



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102755638 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 31

(21) 申请号 201210240339. X

(22) 申请日 2012. 07. 12

(71) 申请人 华中科技大学

地址 430074 湖北省武汉市洪山区华中科技  
大学生命科学与技术学院 113 室

(72) 发明人 王擎 吕丘仑 涂欣 徐承启  
姚雨峰

(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限  
公司 42104

代理人 唐正玉

(51) Int. Cl.

A61K 38/18(2006. 01)

A61K 48/00(2006. 01)

A61P 9/10(2006. 01)

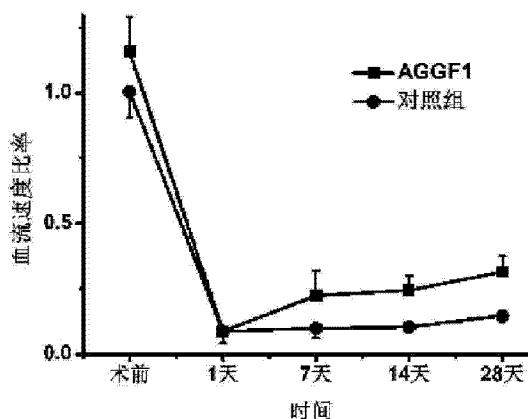
权利要求书 1 页 说明书 9 页  
序列表 9 页 附图 4 页

## (54) 发明名称

AGGF1 在制备促进血管形成的药物中的用途

## (57) 摘要

本发明涉及生长因子 AGGF1 在制备促进血管形成的药物中的用途,其中所述 AGGF1 可以是 AGGF1 蛋白、编码 AGGF1 的核苷酸序列或其活性片段。本发明涉及一种非治疗目的的促进血管新生的方法,包括给予血管刺激有效量的 AGGF1 蛋白或其活性片段、和 / 或编码 AGGF1 蛋白或其活性片段的核苷酸片段。



1. AGGF1 蛋白或其活性片段在制备促进血管形成的药物中的用途。
2. 根据权利要求 1 的用途,其中所述 AGGF1 蛋白是重组 AGGF1 蛋白。
3. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其中所述药物是注射剂。
4. 编码 AGGF1 蛋白或其活性片段的核苷酸片段在制备促进血管形成药物中的用途。
5. 根据权利要求 4 的用途,其中所述编码 AGGF1 蛋白或其活性片段的核苷酸片段与质粒有效连接。
6. 根据权利要求 4 的用途,其中所述编码 AGGF1 蛋白或其活性片段的核苷酸片段与腺病毒载体、腺相关病毒载体或者其他复制缺陷的逆转录病毒载体有效连接。
7. 根据权利要求 5 或 6 的用途,其中所述含有 AGGF1 的质粒或者病毒包裹在微泡中。
8. 根据权利要求 1 或 4 的用途,其中所述药物用于治疗局部缺血性疾病。
9. 权利要求 8 的方法,其中所述疾病选自冠状动脉疾病导致的慢性稳定型心绞痛、严重肢体缺血、慢性静脉性腿部溃疡、糖尿病神经病变、出生后动脉功能不全、再狭窄、缺血性心血管病和终末期冠状动脉病变的病症。
10. 根据权利要求 1 或 4 的用途,其中所述 AGGF1 蛋白或其活性片段、或编码 AGGF1 蛋白或其活性片段的核苷酸片段与至少一种选自 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、PlGF、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、HGF 和 FGF 的生长因子一起用于促进血管形成。
11. 根据权利要求 1 或 4 的用途,其中所述 AGGF1 蛋白或其活性片段、或编码 AGGF1 蛋白或其活性片段的核苷酸片段与内皮祖细胞、骨髓干细胞和 / 或心肌干细胞等细胞一起用于促进血管的形成。
12. 一种非治疗目的的促进血管形成的方法,包括给予血管刺激有效量的 AGGF1 蛋白或其活性片段、和 / 或编码 AGGF1 蛋白或其活性片段的核苷酸片段。

## AGGF1 在制备促进血管形成的药物中的用途

### 发明领域

[0001] 本发明涉及一种通过作用于骨骼肌和心肌的治疗心血管系统及其疾病的方法,更具体地说涉及一种利用生长因子刺激内皮细胞的增殖和生长,进而刺激血管新生来治疗心血管疾病的方法。本发明还涉及生长因子 AGGF1 在制备促进血管形成的药物中的用途,其中所述 AGGF1 可以是 AGGF1 蛋白、编码 AGGF1 的核苷酸序列或其活性片段。

### 背景技术

[0002] 外周血管疾病,尤其是下肢血管疾病通常是由动脉粥样硬化导致血管的狭窄或者闭塞,从而阻止血流流向下肢(J Am Coll Cardiol 47:1239-1312 (2006);循环(Circulation)94:3026-3049(1994))。当今社会,尤其是老年化程度越来越高的时代,下肢血管疾病的发病率也越来越高,成年人的发病率达到12%(J Am Coll Cardiol 58:2020-2045 (2011);新英格兰医学杂志(N Engl J Med)344:1608-1621(2001))。在美国大约有8百万到1千2百万的下肢血管疾病患者(循环(Circulation)110:738-743(2004))。而在德国,65岁以上的女性患病率甚至达到了17%,男性更高,其患病率达到20%(糖尿病治疗(Diabetes Care)26:3357-3358 (2003))。

[0003] 下肢缺血性疾病的临床症状也很多,有的呈现出典型的症状,例如间接性跛行,但很多情况下,下肢缺血疾病患者却表现出别的症状(J Am Coll Cardiol 47:1239-1312 (2006);国际流行病学杂志(Int J Epidemiol)25:1172-1181 (1996))。在一些严重的患者中,下肢缺血严重影响生活质量,并且导致了较高的发病率和死亡率(新英格兰医学杂志(N Engl J Med)326:381-386 (1992))。严重的下肢缺血病人的一年生存率接近25%。更为重要的是,下肢缺血患者中46%同时患有冠状动脉疾病,10%以上的病人还有脑血管疾病(J Clin Epidemiol 45:529-542 (1992);循环(Circulation)122:1862-1875 (2010))。

[0004] 当前下肢血管疾病的治疗主要集中在降低心脑血管的发病率和死亡率上,同时缓解下肢血管疾病的症状等方面糖尿病治疗(梅奥临床进展(Mayo Clin Proc)85(7):678-692 (2010))。降脂类药物。降血压药物和抗血栓药物等药物用于预防心梗和脑梗等疾病(梅奥临床进展(Mayo Clin Proc)85(7):678-692 (2010))。但是一些下肢血管疾病患者可能遭受着巨大的疼痛,而不得不选择截肢。为了避免截肢等其他严重的病症,血管形成术,支架和外周血管搭桥等外科手术常常用于腿部的血流再灌(血栓研究(Thromb Res)106(6):V285-294 (2002))。但是,一些接受过血管外科手术的下肢血管患者比接受外科手术的冠心病患者的长期生存率明显低(J Am Coll Cardiol 51:1588-1596 (2008))。最为重要的是很多下肢缺血患者因为种种原因,不适合做血管外科或者介入手术(循环研究(Circ Res)105:724-736 (2009))。所以采用血管生成因子等促血管新生和改善微循环的治疗性血管新生的方法,越来越被人们认可,尤其是在下肢血管疾病的治疗中。一些血管生成因子,例如血管内皮生长因子(VEGF),成纤维生长因子(FGF),肝细胞生长因子(HGF)和胎盘来源的生长因子(PDGF)等,都已经在下肢缺血动物和严重的下肢缺血病人中进行了实

验。

[0005] Tsurumi 第一次将 VEGF 用于缺血性治疗,利用兔的下肢缺血模型,将 VEGF 质粒注射入缺血部位,从而促进血管新生,改善微循环(循环(Circulation)94: 3281-3290 (1996))。

[0006] 利用由水凝胶包裹的气囊导管将质粒 DNA 导入动脉血管内来进行基因治疗。随后,临床研究证实肌肉内注射也能够成功表达转入基因(循环(Circulation)94: 3281-3290(1996))。Baumgartner 进行了前期临床试验,通过将 VEGF<sub>165</sub> 质粒注射到病人具有静息痛或者是难以治愈的溃疡的四肢肌肉进行治疗(循环(Circulation)97: 1114-1123 (1998))。而 Folkman 认为这一结果需要通过解剖学和生理结构的证实,其中包括血液动力学、血管造影、疼痛的减轻效果、缺血性溃疡的恢复状况、肢端恢复、内皮增殖细胞的免疫组化来验证(循环(Circulation)97: 1108-1110 (1998))。

