

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07H 21/04

C12Q 1/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03810440.7

[43] 公开日 2005 年 8 月 10 日

[11] 公开号 CN 1653080A

[22] 申请日 2003.3.7 [21] 申请号 03810440.7

[30] 优先权

[32] 2002.3.7 [33] US [31] 60/363,019

[86] 国际申请 PCT/US2003/006900 2003.3.7

[87] 国际公布 WO2003/080640 英 2003.10.2

[85] 进入国家阶段日期 2004.11.8

[71] 申请人 路德维格癌症研究院

地址 美国纽约州

共同申请人 利森蒂亚有限公司

[72] 发明人 卡里·阿利塔洛 泰加·马基嫩

塔蒂亚娜·彼得罗娃

皮普萨·萨哈里嫩 朱亚·萨哈里嫩

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 11 页 说明书 163 页 附图 2 页
按照条约第 19 条的修改 12 页

[54] 发明名称 淋巴管和血管的内皮细胞基因

[57] 摘要

本发明提供了在淋巴管内皮细胞和血管内皮细胞中差异表达的多核苷酸和基因。这些基因可用于治疗涉及淋巴管的疾病，所述疾病例如淋巴水肿，各种炎性疾病，和通过淋巴管系统进行的癌转移。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 差异调节血管内皮细胞(BEC)或淋巴管内皮细胞(LEC)的生长或分化的方法，包括使内皮细胞和一种组合物接触，所述组合物包含差异调节血管和淋巴管内皮细胞的制剂，所述制剂选自以下物质：
- 5 (a) 包含 BEC 多肽或 LEC 多肽的氨基酸序列的多肽，或者所述多肽的活性片段；
- (b) 包含编码(a)的多肽的核苷酸序列的多核苷酸；
- (c) 特异性结合(a)的多肽的抗体；
- (d) 包含(c)的抗体的片段的多肽，其中所述片段和抗体与该多肽结合；
- 10 (e) 编码(a)的多肽的人基因或 mRNA 的反义核酸；
- (f) 编码(a)的多肽的人基因或 mRNA 的干扰 RNA (RNAi)。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述内皮细胞与所述组合物在活体外接触。
3. 权利要求 1 方法，其中所述组合物包含可药用的稀释剂，佐剂或载体，且所述接触步骤包括将所述组合物给药受试哺乳动物，以差异调节受
- 15 试哺乳动物的 BEC 或 LEC。
4. 权利要求 3 方法，包括：
- 鉴定患有以 LEC 的过度增生为特征的病症的人类受试者；和
- 将所述组合物给药该人类受试者，其中所述制剂差异抑制 LEC 的生长和 BEC 的生长。
- 20 5. 权利要求 3 方法，包括：
- 鉴定患有以 LEC 的过度增生为特征的病症的人类受试者；
- 筛选受试者的 LEC，以鉴定表 3 中的多肽的过度表达；和
- 将所述组合物给药该人类受试者，其中所述制剂通过抑制筛选步骤所鉴定的多肽的表达，差异抑制 LEC 的生长和 BEC 的生长。
- 25 6. 根据权利要求 3 的调节人类受试者的淋巴管内皮细胞的生长的方法，包括以下步骤：
- 鉴定患有增生性淋巴疾病的人类受试者；
- 筛选受试者以鉴定表 3 中所述的 LEC 多肽的低表达或低活性，其中所述蛋白不在表 1 或 2 中；

将所述组合物给药人类受试者，其中所述制剂包含筛选步骤鉴定的 LEC 多肽(a)或者所述多肽的活性片段，或者包含编码该多肽的核苷酸序列的多核苷酸(b)。

7. 一种制剂在制备差异调节血管内皮细胞(BEC)或淋巴管内皮细胞 (LEC)的生长或分化的药物中的用途，所述制剂选自：

(a) 包含 BEC 多肽或 LEC 多肽的氨基酸序列的多肽，或者所述多肽的活性片段；

(b) 包含编码(a)的多肽的核苷酸序列的多核苷酸；

(c) 特异性结合(a)的多肽的抗体；

10 (d) 包含(c)的抗体的片段的多肽，其中所述片段和抗体与该多肽结合；

(e) 编码(a)的多肽的人基因或 mRNA 的反义核酸；

(f) 编码(a)的多肽的人基因或 mRNA 的干扰 RNA (RNAi)。

8. 权利要求 1-7 之一的方法或用途，其中所述多肽是选自表 3 的 LEC 多肽，而且所述制剂差异调节 LEC 和 BEC 的生长或分化。

15 9. 权利要求 1-7 的方法或用途，其中所述多肽是选自表 4 的 BEC 多肽，而且所述制剂差异调节 BEC 和 LEC 的生长或分化。

10. 权利要求 8 或 9 的方法或用途，其中所述多肽不在表 1 或 2 中。

11. 权利要求 8 的方法或用途，其中所述 LEC 多肽包含选自 SEQ ID NO: 81, 187, 207, 211, 221, 235, 241, 293 或 391 的氨基酸序列。

20 12. 权利要求 8 的方法或用途，其中所述 LEC 多肽包含选自 SEQ ID NO: 31-34, 46, 或 48 的氨基酸序列。

13. 权利要求 12 的方法和用途，其中所述制剂包含(c)的抗体或(d)的多肽。

25 14. 权利要求的方法 12，其中所述制剂包含(a)的多肽的细胞外区片段，或者编码所述细胞外区片段的多核苷酸。

15. 权利要求 1-10 之一的方法，其中所述制剂包含反义分子。

16. 治疗遗传性淋巴水肿的方法，包括：

30 鉴定患有淋巴水肿的人类受试者，该受试者的编码表 3 中鉴定的 LEC 蛋白的基因的至少一个等位基因中具有突变，其中所述突变和人类受试者中的淋巴水肿相关，并且所述 LEC 蛋白不是 VEGFR-3；且

给药所述受试者一种组合物，所述组合物包含选自 VEGF-C 多肽，VEGF-D 多肽，VEGF-C 多核苷酸，或 VEGF-D 多核苷酸的淋巴管生长制剂。

17. 选自 VEGF-C 多肽，VEGF-D 多肽，VEGF-C 多核苷酸，或 VEGF-D 多核苷酸的淋巴管生长制剂在制备药物中的用途，所述药物用于治疗表 3 中鉴定的 LEC 基因突变造成的遗传性淋巴水肿，且所述基因不是 VEGFR-3。

18. 筛选内皮细胞疾病或患该疾病的倾向性的方法，包括：

从人类受试者获得含有内皮细胞 mRNA 样品；

根据样品中从所述基因转录的 mRNA 的量测定 BEC 或 LEC 基因的表达，其中所述 BEC 或 LEC 基因编码表 3 或 4 中鉴定的多肽。

19. 监测药物对内皮细胞的效力或毒性的方法，包括以下步骤：

将药物给药受试动物前后，测定受试哺乳动物内皮细胞中至少一种 BEC 或 LEC 基因的表达，其中至少一种 BEC 或 LEC 基因编码表 3 中所述的多肽，并且其中 BEC 或 LEC 基因的表达的改变与药物对内皮细胞的效力或毒性相关。

20. 鉴定调节内皮细胞的生长的化合物的方法，包括：

在存在或缺乏化合物的条件下培养内皮细胞；

- 测定细胞中至少一种 BEC 或 LEC 基因的表达，其中的 BEC 或 LEC 基因选自编码表 3 和 4 中的多肽的基因；与缺乏该化合物的情况相比，存在该化合物时至少一种 BEC 基因的表达改变表明该化合物是 BEC 生长的调节物；且与缺乏该化合物的情况相比，存在该化合物时至少一种 LEC 基因的表达改变表明该化合物是 LEC 生长的调节物。

21. 权利要求 20 的筛选选择性调节 BEC 或 LEC 的生长或分化的化合物的方法，

- 其中所述测定步骤包含测定细胞内至少一种 BEC 基因和至少一种 LEC 基因的表达，和

所述方法包含通过筛选差异调节至少一种 BEC 基因的表达和至少一种 LEC 基因的表达的化合物，筛选选择性地调节 BEC 或 LEC 的生长或分化的化合物。

22. 一种组合物，包含：

一种分离的多核苷酸，包含编码含有选自 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 81, 187, 207, 211, 221, 235, 241, 293, 或 391 的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列；和

可药用的稀释剂，载体或佐剂。

- 5 23. 权利要求 22 的组合物，包含含有选自 SEQ ID NO: 14-30, 45, 47, 49, 51, 82, 93, 111, 188, 208, 212, 222, 236, 242, 294, 或 392 的核苷酸序列的多核苷酸，或编码所述多肽的所述多核苷酸的片段。

24. 一种表达载体，包含与一种多核苷酸可操作地连接的表达控制序列，所述多核苷酸包含编码含有选自 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 81,
10 187, 207, 211, 221, 235, 241, 293 或 391 的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列。

25. 权利要求 24 的表达载体，是含有该多核苷酸的复制缺陷的腺病毒或腺伴随病毒载体。

26. 一种组合物，包含权利要求 24 或 25 的表达载体以及可药用的稀释剂，载体或佐剂。

- 15 27. 一种试剂盒，包含权利要求 22, 23 或 26 之一的组合物，所述组合物与将其给药受试哺乳动物来调节该受试动物的淋巴系统的说明包装在一起。

28. 使用权利要求 24 的表达载体转化或转染的宿主细胞。

29. 制备 LEC 多肽的方法，包括在细胞表达该多核苷酸编码的多肽的
20 条件下，使权利要求 28 的宿主细胞生长。

30. 纯化并分离的多肽，包含选自 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 81, 187, 207, 211, 221, 235, 241, 293 或 391 的氨基酸序列。

31. 纯化并分离的多肽，其包含的氨基酸序列选自以下序列：

- (a) SEQ ID NO: 31-34, 46, 48, 207, 676, 859 或 861；以及
25 (b) (a) 的氨基酸序列的至少 10 个氨基酸的细胞外区片段。

32. 权利要求 31 的纯化并分离的可溶性多肽，包含选自 SEQ ID NO: 31-34, 46, 48, 207, 676, 859 或 861 的氨基酸序列的胞外区片段，其中所述多肽缺乏任何跨膜区。

33. 权利要求 32 的多肽，所述多肽缺乏任何细胞内区。

- 30 34. 一种融合蛋白，包含权利要求 32 或 33 的多肽，所述多肽与包含免疫球蛋白恒定区的免疫球蛋白片段融合。

35. 一种组合物, 包含权利要求 30-34 之一的多肽或蛋白, 以及可药用的稀释剂, 载体或佐剂。

36. 一种试剂盒, 包含权利要求 35 的组合物, 以及将所述药物组合物给药受试哺乳动物以调节所述受试动物的淋巴系统的说明。

5 37. 一种抗体, 其与权利要求 30-34 之一的多肽特异性结合。

38. 权利要求 37 的抗体, 其是一种人化的抗体。

39. 一种蛋白质, 包含与权利要求 30-34 之一的多肽特异性结合的抗体的抗原结合区, 其中所述蛋白与该多肽特异性结合。

40. 鉴定 LEC 核酸的方法, 包括:

10 (a) 使含有候选 LEC 核酸的生物样品与一种多核苷酸或其互补序列在严格的杂交条件下接触, 所述多核苷酸包含 SEQ ID NO:1-30, 45, 47, 49, 51, 82, 93, 111, 188, 208, 212, 236, 242, 294 或 392 的序列的至少 14 个连续核苷酸的片段, 所述严格的杂交条件是:

15 (i) 42°C, 在含有 50%甲酰胺, 5xSSPE, 5x Denhardt's 溶液, 0.1% SDS 和 0.1 mg/ml 变性的鲑精 DNA 的溶液中杂交 20 小时, 和

 (ii) 5°C, 在 1xSSC, 0.1% SDS 中洗涤 30 分钟; 和

 (b) 检测所述候选 LEC 核酸和所述多核苷酸的杂交, 由此鉴定 LEC 核酸。

41. 鉴定 LEC 蛋白的方法, 包括:

20 (a) 使含有候选 LEC 蛋白的生物样品与权利要求 37 的抗体或权利要求 39 的蛋白之一的 LEC 蛋白结合配偶体在适合二者结合的条件下接触; 和

 (b) 检测所述候选 LEC 蛋白和所述 LEC 结合配偶体之间的结合, 从而鉴定 LEC。

42. 鉴定 LEC 的方法, 包括:

25 (a) 使含有细胞的生物样品和 LEC 结合配偶体在适宜两者结合的条件下接触, 其中所述 LEC 结合配偶体包含与一种多肽结合的抗体, 所述多肽含有 SEQ ID NO:31-34, 46, 48, 207, 676, 859 或 861 的序列, 或包含所述抗体的抗原结合片段; 和

30 (b) 通过检测细胞和所述 LEC 结合配偶体之间的结合鉴定 LEC, 其中 LEC 结合配偶体与细胞的结合鉴定 LEC。

43. 测定患遗传性淋巴水肿的危险性的方法, 包括:

(a) 检测人类受试者的核酸突变, 所述突变与遗传性淋巴水肿基因型相关, 并且与相应的野生型等位基因编码的多肽的氨基酸序列相比, 所述突变改变人类受试者的至少一种等位基因编码的氨基酸序列, 其中所述野生型多肽是表 3 中鉴定的多肽。

5 44. 测定患遗传性淋巴水肿的危险性的方法, 包括:

(a) 检测人类受试者的核酸中的突变, 所述突变与遗传性淋巴水肿基因型相关, 并且与相应的野生型等位基因编码的多肽的氨基酸序列相比, 所述突变改变人类受试者的至少一种等位基因编码的氨基酸序列, 其中所述野生型多肽包含选自 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 52, 54, 207, 676, 859 或
10 861 的氨基酸序列;

(b) 使核酸中的所述突变的存在或缺失与患遗传性淋巴水肿的危险性相关, 其中核酸中存在所述突变与患遗传性淋巴水肿的危险性增加相关, 并且核酸中缺乏所述的突变与患遗传性淋巴水肿的危险性不增加相关。

45. 测定患遗传性淋巴水肿的危险性的方法, 包括:

15 (a) 检测人类受试者的核酸的突变, 其中与野生型等位基因编码的转录因子多肽的转录调节活性相比, 所述突变改变了该人类受试者的至少一种转录因子的等位基因编码的氨基酸序列, 还改变该等位基因编码的转录因子多肽的转录调节活性,

其中所述野生型转录因子多肽包含 SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 211,
20 或 SEQ ID NO: 241 的氨基酸序列, 以及表 5 中的序列编码的转录因子; 和

(b) 使核酸中所述突变的存在或缺失与患遗传性淋巴水肿的危险性相关, 其中其中核酸中存在所述突变与患遗传性淋巴水肿的危险性增加相关, 并且核酸中缺乏所述的突变与患遗传性淋巴水肿的危险性不增加相关。

46. 权利要求 45 的方法, 其中所述野生型转录因子等位基因包含表
25 示为 SEQ ID NO:54 的 Sox18 氨基酸序列。

47. 权利要求 46 的方法, 其中与所述测定鉴定了改变反式激活或 Sox18 等位基因编码的蛋白的 DNA 结合区氨基酸序列的突变。

48. 权利要求 46 的方法, 其中与野生型 SOX18 对所述基因的转录活化相比, 所述突变减少 SOX18 应答型基因的转录活化。

30 49. 测定患遗传性淋巴水肿的危险性的方法, 包括:

(a) 检测人类受试者的核酸的突变, 其中与野生型等位基因编码的粘附多肽的结合亲和力相比, 所述突变改变了该人类受试者的至少一种转录因子的等位基因编码的氨基酸序列, 还改变了该 LEC 等位基因编码的粘附多肽的结合亲和力,

5 其中所述野生型粘附多肽包含选自 SEQ ID NO: 31-34, 46, 207, 676, 859 或 861 的氨基酸序列; 和

(b) 使核酸中所述突变的存在或缺失与患遗传性淋巴水肿的危险性相关, 其中核酸中存在所述突变与患遗传性淋巴水肿的危险性增加相关, 并且核酸中缺乏所述突变与患遗传性淋巴水肿的危险性不增加相关。

10 50. 权利要求 43-49 之一的方法, 其中所述测定鉴定了突变的存在, 并且所述相关步骤鉴定了所述病人患遗传性淋巴水肿的危险性增加。

51. 筛选人类受试者患遗传性淋巴水肿的危险性增加的方法, 包括测定人类受试者的核酸突变, 所述突变改变了该核酸编码的至少一种多肽的氨基酸序列, 所述多肽包含表 3 的氨基酸序列。

15 52. 权利要求 51 的方法, 其中所述多肽包含 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 和 54, 207, 676, 859, 和 861 之一的氨基酸序列, 并且与患遗传性淋巴水肿的危险性相关。

53. 权利要求 52 的方法, 其中所述多肽包含以 SEQ ID NO: 54 表示的 SOX18 氨基酸序列。

20 54. 权利要求 43-53 之一的方法, 其中所述方法包括以下步骤中的至少一步:

(a) 测定人类受试者的至少一种多核苷酸的至少一种密码子的核苷酸序列;

(b) 进行杂交试验以测定来自人类受试者的核酸具有的核苷酸序列与一种或多种对照序列相同还是不同;

(c) 进行多核苷酸迁移试验来测定来自人类受试者的核酸具有的核苷酸序列与一种或多种对照序列相同还是不同; 和

(d) 进行限制性核酸内切酶消化试验确定人类受试者的核酸具有的核苷酸序列与一种或多种对照序列相同还是不同。

55. 权利要求 43-53 之一的方法, 其中所述方法包括: 进行聚合酶链反应(PCR)来扩增包含所述 LEC 多核苷酸的编码序列的核酸, 并测定所扩增的核酸的核苷酸序列。

56. 筛选人类受试者的遗传性淋巴水肿基因型的方法, 包括:

5 (a) 提供包括来自所述人类受试者的核酸的生物样品; 和

(b) 分析所述核酸中突变的存在, 与编码选自 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 54, 207, 676, 859 或 861 的氨基酸序列的人类基因相比, 所述突变改变了人类受试者中至少一种基因的至少一种等位基因所编码的氨基酸序列, 其中人类受试者中存在的突变改变上述氨基酸序列的方式与人类受试者的淋巴水肿相关可鉴定遗传性淋巴水肿。

57. 权利要求 56 的方法, 其中所述生物样品是细胞样品。

58. 权利要求 56 的方法, 其中所述分析包括测定所述核酸的部分序列。

59. 权利要求 56 的方法, 其中所述人类受试者具有由筛选法所鉴定的遗传性淋巴水肿基因型。

60. 权利要求 49 的方法, 其中至少一种基因对应于编码 SEQ ID NO: 54 的氨基酸序列的人 Sox18 基因。

61. 抑制淋巴管生成的方法, 包括:

给药受试者 LEC 跨膜多肽的抑制物,

20 其中所述 LEC 跨膜多肽包含选自 SEQ ID NO: 31-34, 46 48, 207, 676, 859 或 861 的氨基酸序列, 而且

其中所述抑制物选自:

(a) LEC 跨膜多肽的可溶性细胞外区片段;

(b) 与 LEC 跨膜多肽胞外区结合的抗体;

25 (c) 一种多肽, 包含(b)的抗体的抗原结合区; 和

(d) 一种反义核酸, 与编码 LEC 跨膜多肽和其互补物的核酸互补。

62. 权利要求 61 的方法, 其中所述抑制物是包含 LEC 多肽的胞外区片段的多肽, 其中所述胞外区的序列选自 SEQ ID NO:31 的氨基酸 1-152, SEQ ID NO:32 的氨基酸 1-695 或 SEQ ID NO:33 的氨基酸 1-248。

30 63. 权利要求 61 或 62 的方法, 其中所述受试者是患有肿瘤的人。

64. 调节哺乳动物受试者的淋巴管生成的方法, 包括: 将 LEC 多核苷酸的反义分子以有效抑制 LEC 多核苷酸编码的多肽的转录或翻译的量, 给药需要调节淋巴管生成的受试哺乳动物, 其中所述 LEC 多核苷酸包含选自 SEQ ID NO: 14-30, 45, 47, 49, 51, 208, 677, 860 或 862 的核苷酸序列。
- 5 65. 治疗遗传性淋巴水肿的方法, 包括:
- (a) 鉴定患有遗传性淋巴水肿的人类受试者, 与包含 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 54, 207, 676, 859, 和 861 之一的氨基酸序列的多肽的氨基酸序列相比, 该人类受试者具有的突变改变了其至少一种多肽的氨基酸序列; 并且
- 10 (b) 将 VEGF-C 多核苷酸, VEGF-C 多肽, VEGF-D 多核苷酸或 VEGF-D 多肽的淋巴管生长因子给药所述受试者。
66. 调节内皮细胞或者内皮前体细胞的生长的方法, 包括将内皮细胞或内皮前体细胞与包含调节细胞内的 prox-1 转录调控的试剂接触, 其中所述试剂选自:
- 15 (a) prox-1 多肽;
- (b) 编码 prox-1 多肽的多核苷酸; 或
- (c) prox-1 的反义分子。
67. 权利要求 66 的方法, 其中所述细胞包括培养的内皮细胞或内皮前体细胞, 而且接触是离体进行的。
- 20 68. 权利要求 67 的方法, 其中所述接触包括将所述试剂加入培养基中。
69. 权利要求 66-68 之一的方法, 其中所述细胞包括内皮前体细胞。
70. 权利要求 66-69 之一的方法, 其中所述细胞在接触步骤之后被引入受试哺乳动物中。
- 25 71. 权利要求 70 的方法, 其中所述受试者是人。
72. 权利要求 71 的方法, 其中的人类受试者患有 LEC 疾病。
73. 提高人类受试者中的 LEC 的功能的方法, 包括:
- 从人类受试者中分离内皮细胞或内皮前体细胞;
- 用包含编码 prox-1 多肽的核苷酸序列的表达载体转化或转染所述内皮
- 30 细胞, 以促进 LEC 的分化或生长; 和
- 转化或转染步骤后, 将 LEC 细胞给予人类受试者。

74. 权利要求 73 的方法, 其中所述分离和给药步骤中的人类受试者相同。

75. 权利要求 73 或 74 的方法, 其中所述人类受试者患有淋巴水肿。

76. 权利要求 73-75 之一的方法, 其中所述载体和转化或转染方法被
5 选用于 prox-1 的瞬时表达。

77. 权利要求 73-75 之一的方法, 其中所述表达载体是复制缺陷的腺病毒载体。

78. 分离的多肽, 其包含的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸 61-127 具有至少 95% 的同一性。

10 79. 权利要求 78 的多肽, 其包含的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸 30-152 具有至少 95% 的同一性。

80. 一种可溶性多肽, 包含 SEQ ID NO: 31 中的氨基酸序列的片段, 其中所述片段缺乏 SEQ ID NO: 31 的跨膜和细胞内氨基酸。

81. 一种分离的多肽, 包含 SEQ ID NO: 32 的至少一个富含亮氨酸的
15 区。

82. 权利要求 81 的分离的多肽, 其中所述多肽缺乏 SEQ ID NO: 32 的跨膜氨基酸。

83. 一种分离的多肽, 包含 SEQ ID NO: 33 的至少一个富含亮氨酸的区。

20 84. 权利要求 81 的分离的多肽, 其中所述多肽缺乏 SEQ ID NO: 33 的跨膜氨基酸。

85. 一种分离的多肽, 其包含的氨基酸序列与包含 SEQ ID NO: 111 的氨基酸序列的多肽的片段具有至少 95% 的同一性,

其中所述片段包含至少一个血小板反应蛋白 I 型同上序列。

25 86. 权利要求 85 的分离的多肽, 其中所述片段包括 SEQ ID NO: 111 的六个血小板反应蛋白 I 型重复序列。

87. 一种分离的多肽, 其包含的氨基酸序列与包含 SEQ ID NO: 111 的氨基酸序列的多肽的片段具有至少 95% 的同一性,

其中所述片段包括至少一个免疫球蛋白 C-2 型结构域。

30 88. 权利要求 85 的分离的多肽, 其中所述片段包含 SEQ ID NO: 111 的三个免疫球蛋白 C-2 类型结构域序列。

-
89. 一种融合蛋白，包含权利要求 78-88 之一的多肽和一种异源性多肽。
90. 一种抗体，其特异性地与权利要求 78-88 之一的多肽结合。
91. 一种多核苷酸，其包含编码权利要求 78-89 之一的多肽的核苷酸
- 5 序列。
92. 包含权利要求 91 的多核苷酸的表达载体，其可操作地连接于表达控制序列。
93. 权利要求 92 的表达载体，其是复制缺陷的腺病毒载体。

淋巴管和血管的内皮细胞基因

技术领域

本发明涉及在淋巴管内皮细胞中特异性表达的多核苷酸和蛋白。

5 背景技术

近来关于淋巴血管生长因子(lymphangiogenic growth factors)和癌症的淋巴管内生长和转移 (Mandriota 等, EMBO J. 20:672-682 (2001); Skobe,等, Nat. Med. 7:192-198 (2001); Stacker,等, Nat. Med. 7:186-191 (2001); Karpanen 等, Cancer Res. 61:1786-1790 (2001))的联系的证据表明, 淋巴管可用作肿瘤治疗的又一个靶点。癌细胞通过直接侵入周围组织, 扩散到体腔, 侵入血管系统(血管源性转移)在体内扩散, 也通过淋巴系统扩散(淋巴转移)。局部淋巴结播散是多种常见癌症转移的第一步, 并且和疾病的预后高度相关。参与从肿瘤区引流组织液的淋巴结称为哨兵淋巴结(sentinel nodes), 在适当的位置上通过诊断发现这些淋巴结, 并在疑有癌细胞转移的情况下, 则去
15 除它们。然而, 虽然其与临床相关(relevance), 对于导致通过血流或通过淋巴系统转移的机制却知之甚少。

直到最近, 尽管淋巴管在医学上很重要, 它们受到的重视远小于血管。淋巴管从大多数组织的组织间隙收集富含蛋白质的液体和白细胞, 并将它们作为淋巴这种白色不透明的液体运输到血液循环。小淋巴管汇合成较大的淋巴管, 将淋巴液通过胸导管引流到颈部的大静脉。淋巴结是沿淋巴管分布的过滤站, 收集淋巴管(collecting lymphatic vessels)周围的平滑肌收缩和身体的运动(bodily movements)驱动淋巴的运动, 流动的方向由静脉内的瓣膜控制, 就像在静脉中一样。淋巴毛细管内覆内皮细胞, 它们之间具有很多大的内皮间隙并有明显的接点。淋巴毛细管还缺乏连续的基底膜, 而且
20 没有周细胞。锚丝(Anchoring filaments)连接淋巴管内皮细胞的近腔表面和血管周围的细胞外基质, 并在组织水肿时锚丝牵引内皮细胞以保持淋巴管的开放。淋巴管缺乏或堵塞通常由感染, 外科手术或放疗造成, 极少数情况下由遗传缺陷造成, 使得蛋白富集液在组织中聚集, 即淋巴水肿。淋巴系统对于肠脂肪吸收和免疫应答也很重要。细菌, 病毒和其他外来物质被淋

巴管吸收并运送到淋巴结，在淋巴结中，外来物质被呈递给免疫细胞，而树突细胞则在此借由淋巴来穿行。对操纵淋巴管的理解和能力进展缓慢。

淋巴管内皮细胞的发育或功能异常可导致淋巴管肿瘤或畸形，例如淋巴管瘤或淋巴管扩张。Witte 等, Regulation of Angiogenesis (eds. Goldber, I.D. & Rosen, E.M.) 65-112 (Birkäuser, Basel, Switzerland, 1997)。VEGFR-3 酪氨酸激酶受体在正常淋巴内皮中表达，并在多种类型的血管肿瘤中发生上调，包括卡波奇肉瘤(Kaposi's sarcomas)。Jussila 等, Cancer Res 58, 1955-1604 (1998); Partanen,等, Cancer 86:2406-2412 (1999)。由感染，手术，放射治疗或遗传缺陷造成的淋巴管缺失或功能障碍导致淋巴水肿，其特征是富含蛋白的液体在该组织中的慢性累积，从而导致肿胀。VEGFR-3 信号对淋巴管生成的重要性在家族性淋巴水肿的遗传学中得到了揭示，所述疾病的特征是皮肤淋巴管发育不全，导致外貌变丑和肢体肿胀致残。Witte,等, Regulation of Angiogenesis (eds. Goldber, I.D. & Rosen, E.M.) 65-112 (Birkäuser, Basel, Switzerland, 1997); Rockson, S.G, Am. J. Med. 110, 288-295 (2001)。一些患有淋巴水肿的家族成员是编码酪氨酸激酶结构域的 VEGFR3 外显子的错义突变杂合子，这种突变导致受体蛋白失活。Karkkainen,等, Nature Genet. 25:153-159 (2000); Irrthum,等, Am. J. Hum. Genet. 67:295-301 (2000)。

本领域需要关于控制内皮细胞多样性的转录程序的信息，以及血管生成和淋巴管生成的机制的信息。本领域还需要新的血管标志物，所述标志物可用作研究包括肿瘤转移在内的多种涉及淋巴管的疾病的有价值的靶点。

发明内容

本发明的组合物包括分离的多核苷酸，具体为淋巴管内皮细胞基因，多肽，这些多核苷酸编码的分离的多肽，重组 DNA 分子，克隆的基因或其简并变体，尤其是天然存在的变体例如等位基因变体，以及特异性识别一种或多种存在于所述多肽上的表位的抗体。

本发明的组合物还包括含有本发明的多核苷酸的载体(包括表达载体)，经遗传改造含有这种多核苷酸的细胞，和经遗传改造表达这种多核苷酸的细胞。

在选定的实施方案中，本发明这种分离的多核苷酸包含序列表中所述的多核苷酸序列，例如 SEQ ID NO:1-30 之一。

本发明的多核苷酸还包括，但不限于，与 SEQ ID NO:1-30 的核苷酸序列的互补序列在高度严格的条件下杂交的多核苷酸；与 SEQ ID NO:1-30 的核苷酸序列的互补序列在中等严格的条件下杂交的多核苷酸；上述任一种多核苷酸的等位基因变体多核苷酸；编码上述任一种蛋白的种同源物 (species homologue) 的多核苷酸；编码包含 SEQ ID NO:1-30 之一编码的多肽的特定结构域或截短部分(truncation)的多肽的多核苷酸。示例性的高度严格的杂交条件是在 42℃，含有 50% 甲酰胺, 5xSSPE, 5x Denhardt's 溶液, 0.1% SDS 和 0.1 mg/ml 变性的鲑精 DNA 的溶液中杂交 20 小时，然后用 1xSSC, 0.1% SDS 在 65℃ 洗涤 30 分钟。

本发明的另一方面涉及 LEC 和 BEC 多肽，包括上述多核苷酸编码的多肽。在一些实施方案中，所述多肽是本发明多肽的成熟形式。特别是经纯化并分离的多肽，所述多肽包含 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 81, 187, 207, 211, 221, 235, 241, 293, 和 391 之一的氨基酸序列；以及经纯化并分离的多肽，所述多肽包含选自以下序列的氨基酸序列：(a) SEQ ID NOs: 31-34, 46, 48, 207, 676, 859, 和 861；和(b) (a)中的氨基酸序列的包括至少 10 个氨基酸的胞外区片段。此外，本发明还包括上述纯化并分离的可溶性多肽，所述多肽包含 SEQ ID NO: 31-34, 46, 48, 207, 676, 859, 和 861 之一的氨基酸序列的胞外区片段，其中所述多肽缺乏任何跨膜区。这种多肽还缺乏任何细胞内区。本发明还涉及融合蛋白，所述蛋白包含与有含免疫球蛋白恒定区的免疫球蛋白片段融合的上述多肽。

相关地，本发明还提供了一种组合物，所述组合物包含上述的多肽或蛋白，以及可药用的稀释剂，载体或佐剂。本发明的多肽组合物可包含可接受的载体，如亲水的载体例如可药用的载体。还提供了包含这样一种组合物的试剂盒，以及给药受试哺乳动物所述药物组合物来调节受试动物体内的淋巴系统的方案。本发明还提供了特异性结合上述多肽的抗体，在一些实施方案中所述抗体是人源化的。本发明还提供了包含特异性结合上述多肽的抗体的抗原结合区的蛋白，其中所述蛋白与所述多肽特异性结合。

本发明还涉及制备多肽的方法，包括在适宜的培养基中，使本发明的细胞培养物生长，并纯化来自培养物或细胞提取物的蛋白。具体地，本发明涉及制备 LEC 多肽的方法，包括使得用本文所述的表达载体转化或转染的宿主细胞生长，其中生长的条件使所述细胞表达所述多核苷酸编码的多肽。

本发明还提供了鉴定本文的产物和组合物的方法。具体地，本发明提供了鉴定 LEC 核酸的方法，包括：(a)使含有候选 LEC 核酸的生物样品和多核苷酸或其互补体在严格的杂交条件下接触，所述多核苷酸包含：SEQ ID NO:1-30, 45, 47, 49, 51, 82, 93, 111, 188, 208, 212, 236, 242, 294, 和 392 之一的至少 14 个连续核苷酸的片段，所述杂交条件为：(i) 42℃，在含有 50% 甲酰胺, 5xSSPE, 5x Denhardt's 溶液, 0.1% SDS 和 0.1 mg/ml 变性的鲑精 DNA 的溶液中杂交 20 小时，和(ii) 65℃，1xSSC, 0.1% SDS 中洗涤 30 分钟；和(b)检测候选 LEC 核酸和该多核苷酸的杂交，由此鉴定 LEC 核酸。

本发明还提供了鉴定 LEC 蛋白的方法，包括 (a) 使含有候选 LEC 蛋白的生物样品和选自本文所述抗体或本文所述蛋白或多肽的 LEC 蛋白结合配偶体在适宜二者结合的条件下接触；和(b)检测候选 LEC 蛋白和 LEC 结合配偶体之间的结合，由此鉴定 LEC 蛋白。

本发明还涉及鉴定 LEC 的方法，包括 (a) 使包含细胞的生物样品和 LEC 结合配偶体在适宜两者结合的条件下接触，其中的 LEC 结合配偶体包含与多肽结合的抗体或该抗体的抗原结合片段，所述多肽包含 SEQ ID NO:31-34, 46, 48, 207, 676, 859, 和 861 之一；和(b)通过检测细胞和 LEC 结合配偶体之间的结合鉴定 LEC，其中 LEC 结合配偶体与细胞的结合可鉴定 LEC。

本发明的多核苷酸在分子生物学领域的熟练技术人员已知的多种技术中有多种应用。这些技术包括用作杂交探针，作为 PCR 的引物，用于染色体和基因作图，用于重组制备蛋白，和用于产生反义 DNA 或 RNA、其化学类似物等诸如此类。例如，mRNA 的表达主要限于特定的细胞或组织类型例如淋巴管内皮细胞时，本发明的多核苷酸可用作杂交探针，使用例如原位杂交法检测样品中特定细胞或组织 mRNA 的存在。

另一方面，本发明提供了一种包含分离的多核苷酸的组合物，所述多核苷酸包含编码包含 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 81, 187, 207, 211, 221, 235, 241, 293, 和 391 之一的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列；以及可药用的稀释剂，载体或佐剂。在一些实施方案中，所述组合物包含编码该多肽的多核苷酸或其片段，所述多核苷酸包括 SEQ ID NO: 14-30, 45, 47, 49, 51, 82, 93, 111, 188, 208, 212, 222, 236, 242, 294, 和 392 之一的核苷酸序列。

本发明还提供了包含表达控制序列的表达载体，所述序列与包含编码包含 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 81, 187, 207, 211, 221, 235, 241, 293, 和 391 之一的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列可操作地连接。在一些实施方案中，所述表达载体是含所述多核苷酸的复制缺陷的腺病毒或腺伴随病毒载体。本发明另一方面涉及包含上述表达载体和可药用的稀释剂，载体或佐剂的组合物。此外，本发明提供了包含组合物的试剂盒，所述组合物包含上述多核苷酸或载体以及可药用的稀释剂，载体或佐剂，其包装内还有将该组合物给药受试哺乳动物以调节受试动物的淋巴系统的方案。

本发明还提供了由上述表达载体转化或转染的宿主细胞。

本发明的多肽可用于多种传统方法和目前用于其它蛋白的方法中。此外，本发明的多肽还可用于产生特异性结合该多肽的抗体。

本发明还提供了差异调节血管内皮细胞(BEC)或淋巴管内皮细胞(LEC)的生长和分化的方法，包括使内皮细胞和包含差异调节血或淋巴管内皮细胞的试剂的组合物接触，所述试剂选自：(a) 包含 BEC 多肽或 LEC 多肽的氨基酸序列的多肽，或该多肽的活性片段；(b) 包含编码(a)的多肽的核苷酸序列的多核苷酸；(c) 特异性结合(a)的多肽的抗体；(d) 包含(c)的抗体的片段的多肽，其中所述片段和抗体与所述多肽结合；(e)编码(a)的多肽的人基因或 mRNA 的反义核酸；(f)编码(a)的多肽的人基因或 mRNA 的干扰 RNA (RNAi)。所述方法包括使内皮细胞与所述组合物在活体外或活体内接触。所述组合物可包含可药用的稀释剂，佐剂或载体，而且所述接触步骤包括将所述组合物给药受试哺乳动物从而差异调节受试哺乳动物的 BEC 或 LEC。

此外，所述方法包括鉴定患有以 LEC 过度增生为特征的疾病的人类受试者；给药所述人类受试者该组合物，其中的试剂差异性抑制 LEC 的生长和 BEC 的生长；可选地该方法可包括鉴定患有以 LEC 过度增生为特征的疾

病的人类受试者；筛选受试者的 LEC 以便鉴定表 3 中的多肽的过度表达；将该组合物给药该人类受试者，其中所述试剂通过抑制筛选步骤鉴定的多肽的表达，差异抑制 LEC 的生长和 BEC 的生长。

本发明还涉及调节人类受试者的淋巴管内皮细胞的生长的方法，包括以下步骤：鉴定患有增生性淋巴疾病的人类受试者，筛查受试者鉴定表 3 所示 LEC 多肽的过低表达或过低活性，其中所述蛋白不在表 1 或 2 中；将所述组合物给药所述人类受试者，其中所述试剂包括筛选步骤所鉴定的 LEC 多肽(a)或该多肽的活性片段，或包括包含编码该多肽的核苷酸序列的多核苷酸(b)。

10 本发明的另一方面涉及使用一种试剂制备用于差异调节血管内皮细胞(BEC)或淋巴管内皮细胞(LEC)的生长或分化的药物，所述试剂选自：(a) 包含 BEC 多肽或 LEC 多肽的氨基酸序列的多肽，或该多肽的活性片段；(b) 包含编码多肽(a)的核苷酸序列；(c) 特异性结合多肽(a)的抗体；(d) 包含(c)的抗体的片段的多肽，其中所述片段和抗体与该多肽结合；(e) 编码多肽(a)的人基因或 mRNA 的反义核酸；(f) 编码多肽(a)的人基因或 mRNA 的干扰 RNA (RNAi)。

本发明另一方面提供了调节内皮细胞生长的化合物的鉴定方法，包括以下步骤：在存在或缺失一种化合物的条件下培养内皮细胞；测定细胞内 BEC 或 LEC 基因的至少一种的表达，其中 BEC 或 LEC 基因选自编码表 3 和 4 中的多肽的基因，其中存在所述化合物相比于缺失所述化合物时至少一种 BEC 基因的表达改变表明该化合物是 BEC 生长的调节物，且其中存在所述化合物相比于缺失所述化合物时至少一种 LEC 基因的表达改变表明该化合物是 LEC 生长的调节物。所述方法可用于筛选选择性调节 BEC 或 LEC 生长或分化的化合物，其中测定步骤包括测定细胞中至少一种 BEC 基因和至少一种 LEC 基因的表达，且其中所述方法包括通过筛选差异调节至少一种 BEC 基因的表达相比于至少一种 LEC 基因的表达的化合物，筛选出可选择性调节 BEC 或 LEC 生长或分化的化合物。

此外，本发明涉及本发明上述方面的方法或用途，其中所述多肽是表 3 中的 LEC 多肽，以及差异调节 LEC 生长或分化相比于 BEC 生长或分化的试剂。在一些实施方案中，所述 LEC 多肽包括 SEQ ID NO: 81, 187, 207, 211,

221, 235, 241, 293,和 391 之一的氨基酸序列;在另外的实施方案中,所述 LEC 多肽包括 SEQ ID NO: 31-34, 46 和 48 之一的氨基酸序列。在这些实施方案中,试剂可以是特异性结合上述 LEC 多肽的抗体,或者这种抗体的多肽片段。此外,该试剂可以是上述多肽的胞外区,或编码胞外区的多核苷酸,或者反义分子或核酸。可选地,所述多肽是表 4 中的 BEC 多肽,且该试剂差异调节 BEC 生长分化相比于 LEC 生长和分化。优选,所述多肽不在表 1 或 2 中。

本发明的方法还涉及检测样品中本发明的多核苷酸或多肽存在的方法。这种方法可例如,被用作上述疾病的预后和诊断评估的一部分,以及鉴定显示易患有所述疾病的受试者。此外,本发明还提供了在用于治疗与淋巴管内皮细胞有关的疾病的临床实验中评估药物有效性,监控病人的病情进展的方法。

本发明还提供了鉴定调节本发明的多核苷酸和/或多肽的表达的化合物。所述方法可用于例如,鉴定可缓解与上述 SEQ ID NO:1-30 之一的蛋白表达有关的疾病的症状的化合物。这种方法包括,但不限于,用于鉴定与本发明的多肽反应(例如结合)的化合物或其他物质的分析试验。

此外,本发明提供了测定患遗传性淋巴水肿的危险性的方法,所述方法包括 (a) 测定人类受试者中与遗传性淋巴水肿基因型相关的核酸突变,而且与相应的野生型等位基因所编码的多肽的氨基酸序列相比,所述突变改变该人类受试者的至少一种等位基因编码的氨基酸序列,其中所述野生型多肽是表 3 中鉴定的多肽。可选地,测定患遗传性淋巴水肿的危险性的方法,包括 (a) 测定人类受试者中与遗传性淋巴水肿基因型相关的核酸突变,而且与相应的野生型等位基因所编码的多肽的氨基酸序列相比,所述突变改变该人类受试者的至少一种等位基因编码的氨基酸序列,其中所述野生型多肽包含 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 52, 54, 207, 676, 859, 和 861 之一的氨基酸序列; (b) 使核酸中突变的存在或缺失与患遗传性淋巴水肿的危险性相关,其中核酸中所述突变的存在与患遗传性淋巴水肿的危险性相关,且核酸中所述突变缺失与患遗传性淋巴水肿的危险性不增加相关。

测定患淋巴水肿的危险性的另一种方法包括以下步骤: (a) 测定人类受试者的核酸的突变,所述突变改变了人类受试者的至少一种转录因子等位

基因编码的氨基酸序列，并且与野生型等位基因编码的转录因子多肽的转录调节活性相比，所述突变改变了该等位基因编码的转录因子多肽的转录调节活性，其中所述野生型转录因子多肽包含 SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 241 之一的氨基酸序列，和表 5 中的序列编码的转录因子；

5 和(b) 使核酸中所述突变的存在或缺失和发生遗传性淋巴水肿的危险性相关联，其中核酸中存在所述突变和患淋巴水肿危险性增加相关，而核酸中缺失所述突变和患遗传性淋巴水肿危险性不增加相关。在该方法中，所述野生型转录因子等位基因可包含表述为 SEQ ID NO:54 的 Sox18 氨基酸序列。在本方法的一些实施方案中，所述分析鉴定了改变 Sox18 等位基因编码的蛋白的反式激活区或 DNA 结合区的氨基酸序列的突变；在本方法的另

10 一些实施方案中，与野生型 SOX18 对相应基因的转录活化相比，所述突变降低了 SOX18 反应型基因的转录活化。

本发明另一方面提供了测定患遗传性淋巴水肿的危险性的方法，包括(a) 测定人类受试者的核酸中的突变，其中与野生型等位基因编码的野生型粘附多肽相比，所述突变改变至少一种 LEC 基因的等位基因编码的氨基酸序列，并改变该 LEC 基因等位基因编码的粘附多肽的结合亲和力，其中所述野生型粘附多肽包含 SEQ ID NO:31-34, 46, 207, 676, 859, 和 861 之一的氨基酸序列；和(b) 使核酸中存在或缺失所述突变和患遗传性淋巴水肿的危险性相关联，其中核酸中存在所述突变和出现淋巴水肿的危险性增加相关联，

15 而核酸中缺失所述突变和患遗传性淋巴水肿的危险性不增加相关联。在本方法的一些实施方案中，至少一种基因相应于编码 SEQ ID NO: 54 所述的氨基酸序列的人 Sox18 基因。

在测定出现本发明的遗传性淋巴水肿的方法中，所述测定可确定突变的存在，并且关联性步骤可确定病人患遗传性淋巴水肿的危险性的增加。

25 本发明还涉及筛选患遗传性淋巴水肿的危险性增加的人类受试者的方法，包括测定人类受试者的核酸中的突变，所述突变改变了所述核酸编码的至少一种包含表 3 中氨基酸序列的多肽的氨基酸序列。在本发明的一些实施方案中，所述多肽包 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 54, 207, 676, 859, 以及 861 之一的氨基酸序列，并与患遗传性淋巴水肿的危险性相关联，而

