



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112359018 A

(43) 申请公布日 2021.02.12

(21) 申请号 202010988981.0

A61K 38/17 (2006.01)

(22) 申请日 2013.09.06

A61K 38/16 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 35/30 (2015.01)

61/698,246 2012.09.07 US

A61K 31/65 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201380058368.7 2013.09.06

(71) 申请人 麻省眼耳医院

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 陈正义

(74) 专利代理机构 北京奉思知识产权代理有限公司

11464

代理人 邹轶蛟 石红艳

(51) Int. Cl.

C12N 5/0793 (2010.01)

A61K 48/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书40页 附图36页

(54) 发明名称

用于再生毛细胞和/或支持细胞的方法及组合物

(57) 摘要

本发明提供了用于诱导内耳的细胞(例如,耳蜗毛细胞和椭圆囊毛细胞)重新进入细胞周期并增殖的方法和组合物。更具体地,本发明涉及使用增加c-myc的活性和/或Notch活性的药剂,用于诱导耳蜗毛细胞或椭圆囊毛细胞和/或耳蜗支持细胞或椭圆囊支持细胞重新进入细胞周期并增殖。本发明的方法和组合物可以用于促进毛细胞和/或支持细胞的增殖,以治疗有听力损失风险或患有此病的对象,或有前庭功能障碍风险或患有此病的对象。

1. 一种诱导分化的耳蜗细胞或椭圆囊细胞进行增殖或重新进入细胞周期的方法,所述方法包括提高细胞内c-myc活性和Notch活性足以诱导所述耳蜗细胞或椭圆囊细胞进行增殖或重新进入细胞周期。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述细胞在重新进入所述细胞周期时进行去分化。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述耳蜗细胞或所述椭圆囊细胞是毛细胞或支持细胞。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,通过施用有效量的c-myc蛋白质或c-myc激活剂提高c-myc活性。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中,通过施用有效量的Notch蛋白质、Notch胞内域(NICD)蛋白质或Notch激活剂提高Notch活性。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,在提高c-myc活性后,抑制c-myc活性来限制所述耳蜗细胞或椭圆囊细胞的增殖和/或促进所述耳蜗细胞或椭圆囊细胞的存活。

7. 根据权利要求3-6中任一项所述的方法,其中,当所述耳蜗细胞或椭圆囊细胞是支持细胞时,所述方法还包括以下步骤:在所述支持细胞增殖后抑制Notch活性,从而诱导所述支持细胞和/或至少一种其子代细胞分化成毛细胞。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中,通过施用有效量的Notch抑制剂抑制所述Notch活性。

9. 根据权利要求3-8中任一项所述的方法,其中,当所述耳蜗细胞或椭圆囊细胞是支持细胞时,所述方法还包括以下步骤:在所述支持细胞增殖后提高Atoh1活性,从而诱导所述支持细胞和/或至少一种其子代细胞分化成毛细胞。

10. 一种再生耳蜗毛细胞或椭圆囊毛细胞的方法,所述方法包括:

(a) 提高所述毛细胞中c-myc活性和Notch活性,从而诱导细胞增殖以生成子代细胞;以及

(b) 在细胞增殖之后,降低Notch活性,从而诱导所述细胞和所述子代细胞的至少一种分化以生成分化的耳蜗毛细胞或椭圆囊毛细胞。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中,所述耳蜗细胞或椭圆囊细胞是毛细胞或支持细胞。

12. 根据权利要求10或11中任一项所述的方法,其中,在步骤(a)中,通过使所述细胞与有效量的c-myc蛋白质或c-myc激活剂相接触来提高c-myc活性。

13. 根据权利要求10-12中任一项的方法,其中,在步骤(b)中,通过使所述细胞与有效量的Notch蛋白质、Notch胞内域(NICD)蛋白质或Notch激活剂相接触来提高Notch活性。

14. 根据权利要求10-13中任一项所述的方法,其中,在步骤(b),通过使所述细胞与有效量的Notch抑制剂相接触来降低Notch活性。

15. 根据权利要求12所述的方法,其中,将所述c-myc蛋白质或c-myc激活剂施用到对象的内耳。

16. 根据权利要求13或15所述的方法,其中,将所述Notch蛋白质、NICD蛋白质或所述Notch激活剂施用到对象的内耳。

17. 根据权利要求14、15或16所述的方法,其中,将所述Notch抑制剂施用到对象的内耳。

用于再生毛细胞和/或支持细胞的方法及组合物

[0001] 本申请是基于2013年9月6日提交的申请号为201380058368.7 的名为“用于再生毛细胞和/或支持细胞的方法及组合物”的申请的 案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求于2012年9月7日提交的美国临时专利申请号 61/698,246的优先权和权益,在此以参考的方式并入其全部内容。

技术领域

[0004] 本发明的领域一般涉及诱导内耳细胞重新进入细胞周期并增殖的 方法和组合物。更具体地,本发明涉及增加细胞内c-myc(原癌基因) 活性和/或Notch活性以诱导内耳的毛细胞和/或支持细胞重新进入细胞 周期并增殖。

背景技术

[0005] 一种最普通类型的听力损失是由毛细胞或毛细胞功能的损失引起 的感觉神经性聋。毛细胞是耳蜗的感觉细胞,耳蜗负责将声音转换成 电信号。在出生时,人类内耳每个耳蜗仅有约15000个毛细胞,并且尽 管各种遗传或环境因素(例如,曝噪,耳毒性药物中毒、病毒性感染、老化以及遗传缺陷)导致这些细胞损失,但不能更替这些损失或者受 损的细胞。还发现毛细胞也存在于前庭的椭圆囊中,前庭是调节平衡 的器官。因此,毛细胞再生是恢复听力和前庭功能的重要途径。

[0006] 迄今为止,对成熟哺乳动物内耳中的毛细胞的再生的研究集中在 对现有支持细胞进行转分化。支持细胞在内耳内的感觉毛细胞之下, 至少部分地包围并物理地支持感觉毛细胞。支持细胞的实施例包括内 杆(柱细胞)、外杆(柱细胞)、内指细胞、(Deiters)外指细胞, Held细胞、Hensen细胞、Claudius细胞、Boettcher细胞、齿间细胞以 及(Huschke)听牙。通过支持细胞中的无调同元蛋白质1(Protein Atonal Homolog 1) (Atoh1)的过表达或激活,或通过将支持细胞暴露于Atoh1 激动剂,支持细胞向毛细胞的转分化是生成新的毛细胞的一个此类途 径。然而,此途径的一个局限性是,支持细胞向毛细胞的转分化减少 了支持细胞的现存种群,这会损害内耳功能。此外,Atoh1在缺少支持 细胞的老化的内耳或扁平上皮中的过表达,不足以诱导毛细胞。另外, 仍不清楚是否所有类型的支持细胞可以基于Atoh1的过表达转分化成 毛细胞。

[0007] 毛细胞再生的其他研究已经通过例如阻断Rb1和p27kip1的途径 检测了胚胎小鼠或新生小鼠中的毛细胞重新进入细胞周期的情况。然 而,在成年小鼠内耳中的类似处理未曾诱导使其重新进入细胞周期。此外,胚胎小鼠和新生小鼠的重新进入细胞周期的毛细胞一般随后死 亡。

[0008] 超过150种遗传学耳聋是由于影响毛细胞和支持细胞二者的基因 突变。例如,肌球蛋白VIIA(Myosin VIIa)中的突变引起毛细胞的静纤毛 异常,这会导致永久性耳聋。GJB2(连接蛋白26)突变造成对支持细 胞的损害,这导致最常见形式的遗传学耳聋。已开发出各种途径(例 如,基因疗法和反义寡核苷酸疗法)作为遗传性聋的可能的治疗途径。然而,大部分

的这些缺陷在胚胎发育期间发生。到出生时,受影响的毛细胞和支持细胞已经死亡或严重退化,变得难以干预。因此,为治疗遗传学耳聋,在子宫内和出生后都一直需要再生毛细胞和/或支持细胞,这可以与其他途径结合,以纠正此疾病根本的基因缺陷。

[0009] 此外,内耳非感觉细胞(例如在韧带中的纤维细胞)在听力中起重要作用。诸如噪声和老化的因素可以损害内耳非感觉细胞,这造成听力损失。这些细胞类型,类似于内耳中的很多细胞,缺乏损伤后自发再生的能力。

[0010] 因为自发再生不在哺乳动物的内耳中发生,恢复听力损失需要介入以更替损失或退化的内耳细胞类型。因此,一直需要再生哺乳动物耳内的毛细胞和/或支持细胞,特别是内耳中的那些细胞,以更替例如由于遗传或环境因素而损失的那些细胞。再生的毛细胞和/或支持细胞可用来减缓听力和/或前庭功能的损失,和/或部分或完全地恢复听力和/或前庭功能的损失。

发明内容

[0011] 本发明部分地基于以下发现:增加例如内耳细胞的耳细胞中c-myc活性、Notch活性或c-myc和Notch二者的活性,会促进细胞重新进入细胞周期并增殖。当细胞例如是毛细胞或支持细胞时,可以预期,细胞增殖和随后分化成毛细胞和/或支持细胞可以恢复或改善听力和/或前庭功能。

[0012] 在一个方面,本发明涉及一种诱导分化的耳蜗细胞或椭圆囊细胞增殖或重新进入细胞周期的方法。该方法包括提高细胞内c-myc和Notch二者的活性,使之足以诱导耳蜗细胞或椭圆囊细胞增殖或重新进入细胞周期。一旦进入到细胞周期,细胞可分化但保留其分化状态的样子。在某些实施方式中,耳蜗细胞或椭圆囊细胞可以例如是毛细胞或支持细胞。该方法还可包括下述步骤:在耳蜗细胞或椭圆囊毛细胞或支持细胞增殖后,抑制c-myc和/或Notch的活性,以诱导细胞和/或其子细胞的至少一者分化或转分化成毛细胞。增殖后对c-myc和/或Notch活性的抑制在提高细胞存活率方面可以说是非常重要的。

[0013] 在另一个方面,本发明涉及一种用于再生耳蜗毛细胞或椭圆囊毛细胞的方法。该方法包括增加毛细胞内c-myc和Notch二者的活性,从而诱导细胞增殖以生成一种、两种或更多种子代毛细胞,并且,在细胞增殖后,降低c-myc和/或Notch活性以诱导和/或维持子代毛细胞的分化。在某些实施例中,耳蜗细胞或椭圆囊细胞例如可以是毛细胞或支持细胞。这些步骤可以在体内(例如,在哺乳动物内耳中,特别是耳蜗或椭圆囊中)进行,或离体进行,离体进行中,将所得到的细胞进行培养并且/或引入到受试者的内耳中。

[0014] 在另一方面,本发明涉及一种用于降低对象听力损失、维持或促进其听力的方法。该方法包括增加内耳的毛细胞和/或其支持细胞内c-myc和Notch二者的活性,从而诱导细胞增殖以生成子代细胞,并且,在细胞增殖后,降低c-myc和/或Notch活性,并允许毛细胞源的子代细胞分化成毛细胞,或允许支持细胞源的子代细胞转分化成毛细胞,从而降低对象听力损失,维持或促进其听力。通过激活Atoh1活性(例如通过基因表达、通过施用有效量的Atoh1或Atoh1激动剂)可以诱导支持细胞源的子代细胞转分化成毛细胞。这些步骤可以在体内(例如,在哺乳动物内耳中,特别是耳蜗)进行,或离体进行,在离体过程中,将所得到的细胞进行培养和/或引入到对象的内耳中。

[0015] 在另一个方面,本发明涉及一种用于降低对象前庭功能损失、维持或促进其前庭

功能的方法。该方法包括增加内耳的毛细胞和/或支持细胞内c-myc和Notch二者的活性,从而诱导细胞增殖以生成子代细胞,并且,在细胞增殖后,降低c-myc和/或Notch活性,并允许毛细胞源 的子代细胞分化成毛细胞,或允许支持细胞源 的子代细胞转分化成毛细胞,从而降低对象前庭功能的损失、维持或促进其前庭功能。通过 激活Atoh1活性(例如通过基因表达、通过施用有效量的Atoh1或Atoh1 激动剂)可以诱导支持细胞源 的子代细胞转分化成毛细胞。这些步骤 可以在体内(例如,在哺乳动物内耳中,特别是椭圆囊中)进行,或离体进行,在离体过程中,将所得到的细胞进行培养和/或引入到对象 的内耳中。

[0016] 在本发明的上述各方面中,通过使细胞与有效量的c-myc蛋白质 或c-myc激活剂接触可增加c-myc活性。在c-myc活性增加后,可以 抑制c-myc活性以限制耳蜗细胞或椭圆囊细胞的增殖和/或以促进耳蜗 细胞或椭圆囊细胞的存活。类似地,在本发明的上述各方面中,通过 使细胞与有效量的Notch蛋白质、Notch胞内域(NICD) 蛋白质或Notch 激活剂接触,可增加Notch活性。通过使细胞与有效量的Notch抑制剂 接触,可以抑制Notch活性。

[0017] 在某些实施方式中,可对对象的内耳施用c-myc蛋白质或c-myc 激活剂。在某些实施方式中,可为对象的内耳施用Notch蛋白质、NICD 蛋白质、Notch激活剂和/或Notch抑制剂。在其他实施方式中,可为对 象的内耳共同施用c-myc蛋白质或c-myc激活剂连同Notch蛋白质、NICD蛋白质、Notch激活剂和/或Notch抑制剂。

[0018] 通过参考以下附图、详细说明和权利要求书,可更完全地理解 本发明的前述方面和实施方式。

附图说明

[0019] 通过参考在此描述的附图可更完全地理解本发明的主题和特征。

[0020] 图1(A)示出人类c-myc的全长蛋白质序列(NP_002458.2;SEQ ID NO:1),并且图(B)示出c-myc蛋白质共有蛋白质序列(SEQ ID NO:9)。

[0021] 图2(A)示出人类Notch全长蛋白质序列(NP_060087.3;SEQ ID NO:2),图(B)示出人类Notch胞内域的蛋白质序列(NP_060087.3残基1754-2555;SEQ ID NO:7),并且图(C)示出Notch胞内域的共有蛋白质序列(SEQ ID NO:10)。

[0022] 图3(A)示出人类Atoh1的全长蛋白质序列(NP_005163.1;SEQ ID NO:3),并且图(B)示出Atoh1共有蛋白质序列(SEQ ID NO:11)。

[0023] 图4示出人类c-myc mRNA(信使核糖核酸)的核酸序列(NM_002467.4;SEQ ID NO:4)。

[0024] 图5(A)示出人类Notch mRNA的核酸序列(NM_017617.3;SEQ ID NO:5),并且图(B)示出人类Notch胞内域的核苷酸序列(NM_017617.3核苷酸位置5260-7665;SEQ ID NO:8)。

[0025] 图6示出人类Atoh1 mRNA的核酸序列(NM_005172.1;SEQ ID NO:6)。

[0026] 图7示出在将Ad-Cre-GFP病毒和Ad-Myc病毒注射到45日龄的 NICD^{flox/flox}小鼠的耳蜗后4天(A-E)、8天(K-O)或12天(P-T)后,细胞类型特异性和BrdU双重标记的耳蜗毛细胞和支持细胞这些细胞。实线箭头表示BrdU标记的毛细胞,并且空心箭头表示标有BrdU的支持细胞。图7(F-J)示出未注射的对照耳蜗,其中没有发现具有 细胞类型特异性标记和BrdU双重标记的毛细胞和支持细胞。图7(A、F、K和P)示出BrdU标记。图7(B、G、L和Q)示出毛细胞的Myo7a 标记。图7(C、H、M和R)示出支持细胞的Sox2标记。图7(D、I、N和S)示出细胞核

的DAPI标记。图7 (E、J、O和T) 示出合并的 图像。

[0027] 图8示出在注射Ad-Cre-GFP/Ad-Myc混合物35天后,随后每天 施用BrdU持续5天后,NICD^{flox/flox}小鼠耳蜗上皮中细胞类型特异性和BrdU双重标记的耳蜗毛细胞和支持细胞。图8 (A、F和K) 示出 BrdU标记。图8 (B、G和L) 示出毛细胞的Myo7a标记。图8 (C、H和M) 示出支持细胞的Sox2标记。图8 (D、I和N) 示出细胞核的 DAPI标记。图8 (E、J和O) 示出合并的图像。图8 (A-E) 示出BrdU 和Myo7a标记,表明注射35天后增殖毛细胞是存活的 (图8A、图8B、图8C和图8E的实线箭头)。图8 (F-J) 示出来源于一个母代毛细胞 的分裂的两个毛细胞的放大图像,此子代毛细胞显示出静纤毛 (图8J 的实线无尾箭头)。图8 (K-O) 示出BrdU和Sox2标记的细胞 (图8K、图8M和图8O的空心箭头),表明注射35天后增殖支持细胞是存活的。图8 (K、L、M和O) 中的实心箭头示出Myo7a⁺/BrdU⁺毛细胞。图8 (K、L、M和O) 中的无尾箭头示出Myo7a⁺/Sox2⁺/BrdU⁺毛细胞。

[0028] 图9示出具有细胞类型特异性和BrdU双重标记的老龄 NICD^{flox/flox}小鼠耳蜗上皮耳蜗毛细胞和支持细胞,其中所述小鼠在 15天的过程中注射有Ad-Cre-GFP/Ad-Myc混合物。图9 (A、F和K) 示出毛细胞的Myo7a标记。图9 (B、G和L) 示出分裂细胞的BrdU 标记。图9 (C、H和M) 示出支持细胞的Sox2标记。图9 (D、I和N) 示出细胞核的DAPI标记。图9 (E、J和O) 示出合并的图像。图9 (A-J) 示出用Ad-Myc和Ad-Cre-GFP腺病毒注射后Myo7a⁺/BrdU⁺毛细胞 (A、B和E;箭头) 和Sox2⁺/BrdU⁺支持细胞 (B、C、E、G、H和J;无尾 箭头)。图9 (K-O) 示出在单独注射Ad-Cre-GFP病毒的17个月大小 的NICD^{flox/flox}小鼠中的相同染色。后一组中没有发现BrdU标记的 毛细胞或支持细胞。比例尺:10μm。

[0029] 图10示出在用Ad-Myc/Ad-NICD转导10天的培养的成年人类耳 蜗组织 (图10A-E) 和椭圆囊 (图10F-J) 组织中的BrdU (图10A和 图10F)、Myo7a (图10B和图10G) 和Sox2 (图10C和图10H) 标 记的毛细胞和支持细胞。空心箭头 (图10A、图10C、图10D、图10E、图10F、图10H、图10I和图10J) 表示增殖的支持细胞 (Sox2⁺/BrdU⁺), 并且实线箭头 (F-J) 表示增殖的毛细胞 (Myo7a⁺/BrdU⁺)。细胞核由 DAPI (D和I) 染色示出。

[0030] 图11示出在成年猴类耳蜗培养物中的Myo7⁺毛细胞 (A和F) 和 Sox2⁺支持细胞 (C和H)。分裂细胞 (B和G) 由EdU标记。图11 (A-E) 示出Ad-GFP感染的对照猴类耳蜗,其中没有识别出EdU⁺。图11 (G、H和J) 示出暴露于Ad-Myc/Ad-NICD病毒的猴类耳蜗培养 物中的EdU⁺/Sox2⁺支持细胞 (无尾箭头)。在对照培养物和 Ad-Myc/Ad-NICD病毒感染的培养物中,都没有观察到毛细胞重新进入 细胞周期 (A、E、F和J;箭头)。比例尺:20μm。

[0031] 图12示出对rtTa/tet-on-Myc/tet-on-NICD小鼠的支持细胞 (箭头; B、C和E) 而不是内毛细胞 (无尾箭头; A、C和E) 增殖的选择性诱导,其中该小鼠暴露于由植入式渗透泵持续施用9天的多西环素以诱导NICD和Myc的表达。重新进入细胞周期的细胞在相同的周期中经 由每天的EdU (图12B) 给药标记。细胞核用DAPI (图12D) 染色。内毛细胞用小清蛋白 (Parvalbumin) (Parv;图12A) 染色。支持细胞 用Sox2 (图12C) 染色。由于Notch激活 (图12A、图12C和图12E 中最右边的无尾箭头),示出还表达Sox2的单Parv⁺毛细胞。没有示 出外毛细胞,因为它们 在渗透泵的手术植入期间丢失了。比例尺:20μm。

[0032] 图13示出在体内暴露于升高的c-myc和Notch二者的活性后选择 性诱导外部毛细胞以重新进入细胞周期。使 rtTa/tet-on-Myc/tet-on-NICD小鼠暴露于通过植入式渗透泵持续施用的 多西环素12天,以诱导NICD和Myc的表达,然后收获小鼠组织用于 染色。在暴

露于多西环素期间,通过每天的EdU(图13B)给药标记重新进入细胞周期的细胞。细胞核用DAPI染色(图13D)。内外毛细胞用Esp⁺(Esp;图13A)染色。支持细胞用Sox2(图13C)染色。注意,与图12中所示的实验相比,在本实验中外毛细胞在渗透泵的植入期间是备用的。图13(B和E;箭头)中示出Esp⁺/EdU⁺外毛细胞,表明在升高的c-myc和Notch活性的暴露水平下外毛细胞增殖的选择性诱导。

[0033] 图14示出用FM-143FX(FM1)标记的Esp⁺阳性(Esp⁺)毛细胞,以展示具有功能性膜通道的细胞。45日龄NICDflox/flox小鼠的耳蜗暴露于Ad-Myc/Ad-Cre-GFP病毒,并且在病毒注射后每天注射一次EdU,持续5天,以标记分裂细胞。注射病毒35天后,收获耳蜗,短暂地暴露于FM1,固定并染色。图14(A-E)示出未重新进入细胞周期的Esp⁺/FM1⁺/EdU⁻的对照毛细胞,但其表达Esp且摄取FM1。图14(F-J)示出在暴露于Ad-Myc/Ad-NICD病毒的耳蜗中Esp⁺/FM1⁺/EdU⁺毛细胞,表明在经历了重新进入细胞周期的细胞中存在于功能性膜通道。无尾箭头(图14H)表示EdU标记;箭头(图14F)表示存在Esp⁺发束。比例尺:10μm。

[0034] 图15示出Myo7a⁺毛细胞的生成过程伴随有神经丝-阳性(NF⁺;图15B)神经纤维的生成过程,其中Myo7a⁺毛细胞暴露于升高水平的c-myc和Notch活性后受诱导以经历细胞增殖。45日龄NICDflox/flox小鼠的耳蜗暴露于Ad-Myc/Ad-Cre-GFP病毒,并且在注射病毒后,每天注射一次BrdU,持续15天,以标记分裂细胞(图15C)。注射病毒20天后收获组织并且染色。图15(A)示出Myo7⁺毛细胞。细胞核使用DAPI染色(图15D)。图15(E)示出在分图中最右边的箭头指示的方形区域的放大图和所有染色的合并图。箭头(图15A、图15C和图15E)表示与NF⁺神经节神经元神经纤维接触的Myo7a⁺/BrdU⁺毛细胞。比例尺:10μm。

[0035] 图16(A-E)示出内毛细胞的实施例,其中内毛细胞通过暴露于升高水平的c-myc和Notch活性受到诱导以进行增殖,并且表达内毛细胞特异性标记(Vglut3;图16B和图16G)和功能性突触的标记(CtBP2;图16A和图16F;方括号)。45日龄NICDflox/flox小鼠的耳蜗经由单次注射病毒暴露于Ad-Myc/Ad-Cre-GFP(图16A-E)或Ad-GFP(图16F-J)病毒,并且在病毒注射后,每天注射一次BrdU,持续15天,以标记分裂细胞(图16C和图16H)。然后收获组织并染色。细胞核用DAPI(图16D和图16I)染色。图16(A-E)示出在暴露于升高的c-myc和Notch二者的活性后受诱导而增殖的CtBP2⁺/Vglut3⁺/BrdU⁺内毛细胞(图16B;箭头),以及不经历重新进入细胞周期的CtBP2⁺/Vglut3⁺/BrdU⁻内毛细胞(图16B;无尾箭头)。(图16F-J)示出暴露于Ad-GFP的内毛细胞,其不是对BrdU染色呈阳性,而是对表达的内毛细胞特异性标记Vglut3和突触前标记CtBP2染色呈阳性。IHC=内毛细胞层。

[0036] 图17示出培养的来自多西环素可诱导的rtTa/tet-on-Myc/tet-on-Notch小鼠的耳蜗支持细胞,其中,该耳蜗支持细胞在暴露于单独Atoh1-表达腺病毒(图17F-J)或多西环素和Atoh1-表达腺病毒(Ad-Atoh1;图17A-E和图17K-O)后诱导而转分化或增殖和转分化成功能性毛细胞。解剖来自成年rtTa/tet-on-Myc/tet-on-Notch小鼠的耳蜗,并在多西环素存在(图17A-E和K-O)或不存在(图17的F-J)的条件下培养5天,然后感染Ad-Atoh1并额外培养14天。每天添加EdU以标记分裂细胞(图17A、图17F和图17M)。用DAPI对细胞核染色(图17D、图17I和图17N)。图17(A-E)示出暴露于多西环素然后暴露于Ad-Atoh1并用EdU标记的支持细胞重新进入细胞周期和/或转分化成Myo7a⁺/Parv⁺毛细胞(在图17A、图17B、图17C和图17E中的实心箭头)。图17(B、C和E)中空心箭头表示存在已分化成毛细胞但没有经历重新进入细胞周期过程的Myo7a⁺/Parv⁺支持细胞。图17(A和E)中的无尾箭头表

示EdU+ 支持细胞。图17 (F-J) 示出暴露于Ad-Atoh1而不是多西环素的支持 细胞转分化成Myo7a+/Parv+毛细胞。图17 (G、H和J) 中的箭头表示 已转分化成Myo7a+/Parv+毛细胞但没有经历重新进入细胞周期过程的 支持细胞。图17 (K-O) 示出暴露于多西环素然后暴露于Ad-Atoh1并 用FM1 (图17L) 和Edu (图17M) 标记的支持细胞,该支持细胞具 有Esp+发束 (图17K) 并摄取FM1染料。图17 (K和O) 中的箭头表 示显示出静纤毛的Esp+/FM1+/EdU+毛细胞, 该毛细胞源自经历过重新 进入细胞周期的转分化的支持细胞。图17 (K, O) 中的无尾箭头表 示 Esp+/FM1+/EdU-毛细胞,该毛细胞源自未经历重新进入细胞周期的转 分化的支持细胞。比例尺:10μm。

[0037] 图18示出在对照耳蜗细胞中和暴露于升高的c-Myc和NICD水平 后的耳蜗细胞中生成的几组mRNA转录本的半定量RT-PCR分析结果。成年NICD^{flox/flox}小鼠耳蜗暴露于Ad-Myc/Ad-Cre-GFP (Myc+Nicd) 或Ad-GFP (Ctr) 并培养4天,提取mRNA,并进行半定量RT-PCR。检查干细胞基因 (Nanog、ALPL和SSEA) 和耳祖细胞基因/Notch基 因 (Eya1、DLX5、Six1、Pax2、p27kip1、Islet-1、Sox2、Math1、NICD、Prox1和Hes5) 的表达变化。GAPDH表达用于内部对照。

[0038] 图19 (A) 示出人类N-myc的全长蛋白质序列 (NP_005369.2; SEQ ID NO:12), 并且图19 (B) 示出人类N-myc的核酸序列 (NM_005378.4; SEQ ID NO:13)。

[0039] 图20 (A) 示出人类Notch2的全长蛋白质序列 (NP_077719.2; SEQ ID NO:14), 并且图20 (B) 示出人类Notch2的核酸序列 (NM_024408.3; SEQ ID NO:15)。

[0040] 图21 (A) 示出人类Notch3的全长蛋白质序列 (NP_000426.2; SEQ ID NO:16), 并且图21 (B) 示出人类Notch3的核酸序列 (NM_000435.2; SEQ ID NO:17)。

[0041] 图22 (A) 示出人类Notch4的全长蛋白质序列 (NP_004548.3; SEQ ID NO:18); 并且图22 (B) 示出人类Notch4的核酸序列 (NM_004557.3; SEQ ID NO:19)。

[0042] 图23 (A) 示出人类Atoh1的全长蛋白质序列 (NP_660161.1; SEQ ID NO:20), 并且图 (B) 示出人类Atoh1的核酸序列 (NM_145178.3; SEQ ID NO:21)。

[0043] 图24示出控制毛细胞中表达的Atoh1增强子的核酸序列 (SEQ ID NO:22)。

[0044] 图25示出控制毛细胞中表达的Pou4f3启动子的核酸序列 (SEQ ID NO:23)。

[0045] 图26示出控制毛细胞中表达的Myo7a启动子的核酸序列 (SEQ ID NO:24)。

[0046] 图27示出控制前庭支持细胞和耳蜗内指细胞、Deiters细胞和Pillar 细胞中的表达的Hes5启动子的核酸序列 (SEQ ID NO:25)。

[0047] 图28示出控制前庭支持细胞和耳蜗内指细胞、Deiters细胞和Pillar 细胞中的表达的GFAP启动子的核酸序列 (SEQ ID NO:26)。

具体实施方式

[0048] 本发明涉及一种用于诱导耳 (特别是内耳) 中的毛细胞和/或支持 细胞重新进入细胞周期并增殖的方法和组合物。本发明的方法和组合 物可以用于增加由于环境或遗传因素减少的毛细胞和/或支持细胞的种 群。使用在此所描述的方法和组合物,有可能维持或改善内耳的听力 和/或前庭功能。

[0049] 如在此所证实,同时增加c-myc和Notch二者的活性似乎是诱导 内耳细胞重新进入细胞周期并增殖的重要步骤。如在下面的实施例中 所示,在哺乳动物内耳中的c-myc和

Notch的过表达会使毛细胞和支持细胞重新进入细胞周期并增殖。毛细胞的增殖(或支持细胞的增殖,随后这些细胞转分化成毛细胞)可改善对象的听力和/或前庭功能。

[0050] 定义

[0051] 为方便起见,将说明书、实施例和所附权利要求书的某些术语收集在此部分。

[0052] 在此所用的术语“有效量”应理解为活性剂(例如,c-myc或Notch 激活剂)的量,即足以诱导内耳细胞(例如,毛细胞或支持细胞)重新进入细胞周期和/或增殖。这些细胞与有效诱导重新进入细胞周期和/或增殖的一定量的活性剂相接触。

[0053] 如在此所用,“药学可接受”或“药理学可接受”意为当视情况施用 到对动物或人类时,不产生不利的、过敏的或其他不良反应的分子实体和组合物。术语“药学可接受的载体”包括任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、抗菌药剂和抗真菌药剂、等渗和吸收延迟剂等。这类药学 活性物质的介质和药剂的用途是本领域众所周知的。除了任何常规介质或试剂与药效成分不相容之外,会考虑其治疗组合物中的应用。也可以将补充的活性成分掺入到组合物中。

[0054] 在整个说明书中术语“对象”用于描述根据本发明的方法对其进行 治疗的动物、人类或非人类。可以预期涉及兽医和非兽医方面的应用。该术语包括但不限于禽类和哺乳动物,例如人类、其他灵长目动物、猪、诸如小鼠和大鼠的啮齿动物、兔、豚鼠、仓鼠、牛、马、猫、狗、绵羊和山羊。典型的受试者包括人类、农场动物和诸如猫和狗的家用 宠物。

[0055] 在此所用的一种或多种“靶细胞”是能够重新进入细胞周期的细胞 和/或增殖和/或转分化成为或到具有或产生具有听觉毛细胞或前庭毛 细胞的特性的细胞。靶细胞包括但不限于例如毛细胞(例如内耳毛细胞),毛细胞包括听觉毛细胞(内毛细胞和外毛细胞)和前庭毛细胞(例如位于椭圆囊、小囊和三个半圆管道中的细胞)、祖细胞(例如 内耳祖细胞)、支持细胞(例如,Deiters细胞、柱细胞、内指细胞、顶盖细胞和Hensen细胞)、表达p27kiP、p75、S100A、Jagged-1、prox1 的一种或多种的支持细胞和/或生殖细胞。“内毛细胞”是指解剖学上位于柯蒂氏器官中在基底膜的上方的内耳的感觉细胞。“外毛细胞”是指在解剖学上位于的柯蒂氏器官中在顶盖膜下靠近基底膜中心的内耳的感 觉细胞。靶细胞的实施例还包括纤维细胞、边缘细胞或表达Gjb2、Slc26a4和Gjb6的一种或多种的齿间细胞。如在此所述,在用在此所述的方法、化合物和组合物处理之前,可以使用对靶细胞而言是唯一 的一个限定组的一种或多种标记(例如,细胞表面标记)识别这些靶 细胞的每一个。不同组的一种或多种标记(例如,细胞表面标记)也 可以用来识别靶细胞具有听觉毛细胞或支持细胞特征。

[0056] 如在此所用,术语“宿主细胞”是指在体内、离体或体外用重组载 体或多核苷酸转染、感染或转导的细胞。宿主细胞包括包装细胞、生 产细胞和用病毒载体感染的细胞。在特定实施方式中,将本发明的病 毒载体感染的宿主细胞施用给需要治疗的对象。在某些实施方式中,术语“靶细胞”与宿主细胞中可互换使用,并用于指受转染、感染或转导 的期望细胞类型的细胞。

[0057] 在此所用的术语“载体”是指能够传送或运送另一核酸分子的核酸 分子。被转移的核酸通常连接到(例如插入)载体核酸分子中。载体 可包括引导细胞中自主复制的序列,或者可包括足以允许整合到宿主 细胞DNA(脱氧核糖核酸)中的序列。有用的载体包括例如质粒(例如 DNA质粒或RNA质粒)、转座子、粘粒、细菌或酵母人工染色体和 病毒载体。有用

的病毒载体例如包括腺病毒、复制缺陷型逆转录病毒 和慢病毒。

[0058] 如在此所用,术语“病毒载体”是指包括病毒-来源的核酸因子的核 酸分子,病毒-来源的核酸因子通常有利于核酸分子转移或整合到细胞 的基因组中或是指介导核酸转移的病毒颗粒。病毒颗粒典型地包括多 种病毒成分,并且有时还包括除一种或多种核酸之外宿主细胞成分。术语“病毒载体”还可指能够将核酸转移到细胞或到被转移的核酸自身 中的病毒或病毒颗粒。病毒载体和转移质粒含有主要源自病毒的结构 遗传因子和/或功能性遗传因子。

[0059] 术语“逆转录病毒载体”是指含有主要源自逆转录病毒的结构遗传 因子和功能性遗传因子或其部分的病毒载体或质粒。

[0060] 术语“慢病毒载体”是指含有主要源自慢病毒的结构遗传因子和功 能性遗传因子或其部分的病毒载体或质粒。

[0061] 术语“慢病毒载体”或“慢病毒表达载体”可用于指慢病毒转移质粒 和/或传染性慢病毒颗粒。应当理解,诸如克隆位点、启动子、调节因 子、异源核酸等的核酸序列因子,以RNA形式存在于本发明的慢病毒 颗粒中,并以DNA形式存在于本发明的DNA质粒中。

[0062] 术语“杂合体”是指含有逆转录病毒(例如,慢病毒)序列和非慢 病毒序列两者的载体、LTR或其他核酸。杂合载体可指包括用于逆转 录、复制、整合和/或包装的逆转录病毒(例如,慢病毒)序列的载体 或转移质粒。在本发明的一些实施方式中,杂合载体可用于实施在此 描述的本发明。

[0063] 术语“转导”是指使用逆转录病毒载体或慢病毒载体借助病毒性感 染而不是转染的途径递送一种或多种基因或其他多核苷酸序列。在某 些实施方式中,如果细胞包括通过用病毒(例如,腺病毒)或逆转录 病毒载体感染而递送到此细胞的基因或其他多核苷酸序列,则该细胞 (例如靶细胞)被“转导”。在特定实施方式中,转导的细胞包括由其细 胞基因组中的逆转录病毒载体或慢病毒载体递送的一种或多种基因或 其他多核苷酸序列。

[0064] 在此所用的术语“c-myc”是指在细胞周期进程、细胞凋亡和细胞转 化中起作用 和/或具有在下面第1(i)章节列出的氨基酸序列或共有氨 基酸序列的多功能核磷蛋白质。人类c-myc的全长序列出现在例如登 记号NP_002458.2下的NCBI蛋白质数据库中(参见 ncbi.nlm.nih.gov 和SEQ ID NO:1)。SEQ ID NO:9列出用于使用ClustalW建自人类、大 鼠、小鼠和黑猩猩的比对的c-myc的共有序列。C-myc用作调节特 定靶基因转录的转录因子。此基因的突变、过表达、重排和易位已与 多种造血肿瘤、白血病和包括伯基特淋巴瘤的淋巴瘤相关联。C-myc 在本领域中也是众所周知的以作为以下各项,如MYC、v-myc髓细胞 组织增生病毒肿瘤基因同系物(鸟类)、转录因子p64、bHLHe39、MRTL、鸟类髓细胞组织增生 病毒肿瘤基因同系物、v-myc鸟类髓细胞 组织增生病毒肿瘤基因同系物、myc原癌基因蛋白 质、E类碱性螺旋- 环-螺旋蛋白质39、myc-相关转译/定位调节因子以及原癌基因c-Myc 和 BHLHE39。

[0065] 在此所用的术语“Notch”是指信号蛋白质的Notch家族,包括 Notch1、Notch2、Notch3和Notch4、NICD、和/或具有下面第(1)(i) 章节列出的氨基酸序列或共有氨基酸序 列的蛋白质。人类Notch1的全 长序列出现在例如登记号NP_060087.3下的NCBI蛋白质数据 库中(参 见ncbi.nlm.nih.gov和SEQ ID NO:2)。该I型跨膜蛋白质家族的成员 共享包括多个表皮生长因子-状(EGF)重复元组成的胞外域和多个不 同域类型组成的胞内域的结构特

征。Notch家族成员通过控制细胞命运 决定过程而在多种发育过程中起作用。

[0066] Notch1在高尔基体外侧网络中裂解,并且在细胞表面上呈现为异 质二聚体。Notch1用作膜结合配体Jagged 1、Jagged2和Delta1的受体,以调节细胞命运确定过程。一旦通过释放的notch胞内域(NICD)激 活配体,就形成了与RBPJ/RBPSUH复合的转录激活剂,并激活分裂基 因座增强子的基因。Notch1对细胞分化、增殖和凋亡程序的实现产生 影响。

[0067] 在此公开诱导分化的耳蜗细胞或椭圆囊细胞增殖或重新进入细胞 周期的方法。该方法包括增加细胞内c-myc活性、Notch活性或c-myc 和Notch二者的活性,使其足以诱导耳蜗细胞或椭圆囊细胞增殖或重新 进入细胞周期。

[0068] 在某些实施方式中,该方法包括当Notch活性已增加时,例如,当响应于内耳的损害已上调Notch1时,增加细胞内c-myc活性。在某些实施方式中,本发明涉及一种诱导分化的耳蜗细胞或椭圆囊细胞增 殖或重新进入细胞周期的方法,其中响应于对耳蜗细胞或椭圆囊细胞 的损害,相比在未损坏的耳蜗细胞或椭圆囊细胞中的Notch活性水平,分别增加Notch活性。该方法包括增加耳蜗细胞或椭圆囊细胞内c-myc 活性,使其足以诱导耳蜗细胞或椭圆囊细胞增殖或重新进入细胞周期。

[0069] 在其他实施方式中,该方法包括当已增加c-myc活性时,增加细 胞内的Notch活性。(参见,例如, Lee et al. (2008) ASSOC. RES. OTOLARYNGOL. ABS.:762.) 具体地,本发明涉及一种诱导分化的耳 蜗细胞或椭圆囊细胞增殖或重新进入细胞周期的方法,其中响应 于耳 蜗细胞或椭圆囊细胞的损害,相比于未损坏的耳蜗细胞或椭圆囊细胞 内的c-myc活性水平,分别增加细胞内的c-myc活性。该方法包括增 加耳蜗细胞或椭圆囊细胞内的Notch活性,使其足以诱导耳蜗细胞或椭 圆囊细胞增殖或重新进入细胞周期。

[0070] 视情况,在c-myc活性、Notch活性或c-myc和Notch二者的活性 增加后,根据本领域已知和/或如在此所述的方法,可抑制Notch以使 增殖的支持细胞转分化成毛细胞。可选地或附加地,视情况,在c-myc 活性、Notch活性或c-myc和Notch二者的活性增加后,可以增加Atoh1 活性,以使增殖的支持细胞转分化成毛细胞。增加Atoh1活性的方法 (包括使用Atoh1激动剂)在本领域中是已知的(参见,例如,美国 专利号8,188,131;美国专利公开号 20110305674;美国专利公开号 20090232780;Kwan et al. (2009) INT' L SYMPOSIUM ON OLFACTION AND TASTE:ANN.N.Y.ACAD.SCI.1170:28-33;Daudet et al. (2009) DEV.BIO.326:86-100;Takebayashi et al. (2007) DEV.BIO. 307:165-178;和Ahmed et al. (2012) DEV.CELL 22 (2) :377-390)。

[0071] 还公开了一种再生耳蜗毛细胞或椭圆囊毛细胞的方法。该方法包 括(a)视情况,增加毛细胞内c-myc活性、Notch活性或c-myc和Notch 二者的活性,从而诱导细胞增殖以生成一种、两种或更多种子代细胞,以及(b)在细胞增殖后,降低Notch活性以诱导细胞和子代细胞的至 少一者分化,以生成分化的耳蜗毛细胞或椭圆囊毛细胞。该过程可以 在体内或离体进行。在一个实施方式中,降低源自于支持细胞的细胞 内的Notch活性,以使支持细胞转分化成毛细胞。在另一个实施方式中, 增加源自于支持细胞的细胞内的Atoh1活性,以使支持细胞转分化成 毛细胞。

[0072] 在某些实施方式中,在c-myc和Notch诱导毛细胞或支持细胞内 的增殖后,降低c-myc活性,以诱导细胞和子代细胞的至少一者分化, 以生成分化的耳蜗毛细胞或椭圆囊毛细胞。增殖后降低c-myc活性可 以促进增殖细胞的存活。

[0073] 还公开了一种用于降低对象听力损失、维持或促进其听力的方法。该方法包括视情况,增加内耳的毛细胞和/或支持细胞内c-myc活性、Notch活性或c-myc和Notch二者的活性,从而诱导细胞增殖以生成子代细胞,并且在细胞增殖后,降低c-myc和/或Notch活性,并且允许来源于毛细胞的子代细胞分化成毛细胞,或允许来源于支持细胞的子代细胞转分化成毛细胞,从而降低对象听力损失、维持或促进其听力。因此,通过激活Atoh1活性(例如通过基因表达、通过施用有效量的Atoh1或Atoh1激动剂)可诱导来源于支持细胞的子代细胞转分化成毛细胞。这些步骤可以在体内(例如,在哺乳动物的内耳,特别是在耳蜗中)进行,或离体进行,在离体过程中,将所得到的细胞进行培养和/或引入到对象的内耳中。

[0074] 还公开了一种用于减少对象前庭功能损失、维持或促进前庭功能的方法。该方法包括视情况,增加在内耳的毛细胞和/或支持细胞内c-myc活性、Notch活性或c-myc和Notch二者的活性,从而诱导细胞增殖以生成子代细胞,并且在细胞增殖后,降低c-myc和/或Notch活性,并且允许来源于毛细胞的子代细胞分化成毛细胞,或允许来源于支持细胞的子代细胞转分化成毛细胞,从而降低对象前庭功能损失、维持或促进其前庭功能。通过激活Atoh1活性(例如通过基因表达、通过施用有效量的Atoh1或Atoh1激动剂)可诱导来源于支持细胞的子代细胞转分化成毛细胞。这些步骤可以在体内(例如,在哺乳动物的内耳,特别是在耳蜗中)进行,或离体进行,在离体过程中,将所得到的细胞培养和/或引入到对象的内耳中。

