



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116672445 A

(43) 申请公布日 2023.09.01

(21) 申请号 202210879114.2

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2017.02.27

A61K 39/395 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 19/10 (2006.01)

62/300,492 2016.02.26 US

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201780025896.0 2017.02.27

(71) 申请人 德克萨斯大学体系董事会

地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 姜欣 安志强 张凝艳 熊伟

曼努埃尔·A·里克尔梅 顾肃敏

娜奥米·L·塞尔

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

专利代理人 孙占华 张广育

权利要求书1页 说明书25页

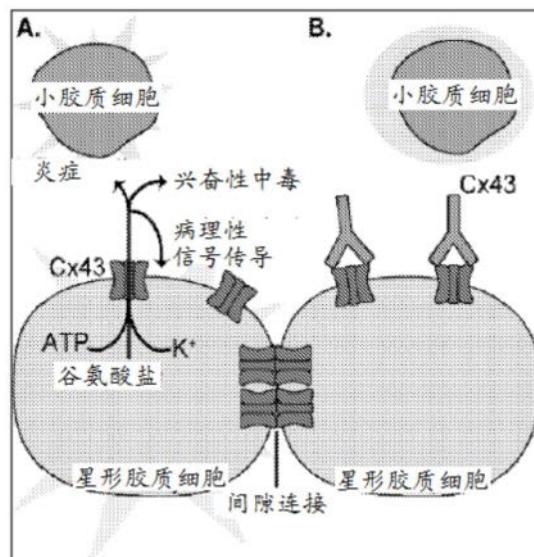
序列表(电子公布) 附图13页

(54) 发明名称

连接蛋白(Cx)43半通道结合抗体及其用途

(57) 摘要

提供了结合连接蛋白43半通道并抑制或激活通道打开的抗体。在某些方面,还提供了用于用激活Cx43通道打开的抗体检测或治疗癌症的方法。同样地,提供了用于用抑制Cx43通道打开的抗体治疗炎症性疾病(例如,骨关节炎)和神经损伤(例如,脊髓损伤)的方法。



1. 一种治疗或预防受试者的骨质疏松、骨量减少或癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的结合连接蛋白43(Cx43)半通道并增强通道打开的抗体或编码所述抗体的表达载体。
2. 如权利要求1所述的方法,所述方法进一步定义为用于治疗或预防骨质疏松或骨量减少的方法。
3. 如权利要求1所述的方法,所述方法进一步定义为用于治疗癌症的方法。
4. 如权利要求3所述的方法,所述方法进一步定义为用于治疗或预防患有癌症的受试者的骨转移的方法。
5. 如权利要求1所述的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的所述抗体。
6. 如权利要求1所述的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的编码所述抗体的表达载体。
7. 如权利要求3所述的方法,其中所述癌症为乳腺癌、前列腺癌或骨肉瘤。
8. 如权利要求1所述的方法,其中所述抗体或所述编码所述抗体的表达载体在药学上可接受的组合物中施用。
9. 如权利要求1所述的方法,其中全身性地施用所述抗体。
10. 如权利要求1所述的方法,其中静脉内、皮内、瘤内、肌内、腹膜内、皮下或局部施用所述抗体。

连接蛋白 (Cx) 43半通道结合抗体及其用途

[0001] 本申请是2017年2月27日提交的申请号为PCT/US2017/019605、发明名称为“连接蛋白 (Cx) 43半通道结合抗体及其用途”的国际申请的分案申请，所述国际申请于2018年10月25日进入中国国家阶段，其申请号为201780025896.0。

[0002] 说明书

[0003] 本申请要求2016年2月26日提交的美国临时专利申请号62/300,492的权益，所述临时申请以引用的方式整体并入本文。

背景技术

[0004] 在一些实施方案中，本发明整体涉及分子生物学、癌症生物学和风湿病学领域。更具体地，它涉及连接蛋白 (Cx) 43半通道结合抗体及其用于治疗和检测疾病诸如癌症、神经损伤和骨关节炎的用途。

[0005] 2. 相关技术描述

[0006] 创伤性脊髓损伤 (SCI) 和创伤性脑损伤 (TBI) 是全世界严重的健康问题，并且每年超过150万患者被诊断患有创伤性脑损伤和脊髓损伤。SCI和TBI患者不仅可能丧失神经功能，而且还有更大的神经性疼痛风险和其他与神经控制丧失相关的并发症风险。继发性损伤是造成重大的创伤后神经功能丧失的原因。损伤后神经炎症过程的一部分是激活星形胶质细胞和形成胶质瘢痕，从而导致轴突再生的不可渗透性环境。治疗目标包括通过靶向星形胶质细胞的创新性方法限制病变的大小和轴突丧失，星形胶质细胞是一类在支持神经元功能和胶质瘢痕形成中起主要作用的支持细胞。然而，仍然需要可用于成功限制胶质瘢痕形成的组合物。

[0007] 骨组织是乳腺癌和前列腺癌转移的优选位点。高达75%的晚期癌症患者发生骨转移。目前，没有治愈转移性乳腺癌的方法，并且也没有具有极小副作用的用于治疗骨转移的可靠干预药物。

[0008] 骨关节炎 (OA) 是影响美国成年人约20%的普遍的疾病。该疾病引起关节，包括关节软骨和软骨下骨的退化。OA的病理学特征在于关节软骨丧失，导致关节间隙变窄、关节摩擦增加和潜在的结构重塑。目前的治疗包括运动、改变生活方式和镇痛药。如果症状变得严重，则通常进行关节置换手术。到目前为止，没有可用于治疗OA的特定药物干预。

[0009] 连接蛋白半通道在细胞和组织功能中起重要作用，并且连接蛋白半通道的功能异常可能涉及各种病理条件，诸如上述的那些。因此，仍然需要用于治疗与半通道活性相关的病理病状(例如，炎症、SCI、TBI、骨转移)的其他疗法，以及用于鉴定此类疗法的方法。

发明内容

[0010] 在第一实施方案中，本发明提供了治疗或预防患有癌症的受试者的癌症或骨转移的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的结合连接蛋白43 (Cx43) 半通道并增强通道打开的抗体(诸如本文详述的Ab2抗体)或编码所述抗体的表达载体。在进一步的实施方案中，提供了治疗或预防受试者的骨质疏松或骨量减少的方法，所述方法包括向受试者施用有效

量的结合连接蛋白43(Cx43)半通道并增强通道打开的抗体(诸如本文详述的Ab2抗体)或编码所述抗体的表达载体。在某些方面,所述方法包括向受试者施用有效量的抗体。在进一步的方面,所述方法包括向受试者施用有效量的编码所述抗体的表达载体。在一些方面,癌症是乳腺癌、前列腺癌(例如,伴有骨转移)或骨肉瘤。在进一步的方面,癌症是具有骨转移的癌症。

[0011] 在进一步的方面,编码所述抗体的表达载体可以在药学上可接受的组合物中施用。在某些方面,抗体可以全身性地施用。在其他方面,抗体可以静脉内、皮内、瘤内、肌内、腹膜内、皮下或局部施用。

[0012] 在若干个方面,抗体可以包含与SEQ ID NO:19相同的第一V_H CDR、与SEQ ID NO:20相同的第二V_H CDR、与SEQ ID NO:21相同的第三V_H CDR、与SEQ ID NO:49相同的第一V_L CDR、与SEQ ID NO:50相同的第二V_L CDR,和与SEQ ID NO:51相同的第三V_L CDR。在一些方面,抗体是人源化抗体。在某些方面,抗体可以包含与SEQ ID NO:58至少90%相同的VH氨基酸序列和/或与SEQ ID NO:63至少90%相同的VL氨基酸序列。在进一步的方面,抗体包含根据SEQ ID NO:58的VH氨基酸序列和/或根据SEQ ID NO:63的VL氨基酸序列。

[0013] 在更进一步的方面,所述方法可以另外包括向受试者施用至少第二抗癌疗法。在某些方面,第二抗癌疗法是手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法或细胞因子疗法。

[0014] 在进一步的实施方案中,本发明提供了治疗或预防受试者的神经退行性疾病或神经损伤的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的结合连接蛋白43(Cx43)半通道并抑制通道打开的抗体(诸如本文详述的Ab1抗体)或编码所述抗体的表达载体。在若干个方面,所述方法包括向受试者施用有效量的抗体。在其他方面,所述方法可以包括向受试者施用有效量的编码所述抗体的表达载体。

[0015] 在一些方面,所述方法可以另外定义为用于治疗或预防神经退行性疾病的方法。在进一步的方面,神经退行性疾病可以是多发性硬化症或阿尔茨海默病。在其他方面,所述方法可以另外定义为用于治疗或预防神经损伤的方法。在某些方面,神经损伤包括脊髓损伤(SCI)、中风或创伤性脑损伤(TBI)。在一些特定方面,受试者患有神经损伤或已经被诊断为神经损伤。在若干个方面,编码所述抗体的表达载体可以在药学上可接受的组合物中施用。在某些方面,抗体可以全身性地施用。在进一步的方面,抗体进行静脉内、皮内、肌内、腹膜内、皮下或局部施用。

[0016] 在若干个方面,抗体包含与SEQ ID NO:19相同的第一V_H CDR、与SEQ ID NO:20相同的第二V_H CDR、与SEQ ID NO:21相同的第三V_H CDR、与SEQ ID NO:31相同的第一V_L CDR、与SEQ ID NO:32相同的第二V_L CDR,和与SEQ ID NO:33相同的第三V_L CDR。在一些方面,抗体是人源化抗体。在某些方面,抗体包含与SEQ ID NO:58至少90%相同的VH氨基酸序列和/或与SEQ ID NO:60至少90%相同的VL氨基酸序列。在一些具体方面,抗体包含根据SEQ ID NO:58的VH氨基酸序列和/或根据SEQ ID NO:60的VL氨基酸序列。

[0017] 在又进一步的实施方案中,提供了重组的连接蛋白43(Cx43)半通道结合抗体。在某些方面,抗体包含与SEQ ID NO:19相同的第一V_H CDR、与SEQ ID NO:20相同的第二V_H CDR、与SEQ ID NO:21相同的第三V_H CDR、与SEQ ID NO:49相同的第一V_L CDR、与SEQ ID NO:50相同的第二V_L CDR,和与SEQ ID NO:51相同的第三V_L CDR。在一些方面,抗体是人源化抗

体。在某些具体方面,抗体包含与SEQ ID NO:58至少90%相同的VH氨基酸序列和/或与SEQ ID NO:63至少90%相同的VL氨基酸序列。在特定方面,抗体可以包含根据SEQ ID NO:58的VH氨基酸序列和/或根据SEQ ID NO:63的VL氨基酸序列。

[0018] 在若干个方面,抗体可以包含与SEQ ID NO:19相同的第一V_H CDR、与SEQ ID NO:20相同的第二V_H CDR、与SEQ ID NO:21相同的第三V_H CDR、与SEQ ID NO:31相同的第一V_L CDR、与SEQ ID NO:32相同的第二V_L CDR,和与SEQ ID NO:33相同的第三V_L CDR。在某些方面,抗体是人源化抗体。在一些方面,抗体包含与SEQ ID NO:58至少90%相同的VH氨基酸序列和/或与SEQ ID NO:60至少90%相同的VL氨基酸序列。在某些特定方面,抗体包含根据SEQ ID NO:58的VH氨基酸序列和/或根据SEQ ID NO:60的VL氨基酸序列。

[0019] 在又进一步的实施方案中,本发明提供了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包含根据上述实施方案和方面的抗体或编码根据上述实施方案和方面的抗体的表达载体。在一些方面,至受试者的药物组合物包含编码根据上述实施方案和方面的抗体的表达载体。在其他方面,至受试者的药物组合物包含根据上述实施方案和方面的抗体。在若干个方面,所述方法还可以定义为用于抑制或预防受试者的癌症骨转移的方法。在某些方面,药物组合物可以全身性地施用。在特定方面,药物组合物进行静脉内、皮内、瘤内、肌内、腹膜内、皮下或局部施用。

[0020] 在一些方面,药物组合物可以包含与SEQ ID NO:19相同的第一V_H CDR、与SEQ ID NO:20相同的第二V_H CDR、与SEQ ID NO:21相同的第三V_H CDR、与SEQ ID NO:31相同的第一V_L CDR、与SEQ ID NO:32相同的第二V_L CDR,和与SEQ ID NO:33相同的第三V_L CDR。在若干个方面,所述方法还可以包括向受试者施用至少第二抗癌疗法。在进一步的方面,第二抗癌疗法是手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法或细胞因子疗法。

[0021] 在进一步的方面,本发明提供了治疗受试者的炎症性疾病、神经退行性疾病或神经损伤的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包含根据上述实施方案和方面的抗体(结合Cx43半通道并抑制通道打开的抗体,例如本文详述的Ab1抗体)或编码根据上述实施方案和方面的抗体的表达载体。在某些方面,至受试者的药物组合物包含编码根据上述实施方案和方面的抗体的表达载体。在特定方面,至受试者的药物组合物包含根据上述实施方案和方面的抗体。

