



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101802002 A

(43) 申请公布日 2010.08.11

(21) 申请号 200780011778.0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2007.04.05

C07K 16/00(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

(30) 优先权数据

60/790,506 2006.04.07 US

60/798,896 2006.05.09 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.10.06

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2007/051239 2007.04.05

(87) PCT申请的公布数据

W02007/116360 EN 2007.10.18

(71) 申请人 宝洁公司

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 R·J·罗特洛 K·G·皮特斯

M·G·戴维斯

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

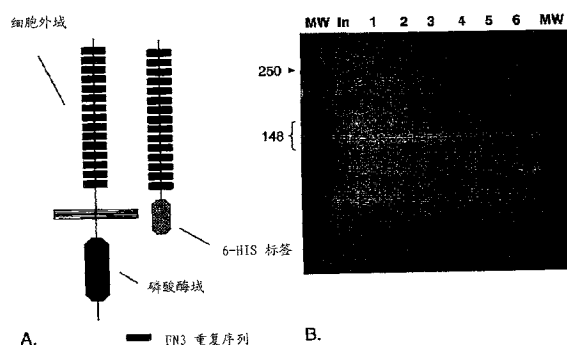
权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 10 页

(54) 发明名称

结合人蛋白酪氨酸磷酸酶 β (HPTP β) 的抗体及其用途

(57) 摘要

本发明公开了结合人蛋白酪氨酸磷酸酶 β (HPTP β) 的抗体及其抗原结合片段以及它们的用途。



1. 一种结合人蛋白酪氨酸磷酸酶  $\beta$  (HPTP  $\beta$ ) 的分离抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段调节血管新生。

2. 如权利要求 1 所述的抗体,其中所述抗体结合 HPTP  $\beta$  的 N- 末端部分。

3. 如权利要求 2 所述的抗体,其中所述抗体结合 HPTP  $\beta$  的首次 FN3 重复序列。

4. 如权利要求 3 所述的抗体,其中所述 HPTP  $\beta$  的首次 FN3 重复序列具有序列标识号: 11 表示的序列或其片段。

5. 如权利要求 1 所述的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。

6. 如权利要求 5 所述的单克隆抗体,所述单克隆抗体由杂交瘤细胞系 ATCC 号 PTA-7580 产生,或者如权利要求 5 所述的单克隆抗体的片段,所述片段由杂交瘤细胞系 ATCC 号 PTA-7580 产生。

7. 如前述任一项权利要求所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是人源化的。

8. 如权利要求 6 所述的抗体,所述抗体包括来自所述单克隆抗体 R15E6 的抗原结合区域残基并且是人源化的。

9. 如权利要求 7 所述的抗体的抗原结合片段,其中所述片段包括重链可变区和轻链可变区。

10. 如权利要求 7 所述的抗体的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自由下列组成的组:Fv 片段、Fab 片段、Fab' 片段和 F(ab')<sub>2</sub> 片段。

11. 结合 HPTP  $\beta$  并调节血管新生的抗体或其抗原结合片段的用途,所述抗体或其抗原结合片段用于制备用于治疗血管新生失调的药物。

12. 如权利要求 11 所述的用途,其中所述血管新生失调是一种血管新生升高的失调,所述失调选自糖尿病视网膜病变、黄斑变性、癌症、镰状细胞性贫血、肉状瘤、梅毒、弹力纤维性假黄瘤、佩吉特氏病、静脉闭塞、动脉闭塞、颈动脉阻塞病、慢性葡萄膜炎 / 玻璃体炎、分枝杆菌感染、莱姆氏病、系统性红斑狼疮、早产儿视网膜病、伊耳斯氏病、白塞病、感染引起的视网膜炎或脉络膜炎、眼假组织胞浆菌病、白斯特氏病、近视、眼凹、斯特格病变、睫状体平坦部炎、慢性视网膜脱落、高粘滞综合症、弓形体病、外伤和激光术后并发症、红变相关的疾病、以及增殖性玻璃体视网膜病变。

13. 如权利要求 11 所述的用途,其中所述血管新生失调是一种血管新生升高的失调,所述失调选自炎症肠疾病包括克隆氏病和溃疡性结肠炎、牛皮癣、肉状瘤、类风湿性关节炎、血管瘤、奥斯勒-韦伯-朗迪病、或遗传性出血性毛细血管扩张症、实体瘤或血道转移瘤以及获得性免疫缺损综合症。

14. 如权利要求 11 所述的用途,其中所述血管新生失调是一种血管新生降低的失调,所述失调选自骨骼肌或心肌局部缺血、中风、冠状动脉疾病、周围性血管疾病、以及冠状动脉疾病,优选地其中所述血管新生降低的失调是周围性血管疾病或冠状动脉疾病。

15. 单克隆抗体 R15E6。

16. 一种抗体,所述抗体具有与所述单克隆抗体 R15E6 相同的或基本上相同的生物学特性。

17. 一种药物组合物,所述药物组合物包括:

a. 如权利要求 1、6、7、8、15 或 16 中任一项所述的抗体或其片段;和

b. 药用载体。

## 结合人蛋白酪氨酸磷酸酶 $\beta$ (HPTP $\beta$ ) 的抗体及其用途

### [0001] 发明领域

[0002] 本发明涉及结合人蛋白酪氨酸磷酸酶  $\beta$  (HPTP  $\beta$ ) 的抗体及其抗原结合片段以及它们的用途。

### [0003] 发明背景

[0004] 血管新生是从已有的脉管系统中生成新的血管,它在许多生理和病理过程中起着重要的作用 (Nguyen, L. L. 等人, *Int. Rev. Cytol.*, 204, 1-48 (2001))。血管新生是一个复杂的过程,受构成血管里层的内皮细胞与其周围环境间的通讯的调节。在血管新生的早期阶段,组织或肿瘤细胞响应环境刺激诸如缺氧,产生并分泌前血管新生生长因子。这些因子扩散到内皮细胞附近并刺激受体,导致蛋白酶的产生和分泌,所述蛋白酶降解周围的细胞外基质。活化内皮细胞开始向这些生长因子源迁移并扩散到周围组织中 (Bussolino, F., *Trends Biochem. Sci.*, 22, 251-256, (1997))。然后内皮细胞停止增殖并分化成管状结构,这是形成稳定成熟的血管的第一步。随后在血管形成的下一步骤中,内皮周围细胞如周细胞和平滑肌细胞汇集在新形成的血管处。

[0005] 血管新生由天然存在的前血管新生生长因子和抗血管新生生成因子的平衡调节。血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子和血管生成素代表了一些潜在的前血管新生生长因子。这些配体结合到它们各自的在内皮细胞表面上的受体酪氨酸激酶上,并转导促进细胞迁移和细胞增殖的信号。尽管已经鉴别出多个调节因子,驱动此过程的分子机制仍未得到充分地了解。

[0006] 许多疾病状态是由持久的未调节的或不正确调节的血管新生引起的。在此类疾病状态中,未调节的或不正确调节的血管新生可引起具体的疾病或加剧现有的病理状态。例如,眼内血管新生已经被认为是失明的最常见病因,并构成大约 20 种眼病的病理学基础。在某些以前就有的病症如关节炎中,新形成的毛细血管侵入关节并破坏软骨。在糖尿病中,视网膜中新形成的毛细血管侵入玻璃体,引起出血和失明。

[0007] 实体瘤的生长和转移也可以是血管新生依赖性的, Folkman 等人, "Tumor Angiogenesis," 第 10 章, 第 206-32 页, *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn 等人, eds., W. B. Saunders (1995)。已有研究显示直径大于 2mm 的肿瘤必须获得自身的血液供应,它们通过诱导新的毛细血管生长来达到这一目的。在这些新的血管进入肿瘤后,它们为肿瘤生长提供必需的营养和生长因子,以及为肿瘤细胞提供进入循环并转移至更远位点如肝脏、肺或骨的途径 (Weidner, *New Eng. J. Med.*, 324, 1, 1-8 (1991))。当在荷瘤动物中用作药物时,血管新生的天然抑制剂可预防小肿瘤的生长 (O' Reilly 等人, *Cell*, 79, 315-28 (1994))。在一些方案中,甚至在停止治疗后,应用此类抑制剂引起肿瘤的变小和消失 (O' Reilly 等人, *Cell*, 88, 277-85 (1997))。此外,向某些肿瘤供应血管新生的抑制剂可加强它们对其它治疗方案的响应 (参见例如 Teischer 等人, *Int. J. Cancer*, 57, 920-25 (1994))。

[0008] 尽管许多疾病状态是由持久的未调节的或不正确调节的新生引起的,但是一些疾病状态可通过促进血管新生来治疗。组织生长和修复是生物体的活动,其中发生了细胞增

殖和血管新生。因此伤口修复的一个重要方面是受损组织通过血管新生再次形成血管。

[0009] 愈合缓慢的、不愈合的伤口是老年人群病态延长的一个主要原因。尤其是在卧床不起的患者或糖尿病患者中,常发生严重的不愈合皮肤溃疡。在许多情况下,愈合延误或是由于供血不足,或是由于持续压力,或是由于血管闭合。由于小动脉粥样硬化或静脉停滞引起的毛细血循环不良导致无法修复受损的组织。此类组织常被人体天生的防御系统不影响其增殖的微生物所感染,而人体天生的防御系统需要血管生成良好的组织以有效地消除病原体。因此,多数干预治疗致力于使局部缺血组织恢复血流量,从而使得营养物质和免疫因子能到达伤口位置。

[0010] 大血管中的动脉粥样硬化病变可引起组织局部缺血,此症状可通过调节受影响组织的血管生长得到改善。例如,冠状动脉中的动脉粥样硬化病变会引起绞痛和心肌梗塞,如果病人能通过刺激副动脉的生长恢复血流量,则可预防上述症状。同样,向腿部供血的大动脉中的动脉粥样硬化会引起骨骼肌缺血,限制腿的活动能力,在一些情况下会导致截肢,此类症状也可以通过血管生长疗法改善血流量来进行预防。

[0011] 其它疾病诸如糖尿病和高血压的特征在于小血管如细动脉和毛细血管的数量和密度减少。这些小血管对氧气和营养物质的递送是非常重要的。这些血管数量和密度的减少导致高血压和糖尿病的不良后果,包括跛行、局部缺血溃疡、急进型高血压和肾衰竭。这些常见的失调和许多其它不常见的疾病,例如伯格病,都可以通过血管新生疗法增加小血管的数量和密度而得到改善。

[0012] 因此,存在着对鉴别血管新生调节因子的持续需要。

[0013] 根据上述内容,治疗血管新生调节的失调需要鉴别生物化学靶区。然而,血管新生涉及多个生长因子的作用和它们的同源受体酪氨酸激酶 (RTKs), Yancopoulos 等人, *Nature*, 407, 242-248, 2000)。例如血管内皮生长因子 (VEGF) 对胚胎血管系统中的内皮细胞分化成新生儿血管是非常重要的。此外, VEGF 在成人血管系统中促进血管发育。外源 VEGF 的给药促进了侧支血管的发育并改善缺血组织的血流量。

[0014] 迄今已经确认了三个 VEGF RTK, 分别是 VEGFR1 (FLT-1)、VEGFR2 (KDR) 和 VEGFR3 (FLT-4)。尽管这些受体是高度保守的,但基于其生物化学特征和生物活性,每个受体具有特异性的和不重叠的功能。三个受体中, VEGFR2 据信在血管系统发育过程中和成人的血管新生期间对调节 VEGF 的功能起着主导作用。然而, VEGFR1 和 VEGFR3 是胚胎血管系统的正常发育所必需的,对成人组织中的血管新生也是非常重要的。由于 VEGF 的结合和二聚化, VEGFR2 激酶结构域的构象变化提高了它的激酶活性,导致特异性酪氨酸残基上的其它二聚体构件的“自体磷酸化”。这些自体磷酸化事件促进了激酶活性的进一步提高,并为细胞内信号分子的结合提供了锚定位点。

[0015] 然而,只活化单独的血管新生途径可能不足以产生能向缺血组织提供足够血液的、持续的和功能性的血管。这些发现,连同胚胎血管系统发育涉及多个 RTK 的事实一起,说明了调节多个血管新生途径的生物化学靶区将比单独生长因子的给药更有优势。

[0016] 蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP) 包括一个由密切相关的酶组成的家族,所述酶将包含磷酸酪氨酸残基的蛋白质去磷酸化。近来有证据显示 PTP 的一个功能是限制 RTK 的磷酸化和活化。例如, HCPTPA, 一种低分子量蛋白酪氨酸磷酸酶,显示与 VEGFR2 结合并负向调节它在培养的内皮细胞中的活化和在血管新生检测分析法中的生物活性 (Huang 等人, *Journal*

of Biological Chemistry, 274, 38183-38185, 1999)。

[0017] 除了 VEGFR2 之外,来自另一种 RTK (Tie-2, 血管生成素 (Ang1 和 Ang2) 的受体) 的信号输入也是非常重要的。删除小鼠的 Ang1 或 Tie-2 基因可导致继发于血管系统发育异常的胚胎死亡 (Yancopoulos 等人, Nature, 407, 242-248, 2000)。此外,皮肤中 Ang1 的过表达会增加皮肤血管,而施用外源 Ang1 会增加缺血骨骼肌中的血流量 (Suri 等人, Science, 282, 468-471, 1998)。此外,在癌症动物模型中抑制 Tie-2 的活化会抑制血管新生并限制肿瘤的发展 (Lin 等人, J Clin. Invest., 100, 2072-2078, 1997)。除了它的血管新生活性之外,通过外源 Ang1 的给药来活化 Tie-2 还可以阻止 VEGF 介导的血管渗漏和前炎症效果,但是会增加它的血管新生效果 (Thurston 等人, Nature Medicine, 6, 460-463, 2000)。因此,调节 VEGFR2 和 Tie-2 信号转导的生物靶区可产生更好的前血管新生或抗血管新生疗法。

