



(10) 授权公告号 CN 108779159 B

(45) 授权公告日 2022.12.30

(21) 申请号 201780015045.8

C07K 16/22 (2006.01)

(22) 申请日 2017.02.03

A61K 39/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108779159 A

(56) 对比文件

WO 2006098887 A2, 2006.09.21

WO 2015179317 A2, 2015.11.26

(43) 申请公布日 2018.11.09

WO 2015196051 A1, 2015.12.23

(30) 优先权数据

CN 101905024 A, 2010.12.08

62/291,446 2016.02.04 US

CN 104039133 A, 2014.09.10

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.09.04

GINA M. PELOSO ET AL. Association of Low-Frequency and Rare Coding-Sequence Variants with Blood Lipids and Coronary Heart Disease in 56,000 Whites and Blacks.《AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS》.2014, (第2期), 223-232.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/016487 2017.02.03

ANNY DEVOY ET AL. Genomically humanized mice: technologies and promises.《NATURE REVIEWS GENETICS》.2012, 第13卷14-20.

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2017/136712 EN 2017.08.10

F. QUAGLIARINI ET AL. Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3.《PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS》.2012, 第109卷 (第48期), 19751-19756.

(73) 专利权人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 V·古萨洛瓦 A·J·莫菲

J·葛洛马达 D·郭

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 张小勇

审查员 王康

(51) Int.Cl.

C07K 14/515 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书36页

序列表16页 附图16页

(54) 发明名称

具有经改造的ANGPTL8基因的非人动物

(57) 摘要

本发明提供了非人动物,以及制备和使用所述非人动物的方法和组合物,其中所述非人动物包含血管生成素样蛋白8 (ANGPTL8) 基因的人源化。在一些实施例中,所述非人动物可描述为具有对内源性ANGPTL8基因座的遗传修饰,使得所述非人动物表达人ANGPTL8多肽。

1. 一种小鼠基因组, 其在内源性Angptl8基因座处包含经改造的Angptl8基因, 其中所述经改造的Angptl8基因:

包含内源性小鼠Angptl8基因的5'非翻译区、人ANGPTL8基因的外显子1的编码部分和人ANGPTL8基因的外显子2-4;

编码序列为SEQ ID NO:6的多肽; 并且

在所述内源性Angptl8基因座处与内源性小鼠Angptl8启动子可操作地连接;

其中与野生型小鼠相比, 包含所述小鼠基因组的小鼠显示出增强的甘油三酯水平。

2. 根据权利要求1所述的小鼠基因组, 其中所述经改造的Angptl8基因包括内源性小鼠Angptl8基因的3'非翻译区。

3. 一种制备小鼠的方法, 所述小鼠基因组包含经改造的Angptl8基因, 所述经改造的Angptl8基因编码人ANGPTL8多肽, 所述方法包括修饰小鼠基因组, 使得经修饰的基因组在内源性Angptl8基因座处包含经改造的Angptl8基因, 其中所述经改造的Angptl8基因:

包含内源性小鼠Angptl8基因的5'非翻译区、人ANGPTL8基因的外显子1的编码部分和人ANGPTL8基因的外显子2-4;

编码序列为SEQ ID NO:6的多肽; 并且

在内源性Angptl8基因座处的内源性小鼠Angptl8启动子的控制下, 从而制备所述小鼠, 其中与野生型小鼠相比, 所述小鼠显示出增强的甘油三酯水平。

4. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述修饰小鼠基因组包括:

(a) 将基因组片段置于小鼠胚胎干细胞中的内源性Angptl8基因内, 所述基因组片段包含编码所述人ANGPTL8多肽的核苷酸序列;

(b) 获得 (a) 中生成的所述小鼠胚胎干细胞; 和,

(c) 使用 (b) 的所述小鼠胚胎干细胞产生小鼠。

5. 根据权利要求4所述的方法, 所述方法还包括育种 (c) 中生成的小鼠的步骤, 使得产生对于表达来自经改造的Angptl8基因的人ANGPTL8多肽纯合的小鼠。

6. 小鼠在制备小鼠模型中的用途, 所述小鼠模型用于评价靶向人ANGPTL8的药物的降甘油三酯功效或药代动力学性质的方法, 其中所述小鼠包含根据权利要求1或2所述的小鼠基因组, 并且所述评价包括以下步骤:

将所述药物施用于所述小鼠; 和

执行测定以确定靶向人ANGPTL8的药物的一种或多种降甘油三酯性质或一种或多种药代动力学性质。

7. 根据权利要求6所述的用途, 其中任选靶向人ANGPTL8的所述药物是抗ANGPTL8抗体。

## 具有经改造的ANGPTL8基因的非人动物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2016年2月4日提交的美国临时申请号62/291,446的优先权利益,所述美国临时申请的全部内容以引用的方式并入本文。

[0003] 序列表以引用方式并入

[0004] 38kb的命名为34634\_10232US01\_SequenceListing的以ASCII文本文件的序列表,于2017年2月2日创建,并且经由EFS-Web提交给美国专利和商标局(United States Patent and Trademark Office),以引用的方式并入本文。

### 背景技术

[0005] 根据世界卫生组织(World Health Organization) (WHO),心血管疾病是每年死亡的首要原因。特别地,估计2012年有1750万人死于心血管疾病,这占有全球死亡的约31%。心血管疾病包括心脏和血液病症,并且具有几种相关风险因素,其中最显著地包括行为风险因素,例如烟草和/或酒精使用、不健康饮食和肥胖,以及身体活动不足。这些行为危险因素包括例如高血压、高血糖和/或高血脂水平。脂质(脂肪)包括胆固醇和甘油三酯两者,不溶于血液并且经由脂蛋白转运通过血流。高血脂水平可增加心血管疾病的风险,并且需要经由药物以及在某些情况下手术的管理。

### 发明内容

[0006] 本发明涵盖以下认识:期望改造非人动物以允许改进的体内系统,用于鉴定和开发可用于治疗代谢病症的新治疗剂和/或治疗方案,在一些实施例中,所述代谢病症的特征在于脂质功能障碍。本发明还涵盖以下认识:期望改造非人动物以允许改进的体内系统,用于鉴定和开发可用于治疗心血管疾病、病症或状况的新治疗剂。此外,本发明还涵盖以下认识:具有经改造的血管生成素样蛋白8(Angpt18)基因和/或以其它方式表达、含有(例如,在血液中)或产生人或人源化血管生成素样蛋白8多肽的非人动物是期望的,例如用于鉴定和开发可用于治疗高甘油三酯血症的治疗剂。

[0007] 在一些实施例中,提供了具有包含经改造的Angpt18基因的基因组的非人动物,所述经改造的Angpt18基因包括来自两个不同物种(例如人和非人)的遗传材料。在一些实施例中,此类经改造的Angpt18基因包括编码人ANGPTL8多肽的一个或多个卷曲螺旋结构域的遗传材料。在一些实施例中,此类经改造的Angpt18基因包括编码全部或部分的人ANGPTL8多肽的N末端区域的遗传材料。因此,在一些实施例中,如本文所述的非人动物的经改造的Angpt18基因编码具有全部或基本上全部为人的序列的Angpt18多肽。在各种实施例中,由如本文所述的非人动物表达的Angpt18多肽在非人启动子(例如,非人Angpt18启动子)的控制下表达。

[0008] 在一些实施例中,提供了非人动物,其基因组包含含有内源部分和人部分的Angpt18基因,其中所述内源部分和人部分与非人Angpt18调节元件可操作地连接。

[0009] 在一些实施例中,提供了非人动物,其在非人Angpt18调节元件的控制下表达人

ANGPTL8多肽。

[0010] 在一些实施例中,Angpt18基因的内源部分包括或包含内源性非人Angpt18启动子。在一些实施例中,Angpt18基因的内源部分包括或包含紧邻内源性非人Angpt18基因座处的内源性非人Angpt18基因的3'非翻译区的下游的3'区域或序列。

[0011] 在一些实施例中,Angpt18基因的内源部分包括或包含5'和/或3'非翻译区(UTR)。在一些实施例中,Angpt18基因的内源部分包括5'和/或3'非翻译区(UTR),并且还包括内源性Angpt18ATG起始密码子。在一些实施例中,内源Angpt18基因的5'和3'UTR各自具有与啮齿类动物Angpt18基因中出现的相应的5'和3'UTR基本上相同或相同的序列。在一些特定实施例中,内源Angpt18基因的5'和3'UTR各自具有与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3中出现的相应的5'和3'UTR至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%相同的序列。

[0012] 在一些实施例中,如本文所述的Angpt18基因编码的多肽具有与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%相同的序列。在一些实施例中,如本文所述的Angpt18基因编码的多肽具有与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8基本上相同或相同的序列。

[0013] 在一些实施例中,人部分包括或包含全部或部分的人ANGPTL8基因的外显子1-4。在一些实施例中,人ANGPTL8基因的外显子1-4的全部或部分与SEQ ID NO:5的人ANGPTL8 mRNA序列中出现的相应外显子1-4的全部或部分至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%相同。在一些实施例中,人ANGPTL8基因的外显子1-4的全部或部分与SEQ ID NO:5的人ANGPTL8 mRNA序列中出现的相应外显子1-4的全部或部分基本上相同或相同。在一些实施例中,人部分还包含人ANGPTL8基因的3'UTR。在一些实施例中,人部分包含对于非人动物中的表达密码子优化的序列。

[0014] 在一些实施例中,人ANGPTL8多肽包括或包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的氨基酸残基22-198至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,人ANGPTL8多肽包括或包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的氨基酸残基22-198基本上相同或相同的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施例中,人ANGPTL8多肽由序列编码,所述序列与SEQ ID NO:9至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%相同。在一些实施例中,人ANGPTL8多肽由与SEQ ID NO:9基本上相同或相同的序列编码。在一些实施例中,人ANGPTL8多肽由密码子优化的序列编码。

[0016] 在一些实施例中,人ANGPTL8多肽是变体人ANGPTL8多肽。在一些实施例中,变体人ANGPTL8多肽的特征在于R59W氨基酸取代。在一些实施例中,变体人ANGPTL8多肽的特征在于Q121X氨基酸取代。在一些实施例中,变体人ANGPTL8多肽的特征在于以下或与以下相关:较低的血浆低密度脂蛋白(LDL)-胆固醇和/或高密度脂蛋白(HDL)-胆固醇水平。在一些实施例中,变体人ANGPTL8多肽的特征在于增强的甘油三酯水平或与增强的甘油三酯水平相关。在一些实施例中,人ANGPTL8多肽由置于内源性非人Angpt18基因座处的核酸序列编码。

[0017] 在一些实施例中,提供了分离的非人细胞或组织,其基因组包含如本文所述的

Angpt18基因。在一些实施例中,细胞为淋巴细胞。在一些实施例中,细胞选自B细胞、树突状细胞、巨噬细胞、单核细胞和T细胞。在一些实施例中,组织选自脂肪、膀胱、大脑、乳房、骨髓、眼、心、肠、肾、肝、肺、淋巴结、肌肉、胰腺、血浆、血清、皮肤、脾、胃、胸腺、睾丸、卵子以及它们的组合。

[0018] 在一些实施例中,提供了从本文所述的分离的非人细胞制备、生成或产生的永生化细胞。

[0019] 在一些实施例中,提供了非人胚胎干(ES)细胞,其基因组包含如本文所述的Angpt18基因。在一些实施例中,非人胚胎干细胞是啮齿类动物胚胎干细胞。在某些实施例中,啮齿类动物胚胎干细胞是小鼠胚胎干细胞并且来自129品系、C57BL品系或它们的混合物。在某些实施例中,啮齿类动物胚胎干细胞是小鼠胚胎干细胞并且是129和C57BL品系的混合物。

[0020] 在一些实施例中,提供了本文所述的非人胚胎干细胞用于制备非人动物的用途。在一些特定实施例中,非人胚胎干细胞是小鼠胚胎干细胞,并且用于制备如本文所述的包含Angpt18基因(或基因座)的小鼠。在一些特定实施例中,非人胚胎干细胞是大鼠胚胎干细胞,并且用于制备如本文所述的包含Angpt18基因(或基因座)的大鼠。

[0021] 在一些实施例中,提供了包含本文所述的非人胚胎干细胞、由其制备、由其获得或由其产生的非人胚胎。在某些实施例中,非人胚胎为啮齿类动物胚胎;在一些实施例中,为小鼠胚胎;在一些实施例中,为大鼠胚胎。

[0022] 在一些实施例中,提供了本文描述的非人胚胎用于制备非人动物的用途。在一些特定实施例中,非人胚胎是小鼠胚胎,并且用于制备如本文所述的包含Angpt18基因(或基因座)的小鼠。在一些特定实施例中,非人胚胎是大鼠胚胎,并且用于制备如本文所述的包含Angpt18基因(或基因座)的大鼠。

[0023] 在一些实施例中,提供了包含本文所述的分离的非人细胞或组织、本文所述的永生化细胞、本文所述的非人胚胎干细胞、本文所述的非人胚胎或本文所述的非人动物的试剂盒。

[0024] 在一些实施例中,提供了用于制造和/或开发用于治疗或诊断的药物(例如,抗体或其抗原结合片段)的本文所述的试剂盒。

[0025] 在一些实施例中,提供了用于制造和/或开发用于治疗、预防或改善疾病、病症或状况的药物(例如,抗体或其抗原结合片段)的本文所述的试剂盒。

[0026] 在一些实施例中,提供了本文所述的转基因、核酸构建体、DNA构建体或靶向载体。在一些特定实施例中,转基因、核酸构建体、DNA构建体或靶向载体如本文所述包含全部或部分的Angpt18基因(或基因座)。在一些特定实施例中,转基因、核酸构建体、DNA构建体或靶向载体包含DNA片段,所述DNA片段如本文所述包括全部或部分的Angpt18基因(或基因座)。在一些特定实施例中,转基因、核酸构建体、DNA构建体或靶向载体包含Angpt18基因(或基因座),其包含SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17中的任何一个。在一些特定实施例中,转基因、核酸构建体、DNA构建体或靶向载体包含Angpt18基因(或基因座),其包含SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17。在某些实施例中,转基因、核酸构建体、DNA构建体或靶向载体还包含一个或多个选择标记物。在一些特定实施例中,转基因、核酸构建体、DNA构建体或靶向载体还包含一个或多个位点特异

性重组位点(例如loxP、Frt或其组合)。在某些实施例中,转基因、核酸构建体、DNA构建体或靶向载体如图3所示。

[0027] 在一些实施例中,提供了本文所述的转基因、核酸构建体、DNA构建体或靶向载体用于制备非人胚胎干细胞、非人细胞、非人胚胎和/或非人动物的用途。

[0028] 在一些实施例中,提供了制备表达来自内源Angptl8基因的人ANGPTL8多肽的非人动物的方法,该方法包括(a)将基因组片段置于非人胚胎干细胞的内源Angptl8基因内,所述基因组片段包含编码全部或部分的人ANGPTL8多肽的核苷酸序列;(b)获得(a)中生成的非人胚胎干细胞;并且(c)使用(b)的非人胚胎干细胞产生非人动物。

[0029] 在一些实施例中,核苷酸序列包含全部或部分的人ANGPTL8基因的外显子1-4。在一些实施例中,核苷酸序列还包含人ANGPTL8基因的3' UTR。在一些实施例中,核苷酸序列编码人ANGPTL8多肽的成熟形式(即,不含信号肽)。在一些实施例中,核苷酸序列编码人ANGPTL8多肽的氨基酸22-60、77-134、156-193或22-198。在一些实施例中,核苷酸序列包含一个或多个选择标记物。在一些实施例中,核苷酸序列包含一个或多个位点特异性重组位点。在一些实施例中,核苷酸序列包含重组酶基因和侧面为重组酶识别位点的选择标记物,所述重组酶识别位点定向为指导切除。在一些实施例中,重组酶基因与启动子可操作地连接,所述启动子驱动分化细胞中重组酶基因的表达,并且不驱动未分化细胞中重组酶基因的表达。在一些实施例中,重组酶基因与有转录能力和发育调节的启动子可操作地连接。在一些实施例中,有转录能力和发育调节的启动子是或包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14;在一些特定实施例中,有转录能力和发育调节的启动子是或包含SEQ ID NO:12。在一些实施例中,核苷酸序列包含对于非人动物中的表达密码子优化的一个或多个序列。在制备表达来自内源Angptl8基因的人ANGPTL8多肽的非人动物的方法的一些实施例中,该方法还包括育种(c)中生成的啮齿类动物的步骤,使得产生对于表达来自内源Angptl8基因的人ANGPTL8多肽纯合的啮齿类动物。

[0030] 在一些实施例中,提供了制备其基因组包含编码人Angptl8基因的非人动物的方法,所述人ANGPTL8基因编码人ANGPTL8多肽,所述方法包括修饰非人动物的基因组,使得它包含Angptl8基因,所述Angptl8基因编码在非人动物Angptl8调节序列的控制下的人ANGPTL8多肽,从而制备所述非人动物。

[0031] 在一些实施例中,Angptl8基因被修改为包括全部或部分的人ANGPTL8基因的外显子1-4。在一些实施例中,基因Angptl8被修改为包括全部或部分的人基因ANGPTL8的外显子1-4,并且被修改为还包括人ANGPTL8基因的3' UTR。

[0032] 在一些实施例中,提供了通过本文所述的方法中的任一种获得(由其制备、由其获得或由其产生)的非人动物。

[0033] 在一些实施例中,提供了评价靶向人ANGPTL8的药物的降甘油三酯功效的方法,所述方法包括以下步骤:将药物施用于如本文所述的非人动物,并且执行测定以确定靶向人ANGPTL8的药物的一种或多种降甘油三酯性质。

[0034] 在一些实施例中,提供了评价靶向人ANGPTL8的药物的药代动力学性质的方法,所述方法包括以下步骤:将药物施用于如本文所述的非人动物,并且执行测定以确定靶向人ANGPTL8的药物的一种或多种药代动力学性质。

[0035] 在一些实施例中,靶向人ANGPTL8的药物是ANGPTL8拮抗剂。在一些实施例中,靶向

人ANGPTL8的药物是ANGPTL8激动剂。在一些实施例中,靶向人ANGPTL8的药物是抗ANGPTL8抗体。在一些实施例中,将靶向人ANGPTL8的药物静脉内、腹膜内或皮下施用于啮齿类动物。

[0036] 在一些实施例中,提供了其基因组包含经改造的Angptl8基因的非人动物,所述经改造的Angptl8基因包括包含内源Angptl8基因的5'UTR的内源部分,以及包含人ANGPTL8基因的外显子1-4的全部或部分和3'UTR的人部分,其中所述人部分可操作地连接到内源性非人Angptl8ATG起始密码子且可操作地连接到内源性非人Angptl8启动子,并且其中所述非人动物在其血清中表达人ANGPTL8多肽。经改造的Angptl8基因还可包括或连接至或随后为内源Angptl8基因的3'UTR,和/或在内源性Angptl8基因座处的内源Angptl8基因的3'UTR紧下游的3'序列。

[0037] 在一些实施例中,提供了高甘油三酯血症的非人动物模型,所述非人动物表达如本文所述的人ANGPTL8多肽。

[0038] 在一些实施例中,提供了高甘油三酯血症的非人动物模型,所述非人动物具有包含如本文所述的Angptl8基因的基因组。

[0039] 在一些实施例中,提供了用于制造和/或开发用于治疗或诊断的药物的本文所述的非人动物或细胞。

[0040] 在一些实施例中,提供了本文所述的非人动物或细胞用于制造和/或开发用于医学(诸如用作药剂)的药物或疫苗的用途。

[0041] 在一些实施例中,提供了如本文所述的非人动物或细胞,用于制造用于治疗、预防或改善疾病、病症或状况的药剂。在一些实施例中,疾病、病症或状况是高甘油三酯血症。在一些实施例中,疾病、病症或状况是心血管疾病、病症或状况。

[0042] 在一些实施例中,提供了如本文所述的非人动物或细胞在药剂制造中的用途,所述药剂用于治疗特征在于脂质功能障碍的疾病、病症或状况。

[0043] 在一些实施例中,提供了如本文所述的非人动物或细胞在制造和/或开发结合人ANGPTL8的抗体中的用途。

[0044] 在各种实施例中,非人Angptl8调节元件包括非人Angptl8启动子;在一些特定实施例中,内源性非人Angptl8启动子。

[0045] 在各种实施例中,如本文所述的Angptl8基因是人源化Angptl8基因。

[0046] 在各种实施例中,Angptl8基因的人部分编码氨基酸序列,所述氨基酸序列尤其编码人ANGPTL8多肽的氨基酸序列,所述人ANGPTL8多肽负责脂质结合或结合ANGPTL3。

[0047] 在各种实施例中,Angptl8多肽的人部分包含人ANGPTL8多肽的卷曲螺旋结构域或N末端区域的氨基酸序列。

[0048] 在各种实施例中,如本文所述的非人动物表达可在非人动物的血清中可检测的人ANGPTL8多肽。在各种实施例中,如本文所述的非人动物无法在非人动物的血清中可检测地表达内源性Angptl8多肽。

[0049] 在各种实施例中,如本文所述的非人动物包含Angptl8基因(或基因座),其包括SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11。在各种实施例中,如本文所述的非人动物包含Angptl8基因(或基因座),其包括SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:18。

[0050] 在各种实施例中,本文所述的非人动物是啮齿类动物;在一些实施例中,小鼠;在一些实施例中,大鼠。在一些实施例中,本文所述的小鼠选自129品系、BALB/C品系、C57BL/6

品系和混合的129xC57BL/6品系;在某些实施例中,C57BL/6品系。

[0051] 如本申请中所用,术语“约”和“大约”可等同使用。本申请中与或不与约/大约一起使用的任何数字意在涵盖由相关领域普通技术人员所理解的任何正常波动。

## 附图说明

[0052] 本文中包括的由以下各图组成的附图仅用于举例说明目的而非用于限制。

[0053] 图1显示了非人(例如小鼠)和人血管生成素样蛋白8 (ANGPTL8) 基因的基因组结构的不按照比例的代表性图解。外显子在每个外显子下方编号。还指出了每个基因的非翻译区(空心方框)。编码信号肽的编码序列的相对部分对于每个基因在外显子1上方指示。

[0054] 图2显示了人ANGPTL8 (hANGPTL8, SEQ ID NO:6)、小鼠Angptl8 (mAngptl8, SEQ ID NO:4)、大鼠Angptl8 (rAngptl8, SEQ ID NO:2) 和经改造的Angptl8 (engAngptl8; SEQ ID NO:8) 的代表性氨基酸序列的比对。星号(\*) 指示相同的氨基酸;冒号(:) 表示保守取代;句点(.) 指示半保守取代;空白指示非保守替代;加方框的氨基酸残基指示信号肽。

[0055] 图3显示了用于人源化非人Angptl8基因的示例性方法的不按照比例的代表性图解。上图:根据实例1制备的靶向载体,用于经由同源重组插入鼠Angptl8基因座内;下图:经由同源重组和重组酶介导的选择盒缺失插入靶向载体后靶向的鼠Angptl8基因座。所选的核苷酸连接位置在每个连接下面以横线标记,并且由SEQ ID NO指出每个连接。

[0056] 图4显示了小鼠和人血管生成素样蛋白8 (ANGPTL8) 基因的基因组结构的不按照比例的代表性图解,指示实例1中描述的测定中采用的探针的大致位置。内源性鼠Angptl8基因的人源化中采用的示例性合成DNA片段的长度和相应的缺失在每个分别基因下方指示,并且在实例1中描述。

[0057] 图5显示了野生型(WT) 和如实例2中所述对于人源化Angptl8基因纯合的小鼠 (ANGPTL8<sup>hum/hum</sup>) 中的甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 和高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 的代表性水平。脂质水平呈现为在从静脉血分离的血浆中的mg/dL。

[0058] 图6显示了如实例3中所述,对于人源化的Angptl8基因纯合的小鼠中的人ANGPTL8的代表性组织特异性(肝和脂肪组织) 表达。表达水平显示为每千克碱基转录物/百万映射读数 (RPKM)

[0059] 图7显示了在抗ANGPTL8抗体或对照(具有无关特异性的同种型匹配的人IgG) 施用之前和施用之后,如实例4中所述对于人源化的Angptl8基因纯合的小鼠中的代表性血清甘油三酯水平。血清甘油三酯水平呈现为用抗体处理前(出血前) 和处理后(施用后) 的mg/dL。

[0060] 图8A-8K。对于mRNA序列,粗体字体指示编码序列,并且连续外显子(如果指示的话) 通过交替的加下划线文本分开;对于经改造的mRNA序列,人序列包含在圆括号内。对于氨基酸序列,信号序列由加下划线的字体指示。8A。褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) Angptl8 mRNA (SEQ ID NO:1, NCBI参考序列NM\_001271710.1)。8B。褐家鼠Angptl8氨基酸 (SEQ ID NO:2, NCBI参考序列:NP\_001258639.1)。8C。小家鼠 (*Mus musculus*) Angptl8 mRNA (SEQ ID NO:3, NCBI参考序列:NM\_001080940.1)。8D。小家鼠Angptl8氨基酸 (SEQ ID NO:4, NCBI参考序列:NP\_001074409.1)。8E。智人 (*Homo sapiens*) ANGPTL8 mRNA (SEQ ID NO:5, NCBI参考序列:NM\_018687.6)。8F。智人ANGPTL8氨基酸 (SEQ ID NO:6, NCBI参考序列:NP\_061157.3)。8G。示例性经改造的Angptl8mRNA (SEQ ID NO:7)。8H。示例性经改造的Angptl8氨基酸 (SEQ



ID NO:8)。8I。用于改造非人Angptl8基因的示例性合成DNA片段(SEQ ID NO:9;~2,383bp,包括人ANGPTL8基因的外显子1-4和3' UTR)。8J。包括选择盒(SEQ ID NO:10;人序列以粗体大写字体指示,选择盒序列以小写字体指示,并且小鼠序列由常规大写字体指示)的示例性经改造的Angptl8等位基因。8K。重组酶介导的选择盒切除后的示例性经改造的Angptl8等位基因(SEQ ID NO:11;人序列以粗体大写字体指示,重组酶介导的选择盒缺失后剩余的序列以小写字体指示,并且小鼠序列由常规大写字体指示)。

[0061] 图9A。显示了跨越上游插入点的核苷酸序列,其指示在插入点处与人ANGPTL8基因组序列邻接的内源小鼠序列(包含在下方的圆括号内,其中ATG起始密码子为粗体字体)。

[0062] 图9B。显示了跨越自缺失的新霉素盒的5'末端的核苷酸序列,其指示与插入点下游的盒序列邻接的人ANGPTL8基因组序列(包含在下方的圆括号内,其中XhoI位点为斜体字体,并且loxP位点为粗体字体)。

[0063] 图9C。显示了跨越自缺失的新霉素盒的3'末端处的下游插入点的核苷酸序列,其指示与小鼠Angptl8基因组序列邻接的盒序列(包含在下方的圆括号内,其中loxP位点为粗体字体,I-CeuI识别位点加下划线,并且NheI识别位点为斜体)。

[0064] 图9D。显示了跨越新霉素盒缺失后的下游插入点的核苷酸序列(人ANGPTL8 3' UTR和小鼠ANGPTL8 3' UTR之间剩余的77bp),其指示与剩余的盒序列并列的人和小鼠基因组序列(包含在下方的圆括号内,其中XhoI和NheI识别位点为斜体,loxP位点为粗体,并且I-CeuI限制位点加下划线)。

[0065] 定义

[0066] 本发明不限于本文中描述的特定方法和实验条件,因为此类方法和条件可以变化。还应当理解,本文所用的术语仅用于描述特定实施例的目的,而无意进行限制,因为本发明的范围仅由权利要求限定。

[0067] 除非另有定义,否则本文中使用的所有术语和短语包括所述术语和短语在本领域中已获得的含义,除非明确地指出相反或根据其中使用所述术语或短语的上下文明显相反。尽管与本文中描述的那些方法和材料类似或等等的任何方法和材料可用于本发明的实践或测试,但现在描述具体的方法和材料。本文提及的所有专利和非专利出版物据此以引用方式并入。

[0068] 大约:当在本文中应用于一个或多个目的值时,指与所述参考值相似的值。在某些实施例中,除非另有所指或根据上下文明显不同,否则术语“大约”或“约”是指在任一方向(大于或小于)上落在所述参考值的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小内的值的范围(除了这样的数字将超过可能值的100%的情况外)。

[0069] 生物活性的:如本文使用的,指在生物系统中、在体外或体内(例如在生物中)具有活性的任何试剂的特征。例如,当存在于生物中时在生物内具有生物效应的药剂被认为具有生物活性。在特定实施例,当蛋白质或多肽具有生物活性时,所述该蛋白质或多肽的共享所述蛋白质或多肽的至少一种生物活性的部分通常被称为“生物活性”部分。

[0070] 可比较的:如本文使用的,指两个或更多个试剂、实体、情况、条件组等,其可彼此不相同,但足够相似以允许在其间的比较,使得可基于观察到的差异或相似性合理地得出结论。本领域普通技术人员在上下文中将理解,在任何给定的情况下,对于两种或更多种这

样的药剂、实体、情形、条件组等需要多大程度的同一性来被认为是可比较的。

[0071] 保守的:如本文使用的,指描述保守氨基酸取代的情况,包括氨基酸残基由具有含有相似化学性质(例如电荷或疏水性)的侧链R基团的另一个氨基酸残基的取代。一般来讲,保守氨基酸置换基本上不会改变蛋白质的目的功能性质,例如,受体结合配体的能力。具有含有相似化学性质的侧链的氨基酸组的例子包括:脂肪族侧链,如甘氨酸(Gly,G)、丙氨酸(Ala,A)、缬氨酸(Val,V)、亮氨酸(Leu,L)和异亮氨酸(Ile,I);脂肪族羟基侧链,如丝氨酸(Ser,S)和苏氨酸(Thr,T);含酰胺侧链,如天冬酰胺(Asn,N)和谷氨酰胺(Gln,Q);芳香族侧链,如苯丙氨酸(Phe,F)、酪氨酸(Tyr,Y)和色氨酸(Trp,W);碱性侧链,如赖氨酸(Lys,K)、精氨酸(Arg,R)和组氨酸(His,H);酸性侧链,如天冬氨酸(Asp,D)和谷氨酸(Glu,E);以及含硫侧链,如半胱氨酸(Cys,C)和甲硫氨酸(Met,M)。保守氨基酸取代组包括例如缬氨酸/亮氨酸/异亮氨酸(Val/Leu/Ile,V/L/I)、苯丙氨酸/酪氨酸(Phe/Tyr,F/Y)、赖氨酸/精氨酸(Lys/Arg,K/R)、丙氨酸/缬氨酸(Ala/Val,A/V)、谷氨酸盐/天冬氨酸盐(Glu/Asp,E/D)和天冬酰胺/谷氨酰胺(Asn/Gln,N/Q)。在一些实施例中,保守氨基酸置换可为丙氨酸对蛋白质中的任何天然残基的置换,如例如丙氨酸扫描诱变中所使用的。在一些实施例中,制备保守取代,其在Gonnet,G.H.等人,1992,Science 256:1443-1445中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值。在一些实施例中,取代是中等保守取代,其中所述取代在PAM250对数似然矩阵中具有非负值。