30 且特别涉及包含 SEQ ID NO: 54 的 SOX18 氨基酸序列的多肽。

本发明的另一方面涉及测定或筛选出现上述遗传性淋巴水肿的危险性的方法，其中该方法包括以下步骤的至少一步：(a)测定人类受试者的至少一种多核苷酸的至少一个密码子的核苷酸序列；(b) 进行杂交试验以便测定所述人类受体的核酸具有的核苷酸序列和一种或多种对照序列相同还是不同；(c)进行多核苷酸迁移(migration)试验，确定人类受试者的核酸具有的核苷酸序列和一种或多种对照序列相同还是不同；(d) 使用限制性内切酶进行消化，确定人类受试者的核酸具有的核苷酸序列和一种或多种对照序列相同还是不同。

本发明的另一方面提供了测定或筛选出现上述遗传性淋巴水肿的危险性，其中所述方法包括：进行聚合酶链反应(PCR)以便扩增包含 LEC 多核苷酸编码序列的核酸，并测定所扩增核酸的核苷酸序列。

本发明还提供了筛选人类受试者中的遗传性淋巴水肿基因型的方法，包括(a)提供包含来自所述受试者的核酸的生物样品，和(b)分析所述核酸中存在的突变，与编码 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 54, 207, 676, 859, 和 861 之一的氨基酸序列的人类基因相比，所述突变改变了人类受试者中的至少一种基因的至少一种等位基因所编码的氨基酸序列，其中当所述突变改变人受试者中编码的氨基酸序列，且这种改变与人类受试者中的淋巴水肿相关时，这种突变的存在指示了遗传性淋巴水肿基因型。在本方法的一些实施方案中，所述生物样品是细胞样品。在本方法的另一些实施方案中，所述分析包括测定所述核酸的一部分的序列。本发明的另一些实施方案中，所述人类受试者通过筛选方法被鉴定为具有遗传性淋巴水肿基因型。

本发明另一方面提供了抑制淋巴管生成的方法，包括给药受试者 LEC 跨膜多肽的抑制物，其中所述 LEC 跨膜多肽包括 SEQ ID NO: 31-34, 46 48, 207, 676, 859, 和 861 之一的氨基酸序列，且其中所述抑制物选自：(a) LEC 跨膜多肽的可溶性细胞外区片段；(b) 与所述 LEC 跨膜多肽的胞外区结合的抗体；(c) 包含(b)的抗体的抗原结合区的多肽；和(d) 与编码该 LEC 跨膜多肽的核酸或其互补链互补的反义核酸。在本方法一些实施方案中，所述抑制物是包含 LEC 多肽的胞外区片段的多肽，其中胞外区序列选自以下序列：SEQ ID NO:31 的氨基酸 1-152, SEQ ID NO:32 的氨基酸 1-695 和 SEQ ID

NO:33 的氨基酸 1-248。在本方法的一些实施方案中,所述受试者是患有肿瘤的人。

本发明还提供了调节受试哺乳动物的淋巴管生成的方法,包括:将 LEC 多核苷酸的反义分子给药需要调节淋巴管生成的受试哺乳动物,其量可有效抑制 LEC 多核苷酸编码的多肽的转录或翻译,其中所述 LEC 多核苷酸包含选自 SEQ ID NO: 14-30, 45, 47, 49, 51, 208, 677, 860, 和 862 之一的核苷酸序列。

本发明的方法还包括治疗上述与淋巴管内皮细胞相关的疾病的方法,包括将该化合物给药显示与所述疾病相关的症状或有患该病趋势的个体。

10 本发明另一方面提供了治疗遗传性淋巴水肿的方法,包括:(a) 鉴定患有遗传性淋巴水肿的人类受试者,而且与包含 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 54, 207, 676, 859, 和 861 之一的氨基酸序列的多肽的氨基酸序列相比,所述人类受试者具有的突变改变了所编码的至少一种多肽的氨基酸序列;和(b)将淋巴管生长因子给药所述受试者,所述淋巴管生长因子选自:
15 VEGF-C 多核苷酸, VEGF-C 多肽, VEGF-D 多核苷酸, 和 VEGF-D 多肽。

本发明还提供了治疗遗传性淋巴水肿的方法,包括:鉴定患有淋巴水肿的人类受试者,所述人类受试者中编码表 3 所示 LEC 蛋白的基因的至少一种等位基因具有突变,所述突变与人类受试者中的淋巴水肿相关;且其中 LEC 蛋白不是 VEGFR-3;以及将一种包含淋巴管生长试剂的组合物给药
20 受试者,所述试剂选自: VEGF-C 多肽, VEGF-D 多肽, VEGF-C 多核苷酸, 和 VEGF-D 多核苷酸。本发明还涉及利用选自 VEGF-C 多肽, VEGF-D 多肽, VEGF-C 多核苷酸, 和 VEGF-D 多核苷酸的淋巴管生长试剂制备用于治疗遗传性淋巴水肿的药物的用途,其中遗传性淋巴水肿由表 3 中鉴定的 LEC 基因的突变造成,且其中的基因不是 VEGFR-3。

25 此外,本发明涉及通过给药调节靶基因产物的总体活性的化合物和其它物质治疗这种疾病或病症的方法。化合物和其它物质可在靶基因表达或靶蛋白活性的水平上起所述调节作用。这些治疗方法包括:将本发明的多肽或多核苷酸给药内皮细胞,例如 LEC 和/或 BEC,或例如人类病人等有机体。本发明的示例性方法是给药以下治疗剂之一:能够调节本发明的至少
30 一种多核苷酸的表达的反义多核苷酸,本发明的多肽,本发明的多核苷酸,

特异性识别本发明的多肽的抗体或抗体片段, VEGF-C 多核苷酸, VEGF-C 多肽, VEGF-D 多核苷酸, VEGF-D 多肽和可溶性 VEGFR-3 多肽。

本发明另一方面提供了筛选内皮细胞疾病或患有该疾病的倾向性的方法, 包括从人类受试者获得包含内皮细胞 mRNA 的生物样品; 根据样品中
5 由该基因转录的 mRNA 的量测定 BEC 或 LEC 基因的表达, 其中 BEC 或 LEC 基因编码表 3 或 4 中鉴定的多肽。

本发明涉及抑制淋巴管内皮细胞生长的方法, 所述方法包括使细胞和组合物接触, 所述组合物包含至少一种与能够抑制生长的试剂偶联的抗体, 其中所述试剂选自细胞毒性剂和细胞生长抑制剂, 其中所述抗体特异性结
10 合由一种多核苷酸编码的多肽, 其包含 SEQ ID NO:14-17, 45, 47, 860 和 862 之一的序列。本发明的一个具体实施方案中, 所述多肽包含 SEQ ID NO:31-34, 46, 48, 859 和 861 之一的氨基酸序列。

本发明还涉及检测淋巴管内皮细胞的方法, 所述方法包括将细胞和一种组合物接触, 所述组合物包含至少一种与可检测的试剂, 例如荧光分子
15 或放射标记的分子偶联的抗体。在具体的实施方案中, 所述抗体特异性结合包含 SEQ ID NO: 14-17, 45, 47, 860 和 862 之一的序列的多核苷酸编码的多肽。本方法更具体的实施方案中, 所述多肽包含 SEQ ID NO: 31-34, 46, 48, 859 和 861 之一的氨基酸序列。

本发明还涉及分离淋巴管内皮细胞的方法, 其包括将所述细胞域固体
20 基质接触, 所述基质含有至少一种能够和细胞的细胞膜中的跨膜蛋白结合的抗体, 并分离与该抗体基质特异性结合的细胞。在具体的实施方案中, 所述抗体与包含 SEQ ID NO: 14-17, 45, 47, 860 和 862 之一的序列的多核苷酸编码的多肽特异性结合。本方法更具体的实施方案中, 所述多肽包含 SEQ ID NO: 31-34, 46, 48, 859 和 861 之一的氨基酸序列。

25 本发明还涉及将激动剂或拮抗剂给药淋巴管内皮细胞, 包括选择能够特异性结合淋巴管内皮细胞特异蛋白的抗体, 肽或小分子量化合物, 其中的抗体, 肽或小分子量的化合物是生长因子受体, 细胞因子受体, 趋化因子受体, 或造血因子受体的激动剂或拮抗剂, 并将所述抗体, 肽或小分子量的化合物和需要生长刺激或抑制的淋巴管内皮细胞接触。在具体的实施方案
30 案中, 这种淋巴管内皮细胞与淋巴水肿, 淋巴管瘤, 淋巴管骨髓瘤

(lymphangiomyeloma), 淋巴管肌瘤病(lymphangiomatosis), 淋巴管扩张(lymphangiectasis), 淋巴管肉瘤(lymphosarcoma)和淋巴管硬化(lymphangiosclerosis)有关。

5 本发明还涉及将细胞毒性或细胞生长抑制性药物给予淋巴管内皮细胞, 包括筛选能够特异性结合淋巴管内皮细胞特异性蛋白的抗体, 肽或小分子量化合物, 其中所述抗体, 肽或小分子化合物与细胞毒性或细胞生长抑制性的药物结合。在具体的实施方案中, 所述复合物给药可用于治疗易于转移到淋巴系统的恶性肿瘤疾病。

10 本发明还提供了监测药物对内皮细胞的效力或毒性的方法, 包括测定给药前后受试哺乳动物内皮细胞的至少一种 BEC 或 LEC 基因的表达, 其中所述至少一种 BEC 或 LEC 基因编码表 3 或 4 中所述的多肽, 并且其中 BEC 或 LEC 基因的表达的改变和药物对内皮细胞的效力或毒性有关。

15 所述发明涉及淋巴管内皮细胞标记蛋白, 所述蛋白包含 SEQ ID NO:14-17 之一的多核苷酸; 和在严格条件下与 SEQ ID NO:14-17 之一杂交的多核苷酸编码的多肽。在具体的实施方案中, 所述淋巴管内皮细胞标记蛋白包含 SEQ ID NO:31-34 之一的多肽。

本发明还涉及能够特异性结合淋巴管内皮细胞标记蛋白的抗体, 所述标记蛋白包含 SEQ ID NO:31-34 之一的多肽。

20 本发明还涉及检测淋巴管内皮细胞的方法, 包括使所述细胞和抗体接触, 其中所述抗体具有可检测的标记。

本发明还涉及抑制淋巴管内皮细胞的至少一种生物活性的方法, 包括使细胞和能够与至少一种由 SEQ ID NO:14-17, 45, 47, 860 和 862 之一编码的多肽结合的试剂接触, 其中所述多肽与没有和该试剂接触的多肽相比, 活性被降低。

25 本发明还涉及抑制淋巴管内皮细胞生长的方法, 所述方法包括将所述细胞和一种反义寡核苷酸接触, 所述反义寡核苷酸能够特异性结合至少 SEQ ID NO:1-30, 45, 47, 860 和 862 之一的多核苷酸。在具体的实施方案中, 所述反义寡核苷酸主要由 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 860 和 862 之一的约 12 到约 25 个连续的核苷酸组成。

根据本申请的全文内容, 本发明的其它特征和变化对于本领域熟练技术人员是显而易见的, 并且所有这些特征都意图作为本发明的内容。

附图说明

5 图 1: LEC 和 BEC 中差异表达的基因的实例。其转录子的 Northern 印迹和杂交。通过使用 GAPDH 测证明加样量相等。在微阵列分析时, 从 LEC 中提取 RNA, 并在 VEGF-C 存在的条件下培养(LEC/+C)。验证微阵列结果时, 也从没有加入 VEGF-C 的 LEC 培养物(LEC/-C)中提取 RNA 作为对照。

图 2: BEC 和 LEC 中表达的细胞骨架结构, 钙粘着蛋白复合物和整联蛋白 $\alpha 9$ 。对 LEC 和 BEC 的混合培养物进行双染, 显示 N-钙粘着蛋白 (a),
10 VE-钙粘着蛋白 (c), β -连环蛋白 (e), 片珠蛋白(plakoglobin) (g), F-肌动蛋白 (i)和整联蛋白 $\alpha 9$ (k), 以及 LEC 特异的标记物 podoplanin (绿; b, d, f, h, j, l)。整联蛋白 $\alpha 9$ 在淋巴管内皮中表达(arrow)但不在血管内皮中表达楔形 (arrowhead)。人皮肤的连续切片使用整联蛋白 $\alpha 9$ (m), VEGFR-3 (n)或血管
15 内皮抗原 PAL-E (o)的抗体染色。

发明详述

淋巴管系统的一个主要作用是去除丛血毛细血管中不断渗出的过量的富含蛋白的间质液体, 并将其引流回血液循环(Witte, M.H., 等, Microsc. Res.
20 Tech. 55:122-145. 2001; Karpanen, T., 等, J. Exp. Med. 194:F37-F42. 2001; Karkkainen, M.J., 等, Trends Mol. Med. 7:18-22. 2001)。此外, 所述淋巴系统通过淋巴结链过滤淋巴液及其抗原, 提供了持续的免疫监视, 并且是从肠道吸收脂类的主要途径之一。长期以来已知多种类型的癌症中, 淋巴管提供了肿瘤转移的主要途径, 而且局部淋巴结扩散与疾病的进展相关。遗传
25 性淋巴水肿, 手术后继发的淋巴水肿, 以及丝虫病引起的淋巴管堵塞, 其特征都是受损部位的功能丧失和变形肿胀, 与淋巴管的不全堵塞相关。Witte, M.J., 等, Microsc. Res. Tech 55:122-145 (2001)。

尽管淋巴管在医学上很重要, 直到最近, 人们对血管系统的这部分细胞生物学的注意仍然很少。过去四年中的研究揭示了淋巴管特异的血管内
30 皮生长因子 VEGF-C 和 VEGF-D 的存在, 所述生长因子是受体酪氨酸激酶

VEGFR-3 的配体,并显示了它们对于淋巴管的正常发育的重要性(见, Jeltsch, M.,等, Science 276:1423-1425 (1997); Veikkola, T.,等, EMBO J. 20:1223-1231 (2001); Mäkinen, T.,等, Nat. Med. 7:199-205 (2001)). 这些分子也参与淋巴水肿和淋巴管转移的发展(Karpanen, T.,等, J. Exp. Med. 194:F37-F42 (2001);
5 Karkkainen, M.J.,等, Trends Mol. Med. 7:18-22. 2001)。

生长因子血管内皮生长因子 C (VEGF-C), 以及编码 VEGF-C, 和 VEGF-C 变体和类似物的天然人类和非人类哺乳动物, 和鸟类多核苷酸序列, 在以下文章中详述: 1998 年 2 月 2 日提交的国际专利申请 PCT/US98/01973, 1998 年 8 月 6 日公开的国际公开 WO98/33917; Joukov 等,
10 J. Biol. Chem., 273(12): 6599-6602 (1998); 和 Joukov 等, EMBO J., 16(13): 3898-3911 (1997), 所有这些文章的全文内容包含在文中作为参考。如本文详述, 人 VEGF-C (SEQ ID NO: 863)最初是以人类细胞中作为 419 个氨基酸的前蛋白-VEGF-C 多肽的形式产生的。根据布达佩斯条约的规定, 将编码人 VEGF-C (SEQ ID NO: 864)的 cDNA 保藏在美国典型培养物保藏中心
15 (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 (USA), (保藏日 1995 年 7 月 24 日, ATCC 保藏号 97231)。其它物种的 VEGF-C 序列也有报道。见例如 Genbank 保藏号 MMU73620 (Mus musculus); 和 CCY15837 (Coturnix coturnix), 包含在文中作为参考。

前蛋白 (prepro) -VEGF-C 多肽经多阶段处理产生成熟的和最活泼的
20 VEGF-C 多肽, 根据还原条件下的 SDS-PAGE 估计约为 21-23 kD(SEQ ID NO: 863)。这样的加工包括单肽(残基 1-31)的裂解; 裂解羧基末端肽(大约对应于约氨基酸 228-419 并具有并具有 Balbiani 环 3 蛋白(BR3P)序列的隔开的 (spaced)半胱氨酸残基[Dignam 等, Gene, 88:133-40 (1990); Paulsson 等, J. Mol. Biol., 211:331-49 (1990)])来产生月 29kD 的部分加工形式; 以及裂解(明显在
25 细胞外)氨基末端肽(大约对应于氨基酸 32-103)以产生约 21-23kD 的完全加工形式。实验证据表明, 部分加工的 VEGF-C (例如, 29 kD 的形式) 能够结合 VEGFR-3 (Flt4 受体), 而只有完全加工的 VEGF-C 才以高亲和力结合 VEGFR-2。很明显 VEGF-C 多肽天然地结合成非二硫化物连接的二聚体。

已证明 VEGF-C 的氨基酸 103-227 对于保持 VEGF-C 的功能不都是必要
30 的。由氨基酸 113-213 组成(并且缺乏残基 103-112 和 214-227)的多肽保持结

合和刺激 VEGF-C 受体的能力,并且预期包含大约残基 131 到大约残基 211 的多肽将保持 VEGF-C 的生物活性。氨基酸位置 156 上的半胱氨酸残基显示对于 VEGFR-2 的结合能力很重要。然而, VEGF-C ΔC_{156} 多肽 (即, 由于缺失或替代而缺乏该半胱氨酸的类似物) 仍然是 VEGFR-3 的有效激活物。

- 5 VEGF-C 多肽的位置 165 上的半胱氨酸对于结合两种受体都很重要, 然而缺乏位置 83 或 137 上的半胱氨酸的类似物与天然 VEGF-C 竞争结合两种受体并刺激两种受体。

VEGF-D 在结构和功能上与 VEGF-C 最为接近 (见美国专利 6,235,713 和国际专利 WO 98/07832, 包含在文中作为参考)。VEGF-D 的多核苷酸序
10 列见 SEQ ID NO: 866; 编码的氨基酸序列见 SEQ ID NO: 865。和 VEGF-C 一样, VEGF-D 最初是作为前蛋白肽表达的, 并经过了 N 末端和 C 末端的蛋白裂解加工, 形成非共价连接的二聚体。VEGF-D 刺激体内内皮细胞的有丝分裂反应。在胚胎形成期间, VEGF-D 以一种复杂的时间和空间模式表达, 且它在成人的心脏, 肺和骨骼肌中持续表达。VEGF-D 的生物活性片段分离
15 物称为 VEGF-D $\Delta N \Delta C$, 在国际专利公开 WO 98/07832 中描述, 包含在文中作为参考。VEGF-D $\Delta N \Delta C$ 由 VEGF-D 的氨基酸残基 93-201 (SEQ ID NO: 26) 组成, 可选地与亲合标记肽 FLAG[®], 或其他序列连接。

前蛋白-VEGF-D 多肽具有推定的 21 个氨基酸的信号肽, 并且明显通过与加工前蛋白-VEGF-C 类似的方式进行蛋白裂解加工。“重组成熟”的
20 VEGF-D 缺乏残基 1-92 和 202-354, 其保持活化受体 VEGFR-2 和 VEGFR-3 的能力, 并且和非共价连接的二聚体结合。因此, 优选的 VEGF-D 多核苷酸包括编码氨基酸 93-201 的核苷酸序列。上述将功能保持性修饰引入 VEGF-C 多肽的方法也适于将功能保持性的修饰引入 VEGF-D 多肽。本发明的另一方面还涉及实施本发明的方法, 其用 VEGF-D 多肽代替 VEGF-C 多
25 肽。

与血管内皮细胞相比, 淋巴管内皮显示特殊的形态学和分子特征。例如, 淋巴毛细管比毛细血管更大, 它们具有无规且塌陷的管腔, 其中没有血细胞, 不连续的基底层, 重叠的细胞间连接复合体和将淋巴内皮细胞连接到细胞外基质的锚丝 (Witte, M.H., 等, Microsc. Res. Tech. 55:122-145
30 (2001))。和毛细血管不同, 没有周细胞覆盖淋巴毛细管。在分子水平上,

鉴定了多种淋巴管特异性标记物, 包括 VEGFR-3, Prox-1 转录因子, 透明质酸(hyaluronan)受体 LYVE-1, 膜粘蛋白 podoplanin, β 趋化因子受体 D6, 细胞骨架蛋白粒桥蛋白 I 和 II 以及举是细胞甘露糖 I (Wigle, J.T. & Oliver, G., Cell 98:769-778 (1999); Banerji, S., 等, J. Cell Biol. 144:789-801 (1999):

5 Breiteneder-Geleff, S., 等, Am. J. Pathol. 154:385-394 (1999); Nibbs, R.J., 等, Am. J. Pathol. 158:867-877 (2001); Ebata, N., 等, Microvasc. Res. 61:40-48. (2001); Irijala, H., 等, J. Exp. Med. 194:1033-1041 (2001)). 本发明还涉及使用基因绘图(gene profiling)的方法, 鉴别淋巴毛细管内皮细胞与血管内皮细胞。

“严格的杂交条件”或“严格的条件”指这样一种条件, 例如寡核苷酸的核酸在该条件下与其靶序列特异性杂交。严格的条件与序列有关, 并且根据环境而不同。较长的核酸比较短的核酸的杂交温度更高。通常, 严格的条件被选为在特定的离子强度和 PH 下, 比特定序列的热溶解温度(T_m)低约 5°C。 T_m 是温度(在特定的离子强度, PH 和核酸浓度条件下), 在该温度下, 约 50%的与靶核苷酸互补的核酸与靶核苷酸以等当量杂交。术语“互

15 补”指两个核酸分子的核苷酸之间的标准 Watson-Crick 碱基配对。通常, 严格的条件是: pH 7.0-8.3, 盐浓度低于约 1.0M 钠离子, 通常为约 0.01- 1.0 M 钠离子(或其他盐), 而且对于短探针, 引物和寡核苷酸(例如 10-50 个核苷酸)温度至少约 30°C, 而对于较长的探针, 引物和寡核苷酸温度至少约 60°C。如本领域已知, 严格的条件可通过加入去稳定剂, 例如甲酰胺来实现。

20 示例性的严格条件是在含有 50%甲酰胺, 5xSSPE, 5x Denhardt's 溶液, 0.1% SDS 和 0.1 mg/ml 变性的鲑精 DNA 的溶液中, 在 42°C 下杂交 20 小时, 然后在 65°C 下, 1xSSC, 0.1% SDS 中洗涤 30 分钟。

根据本发明, 发现血管和淋巴管内皮细胞具有不同的基因表达图。这些结果提供了关于内皮细胞基因型多样性的新发现, 并揭示了新的潜在的

25 淋巴内皮分子, 其中一些还提供了治疗以异常血管生成或淋巴管生成为特征的疾病的重要靶点。

已发现了编码参与炎症过程以及介导细胞-细胞和细胞-基质间相互作用的蛋白的基因的表达不同。此外, 内皮细胞生物学领域还鉴定了多种以前未知的基因, 它们在两种细胞系中的差异表达。所述基因的一些最初是

30 从神经组织中克隆的, 包括参与突触巨分子的吸收和突触形成以及重构的

基因 (neuronal pentraxins I 和 II (Kirkpatrick, L.L., 等, J. Biol. Chem. 275:17786-17792. 2000), 参与突触小泡的运输的基因(NAP-22 (Yamamoto, Y.,等, Neurosci. Lett. 224:127-130. 1997), piccolo (Fenster, S.D.,等, Neuron 25:203-214 (2000)) 以及参与轴突生长和引导的基因(Nr-CAM (Grumet, M., 5 Cell Tissue Res. 290:423-428 (1997), reelin (Rice, D.S. & Curran, T., Annu. Rev. Neurosci. 24:1005-1039 (2001))).

此外, LEC 还特异性表达一些目前仍未定型的基因, 最初在神经组织中克隆并在其中高表达(KIAA 基因(Kikuno, R., 等, Nucleic Acids Res. 30:166-168. 2002)。本文的基因表达 profiling 数据支持一下观点: 控制神经
10 细胞定位, 引导轴突生长锥(axonal growth cones)到达它们的特异性靶点, 以及突触形成具有相同的分子机制, 通常该机制也适用于血管系统形成及 BEC 和 LEC 的确定。首先在神经系统发育中描述的一些其他信号分子也参与血管系统的发育, 反之也如此(Shima 和 Mailhos, Curr. Opin. Genet. Dev. 10:536-542 (2000); Oosthuyse,等, Nat. Genet. 28:131-138 (2001); Sondell,等,
15 Eur. J. Neurosci. 12:4243-4254 (2000))。

在 LEC 中, 观察到在平滑肌细胞(SMCs)和周细胞中表达的一些基因的表达, 例如基质 Gla, 它是矿质结合的细胞外基质蛋白, 参与抑制血管和组织的钙化(Luo, G.,等, Nature 386:78-81 (1997)), 单胺氧化酶 A, 它是主要的单胺激素和神经递质的降解酶(Rodriguez, M.J., 等, Cell Tissue Res.
20 304:215-220 (2001)), 整联蛋白 $\alpha 9$ (Palmer, E.L., 等, J. Cell Biol. 123:1289-1297 (1993)) 和载脂蛋白 D (Hu, C.Y.,等, J. Neurocytol. 30:209-218 (2001))。LEC 和 SMCs 之间类似的基因表达模式与淋巴毛细管周围缺乏 SMC 有关。LEC 还独立执行一些 SMC 的任务。例如, 淋巴流动的保持是由于 LEC 的内在收缩性(Witte, M.H.,等, Microsc. Res. Tech. 55:122-145 (2001)),
25 与血管 SMCs 的收缩能力类似。

淋巴管和血管的分子鉴别在研究涉及血管和/或淋巴管的疾病以及这类疾病的靶向治疗中是重要的。目前, 已鉴定了多种淋巴内皮特异的标志物, 但其中一些只在部分淋巴管中表达, 而另一些也在一些血管内皮或其他细胞类型中表达, 而且其表达模式在病理条件下发生改变(例如, VEGFR-3
30 (Valtola, R.,等, Am. J. Pathol. 154:1381-1390. 1999))。本发明的新的血管标记

物的鉴定应提供对病理条件下的血管和淋巴管的更可信的分析，并最终使诊断和治疗更好。此外，抑制参与血管生成和/或淋巴管生成的调控的特定分子的功能已知能够防止肿瘤生长和转移，并且刺激血管和淋巴管的生长显示对多种病理条件有益。因此，本发明鉴定的 BEC 和 LEC 特异性分子调节物可提供治疗以异常血管生成和淋巴管生成作为特征的疾病的新靶点。

一些新的 LEC 基因编码跨膜蛋白，它们可能是淋巴管内皮细胞特异的分子标记(表 6)。这些基因和编码的蛋白可用于淋巴管疾病的靶向治疗。它们也可用于制备抗体，抗 LEC 特异性蛋白的抗体可用来鉴别生理和病理条件下的血管和淋巴管。抗体也可用于分离淋巴管内皮细胞。这些蛋白也可调节淋巴管生成，并为淋巴管疾病例如淋巴水肿提供新的候选基因。

淋巴管内皮细胞特异性表面分子可用作靶向抗体，肽和小分子量化化合物的分子药物，它们可作为生长因子受体，细胞因子和趋化因子受体，以及造血因子受体信号，细胞粘附和细胞与胞外基质或其他细胞表面分子相互作用的激动剂或拮抗剂。这种分子也可用于将细胞毒性或抑制细胞生长的药物靶向淋巴管内皮细胞，以及用于附着电荷密集的(electron-dense)，不透射线的，或者放射活性的标记物来显像与淋巴管相关的疾病过程。所述疾病包括，淋巴水肿，淋巴管瘤，淋巴管骨髓瘤，淋巴管肌瘤病，淋巴管扩张，淋巴肉瘤和淋巴管硬化。

淋巴管内皮细胞表面分子也可用来靶向基因治疗，例如通过抗体包被的脂质体(含有蛋白或基因作为运载物)，或通过病毒转导载体例如具有修饰的衣壳/包膜的腺病毒，腺伴随病毒或慢病毒。淋巴管内皮细胞特异性分子的处理可用于治疗与组织水肿相关的疾病过程，所述治疗通过增加液体通过淋巴管壁的运输，例如通过调节内皮细胞-细胞或细胞-基质相互作用或者通过刺激跨内皮转运。将例如细胞毒性或抑制细胞生长的化合物靶向淋巴管内皮细胞对于治疗可能通过淋巴系统转移的恶性肿瘤有价值。

淋巴管内皮细胞分子可促进淋巴管内皮细胞的体外生长以及淋巴管的体外组织改造，所述淋巴细胞和淋巴管用于其中的淋巴管被破坏的疾病，例如手术后或者多种类型的淋巴水肿。细胞表面蛋白配体可进一步用于包被各种用于细胞粘附的聚合基质，例如生物植入物。

淋巴管内皮细胞特异性分子例如表面分子是调节感染，自身免疫和感染过程的重要工具，所述过程涉及白细胞迁移和免疫识别以及次级免疫应答的刺激。这种过程包括抗原呈递细胞迁移入包括淋巴结的淋巴系统，和淋巴细胞和其他白细胞亚类的跨内皮细胞输送，以及各种类型的白细胞的回巢，存活和功能。

这些分子使得可调节从肠道吸收的包括脂肪酸/乳糜微粒的脂肪酸的代谢，和调控各种器官例如皮下组织和动脉壁的脂肪组织中脂肪的聚集。

淋巴管内皮细胞特异性分子还使得可调节从肠道吸收的包括脂肪酸/乳糜微粒的脂肪酸的代谢，和调控各种器官例如皮下组织和动脉壁的脂肪组织中脂肪的聚集。

淋巴细胞特异性跨膜蛋白据信在细胞粘附(例如淋巴管内皮细胞-淋巴管内皮细胞，淋巴管内皮细胞-平滑肌细胞，淋巴管内皮细胞-免疫系统细胞例如淋巴细胞或树突细胞之间的粘附)，细胞-胞外基质接触中起作用，或者作为生长因子，细胞因子，趋化因子，或者微生物受体或离子通道。所述跨膜蛋白和细胞内分子相连，所述细胞内分子可诱导细胞生长，细胞迁移，细胞凋亡，细胞分化或细胞粘附或其他内皮细胞特异的细胞功能，例如白细胞粘附受体的表达，一氧化氮的释放，抗凝蛋白，吸收周围组织的液体和蛋白以及肠道或脂肪组织的脂肪。具有短细胞内区的 TM 蛋白可和其他 TM 蛋白的复合，作为辅助性受体起作用。

跨膜蛋白及其细胞内结合配偶分子可用作正常和疾病状态下的淋巴管内皮细胞的分子标记物，并用于鉴别生理和病理情况下的血管和淋巴管。

淋巴管特异性跨膜蛋白的抗体，以及与淋巴管特异性 TM 蛋白的胞外区结合的肽和小分子化合物可用于粘附电荷密集的，不透射线的或者放射活性的标记物来显像与淋巴管相关的疾病过程。这种疾病包括淋巴水肿，淋巴管瘤，淋巴管骨髓瘤，淋巴管肌瘤病，淋巴管扩张，淋巴肉瘤和淋巴管硬化。类似地，可在治疗患有淋巴管生长不足例如淋巴水肿的病人时，或者可选地在为防止淋巴管生长的治疗例如肿瘤的治疗时使淋巴管显像，从而易化本发明的治疗方法的监督。

预期 LEC-特异性 TM 蛋白的抗体也可用于分离淋巴管内皮细胞。

淋巴管特异性跨膜蛋白的抗体，或者与淋巴管特异性 TM 蛋白的胞外区结合的肽或小分子化合物据信可用于将药物递送靶向淋巴管内皮细胞，例如通过将抗体，肽或小分子化合物与细胞毒性或抑制细胞生长的化合物偶联。这种偶联的化合物可用于治疗易于通过淋巴系统转移的恶性肿瘤疾病，以及缓解与任何这种疾病相关的症状的治疗剂。所述抗体，肽或小分子化合物也可和刺激淋巴管内皮细胞的分子偶联以加强刺激，所述分子例如生长因子，细胞因子和趋化因子。

此外，淋巴管特异性 TM 蛋白或与淋巴管特异性 TM 蛋白的胞外区结合的肽，或小分子化合物的抗体可用来靶向基因治疗，例如通过抗体包被的脂质体(含有蛋白，基因或其他分子作为运载体)，或者通过病毒转导载体例如具有修饰的衣壳/包膜的腺病毒，腺伴随病毒或慢病毒。淋巴管内皮细胞特异性分子的处理可用于治疗与组织水肿相关的疾病过程，所述疾病是由于淋巴管的相对缺乏，或相对功能不全，可以由感染，手术，放射治疗或基因缺陷导致液体通过淋巴管壁的运输增加，例如通过调节内皮细胞-细胞或细胞-基质相互作用或者通过刺激跨内皮转运。

淋巴管内皮细胞分子可促进淋巴管内皮细胞的体外生长以及淋巴管的体外组织改造，用来治疗其中的淋巴管被破坏的疾病，例如手术后或者多种类型的淋巴水肿，以及本文所述的其他应用。细胞表面蛋白配体可进一步用来包被各种用于细胞粘附的聚合基质，例如生物植入物。

涉及白细胞迁移和免疫识别的炎症，自身免疫和感染过程，例如抗原呈递细胞迁移进入包括淋巴结的淋巴系统，和淋巴细胞和其他白细胞亚类的跨内皮细胞输送，以及各种类型的白细胞的回巢，存活和功能可通过靶向内皮细胞特异性 TM 蛋白被调节，该蛋白介导这些细胞粘附过程。

本文还涉及将淋巴管特异性基因的上调，例如在癌症中，用作诊断标志物，并使用淋巴管内皮细胞特异性蛋白的抗体来监控这种上调表达，例如通过组织免疫染色或通过使用可以淋巴管内皮细胞特异性 mRNA 在例如本文的严格杂交条件下杂交的探针。

淋巴管内皮细胞特异性转录因子预期对淋巴管内皮细胞从胚胎干细胞，内皮前体细胞，或者血管内皮细胞的分化有用。

淋巴管内皮细胞特异性转录因子预期可改善淋巴管内皮细胞在体外的生长, 以及促进淋巴管的体外组织改造, 所述淋巴细胞和淋巴管用于其中的淋巴管被破坏的疾病, 例如手术后或者多种类型的淋巴水肿, 以及本文公开的其他应用。

5 细胞内信号蛋白参与调解淋巴管内皮细胞的增殖, 分化, 凋亡, 迁移或粘附的信号通路, 预计所述蛋白可用作抑制这些信号事件的小分子化合物的靶点, 以及依赖这种信号的细胞功能的靶点。预计信号蛋白还参与 VEGFR-3 信号通路, 并可用于调节至少部分由 VEGFR-3 信号控制的细胞活性, 例如淋巴管生成。

10 预期淋巴管内皮细胞分子还可改善淋巴管内皮细胞在体外的生长, 以及促进淋巴管的体外组织改造, 所述淋巴细胞和淋巴管用于其中的淋巴管被破坏的疾病, 例如手术后或者多种类型的淋巴水肿, 以及本文所述的其他应用。

预期淋巴管特异性转录因子也可用于调节内皮细胞中的基因表达, 来
15 诱导其它淋巴管特异性基因在例如血管内皮细胞或内皮前体细胞中的表达。

预期淋巴管特异性基因转录物可提供用于 RNA 干扰(RNAi)诱导的表达抑制的的靶点。RNAi 技术与其可用于本发明的方法, 例如有效治疗高和低增殖性内皮细胞相关疾病和病症的治疗方法, 以及缓解与任何这种疾病或
20 病症有关的症状。RNAi 的方法在本领域已知, 且已知的 RNAi 技术可用于本发明的多个方面。见 Fire 等, Nature 391:806-811. (1998) 和 Sharp, P., Genes 和 Dev. 13:139-141. (1999), 包含在文中作为参考。优选 RNAi 化合物是与表达所需靶点的的部分或全部编码区对应的双链 RNA 分子。

多种新的 LEC 基因编码转录因子, 所述转录因子控制细胞的命运
25 (iroquois 相关同源框基因), 并且在淋巴管内皮细胞的分化中有重要作用。本文公开的转录因子可控制例如淋巴管内皮细胞的增殖所涉及的基因的转录, 并且是淋巴管生长的重要分子调节物(表 5)。淋巴管内皮细胞特异性转录因子对淋巴管内皮细胞从胚胎干细胞, 内皮前体细胞和从血管内皮细胞中的分化有用。

淋巴内皮转录因子使得淋巴管内皮细胞的体内生长，以及促进淋巴管的体内组织改造，用在其中的淋巴管被破坏的疾病中，例如手术后或者多种类型的淋巴水肿。

本发明的多核苷酸

5 通常，本发明分离的多核苷酸包括 LEC 和 BEC 多核苷酸，它们显示不同的表达并在表 3, 4, 14, 15 和 16 中被鉴定。这些多核苷酸的序列以及其可获得的已知的数据库保藏号在表 16 中提供。在表 14 和 15 种，这些保藏号与唯一的序列鉴定物(sequence identifier)相关，从而可通过每种保藏物(citation)的序列鉴定物确定保藏号。多核苷酸序列可包括一个编码区并包括
10 非编码的侧翼序列，可被本领域熟练技术人员轻易鉴定。本发明涉及的多核苷酸包含一个编码区的部分或全部，具有或不具有侧翼区，例如多腺苷酸序列，5' 非编码序列，等等诸如此类。本发明的多核苷酸还包括，但不限于，与 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51 之一的核苷酸序列的互补序列在高度严格的杂交条件下杂交的多核苷酸；与 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51
15 之一的核苷酸序列的互补序列在中度严格的杂交条件下杂交的多核苷酸；上述多核苷酸之一的等位基因变体；编码上述蛋白之一的种同源物的多核苷酸，编码包含 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50 和 52 之一的特定结构域或截短序列的多肽的多核苷酸。这种多核苷酸在上述条件下与 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51 之一的互补序列或者 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和
20 51 之一的片段杂交，其中所述片段大于至少约 10 bp，并且可选地在其他实施方案中，大于约 20 到约 50 bp，或者在适当的情况下，大于约 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 或 800 bp。

本发明的多核苷酸还提供了上述多核苷酸的变体。通常这种变体序列与上述多核苷酸的差异不大于约 20%，即，与相应的对照序列相比，类似序
25 列中单个核苷酸替代，添加，和/或缺失的数量除以变体核苷酸序列的总数为约 0.2 或更小。这种序列据说与所述序列具有 80% 的序列相同性。这种变体序列可通常通过应用前述算法鉴定。

在一种实施方案中，本发明的变体多核苷酸序列与所述序列的差异不大于 10%，即，与相应的对照序列相比，类似序列中单个核苷酸替代，添
30 加，和/或缺失的数量除以变体核苷酸序列的总数为约 0.1 或更小。这种序

列据说与所述序列具有 90%的序列相同性。这种变体序列可通常通过应用前述算法鉴定。

在本发明另一实施方案中，本发明的变体多核苷酸序列与所述序列的差异不大于5%，即，与相应的对照序列相比，类似序列中单个核苷酸替代，
5 添加，和/或缺失的数量除以变体核苷酸序列的总数为约 0.05 或更小。这种序列据说与所述序列具有 95%的序列相同性。这种变体序列可通常通过应用前述算法鉴定。

在本发明另一实施方案中，本发明的变体多核苷酸序列与所述序列的差异不大于2%，即，与相应的对照序列相比，类似序列中单个核苷酸替代，
10 添加，和/或缺失的数量除以变体核苷酸序列的总数为约 0.02 或更小。这种序列据说与所述序列具有 98%的序列相同性。这种变体序列可通常通过应用前述算法鉴定

本发明的多核苷酸可以通过已经建立的重组 DNA 技术(see Sambrook J 等 (2d Ed.; 1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring
15 Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)和其他任何一种核苷酸序列连接。用于连接多肽的核苷酸序列包括各种载体，例如，质粒，粘粒， λ 噬菌体衍生物，噬菌粒等本领域已知的载体。相应地，本发明还提供了包含本发明的多核苷酸的载体以及含有该多核苷酸的宿主细胞。通常，载体含有在至少一种生物体中有功能的复制起点，便利的限制性核酸内切酶位点，
20 以及宿主细胞的选择性标记物。本发明的载体包括表达载体，复制载体，探针生成载体，测序载体(sequencing vectors)，和逆转录病毒载体。本发明的宿主细胞可以是原核或真核细胞，并可以是单细胞有机体或者多细胞有机体的一部分。本领域熟练技术人员已知大量适宜的载体和启动子，并且可购得它们用来产生本发明的重组构建体。

25 本发明范围内的序列不限于本文所述的具体序列，还包括其等位基因变体。等位基因变体的测定通常可通过比较 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51 之一的序列，其代表性的中间片段，或者与 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51 之一的序列具有至少 99.9%的同一性同核苷酸序列和相同物种的另一分离株 (isolate) 的序列。此外，为了提供密码子多样性，本发明包括的核酸
30 分子编码的氨基酸序列与本文公开的特异性开放阅读框架 (ORFs)的氨基

酸序列相同。换言之，在 ORF 的编码区，尤其涉及使用一种密码子替换另外一种编码相同氨基酸的密码子。

除非本文特别指出的，所有定义的术语都是本领域已知的，例如见美国专利 6,350,447，包含在文中作为参考。

- 5 本发明还涉及根据本发明的 LEC 或 BEC 多核苷酸之一的序列的反义多核苷酸。这种反义多核苷酸与在 LEC 和 BEC 中差异表达的本发明的多核苷酸序列或其片段是基本互补的(例如，至少 90% 互补性)，优选完全互补，所述本发明的多核苷酸见序列表，表 3，4，14-16，以及本说明书的全文内容。这些多核苷酸序列包括 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51 之一或其包括
- 10 至少 10 个连续的核苷酸的片段。所述反义核苷酸包含与编码蛋白质的“有义”核酸互补的核苷酸序列(例如，与双链 cDNA 分子的编码序列或 mRNA 序列互补)。设计并最优化反义核苷酸的方法见 Lima 等，(J Biol Chem; 272:626-38. 1997) 和 Kurreck 等，(Nucleic Acids Res.; 30:1911-8. 2002)。一方面，本文的反义核酸分子包括与至少约 10, 25, 50, 100, 250 或 500 个核苷酸
- 15 或者整个编码序列互补的序列。本发明的反义核酸通过化学合成或酶偶联反应使用本领域已知的方法构建。

- 在一种实施方案中，反义核酸分子与编码本发明的多肽的核苷酸序列的编码链的“编码区”反义。术语“编码区”指包含被翻译成氨基酸残基的密码子的核苷酸序列的区。在另一实施方案中，该反义核酸分子与编码该
- 20 多核苷酸的核苷酸序列的“让步区(conceding region)”反义。术语“让步区”指与编码区侧接的 5' 和 3' 序列，它们不被翻译成氨基酸(即，也称为 5' 和 3' 非翻译区)。

- 本发明的反义核酸可根据 Watson 和 Crick 或 Hoogsteen 碱基配对规则进行设计。所述反义核酸分子可以和本发明的多核苷酸的 mRNA 的整个
- 25 编码区互补，但更优选仅和 mRNA 的编码或非编码区的一部分反义的寡核苷酸。反义寡核苷酸的长度可以是例如约 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, or 50 个核苷酸。本发明的反义核酸可使用化学合成或酶偶联反应使用本领域已知的方法构建。例如，反义核酸(例如，反义寡核苷酸)可利用化学方法，使用天然存在的核苷酸或者经不同的修饰后的核苷酸合成，所述修饰是为

了增加分子的生物稳定性或者提高反义和有义核酸之间形成的双链的物理稳定性(例如,可使用硫代磷酸酯衍生物和吡啶取代的核苷酸)。

所述本发明的反义核酸分子通常给药受体或在原位生成使得它们和编码互补多核苷酸的细胞 mRNA 和/或基因组 DNA 杂交或结合,从而抑制蛋白的表达(例如通过抑制转录和/或翻译)。杂交反映了形成稳定双链的通常的核苷酸互补性,或者如果反义核苷酸分子与 DNA 双链结合,表明是通过双螺旋结构的大沟(groove)中的特异性相互作用。

给药本发明的反义核酸分子的途径的实例包括直接注入组织位点。可选地,可修饰反义核酸分子使其靶向选定的细胞然后系统地给药。例如,就系统给药而言,反义核酸分子可被修饰使得它们特异性结合选定的细胞表面表达的受体或抗原(例如,通过连接所述反义核酸分子和结合细胞表面受体或抗原的肽或抗体)。反义治疗的其他途径可用于本发明,例如局部给药,经皮给药[见 Brandin Curr. Opin. Mol. Ther. 3:244-8. 2001],使用纳米颗粒系统的反义给药[Lambert 等, Adv. Drug. Deliv. Rev. 47:99-112. 2001],或给药与肽偶联的反义核苷酸[Juliano 等, Curr. Opin. Mol. Ther. 2:297-303. 2000]。

本发明还涉及将本发明的多核苷酸用于基因治疗或用于重组表达载体中,所述载体产生可调节 LEC 活性的本发明的多核苷酸或多肽,并可用于例如淋巴水肿的 LEC 疾病的治疗。将编码本发明的多肽的功能性基因递送到适当的细胞可通过使用载体在活体外,原位或活体内实现,所述载体包括病毒载体(例如腺病毒,腺伴随病毒或逆转录病毒),或在活体外用生理 DNA 转移方法(例如,脂质体或化学处理)实现。见,例如,Anderson, Nature, supplement to vol. 392, no. 6679, 25-20 页 (1998)。关于基因治疗技术的其他综述见 Friedmann, (Science, 244: 1275-1281. 1989); Verma, (Scientific American: 263:68-72, 81-84. 1990); 和 Miller, (Nature, 357: 455-460. 1992)。将本发明的任何一种核苷酸或者编码本发明的多肽的任何一种基因导入也可通过染色体外基质(substrate)(瞬时表达)或人工染色体(稳定表达)实现。细胞也可在存在本发明的蛋白的条件下离体培养,使所述细胞增殖或在细胞中产生所需的效果或活性。在另一实施方案中,包含表达本发明的多核苷酸或

