮积症代表一组流行度为约 1:25,000 的疾病。

[0156] 通常根据所涉及的主要贮积物质的性质对所述溶酶体贮积病进行分类,可以将其大致分成以下组:

[0157] - 脂质贮积症(或脂沉积病(lipidose))

[0158] o 鞘脂贮积症(包括高歇氏病和尼曼-皮克病)

[0159] o 神经节苷脂贮积病(包括泰-萨氏病)

[0160] o 脑白质营养不良

[0161] - 粘多糖贮积病(包括 Hunter 综合征和 Hurler 病)

[0162] - 粘脂贮积病

[0163] - 糖蛋白贮积病(糖蛋白贮积病)

[0164] o 甘露糖贮积病

[0165] o 岩藻糖苷贮积症

[0166] - 糖原贮积病

[0167] 根据疾病的严重程度,患者或者在年轻时或在不可预测的年龄死亡,许多患者在出生后数月或数年死亡,然而,其他存活进入成人早期的,最终死于其特定病症的多种病理。LSD 的症状根据特定病症而不同,并且可以为轻微的至严重的症状。所述症状可以包括发育延迟、运动障碍、癫痫发作、痴呆、耳聋和 / 或失明。一些患有 LSD 的人的肝脏增大(肝肿大),脾增大(脾肿大),具有肺和心脏问题以及骨骼生长异常。

[0168] 通过酶测定初步筛出多数患者,酶测定是实现确诊的最有效方法。在一些家族(其中引起疾病的突变是已知的)中和某些遗传隔离群体中,可以进行突变分析。由于可能具有多种不同的突变,有时对编码受影响的特定酶的基因进行测序是确诊必须的。当具有已知的遗传风险因子时,产前诊断可能是有用的。

[0169] 在一个实施方式中,本发明涉及用于治疗源于酶缺陷的溶酶体贮积症的方法,所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在不直接相关。

[0170] 在一个实施方式中,所述溶酶体贮积症不是选自尼曼 - 皮克病、法伯氏病、克拉伯病、I 型唾液酸沉积症、异染性脑白质营养不良、戈谢病、法布里病和鞘脂激活蛋白缺乏病的组。

[0171] 在一个实施方式中,所述溶酶体贮积症选自糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病组成的组。

[0172] 溶酶体的鞘脂水解

[0173] 许多酶都参与溶酶体对鞘脂(或糖鞘脂)的代谢(参见图 1)。这些酶(或者更具体地为水解酶)均参与特定鞘脂的降解。

[0174] 溶酶体鞘脂水解酶与鞘脂激活因子蛋白(SAP 或鞘脂激活蛋白)相互作用以刺激所述水解酶的活性。认为 SAP 有利于水溶性酶和膜结合底物之间的酶 / 底物相互作用。

[0175] 此外,晚期内涵体和溶酶体区室的脂质组成的特征在于存在带负电荷的磷脂,例如 BMP 和 PI(磷脂酰肌醇),其也刺激一些水解酶的活性。BMP- 依赖性溶酶体水解酶包括唾液酸酶、 α - 半乳糖苷酶 A、葡糖神经酰胺酶、 β - 半乳糖苷神经酰胺酶、芳基硫酸酯酶 A、酸性神经酰胺酶和鞘磷脂酶。

[0176] 辅因子鞘脂激活蛋白

[0177] 鞘脂激活蛋白是作为多种溶酶体脂质降解酶的激活剂的小的溶酶体蛋白,其可能通过从膜环境分离脂质底物,由此使其更易接近可溶的降解酶而发挥作用。所有哺乳动物鞘脂激活蛋白均以单个前体分子(鞘脂激活蛋白原)合成,所述前体分子包含在蛋白水解切割后产生活性鞘脂激活蛋白的四个鞘脂激活蛋白 -B 结构域和在激活反应中被除去两个鞘脂激活蛋白 -A 结构域。所述鞘脂激活蛋白 -B 结构域还存在于其它蛋白中,其中一些在膜裂解中具有活性。

[0178] 鞘脂激活蛋白原(PSAP)是在人中由 PSAP 基因编码的蛋白。该基因编码高度保守的糖蛋白,其是 4 个裂解产物鞘脂激活蛋白 A、B、C 和 D 的前体。鞘脂激活蛋白是鞘脂激活

因子蛋白或 SAP 的缩写。所述前体蛋白的各结构域的长度均为大约 80 个氨基酸残基,并且半胱氨酸残基以及糖基化位点的位置几乎相同。鞘脂激活蛋白 A-D 主要位于溶酶体区室,在此其促进具有短的寡糖基团的糖鞘脂的代谢。所述前体蛋白同时作为分泌蛋白和膜内在蛋白(integral membrane protein)而存在,并且具有亲神经活性。特定溶酶体水解酶对某些鞘脂的水解需要鞘脂激活蛋白 A-D。

[0179] 鞘脂激活蛋白是唾液酸酶(SAP-B)、 α -半乳糖苷酶 A(SAP-B)、葡糖神经酰胺酶(SAP-C)、 β -半乳糖苷神经酰胺酶(SAP-C)、芳基硫酸酯酶 A(SAP-B)和酸性神经酰胺酶(SAP-D)的重要辅激活物。酸性鞘磷脂酶(aSMase)并不决定性地依赖于任何已知的激活蛋白,然而鞘脂激活蛋白的存在提高了该酶的活性。第五个鞘脂激活蛋白 GM2-激活蛋白也已经被表征。

[0180] BMP

[0181] 二(单酰基甘油)磷酸酯(BMP)还被称为溶血二磷脂酸,是晚期内涵体和溶酶体区室的脂质成分的主要部分,其是带负电荷的磷脂,更具体地是甘油-磷脂。

[0182] BMP 首次分离自兔肺部,但现在已知是所有动物组织的常见但却很少的组分。BMP 的立体化学构型与其它动物甘油-磷脂的区别在于磷酸二酯部分与甘油的 sn-1 和 sn-1' 而非 sn-3 位置相连。甘油部分中的 sn-3 和 3' 或 sn-2 和 sn-2' 位置是否被脂肪酸酯化仍不清楚。不论脂肪酸在甘油分子上的位置如何,其组成都可以以 18:1(n-9) 和 18:2(n-6)、20:4 和 22:6(n-3) 的丰度而不同,不过这高度取决于具体的组织、细胞类型或细胞器。这种不同的组成提示十分特异的功能,这些中的一些仍未被揭示。

[0183] BMP 通常为动物组织的相当少的组分。然而,在肝脏和其它组织的溶酶体中高度富含 BMP,在这些组织中其可占膜磷脂的 15% 或更高,并且目前被认作是该细胞器的标记物。含有特有的脂质 BMP 的是晚期内涵体和溶酶体。确实,包含 70% 之多的 BMP 磷脂的似乎是晚期内涵体的内膜。

[0184] 有利的证据是 BMP 主要在内涵体系统中由磷脂酰甘油合成。在所认为的主要途径中,在第一步,磷脂酶 A₂ 从磷脂酰甘油的 sn-2 位置除去脂肪酸。在第二步,通过与溶血磷脂酰甘油(作为酰基供体和酰基受体)的酰基转移酶反应使溶血磷脂酰甘油在头部基团甘油部分的 sn-2' 位置被酰化,从而产生 sn-3:sn-1' 溶血二磷脂酸。第三步仍没有被适当地描述,但肯定包括从主要甘油单元的 sn-1 位置除去脂肪酸,以及磷酰基酯从 sn-3 到 sn-1 位置的重排。最终,可能通过与作为供体的另一个磷脂的酰基转移反应使主要甘油单元的 sn-2 位置被酯化(由此产生独特的脂肪酸组成)。也可能是其它生物合成途径。

[0185] BMP 在溶酶体中的功能仍处于积极研究中,其可能通过倾向不形成双层的帮助在复杂的腔内膜系统的形成中发挥结构性作用。BMP 是锥形分子,并且促进在内涵体中的 pH 下的膜融合。此外,BMP 的独特立体化学性质意味着其对磷脂酶具有抗性,因此将阻止或防止溶酶体膜的自降解。脂肪酸组分可以通过酰基转移反应而迅速转换(turn over),但甘油磷脂骨架是稳定的。另一种可能性是该脂质可以与膜区域中功能类似于筏(raft)的特定蛋白结合。已经提出,在多泡晚期内涵体内包含的富含 BMP 的膜的特征性网络通过作为收集和重分配点而调节胆固醇运输。例如,当用抗 BMP 抗体温育溶酶体膜时,胆固醇易于集聚。该过程受 Alix/AIP1 的控制,Alix/AIP1 是特异性地与 BMP 相互作用的蛋白且参与向多泡内涵体中的分选。

[0186] 已知 BMP 极大地刺激参与糖基神经酰胺降解的酶,例如鞘脂激活因子蛋白,如鞘脂激活蛋白。在这种情况下,BMP 可以简单地发挥功能以提供适合鞘糖脂水解酶与其激活物相互作用的环境。此外,BMP 还在为在肺泡巨噬细胞中产生二十烷酸提供花生四烯酸酯中发挥极大作用。

[0187] 当膜中存在 BMP 时,BMP 依赖性酶的水解速度极大提高,对于 aSMase,甚至在没有诸如鞘脂激活蛋白的激活蛋白存在的情况下也如此。在图 1 中,点划圈标记的是具有 BMP 依赖性的酶或所述酶的缺陷性疾病。

[0188] BMP 与溶酶体贮积病,例如尼曼-皮克 C 病(胆固醇集聚)和某些药物诱导的脂沉积症的病理有关。在这些情况下,其组成易于改变从而有利于包含较少多不饱和组分的分子。BMP 是被患有所谓抗磷脂综合征的罕见且尚不清楚的疾病的患者的自免疫血清识别的抗原,因此,其可能是该疾病的病理基础中的因子。

[0189] 脂质贮积症

[0190] 脂质贮积症(或脂沉积病)是溶酶体贮积症的一个亚群,在该组疾病中由于脂质代谢所需的酶的表达或功能的降低使有害量的脂质积聚在细胞内。这种过量贮积的脂质可随时间引起永久的细胞和组织损伤,尤其在脑、外周神经系统、肝、脾和骨髓中。

[0191] 已经对以脂质集聚为特征的一些溶酶体贮积症(即脂质贮积症)进行了表征;包括尼曼-皮克病(NPD)、法伯氏病、克拉伯病、法布里病、唾液酸沉积症 I 型、异染性脑白质营养不良和鞘脂激活蛋白缺乏病。

[0192] 其他的脂质贮积症包括:神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症及其他脂质贮积症,如本文以下概述。

[0193] 神经节苷脂贮积病

[0194] 一个方面,本发明提供能够提高 Hsp70 的细胞内浓度和/或活性的生物活性剂,用于治疗神经节苷脂贮积病。

[0195] 一个方面,本发明提供能够提高 Hsp70 的细胞内浓度和/或活性的生物活性剂,用于治疗选自有以下组成的组的神经节苷脂贮积病:桑德霍夫病(或 II 型 GM2 神经节苷脂贮积病)、典型婴儿型桑德霍夫病、青少年型桑德霍夫病、成人/晚发型桑德霍夫病、泰伊-萨克斯二氏病(或 I 型 GM2 神经节苷脂贮积病)、婴儿型泰伊-萨克斯二氏病、青少年型泰伊-萨克斯二氏病、成人/晚发型泰伊-萨克斯二氏病、AB 变异型 GM2-神经节苷脂贮积病、GM1 神经节苷脂贮积病、早发性婴儿型 GM1 神经节苷脂贮积病、迟发性婴儿型 GM1 神经节苷脂贮积病、成人型 GM1 神经节苷脂贮积病、GM3 神经节苷脂贮积病和粘多糖贮积症 IV 型。

[0196] 根据 WHO 的国际疾病分类,上述疾病一起分组为神经节苷脂贮积病。

[0197] 神经节苷脂贮积病是由积聚称为神经节苷脂的脂质引起的脂质贮积症。神经节苷脂是由鞘糖脂(神经酰胺和低聚糖)组成的分子,具有与糖链相连的一或多个唾液酸(AKA n-乙酰神经氨酸,NANA)。60 多种已知神经节苷脂的区别主要在于 NANA 残基的位置和数目。它是调节细胞信号转导事件的细胞质膜成分。它们主要发现于神经系统中,在此它们构成所有磷脂的 6%。

[0198] GM1 神经节苷脂贮积病(也称为 NOS 神经节苷脂贮积病)是由 β -半乳糖苷酶缺乏引起的,这导致酸性脂质物质在中枢和周围神经系统,但特别是在神经细胞中的异常储存。GM1 具有三种形式:早发性婴儿型、晚发性婴儿型和成人型。

[0199] GM2 神经节苷脂贮积病是由 β -氨基己糖苷酶的酶缺乏引起的一组相关遗传疾病。该酶催化称为神经节苷脂的脂肪酸衍生物的生物降解。所述疾病以其各自的名称更为所知。

[0200] β -氨基己糖苷酶是见于溶酶体中的降解脂质的关键水解酶。当 β -氨基己糖苷酶不再适当发挥作用时,脂质在脑部的神经组织中积聚。随着脑部发育,神经节苷脂在生命早期被快速生成和生物降解。

[0201] 所有三种疾病罕见于普通人群:泰伊-萨克斯二氏病、AB 变异型和桑德霍夫病可能一起被轻易地定义为单一疾病,因为该三种疾病与相同的代谢途径失调相关,且具有相同的结果。每一种代表酶激活所需亚基中不同分子点的失调。

[0202] 泰伊-萨克斯二氏病(缩写为 TSD,也称之为 I 型 GM2 神经节苷脂贮积病或己糖胺酶 A 缺乏)是引起脑部和脊髓中神经细胞的进行性破坏的一种罕见的常染色体隐性疾病。该疾病是由染色体 15 上 HEXA 基因中的突变引起的,所述基因编码溶酶体酶乙酰 β -N-乙酰己糖胺酶 A 的 α 亚基。

[0203] 基于神经症状的发作时间,将泰伊-萨克斯二氏病分为不同形式。所述不同形式反映了突变碱基的多样性:婴儿型 TSD、青少年型 TSD 和成人/晚发型 TSD。

[0204] 桑德霍夫病(也称为 Jatzkewitz-Pilz 综合征、II 型 GM2 神经节苷脂贮积病和己糖胺酶 A 和 B 缺乏)是引起脑部和脊髓中神经细胞的进行性破坏的一种罕见的常染色体隐性代谢疾病。该疾病源于染色体 5 上 HEXB 基因中的突变,所述基因对于溶酶体酶 β -N-乙酰己糖胺酶 A 和 B 是关键的。桑德霍夫病在临床上与泰伊-萨克斯二氏病不同。基于患者何时表现出症状,该疾病具有三种亚型:经典婴儿型、青少年型和成人晚发型。

[0205] AB 变异型 GM2-神经节苷脂贮积病是引起脑部和脊髓中神经细胞的进行性破坏的一种罕见的常染色体隐性代谢疾病。AB 变异型是由制造 β -己糖胺酶的酶辅因子(称为 GM2 激活蛋白)的基因失效引起的。

[0206] GM3 神经节苷脂贮积病是由(N-乙酰神经氨酰)-半乳糖苷葡糖神经酰胺 N-乙酰转移酶的缺乏引起的神经节苷脂生物合成疾病,伴有肝和脑组织中神经节苷脂 GM3 的过量积聚,以及高级神经节苷脂同系物的缺乏。

[0207] 粘多糖贮积症 IV 型 (ML IV) 是常染色体隐性溶酶体贮积症。该疾病由 MCOLN1 基因中的突变引起,所述基因编码非选择性阳离子通道 mucolipin1。认为 Mucolipin1 位于内体中。Mucolipin1 的一个重要性质是降低的 pH(酸化)使蛋白失活,这估计是通过组装错误。MCOLN1 中具有至少 29 种已知的突变,遍布基因定位。许多已知的突变导致不表达 mucolipin1,然而较轻微的突变产生功能失调形式的阳离子通道。仅改变蛋白 C-端的突变导致轻微表型的疾病,通常不影响脑部。ML IV 引起受累细胞积聚被认为是异常溶酶体的自发荧光液泡。

[0208] 神经元蜡样质脂褐质沉积症

[0209] 一个方面,本发明提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和/或活性的生物活性剂,用于治疗神经元蜡样质脂褐质沉积症。

[0210] 一个方面,本发明提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和/或活性的生物活性剂,用于治疗选自以下组成的组的神经元蜡样质脂褐质沉积症:贝敦氏症(或斯皮尔梅伊尔·沃格特病)、比-扬病(Bielschowsky-Jansky disease)、库夫斯病(Kufs disease)和桑-哈病

(Santavuori-Haltia disease)。

[0211] 根据 WHO 国际疾病,上述疾病一起分组为神经元蜡样质脂褐质沉积症。

[0212] 神经元蜡样质脂褐质沉积症 (NCL) 是由身体组织中脂色素 (脂褐素) 的过量积聚引起的遗传上分离的一类神经变性疾病的通常。这些脂色素是由脂肪和蛋白组成的。NCL 的早期分类基于发作年龄将该疾病分为四种类型,然而较新的分类根据相关基因进行分类。

[0213] - 婴儿型 NCL (桑 - 哈病、INCL 或 I 型) 与棕榈酰蛋白硫酯酶相关。

[0214] - 晚发性婴儿型 NCL (比 - 扬病或詹 - 比二氏病、LINCL 或 II 型) 与三肽基肽酶 I 相关。

[0215] - 青少年型 NCL (贝敦氏症、JNCL 或 III 型,也称之为斯皮尔梅伊尔 - 沃格特 - 舍格伦 - 贝敦氏病 (Spielmeyer-Vogt-**Sjögren** -Batten disease) 或斯皮尔梅伊尔 • 沃格特病) 与 CLN3 基因中的突变相联系。这是最普遍的形式。

[0216] - 成人型 NCL (库夫斯病、ANCL 或 IV 型) - 没有确定相关基因。

[0217] 其他脂质贮积症

[0218] 一个方面,本发明提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗选自脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病组成的组的疾病。

[0219] 溶酶体酸性脂酶是溶酶体内甘油三酯和胆固醇酯水解的必需酶。其缺乏产生 2 种人类表型:沃尔曼氏症和胆固醇酯贮积病。沃尔曼氏症在婴儿期是致命的,而胆固醇酯贮积病是较轻微的形式,并且通常在成人期显现。

[0220] 沃尔曼氏症的更严重的病程是由无残留酶活性的溶酶体酸性脂酶基因缺陷引起的。沃尔曼氏症还叫做原发性家族性黄瘤病,累及肾上腺并伴有肾上腺的钙化。沃尔曼氏症具有甘油三酯和胆固醇酯二者的积聚,而胆固醇酯贮积病主要具有升高的胆固醇酯。溶酶体酸性脂酶基因型决定残留酶活性的水平,导致表型的严重程度。

[0221] 脑腱性黄瘤病 (CTX) 也被称为脑胆固醇贮积病 (或范 - 谢 - 爱三氏综合征) 是一种常染色体隐性形式的黄瘤病,与一种形式的胆固醇 (胆甾烷醇) 在脑和其他组织中的沉积相关,具有升高的血浆胆固醇水平,但具有正常的总胆固醇水平。CTX 与 CYP27A1 基因 (固醇 27-羟化酶) 中的突变相关。

[0222] 粘多糖贮积症

[0223] 一个方面,本发明提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗粘多糖贮积症。

[0224] 一个方面,本发明提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗选自以下组成的组的疾病:I 型粘多糖贮积症、II 型粘多糖贮积症、III 型粘多糖贮积症、IV 型粘多糖贮积症、VI 型粘多糖贮积症、VII 型粘多糖贮积症、VIII 型粘多糖贮积症和 IX 型粘多糖贮积症。

[0225] 另一方面,本发明提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗选自以下组成的组的疾病:贺勒氏症、贺勒氏 - 施艾氏症、施艾氏症、亨特氏综合征、迪 • 费兰特综合征、马 - 拉氏综合征 (轻微或严重)、莫基奥综合征 (典型或莫奎样 (Morquio-like)) 和沙费利波综合征 (A、B、C 或 D 型)。

[0226] 根据 WHO 国际疾病分类,上述疾病一起分组为粘多糖贮积症。

[0227] 粘多糖是由连接到重复二糖分支的中心蛋白部分组成的硫酸化聚合物,通常在溶

酶体中降解为无机硫酸化单糖。

[0228] - 硫酸皮肤素由 L- 艾杜糖醛酸和 N- 乙酰半乳糖胺的交替单元组成, 通常见于许多不同结缔组织的基质中。

[0229] - 硫酸乙酰肝素由与 N- 乙酰葡萄糖胺交替的糖醛酸 (D- 葡萄糖醛酸或 L- 艾杜糖醛酸) 连接形成, 且与几乎所有细胞的细胞膜相关。

[0230] - 硫酸角质素由与 N- 乙酰葡萄糖胺交替的 D- 半乳糖残基组成, 且大部分见于软骨、髓核和角膜。

[0231] - 硫酸软骨素由 D- 葡萄糖醛酸和 N- 乙酰半乳糖胺组成, 且大部分见于软骨和角膜。

[0232] 粘多糖贮积症 (MSP) 源于糖胺聚糖例如硫酸皮肤素、硫酸角质素、硫酸乙酰肝素和硫酸软骨素的异常降解, 引起器官积聚及最终的功能失调。糖胺聚糖或粘多糖通常是角膜、软骨、骨头、结缔组织和网状内皮组织的成分, 因此是糖胺聚糖或粘多糖的过量贮积的靶向器官。

[0233] 参与糖胺聚糖或粘多糖降解的代谢酶缺乏。糖胺聚糖的逐步降解需要 4 种糖苷酶、5 种硫酸酯酶和 1 种非水解转移酶。MPS 共有慢性和进行性进程、多系统累及、器官巨大症、复合型骨发育不良和异常面容 (abnormal facies) 的类似临床特征。除 X- 连锁的 MPS II 外, 传播途径是常染色体隐性。描述了各种突变, 且基因型与疾病的关联开始从突变分析中显现。

[0234] 总体上, MPS 是进行性疾病, 特征在于累及多个器官, 包括脑、肝、脾、心脏和血管, 其中许多与粗糙的面部特征、角膜混浊和智力迟钝有关。通常可由尿液检查进行诊断, 尿液显示糖胺聚糖片段的升高的浓度。

[0235] I 型 MPS 包括贺勒氏症 (I H 型 MPS)、贺勒氏 - 施艾氏症 (I H/S 型 MPS) 和施艾氏症 (I S 型 MPS)。缺乏 α -L- 艾杜糖醛酸酶, 其将末端 L- 艾杜糖醛酸残基从硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素二者切除。

[0236] 在 II 型 MPS (贺勒氏症) 中, 缺乏艾杜糖 -2- 硫酸酯酶 (也称之为贺勒氏矫正因子 (Hunter corrective factor)), 其特异地将硫酸基团从硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素的 L- 艾杜糖醛酸的 2- 位移除。已显示纯化的人类重组艾度硫酸酯酶改变患有贺勒氏症个体的疾病表现。

[0237] 在 III 型 MPS (沙费利波综合征) 中, 可出现乙酰肝素 N- 硫酸酯酶 (A 型)、 α N- 乙酰葡萄糖胺糖苷酶 (B 型)、乙酰 CoA: α - 葡糖胺乙酰转移酶 (C 型) 和 N- 乙酰葡萄糖胺 6- 硫酸酯酶 (D 型) 的缺乏。所有 4 种酶都是硫酸乙酰肝素降解所需的。

[0238] IV 型 MPS (莫基奥综合征) 源于硫酸角质素的缺陷降解。识别了两种酶的缺乏: IV A 型中的 N- 乙酰半乳糖胺 -6- 硫酸酯酶 (也称为半乳糖 -6- 硫酸酯酶) 和 IV B 型中的 β - 半乳糖苷酶。

[0239] 在 VI 型 MPS (马 - 拉氏综合征) 中, 出现芳硫酸酯酶 B (即 N- 乙酰半乳糖胺 4- 硫酸酯酶) 的缺乏。它水解硫酸皮肤素的 N- 乙酰半乳糖胺残基的 4 位的硫酸基团。

[0240] VII 型 MPS (史莱氏症或 β - 葡萄糖醛酸酶缺乏) 是由 β - 葡萄糖醛酸酶缺乏引起的, 所述酶移除硫酸皮肤素、硫酸乙酰肝素和硫酸软骨素中存在的葡萄糖醛酸残基。

[0241] 迪·费兰特综合征 (VIII 型粘多糖贮积症) 是见于非常少患者中的疾病。

[0242] 糖原贮积病

[0243] 一个方面,本发明提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗糖原贮积病 (GSD)。

[0244] 一个方面,本发明提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗选自有以下组成的组的糖原贮积病:心脏糖原贮积病、安德森病、科里病 (或福布斯氏病)、赫斯氏症、麦卡德尔氏病、庞贝氏症、塔瑞氏病 (Tauri disease 或 Tarui disease)、冯吉尔克氏病。

[0245] 根据 WHO 国际疾病分类 (<http://www.who.int/classifications/icd/en/>),上述疾病一起分组为糖原贮积病。

[0246] 糖原贮积病 (GDS, 也为糖原病和糊精病 (dextrinosis)) 是肌肉、肝脏或其他细胞类型中糖原合成或降解过程缺陷的结果。GSD 具有两种原因:遗传的和获得的。遗传 GSD 由参与这些过程的代谢的任何先天错误 (遗传缺陷酶) 引起。

[0247] 在一个实施方式中,提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗心脏糖原贮积病 (由心肌中过量糖原沉积引起的心脏肥大,作为全身糖原贮积症的一部分)。

[0248] 在一个实施方式中,提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗安德森病 (也被称为 IV 型 GSD; 酶缺乏:糖原分支酶)

[0249] 在一个实施方式中,提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗科里病或福布斯氏病 (也被称为 III 型 GSD; 酶缺乏:糖原脱支酶)。

[0250] 在一个实施方式中,提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗赫斯氏症 (也被称为 IV 型 GSD; 酶缺乏:肝糖原磷酸化酶)。

[0251] 在一个实施方式中,提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗麦卡德尔病 (也被称为 V 型 GSD; 酶缺乏:肌肉糖原磷酸化酶)。

[0252] 在一个实施方式中,提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗庞贝氏症 (也被称为 II 型 GSD; 酶缺乏:酸性 α -葡萄糖苷酶 / 酸性麦芽糖酶)。

[0253] 庞贝氏症也被称为婴儿型酸性麦芽糖酶病, II 型 GSD 变体。另一种 II 型 GSD 变体是“缓慢进行性酸性麦芽糖酶病”或 Danon 病。

[0254] 在一个实施方式中,提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗塔瑞氏病 (也被称为 VII 型 GSD; 酶缺乏:肌肉果糖磷酸激酶)。

[0255] 在一个实施方式中,提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗冯吉尔克氏病 (也被称为 I 型 GSD; 酶缺乏:葡萄糖-6-磷酸酶)。

[0256] 溶酶体酶的翻译后修饰的缺陷

[0257] 一个方面,本发明提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗选择由粘多糖贮积症 II (I-细胞疾病) 和粘多糖贮积症 III (假胡尔勒氏多种营养不良, pseudo-Hurler polydystrophy) 组成的组的疾病。

[0258] I-细胞疾病 (粘多糖贮积症 II) 和假胡尔勒氏多种营养不良 (粘多糖贮积症 III) 两者均由溶酶体酶运输异常引起,其中新合成的溶酶体酶被分泌到细胞外基质而不是正确靶向溶酶体。

[0259] 缺陷酶是 UDP-N-乙酰葡萄糖胺溶酶体酶 N-乙酰葡萄糖胺 1-磷酸转移酶。该酶

催化甘露糖-6-磷酸识别标记合成中的第一步骤,所述标记介导溶酶体酶在高尔基复合体中加工后,到达其目标溶酶体。其传播模式是常染色体隐性的。

[0260] 糖蛋白降解缺陷-糖蛋白贮积病

[0261] 一个方面,本发明提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗选自以下组成的组的疾病:天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病、 α -甘露糖贮积病、I 型 α -甘露糖贮积病、II 型 α -甘露糖贮积病、 β -甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病(粘多糖贮积症 I)。

[0262] 在一个实施方式中,提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗甘露糖贮积病,例如 α -甘露糖贮积病和 / 或 β -甘露糖贮积病。

[0263] 溶酶体 α -甘露糖苷酶是糖蛋白降解途径中的主要外切糖苷酶。该酶的缺乏引起溶酶体贮积症 α -甘露糖贮积病。溶酶体 α -D-甘露糖苷酶通过高甘露糖、杂合和复合低聚糖的连续降解参与 N-连接糖蛋白的分解代谢。