[0072] 对照:如本文使用的,指“对照”是结果针对其进行比较的标准的本领域理解的含义。通常,对照通过分离变量以得出有关此类变量的结论而用于增进实验完整性。在一些实施例中,对照是与测试反应或测定同时进行以提供对比物的反应或测定。如本文使用的,“对照”可以指“对照动物”。“对照动物”可具有如本文所述的修饰,与本文所述的修饰不同的修饰或不具有修饰(即,野生型动物)。在一个实验中,应用“测试”(即,测试的变量)。在第二实验中,“对照”(即,被测试的变量)不适用。在一些实施例中,对照是历史对照(即,此前进行的测试或测定,或此前已知的量或结果)。在一些实施例中,对照是或包括印刷或以其他方式保存的记录。对照可为阳性对照或阴性对照。

[0073] 破坏:如本文使用的,指与DNA分子(例如,与内源同源序列如基因或基因基因座)的同源重组事件的结果。在一些实施例中,破坏可实现或代表插入、缺失、取代、替换、错义突变或DNA序列移码或它们的组合。插入可包括插入整个基因或基因片段,例如外显子,其可来源于除内源性序列之外的其他来源(例如异源序列)。在一些实施例中,破坏可提高基因或基因产物的(例如由基因编码的蛋白质的)表达和/或活性。在一些实施例中,破坏可降低基因或基因产物的表达和/或活性。在一些实施例中,破坏可改变基因或编码的基因产物(例如编码的蛋白质)的序列。在一些实施例中,破坏可截短基因或编码的基因产物(例如编码的蛋白质)或使其片段化。在一些实施例中,破坏可使基因或编码的基因产物延长;在一些这样的实施例中,破坏可实现融合蛋白的组装。在一些实施例中,破坏可影响基因或基因产物的水平但不影响其活性。在一些实施例中,破坏可影响基因或基因产物的活性但不影响其水平。在一些实施例中,破坏可对基因或基因产物的水平没有显著影响。在一些实施例中,破坏可对基因或基因产物的活性没有显著影响。在一些实施例中,破坏可对基因或基因产物的水平或活性都没有显著影响。

[0074] 确定、测量、评估、评价、测定和分析:在本文中可互换使用以指任何形式的测量,

并且包括确定元素是否存在。这些术语包括定量和/或定性测定。测定可为相对的或绝对的。“测定...的存在”包括确定存在的某物的量和/或确定其是否存在。

[0075] 内源基因座或内源基因：如本文使用的，指在引入如本文所述的改变、破坏、缺失、插入、修饰、替换或取代之之前，在亲本或参考生物中发现的遗传基因座。在一些实施例中，内源基因座具有天然存在的序列。在一些实施例中，内源基因座为野生型基因座。在一些实施例中，参考生物为野生型生物。在一些实施例中，参考生物为经改造的生物。在一些实施例中，参考生物是实验室培育的生物（无论是野生型的还是经改造的）。

[0076] 内源启动子：如本文使用的，指例如在野生型生物中与内源基因天然相关的启动子。

[0077] 经改造的：如本文使用的，一般而言，指已通过人为操纵的方面。例如，在一些实施例中，当不以自然界中的顺序连接在一起的两个或更多个序列通过人工操纵而在经改造的多核苷酸中直接彼此连接时，多核苷酸可被视为“经改造的”。在一些具体的此类实施例中，经改造的多核苷酸可以包含自然界中存在的与第一编码序列可操作地结合但不与第二编码序列可操作地结合的调控序列，该调控序列通过人工连接而使得其与第二编码序列可操作地结合。可替代地或另外地，在一些实施例中，各自编码自然中不彼此连接的多肽元件或结构域的第一核酸序列和第二核酸序列可以在单个经改造的多核苷酸中彼此连接。相比之下，在一些实施例中，如果细胞或生物已被操纵而使得其遗传信息被改变（例如，先前不存在的新遗传物质已经被引入，或者先前存在的遗传物质已被改变或去除），则该细胞或生物可以被视为“经改造的”。如通常实践并且由本领域的技术人员所理解的，即使实际的操作是对先前的实体进行的经改造的多核苷酸或细胞的子代通常仍然被称为“经改造的”。此外，本领域的技术人员将认识到，可以通过多种可用的方法来实现本文所述的“改造”。例如，在一些实施例中，“改造”可以涉及通过使用计算机系统进行选择或设计（例如，核酸序列、多肽序列、细胞、组织和/或生物），所述计算机系统经编程以执行分析或比较，或者分析、推荐和/或选择序列、改变等）。可替代地或另外地，在一些实施例中，“改造”可以涉及使用体外化学合成方法和/或重组核酸技术，比如核酸扩增（例如经由聚合酶链式反应）杂交、突变、转化、转染等，和/或多种受控交配方法中的任一种。如本领域技术人员了解的，各种已建立的此类技术（例如用于重组DNA、寡核苷酸合成和组织培养和转化（例如电穿孔、脂转染等）是本领域众所周知的，并且在本说明书自始至终引用和/或讨论的各种一般和更具体的参考文献中描述。参见例如Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，N.Y.，1989）。

[0078] 基因：如本文使用的，指编码产物（例如，RNA产物和/或多肽产物）的染色体中的DNA序列。在一些实施例中，基因包括编码序列（即，编码特定产物的序列）。在一些实施例中，基因包括非编码序列。在一些特定实施例中，基因可以包括编码（例如，外显子）和非编码（例如，内含子）序列二者。在一些实施例中，基因可包括一个或多个调控序列（例如启动子、增强子等）和/或内含子序列，其例如可控制或影响基因表达的一个或多个方面（例如细胞类型特异性表达、诱导型表达等）。为了清楚起见，我们注意到，如在本专利申请中使用的，术语“基因”一般指编码多肽的核酸的一部分；该术语可任选涵盖调控序列，如根据上下文对于本领域的普通技术人员将明确的。该定义并非预期排除将术语“基因”应用于非蛋白质编码表达单元，而是为了阐明在大多数情况下，如本文件中使用的该术语指编码多肽的

核酸。

[0079] 异源的：如本文使用的，指来自不同来源的试剂或实体。例如，当参考存在于特定细胞或生物中的多肽、基因或基因产物使用时，该术语阐明了相关多肽、基因或基因产物：1) 通过人为改造；2) 通过人为（例如，经由遗传改造）引入细胞或生物（或其前体）内；和/或 3) 不由相关细胞或生物（例如相关细胞类型或生物类型）天然产生或者存在于相关细胞或生物中。

[0080] 宿主细胞：如本文使用的，指异源（例如外源）核酸或蛋白质已引入其内的细胞。本领域技术人员在阅读本公开内容后将理解，此类术语不仅指特定的主题细胞，而且还用于指该细胞的子代。因为某些修饰可因突变或环境影响而在后续世代中发生，所以这样的子代事实上可不等同于亲本细胞，但仍包括在如本文中使用的术语“宿主细胞”的范围内。在一些实施例中，宿主细胞为原核或真核细胞或包含原核或真核细胞。一般而言，宿主细胞是适合于接受和/或产生异源核酸或多肽的任何细胞，而与细胞指定至其的生命界无关。示例性细胞包括原核生物和真核生物的细胞（单细胞或多细胞）、细菌细胞（例如，大肠杆菌（*E.coli*）、芽孢杆菌属菌种（*Bacillus* spp.）、链霉菌属菌种（*Streptomyces* spp.）等的菌株）、分枝杆菌细胞、真菌细胞、酵母细胞（例如，酿酒酵母（*S.cerevisiae*）、粟酒裂殖酵母（*S.pombe*）、巴斯德毕赤酵母（*P.pastoris*）、甲醇毕赤酵母（*P.methanolica*）等）、植物细胞、昆虫细胞（例如，SF-9、SF-21、杆状病毒感染的昆虫细胞、粉纹夜蛾（*Trichoplusia ni*）等）、非人动物细胞、人细胞或细胞融合物例如杂交瘤或四源杂交瘤。在一些实施例中，细胞为人、猴、猿、仓鼠、大鼠或小鼠细胞。在一些实施例中，细胞为真核细胞并且选自以下细胞：CHO（例如CHO K1、DXB-11CHO、Veggie-CHO）、COS（例如COS-7）、视网膜细胞、Vero、CV1、肾（例如HEK293、293EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK）、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60、（例如BHK21）、Jurkat、Daudi、A431（表皮的）、CV-1、U937、3T3、L细胞、C127细胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、Sertoli细胞、BRL 3A细胞、HT1080细胞、骨髓瘤细胞、肿瘤细胞和来源于前述细胞的细胞系。在一些实施例中，细胞包含一个或多个病毒基因，例如表达病毒基因的视网膜细胞（例如PER.C6<sup>TM</sup>细胞）。在一些实施例中，宿主细胞为分离的细胞或包含分离的细胞。在一些实施例中，宿主细胞为组织的一部分。在一些实施例中，宿主细胞为生物的一部分。

[0081] 人源化：本文根据其本领域理解的含义使用，以指核酸或多肽，其结构（即，核苷酸或氨基酸序列）包括与非人动物中天然发现的特定基因或多肽的结构基本上或同一地对应的部分，并且还包括与在相关的特定非人基因或蛋白质中发现的部分不同，而是与相应的人基因或多肽中发现的可比较结构更紧密地对应的部分。在一些实施例中，“人源化”基因是编码具有与人多肽（例如，人蛋白质或其部分-例如其特征性部分）的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的多肽的基因。例如，在膜受体的情况下，“人源化”基因可编码具有细胞外部分的多肽，其全部或部分具有与人细胞外部分的那种一样的氨基酸序列，并且剩余序列与非人（例如小鼠）多肽的那种一样。在分泌多肽的情况下，“人源化”基因可编码具有成熟肽的多肽，其全部或部分具有与人成熟肽的那种一样的序列、以及与非人（例如小鼠）肽的那种一样的信号序列。在一些实施例中，人源化基因包含人基因的DNA序列的至少一部分。在一些实施例中，人源化基因包含人基因的完整DNA序列或人基因的DNA序列，其编码对应于成熟人肽或多肽的成熟肽或多肽。在一些实施例中，人源化多肽包含具有在人多肽中

出现的部分的序列。在一些实施例中，人源化多肽包含人多肽的完整序列，并且由对应于人基因的同源物或直向同源物的非人动物的内源基因座表达。

[0082] 同一性：如本文与序列比较结合使用的，指如通过本领域已知的可用于测量核苷酸和/或氨基酸序列同一性的多种不同算法确定的同一性。在一些实施例中，使用ClustalW v.1.83 (慢) 比对来确定如本文所述的同一性，所述比对采用10.0的开放空位罚分、0.1的延伸空位罚分并且使用Gonnet相似性矩阵 (MACVECTOR™10.0.2, MacVector Inc., 2008)。

[0083] 在体外：如本文使用的，指在人工环境中，例如在试管或反应容器中，在细胞培养等中，而不是在多细胞生物内发生的事件。

[0084] 在体内：如本文使用的，指在多细胞生物例如人和非人动物内发生的事件。在基于细胞的系统的背景下，该术语可用于指在活细胞内 (与例如体外系统相反) 发生的事件。

[0085] 分离的：如本文使用的，指在最初生产时 (无论在自然界中和/或在实验环境中)，已 (1) 与它结合的至少一些组分分开，和/或 (2) 通过人为设计、产生、制备和/或制造的物质和/或实体。分离的物质和/或实体可与约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或超过约99%的最初与其关联的其他组分分离。在一些实施例中，分离的试剂为约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或超过约99%纯的。如本文使用的，如果物质基本上不含其他组分，则其是“纯的”。在一些实施例中，如将被本领域技术人员所理解的，物质在与某些其他组分例如一种或多种载体或赋形剂 (例如，缓冲液、溶剂、水等) 组合后，仍可被认为是“分离的”或甚至“纯的”；在此类实施例中，计算物质在不包括此类载体或赋形剂情况下的分离百分比或纯度。只是给出一个实例，在一些实施例中，天然存在的生物聚合物诸如多肽或多核苷酸a) 在因其衍生的起源或来源而不与在其天然状态下天然伴随其的一些或全部组分关联时；b) 在其基本上不含与天然产生其的物种相同的物种的其他多肽或核酸时；c) 当由不是天然产生其的物种的细胞或其他表达系统表达或以其他方式与来自所述细胞或其他表达系统的组分关联时，被认为是“分离的”。因此，例如，在一些实施例中，化学合成或在与在自然界中产生多肽的细胞系统不同的细胞系统中合成的多肽被视为“分离的”多肽。替代地或另外地，在一些实施例中，已历经一种或多种纯化技术的多肽在其已与a) 在自然界中与其关联的；和/或b) 当最初产生时与其关联的其他组分分离的程度上可被认为是“分离的”多肽。

[0086] 基因座 (Locus) 或基因座 (Loci)：如本文使用的，包括基因 (或显著序列)、DNA序列、多肽编码序列或生物基因组的染色体上的位置的特定位置。例如，“Angpt18基因座”可指Angpt18基因、Angpt18DNA序列、Angpt18编码序列的特定定位或生物基因组的染色体上的Angpt18位置，其已被鉴定这样的序列存在的位置。“Angpt18基因座”可包含Angpt18基因的调节元件，包括但不限于增强子、启动子、5' 和/或3' UTR、或其组合。本领域的普通技术人员将会理解，在一些实施例中，染色体可以包含几百个或甚至几千个基因，并且在不同物种之间进行比较时显示出相似的遗传基因座的物理共定位。此类遗传基因座可以描述为具有共有的同线性。

[0087] 非人动物：如本文使用的，指并非人的任何脊椎动物生物。在一些实施例中，非人动物为圆口纲脊椎动物、硬骨鱼、软骨鱼 (例如，鲨鱼或鳐)、两栖动物、爬行动物、哺乳动物或鸟。在一些实施例中，本文所述的非人动物是哺乳动物。在一些实施例中，非人哺乳动物

为灵长类动物、山羊、绵羊、猪、狗、牛或啮齿类动物。在一些实施例中，本文所述的非人动物是小型哺乳动物，例如跳鼠总科 (Dipodoidea) 或鼠总科 (Muroidea) 的小型哺乳动物。在一些实施例中，本文所述的遗传修饰的动物是啮齿类动物。在一些实施例中，本文所述的啮齿类动物选自小鼠、大鼠和仓鼠。在一些实施例中，本文所述的啮齿类动物选自鼠总科。在一些实施例中，本文所述的遗传修饰的动物来自选自下列的家族：丽仓鼠科 (Calomyscidae) (例如，类小鼠的仓鼠)、仓鼠科 (Cricetidae) (例如，仓鼠、新世界大鼠和小鼠、田鼠)、鼠科 (Muridae) (真小鼠和大鼠、沙鼠、棘鼠、冠鼠)、马岛鼠科 (Nesomyidae) (攀鼠、岩鼠、具尾大鼠、马达加斯加大鼠和小鼠)、刺山鼠科 (Platacanthomyidae) (例如，刺棒睡鼠) 和鼯形鼠科 (Spalacidae) (例如，鼯鼠、竹鼠和鼯鼠)。在某些实施例中，本文所述的遗传修饰的啮齿类动物选自真小鼠或大鼠 (鼠科)、沙鼠、棘鼠和冠鼠。在某些实施例中，本文所述的遗传修饰的小鼠来自鼠科的成员。在一些实施例中，本文所述的非人动物是啮齿类动物。在某些实施例中，本文所述的啮齿类动物选自小鼠和大鼠。在一些实施例中，本文所述的非人动物是小鼠。

[0088] 在一些实施例中，本文所述的非人动物是啮齿类动物，所述啮齿类动物是选自以下的C57BL品系的小鼠：C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr和C57BL/01a。在一些特定实施例中，如本文所述的小鼠是选自其为129P1、129P2、129P3、129X1、129S1 (例如129S1/SV、129S1/SvIm)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129/SvJae、129S6 (129/SvEvTac)、129S7、129S8、129T1、129T2 (参见例如Festing等人，1999, Mammalian Genome 10:836; Auerbach, W. 等人，2000, Biotech. 29 (5) :1024-1028, 1030, 1032) 品系的129品系。在某些实施例中，本文所述的遗传修饰的小鼠是前述129品系和前述C57BL/6品系的混合物。在某些实施例中，本文所述的小鼠是前述129品系的混合物，或前述BL/6品系的混合物。在某些实施例中，如本文所述的混合物的129品系为129S6 (129/SvEvTac) 品系。在一些实施例中，本文所述的小鼠是BALB品系，例如BALB/C品系。在一些实施例中，本文所述的小鼠是BALB品系和另一种前述品系的混合物。

[0089] 在一些实施例中，本文所述的非人动物是大鼠。在某些实施例中，本文所述的大鼠选自Wistar大鼠、LEA品系、Sprague Dawley品系、Fischer品系、F344、F6和Dark Agouti。在某些实施例中，本文所述的大鼠品系为选自Wistar、LEA、Sprague Dawley、Fischer、F344、F6和Dark Agouti的两个或更多个品系的混合物。

[0090] 核酸：如本文使用的，在其最广泛的意义上，指掺入或可掺入寡核苷酸链内的任何化合物和/或物质。在一些实施例中，“核酸”是通过磷酸二酯键联被掺入到或可被掺入到寡核苷酸链中的化合物和/或物质。从上下文可以看出，在一些实施例中，“核酸”是指单个核酸残基 (例如核苷酸和/或核苷)；在一些实施例中，“核酸”是指含有含单个核酸残基的寡核苷酸链。在一些实施例中，“核酸”为RNA或包含RNA；在一些实施例中，“核酸”为DNA或包含DNA。在一些实施例中，“核酸”为一个或多个天然核酸残基、包含一个或多个天然核酸残基或由一个或多个天然核酸残基组成。在一些实施例中，“核酸”为一个或多个核酸类似物、包含一个或多个核酸类似物或由一个或多个核酸类似物组成。在一些实施例中，核酸类似物与“核酸”的差别在于其不利用磷酸二酯主链。例如，在一些实施例中，“核酸”为一个或多个“肽核酸”、包含一个或多个肽核酸或由一个或多个肽核酸组成，所述肽核酸在本领域中是

已知的并且在主链中具有肽键而非磷酸二酯键,其被认为在本发明的范围之内。替代地或另外地,在一些实施例中,“核酸”具有一个或多个硫代磷酸酯和/或5'-N-亚磷酰胺键联而非磷酸二酯键。在一些实施例中,“核酸”为一个或多个天然核苷(例如,腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷)、包含一个或多个天然核苷、或由一个或多个天然核苷组成。在一些实施例中,“核酸”为一个或多个核苷类似物(例如,2-氨基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5丙炔基-胞苷、C-5丙炔基-尿苷、2-氨基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、2-氨基腺苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氧代腺苷、8-氧代鸟苷、O(6)-甲基鸟嘌呤、2-硫代胞苷、甲基化碱基、插入型碱基及其组合)、包含一个或多个核苷类似物或由一个或多个核苷类似物组成。在一些实施例中,与天然核酸中的糖相比,“核酸”包含一个或多个经修饰的糖(例如,2'-氟核糖、核糖、2'-脱氧核糖、阿拉伯糖和己糖)。在一些实施例中,“核酸”具有编码功能性基因产物诸如RNA或蛋白质的核苷酸序列。在一些实施例中,“核酸”包括一个或多个内含子。在一些实施例中,“核酸”通过下述方式中的一种或多种来制备:从天然来源分离、通过基于互补模板的聚合(体内或体外)进行的酶促合成、在重组细胞或系统中的复制、化学合成及其组合。在一些实施例中,“核酸”的长度为至少3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000个或更多个残基。在一些实施例中,“核酸”为单链的;在一些实施例中,“核酸”为双链的。在一些实施例中,“核酸”具有包含至少一个元件的核苷酸序列,所述元件编码多肽或与编码多肽的序列互补。在一些实施例中,“核酸”具有酶促活性。

[0091] 可操作地连接:如本文使用的,指其中所述组分处于允许它们以其预期方式起作用的关系中的并列。与编码序列“可操作地连接”的控制序列以这样的方式连接,使得在与控制序列相容的条件下获得编码序列的表达。“可操作地连接”序列包括与目的基因相邻的表达控制序列和以反式方式作用或远距离作用以控制目的基因的表达控制序列。如本文使用的,术语“表达控制序列”是指这样的多核苷酸序列:所述多核苷酸序列是实现与其相连的编码序列表达和加工所必需的。“表达控制序列”包括合适的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的RNA加工信号例如剪接和多聚腺苷酸化信号;使细胞质mRNA稳定的序列;增强翻译效率的序列(即Kozak共有序列);增强蛋白稳质定性的序列;以及当需要时,增强蛋白分泌的序列。这种控制序列的性质取决于宿主生物而不同。例如,在原核生物中,此类控制序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列,而在真核生物中,典型地,此类表达控制序列包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”旨在包括其存在对于表达和加工来说是必需的组分,并且还可包括额外的组分,其存在是有利的,例如,前导序列和融合伴侣序列。

[0092] 患者或受试者:如本文使用的,指所提供的组合物施用于其施用或可施用于其的任何生物,例如用于实验、诊断、预防、美容和/或治疗目的。典型的患者包括动物(例如哺乳动物如小鼠、大鼠、兔子、非人灵长类和/或人)。在一些实施例中,患者为非人动物。在一些实施例中,患者或受试者(例如,非人动物患者)可具有如本文所述的修饰,与如本文所述不同的修饰或不具有修饰(即,野生型非人动物患者)。在一些实施例中,非人动物患有或易患



一种或多种病症或状况。在一些实施例中,非人动物展示出疾病、病症或状况的一种或多种症状。在一些实施例中,非人动物已诊断有一种或多种疾病、病症或状况。

[0093] 多肽:如本文使用的,指氨基酸的任何聚合链。在一些实施例中,多肽具有天然存在的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽具有非天然存在的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽具有氨基酸序列,其包含彼此单独天然存在的部分(即,来自两种或更多种不同的生物,例如,人和非人部分)。在一些实施例中,多肽具有通过人工行为进行设计和/或产生的被改造的氨基酸序列。

[0094] 启动子或启动子序列:如本文使用的,指DNA调节区,其能够被细胞中的RNA聚合酶结合(例如,直接地或通过其它启动子结合的多肽或物质)并起始编码序列的转录。一般而言,启动子序列在其3'末端处被转录起始位点结合并向上游(5'方向)延伸,以包括在任何水平下起始转录所必需的最少数目的碱基或元件。启动子可与表达控制序列或待表达的目的核酸可操作地结合或可操作地连接,所述表达控制序列包括增强子和阻遏子序列。在一些实施例中,启动子可为诱导型的。在一些实施例中,诱导型启动子可为单向或双向的。在一些实施例中,启动子可为组成型启动子。在一些实施例中,启动子可为混合启动子,其中含有转录调节区的序列从一个来源获得,并且含有转录起始区的序列从第二来源获得。用于将控制元件与转基因内的编码序列连接的系统是本领域众所周知的。例如,一般分子生物学和重组DNA技术在以下中描述:Principles of Gene Manipulation:An Introduction to Genetic Manipulation,第5版,由Old,R.W.和S.B.Primrose编辑,Blackwell Science, Inc.,1994;Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,由Sambrook,J.等人编辑,Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989。

[0095] 重组体:如本文使用的,预期指通过重组手段设计、改造、制备、表达、产生或分离的多肽,例如使用转染到宿主细胞内的重组表达载体表达的多肽,从重组组合的人多肽文库分离的多肽(Hoogenboom H.R.,1997,TIB Tech.15:62-70;Azzazy H.和Highsmith W.E.,2002,Clin.Biochem.35:425-45;Gavilondo J.V.和Larrick J.W.,2002,BioTech.29:128-45;Hoogenboom H.和Chames P.,2000,Immunology Today 21:371-8),从对于人免疫球蛋白基因是转基因的动物(例如小鼠)中分离的抗体(参见例如Taylor,L.D.等人,1992,Nucl.Acids Res.20:6287-95;Kellermann S-A.和Green L.L.,2002,Curr.Opin.Biotechnol.13:593-7;Little M.等人,2000,Immunol.Today 21:364-370;Murphy,A.J.等人,2014,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.111(14):5153-8),或者通过涉及将所选序列元件彼此剪接的任何其它手段制备、表达、产生或分离的多肽。在一些实施例中,此类选定的序列元件中的一个或多个是天然存在的。在一些实施例中,此类选定的序列元件中的一个或多个是在计算机芯片上(in silico)设计的。在一些实施例中,一个或多个此类选定的序列元件由已知序列元件的诱变(例如体内或体外)产生,所述已知序列元件例如来自天然来源或合成来源。例如,在一些实施例中,重组多肽由存在于目的来源生物(例如人、小鼠等)的基因组中的序列构成。在一些实施例中,重组多肽具有由诱变(例如,体外或体内,例如在非人动物中)产生的氨基酸序列,以使得所述重组多肽的氨基酸序列为这样的序列,该序列虽然源自多肽序列且与多肽序列相关,但可能不天然存在于非人动物体内的基因组内。

[0096] 替换:如本文使用的,指通过其宿主基因座(例如在基因组中)中发现的“被替换



的”核酸序列(例如基因)从该基因座中去除,并且不同的“替换”核酸置于其位置中的过程。在一些实施例中,被替换的核酸序列与替换核酸序列是相互可比较的,因为,例如,它们彼此同源和/或含有相应的元件(例如,蛋白质编码元件、调控元件等)。在一些实施例中,被替换的核酸序列包含启动子、增强子、剪接供体位点、剪接受体位点、内含子、外显子、非翻译区(UTR)中的一个或多个;在一些实施例中,替换核酸序列包含一个或多个编码序列。在一些实施例中,替换核酸序列为被替换的核酸序列的同源物。在一些实施例中,替换核酸序列为被替换的序列的直向同源物。在一些实施例中,替换核酸序列为人核酸序列或包含人核酸序列。在一些实施例中,替换核酸序列为经改造的核酸序列或包含经改造的核酸序列。在一些实施例中,包括在替换核酸序列为人核酸序列或包含人核酸序列的情况下,被替换的核酸序列为啮齿类动物序列或包含啮齿类动物序列(例如小鼠或大鼠序列)。这样放置的核酸序列可包含其为用于获得这样放置的序列的来源核酸序列的部分的一个或多个调节序列(例如,启动子、增强子、5'-或3'-非翻译区等)。例如,在各种实施例中,替换是用异源序列取代内源序列,其导致从如此放置的核酸序列(包含异源序列)产生基因产物,而不是内源序列的表达;替换是用核酸序列替换内源基因组序列,所述核酸序列编码与由内源序列编码的多肽具有相似功能的多肽(例如,内源基因组序列编码Angptl8多肽,并且DNA片段编码全部或部分的一个或多个ANGPTL8多肽)。在各种实施例中,内源基因或其片段被对应的人基因或其片段替换。对应的人基因或其片段是作为被替换的内源基因或其片段的直向同源物的人基因或片段,或在结构和/或功能上与被替换的内源基因或其片段基本上相似或相同的人基因或片段。

[0097] 参考:如本文使用的,描述试剂、动物、群组、个体、群体、样品、序列或目的值针对其进行比较的标准或对照试剂、群组、个体、群体、样品、序列或值。在一些实施例中,参考试剂、群组、个体、群体、样品、序列或值与试剂、群组、个体、群体、样品、序列或目的值的测试或确定基本上同时进行测试和/或确定。在一些实施例中,参考试剂、群组、个体、群体、样品、序列或值是历史参考,其任选在有形介质中体现。在一些实施例中,参考可指对照。如本文使用的,“参考”可以指“参考动物”。“参考动物”可具有如本文所述的修饰,与本文所述的修饰不同的修饰或不具有修饰(即,野生型动物)。通常,如本领域技术人员将理解的,在与用于确定或表征试剂、动物(例如,哺乳动物)、群组、个体、群体、样品、序列或目的值的那些可比较的条件下,确定或表征参考试剂、动物、群组、个体、群体、样品、序列或值。

[0098] 基本上:如本文使用的,指显示出目的特征或性质的总体或接近总体程度或范围的定性条件。生物学领域的普通技术人员将理解,生物和化学现象很少(如果有的话)进行至完成和/或进行至完全,或实现或避免绝对的结果。术语“基本上”因此在本文中用于捕获许多生物学现象和化学现象固有的完全的潜在缺乏。

[0099] 基本同源性:如本文使用的,指氨基酸或核酸序列之间的比较。如本领域普通技术人员将理解的,如果两个序列在对应的位置上含有同源残基,则它们通常被认为是“基本上同源的”。同源残基可为相同的残基。可替代地,同源残基可以是不相同的残基,具有适当相似的结构和/或功能特征。例如,如由本领域的普通技术人员所熟知的,某些氨基酸通常被归类为“疏水性”或“亲水性”氨基酸,和/或归类为具有“极性”或“非极性”侧链。一个氨基酸对另一个相同类型的氨基酸的置换可通常被认为是“同源”置换。典型的氨基酸分类汇总如下:

