



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101970004 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 09

(21) 申请号 200880127172. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 12. 19

A61K 39/395 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 35/00 (2006. 01)

12/005054 2007. 12. 20 US

C07K 16/22 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 08. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/013899 2008. 12. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02009/085209 EN 2009. 07. 09

(71) 申请人 瓦斯基基因治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 P · 吉尔 R · 刘

V · 克拉斯诺佩洛夫

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公

司 72001

代理人 赵向辉 李连涛

权利要求书 2 页 说明书 34 页 序列表 14 页

附图 26 页

(54) 发明名称

使用和鉴定 δ 样 4 的调节子的方法

(57) 摘要

在一些实施方式中, 本发明提供了鉴定和使用 δ 样 4 (D114) 信号传导的激动剂和拮抗剂的方法。

1 MAAASSASG WALLLLVALW QRAAGSGVF QLQLQEFIN RGVLASGRPC EPGCRITFRV
61 CLKHFQAVVS PGPCFTGTVS TPVLGTNSFA VRDDSSGGGR NPLQLPFNET WPGTFSLIIE
121 AKHAPGDDL R PEARPPDALI SKIAIQGSLA VGQNWLLDEQ TSTILTRLVYS YRVICSDNY
181 GDNCSRLLCKK RNDHFGHYVC QPDGNLSCLP GWTGEYQQP ICLSGCHEQN GYCSKPAECL
241 CRPGWQGRIC NECIPHNGCR HGTCSTFWQC TCDEGWGGLF CDQDLNYCTH HSPCKNGATC
301 SNSGQRSYTC TCRPGYTGVD CELELSECD S NPCRNGGSCK DQEDGYHCLC PPGYYGLHCE
361 HSTLSCADSP CFNGGSCRER NQGANVACEC PFNFTGSNCE KKVDRCTSNP CANGGQCINR
421 GFSRMCRCRP GETGTyceLH VSDCARNPCA HGGTCHDLEN GLMCTCPAGF SGRRCCEVRTS
481 IDACASSPCF NRATCYTDLS TDTFVCNCFY GFVGSRCFFP VGLPPSPFWV AVSLGVGLAV
541 LLVLLGMVAV AVRQLRLRRP DDGSRAMNN LSDFQKDNLI PAAQLKNTNQ KKELEVDCGL
601 DKSNCGRQON HTLDYNLAPG PLGRGTMPGK FPHSDKSLGE KAPLRLHSEK PECRISAICS
661 PRDSMYQSV C LISEERNECV IATEV

人类 δ 样 4 蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1; GenBank NP_061947)

1. 一种用于治疗癌症的方法,所述方法包括给予有此需要的受试者有效量的 D114 拮抗剂。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述 D114 拮抗剂是包含 D114 的细胞外区域的多肽。
3. 权利要求 2 的方法,其中所述拮抗剂与赋予增强的药物动力学性质的部分共价连接。
4. 权利要求 3 的方法,其中所述部分选自 Fc 结构域、His 标签或聚氧化烯部分。
5. 权利要求 2 的方法,其中所述拮抗剂包含 SEQ ID NO:1 的 DSL 结构域或其变体。
6. 权利要求 2 的方法,其中所述拮抗剂包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 27-524,或其变体。
7. 权利要求 2 的方法,其中所述拮抗剂包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-486,或其变体。
8. 权利要求 2 的方法,其中所述拮抗剂包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 27-486,或其变体。
9. 权利要求 2 的方法,其中所述拮抗剂包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-442,或其变体。
10. 权利要求 2 的方法,其中所述拮抗剂包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 27-442,或其变体。
11. 权利要求 1 的方法,其中所述拮抗剂是与 D114 的细胞外区域结合的抗体或其片段。
12. 权利要求 11 的方法,其中所述抗体是单克隆抗体。
13. 权利要求 11 的方法,其中所述抗体是人类的或人源化抗体。
14. 权利要求 11 的方法,其中所述抗体与赋予增强的药物动力学性质的部分共价连接。
15. 权利要求 14 的方法,其中所述部分选自 Fc 结构域、His 标签或聚氧化烯部分。
16. 权利要求 11 的方法,其中所述抗体包含 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5。
17. 权利要求 11 的方法,其中所述抗体包含 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7。
18. 一种用于抑制血管生成的方法,所述方法包括给予有此需要的受试者有效量的 D114 信号传导的拮抗剂。
19. 权利要求 18 的方法,其中所述 D114 的拮抗剂是包含 D114 的细胞外区域的多肽。
20. 权利要求 19 的方法,其中所述拮抗剂与赋予增强的药物动力学性质的部分共价连接。
21. 权利要求 20 的方法,其中所述部分选自 Fc 结构域、His 标签或聚氧化烯部分。
22. 权利要求 19 的方法,其中所述拮抗剂包含 SEQ ID NO:1 的 DSL 结构域或其变体。
23. 权利要求 19 的方法,其中所述拮抗剂包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 27-524,或其变体。
24. 权利要求 19 的方法,其中所述拮抗剂包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-486,或其变体。
25. 权利要求 19 的方法,其中所述拮抗剂包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 27-486,或其变体。
26. 权利要求 19 的方法,其中所述拮抗剂包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-442,或其变体。
27. 权利要求 19 的方法,其中所述拮抗剂包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 27-442,或其变体。
28. 权利要求 18 的方法,其中所述拮抗剂是与 D114 的细胞外区域结合的抗体或其片

段。

29. 权利要求 28 的方法,其中所述抗体是单克隆抗体。
30. 权利要求 28 的方法,其中所述抗体是人类的或人源化抗体。
31. 权利要求 28 的方法,其中所述抗体与赋予增强的药物动力学性质的部分共价连接。
32. 权利要求 31 的方法,其中所述部分选自 Fc 结构域、His 标签或聚氧化烯部分。
33. 权利要求 28 的方法,其中所述抗体包含 SEQ ID NO:4 或 SEQ IDNO:5。
34. 权利要求 28 的方法,其中所述抗体包含 SEQ ID NO:6 或 SEQ IDNO:7。
35. 权利要求 18 的方法,其中所述拮抗剂在哺乳动物内皮细胞中以有效的浓度抑制 VEGF 刺激的血管生成。
36. 权利要求 18 的方法,其中所述受试者患有血管生成相关疾病。
37. 权利要求 18 的方法,还包括给予至少一种另外的抗血管生成剂,述另外的抗血管生成剂与所述拮抗剂一起以加成或协同方式抑制血管生成。
38. 权利要求 37 的方法,其中所述另外的抗血管生成剂是 Notch 受体的抑制剂。
39. 权利要求 18 的方法,其中所述 D114 信号传导的拮抗剂抑制哺乳动物内皮细胞中动脉表型的表达。
40. 权利要求 39 的方法,其中所述动脉表型选自 EphrinB2 的表达和连接蛋白 37 的表达。
41. 权利要求 18 的方法,其中所述 D114 信号传导的拮抗剂抑制 Notch 调节的基因。
42. 一种用于抑制 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 阳性细胞向血管募集的方法,该方法包括给予有此需要的受试者有效量的 D114 信号传导的抑制剂。
43. 权利要求 42 的方法,其中所述抑制剂选自:D114 的抗体或其片段、可溶性 D114-His 融合物或可溶性 D114-Fc 融合物。
44. 权利要求 42 的方法,其中所述 α -SMA 阳性细胞选自:周细胞、平滑肌细胞或周内皮细胞。
45. 权利要求 42 的方法,其中所述血管是静脉移植物。
46. 权利要求 42 的方法,其中所述静脉移植物是隐静脉移植物。
47. 权利要求 42 的方法,其中所述受试者患有血管生成相关疾病。
48. 一种与位于 D114 的细胞外部分中的表位结合的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分。
49. 权利要求 48 的分离的单克隆抗体,其中所述抗体或其抗原结合部分与位于选自以下的结构域中的表位结合:MN1L、DSL、以及一个或多个 EGF 重复。
50. 权利要求 48 的分离的单克隆抗体,其中所述抗体是人源化抗体。
51. 权利要求 48 的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含含有 SEQ IDNO:4 或 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列。
52. 权利要求 48 的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含含有 SEQ IDNO:6 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列。

使用和鉴定 δ 样 4 的调节子的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求申请日为 2007 年 12 月 20 日的美国专利申请系列号 12/005,054 的优先权,美国专利申请系列号 12/005,054 是申请日为 2006 年 9 月 1 日的美国专利申请系列号 11/514,773 的部分继续申请,美国专利申请系列号 11/514,773 要求申请日为 2005 年 9 月 1 日的美国临时申请系列号 60/713,637 的优先权。美国专利申请系列号 12/005,054 还要求申请日为 2006 年 12 月 20 日的美国临时申请系列号 60/876,444 的优先权和申请日为 2007 年 2 月 16 日的美国临时申请系列号 60/901,754 的优先权。以上提及的所有申请的教导均通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 血管生成,即从预先存在的脉管系统的内皮发育出新的血管,是宿主内的实体瘤生长、进展和转移的关键过程。在生理学上正常的血管生成过程中,血管内皮与其邻近基质成分的自分泌、旁分泌和双分泌相互作用在空间和时间上均受到严格调控。另外,促血管生成和抑制血管生成的细胞因子和生长因子的水平和活性保持平衡。相反,活性肿瘤生长所需的病理性血管生成是持续且持久的,这代表了正常血管生成系统的失调。实体瘤和造血系统肿瘤类型尤其与高水平的不正常的血管生成相关联。最近,显而易见的是,某些类型的白血病也受到血管生成中涉及的信号传导的影响。

[0004] 抑制血管生成的试剂在治疗癌症中是有用的。Avastin™(贝伐珠单抗),其为与血管内皮生长因子(VEGF)结合的单克隆抗体,被证明在治疗多种癌症中是有效的。SDF/CXCR4 信号传导途径的拮抗剂抑制肿瘤血管新生并且对于抵抗小鼠模型中的癌症是有效的(Guleng 等人, Cancer Res. 2005 Jul 1 ;65(13) :5864-71)。已经完成了异香豆素 2-(8-羟基-6-甲氧基-1-氧-1H-2-苯并吡喃-3-基)丙酸(NM-3)作为口服生物可利用的血管生成抑制剂的 I 期临床评估。NM-3 在体外直接杀死内皮和肿瘤细胞,并且在治疗小鼠中的多种人类肿瘤异种移植中是有效的(Agata 等人, Cancer Chemother Pharmacol. 2005 Jun 10 ; 电子出版([Epub ahead of print]))。

[0005] 血管生成是其它的非致瘤性紊乱的特征。各种视觉紊乱,特别是增殖性视网膜病和年龄相关性黄斑变性,以及炎性紊乱,例如类风湿性关节炎和牛皮癣,均具有受影响组织的血管化增加的特征。抗血管生成剂对于治疗这些紊乱是有效的。Macugen™,一种与 VEGF 结合的适体(aptamer),已被证明在治疗血管新生(wet)年龄相关性黄斑变性中是有效的。TNF- α 拮抗剂在治疗类风湿性关节炎中的成功部分归功于对于炎性关节组织的抗血管生成效应(Feldmann 等人 Annu Rev Immunol. 2001 ;19 :163-96)。

[0006] 动脉生成,一个与血管生成相关但不同的过程,当预先存在的血管的腔增大而形成侧支时,发生动脉生成。心肌梗塞或外周缺血(例如肢体、肾脏等)后,微动脉变成传导力更加显著的血管,从而在供给受影响组织的主动脉阻塞之后维持血流。因此,促进动脉生成的试剂可用于治疗心肌梗塞和其它缺血事件,并且可以在检测到或怀疑发生部分动脉阻塞时用于预防缺血事件。

[0007] Notch 途径,特别是 Notch1 和 Notch4,参与血管生成过程。Notch 信号传导通常参与多种不同过程的调节,如细胞增殖、分化、特化和存活 (Artavanis-Tsakonas 等人,1999)。多种 Notch 受体和配体的存在显示了其在脊椎动物中的复杂性,每个均具有不同的表达模式。在哺乳动物中有 4 种 Notch 受体 (notch1-4) 和 5 种配体 (jagged1、2 和 D111、3 和 4)。在小鼠中,Notch 受体和配体的突变导致来自所有三个种系的各种器官,包括血管系统的异常 (Iso 等人,2003)。Notch 途径通过局部细胞的相互作用发挥作用,存在于一个细胞表面上的配体的细胞外结构域与邻近细胞上的受体的细胞外结构域发生相互作用。这种相互作用允许 Notch 的细胞外结构域上的两种 ADAM 蛋白酶发挥作用,然后跨膜结构域上的 γ -分泌酶发挥作用而将细胞内结构域从细胞膜释放,从而允许所述细胞内结构域被导入细胞核,在细胞核内,所述细胞内结构域与 CSL 发生作用以激活分裂增强子 (enhancer-of-split) 家族的转录抑制子的表达 (Mumm & Kopan,2000)。

[0008] 长期以来,人们认为动脉相对于静脉的分化主要依赖于物理因素,例如血压和氧浓度。但是,最近,鉴定了很多在产生循环很久之前即在动脉或静脉内皮细胞中特异性表达的基因,这似乎表明内皮细胞的遗传决定在动脉和静脉之间的初级分化事件中的重要作用。这些基因中有一种为 eph-B4,其在静脉内皮细胞中特异性表达 (Adams 等人,1999),另外还有 ephrin-B2 (Adams 等人,1999 ;Gale 等人,2001)、notch1 (Krebs 等人,2000)、notch4 (Uyttendaele 等人,1996) 和 d114 (Shutter 等人,2000),这些基因在动脉内皮细胞中特异性表达。

[0009] 以斑马鱼 Notch 同源物的突变进行的研究证明了该途径在血管内皮生长因子和 sonic-hedgehog 的下游和 ephrin 途径的上游调节动脉相对于静脉内皮分化的重要性 (Lawson 等人,2002),成为在内皮动脉特异性模式中最先表达的基因。在斑马鱼和小鼠中有越来越多的证据表明 Notch 功能对于动脉内皮细胞最终归宿的建立是必不可少的 (Lawson 等人,2002 ;Fischer 等人,2004 ;Duarte 等人,2004)。

[0010] 本公开的目标是提供用于调节血管生成、动脉生成和血管特性 (identity) 的试剂和治疗性处理。

[0011] 发明概述

[0012] 在一些方面,本公开提供了 Notch 配体 δ 样 4 (Delta-like 4, D114) 的激动剂和拮抗剂的用途和鉴定 Notch 配体 δ 样 4 (D114) 的激动剂和拮抗剂的方法。令人惊奇的是,如本文所教导,D114 的激动剂和拮抗剂均可用于治疗正在发生血管生成的肿瘤,或者,在其它情况下,如果需要的话,用于抑制或破坏血管生成。此外,本公开提供了通过给予 D114 激动剂刺激动脉生成的方法。动脉生成是副动脉形成和生长的过程,通常是在缺血组织中。因此,D114 激动剂可用于治疗患有或具有患上缺血事件 (例如外周或冠状动脉缺血) 风险的患者。本公开还涉及以下发现 :D114 的上调引起内皮细胞采纳 (adopt) 动脉特性,而 D114 的抑制则引起内皮细胞采纳静脉特性。因此,本公开提供了通过使用 D114 的激动剂或拮抗剂 (视情况) 而改变静脉或动脉特性的方法。另外,本公开提供了可用于评价目标试剂是否是 D114 信号传导的激动剂或拮抗剂的生物标志物。

[0013] 在一个实施方式中,本公开描述了用于治疗癌症的方法,包括给予有此需要的受试者有效量的 D114 的拮抗剂。该拮抗剂可以是多肽,特别是包含 D114 的细胞外区域的肽。在一个方面,多肽可以是单体,但也可以作为二体发挥作用。仅仅为了举例说明,包含 D114

的细胞外区域的多肽的例子可以选自 SEQ ID NO:1 的 DSL 结构域、氨基酸 27-524、氨基酸 1-486、氨基酸 27-486、氨基酸 1-442 和氨基酸 27-442、或其变体。此外,多肽可以包含 D114 的以下结构域中的至少一个,或其组合:MNNL、DSL、EGF5、EGF5(参见图 20A)。另外,D114 的拮抗剂可以包含与 D114 的细胞外区域结合的抗体或其片段。这样的抗体可以是单克隆的、人类的或人源化的。在特定的实施方式中,所述抗体可以包含 SEQ ID NO:4-7 中的至少一个。以上提及的所有的 D114 拮抗剂均可以与本文通篇所公开的赋予增强的药物动力学性质的部分共价连接。特别地,所述部分可以选自 Fc 结构域、His 标签或聚氧化烯(例如 PEG)。

[0014] 在另一个实施方式中,D114 的拮抗剂在哺乳动物内皮细胞中以有效浓度刺激动脉表型的表达。这样的表型可以选自,例如,EphrinB2 和连接蛋白(connexin)37 的表达。或者,D114 的拮抗剂在哺乳动物内皮细胞中以有效浓度抑制静脉表型的表达。这样的表型的例子可以是 EphB4 的表达。此外,静脉表型可以包括 Notch 调节的基因例如 Hey1、Hey2、Hes1 和 Hes2 的抑制。

[0015] 本公开还提供了用于在血管例如静脉移植物或隐静脉移植物中促进采纳(adoption)动脉特性的方法。该方法包括给予有此需要的受试者有效量的治疗性多肽,所述多肽包含 D114 的细胞外结构域。所述包含 D114 的细胞外结构域的多肽可以选自 SEQ ID NO:1 的 DSL 结构域、氨基酸 27-524、氨基酸 1-486、氨基酸 27-486、氨基酸 1-442 和氨基酸 27-442,所有这些均可以与本文通篇所公开的赋予增强的药物动力学性质的部分共价连接。特别地,所述部分可以选自 Fc 结构域、His 标签或聚氧化烯(例如 PEG)。这样的治疗性多肽可以是单体或二体,如上所述。

[0016] 在进一步的实施方式中,本公开提供了用于抑制血管生成的方法,该方法包括给予有此需要的受试者有效量的 D114 信号传导的拮抗剂。但是,在一些方面,该方法还可用于破坏血管生成。即,“抑制”血管生成可以不仅仅定义为阻止血管形成,还可定义为阻止功能性血管的形成。可用于抑制血管生成的拮抗剂可以是多肽,特别是包含 D114 的细胞外区域的肽。在一个方面,所述多肽可以是单体,但也可以作为二体发挥作用。包含 D114 的细胞外区域的多肽的一些例子可以选自 SEQ ID NO:1 的 DSL 结构域、氨基酸 27-524、氨基酸 1-486、氨基酸 27-486、氨基酸 1-442 和氨基酸 27-442、或其变体。此外,多肽可以包含 D114 的以下结构域中的至少一个,或其组合:MNNL、DSL、EGF5、EGF5(参见图 20A)。另外,D114 的拮抗剂可以包含与 D114 的细胞外区域结合的抗体或其片段。这样的抗体可以是单克隆的、人类的或人源化的。在特定的实施方式中,所述抗体可以包含 SEQ ID NO:4-7 中的至少一个。以上提及的所有的 D114 拮抗剂均可以与本文通篇所公开的赋予增强的药物动力学性质的部分共价连接。特别地,所述部分可以选自 Fc 结构域、His 标签或聚氧化烯(例如 PEG)。D114-Fc 偶合物的一些特定的例子的序列显示于图 25。

[0017] 此外,以上提及的任何 D114 信号传导的拮抗剂在哺乳动物内皮细胞中以有效的浓度抑制 VEGF 刺激的血管生成,并且可以通过给予该拮抗剂来治疗血管生成相关疾病。血管生成相关疾病的例子包括依赖于血管生成的癌症、良性肿瘤、炎性紊乱、慢性关节风湿病和牛皮癣、视觉血管生成性疾病、Osler-Webber 综合征、心肌血管生成、斑块血管新生、毛细血管扩张、血友病性关节病、血管纤维瘤、创面肉芽(wound granulation)、伤口愈合、毛细血管扩张性牛皮癣硬皮病、化脓性肉芽瘤、红变、关节炎和糖尿病性血管新生。另外,可以通过进

一步同时或依次给予至少一种另外的抗血管生成剂来抑制血管生成,所述另外的抗血管生成剂与所述拮抗剂一起以加成或协同方式抑制血管生成。在特定的实施方式中,所述另外的抗血管生成剂可以是 Notch 受体的抑制剂。

[0018] 本公开还证明了包含 D114 的细胞外结构域的部分的单体多肽在低浓度时促进血管生成而在较高浓度时抑制 VEGF 介导的血管生成。可溶性 D114 多肽在所有的浓度促进动脉化或动脉生成。因此,通过选择单体可溶性 D114 多肽的合适剂量,可以达到对于血管生成的不同效应。在一些实施方式中,可溶性 D114 多肽包含 SEQ ID NO :1 的 DSL 结构域(氨基酸 173-233)但缺少跨膜和细胞内部分(氨基酸 552-685)。任选地,D114 多肽包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸 27-528 的区域中的至少 200 个氨基酸。任选地,D114 多肽包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸 27-486 并且优选地包含氨基酸 27-524。在一些实施方式中,可溶性 D114 多肽包括赋予需要的药物动力学性质的部分,例如 Fc 结构域或聚氧化烯部分(例如 PEG)。

[0019] 在一些实施方式中,本公开提供了用于刺激动脉生成的方法。该方法可以包括给予有此需要的受试者有效量的 D114 信号传导的激动剂。所述受试者可以患有或具有患上缺血性病症的风险。该受试者可以患有冠状动脉疾病,包括,例如,绞痛,或可以患有心肌梗塞。该受试者可以患有外周动脉疾病,例如肢体、脑或器官例如肾脏中的缺血事件或部分阻塞。该受试者可以被诊断为具有患上缺血事件的风险。

[0020] 在一些实施方式中,本公开提供了用于促进在血管中采纳动脉特性的方法。这样的方法可以包括离体(ex vivo)给予血管或给予有此需要的受试者有效量的 D114 信号传导的激动剂。血管可以是静脉移植物,例如隐静脉移植物。

[0021] 在一些实施方式中,本公开提供了破坏血管生成的方法。这样的方法可以包括给予有此需要的受试者有效量的 D114 信号传导的激动剂。

[0022] 在一些实施方式中,本公开提供了破坏肿瘤脉管系统的方法。这样的方法可以包括给予有此需要的受试者有效量的 D114 信号传导的激动剂。

[0023] 在一些实施方式中,本公开提供了用于评估测试试剂对于 D114 信号传导的效应的方法。该方法可以包括(a)使内皮谱系的细胞与测试试剂接触;和(b)检测与动脉或静脉表型相关的表型。促进采纳动脉表型的测试试剂或抑制采纳静脉表型的试剂是 D114 信号传导的激动剂,而抑制采纳动脉表型或促进采纳静脉表型的试剂是 D114 信号传导的拮抗剂。

[0024] 本公开提供了可用于区分 D114 信号传导的激动剂和拮抗剂的特征。一般地,D114 信号传导的激动剂在哺乳动物内皮细胞中刺激动脉表型的表达并且抑制静脉表型的表达。一般地,D114 信号传导的拮抗剂在哺乳动物内皮细胞中抑制动脉表型的表达并且刺激静脉表型的表达。可以为了评价动脉和静脉表型的目的而检测任何已知的区分动脉和静脉内皮细胞的特征。例如,EphrinB2 的表达和连接蛋白 37 的表达可用作动脉表型的指征。作为另一个例子,EphB4 的表达可用作静脉表型的指征。

[0025] 在一些方面,本公开提供了抑制 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)阳性细胞向血管募集的方法,该方法包括给予有此需要的受试者有效量的 D114 信号传导的抑制剂。在一些实施方式中,所述抑制剂选自 D114 的抗体、D114-His 融合物或 D114-Fc 融合物。在一些实施方式中, α -SMA 阳性细胞选自周细胞(pericyte)、平滑肌细胞或周内皮细胞(periendothelial cell)。在一些实施方式中,血管是静脉移植物。在一些实施方式中,静

脉移植是隐静脉移植。在一些实施方式中,受试者患有血管生成相关疾病。在一些实施方式中,血管生成相关疾病选自如上所述的疾病。在一些实施方式中,该方法还包括给予至少一种另外的抗血管生成剂,所述抗血管生成剂与所述 D114 信号传导抑制剂一起以加成或协同方式抑制血管生成。

[0026] 在其它方面,本公开提供了与位于 D114 的细胞外部分中的表位结合的分离的单克隆抗体或抗原结合部分的组合物。位于 D114 的细胞外部分中的表位的例子包括 MN1 和 DSL 结构域,以及任意一个或多个 EGF 重复,如图 20A 所示。这样的抗体可以包括但不限于 SEQ ID NO:4-7 的任意一个。所述抗体还可以是人源化抗体。

附图说明

[0027] 图 1 显示了人类 δ 样 4 蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1;GenBank NP_061947)。以下划线标出了信号序列:氨基酸 1-26。以粗体标出了跨膜结构域:氨基酸 532-552。成熟蛋白的细胞外结构域是氨基酸 27-531,虽然信号肽处理的不准确性会导致稍长或稍短的蛋白。细胞内结构域是氨基酸 553-685。

[0028] 图 2 显示了编码人类 δ 样 4 蛋白的核酸序列 (cDNA) (SEQ ID NO:2;GenBank NM_019074)。编码序列是核酸 321-2378。

[0029] 图 3 显示了 pZ/EG-mD114 转基因载体和 Cre 活性的结果。

[0030] 图 4. (a) 在 E8.0 时 ZEG-mD114 胚胎的 LacZ 染色;(b) 在 E8.5 时 dt 胚胎中 EGFP 的表达;(c) 在 E9.0 时 dt 胚胎中的出血和心包水肿。

[0031] 图 5. E9.0 和 E9.5 时 dt 和对照胚胎的全固定 (Whollemount) PECAM1 免疫染色。(a) E9.0 时的对照胚胎;(b) E9.0 时的 dt 胚胎,其显示了肥大的背主动脉(左下箭头)、分支的 ACV(右下箭头)和头部区域中未成熟的血管丛(上面的箭头);(c) E9.5 时的对照胚胎;(d) E9.5 时的 dt 胚胎,其显示了肥大的背主动脉、几乎没有 ACV 的迹象、头部区域中未成熟的血管丛和肥大的静脉窦和心室。将 E9.5 时的染色的胚胎切成一半,显示了 dt 胚胎 (f) 的主动脉恰好在其与静脉窦的结点的后面萎缩(下面的箭头),而在对照胚胎 (e) 中,在整个胚胎中保持相同的口径。dt 胚胎 (h) 的体节间血管(上面的箭头)出现轻微的扩张并且比对照胚胎 (g) 的短。在 dt 胚胎的背侧区域(下面的箭头)没有发生血管生成。(i) E9.5 对照胚胎的卵黄囊,(j) dt 胚胎的卵黄囊,与对照胚胎的脉管结构的高度组织化结构不同,dt 胚胎的卵黄囊显示缺少初级丛的重塑。

[0032] 图 6. 冷冻切片和微血管造影中的 PECAM1 免疫染色。(a-g) 为 E9.5dt 胚胎的连续切片(由前至后),其显示了即将与静脉窦(下面的箭头)连接之前,主动脉(右上的箭头)和 ACV(左上的箭头)之间的融合。在切片

[0033] (a) 中,ACV 由小的毛细血管(左上的箭头)的丛组成,在即将与背主动脉融合之前,这些小的毛细血管结合在一起形成了具有大的腔的单一血管。切片 (e) 显示静脉窦后面的区域中的主动脉萎缩。(f,g) E9.5 野生型胚胎的连续切片显示了如上所述的相同区域。以印度墨汁注射的微血管造影确认了 dt 胚胎 (i) 的背主动脉和 ACV 之间的功能性连接的存在,墨汁从主动脉(左手侧的箭头)直接流向静脉窦(右手侧的箭头),这与对照胚胎 (h) 中观察到的常规血流是不同的。

[0034] 图 7. dt 胚胎中动脉标志物的静脉表达。以 ephrin-B2(a,b,c) 和连接蛋白 37(d、

e、f) 特异性核糖核酸探针 (riboprobe) 与来自 E9.0dt 胚胎的冷冻切片进行原位杂交。突变的胚胎显示:在背主动脉 (AD) 和前主静脉 (VCA) 中均同时表达这些动脉特异性标志物。如所预计的那样,在对照胚胎 (c、f) 中,表达被限制在主动脉中。

[0035] 图 8. 突变胚胎的静脉内皮中 Notch 信号传导的上调。以 hey1 (a、b、c) 和 Notch1 (d、e、f) 特异性核糖核酸探针与来自 E9.0dt 胚胎的冷冻切片进行原位杂交。在前主静脉 (VCA) 中,两个基因均显示出上调。如所预计的那样,在对照胚胎 (c、f) 中,表达被限制在主动脉中。

[0036] 图 9. dt 胚胎中静脉特异性标志物的下调。来自 E9.0dt 胚胎的冷冻切片的原位杂交和免疫染色:(a) 抗 -Eph-B4 免疫染色,(c) eph-b4mRNA;来自 E9.0 对照胚胎的冷冻切片的原位杂交和免疫染色:(b) 抗 -Eph-B4 免疫染色,(d) eph-b4mRNA。

[0037] 图 10 显示了人类 D114 结构域结构的示意图(上端)和带注解的人类 D114 氨基酸 (SEQ ID NO:1) (下端)。以下划线标出并指明了信号序列和 DSL 结构域。阴影部分是第 8 个 EGF8 结构域 (EGF8)。ΔXB (ΔEGF8) 构建体在 C 末端在 EGF8 重复的 CAS 残基之后含有另外的 19 个氨基酸 (RSPSCIYRRSWRSRGAQIL) (SEQ ID NO:3)。P524-His 构建体结束于跨膜结构域之前 4 个氨基酸的 P524,在 C 末端有 6xHis 标签。两个构建体均含有受体-结合结构域:DSL 结构域。全长构建体具有 Myc 标签或无标签。