[0007] Makinen 等人比较了将 VEGF<sub>165</sub> 的质粒与其编码腺病毒对表现出跛行以及严重的肢端缺血(critical limb ischemia, CLI)的 PAD 的治疗效果。参与该经皮腔内血管成形术的 45 位 PAD 患者随机的接受了 VEGF<sub>165</sub> 的质粒、VEGF<sub>165</sub> 编码腺病毒和乳酸林格氏安慰剂(分子治疗(Mol Ther)6: 127 - 133 (2002))。而 VEGF<sub>165</sub> 的治疗均表现出一定的安全性以及显著的血管形成的疗效,但是 VEGF<sub>165</sub> 临床实验中,治疗组与对照组却没有显著区别。

[0008] 在 VEGF 的异构体中,缺乏发卡结合域的 VEGF<sub>121</sub> 也被认为可以与蛋白复合体结合。这是由于区域性表达的 VEGF<sub>121</sub> 在组织中的半衰期比较短。因此,它只能诱导血管形成的早期阶段,也就是说它与内皮细胞松散的结合可能导致了组织水肿。而具有较长的组织半衰期的 VEGF<sub>165</sub> 可以有效的介导血管形成的整个时期。

[0009] RAVE (Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial Growth Factor) 的临床实验是第一次随机双盲且设有安慰剂对照组的肌肉注射腺病毒载体的 PAD 治疗(循环(Circulation)108: 1933-1938 (2003))。其中,105 名患有单侧运动受限的跛行被随机的分别进行肌肉注射低浓度 AdVEGF<sub>121</sub>、高浓度 AdVEGF<sub>121</sub> 以及安慰剂进行治疗。经过一个季度以及半年的治疗,研究人员在这三组患者中并没有发现主要疗效终点以及辅助疗效终点之间的区别,而 AdVEGF<sub>121</sub> 组的治疗表现出了与给药剂量相关的外周水肿。这一结果非常引人注目,由于 VEGF 能够提高血管的渗透性,因此显示出 AdVEGF<sub>121</sub> 在该实验中是具有生物活性的。

[0010] Comerota 等人发表了第一篇有关 FGF1 基因对 CLI 的临床治疗研究(血管外科杂志(J Vasc Surg)35 :930-936(2002))。结果表明在外周动脉疾病患者肌肉注射 FGF1(NV1FGF)的裸质粒的治疗过程中,对伤口愈合、疼痛减轻乃至经皮氧压力的改善方面都颇有成效。然而,Nikol 等人在 TALISMAN201 (Therapeutic Angiogenesis with Intramuscular NV1FGF Improves Amputation-Free Survival in Patients with Critical Limb Ischemia) 的临床试验中对 CLI 的病人进行了临床 II 期的实验(分子治疗(Mol Ther)16: 972 - 978 (2008))。这些病人随机的接受 NV1FGF (n=59)或者是安慰剂(n=66)的肌肉内注射。在接受治疗的 25 周后,分别有 19.6% 来自于治疗组以及 14.3% 来自于对照组的病人到达了主要疗效终点。这一结果并不十分理想,但在实验组汇总截止率接近 37.3%,相比较于对照组的 55.4% 有一个明显的减少(风险比率=0.498 ;P=0.015)。另外,接受 NV1FGF 治疗的患者的死亡率呈现出下降的趋势。而截肢与死亡均是作为 CLI 病人的 NV1FGF 的临床 III 期试验的

主要疗效终点。

[0011] Taniyama 等将外源性 HGF 作为治疗缺血性疾病的基因药物进行研究,在大鼠和兔子的下肢缺血模型中,都取得了很好的效果,可以促进血管新生,减轻溃烂程度,缓解坏死程度(基因治疗(Gene Ther)8:181-189(2001))。Morishita 及同事们进行了一项有关 HGF 的基因治疗的预实验以及其安全性的评估,该项研究将会为临床 II 期的 HGFSTAT 研究提供依据(高血压(hypertension)44:203-209(2004);高血压(hypertension)33:1379-1384(1999))。参与这项实验的 104 名患者将随机的接受安慰剂以及三种不同剂量的 HGF 质粒的注射治疗(循环(Circulation)118:58-65(2008))。在试验过程中出现了大约 60% 的严重的不良事件,但这一结果并不是出现在所有的分组中。而其也证明了我们无需对 HGF 质粒治疗安全性担忧。但是,当那些在治疗前就表现出 15 mm 汞柱高的 TcPO<sub>2</sub> 提高的病人被排除在外后,接受最大剂量的 HGF 质粒的病人该指标的提高最为明显。这一结论强调了当使用代理终点来衡量严重的 PAD 患者时,传统的结果往往会遭到严峻的挑战。

[0012] 另外一种 HGF 的载体在最近的早期临床研究中得到了应用。VM202 包括了人类 HGF 基因和 HGF-X7 的基因组 cDNA 杂交,它可以通过不同的剪接方式来表达多种 HGF 的异构体。2009 年 3 月,一项涵盖了 12 位 CLI 患者的治疗安全性以及计量梯度研究(ClinicalTrials.gov Identifier : NCT00696124) 结果为该治疗方法的安全性以及生物活性提供了初步的证据。

[0013] HIF-1 的转录作为一个典型的基因总开关可以在血管形成的生理学以及病理学过程中调控多个下游靶点。例如,学者已经对以 HIF-1 或者是其他氧气敏感型细胞中的调控因子为靶点的治疗缺血性疾病的方案进行了研究(自然医学(Nat Med)9:677-684(2003))。并且在年轻和老年小鼠的下肢缺血模型中开展了实验,发现 HIF-1 可以促进血管新生,提高血流再灌的情况,尤其是对于老年小鼠而言,这种情况更加明显(循环研究(Circ Res)101:1310-1318(2007))。Rajagopalan 等人开展了针对利用修饰以及激活 HIF-1 来治疗 38 位 PAD 以及 CLI 患者的计量检定临床试验的安全性评估。他们并没有发现任何该方法的负面效应(循环(Circulation)115:1234-1243(2007))。与此同时,尽管他们所选取的样本量比较小,但是在这些病人中,学者们观察到疼痛症状的减轻以及溃烂的恢复。在 WALK 这项临床研究中(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00117650),研究者们拥有了包括了 289 位病人,更为随机,病情也更为严重的病人样本。

[0014] AGGF1,又名 VG5Q,是于 2004 年发现的一个先天性静脉畸形骨肥大综合征(Klippel-Trenaunay Syndrome, KTS)。KTS 是一种罕见的先天性血管疾病,主要症状为毛细血管、静脉管、淋巴管畸形和过度增生,该病于 1900 年首次由法国医生 Klippel 和 Tranaunay 归类、描述并定义。承受疾病带来的疼痛等生理上的痛苦,还得承受由于残疾和畸形而引起的巨大的精神压力。

[0015] KTS 临床最主要的特征有 3 个:皮肤毛细血管、淋巴管畸形和增生,常常伴有红色血管斑(port-wine stains);早发性静脉曲张或者静脉畸形(Venous malformations or varicose veins);骨骼或者软组织生长过度,通常表现为单侧肢体肥大。一般而言,大多数病人具有上述 2 个特征,但 KTS 的临床诊断标准仍然为这三个基本特征。

[0016] 由于 KTS 是一种综合征,所以常常伴有很多其他的临床症状:

[0017] 毛细血管畸形(capillary malformations, CMs)是最常见的皮肤血管畸形,

95-100%的KTS病人都有明显的毛细血管畸形,并且形成血管斑,由于症状不同其颜色也不同,从浅色到紫红色不等。KTS患者的毛细血管相对较薄,其内层的内皮细胞一般呈扁平状。

[0018] 静脉畸形(Venous malformations)在70-80%的KTS病人中都会出现的,但其病症的表现差别较大,有的较轻,只有小的浅静脉异常,有的则比较也暗中,往往出现大面积的病变,并伴有溃烂。这种表征在婴儿时期不太明显,但伴随着年龄的增长,其症状逐渐严重。大多数静脉曲张不出现在皮肤表面,但是还是有很多KTS患者在病腿的内部的静脉出现畸形,例如内部静脉管腔曲张,静脉瓣缺失,静脉发育不全,以及某些深度静脉缺失,更有甚者,在有些病人中发现其腹腔或者盆腔的静脉出现畸形。

[0019] 淋巴管异常(Lymphatic abnormalities, LMs)多指皮肤或皮下的淋巴管缺陷,这种情况多发于KTS患者的面颈部。而且大约20%KTS患者的淋巴管中的淋巴液渗漏出来。

[0020] Tian在KTS患者家系中,通过定位克隆的方法,发现一位KTS患者的淋巴细胞中出现了t(5;11)(q3.3;p15.1)平衡易位,采用PCR的方法,找到了这2条染色体的精确的易位断裂点,从而克隆出在易位断裂点附近的KTS候选基因,AGGF1(VG5Q)就是在5号染色体的断裂点附近克隆到的,也正是这个原因,这个基因一开始就被命名为VG5Q。