多肽的载体的细胞可在活体外培养，并被给药需要治疗 LEC 疾病或病症的个体。

根据公开的核酸构建体，可能通过常规的重组 DNA/RNA 技术制备包含 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51 之一的序列的基因之一的基因产物。多种表达载体/宿主系统可用来包含并表达所述编码序列。这些表达载体/宿主系统包括，但不限于，微生物，例如重组噬菌体转化的细菌，质粒，噬菌粒或粘粒 DNA 表达载体；酵母表达载体转化的酵母菌；病毒表达载体感染的昆虫细胞系统(例如，杆状病毒)；病毒表达载体转染的植物细胞系统(例如，花椰菜花叶病毒，CaMV；烟草花叶病毒，TMV)或细菌表达载体转化的植物细胞系统(例如，Ti 或 pBR322 质粒)；甚至动物细胞系统。用于重组蛋白制备的哺乳动物细胞包括，但不限于，VERO 细胞，HeLa 细胞，中国藏书卵巢(CHO) 细胞，COS 细胞 (例如 COS-7)，WI38，BHK，HepG2，3T3，RIN，MDCK，A549，PC12，K562 和 HEK 293 细胞。

本发明的多肽

通常，本发明的分离 LEC 和 BEC 由上述本发明差异表达的 LEC 和 BEC 多核苷酸编码。LEC 和 BEC 的序列以及其已知的数据库保藏号在表 16 中提供。在表 14 和 15 中，这些保藏号与唯一的序列鉴定物相关，因此可通过每篇文献的(citation)序列鉴定物进行鉴定。本发明分离的多肽包括，但不限于，包含 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50 和 52 之一的氨基酸序列或者 SEQ ID NO.: 1-30, 45, 47, 49 和 51 之一的核苷酸序列编码的氨基酸序列的多肽，或相应的全长或成熟蛋白。本发明还提供了 SEQ ID NO.: 31-44, 46, 48, 50 和 52 之一的氨基酸序列的生物活性或免疫活性变体，或保持生物活性的相应全长或成熟蛋白适宜的变体多肽，该多肽具有至少约 65%，至少约 70%，至少约 75%，至少约 80%，至少约 85%，86%，87%，88%，89%，至少约 90%，91%，92%，93%，94%，典型地至少约 95%，96%，97%，更典型地至少约 98%，或最典型地至少约 99% 的氨基酸同一性。本发明还涉及本发明的蛋白的片段，所述片段包含本发明公开的序列的至少 10 个连续的氨基酸，且能够显示相应的全长蛋白的生物活性。

通过公开的核苷酸序列的翻译在序列表中鉴定了蛋白质编码序列。这 30 种蛋白的成熟形式可通过全长多核苷酸在适宜的哺乳动物细胞或者其他宿

主细胞中的表达获得。成熟形式的蛋白的序列也可通过全长形式的氨基酸序列确定。本发明的蛋白如果是膜结合的，还提供可溶形式的蛋白。在这种形式中，部分或所有使得蛋白成为膜结合的蛋白的区均被缺失，使得该蛋白能够从表达它的细胞完整地分泌。

- 5 本领域已知的多种方法可用来获得本发明分离的多肽或蛋白中的任何一种。最简单的水平上，可使用可购得的肽合成仪来合成所述氨基酸序列。本发明的多肽和蛋白还可任选地从细胞中纯化，所述细胞被改变以表达所需的多肽或蛋白。如果细胞通过基因操纵而产生其通常不产生或者以低水平产生的多肽或蛋白，就称本文的细胞被改变以表达所需的多肽或蛋白。
- 10 本领域熟练技术人员可轻易采用将重组或合成序列引入真核或原核细胞并在其中表达的方法，以生成可产生本发明的多肽或蛋白之一的细胞。

多肽的“片段”指分子的任何部分，例如肽核（core），或者肽核的变体，或者多肽的细胞外区。多肽的“变体”指在结构和生物活性上与整个分子，或其片段基本相似的分子。因此，如果两种分子具有类似的活性，

15 即使两种分子之一的组成或次级，三级或四级结构与另一种分子不同，或者即使氨基酸残疾的序列不同，仍认为它们是本发明所述的变体。多肽或遗传序列的“类似物”指与分离的多肽或遗传序列在功能和结构上基本类似的蛋白或遗传序列。

- 应理解可对纯化的或分离的多肽进行保守的氨基酸取代，所述多肽包
- 20 含 SEQ ID NO.: 31-44, 46, 48, 50 和 52 的序列之一，产生保持生物活性或免疫活性的多肽，特别是这种取代的数目较小时。“保守的氨基酸取代”指一种氨基酸被具有类似的化学性质的侧链的氨基酸取代。用来进行保守取代的类似的氨基酸包括具有酸性侧链的氨基酸(谷氨酸，天冬氨酸)；具有碱性侧链的氨基酸(精氨酸，赖氨酸，组氨酸)；具有极性氨基侧链的氨基酸(谷氨酰胺，天冬酰胺)；具有疏水的亲脂的侧链的氨基酸(亮氨酸，异亮氨酸，缬氨酸，丙氨酸，甘氨酸)；具有芳香基侧链的氨基酸(苯丙氨酸，色氨酸，酪氨酸)；具有小侧链的氨基酸(甘氨酸，丙氨酸，丝氨酸，苏氨酸，蛋氨酸)；或者具有脂肪族羟基侧链的氨基酸(丝氨酸，苏氨酸)。
- 25

微阵列

本发明的另一方面是一种组合物，所述组合物包含多种用于检测以具体细胞类型为特征的基因表达模式和检测具体细胞类型例如淋巴管内皮细胞的表达模式中的变化的多核苷酸探针。例如，本发明包含阵列，例如微
5 阵列，所述阵列包含具有选自序列表中显示的多核苷酸序列的至少 10 个连续的核苷酸的多核苷酸。

本发明还涉及这样的微阵列，所述微阵列包含的多核苷酸具有选自 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 5 的至少 10 个连续的核苷酸。本发明的微阵列包含至少 3 种多核苷酸，其中每种列举的多核苷酸具有选自 SEQ ID
10 NOSEQ ID NO:1-30, 45, 47, 49 和 51 的独特的序列。这种微阵列还具有完全相同的多核苷酸和其它多核苷酸，例如用于使用微阵列的基于杂交的分析中的对照多核苷酸。阵列，包括微阵列，具有三种以上不同的本发明的多核苷酸，例如至少 5 种，7 种，9 种，20 种，50 种或更多这种多核苷酸，所述阵列被认为是本发明的阵列，并具有使生物样品例如各种内皮细胞类
15 型产生细微差的能力，或者在使用这种微阵列的过程中，提供不同的，通常更高水平的置信度，例如用于筛选特定的内皮细胞，用于筛选异常的或疾病细胞和组织，等诸如此类。

术语“微阵列”指可杂交的阵列元件的有序排列。所述阵列元件(array elements)的排列使得优选在固体支持物上有至少三种或更多种不同的阵列
20 元件，更有选至少 100 种阵列元件，并最有选至少 1000 种阵列元件。优选，所述固体支持物是 1 cm² 的基质表面，珠，纸，尼龙或其他类型的膜，滤纸，芯片，玻璃载玻片，或任何其它适宜的固相支持物。每个阵列元件的杂交信号是独立可识别的。在右选地实施方案中，所述阵列元件包括多核苷酸探针。

25 杂交的意思是将两种或多种核酸在适宜碱基配对的条件下接触。杂交包括部分或完全互补的核酸之间的相互作用。适宜的杂交条件对于本领域熟练技术人员是已知的。在具体的应用中，需要获得较低程度的严格条件。在这些条件下，即使反应链的序列不是完全互补的，在一个或几个位点是错配的，杂交仍可出现。通过根据本领域的知识调节条件可使反应条件的
30 严格程度较低，例如增加盐浓度和/或降低温度。适宜的杂交条件是允许从

可鉴定的表达单位例如基因的基因表达的检测的那些条件。优选的杂交条件是严格的杂交条件，例如在 42℃ 在溶液（即，杂交溶液）中（所述溶液包含 50% 甲酰胺，1% SDS，1 M NaCl，10% 葡聚糖硫酸酯），并在洗涤液中 65℃ 洗涤 30 分钟，所述洗涤溶液包含 1 X SSC 和 0.1% SDS。应理解在本领域中，

5 相同程度的严格条件可通过改变温度和缓冲液，或盐浓度来实现，如 Ausubel, 等 (Eds.), Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1994), pp. 6.0.3 to 6.4.10 所述。杂交条件的修饰可由经验确定或根据探针的鸟嘌呤/胞嘧啶(GC)碱基配对精确计算。杂交条件可如 Sambrook, 等, (Eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press:

10 Cold Spring Harbor, New York (2d. Ed.; 1989), 9.47-9.51 页所述计算。

使用本发明的探针和引物的一种方法是用于检测人细胞中的基因表达。通常，靶基因将表达 RNAs，但也可筛选基因组 DNA 或 cDNA 文库。通过改变杂交条件的严格程度和靶结合位点（即探针的序列，相应于 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51 之一的一部分），杂交可产生不同程度的同源性。

15 所述微阵列可用于大量靶多核苷酸的大规模的遗传或基因表达分析。所述微阵列还可用于诊断疾病和监测治疗。此外，所述微阵列还可用于检测个体对疾病的易感性。此外，所述微阵列还可用来检测对感染，药物治疗的细胞反应性，等等诸如此类。

所述核算探针可以是基因组 DNA or cDNA or mRNA 多核苷酸或寡肽，或者任何 RNA 样或 DNA 样物质，例如肽，核酸，分支 DNA，等等诸如此类。所述探针可以是有义或反义核苷酸探针。如果靶多核苷酸是双链的，所述探针可以是有义或反义链。如果靶多核苷酸是单链的，所述探针可以是互补的单链。在一种实施方案中，所述探针是 cDNAs。目的 DNA 序列的大小可变，优选具有 100-10000 个核苷酸，更有选为 150-3500 个核苷酸。

25 探针可以用多种合成或酶技术制备，这是本领域已知的。所述探针可以通过使用本领域已知的化学方法（Caruthers 等, *Nucleic Acids Res., Symp. Ser.*, 215-233, 1980）合成其全部或部分。

药物配制剂和给药途径

本发明的蛋白（无论其来源，例如来自重组和非重组来源）可被给药需要

30 治疗的病人，可以单独给药，或者与适宜的载体，稀释剂，辅剂或赋形剂

以治疗或改善各种疾病的剂量混合，以药物组合物的方式给药。这种组合物可以包括(除了蛋白质和载体以外)稀释剂，滤液，盐，缓冲液，稳定剂，增溶剂，以及其它本领域已知的物质。术语“可药用的”指非毒性物质，它不干扰活性成分的生物活性的有效性。载体的性质有赖于给药途径。本

5 发明的药物组合物还包含细胞因子，趋化因子，淋巴因子，生长因子，或其它生血因子，例如 PDGF, VEGF (具体为 VEGF-C 或 VEGF-D), VEGFR-3 (包括含有细胞外区的可溶性 VEGFR-3 肽), M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IFN, TNF0, TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, 血小板生成素，干细胞因子，和

10 红细胞生成素。也涉及这些多肽的各种形式，例如分离的全蛋白质，亚基，片段(例如可溶性片段)，和蛋白融合物。所述药物组合物还可含有其它试剂，该试剂可增强所述蛋白的活性，补充其活性或在治疗中的用途。这种添加因子和/或试剂可包含在所述药物组合物中，产生与本发明的蛋白协同的作用，或者用以使副作用最小化。相反，本发明的蛋白可以包含在具体的细

15 胞因子，淋巴因子，其它生血因子，血小板生成或抗血小板因子，或者抗炎试剂的制剂中，从而使所述细胞因子，淋巴因子，其它生血因子，血小板生成或抗血小板因子，或者抗炎试剂的副作用最小化。本发明的蛋白可以在多聚体(例如异二聚体或同二聚体)或在与自身或其它蛋白的复合物中有活性。结果，本发明的药物组合物以这种多聚物形式或复合物形式包

20 含本发明的蛋白。

本申请的组合物的配制和给药见"Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., 最新版。治疗有效剂量还指足以缓解症状的化合物的量，例如治疗，治愈预防或缓解相关医学病情的量，或者增加有益改变，治愈，防止或改善这种病情的速率的量。单独给药独立的活性

25 成分时，所述治疗有效剂量指该单独的成分。当联合给药时，治疗有效剂量指产生治疗效果的活性成分的联合用量，可以是联合给药，序贯给药或者同时给药。

进行本发明的治疗方法或用途时，将治疗有效量的本发明的蛋白给药患有待治疗的病情或疾病的哺乳动物。可根据本发明的方法单独或联合其

30 他治疗(例如使用细胞因子，淋巴因子或其它生血因子的治疗)给药本发明的

蛋白。与一种或多种细胞因子，淋巴因子或其它生血因子联合给药时，本发明的蛋白可同时和所述细胞因子，淋巴因子，其它生血因子，溶栓因子或抗血小板因子同时给药，或者序贯给药。如果是序贯给药的，主治医师将决定联合给药本发明的蛋白和细胞因子，淋巴因子，其它生血因子，溶栓因子或抗血小板因子的适当顺序。

给药途径

适宜的给药途径可例如，包括经口，经直肠，经粘膜，或经肠道给药；肠道外递送，包括肌肉内，皮下，髓内注射，以及鞘内，直接心室内，静脉内，腹膜内，鼻腔内或眼内注射。给药用于所述药物组合物中或用于进行本发明的方法的蛋白，可通过多种常用方式进行，例如口服，吸入，局部应用或用于皮肤，皮下，腹膜内，胃肠外或静脉内注射。静脉内给药哺乳动物，例如人类病人，是优选的。可选，可将化合物以局部而非系统的方式给药，例如通过将所述化合物注射入目的作用位点。

组合物/配制剂

用于本发明的药物组合物因此可以使用一种或多种生理上可接受的载体(包扩赋形剂和辅料)以常见的方式进行配制，所述载体可促进将该活性化合物加工成可药用的制剂。这些药物组合物可以由例如，通过普通的混合，溶解，颗粒化，制备糖衣丸，研磨，乳化，装入胶囊，截留(entrapping)，或冻干法制备。适合的配制剂有赖于所选的给药途径。当治疗有效量的本发明的蛋白口服给药时，本发明的蛋白可为片剂，胶囊，粉末，溶液或酞剂的形式。如果以片剂的形式给药，本发明的药物组合物还可以含有固相载体例如凝胶或辅料。所述片剂，胶囊，以及粉末含有约5-95%的本发明的蛋白，并有选含有约25-90%的本发明的蛋白。当以液体形式给药时，可添加液体载体例如水，汽油，动物或植物油例如花生油，矿物油，大豆油或芝麻油，或者合成油。液体形式的药物组合物还可包含生理盐水，葡聚糖，或其它糖类的溶液，或者二醇例如乙二醇，丙二醇或聚乙二醇。当以液体形式给药时，该药物组合物含有约0.5-90%重量的本发明的蛋白，并有选含有1-50%重量的本发明的蛋白。

当通过静脉内，皮肤或皮下注射给药治疗有效量的本发明的蛋白时，本发明的蛋白将是不含致热源，可胃肠外给药的水溶液形式。这种胃肠外可接受的具有适当的pH值，等张性，稳定性，等等性质的蛋白溶液的制备

物，是本领域熟练技术人员已知的。优选的用于静脉内，皮肤或者皮下注射的药物组合物含有(除本发明的蛋白以外)等张的载体，例如氯化钠注射液，乳酸林格氏注射液，或者本领域已知的其它载体。本发明的药物组合物还包括稳定剂，防腐剂，缓冲液，抗氧化剂，或其它本领域熟练技术人员已知的添加剂。对于注射而言，本发明的试剂可配置成水溶液，优选是生理上相容的缓冲液，所用缓冲液例如汉克氏液(Hank's solution)，林格氏液，或者生理盐水。对于经粘膜给药，适合待透过的屏障得渗透剂被用于该制剂。这种渗透剂通常是本领域已知的。

对于口服给药，所述化合物可通过将活性化合物与本领域已知的可药用的载体结合而被轻易地配制。这样的载体使得本发明的化合物能够配制成片剂，丸剂，糖衣丸，胶囊，液体，凝胶，糖浆，浆，悬液等等，用于待治疗的病人口服。用于口服的药物制备物可通过与固相赋形剂结合而获得，可选地研磨产生的混合物，并且如需要，在加入适宜的辅剂后加工颗粒的混合物，以获得片剂或糖丸的核心。适宜的赋形剂是，具体为，填充物例如糖类，包括乳糖，蔗糖，甘露糖或山梨糖；纤维素制备物例如，玉米淀粉，小麦淀粉，大米淀粉，土豆淀粉，凝胶，黄芪胶，甲基纤维素，羟丙甲基纤维素，羧甲基纤维素钠，和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要，可加入分解剂，例如交联的聚乙烯吡咯烷酮，琼脂，或藻酸，或其盐例如藻酸钠。可给糖衣丸核心提供适宜的包衣。为此目的，可是用浓缩的蔗糖溶液，其可选地含有阿拉伯胶，滑石，聚乙烯吡咯烷酮，carbopol 凝胶，聚乙二醇，和/或二氧化钛，漆液，以及适宜的有机溶剂或溶剂混合物。染料和色素可加入所述片剂或糖衣丸中，用来鉴别或表征活性化合物制剂的不同组合。

可口服的药物制备物包括凝胶制成的推入式(push-fit)胶囊，以及柔软的密封的凝胶和可塑剂制成的胶囊，所述可塑剂例如甘油或山梨醇。推入式胶囊可以包含活性成分，其与填充物例如乳糖，结合物例如淀粉，和/或润滑剂例如滑石或硬脂酸镁，以及可选的稳定剂混合。在软性胶囊中，所述活性化合物可以溶解或悬浮在适宜的液体中，例如脂肪类油，液体石蜡，或者液体聚乙二醇。此外，还可加入稳定剂。所有口服给药的配制剂应是

适宜这种给药的剂型。对于经颊给药，所述组合物可以采用以通常方式配制的片剂或锭剂的形式。

对于通过吸入给药，根据本发明所用的化合物可以来自压缩的包装或雾化器的气溶胶喷雾的形式，使用适宜的推进物方便地递送，所述推进物例如二氯二氟甲烷，三氯氟甲烷，二氯四氟乙烷，二氧化碳或者其他适宜的气体。如果是压缩的气溶胶，所述剂型单位可以通过提供活瓣递送来定量。例如用于吸入器或吹入器的凝胶的胶囊和药筒，可配制成含有化合物的粉末混合物和适宜的粉末基质例如乳糖或淀粉。所述化合物可配置成用于通过注射胃肠外给药，例如通过弹丸注射或者连续输注。用于注射的配制剂可以单位剂量形式存在于，例如安瓿，或多剂型容器中，还可含有加入的防腐剂。所述组合物可以是悬液，溶液或油性或水性载体中的乳液的形式，并且包含配制用试剂(formulatory agents)例如悬浮剂，稳定剂和/或分散剂。

用于胃肠外给药的药物配制剂包括水中可溶形式的活性化合物的水溶液。此外，活性化合物的悬液可制备成适宜的油性注射悬液。适宜的亲脂性溶剂或载体包括脂肪族油类，例如芝麻油，或合成的脂肪酸酯类，例如乙基油酸酯或甘油三酸酯，或者脂质体。含水的注射悬浮液含有适宜的稳定剂或试剂，其可增加所述化合物的溶解性，使得可制备高浓度的溶液。可选地，所述活性成分可以是粉末形式，在使用之前，可用适宜的载体例如无菌的不含致热源的水溶解。

所述化合物也可配制成直肠用组合物的形式，例如栓剂或灌肠剂，例如含有通常的栓剂基质，例如可可油或其它甘油酯。除了前述的配制剂外，所述化合物还可配制成贮存制备物。这种长效配制剂可通过植入(例如皮下或肌肉内)或通过肌肉内注射给药。因此，例如所述化合物可与适宜的聚合物或疏水物质(例如可接受的油中的乳状液)或离子交换树脂配在一起，或者配制成基本不可溶的衍生物，例如配制成基本不可溶的盐类。

本发明的疏水化合物的药物载体是助溶系统，包含苯乙醇，非极性表面活性剂，可与水混合的有机共聚物，以及水相。所述助溶系统可以是VPD助溶系统。VPD是一种溶液，包含3% w/v的苯乙醇，8% w/v的非极性表面活性剂聚山梨醇酯 80，和 65% w/v的聚乙二醇 300，溶于无水乙醇

中。VPD 助溶系统(VPD:5W)由用 5% 的葡聚糖水溶液按 1: 1 稀释的 VPD 组成。所述助溶系统有效地溶解疏水性化合物, 并且其自身在系统给药时产生的毒性较低。通常, 助溶系统的比例可在较大范围内变化, 而不会破坏其溶解力和毒性。此外, 助溶系统的成分也可不同; 例如, 其它低毒性

5 的非极性表面活性剂可用来代替聚山梨醇酯 80; 聚乙二醇的比例可以变化; 其它生物可相容的聚合物可替代聚乙二醇, 例如聚乙烯吡咯烷酮, 以及其它糖或聚糖也可替代葡聚糖。可选地, 其它用于疏水性药物化合物的递送系统也可被使用。脂质体和乳剂是已知的疏水药物的递送载体的实例。也可用一些有机溶剂例如二甲基亚砜, 但通常其毒性较大。此外, 所述化合物

10 物可是用持续释放系统递送, 例如含有治疗剂的固体疏水聚合物的半透性基质。各种缓释物质已经确立并且是本领域熟练技术人员已知的。缓释胶囊可根据其化学性质在几个星期到超过 100 天的时间段内释放所述化合物。根据治疗剂的化学性质和生物稳定性, 还可使用其它蛋白稳定化的方案。

所述药物组合物还包含适宜的固相或凝胶相载体或赋形剂。这种载体

15 或赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙, 磷酸钙, 各种糖, 淀粉, 纤维素衍生物, 凝胶和聚合物例如聚乙二醇。本发明的许多蛋白酶抑制性化合物可作为具有可药用的抗衡离子的盐。这种可药用的碱加成盐是保持游离酸的生物效力和性质的那些盐, 通过与无机或有机碱反应获得, 所述无机或有机碱例如氢氧化钠, 氢氧化镁, 氨水, 三烷基胺, 二烷基胺, 单烷基胺,

20 二价氨基酸, 乙酸钠, 苯甲酸钾, 三乙醇胺, 等等诸如此类。

本发明的药物组合物可以是本发明的蛋白与蛋白或肽抗原的复合物的形式。本发明的药物组合物可以是脂质体的形式, 其中本发明的蛋白是结合的, 其除了可以和其它可药用的载体结合以外, 还可以和两性试剂例如以聚合的微束形式, 不可溶的单分子层, 液体结晶, 或薄层的形式存在于

25 水溶液中的脂类。用于脂质体制制剂的适宜的脂类包括, 但不限于, 单甘油酯, 二甘油酯, 硫化物, 溶血卵磷脂, 磷脂, 皂角苷, 胆酸等。本领域熟练技术人员可以制备这样的脂质体制制剂, 如美国专利 4,235,871; 4,501,728; 4,837,028; 和 4,737,323 中所述, 每篇文献都包含在文中作为参考。

本发明的蛋白在药物组合物中的量有赖于正在治疗的疾病的病情的性质和严重性，以及病人接受过的治疗的性质。最后，主治医师决定用于治疗每个个体病人的本发明的蛋白的量。开始，主治医师将给药低剂量的本发明的蛋白，并观察病人的反应。较大剂量的本发明的蛋白会在从病人获得乐观的治疗效果时给予，并且在该时间点，所述剂量不再增加。多种用于本发明的治疗方法的药物组合物包含约 0.01 μg 到约 100 mg (优选约 0.1 μg 到约 10 mg, 更优选 about 0.1 μg to about 1 mg) 本发明的蛋白每公斤体重。给药时，本发明所用的药物组合物是不含致热源，生理上可接受的形式。除本发明的蛋白以外的治疗上有用的试剂，可以可选地或额外地，同时或序贯地与本发明的方法中的组合物一起给药。

本发明的多核苷酸也可用于基因治疗。这种多核苷酸可在体内或活体外被引入细胞内用于在受试哺乳动物中表达。本发明的多核苷酸还可通过已知的将核酸引入细胞或有机体的方法(包括，但不限于以病毒载体裸露的 DNA 的形式)给药。细胞可以在存在本发明的蛋白的条件下离体培养，以进行增殖或者在这种细胞中产生所需的效果或活性。治疗的细胞可被引入体内用于治疗。

有效剂量

适合用于本发明的药物组合物包括一种组合物，它包含实现预期目的的有效量的活性成分。更具体地，治疗有效量指有效预防被治疗的受试者的病情进展或缓解其症状的量。可确定有效剂量的适宜性质包括测定 LEC 和/或 BEC 的生长刺激或抑制，细胞分化成 LEC 和/或 BEC 的速率或程度，细胞表达模式改变成或偏离 LEC 或 BEC 的特定表达模式的倾向性，等等诸如此类。测定有效量在本领域熟练技术人员的能力范围内，尤其是在本发明公开内容的启发下。对于任何用于本发明的方法中的化合物而言，所述治疗有效剂量首先可以通过细胞培养试验来估计。例如，对于抑制性方法，可将药剂给予动物模型，得到包含细胞培养测定的 IC₅₀ (即检验化合物的浓度是最大抑制浓度的一半) 的循环浓度范围。这样的信息可用来更准确地测定人类所用的剂量。

治疗有效剂量指化合物的量导致症状缓解，或者使患有致命性疾病的病人的生存期延长。这种化合物的毒性和治疗有效性可通过标准的药学方

法在细胞培养或试验动物中测定，例如用于测定 LD50(使 50 % 的数量致死的剂量)或 ED50(对 50 % 的数量治疗有效的剂量)的方法。毒性和治疗性效果的剂量比是治疗的指数，并且可表示为 LD50 和 ED50 之间的比例。显示高治疗指数的化合物是优选的。从这些细胞培养试验和动物研究获得的数据

5 可用于配制较大范围的用于人类的剂量。这种化合物的剂量优选在包括 ED50 的循环浓度的范围内，所述范围几乎没有或没有毒性。所述剂量可在该范围内变化，根据所用剂量和给药途径而不同。准确的配制，给药途径和剂量可根据病人的病情由医师决定。见例如，Fingl 等，1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1.

- 10 给药的组合物的剂量有赖于被治疗的受试者，该受试者的体重，病情的严重程度，给药的方式和医师的判断。

包装

- 如果需要，组合物可以存在于包装或含有一个或多个含活性成分的单位剂量形式的配药器中。所述包装可，例如，包含金属或塑料箔的例如泡
- 15 状包装。所述包装或配药器可附有给药说明。也可制备配制在相容的药物载体中包含本发明的化合物的组合物，所述组合物置于适宜的容器中，并包含治疗所述指征说明。

- 此外，本发明包含利用这种组合物制备用于治疗细胞或例如人的有机体的药物，所述细胞或有机体患有 LEC 和/或 BEC 过度增生或增殖低下的
- 20 疾病，例如淋巴水肿，淋巴管瘤，淋巴管骨髓瘤，淋巴管肌瘤病，淋巴管扩张，淋巴肉瘤，或淋巴管硬化，所述治疗包括将有效量或剂量的本发明的组合物给药所述细胞或有机体。适宜的组合物包括，但不限于，任何根据本发明的多核苷酸(例如反义 多核苷酸)，和本发明的任何多肽，特异性识别本发明的多核苷酸或多肽的抗体，对于调节本发明的多核苷酸的表达有效
- 25 的小分子，等等诸如此类。还涉及本发明的组合物用于制备药物来改善与 LEC 或 BEC 相关的疾病或病症有关的症状。

抗体

- 抗体可用于调节本发明的多肽，这是由于可容易地产生具有相关特异性的抗体的能力，以及将抗体用于人类治疗的技术的不断改进。因此本发
- 30 明涉及使用对本发明的目的多肽特异的抗体(例如单克隆 和多克隆抗体，单

- 链抗体, 嵌合抗体, 双功能、双特异性抗体, 人源化抗体, 人抗体, 以及互补决定区(CDR)移植的抗体, 包括含有特异性识别本发明的多肽地 CDR 序列)。优选的抗体是人抗体, 例如在转基因动物中产生的抗体, 其可根据 WO93/11236, published June 20, 1993, 其全文包含在文中作为参考所述的方法制备和鉴定。本发明还提供了抗体片段, 包括 Fab, Fab, F(ab)₂, 和 Fv。术语"对...的特异性"用于描述本发明的抗体时, 指本发明的抗体的可变区识别并结合目的多肽的水平与其结合其他物质相比, 可见测出有所不同, 其水平较高(即, 尽管可能存在局部的序列同一性, 同源性或相似性, 通过测定结合亲合力的差异, 能够区别目的多肽和其它已知的同家族多肽)。也应理解特异性抗体也和其它蛋白反应(例如, 金黄色葡萄球菌蛋白 A 或 ELISA 技术中的其它抗体), 所述反应是通过抗体的可变区以外的序列, 具体为该分子的恒定区。测定本发明的抗体的结合特异性的筛选法是本领域已知并常用的。这些方法的详述见 Harlow 等 (Eds.), *Antibodies A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), 第 6 章。
- 15 非人抗体可以通过本领域已知的任何方法人源化。优选的“人源化”抗体具有人恒定区, 而所述抗体的可变区, 或至少一个互补决定区(CDR)来自非人物种。人源化非人抗体的方法是本领域已知的(见美国专利 5,585,089, 和 5,693,762)。通常人源化抗体具有一个或多个引入其框架区的来自非人来源的氨基酸。可例如使用 Jones 等 [Nature 321: 522-525, (1986)], Riechmann 等, [Nature, 332: 323-327, (1988)] 和 Verhoeyen 等 [Science 239:1534-1536, (1988)]所述的方法进行, 即通过用人抗体相应区取代至少一部分啮齿类 CDR。多种用于制备改造的抗体的方法例如, 在 Owens 和 Young, J. Immunol. Meth., 168:149-165 (1994)中描述。可将进一步的改变引入所述抗体的框架区来调节其亲合力或免疫源性。
- 25 本发明还提供了产生本发明的抗体的杂交瘤。本发明的抗体可用于检测和/或纯化本发明的多肽。

本发明的多肽和/或多核苷酸也可用于免疫动物以获得与所述多肽特异性反应的多克隆或单克隆抗体。这种抗体可使用整个多肽或其片段作为免疫源而获得。所述肽免疫源还包含位于羧基末端的半胱氨酸残基, 并且可以 30 以和例如匙孔血蓝蛋白(KLH)的半抗原偶联。合成这种多肽的方法是本领域

已知的,例如见 R. P. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2154 (1963); J. L. Krstenansky,等, FEBS Lett. 211: 10 (1987)。与本发明的蛋白结合的单克隆抗体可用于多肽的免疫检测的诊断性试剂。与所述多肽结合的中和性单克隆抗体可以是用于与所述多肽相关的疾病的治疗剂,以及用于治疗涉及该多肽的异常表达的一些形式的癌症。如果是癌细胞或白血病细胞,该多肽的中和性单克隆抗体可用于检测和防止所述多肽介导的癌细胞的转移性播散。通常,用于制备多克隆和单克隆抗体的技术以及能够产生所需抗体的杂交瘤是本领域已知的(Campbell, A. M., Monoclonal Antibodies Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry 和 Molecular Biology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1984); St. Groth 等, J. Immunol. 35:1-21 (1990); Kohler 和 Milstein, Nature 256:495-497 (1975)), the trioma 技术,人 B 细胞杂交瘤技术(Kozbor 等, Immunology Today 4:72 (1983); Cole 等, in Monoclonal Antibodies 和 Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96 页)。

任何已知产生抗体的动物(小鼠,兔子等)可用本发明的肽或多肽来免疫。免疫的方法是本领域已知的。这种方法包括所述多肽的皮下或腹膜内注射。本领域熟练技术人员认识到用于免疫的本发明 ORF 编码的多肽的量根据被免疫的动物,肽的抗原性,以及注射的部位不同而变化。所述蛋白用作免疫原,可被修饰或在辅剂中给药以提高所述蛋白的抗原性。提高蛋白抗原性的方法是本领域已知的,并且包括,但不限于,将所述抗原和异源性蛋白(例如球蛋白或 β -半乳糖苷酶)偶联,或者通过在免疫过程中掺入辅剂。

对于单克隆抗体,来自免疫后动物的脾细胞被取出,与骨髓瘤细胞例如 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞融合,使其成为产生单克隆抗体的杂交瘤细胞。本领域已知的方法中的任何一种可用于鉴定可产生具有所需特征的抗体的杂交瘤细胞。这些包括使用 ELISA 试验,Western 印迹,或放射性免疫试验来检测杂交瘤(Lutz 等, Exp. Cell Research. 175:109-124. 1988)。分泌所需抗体的杂交瘤被克隆,并使用本领域已知的方法确定其类型和亚型(Campbell, A. M., Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry 和 Molecular Biology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam,

The Netherlands (1984))。用于制备单链抗体的技术(美国专利 4,946,778) 可被用来制备本发明的多肽的单链抗体。

对于多克隆抗体, 含有抗体的抗血清从被免疫的动物中分离出来, 并使用上述方法之一筛选具有所需特异性的抗体的存在。本发明还提供了上述抗体的可检测的标记形式。抗体的可检测标记可通过使用放射性同位素, 亲合标记(例如生物素, 抗生物素蛋白, 等等诸如此类), 酶标记(例如辣根过氧化物酶, 碱性磷酸酶, 等等诸如此类), 荧光标记物(例如 FITC 或罗丹明, 等等诸如此类), 顺磁性原子, 等等诸如此类。获得这种标记的方法是本领域已知的, 例如, 见 Sternberger, L. A.等, J. Histochem. Cytochem. 18:315. 1970; Bayer, E. A.等, Meth. Enzym. 62:308 (1979); Engval, E.等, Immunol. 109:129. 1972; 和 Goding, J. W. J. Immunol. Meth. 13:215. (1976)。

本发明的标记的抗体可用在活体外, 活体内, 以及原位试验中来鉴定表达目的多肽的片段的细胞或组织。所述抗体也可直接用于治疗或其它诊断。本发明还提供了固定在固相支持物上的上述抗体。这种固相支持物的实例包括塑料例如聚碳酸酯, 复合碳水化合物例如琼脂糖和琼脂糖凝胶, 以及丙烯酸树脂例如聚丙烯酸和乳胶珠。将抗体偶联到这种固相支持物上的技术是本领域已知的(Weir, D. M.等, "H and book of Experimental Immunology" 4th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, Engl 和, Chapter 10 (1986); Jacoby, W. D.等, Meth. Enzym. 34 Academic Press, N.Y. (1974))。本发明的固定的抗体可用在体外, 体内以及原位试验中, 还用于本发明的蛋白的免疫亲和力纯化。

可机读的序列

在该实施方案的一种应用中, 本发明的核苷酸序列可记载在可机读的介质上。本文的“可机读介质”指任何可被计算机阅读并直接获取的介质。这种介质包括, 但不限于, 磁性储存介质, 例如软盘, 硬盘储存介质, 和磁盘; 光学储存介质, 例如 CD-ROM; 电学储存介质, 例如 RAM 和 ROM; 以及这些种类的杂合介质例如磁性/光学储存介质。熟练技术人员可轻易采用任何已知的将信息记载在计算机可读的介质上的方法来获得包含本发明的核苷酸序列的产品。

多种本领域熟练技术人员可得的数据存储结构可用来产生其上记载了本发明的核苷酸序列的可机读的介质。数据存储结构的选择通常基于所选的获取存储的信息的方法。此外，多种数据处理程序和格式可用来将本发明的核苷酸序列的信息存储在可机读的介质上。序列信息可存在于文字处
5 理文本文件中，在可购得的例如 WordPerfect 和 Microsoft Word 中格式化，或作为 ASCII 文件的形式，存储在数据库应用程序(database application)中，例如 DB2, Sybase, Oracle, 等诸如此类。本领域熟练技术人员可轻易采用任何数量的数据处理器构建的格式(例如文本文件或数据库)，来获得的其上记载了本发明的核苷酸序列的计算机可读的介质。通过提供 SEQ ID NO: 1-30,
10 45, 47, 49 和 51 的核苷酸序列或其代表性片段，或者可机读形式的与 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51 具有 99.9% 的序列同一性的核苷酸片段，本领域熟练技术人员可常规地获取用于多种目的的序列信息。计算机软件可公开获得，使得熟练技术人员可获取计算机可读介质上的序列信息。下面的实施例显示了如何在 Sybase 系统上使用执行 BLAST (Altschul 等, J. Mol.
15 Biol. 215:403-410. 1990) 和 BLAZE (Brutlag 等, Comp. Chem. 17:203-207 (1993))搜索算法(search algorithms)的软件来鉴定核酸序列内的开放阅读框架(ORFs)。这种 ORFs 可以是编码蛋白的片段，并且可用于制备商业上重要的蛋白，例如用于发酵反应中的酶以及制备商业上有用的代谢物。

本文的“基于计算机的系统”指用于分析本发明的核苷酸序列信息的
20 硬件工具，软件工具，以及数据存储工具。本发明的基于计算机的系统的最少硬件工具包括一个中央处理单元(CPU)，输入工具，输出工具和数据存储工具。本领域熟练技术人员可轻易理解目前可得的基于计算机的系统中的任何一种都适宜用于本发明中。如上述，本发明的基于计算机的系统包含其中存储了本发明的核苷酸序列的一种数据存储工具，以及必要的硬件
25 和软件工具用于支持和执行搜索工具(means)。

本文的“搜索工具”指一种或多种能够在基于计算机的系统上执行来比较靶序列或靶结构基序和存储在数据存储工具中的序列信息。搜索工具用来鉴定已知序列的片段或区，所述序列与具体的靶序列或靶基序匹配。各种已知的算法已被公开，并且多种可购得的用于进行搜索方法的软件被
30 用于并且可被用于本发明的基于计算机的系统。这样的软件的实例包括，

但不限于, MacPattern (EMBL), BLASTN 和 BLASTA (NPOLYPEPTIDEIA)。熟练技术人员可容易地理解任何一种可得的用于进行同源性搜索的算法或执行软件包可用于本发明的基于计算机的系统。本文的“靶序列”可以是6个或更多个核苷酸的核酸或2个或更多个氨基酸的氨基酸序列。熟练技术人员可容易地理解靶序列越长, 靶序列在数据库中作为随机出现的序列的可能性就越小。靶序列最优选的序列长度是从约10-100个氨基酸或者从约30-300个核苷酸残基。然而, 可以理解搜索商业上重要的片段, 例如涉及基因表达和蛋白加工的序列片段可以较短。

本文的“靶结构基序”, 或“靶基序”指任何合理选出的序列或序列的组合, 其中的序列是基于靶基序的折叠形成的三位结构。本领域已知多种靶基序。蛋白靶基序包括, 但不限于, 酶活性位点和信号序列。核酸靶基序包括, 但不限于, 启动子序列, 发夹结构, 和可诱导的表达元件(蛋白结合序列)。

诊断性试验和试剂盒

本发明还提供了诊断性试验, 以及相关的试剂盒, 用于过度增殖和/或增殖低下的例如 LEC 或 BEC 的内皮细胞的病症或疾病。这些试验包括通过使用本发明的核酸探针或抗体鉴定试验样品中本发明的 ORFs 之一或其同源物的存在或表达。

通常, 检测本发明的多核苷酸的方法包括将样品与结合多核苷酸并形成复合物的化合物接触足够长的时间以形成复合物, 并检测所述复合物, 使得如果检测到所述复合物, 就表示在样品中检测到了本发明的多核苷酸。

这种方法也可包括将样品在严格的杂交条件下和核酸引物接触, 所述核酸引物在这样的条件下退火结合本法发明的多核苷酸, 然后扩增退火的多核苷酸, 使得如果多核苷酸被扩增, 本发明的多核苷酸在样品中被检测出。

通常, 检测本发明的多肽的方法包括样品与结合多肽并形成复合物的化合物接触足够长的时间以形成复合物, 并检测所述复合物, 使得如果检测到所述复合物, 就表示在样品中检测到了本发明的多肽。具体而言, 这种方法包括将检验样品和本发明的一种或多种抗体或者一种或多种核酸探针一起温育, 并测定核酸探针或抗体与检验样品内的成分的结合。

将核酸探针或抗体与检验样品共同温育的条件各异。温育条件有赖于试验使用的模式，采用的检验方法，以及试验所用的核酸探针或抗体的类型和性质。本领域熟练技术人员可认识到任何一种常用的可得的杂交，扩增或免疫试验形式可轻易采用本发明的核酸探针或抗体。这种试验的实例

5 见 Chard, T., *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1986); Bullock, G. R. 等, *Techniques in Immunocytochemistry*, Academic Press, Orlando, Fla. Vol. 1 (1982), Vol. 2 (1983), Vol. 3 (1985); Tijssen, P., *Practice and Theory of immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*,
10 Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1985)。本发明的检验样品包括细胞，细胞的蛋白或膜提取物，或者生物液体例如痰液，血液，血清，血浆或尿液。用于本发明的方法的检验样品可根据试验模式，检验方法的性质，以及被检测的组织，细胞或提取物而不同。制备细胞的蛋白提取物或膜提取物的方法是本领域已知的，并可被用来获得与使用的系统
15 相容的样品。

在本发明的另一个实施方案中，提供了含有必要的反应剂以进行本发明的试验的试剂盒。在一个实施方案中，本发明提供了隔室试剂盒，来容纳紧邻的一个或多个容器，所述容器包括：(a) 第一容器，它包含本发明的一种探针或抗体；和(b) 一种或多种其它容器，包含一种或多种洗涤剂，能够检测结合的探针或抗体的存在的试剂。

20

具体而言，隔室试剂盒包括任何其中的反应剂包含在分离的容器中的试剂盒。这种容器包括小的玻璃容器，塑料容器或者塑料或纸的条状容器。这种容器使得技术人员有效地将反应剂从一个隔室转移到另一个隔室，使得样品和试剂不被交叉污染，并且每个容器中的试剂或溶液可以以定量的方式从一个隔室加入另一个隔室中。这样的容器包括能够容纳检验样品的容器，包含试验所用的一种或多种抗体的容器，包含洗涤剂(例如磷酸盐缓冲的盐溶液，Tris 缓冲液，等诸如此类)的容器，以及含有用于检测结合的抗体或探针的试剂的容器。检测试剂的类型包括标记的核酸探针，标记的二级抗体，或者可选地，如果初级抗体被标记，还包括能够和标记的抗

25

体反应的酶或抗体结合剂。本领域熟练技术人员已知，本发明公开的探针和抗体可并入本领域已知的试剂盒形式中。

实施例

用于实施例中的方法如下：

5 抗体

使用抗 VEGFR-3 单克隆抗体 (克隆 2E11D11; 见国际申请 PCT/US02/22164, 由 WO 03/006104 公开), PAL-E (MoNOsan), CD31 (Dako), N-钙粘着蛋白, VE-钙粘着蛋白, β -连环蛋白 和片珠蛋白 和多克隆兔抗人 podoplanin (Breiteneder-Geleff, S., 等, Am. J. Pathol. 154:385-394 (1999)). 小鼠
10 抗人整联蛋白 9 由 Dr. Dean Sheppard (University of California at San Francisco, San Francisco) 和 Dr. Curzio Rüegg (University of Lausanne Medical School, Lausanne, Switzerland) 提供。荧光染料偶联的二级抗体来自 Jackson Immunoresearch。

细胞培养和转染

15 人羊膜上皮细胞在存在 5% 胎牛血清的 Med199 培养基中培养。人真皮微血管内皮细胞来自 PromoCell (Heidelberg, Germany)。抗 Podoplanin 抗体, MACS 胶质超顺磁 MicroBeads 和山羊抗兔 IgG 抗体偶联 (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), 根据出厂说明, 使用 LD 及 MS 分离柱和 Midi/MiniMACS 分离器 (Miltenyi Biotech) 进行细胞分类。分离的细胞在纤连
20 蛋白包被的 (10 μ g/ml, Sigma, St. Louis, MO) 板上培养 (Mäkinen, T., 等, EMBO J. 20:4762-4773. 2001)。

RNA 分离, Northern 印迹和微阵列分析

总 RNA 被分离并在 Rneasy 中使用 DNaseI 处理 (Qiagen, Valencia, CA)。³²P-标记的和 Atlas 滤纸杂交的探针 (Clontech) 使用 2-5 μ g 总 RNA 根据出厂
25 说明制备, 但探针使用 Nick-25 柱 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 纯化。杂交并洗涤后, 该膜用 Fuji BAS 100 phosphorimager 分析。对于 Affymetrix® 分析, 四种独立的 BEC 和 LEC 样品的制备和杂交使用从不同个体中分离的四组细胞提取的 RNA 进行。对于 Affymetrix® 表达分析, 使用 5 μ g 总 RNA 使用 Custom SuperScript ds-cDNA 合成试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 来合
30 成双链 cDNA。随后使用 Enzo BioArray™ HighYield™ RNA 转录标记试