[0038] 图 11 显示了经过镍柱纯化 (SDS-PAGE;CBB-G250 染色) 的纯化的 hD114-P524-6xHis 蛋白(组氨酸标签化的 hD114-P524)。

[0039] 图 12. hD114 抑制人类动脉内皮细胞 (HUAEC) 中管的形成。使用 50ng/ml 的 VEGF 作为阳性对照。在较低的浓度时 (30ng/ml 或 100ng/ml),D114 促进管的形成,而在 500ng/ml 时,D114 抑制管的形成(数据未显示)。定量分析了 sD114 处理的 HUVEC 中管的长度和结点数目 (Bioquant Image Analysis;平均值来自 2 次重复实验的一式三份的孔)。在以人类动脉内皮细胞进行的检验中观察到了相似的结果(数据未显示)。

[0040] 图 13. hD114 抑制人类动脉内皮细胞 (HUAEC) 中的萌发 (sprouting)。使用 20ng/ml 的 VEGF 作为阳性对照。在 100ng/ml 或 200ng/ml 时,D114 促进萌发,而在 500ng/ml 时,D114 抑制萌发(数据未显示)。显示了血管区域的定量分析 (Bioquant Image Analysis;平均值来自 2 次重复实验的一式三份的孔)。在以 sD114-Fc 进行的检验中观察到了相似的结果(数据未显示)。

[0041] 图 14. hD114 在高浓度时抑制人类动脉内皮细胞 (HUAEC) 中 VEGF 刺激的萌发。以 20ng/ml 使用 VEGF。在 100ng/ml 时 D114 几乎没有效应,而在 200ng/ml 时 D114 抑制 VEGF 刺激的萌发。

[0042] 图 15. D114^{+/-} 突变体小鼠显示出血管增殖的缺陷型增长:(A) 使用 PECAM 全固定免疫染色检测野生型和 D114^{+/-} 胚胎的脉管系统。将背主动脉和主静脉标记为 a 和 v。相对于野生型,在 E10.5 时的 D114^{+/-} 胚胎中观察到了血管分支及密度的增加以及大血管的缺失。(B) 按照 (A) 的方式检测了肿瘤移植后 D114^{+/-} 成年小鼠的血管反应。野生型小鼠显示出肿瘤中有组织的血管增殖(左半部分),而突变体小鼠显示出显著增加的血管反应,其缺少组织化和血管层级。(C) 通过 β-gal 染色检测 D114^{+/-} 突变体小鼠的肿瘤和正常区域中 D114 的表达。在正常组织中的一些不连续血管中观察到了 D114 的表达,而肿瘤区域显示出很多类似表现的 β-gal 阳性血管,其指征了肿瘤血管中 D114 的诱导。(D) 通过 α-SMA

定位检测新形成的血管周围的周细胞覆盖。在野生型小鼠中,血管显示出 PECAM 和 α -SMA 的共定位(左侧图板)。但是,在 D114^{+/-} 小鼠肿瘤血管中,内皮细胞沿线的(lining) α -SMA 阳性细胞的数目显著降低(右侧图板)。(E) 在肿瘤的多数但不是全部血管中, D114 是激活的。邻近肿瘤切片的 β -gal(左侧图板)和 PECAM 免疫染色(右侧图板)显示:内皮细胞特异性 PECAM 染色比 lacZ D114- 受体表达丰富得多。

[0043] 图 16. sD114 的生物化学性质:(A) 将 Notch-Fc 融合蛋白直接包被在 ELISA 平板上。使 sD114-AP 与 Notch-Fc 结合,通过加入 AP 底物定量检测所结合的 D114。sD114-AP 与 Notch1 有效结合但不与 Notch3 有效结合(左侧图板)。检测了 sD114-Fc 和 sD114-His 与 Notch 1 的结合。(B) 以 sD114-Fc、sD114-His 的表达载体或仅以载体本身转染 HUVEC 细胞。sD114 蛋白不诱导响应 Notch 的 Hes-2 基因的表达。(C) 当 HUVEC 细胞与表达 D114-FL(全长)的 choK 共同培养时,通过 Hes-1、Hey-1 和 Hes-2 诱导测定的 Notch 激活。重组 sD114-Fc 和 sD114-His 的加入减少了响应 Notch 的基因的诱导。两个独立实验产生相似的结果。

[0044] 图 17. 在鼠 Matrigel 检验中,sD114 诱导血管反应但是缺少灌注:(A) 通过皮下向 Balb/C nu/nu 小鼠注射 Matrigel。6 天之后,取下胶塞(plug)并在石蜡中处理。以 H&E 将单独的切片染色,显示了来自 2 个独立实验的一式三份胶塞的 20 倍放大的代表性图像。(B) 以 PECAM 将 Matrigel 胶塞染色。以 Nikon Coolpix 5000 照相机在 Nikon Eclipse E400 显微镜下获取显微图像,使用 4x/0.13NA 物镜和 10 倍目镜。将来自所有胶塞的血管化区域的定量的平均值($\pm$ SEM)显示于条形图中(Scion Image 软件)。P 值 < 0.01。

[0045] 图 18. sD114 抑制鼠肿瘤异种移植模型中的肿瘤生长:(A) 将含有 1×10^6 HT29 个细胞(处于含有 PBS 或 sD114-Fc 或 sD114-His(5 μ g/ml)的 Matrigel 制备物中)的植入物给予小鼠(n = 6/组),2 周之后测定肿瘤体积,收集并分析肿瘤。在 sD114 组中肿瘤体积显著较小(图 6A)。实验重复进行 2 次。(B) 在评价 sD114 的内源性表达的效应时,以含有 D114-FL、sD114-Fc、sD114-His 的表达载体或仅以载体本身转染 HT29 细胞。进行截短的 CD4 的共表达以允许进行转染细胞的分选。在小鼠中植入相同数目的转染的细胞(n = 6/组)。测定肿瘤的体积(图 6B)。在 sD114 组中肿瘤体积显著较小。(C) 按照“方法”部分的描述,通过 PECAM 免疫染色测定微脉管系统并定量测定血管体积。(D) 在收集肿瘤之前,注入缺氧(hypoxia)探针,然后按照“方法”中的描述,以单克隆抗体和荧光标记的二抗探测肿瘤切片。按照“方法”中的描述,使用 ImageJ 定量测定缺氧区域。所有的数值均表示为平均值 $\pm$ SEM。*P < .01, Student's t 检验。以 Nikon Coolpix 5000 照相机和 Nikon Eclipse E400 显微镜获取显微图像,使用 10 倍目镜。放大倍率是 20x/0.5NA 物镜。(E) 通过在杀死小鼠之前 10-15 分钟注射荧光标记的植物凝集素并收集肿瘤来测定血管灌注。植物凝集素定位于灌注区而 PECAM 染色部分代表血管。在对照组中,植物凝集素和 PECAM 共定位,而 sD114 组显示出显著的灌注缺失。(F) 肿瘤血管中 α -SMA 的定位。对照组显示出 α -SMA 和 PECAM 的共定位,而 sD114 组中的微血管中具有极少量的 α -SMA 阳性细胞。

[0046] 图 19. 可溶性 D114 在鼠异种移植(zenograft)模型中抑制体内肿瘤生长。从移植后第 5 天开始,通过腹膜内给予缺少 EGF 样结构域 7 和 8 的 D114-E6(SEQ ID NO:1 的残基 1-422),浓度为 5mg/kg,一周三次。在高浓度时 VEGF 刺激人类动脉内皮细胞(HUAEC)的萌发。还检测了 D114-E6 与 VEGF 中和抗体(Avastin)的组合效应。从移植后第 5 天开始,还通过腹膜内给予 Avastin,浓度为 10mg/kg,一周三次。

[0047] 图 20. 抗-D114 抗体的表位作图:(A) 与碱性磷酸酶融合的 D114 截短突变体的完整系列。鉴定了 4 个单独的克隆,每个具有针对 D114 的特异性结合区域。(B) 在 4℃在 PBS 中将 4 μg/ml (100 μl) 的 D114 抗体包被至 ELISA 平板过夜。以 0.5%的 BSA 将平板封闭 2 个小时,然后加入 20ng 与碱性磷酸酶融合的可溶性 D114 蛋白。在室温孵育 45 分钟后,以 PBST 洗涤平板并在 37℃与 PNPP 孵育 20 分钟。该实验至少重复三次。

[0048] 图 21. 人类 D114(hD114)、小鼠 D114(mD114) 和人类 D111(hD111) 的蛋白序列比对。从 N 末端至 C 末端,第一个阴影区域表示抗体克隆 #2-6 的表位。第二个阴影区域代表 DSL 区域。包含 EGF 样 3(E3) 结构域的第三个阴影区域表示抗体克隆 #61B 的表位。

[0049] 图 22. 抗 D114 抗体的表征:(A) 在小鼠中通过以可溶性人类 D114-His 蛋白 (SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-524) 进行免疫接种来产生人类 D114 抗体。总结了四个抗体克隆。(B) 两个被命名为 #2-6 和 #61B 的抗体有效地中和 D114-Notch1 的相互作用。在 4℃在 PBS 中将 0.5 μg/ml (100 μl) Notch1-Fc 包被至 ELISA 平板过夜。以 0.5%的 BSA 将平板封闭 2 个小时,然后加入所示数量 D114 抗体,所述 D114 抗体预先与 50ng 的与碱性磷酸酶融合的可溶性 D114 混合。在室温孵育 45 分钟后,以 PBST 洗涤平板并在 37℃与 PNPP 孵育 1.5 小时。该实验至少重复三次。

[0050] 图 23. 命名为 #61B 的 D114 抗体克隆的可变区 V_H(SEQ ID NO:4) 和 V_L(SEQ ID NO:5) 的序列。

[0051] 图 24. 命名为 #2-6 的 D114 抗体克隆的可变区 V_H(SEQ ID NO:6) 和 V_L(SEQ ID NO:7) 的序列。

[0052] 图 25. D114-Fc 融合蛋白连接子工程化。融合蛋白之间的连接子区域可能影响目标蛋白的功能。测试了 D114(E6) 和人类 IgG1Fc(从 Fc 铰链区的 EPKS 开始) 之间的三个不同的连接子。L1 和 L2 融合蛋白之间有三倍的差异。选择了 D114-L2-Fc 进行肿瘤异种移植研究。在 4℃在 PBS 中将 0.5 μg/ml (100 μl) Notch1-Fc 包被至 ELISA 平板过夜,然后以 0.5%的 BSA 将平板封闭 2 个小时。将所示数量的 D114-Fc 蛋白或 BSA 与 50ng 的 D114(E8)-AP 预先混合,然后加入。在室温孵育 45 分钟后,以 PBST 洗涤平板并在 37℃与 PNPP 孵育 1 小时。

[0053] 发明详述

[0054] 本发明部分基于以下发现:δ 样 4 的功能对于体内血管生成而言是非常重要的,并且,此外,δ 样 4 活性的增加与动脉内皮细胞的增殖增加和内皮细胞采纳动脉特性的增加相关联。本申请人产生了小鼠 D114 敲除突变体,其显示出剂量敏感的血管生成上的缺陷。此外,本申请人产生了小鼠 D114 过表达模型并且证明在一些情况下,D114 表达的增加引起动脉组织的肥大,并且,此外,还引起静脉组织采纳动脉特性。基于这些结果,显而易见的是血管生成,其中产生动脉和静脉微血管系统,对 D114 活性高度敏感,并且可以通过抑制或过度激活 D114 而被扰乱(例如,抑制或使其紊乱或无效的方式发生)。因此,令人惊奇的是,D114 的激动剂和拮抗剂均可用于治疗正在发生血管生成的肿瘤。此外,本发明涉及以下发现:D114 的过表达能够刺激动脉生长并且因此可用于刺激动脉生成。动脉生成是副动脉形成和生长的过程,通常是在缺血组织中。因此,D114 激动剂可用于治疗患有或具有患上缺血事件(例如外周或冠状动脉缺血)风险的患者。此外,本公开证明可溶性单体或二体 D114 多肽能够分别以低浓度或高浓度抑制或促进血管生成。

[0055] D114 激动剂 / 拮抗剂的确定 (determinant)

[0056] 本发明还涉及可以用于评价目标试剂是否是 D114 信号传导的激动剂或拮抗剂的生物标志物。一般性涉及 δ 蛋白 (包括 D114) 的科学文献没有明确阐明某特定试剂激活或是抑制 D114 介导的信号传导。例如,已经在众多分析中测试了 D114 和 δ 细胞外结构域 (例如可溶性单体或二体形式,具有缺失的细胞内结构域的形式和可溶性 Fc 融合物),但是仍然不清楚所观测到的效应中是否有任何效应是由激动剂或拮抗剂活性引起的,或者究竟是否存在任何有意义的活性。此外,反应剂可能以多种方式影响 D114 的信号传导。例如,反应剂可能影响 Notch1 和 / 或 Notch4 的激活,或反向 (retrograde) D114 信号传导的激活,其可能由 D114 细胞内结构域介导。反应剂还可能影响早老素 (preseniline) 蛋白酶活性的活性,其可能同时影响 Notch1 和 Notch4。本公开证明 D114 的过度激活引起内皮细胞采纳动脉表型,表现为 EphrinB2 和连接蛋白 37 的表达;而 D114 功能的丧失引起内皮细胞采纳静脉特性,表现为 EphB4 的表达。这种关于 D114 活性的遗传决定的体内效应的信息将允许鉴定已知的和新发现的试剂作为 D114 信号传导的激动剂或拮抗剂。

[0057] 试剂

[0058] 因此,在一些方面,本公开提供了多种多肽化合物 (试剂),其可用于治疗癌症以及与血管生成相关的失调和与不想要的血管生成相关的过程。

[0059] D114 是一种 Notch 配体,其含有信号序列、DSL 结构域、8 个表皮生长因子样重复、跨膜结构域和细胞内区域,这些均具有 δ 蛋白家族成员的特征。 δ -4mRNA 的组织分布类似于以前描述过的 Notch-4(Int-3) 转录本。 δ -4 的细胞外部分的可溶性形式抑制人类主动脉内皮细胞的明显增殖,但不抑制人类肺部动脉内皮细胞的增殖。Yoneya 等人 J. Biochem. Vol. 129, pp. 27-34 (2001)。

[0060] Notch 蛋白家族成员是跨膜受体,其含有特征性的多个表皮生长因子 (EGF) 样重复以及保守结构域,例如 RAM、ankyrin 样重复和 PEST 序列。Notch 蛋白的受体包括:黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中的 δ 和 Serrate;秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中的 LAG-2 和 APX-1;以及脊椎动物中的 δ 和 Serrate (或 Jagged)。这些配体也是跨膜蛋白并且在数目可变的 EGF 样重复的上游含有高度保守的 DSL (δ -Serrate-LAG-2) 基序。DSL 结构域是 Notch 配体的特征性特征,对于蛋白功能是重要的;因此,LAG-2 中的 DSL 结构域的点突变导致活性的丧失。虽然脊椎动物的 δ 和 Jagged (Serrate) 蛋白显示出类似的结构,但是每组蛋白还具有几个不同的特征。因此,虽然脊椎动物 δ 蛋白含有 8 个 EGF 样重复,但是 Jagged 蛋白含有 16 个这样的重复。此外,在 Jagged 蛋白中,EGF 结构域之后跟随着富含半胱氨酸的结构域,但在 δ 蛋白中没有。然而,这些结构差异的结果仍然是未知的。

[0061] Uyttendaele 等人 (1996) 克隆了对应于小鼠 Notch4 基因的完全编码区的 cDNA。原位杂交显示:在胚胎和成人阶段,Notch4 转录本主要被限制在内皮细胞中,这提示了 Notch4 在脊椎动物内皮发育过程中的作用。

[0062] Li 等人 (Genomics. 1998 Jul 1; 51(1):45-58) 报道:人类 NOTCH4 基因含有 30 个外显子并跨越大约 30kb。他们分离了对应于 6.7-kb NOTCH4 (S) 和 9.3-kb NOTCH4 (L) mRNA 异构体的 cDNA。他们推测出 NOTCH4 (S) 编码的蛋白长度为 2,003 个氨基酸并且含有特征性 Notch 基序:信号肽、29 个表皮生长因子 (EGF) 样重复、3 个 Notch/lin-12 重复、跨膜区域、

6 个 cdc10(603151)/ankyrin 重复以及在 C 末端具有 PEST 保守区域。小鼠和人类 NOTCH4 蛋白的序列具有 82% 的同一性。不完全剪接的 NOTCH4(L) cDNA 潜在编码 2 个不同蛋白。一个由 7 个 EGF 重复组成。第二个含有跨膜结构域和细胞内区域并且类似于小鼠 int3 原癌蛋白。Northern 印迹分析显示 :NOTCH4(S) 是主要的转录本并且在多种组织中表达。

[0063] Krebs 等人 (2000) 通过基因打靶产生了 Notch4 缺陷型小鼠。该突变的胚胎纯合子发育正常, 纯合子突变成体是可以存活的且不育的。但是, Notch4 突变显示出与相关的 Notch1 基因的靶突变的遗传相互作用。Notch1 突变体和 Notch1/Notch4 双突变体胚胎均显示出血管生成性血管重塑的严重缺陷。编码 Notch 家族受体的配体的基因的表达模式的分析表明 :只有 D114 基因的表达模式与编码早期胚胎脉管系统中 Notch1 和 Notch4 受体的配体的预期表达模式相符。因此, Notch 信号传导途径在调节血管形态形成和重塑中具有必不可少的作用, 并且表明 :尽管 Notch4 基因在胚胎发育过程中虽然不是必不可少的, 但是 Notch4 和 Notch1 基因在小鼠胚胎形成过程中具有部分重叠的作用。

[0064] 如上所述, 本公开提供了使用和鉴定 D114 信号传导的激动剂和拮抗剂的方法。一般地, 候选的激动剂和拮抗剂将是任何与参与 D114 信号传导途径的蛋白 (包括, 例如, D114、Notch1、Notch4 和早老素) 结合的抗体或其可溶性部分。候选的激动剂和拮抗剂还可以是与该途径的成员结合或影响该途径成员的小分子或其它试剂。反义或 RNAi 核酸可用作 D114、Notch1、Notch4 或早老素或该信号传导途径的其它成员的拮抗剂。

[0065] 试剂的例子包括 :

[0066] (a) 与 D114 选择性结合的抗体 ;

[0067] (b) 与 Notch1 选择性结合的抗体 ;

[0068] (c) 与 Notch4 选择性结合的抗体 ;

[0069] (d) 与 Notch1 和 Notch4 选择性结合的抗体 ;

[0070] (e) 包含 D114 的 Notch 受体结合部分的多肽单体 ;

[0071] (f) 包含 D114 的 Notch 受体结合部分的多肽二体 ;

[0072] (g) 包含两个或更多个含有 D114 的 Notch 受体结合部分的多肽的多肽多体 (multimer) ;

[0073] (h) 包含 Notch1 或 Notch4 的 D114 结合部分的多肽单体 ;

[0074] (i) 包含两个或更多个含有 Notch1 或 Notch4 的 D114 结合部分的多肽的多肽多体。

[0075] 预计干扰早老素活性或其它金属蛋白酶 (例如 kuzbanian) 的试剂将调节 D114 信号传导。可以按照本文的描述检测这些试剂中的每一个的激动剂或拮抗剂活性。

[0076] D114 多肽

[0077] 在一些方面, 试剂是包含 D114 蛋白的细胞外结构域的可溶性多肽, 例如 SEQ ID NO :1 的氨基酸 27-531 所示。在具体的实施方式中, D114 可溶性多肽包含 D114 蛋白的 DSL 结构域。在另一个实施方式中, D114 可溶性多肽是包含至少 EGF 样结构域的结构域 5 或 6 的截短物。

[0078] 本文使用的本发明的可溶性多肽包括 D114 可溶性多肽的片段、功能性变体和修饰形式。可以通过测定对于内皮细胞中的动脉或静脉表型的效应来测定本发明的可溶性多肽的这些片段、功能性变体和修饰形式作为 D114 的激动剂或拮抗剂的活性。

[0079] 在一些实施方式中,可以通过筛选由相应的编码 D114 的核酸片段重组产生的多肽获得本发明的可溶性多肽的分离的片段。此外,可以通过使用本领域已知的技术例如常规 Merrifield 固相 f-Moc 或 t-Boc 化学通过化学方式合成所述片段。可以产生(重组地或通过化学合成)并测试所述片段以鉴定那些能够调节 D114 信号传导的肽片段。

[0080] 在一些实施方式中,D114 可溶性多肽的功能性变体包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的残基 27-531 具有至少 90%、95%、97%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列。

[0081] 在一些实施方式中,本发明考虑到通过修饰本发明的可溶性多肽的结构而制备功能性变体,所述修饰的目的是例如增强治疗性或预防性功效,或者稳定性(例如体外保质期和体内抵抗蛋白水解降解的抗性)。可以通过例如氨基酸取代、删除或添加来产生修饰的可溶性多肽。例如,可以合理预计:例如,以异亮氨酸或缬氨酸单独替换亮氨酸、以谷氨酸替换天冬氨酸、以丝氨酸替换苏氨酸、或以结构上相关的氨基酸进行的相似的氨基酸替换(例如保守性突变)将不会对所产生的分子的生物学活性产生重大影响。保守性替换是那些发生在具有相关侧链的氨基酸家族内的替换。

[0082] 本发明还考虑到产生 D114 多肽的组合突变系列以及截短突变体的方法,这对于鉴定功能性变体序列是特别有用的。筛选这种组合文库的目的可以是为了产生例如可以作为 D114 的激动剂或拮抗剂的可溶性多肽变体。可以产生源于组合的变体,其相对于天然产生的可溶性多肽具有选择性功能。当从重组 DNA 构建体表达时,这样的变体蛋白可用于基因治疗程序。同样地,诱变可以产生具有与相应的野生型可溶性多肽显著不同的体内半衰期的变体。例如,可以使得改变的蛋白针对蛋白水解降解或其它细胞过程更加稳定或更不稳定,所述其它细胞过程导致目标蛋白(例如可溶性多肽)的破坏或灭活。这样的变体以及编码它们的基因可用于通过调节本发明的可溶性多肽的半衰期而改变他们的水平。短的半衰期能够产生更短暂的生物学效应,并且当作为可诱导表达系统的一部分时,能够允许更加严格地控制细胞内重组可溶性多肽的水平。如上所述,这样的蛋白,特别是它们的重组核酸构建体,可用于基因治疗程序。

[0083] 有很多从简并寡核苷酸序列产生潜在同源物文库的方法。可以使用自动化 DNA 合成仪进行简并基因序列的化学合成,然后将合成的基因连接至合适的基因以进行表达。基因的简并系列的目的是:在一个混合物中提供编码潜在的可溶性多肽序列的想要的系列的所有序列。简并寡核苷酸的合成在本领域是熟知的(参见,例如, Narang, SA(1983) Tetrahedron 39:3; Itakura 等人, (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam; Elsevier pp273-289; Itakura 等人, (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura 等人, (1984) Science 198:1056; Ike 等人, (1983) Nucleic Acid Res. 11:477)。这样的技术已经被应用于其它蛋白的指导性演化(参见,例如, Scott 等人, (1990) Science 249:386-390; Roberts 等人, (1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin 等人, (1990) Science 249:404-406; Cwirla 等人, (1990) PNAS USA 87:6378-6382; 以及美国专利号:5,223,409、5,198,346、和 5,096,815)。

[0084] 或者,其它形式的诱变可用于产生组合文库。例如,可以使用例如丙氨酸扫描诱变等技术(Ruf 等人, (1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wang 等人, (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint 等人, (1993) Gene 137:109-118; Grodberg 等人, (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima 等人, (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892;

Lowman 等人, (1991) *Biochemistry* 30 :10832-10838 ;和 Cunningham 等人, (1989) *Science* 244 :1081-1085), 通过连接子扫描诱变 (Gustin 等人, (1993) *Virology* 193 :653-660 ; Brown 等人, (1992) *Mol. Cell Biol.* 12 :2644-2652 ;McKnight 等人, (1982) *Science* 232 :316) ;通过饱和诱变 (Meyers 等人, (1986) *Science* 232 :613) ;通过 PCR 诱变 (Leung 等人, (1989) *Method Cell Mol Biol* 1 :11-19) ;或通过随机诱变, 包括化学诱变等等 (Miller 等人, (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY ;和 Greener 等人, (1994) *Strategies in Mol Biol* 7 :32-34) 通过筛选从文库中产生并分离可溶性多肽变体 (例如拮抗剂形式)。连接子扫描诱变, 特别是组合环境中的连接子扫描诱变, 是用于鉴定截短 (生物活性) 形式的本发明的可溶性多肽的理想方法。

[0085] 本领域已知有众多用于筛选通过点突变和截短制备的组合文库的基因产物的技术, 以及, 就此而言, 用于筛选 cDNA 文库中的具有特定性质的基因产物的技术。这样的技术一般可以适用于迅速筛选通过本发明的可溶性多肽的组合诱变产生的基因文库。最广泛使用的用于筛选大的基因文库的技术通常包括 : 将基因文库克隆进入可复制的表达载体、以产生的载体文库转化合适的细胞、在一定条件下表达组合基因, 所述条件为 : 所需要的活性的检测促进编码被检测的产物的基因的载体的相对容易的分离。以下描述的每个示例性检验均可适用于筛选大量的通过组合诱变技术产生的简并序列所需要的高通量分析。

[0086] 在一些实施方式中, 本发明的可溶性多肽还可以包括翻译后修饰。这样的修饰包括但不限于乙酰化、羧化、糖基化、磷酸化、脂化、和酰化。结果是, 修饰的可溶性多肽可能还有非氨基酸元件, 例如聚乙二醇、脂、多糖或单糖、和磷酸盐 (phosphate)。可以就其对 D114 的激动剂或拮抗剂效应来测试这样的非氨基酸元件对于可溶性多肽功能的效应。

[0087] 在一些方面, 本发明的可溶性多肽的功能性变体或修饰形式包括具有至少一部分可溶性多肽和一个或多个融合结构域的融合蛋白。这样的融合结构域的众所周知的例子包括但不限于, 聚组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽 S 转移酶 (GST)、硫氧化还原蛋白、蛋白 A、蛋白 G、和免疫球蛋白重链恒定区 (Fc)、麦芽糖结合蛋白 (MBP), 其对于通过亲和层析分离融合蛋白是特别有用的。为了亲和纯化的目的, 使用了用于亲和层析的相关基质, 例如谷胱甘肽 -、淀粉酶、和镍 - 或钴 - 偶联的树脂。本领域熟知的另一种融合结构域是绿色荧光蛋白 (GFP)。融合结构域还包括“表位标签”, 其通常为短的肽序列, 针对该表位标签的特异性抗体是可以获得的。熟知的表位标签 (针对该表位标签可以容易地获得单克隆抗体) 包括 FLAG、流感病毒血凝素 (HA) 和 c-myc 标签。在一些情况下, 融合结构域具有蛋白酶切割位点, 例如因子 Xa 或凝血酶, 这允许相关的蛋白酶部分消化融合蛋白从而从其中释放重组蛋白。然后可以通过后续的层析分离法从融合结构域中分离被释放的蛋白。在一些实施方式中, 本发明的可溶性多肽含有一个或多个修饰, 所述修饰能够使可溶性多肽稳定。例如, 这样的修饰增强可溶性多肽的体外半衰期、增强可溶性多肽的循环半衰期或减少可溶性多肽的蛋白水解降解。

[0088] 在一些实施方式中, 可以通过多种本领域已知的技术产生本发明的可溶性多肽 (未修饰的或经修饰的)。例如, 可以使用标准蛋白化学技术合成这样的可溶性多肽, 例如在 Bodansky, M. *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin (1993) 和 Grant G. A. (ed.), *Synthetic Peptides : A User's Guide*, W. H. Freeman and Company, New York (1992) 中描述的那些技术。另外, 可以通过商业渠道获得自动化肽合成仪 (例如,

Advanced ChemTech Model 396 ;Milligen/Biosearch 9600)。或者,可以使用各种本领域熟知的各种表达系统通过重组方式产生可溶性多肽、其片段或变体(参见下文)。

[0089] 基因治疗

[0090] 在一些方面,本发明涉及分离的和/或重组的编码 D114 多肽的核酸。本发明的核酸可以是单链的或双链的 DNA 或 RNA 分子。这些核酸可用作治疗剂。例如,这些核酸可用于制备重组的可溶性多肽,所述多肽作为治疗剂给予细胞或个体。或者,可以在例如基因治疗中将这此核酸作为治疗剂直接给予细胞或个体。

[0091] 在一些实施方式中,本发明提供了分离的或重组的核酸序列,其与 SEQID NO :2 所示的核苷酸序列的区域具有至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性。本领域普通技术人员将认识到,与本发明的核酸互补的核酸序列以及本发明核酸的变体也落在本发明的范围内。在进一步的实施方式中,本发明的核酸序列可以被分离、重组、和/或与异源核苷酸序列融合,或处于 DNA 文库中。