[0021] 随后的研究发现VG5Q的全长蛋白有718个氨基酸,通过蛋白质结构分析发现VG5Q含有多个结构域,在N端有一个环状结构,还有个OCTamer重复结构域(OCRE),Forkhead相关结构域(FHA),C端有G-patch结构域。根据CG5Q的蛋白质结构域,所以,人们就把VG5Q重新命名为AGGF1(Angiogenic Factor with G-patch and FHA domains 1, AGGF1)

[0022] 1995年Hofmann和Bucher发现FHA结构域(Forkhead-associated domain)是一个可以特异性识别苏氨酸的磷酸激酶的蛋白结构域。到目前为止,有200多种蛋白质含有这个结构域。这个结构域涉及到一系列的反应,例如信号传导通路,转录,蛋白翻译,DNA修复和蛋白质降解等,这个结构域常常在激酶,磷酸酶,驱动蛋白,转录因子,RNA结合蛋白,和一些代谢酶中。

[0023] AGGF1蛋白序列在各物种之间的保守性较高,尤其是Forkhead相关结构域(FHA)和C端的G-patch结构域,但是AGGF1的这些结构域的功能研究得却不深入。

[0024] 目前在现有技术中,没有发现有关AGGF1的促血管生成能力的报道。

## 发明内容

[0025] 本发明的目的是提供一种新的刺激和促进缺血组织的血管新生的方法,

[0026] 依照本发明的第一方面,通过提供了一种促进生物体组织的血管重建的方法而实验这些和其他目的,包括给予上述需要这些治疗的生物体有效量的AGGF1蛋白,或它的有着AGGF1生物活性的片段或类似物。

[0027] 所述的AGGF1可以是人类AGGF1,也可以是小鼠、大鼠等其他哺乳动物的AGGF1。人的AGGF1的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO:1所示;其编码核苷酸序列如序列表中SEQ ID NO:2所示;小鼠的AGGF1的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO:3所示;其编码核苷酸序列如序列表中SEQ ID NO:4所示。如序列表所示,人类AGGF1的氨基酸序列与小鼠的AGGF1的氨基酸序列具有很高的同源性。各物种中的AGGF1基因具有高度同源性,其氨基酸序列的具有高度的同一性,因此在本发明中可以相互替换使用。此外,还可使用各种AGGF1基因的变体、活性片段、缀合物和其他衍生物。

[0028] 依照本发明的另外一方面,通过提供一种通过血管发生刺激缺血组织血管新生的方法而实现本发明的目的,包括给予有效的血管刺激量的 AGGF1 蛋白,或它的有着 AGGF1 生物学活性的片段或类似物的步骤。

[0029] 梗死后的缺血性疾病状态时血流减少后引起的灌注减少所造成的。通过血液对梗死区域的再灌注可以减缓这个问题。因为梗死区域的绝大多数血管和肌肉细胞将坏死,只有通过增加血流才能达到再灌注,血流的增加依赖于梗死区域的新血管。

[0030] 因此,利用 AGGF1 进行血管新生进行治疗的候选疾病包括,其中,(1) 肢体缺血性或慢性静脉腿部溃疡患者;(2) 脑梗患者;(3) 血管造影证实的冠状动脉疾病引起的慢性稳定型心绞痛患者(Carmeliet P 和 Collen D,血管发生和心血管疾病的转基因小鼠模型(综述),病理学杂志,2000;190(3)387-405);(4) 出生后动脉不良患者;(5) 球囊成形术后再狭窄患者(Carmeliet P, Moons L, 及 Collen D,血管发生、动脉狭窄、粥样硬化和止血的小鼠模型(综述),心血管研究,1998;39(1)8-33);(6) 缺血性心血管疾病患者;以及(7) 终末期冠状动脉疾病患者。

[0031] 依照本发明,有很多种可以用于给予患者没能有效促进血管新生的 AGGF1 的技术,这些患有缺血性或者其他一些可以通过血管新生而缓解的病变的患者。给予的 AGGF1,可以以裸 DNA 或其以载体基因给予,也可以是重组蛋白,也可以是病毒。当然了,如果需要,可以使用可调控的载体。这些给予方式,同样可以和一些辅料,例如一些高分子材料(树脂等),一起进行给予,从而提高转染效率,延长表达时间。可以采取肌肉直接注射或采取静脉注射,还可以采用电穿孔方法,同样也可以将其附着在支架上,缓慢释放,也可以采取超声微泡技术,或者纳米泡等手段进行给药治疗。

[0032] 例如,在手术期间或者通过微开胸术,可以通过心肌直接注射编码 AGGF1 的裸质粒 DNA,或者包裹 AGGF1 的病毒,或者 AGGF1 蛋白给予心肌缺血患者 AGGF1。

[0033] 同样在超声引导下,可以让超声微泡在心梗部位或者肢体缺血部位裂开,从而将 AGGF1 释放出来作用在目的部位。Mukherjee 等通过超声介导包裹有人重组 VEGF 蛋白的造影剂,从而明显促进血管新生(J Am Coll Cardiol 2000;35:1678-86)。Enomoto 等采用超声微泡的技术,将 BMC 细胞特异性释放到了大鼠心梗部位(Heart 2006;92:515-520)。

[0034] 另一种 AGGF1 给药的可能性是在缺血肢体的肌肉内注射 AGGF1 质粒或者包裹 AGGF1 的病毒,以腺相关病毒或逆转录病毒等为主。Korpisalo 等将腺病毒直接注射在下肢缺血兔稍微肌肉上(Circ. Res. 2008;103:1092-1099)。Shimpo 等将包裹有 VEGF 的腺相关病毒直接打入到下肢缺血的大鼠的腿部肌肉中(Cardiovasc Res (2002) 53(4):993-1001)。Hiraoka 等则是直接将裸质粒注射到下肢缺血大鼠的肌肉内(Circulation 2003;108:2689-2696)。有的人为了提高表达量,甚至采用电穿孔的技术。在下肢缺血的兔子的后肢肌肉上注射 FGF 质粒后,采用电穿孔的技术提高了 FGF 的表达量(Journal of Surgical Research 120, 37-46 (2004))。

[0035] 重组 AGGF1 蛋白可以通过静脉注射,从而改善缺血部位的坏死程度,促进血管新生。Sumi 等通过尾静脉注射重组高密度脂蛋白给下肢缺血小鼠,从而促进血管新生,改善缺血导致的不良反应(Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007;27:813-818)。

[0036] 此外,本发明还提供了 AGGF1 蛋白或其活性片段在制备促进血管形成药物中的用途;其中所述 AGGF1 蛋白可以是天然 AGGF1 蛋白或重组 AGGF1 蛋白;所述药物可以是注

射剂。

[0037] 本发明还提供了编码 AGGF1 蛋白或其活性片段的核苷酸片段在制备促进血管形成药物中的用途；其中所述核苷酸片段可以与质粒连接，也可以与腺病毒载体、腺相关病毒载体或者其他复制缺陷的逆转录病毒载体连接；所述含有 AGGF1 的质粒或者病毒包裹在微泡中。

[0038] 上述药物用于可治疗选自冠状动脉疾病导致的慢性稳定型心绞痛、严重肢体缺血、慢性静脉性腿部溃疡、糖尿病神经病变、出生后动脉功能不全、再狭窄、缺血性心血管病和终末期冠状动脉病变的病症。

[0039] 在另一实施方案中，所述 AGGF1 蛋白或其活性片段、或编码 AGGF1 蛋白或其活性片段的核苷酸片段与至少一种选自 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、PIGF、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、HGF 和 FGF 的生长因子一起用于促进血管形成。

[0040] 在另一个实施方案中，所述 AGGF1 蛋白或其活性片段、或编码 AGGF1 蛋白或其活性片段的核苷酸片段与内皮祖细胞、骨髓干细胞和 / 或心肌干细胞等细胞一起用于促进血管的形成。

[0041] 本发明的有益效果：针对缺血组织或者部位导入外源性的治疗性的 AGGF1，发现能够明显提高缺血部位的血液流速，促进血管新生，提高缺氧部位的氧气供应，缓解缺血症状，提高运动能力，坏死程度明显降低。

#### 附图说明

[0042] 通过参照下面的实验可以进一步详细的描述本发明，这些实验说明了 AGGF1 在促进缺血组织的血管形成中的活性，附图显示了这些实验的结果，其中：

[0043] 图 1 是手术前小鼠的股动脉的血流情况图。通过小动物高频超声多普勒，在彩色脉冲多普勒的模式下，检测正常小鼠的股动脉的血流情况。

[0044] 图 2 是手术后小鼠的股动脉的血流情况图。通过小动物高频超声多普勒，在彩色脉冲多普勒的模式下，检测下肢缺血小鼠的股动脉的血流情况。通过频谱发现，股动脉近心端被结扎或者出现较大程度的狭窄，下肢供血明显不足，收缩期最大血流速度发生了明显的下降。若频谱，没有发生改变，且收缩期最大血流速度没有较大程度的降低，则认为手术不成功，应剔除造模失败小鼠。

