

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/567

A01N 37/18

A61K 38/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02827192.0

[43] 公开日 2005 年 5 月 11 日

[11] 公开号 CN 1615440A

[22] 申请日 2002. 11. 13 [21] 申请号 02827192.0

[30] 优先权

[32] 2001. 11. 16 [33] US [31] 60/332,429

[86] 国际申请 PCT/US2002/036865 2002. 11. 13

[87] 国际公布 WO2003/044172 英 2003. 5. 30

[85] 进入国家阶段日期 2004. 7. 16

[71] 申请人 杰南技术公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 纳波莱昂内·费拉拉

汉斯-彼得·格伯 乔·科沃尔斯基

玛丽亚·T·皮萨巴罗

丹尼尔·E·舍曼

[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 2 页 说明书 55 页 序列表 10 页
附图 27 页

[54] 发明名称 含有血管生成素-样蛋白质
3ANGPTL3 的组合物及其使用方法

[57] 摘要

本发明涉及制备和使用 Angptl3 多肽的方法和工具。本发明具体涉及 Angptl3 多肽在诱导肝脏再生和血管生成中的用途。其它方法包括 Angptl3 多肽在诊断和治疗肝脏疾病中的用途。在此还提供了与本发明的多肽结合的抗体。

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

1. 一种治疗以 Angptl3 过量表达为特征的组织损伤的方法, 包括用 Angptl3 的拮抗剂治疗该组织。
- 5 2. 权利要求 1 的方法, 其中该组织是肝脏组织。
3. 权利要求 2 的方法, 其中该组织损伤与炎症相关。
4. 权利要求 3 的方法, 其中该组织损伤与慢性肝脏疾病相关。
5. 权利要求 2 的方法, 其中该组织损伤与肝脏肿瘤相关。
6. 权利要求 1 的方法, 其中该组织是心脏组织。
- 10 7. 权利要求 6 的方法, 其中该组织损伤与炎症相关。
8. 权利要求 6 的方法, 其中该组织损伤与以 Angptl3 表达升高为特征的
 心脏疾病相关。
9. 权利要求 1 的方法, 其中该拮抗剂是抗-Angptl3 抗体或抗- $\alpha\text{v}\beta 3$ 抗体。
10. 权利要求 1 的方法, 其中该拮抗剂是免疫粘附素。
- 15 11. 一种治疗哺乳动物受试者的慢性肝脏疾病的方法, 包括给需要的哺
 乳动物受试者施用有效量的 Angptl3 的拮抗剂。
12. 权利要求 11 的方法, 其中该慢性肝脏疾病的特征在于 Angptl3 的表
 达升高。
13. 权利要求 11 的方法, 其中该拮抗剂是抗-Angptl3 或抗- $\alpha\text{v}\beta 3$ 的抗体。
- 20 14. 一种治疗哺乳动物受试者中以 Angptl3 表达升高为特征的心脏疾病
 的方法, 包括给受试者施用有效量的 Angptl3 的拮抗剂。
15. 权利要求 14 的方法, 其中该拮抗剂是抗-Angptl3 的抗体或抗- $\alpha\text{v}\beta 3$
 的抗体。
16. 一种治疗急性肝脏疾病的方法, 包括给需要的哺乳动物受试者施用
25 治疗上有效量的多肽或其激动剂, 该多肽包含与 SEQ ID NO: 2 的人 Angptl3
 序列具有至少 80% 序列相同性的氨基酸序列。
17. 权利要求 16 的方法, 其中所述的多肽包含 SEQ ID NO: 2 的人
 Angptl3 序列的氨基酸区域 281-293(P1, SEQ ID NO: 14), 442-460(P2, SEQ ID
 NO: 15), 和 415-430(P3, SEQ ID NO: 17)。
- 30 18. 权利要求 16 的方法, 其中所述的多肽包含 SEQ ID NO: 2 的人
 Angptl3 序列的血纤蛋白原结构域。

19. 权利要求 16 的方法，还包括给药另一治疗剂。

20. 权利要求 16 的方法，其中所述的激动剂是特异性结合 Angptl3 或 $\alpha v\beta 3$ 的激动剂抗体。

21. 一种诱导急性肝脏损伤后的肝脏再生的方法，包括给需要的哺乳动物受试者施用治疗上有效量的多肽或其激动剂，该多肽包含与 SEQ ID NO: 2 的人 Angptl3 序列具有至少 80 % 序列相同性的氨基酸序列。

22. 一种诱导组织中血管生成的方法，包括用有效量的多肽或其激动剂治疗该组织，该多肽包含与 SEQ ID NO: 2 的人 Angptl3 序列具有至少 80 % 序列相同性的氨基酸序列。

23. 权利要求 22 的方法，其中该组织是肝脏组织。

24. 权利要求 22 的方法，其中该组织是心脏组织。

25. 一种抑制组织中血管透性不需要地增大的方法，包括用有效量的 Angptl3 的拮抗剂治疗该组织。

26. 权利要求 25 的方法，其中该组织是肝脏组织。

27. 权利要求 25 的方法，其中该组织是心脏组织。

28. 一种鉴定存在心血管疾病危险的人类受试者的方法，包括测定所述受试者心脏组织中 Angptl3 mRNA 或其表达产物的水平相对于正常心脏组织中 Angptl3 或其表达产物的水平，当该受试者心脏组织中 Angptl3 mRNA 或其表达产物的水平相对于正常心脏组织升高时，则确定该受试者存在危险。

29. 一种鉴定存在肝脏损伤危险的人类受试者的方法，包括测定所述受试者肝脏组织中 Angptl3 mRNA 或其表达产物的水平相对于正常肝脏组织中 Angptl3 或其表达产物的水平，当该受试者肝脏组织中 Angptl3 mRNA 或其表达产物的水平相对于正常肝脏组织升高时，则确定该受试者存在危险。

含有血管生成素-样蛋白质 3
ANGPTL3 的组合物及其使用方法

5

发明背景

技术领域

本发明涉及 Angptl3 多肽以及制备和使用所述蛋白质分子的方法和工具(means), 和结合 Angptl3 多肽的抗体。

10

相关技术的描述

新血管的生长在胚胎发育和出生后发育的正常生理学过程中是一个必要条件。从已有的毛细血管增生出新血管的过程(称为血管生成), 还在实体瘤, 糖尿病性视网膜病, 牛皮癣, 炎症和类风湿性关节炎的病理发展中起关键作用(Ferrara, *Recent Prog. Horm. Res.* 55: 15-35 (2000), 讨论 35-6)。

15

血管生成不仅依赖于生长因子, 例如血管内皮生长因子(VEGF)和成纤维细胞生长因子(FGF), 而且还受到包括整联蛋白在内的细胞粘附分子(CAMs)的影响。编码特异性粘附受体的各种基因的失活或在动物模型中施加封闭性抗体对内皮细胞的血管生成反应具有显著的影响(Elicieri 和 Cheresh, *Mol.Med.*, 4: 741-50 (1998))。

20

细胞粘附蛋白的整联蛋白家族由 15 个 α 和 8 个 β 亚基组成, 有至少 22 种不同的 $\alpha\beta$ 异二聚体组合形式(Byzova 等, *Mol. Cell.*, 6 (4): 851-60 (2000))。其中, 至少 6 种组合($\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 1$ 和 $\alpha 1\beta 1$)涉及血管生成(Hynes 和 Bader, *Thromb. Haemost.*, 78(1): 83-7(1997); Hynes 等, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32(5): 501-10 (1999))。整联蛋白促进细胞粘附并迁移到在

25

细胞间隙和基底膜中发现的细胞外基质蛋白上。

整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 是包括玻连蛋白, 纤连蛋白, 血纤蛋白原, 层粘连蛋白, 胶原蛋白, 冯威勒布兰特(Van Willebrard)因子, 骨桥蛋白和 MMP2 的片断(PEX)等在内的广泛多种细胞外基质蛋白的受体(综述参见 Eliceiri 和 Cheresh, *Cancer J. Sci.Am.* 6 Suppl 3: S245-9 (2000))。尽管 $\alpha v\beta 3$ 具有混杂的

30

配体结合行为, 但是在成年组织中并不广泛表达, 仅在一些血管, 肠和子

宫平滑肌细胞中发现(Brem 等, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35: 3466-74 (1994)。该受体也在某些活化的白细胞中表达, 在巨噬细胞和破骨细胞中表达, 这时它在骨吸收期间起重要作用(McHugh, 等, *J. Clin. Invest.*, 105: 433-40 (2000))。最突出的是, 在暴露于低氧和诸如血管内皮生长因子 A(VEGF-A)等细胞因子的内皮细胞中, $\alpha v\beta 3$ 出现上调(Suzuma 等, *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 39: 1029-35 (1998); Walton 等, *J. Cell. Biochem.* 78: 674-80 (2000))。在体内, 在肿瘤肉芽组织内的血管细胞上, 在伤口愈合, 黄斑变性和其它新血管疾病期间观察到 $\alpha v\beta 3$ 表达增加。在肿瘤血管生成的各种体外和体内模型中, 用单克隆抗体或配体拮抗剂封闭 $\alpha v\beta 3$ 导致形成钝头血管(Brooks 等, *Cell* 79: 1157-64(1994); Eliceiri 和 Chersesh, *Mol. Med.* 4: 741-50 (1998))。

尽管有大量的报道集中在诸如肿瘤生长或心肌局部缺血后侧副管形成等病理情况下与血管生成的调节相关的机理上, 但是令人惊奇的是对于肝脏再生期间血管生成过程的作用所知甚少。经部分肝切除术(PH)后, 肝细胞和非实质细胞表达血管内皮生长因子(VEGF) mRNA(Mochida 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226: 176-9 issn:0006-291x(1996)), 意味着 VEGF 借助于诱导血管生成可能在肝脏再生中起作用。然而, 抗 VEGF 的中和抗血清不会改变损伤后的恢复率, 而是导致在该模型中增生的内皮细胞和肝细胞减少(Taniguchi 等, *J. Histochem. Cytochem.* 49: 121-30 (2001))。与此一致, 加入血管生成抑制剂 TNP-470 不会损害部分肝切除术后的伤口愈合, 表明肝脏再生期间不需要 TNP470-敏感型血管生成(Tanaka 等, *Br. J. Surg.*, 83 (10): 1444-7 (1996))。

仍然需要鉴定在肝脏再生, 且特别是在肝脏再生期间的血管生成过程中涉及的新因子。

25 发明概述

本发明涉及含有与人 Angptl3 序列具有序列相同性的氨基酸序列的多肽, 或其激动剂(agonist)治疗以 Angptl3 过量表达为特征的组织损伤的用途。具体地说, 本发明涉及 Angptl3 在治疗(包括预防)或鉴定存在组织损伤危险, 优选肝脏或心脏组织损伤危险的人类受试者中的用途。因此, 据信 Angptl3 涉及肝脏再生期间血管生成过程的调节。

本发明涉及治疗以 Angptl3 过量表达为特征的组织损伤的方法,包括用 SEQ ID NO: 2 所示 Angptl3 的拮抗剂或其哺乳动物同系物处理组织。在一个实施方案中,该治疗包括预防,更具体地说,预防组织损伤的进展。

在一个优选的实施方案中,该组织优选是人肝脏组织。该拮抗剂优选是 SEQ ID NO: 2 所示 Angptl3 的拮抗剂。该组织损伤优选与炎症或肝脏肿瘤相关。该炎症优选与选自由肝硬化,肝纤维变性,慢性肝炎,甲、乙、丙、丁、戊和庚型病毒性肝炎,中毒性代谢性肝损伤,脂肪肝,肝脏局部缺血再灌注(ischemia reperfusion)损伤和脓毒病组成的组中的一种慢性肝病相关。肝硬化是酒精性肝硬化或原发胆汁性肝硬化(PBC)。肝炎是选自由慢性自身免疫性肝炎,慢性酒精性肝炎和非酒精性脂肪肝炎(NASH)组成的组中。肝脏肿瘤选自由肝细胞癌,胆管癌和肝脏转移癌组成的组中。

在另一实施方案,该组织优选是心脏组织。该组织损伤优选与炎症相关。该组织损伤优选与特征在于 Angptl3 表达升高的心脏疾病相关。在另一方面,该组织损伤与其发病机理包括炎症反应,或在其形成中炎症是一个危险因素的那些心脏疾病相关。该心脏疾病优选选自由冠状动脉疾病,心肌病,心肌炎,充血性心力衰竭(CHF),和心肌梗塞组成的组中。心肌病优选选自由非特异性肥大和扩张性心肌病组成的组中。

在另一实施方案中,该拮抗剂是抗-Angptl3 的抗体,抗- $\alpha\text{v}\beta 3$ 的抗体,免疫粘附素或小分子。该抗体优选是单克隆抗体,选自由 Fab, Fab', F(ab')₂ 和 Fv 片段组成的组中的抗体片段或单链抗体。该单克隆抗体优选是嵌合的,人源化的或人的。该免疫粘附素至少包含与免疫球蛋白序列融合的 $\alpha\text{v}\beta 3$ 的配体结合区或至少包含用于免疫球蛋白序列的 Angptl3 的受体结合区。

在另一方面,本发明包括治疗哺乳动物受试者中的慢性肝脏疾病的方法,包括给需要的哺乳动物受试者施用有效量的具有 SEQ ID NO: 2 的 Angptl3 的拮抗剂,或其哺乳动物同系物。在一个实施方案中,该哺乳动物受试者是人。该治疗包括预防且更具体地说,预防肝脏疾病的进展。施用的该拮抗剂是具有 SEQ ID NO: 2 的 Angptl3 的拮抗剂或抗体,特别是抗-Angptl3 的抗体或抗- $\alpha\text{v}\beta 3$ 的抗体。该慢性肝病特征在于 Angptl3 的表达升高。该肝脏疾病选自由肝硬化,肝纤维变性,慢性肝炎,甲、乙、丙、丁、戊和庚型病毒性肝炎,中毒性代谢性肝损伤,脂肪肝,肝脏局部缺血再灌注损伤和脓毒病组成的组中。

在另一方面，本发明包括治疗哺乳动物受试者中的心脏疾病的方法，包括给受试者施用有效量的具有 SEQ ID NO: 2 的 Angptl3 的拮抗剂，或其哺乳动物同系物。在一个实施方案中，该哺乳动物受试者是人。该治疗包括预防且更具体地说，预防心脏疾病的进展。施用的该拮抗剂是具有 SEQ ID NO: 2 的 Angptl3 的拮抗剂。该心脏疾病选自冠状动脉疾病，心肌病，心肌炎，充血性心力衰竭(CHF)，和心肌梗塞组成的组中。该拮抗剂是抗-Angptl3 的抗体或抗- $\alpha\text{v}\beta 3$ 的抗体。

在另一方面，本发明包括治疗急性肝脏疾病的方法，包括给需要的哺乳动物受试者施用治疗上有效量的多肽，或其激动剂，该多肽包含与具有 SEQ ID NO: 2 的人 Angptl3 序列具有至少 80% 的序列相同性的氨基酸序列。在一个实施方案中，该哺乳动物受试者是人。该治疗包括预防且更具体地说，预防急性肝脏疾病的进展。该多肽包含与具有 SEQ ID NO: 2 的人 Angptl3 序列具有至少 98% 相同性的氨基酸序列，或其激动剂。在一个优选的实施方案中，该多肽包含具有 SEQ ID NO: 2 的人 Angptl3 序列的氨基酸区域 281-293(P1, SEQ ID NO: 14)，442-460(P2, SEQ ID NO: 15)，和 415-430(P3, SEQ ID NO: 17)。在另一优选的实施方案中，该多肽包含具有 SEQ ID NO: 2 的人 Angptl3 序列的血纤蛋白原结构域。在甚至更优选的实施方案中，该方法包括施用另一治疗剂。该另一治疗剂是血管内皮生长因子(VEGF)或成纤维细胞生长因子(FGF)。该激动剂是特异性结合 Angptl3 或 $\alpha\text{v}\beta 3$ 的激动剂抗体。

在另一方面，本发明包括在急性肝脏损伤后诱导肝脏再生的方法，包括给需要的哺乳动物受试者施用治疗上有效量的多肽，或其激动剂，该多肽包含与具有 SEQ ID NO: 2 的人 Angptl3 序列具有至少 80% 序列相同性的氨基酸序列。该哺乳动物受试者优选是人类。该人类受试者可能被诊断为患有炎症性肝脏疾病，例如慢性，酒精性或病毒性肝炎，脓毒病，原发胆汁性肝硬化(PBC)或原发性或转移性肝癌，肝脏受到化学或机械损伤或者由于诸如慢性肝炎，肝硬化，原发性或转移性肝癌，或胆囊癌等原因接受了肝切除术。另外，患者可能暴露于引起肝脏损伤的化学剂或其它环境或其它已知因素，且在所述损伤进展前得到治疗。预防性治疗具体包括在本发明的范围内。

在另一方面，本发明包括在组织中诱导血管生成的方法，包括用有效量的多肽，或其激动剂治疗该组织，该多肽包含与具有 SEQ ID NO: 2 的人 Angptl3 序列具有至少 80 % 序列相同性的氨基酸序列。在一个实施方案中，该组织是心脏组织或肝脏组织，该肝脏组织可以是由于感染性或自身免疫性病变，机械或化学损伤，或者癌症或转移癌而被损伤的患病肝脏组织。预防性治疗且更具体地说预防该疾病的进展具体包括在本发明的范围内。

在另一方面，本发明包括抑制组织中不需要的血管透性增大的方法，包括施用有效量的具有 SEQ ID NO: 2 的 Angptl3 的拮抗剂，或其哺乳动物同系物。血管透性增大可以是组织损伤后小血管透性的增大或者可以是在暴露于毒素而引起的血管内皮坏死之后出现。血管透性增大与炎症相关，优选慢性炎症。该组织是肝脏组织或心脏组织。预防性治疗且更具体地说预防该疾病的进展都具体包括在本发明的范围内。

在另一方面，本发明包括鉴定存在心血管疾病危险的人类受试者的方法，优选在发生严重损伤之前。该方法包括测定所述受试者心脏组织中 Angptl3 mRNA 或其表达产物的水平，相对于所述受试者心脏组织中 Angptl3 或其表达产物的水平，相对于正常心脏组织中 Angptl3 或其表达产物的水平，且该受试者心脏组织中 Angptl3 mRNA 或其表达产物的水平相对于正常心脏组织升高则确定该受试者存在危险。该心脏组织样品可从怀疑存在心血管疾病危险的受试者，优选从人类患者获取，且可进行差别基因表达分析以检测 SEQ ID NO: 1 所示人 Angptl3 基因的上调，比较存在危险的心脏组织样品中 Angptl3 的表达与从正常心脏组织获取的第二种心脏样品的表达。差别基因表达分析可通过包括 northern 印迹，原位杂交，逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)等已知技术，或者通过使用微阵列技术进行。

在另一方面，本发明包括鉴定存在肝脏损伤危险的人类受试者的方法，优选在发生严重损伤之前。该方法包括测定所述受试者肝脏组织中 Angptl3 mRNA 或其表达产物的水平，相对于正常肝脏组织中 Angptl3 或其表达产物的水平，且该受试者肝脏组织中 Angptl3 mRNA 或其表达产物的水平相对于正常肝脏组织升高则确定该受试者存在危险。该肝脏组织样品可从怀疑存在肝脏损伤危险的受试者，优选从人类患者获取，且可进行差别基因表达分析以检测 SEQ ID NO: 1 所示人 Angptl3 基因的上调，比较存在危险的肝脏样品中 Angptl3 的表达与从正常肝脏组织获取的第二种肝脏样品的表达。

差别基因表达分析可通过包括 northern 印迹, 原位杂交, 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)等已知技术, 或者通过使用微阵列技术进行。

在所有治疗性应用(包括预防)中, Angptl3 多肽, 或其激动剂或拮抗剂可与诸如另一血管生成因子, 例如血管内皮生长因子(VEGF), 或成纤维细胞生长因子(FGF)等另一治疗剂组合给药。

附图说明

图 1 是 Angptl3 的核苷酸序列(SEQ. ID NO: 1) (DNA 16451)。

图 2A 和 2B 是 Angptl3 的氨基酸序列(SEQ. ID NO: 2)。

图 3A 是 Angptl3(SEQ ID NO: 2)和血管生成素(angiopoietin)-1(ANG1)和血管生成素-2(ANG2)的结构域结构的比较。

图 3B 显示了用含有人 ANG2, ARP1, Angptl3 的 gD-表位标记形式的条件培养基或对照培养基培养的 HMVEC 细胞的 FACS 分析结果。

图 4 显示了用分别编码 ANG1, ANG2, ARP1, Angptl3 的 gD-标记形式和 Tie1 受体或 Tie2 受体的质粒共转染 293 细胞的共免疫沉淀实验的结果。上清用抗 Tie1 或 Tie2 的抗体免疫沉淀, 通过 SDS-PAGE 分离并印迹到 PVDF 膜上的蛋白质用抗 gD 标记或 Tie 受体的抗体分别温育。

图 5A-C 显示了 Angptl3 的血纤蛋白原结构域的同源性模型。(A)人血纤蛋白原(3FIB) γ -链 C 末端的 X-射线结构(白色), 和 Angptl3 的血纤蛋白原样结构域的模型结构(绿色)的叠置带状图。 α 螺旋表示为圆筒, β 链用箭头指示。标记了在两种结构中有区别的区域。(B)Angptl3 的血纤蛋白原样结构域的模型结构(绿色)的带状图。 $\alpha 5\beta 3$ 中包含的 P1, P1, 和 P3 区以黄色显示。(C)人血纤蛋白原(3FIB) γ -链 C 末端(SEQ ID NO: 27)与 Angptl3 的血纤蛋白原样结构域(SEQ ID NO: 28)和人血管生成素 1(SEQ ID NO: 29), 2 (SEQ ID NO: 30)和 4 (SEQ ID NO: 31)的序列对比。亲水和带电的残基以蓝色表示, 芳香/疏水残基以橙色表示。共有序列在序列对比下面显示; 保守的亲水/带电和芳香/疏水突变分别标记为蓝色和橙色方框。相应于本研究所用的肽的残基在黄色框中表示。编号方式相应于 3FIB 的 x-射线结构。

图 6A-C 提供了 Angptl3 是分泌型糖蛋白的证据。(A)免疫亲和纯化的人 Angptl3 的考马斯染色的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶。(B)从瞬时转染的 CHO 细胞免疫亲和纯化的鼠 Angptl3 经银染的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶。(C)用(+)

或没用(-)PNGase-F 处理的重组 Angptl3 蛋白的分子量比较。gD 标记的 hAngptl3 的预期分子量是 60 kDa。使用抗-gD 抗体进行 Western 印迹。

图 7A-E 提供了 Angptl3 用于内皮细胞结合的结构域的功能性分析并将 $\alpha v \beta 3$ -整联蛋白鉴定为生物学反应的介质。(A)在用 200 nM MA 进行刺激的
5 4 小时前,用肽 p1, p2 和 p3 的组合(总体 100 μ M 或 250 μ M),对照 (NL6-PP2-scr, 250 μ M)或 RGD 或 RGE 肽(250 μ M)预培养后测试 HMVEC 贴壁。存在 200 nM PMA 且没有肽时的贴壁设定为值 100%。(B)在用 20 μ g/ml hAngptl3 或 BSA 覆盖的微量滴定板上测试过量表达整联蛋白 $\alpha IIb \beta 3$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 1$, 或 $\alpha v \beta 5$ 的 293 细胞的贴壁。在 37 $^{\circ}$ C 允许细胞贴壁并在 4 小时后定量。
10 (C) 用增大量的 hAngptl3 覆盖 96-孔平板在 4 $^{\circ}$ C 过夜,用 3% BSA 在 37 $^{\circ}$ C 封闭非特异性结合 1 小时,平板接种 HMVEC 细胞前用 PBS 洗涤孔。显示的数据是三个独立实验的平均值和 SD。(D)在用 200 nM PMA 进行刺激前,用含有或不含 25mg/ml 封闭抗体抗- $\alpha 5 \beta 1$ (JBS5),抗- $\alpha v \beta 3$ (LM609),或抗- $\alpha v \beta 5$ (P1F6)预培养 HMVEC。作为阴性对照,贴壁在 10 mM EDTA 存在下进行。
15 (E)在含有或不含 25 μ g/ml 封闭抗体抗- $\alpha v \beta 3$ (LM609),或抗- $\alpha v \beta 5$ (P1F6)的条件下未刺激或 hAngptl3 刺激(50 μ g/ml)的 HMCECs 迁移 16 小时。

图 8A-C 显示了 Angptl3 在发育期间的肝细胞中表达且在患病肝脏中显著上调。(A)使用人多组织印迹(Clontech)进行 hAngptl3 的 Northern 印迹分析,揭示了在肝脏和肾中 hAngptl3 的表达。每个泳道含有来自成人脑(BR),
20 心脏(HT),骨骼肌(SM),结肠(CO),胸腺(TH),脾(SP),肾(KD),肝(LI),小肠(SI),胎盘(PL),肺(LU),和外周血白细胞(PBL)的 2 μ g RNA。(B)在来自肝硬化组织中的和被 acetaminophen 中毒损伤后的肝细胞中 hAngptl3 的表达显著上调。在肝脏肿瘤样品中未观察到改变。(C)胎鼠肝脏的原位杂交表明在 E15 和 E18 的肝细胞中表达 mAngptl3,但在红细胞祖细胞,内皮细胞
25 和巨核细胞中不表达。

图 9A-E 显示了 CCLF1 对大鼠角膜中体内血管生成的诱导的影响。(A)用缓冲液(对照),(B)鼠 Angptl3(500 ng),(C)VEGF(100 ng),(D)鼠 Angptl3(500 ng)和 VEGF(100 ng)处理 hydon 颗粒,6 天后进行移植,所得大鼠角膜的代表性平整-封固的显微照片。(E)针对对照,VEGF(100ng),mAngptl3(500ng),
30 mAngptl3(500ng)和所示组合的体内血管生成反应的总结性数据。数据表示

为平均值 $\pm$ SE, $n=5$ 只动物/组。与对照相比 $p < 0.005$ (用于非参数值的 Mann-Whitney 检验)。

图 10A-B 显示, 根据在第 0 天用腺病毒感染并在第 4 天用 CC14 处理后在第 7 天的天冬氨酸转移酶(AST)的血清水平, 评估鼠 Angptl3 在 CC14 诱导的肝脏毒性中的保护效果。图 10A 显示, 在第 0 天用腺病毒感染并在第 4 天用 CC14 处理后, 在第 7 天时所测试的所有构建体的表达水平相等。图 10B 显示了在第 0 天用所示病毒载体处理并在第 4 天用 CC14 处理后在第 7 天时小鼠血清中的 AST 水平。(P < 0.0001)。

图 11A-B 显示, 在 C57/B16 野生型小鼠肝脏中鼠 Angptl3 延长表达后, 血清 AST 水平增加。图 11A 显示, 在第 0 天用所示病毒构建体处理并在第 4 天用 CC14 处理后, 在各时间点, 小鼠血清中的 AST 水平。图 11B 显示, 在腺病毒感染的两周后, RAG2 敲除小鼠血清中 ALT 和 AST 水平增加。结果以平均值 $\pm$ SEM 表示。每组动物数为 6(P < 0.0001)。

图 12A-D 显示了 K5-Angptl3 转基因小鼠或野生型 FVB 小鼠皮肤中, 因皮内施用表达 Angptl3 的腺病毒载体而导致血管渗漏增加。图 12A 显示了 RNA 的实时 RT-PCR 分析结果, 所述 RNA 是从转基因小鼠和窝型匹配(liter matched)的野生型对照小鼠的各种器官分离的。皮肤中转基因的表达式达到在肝脏中检测到的内源性 Angptl3 表达水平的大约 10%。图 12B 显示了 RNA 的实时 RT-PCR 分析结果, 所述 RNA 是在出生后不同时间点从转基因小鼠和窝型匹配的野生型对照小鼠的皮肤活检组织分离的。图 12C 显示了对 11 周-龄的转基因小鼠和窝型匹配的野生型对照小鼠进行伊文思蓝试验以测定血管透性水平的结果。转基因小鼠显示出在基础条件下血管透性明显增大(左侧组)而用芥子油攻击时不增大(右侧组)。通过分光光度计在 610nm 下的吸收测量渗出的伊文思蓝染料量并表示为每 1mg 组织湿重的染料含量(下面组)。结果表示为平均值 $\pm$ SEM, 每组动物数为 6 只, P < 0.05。图 12D 显示了用 1×10^9 Pfu 的所示腺病毒构建体皮肤内注射 FVB 小鼠, 在给药 6 天后进行的伊文思蓝试验的结果。用 Angptl3(p < 0.05)或 VEGF(p < 0.005)处理的小鼠皮肤显示出与对照处理的小鼠(LacZ)相比时在基础条件下血管透性明显增大(左侧组)。用分光光度计在 610nm 下测量渗出的伊文思蓝染料量并表示为每 1mg 组织湿重的染料含量。结果表示为平均值 $\pm$ SEM, 且每组动物数为 6 只, P < 0.05。

图 13 显示了新鲜分离的鼠肝细胞与重组鼠 Angptl3(mAngptl3)的结合水平。肝细胞粘着到以所示浓度的重组 mAngptl3, 纤连蛋白或 BSA 对照覆盖的培养皿上。用 3% BSA 在 37℃ 封闭非特异性结合 1 小时, 平板接种细胞前用 PBS 洗涤孔。所示的数据代表在总共 3 个独立实验中以一式三份进行的一个代表性实验的平均值 $\pm$ SD。

优选实施方案的详细描述

A. 定义

术语“肝脏疾病”在此以最广义使用且是指与任何类型的肝脏损伤相关的任何肝脏疾病, 而不论其内在原因。因此, 肝脏疾病可以由例如, 感染或自身免疫病变, 对肝脏的机械或化学损伤, 或癌症引起, 所有这些情况都包含在“肝脏疾病”的定义内。对肝脏的化学损伤可能由各种毒素引起, 例如醇, 四氯化碳, 三氯乙烯, 铁过量, 药物过量, 药物副作用等。

术语“与炎症相关的组织损伤”及其语法上的变化形式用于指至少部分由炎症引起或者伴随着炎症反应的任何组织损伤。组织可以是例如, 肝脏组织或心脏组织, 且组织损伤可以例如, 与炎症性肝脏疾病, 或者心脏疾病相关。

本文使用的术语“炎症性肝脏疾病”是指其病理涉及炎症性细胞活化并募集至肝脏的任何肝脏疾病, 而不论其内在原因是感染还是自身免疫病变, 对肝脏的化学损伤, 或其它。因此, 炎症性肝脏疾病包括, 但不限于, 酒精性肝炎和肝硬化, 病毒性肝炎, 肝脏的局部缺血再灌注损伤, 脓毒病和原发胆汁性肝硬化(PBC)。其综述参见 Lawson 等, *Toxicol Sci* 54 : 509-16 (2000)。