[0092] 在其它的实施方式中,本发明的核酸还包括在高度严谨条件下与 SEQID NO :2 所示的核苷酸序列杂交的核苷酸序列,或其互补序列。如上所述,本领域普通技术人员将容易地理解:促进 DNA 杂交的合适的严谨条件是可以变化的。本领域普通技术人员将容易地理解:促进 DNA 杂交的合适的严谨条件是可以变化的。例如,可以在大约 45°C 在 6.0x 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中进行杂交,然后在 50°C 以 2.0x SSC 进行洗涤。例如,洗涤步骤中的盐浓度可以选自:在 50°C 大约 2.0x SSC 的低度严谨至在 50°C 大约 0.2x SSC 的高度严谨。此外,洗涤步骤中的温度可以从在室温,大约 22°C 的低度严谨条件升高至大约 65°C 的高度严谨条件。温度和盐都是可以变化的,或者可以将温度或盐浓度保持不变而改变其它变量。在一个实施方式中,本发明提供了在室温在 6x SSC 的低度严谨条件下杂交然后在室温在 2x SSC 中进行洗涤的核酸。

[0093] 由于遗传密码的简并性而与本发明的核酸不同的分离的核酸也落在本发明的范围内。例如,很多氨基酸由不止一个三元组(triplet)代表。指定同一个氨基酸的密码子或同义物(例如,CAU 和 CAC 是组氨酸的同义物)可能引起不影响蛋白的氨基酸序列的“沉默”突变。但是,预计那些确实引起本发明的蛋白的氨基酸序列改变的 DNA 序列多态性将存在于哺乳动物细胞中。本领域技术人员将认识到编码特定蛋白的核酸的一个或多个核苷酸(多达大约 3-5% 的核苷酸)中的这些变异可能由于天然等位基因变异而存在于给定物种的个体中。任意的以及所有的这样的核苷酸变异和由此导致的氨基酸多态性均落在本发明的范围内。

[0094] 在一些实施方式中,本发明的重组核酸可以在表达构建体中与一个或多个调控核苷酸序列可操作地连接。调控核苷酸序列通常适合于用于表达的宿主细胞。对于多种宿主细胞,本领域已知有多种类型的合适的表达载体和适合的调控序列。通常来讲,所述一个或多个调控核苷酸序列可以包括但不限于,启动子序列、引导或信号序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列、以及增强子或激活子序列。本发明考虑到本领域已知的组成型或可诱导的启动子。启动子可以是天然产生的启动子或组合了一种以上的启动子元件的杂启动子。表达构建体可以存在于细胞中的游离体例如质粒上,或者表达构建体可以被插入到染色体中。在优选的实施方式中,表达载体含有可选择的标记物基因以允许对转化的宿主细胞进行选择。可选择的标记物基因在本领域是熟知的并且可以根据所

用的宿主细胞而变化。

[0095] 在本发明的一个方面,在表达载体中提供了本发明的核酸,所述表达载体包含编码 D14 多肽且与至少一个调控序列可操作连接的核苷酸序列。调控序列是本领域可认识到的且被选择用于指导可溶性多肽的表达。因此,术语调控序列包括启动子、增强子和其它表达控制元件。在 Goeddel ;Gene Expression Technology :Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA(1990) 中描述了示例性的调控序列。例如,控制 DNA 序列表达(当与之可操作地连接时)的众多表达控制序列中的任意一个均可用于这些载体中以表达编码可溶性多肽的 DNA 序列。这样的有用的表达控制序列包括例如 SV40 早期和晚期启动子、tet 启动子、腺病毒或细胞巨化病毒立即早期启动子、lac 系统、trp 系统、TAC 或 TRC 系统、表达受到 T7 RNA 聚合酶指导的 T7 启动子、噬菌体 λ 的主要操纵子和启动子区域、fd 包被蛋白的控制区域、3-磷酸甘油酸盐激酶或其它糖分解酶的启动子、酸性磷酸酶例如 Pho5 的启动子、酵母 α -杂交因子的启动子、杆状病毒系统的多面体启动子和其它已知的控制原核或真核细胞或其病毒的基因表达的序列,及其各种组合。应该理解,表达载体的设计可以取决于这样的因素,例如待转化的宿主细胞的选择和/或想要表达的蛋白的类型。此外,还应该考虑到载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力和该载体编码的任何其它蛋白例如抗生素标志物的表达。

[0096] 本发明还涉及经过重组基因转染的宿主细胞,所述重组基因包括一种或多种本发明的可溶性多肽的编码序列。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如,可以在细菌细胞例如大肠杆菌、昆虫细胞(例如使用杆状病毒表达系统)、酵母、或哺乳动物细胞中表达本发明的可溶性多肽。其它合适的宿主细胞对本领域技术人员是已知的。

[0097] 产生可溶性多肽的方法

[0098] 因此,本发明还涉及产生本发明的可溶性多肽的方法。例如,可以在合适的条件下培养经过编码 D114 可溶性多肽的表达载体转染的宿主细胞以允许实现 D114 可溶性多肽的表达。D114 可溶性多肽可以被分泌,并且从细胞与含有可溶性多肽的培养基的混合物中分离出来。或者,可以将可溶性多肽保持在胞质内或细胞膜组分内并且收获、裂解细胞并分离蛋白。细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其它的副产物。用于细胞培养的合适的培养基在本领域是熟知的。可以使用本领域已知的用于蛋白纯化的技术从细胞培养基、宿主细胞或二者之中分离可溶性多肽,所述技术包括离子交换层析、凝胶过滤层析、超滤、电泳、和以可溶性多肽的特定表位特异性的抗体进行免疫亲和纯化。在优选的实施方式中,可溶性多肽是包含促进其纯化的结构域的融合蛋白。

[0099] 可以通过将克隆的基因或其部分连接进入适合于在原核细胞、真核细胞(酵母、禽类、昆虫或哺乳动物)或二者中表达的载体中来产生本发明的重组核酸。用于生产重组可溶性多肽的表达载体包括质粒和其它载体。例如,合适的载体包括以下类型的质粒:用于在原核细胞例如大肠杆菌中表达的 pBR322 衍生的质粒、pEMBL 衍生的质粒、pEX 衍生的质粒、pBTac 衍生的质粒、和 pUC 衍生的质粒。

[0100] 优选的哺乳动物表达载体同时包含促进该载体在细菌中繁殖的原核序列和在真核细胞中表达的一个或多个真核转录单元。适合于转染真核细胞的哺乳动物表达载体的例子有:pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo 和 pHyg 衍生的载体。这些载体中有一些经过来自细菌质粒例如

pBR322 的序列的修饰,以促进在原核和真核细胞中的复制和药物抗性选择。或者,病毒例如牛乳头瘤病毒 (BPV-1) 或 Epstein-Barr 病毒的衍生物 (pHEBo、pREP 衍生的和 p205) 可用于真核细胞中蛋白的瞬间表达。可以在以下关于基因治疗输送系统的描述中找到其它病毒 (包括逆转录病毒) 表达系统的例子。用于制备质粒和转化宿主生物的各种方法在本领域是熟知的。关于原核和真核细胞的其它合适的表达系统以及一般性的重组程序,参见 Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), 第 16 和 17 章。在一些情况下,可能需要通过使用杆状病毒表达系统表达重组 SLC5A8 多肽。这样的杆状病毒表达系统的例子包括 pVL 衍生的载体 (例如 pVL1392、pVL1393 和 pVL941)、pAcUW 衍生的载体 (例如 pAcUW1) 和 pBlueBac 衍生的载体 (例如含有 β -gal 的 pBlueBac III)。

[0101] 制备融合基因的技术是熟知的。本质上讲,根据常规技术进行编码不同多肽序列的各种 DNA 片段的连接,其中应用了平结尾或交错结尾的末端以进行连接、限制性酶切消化以提供合适的末端、视情况进行的粘末端的填满、碱性磷酸酶处理以避免不想要的连接、以及酶学的连接。在另一个实施方式中,可以通过常规技术合成融合基因,所述常规技术包括自动化 DNA 合成仪。或者,可以使用锚定引物进行基因片段的 PCR 扩增,其产生两个连续基因片段之间的互补性悬突,然后可以使互补性悬突退火以产生嵌合基因序列 (参见,例如, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel 等人, John Wiley & Sons : 1992)。

[0102] 抗体

[0103] 在一些方面,本发明提供了对 D114 信号传导具有激动剂或拮抗剂效应的抗体。这样的抗体可以与抗原例如 D114、Notch1 或 Notch4 结合。优选地,所述抗体与这样的抗原的细胞外结构域结合。可以理解:抗体可以是多克隆的或单克隆的;完整的或截短的,例如 F(ab')₂、Fab、Fv;异种的、同种的、合成的、全长的人类抗体或其修饰的形式,例如人源化的、嵌合的。全长人类抗体可以从表达人类免疫球蛋白基因的转基因动物中选择或从表达抗体片段的重组文库中组装。

[0104] 例如,可以通过标准程序 (参见,例如, Antibodies : A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press : 1988)) 通过使用源自 D114、Notch1 或 Notch4 的免疫原来制备抗-蛋白/抗-肽抗血清或单克隆抗体。可以使用免疫原性形式的肽 (例如,能够引发抗体反应的多肽或抗原性片段,或融合蛋白) 免疫接种哺乳动物,例如小鼠、仓鼠或兔子。赋予蛋白或肽以免疫原性的技术包括与载体偶联或其它本领域熟知的技术。可以在存在佐剂的情况下给予抗原的免疫原性部分。可以通过检测血浆或血清中的抗体滴度来监测免疫的进展。可以使用免疫原作为抗原通过标准的 ELISA 或其它免疫检验法来评价抗体的水平。

[0105] 以抗原性制备物免疫接种动物之后,可以获得抗血清,如果需要的话,可以从血清中分离多克隆抗体。为了产生单克隆抗体,可以从经免疫的动物收集产生抗体的细胞 (淋巴细胞) 并通过标准体细胞融合程序与无限增殖细胞例如骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞。这样的技术在本领域是熟知的,并且包括,例如,杂交瘤技术 (最初由 Kohler 和 Milstein, (1975) Nature, 256 : 495-497 开发)、人类 B 细胞杂交瘤技术 (Kozbar 等人, (1983) Immunology Today, 4 : 72) 和产生人类单克隆抗体的 EBV- 杂交瘤技术 (Cole 等人,

(1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96)。可以通过免疫化学方式筛选杂交瘤细胞以产生与 D114、Notch1、Notch4 或其它靶多肽特异性反应的抗体,和分离自包含这样的杂交瘤细胞的培养物的单克隆抗体。

[0106] 本文使用的术语“抗体”旨在包括其片段,所述片段也与抗原特异性反应。可以使用常规技术将抗体片段化,并且按照如上针对完整抗体所述的相同的方式筛选所述片段的效用。例如,可以通过使用胃蛋白酶处理抗体以产生 F(ab)2 片段。可以处理所产生的 F(ab)2 片段以还原二硫桥,从而产生 Fab 片段。本发明的抗体还包括双特异性的、单链的和嵌合的及人源化的具有抗原亲和性的分子,所述亲和性由抗体的至少一个 CDR 区域所赋予。产生单链抗体的技术(美国专利号 4,946,778)也可以适用于产生单链抗体。同样,转基因小鼠或其它生物包括其它哺乳动物可用于表达人源化抗体。在优选的实施方式中,抗体还包括连接在抗体上并且能够被检测的标记(例如,标记可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或酶的辅因子)。

[0107] 在一些优选的实施方式中,本发明的抗体是单克隆抗体,在一些实施方式中,本发明提供了用于产生新型抗体的方法。例如,用于产生与 D114、Notch1 或 Notch4 特异性结合的单克隆抗体的方法可以包括:给予小鼠一定量的免疫原性组合物,所述组合物包含有效刺激可检测的免疫反应的抗原多肽;从小鼠获得产生抗体的细胞(例如来自脾脏的细胞)并将产生抗体的细胞与骨髓瘤细胞融合以获得产生抗体的杂交瘤;并且测试产生抗体的杂交瘤以鉴定产生与抗原特异性结合的单克隆抗体的杂交瘤。一旦获得杂交瘤,即可以在细胞培养物中繁殖杂交瘤,任选地在源自杂交瘤的细胞生产单克隆抗体的培养条件下进行。可以从细胞培养物纯化单克隆抗体。

[0108] 在一些实施方式中,本公开提供了本文公开的任意抗体的人源化形式,以及包含至少一个源自本文公开的抗体的 CDR 部分,特别是 CDR3 的抗体及其抗原结合部分。在优选的实施方式中,抗体是单克隆抗体,其有待给予该抗体的受试者是免疫相容的,优选地,是临床上可以接受的给予人类的抗体。

[0109] 在一些实施方式中,单链抗体和嵌合的、人源化的或灵长类化(CDR 接合)的抗体,以及嵌合的或 CDR 接合的单链抗体,其包含源自不同物种的部分,也包括在本发明中作为抗体的抗原结合部分。可以通过化学方式或常规技术将这些抗体的不同部分连接在一起,或者可以使用遗传工程技术作为连续蛋白进行制备。例如,可以表达编码嵌合或人源化链的核酸以产生连续蛋白。参见,例如, Cabilly 等人,美国专利号 4,816,567;Cabilly 等人,欧洲专利号 0,125,023B1;Boss 等人,美国专利号 4,816,397;Boss 等人,欧洲专利号 0,120,694B1;Neuberger, M. S. 等人,WO 86/01533;Neuberger, M. S. 等人,欧洲专利号 0,194,276 B1;Winter, 美国专利号 5,225,539;和 Winter, 欧洲专利号 0,239,400 B1。另外关于灵长类化的抗体,参见, Newman, R. 等人, BioTechnology, 10:1455-1460 (1992)。关于单链抗体,参见,例如 Ladner 等人,美国专利号 4,946,778;and Bird, R. E. 等人, Science, 242:423-426 (1988)。

[0110] 此外,还可以产生抗体的功能性片段,包括嵌合的、人源化的、灵长类化的或单链抗体的片段。本发明抗体的功能性片段保持其所源自的全长抗体的至少一个结合功能和/或调节功能。优选的功能片段保持相应的全长抗体的抗原结合功能(例如针对 D114 的特异性)。一些优选的功能片段保持抑制 D114 的一种或多种功能特性的能力,例如结合活性、

信号传导活性和 / 或对细胞反应的刺激。

[0111] 如以下实施例所示, 本申请人已产生了针对 D114 的单克隆抗体以及产生 D114 单克隆抗体的杂交瘤细胞系。进一步以多种方式对这些抗体进行了表征, 例如它们抑制 D114 与 Notch 之间的相互作用的能力以及它们的交叉反应性。此外, 表位作图研究揭示: 这些 D114 抗体可以与 D114 的一个或多个区域特异性结合。例如, 如图 21 所示, 命名为 #2-6 的抗体克隆与跨越包括 MNL 结构域的区域结合; 而命名为 #61B 的克隆与包括 EGF 样 3 结构域的区域结合。鉴定的其它抗体克隆与其它 EGF 样结构域结合, 如图 20A 所示。

[0112] 此外, 用于筛选抗体以鉴定想要的抗体的技术可能影响所获得的抗体的性质。例如, 用于某些治疗目的的抗体将优选能够靶向特定的细胞类型。因此, 为了获得这种类型的抗体, 可能需要筛选与表达目标抗原的细胞结合的抗体 (例如, 通过荧光激活的细胞分选法)。同样地, 如果抗体是用于与溶液中的抗原结合, 可能需要测试溶液结合。存在多种不同的用于测定抗体: 抗原相互作用从而鉴定特定的想要的抗体的技术。这样的技术包括 ELISA、表面等离子共振结合检验 (例如 Biacore 结合检验, Bia-core AB, Uppsala, Sweden)、三明治检验 (例如, IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland 的顺磁性珠子系统)、western 印迹、免疫沉淀检验和免疫组化。

[0113] 反义和 RNAi

[0114] 在一些方面, 本公开提供了分离的核酸化合物, 其至少包括在生理条件下与 D114 转录本杂交并减少细胞中 D114 表达的部分。这样的核酸可用作如本文描述的 D114 拮抗剂。D114 转录本可以是任何剪接前转录本 (即, 包括内含子)、剪接后转录本、以及任何剪接变体。在一些实施方式中, D114 转录本具有对应于如 SEQ ID NO: 2 所示的 cDNA (特别是其编码部分) 的序列。在一些方面, 本公开提供了分离的核酸化合物, 其至少包括在生理条件下与 Notch1 或 Notch4 转录本杂交并减少细胞中 Notch1 或 Notch4 表达的部分。这些也可用作 D114 拮抗剂。Notch1 或 Notch4 转录本可以是任何剪接前转录本 (即, 包括内含子)、剪接后转录本、以及任何剪接变体。

[0115] 核酸化合物的类别的例子包括反义核酸、RNAi 构建体和催化性核酸构建体。核酸化合物可以是单链或双链的。双链化合物还可以包括悬突或非互补性区域, 其中一条链或另一条链是单链的。单链化合物可以包括自我互补的区域, 意思是该化合物形成所谓的“发夹”或“茎-环”结构, 其具有双链螺旋结构区域。核酸化合物可以包含与由 D114、Notch1 或 Notch4 核酸序列的不超过 1000 个、不超过 500 个、不超过 250 个、不超过 100 个、或不超过 50 个核苷酸组成的区域互补的核苷酸序列。互补性区域将优选为至少 8 个核苷酸, 任选地是至少 10 个或至少 15 个核苷酸。互补性区域可以落在靶转录本的内含子、编码序列或非编码序列之内, 例如编码序列部分。一般地, 核酸化合物的长度为大约 8 个至大约 500 个核苷酸或碱基对, 任选地其长度为大约 14 至大约 50 个核苷酸。核酸可以是 DNA (特别是用作反义)、RNA 或 RNA:DNA 杂交体。任何一条链都可以包括 DNA 和 RNA 的混合物, 以及不能被简单地分类为 DNA 或 RNA 的修饰的形式。同样地, 双链化合物可以是 DNA:DNA、DNA:RNA 或 RNA:RNA, 并且任何一条链也可以包括 DNA 和 RNA 的混合物, 以及不能被简单地分类为 DNA 或 RNA 的修饰的形式。核酸化合物可以包括多种修饰物中的任意一个, 包括对于骨架 (天然核酸中的糖-磷酸盐部分, 包括核苷酸之间的键) 或碱基部分 (天然核酸的嘌呤或嘧啶部分) 的一种或多种修饰。反义核酸化合物将优选具有大约 15 至大约 30 个核苷酸的长度,

并且通常将包括一种或多种修饰以改善在血清、细胞或该化合物可能被输送的位点（例如在口服输送化合物的情况下为胃；在通过吸入方式输送化合物的情况下为肺）中的特性，例如稳定性。一般地，在 RNAi 构建体的情况下，与靶转录本互补的链是 RNA 或其修饰形式。另一条链可以是 RNA、DNA 或任何其它变体。双链的螺旋部分或单链“发夹”RNAi 构建体优选将具有 18 至 40 个核苷酸的长度，任选地其长度为大约 21 至 23 个核苷酸，只要其被用作 Dicer 底物。催化性或酶核酸可以是核酶或 DNA 酶并且也可以包括修饰的形式。当在生理条件下并且以无意义或有意义对照物几乎没有或没有效应的浓度与细胞接触时，核酸化合物可以将靶标的表达抑制大约 50%、75%、90% 或更多。用于测试核酸化合物的效应的优选浓度是 1、5 和 10 微摩。还可以测试核酸化合物对于细胞表型例如动脉或静脉特性的效应。

[0116] 筛选 / 检验方法

[0117] 存在很多筛选作为 D114 信号传导的激动剂或拮抗剂的候选试剂的方法。本公开提供了可用于区分 D114 信号传导的激动剂或拮抗剂的特征。一般而言，D114 信号传导的激动剂刺激哺乳动物内皮细胞中动脉表型的表达并且抑制静脉表型的表达。一般而言，D114 信号传导的拮抗剂抑制哺乳动物内皮细胞中动脉表型的表达并且刺激静脉表型的表达。为了评价动脉和静脉表型，可以检测任何已知的区分动脉和静脉内皮细胞的特征。例如，EphrinB2 的表达和连接蛋白 37 的表达可用作动脉表型的指示。作为另一个例子，EphB4 的表达可用作静脉表型的指示。

[0118] 还可以按照与 D114、Notch1 或 Notch4 的结合活性或者刺激或抑制产生 Notch1 (NICD)、Notch4 或 D114 的活性细胞内结构域的能力来筛选试剂。从发状 / 分裂增强子 (HES) 敏感性启动子的表达也可用于确定 Notch 信号传导是否被激活。NICD 刺激 HES 和 HES 驱动的启动子的表达。

[0119] 然后，可以在动物中测试通过任何筛选系统鉴定的化合物以评价它们对于血管生成、动脉生成、或体内抗肿瘤活性的效应，以及对于体内动脉或静脉特性的效应。

[0120] 可以进行化合物或分子的高通量筛选以鉴定抑制血管生成或抑制肿瘤生长的试剂或药物。测试试剂可以是任何化学物质（元素、分子、化合物、药物），通过合成制备的、通过重组技术制备的或从天然来源分离的。例如，测试试剂可以是肽、多肽、拟肽、糖、激素、或核酸分子。此外，测试试剂可以是小分子或通过组合化学制备的具有更高复杂度的分子，例如，并编辑进入文库。这些文库可以包括例如醇、烷基卤化物、胺、酰胺、酯、醛、醚和其它种类的有机化合物。测试试剂还可以是分离自细胞——细菌、动物或植物——裂解液或培养基的天然的或经遗传工程化改造的产物，或者可以是细胞裂解液或培养基本身。可以以单独的形式或作为化合物混合物将测试化合物呈递至测试系统中，尤其是在最初的筛选步骤中。

[0121] 例如，可以进行一项检验以筛选特异性抑制 D114（配体）与 Notch1/Notch4（受体）结合，或者相反的结合的化合物，例如，通过抑制标记的配体 - 或受体 -Fc 融合蛋白与无限增殖细胞的结合。

[0122] 在用于鉴定干扰两个细胞表面分子（例如 Notch1 和 D114）之间的相互作用的物质的检验的一个实施方式中，将表达一种类型的细胞表面分子的细胞样品与标记的配体或标记的配体 + 测试化合物（或测试化合物组）接触。确定与细胞结合的标记的配体的量。在与测试化合物接触的样品中较少量的标记（其中所述标记可以是例如放射性同位素、荧

光或颜色标记)是该测试化合物干扰结合的指征。使用表达配体的细胞的反式检验可用于测试干扰 Eph 受体或其可溶性部分的结合的物质。

[0123] 可以使用与固体支持物连接的成分(例如细胞、纯化的蛋白,包括融合蛋白和具有结合活性的部分)来进行鉴定干扰 D114 和 Notch1/Notch4 之间的相互作用的物质的检验,其中所述成分不与测试化合物相互竞争。固体支持物可以是任意合适的固相或基质,例如珠子、平板壁或其它合适的表面(例如,微量滴定板的孔)、柱孔玻璃(CPG)或可以浸入溶液例如孔中的溶液中的钉。可以直接或者通过一个或多个连接子分子将细胞或纯化的蛋白连接至固体支持物。

[0124] 在一个实施方式中,可以通过标准技术例如化学交联,或通过针对分离的或纯化的蛋白产生的抗体将分离的或纯化的蛋白固定于合适的亲和基质并结合至固体支持物上。可以将基质装于柱子中或其它合适的容器中并在适合于化合物与蛋白结合的条件下与待测的一种或多种化合物(例如混合物)接触。例如,可以使含有化合物的溶液流过基质。可以以合适的洗涤缓冲液洗涤基质以除掉未结合的化合物和非特异性结合的化合物。可以通过合适的洗脱缓冲液释放那些保持结合的化合物。例如,洗脱缓冲液的离子强度或 pH 的变化将引起化合物的释放。或者,洗脱缓冲液可以包含设计为破坏化合物结合的释放成分(例如,视情况可以是破坏测试化合物与蛋白结合或竞争性抑制其结合的一种或多种配体或受体,或其类似物)。

[0125] 可以制备包含与第二个部分(在天然发现的该蛋白中不存在所述部分)相连的蛋白的全部或一部分的融合蛋白以用于本方法的另一个实施方式。为此目的的合适的融合蛋白包括:其中所述第二个部分包含亲和配体(例如酶、抗原、表位)的那些。可以通过将蛋白或其部分插入到合适的编码亲和配体的表达载体来产生所述融合蛋白。可以将所述表达载体引入合适的宿主细胞以进行表达。将宿主细胞破坏,可以在足以使融合蛋白的亲和配体部分与亲和基质结合的条件下将细胞材料与亲和基质接触,从而使包含融合蛋白的细胞材料结合至合适的亲和基质。

[0126] 在该实施方式的一个方面,可以在足以使融合蛋白的亲和配体部分与基质结合的条件下将融合蛋白固定于合适的亲和基质,并且在适合于化合物与结合的融合蛋白的受体或配体蛋白部分结合的条件下与待测的一种或多种化合物(例如混合物)接触。然后,可以以合适的洗涤缓冲液洗涤具有结合的融合蛋白的亲和基质以除掉未结合的化合物和非特异性结合的化合物,但不显著破坏特异性结合的化合物的结合。可以通过将其中结合了融合蛋白的亲和基质与合适的洗脱缓冲液(化合物洗脱缓冲液)接触来释放那些保持结合的化合物。在这个方面,可以将化合物洗脱缓冲液配制为允许通过亲和基质保留融合蛋白,但是可以配制为干扰待测化合物与融合蛋白的受体或配体蛋白部分的结合。例如,洗脱缓冲液的离子强度或 pH 的变化可以引起化合物的释放,或者,洗脱缓冲液可以包含设计为破坏化合物与融合蛋白的受体或配体蛋白部分结合的释放成分(例如,可以破坏化合物与融合蛋白的受体或配体蛋白部分结合的一种或多种配体或受体,或其类似物)。固定可以在融合蛋白与化合物接触之前、同时或之后进行,视情况而定。本方法的各种变体是可能的,这取决于一些因素,例如所测的化合物、所选的亲和基质和洗脱缓冲液制剂。例如,在洗涤步骤之后,可以通过合适的洗脱缓冲液(基质洗脱缓冲液)将其中结合了化合物的融合蛋白从亲和基质上洗脱下来。当融合蛋白包含可切割的连接子(例如凝血酶切割位点)时,从

亲和配体上切割可以释放一部分的其中结合了化合物的融合物。然后,可以通过合适的方法(例如提取)将结合的化合物从融合蛋白或其切割产物上释放。

[0127] 治疗性应用

[0128] 在一些实施方式中,本发明提供了抑制血管生成的方法和治疗与血管生成相关的疾病的方法。在其它实施方式中,本发明提供了抑制或减少肿瘤生长的方法和治疗患有癌症的个体的方法。这些方法涉及给予个体治疗上有效量的一种或多种上文描述的 D114 信号传导调节剂。这些方法特别旨在动物的治疗性和预防性治疗,更特别的是人类。

[0129] 如本文所述,与血管生成相关的疾病包括但不限于,依赖于血管生成的癌症,包括,例如,实体瘤、血液产生的肿瘤例如白血病、和肿瘤转移;良性肿瘤,例如血管瘤、听觉神经瘤、神经纤维瘤、沙眼和化脓性肉芽瘤;炎性失调,例如免疫和非免疫炎症;慢性关节风湿病和牛皮癣;视觉血管生成性疾病,例如糖尿病性视网膜病、早熟性视网膜病、黄斑变性、角膜移植排斥、血管新生性青光眼、晶状体后纤维增生症、红变;Osler-Webber 综合征、角膜疾病、红变、关节炎和糖尿病性血管新生。

[0130] 特别地,本发明的治疗剂可用于治疗或预防癌症(肿瘤),包括但不限于结肠癌、乳腺癌、间皮瘤、前列腺癌、膀胱癌、头和颈部鳞状细胞瘤(HNSCC)、卡波西肉瘤和白血病。在一些实施方式中,本发明的方法可单独使用。或者,本方法可以与其它旨在治疗或预防增殖性失调(例如肿瘤)的常规抗肿瘤治疗方法联合。例如,这样的方法可用于预防性癌症预防、手术后癌症复发和转移的预防,以及作为其它常规癌症治疗的辅佐。本发明认识到可以通过使用本发明的多肽治疗剂增强常规癌症治疗(例如,化疗、放疗、光疗、免疫疗法和手术)的有效性。在该方法的一些实施方式中,可以一起(同时)或在不同时间(依次)给予本公开的一种或多种治疗剂。此外,所述治疗剂可以与另一种类型的用于治疗癌症或用于抑制血管生成的化合物一起给药。

[0131] 已经表明了多种常规化合物具有抗肿瘤活性。这些化合物已经被用作化疗中的药物试剂以使实体瘤收缩、预防转移和进一步生长、或减少白血病或骨髓恶性肿瘤中的恶性细胞的数目。虽然在治疗各种类型的恶性肿瘤中化疗已经是有用的,但是很多抗肿瘤化合物诱导不想要的副作用。已经表明:当把两种或更多种不同治疗组合起来时,治疗可以协同作用并允许减少每种治疗的剂量,从而减少每种化合物在较高剂量时导致的有害副作用。在其它情况下,对某个治疗呈抗性的恶性肿瘤可能对于两种或更多治疗的组合治疗起反应。

[0132] 当本发明的治疗剂与另一种常规抗肿瘤试剂联合给药时(无论同时或依次),显示出这样的治疗剂增强抗肿瘤试剂的治疗效应或克服细胞对这样的抗肿瘤试剂的抗性。这使得可以降低抗肿瘤试剂的剂量,从而减少不想要的副作用,或恢复抗肿瘤试剂在抗性细胞中的有效性。

[0133] 可用于组合型抗肿瘤治疗的药物化合物包括,仅仅举例来讲:氨鲁米特、安吡啶、阿那曲唑、天冬酰胺酶、bcr、比卡鲁胺、博来霉素、布舍瑞林、白消安、喜树碱、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯贝丁酯、秋水仙碱、环磷酰胺、环丙孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素 D、柔红霉素、己二烯雌酚、己烯雌酚、多西他赛、多柔比星、表柔比星、雌二醇、雌莫司汀、依托泊苷、依西美坦、非格司亭、氟达拉滨、氟氢可的松、氟尿嘧啶、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、三羟基黄酮、戈舍瑞林、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马