[0075] 在此描述的方法和组合物可用于治疗具有听觉障碍或将有患听觉障碍风险的对象,听觉障碍由诸如感觉神经毛细胞的听毛细胞的损失引起。可采用本领域已知的标准听力测试鉴定患有听觉障碍的病人。该方法可以包括:(a)视情况,增加受试者毛细胞内c-myc活性、Notch活性或c-myc和Notch二者的活性,从而诱导细胞增殖以生成子代细胞,和(b)在细胞增殖后,降低Notch活性以诱导细胞和子代细胞的至少一者分化,以生成分化的耳蜗毛细胞或椭圆囊毛细胞。这可以通过将一种或多种药剂施用给对象以调节c-myc活性和Notch活性来完成。可选地,该过程可以在离体的细胞(例如,耳蜗细胞和/或椭圆囊细胞)发生,然后将得到的细胞移植到对象的内耳中。在某些实施方式中,在此所述的方法和组合物可以用于促进神经突从内耳中的神经节神经元生长。例如,毛细胞的再生可促进新的神经突从神经节神经元生长并且形成具有再生毛细胞的新突触,以将声音信号和平衡信号从毛细胞发送给大脑。

[0076] 在某些实施方式中,在此所述的方法和组合物可以用于促进神经突从内耳中的神经节神经元生长。例如,毛细胞的再生可促进新的神经突从神经节神经元生长并且形成具有再生毛细胞的新突触,以将声音信号和平衡信号从毛细胞发送给大脑。在一些实施方式中,在此所述的方法和组合物可以用于重新恢复毛细胞和听觉神经元之间正确的突触连接以治疗例如听觉神经病。

[0077] 感觉神经毛细胞损失的对象经历耳蜗毛细胞的退化,从而频繁导致毛细胞损失区域中螺旋神经节神经元的损失。这类对象也可经历柯蒂氏器官中支持细胞的损失,以及颞骨材料中角膜缘、螺旋韧带和血管纹的退化。

[0078] 在某些实施方式中,本发明可用于例如,通过促进一种或多种细胞分化(例如,完全地或部分地分化)成能够用作例如毛细胞的耳感觉细胞的一种或多种细胞,治疗由于耳

中细胞损失引起的毛细胞损失 和任何异常,比如听力损失、耳聋、前庭失常、耳鸣(参见 Kaltenbach et al. (2002) J NEUROPHYSIOL. 88 (2) :699-714s) 和听觉过敏 (Kujawa et al. (2009) J. NEUROSCI. 29 (45) :14077-14085)。

[0079] 在某些实施方式中,对象可以患有感觉神经性听力损失或传导性 听力损失,所述感觉神经性听力损失因耳的感觉部分(耳蜗)或非感 觉部分(角膜缘、螺旋韧带和血管纹)或神经部分(听觉神经)的损 伤或失效而引起,所述传导性听力损失是因为外耳和/或中耳的堵塞或 损伤而引起。可选地或附加地,对象可以患有传导路径(外耳或中耳 中)和神经路径(内耳)二者兼有的问题而引起的混合性听力损失。混合性听力损失的实施例是与由于老化相关联的损伤引起的感觉神经 损失结合的由于中耳感染引起的传导损失。

[0080] 在某些实施方式中,对象可以是聋的或患有由于任何原因或任何 类型事件造成的听力损失。例如,对象可以是因遗传或先天不足的致 聋的对象;例如,患者可以是自出生就是的耳聋患者,或可以是由于 遗传或先天不足逐渐丧失听力的耳聋患者或耳背患者。在另一实施例 中,患者可以是由于创伤事件(比如物理损伤耳结构,或突然的大噪 声,或长时间暴露在很响的噪声中)引起的耳聋或耳背患者。例如, 长期暴露于音乐会、机场跑道和施工区域可引起内耳损伤并且随后造 成听力损失。

[0081] 在某些实施方式中,对象可以经历化学-诱导的耳毒性,其中耳毒 性物质包括治疗药物,治疗药物包括抗肿瘤药、水杨酸盐、奎宁和氨 基苷抗生素、食物或药物中的污染物以及环境或工业污染物。

[0082] 在某些实施方式中,对象可以患有由老化引起的听力障碍。可选 地或附加地,对象可以患有耳鸣(特征为耳朵中的振铃)或听觉过敏 (对声音有较高的灵敏度)。

[0083] 另外,在此所述的方法和组合物可用于治疗患有前庭功能障碍的 对象,前庭功能障碍包括双侧和单侧前庭功能障碍。前庭功能障碍是 内耳功能障碍,特征为具有包括头晕、不平衡、眩晕、恶心和视力模 糊的症状,并且可伴随听觉问题、疲劳和认知机能的变化。前庭功能 障碍可由于以下原因引起:遗传或先天不足、诸如病毒或细菌感染的 感染,或诸如外伤或非外伤损伤的损伤。最常通过测量疾病的各个症 状(例如,眩晕、恶心和视力模糊)来测试前庭功能障碍。

[0084] 可选地或附加地,在此所述的方法和组合物可预防性地使用,例如 用于防止、减少或延迟与内耳功能损失相关联的听力损失、耳聋或其 他听觉障碍的恶化。例如,含有一种或多种药剂的组合物可与诸如可 能影响听力损失的激活剂的第二组合物一起施用(例如,之前、之后 或与之同时)。这样的耳毒性药物包括抗生素新霉素、卡那霉素、氨 丁卡霉素、紫霉素、庆大霉素、妥布霉素、红霉素、万古霉素和链霉 素;化疗剂,例如顺铂;非甾体抗炎药(NSAID),例如水杨酸胆碱 镁、双氯芬酸、二氟尼柳、非诺洛芬、氟比洛芬、布洛芬、吲哚 美辛、优布芬、甲氯芬那酸、萘丁美酮、奈普生、奥沙普秦、保太松、比罗 昔康,双水杨酸酯、舒林酸和托美丁;利尿剂;水杨酸酯如阿司匹林; 和某些抗疟治疗剂,如奎宁和氯喹。例如,可以使用在此所述的化合 物和方法治疗接受化疗的患者。例如,已知化疗药物顺铂可造成 听力 损失。因此,含有一种或多种增加c-myc和Notch二者的活性的试剂的 组合物可以与顺铂一起施用(例如,之前、之后或与之同时),以防 止或降低顺铂副作用的严重程度。这样的组合物可在施用第二治疗剂 之前、之后和/或与之同时施用。这两种药物可以通过不同的 给药途径 施用。

[0085] 在某些实施方式中,可以使用本文描述的方法和组合物以增加细胞(例如,内耳细胞)中c-myc和Notch的水平(例如蛋白质水平)和/或活性(例如生物活性)。示例性方法和组合物包括但不限于用于增加细胞中c-myc或Notch的表达(例如,转录和/或转译)或水平(例如浓度)的方法和组合物。可以设想,可以在体内和离体的毛细胞和/或支持细胞中实现这样的调节。

[0086] 1. 用于增加C-myc、Notch和Atoh1活性的方法和组合物

[0087] (i) C-myc、Notch或Atoh1多肽

[0088] 可以设想的是,使用本领域已知的技术可以将c-myc、Notch和Atoh1蛋白质,包括全长蛋白质、生物活性片段以及c-myc和Notch的同系物导入靶细胞。

[0089] 示例性的c-myc多肽包括,例如,正如NCBI蛋白质数据库中所引用的NP002458.2 (SEQ ID NO:1)。示例性Notch多肽包括,例如,正如NCBI蛋白质数据库中所引用的NP060087.3 (SEQ ID NO:2)。示例性的Atoh1多肽包括,例如,正如NCBI蛋白质数据库中所引用的NP005163.1 (SEQ ID NO:3)。

[0090] 在某些实施方式中,编码c-myc、Notch和Atoh1家族成员的核酸序列可以按照本文所描述的方法使用。示例性的c-myc家族成员包括N-myc,在NCBI蛋白质数据库中引用为NP_005369.2 (SEQ ID NO:12)。示例性的Notch家族成员包括Notch2,在NCBI蛋白质数据库中引用为NP_077719.2 (SEQ ID NO:14);示例性的Notch家族成员包括Notch3,在NCBI蛋白质数据库中引用为NP_000426.2 (SEQ ID NO:16);示例性的Notch家族成员包括Notch4,在NCBI蛋白质数据库中引用为NP_004548.3 (SEQ ID NO:18)。示例性的Atoh1家族成员包括Atoh7,在NCBI蛋白质数据库中引用为NP_660161.1 (SEQ ID NO:20)。

[0091] 在某些实施方式中,本发明的蛋白质序列可包括共有蛋白质序列或编码共有蛋白质序列的核苷酸序列。本发明的c-myc、Notch胞内结构域和Atoh1的共有蛋白质序列将在下文阐述。

[0092] 使用ClustalW从人、小鼠、大鼠和黑猩猩序列构建的c-myc共有蛋白质序列如下:

[0093] MPLNVX1FX2NRNYDL DYDSVQPYFX3CDEEENFYX4QQQQSE LQPPAPSEDIWKKFELLPTPLSP
SRRSGLCSPSYVAVX5X6X7FSX8R X9DX10DGGGGX11FSTADQLEMX12TELLGGDMVNQSFICDPDET FI
KNIIIQDCMWSGFSAAAKLVSEKLASYQAARKDSX13SX14X15PA RGHSVCSTSSLYLQDLX16AAASECIDPS
VVFPYPLNDSSPKSCX17S X18DSX19AFSX20SSDLSX21ESSPX22X23X24PEPLVLHEETPPT TSS
DSEEEQX25DEEEIDVVSVEKRQX26PX27KRSESGSX28X29X30G GHSKPPHSPLVLKRCHVSTHQHNYAAPP
STRKDYPAAKRX31KLDS X32RVLX33QISNNRKCX34SPRSSDTEENX35KRRTHNVLERQRRNE LKRSFFAL
RDQIPELENNEKAPKVILKKATAYILSX36QAX37EX38K LX39SEX40DLLRKRREQLKHKLEQLRNSX41A
(SEQ ID NO:9),其中 X1是S或N;X2是T或A;X3是Y或I;X4是Q或H;X5是T或A;X6是P或T;X7
是S或化学键;X8是L或P;X9是G或E;X10是N或D;X11是S或N;X12是V或M;X13是G或T;X14是P
或L;X15是N或S;X16是S或T;X17是P或A或T;X18是Q或S;X19是S或T;X20是P或S;X21是T或
化学键;X22是Q或R;X23是A或G;X24是S或T;X25是E或D;X26是A或T或P;X27是G或A;X28是
P或S;X29是P或S;X30是A或S;X31是V或A;X32是V或G;X33是K或R;X34是T或S;X35是D或V;
X36是V或I;X37是E或D;X38是Q或H;X39是T或I;X40是E或K;以及X41是C或G。

[0094] 使用ClustalW从人、大鼠和小鼠序列构建的Notch胞内结构域的共有蛋白质序列如下:

[0095] VLLSRKRRRQHGLWFPEGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKP LKNASDGALMDDNQNEWGDEDLET
KKFRFEPPVVLPLDX1DQTDH RQWTQQHLDAADLRX2SAMAPTPPQGEVDADCMDVNVVRGPDGFTP LMIASCSG
GGLETGNSEEEEDAPAVISDFIYQGASLHNQTDRTGETA LHLAARYSRSDAAKRLLEASADANIQDNMGRTPPLHA
AVSADAQGV FQILX3RNRATDLDAARMHDGTTPLILAAARLAVEGMLLEDLINSHADV NAVDDLKGSALHWAAAVNN
VDAAVVLLKNGANKDMQNNX4EETP LFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDITDHMDRLPRDIAQERMHHDIV RLL
DEYNLVRSPQLHG5X6LGGTPTLSPX7LCSPNGYLGX8LKX9X1 0X11QGKKX12RKPSX13KGLACX14SKEA
KDLKARRKKSQDGKGCL LDSSX15MLSPVDSLESPHGYLSDVASPPLLPSPFQQSPSX16PLX17H LPGMPDTH
LGIX18HLNVAAKPEMAALX19GGX20RLAFEX21X22PP RLSHLPVASX23X24STVLX25X26X27X28X29G
AX30NFTVGX31X32 X33SLNGQCEWLX34RLQX35GMVPX36QYNPLRX37X38VX39PGX4 0LSTQAX41X4
2LQHX43MX44GPX45HSSLX46X47X48X49LSX50X51 X52X53YQGLPX54TRLATQPHLVQTQQVQPQNLQ
X55QX56QNLQX 57X58X59X60X61X62X63X64X65X66X67X68X69X70PPX71QPHLX72 VSSAAX73G
HLGRSFLSGEPSQADVQPLGPSSLX74VHTILPQESX75A LPTSLPSSX76VPPX77TX78X79QFLTPPSQHSY
SSX80PVDNTPSHQL QVPEHPFLTTPSPESPDQWSSSSX81HSNX82SDWSEGX83SSPPTX84M
X85SQIX86X87IPEAFK (SEQ ID NO:10), 其中X1是D或S;X2是M 或V;X3是L或I;X4是K或R;X5
是T或A;X6是A或P;X7 是T或P;X8是S或N;X9是S或P;X10是A或G;X11是T或V; X12是A或V;
X13是T或5;X14是G或5;X15是G或S;X16是 M或V;X17是S或N;X18是S或G;X19是A或G;X20是S
或 G;X21是P或T;X22是P或G;X23是S或G;X24是A或T;X25 是S或G;X26是T或S;X27是N或S;
X28是G或S;X29是T 或G;X30是M或L;X31是A或G;X32是P或S;X33是A或T; X34是P或S;X35是
N或S;X36是S或N;X37是P或G;X38是 G或S;X39是T或A;X40是T或P;X41是A或P;X42是G或S;
X43是G或S;X44是M或V;X45是L或I;X46是S或A;X47 是T或A;X48是N或S;X49是T或A;X50是P
或Q;X51是M 或I;X52是M或I;X53是S或化学键;X54是S或N;X55是L或 I或M;X56是Q或P;X57
是化学键或P;X58是化学键或A;X59 是化学键或N;X60是化学键或I;X61是化学键或Q;X62
是化学键 或Q;X63是化学键或Q;X64是化学键或Q;X65是化学键或S;X66 是化学键或L;X67
是化学键或Q;X68是化学键或P;X69是化学键 或P;X70是化学键或P;X71是P或S;X72是S或
G;X73是N或 S;X74是P或A;X75是Q或P;X76是M或L;X77是M或V; X78是T或A;X79是T或A;X80
是S或化学键;X81是P或R; X82是I或V;X83是I或V;X84是T或S;X85是P或Q;X86是 T或A;X87
是H或R。

[0096] 使用ClustalW从人、小鼠和黑猩猩序列构建的Atohl的共有蛋白质序列如下:

[0097] MSRLHAEWEAEVKELGDHHRX1PQPHHX2PX3X4PPX5X6QP PATLQARX7X8PVYPX9ELSLDLS
TDPRAWLX10PTLQGX11CTARAA QYLLHSPXL12ASEAAAPRDEX13DX14X15GELVRRSX16X17GX18 X
19X20SKSPGPVKVREQLCKLKGGVVDELGCSRQRAPSSKQVNG VQKQRRLAANARERRRMHGLNHAFDQLRNV
IPSFNNDKKLSKYET LQMAQIYINALSELLQTPX21X22GEQPPPPX23ASCKX24DHHHLRTA X25SYEGGAG
X26X27X28X29AGAQX30AX31GGX32X33RPTPPGX3 4CRTRFSX35PASX36GGYSVQLDALHFX37X38FE
DX39ALTAMMAQ KX40LSPSLPGX41ILQPQEX42NSKTSRPSHRSDGEFSPHSITYSDSD EAS (SEQ ID
NO:11), 其中X1是Q或H;X2是L或V;X3是Q或化 学键;X4是P或化学键;X5是P或化学键;X6是P
或化学键;X7 是E或D;X8是H或L;X9是P或A;X10是A或T;X11是I或L;X12是S或G;X13是V或A;
X14是G或S;X15是R或Q;X16 是S或G;X17是G或C;X18是A或G;X19是S或化学键;X20 是S或L;
X21是S或N;X22是G或V;X23是P或T;X24是S 或N;X25是A或S;X26是A或N;X27是A或S;X28是T
或A; X29是A或V;X30是Q或P;X31是S或P;X32是S或G;X33 是Q或P;X34是S或P;X35是A或G;

X36是A或S;X37是S 或P;X38是T或A;X39是S或R;X40是N或D;X41是S或G; 以及X42是E或D。

[0098] 正如本文所使用的,术语“Atoh1”是指属于转录因子的碱性螺旋-环-螺旋(BHLH)家族的一种蛋白质(其参与形成哺乳动物内耳中的 毛细胞),和/或是具有本文所述的氨基酸序列或共有序列的蛋白质。

[0099] c-myc、Notch或Atoh1多肽可以与组合物组合使用,以增强生物 细胞摄取多肽。在某些实施方式中,Atoh1、c-myc或Notch多肽可进行突变以包括增强生物细胞摄取多肽的氨基酸序列。在某些实施方式 中,Atoh1、c-myc或Notch多肽可以经改变或突变而增加多肽(例如 c-myc、Notch或Atoh-1点突变体)的稳定性和/或活性。在某些实施方式中,c-myc、Notch或Atoh1多肽可以被改变,以增加多肽的核转位。在某些实施方式中,改变的c-myc、Notch或Atoh1多肽或c-myc、Notch 或Atoh1的生物活性片段保留了该物种中全长野生型各自的myc、Notch 或Atoh1蛋白质的生物活性的至少50%、60%、70%、80%、90%或95%, 该物种与由或将由本发明的方法和组合物处理的对象相同。

[0100] 在某些实施方式中,c-myc多肽序列与NP002458.2 (SEQ ID NO:1) 可以50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100% 相同。在某些实施方式中,Notch多肽序列与NP060087.3 (SEQ ID NO:2) 可以50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100% 相同。在某些实施方式中,Atoh1多肽序列与NP005163.1 (SEQ ID NO:3) 可以50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100% 相同。在某些实施方式中,由改性Atoh1、c-myc或Notch核酸序列和 Atoh1、c-myc或Notch多肽序列编码的介质具有至少部分的分子活性(例如,生物活性),该分子由相应的例如未修饰的、全长Atoh1、c-myc 或Notch核酸序列和Atoh1、c-myc或Notch多肽序列编码。例如,修 饰的Atoh1、c-myc或Notch核酸序列和修饰的Atoh1、c-myc或Notch 多肽编码的分子保留了50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、或100%的由相应的例如未修饰的Atoh1、c-myc、或Notch 核酸序列和/或全长Atoh1、c-myc或Notch多肽序列编码的分子活性(例 如生物学活性)。

[0101] 在某些实施方式中,本发明的c-myc蛋白质包含功能结构域,该 功能结构域与包括SEQ ID NO:1中第16-360位氨基酸残基的Myc-N结 构域、包括SEQ ID NO:1中第370-426位氨基酸残基的螺旋-环-螺旋结 构域、包括SEQ ID NO:1中第423-454位氨基酸残基的Myc亮氨酸拉 链和/或SEQ ID NO:1中周围和/或间插序列至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%相同。在某些实施方式中,本发 明的Notch蛋白质包含功能结构域,该功能结构域与包括SEQ ID NO:2 中第1754-2555位氨基酸残基的Notch胞内结构域至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%相同。在某些实施方式 中,本发明的Atoh1蛋白质包括功能结构域,该功能结构域与包括SEQ ID NO:3中第158-214位氨基酸的碱性螺旋-环-螺旋结构域、包括SEQ ID NO:3中第172-216位氨基酸的螺旋-环-螺旋结构域和/或SEQ ID NO:3 中周围和/或间插序列至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%相同。

[0102] 在某些实施方式中,本发明的c-myc和Notch蛋白质可以作为含 有c-myc和Notch(或其活性结构域)的单一蛋白质施用于细胞,优选 地通过可裂解连接肽分离。示例性的可裂解连接肽是本领域已知的(例 如,参见美国专利号5,258,498和美国专利号6,083,486)。

[0103] 在靶细胞和/或靶细胞的细胞核中对C-myc、Notch或Atoh1水平(例 如蛋白质水平)和/或活性(例如生物活性)可以用标准方法例如蛋白 质印迹、原位杂交、逆转录聚合酶

链式反应、免疫细胞化学、病毒滴度检测以及基因报道分析进行评估。通过比较第一细胞样品或标准品中c-myc、Notch或Atohl的水平和/或活性与第二细胞样品中c-myc、Notch或Atohl的水平和/或活性,可以评估靶细胞和/或靶细胞的细胞核中c-myc、Notch或Atohl水平(例如蛋白质水平)和/或活性(例如生物活性)的增加,例如,将细胞样品与一种预期药剂接触,以增加c-myc、Notch或Atohl的水平和/或活性。

[0104] 在本领域的技术范围之内,可通过各种方式来确定序列的同一性,例如,使用诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件等可公开获得的计算机软件进行序列比对并计算序列的同一性。美国国家生物技术信息中心 (NCBI) (网站ncbi.nlm.nih.gov) 可用的示例性软件程序包括blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx。本领域技术人员可以决定用于测量序列比对的合适参数,包括在被比较的全长序列上获得最大比对所需要的任何算法。柱形图、说明、序列对比、预期值(即,用于报告针对数据库序列的匹配的统计显著性阈值)、截止值、矩阵和筛选的搜索参数均使用默认设置。blastp、blastx、tblastn和tblastx使用的默认打分矩阵是BLOSUM62矩阵 (Henikoff et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919)。在一个方法中,同一性百分比可以使用blastp(可从NCBI获得的2.2.26版本)的默认参数确定。

[0105] (ii) 编码Atohl、c-myc或Notch的DNA

[0106] 使用本领域已知的一个或多个表达构建体,可以在靶细胞中表达Atohl、c-myc或Notch。这种表达构建体包括但不限于裸DNA、病毒和非病毒表达载体。可以在靶细胞中表达的示例性的c-myc核酸序列包括,例如,NCBI基因数据库中所引用的NM_002467.4 (SEQ ID NO:4)。可以在靶细胞中表达的示例性Notch核酸序列包括,例如,正如NCBI基因数据库中所引用的NM_017617.3 (SEQ ID NO:5)。可以在靶细胞中表达的示例性的Atohl核酸序列包括,例如,正如NCBI基因数据库中所引用的NM_005172.1 (SEQ ID NO:6)。

[0107] 在某些实施方式中,可以使用c-myc、Notch和Atohl家族成员。示例性的c-myc家族成员包括N-myc,在NCBI基因数据库中引用为NM_005378.4 (SEQ ID NO:13)。示例性的Notch家族成员包括Notch2,在NCBI基因数据库中引用为NM_024408.3 (SEQ ID NO:15); Notch3,在NCBI基因数据库中引用为NM_000435.2 (SEQ ID NO:17);和Notch4,在NCBI基因数据库中引用为NM_004557.3 (SEQ ID NO:19)。示例性的Atohl家族成员包括Atohl7,在NCBI基因数据库中引用为NM_145178.3 (SEQ ID NO:21)。

[0108] 在某些实施方式中,编码c-myc、Notch或Atohl的DNA可以是未修饰过的野生型序列。或者,编码c-myc、Notch或Atohl的DNA可以用标准技术修饰。例如,编码c-myc、Notch或Atohl的DNA可以被修饰或突变,例如,以提高DNA或所产生的多肽的稳定性。这类改变的DNA所产生的多肽应保持野生型c-myc、Notch或Atohl的生物活性。在某些实施方式中,编码Atohl、c-myc或Notch的DNA可被改变以增加所产生的多肽的核转位。在某些实施方式中,编码c-myc、Notch或Atohl的DNA可以使用标准分子生物学技术修饰以包括额外的DNA序列,该额外的DNA序列可以编码,例如,可检测的多肽、信号肽和蛋白酶切割位点中的一个或多个。

[0109] 在某些实施方式中,c-myc核酸序列与NM_002467.4 (SEQ ID NO:4) 可以50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100% 相同。在某些实施方式中,Notch核酸序列与NM_017617.3 (SEQ ID NO:5) 是50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、

99%或100% 相同。在某些实施方式中,Atohl核酸序列与NM_005172.1 (SEQ ID NO:6) 是50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%相同。

[0110] 在某些实施方式中,本发明的c-myc核酸序列包括功能域,该功能域与编码Myc-N结构域(含SEQ ID NO:1中第16-360位氨基酸残基) 和螺旋-环-螺旋结构域(含SEQ ID NO:1中第370-426位氨基酸残基) 的DNA、编码Myc亮氨酸拉链结构域(含SEQ ID NO:1中第423-454 位氨基酸残基)的DNA、和/或编码SEQ ID NO:1的周围和/或间插序列的DNA至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99% 或100%相同。在某些实施方式中,本发明的Notch核酸序列包括功能域,该功能域与编码Notch胞内结构域(含SEQ ID NO:2中第1754-2555 位氨基酸残基)的DNA至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%相同。在某些实施方式中,本发明的Atoh 1核酸序列包括功能域,该功能域与编码碱性螺旋-环-螺旋结构域(含SEQ ID NO:3中第158-214位氨基酸残基)的DNA、编码螺旋-环-螺旋结构域(含SEQ ID NO:3中第172-216位氨基酸残基)的DNA、和/或编码 SEQ ID NO:3的周围和/或间插序列的DNA至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%相同。

[0111] (iii) C-myc、Notch或Atohl途径调节剂

[0112] 在某些实施方式中,可以使用靶向c-myc或Notch、或c-myc或 Notch途径的一个或多个组分的化合物或组合物增加或减少c-myc或 Notch的水平(例如蛋白质水平)和/或活性(例如,生物学活性)。类似地,可以使用靶向Atohl或Atohl途径的一个或多个组分的化合物 增加Atohl的水平(例如蛋白质水平)和/或活性(例如生物学活性)。

[0113] 示例性的c-myc激活剂包括靶向FBXW-7的微小RNA(Ishikawa Y et al.,Oncogene 2012Jun 4;doi:10.1038/onc.2012.213)和增加c-myc表 达水平或活性的激活剂,例如去甲二氢愈创木酸(NDGA)(Park S et al.(2004) J.CELL BIOCHEM.91(5):973-86)、CD19 (Chung et a.l,(2012) J.CLIN.INVEST.122(6):2257-2266)、黏连蛋白质(McEwan et al.,(2012) PLoS ONE 7(11):e49160)、苔藓抑素1(Hu et al.(1993) LEUK. LYMPHOMA 10(1-2):135-42)、2'-3'-二甲基-4-氨基偶氮苯(邻-氨基偶 氮甲苯,0AT)(Smetanina et al.(2011) TOXICOL.APPL.PHARMACOL.255(1):76-85)、2-氨基-1-甲基-6- 苯基咪唑[4,5-b]吡啶(PhIP)(Lauber et al.(2004) CARCINOGENESIS 25(12):2509-17)、 β -雌二醇(美国专利号7,544,511B2)、RU38486 (美国专利号7,544,511B2)、地塞米松(美国专利号7,544,511B2)、甲状腺激素(美国专利号7,544,511B2)、类维生素A(美国专利号 7,544,511B2)、和蜕皮激素(美国专利号7,544,511B2)。

[0114] 示例性的c-myc抑制剂包括7-硝基-N-(2-苯基苯基)-2,1,3-苯并二 唑-4-胺(10074-G5)(Clausen DM et al.,(2010) J.PHARMACOL.EXP.THER.335(3):715-27)、硫代噻唑烷酮[Z-E]-5-[4- 乙基苯亚甲基]-2-硫代-1,3-噻唑烷-4-酮(10058-F4)(Clausen et al.(2010) J.PHARMACOL.EXP.THER.335(3):715-27;Lin CP et al.(2007) ANTICANCER DRUGS.18(2):161-70;Huang et al.(2006) EXP.HEMATOL.34(11):1480-9)、4-苯基丁酸(丁酸苯酯)(Engelhard et al.(1998) J.Neurooncol.37(2):97-108)、化合物0012(Hurley et al.(2010) J.VASC.RES.47(1):80-90)、姜黄素(Aggarwal et al.(2005) CLIN.CANCER RES.11(20):7490-8)、氢氧化镁(Mori et al.(1997) J.CELL BIOCHEM.SUPPL.27:35-41)、BP-1-102(Zhang et al.(2012)

PROC.NATL.ACAD.SCI.U.S.A.109(24):9623-8)、WP1193(Sai et al.(2012) J.NEURONCOL.107(3):487-501)、BP-1-107(Page et al.(2012) J.MED.CHEM.55(3):1047-55)、BP-1-108(Page et al.(2012) J.MED.CHEM.55(3):1047-55)、SF-1-087(Page et al.(2012) J.MED.CHEM.55(3):1047-55)、SF-1-088(Page et al.(2012) J.MED.CHEM.55(3):1047-55)、STX-0119(Ashizawa et al.(2011) INT.J.ONCOL.38(5):1245-52)、取代噻唑-4酮化合物(美国专利号7,872,027)、(Z,E)-5-(4-乙基亚苄基)-2-硫代噻唑烷-4-酮(10058-F4)(美国专利号7,026,343)、S2T1-6 OTD(美国公开号20120107317A1)、喹氟拉辛(Quarfloxin)(CX-3543)(美国公开号20120107317A1)、苯甲酰邻胺苯甲酸(美国公开号20120107317A1)、阳离子卟啉TMPyP4(美国公开号20120107317A1)、酪氨酸磷酸化抑制剂和酪氨酸磷酸化抑制剂类化合物(欧洲专利号EP2487156A1)、AG490(欧洲专利号EP2487156A1)、FBXW-7表达载体(Ishikawa Y et al., 同上)以及小干扰RNA(siRNA)靶向c-Myc转录本(Id.)。

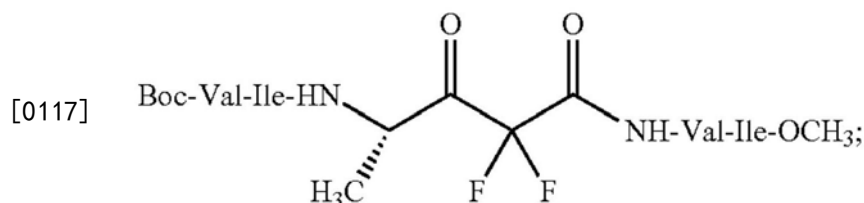
[0115] 示例性的Notch激活剂包括:微小RNA(miRNA),其靶向FBXW-7(Ishikawa Y et al., 同上)、AG-370,5(美国专利号8,114,422)、AG-1296(6,7-二甲氧基-3-苯基喹啉)(Id.)、尼日利亚菌素钠盐(Id.)、细胞松弛素D(Id.)和FCCP(羧基-4-(三氟甲氧基)-苯胺)(Id.)和SP60012(Id.);以及载体,其产生Jagged-1、Jagged-2、Jagged-3、Serrate、Jagged/Serrate蛋白质家族的任意成员、Delta、Delta-like-1、Delta-like-3、Delta-like-4、Delta-like homolog-1(DLK1)和Delta蛋白质家族的任意成员的蛋白质或分离蛋白质、以及这些蛋白中任一种的任意部分(PCT公布W02004090110A3)。示例性的Notch激活剂还可包括如丙戊酸(VPA,参见美国专利号8,114,422)、白梨芦醇和苯乙基异硫氰酸酯等化学激活剂。

[0116] 示例性的Notch抑制剂包括 γ -分泌酶抑制剂,如芳基磺酰胺、苯并二氮杂卓、L-685,458(美国专利公开号2001/0305674)、MK-0752(Purow B.(2012) ADV.EXP.MED.BIOL.727:305-19;Imbimbo BP(2008) CURR.TOP.MED.CHEM.8(1):54-61)、DAPT([N-(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酰基]-S-苯基甘氨酸叔丁酯)(Id.;Ishikawa Y et al., 同上;PCT公布W02011149762A3)、LY-374973(N-[N-(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酰基]-S-苯基甘氨酸叔丁酯)(PCT公布W02011149762A3)、N-[(3,5-二氟苯基)乙酰基]-L-丙氨酰基-2-苯基甘氨酸-1,1-二甲基乙酯(Id.);LillyGSIL685,458(Purow B, 同上)、化合物E((2S)-2-[[(3,5-二氟苯基)乙酰基]氨基]-N-[(3S)-1-甲基-2-氧代-5-苯基-2,3-二氢-1H-1,4-苯并二氮杂-3-基]丙酰胺)(Purow B, 同上)、DBZ(苯并二氮杂卓)(Purow B, 同上)、异香豆素(Purow B, 同上)、JLK6(7-氨基-4-氯-3-甲氧基异香豆素)(Purow B(2012) ADV.EXP.MED.BIOL.727:305-19)、化合物18([11-内]-N-(5,6,7,8,9,10-六氢-6,9-亚甲基苯并[9][8]轮烯-11-基)-噻吩-2-磺酰胺)(Purow B, 同上)、E2012(Imbimbo BP, 同上;PCT公布W02009005688A3)、MRK560(Imbimbo BP, 同上)、LY-411575(Imbimbo BP, 同上)、LY-450139(Imbimbo BP, 同上;PCT公布W02009005688A3)、 γ -分泌酶的抑制剂XII(PCT公布W02011149762A3;PCT公布W02009005688A3)、2,2-二甲基-N-((S)-6-氧代-6,7-二氢-5H-二苯并(b,d)氮杂-7-基)-N'-(2,2,3,3,3-五氟-丙基)-丙二酰胺(美国专利公开号20090181944A1)、GSI-IX(EP1949916B1)、GSI-X(EP1949916B1)、生育酚衍生物(PCT公布W02009040423A1)、[(2S)-2-[[(3,5-二氟苯基)乙酰基]氨基]-N-[(3S)-1-甲基-2-氧代-

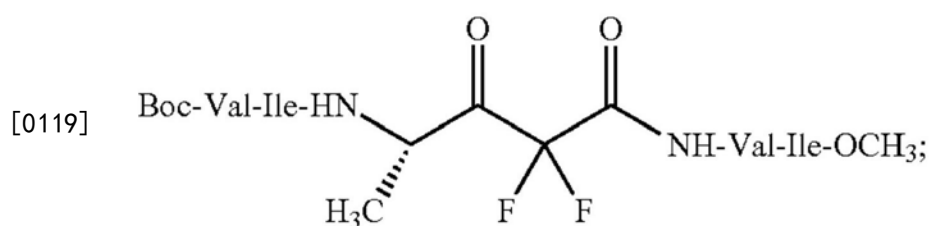
5-苯基-2,3-二氢-1H-1,4-苯并二氮杂卓-3-基]丙酰胺] (PCT公布W02009005688A3)、N-[N-(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酰基]-S-苯基甘氨酸叔丁酯(Id.)、[1,1'-联苯]-4-乙酸(Id.)、2-氟- α -甲基(Id.)、NGX-555(Id.)、LY-411575(Id.)、Cellzome(Id.)、2-噻吩磺酰胺(Id.)、5-氯-N-[(1S)-3,3,3-三氟-1-(羟甲基)-2-(三氟甲基)丙基](Id.)、NICS-15(Id.)、BMS(Id.)、CHF-5074(Id.)、BMS-299897(Imbimbo BP,同上)、R04929097;L-685458((5S)-(叔丁氧羰基氨基)-6-苯基-(4R)-羟基-(2R)-苄基己酰)-L-亮氨酸-L-苯丙氨酸酰胺);BMS-708163(阿加司他);BMS-299897(2-[(1R)-1-[(4-氯苯基)磺酰基](2,5-二氟苯基)氨基]乙基-5-氟苯丁酸);MK-0752;Y0-01027;MDL28170(Sigma);LY411575(N2((2S)-2-(3,5-二氟苯基)-2-羟基乙酰基)-N1-((7S)-5-甲基-6-氧代-6,7-二氢-5H-二苯并[b,d]氮杂-7-基)-1-丙氨酸酰胺,参见美国专利号6,541,466);LY411575的ELN-46719(2-羟基戊酸酰胺类似物(其中LY411575是3,5-二氟-扁桃酸酰胺)(美国专利号6,541,466));PF-03084014((S)-2-((S)-5,7-二氟-1,2,3,4-四氢萘-3-基氨基)-N-(1-(2-甲基-1-(新戊基氨基)丙烷-2-基)-1H-咪唑-4-基)戊酰胺(Samon et al.,MOL CANCER THER 2012;11:1565-1575);以及化合物E((2S)-2-[(3,5-二氟苯基)乙酰基]氨基)-N-[(3S)-1-甲基-2-氧代-5-苯基-2,3-二氢-1H-1,4-苯并二氮杂卓-3-基]丙酰胺;参见W0 98/28268and Samon et al.,MOL CANCER THER 2012;11:1565-1575;购自Alexis Biochemicals)),或其药学上可接受的盐。在某些实施方式中,合适的 γ -分泌酶抑制剂包括:司马西特(Semagacestat)(又称LY450139,(2S)-2-羟基-3-甲基-N-[(1S)-1-甲基-2-氧代-2-[(1S)-2,3,4,5-四氢-3-甲基-2-氧代-1H-3-苯并二氮杂卓-1-基]氨基]乙基]丁酰胺,购自Eli Lilly;W0 02/47671和美国专利号7,468,365);LY411575(N-2((2S)-2-(3,5-二氟苯基)-2-羟基乙酰基)-N1-((7S)-5-甲基-6-氧代-6,7-二氢-5H-二苯并[b,d]氮杂-7-基)-L-丙氨酸酰胺,购自Eli Lilly,Fauq et al.,(2007)BIOORG MED CHEM LETT 17:6392-5);贝加司他(begacestat)(又称GSI-953,美国专利号7,300,951);芳基磺酰胺(AS,Fuwa et al.,(2006)BIOORG MED CHEM LETT.16(16):4184-4189);N-[N-(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酰基]-S-苯基甘氨酸叔丁酯(DAPT,Shih et al.,(2007)CANCER RES.67:1879-1882);N-[N-3,5-二氟苯乙酰基]-L-丙氨酰基-S-苯基甘氨酸甲酯(又称DAPM, γ -分泌酶抑制剂XVI,购自EMD Millipore);化合物W(3,5-二(4-硝基苯氧基)苯甲酸,购自Tocris Bioscience);L-685,458((5S)-(叔丁基氧羰基氨基)-6-苯基-(4R)-羟基-(2R)-苄基己酰)-L-亮氨酸-L-苯丙氨酸酰胺,购自Sigma-Aldrich,Shearmen et al.,(2000)BIOCHEMISTRY 39,8698-8704);BMS-289948(4-氯-N-(2,5-二氟苯基)-N-((1R)-{4-氟-2-[3-(1H-咪唑-1-基)丙基]苯基}乙基)苯磺酰胺盐酸盐,购自Bristol Myers Squibb);BMS-299897(4-[2-((1R)-1-[(4-氯苯基)磺酰基]-2,5-二氟苯胺基)乙基]-5-氟苯基]丁酸,购自Bristol Myers Squibb,参见Zheng et al.,(2009)XENOBIOTICA 39(7):544-55);阿加司他(avagacestat)(又称BMS-708163,(R)-2-(4-氯-N-(2-氟-4-(1,2,4-恶二唑-3-基)苄基)苯磺酰氨基)-5,5,5-三氟戊酰胺,购自Bristol Myers Squibb,Albright et al.,(2013)JPHARMACOL.EXP.THER. 344(3):686-695);MK-0752(3-(4-((4-氯苯基)磺酰基)-4-(2,5-二氟苯基)环己基)丙酸,购自Merck);MRK-003((3'R,6R,9R)-5'-(2,2,2-三氟乙基)-2-((E)-3-(4-(三氟甲基)哌啶-1-基)1-丙烯-1-基)-5,6,7,8,9,10-六氢螺[6,9-甲桥苯并[8]轮烯-11,3'-[1,2,5]噻二唑烷]1',1'-二氧,购自Merck,Mizuma et al.,

(2012)MOL. CANCE. THER. 11 (9) :1999-2009) ; MRK-560 (N-[顺式-4-[(4-氯苯基)磺酰基]-4-(2,5-二氟苯基)环己基]-1,1,1-三氟-甲基磺酰胺, Best et.al., (2006) J. PHARMACOL. EXP. Ther. 317 (2) :786-90) ; RO-4929097 (又称R4733, (S)-2,2-二甲基-N1-(6-氧代-6,7-二氢-5H-二苯并[b,d]氮杂-7-基)-N3-(2,2,3,3,3-五氟丙基)丙二酰胺, 购自Hoffman-La Roche Inc., Tolcher et al., (2012) J. CLIN. ONCOL. 30 (19) :2348-2353) ; JLK6 (又称7-氨基-4-氯-3-甲氧基 异香豆素, 购自Santa Cruz Biotechnology, Inc., Petit et al., (2001) NAT. CELL. BIOL. 3:507-511) ; 他氟比尔 (Tarenflurbil) (又称 (R)-氟联苯丙酸, (2R)-2-(3-氟-4-苯基苯基)丙酸) ; ALX-260-127 (又称化合物11, 如Wolfe et al., (1998) J. MED. CHEM. 41:6中所述) ; 硫化舒林酸 (SSide, et al., (2003) J. BIOL. CHEM. 278 (20) :18664-70) ; 1,1,1-三氟-N-(4-[5-氟-2-(三氟甲基)苯基]-4-[[4(三氟甲基)苯基]磺酰基]环己基)甲基磺酰胺 (美国专利公开号20110275719) ; N-[反式-3-[(4-氯苯基)磺酰基]-3-(2,5-二氟苯基)环丁基]-1,1,1-三氟甲基磺酰胺 (美国专利公开号20110263580) ; N-[顺式-3-[(4-氯苯基)磺酰基]-3-(2,5-二氟苯基)环丁基]-1,1,1-三氟甲基磺酰胺 (美国专利公开号20110263580) ; N-[顺式-3-[(4-氯苯基)磺酰基]-3-(2-氰基-5-氟苯基)环丁基]-1,1,1-三氟甲基磺酰胺 (美国专利公开号20110263580) ; N-[顺式-3-[(4-氯苯基)磺酰基]-3-(2,5-二氟苯基)环丁基]-1,1,1-三氟甲基磺酰胺 (美国专利公开号20110263580) ; N-(顺式-3-(2,5-二氟苯基)-3-[[4-(三氟甲基)苯基]磺酰基]环丁基)-1,1,1-三氟甲基磺酰胺 (美国专利公开号20110263580) ; N-{顺式-3-(5-氯-2-氟苯基)-3-[(4-氯苯基)磺酰基]环丁基}-1,1,1-三氟甲基磺酰胺 (美国专利公开号20110263580) ; N-{顺式-3-(2,5-二氟苯基)-3-[(4-氟苯基)磺酰基]环丁基}-1,1,1-三氟甲基磺酰胺 (美国专利公开号20110263580) ; N-{顺式-3-(2,5-二氟苯基)-3-[(3,4-二氟苯基)磺酰基]环丁基}-1,1,1-三氟甲基磺酰胺 (美国专利公开号20110263580) ; N-[顺式-3-[(4-氰基苯基)磺酰基]-3-(2,5-二氟苯基)环丁基]-1,1,1-三氟甲基磺酰胺 (美国专利公开号20110263580) ; 4-[[顺式-3-[(4-氯苯基)磺酰基]-3-(2,5-二氟苯基)环丁基][三氟甲基]磺酰基]氨基丁酸 (美国专利公开号20110263580) ; N-[顺式-3-[(4-氯苯基)磺酰基]-3-(2,5-二氟苯基)环丁基]-1,1,1-三氟-N-[2-(四氢-2-吡喃-2-基氧基)乙基]甲基磺酰胺 (美国专利公开号20110263580) ; 甲基[[顺式-3-[(4-氯苯基)磺酰基]-3-(2,5-二氟苯基)环丁基][(三氟甲基)磺酰基]氨基]乙酸酯 (美国专利公开号20110263580) ; N-[3-[(4-氯苯基)磺酰基]-3-(2,5-二氟苯基)环丁基]-1,1,1-三氟-N-甲基甲基磺酰胺 (美国专利公开号20110263580) ; N-[3-[(4-氯苯基)磺酰基]-3-(2,5-二氟苯基)环丁基]-1,1,1-三氟-N-甲基甲基磺酰胺 (美国专利公开号20110263580) ; 甲基4-[[顺式-3-[(4-氯苯基)磺酰基]-3-(2,5-二氟苯基)环丁基][(三氟-甲基)磺酰基]氨基]丁酸酯 (美国专利公开号20110263580) ; N-[顺式-3-[(4-氯苯基)磺酰基]-3-(2,5-二氟苯基)环丁基]-N-[(三氟甲基)磺酰基]甘氨酸 (美国专利公开号20110263580) ; N-[顺式-3-[(4-氯苯基)磺酰基]-3-(2,5-二氟苯基)-1-甲基环丁基]-1,1,1-三氟甲基磺酰胺 (美国专利公开号20110263580) ; N-(顺式-3-(2,5-二氟苯基)-1-甲基-3-[[4-(三氟甲基)苯基]磺酰基]环丁基)-1,1,1-三氟甲基磺酰胺 (美国专利公开号20110263580) ; N-[顺式-3-[(4-氯苯基)磺酰基]-3-(2,5-二氟苯基)环丁基]-1,1,1-三氟-N-[(三氟甲基)磺酰基]甲基磺酰胺 (美国专利公开号20110263580) ; 顺式-3-[(4-氯苯基)磺酰基]-3-(2,5-二氟苯基)环丁基]