剂盒 (Affymetrix, Santa Clara, CA)制备生物素标记的 cRNA, 并用 RNeasy 柱(Qiagen, Valencia, CA)去除未结合的核苷酸。人基因组 95Av2 微阵(用于 Prox-1 试验)和 9513-E 微阵列(主要是非特异性(uncharacterized)的 EST 序列)的杂交, 洗涤以及染色, 是根据出厂说明进行的(Affymetrix, GeneChip
5 Expression Analysis Technical Manual)。所述探针阵列在 570 nm 使用 Agilent GeneArray® Scanner 进行检测, 并且用 Affymetrix® Microarray Suite version 5.0 和 Data Mining Tool version 3.0 分析定量扫描的读数。使用 100 的总放大强度(global scaling intensity)计算杂交强度。

差异表达的序列用于搜索 the National Center for Biotechnology
10 Information 和 the National Library of Medicine 的 GenBank 数据库中的 EST 重叠群。使用 NCBI/NLM 提供的 orf 发现软件预测(NCBI/NLM)和开放阅读框架。SOSUI 系统用于预测来自蛋白序列的跨膜螺旋和信号序列, 并且使用 P fam(比对和 HMMs 的蛋白家族数据库)预测其它蛋白结构域的构建。

免疫荧光和免疫组织化学

15 细胞在盖玻片上培养, 使用 4% 的多聚甲醛固定, 并用磷酸盐缓冲盐溶液(PBS)中的 Triton-X100 透化, 并用初级抗体进行染色。对于整联蛋白 9, 染色的活细胞和抗体一起在冰上保持 15 分钟然后进行固定。细胞可进一步使用 FITC 或 TRITC 偶联的二级抗体进行染色。F-肌动蛋白使用得克萨斯红(TexasRed)偶联的鬼笔环肽(Molecular Probes, Eugene, OR)染色。使用
20 Hoechst 33258 荧光染料(Sigma)进行复染, 并使用 Zeiss Axioplan 2 荧光显微镜观察。

手术取出的正常人皮肤包埋于 Tissue-Tek® (Sakura, The Netherlands)中, 然后进行冷冻和切片。切片(6 μ m)在冷丙酮中固定 10 分钟, 然后使用初级抗体进行染色, 接着使用 Vectastain Elite ABC 试剂盒(载体 Laboratories,
25 Burlingame, CA)和 3-氨基-9-乙基咔唑 (Sigma, St. Louis, MO)进行染色。

实施例 1

鉴定差异表达的基因

血管和淋巴管内皮细胞(分别为 BEC 和 LEC)从人皮肤微血管内皮细胞培养物中, 使用微磁珠和抗淋巴管内皮细胞表面标记 podoplanin
30 (Breiteneder-Geleff, S.,等, Am. J. Pathol. 154:385-394 (1999); Mäkinen, T.,等,

EMBO J. 20:4762-4773 (2001))进行分离。分离的 BEC 和 LEC 群使用抗 VEGFR-3 抗体或 podoplanin 通过免疫荧光评估为大于 99%。分离的细胞培养两代后,从培养物中分离 RNA 并将其和寡核苷酸微阵列杂交,所述微阵列含有约 12000 已知的基因,即预期人转录物总数的约 1/3。

5 如预期的那样, podoplanin, 粒桥蛋白 I/II 和巨细胞甘露糖受体(已知的淋巴管内皮细胞标记), 被发现在 LEC 中特异。见, Breiteneder-Geleff, S., 等, Am. J. Pathol. 154:385-394 (1999); Ebata, N., 等, Microvasc. Res. 61:40-48. (2001); 和 Irjala, H., 等, J. Exp. Med. 194:1033-1041 (2001)。由于这些结果与已知的体内和体外基因表达模式一致, 对基因表达模式进行了进一步的表
10 征。当在复制分析中选择的复制的信号与 $\log_2$ 的比值为 1.0(两倍差异)时, 超过 400 个基因被发现在 LEC 和 BEC 中的表达有差异。表达有差异的基因的一些实例在表 1 中按其功能分别显示, 并在表 2-4 中提供了差异表达的基因的完整列表。表 3 和 4 提供了差异表达的基因的完整列表, 所述列表包括 GenBank 的保藏号和独立收获的 BEC 和 LEC 的表达水平之间的差异
15 (信号的 $\log_2$ 比值 $\pm$ s.d.)。通过对 31 个选出的基因的 Northern 印迹和免疫荧光证实了微阵列的数据(见图 1)。

表 3 和 4 中列出的每种基因都通过基因保藏号鉴定, 该保藏号与公开的基因组数据库例如 NCBI 保管的 GenBank 数据库中发现的基因的序列相关。这些序列包含在文中作为参考。

表 1

选出的在 BEC 和 LEC 中差异表达的基因类型

	血管内皮细胞	淋巴管内皮细胞
粘附分子	整联蛋白 $\alpha 5$ 整联蛋白 $\beta 5, \beta 4^*$ ICAM-1*, ICAM-2 N-钙粘着蛋白* selectin P, selectin E* 原钙粘着蛋白 (protocaherin) 42* CD44* EphrinB1*	整联蛋白 $\alpha 9^*$ 整联蛋白 $\alpha 1$ 巨噬细胞甘露糖受体 I*

	血管内皮细胞	淋巴管内皮细胞
细胞骨架蛋白	粘着斑蛋白 claudin 7* 肌动蛋白, α 2 抑制蛋白 2	粒桥蛋白 I 和 II* 内收蛋白 γ α -辅肌动蛋白-2 相关 LIM 蛋白 *
ECM 蛋白	胶原蛋白 8A1*, 6A1*, 基质 Gla 蛋白* 4A2/13A1*, 1A2* 层粘连蛋白* 多能聚糖* 蛋白多糖 1	
ECM 调节	MMP-1, MMP-10, MMP-14* uPA*, tPA* 组织蛋白酶 C	TIMP-3
受体酪氨酸激酶 和其它蛋白激酶	VEGFR-1 (sVEGFR-1*)	VEGFR-3* Lyn Dyrk3
转录因子	STAT6* TFEC* MAD-3* HMGI-C* JUN* GATA2	prox-1* MEF2C* c-maf* 叉头盒 M1 CREM 耳(ear)-3
生长因子	VEGF-C* 胎盘生长因子	造血因子-2
细胞因子, 趋化因子 和受体	IL-8*, IL-6* 干细胞因子* 单核细胞趋化蛋白 1 UFO/axl*	IL-7* SDF-1b*

	血管内皮细胞	淋巴管内皮细胞
	CXCR4	
	CCRL2/CKRX*	
	IL-4 受体	
细胞周期	p27*	Cdk-抑制物 p57KIP2*
	p21	细胞周期蛋白依赖的激酶抑制
	gadd45	物 3, CIP2
		细胞周期蛋白 E2*
		细胞周期蛋白 B1, B2*
氧化应激	硫氧还原蛋白还原酶 β *	含硒蛋白(selenoprotein)P*
其它	Neuropilin-1	podoplanin*
	HNMP-1*	MRC OX2
	内皮细胞蛋白 C/APC 受体	载脂蛋白 D
	Rnase A, 胰腺的*	Semaphorin 3A*
	TGF- β	脂肪酸结合蛋白 4
	LTBP-2	LITAF/Pig7*
	金属硫蛋白 I, II, III	IGFBP-2*
	环加氧酶 2*	piccolo*
	clusterin/载脂蛋白 J	单胺氧化酶 A
	神经元(neuronal) pentraxin I*	神经元(neuronal) pentraxin II*
总数	222 个基因	187 个基因

粗体显示的基因通过 Northern 印迹或免疫荧光确定，且用星号(*)标记的基因是仅在两种细胞系之一中特异性表达的基因。

表 2
已知的 LEC 特异性基因

基因	检测 *	保藏号	
		起始 EST	可能的基因
CD36	Af (S/4,3)	R20784	M98399
=COL1/TSP 受体, 脂肪酸转运蛋白		H54254	
β 1-syntrophin	Af (S/4,5)	氨基酸 447177	L31529
collectin 亚家族成员 12	Af (S/4,5)	R74387	NM_030781
分解蛋白 (disintegrin) 和	Af (S/4,3)	氨基酸 147933	
金属蛋白酶结构域 12			NM_003474
细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白	Af (S/4,0)	AI733018	
4			NM_005214
niban 蛋白 NM_022083 niban	Af (S/3,7)	氨基酸 554814	
蛋白			NM_052966
含多个 PDZ 区的蛋白, LNX	Af (S/3,5)	AI738919	NM_032622
MAGE-E1 蛋白	Af (S/3,2)	AI435112	NM_030801
上游刺激因子 1, USF1	Af (S/2,6)	氨基酸 701033	
(基因组匹配)			AB017568
与 YRPW 基序 1 相关的分裂的	Af (NS/2,6)	R61374	
毛 状 / 增 强 子			
(hairy/enhancer-of-split related			
with YRPW motif 1)			NM_012258
α -2,8-聚唾液酸转移酶	Af (S/2,5)	AI422986	L41680
semaphorin 6A1	Af (S/2,4)	W21965	NM_020796
鸟苷酸核苷酸结合蛋白	Af (S/2,3)	氨基酸 738022	
(G prot), γ 2			
膜整合蛋白 3	Af (S/2,3)	氨基酸 128019	NM_030926
与小鼠糖皮质激素诱导的基因	Af (S/2,0)	AI678080	
1 类似			XM_070471

基因	检测 *	起始 EST	保藏号
			可能的基因
YAP65 (Yes-相关蛋白 , 65 kDa Af (NS/2,0) AL048399			
MW)			X80507
17 kDa 胎脑蛋白	Af (NS/1,9)	H92988	NM_022343
Kruppel-样因子 5	Af (S/1,8)	AI815057	NM_001730
降钙素受体样, CGRP 类型 1 受体	Af (S/1,7)	AI741128,	
体		T94540	NM_005795, L76380
成纤维细胞生长因子 13, 同种型 1A	Af (NS/1,7)	AW014749	
			NM_004114
四区(tetraspan) NET-6 蛋白	Af (NS/1,6)	W22687	NM_014399
环指(ring finger)蛋白 11	Af (S/1,6)	AL079648	BC020964

* Af=Affymetrix, S=对 LEC 特异, NS=非特异(也在 BEC 中表达), 数字代表 BEC 和 LEC 之间的信号强度的 log2 比值

实施例 2

5 参与炎症的基因的 BEC-特异性表达基因

内皮细胞在炎症反应的多个步骤中起重要作用。它们募集白细胞到炎症灶, 并且有专门的内皮细胞(高内皮小静脉)负责使淋巴细胞回到次级淋巴器官中。此外, 内皮细胞调节白细胞的活化, 反之亦然, 所述内皮细胞通过白细胞分泌的分子被活化。与细胞培养中内皮细胞的活化相一致, BEC 表达高水平的前感染淋巴因子和趋化因子(干细胞因子, 白介素-8, 单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1))和受体(UFO/axl, CXCR4, IL-4R)见表 1。CXCR4 及其配体, 基质细胞来源的因子(SDF-1), 在捕获正常淋巴细胞, 单核细胞, 以及造血干细胞和造血祖细胞中起重要作用; CXCR4 或 SDF-1 的靶向活化导致心脏发生, 造血作用和血管发育受损(Tachibana,等, Nature 393:591-594. 1998)。SDF-1b 主要是由 LEC 产生的, 表明这一趋化因子可能参与表达 CXCR-4 的细胞的 LEC 启动的趋化作用。此外, CXCR4 和 SDF-1 在 BEC 和 LEC 上的表达的交互模式表明这两种细胞类型使用这些分子进行旁分泌联络。

实施例 3

细胞粘附, 细胞-细胞相互作用和细胞骨架分子

检测到 BEC 和 LEC 之间的更明显的差异是参与细胞骨架和细胞-细胞或细胞-基质相互作用的基因的表达 (见表 3 和 4)。例如, N-钙粘着蛋白, 它参与内皮细胞和 SMCs 以及周细胞之间的相互作用(Gerhardt, 等, Dev. Dyn. 218:472-479. 2000), 在 BEC 中被特异性检测到。这与淋巴毛细管不是被 SMCs 包围这一事实一致。在免疫染色中, N-钙粘着蛋白只在 BEC 中检测得到, 而 VE-钙粘着蛋白存在于这两种细胞类型中(图 2a-d)。钙粘着蛋白的胞质区与 β -连环蛋白, 片珠蛋白 (γ -连环蛋白) 和 p120^{cas} 反应, 并通过 α -肌动蛋白, 粘着斑蛋白, ZO-1, ZO-2 和 spectrin 将所述胞质区和肌动蛋白骨架相连接 (Provost, E. & Rimm, Curr. Op. Cell Biol. 11:567-572. 1999)。BEC 表达非常高水平的 β -连环蛋白 (图 2e,f) 和粘着斑蛋白, 而片珠蛋白主要存在于 LEC 上(图 2g,h)。LEC 和 BEC 的染色也显示了显著不同的肌动蛋白的结构。BEC 显示多种应激纤维, 所述纤维在 LEC 几乎完全缺失, 而在 LEC 中观察到了肌动蛋白在真皮中的分布(图 2i, j)。

整联蛋白是重要的细胞粘附介导体(Giancotti & Ruoslahti, Science 285:1028-1032. 1999)。它们是跨膜蛋白, 由两种多肽组成, 即 α 和 β 亚基。它们的胞外区结合细胞外基质蛋白, 而所述胞质区结合细胞骨架和参与信号转导的蛋白。整联蛋白 $\alpha 5$ 是纤连蛋白受体的亚基, 主要在 BEC 中表达。反之, 整联蛋白 $\alpha 1$ 和 $\alpha 9$, 分别为层粘连蛋白和胶原蛋白的受体以及为骨桥蛋白 和腱生蛋白的受体提供了亚基, 它们在 LEC 中表达(图 1a 和图 2k,l)。在人皮肤中, 整联蛋白 $\alpha 9$ 的抗体特异性染色淋巴毛细管, 而血管内皮细胞是阴性的(图 2m-o)。此外, 已有报道, 在动脉平滑肌细胞中检测到整联蛋白 $\alpha 9$ (Palmer, 等, J. Cell Biol. 123:1289-1297. 1993)。有趣的是, 整联蛋白 $\alpha 9$ 已显示对淋巴系统的正常发育是重要的。缺乏整联蛋白 $\alpha 9\beta 1$ 的小鼠由于乳糜胸(可能是淋巴)渗出而出现了呼吸衰竭, 并在出生后 6-12 天死亡(Huang, 等, Mol. Cell Biol. 20:5208-5215. 2000)。

BEC, 而不是 LEC, 产生两种层粘连蛋白和不同类型的胶原蛋白 (表 4)。在共培养中, 这些基底膜成分对于 LEC 的粘附和生长是必要的(Mäkinen, T., 等, EMBO J. 20:4762-4773. 2001)。此外, 许多参与基质降解和重塑的蛋白,

包括几种基质金属蛋白酶, 组织型和尿激酶 纤溶酶原激活物, 以及纤溶酶原激活物 I 主要在 BEC 中检测到, 而 while 基质金属蛋白酶的抑制物 -3 (TIMP-3)主要在 LEC 中检测到 (表 3 和图 1)。和其它可溶的 TIMPs 不同, TIMP-3 是细胞外基质的成分。据报道重组的 TIMP-3 可对生血因子应答, 从而抑制内皮细胞迁移和管形成, 如果是在肿瘤模型中表达, 重组的 TIMP-3 可很可能通过抑制肿瘤的扩张, 生长因子从细胞外基质的释放, 或者血管生成来抑制肿瘤生长(An 和-Apte,等, Biochemistry & Cell Biology 74:853-862. 1996)。

其它以前已知的基因在微阵列中被鉴定为 LEC-特异性 转录因子 or 跨膜蛋白。见表 5 和 6。

表 5
鉴定的转录因子

基因	检测 *	保藏号	
		起始 EST	可能的基因
与 Iroquois 相关的同源框 2 同源	Af (S/4,2)	氨基酸 936528 不是从人(18)克隆的	
与小鼠 odd-skipped 相关 1 锌指			
TF 相似	Af (S/3,3)	AI809953	(19)
来自 7q35-qter 的 PAC 克隆			
RP4-751H13	Af (S/2,3)	AC004877	
与小鼠糖皮质激素诱导的基因 1			
类似	Af (NS/2)	AI678080	XM_070471

* Af=Affymetrix, S=对 LEC 的特异性, NS=非特异性 (也在 BEC 中表达), 数字代表 BEC 和 LEC 之间的信号强度的 log2 比值。

表 6
鉴定的跨膜蛋白

基因	检测*	起始 EST	保藏号	
			可能的基因	
KIAA0626	Af(S/4,7)	AB014526	NM_021647	(14)
KIAA0644	Af(S/3,9)	AB014544	NM_014817	(15)
未知蛋白	Af(S/3,5)	AI333655	XM_059074	(16)
假想蛋白 FLJ20898	Af(NS/1,8)	AI733570	NM_024600	(862)
与 layilin 相似, 未命名的蛋白产物	Af(NS/1,7)	AA447940	AK055654, XM_084655	(45)
假想蛋白 FLJ23403	Af(NS/3,2)	AI681538	NM_022068	(860)
KIAA0062		D31887	XM_046677	(47)
间充质干细胞蛋白 DSCD75	Af(S/1,8)	AW009871	NM_016647	(17)

* Af=Affymetrix, S=对 LEC 的特异性, NS=非特异性 (也在 BEC 中表达), 数字代表 BEC 和 LEC 之间的信号强度的 log2 比值。

此外, 表 10 和 11 分别描述了鉴定的已知 LEC 基因及其保藏号, 和差异表达的基因及其保藏号, 而表 12 描述了在扫描中鉴定的其它未知蛋白。

实施例 4

PROX-1 对 LEC 基因的差异性调节

研究了淋巴分化程序的机制。Prox-1 同源框转录因子被发现在 LEC 中特异性表达, 并且小鼠中 Prox-1 的靶向破坏被报道导致淋巴管发育的阻抑 (Wigle 等, Cell, 98:769-778. 1999)。尽管 prox-1 基因几乎十年前就发现了, Prox-1 靶基因仍没有被鉴定。为确定同源区转录因子 Prox-1 造成了分化的 LEC 和 BEC 基因型, 分析上述鉴定的基因在原代 BEC 和 LEC 中, 存在或缺乏 Prox-1 过度表达的条件下的表达。

腺病毒介导的原代内皮细胞中的 prox-1 基因转移用来在 BEC 细胞中诱导基因的表达。为了消除腺病毒感染造成的基因表达变化, 将 AdLacZ (编码 β -半乳糖苷酶)引入 BEC 作为对照。

prox-1 cDNA 通过 RT-PCR 使用来自人内皮细胞的 RNA 进行扩增, 所用引物为 5' -GCCATCTAGACTACTCATG 氨基酸 GCAGCT-3' (SEQ ID NO: 61) 和 5' -GCGCAG 氨基酸 TTCGGCCCTGACCATGACAGCACA-3'

(SEQ ID NO: 62)。PCR 产物被克隆到 pAMC 表达载体中, 产生 N-末端 Myc-标记的 Prox-1。所述构建体随后被亚克隆入 pAdCMV 中, 以产生 AdProx-1 来制备腺病毒。AdProx-1 和 AdLacZ 病毒株如所述方法制备(Laitinen 等, Hum. Gene Ther. 9:1481-1486. 1998)。腺病毒产生的 Prox-1 迁移的分子量为约 85 kDa, 并且也被 Prox-1 C-末端肽的抗体识别。突变的 Prox-1 N625A/R627A, (密码子 625 处的天冬氨酸变成了丙氨酸, 密码子 627 处的精氨酸变成了丙氨酸)是通过使用 QuikChange 定点诱变试剂盒(Stratagene, La Jolla, CA)和以下引物制备的:

5' -CTCATC 氨基酸 GTGGTTTAGCGCTTTCCGTAGTTTTACTAC-3'

10 (SEQ ID NO: 63)和

5' -GTAGT 氨基酸氨基酸 CTCACGG 氨基酸 GCGCT 氨基酸 ACCACTTGATGAG-3. (SEQ ID NO: 64)。

将人皮肤微血管内皮细胞, 冠状动脉内皮细胞(CAECs), 隐静脉内皮细胞(SAVECs), BEC 和 LEC 铺于板上, 24 小时后, 以 8,000 细胞/cm² 的密度, 15 在不含血清的培养基中以 50 - 100PFU/细胞, 用腺病毒感染 1 小时。孵育期末, 洗涤细胞, 然后在完全培养基中培养 20 - 24 个小时。如上述进行总 RNA 分离和阵列杂交。

滴定试验显示, 人微血管内皮细胞感染 AdProx-1 or AdLacZ 后导致感染 24 小时后, >90%的细胞中的腺病毒编码的蛋白的核表达。为了研究 20 Prox-1 诱导的基因表达中的变化, 使用了人 cDNA 滤纸阵列, 所述阵列含有约 1,000 已知对常见细胞代谢重要的基因, 以及在调节心血管功能和血细胞生成中特别涉及的基因。AdProx-1 上调 28LEC 基因的表达, 而下调 63BEC 基因的表达(见下表 7), 可以通过 10 个或 11 个选出的基因 Northern 印迹确定。与在 LEC 和 BEC 中差异表达的基因相比较, Prox 调节的 15 个基因 (即, 25 约 30%) 被发现在培养的 LEC 和 BEC 之间的表达有差异, 表明 Prox-1 是调节内皮细胞身份(identity)。

表7
Prox-1 调控的 LEC/BEC 基因

基因	保藏号	¹ 信号对数比	² s.d.
AdProx-1 诱导的 LEC 特异性 (28 种基因)			
细胞周期蛋白 E2	AF091433	4.95	1.17
富含半胱氨酸和甘氨酸的蛋白 2	U57646	4.58	0.36
Cdk-抑制物 p57KIP2	U22398	3.77	0.68
亲代表达的 10	AB028974	3.54	0.95
血栓烷 A2 受体	D38081	2.32	0.13
B-myb	X13293	2.11	0.28
视网膜母细胞瘤相关蛋白 HEC	AF017790	1.86	0.13
胆固醇 25 羟化酶	AF059214	1.86	0.56
G 蛋白偶联的受体, 家族 C, 组 5, 成员 B	AC004131	1.83	0.32
胸腺嘧啶脱氢酶 1	M15205	1.80	0.39
CREM (cAMP 反应性因子调节物)	S68134	1.78	0.30
α-辅助蛋白-2-相关 LIM 蛋白	AF002282	1.77	0.42

基因	保藏号	¹ 信号对数比	² s.d.
粒桥蛋白 (DPI, DPII)	AL031058	1.74	1.03
MCM6 微型染色体保持缺陷的 6(minichromosome maintenance deficient 6)	D84557	1.72	0.06
红细胞膜蛋白带 4.9 (dema1in)	U28389	1.71	0.25
GTP 环化水解酶 1	U19523	1.61	0.04
KIAA0186 基因产物	D80008	1.47	0.11
细胞分裂周期 2 蛋白	X05360	1.35	0.43
来自克隆 643 的假想蛋白	AF091087	1.25	0.22
泛素载体蛋白 E2-C	U73379	1.23	0.12
有丝分裂检验点(checkpoint)激酶 Mad3L	AF053306	1.22	0.47
V-Erba 相关 Ear-3 蛋白	HG3510-HT3704	1.20	0.20
糖原磷酸化酶(PYGL)	AF046798	1.16	0.54
fms-相关的酪氨酸激酶 4, VEGFR-3	X69878	1.10	0.00
含 BTB(POZ)区 3 (BTB (POZ) domain containing 3)	AB023169	1.10	0.08
SMC4 染色体结构保持 4 样 1(structural maintenance of chromosomes 4-like 1)(酵母)	AB019987	1.09	0.59
高活性组蛋白 2(high-mobility group protein 2)	X62534	1.07	0.04

基因	保藏号	¹ 信号对数比	² s.d.
α 拓扑异构酶	L47276	1.04	0.49
基因	保藏号	¹ 信号对数比	² s.d.
AdProx-1 抑制的 BEC 特异性 (63 种基因)			
neuropilin-1	AF016050	NM_003873 -3.99	0.42
ras-相关的 C3 肉毒杆菌毒素底物 2, RAC2	M64595	NM_002872 -3.87	0.47
含三部分基序的 22(tripartite mortif-containing 22)	X82200	NM_006074 -3.56	0.28
小的可诱导细胞因子 A2 (单核细胞趋化蛋白 1)	M26683	NM_002982 -3.56	0.03
锌指蛋白 238	AJ223321	NM_006352 -3.08	0.13
uPA	X02419	-3.05	0.02
转录因子 EC	D43945	NM_012252 -3.04	0.08
RNase A, 胰腺的	D26129	NM_002933 -2.72	0.02
维生素 A 反应性; 细胞骨架调控的	AF070523	NM_006407 -2.51	0.6
白介素 6	X04430	NM_000600 -2.42	0.63
Rho GDP 解离抑制物(GDI) β	X69549	NM_001175 -2.42	0.03
基质金属蛋白酶 14	X83535	NM_004995 -2.37	0.08
E3 泛素接合酶 SMURF2	氨基酸	NM_022739 -2.22	0.06

630312						
死亡受体 6	AF068868	NM_014452	-2.16	0.61		
蛋白 C 受体, 内皮(EPCR)	L35545	NM_006404	-2.09	0.14		
基因	保藏号		¹ 信号对数比	² s.d.		
造血和神经膜蛋白 (HNMP-1)	U87947	NM_001425	-2.08	0.63		
KIAA0836	AB020643		-2.07	0.44		
硫酸软骨素蛋白多糖 2 (多能聚糖)	X15998	NM_004385	-1.99	0.65		
G 蛋白信号 4 调节物	A1267373	NM_005613	-1.93	0.54		
磷酸果糖激酶, 肌肉	U24183	NM_000289	-1.93	0.11		
IGF-II mRNA-结合蛋白 3	U97188	NM_006547	-1.9	0.23		
神经元细胞粘附分子 Nr-CAM/hBRAVO	AB002341	NM_005010	-1.89	0.13		
细胞表面糖蛋白 CD44	L05424		-1.84	0.12		
纤溶酶原激活物-1	J03764	NM_000602	-1.83	0.33		
AF1Q 蛋白	U16954	NM_006818	-1.79	0.23		
人克隆 24674 mRNA 序列	AF070578		-1.76	0.01		
烟酰胺 N 甲基转移酶	U08021	NM_006169	-1.74	0.49		
乳酸脱氢酶 B	X13794		-1.73	0.08		
KIAA0537 基因产物	AB011109	NM_014840	-1.73	0.08		

LIM 区(domain)蛋白	X93510	NM_003687	-1.67	0.11
淋巴细胞抗原 75, DEC-205	AF011333	NM_002349	-1.61	0.08
自然杀伤细胞转录物 4	AA631972	NM_004221	-1.59	0.05
磷脂酶 A2	M72393		-1.58	0.41
R-ras	M14949		-1.56	0.1
腺苷酸环化酶相关蛋白 2	N90755	NM_006366	-1.55	0.08
leupaxin	AF062075	NM_004811	-1.53	0.3
信号转导物和转录激活物 6 (STAT6)	AF067575		-1.51	0.45
LYL-1	M22637		-1.51	0.14
selectin P	M25322	NM_003005	-1.47	0.37
蛋白激酶, 不依赖 cAMP, 催化的, β	M34181	NM_002731	-1.43	0.49
TRAM 样蛋白	D31762	NM_012288	-1.42	0.43
鸟苷酸结合蛋白 2, 干扰素可诱导的	M55543	NM_004120	-1.41	0.51
基因		保藏号	¹ 信号对数比	² s.d.
细胞间粘附分子 2	X15606	NM_000873	-1.38	0.13
蛋白多糖 1, 分泌性颗粒	X17042	NM_002727	-1.35	0.47
原肌球蛋白 1 (α)	Z24727	NM_000366	-1.32	0.1
成纤维细胞活化蛋白, α 亚基	U09278	NM_004460	-1.25	0.12

假想蛋白 DKFZp564D0462	AL033377	-1.25	0.23	
有丝分裂原活化的蛋白激酶活化的蛋白激酶 3	U09578	NM_004635	-1.2	0.35
β 淀粉样蛋白(A4)前体蛋白结合的	U62325	-1.2	0.18	
AXL 受体酪氨酸激酶	M76125	NM_001699	-1.19	0.3
整联蛋白 α 5	X06256	NM_002205	-1.18	0.02
月元病毒蛋白 (PrP)	U29185	-1.18	0.07	
TRAF 家族成员相关的 NFKB 激活物 (TRAF family member-associated NFKB activator)	U59863	NM_004180	-1.17	0.13
膜联蛋白 VI	Y00097	NM_001155	-1.16	0.12
钴胺传递蛋白 II	L02648	NM_000355	-1.16	0.12
含寿司重复(sushi-repeat)的蛋白, X 染色体	U61374	NM_006307	-1.13	0.09
骨形态发生蛋白 6	M60315	NM_001718	-1.13	0.39
假想蛋白, 来自克隆 23549 和 23762	U90908	NM_021226	-1.1	0.6
视网膜 cDNA 随机引物亚文库, EST	W28438	-1.09	0.36	
TU3A 蛋白	AF035283	-1.06	0.29	
角蛋白 7	AJ238246	NM_005556	-1.05	0.53
潜在的转化型生长因子结合蛋白 2	Z37976	NM_000428	-1.04	0.13
N-钙粘着蛋白	M34064	NM_001792	-1.02	0.12

0.22

-1.01

AL049957

cDNA DKFZp564J0323 (来自克隆 DKFZp564J0323)

¹ 所述改变表达为 log₂ 的比值。

² 表达水平改变的标准偏差。

还研究了重组 Prox - 1 在 BEC 中(通常是缺失的)表达的能力, 所述表达可修饰这些细胞对淋巴管内皮细胞的基因型的转录过程。通过寡核苷酸微阵列分析可确定, 对照 AdLacZ, 不显著改变 BEC 或 LEC 特异的转录。反之, AdProx-1 增强许多 LEC 特异的 mRNA 的表达, 例如 VEGFR-3, p57Kip2, 粒桥蛋白 I/II 和 α -肌动蛋白相关的 LIM 蛋白 (见表 8)。令人吃惊的是, Prox-1 还抑制在 BEC 中特定表达的基因的表达式的大约 40%, 所述基因例如转录因子 STAT6, the UFO/axl 受体酪氨酸激酶, neuropilin-1 (NRP-1), 单核细胞化学吸引剂蛋白-1 (MCP-1)和整联蛋白 $\alpha 5$ (见表 7 和表 8)。这些基因表达的结果与淋巴管的体内研究一致。例如, 在淋巴内皮中发现了 VEGFR-3 和粒桥蛋白 I/II(Ebata 等, Microvasc. Res. 61:40-48. 2001; Kaipainen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 3566-70. 1995), 并且发现在 BEC 中由 Prox-1 表达的 VEGF 辅受体(co-receptor)NRP-1, 在小鼠皮肤中的血管表达, 而不在其淋巴管中表达。

15 表 8

Prox-1 调控的 LEC 和 BEC 特异性基因的实例

	LEC-特异性, 上调	BEC-特异性, 下调
粘附分子		整联蛋白 $\alpha 5$
		ICAM-2
		CD44
		Nr-CAM
		P-selectin
细胞骨架蛋白	粒桥蛋白 I 和 II	leupaxin
	α -肌动蛋白-2 相关的 LIM 蛋白	
ECM 蛋白		多能聚糖
		蛋白多糖 1

ECM 蛋白		多能聚糖 蛋白多糖 1
	LEC-特异性, 上调的	BEC-特异性, 下调的
ECM 调节		MMP-14 uPA PAI-I
受体酪氨酸激酶	VEGFR-3	UFO/axl
转录因子	CREM ear-3	STAT6
细胞因子, 趋化因子和受体		TFEC IL-6 MCP-1
细胞周期控制	p57Kip2 细胞周期蛋白 E2	
其它	胆固醇 25 羟化酶 血栓烷 A2 受体	Neuropilin-1 内皮细胞蛋白 C 受体
总数	28 个基因 (LEC-特异性基因的 19%)	63 个基因 (BEC-特异性基因的 38%)

粗体所示的基因通过 Northern 印迹或 RT-PCR 确定。

为确定基因表达中的 Prox-1 诱导的改变是否细胞类型特异的，分析了其他内皮细胞类型(即冠状动脉内皮细胞(CAECs)和隐静脉内皮细胞(SAVECs))和非内皮细胞类型(即羊膜内皮细胞(AEC))中，AdProx-1 or AdLacZ 感染后基因表达的改变。在所有这些细胞类型中，AdProx-1 强烈地上调细胞周期蛋白 E1 和 E2, 组蛋白 H2B, 和 PCNA。然而，AdProx-1 只在 CAECs 和 SAVECs 中诱导 VEGFR-3 的表达，而不在 AECs 中诱导该基因的表达。

这些结果和 Prox-1 胚胎中缺乏淋巴管分化一致。有趣的是，Prox-1 在原代内皮细胞中的表达导致 VEGFR-3 受体酪氨酸激酶的上调，该激酶在孕中期后对淋巴内皮特异，并且对正确的淋巴管生长和功能是必要的(Karkkainen 和 Petrova, 原癌基因 19:5598-5605. 2000)。例如，人和小鼠中 VEGFR-3 的活化突变导致淋巴管发育不全和淋巴水肿 (Jeltsch 等, Science 276:1423-1425. 1997; Karkkainen 等, Nat. Genet., 25:153-159. 2000; Karkkainen 等, Trends Mol. Med. 7:18-22. 2001)。上述结果表明 Prox-1 对 VEGF-3 的表达的上调是淋巴管内皮细胞身份的确定中的重要途径之一，还表明成人血管内皮细胞中不同细胞的基因型是可塑的，并且对转录重编(transcriptional reprogramming)敏感，这对于本发明影响内皮细胞的治疗方法是有用的。

20 实施例 5

使用 ADPROX-1 转染的细胞进行离体细胞刺激和淋巴水肿的基因治疗

Prox-1 调节特异性参与 LEC 发育的基因的能力为治疗显示 LEC 疾病的个体或由 LEC 基因表达水平增加或降低造成的病情提供了方法。Prox-1 上调可用于促进 LEC 发育，治疗以例如淋巴管发育较宽为特征的淋巴管系统发育不良为特征的 LEC 疾病，例如淋巴水肿。本领域已知，细胞的离体转染和随后将这些细胞转移到病人体内是有效的上调转移的特定基因的体内水平的方法，并可缓解由于这些基因的表达较低导致的疾病。(Gelse 等, Arthritis Rheum.

48:430-41. 2003; Huard 等, 基因 Ther. 9:1617-26. 2002; Kim 等, Mol. Ther. 6:591-600 2002)。

为产生治疗 LEC 发育疾病的疗法, 将内皮细胞, 例如 CAEC, SVEC, LEC 或 BEC 从患有 LEC 疾病(例如淋巴水肿)的个体中分离出来, 并随后将这些细胞置于适当的培养基中(见上文)以促进细胞的生长和存活力。随后如所述使用上述的 AdProx-1 载体感染这些细胞, 来启动非 LEC 在体外的 LEC 分化, 以及促进培养基中 LEC 的生长。这些转染后的细胞随后以有效促进 LEC 在体内的扩增的数量被转入患病的病人。在优选的实施方案中, 受操作的细胞是自体细胞。这些细胞通过一种或多种通常包括注射的给药途径来递送。这些细胞被地送到 LEC 疾病或病症例如淋巴水肿的局部位点或者被系统地递送。

将 Prox-1 感染的细胞引入患有淋巴水肿的病人提供了补充性的 LEC, 所述 LEC 可以并入淋巴系统网络中来促进淋巴管发育和完成淋巴清除来缓解淋巴水肿的症状。还涉及一种方法, 包括将 AdProx-1 转染到内皮细胞内, 并给药转染的细胞, 这种方法对于治疗任何以 LEC 数目或活性为特征的疾病是有效的, 所述疾病例如淋巴水肿, 淋巴管瘤, 淋巴管骨髓瘤, 淋巴管肌瘤病, 淋巴管扩张, 淋巴肉瘤, 和淋巴管硬化。此外, 这种方法还可用来缓解与这种疾病相关的症状(例如, 淋巴水肿中由淋巴导致的肿胀)。

实施例 6

LEC-特异性基因的表征

使用 LEC 和 BEC 基因之间的扣除文库(subtraction library)进一步分析 LEC-特异性基因。为构建所述文库, 如上述分离总 RNA, 并且使用 SMARTPCR cDNA 合成试剂盒(BD Biosciences Clontech)预扩增 5µg of 总 RNA。使用 RsaI 消化后, PCR-选择的 cDNA subtraction 以两个方向进行, 导致差异表达的序列的选择性扩增, 并且制备了 subtracted LEC 和 BEC cDNA 文库(BD Biosciences Clontech)。使用 1 (tester): 30 (driver) 的比例以两个方向进行扣除杂交, 并使用 PCR 扩

增扣除后的 cDNA 库。50ng 纯化的 PCR 扩增产物被克隆入 pAtlas 载体(基于 PUC 的载体)用来构建扣除文库, 尽管本领域已知一些其他载体也可用来构建。

- 扣除的 LEC 特异性文库的示差筛选如 PCR-Select Differential Screening Kit User Manual (BD Biosciences Clontech)所述进行。LEC-特异性扣除文库经平板培养, 并挑出单个的细菌克隆使其生长。DNA 提取后, 用 PCR 扩增插入物并进行测序。等分量的 PCR 扩增插入物也在尼龙膜上进行排列并用来和 ^{32}P 标记的 cDNA 探针杂交。扣除的 LEC 特异性(tester)和扣除的 BEC 特异性(driver)cDNA 探针的杂交结果用于差异表达分析。

- BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool)用来比较核苷酸, 蛋白和 EST 序列数据库的序列。对于未知的序列, 搜索 EST 重叠群, 并使用 ORF finder 预测开放阅读框架。蛋白结构域构型用 Pfam (Protein families database of alignments 和 HMMs)和 Smart (Simple Modular Architecture Research Tool)分析。

在 LEC 和 BEC 中差异表达的克隆的核苷酸序列如上述方式分析。首次筛选中多种 EST 或未知的基因片段被进一步研究来确定其与已知基因序列的相似性, 来确定任何开放阅读框架以及功能性结构域的类似性。这些结果见表 9。

表 9

克隆命名和(SEQ ID NO)	EST	人基因组保藏号#	KIAA 名称 #和(SEQ ID NO)	预期的基因功能
LE000100001_A06 (SEQ ID NO: 61)	AB014526	NM_021647	KIAA0626 SEQ ID NO: 14	Ig 结构域基序, 很可能的细胞 粘附功能
LE0000100050_A01 (SEQ ID NO: 59)	AB014544	NM_014817	KIAA0644 SEQ ID NO: 15	富含亮氨酸的基序, 细胞粘附 活性
LE0000100055_H05	AI333655	XM_059074	无 KIAA,称为 hLyrp SEQ ID NO: 16	富含亮氨酸的重复序列, 细胞 粘附蛋白
	AI681538	NM_016647	SEQ ID NO: 17	与间充质干细胞蛋白类似
	氨基酸 XM_084655 447940		SEQ ID NO: 45	与 layilin 类似, 很可能的细胞 粘附功能
LE000100017_C02 (SEQ ID NO: 55)	XM_046677	D31887	KIAA0062 SEQ ID NO: 47	锌转运物基序, 金属离子转运
LE0000100049_E10	XM_047672	XM_047672	KIAA1673	RNA-结合区, 与 RNA 结合蛋
LE0000100054_F09			SEQ ID NO: 26	白类似
LE0000100056_F07 SEQ ID NOs:				
LE0000100053_A06 SEQ ID NO: 56	AI761647	NM_015147	KIAA0582 SEQ ID NO: 49	
LE0000100055_G10	D14657	NM_014736	KIAA0101	
LE0000100046_C12 SEQ ID NOs: 57-58			SEQ ID NO: 51	

发现多种 LEC-特异性基因与 KIAA 基因序列相对应, KIAA 是大
5 的核苷酸 EST 克隆, 编码未知的人蛋白。(Kazusa DNA Research
Institute, 1532-3, Yana Kisarazu, Chiba, 292-0812, Japan)。这些 LEC 特

异性基因在多种可得的数据库中进一步分析,以确定物种同源物的存在和这些同源物的相似性百分比,以及揭示显示与保守的蛋白结构域的相似性的氨基酸序列。

- LEC 克隆序列的分析使用 National Institutes of Health 提供的
- 5 U.S. National Center for Biotechnology Information 保存的 Homolo 基因数据库,来确定物种同源物和直向同源物以及其与新分离的人 LEC 特异性基因的相似性百分比。这些序列的分析使用的资源是 curated 和计算后的基因同源物,如由 Uni 基因代表或基因组序列的注释表示,通常比较 EST 和来自 UniGene 的 mRNA 序列,以及从注释的基因组序列中提取的转录物。(Zhang,等, J. Comp. Biol. 7:203-14. 2000)。一种有机体中的核苷酸序列与另一种有机体中的核苷酸序列的最佳匹配基于这两个序列之间相似性的程度,其最小比对为 100 个碱基对。这两个序列之间的相似性通过比对值确定。序列对的比对是被比对的两个序列的部分的相似性得分的总和。
- 15 HomoloGene 分析表明相应于 KIAA0626, KIAA0644, 和 KIAA0062 的人 LEC 基因,与 EST 和以下未知的基因序列同源:小鼠(所有),大鼠(KIAA0062, KIAA0644),牛(KIAA0062),猪(KIAA0626, KIAA0644)和非洲爪蟾属(KIAA0644)。所述克隆显示与被鉴定为 Homolo 基因的同源物的基因大约 80% ($\pm$ 3%)的相似性,
- 20 KIAA0644 显示与猪 EST 序列 BE233028.1 高达 86%的同源性,以及与 *X. laevis* 基因较低的 72%的相似性。

- 使用 Pfam 比较分析 LEC 基因发现,相应于 KIAA0626 (SEQ ID NO: 14), KIAA0644 (SEQ ID NO: 15), hLyrp (SEQ ID NO: 16), XM_084655 (SEQ ID NO: 45) 和 KIAA0062 (SEQ ID NO: 47)的核苷酸序列显示以编码的跨膜结构域为特征的核苷酸序列,说明相应的
- 25 多肽(其氨基酸序列分别为 SEQ ID NO: 31, 32, 33, 46 和 48)在细胞的表面表达。KIAA1673, KIAA0582 和 KIAA0101 不显示明显的跨膜区并且据预期是胞质的或核蛋白。Northern 印迹测定的组织表达显示, KIAA0101 在肾,胸腺,结肠和小肠中表达,而 KIAA0582 在心

脏, 骨骼肌, 和卵巢中强烈表达, 在肾和胎盘中表达较低, 而在脑, 肺, 胸腺, 小肠和前列腺中表达更低。

KIAA0626 转录子的 Northern 印迹分析表明, KIAA0626 在 LEC 中特异性表达, 并且见于心, 骨骼肌和肾。原位分析表明 KIAA0626 在 11 天的小鼠胚胎(E11)中的肌节间组织和血管周围的周细胞中, 以及卵黄囊血管, 内皮细胞以及周围的周细胞中表达。KIAA0626 (SEQ ID NO: 14)的多核苷酸序列编码 409 个氨基酸(409 氨基酸)的蛋白 (SEQ ID NO: 31), 所述蛋白具有一个信号序列(氨基酸 1-29), 一个 Ig 超家族结构域(大约氨基酸 61-127), 一个短跨膜区(大约氨基酸 153-175), 和一个从大约氨基酸 176-409 的长 234 个氨基酸的胞质区。预计 Ig 结构域可支持所述蛋白与其配体的结合, 而长胞质结构域表明 KIAA0626 可能参与 LEC 的细胞内信号。