本文使用的术语“慢性肝脏疾病”是指以 Angptl3 过量表达为特征的肝脏疾病, 且包括, 但不限于肝脏的炎症性疾病和肝脏肿瘤。例如, 肝脏的炎症性疾病包括, 诸如酒精性肝硬化和原发胆汁性肝硬化(PBC)等肝硬化, 肝脏纤维变性, 慢性肝炎, 即慢性自身免疫性肝炎, 慢性酒精性肝炎, 非酒精性脂肪肝炎(NASH, 也称为脂肪变性), 病毒性肝炎甲型, 乙型, 丙型, 丁型, 戊型和庚型, 中毒代谢性肝脏损伤, 脂肪肝, 肝脏的局部缺血再灌注损伤, 和脓毒病。肝脏肿瘤包括, 例如, 肝细胞癌, 胆管癌, 和肝脏的转移癌。

本文使用的术语“急性肝脏疾病”是指短期的肝脏疾病，其病史一般不超过 6 个月。该定义包括，例如，急性肝炎，即急性自身免疫性肝炎和急性酒精性肝炎，和急性肝衰竭。该定义特别包括不以 Angptl3 过量表达为特征的任何短期肝脏疾病。

- 5 本文使用的术语“心脏疾病”是指其病理包括炎症反应，或者炎症是其形成的一个危险因素的任何心脏疾病。该定义特别包括以 Angptl3 表达提高为特征的任何心脏疾病。该定义包含的心脏疾病包括，但不限于，冠状动脉疾病，诸如肥大性心肌病，非特异性肥大和扩张性心肌病等心肌病，心肌炎，充血性心力衰竭(CHF)，心脏病发作，等。

- 10 本文使用的“酒精性肝炎”包括由过量消费酒精引起的急性和慢性肝炎，且包括从仅有实验室试验异常作为疾病征兆的轻度肝炎，到具有诸如黄疸(由胆红素滞留引起的黄皮肤)，肝性脑病变(由肝衰竭引起的神经机能障碍)，腹水(腹部的液体积聚)，出血性食管静脉曲张(食管中静脉曲张)，异常凝血和昏迷等并发症的严重肝脏机能障碍。

- 15 本文使用的术语“病毒性肝炎”是指由甲，乙，丙，丁，戊或庚型肝炎感染引起的肝炎。

甲肝病毒(HAV)是来自小 RNA 病毒科(*Picornaviridae*)肠道病毒的一种，通常引起轻度的疾病，该疾病的特征在于突然发热，不适，恶心，食欲不振，和腹部不适，几天后出现黄疸。

- 20 乙肝病毒(HBV)是嗜肝 DNA 病毒科(*Hepadnaviridae*)主要的双链 DNA 病毒。HBV 引起人类肝炎且该科中的相关病毒引起鸭，松鼠和土拨鼠肝炎。HBV 基因组具有 4 个基因：pol, env, pre-core 和 X，分别编码病毒 DNA 聚合酶，包膜蛋白，前核心蛋白(它加工成病毒衣壳)和蛋白质 X。蛋白质 X 的功能还不清楚，但是它可能涉及宿主细胞基因的激活和癌形成。HBV 引起急性和慢性肝炎。变成慢性感染的机会取决于年龄。大约 90% 的受感染新生儿和 50% 的受感染低龄儿童会变成慢性感染。相反，只有大约 5% 至 10% 感染 HBV 的具有免疫能力的成年人发展成慢性乙肝。

- 25 丙肝病毒(HCV)是黄病毒科(*Flaviviridae*)的正链单链 RNA 病毒。基因组大约为 10,000 个核苷酸且编码大约 3,000 个氨基酸的单个多蛋白。该多蛋白被宿主细胞和病毒蛋白酶加工成三个主要结构蛋白和数个病毒复制所必需的非结构蛋白。已鉴定了数个不同的 HCV 基因型，它们的基因组序列略
- 30

有不同，这与预后和对治疗的反应中的差异相关联。被 HCV 急性感染的个体大约 85 % 变成慢性感染。因此，HCV 是慢性(持续超过 6 个月)肝炎的主要病因。一旦被慢性感染，该病毒不经治疗几乎不能清除。在极少情况下，HCV 感染引起临床上的急性疾病，甚至肝衰竭，然而，大多数情况的急性感染是临床上不可检测的。

丁型肝炎病毒(HDV，也称为δ病毒)是小环形 RNA 病毒。HDV 具有复制缺陷，因此在另一病毒不存在时不能繁殖。在人类，HDV 感染仅在存在 HBV 感染时发生。

戊型肝炎病毒(HEV)通常引起与甲肝疾病在临床上不能区分的肝炎。症状包括不适，食欲不振，腹痛，关节痛，和发热。戊肝以流行病和散发性地方病形式发生，通常与饮水污染相关。

庚型肝炎病毒(HGV)是相对新发现的黄病毒，与 HCV 相关但有区别，可引起急性和慢性肝炎。

当身体一个区域的血流暂时停止(局部缺血)且然后再形成血流(再灌注)时发生局部缺血再灌注损伤。可交换使用的术语“局部缺血再灌注损伤”与“局部缺血性再灌注损伤”是指与细胞缺氧相关的起始损伤和与给细胞再供氧时的炎症反应相关的后续损伤。局部缺血再灌注损伤可在一些手术期间发生，如修复动脉瘤和进行器官移植的手术。该损伤可在供血中断的身体部位发生，或者可在局部缺血期间供血充分的部位发生。例如，肝脏的局部缺血再灌注损伤可由肝脏和胆手术切除术引起，且在临床上表现为包括急性肝细胞损伤和坏死在内的肝脏机能障碍等并发症。

“原发性胆汁性肝硬化(PBC)”是以肝脏内小胆管的炎症性破坏为特征的一种疾病。PBC 最终导致肝脏硬化。PBC 的病原学还不完全了解，但是由于存在自身抗体，一般认为它是一种自身免疫疾病，尽管如此，还不能完全排除诸如传染因素等其它病原学。诊断为 PBC 的大约 90% 的病人是妇女，最常见的年龄在 40 至 60 岁之间。

“脓毒病”是细菌感染の結果，可在身体任一部位(包括肝脏或胆管)发起。脓毒病可以是威胁生命的情况，特别是在免疫系统减弱的人中。

本文使用的术语“血管生成”是指从已有血管系统形成新血管的过程且需要进行内皮细胞的增殖和迁移。

本文使用的术语“肝硬化”是指在解剖上特征为与纤维变性结合的肝脏扩散型结节的病理性肝脏状况。肝硬化是包括与慢性酒精滥用，慢性病毒性肝炎，代谢性和胆疾病相关的大多数类型慢性肝脏疾病的最终共同方向。

- 5 术语“Angptl3 多肽”，“Angptl3 蛋白”，和“Angptl3”可交换使用，且包含天然序列 Angptl3 和 Angptl3 多肽的变异体(在本文中有进一步限定)。Angptl3 多肽可从诸如人组织类型或另一来源等各种来源分离，或者通过重组和/或合成方法制备。应注意，Angptl3 以前也称为“FLS139”，“NL6”，或“CCFL1”。因此，任何提及的 Angptl3 也应理解为是指 FLS139，NL6 和
10 CCFL1 多肽。

- “天然序列 Angptl3”或“天然 Angptl3”包含与天然来源的 Angptl3 分子具有相同氨基酸序列的多肽。该天然序列 Angptl3 可从天然分离或者可通过重组和/或合成方法产生。术语“天然序列的 Angptl3”或“天然 Angptl3”特别包含天然存在的截短或分泌形式(例如，胞外结构域序列)，天然存在的
15 变异体形式(例如，旁路剪接形式)和 Angptl3 的天然存在的等位基因变异体。在本发明的一个实施方案中，Angptl3 的天然序列是含有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 1 至 460 的成熟或全长天然序列 Angptl3。尽管表明 SEQ ID NO: 2 的人 Angptl3 多肽以本文称为氨基酸位置 1 的甲硫氨酸残基开始，但是采用位于 SEQ ID NO: 2 的氨基酸位置 1 上游或下游的另一甲硫氨酸残基作为 Angptl3
20 多肽的起始氨基酸残基是可想得到和可能的。另外，术语“天然序列 Angptl3”和“天然 Angptl3”特别包括无起始甲硫氨酸的多肽。

- 可交换使用的术语“Angptl3 变异体”或“Angptl3 变异体多肽”是指如下限定的活性 Angptl3 多肽，它与(a)SEQ ID NO: 2 所示 Angptl3 多肽的残基 1 至 460，或其非人哺乳动物同系物，或者(b)SEQ ID NO: 2 的氨基酸序
25 列或其非人哺乳动物同系物的另一具体产生的片断的氨基酸序列具有至少大约 80% 的氨基酸序列相同性。例如，该 Angptl3 变异体多肽包括这样的 Angptl3 多肽，其中在 SEQ ID NO: 2 的序列 N-和/或 C-末端，以及在其一个或多个内部结构域中添加或缺失了一个或多个氨基酸残基。一般来说，Angptl3 变异体多肽与 SEQ ID NO: 2 所示 Angptl3 多肽的残基 1 至 460 或其
30 非人哺乳动物同系物具有至少大约 80% 的氨基酸序列相同性，更优选至少大约 81% 的氨基酸序列相同性，更优选至少大约 82% 的氨基酸序列相同性，

更优选至少大约 83 % 的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 84 % 的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 85 % 的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 86 % 的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 87 % 的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 88 % 的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 89 % 的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 90 % 的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 91 % 的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 92 % 的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 93 % 的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 94 % 的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 95 % 的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 96 % 的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 97 % 的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 98 % 的氨基酸序列相同性且还更优选至少大约 99 % 的氨基酸序列相同性。Angptl3 的变异体多肽不包含天然 Angptl3 多肽序列。一般来说, Angptl3 变异体多肽是至少大约 10 个氨基酸的长度, 通常是至少大约 20 个氨基酸的长度, 更常见的是至少大约 30 个氨基酸的长度, 更常见的是至少大约 40 个氨基酸的长度, 更常见的是至少大约 50 个氨基酸的长度, 更常见的是至少大约 60 个氨基酸的长度, 更常见的是至少大约 70 个氨基酸的长度, 更常见的是至少大约 80 个氨基酸的长度, 更常见的是至少大约 90 个氨基酸的长度, 更常见的是至少大约 100 个氨基酸的长度, 更常见的是至少大约 150 个氨基酸的长度, 更常见的是至少大约 200 个氨基酸的长度, 更常见的是至少大约 250 个氨基酸的长度, 更常见的是至少大约 300 个氨基酸的长度, 或更长。特别优选的 Angptl3 变异体保留了 SEQ ID NO: 2 所示天然人 Angptl3 序列的氨基酸区域 281 至 193, 415 至 430, 和 442-460 中的至少一个, 或非人哺乳动物 Angptl3 同系物的相应区域, 或者在该区域内仅含有保守氨基酸取代。

术语“血纤蛋白原结构域”或“血纤蛋白原样结构域”用于指 Angptl3 的氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)中从大约位置 238 至大约位置 460 的氨基酸。

相对于本文鉴定的 Angptl3 多肽序列的“氨基酸序列相同性百分数(%)”定义为对位排列该序列且按需要导入间隔以达到最大序列相同性百分数后与 Angptl3 序列中氨基酸残基相同的候选序列氨基酸残基的百分数, 且任何保守取代都不作为该序列相同性的一部分。以测定氨基酸序列相同性百分数为目的的序列对比可按本领域技术内的各种方法完成, 例如, 使用公众可得到的计算机软件, 例如 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 或 Megalign

(DNASTAR)软件。本领域的技术人员可确定用于测量序列对比的合适参数，包括在所比较的序列全长上达到最大对位排列所需的任何算法。然而，为达到本文目的，氨基酸序列相同性%可通过使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 按下文所述获得，其中图 4A-Q 提供了 ALIGN-2 程序的全部源代码。ALIGN-2 序列比较计算机程序由 Genentech, Inc.创作且图 4A-Q 所示的源代码在美国版权局，华盛顿区，20559 以用户文件存档，以美国版权登记号 TXU510087 登记。ALIGN-2 程序通过 Genentech, Inc., South San Francisco, California 可公开得到或者可从图 4A-Q 提供的源代码编译。编译 ALIGN-2 程序应基于 UNIX 操作系统平台，优选数字 UNIX V4.0D。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程序设定且不改变。

为达到本文目的，给定氨基酸序列 A 与，和，或者对给定氨基酸序列 B 的氨基酸序列相同性%(任选可表述为具有或者包含与，和，或者对给定氨基酸序列 B 的某一氨基酸序列相同性%的给定氨基酸序列 A)计算如下：

100 乘以分数 X/Y

其中 X 是通过序列对比程序 ALIGN-2 在 A 和 B 经该程序进行序列对比中评分为相同性匹配的氨基酸残基数，且其中 Y 是 B 中氨基酸残基的总数。可预料到如果氨基酸序列 A 的长度与氨基酸序列 B 的长度不相等时，A 与 B 的氨基酸序列相同性%不等于 B 与 A 的氨基酸序列相同性%。

除非另有说明，本文使用的所有氨基酸序列相同性%值为使用 ALIGN-2 序列比较计算机程序按上述获得。然而，氨基酸序列相同性%也可使用序列比较程序 NCBI-BLAST2(Altschul 等, Nucleic Acids Res. 25: 3389- 3402 (1997))测定。NCBI-BLAST2 序列比较程序可从网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 下载。NCBI-BLAST2 使用了一些检索参数，其中所有这些检索参数设定为默认值，包括，例如，暴露(unmask)=是，链(strand)=全部，预期事件= 10，最低复杂性长度=15/5，多途径(multi-pass)e-值= 0.01，多途径常数=25，最终有间隔的序列对比减少=25，记分矩阵= BLOSUM62。

在使用 NCBI-BLAST2 用于氨基酸序列比较的情况下，给定氨基酸序列 A 与，和，或者对给定氨基酸序列 B 的氨基酸序列相同性%(任选可表述为具有或者包含与，和，或者对给定氨基酸序列 B 的某一氨基酸序列相同性%的给定氨基酸序列 A)计算如下：

100 乘以分数 X/Y

其中X是通过序列对比程序 ALIGN-2 在A和B经该程序进行序列对比中评分为相同性匹配的氨基酸残基数,且其中Y是B中氨基酸残基的总数。可预料到如果氨基酸序列A的长度与氨基酸序列B的长度不相等时,A与B的氨基酸序列相同性%不等于B与A的氨基酸序列相同性%。

- 5 “Angptl3 变异体核酸序列”是指编码如下定义的活性 Angptl3 多肽且与(a)编码 SEQ ID NO: 2 所示 Angptl3 氨基酸序列的残基 1 至 460, 或其非人哺乳动物同系物的核酸序列, 或者(b)编码 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列或其非人哺乳动物同系物的另一具体产生的片断的核酸序列具有至少大约 80 %的核酸序列相同性的核酸分子。一般来说, Angptl3 变异体多核苷酸与(a)
- 10 编码 SEQ ID NO: 2 的残基 1 至 460, 或者该人类多肽的非人哺乳动物同系物的核酸序列具有至少大约 80%的核酸序列相同性, 更优选至少大约 81 %的核酸序列相同性, 更优选至少大约 82 %的核酸序列相同性, 更优选至少大约 83 %的核酸序列相同性, 更优选至少大约 84 %的核酸序列相同性, 更优选至少大约 85 %的核酸序列相同性, 更优选至少大约 86 %的核酸序列相同性,
- 15 更优选至少大约 87 %的核酸序列相同性, 更优选至少大约 88 %的核酸序列相同性, 更优选至少大约 89 %的核酸序列相同性, 更优选至少大约 90 %的核酸序列相同性, 更优选至少大约 91 %的核酸序列相同性, 更优选至少大约 92 %的核酸序列相同性, 更优选至少大约 93 %的核酸序列相同性, 更优选至少大约 94 %的核酸序列相同性, 更优选至少大约 95 %的核酸序列相同性,
- 20 更优选至少大约 96 %的核酸序列相同性, 更优选至少大约 97 %的核酸序列相同性, 更优选至少大约 98 %的核酸序列相同性且还更优选至少大约 99 %的核酸序列相同性。

- 一般来说, Angptl3 变异体核酸序列是至少大约 30 个核苷酸的长度, 通常是至少大约 60 个核苷酸的长度, 更常见的是至少大约 90 个核苷酸的
- 25 长度, 更常见的是至少大约 120 个核苷酸的长度, 更常见的是至少大约 150 个核苷酸的长度, 更常见的是至少大约 180 个核苷酸的长度, 更常见的是至少大约 210 个核苷酸的长度, 更常见的是至少大约 240 个核苷酸的长度, 更常见的是至少大约 270 个核苷酸的长度, 更常见的是至少大约 300 个核苷酸的长度, 更常见的是至少大约 450 个核苷酸的长度, 更常见的是至少
- 30 大约 600 个核苷酸的长度, 更常见的是至少大约 900 个核苷酸的长度, 或更长。

- 相对于本文鉴定的编码 Angptl3 多肽的核酸序列的“核酸序列相同性百分数(%)”定义为对位排列该序列且按需要导入间隔以达到最大序列相同性百分数后与编码 Angptl3 多肽的核酸序列中的核苷酸相同的候选序列中核苷酸的百分数。以测定核酸序列相同性百分数为目的的序列对比可按本领域技术内的各种方法完成,例如,使用公众可得到的计算机软件,例如 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 或 Megalign(DNASTAR)软件。本领域的技术人员可确定用于测量序列对比的合适参数,包括在所比较的序列全长上达到最大对位排列所需的任何算法。然而,为达到本文目的,核酸序列相同性值%可通过使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 按下文所述获得。ALIGN-2 序列比较计算机程序由 Genentech, Inc.创作且源代码在美国版权局,华盛顿区,20559 以用户文件存档,以美国版权登记号 TXU510087 登记。ALIGN-2 程序通过 Genentech, Inc., South San Francisco 可公开得到。编译 ALIGN-2 程序应基于 UNIX 操作系统平台,优选数字 UNIX V4.0D。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程序设定且不改变。
- 为达到本文目的,给定核酸序列 C 与,和,或者对给定核酸序列 D 的核酸序列相同性%(任选可表述为具有或者包含与,和,或者对给定核酸序列 D 的某一核酸序列相同性%的给定核酸序列 C)计算如下:

$$100 \text{ 乘以分数 } W/Z$$

- 其中 W 是通过序列对比程序 ALIGN-2 在 C 和 D 经该程序进行的序列对比中评分为相同性匹配的核苷酸数,且其中 Z 是 D 中核苷酸的总数。可预料到如果核酸序列 C 的长度与核酸序列 D 的长度不相等时,C 与 D 的核酸序列相同性%不等于 D 与 C 的核酸序列相同性%。

- 除非另有说明,本文使用的所有核酸序列相同性%值为使用 ALIGN-2 序列比较计算机程序按上述获得。然而,核酸序列相同性%也可使用序列比较程序 NCBI-BLAST2(Altschul 等, Nucleic Acids Res. 25: 3389- 3402 (1997))测定。NCBI-BLAST2 序列比较程序可从网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 下载。NCBI-BLAST2 使用了一些检索参数,其中所有这些检索参数设定为默认值,包括,例如,暴露(unmask)=是,链(strand)=全部,预期事件= 10,最低复杂性长度=15/5,多途径(multi-pass)e-值= 0.01,多途径常数=25,最终有间隔的序列对比减少=25,记分矩阵= BLOSUM62。

在使用 NCBI-BLAST2 用于序列比较的情况下, 给定核酸序列 C 与, 和, 或者对给定核酸序列 D 的核酸序列相同性 % (任选可表述为具有或者包含与, 和, 或者对给定核酸序列 D 的某一核酸序列相同性 % 的给定核酸序列 C) 计算如下:

5

$$100 \text{ 乘以分数 } W/Z$$

其中 W 是通过序列对比程序 ALIGN-2 在 C 和 D 经该程序进行的序列对比中评分为相同性匹配的核苷酸数, 且其中 Z 是 D 中核苷酸的总数。可预料到如果核酸序列 C 的长度与核酸序列 D 的长度不相等时, C 与 D 的核酸序列相同性 % 不等于 D 与 C 的核酸序列相同性 %。

10

在其它实施方案中, Angptl3 变异体多核苷酸是编码活性 Angptl3 多肽且与编码 SEQ ID NO: 2 所示全长 Angptl3 多肽的核苷酸序列能够杂交, 优选在严格杂交和洗涤条件下杂交的核酸分子。Angptl3 变异体多肽可以是由 Angptl3 变异体多核苷酸编码的那些多肽。

15 在按上述进行的氨基酸序列相同性比较上下文中使用的术语“正数”不仅包括在比较的序列中相同的氨基酸残基, 而且包括具有相似特性的那些氨基酸残基。相对于感兴趣的氨基酸残基评分为正值的氨基酸残基是与感兴趣的氨基酸残基相同或者是感兴趣的氨基酸残基的优选取代的那些氨基酸残基。

20 为达到本文目的, 给定氨基酸序列 A 与, 和, 或者对给定氨基酸序列 B 的正数值 % (任选可表述为具有或者包含与, 和, 或者对给定氨基酸序列 B 的某一正数值 % 的给定氨基酸序列 A) 计算如下:

$$100 \text{ 乘以分数 } X/Y$$

25 其中 X 是通过序列对比程序 ALIGN-2 在 A 和 B 经该程序进行的序列对比中评分为上述限定的正值的氨基酸残基数, 且其中 Y 是 B 中氨基酸残基的总数。可预料到如果氨基酸序列 A 的长度与氨基酸序列 B 的长度不相等时, A 对 B 的正值 % 不等于 B 对 A 的正值 %。

30 术语“抗体”以最广义使用且具体包括, 例如, 单一抗-Angptl3 单克隆抗体(包括激动剂, 拮抗剂, 和中和抗体), 具有多表位特异性的抗-Angptl3 抗体组合物, 单链抗-Angptl3 抗体, 和抗-Angptl3 抗体的片断(见下文)。本文使用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同源的抗体群体获得的抗体, 即除了少量存在的天然发生的突变外, 该群体包含的各个抗体是相同的。

本文使用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同源的抗体群体获得的抗体，即除了少量存在的天然发生的突变外，该群体包含的各个抗体是相同的。

“抗体片断”包含完整抗体的一部分，优选完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片断的例子包括 Fab, Fab', F(ab')₂, 和 Fv 片断；二价抗体 (diabodies)；线性抗体(Zapata 等, Protein Eng., 8 (10): 1057-1062[1995])；单链抗体分子；和从抗体片断形成的多特异性抗体。

木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的称为“Fab”片断且分别具有单个抗原结合位点的抗原结合片断，和残留的“Fc”片断，Fc 片断的名称反映了其容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生 F(ab')₂ 片断，它具有两个抗原结合位点且依然能够交联抗原。

“Fv”是最小的抗体片断，它含有完整的抗原识别和结合位点。该区域由以紧密非共价缔合的一个重链可变区和一个轻链可变区的二聚体组成。在其构型中各可变区的 3 个 CDRs 相互作用形成该 V_H-V_L 二聚体表面的抗原结合位点。6 个 CDRs 总合可赋予该抗体的抗原结合特异性。然而，即使单个可变区(或仅含有 3 个抗原特异性 CDRs 的 Fv 半分子)也具有识别和结合抗原的能力，尽管比完整结合位点的亲和性要低。

Fab 片断还含有轻链恒定区和重链第一恒定区(CH1)。Fab 片断与 Fab' 片断的区别在于在重链 CH1 结构域的羧基末端增加了几个残基，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。那些在其恒定区的半胱氨酸残基携带游离巯基的 Fab' 在本文中命名为 Fab'-SH。F(ab')₂ 抗体片断最初由 Fab' 片断配对产生，在其之间具有铰链半胱氨酸。抗体片断的其它化学偶连也是已知的。

来自任一脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”，根据其恒定区的氨基酸序列，可称为κ和λ这两个明显不同的类型之一。

根据其重链恒定区的氨基酸序列，可将免疫球蛋白分为不同的类型。有 5 种主要的免疫球蛋白类型：IgA, IgD, IgE, IgG, 和 IgM, 其中的一些可进一步分成亚类(同种型)，例如，IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 和 IgA2。相应于免疫球蛋白不同类型的重链恒定区分别称为 α, δ, ε, γ 和 μ。不同类型的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。

术语“二价抗体(diabodies)”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段包含在同一肽链(V_H - V_L)中与轻链可变区(V_L)相连的重链可变区(V_H)。通过使用短到不允许在同一链上的两个结构域之间配对的接头,可迫使该结构域与另一链上的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。在例如,
5 EP 404,097; WO 93/11161; 和 Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)中对二价抗体有更充分的描述。

“分离的”抗体是指从其天然环境成份中鉴定和分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染成份是可能干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质,且可能包括酶,激素,和其它蛋白型或非蛋白型溶质。在优选的实施方案中,
10 该抗体可纯化(1)按劳里(Lowry)方法测定的抗体重量超过 95%,且最优重量超过 99%, (2)其纯化程度足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N-末端或内部氨基酸序列,或(3)在还原型或非还原型条件下进行 SDS-PAGE 并使用考马斯蓝或者,优选银染测定具有同质性。该分离的抗体包括在重组细胞内的原位抗体,因为该抗体天然环境中的至少一种成份不
15 存在。然而,一般来说,分离的抗体由至少一个纯化步骤制备。

术语“可变的”是指可变区的某些部分在不同抗体之间存在较大序列差异且用于各特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,该可变性不是在抗体可变区中平均分布。它集中在轻链和重链可变区两者中称为互补决定区(CDRs)或高变区的三个片段中。可变区保守程度更高的部分称为框架(FR)区。天然重链和轻链的可变区各包含 4 个 FR 区,大量采取 β -折叠构型,由 3 个 CDRs 相连接,形成环形连接,在某些情况下形成 β -折叠结构的一部分。各链中的 CDRs 通过 FR 区紧密相邻,并与来自另一链的 CDRs 一起负责形成抗体的抗原结合位点(参见 Kabat 等, NIH Publ. No. 91-3242, 第 I 卷,第 647-669 页(1991))。恒定区不直接涉及抗体与抗原的结合,但表
20 现出各种效应物功能,例如,使抗体参与抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。
25

本文使用的术语“高变区”是指抗体上负责抗原结合的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(即,轻链可变区中的残基 24-34(L1), 50-56(L2)和 89-97 (L3)和重链可变区中的 31-35(H1), 50-65(H2)和 95-102 (H3); Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD. [1991])和/或来自“高变环”的那些残基(即,轻链可变区的残基
30

26-32(L1), 50-52(L2)和 91-96 (L3)和重链可变区的 26-32(H1), 53-55(H2)和 96-101(H3); Clothia 和 Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 [1987])。 “框架” 或 “FR” 残基是指除了本文限定的高变区残基以外的那些可变区残基。

非人(例如, 鼠)抗体的 “人源化” 形式是指含有来自非人免疫球蛋白最小序列的嵌合免疫球蛋白, 免疫球蛋白链或其片断(例如, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 或抗体的其它抗原结合序列)。大多数情况下, 人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体), 其中来自受体 CDR 的残基被具有所需特异性, 亲和性, 和能力的来自诸如小鼠, 大鼠或兔的非人物种(供体抗体)CDR 的残基取代。在某些情况下, 人免疫球蛋白的 Fv FR 残基被相应的非人残基取代。另外, 人源化的抗体可包含在受体抗体或引入的 CDR 或框架序列中均没有发现的残基。可作出这些修饰以进一步优化和最大化抗体效果。一般来说, 人源化抗体可包含至少一个, 且一般是 2 个可变区的基本上全部, 其中全部或基本上全部的 CDR 区相应于非人免疫球蛋白的 CDR 区且全部或基本上全部的 FR 区是人免疫球蛋白序列的 FR 区。人源化抗体优选还包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc), 一般是人免疫球蛋白的 Fc。对于更详细的情况, 参见, Jones 等, Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann 等, Nature, 332: 323-329[1988]; 和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)。人源化抗体包括 PRIMATIZED™ 抗体, 其中该抗体的抗原结合区来源于用目的抗原免疫猕猴产生的抗体。

本文使用的术语 “免疫粘附素” 是指结合了异源蛋白质 (“粘附素”) 的结合特异性与免疫球蛋白恒定区的效应器功能的抗体样分子。在结构上, 免疫粘附素包含氨基酸序列与免疫球蛋白恒定区序列的融合, 该氨基酸序列具有除抗体的抗原识别和结合位点以外的所需结合特异性(即, 是 “异源性的”)。免疫粘附素分子的粘附素部分一般是至少含有受体或配体的结合位点的连续氨基酸序列。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定区序列可从诸如 IgG-1, IgG-2, IgG-3, 或 IgG-4 亚型, IgA(包括 IgA-1 和 IgA-2), IgE, IgD 或 IgM 等任何免疫球蛋白获得。

杂交反应的 “严格性” 是本领域的普通技术人员容易测定的, 且一般根据探针长度, 洗涤温度, 和盐浓度凭经验进行计算。一般来说, 探针越长需要的合适退火温度越高, 而探针越短需要的温度越低。杂交一般依赖于变性 DNA 在低于其解链温度的环境中存在互补链时重退火的能力。探针

与可杂交序列之间所需的同源性程度越高,可使用的相对温度越高。结果,随着相对温度越高则倾向于使得反应条件更严格,而温度越低则严格程度越低。对于杂交反应更详细的情况和解释参见, Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)。

- 5 本文定义的“严格条件”或“高度严格条件”可通过下列条件确定: (1) 采用低离子强度和高温度洗涤,例如 50℃, 0.015M 氯化钠/0.0015M 柠檬酸钠/0.1%十二烷基磺酸钠; (2)杂交期间采用诸如甲酰胺等变性剂,例如, 50 % (v/v) 甲酰胺与 0.1 % 牛血清白蛋白/0.1% Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯烷酮/50mM 磷酸钠缓冲液, pH 6.5, 含 750 mM 氯化钠, 75 mM 柠檬酸钠, 42℃, 或(3)
- 10 采用 42℃, 50%甲酰胺, 5 x SSC (0.75M NaCl, 0.075M 柠檬酸钠), 50 mM 磷酸钠(pH 6.8), 0.1%焦磷酸钠, 5 x Denhardt's 溶液, 超声处理的鲑精 DNA (50µg/ml), 0.1% SDS, 和 10%葡聚糖硫酸酯, 在 42℃的 0.2 x SSC(氯化钠/柠檬酸钠)和 55℃的 50%甲酰胺中洗涤,接着在 55℃含有 EDTA 的 0.1 x SSC 中进行高度严格洗涤。
- 15 “中度严格条件”可按 Sambrook 等, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 所述确定, 且包括使用比上文所述严格程度更低的洗涤溶液和杂交条件(例如, 温度, 离子强度和% SDS)。中度严格条件的例子是在含有: 20%甲酰胺, 5 x SSC(150mM NaCl, 15 mM 柠檬酸三钠), 50 mM 磷酸钠(pH 7.6), 5 x Denhardt's 溶液, 10%葡聚糖硫酸酯, 和 20mg/ml 变性剪切的鲑精 DNA 中 37℃温育过夜, 接着在大约
- 20 37-50℃在 1 x SSC 中洗膜。本领域的技术人员将认识到如何调节温度, 离子强度等以适应诸如探针长度等因素的需要。