[0022] 在进一步的方面,所述方法可以另外定义为用于治疗或预防炎症性疾病的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的结合Cx43半通道并抑制通道打开的抗体(诸如本文详述的Ab1抗体)或编码所述抗体的表达载体。在一些特定方面,炎症性疾病是骨关节炎。在一些方面,提供了用于促进伤口愈合,诸如皮肤或角膜伤口愈合的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的结合连接蛋白43 (Cx43) 半通道并抑制通道打开的抗体(诸如本文详述的Ab1抗体)或编码所述抗体的表达载体。在其他方面,所述方法可以另外定义为用于治疗或预防神经退行性疾病的方法。在某些具体方面,神经退行性疾病是多发性硬化症或阿尔茨海默病。在若干个方面,所述方法还可以定义为用于治疗或预防神经损伤的方法。在一些具体方面,神经损伤包括脊髓损伤(SCI)、创伤性脑损伤(TBI)或中风。在某些方面,受试者患有神经损伤或已经被诊断为神经损伤。

[0023] 在一些方面,药物组合物可以全身性地施用。在特定方面,药物组合物进行静脉内、皮内、瘤内、肌内、腹膜内、皮下或局部施用。

[0024] 在某些实施方案中,还提供了针对半通道多肽的抗体,和编码此类抗体的核酸分子。在某些方面,实施方案的抗体结合具有FLSRPTEKTI (SEQ ID NO:13)、KRDPCPHQVD (SEQ ID NO:14) 或LSAVYTCKR (SEQ ID NO:15) 的氨基酸序列的表位。在具体方面,抗体结合具有FLSRPTEKTI (SEQ ID NO:13) 的氨基酸序列的表位。

[0025] 在进一步的实施方案中,根据实施方案使用的抗体可以是国际 (PCT) 专利公开号 WO 2015,027120 中描述的那些抗体中的任一种,所述专利以引用的方式并入。在一个实施方案中,本发明提供了特异性结合半通道的分离抗体,其包含具有SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的轻链。

[0026] 在某些方面,第一重链区包含具有SEQ ID NO:2 的13至37位残基的氨基酸序列的氨基酸序列;第二重链区具有对应于SEQ ID NO:2 的46至66位残基的氨基酸序列;并且第三重链区包含具有SEQ ID NO:2 的97至116位残基的氨基酸序列的氨基酸序列。

[0027] 在另一方面,第一轻链区包含具有SEQ ID NO:4 的9至40位残基的氨基酸序列的氨基酸序列;第二轻链区具有对应于SEQ ID NO:4 的49至58位残基的氨基酸序列;并且第三轻链区包含具有SEQ ID NO:4 的64至108位残基的氨基酸序列的氨基酸序列。

[0028] 在一个实施方案中,本发明提供了特异性结合半通道和间隙连接的分离抗体,其包含具有SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的轻链。

[0029] 在某些方面,第一重链区包含具有SEQ ID NO:6 的13至37位残基的氨基酸序列的氨基酸序列;第二重链区具有对应于SEQ ID NO:6 的46至66位残基的氨基酸序列;并且第三重链区包含具有SEQ ID NO:6 的97至116位残基的氨基酸序列的氨基酸序列。

[0030] 在另一方面,第一轻链区包含具有SEQ ID NO:8 的9至42位残基的氨基酸序列的氨基酸序列;第二轻链区具有对应于SEQ ID NO:8 的51至60位残基的氨基酸序列;并且第三轻链区包含具有SEQ ID NO:8 的66至125位残基的氨基酸序列的氨基酸序列。

[0031] 在一个实施方案中,本发明提供了特异性结合间隙连接的分离抗体,其包含具有SEQ ID NO:10 的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的轻链。

[0032] 在某些方面,第一重链区包含具有SEQ ID NO:10 的10至34位残基的氨基酸序列的氨基酸序列;第二重链区具有对应于SEQ ID NO:10 的43至59位残基的氨基酸序列;并且第三重链区包含具有SEQ ID NO:10 的94至109位残基的氨基酸序列的氨基酸序列。

[0033] 在另一方面,第一轻链区包含具有SEQ ID NO:12 的9至40位残基的氨基酸序列的氨基酸序列;第二轻链区具有对应于SEQ ID NO:12 的49至58位残基的氨基酸序列;并且第三轻链区包含具有SEQ ID NO:12 的64至108位残基的氨基酸序列的氨基酸序列。

[0034] 在某些方面,抗体包括全长抗体、抗体片段、单链抗体、双特异性抗体、微型抗体、结构域抗体、合成抗体和抗体融合体及其片段。

[0035] 进一步的实施方案提供了药物组合物,其包含本文所述的抗体和药学上可接受的载剂。还提供了用作药物或用于癌症治疗和抑制癌症转移的本发明的抗体或药物组合物。

[0036] 进一步的实施方案提供了治疗或预防癌症转移的方法。治疗方法可以包括向有需要的受试者施用有效量的本文所述的分离抗体。还提供了如本文所述的抗体在制造用于治疗或预防癌症转移的药物中的用途。

[0037] 某些方面涉及使用抗体、化合物或药剂抑制软骨细胞中的炎症性反应的体外方法。在某些方面,方法涉及通过以下项来确定对软骨细胞中Cx43半通道打开的抑制的作用:

(i) 使用荧光黄或Alexa染料通过染料摄取测定来确定半通道打开, (ii) 评估IL-1 β 对半通道打开的抑制作用, (iii) 通过流体流动剪切应力形式的机械负荷测试药剂对半通道打开的抑制作用。

[0038] 某些方面涉及通过以下项来确定抗体、化合物或药剂对抑制IL-1 β 和机械负荷所诱发的炎症性应答的作用的方法: (i) 测定对IL-1 β 诱导的核因子- κ B(NF- κ B)激活的抑制, (ii) 测定对体流动剪切应力诱导的NF- κ B激活的抑制。

[0039] 其他方面涉及使用单克隆抗体、化合物或药剂治疗OA或鉴定OA的体内方法, 所述方法包括: (i) 将抗体、化合物或药剂注射到膝盖骨腔中, (ii) 评估对IL-1 β 诱导的NF- κ B激活的抑制, (iii) 通过X射线、组织学分析和身体运动评估OA发展。

[0040] 如本文所用, 术语“抗原”是能够被抗体或T细胞受体结合的分子。在某些实施方案中, 可对抗体之外的结合部分进行工程化以特异性结合抗原, 例如适配子、高亲合性多聚体(avimer)等。

[0041] 术语“抗体”或“免疫球蛋白”用于包括完整抗体及其结合片段/区段。如本文所用, 术语“抗体”旨在广泛地指任何免疫结合剂, 诸如IgG、IgM、IgA、IgD、IgE和基因修饰的IgG以及包含保留抗原结合活性的抗体CDR结构域的多肽。抗体可以选自由以下项组成的组: 嵌合抗体、亲和力成熟抗体、多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、人抗体或抗原结合抗体片段或天然或合成配体。通常, 片段与衍生所述片段的完整抗体竞争与抗原的特异性结合。片段包括单独的重链、轻链、Fab、Fab'F(ab')₂、Fabc和Fv。通过重组DNA技术或通过酶促方式或化学方式分离完整免疫球蛋白来产生片段/区段。术语“抗体”还包括与其他蛋白质化学缀合或表达为融合蛋白的一条或多条免疫球蛋白链。术语“抗体”还包括双特异性抗体。双特异性或双功能抗体是具有两对不同重链/轻链和两个不同结合位点的人工杂交抗体。双特异性抗体可通过多种方法产生, 包括融合杂交瘤或连接Fab'片段。参见, 例如Songsivilai和Lachmann, Clin Exp Immunol 79:315-21, 1990; Kostelny等人, J. Immunol. 148:1547-53, 1992。

[0042] 术语“分离的”可以指基本不含其来源中的细胞物质、细菌物质、病毒物质或培养基(当通过重组DNA技术产生时)或化学前体或其他化学品(当化学合成时)的核酸或多肽。此外, 分离的化合物是指可作为分离的化合物施用至受试者的化合物; 换言之, 如果化合物附着到柱上或包埋在琼脂糖凝胶中则不会被简单地认为是“分离的”。此外, “分离的核酸片段”或“分离的肽”是不天然作为片段形式存在的和/或通常不处于功能状态的核酸或蛋白质片段。

[0043] 本发明的部分(诸如多肽、肽、抗原或免疫原)可以缀合或者共价或非共价连接至其他部分(诸如佐剂、蛋白质、肽、支持物、荧光部分或标记)。术语“缀合”或“免疫缀合”广义地用于定义一个部分与另一药剂的操作性结合, 并且并非旨在单独指任何类型的操作性结合, 尤其不限于化学“缀合”。

[0044] 术语“提供”根据其普通含义“供应或配备来使用”而使用。在一些实施方案中, 通过施用蛋白质来直接提供所述蛋白质, 而在其他实施方案中, 通过施用编码蛋白质的核酸来有效地提供所述蛋白质。在某些方面, 本发明涵盖包含核酸、抗原、肽和/或表位的各种组合的组合物。

[0045] 短语与靶标“特异性结合”或“具有特异性免疫反应性”是指在存在其他生物分子

的异质群体的情况下决定分子的存在性的结合反应。因此,在指定的免疫测定条件下,指定的分子优先结合到特定的靶标,而不会大量结合样品中存在的其他生物分子。抗体与靶标在此类条件下的特异性结合需要针对与靶标的特异性来选择抗体。多种免疫测定形式可用于选择与特定蛋白质特异性免疫反应的抗体。例如,固相ELISA免疫测定常规地用于选择与蛋白质特异性免疫反应的单克隆抗体。有关可用于测定特异性免疫反应性的免疫测定形式和条件的描述,参见例如Harlow和Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1988。

[0046] 贯穿本申请讨论了本发明的其他实施方案。相对于本发明的一个方面讨论的任何实施方案也适用于本发明的其他方面,反之亦然。本文所述的每个实施方案应被理解为适用于本发明所有方面的本发明的实施方案。据设想,本文所讨论的任何实施方案可相对于本发明的任何方法或组合物进行实施,反之亦然。此外,本发明的组合物和试剂盒可用于实现本发明的方法。

[0047] 当在权利要求和/或说明书中连同术语“包含”一起使用时,使用词语“一个(a)”或“一种(an)”可意指“一个(种)”,但它也符合“一个(种)或多个(种)”、“至少一个(种)”及“一个(种)或一个(种)以上”的含义。

[0048] 贯穿本申请,术语“约”用于指示值包括测定所述值所用的装置或方法的误差的标准偏差。

[0049] 除非明确指明只是指代替方案或替代方案相互排斥,否则权利要求书中所用的术语“或”用于意指“和/或”,但本公开支持只是指替代方案和“和/或”的定义。

[0050] 如本说明书和权利要求书中所用,词语“包含 (comprising)”(以及包含 (comprising) 的任何形式诸如“包含 (comprise)”和“包含 (comprises)”)、“具有 (having)”(以及具有 (having) 的任何形式诸如“具有 (have)”和“具有 (has)”)、“包括 (including)”(以及包括 (including) 的任何形式诸如“包括 (includes)”和“包括 (include)”)或“包含 (containing)”(以及包含 (containing) 的任何性质诸如“包含 (contains)”和“包含 (contain)”)是包含性的或开放式的,并且不排除其他的未陈述的元素或方法步骤。

[0051] 通过以下详细描述,本发明的其他目的、特征和优势将变得显而易见。然而,应当理解,尽管指出本发明的特定实施方案,但是详细描述和特定实施例仅通过说明的方式给出,因为从此详细描述中,本发明的精神和范围内的各种改变和修改对于本领域技术人员来说将变得显而易见。

附图说明

[0052] 以下附图组成本说明书的一部分,并且被包括以进一步展现本发明的某些方面。本发明可通过参考与本文呈现的说明书实施方案的详细描述结合的这些附图中的一个或多个来更好地理解。

[0053] 图1-Cx43通常定位于细胞之间的间隙连接中或作为质膜上的半通道。在A)侧: Cx43半通道的病理性打开导致继发性损伤的传播、星形/小胶质细胞的激活和炎症。B)侧说明了防止Cx43半通道病理性打开阻止分子释放,从而使星形胶质细胞充当管理(caretaker)细胞并防止继发性损伤进一步扩散的提议。

[0054] 图2-通过Cx43半通道阻断小鼠单克隆抗体(M1)和小鼠-人嵌合抗体HMAb1(这些抗

体包含相同的鼠类可变结构域和CDR)抑制人原代星形胶质细胞中IL-1 β 对Cx43半通道的激活。通过溴化乙锭摄取确定半通道活性。

[0055] 图3A-图3G-对小鼠进行单次SCI并在损伤后30分钟用IP盐水、对照IgG或HMAb1(25mg/kg)治疗。在损伤后14和56天测量胶质瘢痕形成。(A-F)用(A-C)对照IgG或(D-F)HMAb1治疗的小鼠中脊髓的代表性图像,其中针对星形胶质细胞标记物GFAP对脊髓进行免疫组织化学。病变边界用虚白线表示。(G)将GFAP免疫标记定量为平均强度乘以阳性染色的面积。结果表示为假手术、IgG治疗小鼠的百分比。结果是平均值 \pm SEM。与Igg相比*p<0.05,***p<0.001,w/杜凯氏(Tukey's)HSD n=3-4。