通过 Northern 印迹分析测定, KIAA0644 (SEQ ID NO: 15)主要在心和脑组织中。E10 小鼠胚胎的原位分析表明 KIAA0644 在整个胚胎中表达。KIAA0644 多核苷酸编码 811 个氨基酸的多肽 (SEQ ID NO: 32), 显示共有 13 个富含亮氨酸的区。富含亮氨酸的区包含一个短的序列基序, 约 20-28 个氨基酸, 该区在蛋白中起细胞粘附和受体分子的作用。富含亮氨酸的区, 下文称为 LRRNT 和 LRRCT, 通常侧接富含半胱氨酸的区。所述 KIAA0644 蛋白含有一个富含亮氨酸的 N 末端区(LRRNT: 氨基酸 26-54), 11 个内部富含亮氨酸的区(LRR1: 氨基酸 84-107, LRR2: 氨基酸 108-131, LRR3: 氨基酸 132-155, LRR4: 氨基酸 156-179, LRR5: 氨基酸 180-203, LRR6: 氨基酸 204-223, LRR7: 氨基酸 230-253, LRR8: 氨基酸 254-277, LRR9: 氨基酸 278-301, LRR10: 氨基酸 302-325, 和 LRR11: 氨基酸 326-349)以及一个 C 末端富含亮氨酸的区 (LRRCT), 从大约氨基酸 359-404。该 KIAA0644 跨膜区跨大约亮氨酸 696-718, 其胞质内区大约 95 个氨基酸, 从氨基酸 719-811。KIAA0644 基因的富含亮氨酸的区使得该基因参与以细胞粘附或配体结合为特征的蛋白-蛋白相互作用。

hLyrp (SEQ ID NO: 16) mRNA 可在骨骼肌中检测到, 并且与 E11 和小鼠胚胎卵黄囊中的 Prox-1 染色相比, 其可通过与淋巴管原位杂交定位。与 KIAA0644 相似, hLyrp 蛋白 (SEQ ID NO: 33) 含有一系列富含亮氨酸的区, 从富含亮氨酸的 N 末端区(LRRNT: 氨基酸 27-55) 延伸经过 5 个内部的富含亮氨酸的区(LRR1: 氨基酸 57-80, LRR2: 氨基酸 81-104, LRR3: 氨基酸 105-128, LRR4: 氨基酸 129-153, LRR5: 氨基酸 154-176), 以 C 末端的富含亮氨酸的区(LRRCT)为终点, 从大约氨基酸 186-240。hLyrp 多肽还含有一个跨膜区, 从氨基酸 249-272, 其具有短的 22 个氨基酸的胞质区。多个连续的富含亮氨酸的区存在于 hLyrp 多肽中表明, 该多肽的作用是细胞粘附分子和/或细胞表面受体。

使用在 LEC 中特异性表达的全长 mRNA 序列分离表 3 所示的多个附加序列。这些序列的结构域预测表明, KIAA0711 (SEQ ID NO: 81 和 82) 含有一个 BPB/POZ 结构域, 所述结构域长达约氨基酸 171-269, 该结构域预期在蛋白-蛋白相互作用中起作用。POZ 区出现在转录辅助因子例如锌指蛋白中, 所述转录因子介导转录抑制并且与组蛋白脱乙酰基酶复合物的组分相互作用。KIAA0711 还具有三个 Kelch 同上, 跨氨基酸 386-437, 439-480, 和 484-525, 并且 Kelch 基序与 β 折叠结构的形成有关。此外, KIAA0711 mRNA 在多种组织中表达。KIAA0711 mRNA 从最高表达水平到最低表达水平见于脑和肾, 肝, 脾; 肺, 卵巢, 胰腺和心; 平滑肌和睾丸。由于这种表达模式从一次 RT-PCR ELISA 中获得, 所述表达模式在循环 RT-PCR 中可能有变化。相应地, 所述表达模式适合筛选以定性的量在组织中特异性表达的基因。如果需要更精确的定量表达模式, 应采用在统计学上更加可信的方法(例如, 多重 RT-PCR ELISA 测定, DNA 芯片分析, RNA 印迹分析, 等等)。

对应于 cDNA DKFZp5640222 (SEQ ID NO: 93) 的结构域图谱表明, 存在 N 末端信号肽(氨基酸 1-23), 两个内部同上结构域和一个可在蛋白例如 myocilin, pancortin, 和 latrophilin 中检测到的

olfactomedin 区(氨基酸 361-616)。Myocilin 中的 OLF 区与青光眼相关。

KIAA1233 (SEQ ID NO: 111)的结构域图谱表明 KIAA 序列含有六个血小板反应蛋白 I 型同上,该序列见于细胞外基质蛋白并通常参与细胞-细胞相互作用,并更特异性参与补体途径,抑制血管生成,以及参与凋亡。KIAA1233 mRNA 从最高表达水平到最低表达水平,其见于脊髓;心,大脑,肺,肾,胰腺,各种脑组织(杏仁核,胼胝体,尾状核,海马,黑质,丘脑和下丘脑核团)和胎肝;胎脑;脾;和睾丸。

10 KIAA0846 (SEQ ID NO: 188)蛋白含有鸟苷酸交换因子中的基序,并因此可能使细胞内蛋白,可能是信号蛋白。KIAA0846 还显示两个 EF 手基序(EF-h 和基序 s),见于信号蛋白(例如钙调蛋白, S100B)(所述蛋白经过依赖钙的构像改变)和缓冲/转运蛋白。KIAA0846 mRNA 从最高的表达水平到最低的表达水平见于肾;心, 15 脑和肺;肝,脾和卵巢;胰腺,平滑肌和睾丸。

蛋白 FLJ13110 (SEQ ID NO: 207 和 208)包含 TB2/DP1, HVA22 超家族蛋白结构域和两个短的跨膜区(SEQ ID NO: 207 的氨基酸 4-22 和 43-65)。HVA22 家族包括来自多种真核细胞的成员,包括 TB2/DP1(在严重的家族性腺瘤样息肉病中缺失)蛋白,其在严重的家族性腺瘤样息肉病,常染色体显性的肿瘤性遗传疾病中缺失。

20 LEC-特异性基因筛选还鉴定了蛋白 KIAA0937 (SEQ ID NO: 211 和 212)。KIAA0937 含有 WWE 结构域(从 SEQ ID NO: 211 的大约氨基酸 30-112, 和 113-189),该结构域是根据其三个保守的残基命名的,并被预期介导泛素化和 ADP 核糖偶联系统中的特异性的蛋白- 25 蛋白相互作用。KIAA0937 预期含有锌指结构域(SEQ ID NO: 211 的氨基酸 443-501),并预期其是细胞内转录因子。KIAA0937 mRNA 从最高的表达水平到最低的表达水平见于,脊髓;下丘脑核团和大脑脑干;广泛意义上的脑(包括杏仁核,胼胝体和胎脑)和卵巢;胎肝;心,肺,肾,脾和脑的部分(尾状核和海马);睾丸和胰腺;以及平滑肌。

KIAA0952 (SEQ ID NO: 241 和 242)含有 Broad-Complex, Tramtrack 和 Bric-a-brac 结构域, 也称为 POZ (痘苗病毒和锌指)结构域。这些结构域已知是多种 C2H2 型转录因子的 N 末端以及 Shaw 类型钾通道的蛋白-蛋白相互作用结构域。这些结构域已知的结构显示
5 紧密地互相缠绕的二体, 该二体是通过 N 末端多肽链和螺旋结构之间的相互作用形成的。

命名为 KIAA0429 (SEQ ID NO: 391 和 392)的蛋白与转移抑制蛋白相似, 并含有大约从氨基酸 467-484 的肌动蛋白-结合 WH2 区, 和从氨基酸 348-466 的富含脯氨酸的区。

10 蛋白 FLJ23403 (氨基酸序列, SEQ ID NO:859; 多核苷酸序列, SEQ ID NO:860)显示于未知的小鼠蛋白 (GenBank Acc. No. XM_129000)大约 85%的同源性, 并含有一系列四个跨膜区, 即氨基酸 44-66, 86-108, 115-137 和 452-474。

其它 LEC-特异性, 上调的基因包括以前未鉴定的蛋白
15 KIAA0186 (SEQ ID NO: 221 和 222), KIAA0513 (SEQ ID NO: 235 和 236) 和命名为 FLJ13910 (SEQ ID NO: 293 和 294)的蛋白。

淋巴管内皮细胞特异性分子的操作预期可用于治疗 LEC 疾病的与组织水肿相关的病症。为不受理论限制, 这种分子的操作预期可调节内皮细胞-细胞或细胞-基质蛋白的相互作用, 或者通过改变通过
20 淋巴关闭的液体运输的状态类影响跨内皮细胞运输。此外, 这种分子还提供了递送治疗性化合物例如生长因子, 有丝分裂原等等诸如此类的靶点, 以及递送本领域已知的细胞抑制剂或细胞毒剂的靶点。这些治疗性化合物通过将治疗剂与例如 LEC 表面标志物的结合配偶体(例如抗体)相连靶向这种细胞。本文鉴定的跨膜蛋白, 具体为富含
25 亮氨酸蛋白, 还提供了调节细胞粘附事件整体到淋巴清除的靶点。

实施例 7

检测 LEC 和淋巴相关病症的微阵列分析

本发明鉴定的 LEC-特异性基因可用于体内检测 LEC 和样品中检测淋巴管系统的范围。该 LEC-特异性基因也预期可用于诊断淋巴水肿和其它 LEC 相关的病症。

本发明的另一方面是一种组合物，包含多个多核苷酸探针，用于检测以特定细胞类型为特征的基因表达模式和用于检测特定细胞类型例如淋巴管内皮细胞的基因表达模式的改变。本文术语“多核苷酸探针”指 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51 之一的核酸序列或其片段，或者编码 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 和 50 之一的氨基酸序列的核酸序列或其片段。优选，所述片段的长度为至少 10 个核苷酸；更优选，该片段长度至少为 20 个核苷酸。这样一种组合物可用于诊断和治疗任何一种病情或疾病，所述疾病涉及或可疑淋巴管内皮细胞功能不良或无功能。在一个实施方案中，本发明提供了一种包含多个多核苷酸探针的组合物，其中至少一部分多核苷酸探针各包含一段独特的序列，所述序列选自 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51 之一。优选，所述组合物包含至少 3 个多核苷酸子集，每种多核苷酸都具有不同的序列，所述序列选自 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51 之一。优选的组合物还有包含至少 5, 至少 7, 至少 9, 至少 15, 至少 20, 或至少 25 个不同的多核苷酸的组合物，所述多核苷酸具有 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51 之一的序列。

所述组合物尤其可用作微阵列中的一套可杂交的阵列元件，用来监控多个靶多核苷酸的表达。所述微阵列包括底物和可杂交的阵列元件。所述微阵列可用于，例如由于异常淋巴管内皮细胞活性造成的疾病的诊断和预后，所述疾病例如淋巴水肿，淋巴管瘤，淋巴管骨髓瘤，淋巴管肌瘤病，淋巴管扩张，淋巴肉瘤，和淋巴管硬化。组合物还可用于鉴定一种以上细胞类型并用于一种以上的疾病，病症或病情的诊断和预后。此外，可从产生信号的那些探针和不产生信号的那些探针获得有用的信息。

- 包含 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51 之一的多核苷酸可用于诊断 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51 编码的基因之一的异常表达相关的病情或疾病。例如, 包含 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51 之一的序列的多核苷酸可用于杂交或体液或组织(例如从活检中获得)的 PCR 分析, 来检测患有淋巴水肿或另一种淋巴相关的疾病的病人的异常基因表达。此外, 包含编码 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48 or 50 之一的氨基酸序列的序列的多核苷酸可用于诊断和具有那些氨基酸序列之一的多台的异常表达相关的病情或疾病。包含至少 10 个核苷酸的片段可用于这些诊断方法中。
- 10 表达模式可以使用本发明包含 SEQ ID NO: 1-30, 45, 47, 49 和 51 之一的组合物产生。由所述微阵列产生的表达模式可用来检测疾病涉及的基因的表达的变更
- 实施例 8
- BEC 和 LEC 中的转录因子
- 15 在 LEC 中差异表达的转录因子包括锌指因子 c-maf 和 MADS 家族转录因子 MEF2C (图 1)。MEF2C 的靶向诱变导致胚胎在 E9.5-10 死亡, 这是由于初始脉管系统重构缺陷和心内膜异常(Bi, 等, Dev. Biol. 211:255-267. 1999)。据报道 MEF2C 可结合转录因子 Sox18 并加强其在内皮细胞中的活性(Hosking, 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 287:493-500. 2001)。在 Sox18 中具有破坏 MEF2C 复合物的纯合子突变的幼鼠在一些遗传背景下出现乳糜性腹水 (Pennisi, D., 等, Nat. 基因 t. 24:434-437. 2000), 表明这两种蛋白可能都参与淋巴管形成的调节。与这一假设一致, MEF2C^{-/-} 胚胎的 PCR-RT 分析显示 VEGFR-3 的表达降低 (Bi, 等, Dev. Biol. 见上文)。
- 20
- 25 STAT6 转录因子由 IL-4 激活, 并且在 BEC 中特异性表达。与这一观察一致, 本文的结果显示 IL-4 受体优选在 BEC 中表达, 一些 IL-4 靶趋化因子和受体例如 MCP-1 和 CXCR4 也如此。VEGF 刺激和活化 VEGFR-2 也已知导致 STAT6 在内皮细胞中磷酸化和活化 (Bartoli, 等, J. Biol. Chem. 275:33189-33192. 2000)。因此 STAT6 在 LEC 中缺

乏表明 VEGFR-2 的下游信号途径在 BEC 和 LEC 中不同。其他转录因子的表达模式见表 5。

实施例 9

SOX18 和遗传性淋巴水肿

5 转录因子 MEF2C 的表达在 LEC 中上调。Sox18 (SEQ ID NO: 53, 以及编码 SOX18 的 SEQ ID NO: 54), 据报道与小鼠中的 MEF2C 反应, 并且也显示在淋巴管内皮细胞发育中可能起作用。为了研究 Sox18 在淋巴水肿中的作用, 研究了人 Sox18 突变体和人遗传性淋巴水肿之间的相互关系。

10 SOX 蛋白, SRY 转录因子家族的类似物, 是遍在的转录因子, 它含有推定的高活动性基因(high-motility group)(HMG)DNA 结合区。(Wegner, M., Nucl. Acids Res. 27:1409-20. 1999)。SOX 蛋白在七聚的 SOX 共有结合序列[5'-(A/T)(A/T)C 氨基酸(A/T)G-3'] (Pennisi 等, Mol. Cell Bio. 20:9331-36. 2000)结合其靶 DNA, 并且在双螺旋的小沟而非
15 大沟处结合 DNA, 这导致该靶基因的转录调节。SOX 蛋白还可能参与将其它 DNA 结合蛋白募集到 DNA 蛋白复合物, 从而支持转录调节(Wegner, 见上文)。SOX18 和 SOX7 以及 SOX17 具有同源性, 它们都是 F 组 Sox 基因。

 SOX18 参与血管发育并且局限于发育的心血管系统和生血活性
20 位点。在 Sox18 中具有 Ragged (Ra)突变的小鼠纯合子出现乳糜性腹水和水肿 (Pennisi 等, Nat. 基因 t. 24:434-37. 2000), 这和淋巴水肿的 Chy 小鼠模型相似(Lyon 等, Mouse News Lett. 71: 26. 1984)。Ra 小鼠中的突变被确定为移码突变, 导致反式激活区的截短 (Pennisi 等, Nat. 基因 t. 24:434-37. 2000)。Sox18 无效小鼠却显示毛囊发育中的仅一个
25 微小的基因型变化, 并且没有显示人和水肿或无规律的血管发育的迹象 (Downes 和 Koopman, Trends Cardio. Med. 11:318-24. 2001)。该基因型可能由于 F 组 Sox 成员即 SOX7 和 SOX17 过多造成。这些蛋白可以在缺乏 SOX18 时替代其功能, 但不能克服 Sox18 显性的阴性

突变体例如 Ra 突变。因此，敲除整个 F 组家族可能产生与 *Ragged* 小鼠类似的淋巴水肿基因型。

小鼠和人 SOX18 是同源的蛋白，包含一个大约 80 个氨基酸的 DNA 结合 HMG-盒子(97%的同源性)，一个在小鼠中大约为 93 个氨基酸的反式激活区(90%的同源性)，以及一个 C 末端区(92%的同源性) (Downes 和 Koopman, 见上文)。人 SOX18 HMG-盒子可定位于核苷酸 395-598，对应氨基酸 84-151。小鼠 HMG 盒子由核苷酸 320-532 编码，对应氨基酸 78-148。目前还没有关于人反式激活区的描述，但本领域熟练技术人员可轻易使用在小鼠 SOX18 的氨基酸 252-346 发现的同源小鼠序列 (Hosking 等, 基因 262:239-47. 2001) 获得人反式激活区。尽管人 SOX18 蛋白显示于小鼠 SOX18 在初级结构水平上相似，人 Sox18 突变体与疾病或病情例如遗传性淋巴水肿没有已知的联系。

人 Sox18 被定位于染色体 20q.13.3 (Stanojcic 等, Biochem. Biophys. Acta. 1492:237-41. 2000)。阐明与遗传性淋巴水肿相关的在该染色体上或其附近的位点上的可遗传的突变可用于确定该疾病的遗传基础，筛选具有出现遗传性或其他形式的淋巴水肿的倾向性的病人，以及作为克服遗传突变的靶向治疗方案的基础。

为了确定 Sox18 和淋巴水肿之间的关系，鉴定患有遗传性淋巴水肿的家族来进行连锁和位置候选基因分析 (linkage and positional candidate gene analyses)。家族成员如果显示一条或两条腿的不对称的或明显的肿胀，或者被诊断为淋巴水肿，或者有个人或家族的四肢肿胀或不对称的报道，则该家族的成员被认为受到遗传性淋巴水肿的影响。

从这样的家族中获得生物样品，来进行遗传分析。使用 Miller 等的方法(Nucleic Acids Res. 16:1215. 1998)，从 EDTA 抗凝的全血中分离 DNA，并使用 Puregene DNA 分离试剂盒 (Gentra Systems, Minneapolis, MN)从 cytobrush 样品中分离 DNA。用于基因组筛选的标记物的分析通过本领域已知的方法进行。见 Browman 等, Am. J.

Hum. Genetic., 63:861-869 (1998); 也见 the NHLBI Mammalian Genotyping Service.

为了探索 Sox18 在淋巴水肿中可能的角色,通过直接测定 Sox18 基因的部分的序列来筛选淋巴水肿家族的先证者中的变异。所述测
5 序法使用根据 Sox18 cDNA 序列 (SEQ ID NO: 53) 产生的扩增引物, 以及相关的 Sox 基因的基因组结构的信息(内含子-外显子数据, 鉴定的结构域基序)。可变位置(单核苷酸多形性)和独特序列引物用于扩增侧接每个位于用于分析的结构域中的可变位点的序列。

正常和受淋巴水肿影响的个体的 Sox18 的基因组 DNA 被测序,
10 并且通过未受影响的个体对比, 得到了在淋巴水肿病人的 Sox18 基因中检测到的突变的图谱。通常在淋巴水肿的病人中检测到的突变, 例如保守的或非保守的核苷酸改变, 缺失, 或插入, 表明特定核苷酸中的突变导致出现淋巴水肿的倾向性。受影响的个体的基因组 DNA 的分析将 Sox18 中的基因组序列中的突变和淋巴水肿联系起来。
15

为证实 Sox18 突变和淋巴水肿的出现之间的相互关系, 进行了遗传关系的研究, 如美国专利申请 US2003026759 和 PCT/US99/06133(每篇参考文件都包含在文中作为参考)中描述的鉴定遗传多态性的方法。

20 两点连锁(Two-point linkage)分析使用常染色体显性模型进行, 所述模型预期在杂合状态中为 80%的外显率, 在纯合状态下为 99%的外显率, 和 1%的拟表型率。该疾病等位基因的频率被定为 1/10,000, 微卫星标记等位基因的频率是通过计数建立者等位基因(founder alleles)来计算的, 还加入了非传送的等位基因的计数。多点
25 分析是通过使用 University of Southampton School of Medicine 提供的 distances from the Location Database 进行的。多点和两点分析可通过使用 VITESSE (v1.1) 程序易化(O'Connell, 和 Weeks, Nature 基因 t., 11:402-408. 1995)。

用于基因组扫描的标记物的分析可通过本领域已知的方法进行。(见 Browman 等, *Am. J. Hum. Genet.*, 63:861-869 (1998); 也见 the NHLBI Mammalian Genotyping Service 和 the Center for Molecular genetics 提供的数据库 (Marshfield, WI))。本领域熟练技术人员可轻
5 易选出染色体 20 (尤其是 20q13.3)中鉴定的遗传连锁标志物, Sox18 就位于其中 (Stanojcic 等, 见上文)。

连锁模拟可使用 SLINK (Weeks 等, *Am. J. Hum. Genet.* 47:A204. 1990)进行, 并且可使用 MSIM (Ott, J., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86:4175-4178. 1989) 分析连锁, 来估计两点连锁分析在被评估的家
10 族中的潜力。使用可得的个体模型, 标志物基因型被模拟成连锁的 (linked)($\theta=0$) 和非连锁的(unlinked)($\theta=0.5$)模型。进行模拟使得检测连锁的力量大于 $Z(\theta)$ 2.0 的 LOD 分数阈值的 90%, 并且假阳性率低于 5%。

与遗传性淋巴水肿相关的突变被预期位于 SOX18 蛋白的功能结
15 构域内。例如, HMG-盒子结构域或者反式激活结构域。示例性的结构域包括导致非保守型替代的错义突变, 导致 Sox18 编码区移码的核苷酸缺失或插入, 框架内缺失或插入例如影响功能结构域的那些, 或者影响 Sox18 表达水平的控制序列的改变。

一旦鉴定了 Sox18 淋巴水肿相关的突变, 含有分离的突变的
20 Sox18 等位基因的 Sox18 突变子表达载体就在例如, 293T 或内皮细胞中表达。Sox18 突变体 DNA 也可以被整合入用于哺乳动物二杂合子系统中的质粒中(例如 pGAL4), 来测定 SOX18 与其结合配偶体例如 MEF2C (Hosking 等, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 287: 493-500. 2001)的相互作用, 或者用来筛选 SOX18 结合配偶体。例如,
25 pGAL4Sox18 载体将 Sox18 基因连接到酵母 Gal4 DNA 结合结构域, 并且转录激活子被连接到分离的载体中的 SOX18 结合配偶体。将这些载体共引入宿主细胞中将导致由 SOX18 与该结合配偶体或候选的结合配偶体的相互作用造成的可监测的报道基因的表达。pCMV-BD 和 pCMV-AD 载体分别含有 GAL4 DNA 结合结构域和

NF- κ B 转录结构域, 可用于该方法中(BD Biosciences Clontech) 来构建和表达基因融合物, 并且使用萤光素酶报道系统检测 SOX18 的结合活性。

5 在这样一个双因子杂合子分析 (dihybrid assay) 中, 含有通过反式激活区影响 SOX18 结合的突变的 Sox18 淋巴水肿-相关的突变体将降低萤光素酶报道活性的量, 表明 Sox18 淋巴水肿相关的突变将通过其通过反式激活区结合其结合配偶体的能力的缺陷导致淋巴水肿。

10 还通过一些技术评估了 Sox18 等位基因中 HMG-box DNA 结合区中的突变。在单杂合子实验中评估 DNA 结合, 在该实验中 DNA 序列与 SOX18 连接, 例如 5'-(A/T)(A/T)C 氨基酸(A/T)G-3' 及其变换, 被置于与双杂合子是严重的靶质粒相似的启动子/报道基因构建体之前(即上游或 5'端)。报道基因试验随后检测了 SOX18 蛋白及其推定 DNA 结合序列之间的结合。DNA 结合也使用凝胶? 实验(gel shift assay)进行, 即将纯化的 SOX18 蛋白和含有 SOX18 DNA 结合序列的 32 P 末端标记的 DNA 片段一同温育。反应产物随后在非变性的聚丙烯酰胺凝胶上进行分析, 来测定 DNA 结合的或游离的 SOX18 的移动性。SOX18 多肽对推定的结合位点的特异性是通过使用含有 SOX18 的结合位点的 DNA 片段或者寡肽, 或者其他无关的 DNA 序列进行竞争试验确定的。

20 此外, 应用了用于检测 DNA/蛋白结合的基于荧光的试验。SOX18 DNA 结合是通过检测与 DNA 或蛋白结合的单个荧光团的荧光测定的。在这些试验中, 蛋白结合是通过 DNA-蛋白复合体形成时荧光强度或极性的改变测定的。可选地, 两种各含有半个该蛋白结合位点地 DNA 片段产生了。这两个双链 DNA 片段具有包含部分蛋白结合位点的互补的单链突出端。一个 DNA 片段用荧光供体标记, 而另一个用受体标记, 其荧光只能在荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer) (FRET)是检测到。发生蛋白结合时, 两个 DNA 片段的突出端退火并使得荧光供体和受体接近, 导致荧光能量

的转移,从而使得受体的荧光可被检测。见 Heyduk,等, Nat. Biotechnol. 20:171-6. 2002。

人 Sox18 基因组合出现淋巴水肿的危险性的关系提供了另一种诊断和/或治疗受到遗传性淋巴水肿影响的个体的方法。阐明与淋巴水肿相关的 Sox18 突变使得可以确定 SOX18 蛋白的活性被突变干扰,即 DNA 结合或蛋白结合,并提供了治疗患有淋巴水肿的病人的指导。

此外,还涉及使用淋巴管生长因子例如 VEGF-C 和/或 VEGF-D 治疗患有 Sox18-诱导的淋巴水肿 的病人,来治疗受损害的淋巴管发育。例如,使用 VEGF-C 和/或 VEGF-D 治疗 VEGFR-3 缺陷的动物克服了 VEGFR-3 不能起信号作用的缺陷,从而促进了淋巴管生成并缓解了淋巴水肿的症状。Sox18-诱导的淋巴水肿 病人用治疗有效量的 VEGF-C 和/或 VEGF-D 治疗。在另一个实施方案中,将 VEGF-C 和/或 VEGF-D 和其他设计为缓解淋巴水肿症状的治疗联合治疗给药上述病人。

实施例 10

VEGF-C 和 VEGF-D 敲除小鼠显示的异常血管发育可以通过给药外源性 VEGF-C 和/或 VEGF-D 多肽克服。为确定 Sox18 转录调节是否能够由于其与 VEGFR-3 启动子的可能的相互作用,以及对 VEGFR-3 的转录影响而克服这一缺陷, VEGF-C or VEGF-D 敲除小鼠通过和从细胞特异的启动子(例如 K-14 角蛋白启动子)过度表达 Sox18 的小鼠进行杂种繁殖,进行遗传杂交。Sox18 活性对淋巴水肿的效果通过入实施例 10 所述测定淋巴水肿和血管发育进行评估。

基因敲出小鼠的存活和 VEGF-C 和/或 VEGF-D 敲除/Sox18-过度表达小鼠中淋巴管发育的检测表明 Sox18 诱导 VEGFR-3 信号并在淋巴管生成中起关键作用。

VEGF-C 过度表达小鼠(K-14-VEGF-C Tg)显示广泛的淋巴管系统网络,并易于发生肿瘤转移,还显示上调的 VEGFR-3 表达和淋巴水肿症状 (美国专利 6,361,946)。为确定 Sox18 是否通过 VEGFR-3

调节 VEGF-C 信号,使 K-14-VEGF-C Tg 小鼠与表达天然突变的 Sox18 (Ragged 突变)的动物或者实验室设计的突变体杂交,产生 K-14-VEGF-C Tg/Sox18^{-/-}小鼠,所述突变体是使用定点诱变和本领域已知的技术在 SOX 蛋白的 DNA 结合或反式激活区中产生突变构建的。

与 K-14-VEGF-C Tg 单突变动物相比, K-14-VEGF-C Tg/Sox18^{-/-}双突变动物显示降低的淋巴管生成,降低的肿瘤转移范围,和降低的 VEGFR-3 水平,表明 Sox18 分子通过 VEGFR-3 干扰 VEGF-C 信号,而且 Sox18 突变体中 VEGFR-3 信号的抑制下调了活化的 VEGFR-3 的淋巴管生成作用。

可选地, K-14-VEGF-C Tg 小鼠与过度表达的 Sox18 等位基因的转基因小鼠(见上文)杂交,并测定 Sox18 上调的作用。与 K-14-VEGF-C Tg 单突变动物相比, K-14-VEGF-C Tg/Sox18 过度表达的双突变动物显示的淋巴管生成,降低的肿瘤转移范围,和降低的 VEGFR-3 水平,表明 Sox18 转录调节抑制 VEGFR-3 信号,并且很可能是淋巴管生成的负向调节中的因子。

表明 Sox18 是淋巴管生成的负向调节物的结果提供了一种治疗由广泛的淋巴管系统介导的疾病的方法,例如肿瘤生长或淋巴管肉瘤中的淋巴管生成,所述方法通过给药提供过量的 SOX18 转录因子的载体,来防止淋巴管生成信号的诱导。

实施例 11

Sox18 在淋巴管发育中的作用

淋巴管内皮细胞显示独特的由例如 VEGFR-3 和 Prox-1 的多种 LEC 特异性基因高度调节的发育模式。Sox18 是 DNA 结合蛋白和转录因子,预期参与这些 LEC 特异性基因的调节,与 LEC 细胞的命运相关。多条证据表明 Sox18 参与 VEGFR-3 转录调节,SOX18 与小鼠中的转录因子 MEF2C 结合, Sox18 突变体和 MEF2C 缺陷的小鼠显示于 VEGFR-3 突变小鼠相似的淋巴水肿症状,而且 VEGFR-3 启动

子含有 MEF2C 结合位点 (Iljin 等, FASEB J. 15:1028-36. 2001)。这些观察支持 SOX18 在淋巴管发育中的作用。

为分析 SOX18 影响 LEC 特异性生长因子的能力, 通过加入 AdProx-1 载体, 诱导血管内皮细胞发育成 LEC。Sox18 mRNA 和蛋白水平在加入所述 Prox-1 载体前后测定。Sox-18 在加入 Prox-1 载体之后的上调预期和淋巴管内皮细胞的发育相关, 表明 Sox-18 是 LEC 分化中的因子。可选地, Sox18 的 DNA 结合和反式激活活性被定点诱变破坏, 从而产生显性阴性或失活的 SOX-18 蛋白。含有 Sox-18 破坏的等位基因的质粒和 AdProx-1 载体一起被共转染到 BEC 中, 来评估存在无功能 Sox-18 基因时 LEC 的发育。LEC 特异性标志物例如 LYVE-1 和 podoplanin 的检测也用于这些试验中来测定 Sox18 调节淋巴管发育的能力。此外, 突变体 Sox-18 还和编码 LEC 特异性蛋白 (例如, VEGFR-3, Prox-1, LYVE-1) 的载体共转染到 293T 细胞中, 并评估了突变的 Sox18 调节所述基因的活性的能力。例如, 存在或缺乏 Sox18 的条件下, VEGF-C 刺激的 VEGFR-3 共转染的 293T 细胞中的信号使用磷酸化试验评估。

淋巴管系统的发育也可以在 Sox-18 突变小鼠中评估, 所述小鼠包括 Ra 小鼠, Sox18 裸鼠, 和具有本文所述的与易患淋巴水肿相关的突变的 Sox18 转基因小鼠。显示淋巴水肿症状的转基因 Sox-18 小鼠, 经改造表达与人突变同源的小鼠基因突变, 或者被改造表达含有淋巴水肿特异性突变的 Sox-18 基因。分析了这些动物中淋巴管系统的发育, 如美国专利 6,361,946 (也见 Kaipainen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 92:3566-70. 1995) 所述, 使用本领域已知的技术, 例如原位杂交来检测 VEGF-C 和/或 VEGFR-3 mRNA 的表达, 检测活体内的 a VEGF-C 和/或 VEGFR-3 蛋白的抗体, 以及使用 Evan's 蓝染料检测来测定 LEC 发育的程度, 并显示活体内有效的淋巴引流。

显性失活的 Sox-18 突变体转染体中的 VEGFR-3 信号表明, Sox18 表达对 VEGFR-3 介导的活性有损伤效应。本发明涉及克服这种类型的突变的治疗, 包括给药例如人类病人的哺乳动物一种包含

SOX18 抑制物的组合物，例如显性失活的基因或显性失活的 Sox18 配体，所述组合物影响 SOX18 干扰 VEGFR-3 信号的能力。可选地，如果 Sox18 活化促进 VEGFR-3 活性，则表明淋巴水肿的治疗包含促进 SOX18 转录活性的组合物，例如在活体外给予过度表达 Sox18 的

5 细胞。

实施例 12

SOX18 介导的淋巴水肿治疗

本发明的另一方面提供是使用 Sox18 制备以细胞为基础的治疗组合物，具体是以 LEC 细胞为基础的组合物。在一个实施方案中，

10 所述细胞是自体细胞，即接受淋巴管系统疾病或病症的治疗的有机体(例如人类病人)的细胞。本发明涉及通过例如同源重组的重组技术增加 Sox18 的内源性表达，例如通过修饰表达控制区，即启动子。可选地，所述细胞被分离的 Sox18 即异源性 Sox18 转化或转染所述细胞，来进行活体内或者活体外的同源 Sox18 表达。

15 例如，SOX18 与转录因子 MEF2C 相互作用，形成的复合物与 VEGFR-3 启动子结合，从而诱导 VEGFR-3 转录并影响 VEGFR-3 蛋白表达和信号水平。预期逆转录病毒或腺病毒载体驱使 SOX18 基因插入表达 LEC 的 VEGFR-3，从而上调 VEGFR-3 介导的信号。

20 这些 Sox18 表达细胞随后用作治疗性组合物，治疗患有 LEC 疾病或病症例如遗传性淋巴水肿或外伤诱导的淋巴水肿的病人。这些细胞用于治疗任何与 VEGFR-3 的表达相关的疾病或病症，例如淋巴管瘤，淋巴管骨髓瘤，淋巴管肌瘤病，淋巴管扩张，淋巴肉瘤，和淋巴管硬化。

25 此外，将 SOX18 多肽 或多肽片段给药患有淋巴水肿的病人来缓解淋巴水肿的症状。给药的含有 DNA 结合区或反式激活区的全长 SOX18 多肽或 SOX18 的片段，将结合其体内的关联结合配偶体并促进 VEGFR-3 信号，或者将启动淋巴管生成过程的下游事件，从而回避淋巴水肿相关的 VEGFR-3 信号或者 VEGF-C 配体结合的缺陷。

在相关的方面，如果 SOX18 表达通过降低的转录因子结合或者 DNA 结合抑制 VEGFR-3 信号，预期 SOX18 的抑制将导致 VEGFR-3 的补偿性上调，减轻与 VEGFR-3 表达过低相关的有害症状。在 Sox18 负向调节 VEGFR-3 活性的情形下，给予对 Sox18 基因特异的反义治疗将抑制 SOX18 的活性，从而使 VEGFR-3 介导信号和淋巴管生长。但由于 F 组 SOX 蛋白 (SOX7/17/18) 的潜在功能性冗余 (potential functional redundancy)，可能需要通过以至所有 F 组蛋白的 DNA 结合活性的机制使所有三种蛋白失活。这一过程是通过例如靶向在所有所述蛋白中高度同源的 DNA 结合区来实现的。认为重组，表达突变的 DNA 结合区的 SOX7/17/18 蛋白作为药物组合物 (含有所有三种突变肽) 给药时，将抑制 SOX18 对 VEGFR-3 的下调，并诱导或促进 VEGFR-3 信号的活性。从上文可见，尽管本发明的具体实施例是为举例而描述，可进行各种修饰而不偏离本发明的精神和范围。

本发明所有上述美国专利申请公开出版物，美国专利申请，外国专利，外国专利申请和非专利出版物的全文内容都包含在本文中作为参考。

表 3
淋巴内皮细胞 (187 种基因)

保藏号	缺失 ¹	基因表达分析				确认		
		Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF	
		ID			比 ²		信号对数比	
肺I型细胞膜相关蛋白, podoplanin	AF030428	NM_006474	41870_at	A	P	7.4	0.925	+
肺I型细胞膜相关蛋白, podoplanin	AI660929	NM_006474	41871_at	A	P	6.1	0.150	+
细胞视黄醇结合蛋白	M11433	NM_002899	38634_at	A	P	7.3	0.255	
巨噬细胞甘露糖受体(MRC1)	M93221		36908_at	A	P	7.1	0.682	
转录因子C-MAF	AF055376	NM_005360	41504_s_at	P	P	5.1	0.522	
转录因子C-MAF	AF055376	NM_005360	41505_r_at	A	P	3.9	0.588	
含硒蛋白 (selenoprotein) P	Z11793	NM_005410	34363_at	A	P	5.0	0.331	
KIAA0466, 免疫球蛋白超家族, AB007935		NM_001542	38086_at	A	P	4.9	2.028	
成员3								
II型膜蛋白, 与 HIV gp120-结合的C-型凝集素类似, CD209抗原样	AB015629	NM_014257	39270_at	A	P	4.9	0.846	
KIAA0626	AB014526	NM_021647	33241_at	A	P	4.7	0.212	

保藏号	缺失 ¹	基因表达分析				确认			
		Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF	信号对数比
		ID	比 ²						
KIAA0711	AB018254	NM_014867	36453_at	A	P	4.6	0.055	+	
整联蛋白α9	D25303	NM_002207	1508_at	A	P	4.3	0.712	+	+
整联蛋白α9	D25303	NM_002207	35948_at	A	P	3.6	1.086	+	+
松弛素 H2	X00948	NM_005059	31732_at	A	P	4.1	0.432		
KIAA0644	AB014544	NM_014817	34214_at	A	P	3.9	0.803	+	
Cdk-抑制物p57KIP2 (KIP2)	U22398	NM_000076	1787_at	A	P	3.8	2.020	+	3.3
Cdk-抑制物p57KIP2 (KIP2)	U22398	NM_000076	39545_at	A	P	3.0	0.150	+	1.4
瞬时受体电压通道 (transient receptor potential channel) TRPC6		NM_004621	36365_at	A	P	3.8	0.988		
cDNA DKFZp564O222 (来自克隆 DKFZp564O222)			38312_at	A	P	3.6	0.876		
枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)样蛋白 (PACE4), 配对的碱性氨基酸裂解系统4	M80482	NM_002570	32001_s_at	P	P	3.6	0.334		
G-蛋白信号16调节物, U70426		NM_002928	41779_at	A	P	3.6	0.673		

保藏号	缺失 ¹	基因表达分析				确认			
		Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF	信号对数比
		ID	比 ²						
A28-RGS14p									
二氢嘧啶酶相关蛋白1, 脑衰蛋白	D78012	NM_001313	40272_at	A	P	3.5	1.192		
反应介导物蛋白 1									
粒桥蛋白 (DPI, DPII)	AL031058	NM_004415	36133_at	A	P	3.5	0.426	+	1.0
pendrin, 溶质载体(solute carrier)	AF030880	NM_000441	36376_at	A	P	3.3	1.156		
家族, 成员4									
reelin (RELN)	U79716	NM_005045	37530_s_at	P	P	3.3	0.142		
整联蛋白, α 1	X68742		120_at	P	P	3.3	0.080	+	
整联蛋白, α 1	X68742		37484_at	M	P	2.4	0.345	+	
胆固醇25羟化酶	AF059214	NM_003956	32363_at	A	P	3.3	0.137		1.5
抑制素 β -B亚单位前体	M31682	NM_002193	38545_at	P	P	3.2	0.056		3.0
KIAA1233	AL109724		38856_at	A	P	3.1	1.540		
前-B细胞刺激因子类似物	L36033	NM_000609	33834_at	A	P	3.0	0.860	RT-PC	
(SDF1b)								R	
V-Erba相关Ear-3蛋白	HG3510-HT37		1147_at	P	P	2.9	0.398		1.7

保藏号	缺失 ¹			基因表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF
	ID	比 ²		信号对数比			
04							
单克隆抗体MRC OX-2鉴定的抗	37716_at	P	P	2.9	0.283	+	1.0
原							
载脂蛋白D	NM_001647	36681_at	M	P	2.9	0.150	+
TIMP3, 基质金属蛋白酶的抑制剂	NM_000362	1035_g_at	A	P	2.8	0.528	+
抑制物							
TIMP3	NM_000362	1034_at	P	P	1.9	0.224	+
乙醛脱氢酶 1	NM_000689	37015_at	P	P	2.8	0.275	
prospero-相关的同源框1 (prox 1)	NM_002763	31918_at	A	P	2.8	0.299	+
基质Gla蛋白	NM_000900	36683_at	A	P	2.6	0.250	+
神经元pentraxin II (NPTX2)	U29195	35663_at	A	P	2.6	1.267	2.9
histatin 2 (HIS2)	M26665	41148_at	A	P	2.6	1.009	
内收蛋白 (adducin) 样蛋白的	NM_016824	33102_at	P	P	2.6	0.277	+
ADDL mRNA, 内收蛋白 3 (γ)							
内收蛋白 3 (γ)	U37122	NM_016824	33103_s_at	M	P	2.4	0.397

保藏号	缺失 ¹			基因表达分析			确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF	信号对数比
	ID	比 ²		比 ²				
转录增强因子2, 多肽 C (肌细胞 L08895 增强因子 2C)	NM_002397	37710_at	A	P	2.5	0.540	+	
MADS框转录增强因子2, (肌细胞 增强因子 2C)	NM_002397	37712_g_a	A	P	1.9	0.197	+	
MADS框转录增强因子2, 多肽 C S57212 (肌细胞增强因子 2C)	NM_002397	37711_at	A	P	1.4	0.442	+	
葡萄糖磷酸变位酶5	L40933	33694_at	A	P	2.5	0.431		
细胞周期蛋白 E2	AF102778	35249_at	A	P	2.5	0.906		5.8
白介素7 (IL7)	M29053	33966_at	A	P	2.4	0.191		
白介素7	J04156	1159_at	A	P	1.9	0.921		
cDNA DKFZp586L0120 (来自克 隆DKFZp586L0120)	AL050154	38351_at	P	P	2.4	0.135		
过氧化物酶体增生活化的受体 (peroxisome proliferative activated receptor), γ , PPARG	NM_005037	37104_at	A	P	2.4	0.502		

保藏号	缺失 ¹			基因表达分析			确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF	信号对数比
	ID	比 ²						
脂肪酸结合蛋白4	氨基酸128249	NM_001442	38430_at	P	P	2.4	0.132	
蛋白激酶C ζ	Z15108	NM_002744	362_at	P	P	2.4	0.008	
46 kDa 柯萨奇病毒和腺病毒受体(CAR)蛋白	Y07593	NM_001338	37534_at	P	P	2.3	0.137	2.2
来自 7q35-qter 的 PAC 克隆 RP4-751H13, 锌指样	AC004877	39837_s_at	A	P	P	2.3	0.714	
胸腺嘧啶脱氢酶1, 可溶	M15205	NM_003258	910_at	P	P	2.3	0.205	2.1
胸腺嘧啶脱氢酶1	K02581	NM_003258	41400_at	M	P	1.7	0.193	1.4
Pig7 (PIG7), LPS诱导的TNF-α因子	AF010312	NM_004862	37024_at	A	P	2.3	0.233	4.6
LPS诱导的TNF-α因子	AL120815	NM_004862	37025_at	P	P	1.3	0.327	3.8
脂肪酶 A, 溶酶体酸, 胆固醇酯酶	X76488	NM_000235	38745_at	P	P	2.3	0.281	
泛素特异性蛋白酶13(异肽酶 T-13)	U75362	NM_003940	40701_at	A	P	2.2	0.334	

保藏号	缺失 ¹			基因表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF
	ID	比 ²		信号对数比			
癌胚抗原相关的细胞粘附分子 X16354	NM_001712	988_at	P	P	2.2	0.048	
1(胆汁糖蛋白)CEACAM1							
cDNA DKFZp586D0918 (来自克 AL049370		41856_at	P	P	2.1	0.385	
隆DKFZp586D0918)							
KIAA0598, B细胞RAG相关蛋白 AB011170	NM_014863	35350_at	P	P	2.1	0.154	
RAMP2 (受体(降钙素)活性修饰 AJ001015	NM_005854	38177_at	P	P	2.1	0.361	
的蛋白 2)							
胆固醇酯转移蛋白前体	M30185						
上皮膜蛋白2	U52100						1.0
MHC II 型淋巴细胞抗原 M83664	NM_002121	38095_i_at	A	P	2.0	1.368	
(HLA-DP)β链							
MHC II 型淋巴细胞抗原 M83664	NM_002121	38096_f_at	A	P	1.2	0.034	
(HLA-DP)β链							
β-抑制蛋白(抑制蛋白) 2	AF106941						
有丝分裂检验点激酶 Bub1 AF053305	NM_004336	41081_at	A	P	2.0	0.195	

保藏号	缺失 ¹		基因表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF
ID	比 ²		信号对数		信号对数比	
(BUB1)						
KIAA0229, 与人锚蛋白 D86982 1(S08275)相似	40971_at	P	P	2.0	0.195	1.6
Sprouty 1同源物(FGF信号的拮抗物)	38767_at	P	P	2.0	0.209	
Rap1的鸟苷酸核苷酸交换因子; M-Ras-调节的GEF, KIAA0277	NM_012294	P	P	2.0	0.497	2.1
translin	NM_004622	A	P	2.0	0.140	
红细胞膜蛋白带4.9 (dematin)	NM_001978	P	P	2.0	0.265	1.9
KIAA0846蛋白	NM_015376	A	P	2.0	0.457	
神经胶质成熟因子, γ	NM_004877	P	P	1.9	0.083	1.0
胰岛素样生长因子结合蛋白 2	NM_000597	A	P	1.9	1.157	
(IGFBP-2)						
平滑肌肌球蛋白重链同种型	32838_at	A	P	1.9	0.179	
Smemb						

保藏号	缺失 ¹		基因表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF
	ID	比 ²		信号对数比		
TTG-2 (具有LIM基序的富含半胱氨酸的蛋白), LIM区 only 2 (rhombotin样 1)	NM_005574	32184_at	P	P	1.9	0.221
细胞周期蛋白 B2	AL080146	32263_at	A	P	1.9	0.276
KIAA0353	AB002351	39544_at	P	P	1.9	0.158
KIAA0559, piccolo (突触前细胞基质蛋白)	AB011131	37780_at	A	P	1.9	0.330
G蛋白偶联的受体, 家族C, 组5, AC004131 成员B	NM_016235	40240_at	P	P	1.9	0.047
G蛋白偶联的受体, 家族C, 组5, AI801872 成员B	NM_016235	40239_g_a	P	P	1.4	0.303
CREM (环AMP-反应性元件调节物 β 同种型)	NM_001881	32066_g_a	P	P	1.9	0.098
CREM (环AMP-反应性元件调节物 β 同种型)	NM_001881	32065_at	P	P	1.8	0.241