[0018] 已经提出将 HPTP  $\beta$  (首次描述于 Kruegar 等人, EMBO J., 9(1990)) 用于调节血管生成素受体型酪氨酸激酶 Tie-2 的活性,例如 W000/65088)。还提出将 HPTP  $\beta$  用于调节 VEGFR2 的活性,例如美国专利公布 2004/0077065。

[0019] 期望得到抗体,例如人源化的单克隆抗体,它选择性地调节 HPTP  $\beta$  的活性并从而提高血管新生信号转导,刺激血管生长(血管新生),和/或增加局部缺血组织的血流量,或减少血管新生信号转导,减少血管生长,和/或减少受影响组织的血流量。本文描述了结合 HPTP  $\beta$  并调节血管新生细胞信号转导的抗体及其片段,其中细胞信号转导继而调节血管新生。

#### [0020] 发明概述

[0021] 本发明涉及结合人蛋白酪氨酸磷酸酶  $\beta$  (HPTP  $\beta$ ) 的抗体以及因此调节的血管新生细胞信号转导,它继而调节血管新生。

[0022] 在一个实施方案中,本发明涉及一种分离抗体或其结合到人蛋白酪氨酸磷酸酶  $\beta$  的抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段调节血管新生细胞信号转导,它继而调节血管新生。

[0023] 在另一个实施方案中,本发明涉及结合人蛋白酪氨酸磷酸酶  $\beta$  的 N-末端部分的抗体。

[0024] 在另一个实施方案中,本发明涉及结合人蛋白酪氨酸磷酸酶  $\beta$  的首次 FN3 重复序列的抗体。

[0025] 在另一个实施方案中,本发明涉及结合人蛋白酪氨酸磷酸酶  $\beta$  的首次 FN3 重复序列的抗体,其中所述人蛋白酪氨酸磷酸酶  $\beta$  的首次 FN3 重复序列具有序列标识号:11 所示的序列或其部分。

[0026] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种抗体,其中所述抗体为单克隆抗体。

[0027] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种抗体,其中所述抗体为单克隆抗体 R15E6(小鼠杂交瘤, Balbc 脾细胞(B细胞),在 2006 年 5 月 4 日保藏于 American Type Culture Collection(ATCC), P. O. Box1549, Manassas, VA 20108 USA, 其 ATCC 号为 PTA-7580)。

[0028] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种具有与 R15E6 相同的或基本上相同的生物学特性的抗体。

[0029] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种抗体,其中所述抗体或抗原结合片段为人

源化的。

[0030] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种抗体,其中所述抗体包括来自单克隆抗体 R15E6 的抗原结合区域残基,并且为人源化的。

[0031] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种抗体的抗原结合片段,其中所述片段包括重链可变区和轻链可变区。

[0032] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种抗体的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自由下列组成的组:Fv 片段、Fab 片段、Fab' 片段和 F(ab')<sub>2</sub> 片段。

[0033] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种治疗受试者血管新生失调的方法,所述方法包括:确认受试者需要血管新生调节;并向受试者施用有效量的结合 HPTP β 并调节血管新生的抗体或其抗原结合片段。

[0034] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种治疗受试者血管新生失调的方法,其中所述血管新生失调是一种血管新生升高的失调,所述失调选自由下列组成的组:糖尿病视网膜病变、黄斑变性、癌症、镰状细胞性贫血、肉状瘤、梅毒、弹力纤维性假黄瘤、佩吉特氏病、静脉闭塞、动脉闭塞、颈动脉阻塞病、慢性葡萄膜炎/玻璃体炎、分枝杆菌感染、莱姆氏病、系统性红斑狼疮、早产儿视网膜病、伊耳斯氏病、白塞病、感染引起的视网膜炎或脉络膜炎、眼假组织胞浆菌病、白斯特氏病、近视、眼凹、斯特格病变、睫状体平坦部炎、慢性视网膜脱落、高粘滞综合症、弓形体病、外伤和激光术后并发症、红变相关的疾病、以及增殖性玻璃体视网膜病变。

[0035] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种治疗受试者血管新生失调的方法,其中所述血管新生失调是一种血管新生升高的失调,所述失调选自下组:包括但不限于糖尿病视网膜病变、黄斑变性、癌症、类风湿性关节炎、血管瘤、奥斯勒-韦伯-朗迪病、或遗传性出血性毛细血管扩张症、以及实体瘤或血道转移瘤。

[0036] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种治疗受试者血管新生失调的方法,其中所述血管新生失调是一种血管新生升高的失调,所述失调选自由下列组成的组:炎性肠疾病包括克隆氏病和溃疡性结肠炎、牛皮癣、肉状瘤、类风湿性关节炎、血管瘤、奥斯勒-韦伯-朗迪病、或遗传性出血性毛细血管扩张症、实体瘤或血道转移瘤、以及获得性免疫缺损综合症。

[0037] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种治疗受试者血管新生失调的方法,其中所述血管新生失调是一种血管新生降低的失调,所述失调选自下组:包括但不限于骨骼肌或心肌局部缺血、中风、冠状动脉疾病、周围性血管疾病、冠状动脉疾病、脑血管疾病、糖尿病性神经病以及伤口愈合。

[0038] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种治疗受试者血管新生失调的方法,其中所述血管新生失调是一种血管新生降低的失调,所述失调选自由下列组成的组:骨骼肌或心肌局部缺血、中风、冠状动脉疾病、周围性血管疾病、冠状动脉疾病。

[0039] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种治疗受试者血管新生降低的失调的方法,其中所述血管新生降低的失调为周围性血管疾病。

[0040] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种治疗受试者血管新生降低的失调的方法,其中所述血管新生降低的失调为冠状动脉疾病。

[0041] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种药物组合物,所述组合物包括:结合人蛋白

酪氨酸磷酸酶  $\beta$  的抗体或其片段 ;以及药用载体。

[0042] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种药物组合物,所述组合物包括:结合人蛋白酪氨酸磷酸酶  $\beta$  的抗体或其片段,其中所述抗体为单克隆抗体 R15E6 ;以及药用载体。

[0043] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种药物组合物,所述组合物包括:结合人蛋白酪氨酸磷酸酶  $\beta$  的抗体或其片段,其中所述抗体为具有与 R15E6 相同或基本上相同的生物学特性的单克隆抗体 ;以及药用载体。

[0044] 另一个实施方案中,本发明涉及一种药物组合物,所述组合物包括:结合人蛋白酪氨酸磷酸酶  $\beta$  的抗体或其片段,其中所述抗体或抗原结合片段为人源化的 ;以及药用载体。

[0045] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种药物组合物,所述组合物包括:结合人蛋白酪氨酸磷酸酶  $\beta$  的抗体或其片段,其中所述抗体包括来自单克隆抗体 R15E6 的抗原结合区域残基,并且为人源化的 ;以及药用载体。

#### [0046] 附图概述

[0047] 图 1 :HPTP  $\beta$  ECD 蛋白的设计和产生。(图 A) 全长 HPTP  $\beta$  和 HPTP  $\beta$  胞外域 -6His 融合蛋白的示意图。(图 B) 来自 Ni-NTA 柱的咪唑洗脱液银染结果,所述柱中加入了用引导  $\beta$  ECD-6His 表达的载体转染的 HEK293 细胞上清液。检测到了一条单独的高分子量条带,与 HPTP  $\beta$  胞外域 -6His 蛋白相符合。

[0048] 图 2 :R15E6 识别内皮细胞上的内源 HPTP  $\beta$ 。(图 A) 内皮细胞溶解产物用对照抗体(泳道 1)、R15E6(泳道 2) 或抗 -Tie2 和抗 -VEGFR2 抗体的混合物(泳道 3) 分别进行免疫沉淀。免疫沉淀物溶解于 SDS-PAGE,转移到 PVD 膜上,用 R15E6、抗 -Tie2 和抗 -VEGFR2 抗体的混合物通过 western 印迹法检测。可看到 R15E6(泳道 2) 有一条单独的高分子量条带,与 HPTP  $\beta$  相符合,而对照抗体(泳道 1) 或抗 -Tie2 和抗 -VEGFR2 的混合物(泳道 3) 无此条带。(图 B) 内皮细胞经过 FACS 分析,R15E6(白峰) 或无第一抗体对照物(黑峰)。荧光长移说明在完整的内皮细胞表面上 R15E6 结合 HPTP  $\beta$ 。

[0049] 图 3 :R15E6 促进 HUVEC 中的 Tie2 受体活化。Tie2 活化如实施例 4 所述在人内皮细胞中进行测量。R15E6 剂量依赖性地促进基底的和 Ang1 诱导的 Tie2 活化。

[0050] 图 4 :R15E6 促进 HUVEC 存活。血清饥饿人内皮细胞的存活如实施例 4 所述进行测量。符合它对 Tie2 活化的效果,R15E6 剂量依赖性地促进基底的和 Ang1 诱导的内皮细胞存活(图 A)。此外,R15E6 还剂量依赖性地促进 VEGF 和 FGF 介导的内皮细胞存活(图 B 和图 C)。对照抗体不能促进内皮细胞存活(图 D)。

[0051] 图 5 :R15E6 促进 HUVEC 迁移。人内皮细胞的迁移如实施例 4 中所述进行测量。R15E6 剂量依赖性地促进基底的和 VEGF 诱导的内皮细胞迁移。

[0052] 图 6 :R15E6 在 HUVEC/小珠血管生成检测分析法中促进毛细血管形态发生。人内皮细胞的毛细血管形态发生如实施例 4 所述在小珠血管生成检测分析法中进行测量。R15E6 促进基底的和 VEGF 诱导的内皮细胞毛细血管形态发生。

[0053] 图 7 :Western 印迹分析将 R15E6 结合表位定位于 HPTP  $\beta$  胞外域的 N-末端 FN3 重复序列。(图 A) 通过 western 分析,R15E6 结合所有 C-末端平截突变型证明结合表位位于 N-末端的 2 个 FN3 重复序列。(图 B) 对小鼠/人嵌合蛋白的分析进一步将 R15E6 结合表位定位于 HPTP  $\beta$  的 N-末端 FN3 重复序列。

[0054] 图 8 :MSD 分析证实 R15E6 结合表位定位于 HPTP  $\beta$  细胞外域的 N- 末端 FN3 重复序列。(图 A) 通过 MSD 分析, R15E6 结合所有 C- 末端平截突变型证实结合表位位于 N- 末端的 2 个 FN3 重复序列。(图 B) 对小鼠 / 人嵌合蛋白的分析进一步证实 R15E6 结合表位定位于 HPTP  $\beta$  的 N- 末端 FN3 重复序列。

[0055] 图 9 :MSD 分析证明单价 R15E6Fab 片段也结合 HPTP  $\beta$  的 N- 末端 FN3 重复序列。(图 A) 与完整 R15E6 抗体相似, R15E6Fab 片段结合所有 C- 末端平截突变型证实结合表位位于 N- 末端的 2 个 FN3 重复序列。(图 B) 对小鼠 / 人嵌合蛋白的分析进一步将 R15E6Fab 片段的结合表位定位于 HPTP  $\beta$  的 N- 末端 FN3 重复序列。

[0056] 图 10 :单价 R15E6Fab 片段不能促进 Tie2 的活化, 并阻止 Tie2 被完整 R15E6 活化。

[0057] 图 11 :R15E6Fab 片段有效地抑制了内皮细胞的存活。(图 A) 与 Fab 片段对照物相比, R15E6Fab 片段有效地抑制了内皮细胞的存活。(图 B) 完整的 R15E6 的竞争作用减弱了 R15E6Fab 片段的抑制效果。

[0058] 图 12 :R15E6Fab 片段抑制 VEGF 介导的内皮细胞迁移。

#### [0059] 序列列表描述

[0060] 序列列表中的每一个核苷酸和蛋白质序列与相应的 Genbank 或 Derwent 保藏编号 (适用时) 以及它们的起源物种一起显示于表 I 中。

#### [0061] 表 I

[0062]

序列描述	序列标识号： 核苷酸, 蛋白质	物种	等同的 Genbank 保藏编号
具有 His 和 Gly 标签的 HPTP $\beta$ 细胞外域	1, 2	人类	
全长 HPTP $\beta$ 的细胞外域	3	人类	X54131 NM_002837
1/2 (AA1-730, 8 FN3' s) 775aa	4	人类	
1/4 (AA1-376, 4 FN3' s) 421aa	5	人类	
1/8 (AA1-202, 2 FN3' s) 247aa	6	人类	
小鼠全长 ECD1632aa	7	小家鼠	NM_029928
第一人 FN3- 小鼠 1/2	8	人 - 小鼠嵌合物	
第二人 FN3- 小鼠 1/2	9	人 - 小鼠嵌合物	
头两个人 FN3, - 小鼠 1/2	10	人 - 小鼠嵌合物	
人 FN3, 首次重复序列	11	人类	

#### [0063] 发明详述

[0064] 本发明涉及结合 HPTP  $\beta$  的抗体及其应用。

[0065] 标准技术可用于重组 DNA、低聚核苷酸合成、以及组织培养和转化 (例如电穿孔、微脂粒感染)。可按照厂商的说明书、或本领域中的常规方法、或如本文所述使用酶反应和纯化技术。所述技术和程序一般按照本领域已知的常规方法, 并如本说明书中引用和讨论的各种常规的以及较具体的参考文献所述进行实施。除非提供具体的定义, 与本文所述的

分析化学、有机合成化学、和医药化学有关的所用命名以及试验程序和技术是那些本领域已知的和普遍使用的。标准技术可用于化学合成、化学分析、药物制备、制剂配制和递送、以及治疗病人。

[0066] 除非另外指明,应当理解以下术语具有以下含义:

[0067] 本文所用的“蛋白质”可与肽和多肽互换。HPTP  $\beta$  是序列列表中限定的人蛋白酪氨酸磷酸酶。在一些实施方案中,使用 HPTP  $\beta$  的不同片段。下文所述的同源物、直向同源物、片段、变体、和 HPTP  $\beta$  蛋白和基因的突变型均被认为在术语“HPTP  $\beta$ ”的范围内。