替尼、干扰素、伊立替康、来曲唑、亚叶酸、亮丙立德、左旋咪唑、洛莫司汀、氮芥、甲羟孕酮、甲地孕酮、美法仑、巯嘌呤、美司钠、甲氨喋呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特、诺考达唑、奥曲肽、奥沙利铂、紫杉醇、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉素、吡吩姆、丙卡巴肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链佐星、苏拉明、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷、睾酮、硫鸟嘌呤、塞替派、二茂钛二氯化物、托泊替康、曲妥珠单抗、维 A 酸、长春碱、长春新碱、长春地辛、和长春瑞滨。

[0134] 这些化疗抗肿瘤化合物可以根据它们的作用机理分成例如以下的组：抗代谢 / 抗癌试剂，例如嘧啶类似物（5- 氟尿嘧啶、氟尿苷、卡培他滨、吉西他滨和阿糖胞苷）和嘌呤类似物、叶酸盐拮抗剂及相关的抑制剂（巯嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁、和 2- 氯脱氧腺苷（克拉屈滨））；抗增殖 / 抗有丝分裂试剂，包括天然的产物，例如长春花生物碱类（长春碱、长春新碱、和长春瑞滨），微管阻断剂，例如紫杉烷（紫杉醇、多西他赛）、长春新碱、长春碱、诺考达唑、埃博霉素和诺维本，鬼臼乙叉甙（依托泊苷、替尼泊苷），DNA 损伤剂（放线菌素、安吡啶、安慈拉环素、博来霉素、白消安、喜树碱、卡铂、不孕苯丁酸、顺铂、环磷酰胺、环磷酰胺、放线菌素 D、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、六甲基三聚氰胺奥沙利铂、异环磷酰胺、美法仑、雌莫司汀、丝裂霉素、米托蒽醌、亚硝基脲、普卡霉素、丙卡巴肼、泰克索、泰索帝、替尼泊苷、三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊苷（VP16））；抗生素，例如放线菌素 D（放线菌素 D）、柔红霉素、多柔比星（阿霉素）、伊达比星、安慈拉环素、米托蒽醌、博来霉素、普卡霉素（普卡霉素）和丝裂霉素；酶（L- 天冬酰胺酶，其全身性代谢 L- 天冬酰胺并剥夺那些不具有合成其自身的天冬酰胺能力的细胞）；抗血小板试剂；抗增殖 / 抗有丝分裂烷化剂，例如氮芥子气（二氯甲基二乙胺、环磷酰胺和类似物、美法仑、不孕苯丁酸）、乙基三聚氰胺和甲基三聚氰胺（六甲蜜胺和塞替派）、烷基磺酸酯 - 白消安、亚硝基脲（卡莫司汀（BCNU）和类似物、链佐星）、三氮烯类 - 氮烯唑胺（DTIC）；抗增殖 / 抗有丝分裂抗代谢剂，例如叶酸类似物（甲氨喋呤）；铂配合物（顺铂、卡铂）、丙卡巴肼、羟基脲、米托坦、氮鲁米特；激素、激素类似物（雌性激素、他莫昔芬、戈舍瑞林、比卡鲁胺、尼鲁米特）和芳香酶抑制剂（来曲唑、阿那曲唑）；抗凝血剂（肝素、合成的肝素盐和其它的凝血酶抑制剂）；纤溶剂（例如组织纤溶酶原激活剂、链激酶和尿激酶）、阿司匹林、双嘧达莫、噻氯匹定、氯吡格雷、阿昔单抗；抗迁移试剂；抗分泌试剂（breveldin）；免疫抑制剂（环胞素、他克莫司（FK-506）、西罗莫司（雷帕霉素）、硫唑嘌呤、霉酚酸酯）；抗血管生成化合物（TNP-470、染料木素）和生长因子抑制剂（血管内皮细胞生长因子（VEGF）抑制剂、成纤维细胞生长因子（FGF）抑制剂）；血管紧张素受体阻断剂；氧化氮供体；反义寡核苷酸；抗体（曲妥珠单抗）；细胞周期抑制剂和分化诱导剂（维 A 酸）；mTOR 抑制剂、拓扑异构酶抑制剂（多柔比星（阿霉素）、安吡啶、喜树碱、柔红霉素、放线菌素 D、依尼泊胺、表柔比星、依托泊苷、伊达比星和米托蒽醌、托泊替康、伊立替康）、皮质类固醇（可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基泼尼松龙、泼尼松、和泼尼松龙）；生长因子信号转导激酶抑制剂；线粒体失调诱导剂和胱天蛋白酶激活剂；和染色质破坏剂。

[0135] 在一些实施方式中，可用于组合型抗血管生成治疗的药物化合物包括：(1) “血管生成分子”释放的抑制剂，例如 bFGF（碱性成纤维细胞生长因子）；(2) 血管生成分子的中和剂，例如抗 - β bFGF 抗体；和 (3) 内皮细胞对于血管生成刺激的反应的抑制剂，包括胶原酶抑制剂、基底膜翻转抑制剂、抑制血管生成的类固醇、源自真菌的血管生成抑制

剂、血小板因子 4、凝血酶敏感蛋白、关节炎药物例如 D-青霉胺和硫代苹果酸金、维生素 D₃ 类似物、 α 干扰素、等等。对于另外的推荐的血管生成抑制剂,参见 Blood 等人, Bioch. Biophys. Acta., 1032:89-118 (1990), Moses 等人, Science, 248:1408-1410 (1990), Ingber 等人, Lab. Invest., 59:44-51 (1988), 和美国专利号 5,092,885、5,112,946、5,192,744、5,202,352 和 6,573,256。此外,存在众多可用于抑制血管生成的化合物,例如阻断 VEGF 介导的血管生成途径的肽或试剂、内皮抑制素蛋白或衍生物、血管抑制素的赖氨酸结合片段、黑色素或促进黑色素的化合物、纤溶酶原片段(例如纤溶酶原的 Kringle 1-3)、肌钙蛋白(tropoin)亚基、玻璃粘连蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 的拮抗剂、源自皂角素 B 的肽、抗生素或类似物(例如四环素或新霉素)、含有地诺孕素的组合物、包含与肽结合的 MetAP-2 抑制性核心的化合物、化合物 EM-138、查耳酮及其类似物、和 naaladase 抑制剂。参见,例如美国专利号 6,395,718、6,462,075、6,465,431、6,475,784、6,482,802、6,482,810、6,500,431、6,500,924、6,518,298、6,521,439、6,525,019、6,538,103、6,544,758、6,544,947、6,548,477、6,559,126 和 6,569,845。

[0136] 取决于组合型治疗的性质,可以在给予其它治疗的时候和/或之后继续本发明的治疗剂的给药。多肽治疗剂的给药可以以单剂或以多剂进行。在一些情况下,在常规治疗之前至少几天开始治疗剂的给药,而在其它情况下,在常规治疗临开始之前或进行常规治疗的时候开始治疗剂的给药。

[0137] 在一些实施方式中,本公开提供了用于刺激动脉生成的方法。该方法可以包括给予有此需要的受试者有效量的 D114 信号传导的激动剂。所述受试者可以患有或具有患上缺血性病症的风险。该受试者可以患有冠状动脉疾病,包括,例如,绞痛,或可以患有心肌梗塞。该受试者可以患有外周动脉疾病,例如肢体、脑或器官例如肾脏中的缺血事件或部分阻塞。该受试者可以被诊断为具有患上缺血事件的风险。

[0138] 在一些实施方式中,本公开提供了用于促进在血管中采纳动脉特性的方法。这样的方法可以包括离体给予血管或给予有此需要的受试者有效量的 D114 信号传导的激动剂。血管可以是静脉移植物,例如隐静脉移植物,例如可用于冠状动脉旁路移植术。

[0139] 制剂

[0140] 在一些实施方式中,本发明的治疗剂与药学上可接受的载体一起配制。可以单独给予这样的治疗剂或作为药物制剂(组合物)的成分给予。可以将化合物配制为以任何方便用于人类或兽用医药的方式给药。组合物中还可以存在润湿剂、乳化剂和润滑剂,例如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、矫味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂。

[0141] 在一些方面,本公开提供了药物组合物,其包含任意的靶向 D114、Notch1、Notch4 或该途径的其它成员的多种核酸化合物。药物组合物一般将包括药学上可接受的载体。

[0142] 适合于非肠道给药的药物组合物可以包含一种或多种多肽治疗剂,其与一种或多种药学上可接受的无菌的等渗的水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳液、或无菌粉末组合,所述粉末可以在临近使用前复原为无菌可注射的溶液或分散液,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使所述制剂与预期受体的血液等渗的溶质、或悬浮剂或增稠剂。可用于本发明的药物组合物的合适的水性和非水性载体的例子包括水,乙醇,多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇、等等),及其合适的混合物,植物油,例如橄榄油和可注射的有机酯,例如油

酸乙酯。可以通过使用包衣材料,例如卵磷脂,或通过维持需要的颗粒大小(如果是分散剂),以及通过使用表面活性剂来维持合适的流动性。

[0143] 这些组合物还可以含有佐剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可以通过加入各种抗菌剂和抗真菌剂,例如,对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚山梨酸等来确保对微生物的阻止作用。还可能需要在组合物中包括等渗试剂,例如糖、氯化钠等等。此外,可以通过加入延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和白明胶而产生可注射药物形式的延缓的吸收。

[0144] 可以通过在生物可降解的聚合物例如聚丙交酯-聚乙交酯中形成一种或多种多肽治疗剂的微胶囊基质来制备可注射的长效(depot)形式。取决于药物与聚合物的比例以及所用的特定聚合物的性质,可以控制药物释放的速率。其它生物可降解聚合物的例子包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。还可以通过将药物装入与身体组织相容的脂质体或微乳剂来制备长效可注射制剂。

[0145] 本发明的肽治疗剂的制剂包括适合于口服/鼻服、局部、非肠道、直肠和/或阴道内给药的那些制剂。可以方便地将制剂配制为单元剂型,并可以通过药剂学领域熟知的任何方法来制备。与载体材料混合以产生单一剂型的活性成分的量将根据所治疗的主体、特定的给药模式而变化。与载体材料混合以产生单一剂型的活性成分的量通常是产生治疗效应的化合物的量。

[0146] 在一些实施方式中,制备这些制剂或组合物的方法包括:将另一种类型的抗肿瘤或抗血管生成治疗剂与载体和任选的一种或多种辅助性成分混合。一般地,可以用液体载体或精细分割的固体载体或二者来制备制剂,然后,如果必要的话,将产品塑形。

[0147] 用于口服给药的制剂可以是以下形式:胶囊、扁囊剂、药丸、药片、锭剂(使用香味基底,通常是蔗糖和阿拉伯树胶或黄芪胶)、粉末、颗粒或作为水性或非水性液体中的溶液或悬浮液,或作为水包油或油包水液体乳液,或作为酞剂或糖浆,或作为锭剂(使用惰性基底,例如白明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯树胶)和/或口腔洗液等等,每种包含预定数量的本发明的治疗剂作为活性成分。

[0148] 在用于口服给药的固体剂型(胶囊、药片、药丸、糖衣丸、粉末、颗粒等等)中,可以将一种或多种本发明的多肽治疗剂与一种或多种药学上可接受的载体混合,所述载体例如柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或以下任意的:(1)填充剂或补充剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2)粘合剂,例如,如,羧甲基纤维素、藻酸盐、白明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖、和/或阿拉伯树胶;(3)湿润剂,例如甘油;(4)崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5)溶液阻滞剂,例如石蜡;(6)吸收加速剂,例如季胺化合物;(7)润湿剂,例如,如,十六烷基醇和单硬脂酸甘油;(8)吸附剂,例如高岭土和斑脱土粘土;(9)润滑剂,例如云母、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠、及其混合物;和(10)着色剂。如果是胶囊、药片和药丸,则药物组合物还可以包含缓冲剂。相似类型的固体成分也可以用作软和硬填充的白明胶胶囊中的填充剂,所述胶囊使用赋形剂例如乳糖或奶糖,以及高分子量的聚乙二醇等等。

[0149] 用于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酞剂。除了活性成分之外,液体剂型可以包含本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂、溶解剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、

1,3-丁二醇、油（特别是，棉花籽油、落花生油、玉米胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油）、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和山梨聚糖的脂肪酸酯，及其混合物。除了惰性稀释剂之外，口服组合物还可以包括佐剂，例如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、矫味剂、着色剂、香料和防腐剂。

[0150] 除了活性化合物之外，悬浮液中可以含有悬浮剂，例如乙氧基化异硬脂酸醇、聚氧乙烯山梨醇和山梨聚糖酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、斑脱土、琼脂、和黄芪胶、及其混合物。

[0151] 本发明的治疗剂可通过局部施用到皮肤或粘膜，例如子宫颈和阴道的粘膜。局部制剂可以进一步包括众多已知可以有效作为皮肤或角质层刺透增强剂中的一种多种。这些试剂的例子有：2-吡咯烷酮、N-甲基-2-吡咯烷酮、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、丙二醇、甲醇或异丙醇、二甲基亚砷和氮酮。还可以包括另外的试剂以配制美容上可接受的制剂。这些试剂的例子包括脂肪、蜡、油、染料、香料、防腐剂、稳定剂和表面活性剂。还可以包括角质层分离剂，例如本领域已知的那些。其例子有水杨酸和硫磺。

[0152] 用于局部或透皮给药的剂型包括粉末、喷雾剂、软膏、糊剂、霜剂、洗液、凝胶、溶液、贴片和吸入剂。本发明的多肽治疗剂可以在无菌条件下与药学上可接受的载体以及任意的可能需要的防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。除了本发明的多肽试剂之外，软膏、糊剂、霜剂和凝胶中可以含有赋形剂，例如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄芪胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅树脂、斑脱土、硅酸、云母和氧化锌，或其混合物。

[0153] 除了本发明的多肽治疗剂之外，粉末和喷雾剂可以含有赋形剂，例如乳酸、云母、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚胺粉末，或这些物质的混合物。喷雾剂还可以包含惯用的推进剂，例如氯氟烃和挥发性未取代的烃，例如丁烷和丙烷。

[0154] 阴道内或直肠给药的制剂可配制为栓剂，其是这样制备的：将本发明的一种或多种化合物与一种或多种合适的非刺激性赋形剂或载体混合，所述赋形剂或载体包括例如可可油、聚乙二醇、栓剂用的蜡或水杨酸盐，其在室温是固态的而在体温时是液态的，因此，在直肠或阴道腔内将融化并释放活性化合物。

[0155] 在其它实施方式中，可以在细胞内从真核启动子表达本发明的多肽治疗剂。例如，可以在真核细胞中从合适的载体表达 D114 或 Notch1/Notch4 的可溶性多肽。载体优选为 DNA 质粒或病毒载体。可以基于（但不限于）腺相关病毒、逆转录病毒、腺病毒或甲病毒来构建病毒载体。优选地，载体稳定地进入靶细胞中并维持在其中。或者，病毒载体可用于提供瞬间表达。如果需要的话，可以重复给予这样的载体。编码本发明的多肽治疗剂的载体的输送可以是全身性的，例如通过静脉内或肌肉内给药，或者施用至从患者移植出来的靶细胞，然后再将其重新导入该患者中，或者可以通过其它任何允许将其引入需要的靶细胞中的方式（参见综述：Couture 等人，1996，TIG.，12,510）。

实施例

[0156] 对本发明进行了一般性描述，将通过参考以下实施例更容易地理解本发明，以下实施例的目的仅仅是为了解释本发明的一些方面和实施方式，不是为了限制本发明。

[0157] 实施例 1：小鼠动脉发育过程中对 D114 的剂量敏感性需求

[0158] Duarte 等人 (Genes Dev. 2004 Oct 15;18(20):2474-8) 证明：小鼠 D114 中丧失功能的突变导致血管发生和血管生成的缺陷，并且这些缺陷是剂量依赖性的，D114^{+/-} 小鼠

比纯合子 D114^{-/-} 小鼠显示出更轻的表型。此外, D114 功能的丧失导致动脉血管特性的丧失。这些结果证明了对于 D114 信号传导的敏感性水平,这在 Notch 途径中是史无前例的。血管发育对 D114 剂量的敏感性表明了 D114-Notch1/4 信号传导途径的拮抗剂在抑制血管生成中将是高度有效的。

[0159] 实施例 2 :mDLL4 的过表达导致发育中的小鼠胚胎中的动脉肥大和静脉特性的丧失。

[0160] 在本研究中,本申请人通过产生并鉴定小鼠的功能获得性突变体进一步研究了 mD114 在哺乳动物血管发育中的作用。为了产生一般化的 mD114 的过表达,产生了条件化转基因小鼠系 ZEG-mD114。当与组成型 cre 系 CAG-Cre 小鼠 (Sakai 等人,1997) 杂交时,这些小鼠在鸡 β 肌动蛋白启动子和 CMV 增强子的控制之下表达天然形式的 mD114。下文描述了观察到的功能获得性表型。

[0161] 将 mD114 cDNA 克隆进入 pCALL2-MigR (Lobe 等人,1999) 以产生 pZ/EG-mD114 转基因载体 (图 7),将该载体通过电穿孔导入 R1 小鼠胚胎干 (ES) 细胞。将通过标准方法 (Nagy & Rossant,2000) 从电穿孔的 ES 细胞获得的转基因小鼠系与组成型 cre 系 CAG-Cre 杂交。按照第二报告分子 EGFP 的荧光分析得到的胚胎,所述第二报告分子 EGFP 在那些发生了 Cre 重组的细胞中与 mD114 共表达。发现在双转基因胚胎 (dt) 中 EGFP 的表达是强烈的和一般性的 (图 8),在 E8.5 至 E9.5 时以正常的孟德尔比例发生。在 E9.0 时,这些胚胎显示出头部、心脏、鳃弓和后腹区的严重出血,心包水肿和不完全翻转 (图 8c)。在 E10.5 之后,没有双转基因胚胎得到恢复。

[0162] 在双转基因胚胎的全固定和冷冻切片中以 PECAM1 抗血清进行的免疫染色显示了早在 E8.5 时即发生的动静脉畸形,特别是背主动脉和前主静脉之间的融合区 (图 10)。在这个阶段,还存在程度明显的主动脉肥大,其逐渐变得更严重,直至 E9.5,这提示了 Notch 途径在调节内皮细胞增殖中的作用 (图 9)。与该假设相一致,BrdU 掺入研究显示:在双转基因胚胎的前侧背主动脉中,内皮细胞的增殖平均增加了 40% (未显示)。另一方面,前主静脉 (ACV) 出现了分支,仿佛它们未经过正确的血管生成重塑 (图 9) 或几乎没有重塑,除了直接连接至静脉窦的区域之外 (图 10)。在卵黄囊和头部区域中同样没有发生血管生成重塑,在这两种情况下持续存在初级毛细血管丛 (图 9)。体节间血管比正常的稍大、稍短,这可能是由于动脉和静脉血管之间的融合以及在背的最末端未发生分支的缘故 (图 9)。有时可见到侵入的体节,这提示它们的生长途径方向的破坏 (未显示)。在 E9.5 时,发现 dt 胚胎的主动脉直接与静脉窦区域连接 (图 10),在心脏末端之间产生了动脉微循环。在主动脉与静脉窦连接后主动脉变得严重萎缩,推测这是由于血流不足的结果 (图 9 和 10)。以墨汁注射进行的微血管造影研究显示:在这些突变体中血液从主动脉弓流向主动脉,然后直接流向静脉窦,几乎没有血液到达后侧背主动脉 (图 10)。

[0163] 对动脉和静脉特异性标志物表达的表征揭示了显著的突变表型,其中胚胎中的所有血管都只呈现出动脉标志物。双转基因胚胎的静脉显示出动脉特异性标志物例如 ephrin-B2、连接蛋白 37、hey1 和 notch1 的异常表达 (图 11 和 12)。另一方面,在这些突变体中检测不到静脉标志物 (例如 EphB4) 的表达 (图 13)。此外,在 E9.0 时在突变胚胎的静脉窦区域中检测到了造血簇 (未显示),其通常在主动脉-生殖腺-中肾区域的主要动脉中是特异的,这提供了静脉结构的功能性动脉化的证据。

[0164] mD114 的过表达导致动脉肥大和动脉静脉分路、定位性血管生成停滞、内皮细胞动脉特性标志物在静脉血管中的异常表达以及内皮细胞静脉特性标志物的下调。

[0165] 这些结果证明了 mD114 在建立内皮动脉细胞特性中的作用,并且提示其参与成血管细胞/内皮细胞增殖和血管生成的调节。

[0166] 实施例 3:人类 δ 样 (hd114) 调节内皮细胞管的形成和内皮细胞的萌发

[0167] 将人类 d114 (SEQ ID NO:1 的氨基酸 26-524) 的细胞外结构域克隆进入具有 His 标签或 Fc 标签的哺乳动物表达载体,并在 293 细胞和 CHO-K 细胞中作为分泌蛋白表达。首先显示纯化的 d114 与 Notch1 结合,然后测试当在 matrigel 上培养时,其对于内皮细胞的体外活性。参见图 10 和 11。在 8-24 小时内,内皮细胞组织起来以形成管状结构,在生长因子剥夺的条件下管的形成是最少的。以 20ng/ml 加入 VEGF 诱导了管的形成。当在缺少生长因子的条件下测试时,D114 以较低的剂量水平 (100 和 200ng/ml) 诱导管的形成;而在较高的剂量水平 500ng/ml 时,不能诱导管的形成 (图 12)。但是,当向含有 VEGF 的培养物中加入 D114 时,其不诱导管的形成。

[0168] 还在萌发检验中测试了人类 d114,其中以不同剂量水平的 d114 处理内皮细胞球形体 (图 13 和 14)。在较低的剂量水平时诱导了萌发而在较高的剂量水平时不能促进萌发 (图 13)。与此相反,较低水平的 d114 对于 VEGF 处理的内皮细胞萌发的影响是最小的,但是在较高的剂量水平时萌发显示出显著降低 (图 14)。

[0169] 实施例 3 的方法和材料

[0170] 内皮细胞、平滑肌细胞和共培养球形体的产生

[0171] 产生确定细胞数目的内皮细胞和平滑肌细胞球形体。简而言之,将 SM 或 HUVE 细胞悬浮于相应的含有 0.25% (w/v) 羧甲基纤维素的培养基中并培植于非粘附性圆底 96 孔板。在这些条件下,所有的悬浮细胞均促成每孔中确定大小和细胞数目的单一球形体的形成 (标准大小:2250 个细胞/球形体;体外血管生成:750-1000 细胞/球形体)。为了产生共培养球形体,将等量的悬浮的 SM 和 HUVE 细胞 (标准大小:1125 个 SMC 和 1125 个 HUVEC/球形体;体外血管生成:500 个 SMC 和 500 个 HUVEC/球形体) 混合并培植于如上所述的非粘附性圆底 96 孔板中。将球形体培养至少 24 小时并用于相应的实验。

[0172] 体外血管生成检验

[0173] 按照以前的描述,使用内皮细胞、平滑肌细胞和共培养球形体定量测定胶原凝胶中的体外血管生成。简而言之,过夜产生含有 750-1000 个细胞的球形体,然后将其包埋于胶原凝胶中。在使用之前制备胶原贮存液:将 8 体积的大鼠尾的酸性胶原提取物 (在 4℃ 平衡至 2mg/ml) 与 1 体积的 10x EBSS (Gibco BRL, Eggenstein, Germany) 混合;以 1 体积 0.1N 的 NaOH 将 pH 调节至 7.4。将此贮存液 (0.5ml) 与 0.5ml 室温培养基 (ECGM 基础培养基 [PromoCell], 其中含有 40% FCS, 含有 0.5% (w/v) 的羧甲基纤维素以防止球形体在胶原凝胶聚合之前沉降)、50 个球形体和相应的测试物质混合。将含有凝胶的球形体迅速转移至预热的 24 孔平板并让其聚合 (1 分钟),然后将 0.1ml 的 ECGM 基础培养基加到凝胶上面。在 37℃, 5% CO₂ 和 100% 湿度孵育凝胶。24 小时后,通过使用数码成像软件 DP-Soft (Olympus) 测定从每个球形体 (100 倍放大的目镜网格) 生长出来的萌发的长度来数码地定量测定体外血管生成,每个实验组和实验分析至少 10 个球形体。

[0174] 荧光细胞标记

[0175] 按照生产商的说明书,使用荧光染料 PKH26(红色荧光)和 PKH67(绿色荧光)标记 SMC 和 HUVEC。经胰蛋白酶作用后,使用 HBSS 将悬浮的细胞洗涤一次,以 PKH26 或 PKH67 将膜标记 5 分钟,并使用相应的培养液洗涤三次。使用荧光显微镜检测细胞标记的质量。

[0176] 超结构分析

[0177] 将球形体固定于 Karnovsky 固定液中,在 1.0%四氧化锇中后固定,在系列梯度的乙醇中脱水,并包埋于 Epon。切取 0.5 μm 的切片并以 azure11 亚甲蓝染色以进行光学显微镜分析。切取超薄切片 (50–80nm),收集在铜网格中,并以乙酸双氧铀和柠檬酸铅进行自动染色,以进行 Zeiss EM 10 电子显微镜观察。

[0178] 为了定量测定表面球形体内皮细胞上的内皮细胞间连接复合体,对两个独立制备物中随机挑选的 20 个球形体 / 实验组中的所有连接复合体进行计数。结果表示为连接复合体的数目 / 100 个表面单层内皮细胞 (每个实验组分析至少 200 个 EC)。

[0179] 形态学和免疫组化分析

[0180] 收集球形体并在 200g 离心 3 分钟。通过胰蛋白酶作用收集培养的单层细胞并通过离心将其收集。将球形体和沉淀的单层细胞固定于含有 4%多聚甲醛的 HBSS 中并进行石蜡包埋处理;脱水后(系列梯度的乙醇和异丙醇,每个进行 1 小时),首先将样品于 60°C 在石蜡 I(熔解温度为 42°C)中浸没 12 小时。再次通过离心收集球形体和单层细胞并于 70°C 在石蜡 II(熔解温度为 56°C)中浸没 12 小时。最后,将得到的石蜡块冷却至室温并裁减,以进行切片。对于组织化学分析,切取石蜡切片 (4 μm)、去石蜡并复水化。然后将切片与 3%的 H_2O_2 在水中孵育以抑制内源过氧化物酶。在磷酸盐缓冲液中洗涤之后,将切片与封闭溶液 (10%正常的山羊血清)孵育 30 分钟,然后在 4°C湿室中与相应的一抗孵育过夜。然后,将其与二抗(生物素化的山羊抗兔子免疫球蛋白或生物素化的山羊抗小鼠免疫球蛋白抗体;Zymed, San Francisco, Calif)孵育,暴露于链霉亲和素过氧化物酶,以作为底物的二氨基联苯胺显色,以苏木精进行弱复染。

[0181] 球形体中细胞凋亡的检测

[0182] 按照生产商的说明书,应用原位细胞死亡检测试剂盒,通过对核小体片段化产物的组织化学检测 (TUNEL) 来显示凋亡细胞。简而言之,进行去石蜡处理并以蛋白酶 K 消化之后,通过使用末端脱氧核苷酸转移酶在 3'端以荧光素-dUTP 标记来检测包埋于石蜡中的球形体的切片中的核小体片段化产物。通过直接进行荧光显微镜镜检,或者将切片与过氧化物酶标记的抗荧光素抗体孵育并以作为底物的二氨基联苯胺显色后间接进行荧光显微镜镜检来显示所述标记。

[0183] DNA 片段酶联免疫检验 (ELISA)

[0184] 通过 ELISA 进行片段化的 DNA 的定量测定(细胞死亡检测 ELISA 试剂盒)。在室温进行 60 分钟的裂解,剧烈摇动,以此来提取 10 个球形体的片段化 DNA。在 13,000g 将提取物离心 10 分钟,按照生产商的说明书,将 300 μl 的上清液与过氧化物酶标记的抗 DNA 抗体和生物素化的抗组蛋白抗体在链霉亲和素包被的平板中孵育。洗涤之后,通过与过氧化物酶底物 ABTS (2,2' - 联氮 - 双 [3- 乙基苯并噻唑 - 磺酸盐]) 显色来显示单 - 和寡聚核小体 DNA 的结合。在 405nm 使用自动化微量滴定板读数器分析平板。

[0185] 统计学分析

[0186] 所有的结果均表示为平均值 $\pm$ SD。通过非配对 Student t 检验分析实验组之间的

差异。P 值 < 0.05 被认为是统计学上显著的。

[0187] 实施例 4 : 胚胎和成体 D114^{+/-} 突变体小鼠中的血管增殖

[0188] 由于血管发育的缺陷, D114^{-/-} 和多数 D114^{+/-} 小鼠在子宫内即死亡。D114^{+/-} 胚胎的封闭检测显示: 直至 E8.75 之前其一直具有正常的血管发生, 到 E8.75 时首次血管缺陷变得明显。具有增加的血管增殖, 其显示出蜂巢模样并且缺少分级的动脉分支和成熟 (图 15A)。我们接下来研究了成体 D114^{+/-} 突变体和野生型小鼠中的血管反应和重塑。将 S180 肿瘤细胞植入小鼠 (6 周龄)。通过 PECAM 和 α -SMA 免疫定位检测 10 天之后收集的肿瘤和邻近组织的血管反应。野生型小鼠显示出肿瘤中的增加的血管反应 (图 15B), 并且血管具有组织化的网络结构。与此相比, D114^{+/-} 小鼠显示出血管反应的更高的增长 (1.5 倍增长, P < 0.05)。此外, 血管显示出缺少组织架构并且缺少分级。