[0045] 图 3 是不同时间点超声检测的左右腿的血流速度的比率情况图。由于血流与温度的有一定相关性，所以为了排除这些因素的影响，所以采用血流比率的统计方法。

[0046] 图 4 是不同时间点小鼠组织坏死情况图。0，没有坏死；1，一个脚趾坏死；2，2 个或多个脚趾坏死；3，脚坏死；4，整条腿的坏死；5，自行截肢。所有组均为  $n = 9$ 。

[0047] 图 5 是不同时间点小鼠后肢行为能力的评分图。1，对于尾部的牵拉，后肢能伸缩，但脚趾没有反应；2，后肢和脚趾皆没有反应；3，后肢拖行。所有组均为  $n = 9$ 。

[0048] 图 6 是给药 7 天，14 天和 28 天的小鼠腓肠肌的免疫组化结果图。血管特异性标记物 CD31 标记的新生血管的情况。

[0049] 图 7 是给药 28 天的小鼠腓肠肌的新生血管的统计结果图。针对血管特异性标记物 CD31 标记的新生血管的进行统计，图 7A 是单位面积新生血管数量的情况图。图 7B 是相对于肌束而言新生血管的数量图。

[0050] 图 8 是小鼠腓肠肌肌肉组织切片的 HE 染色示意图。图 8C 是图 8A 图片中方框的放大图 ;图 8D 是图 8C 图片中方框的放大图。

## 具体实施方式

[0051] 材料和实验方法

[0052] 1) 单侧下肢动脉结扎

[0053] 10-12 周雄性 C57BL/6 小鼠用戊巴比妥钠 (50mg/kg) 腹腔麻醉, 并使其在手术中能自发呼吸。在小鼠左侧和右侧的腹股沟部到大腿部位用脱毛膏脱毛, 使其表面干净。横向剪开皮肤, 钝性分离出血管和神经。再小心将静脉和动脉分离开。右侧用 6-0 丝线将髂动脉结扎。顺着髂动脉往下分离血管, 随后将股动脉进行结扎。在结扎过程中, 不要伤及静脉和伴行的神经。左侧用 6-0 丝线将动脉绕一圈, 在实验中作为对照, 即假手术腿。

[0054] 2) AGGF1 和 bFGF 的质粒制备

[0055] 使用已将目的基因整合进常用基因表达载体的重组表达载体, 用于制备 AGGF1 和 bFGF 质粒的方法先前已有描述, 根据 *Circulation* 108: 2689-2696 (2003) 中的方法制得 AGGF1 和 bFGF 质粒的。通过酚氯仿萃取和乙酸钾沉淀, 纯化 AGGF1 和 bFGF 质粒, 不含有内毒素。

[0056] 3) 小动物超声检测股动脉血流

[0057] 采用 Vevo 2100 高分辨率小动物超声系统 (Visualsonics Inc, Toronto, Canada) 检测小鼠血流。采用 1% 异戊烷麻醉小鼠, 将其仰放在 37°C 的鼠板上, 用脱毛膏将小鼠的两支腿的大腿部位到小腿部位的毛脱掉, 减除毛发对超声检测的影响。采用 MS550 型探头进行检测。在彩色脉冲多普勒的模式下检测股动脉的血流速度。在手术前先检测小鼠股动脉的血流情况如图 1 所示, 手术后第 1 天, 再次通过超声检测如图 2 所示, 判断下肢缺血模型是否成功。手术成功的标准为, 脉冲多普勒的频谱出现了异常, 基本上没有出现收缩期的最大血流, 而且血流速度, 明显降低, 基本上小于手术前的 10%。

[0058] 4) 组织坏死和行为能力的检测

[0059] 未参加本实验的人, 对小鼠的组织坏死和行为能力的情况进行评分。组织坏死的评分标准 (*Eur J Pharmacol* 634(1-3): 121-131 (2010)) 为 :0, 没有坏死 ;1, 一个脚趾坏死 ;2, 2 个或多个脚趾坏死 ;3, 脚坏死 ;4, 整条腿的坏死 ;5, 自行截肢, 如图 4 所示。通过评分, 我们发现相对于空质粒而言, AGGF1 可以改善缺血组织坏死的情况, 减轻小鼠的缺血症状, 从而减轻因缺血而带来的病痛。

[0060] 行为能力的评分标准 (循环研究 (*Circ Res*)101: 1310-1318(2007)) 为 :0, 对于尾部的牵拉, 后肢有正常反应 ;1, 对于尾部的牵拉, 后肢能伸缩, 但脚趾没有反应 ;2, 后肢和脚趾皆没有反应 ;3, 后肢拖行, 如图 5 所示。下肢缺血小鼠的后肢的活动能力, 在 AGGF1 的作用下, 明显得到了增强, 有利于缓解小鼠的缺血症状。运动能力的增强, 也有利于缺血下肢的血管新生, 从而改善由于缺血导致的各种不良的后果 (循环 (*Circulation*)122: 707-716 (2010))。

[0061] 5) 免疫组化检测

[0062] 手术后 29 天, 将小鼠处死, 分离出腓肠肌, 4% 的多聚甲醛固定过夜, 石蜡包埋后, 切片。采用新生血管的特异标记物 CD31 进行免疫组化检测, 如图 6 所示。

[0063] 实施例 1

[0064] 针对缺血组织,采用 AGGF1 基因进行血管新生的治疗

[0065] 按照上述方法,建立小鼠下肢缺血模型。

[0066] 采用肌肉注射 DNA 质粒的给药方式,对小鼠下肢缺血模型的缺血性部位进行血管新生治疗。手术 1 天后,在结扎部位下方,即腓肠肌部位,进行单点注射 0.15ml 的质粒。

[0067] 在手术后 8 天,15 天,29 天进行血流检测,如图 3 所示。手术后 8 天,AGGF1 治疗小鼠的左右腿血流流速比是  $0.22 \pm 0.10$ ,而对照组的小鼠的左右腿血流流速比为  $0.10 \pm 0.04$ , ( $P < 0.05$ ,  $n=9$ )。手术后 29 天的时候,AGGF1 治疗小鼠的左右腿血流流速比是  $0.31 \pm 0.06$ ,而对照组的小鼠的左右腿血流流速比为  $0.14 \pm 0.03$ , ( $P < 0.01$ ,  $n=9$ )。发现通过 AGGF1 治疗确实可以明显提高血流速度,血流再灌能力增强。

[0068] 根据免疫组化检测结果,发现外源性 AGGF1 能明显的刺激微血管的生成。AGGF1 刺激 28 天后新生血管数量达到了  $0.934 \pm 0.413/\text{mm}^2$ ,而对照组仅仅  $0.538 \pm 0.388/\text{mm}^2$  ( $P < 0.01$ ),如图 7A 所示,同时相对于肌束而言新生血管的数量是  $439.2 \pm 250.1$ ,对照组为  $172.5 \pm 109.4$  ( $P < 0.05$ ),如图 7B 所示。

[0069] 通过对切片进行 HE 染色,发现接受 AGGF1 注射的小鼠,细胞核的集中化并不显著。并且,坏死的肌肉纤维数量也明显下降,如图 8 所示。由此可见,AGGF1 可以明显促进血管生成。

[0070] 实施例 2:

[0071] 针对缺血组织,采用重组 AGGF1 蛋白进行血管新生的治疗

[0072] 按照上述方法,建立小鼠下肢缺血模型。

[0073] 建立小鼠下肢缺血模型后,在手术的第二天将纯化的 AGGF1 蛋白,通过尾静脉进行注射,诱导缺血组织中血管发生,缓解缺血导致的不良反应。按照上述方法进行组织坏死和行为能力的检测,发现给予 AGGF1 蛋白的小鼠的后肢运动能力明显增强,坏死程度也得到了改善。

[0074] 实施例 3:

[0075] 针对缺血组织,采用 AGGF1 腺相关病毒进行血管新生的治疗

[0076] 将编码 AGGF1 的 cDNA 克隆到腺相关病毒载体,转染,纯化,鉴定,测定其滴度,得到 AGGF1 腺相关病毒。

[0077] 按照上述方法,建立小鼠下肢缺血模型。在手术的第二天,将纯化后得到 AGGF1 腺相关病毒,通过尾静脉进行注射。并在注射后的不同时间点检测股动脉血流、以及进行组织坏死和行为能力的检测。检测结果表明,与对照(缺乏编码 AGGF1 的 cDNA 的空腺相关病毒载体)相比,注射了 AGGF1 腺相关病毒的小鼠股动脉血流明显增加,小鼠的后肢运动能力明显增强,坏死程度也得到了改善。这些实验结果证实了 AGGF1 腺相关病毒能有效诱导缺血组织中血管发生,缓解缺血导致的不良反应。

