

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00804556.9

G01N 33/00
A01N 43/04 A61K 38/00
A61K 39/395 A61K 39/40
A61K 39/42 A61K 39/44
C07H 21/02 C07H 21/04
C12N 15/00 C12N 15/09
C12P 19/34
[11]公开号 CN 1342264A

[43]公开日 2002 年 3 月 27 日

[22]申请日 2000.3.3 [21]申请号 00804556.9

[30]优先权

[32]1999.3.3 [33]US [31]60/160,083

[86]国际申请 PCT/US00/05465 2000.3.3

[87]国际公布 WO00/52462 英 2000.9.8

[85]进入国家阶段日期 2001.9.3

[71]申请人 路德维格癌症研究所

地址 美国纽约

[72]发明人 卡琳·奥瑟 彼得·托伦

乌尔夫·埃里克松

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 5 页 说明书 31 页 附图页数 8 页

[54]发明名称 血管内皮生长因子 B(VEGF-B)缺陷动物的心脏异常及与这些心脏异常相关的方法

[57]摘要

VEGF-B 缺陷动物显示出似乎由房室(AV)传导缺陷以及心肌局部缺血导致的心脏异常。本发明提供了用 VEGF-B 缺陷的非人类动物筛选具有调节房室传导或局部缺血活性的化合物,用于治疗或减轻房室传导缺陷或局部缺血,以及用于诊断心脏病。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种筛选具有调节心房与心室传导活性的化合物的方法，所述方法包括将所述化合物导入 VEGF-B 缺陷的非人动物中，并分析在所述动物体内对房室传导的作用。

2. 一种筛选具有调节局部缺血活性的化合物的方法，所述方法包括将所述化合物导入 VEGF-B 缺陷的非人动物中，并分析在所述动物体内对局部缺血的作用。

3. 一种治疗或减轻哺乳动物房室传导缺陷的方法，包括给予减轻房室传导缺陷有效量的 VEGF-B，或其具有 VEGF-B 生物活性的片段或类似物。

4. 一种治疗或减轻哺乳动物局部缺血的方法，包括给予减轻局部缺血有效量的 VEGF-B，或其具有 VEGF-B 生物活性的片段或类似物。

5. 一种治疗或减轻哺乳动物房室传导缺陷或局部缺血的方法，包括给予有效量的编码 VEGF-B 或其有 VEGF-B 生物活性的片段或类似物的核酸序列，其中所述核酸能编码有效量的所述 VEGF-B，或其片段或类似物，以治疗或减轻房室传导缺陷或局部缺血。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述核酸序列可操纵地与一启动子序列连接。

7. 权利要求 5 的方法，其中所述核酸序列克隆入载体中并可操纵地与一启动子序列连接。

8. 权利要求 7 的方法，其中载体是表达载体。

9. 权利要求 8 的方法，其中表达载体选自基于腺病毒、痘苗病毒或逆转录病毒的载体。

10. 一种在测试个体中诊断特征在于丧失 VEGF-B 表达的心脏疾病的方法，包括以下步骤：

提供来自所述测试个体的第一个 DNA 样品；

提供含有 VEGF-B DNA 的第二个 DNA 样品；

将第一个 DNA 样品与一系列特异于 VEGF-B DNA 的引物接触，
所述引物可操作地偶联于聚合酶；

将第二个 DNA 样品与一系列特异于 VEGF-B DNA 的引物接触，
所述引物可操作地偶联于聚合酶；

用第一个和第二个 DNA 样品进行聚合酶链反应；及

对比第一个和第二个 DNA 样品的聚合酶链反应，以确定在所述
第一个 DNA 样品中 VEGF-B DNA 扩增的缺失。

11. 一种在测试个体中诊断特征在于丧失 VEGF-B 表达的心脏疾
病的方法，包括以下步骤：

提供来自所述测试个体的生物样品；

将所述样品与 VEGF-B 的特异结合试剂接触；及

检测所述特异结合试剂结合的丧失。

12. 权利要求 11 的方法，其中特异结合试剂包括 VEGF-B 的抗
体。

13. 一种诊断测试个体心脏中 VEGF-B 缺陷的方法，所述方法包
括：

为所述测试个体作心电图；并

与正常心电图相比较，评测所作心电图的 PQ 间期延长，或 ST
复波下移。

14. 一种检测测试个体心脏中 VEGF-B 缺陷的方法，所述方法包
括：

为所述测试个体作心电图；并

与正常心电图相比较，评测所作心电图的 PQ 间期延长，或 ST
复波下移。

说明书

血管内皮生长因子 B (VEGF-B) 缺陷动物的心脏异常 及与这些心脏异常相关的方法

本发明涉及 VEGF-B 缺陷动物及其心脏异常。本发明提供了用 VEGF-B 缺陷动物筛选减轻心脏异常，及诊断心脏疾病，尤其特征在于 VEGF-B 表达丧失的疾病的方法。

哺乳动物脉管系统的两种主要组成成分是内皮细胞和平滑肌细胞。内皮细胞形成哺乳动物所有血管和淋巴管的内表面。新血管的形成可通过两种不同过程发生，血管发生 (vasculogenesis) 或血管生成 (angiogenesis) (参见 Risau, W., 自然 386: 671-674 (1997))。血管发生特征在于内皮细胞前体原位分化为成熟内皮细胞及这些细胞的相结合形成血管，如发生在早期胚胎初级血管丛的形成中。相反，血管生成，通过预先存在的脉管的生长及分支形成血管，在胚胎生长后期是重要的，且负责成体中发生的血管生长。血管生成是一种复杂生理过程，包括内皮细胞增殖，胞外基质降解，血管分支，及随后的细胞粘附。在成体中，在正常环境下血管生成被紧密控制并限制在雌性生殖系统中。然而血管生成可在组织损伤的情况下激活。重要的是实体肿瘤能诱导周围组织中血管生成，因此维持肿瘤生长及促进肿瘤转移的形成 (Folkman, J., 自然医学 1: 27-31, (1995))。复杂的血管生成的分子机制还远未了解。

血管生成还参与许多病理情况，其在疾病的不同后遗症中起作用或直接参与其中。一些血管生成例如包括与各种肝脏疾病相关的新血管生成，糖尿病的新血管生成后遗症，高血压的新血管生成后遗症，外伤后的新血管生成，由于头部外伤所致新血管生成，慢性肝脏感染 (如慢性肝炎) 中的新血管生成，由于烫伤或冻伤所致的新血管生成，与激素过量相关的功能异常，血管瘤的产生及血管成形

术后的再狭窄。

由于血管生成在如此多的生理和病理过程中的重要作用，参与控制血管生成的因子已经深入研究。许多生长因子已示出可调节血管生成；这些因子包括成纤维细胞生长因子（FGFs），血小板衍生的生长因子（PDGF），转化生长因子 α （TGF α ），和肝细胞生长因子（HGF）。见例如 Folkman 等，生物化学杂志 267: 10931-10934 (1992) 所述。

已提示内皮细胞特异性生长因子的特殊家族—血管内皮生长因子（VEGFs），及其相应的受体，主要负责内皮细胞生长和分化的刺激，以及分化的细胞的一些功能。这些因子是 PDGF/VEGF 家族的成员，并呈现通过内皮受体酪氨酸激酶（RTKs）起作用。生长因子的 PDGF/VEGF 家族属于生长因子胱氨酸-结超家族，该超家族还包括神经营养因子和转化生长因子 β 。

在 PDGF/VEGF 家族中已鉴别 8 种不同的蛋白质，有 2 种 PDGF (A 和 B)，VEGF 和 5 种与 VEGF 密切相关的成员。这 5 种与 VEGF 密切相关的成员是：VEGF-B，见于 Ludwig 癌症研究所和 Helsinki 大学的国际专利申请 PCT/US96/02957（WO 96/26736）和美国专利 5840693 及 5607918 所述；VEGF-C 或 VEGF2，见于 Joukov 等，EMBO 杂志 15: 290—298 (1996)，Lee 等，美国科学院院报 93: 1988—1992，和人体基因组科学有限公司的美国专利 5932540 和 5935540 所述；VEGF-D，见于国际专利申请 No. PCT/US97/14696（WO 98/07832），和 Achen 等，美国科学院院报 95: 548-553 (1998) 所述；胎盘生长因子（PlGF），见于 Maglione 等，美国科学院院报 88: 9267-9271 (1991)；和 VEGF3，见于人体基因组科学有限公司的国际专利申请 No. PCT/US95/07283（WO 96/39421）所述。每个 VEGF 家族成员与 VEGF 有 30%—45% 的氨基酸序列相同性。VEGF 家族成员共同具有一个 VEGF 同源结构域，该结构域含有形成胱氨酸—结基序的 6

个半胱氨酸残基。VEGF 家族的功能特点包括改变内皮细胞促分裂原性，诱导血管通透性及血管生成和淋巴管生成性。

血管内皮生长因子 (VEGF)，如同其名称，是内皮细胞特异性促分裂原。其具有强有力的血管生成活性，即其促进新血管生长。血管生成是一个维持生命所必需的生理过程，牵连许多血液中的蛋白质和血管中的细胞。在血管生成期间，促分裂原性因子如 VEGF 起重要作用。然而，这些因子所起的详尽生物化学作用还不清楚。

由于对 VEGF 的鉴别和定性，关于血管生成因子的活性和新因子的阐明有许多重要发现。早期发现显示血管生成是正常发育和生理所需的。如胚胎生成，伤口愈合，及黄体形成，均涉及血管生成和血管生成因子。例如在伤口愈合期间，VEGF 水平提高提示 VEGF 表达与伤口愈合之间的直接相关性。同样，VEGF 调节缺陷可与伤口愈合失调有关 (Frank, S., 等, 生物化学杂志 2705: 12607—12613 (1995))。

其它关于血管生成因子的重要发现表明持久和未调节的血管生成加重和/或导致疾病。例如，关节炎涉及新毛细血管侵入关节并破坏关节软骨。在糖尿病中，视网膜中的新毛细血管侵入玻璃体，导致出血和失明。(Folkman, J.和 Shing, Y., 生物化学杂志 267: 10931-10934 (1992))。血管生成因子在这些及其它疾病中的作用还不十分清楚。

另一种重要发现包括血管生成与肿瘤发育之间的关系。肿瘤生长与转移均依赖于血管生成过程 (Folkman, J.和 Shing, Y., 生物化学杂志 267: 10931-10934 (1992))。例如，当肿瘤细胞导入动物时，VEGF mRNA 的表达模式揭示在坏死的肿瘤生长区域周围的细胞中有最高的表达水平。在这些区域内鉴别了许多血管。VEGF 在这些区域中的表达提示血氧不足，一种缺氧状态，引发 VEGF 在坏死的肿瘤中表达和释放。另一种血管内皮细胞促分裂原，VEGF-B，如下更充分的阐述，也与肿瘤生长尤其恶性肿瘤生长直接相关 (见美国专利

No.5840693 所述)。

VEGF 是结构上与血小板衍生生长因子 (PDGF) 相关的蛋白质家族的成员。PDGF 是平滑肌细胞,神经胶质细胞, 和一些其它类型细胞的强促分裂原。一方面, PDGF 家族的成员特征在于有 8 个保守的半胱氨酸残基。在它们的活性生理状态, 蛋白质是在 8 个半胱氨酸残基的分子间和分子内通过二硫键形成的二聚体。另一方面, 此家族成员在其促分裂原作用, 尤其对内皮细胞和相关类型细胞的促分裂原作用中是相关的。

血管内皮生长因子 B (VEGF-B), 一种非糖基化的高度碱性的生长因子, 是另一种 PDGF 家族成员。由于与 VEGF, PDGF-A, PDGF-B, 和 PlGF (血小板生长因子) 在结构上密切相关, VEGF-B 在成体和胚胎组织, 尤其在肌组织中的血管生成中起作用。VEGF-B 还具有血管生成促分裂原作用。Northern 印迹分析显示 VEGF-B mRNA 在许多小鼠和人的组织中存在, 包括心脏, 脑, 和骨骼肌中。RT-PCR 分析已证实 VEGF-B mRNA 存在于黑素瘤, 正常皮肤, 和肌肉中。

