



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108103104 B

(45) 授权公告日 2021.07.06

(21) 申请号 201711392979.1

A61P 9/10 (2006.01)

(22) 申请日 2017.12.21

A61P 3/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108103104 A

(56) 对比文件

CN 102498213 A, 2012.06.13

CN 102498213 A, 2012.06.13

(43) 申请公布日 2018.06.01

CN 103492574 A, 2014.01.01

(73) 专利权人 北京锦篮基因科技有限公司
地址 100176 北京市大兴区经济技术开发区
路东区经海三路35号德上科技园2
号楼高区

US 2017044504 A1, 2017.02.16

刘铁连等. 人血管生成素1和血管内皮生长
因子165重组腺病毒载体构建及目的基因表达.
《中国组织工程研究与临床康复》. 2008, 第12卷
(第41期), 第8103-8106页.

(72) 发明人 余双庆 董小岩 田文洪 马思思
张著月

Wimmer, T. et al.. Functional
Characterization of AAV-Expressed
Recombinant Anti-VEGF Single-Chain
Variable Fragments In Vitro. 《JOURNAL OF
OCULAR PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS》
. 2015, 第31卷 (第5期), 第269-276页.

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
代理人 张莉 黄革生

审查员 何春征

(51) Int. Cl.

G12N 15/864 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

权利要求书1页 说明书13页
序列表9页 附图6页

(54) 发明名称

一种预防和治疗脉络膜新生血管相关眼部
疾病的基因药物

(57) 摘要

本发明提供用于预防或治疗脉络膜血管新
生相关的眼部疾病的组合物和方法, 该组合物为
包含VEGF抗体或其功能片段基因的重组载体表
达单元和合适的腺相关病毒 (adeno-associated
virus, AAV) 外壳的重组病毒载体, 其通过玻璃体
腔或视网膜下注射可预防或治疗脉络膜血管新
生相关的眼部疾病, 如年龄相关黄斑变性和糖尿
病视网膜病变等。

1. 一种组合物,所述组合物包括携带表达VEGF抗体或其功能片段的重组载体表达单元的单链重组AAV病毒,

其中所述重组载体表达单元的特征在于,包括:(1)含有结构组成为启动子-抗体或抗体功能片段基因-WPRE-polyA-增强子的表达单元;和(2)含有两个AAV2病毒的ITR序列,其中:

所述启动子为SEQ ID NO: 1所述的CASS启动子;

所述polyA为BGH polyA;

所述增强子为UBC增强子,

其中所述抗体或抗体功能片段基因的核苷酸序列为SEQ ID No.4所示的核苷酸序列或SEQ ID No.3所示的核苷酸序列;或为编码SEQ ID No.10或SEQ ID No.9所示的氨基酸但因遗传密码的简并性而与SEQ ID NO: 4或3的核苷酸序列不同的核苷酸序列。

2. 根据权利要求1所述组合物,其中所述单链重组AAV病毒的外壳的血清型为AAV2、AAV5、AAV8或AAV9。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述重组载体表达单元的特征在于,包括:

(1)如SEQ ID No.1所示的CASS启动子;和

(2)如SEQ ID No.3所示的抗体功能片段基因或SEQ ID No.4所示的抗体基因;或编码如SEQ ID No.9或SEQ ID No.10所示的氨基酸但因遗传密码的简并性而与SEQ ID NO: 3或4的核苷酸序列不同的抗体功能片段基因或抗体基因;和

(3)如SEQ ID No.5所示的土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element, WPRE);和

(4)如SEQ ID No.6所示的polyA;和

(5)如SEQ ID No.7所示的真核基因表达增强子。

4. 依据权利要求3所述的组合物,其中所述组合物包含携带所述重组表达载体单元的单链重组AAV2、AAV5、AAV8或AAV9病毒载体。

5. 一种基因治疗药物,其特征在于,包括如权利要求1-4任一项所述组合物。

6. 权利要求1-4任一项的组合物在制备用于在脉络膜血管新生相关的眼部疾病预防或治疗中应用的药物中的用途。

7. 根据权利要求6所述的用途,其特征在于,所述药物的给药方式为视网膜下或玻璃体腔注射重组病毒载体。

8. 根据权利要求6或7的用途,其特征在于,所述眼部疾病为年龄相关黄斑变性或糖尿病视网膜病变。

一种预防和治疗脉络膜新生血管相关眼部疾病的基因药物

技术领域

[0001] 本发明涉及表达VEGF抗体的重组腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体在预防或治疗脉络膜血管新生相关的眼部疾病中的应用,如年龄相关黄斑变性和糖尿病视网膜病变等。

背景技术

[0002] 脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是多种眼部疾病的严重并发症,它能够引起眼底的组织出血、渗出及增生等一系列病理改变,因而造成眼球结构和功能的破坏,严重损害视功能。这一系列的眼底病变包括年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)、糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)和早产儿视网膜病等,严重影响视力,甚至致盲。

[0003] 年龄相关性黄斑变性是一种随年龄增加而发病率上升并导致中心视力下降的疾病,又称为老年相关性黄斑变性,是一种严重损害中心视力的眼病,以视觉极为敏感的视网膜黄斑区的退行性改变和新生血管生成为特征。临床上根据脉络膜有无新生血管伸入视网膜色素上皮,而将AMD分为萎缩型(干性AMD)与渗出型(湿性AMD)。90%的AMD患者是干性AMD,是由氧化应激的损伤所致,可导致黄斑区组织萎缩变薄。10%的AMD患者是湿性AMD,由视网膜下的异常血管形成所致,主要病理表现为脉络膜病理性新生血管生长,这些新生血管渗液、渗血,从而导致中心视力下降,而且视力下降速度较快且严重。随着我国老龄化步伐的加快,湿性AMD致盲性眼病的发病人数呈逐年上升趋势,是老年人视力降低和致盲的主要眼病之一,在我国45岁以上人群中AMD发生率约5%,75岁以上人群中AMD发生率接近20%。

[0004] 糖尿病视网膜病变是糖尿病的严重并发症之一,致盲率高,也是后天致盲性眼病的重要原因之一。长期的高血糖环境会损伤视网膜血管的内皮,视网膜毛细血管受损后出现渗漏现象,造成周围组织水肿、出血,以及毛细血管闭塞,引起视网膜缺血、缺氧,并产生新生血管,从而导致视网膜大量出血与玻璃体内大量积血,出现增殖性玻璃体视网膜病变。

[0005] 研究认为VEGF在生理和病理的血管生成中都是必不可少的重要诱导因子,如能抑制VEGF的活性,可有效地控制新生血管的生成[1, 2]。1990年代以来,以VEGF为靶标,通过阻断VEGF信号通路抑制眼底血管新生的药物成为开发的热点。兰尼单抗(FPFab01bizumab, 商品名Lucentis)可特异性地结合VEGF A,已获美国FDA批准用于治疗湿性老年黄斑变性和糖尿病性黄斑水肿[3],临床结果显示,在应用兰尼单抗的患者中约95%有改善或稳定的视觉; VEGF Trap-Eye (阿柏西普或Eylea)是美国Regeneron制药公司开发的VEGF重组蛋白,临床研究结果显示对DME的疗效令人满意。KH902(康柏西普, Conbercept)是成都康弘公司开发的针对老年黄斑变性(AMD)的VEGFR-Fc重组蛋白,2013年12月批准上市用于治疗AMD[4]。另外,与兰尼单抗靶点相同但成分为全IgG1分子的药物贝伐单抗(Avastin, FPIG01cizumab),目前只被FDA批准用于治疗结肠癌以及其他癌症,并不包括黄斑变性等眼底病。尽管如此,为了降低患者的经济负担,作为替代,很多眼科医师会超适应症使用贝伐单抗治疗视网膜相关的眼底病变,在一些临床前期和临床期试验中被证明和兰尼单抗疗效

相当[5-10]。

[0006] 尽管针对VEGF靶标的药物在临床上取得了很大的进展,但眼内注射兰尼单抗, Elyea或KH902的费用都是非常昂贵的,而且这些药物面临着一个共同问题,即注射进体内的蛋白药物随着药物代谢会很快被清除掉,因此需要持续多次的眼内注射才能维持治疗效果。大多数情况下,须每4~8周重复给药一次。例如,兰尼单抗推荐每月给药1次或初始3个月连续每月注射1次给药之后,按每3个月注射给药1次。康柏西普推荐给药方案为:初始3个月,每个月玻璃体腔内给药1次,之后每3个月玻璃体腔内给药1次;或者在初始3个月连续每月玻璃体腔内给药1次后,按需给药。持续多次给药一方面增加医疗负担,另一方面多次玻璃体内注射给药也带来严重并发症如感染性眼内炎和视网膜脱落等的风险增加。针对血管新生相关的AMD和DR等疾病的现有疗法的局限性已在本领域中产生了对于经济可行的、持续更长的治疗策略的需求。

[0007] AAV来自细小病毒家族,是目前发现的一类结构最简单的单链DNA缺陷型病毒,它编码两个末端的反向重复序列(ITR)中的cap和rep基因。重组腺相关病毒载体(rAAV) 是将AAV中的cap和rep基因替换成目标基因,目标基因不插入细胞的染色体中,以独立的染色体外DNA附加体的形式保留在细胞核中,在体内长期表达外源基因。由于AAV仅含衣壳蛋白和目标基因,因此安全性好、免疫源性低,而且AAV还具有宿主细胞范围广,能感染分裂和非分裂细胞等特点,成为现阶段在世界范围内应用最广的基因载体。Maguire(2008)等将AAV2-RPE65注射到3名LCA II患者的视网膜下腔,随访1年,患者视野有了显著改善,视觉敏感度得到持续而稳定的提高[11]。2016年8月份,AAV2-RPE65的3期临床试验结果发布,经AAV2-RPE65治疗一年后,93%(27/29)的患者功能性视力有所改善,并且基因治疗的疗效长达两年之久[12]。华中科技大学李斌等利用AAV2载体将ND4基因导入病人视网膜神经细胞用于治疗Leber遗传性视神经病变,在注射rAAV-ND4药物36个月后,9例接受治疗的病人中有6例表现出明显的视力改善[13]。AAV载体在眼科单基因遗传病中的临床应用提示我们利用AAV载体将VEGF抗体的基因导入眼内,有可能开发出一种新的治疗血管新生相关眼部疾病的基因治疗药物,这种基因治疗药物可以在眼内长期维持有治疗效果的抗体浓度,长期抑制眼部VEGF的活性,达到长效治疗老年相关性黄斑变性、糖尿病视网膜病等脉络膜血管新生相关的眼部疾病的效果。同时,由于这种基因治疗药物可以在体内长期表达,还可以起到预防疾病发生的作用。

