

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580025365.9

[51] Int. Cl.

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 35/34 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

[43] 公开日 2007年7月18日

[11] 公开号 CN 101001643A

[22] 申请日 2005.6.20

[21] 申请号 200580025365.9

[30] 优先权

[32] 2004.6.21 [33] US [31] 60/581,571

[86] 国际申请 PCT/US2005/021902 2005.6.20

[87] 国际公布 WO2006/002152 英 2006.1.5

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.26

[71] 申请人 克里夫兰诊所基金会

地址 美国俄亥俄州

[72] 发明人 马克·S·佩恩

马修·凯德罗夫斯基

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限
责任公司

代理人 王达佐 韩克飞

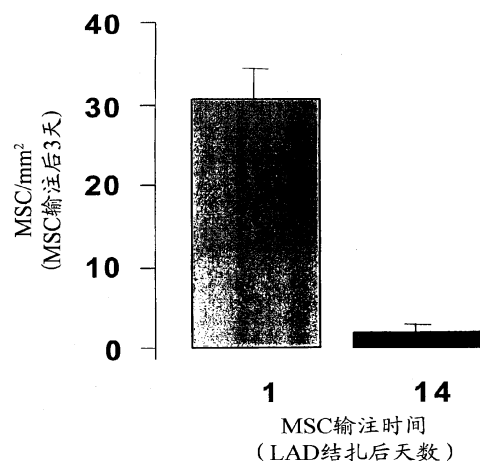
权利要求书 3 页 说明书 31 页 序列表 10 页
附图 5 页

[54] 发明名称

用于干细胞归巢的 CCR 配体

[57] 摘要

治疗性应用中, CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5
中至少一种的趋化因子配体可用于归巢干细胞。



1. 方法，其包括：

在接受治疗的组织中提供 CCR-1、CCR-2、CCR-3 或 CCR-5 中至少一种的趋化因子配体；以及

使所述接受治疗的组织的外周血中的干细胞浓度从第一浓度提高至第二浓度。

2. 如权利要求 1 所述的方法，所述干细胞的浓度通过动脉或静脉输注所述干细胞来提高。

3. 如权利要求 2 所述的方法，所述干细胞表达和/或被诱导表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种。

4. 如权利要求 3 所述的方法，所述干细胞包括间充质干细胞或多潜能成体祖细胞中的至少一种。

5. 如权利要求 2 所述的方法，所述趋化因子配体选自 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-2 及其组合。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其中通过向所述接受治疗的组织引入表达载体而在所述接受治疗的组织中提供所述趋化因子配体，所述表达载体包含编码所述趋化因子配体的核酸。

7. 如权利要求 5 所述的方法，其中通过向接受治疗的组织引入细胞而在所述接受治疗的组织中提供所述趋化因子配体，所述细胞在被引入所述组织之前被表达载体转染，所述表达载体包含编码所述趋化因子配体的核酸。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其中所述接受治疗的组织包括梗塞的心肌组织。

9. 方法，其包括：

在接受治疗的组织中提供选自 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-2 及其组合的趋化因子；以及

使所述接受治疗的组织的外周血中的干细胞浓度从第一浓度提高至第二浓度。

10. 如权利要求 9 所述的方法，所述干细胞的浓度通过动脉或静脉输注所述干细胞来提高。

11. 如权利要求 10 所述的方法，所述干细胞表达或被诱导表达 CCR-1、CCR-2、CCR-3 或 CCR-5 中的至少一种。

12. 如权利要求 9 所述的方法，通过向所述接受治疗的组织引入表达载体而在所述接受治疗的组织中提供所述趋化因子配体，所述表达载体包含编码所述趋化因子配体的核酸。

13. 如权利要求 9 所述的方法，通过向所述接受治疗的组织引入细胞而在所述接受治疗的组织中提供所述趋化因子配体，所述细胞在被引入所述组织之前被表达载体转染，所述表达载体包含编码所述趋化因子配体的核酸。

14. 如权利要求 9 所述的方法，所述接受治疗的组织包括梗塞的心肌组织。

15. 如权利要求 13 所述的方法，所述被表达载体转染的细胞包括心脏成纤维细胞。

16. 如权利要求 15 所述的方法，所述心脏成纤维细胞被编码 MCP-3 的表达载体转染。

17. 如权利要求 10 所述的方法，所述被输注的细胞包括间充质干细胞，在以所述趋化因子治疗后以多间隔方式输注所述间充质干细胞。

18. 心脏成纤维细胞，其被遗传修饰以表达 CCR-1、CCR-2、CCR-3 或 CCR-5 中至少一种的配体。

19. 如权利要求 18 所述的心脏成纤维细胞，所述配体包括 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 或 MIP-2 中至少一种。

20. 如权利要求 18 所述的心脏成纤维细胞，所述配体包括 MCP-3。

用于干细胞归巢的 CCR 配体

相关申请

本申请要求 2004 年 6 月 21 日递交的第 60/581,571 号美国临时申请的权益，在此并入该临时申请作为参考。

发明领域

本发明涉及趋化因子，尤其涉及诱导干细胞趋化性的趋化因子的用途。

发明背景

急性心肌梗塞(MI)在西方社会仍是致病和死亡的主要原因。最近的治疗进展普遍关注于在梗塞相关动脉内恢复顺行灌注，但其效果显示存在“上限”。Topol, E.J. *Lancet* 357, 1905-1914 (2001)。很大一部分急性心肌梗塞(MI)患者最终发展为充血性心力衰竭(CHF)，主要原因为左心室(LV)重塑，其过程包括心肌的变细、扩张、功能下降并最终导致死亡。Robbins, M. A. & O'Connell, J.B., pp. 3-13 (Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998)。Pfeffer, J.M., Pfeffer, M.A., Fletcher, P.J. & Braunwald, E. *Am. J. Physiol* 260, H1406-H1414 (1991)。Pfeffer, M.A. & Braunwald, E. *Circulation* 81, 1161-1172 (1990)。

一种治疗心肌梗塞后该过程的方法涉及细胞疗法。Penn, M.S. *et al. Prog. Cardiovasc. Dis.* 45, 21-32 (2002)。移植重在使用不同的细胞类型，包括已分化的细胞，如骨骼成肌细胞、心肌细胞、平滑肌细胞以及成纤维细胞，或骨髓源性细胞。Koh, G.Y., Klug, M.G., Soonpaa, M.H. & Field, L.J. *J. Clin. Invest* 92, 1548-1554 (1993)。Taylor, D.A. *et al. Nat. Med.* 4, 929-933 (1998)。Jain, M. *et al. Circulation* 103, 1920-1927 (2001)。Li, R.K. *et al. Ann. Thorac. Surg.* 62, 654-660 (1996)。Etzion, S. *et al. J. Mol. Cell Cardiol.* 33, 1321-1330 (2001)。Li, R.K., Jia, Z.Q., Weisel, R.D., Merante, F.

& Mickle, D.A. *J. Mol. Cell Cardiol.* 31, 513-522 (1999). Yoo, K.J. *et al. Yonsei Med. J.* 43, 296-303 (2002). Sakai, T. *et al Ann. Thorac. Surg.* 68, 2074-2080 (1999). Sakai, T. *et al. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 118, 715-724 (1999). Orlic, D. *et al. Nature* 410, 701-705 (2001). Tomita, S. *et al. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 123, 1132-1140 (2002).

日益增多的文献证明, 干细胞被动员至心脏和分化为心肌细胞是自然发生的过程。Jackson, K.A. *et al. J. Clin. Invest* 107, 1395-1402 (2001). Quaini, F. *et al. N. Engl. J. Med.* 346, 5-15 (2002)。而这一过程发生的速率不足以令心肌梗塞后的左心室功能有实质性恢复。最近, 研究已证明通过向血流中直接注入干细胞, 或通过在心梗塞之前从骨髓中化学动员干细胞, 有可能使受损心肌再生。这些研究证明干细胞能够在围梗塞期(perி-infarct period)归巢(home)至梗塞区域, 以及随后这些细胞能够分化为心肌细胞。Kocher, A. A. *et al. Nat. Med.* 7, 430-436 (2001). Orlic, D. *et al. Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A* 98, 10344-10349 (2001). Peled, A. *et al. Blood* 95, 3289-3296 (2000). Yong, K. *et al. Br. J. Haematol.* 107, 441-449 (1999)。至今, 所有研究都专注于干细胞在心梗塞后 48 小时内使心肌再生的能力。

发明概述

本发明涉及作为干细胞化学吸引剂的趋化因子, 该干细胞表达或被诱导表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种, 例如间充质干细胞(MSCs)、多潜能成体祖细胞(MAPCs), 和/或其它干细胞。为治疗性应用和/或细胞治疗, 可在哺乳动物个体的组织中提供本发明的趋化因子以诱导干细胞向该组织动员。该被诱导的干细胞可分化成特化的和/或部分特化的细胞, 这些细胞可再定居(repopulate)(即植入(engraft))并且部分或全部恢复接受治疗组织的正常功能。可被本发明的趋化因子诱导的特定类型的干细胞的一个例子是间充质干细胞(MSC)。可被本发明的趋化因子潜在诱导的干细胞的另一个例子是多潜能成体祖细胞(MAPC)。此外, 干细胞的其它例子包括经遗传修饰以表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的干细胞。

根据本发明的一方面, 该趋化因子包括 CCR1、CCR2、CCR3、或 CCR5 中至少一种的配体。CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体被发现是哺乳动物个体 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的化学吸引剂。CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体可包括单核细胞趋化蛋白 1-5 (即 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4 和 MCP-5)、巨噬细胞炎性蛋白 1-2 (即 MIP-1 α 、MIP-1 β 和 MIP-2), 以及能够与 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种结合并且作为 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的化学吸引剂的任何其它配体(如蛋白质、多肽等)。

根据本发明, 这些 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 可具有与天然哺乳动物 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 大致相同的氨基酸序列, 还可以是天然哺乳动物 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 的变体, 如哺乳动物 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 的片段、类似物和衍生物。

根据本发明的另一方面, 通过向组织中引入表达载体, 可在该组织 中提供 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体。该表达载体包括编码 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体的核酸。任选地, 该表达载体可包括组织特异性启动子, 如心肌组织的组织特异性启动子。

根据本发明的另一方面, 通过向离体培养的组织中引入细胞, 可在该组织 中提供 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体。该离体培养的细胞可包括同种异体的和/或从待治疗个体收集的自体细胞。在被引入梗塞组织之前, 该被引入接受治疗的组织中的细胞可被表达载体转染。该表达载体可包括编码 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体的核酸。

本发明还涉及治疗哺乳动物个体梗塞组织的方法。在该方法中, 可在梗塞组织中和/或梗塞组织紧接部位提供 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体。当在梗塞组织中提供 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体时, 可将梗塞组织外周血中表达或

被诱导表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的干细胞的浓度(或数量)从第一浓度提高到第二浓度。

向接受治疗的哺乳动物个体外周血中注射干细胞和/或向动脉或静脉输注干细胞,可提高外周血中表达或被诱导表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的干细胞的数目。依照本发明可被注射或输注的特定类型干细胞的一个例子是间充质干细胞(MSC)。可被注射或输注的干细胞的另一个例子是多潜能成体祖细胞(MAPC)。干细胞的其它例子包括经遗传修饰以表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的干细胞。

附图简要说明

在参考附图阅读本发明的以下说明后,本发明所属领域的技术人员可清楚了解本发明的其它特征,附图中:

图 1 为比较 LAD 结扎后 3 天和 14 天,输注了 MSCs 的大鼠的梗塞区域单位面积内 MSCs 数量的图;

图 2 为比较心肌梗塞后瞬时表达的趋化因子和在 MSC 中表达且不在 CF 中表达的趋化因子受体的图;

图 3 显示了用 PCR 确定的 CCR1、CCR2 和 CCR5 在 MSCs、CF 和 大鼠脾中的表达;

图 4 为比较以下四种情况下梗塞区域单位面积内 MSCs 数量的图:对表达 MCP-3 的 CFs 单次输注 MSCs、对不表达 MCP-3 的 CFs 单次输注 MSCs、对表达 MCP-3 的 CFs 多次输注 MSCs、对不表达 MCP-3 的 CFs 多次输注 MSCs;

图 5a 和 5b 为显示接受了表达 MCP-3 的 CFs 和对照 CFs 的大鼠的 LVEDD 和缩短分数(shortening fraction)的图。

实施方案描述

除非另有说明,此处用到的所有技术术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员所通常理解的含义相同。分子生物学术语的通用定义可以例如参见 Rieger *et al.*, *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*(经典与分子遗传学词典), 5th edition, Springer-Verlag: New

York, 1991; 以及 Lewin, Genes V(基因 V), Oxford University Press: New York, 1994.