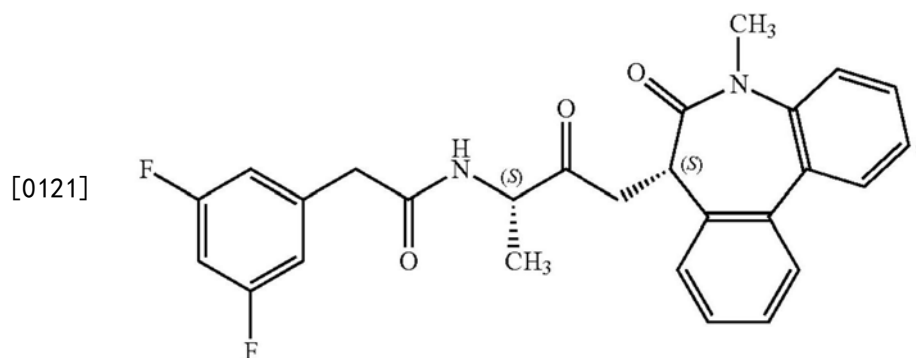
[(三 氟甲基)磺酰基]亚胺钠(美国专利公开号20110263580);[顺式-3-[(4- 氯苯基)磺酰基]-3-(2,5-二氟苯基)环丁基][(三氟甲基)磺酰基]亚胺钾(美国专利公开号20110263580);N-[顺式-3-[(4-三氟甲氧基苯基)磺酰基]-3-(2,5-二氟苯基)环丁基]-1,1,1-三氟甲基磺酰胺(美国专利公开号 20110263580);1,1,1-三氟-N-(4-[5-氟-2-(三氟甲基)苯基]-4-{[4-(三氟 甲基)苯基]磺酰基}环己基)甲基磺酰胺(美国专利公开号20110263580); γ -分泌酶抑制剂I(又称Z-Leu-Leu-Nle-CHO,苄氧 羰基-亮氨酰-亮氨酰-正亮氨酸,购自Calbiochem); γ -分泌酶抑制剂 II:



[0118] (MOL) (CDX) (购自Calbiochem); γ 分泌酶抑制剂III, (N- 苄氧羰基-亮氨酰-亮氨酸,购自Calbiochem); γ 分泌酶抑制剂IV, (N-(2- 萘酰)-缬氨酰-苯基丙氨酰,购自Calbiochem); γ -分泌酶抑制剂V(又 称Z-LF-CHO,N-苄氧羰基-亮氨酰-苯基丙氨酰,购自EMD Millipore); γ -分泌酶抑制剂VI(1-(S)-内-N-(1,3,3)-三甲基二环[2.2.1]庚-2-基)-4-氟 苯基磺酰胺,购自EMD Millipore); γ 分泌酶抑制剂VII, (又称化合物A,MOC-LL-CHO,薄荷氧羰基-LL-CHO,购自Calbiochem); γ 分泌酶抑制剂X, ({1S-苄基-4R-[1-(1S-氨基甲酰-2-苯乙基氨基甲 酰)-1S-3-甲基丁基氨基甲酰]-2R-羟基-5-苯基苯基}氨基甲酸叔丁基酯, 购自Calbiochem); γ 分泌酶抑制剂XI, (7-氨基-4-氯-3-甲氧基异香 豆素,购自Calbiochem); γ 分泌酶抑制剂XII, (又称Z-Ile-Leu-CHO, Shih and Wang, (2007) CANCER RES.67:1879-1882); γ 分泌酶抑制剂 XIII, (Z-Tyr-Ile-Leu-CHO,购自Calbiochem); γ 分泌酶抑制剂XIV, (Z-Cys(t-Bu)-Ile-Leu-CHO,购自Calbiochem); γ 分泌酶抑制剂XVII, (又称WPE-III-31C)、



[0120] (MOL) (CDX) (购自Calbiochem); γ 分泌酶抑制剂XIX, (又称苯并二氮杂卓,(2S,3R)-3-(3,4二氟苯基)-2-(4-氟苯基)-4-羟基 -N-((3S)-2-氧代-5-苯基-2,3-二氢-1H-苯并[e][1,4]二氮杂卓-3-基)-丁酰 胺,Churher et al., (2003) J MED CHEM.46(12):2275-8); γ 分泌酶抑制 剂XX, (又称苯并二氮杂卓,(S,S)-2-[2-(3,5-二氟苯基)乙酰氨基]-N-(5- 甲基-6-氧代-6,7-二氢-5H-二苯并[b,d]氮杂-7-基)丙酰胺,



[0122] (MOL) (CDX) (Weihofen et al., Science 296:2215-2218, 2002, 购自 Calbiochem); γ 分泌酶抑制剂 XXI, ((S,S)-2-[2-(3,5-二氟苯基)-乙酰氨基]-N-(1-甲基-2-氧代-5-苯基-2,3-二氢-1H-苯并[e][1,4]二氮杂卓-3-基)-丙酰胺, 购自 Calbiochem); 5-甲基-2-丙-2-基环己基-N-[4-甲基-1-[(4-甲基-1-氧代戊烷-2-基)氨基]-1-氧代戊烷-2-基]氨基甲酸酯 (购自 HDH Pharma Inc.); N-反式-3,5-二甲氧基肉桂酰-Ile-亮氨酸 (购自 Calbiochem); N-叔丁氧羰基-甘氨酸-缬氨酸-缬氨酸; 异戊酰基-VV-Sta-A-Sta-OCH₃ (购自 Calbiochem); 二乙基-(5-苯基-3H-氮杂-2-基)-胺 (美国专利号 8188069); 二乙基-(5-异丙基-3H-氮杂-2-基)-胺 (专利号 8188069); 二乙基-(4-苯基-3H-氮杂-2-基)-胺 (美国专利号 8188069); 二乙基-(6-苯基-3H-氮杂-2-基)-胺 (美国专利号 8188069); 5-苯基-1,3-二氢-氮杂-2-酮 (美国专利号 8188069); 5-异丙基-1,3-二氢-氮杂-2-酮 (美国专利号 8188069); 4-苯基-1,3-二氢-氮杂-2-酮 (美国专利号 8188069); 6-苯基-1,3-二氢-氮杂-2-酮 (美国专利号 8188069); 2-丁氧基-5-苯基-3H-氮杂卓 (美国专利号 8188069); 1-甲基-5-苯基-1,3-二氢-氮杂-2-酮 (美国专利号 8188069); 5-异丙基-1-甲基-1,3-二氢-氮杂-2-酮 (美国专利号 8188069); 1-甲基-4-苯基-1,3-二氢-氮杂-2-酮 (美国专利号 8188069); 1-甲基-6-苯基-1,3-二氢-氮杂-2-酮 (美国专利号 8188069); 1-甲基-5-苯基-1H-氮杂卓-2,3-二酮-3-肟 (美国专利号 8188069); 5-异丙基-1-甲基-1H-氮杂卓-2,3-二酮-3-肟 (美国专利号 8188069); 1-甲基-6-苯基-1H-氮杂卓-2,3-二酮-3-肟 (美国专利号 8188069); 1-甲基-4-苯基-1H-氮杂卓-2,3-二酮-3-肟 (美国专利号 8188069); 3-氨基-1-甲基-5-苯基-1,3-二氢-氮杂-2-酮 (美国专利号 8188069); 3-氨基-5-异丙基-1-甲基-1,3-二氢-氮杂-2-酮 (美国专利号 8188069); 3-氨基-1-甲基-4-苯基-1,3-二氢-氮杂-2-酮 (美国专利号 8188069); 3-氨基-1-甲基-6-苯基-1,3-二氢-氮杂-2-酮 (美国专利号 8188069); (S)-[1-(1-甲基-2-氧代-5-苯基-2,3-二氢-1H-氮杂-3-基氨基甲酰)-乙基]-氨基甲酸叔丁酯 (美国专利号 8188069); [(S)-1-(5-异丙基-1-甲基-2-氧代-2,3-二氢-1H-氮杂-3-基氨基甲酰)-乙基]氨基甲酸叔丁酯 (美国专利号 8188069); [(S)-1-(1-甲基-2-氧代-4-苯基-2,3-二氢-1H-氮杂-3-基氨基甲酰)-乙基]氨基甲酸叔丁酯 (美国专利号 8188069); [(S)-1-(1-甲基-2-氧代-6-苯基-2,3-二氢-1H-氮杂-3-基氨基甲酰)-乙基]-氨基甲酸叔丁酯 (美国专利号 8188069); (S)-2-氨基-N-(1-甲基-2-氧代-5-苯基-2,3-二氢-1H-氮杂-3-基)-丙酰胺 (美国专利号 8188069); (S)-2-氨基-N-(5-异丙基-1-甲基-2-氧代-2,3-二氢-1H-氮杂-3-基)丙酰胺 (美国专利号 8188069); (S)-2-氨基-N-(1-甲基-2-氧代-6-苯基-2,3-二氢-1H-氮杂-3-基)丙酰胺盐酸盐 (美国专利号 8188069); (S)-2-氨基-N-(1-甲基-2-氧代-4-苯基-2,3-二氢-1H-氮杂-3-基)丙酰胺盐酸盐 (美国专利号

8188069); (S)-2-氟-3-甲基-丁酸(美国专利号8188069); (S)-2-羟基-3-甲基-N-[(S)-1-((S)-1-甲基-2-氧代-5-苯基-2,3-二氢-1H-氮杂-3-基氨基甲酰)-乙基]-丁酰胺(美国专利号8188069); (S)-2-氟-3-甲基-N-[(S)-1-(1-甲基-2-氧代-5-苯基-2,3-二氢-1H-氮杂-3-基氨基甲酰)-乙基]-丁酰胺(美国专利号8188069); (S)-2-羟基-N-[(S)-1-(5-异丙基-1-甲基-2-氧代-2,3-二氢-1H-氮杂-3-基氨基甲酰)乙基]-3-甲基-丁酰胺(美国专利号8188069); (S)-2-羟基-3-甲基-N-[(S)-1-(1-甲基-2-氧代-4-苯基-2,3-二氢-1H-氮杂-3-基氨基甲酰)-乙基]-丁酰胺(美国专利号8188069); (S)-2-羟基-3-甲基-N-[(S)-1-(1-甲基-2-氧代-6-苯基-2,3-二氢-1H-氮杂-3-基氨基甲酰)-乙基]-丁酰胺(美国专利号8188069); 以及 (S)-2-氟-3-甲基-N-[(S)-1-(1-甲基-2-氧代-6-苯基-2,3-二氢-1H-氮杂-3-基氨基甲酰)-乙基]-丁酰胺(美国专利号8188069) 及其药学上可接受的盐。

[0123] 美国专利申请公开号2004/0029862、2004/0049038、2004/0186147、2005/0215602、2005/0182111、2005/0182109、2005/0143369、2005/0119293、2007/0190046、2008/008316、2010/0197660和2011/0020232; 美国专利号6,756,511、6,890,956、6,98,626、7,049,296、7,101,895、7,138,400、7,144,910、7,183,303、8,188,069; 以及国际公开号W01998/28268、W02001/70677、W02002/049038、W02004/186147、W02003/093253、W02003/093251、W02003/093252、W02003/093264、W02005/030731、W02005/014553、W02004/039800、W02004/039370、W02009/023453、EP 1720909、EP 2178844、EP2244713中公开了 γ -分泌酶抑制剂的其他实施方式。

[0124] 其他示例性的Notch抑制剂包括非甾体抗炎药(NSAID), 如氟比洛芬(Purow B, 同上)、MPC-7869(Imbimbo BP, 同上)、布洛芬(Id.)、硫化舒林酸、吲哚美辛、 α -分泌酶抑制剂(ASIs)(Purow B, 同上)、Na⁺/H⁺逆向转运莫能菌素(Id.); 阻止Notch与诸如Jagged、Numb、Numb-like、CBF1转录因子和mastermind-like(MAML)等互作蛋白质结合的小分子(Id.; Ishikawa Y et al., 同上); 与Notch蛋白质或诸如Delta-Like-4等Notch配体结合的抗体(Purow B, 同上); 与诸如SAHM1等Notch蛋白质结合的肽(Id.); 显性失活形式的基因, 例如MAML(Id.; Ishikawa Y et al., 同上)、Numb/Numb-Like(Purow B, 同上)和FBXW-7(Id.); 增加如FBXW-7等Notch调节剂水平的表达载体(Id.; Ishikawa Y et al., 同上); 靶向Notch转录本的siRNA(Purow B, 同上); 微小RNA, 例如miR-326、miR-34a、microRNA-206和miR-124(Id.); 以及Notch抗体(美国专利号58,226,943, 美国公开号20090258026A2, PCT公布W02012080926A2)。

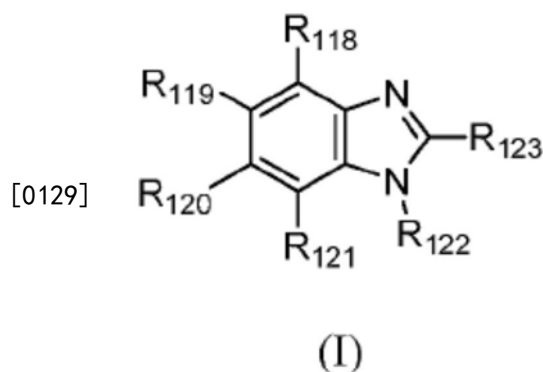
[0125] 示例性的Atoh1激活剂包括, 例如, β -连环蛋白质或 β -连环蛋白质途径激动剂, 例如Wnt配体、DSH/DVL1、2、3、LRP68N、WNT3A、WNT5A、和WNT3A、5A。本领域综述了其他Wnt/ β -连环蛋白质途径激活剂和抑制剂(Moon et al., Nature Reviews Genetics, 5:689-699, 2004)。在一些实施方式中, 合适的Wnt/ β -连环蛋白质途径激动剂可包括抗体及其抗原结合片段、和特异性结合受体的卷曲蛋白质(Fzd)家族的肽。

[0126] 激酶抑制剂, 例如, 酪蛋白激酶1(CK1)和糖元合酶激酶3 β (GSK3 β)抑制剂也可以作为 β -连环蛋白质或 β -连环蛋白质途径激动剂, 以激活Atoh1。GSK3 β 抑制剂包括, 但不限于, 氯化锂(LiCl)、Purvalanol A、奥罗莫星、阿特波龙、kenpauillone、苄基-2-甲基-1,2,4-噻二唑烷-3,5-二酮(TDZD-8)、2-硫代(3-碘苄基)-5-(1-吡啶基)-[1,3,4]-二唑(GSK3抑制剂II)、2,4-二苄基-5-氧代噻二唑烷-3-硫酮(OTDZT)、(2'Z,3'E)-6-溴靛玉红-3'-脞

(BIO)、二溴苯乙酮-4(即, Tau蛋白激酶1 (TPK1) 抑制剂)、2-氯-1-(4,5-二溴-噻吩-2-基)-乙酮、N-(4-甲氧苄基)-N-(5-硝基-1,3-噻唑-2-基) 脲 (AR-A014418) 和靛玉红 (indirubins) (例如靛玉红-5-磺酰胺; 靛玉红-5-磺酸(2-羟基乙基)-酰胺靛玉红-3'-单肟; 5-碘-靛玉红-3'-单肟; 5-氟代靛玉红; 5,5'-二氟代靛玉红; 5-硝基靛玉红; 5-氯代靛玉红; 5-甲基靛玉红, 5-溴靛玉红)、4-苄基-2-甲基-1,2,4-噻二唑烷-3,5-二酮 (TDZD-8)、2-硫代(3-碘苄基)-5-(1-吡啶基)-[1,3,4]-二唑 (GSK3抑制剂II)、2,4-二苄基-5-氧代噻二唑烷-3-硫酮 (OTDZT), (2'Z,3'E)-6-溴靛玉红-3'-肟 (BIO)、 α -4-(4-二溴苯乙酮(即, Tau蛋白激酶1 (TPK1) 抑制剂)、2-氯-1-(4,5-二溴-噻吩-2-基)-乙酮、(vi) N-(4-甲氧苄基)-N-(5-硝基-1,3-噻唑-2-基) 脲 (AR-A014418) 和H-KEAPPAPPQSpP-NH₂ (L803) 或其细胞渗透衍生物Myr-N-GKEAPPAPPQSpP-NH₂ (L803-mts)。美国专利号 256,417,185; 6,489,344; 和6,608,063公开了其他的GSK3 β 抑制剂。在一些实施方式中,合适的激酶抑制剂可包括被设计成降低GSK3 β 和/或CK1蛋白质水平的RNAi和siRNA。在一些实施方式中,有用的激酶抑制剂包括FGF途径抑制剂。在一些实施方式中,FGF途径抑制剂包括,例如,SU5402。

[0127] 如Ahmed et al. (2012) Dev. Cell 22 (2):377-390中所述,其他的 Atohl激活剂包括 γ 分泌酶抑制剂(例如,除了以上列出的Notch抑制剂之外,芳基磺酰胺、二苯并氮杂类、苯并二氮杂、N-[N-(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酰基]-(S)-苯基甘氨酸叔丁酯 (DAPT; EMD Biosciences, San Diego, CA, USA)、L-685,458或MK0752ho)、庆大霉素以及转录因子Eya1和Six1 (任选Sox2) 的组合。

[0128] 美国专利号8,188,131中描述了其他Atohl激活剂,包括;式I代表的化合物:



[0130] 其中:

[0131] R₁₁₈、R₁₁₉、R₁₂₀和R₁₂₁中的每一个独立地选自H、卤素、OH、CN、NO₂、C₁-C₃烷基、C₁-C₃卤代烷基、C₁-C₃烷氧基和C₁-C₃卤代烷氧基;

[0132] R₁₂₂是氢或-Z-Ra; 其中:

[0133] Z为O或化学键; 和

[0134] Ra是:

[0135] (i) C₁-C₆烷基或C₁-C₆卤代烷基, 它们中的每一个均任选被1-3R_b取代; 或

[0136] (ii) C₃-C₁₀环烷基、C₃-C₁₀环烯基, 它们中的每一个任选被1-5R_c取代基取代; 或

[0137] (iii) C₇-C₁₁芳烷基、或含有6-11个原子的杂芳烷基, 它们中的每一个任选被1-5R_c取代;

[0138] (iv) C₆-C₁₀芳基或含有5-10个原子的杂芳基, 它们中的每一个均任选被1-5R_d取代;

[0139] R123是:

[0140] (i) 氢;或

[0141] (ii) C1-C6烷基或

[0142] C1-C6卤代烷基,它们中的每一个均任选被1-3Rb取代;或

[0143] (iii) C6-C10芳基或含有5-10个原子的杂芳基,它们中的每一个 均任选被1-5Rd取代;或

[0144] (iv) C7-C11芳烷基、或含有6-11个原子的杂芳烷基,它们中的 每一个任选被1-5Rc取代;或

[0145] (v) -(C1-C6烷基-Z1-(C6-C10芳基)),其中Z1是O、S、NH或 N(CH₃);烷基部分任选地被1-3Rb取代;且芳基部分任选地被1-5Rd 取代;或

[0146] (vi) -(C1-C6烷基)-Z2-(含有5-10个原子的杂芳基),其中Z2 是O、S、NH或N(CH₃);烷基部分任选地被1-3Rb取代;以及杂芳 基部分任选地被1-5Rd取代;或

[0147] (vii) -(C1-C6烷基)-Z3-(C3-C10环烷基),其中Z3是O、S、NH 或N(CH₃);烷基部分任选地被1-3Rb取代;且环烷基部分任选地被 1-5Rc取代;

[0148] 在每一种情况下,Rb独立地为:

[0149] (i) NH₂;NH(C1-C3烷基);N(C1-C3烷基)₂;羟基;C1-C6烷 氧基或C1-C6卤素烷氧基;或

[0150] (ii) C3-C7环烷基任选地被独立地选自C1-C6烷基的1-3个取代 基取代,NH₂;NH(C1-C3烷基);N(C1-C3烷基)₂;羟基;C1-C6烷氧 基或C1-C6卤素烷氧基;

[0151] 在每一种情况下,Rc独立地为:

[0152] (i) 卤素;NH₂;NH(C1-C3烷基);N(C1-C3烷基)₂;羟基;C1-C6 烷氧基;C1-C6卤素烷氧基;或氧代基;或

[0153] (ii) C1-C6烷基或C1-C6卤素烷基;以及

[0154] 在每一种情况下,Rd独立地为:

[0155] (i) 卤素;NH₂;NH(C1-C3烷基);N(C1-C3烷基)₂;羟基;C1-C6 烷氧基或C1-C6卤素烷氧基;硝基;-NHC(O)(C1-C3烷基);或氰基;或

[0156] (ii) C1-C6烷基或C1-C6卤素烷基;或其药学上可接受的盐。

[0157] 美国专利号8,188,131描述的其他示例性Atohl激活剂包括4-(4- 氯苯基)-1-(5H-嘧啶并[5,4-b]吡啶-4-基)-1H-吡啶-3-胺;6-氯-1-(2-氯苄氧基)-2-苯基-1H-苯并[d]咪唑;6-氯-1-(2-氯苄氧基)-2-(4-甲氧基苯基)-1H- 苯并[d]咪唑;6-氯-2-(4-甲氧基苯基)-1-(4-甲基苄氧基)-1H-苯并[d]咪 唑;6-氯-1-(3,5-二甲基苄氧基)-2-(4-甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑;6- 氯-1-(4-甲氧基苄氧基)-2-(4-甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪 唑;1-(4-甲基苄 氧基)-6-硝基-2-苯基-1H-苯并[d]咪唑;4-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯 酚;2,5-二氯-N-((1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)甲基)苯胺;4-(2-(1-甲基-1H- 苯并[d]咪唑-2-基)乙基)苯胺;2-((2-甲氧基苯氧基)甲基)-1H-苯并[d]咪 唑;2-((4-氟苯氧基)甲基)-1-甲基-1H-苯并[d]咪唑;2-(苯硫甲基)-1H-苯 并[d]咪唑;3-(6-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-2H-苯并吡喃-2-亚胺;N-(2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯基)异丁酰胺;2-(邻-甲苄氧基甲基)-1H- 苯并[d]咪唑;2-(4-甲氧基苯基)-1-苯乙基-1H-苯并[d]咪唑;N-(6-溴苯并[d]噻唑-2-基)噻吩-2-甲酰胺;N-(苯并[d]噻唑-2-基)-1-甲基-1H-吡啶-5-

甲酰胺;2-(4-氟苄基硫代)苯并[d]噻唑;5-氯-N-甲基苯并[d]噻唑-2-胺;N-(6-乙酰胺基苯并[d]噻唑-2-基)呋喃-2-甲酰胺;N-(6-氟苯并[d]噻唑-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺;2-(苯并[d]恶唑-2-基硫代)-N-(2-氯苯基)乙酰胺;5-氯-2-苯基苯并[d]恶唑;5-甲基-2-间-甲苯基苯并[d]恶唑;2-(4-异丁氧基苯基)-3-(萘-2-基)-2,3-二氢喹啉-4(1H)-酮;N-(2-(2-(4-氟苯基)-2-氧代乙硫基)-4-氧代喹啉-3(4H)-基)苯甲酰胺;2-(4-氯苯基)-4-(4-甲氧基苯基)-1,4-二氢苯并[4,5]咪唑并[1,2-a]嘧啶;2-(3-吡啶基)-4-(4-溴苯基)-1,4-二氢苯并[4,5]咪唑并[1,2-a]嘧啶;N-仲丁基-1,7,7-三甲基-9-氧代-8,9-二氢-7H-氟[3,2-f]苯并吡喃-2-甲酰胺;N-(3-氨基甲酰-5,6-二氢-4H-环戊醇[b]噻吩-2-基)苯并呋喃-2-甲酰胺;3-氯-N-(5-氯吡啶-2-基)苯并[b]噻吩-2-甲酰胺;3-氯-N-((四氢呋喃-2-基)甲基)苯并[b]噻吩-2-甲酰胺;N-(3-(5-氯-3-甲基苯并[b]噻吩-2-基)-1H-吡唑-5-基)乙酰胺;2-(萘-2-基)-1H-吡啶;2-(吡啶-2-基)-1H-吡啶;N-(2-氯苯基)-2-(1H-吡啶-3-基)-2-氧代乙酰胺;2-间-甲苯基喹啉;2-(4-(2-甲氧基苯基)哌嗪-1-基)喹诺酮;2-(1H-苯并[d][1,2,3]三唑-1-基)-N-(2,3-二氢-1H-茛-2-基)乙酰胺;1-苯乙基-1H-苯并[d][1,2,3]三唑;7-(4-氟苄氧基)-2H-苯并吡喃-2-酮;N-(2,4-二氯苯基)-8-甲氧基-2H-苯并吡喃-3-甲酰胺;N-(3-氯苯基)-8-甲基-3,4-二氢喹啉-1(2H)-甲硫代酰胺;7-甲氧基-5-甲基-2-苯基-4H-苯并吡喃-4-酮;2-(3,4-二甲基苯基)喹啉;4-溴-N-(5-氯吡啶-2-基)苯甲酰胺;3-氨基-6,7,8,9-四氢-5H-环庚[e]噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酰胺;(Z)-3-甲基-N'-(烟酰氧基)苯甲酰胺;N,N-二乙基-6-甲氧基噻吩并[2,3-b]喹啉-2-甲酰胺;6-(4-甲氧基苯基)-1,2,3,4-四氢-1,5-萘啶;5-溴-N-(2-(苯基硫代)乙基)烟酰胺;N-(6-甲基吡啶-2-基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二恶英-6-甲酰胺;2-(4-甲基苄基硫基)恶唑并[4,5-b]吡啶;N-(2-甲氧基乙基)-5-p-甲苯基嘧啶-2-胺;4-(5-(苯并[b]噻吩-2-基)嘧啶-2-基)吗啉;4-(5-(4-氟苯基)嘧啶-2-基)吗啉;N-(4-溴-3-甲基苯基)喹啉-4-胺;N-(4-甲氧基苯基)喹啉-4-胺;N-(3-甲氧基苯基)-9H-嘌呤-6-胺;N,N-二乙基-1-间-甲苯基-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺;(5-(4-溴苯基)呋喃-2-基)(吗啉)甲酮;(Z)-4-溴-N'-(呋喃-2-羰氧基)苯甲酰胺;N-(4-碘代苯基)呋喃-2-甲酰胺;5-(5-(2,4-二氟苯基)呋喃-2-基)-1-(甲基磺酰)-1H-吡唑;1-(3-氨基-5-(4-叔丁苯基)噻吩-2-基)乙酮;N-(3-氰基-4,5,6,7-四氢苯并[b]噻吩-2-基)-2-氟苯甲酰胺;N-(5-氯吡啶-2-基)噻吩-2-甲酰胺;N-(2-(4-氟苯氧基)乙基)噻吩-2-甲酰胺;2,5-二甲基-N-苯基-1-(噻吩-2-基甲基)-1H-吡咯-3-甲酰胺;N-(3-氰基噻吩-2-基)-4-异丙氧基苯甲酰胺;2-(4-甲氧基苯氧基)-N-(噻唑-2-基)乙酰胺;4-(4-甲氧基苯基)-N-(3-甲基吡啶-2-基)噻唑-2-胺;4-(bi苯基-4-基)噻唑-2-胺;4-(4-(4-甲氧基苯基)噻唑-2-基)-3-甲基异恶唑-5-胺;N-(2-甲氧基苯基)-4-苯基噻唑-2-胺;1-(4-氨基-2-(间-甲苯基氨基)噻唑-5-基)-2-甲基丙烷-1-酮;4-(4-氯苯基)-1-(5H-嘧啶并[5,4-b]吡啶-4-基)-1H-吡唑-3-胺;2-(4-氯苯基)-6-乙基-5-甲基吡唑并[1,5-a]嘧啶-7(4H)-酮;5-甲氧基-2-(5-苯基-1H-吡唑-3-基)苯酚;(3-(4-溴苯基)-1-苯基-1H-吡唑-4-基)甲醇;N-(2,5-二氯苯基)-1-乙基-1H-吡唑-3-甲酰胺;4-氯-1-甲基-N-(2-氧代-2-苯基乙基)-1H-吡唑-3-甲酰胺;N-(3-(5-叔丁基-2-甲基呋喃-3-基)-1H-吡唑-5-基)苯甲酰胺;N-(5-甲基异恶唑-3-基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-甲酰胺;(5-(4-溴苯基)异恶唑-3-基)(吗啉)甲酮;N-(4-溴苯基)-5-异丙基异恶唑-3-甲酰胺;5-((4-氯-2-甲基苯氧基)甲基)-3-(吡啶-4-基)-1,2,4-恶二唑;5-(2-甲氧

基苯基)-3-p-甲苯基-1,2,4-恶二唑;5-(苯氧基甲基)-3-(吡啶-3-基)-1,2,4-恶二唑;5-(2-氯-4-甲基苯基)-3-(吡啶-3-基)-1,2,4-恶二唑;3-(2-氯苯基)-5-p-甲苯基-1,2,4-恶二唑;5-(哌啶-1-基甲基)-3-对甲苯基-1,2,4-恶二唑;5-(4-溴苯基)-3-(吡啶-3-基)-1,2,4-恶二唑;5-(2-溴苯基)-3-(4-溴苯基)-1,2,4-恶二唑;5-(2-溴-5-甲氧基苯基)-3-(硫代苯基-2-基)-1,2,4-恶二唑;3-(2-氟苯基)-N-(3-(哌啶-1-基)丙基)-1,2,4-恶二唑-5-胺;2-(2-氯苯并基)-N-(4-氟苯基)肼基硫代甲酰胺;2-(甲基氨基)-N-苯乙基苯甲酰胺;4-叔丁基-N-((四氢呋喃-2-基)甲基)苯甲酰胺;2-苯基-5-邻-甲苯基-1,3,4-恶二唑;4-(3-(4-氯苯基)-4,5-二氢-1H-1,2,4-三唑-5-基)-N,N-二甲基苯胺;7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-1,10b-二氢螺[苯并[e]吡啶并[1,5-c][1,3]恶嗪-5,1'-环己烷];6-氧代-2-(4-(3-(三氟甲基)苯氧基)苯基)-1,4,5,6-四氢吡啶-3-甲腈;6-(4-甲氧基苯基)咪唑并[2,1-b]噻唑;2-(2-溴苯氧基)-N-(4H-1,2,4-三唑-3-基)乙酰胺;1-(吡啶-1-基)-2-苯氧基乙酮;2-(4-氯苯基)-6,7,8,9-四氢苯并[e]咪唑并[1,2-b][1,2,4]三嗪;及其药学上可接受的盐。

[0158] 2.用于调节c-myc、Notch和Atohl的药剂的递送

[0159] 蛋白质、激活剂和抑制剂的递送

[0160] c-myc、Notch或Atohl活性调节剂的递送方法部分依赖于毛细胞或支持细胞是否在体内或离体情况下与所关注的药剂接触。在体内方法中,药剂被递送至哺乳动物的内耳中。在离体方法中,药剂与离体细胞接触。最终使用本领域已知和使用过的技术,可以将毛细胞移植入受试者的内耳。

[0161] 在某些实施方式中,通过在受试者的内耳施用c-myc蛋白质或c-myc激活剂增加c-myc活性,以得出,例如,最终浓度为大于约30 μ M,例如,范围为约30 μ M至约1000 μ M。在某些实施方式中,c-myc蛋白质或c-myc激活剂可以施用足够的量以得出最终浓度为大于约30 μ M。例如,c-myc蛋白质或c-myc激活剂可以施用足够的量以得出最终浓度为约30 μ M至约1000 μ M,50 μ M至约1000 μ M、80 μ M至约1000 μ M、约100 μ M至约1000 μ M、约150 μ M至约1000 μ M、约200 μ M至约800 μ M或约200 μ M至约600 μ M。

[0162] 在其他实施方式中,可向哺乳动物的内耳局部施用的c-myc蛋白质或c-myc激活剂的施用剂量约0.025mg至约4mg、约0.035mg至约2mg、约0.05mg至约2mg、约0.1mg至约2mg、约0.2mg至约1mg、或者约0.2至约0.8mg。在一个实施方式中,局部施用0.5mg的c-myc蛋白质或c-myc激活剂至内耳。在某些其他实施方式中,可以局部施用约0.05mg至约2mg、约0.2mg至约2mg、约0.05mg至约1.5mg、约0.15mg至约1.5mg、约0.4mg至约1mg或约0.5mg至约0.8mg的c-myc蛋白质或c-myc激活剂至哺乳动物内的内耳。

[0163] 在某些实施方式中,通过施用Notch蛋白质、NICD蛋白质或Notch激活剂至受试者的内耳增加Notch的活性,以得出最终浓度为大于约30 μ M,例如,范围为约30 μ M至约1000 μ M。在某些实施方式中,可以施用足够量的Notch蛋白质、NICD蛋白质或Notch激活剂以得出最终浓度为大于约30 μ M。例如,可以施用足够量的Notch蛋白质、NICD蛋白质或Notch激活剂以得出最终浓度为约30 μ M至约1000 μ M、5 μ M至约1000 μ M、80 μ M至约1000 μ M、约100 μ M至约1000 μ M、约150至约1000 μ M、约200 μ M至约800 μ M、或约200 μ M至约600 μ M。

[0164] 在其他实施方式中,可向哺乳动物的内耳局部施用的Notch蛋白质、NICD蛋白质或Notch蛋白质激活剂的施用剂量约0.025mg至约4mg、约0.035mg至约2mg、约0.05mg至约

2mg、约0.1mg至约2mg、约0.2mg至约1mg、或者约0.2mg至约0.8mg。在一个实施方式中，局部施用0.5mgNotch蛋白质、NICD蛋白质或Notch激活剂到哺乳动物内耳。在某些其他实施方式中，可以局部施用约0.05mg至约2mg、约0.2mg至约2mg、约0.05mg至约1.5mg、约0.15mg至约1.5mg、约0.4mg至约1mg、或约0.5mg至约0.8mg的Notch蛋白质、NICD30蛋白质或Notch激活剂到哺乳动物的内耳。

[0165] 在某些实施方式中，在进行细胞增殖之后，通过施用Notch抑制剂抑制Notch活性。可以施用一种Notch抑制剂以得出最终浓度为大于约30 μ M，例如，范围为30 μ M至约1000 μ M。在某些实施方式中，可以施用足够量的Notch抑制剂以得出最终浓度为大于约30 μ M。例如，可以施用足够量的Notch抑制剂以得出最终浓度为约30 μ M至约1000 μ M、50 μ M至约1000 μ M、80 μ M至约1000 μ M、约100 μ M至约1000 μ M、约150至约1000 μ M、约200 μ M至1000 μ M、或约200 μ M至约600 μ M。在某些实施方式中，施用足够量的Notch抑制剂以得出最终浓度为约400 μ M。

[0166] 在其他实施方式中，可向哺乳动物的内耳局部施用的Notch抑制剂的施用剂量为约0.025至约4mg、约0.035至约2mg、约0.05mg至约2mg、约0.1mg至约2mg、约0.2mg至约1mg、或约0.2mg至约0.8mg。在一个实施方式中，局部施用0.5mg的Notch抑制剂到哺乳动物的内耳。在某些其他实施方式中，可以局部施用约0.05mg至约2mg、约0.2mg至约2mg、约0.05mg至约1.5mg、约0.15mg至约1.5mg、约0.4mg至约1mg、或约0.5mg至约0.8mg的Notch抑制剂到哺乳动物的内耳。在一些实施方式中，局部施用约0.7mgNotch抑制剂到哺乳动物的内耳。

[0167] 在某些实施方式中，通过在受试者的内耳中施用Atoh1蛋白质或Atoh1激活剂增加Atoh1活性，以得出，例如，最终浓度为大于约30 μ M，例如，范围为约30 μ M至约1000 μ M。在某些实施方式中，可以施用足够量的Atoh1蛋白质或Atoh1激活剂以得出最终浓度为大于约30 μ M。例如，可以施用足够量的Atoh1蛋白质或Atoh1激活剂以得出最终浓度为约30 μ M至约1000 μ M、50 μ M至约1000 μ M、80 μ M至约1000 μ M、约100 μ M至约1000 μ M、约150 μ M至约1000 μ M、约200 μ M至约800 μ M、或约200 μ M至约600 μ M。

[0168] 在其他实施方式中，可向哺乳动物的内耳局部施用的Atoh1蛋白质或Atoh1激活剂的施用剂量为约0.025mg至约4mg、约0.035mg至约2mg、约0.05mg至约2mg、约0.1mg至约1mg、约0.2mg至约1mg、或约0.2至约0.8mg。在一个实施方式中，局部施用0.5mgAtoh1蛋白质或Atoh1激活剂到哺乳动物的内耳。在某些其他实施方式中，可以局部施用约0.05mg至约2mg、约0.2mg至约2mg、约0.05mg至约1.5mg、约0.15mg至约1.5mg、约0.4mg至约1mg或约0.5mg至约0.8mg的Atoh1蛋白质或Atoh1激活剂到哺乳动物的内耳。

[0169] DNA的递送

[0170] 在一些方面，使用本领域已知的表达构建体（例如，裸DNA构建体、基于DNA载体的构建体和/或病毒载体和/或基于病毒的构建体）以表达编码所需c-myc、Notch或Atoh1蛋白质的核酸，可以提高靶细胞中c-myc、Notch或Atoh1的活性。在某些实施方式中，表达c-myc和Notch或NICD为两个分离的基因的单个DNA构建体可以被递送到所述对象的内耳。在某些实施方式中，表达c-myc和Notch或NICD和Atoh1作为三个分离的基因的单个DNA构建体可被递送进入对象的内耳。

[0171] 示例性的表达构建物可被配制为药物组合物，例如，用于施用于对象。

[0172] DNA构建体和这些构建体的治疗用途为本领域的技术人员所熟知（参见，例如，Chiarella et al. (2008) Recent Patents Anti-Infect. Drug Disc. 3:93-101; Gray et

al. (2008) Expert Opin. Biol. Ther. 8:911-922; Melman et al. (2008) Hum. Gene Ther. 17:1165-1176) 裸DNA构建体通常包括一种或多种治疗性核酸(例如,编码c-myc和/或Notch的DNA)和启动子序列。一种裸DNA构建体可以是通常称为pDNA的DNA载体。裸DNA通常并不整合到染色体DNA中。通常,裸DNA构建体不需要脂质、聚合物、或病毒蛋白质的存在或不用于结合存在的脂质、聚合物或病毒蛋白质。这些构建体也可以包括在此所描述的一个或多个非治疗组分。

[0173] DNA载体在本领域中是已知的,并且通常是环状双链DNA分子。DNA载体的大小的范围通常为3-5千碱基对(例如,包括插入的治疗性核酸)。与裸DNA类似,DNA载体可用来在靶细胞中递送和表达一种或多种治疗性蛋白质。DNA载体并不整合到染色体DNA中。

[0174] 一般地,DNA载体包括允许在靶细胞中复制的至少一种启动子序列。通过结合DNA载体与,例如,阳离子脂质,并形成DNA复合体可促进DNA载体的摄取。通常,病毒载体是来源于病毒的双链环状DNA分子。病毒载体通常在大小方面大于裸DNA和DNA载体构建体并具有更大的用于导入外源(即,非病毒编码)基因的容量。与裸DNA和DNA载体类似,病毒载体可用来在靶细胞内递送和表达一种或多种治疗性核酸。不同于裸DNA和DNA载体,某些病毒载体稳定地融入染色体DNA中。通常,病毒载体包括至少一种启动子序列,其允许在宿主细胞中复制的一个或多个载体编码的核酸,例如,治疗性核酸。病毒载体可以任选地包括在此所描述的一种或多种非治疗组分。有利的是,病毒载体到靶细胞的摄取不需要额外的组分,例如阳离子脂质。相反,病毒载体在与靶细胞直接接触时转染或感染细胞。

[0175] 本文所描述的方法包括使用逆转录病毒载体、腺病毒衍生载体和/或腺伴随病毒载体作为重组基因递送系统以在体内尤其是人体内转移外源基因。用这种病毒在体外或体内产生重组逆转录病毒并感染细胞的方案可以参见《现代分子生物学实验技术》(Ausubel, F.M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14) 以及其他标准实验室手册。

[0176] 用作DNA载体和病毒载体(如腺病毒、逆转录病毒和慢病毒)的转导药剂的病毒可以用于实施本发明。示例性的逆转录病毒包括,但不限于:莫洛尼氏鼠白血病病毒(M-MuLV)、莫洛尼鼠类肉瘤病毒(MoMSV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猫白血病抗病毒(FLV)、泡沫病毒、弗云德小鼠白血病病毒、鼠干细胞病毒(MSCV)和鲁斯氏肉瘤病毒(RSV)和慢病毒。如本文所用,术语“慢病毒”是指一种复合物逆转录病毒的病毒组(属)。示例性慢病毒包括但不限于:HIV(人类免疫缺陷性抗病毒;包括HIV型1和HIV型2);绵羊脱髓鞘性脑白质炎-羊慢性进行性肺炎病毒(VMV);山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV);马传染性贫血病病毒(EIAV);猫免疫缺陷抗病毒(FIV);牛免疫虚病毒(BIV);以及猿免疫缺陷病毒(SIV)。

[0177] 在某些实施方式中,可根据本文所述方法来使用腺病毒。可以操作腺病毒的基因组使得它编码并表达目的基因产物,但是所述产物在正常裂解病毒生活周期中复制能力方面是失活的。合适的腺病毒载体来源于腺病毒株Ad型5d1324或腺病毒的其他株(例如Ad2、Ad3、Ad7等)是本领域技术人员已知的。重组腺病毒在某些情况下可以是有益的,因为它们没有能力感染非分裂细胞并且可以用于感染各种各样的包括上皮细胞的细胞类型。此外,病毒颗粒相对稳定,易于纯化和浓缩,并且如上所述,可被修饰以影响感染谱。另外,导入的腺病毒脱DNA(和其中包含的外源DNA)不会整合到宿主细胞的基因组中,但保

持附加体形式,从而避免因原位插入诱变而导致的问题,在 原位处,导入的DNA逐渐整合进宿主基因组(例如逆转录病毒DNA)。此外,相对于其他基因递送载体,腺病毒基因组携带外源DNA的能力 较强(可达8千碱基对)。

[0178] 腺伴随病毒是天然存在的缺陷型病毒,它需要额外的病毒(如腺 病毒或疱疹病毒)作为辅助病毒以实现有效复制和生产性生命周期。还可以是少数可以将其DNA整合到非分裂细胞并表现出高频率稳定整合的病毒之一。

[0179] 在各种实施方式中,通过直接注射将一种或多种病毒载体施用到 对象体内的细胞、组织或器官,所述病毒载体表达编码本发明的一种 或多种多肽的一种或多种治疗性转基因(例如,Atohl、Notch、c-myc)。