[0189] 因此, 血管反应增加了, 但是缺少成熟化。新形成的血管的成熟伴随周细胞的募集。我们假设 D114^{+/-} 小鼠中新形成的血管在周细胞募集方面可能是缺陷的。因此, 在野生型小鼠的肿瘤血管中, 周细胞与 α -SMA 抗体的共定位显示出丰富的信号; 而 D114^{+/-} 小鼠的肿瘤血管显示出周细胞覆盖的显著缺陷 (图 15D)。周细胞的募集减少可能促成 D114^{+/-} 小鼠肿瘤血管中血管分级的缺失。此外, 这些发现揭示出 D114 在周细胞向新形成的血管募集中的新作用。我们接下来想确定成体小鼠中血管反应的缺陷是否导致基因表达的改变, 特别是 d114 表达的改变。为此, 我们使用包括 LacZ 报告分子的靶载体产生突变体小鼠以观察 D114 启动子的活性。D114^{+/-} 突变体小鼠在邻近肿瘤的正常组织中显示出高度结构化的表达 LacZ 的血管 (图 15C), 而在肿瘤血管内的血管中 LacZ 的活性显著升高 (图 15C), 这表明肿瘤脉管系统中 D114 的激活。进行了肿瘤血管的连续切片中的 PECAM 定位以确定肿瘤脉管系统中 D114 激活的程度。D114 在多数肿瘤血管中表达, 而不是所有肿瘤血管都有表达 (图 15E)。

[0190] 实施例 5 : 可溶性 D114 抑制 D114-Notch 信号传导

[0191] 我们接下来想确定可溶性 D114 是否能够拮抗 Notch 的激活。在哺乳动物细胞中表达了与 AP、Fc 或 His 标签融合的人类 D114 的细胞外结构域, 经纯化后确定其与 Notch1-Fc (图 16A) 和 Notch4-Fc (数据未显示) 结合, 但不与 Notch3-Fc (图 16A) 或单独的 Fc (数据未显示) 结合。Notch 的激活依赖于细胞环境中 D114 的表达。为了测定可溶解形式的 D114 不诱导 Notch 的激活, 我们将各种 D114 构建体引入内皮细胞中并通过 RT-PCR 检测下游响应 Notch 的基因 (Hey1、Hey2、Hes1 和 Hes2) 的诱导。D114-Fc 或 D114-His 没有诱导 Hes2, 这显示了 Notch 激活的缺失的代表性数据 (图 16B)。Hes2 在 Notch 的下游, 当全长 D114 存在于细胞环境中时, 全长 D114 诱导 Hes2 (图 16C)。我们接下来确定了 sD114 是否能够抑制细胞 D114 在诱导 Notch 信号传导中的活性。为此, 将全长 D114 (D114-FL) 引入 choK 细胞中并与表达靶 Notch1 和 Notch 4 的 HUVEC 细胞共培养。在人类内皮细胞中, 使用人类基因特异性引物对, D114-FL 诱导 Notch 调节的基因 Hey1、Hey2、Hes1 和 Hes2 (图 16C)。在相同的实验中, 加入人类 sD114-Fc 和 sD114-His 阻止了 D114-FL 诱导的 Hey1、Hey2、Hes1 和 Hes2 的激活 (图 16C)。因此, 可溶性 D114 作为 D114-Notch 信号传导的拮抗剂发挥作用。基因表达的定量显示: D114-Fc 将 Hey1、Hey2、Hes1 和 Hes2 分别抑制到对照的 69%、26%、29% 和 46%, 而 sD114-His 将它们的表达分别减少至 48%、3%、10% 和 28%。

[0192] 实施例 6 : sD114 在体内诱导 Matrigel 胶塞的血管化

[0193] 为了进一步证明 sD114 能够直接在体内抑制血管生成,我们进行了小鼠 Matrigel 胶塞实验。以 VEGF、sD114-Fc、sD114-His 或各种组合补充 Matrigel,并注射进入 Balb/C nu/nu 小鼠的腹部皮下组织中。6 天之后,不含生长因子的 Matrigel 胶塞几乎没有血管化(图 17A),而 VEGF 募集内皮细胞并遍布胶塞形成各种阶段的血管结构,包括那些具有开口腔的血管结构,所述腔中含有红血细胞。在 VEGF 的环境中,sD114 显示出血管结构的显著增加(图 17),其类似于细绳状,多数缺乏腔。类似地,在没有 VEGF 的情况下,单独的 sD114 也能够诱导血管生成。以 PECAM 进行的免疫化学检测进一步证明了 VEGF 诱导的填充了红血细胞的大血管与 sD114 诱导的表达 PECAM 但缺少腔和缺少灌注(由红血细胞的存在定义)的血管之间的差异(图 17B)。还使用 Drabkin 反应剂试剂盒通过 Drabkin 方法特异性地定量测定了血红蛋白。将倍数变化与表示为 1 的对照测量值比较。因此,在对照、VEGF、D114-Fc 和 D114-His 组中血红蛋白水平的中位数分别为 1、9.7、2.5 和 3。与只含 VEGF 相比,含有 sD114 的 Matrigel 胶塞中的血红蛋白浓度几乎降低了 4 倍。

[0194] 实施例 7:sD114 抑制无胸腺小鼠中人类肿瘤的生长

[0195] 肿瘤血管相对于静止血管而言具有不同的基因表达模式。D114 是一些人类和鼠肿瘤的肿瘤血管中诱导的基因之一(图 15C)。D114 诱导可能是肿瘤血管的一般性特征,一种可能对肿瘤生长有益的特征。发现 D114 主要在肿瘤脉管系统中表达。为了确定 sD114 对肿瘤细胞的效应,在体外以各种浓度的 sD114 测试了肿瘤细胞的存活性(HT29、MCF-7、SCC-15、B16、PC3 和 KS-SLK 细胞系),没有观察到效应(数据未显示)。鉴于 D114 在体内具有显著影响血管生成的能力,以及观察到的血管反应的 sD114 变化,我们推论 sD114 可能在体内调节肿瘤生长。因此,我们在肿瘤异种移植模型中检测了 sD114 的体内活性。以含有载体或 sD114 的 Matrigel 预固定 HT29(人类结肠癌细胞系)和 KS-SLK(人类卡波西肉瘤细胞系)细胞并通过皮下进行移植。与对照肿瘤相比,补充了 sD114 的异种移植植物在 2 周内显示出显著减少的肿瘤生长(图 18A)。在 KS-SLK 中获得了相似的结果。在 2 周时对照肿瘤的肿瘤体积中位数是 583mm^3 ;而在含有 sD114-His 的 Matrigel 中是 267mm^3 。

[0196] 我们接下来研究了当肿瘤细胞产生 sD114 时,sD114 的效应。以表达载体转染 HT29 和 KS-SLK 细胞以产生 D114-FL、sD114-Fc、sD114-His,以 Western 印迹检验确认每种蛋白的表达(数据未显示)。截短的 CD4 的共表达允许将转染的细胞分选至 90% 以上的纯度。将等数目的细胞(每个注射位点 1×10^6 个细胞)植入无胸腺小鼠(每组 6-8 个肿瘤)并在 2 周的时间内测定肿瘤体积。在仅有载体的组以及 D114-FL 组中,肿瘤体积是相似的;而 sD114-Fc 和 sD114-His 显著减小肿瘤体积(sD114-His 减小 70% 以上)(图 18B)。使用 PECAM 免疫染色测定收获时的肿瘤的血管密度。表达 D114-FL 或仅有载体的肿瘤显示出高度结构化的血管(图 18C)。相反,表达 sD114 的肿瘤显示出血管构架中的显著变化。与仅有载体或 D114-Fc 的组相比,表达 sD114 的肿瘤脉管结构中具有多得多的分支点(图 18)。在 KS-SLK 肿瘤异种移植植物中获得了相似的结果。血管显著较细并且经常缺少明显的腔。这些特征使人联想到 D114^{+/-} 小鼠以及注入了 sD114 的 Matrigel 胶塞中的血管分支。与不完善形成的缺少腔的细血管一致,我们检测了缺氧区域。缺氧分析仅集中在存活的肿瘤区域。在 sD114-Fc 和 sD114-His 中存在大的和宽的缺氧区域。这些区域的定量检测显示出:与表达 D114-FL 和载体的肿瘤相比,表达 sD114 的肿瘤的缺氧区域显著增加(图 18D)。还使用荧光标记的与血管腔表面结合的植物凝集素测定了肿瘤灌注。与 D114-FL 和载体转染的细

胞相比,在表达 sD114 的肿瘤中具有非常有限的灌注(图 18E)。此外,我们通过定位 α -SMA 的表达测定了新形成的肿瘤血管中周细胞的存在。野生型小鼠中的肿瘤血管显示出正常的周细胞覆盖,而 D114^{+/-} 小鼠中的肿瘤血管呈现出周细胞覆盖的显著减少,如内皮细胞沿线(lining)的 α -SMA 阳性细胞的数目所确定。类似地,sD114 减少了带有人类肿瘤的无胸腺小鼠的肿瘤血管中的周细胞数目。

[0197] 材料和方法

[0198] 实施例 4-7 中使用的材料和方法如下所述:

[0199] 胚胎和成体中 D114 种系突变体小鼠的分析:按照以前的描述¹⁶,在 CD1 背景下产生了 D114 敲除小鼠。D114^{-/-} 和多数 D114^{+/-} 小鼠胚胎具有致死表型。以血小板内皮细胞粘附分子(PECAM)和 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)染色显示了 D114^{+/-} 胚胎的脉管结构。研究了存活至成年的 D114^{+/-} 小鼠的脉管结构中的变化。将 5×10^6 个肿瘤细胞(S180 小鼠肉瘤细胞系)移植进入 D114^{+/-}CD1 雄性小鼠和野生型小鼠(6-8 周龄)。2 周后收集肿瘤进行分析。通过使用包括 LacZ 报告分子的靶载体研究了 D114^{+/-} 小鼠的肿瘤组织和邻近的正常组织中 D114 的表达。通过标准技术¹⁸ 进行全固定胚胎免疫组化(PECAM 抗体来自 Pharmingen)和 lacZ 染色。

[0200] RT-PCR 分析:使用 SuperScript Preamplification System kit(GIBCOBRL)从总 RNA 合成 cDNA 的第一条链,并使用(0.1 μ g)及 D114、GAPDH、 β -肌动蛋白、Hey1、Hey2、Hes1、Hes2 特异性探针进行 PCR(本研究中使用的引物对备索),通过溴化乙锭染色显示 PCR 产物。

[0201] 抗体及其它反应剂:抗-PECAM(M20)来自 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA),抗- α -SMA(Dako, Carpinteria, CA)、IgG-Fc 片段和抗人类 Fc 来自 Jackson Laboratories(Bar Harbor, ME),Notch1-Fc 和 Notch3-Fc 来自 R&D(R&D systems),缺氧探针-1 来自 Chemicon(Chemicon International, Temecula, CA),若丹明标记的蓖麻凝集素 I(RCA)来自 Vector labs(Vector labs, Burlingame, CA),碱性磷酸酶底物 PNPP 购自 Sigma(Sigma Chemicals, St. Louis, MO)。

[0202] 细胞培养:正常人类脐带静脉内皮细胞(HUVEC)和人类脐带动脉内皮细胞(HUAEC)获自 Cambrex(Walkersville, MD)并维持在补充了 EGM2 的培养基(Invitrogen)中。对于所有的实验,使用 4 个或更少传代的 HUVEC 和 HUAEC,并且从汇合平皿收集。ChoK 细胞系获自 American Type Culture Collection(Manassas, VA)并在推荐的条件下培养。

[0203] D114 构建体:通过从由胎儿肺组织制备的人类 cDNA(Clontech)进行 PCR 扩增来克隆全长的人类 D114 基因。全长(氨基酸残基 1-685)和 C 末端 His 标记的细胞外结构域(氨基酸残基 1-486)蛋白均表达自 pcDNA3.1 表达质粒(Invitrogen)。AP 融合蛋白表达自 pAptag-2 载体(GeneHunter Corp.)。所有的蛋白均在 ChoK 细胞(ATCC)中使用 Lipofectamine 2000(Invitrogen)进行瞬间表达。从镍-NTA 柱和蛋白 A-Sepharose 柱纯化 His 标记的和 Fc 融合的 D114 蛋白。

[0204] Notch 受体结合和激活途径:在 4 °C 在 PBS 中将 5 μ g/ml 的 Notch1-Fc 和 Notch3-Fc 在 96 孔板中进行过夜包被。在 PBS 和 0.1% Tween-20(PBST)中稀释 D114-AP,将 50 μ l 的每种稀释液与 Notch-Fc 一起孵育并以 PBS 中的 5% 牛奶封闭 1 个小时。以 PBST 将孔洗涤三次,以 PNPP 显色并在 OD₄₀₅ 读数。通常,人类脐带静脉内皮细胞(HUVEC)在 100-mm

的平皿中生长至 80% 的汇合度并与瞬间表达全长 D114 的 choK 细胞共培养 (1 : 1 比例) 或仅转染了载体的 choK 细胞共培养。以 rD114-His 或 rD114-Fc 处理共培养物 24 小时的时间, 收集细胞并分离总 RNA 以进行进一步分析²⁰。

[0205] 细胞分选: 按照生产商的指示使用 MACSelect 4.1 转染细胞选择试剂盒进行转染细胞的分选。简而言之, 以含有目标质粒的表达载体和 pMACS 4.1 质粒共转染细胞。36 小时后, 以 5mM 的 EDTA 收集细胞并在 4°C 与 MACSelect 4Microbead 一起孵育 15 分钟。然后将细胞悬浮液通过磁场中的 MS+ 柱。3 次洗涤之后, 将柱从磁场中取出来并在培养液中洗脱所选择的细胞。使用荧光 D114 单克隆抗体通过 FACS 分析所分选的细胞从而确定选择效率 (数据未显示)。

[0206] EC 管形成检验: 将 Matrigel (250 μ L; BD Biosciences, Palo Alto, CA) 置于冰冷的 24 孔板的每个孔中。将平板在室温中放置 15 分钟, 在 37°C 中放置 30 分钟以使 Matrigel 聚合。将 EGM2 培养基中的 HUVEC 以 1×10^4 个细胞 / 孔的浓度与各种浓度的测试材料一起培植于平板中, 一式三份。孵育 6 小时和 24 小时之后, 使用 Bioquant Image Analysis system (Bioquant, Nashville, TN) 获取每个浓度的图像。使用 ImageJ 软件 (NIH, Bethesda, MD) 比较不同小组之间形成的管的长度和结点的数目。实验重复进行两次¹⁹。

[0207] 血管萌发: 内皮细胞球形体按照如下方式产生: 将含有 0.25% (w/v) 羧甲基纤维素的培养基中的等量内皮细胞 (1000 个细胞 / 孔) 悬浮并培植于非粘附性圆底 96 孔板中。使内皮细胞悬浮以在每个孔中形成单一的球形体。将球形体包埋于胶原凝胶中并培养至少 24 小时。使用数码成像 DP-Soft (Olympus) 数码地记录萌发 (100 倍放大的目镜网格), 每个实验组和实验分析至少 10 个球形体。还通过使用 ImageJ 测定萌发的长度来定量确定萌发¹⁹。

[0208] 小鼠 Matrigel 胶塞血管生成检验: 使用 Matrigel 胶塞检验分析了体内血管生成。Matrigel 在体温时迅速形成固态凝胶, 将因子捕获以允许缓慢释放和向周围组织的延长性暴露。在 4°C 将液体形式的 Matrigel (8.13mg/mL, 0.5mL) 与单独的载体 (含有 0.25% BSA 的 PBS) 或 VEGF, 或 sD114, 或 VEGF 和 sD114 混合。沿着腹膜中线将 Matrigel (0.5mL) 注射进入雌性 Balb/Cnu/nu 小鼠 (6 周龄, 每组 5 只) 的腹部皮下组织。在第 6 天, 将小鼠进行人道主义处死并回收胶塞、称重并分割以进行血红蛋白测定和免疫组化分析。通过 PECAM 免疫染色建立渗透细胞的血管特性。实验重复进行三次。使用 ImageJ 计算每个切片中的血管化区域。使用生产商推荐的程序通过 Drabkin 方法 (Drabkin reagent kit 525; Sigma, St. Louis, MO) 测定一半 Matrigel 胶塞中的血红蛋白。

[0209] 免疫组化和免疫荧光: 使用标准方法^{16,19} 处理福尔马林固定的石蜡包埋的组织的切片 (5 μ m)。在 4°C 将切片与一抗孵育过夜并在室温与合适的二抗孵育 1 个小时。根据生产商的指示使用来自 Vector Laboratories (Burlingame, CA) 的 ABC 染色试剂盒定位抗体的结合, 使用 DAB 底物溶液 (Vector Laboratories) 检测过氧化物酶活性。常规的阴性对照为: 仅有一抗和二抗以及以正常的 IgG 同种型替换一抗。使用 ImageJ 建立阳性染色区域并通过 Student t 检验进行分析。

[0210] 以相似的方式进行荧光免疫染色以检测 EC 特异性标志物包括 PECAM 的表达水平。使用合适的荧光素偶联的二抗 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 并以 4', 6-联脒-2-苯基吡啶二盐酸盐 (DAPI) 复染细胞核。以 Vectashield 抗衰减封固溶液 (Vector Laboratories)

封固玻片,使用 Olympus AX70 荧光显微镜和 Spot v2.2.2(Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) 数码成像系统获得图像。

[0211] 小鼠肿瘤异种移植物:将肿瘤细胞 (1.5×10^6) HT29(人类结肠癌细胞系)或 KS-IMM(人类卡波西肉瘤细胞系)通过皮下移植进入雄性无胸腺 BalbC nu/nu(6-8 周龄,每组 6 只小鼠并重复两次)的腰窝。为了评价 sD114 的局部效应,将肿瘤细胞与含有或不含有 $5 \mu\text{g/ml}$ sD114 的 Matrigel 混合(1 : 1 体积 / 体积;BD Biosciences)。在第 14 天按照 $0.52 \times a \times b^2$ 的估计测定肿瘤体积,其中 a 和 b 是明显肿瘤的最大和最小长度。使用 Student t 检验比较肿瘤体积, $P < .05$ 被认为是统计学上显著的。将动物进行人道主义处死并收集肿瘤和邻近的正常组织。将收集的组织分割以进行福尔马林固定或 OCT 冷冻以进行分析。使用在收集肿瘤之前 1 个小时根据推荐的程序以 60mg/kg 的剂量在腹膜内注入并定位的缺氧探针 -1 (HP1-100, Chemicon) 研究缺氧的分布和强度。使用在收集肿瘤之前 10-15 分钟注入的若丹明标记的蓖麻凝集素 I (Vectorlabs) 研究血管灌注并根据生产商推荐的程序进行分析。所有的程序经过我们的机构动物管理和使用委员会批准并根据动物关怀条例的规定进行。

[0212] 参考文献

[0213] Adams, R. H. , Wilkinson, G. A. , Weiss, C. , Diella, F. , Gale, N. W. , Deutsch, U. , Risau, W. and Klein, R. (1999). *Genes Dev* 13, 295-306.

[0214] Artavanis-Tsakonas, S. , Rand, M. D. and Lake, R. J. (1999). *Science* 284, 770-6.

[0215] Duarte, A. , Hirashima, M. , Benedito, R. , Trindade, A. , Diniz, P. , Bekman, E. , Costa, L. , Henrique, D. , Rossant, J. (2004) *Genes Dev* 18, 2474-8.

[0216] Fischer, A. , Schumacher, N. , Maier, M. , Sendtner, M. and Gessler, M. (2004). *Genes Dev* 18, 901-11.

[0217] Gale, N. W. , Baluk, P. , Pan, L. , Kwan, M. , Holash, J. , DeChiara, T. M. , McDonald, D. M. and Yancopoulos, G. D. (2001). *Dev Biol* 230, 151-60.

[0218] Iso, T. , Hamamori, Y. and Kedes, L. (2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 543-53.

[0219] Krebs, L. T. , Xue, Y. , Norton, C. R. , Shutter, J. R. , Maguire, M. , Sundberg, J. P. , Gallahan, D. , Closson, V. , Kitajewski, J. , Callahan, R. 等人 (2000) *Genes Dev* 14, 1343-52.

[0220] Lawson, N. D. , Vogel, A. M. and Weinstein, B. M. (2002) *Dev Cell* 3, 127-36.

[0221] Nagy, A. and Rossant, J. (2000). In *Gene targeting: a practical approach*, (ed. A. L. Joyner), pp. 177-206. New York :Oxford University Press.

[0222] Mumm, J. S. and Kopan, R. (2000) *Dev Biol* 228, 151-65.

[0223] Sakai, K. and Miyazaki, J. (1997) *Biochem Biophys Res Commun* 237, 318-24.

[0224] Shutter, J. R. , Scully, S. , Fan, W. , Richards, W. G. , Kitajewski, J. , Deblandre, G. A. , Kintner, C. R. and Stark, K. L. (2000) *Genes Dev* 14, 1313-8.

[0225] Uyttendaele, H. , Marazzi, G. , Wu, G. , Yan, Q. , Sassoon, D. and Kitajewski, J. (1996) *Development* 122, 2251-9.

[0226] Yoneya 等人 *J. Biochem.* Vol. 129, pp. 27-34 (2001)

- [0227] Li 等人 Genomics. 1998 Jul 1 ;51(1) :45-58.
- [0228] Lobe 等人, Dev Biol. 1999 Apr 15 ;208(2) :281-92.
- [0229] Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature. 1997 ;386 :671-674.
- [0230] Rossant J and Hirashima M. Vascular development and patterning :making the right choices. Curr Opin Genet Dev. 2003 ;13 :408-412.
- [0231] Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. Curr Mol Med. 2003 ;3 :643-651.
- [0232] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature. 2005 ;438 :932-936.
- [0233] Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, 等人 Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature. 1996 ;380 :439-442.
- [0234] Bray SJ. Notch signalling :a simple pathway becomes complex. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 ;7 :678-689.
- [0235] Iso T, Hamamori Y, Kedes L. Notch signaling in vascular development. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 ;23 :543-553.
- [0236] Hainaud P, Contreres JO, Villemain A, 等人 The Role of the Vascular Endothelial Growth Factor-Delta-like 4 Ligand/Notch4-Ephrin B2 Cascade in Tumor Vessel Remodeling and Endothelial Cell Functions. Cancer Res. 2006 ;66 :8501-8510.
- [0237] Krebs LT, Xue Y, Norton CR, 等人 Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. Genes Dev. 2000 ;14 :1343-1352.
- [0238] Uyttendaele H, Marazzi G, Wu G, Yan Q, Sassoon D, Kitajewski J. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. Development. 1996 ;122 :2251-2259.
- [0239] Shutter JR, Scully S, Fan W, 等人 Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. Genes Dev. 2000 ;14 :1313-1318.
- [0240] Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. Cell. 1998 ;93 :741-753.
- [0241] Gerety SS, Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. Mol Cell. 1999 ;4 :403-414.
- [0242] Lawson ND, Vogel AM, Weinstein BM. sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. Dev Cell. 2002 ;3 :127-136.
- [0243] Fischer A, Schumacher N, Maier M, Sendtner M, Gessler M. The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. Genes Dev. 2004 ;18 :901-911.
- [0244] Duarte A, Hirashima M, Benedito R, 等人 Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. Genes Dev. 2004 ;18 :2474-2478.

[0245] Krebs LT, Shutter JR, Tanigaki K, Honjo T, Stark KL, Gridley T. Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes Dev.* 2004 ;18 :2469-2473.

[0246] Hogan B, Beddington R, Constantini F, and Lacy E. Manipulating the mouse embryo. Cold Spring Harbor, NY :Laboratory Press ;1994.

[0247] Kertesz N, Krasnoperov V, Reddy R, 等人 The soluble extracellular domain of EphB4(sEphB4) antagonizes EphB4-EphrinB2 interaction, modulates angiogenesis, and inhibits tumor growth. *Blood.* 2006 ;107 :2330-2338.

[0248] Xia G, Kumar SR, Hawes D, 等人 Expression and significance of vascular endothelial growth factor receptor 2 in bladder cancer. *J Urol.* 2006 ;175 :1245-1252.

[0249] Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, 等人 Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996 ;380 :435-439.

[0250] Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992 ;359 :843-845.

[0251] Mailhos C, Modlich U, Lewis J, Harris A, Bicknell R, Ish-Horowicz D. Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. *Differentiation.* 2001 ;69 :135-144.

[0252] Diez H, Fischer A, Winkler A, 等 人 Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate. *Exp Cell Res.* 2006.

[0253] 通过引用的方式并入

[0254] 本文提及的所有公开物和专利皆通过引用的方式全文并入本文,如同每篇单独的公开物或专利均特别且单独被指明通过引用的方式并入。

[0255] 虽然已经讨论了本发明的具体实施方式,但是以上说明书仅是为了解释而不是为了限制。在阅读了本说明书和以下权利要求书之后,本发明的很多变体对于本领域技术人员将是显而易见的。本发明的完整范围应该通过参见以下权利要求书以及其等同物的完整范围和说明书以及这样的变体而确定。

[0001]

序列表

<110> 瓦斯基因治疗公司 (VASGENE THERAPEUTICS, INC.)