[0008] 目前,从自然界已经分离出了12种血清型的AAV,得到的AAV突变型已达100多种。不同血清型AAV的衣壳蛋白识别细胞表面的受体不同,因而对不同组织细胞的侵染效率差异很大,表现出一定的器官靶向特异性。其中AAV2、AAV5、AAV8和AAV9对视网膜层细胞的感染能力很好[14, 15],可直接采用视网膜下腔或玻璃体内注射的方式进行有效感染[16]。

[0009] 鉴于以上背景,本发明提供了一种新的治疗血管新生相关眼部疾病的基因治疗药物及其用途,即利用AAV2、AAV5、AAV8和AAV9载体将VEGF抗体基因或其功能片段导入视网膜细胞层并实现高效表达。通过一次给药即可长期抑制眼部VEGF的活性,达到预防或长效治疗老年相关性黄斑变性、糖尿病视网膜病等脉络膜血管新生(CNV)相关的眼部疾病的效果。

发明内容

[0010] 本发明提供一种AAV载体介导的VEGF抗体基因表达载体及其用途,包含与该载体

的组合物、重组表达单元及基因治疗方式。该重组病毒能长期有效表达VEGF全抗体或其功能片段,从而达到长期抑制眼部VEGF的活性,预防或长效治疗糖尿病视网膜病、老年相关性黄斑变性等脉络膜血管新生相关的眼部疾病的目的。

[0011] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0012] 本发明提供了一种重组载体表达单元,其特征在于,包括:

[0013] (1)如SEQ ID No.1或SEQ ID No.2所示的启动子的核苷酸序列;和/或

[0014] (2)如SEQ ID No.3或SEQ ID No.4所示的VEGF抗体基因编码区的核苷酸序列;和/或如SEQ ID No.9或SEQ ID No.10所示的氨基酸序列,但因遗传密码的简并性而与SEQ ID No.3或SEQ ID No.4的核苷酸序列不同的序列;和/或

[0015] (3)如SEQ ID No.5所示的土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element, WPRE)的核苷酸序列;和/或

[0016] (4)如SEQ ID No.6所示的polyA序列;和/或

[0017] (5)如SEQ ID No.7或SEQ ID No.8所示的真核基因表达增强子的核苷酸序列。

[0018] 本发明还提供了所述重组载体表达单元的构建方法,在本发明的一些具体实施方案中,所述重组载体表达单元的构建方法,是将人工拼接CASI(专利US8865881 B2)或CASS的启动子、VEGF抗体重链和轻链基因编码区组合序列、WPRE、polyA序列和UBC或SV40增强子组合起来连接到载体中,构建表达载体。

[0019] 本发明还提供了所述重组病毒载体的制备方法:

[0020] 步骤1:将启动子、抗体重链和轻链基因编码区组合序列(FPFab或FPIG)、WPRE、polyA序列和SV40增强子组合起来连接到载体中,构建表达载体。

[0021] 步骤2:将所述表达载体同包装AAV病毒需要的其他质粒共转染宿主细胞,包装、纯化即得充足AAV载体。

[0022] 在本发明的一些具体实施方案中,所述重组表达载体构建方法中的载体为质粒或病毒。

[0023] 在本发明的一些具体实施方案中,所述重组表达载体构建方法中的病毒为单链病毒,包括但不限于血清型为2、5、8和9型腺相关病毒。

[0024] 所述重组载体为AAV2、AAV5、AAV8或AAV9重组载体,其携带基因组结构为ITR-promoter-FPIG-WPRE-polyA-enhancer-ITR或ITR-promoter-FPFab-WPRE-polyA-enhancer-ITR的重组表达载体,简称AAV2-FPIG、AAV5-FPIG、AAV8-FPIG、AAV9-FPIG、AAV2-FPFab、AAV5-FPFab、AAV8-FPFab或AAV9-FPFab。

[0025] 所述重组载体表达单元包括:ITR (AAV-2 inverted terminal repeat sequence)、人为拼接的启动子CASI或CASS、抗体重链和轻链基因编码区组合序列(分泌信号1-VEGF抗体重链全基因-2A-分泌信号2-VEGF抗体轻链基因,简称FPIG;或分泌信号1-VEGF抗体重链基因CH1区-2A-分泌信号2-VEGF抗体轻链基因,简称FPFab)、WPRE、polyA、UBC增强子或SV40增强子(UBC enhancer或SV40 enhancer)和ITR。

[0026] 其中,ITR (Patent W00220748)的序列如SEQ ID No.11所示; CASS promoter的序列如SEQ ID No.1所示;CASI promoter的序列如SEQ ID No.2;FPFab的序列如SEQ ID No.3;FPIG01的序列如SEQ ID No.4所示;WPRE的序列如SEQ ID No.5所示;polyA的序列如

SEQ ID No.6所示;UBC enhancer的序列如SEQ ID No.7所示;SV40 enhancer的序列如SEQ ID No.8所示。

[0027] 本发明还提供了几种重组病毒,其特征在于,包括AAV2、AAV5、AAV8或AAV9携带所述重组载体表达单元。

[0028] 本发明还提供了药物的基因治疗方式,其特征在于,所述基因治疗方式为视网膜下注射或玻璃体腔注射重组病毒。

[0029] 本发明还提供了所述重组表达载体和基因治疗方式在预防或治疗血管新生相关的眼部疾病如年龄相关性黄斑变性和糖尿病视网膜病变等疾病中的应用。

[0030] VEGF是血管新生相关的眼部疾病发生发展过程中重要的作用因子,阻断VEGF的功能可以有效控制年龄相关性黄斑变性、糖尿病视网膜病变等的疾病进展,改善患者的视力。本发明的实验中,设计了多种含VEGF全抗体或抗体Fab片段基因的重组表达载体质粒(图2)。根据Drugbank上公布的兰尼单抗(DB01270)和贝伐单抗(DB00112)重链和轻链氨基酸序列,在其N端分别加上人IgG重链和 κ 链的分泌信号肽,并用具有自我切割功能的2A连接抗体重链和轻链,构成了FPFab的氨基酸序列(SEQ ID No.9)和FPIG的氨基酸序列(SEQ ID No.10),为提高基因的表达效率按照人密码子偏好对FPIG和FPFab基因进行了优化,用全基因合成的方式获得了抗体基因。为了能在体内高效表达抗体基因,本发明选用了人工拼接的高效增强子和启动子组合CASS或CASI来调控基因的转录,同时在抗体基因开放读码框后面引入WPRE,增强mRNA的转录水平。在polyA的选择上,在AAV载体基因容量的范围内,选用了较长的BGH polyA。根据重组AAV载体在体内可形成环状DNA的特性,本发明在poly A的下游加入了UBC增强子或SV40增强子,进一步增加mRNA的转录水平和稳定性,构建了表达FPFab的AAV包装质粒pAAV2neo-FPFab01和 pAAV2neo-FPFab02以及表达FPIG的AAV包装质粒pAAV2neo-FPIG01和pAAV2neo-FPIG02。在293T细胞和ARPE19中pAAV2neo-FPFab01、pAAV2neo-FPFab02、pAAV2neo-FPIG01和pAAV2neo-FPIG02均可有效表达FPFab和FPIG,表达水平无明显差异,提示这几种构建体均可作为AAV-FPIG和AAV-FPFab的包装质粒。在后续AAV包装过程选用pAAV2neo-FPFab01和pAAV2neo-FPIG01进行病毒包装。

[0031] 进一步按照文献[17]报道的方法进行重组AAV载体的包装和纯化,点杂交方法测定病毒的基因组滴度。具体地,采用三质粒共转染方法对该重组载体进行AAV病毒包装,按照吴小兵等报道的AAV载体纯化方法进行纯化[18],用点杂交法测定病毒滴度,具体操作参照文献[19]。

[0032] 选取对眼睛组织有更好亲和性的2、5、8和9型重组AAV病毒。对AAV-FPFab01或AAV-FPIG01对脉络膜新生血管(CNV)的抑制作用进行了评估。大鼠脉络膜新生血管模型是国内普遍使用的动物模型。目前建立CNV动物模型主要是通过高能量激光光凝视网膜,选择性破坏光感受器外节盘膜、Bruch膜、RPE层以及部分前脉络膜毛细血管网,随后发生损伤修复反应,包括成纤维细胞、RPE和血管内皮细胞侵入生长,最终光凝区内新生血管形成。通过向CNV模型大鼠眼中通过视网膜下或玻璃体腔单次注射AAV2-FPFab01、AAV5-FPFab01、AAV8-FPFab01、AAV9-FPFab01或AAV2-FPIG01可有效治疗CNV(表2)。AAV-FPFab01和AAV-FPIG01注射组大鼠的CNV面积和厚度与AAV9-GFP注射组相比有明显的改善,差异有统计学意义(单因素方差分析, $P < 0.01$);在实验中同时设置贝伐单抗治疗组,贝伐单抗注射2次和3次组随注射次数的增加CNV面积和厚度均有所降低,但注射1次组与对照组相比差异不显著。以上结

果说明贝伐单抗需要多次注射才能达到理想的治疗效果,而AAV-FPFab01或AAV-FPIG01只需一次注射就可以长期维持治疗效果。同时AAV-FPFab01或AAV-FPIG01通过视网膜下和玻璃体腔注射途径给药时血液中的VEGF抗体可持续在较低水平,相比于贝伐抗体注射后出现的较高血浆抗体峰值,可能会有更好的安全性(图4)。

[0033] 为了进一步评估AAV-FPFab01或AAV-FPIG01对于治疗糖尿病视网膜损伤的功效,进行了一项在大鼠糖尿病模型中的实验。糖尿病患者中的视觉丧失由炎症介导,导致血-视网膜屏障的最终崩溃和随后的血管渗漏,从而引起黄斑水肿。链脲佐菌素(streptozocin, STZ)-糖尿病大鼠模型可以显示其血管渗漏表征[20]。在用伊文氏蓝通透性实验评价AAV-FPFab01或AAV-FPIG01对糖尿病大鼠眼部血管渗漏的治疗效果实验中,荧光显微镜下可见正常对照大鼠血管形态正常,糖尿病鼠未治疗眼伊文氏蓝溢出于血管外,AAV-FPFab01或AAV-FPIG01组在所有时间点均未见染料泄露或极少量的染料渗漏,血管形态接近于正常对照组大鼠。伊文氏蓝通透性结果(图6)结果显示,所有糖尿病大鼠的未治疗对照眼均出现了伊文氏蓝通透性的明显升高;贝伐单抗治疗眼在3次注射后短期内可以很好减轻血管通透性,接近正常小鼠眼,但在停药一段时间后(5周以后),血管通透性又有所升高,至停药后第9周检测时血管通透性与对照眼相比已无明显差异(12.78 ± 1.78 vs 14.03 ± 1.03);而所有AAV-FPFab01或AAV-FPIG01注射眼的伊文氏蓝通透性一直维持在较低水平,与正常大鼠相比无明显差异。说明AAV-FPFab01或AAV-FPIG01可以达到一次治疗,长期维持疗效的作用。在糖尿病早期使用,可达到预防疾病发生的作用。