- 25 本文使用的术语“表位标记的”是指含有与“标记多肽”融合的 Angptl3 多肽的嵌合多肽。标记多肽具有足够的残基以提供可对其产生抗体的表位, 而且它足够短使其不能干扰与它融合的多肽的活性。标记多肽还优选是相当特异的, 以便其抗体基本上不与其它表位交叉反应。合适的标记多肽一般具有至少 6 个氨基酸残基且通常在大约 8 到 50 个氨基酸残基之间(优选在大约 10 到 20 个氨基酸残基之间)。

- 30 本文关于 Angptl3 分子的术语“生物学活性”和“生物学上有活性的”是指分子特异性结合并调节由天然 $\alpha v \beta 3$ 整合蛋白受体介导的诸如血管内皮细胞粘着和/或迁移等细胞反应的能力。在本文上下文中, 术语“调节”包

括促进和抑制，因此，本发明的(天然和变异体)Angptl3 分子包括天然 $\alpha\text{v}\beta 3$ 整联蛋白受体的激动剂和拮抗剂。本文的 Angptl3 配体的优选生物学活性包括血管形成(血管生成)的促进或抑制，且具体地说，涉及肝脏再生期间的血管形成过程。

5 术语“激动剂”用于指本发明的天然 Angptl3 分子的肽和非肽类似物，和特异性结合该天然 Angptl3 分子的抗体，前提是它们具有通过天然 Angptl3 受体($\alpha\text{v}\beta 3$)传导信号的能力。换句话说，术语“激动剂”在 Angptl3 受体($\alpha\text{v}\beta 3$)的生物学作用上下文中定义。优选的激动剂具有上文限定的天然 Angptl3 的优选生物学活性，例如促进血管形成(血管生成)，例如在肝脏再生期间。

10 术语“拮抗剂”用于指天然 Angptl3 分子的肽和非肽类似物，以及抗体，前提是它们具有抑制 Angptl3 的生物学功能的能力，而不论它们是否具有结合 Angptl3 或其受体 $\alpha\text{v}\beta 3$ 的能力。因此，具有结合 Angptl3 或其受体的能力的拮抗剂包括抗-Angptl3 和抗- $\alpha\text{v}\beta 3$ 的抗体。优选的拮抗剂是血管内皮细胞粘着和/或迁移的抑制剂，且特别是血管生成，具体来说与恶性肿瘤生长，
15 肝脏的炎症性疾病或心脏病相关的血管生成的抑制剂。

本文使用的“肿瘤”是指不论是恶性还是良性的所有赘生性细胞生长和增殖，以及所有前癌性和癌性的细胞和组织。

术语“癌症”和“癌性”是指或者描述哺乳动物中一般特征在于细胞生长不受调控的生理学状态。癌症的例子包括，但不限于，癌，淋巴瘤，
20 母细胞瘤，肉瘤，和白血病。癌症的更具体的例子包括乳腺癌，前列腺癌，结肠癌，鳞状细胞癌，小细胞肺癌，非小细胞肺癌，胃肠癌，胰腺癌，成胶质细胞瘤，宫颈癌，卵巢癌，肝脏癌症，膀胱癌，肝细胞瘤，结肠直肠癌，子宫内膜癌，唾液腺癌，肾癌，外阴癌，甲状腺癌，肝癌和各种类型的头和颈癌症。

25 “治疗”是指治疗性处理和预防性或防止性措施，其中的目的是预防或缓解(减轻)目标病理状况或病症。需要治疗的情况包括已经患有该病症以及倾向于患有该病症或者需要预防该病症的情况。在肿瘤(例如，癌症)治疗中，治疗剂可直接减弱肿瘤细胞的病理学，或者导致肿瘤细胞更容易被诸如放射和/或化疗等其它治疗剂治疗。

癌症的“病理学”包括危害患者健康的所有现象。它包括，但不限于，异常或不能控制的细胞生长，转移，干扰相邻细胞的正常功能，以异常水平释放细胞因子或其它分泌产物，抑制或加重炎症反应或免疫反应，等。

“慢性”给药是指与急性方式相对的以连续方式施用药剂，以便在延长的时间期限内维持起始治疗效果(活性)。“间歇性”给药是指不是连续无中断地进行，而是具有周期性特性的治疗。

用于治疗目的的“哺乳动物”是指分类为哺乳动物的任何动物，包括人类，驯养动物和农场动物，以及动物园动物，竞技动物，或宠物动物，例如狗，猫，牛，马，绵羊，猪，山羊，兔等，优选的是，该哺乳动物是人类。

与一种或多种其它治疗剂“组合”的给药包括同时的(同时进行的)和以任何顺序连续的给药。

本文使用的“载体”包括对于以所用剂量和浓度与其接触的细胞或哺乳动物无毒的药用上可接受的载体，赋形剂，或稳定剂。通常生理学上可接受的载体是含水的 pH 缓冲溶液。生理学上可接受的载体的例子包括诸如磷酸盐，柠檬酸盐，和其它有机酸在内的缓冲液；包括抗坏血酸在内的抗氧化剂；低分子量(不超过 10 个残基)多肽；诸如血清白蛋白，明胶，或免疫球蛋白等蛋白质；诸如聚乙烯吡咯烷酮等亲水性多聚体；诸如甘氨酸，谷氨酰胺，天冬酰胺，精氨酸或赖氨酸等氨基酸；单糖，二糖，和包括葡萄糖，甘露糖，或糊精等其它糖类；诸如 EDTA 等螯合剂；诸如甘露醇或山梨醇等糖醇；诸如钠等成盐反离子；和/或诸如 TWEEN™，聚乙二醇(PEG)，和 PLURONICS™等非离子表面活性剂。

“脂质体”是用于给哺乳动物给药(例如 PRO10282 多肽或其抗体)的由各种类型的脂类，磷脂和/或表面活性剂组成的小泡。脂质体的成份通常以双层结构排列，类似于生物膜的脂类排列。

“小分子”本文定义为具有低于大约 500 道尔顿的分子量。

本文公开的 Angptl3 多肽的“有效量”是能够触发所需生物学反应的量。具体地说，Angptl3 多肽或其激动剂的“有效量”优选是能够调节通过 $\alpha v \beta 3$ Angptl3 受体介导的，诸如内皮细胞，例如血管内皮细胞的粘着和/或迁移等细胞反应的量。该术语包括能够引起血管生成，特别是与肝脏再生相关的血管生成的量。

例如, 当使用天然 Angptl3 多肽的拮抗剂时, 与肿瘤治疗有关的“治疗有效量”是指能够引起一种或多种下列效果的量: (1)一定程度地抑制肿瘤生长, 包括延缓和生长完全停止; (2)肿瘤细胞数减少; (3)肿瘤大小减小; (4)抑制(即, 减少, 延缓或完全停止)肿瘤细胞渗入外周器官; (5)抑制(即, 减少, 延缓或完全停止)转移; (6)增强抗肿瘤免疫反应, 其有可能但不是必需导致肿瘤的消退或排斥; 和/或(7)一定程度地缓解与该疾病相关的一种或多种症状。用于肿瘤治疗目的的 Angptl3 多肽拮抗剂的“治疗有效量”可凭经验并以常规方式测定。

“血管内皮生长因子”或“VEGF”是内皮细胞特异性促分裂原, 它显示出受低氧刺激且是肿瘤血管生成所必需的(Senger 等, *Cancer* 46: 5629-5632(1986); Kim 等, *Nature* 362: 841-844 (1993); Schweiki 等, *Nature* 359: 843-845(1992); Plate 等, *Nature* 359: 845-848(1992))。本文使用的该术语包括所有 VEGF 同种型, 包括, 但不限于人 VEGF121 和 VEGF165 同种型。

15 B. 人 Angptl3 的非人哺乳动物同系物

天然人 Angptl3 的分离在实施例 1 中描述, 且也在 PCT 公开号 WO 99/15654 中描述。Angptl3 DNA 还于 1997 年 9 月 18 日在美国典型培养物保藏中心(ATCC)保藏, 命名为 FLS139-DNA16451-1078, 指定的 ATCC 保藏号为 209283。

20 为了鉴定其它非人哺乳动物同系物, 或剪接体或其它天然存在的变异体, 可采用设计用于鉴定目的基因或由其编码的蛋白质的探针(例如抗人 Angptl3 序列的抗体或至少大约 20-80 个碱基的寡核苷酸)筛选文库。可使用标准程序, 例如按 Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(纽约:冷泉港实验室出版, 1989)所述用选定的探针筛选 cDNA 或基因组文库。

25 分离编码其它天然 Angptl3 多肽的基因的一个可供选择的方法是使用 PCR 方法(Sambrook 等, 出处同上; Dieffenbach 等, PCR Primer: A Laboratory Manual(冷泉港实验室出版, 1995))。

选择作为探针的寡核苷酸序列应当足够长且足够明确使得假阳性最小化。优选标记该寡核苷酸以便在与待筛选文库中的 DNA 杂交时可检测它。

30 标记的方法是本领域熟知的, 且包括使用诸如 ^{32}P -标记的 ATP 等放射性标

记,生物素标记或酶标记。包括中等严格和高度严格等杂交条件在 Sambrook 等, 出处同上中提供。

在该文库筛选方法中鉴定的序列可与在诸如 GenBank 的公共数据库或其它私有序列数据库中保存和得到的其它已知序列进行比较和序列对比。

- 5 使用本领域已知的方法并按本文所述可测定在该分子的限定区域内或在全长序列中的序列相同性(在氨基酸或者核苷酸水平上)。

- 通过使用本文首次公开的推定氨基酸序列,且如果需要,可使用在 Sambrook 等, 出处同上中描述的用于检测前体的常规引物延长方法,并处理没有被逆转录成 cDNA 的 mRNA 中间体,来筛选选定的 cDNA 或基因组文库,可获得具有蛋白质编码序列的核酸。
- 10

C. Angptl3 变异体

- 天然人 Angptl3 是本领域已知的,且在例如,1999 年 4 月 1 日公开的 PCT 公开号 WO 99/15654 中公开。在天然全长序列 Angptl3(SEQID NO: 2)中,或在本文所述 Angptl3 氨基酸序列的各种结构域中的变异可使用例如,
- 15 任一技术和在例如,美国专利号 5,364,934 中所述的保守和非保守突变的指导来产生。变异可以是对编码 Angptl3 多肽的一个或多个密码子进行的取代,缺失或插入,导致 Angptl3 的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 的天然序列相比被改变。任选该变异是在天然或变异体 Angptl3 序列的一个或多个结构域中至少一个氨基酸被任何其它氨基酸取代。通过比较 Angptl3 序列与同源
- 20 的已知蛋白质分子的序列,并使高度同源性区域中氨基酸序列改变的数目最小化,可找到关于确定哪一个氨基酸残基可插入,取代或缺失而对所需活性无不利影响的指导。氨基酸取代可以是一个氨基酸被具有相似结构和/或化学特性的另一氨基酸取代,例如亮氨酸被丝氨酸取代,即保守氨基酸取代的结果。插入或缺失可任选是在大约 1 到 5 个氨基酸的范围内。通过
- 25 在序列中系统地产生氨基酸的插入,缺失或取代并检测所得变异体是否具有由全长或成熟天然序列表现出的活性,可测定允许的变异。

- 因此,本文提供了 Angptl3 多肽的片断。例如,与全长天然蛋白质相比,该片断可以是在 N-末端或 C-末端被截短,或者可以是缺失了内部残基。一些片断缺失了对于 Angptl3 多肽的所需生物学活性不是必需的氨基酸残基。
- 30 实施例 5 中描述的 SEQ ID NO: 2 的天然人 Angptl3 的血纤蛋白原结构域的同源性模型,以及对 Angptl3 与内皮细胞结合的结构域的功能性分析,

可用于设计本文的 Angptl3 变异体。根据 Angptl3 的血纤蛋白原样结构域的模型结构，发现天然人 Angptl3 (SEQ ID NO: 2)的区域 P1: 氨基酸 281-293(SEQ ID NO: 14); P2:氨基酸 442-460(SEQ ID NO:15); 和 P3 氨基酸 415-430(SEQ ID NO: 17)与 $\alpha v\beta 3$ 结合相关。为了保留受体结合和通过受体激活和传导信号的能力，应基本上保留 P1, P2 和 P3 区，或者仅在这些区域进行保守取代。另一方面，为了设计 Angptl3 拮抗剂，必需在一个或多个这些区域内作出更有意义的氨基酸改变。通过图 5B 所示的带状图，和图 5C 所示的序列对比可进一步帮助 Angptl3 变异体的设计，其中亲水性和带电的残基以蓝色表示，芳香基和疏水性残基以橙色表示。

如上所述，在具体实施方案中，在本发明的 Angptl3 变异体制备中保守取代是有利的。该保守取代在表 1 中在优选取代的标题下表示。如果该取代导致生物学活性改变，那么可导入表 1 中命名为举例性取代的，或在下文有关氨基酸类型中进一步描述的更重大的改变并筛选其产物。

表 1

15

	<u>原始残基</u>	<u>举例性取代</u>	<u>优选取代</u>
	Ala (A)	val; leu; ile	val
	Arg (R)	lys; gln; asn	lys
	Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
20	Asp (D)	glu	glu
	Cys (C)	ser	ser
	Gln (Q)	asn	asn
	Glu (E)	asp	asp
	Gly (G)	pro; ala	ala
25	His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
	Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸	leu
	Leu (L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	ile
	Lys (K)	arg; gln; asn	arg
	Met (M)	leu; phe; ile	leu
30	Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
	Pro (P)	ala	ala

	Ser (S)	thr	thr
	Thr (T)	ser	ser
	Trp (W)	tyr; phe	tyr
	Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
5	Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; 正亮氨酸	leu

通过选择对于维持(a)取代区中多肽主链的结构, 例如折叠和螺旋构象, (b)在靶位点的分子的电荷或疏水性, 或(c)侧链的大小, 这几方面其效果显著不同的取代, 可实现对 Angptl3 变异体多肽的功能或免疫学相同性的重大修饰。天然存在的残基可根据共有的侧链特性分成几组:

- (1)疏水型: 正亮氨酸, met, ala, val, leu, ile;
- (2)中性亲水型: cys, ser, thr;
- (3)酸性: asp, glu;
- (4)碱性: asn, gln, his, lys, arg;
- 15 (5)影响链方向的残基: gly, pro; 和
- (6)芳香基: trp, tyr, phe.

非保守取代需要将一种类型中的成员更换成另一种类型。该取代的残基也可导入保守取代位点, 或者更优选的是导入剩下的(非保守的)位点。

使用诸如寡核苷酸介导的(定点)诱变, 丙氨酸扫描, 和 PCR 诱变等本领域已知的方法可作出该变异。可对克隆的 DNA 进行定点诱变(Carter 等, Nucl. Acids Res., 13: 4331(1986); Zoller 等, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)), 盒式诱变[Wells 等, Gene, 34: 315 (1985)], 限制性选择诱变(Wells 等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986))或其它已知技术, 以产生 Angptl3 变异体 DNA。

25 通过许多常规技术中的任一种可制备 Angptl3 片断。所需的肽片断可以是化学合成的。一个可供选择的方法包括通过酶消化, 例如, 通过用已知在由特定氨基酸残基限定的位点裂解蛋白质的酶处理该蛋白质, 或者通过用合适的限制性酶消化 DNA 并分离所需的片断来产生 Angptl3 片断。还有另一合适的技术包含通过聚合酶链式反应(PCR)分离和扩增编码所需多肽

30 片断的 DNA 片断。在该 PCR 中的 5'和 3'引物可采用限定该 DNA 片断所需

末端的寡核苷酸。优选的是, Angptl3 多肽片断与 SEQ ID NO: 2 的天然 Angptl3 共有至少一种生物学和/或免疫学活性。

也可采用扫描氨基酸分析沿连续序列鉴定一个或多个氨基酸。其中优选的扫描氨基酸是相对较小的中性氨基酸。这类氨基酸包括丙氨酸, 甘氨酸, 丝氨酸, 和半胱氨酸。一般来说丙氨酸是该组中优选的扫描氨基酸, 因为它消除了 β -碳之外的侧链且改变变异体主链构象的可能性较小 (Cunningham 和 Wells, Science, 244: 1081-1085(1989))。丙氨酸通常优选的另一原因是它是最常见的氨基酸。另外, 在包埋的和暴露的位置都经常发现它 (Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N. Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976))。如果丙氨酸取代不能产生足够量的变异体, 可使用同功能(isoteric)的氨基酸。

制备 Angptl3 变异体, 天然和变异体 Angptl3 多肽的共价修饰, 与 Angptl3(包括变异体)特异性结合的抗体, 和免疫粘附素的更详细的情况在例如, WO 99/15654 中提供。

15 D. Angptl3 多肽的用途

如下文实施例中所述, 对成人组织中 Angptl3 的表达分析证实了肝脏特异性表达以及在疾病, 肝硬化中或中毒性肝脏损伤后的肝细胞中强烈上调。另外, 体内施用 Angptl3 导致血管透性增加和对肝脏损伤的短期保护效应, 但是 Angptl3 的延长表达与肝脏损伤相关。另外, 在体内的大鼠角膜试验中检测时 Angptl3 诱导血管生成。在最后一试验中 Angptl3 对血管生长的强烈诱导结合在病变肝脏样品中检测到的显著表达, 有力地表明该因子在肝脏再生期间血管生成过程的调节中起重要作用。

因此, 据信 Angptl3 和 Angptl3 激动剂可用于治疗, 预防和/或鉴定存在急性肝脏疾病危险的受试者和诱导急性肝脏损伤后的肝脏再生和/或组织中的血管生成。急性肝脏损伤可能与炎症性肝脏疾病相关, 该疾病是例如慢性, 酒精性或病毒性肝炎, 对肝脏的化学或机械损伤, 由于慢性肝炎, 肝硬化, 原发性或转移性肝脏癌症或胆囊癌症引起的肝切除。组织中的血管生成可能与由于感染或自身免疫病变, 机械或化学损伤或癌症或转移癌而导致损伤的心脏组织或肝脏组织相关。

30 因此, 据信 Angptl3 拮抗剂可用于治疗和/或预防以 Angptl3 过量表达为特征的组织损伤, 慢性肝脏疾病, 和/或以 Angptl3 表达升高为特征的心脏

- 疾病。以 Angptl3 过量表达为特征的组织损伤包括与炎症相关的肝脏组织损伤，不限于与慢性肝脏疾病相关的炎症，其病理涉及激活炎症细胞并募集到肝脏，而不论内在病因是感染或自身免疫性疾病，还是对肝脏的化学损伤，或者其它。因此，以 Angptl3 过量表达为特征的肝脏组织损伤包括肝硬化，例如酒精性肝硬化和原发胆汁性肝硬化(PBC)，肝脏纤维变性，慢性肝炎，例如慢性自身免疫性肝炎，慢性酒精性肝炎，和非酒精性脂肪肝炎(NASH)，病毒性肝炎甲，乙，丙，丁，戊和庚型，中毒代谢性肝脏损伤，脂肪肝，肝脏的局部缺血再灌注损伤，和脓毒病，和与肝脏肿瘤相关的肝脏损伤，不限于肝细胞癌，肝外胆管癌，胆管癌和肝脏的转移癌。心脏组织损伤与 Angptl3 表达升高或心脏疾病相关，其病理包括炎症性反应，或者在其形成中炎症是一种危险因素，且心脏组织损伤与 Angptl3 的表达升高相关，不限于冠状动脉疾病，心肌病，例如非特异性肥大和扩张性心肌病，心肌炎，充血性心力衰竭(CHF)，和心肌梗塞。其综述参见 Lawson 等, *Toxicol Sci* 54: 509-16 (2000)，出处同上。
- 15 另外，据信 Angptl3 拮抗剂可用于抑制不需要的组织血管透性增大。该组织可以是肝脏或心脏组织。血管透性增大可以是组织损伤后小血管透性的增大且可以在由于接触毒素引起的血管内皮坏死之后出现或者可以是与炎症相关，例如慢性炎症/对以 Angptl3 过量表达为特征的组织损伤的治疗和/或预防，慢性肝脏疾病，和/或以 Angptl3 表达升高为特征的心脏疾病。
- 20 另外，据信 Angptl3 拮抗剂可用于预防和/或治疗由过多消费酒精引起的慢性酒精性肝炎。酒精性肝炎可包括从仅有实验室试验异常作为疾病征兆的轻度肝炎，到伴有诸如黄疸(由胆红素滞留引起的黄皮肤)，肝性脑病变(由肝衰竭引起的神经机能障碍)，腹水(腹部的液体积累)，出血性食管静脉曲张(食管中静脉曲张)，异常凝血和昏迷等并发症的严重肝脏机能障碍。
- 25 本发明还包括影响肝脏的 T-细胞介导的疾病。T 细胞导致的自身免疫损伤由细胞毒性 T 细胞直接介导且由 T 辅助细胞间接介导。本文将要治疗的自身免疫疾病包括，但不限于，自身免疫肝炎和原发胆汁性肝硬化。自身免疫性肝炎(也称为自身免疫性慢性活动性肝炎)是一种慢性疾病，其特征在于持续的肝细胞坏死和炎症，如果不进行治疗，一般发展成肝硬化和最终的肝衰竭。原发胆汁性肝硬化是肝内或胆汁系统的自身免疫疾病，与胆汁
- 30

分泌受损相关。据信自身免疫抗体和 T 细胞介导了与该疾病相关的肝脏组织损伤。

Angptl3 拮抗剂也可用于治疗肝脏的局部缺血再灌注损伤。如前所述，当身体一个区域的血流暂时停止(局部缺血)且然后再形成血流(再灌注)时一般发生局部缺血再灌注损伤。该损伤可在供血中断的身体部位发生，或者可在局部缺血期间供血充分的部位发生。肝脏的局部缺血再灌注损伤可由例如，肝脏和胆手术切除术等各种内在病因引起，且在临床上表现为包括急性肝细胞损伤和坏死在内的肝脏机能障碍等并发症。

Angptl3 拮抗剂包括，但不限于，抑制靶基因产物的表达和/或活性的抗体，小的有机分子和无机分子，肽，磷肽，反义分子和核酶分子，三链螺旋分子，等。

例如，反义 RNA 和 RNA 分子通过与被靶向的 mRNA 杂交而直接阻断 mRNA 的翻译并阻止蛋白质翻译。当使用反义 DNA 时，优选来自例如，靶基因核苷酸序列大约-10 到+10 位置之间的翻译起始位点的寡聚脱氧核糖核苷酸。

核酶是能够催化 RNA 特异性裂解的酶性 RNA 分子。核酶通过与互补靶 RNA 的序列特异性杂交，随后进行核酸内切性裂解而起作用。潜在 RNA 靶内的特异性核酶裂解位点可通过已知技术鉴定。更详细的情况参见，例如 Rossi, Current Biology, 4: 469-471(1994)，和 PCT 公开号 WO 97/33551(1997 年 9 月 18 日公开)。

在三链螺旋形成中用于抑制转录的核酸分子应是单链的且由脱氧核苷酸组成。可设计这些寡核苷酸的碱基组成以便促进通过 Hoogsteen 碱基配对规律形成三链螺旋，该碱基组成一般需要在双螺旋的一条链上有相当长的嘌呤或嘧啶链。更详细的情况参见，例如，PCT 公开号 WO 97/33551，出处同上。

当本文的 Angptl3 多肽(包括其激动剂和拮抗剂)用作治疗剂时，可按照已知方法配制它们以制备药用上有用的组合物，其中 Angptl3 多肽在混合物中与药用上可接受的载体赋形剂混合。通过将具有所需纯度的活性成份与任选的生理学上可接受的载体，赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. Ed. (1980))以冻干配制品或水溶液的形式混合，可制备用于贮存的治疗性配制品。可接受的载体，赋形剂，或稳定剂在所

用剂量和浓度下对接受者无毒性，且包括诸如磷酸盐，柠檬酸盐和其它有机酸等缓冲液；包括抗坏血酸等抗氧化剂；低分子量(不超过大约 10 个残基)多肽；诸如血清白蛋白，明胶，或免疫球蛋白等蛋白质；诸如聚乙烯吡咯烷酮等亲水性多聚体；诸如甘氨酸，谷氨酰胺，天冬酰胺，精氨酸或赖氨酸等氨基酸；单糖，二糖，和包括葡萄糖，甘露糖，或糊精在内的其它糖类；诸如 EDTA 等螯合剂；诸如甘露醇或山梨醇等糖醇；诸如钠等成盐反离子；和/或诸如 TWEEN™，PLURONICS™ 或 PEG 等非离子表面活性剂。

用于体内给药的配制品必须是无菌的。在冻干和重建之前或之后通过除菌滤膜过滤可容易地实现无菌。

10 本文的治疗性组合物一般放入具有无菌入口的容器中，例如具有通过皮下注射针头可刺入的塞子的静脉内用溶液袋或小瓶。

给药途径可按已知的方法，例如通过静脉内，腹膜内，脑内，肌肉内，眼内，动脉内或病灶内途径注射或输注，局部给药，或通过持续释放系统给药。

15 本发明的药用组合物的剂量和所需药物浓度可根据预想的具体用途变化。确定合适的剂量或给药途径是普通医师技术内熟知的。动物实验可为测定人类治疗的有效量提供可靠的指导。按照 Mordenti, J.和 Chappell, W. “The use of interspecies scaling in toxicokinetics”，见 Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi 等，编，Pergamon Press, New York 1989，第 42-96
20 页制订的原则可进行有效量的种间比例缩放。

当体内施用 Angptl3 多肽或其激动剂或拮抗剂时，正常的剂量可根据给药途径从每天大约 10 ng/kg 到高达 100 mg/kg 哺乳动物体重或更多，优选大约 1μg/kg/天到 10 mg/kg/天。关于具体剂量和给药方法的指导在文献中提供，参见，例如，美国专利号 4,657,760；5,206,344；或 5,225,212。可预期不同的
25 的配制品对不同的治疗化合物和不同的疾病有效，例如，针对一种器官或组织的给药必须以不同于另一种器官或组织的方式给药。

例如，在测定治疗任一具体肝脏疾病的有效量之前，通过对病人的常规临床和实验室评估确定该疾病的严重性。通过随后以诸如每周，两周或一个月的定期间隔进行临床和实验室肝功评估来评估治疗效果。

30 如果在释放特征适合于治疗需要施用 Angptl3 多肽的任何疾病或病症的配制品中需要 Angptl3 多肽的持续释放给药时，可考虑使 Angptl3 多肽微

- 囊化。用人生长激素(rhGH), 干扰素- γ (rhIFN- γ), 白介素-2, 和 MN rgp120 已经成功地使用于持续释放的重组蛋白微囊化。Johnson 等, Nat. Med., 2:795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27: 1221-1223(1993); Hora 等, Bio/Technology.8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single
- 5 Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems", 见 Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach, Powell 和 Newman 编 (Plenum Press: New York, 1995), 第 439-462 页; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; 和美国专利号 5,654,010。

- 由于聚-乳-共乙醇酸(poly-lactic-coglycolic acid, PLGA)多聚体的生物相
- 10 容性和广泛的可生物降解特性, 已经使用它开发了这些蛋白质的持续释放剂型。PLGA 的降解产物, 即乳酸和乙醇酸可在人体内迅速清除。另外, 可根据该多聚体的分子量和组成将其可降解性从几个月调节到几年。Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", 参见: M. Chasin 和 R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery
- 15 Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), 第 1-41 页。

将 Angptl3 治疗剂与其它治疗方案结合是可取的。例如, 用 Angptl3 多肽或其激动剂进行的治疗可与诸如血管内皮细胞生长因子(VEGF)或成纤维细胞生长因子(FGF)等其它血管生成因子的给药结合。

E. 产品

- 20 在本发明的另一实施方案中, 提供了含有用于诊断或治疗上述疾病的物质的产品。该产品包含容器和标签。合适的容器包括, 例如, 瓶子, 小瓶, 注射器和试管。容器可由诸如玻璃或塑料等各种材料制成。该容器内含有诊断或治疗该症状有效的组合物且可以具有无菌入口(例如, 该容器可以是具有通过皮下注射针头可刺入的塞子的静脉内用溶液袋或小瓶)。该组
- 25 合物中的活性试剂通常是能够干扰本文鉴定的基因产物的活性的抗肿瘤剂, 例如抗体。容器上的或者与其相连的标签指示该组合物用于诊断或治疗选定的症状。该产品还可包含第二个容器, 该容器中含有药用上可接受的缓冲液, 例如磷酸盐缓冲液, 林格(Ringer's)溶液和葡萄糖溶液。它还包含从商业和用户角度需要的其它材料, 包括其它缓冲液, 稀释剂, 过滤器,
- 30 针头, 注射器和含有使用说明的包装插图。

F. 诊断用途

由于在炎症性肝脏疾病中 Angptl3 上调,其相对于正常组织的过量表达可用作该疾病的诊断标记。

基因扩增和/或表达可在样品中直接测量,例如,根据本文提供的序列使用合适标记的探针进行常规 Southern 印迹, Northern 印迹以定量 mRNA 的转录(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 5201-5205 (1980)), 斑点印迹(DNA 分析), 或原位杂交。另外,可采用能识别包括 DNA 双螺旋, RNA 双螺旋, 和 DNA-RNA 杂交双螺旋或 DNA-蛋白质双螺旋在内的特异性双螺旋的抗体。而抗体可以是标记的, 在双螺旋结合到表面上的情况下可进行试验, 以便通过在表面形成双螺旋来检测与该双螺旋结合的抗体的存在。

例如,可使用抗体,包括抗体片段定性或定量检测 Angptl3 蛋白的表达。如上所述, 抗体优选携带可检测的标记, 例如荧光标记, 且可通过光学显微镜检, 流式细胞术, 荧光测定法, 或本领域已知的其它技术监测其结合。如果扩增的基因编码细胞表面蛋白, 例如生长因子, 那么这些技术特别合适。所述结合试验基本上按上文第 5 节所述进行。

与 Angptl3 蛋白质结合的抗体的原位检测可通过例如, 免疫荧光法或免疫电子显微镜检来进行。为此目的, 可从患者取出组织样品, 对其应用标记抗体, 优选通过将该抗体覆盖在生物学样品上来应用。该方法还允许测定检查的组织中标记基因产物的分布。对于本领域的技术人员而言显而易见的是用于原位检测的各种组织学方法是容易得到的。

用于定量差异性基因表达的一种最灵敏且最灵活的定量方法是 RT-PCR, 它可用于比较在不同样品群体, 在正常和肿瘤组织, 在接受或未接受药物治疗的样品中的 mRNA 水平, 从而鉴定基因表达方式, 区分密切相关的 mRNAs, 和分析 RNA 结构。