因此, VEGF-B 在哺乳动物的许多组织中表达, 但大多数集中在心脏, 骨骼肌, 和胰腺。VEGF-B 的表达模式不同于 VEGF, 尽管它们都在许多组织中表达 (Olofsson, B.等美国科学院院报 93: 2576-2581 (1996))。

小鼠和人的 VEGF-B 基因几乎是相同的, 且均跨越大约 4kb 的 DNA。此基因由 7 个外显子组成, 且它们的外显子—内含子结构类似于 VEGF 和 PlGF 基因 (Grimmond 等, 基因组研究 6: 124-131 (1996); Olofsson 等, 生物化学杂志 271: 19310-19317(1996); Townson 等, 生物化学生物生理学研究综述 220: 922-928 (1996))。目前已识别通过 mRNA 的可变剪接产生的 VEGF-B 的两种同种型 (Grimmond 等, 基因组研究 6: 124-131 (1996); Olofsson 等, 生物化学杂志 271: 19310-19317(1996); Townson 等, 生物化学生物生理学研究综述 220:

922-928 (1996))。这两种分泌形式的 VEGF-B 分别有 167 个 (VEGF-B₁₆₇) 和 186 个 (VEGF-B₁₈₆) 氨基酸残基。该同种型具有相同的 115 个氨基酸残基的 N 末端结构域, 不包括信号序列, 而 C 末端结构域不同。通常 N 末端结构域由外显子 1-5 编码。剩余的 3 个外显子的不同用途是产生两种剪接同种型。通过使用外显子 6 中的可变剪接受体位点, 导入一个 101bp 的插入引起读框移位, 和 VEGF-B₁₆₇ cDNA 编码区终止。因此, 这两种 VEGF-B 同种型具有不同的 C 末端结构域。

VEGF-B 的两种剪接同种型的不同 C 末端结构域影响它们的生物化学和细胞生物学性质。VEGF-B₁₆₇ 的 C 末端结构域与 VEGF 中相应区域在结构上相关, 具有一些保守的半胱氨酸残基和一段碱性氨基酸残基序列。因此, 此结构域是高度亲水的和碱性的, 且因此 VEGF-B₁₆₇ 在分泌时将保持细胞结合形式, 除非生产细胞是用肝素随后高盐浓度处理的。结合 VEGF-B₁₆₇ 的细胞结合形式的分子似乎是细胞表面或细胞外周硫酸肝素蛋白聚糖。此同种型的细胞结合形式通过其独特的碱性 C 末端区发生。

VEGF-B₁₈₆ 的 C 末端结构域与数据库中已知氨基酸序列无明显相似性。VEGF-B₁₈₆ 的 C 末端结构域的疏水性与 VEGF-B₁₆₇ 的亲水性和碱性的 C 末端的性质相反。这可通过观测到 VEGF-B₁₈₆ 在分泌时不保持细胞结合形式而证实。近来的研究结果表明此同种型是经蛋白酶解加工的, 其调节蛋白质的生物学性质 (Olofsson 等, 美国科学院院报 95: 11709-11714 (1998))。

关于人和小鼠 VEGF-B 及各自的同种型的分离和定性包括核苷酸和氨基酸序列详见于路德维格癌症研究所和赫尔辛基大学的 PCT/US96/02957, 美国专利 5840693 和 5607918 及 Olofsson 等, 美国科学院院报 93: 2576-2581 (1996) 所述。国际专利申请 PCT/US97/14696 (WO 98/07832), 美国专利 5840693 和 5607918 在

此并入参考。

与其相关的促分裂原蛋白一样，VEGF-B 在体内呈现为二硫键连接的同源二聚体。VEGF-B 的两种同种型也与 VEGF 形成异源二聚体，与参与类 PDGF 蛋白的分子间和分子内二硫键内的 8 个半胱氨酸残基的保守形式一致。另外，VEGF-B 和 VEGF 在许多组织中的共同表达提示，VEGF-B₁₆₇-VEGF 异源二聚体是天然发生的。VEGF-B₁₆₇-VEGF 异源二聚体保持细胞结合形式。相反，VEGF-B₁₈₆ 和 VEGF 异源二聚体在培养基中自由地从细胞中分泌。VEGF 还与 PlGF 形成异源二聚体（DiSalvo 等，生物化学杂志 270: 7717-7723 (1995)）。生长因子此家族的成员之间异源二聚体复合物的生成可提供血管生成或调节分子的多样性阵列的基础。

如上所述，PDGF/VEGF 家族成员通过与受体酪氨酸激酶结合而起作用。通常地，受体酪氨酸激酶是糖蛋白，其由能结合特异性生长因子的胞外结构域，通常是蛋白质 α 螺旋部分的跨膜域，在其处受体可例如通过蛋白质磷酸化调节的膜并列（juxtamembrane）结构域，作为受体酶组分的酪氨酸激酶结构域，及在许多受体中参与识别和结合酪氨酸激酶的底物的羧基端末尾组成。

已经鉴别了 5 个内皮细胞特异性受体酪氨酸激酶，称为 VEGFR-1 (Flt-1)，VEGFR-2 (KDR/Flk-1)，VEGFR-3(Flt4)，Tie 和 Tek/Tie-2。这些受体的特异性和亲和性不同。所有这些受体都有为信号转导所必需的固有的酪氨酸激酶活性。

已知与 VEGFs 结合的受体酪氨酸激酶是 VEGFR-1，VEGFR-2，和 VEGFR-3。VEGFR-1 和 VEGFR-2 与 VEGF 高亲和性结合，VEGFR-1 还结合 PlGF。VEGF-B 与 VEGFR-1 高亲和性结合，但不与 VEGFR-2 或 VEGFR-3 结合（Olofsson 等，美国科学院院报 95: 11709-11714 (1998)）。VEGF-C 已示出是 VEGFR-3 的配体，且还激活 VEGFR-2（Joukov 等，EMBO 杂志 15: 290-298 (1996)）。VEGF-D 与 VEGFR-2

和 VEGFR-3 均结合 (Achen 等, 美国科学院院报 95: 548-553 (1998))。Tek/Tie-2 的配体已由 Regeneron 制药公司的国际专利申请 No. PCT/US95/12935 (WO 96/11269) 阐述。Tie 的配体还未鉴别。

近来, 已纯化和克隆了一种新的 130-135kDa 的 VEGF 同种型特异性受体 (Soker 等, 细胞 92: 735-745 (1998))。发现 VEGF 受体通过外显子 7 编码的序列特异地结合 VEGF₁₆₅, 其示出与肝素的微弱亲和性 (Soker 等, 细胞 92: 735-745 (1998))。令人惊奇地, 此受体示出与人 neuropilin-1 (NP-1) 相同, NP-1 是一种参与早期神经形态发生中的一种受体。PIGF-2 也呈现与 NP-1 相互作用 (Migdal 等, 生物化学杂志 273: 22272-22278 (1998))。

VEGFR-1, VEGFR-2 和 VEGFR-3 是通过内皮细胞不同表达的。通常地, VEGFR-1 和 VEGFR-2 均在血管内皮中表达 (Oelrichs 等, 癌基因 8: 11-18 (1992); Kaipainen 等, 实验方法杂志 178: 2077-2088 (1993); Dumont 等, Dev. Dyn. 203:80-92(1995); Fong 等, Dev. Dyn.207: 1-10 (1996)), VEGFR-3 主要在成体组织的淋巴内皮中表达 (Kaipainen 等, 美国科学院院报 9: 3566-3570 (1995))。VEGFR-3 还在肿瘤周围的血管中表达。

尽管 VEGFR-1 在发育期间主要在内皮细胞中表达, 但在胚胎发生的早期阶段也发现其在造血前体细胞中 (Fong 等, 自然 376: 66-70 (1995))。在成体中, 单核细胞和巨噬细胞也表达此受体 (Barleon 等, 血液 87: 3365-3343 (1995))。在胚胎中, VEGFR-1 由大多数血管表达 (Breier 等, Dev. Dyn.204: 228-239 (1995); Fong 等, Dev. Dyn.207: 1-10 (1996))。

转基因动物是研究蛋白质功能和生理活性的有效工具, 且已为此产生了许多这种动物。一种产生转基因动物的特殊方法包括同源重组法。在同源重组中, 所有或部分基因组序列用另一种含有同源序列的 DNA 置换。通过转基因操作和同源重组, 动物细胞中的基因或

部分基因可被改变。改变基因以编码不再有天然蛋白质的功能的蛋白质，产生无效突变体或无效等位基因。（见例如，美国专利 No.5557032）。

为研究 VEGF 功能和生理学，已报道了含有 VEGF 基因无效突变体的转基因胚胎（Carmeliet, P., 等，自然 380: 435-439 (1996)），从中得到一些重要发现。在 VEGF 无效突变体的胚胎杂合子中，血管形成是异常的，但未废除。VEGF 无效突变体的胚胎纯合子在血管生成中表现更明显的削弱。此纯合子胚胎死于中期妊娠。在由生殖细胞系传递产生的杂合子子代胚胎中观测到相似表型。然而，Carmeliet 的关于胚胎的研究，未报道动物的表型和用途。另外，VEGF 转基因胚胎的产生，未有关于所有类 VEGF 蛋白质的血管生成或肿瘤生长调节性质的发现。

因此，尽管本领域阐述了血管生成因子的功能和生理，这些因子仍未完全清楚，仍需要可用于评价血管生成因子如 VEGF-B 的活性，以及它们在上述各种疾病中作用，和/或用于开发和/或评价其它血管生成肽的方法。

发明概述

本发明一方面包括含有突变的 VEGF-B 基因的转基因动物的应用。VEGF-B 基因是通过同源重组方法突变的。这些转基因动物有许多用途。例如，所述动物的研究可提供关于 VEGF-B 多肽，其片段或类似物如小分子的治疗和施用的重要信息。尤其本发明的转基因动物可用于阐明 VEGF-B 和/或其它细胞因子对生理现象如通透性，炎症和/或组织修复的作用。此动物或衍生自此动物的细胞用于筛选分析，以鉴别调节血管生成和/或肿瘤生长的化合物。此动物也可用于测试 VEGF-B 激动剂在体内的分布和功能和非毒性，及含有 VEGF-B 的分子。

本发明另一方面提供了一种含有至少一种无功能突变的 VEGF-B 等位基因的转基因非人动物的应用方法。此转基因动物是通过将转基因 DNA 导入非人动物优选小鼠的胚胎干细胞中而产生的。此转基因 DNA 有一个同源于 VEGF-B 的序列的区域。然后，选择这样的细胞，其中转基因 DNA 已整合入干细胞基因组 DNA 的至少一个拷贝的内源基因组 VEGF-B 序列位点。将此细胞导入发育动物的胚胎中，并使其发育成转基因动物。

用于产生本发明方法所使用的转基因动物的转基因 DNA，包含来自 VEGF-B 基因的核苷酸序列，该序列已通过本领域许多已知方法改变，突变或修改。因此，用于产生转基因动物的 DNA 可含有许多不同的 DNA 序列。根据所需效应选择适当的序列。例如，半胱氨酸的至少一个密码子可改变或缺失。所得动物可产生一种 VEGF-B，其具有与天然 VEGF-B 或另一种类 PDGF 蛋白质形成二聚体的改变的能力。在一优选的实施方案中，VEGF-B 的 8 个半胱氨酸有 7 个已缺失，产生 VEGF-B 的无效突变体。