[0068] “片段”是指核苷酸或蛋白质序列的一部分。片段可保留其源蛋白的生物活性。核苷酸序列的片段也可用作杂交探针和引物,或用于调节基因表达,例如反义、siRNA、或小 RNA。生物活性部分可以通过下列方法制备:分离本发明的其中一个核苷酸序列的部分、表达被编码的部分(例如,通过体外重组表达),评估被编码蛋白质的活性。

[0069] 本领域的技术人员也能认识到,得自除了那些序列列表中列出的物种之外的基因和蛋白质,尤其是脊椎动物,也是可用的。此类物种包括但不限于小鼠、大鼠、豚鼠、兔子、狗、猪、山羊、母牛、猴子、黑猩猩、绵羊、仓鼠和斑马鱼。本领域的技术人员还将认识到通过使用来自已知物种序列的探针,cDNA 或同源于已知序列的基因序列可以从相同的或替代物种中通过已知的克隆方法获得。此类同源物和直向同源物被设想用于本发明的实践。

[0070] “变体”是指类似的序列。例如,保守变体可包括那些因为遗传密码退化,编码本发明其中一个多肽的氨基酸序列的那些序列。天然存在的等位变体和剪接变体可以用已知的技术鉴定,例如用聚合酶链反应(PCR)、单核苷酸多态性(SNP)分析和杂交技术。为了分离直向同源物和同源物,一般的严紧杂交条件主要通过规定具体序列、序列长度、鸟嘌呤+胞嘧啶(GC)含量和其它参数被利用。变体核苷酸序列还包括合成来源的核苷酸序列,例如通过使用定点诱变获得的核苷酸序列。变体可包含单独来自基因组位点或与其它序列组合的额外的序列。

[0071] 本发明的分子也包括平截的和/或突变的蛋白质,其中配体结合或信号转导不需要的蛋白质区域已被删除或修饰。同样,它们也发生突变以改变其配体结合或信号转导活性。此类突变可涉及非保守突变、删除、或氨基酸或蛋白质域的增加。变体蛋白可保留或不保留生物活性。这种变体可以由例如基因多态性或人类操纵产生。

[0072] 本文还可以想到融合蛋白。使用已知的方法,本领域的技术人员将能够制造本发明的蛋白质的融合蛋白;尽管它不同于与源蛋白的形式,但也是可用的。例如,融合部分可以是信号(或前导)多肽序列,该序列共同翻译或在后翻译指导蛋白质从它的合成部位转移到另一个部位(例如,酵母  $\alpha$  因子前导)。作为另外一种选择,可将它加入以有利于本发明蛋白质的纯化或识别(例如,聚 His、标记肽、或荧光蛋白)。

[0073] 术语“抗原”是指能被选择性结合剂如抗体结合,另外还能在动物中使用以生产能够结合抗原表位的抗体的分子或分子部分。抗原可以有一个或多个表位。

[0074] 术语“表位”包括任何抗原决定簇,优选多肽决定簇,能够特异结合到免疫球蛋白或 T-细胞受体上。在某些实施方案中,表位决定簇包括化学活性表面基团诸如氨基酸、糖、类脂、磷酸基、或磺酰基,并且在某些实施方案中,表位决定簇可具有特异的三维结构特性,和/或特异的电荷特性。表位是抗原的抗体结合区域。在某些实施方案中,抗体被认为,当它优选地识别其在蛋白质和/或大分子复合混合物中的目标抗原时会特异性地结合抗原。

抗体也被认为,当它对抗原表现出比其它相关的和 / 或不相关的分子更高的亲和力时会特异性地结合抗原。

[0075] 如本文所用,术语“抗体”(Ab) 包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、单链抗体例如来自骆驼的抗体、抗体片段例如可变区和 / 或恒定区片段,只要它们表现出期望的生物活性,例如抗原结合活性。术语“免疫球蛋白”(Ig) 与本文的“抗体”是可互换的。

[0076] “分离抗体”是已经被鉴定的、和 / 或分离的、和 / 或从其天然环境中重新获得的抗体。

[0077] 基本的四链抗体单位是一种糖蛋白异四聚体,由两个相同的轻(L) 链和两个相同的重链(H) 组成(IgM 抗体由 5 个基本的异四聚体单位和一个附加的称为 J 链的多肽组成,因此包含 10 个抗原结合位点,然而分泌的 IgA 抗体可聚合以形成多价的聚合体,所述聚合体包括 2 至 5 个基本的 4 链单位以及 J 链)。就 IgG 而言,四链单位一般为约 150 千道尔顿(kDa)。每个 L 链通过一个共价二硫键连接到一个 H 链上,而两个 H 链取决于 H 链同种型通过一个或多个二硫键彼此相连。每个 H 链和 L 链也有规则排列的链内二硫桥。每个 H 链在 N- 末端具有一个可变区( $V_H$ ),每个  $\alpha$  和  $\gamma$  链有三个恒定区( $C_H$ ) 而每个  $\mu$  和  $\epsilon$  同种型有四个  $C_H$  区。每个 L 链在 N- 末端具有可变区( $V_L$ ),在另一端有恒定区( $C_L$ )。  $V_L$  与  $V_H$  相连,并且  $C_L$  与重链( $C_H1$ ) 的第一恒定区相连。据信特殊的氨基酸残基形成轻链和重链可变区之间的界面。 $V_H$  和  $V_L$  对一起形成专一的抗原结合位点。不同类别抗体的结构和特性参见例如 Basic and Clinical Immunology,第 8 版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow(eds.), Appleton & Lange, 1994, 第 6 章第 71 页。

[0078] 来自任何脊椎动物的 L 链基于它们的恒定区氨基酸序列可被分成两种不同类型,分别称为  $k$  和  $\lambda$ 。取决于它们的重链( $C_H$ ) 恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可以被分为不同的类别或同种型。有五类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,它们各自具有指定的重链  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  和  $\mu$ 。根据 CH 序列和功能的相对较小的差异,可将  $\gamma$  类和  $\alpha$  类进一步分成亚型,例如,人表达以下亚型: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。

[0079] 驼科家族的成员例如无峰驼、骆驼和单峰驼包含独特的抗体型,所述抗体缺失轻链,并进一步缺失  $C_H$  区 (Muyltermans, S., Rev. Mol. Biotechnol., 74, 277-302 (2001))。这些重链抗体的可变区称为  $V_{HH}$  或 VHH, 并且构建衍生自功能性免疫球蛋白的最小的可利用完整抗原结合片段 (15kDa)。

[0080] 术语“可变的”是指可变区的某些片段在抗体中的序列差别很大。V 区调节抗原结合并且限定特异抗体对其抗原的特异性。然而,可变性未被平均分配到可变区的 110 个氨基酸序列片段中。相反, V 区由相对不变的区域组成,该区域称为框架区 (FR),长 15 至 30 个氨基酸,它们被较短的高可变区域分隔,该区域称为“高变区”,每个长 9 至 12 个氨基酸。每个天然重链和轻链的可变区包括四个主要采用  $\beta$ - 折叠构型的 FR,它们由三个高变区相连,形成环形连接,并且在一些情况下形成部分  $\beta$ - 折叠结构。每条链中的高变区被 FR 结合到一起,彼此非常接近,并与其它链的高变区一起有助于形成抗体的抗原结合位点。抗体与抗原的结合不直接涉及恒定区,但是所述恒定区表现出多种效应子功能,诸如参与抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)。

[0081] 术语“高变区”当在本文中使用时是指负责抗原结合的抗体氨基酸残基。高变区一

般包括来自“互补性决定区”或“CDR”的氨基酸残基（例如  $V_L$  中的约 24 至 34 残基 (L1)、50 至 56 残基 (L2) 和 89 至 97 (L3) 残基, 以及  $V_H$  中的约 1 至 35 残基 (H1)、50 至 65 残基 (H2) 和 95 至 102 残基 (H3) ;Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 和 / 或那些来自“高变环”的残基。

[0082] 如本文所用, 术语“单克隆抗体”是指从一组基本上同源的抗体中获得的抗体, 即, 该组抗体中包括的各个抗体是相同的, 除了可能有的微量天然存在的突变。与包括抗不同表位的不同抗体的多克隆抗体相对照, 每个单克隆抗体抗一个单独的表位, 即, 一个单独的抗原决定簇。除了它们的特异性之外, 单克隆抗体的优点还在于它们可通过其它抗体被无污染的合成。修饰语“单克隆”将被理解为不需要任何特殊的方法生产抗体。例如, 本发明可用的单克隆抗体可通过杂交瘤方法进行制备, 或使用在细菌、真核动物或植物细胞中的重组 DNA 方法进行制造 (参见例如美国专利 4, 816, 567)。所述“单克隆抗体”还可使用可用的技术从噬菌体抗体文库中分离, 例如 Clackson 等人, Nature, 352 :624-628(1991)。

[0083] 本文的单克隆抗体包括“嵌合”抗体, 其中一部分重链和 / 或轻链与衍生自特定物种的或属于特定抗体类型或亚型的抗体中的对应序列相同或同源, 而残余链与衍生自另一种物种或属于另一种抗体类型或亚型的抗体中的对应序列相同或同源, 以及此类抗体的片段, 只要它们表现出所需的生物活性 (参见美国专利 4, 816, 567 ;和 Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855(1984))。

[0084] “抗体片段”包括多亚基抗体的一部分, 优选完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、Fab 结合物的二聚体和三聚体、Fv、scFv、微型抗体 ;二聚体、三聚体和四聚体 ;线性抗体 (参见 Hudson 等人, Nature Med. 9, 129-134(2003))。

[0085] “Fv”是包含全部抗原结合位点的最小抗体片段。此片段由一个重链可变区和一个轻链可变区通过牢固的非共价结合形成的二聚体组成。从这两个区域发出六个高变环 (从 H 链和 L 链各发出 3 个环), 产生用于抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体抗原结合特异性。然而, 甚至单独一个可变区 (或仅包括三个抗原特异性的 CDR 的半个 Fv) 都具有识别和结合抗原的能力, 因此它们被包括在 Fv 的定义中。

[0086] “单链 Fv”也简称为“sFv”或“scFv”, 它是包括连接到单多肽链中的  $V_H$  和  $V_L$  抗体域的抗体片段。优选地, sFv 多肽还包括在  $V_H$  和  $V_L$  域之间的多肽连接肽, 它使得 sFv 形成抗原结合所需的构型。

[0087] 术语“二聚体、三聚体、和四聚体”是指通过构建 sFv 片段与  $V_H$  和  $V_L$  区之间的短连接片段 (约 5 至 10 各残基) 来制备的小抗体片段, 所述短连接片段使得 V 区形成链间而不是链内的配对, 导致多价片段。

[0088] 术语“人源化抗体”或“人抗体”是指这样的抗体 :包括来自非人类物种 (例如小鼠) 的重链和轻链可变区序列, 但是其中至少一部分  $V_H$  和 / 或  $V_L$  序列已经被改造成较“类似人的”, 即与人类种系可变区更相似。一种人源化抗体类型是 CDR- 移植抗体, 其中人 CDR 序列被引入非人的  $V_H$  和  $V_L$  序列以置换对应的非人 CDR 序列。制造嵌合的 CDR 移植和人源化抗体的方法是本领域的普通技术人员已知的 (参见例如美国专利 4, 816, 567 和 5, 225, 539)。一种制造人抗体的方法使用转基因动物如转基因小鼠。这些转基因动物包

含被插入它们自己的基因组的、基本部分的人抗体生产基因组,致使在抗体生产中动物自己的内源抗体生产缺乏。制造转基因动物的方法是本领域已知的。此类转基因动物可使用 XenoMouse<sup>TM</sup> 技术或使用“小位点”方法进行制造。制造 XenoMice<sup>RTM</sup> 的方法在美国专利 6,162,963、6,150,584、6,114,598 和 6,075,181 中有所描述。使用“小位点”方法制造转基因动物的方法在美国专利 5,545,807、5,545,806 和 5,625,825、以及 W093/12227 中有所描述。

[0089] 非人抗体的人源化近年来已经变得常规化,现在是本领域技术人员掌握的知识。有几家公司提供制造人源化抗体的服务,例如 Xoma、Aries、Medarex、PDL、和 Cambridge Antibody Technologies。人源化方案被广泛描述于技术文献中,例如 Kipriyanov and Le Gall, *Molecular Biotechnol*, Vol. 26, pp39-60 (2004), Humana Press, Totowa, NJ ;Lo, *Methods Mol. Biol.*, Vol. 248, pp135-159 (2004), Humana Press, Totowa, NJ ;Wu 等人, *J. Mol. Biol.* 294, 151-162 (1999)。

[0090] 在某些实施方案中,本发明的抗体可在除杂交瘤细胞系之外的细胞系中表达。可以通过已知方法,使用编码特定抗体的序列转化合适的哺乳动物宿主细胞,以将多核苷酸引入宿主细胞,所述方法包括例如将多核苷酸包封在病毒中(或在病毒载体中)并用病毒(或载体)转化宿主细胞,或通过本领域已知的转染方法,这些方法为美国专利 4,399,216、4,912,040、4,740,461 和 4,959,455 所证实。使用的转化程序可取决于需被转化的宿主。将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞的方法是本领域已知的,包括但不限于葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、凝聚胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、脂质体中的多核苷酸包封、将核酸与带正电的类脂混合、以及将 DNA 直接显微注射进细胞核。

[0091] 使用标准连接技术将编码抗体的重链恒定区、重链可变区、轻链恒定区、或轻链可变区的氨基酸序列的核酸分子,或如果需要的话它们的合适组合的片段,插入合适的表达载体。抗体重链恒定区或轻链恒定区可连接到适宜可变区的 C 末端,并连接到表达载体中。所述载体通常选择在使用的特定宿主细胞中是功能性的载体(即,所述载体与宿主细胞相容以使得基因扩增和/或基因表达可发生)。表达载体参见 *Methods Enzymol.* vol. 185 (Goeddel, ed.), 1990, Academic Press。

[0092] 本发明的抗体及其片段结合 HPTP  $\beta$  并调节血管新生。如上述定义,术语抗体用于表示抗原结合片段。下文进一步描述此类抗体和抗原结合片段的用途。