第一步是从靶样品分离 mRNA。该起始材料一般是从病变组织和相应的正常组织分别分离的总 RNA。因此, 可从例如, 冷冻的或保存的石蜡包埋的和固定的(例如福尔马林固定的)病变组织样品提取 mRNA, 用于与相同类型的正常组织进行比较。mRNA 的提取方法是本领域熟知的且在包括 Ausubel 等, Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley 和 Sons (1997) 的分子生物学标准教科书中的公开。从石蜡包埋的组织提取 RNA 的方法在例如, Rupp 和 Locker, *Lab Invest* 56: A67 (1987), 和 De Andres 等, *BioTechniques* 18: 42044 (1995)中公开。具体地说, 可使用来自诸如 Qiagen

等厂商的纯化试剂盒,缓冲液组和蛋白酶按照产品说明书进行RNA的分离。例如,可使用 Qiagen Rneasy 微型柱从培养物的细胞中分离总 RNA。使用 RNA Stat-60(Tel-Test)可从组织样品分离总 RNA。

由于 RNA 不能用作 PCR 的模板,因此通过 RT-PCR 进行差异性基因表达分析的第一步是将 RNA 模板逆转录成 cDNA,接着在 PCR 反应中进行其指数扩增。两种最常用的逆转录酶是禽成髓细胞瘤病毒逆转录酶(AMV-RT)和 Moloney 鼠白血病病毒逆转录酶(MMLV-RT)。逆转录步骤一般根据情况和表达目标的分布使用特异性引物,随机六聚体,或寡聚-dT 引物引发。例如,提取的 RNA 可以使用 GeneAmp RNA PCR 试剂盒(Perkin Elmer, CA, USA),按照产品说明书进行逆转录。然后产生的 cDNA 可用作随后的 PCR 反应的模板。

尽管 PCR 步骤可使用各种热稳定性 DNA-依赖型 DNA 聚合酶,但是一般采用 Taq DNA 聚合酶,它具有 5'-3'核酸酶活性而缺乏 3'-5'核酸内切酶活性。因此,TaqMan PCR 一般使用 Taq 或 Tth 聚合酶的 5'-核酸酶活性水解结合到其靶扩增子上的杂交探针,但是也可使用具有同等 5'核酸酶活性的任何酶。可使用两个寡核苷酸引物产生 PCR 反应典型的扩增子。可以设计第三种寡核苷酸或探针来检测位于两个 PCR 引物之间的核苷酸序列。该探针不能用 Taq DNA 聚合酶延伸,且已用报告荧光染料和猝灭荧光染料进行了标记。当两种染料在探针上紧密靠近时,来自报告染料的任何激光诱导的发射都被猝灭染料猝灭。在扩增反应期间,Taq DNA 聚合酶以模板依赖型方式裂解该探针。所得的探针片断在溶液中分散,来自释放的报告染料的信号不受第二荧光团的猝灭影响。每合成一个新分子就释放一分子的报告染料,检测未猝灭的报告染料提供了定量解释该数据的基础。

TaqMan RT-PCR 可使用商业上可得到的设备,例如,ABI PRIZM 7700™ Sequence Detection System™(Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA),或 Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)进行。在一个优选的实施方案中,5'核酸酶方法在诸如 ABI PRIZM 7700™ Sequence Detection System™等实时定量 PCR 装置上运行。该系统由热循环仪,激光器,电荷耦合装置(charge-coupled device (CCD)),照相机和计算机组成。该系统在热循环仪上以 96-孔形式扩增样品。扩增期间,通过所有 96

孔的光纤电缆实时收集激光诱导的荧光信号，并在 CCD 中检测。该系统包括运行该仪器和分析该数据的软件。

5' -核酸酶测定数据开始表示为 C_t ，或临界循环。如上所述，每个循环期间记录荧光值，它代表在扩增反应中到该时间点扩增的产物量。荧光信号首次记录为统计学上显著的时间点是临界循环(C_t)。当比较病变组织的细胞与正常细胞的 RNA 表达时，用 ΔC_t 值作为核酸样品中特定靶序列的起始拷贝相对数的度量值。

为了最小化误差和样品与样品间差异的影响，通常使用内部标准进行 RT-PCR。理想的内部标准在不同组织间以恒定水平表达，且不受实验处理的影响。最常用于标准化基因表达模型的 RNAs 是管家基因甘油醛-3-磷酸-脱氢酶(GAPDH)和 β -肌动蛋白的 mRNAs。

使用微阵列技术也可鉴定或证实差异性基因表达。在该方法中，将目的核苷酸序列涂板，或排列在芯片基质上。然后将排列的序列与来自目的细胞或组织的特异性 DNA 探针杂交。

15 在微阵列技术的一个具体实施方案中，将经过 PCR 扩增的 cDNA 克隆的插入片断以密集的阵列应用在基片上。优选在基片应用至少 10,000 个核苷酸序列。每片芯片上固定 10,000 个单元，所得的微阵列基因适合于在严格条件下杂交。从目的组织提取 RNA，通过逆转录掺入含荧光的核苷酸，因此产生荧光标记的 cDNA 探针。使芯片上的标记 cDNA 探针与阵列上的
20 各 DNA 点特异性杂交。严格洗涤去掉非特异性结合的探针后，通过共焦激光显微镜扫描该芯片。定量各阵列单元的杂交以便评估相应的 mRNA 丰度。通过双色荧光的利用，分别标记的从两种 RNA 来源产生的 cDNA 探针与阵列逐对杂交。因此可同时测定相应于各具体基因的两种来源的转录子的相对丰度。微型化的杂交规模允许方便且迅速地评估大量基因的表达模式。
25 已表明这类方法具有检测每个细胞仅表达几个拷贝的那些稀有转录子所需的灵敏度，并且可重复检测在表达水平上至少大约 2 倍的差异(Schena 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(20): 106-49(1996))。核酸的杂交方法和微阵列技术是本领域熟知的。

下面的实施例仅为了说明性目的而提供，且并不打算以任何方式限制
30 本发明的范围。

本说明书引证的所有专利和参考文献以其整体在此引用以供参考。

实施例

实施例中提及的商业上可得到的试剂均按产品说明书使用，除非另有说明。在下面实施例和整个说明书中以 ATCC 保藏号鉴定的那些细胞的来源是美国典型培养物保藏中心，Manassas, VA。

5 实施例 1

Angptl3 的鉴定

在从 Clontech Laboratories, Inc. Palo Alto, CA USA, 获得产品目录号为 64018-1 的人胎儿肝脏 mRNA, 制备 cDNA 文库, 从中鉴定 Angptl3, 方法按照 “Instruction Manual: Superscript® Lambda System for cDNA Synthesis and
10 λ cloning”, 产品目录号 19643-014, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA 中所述。除非另有说明, 所有试剂也都从 Life Technologies 获得。整个方法总结为下列步骤: (1)第一链合成; (2)第二链合成; (3)添加衔接头; (4)酶消化; (5)凝胶分离 cDNA; (6)连接进载体; 和(7)转化。

第一链合成:

15 将 Not1 引物衔接头(Life Tech., 2μl, 0.5μg/μl)加入无菌的 1.5 ml 微量离心管中, 向管中加入 polyA+ mRNA(7μl, 5μg)。将反应管加热到 70℃ 5 分钟或足以使 mRNA 二级结构变性的时间。然后在冰上冷却反应并加入 5X 第一链缓冲液(Life Tech., 4μl), 0.1M DTT (2μl)和 10 mM dNTP 混合物(Life Tech., 1μl), 然后加热到 37℃ 2 分钟以平衡温度。然后加入 Superscript II®
20 逆转录酶(Life Tech., 5μl), 充分混合反应管并在 37℃ 温育 1 小时, 并通过放置在冰上来终止反应。反应物的最终浓度如下: 50 mM Tris-HCl (pH 8.3); 75 mM KCl; 3mMgCl₂; 10mM DTT; 各 500μM 的 dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP; 50μg/ml 的 Not1 引物-衔接头; 5μg(250μg/ml)mRNA; 50,000U/ml Superscript II® 逆转录酶。

25 第二链合成:

在冰上时, 向来自第一链合成的反应管中加入下列试剂, 充分混合反应物并使其在 16℃ 反应 2 小时, 注意不使温度超过 16℃: 蒸馏水(93μl); 5X 第二链缓冲液(30μl); dNTP 混合物(3μl); 10 U/μl 大肠杆菌 DNA 连接酶(1μl); 10U/μl 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I(4μl); 2 U/μl 大肠杆菌 RNase H (1μl)。
30 加入 10 U T4 DNA 聚合酶(2μl), 反应物在 16℃ 继续温育另一个 5 分钟。反应物的最终浓度如下: 25mM Tris-HCl (pH 7.5); 100 mM KCl; 5mM MgCl₂;

10mM (NH₄)₂SO₄; 0.15 mM β-NAD⁺; 各 250μM 的 dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 1.2 mM DTT; 65U/ml DNA 连接酶; 250U/ml DNA 聚合酶 I; 13 U/ml Rnase H。通过在冰上放置和通过加入 0.5M EDTA(10μl)来停止反应, 然后通过酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1, 150μl)提取。取出水相, 收集并稀释进 5M NaCl (15μl)和无水乙醇(-20℃, 400μl)中, 以 14,000xg 离心 2 分钟。小心分离上清与所得的 DNA 沉淀, 将沉淀重悬于 70%乙醇(0.5 ml)中并再次以 14,000xg 离心 2 分钟。再次去掉上清, 将沉淀在真空离心蒸发浓缩器(speedvac)中干燥。

添加衔接头

10 向来自上述第二链合成的 cDNA 沉淀中加入下列试剂, 轻轻混合反应物并在 16℃温育 16 小时: 蒸馏水(25μl); 5X T4 DNA 连接酶缓冲液(10μl); Sal I 衔接头(10μl); T4 DNA 连接酶(5μl)。反应物的最终组成如下: 50 mM Tris-HCl (pH 7.6); 10 mM MgCl₂; 1 mM ATP; 5% (w/v) PEG 8000; 1 mM DTT; 200μg/ml Sal I 衔接头; 100U/ml T4 DNA 连接酶。通过酚: 氯仿: 异戊醇
15 (25:24:1, 50μl)提取反应物, 取出水相, 收集并稀释进 5M NaCl (8μl)和无水乙醇(-20℃, 250μl)中。然后以 14,000xg 离心 20 分钟, 弃去上清并将沉淀重悬于 0.5ml 70%乙醇中, 再次以 14,000xg 离心 2 分钟。随后去掉上清且所得的沉淀在真空离心蒸发浓缩器中干燥并继续进入下一步操作。

酶消化:

20 向来自前一段用 Sal I 衔接头制备的 cDNA 中加入下列试剂且混合物在 37℃温育 2 小时: DEPC-处理的水(41μl); Not I 限制性缓冲液(REACT, Life Tech., 5μl), Not I(4μl)。该反应物的最终组成如下: 50 mM Tris-HCl(pH 8.0); 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 1,200 U/ml Not I。

cDNA 的凝胶分离:

25 cDNA 在 5%丙烯酰胺凝胶上通过丙烯酰胺凝胶电泳按大小进行分级分离, 从凝胶上切下通过与分子量标记比较测定的大于 1Kb 的任何片断。然后将 cDNA 从凝胶上电洗脱进 0.1xTBE 缓冲液(200μl)中, 用酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1, 200μl)进行提取。取出水相, 收集并以 14,000xg 离心 20 分钟。分离上清与 DNA 沉淀, 将该沉淀重悬于 70%乙醇(0.5ml)中并再次以
30 14,000xg 离心 2 分钟。再次弃去上清, 沉淀在真空离心蒸发浓缩器中干燥并重悬于蒸馏水(15μl)中。

将 cDNA 连接进 pRK5 载体:

将下列试剂加在一起并在 16℃ 温育 16 小时: 5 X T4 连接酶缓冲液(3μl); pRK5, XhoI, NotI 消化的载体, 0.5μg, 1μl); 从前一段制备的 cDNA(5μl) 和蒸馏水(6μl)。随后, 再加入蒸馏水(70μl)和 10mg/ml tRNA (0.1μl)并通过酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1)提取整个反应物。取出水相, 收集并稀释进 5M NaCl (10μl)和无水乙醇(-20℃, 250μl)中。然后以 14,000xg 离心 20 分钟。倾析, 将沉淀重悬于 70%乙醇(0.5ml)中, 再以 14,000xg 离心 2 分钟。然后将 DNA 沉淀在真空离心蒸发浓缩器中干燥并洗脱进蒸馏水(3μl)中用于下一步操作。

10 将文库连接物转化进细菌:

将前面制备的连接的 cDNA/pRK5 载体 DNA 在冰上冷却, 向其中加入电感受态的 DH10B 细菌(Life Tech., 20μl)。然后按厂商建议对细菌载体混合物进行电穿孔。随后加入 SOC 培养基(1ml), 混合物在 37℃ 温育 30 分钟。然后将转化子平板接种到 20 个标准 150 mm 的含有氨苄青霉素的 LB 平板上并培养 16 小时(37℃)以允许菌落生长。然后刮下阳性菌落并使用标准 CsCl-梯度方法从细菌沉淀中分离 DNA。例如, Ausubel 等, 2.3.1。

Angptl3 的鉴定

Angptl3 可通过本领域已知的任何标准方法, 包括 Klein R. D.等, (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93,7108-7113 和 Jacobs(1996 年 7 月 16 日公开的美国专利号 5,563,637)报道的方法, 在人胎儿肝脏文库中鉴定。根据 Klein 等和 Jacobs 的方法, 编码新分泌的和膜结合的哺乳动物蛋白质的 cDNAs, 可通过检测其分泌前导序列来鉴定, 其中使用酵母转化酶基因作为报道系统。转化酶催化蔗糖裂解为葡萄糖和果糖以及棉子糖裂解为蔗糖和蜜二糖。转化酶的分泌形式是酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的蔗糖利用所必需的, 因此不能产生分泌型转化酶的酵母细胞在含有蔗糖作为唯一碳源和能源的培养基上难以生长。Klein R. D.出处同上和 Jacobs,出处同上都利用了哺乳动物信号序列能有功能地取代酵母转化酶的天然信号序列的已知能力。将哺乳动物 cDNA 文库连接到编码非分泌型酵母转化酶的 DNA 上, 分离已连接的 DNA, 并转化进不含转化酶基因的酵母细胞中。含有连接到哺乳动物信号序列上的非分泌型酵母转化酶基因的重组子, 可根据其在仅含有蔗糖或者仅含有棉子糖作为碳源的培养基上生长的能力来鉴定。然后使用鉴定的哺

乳动物信号序列, 筛选第二个全长 cDNA 文库, 以分离编码相应的分泌蛋白的全长克隆。例如, 克隆可通过表达克隆或者通过本领域已知的任何其它技术进行。

用于鉴定 Angptl3 的引物如下:

5 OLI114 CCACGTTGGCTTGAAATTGA (SEQ ID NO : 3)

OLI115 CCTCCAGAATTGATCAAGACAATTCATGATTTGATTCTCTA
TCTCCAGAG (SEQID NO: 4)

OLI116 TCGTCTAACATAGCAAATC (SEQ ID NO :5)

Angptl3 的核苷酸序列在图 1(SEQ. ID. NO: 1)中显示, 而其氨基酸序列
10 在图 2A 和 2B (SEQ. ID. NO: 2)中显示。Angptl3 含有与 TIE-2 受体的两个已知的人类配体(h-TE2L1 和 h-TIE2L2)以及人血管生成素 1, 2 和 4(ANG1, ANG2, ANG4, 图 5C)表现出高度序列同源性的血纤蛋白原样结构域(图 3A, 和图 5A-C)。

Angptl3 的一个克隆按布达佩斯条约于 1997 年 9 月 18 日在美国典型培
15 养物保藏中心(ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 保藏, 指定的保藏号为 ATCC209281。

实施例 2

Angptl3 的表达

将人 Angptl3 克隆进真核表达载体 pRK5tkNEO 和杆状病毒载体 pHIF,
20 即一种从 PharMingen, CA 购买的 pVL1393 的衍生物中。将质粒 DNA 与 BaculoGold™ DNA (PharMingen, CA)用 Lipofectin(GIBCO-BRL, MD)共转染进草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)(“Sf9”)细胞(ATCC CRL 1711)中。4 天后, 收获细胞, 使用 500μl 的上清感染 2×10^6 个 Sf9 细胞并扩增杆状病毒。扩增 72 小时后, 收获细胞并使用 10 ml 上清感染 7.5×10^5 个 H5 细胞/ml 40
25 小时。收获并通过 0.45μm 醋酸纤维素滤膜过滤后, 纯化上清。在大规模瞬时转染实验中小鼠 Angptl3 在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中过量表达。使用免疫亲和色谱法从生长于悬液中并被杆状病毒感染的昆虫细胞上清中纯化人 Angptl3。通过将抗-gD Fab 偶连到 glycophasse-CPG(可控制孔径的玻璃)上产生色谱柱。将澄清的($1000 \times g$ 离心 5 分钟然后 0.2μm 过滤)培养基上样并在 4
30 °C 过夜。用 PBS 洗涤柱子直到流出液在 280nm 下的吸光度回到基线, 用 pH 3.0 的 50 mM 柠檬酸钠洗脱。洗脱蛋白在 1 mM HCl 中透析(Spectra-pore;

MWCO 10,000)并在-70℃冷冻。将含有小鼠 Angptl3 的瞬时表达的 CHO 培养物澄清并使用 10,000 MWCO 膜(Amicon)浓缩。将该体积按前面对人 Angptl3 所述转移到与 glycopase-CPG 柱偶连的抗-gD Fab 上。洗脱合并液用 10 mM 乙酸钠(pH 5.0)稀释成导电率<5 mS 并上样到 S Sepharose Fast Flow(Amersham Pharmacia Biotech, NJ)上。用 10 mM 乙酸钠 pH 5.0 洗涤柱子,直到流出液在 280nm 的吸光度回到基线,用在 10 mM 乙酸钠 pH 5.0 中的 20 倍柱体积梯度 0-0.5M NaCl 洗脱。使用反向 C-4 色谱法(Vydac, CA)进一步纯化含有小鼠 Angptl3 的在 0.45 M-0.5 M NaCl 处洗脱的级分。所述级分用 0.1%三氟乙酸梯度酸化。将以 67%乙腈洗脱的小鼠 mAngptl3 冻干并在-70℃贮存。纯化蛋白的鉴定通过 N-末端序列分析证实。使用商品试剂盒证实 LPS 浓度且对于所有人或鼠 Angptl3 制品测定为<5 Eu/ml。

实施例 3

制备结合 Angptl3 的抗体

本实施例说明了可特异性地结合 Angptl3 的单克隆抗体的制备。

产生单克隆抗体的技术是本领域已知的且在例如, Goding, 出处同上中描述。可采用的免疫原包括本发明的纯化的配体同系物, 含有该配体同系物的融合蛋白, 和在细胞表面表达重组配体同系物的细胞。免疫原的选择可由本领域的技术人员不需过多的实验来作出。

用在完全弗氏佐剂中乳化的免疫原通过以 1-100 微克的含量皮下或腹腔内注射来免疫诸如 Balb/c 等小鼠。作为选择, 免疫原可在 MPL-TDM 佐剂(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT)中乳化并注射进动物后爪垫。然后免疫的小鼠在 10 到 12 天后用在选定佐剂中乳化的额外(additional)免疫原加强免疫。此后, 在几周内也可用额外的免疫注射对小鼠进行加强免疫。通过眼眶后取血从小鼠定期获得血清样品用于进行 ELISA 试验以检测该抗体。

检测到合适的抗体滴度后, 用给定配体的最终静脉内注射液注射抗体“阳性”的动物。3 至 4 天后, 处死小鼠并收获脾细胞。然后将脾细胞与鼠骨髓瘤细胞系, 如可从 ATCC, No. CRL 1597 得到的 P3X63AgU.1, 融合(使用 35%的聚乙二醇)。该融合产生杂交瘤细胞, 随后可将其平板接种在含有 HAT(次黄嘌呤, 氨基蝶呤, 和胸腺嘧啶核苷)培养基的 96 孔组织培养板上以抑制非融合细胞, 骨髓瘤杂交体, 和脾细胞杂交体的增殖。

可在 ELISA 中筛选杂交瘤细胞对抗原的反应性。分泌抗本文 TIE 配体同系物的所需单克隆抗体的“阳性”杂交瘤细胞可通过本领域熟知的技术测定。

- 5 可将阳性杂交瘤细胞腹膜内注射进同系 Balb/c 小鼠中以产生含有抗-TIE-配体的单克隆抗体的腹水。作为选择, 杂交瘤细胞可在组织培养瓶或转瓶中生长。产生在腹水中的单克隆抗体可使用硫酸铵沉淀, 接着通过凝胶排阻层析来纯化。作为选择, 可采用以抗体与蛋白质 A 或蛋白质 G 的结合为基础的亲和层析。

实施例 4

10 内皮细胞的结合

血管生成素是分泌型因子, 它通过其 N-末端的血纤蛋白原(FBN)-样结构域与内皮细胞特异性酪氨酸激酶受体 Tie2 结合来调节血管生成。发现在该分泌型配体家族中存在的 C-末端卷曲螺旋结构域是配体寡聚反应所必需的(Procopio 等, J. Biol. Chem. 274: 30196-201 (1999))。

- 15 与血管生成素相似, Angptl3 是由 N-末端信号肽, 接着的一个卷曲螺旋结构域和一个 C-末端 FBN-样结构域组成的分泌型糖蛋白(图 3A)。

- 由于在 Angptl3 和血管生成素之间存在结构相似性, 试验了 Angptl3 在培养物中与表达 Tie2 受体的原代内皮细胞结合的能力。人微血管内皮细胞(HMVECs)从 Cell System (Kirkland, WA)购买, 并按厂商说明书在含有 10%胎牛血清和促分裂原的 CS-C 完全培养基中维持, 分别用表达表位(gD)-标记形式的 Tie2 配体血管生成素 1 和 2(Ang1 和 Ang2), Angptl3, 和血管生成素相关蛋白 1(ARP1)的瞬时转染 293 细胞产生的条件培养基进行培养。ARP1 是一种结构上相关的分子, 由卷曲螺旋和血纤蛋白原样结构域组成但不能结合 Tie2, 用作阴性对照。如图 3B 所示, 在没有观察到 ARP1 结合的条件
20 下 Ang2 和 Angptl3 强烈结合 HMVEC。这些发现证实了 Angptl3 与内皮细胞的结合是特异性的且暗示着在内皮细胞上存在介导 Angptl3 结合的受体。

- Tie2 是血管生成素 1, 2 和 3(Ang1, Ang2, 和 Ang3)的受体, Tie1 是与 Tie2 具有高度序列同源性的孤独受体, 为了试验是 Tie2 还是 Tie1 与 Angptl3 结合, 使用分别以表位(gD)-标记形式的 Ang1 和 Ang2, Angptl3, 和 ARP1
25 的表达载体结合 Tie1 和 Tie2 的全长受体构建体瞬时转染的 293 细胞进行免疫沉淀实验。通过在含有新鲜添加的蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液(1xPBS;

1%NP40; 0.5%脱氧胆酸钠; 0.1% SDS; PMSF, 100 μ g/ml; 抑酶肽, 30 μ l/ml; 正钒酸钠, 1 μ M)中裂解来制备总细胞提取物。提取物用 Tie1 或 Tie2 的特异性抗体(Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA)温育, 所得的免疫沉淀通过 SDS-PAGE 和免疫印迹分析。具体地说, 通过 SDS-PAGE 分离并印迹到 PVDF 膜上的蛋白质分别用抗 gD 标记或 Tie 受体的抗体温育。如图 4 所示, Tie1 和 Tie2 在允许 Tie2 与 Ang1 和 Ang2 结合的实验条件下不结合 Angptl3。这些发现证实了 Angptl3 既不是 Tie2 的配体也不是 Tie1 的配体, 且表明在内皮细胞上存在介导细胞结合实验中观察到的强烈结合的其它受体。

感兴趣的是, 模拟“肿瘤样”条件而暴露于低氧或 VEGF 的细胞与 Angptl3 的结合显著增强(数据未显示)。以前发现这些条件诱导内皮细胞上的整联蛋白表达(Suzuma 等, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39: 1028-35(1999)), 而发现 Tie1 和 Tie2 受体水平不改变(Mandriota 和 Pepper, *Circ. Res.* 83 : 852-9(1998)和 Oh 等, *J. Biol. Chem.* 274: 15732-9 (1999))。

实施例 5

15 FBN-Angptl3 的分子模型

Angptl3 的 FBN-样结构域与人血纤蛋白原 γ 链的 C 末端具有 39.6%的序列相同性。为了研究 Angptl3 与内皮细胞结合的生物学功能和分子机制, 使用对 FBN 结构域的 X-射线晶体学研究提供的结构信息和同源性建模技术构建 Angptl3 的 FBN-样结构域模型。FBN 结构域具有由三个明确的结构域组成的特有折叠: 该三个结构域是: 由一个双链反向平行的 β -折叠和侧翼的一个短螺旋形成的 N 端结构域; 由具有两个短螺旋的 5 链反向平行的 β -折叠和倚靠其一个面排列的发夹环形成的中央结构域; 和主要由环组成的第三个结构域(图 5B)。

为了构建 FBN-Angptl3 模型, 通过使用 clustalW(Thompson 等, *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-80(1994))和 threading(ProCeryon Biosciences Inc.)在 FBN-Angptl3 序列和一些 FBN 结构域结构之间进行序列结构对比。从该序列对比中, 选择 3FB(PDB 代码)作为模板结构用于模型构建。程序 PROCHECK(Laskowski 等, *J. Biomol. NMR* 8:477-86(1996))用于评估该模型的几何品质, 它与 PDB 中保存的结构的参考数据库比较时超过平均立体化学品质。最终的 FBN-Angptl3 模型与模板比较时所有 C_{α} 原子的 r.m.s.d 为

1.95Å。FBN 结构域的总体折叠在 FBN-Angptl3 中保守，在氨基酸位置 220-224，289-306，和 357-363 所示环区域中有一些差异(图 5A 和 B)。

对人血纤蛋白原 γ 链的研究导致鉴定了与整联蛋白 α MP2(即主要在白细胞上表达的整联蛋白)结合相关的两个区域(Ugarova 等, *J. Biol. Chem.* 273: 22519-27(1998))。在线性氨基酸序列上分开的这两个区域在 FBN 结构域的三维结构中形成两个相邻的反向平行的 β -链(P1, 残基 190-202; P2, 残基 377-395)。已发现在血纤蛋白原 γ 链内的一个不同区域(P3, 346-358)和 tenasin-C 也涉及与整联蛋白 α v β 3 的结合(Yokoyama 等, *J. Biol. Chem.* 275: 16891-8(2000))。该 FBN-Angptl3 模型和人血纤蛋白原 γ 链的 FBN 结构域在这些区域(P1:38-50; P2:199-214 ; P3: 346-361)中具有高度的结构相似性(图 5A)，其中的编号遵循 3FIB 的编号(PDB 代码)。按照 Angptl3 的氨基酸编号 (SEQ ID NO: 2)，在成熟蛋白质的氨基酸序列中 P1 相应于氨基酸 281-293(SEQ ID NO: 14); P2 相应于氨基酸 442-460(SEQ ID NO: 15); 且 P3 相应于氨基酸 415- 430(SEQ ID NO: 17)。

为了验证 Angptl3 的 FBN-样结构域内的区域是否负责结合的假设，设计并合成了一些肽(表 2)。P3 序列编码在不同结构域之间具有最大结构差异的区域且因此可测定受体特异性。来自相同区域的一些拼凑和颠倒的肽用作对照肽(表 2)。带有氨基末端 gD 表位标记的重组人 Angptl3 蛋白质按实施例 2 所述使用杆状病毒表达系统产生(图 6A)。

重组 Angptl3 的糖基化状态按照厂商说明书(New England Biolabs, MA)用 PNGase-F 处理来测定。纯化的蛋白质(50ng)通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶(10% Tris-Glycine, Invitrogen, CA)进行电泳并使用标准方法电转移到硝酸纤维素膜(Invitrogen, CA)上。膜在含 5% w/v 速溶脱脂奶粉的 PBS 中温育封闭并在 4℃用含 1 μ g/ml 单克隆抗-gD(克隆 5B6.K6)抗体的封闭缓冲液温育过夜。膜用 PBS/0.05% Tween 20 洗涤且随后用辣根过氧化物酶偶连的驴抗小鼠抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA)在室温下温育 1 小时。按照厂商的方法(Amersham Pharmacia Biotech, NJ)通过化学发光检测来观察 Angptl3 蛋白。按以前所述进行免疫沉淀，瞬时转染和 FACS 分析(Klein 等, *Nature* 387 : 717-21 (1997))。

用 PNGase 温育时 Angptl3 带的迁移率下降表明该重组蛋白是糖基化的(图 6C)。以前对于血管生成素得到过相似的结果。如图 7A 所示，向贴

- 壁试验中加入所有 3 种肽，完全阻断了内皮细胞与 Angptl3 的结合。整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 在 RGD 粘着序列环境中能够识别其一些配体。与我们的观察结果(即 Angptl3 的血纤蛋白原样结构域不编码该 RGD 序列)一致，加入 RGD 肽仅部分消除 HMVEC 贴壁，而 RGE-肽无影响。该结果表明只有部分 Angptl3 与 $\alpha v\beta 3$ 的相互作用以 RGD-依赖型方式介导。因此，这些数据表明 Angptl3 的 FBN-样结构域内的所有三个区域都是受体结合位点的一部分。

表 2

名称	序列	SEQ ID NO
NL6_P1*	PWTLIQHRIDGSQ	14
NL6_PP1	PWTLIQHRIDGSQ	14
NL6_P2*	YSIKSTKMLIHPTDSESFE	15
NL6_PP2	YSIKSTKMLIHPTDSES	16
NL6_P3*	GKYNKPRAKSKPERRR	17
NL6_PP3	GKYNKPRAKSKPER	18
NL6_P32	GKYNKPRAKSKPE	19
对照肽名称	序列	SEQ ID NO
NL6_PP1_inv	QSGDIRHQILTWP	20
NL6_PP1_src	PQWSTGLDIIQRH	21
NL6_PP2_inv	SESDTPHILMKTSKISY	22
NL6_PP2_src	YSSEISKDSTTPKHMIL	23
NL6_PP3_inv	REPKSKARPKNYKG	24
NL6_PP3_src	GRKEYPNKKSPKRA	25
FBG_P1	GWTVFQKRLDGSV	26
FBG_P2	YSMKKTTMKIIPFNRL	10
FBG_P3	GVYYQGGTYSKAS	12