[0078] 上述三个实施例分别通过注射编码 AGGF1 的质粒、注射 AGGF1 蛋白、以及注射 AGGF1 腺相关病毒至小鼠下肢缺血模型中,结果均表明 AGGF1 能有效诱导缺血组织中血管发生,缓解缺血导致的不良反应。从而证实了 AGGF1 能够诱导血管发生,并治疗由局部缺血所导致的疾病和其他不良反应。

[0079] 本发明虽然通过以上实施例进行了详细说明,但应当理解的是,这些实施例仅用

---

于描述的目的,不应理解为对本发明的限制。

[0001]

## 序列表

<110> 华中科技大学  
 <120> AGGF1 在制备促进血管形成的药物中的用途  
 <160> 4

<210> 1  
 <211> 714  
 <212> 蛋白质  
 <213> 人类

<400> 1

Met Ala Ser Glu Ala Pro Ser Pro Pro Arg Ser Pro Pro Pro Pro Thr  
 1 5 10 15

Ser Pro Glu Pro Glu Leu Ala Gln Leu Arg Arg Lys Val Glu Lys Leu  
 20 25 30

Glu Arg Glu Leu Arg Ser Cys Lys Arg Gln Val Arg Glu Ile Glu Lys  
 35 40 45

Leu Leu His His Thr Glu Arg Leu Tyr Gln Asn Ala Glu Ser Asn Asn  
 50 55 60

Gln Glu Leu Arg Thr Gln Val Glu Glu Leu Ser Lys Ile Leu Gln Arg  
 65 70 75 80

Gly Arg Asn Glu Asp Asn Lys Lys Ser Asp Val Glu Val Gln Thr Glu  
 85 90 95

Asn His Ala Pro Trp Ser Ile Ser Asp Tyr Phe Tyr Gln Thr Tyr Tyr  
 100 105 110

Asn Asp Val Ser Leu Pro Asn Lys Val Thr Glu Leu Ser Asp Gln Gln  
 115 120 125

Asp Gln Ala Ile Glu Thr Ser Ile Leu Asn Ser Lys Asp His Leu Gln  
 130 135 140

Val Glu Asn Asp Ala Tyr Pro Gly Thr Asp Arg Thr Glu Asn Val Lys  
 145 150 155 160

Tyr Arg Gln Val Asp His Phe Ala Ser Asn Ser Gln Glu Pro Ala Ser

[0002]

	165	170	175
Ala Leu Ala Thr Glu Asp Thr Ser Leu Glu Gly Ser Ser Leu Ala Glu			
	180	185	190
Ser Leu Arg Ala Ala Ala Glu Ala Ala Val Ser Gln Thr Gly Phe Ser			
	195	200	205
Tyr Asp Glu Asn Thr Gly Leu Tyr Phe Asp His Ser Thr Gly Phe Tyr			
	210	215	220
Tyr Asp Ser Glu Asn Gln Leu Tyr Tyr Asp Pro Ser Thr Gly Ile Tyr			
	225	230	235
Tyr Tyr Cys Asp Val Glu Ser Gly Arg Tyr Gln Phe His Ser Arg Val			
	245	250	255
Asp Leu Gln Pro Tyr Pro Thr Ser Ser Thr Lys Gln Ser Lys Asp Lys			
	260	265	270
Lys Leu Lys Lys Lys Arg Lys Asp Pro Asp Ser Ser Ala Thr Asn Glu			
	275	280	285
Glu Lys Asp Leu Asn Ser Glu Asp Gln Lys Ala Phe Ser Val Glu His			
	290	295	300
Thr Ser Cys Asn Glu Glu Glu Asn Phe Ala Asn Met Lys Lys Lys Ala			
	305	310	315
Lys Ile Gly Ile His His Lys Asn Ser Pro Pro Lys Val Thr Val Pro			
	325	330	335
Thr Ser Gly Asn Thr Ile Glu Ser Pro Leu His Glu Asn Ile Ser Asn			
	340	345	350
Ser Thr Ser Phe Lys Asp Glu Lys Ile Met Glu Thr Asp Ser Glu Pro			
	355	360	365
Glu Glu Gly Glu Ile Thr Asp Ser Gln Thr Glu Asp Ser Tyr Asp Glu			
	370	375	380
Ala Ile Thr Ser Glu Gly Asn Val Thr Ala Glu Asp Ser Glu Asp Glu			
	385	390	395
			400

[0003]

Asp Glu Asp Lys Ile Trp Pro Pro Cys Ile Arg Val Ile Val Ile Arg  
 405 410 415

Ser Pro Val Leu Gln Ile Gly Ser Leu Phe Ile Ile Thr Ala Val Asn  
 420 425 430

Pro Ala Thr Ile Gly Arg Glu Lys Asp Met Glu His Thr Leu Arg Ile  
 435 440 445

Pro Glu Val Gly Val Ser Lys Phe His Ala Glu Ile Tyr Phe Asp His  
 450 455 460

Asp Leu Gln Ser Tyr Val Leu Val Asp Gln Gly Ser Gln Asn Gly Thr  
 465 470 475 480

Ile Val Asn Gly Lys Gln Ile Leu Gln Pro Lys Thr Lys Cys Asp Pro  
 485 490 495

Tyr Val Leu Glu His Gly Asp Glu Val Lys Ile Gly Glu Thr Val Leu  
 500 505 510

Ser Phe His Ile His Pro Gly Ser Asp Thr Cys Asp Gly Cys Glu Pro  
 515 520 525

Gly Gln Val Arg Ala His Leu Arg Leu Asp Lys Lys Asp Glu Ser Phe  
 530 535 540

Val Gly Pro Thr Leu Ser Lys Glu Glu Lys Glu Leu Glu Arg Arg Lys  
 545 550 555 560

Glu Leu Lys Lys Ile Arg Val Lys Tyr Gly Leu Gln Asn Thr Glu Tyr  
 565 570 575

Glu Asp Glu Lys Thr Leu Lys Asn Pro Lys Tyr Lys Asp Arg Ala Gly  
 580 585 590

Lys Arg Arg Glu Gln Val Gly Ser Glu Gly Thr Phe Gln Arg Asp Asp  
 595 600 605

Ala Pro Ala Ser Val His Ser Glu Ile Thr Asp Ser Asn Lys Gly Arg  
 610 615 620

Lys Met Leu Glu Lys Met Gly Trp Lys Lys Gly Glu Gly Leu Gly Lys  
 625 630 635 640

[0004]

Asp Gly Gly Gly Met Lys Thr Pro Ile Gln Leu Gln Leu Arg Arg Thr  
 645 650 655

His Ala Gly Leu Gly Thr Gly Lys Pro Ser Ser Phe Glu Asp Val His  
 660 665 670

Leu Leu Gln Asn Lys Asn Lys Lys Asn Trp Asp Lys Ala Arg Glu Arg  
 675 680 685

Phe Thr Glu Asn Phe Pro Glu Thr Lys Pro Gln Lys Asp Asp Pro Gly  
 690 695 700

Thr Met Pro Trp Val Lys Gly Thr Leu Glu  
 705 710

<210> 2  
 <211> 2145  
 <212> DNA  
 <213> 人类

<400> 2

```

atggcctcgg aggcgcgcgc cccgccgcgg tcgccgcgcg cgcaccctc ccccgagcct    60
gagctggccc agctaaggcg gaaggtggag aagttggaac gtgaactgcg gagctgcaag    120
cggcaggtgc gggagatcga gaagctgctg catcacacag aacggetgta ccagaacgca    180
gaaagcaaca accaggagct ccgcacgcag gtggaagaac tcagtaaaat actccaacgt    240
gggagaaatg aagataataa aaagtctgat gtagaagtac aaacagagaa ccatgctcct    300
tggatcaatc cagattatct ttatcagacg tactacaatg acgtagtctc tccaaataaa    360
gtgactgaac tgtcagatca acaagatcaa gctatcgaaa ctctatcttt gaattctaaa    420
gaccatttac aagtagaaaa tgatgcttac cctgggtacc atagaacaga aaatggtaaa    480
tatagacaag tggaccatct tgcctcaaat tcacaggagc cagcatctgc attagcaaca    540
gaagatacct ccttagaagg ctcactcatta gctgaaagt tggagagctgc agcagaagcg    600
gctgtatcac agactggatt tagttatgat gaaaatactg gactgtatct tgaccacagc    660
actggtttct attatgattc tgaaaatcaa ctctattatg atccttcac tggaaattat    720
tactattgtg atgtgaaaag tggtcggtat cagtttcatt ctgagtaga ttgcaacct    780
tatecgactt ctgacacaaa acaaagtaaa gataaaaaat tgaagaagaa aagaaaagat    840
ccagattctt ctgcaacaaa tgaggaaaag gatttgaact cagaggatca aaaagccttc    900
agtgttgaac atacaagctg caatgaggaa gaaaatttcg caaatatgaa aaagaagcc    960
aaaataggca ttcacacaaa aaatagctcc cccaaagtca ctgttccaac tagtggaat    1020
actatagagt ctctcttcca tgaaaacate tctaattcaa catcatttaa agatgagaaa    1080
atcatggaga ctgatagtga accagaggaa ggtgaaatta cagactctca gactgaggat    1140
agttatgacg aagccattac cagtgaagge aatgtaactg cagaagatag tgaggatgaa    1200
gatgaagaca aaatttgccc cccatgtatt agagtaattg tcattagatc acctgtgttg    1260
    
```