另一方面，本发明提供了一种筛选化合物的方法，该化合物在转基因动物中具有实现血管生成，或调节肿瘤生长或进展，或增加心肌组织的能力。此方法包括将化合物导入转基因动物中，并检测动物体内血管发育。或者，此方法包括将肿瘤细胞导入转基因动物中，并将化合物导入相同动物中，检测动物体内肿瘤发育。

上述方法的各种实施方案包括在本发明范围内。例如，可以衍生一种筛选具有恢复或可检测地实现 VEGF-B 基因产物的活性的能力的化合物的方法，包括将化合物加入到合适的细胞系中。根据本发明产生的转基因动物和细胞系可用于这些方法中。这种动物或细胞系系统也可用于选择化合物，其能恢复或调节 VEGF-B 基因的活性和/或血管生成。此化合物可以是蛋白质形式（例如在体外重组或合成的），或者是编码 VEGF-B 或其类似物的 DNA 形式。可以是可操

纵地与启动子连接的裸基因组 DNA 或 cDNA，其可进一步与病毒或细菌载体连接。DNA 可掺入脂质体结构中，如 Lui 等，自然生物技术，15：167-172（1997）。此 DNA 或蛋白质也可由 VEGF-B 剔除小鼠胚胎在 8-16 个细胞的胚胎阶段提供。

具有突变体 VEGF-B 基因序列（其野生型或突变的片段）的所得转基因动物可用于产生双转基因动物。为此，突变体 VEGF-B 转基因动物可与其它相同物种的转基因动物或与相同物种的天然发生的突变体动物交配。所得双转基因动物或衍生自其中的细胞，可作为突变体亲代转基因动物用于相同的应用中。

已知突变或修改核酸序列的方法，可用于产生本发明所用的 VEGF-B 突变体动物，细胞系或序列。这种方法包括但非限于点突变，定点诱变，缺失突变，插入突变，得自同源重组的突变，和得自化学或放射性处理的 DNA 或携带 DNA 的细胞的突变体。如果需要或必需，PCR 分析或 DNA 测序可用于确定产生的突变。然后，突变体动物，细胞系或序列可用于所述 DNA 序列，系统，分析，方法中。定义上突变的或修饰的 DNA 与基因组 DNA 是不同的或不相同的。突变体动物也可通过将含有本文所述的或通过本发明产生的序列的第一个转基因动物与第二个动物交配而产生。第二个动物可含有不同于第一个动物中所含有的 DNA。以这种方式可产生各种突变体动物系。

另外，重组 DNA 方法适于突变本文所述 DNA 序列，将这些 DNA 序列连接于表达载体，并表达 VEGF-B 蛋白质或突变体。由此可分析 VEGF-B 突变体的生物化学或行为活性。以此方式可产生阻止有效的 VEGF-B 表达的突变的 DNA 序列。

本发明中“修饰的 VEGF-B DNA”指来自已经通过体外或重组 DNA 方法修饰的 VEGF-B 基因的核苷酸序列。修饰的 VEGF-B DNA 不含有如来自一种胚胎干细胞的基因一样的核苷酸序列，该胚胎干

细胞已导入转基因 DNA。特别包括的是在 VEGF-B DNA 序列中由于核苷酸的缺失，取代和插入所作的修饰。例如，一个特殊修饰的 VEGF-B DNA 含有小鼠 VEGF-B DNA 序列的 3 个或所有 4 个外显子的缺失。VEGF-B 基因座的限制图谱（图 1 和 3）通过缺失至少一个限制性片段，可用于设计各种修饰的 VEGF-B DNAs。

本发明的方法提供了解释各种物质包括血管生成生长因子的血管生成和肿瘤生长调节活性的有效模型。VEGF-B 的治疗，诊断和调节用途可利用具有改变的 VEGF-B 基因的转基因动物，从模型系统中确定。尤其地，转基因动物根据本发明可用于基于 VEGF-B 影响生理现象如通透性，炎症和/或组织修复的治疗方案中。另外，本发明的方法可用于评价其它多肽或小分子的类 VEGF-B 活性，如血管生成活性，或 VEGF-B 对内皮细胞基因表达具有的一种活性，如影响其基本性质例如从血流中摄取营养至特殊组织中。

转基因动物根据本发明可用于阐明 VEGF-B 的发育和体内平衡功能，通过监测和对比用于野生型 (+/+), 杂合子 (+/-), 和无效等位基因 (-/-) 动物的不同生理应激结果而进行。例如，VEGF-B 对血液凝血时间的作用可通过在创伤分析中使用而监测；VEGF-B 对肿瘤生长的作用可通过监测植入的肿瘤细胞的增殖而确定；VEGF-B 对物理活性的作用可通过对比性物理活性研究而揭示；和/或 VEGF-B 对应激反应的作用可通过应用一些应激如暴露于压缩空气中而确定。另外，VEGF-B 对心率，心输出量（如血压）和/或血动力（hemodynamic）性的作用，可用本发明的转基因动物如 Zhou 等，自然医学 4: 201-07 (1998) 所述方法进行分析。

VEGF-B 在正常心脏功能中作用可通过对比 VEGF-B 缺陷鼠 (-/-) 和正常鼠 (+/+) 的同窝仔而研究。VEGF-B 表达丧失揭示一些明显的不同。这些不同表明缺陷的动物有房室 (AV) 传导缺陷和可表明心肌局部缺血的迹象。

本发明的另一方面提供了一种筛选化合物的方法，该化合物具有调节房室传导或局部缺血的活性。此方法包括将要筛选的化合物导入 VEGF-B 缺陷的非人动物中，并分析对该动物的房室传导和局部缺血的作用。此方法还可用于筛选多于一种的具有调节房室传导或局部缺血活性的化合物，例如当筛选噬菌体，肽或组合文库时。可溶性肽文库及其应用的代表见于 R.A.Houghten, 基因 137: 7-11 (1993) 所述。随机呈递肽的噬菌体文库例如 Barry 等, 自然医学 2: 299-305 (1996)。一般的组合文库及其应用见于 K.S.Lam, 抗癌药物研究 12: 145-167 (1997); Nefzi 等, 生物有机化学和药物化学通信 8: 2273-2278 (1998); Coffen 等, 药物化学研究 8: 206-218 (1998); 和 Li 等, 现代药物开发 3: 105-112 (1998)。

本发明另一个相关方面涉及一种治疗或减轻房室传导缺陷或局部缺血的方法，包括施用有效减轻房室传导缺陷或局部缺血量的 VEGF-B，或其具有 VEGF-B 生物活性的片段或类似物。

术语“类似物”或“功能类似物”指修饰形式的全长 VEGF-B 或其片段，其中已进行至少一个氨基酸取代，这样所述类似物在体内和/或体外基本保持与未修饰的全长 VEGF-B 或其片段一样的生物活性。

表达“VEGF-B 的生物活性”是指刺激一或多种内皮细胞增殖，分化，迁移，存活或血管生成或血管通透性的能力。

用于治疗或减轻房室传导缺陷或局部缺血的 VEGF-B 多肽及其类似物也可与其药理学适合的非毒性盐，和药理学合适的固体或液体载体或佐剂组合应用。

这种载体或佐剂例如包括但非限于盐水，缓冲盐水，林格式液，矿物油，滑石，玉米淀粉，明胶，乳糖，蔗糖，微晶纤维素，高岭土，甘露糖醇，磷酸钙，氯化钠，藻酸，葡萄糖，水，甘油，乙醇，增稠剂，稳定剂，悬浮剂，及其组合。这种组合物可以是溶液，悬

浮液，片剂，胶囊，乳状液，药膏，酏剂，糖浆，糊纸包药，油膏，或其它常用形式。配方应适于施用方式。含有本发明肽的组合物含有大约 0.1% —90%（重）的活性化合物，大多数为 10%—30%（重）。

就肌内应用而言，无菌配方优选 VEGF-B 的适当的可溶的盐形式，如盐酸盐，可以是溶于药物稀释剂中施用，所述稀释剂如是无热原水（蒸馏水），生理盐水，或 5%葡萄糖液。可以制备适当的不溶形式的化合物，并在水基或药物学合适的油基中形成悬浮液而施用，所述油基例如是长链脂肪酸酯如油酸乙酯。

施用剂量和途径将依赖于病人的自然条件和治疗的疾病，且要根据医生或兽医的意见而定。适当的施用途径包括口服，舌下，肌内，腹膜内，或静脉内注射，非肠道应用，局部应用，植入等。例如，将有效量的本发明的肽或抗体施用于需要其的机体，剂量为大约 0.1—100mg/kg 体重之间，优选 1—10mg/kg 体重。对治疗进展，病人的副作用和循环多肽水平进行监测，将提供制定最佳剂量的另外的指导。局部施用 VEGF-B 或其片段或类似物的方式与施用 VEGF 相同。

另一种治疗或减轻房室传导缺陷或局部缺血的方法，包括施用有效量的编码 VEGF-B 或其有 VEGF-B 生物活性的片段或类似物的核酸序列，其中所述核酸能编码有效量的所述 VEGF-B 或其片段，以治疗或减轻房室传导缺陷或局部缺血。此核酸序列优选可操纵地与启动子序列连接。

核酸可以是裸露的和/或在载体或脂质体中。本发明优选的载体是表达载体，其中本发明的核酸可操纵地结合一或多个适当的启动子和/或其它控制序列，这样用克隆入载体的核酸转化或转染适当的细胞时，细胞能表达本发明的多肽。大多数优选的载体是适于转染进行基因治疗的载体，如腺病毒载体，痘苗载体，或逆转录病毒载体或脂质体。本领域已知各种这种载体。

本发明另一方面提供了一种诊断测试个体中心脏疾病的方法，包

括为病人做心电图并查看 PQ 间期是否延长和/或 ST 段是否下移（或 U 波）。

本发明另一方面提供了一种诊断测试个体心脏疾病的方法，所述心脏疾病特征是丧失 VEGF-B 表达。这些方法可包括通过用聚合酶链反应寻找 VEGF-B DNA 扩增缺失或检测特异性结合剂与 VEGF-B 结合缺失而寻找 VEGF-B 表达丧失。特异性结合剂优选是 VEGF-B 的抗体。最优选的抗体是 VEGF-B 的单克隆抗体。

本发明的抗体可用可检测的标记进行标记。抗体可偶联于适当的超磁性，顺磁性，电子致密的，生态的（ecogenic）或放射性或非放射性制剂以显影。放射性制剂/标记例如包括放射性原子或基团，如 ^{125}I 或 ^{32}P 。非放射性标记包括酶标记如辣根过氧化物酶，或荧光标记如异硫氰酸荧光素（FITC）。可直接或间接，共价或非共价进行标记。

附图简述

本发明参考以下附图将得以更进一步阐述。

图 1 是产生小鼠 VEGF-B 基因的无效突变体的方案示意图；

图 2 示出尾 DNA 的 PCR 扩增物的琼脂糖凝胶电泳，所述尾 DNA 来自同窝纯合子 VEGF-B (+/+), 杂合子 (+/-) 和 VEGF-B 基因座的纯合剔除鼠 (-/-) 的 F2 子代；

图 3 示出小鼠 VEGF-B 基因座的详细限制性图谱。限制酶及相应符号见以下所列；

图 4 示出用于产生定向于小鼠 VEGF-B 基因座的转基因载体的方法图示。以下所述的每个构建体 A-E 示于产生定向于小鼠 VEGF-B 基因座的转基因载体的例证方法中；