此处描述的方法包括传统分子生物学技术在内。这些技术在本领域内已被广泛了解, 其详细描述可参见方法学论著, 如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual(分子克隆实验室手册), 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sarnbrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; 以及 Current Protocols in Molecular Biology(现代分子生物学规程), ed. Ausubel *et al.*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (有定期更新)。核酸的化学合成方法的论述可参见如 Beaucage and Carmthers, Tetra. Letts. 22: 1859-1862, 1981, 以及 Matteucci *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 103:3185, 1981。核酸的化学合成可由例如商品化的自动寡核苷酸合成仪来完成。免疫学方法(如抗原特异性抗体的制备、免疫沉淀和免疫印迹)的描述可参见如 Current Protocols in Immunology(现代免疫学规程), ed. Coligan *et al.*, John Wiley & Sons, New York, 1991; 以及 Methods of Immunological Analysis(免疫学分析方法), ed. Masseyeff *et al.*, John Wiley & Sons, New York, 1992。常规的基因转移和基因治疗方法也适于在本发明中使用。例如参见, Gene Therapy: Principles and Applications(基因治疗: 原理与应用), ed. T. Blackenstein, Springer Verlag, 1999; Gene Therapy Protocols (Methods in Molecular Medicine)(基因治疗规程(分子医学方法)), ed. P. D. Robbins, Humana Press, 1997; 以及 Retro-vectors for Human Gene Therapy(用于人类基因治疗的逆转录载体), ed. C. P. Hodgson, Springer Verlag, 1996。

本发明涉及作为干细胞的化学吸引剂的趋化因子, 该干细胞表达或被诱导表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中的至少一种, 例如间充质干细胞(MSCs)、多潜能成体祖细胞(MAPCs)、和/或其它干细胞。因治疗性应用和/或细胞治疗, 可在哺乳动物个体组织中提供本发明的趋化因子以诱导干细胞动员至该组织。这些被诱导的干细胞可以分化成特化的和/或部分特化的细胞, 它们可以再定居(即植入)并且部分或全部恢复接受治疗组织的正常功能。

依照本发明，哺乳动物个体可包括任何哺乳动物，如人类、大鼠、小鼠、猫、狗、山羊、绵羊、马、猴子、猿、兔、牛等。该哺乳动物个体可处于发育的任何阶段，包括成体、未成年动物和新生个体。该哺乳动物个体还可包括胚胎阶段的个体。

根据本发明，表达或被诱导表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的干细胞包括可以无限自我更新和可以分化成有特定功能的更成熟细胞的未特化细胞。在人类中，干细胞已在早期胚胎的内细胞团中、胚胎的某些组织中、脐带和胎盘中以及几种成体器官中得到鉴定。在某些成体器官中，干细胞可在该器官中形成多于一种的特化细胞类型。可分化成超出它们通常所驻留部位的细胞类型的干细胞表现出可塑性。当干细胞被发现可形成与不同器官相关的多种组织类型时，它被称为多潜能的(multipotent)或多能性的(pluripotent)。

根据本发明，可被趋化因子诱导的特定类型干细胞的一个例子是间充质干细胞(MSC)。MSCs 为形成性多能性胚细胞或胚胎细胞，能分化为特定类型的结缔组织(即体内支持特化元件的组织，尤其包括脂肪组织、骨组织、软骨组织、弹性组织、肌肉组织以及纤维结缔组织，这取决于体内或体外各种环境的影响)。这些细胞存在于骨髓、血液、真皮和骨膜中，并可采用多种熟知的方法分离及纯化，如在授予 Caplan 和 Haynesworth 的第 5,197,985 号美国专利(在此并入本文作为参考)以及众多其它参考文献中所公开的方法。

根据本发明，可被趋化因子潜在诱导的干细胞的另一例子是多潜能的成体祖细胞(MAPC)。依据本发明，MAPCs 包括成体祖细胞或干细胞，它们能够分化为它们通常所驻留的组织之外的细胞类型(即表现出可塑性)。MAPCs 的实例可包括成体 MSCs 以及造血祖细胞。MAPCs 的来源可包括骨髓、血液、眼组织、真皮、肝脏以及骨骼肌。举例来说，包括造血祖细胞在内的 MAPCs 可采用在第 5,061,620 号美国专利(在此并入本文作为参考)以及众多其它参考文献中所公开的方法分离及纯化。

干细胞，如 MSCs、MAPCs、和/或其它干细胞，可自然表达或被诱导以表达各种 CXC 和 CC 趋化因子受体，包括 CXCR5、CCR-1、

Cmkbr1L2、CCR2、CCR3、CCR5、CCR7、CCR8、CCR9、CMKOR1 以及 CX3CR1。发现在哺乳动物个体中，CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体可用作 MSCs 和/或 MAPCs 的化学吸引剂。CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体可包括单核细胞趋化蛋白 1-5 (即 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4 和 MCP-5)、巨噬细胞炎性蛋白 1-2(即 MIP-1 α 、MIP-1 β 和 MIP-2)以及能够与 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种结合并且用作 MSCs 和/或 MAPCs 的化学吸引剂的任何其它配体(如蛋白质、多肽等)。

根据本发明，MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 可以有与天然哺乳动物 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 大致相同的氨基酸序列。例如，MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 可以分别具有与以下序列大致相同的氨基酸序列：SEQ ID: 1、SEQ ID: 2、SEQ ID: 3、SEQ ID: 4、SEQ ID: 5、SEQ ID: 6、SEQ ID: 7 以及 SEQ ID: 8。SEQ ID: 1、SEQ ID: 2、SEQ ID: 3、SEQ ID: 4、SEQ ID: 5、SEQ ID: 6、SEQ ID: 7 以及 SEQ ID: 8 分别包括人 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、小鼠 MIP-1 α 、大鼠 MIP-1 β 和小鼠 MIP-2 的氨基酸序列，并且与 GenBank 登陆号为 AAM54046、CAA76341、CAA50407、CAA04888、AAS28707、NP035467、NP446310 和 NP063316 的核酸序列大致相同。

本发明的 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 还可以是天然哺乳动物 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 的变体(variant)，例如哺乳动物 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 的片段、类似物和衍生物。这些变体可包括例如天然 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因(即自然产生的核酸，编码自然产生的哺乳动物 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2)的自然产生的等位基因变体编码的多肽，天然 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因的可变剪接(alternative splice)形式编码的多肽，天然

MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2基因的同源基因(homolog)或直系同源基因(ortholog)编码的多肽,以及由天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β ,和/或MIP-2基因的非自然产生的变体编码的多肽。

MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2变体的肽(或氨基酸)序列与天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2的序列有一个或多个氨基酸的不同。这些变体的肽序列可以MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白的一个或多个氨基酸的缺失、增加或置换为特征。氨基酸插入优选约1-4个邻接的氨基酸,氨基酸缺失优选约1-10个邻接的氨基酸。变体MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白基本保留了天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白的功能活性。优选的MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白变体可通过表达本发明范围内的核酸分子而产生,其以沉默变异或保守性变异为特征。

对应于一种或多种特定基序和/或结构域,或对应于任意长度的MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白片段都在本发明的范围之内。分离的MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白的肽段可通过筛选由编码此多肽的核酸上的对应片段经重组产生的多肽而得到。另外,可用本领域中已知的技术化学合成片段,例如常规的Merrifield固相f-Moc或t-Boc化学。举例来说,本发明中的MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白可被任意分割为所需长度的片段且片段间无重叠,或优选地分割为所需长度的有重叠的片段。这些片段可以重组方式制备,并经检测以鉴定那些具有天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白激动剂功能的肽段。

MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白变体还可包括这些蛋白的重组体形式。除MCP-1、MCP-2、

MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白之外，本发明优选的重组多肽由与编码哺乳动物蛋白的基因的核酸序列有至少85%的序列一致性的核酸来编码。

MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白变体可包括组成型表现天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白的功能活性的蛋白激动形式。其它蛋白变体可包括抗蛋白水解的变体，例如，其由于突变而改变了蛋白酶酶的靶序列。通过检测变体的天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白功能活性，可方便地确定多肽氨基酸序列的改变是否产生了具有天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2的一种或多种功能活性的变体。

编码MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白的核酸分子可以是天然或非天然核酸，为RNA或DNA形式(如cDNA、基因组DNA和合成的DNA)。该DNA可为双链或单链，若为单链则可为编码链(有义链)或非编码链(反义链)。

举例来说，编码MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2的核酸分子可分别具有与以下序列大致相同的序列：SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15以及SEQ ID NO: 16。SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15以及SEQ ID NO: 16分别与GenBank登陆号为NM002982、NM005623、NM006273、NM005408、NM011331、NM013025、NM013652和NM053647的核酸序列大致相同。

本发明中其它编码MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白的核酸分子可以是天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白基因的变体，如编码天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白的片段、类似物和衍生物的核酸分子。这些变体例如可能是天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和

/或 MIP-2 基因的自然产生的等位基因变体,天然 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因的同源基因,天然 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因的非自然产生的变体。这些变体具有与天然 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因相差一个或多个碱基的核苷酸序列。例如,这些变体的核苷酸序列可以天然 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因的一个或多个核苷酸的缺失、增加或置换为特征。核酸增加优选为约 1-10 个邻接的核苷酸,缺失优选为约 1-10 个邻接的核苷酸。

在其它应用中,在结构上显示实质改变的天然 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 蛋白变体可通过不至于导致被编码多肽发生保守改变的核苷酸置换来产生。这类核苷酸置换的实例会导致(a)多肽骨架结构的改变;(b)多肽电荷或疏水性的改变;(c)氨基酸侧链大小的改变。一般预期使蛋白质性能产生最大改变的核苷酸置换会在密码子中产生非保守性改变。可能导致多肽结构重大改变的密码子改变的实例为(a)导致亲水性残基(如丝氨酸或苏氨酸)置换疏水性残基(如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸或丙氨酸),或相反;(b)导致半胱氨酸或脯氨酸置换任何其它残基,或相反;(c)导致具有带正电荷侧链的残基(如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)置换带负电荷的残基(如谷氨酰胺,天冬酰胺),或相反;或(d)导致具有大侧链的残基(如苯丙氨酸)置换无侧链的残基(如甘氨酸),或相反。

本发明中天然 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因自然产生的等位基因变体是分离自哺乳动物组织的核酸,其与天然 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因有至少 75%的序列一致性,并编码与天然 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 蛋白具有结构相似性的多肽。本发明中天然 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因的同源基因或直系同源基因是分离自其它物种的核酸,其与天然基因有至少 75%的序列一致性,并编码与天然 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、

MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白具有结构相似性的多肽。可搜索公共和/或私有的核酸数据库,以鉴别其它与天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2基因有较高比例(如70%或以上)序列一致性的核酸分子。

非自然产生的MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2基因变体是不存在于自然界中的核酸(如人工制备的),与天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2基因有至少75%的序列一致性,并且编码与天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白具有结构相似性的多肽。非自然产生的MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2基因变体的实例为编码天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白质的片段的变体,在严紧条件下与天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2基因或天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2基因的互补链杂交的变体,与天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2基因或天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2基因的互补链有至少65%的序列一致性的变体,以及编码MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2融合蛋白的变体。

本发明中编码天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白片段的核酸为编码天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白的氨基酸残基的核酸。编码天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白片段的核酸或与编码天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白片段的核酸杂交的较短的寡核苷酸可被用作探针、引物、或反义分子。编码天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白片段的核酸或与编码天然MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2蛋白片段的核酸杂交的较长的多

核苷酸也可被用于本发明的多个方面。编码 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 片段的核酸可通过对全长天然 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因或其变体的酶消化(例如,用限制性内切酶)或化学降解而制得。