10

实施例 6

细胞贴壁试验

A. 鉴定整联蛋白介导的 Angptl3 细胞贴壁

为了鉴定整联蛋白与 Angptl3 的可能结合, 将重组 Angptl3 蛋白质覆盖到 96-孔平底微量滴定板(MaxiSorp, Nunc, Denmark)上于 4℃过夜, 并用含 100μg/ml BSA 的 PBS 在 37℃封闭 1 小时。检测了用包括 IIbIIIa($\alpha_{IIb}\beta_3$), $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_1$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 在内的不同整联蛋白异二聚体稳定转染的各种 293 细胞系结合 Angptl3 包被板的能力。收获细胞并在含 1% BSA, 1mM CaCl₂ 和 1 mM MgCl₂ 的无血清 CS-C 培养基中稀释至 10⁵ 个细胞/ml。细胞在含有或不含封闭抗体或肽的条件下 37℃预培养 15 分钟, 然后用 200 nM PMA 刺激。将细胞悬液(10⁴ 个细胞/孔)加入包被孔中, 平板在 37℃培养选定的时间。通过 PBS 洗涤去掉非贴壁细胞, 并使用 Landegren 的 PNAG 方法测量细胞贴壁 (Landegren, U., *J. Immunol. Methods*, 67: 379-388(1984))。结果以一式三份孔的平均 OD₄₀₅ 值表示。

在检测的稳定细胞系中, 表达 $\alpha_v\beta_3$ 的细胞相对于其它细胞系细胞表现出与 Angptl3 的粘着显著增强(图 7B)。因此, 这些发现证实, 重组人 Angptl3 特异性地结合 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白。这与暴露于低氧和 VEGF 的内皮细胞更有效地结合 Angptl3 的在先观察结果一致。

B. $\alpha_v\beta_3$ 介导 Angptl3 细胞粘着

已知整联蛋白被其配体激活时诱导诸如细胞粘着和迁移等生物学反应。已设计实验检测了 Angptl3 是否对原代人内皮细胞发挥该作用, 和 $\alpha_v\beta_3$ 是否足以介导这些反应。当在内皮细胞贴壁试验中检测时, Angptl3 在温育后 4 小时内诱导强烈的剂量依赖型贴壁(图 7C)。观察到的水平相当于将细胞平板接种在玻连蛋白, 即 $\alpha_v\beta_3$ 的原著型(prototypic)配体上时获得的水平(数据未显示)。

为了确定 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白是否足以介导 Angptl3 细胞粘着, 在细胞贴壁试验中检测了封闭性抗体或抑制性肽抑制贴壁的能力。在用 Angptl3-包被的孔进行培养前向内皮细胞中加入功能封闭性抗体。抗 $\alpha_5\beta_1$ 或 $\alpha_v\beta_5$ 的功能封闭性抗体的存在不减少 HMVECs 与 Angptl3(20μg/ml)包被的培养皿的粘着, 然而, $\alpha_v\beta_3$ 特异性抗体完全阻断粘着(图 7D)。作为通用对照, 向结合实验中加入消除整联蛋白与其配体结合的 EDTA (10 mM)。如图 7D 所示, 干扰整联蛋白对二价阳离子的依赖性完全消除了内皮细胞贴壁。

30 实施例 7

细胞迁移试验

由于针对内皮细胞的整联蛋白活性的另一标志是其对配体刺激的迁移反应，已建立了一种迁移测定法，其允许研究 Angptl3 对诱导内皮细胞迁移的影响。

- 在 T. V. Byzova 等, *Exp. Cell Res.*, 254:299-308(2000)所述的迁移测定法
- 5 中检测 Angptl3。该迁移测定法使用具有 8 μ m 孔径的 HTS 多孔组织培养插件(Becton Dickinson, NJ)。将 Angptl3 蛋白在 PBS 中稀释成 50ng/ μ l 并用作滤膜表面的内涂层。用 3% BSA/PBS 预覆盖后，将滤膜放在 500 μ l 含 1% BSA, 1mM CaCl₂ 的无血清 CS-C 培养基中。用 PBS 洗涤 HMVECs 3 次，收获并以 10⁵ 个细胞/ml 悬浮于按上述添加的无血清培养基中。在用
- 10 PMA(200nM)刺激前细胞在含有或不含封闭性抗体(25 μ g/ml)的条件下 37 $^{\circ}$ C 预培养 15 分钟。将细胞悬液(250 μ l)加入上面室中，允许细胞在 5% CO₂ 的湿润培养箱中 37 $^{\circ}$ C 迁移过夜。培养后，使用棉签去掉上孔中剩余的细胞，用甲醇固定迁移到膜下表面的细胞并用 YO-PRO-1 碘化物(Molecular Probes)染色。使用 *Openlab* 软件(Improvision, MA)将迁移结果定量为细胞平均数/
- 15 显微镜视野。

内皮细胞接触 Angptl3 16 至 20 小时后，观察到与 BSA 对照处理相比细胞迁移增加 2.5 倍(图 7E)。最重要的是，施加抗 α v β 3 的拮抗性抗体封闭该迁移，而封闭其它整联蛋白的对照抗体不能。因此，Angptl3 潜在地诱导原代人内皮细胞的迁移且两种活性都被抗 α v β 3 的拮抗性抗体封闭。

20 实施例 8

Angptl3 的组织表达

A. 原位杂交

原位杂交按以前所述(Lu, *Cell Vision* 1:169-176(1994))进行。设计 PCR 引物：

- 25 上游：5'T7 启动子：GGATTCTAATACGACTCACTAT AGGGC(SEQ ID NO: 6)+GGCATTCCTGCTGAATGTACC (hAngptl3 特异性序列，SEQ ID NO: 7)3'和下游 5'T3 启动子：CTATGAAATTAACCCTCACTAAAGGGA(SEQ ID NO: 8)+ ACCCACTCATCATGCCACCA(hAngptl3 特异性序列，SEQ ID NO: 9)3'用于扩增人 Angptl3 的 506-bp 片断和
- 30 上游：5'T7 启动子：GGATTCTAATACGACTCAC TATAGGGC(SEQ ID NO: 6)+5'GATGACCTTCCTGCCGACTG (mAngptl3 特异性序列，SEQ ID

NO:11)3'和下游: T3 启动子: CTATGAAATTAACCCTCACTAAAGGGA (SEQ ID NO: 8) + 5'GTCATTCCACCACCAGCCA(mAngptl3 特异性序列, SEQ ID NO: 13)。引物包含编码 27 个核苷酸的 T7 或 T3 RNA 聚合酶起始位点的延长序列, 以允许从扩增产物分别体外转录有义或反义核糖探针。将人组织的 5 μ m 厚切片脱蜡, 在 20 μ g/ml 蛋白酶 K 中 37 $^{\circ}$ C 脱蛋白 15 分钟, 在 2 x SSC 中漂洗, 通过分级浓度的乙醇脱水并在预杂交缓冲液中温育 1-4 小时。将小鼠组织在 4 μ g/ml 蛋白酶 K 中 37 $^{\circ}$ C 消化 30 分钟并按上述处理。³³P-UTP-标记的有义和反义探针与切片在 55 $^{\circ}$ C 杂交过夜。通过在 20mg/ml RNaseA 中 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟去掉未结合的探针, 接着在 55 $^{\circ}$ C 以 0.1 x SSC 高度严格洗涤 2 小时, 并通过分级浓度的乙醇脱水。将玻片浸入 NBT2 核示踪乳液 (Eastman Kodak, NY) 中, 在含有干燥剂的密封塑料玻片盒中 4 $^{\circ}$ C 曝光 4 周, 显影, 并用苏木精和曙红复染。

如图 8C 所示, 在从 E15 和 E18 小鼠胚胎的胚胎肝脏切片中观察到肝细胞特异性表达。在分析的胚胎切片内的红细胞祖细胞, 内皮细胞或巨核细胞上没有 Angptl3 表达。

B. Northern 印迹

为了研究成人组织中的 Angptl3 表达, 用上述覆盖编码序列 5'端的放射性标记探针探测多组织的 Northern 印迹。与用鼠直向同源 Angptl3 发现只在肝脏中表达的在先观察结果相反(Conklin 等, *Genomics* 62: 477-82(1999)), 在成人肝脏和肾中发现人 Angptl3 的表达, 尽管在肾中观察到的信号明显较低(图 8A)。除了在骨骼肌组织中有一些微弱信号外, 在分析的包括肺和脑在内的任一其它成人组织中没有发现表达。通过对来自人和小鼠标本的各种正常和病变组织进行原位杂交研究了 Angptl3 mRNA 表达的细胞定位。所述组织包括所有主要器官, 骨髓, 以及诸如肝硬化, 转移性肝脏腺癌等病理肝脏组织和来自 acetaminophen 诱导的肝毒性病例的切片。如图 8B 所示, 在正常成人肝脏中发现了一些本底表达, 证实了 northern 印迹的数据。尽管在分析的肝脏肿瘤样品内表达无变化, 但是在与肝硬化等炎症相关的病变肝脏和毒性损伤后的病变肝脏的切片中观察到强烈诱导。如高倍放大插图所示, 在正常和病变肝脏组织中都发现肝细胞的特异性表达(图 8C)。在病变组织内或周围的基质细胞, 淋巴细胞和内皮细胞中没有检测到表达。

总之, 这些数据证实了胚胎发育期间 Angptl3 的肝细胞特异性表达方式以及在与炎症相关的各种病变肝脏病例中强烈的肝细胞特异性上调。

C. 基因表达分布

使用代表正常状态和包括癌症和非癌症等疾病状态的人组织的
5 GeneLogic 数据库对 Angptl3 进行基因表达分析。

使用 GeneLogic 基因表达数据库证实, 在通过人肝脏切片的原位杂交鉴定的肝脏疾病状态下, 表达增加(图 8B)。除了肝脏外, 在大多数组织和器官中 Angptl3 的基础水平较低。在肝脏, 心脏和甲状腺中, 正常和病理状况之间的 Angptl3 表达水平存在显著提高。用各种肝脏疾病的患者的样品对
10 Angptl3 表达进行更详细的亚类分析, 证实了在肝硬化期间 Angptl3 的表达最强。令人感兴趣的是, GeneLogic 数据库分析揭示, 不仅在病理学肝脏, 而且在诸如冠心病和肥大性心肌病等心脏疾病中强烈诱导 Angptl3 表达。与 Angptl3 的表达水平升高相关的疾病形式都共同具有由包括胶原蛋白, 纤连蛋白, 玻连蛋白和层粘连蛋白在内的各种细胞外基质蛋白组成的纤维变性
15 组织的形成, 已知所有这些 ECM 分子都与特异性整联蛋白形式结合。

实施例 9

Angptl3 的体内血管生成活性测定

为了检测 Angptl3 是否能够诱导大鼠角膜的体内血管生成反应, 将含有鼠和人 Angptl3(500ng)以及人 VEGF(100ng)的透明质酸酶药丸(hyaluron
20 pellets)按以前所述分别或联合植入(Xin 等, *J. Biol. Chem.*, 274: 99116-9121(1999))。将含有赋形剂(对照), 鼠或人 Angptl3(500 ng), VEGF(100 ng), 或鼠或人 Angptl3(500 ng)与 VEGF(100 ng)的组合物的透明质酸酶药丸植入 250 至 300 g 雄性 Sprague-Dawley 大鼠的角膜。所有透明质酸酶药丸含有 100 ng 硫糖铝(sucralfate)。在第 6 天, 安乐处死动物并注射荧光素异硫氰
25 酸葡聚糖酯以便观察血管系统。对摘出的眼球进行角膜整体封固并使用计算机辅助图像分析(Image Pro-Plus 2.0, Silver Spring, MD)分析新血管区。与以前在角膜血管生成试验中检测时针对血管生成素 1 和 2 的效果的报道相反(Asahara 等, *Circ. Res.* 83 : 233-40 (1998)), 药丸移植 5 天后, 单独的重组 Angptl3 有效诱导强烈的血管生成反应。如图 9A 和 B 所示, 与重组人蛋白
30 相比, 鼠 Angptl3 在诱导血管生成中有效性略高, 但是两者的反应都相当于 VEGF 获得的水平。与 VEGF 联合处理时, 观察到叠加效果但没有协同效应

(图 9B)。这些发现可能反映了两种配体参与的互相依赖的信号转导途径 (Byzova 等, *Mol. Cell.* 6: 852-60 (2000))。

实施例 10

Angptl3 的体内生物学活性

5 A. 静脉内和真皮内给药 Angptl3 的瞬时保护效果和长期效果

方法

腺病毒产生: 使用 AdEasy 腺病毒载体系统(Stratagene)基本上按厂商说明书产生腺病毒 CMV-gD-mAngptl3, CMV-lacZ 和 mVEGF164。通过将 Angptl3 或 VEGF 的编码区克隆进来自 Stratagene 的 Ad-easy 载体构建试剂盒的多接头位点, 构建编码鼠 Angptl3 或 VEGF 的重组腺病毒载体。将 mAngptl3 或 VEGF 的编码区克隆到 pShuttleCMV 载体的 NotI 和 HindIII 位点之间。这些载体与提供的 pShuttleCMV-lacZ 一起在 BJ5183 电感受态细菌 (Stratagene)中重组, AdEasy 载体含有缺失 E1 和 E3 区域的 Ad5 基因组。通过将重组 AdEasy 质粒瞬时转染进宿主 HEK293 细胞, 制备原代病毒原种。

10 腺病毒原种在 HEK293 细胞中进一步扩增并使用 Virakit 腺病毒纯化试剂盒 (Virapur)纯化。通过琼脂糖覆盖的噬斑测定法获得腺病毒滴度。

1. 短期静脉内给药 Angptl3 的保护效果

为了对肝脏防止中毒性损伤的保护作用进行短期分析, 通过尾静脉注射给 12 只成年 BalbC 小鼠施用腺病毒构建体, 以便经过 1×10^9 Pfu 剂量的编码 mAngptl3 和 LacZ 的对照病毒, 和 1×10^7 Pfus 的编码 VEGF 的病毒处理, 在早至处理的 2 天后直到多达 3 周的期间, 在肝脏中可以连续且强烈表达蛋白质。用腺病毒载体处理后 5 天时, 将小鼠再分成两个亚组(n=6), 进一步接受载体(橄榄油)或 CCl_4 (四氯化碳)处理, CCl_4 是一种诱导肝脏损伤的强效肝毒性剂。通过口服管饲法以 4ml/kg 给予载体和 CCl_4 。48 小时后,

20 处死动物, 收集血液, 收获组织并固定用于分析。在腺病毒感染后 7 天时通过 western 印迹分析法分析小鼠中构建体的表达水平(图 10A)。

结果

Angptl3 对 CCl_4 诱导的肝细胞坏死的保护效应得到如下证实: 在用编码 Angptl3 的腺病毒处理的小鼠血清中, 作为肝衰竭指标的天冬氨酸转移酶 (AST)的血液水平显著下降 2.1 倍, 而任何对照构建体不下降($p < 0.0001$)(图 10B)。因此, 重组 Angptl3 的瞬时给药对于治疗肝脏损伤有益。

30

2. Angptl3 的静脉内延长表达所诱导的肝脏损伤

为了评估 Angptl3 水平升高的长期效果,用上述编码 Angptl3 的腺病毒载体处理的小鼠在病毒转导后两周期限内鉴定。

a. 血液化学分析

- 5 在腺病毒转导后 2 周的期限内,从野生型, C57B16 小鼠获取血清样品,测量肝脏功能的血液化学水平指标。在 Cobas Integra 400 上测定血液学 Cell-Cyn 13700, 和血液化学水平。

如图 11A 所示, 编码 Angptl3 的腺病毒载体而不是编码 LacZ 或血管生成素 1(Ang1)的对照病毒,可诱导血清 ALT 和 AST 水平强烈升高。血清 ALT 和 AST 水平的升高相当于用四氯化碳处理观察到的 ALT 和 AST 水平。因此,在炎症性肝脏疾病或心脏疾病期间干扰 Angptl3 活性可能是有效的治疗方法。

为了进一步评定免疫系统的潜在贡献,在免疫受损的缺乏 B-和 T-细胞的 RAG2-敲除小鼠和缺乏 B, T 和自然杀伤(NK)细胞的 SCID 小鼠中测量肝脏功能的血液化学水平指标。如图 11B 所示, 编码 Angptl3 的腺病毒载体诱导 RAG2 小鼠中的 AST 和 ALT 水平,表明发生 Angptl3 诱导的肝脏功能改变,其与完整免疫系统的存在无关。

b. 肝细胞增殖

- 20 为了进一步鉴定用表达 Angptl3 的腺病毒载体处理 RAG2-敲除小鼠和 SCID 小鼠的效果,在用表达 Angptl3 的腺病毒载体或对照腺病毒载体处理的 RAG2-敲除小鼠和 SCID 小鼠中,对所处理小鼠的各种经福尔马林固定并掺入了 BrdU 的器官(包括肾, 心脏, 肝脏, 肺和小肠)中的细胞增殖进行定量。从腺病毒给药(IV)后 14 天的对照小鼠或 Angptl3-处理小鼠获取石蜡包埋的切片, 进行 BrDU 染色来测量细胞增殖, 以检测细胞周期 S 期期间的细胞。处死前 1 小时以 100 mg/kg 的剂量给动物腹膜内施用 BrdU。用 0.05% 胰蛋白酶在 37℃处理 20 分钟, 用含 95%甲酰胺的 0.15M 柠檬酸三钠在 70℃处理 45 分钟进行变性后, 用 1:1000 稀释度的小鼠抗 IdU/BrdU 抗体 (Caltag)4℃染色组织过夜。用生物素标记的马抗小鼠 IgG 抗体(Vector)作为第二试剂, 通过使用 Vectastin ABC Standard Elite 试剂盒(Vector Laboratories)检测。用小鼠同种型(Zymed)作为阴性对照。然后用苏木精复染切片。计数

在 40x 物镜下随机选择的 10 个独立视野中带标记细胞核的总数。每个视野覆盖 0.063mm² 的面积。

如表 2 所示,在用表达 Angptl3 的腺病毒载体处理的 RAG2-敲除小鼠和 SCID 小鼠中观察到超过 10 倍的对肝细胞增殖的诱导。

5 表 2: 处理 14 天后,相对于对照处理,在 Angptl3 处理的 RAG2 敲除小鼠或 SCID 淡棕色小鼠肝脏切片中, BrDU 染色增加

	RAG2 敲除小鼠	SCID 淡棕色小鼠
PBS	13.0±5.3	9.0±6.2
Ad-LacZ(1x10 ⁹ PFU)	3.5±1.3	3.3±1.7
Ad-Angptl3(1x10 ⁹ PFU)	81.2±24.9	67.2±20.1

c. 组织学分析

10 对从腺病毒载体感染 14 天后的 C57/B16 收获的肝脏切片进行组织学分析。与从编码 LacZ 的腺病毒载体处理的对照小鼠分离的肝脏相比,从编码 Angptl3 的腺病毒载体处理的小鼠分离的肝脏切片中观察到肝细胞和炎性浸润物内作为细胞增殖指标的有丝分裂相增加。Angptl3-处理的动物肝脏比对照处理的动物肝脏也明显更大。

d. FACS 分析

15 尽管通过体外 ELISA 测定法检测时在免疫细胞上表达的 LFA1 和 Mac-1 不与重组 Angptl3 结合(Camenisch 等, 2002),但是在免疫细胞上表达的整联蛋白家族的其它成员与 Angptl3 相关。

20 为了研究炎症性细胞在表达 CCLF1 的腺病毒载体所处理的小鼠肝脏中引起观察到的组织损伤的可能性,通过 FACS 测定外周血细胞的量,所述 FACS 通过染色细胞类型特异性标记来确定各种谱系的存在。与用表达 LacZ 或 Ang1 的对照腺病毒载体处理的小鼠的检测量相比,用表达 Angptl3 的腺病毒载体处理的小鼠中检测到的祖细胞(Sca1), T-细胞(CD4 和 CD8), B-细胞(B220), 巨噬细胞(Gr1/Mac1)和红细胞系的细胞(Ter119)的量无显著差异。同样,在处理组之间观察到血清甘油酯和胆固醇的量无差异。

25 e. 细胞贴壁分析

为了进一步分析与介导肝脏损伤相关的细胞机制,类似于实施例 6 中所述的细胞贴壁试验,在 Angptl3-包被的组织培养皿上进行肝细胞和内皮细胞的细胞贴壁实验。

用所示浓度的蛋白质在 4℃ 包被 96-孔平底板(MaxiSorp, Nunc, Denmark)过夜,用含 3% BSA 的 PBS 在 37℃ 封闭 1 小时。收获原代人皮肤内皮细胞(HMVECs)和使用 LeCouter 等(LeCouter 等,2001)所述的方法从成年 C57/B16 小鼠肝脏新鲜分离的鼠肝细胞,并在 200 nM PMA 存在的条件下,在含有 1% BSA, 1mM CaCl₂ 和 1 mM MgCl₂ 的无血清 CS-C 培养基中稀释成个 10⁵ 个细胞/ml。不存在 PMA 时观察到关于细胞结合的定性相似结果。向包被孔中加入细胞悬液(10⁴ 个细胞/孔)并在 37℃ 将平板培养选定的时间。通过 PBS 洗涤去掉非贴壁细胞并使用 Landegren 的 PNAG 方法(Landegren, 1984)测量细胞贴壁。结果表示为一式三份孔中的平均 OD₄₀₅ 值。

如图 13 所示, HMVEC 对 Angptl3-包被板的贴壁相当于观察到的对纤连蛋白包被板贴壁水平的 20%到 50%。还观察到包被浓度依赖型肝细胞贴壁。因此,肝细胞和内皮细胞可以参与介导在 Angptl3 处理小鼠的肝脏中观察到的生物学效应。

3. 皮内给药 Angptl3 增大血管透性

为了研究在成年小鼠中瞬时表达 Angptl3 诱导的血管变化,将腺病毒表达载体(10x10⁹PFUs)以 10μl 总体积施用到麻醉的成年 FVB 小鼠耳朵表皮层并通过使用伊文思蓝试验进一步分析血管透性变化。简单地说,从开始并且在整个伊文思蓝试验期间麻醉小鼠。麻醉开始后,将 100μl 伊文思蓝(1%的 PBS 溶液)通过尾静脉注射方式对小鼠给药。伊文思蓝给药的 60 分钟后,在 120 mmHg 压力下用 pH 3.5 的含 1%低聚甲醛的柠檬酸盐缓冲液从左心室灌注小鼠。取下耳朵并称重。用 1 mL 甲酰胺从耳朵提取伊文思蓝染料。用分光光度计在 610nm 下测量渗出的伊文思蓝量并表示为每 1mg 组织湿重的染料含量。

结果:

在给药的 6 天后,在静脉内施用表达 Angptl3 或 VEGF 的腺病毒载体的小鼠耳朵中,相对于施用表达 LacZ 的对照腺病毒载体的小鼠而言,通过伊文思蓝试验观察到的血管透性水平增大(图 12D)。

B. 表达-K5-mAngptl3 的转基因小鼠中血管透性增大

在一个可供选择的方法中,通过制备在角质细胞特异性启动子(其在发育期间和成体中组成型表达)控制下表达鼠 *Angptl3* 的转基因小鼠,来研究皮肤中 *Angptl3* 表达水平升高的发育影响。

1. 起始转基因小鼠

- 5 按照标准方法(Filvaroff 等, 2002)使用允许在鼠 K5 启动子控制下表达 *Angptl3* 的构建体 K5-gD-mAng5 制备起始转基因小鼠。为了产生 K5-gD-mAng5 构建体,将 *Angptl3* 基因切成 NotI-NotI 并插入 pNASSK5 β NotI-NotI-SAP 中产生 K5-gD-mAng5。

- 10 总共制备了 17 个转基因起始株。使用如下引物组通过对小鼠尾 DNA 进行 PCR(QIAGEN, Santa Clarita, CA)测定 9 日龄小鼠幼仔的基因型:

gD-mAng5.311.F:ATATGCCTTGGCGGATGC(SEQ ID NO: 32); 和

gD-mAng5.578.R:ATGGACAAAATCTTTAAGTCCATGAC (SEQ ID NO: 33)。

- 15 在 8 周龄时,获取包括肌肉,肾,肝脏,脾,皮肤,脑,胸腺和肠在内的一些组织的活检标本,经过实时 RT-PCR 来测定 *Angptl3* 的内源性表达和转基因表达水平。为了进行 RT-PCR 分析,使用设计成可测量内源性转录子和转基因转录子的下列探针和引物:

MMAng5.1165.FP:FAM-CTCCCAGAGCACACAGACCTGATGTTTT
-TAMRA (SEQ ID NO: 34)

- 20 MMAng5.1144.F:GCTGGCAATATCCCTGGG(SEQ ID NO: 35)

MMAng5.1223.R:AGCTGTCCCTTTGCTCTGTGA (SEQ ID NO:36)。

通过 Student's t 检验测定在鼠 K5 启动子下表达 *Angptl3* 的转基因小鼠之间的差异的统计学分析, P 值<0.05 时认为是统计学上显著, P 值<0.01 时为非常显著。

- 25 2. 后代转基因小鼠

根据对所有转基因起始小鼠的皮肤活检标本的基因表达分析,鉴定了 5 个 *Angptl3*-表达最高的起始株并选择用于进一步繁殖 C57/B16 小鼠。基因型频率分析揭示了该转基因的正常孟德尔频率分布且观察到没有明显的出生后致死性与转基因表达相关。

- 30 a. 转基因表达

分离所示各种组织的 RNA 并通过实时 RT-PCR 评估相对于内源性表达的相对转基因表达水平，特别是在肝脏中的水平。

正如预期，相对于窝型匹配的野生型对照，在转基因皮肤中观察到鼠 Angptl3 表达水平升高。皮肤中 Angptl3 的转基因表达水平达到肝脏内源性
5 Angptl3 表达水平的大约 10 % (图 12A)。

另外，与野生型小鼠相比，在 12 周龄转基因小鼠的肺和脑中观察到中等表达。因此，肺和脑中的表达可由这些组织中 K5 启动子的转录活性增加引起。

与成人肾中通过 Northern 印迹分析发现的中度 Angptl3 表达一致(图
10 8A), 对小鼠肾 RNA 的 Taqman 分析揭示了 Angptl3 的中度内源性表达水平。

为了监测出生后一个时间段内的转基因表达，用从 3, 6 和 11 周龄转基因小鼠的皮肤活检标本分离的 RNA 进行实时 RT-PCR 分析。如图 12B 所示，在检测的所有发育阶段，在转基因小鼠皮肤中观察到恒定水平的转基因表达。

15 b. 血管透性

根据转基因表达数据，选择 12 周龄转基因小鼠和野生型窝型匹配的野生型对照，并使用相似于上文和以前对血管生成分子的血管生成素家族的两个结构上相关的成员 Ang1 和 Ang2 所述的伊文思蓝测定法进行血管透性测定(Maisonpierre 等，1997; Thurston 等，2000; Thurston 等，1999)。通过
20 上文所述的伊文思蓝测定法测量血管透性。进行伊文思蓝分析的两个 11 周龄转基因株与窝型匹配的野生型品系相比基础水平的血管透性明显增大，即增大 2 到 3 倍(图 12C)。然而，在进行伊文思蓝测定分析前用芥子油攻击小鼠，则转基因小鼠和窝型匹配的野生型小鼠之间血管透性差异较不显著。因此，转基因小鼠相对于其野生型同窝对照而言血管透性增加表明 Angptl3
25 在血管透性调节中起作用。

材料的保藏

如前所述，下列材料保藏在美国典型培养物保藏中心，12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA (ATCC):

30	<u>材料</u>	<u>ATCC 保藏号</u>	<u>保藏日</u>
	Angptl3-DNA16451-1078	209281	9/18/97

按照布达佩斯条约的规定在国际上认可的用于专利程序的微生物保藏机构并按其实施细则(布达佩斯条约)进行这些保藏。这样保证了该保藏物的活培养物从保藏日起维持 30 年。按布达佩斯条约的条款该保藏物由 ATCC 使其可获得且按 Genentech, Inc.与 ATCC 之间的协议进行,该协议保证在相关美国专利颁发时或在任何美国或外国专利申请公开提供给公众时,无论哪一个在先,该保藏物的培养物后代可持久和无限制地为公众获得,且保证按照 35 USC § 122 和依据其委员会规定(包括具体参考 886 OG 683 的 37 C.F.R. § 1.14)对其授权的美国专利和商标委员认定的个人获得该后代。

本申请的受让人同意如果保藏的该材料的培养物在合适条件下培养时如果死亡导致丢失或破坏时,该材料将在通知时用另一相同材料迅速替换。该保藏材料的可获得性不应解释为允许违反任何政府机构按其专利法批准的权利来实施本发明。

本说明书认为足以使得本领域的技术人员能够实施本发明。本发明不限于保藏的构建体限定的范围,因为保藏物的实施方案是用作对本发明某些方面的单一例证且功能上等同的任何构建体都在本发明范围内。本文的材料保藏不构成承认文字形式的描述不足以使得本发明的任一方面,包括其最佳的更多方面能够实施,也不应解释为将权利要求书的范围局限于所提供的具体例证。事实上,除了本文所示和所述之外,对本发明的各种修饰根据前面的描述对本领域的技术人员将是显而易见的且落在所附权利要求书的范围内。

<110> 杰南技术公司 (Genentech, Inc.)