[0005]

cagataggat cactctttat cattaactgct gtaaaccctg ctacaattgg aagagaaaag 1320  
 gatatggaac atactctccg aatccctgaa gttgggtgca gtaagtttca tgcagaaatt 1380  
 tattttgacc atgacttaca aagtattgtc cttgtggatc aaggcagtca aaatggcaca 1440  
 attgtaaatg gaaaacagat tcttcagccg aaaactaaat gtgaccctta cgtacttgag 1500  
 catggagatg aagtcaaaat tggagaaaact gtcttatect tteacattea tectggcagt 1560  
 gataacctgtg atggctgtga accagggcag gttagagecc accttcgect tgataagaaa 1620  
 gatgaatctt ttgtttggcc aacactaagt aaggaggaaa aagagttgga aagaagaaaa 1680  
 gaattaaaga aaatacagat aaaatatggt ttacagaata cagaatacga agatgaaaag 1740  
 acattgaaga atccaaaata taaagataga gctggaaaac gtagggagca ggttggaagt 1800  
 gaaggaactt iccaaagaga tgatgctcct gcatctgttc attctgaaat tactgatagc 1860  
 aacaaaggtc ggaagatggt ggagaagatg ggttggaaga aaggagaggg cctggggaag 1920  
 gatggtggag gaatgaaaac gccgatccag ctfcagcttc ggcaaacaca tgcagccttg 1980  
 gggacaggca aaccatectc atttgaagat gttcaccttc tccaaaacaa gaacaaaaaa 2040  
 aactgggaca aagcagcaga gcggtttact gaaaacttc cagaaactaa gcctcaaaaa 2100  
 gatgaccag ggaccatgcc ttgggtaaaa gggacttag agtga 2145

<210> 3  
 <211> 711  
 <212> 蛋白质  
 <213> 小鼠

<400> 3

Met Ala Ser Glu Ala Pro Ser Pro Pro Ser Pro Ser Pro Pro Pro Pro  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Pro Glu Pro Glu Leu Ala Gln Leu Arg Arg Lys Val Glu Lys  
 20 25 30  
 Leu Glu Arg Glu Leu Arg Ser Cys Arg Arg Gln Val Arg Glu Val Glu  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Gln His Thr Glu Arg Leu Tyr Arg Asn Ala Glu Ser Asp  
 50 55 60  
 Asn Gln Glu Leu Arg Thr Gln Val Glu Glu Leu Ser Lys Ile Leu His  
 65 70 75 80  
 Cys Gly Lys Asn Glu Asp Asn Pro Lys Ser Asp Val Glu Val Gln Thr  
 85 90 95  
 Glu Ser Gln Ala Pro Trp Ala Ile Ser Asp Tyr Tyr Tyr Gln Thr Cys  
 100 105 110

[0006]

Tyr Asn Asp Asp Ser Leu Pro Ser Lys Glu Thr Glu Leu Cys Val Gln  
 115 120 125

Gln Ser Gln Cys Ala Gln Ala Ser Ala Leu Asp Pro Gln Asp Glu Ser  
 130 135 140

His Ile Asp Ser Gly Ser Tyr Ala Gly Ala Asp Ala Thr Glu Gly Val  
 145 150 155 160

Ser His Arg Gln Glu Asp Ala Val Thr Ser Asp Ser Gln Glu Ser Val  
 165 170 175

Ser Ala Leu Ala Glu Gly Pro Ala Leu Glu Gly Ser Ser Leu Ala Glu  
 180 185 190

Ser Leu Arg Ala Ala Ala Glu Ala Ala Val Ser Gln Thr Gly Phe Thr  
 195 200 205

Tyr Asp Glu Ser Thr Gly Leu Tyr Phe Asp His Ser Thr Gly Phe Tyr  
 210 215 220

Tyr Asp Ser Glu Asn Gln Leu Tyr Tyr Asp Pro Ser Thr Gly Ile Tyr  
 225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Asp Val Glu Ser Gly Arg Tyr Gln Phe His Ser Arg Val  
 245 250 255

Asp Leu Gln Pro Tyr Gln Thr Ser Ser Thr Lys Pro Asn Arg Glu Arg  
 260 265 270

Arg Leu Lys Lys Arg Arg Lys Glu Pro Gly Phe Tyr Thr Ala Asn Glu  
 275 280 285

Glu Lys Asp Leu Ser Ser Glu Asp Gln Lys Val Cys Ser Val Glu Tyr  
 290 295 300

Ile Asn Cys Ser Glu Asp Glu His Ser Gly Asn Val Lys Lys Lys Ala  
 305 310 315 320

Arg Thr Asp Thr Ser His Lys Ser Ser Pro Leu Gln Leu Thr Val Ala  
 325 330 335

Val Ser Gly Asp Thr Val Glu Ser Pro Gly Asp Asp Asn Ser Ala Ser

[0007]

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

[0008]

Lys Ala Leu Lys Asn Pro Lys Tyr Lys Asp Arg Ala Gly Lys Arg Arg  
 580 585 590

Glu Gln Val Gly Ser Glu Gly Thr Phe Gln Arg Asp Asp Ala Pro Ala  
 595 600 605

Ser Val His Ser Glu Ile Thr Asp Ser Asn Lys Gly Arg Lys Met Leu  
 610 615 620

Glu Lys Met Gly Trp Lys Arg Gly Glu Gly Leu Gly Lys Asp Gly Gly  
 625 630 635 640

Gly Met Lys Thr Pro Ile Gln Leu Gln Leu Arg Arg Thr His Ala Gly  
 645 650 655

Leu Gly Thr Gly Lys Leu Ser Ser Ile Asp Asp Val His Leu Ile Gln  
 660 665 670

Asn Lys Ser Lys Lys His Trp Asp Lys Ala Arg Glu Arg Phe Ala Glu  
 675 680 685

Thr Phe Thr Glu Asn Lys Pro Arg Lys Glu Thr Pro Gly Ala Val Pro  
 690 695 700

Trp Val Thr Gly Thr Ala Glu  
 705 710

<210> 4

<211> 2136

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 4

atggcctcag aggcgccctc gccgccttcg ccttctccgc egccgccgcg etctccggag 60  
 cggagctgg cgcagctcag gcggaaggtg gagaagtgg agcgcgagct gggagctgc 120  
 cggaggcagg tgcgggaggt ggagaagctg ctgcagcaca cggagcgact ctaccgcaac 180  
 gccgagagcg acaaccagga gctccgcacg caggtagaag aacttagtaa aatactccat 240  
 tgtgggaaaa atgaagataa tccgaagtct gatgtagaag tacagacaga gagccaagct 300  
 ccttgggcga ttctagatta ttactatcag acatgttata atgacgacag tcttcccagt 360  
 aaagagacgg agctgtgtgt acagcagagt cagtgtgctc aggettccgc tcttgatcct 420  
 caggacgagt cacacataga cagcgggagt tatgetgtg etgatgccac agaaggtgtt 480  
 agccatagac aggaggacgc cgtcacctct gactcacagg agagtgtgtc cgcgctagea 540