在严紧条件下可与前述核酸之一杂交的核酸也可在本发明中使用。例如,在低严紧条件、中严紧条件或高严紧条件下可与前述核酸之一杂交的这些核酸处于本发明范围内。

本发明也可使用编码 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 融合蛋白的核酸分子。这类核酸可通过制备在被引入合适的靶细胞时表达 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 融合蛋白的构建体(如表达载体)而制得。例如,此构建体可通过将编码 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 蛋白的第一多核苷酸与编码其它蛋白的第二多核苷酸同框(in frame)融合连接而制得,从而当处于适宜的表达系统中时此构建体的表达产生融合蛋白。

本发明的寡核苷酸可以是单链或双链的 DNA 或 RNA 或它们的嵌合混合物或衍生物或修饰的形式。该寡核苷酸可在诸如碱基部分、糖基部分或磷酸主链上被修饰,以增强分子的稳定性、促进杂交等。本发明的寡核苷酸还可能另含其它附属基团,例如肽(例如为了在体内靶向靶细胞受体),或利于跨细胞膜转运以及杂交触发的裂解的试剂。为此,核酸可偶联至其它分子,例如肽、杂交触发的交联剂、转运试剂、杂交触发的裂解试剂等。

通过将趋化因子配体单独地或以药物组合物的形式向接受治疗的哺乳动物组织给药,可在该组织中提供 CCR1, CCR2, CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2)。根据待接受治疗的组织不同,含有趋化因子配体的药物组合物可以以多种方法给药。一方面,该药物组合物可通过注射给药。给药途径可以是皮下的或肠胃外的,例如包括静脉内的、

动脉内的、肌肉内的、腹膜内的、心肌内的、和经心内膜的 (transendocardial)。

将趋化因子配体通过肠胃外给药时，它通常会被配制成单位剂量的可注射形式(如溶液、悬浮液和/或乳状液)。适合于注射的药物制剂的实例包括无菌水溶液或分散液和可重建成无菌水溶液或分散液的无菌粉末。药物载体可为溶剂或含有例如水、乙醇、多羟基化合物(例如，甘油、丙二醇、液态聚乙二醇等)的分散介质、它们的合适的混合物和植物油。

通过使用包衣(比如卵磷脂)在分散时保证所需的粒子大小和通过使用表面活性剂可以保持合适的流动性。非水性的载体，比如棉籽油、芝麻油、橄榄油、豆油、玉米油、葵花籽油、或花生油，以及酯，比如豆蔻酸异丙酯，可被用作化合物组合物的溶剂系统。

另外，可加入增加组合物稳定性、无菌性和等渗性的各种添加剂，包括抗菌防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲液。各种抗细菌剂和抗真菌剂，例如，对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯、山梨酸等可以保证防止微生物的作用。在很多情况下，需要包括等渗剂，例如，糖、氯化钠等等。使用延迟吸收的物质，例如，单硬脂酸铝和明胶，可以延长可注射药物形式的吸收。但是根据本发明，使用的任何载体、稀释剂、或添加剂都必须与所用的化合物相容。

可通过将用来实施本发明的化合物混合在所需量的合适溶剂中，并依需要添加不同量的其它成分来制备无菌注射液。

或者，通过向靶细胞中引入导致、增强和/或上调靶细胞中至少一种趋化因子配体(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2)表达的试剂，可在待接受治疗的哺乳动物个体组织 中提供 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2)。靶细胞可包括待接受治疗组织的细胞和引入该试剂后再移植到该组织中的离体细胞(例如心脏成纤维细胞)。可用众所周知的细胞移植技术将培养的细胞移植到接受治疗的组织中。举例来说，可用结核菌素注射器将培养细胞的悬浮培养物注射到哺乳动物个体的接受治疗的组织中。

该离体细胞对于接受治疗哺乳动物个体的组织来说可以是自体的或同种异体的。其中靶细胞是指被移植进待治疗组织中的细胞，该靶细胞可以与接受治疗组织的细胞类型相同，也可以是不同细胞类型。

举例说明，当待治疗的组织是梗塞的心肌，移植进待治疗组织的细胞可包括培养的心细胞、骨骼成肌细胞、成纤维细胞(如心脏成纤维细胞)、平滑肌细胞以及骨髓源性细胞。这些细胞可在移植前从待治疗的个体收集(即自体细胞)并培养。自体细胞可以提高移植时细胞的生物相容性和最大限度减少排斥的可能性。

可移植进梗塞心肌的细胞的例子包括骨骼成肌细胞。成肌细胞保持了骨骼肌的再生潜力，在应激时，成肌细胞增殖和分化成肌管，最终形成能够收缩的肌纤维。植入心肌中的成肌细胞经历肌管形成、细胞周期停滞并存活。功能研究显示在成肌细胞植入心肌后区域性收缩和顺从性增强。

骨骼成肌细胞可容易地从肌纤维的基膜下收集、培养以扩增细胞系，然后移植到梗塞心肌中。例如，在鼠科动物个体中，骨骼成肌细胞可以从该动物的后肢收集、培养、然后移植到该动物的梗塞心肌中。

可有利地移植到梗塞心肌中的细胞的其它例子包括心脏的成纤维细胞(即心脏成纤维细胞)。心脏成纤维细胞易于与心肌相容并且可容易地被转染以表达目的趋化因子。

例如通过结核菌素注射器将培养细胞的悬浮液注射到梗塞的心肌组织中，可将该培养细胞移植到梗塞心肌。

被引入靶细胞的试剂可包含天然的或合成的核酸(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 核酸)，该核酸被并入重组核酸构建体(通常为 DNA 构建体)，此构建体可被引入细胞并在细胞内复制。此构建体优选包括复制系统以及能够在给定的靶细胞内转录和翻译多肽编码序列的序列。

其它试剂也可被引入靶细胞以引起靶细胞中趋化因子配体的表达。例如，促进 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 编码基因转录的试剂，促进编码 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 的 mRNA 翻译的试剂，

和/或减少编码 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 的 mRNA 降解的试剂可被用于提高 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 的水平。提高细胞内基因的转录速率可通过在 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 编码基因的上游引入外源启动子来实现。促进异源基因表达的增强子元件也可被使用。

将试剂引入靶细胞的优选方法涉及使用基因疗法。基因疗法指基因转移以在体内或体外从细胞表达治疗性产物。依据本发明，基因疗法可被用于在体内或体外从靶细胞表达趋化因子配体(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2)。

基因疗法的一种方法使用包括编码 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2)的核苷酸的载体。“载体”(常称为基因递送或基因转移的“交通工具”)指包含待递送至靶细胞的多核苷酸的高分子或分子复合体，无论是在体外还是体内。待递送的多核苷酸可包含在基因疗法中有益的编码序列。载体例如包括病毒载体(如腺病毒(‘Ad’)、腺相关病毒(AAV)和逆转录病毒)、脂质体及其它含脂复合体，以及其它能够介导多核苷酸向靶细胞递送的高分子复合体。

载体也可包含其它进一步调节基因递送和/或基因表达，或者向靶细胞提供有益性能的组分或功能性。这些其它组分包括例如影响结合或靶向细胞的组分(包括介导对细胞类型或组织特异性结合的组分)；影响细胞对载体核酸吸收的组分；影响多核苷酸被吸收后在细胞内定位的组分(如介导核定位的试剂)；以及影响多核苷酸表达的组分。这些组分也可包括标记物，例如可检测和/或可选择的标记物，其可被用于检测或选择已经吸收并开始表达被载体递送的核酸的细胞。这些组分可作为载体的天然特征而被提供(如使用特定的病毒载体，其具有介导结合和吸收的组分或功能性)，或者载体可经修饰而提供这些功能性。

选择性标记物可为阳性、阴性或双功能的。阳性可选择标记物使带有标记物的细胞被选择，而阴性可选择标记物使带有标记物的细胞

被选择性排除。多种这样的标记物基因已被描述，包括双功能性的(即阳性/阴性)标记物(参见，诸如 Lupton, S., WO 92/08796, 1992年5月29日公布；以及 Lupton, S., WO 94/28143, 1994年12月8日公布)。这些标记物基因可在基因治疗前后提供有利的额外控制措施。在本领域已知有多种这样的载体并被广泛使用。

可用在本发明中的载体包括病毒载体、基于脂质的载体以及其它能够将本发明的核苷酸递送至靶细胞的载体。载体可为靶向载体(targeted vector)，尤其是优先与特定细胞类型(例如心肌细胞)结合的靶向载体。本发明优选使用的病毒载体为对靶细胞呈现低毒性且能组织特异地诱导产生治疗有益量的趋化因子配体(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2)的病毒载体。

目前优选的病毒载体源自腺病毒(Ad)或腺相关病毒(AAV)。人类病毒载体和非人类病毒载体都可被使用，但是优选地重组病毒载体在人体中复制缺陷。当载体是腺病毒时，其优选包含含有启动子的多核苷酸并在人体中复制缺陷，其中该启动子可操作地与例如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 的编码基因连接。

希望在本发明中使用腺病毒载体，因为它们(1)在靶细胞中能够高效表达，和(2)可以容纳相对大量的异源(非病毒)DNA。重组腺病毒的一个例子“无肠的(gutless)”、“高容量的”或者“依赖协助的”腺病毒载体。这样的载体具有诸如以下的特征：(1) 缺失全部或大部分病毒编码序列(编码病毒蛋白的序列)，(2) 病毒 DNA 复制所需的病毒反向末端重复(ITRs)序列，(3) 高达 28-32 kb 的“外源”或“异源”序列(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 的编码序列)，以及(4) 将病毒基因组包入传染性衣壳所需的病毒 DNA 包装序列。特别对于心肌细胞，此重组腺病毒载体的变体包含组织特异性的(如心肌细胞)、可操作地与趋化因子配体基因(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因)连接的增强子和启动子。

基于腺相关病毒的载体是有利的，由于其对靶细胞有极高的转导效率，并能以位点特异性的方式整合入靶基因组。重组 AAV 载体的使

用在 Tal, J., *J. Biomed. Sci.* 7:279-291, 2000 和 Monahan and Samulski, *Gene Therapy* 7:24-30,2000 中有详细讨论。优选的 AAV 载体包含一对 AAV 反向末端重复, 其位于至少一个表达盒(cassette)的两侧, 该表达盒包含可操作地连接到 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 核酸中至少一种的组织(如心肌)或细胞(如心肌细胞或心脏成纤维细胞)特异性启动子。包括 ITRs、启动子和 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因的 AAV 载体的 DNA 序列可整合入靶基因组。

依据本发明可用的其它病毒载体包括基于单纯疱疹病毒(HSV)的载体。缺失一个或多个中早期基因(IE)的 HSV 载体是有利的, 由于其通常无细胞毒性, 在靶细胞中保持近似潜伏的状态, 以及提供高效的靶细胞转导。重组 HSV 载体可容纳大约 30 kb 的异源核酸。优选的 HSV 载体应满足: (1) 从 I 型 HSV 工程化的, (2) 其 IE 基因缺失, 以及(3) 包含可操作地连接到 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 核酸中至少一种的组织特异性(如心肌)启动子。HSV 扩增子载体也可在本发明的多种方法中用到。通常, HSV 扩增子载体长度约为 15 kb, 并具有病毒复制起点及包装序列。

本发明也可使用逆转录病毒, 例如 C-型逆转录病毒和慢病毒。逆转录病毒的结构和生命周期使其成为适于基因转移的理想媒介, 因为(i) 大部分编码其结构基因的序列被删除并被目的基因取代, 后者在逆转录病毒长末端重复(LTR)区内的调控序列的控制下被转录, 并且(ii) 它们通过整合入宿主基因组的 DNA 中间体复制。尽管在宿主基因组中的整合位点呈现随机性, 但前病毒(provirus)以低拷贝数整合于限定的结构。

逆转录病毒可为 RNA 病毒, 即病毒基因组为 RNA。但是, 这种基因组 RNA 逆转录为 DNA 中间体, 其高效地整合入被感染细胞的染色体 DNA 中。这种整合的 DNA 中间体被称为前病毒。逆转录病毒的基因组和前病毒 DNA 有三个基因: gag、pol 和 env, 两侧为两个长末端重复 (LTR) 序列。gag 基因编码内部结构(核衣壳)蛋白, pol 基因编码 RNA 指导的 DNA 聚合酶(逆转录酶); 而 env 基因编码病毒的包膜