[0100]	丙氨酸	Ala	A	非极性	中性	1.8
	精氨酸	Arg	R	极性	阳性	-4.5
	天冬酰胺	Asn	N	极性	中性	-3.5
	天冬氨酸	Asp	D	极性	阴性	-3.5
	半胱氨酸	Cys	C	非极性	中性	2.5
	谷氨酸	Glu	E	极性	阴性	-3.5
	谷氨酰胺	Gln	Q	极性	中性	-3.5
	甘氨酸	Gly	G	非极性	中性	-0.4
	组氨酸	His	H	极性	阳性	-3.2
	异亮氨酸	Ile	I	非极性	中性	4.5
	亮氨酸	Leu	L	非极性	中性	3.8
	赖氨酸	Lys	K	极性	阳性	-3.9
	甲硫氨酸	Met	M	非极性	中性	1.9
	苯丙氨酸	Phe	F	非极性	中性	2.8
	脯氨酸	Pro	P	非极性	中性	-1.6
	丝氨酸	Ser	S	极性	中性	-0.8
	苏氨酸	Thr	T	极性	中性	-0.7
	色氨酸	Trp	W	非极性	中性	-0.9
	酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性	-1.3
	缬氨酸	Val	V	非极性	中性	4.2

不明确的氨基酸	3-字母	1-字母
天冬酰胺或天冬氨酸	Asx	B
谷氨酰胺或谷氨酸	Glx	Z
亮氨酸或异亮氨酸	Xle	J
未指明的或未知的氨基酸	Xaa	X

[0101] 如本领域中所熟知的,氨基酸或核酸序列可使用多种算法中的任意算法来进行比较,所述算法包括商业计算机程序中可获得的那些算法如用于核苷酸序列的BLASTN以及用于氨基酸序列的BLASTP、空位BLAST和PSI-BLAST。示例性的此类程序描述于以下文献中: Altschul等人,1990,Basic local alignment search tool,J.Mol.Biol.,215(3):403-410;Altschul等人,1996,Methods Enzymol.266:160-80;Altschul等人,1997,Nucleic Acids Res.25:3389-3402;Baxevanis等人,1998Bioinformatics:A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins,Wiley;和Misener等人(编)(1999) Bioinformatics Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology,第132卷), Humana Press。除了鉴定同源序列以外,上文提及的程序通常还提供同源性程度的指示。在一些实施例中,如果两个序列的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的相应残基在相关的残基序列段(stretch)上是同源的,则这两个序列被认为是基本上同源的。在一些实施例中,相关序列段为完全序列。在一些实施例中,相关序列段为至少9个、10个、11个、12个、13个、14个、15

个、16个、17个或更多个残基。在一些实施例中，相关序列段包括沿着完全序列的连续残基。在一些实施例中，相关序列段包括沿着完全序列的不连续的残基。在一些实施例中，相关区段为至少10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个或更多个残基。

[0102] 基本同一性：如本文使用的，指氨基酸或核酸序列之间的比较。如本领域普通技术人员将理解的，如果两个序列在对应的位置上含有相同残基，则它们通常被认为是“基本上相同的”。如本领域中所熟知的，氨基酸或核酸序列可使用多种算法中的任意算法来进行比较，所述算法包括商业计算机程序中可获得的那些算法如用于核苷酸序列的BLASTN以及用于氨基酸序列的BLASTP、空位BLAST和PSI-BLAST。示例性的此类程序描述于以下文献中：Altschul等人，1990, Basic local alignment search tool, J.Mol.Biol., 215 (3) :403-410; Altschul等人，1996, Methods Enzymol. 266:160-80; Altschul等人，1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Baxeavanis等人，1998, Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley; Misener等人(编) (1999) Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, 第132卷), Humana Press。除了鉴定相同的序列以外，上文提及的程序通常还提供同一性程度的指示。在一些实施例中，如果两个序列的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的相应残基在相关的残基序列段上是相同的，则这两个序列被认为是基本上相同的。在一些实施例中，相关序列段为完全序列。在一些实施例中，相关区段为至少10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个或更多个残基。

[0103] 靶向载体或靶向构建体：如本文使用的，指包含靶向区域的多核苷酸分子。靶向区域包含与靶细胞、组织或动物中的序列相同或基本上相同并且提供靶向构建体经由同源重组至所述细胞、组织或动物的基因组内的位置中的整合的序列。还包括使用位点特异性重组酶识别位点(例如，loxP和/或Frt位点)靶向的靶向区域。在一些实施例中，靶向构建体还包含特定目的核酸序列或基因、可选择标记物、控制和/或调控序列、以及允许通过帮助或促进涉及此类序列的重组的蛋白质的外源添加而介导的重组的其他核酸序列。在一些实施例中，靶向构建体还包含全部或部分的目的基因，其中所述目的基因是编码全部或部分多肽的异源基因，所述多肽具有与由内源序列编码的多肽相似的功能。在一些实施例中，靶向构建体还包含全部或部分的目的的人源化基因，其中所述目的的人源化基因编码全部或部分多肽，所述多肽具有与由内源序列编码的多肽相似的功能。在一些实施例中，靶向构建体还包含全部或部分的目的经改造的目的基因，其中所述经改造的目的基因编码全部或部分多肽，所述多肽具有与由内源序列编码的多肽相似的功能。

[0104] 变体：如本文使用的，指这样的实体，其显示与参考实体显著的结构同一性，但与参考实体相比在一种或多种化学部分的存在或水平下在结构上参考实体。在许多实施例中，“变体”还在功能上与其参考实体不同。一般来讲，特定实体是否被适当地认为是参考实体的“变体”是基于其与参考实体的结构同一性的程度。如本领域技术人员将理解的，任何生物或化学参考实体具有某些特征性结构元件。根据定义，“变体”是共享一个或多个此类特征性结构元件的不同的化学实体。只是给出一些实例，小分子可具有特征性核结构元件(例如，大环核)和/或一个或多个特征性侧链部分，以使得小分子的变体是共享核结构元件和特征性侧链部分，但在其他侧链部分上和/或在存在于核内的键的类型(单键相对于双键，E相对于Z，等)上不同的分子，多肽可具有包含在线性或三维空间中相对于彼此具有指

定的位置和/或促成特定生物功能的多个氨基酸的特征性序列元件,核酸可具有包含在线性或三维空间中相对于彼此具有指定的位置的多个核苷酸残基的特征性序列元件。例如,“变体多肽”可由于氨基酸序列中的一个或多个差异和/或共价附接于多肽主链的化学部分(例如,碳水化合物、脂质等)中的一个或多个差异而与参考多肽不同。在一些实施例中,“变体多肽”显示出与参考多肽具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%的总体序列同一性。替代地或另外地,在一些实施例中,“变体多肽”不与参考多肽共享至少一个特征性序列元件。在一些实施例中,参考多肽具有一种或多种生物活性。在一些实施例中,“变体多肽”共享参考多肽的一种或多种生物活性。在一些实施例中,“变体多肽”缺乏参考多肽的一种或多种生物活性。在一些实施例中,“变体多肽”显示出相较于参考多肽降低水平的一种或多种生物活性。在许多实施例中,如果目的多肽具有与亲代的氨基酸序列相同但在特定位置上具有少数序列改变的氨基酸序列,则目的多肽被认为是亲代或参考多肽的“变体”。通常,变体中少于20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%的残基相较于亲代被置换。在一些实施例中,“变体”相较于亲代具有10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个置换的残基。通常,“变体”具有很少数目(例如,少于5个、4个、3个、2个或1个)的置换的功能残基(即,参与特定生物学活性的残基)。此外,相较于亲代,“变体”通常具有不超过5个、4个、3个、2个或1个添加或缺失,并且通常不具有添加或缺失。此外,任何添加或缺失通常少于约25个、约20个、约19个、约18个、约17个、约16个、约15个、约14个、约13个、约10个、约9个、约8个、约7个、约6个残基,并且通常少于约5个、约4个、约3个或约2个残基。在一些实施例中,亲代或参考多肽是天然发现的多肽。如将由本领域普通技术人员所理解的,目的特定多肽的多个变体通常可为天然存在的,特别是当目的多肽为传染原多肽时。

[0105] 载体:如本文使用的,指能够转运它与之结合的另一种核酸的核酸分子。在一些实施例中,载体能够在宿主细胞诸如真核和/或原核细胞中进行染色体外复制和/或表达与它们连接的核酸。能够引导可操作地连接的基因的表达的载体在本文中称为“表达载体”。

[0106] 野生型:如本文使用的,具有其领域理解的含义,其指具有如在自然界中在“正常”(与突变体、患病的、改变的等相比)状态或背景下发现的结构和/或活性的实体。本领域普通技术人员将了解,野生型基因和多肽经常以多种不同的形式(例如,等位基因)存在。

## 具体实施方式

[0107] 本发明尤其提供了改进的和/或经改造的非人动物,其具有编码血管生成素样蛋白8 (ANGPTL8) 的异源遗传材料,用于确定ANGPTL8调节剂(例如抗ANGPTL8)用于治疗代谢病症的治疗功效,以及测量脂质(例如甘油三酯)代谢、葡萄糖稳态、对体重、组成和能量消耗的各种作用的测定。考虑此类非人动物提供了在确定ANGPTL8调节剂的治疗功效及其对于ANGPTL8阻断的潜力方面的改进。因此,本发明可特别用于开发抗ANGPTL8治疗剂,用于治疗来源于或特征在于各种代谢病症的疾病、病症或状况,包括甘油三酯功能障碍、葡萄糖耐受不良和血脂异常(Zhang和Abou-Samra, Cardiovascular Diabetology 2014,13:133)。特别地,本发明涵盖了非人(例如鼠)Angptl8基因的改造,导致人ANGPTL8多肽在非人动物的血清中表达。此类非人动物具有提供体内动物模型的能力,所述体内动物模型用于确定抗ANGPTL8治疗剂在代谢病症和/或心血管疾病、病症和/或病症的治疗中的功效。在一些实施

例中,与野生型非人动物相比,如本文所述的非人动物证实增强的甘油三酯水平。在一些实施例中,如本文所述的非人动物提供了用于脂蛋白代谢的体内动物模型。在一些实施例中,如本文所述的非人动物提供了用于高甘油三酯血症的体内动物模型。

[0108] 在一些实施例中,由如本文所述的非人动物表达(或分泌)的Angptl8多肽包含对应于人ANGPTL8多肽的氨基酸22-60、77-134、156-193或22-198的序列。在一些实施例中,由本文所述的非人动物的基因组内的遗传材料编码的Angptl8多肽包含对应于鼠Angptl8多肽的信号肽的序列。在一些实施例中,如本文所述的非人动物在内源性Angptl8基因座处包含Angptl8基因,其含有来自非人动物和异源物种(例如人)的遗传材料。在一些实施例中,如本文所述的非人动物包含经改造的Angptl8基因,其中所述经改造的Angptl8基因包含全部或部分的人ANGPTL8基因的外显子1-4。在一些实施例中,如本文所述的非人动物包含经改造的Angptl8基因,其中所述经改造的Angptl8基因包含人ANGPTL8基因的外显子1的编码部分和外显子2-4。在一些实施例中,如本文所述的非人动物包含经改造的Angptl8基因,其中所述经改造的Angptl8基因包含人ANGPTL8基因的外显子1的编码部分(或排除起始密码子的外显子1的编码部分)、外显子2、外显子3和外显子4(其包括3' UTR)。在一些特定实施例中,如本文所述的非人动物包含经改造的Angptl8基因,其中所述经改造的Angptl8基因包含~2,383bp的人ANGPTL8基因,其对应于从紧接着起始密码子开始的外显子1的编码部分直到外显子4,包括人ANGPTL8基因的3' UTR(例如,~256bp)。在一些实施例中,如本文所述的非人动物在内源性Angptl8基因座处包含经改造的Angptl8基因,其中所述经改造的Angptl8基因包含与内源性Angptl8启动子可操作地连接的内源Angptl8基因的5' UTR,人ANGPTL8基因的外显子1的编码部分、外显子2、外显子3和外显子4(其包括3' UTR);并且在一些实施例中,在产生此类经改造的Angptl8基因时,在所述内源性Angptl8基因座处的内源Angptl8基因的外显子1的编码部分、外显子2-3和外显子4的编码部分已被缺失。在各种实施例中,如本文所述的非人动物无法可检测地表达内源性Angptl8多肽的全部或部分。

[0109] 在下面的章节中详细地描述本发明的各个方面。章节的使用不意味着限制本发明。每一个章节可适用于本发明的任何方面。在本申请中,除非另有说明,“或”的使用意指“和/或”。

[0110] 血管生成素样蛋白8 (ANGPTL8)

[0111] ANGPTL8(也称为TD26、RIFL、Lipasin、C19orf80和Betatrophin)是新近识别的ANGPTL家族成员,其已牵涉甘油三酯和葡萄糖代谢两者。系统发育分析已揭示ANGPTL8与ANGPTL3和ANGPTL4密切相关(Fu,Z.等人,2013,Biochem.Biophys.Res.Comm.430:1126-31;Quagliarini F.等人;2012,PNAS 109:19751-19756)。ANGPTL8是主要在肝和脂肪组织中表达的分泌多肽,并且与相关家族成员ANGPTL3和ANGPTL4不同,缺少C末端纤维蛋白原样结构域,但含有N末端卷曲螺旋结构域,更像其它ANGPTL家族成员(Mattijssen F.和Kersten S,Biochim Biophys Acta 1821,2012:782-789)。

[0112] ANGPTL8的肝过表达与高甘油三酯血症相关,而Angptl8的失活引起血浆甘油三酯水平中的降低(Quagliarini,F.等人,2012,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 109(48):19751-6;Wang,Y.等人,2013,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 110:16109-14)。尽管有报道称ANGPTL8涉及脂质的调节,但负责机制仍在争论之中。仅举一例,一种机制认为原因在于ANGPTL8抑制脂蛋白脂肪酶活性,导致甘油三酯水解和清除降低(Zhang,R.等人,2012,

Biochem.Biophys.Res.Comm.424:786-92)。还已报道ANGPTL8在小鼠中的 $\beta$ 细胞增殖和 $\beta$ 细胞量中起作用,在所述小鼠中通过胰岛素受体拮抗剂S961诱导胰岛素抵抗(Yi,P.等人2013,Cell 153:747-58)。然而,随后的研究已揭示ANGPTL8不是对胰岛素抵抗的 $\beta$ 细胞功能或 $\beta$ 细胞生长反应所必需的。此外,ANGPTL8的过表达不增加 $\beta$ 细胞区域或改善血糖控制(Gusarova,V.等人,2014,Cell 159:691-6)。由于ANGPTL8的肝过表达与高甘油三酯血症相关,并且Angptl8的失活导致血浆甘油三酯水平中的降低,ANGPTL8的抑制剂或拮抗剂可证明在治疗疾病中有效,所述疾病的特征部分在于甘油三酯水平升高,例如但不限于高甘油三酯血症。根据使用野生型小鼠的一项报告,当腹膜内注射时,针对lipasin的单克隆抗体降低血清甘油三酯水平(Zhang,R.,2015,Endocrine Society's 97th Annual Meeting, Presentation No.0R13-6, March 5-8, San Diego, CA)。

[0113] 需要更全面和详细地理解ANGPTL8介导的功能和脂质代谢中的ANGPTL8途径、葡萄糖稳态、对体重、身体组成、能量消耗和心血管功能的作用,以开发用于将来治疗人患者的实用靶向疗法,所述人患者患有高甘油三酯血症和特征在于甘油三酯和脂质水平升高的其它疾病、病症或状况。

[0114] ANGPTL8序列

[0115] ANGPTL8(也称为TD26、RIFL、Lipasin、C19orf80和Betatrophin)是血管生成素蛋白家族的成员。如本文使用的,“ANGPTL8”指人ANGPTL8多肽,并且在一些实施例中,指不含信号肽的人ANGPTL8多肽(例如,包含如SEQ ID NO:6的22-198中所示的氨基酸序列的多肽)。示例性人ANGPTL8氨基酸(包括信号肽)和mRNA序列可分别在GenBank登录号NP\_061157.3(SEQ ID NO:6)和NM\_018687.6(SEQ ID NO:5)中找到(参见图8D和8E)。人ANGPTL8的N末端卷曲螺旋结构域跨越SEQ ID NO:6的氨基酸残基~77-134和156-193。

[0116] 示例性啮齿类动物(例如大鼠和小鼠)、人和经改造的Angptl8序列在图8A-8H中阐述。用于改造如本文所述的非人Angptl8基因的示例性合成DNA片段也在图8I中阐述。对于mRNA序列,粗体字体指示编码序列,并且连续外显子(如果指示的话)通过交替的加下划线文本分开;对于经改造的mRNA序列,人序列包含在圆括号内。对于氨基酸序列,信号序列由加下划线的字体指示。

[0117] DNA构建体和具有人源化ANGPTL8基因的非人动物的产生

[0118] 通常,将全部或部分含有Angptl8基因(例如,异源或经改造的Angptl8基因)的多核苷酸分子插入载体,优选DNA载体内,以便在合适的宿主细胞中复制多核苷酸分子。

[0119] 根据大小,Angptl8基因或Angptl8编码序列可直接由可得自商业供应商的cDNA源克隆,或基于可得自GenBank的公开序列在计算机芯片上设计。可替代地,细菌人工染色体(BAC)文库可提供来自目的基因(例如,异源Angptl8基因)的异源Angptl8序列。BAC文库含有100-150kb的平均插入片段大小,并且能够携带高达300kb的插入片段(Shizuya,H.等人,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A.89:8794-7;Swiatek,P.J.和T.Gridley,1993,Genes Dev.7:2071-84;Kim,U.J.等人,1996,Genomics 34:213-8;以引用的方式并入本文)。例如,已构建人和小鼠基因组BAC文库,并且这些文库可商购获得(例如,Invitrogen,Carlsbad Calif.)。基因组BAC文库也可充当异源Angptl8序列以及转录控制区域源。

[0120] 可替代地,可从酵母人染色体(YAC)分离、克隆和/或转移异源Angptl8序列。整个异源基因或基因座可以被克隆并包含在一个或几个YAC内。如果使用多个YAC并且它们含有

重叠同源性区域,则它们可以在酵母宿主菌株内重组以产生代表整个基因座的单一构建体。YAC臂可以通过改造用哺乳动物选择盒进一步修饰,以帮助通过本领域已知的和/或本文所述的方法将构建体引入胚胎干细胞或胚胎。

[0121] 上文提供了用于在非人动物中构建人源化Angptl8基因的示例性mRNA和氨基酸序列。其它异源Angptl8序列也可在GenBank数据库或本领域已知的其它序列数据库中找到。

[0122] 在一些实施例中,如本文所述的含有Angptl8序列的DNA构建体包含与非人调节序列(例如啮齿类动物启动子)可操作地连接的编码人ANGPTL8多肽的至少约氨基酸22-60、77-134、156-193或22-198的人ANGPTL8基因组(或cDNA)序列,用于在转基因非人动物中表达。在一些实施例中,如本文所述的含有Angptl8序列的DNA构建体包含与非人Angptl8启动子可操作地连接的编码人ANGPTL8多肽的至少约氨基酸22-60、77-134、156-193或22-198的人ANGPTL8基因组(或cDNA)序列,以及一个或多个非人Angptl8非翻译区(例如,5'和/或3' UTR)。包括在本文描述的DNA构建体中的人和/或非人Angptl8序列可与自然界中发现的(例如基因组)、人工(例如合成)的人和/或非人Angptl8序列相同或基本上相同,或者可被人为改造。在一些实施例中,Angptl8序列在起源中是合成的,并且包括在自然界中发现的人ANGPTL8基因中发现的一个或多个序列。例如,DNA构建体可包括合成DNA,其对应于人ANGPTL8基因的外显子1-4,并且编码与非人Angptl8调节序列(例如启动子)和非编码序列(例如,一种或多种非人UTR)可操作地连接的人ANGPTL8多肽的至少约氨基酸22-60、77-134、156-193或22-198,使得具有全人或基本上全人序列的Angptl8多肽由所得到的DNA构建体编码。可替代地,DNA构建体可包括对应于遗传材料的合成DNA,所述遗传材料编码与非人Angptl8调节序列(例如启动子)和编码序列(例如,一个或多个非人外显子)可操作地连接的人ANGPTL8多肽的功能部分(例如,一个或多个卷曲螺旋结构域、N末端区域),使得具有人和非人部分的Angptl8多肽由所得到的DNA构建体编码。在一些实施例中,Angptl8序列包含与异源Angptl8基因(例如人ANGPTL8基因)天然相关的序列。在一些实施例中,Angptl8序列包含与异源Angptl8基因并非天然相关的序列。在一些实施例中,Angptl8序列包含对于在非人动物中表达进行优化的序列。在一些实施例中,与非人Angptl8序列可操作地连接的异源Angptl8序列各自编码在自然界中在分开的多肽中出现的Angptl8多肽的一部分。如果另外的序列可用于优化异源Angptl8序列的表达,则可使用现有序列作为探针来克隆此类序列。用于最大化异源Angptl8基因或异源Angptl8编码序列表达所必需的另外序列可从基因组序列或其它源获得,取决于所需的结果。

[0123] DNA构建体可以使用本领域已知的方法制备。例如,DNA构建体可以制备为较大质粒的一部分。这种制备允许以本领域已知的有效方式克隆和选择正确的构建体。含有本文所述的一个或多个核苷酸编码序列的DNA片段可以定位于质粒上的简便限制性位点之间,使得它们可易于从其余的质粒序列分离,以掺入所需的动物。

[0124] 用于制备质粒和包含所述质粒的宿主生物的许多方法是本领域已知的。对于用于原核细胞和真核细胞两者的其它合适的表达系统以及一般的重组程序,参见Principles of Gene Manipulation:An Introduction to Genetic Manipulation,第5版,由Old,R.W.和S.B.Primrose编辑,Blackwell Science,Inc.,1994;Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,由Sambrook,J.等人编辑,Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989。

[0125] 提供了非人动物,其在非人动物的血清中表达全部或部分的人ANGPTL8多肽,所述

表达来源于编码Angpt18多肽的非人动物的内源基因座(例如,Angpt18基因座)的遗传修饰。本文描述的合适的实例包括啮齿类动物,具体地讲,小鼠。

[0126] 在一些实施例中,人源化Angpt18基因包含来自异源物种(例如人)的遗传材料,其中所述人源化Angpt18基因编码Angpt18多肽,其包含来自异源物种的遗传材料的编码部分。在一些实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因包含异源物种的基因组DNA,其编码在非人动物的血清中表达的Angpt18多肽,其中所述Angpt18多肽具有全人或基本上全人的序列。还提供了用于制备含有所述人源化Angpt18基因的非人动物、非人胚胎和细胞的非人动物、胚胎、细胞和靶向构建体。

[0127] 在一些实施例中,缺失内源Angpt18基因。在一些实施例中,改变内源Angpt18基因,其中所述内源Angpt18基因的一部分替换为异源序列(例如,全部或部分的人ANGPTL8序列)。在一些实施例中,所有或基本上所有内源Angpt18基因替换为异源基因(例如,全部或部分的人ANGPTL8基因)。在一些实施例中,将异源Angpt18基因的一部分插入内源性Angpt18基因座处的内源性非人Angpt18基因内。在一些实施例中,异源基因为人基因。在一些实施例中,对内源Angpt18基因的两个拷贝之一进行修饰或人源化,产生就人源化Angpt18基因而言是杂合的非人动物。在其它实施例中,提供了对于人源化Angpt18基因纯合的非人动物。

[0128] 在一些实施例中,如本文所述的非人动物在内源性非人Angpt18基因座处含有全部或部分的人ANGPTL8基因。在一些实施例中,如本文所述的非人动物在除内源性非人Angpt18基因座外的位置处含有全部或部分的人ANGPTL8基因。因此,如本文所述的非人动物可表征为具有人源化或异源Angpt18基因。可使用各种方法检测在内源性Angpt18基因座处替换、插入、修饰或改变的Angpt18基因或者从此类基因表达的多肽,所述方法包括例如PCR、蛋白质印迹、RNA印迹、限制性片段长度多态性(RFLP)、或者等位基因获得或丧失测定。可通过相同或相似手段检测随机插入非人动物基因组内的人源化或异源Angpt18基因。在一些实施例中,如本文所述的非人动物就如本文所述的人源化或异源Angpt18基因而言是杂合的。

[0129] 在各种实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因包括Angpt18基因,其具有人ANGPTL8基因的外显子1的编码部分(从ATG起始密码子开始或紧接着ATG起始密码子之后开始到外显子1的3'末端)和外显子2-4。

[0130] 在各种实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因包括Angpt18基因,其具有第一外显子、第二外显子、第三外显子和第四外显子,所述外显子各自具有与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7中出现的第一外显子、第二外显子、第三外显子和第四外显子至少50%(例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)相同的序列。

[0131] 在各种实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因包括Angpt18基因,其具有第一外显子、第二外显子、第三外显子和第四外显子,所述外显子各自具有与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7中出现的第一外显子、第二外显子、第三外显子和第四外显子基本上相同或相同的序列。

[0132] 在各种实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因包含与SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11至少50%(例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、



93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)相同的序列。

[0133] 在各种实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因包含与SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11基本上相同或相同的序列。

[0134] 在各种实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因是或包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11。

[0135] 在各种实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因包含5'非翻译区和/或3'非翻译区,所述5'非翻译区具有与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3中出现的5'非翻译区至少50%(例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)相同的序列,所述3'非翻译区具有与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3中出现的3'非翻译区至少50%(例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)相同的序列。

[0136] 在各种实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因包含5'非翻译区和/或3'非翻译区,所述5'非翻译区具有与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3中出现的5'非翻译区基本上相同或相同的序列,所述3'非翻译区具有与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3中出现的3'非翻译区基本上相同或相同的序列。

[0137] 在各种实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因包含5'非翻译区和/或3'非翻译区,所述5'非翻译区具有与内源性非人Angpt18基因的5'非翻译区基本上相同或相同的序列,所述3'非翻译区具有与人ANGPTL8基因的3'非翻译区基本上相同或相同的序列。在特定实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因包含5'非翻译区和/或3'非翻译区,所述5'非翻译区具有与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3中出现的5'非翻译区基本上相同或相同的序列,所述3'非翻译区具有与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7中出现的3'非翻译区基本上相同或相同的序列。

[0138] 在具体实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因包含内源性非人(例如小鼠或大鼠)Angpt18基因的5'非翻译区、人ANGPTL8基因的外显子1的编码部分和人ANGPTL8基因的外显子2-4,其包括人ANGPTL8基因的3' UTR。

[0139] 在各种实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因包含与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7中出现的核苷酸编码序列至少50%(例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)相同的核苷酸编码序列(例如,cDNA序列)。

[0140] 在各种实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因包含与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7中出现的核苷酸编码序列基本上相同或相同的核苷酸编码序列(例如,cDNA序列)。

[0141] 在各种实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因编码与人ANGPTL8多肽相同或基本上相同的Angpt18多肽。在各种实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因编码的Angpt18多肽与由人ANGPTL8基因翻译的全长人ANGPTL8蛋白质(其包括人ANGPTL8信号肽或人ANGPTL8全长蛋白质的前21个氨基酸)相同或基本上相同。

[0142] 在各种实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因编码Angpt18多肽,其具有的氨基酸序列与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8中出现的氨基酸序列至少50%(例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)相同。

[0143] 在各种实施例中,如本文所述的人源化Angpt18基因编码Angpt18多肽,其具有的氨基酸序列与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8中出现的氨基酸序列基本上相同或相同。

[0144] 在各种实施例中,由如本文所述的非人动物产生的Angpt18多肽包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的氨基酸残基22-198至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的氨基酸序列。

[0145] 在各种实施例中,由如本文所述的非人动物产生的Angpt18多肽包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的氨基酸残基22-198基本上相同或相同的氨基酸序列。

[0146] 在各种实施例中,由如本文所述的非人动物产生的Angpt18多肽包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的氨基酸残基77-134至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的氨基酸序列。

[0147] 在各种实施例中,由如本文所述的非人动物产生的Angpt18多肽包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的氨基酸残基77-134基本上相同或相同的氨基酸序列。

[0148] 在各种实施例中,由如本文所述的非人动物产生的Angpt18多肽包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的氨基酸残基156-193至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的氨基酸序列。

[0149] 在各种实施例中,由如本文所述的非人动物产生的Angpt18多肽包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的氨基酸残基156-193基本上相同或相同的氨基酸序列。

[0150] 在各种实施例中,由如本文所述的非人动物产生的Angpt18多肽包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的氨基酸残基22-60至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的氨基酸序列。

[0151] 在各种实施例中,由如本文所述的非人动物产生的Angpt18多肽包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的氨基酸残基22-60基本上相同或相同的氨基酸序列。

[0152] 在各种实施例中,由如本文所述的非人动物产生的Angpt18多肽包括一个或多个卷曲螺旋结构域,其中所述一个或多个卷曲螺旋结构域包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8中出现的一个或多个卷曲螺旋结构域至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的氨基酸序列。

[0153] 在各种实施例中,由如本文所述的非人动物产生的Angpt18多肽包括一个或多个卷曲螺旋结构域,其中所述一个或多个卷曲螺旋结构域包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8中出现的一个或多个卷曲螺旋结构域基本上相同或相同的氨基酸序列。

[0154] 在各种实施例中,由如本文所述的非人动物产生的Angpt18多肽具有N末端区域,所述N末端区域包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8中出现的N末端区域至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的氨基酸序列。

[0155] 在各种实施例中,由如本文所述的非人动物产生的Angpt18多肽具有N末端区域,

所述N末端区域包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8中出现的N末端区域基本上相同或相同的氨基酸序列。

[0156] 提供了用于制备非人动物的组合物和方法,所述非人动物表达人或人源化Angpt18多肽,包括特定多态性形式、等位基因变体(例如单个氨基酸差异)或可变剪接同种型,包括用于制备非人动物的组合物和方法,所述非人动物从人启动子和人调节序列表达此类多肽。在一些实施例中,还提供了用于制备从非人启动子和非人调控序列表达此类蛋白质的非人动物的组合物和方法。在一些实施例中,还提供用于制备从内源启动子和内源性调节序列表达此类蛋白质的非人动物的组合物和方法。在某些实施例中,内源启动子和内源性调节序列为内源性啮齿类动物启动子和内源性啮齿类动物调节序列。该方法包括将编码全部或部分人ANGPTL8多肽的遗传材料插入对应于内源Angpt18基因的非人动物基因组中的精确位置处,从而产生表达全部或部分为人的Angpt18多肽的人源化Angpt18基因。在一些实施例中,方法包括将对应于全部或部分人ANGPTL8基因的外显子1-4的基因组DNA插入非人动物的内源Angpt18基因内,从而产生编码含有人部分的Angpt18多肽的人源化基因,所述人部分含有由插入的外显子编码的氨基酸。