[0034] 以上结果说明AAV-FPFab01和AAV-FPIG01有希望成为预防或长效治疗CNV的有效药物。

[0035] 本发明用到的重要原始实验材料如下所示:

[0036] pHelper质粒,来源于AAV Helper Free System(Agilent Technologies,美国),由本公司购自Agilent Technologies公司并保存。该质粒包含三质粒共转染HEK293细胞制备重组AAV病毒所需要的腺病毒来源辅助功能基因E2A、E4和VA RNA等。

[0037] pAAV-R2C5和pAAV-R2C9质粒,由本公司构建保存。以AAV Helper Free System(Agilent Technologies,美国)中的pAAV-RC质粒为基本骨架,用AAV5(GenBank ID: LQ339043.1)、AAV8基因组(GenBank ID: NC_006261.1)或AAV9外壳蛋白编码序列(GenBank ID: AY530579)替换pAAV-RC质粒中第2013至4220位序列,即得pAAV-R2C5、pAAV-R2C8或pAAV-R2C9质粒。pAAV-R2C5、pAAV-R2C8和pAAV-R2C9质粒分别包含完整的AAV5、AAV8或AAV9的cap基因和AAV2的rep基因,在三质粒共转染包装制备重组AAV病毒中提供包装所必须的4种Rep蛋白(Rep78、Rep68、Rep52和Rep40)和AAV5、AAV8或AAV9外壳蛋白。

[0038] AAV2neo质粒,本公司构建保存,一种常用的AAV质粒克隆载体,含有两个AAV2的反向末端重复序列(inverted terminal repeat, ITR),在两个ITR之间包含人巨细胞病毒早期启动子、多克隆位点和牛生长激素polyA加尾信号等元件。质粒构建过程参见文献[21]。在本发明中用作克隆抗体基因表达单元FPFab、FPIG和GFP表达单元的基本骨架。

[0039] 附图说明:

[0040] 图1. pAAV2neo-CASS-GFP质粒示意图。其中ITR, inverted terminal repeat是长度为145bp的AAV2野生型反向末端重复序列;CASS为人工拼接的启动子;GFP是绿色荧光蛋白基因读码框;WPRE是土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件;BGH polyA为牛生长激素的多聚核

苷酸加尾信号;UBC enhancer是人为拼接的UBC基因增强子;Amp为氨苄青霉素抗性基因读框;Neo是新霉素抗性基因读框;Xho I、EcoRI、NotI、BglIII、BamH I和NheI均为限制性酶切位点。

[0041] 图2. pAAV2neo-FPFab01、pAAV2neo-FPFab02、pAAV2neo-FPIG01和pAAV2neo-FPIG02质粒示意图。其中ITR是inverted terminal repeat,长度为145bp的AAV2野生型反向末端重复序列;CASS和CASI是人工拼接的启动子;FPIG为VEGF全IgG抗体基因读码框;FPFab为VEGF抗体Fab片段基因读码框;WPRES是土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件;BGH polyA为牛生长激素的多聚核苷酸加尾信号;UBC enhancer是人为拼接的UBC基因增强子;SV40 enhancer是SV40基因增强子;Amp是氨苄青霉素抗性基因读框;Neo为新霉素抗性基因读框;Xho I、EcoRI、NotI、BglIII、BamH I和NheI均为限制性酶切位点。

[0042] 图3. 给药后FFA检查结果

[0043] 图4. 大鼠的血清中VEGF抗体的表达水平。

[0044] 图5. STZ诱导糖尿病大鼠的给药及检测时间点。

[0045] 图6. STZ诱导糖尿病大鼠治疗后的视网膜伊文氏蓝通透性。

[0046] 具体实施方式:

[0047] 实施例1. 质粒载体的构建

[0048] (1) 携带报告基因Gluc的不同表达单元的构建

[0049] 全基因合成了启动子CASS (SEQ ID No.1)、土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element, WPRES, SEQ ID No.5)和UBC 增强子(SEQ ID No.7),并在CASS启动子5'端引入XhoI酶切位点,在3'端引入EcoRI酶切位点。通过标准的分子生物学操作做首先将本实验室保存的AAV质粒克隆载体pAAV2neo上的启动子替换为CASS,在多克隆位点的EcoRI和BglIII酶切位点之间插入GFP和WPRES序列,在BGH polyA下游的BamHI和NheI酶切位点之间引入UBC 增强子,构成了启动子-GFP-WPRES-poly A-UBC增强子的基因表达单元,命名为pAAV2neo-CASS-GFP,其结构示意图见图1。

[0050] (2) 表达VEGF抗体基因的AAV载体质粒的构建

[0051] 根据Drugbank上公布的兰尼单抗氨基酸序列(DB01270)和贝伐单抗氨基酸序列(DB00112),在其N端加上分别加上人IgG重链和κ链的分泌信号肽,并用具有自我切割功能的2A连接抗体重链和轻链,组成了结构为分泌信号肽1-抗体重链-2A-分泌信号肽2-抗体轻链的开放读码框,FPFab的氨基酸序列如SEQ ID No.9,FPIG的氨基酸序列如SEQ ID No.10,根据人密码子偏好设计核苷酸序列,并在基因的5'端引入EcoRI酶切位点,在3'端引入NotI酶切位点,分别命名为FPFab和FPIG,由南京金斯瑞公司合成全基因(SEQ ID No.3和SEQ ID No.4)。用EcoRI/NotI双酶切FPFab或FPIG基因和pAAV2neo-CASS-GFP质粒,通过酶切、连接、转化和克隆筛选鉴定等常规分子生物学操作构建了表达FPFab或FPIG基因的AAV包装质粒pAAV2neo-FPFab01和pAAV2neo-FPIG01,其结构图示意图见图2A和图2B。同时全基因合成了启动子CASI (SEQ ID No.2),在其5'端引入XhoI酶切位点,在其3'端引入EcoRI酶切位点;全基因合成SV40 增强子(SEQ ID No.8),在其5'端引入BamHI酶切位点,和在其3'端引入NheI酶切位点;用XhoI/EcoRI双酶切CASI启动子和pAAV2neo-FPFab01或pAAV2neo-FPIG01,将pAAV2neo-FPFab01或pAAV2neo-FPIG01上的CASS启动子替换为CASI,构建pAAV2neo-

CASI-FPFab01或pAAV2neo-CASI-FPIG01,随后用BamHI/NheI双酶切SV40 enhancer和pAAV2neo-CASI-FPFab01或pAAV2neo-CASI-FPIG01质粒,通过连接、转化和克隆筛选鉴定等常规分子生物学操作将UBC enhancer替换为SV40 enhancer,构建了pAAV2neo-FPFab02和pAAV2neo-FPIG02,其结构图示意图见图2C和图2D。

[0052] 实施例2. pAAV2neo-FPFab01、pAAV2neo-FPIG01、pAAV2neo-FPFab02和pAAV2neo-FPIG02在细胞中的表达水平比较

[0053] 将pAAV2neo-FPFab01、pAAV2neo-FPIG01、pAAV2neo-FPFab02、pAAV2neo-FPIG02和pAAV2neo-CASS-GFP,分别转染293T和ARPE19细胞,转染后96h收集细胞上清,用ELISA方法检测上清中FPFab和FPIG的表达水平。具体操作简述如下:将293T或ARPE19细胞按 5×10^4 个/孔接种至48孔培养板中,37℃ 5%CO₂培养箱培养至细胞80~90%融合,分别用lipofectamine 2000转染质粒pAAV2neo-FPFab01、pAAV2neo-FPIG01、pAAV2neo-FPFab02、pAAV2neo-FPIG02或pAAV2neo-CASS-GFP,具体操作参见lipofectamine 2000说明书,每个质粒设置4个复孔。转染后96h后取上清,用ELISA法检测上清中的FPFab或FPIG的表达水平。

[0054] ELISA检测方法简述如下:用VEGF165蛋白(义翘神州生物技术有限公司)包被酶标板,每孔100ng,室温温育1h,用含0.05%Tween的PBS洗板5次。用含5%脱脂奶的PBS 200μL/孔室温封闭30min,洗板5次。在同一酶标板中加入贝伐单抗(Lucentis,瑞士罗氏公司)标准品和待测样品,标准品从第一孔从1nM开始连续8个稀释度进行倍比稀释,做两个复孔;待测样品从1:10起进行倍比稀释,做两个复孔,37℃孵育1小时,洗板5遍。每孔加入1:5000稀释的HRP标记的小鼠抗人k抗体(Southern Biotech公司)抗体37℃孵育1小时,洗板5遍。每孔加入新鲜配制的TMB显色液100μL,室温避光反应20min。加入2mol/L硫酸50μL/孔终止反应。用酶标仪在450nm测定吸收值。用非线性回归计算待测样品的FPFab或FPIG含量。

[0055] 结果见表1, pAAV2neo-FPFab01、pAAV2neo-FPIG01、pAAV2neo-FPFab02或pAAV2neo-FPIG02在293T细胞和ARPE19中均可有效表达FPFab和FPIG,表达水平无明显差异。在后续AAV包装过程选用pAAV2neo-FPFab01和pAAV2neo-FPIG01进行病毒包装。

[0056] 表1. pAAV2neo-FPFab01、pAAV2neo-FPIG01、pAAV2neo-FPFab02或pAAV2neo-FPIG02在细胞中的表达水平(nM,均值±标准差)

[0057]	293T	ARPE19
pAAV2neo-FPFab01	23.4±1.25	13.1±0.19
pAAV2neo-FPFab02	21.03±1.09	14.73±0.98
pAAV2neo-FPIG01	13.45±0.85	8.98±0.65
pAAV2neo-FPIG02	14.09±0.12	7.59±0.40
pAAV2neo-CASS-GFP	0.09±0.01	0.07±0.02