[0264] α -甘露糖贮积病根据其临床表现可分为婴儿型表型(或 I 型)以及青少年-成人表型(或 II 型)。

[0265] β -甘露糖贮积病是由溶酶体酶 β -甘露糖苷酶缺乏引起的常染色体隐性溶酶体贮积症。在报导的人类病例中,该疾病的临床表现是异质的,从相对轻微到相对严重的范围。该酶裂解二糖甘露糖- β 1,4-GlcNAc 的 β -甘露糖苷连接键。该酶活性的遗传缺乏导致溶酶体贮积症 β -甘露糖贮积病的病理表现, β -甘露糖贮积病的特征在于含有 β -1,4 连接的未降解贮积产物的积聚和分泌。

[0266] 在一个实施方式中,提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗天冬氨酰葡萄糖胺尿症。

[0267] 天冬氨酰葡萄糖胺尿症(AGU),是一种由 N-天冬氨酰 β -氨基葡萄糖苷酶(天冬氨酰氨基葡萄糖苷酶)的活性缺乏引起的罕见的常染色体隐性溶酶体贮积症。该酶通常裂解溶酶体中称为低聚糖的长的糖链。

[0268] 在一个实施方式中,提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗岩藻糖苷贮积症。

[0269] 岩藻糖苷贮积症,也被称为 α -1-岩藻糖苷酶缺乏,是一种罕见的常染色体隐性溶酶体贮积症,其中所述酶岩藻糖苷酶没有在细胞中被恰当地用来降解岩藻糖。该酶通常裂解溶酶体中称为低聚糖的长的糖链。

[0270] 在一个实施方式中,提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗 II 型唾液酸贮积病或 I 型粘脂贮积症(也被称为神经氨酸酶缺乏)。

[0271] 在一个实施方式中,I 型唾液酸贮积病不是本发明的目标。

[0272] 应理解,II 型唾液酸贮积病在本发明中意指与不直接依赖 BMP 作为辅因子的酶相关的变体或疾病,更正确地表示为 I 型粘脂贮积症(或神经氨酸酶缺乏)。

[0273] I 型粘脂贮积症(ML I)是一种罕见的遗传性溶酶体贮积症,具有类似粘多糖贮积症和鞘脂贮积症的临床和组织学结果。该疾病最初被分类为脂粘多糖贮积病,之后被分类至现已知为粘脂贮积症的类似疾病的组。患有 ML I 的患者随后发现在白血球和培养成纤维细胞中具有 α -N-乙酰神经氨酸酶(神经氨酸酶或唾液酸酶)的单一性缺乏(isolated deficiency),并且因此在尿中具有增加含量的唾液酸寡糖。由于神经氨酸酶缺乏,ML I 现

在根据唾液酸酶分类,是一组由于单一性神经氨酸酶而生物化学上不同的病种。识别了 ML I 的两种主要的临床表型。

[0274] 各种缺陷类型

[0275] 一个方面,本发明提供能够提高 Hsp70 细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,用于治疗选自有以下组成的组的溶酶体贮积症:涉及酶缺陷、酶的翻译后修饰的缺陷、非酶蛋白的缺陷、膜运输蛋白缺陷、酶保护性蛋白缺陷、跨膜蛋白缺陷和 / 或非跨膜蛋白缺陷的疾病。

[0276] LSD 的当前治疗形式

[0277] 针对溶酶体贮积病没有治愈,治疗多为症状性的,不过已经尝试了骨髓移植和酶替代疗法 (ERT) 并且取得一些成功。此外,在专科中心正在进行母系脐带血移植用于这些疾病中的一些。然而,移植疗法伴随有多种副作用,且常常使患者产生并发症。此外,底物减少疗法(用于减少贮积物质的集聚的方法)目前正在用于评价这些疾病中的一些。

[0278] 对于多数溶酶体贮积病,未满足的主要需求仍然是提供有效的治疗形式。

[0279] 已经针对一些溶酶体贮积病开发出了酶替代疗法,用于治疗戈谢病的 **Cerezyme[®]** 已经上市多年。通过重组技术制备缺陷性酶葡糖脑苷脂酶,并通过静脉输注数小时施予。治疗不是治愈性的,且患者需要终生治疗以阻止疾病的发展。通过 ERT 可改善一些症状。

[0280] 然而,对于多数 LSD,还没有开发出有效地 ERT。这可能是由于缺陷性酶的复杂亚基结构使活性酶的生产被证明是一个难题。确实,酶在生成后可能错误折叠。

[0281] 对于可利用 ERT 的那些 LSD,存在使该治疗形式较不理想的缺点。首先且最重要地,ERT 是非常昂贵的治疗形式,其对社会造成经济负担且使许多患者难以接近。此外,ERT 仅特异地针对一种疾病。已经报道了 **Cerezyme[®]** 的一些副作用,包括免疫反应的形成、恶心、呕吐、腹痛、腹泻、皮疹、疲劳、头疼、发烧、头晕眼花、寒战、背疼和心率快速以及过敏反应提示性症状。

[0282] 因此,本发明公开的内容提供了用于治疗溶酶体贮积病的创新性新方法。这尤其与还没有开发出有效疗法的这些疾病、可能受益于较低廉的治疗的那些疾病以及可能受益于包含本发明的生物活性剂的组合疗法的那些疾病有关。

[0283] 如本文所公开的,本发明的方法提供了显著比 ERT 廉价且针对多于一种具体溶酶体贮积症的治疗形式。

[0284] 分子伴侣

[0285] 细胞在开始转录以及之后翻译 DNA 遗传密码时消耗大量能量,最终产生具有细胞生命的这个点所需要的功能的多肽。然而,为了获得完整功能的蛋白,必须克服最后的许多障碍,其中之一是该新生多肽链的正确折叠。获得正确折叠的进化意义是明显的,合成没有正确构象并由此没有功能的肽不仅是一种可怕的能量浪费,而且此类蛋白在细胞腔室中的聚合可能证明对细胞是有害的。考虑到高蛋白浓度的细胞内环境,这种聚合事实上是一种完全可能的结果,由此蛋白产生了复杂且完善的机器帮助蛋白折叠以使蛋白在此条件下维持功能状态并不意外。这些蛋白被统称为分子伴侣,因为象其人类对应物一样,它们防止其不成熟客户之间的不利相互作用。

[0286] 分子伴侣发现于蛋白发生构象重排的所有细胞区室中,虽然蛋白合成是细胞内未折叠肽的主要来源,但当细胞面临高温或可能使蛋白结构变化由此易于未折叠和聚合的其它刺激物时,利用包括产生保护性蛋白的特定细胞应答应对。这种应答是在从原核细胞至真核细胞的各种细胞类型中观察到的现象,被称为热休克反应或应激反应。由这种应答诱导的蛋白被称为热休克蛋白(HSP),其具有几个家族。这些家族由在序列上、结构上和功能上相关的蛋白组成,然而不同家族的伴侣分子可在结构和细胞功能上明显不同。伴侣分子家族的主要实例是Hsp70蛋白,其构成了真核细胞的多数区室中、真细菌中和许多古细菌(archae)中存在的普遍性伴侣系统的核心部分。除了作为伴侣分子外,最近发现该家族参与细胞稳态的其它方面,最明显地通过其抗凋亡性质、其免疫性功能和癌细胞对Hsp70上调的明显依赖性。

[0287] 热休克蛋白70家族

[0288] Hsp70蛋白参与包括蛋白折叠和不稳定细胞蛋白的降解在内的多种细胞过程,并且还发挥其它细胞保护性作用。Hsp70在这些过程中的共同作用似乎是与部分折叠的多肽的短疏水部分结合,由此促进准确折叠并防止聚合。在真核细胞中,Hsp70伴侣分子在体内与调节其功能循环的主要步骤的不同类蛋白相互作用;在这些蛋白中有J-结构域家族蛋白Hsp40。此外,已经鉴定出了额外的结伴蛋白,其中一些将Hsp70连接至诸如Hsp90系统的其它伴侣分子系统。

[0289] 人Hsp70家族的成员

[0290] 分子伴侣的一些重要功能包括蛋白至细胞区室的输送、在胞质溶胶、内质网和线粒体中的蛋白折叠、防止蛋白聚合以及错误折叠蛋白的重折叠。目前,人Hsp70家族包括由不同基因编码的10个成员,该部分旨在提供这些家族成员在功能、表达谱和同源性/序列同一性方面的概述。虽然Tavaria et al.已经制定了一套通用的规则,该规则提供了基因座名称、基因和蛋白之间的逻辑联系,但关于不同人Hsp70家族成员的命名仍存在许多混淆。然而,由于种类间仍然存在一些混淆,在本文中提供其基因座的名称表示Hsp70基因和蛋白。名称Hsp70可以表示基因座名称为HSPA1A和HSPA1B的两种诱导型Hsp70家族成员,或者如本文的通用性所显示的整体表示整个Hsp70家族。然而,如本发明全文所使用的,Hsp70意在表示基因座名称为HSPA1A和HSPA1B的两种诱导型Hsp70家族成员的任一个。

[0291] HspA1A和HspA1B

[0292] 由基因座HSPA1A和HSPA1B转录的基因是两个热/应激诱导Hsp70基因,涉及人Hsp70的多数文献都指的是由这两个基因编码的蛋白。所述基因产生由641个氨基酸构成,彼此具有99%的同一性且是首个被克隆和表征的人Hsp70家族成员的蛋白。这些基因在6p21.3被连锁在MHC III类复合体中、无内含子且启动子区域包含HSE,使其能够与HSF结合,并在多种细胞攻击的应答中诱导转录。

[0293] 人热休克70kDa蛋白1A(HSPA1A)的蛋白质序列是(SEQ ID NO:1)(登录号:NM_005345.5):

[0294] MAKAAAIGIDLGGTYSCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVALNPQNTVFD
AKRLIGRKFQDPVVQSDMKHWPQVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYPPEISSMVLTKMKEIAEAYLGYPVTNAVITV
PAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNLVLRINEPTAAAIAAYGLDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIIDGIFEVKATA
GDTHLGGEDFDNRLVNHVVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRA

RFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRIPKVQKLLQDFNGRDLNKSINPDEAVAYGAAVQA
AILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLTAGGVM TALIKRNSTIPTKQTQIFTTYS DNQPGVLIQVYEGERAMTKDNN
LLGRFELSGIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVTATDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAEKYKAEDV
QRERVS AKNALESYAFNMKSAVEDEGLKGGKISEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKELEQVCNPIIS
GLYQGAGGPGPGGFGAQQGPKGGSGSGPTIEEVD

[0295] 人热休克 70kDa 蛋白 1A(HSPA1A) 的核酸 (DNA) 序列是 (SEQ ID NO:2) (登录号:
NM_005345.5):

[0296]

```
1 ataaaagccc aggggcaagc ggtccggata acggetagcc tgaggagctg ctgcgacagt  
61 ccactacett ttctgagagt gactcccggt gtcccaaggc ttcccagagc gaacctgtgc
```

[0297]

```

121 ggctgcaggc accggcgcgt cgagtttccg gcgtccggaa ggaccgagct cttctcgcgg
181 atccagtgtt cegtttccag cccccaatct cagagcggag ccgacagaga gcaggggaacc
241 ggcatggcca aagccgcggc gatcggcatc gacctgggca ccacctactc ctgctgggg
301 gtgttccaac acggcaaggt ggagatcatc gccaacgacc agggcaaccg caccaccccc
361 agctacgtgg ctttcacgga caccgagcgg ctcacggggg atgctggcca gaaccaggtg
421 gcgctgaacc cgcagaacac cgtgtttgac gcgaagcggc tgattggccg caagtctggc
481 gaccctgggg tgcagtcgga catgaagcac tggcctttcc aggtgatcaa cgacggagac
541 aagcccaagg tgcaggtgag ctacaagggg gagaccaagg cattctacc caggagatc
601 tcgtccatgg tgctgaccaa gatgaaggag atcgcggagg cgtacctggg ctaccctggg
661 accaacgcgg tgatcacctg gccggcctac ttaacgact cgcagcgcga ggccaccaag
721 gatgcgggtg tgatcgcggg gctcaacgtg ctgctggatc tcaacgagcc caccgcccgc
781 gccatgcctt acggcctgga cagaacgggc aagggggagc gcaacgtgct catctttgac
841 ctgggctggg gcaccttcca cgtgtccatc ctgacgatcg acgacggcat cttcagaggtg
901 aaggccacgg ccggggacac ccacctgggt ggggaggact ttgacaacag gctggtgaac
961 cacttctgtg aggagttcaa gagaaaacac aagaaggaca tcagccagaa caagcgagcc
1021 gtgaggcggc tgcgcaccgc ctgctgagag gcccaagagga ccctgtctgc cagcaccaccg
1081 gccagcctgg agatcgactc cctgtttgag ggcctcgaact tctacacgct catcaccagg
1141 gcgaggttcg aggagctgtg ctccgacctg ttccgaagca ccctggagcc cgtggagaag
1201 gctctgcgcg acgccaagct ggacaaggcc cagattcacg acctggtcct ggtcgggggc
1261 tccaccgcga tccccaaggt gcagaagctg ctgcaggact tcttcaacgg gcgacacctg
1321 aacaagagca tcaacccgca cgaggctgtg gcctacgggg cggcgggtgca ggcggccatc
1381 ctgatggggg acaagtccga gaacgtgcag gacctgctgc tctggtgact ggctcccctg
1441 tcgctggggc tggagacggc cggagggcgt atgactgcc tgatcaagcg caactccacc
1501 atccccacca agcagacgca gatcttcacc acctactccg acaaccaacc cggggtgctg
1561 atccaggtgt acgagggcga gagggccatg acgaaagaca acaatctgtt ggggcgcttc
1621 gagctgagcg gcatccctcc ggccccagg ggcgtgccc agatcgaggt gaccttcgac
1681 atcgatgcca acggcatcct gaacgtcag gccacggaca agagcaaccg caaggccaac
1741 aagatcacca tcaccaacga caagggcccgc ctgagcaagg aggagatcga gcgcatggtg
1801 caggaggcgg agaagtacaa agcggaggac gaggtgcagc gcgagagggg gtcagccaag
1861 aacgccttgg agtctacgc cttcaacatg aagagcgcg tggaggatga ggggtcaag
1921 ggcaagatca gcgaggcggc caagaagaag gtgctggaca agtgtaaga ggtcatctcg
1981 tggctggacg ccaacacctt ggccgagaag gacgagtttg agcacaagag gaaggagctg
2041 gagcaggtgt gtaacccat catcagcggc ctgtaccagg gtgcoggtg tcccgggctt
2101 gggggcttcg gggctcaggg tcccaaggga gggctctgggt caggccccac cattgaggag
2161 gtagattagg ggcctttcca agattgctgt ttttgtttg gagcttcaag actttgcatt
2221 tcctagtatt tctgtttgtc agttctcaat ttctgtgtt tgcaatggtg aaatttttg
2281 gtgaagtact gaacttgctt tttttccggg ttctacatgc agagatgaat ttatactgcc
2341 atcttacgac tttttcttct ttttaataca cttaactcag gccatttttt aagttggtta
2401 cttcaaagta aataaacttt aaaattcaaa aaaaaaaaa aaaaa

```

[0298] 人热休克蛋白 70kDa 蛋白 1B(HSPA1B) 的蛋白序列是 (SEQ ID NO:3) (登录号: NM_005346):

[0299] MAKAAAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFDTERLIGDAAKNQVALNPQNTVFD
AKRLIGRKFQDPVVQSDMKHWPFFQVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYPEEISSMVLTKMKEIAEAYLGYPTNAVITV
PAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNLVRI INEPTAAAIAYGLDRTGKGERNVLI FDLGGTFDVSILIDDGIFEVKATA

GDTHLGGEDFDNRLVNHVVEEFKRKHKKDI SQNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRA
 RFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRIPKVQKLLQDFNDRDLNKSINPDEAVAYGAAVQA
 AILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLLETAGGVMTALIKRNSTIPTKQTQIFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNN
 LLGRFELSGIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVTATDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKADEV
 QRERVSAKNALESYAFNMKSAVEDEGLKGI SEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKELEQVCNPIIS
 GLYQGAGGPGPGGFGAQGPKGSGSGPTIEEVD

[0300] 人热休克蛋白 70kDa 蛋白 1B(HSPA1B) 的核酸 (DNA) 序列是 (SEQ ID NO:4) (登录号 :NM_005346):

[0301]

```

1  ggaaaacggc cagcctgagg agctgctgcg agggctccgct tcgtctttcg agagtgactc
61  ccgcgggtccc aaggctttcc agagcgaacc tgtgcggtcg caggcaccgg cgtggtgagt
121 ttccggcggtt ccgaaggact gagctcttgt cgcggatccc gtcgcgcggt tccagcccc
181 agtctcagag cggagcccac agagcagggc accggcatgg ccaaagccgc ggcgatcggc
241 atcgacctgg gcaccaccta ctctgctgtg ggggtgttcc aacacggcaa ggtggagatc
301 atcgccaacg accagggcaa ccgcaccacc ccagctacg tggccttcac ggacaccgag
361 cggtcatcgc gggatgctgc caagaaccag gtggcgtga acccgagaa caccgtgttt
421 gaocggaagc ggctgatcgg ccgcaagttc ggcgaccggc tgggtgcagtc ggacatgaag
481 cactggcctt tccaggtgat caacgacgga gacaagccca aggtgcaggt gagctacaag
541 ggggagacca aggcattcta ccccgaggag atctcgtcca tgggtctgac caagatgaag
601 gagatcgccg aggcgtacct gggtaccggc gtgaccaacg cggtgatcac cgtgccggcc
661 tacttcaacg actcgcagcg ccaggccacc aaggatgcgg gtgtgatcgc ggggctcaac
721 gtgctgcgga tcatcaacga gccacgggcc gccgccatcg cctacggcct ggacagaacg
781 ggcaaggggg agcgcgaacgt getcatcttt gacctgggcg ggggcacctt cgacgtgtcc
841 atcctgacga tcgacgacgg catcttcgag gtgaaggcca cggccgggga caccacctg
901 ggtggggagg actttgacaa caggctggtg aaccacttcg tggaggagt caagagaaaa
961 cacaagaagg acatcagcca gaacaagcga gccgtgaggc ggctgcgcac cgcctgcgag
1021 agggccaaga ggacctgtc gtccagcacc caggccagcc tggagatcga ctccctgttt
1081 gagggatcgc acttctacac gtccateacc agggcgaggt tcgaggaget gtgctccgac
1141 ctgttccgaa gcaccctgga gcccggtggag aaggctctgc gcgacgccc aa gctggacaag
1201 gccagatte acgacctggt cctggctggg ggtccacc ccacccccaa ggtgcagaag
1261 ctgctgcagg acttcttcaa cgggcgcgac ctgaacaaga gcatcaacc ccgacgaggct
1321 gtggcctacg gggcggcggt gcaggcggcc atcctgatgg gggacaagtc cgagaacgtg
1381 caggacctgc tgctgctgga cgtggctccc ctgtcgtctg ggctggagac ggccggaggc
1441 gtgatgactg ccctgatcaa gcgcaactcc accatcccca ccaagcagac gcagatcttc
1501 accacctact ccgacaacca acccggggtg ctgatccagg tgtacgaggg cgagagggcc
1561 atgacgaaag acaacaatct gttggggcgc ttcgagctga gcggcatccc tccggcccc
1621 aggggctgtc ccagatcga ggtgaccttc gacatcgtg ccaacggcat cctgaacgtc
1681 acggccacgg acaagagcac cggcaaggcc aacaagatca ccatcacc aa cgacaagggc
1741 cgctgagca aggaggagat cgagcgcgat gtgcaggagg cggagaagta caaagcggag
1801 gacgaggctc agcgcgagag ggtgtcagcc aagaacgccc tggagtecta cgcttcaac
1861 atgaagagcg ccgtggagga tgaggggctc aagggcaaga tcagcgaggc ggacaagaag
1921 aaggttctgg acaagtgtca agaggtcacc tcgtggctgg acgccaacac cttggccgag
1981 aaggacgagt ttgagcacia gaggaaggag ctggagcagg tgtgtaacc catcatcagc

```

[0302]

```

2041 ggactgtacc aggggtgccgg tgggtcccggg cctggcggct tgggggctca ggggtcccaag
2101 ggaggggtctg ggtcaggccc taccattgag gaggtggatt aggggccttt gttctttagt
2161 atgtttgtct ttgaggtgga ctgttgggac tcaaggactt tgctgctggt ttctatgctc
2221 atttctgctt cagctctttg ctgcttcact tctttgtaaa gttgtaacct gatggtaatt
2281 agctggcttc attatTTTTG tagtacaacc gatatgttca ttagaattct ttgcatttaa
2341 tgttgatact gtaaggggtg ttctgtccct ttaaataaat caacactgcc accttctgta
2401 cgagtttggt tgTTTTTTTT tTTTTTTTTT tTTTTTgctt ggcgaaaaca ctacaaaggc
2461 tgggaatgta tgTTTTTATA atttgtttat ttaaataatga aaaataaaat gttaaacttt
2521 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a

```

[0303] HspA1L 和 HspA2

[0304] 由于雄性生殖细胞的强表达偏好而将这两种 Hsp70 家族成员称为“沙文基因(chauvinist gene)”。hspA1L 基因是组成型表达的无内含子的 Hsp70 家族成员,位于第 6 号染色体上相同的 MHC III 类复合体中的 HSPA1A 基因座端粒端(telomeric)4kb。该基因在热休克前后均以少量表达,但具有有利于在小鼠、大鼠和人中的睾丸的表达图谱,其是与 HspA1A 具有 90% 同一性的 641 个氨基酸(aa)的蛋白质。hspA2 基因首次分离自小鼠基因文库,后来显示在包括骨骼肌、卵巢、小肠、结肠、脑、胎盘和肾的多种人体组织中以低水平组成型表达,但在睾丸中高表达。该基因的表达(或者缺乏表达)与人的异常精子发生有关,hspA2^(-/-) 雄性小鼠是不育的。该基因位于第 14 号染色体上,产生与 HspA1A 具有 84% 同一性的 639aa 的蛋白,虽然由于两篇文献已经提出了不同的基因座位置 14q24.1 和 14q22 使得其准确位置仍在讨论中。

[0305] HspA6 和 HspA7

[0306] hspA6 和 hspA7 基因是 Hsp70 家族的热诱导型成员,在小鼠中没有明显的对应物。这两个基因在启动子位置包含 HSE,且无内含子。所述基因共同位于第 1 号染色体上,其核苷酸序列彼此具有 94% 的同一性。然而,由于 hspA7 基因具有单个核苷酸插入,从而在 +1324 产生早熟的终止密码,仅 HspA6 具有功能。HspA6 蛋白的长度为 643aa,且显示与 HspA1A 和 HspA1B 具有 77% 的同一性。

[0307] HspA5 和 HspA9

[0308] hspA5 和 hspA9 基因是 Hsp70 家族的两个区室特异性成员。655aa 的 HspA5 蛋白位于内质网(ER)中,并促进该区室内新合成蛋白的折叠和运输。该蛋白与 HspA1A 具有 64% 的同一性,其基因位于 9q34。679aa 的 HspA9 蛋白位于线粒体中,其在此帮助蛋白质在运输穿过线粒体膜后的折叠。HspA9 位于 5q31.1,蛋白与 HspA1A 具有 52% 的同一性。

[0309] HspA8

[0310] 同源 Hsp70 成员(被称为 Hsc70)由位于 11q24 的 hspA8 基因编码,产生与 HspA1A 具有 86% 同一性的 646aa 的蛋白,并且其所有组织和细胞系中均组成型地表达。该蛋白在细胞内的功能与 Hsp70 类似,提供在正常条件下所需的伴侣,但还在披网格蛋白小泡的去包被中以及伴侣分子介导的自吞噬中发挥作用。

[0311] HspA3 和 HspA4

[0312] 由于对 HSPA3 是否根本不存在还存在怀疑并且 HSPA4 最可能是 Hsp110 家族的成员但关于其目前还没有了解(除了其位于 5q31.1-2 的染色体位置外),因此在本文中将对这两者进行讨论。

[0313] 表 1: 人 Hsp70 基因家族的列表。列出了这些基因的基因组座名称、本文使用的名称、染色体的定位(位置)、与 HspA1A 的氨基酸序列同一性以及文献中参见的可选名称。

[0314]

基因组	本文使用的名称, 基因/蛋白	位置	与 HSPA1A 序列同一性(%)	可选的名称
HSPA1A	<i>hspA1A</i> /HspA1A (Hsp70)	6p23.1	100	Hsp70; Hsp72; Hsp70-1
HSPA1B	<i>hspA1B</i> /HspA1B (Hsp70)	6p23.1	99	Hsp70; Hsp72; Hsp70-2
HSPA1L	<i>hspA1L</i> /HspA1L	6p23.1	90	Hsp70-Hom; Hsp70t
HSPA2	<i>hspA2</i> /HspA2	14q24.1	84	Hsp70-3
HSPA4	<i>hspA4</i> /HspA4	5q31.1	31	Hsp70RY; APG-2
HSPA5	<i>hspA5</i> /HspA5	9q34	64	BiP; GRP78
HSPA6	<i>hspA6</i> /HspA6	1q	84	Hsp70-6; Hsp70B'
HSPA7	<i>hspA7</i> /HspA7	1q	-	Hsp70-7; Hsp70B
HSPA8	<i>hspA8</i> /HspA8 (Hsc70)	11q24	86	Hsc70; Hsp73
HSPA9	<i>hspA9</i> /HspA9	5q31.1	52	GRP75; PBP74; mtHsp75; 致死蛋白(mortalin); mot-2

[0315] Hsp70 的转录调控

[0316] 人 Hsp70 启动子的基因组印迹显示, 热休克 / 应激诱导热休克转录因子 (HSF) 与被称为热休克元件 (HSE) 的包含 nGAAn 序列的区域迅速结合。正常情况下, Hsp70 与残留在胞质中的 HSF 结合, 但在应激过程中 HSF 从 Hsp70 分离并在被 PKC 或其它丝氨酸 / 苏氨酸激酶磷酸化后采取均三聚体构象 (homotrimeric conformation)。HSF 三聚体进入细胞核, 在此其与位于 Hsp70 基因的启动子区域的 HSE 结合并进一步被 HSF 激酶磷酸化。

[0317] 目前已经在人中表征了三种 HSF (HSF1、HSF2 和 HSF4)。HSF1 是在多数应激条件下均被激活的主要转录因子, 并且对可被分类成生理 (例如细胞分裂、激素刺激)、病理 (例如感染、发烧、炎症、恶性病) 和环境条件 (例如热休克、重金属、乙醇) 的多种刺激物产生应答。HSF2 仅对氯高铁血红素产生应答, 而 HSF4 优先在人心脏、胰腺、脑和骨骼肌中表达, 缺乏在所有脊椎动物 HSF 中均有且似乎抑制 HSP 表达的 C- 末端疏水性重复。不清楚负责合成组成型表达的 Hsp70 (Hsc70) 的 Hsp70 基因调控, 但似乎 HSF 并不参与其中。

[0318] 虽然 HSF 是调节 HSP 表达的最著名因子, 但已知其它转录因子也具有同一功能。已经证明特异性 CCAAT- 盒结合因子 (CBF) 诱导 Hsp70 转录, 肿瘤抑制因子 p53 可以通过与 Hsp70 的启动子区结合和通过中和 CBF 而抑制转录, 并且 HSF 能够被热休克因子结合蛋白 1 (HSBP1) 拮抗, 其通过这种方式削弱 Hsp70 的转录。

[0319] Hsp70 的结构和功能性质

[0320] 通过真细菌 Hsp70 (DnaK)、其 Hsp40 辅伴侣 (DnaJ) 和核苷酸置换因子 GrpE, 最大

程度了解 Hsp 系统的结构和功能。然而,虽然有证据提示 GrpE 的解偶联,但通常认为所述机制在真核生物中是类似的。本部分将集中于真核生物 Hsp70 系统,但在恰当时也将包括对真细菌系统的讨论。