[0157] 适当时,编码全部或部分人(或人源化)ANGPTL8多肽的遗传材料或多核苷酸序列的编码区可被修饰,以包括对于来自非人动物中的细胞的表达进行优化的密码子(例如参见美国专利号5,670,356和5,874,304)。密码子优化序列为合成序列,并且优选地编码与非密码子优化亲代多核苷酸所编码的多肽相同的多肽(或具有与全长多肽基本上相同活性的全长多肽的生物活性片段)。在一些实施例中,编码全部或部分人(或人源化)ANGPTL8多肽的遗传材料的编码区可包括改变的序列,以优化对于特定细胞类型(例如啮齿类动物细胞)的密码子使用。例如,待插入非人动物(例如啮齿类动物)的内源Angpt18基因内、对应于全部或部分人ANGPTL8基因的外显子1-4的基因组DNA的密码子可被优化用于在非人动物的细胞中表达。此序列可描述为密码子优化序列。

[0158] 用于产生转基因非人动物的方法,包括敲除和敲入,是本领域熟知的(参见例如Gene Targeting:A Practical Approach,Joyner编,Oxford University Press,Inc.(2000))。例如,转基因啮齿类动物的生成可任选涉及破坏一个或多个内源性啮齿类动物基因(或基因区段)的遗传基因座,并且将一个或多个异源基因(或Angpt18编码序列)引入啮齿类动物基因组内,在一些实施例中,在与内源性啮齿类动物基因(或基因区段)相同的位置处。

[0159] 在一些实施例中,将如本文所述的异源(例如人或人源化)Angpt18基因或异源Angpt18编码序列随机引入啮齿类动物的基因组中。在此类实施例中,包含、含有或以其它方式容纳随机引入的异源(或人源化Angpt18基因或异源Angpt18编码序列)的啮齿类动物可表征为具有异源Angpt18转基因或异源Angpt18转基因构建体。通常,转基因和/或转基因构建体尤其包括使用本文描述的或者本领域已知的方法通过人工引入非人细胞(例如,啮齿类动物胚胎干细胞)的核酸序列(编码例如目的多肽的全部或部分)。另外,转基因可以是对于其引入的非人动物或细胞部分或完全异源的,即外源的。转基因还可包括一种或多种转录调节序列和任何其它核酸,例如内含子或启动子(例如组成型、组织特异性等),其对于所选择的核酸序列的表达可为所必需的。在一些实施例中,将如本文所述的异源(或人源化)Angpt18基因或异源Angpt18编码序列引入啮齿类动物的基因组中的内源Angpt18基因

内;在一些特定实施例中,内源Angptl8基因基因座被改变、修饰或改造,以含有与一种或多种非人Angptl8序列(或基因片段)可操作连接的人ANGPTL8序列(或基因片段)。

[0160] 如本文所述,异源(或人源化)Angptl8基因或异源Angptl8编码序列与表达控制序列(例如启动子)可操作地连接,以驱动异源(或人源化)Angptl8在非人动物中的表达。在一些实施例中,此类启动子是非人Angptl8启动子(例如啮齿类动物Angptl8启动子)。阅读本公开内容的技术人员将认识到,如本文所述,其它非人启动子可与插入非人动物的基因组内的异源Angptl8序列可操作地连接,无论此类异源Angptl8序列是置于与内源非人基因相同的位置处还是随机整合到非人动物的基因组内。在一些实施例中,非人启动子是或包含组成型启动子。在一些实施例中,非人启动子是或包含病毒启动子(例如,猿猴病毒启动子、单纯疱疹病毒启动子、乳头瘤病毒启动子、腺病毒启动子、逆转录病毒启动子等)。在一些实施例中,非人启动子是哺乳动物启动子。可根据本发明使用的启动子的合适例子包括但不限于SR $\alpha$ 启动子、人或鼠CMV启动子、EF1 $\alpha$ 启动子和SV40早期启动子区。以组织特异性方式控制所需多肽表达的其它启动子是本领域已知的,并且可根据需要用于本文所述的方法中。此外,可取决于用于表达的所需细胞类型选择启动子。示例性的启动子可在例如以下中找到:Villa-Komaroff等人,1978,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.75:3727-31;Benoist等人,1981,Nature 290:304-10;Wagner等人,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:1441-5;Brinster等人,1982,Nature 296:39-42;DeBoer等人,1983,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.80:21-5;Boshart等人,1985,Cell 41:521-30;Foecking等人,1986,Gene 45:101-5;Takebe等人,1988,Mol.Cell.Bio.8:466-72。

[0161] 在各种实施例中,人源化Angptl8基因方法采用内源蛋白质相互作用和信号传导的相对最低限度的修饰,并且在各种实施例中,导致非人动物中的天然Angptl8介导的功能和/或活性,因为Angptl8序列的基因组序列在单个片段中被修饰,并且因此通过包括必需的调节序列保留正常功能。此外,在各种实施例中,修饰不影响血清中功能性Angptl8多肽的分泌,并且经由与各种脂质(例如甘油三酯)的结合维持正常功能和/或相互作用。

[0162] 图1中提供了内源性鼠Angptl8基因和人ANGPTL8基因的基因组组构的图示(不按照比例)。图3中提供了使用含有人ANGPTL8基因的外显子1-4和3' UTR的基因组片段,用于人源化内源性鼠Angptl8基因的示例性方法。如所示,经由与靶向构建体的同源重组,将对应于人ANGPTL8基因的外显子1-4和3' UTR的2,383bp合成DNA片段插入内源性鼠Angptl8基因基因座的1,576bp序列的位置内。2,383bp合成DNA片段可直接从人DNA克隆,或从源序列(例如,GenBank登录号NM\_018687.6,SEQ ID NO:5)合成。该基因组DNA包括编码负责脂质结合的人ANGPTL8多肽的至少约氨基酸残基22-198的基因部分。

[0163] 可通过本领域已知的任何方法制备在内源性Angptl8基因座处具有人源化Angptl8基因的非人动物(例如小鼠)。例如,可制备靶向载体,其引入全部或部分的人ANGPTL8基因连同可选择标记物基因。图3示出了靶向载体,其含有小鼠基因组的内源性Angptl8基因座,其包含2,383bp合成DNA片段的插入片段,所述插入片段对应于人ANGPTL8基因的外显子1-4(具体地,外显子1的编码部分、外显子2、外显子3和包括3' UTR的外显子4)。如所示,靶向构建体含有5'同源臂,其含有内源性鼠Angptl8基因(~79kb)的外显子1上游的序列(即包括ATG起始密码子),随后为2,383bp合成DNA片段、药物选择盒(例如,在两侧上侧面为loxP序列的新霉素抗性基因;~5kb)、以及含有内源性鼠Angptl8基因(~148kb)

的3' UTR的3'同源臂。靶向构建体含有自缺失药物选择盒(例如, loxP序列侧接的新霉素抗性基因;参见美国专利No. 8,697,851、8,518,392和8,354,389,所有这些专利以引用方式并入本文)。在胚胎干细胞中的电穿孔后,产生包含在靶向载体中的经修饰的内源Angpt18基因,其在1,576bp内源性野生型Angpt18基因的位置中包括2,383bp的人ANGPTL8基因(即外显子1的编码部分、外显子2、外显子3和包括3' UTR的外显子4)。产生人源化Angpt18基因,导致表达人源化Angpt18多肽的细胞或非人动物,所述人源化Angpt18多肽含有由2,383bp合成DNA片段编码的氨基酸。以发育依赖性方式去除药物选择盒,即源自其种系细胞含有上述人源化Angpt18基因的小鼠的后代,将在发育期间从分化细胞中脱落可选择标记物(参见图3的底部)。

[0164] 下文提供了示例性启动子,其可与包括在本文所述的靶向载体中的药物选择盒和/或重组酶基因可操作地连接。可用于本文所述的靶向载体中的另外的合适启动子包括美国专利号8,697,851、8,518,392和8,354,389中描述的那些;所有这些美国专利都以引用的方式并入本文)。示例性启动子序列包括鱼精蛋白1(Prm1)启动子(SEQ ID NO:12)、Blimp1启动子1kb(SEQ ID NO:13)和Blimp1启动子2kb(SEQ ID NO:14)。

[0165] 在一些实施例中,如本文所述的具有人源化Angpt18基因的非人动物可表征为对于人源化Angpt18基因转基因或转基因Angpt18非人动物。此类描述在本文中可互换使用,并且指任何非天然存在的非人动物,其中非人动物的一个或多个细胞含有全部或部分的异源Angpt18核酸序列和/或Angpt18编码序列,如本文所述。在一些实施例中,通过有意的遗传操纵,例如通过显微注射或通过用重组病毒感染,通过引入前体细胞内,将全部或部分异源Angpt18核酸序列和/或Angpt18编码序列直接或间接引入细胞内。在此类实施例中,遗传操作不包括经典育种技术,而是针对重组DNA分子的引入,所述重组DNA分子含有全部或部分的异源Angpt18核酸序列和/或Angpt18编码序列,如本文所述。这种分子可以整合在染色体,或它可以是染色体外复制的DNA。如本文所述,转基因非人动物包括对于全部或部分异源Angpt18核酸序列和/或Angpt18编码序列为杂合或纯合的动物,和/或具有全部或部分异源Angpt18核酸序列和/或Angpt18编码序列的单个拷贝或多个拷贝的动物,如本文所述。

[0166] 基于在其基因组中人源化Angpt18基因的存在和/或非人动物的组织或细胞中含有由插入的遗传材料编码的氨基酸的Angpt18多肽的表达,可鉴定转基因建立者非人动物。转基因建立者非人动物然后可用于育种携带人源化Angpt18基因的另外非人动物,从而产生各自携带人源化Angpt18基因的一个或多个拷贝的一系列非人动物。此外,根据需要,携带人源化Angpt18基因的转基因非人动物还可与携带其它转基因(例如人免疫球蛋白基因)的其它转基因非人动物育种。

[0167] 还可产生转基因非人动物,以含有允许人源化Angpt18基因(或人源化Angpt18转基因)的调控或定向表达的选择系统。示例性系统包括噬菌体P1的Cre/loxP重组酶系统(参见例如,Lakso,M.等人,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.89:6232-6)、以及酿酒酵母的FLP/Frt重组酶系统(O'Gorman,S.等人,1991,Science 251:1351-5)。可通过构建“双重”转基因动物来提供此类动物,例如通过使两种转基因动物交配,一种含有包含选择修饰的转基因(例如,人源化的Angpt18基因或转基因),并且另一种含有编码重组酶(例如Cre重组酶)的转基因。

[0168] 尽管本文广泛讨论了在小鼠(即,具有Angpt18基因的小鼠,所述Angpt18基因编码

全部或部分具有人序列的Angptl8多肽)中采用人源化Angptl8基因的实施例,但还提供了包含人源化Angptl8基因的其它非人动物。在一些实施例中,此类非人动物包含与啮齿类动物Angptl8启动子可操作地连接的人源化Angptl8基因。在一些实施例中,此类非人动物包含与内源性Angptl8启动子;在一些实施例中,内源性啮齿类动物Angptl8启动子可操作地连接的人源化Angptl8基因。在一些实施例中,此类非人动物表达来自内源基因座的人源化Angptl8多肽,其中所述人源化Angptl8多肽包含人ANGPTL8多肽的至少氨基酸残基22-60、77-134、156-193或22-198。此类非人动物包括可被遗传修饰以表达如本文公开的Angptl8多肽的那些中的任一种,所述非人动物包括例如哺乳动物,例如小鼠、大鼠、兔、猪、牛族动物(例如奶牛、公牛、水牛)、鹿、绵羊、山羊、鸡、猫、狗、雪貂、灵长类动物(例如、绒猴、恒河猴)等。例如,对于那些适当的可经遗传修饰的ES细胞不容易获得的非人动物,采用其他方法来制备包含遗传修饰的非人动物。此类方法包括例如修饰非ES细胞基因组(例如成纤维细胞或诱导的多能细胞)并利用体细胞核转移(SCNT)来将遗传修饰的基因组转移至合适的细胞,例如去核卵母细胞,以及在适于形成胚胎的条件下在非人动物中孕育所述修饰的细胞(例如修饰的卵母细胞)。

[0169] 例如,大鼠多能细胞和/或全能细胞可来自任何大鼠品系,包括例如ACI大鼠品系、Dark Agouti (DA) 大鼠品系、Wistar大鼠品系、LEA大鼠品系、Sprague Dawley (SD) 大鼠品系或Fischer大鼠品系如Fisher F344或Fisher F6。大鼠多能细胞和/或全能细胞也可从源自上述两种或更多种品系的混合物的品系获得。例如,大鼠多能细胞和/或全能细胞可来自DA品系或ACI品系。ACI大鼠品系的特征在于具有黑灰色,伴随白色腹部和足部以及RT1<sup>av1</sup>单倍型。此类品系可从各种源包括Harlan Laboratories获得。来自ACI大鼠的大鼠ES细胞系的例子是ACI.G1大鼠ES细胞。Dark Agouti (DA) 大鼠品系的特征在于具有野灰色皮毛和RT1<sup>av1</sup>单倍型。此类大鼠可从各种源包括Charles River和Harlan Laboratories获得。来自DA大鼠的大鼠ES细胞系的例子是DA.2B大鼠ES细胞系和DA.2C大鼠ES细胞系。在一些情况下,大鼠多能细胞和/或全能细胞来自近交大鼠品系。参见例如,以引用的方式并入本文的美国专利申请公开号2014-0235933A1。

[0170] 用于修饰非人动物基因组(例如,猪、奶牛、啮齿类动物、鸡等基因组)的方法包括例如采用锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应物核酸酶(TALEN)或Cas蛋白(即CRISPR/Cas系统)修饰基因组,以包括人源化Angptl8基因。

[0171] 采用具有人源化ANGPTL8基因的非人动物的方法

[0172] 本发明尤其基于以下认识:使用如本文所述的人源化Angptl8基因可制备利用脂质代谢的调节分子的体内系统。此类体内系统允许开发治疗剂和/或治疗方案,其集中于改善患者中的脂质功能障碍的效应。此外,此类体内系统还提供治疗剂和/或治疗方案的开发,所述治疗剂和/或治疗方案集中于改变高甘油三酯血症和/或心血管疾病、病症或状况中血管生成素相关的脂质代谢调节。

[0173] 如本文所述的非人动物提供了可用于各种测定的表达人(或人源化)ANGPTL8的改进的体内系统和生物材料(例如细胞)源。在各种实施例中,如本文所述的非人动物用于开发靶向人ANGPTL8和/或调节人ANGPTL8信号传导(例如,破坏与人ANGPTL8结合配偶体如ANGPTL3的相互作用)的治疗剂。在各种实施例中,如本文所述的非人动物用于筛选且开发阻断人ANGPTL8与人ANGPTL3的相互作用的候选治疗剂(例如抗体)。在各种实施例中,如本

文所述的非人动物用于确定如本文所述的非人动物中的人ANGPTL8的拮抗剂和/或激动剂的结合概况;在一些实施例中,如本文所述的非人动物用于确定结合人ANGPTL8的一种或多种候选治疗性抗体的一个或多个表位。

[0174] 在各种实施例中,如本文所述的非人动物用于确定抗ANGPTL8抗体的药代动力学概况。在各种实施例中,如本文所述的一种或多种非人动物和一种或多种对照或参考非人动物各自暴露于以不同剂量(例如0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、7.5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、或50mg/kg或更多)的一种或多种候选治疗性抗ANGPTL8抗体。候选治疗性抗体可经由各种所需的施用途径(包括肠胃外和非肠胃外施用途径)来给药。肠胃外途径包括例如静脉内、动脉内、门静脉内、肌内、皮下、腹膜内、脊柱内、鞘内、脑室内、颅内、胸膜内或其他注射途径。非肠胃外途径包括例如经服、经鼻、经皮、经肺、经直肠、经颊面、经阴道、经眼。施用还可通过连续输注、局部施用、从植入物(凝胶、膜等)持续释放和/或静脉内注射来进行。在多个时间点(例如0hr、6hr、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天或最多30或更多天)从非人动物(人源化和对照组)分离血液。可使用得自如文中所述的非人动物的样本进行各种测定以确定施用的候选治疗性抗体的药代动力学性质,包括但不限于总IgG、抗-治疗性抗体应答、凝集等。

[0175] 在各种实施例中,如本文所述的非人动物用于测量阻断或调节人ANGPTL8信号传导的疗效,以及由于细胞变化对基因表达的作用。在各种实施例中,如本文所述的非人动物或由其分离的细胞暴露于在非人动物中结合人ANGPTL8多肽(或人ANGPTL8多肽的一部分)的候选治疗剂,并且在随后的一段时间后,分析对ANGPTL8依赖性过程的作用,例如甘油三酯代谢、脂蛋白脂肪酶活性和各种脂蛋白(例如低密度脂蛋白,LDL)的摄取。

[0176] 如本文所述的非人动物表达人(或人源化)ANGPTL8多肽,因此可生成细胞、细胞系和细胞培养物,以充当用于结合和功能测定中的人ANGPTL8源,例如以测定ANGPTL8拮抗剂或激动剂的结合或功能,特别是当拮抗剂或激动剂对于人ANGPTL8序列或表位特异性,或者可替代地,对于人ANGPTL8序列或与ANGPTL3结合的表位特异性时。在各种实施例中,可使用从如本文所述的非人动物中分离的细胞来测定由候选治疗性抗体结合的ANGPTL8表位。在各种实施例中,由如本文所述的非人动物表达的人(或人源化)ANGPTL8多肽可包含变体氨基酸序列。在各种实施例中,如本文所述的非人动物表达人(或人源化)ANGPTL8变体。在各种实施例中,变体在与配体结合相关联的氨基酸位置上具有多态性。在各种实施例中,如本文所述的非人动物用于通过与人ANGPTL8的多态性变体的相互作用来确定配体结合的效应。示例性变体人ANGPTL8多肽包括特征在于R59W(Quagliarini, F.等人,2012, Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.109(48):19751-6)或Q121X(Clapham等人,BMC Endocr Disord.2016,16:7)氨基酸取代的变体。在一些实施例中,变体人ANGPTL8多肽与较低血浆低密度脂蛋白(LDL)-胆固醇和/或高密度脂蛋白(HDL)-胆固醇水平相关。在一些实施例中,变体人ANGPTL8多肽与较低血浆甘油三酯和/或HDL-胆固醇水平相关。

[0177] 本文所述的非人动物的细胞可以随时分离和使用,或可以在培养中维持多代。在各种实施例中,来自本文所述的非人动物的细胞是永生化的(例如,通过使用病毒)并且在培养中无限期维持(例如,在连续培养中)。

[0178] 如本文所述的非人动物提供了用于评价药物(例如ANGPTL8调节剂)的药代动力学



性质的体内系统。在各种实施例中,药物可递送或施用于如本文所述的一种或多种非人动物,随后对非人动物(或由其分离的细胞)监测或执行一种或多种测定,以确定药物对非人动物的作用。药代动力学性质包括但不限于动物将药物处理成各种代谢物的方式(或一种或多种药物代谢物,包括毒性代谢物的存在或不存在的检测)、药物半衰期、施用后药物的循环水平(例如药物的血清浓度)、抗药物应答(例如抗药物抗体)、药物吸收和分布、施用途径、排泄途径和/或药物清除。在一些实施例中,药物的药代动力学和药效学性质在如本文所述的非人动物中或通过使用如本文所述的非人动物进行监测。

[0179] 在一些实施例中,执行测定包括确定对药物施用于其的非人动物的表型和/或基因型的作用。在一些实施例中,执行测定包括确定药物的批次间变异性。在一些实施例中,执行测定包括确定施用于如本文所述的非人动物和参考非人动物的药物效应之间的差异。在各种实施例中,参考非人动物可具有如本文所述的修饰、与如本文所述的那种不同的修饰或不具有修饰(即,野生型非人动物)。

[0180] 可在非人动物(或者在由其分离的细胞中和/或使用由其分离的细胞)中测量的用于评价药物的药代动力学性质的示例性参数包括但不限于凝集、自噬、细胞分裂、细胞死亡、补体介导的溶血、DNA完整性、药物特异性抗体滴度、药物代谢、基因表达阵列、代谢活性、线粒体活性、氧化性应激、吞噬作用、蛋白质生物合成、蛋白质降解、蛋白质分泌、应激反应、靶组织药物浓度、非靶组织药物浓度、转录活性等等。在各种实施例中,如本文所述的非人动物用于确定药物的药学有效剂量。

[0181] 本文所述的非人动物提供了用于分析和测试药物或疫苗的体内系统。在各种实施例中,可将候选药物或疫苗施用于如本文所述的一种或多种非人动物,随后监测非人动物,以确定对药物或疫苗的免疫应答、药物或疫苗的安全性概况、或者对疾病或状况的作用。用于确定安全性质的示例性方法包括测量毒性、最佳剂量浓度、药物或疫苗的功效和可能的风险因素。此类药物或疫苗可在此类非人动物中进行改进和/或开发。

[0182] 疫苗功效可以多种方式确定。简言之,使用本领域已知的方法疫苗接种本文所述的非人动物,然后用疫苗攻击或将疫苗施用于已经感染的非人动物。非人动物对疫苗的应答可通过监测人动物(或由其分离的细胞)和/或对非人动物(或由其分离的细胞)执行一种或多种测定来测量,以确定疫苗的功效。然后使用本领域已知的和/或本文所述的一种或多种测量,将非人动物对疫苗的应答与对照动物进行比较。

[0183] 疫苗功效还可通过病毒中和测定来确定。简言之,免疫本文所述的非人动物,并且在免疫后的不同日收集血清。连续稀释的血清与病毒预温育,在此期间血清中对于病毒特异性的抗体将与其结合。然后将病毒/血清混合物加入允许细胞中,以通过噬斑测定或微量中和测定来确定感染性。如果血清中的抗体中和病毒,则存在与对照组相比较少的噬斑或较低的相对荧光素酶单位。

[0184] 在各种实施例中,如本文所述的非人动物用于功效研究,以确定抗ANGPTL8治疗剂(例如,抗ANGPTL8抗体)对循环甘油三酯水平的体内作用。例如,如本文所述的非人动物在施用候选治疗剂或对照之前进行放血,并且根据需要组构成各种处理组。候选治疗剂或对照以所需剂量施用,并且在施用后连续几天放血。可使用收集的血清测量甘油三酯、葡萄糖和/或胰岛素的血浆水平。候选治疗剂的水平也可根据需要进行测量。可用于检测各种分子的示例性测定包括ELISA测定和如Wang, Y. 等人, 2013, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 110



(40):16109-114;Quagliarini,F.等人,2012,Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.109(48):19751-6中所述的其它测定。

[0185] 在各种实施例中,在用抗ANGPTL8治疗剂(例如抗ANGPTL8抗体)治疗后,如本文所述的非人动物用于测定脂蛋白脂肪酶(LPL)活性。例如,在施用候选治疗剂或对照之前,将如本文所述的非人动物放血,并根据需要置于各种处理组内。候选治疗剂或对照以所需剂量施用,并且在施用后连续几天放血。在足够的时间(例如几天)之后,向非人动物施用抗凝血剂(例如肝素),使得LPL从血管内皮表面释放,并且其后不久从非人动物获得血液。使用肝素-琼脂糖凝胶层析将肝素后血浆分级以分离LPL,并且使用脂肪酶底物测定LPL活性。例如,一般方法和测定在Wang,Y.等人,2013,Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.110(40):16109-114;Quagliarini,F.等人,2012,Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.109(48):19751-6中描述。

[0186] 在各种实施例中,如本文所述的非人动物用于脂质耐受性测试,以在用抗ANGPTL8治疗剂(例如抗ANGPTL8抗体)治疗后,通过急性脂肪负荷确定甘油三酯清除。例如,在施用候选治疗剂或对照之前,将如本文所述的非人动物放血,并且置于各种处理组内。候选治疗剂或对照以所需剂量施用。几天后,在根据体重施用脂质乳剂(例如,20%浓度)后,使非人动物经受禁食方案。在从每个处理组中的非人动物收集的血液中测定血浆甘油三酯水平。例如,一般方法和测定在Wang,Y.等人,2013,Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.110(40):16109-114;Quagliarini,F.等人,2012,Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.109(48):19751-6中描述。

[0187] 如本文所述的非人动物提供了改进的体内系统,用于开发和表征用于高甘油三酯血症中的候选治疗剂。在各种实施例中,如本文所述的非人动物可经受特定的喂养方案(例如过量喂食或禁食),随后施用一种或多种候选治疗剂。在一些实施例中,候选治疗剂可包括多特异性抗体(例如双特异性抗体)或抗体混合物;在一些实施例中,候选治疗剂包括组合疗法,例如,序贯或同时给药的单特异性抗体的施用。非人动物可经受足够时间的喂养方案,使得ANGPTL8水平在非人动物体内的一个或多个位置(例如肝和/或脂肪组织)中处于高水平。可在候选治疗剂施用之前和候选治疗剂施用之后,测量甘油三酯、葡萄糖和/或胰岛素的血浆水平以及脂蛋白脂肪酶活性等。也可在非人动物中测量候选治疗剂的细胞毒性。

[0188] 本文所述的非人动物可用于开发一种或多种疾病模型,以评价或评估有效地治疗影响人的疾病、病症或状况的候选治疗剂和/或治疗方案(例如,单一疗法、联合疗法、剂量范围测试等)。可在如本文所述的非人动物中建立各种疾病状况,随后施用一种或多种候选分子(例如,靶向ANGPTL8的药物),使得可确定一种或多种候选分子在疾病状况中的功效。可根据剂量将非人动物置于不同的处理组内,使得可确定与已建立的疾病的有效治疗相关联的最佳剂量或剂量范围。在一些实施例中,疾病模型包括心血管疾病、病症或状况。

[0189] 可使用包括肠胃外和非肠胃外施用途径在内的任何施用方法将候选分子施用给非人动物疾病模型。肠胃外途径包括例如静脉内、动脉内、门静脉内、肌内、皮下、腹膜内、脊柱内、鞘内、脑室内、颅内、胸膜内或其他注射途径。非肠胃外途径包括例如经服、经鼻、经皮、经肺、经直肠、经颊面、经阴道、经眼。施用还可通过连续输注、局部施用、从植入物(凝胶、膜等)持续释放和/或静脉内注射来进行。当在本文所述的非人动物中评价联合疗法时,候选分子可以经由相同的施用途径或经由不同的施用途径施用。当在本文所述的非人动物中评价给药方案时,候选分子可以两月一次、每月一次、三周一次、两周一次、每周一次、每日一次以可变的间隔和/或以逐步增加的浓度施用,以确定给药方案,所述给药方案在其中

已建立一个或多个疾病模型的非人动物中显示出所需的治疗或预防效果。

#### [0190] 试剂盒

[0191] 本发明还提供包装或试剂盒,其包括装有至少一种本文所述的非人动物、非人细胞、DNA片段(或构建体)和/或靶向载体的一个或多个容器。试剂盒可以用于任何适用的方法(例如,研究方法)。任选地与一个或多个此类容器相关的可以是由政府机构规定形式的注意事项,该注意事项规定药物或生物产品的制造、使用或销售,该注意事项反映了(a)机构关于用于人类施用的制造、使用或销售的批准,(b)使用说明或它们二者,或管理两个或更多个实体之间的材料和/或生物产品(例如,本文所述的非人动物或非人细胞)的转移的合约。

[0192] 本发明的其他特征将在以下对示例性实施例的描述的过程中显而易见,这些示例性实施例是为了说明而给出的,而无意限制本发明。

#### [0193] 实例

[0194] 提供以下实例是为了向本领域普通技术人员描述如何制备和使用本发明的方法和组合物,而非旨在限制发明人所认为的其发明的范围。除非另外指明,否则所给出的温度为摄氏度,压力是大气压或接近大气压。

#### [0195] 实例1.内源性血管生成素样蛋白8基因的修饰

[0196] 本实例示出了修饰非人哺乳动物例如啮齿类动物(例如小鼠)中的内源Angptl8基因的示例性方法,使得所述内源Angptl8基因编码人ANGPTL8多肽。根据需要,使用任何人序列(例如变体)或人序列(或序列片段)的组合,本实例中描述的方法可用于修饰非人动物的内源Angptl8基因。在本实例中,含有在GenBank登录号NM\_018687.6(SEQ ID NO:5)中出现的人ANGPTL8基因的外显子1-4(排除ATG起始密码子)的2,383bp合成DNA片段用于修饰小鼠的内源Angptl8基因。图2中描绘了由本文所述的啮齿类动物表达的小鼠、人和示例性人ANGPTL8多肽的比对,其中关于每个序列的信号肽在框中指示。图3显示了用于修饰啮齿类动物的内源Angptl8基因以编码人ANGPTL8多肽的靶向载体,所述靶向载体使用 **VELOCIGENE®**技术(参见例如,美国专利号6,586,251和Valenzuela等人,2003,Nature Biotech.21(6):652-659;以引用的方式并入本文)构建。

[0197] 简言之,修饰小鼠细菌人工染色体(BAC)克隆RP23-198h22(Invitrogen),以将含有内源Angptl8ATG起始密码子紧下游的序列缺失至超出终止密码子9bp(即,除了5'11个核苷酸之外的外显子1、外显子2-3和外显子4的5'部分直到超出终止密码子9bp),并且插入人ANGPTL8ATG起始密码子的紧下游,以超出人ANGPTL8 3' UTR(即,在ATG起始密码子紧下游开始的外显子1的编码部分直到外显子4),使用编码人ANGPTL8多肽的2,383bp合成DNA片段。保留含有5'和3'非翻译区(UTR)以及内源Angptl8ATG起始密码子的内源DNA。因此,不含人ANGPTL8起始密码子的人ANGPTL8基因的外显子1-4与内源Angptl8ATG起始密码子在框内融合。2,383bp合成DNA片段(即,对应于人ANGPTL8基因的外显子1-4)的序列分析证实了所有人ANGPTL8外显子和剪接信号。序列分析揭示该序列与参考基因组和ANGPTL8转录物NM\_018687.6匹配。