[0058] 实施例3. 重组AAV病毒的制备和检定

[0059] 应用三质粒包装系统包装和纯化重组AAV病毒,具体操作参照文献[17]。简要地,AAV载体质粒(pAAV2neo-CASS-GFP、pAAV2neo-FPFab01或pAAV2neo-FPIG01)、辅助质粒(pHelper)和AAV的Rep及Cap蛋白表达质粒(pAAV-R2C5或pAAV-R2C8或pAAV-R2C9)按照1:1:1的摩尔比混匀后,采用磷酸钙方法转染HEK293细胞,转染48h后,收获细胞和培养上清。按照吴小兵等报道的AAV载体纯化方法进行纯化[18],用点杂交法测定病毒滴度,具体操作参照文献[19]。

[0060] 实施例4. AAV-FPIG01和AAV-FPFab01在细胞中的表达

[0061] 将BHK-21细胞按 5×10^4 个/孔接种至48孔培养板中, 37°C $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养至BHK细胞70~80%融合,用无血清的培养液将细胞洗两遍,按MOI值(v.g/cell)为 5×10^5 加入重组AAV-FPFab01、AAV-FPIG01或AAV-GFP,每种病毒设置4个复孔。将培养板置于 37°C $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养,1hr后吸去培养液,加入0.3ml/孔含20mM的丁酸钠5%胎牛血清的培养液,以增强其表达, 37°C $5\% \text{CO}_2$ 培养箱继续培养,4~7d后取上清,用ELISA法分别检测其与VEGF165和VEGF121的结合活性。

[0062] ELISA检测方法简述如下:用VEGF165或VEGF121蛋白(义翘神州生物技术有限公司)包被酶标板,50ng/孔, 4°C 包被过夜,用含Tween20的PBS洗液洗板,加5%脱脂奶 37°C 封闭1h,洗板,加入1:10稀释的上清液, 37°C 孵育1h,洗板,加入1:5000稀释的HRP标记羊抗人 κ 链抗体(美国SoutrennBiotech公司), 37°C 孵育1h,洗板,加入TMB显色液显色,最后加入2M H_2SO_4 终止显色,450nm波长下检测吸光度。结果见表2,AAV-FPFab01和AAV-FPIG01均可在细胞中表达有活性的VEGF抗体。

[0063] 表2. AAV-FPFab01和AAV-FPIG01感染细胞上清与VEGF的结合活性 ($\text{OD}_{450\text{nm}}$, 均值 \pm 标准差)

[0064]

	VEGF165	VEGF121
AAV2-FPFab01	3.45 ± 0.25	3.13 ± 0.19
AAV5-FPFab01	1.03 ± 0.09	0.73 ± 0.08
AAV8-FPFab01	1.45 ± 0.15	0.98 ± 0.05
AAV9-FPFab01	1.09 ± 0.12	0.98 ± 0.10
AAV2-FPIG01	3.89 ± 0.06	3.73 ± 0.04
AAV5-FPIG01	0.94 ± 0.09	0.53 ± 0.08
AAV8-FPIG01	1.50 ± 0.15	0.85 ± 0.05
AAV9-FPIG01	0.86 ± 0.07	0.65 ± 0.08
AAV2-GFP	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.02

[0065] 实施例5. AAV-FPFab01和 AAV-FPIG01对大鼠脉络膜新生血管(CNV)的抑制作用

[0066] 目前建立CNV动物模型主要是通过高能量激光光凝视网膜,选择性破坏光感受器外节盘膜、Bruch膜、RPE层以及部分前脉络膜毛细血管网,随后发生损伤修复反应,包括成纤维细胞、RPE和血管内皮细胞侵入生长,最终光凝区内新生血管形成。这是目前国内普遍使用的脉络膜新生血管动物模型。

[0067] 方法:选取棕色挪威(brown norway, BN)大鼠随机分为21组,实验组每组10只,同时留5只做为对照组。由于AAV注射后需要4~6周的时间目的基因的表达才能达到稳定水平,第A~R组于光凝前4周分别经过视网膜下或玻璃体腔注射AAV2-FPFab01、AAV5-FPFab01、AAV8-FPFab01、AAV9-FPFab01、AAV2-FPIG01、AAV5-FPIG01、AAV8-FPIG01、AAV9-FPIG01或AAV2-GFP 1×10^{10} vg/2 μL /眼,2眼均作注射,每组共10眼;S~U组不给药。随后所有大鼠通过半导体倍频激光(波长为532nm)光凝方式建立CNV模型。第12组于光凝后1周通过玻璃体腔注射贝伐单抗(Lucentis,瑞士罗氏公司)50 μg /2 μL /眼,双眼均作注射;第13组于光凝后1周和2周各通过玻璃体腔注射贝伐单抗50 μg /2 μL /眼,双眼均作注射;第14组于光凝后1、2和3周各通过玻璃体腔注射贝伐单抗50 μg /2 μL /眼,双眼均作注射。于贝伐单抗第一次注射后第

1天和第6天检测所有大鼠血清中的VEGF抗体滴度;于光凝后6周通过激光共聚焦显微镜下观察荧光渗漏,扫描测定各组脉络膜巩膜铺片新生血管面积,并在光镜下测定各组CNV中央厚度。

[0068] 1) SD大鼠CNV模型的建立:成年雄性BN大鼠,体重190 ~220g,实验前双眼屈光间质和眼底检查均正常,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。腹腔内注射氯胺酮(100mg/kg)麻醉后,0.5%托吡卡胺扩瞳,用半导体倍频532nm激光(半导体倍频激光器,法国光钛公司)经裂隙灯显微镜和眼底三面镜,将激光导入BN大鼠眼内。每眼距视盘2-3 PD围绕视盘在视网膜血管之间光凝,以光凝后有气泡产生为准,表示已击破Bruch膜。激光功率525mW,光凝斑直径50 μ m,光凝时间0.05s。

[0069] 2) 荧光素眼底血管造影(fluorescence fundus angiography, FFA)检查:于光凝后第5周进行FFA检测。腹腔内注射10%荧光素钠(1ml/kg)后立即连续观察并记录造影结果,观察时间为30min。

[0070] 3) 激光共聚焦扫描显微镜下测定各组脉络膜巩膜铺片新生血管面积:造模后14d,各组随机取5只BN大鼠(10只眼)行CNV面积测量。麻醉大鼠后固定四肢,快速分离暴露两侧颈总动脉。近心端结扎,双侧颈总动脉远心端同时注入肝素钠生理盐水10ml,再立即血管灌注50mg/ml异硫氰酸荧光素-右旋糖酐(FITC-dextran,美国sigma公司) 2ml,夹闭远心端动静脉。立即摘除眼球,于4%多聚甲醛液中固定10min,去除眼前节并摘除视网膜,将脉络膜巩膜壁以视盘为中心做4条放射状切口使其平铺于载玻片上,脉络膜面位置在上,巩膜面在下。利用激光共聚焦扫描显微镜(日本OLYMPUS FV500型号)以480nm激光激发样品,收集505nm荧光信号,测定脉络膜巩膜铺片扫描断面下CNV面积。图像记录软件为Laser Scanning Microscope Fluoview Version 4.3,面积测量软件为Image-ProPlus 5.0。

[0071] 4) 光镜下测定各组CNV中央厚度:各组随机取5只BN大鼠(10只眼)过量麻醉处死后立即摘除眼球固定于4 $^{\circ}$ C,4%多聚甲醛PBS液中24h,梯度酒精脱水、石蜡包埋、平行于角膜至视盘的矢状位连续4 μ m切片。将光镜下证实有脉络膜新生血管形成的每个光凝斑的连续切片中随机选取6张进行观察分析,每张切片随机取3个视野观察并测量CNV中央厚度,取连续切片中含CNV区域内色素上皮层至视网膜内最高点的最大距离记为CNV的最大中央厚度。

[0072] 5) ELISA法检测血清中VEGF抗体浓度:尾静脉采血,分离血清,用ELISA定量检测房水和血清中的VEGF抗体表达水平。ELISA检测同实施例3,不同的是在实验中以药品贝伐单抗(Lucentis,瑞士罗氏公司)作为标准品,设置标准曲线,对样品中的贝伐单抗进行定量分析。

[0073] 结果:FFA检查结果见图3(每组大鼠选取1只具有代表性的图片)显示正常对照大鼠未见荧光渗漏(图3A),AAV2-GFP组出现典型的荧光素渗漏(图3I和图3R),呈典型的强荧光团;贝伐单抗组注射组随注射次数的增加效果也有所增强(图3S-3U);个血清型AAV-FPFab01和AAV-FPIG01注射组荧光渗漏与AAV-GFP对照组相比明显减少,甚至基本消失,多数可以达到或由于贝伐单抗注射3次的效果。

[0074] 脉络膜巩膜铺片中CNV面积和组织切片CNV厚度见表3。AAV-FPFab01和AAV-FPIG01注射组大鼠的CNV面积和厚度与AAV9-GFP注射组相比有明显的改善,差异有统计学意义(单因素方差分析, $P<0.01$);贝伐单抗注射2次和3次组随注射次数的增加CNV面积和厚度均有所降低,差异有统计学意义(单因素方差分析, $P<0.01$),但注射1次组与对照组相比差异不

显著(单因素方差分析, $P > 0.05$)。以上结果说明贝伐单抗需要多次注射才能达到理想的治疗效果,而AAV-FPFab01或AAV-FPIG01只需一次注射就可以长期维持治疗效果。

[0075] 表3. BN大鼠视网膜脉络膜巩膜铺片CNV面积和组织切片CNV厚度比较 (n=10)

组别	药物	给药方式	CNV 面积 (μm^2)	CNV 厚度 (μm)
1	AAV2-FPFab01	视网膜下	5670±920	15.28±5.15
2	AAV5-FPFab01	视网膜下	5980±1530	16.45±3.25
3	AAV8-FPFab01	视网膜下	4690±1020	14.28±5.05
4	AAV9-FPFab01	视网膜下	6720±1650	18.65±4.19
5	AAV2-FPIG01	视网膜下	4620±1320	15.23±5.75
6	AAV5-FPIG01	视网膜下	4320±1030	14.23±3.75
7	AAV8-FPIG01	视网膜下	3620±1150	14.03±4.07
8	AAV9-FPIG01	视网膜下	5620±1390	14.78±5.06
9	AAV2-GFP	视网膜下	35490±3850	62.31±7.14
10	AAV2-FPFab01	玻璃体腔	8500±970	20.03±3.52
11	AAV5-FPFab01	玻璃体腔	9930±1170	23.23±4.55
12	AAV8-FPFab01	玻璃体腔	7030±1230	20.27±5.07
13	AAV9-FPFab01	玻璃体腔	10130±1290	24.53±4.57
14	AAV2-FPIG01	玻璃体腔	7970±1070	20.29±5.08
15	AAV5-FPIG01	玻璃体腔	8990±1360	19.29±4.35
16	AAV8-FPIG01	玻璃体腔	8750±1270	20.36±5.45
17	AAV9-FPIG01	玻璃体腔	9750±1070	22.29±4.06
18	AAV2-GFP	玻璃体腔	33490±3670	60.51±6.18
19	贝伐单抗 1次	玻璃体腔	30580±3785	58.34±7.63
20	贝伐单抗 2次	玻璃体腔	23230±2670	45.42±6.63
21	贝伐单抗 3次	玻璃体腔	8930±1190	20.23±4.57