<120> 使用和鉴定 δ 样 4 的调节子的方法

<130> VASG-PW2-006

<140> PCT/US2008/013899

<141> 2008-12-19

<150> 12/005,054

<151> 2007-12-20

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 685

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Ala Ala Ala Ser Arg Ser Ala Ser Gly Trp Ala Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Val Ala Leu Trp Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Val Phe Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly Val Leu Ala Ser Gly Arg
35 40 45

Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys His
50 55 60

Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys Thr Phe Gly Thr Val Ser
65 70 75 80

Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala Val Arg Asp Asp Ser Ser
85 90 95

Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp Pro
100 105 110

[0002]

Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp His Ala Pro Gly Asp Asp		
115	120	125
Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro Asp Ala Leu Ile Ser Lys Ile Ala		
130	135	140
Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn Trp Leu Leu Asp Glu Gln		
145	150	155 160
Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys Ser		
	165	170 175
Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg Leu Cys Lys Lys Arg Asn		
	180	185 190
Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro Asp Gly Asn Leu Ser Cys		
	195	200 205
Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln Gln Pro Ile Cys Leu Ser		
	210	215 220
Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Ala Glu Cys Leu		
225	230	235 240
Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro His		
	245	250 255
Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr Pro Trp Gln Cys Thr Cys		
	260	265 270
Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr Cys		
	275	280 285
Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys Ser Asn Ser Gly		
	290	295 300
Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Arg Pro Gly Tyr Thr Gly Val Asp		
305	310	315 320
Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser Asn Pro Cys Arg Asn Gly		
	325	330 335
Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr His Cys Leu Cys Pro Pro		

[0003]

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

[0004]

Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln Lys Lys
580 585 590

Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly Lys Gln
595 600 605

Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Pro Leu Gly Arg
610 615 620

Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly Glu
625 630 635 640

Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile Ser
645 650 655

Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu Ile
660 665 670

Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
675 680 685

<210> 2

<211> 3383

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

```

gctgcgcgca ggccgggaac acgaggccaa gagccgcagc cccagccgcc ttggtgcagc 60
gtacaccggc actagccgc ttgcagcccc aggattagac agaagacgcg tctcgggcgc 120
ggctgcgcgc cagccgtagt cacctggatt acctacagcg gcagctgcag cggagccagc 180
gagaaggcca aaggggagca gcgtcccgag aggagcgccct cttttcaggg accccgccgg 240
ctggcggacg cgcgggaaag cggcgtcgcg aacagagcca gattgagggc ccgcgggtgg 300
agagagcgac gcccgagggg atggcggcag cgtcccgag cgcctctggc tgggcgtac 360
tgctgctggt ggcactttgg cagcagcgcg cgcccggtc cggcgtcttc cagctgcagc 420
tgcaggagtt catcaacgag cgcggcgtae tggccagtgg gcggccttgc gagcccggt 480
gccggacttt ctccgcgtc tgccttaagc acttccaggc ggctcgtctcg cccggaccct 540
gcaccttcgg gaccgtctcc acgccggtat tgggcaccaa ctcttcgct gtccgggacg 600
acagtagcgg cggggggcgc aacctctcc aactgccctt caatttcacc tggccgggta 660
ccttctcgtc catcatcgaa gcttggcagc cgccaggaga cgacctgcgg ccagaggcct 720
tgccaccaga tgcactcatc agcaagatcg ccatccaggg ctccctagct gtgggtcaga 780
actggttatt ggatgagcaa accagacccc tcacaaggct gcgctactct taccgggtca 840
tctgcagtga caactactat ggagacaact gctcccgct gtgcaagaag cgcaatgacc 900
acttcggcca ctatgtgtgc cagccagatg gcaactgtc ctgcctgcc ggttggaactg 960

```

[0005]

```

gggaatatig ccaacagcct atctgtcttt cgggctgtca tgaacagaat ggctactgca 1020
gcaagccagc agagtgcctc tgccgcccag gctggcaggg ccggctgtgt aacgaatgca 1080
tccccacaa tggctgtcgc cacggcacct gcagcactcc ctggcaatgt acttgtgatg 1140
agggctgggg aggcctgttt tgtgaccaag atctcaacta ctgcacccac cactccccat 1200
gcaagaatgg ggcaacgtgc tccaacagtg ggccagcgaag ctacacctgc acctgtcgcc 1260
caggctacac tgggtgtggac tgtgagctgg agctcagcga gtgtgacagc aaccctgttc 1320
gcaatggagg cagctgtaag gaccaggagg atggctacca ctgcctgtgt cctccgggct 1380
actatggcct gcattgtgaa cacagcacct tgagctgcgc cgactcccc tgcttcaatg 1440
ggggctcctg ccgggagcgc aaccaggggg ccaactatgc ttgtgaatgt ccccccaact 1500
tcaccggctc caactgcgag aagaaagtgg acaggtgcac cagcaacccc tgtgccaacg 1560
ggggacagtg cctgaaccga ggtccaagcc gcattgtgcc ctgccgtcct ggattcacgg 1620
gcacctactg tgaactccac gtcagcgact gtgcccgtaa cccttgccgc cacgggtggca 1680
cttgccatga cctggagaat gggctcatgt gcacctgccc tgccggcttc tctggccgac 1740
gctgtgaggt gcggacatcc atcgatgcct gtgcctcgag tccctgtctc aacaggggcca 1800
cctgtctacac cgacctctcc acagacacct ttgtgtgcaa ctgcccttat ggctttgttg 1860
gcagccgctg cgagttcccc gtgggcttgc cgcccagctt cccctgggtg gccgtctcgc 1920
tgggtgtggg gctggcagtg ctgctgttac tctgtggcat ggtggcagtg gctgtgcggc 1980
agctcgggct tcgacggccg gacgacggca gcagggaagc catgaacaac ttgtcggact 2040
tccagaagga caacctgatt cctgccgccc agcttaaaaa cacaaccagc aagaaggagc 2100
tggaagtgga ctgtggcctg gacaagtcca actgtggcaa acagcaaac cacacattgg 2160
actataatct ggccccaggg cccctggggc gggggacat gccaggaaag ttccccaca 2220
gtgacaagag cttaggagag aaggcgccac tgcggttaca cagtgaagag ccagagtgtc 2280
ggatatcagc gatattgtcc cccagggact ccatgtacca gtctgtgtgt ttgatattcag 2340
aggagaggaa tgaatgtgtc attgccacgg aggtataagg caggagccta cctggacatc 2400
cctgtctcagc ccgcggctg gaccttcctt ctgcattgtt tacattgcat cctggatggg 2460
acgtttttca tatgcaacgt gctgtctctc ggaggaggag ggaatggcag gaaccggaca 2520
gactgtgaac ttgccaagag atgcaatacc ctccacacc tttgggtgtc tgtctggcat 2580
cagattggca gctgcaccaa ccagaggaa agaaagaga agagatgcca ctgggcactg 2640
ccctgccagt agtggccttc agggggctcc ttccggggct ccggcctgtt ttccagagag 2700
agtggcagta gccccatggg gcccggagct gctgtggcct ccaactggcat ccgtgtttcc 2760
aaaagtgcct ttggcccagg ctccacggcg acagttgggc ccaaatcaga aaggagagag 2820
ggggccaatg agggcagggc ctctgtggg ctggaaaacc actgggtgcg tctcttgtcg 2880
gggtttgccc tggaggtgag gtgagtgtc gagggagggg agtgctttct gccccatgcc 2940
tccaactact gtatgcaggc ctggctctct ggtctagggc ctttgggcaa gaatgtccgt 3000
ctaccggct tccaccacc tctggccctg ggcttctgta agcagacagg cagagggcct 3060
gcccctccca ccagccaagg gtgccaggcc taactggggc actcagggca gtgtgttga 3120
aattccactg agggggaaat caggtgtctc ggccgcctgg gcccttcct ccctcaagcc 3180
catctccaca acctcgagcc tgggtctctg tccactactg ccccagacca ccctcaagc 3240
tggtcttcag aaatcaataa tatgagtttt tatttgttt ttttttttt tttgtagtt 3300
tattttgag tctagtattt caataattta agaatacaga gcaactgacct ttctacattt 3360
tataacatta tttgtatat aat 3383

```

<210> 3

[0006]

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 3

Arg Ser Pro Ser Cys Ile Tyr Arg Arg Ser Trp Arg Ser Arg Gly Ala

1

5

10

15

Gln Ile Leu

<210> 4

<211> 387

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 4

```
gctacgcgtg tccactccga ggtccagctg cagcagtctg gacctgagct ggtaaagcct 60
ggggcttcag tgaagatgtc ctgcaaggct tctggataca cattcactag ctatgttata 120
aactgggtga agcagaagcc tgggcagggc cttgagtgga ttggattaat taatccttac 180
aatgatggta ctaagtacaa tgagaagtgc aaagtcaagg ccacactgac ttcagacaaa 240
tcctccagca cagcctacat ggagctcagc agcctgacct ctgaggactc tgcggtctat 300
tactgtgcat cttattacta cggtagtagg tactactttg actactgggg ccaaggcacc 360
actctcacag tctctcagg taagctt 387
```

<210> 5

<211> 371

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 5

```
gcgcgcgatg tgacatccag atgacacaat cttcatccta cttgtctgta tctctaggag 60
gcagagtca cattaattgc aaggcaagtg accacattaa taattggta gcctggtatc 120
```

[0007]

```

agcagaaacc aggaaatgct cctaggctct taatatctgg tgcaaccagt ttggaaactg 180
gggttccttc aagattcagt ggcagtgat ctggaaagga ttacactctc agcattacca 240
gtcttcagac tgaagatgtt gctacttatt actgtcaaca gtattggagt attccgctca 300
cgttcggtgc tgggaccaag ctggagctga aacgtgagta gaatttaaac tttgcttcct 360
cagttggatc c 371

```

<210> 6

<211> 418

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多核苷酸

<400> 6

```

atgggatgga gcggggtctt tatcttaate ctgtcagtaa ctacagggtg ccactctgag 60
gtccagctgc agcagctctg acctgagctg gagaagcctg gcgcttcagt gaagatatcc 120
tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tacaacatga actgggtgaa gcagagcaat 180
ggaaagagcc ttgagtggat tggaaatatt gatccttact ttggtggtac taactacaac 240
cagaagttca agggcaagcc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
cagctcaaga gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaag aaactatgat 360
tacgacggag gatgctttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctcag 418

```

<210> 7

<211> 396

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多核苷酸

<400> 7

```

atggcctgga ttcctcttat attctctctc ctggctctca gctcaggggc catttcccag 60
gctgtgtgta ctcaggaatc tgcactcacc acatcacctg gtgaaacagt cacactcact 120
tgtcgtcaa gtactggggc tgttacaact agtaactatg ccaactgggt ccaagaaaaa 180
ccagatcatt tattcactgg tctaataagt ggtaccaaca accgagctcc aggtgttcct 240
gccagattct caggctccct gattggagac aaggctgccc tcaccatcac aggggcacag 300
actgaggatg aggcaatata tttctgtgct ctatggtaca gcaaccattg ggtgttcggt 360
ggaggaacca aactgactgt cctaggccag cccaag 396

```

<210> 8

[0008]

<211> 340

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Met Ala Ala Ala Ser Arg Ser Ala Ser Gly Trp Ala Leu Leu Leu Leu

1

5

10

15

Val Ala Leu Trp Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Val Phe Gln Leu

20

25

30

Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly Val Leu Ala Ser Gly Arg

35

40

45

Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys His

50

55

60

Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys Thr Phe Gly Thr Val Ser

65

70

75

80

Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala Val Arg Asp Asp Ser Ser

85

90

95

Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp Pro

100

105

110

Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp His Ala Pro Gly Asp Asp

115

120

125

Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro Asp Ala Leu Ile Ser Lys Ile Ala

130

135

140

Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn Trp Leu Leu Asp Glu Gln

145

150

155

160

Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys Ser

165

170

175

Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg Leu Cys Lys Lys Arg Asn

180

185

190

Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro Asp Gly Asn Leu Ser Cys

195

200

205

[0009]

Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln Gln Pro Ile Cys Leu Ser
 210 215 220
 Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Ala Glu Cys Leu
 225 230 235 240
 Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro His
 245 250 255
 Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr Pro Trp Gln Cys Thr Cys
 260 265 270
 Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr Cys
 275 280 285
 Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys Ser Asn Ser Gly
 290 295 300
 Gln Arg Ser Tyr Thr Gly Val Asp Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys
 305 310 315 320
 Asp Ser Asn Pro Cys Arg Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp
 325 330 335
 Gly Tyr His Cys
 340

<210> 9
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> 鼠属

<400> 9
 Met Thr Pro Ala Ser Arg Ser Ala Cys Arg Trp Ala Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ala Val Leu Trp Pro Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Ile Phe Gln
 20 25 30
 Leu Arg Leu Gln Glu Phe Val Asn Gln Arg Gly Met Leu Ala Asn Gly
 35 40 45
 Gln Ser Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Ile Cys Leu Lys

[0010]

50	55	60
His Phe Gln Ala Thr Phe Ser Glu Gly Pro Cys Thr Phe Gly Asn Val		
65	70	75 80
Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Val Val Arg Asp Lys Asn		
	85	90 95
Ser Gly Ser Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp		
100	105	110
Pro Gly Thr Phe Ser Leu Asn Ile Gln Ala Trp His Thr Pro Gly Asp		
115	120	125
Asp Leu Arg Pro Glu Thr Ser Pro Gly Asn Ser Leu Ile Ser Gln Ile		
130	135	140
Ile Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Lys Ile Trp Arg Thr Asp Glu		
145	150	155 160
Gln Asn Asp Thr Leu Thr Arg Leu Ser Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys		
	165	170 175
Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Glu Ser Cys Ser Arg Leu Cys Lys Lys Arg		
180	185	190
Asp Asp His Phe Gly His Tyr Glu Cys Gln Pro Asp Gly Ser Leu Ser		
195	200	205
Cys Leu Pro Gly Trp Thr Gly Lys Tyr Cys Asp Gln Pro Ile Cys Leu		
210	215	220
Ser Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Asp Glu Cys		
225	230	235 240
Ile Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro		
	245	250 255
His Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Ile Pro Trp Gln Cys Ala		
260	265	270
Cys Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr		
275	280	285

[0011]

Cys Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ser Thr Cys Ser Asn Ser
290 295 300

Gly Pro Lys Gly Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Pro Gly Tyr Thr Gly Glu
305 310 315 320

His Cys Glu Leu Gly Leu Ser Lys Cys Ala Ser Asn Pro Cys Arg Asn
325 330 335

Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asn Ser Tyr His Cys
340 345

<210> 10

<211> 352

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Met Gly Ser Arg Cys Ala Leu Ala Leu Ala Val Leu Ser Ala Leu Leu
1 5 10 15

Cys Gln Val Trp Ser Ser Gly Val Phe Glu Leu Lys Leu Gln Glu Phe
20 25 30

Val Asn Lys Lys Gly Leu Leu Gly Asn Arg Asn Cys Cys Arg Gly Gly
35 40 45

Ala Gly Pro Pro Pro Cys Ala Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu
50 55 60

Lys His Tyr Gln Ala Ser Val Ser Pro Glu Pro Pro Cys Thr Tyr Gly
65 70 75 80

Ser Ala Val Thr Pro Val Leu Gly Val Asp Ser Phe Ser Leu Pro Asp
85 90 95

Gly Gly Gly Ala Asp Ser Ala Phe Ser Asn Pro Ile Arg Phe Pro Phe
100 105 110

Gly Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Leu His
115 120 125

Thr Asp Ser Pro Asp Asp Leu Ala Thr Glu Asn Pro Glu Arg Leu Ile

[0012]

130	135	140	
Ser Arg Leu Ala Thr Gln Arg His Leu Thr Val Gly Glu Glu Trp Ser			
145	150	155	160
Gln Asp Leu His Ser Ser Gly Arg Thr Asp Leu Lys Tyr Ser Tyr Arg			
	165	170	175
Phe Val Cys Asp Glu His Tyr Tyr Gly Glu Gly Cys Ser Val Phe Cys			
	180	185	190
Arg Pro Arg Asp Asp Ala Phe Gly His Phe Thr Cys Gly Glu Arg Gly			
	195	200	205
Glu Lys Val Cys Asn Pro Gly Trp Lys Gly Pro Tyr Cys Thr Glu Pro			
210	215	220	
Ile Cys Leu Pro Gly Cys Asp Glu Gln His Gly Phe Cys Asp Lys Pro			
225	230	235	240
Gly Glu Cys Lys Cys Arg Val Gly Trp Gln Gly Arg Tyr Cys Asp Glu			
	245	250	255
Cys Ile Arg Tyr Pro Gly Cys Leu His Gly Thr Cys Gln Gln Pro Trp			
	260	265	270
Gln Cys Asn Cys Gln Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asn Gln Asp			
	275	280	285
Leu Asn Tyr Cys Thr His His Lys Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys			
290	295	300	
Thr Asn Thr Gly Gln Gly Ser Tyr Thr Cys Ser Cys Arg Pro Gly Tyr			
305	310	315	320
Thr Gly Ala Thr Cys Glu Leu Gly Ile Asp Glu Cys Asp Pro Ser Pro			
	325	330	335
Cys Lys Asn Gly Gly Ser Cys Thr Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Ser Cys			
	340	345	350

<210> 11

<211> 4

[0013]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 11

Gly Ser Pro Gly

1

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 12

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1

5

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 13

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1

5

10

15

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

His His His His His His

[0014]

1 5

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15
Glu Pro Lys Ser
1

1 MAAASRSASG WALLLLVALW QQRAAGSGVF QLQLQEFINE RGVLASGRPC EPGCRTFFRV
61 CLKHFQAVVS PGPCTFGTVS TPVLGTNSFA VRDDSSGGGR NPLQLPFNFT WPGTFSLIIE
121 AWHAPGDDL R PEALPPDALI SKIAIQGSLA VGQNWLLDEQ TSTLTRLRYS YRVICSDNYY
181 GDNC SRLCKK RNDHFGHYVC QPDGNLSCLP GWTGEYCQQP ICLSGCHEQN GYCSKPAECL
241 CRPGWQGRLC NECIPHNGCR HGTCSTPWQC TCDEGWGGLF CDQDLNYCTH HSPCKNGATC
301 SNSGQRSYTC TCRPGYTGV D CELELSECD S NPCRNNGSCK DQEDGYHCLC PPGYYGLHCE
361 HSTLSCADSP CFNGGSCRER NQGANYACEC PPNFTGSNCE KKVDRCTSNP CANGGQCLNR
421 GPSRMCRCRP GFTGTYCELH VSDCARNPCA HGGTCHDLEN GLMCTCPAGF SGRRCEVRTS
481 IDACASSPCF NRATCYTDLS TDTFVCNCPY GFVGSRCFP VGLPPSFPWV **AVSLGVGLAV**
541 **LLVLLGMVAV** AVRQLRLRRP DDGSREAMNN LSDFQKDNLI PAAQLKNTNQ KKELEVDCGL
601 DKSNCGKQQN HTLDYNLAPG PLGRGTMPGK FPHSDKSLGE KAPLRLHSEK PECRISAICS
661 PRDSMYQSVC LISEERNECV IATEV

图 1: 人类 δ 样 4 蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1; GenBank NP_061947)

```

1  gctgcgcgca ggccgggaac acgaggccaa gagccgcagc cccagccgcc ttggtgcagc
61  gtacaccggc actagcccg c ttgcagcccc aggattagac agaagacgcg tcctcggcgc
121 ggtcgccgcc cagccgtagt cacctggatt acctacagcg gcagctgcag cggagccagc
181 gagaaggcca aaggggagca gcgtcccgag aggagcgcct cttttcaggg accccgccgg
241 ctggcgagcg cgcgggaaag cggcgtcgcg aacagagcca gattgagggc ccgcggtgg
301 agagagcgac gcccgagggg atggcggcag cgtcccgag cgcctctggc tgggcgctac
361 tgctgctggt ggcactttgg cagcagcgcg cggccggctc cggcgcttc cagctgcagc
421 tgcaggagtt catcaacgag cgcggcgta c tggccagtgg gcggccttgc gagcccggt
481 gccggacttt cttccgcgtc tgccttaagc acttccaggc ggtcgctcg cccggaccct
541 gcaccttcgg gaccgtctcc acgccggtat tgggcaccaa ctccctcgct gtccgggacg
601 acagtagcgg cggggggcgc aacctctcc aactgccctt caatttcacc tggccgggta
661 ccttctcgct catcatcgaa gcttggcacg cgcagagaga cgacctgcgg ccagaggcct
721 tgccaccaga tgactcatc agcaagatcg ccatccaggg ctccctagct gtgggtcaga
781 actggttatt ggatgagcaa accagcacc tcacaaggct gcgctactct taccgggtca
841 tctgcagtga caactactat ggagacaact gctccgcct gtgcaagaag cgcaatgacc
901 acttcggcca ctatgtgtgc cagccagatg gcaacttgtc ctgctgccc ggttggactg
961 gggaaatattg ccaacagcct atctgtctt cgggctgtca tgaacagaat ggctactgca
1021 gcaagccagc agagtgcctc tgccgccag gctggcaggg ccggctgtgt aacgaatgca
1081 tccccacaa tggctgtcgc caccgcacct gcagcactcc ctggcaatgt acttgtgatg
1141 agggctgggg aggcctgttt tgtgaccaag atctcaacta ctgcaccac cactcccat
1201 gcaagaatgg ggcaacgtgc tccaacagtg ggagcgaag ctacacctgc acctgtcgcc
1261 caggctacac tgggtgtggac tgtgagctgg agctcagcga gtgtgacagc aacctgtc
1321 gcaatggagg cagctgtaag gaccaggagg atggctacca ctgctgtgt cctccgggt
1381 actatggcct gcattgtgaa cacagcacct tgagctgcgc cgactcccc tgcctcaatg
1441 ggggctcctg ccgggagcgc aaccagggg ccaactatgc ttgtgaatgt cccccaact
1501 tcaccggctc caactgcgag aagaaagtgg acaggtgcac cagcaacccc tgtgccaacg
1561 ggggacagtg cctgaaccga ggtccaagcc gcatgtgccg ctgccgtcct ggattcacgg
1621 gcacctactg tgaactccac gtcagcgact gtgccgtaa cccttgcgcc caccgtggca
1681 cttgccatga cctggagaat gggctcatgt gcacctgcc tgcggcttc tctggcgac
1741 gctgtgaggt gcggacatcc atcgatgcct gtgcctcag tccctgttc aacaggcca
1801 cctgtacac cgacctctcc acagacacct ttgtgtgcaa ctgcccttat ggcttgtgg
1861 gcagccgctg cgagttcccc gtgggcttgc cggccagctt cccctgggtg gccgtctcgc
1921 tgggtgtggg gctggcagtg ctgctggtac tgctgggcat ggtggcagt gctgtcggc
1981 agctgcggt tcgacggcg gacgacggca gcagggaag catgaacaac ttgtcgact
2041 tccagaagga caacctgatt cctgccgcc agcttaaaaa cacaaccag aagaaggagc

```

图2:编码人类 δ 样4蛋白的核酸序列 (cDNA) (SEQ ID NO:2; GenBank NM_019074)

```

2101  tggaaagtgga  ctgtggcctg  gacaagtcca  actgtggcaa  acagcaaaac  cacacattgg
2161  actataatct  ggccccaggg  cccctggggc  gggggaccat  gccaggaaag  tttccccaca
2221  gtgacaagag  cttaggagag  aaggcgccac  tgcggttaca  cagtgaaaag  ccagagtgtc
2281  ggatatcagc  gatatgtctc  cccagggact  ccatgtacca  gtctgtgtgt  ttgatatcag
2341  aggagaggaa  tgaatgtgtc  attgccacgg  aggtataagg  caggagccta  cctggacatc
2401  cctgctcagc  cccgcggtct  gaccttcctt  ctgcattgtt  tacattgcat  cctggatggg
2461  acgtttttca  tatgcaacgt  gctgctctca  ggaggaggag  ggaatggcag  gaaccggaca
2521  gactgtgaac  ttgccaagag  atgcaatacc  cttccacacc  tttgggtgtc  tgtctggcat
2581  cagattggca  gctgcaccaa  ccagaggaac  agaagagaag  agagatgcca  ctgggcactg
2641  ccctgccagt  agtggccttc  agggggctcc  ttccggggct  ccggcctgtt  ttccagagag
2701  agtggcagta  gccccatggg  gcccgagct  gctgtggcct  ccactggcat  ccgtgtttcc
2761  aaaagtgcct  ttggcccagg  ctccacggcg  acagtgggc  ccaaatacaga  aaggagagag
2821  ggggccaatg  agggcagggc  ctctgtggg  ctggaaaacc  actgggtgcg  tctcttgctg
2881  gggtttgccc  tggaggtgag  gtgagtgtc  gagggagggg  agtgctttct  gccccatgcc
2941  tccaactact  gtatgcaggc  ctggctctct  ggtctaggcc  ctttgggcaa  gaatgtccgt
3001  ctaccggct  tccaccaccc  tctggccctg  ggcttctgta  agcagacagg  cagagggcct
3061  gcccctccca  ccagccaagg  gtgccaggcc  taactggggc  actcagggca  gtgtgttgga
3121  aattccactg  agggggaaat  caggtgctgc  ggccgcctgg  gccctttcct  ccctcaagcc
3181  catctccaca  acctcgagcc  tgggctctgg  tccactactg  cccagacca  ccctcaaagc
3241  tggctctcag  aaatcaataa  tatgagtttt  tattttgttt  tttttttttt  ttttgtagtt
3301  tattttggag  tctagtattt  caataattta  agaatacaga  gcactgacct  ttctacattt
3361  tataacatta  ttttgtatat  aat

```

图 2(续)