保藏号	缺失 ¹			基因表达分析			确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF	
	ID	比 ²		信号对数比				
CREM (环AMP-反应性元件调节物 β 同种型)	S68271	NM_001881	32067_at	P	P	1.5	0.182	2.0
假想蛋白 FLJ13110	AL080222	NM_022912	36096_at	A	P	1.9	0.387	
肌醇(myo)-1(或4)-单磷酸酶2	AF014398	NM_014214	36496_at	A	P	1.8	0.590	3.2
KIAA0937蛋白	AB023154		35369_at	P	P	1.8	0.185	
有丝分裂纺锤体卷曲螺旋 (coiled - coil) 相关蛋白	AF063308	NM_006461	32120_at	A	P	1.8	0.257	
富含半胱氨酸和甘氨酸的蛋白 (CSRP2)	2 U57646	NM_001321	41401_at	A	P	1.8	0.431	4.3
拓扑异构酶 (DNA) II α (170kD)	AI375913	NM_001067	40145_at	P	P	1.8	0.239	1.0
DNA 拓扑异构酶 II	J04088	NM_001067	1592_at	P	P	1.2	0.162	
蛋白磷酸酶抑制剂 2 (PPP1R2)	U68111		33180_at	P	P	1.8	0.319	
KIAA0186	D80008	NM_021067	39677_at	A	P	1.8	0.269	1.4
双重特异性酪氨酸(Y)-磷酸化调	Y12735	NM_003582	39931_at	P	P	1.8	0.146	

保藏号	Affymetrix ID	缺失 ¹		基因表达分析		确认	
		BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF
信号对数比							
比 ²							
节激酶3 (Dyrk3)							
驱动蛋白样纺锤蛋白 HKSP U37426	NM_004523	40726_at	M	P	1.8	0.439	
(HKSP)							
亨廷顿 (Huntingtin) 相关蛋白反 U94190	NM_003947	40655_at	P	P	1.8	0.529	1.4
应蛋白 (duo)							
diubiquitin	AL031983	39959_at	A	P	1.8	0.841	
bikunin, 丝氨酸蛋白酶抑制物, U78095	NM_021102	34348_at	A	P	1.8	0.398	
Kunitz型, 2							
细胞色素 P-450-1 (TCDD-可诱导 K03191	NM_000499	36767_at	A	P	1.7	0.165	2.0
的)							
细胞色素 P(1)-450	X02612	1025_g_at	P	P	1.1	0.125	1.7
KIAA0513	NM_014732	38735_at	A	P	1.7	0.297	
蛋白磷酸酶抑制物 2 (PPP1R2) U68111		812_at	P	P	1.7	0.185	
RAMP3 (受体(降钙素)活性修饰 AJ001016	NM_005856	35152_at	P	P	1.7	0.228	
蛋白 3)							

保藏号	缺失 ¹	基因表达分析				确认		
		Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF	
		ID	比 ²		信号对数比			
B-myb	X13293	NM_002466	1854_at	M	P	1.7	0.455	2.3
KIAA0952	AB023169	NM_014962	37755_at	P	P	1.7	0.254	1.0
干扰素刺激的基因 (20kD), U88964		NM_002201	33304_at	A	P	1.7	0.178	
HEM45								
GS3955	D87119	NM_021643	717_at	P	P	1.7	0.107	1.6
GS3955	D87119	NM_021643	40113_at	P	P	1.3	0.098	1.3
GRB2相关的接合体 (adaptor) 蛋白 (Grap)	U52518	NM_006613	805_at	A	P	1.7	0.147	
KIAA1071蛋白	AB028994		38286_at	A	P	1.7	0.625	
具有多重剪接(multiple splicing)的RNA结合蛋白基因, RBP-MS/类型 5	D84111	NM_006867	34162_at	P	P	1.7	0.347	
具有多重剪接的RNA结合蛋白基因, RBP-MS/类型 5	D84111	NM_006867	34163_g_a	P	P	1.6	0.147	
因, RBP-MS/类型 5		t						
RBP-MS/类型 4, 具有多重剪接	D84110	NM_006867	1276_g at	P	P	1.5	0.263	

保藏号	缺失 ¹			基因表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF
ID							
比 ²							
的RNA结合蛋白基因							
RBP-MS/类型 4, 具有多重剪接	D84110	NM_006867	38049_g_a	P	P	1.3	0.268
的RNA结合蛋白基因		t					
RBP-MS/类型 3, 具有多重剪接	D84109	NM_006867	38047_at	P	P	1.2	0.225
的RNA结合蛋白基因							
α-辅助蛋白-2相关的LIM蛋白	AF002282	NM_014476	39690_at	A	P	1.7	0.728
semaphorin-III (Hsema-I), L26081		NM_006080	33461_at	A	P	1.6	0.445
semaphorin 3A							
含IQ基序的GTPase活化蛋白 2	U51903	NM_006633	1647_at	M	P	1.6	0.395
抑制蛋白, B 2	HG2059-HT21		957_at	P	P	1.6	0.342
	14						
视网膜母细胞瘤相关蛋白HEC	AF017790	NM_006101	40041_at	P	P	1.6	0.153
LIM区结合蛋白 (LDB1)	AF052389	NM_001290	36065_at	P	P	1.6	0.153
双重特异性磷酸酶5	U15932	NM_004419	529_at	P	P	1.6	0.207
人cDNA 3', mRNA序列	AI557322		39611_at	P	P	1.6	0.081

保藏号	缺失 ¹		基因表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF
	ID	比 ²		信号对数比		
单胺氧化酶A (MAOA)	M68840	NM_000240	41772_at	P	P	0.148
单胺氧化酶A	氨基酸420624	NM_000240	41771_g_a	P	P	0.230
		t				
NECDIN相关蛋白	U35139	NM_002487	36073_at	P	P	0.245
调节(regulatory)溶质载体蛋白, 家族1, 成员1	X82877	NM_006511	31695_g_a	A	P	0.916
		t				
TTK蛋白 激酶	M86699	NM_003318	572_at	P	P	0.196
fms 相关的酪氨酸激酶 4, X69878		NM_002020	403_s_at	A	P	0.403
VEGFR-3					+	+
TSC403,与溶酶体相关的膜糖蛋白类似	AB013924	NM_014398	37168_at	P	P	0.164
HMG-2	X62534		38065_at	P	P	0.105
人克隆24416 mRNA序列	AF052159		35342_at	P	P	0.253
降钙素受体样	L76380	NM_005795	34995_at	P	P	0.509
KIAA0582蛋白	AI761647	NM_015147	40191_s_at	M	P	0.558

保藏号	缺失 ¹			基因表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF
	ID	比 ²		信号对数比			
cDNA DKFZp434B102 (来自克隆 AL080192)	38630_at	A	P	1.5	0.719		
DKFZp434B102)							
cDNA DKFZp586G1922 (来自克隆 AL080110)	39600_at	P	P	1.5	0.160		
隆DKFZp586G1922)							
乙酰-CoA 合酶3	D89053	NM_004457	P	P	1.5	0.264	
脂肪酸辅酶A接合酶, 长链3	氨基酸977580	NM_004457	P	P	1.0	0.120	1.7
STAT诱导的STAT抑制剂-2	AF037989	38994_at	A	P	1.5	0.391	
同源异型蛋白 Hox5.4	HG3502-HT36	696_at	P	P	1.5	0.181	
96							
假想蛋白 FLJ13910, cDNA AL050139	NM_022780	36580_at	P	P	1.5	0.228	
DKFZp586M141 (来自克隆)							
DKFZp586M141)							
cDNA DKFZp586N012 (来自克隆 AL049471)	41690_at	P	P	1.4	0.320		
DKFZp586N012)							
Ubch10, 泛素载体蛋白 E2-C	U73379	NM_007019	1651_at	P	1.4	0.022	1.1

保藏号	缺失 ¹			基因表达分析			确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF	信号对数比
	ID	比 ²						
细胞周期蛋白依赖的激酶抑制物 L25876	NM_005192	1599_at	P	P	1.4	0.431		
3,蛋白酪氨酸磷酸酶 (CIP2)								
糖原磷酸化酶(PYGL)	AF046798	37215_at	P	P	1.4	0.423		1.5
造血因子-2	AF004327	NM_001147	1951_at	P	P	1.4	0.175	1.2
造血因子-2	AF004327	NM_001147	37461_at	P	P	1.2	0.134	+
叉头盒(forkhead box)M1	U74612	NM_021953	34715_at	M	P	1.4	0.367	1.4
可能的异戊二烯化的蛋白酪氨酸磷酸化酶 hPRL-3	AF041434	NM_007079	36008_at	A	P	1.4	0.094	2.3
RAB31, Rab 亚家族的Low Mr GTP结合蛋白	U59877	NM_006868	33371_s_at	P	P	1.4	0.299	
RAB31, RAS 原癌基因 家族成员	AI189226	NM_006868	33372_at	P	P	1.2	0.444	
肌球蛋白 VIIA	U39226	NM_000260	33197_at	P	P	1.4	0.038	1.2
Grb2-相关结合物-1, 与IRS-1相关的停靠 (docking) 蛋白	U43885	NM_002039	1249_at	A	P	1.4	0.073	

保藏号	缺失 ¹ Affymetrix BEC LEC	基因表达分析			NB	IF	信号对数比
		ID	信号对数	s.d. ³ 比 ²			
核纤层蛋白 B1	L37747	37985_at	P	P	1.4	0.643	
微型染色体保持缺陷的(mis5, S. D84557 pombe) 6 HsMcm6		NM_005915	40117_at	P	P	1.4	0.170
1.8							
细胞周期蛋白 B1	M25753	1945_at	P	P	1.4	0.398	
细胞周期蛋白 B1	M25753	34736_at	P	P	1.3	0.160	
RTP, N-myc下游调节的	D87953	NM_006096	36933_at	P	P	1.4	0.131
α 2,3-唾液酸转移酶	AB022918	NM_006100	39298_at	P	P	1.4	0.150
ADP-核糖基化因子样蛋白 4	U73960	NM_005738	33796_at	P	P	1.4	0.281
中心粒蛋白 F (350/400kD, 分裂 激素)	U30872	NM_016343	37302_at	A	P	1.4	0.245
亲代表达的10, KIAA1051	AB028974	NM_015068	39696_at	P	P	1.4	0.300
微管蛋白, α 1 (睾丸特异性)	X06956	36591_at	M	P	1.4	0.300	4.2
KIAA0101	D14657	NM_014736	38116_at	P	P	1.4	0.409
KIAA0128, septin 2	D50918	38826_at	P	P	1.4	0.381	1.8
蛋白磷酸酶2, 调节性亚基 B	Z69030	NM_002719	40785 g a	P	P	1.4	0.453

保藏号	缺失 ¹		基因表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF
	ID	比 ²		信号对数比		
(B56), γ		t				
脱氧胞苷激酶	M60527	NM_000788	886_at	A	P	1.3
整联蛋白 β 3 结合蛋白 (β 3-内	U37139	NM_014288	38501_s at	P	P	1.3
联蛋白)						0.455
						0.171
TAL1 (SCL)中断位点	M74558	NM_003035	32767_at	M	P	1.3
KIAA0666	AB014566		33753_at	P	P	1.3
cAMP- 特异性磷酸二酯酶 8A, AF056490			37676_at	P	P	1.3
PDE8A1						0.222
有丝分裂检验点激酶 Mad3L AF053306		NM_001211	35699_at	P	P	1.3
(MAD3L), BUB1B						0.216
核糖体S6激酶	X85106	NM_021135	32892_at	P	P	1.3
HPTP ε (蛋白酪氨酸磷酸酶 ε)	X54134	NM_006504	32916_at	P	P	1.3
Lyn 酪氨酸激酶 ,v-yes-1 M79321		NM_002350	2024_s at	P	P	1.3
Yamaguchi 肉瘤病毒相关的原癌						0.054
基因同源物						+

保藏号	缺失 ¹	基因表达分析				确认	信号对比
		Affymetrix	BEC	LEC	信号对比 ²		
lyn 酪氨酸激酶, v-yes-1 M16038		NM_002350	1402_at	P	1.3	0.382	+
Yamaguchi 肉瘤病毒相关的原癌基因同源物							
lyn 酪氨酸激酶 M16038		NM_002350	32616_at	P	1.2	0.066	+
brachyury 变体 A (TBX1), T-盒 AF012130		NM_005992	32285_g_a	P	1.3	0.352	
(box) 1 转录因子		t					
单克隆抗体 Ki-67 的抗原的mki67a X65550		NM_002417	418_at	A	1.3	0.357	1.5
mRNA (长链型)							
蛋白酪氨酸磷酸酶受体 pi U81561		NM_002847	36160_s_at	P	1.3	0.193	
(PTPRP)							
cbl-b U26710		NM_004351	514_at	A	1.3	0.482	
细胞周期蛋白 A2 X51688		NM_001237	1943_at	P	1.3	0.277	
核苷磷酸化酶 X00737		NM_000270	430_at	P	1.3	0.272	
TNF-相关的凋亡诱导配体TRAIL U37518		NM_003810	1715_at	P	1.3	0.316	
磷酸二酯酶4B, cAMP-特异性 L20971		NM_002600	33705_at	P	1.3	0.275	

保藏号	缺失 ¹			基因表达分析			确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF	信号对数比
	ID	比 ²						
巢蛋白 (议定菌素)	M30269	NM_002508	35366_at	P	P	1.3	0.050	
HYA22蛋白	D88153	NM_005808	40196_at	P	P	1.3	0.150	1.3
磷脂酸磷酸酶2A型	AF014402	NM_003711	34797_at	P	P	1.3	0.191	
KIAA0512, ALEX2	AB011084	NM_014782	36057_at	P	P	1.2	0.268	
血栓烷A2受体	D38081	NM_001060	336_at	M	P	1.2	0.385	2.4
三叶(trefol)因子3 (小肠)	AI985964	NM_003226	37897_s_at	P	P	1.2	0.183	
G-2 和S期表达的 I(G-2 和S期	AL031588	NM_016426	41660_at	A	P	1.2	0.424	3.1
表达的1)								
ADP-核糖基转移酶(NAD+; 多	AJ236876	NM_005484	34756_g_a	M	P	1.2	0.362	1.1
(ADP-核糖) 聚合酶)-样2		t						
丝氨酸/苏氨酸激酶 12	AF015254	NM_004217	33266_at	P	P	1.2	0.126	
微管蛋白, A1, 同种型 44	HG2259-HT23		330_s_at	P	P	1.2	0.096	1.1
48								
核纤层蛋白 B受体	L25931	NM_002296	288_s_at	P	P	1.2	0.141	

保藏号	Affymetrix ID	缺失 ¹		基因表达分析		NB	IF	信号对数比
		BEC	LEC	信号对数	s.d. ³			
KIAA0429	AB007889	NM_014751	37363_at	P	P	1.2	0.150	2.5
转录因子4	M74719	NM_003199	36605_at	P	P	1.2	0.050	1.1
多配体聚糖3 (N-多配体聚糖), AB007937	NM_014654	32092_at	P	P	P	1.2	0.206	1.0
KIAA0468								
RECK蛋白前体	氨基酸099265	NM_021111	35236_g_a	P	P	1.2	0.173	
			t					
推定的前列腺癌肿瘤抑制物	U42349	NM_006765	36852_at	P	P	1.1	0.082	1.1
蛋白磷酸酶1, 调节性 (抑制物)亚基	AB020630		41577_at	P	P	1.1	0.082	
PDZ 和LIM 区1 (elfin)	U90878	NM_020992	36937_s_at	P	P	1.1	0.096	
假想蛋白 来自克隆643	AF091087	NM_020467	34176_at	P	P	1.1	0.096	1.1
p53-调节的 DDA3	氨基酸926959		37347_at	P	P	1.1	0.058	
KIAA0062	D31887		38797_at	P	P	1.1	0.058	
中链乙酰辅酶A脱氢酶	M91432		37532_at	P	P	1.1	0.308	
间隙连接蛋白, α 1, 43kD (连接	M65188	NM_000165	2018_at	P	P	1.1	0.329	

保藏号	缺失 ¹			基因表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF
ID							
比 ²							
蛋白(connexin)43							
MyoD家族抑制物	U78313	NM_005586	38156_at	P	P	1.1	0.381
核 酸 内 切 / 外 切 酶 Mre11	AF073362	NM_005591	32869_at	P	P	1.1	0.642
(MRE11A)							
核受体超家族2, F组, 1号成员	X16155	NM_005654	39294_at	A	P	1.0	0.446
(nuclear receptor subfamily 2, group F, 成员 1)							

¹ 一种测定, 表明转录子是否被检测到(存在, P), 未检测到(缺失, A), 或勉强检测到(勉强, M; 如果一次试验中为 P, 另一次为 A 也用 M 表示).

² 两种独立采集的 BEC 和 LEC (= 共 4 组比较)的转录子的表达水平的变化. 以 log2 比值表示所述变化.

³ 所述表达水平(四组比较)变化的标准偏差.

NB= Northern 印记, IF= 免疫荧光

表 4
血管内皮细胞 (222 基因)

保藏号	检测 ¹		基因 表达分析			NB	IF	信号对数比
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³			
p27 mRNA, 干扰素 α-诱导的蛋白 27	NM_005532	425_at	P	A	8.3	0.620		1.5
核糖核酸酶A (RNase A), 胰腺的	NM_002933	37402_at	P	A	7.2	0.208		2.7
造血性神经膜蛋白 U87947 (hematopoietic neural membrane protein) (HNMP-1)	NM_001425	39182_at	P	A	5.9	0.381		1.6
N-钙粘着蛋白	M34064	2054_g_at	P	A	5.7	1.345	+	
N-钙粘着蛋白	M34064	2053_at	P	P	3.7	0.514	+	
白介素8 (IL8)	M28130	1369_s_at	P	A	5.3	1.477	+	
白介素8, β -血小板球蛋白样蛋白前体	NM_000584	35372_r_at	P	P	2.8	0.406	+	1.1

保藏号	检测 ¹		基因表达分析		确认				
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF			
	ID	比 ²				信号对数比			
酪氨酸激酶受体 (axl)	M76125	NM_001699	38433_at	P	A	5.1	1.112	+	1.0
酪氨酸激酶,受体 Axl, Alt. HG162-HT316			1278_at	P	A	4.7	0.937	+	1.1
Splice 2	5								
细胞表面糖蛋白CD44 (CD44)	L05424		1126_s_at	P	A	4.9	1.527		1.9
细胞粘附分子 (CD44)	M59040	NM_000610	2036_s_at	P	A	1.9	0.402		2.6
透明质酸受体 (CD44)	L05424		40493_at	P	P	1.9	0.136		2.0
血管内皮生长因子相关蛋白 U43142		NM_005429	159_at	P	A	4.6	0.850	+	
VRP, VEGF-C									
血管内皮生长因子C	X94216	NM_005429	1934_s_at	P	A	4.4	1.342	+	
胶原蛋白 XIII 型, α 1 M33653		NM_005203	38952_s_at	P	A	4.5	0.213		2.7
(=COL4A2)									
胶原蛋白XIII型, α-1	M59217	NM_005203	38951_at	P	A	3.6	1.683		1.1
胶原蛋白 α-2, I型	K01079		32306_g_a	P	A	4.5	2.161		
			t						
胶原蛋白 α-2, I型	K01079		32305_at	P	A	2.8	1.464		

保藏号	检测 ¹		基因表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF
	ID	比 ²				信号对数比
胶原蛋白, I型, $\alpha 2$	NM_000089	32307_s_at	P	A	2.4	1.394
蛋白多糖 I	NM_002727	32227_at	P	P	4.3	0.385
磷酸脂酶 A2, 组 IVA, 钙依 M72393		35938_at	P	A	4.3	2.398
赖的磷脂结合蛋白 (PLA2)						
碳水化合物(硫酸角蛋白 Gal-6) AB003791	NM_003654	41395_at	P	P	4.2	0.232
磺基转移酶						
原肌球蛋白 2 (β), 原纤维细胞 M12125	NM_003289	32314_g_a	P	A	4.2	1.845
原肌球蛋白		t				
硫酸软骨素蛋白多糖2 (多能聚 X15998	NM_004385	38111_at	P	A	4.1	1.746
糖)						
硫酸软骨素蛋白多糖2 (多能聚 X15998	NM_004385	38112_g_a	P	A	2.0	1.219
糖)		t				
潜在的转化长因子 r- β 结合蛋白 Z37976	NM_000428	37906_at	P	P	4.1	0.381
(LTBP-2)						
白介素6 (干扰素, $\beta 2$)	NM_000600	38299_at	P	A	4.0	0.776
						2.0

保藏号	检测 ¹		基因 表达分析		确认		
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF	
	ID			比 ²		信号对数比	
骨形态发生蛋白-4 (hBMP-4)	U43842	NM_001202	40333_at	P	A	4.0	0.883
骨形态发生蛋白 2B, BMP-4	M22490	NM_001202	1114_at	P	A	2.6	1.146
sarcolectin, 角蛋白 7	AJ238246	NM_005556	41294_at	P	P	3.9	0.631
神 经 元 细 胞 粘 附 分 子 , AB002341		NM_005010	37286_at	P	A	3.9	1.642
KIAA0343							1.8
神 经 元 细 胞 粘 附 分 子 , U55258		NM_005010	37288_g_a	P	A	1.5	0.309
hBRAVO/Nr-CAM前体		t					
基质金属蛋白酶 1 (基质胶原酶), 皮肤胶原酶	M13509	NM_002421	38428_at	P	P	3.9	0.521
干细胞因子, KIT 配体	M59964	NM_000899	597_at	P	A	3.9	0.554
uPA	X02419	NM_002658	37310_at	P	A	3.8	0.282
纤溶酶原激活物-1	J03764	NM_000602	672_at	P	P	3.7	0.161
纤溶酶原激活物 1	M14083	NM_000602	38125_at	P	P	2.9	0.118
selectin P, CD62, 颗粒膜蛋白	M25322	NM_003005	40366_at	P	P	3.6	1.869
140 (GMP-140)前体							1.2

保藏号	检测 ¹		基因表达分析			确认		
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF	
	ID			比 ²			信号对数比	
latrophilin-2	AJ131581	NM_012302	34174_s_at	P	A	3.6	0.098	1.1
肌动蛋白, α 2	X13839	NM_001613	32755_at	P	P	3.6	1.067	
成纤维细胞活化蛋白, α	U09278	NM_004460	39945_at	P	A	3.6	0.789	1.2
G蛋白信号10的调节物20	AF060877	NM_003702	41086_at	P	A	3.5	0.615	
IGF-II mRNA-结合蛋白 3	U97188	NM_006547	37558_at	P	P	3.5	0.528	2.1
视网膜cDNA随机引物亚文库, W28438			36497_at	P	A	3.5	0.414	
EST								
脑酸可溶性蛋白1, 神经元组织	AF039656	NM_006317	32607_at	P	A	3.4	0.104	1.6
富集的酸性蛋白 (NAP-22)								
抑制蛋白 2	AL096719	NM_002628	38839_at	P	P	3.4	0.111	1.6
抑制蛋白 2	L10678	NM_002628	38840_s_at	P	P	3.1	0.076	1.6
Na,K-ATPase β -1亚基	U16799	NM_001677	37669_s_at	P	A	3.4	0.249	
Claudin-7	AJ011497	NM_001307	38482_at	P	A	3.4	0.798	
正常牙龈 (normal gingiva)	U51712		39698_at	P	A	3.4	0.391	1.1

保藏号	检测 ¹		基因 表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF
	ID		比 ²			信号对数比
分解蛋白 (disintegrin) 和金属蛋白酶(metalloproteinase)结构域23	NM_003812	40350_at	P	A	3.4	0.600
α I(VIII) 胶原蛋白的COL8A1 X57527	NM_001850	37459_at	P	A	3.3	0.819
mRNA						1.7
信号转导物和转录激活物6 AF067575 (STAT6)		41222_at	P	P	3.3	0.338
转录因子IL-4 Stat, STAT6	U16031					
脂皮质蛋白-III, 膜联蛋白 A3	M20560					
细胞内粘附分子 1 (CD54), 主	M24283					
要组(major group)鼻病毒受体前		32640_at	P	A	3.2	0.184
体						
溶质载体家族1 (神经/上皮高亲	U08989					
合力谷氨酸转运子, 系统 Xag)		38268_at	P	A	3.2	0.687
溶质载体家族1 (神经/上皮高亲	A1928365					
合力谷氨酸转运子, 系统 Xag)		38267_at	P	A	2.6	0.524

保藏号	检测 ¹		基因 表达分析			确认		
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF		
	ID	比 ²						
p53诱导的蛋白	L47738	37579_at	P	A	3.2	0.249	1.0	
二氢嘧啶脱氢酶, DPYD	U20938	NM_000110	38220_at	P	A	3.2	0.306	
自然杀伤细胞转录物4	氨基酸631972	NM_004221	39119_s_at	P	P	3.1	0.082	1.6
PFTAIRE蛋白激酶1, KIAA0834	AB020641	NM_012395	36502_at	P	A	3.1	0.841	
RGP4, G蛋白信号调节物4	U27768	NM_005613	34272_at	P	A	3.0	0.396	1.5
G蛋白信号调节物4	AI267373	NM_005613	34273_at	P	A	2.6	0.473	1.5
原癌基因Aml1-Evi-1, 融合活化	HG4058-HT43	1882_g_at	P	M	2.9	0.590	1.5	
的	28							
原癌基因Aml1-Evi-1, 融合活化	HG4058-HT43	1881_at	P	A	2.0	0.374		
的	28							
腺苷酸环化酶相关蛋白 2	N90755	NM_006366	33405_at	P	A	2.8	0.596	1.5
clusterin (补体裂解抑制物, M25915		NM_001831	36780_at	P	P	2.8	0.161	
SP-40,40, 硫酸糖蛋白2, 载脂蛋白 J)								
ADP核糖基化因子样 7	AB016811	NM_005737	39829_at	P	A	2.7	0.531	

保藏号	检测 ¹		基因 表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF
	ID			比 ²		信号对数比
H 因子(补体)样 1	M65292	NM_002113	32249_at P	A 2.7	0.589	
RNA解旋酶相关的蛋白, 金属	H68340	NM_007372	41446_f_at P	P 2.7	0.296	
硫蛋白-If						
活化的反式肌动蛋白g因子 (50 X82200		NM_006074	36825_at P	A 2.7	0.730	6.2
kDa) Staf50						
环加氧酶-2 (hCox-2)	U04636	NM_000963	1069_at P	A 2.6	1.281	
GRO1原癌基因, 黑素瘤生长刺 X54489		NM_001511	408_at P	A 2.6	0.369	
激活性 (MGSA)						
NRGN, neurogranin	X99076	NM_006176	33925_at M	A 2.6	1.237	
小鼠dkk-1同源物	AB020315		35977_at P	A 2.5	0.398	
胃肠道肿瘤相关抗原GA733-1, J04152		NM_002353	291_s_at P	P 2.5	0.139	
肿瘤相关的钙信号转导物2						
层粘连蛋白	Z15008	NM_005562	35280_at P	A 2.5	0.824	
transgelin, 22kDa 平滑肌蛋白 M95787		NM_003186	36931_at P	A 2.5	0.980	
(SM22)						

保藏号	检测 ¹	基因 表达分析			确认	信号对数比
		Affymetrix	BEC	LEC		
		ID	比 ²	信号对数 s.d. ³		
编码单核细胞分泌蛋白的JE基	M28225	34375_at	P	P	2.4	0.186
因						3.6
锌指蛋白 238, RPF58	AJ223321	NM_006352	35824_at	P	A	2.4
						0.498
组织蛋白酶C	X87212	NM_001814	133_at	P	P	2.4
						0.244
组织型凝血酶原激活物(t-PA)	M15518	NM_000930	33452_at	P	A	2.4
						0.479
寿司重复蛋白	AF060567	NM_014467	37805_at	P	A	2.4
						0.670
膜联蛋白 A6	D00510	NM_001155	39082_at	P	A	2.4
						0.181
EphrinB1	U09303	NM_004429	39721_at	P	A	2.4
						0.946
EphrinB1	U09303	NM_004429	188_at	P	A	1.2
						0.489
TFEC 同种型 (转录因子EC)	D43945	NM_012252	34470_at	P	A	2.4
						0.028
小的可诱导细胞因子A2, (单核	M26683	NM_002982	875_g_at	P	P	2.3
						0.283
细胞趋化蛋白1)						
小的可诱导细胞因子A2 (单核细	M26683	NM_002982	874_at	P	A	1.2
						0.385
胞趋化蛋白 1)						
内皮细胞蛋白 C/APC 受体	L35545	NM_006404	647_at	P	P	2.3
						0.259
						2.2

保藏号	检测 ¹			基因 表达分析			NB	IF	信号对数比
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³				
	ID	比 ²							
(EPCR)									
转 谷 氨 酶 (transglutaminase)2	M55153	NM_004613	231_at	P	M	2.3	0.413		
(TGase)									
转谷氨酶	M55153	NM_004613	38404_at	P	P	1.6	0.093		
(transglutaminase)(TGase)									
人金属硫蛋白-If	M10943		31622_f_at	P	M	2.3	0.230		
转化生长因子β诱导的(BIGH3)	M77349	NM_000358	1385_at	P	A	2.3	0.951		
神经元特异性 (γ) 烯醇酶的	X51956		40193_at	P	A	2.3	0.121		1.6
ENO2 基因									
FAT 肿 瘤 抑 制 物 (果 蝇	X87241	NM_005245	40454_at	P	A	2.3	1.204		
(Drosophila)) 同源物									
恶性细胞表达增强的基因/肿瘤	S82470	NM_024298	181_g_at	P	P	2.2	0.469		
进展增强的基因									
恶性细胞表达增强的基因/肿瘤	S82470	NM_024298	180_at	P	A	1.7	0.420		
进展增强的基因									

保藏号	检测 ¹		基因 表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF
	ID	比 ²	比 ²	比 ²	比 ²	比 ²
cDNA DKFZp566G0746 (来自克 AL050078)	39324_at	P	A	2.2	1.281	
隆DKFZp566G0746)						
赖氨酰氧化酶样2	NM_002318	33127_at	P	P	2.2	0.274
ras-相关的C3肉毒杆菌毒素底物	NM_002872	32737_at	P	P	2.2	0.143
2 (rho 家族, 小 GTP 结合蛋白						3.5
Rac2)						
内 皮 白 细 胞 粘 附 分 子 1	NM_000450	265_s_at	P	A	2.2	0.448
(ELAM-1), selectin E						
层粘连蛋白, α 5, KIAA0533	AB011105	41610_at	P	P	2.2	0.146
胎盘生长因子(PIGF)	X54936	NM_002632	793_at	P	P	2.2
来自染色体的ALL1融合基因1q,	NM_006818	36941_at	P	P	2.2	0.592
AF1q						
溶质质素-2, MMP-10	X07820	NM_002425	1006_at	P	P	2.1
金属硫蛋白-I-A	K01383	31623_f_at	P	P	2.1	0.238
胶原蛋白 VI α -1	X15880	38722_at	P	A	2.1	0.898

保藏号	检测 ¹		基因表达分析			确认		
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF	
	ID			比 ²			信号对数比	
mad 蛋白同源物(hMAD-3)	U68019	NM_005902	1433_g_at	P	A	2.1	0.269	1.1
mad 蛋白同源物(hMAD-3)	U68019	NM_005902	38944_at	P	A	1.8	0.367	1.4
mad 蛋白同源物(hMAD-3)	U68019	NM_005902	1454_at	P	A	2.0	0.304	
膜整合蛋白2A	AL021786		40775_at	P	P	2.1	0.570	
白介素1受体样1	D12763	NM_003856	40322_at	P	A	2.1	0.718	
高度活性性组(非组蛋白染色体)	X92518		35200_at	P	A	2.0	0.177	
蛋白同种型 I-C (HMG1-C)								
表皮生长因子r受体激酶底物	U12535	NM_004447	1467_at	P	A	2.0	0.710	1.0
(Eps8)								
乳酸脱氢酶B	X13794	NM_002300	33819_at	P	P	2.0	0.029	1.6
未知产物的mRNA	D29810		40227_at	P	A	2.0	1.170	
假想蛋白 DKFZp564D0462	AL033377		36014_at	P	A	2.0	0.137	1.1
赖氨酸羟化酶同种型 2	U84573	NM_000935	34795_at	P	P	2.0	0.157	
(PLOC2)								
follistatin样3, follistatin相关蛋白	U76702	NM_005860	33900_at	P	A	2.0	0.075	2.6

保藏号	检测 ¹	基因 表达分析				NB	IF	信号对数比
		Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³			
		ID	比 ²					
(FLRG)								
人克隆24674 mRNA序列	AF070578	36758_at	P	A	2.0	0.612		1.8
L-艾杜糖醇-2 脱氢酶	L29254	38763_at	P	A	1.9	0.140		
神经元pentraxin 1	U61849	NM_002522	37921_at	P	A	1.9	0.744	2.5
来自克隆23549和23762的假想蛋白	U90908	NM_021226	34010_at	P	A	1.9	0.870	
蛋白								
UDP-N-乙酰葡萄糖胺焦磷酸化酶	AB011004	NM_003115	41242_at	P	P	1.9	0.342	
锌指蛋白185 (LIM区)	Y09538	NM_007150	32139_at	P	A	1.8	0.062	1.6
四个半 LIM 结构域2, 心蛋白	U29332	NM_001450	38422_s_at	P	P	1.8	0.229	
(FHL-2)								
有丝分裂原活化的蛋白激酶活化的蛋白激酶 3, MAPKAP激酶	U09578	NM_004635	1637_at	P	A	1.8	0.454	1.4
(3pK)								
金属硫蛋白 1E (功能型)	R92331	36130_f_at	P	P	1.8	0.131		
TU3A蛋白	AF035283	NM_007177	38044_at	P	A	1.8	0.298	1.8

保藏号	检测 ¹			基因表达分析			确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF	信号对数比
	ID	比 ²						
金属硫蛋白 IH	R93527	NM_005951	39594_f_at	P	P	1.8	0.415	
鸟氨酸结合蛋白 II 同种型 II	M55543	NM_004120	32700_at	P	P	1.8	0.304	1.1
(GBP-2)								
可溶性血管内皮细胞生长因子r	U01134	NM_002019	1964_g_at	P	M	1.8	0.384	+
受体 1 (sVEGFR-1)								
R-Ras	M14949		38338_at	P	P	1.8	0.119	
R-ras	M14949		1879_at	P	P	1.2	0.330	1.5
肌氨酸转运物 (SLC6A8), 可溶	U36341	NM_005629	40926_at	P	A	1.8	0.305	
性载体家族6, 成员 8								
mybl(小鸡)同源物靶点, 血红	Z82244	NM_005488	33802_at	P	P	1.8	0.149	
素加氧酶1 (HO-1)								
前胶原-赖氨酸, 2-氧化戊二酸	L06419	NM_000302	36184_at	P	P	1.8	0.310	
5-双加氧酶, 赖氨酸羟化酶								
(PLOD)								
KIAA0836	AB020643		33296_at	P	P	1.8	0.203	1.8

保藏号	检测 ¹		基因表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF
	ID	比 ²		信号对数比		
cDNA DKFZp434C171 (来自克 AL080169)	34183_at	P	A	1.8	0.606	1.2
隆DKFZp434C171)						
白介素4受体的IL-4-R mRNA X52425	NM_000418	404_at	P	1.7	0.244	
趋化因子 (C-C基序)受体样2 AF014958	NM_003965	1445_at	P	1.7	0.386	1.8
(CCR2), 趋化因子受体 X						
(CKRX)						
磷酸脂酶C, β 3 (磷脂酰肌醇 Z16411	NM_000932	364_s_at	P	1.7	0.098	
特异性)						
LIM区蛋白 X93510	NM_003687	32610_at	P	1.7	0.067	1.9
蛋白激酶(cAMP-依赖的, 催化 M34181	NM_002731	36215_at	P	1.7	0.315	1.0
的)抑制物 β						
rho GDP解离抑制物 2 X69549	NM_001175	1984_s_at	P	1.7	0.163	2.4
KIAA0975, 咪唑受体候选物 AB023192	NM_007184	33916_at	P	1.7	0.343	
(candidate)						
脊髓灰质炎病毒受体 X64116	NM_006505	32698_at	P	1.7	0.173	

保藏号	检测 ¹	基因 表达分析				NB	IF	信号对数比
		Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³			
		ID	比 ²					
脊髓灰质炎病毒受体	X64116	NM_006505	32699_s_at	P	1.3	0.102		
即刻早期反应 (immediate early response) 3	S81914	NM_003897	1237_at	P	1.7	0.171		
金属硫蛋白 2A	AI547258	NM_005953	39081_at	P	1.7	0.247		
原肌球蛋白 1 (α)	M19267	NM_000366	36791_g_a	P	1.6	0.184		1.0
		t						
原肌球蛋白 1 (α)	Z24727	NM_000366	36792_at	P	1.4	0.094		1.3
原肌球蛋白 1 (α)	M19267	NM_000366	36790_at	P	1.2	0.213		
TRAM样蛋白	D31762	NM_012288	40051_at	P	1.6	0.244		1.1
E3泛素接合酶SMURF2	氨基酸630312	NM_022739	33354_at	P	1.6	0.244		2.2
含EGF的fibulin样细胞外基质蛋白 1	U03877	NM_004105	32551_at	P	1.6	0.152		
G-蛋白偶联的 56	AJ011001	NM_005682	35769_at	P	1.6	0.075		
c-jun第一(proto)原癌基因 (JUN)	J04111	NM_002228	32583_at	P	1.6	0.377		
G-蛋白信号调节物10, RGS10	AF045229	NM_002925	33121_g_a	P	1.6	0.064		

保藏号	检测 ¹		基因 表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF
	ID	比 ²				
	t					
β 淀粉样蛋白 (A4)前体蛋白结	U62325	40148_at	P	P	1.6	0.312
						1.3
合的,家族B, 成员2 (Fe65样)						
ras相关的rho蛋白	M12174	NM_004040	1826_at	P	P	1.6
						0.281
蛋白 酶体 (prosome, macropain)	AL031177	NM_002814	37957_at	P	A	1.5
						0.265
26S亚基, 非-ATPase, 10						
KIAA0537	AB011109	NM_014840	33787_at	P	P	1.5
						0.135
溶酶体相关的膜蛋白-2	X77196	NM_002294	38403_at	P	P	1.5
						0.432
磷脂转移蛋白	L26232	NM_006227	40081_at	P	P	1.5
						0.046
N-豆蔻酰转移酶2	AF043325	NM_004808	41656_at	P	P	1.5
						0.038
磷酸果糖激酶 (PFKM)	U24183	NM_000289	36196_at	P	P	1.5
						0.374
整联蛋白, β 4	X53587	NM_000213	406_at	P	A	1.5
						0.195
leupaxin	AF062075	NM_004811	36062_at	P	A	1.5
						0.231
内皮素转化酶 1	Z35307	NM_001397	41726_at	P	P	1.5
						0.180
野生型 p53 活化的片段	U03106	NM_000389	2031_s_at	P	P	1.5
						0.399
						1.8
						2.0
						1.3

保藏号	检测 ¹		基因表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF
	ID	比 ²		信号对数比		
-I(WAF1), 细胞周期蛋白依赖						
的激酶抑制物 1A (p21, Cip1)						
ICAM-2,LFA-1的细胞粘附配体	X15606	NM_000873	38453_at	P	1.5	0.024
ICAM-2,LFA-1的细胞粘附配体	X15606	NM_000873	38454_g_a	P	1.5	0.153
细胞间粘附分子2 (ICAM-2)	M32334		590_at	P	1.4	0.152
真核细胞翻译起始因子 2B, AF035280			40515_at	P	1.5	0.108
eIF-2B β亚单位						
鸟苷磷酸化酶	X90858	NM_003364	37351_at	P	1.5	0.064
整联蛋白, β 5	X53002	NM_002213	39754_at	P	1.5	0.068
N-磺基葡糖胺糖基水解酶(磺酰	U30894	NM_000199	35626_at	P	1.5	0.077
胺酶)						
synaptojanin 2	AF039945		36532_at	P	1.5	0.164
金属硫蛋白 1L	氨基酸224832	NM_002450	39120_at	P	1.4	0.664
巨噬细胞加帽蛋白, 凝溶胶蛋白	M94345	NM_001747	38391_at	P	1.4	0.281

保藏号	样	检测 ¹		基因 表达分析			NB	IF	信号对数比
		Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³			
		ID			比 ²				
W68830	HSPC022蛋白	NM_014029	32736_at	P	P	1.4	0.062		2.7
AW006742	人克隆137308 mRNA, 部分cds		38207_at	P	A	1.4	0.442		
L11370	原钙粘着蛋白 42, PC42, 原钙	NM_002587	37562_at	P	A	1.4	0.166		
	粘着蛋白 1 (钙粘着蛋白样 1)								
2 AF005775	caspase样凋亡调节性蛋白	NM_003879	1867_at	P	P	1.4	0.363		1.5
	(CLARP2)								
2 AF005775	caspase样凋亡调节性蛋白	NM_003879	1868_g_at	P	P	1.2	0.325		2.2
	(CLARP2)								
X79882	主要穹隆(major vault)蛋白, lrp	NM_005115	38064_at	P	P	1.4	0.252		1.0
AC004472	范可尼贫血(Fanconi anemia), 互	NM_004629	33842_at	P	A	1.4	0.233		
	补组G								
U29185	月元病毒蛋白 (PrP)	NM_000311	36159_s_at	P	P	1.4	0.342		1.1
	干扰素刺激的蛋白, 15 kDa	NM_005101	38432_at	P	A	1.4	0.244		
L40377	丝氨酸(或半胱氨酸)蛋白酶抑制	NM_002640	36312_at	P	A	1.3	0.360		2.2

保藏号	检测 ¹	基因 表达分析			确认	
		Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB IF
		ID	比 ²		信号对数比	
物, 分化枝B(卵清蛋白), 细胞						
质抗蛋白酶2 (CAP2)						
双糖链蛋白聚糖	J04599	NM_001711	38126_at	P	1.3	0.101
趋化因子 (C-X-C基序),受体 4	L06797	NM_003467	649_s_at	P	1.3	0.177 +
(fusin)						
泛素羧基末端酯酶L1 (泛素硫酯酶)	X04741	NM_004181	36990_at	P	1.3	0.117
KIAA0469	AB007938	NM_014851	37230_at	P	1.3	0.124
TNF(配体)超家族, 成员4 (tax- TNF)	AL022310	NM_003326	32319_at	P	1.3	0.349
转炉活化的糖蛋白 1, 34kD)						
KIAA1053	AB028976		40855_at	P	1.3	0.242 1.6
NAD(P)H-醌氧化还原酶	M81600		38066_at	P	1.3	0.058 1.8
含寿司重复的蛋白	U61374	NM_006307	31855_at	P	1.3	0.610 1.2
整联蛋白, α5	X06256	NM_002205	39753_at	P	1.3	0.179 + 1.2
enigma (LIM区蛋白)	L35240	NM_005451	39530_at	P	1.3	0.396

保藏号	检测 ¹			基因表达分析			NB	IF	信号对数比
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	比 ²			
核苷外切三磷酸二磷酸水解酶 AJ133133	NM_001776	32826_at	P	A	1.3	0.412			1.5
l(ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolyase l)									
转化生长因子-r-β (igf-β), 骨形 M60315	NM_001718	39279_at	P	P	1.3	0.206			
态发生蛋白 6									
转化生长因子-r-β (igf-β), 骨形 M60315	NM_001718	1733_at	P	P	1.0	0.308			
态发生蛋白 6									
烟酰胺N甲基转移酶, NNMT U08021	NM_006169	37032_at	P	P	1.2	0.083			2.1
cDNA DKFZp564J0323 (来自克隆DKFZp564J0323)		39170_at	P	P	1.2	0.264			1.2
硫氧还原蛋白还原酶 β AB019694	NM_006440	41711_at	P	A	1.2	0.206			
f-盒和富含氨基酸重复的蛋白 2 AL049953		36525_at	P	A	1.2	0.300			1.2
转钴蛋白 II (TCN2) L02648	NM_000355	37922_at	P	A	1.2	0.342			1.2
乙醛脱氢酶2, 线粒体的 X05409	NM_000690	32747_at	P	P	1.2	0.117			
GTP结合蛋白 ragB X90530	NM_006064	39989_at	P	M	1.2	0.602			