[0321] Hsp70 包括两个功能实体——N 末端 ATPase 结构域和较小的 C- 末端肽结合结构域。ATPase 结构域包含被裂隙 (cleft) 分开的两个亚结构域,其中,所述裂隙含有决定 C- 末端结构域的肽结合性质的核苷酸结合位点。当结合 ATP 时,肽底物迅速结合和解离(虽然亲合力低),而在没有核苷酸或 ADP 结合至 N- 末端结构域的情况下,肽结合和解离的速率下降而亲合力提高。因此,ATP 水解作为 Hsp70 的两种状态之间的分子开关,其在真核细胞中的循环受到 J- 结构域家族蛋白 Hsp40 的控制而在真细菌中则受 DnaJ 和 GrpE 的控制。Hsp40 的 N- 末端 J- 结构域与 Hsp70 结合,加速 ATP- 水解,由此促进肽捕获,而 Hsp40 的 C- 末端部分通过识别疏水肽而作为伴侣分子发挥作用,由此将 Hsp70 募集至新生肽链。重要的是注意到,分子伴侣不提供用于结合蛋白的折叠的特定立体构象,但抑制非生产性的相互作用,由此使所述蛋白更高效地折叠成其新生结构。

[0322] 在真细菌中,GrpE 诱导从 DnaK (细菌 Hsp70) 释放 ADP,而对于真核细胞的 Hsp70 蛋白,这种因子似乎可有可无,原因是该 ATPase 循环中的限速步骤不是结合 ADP 的解离而是 ATP 水解本身。然而,在真核细胞中由额外的蛋白调节 Hsp70 的功能;均低聚蛋白 Hip (Hsp70 相互作用蛋白) 通过稳定 Hsp70 的 ADP 结合态而作为正调节子,而 Hsp-70 结合蛋白 (CHIP) 和 Bcl-2- 相关抗凋亡蛋白 -1 (Bag-1) 的蛋白羧基末端均具有抑制作用:CHIP 通过抑制 Hsp70 的 ATPase 活性, Bag-1 通过拮抗 Hsp70 的重折叠活性。进一步的相互作用由两种人 Hsp40 蛋白 Hdj1 和 Hdj2 提供,除了其 Hsp40 功能(如上所述)外,这两种蛋白还显示通过 Hop (Hsp- 组织蛋白) 促进 Hsp70 和 Hsp90 的偶联,所述 Hop 是通过其分别与 Hsp70 和 Hsp90 的延长 C- 末端序列结合的两个三十四肽重复 (TPR) 结构域与伴侣分子物理连接的衔接蛋白。最近表明,上述一些蛋白调控非天然或不可逆错误折叠蛋白从伴侣分子至泛素- 蛋白酶体机器的运输。除了其对 Hsp70 的负调节作用外,CHIP 蛋白还能够通过 N- 末端 TPR 结构域与 Hsp90 结合并通过 C- 末端泛素激酶结构域靶向 Hsp90 底物降解,而且还能够能够在功能上与结合了 Hsp70 和蛋白酶体的 BAG-1 配合。这些发现提供了使伴侣分子帮助的折叠和蛋白水解降解(胞质中蛋白组质量控制的两个主要成分)一体化的机制间的可能关联。

[0323] 通过 Hsp70 的细胞保护

[0324] 除了其作为分子伴侣的结果的抗凋亡能力(即在使蛋白变性的条件下促进蛋白折叠)外,Hsp70 还能够以多种其它方式影响细胞存活,包括保护在缺血再灌注损伤后线粒体的功能,阻断在用 TNF 刺激原代成纤维细胞后应激激酶 c-jun N- 末端激酶 (JNK) 的激活,并且已经提出 Hsp70/Bag-1 复合物在细胞应激条件过程中调节细胞生长和有丝分裂。Hsp70 保护细胞免受由一些诸如 TNF、TRAIL、氧化应激、UV- 辐射和抗癌药多柔比星、依托泊苷和紫杉醇的刺激物诱导的细胞死亡的能力进一步凸显了其抗凋亡性质。最后,由于已经证明 Hsp70 拮抗凋亡诱导因子 (AIF),并在 caspase-3 下游发挥抗凋亡功能,报道还提供了 Hsp70 和凋亡机器之间的更直接的相互作用的证据。

[0325] 最近的证据还证明,Hsp70 的有效细胞保护作用部分是由于溶酶体膜的稳定化。作为对此的印证,Hsp70 的缺失触发癌细胞中溶酶体膜的早通透化和组织蛋白酶介导的细胞死亡,外源 Hsp70 有效抑制由多种应激诱导的溶酶体去稳定。此外,Hsp70 缺陷型小鼠患有

由溶酶体蛋白酶至胞质中的泄漏引起的胰腺炎。所有这些事件强调了 Hsp70 作为 PCD 的重要调节物并由此作为细胞存活因子的作用。

[0326] 细胞外的 Hsp70

[0327] 由前面的段落可以看出, Hsp70 的细胞内功能对正确的细胞稳态至关重要, 尤其是在面对毒性应激时。然而, 细胞外 Hsp70 (eHsp70) 的有益作用 (尤其当提及免疫和炎症应答时) 也在显示, 其可能在癌细胞的清除中发挥重要作用。此外, 对于 eHsp70, 还显示参与对应激的一般生理适应和保护对抗细胞损伤的作用。

[0328] 细胞外 Hsp70 和神经保护

[0329] 关于 eHsp70 存在的首个证据来自对乌贼巨大神经索的研究, 其中证明温度的提高诱导围绕轴索的神经胶质细胞鞘中并被转移至所述轴索的一些热休克蛋白。这些发现不久即在培养的大鼠胚胎细胞中重现, 并且重要的是, 关于这点, 已经提供了负责 Hsp70 释放的非典型胞吐途径的证据, 因为典型分泌途径的两个抑制剂莫能菌素或秋水仙碱均不能阻挡 Hsp70 的分泌。自这些出版物公开以来, 其它报道也提供了在多种动物模型系统 (例如青蛙、小龙虾和大鼠) 中神经胶质释放 Hsps 和神经元摄取的实例。培养的人成胶质细胞瘤细胞的研究提供了在胶质细胞作为人体中 eHsp70 来源的作用的证据。该研究表明, 在对照条件下, 每一百万细胞在 24 小时的时间内向培养基释放 ~ 10pg Hsp70。当时间开始时采用 20 分钟热休克时, 这种释放提高 2.5-5 倍。重要的是, 该研究还证明, eHsp70 的释放量大于细胞死亡可能占的量。这些数据都支持由 Tytell et al. 阐明的最先建议的假设, 即 Hsps 的神经胶质释放可能是在代谢应激过程中维持神经元功能的一种途径。

[0330] eHsp70 在急性应激过程中具有神经保护作用的体内证据来自于多个研究。Tidwell et al. 的研究发现, 当在轴索断裂后通过凝胶海绵应用 eHsp70 时, eHsp70 能够减少轴索断裂后运动神经细胞的数量。在同一研究中, 在施用 Hsp70 后还观察到背根神经节感觉神经元 (dorsal root ganglion sensory neuron) 细胞存活增加, 虽然这依赖于比运动神经元稍高的 Hsp70 剂量。此外, 还证明 eHsp70 保护运动神经元 (否则在小鸡胚胎发育观察中注定死亡), 并且还保护在营养因子缺乏后从小鸡脊髓分离的运动神经元。当涉及视网膜的光损害时, 也描述了 eHsp70 在体内的保护作用。在该研究中, Yu et al. 在暴露于之前已经描述的剂量的诱导损伤的光以引起严重的光感受器变性后, 玻璃体内注射重组 Hsp70 和 Hsc70 溶液。有趣的是, 右眼的玻璃体室中存在的 eHsp70 混合物在视网膜中引起明显更多的光感受器。此外, 对荧光标记的 Hsc/Hsp70 的摄取的评价证明, 在施用后 6 小时, 其仍然存在于视网膜中。通过鼻内治疗施用的细胞外 Hsp70 也显示防止大鼠内不可避免的应激的后果, 并且最近指出, 在肌萎缩性侧索硬化症小鼠模型中, 腹膜内注射的重组人 Hsp70 可有效提高寿命、延迟症状发生、保持运动功能并延长运动神经元的存活。在神经元系统中利用 Hsp70 或 Hsc/Hsp70 混合物的其他体外工作进一步证明, eHsp70 能够增强神经细胞应激耐受, 并降低多聚谷氨酰胺 (polyglutamine) 的毒性和聚合。

[0331] 细胞外 Hsp70 和免疫性

[0332] 除了在细胞保护中的作用外, 文献已经证明与质膜结合的 eHsp70 和游离的全身性 eHsp70 在免疫性中发挥作用。考虑到 Hsp70 的主要功能之一是作为细胞内蛋白的伴侣, Hsp70 能够参与免疫原性肽的结合并通过主要组织相容性复合体 (MHC) I 类分子帮助这些肽的提呈可能并不惊奇。此外, 还证明肿瘤来源的 eHsp70 作为免疫原性肽的伴侣并选择性

地与抗原提呈细胞 (APC) 结合。在受体介导的内吞后,这些 Hsp70-肽复合体被呈递至 MHC1 类分子上,导致细胞毒性 t 细胞应答。除了作为自身抗原 (self-antigen) 的伴侣外,Hsp70 还能够结合细菌 DNA 中的微生物肽和未甲基化的 CpG 基序。

[0333] 除了其作为抗原提呈伴侣分子的作用外,eHsp70 还参与先天免疫的刺激。在证明许多细胞类型释放 Hsp70 的同时,还证明 eHsp70 与包括天然自杀 (NK) 细胞、巨噬细胞、单核细胞和树突细胞在内的不同白细胞亚群上的多种受体结合。参与 eHsp70 识别的受体主要包括模式识别受体 (PRR) 并且由来自不同受体家族 (例如 toll 样受体 (TLR)、清道夫受体和 C 型凝集素) 的多种受体构成。受体结合后, eHsp70 能够引起多种细胞因子应答,包括释放诸如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-12、IL-6 和 GM-CSF 的促炎症性细胞因子 (由 NF- κ B 向细胞核的转位触发的过程),这提示 eHsp70 的细胞因子作用,其还形成使新创造的术语伴侣细胞因子 (chaperokine) 表示 eHsp70,以更好地描述 eHsp70 同时作为伴侣和细胞因子的独特功能的提议。

[0334] eHsp70 在免疫中的作用的体内研究的大部分已经在啮齿动物模型中进行。例如,在应答尾休克 (tail-shock) 中 eHsp70 浓度的提高与皮下大肠杆菌注射后炎症的降低和恢复时间的加快有关。此外,向小鼠体内递送 Hsp70 加快了伤口的愈合,这一特点可能是由于巨噬细胞对伤口死细胞的吞噬作用增强。

[0335] 缺乏 Hsp70 在人体内的免疫调节作用的证据,但研究已经证明了 eHsp70 的增加和脑损伤的预后 / 结果的改善之间的关系 (虽然也已经证明了相反的结论)。然而,还显示 eHsp70 的浓度随年龄而下降,这可能提示与年龄相关的进行全面应激反应减少的能力,这又可能解释了随着年龄增长发病率和死亡率增加,不过这还是纯的推测。

[0336] Hsp70 的释放

[0337] 除了证明 eHsp70 在邻近细胞之间 (例如在神经胶质 / 轴索模型中) 的转移的数据外,一些报道证明了循环中存在游离的 eHsp70。对该区室中存在的 Hsp70,必须从器官 / 细胞中释放出来。实现这种释放通常考虑两种主要方法。一个是主动方法,其中在外周循环中观察到的 eHsp70 是由于细胞裂解或死亡而使细胞中 Hsp70 库释放的结果。可选地,或可能另外地,Hsp70 通过非典型胞吐途径被主动释放。

[0338] 已经提出,Hsp70 和其它热休克蛋白仅在引起坏死性死亡的病理条件下释放而不在程序性细胞死亡过程中释放。毫无疑问,引起坏死的严重性损伤和病理条件可导致 Hsp70 向血液中释放。这已经被文献充分证明并且也可从逻辑上推导。然而,最近的研究已经证明,可以通过主动机制从完整细胞释放 Hsp70,并且刺激物的程度决定释放模式。Hsp70 的非坏死性释放的有力证据还来自对锻炼诱导 (exercise-induced) 的 eHsp70 至外周血的释放的研究。取决于锻炼的模式 (身体应变度 (physical strain) 越高,释放的越多),在外周血中能够检测到较多的 eHsp70 释放,并且重要地,还没有已知研究报道过 eHsp70 和肌肉损伤标记物之间的直接相关性。eHsp70 能够被释放而与细胞或组织损伤无关这一结论还被 Fleshner 及其同事极好地证明,他们证明诸如掠食性恐惧和电击的心里应激能够引发应激诱导的 eHsp70 释放,这被认为是一个依赖于儿茶酚胺信号传导的过程。

[0339] 不过,Hsp70 离开细胞的方式仍不清楚,尤其是因为 Hsp70 不含可能使其分泌的任何典型的肽引导序列。此外,由于典型分泌早就已经遭到质疑,这提示必定存在释放 eHsp70 的其它机制。已经证明 eHsp70 能够被释放至特征为外来体的小泡中,但还提出了在细胞体

系和体内 eHsp70 可以作为游离 eHsp70 被释放的证据。已经提出 eHsp70 的释放需要脂质筏,不过这还处于争论中。此外,已经表明,功能溶酶体区室对于 eHsp70 的释放是必须的,并且该释放伴随有溶酶体标记物蛋白在细胞表面的出现,提示这是一个依赖于质膜和溶酶体膜融合分泌。与上述释放是否通过外来体或者通过溶酶体的直接释放无关,有趣的是注意到一些类型的分泌性 MVB/ 晚期内涵体 / 溶酶体区室明显与所有类型的释放有关。

[0340] 由于儿茶酚胺通过 α_1 -肾上腺素受体可导致细胞内钙流动,并且由于已经提出相同的钙流动引起外来体、多泡体和溶酶体的胞吐,目前的假设是在应激情况下,作用于 α_1 -肾上腺素受体的去甲肾上腺素的增加导致细胞内的钙流动和随后 Hsp70 在外来体中的释放。

[0341] 本发明的生物活性剂

[0342] 在一个实施方式中,本发明涉及能够提高 Hsp70 的细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂的应用。

[0343] 根据本发明提高 Hsp70 的细胞内浓度和 / 或活性可以通过提供以下类型的化合物和疗法之一而实现:

[0344] -Hsp70 或其功能片段或变体

[0345] -Hsp70 诱导物和辅诱导物

[0346] • 小分子药物,例如氯吡哌醇 (Bimoclomol) 和阿莫氯醇 (Arimoclomol)

[0347] • 膜流化剂,例如苯甲醇

[0348] • 亚致死热疗 (sublethal heat therapy) ($\leq 42^\circ\text{C}$) 或过高热

[0349] • 来自消炎药和抗肿瘤药类的某些药物

[0350] • 细胞应激

[0351] • 活性氧 (ROS)、肾上腺素,去甲肾上腺素、UV 光线、放射治疗。

[0352] 因此,本发明的生物活性剂可以为提高 Hsp70 的细胞内浓度和 / 或活性的任何试剂、化学品或化合物;并且包括 Hsp70 本身、或其功能片段或变体,以及本领域技术人员已知的任何 Hsp70 诱导物或辅诱导物。

[0353] 认为生物活性剂可以直接或间接提高 Hsp70 的细胞内浓度和 / 或活性。

[0354] 在一个实施方式中,本发明的生物活性剂是 Hsp70 或其功能片段或变体。

[0355] 在另一个实施方式中,本发明的生物活性剂是 Hsp70 诱导物或辅诱导物。

[0356] 在一个实施方式中,本发明的生物活性剂包含 Hsp70 或其功能片段或变体与 Hsp70 诱导物或辅诱导物的组合。

[0357] 本发明一方面提供了能够提高 Hsp70 的细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,其用作药物。

[0358] 本发明另一方面提供了能够提高 Hsp70 的细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂,其用于治疗选自以下组成的组的疾病:糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0359] 本发明另一方面提供了能够提高 Hsp70 的细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂的应用,用于制备用于治疗选自以下组成的组的疾病的药物:糖原贮积病、神经节苷脂贮积

病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0360] 本发明另一方面提供了能够提高 Hsp70 的细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂, 用于治疗溶酶体贮积症, 其中所述溶酶体贮积症源于酶缺陷, 所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 不直接相关。

[0361] 在一个实施方式中, 所述溶酶体贮积症不选自尼曼 - 皮克病、法伯氏病、克拉伯病、I 型唾液酸沉积症、异染性脑白质营养不良、戈谢病、法布里病和鞘脂激活蛋白缺乏病的组。

[0362] 在一个实施方式中, 所述溶酶体贮积症选自糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病组成的组。

[0363] 在一个实施方式中, 所述治疗为预防、治愈或改善。在一个具体的实施方式中, 所述治疗为预防。在另一个实施方式中, 所述治疗是治愈。在再一个实施方式中, 所述治疗为改善。

[0364] 生物活性剂 -Hsp70 或其功能片段或变体

[0365] 本发明一方面提供了 Hsp70 或其功能片段或变体, 其用作药物。

[0366] 本发明的再一方面提供了 Hsp70 或其功能片段或变体, 其用于治疗选自有以下组成的组的疾病: 糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0367] 本发明的再一方面提供了 Hsp70 或其功能片段或变体在制备用于治疗选自有以下组成的组的疾病的药物中的应用: 糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0368] 本发明的再一方面提供了 Hsp70 或其功能片段或变体, 其用于治疗溶酶体贮积症, 其中所述溶酶体贮积症源于酶缺陷, 所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在不直接相关。

[0369] 在一个实施方式中, 所述溶酶体贮积症不选自尼曼 - 皮克病、法伯氏病、克拉伯病、I 型唾液酸沉积症、异染性脑白质营养不良、戈谢病、法布里病和鞘脂激活蛋白缺乏症。

[0370] 在一个实施方式中, 所述溶酶体贮积症选自以下组成的组: 糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0371] 应该理解, 本发明的 Hsp70 或其功能片段或变体可以为任何天然的或合成的产物, 并且可以通过本领域技术人员已知的任何常规技术生产。

[0372] 在一个实施方式中, Hsp70 或其功能片段或变体从天然来源中纯化。所述天然来源可以为任何植物、动物或细菌, 所述植物、动物或细菌表达或者可诱导表达适合向有此需要的个体施用的形式的 Hsp70。

[0373] 然而, 在优选的实施方式中, Hsp70 或其功能片段或变体通过合成制备。在一个优选的实施方式中, 认为 Hsp70 或其功能片段或变体可以为通过常规技术制备的重组蛋白, 并由此被称为 rHsp70。

[0374] 本发明的合成或天然 Hsp70 可以具有源自任何合适的植物、动物或细菌物种的序列。在一个实施方式中, 所述 rHsp70 源自哺乳动物。所述哺乳动物可以选自人 (*homo sapiens*)、小鼠 (*mus musculus*)、牛、狗、大鼠、鼬 (*ferret*)、猪、绵羊和猴。在另一个实施方式中, 所述 rHsp70 源自细菌。

[0375] Hsp70 的部分特征在于种间序列保守程度非常高, 由此可能使源自一个物种的 Hsp70 可用于另一个物种而不引发有害的免疫应答。

[0376] 在一个具体的实施方式中, 所述 rHsp70 具有源自人 Hsp70 的序列。

[0377] 在一个具体的实施方式中, 所述 rHsp70 具有源自多于一个物种的序列。因此, 在一个实施方式中, 所述 Hsp70 或其功能片段或变体可以为嵌合体。

[0378] 重组蛋白是源自重组 DNA 的蛋白。重组 DNA 是通过将天然不共同存在的 DNA 序列结合而形成的天然不存在的 DNA 形式。对于遗传修饰, 通过向加入相关 DNA 而将重组 DNA 引入到已有生物体 DNA (例如细菌质粒) 中, 从而编码针对特定目的的不同性状。遗传修饰不同于遗传重组, 遗传修饰不通过细胞内过程发生, 而是人为工程化。

[0379] 在一个实施方式中, 本发明的 Hsp70 与野生型 Hsp70 蛋白具有 100% 的同一性。在另一个实施方式中, 本发明的 Hsp70 与野生型 Hsp70 蛋白具有小于 100% 的同一性, 例如与野生型蛋白具有 99.9-95% 的同一性, 例如 95-90% 的同一性, 如 90-85% 的同一性, 例如 85-80% 的同一性, 如 80-75% 的同一性, 例如 75-60% 同一性。与同一性的程度无关, 保留了全部或大部分其生物功能的 Hsp70 的任何变体均涵盖于本发明内。

[0380] 在一个实施方式中, 所述生物活性剂是 Hsp70。在一个实施方式中, 所述 Hsp70 是全长 Hsp70。

[0381] 一个实施方式还提供了 Hsp70 的功能片段或变体。如本文所定义的, Hsp70 的功能片段或变体具有期望的功能, 所述期望的功能就本发明而言是逆转溶酶体贮积症的病理和 / 或提高其他分子的细胞摄取的能力。

[0382] 在一个实施方式中, 所述生物活性剂是 Hsp70 的功能片段或变体。

[0383] 在一个实施方式中, 所述生物活性剂是 Hsp70 的功能片段或变体, 其中通过野生型 Hsp70 的缺失、添加或取代对 Hsp70 进行修饰。

[0384] 野生型 Hsp70 蛋白的全长为 641 个氨基酸。在一个实施方式中, Hsp70 的片段意在表示包括全长小于 641 个氨基酸的野生型蛋白, 如小于 625 个氨基酸, 例如小于 600 个氨基酸, 如小于 575 个氨基酸, 例如小于 550 个氨基酸, 如小于 525 个氨基酸, 例如小于 500 个氨基酸, 如小于 475 个氨基酸, 例如小于 450 个氨基酸, 如小于 425 个氨基酸, 例如小于 400 个氨基酸, 如小于 375 个氨基酸, 例如小于 350 个氨基酸, 如小于 325 个氨基酸, 例如小于 300 个氨基酸, 如小于 275 个氨基酸, 例如小于 250 个氨基酸, 如小于 225 个氨基酸, 例如小于 200 个氨基酸, 如小于 175 个氨基酸, 例如小于 150 个氨基酸, 如小于 125 个氨基酸, 例如

小于 100 个氨基酸,如小于 75 个氨基酸,例如小于 50 个氨基酸,如小于 25 个氨基酸的任何片段。

[0385] 野生型 Hsp70 蛋白的全长为 641 个氨基酸。在一个实施方式中,Hsp70 的片段意在表示包括全长大于 10 个氨基酸,如大于 25 个氨基酸,例如大于 50 个氨基酸,如大于 75 个氨基酸,例如大于 100 个氨基酸,如大于 125 个氨基酸,例如大于 150 个氨基酸,如大于 175 个氨基酸,例如大于 200 个氨基酸,如大于 225 个氨基酸,例如大于 250 个氨基酸,如大于 275 个氨基酸,例如大于 300 个氨基酸,如大于 325 个氨基酸,例如大于 350 个氨基酸,如大于 375 个氨基酸,例如大于 400 个氨基酸,如大于 425 个氨基酸,例如大于 450 个氨基酸,如大于 475 个氨基酸,例如大于 500 个氨基酸,如大于 525 个氨基酸,例如大于 550 个氨基酸,如大于 575 个氨基酸,例如大于 600 个氨基酸,如大于 625 个氨基酸的任何片段。

[0386] 在一个实施方式中,认为本发明的 Hsp70 的片段的全长为 5-25 个氨基酸,如 25-50 个氨基酸,例如 50-75 个氨基酸,如 75-100 个氨基酸,例如 100-125 个氨基酸,如 125-150 个氨基酸,例如 150-175 个氨基酸,如 175-200 个氨基酸,例如 200-225 个氨基酸,如 225-250 个氨基酸,例如 250-275 个氨基酸,如 275-300 个氨基酸,例如 300-325 个氨基酸,如 325-350 个氨基酸,例如 350-375 个氨基酸,如 375-400 个氨基酸,例如 400-425 个氨基酸,如 425-450 个氨基酸,例如 450-475 个氨基酸,如 475-500 个氨基酸,例如 500-525 个氨基酸,如 525-550 个氨基酸,例如 550-575 个氨基酸,如 575-600 个氨基酸,例如 600-625 个氨基酸,如 625-640 个氨基酸。

[0387] 在一个实施方式中,Hsp70 的片段或变体包含 Hsp70 的全部或部分 ATPase 结构域。在一个实施方式中,认为本发明的 Hsp70 的片段或变体包含第 30 至第 382 的所有或部分氨基酸。在另一个实施方式中,Hsp70 的片段或变体包含 Hsp70ATPase 结构域的第 90 位氨基酸色氨酸。

[0388] Hsp70 的片段可以为野生型蛋白的截短形式,即其是较短的形式。可以通过从所述蛋白的氨基末端或羧基末端缩短该蛋白而使片段截短,或者也可以通过缺失所述蛋白的任何大小的一个或多个内部区域而使其截短。

[0389] 在一个实施方式中,Hsp70 的片段或变体可以与野生型蛋白具有 100% 的同一性。在另一个实施方式中,Hsp70 的片段或变体还可以为与野生型蛋白具有小于 100% 的同一性,例如与野生型蛋白具有 99.9-95% 的同一性,例如 95-90% 的同一性,如 90-85% 的同一性,例如 85-80% 的同一性,如 80-75% 的同一性,例如 75-60% 同一性的 Hsp70 变体。

[0390] 在一个实施方式中,Hsp70 的片段或变体可以与野生型蛋白具有 100% 的同一性。在另一个实施方式中,所述 Hsp70 的片段或变体还可以为与野生型蛋白具有小于 100% 的同一性,例如与野生型蛋白具有 99.9-95% 的同一性,例如 95-90% 的同一性,如 90-85% 的同一性,例如 85-80% 的同一性,如 80-75% 的同一性,例如 75-60% 同一性的 Hsp70 变体。

[0391] 应该理解,所述功能片段或变体的准确量化作用可能不同于全长分子的作用。在一些情况下,所述功能片段或变体可能确实比全长分子更有效。此外,考虑到片段的尺寸较小,利用片段代替全长分子可能是有利的。

[0392] 在一个实施方式中,Hsp70 的功能片段或变体可以为其中的一个或多个氨基酸已经被取代的 Hsp70 变体。所述取代可以为等同或保守性取代,或者非等同或非保守取代。

[0393] 在一个实施方式中,野生型 Hsp70 的 0.1-1% 的氨基酸被取代,例如 1-2% 氨基酸

残基,例如 2-3% 氨基酸残基,如 3-4% 氨基酸残基,例如 4-5% 氨基酸残基,如 5-10% 氨基酸残基,例如 10-15% 氨基酸残基,如 15-20% 氨基酸残基,例如 20-30% 氨基酸残基,如 30-40% 氨基酸残基,例如 40-50% 氨基酸残基,如 50-60% 氨基酸残基,例如 60-70% 氨基酸残基,如 70-80% 氨基酸残基,例如 80-90% 氨基酸残基,如 90-100% 的氨基酸残基被取代。

[0394] 在一个实施方式中,野生型 Hsp70 的 1-5 个氨基酸残基被取代,如 5-10 个氨基酸残基,例如 10-15 个氨基酸残基,如 15-20 个氨基酸残基,例如 20-30 个氨基酸残基,如 30-40 个氨基酸残基,例如 40-50 个氨基酸残基,如 50-75 个氨基酸残基,例如 75-100 个氨基酸残基,如 100-150 个氨基酸残基,例如 150-200 个氨基酸残基,如 200-300 个氨基酸残基,例如 300-400 个氨基酸残基,如 400-500 氨基酸残基被取代。

[0395] 在一个实施方式中,所述 Hsp70 的功能片段或变体是融合蛋白。在一个实施方式中,所述 Hsp70 的功能片段或变体与标签融合。

[0396] 利用 Hsp70 或其功能片段或变体的优势

[0397] 如上文所讨论的,除了针对戈谢病和法布里病开发的酶替代疗法 (ERT) 外,还没有治愈溶酶体贮积病的方法并且治疗多是对症治疗。如所述,ERT 是仅对一种具体疾病有效的非常昂贵的治疗形式。

[0398] 据本发明人所知,目前还没有为其它与脂质集聚相关的溶酶体贮积病提供 ERT 的成功尝试,因此当前未满足的主要需求是针对这些 LSD 的有效且特异的治疗。

[0399] 与溶酶体贮积病的常规治疗形式相比,向有此需要的个体施用 Hsp70 或其功能片段或变体具有多种优势。

[0400] 首先,利用现代技术生产重组蛋白(例如 rHsp70 或其功能片段或变体)是以简单且直接的方式生产足够量的 rHsp70 或其功能片段或变体。生产重组酶的常规技术为本领域技术人员所熟知。

[0401] 此外,生产重组蛋白,例如 rHsp70、其功能片段或变体是用于生产足够量的 rHsp70 或其功能片段或变体的廉价方法。与用于 ERT 的酶的生产相比,其费用大幅减少。