[0093] 使用血管新生体外和体内模型的筛选检测分析法

[0094] 本发明的抗体可以使用本领域中已知的血管新生检测分析法进行筛选。此类检测分析法包括测量培养细胞中血管代用品生长或组织外植体的血管结构形成的体外检测分析法,和直接地或不直接地测量血管生长的体内检测分析法 (Auerbach, R., 等人 (2003), *Clin Chem* 49, 32-40, Vailhe, B., 等人 (2001), *Lab Invest* 81, 439-452)。

[0095] 血管新生的体外模型

[0096] 大多数这些检测分析法使用培养的内皮细胞或组织外植体,并测量试剂对“血管新生的”细胞应答或对毛细血管样结构形成的功效。体外血管新生检测分析法的实例包括但不限于内皮细胞迁移和增殖、毛细血管形成、内皮新生、主动脉环外植检测分析法和鸡主动脉弓检测分析法。

[0097] 血管新生的体内模型

[0098] 在这些检测分析法中,试剂或抗体在生长因子(即 VEGF 或血管生成素 1)存在或不存在的条件下被局部施用或系统施用,并且新血管生长通过直接观察或测量替代标志物如血色素含量或荧光指示剂进行测量。血管新生实例包括但不限于鸡胚绒毛尿囊膜检测分析法、角膜血管新生检测分析法、以及 MATRIGEL™ 塞检测分析法。

#### [0099] 血管新生失调的治疗

[0100] 术语“调节”定义为其众所公认的词典含义。因此,术语“调节”的含义包括但不限于通过多种方法上调或下调,以固定、使有序或一致、管理、或引导。在一个方面,抗体可用于治疗“血管新生升高的失调”或“血管新生降低的失调”的方法。如本文所用,“血管新生升高的失调”是一种在疾病、失调、和 / 或病症的生物学表现中;在导致失调的生物学级联反应中;或作为失调症状,涉及多余的或升高的血管新生的失调。同样,“血管新生降低的失调”是一种在生物学表现中涉及缺少的或降低的血管新生的失调。此血管新生的“涉及”在血管新生升高的 / 降低的失调中包括但不限于以下内容:

[0101] (1) 血管新生作为失调或生物学表现的“原因”,血管新生的水平由于感染、自身免疫、外伤、生物力学原因、生活方式、或一些其它原因,在遗传上或者升高或者降低。

[0102] (2) 血管新生作为疾病或失调的可见表现的一部分。也就是说,根据血管新生的增高或降低,疾病或失调是可测量的。从临床观点来说,血管新生指示疾病。然而,血管新生不需要成为疾病或失调的“特征”。

[0103] (3) 血管新生是导致疾病或失调的生物化学或细胞级联反应的一部分。在这方面,血管新生的调节可中断级联反应,并且可控制疾病。本发明可治疗的血管新生失调的非限制性实例在下文中进行描述。

[0104] 本发明的抗体可用于治疗与视网膜 / 脉络膜新血管形成相关的疾病,包括但不限于:糖尿病视网膜病变、黄斑变性、癌症、镰状细胞性贫血、肉状瘤、梅毒、弹力纤维性假黄瘤、佩吉特氏病、静脉闭塞、动脉闭塞、颈动脉阻塞病、慢性葡萄膜炎 / 玻璃体炎、分枝杆菌感染、莱姆氏病、系统性红斑狼疮、早产儿视网膜病、伊耳斯氏病、白塞病、感染引起的视网膜炎或脉络膜炎、眼假组织胞浆菌病、白斯特氏病、近视、眼凹、斯特格病变、睫状体平坦部炎、慢性视网膜脱落、高粘滞综合症、弓形体病、外伤和激光术后并发症。其它疾病包括但不限于红变相关的疾病(虹膜新血管形成),和由维管组织或纤维组织的异常增殖引起的疾病,包括所有形式的增殖性玻璃体视网膜病变,无论其是否与糖尿病相关。

[0105] 本发明的抗体可以用于治疗与慢性炎症相关的疾病。具有慢性炎症症状的疾病包括炎性肠疾病诸如克隆氏病和溃疡性结肠炎、牛皮癣、肉状瘤和类风湿性关节炎。血管新生是这些慢性炎症疾病共同具有的一个关键要素。慢性炎症依赖新生毛细血管的连续形成以维持发炎细胞的流入。发炎细胞的流入和存在产生肉芽瘤,因此维持慢性发炎状态。通过本发明的组合物和方法抑制血管新生将预防肉芽瘤的形成并减轻疾病症状。

[0106] 克隆氏病和溃疡性结肠炎特征在于胃肠道中多个位点的慢性炎症和血管新生。克隆氏病特征在于遍及胃肠道的慢性肉芽瘤炎症,胃肠道由被发炎细胞滚筒状围绕的新生毛细血管组成。防止血管新生抑制了新血管的形成并防止肉芽瘤的形成。克隆氏病是一种慢性透壁性炎症疾病,最常见地影响回肠末梢和结肠,但也可能发生在胃肠道从口腔至肛门以及肛周区域的任何部分。克隆氏病患者一般患有慢性痢疾并伴有腹部疼痛、发烧、厌食、体重降低和腹部水肿。溃疡性结肠炎也是一种慢性的、非特异性的炎症,溃疡疾病发生于结

肠黏膜,其特征在于发生血性腹泻。

[0107] 炎性肠疾病还显示肠外表现如皮肤病变。此类病变特征在于发炎和血管新生,可在除胃肠道之外的许多位点发生。本发明的抗体能够通过预防血管新生来治疗这些病变,因此减少发炎细胞的流入和病变形成。

[0108] 肉状瘤是另一种慢性炎性疾病,其特征在于多系统肉芽瘤失调。此疾病的肉芽瘤可在体内的任何位置形成,因此症状取决于肉芽瘤的位置和疾病是否是活动性的。肉芽瘤通过向发炎细胞提供持续供应的新生毛细血管而产生。

[0109] 本发明的抗体还可治疗与牛皮癣相关的慢性炎性疾病。牛皮癣是一种皮肤病,是另一种慢性的和周期性发作的疾病,其特征在于大小不一的丘疹和斑块。防止对维持特征性病变来说必需的新血管形成可导致症状减轻。

[0110] 类风湿性关节炎是一种慢性炎性疾病,其特征在于周边关节的非特异性炎症。据信关节滑液衬里中的血管经受了血管新生。除了形成新的血管网络之外,内皮细胞还释放因子和反应性氧物质,它们导致血管翳生长和软骨损坏。血管新生中涉及的因子可积极地导致并有助于维持类风湿性关节炎的慢性发炎状态。可根据本发明进行治疗的其它疾病为血管瘤、奥斯勒-韦伯-朗迪病、或遗传性出血性毛细血管扩张症、实体瘤或血道转移瘤、以及获得性免疫缺损综合症。

[0111] 本发明的抗体还可用于治疗“血管新生减少的失调”。如本文所用,“血管新生减少的失调”将认为血管新生对治疗疾病、失调、和/或病症是有益的。所述失调特征在于组织遭受或有遭受局部缺血、感染、和/或愈合困难的风险,当组织由于循环不充分而失去足够的氧合血供应时,发生此类失调。如本文所用,“组织”具有广泛的含义,包括但不限于以下内容:心脏组织,诸如心肌和心室;勃起组织;骨骼肌;神经组织,诸如来自小脑的组织;内部器官,诸如脑、心、胰腺、肝脏、脾、和肺;或广义的身体区域诸如四肢、足部、或肢体末梢如手指或脚趾。

#### [0112] 缺血组织生成血管的方法

[0113] 在一个方面,抗体可用于缺血组织生成血管的方法。如本文所用,“缺血组织”是指缺乏足够的血流量的组织。缺血组织的实例包括但不限于由心肌和脑梗塞、肠系膜缺血或肢体缺血、或血管闭合或狭窄引起的缺乏足够供血的组织。在一个实例中,血管闭合可引起氧合血供应的中断。此类血管闭合可由动脉硬化、外伤、外科手术、疾病、和/或其它病因引起。标准常规技术可用于测定组织是否有由不期望的血管闭合引起的缺血损害的风险。例如,在心肌疾病中这些方法包括多种成像技术(例如放射性示踪法、X射线和MRI)和生理学测试。因此诱导血管新生是预防或减轻受血管闭合影响或有受血管闭合影响风险的组织缺血的有效方法。此外,还充分设想了将所述方法用于治疗骨骼肌和心肌局部缺血、中风、冠状动脉疾病、周围性血管疾病、冠状动脉疾病。

[0114] 本领域技术人员使用标准技术可测量组织的血管生成。通过测量治疗前和治疗后组织的血流量,测量受试者血管生成的非限制性实例包括 SPECT(单光子发射计算机断层摄影);PET(正电子发射断层摄影);MRI(核磁共振摄影);以及它们的组合。可使用血管造影术进行宏观血管供应评估。可使用组织学评估在小血管水平定量血管生成。这些技术以及其它技术详述于 Simons 等人,“Clinical trials in coronary angiogenesis,” *Circulation*, 102, 73-86 (2000)。

### [0115] 修复组织的方法

[0116] 在一个方面,抗体可用于修复组织的方法中。如本文所用,“修复组织”是指促进组织修复、再生、生长和 / 或维持,包括但不限于伤口修复或组织工程学。本领域的技术人员知道组织修复需要形成新的血管。继而,组织可能遭受包括但不限于外伤性损伤或病症的损害,所述病症包括关节炎、骨质疏松和其它骨骼失调、以及烧伤。组织也可能遭受由于外科手术、辐射、破口、有毒化学药品、病毒感染或细菌感染、或烧伤引起的损伤的损害。需要修复的组织也包括不愈合的伤口。不愈合伤口的实例包括由糖尿病引起的不愈合皮肤溃疡;或不易愈合的骨折。

[0117] 抗体在引导组织再生 (GTR) 程序中也可用于组织修复。本领域的技术人员在进行创伤性外科手术,使用此类程序以加速伤口愈合。

[0118] 抗体可用于促进组织修复的方法中,所述方法的特征在于在组织工程学的过程期间促进组织的生长。如本文所用,“组织工程学”是指创造、设计和制造生物假体装置,与合成的或天然的材料组合使用,修复或替换身体组织或器官。因此,本方法可用于增加设计和人体组织在体外的生长,使其可用于以后的移植以修复或置换患病的组织。例如,抗体可用于促进皮瓣移植置换的生长,所述皮瓣移植置换是一种治疗烧伤的疗法。

[0119] 在组织工程学的另一方面,可将本发明的抗体包括于包含细胞或不包含细胞的装置中,所述装置当被移植到需要再生的位点时会诱导功能性人类组织再生。如上文所述,可使用生物材料引导的组织再生促进骨再生,例如牙周病。因此,可使用抗体促进装配成三维构型置于伤口或其它需要此类修复的组织位置的再生组织的生长。

[0120] 在组织工程学的另一方面,可将抗体包括在包含设计用于置换患病的内部组织功能的人类组织的外部或内部装置中。此方法涉及从人体分离细胞,将其与结构母体一起放置,并将新体系移植到体内或在体外使用此体系。例如,可将抗体包括于细胞源性血管移植中以促进移植中包含的细胞的生长。设想将本发明的方法用于促进产品诸如软骨和骨、中枢神经系统、肌、肝脏和胰岛(产生胰岛素)细胞中的组织修复、再生和工程学。

### [0121] 药物制剂和使用方法

[0122] 本发明的抗体可施用于个人以治疗或预防可由本发明的基因和蛋白调节的疾病或失调。如本文所用,术语“治疗”是指施用本发明化合物以减轻宿主体内疾病或不适。因此,术语“治疗”包括预防宿主失调的发生,尤其是当宿主倾向于患有该疾病但尚未诊断出该疾病时;抑制失调;和 / 或缓和或消除失调。在将本发明方法用于预防失调的情况下,应当理解的是,术语“预防”不需完全抑制病状。(参见 Webster 的 Ninth Collegiate Dictionary。)相反,本文所用术语“预防”是指本领域技术人员识别易感染疾病群体的能力,这样就可于疾病开始发作之前,使用本发明的化合物。该术语并不意味着可完全避免病状。用本发明的筛选方法确定的化合物可与其它化合物协同施用。

[0123] 已识别的化合物的安全性和治疗功效可通过使用体外或体内技术的标准程序来确定。具有很大治疗指数的化合物为优选的,但是具有较低治疗指数的化合物也是有用的,只要其副作用的程度是可接受的。由体外和体内毒物学和药理学技术获得的数据可用于确定剂量范围。

[0124] 化合物的效力可进一步通过对动物模型或对血管新生无调节或不正确调节的病人的临床试验来评估。

[0125] 如本文所用,“药用载体”旨在包括与药物施用相容的所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌和抗真菌试剂、等渗和吸收延迟试剂等。药物活性物质的此类介质与试剂的使用为本领域所熟知。除了任何常规的介质与试剂是与活性化合物不相容的,此类介质可以在本发明的组合物中使用。辅助的活性化合物也可被掺入到组合物中。本发明的药学组合物被配制为与其预期的给药途径相容。给药途径的实施例包括肠胃外给药,例如静脉注射、皮层内注射、皮下注射、口服(例如,吸入)、透皮注射(局部用药)、经粘膜给药和直肠给药。用于肠胃外给药、皮内注射或皮下注射应用的溶液或悬浮液包括以下组分:消毒的稀释剂例如注射用水、盐水溶液、非挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成的溶剂;抗菌剂例如苜醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂例如乙二胺酸;缓冲液例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐、以及用来调节张力的试剂如氯化钠或右旋糖。pH可以用酸或碱来调节例如盐酸或氢氧化钠。肠胃外给药制剂可以装在一次用量的针剂内、一次性注射器或玻璃或由塑料制成的多重剂量小瓶中。