[0009]

gaaggcccag	cactogaagg	gtectcgctt	gctgagagct	tgagagctgc	agcggaggct	600
gctgtgtcgc	agaccggcct	cacctacgac	gagagcacgg	gcttatattt	tgaccacagc	660
actggtttct	attatgattc	tgaaaaccag	ctgtattatg	acccttccac	ggggatttat	720
tactactgeg	atgtggagag	tggteggtac	cagtttcaact	ctcgcgtaga	ectgcagcct	780
taccagacct	ctagcacaaa	accaaacaga	gaaagaagac	tgaagaagag	aagaaaggag	840
ccaggttttt	atacagcaaa	tgaagaaaag	gatttgagct	cagaagatca	gaaagtctgc	900
agtgtagaat	atataaactg	cagtgaggat	gaacattctg	gaaatgtgaa	aaagaaggcc	960
agaacagaca	cttctcacia	aagcagtccc	ttacagctca	cggtagcagt	tagtggagac	1020
actgtggagt	ctcctggaga	tgataactca	gcgtcatcta	aggatgagag	aatcggagag	1080
agtgagagcg	agccggaaga	aggtagagac	acagactctc	agagtgagaa	gagctatgat	1140
ggagacagta	gcagtgggga	cagggagacc	tcagaagaat	ccgacgatga	agatgaggaa	1200
agaatttggc	cgccctgtat	tcgcgtgatt	gtcattaggt	ctccagtgtt	gcagatgggc	1260
tcgcgttca	tcateaccgc	tgtgagccca	gccaccattg	ggagagagaa	ggacatggag	1320
catactgtga	gaatccctga	agtegetgtt	agtaagtcc	acgcagaagt	ttacttcgac	1380
catgacttgc	aaagctacgt	tcttgtggat	cagggcagcc	agaatggtac	cattgtcaac	1440
gggaaacaga	ttcttcagcc	aaaaactaaa	tgtgatcctt	acgtcctega	acacggcgac	1500
gaagtgaaaa	ttggggagac	tgtgtgtct	tttcacattc	accctggcag	tgagacgtgc	1560
gatggctgtg	agccggggca	ggtcagagct	cacctcgc	tcgatagaaa	ggacgagcct	1620
ctggtcggtc	cagcactaag	taaggaggaa	aaagagttgg	aaagaagaaa	agcactcaag	1680
aaaatacgag	taaagtatgg	cttgcagaat	acagattatg	aagctgaaaa	agcgttgaag	1740
aatcctaagt	ataaagacag	agctggaaaa	cgcagggagc	aggtagggaag	cgaagggact	1800
ttccaaagag	atgacgcccc	tgcgtctgtt	cactctgaaa	ttacagatag	caacaaagge	1860
cgaaagatgt	tggagaagat	ggggtggaaa	cggggagaag	gcctgggaaa	ggacggtgga	1920
gggatgaaaa	cgccgatcca	gcttcagctt	cgacggacac	atgctggctt	ggggacaggg	1980
aagctgtcct	cgattgatga	cgttcacctc	atccagaata	agagcaaaaa	acactgggac	2040
aaagcccggg	agcggtttgc	ggaaactttc	acagaaaaca	aacctcgga	agagacccca	2100
ggggcagtgc	cgtagggtgac	agggactgca	gagtaa			2136