[0056] 图4A-图4C-对小鼠进行SCI并在损伤后30分钟用IgG或抗Cx43抗体(M1)治疗。损伤后两周,分析组织切片的星形胶质细胞标记物GFAP的表达。(A) IgG治疗的或(B) M1治疗的小鼠中脊髓的代表性图像。白色虚线标记病变区域。(C)对来自n=3-5只小鼠的图像的定量示出了切片中GFAP免疫标记的平均值 \pm SEM.*使用双向ANOVA然后使用杜凯氏HSD测试显著性。

[0057] 图5A-图5B-HMAb1治疗改善了对SCI后的身体活动和协调的恢复。对小鼠进行单次SCI并在损伤后30分钟用IP盐水、对照IgG或人-小鼠嵌合抗Cx43抗体(HMAb1)(25mg/kg)治疗。行为测量是在受伤后的6小时时间点以0-3的BMS评分在小鼠中进行的。(A) BMS:后肢功能;0=没有后肢功能并且9=完全正常的后肢功能。(B) 旋转棒法(Rotarod):测试小鼠在加速旋转棒上保持长达300秒的能力以测量运动协调性。结果是平均值 \pm SEM。与Igg相比,*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,w/杜凯氏HSD。

[0058] 图6A-图6G-对小鼠进行单次SCI并在损伤后30分钟用IP盐水、对照Igg或HMAb1(25mg/kg)治疗。通过针对神经元标记物MAP2的免疫标记测量神经元树突。(A-F)用(A-C)对照IgG或(D-F)HMAb1治疗的小鼠中脊髓的代表性图像,其中对脊髓进行免疫组织化学。病变边界用虚白线表示。(G)将MAP2免疫标记定量为平均强度乘以阳性染色的面积。结果表示为假手术、IgG治疗小鼠的百分比。结果是平均值 \pm SEM.*p<0.05,**p<0.01,使用杜凯氏HSD,n=3-4。

[0059] 图7A-图7G-对小鼠进行单次SCI并在损伤后30分钟用IP盐水、对照Igg或HMAb1(25mg/kg)治疗。通过针对神经元标记物NeuN的免疫标记测量神经元核。(A-F)用(A-C)对照IgG或(D-F)HMAb1治疗的小鼠中脊髓的代表性图像,其中对脊髓进行免疫组织化学。病变边界用虚白线表示。(G)将NeuN免疫标记定量为平均强度乘以阳性染色的面积。结果表示为假手术、IgG治疗小鼠的百分比。

[0060] 图8A-图8C-通过人-小鼠嵌合抗Cx43抗体HMAb2抑制骨中的乳腺癌生长(该抗体包含与“M2”抗体相同的鼠类可变结构域和CDR)。将Py8119-Luc细胞注射到对照和cKO雌性小鼠的右胫骨中。左胫骨注射PBS作为对照。(A)通过生物发光成像每周一次地记录肿瘤生长,持续4周并进行定量。数据呈现为平均值 \pm SEM.**,P<0.01,n=7/组。(B) Cx43 cKO小鼠的代表性图像,其中肿瘤扩散到肺部和脑部,用白色箭头示出。(C)注射Py8119细胞的胫骨的代表性X射线照片指明注射肿瘤细胞的位置并且指明发生溶骨性病变(箭头)。注射PBS的左胫骨未显示出溶骨性病变。

[0061] 图9A-图9B-ML0-Y4骨细胞(A)或原代小鼠骨细胞(B)中的Cx43半通道被HMAb2激活,但被HMAb1阻断。将细胞与E2(多克隆)、HMAb1和HMAb2抗体或甘珀酸(CBX)(连接蛋白通

道阻断剂)一起温育。进行溴化乙锭 (EtBr) 染料摄取测定。数据以SEM呈现。与基础对照相比,***,P<0.001。

[0062] 图10A-图10B-体内骨细胞中MHA_b2对半通道的激活。将伊文思 (Evans) 蓝染料注射到WT小鼠的尾静脉中,并IP注射25 μ g/ml MHA_b2。注射后2小时将小鼠处死并用PBS灌注。分离胫骨并制备固定的胫骨组织切片。(A)用罗丹明缀合的抗人IgG检测抗体的存在。比例尺,50 μ m。(B)通过伊文思蓝 (EB) 荧光测量皮质和骨小梁中的染料摄取并对其进行定量。*,P<0.05;***,P<0.001。

[0063] 图11A-图11C-HMA_b2抑制乳腺癌细胞的溶骨性生长并保护骨免受骨折。(A)将Py8119-Luc乳腺癌细胞注射到雌性小鼠的胫骨中。(B)每周一次或两次腹膜内注射25mg/kg的HMA_b2,持续四周。在对照小鼠中每周注射盐水两次。通过生物发光成像每周一次地记录肿瘤生长,持续4周并进行定量(下图)。数据呈现为平均值±SEM。对于HMA_b2和盐水,n=6。(C)通过X射线对注射MHA_b2或盐水的小鼠进行成像。*,P<0.05。

[0064] 图12-Cx43在软骨细胞中大量表达。将从小鼠骨中分离的原代软骨细胞用渗透性细胞中的针对C末端结构域(总)的抗Cx43抗体和非渗透性细胞中的Cx43E2抗体进行免疫染色。

[0065] 图13-HMA_b1阻断软骨细胞中的Cx43半通道。将从小鼠骨中分离的原代软骨细胞用甘珀酸(连接蛋白通道阻断剂)或HMA_b1抗体预处理,然后用或不用IL-1 β 处理。进行溴化乙锭染料摄取测定以确定半通道活性。

[0066] 图14-HMA_b1在体内阻断小鼠软骨细胞中的半通道活性。将伊文思蓝染料注射到WT小鼠的尾静脉中。在染料注射前2小时腹膜内注射Cx43 (M1) mAb (25mg/kg)。染料注射后30分钟,使左胫骨机械负荷一次持续10分钟。通过伊文思蓝 (EB) 荧光测量染料摄取并对其进行定量。P<0.001。n=3。

[0067] 图15-HMA_b2和HAb2抗体均识别骨细胞表面上的Cx43并结合Cx43。(A)用HMA_b2 (MHC2)或HAb2 (HC2)抗体免疫标记亲本HeLa或表达Cx43的HeLa细胞。(B)用抗-HMA_b2 (MHC2)或HAb2 (HC2)抗体免疫荧光标记非渗透性骨细胞ML0-Y4细胞。

[0068] 图16-MHA_b2对溶骨性乳腺癌生长的剂量依赖性抑制。将Py8119-Luc乳腺癌细胞注射到雌性小鼠的胫骨中。每周一次地腹膜内注射5mg/kg、15mg/kg和25mg/kg的HMA_b2,持续4周。在对照小鼠中每周一次地注射盐水。通过生物发光成像每周一次地记录肿瘤生长,持续4周并进行定量。数据呈现为平均值±SEM。对于HMA_b2和盐水,n=6。*,P<0.05。

[0069] 图17A-图17D-HMA_b2增加骨小梁的骨量、体积和厚度。每周一次地向4月龄小鼠腹膜内注射25mg/kg HMA_b2抗体或盐水,持续两周。骨参数,(A)骨体积;(B)骨小梁厚度;(C)骨小梁数;和(D)骨矿物质密度(BMD)通过microCT成像进行测定并对其进行定量。数据呈现为平均值±SEM。n=6;*,P<0.05;**,P<0.01。

[0070] 图18A-图18B-通过MHA_b2抑制溶骨性人乳腺癌生长。(A)将MDA-MB231人乳腺癌细胞注射到雌性免疫受损裸小鼠的胫骨中。每周一次地腹膜内注射25mg/kg的HMA_b2,持续7周。在对照小鼠中每周一次地注射盐水或人IgG。通过生物发光成像每周一次地记录肿瘤生长,持续7周并进行定量。数据呈现为平均值±SEM。n=6。*,P<0.05。(B)7周后将小鼠处死并分离肿瘤。

[0071] 图19-MHA_b1通过抑制NF- κ B的核转位来抑制炎症性应答。将原代小鼠软骨细胞用

或不用白细胞介素(IL)1 β 和MHA_b1处理、进行固定并用抗体NF- κ B抗体免疫标记,并用FITC-WGA反向标记。合并的图像显示在右图中。

具体实施方式

[0072] 各种细胞能够通过由连接蛋白形成的半通道和间隙连接而彼此以及与胞外环境通讯。连接蛋白在整个体内遍在表达。六个连接蛋白构成一个半通道,而2个半通道构成1个间隙连接通道。间隙连接是位于相邻细胞之间的质膜中的一簇通道,并且它们并介导细胞间通讯。半通道是来自间隙连接通道的单独实体。半通道允许在细胞内隔室与细胞外环境之间的分子交换。

[0073] 骨细胞表达称为连接蛋白(Cx)43半通道的半通道。这些骨细胞半通道通常是关闭的,并可在暴露于机械刺激时打开,这导致各种因子释放到骨微环境中。半通道打开所释放的因子可介导可减少肿瘤细胞迁移和骨转移的其他过程。

[0074] 某些实施方案涉及鉴定调节连接蛋白半通道的打开的药剂的方法。在某些方面,所述方法鉴定正调节连接蛋白半通道的打开的化合物或药物。其他实施方案涉及通过向患有癌症的患者施用打开半通道的化合物而治疗癌症的方法。在某些方面,患者具有原发性肿瘤。在某些方面,打开Cx43半通道的化合物可用于抑制或减少向骨的转移。在其他方面,打开Cx43半通道的化合物可用于治疗骨质疏松、骨量减少或骨肉瘤。

[0075] 当癌症从其起源的身体部分(例如,乳腺或前列腺)扩散到其他身体部分(例如,肝或骨)并建立继发性肿瘤时即发生癌转移。骨是癌转移最常见的位点之一。转移到骨的癌症包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、肺癌和皮肤癌(例如,黑素瘤)。在高达75%的晚期乳腺癌和前列腺癌患者中可以鉴定出骨转移。骨转移(mets)与许多严重的临床和生活质量后果相关,诸如但不限于难治性疼痛、病理性骨折、脊髓和神经压迫、骨髓浸润和运动性受损。在许多情况下,癌症的全身性存在也可使癌症无法治愈。

[0076] 正常的骨由三大细胞类型构成:形成骨的成骨细胞、再吸收骨的破骨细胞和骨细胞。骨细胞构成骨细胞的大约95%,并通过协调溶骨和成骨活性而维持骨重塑过程。当癌细胞侵袭骨时,许多正常的骨功能受到影响。癌细胞与局部微环境相互作用,以经由骨破坏和血管形成而促进癌细胞存活。

[0077] 已显示骨细胞中的Cx43半通道通过用阿仑膦酸盐(AD)处理而打开,阿仑膦酸盐是一种有效且常用的双膦酸盐药物。双膦酸盐是一类已知用于治疗许多骨病症(包括骨转移)的药物。Powles等人已显示施用双膦酸盐与乳腺癌患者中的骨转移发生率降低和死亡率降低相关。AD与肿瘤生长减少以及骨破坏和疼痛降低相关。AD抑制破骨细胞活性并诱导骨细胞中Cx43半通道的打开(Plotkin等人,2002)。然而,AD施用伴随着多种严重的副作用。

[0078] I. 抗体

[0079] 本发明的某些方面涉及正调节或负调节半通道功能的抗体。鉴定和分离单克隆抗体的实例在下文描述。

[0080] 如本文所用,术语“CDR”是指抗体可变结构域的互补决定区。对CDR中包括的残基的系统性鉴定已由Kabat等人(1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,United States Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda)开发。可变轻链(VL)CDR在本文定义为包括位置27-32(CDR1)、50-56

(CDR2) 和 91-97 (CDR3) 处的残基。可变重链 (VH) CDR 在本文定义为包括位置 27-33 (CDR1)、52-56 (CDR2) 和 95-102 (CDR3) 处的残基。

[0081] 如本领域技术人员所认识,本文所公开的CDR还可以包括变体。一般来讲,各个变体CDR之间的氨基酸同一性为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。因此,“变体CDR”是与本发明的亲本CDR具有指定的同一性的CDR并且共有生物功能,包括但不限于亲本CDR的至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的特异性和/或活性。

[0082] 虽然用于引入氨基酸序列变异的位点或区是预先确定的,但突变本身不需要预先确定。例如,为了优化给定位点处的突变的性能,在靶密码子或靶区处进行随机诱变,并且针对所需活性的最佳组合筛选表达的抗原结合蛋白CDR变体。在具有已知序列的DNA中的预先确定的位点处产生取代突变的技术是熟知的,例如,M13引物诱变和PCR诱变。使用如本文所述的抗原结合蛋白活性测定进行突变体的筛选。

[0083] 氨基酸取代通常是单个残基;插入通常将在约一个(1)至约二十个(20)氨基酸残基的级别上,但也可以容许明显更大的插入。缺失范围为约一个(1)至约二十个(20)氨基酸残基,但在一些情况下缺失可以大得多。