[0402] 此外,使用 Hsp70 或其功能片段或变体可用于治疗多于一种特异的溶酶体贮积症。这还适用于本发明的 Hsp70 诱导物和辅诱导物。确实,能够提高 Hsp70 的细胞内浓度和/或活性的生物活性剂可用于治疗可通过调节所涉及的与 BMP 相互作用的缺陷性酶的酶促活性而逆转的任何溶酶体贮积病。

[0403] 最后,由于 Hsp70 是内源产生的分子,即源自生物体、组织或细胞内的分子,因此预期施用 Hsp70 或其功能片段或变体不触发免疫应答或触发的免疫应答非常有限。由于当施用于个体时其促进治疗且减少了潜在的副作用,因此这是主要优势。

[0404] Hsp70 的异位表达

[0405] 在一个实施方式中,Hsp70 或其功能片段或变体可以由载体表达。因此,在一个实施方式中,本发明涉及编码 Hsp70 或其功能片段或变体的载体。

[0406] 在本发明的一个实施方式中,Hsp70 或其功能片段或变体可以以载体的形式施用于有此需要的个体。

[0407] 用于表达 Hsp70 或其功能片段或变体的载体可以选自以下:病毒载体(逆转录病毒和腺病毒)或非病毒载体(质粒、粘粒、噬菌体)。

[0408] 在一个实施方式中,所述载体包含一个或多个复制起点、筛选标记和一个或多个

限制性内切酶识别位点。在另一个实施方式中,所述载体可操作地与在合适的宿主细胞中控制所述 Hsp70 或其功能片段或变体转录的调控序列相连。

[0409] 如本文所述,在一个实施方式中,本发明涉及生产 Hsp70 或其功能片段或变体的方法;所述方法包括提供编码所述 Hsp70 或其功能片段或变体的载体,并在体外或在合适的宿主生物内以体内方式表达所述载体,由此产生所述 Hsp70 或其功能片段或变体的步骤。

[0410] 本发明还涉及所分离的包含编码本发明的 Hsp70 或其功能片段或变体的载体的重组或转基因宿主细胞。

[0411] 本发明还涉及产生重组或转基因宿主细胞的方法,所述方法包括以下步骤:提供编码 Hsp70 或其功能片段或变体的载体,将所述载体引入所述重组或转基因宿主细胞并任选地在所述重组或转基因宿主细胞中表达所述载体,由此产生生产所述 Hsp70 或其功能片段或变体的重组或转基因宿主细胞。

[0412] 在另一个实施方式中,本发明涉及包含上述宿主细胞的转基因哺乳动物生物体。

[0413] 在再一个实施方式中,包含本发明的重组或转基因宿主细胞的所述转基因哺乳动物生物体不是人。

[0414] 所述转基因宿主细胞可选自哺乳动物、植物、细菌、酵母或真菌宿主细胞。

[0415] 为了提高 DNA 至细胞的递送,必须保护所述 DNA 免受损伤,且必须有利于其进入细胞。已经产生了具有保护 DNA 在转染过程中免受不利降解的能力的 Lipoplex 和 polyplex。质粒 DNA 可以被脂质以类似于胶束或脂质体的组织性结构所包被。当所述组织性结构与 DNA 结合时,其被称为 lipoplex。有三种类型的脂质可用于形成脂质体:阴离子性(带负电荷)、中性或阳离子性(带正电荷)。聚合物与 DNA 的复合体被称为 polyplex。多数 polyplex 由阳离子性聚合物构成,且其产生有离子的相互作用调节。

[0416] 在另一个实施方式中,可以将 Hsp70 或其功能片段或变体作为裸 DNA 而施用。这是非病毒转染的最简单形式。可以通过使用电转化、声致孔(sonoporation)或者使用“基因枪”(利用高压气体将 DNA 包被的金颗粒射入细胞中),进行裸 DNA 的递送。

[0417] 生物活性剂——Hsp70 诱导物和辅诱导物

[0418] 在一个实施方式中,根据本发明的生物活性剂是 Hsp70 诱导物或辅诱导物。

[0419] Hsp70 诱导物是在没有伴随应激(concomitant stress)的情况下本身能够提高 Hsp70 基因表达和蛋白表达的化合物。

[0420] Hsp70 辅诱导物是在没有伴随(轻度)应激的情况下不能提高 Hsp70 基因表达和蛋白表达,但应激诱导的 Hsp70 水平的提高可被存在的 Hsp70 辅诱导物进一步提高或增强的化合物。

[0421] 本发明一方面提供了 Hsp70 诱导物或辅诱导物,其用作药物。

[0422] 本发明再一方面提供了 Hsp70 诱导物或辅诱导物,其用在选自以下组成的组的疾病的治疗中:糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0423] 本发明再一方面提供了 Hsp70 或其功能片段或变体在制造用于治疗选自以下组

成的组的疾病的药物中的应用：糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0424] 本发明再一方面提供了 Hsp70 诱导物或辅诱导物，用于治疗溶酶体贮积症，其中所述溶酶体贮积症源于酶缺陷，所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在不直接相关。

[0425] 在一个实施方式中，所述溶酶体贮积症不选自尼曼 - 皮克病、法伯氏病、克拉伯病、I 型唾液酸贮积病、异染性脑白质营养不良、戈谢病、法布里病和鞘脂激活蛋白缺乏症。

[0426] 在一个实施方式中，所述溶酶体贮积症选自以下组成的组：糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0427] 在一个实施方式中，本发明的生物活性剂是 Hsp70 诱导物或辅诱导物。在一个具体的实施方式中，本发明的生物活性剂是 Hsp70 诱导物。在另一个具体的实施方式中，本发明的生物活性剂是 Hsp70 辅诱导物。

[0428] 小分子药物——羟胺衍生物

[0429] 在一个实施方式中，本发明的生物活性剂是 Hsp70 辅诱导物。在再一个实施方式中，所述 Hsp70 辅诱导物是小分子药物。

[0430] 在一个具体的实施方式中，本发明的 Hsp70 辅诱导物是羟胺衍生物。在再一个实施方式中，所述羟胺衍生物可选自氯吡哌醇 (BRLP-42)、阿莫氯醇 (BRX-220)、BRX-345 和 BGP-15。

[0431] 在一个具体的实施方式中，所述羟胺衍生物是阿莫氯醇 (BRX-220)。

[0432] 氯吡哌醇 ([2-羟基-3-(1-哌啶基)丙氧基]-3-吡啶-亚胺酰基-氯马来酸盐) ([2-hydroxy-3-(1-piperidinyl)propoxy]-3-pyridine-carboximidoyl-chloride maleate) 是最初开发用于治疗糖尿病并发症 (例如神经病) 的无毒性化合物。已经证明氯吡哌醇部分地通过 HSF-1 的激活提高细胞内包括 Hsp70 在内的热休克蛋白 (HSP)，从而提高试验应激条件下的细胞存活。已经证明氯吡哌醇在没有未折叠蛋白时具有 Hsp70 辅诱导的能力，并且氯吡哌醇与带负电荷的膜脂质相互作用并提高其流动性。BRX-345 是氯吡哌醇的结构类似物，并且诱导 HSP 的能力略小。

[0433] 阿莫氯醇 (BRX-220) 是氯吡哌醇的类似物，其与热休克蛋白相互作用并放大热休克反应。阿莫氯醇目前正处于 ALS (肌萎缩性侧索硬化，一种进行性神经退化病症) 治疗的临床试验中。阿莫氯醇为 CytRx 公司所有。

[0434] 在某些实施方式中，根据本发明的生物活性剂是艾沙那定 (iroxanadine, 5-(哌啶-1-基甲基)-3-吡啶-3-基-5,6-二氢-2H-1,2,4-噁二嗪) (5-(piperidin-1-ylmethyl)-3-pyridin-3-yl-5,6-dihydro-2H-1,2,4-oxadiazine)。

[0435] 因此，本发明一方面提供了在选自以下组成的组的疾病治疗中使用的羟胺衍生物 Hsp70 辅诱导物：糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢

紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0436] 本发明再一方面提供了羟胺衍生物 Hsp70 辅诱导物在制造用于治疗选自以下组成的组的疾病的药物中的应用：糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0437] 本发明再一方面提供了羟胺衍生物 Hsp70 辅诱导物，用于治疗溶酶体贮积症，其中所述溶酶体贮积症源于酶缺陷，所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在不直接相关。

[0438] 在一个实施方式中，所述溶酶体贮积症不选自尼曼 - 皮克病、法伯氏病、克拉伯病、I 型唾液酸贮积病、异染性脑白质营养不良、戈谢病、法布里病和鞘脂激活蛋白缺乏症。

[0439] 在一个实施方式中，所述溶酶体贮积症选自以下组成的组：糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0440] 膜流化剂

[0441] 在一个实施方式中，本发明的生物活性剂是 Hsp70 诱导物。在再一个实施方式中，所述 Hsp70 诱导物是膜流化剂。

[0442] 利用膜流化剂的治疗还可以被称为脂质疗法。

[0443] 在一个具体的实施方式中，本发明的 Hsp70 诱导物是选自以下的膜流化剂：苯甲醇、庚醇、AL721、二十二碳六烯酸、脂肪醇、油醇、二甲基氨基乙醇、A₂C、法尼醇和诸如利多卡因、罗哌卡因、布比卡因和马比佛卡因的麻醉剂以及本领域技术人员已知的其它膜流化剂。

[0444] 除了一部分细胞蛋白在受热过程中变性（蛋白毒性）外，还认为膜流动性的改变是启动热休克反应并诱导 HSP 的细胞热感器（thermosensor）。确实，化学诱导的膜扰乱（类似于热诱导的质膜流动化）能够激活 HSP，而不引起蛋白变性。

[0445] 膜流动性是指细胞膜脂双层的粘性。膜磷脂加入了不同长度和饱和度的脂肪酸。

[0446] 膜流化剂的作用是通过插入到膜脂质之间由此通过消弱脂酰基链间的范德华相互作用而诱导扰乱作用。

[0447] 因此，本发明一方面提供了选自以下的膜流化剂：苯甲醇、庚醇、AL721、二十二碳六烯酸、脂肪醇、油醇、二甲基氨基乙醇、A₂C、法尼醇和诸如利多卡因、罗哌卡因、布比卡因和马比佛卡因的麻醉剂以及本领域技术人员已知的其它膜流化剂，其用在选自以下组成的组的疾病的治疗中：糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0448] 本发明再一方面提供了选自以下的膜流化剂在制造用于治疗选自糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇

酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病组成的组的疾病的药物中的应用；苯甲醇、庚醇、AL721、二十二碳六烯酸、脂肪醇、油醇、二甲基氨基乙醇、A₂C、法尼醇和诸如利多卡因、罗哌卡因、布比卡因和马比佛卡因的麻醉剂以及本领域技术人员已知的其它膜流化剂。

[0449] 本发明再一方面提供了选自以下的膜流化剂用于治疗溶酶体贮积症：苯甲醇、庚醇、AL721、二十二碳六烯酸、脂肪醇、油醇、二甲基氨基乙醇、A₂C、法尼醇和诸如利多卡因、罗哌卡因、布比卡因和马比佛卡因的麻醉剂以及本领域技术人员已知的其它膜流化剂，其中所述溶酶体贮积症源于酶缺陷，所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在不相关。

[0450] 在一个实施方式中，所述溶酶体贮积症不选自尼曼 - 皮克病、法伯氏病、克拉伯病、I 型唾液酸贮积病、异染性脑白质营养不良、戈谢病、法布里病和鞘脂激活蛋白缺乏症。

[0451] 在一个实施方式中，所述溶酶体贮积症选自以下组成的组：糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0452] 用于诱导 Hsp70 的其它方式

[0453] 用于诱导 Hsp70 表达的任何方式都被视为涵盖于本发明中，其中一些列于下文。

[0454] 提高个体温度是包括 Hsp70 在内的 HSP 的有效诱因，并且因此亚致死热疗是本发明的一个方面。在一个实施方式中，亚致死热疗包括提高个体的温度至约 38°C，如约 39°C，例如约 40°C，如约 41°C，例如约 42°C，如约 43°C 的核心温度。

[0455] 因此，本发明一方面提供了亚致死热疗，用于治疗选自有以下组成的组的疾病：糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0456] 本发明另一方面提供了用于治疗溶酶体贮积症的亚致死热疗，其中所述溶酶体贮积症源于酶缺陷，所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在不直接相关。

[0457] 诸如掠食性恐惧和电击的心里应激能够引发应激诱导的 eHsp70 释放，这被认为是一个依赖于儿茶酚胺信号传导的过程。此外，肾上腺素和去甲肾上腺素也可以引发 Hsp70 释放。

[0458] 已经证明以下化合物诱导（或辅诱导）包括 Hsp70 在内的 HSP：膜相互作用化合物：烷基溶血磷脂依地福新 (Edelfosine) (ET-18-OCH₃ 或 1-十八烷基 -2-甲基 -rac-甘油 -3-磷酸胆碱)；消炎药，包括环氧合酶 1/2 抑制剂，例如塞来昔布 (celecoxib) 和罗非昔布 (rofecoxib)，以及 NSAID，例如乙酰水杨酸、水杨酸钠和吲哚美辛；前列腺素 PGA₁、PG_{j2} 和 2-环戊烯 -1-酮；过氧化物酶增殖物激活型受体 γ -激动剂，微管蛋白相互作用抗癌剂，包括长春新碱和紫杉醇；胰岛素增敏剂吡格列酮；抗肿瘤剂，例如卡铂、多柔比星、氟达拉滨、异环磷酰胺和阿糖胞苷；Hsp90 抑制剂格尔德霉素 (geldanamycin)、17-AAG、17-DMAG、根赤壳菌素 (radicicol)、除莠霉素 -A (herbimycin-A) 和花生四烯酸；蛋白酶体抑制剂 MG132 和乳胞素 (lactacystin)；丝氨酸蛋白酶抑制剂 DCIC、TLCK 和 TPCK；抗溃疡药替普瑞

酮 (geranylgeranylacetone) (GGA)、瑞巴匹特 (rebamipide)、甘珀酸 (carbenoxolone) 和聚普瑞锌 (polaprezinc) (L-肌肽锌); 重金属 (锌和锡); 消炎药地塞米松; 可卡因; 烟碱; 醇 (alcohol); α -肾上腺素激动剂; 环戊烯酮前列腺素 (cyclopentenone prostanoids); 以及草本药芍药苷 (paeoniflorin)、甘草甜素 (glycyrrhizin)、雷公藤红素 (celastrol)、二氢雷公藤红素 (dihydrocelastrol)、二氢雷公藤红素二乙酸酯 (dihydrocelastrol diacetate) 和姜黄色素。

[0459] 因此, 本发明一方面提供了选自以下的化合物: 依地福新 (ET-18-OCH₃ 或 1-十八烷基-2-甲基-rac-甘油-3-磷酸胆碱)、塞来昔布和罗非昔布、乙酰水杨酸、水杨酸钠、吲哚美辛、PGA1、PGj2、2-环戊烯-1-酮、过氧化物酶增植物激活型受体 γ -激动剂、长春新碱、紫杉醇、吡格列酮、卡铂、多柔比星、氟达拉滨、异环磷酰胺、阿糖胞苷、格尔德霉素、17-AAG、17-DMAG、根赤壳菌素、除莠霉素-A、花生四烯酸、MG132、乳胞素、DCIC、TLCK 和 TPCK、替普瑞酮 (GGA)、瑞巴匹特、甘珀酸、聚普瑞锌 (L-肌肽锌)、地塞米松、可卡因、烟碱、醇、 α -肾上腺素激动剂、环戊烯酮前列腺素、芍药苷、甘草甜素、雷公藤红素、二氢雷公藤红素、二氢雷公藤红素二乙酸酯和姜黄素以及本领域已知的其他 HSP 诱导物, 其用于治疗选自以下组成的组的疾病: 糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0460] 本发明再一方面提供了选自以下的化合物用于治疗溶酶体贮积症: 依地福新 (ET-18-OCH₃ 或 1-十八烷基-2-甲基-rac-甘油-3-磷酸胆碱)、塞来昔布和罗非昔布、乙酰水杨酸、水杨酸钠、吲哚美辛、PGA1、PGj2、2-环戊烯-1-酮、过氧化物酶增植物激活型受体 γ -激动剂、长春新碱、紫杉醇、吡格列酮、卡铂、多柔比星、氟达拉滨、异环磷酰胺、阿糖胞苷、格尔德霉素、17-AAG、17-DMAG、根赤壳菌素、除莠霉素-A、花生四烯酸、MG132、乳胞素、DCIC、TLCK 和 TPCK、替普瑞酮 (GGA)、瑞巴匹特、甘珀酸、聚普瑞锌 (L-肌肽锌)、地塞米松、可卡因、烟碱、醇、 α -肾上腺素激动剂、环戊烯酮前列腺素、芍药苷、甘草甜素、雷公藤红素、二氢雷公藤红素、二氢雷公藤红素二乙酸酯和姜黄素以及本领域已知的其他 HSP 诱导物, 其用于治疗溶酶体贮积症, 其中所述溶酶体贮积症源于酶缺陷, 所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在不直接相关。

[0461] 本发明的药物组合物

[0462] 本发明涉及能够提高 Hsp70 的浓度和 / 或活性的生物活性剂的用途, 从而使患有由以下组成的组的疾病的患者受益: 糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0463] 虽然本发明的生物活性剂可能以原料化学物施用, 但优选以药物制剂的形式提供。因此, 本发明还提供了用于医药应用的药物组合物, 其包含本发明的生物活性剂或本文所定义的其药理学上可接受的盐和其药理学上可接受的载体。

[0464] 本发明一方面提供了可以向有此需要的个体施用的包含本文定义的生物活性剂的组合物, 例如药物组合物。药物组合物是向个体施用为安全的组合物; 因此可以是药物安

全组合物。

[0465] 在一个实施方式中,本发明涉及包含本发明的生物活性剂的组合物。在一个实施方式中,本文公开的组合物可以与生理学上可接受的载体组合配制。在一个实施方式中,本文公开的组合物可以与药学上可接受的载体组合配制。

[0466] 可以通过常规技术,例如在 Remington:The Science and Practice of Pharmacy 1995, edited by E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19th edition, Easton, Pa. 中描述的技术,制备包含本发明的生物活性剂的药物组合物。

[0467] 本发明的生物活性剂可经配制用于肠胃外施用,并且可以以安瓿、预填充针剂、小体积输注的单位剂量形式或添加了防腐剂的剂量容器的形式提供。所述组合物可以采取诸如包含于油性或水性介质、载体、稀释剂或溶剂中的悬浮液、溶液或乳液的形式,其中所述溶剂包括矿物盐或其它水溶分子的水溶液、丙二醇、乙二醇、植物油、动物油、合成油、可注射有机酯,并且所述组合物可以包含诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂或助悬剂、稳定剂和/或分散剂、色素、缓冲剂、稠化剂和增溶剂等的制剂用试剂。或者,所述活性成分可以为通过无菌固体的无菌分离或通过冻干获得的粉末形式,以在使用前利用合适的介质(例如无菌且无热原质的水)形成。

[0468] 预期本发明还包括可制备的所述生物活性剂的药学上可接受的盐,作为盐的特定水合物形式。这些盐是其在药学应用上可接受的形式,即所述盐将保留母体化合物的生物活性并且所述盐将在其应用中不具有不恰当的或有害的作用,并用在疾病治疗中。

[0469] 药学上可接受的盐以标准方式制备。如果所述母体化合物是碱,利用过量有机酸或无机酸在合适溶剂中对其进行处理。如果所述母体化合物是酸,利用过量有机碱或无机碱在合适溶剂中对其进行处理。

[0470] 可以采用本领域技术人员已知的本发明的生物活性剂的任何合适的制剂。

[0471] 在一个实施方式中,Hsp70 或其功能片段或变体被配制在生物可降解的微球(例如脂质体)中。

[0472] 施用(给药)

[0473] 可以采用任何合适的给药途径以向哺乳动物(优选人)提供有效量的本发明生物活性剂,其中所述生物活性剂在一个实施方式中可以为 Hsp70 或其功能片段或变体。

[0474] 可以通过三种主要递送途径向有此需要的个体施用生物活性剂或药物组合物:1) 外用(涂敷于身体表面,例如皮肤或粘膜),2) 经肠(通过胃肠或消化道),和3) 肠胃外(除胃肠或消化道外的途径)

[0475] 外用包括表皮给药(epicutaneous)(涂敷于皮肤上)、吸入剂、灌肠剂、滴眼剂(滴至结膜)、滴耳剂、鼻内途径和阴道给药。

[0476] 经肠给药除经胃或十二指肠营养管外,还可以为胃肠道的任何部分参与的任何给药形式,并且包括口服给药(通过口,例如片剂、胶囊或滴剂)、直肠(例如栓剂或灌肠剂)给药。

[0477] 肠胃外递送(例如注射或输注)可有效地将生物活性剂递送至靶位点或者将药物引入至血液,并且包括静脉内(进入至静脉内)、动脉内(进入至动脉)、肌肉内(进入至肌肉)、心脏内(进入至心脏)、皮下(在皮肤下面)、骨质内(进入至骨髓)、皮内(进入至皮肤本身)、鞘内或脊柱内(进入至椎管内)、腹膜内(进入腹膜内)、透皮(通过完整的皮肤

扩散)、经粘膜(通过粘膜扩散,例如吹入(insufflation)(嗅吸入)、舌下、口含(buccal)和阴道栓剂)、吸入、硬膜(进入硬膜区)和玻璃体内(进入眼睛)。舌下给药(在舌下)也是一种肠胃外给药方式,由此生物活性剂通过舌下的粘膜组织扩散至血液中。本发明的生物活性剂可以通过任何肠胃外递送途径而施用,并优选通过上述任意方式施用。

[0478] 肠胃外递送具有避免与肠递送相关的在胃肠道中降解的优势。

[0479] 由于肠胃外递送可以使化合物直接被吸收至体循环内,所以肠胃外递送还具有消除与肠递送相关的首过代谢的优势。

[0480] 首过代谢是药物代谢的一种现象,该现象使药物浓度在到达体循环前大幅降低。通常与肝和肠壁相关的是在吸收过程中损失的药物部分。

[0481] 服用药物后,其被消化系统吸收并进入到肝门脉系统。该药物在到达身体其它部分之前通过门静脉进入肝。肝脏代谢多种药物,有时将药物代谢至仅少量活性药物从肝脏排出进入体循环其它部分的程度。因此,经过肝的这种首过(first pass)大幅降低了所述药物的生物利用度。

[0482] 影响药物的首过效应的四个主要系统是胃肠腔的酶、肠壁酶、细菌酶和肝酶。

[0483] 可以通过常规技术制备此种给药的适当剂型。可以通过常规技术制备适合通过吸入给药的剂型,例如喷雾制剂或定量吸入剂(a metered dose inhaler)。

[0484] 在一个实施方式中,本发明的生物活性剂的具体给药方式是通过肠胃外给药。

[0485] 在一个实施方式中,本发明的生物活性剂的肠胃外给药的具体方式是通过静脉、皮下、肌内、动脉、皮下或腹膜内注射。

[0486] 在一个实施方式中,本发明的生物活性剂的肠胃外给药的具体方式是通过吸入。

[0487] 在一个实施方式中,本发明的生物活性剂的肠胃外给药的具体方式是通过静脉内输注。

[0488] 在一个实施方式中,本发明的静脉内输注进行的时间可以为10分钟-20分钟,如20-30分钟,例如30-40分钟,如40-50分钟,例如50-60分钟,如60-90分钟,例如90-120分钟,如2小时-3小时,例如3-4小时,如4-5小时,例如5-6小时,如6-7小时,例如7-8小时。

[0489] 在一个具体的实施方式中,本发明的生物活性剂的肠胃外给药的方式是通过经粘膜递送。在一个实施方式中,所述经粘膜递送为舌下递送,在另一个实施方式中,所述经粘膜递送为口含(buccal)递送,在再一个实施方式中,所述经粘膜递送为吹入或鼻内递送。

[0490] 剂型包括片剂、锭剂、分散体、混悬剂、溶液、胶囊、乳膏、软膏、乳剂、凝胶、洗剂、糊剂、气雾剂或本领域已知的其它形式。

[0491] 所采用的活性成分的有效剂量可以随所采用的具体组合物、给药形式、所治疗的病况和所治疗病况的严重程度而不同。本领域技术人员可以容易地确定此剂量。

[0492] 在一个实施方式中,本发明的生物活性剂以单次日剂量或分次剂量或者以缓释形式以约1微克/kg动物体重-约100毫克/kg动物体重的日剂量施用。可以在该范围内或甚至该范围外对给药方案进行调整,以提供最佳的治疗结果。

[0493] 在一个实施方式中,所施用的本发明生物活性剂的剂量为约1 μ g/kg体重-约10 μ g/kg体重,如约10 μ g/kg体重-约50 μ g/kg体重,例如约50 μ g/kg体重-约100 μ g/kg体重,如约100 μ g/kg体重-约250 μ g/kg体重,例如约250 μ g/kg体重-约500 μ g/kg

kg 体重, 如约 500 μ g/kg 体重 - 约 750 μ g/kg 体重, 例如约 750 μ g/kg 体重 - 约 1000 μ g/kg 体重, 如约 1mg/kg 体重 - 约 10mg/kg 体重, 例如约 10mg/kg 体重 - 约 50mg/kg 体重, 如约 50mg/kg 体重 - 约 100mg/kg 体重。

[0494] 可以以某种时间间隔施用所述剂量, 并且所述剂量可以以 mg/kg 体重 / 时间单位表示。在一个实施方式中, 所述时间单位可以为每分钟, 如每小时, 例如每天, 如每周。

[0495] 联合治疗

[0496] 一方面, 本发明提供了能够提高 Hsp70 的细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂和其它治疗形式的组合, 用于治疗选自以下组成的组的疾病: 糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病。

[0497] 再一方面, 本发明提供了提高 Hsp70 的细胞内浓度和 / 或活性的生物活性剂, 用于与其他治疗形式组合治疗溶酶体贮积症, 其中所述溶酶体贮积症源于酶缺陷, 所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在不直接相关。

[0498] 一个方面, 本发明涉及治疗选自以下组成的组的疾病的方法: 糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病, 其包括施用本发明的任一生物活性剂和至少一种其它治疗形式的组合。

[0499] 因此, 在一个实施方式中, 本发明的生物活性剂与至少一种其它治疗形式 (例如用于所涉及疾病的常规或已知治疗形式) 组合施用于有此需要的个体。

[0500] 应该理解, 本发明的生物活性剂可以是 Hsp70 或其功能片段或变体, 或者 Hsp70 诱导物或辅诱导物。

[0501] 组合多于一种治疗形式的施用可以同时发生或依次发生。同时施用可以为包含在同一组合物或包含在独立的组合物中的两种化合物, 或者可以为基本在同一时间进行的一种组合物和另一种治疗形式。依次施用表示在不同时间点施用多于一种治疗形式, 例如首先施用一种治疗形式, 然后施用第二种治疗形式。依次施用多于一种治疗形式的时间框架可以由本领域技术人员确定, 以获得最佳结果, 并且在一个实施方式中可以为 30 分钟 - 72 小时。

[0502] 化学化合物的治疗形式可以一起施用或分开施用, 每种均为最有效的剂量。施用多于一种化合物可以具有协同作用, 从而有效降低各药物的所需剂量。

[0503] 在一个实施方式中, 将本发明的生物活性剂与一种或多种酶替代疗法 (ERT)、止痛物品 (pain reliever)、皮质类固醇、移植 (例如骨髓移植、脐带血移植或干细胞移植)、底物减少疗法和 / 或对症和支持治疗 (例如物理治疗) 共同施用于有此需要的个体。

[0504] Hsp70 提高了化合物的摄取

[0505] 本发明人进一步证明 Hsp70 提高了其它分子的胞吞摄取 (图 4)。由于在 Hsp70 存在下使化合物更易于被细胞摄取的被动机制, 该提高的摄取可能是不依赖于 Hsp70 发生的, 或者由于与 Hsp70 的直接结合, 其可能是依赖于 Hsp70 发生的。

[0506] Hsp70 提高化合物的细胞摄取的能力有利于施用于细胞的 Hsp70 或其功能片段或

变体易于被细胞所摄取。

[0507] 此外,由于 Hsp70 的存在可提高 Hsp70 和与 Hsp70 组合施用的化合物的摄取, Hsp70 提高化合物的细胞摄取的能力有利于组合治疗方案。