[0180] 在各种其他的实施方式中,使用包封在病毒中的此类载体在体外 或离体情况下转导细胞,并且任选地离体扩增。然后,然后将经转导 的细胞施用到对象的内耳。适合于转导的细胞,包括但不限于干细胞、祖细胞及分化细胞。在某些实施方式中,转导的细胞是胚胎干细胞、骨髓干细胞、脐带干细胞、胎盘干细胞、间充质干细胞、神经干细胞、肝脏干细胞、胰腺干细胞,心脏干细胞、肾脏干细胞、造血干细胞、内耳毛细胞、iPS细胞、内耳支持细胞、耳蜗细胞或椭圆囊细胞。

[0181] 在特定实施方式中,把使用表达一种或多种多肽的本发明的病毒 载体转导的宿主细胞施用到对象以治疗和/或预防听力病症、紊乱或病 况。涉及可根据本发明的某些实施方式使用的病毒载体的用途的其他 方法,可参见,例如Kay (1997) CHEST 111 (6Supp.): 138S-142S; Ferry et al. (1998) HUM.GENE THER.9:1975-81; Shiratory et al (1999) LIVER 19:265-74; Oka et al (2000) CURR.OPIN.LIPIDOL.11:179-86; Thule et al (2000) Gene Ther.7:1744-52; Yang (1992) CRIT.REV. BIOTECHNOL.12:335-56; Alt (1995) J.HEPATOL.23:746-58; Brody et al (1994) ANN.N.Y.ACAD.SCI.716:90-101; Strayer. (1999) EXPERT OPIN.INVETIG.DRUGS8:2159-2172; Smith-Arica et al. (2001) CURR.CARDIOL.REP.3:43-49; 和Lee et al. (2000) NATURE 408:483-8。

[0182] 在本发明的一些实施方式中,可能会希望使用细胞特异性表达控 制序列、细胞类型特异性表达控制序列、细胞谱系特异性表达控制序 列或组织特异性表达控制序列来实现所需的多核苷酸序列的细胞类型 特异性表达、谱系特异性表达或组织特异性表达,例如,以表达仅按 照细胞类型的子集、细胞谱系或组织或在发育的特定阶段中编码多肽 的特定核酸。细胞特异性表达控制序列、细胞类型特异性表达控制序 列、细胞谱系特异性表达控制序列或组织特异性表达控制序列的示例 性实施例包括但不限于所有毛细胞的Atohl增强子(例如,参见图24); 所有毛细胞的Pou4f3启动子(例如,参见图25);所有毛细胞的Myo7a 启动子(例如,参见图26);前庭支持细胞和耳蜗内指骨细胞、Deiters 细胞和Pillar细胞的Hes5启动子(参见,例如图27);以及前庭支持 细胞和耳蜗内指骨细胞、Deiters细胞和Pillar细胞的GFAP启动子(参 见,例如图28)。

[0183] 本发明的特定实施方式提供了所关注的多核苷酸的条件表达。例 如,通过对细胞、组织、生物体等进行处理或放于某种条件下来控制 表达,所述处理或某种条件使多核苷酸被表达或增加或减少由所关注 的多核苷酸编码的多核苷酸的表达。诱导型启动子/系统的示例性实施 例包括但不限于,类固醇-诱导型启动子例如编码糖皮质激素或雌激素 受体的基因的启动子(可通过相应激素处理诱导)、金属硫蛋白启动 子(可通过各种重金属

处理诱导)、MX-1启动子(可由干扰素诱导)、“基因开关”米非司酮可调控系统(Sirin et al 2003, Gene, 323:67)、cumate-诱导型基因开关(WO2002/088346)、四环素-依赖型调控系统等。

[0184] 还可通过使用位点特异性DNA重组酶实现条件表达。根据本发明的某些实施方式,载体包括至少一个(通常两个)位点以用于由位点特异性重组酶介导的重组。如本文所用,术语“重组酶”或“位点特异性重组酶”包括参与涉及一个或多个重组位点(例如,两个、三个、四个、五个、七个、十个、十二个、十五个、二十个、三十个、五十个等)的重组反应的切除式或整合式的蛋白质、酶、辅因子或相关联的蛋白质,这些可以是野生型蛋白质(参见Landy (1993) CURFENT OPINIONIN BIOTECHNOLOGY 3:699-707)或它们的突变体、衍生物(例如,含有重组蛋白质序列或其片段的融合蛋白质)、片段和变体。适用于本发明特定实施方式的重组酶的示例性实施例包括但不限于Cre、Int、IHF、Xis、Flp、Fis、Hin、Gin、OC31、Cin、Tn3解离酶、TndX、XerC、XerD、TnpX、Hjc、Gin、SpCCE1.和ParA。

[0185] 载体可以包括用于很多种位点特异性重组酶中的任何一种的一个或多个重组位点。应当理解的是,位点特异性重组酶的目标位点是除了载体(例如,逆转录病毒载体或慢病毒载体)整合所需的(多个)任何位点之外的位点。

[0186] 在某些实施方式中,载体包含也称为选择性标记的选择基因。典型的筛选基因可编码蛋白质,例如,编码杆菌的D-丙氨酸消旋酶的基因,所述蛋白质能够(a)赋予对抗生素或其他毒素(例如,氨基青霉素、新霉素、潮霉素、甲氨碟呤、博莱霉素、杀稻瘟素或四环素)的抗性;(b)弥补营养缺陷;或(c)提供复合培养基没有的关键营养成分。可以使用任何数量的选择系统来恢复转化细胞系。这些基因包括但不限于,单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler et al., (1977) CELL 11: 223-232)基因和腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy et al., (1990) CELL 22: 817-823)基因,所述基因可以分别用于tk-或aprt-细胞中。

[0187] 产生本文所述表达构建体需要的所有分子生物学技术都是本领域的技术人员所理解的标准技术。

[0188] 在某些实施方式中,例如正如在美国专利号5,543,158;5,641,515;和5,399,363(明确地将每个专利整体地并入以作为参考)中所描述的在耳内、肠胃外、静脉内、肌肉内或甚至腹膜内可能会发生DNA递送。可以在适当地混有表面活性剂(例如羟丙基纤维素)的水中制备诸如游离碱或药理学上可接受的盐的活性化合物的溶液。还可在甘油、液体聚乙二醇及它们的混合物中以及在油中制备分散体。在正常的储藏和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0189] 在某些实施方式中,通过使用任选地与细胞穿透多肽混合的脂质体、纳米胶囊、微粒、微球体、脂质颗粒、囊泡等实现DNA递送,以将本发明的组合物中引入到合适的宿主细胞中。具体地,为了输送可将本发明的组合物配制成包封于脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球体、纳米颗粒或其他形式。可以使用已知常规技术对此类递送载体进行配制和使用。

[0190] 离体DNA递送的示例性配制方法还可包括使用本领域已知的各种转染药剂(例如磷酸钙)、电穿孔、热激和各种脂质体配制方法(即,脂质-介导的转染)。本发明的特定实施方式可包含其他配制方法,例如制药领域中是众所周知的配制方法,并且在例如, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams&Wilkins, 2000中进行描述。

[0191] 递送的持续时间

[0192] 可以改变c-myc、Notch和Atoh1激活的持续时间以实现所需的结果。例如,可有利地将靶细胞暴露于c-myc蛋白质或c-myc激活剂与Notch蛋白质、NICD蛋白质或Notch激活剂1-6天、1周、2周、3周、1个月、3个月、6个月、9个月、1年、2年或更长时间。或者,当通过组成性激活(例如,使用腺病毒来过度表达c-myc)使c-myc增加时,通过在施用myc蛋白质或myc激活剂之后施用c-myc抑制剂可控制提高的c-myc活性的持续时间。在提高的c-myc活性一段时间之后抑制c-myc活性,这可以用于控制增殖,促进细胞存活率,并避免肿瘤发生。

[0193] 类似地,如上面所讨论的,在施用Notch蛋白质、NICD蛋白质或Notch激活剂之后施用Notch抑制剂可以控制提高的Notch活性的持续时间。

[0194] 给药和配制途径

[0195] 给药途径会取决于所治疗的病症而变化。可采用全身给药和/或局部给药的直接疗法治疗毛细胞损失、感觉神经听力损失和前庭障碍。在某些实施方式中,可由对象健康护理人员或医生例如在对对象进行评估后确定给药的途径。

[0196] 本发明提供了(i)一种组合物,该组合物用于增殖或再生耳蜗毛细胞或椭圆囊毛细胞;(ii)一种组合物,该组合物用于增殖或再生耳蜗支持细胞或椭圆囊支持细胞;(iii)一种组合物,该组合物用于减少对象的听力损失、维持对象的听力或促进对象的听力;以及(iv)一种组合物,该组合物用于减少对象前庭功能的损失、维持对象前庭功能或促进对象前庭功能。因此,本发明提供了第一组合物,所述第一组合物包括例如上述药剂的每一种药剂,例如,使用前述方法的每一种单独地或与药物上可接受的载体结合的在毛细胞或支持细胞中增加c-myc活性的药剂和/或增加Notch活性的药剂。此外,本发明提供第二组合物,所述第二组合物包括上述药剂的每一种药剂,例如,使用前述方法的每一种单独地或与药物上可接受的载体结合的在毛细胞或支持细胞中减少或抑制c-myc活性的药剂和/或降低或抑制Notch活性的药剂。当对支持细胞进行再生时,本发明提供了第三组合物,所述第三组合物包括诸如提高Atoh1活性的药剂的药剂以诱导将增殖的支持细胞转分化成毛细胞。

[0197] 在某些实施方式中,可将c-myc蛋白质或c-myc激活剂和Notch蛋白质、NICD蛋白质或Notch激活剂配制成含有适当的载体和/或赋形剂的药物组合物。

[0198] 可将c-myc蛋白质或激活剂和/或Notch蛋白质、NICD蛋白质或Notch激活剂和/或Atoh1蛋白质或激活剂溶解在诸如粘弹性载体的载体中,将所述载体局部导入到内耳中。在其他实施方式中,可将c-myc蛋白质或激活剂和/或Notch蛋白质、NICD蛋白质或Notch激活剂和/或Atoh1蛋白质或激活剂溶解在脂质体或微球中。将药物或药物组合递送到脂质体和/或微球中的方法是本领域中公知的。

[0199] 此外,可以想到的是,可以配制c-myc蛋白质或激活剂和/或Notch蛋白质、NICD蛋白质或Notch激活剂和/或Atoh1蛋白质或激活剂,从而使得在长时间段释放一种或多种蛋白质和/或激活剂。释放系统可以包括生物可降解材料或释放出掺入的活性剂的材料基质。可均匀地或不均匀地将活性剂分布在释放系统中。各种释放系统可用于实施本发明的过程中,然而,选择适当系统会取决于特定药物给药方案所需的释放速率。可以使用不可降解的释放系统和可降解的释放系统。合适的释放系统包括聚合物和聚合物基质、非聚

合物基质或无机和有机赋形剂和稀释剂,例如但不限于,碳酸钙和糖(例如海藻糖)。释放系统可以是天然的或人工合成的。

[0200] 在某些实施方式中,可使用全身给药途径将所述药剂施用给对象,例如诊断为需要进行毛细胞损失治疗的对象。全身给药途径可以包括但不限于,肠胃外给药途径,例如静脉注射、肌肉注射和腹腔内注射液;肠内给药途径,例如通过口服途径、糖锭、压缩片、丸剂、片剂、胶囊、滴剂(例如,滴耳剂)、糖浆、悬浮液和乳液给药;直肠给药,如直肠栓剂或灌肠剂;阴道栓剂;尿道栓剂;透皮给药途径;以及吸入剂(例如,鼻喷雾剂)。

[0201] 可替换地或另外地,可使用局部给药途径将所述药剂施用于对象,例如诊断为需要进行毛细胞损失治疗的对象。这种局部给药途径包括例如通过注射和/或使用泵将一种或多种化合物给药到对象的耳中和/或对象的内耳中。

[0202] 在某些实施方式中,可将所述药剂注射到耳中(例如,耳给药),例如注射到耳蜗的网眼(luminae)(例如,蜗管、前庭阶(Scala vestibulae)和鼓阶)。例如,所述药剂可以通过鼓室内注射(例如,进入中耳)给药,和/或通过注射到外耳、中耳和/或内耳中给药。例如,对于把类固醇和抗生素给药到人耳中而言,这些方法是本领域常规使用的方法。可以例如通过耳的圆窗或通过耳蜗胶囊进行注射。

[0203] 在其他实施方式中,可以通过纳米颗粒(例如蛋白质包被的纳米颗粒)传递所述药剂。基于包被纳米颗粒的配体的细胞类型特异性受体亲和力,可将纳米颗粒靶向到所关注的细胞。通过调控每剂量给药的纳米颗粒的量可调节所述药剂的剂量。

[0204] 可替换地,可使用导管或泵将所述药剂给药到内耳中。例如,导管或泵可将药剂导入到耳蜗网眼或耳的圆窗。在美国专利公开号2006/0030837和美国专利号7,206,639中说明了适于将一种或多种化合物施用到耳(例如,人耳)中的示例性药物递送系统。在某些实施方式中,在外科手术期间,导管或泵可位于例如对象的耳(例如,外耳、中耳和/或内耳)中。

[0205] 可替换地或另外地,可以结合机械装置(例如耳蜗植入物或助听器)递送所述药剂,对象可将所述机械装置戴在外耳中。在美国专利公开号2007/0093878中描述了适用于本发明使用的示例性的耳蜗植入物。

[0206] 在某些实施方式中,上述给药的方式可以以任何顺序组合并且可同时的或交替的。例如,可以同时地或顺序地将所述药剂给药到对象。应理解的是,当同时给药时,药剂可以在同样的药学上可接受的载体(例如,溶解在导入内耳中的相同粘弹性载体中)中或两种药剂可以溶解或分散在分开的药物载体中,所述两种药剂被同时施用。可选择地,可以以分开剂量的形式提供所述药剂并顺序地给药。

[0207] 可替换地或另外地,可根据例如正如CDER数据标准手册,版本号004(参见fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm)描述的食品和药品管理局批准方法中的任一项方法施用所述药剂。

[0208] 3. 药剂到离体毛细胞和支持细胞的递送

[0209] 已经认识到,将所关注的药剂递送到体内的毛细胞和支持细胞的概念还可适用于将所关注的药剂递送到离体的毛细胞和支持细胞。可以使用本领域已知和常用的技术获得和培养毛细胞和支持细胞。然后可将药剂(蛋白质表达载体)、激活剂和抑制剂(例如,如上所述的抑制剂)与培养的毛细胞或支持细胞接触以诱导细胞重新进入细胞周期,并

且增殖。此后,一旦细胞已经增殖,可以使用适当的抑制剂(例如上面讨论的抑制剂)对c-myc和Notch活性进行抑制。然后可在培养中维持所得毛细胞以用于各种应用(包括,例如用于研究毛细胞和/或支持细胞的生物特性、生物物理特性、生理和药理特性)。可选地,然后使用标准外科手术可将所得毛细胞植入到受试者的内耳中。

[0210] 在某些实施方式中,合适细胞可来自哺乳动物,例如人、小鼠、大鼠、猪、绵羊、山羊或非人灵长类动物。在某些实施方式中,可从对象的内耳中获得此类细胞,并且可从以下来源获得此类细胞,所述来源包括柯蒂氏耳蜗器官、耳蜗的耳蜗轴(中心)、耳蜗的螺旋神经节、囊状斑的前庭感觉上皮、椭圆囊斑或半规管的体嵴。可替换地或另外地,所述方法包括从动物的内耳获得组织,其中所述组织包括椭圆囊斑的至少一部分。

[0211] 可将从对象分离的组织悬浮在中性缓冲液,例如磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,并且随后组织消化酶(例如胰蛋白酶、亮肽素和胰凝乳蛋白酶等)或酶的组合,或机械(例如,物理)力,例如研碎进行处理,以将组织分成较小的片。可替换地或另外地,可以使用两种机制的组织裂解。例如,可在约0.05%的酶(例如,约0.001%、0.01%、0.03%、0.07%或1.0%的酶)下培养约5分钟、10分钟、15分钟、20分钟或30分钟,并且在培养后,可将细胞机械裂解。经裂解的组织可以通过装置(例如过滤器或口移液管),所述装置从分化的细胞或细胞碎屑分离出干细胞或祖细胞。细胞的分离可以包括使细胞通过具有逐渐变小孔径的一系列过滤器。例如,过滤孔径的范围可以约为80 μ m或更小、约70 μ m或更小、约60 μ m或更小、约50 μ m或更小,约40 μ m或更小,约30 μ m或更小、约35 μ m或更少,或者约20 μ m或更小。

[0212] 可在培养中保持部分分化细胞和/或完全分化的细胞(例如,通过上述方法产生的细胞)以用于各种用途,包括例如用于研究毛细胞和/或支持细胞的生物特性、生物物理特性、生理和药理特性。可使用患有听力损失和/或前庭功能损失的对象的内耳细胞建立细胞培养来开发潜在治疗方法(例如,筛选治疗听力损失和/或前庭功能损失有效的药物)。另外,可结合多能干细胞(iPS)技术使用本发明的方法以建立细胞系(例如,毛细胞系和/或支持细胞系)。例如,使用已知技术(参见,例如Oshima et al. (2010) CELL 141 (4): 704-716)可诱导听力损失对象的成纤维细胞以生成iPS细胞。然而,因为使用iPS细胞技术生成细胞的数目是有限的,所以可结合iPS细胞技术使用本文提供的方法以产生足够数量的细胞,从而建立细胞系(例如,毛细胞系和/或支持细胞系)。

[0213] 可将部分分化的细胞和/或完全分化的细胞(例如,通过上述方法产生的细胞)通过注射例如以细胞悬浮液的形式移植或植入到内耳中,例如移植或植入到耳蜗的网眼中。例如,可通过耳的圆窗或通过围绕耳蜗的骨胶囊进行注射。通过圆窗可将细胞注射到内耳道中的听力神经干中或鼓阶中。在某些实施方式中,本文所述的细胞可用于例如,如美国专利公开号2007/0093878所描述的耳蜗植入物中。

[0214] 为了改善移植细胞或植入细胞的移入能力,可在分化之前对细胞进行修饰。例如,可对细胞进行改造以过表达一种或多种抗凋亡基因。Fak酪氨酸激酶或Akt基因是可用于此目的的候选抗凋亡基因;FAK或Akt的过表达可防止螺旋神经节细胞的死亡并且当螺旋神经节细胞被移植到另一器官(例如柯蒂氏器官(参见,例如Mangi et al., (2003) NAT.MED.9:1195-201))中时,提高移入成活率。过量表达 α v β 3整联蛋白的神经祖细胞可增强神经突延伸到组织外植体中,原因在于已示出整联蛋白可介导神经突从层粘蛋白底物上的螺旋神经节神经元的延伸(Aletsee et al, (2001) AUDIOLNEUROTOLOGY 6:57-65)。在另

一个实施例中,例如,可通过使用RNAi沉默或使用外源性表达的 cDNA的过表达可以改变肝配蛋白B2和肝配蛋白B3的表达,从而修饰EphA4信号传导事件。已经显示出由来自EphA4的信号引导螺旋神经节神经元,通过肝配蛋白B2和B3 (Brors et al., (2003) J.COMP.NEURL.462:90-100)的细胞表面表达对EphA4进行介导。引导信号的失效可提高达到在成年内耳中的目标神经元的数目。可将诸如神经营养因子BDNF和NT3及LIF的外源因子添加到组织移植中以增强在体内和离体组织培养中神经突朝向目标组织的延伸及其生长。可以通过添加神经营养因子 (BDNF、NT3) 和LIF (Gillespie et al., (2010) NEUROREPORT 12:275-279) 来增强感觉神经元的神经突延伸。

[0215] 4.靶细胞中c-myc、Notch或Atohl活性的测定

[0216] 这里所描述的方法和组合物可以用于诱导细胞(例如成年哺乳动物内耳细胞),从而使其重新进入细胞周期并且增殖。例如,相比于治疗前毛细胞的数量,毛细胞的数量可增加大约2倍、3倍、4倍、6倍、8倍或10倍或更多倍。可在体内或体外诱导毛细胞以使其重新进入细胞周期。能够预期到,使用这些方法可以改善受试者的听力。例如,使用本文所述方法和组合物可以将受试者的听力,相对于治疗前的听力提高至少约5%、10%、15%、20%、40%、60%、80% 或90%。还可进行听力或前庭功能的测试以测量听力改善的状况。

[0217] 可以对接触过(i) c-myc蛋白质或c-myc激活剂和/或(ii) Notch 蛋白质、NICD蛋白质或Notch激活剂的细胞进行指示重新进入细胞进入细胞周期的和增殖的标记的测定。在一个实施例中,可以通过使用例如抗-EdU抗体和抗-BrdU抗体测定细胞是否掺入EdU (5-乙炔基-2'-脱氧尿苷)之后依次掺入BrdU (5-溴-2'-脱氧尿苷)。由EdU和/或BrdU 进行的标记可指示细胞增殖。另外,可使用EdU和BrdU的双重标记以说明细胞经历了至少两次分裂。可替换的或另外地,可以测定细胞是否存在磷酸化的组蛋白H3 (Ph3) 或极光激酶B,这些指示细胞重新进入细胞周期并且经历分裂中期和胞质分裂。

[0218] 细胞标记还可以用于确定靶细胞(例如毛细胞或支持细胞)是否已经进入细胞进入细胞周期的。指示毛细胞的示例性标记包括Myo7a、Myo6、Prestin、Lhx3、Dner、espin、小清蛋白和钙网膜蛋白。指示支持细胞的示例性标记包括Sox2、S100a1、Prox1、Rps6和Jag1。细胞周期标记和/或增殖标记以及细胞型分子的双重标记可用于确定哪些细胞已重新进入细胞周期并且正在增殖。

[0219] 此外,神经元标记(例如,乙酰化微管蛋白、神经丝和CtBP2) 可用于检测神经元结构,从而确定正在增殖的毛细胞是否与神经元相接触。存在邻近或接触毛细胞的神经元标记表明新生成的毛细胞已经与神经元(例如,神经节神经元)形成突触并且表明毛细胞已发生分化。

[0220] 如果合适,在治疗之后,可检测对象(例如患者)的听力或其他与内耳疾病相关的症状是否得到改善。测定听力的方法是众所周知的,并且包括纯音测听、空气传导、听力脑干反应 (ABR) 和骨导测试。这些检查测量人能够听到响度(强度)和音调(频率)的范围。人类的听力测试包括行为观察测听(对于至7个月的婴儿)、视觉强化取向测听(对于7个月至3岁的儿童)以及游戏测听(对于3岁以上的儿童)。Oto-声发射测试可用于测试耳蜗毛细胞的功能,并且耳蜗电图描记术提供关于耳蜗和通到大脑的神经通路的第一部分的功能的信息。在某些实施方式中,在修饰或没有修饰的情况下可继续治疗或可停止治疗。

[0221] 在整个说明书中,其中将组合物描述为具有、包括或包含特定组分,或将过程阐述为具有、包括或包含特定过程步骤,可以想到本发明的组合物还由或基本由所述组分组成,并且本发明的过程还由或基本由所述的处理步骤组成。此外,应当理解的是,步骤的顺序或进行某些操作的次序并不重要,只要本发明仍能操作即可。此外,可同时进行两个或更多步骤或操作。

[0222] 实施例

[0223] 通过下列实施例对本发明做进一步说明,提供这些实施例只是用于说明的目的,而不应解释为以任意方式对本发明的范围或内容做出限制。

[0224] 实施例1:通过C-Myc和Notch使成年耳蜗细胞重新进入细胞周期的体内诱导

[0225] 本实施例将说明,把c-myc和Notch供给到成年动物的内耳细胞可以诱导使分化的耳蜗毛细胞和支持细胞重新进入细胞周期并且进行细胞增殖。

[0226] 鼠龄在1至15个月的成年小鼠可用于研究c-myc和Notch在诱导耳蜗毛细胞和支持细胞重新进入细胞周期、增殖、分化和存活方面的潜能。在单独的实验中,使用的小鼠是野生型(WT)背景的小鼠或带有LoxP侧接的NICD盒(NICDflo_x/flo_x)的小鼠,所述NICD盒易于发生能够激活NICD表达的Cre介导的重组。NICD盒编码(5'-3')小鼠Notch1的细胞内片段(氨基酸1749-2293,缺少C-末端PEST域,参见Murthaugh et al.(2003) PROC.NATL.ACAD.SCI.U.S.A.100(25): 14920-14925)。麻醉小鼠并进行耳蜗造口术,从而能够注射腺病毒。通过蜗管注射病毒,便于感染耳蜗感觉上皮中的毛细胞和支持细胞。分别将带有人c-myc(Ad-Myc)和CRE-GFP(Ad-Cre-GFP)表达盒或c-myc和NICD(Ad-NICD)表达盒的结合体的腺病毒的混合物注射到NICDflo_x/flo_x或WT小鼠的耳蜗中。对每只小鼠的一只耳进行注射,而另一只耳作为未注射的对照。另外的对照用于耳蜗仅注射有Ad-Cre-GFP的情况。Ad-Myc诱导myc过量表达;Ad-NICD诱导NICD过表达;并且Ad-CRE-GFP诱导CRE-GFP的过表达,在LoxP序列侧接的位点的重组,以及在NICDflo_x/flo_x小鼠情况下NICD的过表达。等份混合2x10¹²噬斑形成单位(pFU)效价的病毒,并且对每只动物注射总共0.6μL的病毒。在病毒注射后,在1-5天内每天注射5-溴-2-脱氧尿苷(BrdU)。

[0227] 在病毒注射后4、8、12、35或60天时处死小鼠,并且获得耳蜗。并且在整体装片免疫染色之前对耳蜗进行解剖、固定及脱钙。通过使用抗Myo7a和espin的抗体来标记以标识毛细胞。通过使用抗Sox2的抗体来标记以标识支持细胞。通过使用抗BrdU的抗体来标记以评估重新进入细胞周期及增殖。通过暴露于DAPI来实现细胞核标记。

[0228] 分析通过病毒注射而暴露于c-myc和NICD的耳蜗上皮细胞以确定是否出现了重新进入细胞周期和增殖的现象。在病毒注射后4、8或12天获得注射有Ad-Cre-GFP和Ad-Myc和之后BrdU给药的NICDflo_x/flo_x小鼠的耳蜗并且进行免疫染色(图7)。在所有分析的时间点上,免疫染色的切片显示出存在有如BrdU+/Myo7a+(图7A、B、E、K、L、O、P、Q、T,实心箭头)染色所确定的进入细胞周期的毛细胞。在注射后4天,BrdU+/Sox2+(图7A、B、E,空心箭头)染色显示,该种群中的支持细胞也重新进入细胞周期。这些发现证明,在暴露于c-myc和NICD后可以诱导耳蜗毛细胞和支持细胞重新进入细胞进入细胞周期的。在注射病毒12天时观察BrdU-标记的毛细胞对(假设为衍生自相同细胞分裂的子代细胞),证明在c-Myc和NICD暴露后诱导重新进入细胞周期的细胞可以在随后进行增殖(图7,P-T,箭头)。此外,在任何时间点(图7,F-J,显示4天的时间点)上,在未注射的对照耳中没有观察到耳蜗

细胞中的BrdU染色现象。这些观察表明,将分化的耳蜗毛细胞和支持细胞暴露于提高水平的c-myc和Notch活性能够诱导这些种群重新进入细胞周期。

[0229] 对在病毒注射后更远的时间点时诱导重新进入细胞周期的毛细胞和支持细胞的体内细胞存活率进行评估。在注射病毒后35天时获得感染Ad-Cre-GFP和Ad-Myc病毒并且随后进行BrdU注射的NICDflox/flox小鼠的耳蜗组织,并且进行免疫染色以评估进入细胞周期的毛细胞和支持细胞的重新进入细胞周期的情况以及存活率。对该时间点处染色耳蜗的分析再次表明,存在毛细胞和支持细胞的增殖(图8)。观察到在进行BrdU标记的耳蜗上皮中BrdU阳性染色的并且在病毒注射后35天时获得的Myo7a阳性毛细胞(图8,A-E,箭头)。在相同动物中,可观察到BrdU标记的Sox2阳性支持细胞(图8,K-O,空心箭头)。还显出其中由Notch激活Sox2的正在分裂的毛细胞(图8M,箭头)。这些观察结果表明,在暴露于提升水平的c-myc和Notch活性后诱导重新进入细胞周期的支持细胞和毛细胞可以在体内存活至少35天。还能观察到在c-Myc和NICD病毒暴露之后于这个时间点显示出静纤毛的BrdU标记的毛细胞(图8,F-J,J分图中的箭头)。这个发现表明,诱导重新进入细胞周期的毛细胞或它们的后代保持了分化的毛细胞的外形特性。

[0230] 在一组相似的实验中,将Ad-Myc和Ad-NICD的混合物注射到WT小鼠的蜗管中,之后1-5天内每天对其施用BrdU。在病毒注射后2-35天的时间点获得耳蜗并且进行免疫染色。使用抗BrdU、Myo7a和Sox2抗原的抗体进行的免疫染色显示出在获得的耳蜗中存在双重标记的毛细胞(BrdU+/Myo7a+)和支持细胞(BrdU+/Sox2+)。(数据未示出)。因此,将WT背景的分化的毛细胞和支持细胞暴露于提升水平的c-myc和Notch活性中也能诱导使其重新进入细胞周期以及进行增殖。

[0231] 实施例2:通过C-Myc和Notch体内诱导老龄小鼠的耳蜗细胞重新进入细胞周期

[0232] 下面的实施例表明,将c-myc和Notch提供到内耳细胞还可以诱导老年动物对象的分化的耳蜗毛细胞和支持细胞重新进入细胞周期并且进行细胞增殖。

[0233] 通过耳蜗造口术将Ad-Myc和Ad-Cre-GFP一次注射到17月龄NICDflox/flox小鼠的耳蜗蜗管中,并且在15天后获得动物。注射0.3 μ l等量的效价为2x10¹²的Ad-GFP和Ad-Cre-Myc的混合物。还每天注射一次BrdU(50 μ g/g体重),共15天以标记进入细胞周期的细胞。使用相同的方案作为对照,其中仅将Ad-Cre注射到耳蜗中。在BrdU和病毒注射后获得的耳蜗组织表明,老龄小鼠的细胞经历重新进入细胞周期的过程,这由存在的双标记的毛细胞(BrdU+/Myo7a+)和支持细胞(BrdU+/Sox2+;图9,A-J;箭头表示双重标记的毛细胞;无尾箭头表示双重标记的支持细胞)所证实。相反,在仅注射有Ad-Cre并且经受相同的BrdU标记时程(图9K-O)的17个月大小的NICDflox/flox对照动物的Sox2+支持细胞或Myo7a+毛细胞中没有观察到BrdU标记。

[0234] 这些结果表明,老龄小鼠内耳的毛细胞和支持细胞可实现增殖,这说明老龄人类内耳能够得到相似的效果。

[0235] 实施例3:对从各种哺乳动物的内耳组织获得的培养的成年细胞重新进入细胞周期的诱导

[0236] 下面的实施例表明,暴露于提升水平的c-myc和Notch活性中利于成年小鼠、猴类和人类内耳的毛细胞和支持细胞重新进入细胞周期并且进行增殖。

[0237] 为了研究提升水平的c-myc和Notch活性是否能诱导人类细胞重新进入细胞周期

并且进行增殖,对成年人类耳蜗和椭圆囊组织进行收集。样品来源于外科手术,在外科手术期间丢弃此类组织。将细胞培养在补充有N2和B27(培养基和补充物均来自Invitrogen/GIBCO/BRL, Carlsbad, CA)的高葡萄糖Dulbecco修饰的Eagle培养基和F12培养基中,然后加入1%FBS。

[0238] 把108的工作病毒效价用于5mL的培养物。使收集的组织和经转导培养细胞的培养物与Ad-Myc和Ad-NICD的混合物接触,从而提高细胞水平的c-myc和NICD。在暴露于病毒后,通过将3 μ g/mlBrdU施用到培养物,进入细胞周期的细胞被标记。如同在转导小鼠组织的体内研究中一样,对在培养的人类组织(图10)中的BrdU-标记的支持细胞(Sox2+)和至少一种BrdU-标记的毛细胞(Myos7a+)进行标识。

[0239] 在耳蜗培养物(图10A、C、D、E)和椭圆囊培养物(图10F、H、I、J;所有分图,空心箭头)标识出BrdU+/Sox2+支持细胞。实际上耳蜗细胞培养物不含有毛细胞,因此没有标识到BrdU-标记的耳蜗毛细胞。暴露于病毒会在椭圆囊培养物中产生很少标记的毛细胞,这可能是腺病毒对毛细胞低传染率的结果。然而,在人类椭圆囊培养物中标识出至少一种BrdU+/Myos7a+毛细胞(图10F、G、I、J;实心箭头)。

[0240] 利用获得的小鼠椭圆囊作为培养组织进行相似的基于培养的实验。在之后的实验中,从NICDflox/flox或WT小鼠得到组织并且将所述组织分别感染Ad-Myc/Ad-Cre-GFP或Ad-Myc/Ad-NICD的混合物。在病毒转导后,将细胞暴露于BrdU来标记进入细胞周期的细胞。加入BrdU使其最终浓度为3 μ g/ml。如同在基于人类椭圆囊培养物的实验中,在小鼠培养物中观察到BrdU-标记的毛细胞和支持细胞,这表明这些细胞在暴露于提升水平的Notch和c-myc活性下能够重新进入细胞周期。在这些培养物中观察到BrdU-标记的毛细胞和支持细胞的实施例,尽管多数BrdU-标记的细胞是支持细胞。基于这些发现,看来提升的c-myc和Notch活性会诱导培养的内耳毛细胞和支持细胞重新进入细胞周期并且进行增殖。

[0241] 另外,对从成年猴类获得的培养的耳蜗进行实验。培养基包含含有N2和B27而无血清的DMEM/F12。培养的耳蜗暴露于Ad-Myc/Ad-NICD混合物(最终效价为109)16小时,并且使用新鲜培养基取代培养基持续4天。加入EdU使其最终浓度是10 μ M。通过EdU给药另外地标记进入细胞周期的细胞。将培养的耳蜗固定和染色以具有毛细胞标记和支持细胞标记,及EdU。在暴露于提升水平的c-Myc和NICD(图11G、H、J;无尾箭头)后观察到进入细胞周期的Sox2+/EdU+支持细胞。因此,该实施例表明,在暴露于提升水平的c-Myc和Notch活性下,猴类内耳的细胞也可以受到诱导而进行增殖,这表明所公开的方法能够适用于小鼠以外的哺乳动物,例如,灵长类。在EdU存在下Ad-Cre感染的培养的猴类耳蜗对照中,没有看到EdU标记的细胞(图11A-E),证明没有细胞进行增殖。通常在培养的小鼠耳蜗和猴类的耳蜗中观察到的是,与体内的小鼠耳蜗相比,存活的内毛细胞很少重新进入细胞周期,在体内的小鼠耳蜗中,通过c-Myc和NICD的组合内毛细胞可以容易地受诱导而增殖。可能的是,内毛细胞需要更高浓度的Myc和NICD和更多的时间来增殖,因为培养中使用的效价不像体内效价(109相比于1012)那么高并且在感染后很短的时间内(4天)获得组织。

[0242] 实施例4:耳蜗细胞亚种群的细胞增殖的剂量依赖性诱导

[0243] 以下实施例说明,在不同程度的暴露于c-myc和Notch活性时耳蜗毛细胞的不同种群受诱导而增殖。

[0244] 将渗透泵(Alzet)植入到多西环素可诱导的成年(45日龄)小鼠(rTta/tet-on-Myc/tet-on-NICD)的背部中,渗透泵的管道插入到圆窗龛。以在9天内以每小时1 μ l的速率连续地分配多西环素(DMSO中 150mg/ml),并通过腹膜内注射每天一次同时进行EdU给药(200 μ g/g 体重)来标记增殖细胞。用这一过程中,在包括支持细胞和毛细胞(数据未显示)的所有耳蜗细胞类型中激活c-Myc和NICD。由于手术过程,该样品中的耳蜗丢失了所有外部毛细胞,仅存在支持细胞和一些内毛细胞。将耳蜗细胞暴露于这种水平的c-myc和NICD使Sox2+支持细胞增殖(图12B、C、E;箭头)。通过对比,在暴露于这些水平的c-myc和NICD时Parv+内毛细胞未显示出分裂(图12A、E;无尾箭头)。

[0245] 另外,rTta/Tet-on-myc/Tet-on-NICD小鼠模型用于检查外部毛细胞增殖的诱导情况。在图12描述的相同的过程之后,将rTta/Tet-on-myc/Tet-on-NICD小鼠暴露于多西环素12天,伴随的是在这12天内每天一次进行EdU给药以标记进入细胞周期的细胞。然后获得组织并且对其染色以标记毛细胞(Esp)和支持细胞(Sox2)。在这种情况下,在组织获得和染色后,能观察到EdU+/Esp+增殖的外部毛细胞(图13A、B、E;箭头)。在内毛细胞中没有观察到细胞的增殖。由于该方法能在所有耳蜗细胞类型中激活c-Myc和NICD,该实施例表明将外部毛细胞暴露于提升水平的c-Myc和Notch活性中可以选择性地诱发外部听毛重新进入细胞周期并且进行增殖。在相同的耳蜗中,还发现标记有EdU的较少的支持细胞(相对于外部毛细胞)(数据未显示),这与如下观察结果一致,即在c-Myc和NICD激活之后外部毛细胞具有更强的强力重新进入细胞周期。该样品(图13)与图12中所示的样品形成对比,区别在于大部分的外部毛细胞能够存活并显示出增强的增殖能力。这还表明在外部毛细胞损失之后,在c-Myc和NICD激活时(图12)支持细胞可受到诱导而增殖。

[0246] 总之,这些结果表明,虽然耳蜗毛细胞和支持细胞的所有种群在暴露于提升水平的c-myc和Notch活性时可以受到诱导而分化,但耳蜗内的不同亚种群对不同水平的c-myc和Notch暴露会做出不同的响应。例如,与支持细胞和内毛细胞相比,外部毛细胞会对较低水平的c-myc和Notch刺激做出响应。与内毛细胞相比,支持细胞会对较低水平的c-myc和Notch刺激做出响应,但需要比外部毛细胞更高水平的c-myc和Notch刺激。与支持细胞和外部毛细胞相比,内毛细胞表现出需要更高水平的c-myc和Notch刺激以促进细胞增殖。

[0247] 实施例5:Myc和Notch暴露生成的毛细胞的功能特性

[0248] 下列实施例说明,通过应用本文所述方法生成的毛细胞具有功能性毛细胞的特性。

[0249] 在提升的Myc和Notch暴露程度所生成的毛细胞中评估是否存在毛细胞功能所必需的信号转导通道。使用耳蜗造口术将Ad-Cre-GFP和Ad-Myc混合物注射到45日龄NICDflox/flox小鼠的蜗管中。在腺病毒注射后的5天内每天进行EdU注射以标记增殖的毛细胞。在病毒注射后35天时,解剖小鼠的耳蜗并与荧光染料FM1-43FX培养30秒,之后洗涤并固定耳蜗。将固定的组织脱钙,并且用Espn(Esp)染色以标记毛细胞。通过EdU对经历增殖的细胞进行标记。图14示出,在EdU暴露后(EdU-)之后未重新进入细胞周期的对照Esp+毛细胞摄取FM1-43FX(图14,A-E)。值得注意的是,在Ad-Myc/Ad-NICD病毒注射和EdU暴露(EdU+)后重新进入细胞周期的Esp+毛细胞也摄取FM1-43FX(图14,F-J)。当FM1-43FX通过功能性转导通道迅速进入毛细胞时,FM1-43FX的标记说明在与类似于非增殖毛细胞的增殖毛细胞中存在功能性转导通道。该结果表明,暴露于提升的Myc和Notch活性生成的毛

细胞具有毛细胞功能所必需的功能性膜通道。

[0250] 评估暴露于体内提升水平的c-Myc和Notch活性的细胞中突出形成的情况。使用Ad-Myc/Ad-Cre病毒混合物转导成年(45日龄)NICDflox/flox小鼠,并对其进行BrdU给药,分析如图9所述的功能性突触形成的证明。在病毒注射后20天时获得组织并用染色神经丝(NF)来识别神经节神经元的神经纤维。对染色切片进行的分析显示存在与NF+神经纤维(图15A、C、E;箭头)相接触的增殖的毛细胞(Myos7a+/BrdU+)。这种结果表明,通过本文所公开的方法生成毛细胞的过程伴有神经纤维的再生长过程以及对于毛细胞功能至关重要的功能性突触的形成过程。

[0251] 实施例6:诱导在体内增殖的毛细胞保持特定毛细胞的同一性

[0252] 以下实施例说明,通过对现有内毛细胞进行诱导增殖在体内生成的内毛细胞保持内毛细胞特有的性质。

[0253] 使用Ad-Myc/Ad-Cre病毒混合物体内转导成年NICDflox/flox小鼠的耳蜗15天,在前5天内每天注射BrdU。所使用的方法与图9所描述的那些方法相同。获得耳蜗组织并对其分析内毛细胞-特异性标记。经历重新进入细胞周期(图16A-E;箭头)的内毛细胞以及未重新进入细胞周期(图16A-E;无尾箭头)的内毛细胞对水泡性谷氨酸转运蛋白-3(Vglut3),即内毛细胞特异性标记染色呈阳性。此外,相同的细胞对作为突触前标记的C-末端结合蛋白质2(CtBP2)(方括号)也染色呈阳性,表明存在功能性突触。相反,在暴露于Ad-GFP的对照动物中未观察到BrdU标记,尽管检测到Vglut3+/CtBP2+内毛细胞(图16F-J,方括号)。结果表明,通过暴露于提升水平的c-myc和Notch活性对内毛细胞进行诱导增殖能生成具有功能性突触的标记的内毛细胞。

[0254] 实施例7:增殖支持细胞在培养物中的转分化

[0255] 下面的实施例表明,本文所述方法的应用可用于诱导内耳支持细胞的增殖并且转分化到毛细胞的命运。

[0256] 使用在多西环素诱导(rTta/Tet-on-Myc/Tet-on-NICD)之后能够表达提升水平的myc和Notch的小鼠模型进行实验。将成年小鼠(rTta/Tet-on-Myc/Tet-on-NICD)耳蜗切开,在骨上钻出三个孔以有效地暴露于培养基中并且在供有N2和B27而无血清的DMEM/F12进行培养。将多西环素(1mg/ml)加入到培养基,培养5天,以激活c-Myc/NICD,随后进行16小时的Ad-Atoh1(2x10¹²,1:100稀释度)感染。在另外的14天内把培养基换成新鲜培养基,每3天更换培养基。在整个时期内把EdU(最终浓度10 μ M)加入到培养物中。观察到通过暴露于多西环素而诱导以表达提升的NICD和myc水平的支持细胞进行细胞增殖,这由EdU标记(图17A-E,无尾箭头和实心箭头)所证实。此外,暴露于Ad-Atoh1造成进入细胞周期的支持细胞(图17A、C、E,实心箭头)和未进入细胞周期的支持细胞(图17B、C、E,开放箭头)转分化到毛细胞命运,这可以由Myos7a和小清蛋白(Parv)染色所证实。对照——暴露于Ad-Atoh1(而不是多西环素)培养的rTta/Tet-on-Myc/Tet-on-NICD支持细胞进行分化,但未能重新进入细胞周期(图17F-J,箭头),这由Myos7a+/Parv+/EdU-细胞的存在所证实。在类似的实验中,将从rTta/Tet-on-Myc/Tet-on-NICD小鼠获得的培养出的耳蜗支持细胞暴露于多西环素和Ad-Atoh1病毒,并且之后暴露于FM1-43FX(3 μ M)30秒以研究由该方法生成的毛细胞是否具有功能性毛细胞的特性。对该方案处理的细胞进行Esp染色揭示出在转分化支持细胞中发束的存在,将转分化支持细胞对FM1摄取染色呈阳性,这显示存在功能性膜

通道(图17K、O;箭头)。用FM1标记其他转分化的细胞,但这些细胞没有显示出重新进行细胞周期的迹象,因为它们 是EdU阴性的(图17K、O;箭头)。因此,培养的耳蜗支持细胞 暴露于提升水平的myc和Notch,然后Atoh1诱导支持细胞增殖并使其 转分化成毛细胞命运,其中所生成的细胞具有功能性毛细胞的特性。

[0257] 实施例8:内耳组基因表达的诱导

[0258] 为了理解提升的c-myc和Notch活性如何影响细胞命运,研究在 暴露于c-Myc和NICD后表达的mRNA转录本。

[0259] 培养成年NICDflox/flox小鼠耳蜗并且使其感染 Ad-Myc/Ad-Cre-GFP一夜(2x10¹² 1:100稀释度)。从第二天开始,在 接下的4天内每天更换培养基。把Ad-Cre-GFP感染的NICDflox/flox 小鼠耳蜗作为对照。使用QIAGENmRNA分离试剂盒获得感染的耳蜗 以进行mRNA分离。用Life ScienceTechnology SuperScript III逆转录 酶试剂盒合成cDNAs。使用标准方案进行半定量RT-PCR。不同组的 转录本的分析表明,在c-myc和NICD暴露之后,干细胞基因转录本(例如,Nanog、ALPL、SSEA)未被显著上调。相反,在c-myc和NICD暴露之后大部分对耳祖细胞(例如,Eya1、DLX5、Six1、Pax2、P27kip1、NICD、Prox1、Hes5)具有特异性的所分析转录本被上调(图18)。将GAPDH用作正常化信号强度的内部对照。这些结果显示与使用胚胎干细胞相比,使用本文公开的方法具有固有的决定性优势。具体地, 这些结果证明暴露于提升的c-Myc和Notch活性使祖细胞水平提升, 而不是提升干细胞水平,这很可能使得内耳细胞重新进入细胞周期并 保持所期望的细胞命运。

[0260] 引入作为参考

[0261] 本文提及的各个专利文件和科技文献的整个揭示内容以引用方式 并入本文中,以用于所有目的。

[0262] 等同实施方式

[0263] 可以以其他特定形式实施本发明而不背离本发明的基本特征。因此,上述实施方式被认为是说明性的而不是限制本文所述的发明。本 发明的范围由所附的权利要求限定而不是由前面的说明书,并且在权 利要求的等同范围内和意义上的所有改变都将囊括在权利要求书的范 围之内。

A.