[0084] 取代、缺失、插入或其任意组合可以用来获得最终的衍生物或变体。一般来讲,在少许氨基酸上进行这些改变,以便使分子的改变(特别是抗原结合蛋白的免疫原性和特异性)最小化。然而,在某些情况下可以容许较大的改变。

[0085] 如本文所用,“Fab”或“Fab区”意指包含VH、CH1、VL和CL免疫球蛋白结构域的多肽。Fab可以是指分离情况下的这种区域,或在全长抗体、抗体片段或Fab融合蛋白或如本文概述的任何其他抗体实施方案的语境下的这种区域。

[0086] 如本文所用,“Fv”或“Fv片段”或“Fv区”意指包含单一抗体的VL和VH结构域的多肽。

[0087] 如本文所用,“框架”意指抗体可变结构域的不包括定义为CDR的那些区域的区域。每个抗体可变结构域框架可以进一步再划分成由CDR分隔的连续区域(FR1、FR2、FR3和FR4)。

[0088] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分(或简称为“抗体部分”)”是指保持与抗原(例如,半通道)特异性结合的能力的抗体的一个或多个片段。已证实,可由全长抗体的片段执行抗体的抗原结合功能。涵盖在术语抗体的“抗原结合片段”内的结合片段的实例包括(i) Fab片段,一种由VL/VK、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')2片段,一种包含通过二硫桥键在铰链区连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) Fab'片段,其实质上是带有部分铰链区的Fab(FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul编,第3版1993));(iv) Fd片段,其由VH和CH1结构域组成;(v) Fv片段,其由抗体的单一臂的VL和VH结构域组成;(vi) dAb片段(Ward等人,(1989)Nature341:544-546),其由VH结构域组成;(vii) 分离的互补决定区(CDR);以及(viii) 纳米抗体,一种含有单个可变结构域和两个恒定域的重链可变区。

[0089] 术语“特异性结合”(“或免疫特异性结合”)不旨在指示抗体专有地结合其预期靶标。而是,如果抗体对其预期靶标的亲和力比其对非靶分子的亲和力大约5倍,则抗体“特异性结合”。适宜地,不存在与不希望的物质的明显的交叉反应或交叉结合。抗体对靶分子的亲和力将比其对非靶分子的亲和力大例如至少约5倍,诸如10倍,诸如25倍,尤其是50倍,特

别是100倍或更多。在一些实施方案中,抗体或其他结合剂与抗原之间的特异性结合意指至少 10^6M^{-1} 的结合亲和力。抗体可例如以至少约 10^7M^{-1} ,诸如约 10^8M^{-1} 至约 10^9M^{-1} 、约 10^9M^{-1} 至约 10^{10}M^{-1} 或约 10^{10}M^{-1} 至约 10^{11}M^{-1} 之间的亲和力进行结合。抗体可例如以50nM或更少、10nM或更少、1nM或更少、100pM或更少、或更优选10pM或更少的EC₅₀进行结合。

[0090] 在某些实施方案中,涵盖了结合Cx43蛋白的至少一部分并抑制Cx43的信号传导和癌细胞增殖的抗体或其片段。优选地,抗Cx43抗体是单克隆抗体或人源化抗体。因此,通过已知方法并如本文所述,可以产生对Cx43蛋白、其相应表位中的一个或多个或任何前述的缀合物具有特异性的多克隆或单克隆抗体、抗体片段和结合结构域和CDR(包括任何前述的工程化形式),无论此类抗原或表位是从天然来源分离还是天然化合物的合成衍生物或变体。

[0091] 适用于本发明实施方案的抗体片段的实例包括但不限于:(i)Fab片段,其由V_L、V_H、C_L和C_{H1}结构域组成;(ii)“Fd”片段,其由V_H和C_{H1}结构域组成;(iii)“Fv”片段,其由单一抗体的V_L和V_H结构域组成;(iv)“dAb”片段,其由V_H结构域组成;(v)分离的CDR区;(vi)F(ab')2片段,一种包含两个连接的Fab片段的二价片段;(vii)单链Fv分子(“scFv”),其中V_H结构域和V_L结构域通过肽接头连接,所述肽接头允许两个结构域缔合以形成结合结构域;(viii)双特异性单链Fv二聚体(参见美国专利号5,091,513);以及(ix)双体抗体,即通过基因融合构建的多价或多特异性片段(美国专利申请公布20050214860)。Fv、scFv或双体抗体分子可通过掺入连接V_H和V_L结构域的二硫桥来稳定。还可以制备包含与CH3结构域连接的scFv的微型抗体(Hu等人,1996)。

[0092] 抗体样结合肽模拟物也可涵盖在实施方案中。Liu等人(2003)描述了“抗体样结合肽模拟物”(ABiP),其为充当简化抗体并且具有更长的血清半衰期以及不太繁冗的合成方法的某些有利优势的肽。

[0093] 可以用抗原(诸如Cx43细胞外结构域蛋白)接种动物,以产生对Cx43蛋白特异的抗体。通常,抗原与另一分子结合或缀合以增强免疫应答。如本文所用,缀合物是与用于在动物中引发免疫应答的抗原结合的任何肽、多肽、蛋白质或非蛋白质物质。响应于抗原接种在动物中产生的抗体包括由产生多种单独抗体的B淋巴细胞产生的多种非相同的分子(多克隆抗体)。多克隆抗体是抗体种类的混合群体,所述抗体种类的每一种可识别相同抗原上的不同表位。给定用于在动物中产生多克隆抗体的正确条件,动物血清中的大多数抗体将识别动物已被其免疫的抗原性化合物上的集体表位。该特异性通过亲和纯化以仅选择识别目标抗原或表位的那些抗体来进一步增强。

[0094] 单克隆抗体是其中每一个抗体分子识别相同表位的单种抗体,因为所有抗体产生细胞来源于单个B淋巴细胞系。用于产生单克隆抗体(MAb)的方法通常沿着与用于制备多克隆抗体的那些路线相同的路线开始。在一些实施方案中,将啮齿类动物诸如小鼠和大鼠用于产生单克隆抗体。在一些实施方案中,将兔、绵羊或蛙的细胞用于产生单克隆抗体。大鼠的使用是熟知的并且可提供某些优点。小鼠(例如,BALB/c小鼠)被常规地使用并且通常提供高百分比的稳定融合体。

[0095] 杂交瘤技术包括来自先前用Cx43抗原免疫的小鼠的单个B淋巴细胞与永生化骨髓瘤细胞(通常是小鼠骨髓瘤)的融合。该技术提供将单个抗体产生细胞增殖无穷数目代的方法,以便可产生无限量的具有相同抗原或表位特异性的结构相同的抗体(单克隆抗体)。

[0096] 血浆B细胞可分离自被免疫的兔的新鲜制备的兔外周血单核细胞，并且被进一步选择用于Cx43结合细胞。在富集抗体产生B细胞后，可分离总RNA并合成cDNA。可扩增来自重链和轻链的抗体可变区的DNA序列，将其构建到噬菌体展示Fab表达载体中，并转化到大肠杆菌中。可通过多轮富集淘选选择出特异性结合Cx43的Fab，并对其进行测序。可将选定的Cx43结合命中在兔中表达为全长IgG和使用哺乳动物表达载体系统将其在人胚胎(HEK293)细胞(Invitrogen)中表达为兔/人嵌合形式，并利用快速蛋白液相色谱(FPLC)分离单位使用蛋白G树脂进行纯化。

[0097] 在一个实施方案中，抗体是嵌合抗体，例如，包含移植至异源的非人序列、人序列或人源化序列(例如，框架和/或恒定结构域序列)的来自非人供体的抗原结合序列的抗体。已开发方法来用人来源的类似结构域替代单克隆抗体的轻链和重链恒定结构域，从而保持外来抗体的可变区完整。可选地，在人免疫球蛋白基因的转基因小鼠中产生“完全人”单克隆抗体。也已开发方法来通过重组构建具有啮齿类动物例如小鼠和人氨基酸序列的抗体可变结构域来将单克隆抗体的可变结构域转变成更具人形式。在“人源化”单克隆抗体中，仅高变CDR来源于小鼠单克隆抗体，并且框架区和恒定区来源于人氨基酸序列(参见美国专利号5,091,513和6,881,557)。据认为用在人抗体的对应位置中发现的氨基酸序列替代为啮齿类动物特征性的抗体中的氨基酸序列将在治疗使用过程中减小不利免疫反应的可能性。还可将杂交瘤或其他产生抗体的其他细胞经历遗传突变或其他改变，这可以改变或可以不改变由杂交瘤产生的抗体的结合特异性。

[0098] 用于在各种动物物种中产生多克隆抗体以及用于产生不同类型(包括人源化、嵌合和完全人)的单克隆抗体的方法在本领域中是熟知的并且是高度可预测的。例如，下列美国专利和专利申请提供此类方法的使能描述：美国专利申请号2004/0126828和2002/0172677；和美国专利号3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,196,265;4,275,149;4,277,437;4,366,241;4,469,797;4,472,509;4,606,855;4,703,003;4,742,159;4,767,720;4,816,567;4,867,973;4,938,948;4,946,778;5,021,236;5,164,296;5,196,066;5,223,409;5,403,484;5,420,253;5,565,332;5,571,698;5,627,052;5,656,434;5,770,376;5,789,208;5,821,337;5,844,091;5,858,657;5,861,155;5,871,907;5,969,108;6,054,297;6,165,464;6,365,157;6,406,867;6,709,659;6,709,873;6,753,407;6,814,965;6,849,259;6,861,572;6,875,434；和6,891,024。本文中引用的和本文中的所有专利、专利申请公开案和其他出版物据此以引用的方式并入本申请。

[0099] 可从任何动物来源(包括鸟类和哺乳动物)产生抗体。优选地，所述抗体是羊、鼠类(例如小鼠和大鼠)、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡来源的。此外，更新的技术允许开发人抗体和从人组合抗体文库筛选人抗体。例如，噬菌体抗体表达技术允许在动物免疫不存在的情况下产生特异性抗体，如在美国专利号6,946,546(以引用的方式并入本文)中所描述的。这些技术在Marks (1992) ; Stemmer (1994) ; Gram等人 (1992) ; Barbas等人 (1994) ; 和Schier等人 (1996) 中进行了进一步描述。

[0100] 可完全预期针对Cx43的抗体将具有中和或抵消Cx43的作用而无论动物物种、单克隆细胞系或其他抗体来源的能力。某些动物物种对于产生治疗性抗体可能是不太优选的，因为它们可以更容易引起因补体系统的激活(通过“Fc”部分)而导致的过敏应答。然而，完整抗体可以酶促方式消化成“Fc”(补体结合)片段，和具有结合结构域或CDR的抗体片段。Fc

部分的除去减小抗原抗体片段将引发不希望的免疫应答的可能性,并且因此,无Fc的抗体对于预防性或治疗性治疗可以是优选的。如上所述,还可构建抗体,以成为嵌合抗体或部分或完全人抗体,以减少或消除因向动物施用已在其他物种中产生的或具有来自其他物种的序列的抗体而引起的不利免疫后果。

[0101] 取代性变体通常在蛋白质内的一个或多个位点上含有一个氨基酸对另一个氨基酸的交换,并且可被设计来调节多肽的一种或多种特性(伴有或不伴有其他功能或性质的丧失)。取代可以是保守的,即,一个氨基酸被具有相似形状和电荷的氨基酸替代。保守取代是本领域熟知的,且包括例如以下变化:丙氨酸至丝氨酸、精氨酸到赖氨酸、天冬酰胺至谷氨酰胺或组氨酸、天冬氨酸至谷氨酸、半胱氨酸至丝氨酸、谷氨酰胺至天冬酰胺、谷氨酸至天冬氨酸、甘氨酸至脯氨酸、组氨酸至天冬酰胺或谷氨酰胺、异亮氨酸至亮氨酸或缬氨酸、亮氨酸至缬氨酸或异亮氨酸、赖氨酸至精氨酸、甲硫氨酸至亮氨酸或异亮氨酸、苯丙氨酸至酪氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸、丝氨酸至苏氨酸、苏氨酸至丝氨酸、色氨酸至酪氨酸、酪氨酸至色氨酸或苯丙氨酸、以及缬氨酸至异亮氨酸或亮氨酸。可选地,取代可以是非保守的,以使得多肽的功能或活性受到影响。非保守性变化通常包括用化学上不同的残基取代残基,诸如用极性或带电荷的氨基酸取代非极性或不带电荷的氨基酸,反之亦然。

[0102] 蛋白质可以是重组的或体外合成的。可选地,可从细菌分离非重组或重组蛋白。还设想可将含有此类变体的细菌实现于组合物和方法中。因此,不需要分离蛋白质。

[0103] 设想在组合物中,每ml存在约0.001mg与约10mg之间的总多肽、肽和/或蛋白质。因此,组合物中蛋白质的浓度可以是为约、至少约或至多约0.001、0.010、0.050、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0mg/ml或更多(或可源自其中的任何范围)。在这当中,约、至少约或至多约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%可以是结合Cx43的抗体。

[0104] 抗体或优选地抗体的免疫部分可被化学缀合于其他蛋白质或表达为与其他蛋白质的融合蛋白。出于本说明书和所附权利要求的目的,所有此类融合蛋白包括在抗体或抗体的免疫部分的定义中。