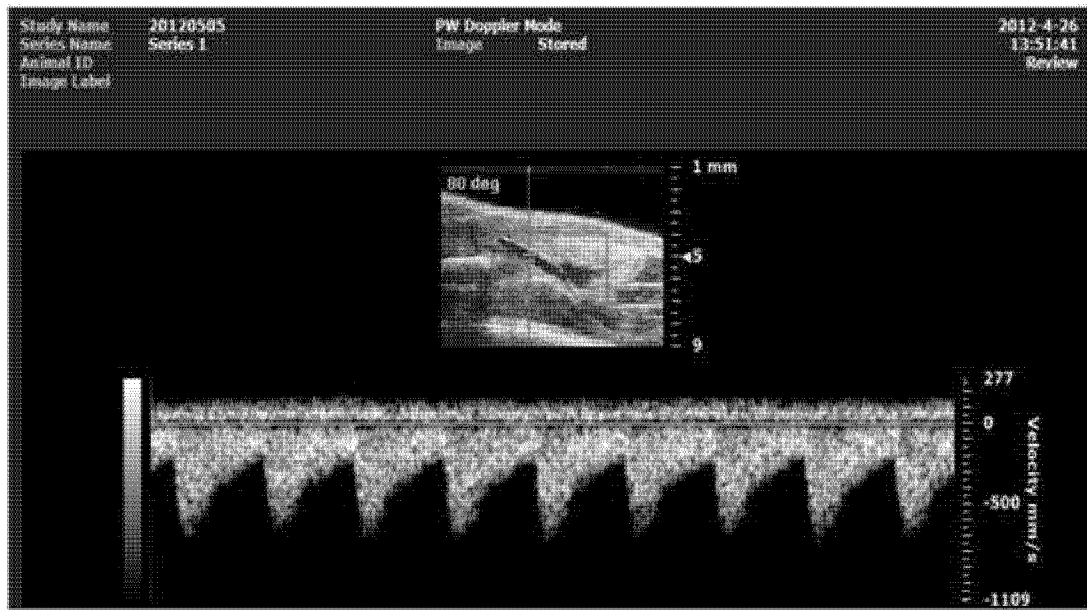


图 1

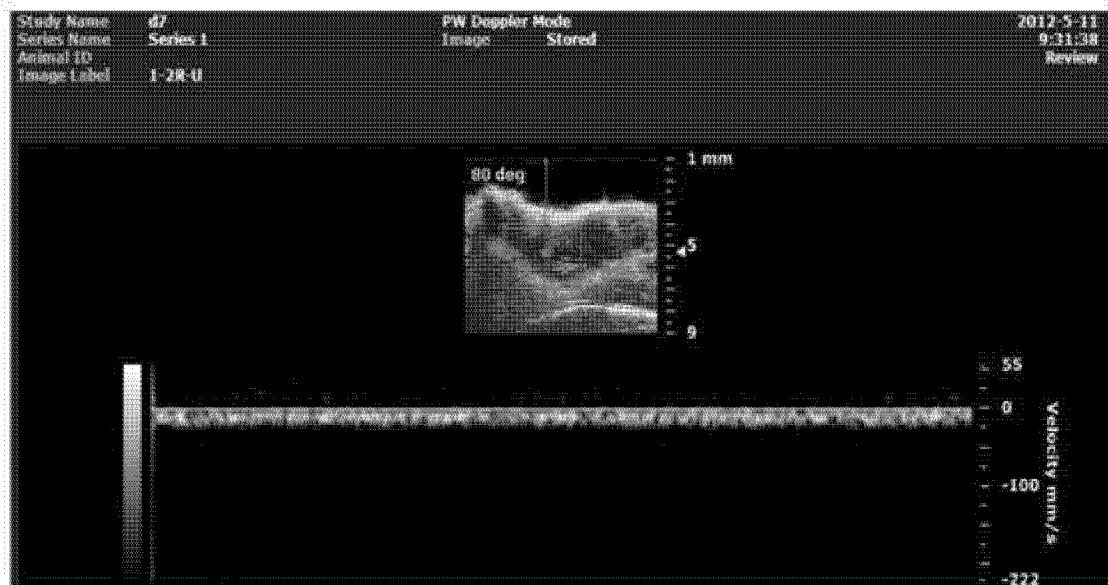


图 2

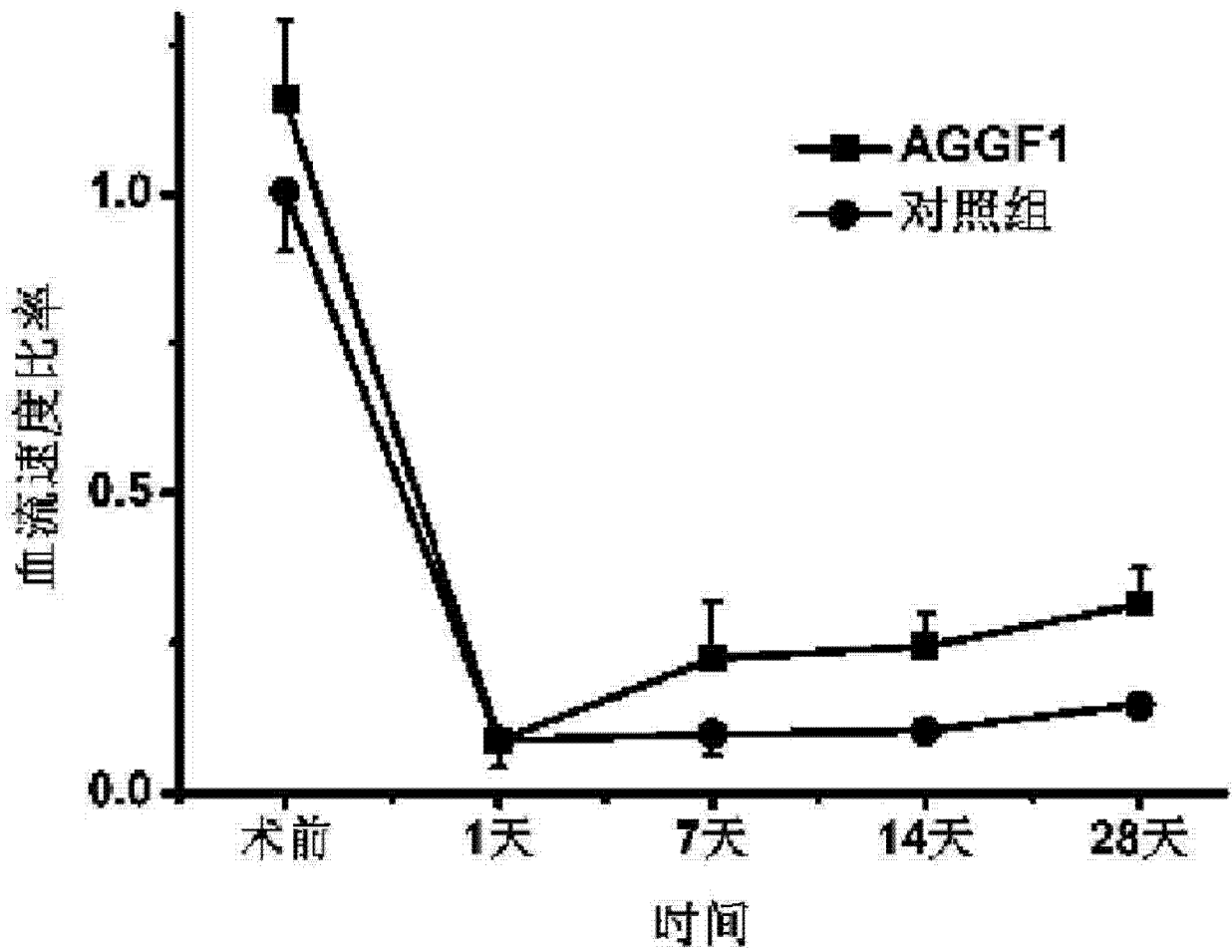


图 3

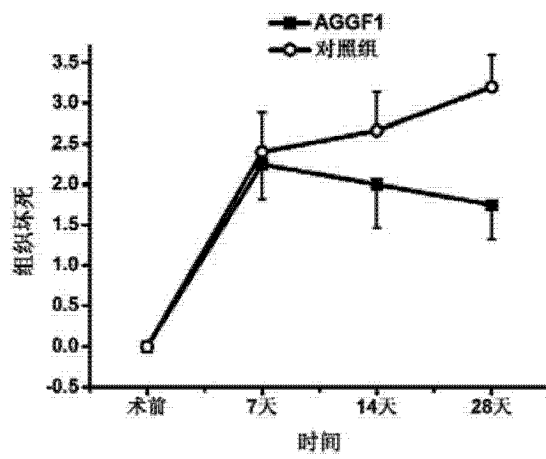


图 4

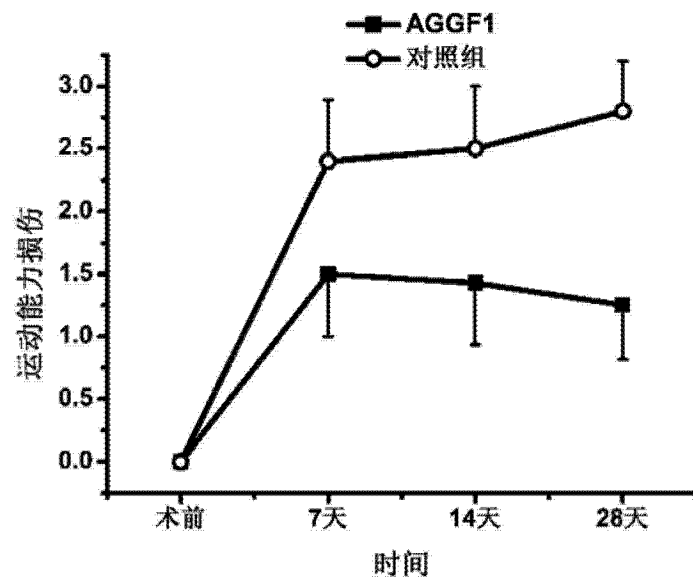


图 5

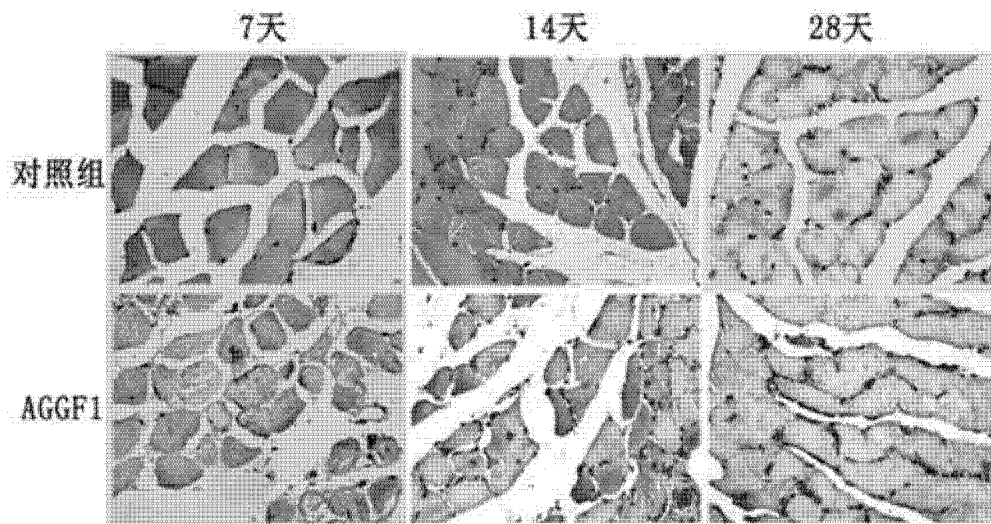


图 6

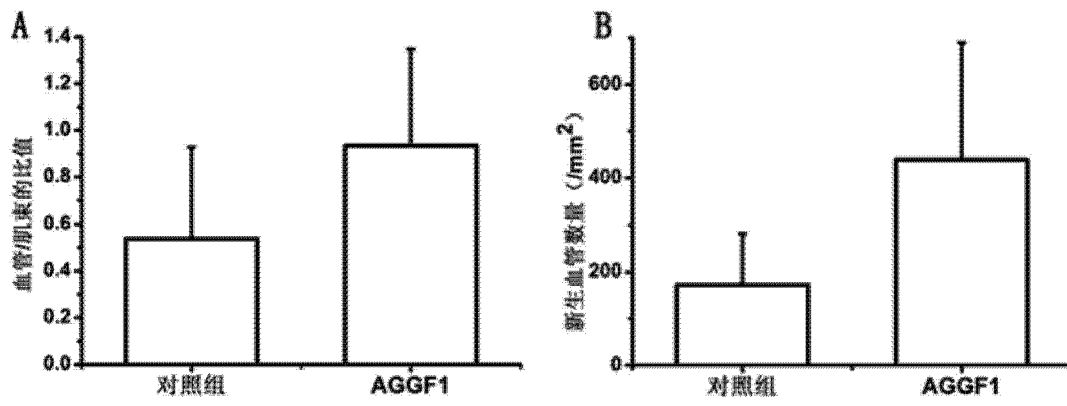


图 7

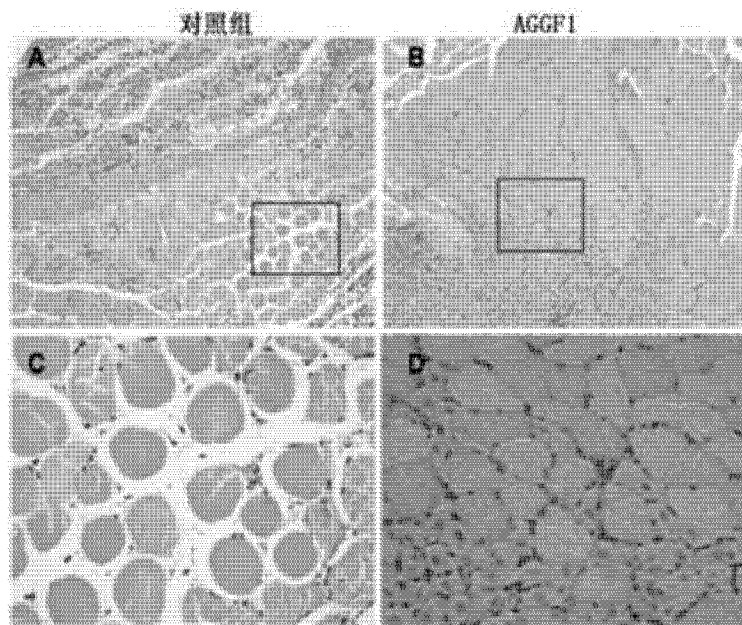


图 8