图 5a 和 5b 是 RNA 的 Northern 印迹图，RNA 来自野生型 (+/+), 杂合 (+/-), 和剔除 (-/-) 小鼠的心脏和骨骼肌组织；

图 6 是在同窝的纯合 VEGF-B (+/+) 和 VEGF-B 缺陷 (-/-) 小

鼠中，对比移植的肿瘤的图示；

图 7A 和 7B 是同窝的纯合 VEGF-B (+/+) 和 VEGF-B 缺陷 (-/-) 小鼠的典型心电图。

举例性实施方案的详述

以下阐述和实施例是本发明实施方案和范围的例证。本发明非限于此阐述范围。本领域技术人员将意识到以下实施例和实施方案可用本领域已知的方法修改。例如，所述的或权利要求的核酸序列可通过已知方法改变，而不改变本发明人已示出的作用和优势。这种变化因此包括在本发明范围内。本领域已知的许多方法的详细方案见于 Ausubel, F.M. 等编辑，分子生物学通用方法，Greene 出版社和 Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Boston, MA(1989)，及 Jan 于 1997 年的增补，后文称为“Ausubel(1989)”，以及 Sambrook, J 等，分子克隆实验手册，第二版，冷泉港实验室出版社，冷泉港，N.Y. (1989)，后文称为“Sambrook(1989)”，以及由 B.Hogan, R.Beddington, F.Constantini 和 E.Lacy 所著的《操作小鼠胚胎实验手册》，冷泉港实验室出版社，(1994)，后文称为“Hogan(1994)”。这些文献特别地并入参考。这些文献利于本领域技术人员进行本发明的实施方案。

本文所用的“无效等位基因”，“无效突变”，和“无效突变体”指编码与野生型蛋白质相比发生变化的蛋白质的基因序列。通常地，“无效突变体”是以基本不能发挥其原来功能的方式而改变。例如，VEGF-B 突变体是编码一种蛋白质的 DNA 序列，该蛋白质不能刺激血管内皮细胞生长，或不呈现任何上述 VEGF-B 的其它作用。然而，与 VEGF-B 的其它生物化学功能相关的结构，如肝素结合和二聚体化，可呈现于由无效等位基因编码的蛋白质中。另外，术语“无效突变体”可以指携带如上述改变的蛋白质的基因序列的动物或细胞。

转基因 DNA 指能导入细胞中的 DNA，此 DNA 掺入到细胞的基因组中。此细胞能产生含有转基因 DNA 的转基因动物。通常地，转基因 DNA 作为载体，转基因载体而构建，以施用于特定的细胞中。这种载体不需要呈特殊的结构形式，如环状形式。

重组基因或序列指已用本领域已知的许多重组 DNA 方法之一操作的基因或序列。

本文所用术语“修饰的 VEGF-B DNA”指来自动物的一种 VEGF-B 核苷酸序列，所述动物已通过一或多种以下方法而修饰，如点突变，定点诱变，缺失诱变，插入诱变，得自同源重组诱变，和/或得自化学或放射性处理 DNA 或携带 DNA 的细胞，或其与另一种与野生型 VEGF-B DNA 性质不相关的 DNA 序列如标记序列连接的突变。修饰的 VEGF-B DNA 可保持一些或全部野生型 VEGF-B DNA 的活性，如 Flt-1 受体结合机制。

本文的 VEGF-B 基因和 DNA 序列非限于小鼠或人的基因或序列。任何物种的动物均可用作 VEGF-B 基因的来源。在掺入转基因 DNA 的重组序列中，与特定胚胎细胞中的 VEGF-B 基因同源的序列不需是来自与胚胎细胞相同的物种。

产生转基因动物的方法不管是何物种基本是相同的。简而言之，转染的细胞在胚胎能整合转染的细胞的阶段注射入胚胎中，例如在胚泡阶段。接着，将胚胎再植入代理母亲中，产生具有转基因 DNA 的嵌合子代。因此，所需要的只是来自动物的适当的胚胎干细胞。

本领域已知各种动物的胚胎干（ES）细胞的产生方法。胚胎干细胞有许多来源，包括小鼠，大鼠，母牛，猪，羊和其它动物。例如，Joyner A.L., (1993), 基因定向实用方法, Wood, R.编辑, 及 Hames, B.D., 实用方法丛书, 第 126 卷, 牛津 IRL 出版社（特别并入参考），阐述了产生 ES 细胞的方法。同样，由 B.Hogan, R.Beddington, F.Constantini 和 E.Lacy 所著《操作小鼠胚胎实验手册》，冷泉港实验

室出版社（1994），阐述了操作小鼠胚胎的方法。另外，Couly 和 LeDouarin，发育 108：543-555（1990），阐述了分离和操作鸡和鹌鹑胚胎的方法。Kimmel 和 Warga，自然 327：234-237（1987），阐述了分离和操作 zebrafish 胚胎的方法。及 Ware 等“饲养动物胚胎干细胞系的发育”，再生研究协会，38：241（1988）揭示了适于许多物种如小鼠，牛，猪和羊的胚胎干细胞培养条件。因此，本发明可应用于其它动物如用于所特别例证的小鼠一样。

本领域已知各种将 DNA 插入动物细胞的方法。例如，转基因 DNA 可微注射入适当的细胞中。病毒载体可用于将 DNA 导入适当的细胞和这些细胞的基因组中（见例如，Tsukui 等，自然生物技术 14：982-985（1996））。细胞也可通过转染和电穿孔方法在体外操作（见 Ausubel(1989)和 Hogan(1994)）。

通常地，转基因 DNA 掺入细胞基因组是通过随机整合或同源重组进行的。本领域技术人员熟知在 ES 细胞或其它细胞中，提高同源重组与随机整合的相对频率的策略，以鉴别和分离已发生同源重组的细胞（见例如 Ausubel(1989)，美国专利 No.5557032，和 Hogan(1994)）。设计转基因 DNA 载体可包括将细胞序列的一些部分或同源于此细胞序列的序列掺入转基因 DNA 中。该部分必须充分同源于此细胞序列以使得转基因 DNA 和细胞 DNA 体内杂交，以发生同源重组。

待插入到胚胎干细胞的转基因 DNA 优选地包含 5'和 3'同源区。这些同源区能促进在胚胎干细胞中的同源重组。本领域技术人员已知的许多出版物讨论了如何构建用于同源重组的同源区。例如，Thomas & Capecchi，细胞 51:503-512(1987)，Mansour 等，自然 317:348-352(1988)，和 Capecchi，美国专利 5,487,992 均讨论了在同源重组技术中设计同源区的策略。因此，设计用于同源重组的序列的方法是本领域已知的。

但是，同源重组不是在已引入转基因 DNA 的每一细胞中发生。另外，经常的情况是在细胞中存在超过一个拷贝的希望经同源重组改变或替换的细胞 DNA 序列，如在具有一个以上等位基因的基因的情况下。因此，通过同源重组，一些细胞可仅在一个细胞内序列中掺入转基因 DNA，而其它细胞将使转基因 DNA 掺入一个以上细胞内序列，或者甚至掺入每个细胞内序列中。因此，纯合子和杂合子动物均可产自用转基因 DNA 进行同源重组的 ES 细胞。纯合子动物可与野生型动物交配以产生与所述转基因杂合的进一步的转基因动物。

实施例

为分析 VEGF-B 在正常和疾病状态下，在体内血管发育和维持中的作用，产生携带突变 VEGF-B 等位基因的小鼠。小鼠中的一个 VEGF-B 等位基因通过同源重组方法功能性地失活。产生自这些细胞的小鼠因此携带一个突变的和一个野生型的 VEGF-B 等位基因。

图 1 由四部分组成，1A-1D，是代表以下产生小鼠 VEGF-B 基因的无效突变的方法的图示。图 1A 是小鼠 VEGF-B 基因的外显子-内含子组构的示意图。图 1B 是 VEGF-B 基因座的限制图谱，其中表明了许多限制酶的切割位点。在图中，限制酶如下表示：N=NotI；S=SpeI；K=KpnI；H=HindIII；和 E=EcoRI。在后文所述的转基因 DNA 构建体中除去的 SpeI-KpnI 片段，以实心框表示。图 1C 的转基因 DNA 构建体用于产生突变 VEGF-B 等位基因。此构建体含有 VEGF-B 基因的 5' 同源片段（NotI/平端的 SpeI），和 3' 同源片段（平端的 KpnI/HindIII），它们位于 pPGK-新霉素盒(neo)的两侧。图 1D 示出在 Southern 印迹分析中，用于鉴别 VEGF-B 的野生型和突变等位基因的 DNA 探针的位置。

在图 2 中，来自新霉素盒（neo）的扩增的野生型条带（wt）和

扩增的条带的迁移示于右侧。

在下述段落中，描述了产生携带突变的 VEGF-B 等位基因的动物详细过程，以及得到的小鼠表型的初步分析。

实施例 1：可用作转基因的 VEGF-B 序列的选择

用于产生转基因动物的 DNA 可以含有多个不同的 DNA 序列。合适的序列的选择取决于是希望的效果。例如，如果希望获得携带 VEGF-B 的无效突变体的动物，转基因 DNA 含有编码不具有 VEGF-B 的主要功能即血管内皮细胞促分裂原的蛋白质的序列。尽管可使用确定突变的代表的促分裂原活性的分析，但是也可使用 VEGF-B 基因的结构信息以精确推导特定突变方案的效果。

在本实施例中，缺失了 VEGF-B 小鼠基因的一部分。缺失的部分含有对于二硫键结合重要的 8 个半胱氨酸残基中的 7 个。如上所述，VEGF-B 是生长因子 PDGF 家族的成员。由于这一家族的成员是结构上相关的，其它 PDGF 家族成员的突变的效果可外推指示对 VEGF-B 的效果。因此，产生特定效果的 VEGF 中的突变可类似地在 VEGF-B 中产生相同或相似的效果。类似地，PDGF 家族中其它成员的突变可用于产生 VEGF-B 基因中的突变。当所有家族成员或甚至家族的一个其它成员的结构信息指示出与比活效果的保守结构时尤其如此。考虑到这些，产生一无效突变体，其中 8 个半胱氨酸残基中的 7 个残基缺失。由于从关于 PDGF 家族的数据中已知半胱氨酸残基参与二硫键结合和二聚体化，缺失 7 个半胱氨酸残基可推定产生无功能的突变体 VEGF-B 蛋白。在下文进一步阐述了关于本发明所用转基因 DNA 中的序列的选择。

为选择在本发明中修饰的 DNA 序列，小鼠 VEGF-B 的基因首先用 pcif-2 作探针，克隆自小鼠 λ FIXII 文库 (Stratagene; La Jolla, CA)。此方法的详细阐述见于 Olofsson 等，生物化学杂志 271:19310-

19317(1996)所述(特别并入参考)。分离并定性 3 个均携带大约 20kb 小鼠基因组 DNA 的 λ 克隆 10, 11, 和 12。此基因组 DNA 的详细限制图谱是通过用不同的限制酶消化 λ DNA, 接着通过 Southern 印迹鉴别限制的片段而产生的。得自小鼠 cDNA 克隆的序列的各种 ^{32}P 标记的寡核苷酸探针用于 Southern 印迹分析中。

得自含有 VEGF-B 基因的 λ DNA 的限制图谱的信息用于选择进行转基因的 DNA。根据转基因动物的性质, 特征, 基因型或表型选择 DNA。可需要各种性质, 特征, 基因型或表型。例如, 一种动物, 其中 VEGF-B DNA 已与标记序列连接, 如与本领域已知的 β -半乳糖苷酶, 绿荧光蛋白或荧光素酶或其它标记连接, 可以是确定表达的 VEGF-B 蛋白的位置的分析所需的。其中 VEGF-B DNA 可操纵地与高度可诱导的启动子或在哺乳动物组织中驱动表达的启动子连接这样的动物可以从动物中获得 VEGF-B 蛋白的目的所需的。所用的启动子或表达系统是本领域已知的。另外, 突变 VEGF-B 序列可操纵地插入转基因动物后, 可提供用于确定血管生成或肿瘤发育的分子基础的研究动物。

在一个转基因方案中, 希望 VEGF-B 基因的无效等位基因。无效等位基因的基因产物在 VEGF-B 的血管生成性质方面是无功能的。具有 VEGF-B 无效等位基因的动物可用于各种分析中以鉴别例如在动物中实现血管生成的化合物。