[0076]

[0077] 大鼠的血清中VEGF抗体的表达水平见图4, AAV9-GFP对照组血清中未检测到VEGF抗体,所有实验组大鼠的血清中均可检测到低水平的VEGF抗体(18~159ng/ml)。贝伐单抗注射组在注射后第一天血清中的抗体水平较高,可达到 145 ± 32 ng/ml,但在注射后第6天降低到 8.6 ± 3.5 ng/ml。AAV2-FPIG01玻璃体腔注射组的血清抗体水平在所有AAV注射组中最高,在2个检测时间点分别为 32 ± 3.5 ng/ml和 38.3 ± 3.2 ng/ml,远低于贝伐单抗注射组在注射后第一天血清中的抗体水平(145 ± 32 ng/ml);其余携带VEGF抗体基因的AAV注射组的抗体水平稳定在更低水平。AAV-FPFab01组比AAV-FPIG01组稍低,但差异无统计学意义(单因素方差分析, $P > 0.05$)。以上结果说明AAV-FPFab01或AAV-FPIG01通过视网膜下或玻璃体腔注射途径给药时血液中的VEGF抗体可持续在较低水平,相比于贝伐单抗注射后出现的较高血浆抗体峰值,可能会有更好的安全性。

[0078] 实施例6. AAV-FPFab01和AAV-FPIG01对STZ诱导糖尿病大鼠的视网膜损伤的保护作用

[0079] 为了进一步评估AAV-FPFab01和AAV-FPIG01对于治疗糖尿病视网膜损伤的功效,进行了一项在大鼠糖尿病模型中的实验。糖尿病患者中的视觉丧失由炎症介导,导致血-视网膜屏障的最终崩溃和随后的血管渗漏,从而引起黄斑水肿。链脲佐菌素(streptozocin, STZ)-糖尿病大鼠模型可以显示其血管渗漏表征。

[0080] 方法:8-10周龄SD大鼠,体重220-250g(购自北京维通利华实验动物技术有限公司),链脲佐菌素(美国Sigma公司)以60mg/kg的剂量快速一次性腹腔注射诱导产生糖尿病模型;另设正常对照组,按体重注射等体积的柠檬酸钠缓冲溶液。于72小时后监测血糖水平,以动物血糖高于20mmol/L为造模成功标准,纳入糖尿病实验组。造模成功的大鼠随机分为18组,分别通过视网膜下或玻璃体腔注射AAV2-FPFab01、AAV5-FPFab01、AAV8-FPFab01、AAV9-FPFab01、AAV2-FPIG01、AAV5-FPIG01、AAV8-FPIG01、AAV9-FPIG01或贝伐单抗,另设正常大鼠对照组,每组15只。由于AAV注射后需要4~6周的时间目的基因的表达才能达到稳定水平,AAV注射组在造模成功后1周选取左眼通过玻璃体腔或视网膜下注射AAV-FPFab01或AAV-FPIG01载体1次,注射剂量为 1×10^{10} vg/眼,所有大鼠右眼注射等剂量的AAV2-GFP注射体积均为2 μ L;贝伐单抗注射组在造模成功后第5、6、7周通过左眼玻璃体腔注射贝伐单抗各1次,共注射3次,注射剂量为50 μ g/眼,右眼注射等体积的无菌生理盐水,注射体积为2 μ L。于给药后不同时间点检测血管渗漏情况,不同实验组的给药以及检测时间点见图5。

[0081] 血管渗漏检测方法如下:按照45mg/kg的剂量经鼠尾静脉注射30mg/ml伊文氏蓝(美国Sigma公司,溶于PBS后过滤除菌)溶液,注射后2h,每组取1只大鼠的眼球制备视网膜铺片,于荧光显微镜下观察视网膜血管形态;另4只大鼠,内眦部取血(>1 ml),置于含肝素的采血管内。然后用37 $^{\circ}$ C枸橼酸钠缓冲液经左心室推注充分灌注,随后处死大鼠,分离大鼠视网膜,-80 $^{\circ}$ C冻存。将采血管中的血浆,用甲酰胺1:100稀释。同时用甲酰胺配制伊文氏蓝标准品,从50000ng/ml起做倍比稀释。将标准曲线溶液和稀释的血液样本按顺序依次置于96孔板中,每孔50 μ l,用BioTek酶标仪测定620nm波长下的吸光度 A_{620} 值,并以 A_{740} 值作为校正值,计算血液中伊文氏蓝的浓度。取出视网膜标本,在37 $^{\circ}$ C烤箱内烘烤5h后称重,计算视网膜干质量。每个视网膜标本加入150 μ L甲酰胺,于70 $^{\circ}$ C烘烤18h。4 $^{\circ}$ C下12000rpm离心10min,取上清液,加入30KD超滤管中3000g离心90min,收集液体,测定伊文氏蓝的含量。按下列公式计算伊文氏蓝通透性:伊文氏蓝通透性[μ l/(g.h)]=[伊文氏蓝含量(μ g)/视网膜组织干

质量(g)]/[时间平均性伊文氏蓝质量浓度($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) \times 循环时间(h)]。

[0082] 荧光显微镜下可见正常对照大鼠血管形态正常,糖尿病鼠未治疗眼伊文氏蓝溢出血管外,AAV-FPFab01和AAV-FPIG01组在所有时间点均未见染料泄露或极少量的染料渗漏,血管形态接近于正常对照组大鼠。伊文氏蓝通透性结果见图6,由于给予不同药物的糖尿病大鼠对照眼(右眼)的通透性数据变异不大,合并为一组计算,命名为糖尿病鼠对照眼。结果显示,所有糖尿病大鼠的对照眼均出现了伊文氏蓝通透性的明显升高;贝伐单抗治疗眼在第8周可以很好减轻血管通透性,接近正常小鼠眼,但在停药一段时间后,血管通透性又有所升高,至第12周检测时通透性与对照眼相比已无明显差异(12.78 ± 1.78 vs 14.03 ± 1.03);而所有AAV-FPFab01或AAV-FPIG01注射眼的伊文氏蓝通透性一直维持在较低水平,与正常大鼠相比无明显差异。说明AAV-FPFab01或AAV-FPIG01可以达到一次治疗,长期维持疗效的作用。

[0083] 以上所述仅是本发明的示例性实施方式,应当指出,对于本技术领域的技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

[0084] 参考文献:

[0085] 1. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 2003. 9(6): p. 669-76.

[0086] 2. Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist*, 2004. 9 Suppl 1: p. 2-10.

[0087] 3. Rodrigues, E.B., et al., Therapeutic monoclonal antibodies in ophthalmology. *Prog Retin Eye Res*, 2009. 28(2): p. 117-44.

[0088] 4. Li, X., et al., Safety and efficacy of conbercept in neovascular age-related macular degeneration: results from a 12-month randomized phase 2 study: AURORA study. *Ophthalmology*. 121(9): p. 1740-7.

[0089] 5. Costa, R.A., et al., Intravitreal FPIG01cizumab for choroidal neovascularization caused by AMD (IBeNA Study): results of a phase 1 dose-escalation study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006. 47(10): p. 4569-78.

[0090] 6. Arias, L., et al., A study comparing two protocols of treatment with intravitreal FPIG01cizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*, 2008. 92(12): p. 1636-41.

[0091] 7. Landa, G., et al., Comparative study of intravitreal FPIG01cizumab (Avastin) versus FPFab01bizumab (Lucentis) in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmologica*, 2009. 223(6): p. 370-5.

[0092] 8. Tufail, A., et al., FPIG01cizumab for neovascular age related macular degeneration (ABC Trial): multicentre randomised double masked study. *Bmj*. 340: p. c2459.

[0093] 9. 段直光, et al., 贝伐单抗治疗老年性黄斑变性临床观察. *国际眼科杂志*, 2014. 14: p. 1016-1019.

[0094] 10. Berg, K., et al., Comparison of FPFab01bizumab and FPIG01cizumab

for neovascular age-related macular degeneration according to LUCAS treat-and-extend protocol. *Ophthalmology*. 122(1): p. 146-52.

[0095] 11. Maguire, A.M., et al., Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*, 2008. 358(21): p. 2240-8.

[0096] 12. Bennett, J., et al., Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial. *Lancet*. 388(10045): p. 661-72.

[0097] 13. Yang, S., et al., Long-term outcomes of gene therapy for the treatment of Leber's hereditary optic neuropathy. *EBioMedicine*. 10: p. 258-68.

[0098] 14. Vandenberghe, L.H., et al., Cone And Rod Transduction With Alternative AAV Serotypes In The Macula Of Non-human Primates. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 52(14): p. 1409-1409.

[0099] 15. Allocca, M., et al., Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virol*, 2007. 81(20): p. 11372-80.

[0100] 16. Lukason, M., et al., Inhibition of choroidal neovascularization in a nonhuman primate model by intravitreal administration of an AAV2 vector expressing a novel anti-VEGF molecule. *Mol Ther*. 19(2): p. 260-5.

[0101] 17. Xiao, X., J. Li, and R.J. Samulski, Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol*, 1998. 72(3): p. 2224-32.

[0102] 18. Wu, X., et al., A novel method for purification of recombinant adenoassociated virus vectors on a large scale

[0103] *Chinese Science Bulletin*, 2001. 46(6): p. 485-488.

[0104] 19. 伍志坚, et al., 一种高效的重组腺伴随病毒载体生产系统. *中国科学(C辑)*, 2001. 31: p. 423-430.

[0105] 20. Miyamoto, K., et al., Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(19): p. 10836-41.

[0106] 21. Dong, X., et al., Establishment of an AAV reverse infection-based array. *PLoS One*. 5(10): p. e13479.