糖蛋白。5'端和3'端的LTR负责启动病毒RNA的转录和多聚腺苷酸化。

5'端LTR附近为基因组逆转录(tRNA引物的结合位点)以及病毒RNA被高效包裹形成病毒粒子(Psi位点)所必需的序列。Mulligan, R. C., In: *Experimental Manipulation of Gene Expression* (基因表达实验操作), M. Inouye (ed). *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 81 :6349-6353 (1984)。

为产生包含重组基因组的病毒粒子,有必要培养提供包装“协助”的细胞系。为此,例如编码逆转录病毒结构基因gag、pol和env的质粒经常规磷酸钙介导的DNA转染法(Wigler, *et al.*, *Cell* 11 :223 (1977))被引入未经其它转化的组织细胞系。含有这种质粒的细胞被称为“包装细胞系(packaging cell line)”。含有这些质粒的包装细胞系可被如此维持,或者复制缺陷型逆转录病毒载体可被引入这些细胞的基因组。在后一种情况中,载体构建体产生的基因组RNA与包装细胞系内组成型表达的逆转录病毒结构基因结合,导致逆转录病毒粒子释放至培养基中。包含逆转录病毒结构基因序列的稳定细胞系是逆转录病毒的“生产者细胞系(producer cell line)”。

逆转录病毒载体也可基于鼠白血病病毒(MLV)。参见诸如, Hu and Pathak, *Pharmacol. Rev.* 52:493-511, 2000 和 Fong *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 17:1-60, 2000。基于MLV的载体可在病毒基因的位置含有最大8kb的异源(治疗性)DNA。该异源DNA可包括组织特异性启动子和核酸,如MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2核酸。在向梗塞心肌递送的方法中,该异源DNA还可编码心肌特异性受体的配体。

可用的其它逆转录病毒载体为基于慢病毒的复制缺陷型载体,包括基于人免疫缺陷(HIV)的载体。参见例如, Vigna and Naldini, *J. Gene Med.* 5:308-316, 2000 和 Miyoshi *et al.*, *J. Virol.* 72:8150-8157, 1998。慢病毒载体是有利的因为它们既能够感染活跃分化的细胞,也能够感染不分化的细胞。它们还高效转导人上皮细胞。

本发明使用的慢病毒载体可源于人类和非人类(包括 SIV)慢病毒。优选的慢病毒载体包括载体扩增必需的核酸序列和可操作地连接到 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因的组织特异性启动子(如心肌)。这些构建体可以包括病毒 LTRs、引物结合位点、多聚嘌呤束(polypurine tract)、att 位点和衣壳化位点。

慢病毒载体可以被包装进任何适合的慢病毒衣壳中。用来自于不同病毒的颗粒蛋白代替一种颗粒蛋白称为“假型化(pseudotyping)”。载体衣壳可以含有来自包括鼠白血病病毒(MLV)或水泡性口炎病毒(VSV)在内的其它病毒的病毒外壳蛋白。VSV G-蛋白的使用产生高载体滴度并促成载体病毒颗粒更高的稳定性。

基于 α 病毒的载体,例如由塞姆利基森林病毒(semliki forest virus, SFV)和辛德毕斯病毒(Sindbis virus, SIN)制得的载体,也可在本发明中使用。 α 病毒的使用在 Lundstrom, K., Intervirology 43:247-257, 2000 和 Perri *et al.*, Journal of Virology 74:9802-9807, 2000 中有描述。 α 病毒载体通常以复制子的形式构建。复制子可包含(1) RNA 复制所需的 α 病毒基因元件,和(2) 异源的核酸,如编码 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 核酸的核酸。在 α 病毒复制子内,异源核酸可操作地连接到组织特异性(如心肌)启动子或增强子。

重组的复制缺陷型 α 病毒载体是有利的,由于其能够高水平地表达异源(治疗性的)基因,以及其能感染广谱的靶细胞。 α 病毒复制子可通过在其病毒粒子表面展示功能性异源配体或结合结构域,使得能与表达相关结合伙伴(cognate binding partner)的靶细胞选择性结合,从而被定向于特定靶细胞类型(如心肌细胞和/或心脏成纤维细胞)。 α 病毒复制子可处于潜伏状态,并因此使得靶细胞内异源核酸能长期表达。复制子也可在靶细胞内表现瞬时异源核酸表达。优选的 α 病毒载体或 α 病毒复制子为非细胞致病性的。

在许多适用于本发明方法的病毒载体中,多于一个启动子可被包含于载体中以允许多于一个异源基因被载体表达。此外,载体也可包含编码信号肽或其它部分的序列,其促进从靶细胞中分泌趋化因子配体

基因产物, 如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因产物。

为将这两种病毒载体系统的优势属性结合起来, 可使用杂交病毒载体向靶组织(例如心肌)递送核酸, 如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 核酸。构建杂交载体的标准技术为本领域技术人员所熟知。此技术可在诸如 Sambrook, *et al.*, *In Molecular Cloning: A laboratory manual*(分子克隆实验室手册). Cold Spring Harbor, N.Y.或任一论述重组 DNA 技术的实验室手册中找到。腺病毒衣壳内包含 AAV 和腺病毒 ITRs 结合体的双链 AAV 基因组可被用于对细胞的转导。在另一变化形式中, AAV 载体可被置于“无肠的”, “依赖协助的”或“高容量的”腺病毒载体内。腺病毒/AAV 杂交载体在 Lieber *et al.*, *J. Virol.* 73:9314-9324, 1999 中有论述。逆转录病毒/腺病毒杂交载体在 Zheng *et al.*, *Nature Biotechnol.* 18: 176-86, 2000 中有所论述。包含在腺病毒内的逆转录病毒基因组可整合入靶细胞基因组, 并实现稳定的基因表达(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因表达)。

进一步考虑了其它有利于趋化因子配体基因(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因)表达及有利于载体克隆的核苷酸序列元件。举例来说, 启动子上游的增强子或例如编码区下游的终止子的存在可有助于表达。

根据本发明的另一方面, 组织特异性启动子, 例如左心室肌球蛋白轻链-2(MLC2v)或肌球蛋白重链的组织特异性转录控制序列, 可被融合到趋化因子配体基因(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因)。通过将这种组织特异性启动子融合进腺病毒构建体, 转基因表达被限制在心室心肌细胞内。使用本发明的重组腺病毒系统可决定基因表达的功效和组织特异性启动子提供的特异性程度。心脏特异性(即心肌组织特异性)表达为本领域公知(*J. Biol. Chem.*, 267:15875-15885, 1992)。也可使用其它启动子, 例如肌钙蛋白-C 启动子。

在体内递送趋化因子配体基因(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因)时, 使用仅针对心肌细胞的(即

不在心脏中的内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞中同时表达)组织特异性启动子使用于治疗的趋化因子配体能足量表达。关于用基因转移治疗 CHF, 将表达限制在心肌细胞内也是有利的。另外, 心肌细胞很可能提供最长久的转基因表达, 因为该细胞不经历快速更新; 因此, 表达不会像在内皮细胞发生的那样因细胞分裂和死亡而降低。已可获得为此目的的内皮细胞特异启动子(Lee, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265:10446-10450, 1990)。

除基于病毒载体的方法之外, 非病毒方法也可被用于将趋化因子配体基因(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 基因)引入靶细胞。关于基因递送的非病毒方法在 Nishikawa and Huang, *Human Gene Ther.* 12:861-870, 2001 中提供了综述。依据本发明, 优选的非病毒基因递送方法使用质粒 DNA 将趋化因子配体核酸(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 核酸)引入细胞。基于质粒的基因递送方法为本领域内所公知。

合成的基因转移分子可被设计为与质粒 DNA(例如, 载有可操作地连接到心肌特异性启动子的 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 编码序列)形成多分子集合体。这些集合体可被设计为与靶细胞(如心肌细胞)结合。

包括脂多胺(lipopolyamine)和阳离子脂质在内的阳离子两性分子可被用于使核酸(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 核酸)向靶细胞(如心肌细胞)内不依赖受体的转移。此外, 预制的阳离子脂质体或阳离子脂质可与质粒 DNA 混合, 以生成细胞转染复合体。有关阳离子脂质配制的方法综述在 Felgner *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 772: 126-139, 1995 和 Lasic and Templeton, *Adv. Drug Delivery Rev.* 20:221-266, 1996 中。为了基因递送, DNA 也可与两性的阳离子肽结合(Fominaya *et al.*, *J. Gene Med.* 2:455-464, 2000)。

依据本发明可使用同时涉及病毒成分和非病毒成分的方法。举例来说, 用于治疗性基因递送的基于 EB 病毒(Epstein Barr virus, EBV)的质粒在 Cui *et al.*, *Gene Therapy* 8: 1508-1513, 2001 中有描述。另外,

涉及与腺病毒结合的DNA/配体/聚阳离子附属物的方法在Curiel, D. T., Nat. Immun. 13:141-164, 1994中有描述。

编码CCR1、CCR2、CCR3或CCR5中至少一种的趋化因子配体(如MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2)的表达的载体可以可注射制剂的形式被递送至靶细胞。可注射的制剂可在需要时包含药物可接受的载体,如生理盐水。依据本发明也可使用其它药物载体、制剂和剂量。

当靶细胞包括待治疗组织(如梗塞心肌)的细胞时,可以通过在荧光镜引导下使用结核菌素注射器进行直接冠状动脉内注射来递送一定量的载体,所述量足以使趋化因子配体(如MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2)表达至能高效治疗的程度。通过向待治疗组织(如梗塞的心肌组织)直接注射载体,可能相当有效地靶向基因并最大程度减少重组载体的丢失。

这种类型的注射使在受影响组织(如心肌)内局部转染需要数量的细胞(如心肌细胞)成为可能,因此使基因转移的疗效最大化和最大限度地减小了针对病毒蛋白的炎性反应的可能性。举例来说,可以使用心肌细胞特异性启动子,例如以便能确保表达只限于心肌细胞。因此,以这种方法递送转基因可能促成靶向的基因表达,例如,在左心室细胞中表达。本领域公知的其它技术也可用于向梗塞心肌的靶细胞移植载体。

当靶细胞是随后移植进梗塞组织的培养细胞时,可以通过向培养基中直接注射来递送载体。转染进细胞中的核酸(如MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2核酸)可以被可操作地连接到任何合适的调控序列,包括组织特异性启动子(如心肌)和增强子。

可以通过公知的移植技术将被转染的靶细胞移植到梗塞的心肌中,例如用结合菌素注射器进行直接冠状动脉内注射。通过首先体外转染靶细胞再将其移植到梗塞心肌,与直接将载体注射进梗塞心肌中相比,梗塞心肌炎性反应的可能性减到最小。

本发明的CCR1、CCR2、CCR3或CCR5中至少一种的趋化因子配体(如MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或MIP-2)在靶细胞中可在任意合适的时长内表达,包括瞬时表达和稳

定、长期表达。在优选的实施方案中，该趋化因子配体在合适和确定的时长内以治疗量表达。

治疗量为能够在接受治疗的动物或人体内产生医疗期望效果的量。如医学领域内所熟知的，任一动物或人体的所需剂量取决于许多因素，包括体型大小、身体表面积、年龄、给药的具体成分、性别、给药时间和给药途径、综合健康状态，以及同时给药的其它药物。蛋白质、核酸或小分子的具体剂量可容易地由本领域技术人员使用下文所描述的实验方法来确定。

趋化因子的表达可能是瞬时的或长期的，当以 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 编码载体转染待治疗组织(如梗塞心肌)或当将经 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 编码载体转染的细胞移植到待治疗组织(如梗塞心肌)时，就是如此。

趋化因子配体的长期表达是有利的，因为其使得在远离手术或移植转染靶细胞过程的时间时干细胞浓度增加。另外，长期或持续上调 CCR1、CCR2、CCR3 和/或 CCR5 的趋化因子配体允许在外周血中提高干细胞浓度的多种尝试。另外，趋化因子配体表达的持续上调引起干细胞从外周血向待治疗组织(如梗塞心肌)的长期归巢，而无需干细胞动员剂。

CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体诱导干细胞从外周血向接受治疗的组织迁移，该干细胞表达或被诱导表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种，例如 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞。通过用例如结核菌素注射器向接受治疗组织或其附近组织直接注射干细胞，可在接受治疗组织的外周血中提供该干细胞。通过静脉或动脉将干细胞输注到接受治疗的哺乳动物个体中，也可在外周血中提供该干细胞。输入的干细胞之后可被接受治疗组织提供的 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 诱导，迁移到该组织中。