Ferrara, Napoleone

Gerber, Hans-Peter

Kowalski, Joe

Pisabarro, Maria Teresa

Sherman, Daniel Eric

<120> 含有血管生成素-样蛋白质 3 ANGPTL3 的组合物及其使用方法

<130> GENENT. 086VPC

<150>

<151>

<160> 36

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2042

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

gcggacgcgt gggtgaaatt gaaaatcaag ataaaaatgt tcacaattaa gtccttctt 60
tttattgttc ctctagttat ttctccaga attgatcaag acaattcatc atttgattct 120
ctatctccag agccaaaatc aagatttgct atgtagacg atgtaaaaat ttagccaat 180
ggcctccttc agttgggaca tggctcttaa gacttgtcc ataagacgaa gggccaaatt 240
aatgacatat ttcaaaaact caacatattt gatcagtcct tttatgatct atcgctgcaa 300
accagtgaat tcaaaagaaga agaaaaggaa ctgagaagaa ctacatataa actacaagtc 360
aaaaatgaag aggtaaagaa tatgtcactt gaactcaact caaaacttga aagcctccta 420
gaagaaaaaa ttctacttca acaaaaagtg aaatathtag aagagcaact aactaactta 480
attcaaaatc aacctgaaac tccagaacac ccagaagtaa ctacacttaa aacttttgta 540
gaaaaacaag ataatagcat caaagacctt ctccagaccg tggaagacca atataaaca 600
ttaaaccaac agcatagtca aataaaagaa atagaaaatc agctcagaag gactagtatt 660
caagaacca cagaaatttc tctatcttcc aagccaagag caccaagaac tactccctt 720
cttcagttga atgaaataag aaatgtaaaa catgatggca ttcttgctga atgtaccacc 780
atttataaca gaggtgaaca tacaagtggc atgtatgcca tcagaccag caactctcaa 840
gtttttcatg tctactgtga tgttatatca ggtagtccat ggacattaat tcaacatcga 900
atagatggat cacaaaactt caatgaaacg tgggagaact acaaatatgg ttttgggagg 960
cttgatggag aattttgggt gggcctagag aagatatact ccatagttaa gcaatcta 1020
tatgttttac gaattgagtt ggaagactgg aaagacaaca aacattatat tgaatatct 1080
ttttacttgg gaaatcacga aaccaactat acgctacatc tagttgcgat tactggcaat 1140
gtccccaatg caatcccga aaacaaagat ttggtgtttt ctacttgga tcacaaagca 1200
aaaggacact tcaactgtcc agagggttat tcaggaggct ggtggtggca tgatgagtgt 1260
ggagaaaaca acctaaatgg taaatataac aaaccaagag caaaatctaa gccagagagg 1320
agaagaggat tatcttgga gtcctcaaat ggaaggttat actctataaa atcaaccaa 1380
atgttgatcc atccaacaga ttcagaaagc tttgaatgaa ctgaggcaat ttaaaggcat 1440
atttaacat taactcattc caagttaatg tggcttaata atctggtata aatccttaag 1500
agaaagcttg agaaatagat tttttttatc ttaaagtcac tgtctattta agattaaaca 1560
tacaatcaca taaccttaaa gaataccgtt tacatttctc aatcaaaatt cttataatac 1620
tattttgttt aaattttgtg atgtgggaat caattttaga tggtcacaat ctagattata 1680
atcaataggt gaacttatta aataacttti ctaaaataaaa aatttagaga cttttatttt 1740
aaaaggcatc atatgagcta atatcacaaac tttcccagtt taaaaaacta gtactcttgt 1800
taaaactcta aacttgacta aatacagagg actggtaatt gtacagttct taaatgttgt 1860
agtattaat tcaaaactaa aaatcgtcag cacagagtat gtgtaaaaat ctgtaataca 1920
aatttttaaa ctgatgcttc attttgctac aaaataaatt ggagtaaatg ttgatataga 1980

```

tttatttatg aaacctaatg aagcagaatt aaatactgta ttaaaataag ttcgctgtct 2040
 tt 2042

<210> 2

<211> 460

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 2

Met Phe Thr Ile Lys Leu Leu Leu Phe Ile Val Pro Leu Val Ile Ser
 1 5 10 15
 Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu Ser Pro Glu
 20 25 30
 Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
 35 40 45
 Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
 50 55 60
 Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
 65 70 75 80
 Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys Glu Glu Glu
 85 90 95
 Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
 100 105 110
 Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
 115 120 125
 Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln
 130 135 140
 Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu His Pro Glu
 145 150 155 160
 Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn Ser Ile Lys
 165 170 175
 Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu Asn Gln Gln
 180 185 190
 His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Ser Ile
 195 200 205
 Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg
 210 215 220
 Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
 225 230 235 240
 Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
 245 250 255
 Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
 260 265 270
 Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
 275 280 285
 Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
 290 295 300
 Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
 305 310 315 320
 Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
 325 330 335
 Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
 340 345 350
 Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
 355 360 365
 Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
 370 375 380
 Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
 385 390 395 400
 Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys

```

          405          410          415
Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
          420          425          430
Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
          435          440          445
Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
          450          455          460

```

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 3
 ccacgttggc ttgaaattga 20

<210> 4
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 4
 cctccagaat tgatcaagac aattcatgat ttgattctct atctccagag 50

<210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 5
 tcgtctaaca tagcaaadc 19

<210> 6
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 噬菌体

<400> 6
 ggattctaatac gactcact atagggc 27

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 7
 ggattcctg ctgaatgtac c 21

<210> 8
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 噬菌体

<400> 8
 ctatgaaatt aaccctcact aaaggga 27

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 9

accacactca tcatgccacc a

21

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 10

Tyr Ser Met Lys Lys Thr Thr Met Lys Ile Ile Pro Phe Asn Arg Leu
1 5 10 15

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> 鼠

<400> 11

gatgaccttc ctgccgactg

20

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 12

Gly Val Tyr Tyr Gln Gly Gly Thr Tyr Ser Lys Ala Ser
1 5 10

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> 鼠

<400> 13

gtcattccac caccagcca

19

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 14

Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly Ser Gln
1 5 10

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 15

Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu
1 5 10 15
Ser Phe Glu

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 16
 Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 Ser

<210> 17
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 17
 Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg
 1 5 10 15

<210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 18
 Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg
 1 5 10

<210> 19
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 19
 Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu
 1 5 10

<210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 含有反向的人序列的肽

<400> 20
 Gln Ser Gly Asp Ile Arg His Gln Ile Leu Thr Trp Pro
 1 5 10

<210> 21
 <211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有拼凑的人序列(scrambled human sequence)的肽

<400> 21

Pro Gln Trp Ser Thr Gly Leu Asp Ile Ile Gln Arg His
1 5 10

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有反向的人序列的肽

<400> 22

Ser Glu Ser Asp Thr Pro His Ile Leu Met Lys Thr Ser Lys Ile Ser
1 5 10 15
Tyr

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有拼凑的人序列的肽

<400> 23

Tyr Ser Ser Glu Ile Ser Lys Asp Ser Thr Thr Pro Lys His Met Ile
1 5 10 15
Leu

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有反向的人序列的肽

<400> 24

Arg Glu Pro Lys Ser Lys Ala Arg Pro Lys Asn Tyr Lys Gly
1 5 10

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有拼凑的人序列的肽

<400> 25

Gly Arg Lys Glu Tyr Pro Asn Lys Lys Ser Pro Lys Arg Ala
1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 26

Gly Trp Thr Val Phe Gln Lys Arg Leu Asp Gly Ser Val
1 5 10

<210> 27

<211> 242

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 27

Lys Asp Cys Gln Asp Ile Ala Asn Lys Gly Ala Lys Gln Ser Gly Leu
1 5 10 15
Tyr Phe Ile Lys Pro Leu Lys Ala Asn Gln Gln Phe Leu Val Tyr Cys
20 25 30
Glu Ile Asp Gly Ser Gly Asn Gly Trp Thr Val Phe Gln Lys Arg Leu
35 40 45
Asp Gly Ser Val Asp Phe Lys Lys Asn Trp Ile Gln Tyr Lys Glu Gly
50 55 60
Phe Gly His Leu Ser Pro Thr Gly Thr Thr Glu Phe Trp Leu Gly Asn
65 70 75 80
Glu Lys Ile His Leu Ile Ser Thr Gln Ser Ala Ile Pro Tyr Ala Leu
85 90 95
Arg Val Glu Leu Glu Asp Trp Asn Gly Arg Thr Ser Thr Ala Asp Tyr
100 105 110
Ala Met Phe Lys Val Gly Pro Glu Ala Asp Lys Tyr Arg Leu Thr Tyr
115 120 125
Ala Tyr Phe Ala Gly Gly Asp Ala Gly Asp Ala Phe Asp Gly Phe Asp
130 135 140
Phe Gly Asp Asp Pro Ser Asp Lys Phe Phe Thr Ser His Asn Gly Met
145 150 155 160
Gln Phe Ser Thr Trp Asp Asn Asp Asn Asp Lys Phe Glu Gly Asn Cys
165 170 175
Ala Glu Gln Asp Gly Ser Gly Trp Trp Met Asn Lys Cys His Ala Gly
180 185 190
His Leu Asn Gly Val Tyr Tyr Gln Gly Gly Thr Tyr Ser Lys Ala Ser
195 200 205
Thr Pro Asn Gly Tyr Asp Asn Gly Ile Ile Trp Ala Thr Trp Lys Thr
210 215 220
Arg Trp Tyr Ser Met Lys Lys Thr Thr Met Lys Ile Ile Pro Phe Asn
225 230 235 240
Arg Leu

<210> 28

<211> 215

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 28

```

Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met
 1          5          10          15
Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp
          20          25          30
Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly
          35          40          45
Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly
          50          55          60
Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile
65          70          75          80
Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Lys
          85          90          95
Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn His Glu
          100          105          110
Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val Pro Asn
          115          120          125
Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys
          130          135          140
Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp
145          150          155          160
Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys
          165          170          175
Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys
          180          185          190
Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile
          195          200          205
His Pro Thr Asp Ser Glu Ser
          210          215

```

<210> 29

<211> 215

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 29

```

Arg Asp Cys Ala Asp Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile
 1          5          10          15
Tyr Thr Ile Tyr Ile Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys
          20          25          30
Asn Met Asp Val Asn Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu
          35          40          45
Asp Gly Ser Leu Asp Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly
          50          55          60
Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe
65          70          75          80
Ala Ile Thr Ser Gln Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp
          85          90          95
Trp Glu Gly Asn Arg Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly
          100          105          110
Asn Glu Lys Gln Asn Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr
          115          120          125
Ala Gly Lys Gln Ser Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr
          130          135          140
Lys Asp Ala Asp Asn Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu
145          150          155          160
Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly

```

```

      165      170      175
Met Phe Tyr Thr Ala Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys
      180      185      190
Trp His Tyr Phe Lys Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met
      195      200      205
Met Ile Arg Pro Leu Asp Phe
      210      215

```

<210> 30
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

```

<400> 30
Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile
 1      5      10      15
Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys
      20      25      30
Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu
      35      40      45
Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly
      50      55      60
Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser
      65      70      75      80
Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp
      85      90      95
Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser
      100      105      110
Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr
      115      120      125
Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr
      130      135      140
Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu
      145      150      155      160
Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly
      165      170      175
Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys
      180      185      190
Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met
      195      200      205
Met Ile Arg Pro Ala Asp Phe
      210      215

```

<210> 31
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

```

<400> 31
Gln Asp Cys Ala Glu Ile Gln Arg Ser Gly Ala Ser Ala Ser Gly Val
 1      5      10      15
Tyr Thr Ile Gln Val Ser Asn Ala Thr Lys Pro Arg Lys Val Phe Cys
      20      25      30
Asp Leu Gln Ser Ser Gly Gly Arg Trp Thr Leu Ile Gln Arg Arg Glu
      35      40      45
Asn Gly Thr Val Asn Phe Gln Arg Asn Trp Lys Asp Tyr Lys Gln Gly
      50      55      60
Phe Gly Asp Pro Ala Gly Glu His Trp Leu Gly Asn Glu Val Val His

```

```

65          70          75          80
Gln Leu Thr Arg Arg Ala Ala Tyr Ser Leu Arg Val Glu Leu Gln Asp
      85          90          95
Trp Glu Gly His Glu Ala Tyr Ala Gln Tyr Glu His Phe His Leu Gly
      100        105        110
Ser Glu Asn Gln Leu Tyr Arg Leu Ser Val Val Gly Tyr Ser Gly Ser
      115        120        125
Ala Gly Arg Gln Ser Ser Leu Val Leu Gln Asn Thr Ser Phe Ser Thr
      130        135        140
Leu Asp Ser Asp Asn Asp His Cys Leu Cys Lys Cys Ala Gln Val Met
145        150        155        160
Ser Gly Gly Trp Trp Phe Asp Ala Cys Gly Leu Ser Asn Leu Asn Gly
      165        170        175
Val Tyr Tyr His Ala Pro Asp Asn Lys Tyr Lys Met Asp Gly Ile Arg
      180        185        190
Trp His Tyr Phe Lys Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ala Ser Arg Met
      195        200        205
Met Ile Arg Pro Leu Asp Ile
      210        215

```

<210> 32
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 鼠

<400> 32
 atatgccttg gcggatgc 18

<210> 33
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 鼠

<400> 33
 atggacaaaa tctttaagtc catgac 26

<210> 34
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 鼠

<400> 34
 ctcccagagc acacagacct gatgtttt 28

<210> 35
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 鼠

<400> 35
 gctggcaata tccctggg 18

<210> 36
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 鼠

<400> 36
 agctgtccct ttgctctgtg a 21