[0508] 对于其中的一个化合物是 ERT 用酶而另一个是 Hsp70 或其功能片段或变体的组合治疗,这可能有助于有效降低为达到有效细胞内剂量而所需的 ERT 用酶量。由于 ERT 非常昂贵,这种降低具有重大意义。

[0509] 因此,在本发明的生物活性剂包含 Hsp70 或其功能片段或变体和 Hsp 诱导物或辅诱导物的情况下, Hsp70 的存在可提高所述 Hsp70 诱导物或辅诱导物的摄取。

[0510] 治疗方法

[0511] 本发明一方面涉及治疗有此需要的个体的方法。

[0512] 因此,本发明一方面提供了治疗选自以下组成的组的疾病的方法:糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病,其包括向有此需要的个体施用本发明的生物活性剂。

[0513] 本发明再一方面提供了治疗溶酶体贮积病的方法,其中所述溶酶体贮积症源于酶缺陷,所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在不直接相关,所述方法包括向有此需要的个体施用本发明的生物活性剂。

[0514] 在一个实施方式中,认为所述治疗为预防、治愈或改善。在一个具体的实施方式中,所述治疗为预防。在另一个实施方式中,所述治疗是治愈。在再一个实施方式中,所述治疗为改善。

[0515] 在一个实施方式中,本发明使用的生物活性剂可以被配制为药物组合物。

[0516] 在一个实施方式中,所述治疗减少了有此需要的个体细胞内集聚的物质。所述物质可以为通常在溶酶体中降解的物质。在一个实施方式中,所述物质为鞘脂。

[0517] 在一个实施方式中,本发明的治疗将溶酶体可降解物质的细胞内集聚量减少至小于 100% 的集聚量,如小于 90% 的集聚量,例如小于 80% 的集聚量,如小于 70% 的集聚量,例如小于 60% 的集聚量,如小于 50% 的集聚量,例如小于 40% 的集聚量,如小于 30% 的集聚量,例如小于 20% 的集聚量,如小于 10% 的集聚量,例如小于 5% 的集聚量。

[0518] 在一个实施方式中,本发明的治疗将溶酶体可降解物质的细胞内集聚量减少了至少 5%,如小于 10%,例如小于 15%,如小于 20%,例如小于 25%,如小于 30%,例如小于 35%,如小于 40%,例如小于 45%,如小于 50%,例如小于 55%,如小于 60%,例如小于 65%,如小于 70%,例如小于 75%,如小于 80%,例如小于 85%,如小于 90%,例如小于 95%,如小于 100%。

[0519] 溶酶体可降解物质的细胞内浓度的降低速度可取决于诸如施用形式和剂量方案等因素。

[0520] 在一个实施方式中,所述治疗延长了有此需要的个体的预期寿命。

[0521] 在一个实施方式中,认为所述预期寿命可提高 6 月-1 年,如 1 年-2 年,例如 2-3 年,如 3-4 年,例如 4-5 年,如 5-6 年,例如 6-7 年,如 7-8 年,例如 8-9 年,如 9-10 年,例如 10-12 年,如 12-14 年,例如 14-16 年,如 16-18 年,例如 18-20 年,如 20-25 年,例如 25-30 年,如 30-40 年,例如 40-50 年,如 50-60 年,例如 60-70 年,如 70-80 年,例如 80-90 年,如

90-100 年。

[0522] 在一个实施方式中,预期寿命提高了至少 6 个月,如至少 1 年,如至少 2 年,例如 3 年,如至少 4 年,例如 5 年,如至少 6 年,例如 7 年,如至少 8 年,例如 9 年,如至少 10 年,例如 12 年,如至少 14 年,例如 16 年,如至少 18 年,例如 20 年,如至少 25 年,例如 30 年,如至少 40 年,例如 50 年,如至少 60 年,例如 70 年,如至少 80 年,例如 90 年,如至少 100 年。

[0523] 本发明一方面还提供了延长溶酶体贮积病患者预期寿命的方法,其中所述溶酶体贮积症源于酶缺陷,所述酶的活性与作为辅因子的溶酶体 BMP 的存在不直接相关,所述方法包括向有此需要的个体施用本发明的生物活性剂。

[0524] 本发明再一方面提供了用于延长患有选自以下组成的组的疾病的患者预期寿命的方法:糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病,其中所述方法包括向有此需要的个体施用本发明的生物活性剂。

[0525] 在一个实施方式中,本发明涉及延长患有选自以下组成的组的疾病的患者预期寿命的方法:糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病,其中所述方法包括向有此需要的个体施用本发明的生物活性剂,其中所述预期寿命被提高 6 月-1 年,如 1 年-2 年,例如 2-3 年,如 3-4 年,例如 4-5 年,如 5-6 年,例如 6-7 年,如 7-8 年,例如 8-9 年,如 9-10 年,例如 10-12 年,如 12-14 年,例如 14-16 年,如 16-18 年,例如 18-20 年,如 20-25 年,例如 25-30 年,如 30-40 年,例如 40-50 年,如 50-60 年,例如 60-70 年,如 70-80 年,例如 80-90 年,如 90-100 年。

[0526] 在一个实施方式中,本发明涉及延长患有选自以下组成的组的疾病的患者预期寿命的方法:糖原贮积病、神经节苷脂贮积病、神经元蜡样质脂褐质沉积症、脑腱性胆固醇贮积病、沃尔曼氏症、胆固醇酯贮积病、糖胺聚糖代谢紊乱、粘多糖贮积症、糖蛋白代谢紊乱、粘脂贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、甘露糖贮积病和 II 型唾液酸贮积病,其中所述方法包括向有此需要的个体施用本发明的生物活性剂。在一个实施方式中,其中所述预期寿命被提高至少 6 个月,如至少 1 年,如至少 2 年,例如 3 年,如至少 4 年,例如 5 年,如至少 6 年,例如 7 年,如至少 8 年,例如 9 年,如至少 10 年,例如 12 年,如至少 14 年,例如 16 年,如至少 18 年,例如 20 年,如至少 25 年,例如 30 年,如至少 40 年,例如 50 年,如至少 60 年,例如 70 年,如至少 80 年,例如 90 年,如至少 100 年。

实施例

[0527] 实施例 1:Hsp70 和二(单酰基甘油)磷酸酯之间的相互作用激活了酸性鞘磷脂酶,稳定了溶酶体膜并促进了细胞存活

[0528] 热休克蛋白 70 (Hsp70) 是在进化上高度保守的分子伴侣,其通过抑制溶酶体膜通透化(应激诱导的细胞死亡的特点)而促进受应激的细胞的存活。该作用的分子机制的线索可能在于最近报道的应激相关和癌症相关的少部分 Hsp70 至溶酶体区室的转移。在此,本发明人证明 Hsp70 通过增强酸性鞘磷脂酶(ASM,将鞘磷脂水解成神经酰胺和磷酸胆碱的

溶酶体酯酶)而稳定溶酶体。在酸性环境中, Hsp70 以高亲合性和高特异性与内溶酶体阴离子磷脂二(单酰基甘油)磷酸酯(BMP, ASM 的主要辅因子)结合, 由此促进 ASM 与 BMP 的结合并刺激 ASM 活性。BMP 抗体或 Hsp70 中的点突变(W90A)对 Hsp70-BMP 相互作用的抑制以及地昔帕明对 ASM 活性的抑制有效地逆转了 Hsp70 介导的溶酶体稳定作用。显著地, A 型尼曼-皮克病(NPDA, 由 ASM 基因的突变引起的严重的溶酶体贮积症)患者细胞中 ASM 活性的降低还与溶酶体稳定性的大幅降低有关, 并且可通过用重组 Hsp70 或 ASM 处理来恢复溶酶体 ASM 活性而有效地纠正这种表型。总之, 这些数据开启了利用通过内吞递送途径进入溶酶体腔的非细胞渗透性化合物治疗溶酶体贮积症和癌症的惊人可能。

[0529] 溶酶体蛋白酶, 即组织蛋白酶, 是由多种应激诱导的进化保守性细胞死亡程序中的重要因子。组织蛋白酶依赖性细胞死亡的特征在于早期溶酶体膜通透化和随后组织蛋白酶向胞质的转移, 组织蛋白酶在此能够启动 caspase 依赖性和 caspase 非依赖性细胞死亡途径。为了测定溶酶体定位是否对所报道的 Hsp70 稳定溶酶体膜并保护细胞免受细胞应激诱导的细胞死亡的能力至关重要, 本发明人利用细胞内吞机器以使重组 Hsp70 (rHsp70) 靶向至溶酶体内。用标记有荧光团的 rHsp70 温育的 U-2-OS 骨肉瘤细胞的免疫细胞化学和生物化学分析表明了 rHsp70 的有效摄取, 其与晚期内涵体标记物和溶酶体标记物的共定位以及与溶酶体膜的结合(图 2a、b 和图 3)。通过利用实时成像监测溶酶体膜的完整性(图 3c), 本发明人证明内吞的 rHsp70 保护溶酶体免受光致氧化(图 3d)。此外, 特异于 Hsp70 的小干扰 RNA (siRNA) 使溶酶体对光致氧化敏感, 并且通过内吞 rHsp70 完全逆转了这种作用, 这证明内源性 Hsp70 的保护作用是由溶酶体腔内的小部分蛋白介导的(图 3e)。尽管摄取类似(数据未显示), 但是重组 Hsc70 和 Hsp70-2(其分别与 Hsp70 的氨基酸序列 86% 和 84% 相同)没有观察到溶酶体定位(图 3d)。

[0530] Hsp70 在溶酶体膜中的存在以及其在产生水解作用的溶酶体环境中存活, 这提示其与溶酶体膜脂质结合。因此, 本发明人研究了 Hsp70 与包含多种膜相关阴离子脂质, 即棕榈酰基-油酰基-磷脂酰丝氨酸(POPS; 主要存在于质膜中)、心磷脂(主要存在于线粒体中)和 BMP(主要存在于晚期内涵体和溶酶体中)的棕榈酰基-油酰基-磷脂酰胆碱(POPC)大单层囊泡(LUV)的相互作用。考虑到内溶酶体区室在成熟为溶酶体后环境酸性的提高, 本发明人对中性(pH 7.4)和酸性(pH 6.0)条件下的蛋白-脂质相互作用进行了比较。在 pH 7.4 时, rHsp70 引起 POPC 溶酶体中 90° 光散射的小的相对变化, 表明非常弱地结合。如之前关于 POPS 的报道, 不论脂质体表面的电荷密度(从 -1 至 -2), 所有带负电荷的脂质都使 rHsp70 与溶酶体在中性 pH 下的结合增强了约 4 倍。显著地, 与中性 pH 相比, 在酸性 pH 下与 BMP 的结合增强几乎 20 倍, 而与 POPS 的结合在酸化后仅略有提高。Hsp70 与 BMP 在酸性 pH 下的高亲合性在一组独立的 BIAcore 实验中得到验证。重要的是, 通过内吞作用递送至内溶酶体区室的 BMP 抗体有效抑制了 rHsp70 在活细胞中稳定溶酶体的能力, 并使细胞对诱导溶酶体泄漏的抗癌药顺铂敏感。

[0531] 为了研究 Hsp70 的哪部分负责结合 BMP, 本发明人测定了 rHsp70 色氨酸及其突变体在停靠在含 BMP 的脂质体中后色氨酸的荧光转移。缺乏氨基末端 ATPase 结构域(rHsp70- Δ ATP)内的第 119-426 氨基酸的 Hsp70 突变体丧失相对峰荧光强度信号, 而缺乏羧基末肽结合结构域(rHsp70- Δ PBD)中的第 437-617 氨基酸的突变体则没有丧失相对峰荧光强度信号, 这表明 Hsp70 与 BMP 的高亲合力结合需要 ATPase 结构域(图 6d)。接着, 本

发明人用苯丙氨酸取代 Hsp70 中的两个色氨酸 (W90F 和 W580F) 并研究了哪个色氨酸负责脂质结合诱导的荧光转移。仅 rHsp70-W90F 的信号具有减少表明,所述蛋白的 NH₂- 末端停靠在脂质层中。对 BMP-rHsp70 相互作用的更量化的 BIAcore 分析证明,Hsp70 主要通过其 ATPase 结构域与 BMP 相互作用。令人吃惊的是,W90F 突变特异性地消除了 rHsp70 与 BMP 之间的相互作用,同时保留了 Hsp70 分子伴侣的结构(通过远 UV 圆二色性和近 UV 圆二色性分析的折叠)和功能(荧光酶折叠和 ATP 水解)方面。因此,rHsp70-W90F 突变体意外地为发明人提供了用于进一步测定 Hsp70 和 BMP 之间的直接相互作用是否使 Hsp70 具有溶酶体保护性质的无价工具。确实,rHsp70-W90F 突变体完全丧失了其保护溶酶体膜免受光致氧化和保护细胞免受顺铂诱导的溶酶体细胞死亡的能力,而 rHsp70-W580F 突变体显示与野生型蛋白相同的功效。重要的是,突变 Hsp70 蛋白的内吞效果与野生型 Hsp70 基本相同。

[0532] 由于内吞小泡中 BMP 的浓度随内涵体成熟以形成溶酶体而提高,所以 pH 调节可能是使 Hsp70 靶向至溶酶体的方式。计算 (PROTPARAM, EXPaSy 蛋白质组学服务器,瑞士生物信息研究所) 表明,Hsp70 的 ATPase 结构域的理论 pI 比肽结合结构域高 1.72 个单位 (6.62 与 4.9)。该特征表明,在酸性 pH 时,ATPase 结构域优选带正电荷,这可能有利于其与阴离子脂质的相互作用。发明人的证明 Hsp70-BMP 相互作用对酸性 pH 和 ATPase 结构域的依赖性的数据支持了该理论。此外,Hsp70 的 ATPase 结构域的静电表面的分子建模表明,Hsp70 的 ATPase 结构域形成接近楔样的结构,并且在包含 W90 的楔的底部具有大量正电荷,这可能解释了 W90F 突变对 Hsp70 的与 BMP 相互作用并稳定溶酶体的能力产生的深刻影响。

[0533] BMP 以高亲和力与 ASM 结合,并刺激其将鞘磷脂水解成神经酰胺饱和磷酸胆碱的能力。BIAcore 分析表明,用亚 - 等摩尔 (sub-equimolar) 浓度的 rHsp70 预处理含 BMP 的 LUV 有利于 ASM 的随后结合,而较高的 rHsp70 浓度则显示抑制作用。显著的是,具有免受应激诱导的溶酶体损伤的保护的 Hsp70 转基因鼠胚胎成纤维细胞 (Hsp70-MEF) 显示了比野生型 MEF (WT-MEF) 显著高的 ASM 活性,并且用细胞保护浓度 (300nM) 的 rHsp70 处理 WT-MEF 将 ASM 的活性提高至与 Hsp70-MEF 相当的水平。为了测定 ASM 是否负责溶酶体稳定作用,发明人用被完全表征的药理学 ASM 抑制剂地昔帕明处理细胞。地昔帕明以剂量依赖方式降低了 MEF 的存活性,并且细胞死亡与由溶酶体组织蛋白酶向胞质中的泄漏证明的大量溶酶体通透化有关。显著的是,与 WT-MEF 相比,在 Hsp70-MEF 中地昔帕明 - 诱导的细胞死亡和溶酶体泄漏被显著降低。此外,如在光致氧化后加速了溶酶体膜完整性的丧失所证明的 (图 7e),用亚毒性浓度的地昔帕明抑制 ASM 将 Hsp70-MEF 的溶酶体应激抗性逆转至 WT-MEF 的水平。证明 NPDA (由 ASM 基因突变引起的致命的溶酶体贮积症) 患者成纤维细胞中的溶酶体显示对光致氧化诱导的损伤的敏感性的数据进一步支持了 ASM 的溶酶体保护作用。显著地,rHsp70 还能够增强患者细胞中内源性突变 ASM 和同时荷载的 rASM 的酶促活性。通过使溶酶体荷载 rHsp70、rASM 或前述两者的组合获得的 ASM 活性的提高与其在 NPDA 细胞中稳定溶酶体和使大幅扩大的溶酶体区室的体积规格化的能力有关 (图 8b-d)。应该注意,类似于 rHsp70,rASM 也位于溶酶体中。

[0534] 本发明的全部数据表明,在尼曼 - 匹克病中,Hsp70-BMP 相互作用通过包括鞘磷脂代谢的调节而非膜的直接物理稳定化的机制稳定溶酶体。BMP 全部位于内溶酶体区室的内膜中 (在此,其主要功能是支持 ASM 和鞘脂激活因子蛋白对脂质小泡的分裂和从脂质小泡

提取脂质)的事实支持了此种间接作用。有趣的是,ASM介导的溶酶体神经酰胺浓度的增加修饰了溶酶体膜的立体构象并由此促进了其与其它细胞内小泡和质膜的融合。因此,溶酶体膜组成和体积的改变(作为神经酰胺诱导的增强的融合能力的结果)可有助于Hsp70介导的溶酶体稳定性的提高。另一方面,多种凋亡刺激物诱导ASM向质膜外小叶转位,在此,神经酰胺可以形成功能是作为凋亡信号传导中涉及的膜相关信号分子的激活位点的脂质微结构域。因此,神经酰胺可以对细胞存活产生相反作用,这取决于神经酰胺产生于溶酶体内部或者质膜上。

[0535] 上述潜藏在Hsp70的细胞保护作用之下的分子机制开启了用于使癌细胞对通过特异抑制Hsp70的溶酶体稳定功能而诱导溶酶体细胞死亡途径的试剂敏感的令人兴奋的新可能。反之亦然,外源单独施用rHsp70或与rASM组合施用都可直接作为NPD患者的新疗法,其中,目前用于所述NPD患者的治疗选择限于基因治疗和干细胞治疗。

[0536] 方法概述

[0537] 根据现有技术的描述产生了WT-MEF和Hsp70-MEF,对其进行永生化和保持。人NPDA成纤维细胞(83/24)起源于患有肝脾大的5月龄患者的皮肤活检。利用pET-16b载体系统和Ni²⁺-亲和-纯化(Novagen)产生重组蛋白,并根据厂商的说明用Alexa Fluor 488(Molecular Probes)标记。为了分析溶酶体的完整性,本发明人形成了用吖啶橙(在细胞的酸性区室中集聚的因光异色的弱碱)染色的细胞实时成像方法,将所述细胞染成红色并使其对光致氧化敏感。通过Zeiss LSM DUO软件,成纤维细胞中光致氧化诱导的溶酶体pH梯度的丧失和吖啶橙自单个溶酶体向胞质中的泄漏被可视地量化为U2-OS细胞中“红点的消失”和红色的减少以及绿色荧光的增加。按照现有技术的描述,利用zFR-AFC(Enzyme System Products)探针在地高辛处理的样本中测定总的组织蛋白酶活性和胞质的(地高辛提取的)组织蛋白酶活性。基本按照现有技术的描述,在HEPES缓冲液(20mM HEPES, 0.1mM EDTA, 所示pH)中分析色氨酸荧光谱(RFI)和脂质体90°光散射(RSI)。按照现有技术的描述,通过BIAcore 2000利用固定化的LUV进行表面等离子共振。利用Oligofectamine(Invitrogen)转染Hsp70 siRNA(5' -GCCAUGACGAAAGACAACAAUCUGU-3')和对照Hsp70 siRNA。利用标准方法进行免疫检测。基本按照现有技术分析凋亡样细胞死亡和溶酶体膜通透化。通过经现有技术描述修饰的Molecular Probes的Amplex Red Sphingomyelinase Assay Kit(A12220)分析ASM活性。利用双侧成对学生T检验进行统计学分析,并且利用F-检验检验所有数据组的所有方差的可比性。

[0538] 方法

[0539] 细胞培养和试剂:在补充有6%的热灭活小牛血清和青霉素-链霉素的RPMI 1640(Invitrogen)中培养人U-2-OS骨肉瘤细胞系。按照现有技术的描述,产生Hsp70转基因iMEF和适当的对照iMEF,并维持。人原代NPDA成纤维细胞生长在进一步补充有1%丙酮酸钠、1%HEPES、1%L-谷氨酰胺的MEF培养基中。所有细胞都在含有5%CO₂的37°C加湿空气气氛下培养,反复测定并确定支原体阴性。除非另有说明,所有化学物质都购自Sigma-Aldrich(Sigma-Aldrich Denmark A/S)。

[0540] 溶酶体完整性的测定:在补充有3%胎牛血清的Hanks平衡盐溶液中洗涤、照射并分析利用2μg/ml吖啶橙在37°C温育15分钟的亚汇合细胞。以透射光模式从各个孔的8个预定区域选择用于单细胞成像的细胞,之后立即可视化并暴露在来自安装在U-ULS100HG

housing(Olympus) 中的 USH102 100W 汞弧灯 (Ushio electric) 的蓝光下 20 秒。在具有 LCPlanF1 x20 物镜 (NA=0,40) 的 Olympus IX-70 倒置显微镜上进行荧光显微检测。通过计数强的红色染色的损失而对溶酶体 pH 梯度的损失进行定量。研发了用于检测溶酶体完整性的更成熟的方法以处理该研究使用的各种成纤维细胞的较大的溶酶体区室。以透射光模式从各个孔的 8 个预定区域选择用于单细胞成像的细胞,之后使同样的细胞立即并持续暴露在来自 100mW 二极管激光的 489nm 光下,同时在 Zeiss LSM LIVE DUO 共聚焦系统上每隔 330ms 在由用于 495-555nm(绿色)和 LP650nm(红色)光的带通滤波器限定的两个通道中捕获激光扫描显微照片。随后通过完整的 Zeiss LSM DUO 软件分析所产生的延时电影 (timelapse movie)。按照现有技术的描述,利用 zFR-AFC(Enzyme System Products) 探针在地高辛处理的样本中测定总的组织蛋白酶活性和胞质的(地高辛提取的)组织蛋白酶活性。

[0541] 细胞存活率试验:通过基本按照现有技术的描述,通过 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物 (MTT) 还原试验分析细胞密度。通过利用 0.05 μ g/ml Hoechst 33342 (Molecular Probes) 对细胞染色并在倒置的 Olympus IX-70 荧光显微镜 (Filter U-MWU 330-385nm) 下对具有缩聚细胞核的细胞计数来评价凋亡样细胞死亡。对于各个试验,对最小八个随机选取的区域进行计数。

[0542] 免疫检测和显微镜方法:所使用的一抗包括针对 Hsp70 的小鼠单克隆抗体 (2H9; 由 Boris Margulis, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia 惠赠), 针对 3-磷酸甘油醛脱氢酶的小鼠单克隆抗体 (GAPDH; Biogenesis), 针对 BMP 的小鼠单克隆抗体 (6C4), 针对溶酶体膜内在蛋白-1 的小鼠单克隆抗体 (H5C6; 由 J. Thomas August 和 James E. K. Hildreth 开发,并获自在 NICHD 资助下开发的并由美国爱荷华市的爱荷华大学生物科学系维护的发育研究杂交瘤库)。利用所示的一抗、来自 Dako, ECL Western blotting reagents (Amersham) 的结合有过氧化物酶的适当二抗和 Luminescent Image Reader (LAS-1000Plus, Fujifilm) 对通过 10%SDS-PAGE 分离并转移至硝酸纤维素膜上的蛋白进行检测。使用了结合有 Alexa Fluor[®]-576 的二抗或结合有 Alexa Fluor[®]-488 的二抗用于免疫细胞化学。使用溶酶体红色荧光探针[®] (LysoTracker Red[®]) 用于溶酶体区室的生动可视化。利用 Zeiss Axiovert 100M 激光扫描显微镜拍摄荧光图片。在 Zeiss LSM LIVE DUO 系统上进行溶酶体完整性的溶酶体荧光探针 (LysoTracker) 定量和延时摄影。

[0543] 色氨酸荧光光谱和脂质体 90° 光散射:利用由基本如之前所述的脂质组成的 LUV 在 HEPES 缓冲液 (20mM HEPES, 0.1mM EDTA, 所示的 pH7.4 或 6.0) 中分析色氨酸荧光光谱 (RFI) 和脂质体 90° 光散射 (RSI)。对于 RFI, 将 LUV 加入到 10 μ M 试样量中,并在 20 分钟的稳定期后记录光谱。对于 RSI, 将重组蛋白加入到 0.12nmol 试样量中。

[0544] 表面等离子共振 (BIAcore):为了制备 LUV, 将由溶解在有机溶剂中的 10mol% 鞘磷脂、50mol% 卵磷脂、20mol% 胆固醇和 20mol%BMP 构成的脂质混合物在氩气流下干燥,并在 Tris/HCl 缓冲液 (pH 7.4) 中再水化。将所述混合物在液氮中然后在 37°C 的孵箱中冻融 9 次。在超声浴中持续 15 分钟后,使混合物通过孔径为 100nm 的聚碳酸酯膜 21 次。利用 BIAcore 2000 系统在 25°C 进行表面等离子共振测定。将包含 PBS(上样缓冲液)中的 LUV(总脂质浓度为 0.1mM) 固定在 L1 传感芯片 (BIAcore) 的表面。所使用的运行缓冲液为醋酸钠缓冲液 (50mM, pH 4.5)。作为对照,向脂质体表面直接注射酸性磷脂酶 (0.2 μ M, 包

含在 60 μ l 运行缓冲液中)。获得 4100RU - 5250RU 的响应单位。以 20 μ l/ 分钟流速将所示浓度的感兴趣蛋白注射在运行缓冲液中。注射后,附加 10 分钟的解离阶段。在 rASM 跟随 rHsp70 的情况下,在 10 分钟的 rHsp70- 解离阶段后,加入 rASM180 秒钟,之后仍为 10 分钟的解离阶段。

[0545] 分子模建:利用从瑞士生物信息研究所的 Expert Protein Analysis System(EXPaSy) 蛋白组学服务器 (<http://expasy.org/>) 获得的软件进行初级结构分析和分子模建。利用 DeepView-Swiss PDB Viewer 在人 Hsp70-ATPase 结构域 (pdb 码:1S3X) 和人 Hsc70 底物结合结构域 (pdb 码:7HSC) 的晶体结构的基础上,进行分子模建。使用介电常数为 80 (H_2O),使表面模型基于 pH 7.0 的库伦相互作用。

[0546] 统计学分析:为了评价零假设,利用双侧成对学生 T 检验进行统计分析。统计学显著性的截断水平设定为 5%,并利用 F- 检验对所有组数据的方差可比性进行检验。所有统计都基于最小 n=3 的独立试验。

[0547] 实施例 2:体内初步研究中的 NPC1

[0548] 目标

[0549] 确定 HSP70 治疗在下列 NPC 病理测定上的体内效果

[0550] • 身体结果(体重、器官重量 & 存活)

[0551] • 震颤、步态 & 直立方面的行为改变

[0552] • 贮存脂质(胆固醇、GSL 和鞘氨醇)方面的生物化学改变

[0553] • 小脑病理的免疫组织化学分析(浦肯野细胞损失的程度)

[0554] 实验

[0555] 治疗方案

[0556] 将八个经治疗(rHSP70)的 NPC^{-/-} 与八个对照(仅 PBS)NPC^{-/-} 对照进行比较。从三周龄开始,以 10mg/kg 的 rHSP70 或单独载体(PBS),每周三次 IP 处理小鼠。在 7 或 9 周龄(即分别 4 或 6 周治疗后)时,处死三个对照和三个治疗小鼠。将器官灌流(PBS)、称重以及冷冻用于生物化学和免疫组织化学分析。

[0557] 行为分析

[0558] 如之前描述,在 3 周龄时进行行为实验。简言之,使用自动化震颤监控(San Diego instruments)进行震颤分析。通过用无毒染料染色前爪和后爪,使小鼠步行穿过沃特曼(Whatman)3M 纸进行步态分析。测定爪移位以确定它们的后爪与它们的前爪如何相近的叠加,步幅长度以及它们的步态宽度。

[0559] 仅在 9 和 10 周龄进行直立分析。简言之,使动物适应敞箱。5' 之后,计数小鼠的活动,包括动物在箱的中央无支撑直立的次数,或使用箱壁做支撑在箱的边缘直立的次数。

[0560] 生物化学分析

[0561] 不加入缓冲液而使得器官匀浆,并以 10 μ l 试样冷冻。在生物化学分析之前,用 PBS 将新鲜试样复配至 100 μ l。使用 BCA 蛋白分析进行每份的蛋白测定。使用 Invitrogenⁱ 的 Amplex 红胆固醇检测(Red Cholesterol Assay)进行胆固醇检测。使用鞘氨醇碱提取(sphingoid base extraction)分离鞘氨醇,并以 HPLCⁱ 进行分析。通过荧光 HPLCⁱ 提取并分析 GSL。针对蛋白含量,对所有结果进行标准化。