保藏号	检测 ¹		基因表达分析			确认		
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数	s.d. ³	NB	IF	
	ID			比 ²			信号对数比	
淋巴细胞抗原75	AF011333	NM_002349	38160_at	P	A	1.2	0.132	1.7
GM2激活物蛋白	X62078		35820_at	P	P	1.2	0.101	1.5
3型肌醇1,4,5-三磷酸受体	U01062	NM_002224	182_at	P	P	1.2	0.052	1.5
(ITPR3)								
KIAA0284	AI828210		38592_s_at	P	P	1.2	0.078	1.9
金属硫蛋白I-B	M13485		609_f_at	P	P	1.2	0.266	
BTG2	U72649	NM_006763	36634_at	P	P	1.2	0.210	
腺苷酸激酶 I	J04809	NM_000476	36997_at	P	A	1.2	0.246	
肿瘤坏死因子受体超家族, 成员	Y09392	NM_003790	41189_at	P	P	1.2	0.350	
12, WSL-LR, WSL-S1和WSL-S2								
蛋白								
氨基肽酶N/CD13	M22324	NM_001150	39385_at	P	P	1.2	0.398	
生长抑制和DNA损伤诱导的蛋白 (gadd45)	M60974	NM_001924	1911_s_at	P	P	1.2	0.177	
KIAA0638蛋白	AB014538		37375_at	P	P	1.2	0.680	

保藏号	检测 ¹		基因 表达分析			确认		
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF		
	ID			比 ²		信号对数比		
粘着斑蛋白	M33308	NM_003373	36601_at	P	P	1.2	0.078	+
前胶原蛋白-脯氨酸, 2-氧化戊二	U90441	NM_004199	34390_at	P	P	1.1	0.347	
酸 (oxoglutarate) 4-双加氧酶								
(dioxygenase) (脯氨酸 4-羟化								
酶), α 多肽 II								
msg1 相关的基因 1 (mrgI), U65093		NM_006079	33113_at	P	P	1.1	0.164	1.2
Cbp/p300-相互作用的反式激活								
物								
微粒体谷胱甘肽S-转移酶3	AF026977	NM_004528	39018_at	P	P	1.1	0.191	1.1
维生素A反应性; 细胞骨架相关	AF070523	NM_006407	39091_at	P	P	1.1	0.216	2.9
的								
17-kDa蛋白, 干扰素刺激的蛋	M13755	NM_005101	1107_s_at	P	P	1.1	0.119	
白, 15 kDa								
基质金属蛋白酶 14 (插入膜的)	X83535	NM_004995	34747_at	P	A	1.1	0.487	2.4
4F2细胞表面抗原, 溶质载体家	J02939	NM_002394	38029 at	P	P	1.1	0.143	

保藏号	Affymetrix		BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF	信号对数比
	ID	比 ²						
族3, 成员2								
金属硫蛋白-III	M93311	NM_005954	870_f_at	P	1.1	0.334		
蛋白激酶 (cAMP-依赖的, 催化 S76965 的) 抑制物 α		NM_006823	36202_at	P	1.1	0.046		
蛋白激酶 (cAMP-依赖的, 催化 S76965 的) 抑制物 α		NM_006823	546_at	P	1.0	0.367		
reticulocalbin 1, EF-手钙 (hand calcium) 结合区		NM_002901	40556_at	P	1.1	0.035		1.1
lipin 1, KIAA0188	D80010		38098_at	P	1.1	0.080		1.4
蛋白酶, 丝氨酸, 23	AF015287	NM_007173	40078_at	P	1.0	0.099		1.3
hect结构域和RLD 2	AF041080	NM_004667	40877_s_at	P	1.0	0.104		
GATA结合蛋白 (GATA2)	M68891	NM_002050	37194_at	P	1.0	0.325		1.0
agrin前体	AF016903		33454_at	P	1.0	0.272		
均衡 (equilibrative) 核苷转运物 1 (hENT1)	U81375	NM_004955	33901_at	P	1.0	0.352		

保藏号	检测 ¹		基因 表达分析			NB	IF	信号对数比
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³				
	ID	比 ²						
coronin, 肌动蛋白结合蛋白 2B, AB023142	34772_at	P	A	1.0	0.459			
KIAA0925								
f盒(和WD-40 结构域蛋白 3 U07000	NM_012165	537_f_at	P	M	1.0	0.212		
非综合征 (nonsyndromic) 听力 AF073308	NM_004403	41872_at	P	P	1.0	0.535		1.0
障碍蛋白 (DFNA5)								
肌动蛋白丝结合的蛋白 D25248	NM_021638	37578_at	P	P	1.0	0.218		
TNFR相关的死亡受体-6 (DR6) AF068868	NM_014452	35402_at	P	A	1.0	0.235		1.7
血清/糖皮质激素调节的激酶 Y10032	NM_005627	973_at	P	A	1.0	0.174		
DNase X X90392	NM_006730	37214_g_a	P	P	1.0	0.507		
	t							
DNase X X90392	NM_006730	37213_at	P	P	1.0	0.376		
脂肪酸去饱和酶 3 AC004770	NM_021727	34224_at	P	P	1.0	0.294		
LYL-1 M22637		39971_at	P	P	1.0	0.313		1.4
ATP 结 合 盒 , 亚 家 族 C X78338	NM_004996	34016_s_at	P	A	1.0	0.258		2.3
(CFTR/MRP), 成员1								

保藏号	检测 ¹			基因 表达分析		确认	
	Affymetrix	BEC	LEC	信号对数 s.d. ³	NB	IF	信号对数比
	ID	比 ²					
跨膜蛋白 (CD59)	M84349	39351_at	P	P	1.0	0.141	1.1
fms 相关的酪氨酸激酶 1, S77812	NM_002019	1545_g_at	P	P	1.0	0.535	1.9
VEGFR-1							

¹ 一种测定方法，表明转录子是否被检测到(存在，P)，未检测到(缺失，A)，或勉强检测到(勉强，M；如果一次试验中为 P，另一次为 A 也用 M 表示)。

² 两种独立采集的 BEC 和 LEC (= 共 4 组比较)的转录子的表达水平的变化。以 log2 比值表示所述变化。

³ 所述表达水平(四组比较)变化的标准偏差。

NB= Northern 印记, IF= 免疫荧光

表 10

已知的 LEC-特异性基因

基因	检测 *	保藏号	
		起始 EST	可能的基因
CD36	Af(S/4,3)	R20784	M98399
=COL1/TSP 受体, 脂肪酸转运蛋白		H54254	
β 1-syntrophin	Af(S/4,5)	氨基酸 447177	L31529
collectin 亚家族成员 12	Af(S/4,5)	R74387	NM_030781
分解蛋白和金属蛋白酶结构域 12	Af(S/4,3)	氨基酸 147933	NM_003474
细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4	Af(S/4,0)	AI733018	NM_005214
niban 蛋白 NM_022083 niban 蛋白	Af(S/3,7)	氨基酸 554814	NM_052966
含多个 PDZ 区的蛋白, LNX	Af(S/3,5)	AI738919	NM_032622
MAGE-E1 蛋白	Af(S/3,2)	AI435112	NM_030801
上游刺激因子 1, USF1 (基因组匹	Af(S/2,6)	氨基酸 701033	
配)			AB017568
与 YRPW 基序 1 相关的毛状/分裂增	Af(NS/2,6)	R61374	
强子			NM_012258
α -2,8-聚唾液酸转移酶	Af(S/2,5)	AI422986	L41680
semaphorin 6A1	Af(S/2,4)	W21965	NM_020796
鸟苷酸核苷酸结合蛋白 (G prot), γ	Af(S/2,3)	氨基酸 738022	
2			
膜整合蛋白 3	Af(S/2,3)	氨基酸 128019	NM_030926
与小鼠糖皮质激素诱导的基因 1 类	Af(S/2,0)	AI678080	
似			XM_070471
YAP65 (65kDa MW 的 Yes 相关蛋	Af(NS/2,0)	AL048399	
白)			X80507
17 kDa 胎脑蛋白	Af(NS/1,9)	H92988	NM_022343
Kruppel-样因子 5	Af(S/1,8)	AI815057	NM_001730
降钙素受体样, CGRP type 1 受体	Af(S/1,7)	AI741128,	NM_005795, L76380

基因	检测 *	保藏号	
		起始 EST	可能的基因
成纤维细胞生长因子 13, 同种型 Af(NS/1,7) 1A		T94540	
		AW014749	
四区 (tetraspan) NET-6 蛋白	Af(NS/1,6)	W22687	NM_004114
环指蛋白 11	Af(S/1,6)	AL079648	NM_014399
			BC020964

* Af=Affymetrix, S=对 LEC 的特异性, NS=非特异性 (也在 BEC 中表达), 数字代表 BEC 和 LEC 之间的信号强度的 log2 比值。

表 11

根据保藏号鉴定的差异表达的基因

基因	检测 *	起始 EST	SEQ ID NO:
EST	Af (S/4,9)	AL079386	1
EST	Af (S/3,7)	N21555	2
EST	Af (S/3,2)	AL119027	3
EST	Af (S/2,9)	H05299	4
EST	Af (S/2,8)	AA973128	5
EST	Af (NS/2,6)	AI128820	
EST	Af (S/2,3)	AW044647	6
EST	Af (S/2,2)	AI333058	7
EST	Af (S/2,1)	AI536067	8
EST	Af (NS/2,0)	AA156409	
EST	Af (S/1,9)	AI770080	9
EST	Af (NS/1,9)	AA456099	
EST	Af (S/1,8)	AI692645	10
EST	Af (S/1,7)	AL119265	11
EST	Af (S/1,6)	AI478114	12
EST	Af (S/1,6)	AI817448	13

5 * Af=Affymetrix, S=对 LEC 的特异性, NS=非特异性 (也在 BEC 中表达), 数字代表 BEC 和 LEC 之间的信号强度的 log2 比值。

表 12

其它鉴定的蛋白

基因	检测 *	保藏号	
		起始 EST	可能的基因
KIAA1392, 假想蛋白			
DKFZp762K222	Af(S/5,3)	N50545	XM_048721 (20)
与葡萄糖磷酸变位酶 5 相似	Af(S/4,5)	AL046941	XM_047649 (21)
与跨膜受体 Unc5H1 类似	Af(S/4,5)	R56359	XM_030300 (22)
假想蛋白 MGC21854	Af(S/3,7)	AI659418	NM_052862 (23)
KIAA1877	Af(S/3,4)	AW004016	
与未命名的蛋白产物相似	Af(NS/3,1)	氨基酸 036952	XM_085235
未知蛋白	Af(S/2,9)	氨基酸 846091	XM_038314 (24)
KIAA1058 (+ 从 ests 起缺失 N-末端)	Af(S/2,6)	氨基酸 007697	AB028981 (25)
与 KIAA1673 相似	Af(S/2,3)	AI948598	XM_059607 (26)
与溶酶体氨基酸转运子 1 相似	Af(S/2,3)	AI692279	XM_058449 (27)
与 KIAA1673 蛋白相似的人蛋白	Af(S/2,3)	AI948598	XM_059607
KIAA0493	Af(S/2,3)	氨基酸 532655	AB007962 (28)
假想蛋白 MGC2780	Af(S/2,3)	AI734962	NM_025266 (29)
跨膜蛋白 2	Af(NS/2,3)	NM_013390	57094_at HS455J72
新的人染色体 1 基因作图	Af(S/2,2)	氨基酸 651889	(30)

* Af=Affymetrix, S=对 LEC 的特异性, NS=非特异性 (也在 BEC 中表达),

5 数字代表 BEC 和 LEC 之间的信号强度的 log2 比值。

在表 5, 6 和 12 中, 括号里的数字表示序列表里的 SEQ ID NO: 。下表 13 将这些序列与多肽序列 SEQ ID NO:31-44 和 46 (开放阅读框架, ORF's)。

表 13
对应于 LEC-特异性多核苷酸的多肽

保藏号	多核苷酸	多肽
NM_021647	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:31
NM_014817	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:32
XM_059074	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:33
NM_016647	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:34
XM_048721	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:35
XM_047649	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:36
XM_030300	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:37
NM_052862	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:38
XM_039314	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:39
AB028981	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:40
XM_059607	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:41
XM_058449	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:42
NM_025266	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:43
AL137762/HS455J72	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:44
XM_084655	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46

表 14
表 3 中序列的序列鉴定物

	保藏号		氨基酸 SEQ ID NO:	核苷酸 SEQ ID NO:
肺 I 型细胞膜相关蛋白, podoplanin	AF030428	NM_006474	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 66
肺 I 型细胞膜相关蛋白, podoplanin	AI660929	NM_006474	同上	
细胞视黄醇结合蛋白	M11433	NM_002899	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 68
巨噬细胞甘露糖受体(MRC1)	M93221		SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 70
转录因子 C-MAF	AF055376	NM_005360	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 72
转录因子 C-MAF	AF055376	NM_005360	同上	
含硒蛋白 P	Z11793	NM_005410	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 74
KIAA0466, 免疫球蛋白超家族, 成员 3	AB007935	NM_001542	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 76
II 型膜蛋白, 与 HIV gp120-结合 C-型凝集素类似, CD209 抗原样	AB015629	NM_014257	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 78
KIAA0626	AB014526	NM_021647	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 80
KIAA0711	AB018254	NM_014867	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82
整联蛋白 $\alpha 9$	D25303	NM_002207	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84
整联蛋白 $\alpha 9$	D25303	NM_002207	同上	

松弛素 H2	X00948	NM_005059	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 86
KIAA0644	AB014544	NM_014817	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 88
Cdk-抑制物 p57KIP2 (KIP2)	U22398	NM_000076	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 90
<i>Cdk-抑制物 p57KIP2 (KIP2)</i>	<i>U22398</i>	<i>NM_000076</i>	同上	
暂时受体电压通道 TRPC6	AJ006276	NM_004621	SEQ ID NO: 91	SEQ ID NO: 92
cDNA DKFZp564O222 (来自克隆 DKFZp564O222)	AL050002			SEQ ID NO: 93
	M80482	NM_002570	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 95
G- 蛋白 信号 16 调节物 , A28-RGS14p	U70426	NM_002928	SEQ ID NO: 96	SEQ ID NO: 97
二氢嘧啶酶相关蛋白-1, 脑衰蛋白反应介导物蛋白 1	D78012	NM_001313	SEQ ID NO: 98	SEQ ID NO: 99
粒桥蛋白 (DPI, DPII)	AL031058	NM_004415	SEQ ID NO: 100	SEQ ID NO: 101
pendrin, 溶质载体家族, 成员 4	AF030880	NM_000441	SEQ ID NO: 102	SEQ ID NO: 103
reelin (RELN)	U79716	NM_005045	SEQ ID NO: 104	SEQ ID NO: 105
整联蛋白, $\alpha 1$	X68742			SEQ ID NO: 106
整联蛋白, $\alpha 1$	X68742		同上	
胆固醇 25 羟化酶	AF059214	NM_003956	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 108
抑制素 β -B 亚单位前体	M31682	NM_002193	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 110

KIAA1233	AL109724			SEQ ID NO: 111
前-B 细胞刺激因子类似物 (SDF1b)	L36033	NM_000609	SEQ ID NO: 112	SEQ ID NO: 113
V-Erba 相关 Ear-3 蛋白	HG3510-HT3704			SEQ ID NO: 114
单克隆抗体 MRC OX-2 鉴定的抗原	X05323		SEQ ID NO: 115	SEQ ID NO: 116
载脂蛋白 D	J02611	NM_001647	SEQ ID NO: 117	SEQ ID NO: 118
TIMP3,基质金属蛋白酶的组织抑制物	U14394	NM_000362	SEQ ID NO: 119	SEQ ID NO: 120
TIMP3	U14394	NM_000362	同上	
乙醛脱氢酶 1	K03000	NM_000689	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 122
prospero 相关同源框 1 (prox 1)	U44060	NM_002763	SEQ ID NO: 123	SEQ ID NO: 124
基质 Gla 蛋白	AI953789	NM_000900	SEQ ID NO: 125	SEQ ID NO: 126
神经元 pentraxin II (NPTX2)	U29195		SEQ ID NO: 127	SEQ ID NO: 128
histatin 2 (HIS2)	M26665	NM_000200	SEQ ID NO: 129	SEQ ID NO: 130
ADDL mRNA for 内收蛋白样蛋白, 内收蛋白 3 (γ)	D67031	NM_016824	SEQ ID NO: 131	SEQ ID NO: 132
内收蛋白 3 (γ)	U37122	NM_016824	同上	
MADS 框转录增强因子 2, 多肽 C (肌细胞增强因子 2C)	L08895	NM_002397	SEQ ID NO: 133	SEQ ID NO: 134
MADS 框转录增强因子 2, (肌细胞增强因子 2C)		NM_002397	同上	

MADS 框转录增强因子 2, 多肽 C (肌细胞增强因子 2C)	S57212	NM_002397	同上	
葡萄糖磷酸变位酶 5	L40933	NM_021965	SEQ ID NO: 135	SEQ ID NO: 136
细胞周期蛋白 E2	AF102778	NM_004702	SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 138
白介素 7 (IL7)	M29053		SEQ ID NO: 139	SEQ ID NO: 140
白介素 7	J04156	NM_000880	同上	
cDNA DKFZp586L0120 (来自克 隆 DKFZp586L0120)	AL050154			SEQ ID NO: 141
过氧化物酶体增生活化的受体, γ, PPARG	L40904	NM_005037	SEQ ID NO: 142	SEQ ID NO: 143
脂肪酸结合蛋白 4	氨基酸 128249	NM_001442	SEQ ID NO: 144	SEQ ID NO: 145
蛋白激酶 C ζ	Z15108	NM_002744	SEQ ID NO: 146	SEQ ID NO: 147
46 kDa 柯萨奇病毒和腺病毒受 体(CAR)蛋白	Y07593	NM_001338	SEQ ID NO: 148	SEQ ID NO: 149
来自 7q35-qter 的 PAC 克隆 RP4-751H13, 锌指样	AC004877		SEQ ID NO: 150	SEQ ID NO: 151
胸腺嘧啶激酶 1, 可溶	M15205	NM_003258	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 153
胸腺嘧啶激酶 1	K02581	NM_003258	同上	
Pig7 (PIG7), LPS 诱导的 TNF-α 因子	AF010312	NM_004862	SEQ ID NO: 154	SEQ ID NO: 155
LPS 诱导的 TNF-α 因子	AL120815	NM_004862	同上	
脂肪酶 A, 溶酶体酸, 胆固醇酯 酶	X76488	NM_000235	SEQ ID NO: 156	SEQ ID NO: 157

泛素特异性蛋白 13(异肽酶 T-13)	U75362	NM_003940	SEQ ID NO: 158	SEQ ID NO: 159
癌胚抗原相关的细胞粘附分子 1 (胆汁糖蛋白)CEACAM1	X16354	NM_001712	SEQ ID NO: 160	SEQ ID NO: 161
cDNA DKFZp586D0918 (来自克隆 DKFZp586D0918)	AL049370			SEQ ID NO: 162
KIAA0598, B 细胞 RAG 相关蛋白	AB011170	NM_014863	SEQ ID NO: 163	SEQ ID NO: 164
RAMP2 (受体(降钙素)活性修饰蛋白 2)	AJ001015	NM_005854	SEQ ID NO: 165	SEQ ID NO: 166
胆固醇酯转移蛋白前体	M30185	NM_000078	SEQ ID NO: 167	SEQ ID NO: 168
上皮膜蛋白 2	U52100	NM_001424	SEQ ID NO: 169	SEQ ID NO: 170
MHC II 型淋巴细胞抗原 (HLA-DP) β 链	M83664	NM_002121	SEQ ID NO: 171	SEQ ID NO: 172
<i>MHC II 型淋巴细胞抗原 (HLA-DP) β 链</i>	<i>M83664</i>	<i>NM_002121</i>	<i>同上</i>	
β -抑制蛋白(抑制蛋白) 2	AF106941	NM_004313	SEQ ID NO: 173	SEQ ID NO: 174
有丝分裂检验点激酶 Bub1 (BUB1)	AF053305	NM_004336	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 176
KIAA0229, 与人锚蛋白 1 (S08275)相似	D86982		SEQ ID NO: 177	SEQ ID NO: 178
Sprouty 1 类似物(FGF 信号的拮抗物)	AF041037		SEQ ID NO: 179	SEQ ID NO: 180
Rap1 的鸟苷酸核苷酸交换因子; M-Ras-调节的 GEF, KIAA0277		NM_012294	SEQ ID NO: 181	SEQ ID NO: 182
translin	X78627	NM_004622	SEQ ID NO: 183	SEQ ID NO: 184

红细胞膜蛋白带 4.9 (dematin)	U28389	NM_001978	SEQ ID NO: 185	SEQ ID NO: 186
KIAA0846 蛋白	AB020653	NM_015376	SEQ ID NO: 187	SEQ ID NO: 188
神经胶质成熟因子, γ	W07033	NM_004877	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 190
胰岛素样生长因子结合蛋白 2 (IGFBP-2)	X16302	NM_000597	SEQ ID NO: 191	SEQ ID NO: 192
平滑肌肌球蛋白重链同种型 Smemb	S67247		SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 194
TTG-2 (具有 LIM 基序的富含半 胱氨酸的蛋白), LIM 区 only 2 (rhombotin 样 1)	X61118	NM_005574	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 196
细胞周期蛋白 B2	AL080146	NM_004701	SEQ ID NO: 197	SEQ ID NO: 198
KIAA0353	AB002351		SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 200
KIAA0559, piccolo (突触前细胞 基质蛋白)	AB011131		SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 202
G 蛋白偶联的受体, 家族 C, 组 5, 成员 B	AC004131	NM_016235	SEQ ID NO: 203	SEQ ID NO: 204
G 蛋白偶联的受体, 家族 C, 组 5, 成员 B	AI801872	NM_016235	同上	同上
CREM (环 AMP-反应性元件调节 物 β 同种型)	S68134	NM_001881	SEQ ID NO: 205	SEQ ID NO: 206
CREM (环 AMP-反应性元件调节 物 β 同种型)	S68134	NM_001881	同上	同上
CREM (环 AMP-反应性元件调节 物 β 同种型)	S68271	NM_001881	同上	同上
假想蛋白 FLJ13110	AL080222	NM_022912	SEQ ID NO: 207	SEQ ID NO: 208

肌醇(myo)-1(或 4)-单磷酸酶 2	AF014398	NM_014214	SEQ ID NO: 209	SEQ ID NO: 210
KIAA0937 蛋白	AB023154		SEQ ID NO: 211	SEQ ID NO: 212
有丝分裂纺锤体卷曲螺旋相关蛋白	AF063308	NM_006461	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 214
富含半胱氨酸和甘氨酸的蛋白 2 (CSRP2)	U57646	NM_001321	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 216
拓扑异构酶 (DNA) II α (170kD)	AI375913	NM_001067	SEQ ID NO: 217	SEQ ID NO: 218
<i>DNA 拓扑异构酶 II</i>	<i>J04088</i>	<i>NM_001067</i>	同上	同上
蛋白磷酸酶抑制物 2 (PPP1R2)	U68111		SEQ ID NO: 219	SEQ ID NO: 220
KIAA0186	D80008	NM_021067	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 222
双重特异性酪氨酸(Y)-磷酸化调节激酶 3 (Dyrk3)	Y12735	NM_003582	SEQ ID NO: 223	SEQ ID NO: 224
驱动蛋白样纺锤蛋白 HKSP (HKSP)	U37426	NM_004523	SEQ ID NO: 225	SEQ ID NO: 226
亨廷顿相关蛋白反应蛋白 (duo)	U94190	NM_003947	SEQ ID NO: 227	SEQ ID NO: 228
diubiquitin	AL031983	NM_006398	SEQ ID NO: 229	SEQ ID NO: 230
bikunin, 丝氨酸蛋白酶抑制物, Kunitz 型, 2	U78095	NM_021102	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 232
细胞色素 P-450-1 (TCDD-可诱导的)	K03191	NM_000499	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 234
细胞色素 P(1)-450	X02612	NM_000499	同上	同上
KIAA0513		NM_014732	SEQ ID NO: 235	SEQ ID NO: 236

蛋白磷酸酶抑制物 2 (PPP1R2)	U68111		同上	
RAMP3 (受体(降钙素)活性修饰蛋白 3)	AJ001016	NM_005856	SEQ ID NO: 237	SEQ ID NO: 238
B-myb	X13293	NM_002466	SEQ ID NO: 239	SEQ ID NO: 240
KIAA0952	AB023169	NM_014962	SEQ ID NO: 241	SEQ ID NO: 242
干扰素刺激的基因 (20kD), HEM45	U88964	NM_002201	SEQ ID NO: 243	SEQ ID NO: 244
GS3955	D87119	NM_021643	SEQ ID NO: 245	SEQ ID NO: 246
GS3955	D87119	NM_021643	同上	同上
GRB2 相关的接合体蛋白 (Grap)	U52518	NM_006613	SEQ ID NO: 247	SEQ ID NO: 248
KIAA1071 蛋白	AB028994		SEQ ID NO: 249	SEQ ID NO: 250
具有多重剪接的 RNA 结合蛋白 基因, RBP-MS/类型 5	D84111	NM_006867	SEQ ID NO: 251	SEQ ID NO: 252
具有多重剪接的 RNA 结合蛋白 基因, RBP-MS/类型 5	D84111	NM_006867	同上	同上
RBP-MS/类型 4, 具有多重剪接 的 RNA 结合蛋白基因	D84110	NM_006867	同上	
RBP-MS/类型 4, 具有多重剪接 的 RNA 结合蛋白基因	D84110	NM_006867	同上	同上
RBP-MS/类型 3, 具有多重剪接 的 RNA 结合蛋白基因	D84109	NM_006867	同上	同上
α -辅肌动蛋白-2 相关的 LIM 蛋 白	AF002282	NM_014476	SEQ ID NO: 253	SEQ ID NO: 254
semaphorin-III (Hsema-I), semaphorin 3A	L26081	NM_006080	SEQ ID NO: 255	SEQ ID NO: 256

含 IQ 基序的 GTPase 活化蛋白 2	U51903	NM_006633	SEQ ID NO: 257	SEQ ID NO: 258
抑制蛋白, β 2	HG2059-HT2114		同上	
视网膜母细胞瘤相关蛋白 HEC	AF017790	NM_006101	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 260
LIM 区结合蛋白 (LDB1)	AF052389	NM_001290	SEQ ID NO: 261	SEQ ID NO: 262
双重特异性磷酸酶 5	U15932	NM_004419	SEQ ID NO: 263	SEQ ID NO: 264
人 cDNA 3', mRNA 序列	AI557322			SEQ ID NO: 265
单胺氧化酶 A (MAOA)	M68840	NM_000240	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 267
单胺氧化酶 A	氨基酸 420624	NM_000240	同上	
NECDIN 相关蛋白	U35139	NM_002487	SEQ ID NO: 268	SEQ ID NO: 269
调节(调节性)溶质载体蛋白, 家族 1, 成员 1	X82877	NM_006511	SEQ ID NO: 270	SEQ ID NO: 271
TTK 蛋白激酶	M86699	NM_003318	SEQ ID NO: 272	SEQ ID NO: 273
fms 相关的酪氨酸激酶 4, VEGFR-3	X69878	NM_002020	SEQ ID NO: 274	SEQ ID NO: 275
TSC403, 与溶酶体相关的膜糖蛋白类似	AB013924	NM_014398	SEQ ID NO: 276	SEQ ID NO: 277
HMG-2	X62534		SEQ ID NO: 278	SEQ ID NO: 279
人克隆 24416 mRNA 序列	AF052159		SEQ ID NO: 280 空序列	SEQ ID NO: 281
降钙素受体样	L76380	NM_005795	SEQ ID NO: 282	SEQ ID NO: 283

KIAA0582 蛋白	AI761647	NM_015147	SEQ ID NO: 284	SEQ ID NO: 285
cDNA DKFZp434B102 (来自克隆 DKFZp434B102)	AL080192			SEQ ID NO: 286
cDNA DKFZp586G1922 (来自克隆 DKFZp586G1922)	AL080110			SEQ ID NO: 287
乙酰-CoA 合酶 3	D89053	NM_004457	SEQ ID NO: 288	SEQ ID NO: 289
脂肪酸辅酶 A 接合酶, 长链 3	AA977580	NM_004457	同上	
STAT 诱导的 STAT 抑制物-2	AF037989		SEQ ID NO: 290	SEQ ID NO: 291
同源异型蛋白 Hox5.4	HG3502-HT3696			SEQ ID NO: 292
假想蛋白 FLJ13910, cDNA DKFZp586M141 (来自克隆 DKFZp586M141)	AL050139	NM_022780	SEQ ID NO: 293	SEQ ID NO: 294
cDNA DKFZp586N012 (来自克隆 DKFZp586N012)	AL049471			SEQ ID NO: 295
UbcH10, 泛素载体蛋白 E2-C	U73379	NM_007019	SEQ ID NO: 296	SEQ ID NO: 297
细胞周期蛋白依赖的激酶抑制物 3, 蛋白酪氨酸磷酸酶 (CIP2)	L25876	NM_005192	SEQ ID NO: 298	SEQ ID NO: 299
糖原磷酸化酶(PYGL)	AF046798		SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 301
造血因子-2	AF004327	NM_001147	SEQ ID NO: 302	SEQ ID NO: 303
造血因子-2	AF004327	NM_001147	同上	同上
叉头盒 M1	U74612	NM_021953	SEQ ID NO: 304	SEQ ID NO: 305

可能的异戊二烯化的蛋白酪氨酸磷酸化酶 hPRL-3	AF041434	NM_007079	SEQ ID NO: 306	SEQ ID NO: 307
RAB31, Rab 亚家族的 Low Mr GTP 结合蛋白	U59877	NM_006868	SEQ ID NO: 308	SEQ ID NO: 309
RAB31, RAS 原癌基因 家族成员	AI189226	NM_006868		
肌球蛋白 VIIA	U39226	NM_000260	SEQ ID NO: 310	SEQ ID NO: 311
Grb2-相关结合物-1, 与 IRS-1 相关的停靠蛋白	U43885	NM_002039	SEQ ID NO: 312	SEQ ID NO: 313
核纤层蛋白 B1	L37747		SEQ ID NO: 314	SEQ ID NO: 315
微型染色体保持缺陷的(mis5, S. pombe) 6 HsMcm6	D84557	NM_005915	SEQ ID NO: 316	SEQ ID NO: 317
细胞周期蛋白 B1	M25753			SEQ ID NO: 318
细胞周期蛋白 B1	M25753		同上	同上
RTP, N-myc 下游调节的	D87953	NM_006096	SEQ ID NO: 319	SEQ ID NO: 320
α 2,3-唾液酸转移酶	AB022918	NM_006100	SEQ ID NO: 321	SEQ ID NO: 322
ADP-核糖基化因子样蛋白 4	U73960	NM_005738	SEQ ID NO: 323	SEQ ID NO: 324
中心粒蛋白 F (350/400kD, 分裂激素)	U30872	NM_016343	SEQ ID NO: 325	SEQ ID NO: 326
亲代表达的 10, KIAA1051	AB028974	NM_015068	SEQ ID NO: 327	SEQ ID NO: 328
微管蛋白, α 1 (睾丸特异性)	X06956		SEQ ID NO: 329	SEQ ID NO: 330

KIAA0101	D14657	NM_014736	SEQ ID NO: 331	SEQ ID NO: 332
KIAA0128, septin 2	D50918		SEQ ID NO: 333	SEQ ID NO: 334
蛋白磷酸酶 2, 调节性亚基 B (B56), γ	Z69030	NM_002719	SEQ ID NO: 335	SEQ ID NO: 336
脱氧胞苷激酶	M60527	NM_000788	SEQ ID NO: 337	SEQ ID NO: 338
整联蛋白 $\beta 3$ 结合蛋白 ($\beta 3$ -内联蛋白)	U37139	NM_014288	SEQ ID NO: 339	SEQ ID NO: 340
TAL1 (SCL) 中断位点	M74558	NM_003035	SEQ ID NO: 341	SEQ ID NO: 342
KIAA0666	AB014566		SEQ ID NO: 343	SEQ ID NO: 344
cAMP-特异性 磷酸二酯酶 8A, PDE8A1	AF056490		SEQ ID NO: 345	SEQ ID NO: 346
有丝分裂检验点激酶 Mad3L (MAD3L), BUB1B	AF053306	NM_001211	SEQ ID NO: 347	SEQ ID NO: 348
核糖体 S6 激酶	X85106	NM_021135	SEQ ID NO: 349	SEQ ID NO: 350
HPTP ϵ (蛋白酪氨酸磷酸酶 ϵ)	X54134	NM_006504	SEQ ID NO: 351	SEQ ID NO: 352
Lyn 酪氨酸激酶, v-yes-1 Yamaguchi 肉瘤病毒相关的原癌基因同源物	M79321	NM_002350	SEQ ID NO: 353	SEQ ID NO: 354
lyn 酪氨酸激酶, v-yes-1 Yamaguchi 肉瘤病毒相关的原癌基因同源物	M16038	NM_002350	同上	
lyn 酪氨酸激酶	M16038	NM_002350	同上	

brachyury 变体 A (TBX1), T-box 1 转录因子 r	AF012130	NM_005992	SEQ ID NO: 355	SEQ ID NO: 356
单克隆抗体 Ki-67 的抗原的 mki67a mRNA (长链型)	X65550	NM_002417	SEQ ID NO: 357	SEQ ID NO: 358
蛋白酪氨酸磷酸酶受体 pi (PTPRP)	U81561	NM_002847	SEQ ID NO: 359	SEQ ID NO: 360
cbl-b	U26710	NM_004351	SEQ ID NO: 361	SEQ ID NO: 362
细胞周期蛋白 A2	X51688	NM_001237	SEQ ID NO: 363	SEQ ID NO: 364
核苷磷酸化酶	X00737	NM_000270	SEQ ID NO: 365	SEQ ID NO: 366
TNF- 相关的凋亡诱导配体 TRAIL	U37518	NM_003810	SEQ ID NO: 367	SEQ ID NO: 368
磷酸二酯酶 4B, cAMP-特异性	L20971	NM_002600	SEQ ID NO: 369	SEQ ID NO: 370
巢蛋白 (议定菌素)	M30269	NM_002508	SEQ ID NO: 371	SEQ ID NO: 372
HYA22 蛋白	D88153	NM_005808	SEQ ID NO: 373	SEQ ID NO: 374
磷脂酸磷酸酶 2A 型	AF014402	NM_003711	SEQ ID NO: 375	SEQ ID NO: 376
KIAA0512, ALEX2	AB011084	NM_014782	SEQ ID NO: 377	SEQ ID NO: 378
血栓烷 A2 受体	D38081	NM_001060	SEQ ID NO: 379	SEQ ID NO: 380
三叶草因子(trefoil factor)3 (小肠)	AI985964	NM_003226	SEQ ID NO: 381	SEQ ID NO: 382
G-2 和 S-期表达的 1	AL031588	NM_016426	SEQ ID NO: 383	SEQ ID NO: 384

ADP-核糖基转移酶 (NAD ⁺ ; 多 (ADP-核糖) 聚合酶)-样 2	AJ236876	NM_005484	SEQ ID NO: 385	SEQ ID NO: 386
丝氨酸/苏氨酸 激酶 12	AF015254	NM_004217	SEQ ID NO: 387	SEQ ID NO: 388
微管蛋白, A 1, 同种型 44	HG2259-HT2348		同上	
核纤层蛋白 B 受体	L25931	NM_002296	SEQ ID NO: 389	SEQ ID NO: 390
KIAA0429	AB007889	NM_014751	SEQ ID NO: 391	SEQ ID NO: 392
转录因子 4	M74719	NM_003199	SEQ ID NO: 393	SEQ ID NO: 394
多配体聚糖 3 (N-多配体聚糖), KIAA0468	AB007937	NM_014654	SEQ ID NO: 395	SEQ ID NO: 396
RECK 蛋白前体	氨基酸 099265	NM_021111	SEQ ID NO: 397	SEQ ID NO: 398
推定的前列腺癌肿瘤抑制物	U42349	NM_006765	SEQ ID NO: 399	SEQ ID NO: 400
蛋白磷酸酶 1, 调节性 (抑制物) 亚基	AB020630		SEQ ID NO: 401	SEQ ID NO: 402
PDZ 和 LIM 区 1 (elfin)	U90878	NM_020992	SEQ ID NO: 403	SEQ ID NO: 404
假想蛋白 来自克隆 643	AF091087	NM_020467	SEQ ID NO: 405	SEQ ID NO: 406
p53-调节的 DDA3	氨基酸 926959			SEQ ID NO: 407
KIAA0062	D31887		SEQ ID NO: 408	SEQ ID NO: 409
中链乙酰辅酶 A 脱氢酶	M91432		SEQ ID NO: 410	SEQ ID NO: 411

间隙连接蛋白, α 1, 43kD (连接蛋白(connexin)43)	M65188	NM_000165	SEQ ID NO: 412	SEQ ID NO: 413
MyoD 家族抑制物	U78313	NM_005586	SEQ ID NO: 414	SEQ ID NO: 415
核酸内切 / 外切酶 Mre11 (MRE11A)	AF073362	NM_005591	SEQ ID NO: 416	SEQ ID NO: 417
核受体超家族 2, F 组, 1 号成员	X16155	NM_005654	SEQ ID NO: 418	SEQ ID NO: 419

表 15

表 4 中的序列的序列鉴定物

	保藏号		氨基酸 SEQ ID NO:	核苷酸 SEQ ID NO:
p27 mRNA, 干扰素 α -诱导的 蛋白 27	X67325	NM_005532	420	421
核糖核酸酶 A (RNase A), 胰 腺	D26129	NM_002933	422	423
造血性神经膜蛋白 (hematopoietic neural membrane protein) (HNMP-1)	U87947	NM_001425	424	425
N-钙粘着蛋白	M34064	NM_001792	426	427
N-钙粘着蛋白	M34064	NM_001792	同上	
白介素 8 (IL8)	M28130	NM_000584	428	429
白介素 8, β 血小板球蛋白样 蛋白前体	M17017	NM_000584	同上, SEQ ID NO: 430, 空	同上, SEQ ID NO: 431, 空
酪氨酸激酶受体 (axl)	M76125	NM_001699	432	433
	HG162-HT3165		同上	
细胞表面糖蛋白 CD44 (CD44)	L05424		434	435

细胞粘附分子(CD44)	M59040	NM_000610	同上	
透明质酸盐受体 (CD44)	L05424		同上	
血管内皮生长因子 related 蛋白 VRP, VEGF-C	U43142	NM_005429	436	437
血管内皮生长因子 C	X94216	NM_005429	同上	
XIII 型胶原蛋白, α 1 (=COL4A2)	M33653	NM_005203	438	439
XIII 型胶原蛋白, α -1	M59217	NM_005203	同上	
胶原蛋白 α -2 I 型	K01079			440
胶原蛋白 α -2 I 型	K01079		同上	
胶原蛋白, I 型, α 2	V00503	NM_000089	同上	
蛋白多糖 1	X17042	NM_002727	441	442
磷酸脂肪酶 A2, IVA 组, 钙依 赖的磷脂结合蛋白 (PLA2)	M72393		443	444
碳水化合物 (硫酸角蛋白 Gal-6)磺基转移酶	AB003791	NM_003654	445	446
原肌球蛋白 2 (β), 成纤维细 胞原肌球蛋白	M12125	NM_003289	447	448
硫酸软骨素蛋白多糖 2 (多能 聚糖)	X15998	NM_004385	449	450
硫酸软骨素蛋白多糖 2 (多能 聚糖)	X15998	NM_004385	同上	
潜在的转化长因子 r- β 结合蛋 白 (LTBP-2)	Z37976	NM_000428	451	452
白介素 6 (干扰素, β 2)	X04430	NM_000600	453	454
骨形态发生蛋白-4 (hBMP-4)	U43842	NM_001202	455	456
骨形态发生蛋白 2B, BMP-4	M22490	NM_001202	同上	
sarcolectin, 角蛋白 7	AJ238246	NM_005556	457	458
神经元细胞粘附分子,	AB002341	NM_005010	459	460

KIAA0343				
神经元细胞粘附分子, <i>hBRAVO/Nr-CAM</i> 前体	U55258	NM_005010	同上	
基质金属蛋白酶 1 (基质胶原 酶), 皮肤胶原酶	M13509	NM_002421	461	462
干细胞因子, KIT 配体	M59964	NM_000899	463	464
uPA	X02419	NM_002658	465	466
纤溶酶原激活物 1	J03764	NM_000602	467	468
纤溶酶原激活物 1	M14083	NM_000602	同上	
selectin P, CD62, 颗粒膜蛋白 -140 (GMP-140)前体	M25322	NM_003005	469	470
latrophilin-2	AJ131581	NM_012302	471	472
肌动蛋白, α 2	X13839	NM_001613	473	474
成纤维细胞活化蛋白, α	U09278	NM_004460	475	476
G 蛋白信号 10 的调节物 20	AF060877	NM_003702	477	478
IGF-II mRNA-结合蛋白 3	U97188	NM_006547	479	480
视网膜 cDNA 随机引物亚文 库, EST	W28438			481
脑酸溶性蛋白 1, 神经组织富 集的酸性蛋白 (NAP-22)	AF039656	NM_006317	482	483
抑制蛋白 2	AL096719	NM_002628	484	485
抑制蛋白 2	L10678	NM_002628	同上	
Na,K-ATPase β -1 亚基	U16799	NM_001677	486	487
Claudin-7	AJ011497	NM_001307	488	489
正常齿龈	U51712			490
分解蛋白和金属蛋白结构域 23	AB009672	NM_003812	491	492
α 1(VIII) 胶原蛋白的 COL8A1 mRNA	X57527	NM_001850	493	494

信号转导物和转录激活物 6 (STAT6)	AF067575		495	496
转录因子 IL-4 Stat, STAT6	U16031	NM_003153	同上	
脂皮质蛋白-III, 膜联蛋白 A3	M20560	NM_005139	497	498
细胞内粘附分子 1 (CD54), 主要组(major group)鼻病毒受体前体	M24283	NM_000201	499	500
溶质载体家族 1 (神经/上皮高亲和力谷氨酸转运子, 系统 Xag)	U08989	NM_004170	501	502
溶质载体家族 1 (神经/上皮高亲和力谷氨酸转运子, 系统 Xag)	AI928365	NM_004170	同上	
p53 诱导的蛋白	L47738		503	504
二氢嘧啶脱氢酶, DPYD	U20938	NM_000110	505	506
自然杀伤细胞转录物 4	氨基酸 631972	NM_004221	507	508
PFTAIRES 蛋白 激酶 1, KIAA0834	AB020641	NM_012395	509	510
RGP4, G蛋白信号 10 的调节物 4	U27768	NM_005613	511	512
G 蛋白信号的调节物 4	AI267373	NM_005613	同上	
原癌基因 Aml1-Evi-1, 融合活化的(Fusion Activated)	HG4058-HT432 8		513	514
原癌基因 Aml1-Evi-1, 融合活化的	HG4058-HT432 8		同上	
腺苷酸环化酶相关蛋白 2	N90755	NM_006366	515	516
clusterin (补体裂解抑制物, SP-40,40, 硫酸糖蛋白 2, 载脂蛋白 J)	M25915	NM_001831	517	518
ADP 核糖基化因子样 7	AB016811	NM_005737	519	520

H 因子(补体)样 1	M65292	NM_002113	521	522
RNA 解旋酶相关的蛋白, 金属硫蛋白-If	H68340	NM_007372	523	524
活化的反式肌动蛋白 g 因子 (50 kDa) Staf50	X82200	NM_006074	525	526
环加氧酶-2 (hCox-2)	U04636	NM_000963	527	528
GRO1 原癌基因, 黑素瘤生长刺激活性 (MGSA)	X54489	NM_001511	529	530
NRGN, neurogranin	X99076	NM_006176	531	532
小鼠 dkk-1 同源物	AB020315		533	534
胃肠道肿瘤相关抗原 GA733-1, 肿瘤相关的钙信号转导物 2	J04152	NM_002353	535	536
层粘连蛋白	Z15008	NM_005562	537	538
transgelin, 22kDa 平滑肌蛋白 (SM22)	M95787	NM_003186	539	540
编码单核细胞分泌蛋白的 JE 基因	M28225		541	542
锌指蛋白 238, RP58	AJ223321	NM_006352	543	544
组织蛋白酶 C	X87212	NM_001814	545	546
组织型凝血酶原激活物(t-PA)	M15518	NM_000930	547	548
寿司重复蛋白	AF060567	NM_014467	549	550
膜联蛋白 A6	D00510	NM_001155	551	552
EphrinB1	U09303	NM_004429	553	554
EphrinB1	U09303	NM_004429	同上	
TFEC 同种型 (转录因子 EC)	D43945	NM_012252	555	556
小的可诱导细胞因子 A2, (单核细胞趋化蛋白 1)	M26683	NM_002982	557	558
小的可诱导细胞因子 A2 (单核	M26683	NM_002982	同上	

细胞趋化蛋白 1)				
内皮细胞蛋白 C/APC 受体 (EPCR)	L35545	NM_006404	559	560
转谷氨酶(transglutaminase)2 (TGase)	M55153	NM_004613	561	562
转谷氨酶 (TGase)	M55153	NM_004613	同上	
人金属硫蛋白-If	M10943		563	564
转化生长因子 β -诱导的 (BIGH3)	M77349	NM_000358	565	566
神经元特异性 (γ)烯醇酶的 ENO2 基因	X51956		567	568
FAT 肿瘤抑制物 (果蝇 (Drosophila)) 同源物	X87241	NM_005245	569	570
恶性细胞表达增强的基因/肿瘤进展 - 增强的基因	S82470	NM_024298	571	572
恶性细胞表达增强的基因/肿瘤进展 - 增强的基因	S82470	NM_024298	同上, SEQ ID NO: 573, 空	同上, SEQ ID NO: 574, 空
cDNA DKFZp566G0746 (来自克隆 DKFZp566G0746)	AL050078			575
赖氨酰氧化酶样 2	U89942	NM_002318	576	577
ras-相关的 C3 肉毒杆菌毒素底物 2 (rho 家族, 小 GTP 结合蛋白 Rac2)	M64595	NM_002872	578	579
内皮白细胞粘附分子 1 (ELAM-1), selectin E	M24736	NM_000450	580	581
层粘连蛋白, α 5, KIAA0533	AB011105		582	583
胎盘生长因子(PIGF)	X54936	NM_002632	584	585
染色体的 ALL1 融合基因 1q, AF1q	U16954	NM_006818	586	587