NP_002458.2 (SEQ ID NO: 1)

```

1   mdffrvvenq qppatmplnv sftnrnydld ydsvqpyfyc deeenfyqqq qqselqppap
61  sediwnkkfel lptpplspsr rsglcspsyv avtpfslrgd ndggggsfst adqlemvtel
121 lggdmvnqsf icdpddetfi kniiiqdcmw sgfsaaaaklv seklsyqaa rkdsgspnpa
181 rghsvctss lylqdlasaa secidpsvfvf pypndsssp kscasqdssa fspssdsls
241 stesspqgsp eplvlheetp pttssdseee qedeeidvv svekrqapgk rsesgspag
301 ghskpphspl vlkrchvsth qhnyaaappst rkdypaakrv kldsvrvlrq isnnrkctsp
361 rssdteenvk rrthnvlerq rrnelkrsff alrdqipele nnekapkvvi lkkatayils
421 vqaeeqklis eedllrkrre qlkhkleqlr nsca

```

B.

C-myc 共有蛋白质序列 (SEQ ID NO: 9)

```

MPLNVX1FX2NRNYDLDYDSVQPYFX3CDEEENFYX4QQQSELQPPAPSEDIWKKFELLPTPPLSPS
RRSGLCSPSYVAVX5X6X7FSX8RX9DX10DGGGX11FSTADQLEM12TELLGGDMVNQSFICDPDDE
TFIKNII IQDCMWSGFSAAAKLVSEKLASYQAARKDSX13SX14X15PARGHSVCSTSSLYLQDLX16A
AASECIDPSVFPYPLNDSSSPKSCX17SX18DSX19AFSX20SSDSLSSX21ESSPX22X23X24PEPLV
LHEETPPTTSSDSEEEQX25DEEEDVVSVEKRQX26PX27KRSEGSX28X29X30GGHSPPHSPLVL
KRCHVSTHQHNYAAPPSTRKDYPAAKRX31KLDSX32RVLX33QISNNRKX34SPRSSDTEENX35KRR
THNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILSX36QAX37EX38KLX39SEX40
DLLRKRREQLKHKLEQLRNSX41A

```

图1

A.

NP_060087.3 (SEQ ID NO: 2)

```

1  mppllapllc lallpalaar gprcsqpgget clnggkceaa ngteacvcgg afvgprcqdp
61  npclstpckn agtchvvdrr gvadyacscs lgfsgplclt pldnacitnp crnggtcdll
121 tlteykcrcp pgwsgkscqq adpcasnpca nggqclpfea syichcppsf hgptcrqdv
181 ecgqkpglcr hgggtchnevg syrcvcrath tgpncerpvy pcspspcqng gtcrtgtdvt
241 hecaclpgft gqnceenidd cpgnncknng acvdgvntyn croppewtgq yctedvdecq
301 lmpnacqngg tchnthggyn cvcvngwtge dcseniddca saacfhgate hdrvasfyce
361 ephgrtgllc hindacisnp cnegsnodtn pvngkaictc psgytgpacs qdvdecslga
421 npcehagkci ntlgsfecqc lqgytgprce idvnecvsnp cqndatcldq igefqciemp
481 gyegvhcevn tdecasspcl hngrclldkin efqcecptgf tghlcqydvd ecastpcckng
541 akclldgpn ty tcvctegygtg thcevdidec dpdpchygsc kdgvatftcl crpgytghhc
601 etninecssq pcrhgggtcqd rdnaylcfcl kgttgpncei nlldcasspc dsgtclldkid
661 gycacepgy tgsmcninid ecagnpchnng gtcedgingf tcrcepyhd ptclsevnec
721 nsnpcvhgac rdslnykc ddpwsgtnc dinnecesn pcvnggtckd mtsgyvctcr
781 efgsgpncqt ninecasn pc lnqgtclddv agykcncillp ytgatcevv l apcspcrn
841 ggecrqsedy esfscvcptg wqgttcevdi necvlspcrh gascqnthgg yrchcqagys
901 grncetdidd crpnpchnng sctdgintaf cdclpgfrgt fceedineca sdpcrnganc
961 tdcvdsytct cpagfsgihc enntpdctes scfnggtc vd ginsftclcp pgftgsycqh
1021 dvnecdsqpc lhgggtcqdgc gsyrcctcpqg ytgpnccnlv hwcdsspckn ggkcwqthtg
1081 yrcecpsgwt glycdvpsvs cevaaqrqgv dvarlcqhgg lcvdagntthh crcqagygtgs
1141 ycedlvdecs pspcngatc tdylggysck cvagyhgvnc seeideclsh pcqnggtcld
1201 lptnykcscp rgtqgvhcei nvddcnppvd pvsrspkcf ngtcvdqvgg ystcpcpgfv
1261 gercegdvne clsnpcdarg tqncvqrvnd fhcecraght grrcesving ckgkpcckngg
1321 tcavasntar gfickcpagf egatcendar tcgslrclng gtcisgprsp tclclgpfgtg
1381 pecqfpassp clggnpcynq gtceptsesp fyrcclpakf ngllchildy sfgggagrdi
1441 ppplieeace lpecqedagn kvcsllqcnh acgwdggdcs lnfn dpwknc tqslqcwk yf
1501 sdghcdsqcn sagclfdgfd cgraegqcnp lydqyckdhf sdghcdqgcn saecewdgld
1561 caehvperla agtlvvvvlm ppeqlrnssf hflrelsrvi htnvvfkrda hggqmifpyy
1621 greeelrkhp ikraaegwaa pdallgqvka slpvggsegg rrrreldpmd vrgsivylei
1681 dnrqcvqass qcfqsatdva aflgalaslg slnipykiea vqsetveppp paqlhfmyva
1741 aaafvllffv gcgvllsrkr rrqhgqlwfp egfkvseask kkrreplged svglkplkna
1801 sdgalmdndq newgdedlet kkfrfeepvv lpdlddqt dh rwtqghlda adlrmsamap
1861 tppqgevdad cmdvnrvgpd gftplmiasc sgggletgns eeedapavi sdfiyqgasl
1921 hnqtdrtget alhlaarysr sdaakrilea sadaniqdnm grtplhaavs adaqgvfqi
1981 irnratdlda rmhdgttpli laarlavegm ledlinshad vnavddlgks alhwaaavnn
2041 vdaavvllkn gankdmqnnr eetplflaar egsetakvl ldhfanrdit dhmdrlprdi
2101 aqermhhdv rlldeynlvr spqlhgaplg gtptlspplc spngylgslk pgvggkkrvk
2161 psskglacgs keakdlkarr kksqdqkgcl ldssgmlspv dslesphgyl sdvasppilp
2221 spfqqspsvp lnhlpmpdt hlgighlnva akpemaalgg ggrlafetgp prlshlpvas
2281 gtstvlgsss ggalnftvgg stslngqcew lsrlqsgmvp nqynplrgsv apgplstgap
2341 slqhgmvgpl hsslaasals qmmsyqglps trlatqphlv qtqgvqpnl qmqqqnlqpa
2401 niqqqqlqpp pppppqphlg vssaasghlg rsflsgepsq advqplgpss lavhtilpge
2461 spalptslps slvppvtaaq fltpps qhsy sspvdntpsh qlqvpehpf l tpspespdqw
2521 sssspshnvs dwsegvsspp tsmqsqiari peafk

```

图2 (1/2)

B.

NP_060087.3 残基 1754-2555 (SEQ ID NO: 7)

```

1754          vllsrkr rrqhgqlwfp egfkvseask kkrreplged svglkplkna
1801 sdgalmdndq newgdedlet kkfrfeepvv lpdlddqt dh rwtqqhlda adlrmsamap
1861 tppqgevdad cmdvnrvgpd gftplmiasc sgggletgns eeedapavi sdfiyqgasl
1921 hnqtdrtget alhlaarysr sdaakrlllea sadaniqdnm grtplhaavs adaqgvfqi
1981 irnratdllda rmhdgttpli laarlavegm ledlinshad vnavddlgks alhwaaavnn
2041 vdaavvllkn gankdmqnnr eetplflaar egsetakvl ldhfanrdit dhmdrlprdi
2101 aqermhhdv rlldeynlvr spqlhgaplgtptlspplc spngylgslk pgvqgkvrk
2161 psskglacgs keakdlkarr kksqdgkgcl ldssgmlspv dslesphgyl sdvasppllp
2221 spfqqspsvp lnhlpgmpdt hlgighlnva akpemaalg ggrlafetgp prlshlpvas
2281 gtstvlgsss ggalnftvgg stslngqcew lsrlqsgmvp nqynplrgsv appplstqap
2341 slqhgmvqpl hsslaasals qmmsyqglps trlatqphlv qtqgvqpql qmqqqnlqpa
2401 niqqqqslqp pppppqphlg vssaasghlg rsflsgepsq advqplgpss lavhtilpge
2461 spalptslps slvppvtaaq fltpsqhsy sspvntps hqlqvpehpf tpspspdqw
2521 ssspsphsnvs dwsegvsspp tsmqsqiari peafk

```

C.

Notch 胞内域共有蛋白质序列

(SEQ ID NO: 10)

```

VLLSRKRRRQHGQLWFP EGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNASDGALMDNDQNEWGDEDLE
TKKFRFEPPVLPDLX1DQTDHRQWTQQHLDAA DLX2SAMAPT PPQGEVDADCMDVNVRGPDGFTPL
LMIASCSGGGLETGNSEEEEDAPAVISDFIYQGASLHNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAKRLLEA
SADANIQDNMGRTPPLHAAVSADAQGVFQILX3RNRATDLDA RMHDGTTPLILAA RLAVEGMLEDLIN
SHADVNAVDDLGSALHWAAAVNNVDAAVVLLKNGANKDMQNNX4EETPLFLAAREGSYETAKVLLD
HFANRDI TDHMDRLPRDIAQERMHHDIVRLLEDEYNLVRSPQLHG X5X6LG GTPTLSPX7LCSPNGYL
GX8LKX9X10X11QGGKX12RKPSX13KGLACX14SKEAKDLKARRKKSQDGKGCLLDSSX15MLSPVDSL
ESPHGYLSDVASPPLLPSPFQQSPSX16PLX17HLPGMPDTHLGIX18HLNVAAKPEMAALX19GGX20R
LAFEX21X22PPRLSHLPVASX23X24STVLX25X26X27X28X29GAX30NFTVGX31X32X33SLNGQCEWLX
34RLQX35GMVPX36QYNPLRX37X38VX39PGX40LSTQAX41X42LQHX43MX44GPX45HSSLX46X47X48X49
LSX50X51X52X53YQGLPX54TRLATQPHLVQTQQVQPQNLQX55QX56QNLQX57X58X59X60X61X62X63
X64X65X66X67X68X69X70PPX71QPHLX72VSSAAX73GHLGRSFLSGEPSQADVQPLGPSSLX74VHTIL
PQESX75ALPTSLPSSX76VPPX77TX78X79QFLTPPSQHSYSSX80PVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSP
ESPDQWSSSSX81HSNX82SDWSEGX83SSPPTX84MX85SQIX86X87IPEAFK

```

图2 (2/2)

A.

NP_005163.1 (SEQ ID NO: 3)

```

1  msrllhaeew aevkelgdhh rqpqhhlpq pppppppat lqarehpvyp pelslldstd
61  prawlaptlq gictaraaqy llhspelgas eaaaprdevd grgelvrrss ggassskspg
121 pvkvreqlck lkggvvvdcl gcsrqraps kqvnqvqkqr rlaanarerr rmhglnhafd
181 qlrnvipfsfn ndkklskyet lqmaqiyna lsellqtpsg geqpppppas cksdhhhlrt
241 aasyeggagn ataagaqqas ggsqrptpg scrtfrsapa saggyvqla alhfstfeds
301 altammaqkn lspslpgsil qpqvqeenskt sprshrsdge fsphshysds deas

```

B.

Atohl 共有蛋白质序列

(SEQ ID NO: 11)

```

MSRLLHAEWEAEVKELGDHHRX1PQPHHX2PX3X4PPX5X6QPPATLQARX7X8PVYPX9ELSLLDSTD
PRAWLX10PTLQGX11CTARAAQYLLHSPELX12ASEAAAPRDEX13DX14X15GELVRRSX16X17GX18X19
X20SKSPGPVKVREQLCKLKGGVVDELGCSRQRAPSSKQVNGVQKQRRRLAANARERRRMHGLNHA
FDQLRNVIPFSFNNDKKLSKYETLQMAQIYINALSELLQTPX21X22GEQPPPPX23ASCKX24DHHHLR
TAX25SYEGGAGX26X27X28X29AGAQX30AX31GGX32X33RPTPPGX34CRTRFSX35PASX36GGYSVQL
DALHFX37X38FEDX39ALTAMMAQKX40LSPSLPGX41ILQPVQEX42NSKTSRSHRSDGEFSPHSY
SDSDEAS

```

图3

NM_002467.4 (SEQ ID NO: 4)

```
1  gacccccgag ctgtgtgtgt cggcgccgcc accgccgggc cccggccgtc cctggctccc
61  ctcttgcttc gagaaggcca gggcttctca gaggtttggc gggaaaaaga acggagggaag
121 ggatcgcgct gagtataaaa gccgggttttc ggggttttat ctaactcgct gtagtaattc
181 cagcgagagc cagaggagc gagcgggcgg ccggttaggg tggaaagacc gggcgagcag
241 agctcgcgct cgggcgtccc gggaaggag atccggagcg aatagggggc ttcgctctg
301 gccagccct ccgctgata cccagccag cgtccgcaa cctttgccc atccacgaaa
361 ctttgcccat agcagcgggc gggcactttg cactggaact tacaacccc gagcaaggac
421 ggcactctcc cgaacggggg aggetattct gccatttgg ggacacttcc ccgccgtgc
481 caggaccgcg ttctctgaaa ggctctctt gcagctgctt agacgctgga ttttttctcg
541 gtagtggaag accagcagcc tcccgcgacg atgccctca acgttagctt caccacagg
601 aactatgacc tcgactacga ctgggtgcag ccgtatttct actgcgacg ggaggagaa
661 ttctaccagc agcagcagca gagcgagctg cagccccgg cgcacagca ggatatctg
721 aagaaattcg agctgtgccc caccgcgcc ctgtcccta gcgcgcgtc cgggtctctg
781 tcgcccctct acgttgcggt cacacccttc tccttctggg gagacaacga cggcggtggc
841 gggagcttct ccacggcgga ccagctggag atgttgaccg agctgtctgg aggagacatg
901 gtgaaccaga gtttcatctg cgaaccggac gacgagacct tcatcaaaaa catcatcatc
961 caggactgta tgtggagcgg cttctcggcc gccccaagc tcgtctcaga gaagctggcc
1021 tcttaccagg ctgcgcgcaa agacagcggc agcccgaacc ccgcccgcg ccacagcgtc
1081 tgctccacct ccagcttcta cctgcaggat ctgagcgccg ccgcctcaga gtgcatcgac
1141 cctcgggtgg tcttcccta cctctcaac gacagcagct cgcacaagtc ctgcgctctg
1201 caagactcca gcgccttctc tcgctctctg gattctctgc tctcctcgac ggagtctctc
1261 ccgaggggca gcccgagcc cctgggtgctc catgaggaga caccgccac caccagcagc
1321 gactctgagg aggaacaaga agatgaggaa gaaatcgatg ttgtttctgt ggaaaagagg
1381 caggctcctg gcaaaaggtc agagtctgga tcaccttctg ctggaggcca cagcaaacct
1441 cctcacagcc cactggtctc caagaggtgc cagctctcca cacatcagca caactacgca
1501 gcgcctccct ccactcgga ggactatcct gctgccaaqa ggttcaagtt ggacagtgtc
1561 agagtcttga gacagatcag caacaaccga aaatgcacca gccccaggtc ctcgacacc
1621 gaggagaatg tcaagaggcg aacacacaac gtcttgagc gccagaggag gaacgagcta
1681 aaacggagct tttttgccc gcgtgaccag atcccgaggt tggaaaacaa tgaaaaggcc
1741 cccaaggtag ttatccttaa aaaagccaca gcatacatcc tgtccgtcca agcagaggag
1801 caaaagctca tttctgaaga ggacttgttg cggaaacgac gagaacagtb gaaacacaaa
1861 ettgaacagc tacggaaact ttgtgcgtaa ggaaaagtaa ggaacagat tcttctaac
1921 agaaatgtcc tgagcaatca cctatgaact tgtttcaaat gcatgatcaa atgcaacctc
1981 acaaccttgg ctgagtcttg agactgaaag atttagccat aatgtaaac gcctcaaat
2041 ggacttttgg cataaaagaa cttttttatg cttaccatct ttttttttct ttaacagat
2101 ttgtatttaa gaattgtttt taaaaaattt taagatttac acaatgttct tctgtaata
2161 ttgccattaa atgtaaataa ctttaataaa acgtttatag cagttacaca gaatttcaat
2221 cctagtatat agtacctagt attataggta ctataaacc taattttttt tatttaagta
2281 cattttgctt tttaaagtgt atttttttct attgttttta gaaaaataa aataactggc
2341 aaatatatca ttgagccaaa tcttaaaaaa aaaaaaaa
```

图4

A.

NM_017617.3 (SEQ ID NO: 5)

```
1 atgcgcgcgc tccctggcgcc cctgctctgc ctggcgctgc tgcccgcgct cgccgcacga
61 ggcccgcgat gctcccagcc cgggtgagacc tgcctgaatg gcgggaagtg tgaagcggcc
121 aatggcacgg aggcctgcgt ctgtggcggg gccttcgtgg gcccgcgatg ccaggacccc
181 aaccggtgcc tcagcaccac ctgcaagaac gcggggacat gccacgtggg ggaccgcaga
241 ggcgtggcag actatgcctg cagctgtgcc ctgggcttct ctgggccccct ctgcctgaca
301 cccctggaca atgcctgcct caccaacccc tgccgcaacg ggggcacctg cgacctgctc
361 acgctgacgg agtacaagtg ccgctgcccg cccggtgggt cagggaatc gtgccagcag
421 gctgaccggt ggcctccaa cccctgcgcc aacggtggcc agtgcctgcc cttcgaggcc
481 tcctacatct gccactgcc acccagcttc catggcccca cctgccggca ggatgtcaac
541 gagtgtggcc agaagcccg gctttgcgc cacggaggca cctgccaca cgaggtcggc
601 tcctaccgct gcgtctgcc cgccacccac actggcccca actgcgagcg gccctacgtg
661 cctgcagcc cctgcacctg ccagaacggg ggcaacctgc gccccacggg cgacgtcacc
721 cacgagtgtg cctgcctgcc aggtctcacc ggccagaact gtgaggaaaa tctgcagcat
781 tgtccaggaa acaactgcaa gaacgggggt gctgtgtgg acggcggtga cactacaac
841 tgccgctgcc cgccagagt gacaggtcag tactgtaccg aggatgtgga cgagtgccag
901 ctgatgccaa atgcctgcca gaacggcggg acctgccaca acaccacggg tggctacaac
961 tgctgtgtg tcaacggctg gactgtgtgag gactgcagcg agaacattga tgactgtgcc
1021 agcgccgcct gcttccacgg cgccacctgc catgaccgtg tggcctcctt ctactgcag
1081 tgtcccatg gccgcacagg tctgtgtgct cactcaacg acgcatgcat cagcaacccc
1141 tgtaacgagg gctccaactg cgacaccaac cctgtcaatg gcaaggccat ctgcacctgc
1201 cctcggggt acacgggccc ggcctgcagc caggacgtgg atgagtgtc gctgggtgcc
1261 aaccctgcg agcatgggg caagtgcac aacacgtgg gctccttcga gtgccagtg
1321 ctgcagggt acacgggccc ccgatgcgag atcgacgtca acgagtgcgt ctgcaacccg
1381 tgccagaacg acgccacctg cctggaccag attggggagt tccagtgcac ctgcatgcc
1441 ggctacgagg gtgtgcaact cgaggtcaac acagacgagt gtgccagcag cccctgcctg
1501 cacaatggcc gctgcctgga caagatcaat gacttccagt gcgagtgcac cacgggcttc
1561 actgggcatc tgtgccagta cgatgtggac gactgtgcca gacccccctg caagaatggg
1621 gccaaagtgc tggacggacc caacacttac acctgtgtgt gcacggaagg gtacacgggg
1681 acgcaactgc aggtggacat cgatgagtgc gaccccgacc cctgccacta cggctcctgc
1741 aaggacggcg tcgccacctt cactgcctc tgccgccag gctacacggg ccaccactgc
1801 gagaccaaca tcaacgagt ctccagccag ccctgccgce acggggggcac ctgccaggac
1861 cgcgacaacg cctacctctg cttctgcctg aaggggacca caggaccca ctgcgagatc
1921 aacctggatg actgtgccag cagccctgc gactcgggca cctgtctgga caagatcgat
1981 ggctacgagt gtgcctgtga gccgggtac acaggagca tgtgtaacat caacatcgat
2041 gagtgtgcgg gcaacccctg ccacaacggg ggcaacctgc aggacggcat caatggcttc
2101 acctgccgt gccccgagg ctaccacgac cccacctgcc tgtctgagg caatgagtgc
2161 aacagcaacc cctgcgtcca cggggcctgc cgggacagcc tcaacgggta caagtgcgac
2221 tgtgacctg ggtggagtgg gaccaactgt gacatcaaca acaatgagt tgaatccaac
2281 ccttgtgtca acggcggcac ctgcaaagac atgaccagt gctacgtgtg cactgcccg
2341 gagggcttca gcggtcccaa ctgccagacc aacatcaacg agtgtgcgtc caacctatgt
2401 ctgaaccagg gcacgtgtat tgacgacgtt gccgggtaca agtgcaactg cctgctgcc
2461 tacacagggt ccacgtgtga ggtgtgtgt gcccggtgtg ccccagccc ctgcagaaac
2521 ggcggggagt gcaggcaatc cgaggactat gagagcttct cctgtgtctg cccacgggc
2581 tggaagggt agacctgtga ggtcgacatc aacgagtgcg ttctgagccc gtgccggcac
2641 ggcgcatcct gccagaacac ccacggcgcc taccgtgcc actgccaggc cggctacagt
```

图5 (1/5)

A.

NM_017617.3 (SEQ ID NO: 5)

```
2701 gggcgcaact gcgagaccga catcgacgac tgccggccca acccgtgtca caacgggggc
2761 tcctgcacag acggcatcaa cacggccttc tgccgactgcc tgcccggctt ccggggcact
2821 ttctgtgagg aggacatcaa cgagtgtgcc agtgaccctt gccgcaacgg ggccaactgc
2881 acggactgcg tggacagcta cacgtgcacc tgcccgcag gcttcagcgg gatccactgt
2941 gagaacaaca cgcctgactg cacagagagc tcctgtctca acggtggcac ctgctgggac
3001 ggcatcaact cgttcacctg cctgtgtcca cccggcttca cgggcagcta ctgccagcac
3061 gatgtcaatg agtgcgactc acagccctgc ctgcatggcg gcacctgtca ggacggctgc
3121 ggctcctaca ggtgcacctg ccccagggc tacactggcc ccaactgcc gaacctgtg
3181 cactggtgtg actcctcgcc ctgcaagaac ggcggaat gctggcagc ccacaccag
3241 taccgctgcg agtgccccag cggctggacc ggcccttact gcgacgtgcc cagcgtgtcc
3301 tgtgaggtgg ctgcgcagcg acaaggtgtt gacgttgccc gcctgtgcc gcatggaggg
3361 ctctgtgtgg acgcgggcaa cacgcaccac tgccgctgcc aggcgggcta cacaggcagc
3421 tactgtgagg acctggtgga cgagtgtcca cccagccctt gccagaacgg ggccacctgc
3481 acggactacc tggcgggcta ctctgcaag tgctggccg gctaccacgg ggtgaactgc
3541 tctgaggaga tcgacgagtg cctctccac ccctgccaga acgggggac ctgcctcgac
3601 ctccccaca cctacaagtg ctctgcccc cggggcactc aggggtgtga ctgtgagatc
3661 aacgtggacg actgcaatcc cccgctgac cccgtgtccc ggagcccaa gtgctttaac
3721 aacggcacct gcgtggacca ggtggcgccg tacagctgca cctgcccgcc gggtctcgtg
3781 ggtgagcgtc gtgaggggga tgtcaacgag tgctgtcca atccctgcga cgcctgtggc
3841 acccagaact gcgtgcagcg cgtcaatgac ttccactgcg agtgccgtgc tggtcacacc
3901 gggcgccgct gcgagtcctg catcaatggc tgcaaaggca agccctgcaa gaatgggggc
3961 acctgcgcg tggcctccaa caccgcccgc gggttcactt gcaagtgcct tgcgggcttc
4021 gaggggcgca cgtgtgagaa tgacgctcgt acctgcgca gcctgcgtg cctcaacggc
4081 ggacatgca tctccggccc gcgcagcccc acctgcctgt gcctggggcc cttaacgggc
4141 cccgaatgcc agttcccggc cagcagcccc tgccctggcg gcaacccctg ctacaaccag
4201 gggacctgtg agccacatc cgagagcccc ttctaccgtt gcctgtgcc ccgcaaatc
4261 aacgggctct tgtgccacat cctggaacta agcttcgggg gtggggccgg gcgcgacatc
4321 ccccgccgc tgatcgagga ggcgtgcgag ctgcccgagt gccaggagga cgcgggcaac
4381 aaggtctgca gcctgcagtg caacaaccac gcgtgcggct gggacggcgg tgactgctcc
4441 ctcaacttca atgacccctg gaagaactgc acgcagtctc tgcagtgtct gaagtacttc
4501 agtgacggcc actgtgacag ccagtgcac tcagccggct gcctcttoga cggctttgac
4561 tgccagcgtg cgggaaggcca gtgcaacccc ctgtacgacc agtactgcaa ggaccacttc
4621 agcgacgggc actgcgacca gggctgcaac agcgcggagt gcgagtggga cgggctggac
4681 tgtgcggagc atgtaccoga gaggtggcg gccggcacgc tgggtggtgt ggtgctgatg
4741 ccgcccggagc agctgcgcaa cagctccttc cacttctctg gggagctcag ccgctgtctg
4801 cacaccaacg tggctcttaa cgtgacgca caccggcagc agatgatctt cccctactac
4861 ggcgcgagg aggagctgcg caagcaccac atcaagcgtg ccgcccaggg ctgggcccga
4921 cctgacgccc tgctgggcca ggtgaaggcc tcgctgctcc ctggtggcag cgaagggtgg
4981 cggcggcgga gggagctgga ccccatggac gtccgcggct ccatcgtcta cctggagatt
5041 gacaaccggc agtgtgtgca ggctcctctg cagtgtctcc agagtgcac cgactgtggc
5101 gcattcctgg gagcgtctgc ctgcctgggc agcctcaaca tccctacaa gatcgaggcc
5161 gtgcagagtg agaccgtgga gccgcccccg ccggcgagc tgcaactcat gtactgtggc
5221 gcggcgccct ttgtgcttct gttcttctgt ggctgcgggg tgctgtgtgc ccgcaagcgc
5281 cggcggcagc atggccagct ctggttccct gagggcttca aagtgtctga ggccagcaag
```

图5 (2/5)

A.

NM_017617.3 (SEQ ID NO: 5)

```
5341 aagaagcggc gggagccctt cggcgaggac tccgtgggcc tcaagccctt gaagaacgct
5401 tcagacggtg ccctcatgga cgacaaccag aatgagtggg gggacgagga cctggagacc
5461 aagaagtccc ggttcgagga gcccggtggt ctgcctgacc tggacgacca gacagaccac
5521 cggcagtggc ctcagcagca cctggaatgcc gctgacctgc gcatgtctgc catggccccc
5581 acaccgcccc aggggtgaggt tgacgcccgc tgcatggacg tcaatgtccg cgggcctgat
5641 ggcttcaccc cgtcatgat cgcctcctgc agcggggggc gcctggagac gggcaacagc
5701 gaggaagagg aggacgcgcc ggccgtcatc tccgacttca tctaccaggg cgcagcctg
5761 cacaaccaga cagaccgcac gggcgagacc gccttgacc tggccgccc ctaactcacg
5821 tctgatgccg ccaagcgcc tctggaggcc agcgcagatg ccaacatcca ggacaacatg
5881 ggccgcaccc cgttgcattg ggtgtgtgtt gcgcagcac aaggtgtctt ccagatcctg
5941 atccggaacc gagccacaga cctggaatgcc cgcattgatg atggcacgac gccactgatc
6001 ctggctgccc gcctggccgt ggagggcatg ctggaggacc tcatcaactc acacgccgac
6061 gtcaacgcgc tagatgacct gggcaagtcc gccctgcact gggccgccc cgtgaacaat
6121 gtggatgccg cagtgtgtct cctgaagaac ggggctaaca aagatatgca gaacaacagg
6181 gaggagacac cctgtttctt ggcgcgcccg gagggcagct acgagaccgc caaggtgtctg
6241 ctggaccact ttgccaaccg ggacatcacg gatcatatgg accgcctgcc gcgcgacatc
6301 gcacaggagc gcatgcatca cgacatcgtg aggtgtctgg acgagtacaa cctgggtgccc
6361 agcccgcagc tgcacggagc ccgctggtgg ggcaacgcca cctgtctgcc cccgctctgc
6421 tcgcccacg gctacctggg cagcctcaag cccggcgtgc agggcaagaa ggtccgcaag
6481 ccagcagca aaggcctggc ctgtggaagc aaggaggcca aggacctcaa ggcacggagg
6541 aagaagtccc aggcggcaa gggctgcctg ctggacagct ccggcatgct ctgcccctg
6601 agcccctgg agtcacccc tggctacctg tcagacgtgg cctcgccgac actgtgccc
6661 tccccgttcc agcagtctcc gtccgtgccc ctcaaccacc tgcctgggat gcccgacacc
6721 cacctgggca tcgggcacct gaacgtggcg gccaaagccc agatggcggc gctgggtggg
6781 ggcggccggc tggcctttga gactggccca cctcgtctct ccacactgcc tgtggcctct
6841 ggcaccagca ccgtcctggg ctccagcagc ggagggggcc tgaatttcac tgtgggcggg
6901 tccaccagtt tgaatgggtc atgcgagtgg ctgtcccggc tgcagagcgg catggtgccg
6961 aaccaatata accctctgcg ggggagtgtg gcaccaggcc cctgagcac acaggccccc
7021 tcctgcagc atggcatggt agggccgctg cacagtagcc ttgctgccc cgcctgtctc
7081 cagatgatga gctaccaggg cctgcccagc acccggtgtg cccccagcc tcacctggtg
7141 cagaccagc aggtgcagcc aaaaaactta cagatgcagc agcagaacct gcagccagca
7201 aacatccagc agcagcaaa cctgcagccg ccaccaccac caccacagcc gcaccttggc
7261 gtgagctcag cagccagcgg ccacctgggc cggagcttcc tgagtggaga gccgagccag
7321 gcagacgtgc agccactggg ccccagcagc ctggcggtgc aactattctt gccccaggag
7381 agccccgccc tgcacagctc gctgceatcc tgcgtggtcc caccctgtac cgcagcccag
7441 ttcctgacgc cccctcgca gcacagctac tctcgcctg tggacaacac cccagccac
7501 cagctacagg tgcctgagca cccctctctc acccgtccc ctgagtcccc tgaccagtgg
7561 tccagctcgt ccccgcatc caacgtctcc gactggtccg agggcgtctc cagccctccc
7621 accagcatgc agtcccagat cgcgcgcatc ccggaggcct tcaagtaaac ggcgcgccc
7681 acgagacccc ggtctccttt cccaagcctt cgggcgtctg tgtgcgtctt gtggtgcca
7741 gggccgacca gaggagcctt tttaaaacac atgtttttat acaaaaataa aacgaggatt
7801 ttaatttttt ttagtattta tttatgtact tttattttac acagaaacac tgccttttta
7861 tttatatgta ctgtttttat tggcccagc tagaaacttt tatctattct gagaaaacaa
7921 gcaagttctg agagccaggg ttttctacg taggatgaaa agattcttct gtgtttataa
```

图5 (3/5)

A.

NM_017617.3 (SEQ ID NO: 5)

```

7981 aatataaaca aagattcatg atttataaat gccatttatt tattgattcc ttttttcaaa
8041 atccaaaaag aaatgatgtt ggagaaggga agttgaacga gcatagtcca aaaagctcct
8101 gggcggtcca ggcgcgcgcc tttcccgac gccaccaca cccaagcca gcccgccgc
8161 tccaccagca tcacctgcct gttaggagaa gctgcatcca gaggcaaagc gaggcaaagc
8221 tggctcacct tccgcacgcg gattaatttg catctgaaat aggaaacaag tgaaagcata
8281 tgggttagat gttgccatgt gtttttagat gtttcttgca agcatgcttg tgaaaaatgtg
8341 ttctcggagt gtgtatgcca agagtgcacc catggtagca atcatgaatc tttgtttcag
8401 gttcagtatt atgtagtgtt tcgttggtta tacaagttct tggtcctcc agaaccaccc
8461 cggccccctg cccgttcttg aaatgtaggc atcatgcatg tcaaacatga gatgtgtgga
8521 ctgtggcact tgcctgggtc acacacggag gcacccacc cttttctggg gaaagacact
8581 gcctgggctg accccggttg cgccccagc acctcagcct gcacagtgtc ccccagggtc
8641 cgaagaagat gctccagcaa cacagcctgg gccccagctc gcgggaccgc acccccctg
8701 ggctcccgtg ttttgtagga gacttgccag agccgggcac attgagctgt gcaacgcctg
8761 gggctgcgtc ctttggtcct gtccccgcag ccctggcagg gggcatgcgg tcgggcaggg
8821 gctggaggga ggcgggggct gcccttgggc caccctcct agtttgagg gagcagattt
8881 ttgcaatacc aagtatagcc tatggcagaa aaaaagtctg taaatatgtt tttaaagggtg
8941 gattttgttt aaaaaatctt aatgaatgag tctgttgtgt gtcatgccag tgaggacgt
9001 cagacttggc tcagctcggg gagccttagc cgcccatgca ctggggacgc tccgctgccg
9061 tgccgcctgc actcctcagg gcagcctccc ccggtcttac gggggccgcg tgggtccatc
9121 cccagggggc atgaccagat gcgtcccaag atgttgattt ttactgtgtt ttataaaata
9181 gagtgtagtt tacagaaaaa gactttaaaa gtgatctaca tgaggaactg tagatgatgt
9241 atttttttca tcttttttgt taactgattt gcaataaaaa tgatactgat ggtgaaaaaa
9301 aaaaaaaaa

```

B.

NM_017617.3 核苷酸位置 5260 - 7665 (SEQ ID NO: 8)

```

5260 g tgetgctgtc ccgcaagcgc
5281 cggcggcagc atggccagct ctggttccct gagggcttca aagtgtctga ggccagcaag
5341 aagaagcggc gggagccctt cggcgaggac tccgtgggcc tcaagccctt gaagaacgct
5401 tcagacggtg ccctcatgga cgacaaccag aatgagtggg gggacgagga cctggagacc
5461 aagaagttcc ggttcgagga gccctgggtt ctgcctgacc tggacgacca gacagaccac
5521 cggcagtggg ctcagcagca cctggatgcc gctgacctgc gcatgtctgc catggcccc
5581 acaccgccc aggtgaggtt tgacgcccag tgcatggacg tcaatgtccg cgggcctgat
5641 ggcttcaccc cgctcatgat cgctcctgac agcgggggcg gcctggagac gggcaacagc
5701 gaggaagagg aggacgcgcc ggccgtcatc tccgacttca tctaccaggg cggcagcctg
5761 cacaaccaga cagaccgcac gggcgagacc gccttgacac tggccgcccg ctactcagc
5821 tctgatgccg ccaagcgcct gctggaggcc agcgcagatg ccaacatcca ggacaacatg
5881 ggcgcacccc cgctgcatgc ggctgtgtct gccgacgcac aaggtgtctt ccagatcctg
5941 atccggaacc gagccacaga cctggatgcc cgcatgcatg atggcacgac gccactgatc
6001 ctggctgccc gcctggccgt ggaggcatg ctggaggacc tcatcaactc acacgccgac

```

图5 (4/5)

B.