[0105] 实施方案提供针对Cx43的抗体或抗体样分子、连接于至少一种药剂以形成抗体缀合物或有效载荷的多肽和肽。为了增加抗体分子作为诊断剂或治疗剂的功效,常规的是连接或共价结合或复合至少一个所需的分子或部分。这种分子或部分可为但不限于至少一个效应分子或报道分子。效应分子包含具有所需活性例如细胞毒性活性的分子。已被连接至抗体的效应分子的非限制实例包括毒素、治疗性酶、抗生素、放射性标记的核苷酸等。相比之下,报道分子定义为可以使用测定来检测的任何部分。已经与抗体缀合的报道分子的非限制性实例包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、发色团、发光分子、光亲和分子、有色粒子或配体,诸如生物素。

[0106] 用于将抗体连接或缀合至其缀合部分的若干方法在本领域是已知的。一些连接方法涉及金属螯合物的使用,例如采用连接至抗体的有机螯合剂,诸如二亚乙基三胺五乙酸

酐(DTPA)；亚乙基三胺四乙酸；N-氯-对-甲苯磺酰胺；和/或四氯-3-6-二苯基甘脲-3。单克隆抗体还可以在偶联剂诸如戊二醛或高碘酸盐的存在下与酶反应。具有荧光素标记物的缀合物在这些偶联剂存在下或通过与异硫氰酸盐反应来制备。

[0107] II. 疾病治疗

[0108] 本发明实施方案的某些方面可用于预防或治疗与Cx43信号传导相关的疾病或病症。Cx43的信号传导可通过任何合适的药物来减弱以阻止癌细胞增殖。优选地，此类物质可以是抗Cx43抗体。

[0109] “治疗(Treatment)”和“治疗(treating)”是指出于获得疾病或健康相关病状的治疗益处的目的向受试者施用或施加治疗剂或对受试者进行手术操作或物理疗法。例如，治疗可包括施用药学有效量的抑制Cx43信号传导的抗体。

[0110] “受试者”和“患者”是指人或非人，诸如灵长类动物、哺乳动物和脊柱动物。在具体的实施方案中，受试者为人。

[0111] 如在整个本申请中所用，术语“治疗益处”或“治疗上有效的”是指促进或增强受试者在该病状的医学治疗方面的良好状态的任何效果。这包括但不限于疾病的体征或症状的频率或严重度。例如，癌症的治疗可包括，例如减小肿瘤尺寸、降低肿瘤侵袭性、减小癌症生长速率或预防转移。癌症的治疗还可指延长癌症受试者的存活时间。

[0112] A. 药物组合物

[0113] 某些方面包括组合物，例如药物组合物，其包含与药学上可接受的载剂一起配制的单克隆抗体或其抗原结合部分中的一种或组合。此类组合物可包含本文所述的(例如，两种或更多种不同的)抗体或免疫缀合物中的一种或组合。例如，本发明的药物组合物可包含结合靶抗原上的不同表位或具有互补活性的抗体的组合。

[0114] 本发明的药物组合物还可以作为组合疗法而施用，即，与其他药剂组合施用。例如，组合疗法可包括与至少一种其他抗癌剂组合的抗半通道抗体。

[0115] 如本文所用，“药学上可接受的载剂”包括生理上可相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地，载剂适于静脉内、肌内、皮下或肠胃外施用(例如通过注射或输注)。根据施用途径，可以将活性化合物(即抗体或免疫缀合物)用材料包衣以保护所述化合物免受酸和可使所述化合物失活的其他天然条件的作用。

[0116] 可用于本发明的药物组合物中的适合水性和非水性载剂的实例包括水、乙醇、多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)和其适合混合物、植物油(诸如橄榄油)和可注射有机酯(诸如油酸乙酯)。适当流动性可例如通过使用包衣材料(诸如卵磷脂)、在分散体的情况下通过维持所需粒径和通过使用表面活性剂来维持。

[0117] 药学上可接受的载剂包括无菌水性溶液或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。用于药物活性物质的此类介质和药剂的使用为本领域已知的。除非任何常规介质或药剂与活性化合物不相容，否则涵盖其用于本发明的药物组合物中。补充性活性化合物也可掺入到组合物中。

[0118] 治疗组合物在制造和储存的条件下通常必须是无菌和稳定的。可将组合物配制成为溶液、微乳剂、脂质体或适用于较高药物浓度的其他有序结构。载剂可以是溶剂或分散介质，所述溶剂或分散介质含有例如水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)

和其适合的混合物。适当流动性可例如通过使用包衣材料(诸如卵磷脂)、在分散体的情况下通过维持所需粒径和通过使用表面活性剂来维持。在很多情况下,将优选在组合物中包含等渗剂,例如糖类、诸如甘露糖醇、山梨糖醇的多元醇或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中包括延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸盐和明胶)来达成。

[0119] 可通过将所需量的活性化合物在必要时与以上列举的一种成分或成分的组合一起掺入在适当溶剂中,随后进行微过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。总体上,分散体通过将活性化合物掺入到无菌媒介物中来制备,所述媒介物含有基本分散介质和来自以上列举的那些成分的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),此举产生活性成分加来自其先前无菌过滤溶液的任何附加所需成分的粉末。

[0120] 可以与载剂材料组合产生单一剂型的活性成分的量将随所治疗的受试者和特定施用模式而变化。可以与载剂材料组合产生单一剂型的活性成分的量通常为产生治疗效果的组合物的量。一般来讲,在一百份中,该量的范围为约0.01%至约99%的活性成分,优选约0.1%至约70%,最优选约1%至约30%的活性成分与药学上可接受的载剂的组合。

[0121] 调整剂量方案以提供最佳的所需应答(例如,治疗性应答)。例如,可以施用单次推注,随着时间推移可以施用若干分剂量或如由治疗情况的紧急状态指示,剂量可按比例减少或增加。尤其有利的是以便于施用和实现剂量均匀性的剂量单位形式配制肠胃外组合物。如本文使用,剂量单位形式是指适合作为用于待治疗的受试者的单一剂量的物理上离散单位;每个单位含有预先经计算的确定量的活性化合物,其可与期望药物载剂结合产生所需治疗效果。本发明的单位剂型的规格由以下因素决定并且直接取决于这些因素:(a)活性化合物的独特特性和所要实现的特定治疗效果,和(b)在混配此种活性化合物用于治疗个体敏感性的领域中固有的限制。

[0122] 对于抗体施用,剂量范围为约0.0001至100mg/kg,且更通常是0.01至5mg/kg宿主体重。例如,剂量可以是0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg的范围内。示例性治疗方案需要每周施用一次、每两周施用一次、每三周施用一次、每四周施用一次、每月施用一次、每三个月施用一次或每三至六个月施用一次。本发明的抗半通道抗体的优选剂量方案包括经由静脉内施用1mg/kg体重或3mg/kg体重,其中抗体使用以下给药计划之一给予:(i)每四周一次持续六个剂量,然后每三个月一次;(ii)每三周一次;(iii)每三周一次3mg/kg体重,然后1mg/kg体重。

[0123] 在一些方法中,同时施用两种或更多种的具有不同结合特异性的单克隆抗体,在这种情况下施用的每种抗体的剂量在指明的范围之内。抗体通常多次施用。单一剂量之间的间隔可例如是每周一次、每月一次、每三个月一次或每年一次。如通过测量患者中针对靶抗原的抗体的血液水平所指示,间隔也可为不规律的。在一些方法中,剂量被调整以实现约1-1000 μ g/ml的血浆抗体浓度,并且在一些方法中是25-300 μ g/ml。

[0124] 可改变本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平以便获得对于特定患者、组合物和施用模式有效实现所需治疗性应答而对患者无毒性的活性成分的量。选择的剂量水平取决于多种药代动力学因素,包括采用的本发明的特定组合物的活性、施用途径、施用时间、采用的特定化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与使用的特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、所治疗患者的年龄、性别、体重、病状、总体健康状况和先前的病

史和在医学领域众所周知的类似因素。

[0125] “治疗有效剂量”的抗半通道抗体导致疾病症状的严重性减轻、无疾病症状期的频率和持续时间增加或预防因疾病困扰所导致的损伤或残疾。治疗有效量的治疗性化合物或抗体可减少受试者的肿瘤转移或以其他方式缓解症状。本领域技术人员将能够基于诸如受试者的体型、受试者症状的严重性和所选的特定组合物或施用途径等因素来确定此类量。

[0126] 本发明的组合物可以经由一种或多种施用途径使用本领域中已知的多种方法中的一种或多种施用。如本领域技术人员所了解,施用途径和/或模式将根据所需结果而变化。优选的本发明的抗体的施用途径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下或其他肠胃外施用途径,例如通过注射或输注。如本文所用,短语“肠胃外施用”意指除肠内和局部施用以外的施用模式,通常通过注射,并且包括而不限于静脉内、肌内、动脉内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内注射和输注。

[0127] B. 组合治疗

[0128] 在某些实施方案中,本发明的组合物和方法涉及与第二或另外的疗法组合的抑制Cx43在癌细胞增殖中的活性的针对Cx43的抗体或抗体片段。此类疗法可适用于治疗与Cx43介导的细胞增殖相关的任何疾病。例如,疾病可以是癌症。

[0129] 所述方法和组合物(包括组合疗法)增强治疗或保护效果,和/或增加另一种抗癌或抗过度增殖性疗法的治疗效果。可以有效地实现所需效果诸如杀伤癌细胞和/或抑制细胞过度增殖的组合量提供治疗性和预防性方法和组合物。该方法可包括将细胞与抗体或抗体片段和第二疗法接触。可将组织、肿瘤或细胞与一种或多种包含一种或多种药剂(即,抗体或抗体片段或抗癌剂)的组合物或药物制剂接触,或通过将组织、肿瘤和/或细胞与两种或更多种不同的组合物或制剂接触,其中一种组合物提供1)抗体或抗体片段、2)抗癌剂,或3)抗体或抗体片段和抗癌剂。另外,设想可将这种组合疗法与化学疗法、放射疗法、手术疗法或免疫疗法结合使用。

[0130] 术语“接触的”和“暴露的”,当用于细胞时,在本文中用于描述籍以将治疗性构建体和化学治疗剂或放射治疗剂递送至靶细胞或与靶细胞直接并置放置的过程。为了实现细胞杀伤,例如将两种药剂以有效地杀伤细胞或阻止其分裂的组合量递送至细胞。

[0131] 可在抗癌治疗之前、期间、之后或以各种组合施用抑制性抗体。施用可具有从同时至数分钟至数天至数周的间隔。在其中将抗体或抗体片段与抗癌剂单独地向患者提供的实施方案中,通常确保不在每一次递送的时间之间终止相当长的时间段,以便两种化合物仍然能够对患者产生有利地组合的效果。在此类情况下,设想可为患者提供彼此约在12至24或72h内,且更具体地,彼此在约6-12h内的抗体疗法和抗癌疗法。在一些情形下,可能希望显著延长治疗时间段,其中各次施用之间经过数天(2、3、4、5、6或7天)至数周(1、2、3、4、5、6、7或8周)。

[0132] 在某些实施方案中,治疗过程将持续1-90天或更长(该这样的范围包括间隔天数)。设想可在第1至第90天的任何天(该这样的范围包括间隔天数)或其任何组合给予一种药剂,并且在第1至第90天的任何天(该这样的范围包括间隔天数)或其任何组合给予另一种药剂。在一天(24小时时段)内,可向患者给予药剂一次或多次施用。此外,在治疗过程后,设想存在不施用抗癌治疗的一段时间。取决于患者的病状,诸如他们的预后、抵抗力、健康等,该时间段可持续1-7天,和/或1-5周,和/或1-12个月或更长(该这样的范围包括间隔天

数)。预期治疗循环将根据需要重复。

[0133] 可采用各种组合。对于以下实例,抗体疗法为“A”并且抗癌疗法为“B”:

[0134] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0135] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0136] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0137] 向患者施用本发明实施方案的任何化合物或疗法将遵从用于施用此类化合物的一般方案,考虑药剂的毒性(如果有的话)。因此,在一些实施方案中,存在对可归因于组合疗法的毒性进行监测的步骤。

[0138] i. 化学疗法

[0139] 可按照本发明实施方案使用广泛多种的化学治疗剂。术语“化学疗法”是指使用药物治疗癌症。“化学治疗剂”用于意指在癌症的治疗中施用的化合物或组合物。这些药剂或药物根据它们在细胞内的活性模式(例如它们是否影响细胞周期以及在什么阶段影响细胞周期)来分类。可选地,可基于其直接交联DNA、嵌入DNA或通过影响核酸合成诱导染色体和有丝分裂异常的能力表征药剂。