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 北京五加和分子医学研究所有限公司
- [0003] <120> 一种预防和治疗脉络膜新生血管相关眼部疾病的基因药物
- [0004] <160> 11
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 960
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
- [0010] <400> 1
- [0011] ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgct ggctgaccgc ccaacgacc 60
- [0012] ccgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca 120
- [0013] ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccac ttggcagtac atcaagtgta 180
- [0014] tcatatgcca agtaccccc ctattgacgt caatgacgt aatggccc cctggcatta 240
- [0015] tgcccagtac atgacctat gggacttcc tacttggcag tacatctac tattagtcac 300
- [0016] cgctattacc atggtcgagg tgagccccc gttctgctc actctccca tctcccccc 360
- [0017] ctccccacc ccaatittgt atttattat tttttaatta ttttgtgcag cgatgggggc 420
- [0018] gggggggggg gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg gggcggggcg 480
- [0019] aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagt tccttttatg 540
- [0020] gcgagcggc gcggcgggc gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc gggagtgcct 600
- [0021] gcgcgtgcc ttcgccccgt gccccctcc gccgccgct cgcgccgcc gccccgctc 660
- [0022] tgactgaccg cgttactaaa acaggtaat ccctgaggcg gaaagaacca tctgtggaat 720
- [0023] gtgtgtcagt taggtgtgg aaagtccca ggctcccag caggcagaag tatgcaaagc 780
- [0024] atgcatctca attagtcagc aaccagggtg gaaagtccc caggctccc agcaggcaga 840
- [0025] agtatcaaaa gcatgcatc caattagtc gcaacatag tccgcccc aactccgcc 900
- [0026] gccttacta accatgttca tgttttctt tttttctac aggtctctgg tgacgaacag 960
- [0027] <210> 2
- [0028] <211> 1055
- [0029] <212> DNA
- [0030] <213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
- [0031] <400> 2
- [0032] ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgct ggctgaccgc ccaacgacc 60
- [0033] ccgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca 120
- [0034] ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccac ttggcagtac atcaagtgta 180
- [0035] tcatatgcca agtaccccc ctattgacgt caatgacgt aatggccc cctggcatta 240
- [0036] tgcccagtac atgacctat gggacttcc tacttggcag tacatctac tattagtcac 300
- [0037] cgctattacc atggtcgagg tgagccccc gttctgctc actctccca tctcccccc 360
- [0038] ctccccacc ccaatittgt atttattat tttttaatta ttttgtgcag cgatgggggc 420
- [0039] gggggggggg gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg gggcggggcg 480
- [0040] aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagt tccttttatg 540
- [0041] gcgagcggc gcggcgggc gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc gggagtgcct 600

[0042]	gcgcgctgcc ttcgccccgt gccccgctcc gccgcccct cgcgccgccc gccccggctc 660
[0043]	tgactgaccg cgttactaaa acaggtaaagt ccggcctccg cgccggggtt tggcgectcc 720
[0044]	cgcgggcgcc cccctcctca cggcgagcgc tgccacgtca gacgaaggc gcagcgagcg 780
[0045]	tcctgatcct tccgcccga cgctcaggac agcggcccgc tgctcataag actcggcctt 840
[0046]	agaaccccag tatcagcaga aggacathtt aggacgggac ttgggtgact ctagggact 900
[0047]	ggttttcttt ccagagagcg gaacaggcga ggaaaagtag tcccttctcg gcgattctgc 960
[0048]	ggagggatct ccgtggggcg gtgaacccg atgatgcctc tactaacctat gttcatgttt 1020
[0049]	tctttttttt tctacagtc ctgggtgacg aacag 1055
[0050]	<210> 3
[0051]	<211> 1557
[0052]	<212> DNA
[0053]	<213> 2 <i>Ambystoma laterale</i> x <i>Ambystoma jeffersonianum</i>
[0054]	<400> 3
[0055]	atgaagcacc tgtggttctt tctgctgctg gtggcagcac caagatgggt gctgagcgag 60
[0056]	gtgcagctgg tggagtccg aggaggactg gtgcagcctg gaggaagcct gaggctgtcc 120
[0057]	tgcgcagcat ctggctatga cttcaccac tacggaatga actgggtgcg ccaggcacca 180
[0058]	ggcaagggac tggagtgggt gggctggatc aatacctata caggcgagcc cacctacgc 240
[0059]	gccacttta agcggcgggt cacctcagc ctggatacca gcaagtccac agcctacctg 300
[0060]	cagatgaact ccctgaggc agaggacacc gccgtgtact attgcgcaa gtatccctac 360
[0061]	tattacggca catccactg gtacttcgac gtgtggggac agggcaccct ggtgacagtg 420
[0062]	agctccgct cgaccaagg acctagcgtg tcccactgg caccttctag caagtctacc 480
[0063]	agcggaggaa cagccgcct gggatgtctg gtgaaggatt acttcccaga gccctgacc 540
[0064]	gtgtcctgga actctggcgc cctgacctt ggcgtgcaca catttctgc cgtgctgcag 600
[0065]	tcctctggcc tgtatagcct gagctccgtg gtgacagtgc catctagctc cctgggcacc 660
[0066]	cagacataca tctgcaacgt gaatcacaag cttccaata ccaaggtgga caagaagtg 720
[0067]	gagccaaagt cttgtgataa gacacacctg aggaagaggc gctccggtc tggagcacca 780
[0068]	gtgaagcaga ccctgaactt cgacctgctg aagcttgccg gcgatgtgga gtccaatcct 840
[0069]	ggccaatgg acatgagggt gccagcacag ctgctgggac tgctgctgct gtggctgagg 900
[0070]	ggagcaagat gcgatatcca gatgacacag tcccatacta gctgagcgc ctccgtgggc 960
[0071]	gaccgggtga ccatcacatg ttctgccagc caggacatca gcaactatct gaattgttac 1020
[0072]	cagcagaagc caggcaaggc cccaagggtg ctgatctact tcacctctc tctgcacagc 1080
[0073]	ggcgtgcctt ccagattctc cggctctggc agcggcaccg actttaccct gacaatcagc 1140
[0074]	tcctcgcagc ccgaggattt cgccacatat tactgccagc agtacagcac cgtgccttgg 1200
[0075]	acatttgcc agggcaccaa ggtggagatc aagcgtacgg tggccgccc tagcgtgttc 1260
[0076]	atctttccc ctagcgacga gcagctgaag tctggcaccg ccagcgtggt gtgcctgctg 1320
[0077]	aacaatttct atccaagaga ggccaagggt cagtggaaagg tggataacgc cctgcagagc 1380
[0078]	ggcaattccc aggagtctgt gaccgagcag gacagcaagg attccacata ctctctgtct 1440
[0079]	agcaccctga cactgtccaa ggccgactat gagaagcaca aggtgtacgc atgcgaggtg 1500
[0080]	accaccagg gactgtctc tcccgtgaca aagagcttta atcggggcga gtgttga 1557
[0081]	<210> 4
[0082]	<211> 2232
[0083]	<212> DNA

[0084] <213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
 [0085] <400> 4
 [0086] atgaagcacc tgtggttctt tctgctgctg gtggcagcac caagatgggt gctgtctgag 60
 [0087] gtgcagctgg ttgaatctgg cggaggactg gttcagcctg gcggatctct gagactgtct 120
 [0088] tgtgcccca gcggtacac cttaccaac tacggcatga actgggtccg acaggccct 180
 [0089] ggcaaaggcc ttgaatgggt cggatggatc aacacctaca ccggcgagcc aacatacgcc 240
 [0090] gccgacttca agcggagatt caccttagc ctggacacca gcaagagcac cgcctacctg 300
 [0091] cagatgaaca gcctgagagc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcaa gtatccccac 360
 [0092] tactacggca gcagccactg gtactttgac gtgtggggac agggcaccct ggtcacagtt 420
 [0093] tcttctgctg cgaccaaggc cccatcgctc ttccccctgg caccctctc caagagcacc 480
 [0094] tctgggggca cagcggccct gggctgctg gtcaaggact acttccccga acctgtgacg 540
 [0095] gtctcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ctttcccggc tgtctacag 600
 [0096] tcctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtc cctccagcag cttgggcacc 660
 [0097] cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 720
 [0098] gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 780
 [0099] gggggaccgt cagtcttctt cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg 840
 [0100] acccctgagg tcacatgctg ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 900
 [0101] aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 960
 [0102] tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1020
 [0103] ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc 1080
 [0104] atctccaaag ccaaagggca gccccagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1140
 [0105] gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1200
 [0106] gacatgcgagc tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1260
 [0107] cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 1320
 [0108] aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1380
 [0109] tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaacgaa aaagaagatc aggttcgggt 1440
 [0110] gcgccagtaa agcagacatt aaactttgat ttgctgaaac ttgcaggtga ttagagatca 1500
 [0111] aatccaggtc caatggacat gagggtgccc gctcagctcc tggggctcct gctgctgtgg 1560
 [0112] ctgagaggtg ccagatgtgc tagcgacatc cagatgacac agagccctag cagcctgtct 1620
 [0113] gccagcgtgg gagacagagt gaccatcaca tgtagcgcca gccaggacat cagcaactac 1680
 [0114] ctgaaactgg atcagcagaa gcccggcaag gccctaagg tgctgatcta ctttaccagc 1740
 [0115] agcctgcaca gcggcgtgcc cagcagatct tctggctctg gcagcggcac cgacttcacc 1800
 [0116] ctgaccatat ctgacctgca gcctgaggac ttcgccacct actactgcca gcagtacagc 1860
 [0117] accgtgcctt ggacatttgg ccagggcacc aaggtggaat tcaagcggcg tacggtggct 1920
 [0118] gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct 1980
 [0119] gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat 2040
 [0120] aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcagc agcaggacag caaggacagc 2100
 [0121] acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc 2160
 [0122] tacgctgctg aagtcacca tcagggcctg agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg 2220
 [0123] ggagagtgtt ag 2232
 [0124] <210> 5
 [0125] <211> 589