NM_017617.3 核苷酸位置 5260 - 7665 (SEQ ID NO: 8)

```

6061 gtcaacgccg tagatgacct gggcaagtcc gccctgcact gggccgccgc cgtgaacaat
6121 gtggatgccg cagttgtgct cctgaagaac ggggctaaca aagatatgca gaacaacagg
6181 gaggagacac ccctgtttct ggccgcccg gagggcagct acgagaccgc caaggtgctg
6241 ctggaccact ttgccaaccg ggacatcacg gatcatatgg accgcctgcc gcgcgacatc
6301 gcacaggagc gcatgcatca cgacatcgtg aggttgcctg acgagtacaa cctggtgctg
6361 agcccgagc tgcacggagc cccgctgggg ggacgcccc cctgtcgcgc cccgctctgc
6421 tcgccaacg gctacctggg cagcctcaag cccggcgtgc agggcaagaa ggtccgcaag
6481 cccagcagca aaggcctggc ctgtggaagc aaggaggcca aggacctcaa ggcacggagg
6541 aagaagtccc aggcggcaa gggctgcctg ctggacagct ccggcatgct ctgcgccgtg
6601 gactccctgg agtaccacca tggctacctg tcagacgtgg cctcgccgcc actgctgccc
6661 tccccgttcc agcagtcctc gtccgtgccc ctcaaccacc tgcctgggat gcccgacacc
6721 cacctgggca tcggggacct gaacgtggcg gccaaagccc agatggcggc gctgggtggg
6781 ggccggccgc tggcctttga gactggccca cctcgtctct cccacctgcc tgtggcctct
6841 ggaccagca ccgtcctggg ctccagcagc ggaggggccc tgaatttcac tgtggcgagg
6901 tccaccagtt tgaatgggca atgcgagtg ctgtcccggc tcagagcggc catggtgccc
6961 aaccaataca accctctgcg ggggagtggt gcaccaggcc ccttgagcac acaggccccc
7021 tccctgcagc atggcatggg agggccgctg cacagttagc ttgctgccac cgccctgtcc
7081 agcatgatga gctaccaggc cctgccagc acccggtgg ccaccagcc tcacctgggt
7141 cagaccagc aggtgcagcc acaaaactta cagatgcagc agcagaacct gcagccagca
7201 aacatccagc agcagcaaac cctgcagccg ccaccaccac caccacagcc gcaccttggc
7261 gtgagctcag cagccagcgg ccacctgggc cggagcttcc tgagtggaga gccgagccag
7321 gcagacgtgc agccactggg cccagcagc ctggcggtgc acactattct gccccaggag
7381 agccccgcc tgccacgtc gctgcatcc tcgttggtcc cccccgtgac cgcagccag
7441 ttcctgacgc cccctcgca gcacagctac tcctgcctg tggacaacac cccagccac
7501 cagctacagg tgcctgagca ccccttctc acccgcctcc ctgagtcccc tgaccagtgg
7561 tccagctcgt ccccgcatc caacgtctcc gactggtccg agggcgctc cagccctccc
7621 accagcatgc agtcccagat cgcccgcat ccggaggcct tcaag

```

图5 (5/5)

NM_005172.1 (SEQ ID NO: 6)

```

1 atgtccgcc tgctgcatgc agaagagtgg gctgaagtga aggagttggg agaccaccat
61 cgccagcccc agccgcatca tctcccgcaa ccgcccgcgc cgcgcagcc acctgcaact
121 ttgcaggcga gagagcatcc cgtctacccg cctgagctgt ccttcctgga cagcaccgac
181 ccacgcgcct ggctggctcc cactttgcag ggcatctgca cggcacgcgc cgcaccgat
241 ttgctacatt ccccgagctt gggtgcttca gaggccgctg cgcctccgga cgaggtggac
301 ggccgggggg agctggtaag gaggagcagc ggccgtgcca gcagcagcaa gagccccggg
361 ccggtgaaag tgcgggaaca gctgtgcaag ctgaaaggcg ggggtggtgt agacgagctg
421 ggctgcagcc gccaacgggc cccttccagc aaacagggtg atggggtgca gaagcagaga
481 cggctagcag ccaacgcagc ggagcggcgc aggatgcatg ggtgaaacca cgccttcgac
541 cagctgcgca atgttatccc gtcttcaaac aacgacaaga agctgtccaa atatgagacc
601 ctgcagatgg cccaaatcta catcaacgcc ttgtccgagc tgcataaac gccccagcga
661 ggggaacagc caccgcgcgc tcagcctccc tgcaaaagcg accaccacca ccttcgcacc
721 gcgcctcctt atgaaggggg cgcgggcaac gcgaccgcag ctggggctca gcaggcttcc
781 ggagggagcc agcggccgac ccgcccggg agttgcggga ctgccttctc agccccagct
841 tctgcgggag ggtactcggg gcagctggac gctctgcact tctgcattt cgaggacagc
901 gccctgacag cgaatgatgg ccaaaagaat ttgtctcctt ctctcccg ggcacatctg
961 cagccagtgc aggaggaaaa cagcaaaact tcgcctcggc cccacagaag gcagcgggaa
1021 ttttccccc attcccatca cagtgaactc gatgaggcaa gtttag

```

图6

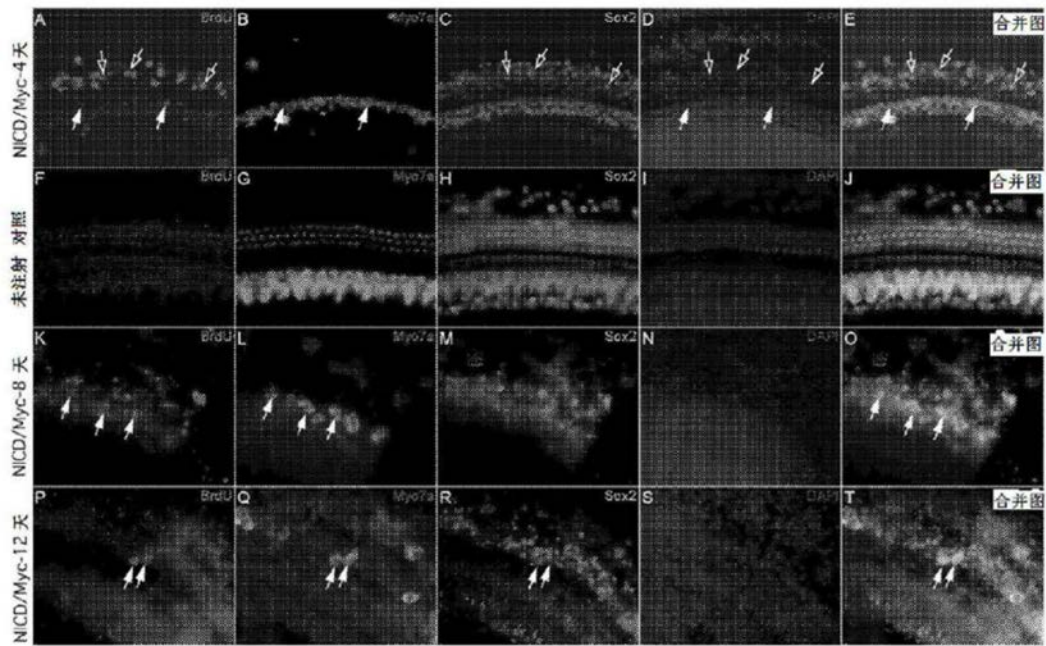


图7

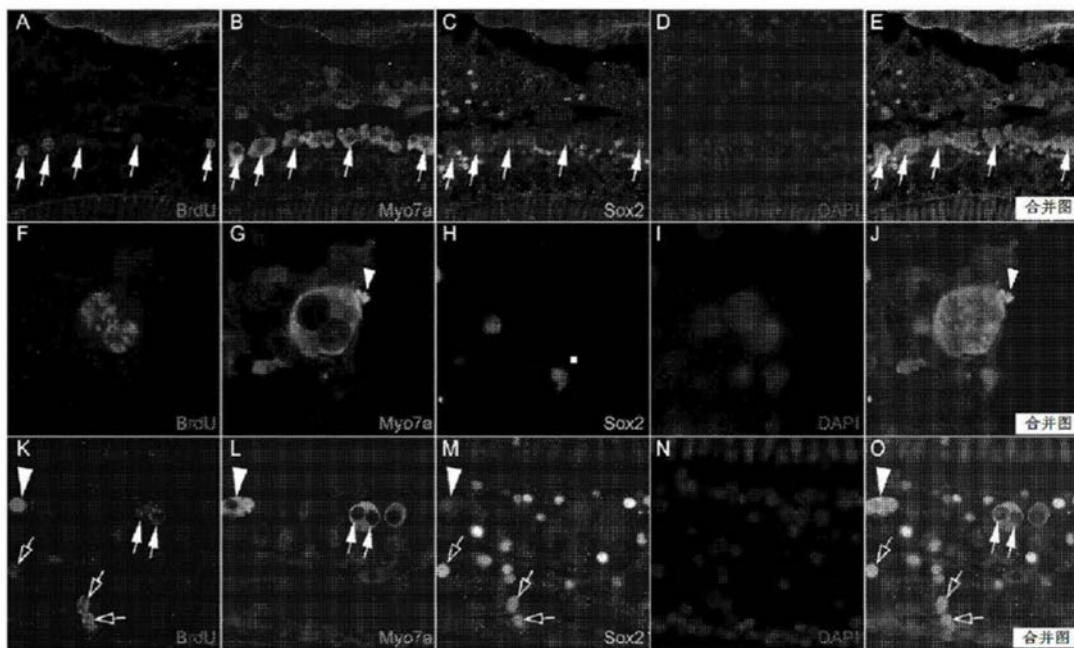


图8

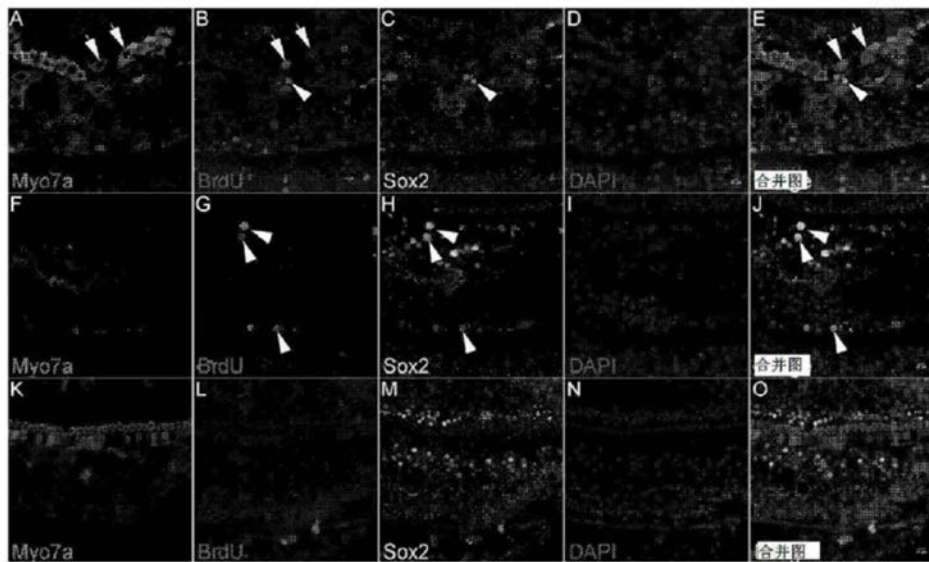


图9

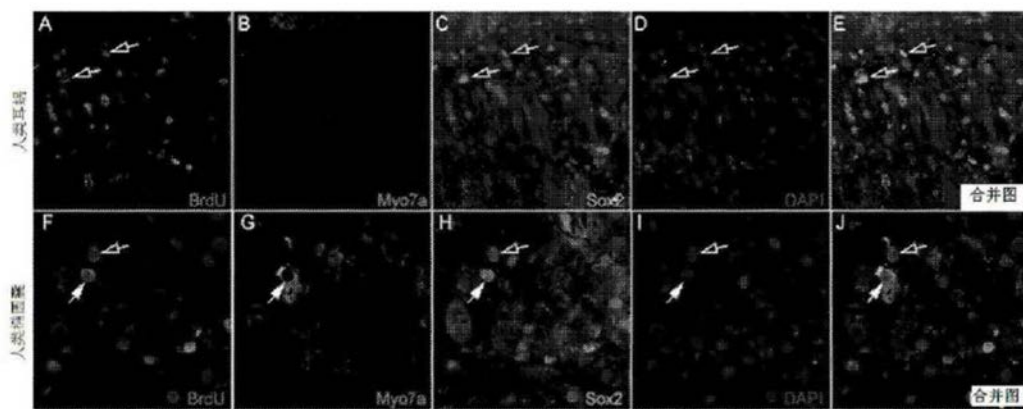


图10

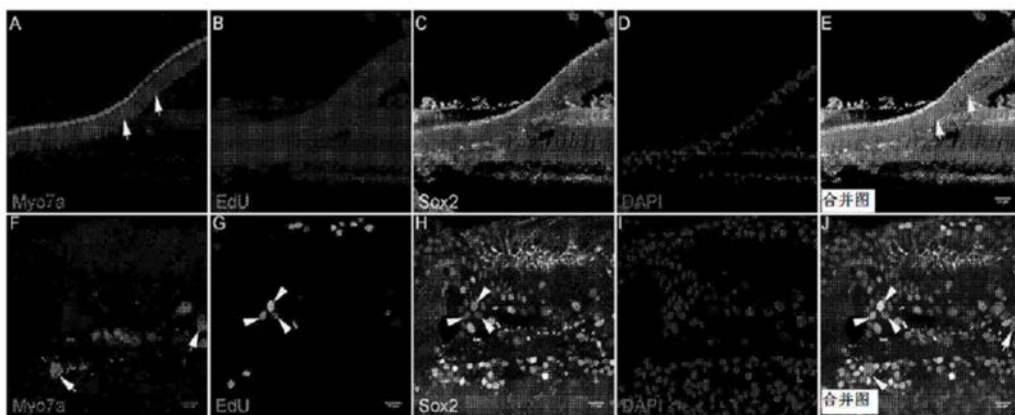


图11

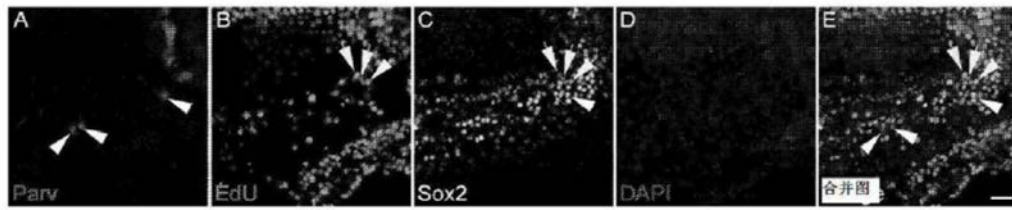


图12

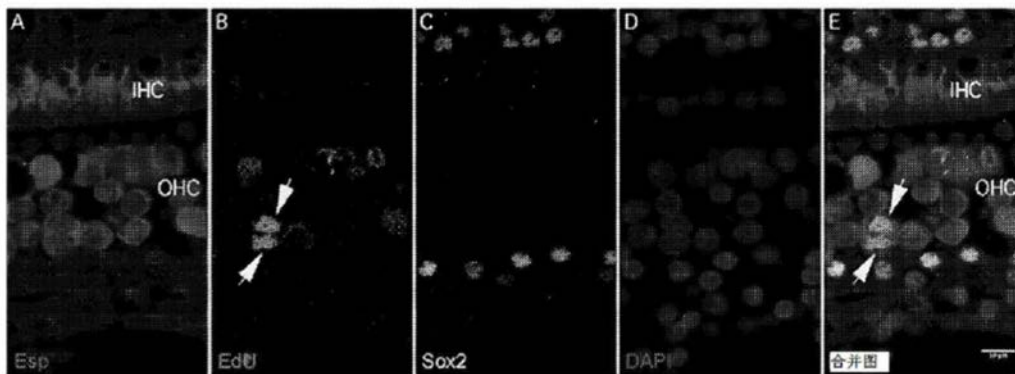


图13

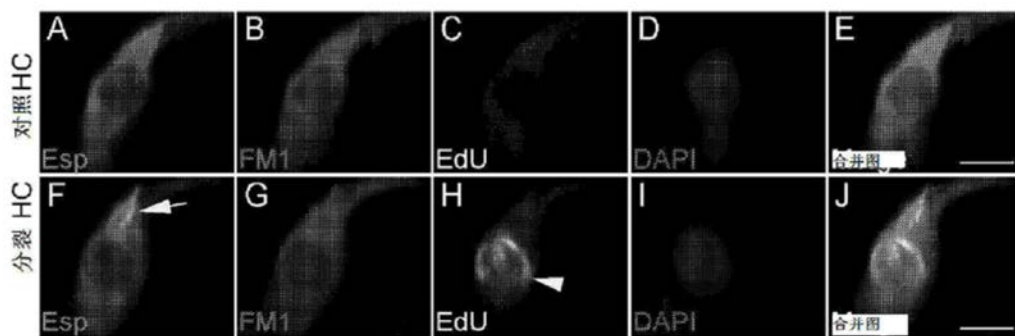


图14

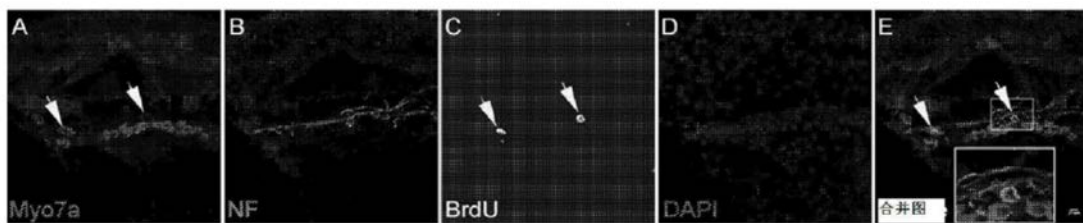


图15

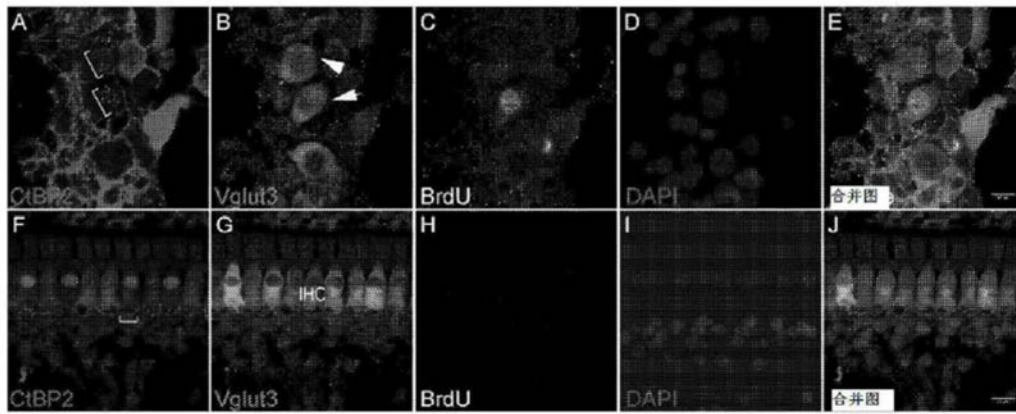


图16

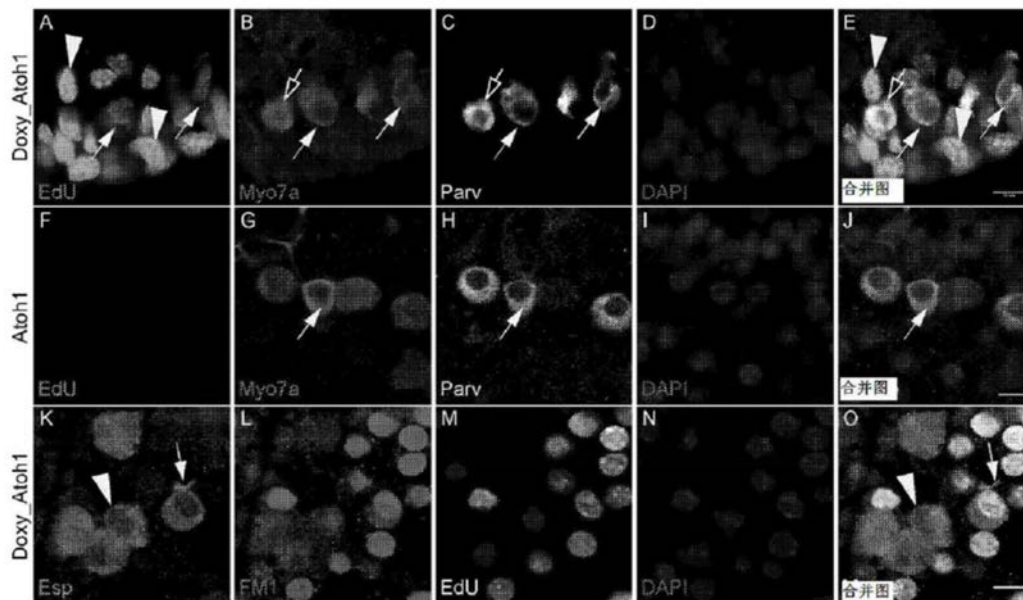


图17

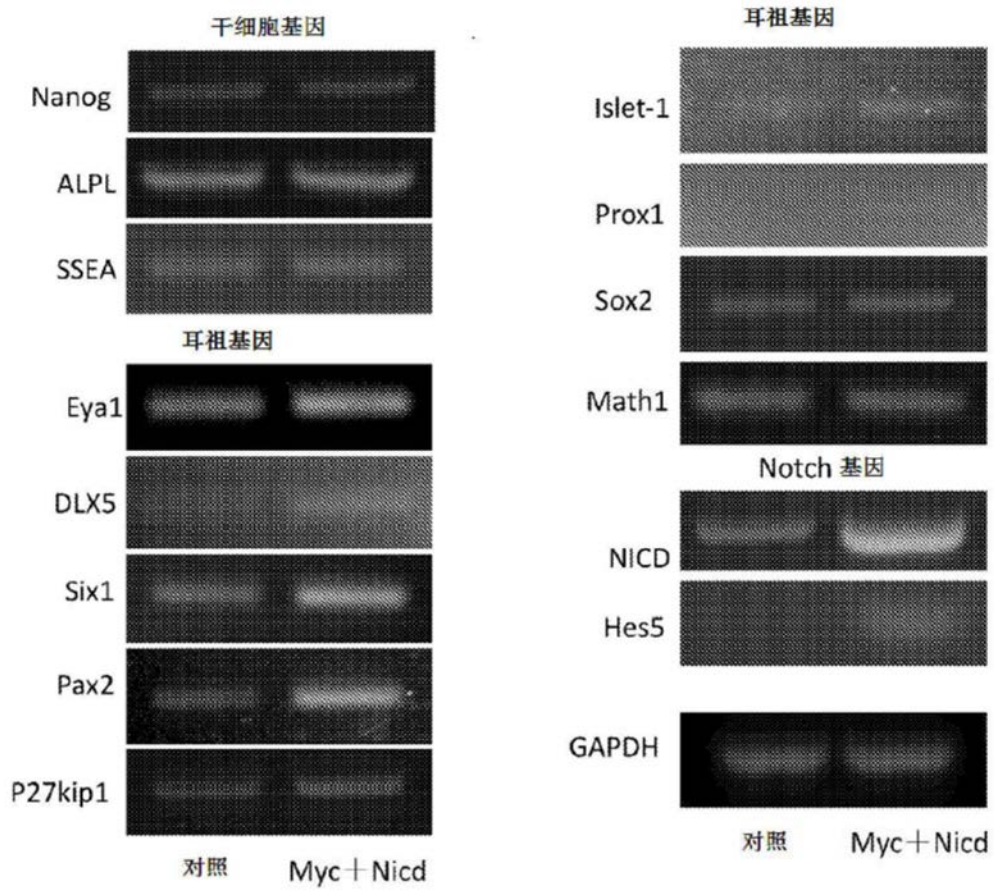


图18

A.

NP_005369.2; SEQ ID NO: 12

```

1   mpstctstmp gmicknpdle fdslqpcfyp deddfyfvgp dstppgediw kkfellptpp
61  lspsrgfaeh sseppswvte mllenelwgs paeedafglg glggltpnpv ilqdcmwsgf
121 sareklerav seklqhgrrp ptagstaqsp gagaaspagr ghggaagagr agaalpaela
181 hpaaecvdpa vvfpfvvnkr epapvpaapa sapaagpava sgagiaapag apgvapprpg
241 grqtsggdhk alstsgedtl sdsddeddee edeeeeeidv tvekrsssn tkavttftit
301 vrpknalgp graqsselil krclpihqgh nyaapspyve sedappqkki kseasprplk
361 svippkaks1 sprnsdseds errrnhnile rqrndlrss fltldrhdvpe lvknekaakv
421 lkkateyv hslqaeehql llekeklqar qqqlkkkieh artc

```

B.

NM_005378.4; SEQ ID NO: 13

```

1   gtcactgtgc tggacgcgct ggggtggatgc ggggggctcc tgggaactgt gttggagccg
61  agcaagcgct agccaggcgc aagcgcgcac agactgtagc catccgagga ccccccgcc
121 ccccgggccc acccgagac acccgcgacg aatcgccctc ggatccctg cagtcggcgg
181 gactgttggg ggtcggcgcc ggccccgcgc ttccgcgcgc cccacgggaa ggaagcacc
241 ccggtattaa aacgaacggg gcggaagaa gccctcagtc gccggcgccg aggcgagccg
301 atgccgagct gtcacacgct caccatgccg ggcatgatct gcaagaaccc agacctcgag
361 tttgactgcg tacagccctg cttctaccgc gacgaagatg acttctactt cggcgggccc
421 gactcgaccc ccccggggga ggacatctgg aagaagtgtg agctgctgcc cacgcccccg
481 ctgtcgccca gccgtggctt cgcggagcac agctccgagc ccccgagctg ggtcacggag
541 atgtgtgctg agaacgagct gtggggcagc ccggccgagg aggacgcgtt cggcctgggg
601 ggactgggtg gcctcacccc caaccgggtc atcctccagg actgcatgtg gagcggttc
661 tccgcccgcg agaagctgga gcgcgcgctg agcgagaagc tgcagcacgg ccgcgggccg
721 ccaaccgccc gttccaccgc ccagtcctcc ggagccggcg ccgccagccc tgcgggtcgc
781 gggcacggcg gggctgcggg agccggcgcc gccggggccg cctgccccgc cgagctcgcc
841 caccggcgcc ccgagtgcgt ggatcccgcc gtggtcttcc cctttccctg gaacaagcgc
901 tagccagcgc ccgtgcccgc agccccggcc agtggcccg cggcgggccc tgcggtcgcc
961 tcggggggcg gtattgccc cccagccggg gcccgggggg tgcctccctc gcgccaggg
1021 ggccgcccga ccagcgggcg cgaccacaag gccctcagta cctccggaga ggacaccctg
1081 agcgattcag atgatgaaga tgatgaagag gaagatgaag aggaagaaat cgacgtgggtc
1141 actgtggaga agcgcgcttc ctctccaac accaaggctg tcaccacatt caccatcact
1201 gtgctgccc aagacgcagc cctgggtccc gggagggtcc agtccagcga gctgatcctc
1261 aaacgatgcc ttcccatcca ccagcagcac aactatgccc cccctctctc ctacgtggag
1321 agtgaggatg cccccaca gaagaagata aagagcgagg cgtccccacg tccgctcaag
1381 agtgtcatcc ccccaaaggc taagagcttg agccccgaa actctgactc ggaggacagt
1441 gagcgtcgca gaaaccacaa catcctggag cgccagcgcc gcaacgacct tcggtccagc
1501 tttctcacgc tcagggacca cgtgccggag ttggtaaaga atgagaaggc cgccaagggtg
1561 gtcattttga aaaaggccac tgagtatgtc cactccctcc aggccgagga gcaccagctt
1621 ttgctggaag aggaaaaatt gcaggcaaga cagcagcagt tgctaaagaa aattgaacac
1681 gctcggactt gctagacgct tctcaaaact ggacagtcac tgccactttg cacattttga
1741 tttttttttt aaacaaacat tgtgttgaca ttaagaatgt tgggtttactt tcaaatcggt
1801 cccctgtcga gttcggctct ggggtggcag taggaccacc agtgtggggg tctgctggga
1861 ccttgagag cctgcacccc aggatgctgg gtggccctgc agcctcctcc acctcacctc
1921 catgacagcg ctaaacgttg gtgacgggtg ggagcctctg gggctgttga agtcaccttg
1981 tgtgttccaa gtttccaaac aacagaaagt cattccttct ttttaaaatg gtgcttaagt
2041 tccagcagat gccacataag gggtttgcca tttgataccc ctggggaaca tttctgtaaa
2101 taccattgac acatccgctt tttgtatata tcctgggtaa tgagaggtgg cttttgcggc

```

图19 (1/2)

```

2161 cagtattaga ctggaagttc atacctaagt actgtaataa tacctcaatg tttgaggagc
2221 atgttttgtg tacaaatata ttgttaatct ctgttatgta ctgtactaat tcttacactg
2281 cctgtatact ttagtatgac gctgatacat aactaaattt gatacttata ttttcgtatg
2341 aaaatgagtt gtgaaagttt tgagtagata ttactttatc actttttgaa ctaagaaact
2401 tttgtaaaga aatttactat atatatatgc ctttttctta gcctgtttct tcctgttaat
2461 gtattttgtc atgttttggtg catagaactg ggtaaatgca aagttctgtg ttttaatttct
2521 tcaaaatgta tatatttagt gctgcatctt atagcacttt gaaataacctc atgttttatga
2581 aaataaatag cttaaaatta aatgaaaaaa aaa

```

图19 (2/2)

A.

NP_077719.2; SEQ ID NO: 14

```

1 mpalrpallw allalwlcca apahalqcrd gyepcvnegm cvtyhngtgy ckcepegflge
61 ycghrdpcek nrcqnggtcv aqamlgkate rcasgftged cqystshpcf vsrpcplnggt
121 chmlsrdtype ctcqvgtgk ecqwtadcls hpcangstct tvanqfscck ltgftgkce
181 tdvnecdipt hcqhgggtcln lpgsyqcqcp qgftgqyds lyvpcapspc vnggtcrqtg
241 dftfecncip gfegstcern iddcpnhrcq nggvcdvgn tyncrcppqw tgqfctedvd
301 ecllqpnacq nggtcanrng gygcvcvngw sgddcsenid dcafasctpg stcidrvasf
361 scmcepegkag llchlddaci snpchkgalc dtnplngqyi ctcpggykga dteddvdeca
421 mansnpceha gkevntdgaf hceclkgayg prcemdinec hsdpcqndat cldkiggftc
481 lcmpgfgkvh celeinecqs npcvnnqgv dkvnrfqclc ppqftgpvcq ididdcsstp
541 clngakcidh pngyecqcat gftgvlceen idncdpdpch hgqcqdgids ytcicnpgym
601 gaicsdqide cysspcldng rclidlvngyq cncqpgtsgv nceinfddca snpcihgicm
661 dginryscvc spgftggrcn ididecasnp crkgatcing vngfrcicpe gphhpscsysq
721 vneclsnpci hgnctgglsq ykclcdagwv gincevdkne clsnpcqngg tcdnlvngyr
781 ctckkgfkgy ncqvnideca snpcplnggtc fddisgytch cvlpytgknc qtvlapcspn
841 pcenaavcke spnfesytcl capgwgqqr c tididecisk pcmnhglchn tgqsymcecp
901 pgfsgmdcee diddclanpc qngsgcmgv ntfsclclpg ftgdkcqtmd neclsepckn
961 ggtcsdyvns ytckcagfd gvhcennine ctesscfngg tcvdginfs clcpvgftgs
1021 felheinecs shpclnegtc vdglgtyrcs cplgytgknc qtlvnlcsrs pcknkgctcvq
1081 kkaesqclcp sgwagaycdv pnvscdiaas rrgvlvehlc qhsgvcinag nthycqcpig
1141 ytgsyceeql decasnpqch gatcsdfigg yrcecvpgyq gvnceyevde cqnqpcqngg
1201 tcidlvnhfk cscppgtrgl lceeniddca rgphclnggq cmdriggysc rclpgfager
1261 cegdinecls npcseegsld ciqltndyle vcrsaftgrh cetfvdvcpq mpclnggtca
1321 vasmnpdffi crcppgfsga rcqsscgvk crkgeqcvht asgprcfcp asgprcfcp
1381 spcqhggsch pqrqppysc qcappfsgsr celytappst ppatclsqyc adkardgvcd
1441 eacnshacqw dggdcsltme npwanesspl pcwdyinnq delcntvecl fdnfecqgns
1501 ktckydkyca dhfkdnhdq gcnscecgwd gldcaadqpe nlaegtlviv vlmpeqllq
1561 darsflralg tllhtnlrik rdsqgelmv pyygeksaam kkqrmtrsl pgeqeqevag
1621 skvfleidnr qcvqdsdhcf kntdaaaall ashaiqgtls yplsvvses ltpertqlly
1681 llavavviil fiillgvima krkrkhgslw lpegftlrrd asnhkrrepv gqdavglknl
1741 svqvseanli gtgtsehwd deggqpkvk aedeallsee ddpidrrpwt qghleadir
1801 rtpslaltpp qaeqevdld vnvrgpdgct plmlaslrqg ssdlsdeded aedssaniit
1861 dlvyggaslg aqtdrtgema lhlaarysra daakrlldag adanaqdnmg rcplhaavaa
1921 daqgvfqiili rnrvtldar mndgttplil aarlavegm aelincqadv navddhgksa
1981 lhwaavnnv eatllllkng anrdmqdnke etplflaare gsyeaakill dhfanrditd
2041 hmdrlprdva rdrmhhdivr lldeynvtps pggtvltal spvicgpnrs flslkhtpmg
2101 kksrrpsaks tmptslpnla keakdakgr rkkslsekva lsessvtlsp vdslesphty
2161 vsdttsppmi tspgilgasp nplataapp apvhaqhals fsnlhemqpl ahgastvlp
2221 vsqllshhhi vspgsgsags lsrlhvpvpv adwmnrmevn etqynemfgm vlapaegthp
2281 giapqsrppe gkhittprep lppivtfqli pkgslagpag apqpqstcpp avagplptmy
2341 qipemarlp vafptammpq qdgqvaqtil payhpfaspv gkytppsgh syassnaaer
2401 tpsghlqg ehpyltpspe spdqwssssp hsdwdsdv tsptpggagg gqrgpgthms
2461 epphnmqv a

```

图20 (1/5)

B.

NM_024408.3; SEQ ID NO: 15

```
1 gcttgcggtg ggaggaggcg gctgaggcgg aaggacacac gaggtgctt cgttgacac
61 ccgagaaagt ttcagccaaa cttcgggcgg cggctgaggc ggcgcccgag gagcgccgga
121 ctcgggggcg ggggagtcga ggcatttgcg cctgggcttc ggagcgtagc gccagggcct
181 gagcctttga agcaggagga ggggaggaga gagtggggct cctctatcgg gacccccctc
241 ccatgtggat ctgccaggc ggcggcggcg gcggcggagg aggaggcgac cgagaagatg
301 cccgccttgc gcccgcctct gctgtgggcg ctgctggcgc tctggctgtg ctgcgcgcc
361 cccgcgcattg cattgcagtg tcgagatggc tatgaacct gtgtaaatga aggaatgtgt
421 gttacctacc acaatggcac aggatactgc aaatgtccag aaggcttctt gggggaatat
481 tgtcaacatc gagaccctg tgagaagaac cgctgccaga atggtgggac ttgtgtggcc
541 caggccatgc tggggaaagc cagtgccga tgtgcctcag ggtttacagg agaggactgc
601 cagtactcaa catctcatcc atgctttgtg tctcgacct gcctgaatgg cggcacatgc
661 catatgtctc gccgggatac ctatgagtgc acctgtcaag tcgggtttac aggtaaggag
721 tgccaatgga cggatgcctg cctgtctcat cctgtgcaa atggaagtac ctgtaccact
781 gtggccaacc agttctctc caaatgcctc acaggcttca cagggcagaa atgtgagact
841 gatgtcaatg agtgtgacat tccaggacac tgccagcatg gtggcacctg cctcaacctg
901 cctggttcct accagtgcga gtgccctcag ggcttcacag gccagtactg tgacagcctg
961 tatgtgccct gtgcacctc acctgtgtgc aatggaggca cctgtcggca gactggtgac
1021 ttcacttttg agtgcaactg ccttcagggt tttgaaggga gcacctgtga gaggaatatt
1081 gatgactgcc ctaaccacag gtgtcagaat ggaggggttt gtgtggatgg ggtcaacact
1141 tacaactgcc gctgtcccc acaatggaca ggacagttct gcacagagga tgtggatgaa
1201 tgctgtctgc agcccaatgc ctgtcaaat gggggcacct gtgccaaccg caatggaggc
1261 tatggctgtg tatgtgtcaa cggctggagt ggagatgact gcagtgaaga cattgatgat
1321 tgtgccttcg cctcctgtac tccaggctcc acctgcctg accgtgtggc ctccttctct
1381 tgcatgtgcc cagaggggaa ggcaggcttc ctgtgtcatc tggatgatgc atgcatcagc
1441 aatccttgcc acaagggggc actgtgtgac accaaccctc taaatgggca atatatttgc
1501 acctgccac aaggctacaa aggggctgac tgcacagaag atgtggatga atgtgccatg
1561 gccaatagca atccttgtga gcatgcagga aaatgtgtga acacggatgg cgccttcac
1621 tgtgagtgtc tgaagggtta tgcaggacct cgttgtgaga tggacatcaa tgagtgccat
1681 tcagaccctt gccagaatga tgcctactgt ctggataaga ttggaggctt cacagtctg
1741 tgcatgccag gtttcaaagg tgtgcattgt gaattagaaa taaatgaatg tcagagcaac
1801 ccttgtgtga acaatgggca gtgtgtggat aaagtcaatc gtttccagtg cctgtgtcct
1861 cctggtttca ctgggccagt ttgccagatt gatattgatg actgttccag tactccgtgt
1921 ctgaatgggg caaagtgtat cgatcaccct aatggctatg aatgccagtg tgccacaggt
1981 ttcactggtg tgttgtgtga ggagaacatt gacaactgtg accccgatcc ttgccaccat
2041 ggtcagtgtc aggatgggat tgattctct acctgcctc gcaatcccg gtacatgggc
2101 gccatctgca gtgaccagat tgatgaatgt tacagcagcc cttgctgaa cgtatggctg
2161 tgcattgacc tgggtcaatg ctaccagtgc aactgccagc caggcacgtc aggggttaat
2221 tgtgaaatta attttgatga ctgtgcaagt aacccttgta tccatggaat ctgtatggat
2281 ggcattaatc gctacagttg tgtctgtcga ccaggattca cagggcagag atgtaacatt
2341 gacattgatg agtgtgcctc caatccctgt cgcaaggggt caacatgtat caacgggtgt
2401 aatggtttcc gctgtatatg ccccgaggga ccccatcacc ccagctgcta ctacaggtg
2461 aacgaatgcc tgagcaatcc ctgcatccat ggaaactgta ctggaggtct cagtggatat
2521 aagtgtctct gtgatgcagg ctgggttggc atcaactgtg aagtggacaa aaatgaatgc
2581 ctttcgaatc catgccagaa tggagggaact tgtgacaatc tggatgaatg atacaggtgt
2641 acttgcaaga agggctttta aggtataaac tgccagggtga atattgatga atgtgcctca
2701 aatccatgcc tgaaccaagg aacctgcttt gatgacataa gtggctacac ttgccactgt
2761 gtgctgccat acacaggcaa gaattgtcag acagtattgg ctccctgttc cccaaacctt
2821 tgtgagaatg ctgctgtttg caaagagtca ccaaattttg agagttatac ttgcttgtgt
2881 gctcctggtt ggcaagggtc gcggtgtacc attgacattg acgagtgtat ctccaagccc
2941 tgcataaacc atggtctctg ccataacacc cagggcagct acatgtgtga atgtccacca
3001 ggcttcagtg gtatggactg tgaggaggac attgatgact gccttgccaa tccttgccag
```

图20 (2/5)

```

3061 aatggaggtt cctgtatgga tggagtgaat actttctcct gcctctgcct tccgggttct
3121 actggggata agtgccagac agacatgaat gagtgtctga gtgaacctg taagaatgga
3181 gggacctgct ctgactacgt caacagttac acttgcaagt gccaggcagg atttgatgga
3241 gtccattgtg agaacaacat caatgagtgc actgagagct cctgtttcaa tgggtggcaca
3301 tgtgttgatg ggattaactc cttctcttgc ttgtgccctg tgggtttcac tggatccttc
3361 tgccctccatg agatcaatga atgcagctct catccatgcc tgaatgaggg aacgtgtgtt
3421 gatggcctgg gtacctaccg ctgcagctgc cccctgggct aactgggaa aaactgtcag
3481 accctgggta atctctgcag tcggtctcca tgtaaaaaca aaggtacttg cgttcagaaa
3541 aaagcagagt cccagtgcct atgtccatct ggatgggctg gtgcctattg tgactgtccc
3601 aatgtctctt gtgacatagc agcctccagg agaggtgtgc ttgttgaaac cttgtgccag
3661 cactcaggtg tetgcatcaa tgctggcaac acgcattact gtcagtgcct cctgggctat
3721 actgggagct actgtgagga gcaactcgat gagtgtgcgt ccaacctctg ccagcacggg
3781 gcaacatgca gtgacttcat tgggtggatac agatgcgagt gtgtcccagg ctatcagggt
3841 gtcaactgtg agtatgaagt ggatgagtgc cagaatcagc cctgccagaa tggaggcacc
3901 tctattgacc ttgtgaacca ttccaagtgc tcttgccac caggcactgc gggcctactc
3961 tgtgaagaga acattgatga ctgtgccggg ggtcccatc gccttaatgg tggtcagtgc
4021 atggatagga ttggaggcta cagttgtgcg tgettgcctg gctttgctgg ggagcgttgt
4081 gagggagaca tcaacgagtg cctctccaac cctgcagct ctgagggcag cctggactgt
4141 atacagctca ccaatgacta cctgtgtgtt tgccgtagtg cctttactgg ccggcactgt
4201 gaaaccttcg tcgatgtgtg tccccagatg cctgcctga atggaggggac ttgtgctgtg
4261 gccagtaaca tgccctgatg tttcatttgc cgttgtcccc cgggattttc cggggcaagg
4321 tgccagagca gctgtggaca agtgaagtgc aggaaggggg agcagtgtgt gcacaccgcc
4381 tctggagccc gctgcttctg cccagatccc cgggactgcg agtcaggctg tgccactgagc
4441 cctgccagc acgggggcag ctgccaccct cagcgcagc ctccttatta ctcctgcag
4501 tgtgccccac cattctcggg tagccgtgtg gaactctaca cggcaccctc cagcaccctc
4561 cctgccacct gtctgagcca gtattgtgcc gacaaagctc gggatggcgt ctgtgatgag
4621 gcctgcaaca gccatgcctg ccagtgggat gggggtgact gttctctcac catggagAAC
4681 cctggggcca actgctctc cccacttccc tgctgggatt atatcaaca ccagtgtgat
4741 gagctgtgca acacggtcga gtgcctgttt gacaactttg aatgccaggg gaacagcaag
4801 accatgcaat atgacaaata ctgtgcagac cacttcaaag acaaccactg acacagggg
4861 tgcaacagtg aggagtgtgg ttgggatggg ctggactgtg ctgctgacca acctgagAAC
4921 ctggcagaag gtaccttgtt tattgtggta ttgatgccac ctgaacaact gctccaggat
4981 gctgcgagct tcttgccggc actgggtacc ctgctccaca ccaacctgcg cattaagcgg
5041 gactcccagg gggaactcat ggtgtacccc tattatggtg agaagtcaag tgctatgag
5101 aaacagagga tgacacgcag atcccttctt ggtgaacaag aacaggaggt ggctggctct
5161 aaagtcttctc tggaatttga caaccgccag tgtgttcaag actcagacca ctgctcaag
5221 aacacggatg cagcagcagc tctctcgccc tctcacgcca tacaggggac cgtgtcatc
5281 cctcttgtgt ctgtcgtcag tgaatccctg actccagaac gcaactcagc cctctatctc
5341 cttgctgttg ctgttgtcat cattctgttt attattctgc tgggggtaat catggcaaaa
5401 cgaaagcgta agcatggctc tctctggctg cctgaagggt tcaactcttc cagagatgca
5461 agcaatcaca agcgtcgtga gccagtggga caggatgctg tggggctgaa aaatctctca
5521 gtgcaagtct cagaagctaa cctaatttgt actggaacaa gtgaacactg ggtcgatgat
5581 gaaggggccc agccaaagaa agtaaaggct gaagatgagg ccttactctc agaagaagat
5641 gacccatttg atcgacggcc atggacacag cagcaccttg aagctgcaga catccgtagg
5701 acaccatgcg tggtctctac cctcctcag gcagagcagg aggtggatgt gttagatgtg
5761 aatgtccgtg gccagatgg ctgcacccca ttgatgttg cttctctctc aggaggcagc
5821 tcagatttga gtgatgaaga tgaagatgca gaggactctt ctgctaaccat catcacagac
5881 ttggtctacc agggtgccag cctccaggcc cagacagacc ggactggtga gatggcctg
5941 caccttgacg cccgtactc acgggctgat gctgccaaag gtctcttgga tgcagggtca
6001 gatgccaatg cccaggacaa catgggcccg tgtccactcc atgtgcagat ggcagctgat
6061 ccccaaggta tcttccagat tctgattgcg aaccgagtaa ctgatctaga tgccaggatg
6121 aatgatggta ctacaccctt gatctctgct gccgcctgg ctgtggaggg aatgggtgca
6181 gaactgatca actgccaagc ggatgtgaat gcagtggatg accatggaaa atctgctctt
6241 cactgggcag ctgctgtcaa taatgtggag gcaactcttt tgttgttgaa aaatggggcc
6301 aaccgagaca tgcaggacaa caaggaagag acacctctgt ttcttgctgc ccgggagggg

```

图20 (3/5)

```

6361 agctatgaag cagccaagat cctgttagac cattttgcca atcgagacat cacagaccat
6421 atggatcgtc ttccccggga tgtggctcgg gatcgcatgc accatgacat tgtgcgcctt
6481 ctggatgaat acaatgtgac cccaagccct ccaggcaccg tgttgacttc tgctctctca
6541 cctgtcatct gtgggcccac cagatctttc ctcagcctga agcacacccc aatgggcaag
6601 aagtctagac ggcccagtg ccaagagtacc atgcctacta gcctccctaa ccttgccaag
6661 gaggcaagg atgccaagg tagtaggagg aagaagtctc tgagtggaaa ggtccaactg
6721 tctgagagtt cagtaacttt atccccgtgt gattccctag aatctcctca caggtatgtt
6781 tccgacacca catcctctcc aatgattaca tcccctggga tcttacaggc ctcacccaac
6841 cctatgttgg ccactgcgc ccctccgtgc ccagtcctgc actatctttt
6901 tetaaccttc atgaaatgca gcctttggca catggggcca gcactgtgtt tccctcagtg
6961 agccagttgc tatcccacca ccacattgtg tctccaggca gtggcagtg tggaagcttg
7021 agtaggctcc atccagtcct agtcccagca gattggatga accgcatgga ggtgaatgag
7081 acccagtaca atgagatgtt tggatgtgtc ctggctccag ctgagggcac ccactcctggc
7141 atagctcccc agagcaggcc acctgaaggg aagcacataa ccaccctcg ggagcccttg
7201 cccccatttg tgactttcca gctcctcct aaaggcagta ttgccaac agcgggggct
7261 ccccagctgc agtccacctg ccctccagct gttgcggggc cctgcaccac cctatctctt
7321 attccagaaa tggcccgttt gccagtggtg gctttcccca ctgccatgat gcccagcag
7381 gacgggcagg tagctcagac cattctccca gcctatcct ctttccagc ctctgtgggc
7441 aagtaccca ccccccttc acagcacagt tatgcttctt caaatgctgc tgagcgaaca
7501 cccagtcaca gtggtcacct ccagggtgag catccctacc tgacaccatc cccagagtct
7561 cctgaccagt ggtcaagttc atcaccacc tctgcttctg actggtcaga tgtgaccacc
7621 agccctaccc ctgggggtgc tggaggagg cagcggggac ctgggacaga ctgagctgag
7681 ccccacaca acaacatgca ggtttatgct tgagagagtc cacctccagt gatagacat
7741 aactgacttt tgtaaatgct gctgaggaa aaatgaagg catccgggag agaaatgaag
7801 aaatctctgg agccagcttc tagaggtagg aaagagaaga tgttcttatt cagataatgc
7861 aagagaagca atctgtcagt ttcactgggt atctgcaagg cttattgatt attctaactc
7921 aataagacaa gtttgtggaa atgcaagatg aatacaagcc ttgggtccat gtttactctc
7981 ttctatttgg agaataagat ggatgcttat tgaagcccag acattcttgc agcttggact
8041 gcattttaag ccctgcaggc ttctgccata tccatgagaa gattctacac tagcgtcctg
8101 ttgggaatta tgccctggaa ttctgctga attgacctac gcactctctc ctccttggac
8161 attcttttgt ctccatttgg tgcttttggg tttgcacctc tccgtgattg tagccctacc
8221 agcatgttat agggcaagac ctttgtgctt ttgatcatte tggcccatga aagcaacttt
8281 ggtctccttt cccctcctgt cttcccggtg tcccttggag tctcacaagg tttactttgg
8341 tatggttctc agcacaaccc tttcaagtat gttgtttctt tggaaaatgg acatactgta
8401 ttgtgttctc ctgcatatat cattcctgga gagagaagg gagagaata cttttcttca
8461 acaaattttg ggggcaggag atcccttcaa gaggtgcac ctttaatttt cttgtctgtg
8521 ttgaggtctt catataaact ttaccaggaa gaagggtgtg agtttgtgtg agtttgtgt
8581 atgggcctgg tcagtgtaaa gttttatcct tgatagtcta gttactatga cctcccccac
8641 ttttttaaaa ccagaaaaag gtttggatg ttggaatgac caagagacaa gtttaactcg
8701 gcaagagcca gttaccacc cacaggctcc cctacttctt gccaaagcatt ccattgactg
8761 cctgtatgga acacatttgt ccagatctg agcattctag gcctgttcca ctaactcacc
8821 cagcatatga aactagtctt aactgttgag cctttccttt catatccaca gaagacactg
8881 tctcaaagt tgtacccttg ccatttagga ctgaactttc cttagcccaa gggaccagtg
8941 gacagttgtc ttccgtttgt cagatgatca gtctctactg attatcttgc tgcctaaagg
9001 cctgctcacc aatctttctt tcacaccgtg tggctcgtgt tactggtata cccagtatgt
9061 tctcactgaa gacatggact ttatatgttc aagtgcagga attgaaaagt tggacttgtt
9121 ttctatgate caaaacagcc ctataagaag gttggaaaag gaggaactat atagcagcct
9181 ttgctatttt ctgctacatc ttcttttctt ctgaagcggc catgacatc cctttggcaa
9241 ctaacgtaga aactcaacag aacattttcc tttcctagag tcacctttta gatgataatg
9301 gacaactata gacttgctca ttgttcagac tgattgcccc tcacctgaat ccactctctg
9361 tattcatgct cttggcaatt tctttgactt tcttttaagg gcagaagcat tttagttaat
9421 tgtagataaa gaatagtttt cttctacttc tccttggggc agttaataat tgggtccatg
9481 ctacactgca acttccgtcc agtgetgtga tgcccatgac acctgcaaaa taagtctctg
9541 ctgggcattt tgtagatatt aacagggtga ttcccgaact ttttggtttg aatgacagtt
9601 ctcatctctt ctatggctgc aagtatgcat cagtgtctcc cacttacctg atttgtctgt

```

图20 (4/5)

```
9661 cgggtggccc atattgaaac cctgcgtgtc tgttggcata atagtttaca aatgggtttt
9721 tcagtccctat ccaaatttat tgaaccaaca aaaataatta cttctgccct gagataagca
9781 gattaagttt gttcattctc tgctttatct tctccatgtg gcaacattct gtcagcctct
9841 ttcatagtgt gcaaacattt tatcattcta aatggtgact ctctgccctt ggacccattt
9901 attattcaca gatggggaga acctatctgc atggacctct gtggaccaca gcgtacctgc
9961 cctttctctc cctcctgtct cagccccact tctgaaagta tcagctactg atccagccac
10021 tggatatttt atatcctccc ttttccttaa gcacaatgtc agaccaaatt gcttgtttct
10081 ttttcttgga ctactttaat ttggatcctt tgggtttgga gaaagggaat gtgaaagctg
10141 tcattacaga caacaggttt cagtgtgtgag gaggacaaca ctgcccttca aactttttac
10201 tgatctctta gattttaaga actcttgaat tgtgtggtat ctaataaaag ggaaggtaag
10261 atggataatc actttctcat ttgggttctg aattggagac tcagttttta tgagacacat
10321 cttttatgcc atgtatagat cctccctctc tatttttggc ttatttttat tgttataaat
10381 gctttctttc tttgactcct cttctgcctg cctttgggga taggtttttt tgtttgttta
10441 tttgcttctc ctgttttgtt ttaagcatca ttttcttatg tgaggtgggg aagggaaagg
10501 tatgagggaa agagagtctg agaattaaaa tatttttagt taagcaattg gctgtgatgc
10561 tcaaatccat tgcctcctct tattgaattt gccaatgtt aatttttgca taataaagaa
10621 ccaaagggtg aatgttttgt tgagaggtgg tttagggatt ttggccctaa ccaatacatt
10681 gaatgtatga tgactatttg ggaggacaca tttatgtacc cagaggcccc cactaataag
10741 tggctactatg gttacttctc tgtgtacatt tctcttaaaa gtgatattat atctgtttgt
10801 atgagaaacc cagtaacca aaaaatgacc gcataattcct gactaaacgt agtaaggaaa
10861 atgcacactt tgtttttact tttccgtttc attctaaagg tagttaagat gaaatttata
10921 tgaaagcatt tttatcaca aataaaaaag gtttgccaag ctgagtgtg ttgtattttt
10981 tattttccaa tactgcatcc atggcctggc agtggttacct catgatgtca taatttgctg
11041 agagagcaaa ttttcttttc tttctgaatc ccacaaagcc tagcaccaaa cttctttttt
11101 tcttctttta attagatcat aaataaatga tcctggggaa aaagcatctg tcaaataagga
11161 aacatcacaa aactgagcac tcttctgtgc actagccata gctggtgaca aacagatggt
11221 tgctcaggga caaggctcct tccaatggaa atgcgaagta gttgctatag caagaattgg
11281 gaactgggat ataagtcata atattaatta tgctgttatg taaatgattg gtttgtaaca
11341 ttccttaagt gaaatttgtg tagaacttaa tatacaggat tataaataaa tatttttgtg
11401 ataaatttgt tataagttca cattcataca tttatttata aagtcagtga gatatttgaa
11461 catgaaaaaa aaaa
```

图20 (5/5)

A.