[0126] 适于注射的药用组合物包括无菌的水溶液(在水溶性的情况中)或分散体,和用以无菌可注射溶液或分散体临时制备的无菌粉末。对于静脉注射添加,合适载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF, Parsippany, N. J.)或磷酸盐缓冲液(PBS)。在所有这些例子中,组合物必须无菌并且其必须是易于以针剂形式存在的流体。在制造和储存条件下必须稳定并且储存必须避免被微生物污染,例如细菌和真菌。载体可以是溶剂或分散介质,包括例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液态聚乙二醇等)、以及它们的合适的混合物。合适的流动性可以通过使用包衣例如卵磷脂、在分散体中维持所需的粒度和使用表面活性剂来维持。可以通过多种抗菌的和抗真菌的试剂来预防微生物,例如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、酚、抗坏血酸、乙基汞硫代水杨酸钠等。在许多情况下,优选组合物中包含等张剂,例如糖、多元醇例如甘露糖醇、山梨醇和氯化钠。注射组合物的延长吸收可以通过将能延迟吸收的试剂,例如铝一硬脂酸盐和明胶,包含进组合物来实现。

[0127] 无菌注射溶液可以如下制备:根据需要,与上文列举成分中的一种或它们的组合一起,将所需量的活性化合物掺入到合适的溶剂中,接着过滤除菌。通常分散体通过将活性化合物掺入到包含基础分散介质和所需的其它成分的无菌载体中来制备。在用以制备无菌注射溶液的无菌粉末的例子中,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,从而产生活性成分加上任何额外的所需成分的粉末,这些所需成分来自以前它们无菌过滤后的溶液。

[0128] 系统给药还可以为经粘膜给药或透皮给药方式。为了经粘膜的或透皮注射的给药,适于渗透过障碍的渗透剂被用于制剂中。这些渗透剂是本领域通常已知的,包括例如为经粘膜的给药,洗涤剂、胆汁盐和梭链孢酸衍生物。经粘膜给药可以使用鼻喷剂或栓剂来完成。为透皮注射给药,活性化合物被配制成本领域通常已知的油膏剂、药膏、凝胶或霜膏。

[0129] 化合物也可以制备成栓剂(例如,使用常规栓剂基质,如椰子油和其它甘油酯)或用于直肠递送的保留灌肠剂形式。

[0130] 在一个实施方案中,一起制备活性化合物和载体,载体将保护化合物不被身体迅速的消除,例如一种受控的释放制剂,其包括灌输和微胶囊化的递送体系。可使用可生物降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯-乙酸乙烯酯、聚酞、聚羟基乙酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这些制剂的方法为本领域的技术人员所熟知。材料也能从Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. 购得。脂质体悬浮液(包括和病毒抗原单克隆抗体一起

用于感染细胞的脂质体)也能被用作可药用的载体。这些可按照本领域的技术人员已知的方法进行制备,例如美国专利 4,522,811 所述的方法。

[0131] 尤其有利的是,以易于给药和同一化剂量的剂量单位形式来配制口服的或肠胃外给药的组合物。本文所用的“剂量单位形式”是指适用作被治疗个体一体剂量的物理离散单位,每个单位包含预定量的活性化合物以及所需的药物载体,所述预定量由所期望的治疗效果来计算。剂量单位形式的规格被指示自并直接取决于活性化合物的独特性质和想要获得的具体治疗效果,以及本领域组合这样一种用于个体治疗的活性化合物所受的内在限制。

#### [0132] 实施例

##### [0133] 实施例 1。HPTP $\beta$ 细胞外域蛋白的生产

[0134] 方法:根据厂商(Origene)说明书从人胎盘文库中克隆全长 HPTP  $\beta$ 。所述克隆除了缺失 FNIII 重复序列 #5 之外,与以前报导的 cDNA 克隆(Genbank accession # X54131)相同。通过 PCR 从全长 cDNA(参见下文序列)中克隆编码 HPTP  $\beta$  的完整可溶解细胞外域(ECD)的 cDNA,全长 cDNA 编码 AA1-1534,并具有增加的 c-末端 His-His-His-His-His-His-Gly(6His-Gly)(序列标识号:1)。将所得 cDNA 克隆进入哺乳动物表达载体,用于在 HEK293 细胞中的瞬时表达(pShuttle-CMV)或稳定表达(pcDNA3.1(-))。为了获得纯化 HPTP  $\beta$  ECD( $\beta$  ECD),用  $\beta$  ECD 表达载体转染 HEK293 细胞,然后在正常生长条件下,在 OptiMEM-无血清(Gibco)培养基中培养 24 小时。然后重新获得条件培养基,离心以移除残留物(1000rpmx5 分钟),在每 10mL 澄清培养基中加入 1mL 洗过的 Ni-NTA 琼脂糖(Qiagen)(500  $\mu$  L 包装),4 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。第二天将混合物加入柱中,并用 20 倍柱床体积的 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,300mM NaCl,20mM 咪唑,pH8 的溶液洗脱。纯化的 HPTP  $\beta$  细胞外域蛋白(序列标识号:2)然后用 200  $\mu$  L/洗脱液洗脱出六个片段,洗脱液为 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,300mM NaCl,250mM 咪唑,pH8。使用还原-变性 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析片段的蛋白含量,通过银染法(Invitrogen)进行检测并通过质谱进行确认。

[0135] 结果:为生产 HPTP  $\beta$  细胞外域的抗体,开发了引导带 6-His 标签的 HPTP  $\beta$  细胞外域蛋白(图 1,图 A)表达的表达式载体。随后,从表达式载体转染的 HEK293 细胞的条件培养基中将带 6-His 标签的 HPTP  $\beta$  细胞外域蛋白纯化至接近同质(图 1,图 B)。

##### [0136] 实施例 2。HPTP $\beta$ 细胞外域的单克隆抗体的产生

[0137] 方法:为了生产 HPTP  $\beta$  细胞外域免疫原,使用 EDC 化学耦合将纯化的 HPTP  $\beta$  细胞外域-6His 蛋白连接到猪的甲状腺球蛋白(Sigma)上(Hockfield, S. 等人,(1993)Cold Spring Harbor Laboratory Press. Volume pp. 111-201, Immunocytochemistry)。所得 HPTP  $\beta$  细胞外域-甲状腺球蛋白共轭物用 pH7.4 的 PBS 进行透析。然后用共轭物(100 至 200  $\mu$  g)和完全弗氏佐剂的 1:1 混合物免疫皮下注射成年 Balb/c 小鼠。2 至 3 周后,对小鼠腹膜内注射或皮下注射不完全弗氏佐剂和共轭物的 1:1 混合物。重复所述注射 4 至 6 周。在第三次注射后 7 天采集小鼠血清并通过 ELISA 和 western 印迹法检测分析 HPTP  $\beta$  细胞外域抗原的免疫反应活性。对抗原显示良好响应的小鼠继续用 31 计量超长针进行单次脾内注射 50  $\mu$  L 纯化 HPTP  $\beta$  细胞外域蛋白和与其 1:1 混合的氢氧化铝(Goding, J. W. (1996) Monoclonal Antibodies: Principles and Practices. 第三版, Academic Press Limited. p. 145)。简而言之,小鼠用 2.5% 的阿佛丁进行麻醉,在皮肤和左斜体壁上切开 1 厘米的切

口。把针从脾的后部插到脾的前部进行纵向注射,施用抗原混合物。缝合体壁,并用两个小金属夹封闭皮肤。监控小鼠使其安全恢复。手术后四天移除小鼠的脾,制造单细胞悬浮液用于融合小鼠骨髓瘤细胞以创造杂交瘤细胞系 (Spitz, M., (1986) *Methods In Enzymology*, Volume 121, Eds. John J, Lagone 和 Helen Van Vunakis. PP. 33-41 (Academic Press, New York, NY))。所得的杂交瘤在 Dulbeccos 改进培养基 (Gibco) 中进行培养,所述培养基补充了 15% 的胎牛血清 (Hyclone) 和次黄嘌呤、氨嘌呤以及胸腺嘧啶核苷。

[0138] 在融合持续 15 天后,开始筛选阳性杂交瘤 8 天。生产抗 HPTP  $\beta$  细胞外域抗体的杂交瘤通过在两套 96 孔板上的 ELISA 进行鉴别:一套涂敷了带组氨酸标签的 HPTP  $\beta$  细胞外域,另一套涂敷了带组氨酸标签的细菌 MurA 蛋白作为阴性对照。二次抗体是用辣根过氧化物酶 (HRP) (Jackson ImmunoResearch) 标记的驴抗鼠 IgG。将 ABTS 片剂溶解于 pH 7.5 的 TBS 缓冲液中引发显色,通过显色反应检测孔内的免疫反应活性。加入 100 微升的 1% SDS 中止各个 HRP 反应混合物,然后用分光光度计读取 405nm 处的吸光度。杂交瘤产生的抗体与 HPTP  $\beta$  细胞外域 -6His 相互作用,但不与 murA-6His 蛋白相互作用,该杂交瘤被用于进一步分析。在 96 孔板中使用限制性稀释液 (每孔 0.8 个细胞) 两次,当超过 99% 的孔有阳性反应时,定义它具有克隆形成能力。使用同型带分离技术 (Roche) 测定抗体的同种型。为了获得纯化抗体以供进一步评估,组织培养上清液使用蛋白 A 或蛋白 G 柱进行亲和纯化。

[0139] 结果:分离出五个对 HPTP  $\beta$  细胞外域蛋白有免疫反应性的单克隆抗体,命名为 R15E6、R12A7、R3A2、R11C3、R15G2 和 R5A8。

[0140] 单克隆抗体 R15E6 在 2006 年 5 月 4 日保藏于 American Type Culture Collection (ATCC), P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA。

[0141] 实施例 3。R15E6 结合人内皮细胞上的内源 HPTP  $\beta$ 。

[0142] A. 通过免疫沉淀反应和 western 印迹法证明 R15E6 结合内源 HPTP  $\beta$ 。

[0143] 材料:人脐静脉内皮细胞 (HUVEC)、EGM 培养基、和来自 Cambrex 的胰蛋白酶中和液;OPTIMEM I (Gibco)、牛血清白蛋白 (BSA; Santa Cruz)、磷酸盐缓冲液 (PBS; Gibco)、生长因子,包括血管生成素 1 (Ang1)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和纤维原细胞生长因子 (FGF) (R&D Systems)、Tie2 单克隆抗体 (Duke University/P&GP)、VEGF 受体 2 (VEGFR2) 多克隆抗体 (Whitaker 等人)、蛋白质 A/G 琼脂 (Santa Cruz)、Tris-甘氨酸预制胶电泳/转移系统 (6% 至 8%) (Invitrogen)、PVDF 膜 (Invitrogen)、裂解缓冲液 (20mm Tris-HCl, 137mm NaCl、10% 丙三醇、1% triton-X-100、2mM EDTA、1mM NaOH、1mM NaF、1mM PMSF、1  $\mu$ g/mL 的亮抑酶肽、1  $\mu$ g/mL 的抑肽素)。

[0144] 方法:HUVEC 单独用抗体 (在 OPTIMEM 中) 或 OPTIMEM I 预处理 30 分钟。在移除预处理后,细胞用 Ang1 (100ng/mL) 在 PBS+0.2% 的 BSA 中处理 6 分钟,并在裂解缓冲液中裂解。溶解产物直接进行 Tris-甘氨酸凝胶电泳或用 2 至 5  $\mu$ g/mL 的 Tie-2 抗体或 10  $\mu$ g/mL 的 R15E6 抗体和蛋白质 A/G 琼脂进行免疫沉淀。免疫沉淀的样本用 1x 裂解缓冲液洗涤,并在 1x 样本缓冲液中煮沸 5 分钟。将样本溶解于 Tris-甘氨酸凝胶,转移至 PVDF 膜上,并使用显示的抗体通过 western 印迹法进行检测 (pTYR Ab (PY99, Santa Cruz), Tie-2, VEGFR2 和 / 或 R15E6)。

[0145] 结果:通过 IP/western 印迹法,R15E6 识别一条主要的高分子量条带,所述条带符合 HPTP  $\beta$  的大小 (图 2, 图 A, 泳道 2)。较弱的低分子量条带可能代表 HPTP  $\beta$  的糖基化程

度较低的前体形式。对照的无免疫性 IgG 的免疫沉淀反应 (IP) 未出现在 HPTP  $\beta$  的分子量范围内的条带 (图 2, 图 A, 泳道 1), 而组合的 Tie2/VEGFR2IP 出现了期望分子量的条带 (图 2, 图 A, 泳道 3)。此结果说明 R15E6 识别 HPTP  $\beta$  并对它是特异性的。

[0146] B. FACS 分析证明的 R15E6 结合内源 HPTP  $\beta$

[0147] 材料: HUVEC、EGM 培养基、和来自 Cambrex 的胰蛋白酶中和液; 来自分子探针的二级 Alexfluor488 标签的抗体; Hanks 平衡盐溶液 (Gibco); FACSCAN 流式细胞分析仪和来自 Becton Dickinson 的 CellQuest 软件。

[0148] 方法: HUVEC 被胰蛋白酶消化, 用胰蛋白酶中和液处理并用 HBSS 洗涤。将 R15E6 抗体 (0.6  $\mu$ g) 加入到在 50  $\mu$ L HBSS 中的 250,000 个细胞中, 置于冰上培养 20 分钟。细胞用 1mL HBSS 洗涤, 然后加入 2  $\mu$ g 荧光共轭的二级抗体, 置于冰上 20 分钟。洗涤细胞并将其重悬浮在 1mL HBSS 中, 然后在 FACSCAN 流式细胞仪上用 CellQuest 软件进行分析。对照细胞仅用荧光共轭的二级抗体处理。

[0149] 结果: 通过 FACS 分析, 完整的 HUVEC、R15E6 与单独的二级抗体相比引起荧光信号的长移 (>90% 的细胞) (图 2, 泳道 B)。此结果指示 R15E6 结合内源 HPTP  $\beta$  存在于完整的内皮细胞表面上。