产生无效等位基因的一种方法包括缺失或修饰 DNA 序列以防止分子内或分子间二硫键的形成, 或分子内和分子间二硫键的形成。具体地, 编码已知或据信参与二硫键的半胱氨酸残基的区域被缺失。或者, 通过本领域已知的点突变或定点诱变程序突变各个半胱氨酸残基。但是, 无效等位基因也可通过许多其它方式产生。从 VEGF-B 的限制图谱, 例如, 可选择方便的限制位点以产生缺失突变体。

原则上, 有许多产生无效突变的方式, 包括但不限于: (i) 缺失

完整基因；(ii) 缺失关键的蛋白编码序列；和 (iii) 缺失转录调控序列。如果突变影响剪接、mRNA 稳定性等，无效突变也可发生。另外，改变读框或引入提前终止密码子的插入或取代也可导致无效突变。

从图 1 所示限制图谱可看出，一种产生定向的转基因构建体的方式是通过缺失限制片段而进行的，其将在 VEGF-B 基因中产生无效突变。将 PTK neo 插入外显子 1 的“B”位点中也可产生无效突变。从图 3 所示更详细的限制图谱中，可设计其它策略。例如，也可设计缺失外显子 1, 2, 3, 4 或 5 任一个，及缺失一个以上外显子组合。

另一种产生无效突变体的方法包括缺失参与受体结合的那些区域。就 PDGF 和 VEGF 而言，存在关于受体结合的结构信息并为本领域所知。可利用此信息缺失 VEGF-B 的相关部分，以产生无效等位基因。同样，与受体 Flt-1 结合的 VEGF-B 及鉴别与受体 Flt-1 结合的 VEGF-B 类似物的方法，见于同时在审的美国专利申请系列号 08/994540 所揭示，这些文献特别地并入参考。此信息也可用于产生 VEGF-B 的无效等位基因。

如上所述，本领域技术人员将意识到本领域已知的许多方法可用于设计 VEGF-B 的无效等位基因。因此，本发明非限于所例证的产生携带 VEGF-B 无效等位基因的转基因动物所进行的缺失。

实施例 2：产生携带 VEGF-B 缺失突变体的转基因载体

在本发明的一个实施方案中，VEGF-B 的氨基端结构域中的 8 个半胱氨酸残基缺失 7 个。这种缺失破坏了用于成熟 VEGF-B 分子共价二聚体化的三个分子内二硫键以及两个分子间二硫键。为此，缺失 330bp SpeI-KpnI 片段，这一片段含有 VEGF-B 基因的外显子 3 的一部分以及外显子 4 的全部。具体地，由外显子 3 的 3' 部分编码的 33 个氨基酸和由外显子 4 编码的所有 24 个氨基酸缺失。从这一定向等

位基因产生的 VEGF-B 蛋白无功能，因为其缺少这些关键氨基酸，该等位基因是无效等位基因。

用于产生缺少 VEGF-B 的 SpeI/KpnI 片段的重组转基因载体的起始材料是亚克隆进质粒 pBluescript™ (Stratagene) 的来自λ-克隆 10 的 10kb NotI/HindIII 片段 (构建体 A)，和克隆进 pBluescript 的 1.7kb pPGK-neo 盒 (Sibilia, M., 科学 269:234-238(1995)) (构建体 B)。

用 KpnI 消化来自构建体 A 的 10kb VEGF-B 片段，用 T4 聚合酶从 KpnI 粘末端产生平末端，最后用 HindIII 酶切，而分离用于产生转基因载体的 3'区的 1.2kb KpnI/HindIII 片段。这一片段和所有后续的片段均是在制备于 1×TBE (Tris 硼酸盐 EDTA) 缓冲液中的低熔点 (LGT) 琼脂糖凝胶上分离。分离的 1.2kb 片段随后连接进 EcoRV 和 HindIII 消化的 pBluescript 载体，产生构建体 C。

转基因载体的 5'片段通过用 NotI/SpeI 酶切从构建体 A 分离。分离的片段然后连接进 NotI/SpeI 酶切的构建体 C，产生构建体 D。

pPGK-neo 盒是通过用 NotI/ HindIII 消化构建体 B，并用 Klenow 片段产生平端而分离的。所得片段凝胶纯化，接着连接于用 EcoRV 消化并用 Klenow 片段产生平端的构建体 D 中，产生构建体 E。选择具有正向插入的 pPGK-neo 盒的 11.2kb 的载体，作为转基因的定向载体。构建体 A—E 的图示见于图 4。

Southern 印迹分析用于确定野生型和突变等位基因之间的相同性。基因组 DNA 用 EcoRI 消化并制备以进行印迹。在上述筛选步骤中用作探针的 450bp 放射标记的片段，主要涵盖了 VEGF-B cDNA 的外显子 7 编码序列和 3' 未翻译区的序列。此探针是用克隆 10 的 DNA 作模板，通过 PCR 产生的。PCR 中使用的引物是 5' — GTGAAGCTCCAGCCGAGCA (有义链) (SEQ ID NO: 1)，和 5' TAGTGTCTTCCATCTCTTT (反义链) (SEQ ID NO: 2)。在这些条件下，突变等位基因产生 6.5kb 的基因组 EcoRI 限制片段，而野

生型等位基因产生大于 20kb 的片段。

实施例 3：将转基因载体插入动物细胞中

含有突变 VEGF-B 的载体（构建体 E），通过电穿孔转染入衍生自 129/SW 小鼠的 E14.1 细胞（Kuhn, R.等, 科学 254:707—710(1991)）中。通过标准方法分离新霉素抗性克隆并定性。由 B. Hougan, R.Beddington, F.Constantini 和 E.Lacy 编辑的《操作小鼠胚胎实验手册》，冷泉港实验室出版社（1994），描述了用于分离和操作胚胎的程序（特别引入本文作参考）。分离来自几百个克隆的基因组 DNA，EcoRI 消化，并用 Southern 印迹分析。用这些程序通过检测 6.5kb 条带和野生型 20kb 条带鉴别了 3 个阳性克隆 1a, 8f 和 9h。对于克隆 1a 和 9h 用放射标记的 PKG-neo 盒探查 Southern 印迹也给出预期的 6.5kb 条带。这些数据显示在 ES 细胞中的两个 VEGF-B 等位基因中的一个等位基因已由所述构建体正确定向，且含有 VEGF-B 无效等位基因的 ES 细胞已产生。

实施例 4：产生转基因动物

将来自细胞系 9h 的细胞用标准程序注射进小鼠胚泡中。由 B. Hougan, R.Beddington, F.Constantini 和 E.Lacy 编辑的《操作小鼠胚胎实验手册》，冷泉港实验室出版社（1994），描述了注射细胞的程序（特别引入本文作参考）。将胚泡植入假孕代理母亲中。所产生的嵌合小鼠即具有转基因 DNA 的小鼠通过子代皮毛颜色鉴别。

例如，由于 ES 细胞衍生自具有 chincilla（黄白色）皮毛和携带 Agouti 基因座的 129/SW 小鼠，而宿主胚泡衍生自具有黑色皮毛和缺少 Agouti 基因座的 C57B1/6 小鼠，所以嵌合小鼠将是 Chincilla（仅由 ES 细胞导致的皮肤块），黑色（仅由宿主细胞导致的皮肤块）和褐色或 Agouti（有 129/SW 和 C57B1/6 细胞混合物存在的皮肤块）。

由于从 129/SW 细胞分泌的 Agouti 蛋白将刺激 C57B1/6 毛囊细胞加工黑色素（黑色色素），由此毛发变为褐色，因此嵌合动物是褐色的。

将雄性嵌合小鼠与 C57B1/6 野生型雌鼠交配。这些雌鼠的子代中存在褐色鼠，表明转基因 DNA 的种系传递。

对制备自这些 F1 鼠尾的 DNA 进行如上述 Southern 印迹分析。通常地，通过外科手术取 0.5cm 的尾部组织，并用于制备 DNA 样品。在 50% 的褐色鼠中存在 6.5kb 的 EcoRI 片段，表明无针对 VEGF-B 的定向无效等位基因的选择。携带定向的 VEGF-B 基因座的 F1 小鼠是杂合子，因为它们也携带 VEGF-B 的野生型等位基因。携带一个失活的 VEGF-B 等位基因的 F1 小鼠正常发育，示出 VEGF-B 的基因剂量对存活不是关键的。

杂交杂合子 F1 小鼠，并通过 Southern 印迹和 PCR 分析子代的尾部 DNA。用两种方法获得的结果是相同的，现提供 PCR 基因分型方法的详细情况。用 F2 子代的尾 DNA 作模板，在标准条件下进行 PCR 扩增。用位于外显子 3 和外显子 4 的两个引物，鉴别野生型等位基因存在 316bp 的扩增条带。这些引物分别是 5' — GCCCAGCTGTGTGACTGT（正向）（SEQ ID NO: 3），和 5' — CCCACCCCATGCTACACT（反向）（SEQ ID NO: 4）。用位于新霉素抗性基因中的两个引物，鉴别定向等位基因具有 140bp 的条带。这些引物分别是 5' — TGTTCCTCCTCTTCCTCATCTCC（正向）（SEQ ID NO: 5），和 5' — ATGTCTGTTGTGCCAGTC（反向）（SEQ ID NO: 6）。图 2 中总结了来自 PCR 扩增的结果。分析显示 VEGF-B 的定向等位基因纯合的小鼠是存活的，且分析大量的 F2 代动物得出野生型、杂合子和携带无效等位基因的纯合动物的比率为 1:2:1。因此，无效等位基因以经典孟德尔方式遗传。

对成年 VEGF-B 剔除小鼠的首次外部观察未揭示与野生型小鼠相比有任何大的形态学改变。但是，观察到某些转基因 VEGF-B 突

变小鼠的心脏似乎畸形 (malform)。这些心脏的大小通常比野生型小，且较大的血管似乎更粗。这些表型表明 VEGF-B 剔除小鼠可用作模型筛选化合物对心脏组织生长或发育的效果。

实施例 5：在细胞或组织样品中检测 VEGF-B 核酸

细胞或组织样品可通过本领域已知的许多常规方法获得。通常，离心的细胞沉淀或组织样品应立即冷冻。用异硫氰酸胍方法 (Chomczynski 等, 分析生物化学, 162:156-159(1987)) 分离总 RNA。用 0.2 μ g 随机六脱氧核苷酸引物、5 单位小鼠反转录酶、作为模板的 5 μ g 总 RNA 和第一链 cDNA 合成试剂盒 (Pharmacia) 合成 cDNA。在 37° C 保温 1 小时后，反应混合物贮存于 -70° C。PCR 扩增的阴性对照样品类似地制备，只是不加反转录酶。作为内标也测试 β - 肌动蛋白，因为其以组成性高水平表达，且其表达在不同细胞中不显示太大的差异。

就 PCR 扩增而言，引物序列选自 VEGF-B 和 β - 肌动蛋白基因，序列如下：

VEGF-B 有义：5' -GCCATGTGTCACCTTCGCAG-3' (SEQ ID NO: 7)

VEGF-B 反义：5' -TGTCCCTGGAAGAACACAGCC-3' (SEQ ID NO: 8)

β - 肌动蛋白有义：5' -CGGGAAATCGTGCGTGACAT-3' (SEQ ID NO: 9)

β - 肌动蛋白反义：5' -GGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3' (SEQ ID NO: 10) (β - 肌动蛋白序列包含来自 Ng 等, 分子细胞生物学 5:2720-732(1985)所述的 2105-2125 位和 2411-2432 位核苷酸)。将取自 cDNA 反应产物的 4 μ l 等份加热至 94° C 5 分钟，并用作模板，用 20 pmole 引物，10 $\times$ PCR 缓冲液，1 μ l 的 20mM dNTP