[0198] 2,383bp合成DNA片段通过Genescript Inc.(Piscataway,NJ)合成,并且克隆到氨苄青霉素抗性质粒载体内。独特的限制酶识别位点用于连接侧面为重组酶识别位点的~4,996bp自缺失的新霉素盒(loxP-hUb1-em7-Neo-pA-mPrm1-Crei-loxP;参见美国专利号8,

697,851、8,518,392和8,354,389,所有这些美国专利都以引用的方式并入本文)。经由在含有新霉素的琼脂培养基上铺平板执行在细菌细胞中的后续选择。在与小鼠BAC克隆RP23-198H22同源重组之前,使靶向载体线性化。通过设计,人ANGPTL8 2,383bp片段与小鼠下游序列之间的连接包括人ANGPTL8 3' UTR,随后为小鼠Angptl8 3' UTR(图3)。所得到的靶向载体从5'到3'包含5'同源臂(其含有来自BAC克隆RP23-198h22的~79kb小鼠基因组DNA)、2,383bp合成DNA片段(对应于人ANGPTL8基因的外显子1-4)、侧面为loxP位点的自缺失的新霉素盒、以及来自BAC克隆RP23-198h22的~148kb小鼠基因组DNA。

[0199] 上述经修饰的bMQ-400017BAC克隆用于电穿孔小鼠胚胎干(ES)细胞,以产生包含内源Angptl8基因的经修饰的ES细胞,所述内源Angptl8基因对于外显子1(减去ATG起始密码子)直到包括人ANGPTL8 3' UTR的外显子4(即,缺失1,576bp的内源Angptl8基因并插入2.383bp的人ANGPTL8编码序列)人源化。通过测定(Valenzuela等,同上)鉴定含有经修饰的Angptl8基因的阳性靶向ES细胞,所述测定检测人ANGPTL8序列(例如,外显子1-4)的存在,并且证实小鼠Angptl8序列(例如,外显子1-4和/或5'和3' UTR)的丢失和/或保留。表1列出了用于证实如上所述的内源Angptl8基因修饰的引物和探针(图4)。

[0200] 跨越上游插入点的核苷酸序列包括下述,其指示在插入点处与人ANGPTL8基因组序列邻接的内源小鼠序列(包含在下方的圆括号内,其中ATG起始密码子为粗体字体): (AAGGCAGCCG CAGCGCCCCG GGAACCACAC CCACGAACT GTCAGCCATG) CCAGTGCCTG CTCTGTGCCT GCTCTGGGCC CTGGCAATGG TGACCCGGCC (SEQ ID NO:15) (图9A)。还参见图3。

[0201] 跨越自缺失的新霉素盒的5'末端的核苷酸序列包括下述,其指示与插入点下游的盒序列(包含在下方的圆括号内,其中XhoI位点为斜体字体并且loxP位点为粗体字体)邻接的人ANGPTL8基因组序列:GGGAGACCCC ACCCAGCATG ATGTATGAAT ACCTCCCATT CAAGTGCCCA (CTCGAG ATAACCTTCG TATAATGTAT GCTATACGAA GTTAT ATGCATGGCC TCCGCGCCGG GTTTTGGCGC CTCCCGCGGG CGCCCCCTC CTCACGGCGA GCGCTGCCAC GTCAGACGAA GGGCGCAGCG AGCGTCCTGA) (SEQ ID NO:16) (图9B)。还参见图3。

[0202] 跨越在自缺失的新霉素盒的3'末端处的下游插入点的核苷酸序列包括下述,其指示与小鼠Angptl8基因组序列邻接的盒序列(包含在下方的圆括号内,其中loxP位点为粗体字体,I-CeuI识别位点加下划线,并且NheI识别位点为斜体): (TTTCACTGCAT TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA ACTCATCAAT GTATCTTATC ATGTCTGGA ATAACCTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTA TGCTAGTAACCTATAACGGTCCTAAGGTAGCGA GCTAGC) GATGCCACCGA GGACCAGTTGT GCTGCAAGGAA CACTGAAGCG CTCCACC (SEQ ID NO:17) (图9C)。还参见图3。

[0203] 在新霉素盒缺失后跨越下游插入点的核苷酸序列(人ANGPTL8 3' UTR和小鼠Angptl8 3' UTR之间保留的77bp)包括下述,其指示与剩余的盒序列(包含在下方的圆括号内,其中XhoI和NheI识别位点为斜体,loxP位点为粗体,并且I-CeuI限制性位点加下划线)并列的人和小鼠基因组序列:GGGAGACCCC ACCCAGCATG ATGTATGAAT ACCTCCCATT CAAGTGCCCA (GTCGAG ATAACCTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGCTAGTAACCTATAACGGTCCTAAG GTAGCGA GCTAGC) GATGCCACCG AGGACCAGTT GTGCTGCAAG GAACACTGAA GCGCTCCACC (SEQ ID NO:18) (图9D)。还参见图3。

[0204] 然后使用VELOCIMOUSE®方法,将阳性ES细胞克隆用于植入雌性小鼠(参见例如,美国专利号7,294,754和Poueymirou等人,2007,Nature Biotech.25(1):91-99),以

生成含有人ANGPTL8外显子1-4 (包括人ANGPTL8 3' UTR) 插入小鼠的内源性Angptl8基因座内的一窝幼崽。使用检测人ANGPTL8序列的存在的如先前所述的测定 (Valenzuela等人, 同上), 通过对从尾巴剪片 (snip) 中分离的DNA的基因分型, 再次证实且鉴定携带人ANGPTL8外显子1-4 (即2,383bp合成DNA片段) 代替内源性Angptl8外显子1-4的小鼠 (图4)。将幼崽进行基因分型, 并且选择对于人ANGPTL8序列杂合的动物群组用于表征。

[0205] 表1

名称	引物	序列(5'-3')	
7182mU	正向	GGTGTGTTGGTGGCAGGTAAGAGT	(SEQ ID NO:19)
	探针	TGAGGAAATGGTAAACCCAGAACAGA	(SEQ ID NO:20)
	反向	TGGTGTGTCATCAGGGTATGTTTC	(SEQ ID NO:21)
7182mD	正向	TGAGCCTGGTGGGATTACTCT	(SEQ ID NO:22)
	探针	TAGCAGTGGAAGTTGCCTAGGTCC	(SEQ ID NO:23)
	反向	CCGTCAAGGCCAGTGCTT	(SEQ ID NO:24)
7182hU	正向	GCAAGCCTGTTGGAGACTCAG	(SEQ ID NO:25)
	探针	CACCGTAGCTGCGACACTGTGG	(SEQ ID NO:26)
	反向	AGACACGAACCTCTTTTGA	(SEQ ID NO:27)
7182hD	正向	TGGGCTGAGCCACATCTC	(SEQ ID NO:28)
	探针	CAGACTCCACACAGCGGCGCT	(SEQ ID NO:29)
	反向	TCAGTTCCATCCAGGCAGATTC	(SEQ ID NO:30)

[0208] 实例2. 人ANGPTL8在非人动物中的表达

[0209] 本实例证实根据实例1含有经改造的Angptl8基因的非人动物 (例如啮齿类动物) 表达 (或分泌) 在非人动物的血浆中可检测的人 (或人源化) ANGPTL8多肽。特别地, 如下所述, 与含有野生型Angptl8基因的野生型非人动物 (例如野生型啮齿类动物) 相比, 具有经改造的Angptl8基因的非人动物证实增强的甘油三酯水平。

[0210] 简言之, 静脉血在非禁食条件下从野生型 (n=9) 和对于经改造的Angptl8基因纯合的小鼠 (n=8) 中从眶后丛收集到EDTA管中。通过以4,000rpm离心收集的血液10分钟来分离血浆。使用抗ANGPTL8抗体, 通过ELISA测定分析血浆的人ANGPTL8表达。

[0211] 数据证实人ANGPTL8分泌到对于人源化Angptl8基因纯合的小鼠的血浆内。特别地, 对于由其收集血液的所有人源化小鼠, 人ANGPTL8的蛋白质表达平均为约400ng/mL。因此, 根据实例1含有经改造的Angptl8基因的啮齿类动物在血浆中可检测地表达 (且分泌) 人ANGPTL8。特别地, 人ANGPTL8的此类表达 (或分泌) 在这些动物中处于啮齿类动物Angptl8调节元件 (例如啮齿类动物Angptl8启动子) 的控制下。

[0212] 在另一个实验中, 在非禁食条件下从野生型和对于经改造的Angptl8基因纯合的小鼠 (如上所述) 收集的 plasma 也用于测定血浆脂质水平。

[0213] 简言之, 根据制造商的说明书, 使用血清化学分析仪 ADVIA® 1800 (Siemens),

测量血浆脂质(甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇[LDL-C]、高密度脂蛋白胆固醇[HDL-C])。代表性结果在图5中阐述。

[0214] 如图5所示,与野生型啮齿类动物相比,如本文所述的具有经改造的Angptl8基因的啮齿类动物证实增强的甘油三酯水平。

[0215] 实例3.人ANGPTL8在非人动物中的组织表达

[0216] 本实例证实根据实例1含有经改造的Angptl8基因的非人动物(例如啮齿类动物)表达(或分泌)在非人动物的各种组织中可检测到的人(或人源化)ANGPTL8多肽。特别地,如下所述,具有经改造的Angptl8基因的非人动物证实人ANGPTL8在肝和脂肪组织中的表达。

[0217] 简言之,如实例1所述,使用在再喂养条件下从对于经改造的Angptl8基因纯合的小鼠收集的组织,如先前所述(Mastaitis, J. 等人, 2015, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112 (6): 1845-9)执行RNA制备和RNAseq读数作图。代表性结果在图6中阐述。

[0218] 如图6所示,在人源化Angptl8小鼠的肝和脂肪组织(例如,白色脂肪、皮下和棕色脂肪)中鉴定了人ANGPTL8表达。本实例证实如本文所述的鼠Angptl8基因的改造导致人ANGPTL8多肽以组织特异性方式的表达,并且因此,提供了用于确定抗ANGPTL8治疗剂降低体内甘油三酯水平的功效的体内动物模型。

[0219] 实例4.ANGPTL8调节剂的体内功效

[0220] 本实例证实经修饰以根据实例1含有人源化Angptl8基因的非人动物(例如,啮齿类动物)可用于体内测定中,以筛选Angptl8调节剂(例如,抗ANGPTL8抗体)的降甘油三酯功效。在本实例中,在对于人源化Angptl8基因纯合的小鼠中筛选代表性的抗ANGPTL8抗体,以确定单克隆抗体疗法降低升高的甘油三酯的功效。

[0221] 简言之,在实验前5天,将对于经改造的Angptl8基因纯合的小鼠(如上所述)预先放血,并且基于其甘油三酯水平分选到处理组内(n=5/处理组),以便跨越每组的平均甘油三酯水平是相等的。在研究的第0天时,通过皮下注射以10mg/kg剂量施用抗ANGPTL8抗体或对照(具有无关特异性的同种型匹配的人IgG4对照)。在注射后4天时将小鼠放血,并且通过ADVIA® 1800血清化学分析仪(Siemens)测定血清甘油三酯水平。对于所有测试的抗体,结果表示为每组的平均值±SEM。代表性结果在图7中阐述。

[0222] 如图7所示,与对照抗体相比,抗ANGPTL8抗体疗法显著降低了循环甘油三酯水平。此外,这些数据提示如实例1中所述含有经改造的Angptl8基因的小鼠表达人ANGPTL8,并且可用于筛选用于治疗升高的甘油三酯水平的治疗剂。总之,本公开内容证实本文提供的非人动物提供了用于评价抗ANGPTL8抗体的降甘油三酯功效的体内系统,并且在一些实施例中,提供了用于高甘油三酯血症的体内动物模型。

[0223] 等同物

[0224] 已如此描述了本发明的至少一个实施例的几个方面,应了解本领域技术人员将容易想到各种改变、修改和改进。此类改变、修改和改进旨在是本公开内容的一部分,并且旨在处于本发明的精神和范围之内。因此,上述描述和附图仅仅作为举例的方式,并且本发明通过下面的权利要求进行详细描述。

[0225] 在权利要求中使用序数术语如“第一”、“第二”、“第三”等来修饰权利要求元素,其本身并不意味着一个权利要求要素相对于另一个要素的任何优先性、优先级或顺序或者其中执行方法行为的时间顺序,而是仅用作区分具有某一名称的一个权利要求元素与具有同

一名称的另一个元素(但使用序数术语)的标记,以区分权利要求元素。

[0226] 除非明确地指出相反,否则本文说明书和权利要求中所使用的冠词“一个”和“一种”在说明书和权利要求中应被理解为包括多个指代物。在组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或描述应当被视为是满足以下情况,即组成员中的一个、多于一个或全部存在于、被应用于给定的产品或方法中,或以其他方式与给定的产品或方法相关,除非指出相反或根据上下文明显不同。本发明包括这样的实施例,其中组中的一个确切成员存在于、被应用于给定的产品或方法中,或以其他方式与给定的产品或方法相关。本发明还包括这样的实施例,其中多于一个组成员或全部组成员存在于、被应用于给定的产品或方法中,或以其他方式与给定的产品或方法相关。此外,应当理解,本发明包括涵盖所有的变型、组合和置换,其中来自一条或多条所列权利要求的一个或多个限制、要素、子句、描述性用语被引入从属于同一基础权利要求的另一个权利要求(或者相关的任何其他权利要求)中,除非另外指出或除非对于本领域普通技术人员来说明显会引起矛盾或不一致。当要素以列表的形式(例如以马库什组或类似形式)呈现时,应当理解这些要素的每个亚组也被公开,并且任何要素可从该组中去除。应当理解,通常,当本发明或本发明的方面被称为包含特定的要素、特征等时,本发明的某些实施例或本发明的方面由此类要素、特征等组成或基本上由它们组成。为了简化的目的,这些实施例并不是在每种情况下都明确用本文陈述的那么多用词来具体描述。应当理解,本发明的任何实施例或方面可明确地从权利要求排除,不管在说明书中是否描述了此类具体排除。

[0227] 本领域技术人员将理解可归因于本文中所述的测定或其他方法中获得的值的典型标准偏差或误差。本文引用的描述本发明的背景和提供关于其实践的另外细节的出版物、网站和其它参考材料在此以引用的方式并入。

[0001]	序列表
[0002]	<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
[0003]	<120> 具有经改造的ANGPTL8基因的非人动物
[0004]	<130> 34634PCT (10232W001)
[0005]	<150> 62/291,446
[0006]	<151> 2016-02-04
[0007]	<160> 30
[0008]	<170> PatentIn版本3.5
[0009]	<210> 1
[0010]	<211> 878
[0011]	<212> DNA
[0012]	<213> 褐家鼠
[0013]	<400> 1
[0014]	atacccccga gactgtccac catggttggtg cctattctct gcctcctatg ggccatagca 60
[0015]	acagcagtgc gacctgcccc agtggcccct ctcggtggtc cagagccggc ccaatatgaa 120
[0016]	gagttgacct tgctctttca cggggcccta cagctaggtc aggccctcaa tgggtgtgtac 180
[0017]	aaagccacgg aagctcgctt gacagaagct gggcgcaacc tgggcctttt tgaccaagca 240
[0018]	ctggaatttc tgggaagaga ggtcaatcag ggccgggatg caacacggga gcttcgcacc 300
[0019]	agcttgctcg agattcaggc agaagaggac actttacacc ttcgagcaga agccacagcc 360
[0020]	cgatcgctga gggaagtggc ccgggcccag catgctctgc ggaacagtgt acggagacta 420
[0021]	caagtgcagc tgagaggtgc ctggctaggc caagcccacc aagaatttga gaatttaaag 480
[0022]	gatcgagccg ataagcagaa ccacctcttg tgggctctca ctggccacgt gcagcgacag 540
[0023]	cagcgtgaga tggcagagca gcaacagtgg ctgcggcaga tccagcagag actccacatg 600
[0024]	gcagccctcc cagcctgaga ctacctgat gccactgagg accagttgtg ctgcagggaa 660
[0025]	cactgaatgc gctccaccgg gcctatctat gagcagggcc gacagagctg gctgcccata 720
[0026]	agctagactt ggccgggtga ccccgcttcc tggcagagca gagacagaag caagcaggcg 780
[0027]	ggatggaagg cagaagacag ccccgctggag aaggctggag aaggacatga gctcccttat 840
[0028]	gccccacacc ccacaataaa aaagaggcaa tctataaa 878
[0029]	<210> 2
[0030]	<211> 198
[0031]	<212> PRT
[0032]	<213> 褐家鼠
[0033]	<400> 2
[0034]	Met Val Val Pro Ile Leu Cys Leu Leu Trp Ala Ile Ala Thr Ala Val
[0035]	1 5 10 15
[0036]	Arg Pro Ala Pro Val Ala Pro Leu Gly Gly Pro Glu Pro Ala Gln Tyr
[0037]	20 25 30
[0038]	Glu Glu Leu Thr Leu Leu Phe His Gly Ala Leu Gln Leu Gly Gln Ala
[0039]	35 40 45
[0040]	Leu Asn Gly Val Tyr Lys Ala Thr Glu Ala Arg Leu Thr Glu Ala Gly
[0041]	50 55 60

[0042]	Arg Asn Leu Gly Leu Phe Asp Gln Ala Leu Glu Phe Leu Gly Arg Glu	
[0043]	65	70 75 80
[0044]	Val Asn Gln Gly Arg Asp Ala Thr Arg Glu Leu Arg Thr Ser Leu Ser	
[0045]	85	90 95
[0046]	Glu Ile Gln Ala Glu Glu Asp Thr Leu His Leu Arg Ala Glu Ala Thr	
[0047]	100	105 110
[0048]	Ala Arg Ser Leu Arg Glu Val Ala Arg Ala Gln His Ala Leu Arg Asn	
[0049]	115	120 125
[0050]	Ser Val Arg Arg Leu Gln Val Gln Leu Arg Gly Ala Trp Leu Gly Gln	
[0051]	130	135 140
[0052]	Ala His Gln Glu Phe Glu Asn Leu Lys Asp Arg Ala Asp Lys Gln Asn	
[0053]	145	150 155 160
[0054]	His Leu Leu Trp Ala Leu Thr Gly His Val Gln Arg Gln Gln Arg Glu	
[0055]	165	170 175
[0056]	Met Ala Glu Gln Gln Gln Trp Leu Arg Gln Ile Gln Gln Arg Leu His	
[0057]	180	185 190
[0058]	Met Ala Ala Leu Pro Ala	
[0059]	195	
[0060]	<210> 3	
[0061]	<211> 887	
[0062]	<212> DNA	
[0063]	<213> 小家鼠	
[0064]	<400> 3	
[0065]	tgtcagccat ggctgtgctt gctctctgcc tcctgtggac cttagcatca gcagtgcgac	60
[0066]	ccgctccagt ggcccctctg ggtggtccag agccagctca atatgaagag ctgaccctgc	120
[0067]	tctttcacgg ggccctgcag ctaggccagg ccctcaatgg cgtgtacaga gccacagagg	180
[0068]	ctcgcctgac agaagctggg cacagcctgg gcctctatga cagagcactg gaattcctgg	240
[0069]	ggacagaagt caggcagggc caggatgcca cacaggagct tcgcaccagc ctgtcggaga	300
[0070]	ttcagtgga agaggacgt ttacacctc gagctgaagc cacagcccga tctctggggg	360
[0071]	aagtggcccg ggcccagcag gctctgcggg aactgtacg gagactacaa gtgcagctga	420
[0072]	gaggcgctg gctcggtcaa gccaccaag aatttgagac cttaaaggct cgagctgata	480
[0073]	agcagagcca cctcttatgg gctctcactg gccacgtgca gcgacagcag cgggagatgg	540
[0074]	cagagcagca acagtggctg cgacagatcc agcagagact ccacacagca gccctcccag	600
[0075]	cctgagacta cctggatgcc accgaggacc agttgtgctg caaggaacac tgaagcgtc	660
[0076]	caccaggccc atgaacaggg ctgacagagc cggctgcca tcagctggac ctggccagt	720
[0077]	cacccgctt cctggcagag cggagacaga agcaagcagg cgggatggaa ggcagaagac	780
[0078]	agagccctgt ggaggaggc tggaaaaaga cagagcccc cttatgcca cacacccac	840
[0079]	aataaaagag aacagaggca atctaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa	887
[0080]	<210> 4	
[0081]	<211> 198	
[0082]	<212> PRT	
[0083]	<213> 小家鼠	



[0084]	<400> 4
[0085]	Met Ala Val Leu Ala Leu Cys Leu Leu Trp Thr Leu Ala Ser Ala Val
[0086]	1 5 10 15
[0087]	Arg Pro Ala Pro Val Ala Pro Leu Gly Gly Pro Glu Pro Ala Gln Tyr
[0088]	20 25 30
[0089]	Glu Glu Leu Thr Leu Leu Phe His Gly Ala Leu Gln Leu Gly Gln Ala
[0090]	35 40 45
[0091]	Leu Asn Gly Val Tyr Arg Ala Thr Glu Ala Arg Leu Thr Glu Ala Gly
[0092]	50 55 60
[0093]	His Ser Leu Gly Leu Tyr Asp Arg Ala Leu Glu Phe Leu Gly Thr Glu
[0094]	65 70 75 80
[0095]	Val Arg Gln Gly Gln Asp Ala Thr Gln Glu Leu Arg Thr Ser Leu Ser
[0096]	85 90 95
[0097]	Glu Ile Gln Val Glu Glu Asp Ala Leu His Leu Arg Ala Glu Ala Thr
[0098]	100 105 110
[0099]	Ala Arg Ser Leu Gly Glu Val Ala Arg Ala Gln Gln Ala Leu Arg Asp
[0100]	115 120 125
[0101]	Thr Val Arg Arg Leu Gln Val Gln Leu Arg Gly Ala Trp Leu Gly Gln
[0102]	130 135 140
[0103]	Ala His Gln Glu Phe Glu Thr Leu Lys Ala Arg Ala Asp Lys Gln Ser
[0104]	145 150 155 160
[0105]	His Leu Leu Trp Ala Leu Thr Gly His Val Gln Arg Gln Gln Arg Glu
[0106]	165 170 175
[0107]	Met Ala Glu Gln Gln Gln Trp Leu Arg Gln Ile Gln Gln Arg Leu His
[0108]	180 185 190
[0109]	Thr Ala Ala Leu Pro Ala
[0110]	195
[0111]	<210> 5
[0112]	<211> 888
[0113]	<212> DNA
[0114]	<213> 智人
[0115]	<400> 5
[0116]	ataccttaga ccctcagtc tgccagtgc tgctctgtgc ctgctctggg ccctggcaat 60
[0117]	ggtgaccggg cctgcctcag cggcccccat gggcggccca gaactggcac agcatgagga 120
[0118]	gctgaccctg ctcttccatg ggaccctgca gctgggccag gccctcaacg gtgtgtacag 180
[0119]	gaccacggag ggacggctga caaaggccag gaacagcctg ggtctctatg gccgcacaat 240
[0120]	agaactcctg gggcaggagg tcagccgggg cgggatgca gccaggaac ttcgggcaag 300
[0121]	cctgttgagg actcagatgg aggaggatat tctgcagctg caggcagagg ccacagctga 360
[0122]	ggtgctgggg gaggtggccc aggcacagaa ggtgctacgg gacagcgtgc agcggctaga 420
[0123]	agtccagctg aggagcgctt ggctggggcc tgcctaccga gaatttgagg tcttaaaggc 480
[0124]	tcacgctgac aagcagagcc acatcctatg ggccctcaca ggccacgtgc agcggcagag 540
[0125]	gcgggagatg gtggcacagc agcatcggtt gcgacagatc caggagagac tccacacagc 600

[0126] ggcgctccca gcctgaatct gcctggatgg aactgaggac caatcatgct gcaaggaaca 660  
 [0127] cttccacgcc ccgtgaggcc cctgtgcagg gaggagctgc ctgttcaactg ggatcagcca 720  
 [0128] gggcgccggg ccccaacttct gagcacagag cagagacaga cgcaggcggg gacaaaggca 780  
 [0129] gaggatgtag ccccatgtgg gaggggtgga ggaaggacat gtaccctttc atgcctacac 840  
 [0130] acccctcatt aaagcagagt cgtggcatct caaaaaaaaa aaaaaaaa 888  
 [0131] <210> 6  
 [0132] <211> 198  
 [0133] <212> PRT  
 [0134] <213> 智人  
 [0135] <400> 6  
 [0136] Met Pro Val Pro Ala Leu Cys Leu Leu Trp Ala Leu Ala Met Val Thr  
 [0137] 1 5 10 15  
 [0138] Arg Pro Ala Ser Ala Ala Pro Met Gly Gly Pro Glu Leu Ala Gln His  
 [0139] 20 25 30  
 [0140] Glu Glu Leu Thr Leu Leu Phe His Gly Thr Leu Gln Leu Gly Gln Ala  
 [0141] 35 40 45  
 [0142] Leu Asn Gly Val Tyr Arg Thr Thr Glu Gly Arg Leu Thr Lys Ala Arg  
 [0143] 50 55 60  
 [0144] Asn Ser Leu Gly Leu Tyr Gly Arg Thr Ile Glu Leu Leu Gly Gln Glu  
 [0145] 65 70 75 80  
 [0146] Val Ser Arg Gly Arg Asp Ala Ala Gln Glu Leu Arg Ala Ser Leu Leu  
 [0147] 85 90 95  
 [0148] Glu Thr Gln Met Glu Glu Asp Ile Leu Gln Leu Gln Ala Glu Ala Thr  
 [0149] 100 105 110  
 [0150] Ala Glu Val Leu Gly Glu Val Ala Gln Ala Gln Lys Val Leu Arg Asp  
 [0151] 115 120 125  
 [0152] Ser Val Gln Arg Leu Glu Val Gln Leu Arg Ser Ala Trp Leu Gly Pro  
 [0153] 130 135 140  
 [0154] Ala Tyr Arg Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala His Ala Asp Lys Gln Ser  
 [0155] 145 150 155 160  
 [0156] His Ile Leu Trp Ala Leu Thr Gly His Val Gln Arg Gln Arg Arg Glu  
 [0157] 165 170 175  
 [0158] Met Val Ala Gln Gln His Arg Leu Arg Gln Ile Gln Glu Arg Leu His  
 [0159] 180 185 190  
 [0160] Thr Ala Ala Leu Pro Ala  
 [0161] 195  
 [0162] <210> 7  
 [0163] <211> 877  
 [0164] <212> DNA  
 [0165] <213> 人工序列  
 [0166] <220>  
 [0167] <223> 示例性的经改造的Angpt18多核苷酸

[0168]	<400> 7
[0169]	tgctcagccat gccagtgccct gctctgtgcc tgctctgggc cctggcaatg gtgacccggc 60
[0170]	ctgcctcagc ggcccccatg ggcgggccag aactggcaca gcatgaggag ctgaccctgc 120
[0171]	tcttccatgg gaccctgcag ctggggccagg ccctcaacgg tgtgtacagg accacggagg 180
[0172]	gacggctgac aaaggccagg aacagcctgg gtctctatgg ccgcacaata gaactcctgg 240
[0173]	ggcaggaggt cagccggggc cgggatgcag cccaggaact tcgggcaagc ctgttgagga 300
[0174]	ctcagatgga ggagatatt ctgcagctgc aggagagggc cacagctgag gtgctggggg 360
[0175]	aggtggccca ggcacagaag gtgctacggg acagcgtgca gcggctagaa gtccagctga 420
[0176]	ggagcgcctg gctgggccct gcctaccgag aatttgaggt cttaaaggct cacgctgaca 480
[0177]	agcagagcca catcctatgg gccctcacag gccacgtgca gcggcagagg cgggagatgg 540
[0178]	tggcacagca gcatcggctg cgacagatcc aggagagact ccacacagcg gcgctcccag 600
[0179]	cctgaatctg cctggatgga actgaggacc aatcatgctg caaggaacac ttccacgccc 660
[0180]	cgtgaggccc ctgtgcaggg aggagctgcc tgttactggt gatcagccag ggcgccgggc 720
[0181]	cccacttctg agcacagagc agagacagac gcaggcgggg acaaaggcag aggatgtagc 780
[0182]	cccattgggg aggggtggag gaaggacatg taccctttca tgcctacaca cccctcatta 840
[0183]	aagcagagtc gtggcatctc aaaaaaaaaa aaaaaaa 877
[0184]	<210> 8
[0185]	<211> 198
[0186]	<212> PRT
[0187]	<213> 人工序列
[0188]	<220>
[0189]	<223> 示例性的经改造的Angpt18多肽
[0190]	<400> 8
[0191]	Met Pro Val Pro Ala Leu Cys Leu Leu Trp Ala Leu Ala Met Val Thr
[0192]	1 5 10 15
[0193]	Arg Pro Ala Ser Ala Ala Pro Met Gly Gly Pro Glu Leu Ala Gln His
[0194]	20 25 30
[0195]	Glu Glu Leu Thr Leu Leu Phe His Gly Thr Leu Gln Leu Gly Gln Ala
[0196]	35 40 45
[0197]	Leu Asn Gly Val Tyr Arg Thr Thr Glu Gly Arg Leu Thr Lys Ala Arg
[0198]	50 55 60
[0199]	Asn Ser Leu Gly Leu Tyr Gly Arg Thr Ile Glu Leu Leu Gly Gln Glu
[0200]	65 70 75 80
[0201]	Val Ser Arg Gly Arg Asp Ala Ala Gln Glu Leu Arg Ala Ser Leu Leu
[0202]	85 90 95
[0203]	Glu Thr Gln Met Glu Glu Asp Ile Leu Gln Leu Gln Ala Glu Ala Thr
[0204]	100 105 110
[0205]	Ala Glu Val Leu Gly Glu Val Ala Gln Ala Gln Lys Val Leu Arg Asp
[0206]	115 120 125
[0207]	Ser Val Gln Arg Leu Glu Val Gln Leu Arg Ser Ala Trp Leu Gly Pro
[0208]	130 135 140
[0209]	Ala Tyr Arg Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala His Ala Asp Lys Gln Ser