[0140] 化学治疗剂的实例包括烷基化剂诸如塞替派和环磷酰胺;烷基磺酸盐,诸如白消安、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶,诸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);乙撑亚胺和甲基蜜胺,包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramide)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramide)和三羟甲蜜胺(trimethylololomelamine);番荔枝内酯(尤其是布拉它辛(bullatacin)和布拉它辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括合成类似物拓扑替康);苔藓抑素(bryostatin);凯利他汀(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);念珠藻素(cryptophycin)(特别是念珠藻素1和念珠藻素8);多拉司他汀(dolastatin);倍癌霉素(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);软珊瑚醇(eleutherobin);潘卡他汀(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑素(spongistatin);氮芥,诸如苯丁酸氮芥、蔡氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺(ifosfamide)、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、二氯甲基二乙胺氧化物盐酸盐、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、和尿嘧啶氮芥;亚硝基脲,诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine);抗生素,诸如烯二炔抗生素(例如卡里奇霉素,尤其是卡里奇霉素 γ 1I和卡里奇霉素 ω 1I);达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;二磷酸盐(bisphosphonate),诸如氯膦酸盐;埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新抑癌菌素(neocarzinostatin)发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团、阿克拉霉素(acacinomycin)、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C(cactinomycin)、卡拉比星(carabacin)、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-氧-L-

正亮氨酸、多柔比星 (doxorubicin) (包括吗啉代-多柔比星、氨基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉并-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素 (mitomycin) 诸如丝裂霉素C、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺加霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、培洛霉素 (peplomycin)、泊非霉素 (potfiromycin)、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链脲霉素 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin) 和佐柔比星 (zorubicin)；抗代谢物，诸如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶 (5-FU)；叶酸类似物，诸如二甲叶酸 (denopterin)、蝶罗呤 (pteropterin) 和三甲曲沙 (trimetrexate)；嘌呤类似物，诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤和硫鸟嘌呤；嘧啶类似物，诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿啶 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine) 和氟尿苷 (floxuridine)；雄激素，诸如卡鲁睾酮 (calusterone)、屈他雄酮丙酸盐 (dromostanolone propionate)、环硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane) 和睾内酯 (testolactone)；抗肾上腺剂，诸如米托坦 (mitotane) 和曲洛司坦 (trilostane)；叶酸补充剂，诸如亚叶酸 (frolinic acid)；醋葡萄内酯 (aceglatone)；醛磷酰胺糖苷 (aldophosphamide glycoside)；氨基乙酰丙酸；恩尿嘧啶 (eniluracil)；安吖啶 (amsacrine)；倍曲布西 (bestrabucil)；比生群 (bisantrone)；依达曲沙 (edatraxate)；地佛法明 (defofamine)；地美可辛 (demecolcine)；地吖醒 (diaziquone)；依洛尼塞 (elformithine)；依利醋铵 (elliptinium acetate)；埃博霉素 (epothilone)；依托格鲁 (etoglucid)；硝酸镓；羟脲；香菇多糖 (lentinan)；洛尼代宁 (lonidainine)；美登木素生物碱，诸如美登素和安丝菌素 (ansamitocin)；米托胍腙 (mitoguazone)；米托蒽醌 (mitoxantrone)；莫哌达醇 (mopidanmol)；二胺硝吖啶 (nitraerine)；喷司他丁 (pentostatin)；蛋氨氮芥 (phenamet)；吡柔比星 (pirarubicin)；洛索蒽醌 (losoxantrone)；鬼臼酸 (podophyllinic acid)；2-乙基酰肼；丙卡巴肼 (procabazine)；PSK 多糖复合物；雷佐生 (razoxane)；根霉素 (rhizoxin)；西佐喃 (sizofiran)；锗螺胺 (spirogermanium)；细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid)；三亚胺醌 (triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙胺；单端孢霉烯族毒素 (trichothecene) (尤其是 T-2 毒素、verrucarin A、杆孢菌素 A 和蛇形菌素 (anguidine))；乌拉坦 (urethan)；长春地辛 (vindesine)；达卡巴嗪 (dacarbazine)；甘露醇氮芥 (mannomustine)；二溴甘露醇 (mitobronitol)；二溴卫矛醇 (mitolactol)；哌泊溴烷 (pipobroman)；gacytosine；阿拉伯糖苷 (arabinoside) ("Ara-C")；环磷酰胺；紫杉烷 (taxoid)，例如紫杉醇和多西他塞 (docetaxel)；吉西他滨 (gemcitabine)；6-巯基嘌呤；巯基嘌呤；铂配位络合物，诸如顺铂、奥沙利铂 (oxabplatin) 和卡铂；长春碱 (vinblastine)；铂；依托泊苷 (etoposide) (VP-16)；异环磷酰胺；米托蒽醌 (mitoxantrone)；长春新碱 (vincristine)；长春瑞宾 (vinorelbine)；诺消灵 (novantrone)；替尼泊苷 (teniposide)；依达曲沙 (edatrexate)；道诺霉素 (daunomycin)；氨基蝶呤；希罗达 (xeloda)；伊班膦酸盐 (ibandronate)；伊立替康 (例如 CPT-11)；拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000；二氟甲基鸟氨酸 (DMFO)；类维生素 A，诸如视黄酸；卡培他滨 (capecitabine)；卡铂、丙卡巴肼、普卡霉素 (plicomycin)、吉西他滨 (gemcitabine)、长春

瑞滨 (navelbine)、法尼基蛋白质转移酶抑制剂 (farnesyl-protein transferase inhibitors)、反铂, 以及上述任何物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0141] ii. 放射疗法

[0142] 引起DNA损伤并且已被广泛使用的其他因素包括通常称为的 γ -射线、X-射线和/或放射性同位素至肿瘤细胞的直接递送。还设想了DNA损伤因素的其他形式, 诸如微波、质子束辐照 (美国专利5,760,395和4,870,287) 和UV-辐照。最可能的是所有这些因素都对DNA、对DNA的前体、对DNA的复制和修复以及对染色体的组装和维持造成广泛的损伤。X-射线的剂量范围为持续长时间段 (3至4周) 的50至200伦琴的日剂量至2000至6000伦琴的单次剂量。放射性同位素的剂量范围变化宽广, 并且取决于同位素的半衰期、发射的辐射强度和类型以及被赘生性细胞的摄取。

[0143] iii. 免疫疗法

[0144] 本领域技术人员将理解, 可将另外的免疫疗法与实施方案的方法组合或结合使用。在癌症治疗的背景中, 免疫治疗剂通常依赖于使用免疫效应细胞和分子来靶向并破坏癌细胞。利妥昔单抗(RITUXAN®)是这样的一个实例。免疫效应子可以是例如对于肿瘤细胞表面上的一些标记物是特异性的抗体。抗体单独地可充当治疗的效应子或其可募集其他细胞来实际上实现细胞杀伤。抗体还可被缀合至药物或毒素 (化学治疗剂、放射性核素、蓖麻毒素A链、霍乱毒素、百日咳毒素等) 并且充当靶向剂。可选地, 效应子可以是携带与肿瘤细胞靶标直接或间接相互作用的表面分子的淋巴细胞。各种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。

[0145] 在免疫疗法的一个方面, 肿瘤细胞必须具有一些适合于靶向, 即不存在于大多数其他细胞上的标记物。许多肿瘤标记物存在并且这些标记物的任一种可适合于在本发明的实施方案的背景中进行靶向。常见肿瘤标记物包括CD20、癌胚抗原、酪氨酸酶 (p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸化路易斯抗原、MucA、MucB、PLAP、层粘连蛋白受体、erb B和p155。免疫疗法的替代方面是组合抗癌作用与免疫刺激作用。还存在免疫刺激分子, 包括细胞因子, 诸如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN、趋化因子, 诸如MIP-1、MCP-1、IL-8和生长因子, 诸如FLT3配体。

[0146] 目前处于研究或使用中的免疫疗法的实例是免疫佐剂, 例如, 牛型分枝杆菌 (Mycobacterium bovis)、恶性疟原虫 (Plasmodium falciparum)、二硝基氯苯和芳香族化合物 (美国专利5,801,005和5,739,169; Hui和Hashimoto, 1998; Christodoulides等人, 1998); 细胞因子疗法, 例如干扰素 α 、 β 和 γ 、IL-1、GM-CSF和TNF (Bukowski等人, 1998; Davidson等人, 1998; Hellstrand等人, 1998); 基因疗法, 例如, TNF、IL-1、IL-2和p53 (Qin等人, 1998; Austin-Ward和Villaseca, 1998; 美国专利5,830,880和5,846,945); 和单克隆抗体, 例如抗CD20、抗神经节苷脂GM2和抗p185 (Hollander, 2012; Hanibuchi等人, 1998; 美国专利5,824,311)。设想可将一种或多种抗癌疗法与本文所述的抗体疗法一起使用。

[0147] iv. 手术

[0148] 约60%的具有癌症的人将经历相同类型的手术, 所述手术包括预防性、诊断性或分期性、治愈性和缓解性手术。治愈性手术包括其中癌症组织的全部或部分被物理除去、切除和或破坏的切除, 并且可与其他疗法诸如本发明的实施方案的治疗、化学疗法、放射疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或替代疗法结合使用。肿瘤切除是指至少部分肿瘤的

物理去除。除了肿瘤切除外,利用手术的治疗包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和用显微镜控制的手术(莫氏手术)。

[0149] 在癌性细胞、组织或肿瘤的部分或全部切除后,可在体内形成腔。治疗可通过用另外的抗癌疗法对所述区域进行灌注、直接注射或局部应用来实现。可以例如每1、2、3、4、5、6或7天或每1、2、3、4和5周或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月重复这种治疗。这些治疗同样可具有不同的剂量。

[0150] v. 其他药剂

[0151] 设想可将其他药剂与本发明实施方案的某些方面组合使用以改善治疗的治疗功效。这些另外的药剂包括实现细胞表面受体和GAP连接的上调的药剂、细胞抑制和分化剂、细胞粘附的抑制剂、增加过度增殖细胞对细胞凋亡诱导剂的敏感性的药剂、或其他生物药剂。通过增加GAP连接的数目产生的细胞信号传导的增加可增加对相邻过度增殖的细胞群体的抗过度增殖作用。在其他实施方案中,可将细胞抑制或分化剂与本发明实施方案的某些方面组合使用以改善治疗的抗过度增殖功效。设想细胞粘附的抑制剂改善本发明实施方案的功效。细胞粘附抑制剂的实例是粘着斑激酶(FAK)抑制剂和洛伐他汀。还设想可将增加过度增殖细胞对细胞凋亡的敏感性的其他药剂诸如抗体c225与本发明实施方案的某些方面组合使用来改善治疗功效。

[0152] III. 试剂盒和诊断剂

[0153] 在实施方案的各个方面,预想试剂盒含有治疗剂和/或其他治疗剂和递送剂。在一些实施方案中,本发明实施方案涵盖用于制备和/或施用实施方案的疗法的试剂盒。试剂盒可包括一个或多个容纳本发明实施方案的任何药物组合物的密封小瓶。试剂盒可包括例如至少一种Cx43抗体以及制备、配制和/或施用实施方案的组分或进行本发明方法的一个或多个步骤的药剂。在一些实施方案中,试剂盒还可包括适当的容器,其为不会与试剂盒的组分反应的容器,诸如eppendorf管、测定板、注射器、瓶子或管。容器可由可灭菌性材料诸如塑料或玻璃制造。

[0154] 试剂盒还可包括概述本文所示方法的程序步骤的说明书,并且将遵照与本文所述的或本领域普通技术人员已知的方法大体上相同的方法。说明书信息可存在于含有机器可读指令的计算机可读介质中,所述指令,当使用计算机执行时,致使显示递送药物有效量的治疗剂的真实或实际程序。

[0155] IV. 实施例

[0156] 包括以下实施方案以示范本发明的优选实施方案。本领域技术人员应理解以下实施例中公开的技术代表了由本发明人发现在本发明实践中发挥良好作用的技术,并且因此可以被认为构成本发明实践的优选模式。然而,根据本公开,本领域技术人员应理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下可以在已公开并仍获得类似或相似结果的特定实施方案中做出许多改变。

[0157] 实施例1-抗Cx43单克隆抗体

[0158] 产生抗Cx43单克隆抗体并且鉴定出产生结合Cx43的单克隆抗体的克隆。所有抗体序列的DNA和氨基酸的CDR序列以及每种表征的抗体的正确配对显示在下表中。

[0159] 表1:两种功能性抗体的重链和轻链的配对。

抗体名称	重链	轻链
------	----	----

M1 (HmAb1)	M1H	M1K1
M2 (HmAb2)	M1H	M1M7K

[0161] 表2:来自杂交瘤的抗体链的序列。

MAB	CDR-1	CDR-2	CDR-3
M1H	ggctacacccatcaccagctactat (SEQ ID NO: 16)	attaatcccttagcaatgggttgta ct (SEQ ID NO: 17)	acaagagagggtaaccctactatactatgaac tac (SEQ ID NO: 18)
	GYTFTSYY (SEQ ID NO: 19)	INPSNGGT (SEQ ID NO: 20)	TREGNPYYTMNY (SEQ ID NO: 21)
M7H	ggctacacccatcaccacccatctgg (SEQ ID NO: 22)	attagtcccttagcaacgggtcggt ct (SEQ ID NO: 23)	gcacgatcgacgaggggacttc (SEQ ID NO: 24)
	GYIFTTYW (SEQ ID NO: 25)	ISPSNGRS (SEQ ID NO: 26)	ARFDEGDF (SEQ ID NO: 27)
M1K1	cagagtctgttaaacagtggaaatcaaagacc tac (SEQ ID NO: 28)	ggggcatcc (SEQ ID NO: 29)	cagaatgtcatagttatccattcagc (SEQ ID NO: 30)
	QSLLNNSGNQKTY (SEQ ID NO: 31)	GAS (SEQ ID NO: 32)	QNDHSYPFT (SEQ ID NO: 33)
M1K2	aaaagtgtcagtagatctggctatagttat	cttgcattcc	cagcacattaggagcttacacg