[0150] 实施例 4. R15E6 促进 Tie2 活化, 并促进血管新生响应 (内皮细胞存活、迁移和毛细血管形态发生)。

[0151] A. R15E6 在血管生成素 1 (Ang1)、Tie2 配体存在和不存在的条件下促进 Tie2 的磷酸化。

[0152] 方法: HUVEC 在无血清培养基中, 在各种浓度的 R15E6 存在或不存在、以及加入或不加入 Ang1 的情况下, 如上文所述进行培养。溶解产物被制备、被 Tie2 抗体免疫沉淀、被聚丙烯酰胺凝胶电泳溶解并被转移到 PVDF 膜上。膜结合的免疫沉淀蛋白质然后连续用抗磷酸酪氨酸抗体进行 western 印迹以定量 Tie2 磷酸化, 然后通过 Tie2 抗体定量总 Tie2。Tie2 磷酸化按照抗磷酸酪氨酸信号对总 Tie2 信号的比率进行表示。

[0153] 结果: R15E6 在 Ang1 存在和不存在的条件下都促进 Tie2 磷酸化 (图 3)。此结果指示在内皮细胞表面上的 R15E6 与 HPTP  $\beta$  的结合调节它的生物学功能, 导致在配体存在或不存在的条件下都促进 Tie2 的活化。

[0154] B. R15E6 在内皮生长因子存在和不存在的条件下促进内皮细胞存活。

[0155] 材料: HUVEC、EGM 培养基、和来自 Cambrex 的胰蛋白酶中和液; DMEM (CellGro)、脱脂 BSA (BD Falcon)、Cell Titer Glo ATP 检测分析法 (Promega)、生长因子 (Ang1、VEGF165 和 FGF) (R&D Systems)、Victor VMultilabel 板阅读器 (Perkin Elmer Wallac)。

[0156] 方法: HUVEC 被置于 10,000 个细胞/孔, 在生长因子 (Ang1、VEGF 或 FGF) 存在或不存在、以及有或无各种浓度的 R15E6 抗体的情况下, 在血清饥饿的 DMEM/0.2% BSA 培养基中处理 72 小时。在 72 小时之后, 用 DMEM 洗涤细胞, 然后使用 Cell Titer Glo 发光检测分析法, 根据厂商说明书 (Promega) 测量 ATP 水平, 由此定量存活细胞。

[0157] 结果: 与 Tie2 活化检测分析法的结果相符, R15E6 在浓度为 0.5 和 5nM 之间的加入生长因子的情况下促进了内皮细胞存活 (图 4, 图 A)。同样的, R15E6 促进 Ang1 介导的内皮细胞存活 (图 4, 图 A) 以及由 VEGF 和 FGF 介导的细胞存活 (图 4, 图 B 和 C)。未发现对照单克隆抗体促进细胞存活 (图 4, 图 D)。这些结果证明在内皮细胞表面上 R15E6 与

HPTP  $\beta$  的结合促进基线内皮细胞存活以及多个血管新生途径 (Ang1、VEGF 和 FGF) 介导的细胞存活。

[0158] C. R15E6 在 VEGF 存在和不存在的情况下促进内皮细胞迁移。

[0159] 材料: HUVEC、EGM 培养基、和来自 Cambrex 的胰蛋白酶中和液; 无红色 EBM- 酚 (PRF-EBM, Cambrex)、脱脂 BSA (BD Falcon)、BD Falcon Biocoat 内皮细胞迁移系统 (BD Falcon)、Calcein AM (Molecular Probes); 生长因子 (VEGF165) (R&D Systems)、Victor V Multilabel 板阅读器 (Perkin Elmer Wallac)。

[0160] 方法: 将 HUVEC 重悬浮在 PRF-EBM+0.1% BSA 中, 置入 50,000 个细胞 / 转运池 (BD Bioscience, 3  $\mu$ m 孔径)。生长因子 / R15E6 被置于转运池室的孔底部, 培养 4 至 22 小时。通过标记 4  $\mu$ g/mL 的 Calcein AM90 秒来检测迁移穿越膜的细胞。用 Victor V 仪器 (485/535) 测量荧光。

[0161] 结果: 与存活试验的结果相符, R15E6 促进基线和 VEGF 介导的内皮细胞迁移 (图 5)。

[0162] D. R15E6 在存在和不存在内皮生长因子的情况下促进内皮细胞新生和毛细血管形态发生。

[0163] 材料: HUVEC 和来自 Cambrex 的 EGM 培养基; 来自 Sigma 的 Cytodex 小珠和 I 型胶原; Dulbecco 的 PBS 和来自 Gibco 的 M199 培养基; 来自 R&D 的 VEGF。

[0164] 方法: HUVEC 静脉 4 ( $2 \times 10^6$  个细胞) 和 5mg Cytodex 小珠一起在 10mLEGM、100mm 非组织培养基处理的细菌培养皿中, 非经常振荡培养 48 小时。将涂敷细胞的小珠转移到 50mL 的锥形管中, 重悬浮在 380  $\mu$ L 的 D-PBS 中。胶原凝胶通过将 71.4  $\mu$ L 的涂敷细胞小珠加入 2.8mL 基质溶液中进行制备, 基质溶液由 3mg/mL 胶原在 M199 培养基中组成, 培养基补充了 0.005N NaOH、20mM HEPES 和 26mM NaHCO<sub>3</sub>。在 24 孔组织培养板上的一个孔中加入三百五十微升小珠, 允许基质在 37°C / 5% CO<sub>2</sub> 条件下固化 1 小时。每孔加入 1mL 有或没有 VEGF (10ng/mL) 或 R15E6 (7.5  $\mu$ g/mL) 的 EGM 培养基, 并将其送回培养室。在 48 小时后, 用相差倒立显微镜盲法观察新生细胞, 在三倍孔中每孔观察 50 个小珠以确认是否存在内皮细胞新生。结果用每个小珠的新生细胞数目表示。

[0165] 结果: 与其它检测分析法的结果相符, 在内皮细胞小珠血管生成检测分析法中 R15E6 也促进基线和 VEG 介导的毛细血管形态发生 (图 6)。

[0166] 实施例 5. R15E6 的结合表位位于人 HPTP  $\beta$  细胞外域的 N- 末端 FN3 重复序列。

[0167] A. 对重组 C 末端平截突变型和小鼠 / 人嵌合蛋白的 Western 印迹分析显示 R15E6 结合表位位于人 HPTP  $\beta$  细胞外域的 N- 末端 FN3 重复序列。

[0168] 方法: 用编码显示的 HPTP  $\beta$  平截突变株或小鼠 / 人嵌合蛋白的表达载体转染 HEK293 细胞。然后在 OptiMEM 中培养转染细胞附加的 24 小时, 之后得到包含显示的 HPTP  $\beta$  细胞外域的条件培养基, 所述培养基或者储存备用或者立即用于 western 印迹或 ECL (参见下文) 研究。用于 western 印迹分析时, 包含显示的 HPTP  $\beta$  蛋白或非重组蛋白 (空载体转染的对照) 的 20  $\mu$ L 条件培养基用 PAGE 进行溶解, 转移至 PVDF 膜上并用 R15E6 进行检测。

[0169] 结果: 通过 western 印迹分析, R15E6 结合所有的 HPTP  $\beta$  C 末端删除突变型 (图 7A), 指示结合表位位于头两个 N 末端 FN3 重复序列中。R15E6 不能结合鼠 HPTP  $\beta$  (序列标识号: 7) 细胞外域证明了其对人类蛋白质的特异性 (图 7B 泳道 6 对比泳道 2)。用人序列置

换鼠的第 1 个或第 1 个和第 2 个 N 末端 FN3 重复序列恢复了 R15E6 的结合能力 (图 7B 泳道 3 和泳道 5)。相反的,仅用人序列置换鼠的第 2 个 FN3 重复序列不能恢复其结合能力 (图 7B 泳道 4)。合在一起考虑,这些发现将 R15E6 的结合表位定位于人 HPTP  $\beta$  的 N 末端 FN3 重复序列 (~ 100 个氨基酸)。

[0170] B. 对末端平截突变型和小鼠 / 人嵌合蛋白的 ECL (电化学发光) 分析证实 R15E6 结合表位位于人 HPTP  $\beta$  细胞外域的 N- 末端 FN3 重复序列。

[0171] 方法:包含显示的 HPTP  $\beta$  蛋白的上清液被涂敷在 96 孔的高结合 MSD (Meso Scale Discovery) 板上,使其干燥,用 3% 的 BSA 封闭 1 小时。然后所述蛋白与 R15E6 单克隆抗体或 R15E6Fab 片段 (10nM 或 1.5  $\mu$ g/mL) 一起培养 1 小时,洗板,再与羊抗鼠抗体和 MSD- 标签标志物 (10nM) 一起培养 1 小时。洗去多余的抗体,加入 MSD 读取缓冲液。使用 Sector2400 阅读器 (MSD) 测量光发射。MSD 利用电化学发光检测法检测图案化阵列上的结合情况。Meso Scale Discovery 的技术使用其专卖的 MULTI-ARRAY™ 和 MULTI-SPOT™ 微板,电极被置于板的底部。MSD 的电极由碳制成,生物试剂可通过简单的被动吸附连接到碳上,并保留高水平的生物活性。MSD 检测分析法使用电化学发光标志物用于超敏检测。这些电化学发光标志物当受电化学刺激时发光。当电极置于 MSD 微板底部时检测过程开始,仅有靠近电极的标志物被激发,在 620nm 处进行光测量。

[0172] 结果:与 western 印迹分析相符,通过 MSD 分析 (图 8A) R15E6 结合所有的 HPTP  $\beta$  C 末端平截蛋白。还与 western 印迹分析相符, R15E6 不能结合鼠的 HPTP  $\beta$  细胞外域,但是通过用人 N 末端 FN3 域置换鼠的 N 末端 FN3 重复序列,可以恢复它的结合能力 (图 8B)。这些数据证实 R15E6 的结合表位位于人 HPTP  $\beta$  的 N- 末端 FN3 重复序列。可以预知,单价 R15E6Fab 片段的结合表位也会位于人 HPTP  $\beta$  的 N 末端多数 FN3 重复序列 (图 9)。

[0173] 实施例 6. 单价 R15E6Fab 片段阻止 R15E6 介导的 Tie2 活化并抑制内皮细胞存活和迁移。

[0174] 方法:如上文实施例 4 所述的方法进行 Tie2 的活化与内皮细胞的存活和迁移。单价 R15E6Fab 片段按照前述方法进行制备。纯化的 R15E6 在 0.1M Tris-HCL, pH8.0, 包含 2mM EDTA 和 1mM 二硫苏糖醇的溶液中进行透析。1 至 2mg/mL 的木瓜蛋白酶 (Pierce) 在 37°C 的上述缓冲液中活化 15 分钟。10mg/mL 的 R15E6 与木瓜蛋白酶一起,以 1:100 的酶:底物比率在 37°C 下,相同缓冲液中培养 1h。加入碘代乙酰胺 (终浓度 20mM) 终止消化,避光置于冰上 1h。木瓜蛋白酶消化产物使用磷酸盐缓冲液透析过夜以移除碘代乙酰胺。通过 SDS-PAGE,用  $\gamma$  重链 (分子量 55,000kDa) 的消失量和 Fc 片段的  $\gamma$  链 (分子量 27,000kDa) 与轻链 (分子量 22,000 至 25,000kDa) 的出现量检测消化程度。

[0175] 结果:不同于完整的 R15E6 抗体,Fab 片段不能促进 Tie2 的活化 (图 10)。此外,在过量 Fab 片段存在的情况下,R15E6 介导的 Tie2 活化被阻止 (图 10)。令人惊讶的是,与对照 Fab (图 11A) 相比, R15E6Fab 片段显著地抑制了内皮细胞存活,并且加入完整的 R15E6 (图 11B) 可减弱此抑制效果。与对内皮细胞存活的负性效果相符,R15E6 Fab 也阻止 VEGF 介导的内皮细胞迁移 (图 12)。这些发现说明促进血管新生信号转导需要完整的、二聚的 R15E6,而单体 R15E6 阻止这些作用并且实际上对血管新生的内皮细胞响应具有负性效果。

[0176] 除非另外说明,包括数量、百分比、分数和比例在内的所有量均被理解为受词“约”修饰,并且量并不旨在表示有效数字。

[0177] 除非另外说明,“一个”和“所述”是指“一个或多个”。

[0178] 在发明详述中引用的所有文件都在相关部分中以引用方式并入本文中。对于任何文件的引用不应当解释为承认其是有关本发明的现有技术。当本发明中术语的任何含义或定义与以引用方式并入的文件中术语的任何含义或定义矛盾时,应当服从在本书面文件中赋予该术语的含义或定义。

[0179] 虽然已经举例说明和描述了本发明的具体实施方案,但是对于本领域技术人员来说显而易见的是,在不背离本发明实质和范围的情况下可以做出多个其他改变和变型。因此,所附的权利要求书中意欲包括属于本发明范围内的所有这些改变和变型。