[0562] 免疫组织化学

[0563] 将经过灌流的脑包埋在 OCT 中,并速冻在干冰上的异戊烷中。将脑切片至白明胶包被的载玻片上,在抗体染色前保存在 -80°C 。

[0564] 结果

[0565] 生长曲线 (参考图 12)

[0566] 对照动物 (上图) 显示低于治疗动物的生长曲线,治疗动物直立更加稳定,且达到较高的重量。

[0567] 器官重量

[0568] 没有记录到器官重量的差别。

[0569] 存活

[0570] 由于 7 和 9 周后存留的动物数量很少,不能得到有关存活提高的结论。小鼠 9 和 10 周的视频记录显示 HSP70 治疗的动物较大,具有较好的皮毛状况。此外,它们更加活跃,且具有增多的震颤,其在自主移动上显得更差。

[0571] 在剔除点 (point of culling), 治疗小鼠显示在几天的时间内,已非常差的恶化。

[0572] 原因可能不经意地归因于快速的重量损失,由于之前几天形成的药物剂量在小鼠变得较小时,实际上变得过量,潜在地扩大了任何毒性效应。

[0573] 行为结果 (参考图 13)

[0574] HSP70 治疗小鼠从 3 周治疗时显示增加的震颤,且保持增加至晚期。该震颤在最低频率范围内尤其显著,肉眼清晰可见。

[0575] 步态分析显示在三个所测定变量中无差别 (前爪 :后爪移位、步幅长度、步态宽度)。

[0576] 在 6 治疗周后,直立分析显示无差别。在观察小鼠的基础上,在第 9 周,本发明人决定单独计数成功完成的直立事件以及没有完成的直立事件。这在两组之前显示明显的区别,因为只有对照组没有完成直立。这表明治疗小鼠具有较好的协调性,尽管该点的样本量小 ($n=5$ 治疗, $n=4$ 对照)。

[0577] 生物化学 - 胆固醇 (参考图 14)

[0578] 在 7 周时 (图 14A), 和对照相比, HSP70 治疗小鼠显示周围组织显著减少 (每组小鼠 $n=3$, 一式两份, $*=p<0.05$, $**=p<0.01$, $***=p<0.001$)。

[0579] 脑胆固醇显示下降, 尽管所述下降仅发生在实验的一个重复, 其他两个显示治疗动物与对照具有完全相同的水平 (每组小鼠 $n=3$, 一式三份)。

[0580] 在 9 周时 (图 14B), 两组间没有差别 (每组小鼠 $n=3$, 一式三份)。

[0581] 应注意, 尽管本发明人通过针对每个组织样本并列分析对照和治疗来努力控制试剂内的差别 (difference within kits), 但时间点之间的总胆固醇水平可能不具有直接可比性。

[0582] 生物化学 -GSL (参考图 15)

[0583] 在 7 周时, HSP70 治疗小鼠中, 肝显示 GSL 的显著减少 ($p<0.05$, $*$) (图 15A)。在脾和脑中也有减少, 但非统计学显著 (可能由于低的 n 数)。

[0584] 至 9 周时 (图 15B), 在治疗和非治疗动物之间没有显著差异。

[0585] 在 9 周时, 脑中的总 GSL 水平在治疗和非治疗小鼠中都显著下降 ($p<0.05$)。该现象与来自之前研究的 NPC1 脑的 GSL 测定一致, 可能是神经细胞死亡的结果。有趣的是, 显

示对照小鼠经历了总 GSL 的 5 倍下降,而治疗小鼠所显示的下降看起来则不那么严重。

[0586] 生物化学 - 鞘氨醇 (参考图 16)

[0587] 未对所有器官完成鞘氨醇分析。来自 7 周和 9 周脑的数据显示在 7 周的治疗动物和对照动物间没有显著差异。尽管 9 周时两组都显示整体下降,但治疗动物保持脑中稍微而显著 ($p < 0.005$, **) 的升高的鞘氨醇水平。

[0588] 结论

[0589] 生长曲线

[0590] 表明小鼠健康的总体提高,尤其是在初始阶段。

[0591] 行为数据

[0592] 震颤的增加是可源于 CNS 的效果的令人关注的指标 (高剂量的美格鲁特 (Miglustat) 在患者中显示类似的,尽管较不剧烈的效果)。

[0593] 生物化学

[0594] 与对照相比, HSP70 治疗在 7 周时引起周围贮存胆固醇的下降,尽管脑仍没有定论,因为仅三次重复之一显示了下降。然而,至 9 周时,胆固醇水平在治疗和对照组中相当。这可归因于数个因素中的任一个。首先,小鼠可能产生针对该蛋白的抗体,抑制其效果,使药物的初始效果逐渐消失。其次,高剂量可引起毒性效应,影响小鼠的胆固醇代谢和整体健康。

[0595] 在 7 周时,治疗小鼠内的胆固醇下降得到 GSL 贮存同时下降的支持。在 9 周的治疗小鼠中,周围 GSL 没有显著改变。在 HSP70 治疗的 7 周龄小鼠的脑中, GSL 下降,但结果非统计学显著。较大数量的动物将有利于阐明这一点。在 9 周时,总 GSL 水平在两组中都显著下降。这符合历史数据,所述历史数据显示在 NPC1 病理的末期,明显和显著的下降,有可能是由于细胞死亡造成的。注意到 GSL 的下降在治疗的脑中的下降看上去不那么严重,但还不清楚其是否显著。

[0596] 这得到鞘氨醇数据的支持,其再次遵循从 7 周龄到 9 周龄的历史下降趋势 (可能由于细胞死亡),治疗组中小但显著的提高可反映出改善的细胞存活。一旦通过免疫细胞化学测定了小脑浦肯野细胞数,得知治疗动物中神经元萎缩 / 损失率,该问题将得到更给清楚的解释。

[0001]

序列表

<110> 奥菲泽米有限公司
 <120> 用于增加Hsp70细胞内活性的方法
 <130> P2494PC00
 <140> N/A
 <141> 2011-11-22
 <150> PA 2010 70520
 <151> 2010-11-30
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 641
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)
 <400> i
 Met Ala Lys Ala Ala Ala Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser
 1 5 10 15
 Cys Val Gly Val Phe Gln His Gly Lys Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp
 20 25 30
 Gln Gly Asn Arg Thr Thr Pro Ser Tyr Val Ala Phe Thr Asp Thr Glu
 35 40 45
 Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala Lys Asn Gln Val Ala Leu Asn Pro Gln
 50 55 60
 Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys Arg Leu Ile Gly Arg Lys Phe Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Val Val Gln Ser Asp Met Lys His Trp Pro Phe Gln Val Ile Asn
 85 90 95
 Asp Gly Asp Lys Pro Lys Val Gln Val Ser Tyr Lys Gly Glu Thr Lys
 100 105 110
 Ala Phe Tyr Pro Glu Glu Ile Ser Ser Met Val Leu Thr Lys Met Lys
 115 120 125
 Glu Ile Ala Glu Ala Tyr Leu Gly Tyr Pro Val Thr Asn Ala Val Ile
 130 135 140
 Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ser Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp
 145 150 155 160

[0002]

Ala Gly Val Ile Ala Gly Leu Asn Val Leu Arg Ile Ile Asn Glu Pro
165 170 175

Thr Ala Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Asp Arg Thr Gly Lys Gly Glu
180 185 190

Arg Asn Val Leu Ile Phe Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser
195 200 205

Ile Leu Thr Ile Asp Asp Gly Ile Phe Glu Val Lys Ala Thr Ala Gly
210 215 220

Asp Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp Asn Arg Leu Val Asn His
225 230 235 240

Phe Val Glu Glu Phe Lys Arg Lys His Lys Lys Asp Ile Ser Gln Asn
245 250 255

Lys Arg Ala Val Arg Arg Leu Arg Thr Ala Cys Glu Arg Ala Lys Arg
260 265 270

Thr Leu Ser Ser Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Ile Asp Ser Leu Phe
275 280 285

Glu Gly Ile Asp Phe Tyr Thr Ser Ile Thr Arg Ala Arg Phe Glu Glu
290 295 300

Leu Cys Ser Asp Leu Phe Arg Ser Thr Leu Glu Pro Val Glu Lys Ala
305 310 315 320

Leu Arg Asp Ala Lys Leu Asp Lys Ala Gln Ile His Asp Leu Val Leu
325 330 335

Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys Val Gln Lys Leu Leu Gln Asp
340 345 350

Phe Phe Asn Gly Arg Asp Leu Asn Lys Ser Ile Asn Pro Asp Glu Ala
355 360 365

Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val Gln Ala Ala Ile Leu Met Gly Asp Lys
370 375 380

Ser Glu Asn Val Gln Asp Leu Leu Leu Leu Asp Val Ala Pro Leu Ser
385 390 395 400

Leu Gly Leu Glu Thr Ala Gly Gly Val Met Thr Ala Leu Ile Lys Arg
405 410 415

Asn Ser Thr Ile Pro Thr Lys Gln Thr Gln Ile Phe Thr Thr Tyr Ser

[0003]

420 425 430
 Asp Asn Gln Pro Gly Val Leu Ile Gln Val Tyr Glu Gly Glu Arg Ala
 435 440 445
 Met Thr Lys Asp Asn Asn Leu Leu Gly Arg Phe Glu Leu Ser Gly Ile
 450 455 460
 Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile
 465 470 475 480
 Asp Ala Asn Gly Ile Leu Asn Val Thr Ala Thr Asp Lys Ser Thr Gly
 485 490 495
 Lys Ala Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn Asp Lys Gly Arg Leu Ser Lys
 500 505 510
 Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Gln Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Ala Glu
 515 520 525
 Asp Glu Val Gln Arg Glu Arg Val Ser Ala Lys Asn Ala Leu Glu Ser
 530 535 540
 Tyr Ala Phe Asn Met Lys Ser Ala Val Glu Asp Glu Gly Leu Lys Gly
 545 550 555 560
 Lys Ile Ser Glu Ala Asp Lys Lys Lys Val Leu Asp Lys Cys Gln Glu
 565 570 575
 Val Ile Ser Trp Leu Asp Ala Asn Thr Leu Ala Glu Lys Asp Glu Phe
 580 585 590
 Glu His Lys Arg Lys Glu Leu Glu Gln Val Cys Asn Pro Ile Ile Ser
 595 600 605
 Gly Leu Tyr Gln Gly Ala Gly Gly Pro Gly Pro Gly Gly Phe Gly Ala
 610 615 620
 Gln Gly Pro Lys Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro Thr Ile Glu Glu Val
 625 630 635 640

Asp

<210> 2
 <211> 2445
 <212> DNA
 <213> 人
 <400> 2

[0004]

ataaaagccc aggggcaagc ggtecgata acggctagcc tgaggagctg ctgcgacagt	60
ccactacett ttctgagagt gactcccgtt gtcccaagcc ttcccagagc gaacctgtgc	120
ggctgcagge accggcgctg cgagtttccg gcgtccggaa ggaccgagct cttctcgagg	180
atccagtgtt ccgtttccag cccccaatct cagagcggag ccgacagaga gcaggaacc	240
ggcatgcca aagcccgccg gatcggcacc gacctgggca ccacctacc ctgctgggg	300
gtgttccaac acggcaaggt ggagatcacc gccaacgacc agggcaaccg caccacccc	360
agctacgtgg cttcaegga caccgagcgg ctcatcgagg atgctggcca gaaccaggtg	420
gcgctgaacc cgcagaacac cgtgtttgac gccgaagcgc tgattggccg caagtctggc	480
gacctgggtg tgcagtegga catgaagcac tggccttcc aggtgateca cgaecgagac	540
aagcccaagg tgcaggtgag ctacaagggg gagaccaagg cattctacc cgaggagatc	600
tcgtccatgg tctgaccaa gatgaaggag atcgcagagg cgtacctggg ctaccgggtg	660
accaacgcgg tgatcacctg gccggcctac ttcaacgact cgcagcgcga ggccaccaag	720
gatgctgggt tgatecgagg gctcaacgtg ctgctgatca tcaacgagcc caccgcccgc	780
gccatcgctt accgctgga cagaacgggc aagggggagc gcaacgtgct catctttgac	840
ctgggcgggg gaaccttcca cgtgtccacc ctgacgatcg acgacggcat cttcaggtg	900
aaggccacgg cggggacac ccacctgggt ggggaggact ttgacaacag gctggtgaac	960
cacttcgtgg aggagttcaa gagaaaacac aagaaggaca tcagccagaa caagcagacc	1020
gtgagcgggc tgcgcaccgc ctgctgaggg gccaaagga cctgtctct cagcaccag	1080
gccagcctgg agatcgacc cctgtttgag ggcatcgact tctacacgtc catcaccagg	1140
gcgaggttcg aggagctgtg ctccgacctg ttccgaagca ccttgagacc cgtggagaag	1200
gctctgcgag accccaagct ggacaaggcc cagattcacg acctggtcct ggtcgggggc	1260
tcaccocga tcccgaaggt gcagaagctg ctgcaggact tcttcaacgg gcgcgacctg	1320
aacaagagca teaaccccca cgagctgtg gcctacgggg cggcgggtgca ggcggccacc	1380
ctgatggggg acaagtcga gaacctgcag gacctgctgc tgcctggact ggctcccctg	1440
tcgctggggc tggagacggc cggagcgtg atgactgcc tgatcaagc caactccacc	1500
atcccacca agcagacgca gatcttacc acctactccg acaaccaacc cggggtgctg	1560
atccaggtgt acgagggcga gaggccatg acgaaagaca acaatctgtt gggcgcttc	1620
gagctgagcg gcattccctc ggccccagc ggctgcccc agatcgaggt gacctcgac	1680
atcgalcca accgcalcct gaacgtcacc gccacggaca agagcaaccg caaggccaac	1740
aagateacca taaccaaga caaggccgc ctgagcaagg aggagatega gcgcatggtg	1800
caggagcggg agaagtaca agcggaggac gaggtgcacc gcgagaggt gtcagccaag	1860
aacgcctgg agtctaccg cttcaacatg aagagcggcg tggagatga gggctcaag	1920
ggcaagatca gcgagcgga caagaagaag gtgctggaca agtctcaaga ggctcatctg	1980

[0005]

tggetggacg ccaacacctt ggccgagaag gacgagtttg agcacaagag gaaggagctg 2040
gagcaggtgt gtaaccccat catcagcgga ctgtaccagg gtgcegggtg tcecgggect 2100
gggggettgc gggetcaggg tcccaaggga gggctctgggt caggceccac cattgaggag 2160
gtagattagg ggectttcca agattgetgt ttttgttttg gagcttcaag accttgcaat 2220
tcctagtatt tcigtttgtc agttctcaat ttectgtggt tgcaatggtg aaattttttg 2280
gtgaagtact gaacttgcct tttttccggg ttctacatgc agagatgaaf ttatactgcc 2340
atcttaagac tattttctct ttttaataca cttaactcag gccatttttt aagttggtta 2400
cttcaaagta aataaacctt aaaattcaaa aaaaaaaaaa aaaaa 2445

<210> 3
<211> 641
<212> PRT
<213> 人

<400> 3

Met Ala Lys Ala Ala Ala Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser
1 5 10 15

Cys Val Gly Val Phe Gln His Gly Lys Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp
20 25 30

Gln Gly Asn Arg Thr Thr Pro Ser Tyr Val Ala Phe Thr Asp Thr Glu
35 40 45

Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala Lys Asn Gln Val Ala Leu Asn Pro Gln
50 55 60

Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys Arg Leu Ile Gly Arg Lys Phe Gly Asp
65 70 75 80

Pro Val Val Gln Ser Asp Met Lys His Trp Pro Phe Gln Val Ile Asn
85 90 95

Asp Gly Asp Lys Pro Lys Val Gln Val Ser Tyr Lys Gly Glu Thr Lys
100 105 110

Ala Phe Tyr Pro Glu Glu Ile Ser Ser Met Val Leu Thr Lys Met Lys
115 120 125

Glu Ile Ala Glu Ala Tyr Leu Gly Tyr Pro Val Thr Asn Ala Val Ile
130 135 140

Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ser Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp
145 150 155 160

[0006]

Ala Gly Val Ile Ala Gly Leu Asn Val Leu Arg Ile Ile Asn Glu Pro
165 170 175

Thr Ala Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Asp Arg Thr Gly Lys Gly Glu
180 185 190

Arg Asn Val Leu Ile Phe Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser
195 200 205

Ile Leu Thr Ile Asp Asp Gly Ile Phe Glu Val Lys Ala Thr Ala Gly
210 215 220

Asp Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp Asn Arg Leu Val Asn His
225 230 235 240

Phe Val Glu Glu Phe Lys Arg Lys His Lys Lys Asp Ile Ser Gln Asn
245 250 255

Lys Arg Ala Val Arg Arg Leu Arg Thr Ala Cys Glu Arg Ala Lys Arg
260 265 270

Thr Leu Ser Ser Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Ile Asp Ser Leu Phe
275 280 285

Glu Gly Ile Asp Phe Tyr Thr Ser Ile Thr Arg Ala Arg Phe Glu Glu
290 295 300

Leu Cys Ser Asp Leu Phe Arg Ser Thr Leu Glu Pro Val Glu Lys Ala
305 310 315 320

Leu Arg Asp Ala Lys Leu Asp Lys Ala Gln Ile His Asp Leu Val Leu
325 330 335

Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys Val Gln Lys Leu Leu Gln Asp
340 345 350

Phe Phe Asn Gly Arg Asp Leu Asn Lys Ser Ile Asn Pro Asp Glu Ala
355 360 365

Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val Gln Ala Ala Ile Leu Met Gly Asp Lys
370 375 380

Ser Glu Asn Val Gln Asp Leu Leu Leu Leu Asp Val Ala Pro Leu Ser
385 390 395 400

Leu Gly Leu Glu Thr Ala Gly Gly Val Met Thr Ala Leu Ile Lys Arg
405 410 415

Asn Ser Thr Ile Pro Thr Lys Gln Thr Gln Ile Phe Thr Thr Tyr Ser

[0007]

420 425 430
 Asp Asn Gln Pro Gly Val Leu Ile Gln Val Tyr Glu Gly Glu Arg Ala
 435 440 445
 Met Thr Lys Asp Asn Asn Leu Leu Gly Arg Phe Glu Leu Ser Gly Ile
 450 455 460
 Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile
 465 470 475 480
 Asp Ala Asn Gly Ile Leu Asn Val Thr Ala Thr Asp Lys Ser Thr Gly
 485 490 495
 Lys Ala Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn Asp Lys Gly Arg Leu Ser Lys
 500 505 510
 Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Gln Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Ala Glu
 515 520 525
 Asp Glu Val Gln Arg Glu Arg Val Ser Ala Lys Asn Ala Leu Glu Ser
 530 535 540
 Tyr Ala Phe Asn Met Lys Ser Ala Val Glu Asp Glu Gly Leu Lys Gly
 545 550 555 560
 Lys Ile Ser Glu Ala Asp Lys Lys Lys Val Leu Asp Lys Cys Gln Glu
 565 570 575
 Val Ile Ser Trp Leu Asp Ala Asn Thr Leu Ala Glu Lys Asp Glu Phe
 580 585 590
 Glu His Lys Arg Lys Glu Leu Glu Gln Val Cys Asn Pro Ile Ile Ser
 595 600 605
 Gly Leu Tyr Gln Gly Ala Gly Gly Pro Gly Pro Gly Gly Phe Gly Ala
 610 615 620
 Gln Gly Pro Lys Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro Thr Ile Glu Glu Val
 625 630 635 640

Asp

- <210> 4
- <211> 2551
- <212> DNA
- <213> 人
- <400> 4

[0008]

ggaaaaeggc cagcctgagg agctgctgcg agggctcctt tcgtctttcg agagtgacte	60
ccgcggtccc aaggctttcc agagegaacc tftgcgctg caggcaaccg cgtgttgagt	120
ttccggcgtt cogaaggact gagctcttgt cgcggatccc gtcgcctgtt tccagccccc	180
agtctcagag cggagcccac agagcagggc accggcatgg ccaaagccgc ggcgatcggc	240
atcgacctgg gcaccaccta ctctcgctg ggggtgttcc aacacggcaa ggtggagate	300
atcgcccaac accagggcaa ccgcaccacc cccagctacg tggccttcac ggacaccgag	360
cggctcctcg gggatgctgc caagaaccag gtggcctga acccgcagaa caccgtgttt	420
gacgcgaagc ggtgatcgg ccgcaagttc ggcgaccgg ttgtgcagtc ggacatgaag	480
cactggcctt tccaggtgat caacgaegga gacaagecca aggtgcaggt gagctacaag	540
ggggagacca aggcattcta ccccaggag atctcttcca tggctctgac caagatgaag	600
gagategccg aggcgtacct gggctaccog gtgaccaacg ccgtgatcac cgtgcggccc	660
tacttcaacg actcgcagcg ccaggccacc aaggatgctg gtgtgatcgc ggggctcaac	720
gtgctcgga tcataacga gcccaaggcc gccgccatcg cctacggcct ggacagaacg	780
ggcaaggggg agcgcaacgt gctcatcttt gacctggggc ggggcacctt cgactgttcc	840
atcctgacga tegacgacgg catcttegag gtgaaggcca cggccgggga cacccaactg	900
ggtggggagg actttgaaa caggctggtg aaccacttcg tggaggagt caagagaaaa	960
cacaagaagg acatcagcca gaacaagca gccgtgagge ggotgcgcac cgcctcgag	1020
agggccaaga ggaccctgtc gtccagcacc caggccagcc tggagatcga ctccctgttt	1080
gaggcatcg acttctaac gtccatcac agggcgaggt tcgaggagct gtgctccgac	1140
ctgttccgaa gcaccctgga gccctggag aaggctctgc gcgacgcaa gctggacaag	1200
gccagatcc acgacctggt cctggctggg ggtccaccc gcatecccaa ggtgcagaag	1260
ctgctgcagg acttcttcaa cgggcgcgac ctgaacaaga gcatcaacc cgacgaggt	1320
gtggcctacg gggcggggt gcaggcgcc atcctgatgg gggacaagtc cgagaacgtg	1380
caggacctgc tctgctgga cgtgctccc ctgtcctgg ggtggagac ggccggagcc	1440
gtgatgactg cctgatcaa gcgcaactcc accatccca ccaagcagac gcagatcttc	1500
accacctact ccgacaacca acccgggtg ctgatccagg tgtacgagg cgagagggcc	1560
atgacgaaag acaacaatct gttggggcgc ttcgagctga gcggcatccc tccggcccc	1620
agggcgctgc cccagatcga ggtgaccttc gacatgatg ccaacggcat cctgaacgtc	1680
acggccacgg acaagagcac cggcaagcc aacaagatca ccatcaccaa cgacaagggc	1740
cgcctgagca aggaggagat cgagcgcctg gtgcaggagg cggagaagta caaagcggag	1800
gacgaggtgc agcgcgagag ggtgtcagcc aagaacccc tggagctcta cgccttcaac	1860
atgaagagcg ccgtggagga tgaggggctc aaggcgaaga tcagcgagcc ggacaagaag	1920
aaggttctgg acaagtgtca agaggtcctc tcgtgctgg accccaacac cttgcccag	1980

[0009]

aaggacgagt ttgagcacia gaggaaggag ctggagcagg tgtgtaacce catcateage	2040
ggaactgtacc aggggtgccgg tgggtcccggg cctggegget teggggetca gggteccaag	2100
ggagggtctg ggtcaggccc taccattgag gaggtggatt aggggccttt gttctttagt	2160
atgtttgtct ttgagggtga ctgttgggac tcaaggactt tgctgctggt ttectatgtc	2220
attctgctt cagctctttg ctgcttcact tctttgtaaa gttgtaacct gatgtaatt	2280
agctggettc attatctttg tagtacaace gatagttca ttagaattct ttgcattta	2340
tgttgatact gtaagggtgt ttegttccct ttaaataaat caaacctgcc accttetgta	2400
cgagtttggt tgttttttt ttttttttt ttttttgctt ggcgaaaaca ctacaaagge	2460
tgggaatgta tgtttttata atttgtttat ttaaataatga aaaataaaat gttaaacttt	2520
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa a	2551