[0162]

	(SEQ ID NO: 34)	SEQ ID NO: 35)	(SEQ ID NO: 36)
	KSVSTSGYSY (SEQ ID NO: 37)	LVS (SEQ ID NO: 38)	QHIRELT (SEQ ID NO: 39)
M2K	aaaagtgtcagtagatctggctatagttat (SEQ ID NO: 40)	cttgcattcc (SEQ ID NO: 41)	cagcacattaggagcttacacg (SEQ ID NO: 42)
	KSVSTSGYSY (SEQ ID NO: 43)	LVS (SEQ ID NO: 44)	QHIRELTR (SEQ ID NO: 45)
M1M7 K	gaggcctttagaaaggcgatggaaagacat (SEQ ID NO: 46)	ctgggtct (SEQ ID NO: 47)	tggcaaggtagcacatttccgtggacg (SEQ ID NO: 48)
	QSLLESDGKTY (SEQ ID NO: 49)	LVS (SEQ ID NO: 50)	WQGTHFPWT (SEQ ID NO: 51)

[0163] 克隆的可变结构域示于下图表中。

[0164] 图表1.DNA序列:

[0165] >M1H

GAGGTCCA ACTCCAGCAGCCTGGGCTGA ACTGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTGAAGTTGTC
CTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCAACCAGCTACTATATGTACTGGGTGAAGCAGAGGCCTG
GACAAGGCCTTGAGTGGATTGGGGAAATTAAATCCTAGCAATGGTGGTACTAACTTCATGAG
[0166] AAGTTCAAGAACAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACT
CAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAGAGGGTAACCCCTACT
ATACTATGAACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:
52)

[0167] >M7H

GAGGTCCA ACTCCAGCAACCTGGGCTGA ACTGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTAATGCTGTC
CTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTCAACCACCTACTGGATGCACTGGCTGAAGCAGAGGCCTG
GACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAGTCCTAGCAACGGTCGTTCTAATTACAATAAG
[0168] AAGTTCAAGAACAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACT
CAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCACGATTGACGAGGGGGACT
TCTGGGCCAAGGCACCACTCTCATAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 53)

- [0169] >M1K1
GACATTGTGATGACGCAGTCTCCATCCCTGAGTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTAT
- [0170] GAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAACAGTGGAAATCAAAAGACCTACTTGGCCTGGT
ACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCTAAACTGTTGATCTACGGGCATCCACTAGGGAATCT
GGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACCGATTCACTCTTACCATCAGCAG
TGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTATTACTGTCAGAATGATCATAGTTATCCATTACGT
TCGGCTCGGGACAAAGTTGAAATAAAA (SEQ ID NO: 54)
- [0171] >M1K2
GACATTGTGTTGACACAGTCTCCTGCTCCTTAGCTGTATCTCTGGGCAGAGGGCCACCAT
CTCATACAGGGCAGCAAAAGTGTCACTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAACCAAC
AGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGATCTAACCTAGAATCTGGGTC
[0172] CCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGCTGGGACAGACTTCACCCCTAACATCCATCCTGTGGA
GGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGAGCTTACACGTTGGAGGGGG
GACCAAGCTGAAATCAAAC (SEQ ID NO: 55)
- [0173] >M2K
GATATTGTGATGACCCAGTCTCCGCTCCTTAGCTGTATCTCTGGGCAGAGGGCCACCAT
CTCATACAGGGCAGCAAAAGTGTCACTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAACCAAC
AGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGATCTAACCTAGAATCTGGGTC
[0174] CCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGCTGGGACAGACTTCACCCCTAACATCCATCCTGTGGA
GGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGAGCTTACACGTTGGAGGGGG
GGACCAAGCTGAAATCAAAC (SEQ ID NO: 56)
- [0175] >M1M7
KGACGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTGTGGTTACCATGGACAACCAGCCTCC
ATCTCTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTAGAAAGCGATGGAAAGACATATTGAATTGGT
[0176] TGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCAAAGCGCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTC
TGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTGAAAATCAGC
AGAGTGGAGGCTGAGGATTGGAGTTATTGCTGGCAAGGTACACATTTCGTGGA
CGTTGGTGGAGGCACCAAGCTGAAATCAAAC (SEQ ID NO: 57)
- [0177] 图表2.氨基酸序列:
- [0178] >M1H
EVQLQQPGAEVLKPGASVMLSCKASGYTFTSYYMYWVKQRPGQGLEWIGGINPSNG
- [0179] GTNFNEKFKNKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTREGNPYYTMNYWGQ
GTSVTVSS (SEQ ID NO: 58)
- [0180] >M7H
EVQLQQPGAEVLVRPGASVMLSCKASGYIFTTYWMHWLKQRPGQGLDWIGEISPSNG
- [0181] RSNYNKKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARFDEGDFWGQGTTLI
VSS (SEQ ID NO: 59)
- [0182] >M1K1

- DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKTYLAWYQQKPGQPPKLLIYGA
 [0183] STRESGVPDFRTGSGSGTDFLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPFTFGSGTKLEIK
 (SEQ ID NO: 60)
- [0184] >M1K2
 DIVLTQSPASLA VSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQKPGQPPRLLIYLVSNL
 [0185] ESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEADAATYYCQHIRELTRSEGGPSWKSN (SEQ ID
 NO: 61)
- [0186] >M2-K
 DIVMTQSPASLA VSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQKPGQPPRLLIYLVSN
 [0187] LESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEADAATYYCQHIRELTRSEGGTKLEIK (SEQ ID
 NO: 62)
- [0188] >M1M7-K
 DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQLLES DGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSK
 [0189] LDSGVPDFRTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPWTFGGGTKLEIK
 (SEQ ID NO: 63)
- [0190] 实施例2-脊髓和神经元损伤(SCI)治疗用途
 [0191] 如图1所示,Cx43通常定位于细胞之间的间隙连接中或作为质膜上的半通道。Cx43半通道的病理性打开导致继发性损伤的传播、星形/小胶质细胞的激活和炎症。已提出,防止Cx43半通道病理性打开阻止分子释放,从而使星形胶质细胞充当管理(caretaker)细胞并防止继发性损伤进一步扩散。
 [0192] 通过Cx43半通道阻断小鼠单克隆抗体(M1)和小鼠-人嵌合抗体HMAb1抑制人原代星形胶质细胞中IL-1 β 对Cx43半通道的激活。通过溴化乙锭摄取确定半通道活性。结果示出在图2中。
 [0193] 用HMAb1治疗的小鼠具有减少的胶质瘢痕形成。对小鼠进行单次SCI并在损伤后30分钟用IP盐水、对照Igg或HMAb1(25mg/kg)治疗。在损伤后14和56天测量胶质瘢痕形成。针对星形胶质细胞标记物GFAP对脊髓组织切片进行免疫组织化学(红色)。用对照IgG治疗的小鼠中脊髓的代表性图像示出在图3A-C中并且用HMAb1治疗的小鼠中脊髓的代表性图像示出在图3D-F中。病变边界用虚白线表示。将GFAP免疫标记定量为图3G中的平均强度乘以阳性染色的面积。结果表示为假手术、IgG治疗小鼠的百分比。结果是平均值 \pm SEM。与Igg相比,*p<0.05,***p<0.001,w/杜凯氏HSD n=3-4。
 [0194] 在SCI后用抗Cx43治疗的小鼠中胶质瘢痕形成也减少。对小鼠进行SCI并在损伤后30分钟用IgG或抗Cx43抗体(M1)治疗。损伤后两周,分析组织切片的星形胶质细胞标记物GFAP的表达。代表性图像示出在图4A和图4B中。将结果在图4C中定量。
 [0195] 在用HMAb1治疗后具有SCI的小鼠恢复后肢功能(图5A-图5B)。对小鼠进行单次SCI并在损伤后30分钟用IP盐水、对照IgG或人-小鼠嵌合抗Cx43抗体(HMAb1)(25mg/kg)治疗。
 [0196] SCI后14天,发现用HMAb1治疗的小鼠在病灶周围区域中具有更多的神经元树突。如上所述,对小鼠进行单次SCI并在损伤后30分钟用IP盐水、对照Igg或HMAb1(25mg/kg)治疗。通过针对神经元标记物MAP2的免疫标记测量神经元树突。用对照IgG治疗的小鼠中脊髓

的免疫组织化学代表性图像示出在图6A-C中并且用HMAb1治疗的小鼠中脊髓的免疫组织化学代表性图像示出在图6D-F中。病变边界用虚白线表示。将MAP2免疫标记定量为图6G中所示的平均强度乘以阳性染色的面积。结果表示为假手术、IgG治疗小鼠的百分比。

[0197] SCI后14天,还观察到用HMAb1治疗的小鼠在病灶周围区域中具有更多的神经元核。对小鼠再次进行单次SCI并在损伤后30分钟用IP盐水、对照IgG或HMAb1(25mg/kg)治疗。通过针对神经元标记物NeuN的免疫标记测量神经元核。用对照IgG治疗的小鼠中脊髓的免疫组织化学代表性图像示出在图7A-C中并且用HMAb1治疗的小鼠中脊髓的免疫组织化学代表性图像示出在图7D-F中。病变边界用虚白线表示。将NeuN免疫标记定量为图7G中所示的平均强度乘以阳性染色的面积。结果表示为假手术、IgG治疗小鼠的百分比。

[0198] 实施例3-诊断性和癌症治疗性用途

[0199] 在美国每年因转移性乳腺癌死亡的有大约40,000例。约70%-80%的晚期乳腺癌患者发生骨转移。仅骨转移占乳腺癌治疗成本的三分之二。

[0200] 发现骨细胞特异性Cx43敲除小鼠中骨溶性肿瘤生长增强。将Py8119-Luc细胞注射到对照和cKO雌性小鼠的右胫骨中。左胫骨注射PBS作为对照。通过生物发光成像每周一次地记录肿瘤生长,持续4周并进行定量(图8A-图8C)。

[0201] 将MLO-Y4骨细胞和原代小鼠骨细胞与E2(多克隆)、HMAb1和HMAb2抗体或甘珀酸(CBX)(连接蛋白通道阻断剂)一起温育。进行溴化乙锭(EtBr)染料摄取测定(图9A-9B)。发现Cx43 HMAb2抗体激活半通道。

[0202] 将MLO-Y4骨细胞和原代小鼠骨细胞与E2(多克隆)、HMAb1和HMAb2抗体或甘珀酸(CBX)(连接蛋白通道阻断剂)一起温育。进行溴化乙锭(EtBr)染料摄取测定(图9A-9B)。发现Cx43 HMAb2抗体激活半通道。

[0203] 也观察到HMAb2对溶骨性肿瘤生长的抑制。将Py8119-Luc细胞注射到雌性小鼠的右胫骨中(图11A)。左胫骨注射PBS作为对照。每周一次或两次腹膜内注射25mg/kg的HMAb2,持续四周。在对照小鼠中每周注射盐水两次。通过生物发光成像每周一次地记录肿瘤生长,持续4周并进行定量(图11B)。

[0204] 实施例4-骨关节炎治疗

[0205] 将从小鼠骨中分离的原代软骨细胞用渗透性细胞中的针对C末端结构域(总)的抗Cx43抗体和非渗透性细胞中的Cx43E2抗体进行免疫染色(图12)。在原代软骨细胞的细胞表面上观察到Cx43表达。

[0206] 在其他研究中,将从小鼠骨中分离的原代软骨细胞用甘珀酸(连接蛋白通道阻断剂)或HMAb1抗体预处理,然后用或不用IL-1 β 处理。进行溴化乙锭染料摄取测定以确定半通道活性(图13)。据观察,在原代软骨细胞中HMAb1抗体抑制由IL-1 β 进行的半通道打开。

[0207] 如在上述实施例中,通过体内的Cx43半通道阻断抗体阻断了由胫骨负荷所诱导的伊文思蓝摄取。将伊文思蓝染料注射到WT小鼠的尾静脉中。在染料注射前2小时腹膜内注射Cx43(M1)mAb(25mg/kg)。染料注射后30分钟,使左胫骨机械负荷一次,持续10min。通过伊文思蓝(EB)荧光测量染料摄取并对其进行定量(图14)。

[0208] ***

[0209] 根据本公开,本文公开的并且要求保护的所有方法可在无需过度实验的情况下进行和实施。尽管本发明的组合物和方法已经根据优选实施方案加以描述,但对本领域技术

人员显而易见的是可使本文所述的方法和本文所述方法的步骤或步骤的顺序发生变化,而不偏离本发明的概念、精神和范围。更具体说来,显而易见的是在化学上和生理学上相关的某些药剂可取代本文所述的药剂,同时达到相同或相似结果。对本领域技术人员显而易见的所有此类类似的取代和修改均被认为是在所附权利要求书所限定的本发明的精神、范围和概念之内。