NP_000426.2; SEQ ID NO: 16

```

1   mppgargrrr rrrpmspppp pppvralp1l lllagpgaaa ppcldgspca nggrctqlps
61  reaac1cpgg wvgercqlcd pchsgpcagr gvcqssvvag tarfscrcpr gfrgpdcs1p
121 dpclsspcah garcsvgpdg rflcscppgy qgrscrsdvd ecrvgepcrh ggtclntpgs
181 frcqcpagyt gp1cenpavp capspcrngg tcrqsgd1ty dcac1pgfeg qncevnddc
241 pghrc1nggt cvdgvntync qcpcwttgqf ctedvdecql qpnachnggt cfntlgghsc
301 vcvngwtges csqniddcat avcfhgatch drvasfycac pmgktgllch lddacvsnp
361 hedaicdtnp vngraictcp pgftggacdq dvdecsgan pcehlgrcvn tqgsf1cgcg
421 rgytgprcet dvneclsgpc rnqatcl dri gqftcicmag ftgtyceydi decqsspcvn
481 ggvcckdrvng fsctcpsgfs gscqldvde castpcrnga kcvdqpdye crcaegfegt
541 lcdrnvdcs pdpchhgrcv dgasfscac apgytgtrce sqvdecrrsq crhgkcldl
601 vdkylcrpps gttgvncevn iddcasnpct fgvcrdginr ydcvcpggft gp1cnveine
661 casspcgegg scvdgengfr clcppgslpp lclppshpca hepccshgicy dapggfrcvc
721 epgwsgprcs qslardaces qpcraggtcs sdgmghfctc ppgvqgrqce llspctpnpc
781 hedgricesp gq1pvcscpg gwqgprcqdq vdecagpape gphgictnla tgsfscchgg
841 ytgsqcdqdi ndcdnpncln ggscqdgvgf fscsc1pgfa gprcardvde clsnpcpggt
901 ctdhvasftc tcppgyggfh ceqldpdcsp sscfnggtcv dgvnfsfclc rpgytgahcq
961 headp1srp clhggvcsaa hpgfrctcle sftgpcqql vdwcscrqpc nggrcvqtga
1021 yclcppgwsq r1cd1rslpc reaaaqigvr leg1cagagg cvdedsshyc vcpegrtgsh
1081 ceqevdpcla qpcqhggtcr gymggymcec lpgyngdnce ddvdecasq cqhggscidl
1141 varylcscpp gtlglvcein eddcgpgppl dsgrprclhng tcvdlvggfr ctcppgytgl
1201 rceadinecr sgachaahr dclqdpggf rclchagfsg prcgtvlspc esqpcqhgq
1261 crpspgpggg ltftchcagp fwgprcerva rscrelqcpv gvpcqgtprg prcacpgls
1321 gpscrsfpgs ppgasnasca aapclhggsc rpaplapffr cacaqgwtgp rceapaaape
1381 vseeprcpra acqakrgdqr cdrecnspgc gwdggdcs1s vgdprwqcea lqcwrlfns
1441 rcdpacsspa clydnfdcha ggrertcnpv yekycadhfa dgrcdggcnt eecgwdgldc
1501 asevpallar gvlvltvllp peellrssad flqrlsailr tslrfrldah ggamvfpyhr
1561 pspgseprar relapevigs vvmleidnrl clqspendhc fpdaqsaady lgalsaverl
1621 dfpyplrdvr gepleppeps vpllp1lvag avlllvilvl gvmvarrkre hst1wfpgef
1681 slhkdvashg kgrrepvgqd algmknmakg eslmgevtd wmdtecpeak r1kveepgm
1741 aeeavdcrgw tqhhlvaadi rvapamalt ppgdadadgm dvnvrgpdgf tplmlasfcg
1801 galepmptee deaddtsasi isdlicqgaq lgartdrtge talhlaarya radaakrld
1861 agadt1aqdh sgrt1lhtav tadaqgvfqi l1rnstdld armadgstal ilaarlaveg
1921 mveeliasha dvnvdelgk salhwaavn nveatlal1k ngankdmqds keetplflaa
1981 regsyaaakl lldhfanrei tdhldrlprd vaqerlhqdi vrldqpsgp rsppgphglg
2041 pl1cpggaf1 pglkaaqsqs kksrrppgka glpgqprgr gkkl1lacpg pladssvtls
2101 pvdslsdrp fggppaspgg flegpyaaa tatavs1aql gpggrag1gr qppggcv1sl
2161 gl1npvavpl dwarlpppap pgpsf1lpla pgpql1npgt pvspqerppp ylavpghgee
2221 ypaagahssp pkarflrvps ehpyltpspe spehwaspsp ps1sdwsest pspatatgam
2281 tgalpaq pl1svpss1 aqaqtqlgpq pevtpkrqvl a

```

B.

NM_000435.2; SEQ ID NO: 17

```

1   gcggcgcgga ggctggcccg ggacgcgccc ggagcccagg gaaggaggga ggaggggagg
61  gtcgcgccg cccgccatgg ggcggggggc ccgtggccgc cgcgcgccgc gtcgcccgat
121 gtcgcgccca ccgccaccgc caccgctgcg ggcgctgccc ctgctgctgc tgctagcggg
181 gccgggggct gcagccccc cttgcctgga cggaagccc tgtgcaaatg gaggtcgttg
241 caccagctg ccctcccggg aggctgctg cctgtgccc cctggctggg tgggtgagcg

```

图21 (1/4)

```

301 gtgtcagctg gaggaccct gtcactcagg cccctgtgct ggccgtggtg tctgccagag
361 ttcagtgggtg gctggcaccg cccgattctc atgccgggtg ccccggtggt tccgaggccc
421 tgactgctcc ctgccagatc cctgcctcag cagcccttgt gcccacgggtg cccgctgctc
481 agtggggccc gatggacgct tctctgctc ctgcccacct ggctaccagg gccgcagctg
541 ccgaagcgac gtggatgagt gccgggtggg tgagccctgc cgccatgggtg gcacctgcct
601 caacacacct ggctccttcc gctgccagtg tccagctggc tacacagggc cactatgtga
661 gaaccccgcg gtgccctgtg caccctcacc atgccgtaac gggggcacct gcaggcagag
721 tggcgacctc acttacgact gtgcctgtct tcttgggttt gagggtcaga attgtgaagt
781 gaacgtggac gactgtccag gacaccgatg tctcaatggg gggacatgcg tggatggcgt
841 caacacctat aactgccagt gccctcctga gtggacaggc cagttctgca cggaggacgt
901 ggatgagtgt cagctgcagc ccaacgcctg ccacaatggg ggtacctgct tcaacacgct
961 ggggtggccac agctgcgtgt gtgtcaatgg ctggacaggc gagagctgca gtcagaatat
1021 cgatgactgt gccacagccg tgtgcttcca tggggccacc tgccatgacc gcgtggcttc
1081 tttctactgt gcctgcccc a tgggcaagac tggcctcctg tgtcacctgg atgacgctg
1141 tgtcagcaac ccctgccacg aggatgctat ctgtgacaca aatccggtga acggccgggc
1201 catttgacc tgtcctccc gcttcacggg tggggcatgt gaccaggatg tggacgagtg
1261 ctctatcggc gccaacccct gcgagcactt gggcaggtgc gtgaacacgc agggctcctt
1321 cctgtgccag tgcggtcgtg gctacactgg acctcgctgt gagaccgatg tcaacgagtg
1381 tctgtcgggg ccctgccgaa accaggccac gtgcctcgac cgcataggcc agttcacctg
1441 tatctgtatg gcaggcttca caggaacct a ttgcgaggtg gacattgacg agtgtcagag
1501 tagccctgt gtcaacggtg gggctcgcaa ggaccgagtc aatggcttca gctgcacctg
1561 cccctcgggc ttcagcggct ccacgtgtca gctggacgtg gacgaatgcg ccagcacgcc
1621 ctgcaggaat ggcgccaaat gcgtggacca gcccgatggc tacgagtgcc gctgtgccga
1681 gggctttgag ggcacgctgt gtgatcgcaa cgtggacgac tgctccctg acctatgcca
1741 ccatggctgc tgcgtggatg gcatcgccag cttctcatgt gcctgtgctc ctggctacac
1801 gggcacacgc tgcgagagcc aggtggacga atgccgcagc cagccctgcc gccatggcgg
1861 caaatgccta gacctggtgg acaagtacct ctgccgctgc cttctggga ccacaggtgt
1921 gaactgcgaa gtgaacattg acgactgtgc cagcaacccc tgcacctttg gagtctgccg
1981 tgatggcatc aaccgctacg actgtgtctg ccaacctggc ttcacagggc ccctttgtaa
2041 cgtggagatc aatgagtgtg cttccagccc atgcggcgag ggaggttctt gtgtggatgg
2101 ggaaaatggc ttccgctgcc tctgcccgcc tggtccttg ccccaactct gcctcccccc
2161 gagccatccc tgtgcccattg agccctgcag tcacggcatc tgctatgatg cacctggcgg
2221 gttccgctgt gtgtgtgagc ctggctggag tggccccgc tgccagcaga gcctggcccg
2281 agacgcctgt gagtccagc cgtgcagggc cgggtgggaca tgcagcagcg atggaatggg
2341 tttccactgc acctgcccgc ctggtgtcca gggacgtcag tgtgaactcc tctccccctg
2401 caccgccgaa ccctgtgagc atggggggccg ctgcgagctt gccctggcc agctgcctgt
2461 ctgctcctgc ccccagggtt ggcaaggccc acgatgccag caggatgtgg acgagtgtgc
2521 tggccccgca ccctgtggcc ctcatggtat ctgcaccaac ctggcaggga gtttcagctg
2581 cacctgccat ggagggtaca ctggcccttc ctgcgatcag gacatcaatg actgtgacct
2641 caacccatgc ctgaacggtg gctcgtgcca agacggcgtg ggctcctttt cctgctcctg
2701 cctccctggt ttgcgggcc cagcatgcgc ccgcgatgtg gatgagtgcc tgagcaacct
2761 ctgcggcccg ggcacctgta ccgaccagt ggctccttc acctgcacct gcccgccagg
2821 ctacggaggc ttccactgcg aacaggacct gcccagctgc agccccagct cctgcttcaa
2881 tggcgggacc tgtgtggacg gcgtgaactc gttcagctgc ctgtgccgtc ccggtacac
2941 aggagccac tgccaacatg aggcacacc ctgcctctcg cggccctgcc tacacggggg
3001 cgtctgcagc gccgcccacc ctggcttccg ctgcacctgc ctcgagagct tcacggggcc
3061 gcagtgccag acgctggtgg attggtgcag ccgccagcct tgtcaaaacg ggggtcgctg
3121 cgtccagact ggggcctatt gcctttgtcc ccctggatgg agcggacgcc tctgtgacat
3181 ccgaagcttg ccctgcaggg agggcgagc ccagatcggg gtgcggctgg agcagctgtg
3241 tcaggcgggt gggcagtggt tggatgaaga cagctccac tactgcgtgt gccagaggg
3301 ccgtactggt agccactgtg agcaggaggt ggacccctgc ttggcccagc cctgccagca
3361 tggggggacc tgcctgtggt atatggggg ctacatgtgt gagtgtcttc ctggctacaa
3421 tgggtgataac tgtgaggacg acgtggacga gtgtgcctcc cagccctgcc agcacggggg
3481 ttcatgcatt gacctcgtgg cccgctatct ctgctcctgt ccccaggaa cgctgggggt
3541 gctctgcgag attaatgagg atgactggg cccaggccca ccgctggact cagggccccg

```

图21 (2/4)

3601 gtgcctacac aatggcacct gcgtggacct ggtgggtggt ttccgtgca cctgtcccc
3661 aggatacact ggtttgcgt gcgaggcaga catcaatgag tgtcgtcag gtgcctgcca
3721 cgcggcacac acccgggact gcctgcagga cccaggcgga ggtttccgtt gcctttgtca
3781 tgctggcttc tcaggtcctc gctgtcagac tgtcctgtct ccctgcgagt cccagccatg
3841 ccagcatgga ggccagtgcc gtccatagccc ggtcctggg ggtgggctga ccttcacctg
3901 tcaactgtgcc cagccgttct ggggtccgcg ttgcgagcgg gtggcgcgct cctgccggga
3961 gctgcagtgc ccggtgggcg tcccatgcca gcagacgccc cgcgggcgcg gctgcgcctg
4021 cccccaggg ttgtcgggac cctcctgcgc cagcttccc gggtcgcgc cgggggcca
4081 caacgccagc tgcgcggcgc cccctgtct ccacgggggc tctgcgcgc ccgcgcgct
4141 cgcgccttc ttccgtgcg cttgcgcgca gggctggacc gggcgcgct gcgaggcgcc
4201 cgcgcgggca cccgaggtct cggaggagcc gcggtgccc cgcgcgcct gccaggccaa
4261 gcgcggggac cagcgtgcg accgcgagt caacagccca ggtgcggtt gggacgcg
4321 cgactgctcg ctgagcgtgg gcgacccct gcgcaatgc gaggcgctg agtgctggcg
4381 cctcttcaac aacagccgt gcgaccccg ctgcagctc cccgcctgc tctacgaca
4441 tctcagatgc cagcgcgtg gccgcgagc cacttgaac ccggtgtac agaagtact
4501 cgcgcaccac tttgcgcag gcgcgtcga ccagggtgc aacacgggtg agtgcgctg
4561 ggatgggctg gattgtgcca gcgaggtgcc ggccctgct gcccgcggcg tgcgtgtct
4621 cacagtgtg ctgccgccag aggagctact gcgttccag gccgacttt tgcagcgct
4681 cagcgccatc ctgcgcacct cgtgcgctt ccgcctggac gcgcacggc aggccatggt
4741 cttcccttac caccggccta gtcctggctc cgaaccccg gcccgtcgg agctggcccc
4801 cgaggtgatc ggctcggtag taatgctgga gattgacaac cggctctgc tgcagtcgc
4861 tgagaatgat cactgcttc ccgatgcca gagcgcgct gactacctg gacgctgtc
4921 agcgttgag agcctggact tcccgtaacc actgcgggac gtgcggggg agcgcgtga
4981 gcctccagaa cccagcgtc cgtcgtgcg actgctagt gcggcgctg tcttgcgtc
5041 ggtcattctc gtcctgggtg tcatggtgg ccggcgcaag cgcgagcaca gcacctctg
5101 gttccctgag ggcttctcac tgcacaagga cgtggcctc ggtcacaag gccggcgga
5161 acccgtgggc caggacgcgc tgggcatgaa gaacatggc aagggtgaga gcctgatgg
5221 ggaggtggc acagactgga tggacacaga gtgccagag gccaaagcg taaaggtaga
5281 ggagccaggc atgggggctg aggaggtgt ggattgcgt cagtggact aacaccatc
5341 ggttgcgtg gacatccgc tggcaccag catggcact acaccaccg aggcggccg
5401 agatgctgat ggcattgatg tcaatgtgc tggcccagat ggcttcccc cgctaagct
5461 ggcttcttc tgtgggggg ctctggagc aatgccaaact gaagaggat aggcagatga
5521 cacatcagct agcatcatc ccgacctgat ctgccaggg gctcagctt gggcacggac
5581 tgaccgtact ggcgagact ctttgcacct ggtgcocgt tatgcccgt ctgatgcagc
5641 caagcggctg ctggatgct gggcagacac caatgccag gaccactcag gccgcactc
5701 cctgcacaca gctgtcacag ccgatgcca ggtgtcttc cagattctc tccgaaaccg
5761 gcttacagac ttggatgcc gcatggcaga tggctcaac gcaactgac tggcgcccg
5821 cctggcagta gagggcatg tggaaagact catcgccagc catgctgat tcaatgctg
5881 ggatgagctt gggaaatcag ccttacctg ggtgcggct gtgaacaac tggaaagcc
5941 tttggccctg ctcaaaaat gagccaataa ggacatgcag gatagcaag aggagacccc
6001 cctattcctg gccgcccgc agggcagcta taggctgcc aagctgctgt tggaccact
6061 tgccaaccgt gagatcacg accacctgga caggctgcg cgggacgtg cccaggagag
6121 actgcaccag gacatcgtg gcttgcgtg tcaacccagt gggccccga gcccccccg
6181 tccccaggc ctggggcctc tgcctgttc tccaggggc tctcctcct gcctcaaagc
6241 ggcacagtgc ggggtccaaga agagcaggag gccccccgg aaggcgggg tggggcgca
6301 ggggcccccg gggcggggca agaagctgac gctggcctg cgggcccc tggctgacag
6361 ctcggtcac ctgtgcgcc tggactcgt ggactcccc cggcctttg gtgggcccc
6421 tgcttccctt ggtggcttcc cccttgagg gccctatgc gctgcactg ccaactgagt
6481 gtctctggca cagcttggtg gccaggccg ggcgggtct gggcgccag cccctggagg
6541 atgtgtactc agcctgggccc tgcgtgaacc tgtggtgtg cccctcgatt gggccccgct
6601 gcccccacct gccccccag gccctcgtt cctgctgcca ctggcgccg gaccagctc
6661 gctcaaccca gggacccccg tctccccga ggagcgccc ccgcttacc tggcagctc
6721 aggacatggc gaggagtacc cggcggtgg ggcacacagc agcccccaa aggcgcgtt
6781 cctgcgggtt cccagtgagc acccttacct gacccatcc cccgaatcc ctgagcactg
6841 ggcagcccc tcacctccct cctctcaga ctggtccgaa tccacgcta gccagccac

图21 (3/4)

```
6901 tggcaactggg gccatggcca ccaccactgg ggcactgeet gcccagccac ttccttgtc
6961 tgttcccagc tcccttgetc agggccagac ccagctgggg ccccagccgg aagttacccc
7021 caagaggcaa gtgttggeet gagacgetcg tcagtcttta gatcttgggg gcctaaagag
7081 acccccgctc tgctctcttt cttctctctgt ctcttcttct cttttagtct ttttcacctc
7141 cttctctttc caccaaccct cctgcaccc tgccttgagc cgtgaccgag ataggtcatc
7201 agcccagggc ttcagtcttc ctttatattat aatgggtggg ggctaccacc caccctctca
7261 gtcttgtgaa gagtctggga cctccttctt cccacttctt ctcttccctc attcctttct
7321 ctctccttct ggctctctcat ttccttacac tctgacatga atgaattatt attatcttta
7381 tttttctttt tttttttaca ttttgtatag aaacaaatc atttaacaa acttattatt
7441 attatctttt acaaaatata tatatggaga tgctccctcc cctgtgaac ccccagtg
7501 ccccgctggg ctgagtctgt gggcccatc ggccaagctg gattctgtgt acctagtaca
7561 caggcatgac tgggatcccg tgtaccgagt acacgaccca ggtatgtacc aagtaggcac
7621 ccttgggcgc acccactggg gccaggggtc gggggagtgt tgggagcctc ctccccaccc
7681 caccctccct acttcaactgc attccagatg ggacatgttc catagccttg ctggggaagg
7741 gcccactgcc aactccctct gcccagccc cacccttggc catctccctt tgggaactag
7801 ggggctgctg gtgggaaatg ggagccaggg cagatgtatg cattcctttg tgtccctgta
7861 aatgtgggac tacaagaaga ggagctgeet gagtggtaet ttctcttctt ggtaatcctc
7921 tggcccagcc tcatggcaga atagaggtat ttttaggcta tttttgtaat atggcttctg
7981 gtcaaaatcc ctgtgtagct gaattcccaa gccctgcatt gtacagcccc ccactccctc
8041 caccacctaa taaaggaata gttaacactc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

图21 (4/4)

A.

NP_004548.3; SEQ ID NO: 18

```

1      mqppslllll  llllllcvs  vprgllcgs  fpepcanggt  clslslgggt  cqcagpflge
61     tcqfpdpcqn  aqlcqnngsc  qallpaplg  psspspltps  flctclpgft  gercqakled
121    pcppsfcskr  grchiqasgr  pqcscmpgt  geqcqlrdfc  sanpcvnggv  clatypqicq
181    hcpggfegha  cerdvnefcq  dpgpcpkgt  chntlgsfqc  lcpvgqegpr  celragpcpp
241    rgcsnggtcq  lmpekdstfh  lclcppgfig  pdcevnpgnc  vshqcnggt  cqdgltdytc
301    lcpetwtgwd  csedvdecet  qgpphcrng  tcqnsagsfh  cvcvsgwgt  sceenlddci
361    aatcapgstc  idrvgsfsc  cpggrtgll  hledmclsq  chgdagcstn  pltgstlcl
421    qpgysgptch  qdldeclmaq  qgppspcehg  sclntpgsf  clcppgytgs  rceadhnecl
481    sqpchpgstc  ldllatfhcl  cpgplegql  evetnecasa  pclnhadchd  llnqfqcicl
541    pgfsgtrcee  didecrssp  anggqcqdg  gafhckclpg  fegprcqtev  declsdpcpv
601    gasclldlpg  fclclpsgft  gqleevplca  pnlcqpkqic  kdqkdkancl  cpdgsppcap
661    pednctchhg  hcqrsscvcd  vgwgtpecea  elggcisapc  ahggtcypqp  sgynctcptg
721    ytgptcseem  tachsgpcln  ggscnpspg  yyctcpsht  gpqctstdy  cvsapcfngg
781    tcvnrpgtfs  clcamgfqgp  rceglrpsc  adspcrnat  cqdsppgpr  lcpstgtggs
841    cqtlmdlcaq  kpcprnshcl  qtgpfhcl  lqgwtgplcn  lplsscqkaa  lsqgidvssl
901    chngglcvds  gpsyfchcpp  gfqgslcqh  vnpcesrpcq  ngatcmagps  gylcqcagpy
961    dgqncskeld  acqsgpchnh  gtctpkpggf  hcacppgfv  lrcegdvdec  ldqpchptgt
1021   aachslanaf  ycqclpghtg  qwceveidpc  hsqpcfhhgt  ceatagsplg  fichcpkgfe
1081   gptcshrap  cgfhfhchhg  lclpspkpgf  pprcaclsgy  ggpdccltpa  pkgcgppspc
1141   lyngscsett  glggpgfrcs  cphsspgprc  qkpgakgceg  rsgdgacdag  csgpggnwdg
1201   dgcslgvpdp  wkpcpsfsrc  wllfrdgqch  pqcdseecf  dgydcetppa  ctpaydqych
1261   dhfhngchek  gcntaecgwd  ggdrpedgd  pewgplall  vvlspaldq  qlfalarvis
1321   ltlrvglwvr  kdrdgrdmvy  pypgaraeek  lggttrdpty  eraapqtqpl  gketdlsag
1381   fvvvmgvdls  rcgpdhpsr  cpwdpgllr  flaamaavga  lep1lpgpl  avhphagtap
1441   panqlpwpvl  cspvagvill  algallvlql  irrrrrehga  lw1ppgft  prtqsaphrr
1501   rpplgedsig  lkalkpkae  dedgvvmcsg  peegeevgga  eetgppstcq  lws1sgcgga
1561   lpqaamltp  qesemeapdl  dtrgpdgvtp  lmsavccgev  qsgtfqgawl  gcpepewpll
1621   dggacpqaht  vgtgetplhl  aarfsrptaa  rr1leaganp  nqpdragrt  lhaavaadar
1681   evcql1lrsr  qtavdarded  gt1plmlaar  lavedlveel  iaagadvgar  dkwgktalhw
1741   aaavnnaraa  rs1l1qagadk  daqdnreqtp  lflaaregav  evaql1lglg  aare1rdqag
1801   lapadvahqr  nhwd1l1tle  gagppearhk  atpgreagpf  prartvsvsv  pphgggalpr
1861   crt1sagagp  rgggaclqar  twsvdlaarg  ggayshcrsl  sgvgagggpt  prgr1rfsagm
1921   rgprnpaim  rgrygvaagr  ggrvstddwp  cdwvalgacg  sasnip1ppp  cltpsp1ergs
1981   pqldcgppal  qempinggge  gkk

```

B.

NM_004557.3; SEQ ID NO: 19

```

1      agacgtgagg  cttgcagcag  gccgaggagg  aagaagaggg  gcagtgggag  cagaggagggt
61     ggctcctgcc  ccagtgaag  ctctgagggt  ccctgcctga  agagggacag  ggaccggggc
121    ttggagaagg  ggctgtggaa  tgcagcccc  ttactgctg  ctgctgctgc  tgcctgctgc
181    gctgctatgt  gtctcagtg  tcagaccag  agggctgctg  tgtgggagtt  tccagaacc
241    ctgtgccaat  ggaggcacct  gcctgagcct  gtctctggga  caagggacct  gccagtgtgc
301    ccctggcttc  ctgggtgaga  cgtgccagtt  tcctgacccc  tgccagaacg  cccagctctg
361    ccaaaatgga  ggcagctgcc  aagccctgct  tcccgtccc  ctagggtccc  ccagctctcc
421    ctctccattg  acaccagct  tcttgctcac  ttgctccct  ggettcactg  gtgagagatg
481    ccaggccaag  cttgaagacc  cttgtcctcc  ctcttctgt  tccaaaagg  gccgctgcca
541    catccaggcc  tcgggccgcc  cacagtgtc  ctgcatgct  ggatggacag  gtgagcagtg

```

图22 (1/3)

```
601 ccagcttcg gacttctgtt cagccaaccc atgtgttaat ggaggggtgt gtctggccac
661 atacccccag atccagtgcc actgcccacc gggcttcgag ggccatgcct gtgaacgtga
721 tgtcaacgag tgcctccagg acccaggacc ctgccccaaa ggcacctcct gccataacac
781 cctgggctcc ttccagtgcc tctgccctgt ggggcaggag ggtccacgtt gtgagctgcg
841 ggcaggaccc tgccctccta ggggctgttc gaatgggggc acctgccagc tgatgccaga
901 gaaagactcc acctttcacc tctgcctctg tccccagggt ttcataggcc cagactgtga
961 ggtgaatcca gacaactgtg tcagccacca gtgtcagaat gggggcactt gccaggatgg
1021 getggacacc tacacctgcc tctgcccaga aacctggaca ggctgggact gctccgaaga
1081 tgtggatgag tgtgagaccc aggggtcccc tctgtgcaga aacgggggca cctgccagaa
1141 ctctgctggt agctttcact gcgtgtgtgt gagtggctgg ggcggcaca gctgtgagga
1201 gaacctggat gactgtattg ctgccacctg tgccccggga tccacctgca ttgaccgggt
1261 gggctctttc tctgcctctt gccacactgg acgcacagga ctctgtgcc acttgggaaga
1321 catgtgtctg agccagcctg gccatgggga tgcccaatgc agcaccaccc ccctcacagg
1381 ctccacactc tgccctgtgtc agcctggcta ttcggggccc acctgccacc aggacctgga
1441 cgagtgtctg atggcccagc aaggcccaga tccctgtgaa catggcggtt gctccctcaa
1501 cactcctggc tcttcaact gcctctgtcc acctggctac acaggctccc gttgtcaggc
1561 tgatcacaat gagtgcctct cccagccctg ccaccagga agcacctgtc tggacctact
1621 tgccaccttc cactgcctct gccggccagg cttagaaggg cagctctgtg aggtggagac
1681 caacgagtgt gcctcagctc cctgcctgaa ccacgcggat tgccatgacc tgcctaacgg
1741 cttccagtgc atctgcctgc ctggattctc cggcaccgga tgtgaggagg atatcgatga
1801 gtgcagaagc tctccctgtg ccaatgggtg gcagtgccag gaccagcctg gagecttcca
1861 tgcgaagtgt ctccaggct ttgaaggggc acgctgtcaa acagagggtg atgagtgcct
1921 gagtgaacca tgtcccggtg gaggcagctg ccttgatctt ccaggagcct tcttttgctt
1981 ctgccccctc ggtttcacag gccagctctg tgaggttccc ctgtgtgtc ccaacctgtg
2041 ccagcccaag cagatatgta aggaccagaa agacaaggcc aactgcctct gtctgatgg
2101 aagccctggc tgtgcccac ctgaggacaa ctgcacctgc caccacgggc actgccagag
2161 atcctcatgt gtgtgtgacg tgggttgga cggggccagag tgtgaggcag agctaggggg
2221 ctgcactctc gcacctgtg cccatggggg gacctgtac cccagccct ctggctacaa
2281 ctgcacctgc cctacaggct acacaggacc cacctgtagt gaggagatga cagcttgtca
2341 ctgagggcca tgtctcaatg gcggtcctg caacctagc cctggaggct actactgac
2401 ctgcccccca agccacacag ggccccagtg ccaaaccagc actgactact gtgtgtctgc
2461 cccgtgcttc aatgggggta cctgtgtgaa caggcctggc accttctcct gcctctgtgc
2521 catgggcttc cagggccgcg gctgtgaggg aaagctccgc cccagctgtg cagacagccc
2581 ctgtaggaat agggcaacct gccaggacag cctcagggt ccccgctgcc tctgcccac
2641 tggtacacc ggaggcagct gccagactct gatggactta tgtgccaga agccctgcc
2701 acgcaattcc cactgcctcc agactgggccc ctcttccac tgettgtgc tccagggatg
2761 gacggggcct ctctgcaacc tctcactgtc ctctgccag aaggctgcac tgagccaagg
2821 catagacgtc tcttcccttt gccacaatgg aggcctctgt gtcgacagcg gccctccta
2881 tttctgccac tgccccctg gattccaagg cagcctgtgc caggatcacg tgaacctatg
2941 tgagtccagg ccttgccaga acggggccac ctgcatggcc cagcccagtg ggtatctctg
3001 ccagtgtgcc ccaggtacg atggacagaa ctgctcaaag gaactcgatg cttgtcagtc
3061 ccaacctgtt cacaaccatg gaacctgtac tccaaaacct ggaggattcc actgtgcctg
3121 cctccaggcc tttgtggggc tacgtgtgta gggagacgtg gacgagtgtc tggaccagcc
3181 ctgccacccc acaggcactg cagcctgcca ctctctggcc aatgccttct actgccagt
3241 tctgcctgga cacacaggcc agtggtgtga ggtggagata gacctgtcc acagccaacc
3301 ctgctttcat ggagggacct gtgaggccac agcaggatca cccctgggtt tcatctgcca
3361 ctgccccaa ggttttgaag gccccacctg cagccacagg gcccttctct gcggttcca
3421 tcaactgccac cagggaggcc tgtgtctgcc ctcccctaag ccaggcttcc caccacgtg
3481 tgccctgctc agtggtatg ggggtcctga ctgcctgacc ccaccagctc ctaaaggctg
3541 tgccctccc tccccatgcc tatacaatgg cagctgtctc gagaccacgg gcttgggggg
3601 ccaggcttt cgatgtcctt gccctgcaga ctctccagg ccccggtgtc agaaacccgg
3661 agccaagggg tgtgagggca gaagtggaga tggggcctgc gatgctggct gcagtgccc
3721 gggaggaaac tgggatggag gggactgtc tctgggagtc ccagaccctt ggaagggtg
3781 cccctccac tctcggtgtt ggcttctct cgggacggg cagtgcacc cacagtgtga
3841 ctctgaagag tgtctgtttg atggtacga ctgtgagacc cctccagcct gcactccagc
```

图22 (2/3)

```

3901 ctatgaccag tactgccatg atcaactcca caacgggcac tgtgagaaag gctgcaacac
3961 tgcagagtgt ggctgggatg gaggtgactg caggcctgaa gatggggacc cagagtgggg
4021 gccctccctg gccctgctgg tggtaactgag cccccccagcc ctagaccagc agctgtttgc
4081 cctggcccggt gtgctgtccc tgactctgag ggtaggactc tgggtaagga aggatcgtga
4141 tggcagggac atggtgtacc cctatcctgg ggcccgggct gaagaaaagc taggaggaac
4201 tccggaccccc acctatcagg agagagcagc cctcaaaacg cagcccctgg gcaaggagac
4261 cgaactccctc agtgetgggt ttgtggtggt catgggtgtg gatttgtccc gctgtggccc
4321 tgaccaccgg gcateccgct gtccctggga cctgggctt ctactcgcgt tcctgtctgc
4381 gatggctgca gtgggagccc tggagccctt gctgcctgga ccactgctgg ctgtccaccc
4441 tcatgcaggg accgcacccc ctgccaaaca gcttccctgg cctgtgctgt gctccccagt
4501 ggccgggggtg attctcctgg ccctaggggc tcttctcgtc ctccagctca tccggcgctg
4561 acgccgagag catggagctc tctggctgcc cctgggtttc actcgacggc ctccgactca
4621 gtcagctccc caccgacgcc ggccccact aggcgaggac agcattggtc tcaaggcact
4681 gaagccaaag gcagaagttg atgaggatgg agttgtgatg tgctcaggcc ctgaggaggg
4741 agaggaggtg ggccaggctg aagaaacagg ccacccctcc acgtgccact tcgggtctct
4801 gagtgggtgc tgtggggcgc tccctcaggc agccatgcta actcctcccc aggaatctga
4861 gatggaagcc cctgacctgg acaccctggt acctgatggg gtgacacccc tgatgtcagc
4921 agttttgctgt ggggaagtac agtccgggac cttccaaggg gcatggttgg gatgtcctga
4981 gccctgggaa cctctgctgg atggaggggc ctgtccccag gctcacaccg tgggactggg
5041 ggagaccccc ctgcacctgg ctgcccgatt ctcccggcca accgctgccc gccgcctcct
5101 tgaggctgga gccaaaccca accagccaga ccgggcaggg cgcacacccc ttcattgtgc
5161 tgtgctcggt gatgctcggg aggtctgcca gcttctgctc cgtagcagac aaactgcagt
5221 ggacgctcgc acagaggacg ggaccacacc cttgatgctg gctgcccagg tggcgctgga
5281 agacctggtt gaagaactga ttgcagccca agcagacgtg ggggccagag ataatggggg
5341 gaaaactgct ctgcaactgg ctgctgcctg gaacaacgcc cgagccgccc gctcgttctt
5401 ccaggccgga gccgataaag atgccagga caacagggag cagacccgcg tatcctggc
5461 ggcgccggaa ggagcggtgg aagtagccca gctactgctg gggctggggg cagcccagaa
5521 gctgcgggac caggetgggc tagcgcgggc ggacgtcgtt caccaacgta accactggga
5581 tctgctgacg ctgctggaag gggtggggcc accagaggcc cgtcacaag ccacgcggg
5641 ccgcgaggtc gggcccttcc gcgcgcacg gacggtgtca gtaagcgtgc ccccgcatgg
5701 gggcggggct ctgcgcgct gcgggacgt gtacgccgga gcaggccctc gtggggcg
5761 agcttgtctg caggetcgga cttggtcctg agacttggct gcgcggggg gcggggccta
5821 ttctcattgc cggagcctct cgggagtagg agcaggagga ggcccgaccc ctgcgcggcg
5881 taggttttct gcaggcatgc gcgggcctcg gcccaaccct gcgataatgc gaggaagata
5941 cggagtggct gccgggcgcg gaggcagggt ctcaacggat gactggccct gtgattgggt
6001 ggccctggga gcttgcggtt ctgcctccaa cattccgate ccgcctcctt gccttactcc
6061 gtccccggag cggggatcac ctcaacttga ctgtggtccc ccagccctcc aagaaatgcc
6121 cataaaccaa ggaggagagg gtaaaaaata gaagaataca tggtagggag gaattccaaa
6181 aatgattacc cattaaaagg caggctggaa ggcttctctg gttttaagat ggatccccc
6241 aatgaagggt ttgtgagttt agtttctctc ctaaaatgaa tgtatgccc ccagagcaga
6301 catcttccac gtggagaagc tgcagctctg gaaagagggt ttaagatgct aggatgaggc
6361 aggccagctc ctctccaga aaataagaca ggccacagga gggcagagtg gagtggaaat
6421 acccctaagt tggaaaccaag aattgcaggc atatgggatg taagatgttc ttctctatat
6481 atggtttcca aagggtgcc ctatgatcca ttgtccccc tgcccacaaa tggctgacaa
6541 atattttatt ggacctaact atgtgccagg cactgtgtag gtgctgaaaa gtggccaagg
6601 gccacccccg ctgatgactc cttgcattcc ctcccctcac aacaaagaac tccactgtgg
6661 ggatgaagcg cttcttctag ccactgctat cgctatttaa gaaccctaaa tctgtcaccc
6721 ataataaagc tgatttgaag tgttaaaaaa aaaaaaaaaa aa

```

图22 (3/3)

A.

NP_660161.1; SEQ ID NO: 20

```

1   mksckpsgpp agarvappca ggtecagtca gagrlesaar rrlaanarer rrmqglntaf
61  drlrrvvpqw gqdkklskye tlqmalsyim altrilaeae rfgserdwvg lhcehfgrdh
121 ylpfpgaklp geselysqr1 fgfqpepfqm at

```

B.

NM_145178.3; SEQ ID NO: 21

```

1   ctgcactctc cgacagctac tgcgctaaaa gcgctccttc cctgagcttc gggaaagagt
61  tcattcttct gcaaaggagt ctcaggcttt cccagaggac ttgaaaggcc ttctctgaac
121 cagccacacc aaactctgct gcagaagggt tccttctctt tttcaacttc atgttgagaa
181 aatgactttc tcttgagcat ctcatTTTTCC cctaaatttg ggcaagtga gagatatcag
241 cctgggtcatc cagtagaaca gaaggccgag tcccgcactc cccactgta aactatttga
301 ttgcacgtga gttgctttgt ttatgactta tttgctcaga agaggcacgt tgggaagcgg
361 ctcgagagac cagcccacgc gcaggctctg agcgggcggg cgtgcgaggt cggcgccctc
421 ctgcttgggg ccggggatga agtcctgcaa gccacgcggc ccgcccggcg gagcgccgct
481 tgcacccccg tgcgcggggc gcaccgagtg cgcgggcaag tgcgccgggg ccgggcggct
541 ggagagcgcg gcgcgcaggc gcctggcggc caacgcgcgc gagcgccgcc gcatgcaggg
601 gctcaacact gccttcgacc gcttacgcag ggtggttccc cagtggggcc aggataaaaa
661 gctgtccaag tacgagaccc tgcagatggc cctgagctac atcatggctc tgaccgggat
721 cctggccgag gccgagcgat tcggtctcga gcgggactgg gtgggtctcc actgtgagca
781 cttcggccgc gaccactacc tccggttccc gggcgcaag ctgccggcg agagcgagct
841 gtacagccag agactcttcg gcttccagcc cgagcccttc cagatggcca cctagggcgc
901 gcgcctccgc gggggtgggt gtccggcagc cgtccgagc ctccggccctg ccccaagtag
961 cccagaagcc tcggcgggcc caggattcta aggatgcaat cctcgaggaa aattagtcga
1021 ttctcagatt acctttattc gcatcatcag acctatggac gcaatcattt aattgccttt
1081 cttttccccc cctcctttgt attttgtaga tttcattaat ggatcttggt aatgggttga
1141 ttgctgtgaa aataatgcc cttttccccc tttctgggt actttgaggg aaaacaatct
1201 taagaaaaat aggattaagc tattctgttc cagtcctcag agaaataatc actttcttaa
1261 actttgtgag tttgtcctgt tcgggtgaag ttacagtatc cattacttgt gtttgctcac
1321 aacagagcta ccttcctgtt gtgtaaatgc gtttttgctt tagtgcatgt tgtgtgcaag
1381 catgaagtag aaacactttt tttttctggg tacagtacat gggtatcggg gctctgtatt
1441 tttttaaaact gtgtacacat tattaataaata tacattttat aaaatataaa taaaaacgtg
1501 gatttgtttt tcatgccaaa aaaaaaaaaa aaaa

```

图23

Atoh1 增强子 (SEQ ID NO: 22)