在向被治疗的组织提供趋化因子配体(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2)之后，可注射或输注表达或被诱导表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的干细胞到哺

乳动物个体中。然而该干细胞可在向接受治疗组织提供趋化因子配体(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2)之前给药。

在本发明的一方面,可向哺乳动物个体多次注射或输注表达或被诱导表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的干细胞。举例来说,静脉内输注之后 MSC 在血流中的半衰期通常很短(例如,小于 1 小时)。因此,通过向已在待治疗组织中提供趋化因子配体(如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2)的哺乳动物连续输注 MSCs 以产生更多的 MSC 植入。

或者,可以通过给药诱导干细胞(如 MSCs 和/或 MAPCs)向个体外周血动员,而在接受治疗组织中提供该干细胞。可以用多种试剂动员干细胞到个体的外周血中以提高外周血中干细胞的浓度。例如,为提高哺乳动物个体外周血中的干细胞数量,可以向个体给予促成多能性干细胞从骨髓动员的试剂。现已知多种此类试剂,包括细胞因子,例如粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素(IL)-7、IL-3、IL-12、干细胞因子(SCF)和 flt-3 配体;趋化因子,如 IL-8、Mip-1 α 和 Gro β ; 以及环磷酰胺(cyclophosphamide, Cy)和太平洋紫杉醇(paclitaxel)等化疗剂。这些动员剂在实现干细胞动员的时间范围(time frame)、动员的干细胞类型以及效率等方面有所不同。

可通过将动员剂直接注射入个体而给药。优选地,在向接受治疗的组织提供 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 之后,以动员剂给药。然而,该动员剂可以在向接受治疗组织提供 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 之前给药。

在需要诱导 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞扩展(expand)、再定居、维持和/或再生组织和/或器官系统时,可以向任何组织或器官系统和/或为了潜在的任何细胞疗法或治疗性应用,提供 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体。根据本发明的一方面,CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体可被用在心脏缺血区域心肌(或骨骼

肌, 在外周血管组织的情况下)再生方法中。该方法可用来在远离心肌梗塞的时间(即数周)治疗缺血性心肌病。

该方法包括在哺乳动物个体中动员和引导表达或被诱导表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的干细胞(例如 MSCs 和/或 MAPCs)向梗塞心肌迁移。该梗塞心肌可以包括梗塞的心肌组织、梗塞心肌组织的外围心肌组织、以及梗塞的心肌组织和梗塞心肌组织的外围心肌组织两者。

在远离心肌梗塞时, 通过在梗塞心肌组织中将例如 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 的浓度从第一浓度提高到第二浓度, 可使表达或被诱导表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的干细胞(例如 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞)被诱导迁移至梗塞心肌。MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 的第一浓度可以是 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 蛋白在远离心肌梗塞时(即数周)梗塞心肌中的通常浓度。MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 蛋白的第二浓度可以显著高于 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 蛋白的第一浓度。

通过给药或从 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 蛋白在远离心肌梗塞时梗塞心肌中的通常量上调梗塞心肌中 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 蛋白的表达, 可提高 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 蛋白在梗塞心肌中的浓度。

通过诱导干细胞到梗塞心肌, 梗塞心肌组织可再生, 因为在梗塞心肌中会有更多干细胞, 其可以分化成可以再定居(即植入)并部分或全部恢复梗塞心肌正常功能的细胞。

本发明的方法还包括在外周血中将表达或被诱导表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的干细胞(如 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞)浓度(即数量)从第一浓度提高到显著高于第一浓度的第二浓度的步骤。干细胞的第一浓度可以是远离心肌梗塞时梗塞心肌中干细胞的通常浓度。当梗塞心肌中 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β

和/或 MIP-2 蛋白浓度提高时, 外周血中干细胞浓度可被提高。可在上调梗塞心肌中 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 蛋白表达之前或之后提高外周血中的干细胞浓度。

通过用例如结核菌素注射器将用于再生心肌结构的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞直接注射到梗塞的心肌组织或梗塞部位附近的心肌组织, 可将用于再生心肌结构的表达或被诱导表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞递送到梗塞心肌。或者, 通过向待治疗的哺乳动物个体静脉或动脉输注, 可将干细胞(如 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞)递送到梗塞的心肌组织。用于再生心肌结构的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的输注可以在心肌梗塞后不久(如大约一天)或很久(如数周)实施。此外, 在治疗过程中可以多次输注用于再生心肌结构的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞。

被提高了浓度的 MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 和/或 MIP-2 蛋白诱导到梗塞心肌中的干细胞(如 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞) 有助于心肌再生, 并对左心室功能有实质性改善。

应理解, 尽管主要描述了使用 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体诱导表达或被诱导表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的干细胞(如 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞)到接受治疗组织以用于治疗急性心肌梗塞或充血性心力衰竭, 但 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体可被用于其它为了治疗目的需要诱导干细胞(例如 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞)的治疗性应用。举例来说, 根据本发明, CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的趋化因子配体可被用于肝细胞的再生以替换受损肝组织并恢复肝功能, 可与骨髓移植结合用于化疗和/或放疗致使骨髓消融后的骨髓再生, 用于骨和/或软骨的重建, 用于纠正肌肉障碍(如肌营养不良), 以及其它使组织再生, 或通常利用表达或被诱导表达 CCR1、CCR2、CCR3 或 CCR5 中至少一种的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的治疗性应用。

实施例

以下一系列实施例进一步说明了本发明。为了说明目的而提供以下实施例，但是不能以任何方式将其解释为对本发明范围或内容的限制。

概述

MSC 可以分化成多种器官特异的细胞类型，以及调节受损伤组织的局部微环境和调节免疫系统。几乎不知干细胞如何迁移/归巢到受损伤组织。最近，MSC 的一亚群被证实表达 SDF-1 趋化因子受体 CXCR4，并且一些研究显示该亚群可能因此应答 SDF-1 而归巢。有意思的是，MSC 自己表达 SDF-1，但文献中几乎没有细胞应答它们自己分泌的趋化因子而迁移的先例。

我们已经证明，心肌梗塞后造血干细胞向心脏暂时归巢。HSC 归巢的暂时性是由于 SDF-1 的暂时表达。因为 MSC 已被证明 MI 后向心脏归巢，我们类似地假设心肌分泌归巢 MSC 的趋化因子。为确定可能的 MSC 归巢因子，我们采用了基于基因阵列的策略。

材料和方法

LAD 结扎：动物研究委员会批准了所有的动物实验方案，所有动物都饲养在克里夫兰诊所基金会(Cleveland Clinic Foundation)的 AAALAC 动物实验室内。结扎 Lewis 大鼠左前降支动脉。简言之，以腹膜内克他命和甲苯噻嗪麻痹动物，插管并使用压力循环啮齿动物呼吸器(RSP1002, Kent Scientific Corp, Torrington, CT)按每分钟 80 次呼吸通室内空气。手术显微镜(M500, LeicaTM Microsystems, Bannockburn, IL)辅助的左前降支(LAD)动脉直接结扎诱导了前壁心肌梗塞。

细胞制备和递送：用 0.6 ml DMEM(GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA)冲洗大鼠大腿骨分离骨髓。用 20 号针头轻轻捣碎骨髓块。通过 Percoll 密度梯度分离细胞。260 g 离心细胞 10 分钟，用含有 100 U/ml 盘尼西林 / 100 g/ml 链霉素(Invitrogen, Carlsbad, CA)的 PBS 洗涤三次。洗涤过的细胞再次悬浮并接种在含有 10% FBS 和 1% 抗生素和抗真菌剂(GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA)的 DMEM-LG(GIBCO, Invitrogen, Carlsbad,

CA)中。37°C 培养细胞。三天后通过更换培养基除去未附着细胞。14 天后(第四代)通过以 0.05%胰岛素和 2 mM EDTA(Invitrogen®, Carlsbad, CA) 孵育 5 分钟而收集细胞。用每 10^6 细胞 10 μ l 初级 PE 偶联的小鼠抗大鼠 CD45 抗体(出售者: BD Biosciences, 目录号: 554878)逆向选择(negatively select)MSC 培养物而除净 CD45⁺细胞。用 EasySep PE 选择试剂盒根据制造商说明(Stem Cell technologies)逆向选择 PE 阳性细胞。所得到的 MSC(6-12 代)用于我们的研究。输注前三天, 细胞按 1:3 比例重新接种并培养在含有 10 μ M BrdU(5-溴 2-脱氧尿苷)的完全培养基中, 以标记处于细胞周期中 S 期的细胞。BrdU 标记的 MSC 收集为 10^6 细胞/100 μ l PBS。

用大鼠 MCP-3 表达载体或 pcDNA3.1(对照载体)稳定转染大鼠心脏成纤维细胞。用实时 PCR 确认 MCP-3 的表达。融合细胞进行传代并按 1:2 到 1:3 稀释接种直到第 11 代。

实时 PCR: 用 Rneasy Mini Kit(Qiagen Inc., Valencia, CA)根据制造商说明从六百万细胞中分离 RNA, 然后进行 RT-PCR。用 ABI Prism 7700 序列探测器(Applied Biosystems, Foster City, CA)进行定量实时 PCR。反应混合物含有 SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, Foster City, CA)、300 nM 的各引物、以及 10 μ l cDNA。95°C 活化 AmpliTaq Gold(Applied Biosystems, Foster City, CA)10 分钟后, 我们进行了 45 个循环, 每个循环包含 95°C 15 秒然后 60°C 1 分钟。分析每一次扩增的解离曲线以确定没有非特异的 PCR 产物。CXCR4 引物序列: 正向: ATCATCTCCAAGCTGTCACACTCC; 反向: GTGATGGAGATCCACTT GTGCAC。

免疫染色: 心肌梗塞后 72 小时或 4 周处死动物。根据已建立的实验方案用福尔马林固定组织并用石蜡块包埋。用 10 mM 柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)并在 95°C 加热 5 分钟进行抗原修复(antigen retrieval)。更换新鲜缓冲液再加热 5 分钟, 然后冷却大约 20 分钟。去离子水洗涤载玻片 3 次, 每次 2 分钟。接着将样品在 1%正常封闭用血清的 PBS 溶液中孵育 60 分钟以抑制 IgG 的非特异结合。然后将载玻片和小鼠抗 BrdU 初级抗体(BD

Biosciences, San Jose, CA)一起孵育 60 分钟。通过滴定确定最佳抗体浓度。然后用磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)洗涤载玻片, 再将载玻片和 FITC 偶联的二级抗体(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)一起孵育 45 分钟, 该 FITC 偶联的二级抗体已用含有血清的 PBS 稀释到 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 并在黑暗容器中孵育。用 PBS 彻底洗涤后, 用水性封固剂(Vectashield Mounting Medium with DAPI, H- 1200; Vector Laboratories, Burlingame, CA)对盖玻片封片。

共聚焦免疫荧光显微镜: 用配备有蓝氦(用于 DAPI)、绿氦(用于 Alexa Fluor 488)和红氦(用于 Alexa Fluor 594)激光器的垂直光谱激光扫描共聚焦显微镜(Model TCS-SP; Leica Microsystems, Heidelberg, Germany)分析组织。通过顺序激发收集数据, 以将“渗滤”(bleed-through)减到最小。图像处理、分析和共定位的程度用 Leica Confocal 软件评估。光学切片(optical sectioning)在四帧上取平均值并且设定图像尺寸为 1024x1024 像素。没有对图像进行数字调整。

Western 实验方案: 将细胞提取物制备在 4X 还原性 Lamellae 缓冲液(200mM Tris HCl (pH 6.8), 8% SDS, 0.1%溴酚蓝, 40%甘油)中。根据已建立的实验方案制备十二烷基硫酸钠(SDS)凝胶。蛋白质用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶分离。印迹膜在含有 5%牛奶的 1x TBST (Tris 碱-2.42g、NaCl-8g、1M HCl-3.8 mL 调整 pH 到 7.5、水- 1L、Tween 20-2mL)中放置 1 小时, 然后用针对磷酸化的 *Akt* (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)的初级抗体(1:1000, 5%牛奶的 1xTBST 中)杂交, 然后与过氧化物酶偶联的抗小鼠二级抗体(1:5000 1xTBST 中)一起孵育。用化学发光(Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England)显像。