溶基质素-2, MMP-10	X07820	NM_002425	588	589
金属硫蛋白-I-A	K01383		590	591
胶原蛋白 VI α -1	X15880		592	593
mad 蛋白同源物(hMAD-3)	U68019	NM_005902	594	595
mad 蛋白同源物(hMAD-3)	U68019	NM_005902	同上	
mad 蛋白同源物(hMAD-3)	U68019	NM_005902	同上	
膜整合蛋白 2A	AL021786			596
白介素 1 受体样 1	D12763	NM_003856	597	598
高度活动性组(非组蛋白染色 体)蛋白同种型 I-C (HMGI-C)	X92518		599	600
表皮生长因子 r 受体激酶底物 (Eps8)	U12535	NM_004447	601	602
乳酸脱氢酶 B	X13794	NM_002300	603	604
未知产物的 mRNA	D29810		605	606
假想蛋白 DKFZp564D0462	AL033377			607
赖氨酰羟化酶同种型 2 (PLOD2)	U84573	NM_000935	608	609
Follistatin 样 3, follistatin 相关 蛋白 (FLRG)	U76702	NM_005860	610	611
人克隆 24674 mRNA 序列	AF070578			612
L-艾杜糖醇-2 脱氢酶	L29254		613	614
神经元 pentraxin 1	U61849	NM_002522	615	616
来自克隆 23549 和 23762 的假 想蛋白	U90908	NM_021226	617	618
UDP-N-乙酰葡萄糖胺焦磷酸化 酶	AB011004	NM_003115	619	620
锌指蛋白 185 (LIM 结构域)	Y09538	NM_007150	621	622
四个半 LIM 结构域 2, 心蛋白 (FHL-2)	U29332	NM_001450	623	624

有丝分裂原活化的蛋白激酶活化的蛋白激酶 3, MAPKAP 激酶 (3pK)	U09578	NM_004635	625	626
金属硫蛋白 1E (功能性)	R92331			627
TU3A 蛋白	AF035283	NM_007177	628	629
金属硫蛋白 1H	R93527	NM_005951	630	631
鸟氨酸结合蛋白 同种型 II (GBP-2)	M55543	NM_004120	632	633
可溶血管内皮细胞生长因子 r 受体 1 (sVEGFR-1)	U01134	NM_002019	634	635
R-Ras	M14949		636	637
R-ras	M14949		638	639
肌氨酸转运物(SLC6A8), 可溶性载体家族 6, 成员 8	U36341	NM_005629	同上, SEQ ID NO: 638, 空	同上, SEQ ID NO: 639, 空
mybl(小鸡)同源物靶点, 血红素加氧酶 1 (HO-1)	Z82244	NM_005488	642	643
前胶原-赖氨酸, 2-氧化戊二酸 5-双加氧酶, 赖氨酰羟化酶 (PLOD)	L06419	NM_000302	644	645
KIAA0836	AB020643		646	647
cDNA DKFZp434C171 (来自克隆 DKFZp434C171)	AL080169		648	649
白介素 4 受体的 IL-4-R mRNA	X52425	NM_000418	650	651
趋化因子 (C-C 基序)受体样 2 (CCRL2), 趋化因子受体 X (CKRX)	AF014958	NM_003965	652	653
磷酸脂肪酶 C, β 3 (磷脂酰肌醇-特异性)	Z16411	NM_000932	654	655
LIM 区蛋白	X93510	NM_003687	656	657

蛋白激酶 (cAMP-依赖的, 催化的) 抑制物 β	M34181	NM_002731	658	659
rho GDP-解离抑制物 2	X69549	NM_001175	660	661
KIAA0975, 咪唑受体 候选物 (c 和 idate)	AB023192	NM_007184	662	663
脊髓灰质炎病毒受体	X64116	NM_006505	664	665
脊髓灰质炎病毒受体	X64116	NM_006505	同上	
即刻早期反应 3	S81914	NM_003897	666	667
金属硫蛋白 2A	AI547258	NM_005953	668	669
原肌球蛋白 1(α)	M19267	NM_000366	670	671
原肌球蛋白 1(α)	Z24727	NM_000366	同上	
原肌球蛋白 1(α)	M19267	NM_000366	同上	
TRAM 样蛋白	D31762	NM_012288	672	673
E3 泛素接合酶 SMURF2	氨基酸 630312	NM_022739	674	675
含 EGF 的 fibulin 样细胞外基质蛋白 1	U03877	NM_004105	676	677
G 蛋白偶联的 56	AJ011001	NM_005682	678	679
c-jun 第一原癌基因 (JUN)	J04111	NM_002228	680	681
G 蛋白信号调节物 10, RGS10	AF045229	NM_002925	682	683
β 淀粉样蛋白(A4)前体蛋白结合的, 家族 B, 成员 2 (Fe65-样)	U62325		684	685
ras-相关的 rho 蛋白	M12174	NM_004040	686	687
蛋白酶体 (前体, macropain) 26S 亚基, 非-ATPase, 10	AL031177	NM_002814	688	689
KIAA0537	AB011109	NM_014840	690	691
溶酶体相关的膜蛋白-2	X77196	NM_002294	692	693
磷脂转移蛋白	L26232	NM_006227	694	695
N-豆蔻酰转移酶 2	AF043325	NM_004808	696	697

磷酸果糖激酶 (PFKM)	U24183	NM_000289	698	699
整联蛋白, β 4	X53587	NM_000213	700	701
leupaxin	AF062075	NM_004811	702	703
内皮素转化酶 1	Z35307	NM_001397	704	705
野生型 p53 活化的片段 -1(WAF1), 细胞周期蛋白依赖 的激酶抑制物 1A (p21, Cip1)	U03106	NM_000389	706	707
ICAM-2, LFA-1 的细胞粘附配 体	X15606	NM_000873	708	709
ICAM-2, LFA-1 的细胞粘附配 体	X15606	NM_000873	同上	
细胞内粘附分子 2 (ICAM-2)	M32334		710	711
真核细胞翻译起始因子 2B, eIF-2B β 亚基	AF035280	NM_014239	712	713
鸟苷磷酸化酶	X90858	NM_003364	714	715
整联蛋白, β 5	X53002	NM_002213	716	717
N-磺基葡萄糖胺磺基水解酶(磺 酰胺酶)	U30894	NM_000199	718	719
synaptojanin 2	AF039945		720	721
金属硫蛋白 1L	氨基酸 224832	NM_002450	722	723
巨噬细胞加帽(capping)蛋白, 凝溶胶蛋白样	M94345	NM_001747	724	725
HSPC022 蛋白	W68830	NM_014029	726	727
人克隆 137308 mRNA, 部分 cds	AW006742			728
原钙粘着蛋白 42, PC42, 原钙 粘着蛋白 1 (钙粘着蛋白样 1)	L11370	NM_002587	729	730
caspase 样凋亡调节性蛋白 2 (CLARP2)	AF005775	NM_003879	731	732

caspace 样凋亡调节性蛋白 2 (CLARP2)	AF005775	NM_003879	同上	
主要穹隆(major vault)蛋白, lrp	X79882	NM_005115	733	734
范可尼贫血(Fanconi anemia), 互补组 G	AC004472	NM_004629	735	736
月元病毒蛋白 (PrP)	U29185	NM_000311	737	738
干扰素刺激的蛋白, 15 kDa	氨基酸 203213	NM_005101	739	740
丝氨酸(或半胱氨酸)蛋白酶抑制物, 分化枝 B(卵清蛋白), 细胞质抗蛋白酶 2 (CAP2)	L40377	NM_002640	741	742
双糖链蛋白聚糖	J04599	NM_001711	743	744
趋化因子 (C-X-C 基序), 受体 4 (fusin)	L06797	NM_003467	745	746
泛素羧基末端酯酶 L1 (泛素硫酯酶)	X04741	NM_004181	747	748
KIAA0469	AB007938	NM_014851	749	750
TNF(配体)超家族, 成员 4 (tax-转炉活化的糖蛋白 1, 34kD)	AL022310	NM_003326	751	752
KIAA1053	AB028976		753	754
NAD(P)H-醌氧化还原酶	M81600		755	756
含寿司重复的蛋白	U61374	NM_006307	757	758
整联蛋白, α 5	X06256	NM_002205	759	760
enigma (LIM 区蛋白)	L35240	NM_005451	761	762
核苷外切三磷酸二磷酸水解酶 1 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1)	AJ133133	NM_001776	763	764
转化生长因子 r - β (tgf- β), 骨形态发生蛋白 6	M60315	NM_001718	765	766
转化生长因子 r - β (tgf- β), 骨形态发生蛋白 6	M60315	NM_001718	同上	

烟酰胺 N 甲基转移酶, NNMT	U08021	NM_006169	767	768
cDNA DKFZp564J0323 (来自 克隆 DKFZp564J0323)	AL049957			769
硫氧还原蛋白还原酶 β	AB019694	NM_006440	770	771
f-盒和富含氨基酸 repeat 蛋白 2	AL049953		772	773
钴胺传递蛋白 II (TCN2)	L02648	NM_000355	774	775
乙醛脱氢酶 2, 线粒体的	X05409	NM_000690	776	777
GTP-结合蛋白 ragB	X90530	NM_006064	778	779
淋巴细胞抗原 75	AF011333	NM_002349	780	781
GM2 活化物蛋白	X62078		782	783
3 型肌醇 1,4,5-三磷酸受体 (ITPR3)	U01062	NM_002224	784	785
KIAA0284	AI828210			786
金属硫蛋白 I-B	M13485		787	788
BTG2	U72649	NM_006763	789	790
腺苷酸激酶 1	J04809	NM_000476	791	792
肿瘤坏死因子受体超家族, 成 员 12, WSL-LR, WSL-S1 和 WSL-S2 蛋白	Y09392	NM_003790	793	794
氨基酸酶 N/CD13	M22324	NM_001150	795	796
生长抑制和 DNA 损伤诱导的 蛋白(gadd45)	M60974	NM_001924	797	798
KIAA0638 蛋白	AB014538		799	800
粘着斑蛋白	M33308	NM_003373	801	802
前胶原蛋白-脯氨酸, 2-氧化戊 二酸 4-双加氧酶(脯氨酸 4-羟 化酶), α 多肽 II	U90441	NM_004199	803	804
msg1-相关基因 1 (mrg1), 与	U65093	NM_006079	805	806

Cbp/p300相互作用的反式激活物				
微粒体谷胱甘肽 S-转移酶 3	AF026977	NM_004528	807	808
维生素 A 反应性; 细胞骨架相关的	AF070523	NM_006407	809	810
17-kDa 蛋白, 干扰素刺激的蛋白, 15 kDa	M13755	NM_005101	811	812
基质金属蛋白酶 14 (插入膜的)	X83535	NM_004995	813	814
4F2 细胞表面抗原, 可溶性载体家族 3, 成员 2	J02939	NM_002394	815	816
金属硫蛋白-III	M93311	NM_005954	817	818
蛋白激酶 (cAMP-依赖的, 催化的) 抑制物 α	S76965	NM_006823	819	820
蛋白激酶 (cAMP-依赖的, 催化的) 抑制物 α	S76965	NM_006823	同上	
reticulocalbin 1, EF-h 和钙结合区	D42073	NM_002901	821	822
lipin 1, KIAA0188	D80010		823	824
蛋白酶, 丝氨酸, 23	AF015287	NM_007173	825	826
hect 结构域和 RLD 2	AF041080	NM_004667	827	828
GATA-结合蛋白 (GATA2)	M68891	NM_002050	829	830
agrin 前体	AF016903		831	832
均衡核苷转运物 1(均衡核苷转运物 1)(hENT1)	U81375	NM_004955	833	834
coronin, 肌动蛋白结合蛋白 2B, KIAA0925	AB023142		835	836
f-盒和 WD-40 结构域蛋白 3	U07000	NM_012165	837	838
非综合症性听力障碍蛋白 (DFNA5)	AF073308	NM_004403	839	840

肌动蛋白丝结合蛋白	D25248	NM_021638	841	842
TNFR- 相关的死亡受体 -6 (DR6)	AF068868	NM_014452	843	844
血清/糖皮质激素调节的激酶	Y10032	NM_005627	845	846
DNase X	X90392	NM_006730	847	848
DNase X	X90392	NM_006730	同上	
脂肪酸去饱和酶 3	AC004770	NM_021727	849	850
LYL-1	M22637		851	852
ATP- 结合盒，亚家族 C (CFTR/MRP)，成员 1	X78338	NM_004996	853	854
跨膜蛋白 (CD59)	M84349		855	856
fms- 相关的酪氨酸激酶 1, VEGFR-1	S77812		857	858
假想蛋白 FLJ23403	AI681538	NM_022068	859	860
假想蛋白 FLJ20898	AI733570	NM_024600	861	862

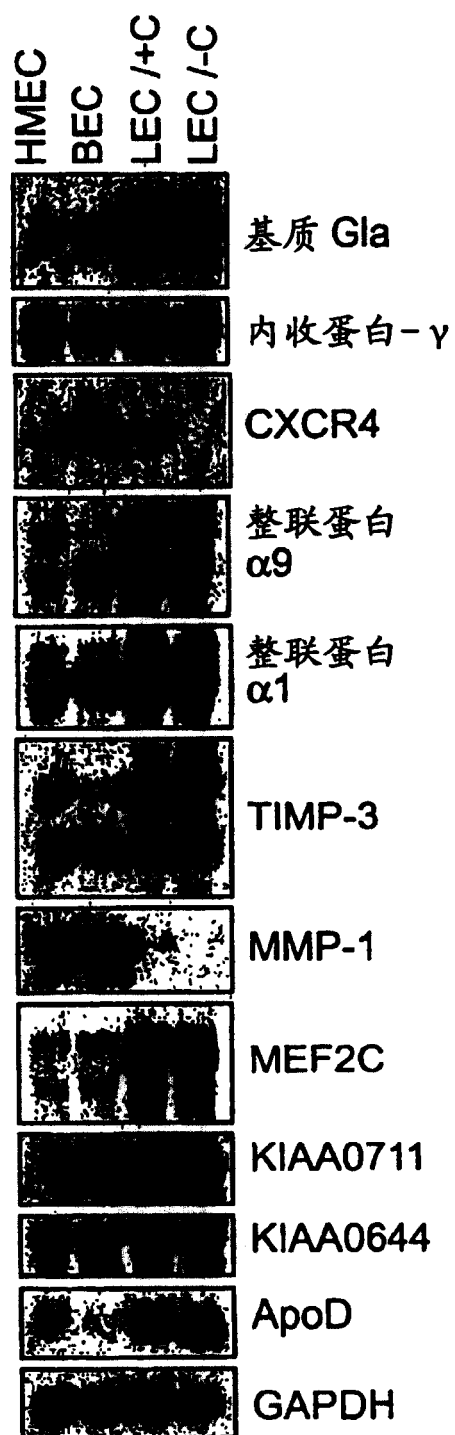


图 1

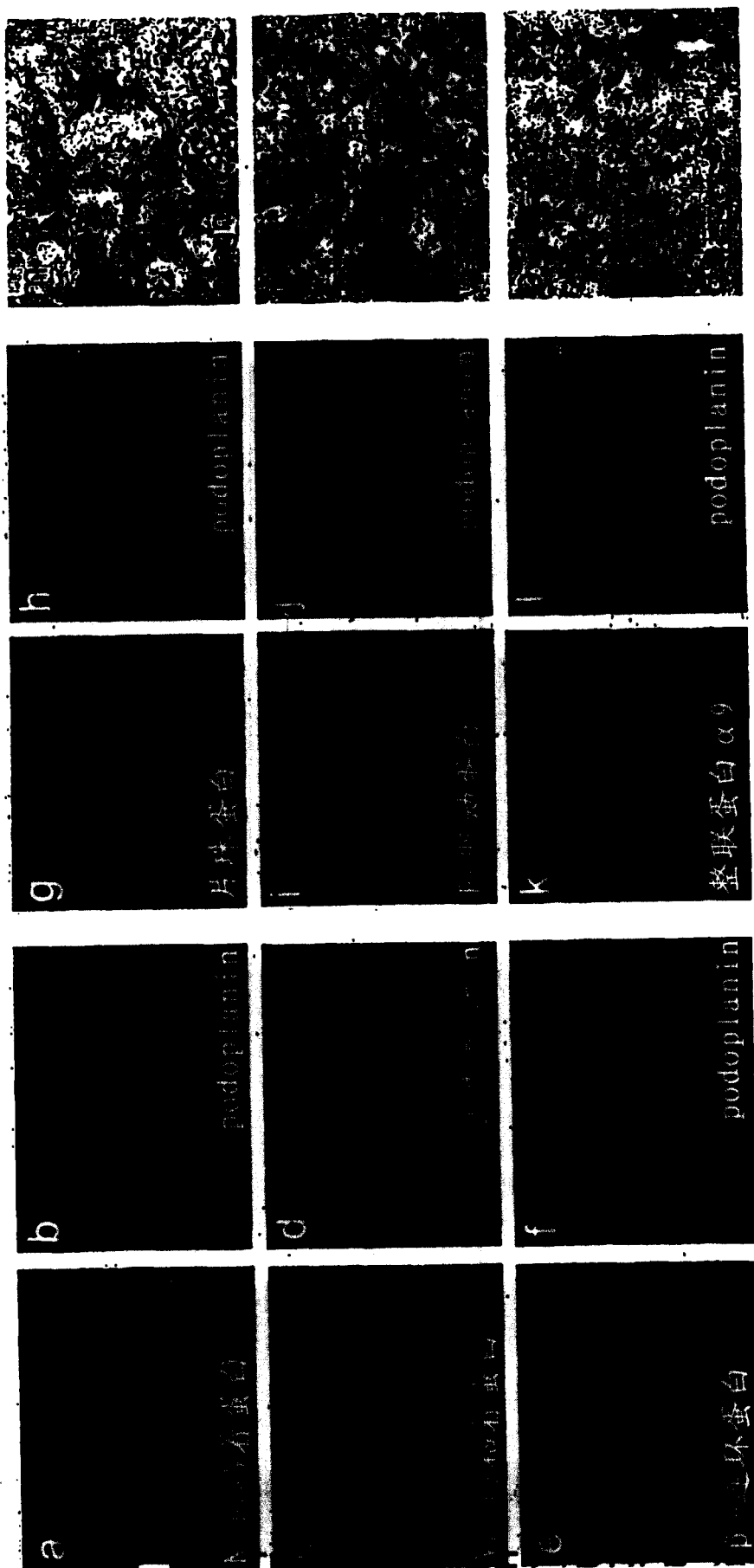


图 2

(于2003年10月15日(15.10.03)被国际局接受;修改了原始权利要求7, 10, 15, 18, 54, 55, 76和77;加入了新权利要求94-99;余下的权利要求未改变(7页))。

1. 差异调节血管内皮细胞(BEC)或淋巴管内皮细胞(LEC)的生长或分化的方法, 包括使内皮细胞和一种组合物接触, 所述组合物包含差异调节血管和淋巴管内皮细胞的制剂, 所述制剂选自以下物质:

- 5 活性片段;
- (a) 包含 BEC 多肽或 LEC 多肽的氨基酸序列的多肽, 或者所述多肽的
- 10 活性片段;
- (b) 包含编码(a)的多肽的核苷酸序列的多核苷酸;
- (c) 特异性结合(a)的多肽的抗体;
- (d) 包含(c)的抗体的片段的多肽, 其中所述片段和抗体与该多肽结合;
- (e) 编码(a)的多肽的人基因或 mRNA 的反义核酸;
- 15 (f) 编码(a)的多肽的人基因或 mRNA 的干扰 RNA (RNAi)。

2. 权利要求1的方法, 其中所述内皮细胞与所述组合物在活体外接触。

3. 权利要求1方法, 其中所述组合物包含可药用的稀释剂, 佐剂或载体, 且所述接触步骤包括将所述组合物给药受试哺乳动物, 以差异调节受试哺乳动物的 BEC 或 LEC。

20 4. 权利要求3方法, 包括:

鉴定患有以 LEC 的过度增生为特征的病症的人类受试者; 和

将所述组合物给药该人类受试者, 其中所述制剂差异抑制 LEC 的生长和 BEC 的生长。

5. 权利要求3方法, 包括:

25 鉴定患有以 LEC 的过度增生为特征的病症的人类受试者;

筛选受试者的 LEC, 以鉴定表3中的多肽的过度表达; 和

将所述组合物给药该人类受试者, 其中所述制剂通过抑制筛选步骤所鉴定的多肽的表达, 差异抑制 LEC 的生长和 BEC 的生长。

6. 根据权利要求3的调节人类受试者的淋巴管内皮细胞的生长的方法, 30 包括以下步骤:

鉴定患有增生性淋巴疾病的人类受试者;

筛选受试者以鉴定表3中所述的LEC多肽的低表达或低活性,其中所述蛋白不在表1或2中;

将所述组合物给药人类受试者,其中所述制剂包含筛选步骤鉴定的LEC多肽(a)或者所述多肽的活性片段,或者包含编码该多肽的核苷酸序列的多核苷酸(b)。

7. 一种制剂在制备差异调节血管内皮细胞(BEC)或淋巴管内皮细胞(LEC)的生长或分化的药物中的用途,所述制剂选自:

(a) 包含BEC多肽或LEC多肽的氨基酸序列的多肽,或者所述多肽的活性片段;

10 (b) 包含编码(a)的多肽的核苷酸序列的多核苷酸;

(c) 特异性结合(a)的多肽的抗体;

(d) 包含(c)的抗体的片段的多肽,其中所述片段和抗体与该多肽结合;

(e) 编码(a)的多肽的人基因或mRNA的反义核酸;和

(f) 编码(a)的多肽的人基因或mRNA的干扰RNA(RNAi)。

15 8. 权利要求1-7之一的方法或用途,其中所述多肽是选自表3的LEC多肽,而且所述制剂差异调节LEC和BEC的生长或分化。

9. 权利要求1-7的方法或用途,其中所述多肽是选自表4的BEC多肽,而且所述制剂差异调节BEC和LEC的生长或分化。

10. 权利要求8的方法或用途,其中所述多肽不在表1或2中。

20 11. 权利要求8的方法或用途,其中所述LEC多肽包含选自SEQ ID NO: 81, 187, 207, 211, 221, 235, 241, 293或391的氨基酸序列。

12. 权利要求8的方法或用途,其中所述LEC多肽包含选自SEQ ID NO: 31-34, 46或48的氨基酸序列。

25 13. 权利要求12的方法和用途,其中所述制剂包含(c)的抗体或(d)的多肽。

14. 权利要求的方法12,其中所述制剂包含(a)的多肽的细胞外区片段,或者编码所述细胞外区片段的多核苷酸。

15. 权利要求1-7之一的方法或用途,其中所述制剂包含反义分子。

16. 治疗遗传性淋巴水肿的方法,包括:

鉴定患有淋巴水肿的人类受试者, 该受试者的编码表 3 中鉴定的 LEC 蛋白的基因的至少一个等位基因中具有突变, 其中所述突变和人类受试者中的淋巴水肿相关, 并且所述 LEC 蛋白不是 VEGFR-3; 且

5 给药所述受试者一种组合物, 所述组合物包含选自 VEGF-C 多肽, VEGF-D 多肽, VEGF-C 多核苷酸, 或 VEGF-D 多核苷酸的淋巴管生长制剂。

17. 选自 VEGF-C 多肽, VEGF-D 多肽, VEGF-C 多核苷酸, 或 VEGF-D 多核苷酸的淋巴管生长制剂在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗表 3 中鉴定的 LEC 基因突变造成的遗传性淋巴水肿, 且所述基因不是 VEGFR-3。

18. 筛选内皮细胞疾病或患该疾病的倾向性的方法, 包括:
10 从人类受试者获得含有内皮细胞 mRNA 样品;
根据样品中从所述基因转录的 mRNA 的量测定 BEC 或 LEC 基因的表达, 其中所述 BEC 或 LEC 基因编码表 3 或 4 中鉴定的多肽。

19. 监测药物对内皮细胞的效力或毒性的方法, 包括以下步骤:
将药物给药受试动物前后, 测定受试哺乳动物内皮细胞中至少一种
15 BEC 或 LEC 基因的表达, 其中至少一种 BEC 或 LEC 基因编码表 3 中所述的多肽, 并且其中 BEC 或 LEC 基因的表达的改变与药物对内皮细胞的效力或毒性相关。

20. 鉴定调节内皮细胞的生长的化合物的方法, 包括:
在存在或缺乏化合物的条件下培养内皮细胞;
20 测定细胞中至少一种 BEC 或 LEC 基因的表达, 其中的 BEC 或 LEC 基因选自编码表 3 和 4 中的多肽的基因; 与缺乏该化合物的情况相比, 存在该化合物时至少一种 BEC 基因的表达改变表明该化合物是 BEC 生长的调节物; 且与缺乏该化合物的情况相比, 存在该化合物时至少一种 LEC 基因的表达改变表明该化合物是 LEC 生长的调节物。

25 21. 权利要求 20 的筛选选择性调节 BEC 或 LEC 的生长或分化的化合物的方法,

其中所述测定步骤包含测定细胞内至少一种 BEC 基因和至少一种 LEC 基因的表达, 和

所述方法包含通过筛选差异调节至少一种 BEC 基因的表达和至少一种
30 LEC 基因的表达的化合物, 筛选选择性地调节 BEC 或 LEC 的生长或分化的化合物。

22. 一种组合物, 包含:
一种分离的多核苷酸, 包含编码含有选自 Q ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 81, 187, 207, 211, 221, 235, 241, 293 或 391 的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列; 和
5 可药用的稀释剂, 载体或佐剂。
23. 权利要求 22 的组合物, 包含含有选自 Q ID NO: 14-30, 45, 47, 49, 51, 82, 93, 111, 188, 208, 212, 222, 236, 242, 294 或 392 的核苷酸序列的多核苷酸, 或编码所述多肽的所述多核苷酸的片段。
24. 一种表达载体, 包含与一种多核苷酸可操作地连接的表达控制序
10 列, 所述多核苷酸包含编码含有选自 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 81, 187, 207, 211, 221, 235, 241, 293 或 391 的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列。
25. 权利要求 24 的表达载体, 是含有该多核苷酸的复制缺陷的腺病毒或腺伴随病毒载体。
26. 一种组合物, 包含权利要求 24 或 25 的表达载体以及可药用的稀
15 释剂, 载体或佐剂。
27. 一种试剂盒, 包含权利要求 22, 23 或 26 之一的组合物, 所述组合物与将其给药受试哺乳动物来调节该受试动物的淋巴系统的说明包装在一起。
28. 使用权利要求 24 的表达载体转化或转染的宿主细胞。
- 20 29. 制备 LEC 多肽的方法, 包括在细胞表达该多核苷酸编码的多肽的条件下, 使权利要求 28 的宿主细胞生长。
30. 纯化并分离的多肽, 包含选自选自 Q ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 81, 187, 207, 211, 221, 235, 241, 293 或 391 的氨基酸序列。
31. 纯化并分离的多肽, 其包含的氨基酸序列选自以下序列:
25 (a) SEQ ID NO: 31-34, 46, 48, 207, 676, 859 或 861; 以及
(b) (a)的氨基酸序列的至少 10 个氨基酸的细胞外区片段。
32. 权利要求 31 的纯化并分离的可溶性多肽, 包含选自 ID NO: 31-34, 46, 48, 207, 676, 859 或 861 的氨基酸序列的胞外区片段, 其中所述多肽缺乏任何跨膜区。
- 30 33. 权利要求 32 的多肽, 所述多肽缺乏任何细胞内区。

34. 一种融合蛋白, 包含权利要求 32 或 33 的多肽, 所述多肽与包含免疫球蛋白恒定区的免疫球蛋白片段融合。

35. 一种组合物, 包含权利要求 30-34 之一的多肽或蛋白, 以及可药用的稀释剂, 载体或佐剂。

5 36. 一种试剂盒, 包含权利要求 35 的组合物, 以及将所述药物组合物给药受试哺乳动物以调节所述受试动物的淋巴系统的说明。

37. 一种抗体, 其与权利要求 30-34 之一的多肽特异性结合。

38. 权利要求 37 的抗体, 其是一种人化的抗体。

39. 一种蛋白质, 包含与权利要求 30-34 之一的多肽特异性结合的抗体的抗原结合区, 其中所述蛋白与该多肽特异性结合。

40. 鉴定 LEC 核酸的方法, 包括:

(a) 使含有候选 LEC 核酸的生物样品与一种多核苷酸或其互补序列在严格的杂交条件下接触, 所述多核苷酸包含 SEQ ID NO:1-30, 45, 47, 49, 51, 82, 93, 111, 188, 208, 212, 236, 242, 294 或 392 的序列的至少 14 个连续核苷酸的片段, 所述严格的杂交条件是:

(i) 42°C, 在含有 50%甲酰胺, 5xSSPE, 5x Denhardt's 溶液, 0.1% SDS 和 0.1 mg/ml 变性的鲑精 DNA 的溶液中杂交 20 小时, 和

(ii) 5°C, 在 1xSSC, 0.1% SDS 中洗涤 30 分钟; 和

(b) 检测所述候选 LEC 核酸和所述多核苷酸的杂交, 由此鉴定 LEC 核酸。

41. 鉴定 LEC 蛋白的方法, 包括:

(a) 使含有候选 LEC 蛋白的生物样品与权利要求 37 的抗体或权利要求 39 的蛋白之一的 LEC 蛋白结合配偶体在适合二者结合的条件下接触; 和

(b) 检测所述候选 LEC 蛋白和所述 LEC 结合配偶体之间的结合, 从而鉴定 LEC。

42. 鉴定 LEC 的方法, 包括:

(a) 使含有细胞的生物样品和 LEC 结合配偶体在适宜两者结合的条件下接触, 其中所述 LEC 结合配偶体包含与一种多肽结合的抗体, 所述多肽含有 SEQ ID NO:31-34, 46, 48, 207, 676, 859 或 861 的序列, 或包含所述抗体的抗原结合片段; 和

(b) 通过检测细胞和所述 LEC 结合配偶体之间的结合鉴定 LEC, 其中 LEC 结合配偶体与细胞的结合鉴定 LEC。

43. 测定患遗传性淋巴水肿的危险性的方法, 包括:

5 (a) 检测人类受试者的核酸突变, 所述突变与遗传性淋巴水肿基因型相关, 并且与相应的野生型等位基因编码的多肽的氨基酸序列相比, 所述突变改变人类受试者的至少一种等位基因编码的氨基酸序列, 其中所述野生型多肽是表 3 中鉴定的多肽。

44. 测定患遗传性淋巴水肿的危险性的方法, 包括:

10 (a) 检测人类受试者的核酸中的突变, 所述突变与遗传性淋巴水肿基因型相关, 并且与相应的野生型等位基因编码的多肽的氨基酸序列相比, 所述突变改变人类受试者的至少一种等位基因编码的氨基酸序列, 其中所述野生型多肽包含选自 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 52, 54, 207, 676, 859 或 861 的氨基酸序列;

15 (b) 使核酸中的所述突变的存在或缺失与患遗传性淋巴水肿的危险性相关, 其中核酸中存在所述突变与患遗传性淋巴水肿的危险性增加相关, 并且核酸中缺乏所述的突变与患遗传性淋巴水肿的危险性不增加相关。

45. 测定患遗传性淋巴水肿的危险性的方法, 包括:

20 (a) 检测人类受试者的核酸的突变, 其中与野生型等位基因编码的转录因子多肽的转录调节活性相比, 所述突变改变了该人类受试者的至少一种转录因子的等位基因编码的氨基酸序列, 还改变该等位基因编码的转录因子多肽的转录调节活性,

其中所述野生型转录因子多肽包含 SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 211, 或 SEQ ID NO: 241 的氨基酸序列, 以及表 5 中的序列编码的转录因子; 和

25 (b) 使核酸中所述突变的存在或缺失与患遗传性淋巴水肿的危险性相关, 其中核酸中存在所述突变与患遗传性淋巴水肿的危险性增加相关, 并且核酸中缺乏所述的突变与患遗传性淋巴水肿的危险性不增加相关。

46. 权利要求 45 的方法, 其中所述野生型转录因子等位基因包含表示为 SEQ ID NO:54 的 Sox18 氨基酸序列。

30 47. 权利要求 46 的方法, 其中与所述测定鉴定了改变反式激活或 Sox18 等位基因编码的蛋白的 DNA 结合区氨基酸序列的突变。

48. 权利要求 46 的方法, 其中与野生型 SOX18 对所述基因的转录活化相比, 所述突变减少 SOX18 应答型基因的转录活化。

49. 测定患遗传性淋巴水肿的危险性的方法, 包括:

- 5 (a) 检测人类受试者的核酸的突变, 其中与野生型等位基因编码的粘附多肽的结合亲和力相比, 所述突变改变了该人类受试者的至少一种转录因子的等位基因编码的氨基酸序列, 还改变了该 LEC 等位基因编码的粘附多肽的结合亲和力,

其中所述野生型粘附多肽包含 SEQ ID NO: 31-34, 46, 207, 676, 859 和 861 之一的氨基酸序列; 和

- 10 (b) 使核酸中所述突变的存在或缺失与患遗传性淋巴水肿的危险性相关, 其中核酸中存在所述突变与患遗传性淋巴水肿的危险性增加相关, 并且核酸中缺乏所述突变与患遗传性淋巴水肿的危险性不增加相关。

50. 权利要求 43-49 之一的方法, 其中所述测定鉴定了突变的存在, 并且所述相关步骤鉴定了所述病人患遗传性淋巴水肿的危险性增加。

- 15 51. 筛选人类受试者患遗传性淋巴水肿的危险性增加的方法, 包括测定人类受试者的核酸突变, 所述突变改变了该核酸编码的至少一种多肽的氨基酸序列, 所述多肽包含表 3 的氨基酸序列。

52. 权利要求 51 的方法, 其中所述多肽包含选自 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 和 54, 207, 676, 859 或 861 的氨基酸序列, 并且与患遗传性淋巴水肿的危险性相关。

53. 权利要求 52 的方法, 其中所述多肽包含以 SEQ ID NO: 54 表示的 SOX18 氨基酸序列。

54. 权利要求 43-49, 51, 52 和 53 之一的方法, 其中所述方法包括以下步骤中的至少一步:

- 25 (a) 测定人类受试者的至少一种多核苷酸的至少一种密码子的核苷酸序列;

(b) 进行杂交试验以测定来自人类受试者的核酸具有的核苷酸序列与一种或多种对照序列相同还是不同;

- 30 (c) 进行多核苷酸迁移试验来测定来自人类受试者的核酸具有的核苷酸序列与一种或多种对照序列相同还是不同; 和

(d) 进行限制性核酸内切酶消化试验确定人类受试者的核酸具有的核苷酸序列与一种或多种对照序列相同还是不同。

55. 权利要求 43-49, 51, 52 和 53 之一的方法, 其中所述方法包括: 进行聚合酶链反应(PCR)来扩增包含所述 LEC 多核苷酸的编码序列的核酸, 5 并测定所扩增的核酸的核苷酸序列。

56. 筛选人类受试者的遗传性淋巴水肿基因型, 包括:

(a) 提供包括来自所述人类受试者的核酸的生物样品; 和

(b) 分析所述核酸中突变的存在, 与编码 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 54, 207, 676, 859, 和 861 之一的氨基酸序列的人类基因相比, 所述突变 10 改变了人类受试者中至少一种基因的至少一种等位基因所编码的氨基酸序列, 其中人类受试者中存在的突变改变上述氨基酸序列的方式与人类受试者的淋巴水肿相关可鉴定遗传性淋巴水肿。

57. 权利要求 56 的方法, 其中所述生物样品是细胞样品。

58. 权利要求 56 的方法, 其中所述分析包括测定所述核酸的部分序 15 列。

59. 权利要求 56 的方法, 其中所述人类受试者具有由筛选法所鉴定的遗传性淋巴水肿基因型。

60. 权利要求 49 的方法, 其中至少一种基因对应于编码 SEQ ID NO: 54 的氨基酸序列的人 Sox18 基因。

20 61. 抑制淋巴管生成的方法, 包括:

给药受试者 LEC 跨膜多肽的抑制物,

其中所述 LEC 跨膜多肽包含选自 SEQ ID NO: 31-34, 46 48, 207, 676, 859 或 861 的氨基酸序列, 而且

其中所述抑制物选自:

25 (a) LEC 跨膜多肽的可溶性细胞外区片段;

(b) 与 LEC 跨膜多肽胞外区结合的抗体;

(c) 一种多肽, 包含(b)的抗体的抗原结合区; 和

(d) 一种反义核酸, 与编码 LEC 跨膜多肽和其互补物的核酸互补。

62. 权利要求 61 的方法, 其中所述抑制物是包含 LEC 多肽的胞外区 30 片段的多肽, 其中所述胞外区的序列选自 SEQ ID NO:31 的氨基酸 1-152, SEQ ID NO:32 的氨基酸 1-695 或 SEQ ID NO:33 的氨基酸 1-248。

63. 权利要求 61 或 62 的方法, 其中所述受试者是患有肿瘤的人。

64. 调节哺乳动物受试者的淋巴管生成的方法, 包括: 将 LEC 多核苷酸的反义分子以有效抑制 LEC 多核苷酸编码的多肽的转录或翻译的量, 给药需要调节淋巴管生成的受试哺乳动物, 其中所述 LEC 多核苷酸包含选自
5 SEQ ID NO: 14-30, 45, 47, 49, 51, 208, 677, 860 或 862 的核苷酸序列。

65. 治疗遗传性淋巴水肿的方法, 包括:

(a) 鉴定患有遗传性淋巴水肿的人类受试者, 与包含 SEQ ID NO: 31-44, 46, 48, 50, 52, 54, 207, 676, 859, 和 861 之一的氨基酸序列的多肽的氨基酸序列相比, 该人类受试者具有的突变改变了其至少一种多肽的氨基酸
10 序列; 并且

(b) 将 VEGF-C 多核苷酸, VEGF-C 多肽, VEGF-D 多核苷酸或 VEGF-D 多肽的淋巴管生长因子给药所述受试者。

66. 调节内皮细胞或者内皮前体细胞的生长的方法, 包括将内皮细胞或内皮前体细胞与包含调节细胞内的 prox-1 转录调控的试剂接触, 其中所
15 述试剂选自:

(a) prox-1 多肽;

(b) 编码 prox-1 多肽的多核苷酸; 或

(c) prox-1 的反义分子。

67. 权利要求 66 的方法, 其中所述细胞包括培养的内皮细胞或内皮
20 前体细胞, 而且接触是离体进行的。

68. 权利要求 67 的方法, 其中所述接触包括将所述试剂加入培养基中。

69. 权利要求 66-68 之一的方法, 其中所述细胞包括内皮前体细胞。

70. 权利要求 66-69 之一的方法, 其中所述细胞在接触步骤之后被引
25 入受试哺乳动物中。

71. 权利要求 70 的方法, 其中所述受试者是人。

72. 权利要求 71 的方法, 其中的人类受试者患有 LEC 疾病。

73. 提高人类受试者中的 LEC 的功能的方法, 包括:

从人类受试者中分离内皮细胞或内皮前体细胞;

30 用包含编码 prox-1 多肽的核苷酸序列的表达载体转化或转染所述内皮细胞, 以促进 LEC 的分化或生长; 和

转化或转染步骤后, 将 LEC 细胞给予人类受试者。

74. 权利要求 73 的方法, 其中所述分离和给药步骤中的人类受试者相同。

75. 权利要求 73 或 74 的方法, 其中所述人类受试者患有淋巴水肿。

5 76. 权利要求 73 - 74 之一的方法, 其中所述载体和转化或转染方法被选用于 prox-1 的瞬时表达。

77. 权利要求 73 - 74 之一的方法, 其中所述表达载体是复制缺陷的腺病毒载体。

78. 分离的多肽, 其包含的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸
10 61-127 具有至少 95% 的同一性。

79. 权利要求 78 的多肽, 其包含的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸 30-152 具有至少 95% 的同一性。

80. 一种可溶性多肽, 包含 SEQ ID NO: 31 中的氨基酸序列的片段, 其中所述片段缺乏 SEQ ID NO: 31 的跨膜和细胞内氨基酸。

15 81. 一种分离的多肽, 包含 SEQ ID NO: 32 的至少一个富含亮氨酸的区。

82. 权利要求 81 的分离的多肽, 其中所述多肽缺乏 SEQ ID NO: 32 的跨膜氨基酸。

20 83. 一种分离的多肽, 包含 SEQ ID NO: 33 的至少一个富含亮氨酸的区。

84. 权利要求 81 的分离的多肽, 其中所述多肽缺乏 SEQ ID NO: 33 的跨膜氨基酸。

85. 一种分离的多肽, 其包含的氨基酸序列与包含 SEQ ID NO: 111 的氨基酸序列的多肽的片段具有至少 95% 的同一性,

25 其中所述片段包含至少一个血小板反应蛋白 I 型同上序列。

86. 权利要求 85 的分离的多肽, 其中所述片段包括 SEQ ID NO: 111 的六个血小板反应蛋白 I 型重复序列。

87. 一种分离的多肽, 其包含的氨基酸序列与包含 SEQ ID NO: 111 的氨基酸序列的多肽的片段具有至少 95% 的同一性,

30 其中所述片段包括至少一个免疫球蛋白 C-2 型结构域。

88. 权利要求 85 的分离的多肽, 其中所述片段包含 SEQ ID NO: 111 的三个免疫球蛋白 C-2 类型结构域序列。

89. 一种融合蛋白, 包含权利要求 78-88 之一的多肽和一种异源性多肽。

5 90. 一种抗体, 其特异性地与权利要求 78-88 之一的多肽结合。

91. 一种多核苷酸, 其包含编码权利要求 78-89 之一的多肽的核苷酸序列。

92. 包含权利要求 91 的多核苷酸的表达载体, 其可操作地连接于表达控制序列。

10 93. 权利要求 92 的表达载体, 其是复制缺陷的腺病毒载体。

94. 权利要求 9 的方法, 其中所述多肽不在表 1 或 2 中。

95. 权利要求 1-7 之一的方法, 其中所述试剂包含一个反义分子, 且其中的多肽不在表 1 或 2 中。

15 96. 权利要求 43-49 之一的方法, 其中所述测定鉴定了所述突变的存在, 并且所述相关步骤鉴定了所述患者患遗传性淋巴水肿的增加了的危险性, 而且其中所述方法包含至少以下步骤之一:

(a) 测定该人类受试者的至少一种多核苷酸的至少一种密码子的核苷酸序列;

20 (b) 进行杂交试验来确定该人类受试者的核酸的核苷酸序列于一种或多种对照序列相同还是不同;

(c) 进行多核苷酸迁移试验来测定来自人类受试者的核酸具有的核苷酸序列与一种或多种对照序列相同还是不同; 和

(d) 进行限制性核酸内切酶消化试验确定人类受试者的核酸具有的核苷酸序列与一种或多种对照序列相同还是不同。

25 97. 权利要求 43-39 之一的方法, 其中所述测定鉴定了所述突变的存在, 而且该相关步骤鉴定了所述病人出现淋巴水肿的危险性增加, 所述方法包括以下步骤: 进行聚合酶链反应(PCR)来扩增包含所述 LEC 多核苷酸的编码序列的核酸, 并测定该扩增的核酸的核苷酸序列。

30 98. 权利要求 73-74 之一的方法, 其中所述人类受试者患有淋巴水肿, 而且其中所选载体以及转化或转染方法用于 prox-1 的瞬时表达。

99. 权利要求 73-74 之一的方法, 其中所述人类受试者患有淋巴水肿,

而且所述载体包含复制缺陷的腺病毒载体。

专利名称(译)	淋巴管和血管的内皮细胞基因		
公开(公告)号	CN1653080A	公开(公告)日	2005-08-10
申请号	CN03810440.7	申请日	2003-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究院		
申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究院		
当前申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究院		
[标]发明人	卡里阿利塔洛 泰加马基嫩 塔蒂亚娜彼得罗娃 皮普萨萨哈里嫩 朱亚萨哈里嫩		
发明人	卡里·阿利塔洛 泰加·马基嫩 塔蒂亚娜·彼得罗娃 皮普萨·萨哈里嫩 朱亚·萨哈里嫩		
IPC分类号	C07H21/04 C12Q1/68 G01N33/50 A61K31/7088 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P9/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	C12Q1/6883 C07K16/22 C12Q2600/158 A61K38/00 G01N33/574 G01N2800/52 G01N33/5748 A61P9/00 A61P35/00		
优先权	60/363019 2002-03-07 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了在淋巴管内皮细胞和血管内皮细胞中差异表达的多核苷酸和基因。这些基因可用于治疗涉及淋巴管的疾病，所述疾病例如淋巴水肿，各种炎症疾病，和通过淋巴管系统进行的癌转移。