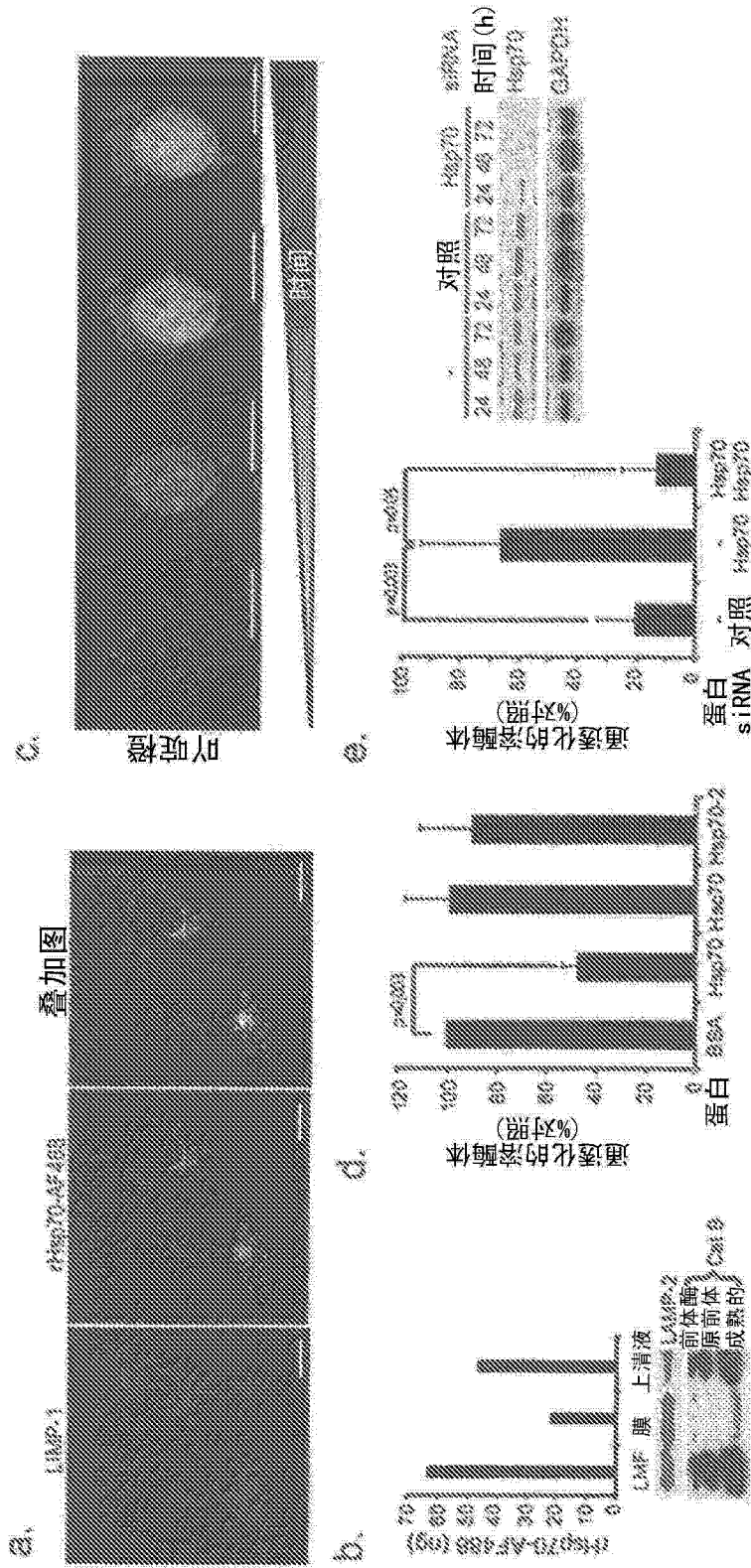


图 2

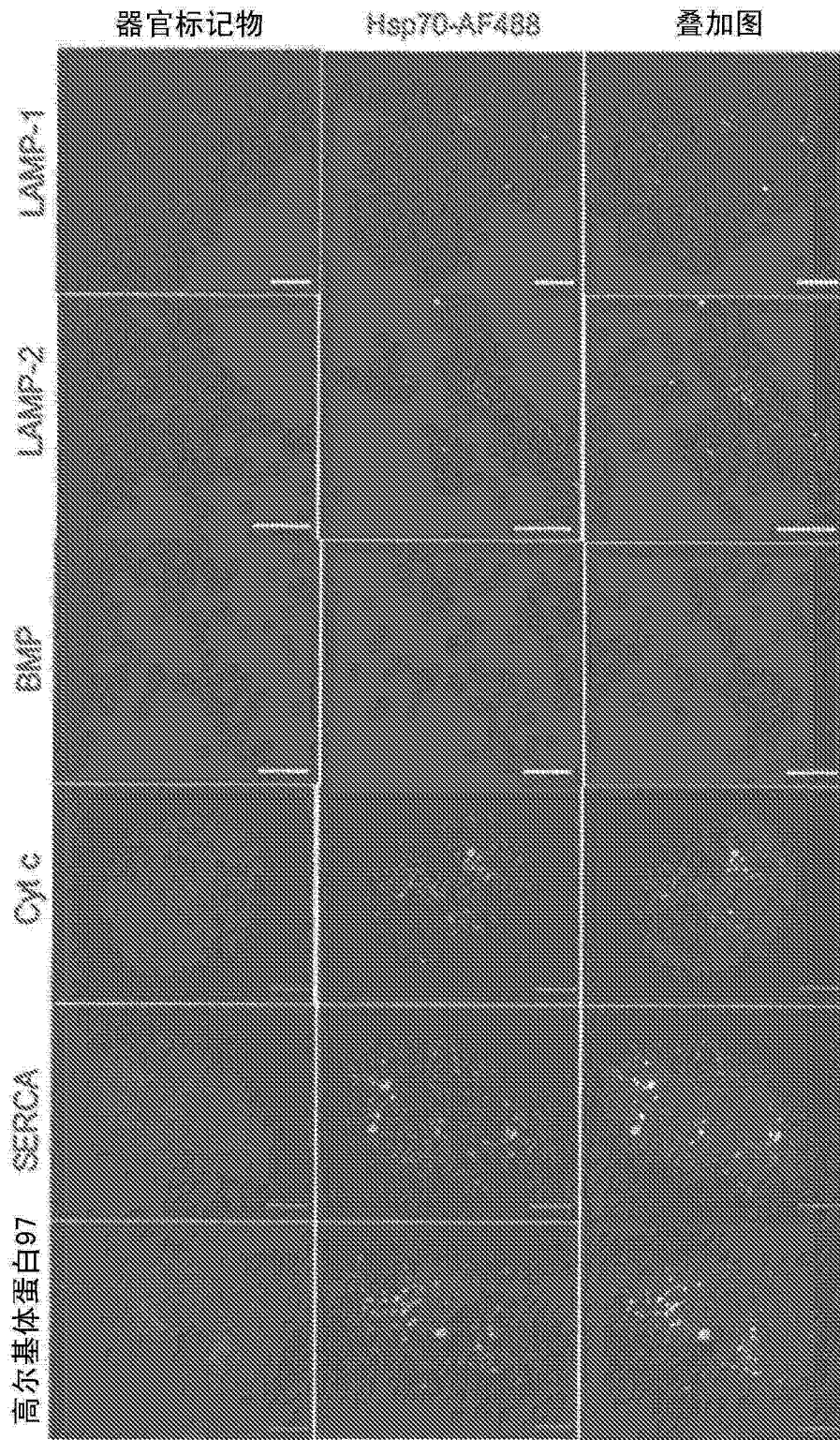


图 3

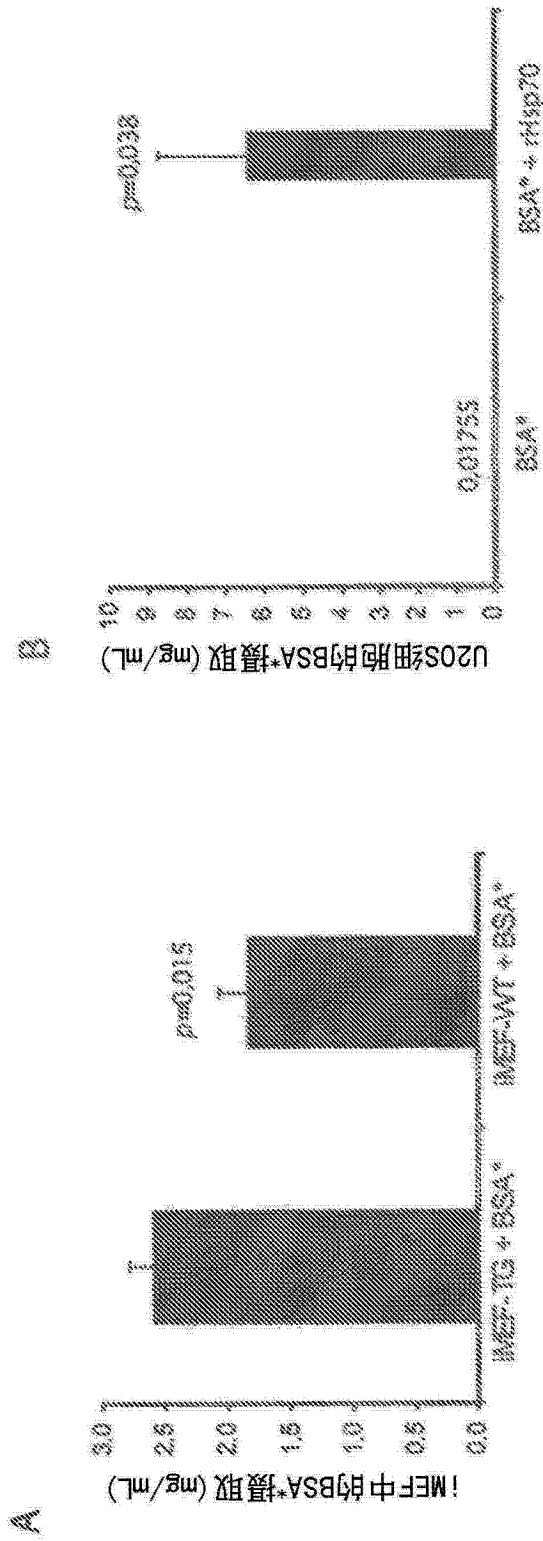


图 4

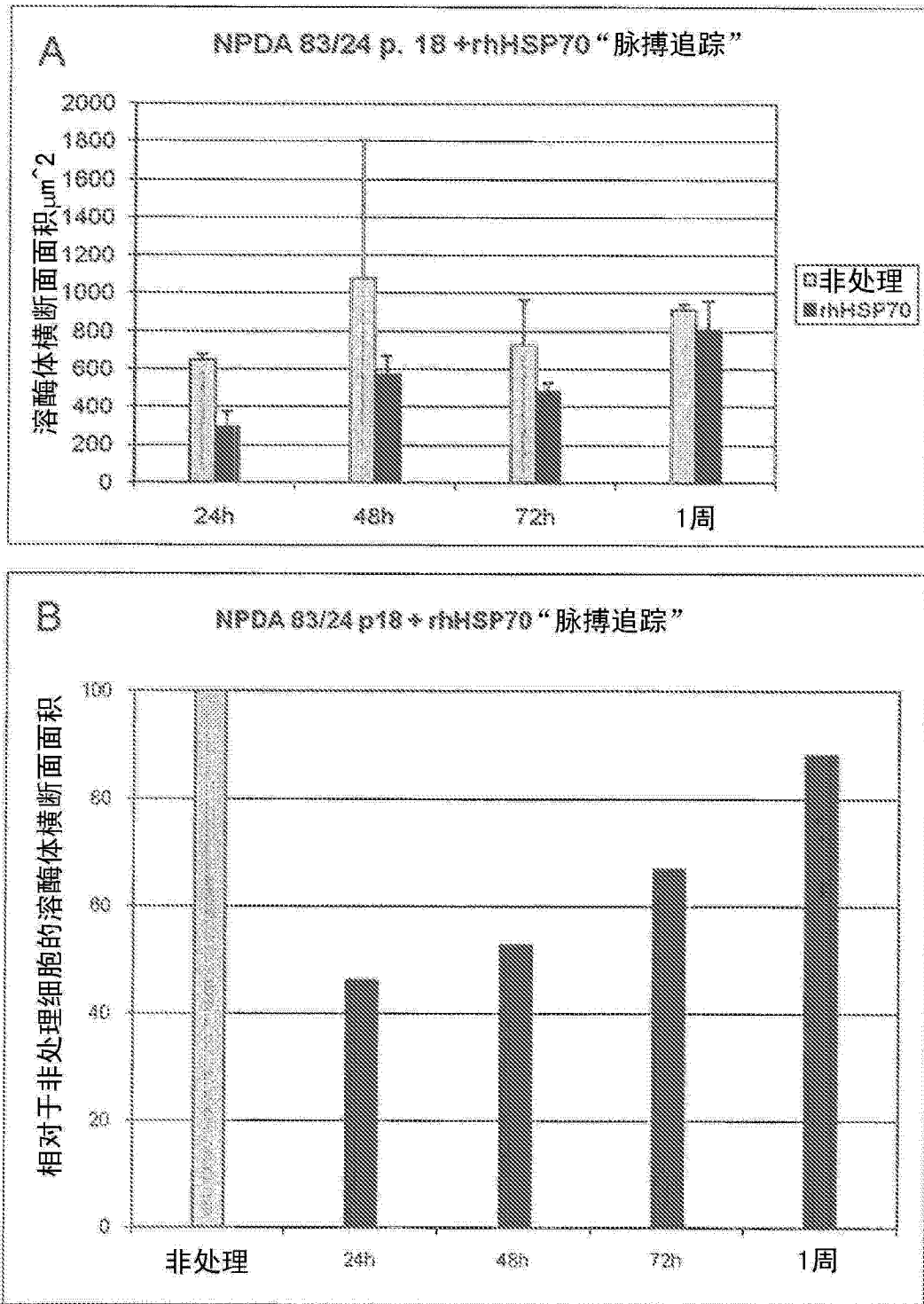


图 5

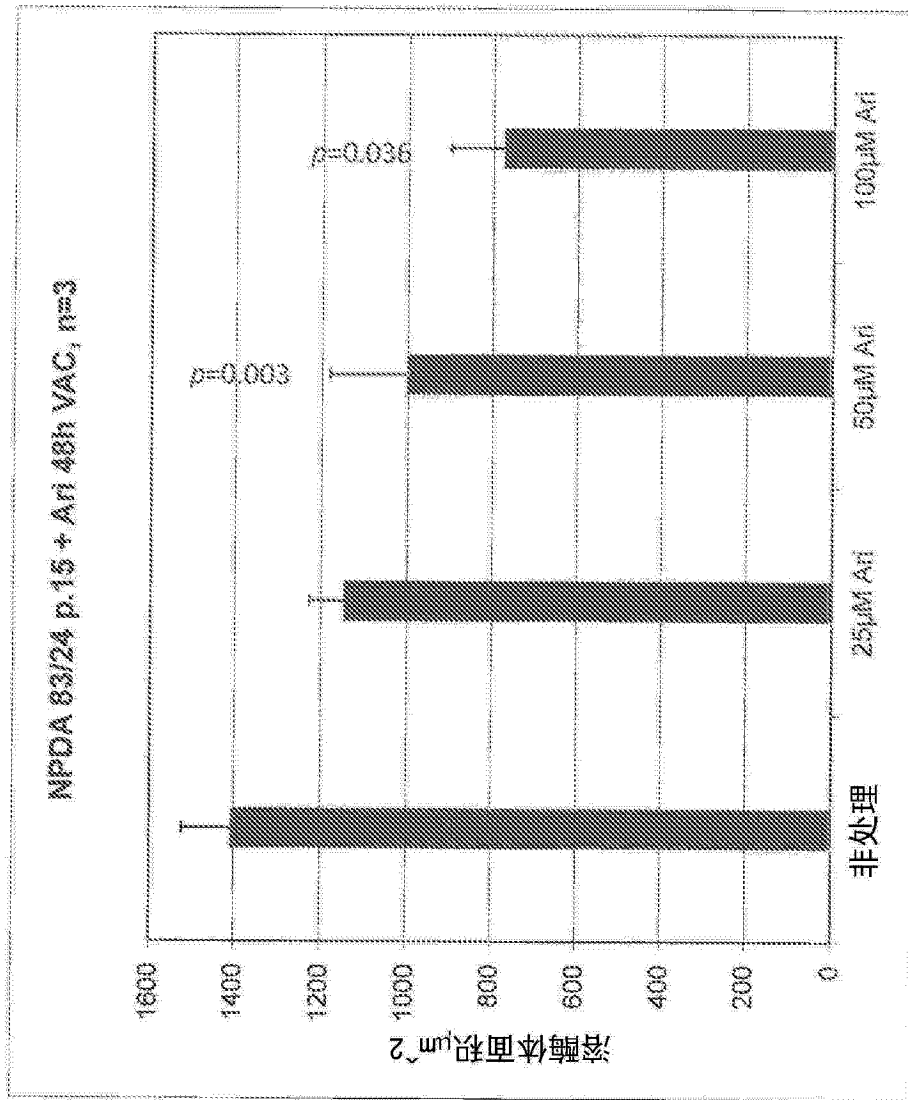


图 6

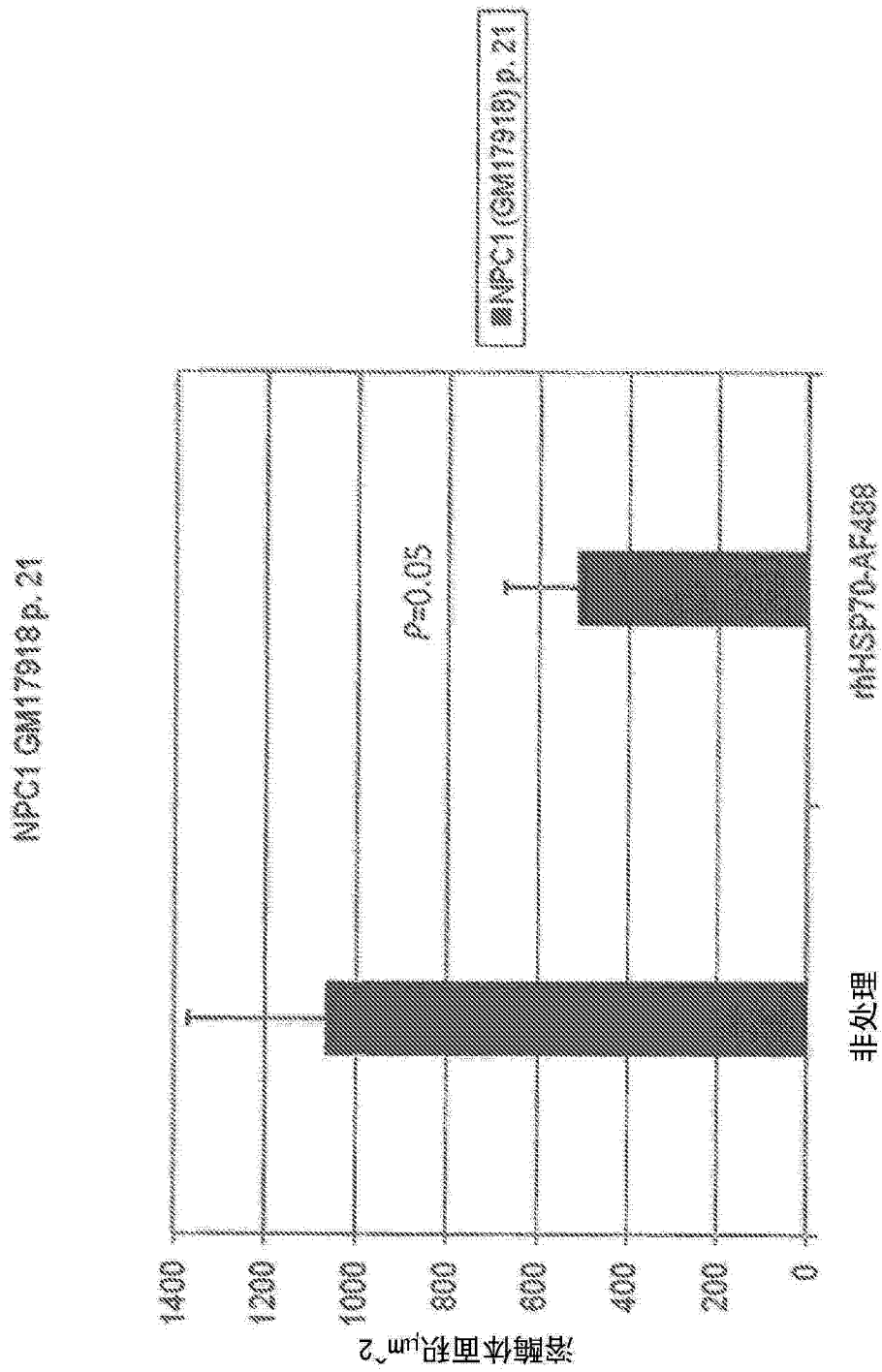


图 7

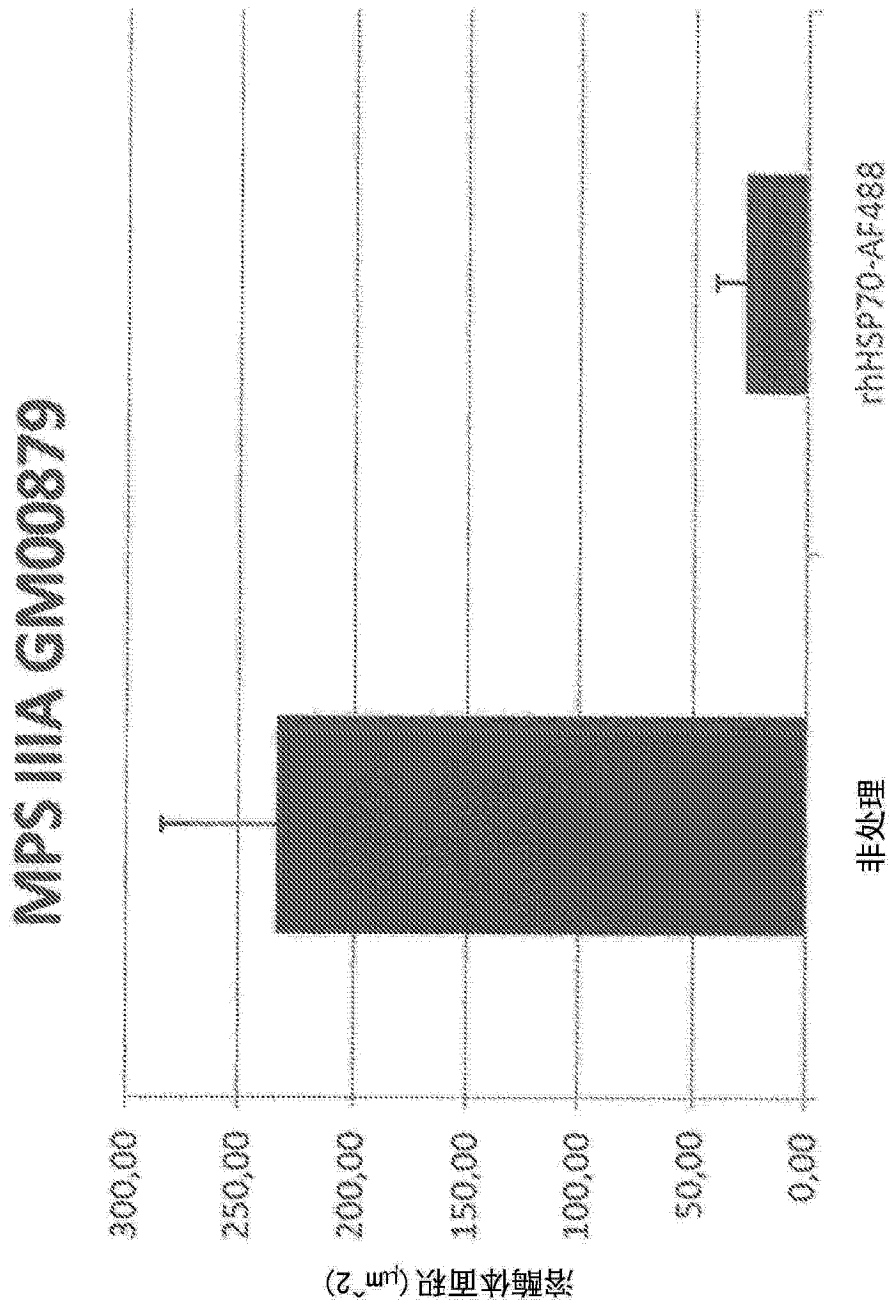


图 8

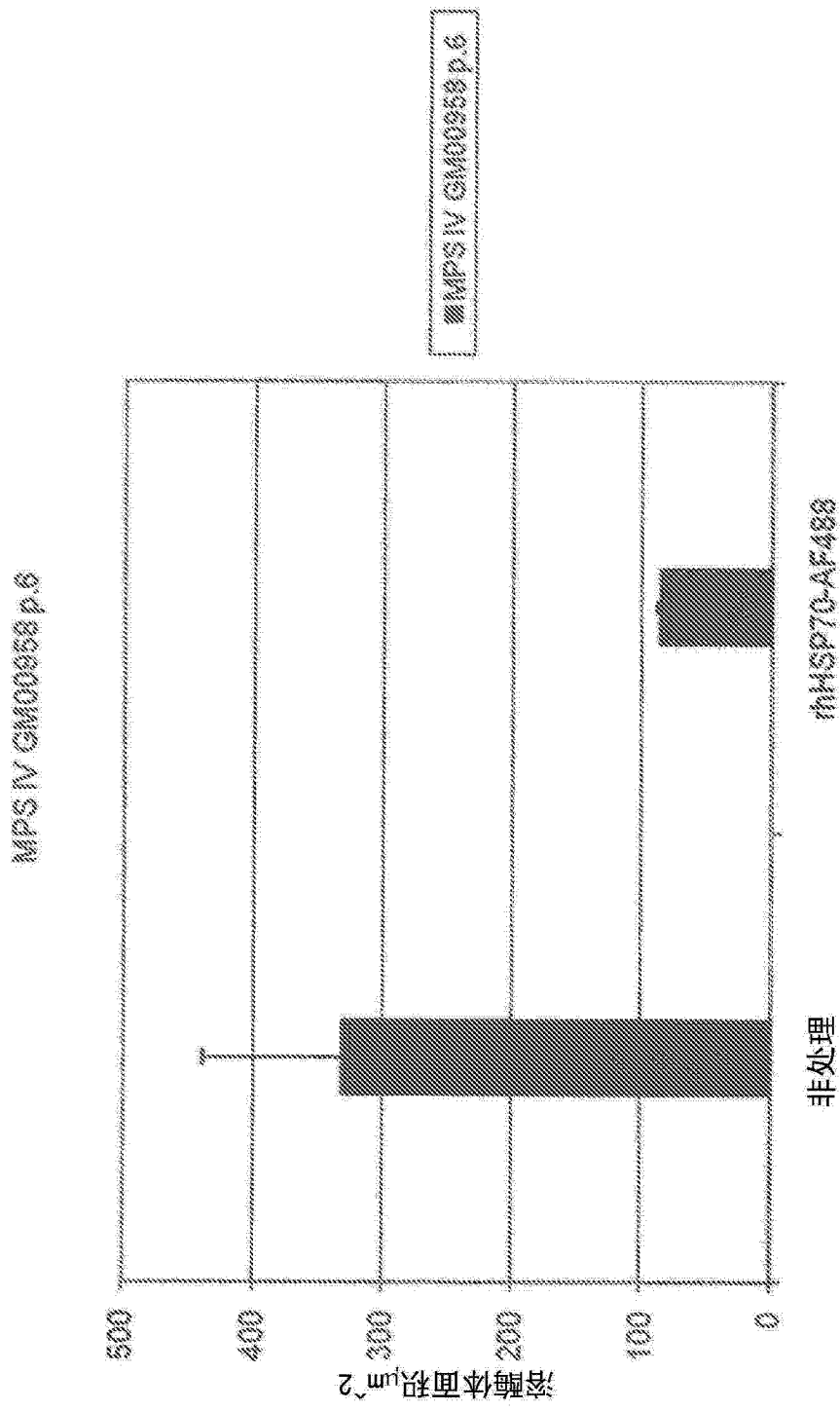


图 6

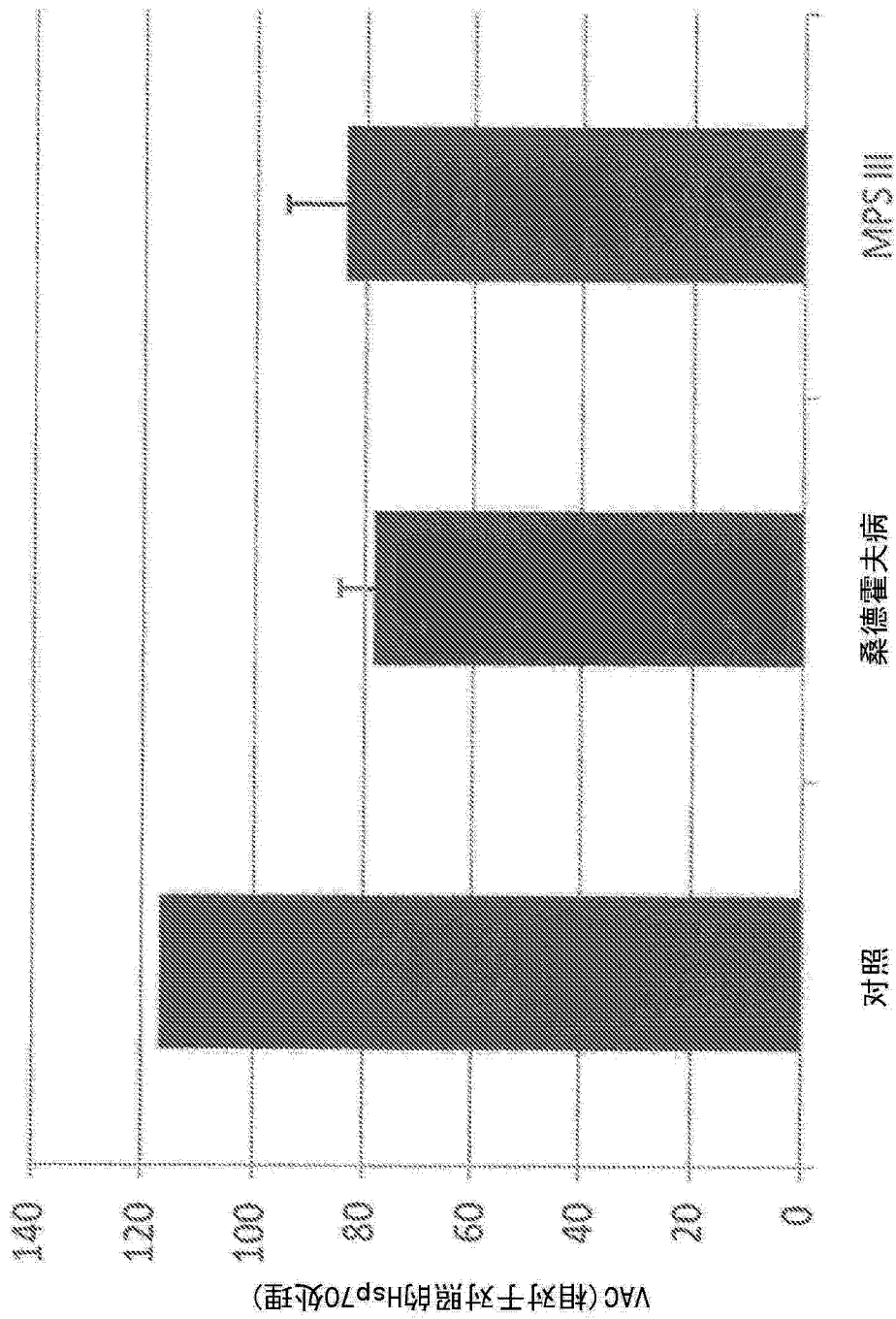


图 10

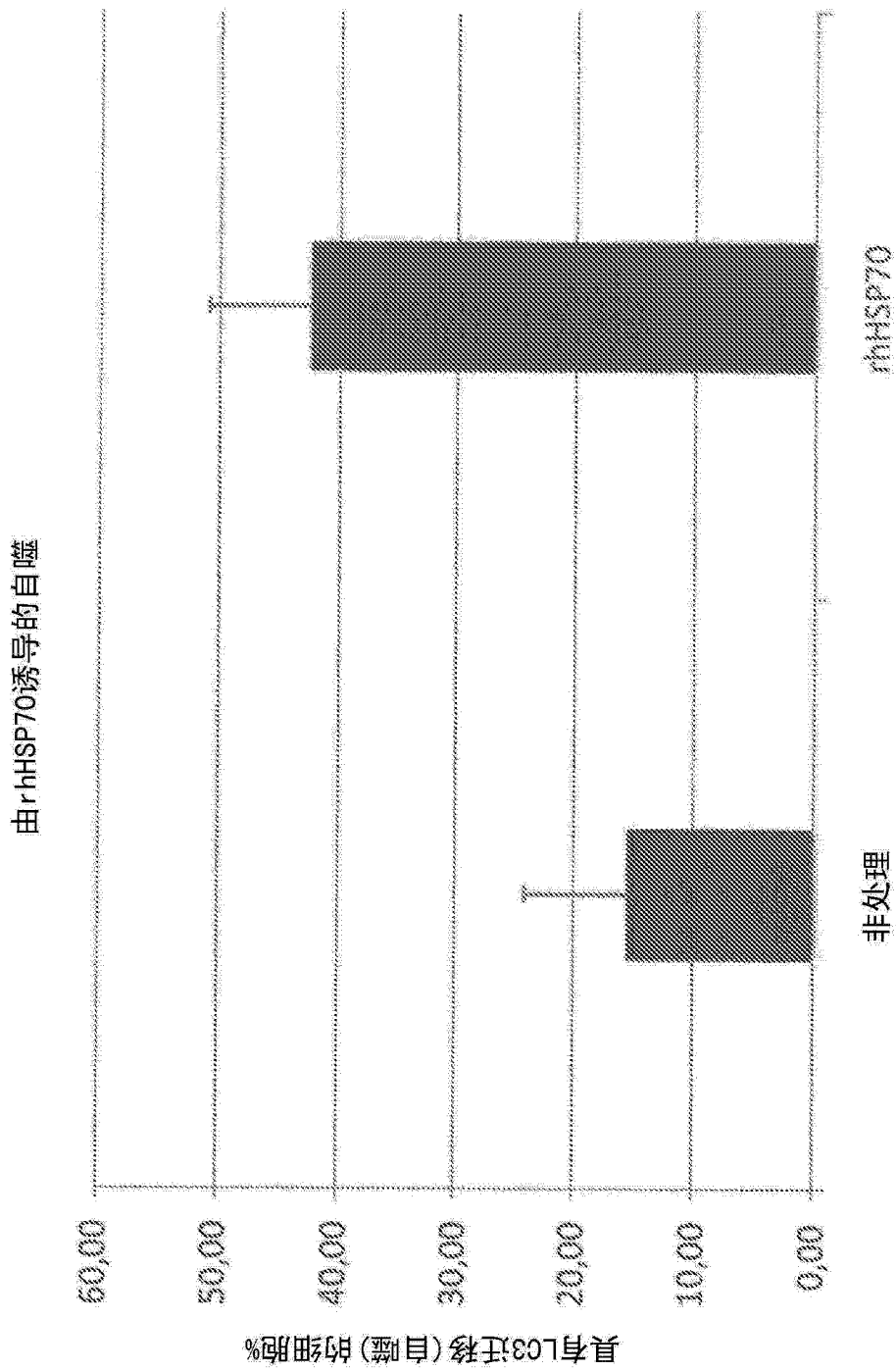