[0126] <212> DNA
 [0127] <213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
 [0128] <400> 5
 [0129] aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa ctatgttgc 60
 [0130] ccttttacgc tatgtggata cgctgctta atgccttgt atcatgctat tgcttcccg 120
 [0131] atggcttca tttctcctc cttgtataaa tcctggttg tgtctctta ttaggagttg 180
 [0132] tggcccgttgc tcaggcaacg tggcgtggtg tgcactgtg ttgctgacgc aacccccact 240
 [0133] ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga ctttgcctt cccctcct 300
 [0134] attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctcggtg 360
 [0135] ttgggactg acaattccgt ggtgtgtcg gggaaatcat cgtccttcc ttggctgctc 420
 [0136] gcctgtgtg ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct gctacgtcc ttggccctc 480
 [0137] aatccagcgg accttcctc ccgcggcctg ctgccgctc tgcggcctct tccgctctt 540
 [0138] cgccttcgcc ctacagacgag tcgatctcc ctttgggccc cctccccgc 589
 [0139] <210> 6
 [0140] <211> 237
 [0141] <212> DNA
 [0142] <213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
 [0143] <400> 6
 [0144] cagatctgcc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctcccccg 60
 [0145] gccttccttg acctggaag gtgccaactc cactgtcctt tctaataaa atgaggaaat 120
 [0146] tgcacgcat tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg ggtggggtg ggcaggacag 180
 [0147] caagggggag gattgggaag acaatagcag gcatgctggg gatgcggtg gctctat 237
 [0148] <210> 7
 [0149] <211> 303
 [0150] <212> DNA
 [0151] <213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
 [0152] <400> 7
 [0153] ggctccgcg ccgggtttg gcgcctccc cgggcgccc cctcctcag gcgagcgtg 60
 [0154] ccacgtcaga cgaagggcgc agcagcgtc ctgactctc cgcccggac ctacggacag 120
 [0155] cggcccgtg ctcataagac tcggccttag aacccagta tcagcagaag gacattttag 180
 [0156] gacgggactt ggtgactct agggcactgg ttttcttcc agagagcga acaggcagg 240
 [0157] aaaagtagtc cttctcggc gattctcgg agggatctcc gtggggcgt gaacccgat 300
 [0158] gat 303
 [0159] <210> 8
 [0160] <211> 133
 [0161] <212> DNA
 [0162] <213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
 [0163] <400> 8
 [0164] taactgttt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac 60
 [0165] aaataaagca ttttttcac tgcattctag ttgtggttg tccaaactca tcaatgtatc 120
 [0166] ttatcatgctc tgg 133
 [0167] <210> 9

[0168]	<211>	518
[0169]	<212>	PRT
[0170]	<213>	2 <i>Ambystoma laterale</i> x <i>Ambystoma jeffersonianum</i>
[0171]	<400>	9
[0172]	Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
[0173]	1	5 10 15
[0174]	Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
[0175]		20 25 30
[0176]	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe	
[0177]		35 40 45
[0178]	Thr His Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	
[0179]		50 55 60
[0180]	Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala	
[0181]		65 70 75 80
[0182]	Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser	
[0183]		85 90 95
[0184]	Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val	
[0185]		100 105 110
[0186]	Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr	
[0187]		115 120 125
[0188]	Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	
[0189]		130 135 140
[0190]	Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr	
[0191]		145 150 155 160
[0192]	Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro	
[0193]		165 170 175
[0194]	Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val	
[0195]		180 185 190
[0196]	His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser	
[0197]		195 200 205
[0198]	Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile	
[0199]		210 215 220
[0200]	Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val	
[0201]		225 230 235 240
[0202]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Leu Arg Lys Arg Arg Ser Gly	
[0203]		245 250 255
[0204]	Ser Gly Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu	
[0205]		260 265 270
[0206]	Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Met Asp Met Arg Val Pro	
[0207]		275 280 285
[0208]	Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Arg Gly Ala Arg Cys	
[0209]		290 295 300

[0210]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0211]	305 310 315 320
[0212]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
[0213]	325 330 335
[0214]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
[0215]	340 345 350
[0216]	Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0217]	355 360 365
[0218]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0219]	370 375 380
[0220]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
[0221]	385 390 395 400
[0222]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[0223]	405 410 415
[0224]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[0225]	420 425 430
[0226]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[0227]	435 440 445
[0228]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[0229]	450 455 460
[0230]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[0231]	465 470 475 480
[0232]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[0233]	485 490 495
[0234]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[0235]	500 505 510
[0236]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0237]	515
[0238]	<210> 10
[0239]	<211> 743
[0240]	<212> PRT
[0241]	<213> 2 <i>Ambystoma laterale</i> x <i>Ambystoma jeffersonianum</i>
[0242]	<400> 10
[0243]	Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
[0244]	1 5 10 15
[0245]	Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
[0246]	20 25 30
[0247]	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
[0248]	35 40 45
[0249]	Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
[0250]	50 55 60
[0251]	Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala

[0252]	65	70	75	80
[0253]	Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser			
[0254]		85	90	95
[0255]	Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val			
[0256]		100	105	110
[0257]	Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr			
[0258]		115	120	125
[0259]	Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser			
[0260]		130	135	140
[0261]	Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr			
[0262]		145	150	155
[0263]	Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro			
[0264]		165	170	175
[0265]	Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val			
[0266]		180	185	190
[0267]	His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser			
[0268]		195	200	205
[0269]	Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile			
[0270]		210	215	220
[0271]	Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val			
[0272]		225	230	235
[0273]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
[0274]		245	250	255
[0275]	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
[0276]		260	265	270
[0277]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
[0278]		275	280	285
[0279]	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
[0280]		290	295	300
[0281]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
[0282]		305	310	315
[0283]	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
[0284]		325	330	335
[0285]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
[0286]		340	345	350
[0287]	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
[0288]		355	360	365
[0289]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr			
[0290]		370	375	380
[0291]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
[0292]		385	390	395
[0293]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			

[0294]		405		410		415
[0295]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr					
[0296]		420		425		430
[0297]	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe					
[0298]		435		440		445
[0299]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys					
[0300]		450		455		460
[0301]	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Lys Arg Arg Ser Gly Ser Gly					
[0302]		465		470		475
[0303]	Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly					
[0304]		485		490		495
[0305]	Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln					
[0306]		500		505		510
[0307]	Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Ser					
[0308]		515		520		525
[0309]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly					
[0310]		530		535		540
[0311]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr					
[0312]		545		550		555
[0313]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile					
[0314]		565		570		575
[0315]	Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly					
[0316]		580		585		590
[0317]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro					
[0318]		595		600		605
[0319]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp					
[0320]		610		615		620
[0321]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Arg Thr Val Ala					
[0322]		625		630		635
[0323]	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser					
[0324]		645		650		655
[0325]	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu					
[0326]		660		665		670
[0327]	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser					
[0328]		675		680		685
[0329]	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu					
[0330]		690		695		700
[0331]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val					
[0332]		705		710		715
[0333]	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys					
[0334]		725		730		735
[0335]	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys					

- [0336] 740
- [0337] <210> 11
- [0338] <211> 145
- [0339] <212> DNA
- [0340] <213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
- [0341] <400> 11
- [0342] ttggccactc cctctctgcg cgctcgetcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
- [0343] cgacgcccg gctttgccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agaggagtg 120
- [0344] gccactcca tctactagggg ttct 145