```
1   TCCAAGGTCC GGCAATGAAG TTTGCATAAC AAACGTTTGG CAGCTCCCTC TCTCACACCC
61  CATTAACAAG CTGTAACATA TAGCTGCAGG TTGCTATAAT CTCATTAATA TTTTGGAAC
121 TTGAATATTG AGTATTCTG AGCGCTCATT CCCCATATGC CAGACCACTC CTGCCATGCT
181 GACTGGTTCC TTTCTCTCCA TTATTAGCAA TTAGCTTCTA CCTTCCAAAG TCAGATCCAA
241 GTATCTAAGA TACTACCAAA GGCATCAACT ATGTATGCAA GTTAGGCATG CTTAATATCA
301 CCCAAACAAA CAAAGAGTCA GCACTTCTTA AAGTAATGAA GATAGATAAA TCGGGTTAGT
361 TCTTTGGGAC ACCGCTGTTG TTTTCAGAG TTTTCTATA CTTTAAGCAG CTTGTTTTAT
421 ATTCTGTCTT TGCCCTCAGC CAGCTAACAT TTIATTTGTT GAGGGTTTTG GCTCACCACA
481 CTTTTGGAAG CTTATTTGAT TTCACGGGGA GCIGAAGGAA GATTGTTTTT GGCAACAGGC
541 AAGTTTAACA CGTTCTTCAT GGGGCATTGC GAATGGCACA TCTACCAGAA AGGGAGGGGG
601 AGTAACTTCC TCGTGCTGAA CCAGCAGGAG ACCAGAGCTT TCCTGAGGTC TTCCTATTGA
661 TTTTAAAGAT TTAAACTGA GCCCAAAGT TGTAATGTTA TTGAAGTTTG TCTTGAATA
721 TACATCTCCT CTGCTAACTT AAAAGTTCAA GAAAGGAAAG GAAAGAAATA GAACCCCTTG
781 CTAACACAAA CCTAGACTGA GAGGTGAAGA TCGCGGGCAA AGACAGGTGG TCACTGAAAC
841 GTTTGCAGTT CTTTTCTTCC GAAGGCTTAG GACACAGGGT AAGGAGGAGC TAAATAAAG
901 CCGAGTGTAC GTTTAGTCTT CTCTGCACCC CAGGCCTAGT GTCTCCCCAG GCAAGGAGTC
961 ACCCCCTTTG CTTCTGGCTC CTAACGAAA AAGGCAAAAG GGAGTGGAGA ATGGGTAAA
1021 TCCCAGGACA CAGGGGAGAG GCAGGGGAGG AGAGAAGTCG GAGGAAGATA AAGGAAAGGA
1081 CAGGAACCAA GAAGCGTGGG GGTAGTTTGC CGTAATGTGA GTGTTTCTTA ATTAGAGAGC
1141 GGCTGACAAT AGAGGGGCTG GCAGAGGCTC CTGGCCCCGG TGCGGAGCGT CTGGAGCGGA
1201 GCACGCGCTG TCAGCTGGTG AGCGCACTCG CTITCAGGCC GCTCCCCGGG GAGCTGAGCG
1261 GCCACATTTA ACACCGTCGT CACCTCCCC GGCTCCTCA ACATCGGCCT CCTCCTCGTA
1321 GACAGCCTTG CTCGGCCCC CACCGGCAGA GTTACAGAA GCCAGAGCCT CTCGCCGTTT
1381 CCCCCG
```

图24

Pou4f3 启动子 (SEQ ID NO: 23)

```

1  AGGGGGTGGC  ACGGCGCGGC  GCGGCGCGGC  GCGGCGCGGC  GCGGCGGGTG  TCTCACAGTT
61  GGCTCTGGC   TCCCTGGTCC  CTCTGGGCAT  CTCGGATCCT  CCCTGGGCTG  GGCAGACAA
121  GAGAGGCAGC  GGCCGACAGG  CGAGTCCAGT  AGCAGCTGTG  CAGGCGGAGG  TTACATGTGA
181  GAAGTTTGTG  AAAGAAACTG  AGAGAAAGAG  AGAGGAAGGC  AAGGCAGGCT  GCAGACACCT
241  GGCCCCGGTG  CCTCACCAGC  TGCCCTCCTG  CGATGGCATC  TTGAGTTCGG  GCAGCTCCTA
301  TCGAAGCCAT  CTTGCCCTGG  ATCCTCCCCG  CCCCTCTCC  AGCATGCCTA  GGTGAGGCTG
361  AGCTGATGGA  GGCTTAGCTG  TGGTTCCAAC  TAACTGCCCT  GTACCAGCAG  AGGAAGCTAG
421  CTTAGTTCAA  AACCTAGTAA  AGCAAACACT  CTGTCAAGGG  AACTTGCCTT  CCCCTTCACA
481  TTGAGCATTC  CTCTGGCAGG  AGTCCTGAAG  AAGATTTATT  AATATGTCCA  TTCTAAAATG
541  ACATAGACTT  CTTAAGGACT  GTTTGGGACA  CATAAGAACT  GATAAGACTC  ACCCTCTAAA
601  AGTCTCCAGA  GTCTTTGAAG  GAACAGACAT  TCATCGTCAC  ATGCTTTTGA  AGAGATAACA
661  GAGCAGGGCT  GGAGAAATGG  CTCAGCAGTT  AAGAAGACTT  CCAGAGGACC  TGGTGAGATT
721  CCCAGTCCCC  TGTAATTCCA  GTTCCAGTGA  ATCTGATGCC  TTCTTCTGGC  CAGCAGCACT
781  CACGCTAGAC  ACAAATGTGG  TATACAAACA  TACATGCAAG  CAAAACAAAA  GTGTGTGTTA
841  AGTGTGTGTG  CATCATGTGC  ATACTACGTG  CCTGGTAAGG  CCAGAAGAAG  ATGTTGGATC
901  CCCTGGAAGT  CTTAGAGATG  GTTGTGAGCT  GCCATGTAGG  TGCTGGAAGT  TGTATCAGGG
961  CCCTCTGGAG  AGGTCAATAA  ATGCTCTTAA  GTGTGAGCC  ATCTCTCCAC  TCCTCATATA
1021  CATTAAAGGA  ATAATTTTTC  TGTACAGGCT  ACAGGGGAGG  TTGAGGCAGG  AAGGTCTCAA
1081  GGCCAAGGCC  AGGCTTAGTT  ACATAGAGGG  AACTGTCTCA  AAATAAGAGT  GGAGGATCTG
1141  GAGAAATGGA  AAGAGCACTG  TTGTTCTTAC  AGGGGACCAA  TTCCTAGCAT  CCACATGGAG
1201  GTCCAAGATC  CTTTTCTGAC  TCTGAAGGTA  TCAGACACTC  ATATGGTAGA  CATACATACA
1261  TGCAGGCAAA  ACACTTATAC  ACATAAGATA  ATCTGAAAAA  AATTAATAAA  GGGGGGAATC
1321  TAACTCATTG  GCAGACCCTT  CGCCTTGAAT  GCACGAGGCC  CTAGGTTTCA  TTTATCATAT
1381  GCAGAGAGTA  GAGTTAGTCA  CATTGGGATA  GACAATAAGC  AGAGAGAAGC  GGGATGCTAG
1441  CTGTCTCCTT  TCTTCCATTG  TGTGTGTGTA  TATATATATA  TGTATACATA  TATATACACA
1501  CACACATATA  CACACACACA  CACACACACA  CACACACACA  CACACTGTAT  ATACTGTAGT
1561  TGTCTTCAGC  CATACCAGAA  GAGGGCAICA  GATCCTATTA  CAGCTGATTT  TGAGCCACCT
1621  TGTGGTTGCT  GGGAGTTGAA  CTTAAGACCT  TGGCAAGAGC  AGCCAATGCT  CTTAACCACCT
1681  GGGCCGTCTC  TCCAATCCCC  TCCCTTCTCT  CATTTTGTTT  CTTTGTGTAT  ACCCGCCCTT
1741  GGGATGATGA  CACTTGGATC  CAAGGTGGAT  CTTCTCTCCT  CGATCAATCC  TTCAAGAAAC
1801  ACCTCACACG  TGTCTTCTT  AAGTTTCTC  TTTTTCCTCA  GACAGGATTT  CTCTGTGTAG
1861  CCATGGCTGG  CCTGTAACCA  TCTTTATAGA  CCAGGCTGGC  CTCGAATCTA  CAGAGATCCA
1921  CCTGCTAATG  AAAGAACTCA  GTGGGGAAAC  CCCCACTCAG  CTCCCGATTC  GGCCTGCACC
1981  CAAGAATCGC  GAATAGAACA  CAACACCTTG  ATGTAACAAC  AAGAGGTTTT  TTAATGGCGG
2041  AGCTCCGGGT  CGAAACGTAT  CTCACACAAC  AGGAGACAGT  GGATTCGACC  ACCGAGCTTA
2101  GAAGCTAGGG  GTTTTTATAG  AAAAGGAGTG  GGGCTGGGGA  AGGAATTGAC  GCGGTTTCAC
2161  ATGATTGGTC  CATTTAAACA  TCAGCAGCCT  GTAACATTTA  ACTTAGGTCA  GAGGGGTGGG
2221  AGCTAGGGAG  GCGAAGGGCT  TGCCCGGGCA  TGTCTGGTCT  TGTCTCTGCT  TGTCTCAGC
2281  CCCAGGTTTC  AAAGCGCACA  AACAACTCTT  TGGGCTATTT  AACATACATT  ACATGAATTA
2341  CAGTTTTATT  TCCTTTCAC  TCTACTGCT  GAGTGCTTGG  CCTAAAGCG  TGCTCCACCA
2401  CCTGGATCCT  TAGGCTTGGC  AACCACATCT  ACTCCTTGTT  ACTTAACACT  GAAATACACC
2461  ACTTTAGCCA  CAACATTCCA  TCCTGTCCCC  CAAGTGTTCC  GATATATCGT  ATCTCATAAC
2521  GCAAAACATT  CTATCCAATT  TCAAGAATTC  CCATAGTTAT  AAAAGTCCCA  ACATGATTGA
2581  AAAGTCCAAG  TTCAATAAAA  TCTCTGGGTC  TCCAAGAAAA  TCCTTAAATG  TGAGTTCTGG
2641  TAACAATCCA  GAAATATTCT  ACATCCAATA  TACAATGGTA  CCAGGTGAAC  ATCATTCC
2701  AAAAGACGGG  AAGGAGAGCA  TAGAACAAAT  GGATGGGACC  AAGTCAAGAC  TAAAACCCAG
2761  GAGAGGAAAT  ACGAAACTCT  GCAGCTCCAT  TTGTAGCACC  GAGGGCACGT  CATATAATGA
2821  CGTGGCGTTG  AAGATGGTTG  TTAGCTGCTG  TGTGGGTCCT  GGGTTCTCTG  GATGAACATT
2881  GACTAGTAAA  AAAATTTTTT  TGAATGAATT  AATTTACTTA  TCTTCTGGGT  GAGGCAGGAT
2941  CTGAATGTGG  AGGCCAGAGG  GCAACTGTGG  GAGTCACTTG  TCTCCTATGT  GTTAGATCTG
3001  GGGAGACAAC  TGAGGAATCC  AGGTCCCCAA  GCTTCATGCC  AGGCACCTTT  ACTAGCGGAG
3061  TCATCTCACT  GACCTTGACA  CTCATCACTT  TAATAACAGT  TACCTTTTAA  TTCATTGATT
3121  TAATTTAATT  AATGATAATT  CCACAGCATT  CAACTCAATC  CTTTTTCTGG  CCATATGGTT
3181  TTCAAAATCT  TTTGCTGTCT  TGAGTCTCAT  TATAAACCCA  ACTAAACACA  ATGACCACAA
3241  CACCTAACTA  AATGCTATGC  TGTCTTGAAG  TGTCTCCAC  CAAATGTGTC  TGTCACCCAT
3301  GTTTCCTTAC  ACACACAAAG  TTTATGGACA  CAGACAAAT  ACTTTGCCAG  AATAGAATTC

```

图25 (1/3)

```

3361 AAATGATCTT TAGTCAAGCT CCCAATAGAG ACCTCATTTG CATCGAAAAC CTCAGGGGGC
3421 CAAGCTTTCA TCCTTTGAGT CTAGTCCACT GAACCTTGT GCATCTAGAC CACTGAAGTC
3481 CAGACAGAAT TCCCCACCAA GCTCTGCTCA CCACACTCTC AGCACCTCTA GTCTACCTTC
3541 CCCTACCAAC CCCCTTCAAG CAAACAAGTT CCAAAGGCGT GAGAACTAGC TGGTTAGCAA
3601 GAATGTAAC TCTGGGTGCC AACTTTCTGT ATTAGATAGT TTTTTCCTCA CTAATCAGAT
3661 ACTTGATAGA AACAAC TTAA AGAGAGAGAAG ATATATTTTG TATCCAGTGT CAGAGTTTTC
3721 AGTGTGAGAG AGCTAGAGCA CAGAATTCTG TGCTGGGTCC CGAGGTAGAG AAAGGAGAA
3781 GCTAGCTCCT GTCAACTTTC CCTCTTTAAC CCATTATTTC CAGCAAAGTC CAAAGCCATG
3841 AGGATGGCAC CACTCACATT CAAGATGAGT CTTTTTTTTT TTTTTTGCCC CTTACTTAAT
3901 CCTCACACTC ACAGGTAGAT CTCACCAGTC TTTCAGGTAA TTCTAAATAT AGTCTAGTTG
3961 ACAAGGAGGA TTAAACCACC ACAGCCCTTG TCAAAACCTC TGAGTCCGAG TTTTCGTGCT
4021 CTGTTTTATG AAAC TGAGT TGCTTCTTTC TTATTCATT CTAATGTTGAA AGCCACTAGC
4081 CCACAGAAAA ATGTCCTTGT CCCTGATTTC AATCTCTCTG GAGAACACAG TGCTCTGAGT
4141 CCTGATTTAT GTGGCAATCT CATGTCCTGG CCAAGATCTT GGTTTTTTGT TTTTGTGTTT
4201 GTTTTGTGTT TTTTGTGTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TGAGATAGGG TCTCACTTAT
4261 GTAGCCCTGG CTGTCTTGAA ACTCCCTATG TAGACCAGGC TGGCCTTGAA CTCACAGAGA
4321 TCCACCTGCC TCTGCCCTCT CAAGTGCCAC TACACTGCCT TAAACCCTAA GATCTTGAAA
4381 CAGTGCTCTC TGTATCTGCA GAACCTGCCA TGAAATCCAG CTAGCAGTGG GTATTTCAAA
4441 GACCTTATAG AATGAAAAAA ATGTGACTCC TTTGGTGCCC TTGACTGAAC CCTGAGATTA
4501 TTTTGGGACT CAATGGGTGT AGGGTATTTT CTTATTTGTT TGTGCTCTAG GTGGGGTCCC
4561 CATTATGTAG CTTAGCTGAC CTTGAACCTC TGATGTAGAA CAGACTGCCC CCCCCACCTG
4621 TCTCTCTATG TGTGTTTTAA TTACAATAAA ATGCCACGGT ATAAGCGTAA GTTTACCTCA
4681 GGCAACCTC TCTTGCATGA CCAACTACAA ATAGTAGTTG ACTGGTTTTT ATTAGATTTT
4741 CATCTAATTG AATTTAAGTT TGTAAGTTCT GAAAAAATG TGTCCTAAGG CTTATCTTGT
4801 ACTTTCATCC CCCCCCCC GCACCAATCT ATTATTTTAT GTGTATGGAG GTTTTGTATG
4861 TATATATGTT TGTGTACCTC CTATGTGAAG TACCCTGGA GGTCCGAAAA GGGCATCAGA
4921 TTCATTGGAA TTAACAAATA GTTCTGAGCT ACCATGTGTG TGCTGGGAAC TGAAC TTGGG
4981 TCTTCTGAAA GACCCAGCCA ATGCTCTTAA TCTCAGGGTC ACTTCTACAG ACCCTGCCGT
5041 TGCAATTTTT AAAAAATTAT TGTGTTCCCT TTGTCATCAT GTGTGTGTC CCGTGCCTT
5101 GTTCCACCCC CATTCCCCAC CGATTTCCTC AGCATTATCT AAAGACCTTG ATAAGGCCTG
5161 TGGTGTGACA GAAAACAGTT GATAAAGGAG ATCAGCATTA CCTTTTTACA GGTCTTTTAA
5221 AAAGCCAAGT AAGTACATGT ATGACTACAC TTAATTGATT TTTAAAATTT CAGCCCCCTT
5281 CTGTAGCTGG GTGTCTTTGC ATGTAGTTTC ACTCTGTCTC CATCAATAGG TTTATGTTCA
5341 GGCAAGCCA TAATCAGATT TTCTAAGAGT CATCTCCAGT GACAATTATT CAGGTCTTAT
5401 TACTATTAA TATTATTTAA TATTTAATTA ATTGATTAA AATCATTATT AATCATTAGT
5461 TTTTCATGTT ATTATTCGTT TCGTTTTGTT TAAGATCTCG CACAGCCCCA GCTGGCCTTG
5521 AACTCAGTCT GTCATCCATG TGAGTACAGA ACTCCAGTT TCCTTCACCC ACATCCCAG
5581 TGCTGAGGTT ACAGGTGTGA ACAGCCACAT CTATCTTACA GATTTACAAT GGTTCATGC
5641 CCTTTTCTGA TGCTATAGAA TAAAGAAAA GTATTTTTC CAGCTAAAGA AGAAAAAAT
5701 GATTCCCTTA CAATTTGTAT TTCTTATCTT TCAGGCTAAT TGATGATTGA GTTCCAACCA
5761 GGTGACTAT AGCAATGTAT AAAAGATTAA TTTTAAAGTG TGACACAAAA ATAAATATTC
5821 AAAATGGTGG ACACACACAC ACACACACAC ACAGAGGCTA GTTTTACTGA TAGGTGTCAG
5881 CTTACTACTG ACCATTGCTA GTGGACCTTA TGGGAAGAAA AGACAGAAAG GTGTTTTCTA
5941 GGGGCCTGAG GGAAGTAGTG GTATTGTCTT GGTGAGCATT TTTTGATGAC TTATTTTATT
6001 TTAATGTGAT TGATGTTTTG CCTACATATA TGCTGTTGA ACCGCATTGG ATCCCCTGAA
6061 ACTGCAGTTA CAGGCTACCA TGTTGGGTGT GGGGAATTGAG CCCAGGTCTT CTGGAAGATC
6121 AGTCAGTGTT GTTAACCACT GAGCCATCTC TCCAGTCCCA CCTAGTCAGT ATTTTCCAAG
6181 TCCATGAGTG ACAGAGCAGT GAAGGGGATG GGTATGAATG CGTCTTTCCC AAGTATTCCT
6241 CTTACAGAC AACGAGGATA TTATGGCATG AAAAGAGACC CTTAAGAGGC TCCATGGGGT
6301 CAGGCAAAAT GTAGGTCCAC TACCTCCATG TTTATTCCCG CTTCCCTTTT GGAATCCACA
6361 CTGGTCAGGA AACAATACTG AGGAGTCTTA AAAGCTAGTG GGAGATAAAA ATCACCCTAG
6421 TTTGACTTCT GGGGACTTGA GGGGCTGTG TTGTGGCACA AAGCCAGTAA TAAGGAGAGG
6481 AACAGTTCAC ATCTGCAGAG AGACCACATC CCTGGAGAGA CTGCAGGCTG TTCTTTAGGT
6541 TAAAAAGGAG GTGCTAACAT TTGTTCCATC CTTTCAACAT GTTGGATGCC GTTTCAAGTG
6601 CTTACCACCA AGTAACCCTC ACTACAGTAG GGGAACTAC TGTATGCATC TGTATACAGA
6661 TGGGCACTGC AGTATAGAGG CCTCAAGATG ACTGTCTCCT GGCCTCTCAG CCAGTAGAAG
6721 TAGAAGCAGC AGTGTGCTCT GAGTCTGATG GCAGCATGCA CTGGGTGTG AAGAAGTGT
6781 CTGAGTGCAC AGTGAGGTCA TCATCATCAT CCTTCTCTC CAGCAAGACC CAAGAAAGCT

```

图25 (2/3)

```
6841 ACCTGAGTAC CATTTCAGTI GGCCTCCCTC ACAGATTGAT GATTGATTGA TTGATTGATT
6901 GTTGTGTGTTG TTTTGCCACA GCAAGGAAGG ACCTAGAATG TGTTTTGGGA TGAGTTGAGA
6961 AAGGACTGGC TGGCAGTCCT GAGGAAAGAG GGGGAGCCAG GTCAGTGTAG GGTGTCATCT
7021 TAGACTAAAT TCATCCCTGG GTCCTAGACT TTCCACACTC TGCCCCCTCA GTGTTAAGAT
7081 TCTGGGAAAC CCAGCACTCT TGAGCACAGA GACAGTGCTG CAGGACACAG CTGGGCAGGA
7141 AGAATTTCTC TTCCAACCCG AAGGCAGCTC TCCAGCCGGC CACAGTCCCA GGATTCCTCA
7201 TCCATTATTC ATGGTGTTTA TTAGCTCCCA GGAAGGGAGA GGAAAGAAGG AGAGGAGGCG
7261 CTAGGGAAAT AGGGGACACA GAGGATGGGG CAGAGACAAA CTTAGGACCC TTAAGTTGGG
7321 GGAACCTCTA AAGGAAGAAG AGGAGGCTAA GAGGTGAAGA GCCCAAAGTC AGACATGGTG
7381 TTGGCTCCAA ACCAGTGAGT GAATGACACT GCTCACAGGT AGGAGATCTT GGGCTAACTT
7441 ATTTGGCTCT TGTTTCCTTT GGCTGTCTAA TGGGATAGCA GTAGCTACTC TGTAGTGTCC
7501 TGTAGGAACG TTGGTCCTAT ACACCTAACAA TACTTTTAA ATATTGAGTG CTCAATACTT
7561 TTCTCATTAT GTTATTATTA TTATTATTAT TATTATTATT ATTATTATTA TTATCATTGC
7621 CTCGCACAAA TCAGTAGCTC AAAAATGATA GCTGTTGTTA CAGGTATTGG GGCTGCTAAG
7681 CTCTACAGAA GTATGCAGAA GAATTGCTCC AGCTAGGCCA GCTGTCCTCT ACTGTTCCCT
7741 AGCAAGCTTT CTGGGGGGTG GGGGGGAAAG GGAGAACTTG GCCCACAAGT TCTGTTTCTC
7801 AGATGAAAGC TGAAACAGCC AGGGTTAGGA AGAAGCCACA GGCTTGTTGA TCAGGAAGCC
7861 TTTCTTCCAC CCAAGCTCAC AGAGGGGAGT ATCACCCGAT AAGCATTCTG GTAACCTCTG
7921 GTCCTTGCCC AGGCTGGTTT CTGAGTTTGG AGGCACCTTT TCGCTATGCA CTGGGATGCA
7981 GGCTTTGAGC TTCAGACTCA GAGCACCTTG AAAATAGCCA GTTTGGGGTG TGTGTGTGTG
8041 TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TCTCAGGAGC TTAAGTCTGC CCTTTCATCC
8101 AGGCAGCTCG AGCTGGGACA GGACAGAGGT TTAGGACTTT ATGCAAAGAA GTCCAGGAGG
8161 AAGAAGAAAG AATCTGTAAA GTCTGGCAAG CTGGAGCCAG GTGGGGCGGG GCGGACAGGA
8221 AGAGGCCCTG CCAGGCCGGG GTATAAATGC TGTGGAGGGG GGCGGCCGCA TCAGGCTCAG
8281 AGTGGCGCGC CGAGACCTGC GGTCCCGCCT TGCCTCCCGG GCCGCCCCTG CGAGTCCCGG
8341 GCGCGTGTGC ACGTCTGCGC GTGCCCCGGC CCTTCCTGGC AGACTGCTTG TAAGATGAGT
8401 GAAGAAGCAG GTGGGGGAGA GGGGAGGCAG CAAGCGAGAG GGCGAGGGGA GCGCTGGCGC
8461 TGAGCGGCGC TCACCTGGAG CGCGGAGAGC TAGCAAGACG A
```

图25 (3/3)

Myo7a 启动子 (SEQ ID NO: 24)

```
1   CTAGAGGGAT CTGTCTGTTT CATTTTTCCC GTACCCCGCA CCCCCCACA CACAAGGGTA
61  AAGACAGAGG GCACAATGGG TAGCTGACCT CTGGTCAGAA GGATGAGCAA GGAAGGCCTT
121 GGAATCACA GATAAAGCT GGCCTTGCTG GTTACCTAGT GAGTCAGAGC CCAGCTCTGT
181 GGAATCCTTC AGGTTCCTCG CTTCCAGTCA GTGTGGGGCT GGCTTGTGCTG AGCTCTGCCC
241 ATCTCAGGCC CTGGGGACAT GGGGGCACAC AGTTCCTGCT CTGCAGCAGC CTTCCAGCAA
301 CTGGGGAAAA TGTACAAATC ATGTCTGATC GAAGTACTGT AGTGICCTTG ATAAGCAGTG
361 TCCCTAGGAG CTGACTCTTA GTCTCTGAGT TCAAGATCTG TGCCCTGTTC TAGTGGAGAG
421 GAGAGACTTA CATGCAGGCC ACAGACGGAG GTGGCAGAGC AGAGATCCTG GGAAGGTGCG
481 GTAGCTAGAG CTAGGAATTT ATGGGCAGGG CCACGGGTAG AAGCIGGGTC GGGTTGTGGA
541 AAACGAAATG ATGGAATACG ACGATAGATT GGATTTGAAG GGGCGAGGGT TGTATGAACT
601 AAGACCAATT CTGCAGTGGT TCAGATGTGG TGCCCTTAAG AGGCTCAGGT GCCAGAAACC
661 AGTGCCCTTT CTGGATAGGG CAGAAAACAG GCAGAACCTG GAGAGGTACG GTGGAGCATG
721 AGGTGGTAAG GACACACACC ATCTCAGGTG GTTTGTTTTG GGGAAAACAA GCATGGATTT
781 CTAGGTTTCT CCGATCGGGT GACCTGCTTA GCCGAGTTTG GGTGCTGAGG AAATGTCTCC
841 GTTATGGTTC TGAGACCACT TTCTCACCCA CCCACTGCCT TCCCAGCATG CACCTCAGCC
901 TCAACGAAGC ACACCTGCCC CAGTTGCCGC CTTGTGATT GGGCTCTGGA TGCTCCAACC
961 TGTGTCTCTC CCACTCTGTG TAGGCTCATG CTACTCACCT GACTCATAG TATCAGTTTC
1021 GTAGGTGAAG GCTGCGTTGG GTGCAAGTCA ACCTTGGACC CTGGTCTCAC TGTGGCACCC
1081 TGGTATGAGG AAGTTGACCG GCTTTTCTTT AGTCTGTAG CAGTTGGCTG TGCCAGCAG
1141 GTGGCACCAT TGCACCATTG ATTCTCCCA CTCCATACCA CTATAGATTG CACCCACCC
1201 TATTCCTCTC CCCACCTTAA CCCACCCACC CCCACCGAAA AGCAGCTTTC CTGAGTAGAT
1261 GTCCAGCTG GCAAGTGTGG GCAGAAGAAG GGGCCAGGTC TCAGGAGGAG GAGGAGGAGG
1321 AGGAGGAGGA GGAAGAGGAA GAGGAGTCCT TCAGCCTCCT TCCTCATCTA CCATGATGAG
1381 TATTTGTGTC CTGTTTATTC CCACCCACTC CTTTTTTTAA ATCACACATT TAAATCACAC
1441 ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACCGGGTA AGTCTGTCTT
1501 GCGTGAGGTG GCTCCTACTC AGGTGGCTTT GCAAACTGTC TGGATAACAG CACACTCAAG
1561 ACTCCTAGGA CAGGCTGTGG GGGCCAGTTG TAGAGCCTGG GGGTGGGGTG CATCTTGGGG
1621 AGTCTCTGTT TGGATGTTGT GTCCAGCCAA GGCTCCAGGT ATTGCCAAGC CTGCTCATTT
1681 ATATGGTCTC TAGTAGTGCC CTGACGAGGG AAGCTGGGTG AGCAGGGGAG GCTACTGGGA
1741 ACTGAGACCC AGCAAAATCA TGAGGAAGAT GGGACGTGAT CAGGTGTCTT AACCATGCAG
1801 AGATGGCAGG TAGTAACACA TGTGACAAGA GACCCTGAGG TCCTGATGGT TGGCCCCAGG
1861 CCCGAGGTTC CCACTGGCCA GCAGTGCCCC CTGGAGCTTC TATGCCTTGC ATCCCTGCTG
1921 GTTAGCTTTA CACAGCACCT TGGGCAACCT CTAGACGTTA GTCAGCAGCC CCAGCACAGC
1981 CCGCCCTCA TGCTGATGTC ACCACATCCA GACCTTCGAG GCCCCAGGG CTCCGCTCC
2041 TGGGAGAAGG CTTTGGAGGG AGAGGGCGGG TGGCAGTGCA GGCTGGACAG CTGCCCTGAA
2101 CAGAAAGAAA GAGTGACCCA GGGAGACAAG AAACAGAGTA GCCCAAGGGA AGCCACAGC
2161 AGCAGCAGAT CAAGGCTCAA GCTGGAGCTG AAAATTGCA GGCTCCAGCC TCAGCTCCA
2221 GAGTCTCTCT GACCTGTGAC CCCTGGCTCC TGGCTGGGAG GTGGIGACTC GGAGGGTGTG
2281 GATAAAACCC AGGTAAGGAT GGGCTGCCCT GGCTGGAAC TTTGGACTGG GGAGGAGTTA
2341 CAGGCTGGGG CCTCCTCTGG AGCCTCTGCC CTTAGGTTCC TGGGACTGGA CTCCCTGAA
2401 CCTACAGGGG CCTTGCCACC ATAGGCATGG AAAGAAAATG CCCCAGCCG TGCACATGGA
2461 GGCTTATGCC CTAGATGAGG GAATAGCTGA AGAGCACAGG GCCTGTGGAG TTGTTTCCGG
2521 GTTGGAGCTG GGTGAGGGGT ATCCAGAGGC AGGGGTGAAA GATGGGAGTG GAGGCTGGGG
2581 GGGCAAGTGT GGATGCCTCT CTCTGCTTGG TCTTTTGGTC ATCTCCCTGA TAATCTATCT
2641 CTCCTTGCAC ACGTTGTTTC TTCTTTGTGT GCCTTACATT CTCTATCCGT GACCCAAGAA
2701 CATGAAGGTT ACCATCTGGG GTTGCCACAG GGTCAGGTA AAATCAGTTG TGGGTCTAGG
2761 GAAAAAACA AAACAAAACA AAAAATATG GTTCTTTGTT CTCAATTTGA AAAGCAACAG
2821 TCTTACACAC TAGTCTAGTC TGGGATGGAG AGGTAGAGCC TCATGCATGG GGTAGAAGAG
2881 ACCTGAGCTT TTCCATGGGT CTTAGCTCT ACCCTCCAAG TCTACAGTCC CAGTCTGTCC
2941 TGCAGCCTTG TACCAGCATG AGTGAGGCAG GGGCCAGGCA GCCTCTTCAG ACGCCAGCTC
3001 TCATAACTAC TGCTGCTGCC TTTGGGATTA TCCCCCTGCC AGGACCCAG CGTGGTGTAG
3061 GTCTCCCGAA GGACCATATG CCCATAGAGA CCCAGGGCGT GGGGTACAGG CTCAGGTGTC
3121 AGGCAGTGTC GTGGGCAGAG GATCAGATGT CCCAGTGCTT CTGAATGGAC CCTTGTGAAA
3181 ACTTAATGCT CACTCGAGGG GCAGGCCAGG CAGGGATGGA GGGGCCTCAC ACCAAGACCT
3241 ATGGGCTGGG GCTGCTTCTG GTGACCACAC TCGAGGCAGC AAATCCATCT CGAGCCTATT
3301 CCTGGGTCCA GCTCTGTGCT GGATGAGGTA AGAGATGAGG GCCACGAACA GGTGTTAGAT
```

图26 (1/2)

```

3361 CATICTGCCA TGTGTCCTAA AACTCCTAAA GCAGTCCTGA ACCAGGAGCA GAGTCCAAAT
3421 CTTACTTAGT GCCAAGTCTT CCCTGCCCTG CTGTGTGACC TTGGGTAAGA GATAGTCCTT
3481 CTCIGAAGTT TGGGCAGCCT CAGGACATTA GTCCCTGTCC CAGCACAGCC CACCCCTCAC
3541 GCTGATGTCT GGTACAGGGC TGACTACACT CCTTTCAAAG CCCTTTGGGA TGACGAGGGC
3601 AGCTTTGGGC AGTGGAGGTG GTGACGGTAA CTGAGGCTCT GGTACATAG ACTGAGCTTT
3661 AATCAGAAGG ATGGAACCA AGAAAGATT CCGTGAGGGA GGAGGGGTAG GGGTGGGTT
3721 GGGGAGGAGT CTAGGTGGCC CTGCAGATCC AAGCTGCCTG GGCTCAGGGC GTGCCATGGT
3781 CTCCTCCAC AGAGCTGTGT CTGGTCACTC CGGCAGGTGT GCTGACGTAG AAG

```

图26 (2/2)

Hes5 启动子 (SEQ ID NO: 25)

```

1 ACCTCTGTCA GAGCTCGGGT GAGGGTTGTG GCAGGGACTA AGGGAGGTGA ATTCTGCACT
61 TATATCTTGC ACTGGACAGA CCATCCTGTG CTGCCTCAAA GCCAAGCCTT CCCCTCTGTC
121 CCAGATGCTT CCATCCATGG TAACCAACA ACCCCTTGTG CTAAGAGCTT CTGGAGCAAG
181 ACCTTCGGAA TAGATCATT ACAGCAGTGG GTCATACTA TAGCAGGAGG GCGTTTCCCT
241 AGTGGGCACT GTGAAGGCC TTCAGTTCCT GAGCTCAGAC ATGGCTGACA TCCATCCAGA
301 GAACCTGGTT TCATTCCACA CTGGCTATTG TGCTCTGATG CCAGCCTCCT GGTTTGGGCC
361 TGGCTAGGTC TTAGGTTGAC CCTAGGAGGA AGCAGGGGGC CTTATCTCCT CCCTCAGCCC
421 CTGCAGAGTA TTGGGGAAAT AGTACAGGTT CCAGATGGAG GGACGCTCCT ACATGGCCAT
481 CCCCTAGGTG TCTAGGGTGT GACTAGTAAG GTCACCTGGT TAGGAACCAC GGTATCAGT
541 TCTTACAAAG AGGCCCATCC AACTGGCAC AGCATTATA TGGGGGCTTA TTTTtaggtc
601 TCCCACCTTC TACCTGCCAA CACAAAATGC TGAATGAAAC TGGAACACAC ACACAGAGGC
661 ATGCACGCGC GCGCCCGCAC GAGCTGAGGG GGATGTCATG AGAGGAGTTA AGGGCAGCCA
721 TGGTTTCCTA AAAGCCACGC GGGAGTAGTG ATCACGGACA GCATGAAGGA GGCACGGTCC
781 TCCTGTTTCA GAGATGCATG TGGCACCTGG TGACACAAGA GCAGTCCAGA TACCCTGTGG
841 GTTCAGGGGT TCCTGAGGGC TTCCTAGGTA TGGGGCTTTG TGCTAGGCAT TATCCAAAGC
901 AAATTTCAGT AGCCTAGAAG TACGCTTGGC AGGCTCCGCG CGTGGCCATT TCTAGCTGCG
961 GAGAAGTCAC TCCTCTCAAC TGACAGAACT GGCAATAAAG CGCCTAAATT CTAAATACAT
1021 GAGTCCCTCT CTCATCCTGT ACCTGCGAAT GGCATGGCGG CAGCATCTGT TTGAGAGAAT
1081 GTGGCCCACT TTAACCCACT GTGCCTGTGG GCAACAGGTC CCAGCTGGGG AGGGTGCCCA
1141 CTCTCTGGA AGTCGCTGTC TGTTTATGTT AAAACTCTCA TTTCTCTGCG CCTGTGGCCT
1201 CTGCCAGCCA GCGGTGGGGA GCCTCTGGGG AGTGGGAGGG AAGAAGGGAG AGAAGGGGGG
1261 GGGAGAGCAC TCCTTCCTGC CCTCCCACC TCCC CGCGC CTGGGAAAAG GCAGCATATT
1321 GAGGCGCGGG GCTCTCAGCA TCAGGCCCCG GGATGCTAAT GAGGGCGAGC GCGTTCCAC
1381 AGCCCGGACA TTGTGCCGCG CGGCCACCT GCTCCTCGGG GAGCGACCAT TGTGCCCGCG
1441 CCAATTACAC GGCAATTTAG CGTGCGCTAA TGGGCCGGCG CCTTTGTGCG GCCCGCGCCG
1501 CCATTGGCCG CCGAGTGTGG GAACGGCCGC GCGCCCGGA CCCAGGCGC CGGGCCGCTG
1561 CCCGCGCCTA TATAGGGCTG GCGTGCTGGG GTCCAGGTCG

```

图27

GFAP 启动子 (SEQ ID NO: 26)

```

1  AGGAGCTCCC ACCTCCCTCT CTGTGCTGGG ACTCACAGAG GGAGACCTCA GGAGGCAGTC
61  TGTCCATCAC ATGTCCAAAT GCAGAGCATA CCCTGGGCTG GGCGCAGTGG CGCACAACTG
121 TAATTCCAGC ACTTTGGGAG GCTGATGTGG AAGGATCACT TGAGCCCAGA AGTTCCTAGAC
181 CAGCCTGGGC AACATGGCAA GACCTATCT CTACAAAAAA AGTTAAAAAA TCAGCCACGT
241 GTGGTGACAC ACACCTGTAG TCCCAGCTAT TCAGGAGGCT GAGGTGAGGG GATCACTTAA
301 GGCTGGGAGG TTGAGGCTGC AGTGAGTCGT GGTGCGCCA CTGCACTCCA GCCTGGGCAA
361 CAGTGAGACC CTGTCTCAA AGACAAAAAA AAAAAAGAA CATATCCTGG
421 TGTGGAGTAG GGGACGCTGC TCTGACAGAG GCTCGGGGGC CTGAGCTGGC TCTGTGAGCT
481 GGGGAGGAGG CAGACAGCCA GGCTTGTCT GCAAGCAGAC CTGGCAGCAT TGGGCTGGCC
541 GCCCCCAGG GCCTCCTCTT CATGCCAGT GAATGACTCA CCTTGGCACA GACACAATGT
601 TCGGGGTGGG CACAGTGCCT GCTTCCCGCC GCACCCAGC CCCCCTCAA TGCCTTCCGA
661 GAAGCCCATT GAGCAGGGGG CTTGCATTGC ACCCCAGCCT GACAGCCTGG CATCTTGGGA
721 TAAAAGCAGC ACAGCCCCCT AGGGGCTGCC CTTGCTGTGT GGCGCCACCG GCGGTGGAGA
781 ACAAGGCTCT ATTCAAGCTG TGCCAGGAA AGGGGATCAG GGGATGCCCA GGCATGGACA
841 GTGGGTGGCA GGGGGGGAGA GGAGGCTGT CTGCTTCCCA GAAGTCCAG GACACAAATG
901 GGTGAGGGGA CTGGGCAGGG TTCTGACCCT GTGGGACCAG AGTGGAGGGC GTAGATGGAC
961 CTGAAGTCTC CAGGGACAAC AGGGCCAGG TCTCAGGCTC CTAGTTGGGC CCAGTGGCTC
1021 CAGCGTTTCC AAACCCATCC ATCCCAGAG GTTCTTCCCA TCTCTCCAG CTGATGTGTG
1081 GGAATCGAG GAAATAAATC TCCAGTGGGA GACGGAGGGG TGGCCAGGGA AACGGGGCGC
1141 TGCAGGAATA AAGACGAGCC AGCAGAGCCA GCICATGTGT AACGGCTTTG TGGAGCTGTC
1201 AAGGCCTGGT CTCTGGGAGA GAGGCACAGG GAGGCCAGAC AAGGAAGGGG TGACCTGGAG
1261 GGACAGATCC AGGGGCTAAA GTCCTGATAA GGCAAGAGAG TGCCGGCCCC CTCTTGCCCT
1321 ATCAGGACCT CCACTGCCAC ATAGAGGCCA TGATTGACCC TTAGACAAAG GGCTGGTGTG
1381 CAATCCCAGC CCCAGCCCC AGAACTCCAG GGAATGAATG GGCAGAGAGC AGGAATGTGG
1441 GACATCTGTG TTCAAGGGAA GGACTCCAGG AGTCTGCTGG GAATGAGGCC TAGTAGGAAA
1501 TGAGGTGGCC CTTGAGGGTA CAGAACAGGT TCATTCTTCG CCAAATTCCC AGCACCTTGC
1561 AGGCACCTTAC AGCTGAGTGA GATAATGCCT GGGTTATGAA ATCAAAAAGT TGGAAAGCAG
1621 GTCAGAGGTC ATCTGGTACA GCCCTTCCTT CCCTTTTTTT TTTTTTTTTT TGTGAGACAA
1681 GGTCCTCTCT TGTTGCCAG GCTGGAGTGG CGCAAACACA GCTCACTGCA GCCTCAACCT
1741 ACTGGGCTCA AGCAATCCTC CAGCCTCAGC CTCCCAAAGT GCTGGGATTA CAAGCATGAG
1801 CCACCCCACT CAGCCCTTTC CTTCTTTTTT AATTGATGCA TAATAATTGT AAGTATTCAT
1861 CATGGTCCAA CCAACCCCTT CTTGACCCAC CTTCTTAGAG AGAGGGTCCCT CTTGCTTCAG
1921 CGGTCAGGGC CCCAGACCCA TGGTCTGGCT CCAGGTACCA CCTGCCTCAT GCAGGAGTTG
1981 GCGTGCCAG GAAGCTCTGC CTCTGGGCAC AGTGACCTCA GTGGGGTGAG GGGAGCTCTC
2041 CCCATAGCTG GGCTGCGGCC CAACCCACC CCCTCAGGCT ATGCCAGGGG GTGTTGCCAG
2101 GGGCACCCGG GCATCGCCAG TCTAGCCAC TCCTTCATAA AGCCCTCGCA TCCCAGGAGC
2161 GAGCAGAGCC AGAGCAGGAT GGAGAGGAGA CGCATCACCT CCGCTGCTCG C

```

图28