超声波心动图: LAD 结扎和 MSC 移植 2 周和 5 周后, 使用与 Sequoia C256 和 GE Vision7 连接的 15MHz 线形阵列换能器做 2D-超声波心动图。通过数字记录的短轴视图 2D 视频和 M-型图像量化 LV 直径和壁厚, 为了得到不同大鼠相同解剖位置的一致测量, 测量位置为恰好在乳头肌之下的

中部 LV。声像图师对处理组情况不知情。两个独立的不知情观察者使用 ProSolv 超声心动图记录仪软件进行线下测量。从由对处理臂(treatment arm)不知情的观察者记录的 M-型视频中随机选取 5 个,再从中取 3 个测量,每个动物测量 6 次。从 M-型记录计算缩短分数。缩短分数(%) = (LVEDD - LVESD)/LVEDD x 100, 其中 LVEDD = 舒张末期左心室内径, 以及 LVESD = 收缩末期左心室内径。

结果

MSC 暂时向损伤心肌归巢

LAD 结扎后 1 或 14 天向大鼠尾静脉输注两百万 BrdU 标记的 MSC。输注后三天,处死大鼠收集心脏。以每 mm^2 BrdU 阳性细胞的数量定量 MSC。图 1 的数据说明了我们的 MSC 制剂在急性心肌梗塞后暂时向心肌归巢。LAD 后一天,单位面积上确认有相当数量的 MSC,但是 LAD 结扎后 14 d, MSC 输注未造成梗塞区域明显的 MSC 植入。

鉴定候选 MSC 归巢因子

图 2 描述了我们用来鉴定候选 MSC 归巢因子的方法和结果。利用趋化因子和趋化因子受体阵列,我们鉴定了明显不同的两组。第一组是最早在 LAD 结扎 1 小时后就表达的趋化因子,它们的表达在 LAD 结扎后 10 天消失(左侧圆圈)。第二组由在 MSC 上表达但不在心脏成纤维细胞表面表达的趋化因子受体组成(右侧圆圈)。候选 MSC 归巢因子是左侧圆圈包含的趋化因子(LAD 结扎后在心肌组织中瞬时表达的)中那些与右侧圆圈包含的受体(MSC 表达但心脏成纤维细胞不表达的)结合的趋化因子。如图 2 所示,只确定了两个趋化因子家族:通过受体 CCR-1 和 CCR-2 的单核细胞化学吸引蛋白(1 和 3)和通过受体 CCR-5 的 MIP-1 α 和 β 。

为了验证和提炼我们从阵列研究中得到的发现结果,我们做了 PCR 以进一步评估 CCR1、CCR2 和 CCR5 的存在。图 3 显示了来自 MSC、CF 和大鼠脾(阳性对照)的 PCR 产物。这些结果显示 CCR1 和 CCR5 在初期 MSC 中的表达显著高于 CF,并且 MSC 对 CCR5 的表达随着时间消失。

MCP-3 的表达对于 MSC 归巢的影响

根据观察(i) CCR2 在 MSC 中的表达看起来是持续的和(2)MSC 归巢的能力不随时间消失,我们决定关注 MCP-3。另一预先确定的鉴定 MSC 归巢因子的标准是 MSC 不表达所关注的趋化因子。我们对 MSC 和 CF 中 MCP-3 的表达进行了实时 PCR 分析。结果表明 MSC 不表达显著水平的 MCP-3。

为检测 MCP-3 是否能诱导 MSC 归巢,我们在 LAD 结扎 1 月后移植了对照或表达 MCP-3 的 CF 到梗塞边缘区域。三天后,我们通过尾静脉输注了 2 百万 BrdU 标记的 MSC,三天后定量 MSC 植入。图 4 证明了重新建立心肌组织中 MCP-3 表达恢复了心肌组织归巢和植入循环 MSC 的能力。尽管这些数据与 MCP-3 在 MSC 归巢中起作用的假设一致,但 MSC 植入的水平比在同一模型中 SDF-1 持续表达引起的 HSC 植入水平低。

我们推论造成 MCP-3 引起的 MSC 植入水平较低的一个原因是,与 HSC 不同,骨髓不是组成型地释放 MSC,并且静脉内输注后 MSC 在血流中的半衰期很短(<1 小时)。因此,我们假设向移植了表达 MCP-3 的 CF 的动物多次输注 MSC 将会促成大量 MSC 植入。图 4 的数据显示 12 天内 6 次静脉内输注每次 1 百万 MSC 后,与对照 CF 相比,MSC 被显著地大量植入到接收了表达 MCP-3 的 CF 的动物的心肌中。

重建 MSC 归巢对心功能的影响

LAD 结扎 1 月后,我们移植了对照和表达 MCP-3 的 CF。然后所有动物从 CF 移植后 3 天起,每隔 1 天在 12 天内接受 6 次输注,每次 1 百万 MSC。CF 移植 1 月后(MI 2 月后),以超声波心动图定量心功能和直径。图 5b 的数据证明了以缩短分数衡量的心功能在接受了表达 MCP-3 的 CF 的动物中显著增强。CF 移植中未见心功能增强。与接受对照 CF 的动物相比,接受了表达 MCP-3 的 CF 的动物的舒张末期左室内径也显著较短(图 5a)。

从本发明的以上描述中,本领域技术人员会想到改进、变化和修改。所附权利要求包括了这些本领域技术内的改进、变化和修改。

<110> 马克·佩恩 (Penn, Marc)

<120> 用于干细胞归巢的 CCR 配体

<130> CCF-7057

<160> 16

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Val Ser Ala Ala Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ile Ala Ala Thr
1 5 10 15

Phe Ile Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val
20 25 30

Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu
35 40 45

Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val
50 55 60

Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln
65 70 75 80

Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr
85 90 95

Pro Lys Thr

<210> 2

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Val Ser Ala Ala Leu Leu Cys Leu Leu Leu Met Ala Ala Thr
1 5 10 15

Phe Ser Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Asp Ser Val Ser Ile Pro Ile
 20 25 30
 Thr Cys Cys Phe Asn Val Ile Asn Arg Lys Ile Pro Ile Gln Arg Leu
 35 40 45

Glu Ser Tyr Thr Arg Ile Thr Asn Ile Gln Cys Pro Lys Glu Ala Val
 50 55 60

Ile Phe Lys Thr Lys Arg Gly Lys Glu Val Cys Ala Asp Pro Lys Glu
 65 70 75 80

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

Leu Lys Pro

<210> 3
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Lys Ala Ser Ala Ala Leu Leu Cys Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Phe Ser Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr
 20 25 30

Thr Cys Cys Tyr Arg Phe Ile Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu
 35 40 45

Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val
 50 55 60

Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln
 65 70 75 80

Lys Trp Val Gln Asp Phe Met Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr
 85 90 95

Pro Lys Leu

<210> 4
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys Val Ser Ala Val Leu Leu Cys Leu Leu Leu Met Thr Ala Ala
 1 5 10 15

Phe Asn Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Asp Ala Leu Asn Val Pro Ser
 20 25 30

Thr Cys Cys Phe Thr Phe Ser Ser Lys Lys Ile Ser Leu Gln Arg Leu
 35 40 45

Lys Ser Tyr Val Ile Thr Thr Ser Arg Cys Pro Gln Lys Ala Val Ile
 50 55 60

Phe Arg Thr Lys Leu Gly Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Glu Lys
 65 70 75 80

Trp Val Gln Asn Tyr Met Lys His Leu Gly Arg Lys Ala His Thr Leu
 85 90 95

Lys Thr

<210> 5
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 未知

<400> 5

Met Lys Val Ser Ala Ala Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ile Ala Ala Thr
 1 5 10 15

Phe Ile Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val
 20 25 30

Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu
 35 40 45

Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val
50 55 60

Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln
65 70 75 80

Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr
85 90 95

Pro Lys Thr

<210> 6
<211> 92
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

Met Lys Val Ser Thr Thr Ala Leu Ala Val Leu Leu Cys Thr Met Thr
1 5 10 15

Leu Cys Asn Gln Val Phe Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Asp Thr Pro Thr
20 25 30

Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Ser Arg Lys Ile Pro Arg Gln Phe Ile Val
35 40 45

Asp Tyr Phe Glu Thr Ser Ser Leu Cys Ser Gln Pro Gly Val Ile Phe
50 55 60

Leu Thr Lys Arg Asn Arg Gln Ile Cys Ala Asp Ser Lys Glu Thr Trp
65 70 75 80

Val Gln Glu Tyr Ile Thr Asp Leu Glu Leu Asn Ala
85 90

<210> 7
<211> 92
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 7

Met Lys Leu Cys Val Ser Ala Phe Ser Leu Leu Leu Leu Val Ala Ala
1 5 10 15

Phe Cys Asp Ser Val Leu Ser Ala Pro Ile Gly Ser Asp Pro Pro Thr
 20 25 30

Ser Cys Cys Phe Ser Tyr Thr Ser Arg Lys Ile His Arg Asn Phe Val
 35 40 45

Met Asp Tyr Tyr Glu Thr Ser Ser Leu Cys Ser Gln Pro Ala Val Val
 50 55 60

Phe Leu Thr Lys Lys Gly Arg Gln Ile Cys Ala Asp Pro Ser Glu Pro
 65 70 75 80

Trp Val Asn Glu Tyr Val Asn Asp Leu Glu Leu Asn
 85 90

<210> 8

<211> 100

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Ala Pro Pro Thr Cys Arg Leu Leu Ser Ala Ala Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Thr Asn His Gln Ala Thr Gly Ala Val Val Ala Ser
 20 25 30

Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Lys Thr Leu Pro Arg Val Asp Phe Lys
 35 40 45

Asn Ile Gln Ser Leu Ser Val Thr Pro Pro Gly Pro His Cys Ala Gln
 50 55 60

Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Gly Gly Gln Lys Val Cys Leu Asp
 65 70 75 80

Pro Glu Ala Pro Leu Val Gln Lys Ile Ile Gln Lys Ile Leu Asn Lys
 85 90 95

Gly Lys Ala Asn
 100

```

<210> 9
<211> 757
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
ggaaccgaga ggctgagact aaccagaaa catccaattc taaaactgaa gctcgcactc      60
tcgcctccag catgaaagtc tctgccgccc ttctgtgcct gctgctcata gcagccacct      120
tcattcccca agggctcgtc cagccagatg caatcaatgc cccagtcacc tgctgttata      180
acttcaccaa taggaagatc tcagtgcaga ggctcgcgag ctatagaaga atcaccagca      240
gcaagtgtcc caaagaagct gtgatcttca agaccattgt ggccaaggag atctgtgctg      300
accccaagca gaagtgggtt caggattcca tggaccacct ggacaagcaa acccaaactc      360
cgaagacttg aacctcaact ccacaacca agaatctgca gctaacttat tttcccctag      420
ctttccccag acaccctggt ttattttatt ataatgaatt ttgtttggtg atgtgaaaca      480
ttatgcctta agtaatgtta attcttattt aagttattga tgttttaagt ttatctttca      540
tggtactagt gttttttaga tacagagact tggggaaatt gcttttcctc ttgaaccaca      600
gttctacccc tgggatggtt tgagggtctt tgcaagaatc attaatacaa agaatttttt      660
ttaacattcc aatgcattgc taaaatatta ttgtggaat gaatattttg taactattac      720
accaaataaa tatatttttg tacaaaaaaaa aaaaaaa                                757

```

```

<210> 10
<211> 1351
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
gtgatggaga gcaccagcaa agccttaggg cccatccctg gcctcctggt acccacagag      60
gggtaggccc ttggctctct tccactatga cgtcagcttc cattcttctt ttcttataga      120
caattttcca tttcaaggaa atcagagccc ttaatagttc agtgagggtca ctttgetgag      180
cacaatccca tacccttcag cctctgctcc acagagccta agcaaaagat agaaactcac      240
aacttccttg ttttgttata tggaaattat cccaggatct ggtgcttact cagcatattc      300
aaggaaggtc ttacttcatt cttecttgat tgtgaccatg cccaggctct ctgctcccta      360
taaaaggcag gcagagccac cgaggagcag agaggttgag aacaaccag aaaccttcac      420
ctctcatgct gaagtcaca cccttgcctt ccaagatgaa ggtttctgca gcgcttctgt      480
gcctgctgct catggcagcc actttcagcc ctcaaggact tgctcagcca gattcagttt      540
ccattccaat cacctgctgc tttaacgtga tcaataggaa aattcctatc cagaggctgg      600