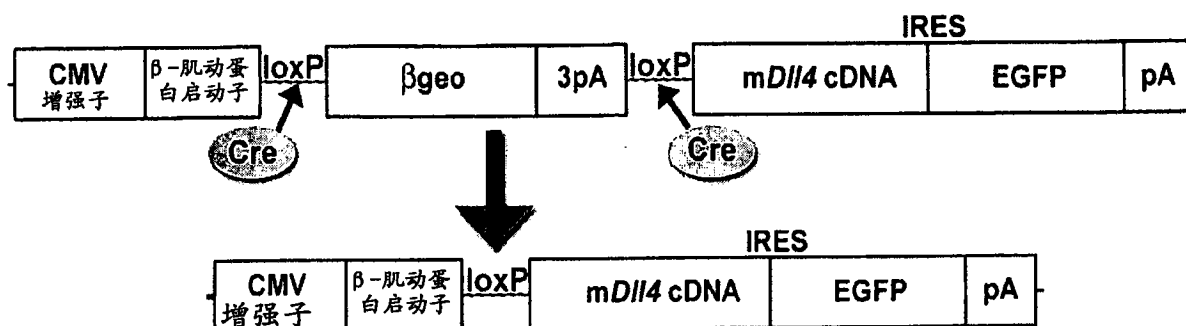


图 3

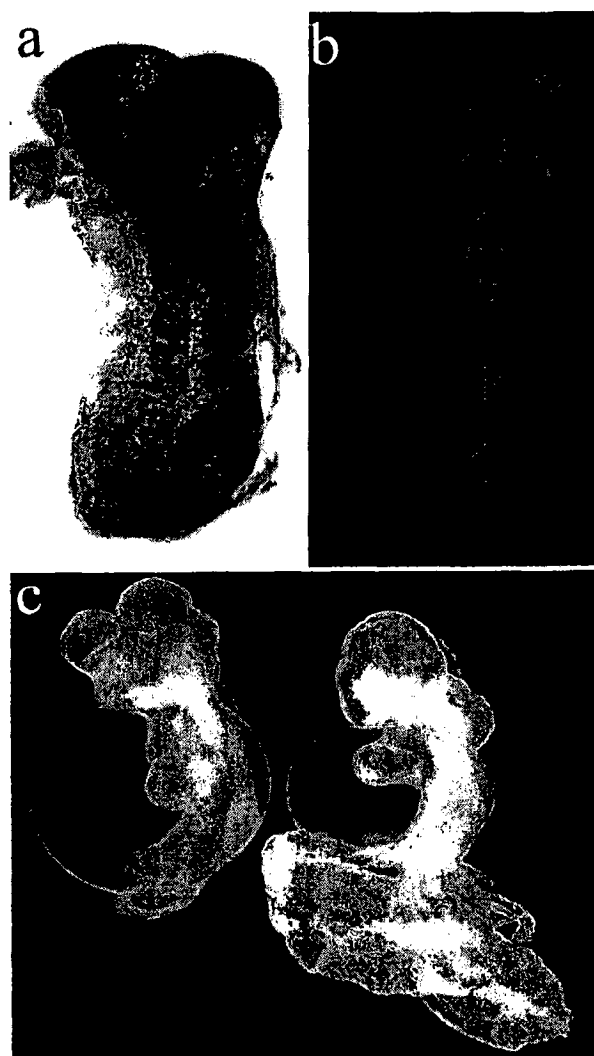


图 4

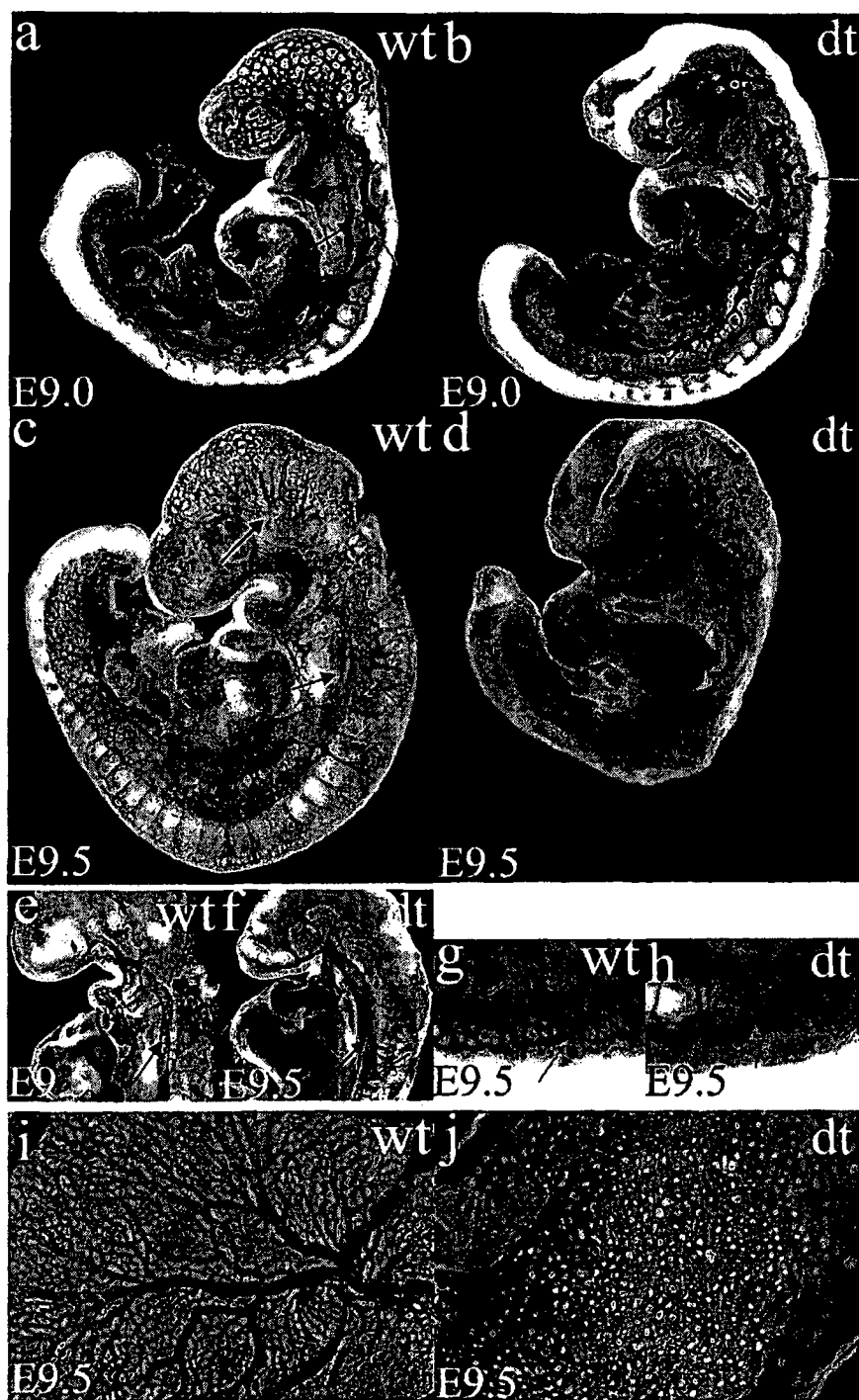


图 5

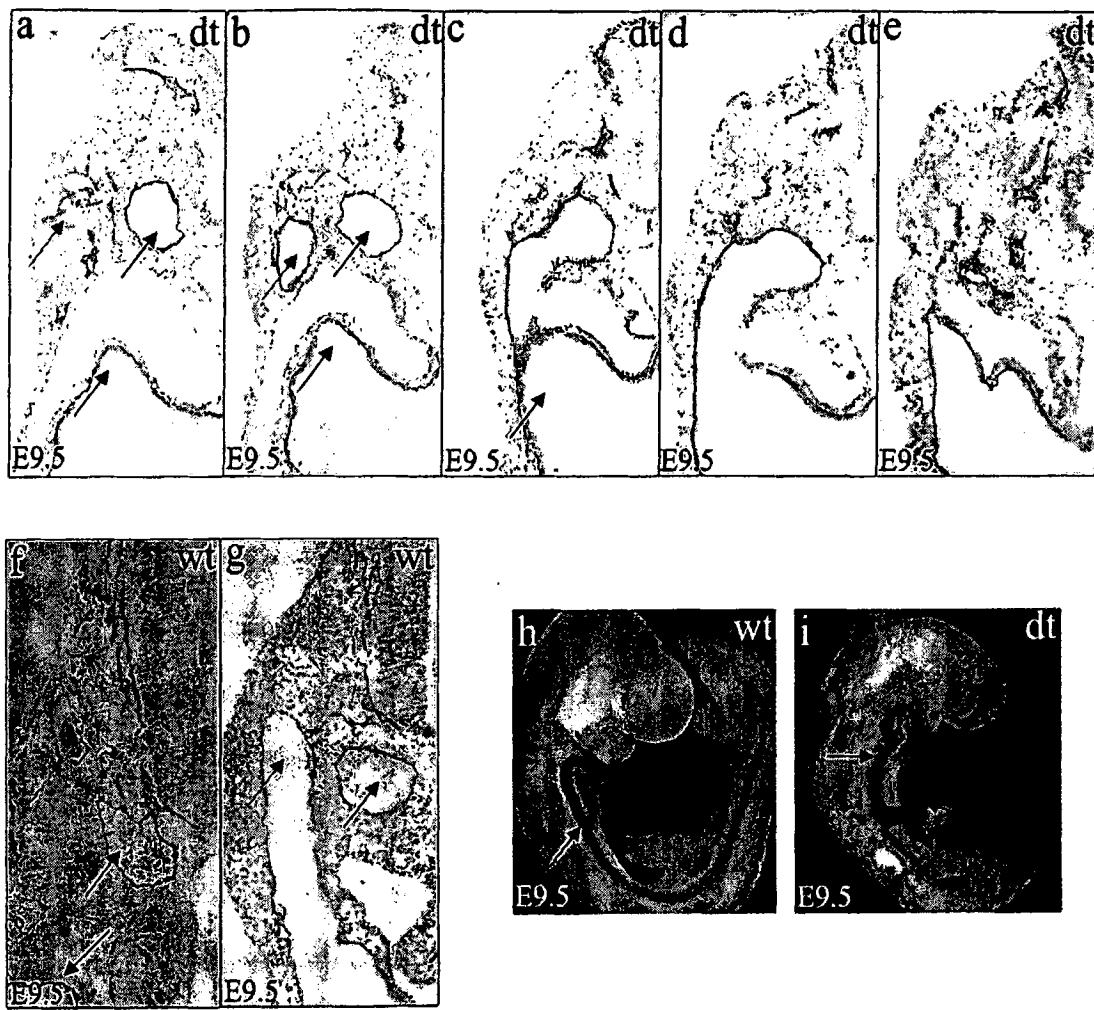


图 6

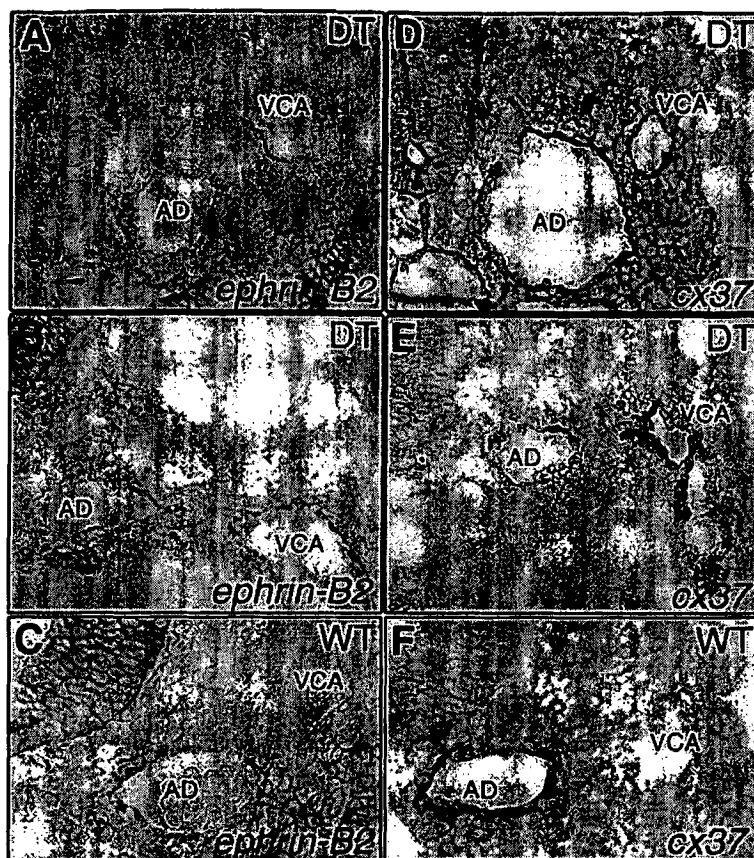


图 7

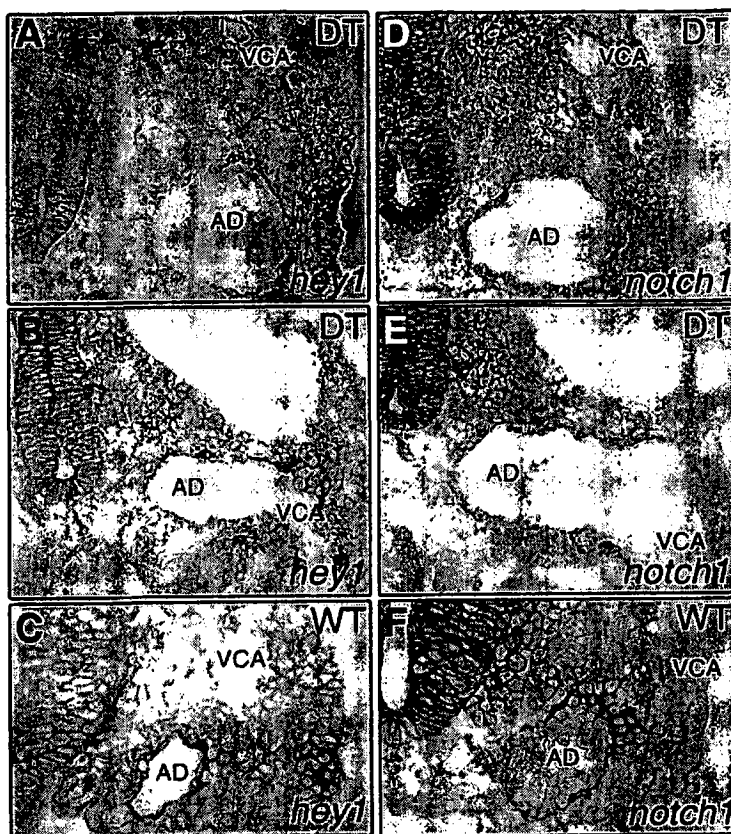


图 8

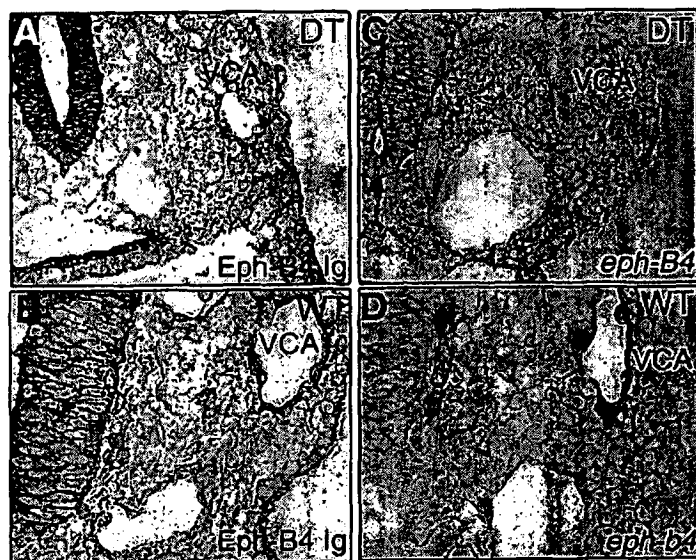


图 9

DLL4构建体

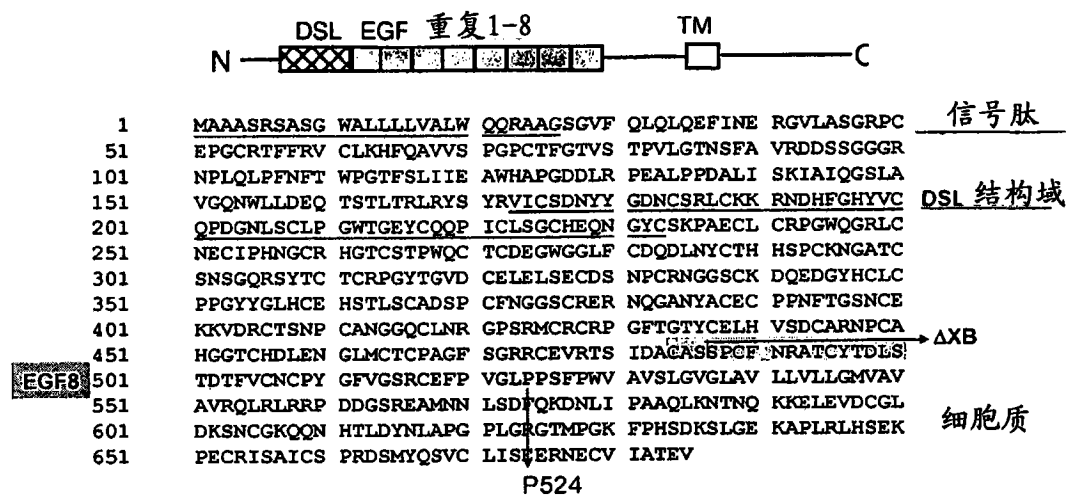
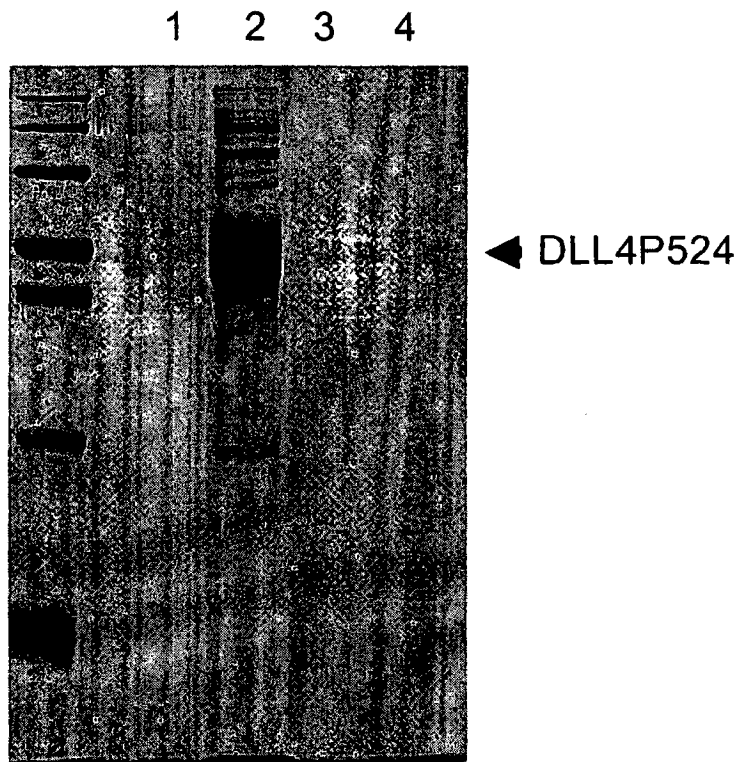


图 10



每个组分30 μl

图 11

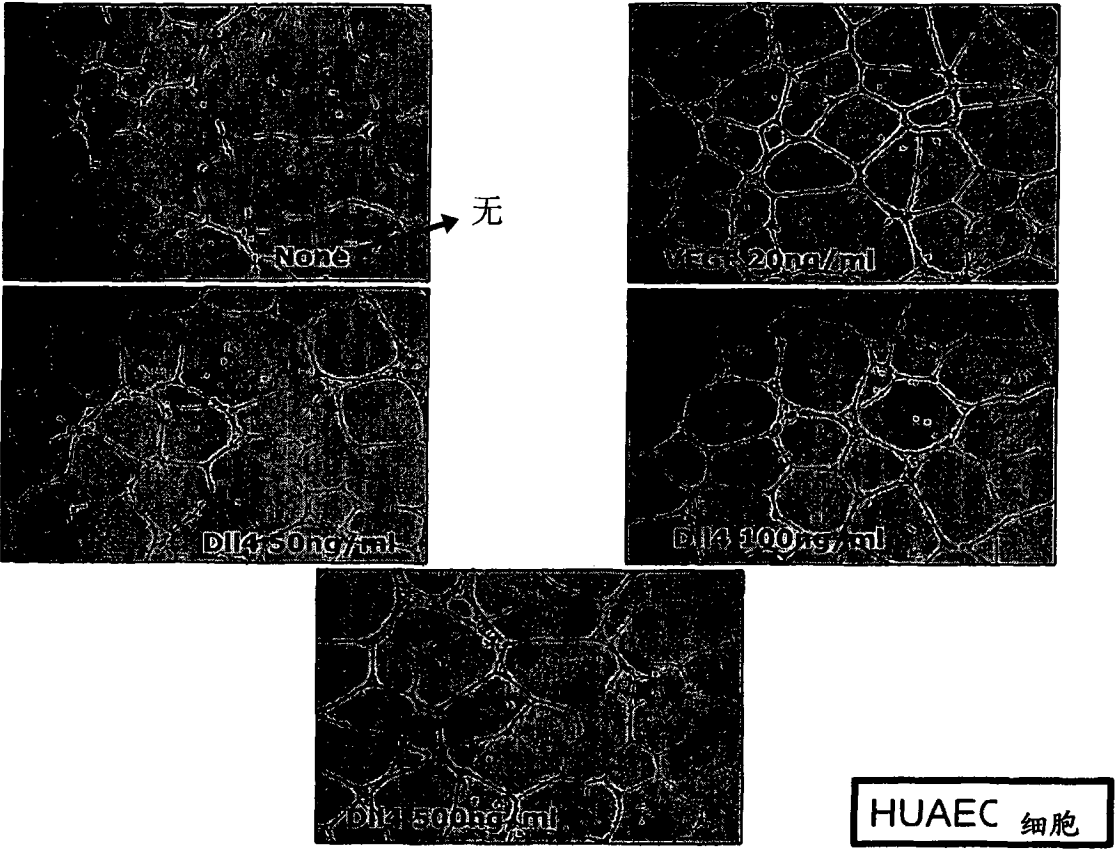


图 12

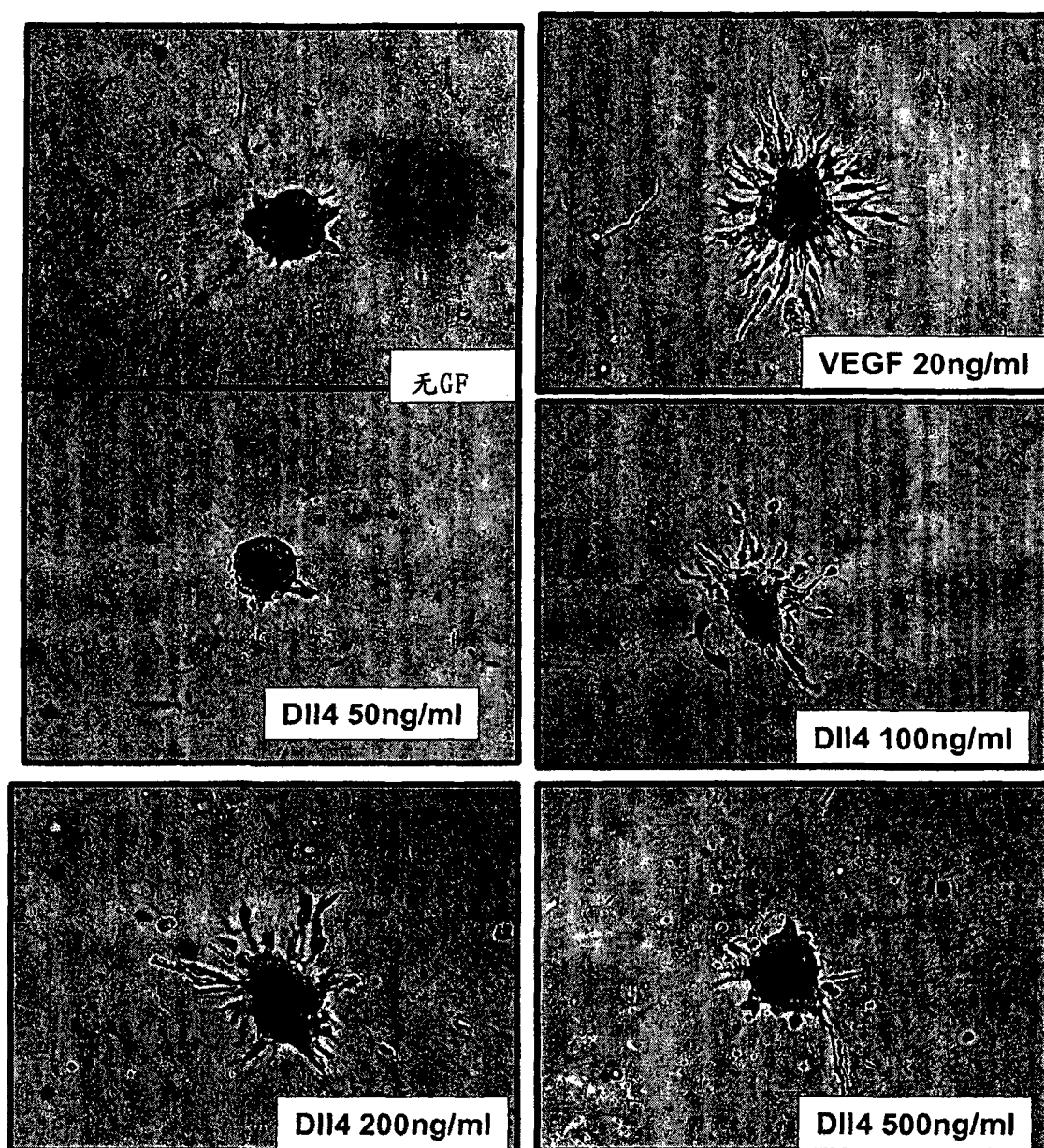


图 13

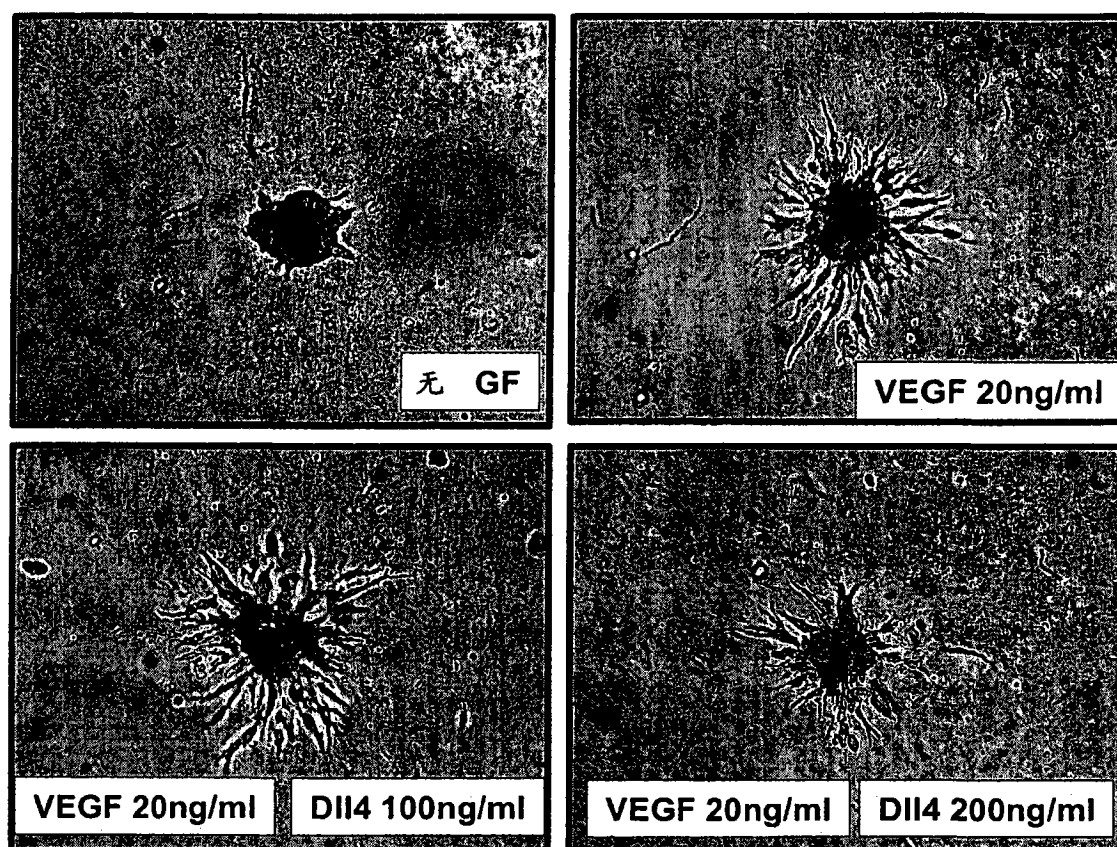


图 14

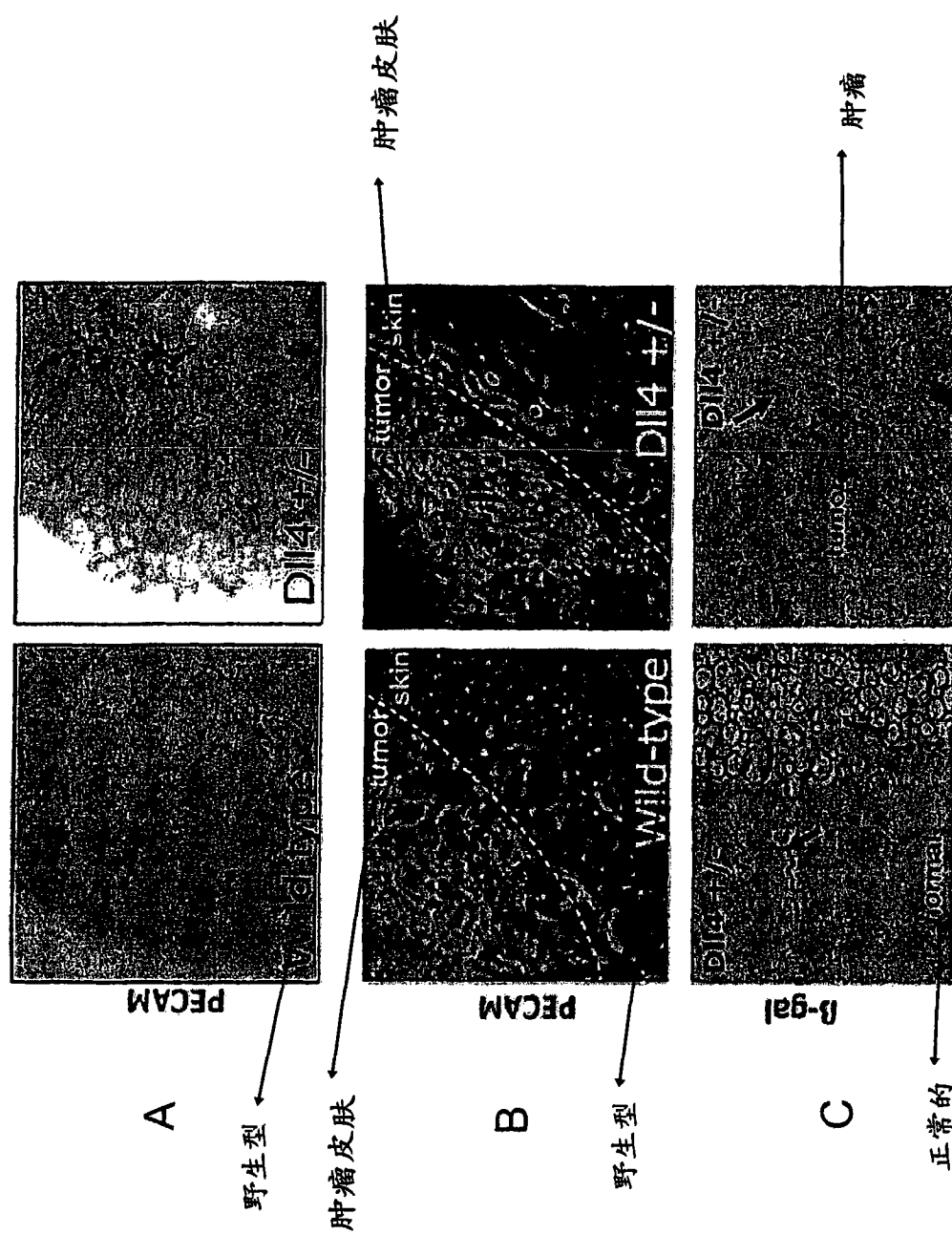


图 15A, B, C

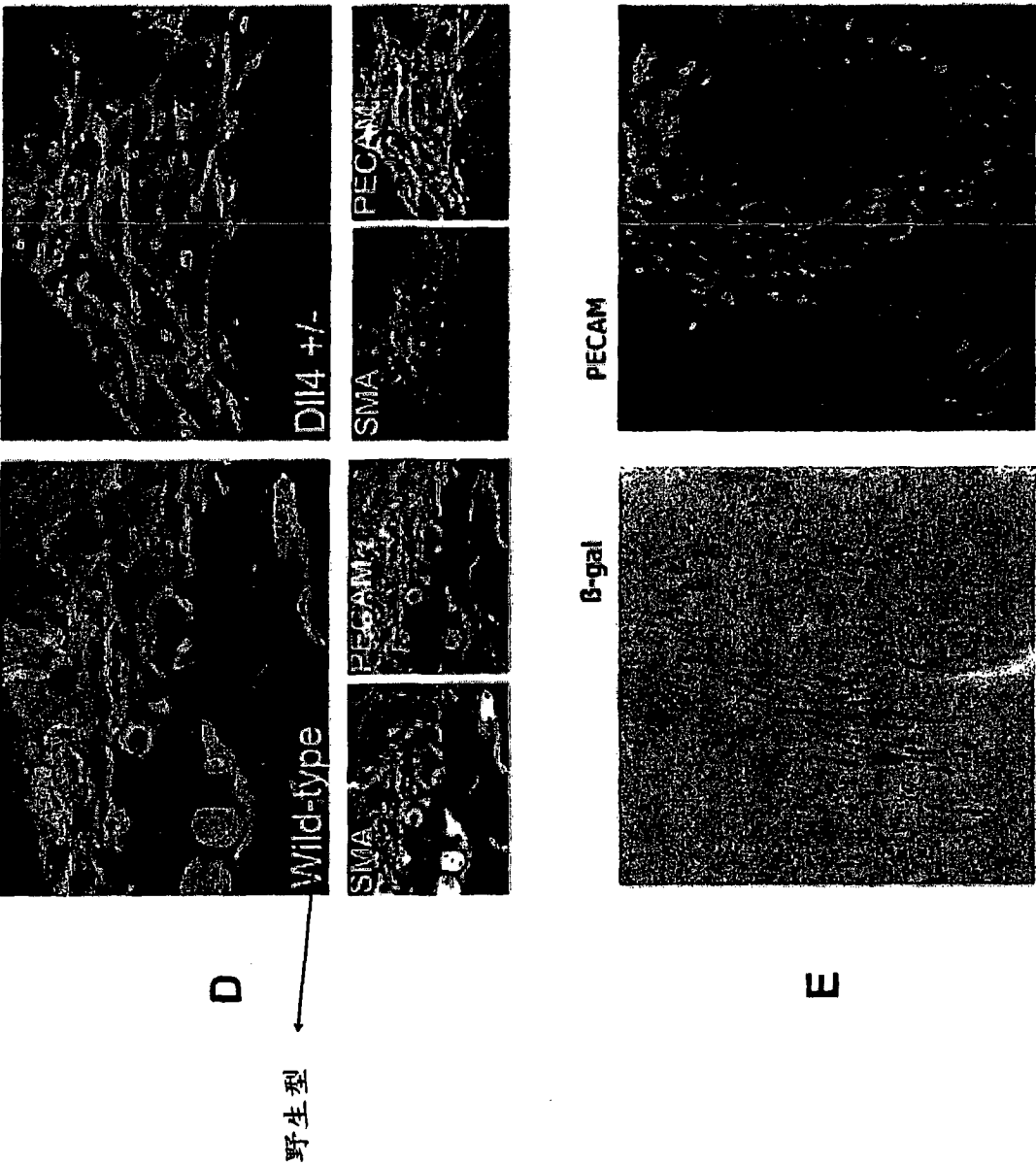
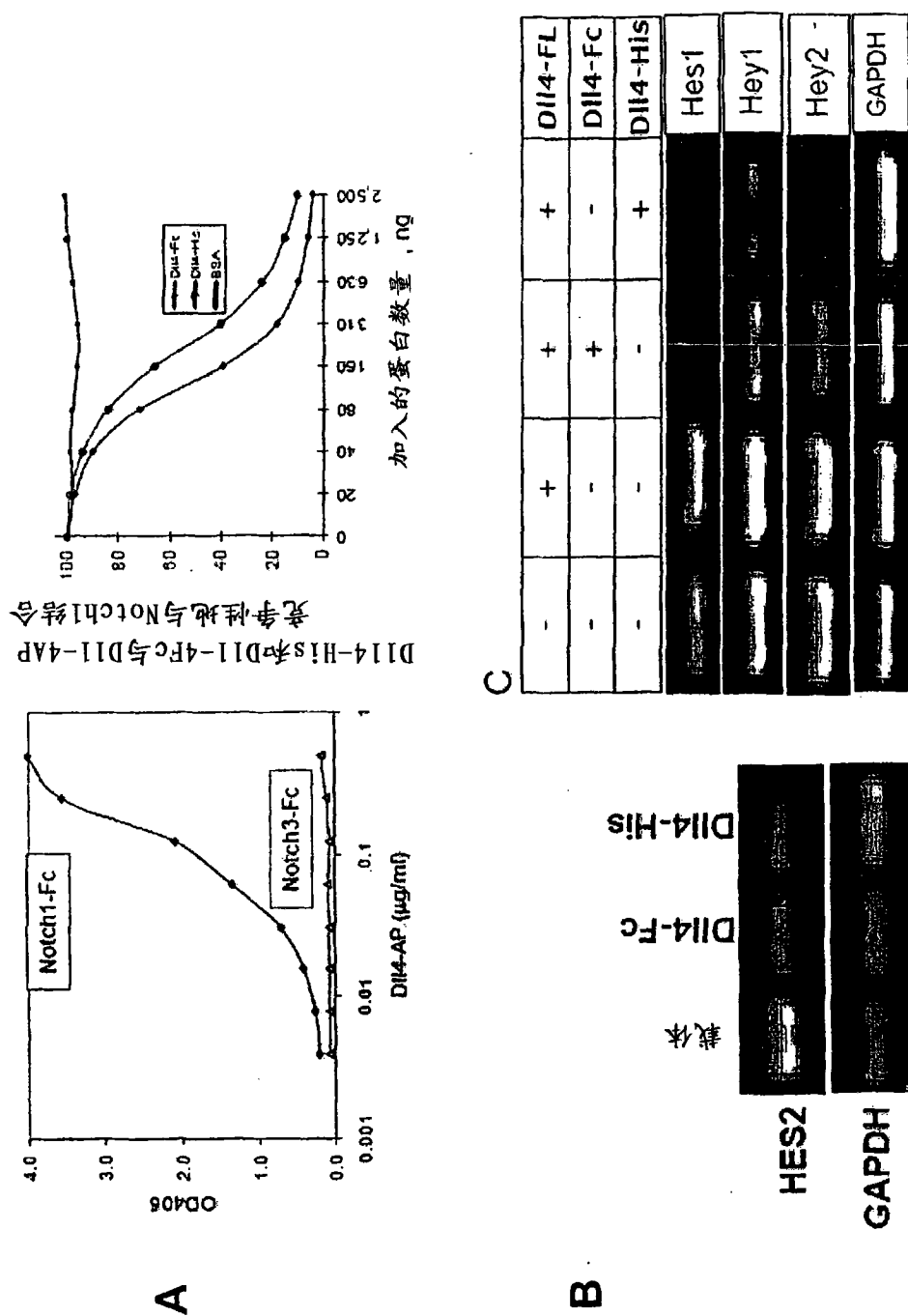