[0210]	145	150	155	160
[0211]	His Ile Leu Trp Ala Leu Thr Gly His Val Gln Arg Gln Arg Arg Glu			
[0212]		165	170	175
[0213]	Met Val Ala Gln Gln His Arg Leu Arg Gln Ile Gln Glu Arg Leu His			
[0214]		180	185	190
[0215]	Thr Ala Ala Leu Pro Ala			
[0216]	195			
[0217]	<210> 9			
[0218]	<211> 2383			
[0219]	<212> DNA			
[0220]	<213> 人工序列			
[0221]	<220>			
[0222]	<223> 示例性的用于改造非人Angpt18基因的合成DNA片段			
[0223]	<400> 9			
[0224]	ccagtgcctg ctctgtgcct gctctgggcc ctggcaatgg tgacccggcc tgcctcagcg	60		
[0225]	gccccatgg gcggcccaga actggcacag catgaggagc tgaccctgct cttccatggg	120		
[0226]	accctgcagc tgggccaggc cctcaacggt gtgtacagga ccacggaggg acggctgaca	180		
[0227]	aaggccagga acagcctggg tctctatggc cgcacaatag aactcctggg gcaggaggtc	240		
[0228]	agccggggcc gggatgcagc ccaggaactt cgggcaagcc tgttggagac tcaggtgggc	300		
[0229]	accgtagctg cgacactgtg gggatggccag gaggccaaag aggagtctgt gtctagggtg	360		
[0230]	accaaccatc ctggtttgcc caggactgaa gggattcctg ggatacaaga ttttcagcga	420		
[0231]	taaactcagg caagtcctta ggtacacaaa gatgagttgg acatcctact agtgaccac	480		
[0232]	tgtttattaa gcagatggag gaggatattc tgcagctgca ggcagaggcc acagctgagg	540		
[0233]	tgctggggga ggtggcccag gcacagaagg tgctacggga cagcgtgcag cggctagaag	600		
[0234]	tccagctgag gagcgcttg ctgggccctg cctaccgaga atttgaggtc ttaaaggtaa	660		
[0235]	ggagctcccc caaccctagt gggctgagac cctgatttcc ggccagaact cgcttctgca	720		
[0236]	ccttgagtcc caaagacctc ccagatcagc ctcccagctc tgtggcctct accctgcatg	780		
[0237]	tccccagaca aaactcaagt ctttttgtgt gcctcagttt cccttttgtg tgcctcagtt	840		
[0238]	gcaataaagg gcaacacctg atatctcaca gtagggccag gtactcaatg caggtaaaat	900		
[0239]	attcagcatg gggcgggcac acagttggtg ctcaataaat tctttttttt tttttttttg	960		
[0240]	agacagagtc tactgttgcc ccaggctgga gtgcagtggt gtgatcttgg ctactgcaa	1020		
[0241]	cctccacctc ctaggttcaa gtgattctcc tgcctcagcc tcctgagtag ctggaattac	1080		
[0242]	aggtgcacca gctaattttt gtatttttta gtagagatgg gatttcacca tgttggccag	1140		
[0243]	gctggtctcg aactcctgac ctcaagggat ctgcctgcct cggtttccca aagtgtctggg	1200		
[0244]	attacaggtg tgagccacta cacctggcca ataaattctt actactagag aaactggtaa	1260		
[0245]	cattttgtga gcaccagta agtaccagc actgttctat gccctttaat aatccatag	1320		
[0246]	atggccgggc atggtggctc atgcctgtaa tccagcact ttgggtagct aaggtgggtg	1380		
[0247]	gaacacttaa ggtcaggagt tcgagaccac cctggccaac atggtgaaac cccgtctcta	1440		
[0248]	ctaaaaatac aaaaaattag ctgggcgtgg tggcatatgc ctgtagtccc agctactcag	1500		
[0249]	gaggcttagg taggagaatc gcttgaacct gggagggtga ggttgcaagt agctgagatc	1560		
[0250]	gtgtcattgc actcagcctg ggtgacagag agagactcaa aaaaaaaaaa aaatccatag	1620		
[0251]	gatgttcac acctcccat gaagtgagtc ctattttatc cccattttac agatggggaa	1680		

[0252]	actgaggcca aagagcattg ttgacttgct gggtcacaca gatacaatga ggggctgggg	1740
[0253]	cagagggtca ggggatggga ggtgaggtgg ctgtcggctg aggtttccat tctgaccccc	1800
[0254]	acaggtcac gctgacaagc agagccacat cctatgggcc ctcacaggcc acgtgcagcg	1860
[0255]	gcagaggcgg gagatgggtg cacagcagca tcggctgcga cagatccagg agaggtgagc	1920
[0256]	ctggcagggg tttggcaggc agggcagttg gatggggggc gcacaggga gctggaaagg	1980
[0257]	ggccccctca cctgggctga gccacatctc cctccccaga ctccacacag cggcgctccc	2040
[0258]	agcctgaatc tgctggatg gaactgagga ccaatcatgc tgcaaggaa acttccacgc	2100
[0259]	cccgtaggc ccctgtgcag ggaggagctg cctgttccact gggatcagcc agggcgccgg	2160
[0260]	gccccacttc tgagcacaga gcagagacag acgcaggcgg ggacaaaggc agaggatgta	2220
[0261]	gccccattgg ggaggggtgg aggaaggaca tgtacccttt catgcctaca caccctcat	2280
[0262]	taaagcagag tcgtggcatc taccaggg tgtctgtgtg tgctcttggc ttagggagac	2340
[0263]	cccaccagc atgatgtatg aatacctccc attcaagtgc cca	2383
[0264]	<210> 10	
[0265]	<211> 7473	
[0266]	<212> DNA	
[0267]	<213> 人工序列	
[0268]	<220>	
[0269]	<223> 示例性的包括选择盒的经改造的Angpt18等位基因	
[0270]	<400> 10	
[0271]	cacgaaactg tcagccatgc cagtgcctgc tctgtgcctg ctctggggcc tggcaatggt	60
[0272]	gacccggcct gcctcagcgg ccccatggg cggcccagaa ctggcacagc atgaggagct	120
[0273]	gaccctgctc ttccatggga ccctgcagct gggccaggcc ctcaacggtg tgtacaggac	180
[0274]	cacggaggga cggctgacaa aggccaggaa cagcctgggt ctctatggcc gcacaataga	240
[0275]	actcctgggg caggaggtca gccggggccg ggatgcagcc caggaaactc gggcaagcct	300
[0276]	gttgagact caggtgggca ccgtagctgc gacactgtgg ggtggccagg agtccaaaga	360
[0277]	ggagtctgtg tctagggtaa ccaaccatcc tggtttgccc aggactgaag ggattcctgg	420
[0278]	gatacaagat ttccagcagc aaactcaggc aagtccttag gtacacaaag atgagttgga	480
[0279]	catcctacta gtgaccact gtttattaag cagatggagg aggatattct gcagctgcag	540
[0280]	gcagaggcca cagctgaggt gctgggggag gtggcccagg cacagaaggt gctacgggac	600
[0281]	agcgtgcagc ggctagaagt ccagctgagg agcgccctgc tgggccctgc ctaccgagaa	660
[0282]	tttgaggtct taaagtaag gagctcccc aaccctagtg ggctgagacc ctgatttccg	720
[0283]	gccagaactc gcttctgcac cttgagtccc aaagacctcc cagatcagcc tccagctct	780
[0284]	gtggcctcta ccctgcatgt cccagacaa aactcaagtc cttttgtgtg cctcagtttc	840
[0285]	ccttttgtgt gcctcagttg caaataaggg caacacctga tatctcacag tagggccagg	900
[0286]	tactcaatgc aggtaaaata ttccagcatg ggcgggcaca cagttggtgc tcaataaatt	960
[0287]	cttttttttt ttttttttga gacagagtct cactgttgcc caggctggag tgcagtgggt	1020
[0288]	tgatcttggc tactgcaac ctccacctcc taggttcaag tgattctcct gcctcagcct	1080
[0289]	cctgagtagc tggaattaca ggtgcaccag ctaatttttg ttttttttag tagagatggg	1140
[0290]	atttcacat gttggccagg ctggtctcga actcctgacc tcaagggatc tgctgcctc	1200
[0291]	ggtttcccaa agtgctggga ttacaggtgt gagccactac acctggccaa taaattctta	1260
[0292]	ctactagaga aactggtaac attttgtgag caccagtaa gtaccagca ctgttctatg	1320
[0293]	ccctttaata atccatatga tggccgggca tggtggtcga tgctgtaat ccagcactt	1380

[0294]	tgggtagcta aggtgggtgg aacacttaag gtcaggagtt cgagaccacc ctggccaaca	1440
[0295]	tggtgaaacc ccgtctctac taaaaataca aaaaattagc tgggcgtggt ggcacatgcc	1500
[0296]	tgtagtccca gctactcagg aggcttaggt aggagaatcg cttgaacctg ggaggtggag	1560
[0297]	gttgcaagtga gctgagatcg tgtcattgca ctcagcctgg gtgacagaga gagactcaaa	1620
[0298]	aaaaaaaaaa aatccatagg atgttcatca cctccccatg aagttagtcc tatttttatcc	1680
[0299]	ccattttaca gatggggaaa ctgaggccaa agagcattgt tgacttgctg ggtcacacag	1740
[0300]	atacaatgag gggctggggc agagggtcag gggatgggag gtgaggtggc tgtcggctga	1800
[0301]	ggtttccatt ctgaccccca caggctcacg ctgacaagca gagccacatc ctatgggccc	1860
[0302]	tcacaggcca cgtgcagcgg cagaggcggg agatggtggc acagcagcat cggctgcgac	1920
[0303]	agatccagga gaggtgagcc tggcaggggt ttggcaggca gggcagttgg atggggggcg	1980
[0304]	cacagggcag ctggaaagg gcccctcac ctgggctgag ccacatctcc ctccccagac	2040
[0305]	tccacacagc ggcgtcccca gcctgaatct gcctggatgg aactgaggac caatcatgct	2100
[0306]	gcaaggaaca cttccacgcc ccgtgaggcc cctgtgcagg gaggagctgc ctgttcaactg	2160
[0307]	ggatcagcca gggcgccggg cccacttct gagcacagag cagagacaga cgcaggcggg	2220
[0308]	gacaaaggca gaggatgtag cccattggg gaggggtgga ggaaggacat gtaccctttc	2280
[0309]	atgcctacac accctcatt aaagcagagt cgtggcatct caccagggt gtctgtgtgt	2340
[0310]	gtccttggt tagggagacc ccaccagca tgatgtatga atacctcca ttcaagtgcc	2400
[0311]	cactcgagat aacttcgtat aatgtatgct atacgaagtt atatgcatgg cctccgcgcc	2460
[0312]	gggttttggc gcctcccgcg ggcgcccccc tcctcacggc gagcgctgcc acgtcagacg	2520
[0313]	aagggcgcag cgagcgtcct gatccttccg cccggacgct caggacagcg gcccgctgct	2580
[0314]	cataagactc ggccttagaa cccagtatc agcagaagga catttttagga cgggacttgg	2640
[0315]	gtgactctag ggcactggtt ttctttccag agagcggaac aggcgaggaa aagtagtccc	2700
[0316]	ttctcggcga ttctgcggag ggatctccgt ggggcgggtga acgccgatga ttatataagg	2760
[0317]	acgcgccggg tgtggcacag ctagttccgt cgcagccggg atttgggtcg cggttcttgt	2820
[0318]	ttgtggatcg ctgtgatcgt cacttggtga gtagcgggct gctgggctgg ccggggcttt	2880
[0319]	cgtggccgcc gggccgctcg gtgggacgga agcgtgtgga gagaccgcca agggctgtag	2940
[0320]	tctgggtccg cgagcaagg tgcctgaac tgggggttgg ggggagcgca gcaaatggc	3000
[0321]	ggctgttccc gagtcttgaa tggaagacgc ttgtgaggcg ggctgtgagg tcgttgaaac	3060
[0322]	aagtggtggg gcatgtggg cggcaagaac ccaaggtctt gaggccttcg ctaatgcggg	3120
[0323]	aaagctctta ttcgggtgag atgggctggg gcaccatctg gggaccctga cgtgaagttt	3180
[0324]	gtcactgact ggagaactcg gtttgtcgtc tgttgccggg gcggcagtta tggcgggtgc	3240
[0325]	gttgggcagt gcacccgtac ctttgggagc gcgcgccctc gtcgtgtcgt gacgtcacc	3300
[0326]	gttctgttgg cttataatgc aggggtgggc cacctgccg taggtgtgcg gtaggccttt	3360
[0327]	ctccgtcga ggacgcaggg ttcgggccta gggtaggtc tcctgaatcg acaggcggcg	3420
[0328]	gacctctggt gaggggaggg ataagtgagg cgtcagttc tttggtcgtt tttatgtacc	3480
[0329]	tatcttctta agtagctgaa gtcccggtt tgaactatgc gtcgggggtt ggcgagtgtg	3540
[0330]	ttttgtgaag ttttttaggc accttttgaa atgtaatcat ttgggtcaat atgtaatttt	3600
[0331]	cagtgttaga ctagtaaat gtccgctaaa ttctggccgt ttttggcttt tttgttagac	3660
[0332]	gtgttgacaa ttaatcatcg gcatagtata tcggcatagt ataatacgac aaggttagga	3720
[0333]	actaaacat gggatcggcc attgaacaag atggattgca cgcaggttct ccggccgctt	3780
[0334]	gggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggtgc tctgatgccg	3840
[0335]	ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt tgtcaagacc gacctgtccg	3900

[0336]	gtgccctgaa tgaactgcag gacgaggcag cgcggtatc gtggctggcc acgacgggcg	3960
[0337]	ttccttgccg agctgtgctc gacgttgctc ctgaagcggg aagggaactgg ctgctattgg	4020
[0338]	gcgaagtgcc ggggcaggat ctctgtcat ctcacctgc tctgcccag aaagtatcca	4080
[0339]	tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc ggctacctgc ccattcgacc	4140
[0340]	accaagcgaa acatcgcatc gagcgcagc gtactcggat ggaagccggt cttgtcgatc	4200
[0341]	aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc gccaggctca	4260
[0342]	aggcgccgat gcccgcggc gatgatctcg tcgtgacca tggcgatgcc tgcttgccga	4320
[0343]	atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgtgg	4380
[0344]	cggaccgcta tcaggacata gcgttggtta cccgtgatat tgctgaagag cttggcggcg	4440
[0345]	aatgggctga ccgcttcctc gtgctttacg gtatcgccgc tcccgattcg cagcgcatcg	4500
[0346]	ccttctatcg ccttcttgac gagttcttct gaggggatcc gctgtaagtc tgcagaaatt	4560
[0347]	gatgatctat taaacaataa agatgtccac taaaatggaa gtttttctg tcatactttg	4620
[0348]	ttaagaaggg tgagaacaga gtacctacat tttgaatgga aggattggag ctacgggggt	4680
[0349]	gggggtgggg tgggattaga taaatgcctg ctctttactg aaggctcttt actattgctt	4740
[0350]	tatgataatg tttcatagtt ggatatcata atttaaaca gcaaaacca attaagggcc	4800
[0351]	agctcattcc tccactcat gatctataga tctatagatc tctcgtggga tcattgtttt	4860
[0352]	tctcttgatt ccactttgt ggttctaagt actgtggtt ccaaatgtgt cagtttcata	4920
[0353]	gcctgaagaa cgagatcagc agcctctgtt ccacatacac ttcattctca gtattgtttt	4980
[0354]	gccaagtict aattccatca gacctcgacc tgcagccct agccggggcg ccagtagcag	5040
[0355]	caccacgtc caccttctgt ctagtaatgt ccaacacctc cctcagtcca aacactgctc	5100
[0356]	tgcatccatg tggtcccat ttatacctga agcacttgat ggggcctcaa tgttttacta	5160
[0357]	gagcccacc ccctgcaact ctgagaccct ctggatttgt ctgtcagtgc ctcactgggg	5220
[0358]	cgttggataa tttcttaaaa ggtcaagttc cctcagcagc attctctgag cagtctgaag	5280
[0359]	atgtgtgctt ttcacagttc aaatccatgt ggctgtttca cccacctgcc tggccttggg	5340
[0360]	ttatctatca ggacctagcc tagaagcagg tgtgtggcac ttaacaccta agctgagtga	5400
[0361]	ctaactgaac actcaagtgg atgccatctt tgtcacttct tgactgtgac acaagcaact	5460
[0362]	cctgatgcca aagccctgcc caccctctc atgcccata ttggacatgg tacaggtcct	5520
[0363]	cactggccat ggtctgtgag gtctgtgtcc tctttgactt cataattcct aggggccact	5580
[0364]	agtatctata agaggaagag ggtgctggct ccaggccac agcccacaaa attccacctg	5640
[0365]	ctcacagggt ggctggctcg acccagggtg tgtccctgc tctgagccag ctcccggcca	5700
[0366]	agccagcacc atgggtaccc ccaagaagaa gaggaagggt cgtaccgatt taaattccaa	5760
[0367]	tttactgacc gtacaccaaa atttgctgc attaccggtc gatgcaacga gtgatgaggt	5820
[0368]	tcgcaagaac ctgatggaca tgttcaggga tcgccaggcg ttttctgagc atacctggaa	5880
[0369]	aatgctctg tccgtttgcc ggtcgtgggc ggcattgtgc aagttgaata accggaaatg	5940
[0370]	gtttcccgca gaacctgaag atgttcgcga ttatcttcta tatcttcagg cgcgcggtct	6000
[0371]	ggcagtaaaa actatccagc aacatttggg ccagctaaac atgcttcac gtcggtccgg	6060
[0372]	gctgccacga ccaagtgaca gcaatgctgt ttcactggtt atgcggcgga tccgaaaaga	6120
[0373]	aaacgttgat gccggtgaac gtgcaaaaca ggctctagcg ttcgaacga ctgatttcga	6180
[0374]	ccaggttcgt tcatcatgg aaaatagtga tcgctgccag gatatacgta atctggcatt	6240
[0375]	tctggggatt gcttataaca ccctgttacg tatagccgaa attgccagga tcagggttaa	6300
[0376]	agatatctca cgtactgacg gtgggagaat gttaatccat attggcagaa cgaaaacgct	6360
[0377]	ggttagcacc gcagggtgag agaaggcact tagcctgggg gtaactaaac tggtcgagcg	6420

[0378] atggatttcc gtctctggtg tagctgatga tccgaataac tacctgtttt gccgggtcag 6480  
 [0379] aaaaaatggt gttgccgcgc catctgccac cagccagcta tcaactcgcg ccctggaagg 6540  
 [0380] gatttttgaa gcaactcatc gattgattta cggcgctaag gtaaataataa aatttttaag 6600  
 [0381] tgtataatgt gttaaactac tgattctaata tgtttgtgta ttttaggatg actctggtca 6660  
 [0382] gagataacctg gcctggctcg gacacagtgc ccgtgtcgga gccgcgcgag atatggcccc 6720  
 [0383] cgctggagtt tcaataccgg agatcatgca agctgggtgc tggaccaatg taaatattgt 6780  
 [0384] catgaactat atccgtaacc tggatagtga aacaggggca atgggtgcgc tgctggaaga 6840  
 [0385] tggcgattga tctagataag taatgatcat aatcagccat atcacatctg tagaggtttt 6900  
 [0386] acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat 6960  
 [0387] tgttgttggt aaacctgccc tagttgcggc caattccagc tgagcgtgcc tccgcaccat 7020  
 [0388] taccagttgg tctggtgtca aaaataataa taaccgggca ggggggatct aagctctaga 7080  
 [0389] taagtaatga tcataatcag ccataacaca tctgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac 7140  
 [0390] ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgtaaacttg 7200  
 [0391] tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa 7260  
 [0392] gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat 7320  
 [0393] gtctggaata acttcgtata atgtatgcta tacgaagtta tgctagtaac tataacggtc 7380  
 [0394] ctaaggtagc gagctagcga tgccaccgag gaccagttgt gctgcaagga aactgaagc 7440  
 [0395] gctccaccag gcccatgaac agggctgaca gag 7473  
 [0396] <210> 11  
 [0397] <211> 2554  
 [0398] <212> DNA  
 [0399] <213> 人工序列  
 [0400] <220>  
 [0401] <223> 示例性的在重组酶介导的选择盒切除后的经改造的Angpt18等位基因  
 [0402] <400> 11  
 [0403] cacgaaactg tcagccatgc cagtgcctgc tctgtgcctg ctctgggccc tggcaatggt 60  
 [0404] gacccggcct gcctcagcgg ccccatggg cggccagaa ctggcacagc atgaggagct 120  
 [0405] gacctgctc ttccatggga ccctgcagct gggccaggcc ctcaacggtg tgtacaggac 180  
 [0406] caggaggga cggtgacaa aggccaggaa cagcctgggt ctctatggcc gcacaataga 240  
 [0407] actcctgggg caggagtca gccggggccg ggatgcagcc caggaaactc gggcaagcct 300  
 [0408] gttggagact caggtgggca ccgtagctgc gacactgtgg ggtggccagg agtccaaaga 360  
 [0409] ggagttcgtg tctagggtaa ccaaccatcc tggtttggcc aggactgaag ggattcctgg 420  
 [0410] gatacaagat ttccagcgat aaactcaggc aagtccttag gtacacaaag atgagttgga 480  
 [0411] catcctacta gtgacctact gtttattaag cagatggagg aggatattct gcagctgcag 540  
 [0412] gcagaggcca cagctgaggt gctgggggag gtggcccagg cacagaaggt gctacgggac 600  
 [0413] agcgtgcagc ggctagaagt ccagctgagg agcgcctggc tgggcccctgc ctaccgagaa 660  
 [0414] tttgaggtct taaaggtaag gagctcccc aaccctagtg ggctgagacc ctgatttccg 720  
 [0415] gccagaactc gtttctgcac cttgagtccc aaagacctcc cagatcagcc tcccagctct 780  
 [0416] gtggcctcta ccctgcatgt cccagacaa aactcaagtc cttttgtgtg cctcagtttc 840  
 [0417] cttttgtgtg gcctcagttg caaataaggg caacacctga tatctcacag tagggccagg 900  
 [0418] tactcaatgc aggtaaaata ttccagcatg ggccggcaca cagttggtgc tcaataaatt 960  
 [0419] cttttttttt ttttttttga gacagagtct cactgttgcc caggctggag tgcagtgggt 1020



[0420]	tgatcttggc tcaactgcaac ctccacctcc taggttcaag tgattctcct gcctcagcct	1080
[0421]	cctgagtagc tggaattaca ggtgcaccag ctaatttttg tatttttttag tagagatggg	1140
[0422]	atttcaccat gttggccagg ctggtctcga actcctgacc tcaagggatc tgccctgcctc	1200
[0423]	ggtttcccaa agtgctggga ttacaggtgt gagccactac acctggccaa taaattctta	1260
[0424]	ctactagaga aactggtaac attttgtgag caccagtaa gtaccagca ctgttctatg	1320
[0425]	ccctttaata atccatatga tggccgggca tgggtggctca tgcctgtaat ccagcactt	1380
[0426]	tgggtagcta aggtgggtgg aacacttaag gtcaggagt cagagaccacc ctggccaaca	1440
[0427]	tggtgaaacc ccgtctctac taaaaataca aaaaattagc tgggcgtggt ggcacatgcc	1500
[0428]	tgtagtccca gctactcagg aggccttaggt aggagaatcg cttgaacctg ggaggtggag	1560
[0429]	gttcagtgatg gctgagatcg tgtcattgca ctacagcctgg gtgacagaga gagactcaa	1620
[0430]	aaaaaaaaa aatccatagg atgttcatca cctccccatg aagtgagtcc tattttatcc	1680
[0431]	ccattttaca gatggggaaa ctgaggccaa agagcattgt tgacttgctg ggtcacacag	1740
[0432]	atacaatgag gggctggggc agagggtcag gggatgggag gtgaggtggc tgtcggctga	1800
[0433]	ggtttccatt ctgaccccca caggctcacg ctgacaagca gagccacatc ctatggggcc	1860
[0434]	tcacaggcca cgtgcagcgg cagaggcggg agatgggtggc acagcagcat cggctgcgac	1920
[0435]	agatccagga gaggtgagcc tggcagggtt ttggcaggca gggcagttgg atggggggcg	1980
[0436]	cacagggcag ctggaagg gccccctcac ctgggctgag ccacatctcc ctccccagac	2040
[0437]	tccacacagc ggcgtcccca gcctgaatct gcctggatgg aactgaggac caatcatgct	2100
[0438]	gcaaggaaca cttccacgcc ccgtgaggcc cctgtgcagg gaggagctgc ctgttctactg	2160
[0439]	ggatcagcca gggcgccggg cccacttct gagcacagag cagagacaga cgcaggcggg	2220
[0440]	gacaaaggca gaggatgtag cccattggg gaggggtgga ggaaggacat gtaccctttc	2280
[0441]	atgcctacac acccctcatt aaagcagagt cgtggcatct caccagggt gtctgtgtgt	2340
[0442]	gtccttggct tagggagacc ccaccagca tgatgtatga atacctccca ttcaagtgcc	2400
[0443]	cactcgagat aacttcgtat aatgtatgct atacgaagtt atgctagtaa ctataacggt	2460
[0444]	cctaaggtag cgagctagcg atgccaccga ggaccagttg tgctgcaagg aacactgaag	2520
[0445]	cgctccacca ggcccatgaa cagggtgac agag	2554
[0446]	<210>	12
[0447]	<211>	680
[0448]	<212>	DNA
[0449]	<213>	人工序列
[0450]	<220>	
[0451]	<223>	鱼精蛋白1 (Prm1) 启动子
[0452]	<400>	12
[0453]	ccagtagcag caccacgctc caccttctgt ctagtaatgt ccaacacctc cctcagtcca	60
[0454]	aacactgctc tgcattccatg tggtcccat ttatactga agcacttgat ggggcctcaa	120
[0455]	tgttttacta gagccaccc ccctgcaact ctgagaccct ctggatttgt ctgtcagtgc	180
[0456]	ctactgggg cgttggataa tttcttaaaa ggtcaagttc cctcagcagc attctctgag	240
[0457]	cagtctgaag atgtgtgctt ttcacagttc aaatccatgt ggcgttttca cccacctgcc	300
[0458]	tggccttggg ttatctatca ggacctagcc tagaagcagg tgtgtggcac ttaacaccta	360
[0459]	agctgagtga ctaactgaac actcaagtgg atgccatctt tgctacttct tgactgtgac	420
[0460]	acaagcaact cctgatgcca aagccctgcc caccctctc atgcccataat ttggacatgg	480
[0461]	tacaggtcct cactggccat ggtctgtgag gtctgtgtcc tctttgactt cataattcct	540

[0462] aggggccact agtatctata agaggaagag ggtgctggct cccaggccac agcccacaaa 600  
 [0463] attccacctg ctcacaggtt ggctggctcg acccaggtgg tgtcccctgc tctgagccag 660  
 [0464] ctcccggcca agccagcacc 680  
 [0465] <210> 13  
 [0466] <211> 1052  
 [0467] <212> DNA  
 [0468] <213> 人工序列  
 [0469] <220>  
 [0470] <223> Blimp1启动子1kb  
 [0471] <400> 13  
 [0472] tgccatcatc acaggatgtc cttccttctc cagaagacag actggggctg aaggaaaagc 60  
 [0473] cggccagget cagaacgagc cccactaatt actgcctcca acagctttcc actcactgcc 120  
 [0474] cccagcccaa catccccttt ttaactggga agcattccta ctctccattg tacgcacacg 180  
 [0475] ctcggaagcc tggctgtggg tttgggcatg agaggcaggg acaacaaaac cagtatatat 240  
 [0476] gattataact ttttctgtt tccctatttc caaatggctg aaaggaggaa gttaggtcta 300  
 [0477] cctaagctga atgtattcag ttagcaggag aaatgaaatc ctatacgttt aatactagag 360  
 [0478] gagaaccgcc ttagaatatt tatttcattg gcaatgactc caggactaca cagcgaaatt 420  
 [0479] gtattgcatg tgctgccaaa ataccttagc tctttccttc gaagtacgtc ggatcctgta 480  
 [0480] attgagacac cgagtttagg tgactagggt tttcttttga ggaggagtcc cccacccgcg 540  
 [0481] cccgtctgc cgcgacagga agctagcgat cgggaggact tagaatacaa tcgtagtgtg 600  
 [0482] ggtaaacatg gagggcaagc gcctgcaaag ggaagtaaga agattcccag tccttggtga 660  
 [0483] aatccatttg caaacagagg aagctgccgc gggtcgcagt cgggtggggg aagccctgaa 720  
 [0484] cccacgctg cagggtggg ctggccaggt gcggccacgc ccccatcgcg gcggctggta 780  
 [0485] ggagtgaatc agaccgtcag tattggtaaa gaagtctgcg gcagggcagg gagggggaag 840  
 [0486] agtagtcagt cgctcgctca ctcgctcgct cgcacagaca ctgctgcagt gacactcggc 900  
 [0487] cctccagtgt cgcggagacg caagagcagc gcgcagcacc tgtccgccc gagcgagccc 960  
 [0488] ggcccgcggc cgtagaaaag gagggaccgc cgaggtgcgc gtcagtactg ctcagcccgg 1020  
 [0489] cagggacgcg ggaggatgtg gactgggtgg ac 1052  
 [0490] <210> 14  
 [0491] <211> 2008  
 [0492] <212> DNA  
 [0493] <213> 人工序列  
 [0494] <220>  
 [0495] <223> Blimp1启动子2kb  
 [0496] <400> 14  
 [0497] gtggtgctga ctcagcatcg gttaataaac cctctgcagg aggctggatt tcttttgttt 60  
 [0498] aattatcact tggaccttctc tgagaactct taagaattgt tcattcgggt ttttttgttt 120  
 [0499] tgttttggtt tggttttttt gggttttttt tttttttttt ttttttggtt ttggagacag 180  
 [0500] ggtttctctg tatatagccc tggcacaaga gcaagctaac agcctgttctc ttcttggtgc 240  
 [0501] tagcgcctcc tctggcagaa aatgaaataa cagggtggacc tacaaccccc ccccccccc 300  
 [0502] ccagtgtatt ctactcttgt ccccggtata aatttgattg ttccgaacta cataaattgt 360  
 [0503] agaaggattt tttagatgca catatcattt tctgtgatac cttccacaca cccctcccc 420