```

GCGGACGCGT GGGTGAAATT GAAAATCAAG ATAAAAATGT TCACAATTAA 50
GCTCCTTCTT TTTATTGTTC CTCTAGTTAT TTCTCCAGA ATTGATCAAG 100
ACAATTCATC ATTTGATTCT CTATCTCCAG AGCCAAAATC AAGATTTGCT 150
ATGTTAGACG ATGTAAAAAT TTTAGCCAAT GGCCTCCTTC AGTTGGGACA 200
TGGTCTTAAA GACTTTGTCC ATAAGACGAA GGGCCAAATT AATGACATAT 250
TTCAAAAAC TCAACATATTT GATCAGTCTT TTTATGATCT ATCGCTGCAA 300
ACCAAGTAAA TCAAAGAAGA AGAAAAGGAA CTGAGAAGAA CTACATATAA 350
ACTACAAGTC AAAAATGAAG AGGTAAAGAA TATGTCACCT GAACTCAACT 400
CAAACTTGA AAGCCTCCTA GAAGAAAAAA TTCTACTTCA ACAAAAAGTG 450
AAATATTTAG AAGAGCAACT AACTAACTTA ATTCAAATC AACCTGAAAC 500
TCCAGAACAC CCAGAAGTAA CTTCACTTAA AACTTTTGTA GAAAAACAAG 550
ATAATAGCAT CAAAGACCTT CTCCAGACCG TGGAAGACCA ATATAAACAA 600
TTAAACCAAC AGCATAGTCA AATAAAGAA ATAGAAAATC AGCTCAGAAG 650
GACTAGTATT CAAGAACCCA CAGAAATTTT TCTATCTTCC AAGCCAAGAG 700
CACCAAGAAC TACTCCCTTT CTTCAAGTTGA ATGAAAATAAG AAATGTAAAA 750
CATGATGGCA TTCCTGCTGA ATGTACCACC ATTTATAACA GAGGTGAACA 800
TACAAGTGGC ATGTATGCCA TCAGACCCAG CAACTCTCAA GTTTTTCATG 850
TCTACTGTGA TGTATATCA GGTAGTCCAT GGACATTAAT TCAACATCGA 900
ATAGATGGAT CACAAAACCT CAATGAAACG TGGGAGAACT ACAAAATATGG 950
TTTTGGGAGG CTTGATGGAG AATTTTGGTT GGGCCTAGAG AAGATATACT 1000
CCATAGTGAA GCAATCTAAT TATGTTTAC GAATTGAGTT GGAAGACTGG 1050
AAAGACAACA AACATTATAT TGAATATTCT TTTTACTTGG GAAATCACGA 1100
AACCAACTAT ACGCTACATC TAGTTGCGAT TACTGGCAAT GTCCCAATG 1150
CAATCCCGGA AAACAAAGAT TTGGTGTTTT CTACTTGGGA TCACAAAGCA 1200
AAAGGACACT TCAACTGTCC AGAGGGTTAT TCAGGAGGCT GGTGGTGGCA 1250
TGATGAGTGT GGAGAAAACA ACCTAAATGG TAAATATAAC AAACCAAGAG 1300
CAAAATCTAA GCCAGAGAGG AGAAGAGGAT TATCTTGGAA GTCTCAAAAT 1350
GGAAGGTTAT ACTCTATAAA ATCAACCAAA ATGTTGATCC ATCCAACAGA 1400
TTCAGAAAGC TTTGAATGAA CTGAGGCAAT TTAAAGGCAT ATTTAACCAT 1450
TAACTCATTC CAAGTTAATG TGGTCTAATA ATCTGGTATA AATCCTTAAG 1500
AGAAAGCTTG AGAAATAGAT TTTTTTTATC TTAAAGTCAC TGTCTATTTA 1550
AGATTAAACA TACAATCACA TAACCTTAAA GAATACCGTT TACATTTCTC 1600
AATCAAAATT CTTATAATAC TATTTGTTTT AAATTTTGTG ATGTGGGAAT 1650
CAATTTTAGA TGGTCACAAT CTAGATTATA ATCAATAGGT GAACTTATTA 1700
AATAACTTTT CTAAATAAAA AATTTAGAGA CTTTTATTTT AAAAGGCATC 1750
ATATGAGCTA ATATCACAAC TTTCCAGTT TAAAAAATA GTACTCTTGT 1800
TAAAACTCTA AACTTGACTA AATACAGAGG ACTGGTAATT GTACAGTTCT 1850
TAAATGTTGT AGTATTAATT TCAAACTAA AAATCGTCAG CACAGAGTAT 1900
GTGTAAAAAT CTGTAATACA AATTTTAAA CTGATGCTTC ATTTTGCTAC 1950
AAAATAATTT GGAGTAAATG TTTGATATGA TTTATTTATG AAACCTAATG 2000
AAGCAGAAAT AAATACTGTA TTAAAAAAG TTCGCTGTCT TT 2042

```

图 1

MET	PHE	THR	ILE	LYS	LEU	LEU	LEU	PHE	ILE	VAL	PRO	LEU	VAL	ILE
1				5					10					15
SER	SER	ARG	ILE	ASP	GLN	ASP	ASN	SER	SER	PHE	ASP	SER	LEU	SER
				20					25					30
PRO	GLU	PRO	LYS	SER	ARG	PHE	ALA	MET	LEU	ASP	ASP	VAL	LYS	ILE
				35					40					45
LEU	ALA	ASN	GLY	LEU	LEU	GLN	LEU	GLY	HIS	GLY	LEU	LYS	ASP	PHE
				50					55					60
VAL	HIS	LYS	THR	LYS	GLY	GLN	ILE	ASN	ASP	ILE	PHE	GLN	LYS	LEU
				65					70					75
ASN	ILE	PHE	ASP	GLN	SER	PHE	TYR	ASP	LEU	SER	LEU	GLN	THR	SER
				80					85					90
GLU	ILE	LYS	GLU	GLU	GLU	LYS	GLU	LEU	ARG	ARG	THR	THR	TYR	LYS
				95					100					105
LEU	GLN	VAL	LYS	ASN	GLU	GLU	VAL	LYS	ASN	MET	SER	LEU	GLU	LEU
				110					115					120
ASN	SER	LYS	LEU	GLU	SER	LEU	LEU	GLU	GLU	LYS	ILE	LEU	LEU	GLN
				125					130					135
GLN	LYS	VAL	LYS	TYR	LEU	GLU	GLU	GLN	LEU	THR	ASN	LEU	ILE	GLN
				140					145					150
ASN	GLN	PRO	GLU	THR	PRO	GLU	HIS	PRO	GLU	VAL	THR	SER	LEU	LYS
				155					160					165
THR	PHE	VAL	GLU	LYS	GLN	ASP	ASN	SER	ILE	LYS	ASP	LEU	LEU	GLN
				170					175					180
THR	VAL	GLU	ASP	GLN	TYR	LYS	GLN	LEU	ASN	GLN	GLN	HIS	SER	GLN
				185					190					195
ILE	LYS	GLU	ILE	GLU	ASN	GLN	LEU	ARG	ARG	THR	SER	ILE	GLN	GLU
				200					205					210