```

| | |
|--|------|
| agagctacac aagaatcacc aacatccaat gtcccaagga agctgtgatc ttcaagacca | 660 |
| aacggggcaa ggaggtctgt gctgaccca aggagagatg ggtcagggat tccatgaagc | 720 |
| atctggacca aatatttcaa aatctgaagc catgagcctt catacatgga ctgagagtca | 780 |
| gagcttgaag aaaagcttat ttattttccc caacctcccc caggtgcagt gtgacattat | 840 |
| tttattataa catccacaaa gagattattt ttaaataatt taaagcataa tattttctaa | 900 |
| aaagtattta attatattta agttgttgat gttttaactc tatctgtcat acatcctagt | 960 |
| gaatgtaaaa tgcaaaatcc tggatgatgtg ttttttgttt ttgttttcct gtgagctcaa | 1020 |
| ctaagttcac ggcaaaatgt cattgttctc cctcctacct gtctgtagtg ttgtggggtc | 1080 |
| ctcccatgga tcatcaaggt gaaacacttt ggtattcttt ggcaatcagt gctcctgtaa | 1140 |
| gtcaaatgtg tgctttgtac tgctgttggt gaaattgatg ttactgtata taactatgga | 1200 |
| attttgaaaa aaaatttcaa aaagaaaaaa atatatataa tttaaaacta aaaaaaaaaa | 1260 |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 1320 |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a | 1351 |

<210> 11
 <211> 810
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

| | |
|--|-----|
| <400> 11 | |
| agcagagggg ctgagaccaa accagaaacc tccaattctc atgtggaagc ccatgccctc | 60 |
| accctccaac atgaaagcct ctgcagcact tctgtgtctg ctgctcacag cagctgcttt | 120 |
| cagccccag gggcttgctc agccagttgg gattaatact tcaactacct gctgctacag | 180 |
| atztatcaat aagaaaatcc ctaagcagag gctggagagc tacagaagga ccaccagtag | 240 |
| ccactgtccc cgggaagctg taatcttcaa gacaaaactg gacaaggaga tctgtgctga | 300 |
| ccccacacag aagtgggtcc aggactttat gaagcacctg gacaagaaaa cccaaactcc | 360 |
| aaagctttga acattcatga ctgaactaaa aacaagccat gacttgagaa acaaataatt | 420 |
| tgtataccct gtcctttctc agagtgggtc tgagattatt ttaatctaatt tctaaggaat | 480 |
| atgagcttta tgtaataatg tgaatcatgg tttttcttag tagattttaa aagttattaa | 540 |
| tattttaatt taatcttcca tggattttgg tgggttttga acataaagcc ttggatgtat | 600 |
| atgtcatctc agtgctgtaa aaactgtggg atgctcctcc cttctctacc tcatgggggt | 660 |
| attgtataag tccttgcaag aatcagtgca aagatttgct ttaattgtta agatatgatg | 720 |
| tcctatgga agcatattgt tattatataa ttacatattt gcatatgtat gactcccaaa | 780 |

ttttcacata aaatagattt ttgtaaaaaa 810

<210> 12
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 aaaaggccgg cggaacagcc agaggagcag agaggcaaag aaacattgtg aaatctccaa 60
 ctcttaacct tcaacatgaa agtctctgca gtgcttctgt gcctgctgct catgacagca 120
 gctttcaacc ccagggact tgctcagcca gatgcaactca acgtcccatc tacttgctgc 180
 ttcacattta gcagtaagaa gatctccttg cagaggctga agagctatgt gatcaccacc 240
 agcaggtgtc ccagaaggc tgtcatcttc agaaccaaac tgggcaagga gatctgtgct 300
 gacccaaagg agaagtgggt ccagaattat atgaaacacc tgggccggaa agctcacacc 360
 ctgaagactt gaactctgct acccctactg aaatcaagct ggagtacgtg aaatgacttt 420
 tccattctcc tctggcctcc tcttctatgc tttggaatac ttctaccata attttcaaat 480
 aggatgcatt cggttttgtg attcaaaatg tactatgtgt taagtaatat tggctattat 540
 ttgacttggt gctggtttgg agtttatttg agtattgctg atcttttcta aagcaaggcc 600
 ttgagcaagt aggttgctgt ctctaagccc ccttcccttc cactatgagc tgctggcagt 660
 gggtttgtat tcggttccca ggggttgaga gcatgctgt gggagtcatg gacatgaagg 720
 gatgctgcaa tgtaggaagg agagctcttt gtgaatgtga ggtgttgcta aatatgttat 780
 tgtggaaaga tgaatgcaat agtaggactg ctgacatttt gcagaaaata cattttattt 840
 aaaatctcct aaaaaaaaaa a 861

<210> 13
 <211> 396
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 13
 tttcgaagtc tttgacctca acatgaagat ttccacactt ctatgcctcc tgctcatagc 60
 taccaccatc agtcctcagg tattggctgg accagatgcg gtgagcacc cagtcacgtg 120
 ctgttataat gttgttaagc agaagattca cgtccggaag ctgaagagct acaggagaat 180
 cacaagcagc cagtgtcccc gggagctgt gatcttcagg accatactgg ataaggagat 240
 ctgtgctgac cccaaggaga agtgggtaa gaattccata aaccacttgg ataagacgtc 300
 tcgaacgtag catccttgaa ccttcatgct taggctgaga gttccaaaa ctcttacgta 360
 tttccccctg aagttcccca cgggcagtgt gatatt 396

<210> 14
 <211> 755
 <212> DNA
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 14
 agaggcagcg agtaccagtc ccttctctgc tctgctgaca agcgcaccct ctgttacctg 60
 ctcagcacca tgaaggtctc caccgctgcc cttgctgttc ttctctgcac catggcgctc 120
 tggaacgaag tcttctcagc gccatatgga gctgacaccc cgactgectg ctgcttctcc 180
 tatggacggc aaattccacg aaaattcatt gctgactatt ttgagaccag cagcctttgc 240
 tccagccgg gtgtcatttt cctgaccaag agaaaccggc agatctgctc tgaccccaaa 300
 gagacctggg tccaagaata catcactgag ctggaactaa atgcctgaga ttagaggcag 360
 caaggaaccc ccaaacctcc gtgggccccg tgtagagcag gggcttgagc cccagaacat 420
 tcctgccacc tgcaaatctc cccctctat aagctgtttg ctgccaagta gccacatcca 480
 gggactcttc acttgaattt ttatttaatt taatcctatt gatttaatac tatttaattt 540
 ttttaattat tttattgtca catttgtgtt tgtagctatt tattctgaaa gacctcaggg 600
 cacattcctc agccctcccc cccctccca gttgctcaca ctgtgtttgg tgacaattat 660
 tctaggtaga cgtgatgaca aagtcatgaa ctgacaaatg tacaatggat gctttgtcta 720
 taccagagaa ataataaata tgctctttaa caaga 755

<210> 15
 <211> 654
 <212> DNA
 <213> *Mus musculus*

<400> 15
 gacagcactc ggccagcttc tgaagcttct gggccctgca gtcccagctc tgtgcaaacc 60
 taaccccag caacaccatg aagctctgct tgtctgccct ctctctctc ttgctcgtgg 120
 ctgccttctg tgctccaggg ttctcagcac caatgggctc tgaccctccc acttctctgct 180
 gtttctctta cacctcccgg cagcttcaca gaagctttgt gatggattac tatgagacca 240
 gcagtctttg ctccaagcca gctgtggtat tcctgaccaa aagaggcaga cagatctgtg 300
 ctaaccccag tgagccctgg gtcactgagt acatgagtga cttggagttg aactgagcag 360
 ctccagcgca gggcaggagg agccaactca ggagaggcct cctcagccct gatgcttctc 420
 actgagaagc gtccttgetc ctcacgttca gatttcctgc ccctcttctt aatttaaate 480
 tctgtgtaga ctttgttttg tttttttggg ggagtattat ttctattatt tatgttttag 540
 ttataggacg cgtgtctccc atggagatgg tocaccattg ctgaaactct gctattgtgg 600

```

atatgactgt gaaattgatt tcatgcattt tcataataaa tctttcttta agat          654

<210> 16
<211> 1101
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 16
actgcacctc tgggcctcca gcaagctccc tctgtgctc aagactccaa cactctttg      60
gtccagagcc atggcccctc cactcgcca gtcctcaat gctgtactgg tctgtctct      120
cctgctggcc accaaccatc aggttacagg ggttgttgtg gccagtgagc tgcgctgtca      180
atgcctgacg accctaccaa gggttgactt caagaacatc cagagcttga cggtgacccc      240
tccaggaccc cactgcgccc agacagaagt catagccact cttaggatg gtcatgaagt      300
ttgtctcaac cctgaagccc ccttggttca gaggatcgtc caaaagatac tgaacaaagg      360
caaggctaac tgacctggaa aggaagaaca tgggctcctg tacctcaacg ggcagaatca      420
aagagaaaag aaacaaactg caccaggaa gcctggatcg tacctgatgt gcctcgctgt      480
ctgagtttat ctatattatt atatatgat ttatattatt attttcagt cctagatggt      540
gttacattta ctatgatatt taaagatat cattggccag ctactgtag tatcttaaga      600
ggtcatttta atatgttgaa gtttattgta ataatgttca atgtgttcag tcagcattat      660
tttacttatg tagttggaag gtgatgcatt tttaaacta tatttattac tttctggggg      720
gggaggggga gttgggtact gactacacca cctccacact gtgatagaga ttggggatga      780
ggggggtggg ggggcaaaca gacgcagtca gagggctttc aaggcaggac tgtgcctgtc      840
cacgtcattt tctgtaagcc ccgagaaggg cgggacgact gttatttctg tctccgtggt      900
tctacactat gtgtacaaca tttctgatgc tgaatgttca acaatcgtaa tgtgaatatc      960
ccctggacat tctatgtctt ctctgtaagg cacagtgcct cgtttagcaa ttgttttgtc     1020
atgctttctc atgtcttgaa gtggggacat ttatattatc atgtactttt acaataaaca     1080
aaaaaataa aaatttttac t                                                  1101