和 2.5U 的 Taq 聚合酶进行 PCR。终体积用 DEPC 处理的水调整为 100 μ l。在 95°C 变性 1 分钟，在 62°C 退火 45 秒，在 72°C 聚合 50 秒，VEGF-B 进行 35 次循环， β -肌动蛋白进行 25 次循环。在每 5 次循环之后，取 15 μ l 等分进行分析。

5 μ l 的 PCR 反应混合物电泳是在含有溴化乙锭的 2%琼脂糖凝胶中进行的。大小标记 DNA 片段的范围在 24-726 个碱基对之间 (Promega, Madison, WI, USA 的 Φ X174 DNA/Hinf I 标记)。

实施例 6：来自转基因动物的细胞和组织的应用

如上所述，VEGF-B 剔除小鼠的心脏比野生型的小，提示该动物在心脏细胞生长分析、心率分析、心输出量分析或其它血液动力学性质分析中实用性。在筛选分析中的其它应用是本领域技术人员能意识到的。

为了在这些筛选方法中应用转基因动物的细胞和组织，可利用含有至少一个衍生自转基因动物的细胞的转基因动物细胞或组织培养物。将细胞作为外植体培养，或通过机械分散而分离并作为原代培养物培养。或者，通过本领域已知的转化方法或通过首先将转基因小鼠与例如 Jat 等，PNAS USA 88:5096-5100(1991)描述的 H-2KtsA58 小鼠杂交或本领域已知的其它相关方法（例如见 McClean, J.S., Tibtech 11:232(1993)）将细胞转化为细胞系。以此方式，剔除突变体与 H-2K^btsA58 转基因小鼠杂交将产生各种细胞的条件永生细胞系。具体地，细胞首先在 ts（温度敏感）A58 T-抗原允许的温度下生长，从而细胞可培养许多代。T-抗原永生细胞。当细胞转至失活 T-抗原活性的不允许温度时，细胞分化，由此可产生来自不同组织的许多不同的细胞系。

实施例 7：血管生成性和/或肿瘤生长调节活性分析

可使用也含有应答细胞的组织样品，如来自 VEGF-B 剔除小鼠的心脏外植体测试 VEGF-B 类似物。组织样品或外植体保持在本领域已知的溶液中。向组织样品或外植体中加入化合物如 VEGF-B 类似物或小分子，并分析对组织样品或外植体的作用。以此方式，生理作用如血管生成性，抑制或促进肿瘤生长，增加肌结构，或与 VEGF-B 相关的其它作用可被分析。本领域技术人员可根据已知方法例如 Ausubel(1989)和 Hogan(1994)所述方法，设计特殊的实施方案。

实施例 8：评价 VEGF-B 转录物的表达

心脏和骨骼肌中 VEGF-B 转录物的表达，在野生型小鼠 (+/+), 杂合小鼠 (+/-), 和纯合剔除小鼠 (-/-) 中通过 Northern 印迹而评价。处死 VEGF-B 缺陷的小鼠和野生型 C57Bl/6 小鼠，将不同的组织立即冷冻并贮存在 -80° C 直至使用。用硫氰酸胍/酸性苯酚方法制备总细胞 RNA (见 Chomczynski 等, 分析生物化学 162:156-159 (1987))。1% 琼脂糖凝胶中的每条泳道使用每个样品的 20 μ g RNA, 在 80 V 电泳大约 3 小时。接着将凝胶移至尼龙膜 (Hybond™-N+, Amersham) 上, 随后通过 UV 交联。在 5 $\times$ SSC, 5 $\times$ Denhardt 溶液, 0.5%SDS, 和 100 μ g/ml 单链 DNA 中进行预杂交 2 小时, 接着用特异的探针根据厂商指导 (Amersham) 在 65° C 杂交过夜。

使用的两个探针是 (a) 全长小鼠 VEGF-B cDNA, 和 (b) 覆盖无效等位基因中 VEGF-B 基因缺失部分的探针。一个 1.8kb 的 VEGF-B₁₆₇ cDNA 片段用于产生第一个探针, 使用随机标记试剂盒 (Amersham) 根据推荐方案进行。Northern 分析中使用的第二个探针用在 VEGF-B 外显子 3 和 4 内的 148bp 片段产生, 该片段用无效等位基因/定向载体最高的 Neo 基因置换并经 PCR 方法标记 (见 Konat 等, PCR 技术, pp37-42, Griffin 编辑, CRC 出版社, Boca Raton(1994))。在标记 PCR 中使用 Taq 聚合酶和 ³²P-dCTP, 循环条件为 94° C 1 分

钟，58° C 2 分钟，72° C 3 分钟，共 30 个循环。

洗涤后，膜用 X-光胶片曝光 2-6 天。膜在煮沸的 0.5% SDS 中洗涤，并在磷成象器曝光过夜以保证完整的洗涤。图 5a 示出用全长小鼠 VEGF-B cDNA 探针的 Northern 印迹结果。图 5b 示出来自覆盖无效等位基因中缺失的 VEGF-B 部分的探针的结果。

结果示出，两个探针均与得自 +/+ 小鼠的高丰度 1.4kb VEGF-B mRNA 杂交，且也检测到 2 个另外的丰度较低的转录物。这两个次要转录物分别为 3.0kb 和 6kb 长。在 +/- 小鼠中获得明显降低的杂交信号，而在得自 -/- 小鼠的 RNA 样品中两个探针均未检测到任何 VEGF-B 转录物。这表明定向的 VEGF-B 等位基因已被剔除且产生无效等位基因，-/- 小鼠不合成 VEGF-B 蛋白。在杂合子中 VEGF-B 转录物的水平降低还表明保留的完整 VEGF-B 等位基因的转录不是补偿性上调的。

实施例 9：肿瘤移植及测量

因为已知肿瘤生长和转移依赖于肿瘤组织的新血管化，在同窝的野生型 (+/+) 和 VEGF-B 缺陷 (-/-) 小鼠中研究移植肿瘤的生长。雄性 VEGF-B 缺陷 (-/-) 小鼠和同窝纯合 C57B1/6 小鼠 (+/+) 用于测试。真皮内注射小鼠 T241 纤维肉瘤细胞。在植入肿瘤细胞前用甲氧基氟烷麻醉 6—8 周龄小鼠，随后将 1×10^6 个生长至对数期的 T241 小鼠纤维肉瘤细胞悬浮于 100 微升 PBS 中，并皮下植入每个小鼠的背部中线。测量每只动物中的肿瘤生长。用测径器每隔一天观测肿瘤大小。肿瘤体积用以下公式计算：宽度² × 长度 × 0.52（见 Boehm 等，自然 390：404—407（1997））。

结果示于图 6。从图中可以看出在一/-动物中肿瘤的生长明显低于 +/+ 动物。示出在指数生长阶段之前的初始阶段，在突变体动物中较长（+/+ 动物 18—20 天，-/- 动物 30—32 天）。此结果表

明 VEGF-B 也许通过影响肿瘤基质从而影响肿瘤血管生成。此论断可根据肿瘤细胞也许表达内源 VEGF-B，同时在突变体动物中观测到此作用而得出。

此结果可归因于对内皮细胞生长的直接作用，或非直接作用如迁移，胞外基质的降解等。在每种情况下，结果示出 VEGF-B 具有促进肿瘤生长作用并表明抗肿瘤方案可在例如通过用与 VEGFR-1 结合的抗 VEGF-B 的单克隆抗体或通过 VEGFR-1 结合的小分子，或通过抗 VEGF-B 疗法，或通过上述两种或多种方法的组合抑制 VEGF-B 作用的基础上设计。

实施例 10：来自正常和 VEGF-B 缺陷小鼠的心脏组织的组织学检查

来自正常和 VEGF-B 缺陷小鼠的心脏组织切片的组织学检查未揭示有大的差异。另外突变动物的心肌横断面的毛细血管密度也正常。这提示 VEGF-B 在控制心肌血管化的血管生成过程中可能不起关键作用。

实施例 11：在 VEGF-B 缺陷动物中分析血管生成因子的表达

用放射标记的 cRNA 探针经 RNase 保护分析对来自正常和 VEGF-B 缺陷小鼠的心脏中基因表达的分析揭示，所研究的大多数基因在突变动物中正常表达。正常表达的基因包括 VEGF、PIGF、PDGF A、PDGF 受体 a 和 b、VEGF 受体 1 和 2、neuropilin 1、Tie 1 受体、尿激酶纤溶酶原激活物、纤溶酶原激活物抑制剂 1 和血小板内皮细胞粘附分子的基因。在突变动物中的表达被改变的唯一基因是 PDGF B（下降约 30%， $p>0.05$ ）。目前尚不清楚 PDGF B 的表达改变的意义。

实施例 12：VEGF-B 缺陷小鼠中的心脏异常

为研究 VEGF-B 在正常心脏功能中的作用，用遥测系统 (DATA Science, St. Paul, MN, USA) 比较 VEGF-B 缺陷小鼠和正常同窝仔以寻找心脏异常。遥测系统由植入式发射器 (TA10ETA-F20)，遥感接收器 (RA1010)，和转播来自遥感接收器的信息的巩固基质 (BCM100) 组成。为记录心电图 (ECGs) 和其它参数，将发生器植入动物的腹部。将两个电极分别置于接近心尖，和右肩皮下。数据获得系统由数据翻译 (DT 2801) AD 转换器和计算机程序 PC-LAB v.5.0 (Axenborg 和 Hirsch, Comp, Meth. Progr. Biomed. 41:55-67 (1993)) 组成。获得的数据用 Excel 宏程序进一步分析，数据表示为每分钟自发活动计数，体温和每分钟的心率。心电图用于研究心脏节律。用计算机程序 PC-LAB v.5.0，从平均心电图以毫秒计算 PQ, QRS 和 QT 间期。使用的是 Johansson 和 Thoren, Acta Physiol. Scand.160: 133-138(1997)所述的方法，在此特别并入参考。

对正常小鼠 (+/+) 和 VEGF-B 缺陷小鼠的平均心电图进行分析显示出一些明显不同。结果示于图 7。

-/-动物的 PQ 间期与+/+动物相比延长 (见表 1: 39.7ms 对 35.7ms, $p > 0.05$)。这表明缺陷的动物具有房室 (AV) 传导缺陷。此原因还未清楚，但人体内 AV 传导降低可以是由 AV 束状纤维局部缺血，由于疤痕组织压迫 AV 束，或心脏钙化，AV 束或 AV 结合纤维炎症，或由于迷走神经极端刺激心脏所致。

尽管 QRS 复波显示是正常的，但小鼠中的 U 波显示有轻度下移的异常。U 波轻度下移可能是局部缺血的指示，因为在人中观察到的相应 ST 复波的类似下移可表示心肌缺血。U 波的面积和振幅如表 1 所示并在图 7A 和 7B 中示出。在-/-小鼠中 U 波下移由图 7B 的阴影区表示，这表明-/-动物中的另一异常。在人中，ST 复波的下移是心肌局部缺血的指示。在大多数情况下，局部缺血有冠状循环不足导致。-/-动物的心率和体温均正常。

表 1 来自正常 (+/+, n=4) 和 VEGF-B 缺陷 (-/-, n=4) 动物的 ECG 测量的一些数据

	基因型		p 值
	+/+	-/-	
PQ 间隔	35.7ms	39.7ms	0.014
U 面积(a.u. ¹)	4.31	9.62	-
U 振幅(a.u. ¹)	-0.013	-0.034	-

¹a.u. 任意单位; ms: 毫秒; 对于 U 面积和振幅, 示出的是不同组的平均值

上述描述和实施例仅为了举例示出而非限制本发明。因为本领域技术人员理解在本发明精神和实质内可对所公开的实施方案进行修改, 因此本发明应被理解为包括在所附权利要求书及其等价物范围内的任何事情。