PRO	THR	GLU	ILE	SER	LEU	SER	SER	LYS	PRO	ARG	ALA	PRO	ARG	THR
				215					220					225
THR	PRO	PHE	LEU	GLN	LEU	ASN	GLU	ILE	ARG	ASN	VAL	LYS	HIS	ASP
				230					235					240
GLY	ILE	PRO	ALA	GLU	CYS	THR	THR	ILE	TYR	ASN	ARG	GLY	GLU	HIS
				245					250					255
THR	SER	GLY	MET	TYR	ALA	ILE	ARG	PRO	SER	ASN	SER	GLN	VAL	PHE
				260					265					270
HIS	VAL	TYR	CYS	ASP	VAL	ILE	SER	GLY	SER	PRO	TRP	THR	LEU	ILE
				275					280					285
GLN	HIS	ARG	ILE	ASP	GLY	SER	GLN	ASN	PHE	ASN	GLU	THR	TRP	GLU
				290					295					300
ASN	TYR	LYS	TYR	GLY	PHE	GLY	ARG	LEU	ASP	GLY	GLU	PHE	TRP	LEU
				305					310					315
GLY	LEU	GLU	LYS	ILE	TYR	SER	ILE	VAL	LYS	GLN	SER	ASN	TYR	VAL
				320					325					330
LEU	ARG	ILE	GLU	LEU	GLU	ASP	TRP	LYS	ASP	ASN	LYS	HIS	TYR	ILE
				335					340					345

图 2A

GLU	TYR	SER	PHE	TYR	LEU	GLY	ASN	HIS	GLU	THR	ASN	TYR	THR	LEU
					350					355				360
HIS	LEU	VAL	ALA	ILE	THR	GLY	ASN	VAL	PRO	ASN	ALA	ILE	PRO	GLU
					365					370				375
ASN	LYS	ASP	LEU	VAL	PHE	SER	THR	TRP	ASP	HIS	LYS	ALA	LYS	GLY
					380					385				390
HIS	PHE	ASN	CYS	PRO	GLU	GLY	TYR	SER	GLY	GLY	TRP	TRP	TRP	HIS
					395					400				405
ASP	GLU	CYS	GLY	GLU	ASN	ASN	LEU	ASN	GLY	LYS	TYR	ASN	LYS	PRO
					410					415				420
ARG	ALA	LYS	SER	LYS	PRO	GLU	ARG	ARG	ARG	GLY	LEU	SER	TRP	LYS
					425					430				435
SER	GLN	ASN	GLY	ARG	LEU	TYR	SER	ILE	LYS	SER	THR	LYS	MET	LEU
					440					445				450
ILE	HIS	PRO	THR	ASP	SER	GLU	SER	PHE	GLU					
					455				460					

图 2B

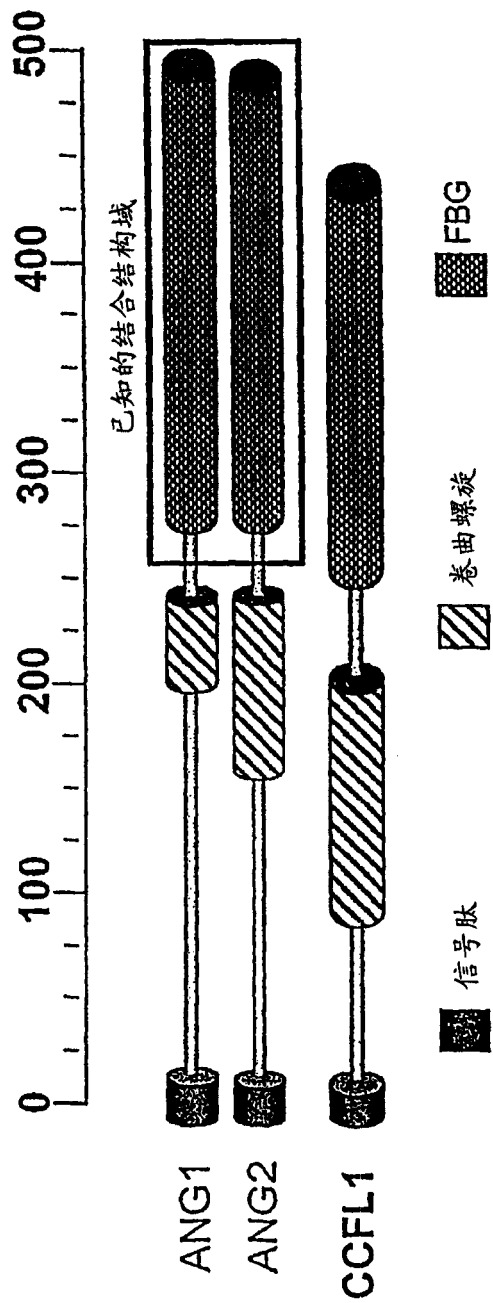


图 3A

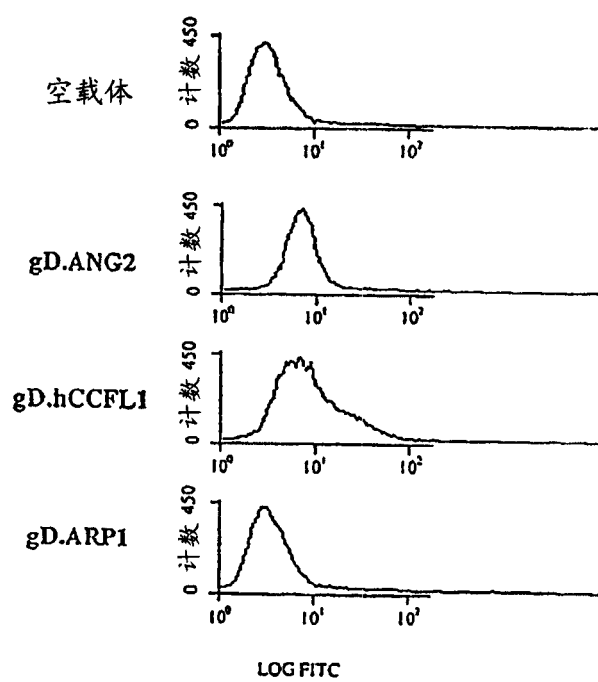


图 3B

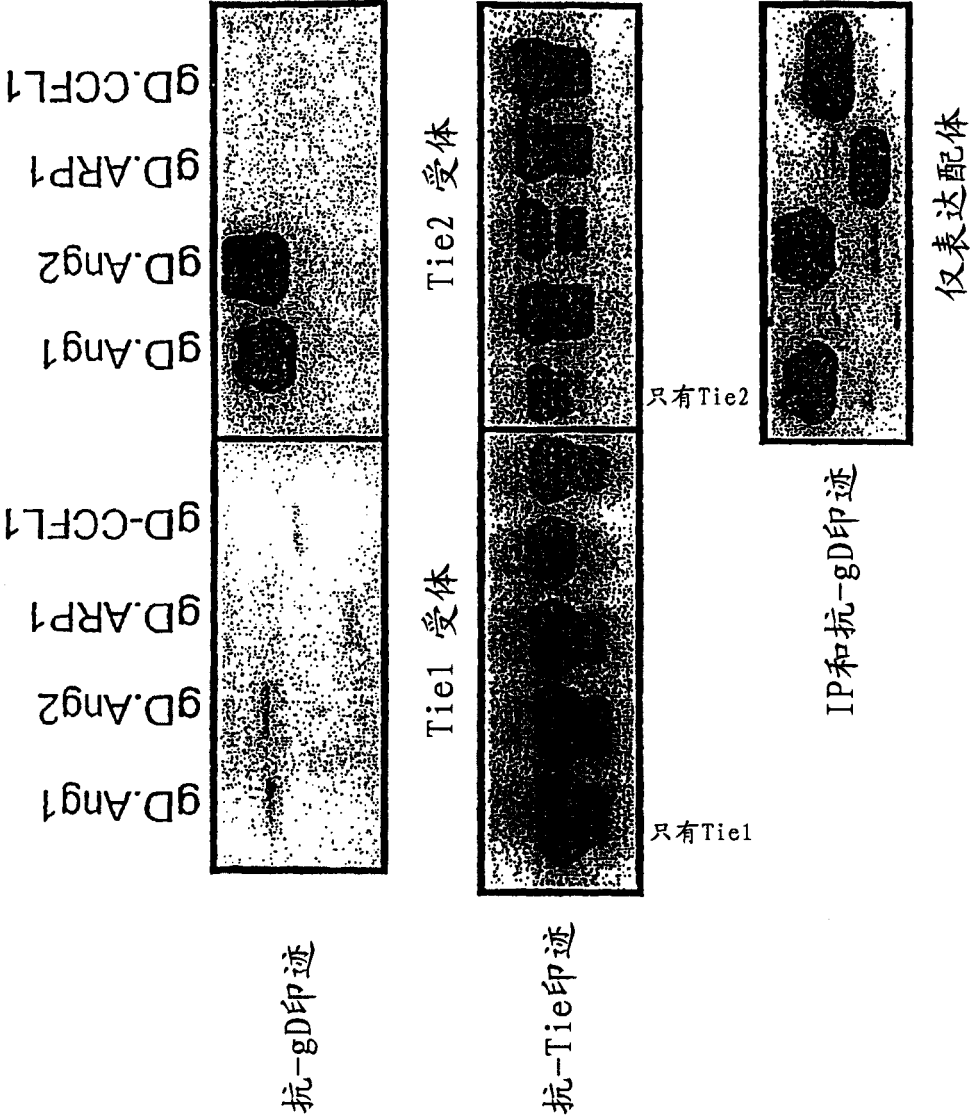
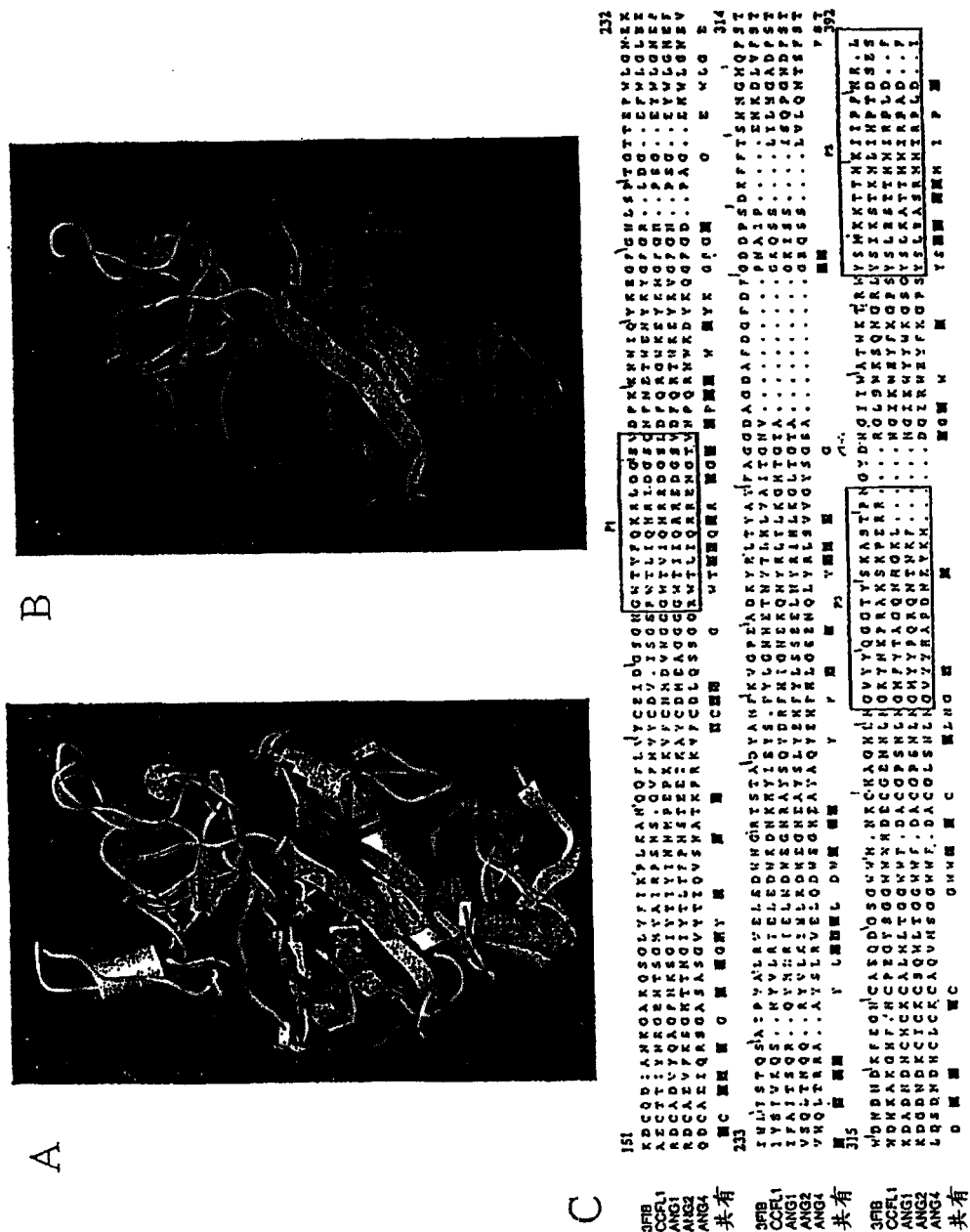


图 4



5

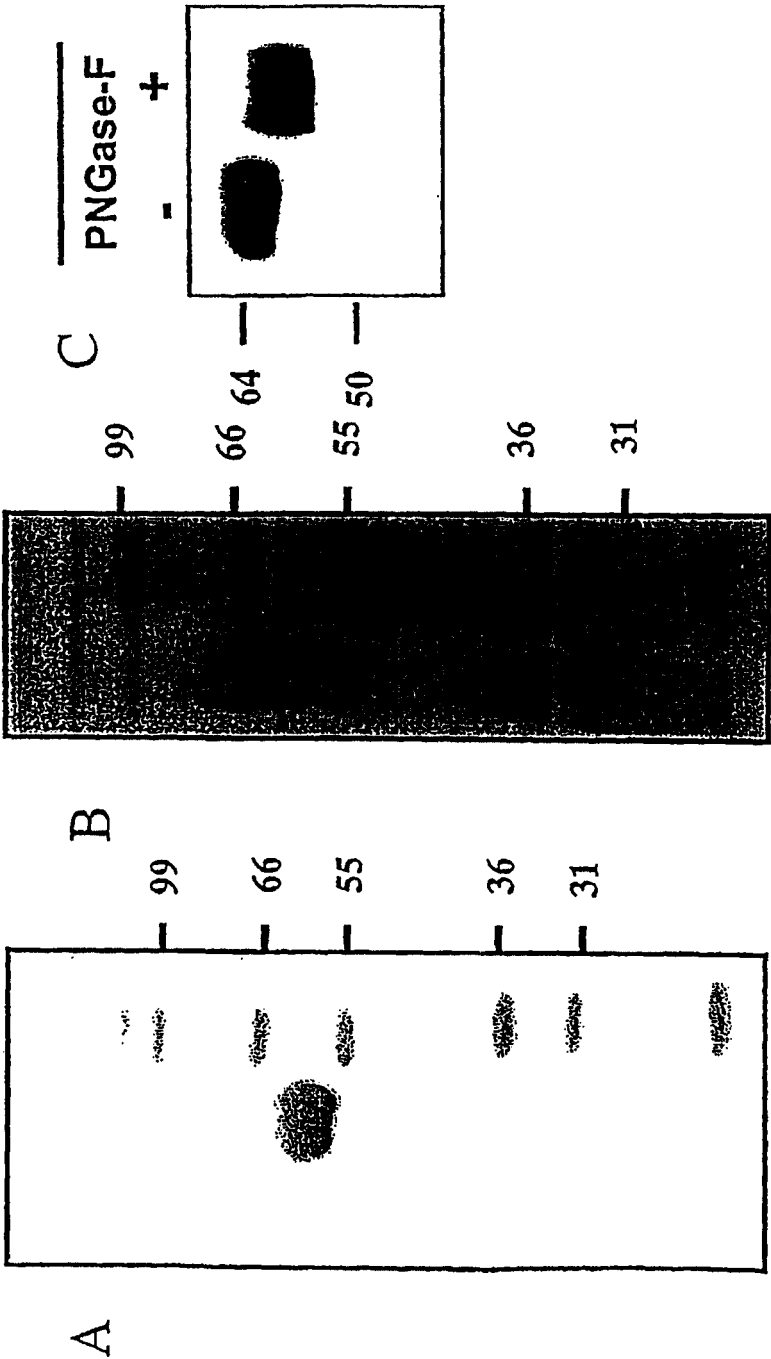


图 6

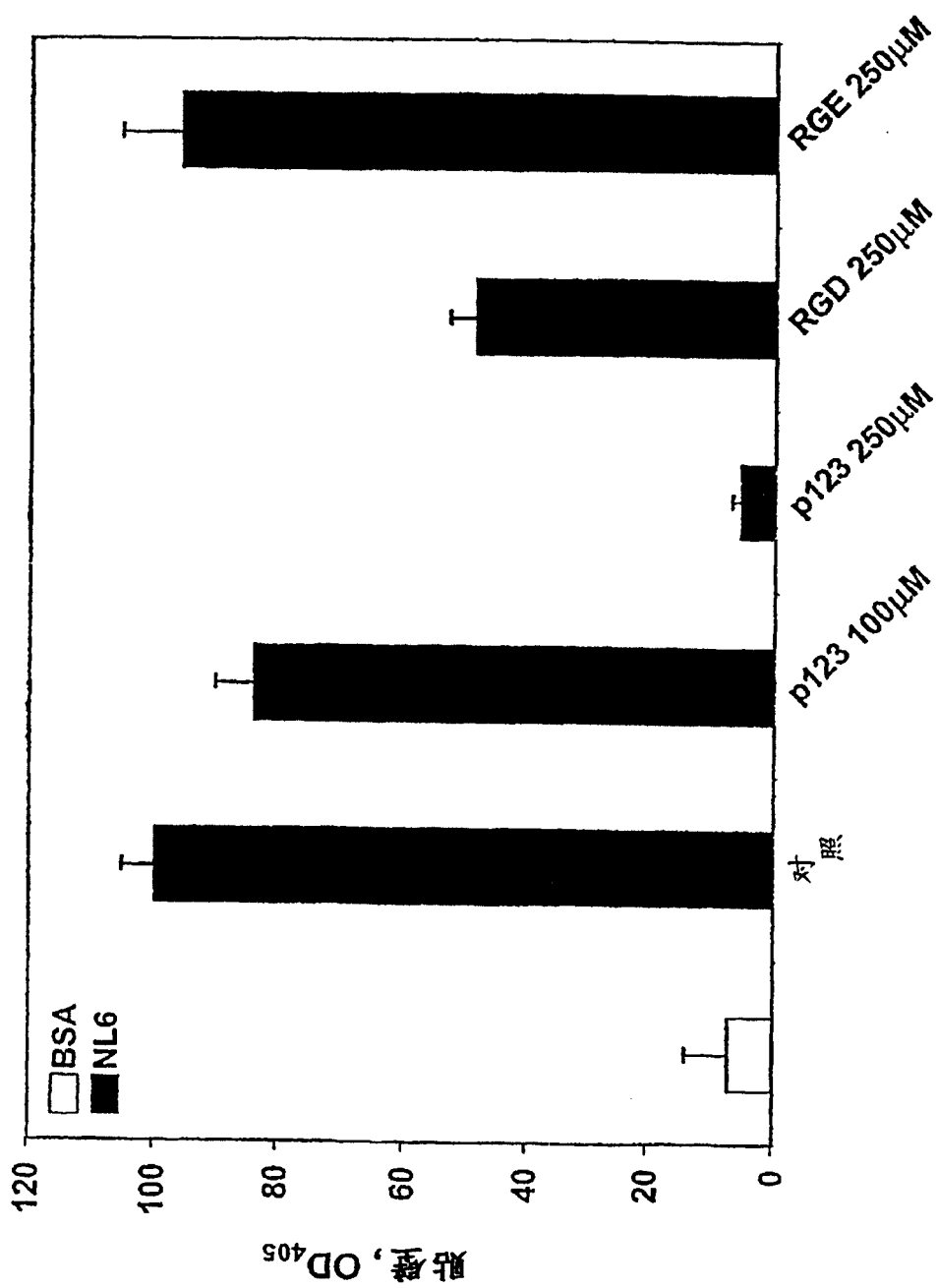


图 7A

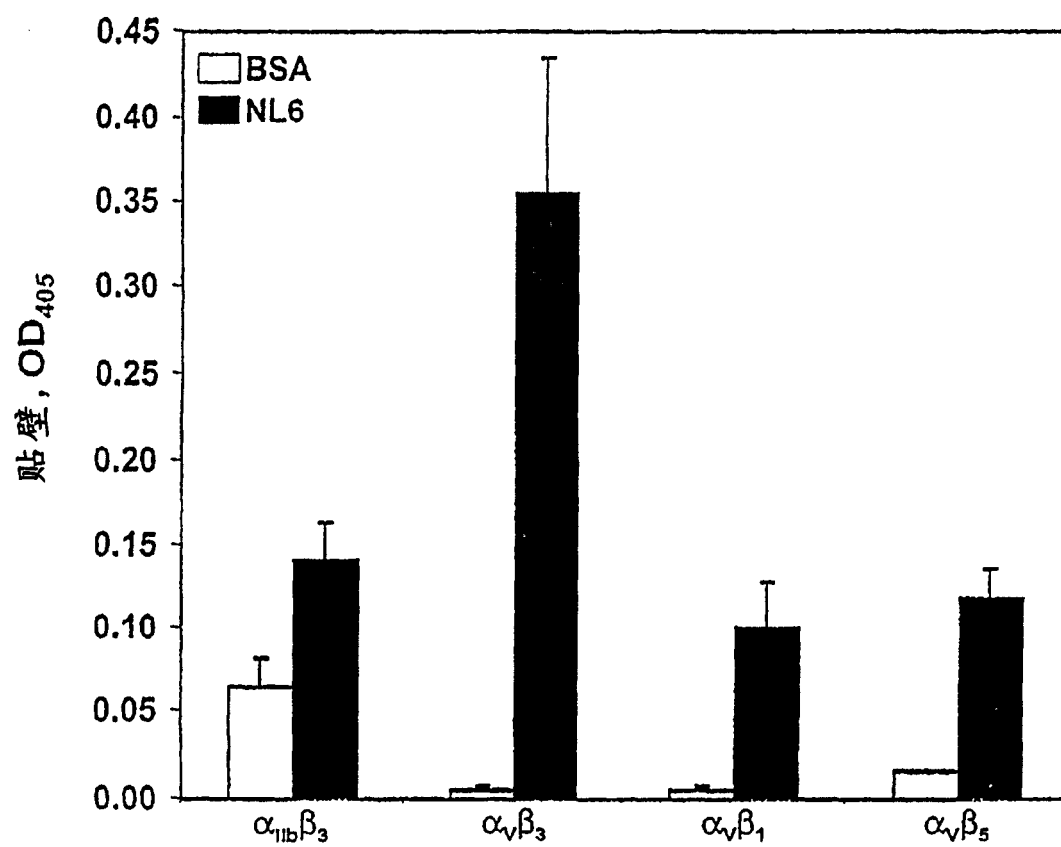


图 7B

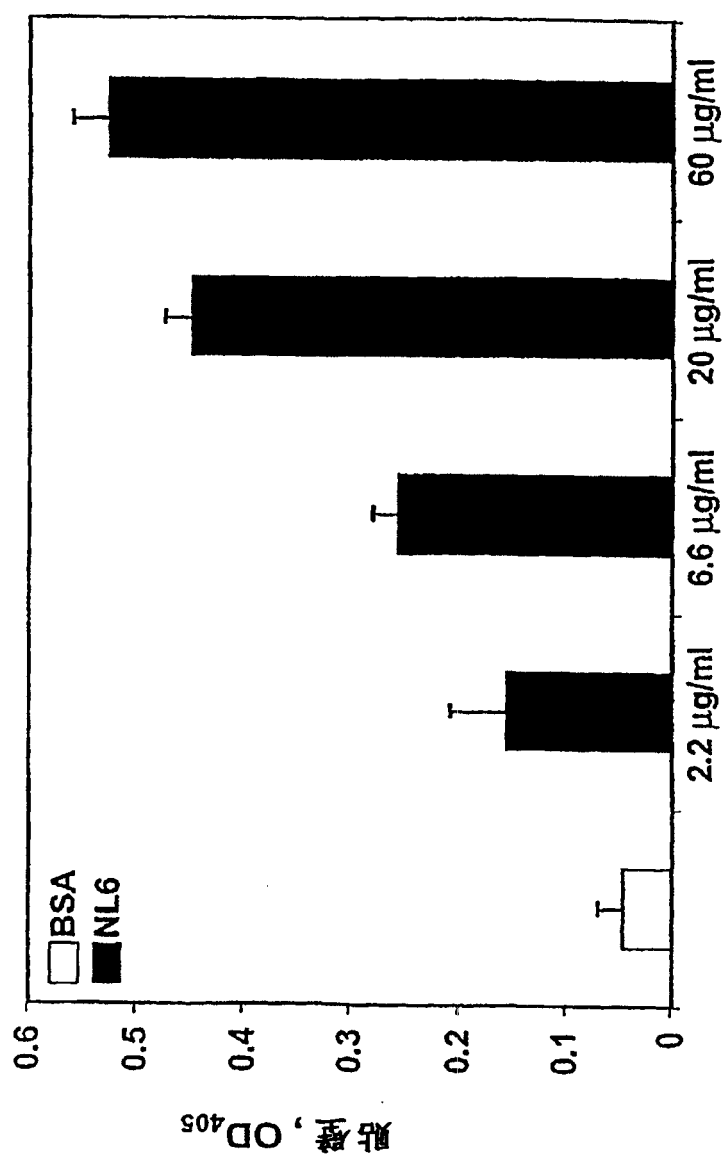


图 7C

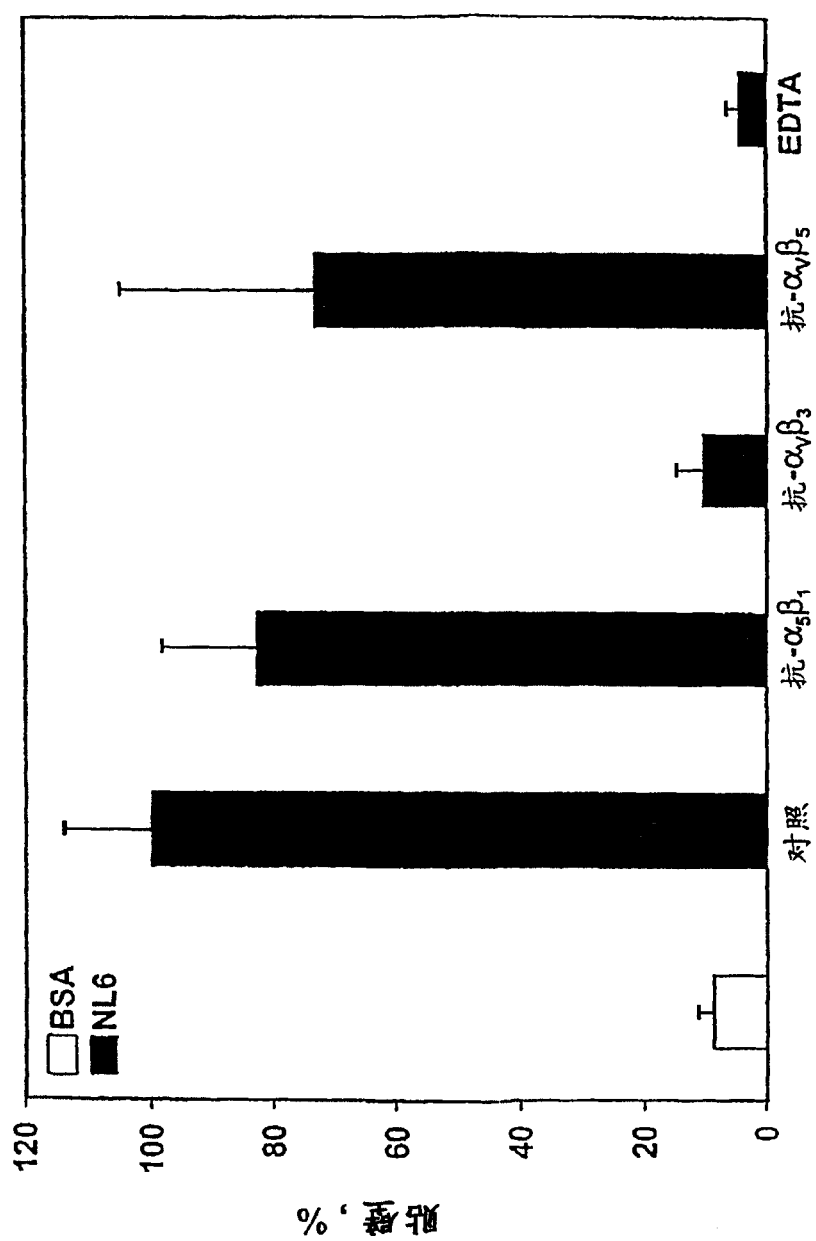


图 7D

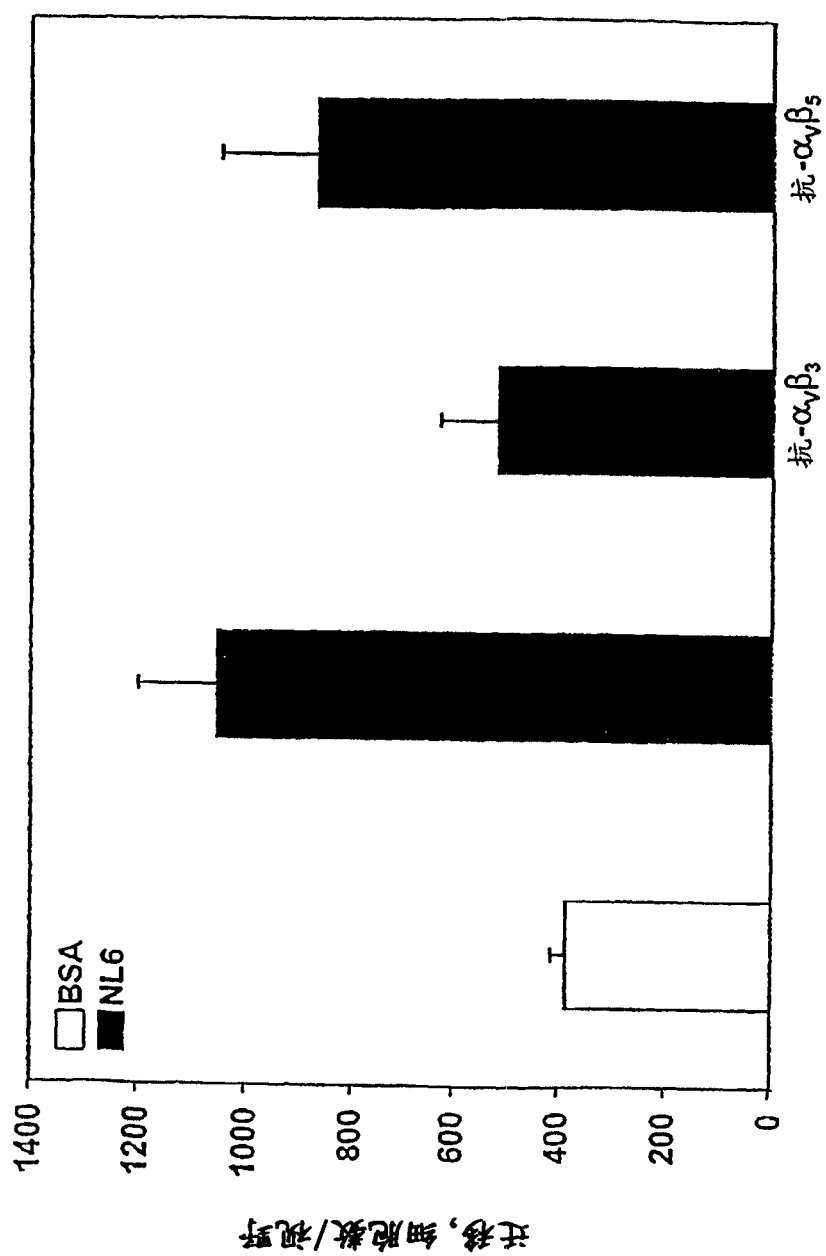


图 7E

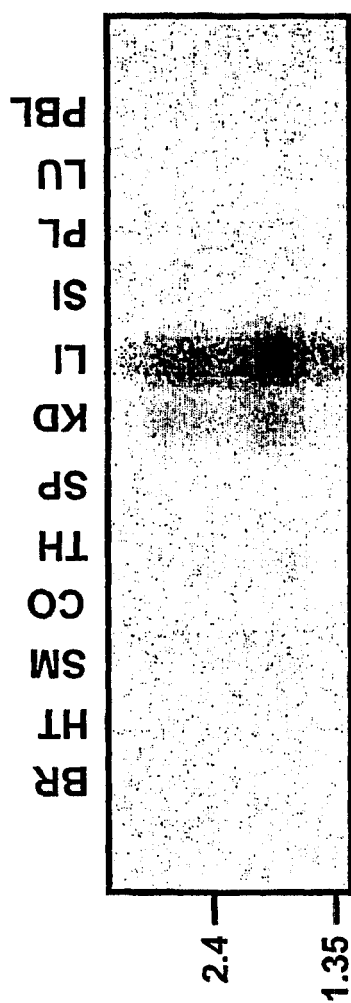


图 8A

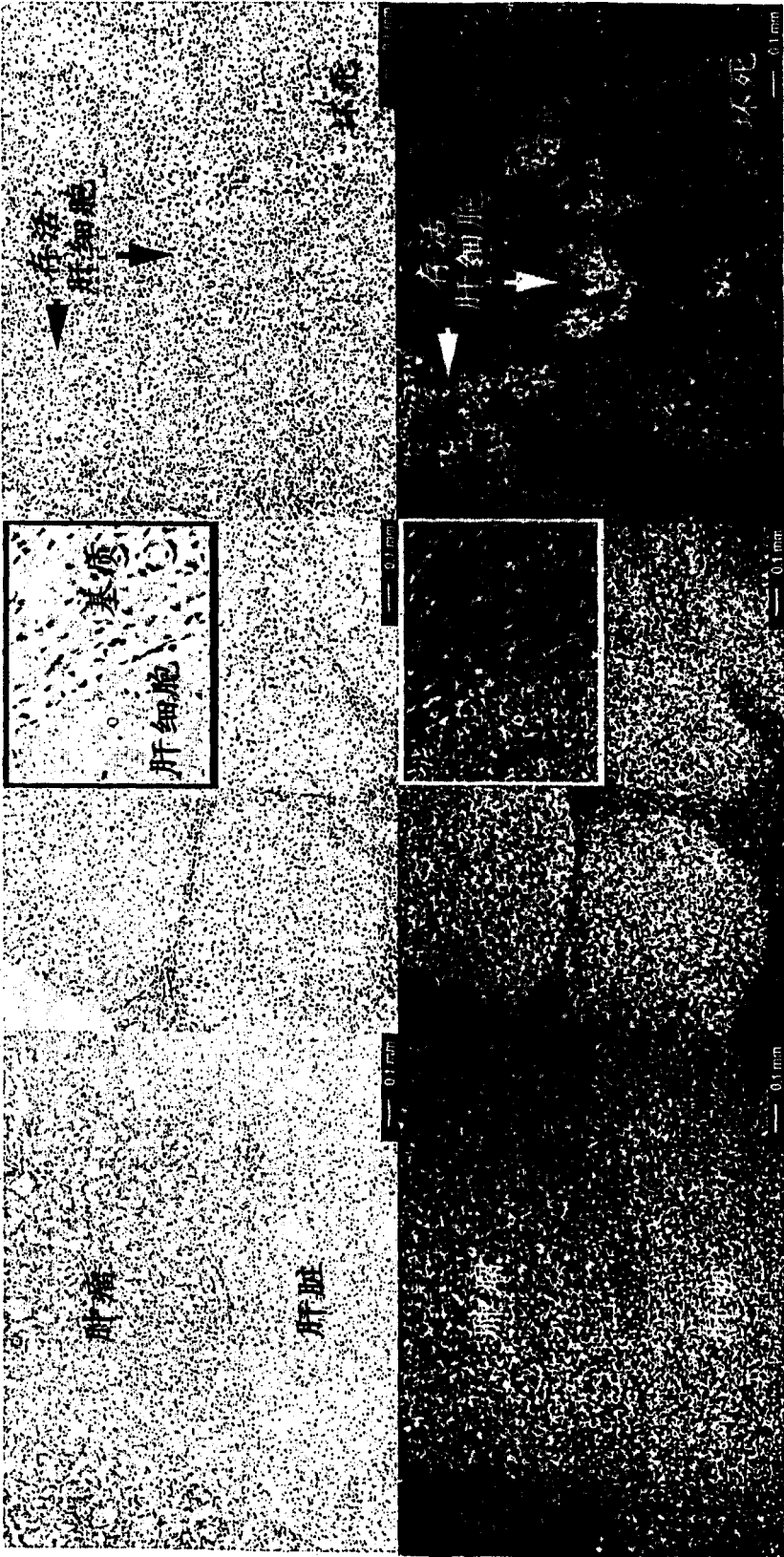


图 8B

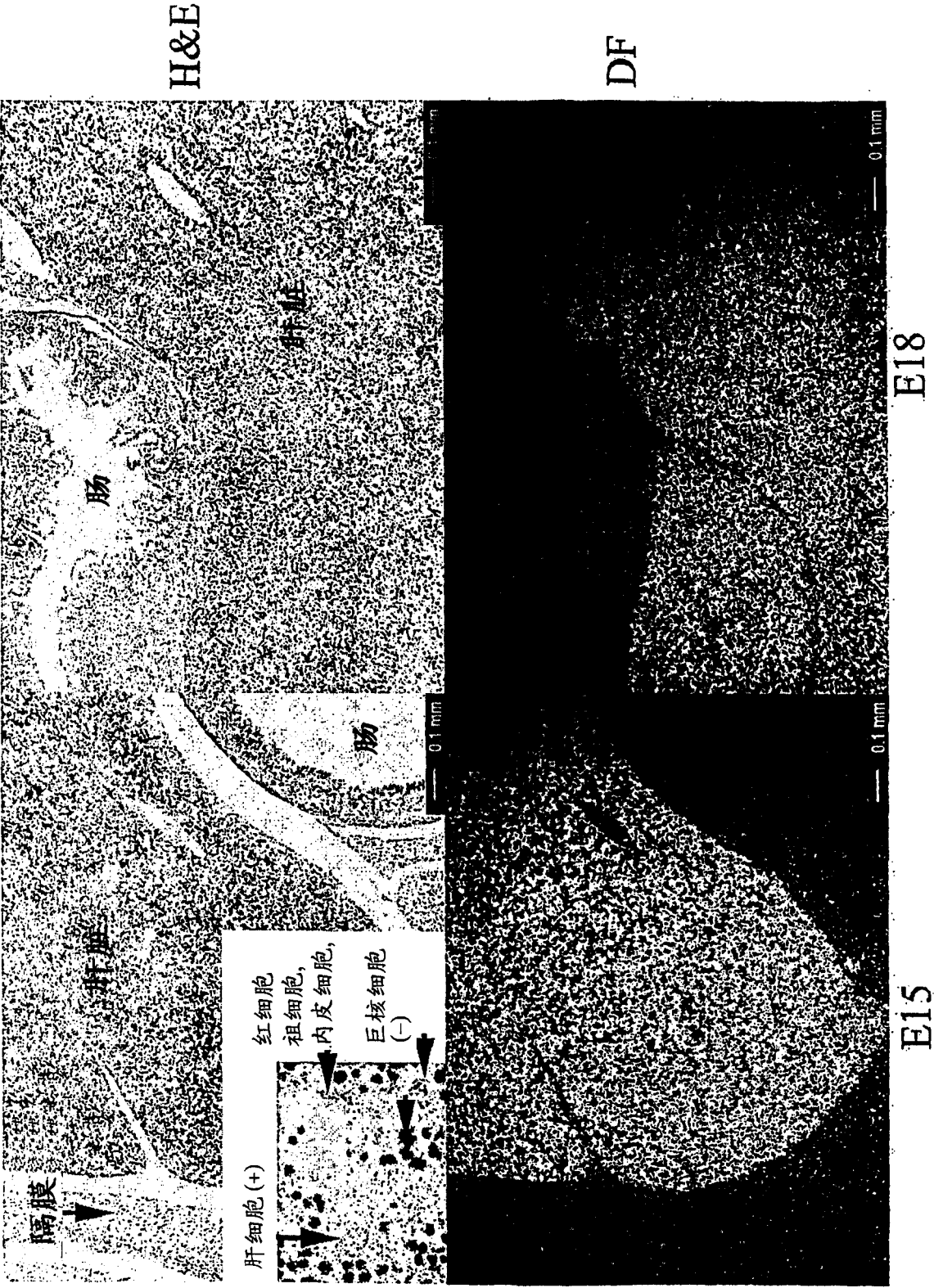


图 8C

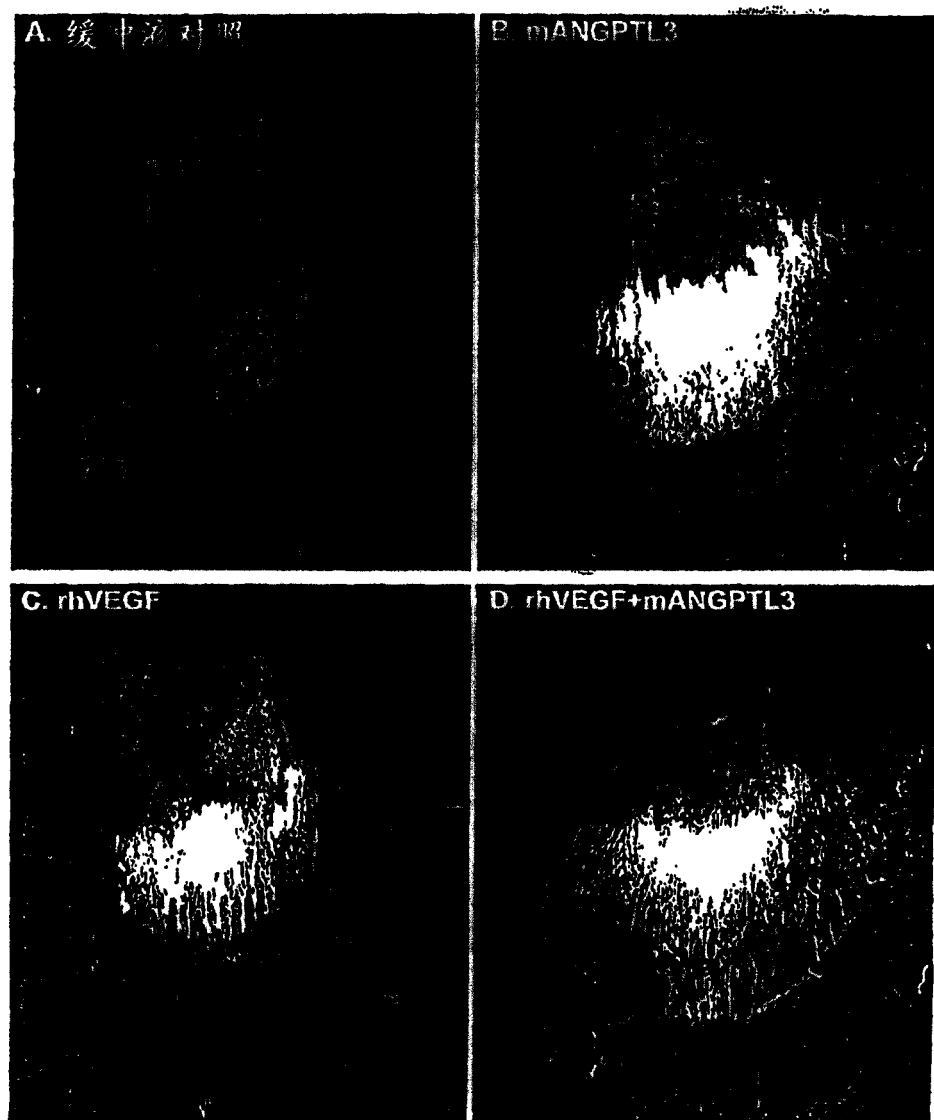


图 9

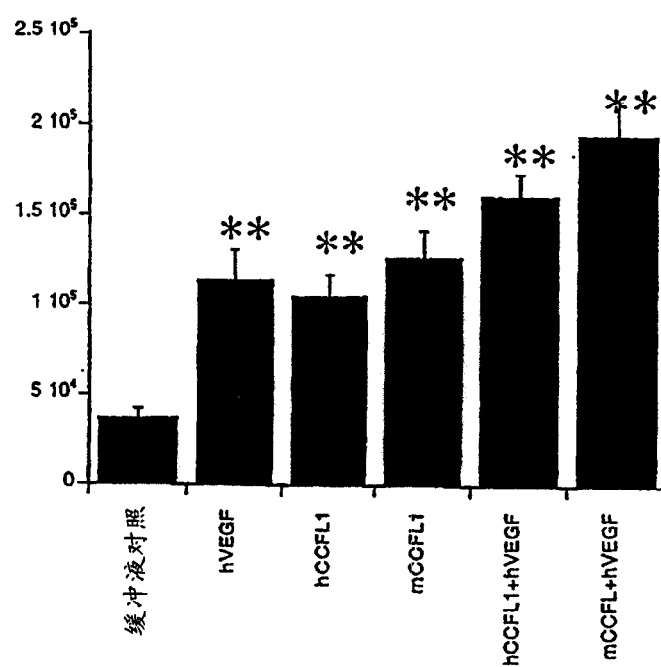


图 9E

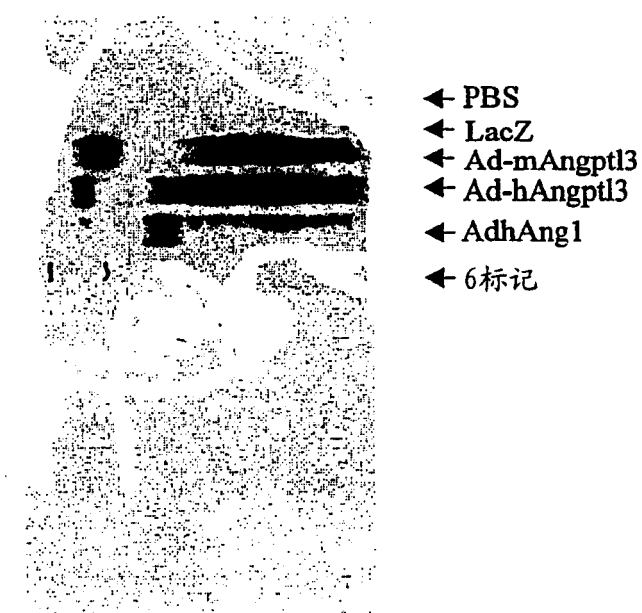


图 10A

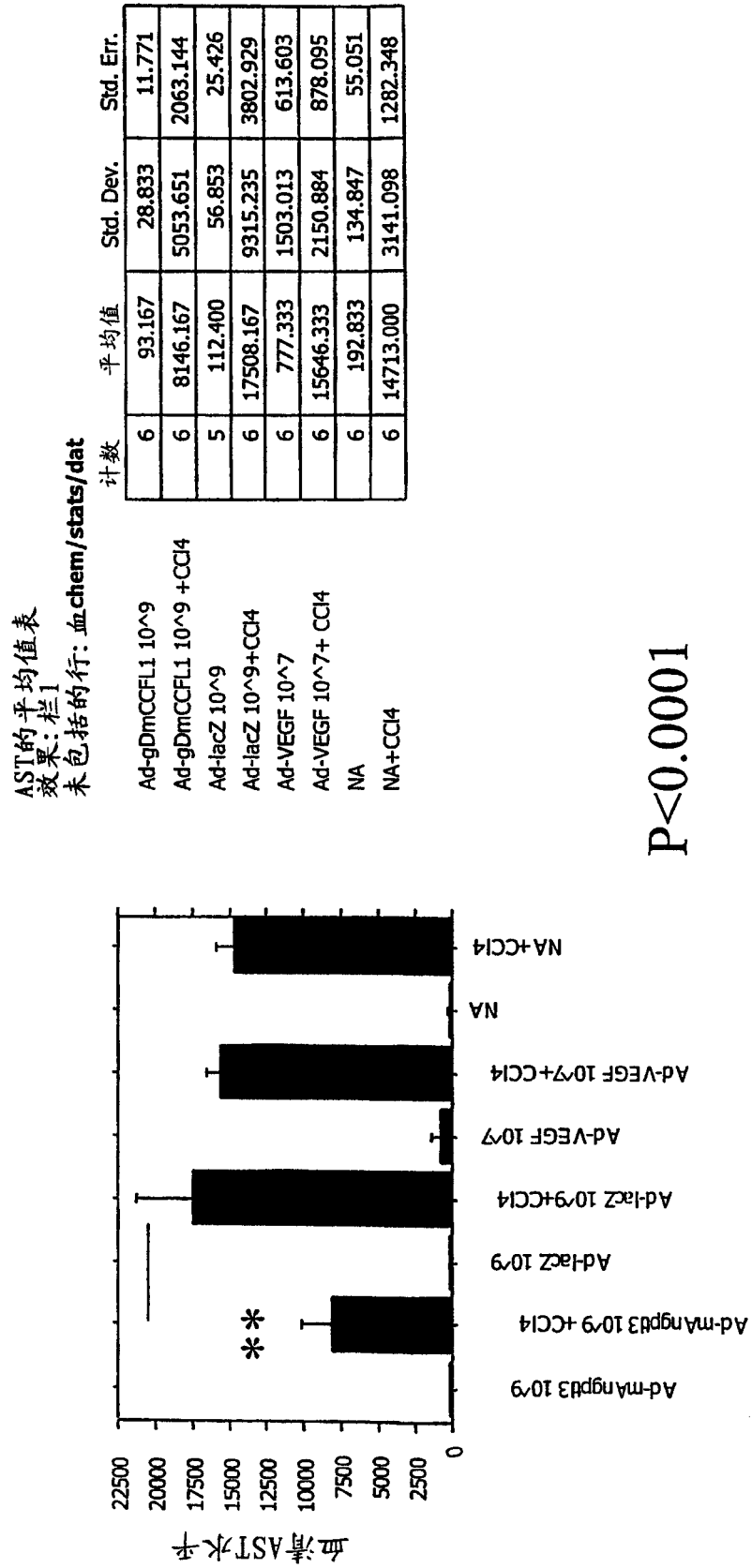


图 10B

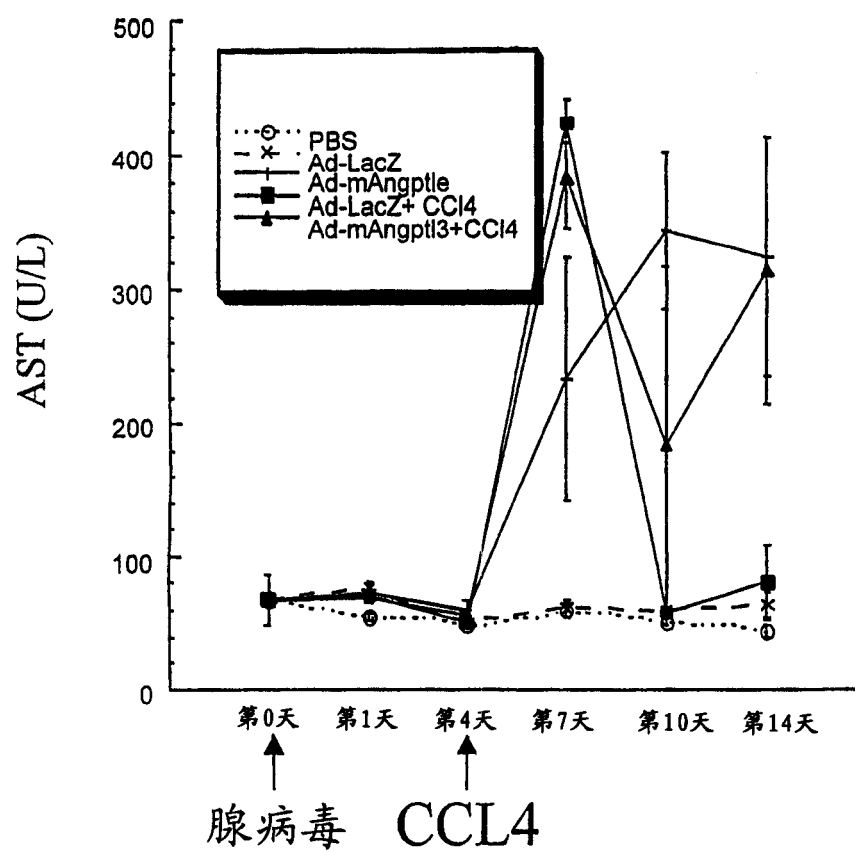


图 11A

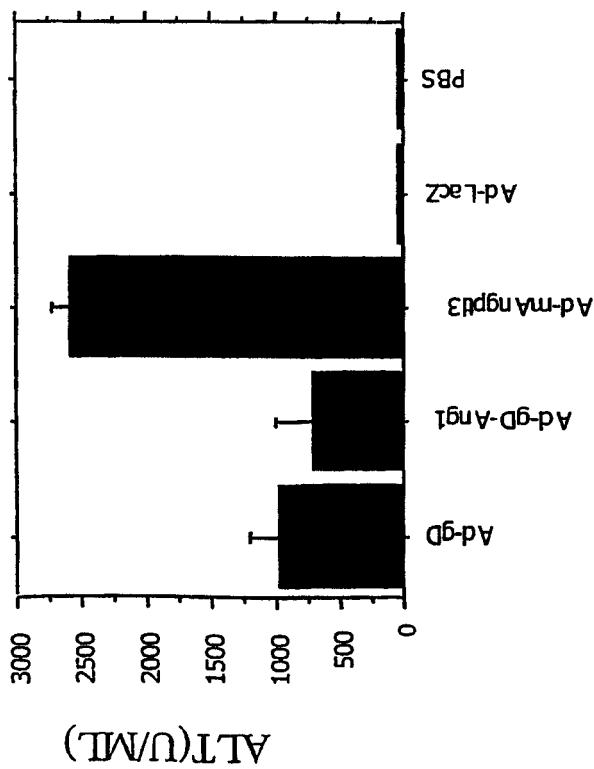
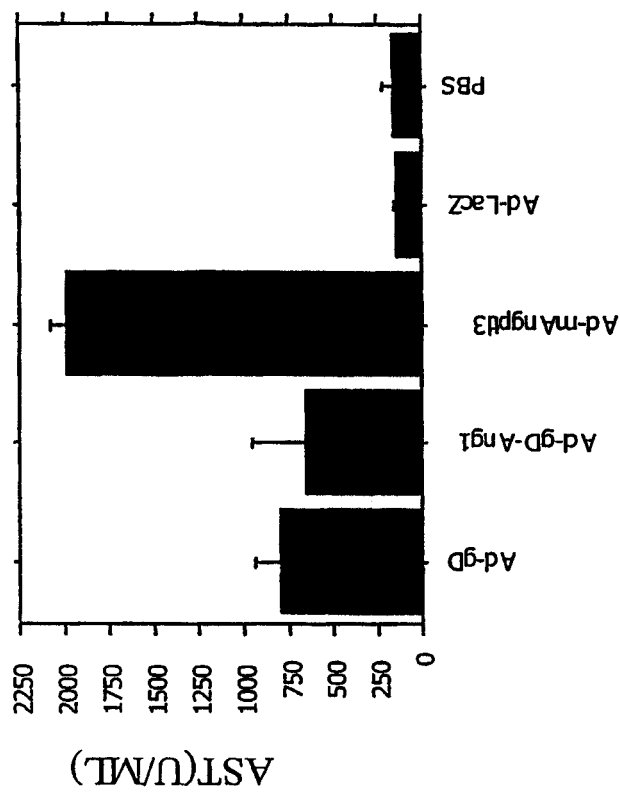


图 11B

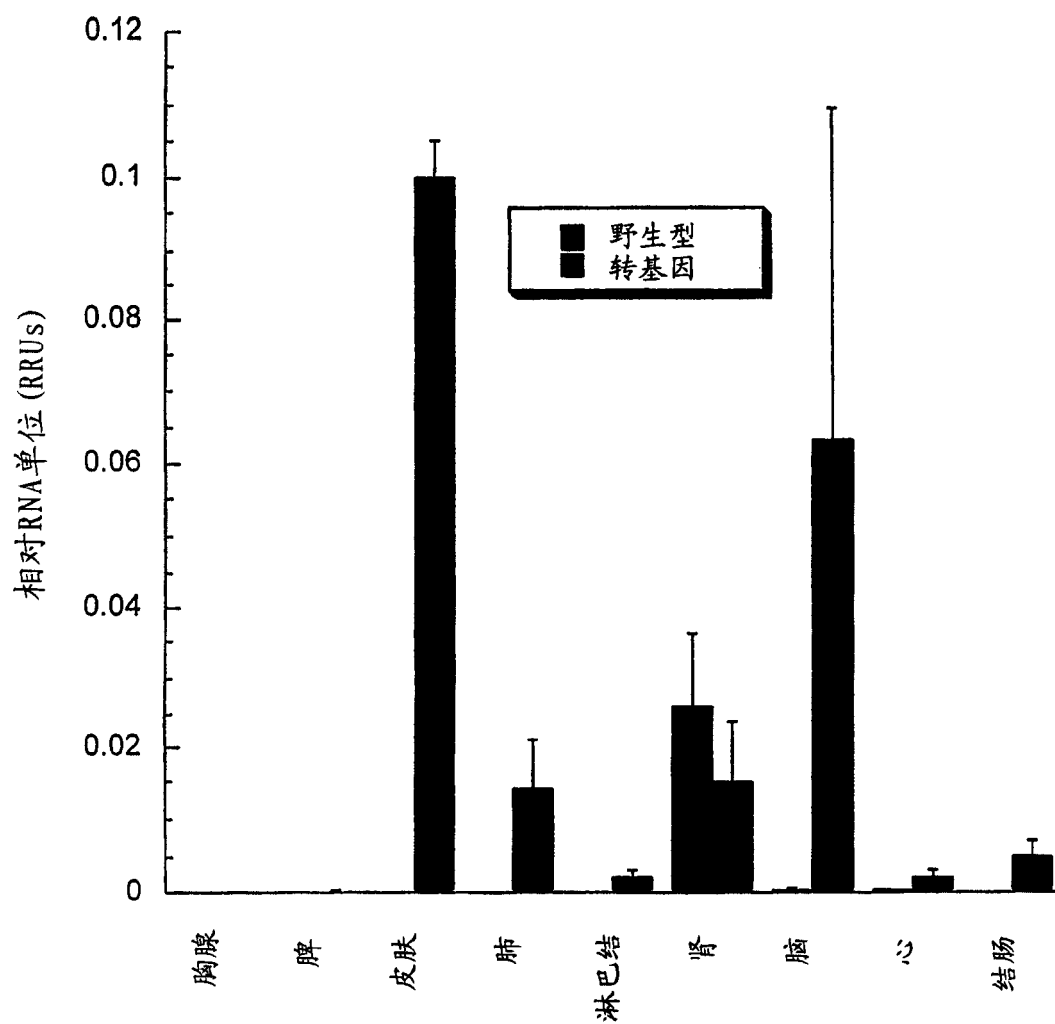


图 12A

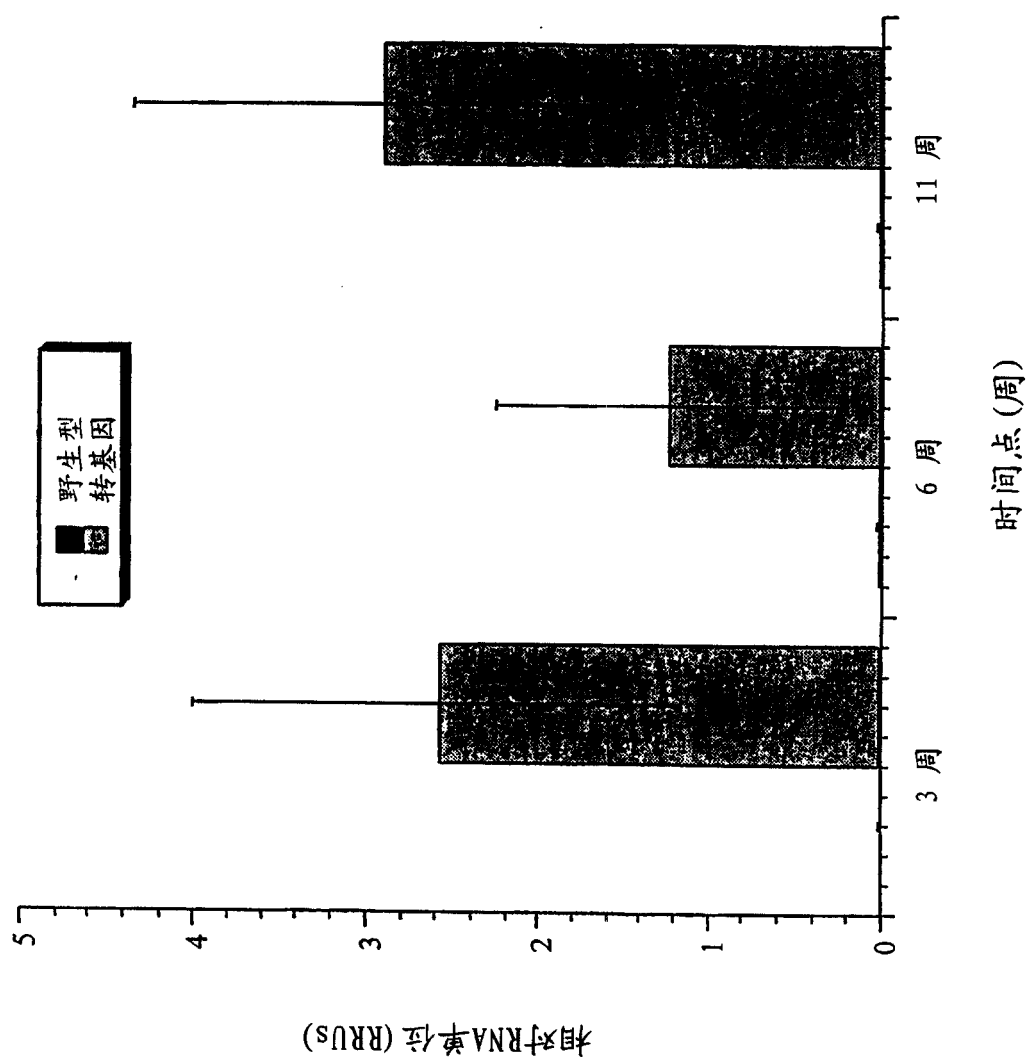


图 12B

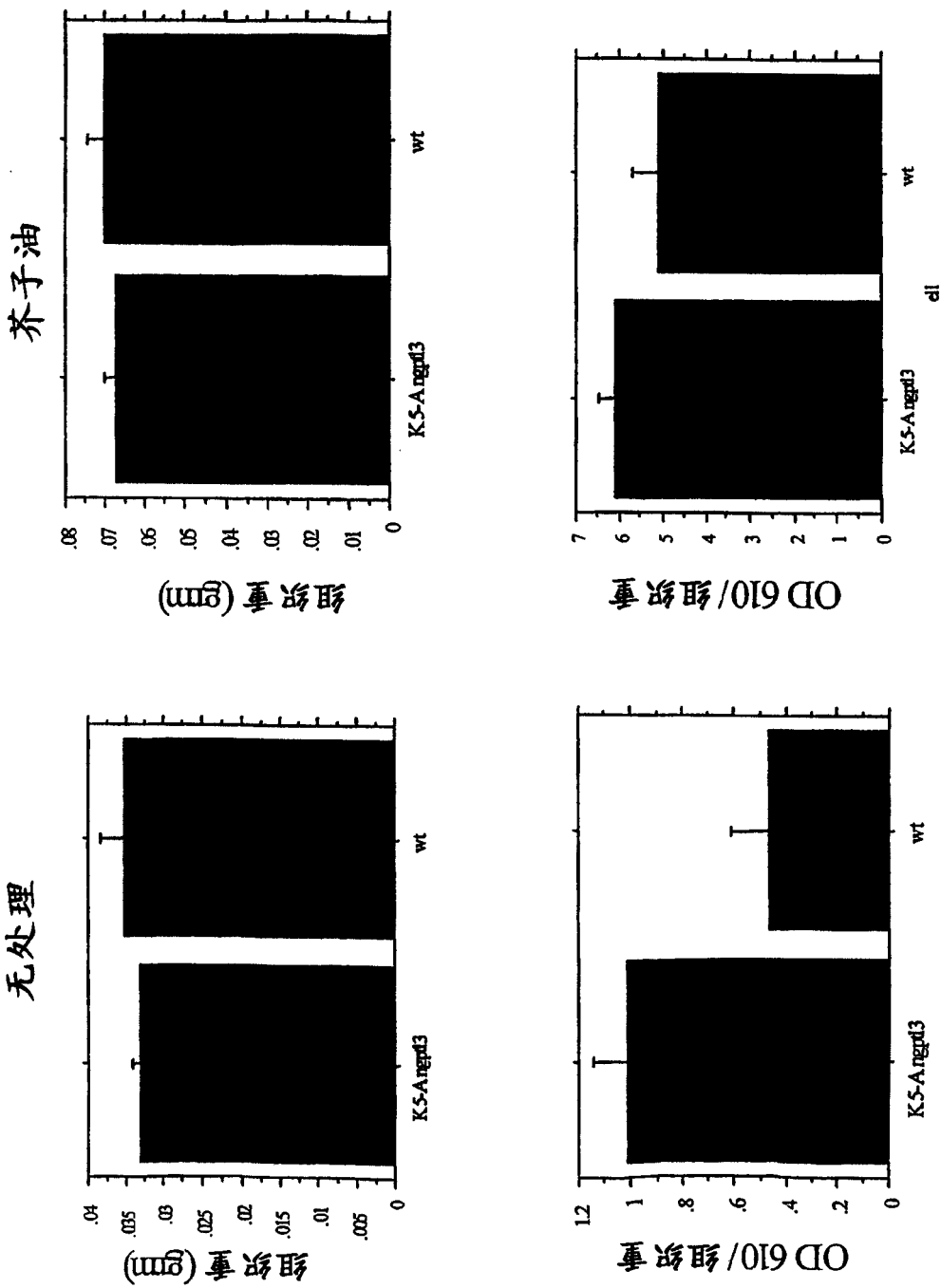


图 12C

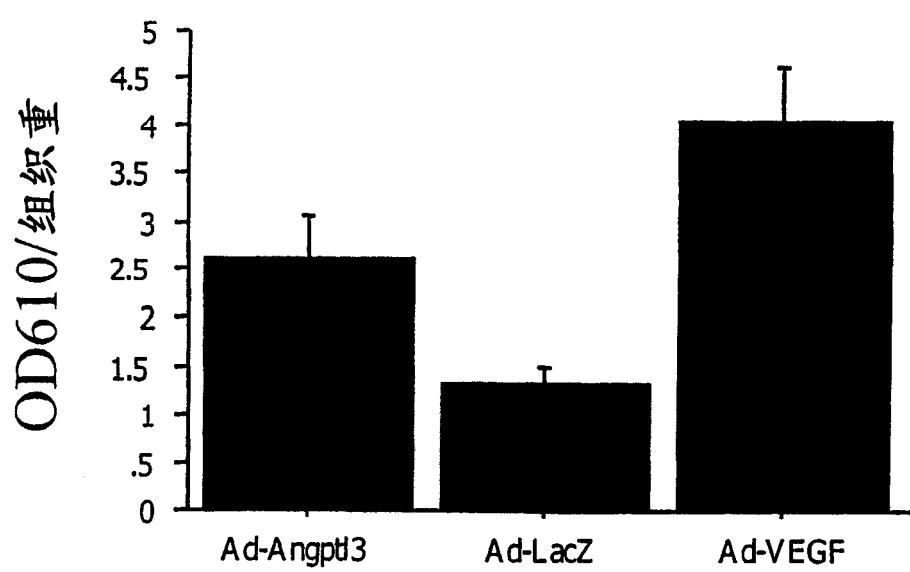


图 12D

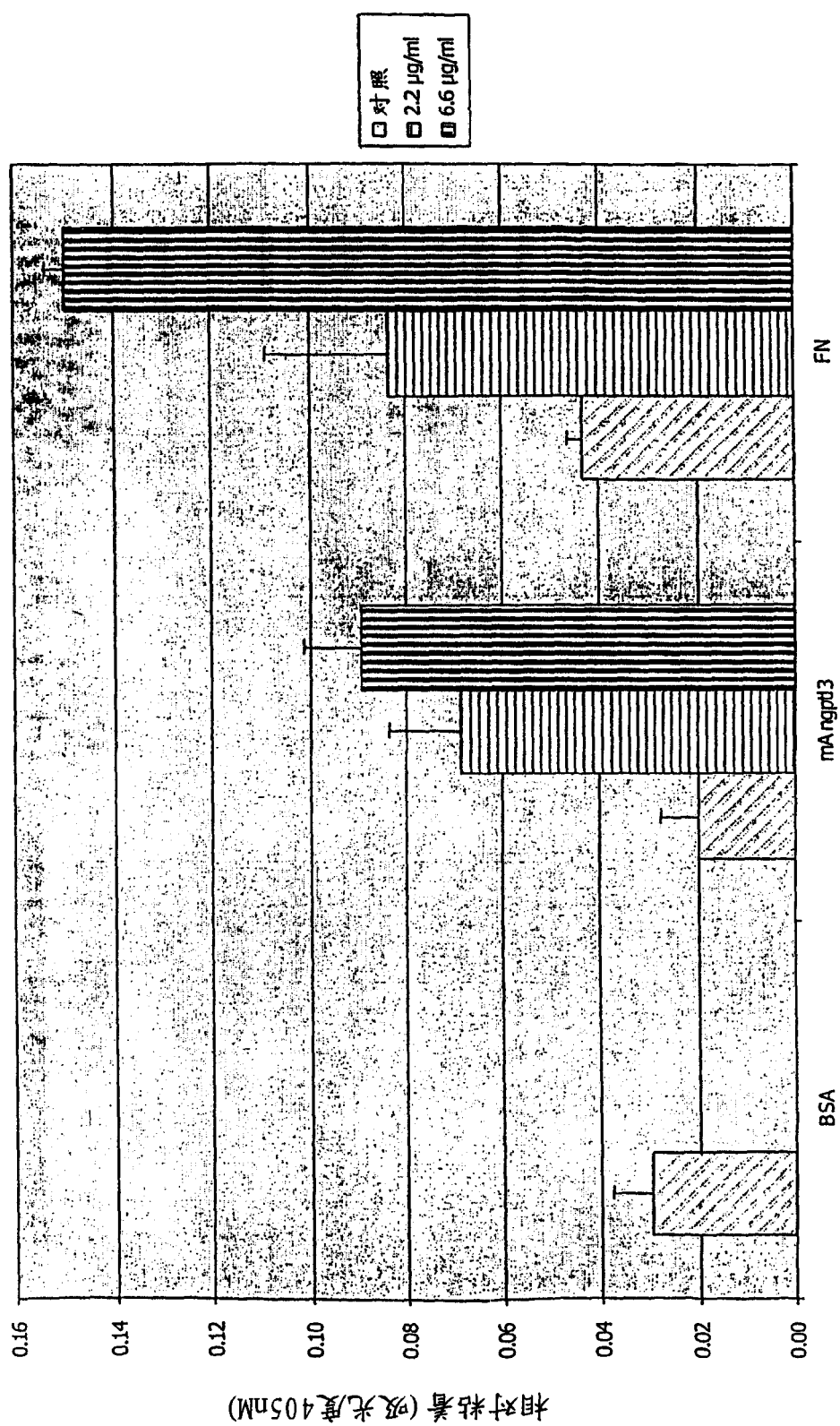


图 13

专利名称(译)	含有血管生成素 - 样蛋白质3ANGPTL3的组合物及其使用方法		
公开(公告)号	CN1615440A	公开(公告)日	2005-05-11
申请号	CN02827192.0	申请日	2002-11-13
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	杰南技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	杰南技术公司		
[标]发明人	纳波莱昂内费拉拉 汉斯彼得格伯 乔科沃尔斯基 玛丽亚T皮萨巴罗 丹尼尔E舍曼		
发明人	纳波莱昂内·费拉拉 汉斯-彼得·格伯 乔·科沃尔斯基 玛丽亚·T·皮萨巴罗 丹尼尔·E·舍曼		
IPC分类号	G01N33/50 A23L1/30 A61K31/704 A61K36/00 A61K36/18 A61K36/27 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/04 A61P9/00 A61P29/00 A61P35/00 C07K14/515 C07K16/22 C07K16/28 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/567 A01N37/18		
CPC分类号	A61K48/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P3/04 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/20 A61P35/00 C07K14/515 C12N2799/022		
优先权	60/332429 2001-11-16 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及制备和使用Angptl3多肽的方法和工具。本发明具体涉及Angptl3多肽在诱导肝脏再生和血管生成中的用途。其它方法包括Angptl3多肽在诊断和治疗肝脏疾病中的用途。在此还提供了与本发明的多肽结合的抗体。