```

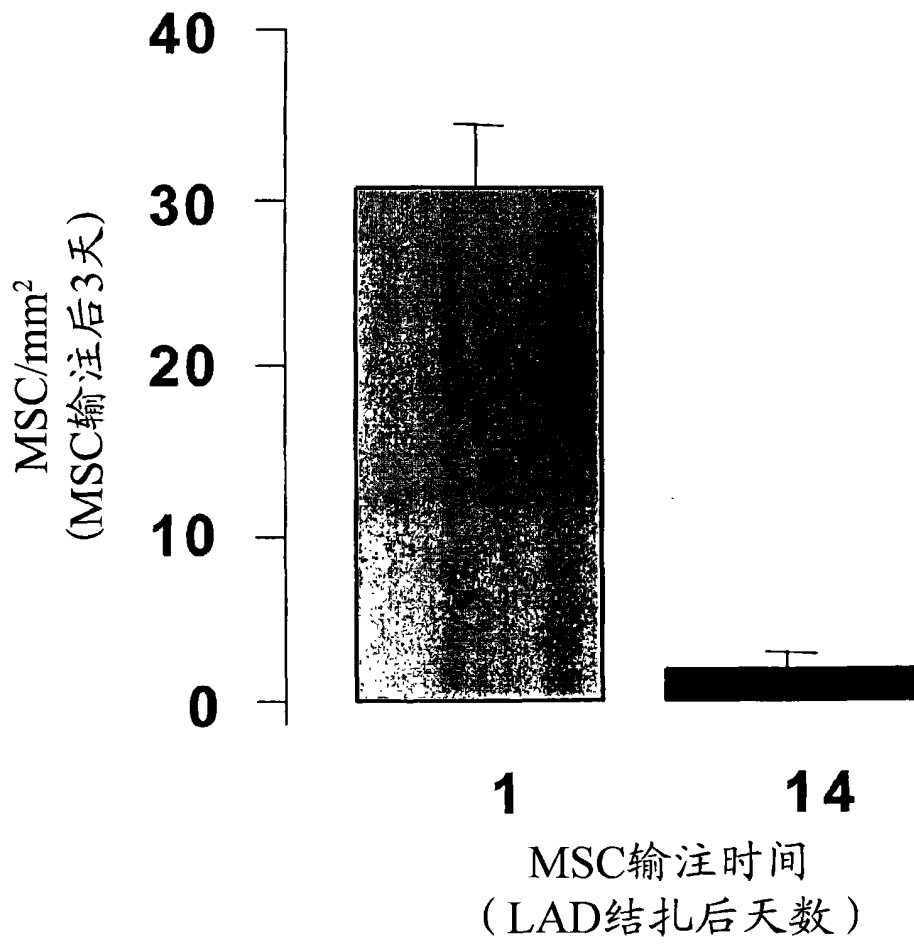


图 1

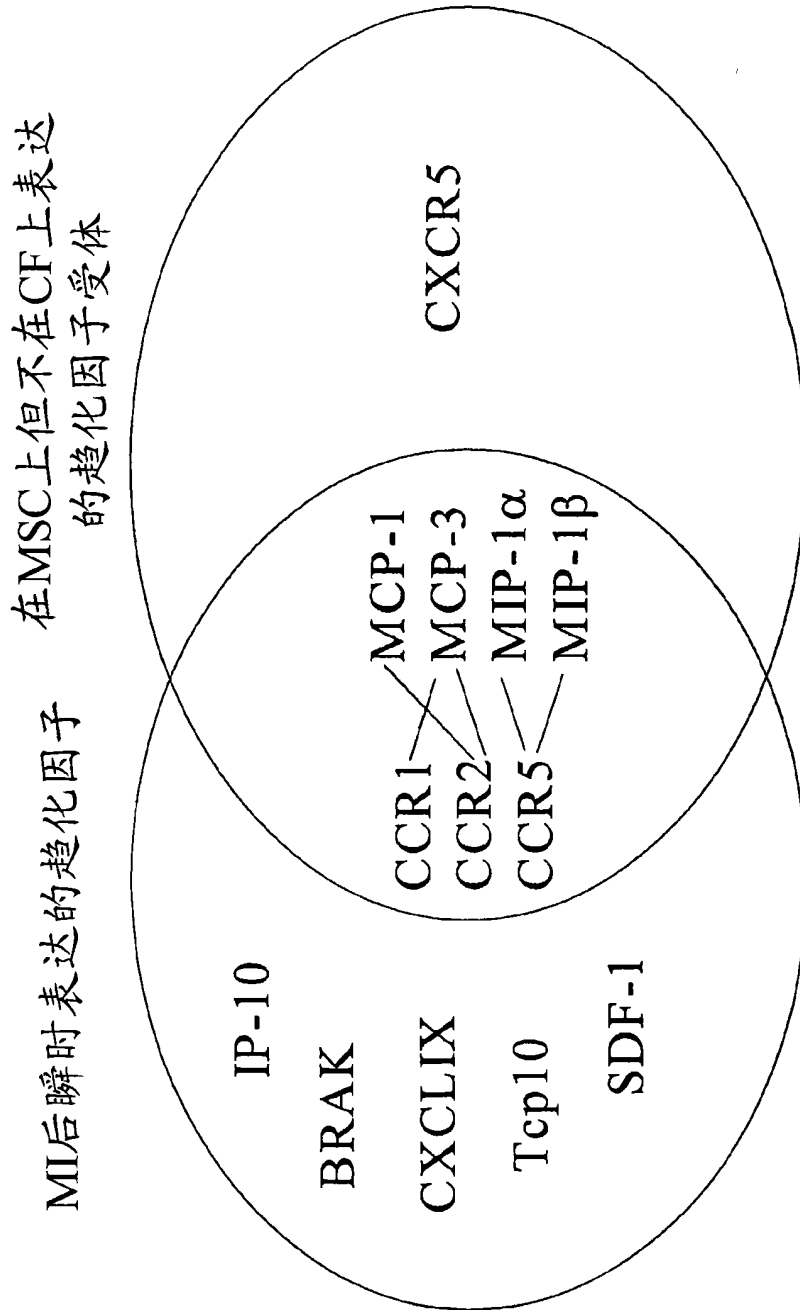


图 2

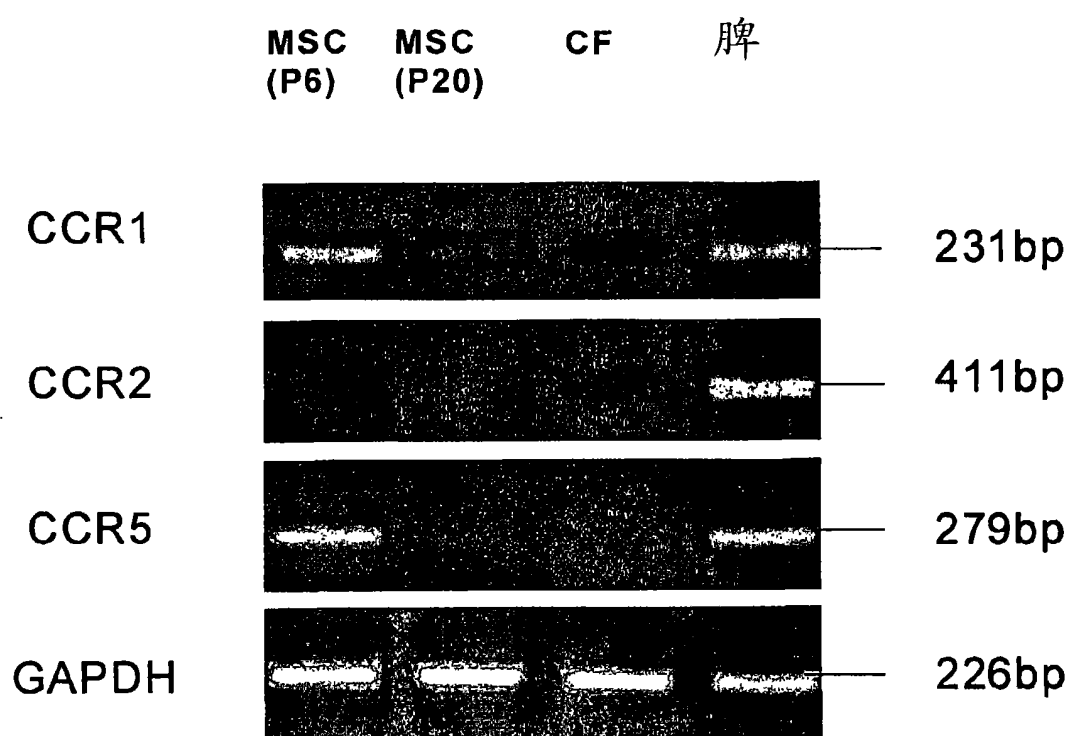


图 3

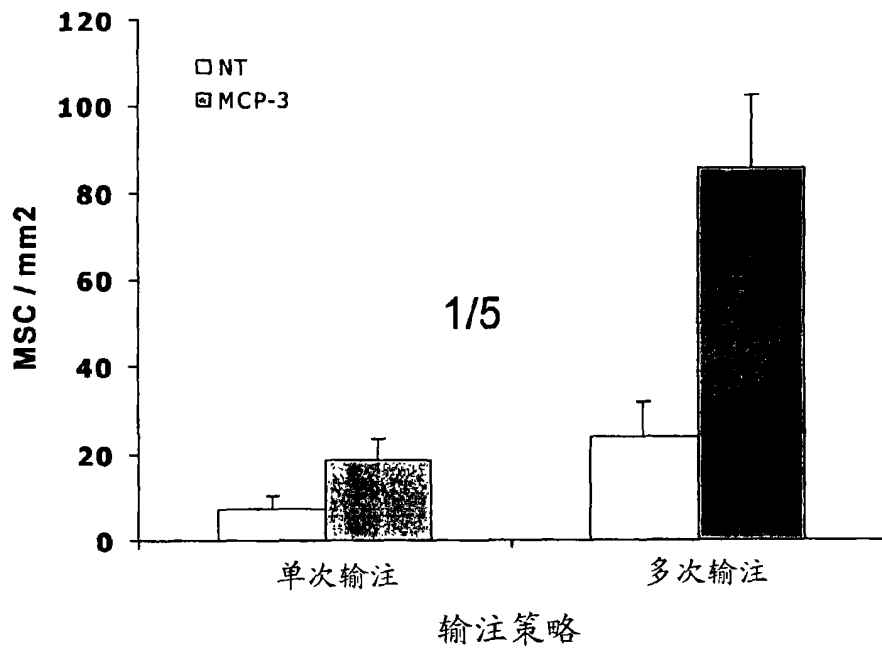


图 4

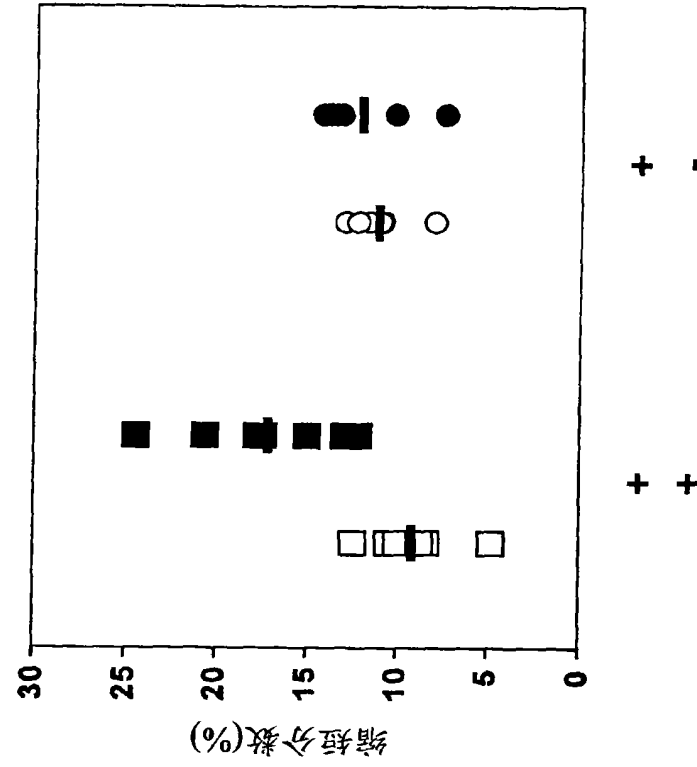


图 5a

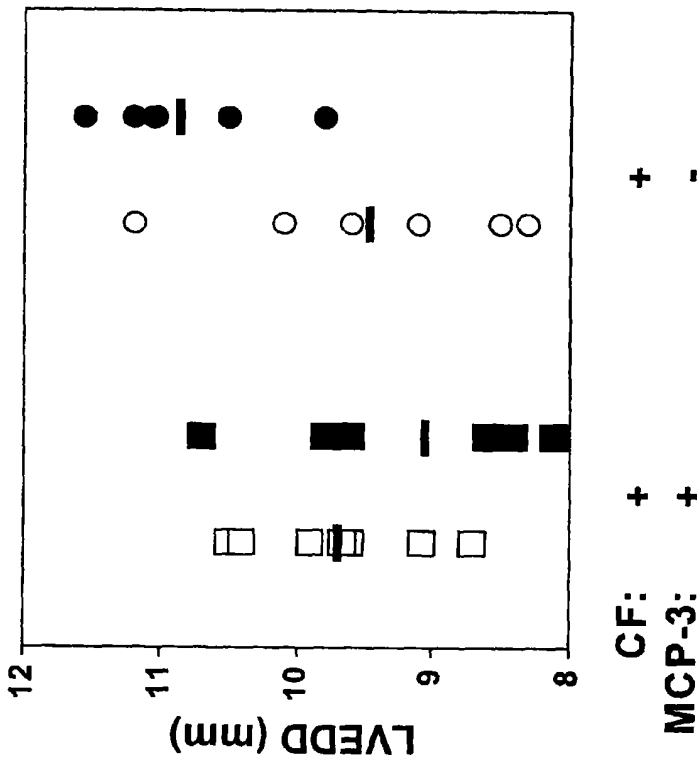


图 5b