说明书附图

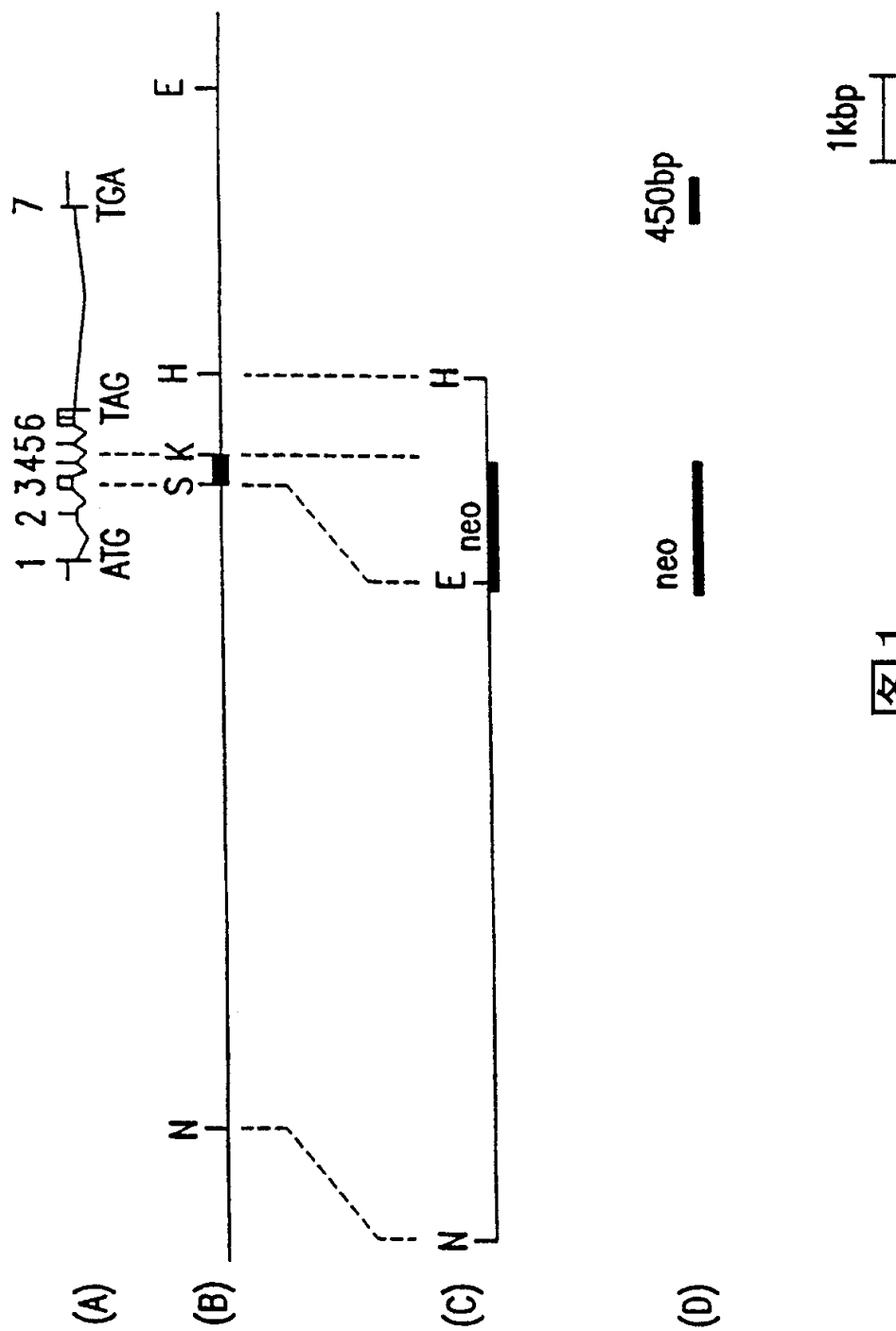


图 1

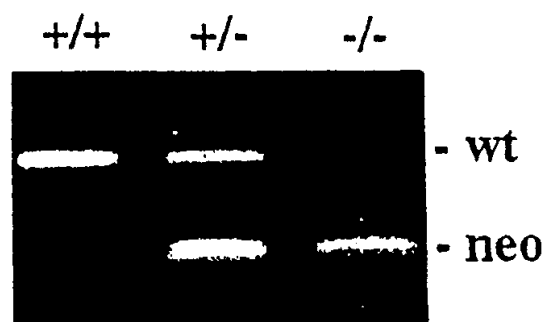
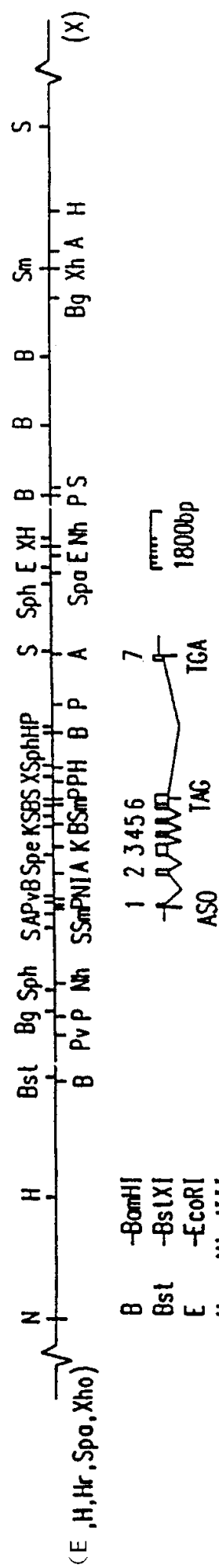


图2



- | | |
|-----|----------|
| B | -BamHI |
| Bst | -BstXI |
| E | -EcoRI |
| H | -HindIII |
| X | -XpnI |
| N | -NcoI |
| Mh | -MheI |
| Nr | -NrvI |
| P | -PstI |
| Pv | -PvuII |
| S | -SacI |
| Sm | -SmaI |
| Sph | -SphI |
| Spe | -SpeI |
| X | -XbaI |
| Xho | -XhoI |