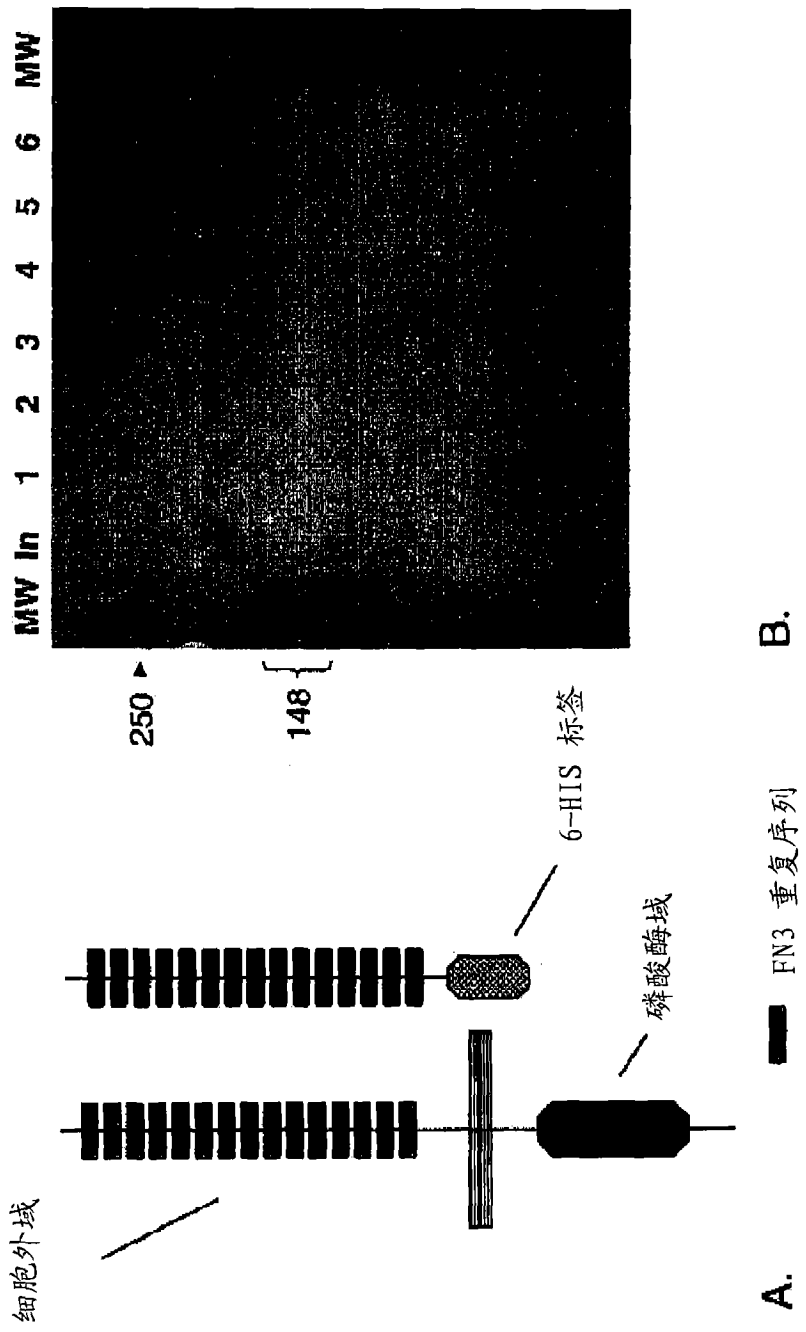


图1

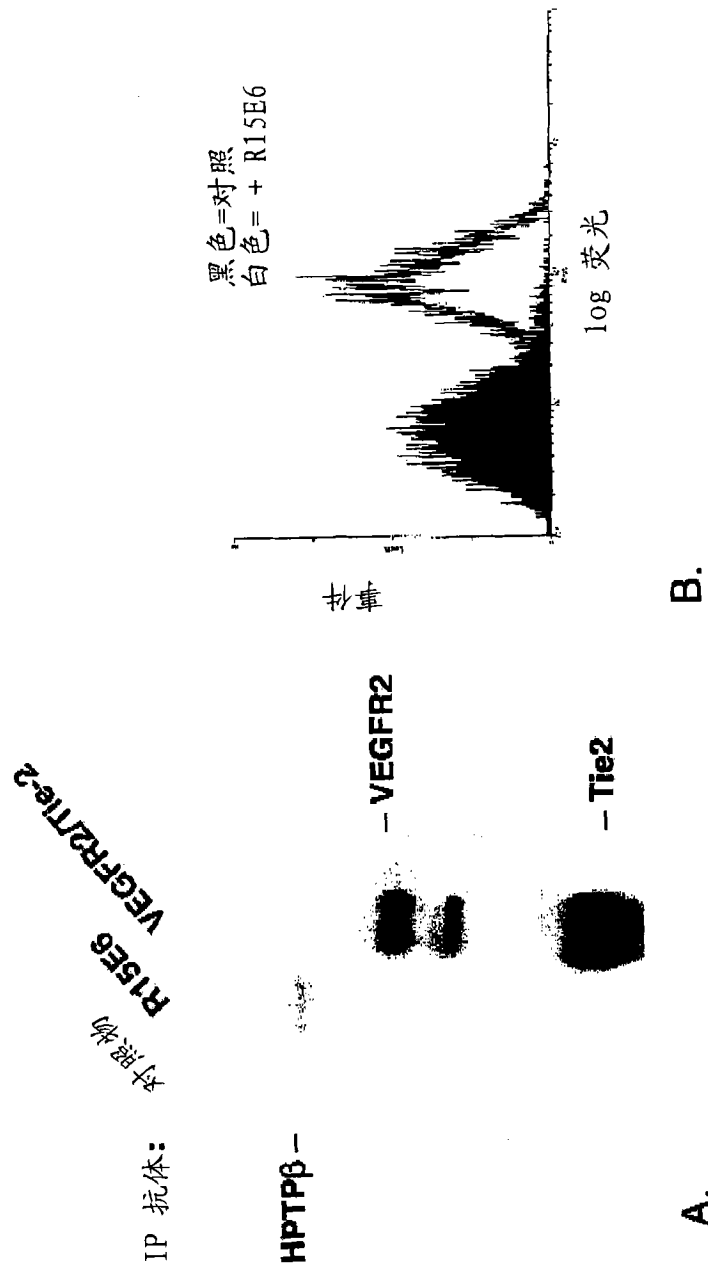


图2

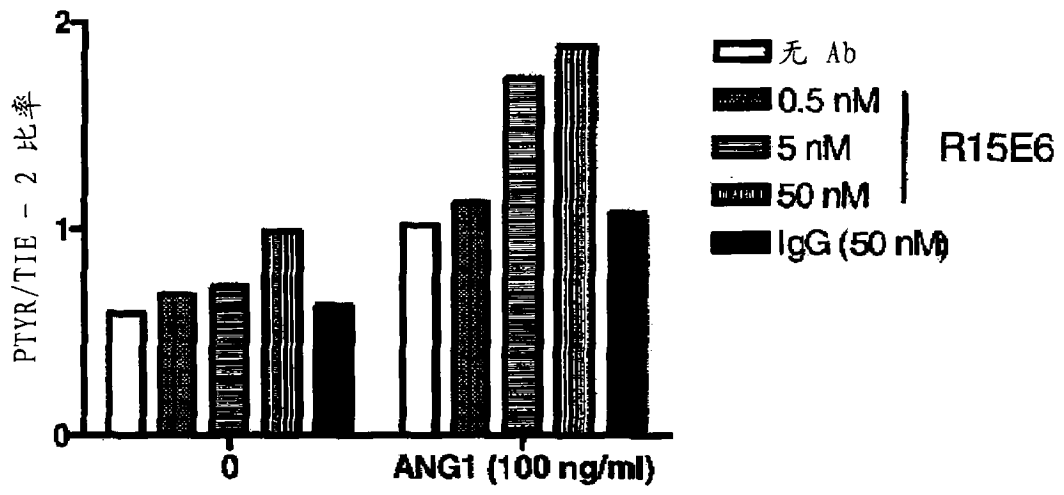


图3

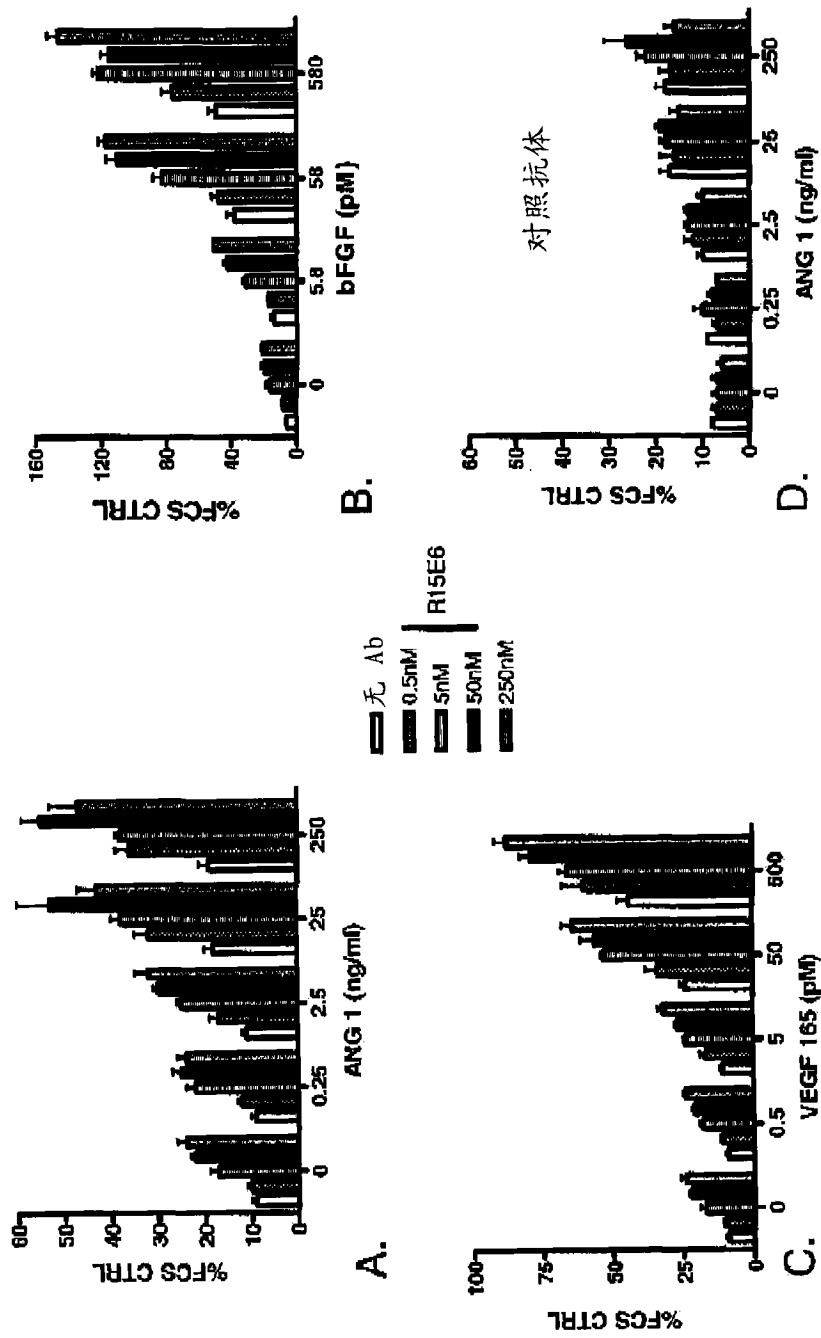


图 4

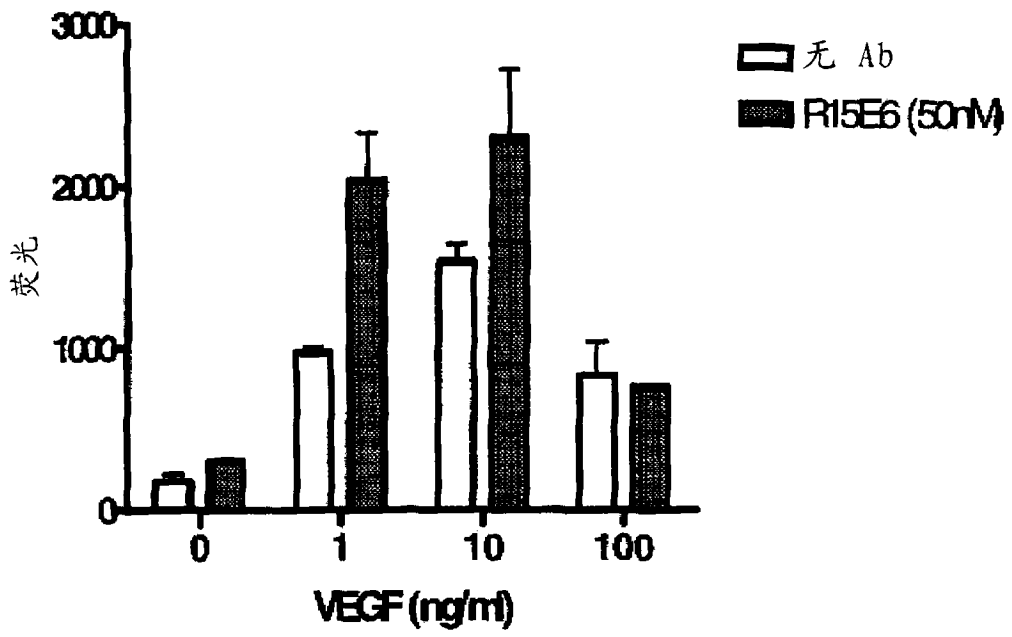


图5

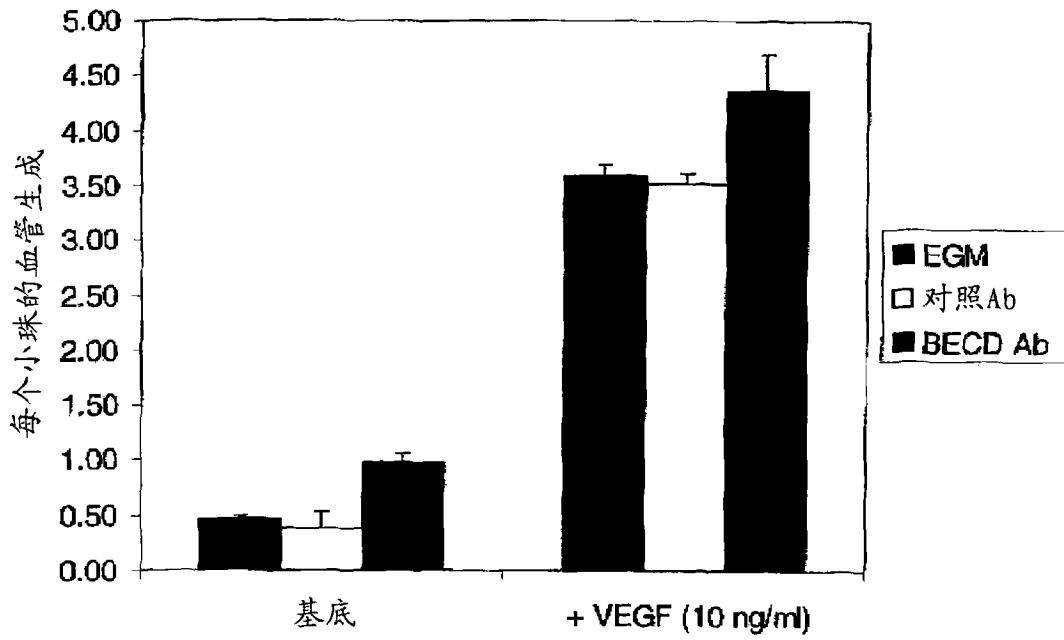


图6

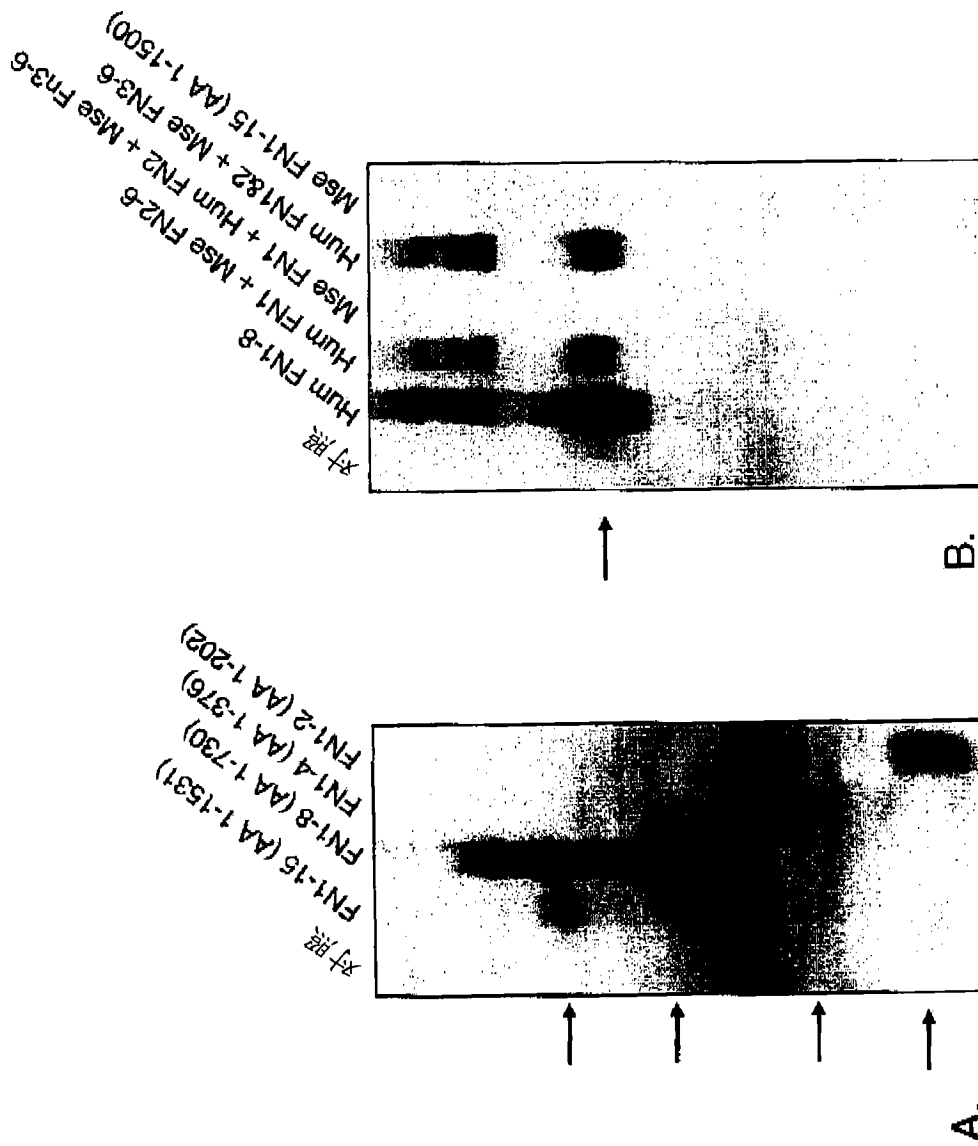