图 15D, E



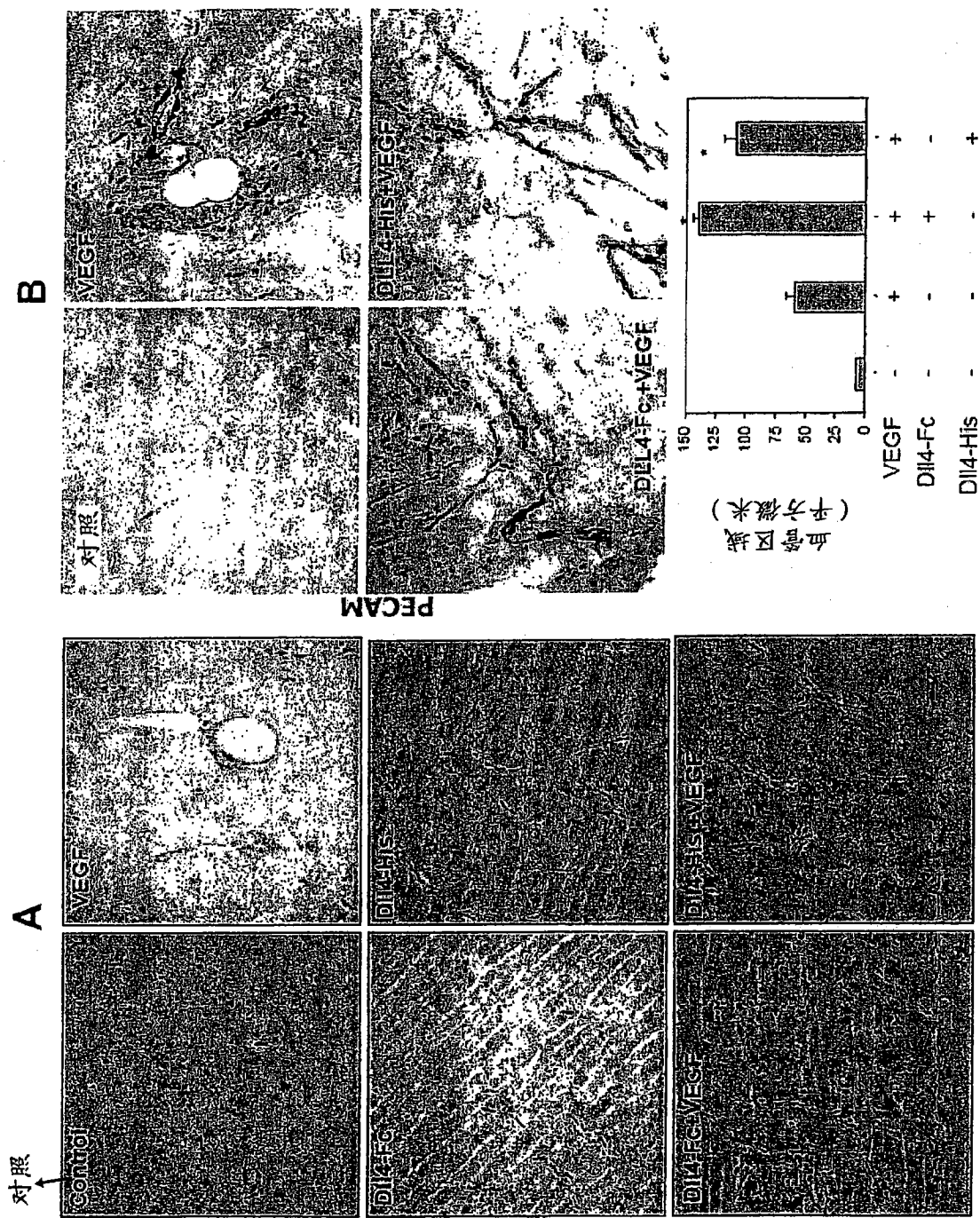


图 17A, B

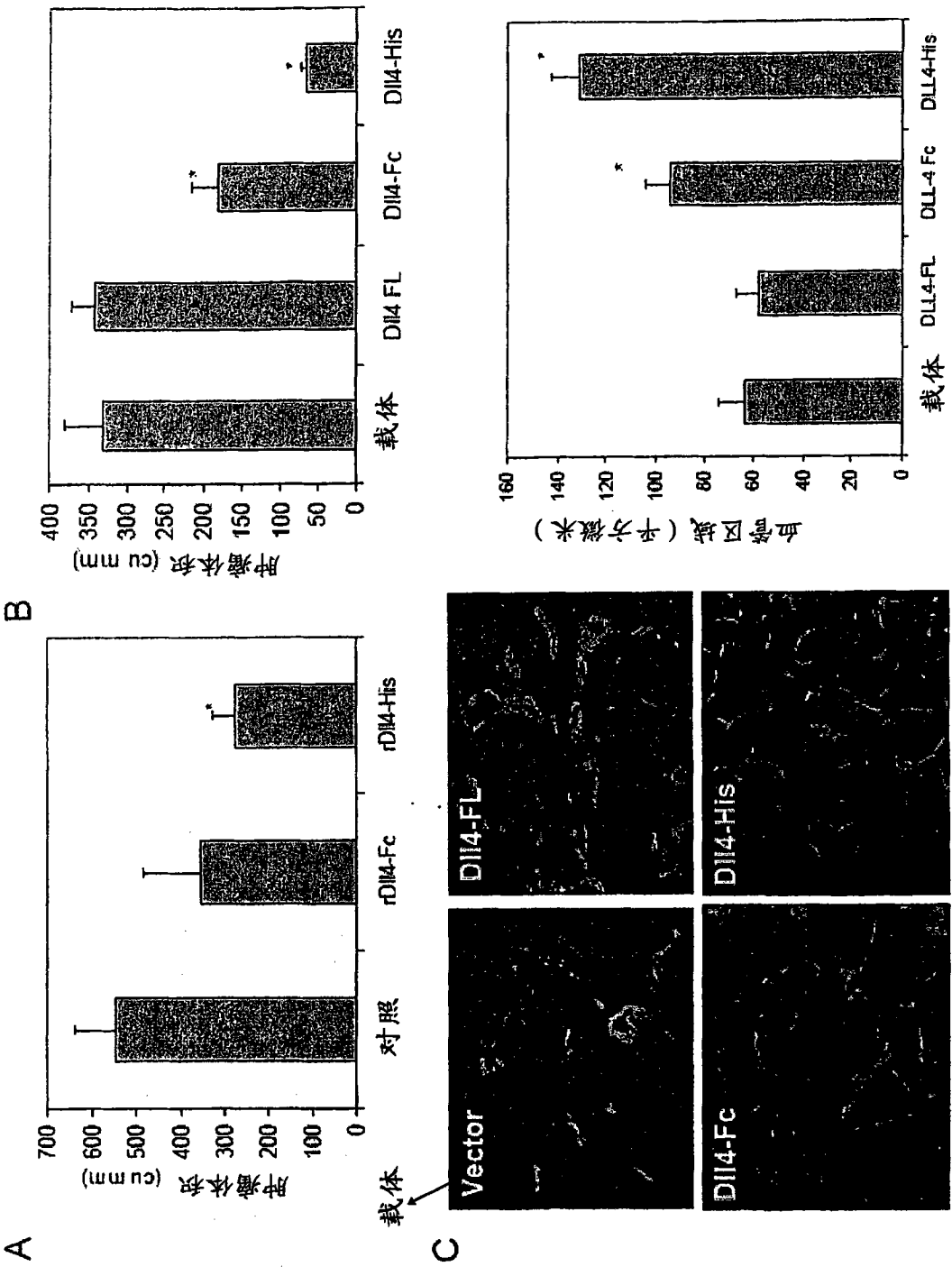


图 18A, B, C

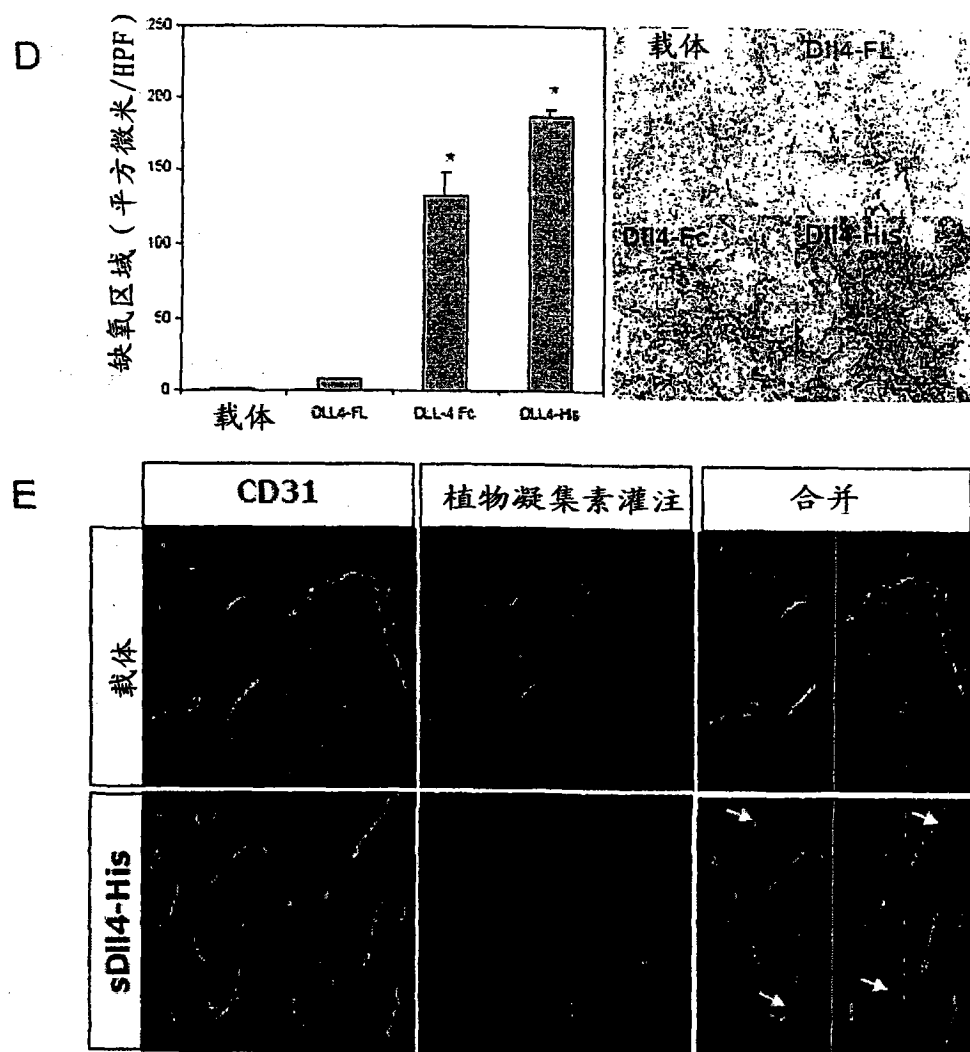


图 18D, E

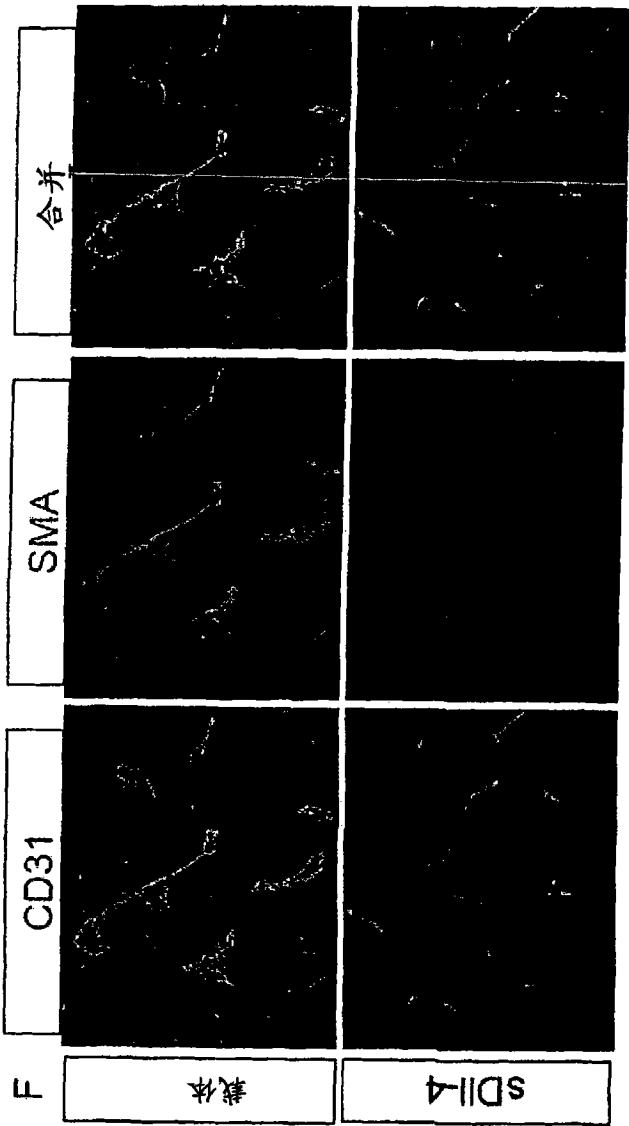


图 18F

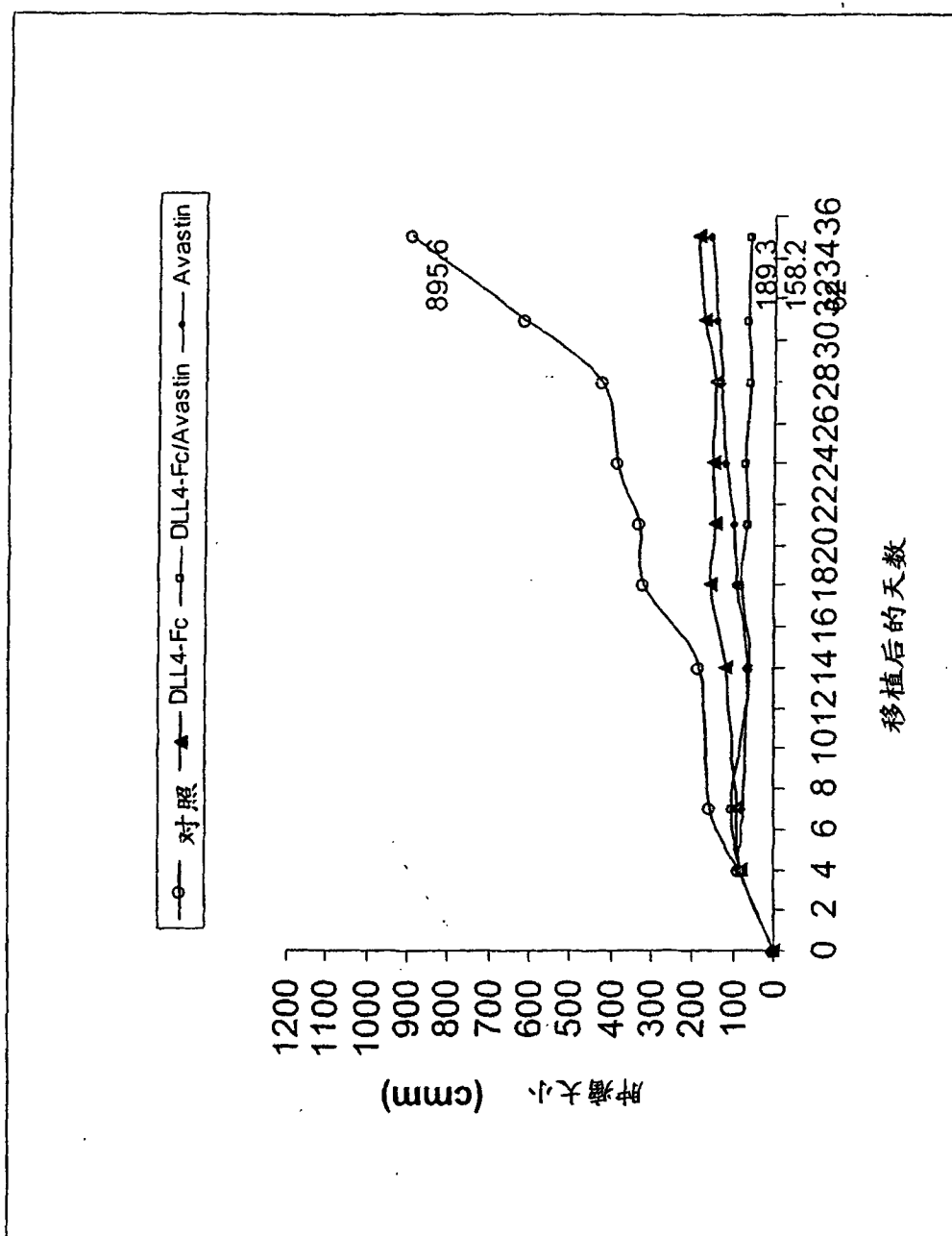
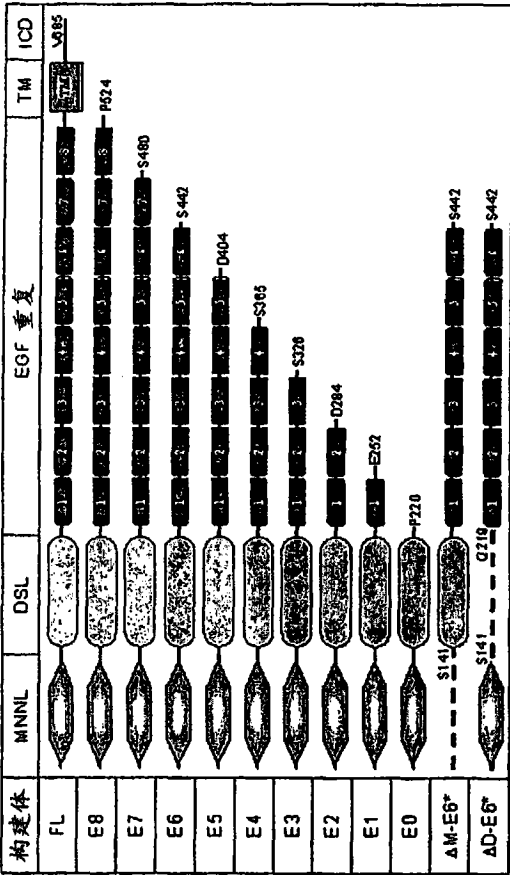


图 19



抗-D114 抗体	2-6	23	61B	125
表位	MNNL +DSL	E7	E3	E4

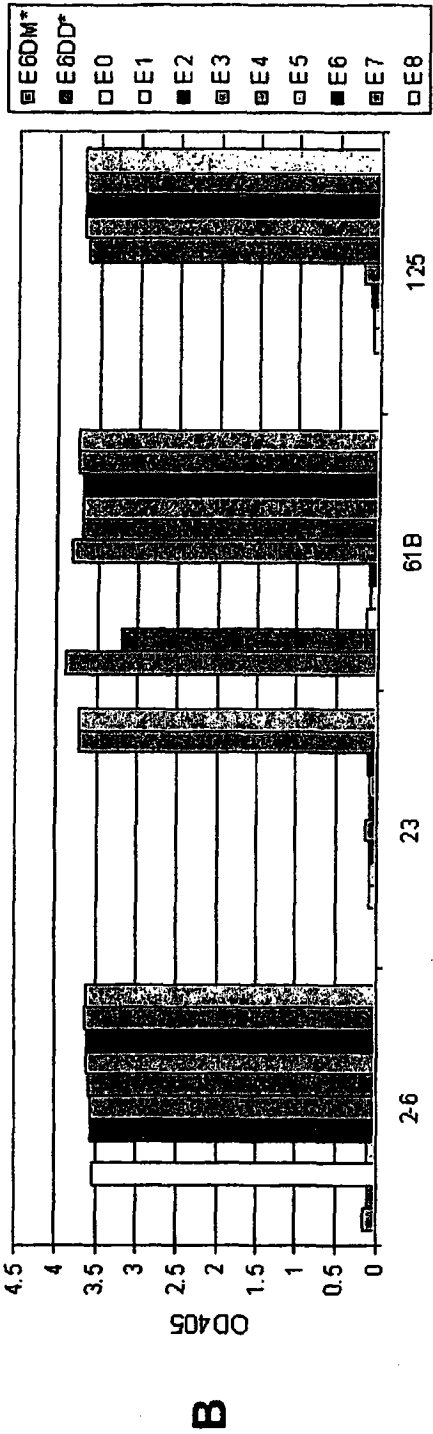


图 20A, B

图 21

A

克隆 #	直接 ELISA	捕获 ELISA	Western 印迹	中和	交叉活性		同种型	
					mDII4	HuDII1	HC	LC
#2-6	+++	++	+/-		-	-	IgG1	λ
#23	++++	++++	-	+/-		-	IgG2a	κ
#61B	+++	++			-	++	IgG1	κ
#125	++	+	-	++	-	-	IgG1	κ

B

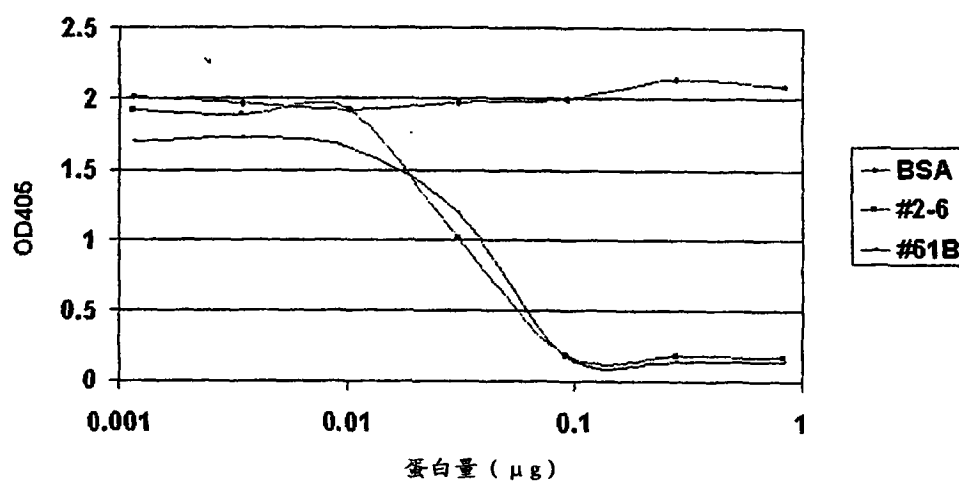


图 22A, B

SEQ ID NO: 4

#61B VH
 GCTACGGGTGTCCTCCAGGTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAGCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCTTCARAGGC
 TTCTGGATACACATTCAGTCTAGCTAAGTATTAAGTGGTGAAGCAGAAAGCTGGGCAGGGCTTGAGTGGATTGGATTAAATCCCTT
 ACAATGATGTTACTAAGTACAAIGAGAGATTCAAAAGTCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTC
 AGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAATCTTATTACTACGGTAGTAGTACTACTTIGACTACTGGGGSCCAAGG
 CACCACTCTCACAGTCTCCTCAGGTAAGCTT

SEQ ID NO: 5

#61B VL
 GCGCGGATGTGACATCCAGATGACACAACTTTCATCCTACTTGTCTGTATCTCTAGGAGGCAGAGTCACCAATTACTTGCARAGGCARGT
 GACCACATTAAATTTGGTTAGCTGGTATCAGCAGAAACCCAGGAAATGCTCCTAGGCTCTTAATATCTGGTGCAACCAAGTTTGGAAAC
 TGGGGTTCCTTCAAGATTCAAGTGGCAGTGGATCTGGAAGGATTACACTCTCAGCATTAACCACTTTCAGACTGAAGATGTGCTACTT
 ATTACTGICACAGTATTGGAGTATCCGCTCACGTTCCGTCGTCGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTGAGTAGAATTTAAACTTTGCT
 TCCTCAGTTGGATCC

图 23

SEQ ID NO: 6

#2-6 VH

ATGGGATGGAGCGGGGTCITTTAICTTTAATCCTGTCAGTAACTACAGGTGTCCACTCTGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCT
 GGAGAGCCTGGCGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCIGGTTACTCATTCACTGGCTACAACTAATGAACITGGGTGAAGCAGAGCA
 ATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTGATCCTTACTTTGGTGGTACTAACTACAACTCAGAAAGITTCAGGGCAGGCCACACATTG
 ACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAAGAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCACTCTATTACTGTGCAAGAAACTTA
 TGATTACGACGGAGGATGCTTTTGACTACTGGGGCCCAAGGCCACACTCTCACAGTCICCTCAG

SEQ ID NO: 7

#2-6 VL

ATGGCCTGGATTCTCTTATATTCTCTCTCTCTGGCTCTCAGCTCAGGGGCCATTTCCAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCAC
 CACATCACCCTGGTGAACAGTCACACTCACTTGTCGCTCAGTACTGGGCTGTTACAACTAGTAACIATGCCAATGGTCCAGAA
 AACCAGATCAITTTATTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACACCGAGCTCCAGGTGTTCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGA
 GACAAGGCTGCCCTCACCAATCACAGGGGCACAGACTGAGGATGAGGCCAATATATTTCTGTGCTCTAIGGTACAGCAACCATTTGGGTGTT
 CGGTGGAGGAACCAACTGACTGTGCTTAGGCCAGCCCAAG

图 24

连接子1 (L1): DII4-GSPG-Fc

连接子2 (L2): DII4-GSGGGGGG-Fc

连接子3 (L3): DII4-GSGGGGSGGGGSGGGG-Fc

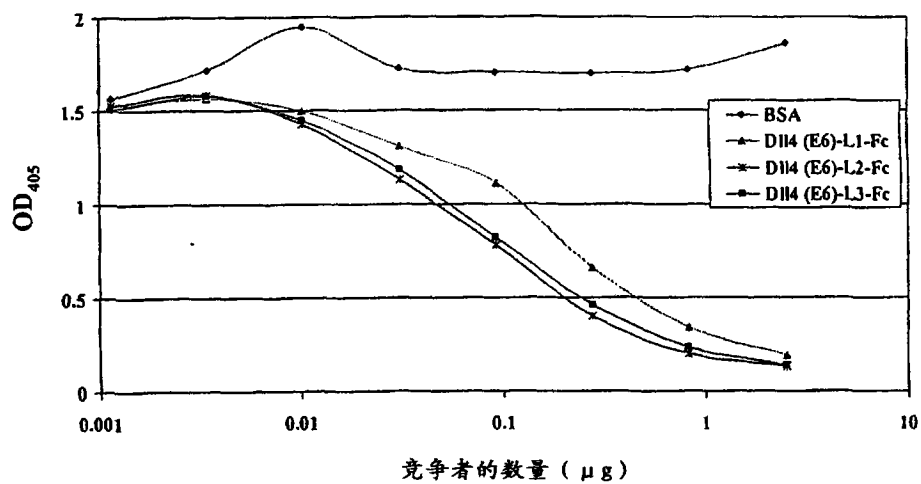


图 25