图 3

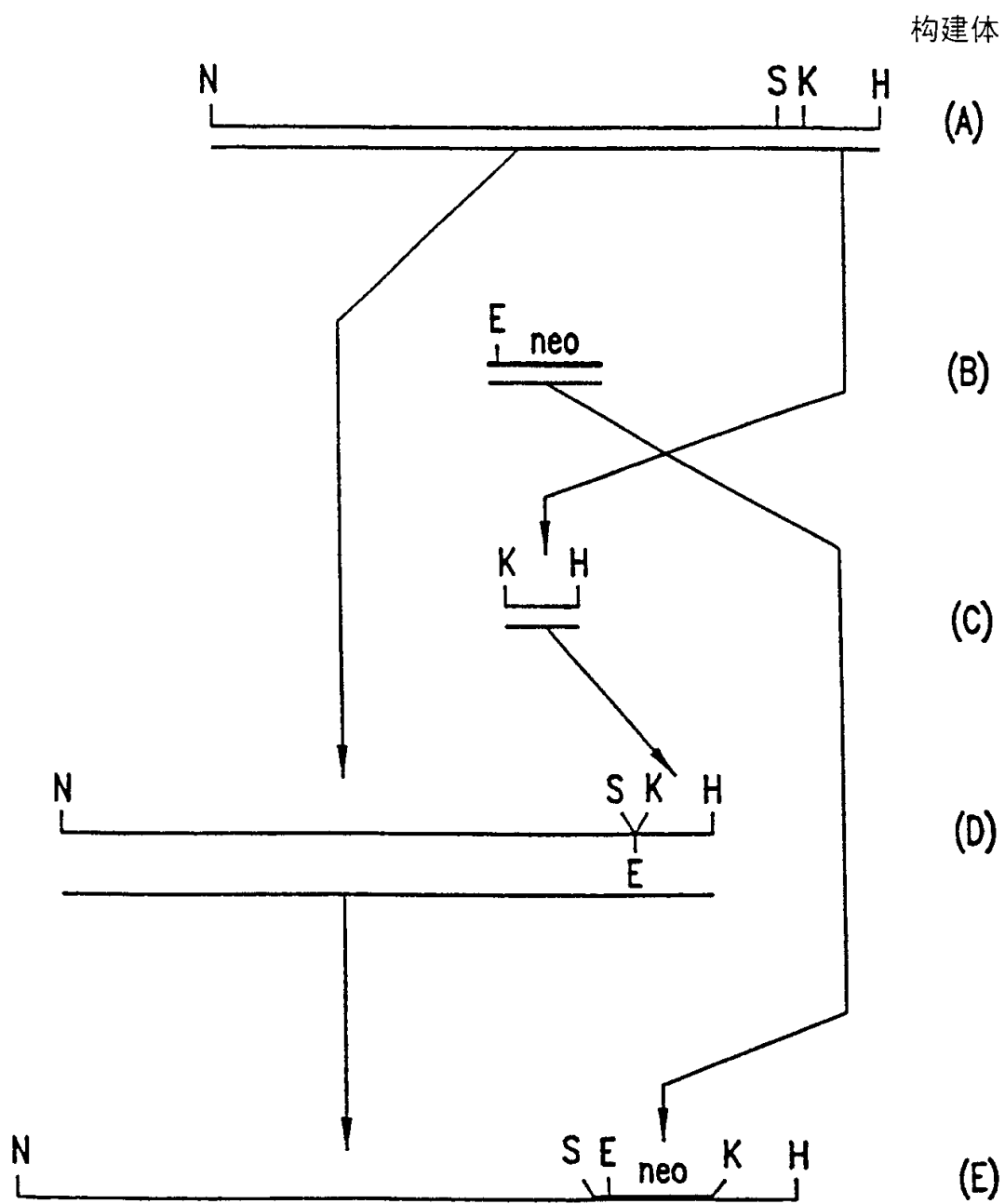


图4

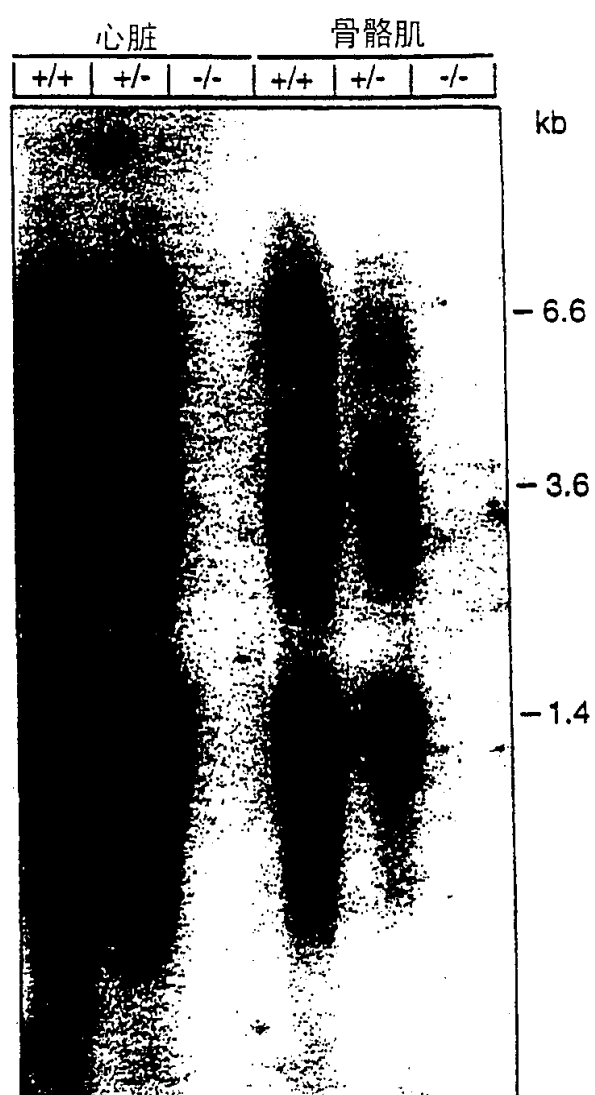


图5a

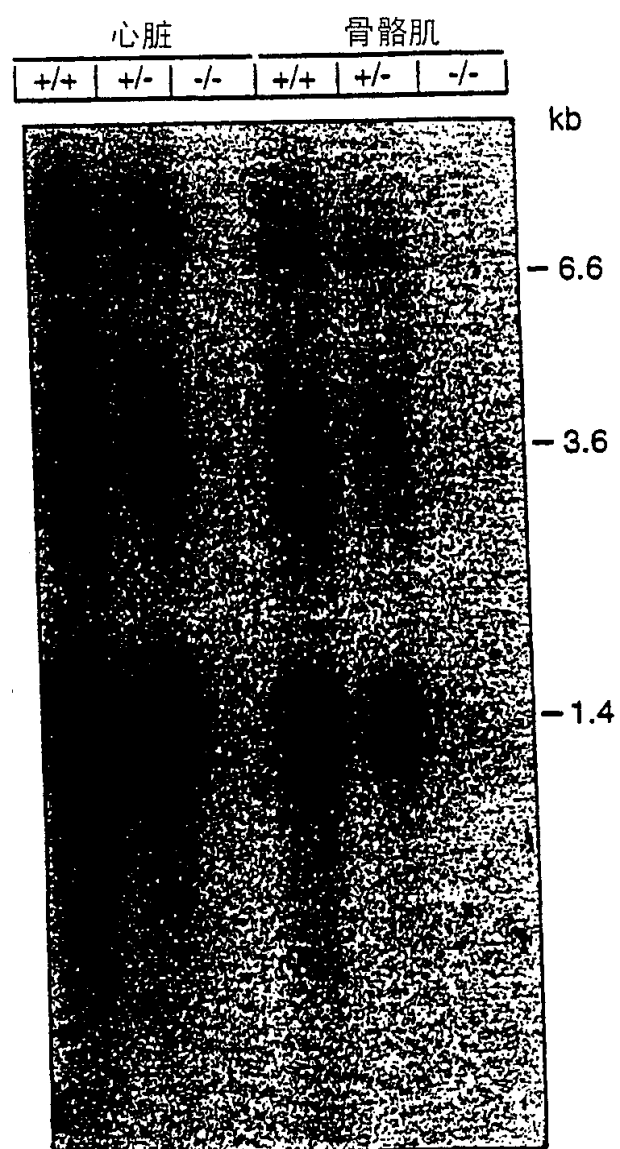


图5b

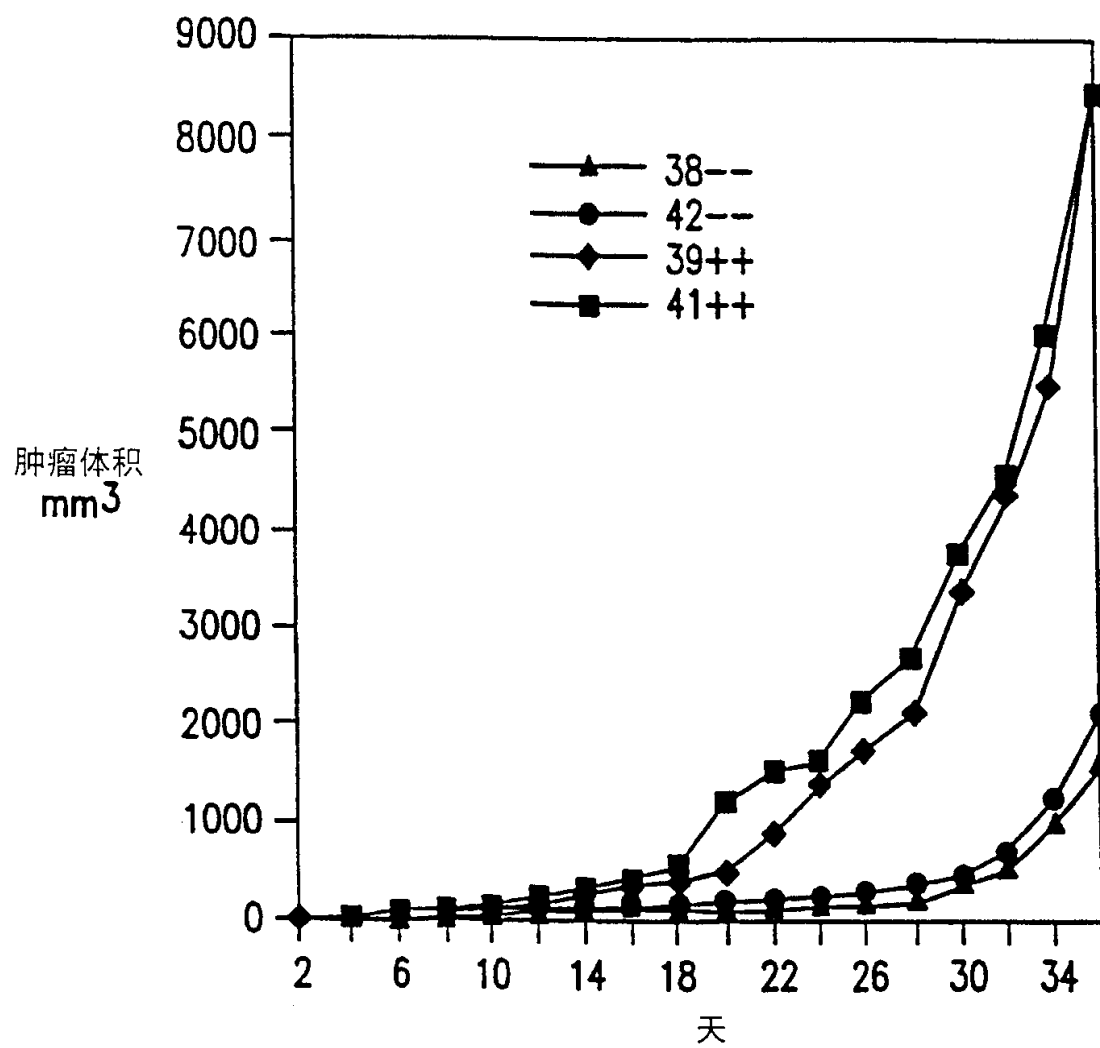


图6

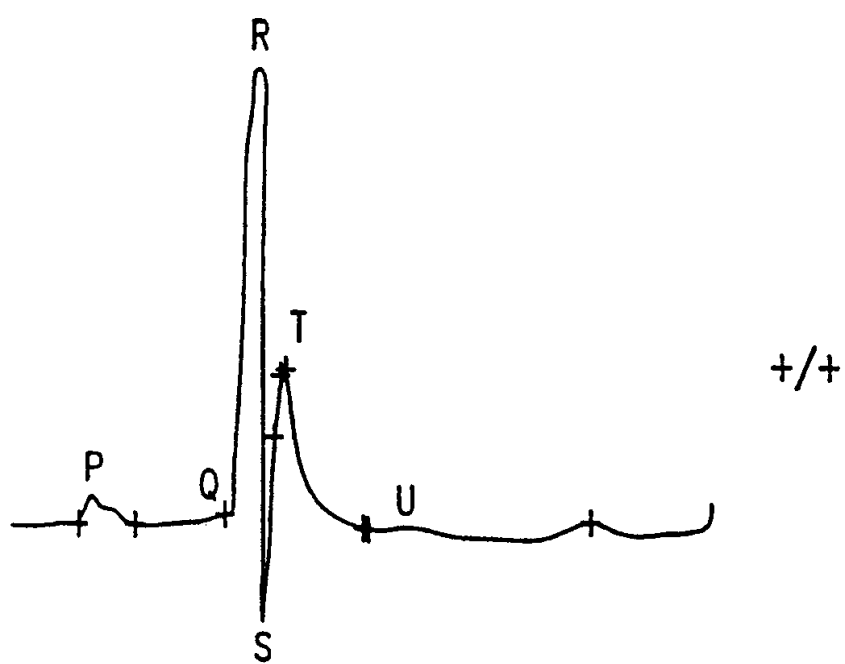


图7A

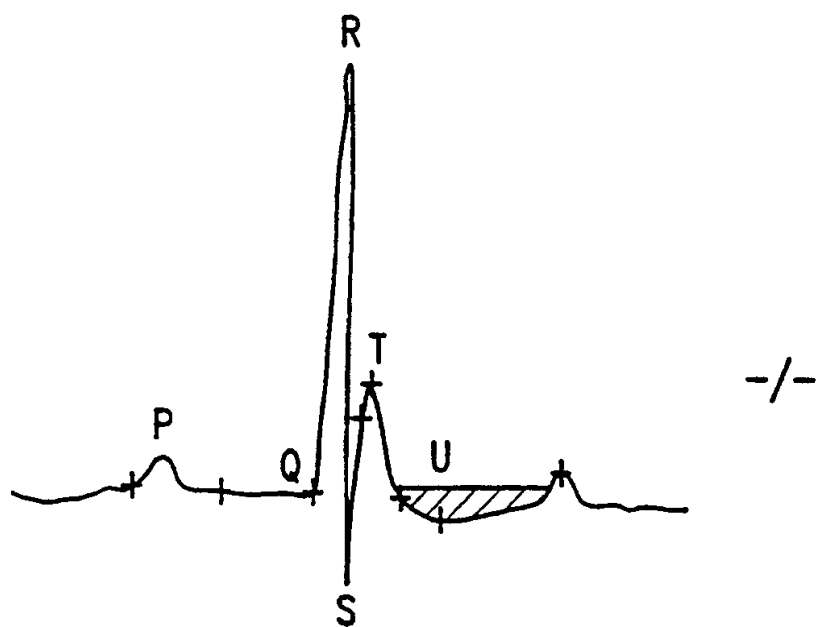


图7B

序列表

<110> 路德维格癌症研究所

<120> 血管内皮生长因子B (VEGF-B) 缺陷动物的心脏异常及与这些心脏异常相关的方法

<130> 路德维格癌症研究所

<140>

<141>

<150> 60/160,083

<151> 1999-03-03

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Murinae gen. sp.

<220>

<223> 小鼠VEGF-B的PCR引物 (有义链)

<400> 1

ggagttgaag gtagtttcgt g

21

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Murinae gen. sp.

<220>

<223> 小鼠VEGF-B的PCR引物 (反义链)

<400> 2

tagtgtcttc catctcttt

19

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Murinae gen. sp.

<220>

<223> 位于外显子3中的小鼠VEGF-B的PCR引物（正向）

<400> 3

tagtgtcttc catctcttt

19

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Murinae gen. sp.

<220>

<223> 位于外显子4中的小鼠VEGF-B的PCR引物（反向）

<400> 4

gccagctgt gtgactgt

18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Murinae gen. sp.

<220>

<223> 新霉素抗性基因的PCR引物（正向）

<400> 5

cccacccat gctacact

18

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Murinae gen. sp.

<220>

<223> 新霉素抗性基因的PCR引物（反向）

<400> 6

tgttctctc ttcctcatct cc

22

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Murinae gen. sp.

<220>

<223> 小鼠VEGF-B的PCR引物（正向）

<400> 7
 attgtctgtt gtgcccagtc 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Murinae gen. sp.

<220>
 <223> 小鼠VEGF-B的PCR引物（反向）

<400> 8
 gccatgtgtc accttcgcag 20

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Murinae gen. sp.

<220>
 <223> 小鼠 β -肌动蛋白基因的PCR引物（有义）
 （核苷酸 2105-2125-Ng et al. Mol. Cell Biol.
 5:2720-2732, 1985）

<400> 9
 tgtccctgga agaacacagc c 21

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Murinae gen. sp.

<220>
 <223> 小鼠 β -肌动蛋白基因的PCR引物（反义）
 （核苷酸 2411-2432-Ng et al. Mol. Cell Biol.
 5:2720-2732, 1985）

<400> 10
 cgggaaatcg tgcgtgacat 20