图7

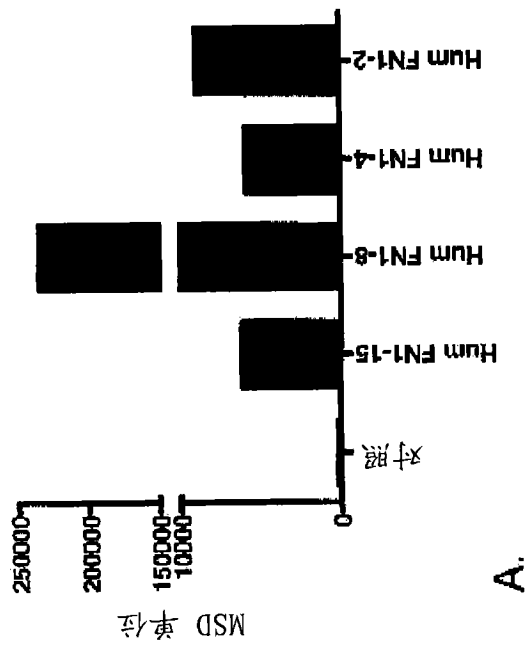
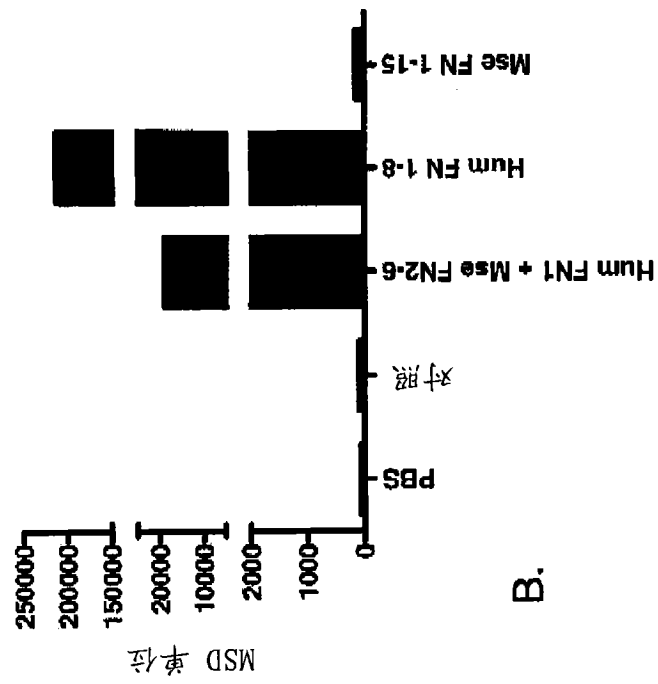


图 8

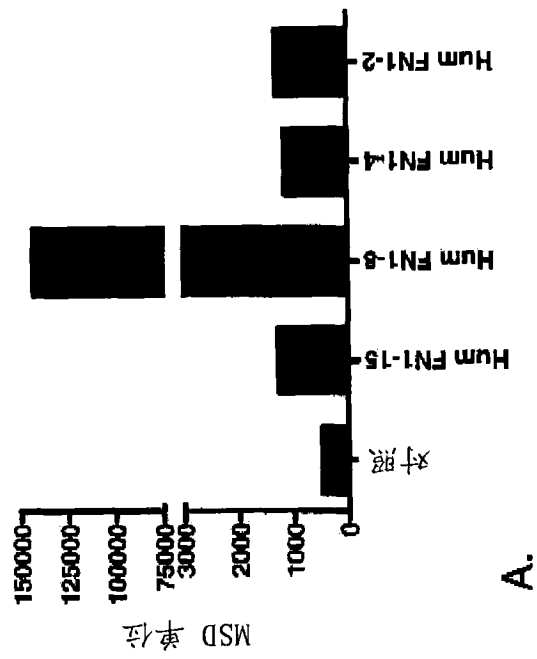
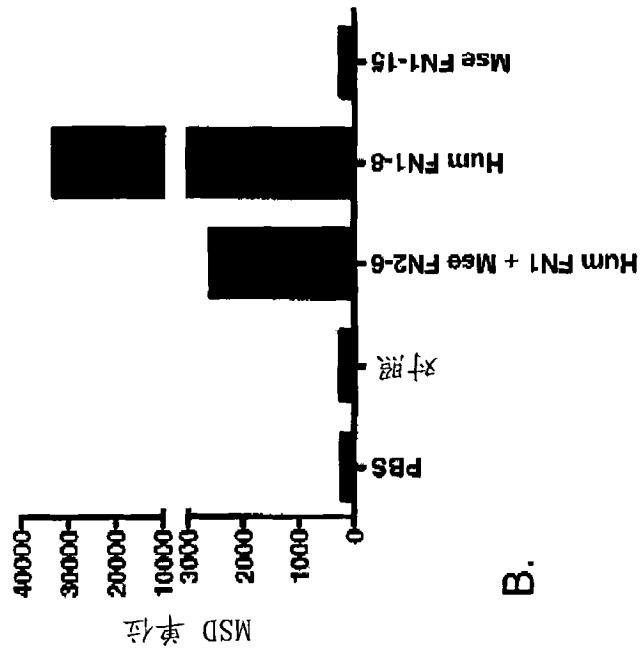


图 9

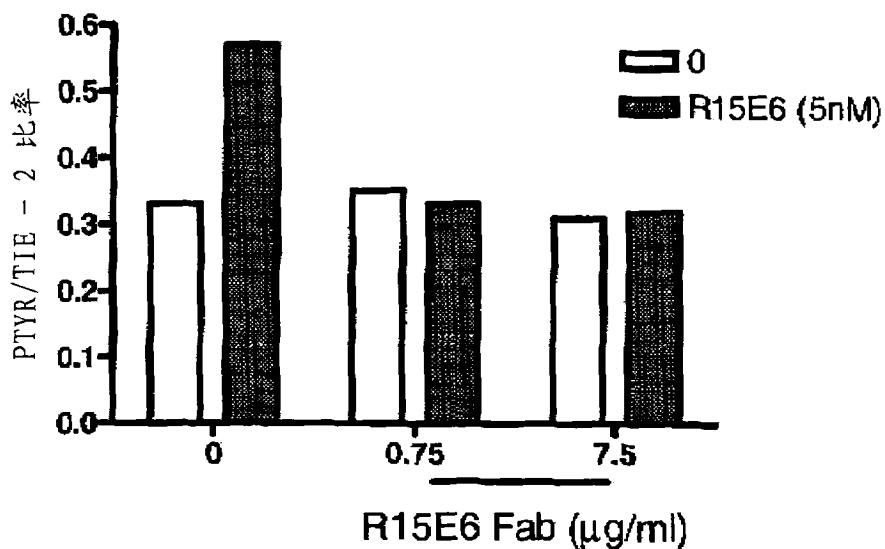


图10

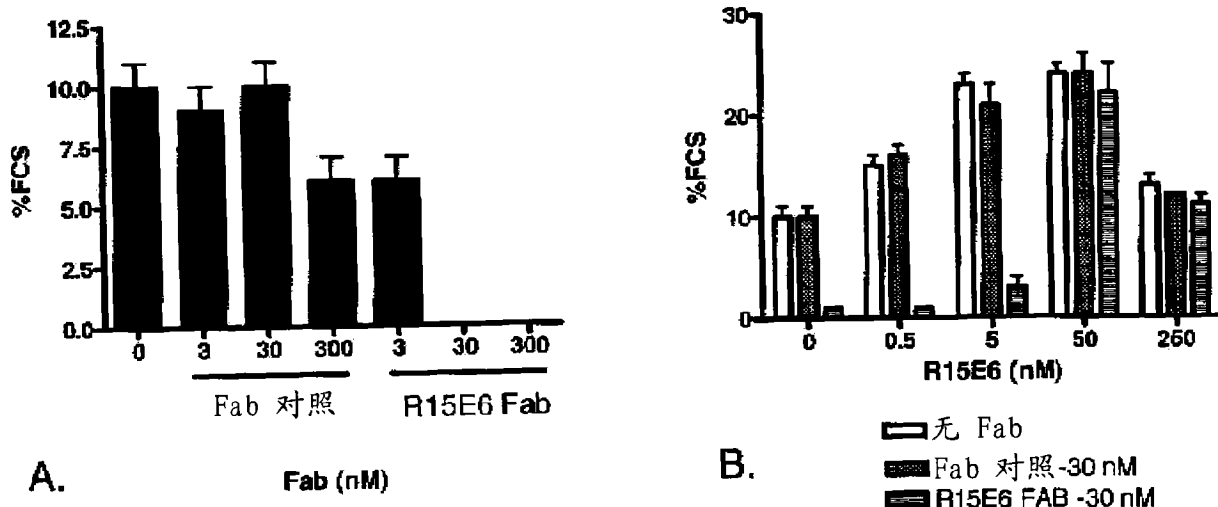


图11

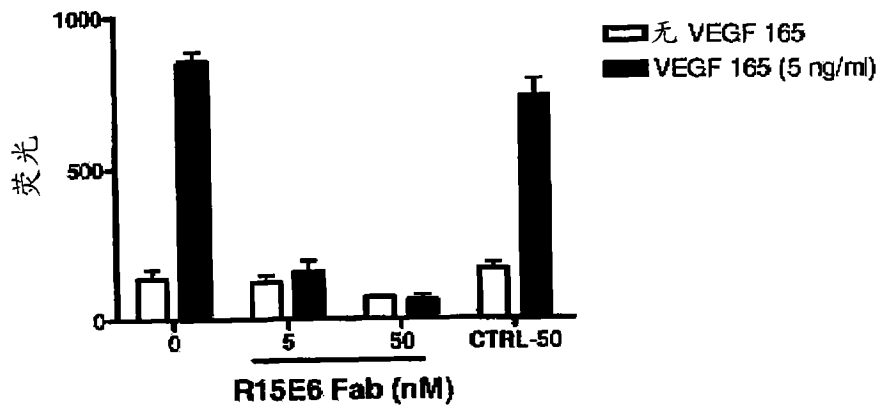


图12