图 11

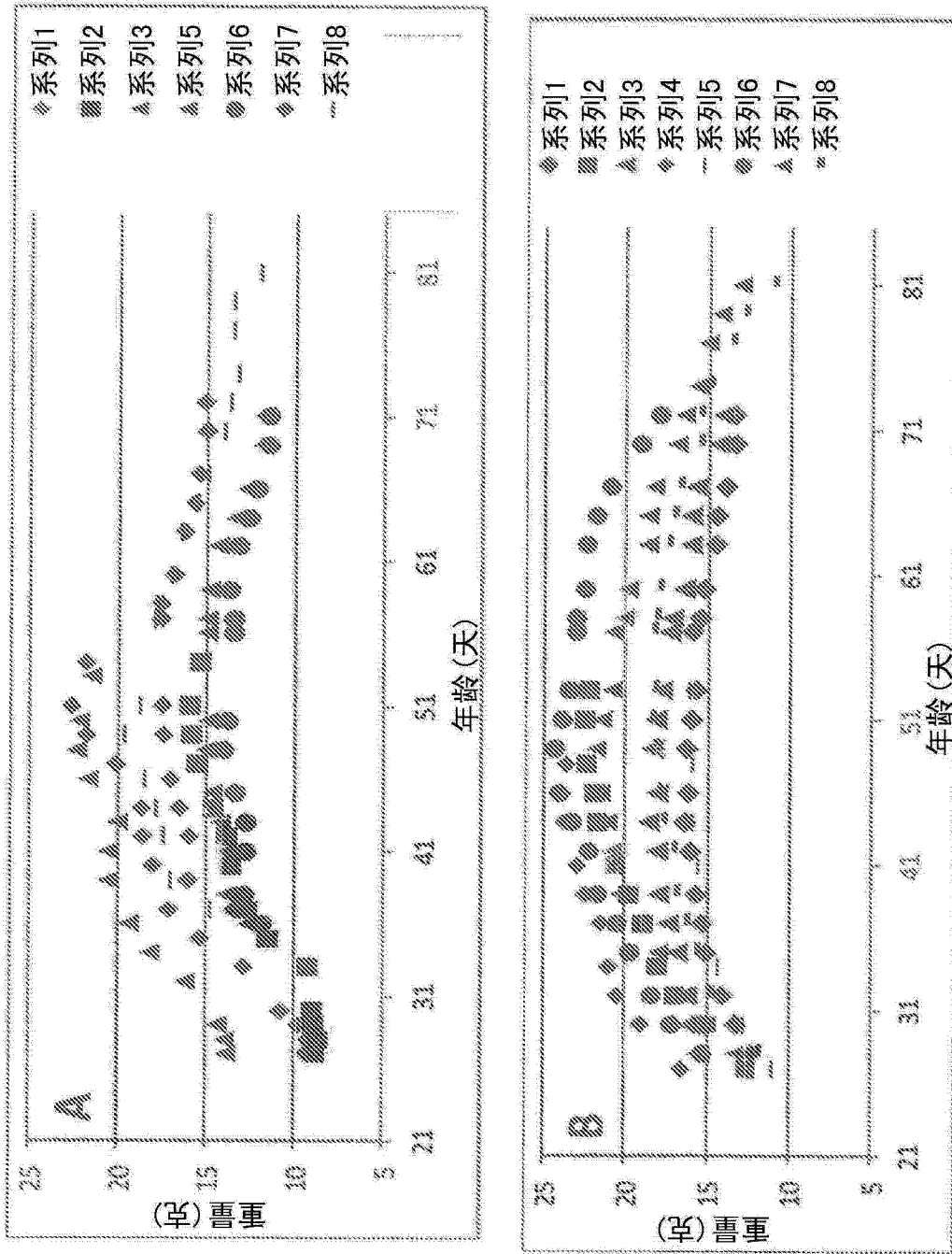


图 12

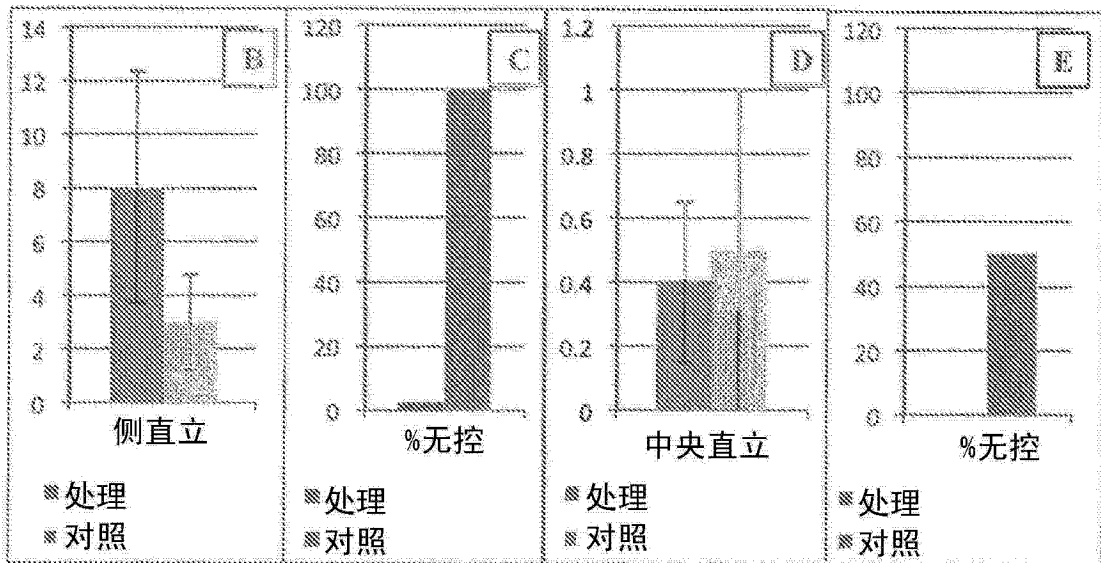
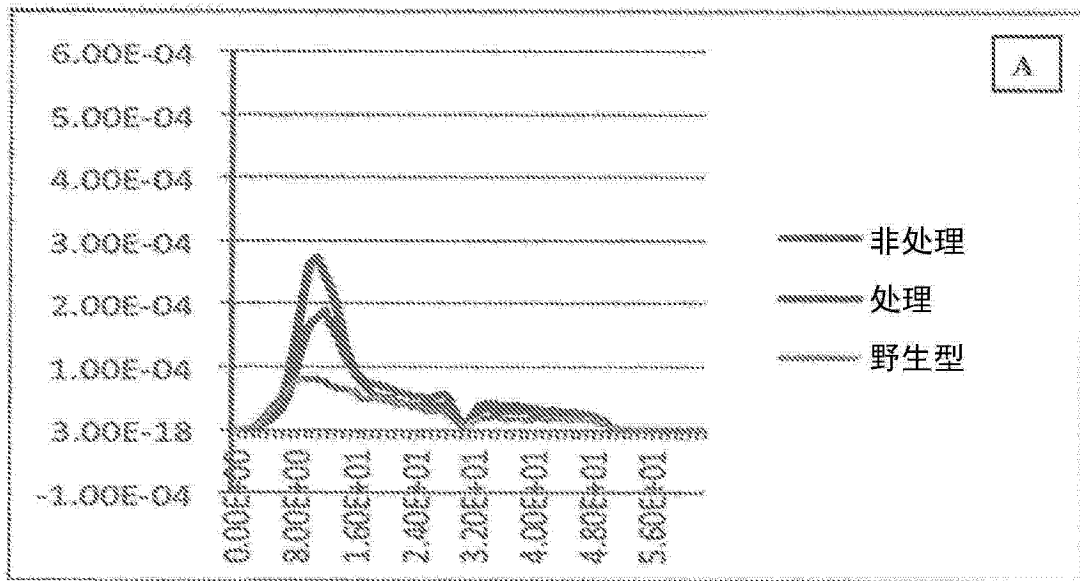


图 13

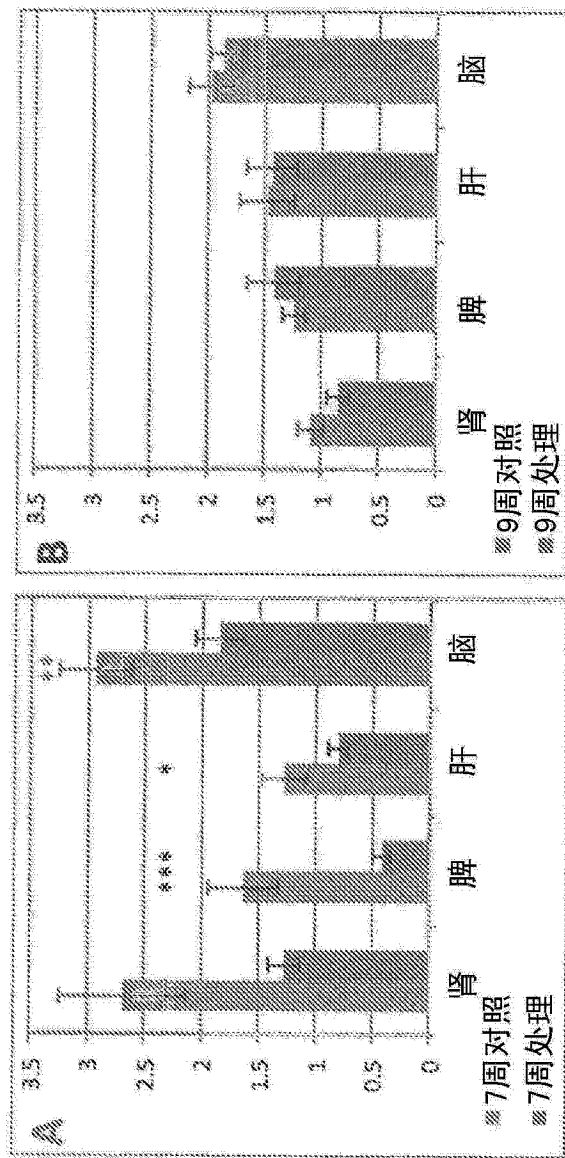


图 14

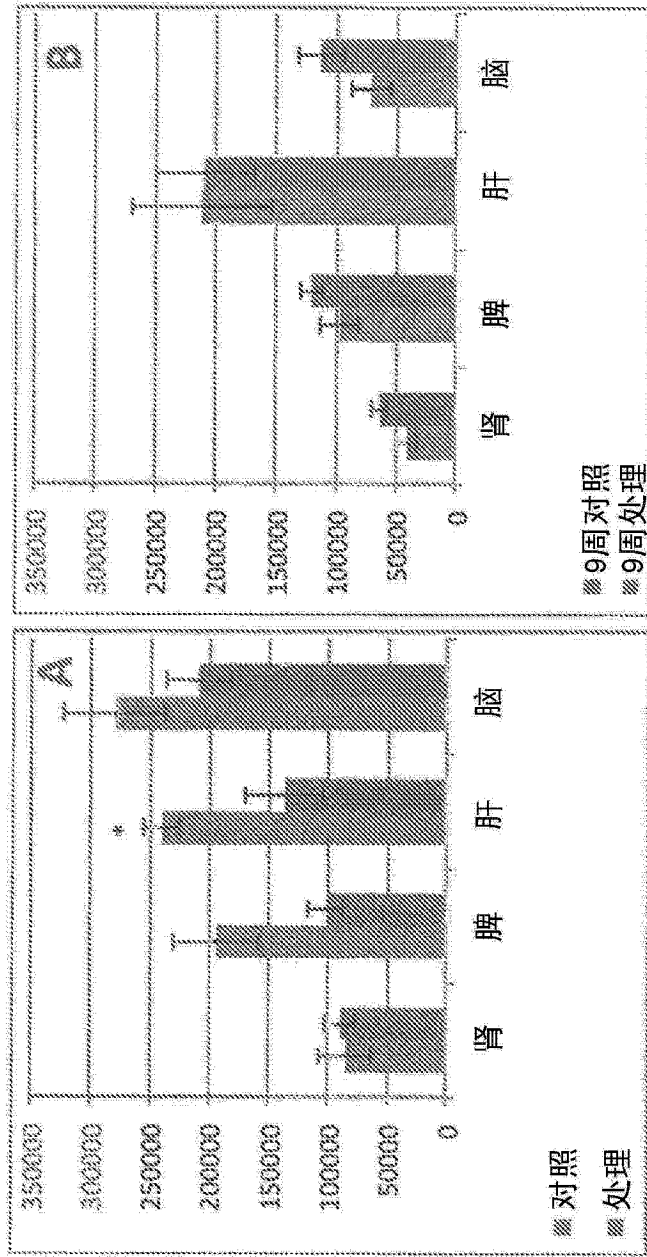


图 15

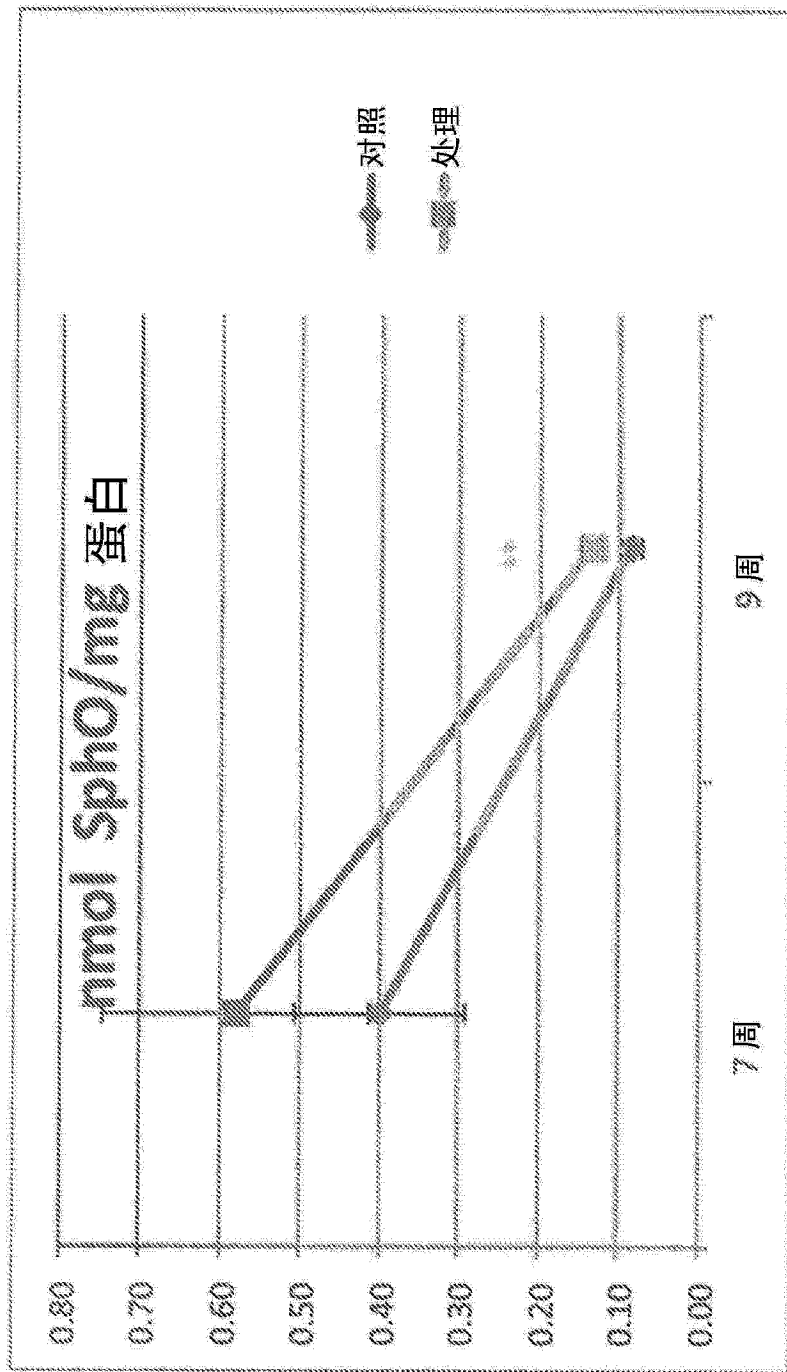


图 16

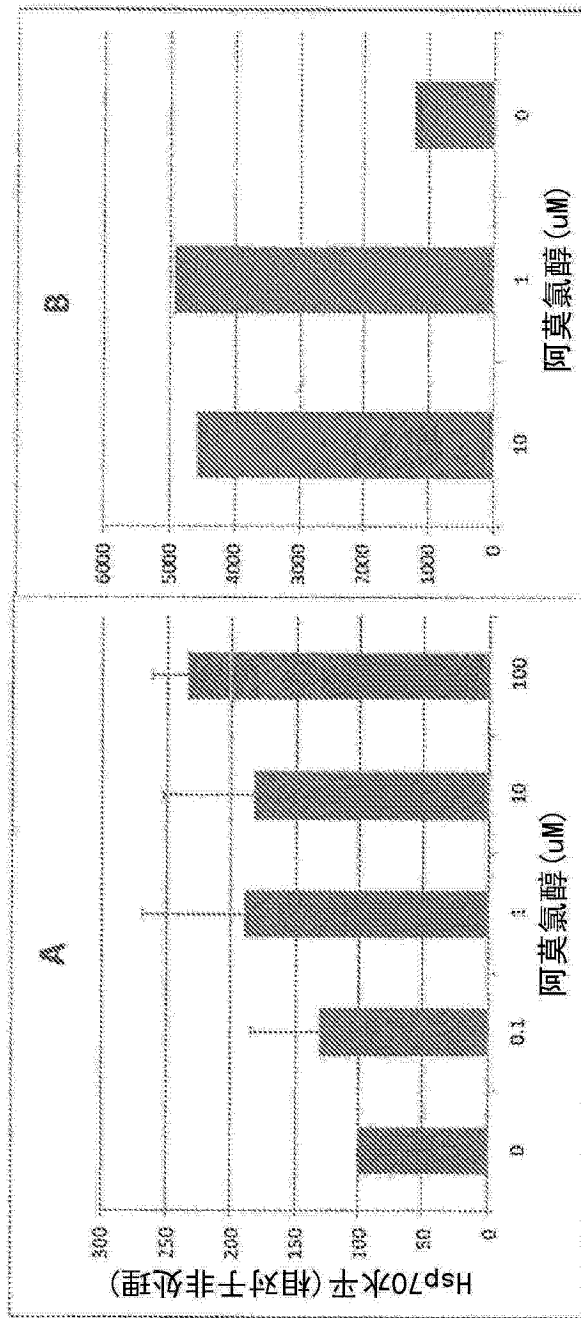


图 17

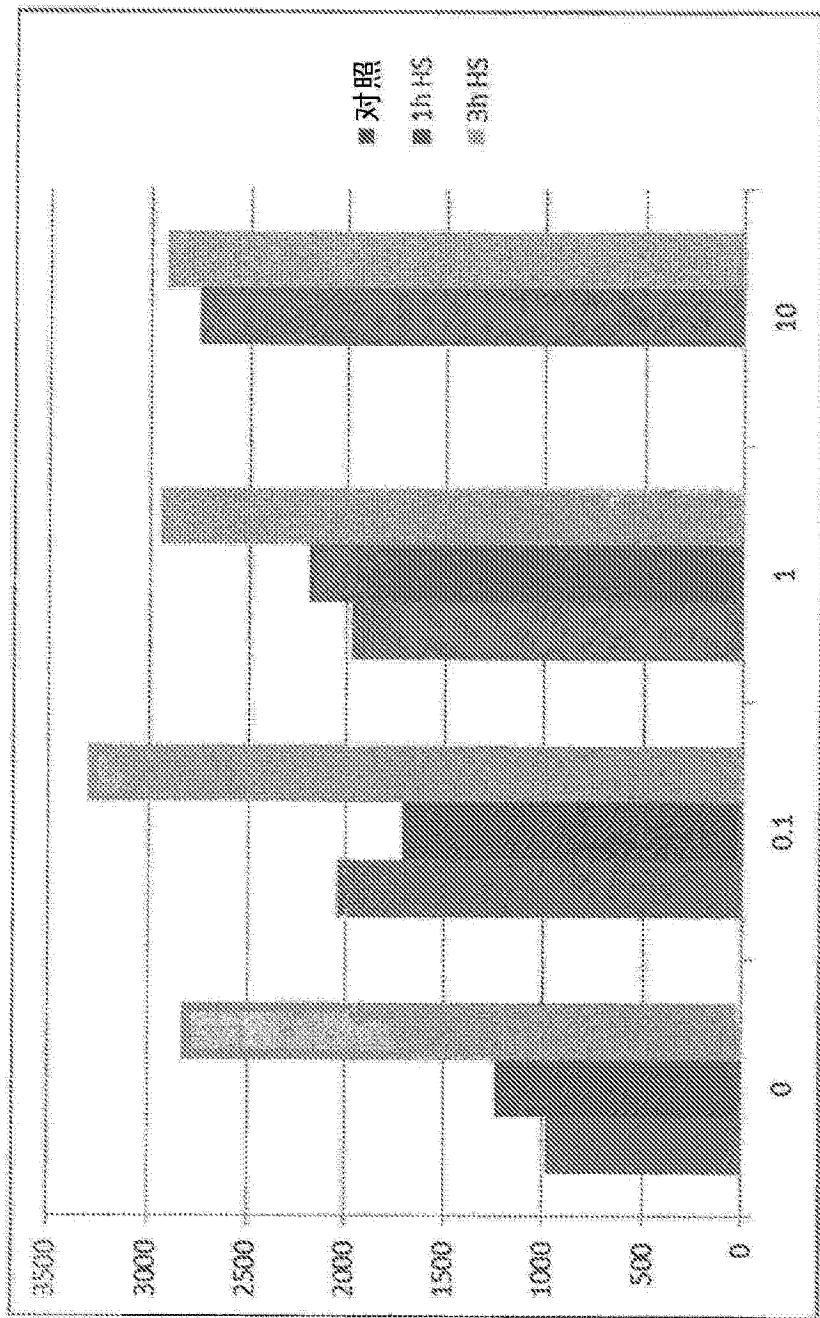


图 18

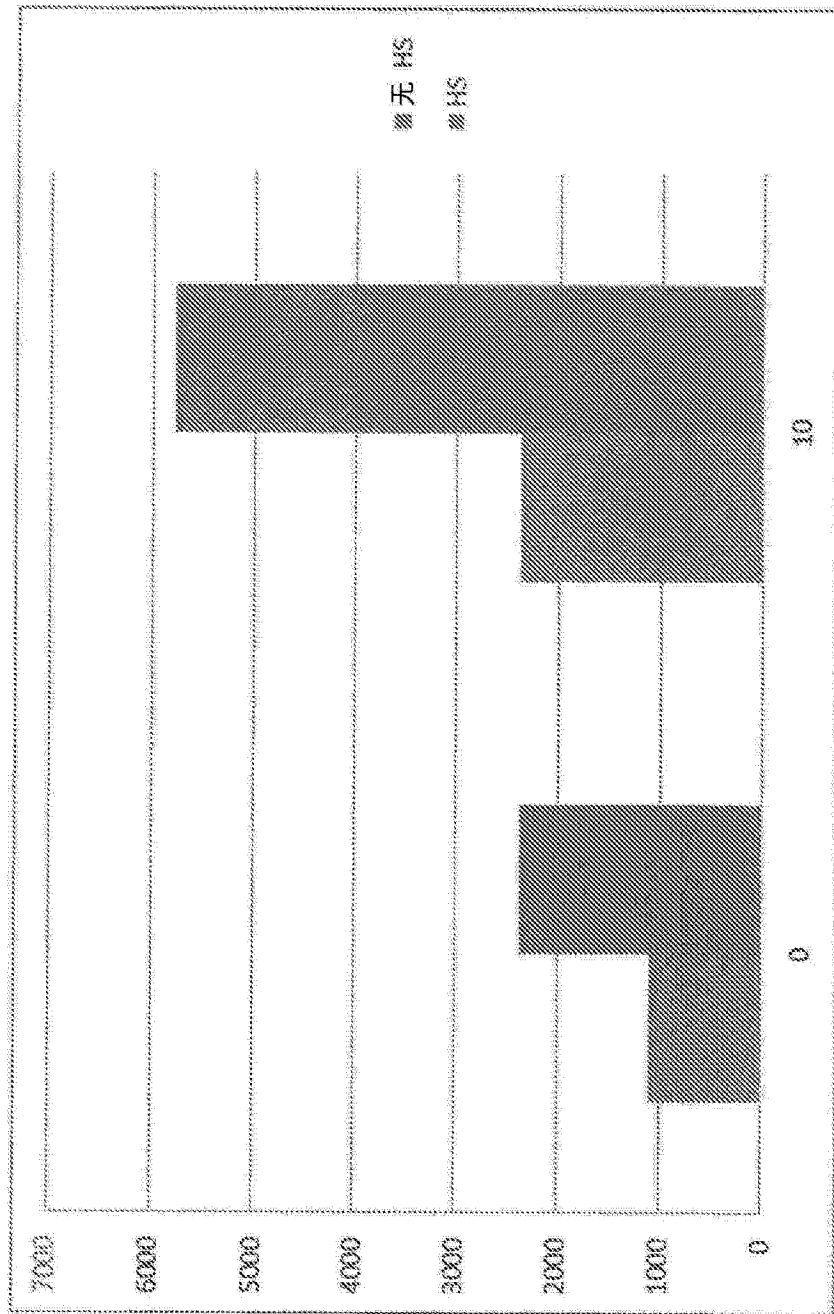


图 19