[0504]	ccaaaaaat ttttctggga aagtttcttg aaaggaaaac agaagaacaa gcctgtcttt	480
[0505]	atgattgagt tgggcttttg ttttgcctgtg tttcatttct tcctgtaaac aaataactcaa	540
[0506]	atgtccactt cattgtatga ctaagttggt atcattaggt tgggtctggg tgtgtgaatg	600
[0507]	tgggtgtgga tctggatgtg ggtgggtgtg tatgccccgt gtgttttagaa tactagaaaa	660
[0508]	gataccacat cgtaaaacttt tgggagagat gattttttaa aatgggggtg ggggtgaggg	720
[0509]	gaacctgcga tgaggcaagc aagataaggg gaagacttga gtttctgtga tctaaaaagt	780
[0510]	cgctgtgatg ggatgctggc tataaatggg cccttagcag cattgtttct gtgaattgga	840
[0511]	ggatccctgc tgaaggcaaa agaccattga aggaagtacc gcatctggtt tgttttgtaa	900
[0512]	tgagaagcag gaatgcaagg tccacgtctt taataataaa caaacaggac attgtatgcc	960
[0513]	atcatcacag gatgtccttc cttctccaga agacagactg gggctgaagg aaaagccggc	1020
[0514]	caggctcaga acgagcccca ctaattactg cctccaacag ctttccactc actgccccca	1080
[0515]	gccaacatc ccctttttta ctgggaagca ttctactct ccattgtacg cacacgtcgc	1140
[0516]	gaagcctggc tgtgggtttg ggcattgagag gcagggacaa caaaaccagt atatatgatt	1200
[0517]	ataacttttt cctgtttccc tatttccaaa tggctgaaag gaggaagtta ggtctaccta	1260
[0518]	agctgaatgt attcagttag caggagaaat gaaatcctat acgtttaata ctagaggaga	1320
[0519]	accgccttag aatatttatt tcattggcaa tgactccagg actacacagc gaaattgtat	1380
[0520]	tgcatgtgct gccaaaatac tttagctctt tccttcgaag tacgtcggat cctgtaattg	1440
[0521]	agacaccgag ttaggtgac tagggttttc ttttgaggag gagtccccca ccccgccccg	1500
[0522]	ctctgccgcg acaggaagct agcgatccgg aggacttaga atacaatcgt agtgtgggta	1560
[0523]	aacatggagg gcaagcgctt gcaaaggga gtaagaagat tcccagtcct tgttgaaatc	1620
[0524]	catttgcaaa cagaggaagc tgccgcgggt cgcagtcggt ggggggaagc cctgaacccc	1680
[0525]	acgctgcacg gctgggctgg ccaggctcgg ccacgcccc atcgcggcgg ctggtaggag	1740
[0526]	tgaatcagac cgctcagtatt ggtaaagaag tctgcggcag ggcaggagg gggaagagta	1800
[0527]	gtcagtcgct cgctcactcg ctgcctcgca cagacactgc tgcagtgaca ctcgccctc	1860
[0528]	cagtgtcgcg gagacgaag agcagcgcgc agcacctgtc cgcccggagc gagcccggcc	1920
[0529]	cgcgccgta gaaaaggagg gaccgccgag gtgcgcgtca gtactgtca gcccggcagg	1980
[0530]	gacgcgggag gatgtggact ggggtggac	2008
[0531]	<210> 15	
[0532]	<211> 100	
[0533]	<212> DNA	
[0534]	<213> 人工序列	
[0535]	<220>	
[0536]	<223> 合成多核苷酸	
[0537]	<400> 15	
[0538]	aaggcagccg cagcggcccc ggaaccacac ccacgaaact gtcagccatg ccagtgcctg	60
[0539]	ctctgtgcct gctctgggcc ctggcaatgg tgaccgggcc	100
[0540]	<210> 16	
[0541]	<211> 150	
[0542]	<212> DNA	
[0543]	<213> 人工序列	
[0544]	<220>	
[0545]	<223> 合成多核苷酸	

- [0546] <400> 16
- [0547] gggagacccc acccagcatg atgtatgaat acctcccatt caagtgccca ctcgagataa 60
- [0548] cttcgtataa tgtatgctat acgaagtat atgcatggcc tccgcgccgg gttttggcgc 120
- [0549] ctcccgcggg cgccccctc ctcacggcga 150
- [0550] <210> 17
- [0551] <211> 181
- [0552] <212> DNA
- [0553] <213> 人工序列
- [0554] <220>
- [0555] <223> 合成多核苷酸
- [0556] <400> 17
- [0557] tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 60
- [0558] ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatgctagt aactataacg gtcctaaggt 120
- [0559] agcgagctag cgatgccacc gaggaccagt tgtgctgcaa ggaacactga agcgctccac 180
- [0560] c 181
- [0561] <210> 18
- [0562] <211> 177
- [0563] <212> DNA
- [0564] <213> 人工序列
- [0565] <220>
- [0566] <223> 合成多核苷酸
- [0567] <400> 18
- [0568] gggagacccc acccagcatg atgtatgaat acctcccatt caagtgccca gtcgagataa 60
- [0569] cttcgtataa tgtatgctat acgaagtat gctagtaact ataacgggcc taaggtagcg 120
- [0570] agctagcgat gccaccgagg accagttgtg ctgcaaggaa cactgaagcg ctccacc 177
- [0571] <210> 19
- [0572] <211> 22
- [0573] <212> DNA
- [0574] <213> 人工序列
- [0575] <220>
- [0576] <223> 合成寡核苷酸
- [0577] <400> 19
- [0578] ggtgttggtg gcaggtaaga gt 22
- [0579] <210> 20
- [0580] <211> 26
- [0581] <212> DNA
- [0582] <213> 人工序列
- [0583] <220>
- [0584] <223> 合成寡核苷酸
- [0585] <400> 20
- [0586] tgaggaaatg gtaaaccag aacaga 26
- [0587] <210> 21

[0588] <211> 24  
[0589] <212> DNA  
[0590] <213> 人工序列  
[0591] <220>  
[0592] <223> 合成寡核苷酸  
[0593] <400> 21  
[0594] tgggtgtgtca tcagggtatg tttc 24  
[0595] <210> 22  
[0596] <211> 21  
[0597] <212> DNA  
[0598] <213> 人工序列  
[0599] <220>  
[0600] <223> 合成寡核苷酸  
[0601] <400> 22  
[0602] tgagcctggt gggattactc t 21  
[0603] <210> 23  
[0604] <211> 24  
[0605] <212> DNA  
[0606] <213> 人工序列  
[0607] <220>  
[0608] <223> 合成寡核苷酸  
[0609] <400> 23  
[0610] tagcagtgga agttgcctag gtcc 24  
[0611] <210> 24  
[0612] <211> 18  
[0613] <212> DNA  
[0614] <213> 人工序列  
[0615] <220>  
[0616] <223> 合成寡核苷酸  
[0617] <400> 24  
[0618] ccgtcaaggc cagtgcctt 18  
[0619] <210> 25  
[0620] <211> 21  
[0621] <212> DNA  
[0622] <213> 人工序列  
[0623] <220>  
[0624] <223> 合成寡核苷酸  
[0625] <400> 25  
[0626] gcaagcctgt tggagactca g 21  
[0627] <210> 26  
[0628] <211> 22  
[0629] <212> DNA

[0630] <213> 人工序列  
[0631] <220>  
[0632] <223> 合成寡核苷酸  
[0633] <400> 26  
[0634] caccgtagct gcgacactgt gg 22  
[0635] <210> 27  
[0636] <211> 21  
[0637] <212> DNA  
[0638] <213> 人工序列  
[0639] <220>  
[0640] <223> 合成寡核苷酸  
[0641] <400> 27  
[0642] agacacgaac tcctctttgg a 21  
[0643] <210> 28  
[0644] <211> 18  
[0645] <212> DNA  
[0646] <213> 人工序列  
[0647] <220>  
[0648] <223> 合成寡核苷酸  
[0649] <400> 28  
[0650] tgggctgagc cacatctc 18  
[0651] <210> 29  
[0652] <211> 21  
[0653] <212> DNA  
[0654] <213> 人工序列  
[0655] <220>  
[0656] <223> 合成寡核苷酸  
[0657] <400> 29  
[0658] cagactccac acagcggcgc t 21  
[0659] <210> 30  
[0660] <211> 22  
[0661] <212> DNA  
[0662] <213> 人工序列  
[0663] <220>  
[0664] <223> 合成寡核苷酸  
[0665] <400> 30  
[0666] tcagttccat ccaggcagat tc 22

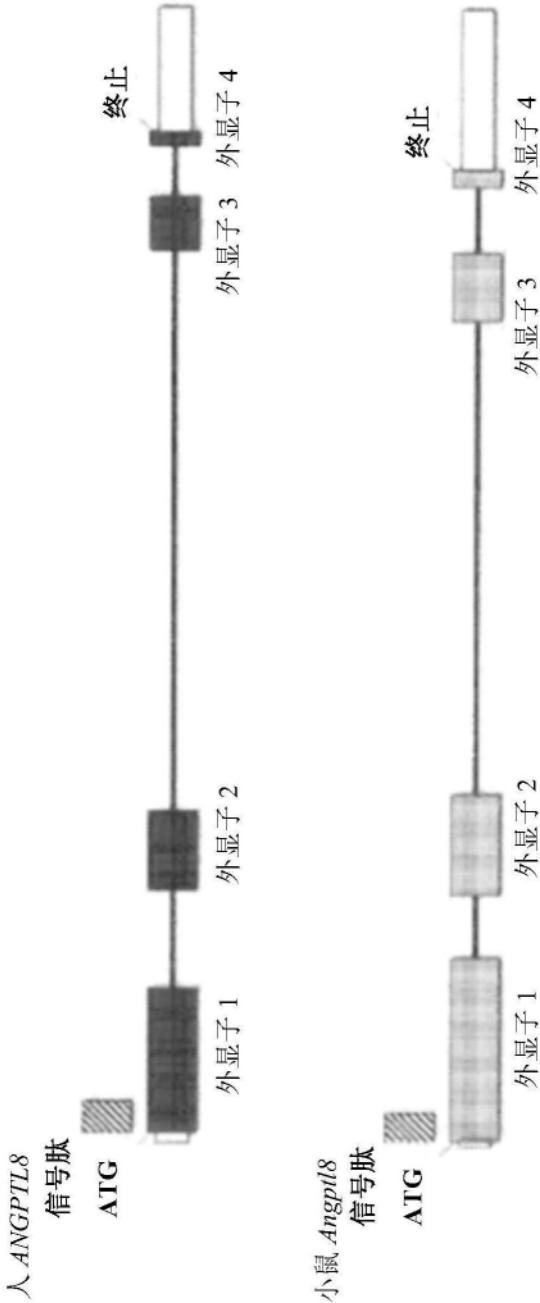


图1

hANGPTL8	10	20	30	40	50	60
mAngptl8	10	20	30	40	50	60
rAngptl8	10	20	30	40	50	60
engAngptl8	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
hANGPTL8	70	80	90	100	110	120
mAngptl8	70	80	90	100	110	120
rAngptl8	70	80	90	100	110	120
engAngptl8	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
hANGPTL8	130	140	150	160	170	180
mAngptl8	130	140	150	160	170	180
rAngptl8	130	140	150	160	170	180
engAngptl8	130	140	150	160	170	180
	190					
hANGPTL8	190					
mAngptl8	190					
rAngptl8	190					
engAngptl8	190					

MPVPALCLLWALAMVTRPASAPMGPELAQAHEELTLFHGTLQALNGVYRTTEGRL  
 MAVLALCLLWTLASAVRPAPVAPLGGPEPAQYEELTLFHGALQALNGVYRATEARL  
 MVVPILCLLWAIATAVRPAPVAPLGGPEPAQYEELTLFHGALQALNGVYKATEARL  
 MPVPALCLLWALAMVTRPASAPMGPELAQAHEELTLFHGTLQALNGVYRTTEGRL  
 \* \* \* \* \* : \* . . \* \* \* . \* \* : \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \*  
 TKARNSLGLYCRTIELLIGQEVSRGRDAAQELRASLLETQMEEDILQQAETAETAEVLGEVA  
 TEAGHSLGLYDRALEFLGTEVRQGQDATQELRTSLSEIQVEEDALHLRAEATARSLEGEVA  
 TEAGRNGLFLDQALEFLGREVNQGRDATRELRTSLSEIQAEEDTLHLRAEATARSLEGEVA  
 TKARNSLGLYCRTIELLIGQEVSRGRDAAQELRASLLETQMEEDILQQAETAETAEVLGEVA  
 \* : \* . . \* \* \* : : : \* \* \* \* : \* \* \* \* : \* \* \* \* : \* \* \* \* : \* \* \* \*  
 QAQKVL RDSVQRLEVQLRS AWLGPAYREFEVLKAHADKQSHILWALTGHVQRQREMVAQ  
 RAQQAAL RDTVRRLQVQLRGAWLGAHQEFETLKAHADKQSHLLWALTGHVQRQREMAEQ  
 RAQHALL RNSVRRQLQVQLRGAWLGAHQEFENLKDRADKQNHLLWALTGHVQRQREMAEQ  
 QAQKVL RDSVQRLEVQLRS AWLGPAYREFEVLKAHADKQSHILWALTGHVQRQREMVAQ  
 : \* \* : \* \* : \* \* : \* \* \* \* : \* \* \* \* : \* \* \* \* : \* \* \* \* : \* \* \* \*  
 QHRLRQIQERLHTAALPA  
 QQWLRQIQQRLLHTAALPA  
 QQWLRQIQQRLLHMAALPA  
 QHRLRQIQERLHTAALPA  
 \* : \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \*

图2



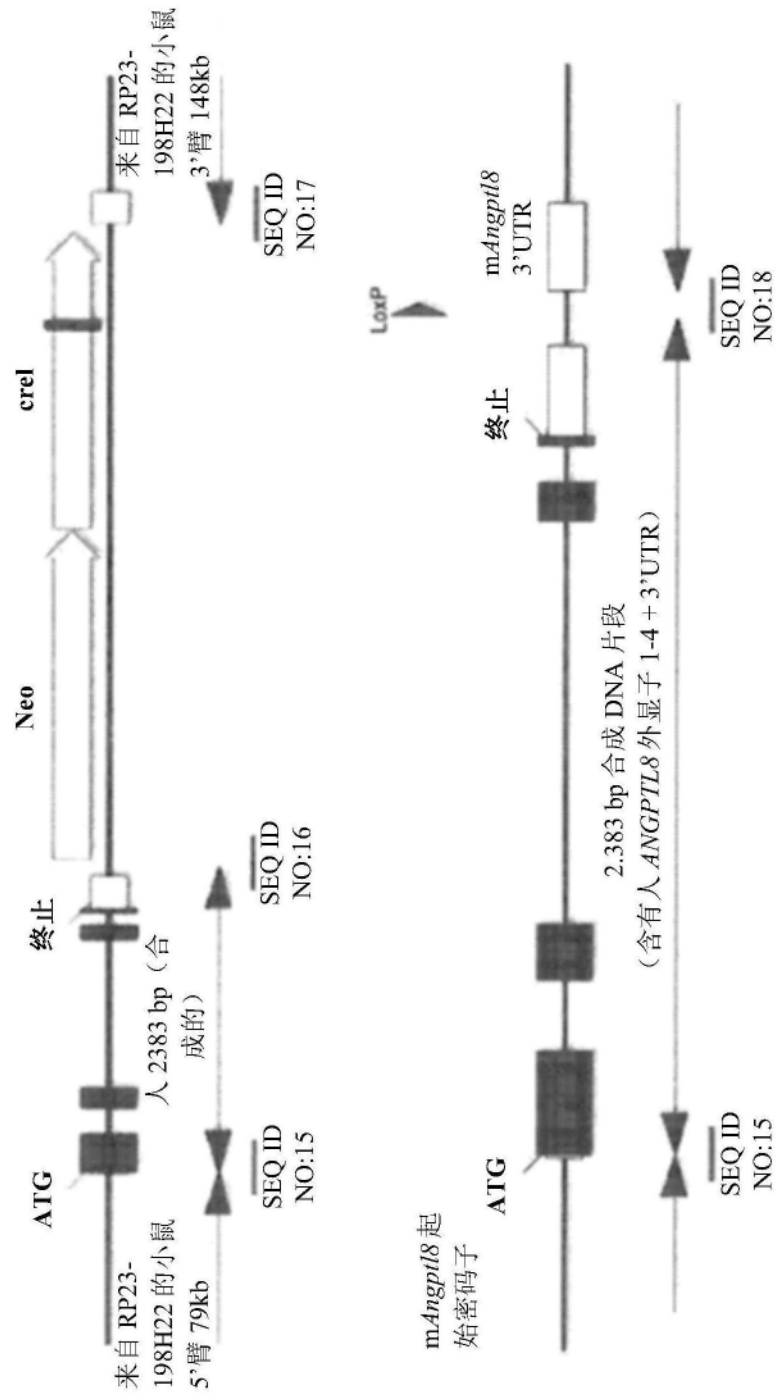


图3

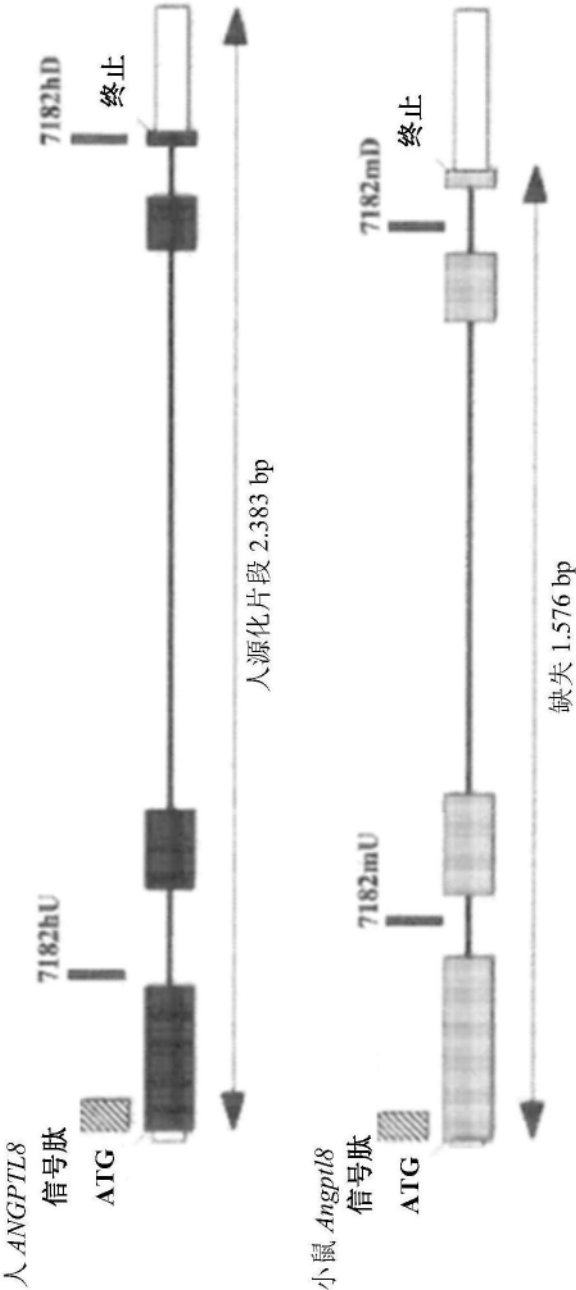


图4

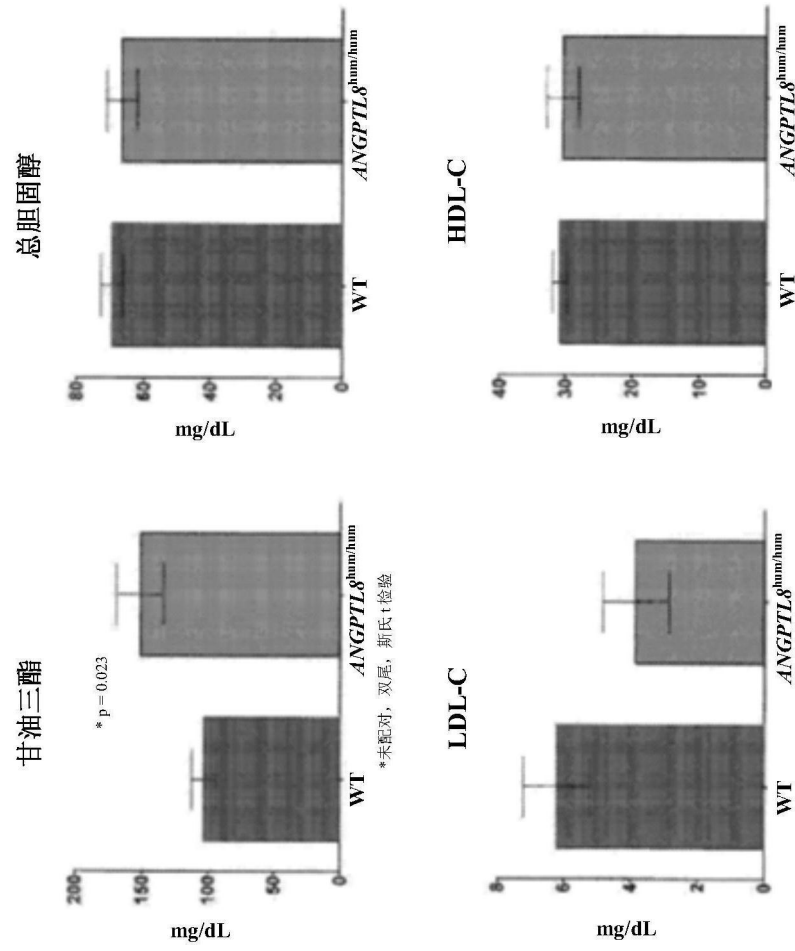


图5

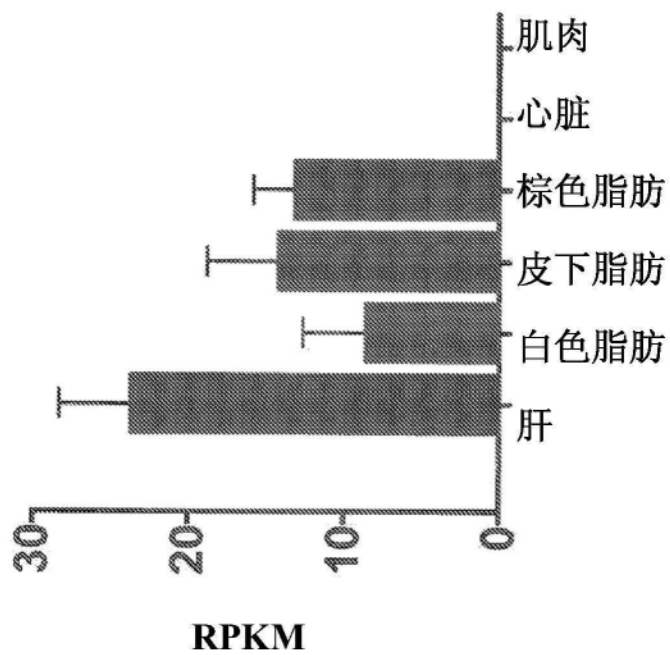


图6

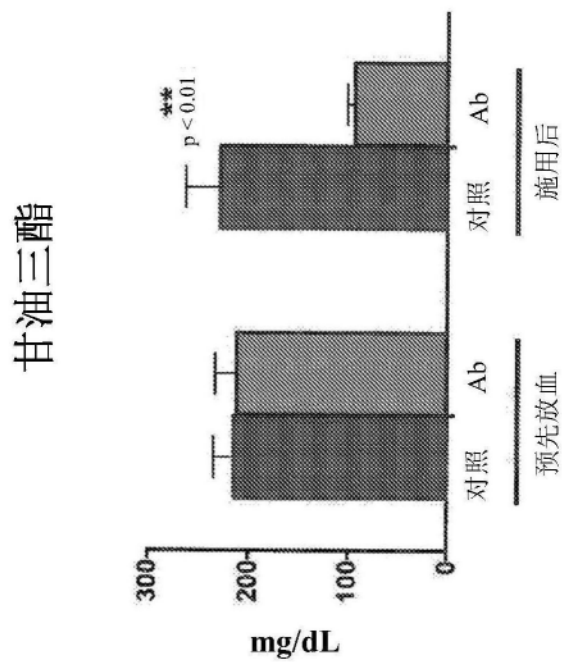


图7

图 8A 褐家鼠 *Angptl8*mRNA (SEQ ID NO:1, NM\_001271710.1) :

ATACCCCCGAGACTGTCCACCATGGTTGTGCCTATTCTCTGCCTCCTATGGGC  
CATAGCAACAGCAGTGCGACCTGCCCCAGTGGCCCCTCTCGGTGGTCCAGA  
GCCGGCCCAATATGAAGAGTTGACCTGCTCTTTACGGGGGCCCTACAGCT  
AGGTCAGGCCCTCAATGGTGTGTACAAAGCCACGGAAGCTCGCCTGACAG  
AAGCTGGGCGCAACCTGGGCCTTTTGTACCAAGCACTGGAATTTCTGGGAA  
GAGAGGTCAATCAGGGCCGGGATGCAACACGGGAGCTTCGCACCAGCTTG  
TCGGAGATTCAGGCAGAAGAGGACACTTTACACCTTCGAGCAGAAGCCACA  
GCCCCGATCGCTGAGGGAAGTGGCCCGGGCCAGCATGCTCTGCGGAACAG  
TGTACGGAGACTACAAGTGCAGCTGAGAGGTGCCTGGCTAGGCCAAGCCC  
ACCAAGAATTTGAGAATTTAAAGGATCGAGCCGATAAGCAGAACCACCTCT  
TGTGGGCTCTCACTGGCCACGTGCAGCGACAGCAGCGTGAGATGGCAGAG  
CAGCAACAGTGGCTGCGGCAGATCCAGCAGAGACTCCACATGGCAGCCCT  
CCCAGCCTGAGACTACCTGGATGCCACTGAGGACCAGTTGTGCTGCAGGGAAC  
ACTGAATGCGCTCCACCGGGCCTATCTATGAGCAGGGCCGACAGAGCTGGCTGC  
CCATCAGCTAGACTTGGCCGGTGCACCCCGCTTCCTGGCAGAGCAGAGACAGAA  
GCAAGCAGGCGGGATGGAAGGCAGAAGACAGCCCCGTGGAGAAGGCTGGAGA  
AGGACATGAGCTCCCTTATGCCCCACACCCCAATAAAAAAGAGGCAATCTAT  
AAA

图8A

图 8B 褐家鼠 *Angptl8* 氨基酸 (SEQ ID NO:2, NP\_001258639.1) :

MVVPILCLLWAIATAVRPAPVAPLGGPEPAQYEELTLLFHGALQLGQALNGVYKAT  
EARLTEAGRNLGLFDQALEFLGREVNQGRDATRELRTSLSEIQAEEDTLHLRAEATA  
RSLREVARAQHALRNSVRRLLQVQLRGAWLGQAHQEFENLKDRADKQNHLLWALT  
GHVQRQQREMAEQQWLRQIQRLHMAALPA

图8B

图 8C 小家鼠 *Angptl8*mRNA (SEQ ID NO: 3, NM\_001080940.1) :

TGTCAGCCATGGCTGTGCTTGCTCTCTGCCTCCTGTGGACCTTAGCATCAGC  
AGTGCGACCCGCTCCAGTGGCCCCCTCTGGGTGGTCCAGAGCCAGCTCAATA  
TGAAGAGCTGACCCTGCTCTTTACGGGGGCCCTGCAGCTAGGCCAGGCCCT  
CAATGGCGTGTACAGAGCCACAGAGGCTCGCCTGACAGAAGCTGGGCACA  
GCCTGGGCCTCTATGACAGAGCACTGGAATTCCTGGGGACAGAAAGTCAGG  
CAGGGCCAGGATGCCACACAGGAGCTTCGCACCAGCCTGTTCGGAGATTCA  
GGTGGAAGAGGACGCTTTACACCTTCGAGCTGAAGCCACAGCCCGATCACT  
GGGGGAAGTGGCCCGGGCCAGCAGGCTCTGCGGGACACTGTACGGAGAC  
TACAAGTGCAGCTGAGAGGCGCCTGGCTCGGTCAAGCCCACCAAGAATTTG  
AGACCTTAAAGGCTCGAGCTGATAAGCAGAGCCACCTCTTATGGGCTCTCA  
CTGGCCACGTGCAGCGACAGCAGCGGGAGATGGCAGAGCAGCAACAGTGG  
CTGCGACAGATCCAGCAGAGACTCCACACAGCAGCCCTCCCAGCCTGAGAC  
TACCTGGATGCCACCGAGGACCAGTTGTGCTGCAAGGAACACTGAAGCGCTCCA  
CCAGGCCCATGAACAGGGCTGACAGAGCCGGCTGCCCATCAGCTGGACCTGGC  
CAGTGCACCCCGCTTCCTGGCAGAGCGGAGACAGAAGCAAGCAGGCGGGATGG  
AAGGCAGAAGACAGAGCCCTGTGGAGGAGGGCTGGAAAAAGACACGAGCCCC  
CTTATGCCCCACACCCCCACAATAAAAGAGAACAGAGGCAATCTAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAA

图8C

图 8D 小家鼠 *Angptl8* 氨基酸 (SEQ ID NO:4, NP\_001074409.1) :

MAVLALCLLWTLASAVRPAPVAPLGGPEPAQYEELTLFHGALQLGQALNGVYRA  
TEARLTEAGHSLGLYDRALEFLGTEVRQGQDATQELRTSLSEIQVEEDALHLRAEAT  
ARSLGEVARAQALRDTVRRLLQVQLRGAWLGQAHQEFETLKARADKQSHLLWAL  
TGHVQRQQREMAEQQWLRQIQRLHTAALPA

图8D

图 8E 智人 *ANGPTL8*mRNA (SEQ ID NO:5, NM\_018687.6) :