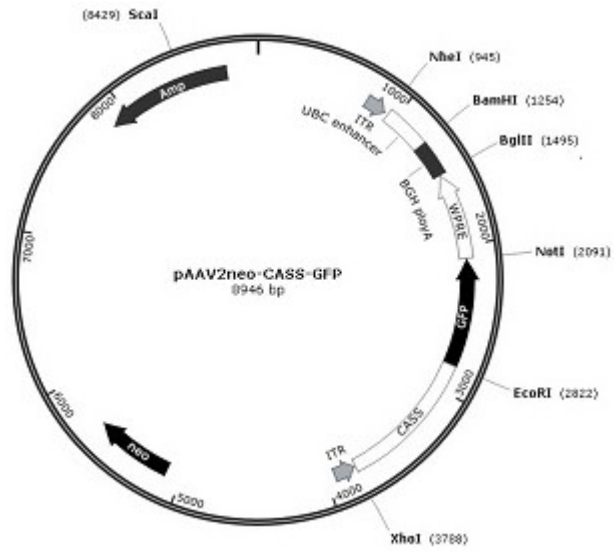


图1

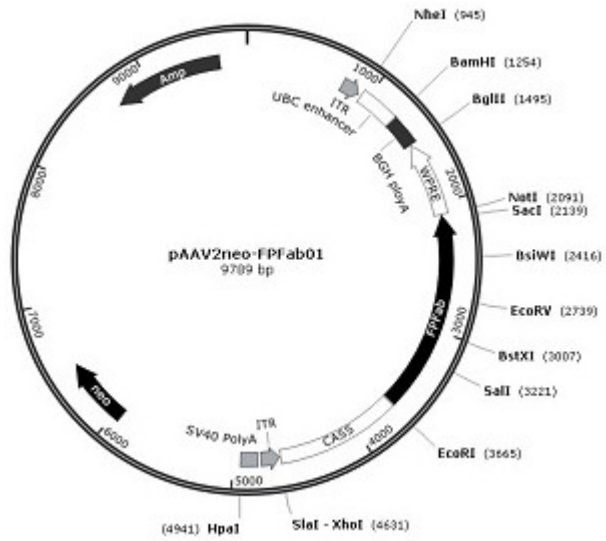


图2A

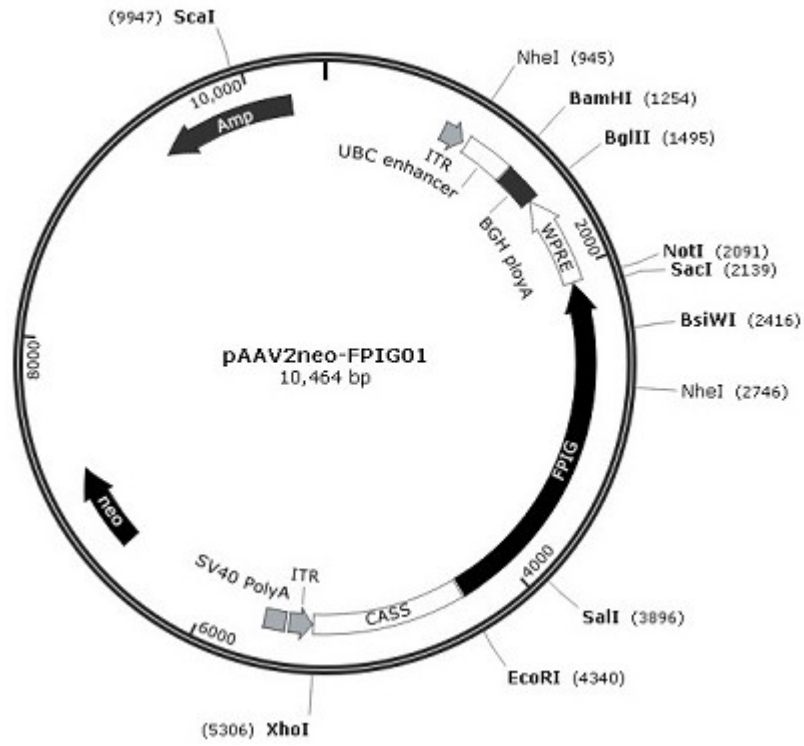


图2B

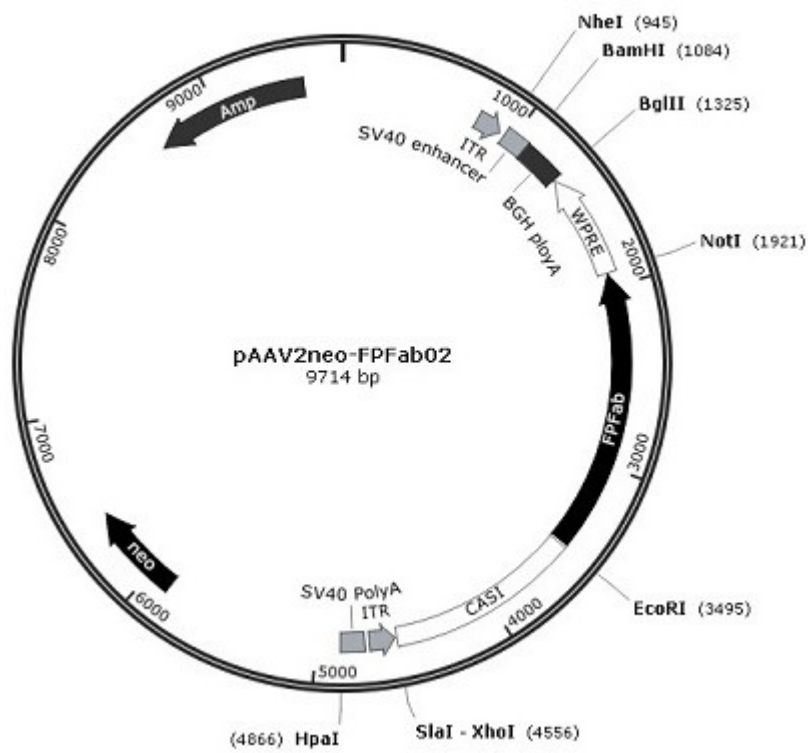


图2C

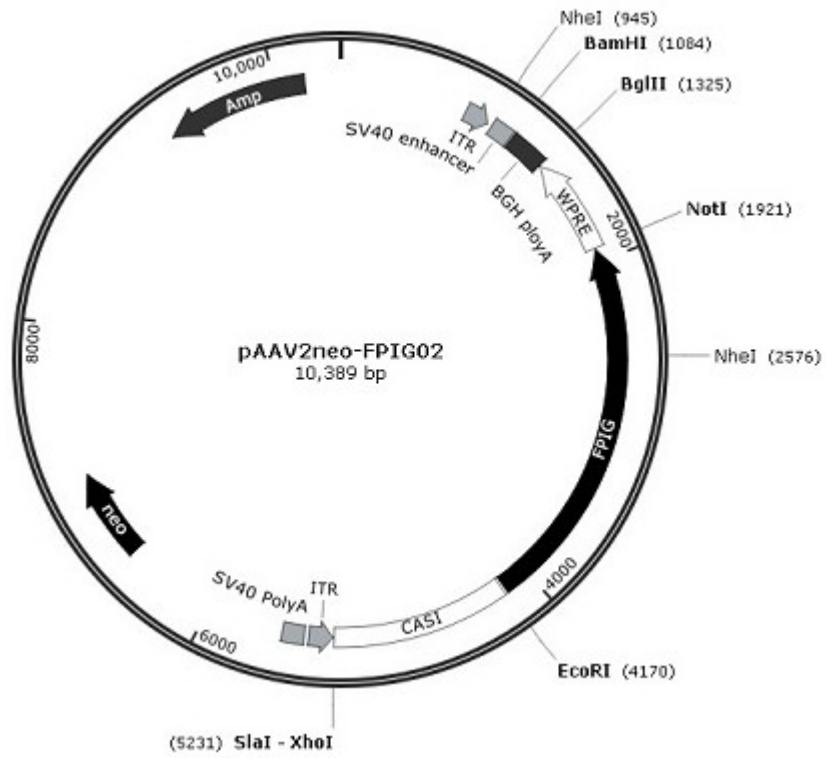


图2D

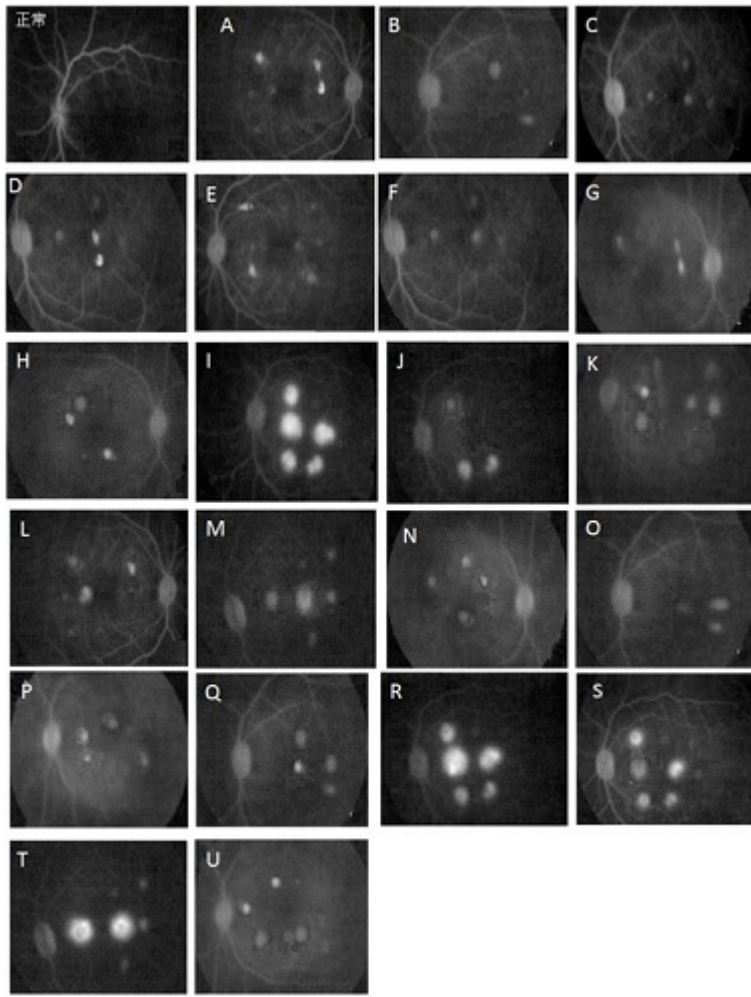


图3

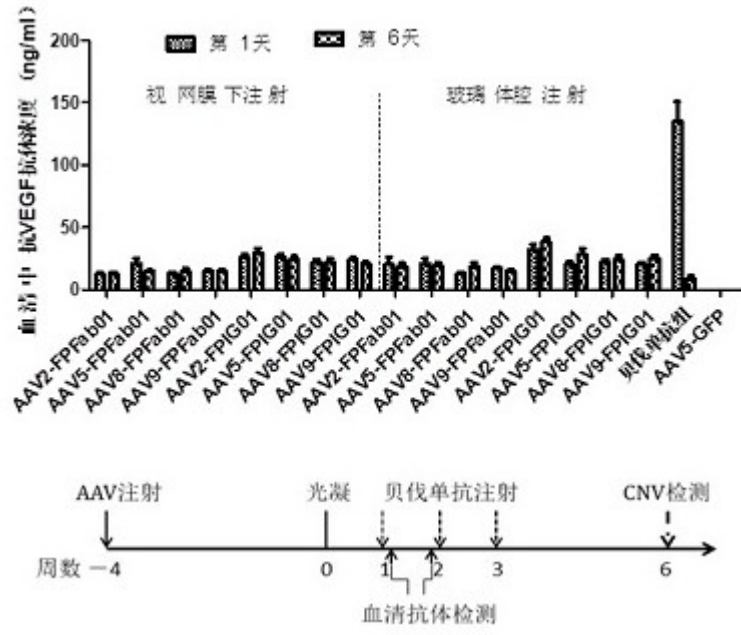


图4

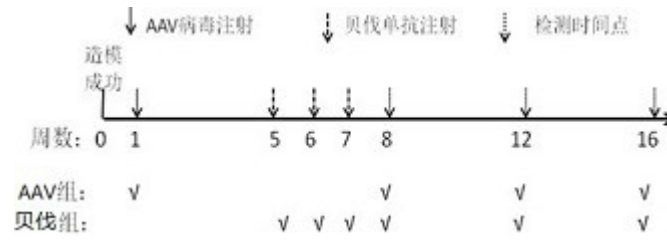


图5

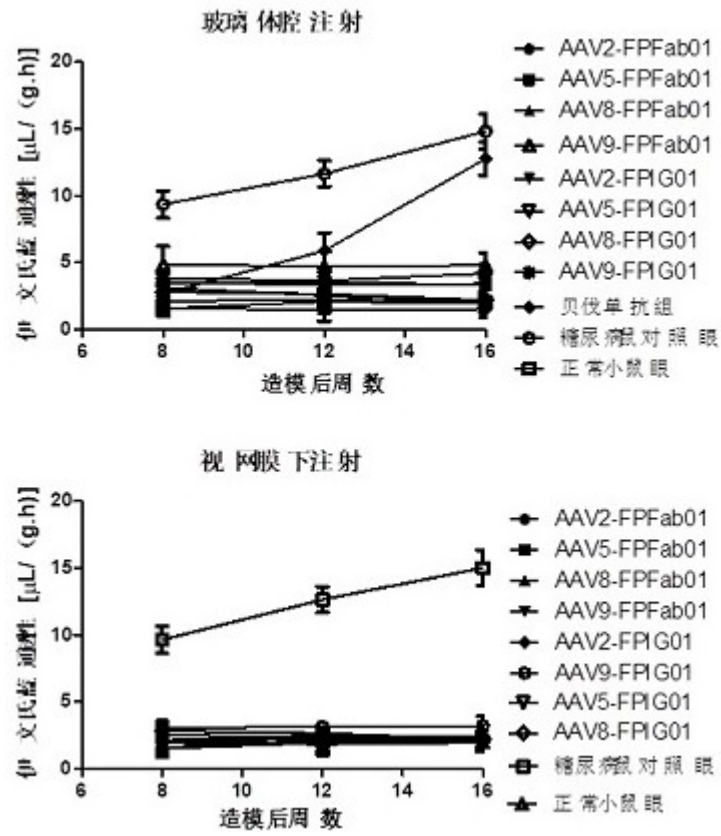


图6