ATACCTTAGACCCTCAGTCATGCCAGTGCCTGCTCTGTGCCTGCTCTGGGCC  
CTGGCAATGGTGACCCGGCCTGCCTCAGCGGCCCCCATGGGCGGCCAGA  
ACTGGCACAGCATGAGGAGCTGACCCTGCTCTTCCATGGGACCCTGCAGCT  
GGGCCAGGCCCTCAACGGTGTGTACAGGACCACGGAGGGACGGCTGACAA  
AGGCCAGGAACAGCCTGGGTCTCTATGGCCGCACAATAGAACTCCTGGGG  
CAGGAGGTGAGCCGGGGCCGGGATGCAGCCCAGGAACTTCGGGCAAGCCT  
GTTGGAGACTCAGATGGAGGAGGATATTCTGCAGCTGCAGGCAGAGGCCA  
CAGCTGAGGTGCTGGGGGAGGTGGCCCAGGCACAGAAGGTGCTACGGGAC  
AGCGTGCAGCGGCTAGAAGTCCAGCTGAGGAGCGCCTGGCTGGGCCCTGC  
CTACCGAGAATTTGAGGTCTTAAAGGCTCACGCTGACAAGCAGAGCCACAT  
CCTATGGGCCCTCACAGGCCACGTGCAGCGGCAGAGGCGGGAGATGGTGG  
CACAGCAGCATCGGCTGCGACAGATCCAGGAGAGACTCCACACAGCGGCG  
CTCCCAGCCTGAATCTGCCTGGATGGAAGTGAAGGACCAATCATGCTGCAAGGA  
ACACTTCCACGCCCCGTGAGGCCCTGTGCAGGGAGGAGCTGCCTGTTCACTGG  
GATCAGCCAGGGCGCCGGGCCCCACTTCTGAGCACAGAGCAGAGACAGACGCA  
GGCGGGGACAAAGGCAGAGGATGTAGCCCCATTGGGGAGGGGTGGAGGAAGG  
ACATGTACCCTTTCATGCCTACACACCCCTCATTAAGCAGAGTCGTGGCATCTC  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图8E

图 8F 智人 *ANGPTL8* 氨基酸 (SEQ ID NO:6, NP\_061157.3) :

MPVPALCLLWALAMVTRPASAAPMGGPELAQHEELTLLFHGTLQLGQALNGVYRT  
TEGRLTKARNSLGLYGRTIELLGQEVSRGRDAAQELRASLLETQMEEDILQLQAEAT  
AEVLGEVAQAQKVL RDSVQRLEVQLRSAWLGPAYREFEVLKAHADKQSHILWALT  
GHVQRQRREMVAQQHRLRQIQERLHTAALPA

图8F

图 8G 示例性的经改造的 *Angptl8*mRNA (SEQ ID NO:7):

TGTCAGCCATG(CCAGTGCCTGCTCTGTGCCTGCTCTGGGCCCCTGGCAATGG  
TGACCCGGCCTGCCTCAGCGGCCCCCATGGGCGGCCCAAGACTGGCACAG  
CATGAGGAGCTGACCCTGCTCTTCCATGGGACCCTGCAGCTGGGCCAGGC  
CCTCAACGGTGTGTACAGGACCACGGAGGGACGGCTGACAAAGGCCAGGA  
ACAGCCTGGGTCTCTATGGCCGCACAATAGAACTCCTGGGGCAGGAGGTC  
AGCCGGGGCCGGGATGCAGCCCAGGAACTTCGGGCAAGCCTGTTGGAGAC  
TCAGATGGAGGAGGATATTCTGCAGCTGCAGGCAGAGGCCACAGCTGAGG  
TGCTGGGGGAGGTGGCCAGGCACAGAAGGTGCTACGGGACAGCGTGCAG  
CGGCTAGAAGTCCAGCTGAGGAGCGCCTGGCTGGGCCCCTGCCTACCGAGA  
ATTGAGGTCTTAAAGGCTCACGCTGACAAGCAGAGCCACATCCTATGGGC  
CCTCACAGGCCACGTGCAGCGGCAGAGGCGGGAGATGGTGGCACAGCAGC  
ATCGGCTGCGACAGATCCAGGAGAGACTCCACACAGCGGCGCTCCCAGCC  
TGAATCTGCCTGGATGGAAGTGAAGGACCAATCATGCTGCAAGGAACACTTCCAC  
GCCCCGTGAGGCCCCCTGTGCAGGGAGGAGCTGCCTGTTCACTGGGATCAGCCAG  
GGCGCCGGGCCCCACTTCTGAGCACAGAGCAGAGACAGACGCAGGCGGGGACA  
AAGGCAGAGGATGTAGCCCCATTGGGGAGGGGTGGAGGAAGGACATGTACCTT  
TCATGCCTACACACCCTCATTAAAGCAGAGTCGTGGCATCTCAAAAAAAAAA  
AAAAAA)

图8G

图 8H 示例性的经改造的 *Angptl8* 氨基酸(SEQ ID NO:8):

MPVPALCLLWALAMVTRPASAAPMGGPELAQHEELTLLFHGTLQLGQALNGVYRT  
TEGRLTKARNSLGLYGRTIELLGQEVSRGRDAAQELRASLLETQMEEDILQLQAEAT  
AEVLGEVAQAQKVL RDSVQRLEVQLRSAWLGPAYREFEVLKAHADKQSHILWALT  
GHVQRQRREMVAQQHRLRQIERLHTAALPA

图8H



图 8I 示例性的用于改造非人 *Angptl8* 基因(SEQ ID NO:9)的合成 DNA 片段:

CCAGTGCCTGCTCTGTGCCTGCTCTGGGCCCTGGCAATGGTGACCCGGCCTGCCTCAGC  
GGCCCCCATGGGCGGCCAGAACTGGCACAGCATGAGGAGCTGACCTTGCTCTTCCATG  
GGACCCTGCAGCTGGGCCAGGCCCTCAACGGTGTGTACAGGACCACGGAGGGACGGCT  
GACAAAGGCCAGGAACAGCCTGGGTCTCTATGGCCGCACAATAGAACTCCTGGGGCAG  
GAGGTGAGCCGGGGCCGGGATGCAGCCCAGGAACTTCGGGCAAGCCTGTTGGAGACTC  
AGGTGGGCACCGTAGCTGCGACACTGTGGGGTGGCCAGGAGTCCAAAGAGGAGTTCGT  
GTCTAGGGTAACCAACCATCCTGGTTTGCCAGGACTGAAGGGATTCTTGGGATACAAG  
ATTTTCAGCGATAAACTCAGGCAAGTCCTTAGGTACACAAAGATGAGTTGGACATCCTA  
CTAGTGACCCACTGTTTATTAAGCAGATGGAGGAGGATATTCTGCAGCTGCAGGCAGAG  
GCCACAGCTGAGGTGCTGGGGGAGGTGGCCCAGGCACAGAAGGTGCTACGGGACAGCG  
TGCAGCGGCTAGAAGTCCAGCTGAGGAGCGCCTGGCTGGGCCCTGCCTACCGAGAAATT  
GAGGTCTTAAAGGTAAGGAGCTCCCCAACCCTAGTGGGCTGAGACCCTGATTTCCGGC  
CAGAACTCGCTTCTGCACCTTGAGTCCCAAAGACCTCCCAGATCAGCCTCCCAGCTCTGT  
GGCCTCTACCCTGCATGTCCCCAGACAAAACCTCAAGTCCTTTTGTGTGCCTCAGTTTCCC  
TTTTGTGTGCCTCAGTTGCAATAAGGGCAACACCTGATATCTCACAGTAGGGCCAGGT  
ACTCAATGCAGGTAAAATATTACAGCATGGGGCGGGCACACAGTTGGTGCTCAATAAATT  
CTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGAGTCTCACTGTTGCCAGGCTGGAGTGCACTGGTGT  
GATCTTGGCTCACTGCAACCTCCACCTCCTAGGTTCAAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCTC  
CTGAGTAGCTGGAATTACAGGTGCACCAGCTAATTTTTGTATTTTTTAGTAGAGATGGG  
ATTTACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAAGGGATCTGCCTGCCTC  
GGTTTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACTACACCTGGCCAATAAATTCTT  
ACTACTAGAGAACTGGTAACATTTTGTGAGCACCCAGTAAGTACCCAGCACTGTTCTA  
TGCCCTTTAATAATCCATATGATGGCCGGGCATGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCA  
CTTTGGGTAGCTAAGGTGGGTGGAACACTTAAGGTGAGGAGTTCGAGACCACCTGGCC  
AACATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCTGGGCGTGGTGGCAC  
ATGCCTGTAGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTTAGGTAGGAGAATCGCTTGAACCTGGGAG  
GTGGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATCGTGTCAATTGCACTCAGCCTGGGTGACAGAGAGA  
GACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCATAGGATGTTTCATCACCTCCCCATGAAGTGAGTCCT  
ATTTTATCCCCATTTTACAGATGGGGAACTGAGGCCAAAGAGCATTGTTGACTTGCTG  
GGTCACACAGATAACAATGAGGGGCTGGGGCAGAGGGTCAGGGGATGGGAGGTGAGGT  
GGCTGTGGCTGAGGTTTCCATTCTGACCCCCACAGGCTCACGCTGACAAGCAGAGCCA  
CATCCTATGGGCCCTCACAGGCCACGTGCAGCGGCAGAGGCGGGAGATGGTGGCACAG  
CAGCATCGGCTGCGACAGATCCAGGAGAGGTGAGCCTGGCAGGGGTTTGGCAGGCAGG  
GCAGTTGGATGGGGGGCGCACAGGGCAGCTGGAAAGGGGCCCCCTCACCTGGGCTGAG  
CCACATCTCCCTCCCCAGACTCCACACAGCGCGCTCCCAGCCTGAATCTGCCTGGATG  
GAACTGAGGACCAATCATGTGCAAGGAACACTTCCACGCCCCGTGAGGCCCTGTGCA  
GGGAGGAGCTGCCTGTTCACTGGGATCAGCCAGGGCGCCGGGCCCCACTTCTGAGCACA  
GAGCAGAGACAGACGAGGCGGGGACAAAGGCAGAGGATGTAGCCCCATTGGGGAGG  
GGTGGAGGAAGGACATGTACCCTTTCATGCCTACACACCCCTCATTAAAGCAGAGTCGT  
GGCATCTCACCCAGGGTGTCTGTGTGTGCTTGGCTTAGGGAGACCCACCCAGCATG  
ATGTATGAATACCTCCCATTCAAGTGCCCA

图8I

图 8J 示例性的包括选择盒的经改造的 *Angptl8* 等位基因(SEQ ID NO:10):

[7182 等位基因]CACGAAACTGTCAGCCATGCCAGTGCCTGCTCTGTGCCTGCTCTGGGCCC  
TGGCAATGGTGACCCGGCCTGCCTCAGCGGGCCCCCATGGGCGGGCCAGAACTGGC  
ACAGCATGAGGAGCTGACCCTGCTCTTCCATGGGACCCTGCAGCTGGGCCAGGCC  
CTCAACGGTGTGTACAGGACCACGGAGGGACGGCTGACAAAGGCCAGGAACAGCC  
TGGGTCTCTATGGCCGCACAATAGAACTCCTGGGGCAGGAGGTGAGCCGGGGCCG  
GGATGCAGCCCAGGAACTTCGGGCAAGCCTGTTGGAGACTCAGGTGGGCACCGTA  
GCTGCGACACTGTGGGGTGGCCAGGAGTCCAAAGAGGAGTTCGTGTCTAGGGTAA  
CCAACCATCCTGGTTTGGCCAGGACTGAAGGGATTCTGGGATACAAGATTTTCAG  
CGATAAACTCAGGCAAGTCCTTAGGTACACAAAGATGAGTTGGACATCCTACTAGT  
GACCCACTGTTTATTAAGCAGATGGAGGAGGATATTCTGCAGCTGCAGGCAGAGG  
CCACAGCTGAGGTGCTGGGGGAGGTGGCCAGGCACAGAAGGTGCTACGGGACA  
GCGTGCAGCGGCTAGAAGTCCAGCTGAGGAGCGCCTGGCTGGGCCCTGCCTACCG  
AGAATTTGAGGTCTTAAAGGTAAGGAGCTCCCCAACCCCTAGTGGGCTGAGACCC  
TGATTTCCGGCCAGAACTCGCTTCTGCACCTTGAGTCCCAAAGACCTCCAGATCA  
GCCTCCCAGCTCTGTGGCCTCTACCCTGCATGTCCCAGACAAAACCTCAAGTCCTT  
TTGTGTGCCTCAGTTTCCCTTTTGTGTGCCTCAGTTGCAAATAAGGGCAACACCTG  
ATATCTCACAGTAGGGCCAGGTACTCAATGCAGGTAATAATTCAGCATGGGGCG  
GGCACACAGTTGGTGCTCAATAAATTTCTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACAGAGTCTC  
ACTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGTGATCTTGGCTCACTGCAACCTCCACC  
TCCTAGGTTCAAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGAATTACAGGT  
GCACCAGCTAATTTTGTATTTTGTAGTAGAGATGGGATTTACCATGTTGGCCAG  
GCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAAGGGATCTGCCTGCCTCGGTTTCCCAAAGTGC  
TGGGATTACAGGTGTGAGCCACTACACCTGGCCAATAAATTTCTTACTACTAGAGAA  
ACTGGTAACATTTTGTGAGCACCCAGTAAGTACCCAGCACTGTTCTATGCCCTTTA  
ATAATCCATATGATGGCCGGGCATGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGG  
GTAGCTAAGGTGGGTGGAACACTTAAGGTGAGGAGTTCGAGACCACCCTGGCCAA  
CATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCTGGGCGTGGTGGCA  
CATGCCTGTAGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTTAGGTAGGAGAATCGCTTGAACCT  
GGGAGGTGGAGGTGTCAGTGAGCTGAGATCGTGTGATTGCACTCAGCCTGGGTGA  
CAGAGAGAGACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCATAGGATGTTTCATCACCTCCCCATG  
AAGTGAGTCCTATTTTATCCCCATTTTACAGATGGGGAACTGAGGCCAAAGAGCA  
TTGTTGACTTGCTGGGTACACAGATACAATGAGGGGCTGGGGCAGAGGGTCAGG  
GGATGGGAGGTGAGGTGGCTGTCGGCTGAGGTTTCCATTCTGACCCCCACAGGCT  
CACGCTGACAAGCAGAGCCACATCCTATGGGCCCTCACAGGCCACGTGCAGCGGC  
AGAGGCGGGAGATGGTGGCACAGCAGCATCGGCTGCGACAGATCCAGGAGAGGT  
GAGCCTGGCAGGGGTTTGGCAGGCAGGGCAGTTGGATGGGGGGCGCACAGGGCA  
GCTGGAAGGGGGCCCCCTCACCTGGGCTGAGCCACATCTCCCTCCCCAGACTCCA  
CACAGCGGCGCTCCCAGCCTGAATCTGCCTGGATGGAACTGAGGACCAATCATGC  
TGCAAGGAACACTTCCACGCCCCGTGAGGCCCCCTGTGCAGGGAGGAGCTGCCTGT  
TCACTGGGATCAGCCAGGGCGCCGGGCCCACTTCTGAGCACAGAGCAGAGACAG

图8J

ACGCAGGCGGGGACAAAGGCAGAGGATGTAGCCCCATTGGGGAGGGGTGGAGGA  
AGGACATGTACCCTTTTCATGCCTACACACCCCTCATTAAAGCAGAGTCCGTGGCATC  
TCACCCAGGGTGTCTGTGTGTGTCTTGGCTTAGGGAGACCCACCCAGCATGAT  
GTATGAATACCTCCCATTCAGTGCCCActcagataactcgtataatgtatgtatagaaagtatatgcatggcct  
ccgcgcgggttttggcgctcccgcgggcgccccctctcacggcgagcgctgccacgtcagacgaaggcgagcgagcgctgac  
cttccgccggagcgtcagacagcgggcgctgctcataagactcgcccttagaacccagatcagcagaaggacatttaggacgggactf  
gggtgactctagggactggttttcttcagagagcggaacaggcgaggaagtagtccctctcggcgattctcgaggagatccgtggg  
gcggtgaacggcgatgattatataaggacgcgcgggtgtggcgacagctagttccgtcgcagccgggatttgggtcgggtctgttggatc  
gctgtgacgtcacttggtagtagcggtgtgtgggtggcggttctgtggcgccggcgctcgggtggagcggaagcgtgtggaga  
gaccgccaagggtgtgtgtgggtccgcgagcaagggttgcctgaactgggggttggggggagcgagcaaaatggcggtgttccgagt  
cttgaatggaagacgttgtgagcggggtgtgaggtcgttgaacaagggtggggggcatgtggcgcgcaagaaccaaggcttggagcct  
tcgtaatgcgggaaagctcttattcggtgagatgggtggggcaccatctggggaccctgacgtgaagttgtcactgactggagaactcgtt  
tgtgtctgttggggggcgagttatggcggtgcccgttggcgagtgacccgtaccttgggagcgcgccccctgtgtgtgtgacgtcac  
ccgttctgttggcttataatgcagggtggggccacctgcgggtaggtgtgcccgtaggttttctcgtcgcagacgcagggttccggcctagggt  
aggctctctgaatgcagagcgcccgaccctgtgtgaggggaggggataagtgaggcgctcagtttcttggctgggttattgtacctatctttaa  
tagctgaagctccggtttgaaciatgcgtcgggggttggcgagtgtgttggaggttttaggcacctttgaaatgtaatcatttgggtcaaatgt  
aatttcagttgtagactagtaaatgtccgctaaatctggcggttttggctttttgttagacgtgttgacaatfaatcatcgcatagatatacggcata  
gtataatacgacaaggtaggaacfaaacatgggacgcgccattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggcgcttgggtggagaggc  
tattcggctatgactgggcacacagacaatcggtctgtctgtatgcgcggttccggctgtcagcgagggcgcccggttcttctgtcaaga  
ccgacctgtccggtgccccgaatgaactgcagacgagggcagcgcggtatctgtggtcggcacgagggcggttccgtgcgacgtgtgtcgc  
acgtgtcactgaagcgggaggggactggctgtattggcgcaagtgccggggcaggtatctctgtcatctaccctgtctcgtccgagaaagta  
tccatcatgggtgatcaatgcggcggtgtcatagctgtatcccgctaccctgaccaccaagcgaaacatcgatcggagcgagac  
gtacgcggtatggaagccggtgtgtgtgtatcaggtatgtgtgacgaagagcatcaggggtcgcgcgacccgaactgttgcgagggctcaagg  
cgcgcatgcccgcagcgcatgtctgtcgtgacccatggcgatgctgtgcccgaatatcatggtggaaatggcgcttcttctggtatcgc  
actgtggcgcggttgggtgtgtggcgaccgctatcaggacatagcggttggctaccctgtatgtgtaagagcttggcggaatgggtgacgg  
cttctcgtgtcttaccgtatcgccgtctccgattcgagcgcatcgcccttctatcgcccttctgacgagttcttctgaggggacccgtgtgaagctgt  
cagaaatgtatgtatataaacaataaagatgtccactaaaatggaggttttctgtcacttcttgaagaagggtgagaaacagagtaacctatctt  
gaatggagggattggagctacgggggtgggggtgggtgtgggttagataaatgctgtcttcttactgaaggctcttactattgtttatgataatgtt  
tcatagttggatacataatfaaacaagcaaaacaaatfaaggggcagctcatctccactcatgatctatagatctatagatctctgtggatc  
attgttttctcttattccactttgtgttctaaagtactgtgtttccaatgtgtcagttcatagcctgaagaacgagatcagcagccctgttccaca  
tacacttcaattcagattgttttggcaagttctaattccatcagacctgcacctgcagccctagccggggcgccagtagcagcaccacgtccac  
cttctgtctagtaatgtcacaacctccctcagtcacaacctgtctgtcatcctgtgtgctcccaattatacctgaagcactgtatggggcctcaatgt  
tttactagagccaccccttgaactctgagacctctggatttgtgtgtcagtgccctactggggcggttggataatttctaaagggtcaagttccc  
tcagcagcattctctgagcagctgaagatgtgtgtttcacagttcaaatccatgtggctgttccaccactgacctggccttgggttattctatcagg  
acctagcctagaagcaggtgtgtgtggcacttaacacctaagctgagtgactaactgaacacicaagtggaatgccalcitgtcacttctgactgtgac  
acaagcaactcctgatgccaaagccctgccacccctctatgccatatttggacatggtacaggtcctcactggccatggtctgtgaggtcctg  
gtcctcttgaactcataattcctagggggcactagatctataagaggaagagggtgtgtgtgtccagggccacagccacaaaaatccacctgtc  
acaggttggctgtgtcgaaccaggtgtgtgtccctgtctgagccagctcccggccaagccagcaccatgggtacccccagaagaagagga  
agggtgcgtaccgatttaattcaatttaccgtacacaaaatttgcctgacattaccggtcgtatgaacgagtgatgaggttcgaagaacct  
gatggacatgttcagggtatccaggcggtttctgagcatacctggaaaatgcttctgtccgttggcggtcgtggggcgcatggtgcaagtgaat  
aaccggaaatggttcccgagaacctgaagatgttcgagattatcttatacttcaggcgcgcggtctggcagtaaaaaciatccagcaacatt  
ggggcagctaaacatgttcatcgtcgtgtccgggtgccacgaccaagtgacagcaatgtgttctactggttatgcggcggtatccgaaagaaa  
acgttgatccgggtgaacgtgcaaaacaggtctatgcgttcgaacgcactgatttcgaccaggttcgttctactcatgaaatagtgatcgtgcc

图8J (续)

aggatatacgtaatctggcatttctggggattgcttataacacccctgttacgfatagccgaaattgccagatcagggttaaagatatctcacgtactg  
acgggtgggagaatgttaatccatattggcagaacgaaacgctgggttagcaccgaggtgtagagaaggcacttagcctgggggtaactaaact  
ggtcgagcgatggattccgtctctgtgtgagctgatgccgaataactaactgttttggcgggtcagaaaaatgtgttgcgcgccatctgcc  
accagccagctatcaactcgcgccctggaagggaattttgaagcaactcaicgattgatttacggcgctaaggtaaataaaaaattttaagtgtataa  
tgtgttaactactgattctaattgtttgtgtatttaggatgactctggtcagagataacctggcctggctggacacagtgcccgtgtcggagccgcg  
cgagatatggccgcgctggagttcaataccggagatcatgcaagctgggtggctggaccaatgtaaatattgtcatgaactatatccgtaacctgg  
atagtgaacaggggcaatgggtgcgcctgctggaagatggcgattgatctagataagtaatgatcfaatcagccatafcacatctgtagaggttt  
acttgctttaaaaaacctcccacacctccccgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgtttgttaaacctgccctagttgcggccaattccag  
ctgagcgtgcctccgcaccattaccagttggctgtgtcaaaaataataaaccgggcaggggggatctaagctctagataagtaatgatcata  
atcagccatafcacatctgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgtttgttaa  
ctgtttattgcagcttataatgggttacaataaaagcaatagcatcacaatttcacaataaaacattttttactgcattctagttgtgtttgtccaaa  
ctcatcaatgtatcttcatgtctggaataacttcgtataatgtatgtatatacgaagttatgctagtaactataacggctctaaggtagcgagctagcG  
ATGCCACCGAGGACCAGTTGTGCTGCAAGGAACACTGAAGCGCTCCACCAGGCCCATG  
AACAGGGCTGACAGAG

图8J (续)

图 8K 示例性的在重组酶介导的选择盒切除后的经改造的 *Angptl8* 等位基因(SEQ ID NO:11):

[7183 等位基因]CACGAAACTGTCAGCCATGCCAGTGCCTGCTCTGTGCCTGCTCTGGGCCC  
TGGCAATGGTGACCCGGCCTGCCTCAGCGGCCCCCATGGGCGGCCAGAACTGGC  
ACAGCATGAGGAGCTGACCCTGCTCTTCCATGGGACCCTGCAGCTGGGCCAGGCC  
CTCAACGGTGTGTACAGGACCACGGAGGGACGGCTGACAAAGGCCAGGAACAGCC  
TGGGTCTCTATGGCCGCACAATAGAACTCCTGGGGCAGGAGGTGAGCCGGGGCCG  
GGATGCAGCCCAGGAACTTCGGGCAAGCCTGTTGGAGACTCAGGTGGGCACCGTA  
GCTGCGACACTGTGGGGTGGCCAGGAGTCCAAAGAGGAGTTTCGTGTCTAGGGTAA  
CCAACCATCCTGGTTTGGCCAGGACTGAAGGGATTCTGGGATACAAGATTTTCAG  
CGATAAACTCAGGCAAGTCCTTAGGTACACAAAGATGAGTTGGACATCCTACTAGT  
GACCCACTGTTTATTAAGCAGATGGAGGAGGATATTCTGCAGCTGCAGGCAGAGG  
CCACAGCTGAGGTGCTGGGGGAGGTGGCCAGGCACAGAAGGTGCTACGGGACA  
GCGTGCAGCGGCTAGAAGTCCAGCTGAGGAGCGCCTGGCTGGGCCCTGCCTACCG  
AGAATTTGAGGTCTTAAAGGTAAGGAGCTCCCCAACCCTAGTGGGCTGAGACCC  
TGATTTCCGGCCAGAACTCGCTTCTGCACCTTGAGTCCCAAAGACCTCCCAGATCA  
GCCTCCAGCTCTGTGGCCTCTACCCTGCATGTCCCCAGACAAAACCTCAAGTCCTT  
TTGTGTGCCTCAGTTTCCCTTTTGTGTGCCTCAGTTGCAAATAAGGGCAACACCTG  
ATATCTCACAGTAGGGCCAGGTAATCAATGCAGGTAATAATTCAGCATGGGGCG  
GGCACACAGTTGGTGCTCAATAAATTTCTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACAGAGTCTC  
ACTGTTGCCCAGGCTGGAGTGAGTGCTGATCTTGGCTCACTGCAACCTCCACC  
TCCTAGGTTCAAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGAATTACAGGT  
GCACCAGCTAATTTTGTATTTTGTAGTAGAGATGGGATTTCACCATGTTGGCCAG  
GCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAAGGGATCTGCCTGCCTCGGTTTCCCAAAGTGC  
TGGGATTACAGGTGTGAGCCACTACACCTGGCCAATAAATTTCTTACTACTAGAGAA  
ACTGGTAACATTTTGTGAGCACCCAGTAAGTACCCAGCACTGTTCTATGCCCTTTA  
ATAATCCATATGATGGCCGGGCATGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGG  
GTAGCTAAGGTGGGTGGAACACTTAAGGTGAGGAGTTCGAGACCACCTGGCCAA  
CATGGTGAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCTGGGCGTGGTGGCA  
CATGCCTGTAGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTTAGGTAGGAGAATCGCTTGAACCT  
GGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATCGTGTCAATTGCACTCAGCCTGGGTGA  
CAGAGAGAGACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCATAGGATGTTTCATCACCTCCCCATG  
AAGTGAGTCTTATTTATCCCCATTTTACAGATGGGGAAACTGAGGCCAAAGAGCA  
TTGTTGACTTGCTGGGTACACAGATACAATGAGGGGCTGGGGCAGAGGGTCAGG  
GGATGGGAGGTGAGGTGGCTGTGCGGTGAGGTTTCCATTCTGACCCCCACAGGCT  
CACGCTGACAAGCAGAGCCACATCCTATGGGCCCTCACAGGCCACGTGCAGCGGC  
AGAGGCGGGAGATGGTGGCACAGCAGCATCGGCTGCGACAGATCCAGGAGAGGT  
GAGCCTGGCAGGGGTTTGGCAGGCAGGGCAGTTGGATGGGGGGCGCACAGGGCA  
GCTGGAAAGGGGCCCCCTCACCTGGGCTGAGCCACATCTCCCTCCCCAGACTCCA  
CACAGCGGCGCTCCAGCCTGAATCTGCCTGGATGGAAGTGAAGACCAATCATGC  
TGCAAGGAACACTTCCACGCCCGGTGAGGCCCTGTGCAGGGAGGAGCTGCCTGT  
TCACTGGGATCAGCCAGGGCGCCGGGCCCACTTCTGAGCACAGAGCAGAGACAG  
ACGCAGGCGGGGACAAAGGCAGAGGATGTAGCCCCATTGGGGAGGGGTGGAGGA  
AGGACATGTACCTTTTCATGCCTACACACCCCTCATTAAGCAGAGTCGTGGCATC  
TCACCCAGGGTGTCTGTGTGTCTTGGCTTAGGGAGACCCACCCAGCATGAT  
GTATGAATACCTCCATTCAAGTGCCCActcgagataactcgtataatgtatgctatacgaagtatgctagtaacta  
taacggctctaaggtagcgagctagcGATGCCACCGAGGACCAGTTGTGCTGCAAGGAACACTGAAGC  
GCTCCACCAGGCCCATGAACAGGGCTGACAGAG

图8K

(AAGGCAGCCG CAGCGGCCCG GGAACCACAC CCACGAAACT GTCAGCCATG)  
CCAGTGCCTG CTCTGTGCCT GCTCTGGGCC CTGGCAATGG TGACCCGGCC  
(SEQ ID NO:15)

图9A

GGGAGACCCC ACCCAGCATG ATGTATGAAT ACCTCCCATT CAAGTGCCCA  
(*CTCGAG* **ATAACTTCG TATAATGTAT GCTATACGAA GTTAT** ATGCATGGCC  
TCCGCGCCGG GTTTTGGCGC CTCCCGCGGG CGCCCCCTC CTCACGGCGA  
GCGCTGCCAC GTCAGACGAA GGGCGCAGCG AGCGTCCTGA)(SEQ ID NO:16)

图9B

(TTTCACTGCAT TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA ACTCATCAAT GTATCTTATC  
ATGTCTGGA **ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT**  
GCTAGTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGA *GCTAGC*) GATGCCACCGA  
GGACCAGTTGT GCTGCAAGGAA CACTGAAGCG CTCCACC(SEQ ID NO:17)

图9C

GGGAGACCCC ACCCAGCATG ATGTATGAAT ACCTCCCATT CAAGTGCCCA  
(*GTCGAG* **ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT**  
GCTAGTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGA *GCTAGC*) GATGCCACCG  
AGGACCAGTT GTGCTGCAAG GAACACTGAA GCGCTCCACC(SEQ ID NO:18)

图9D