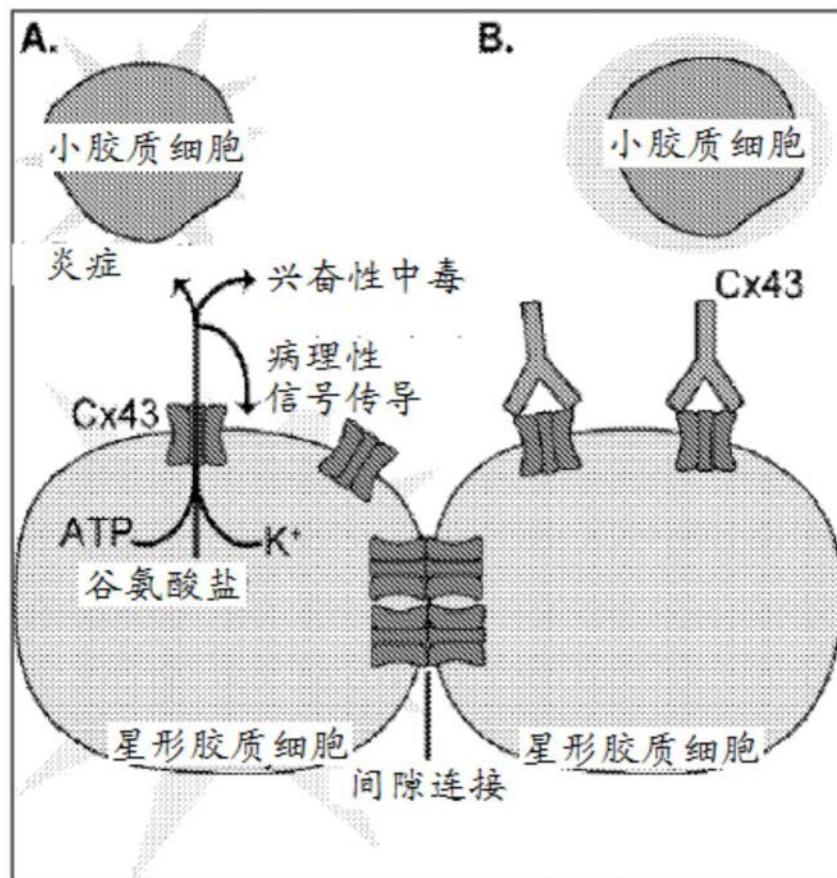


图1

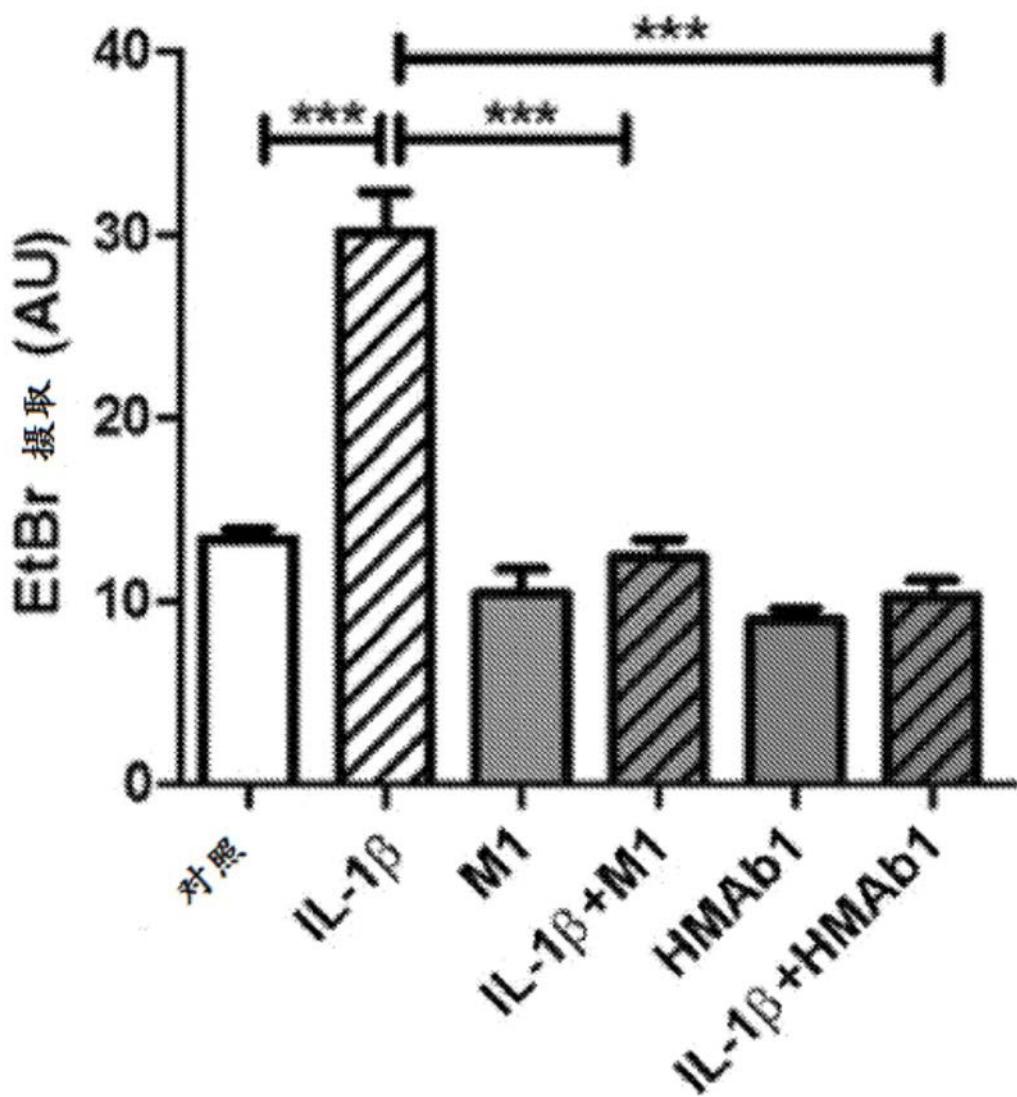


图2

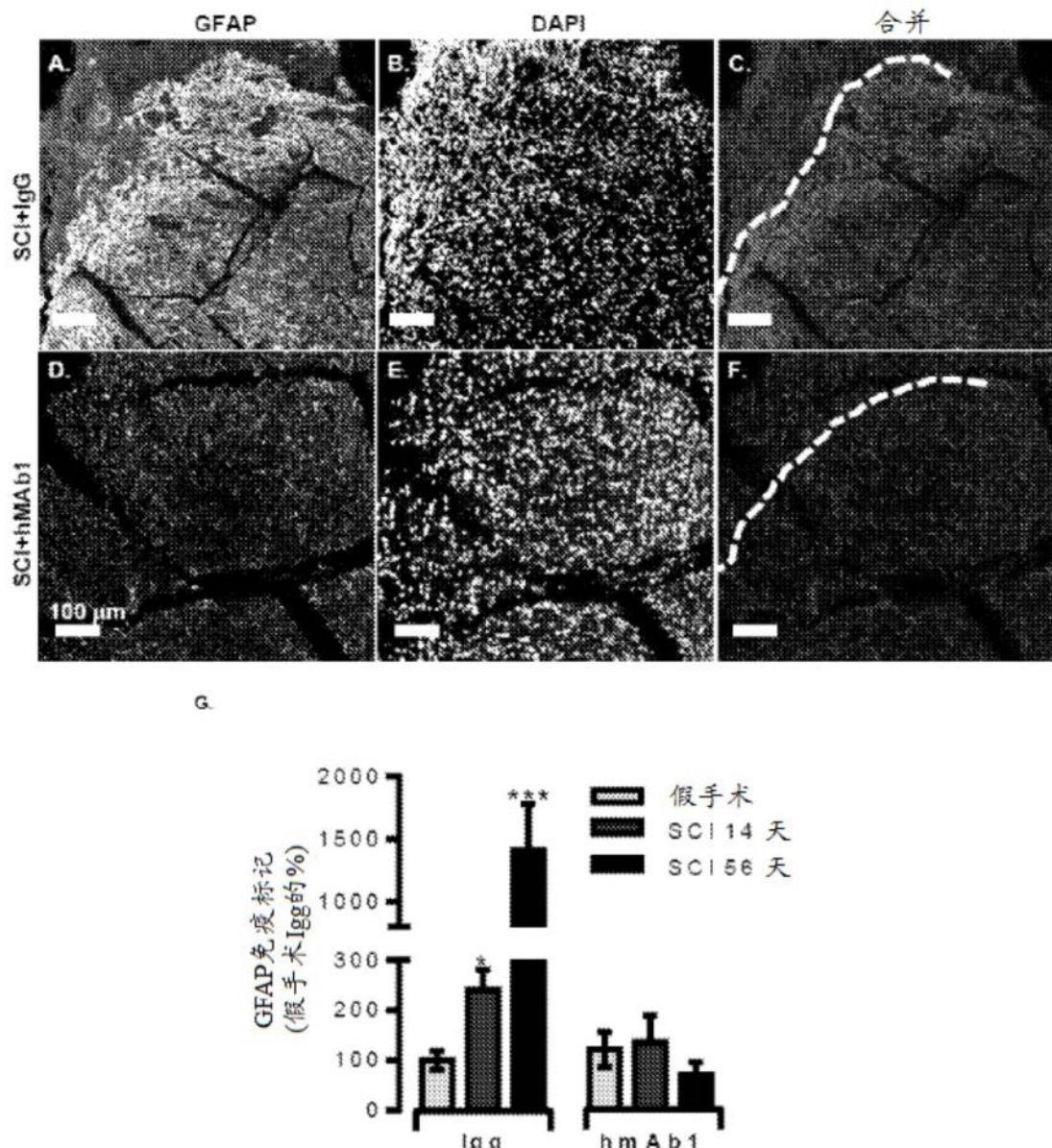


图3A-3G

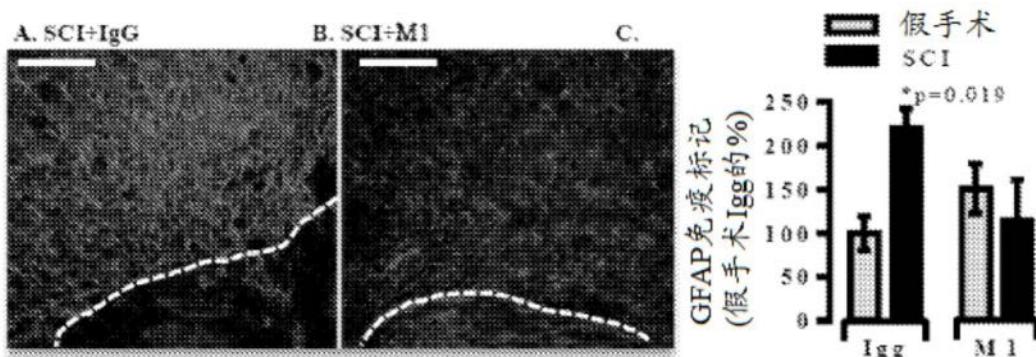


图4A-4C

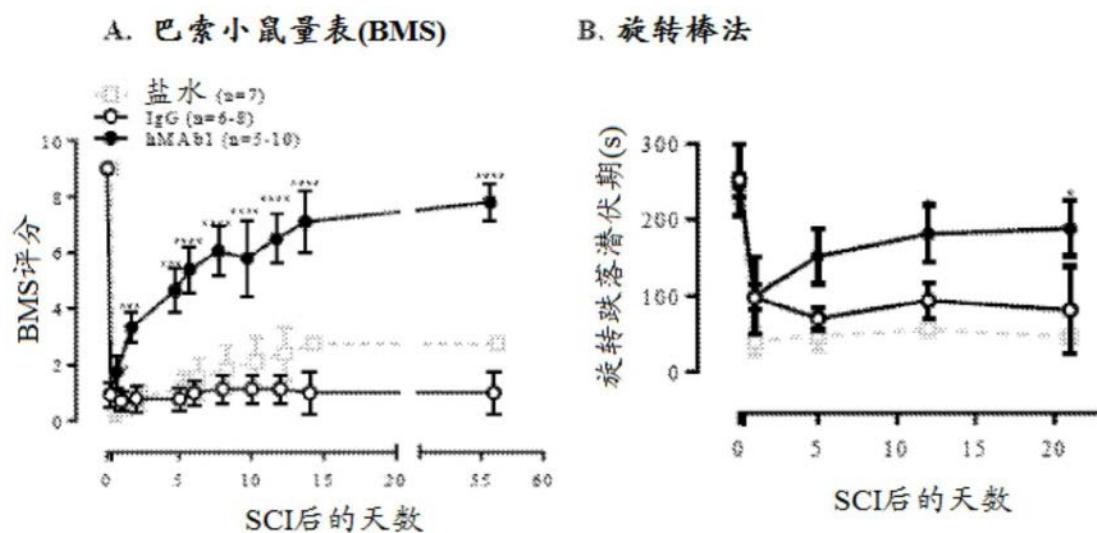


图5A-5B

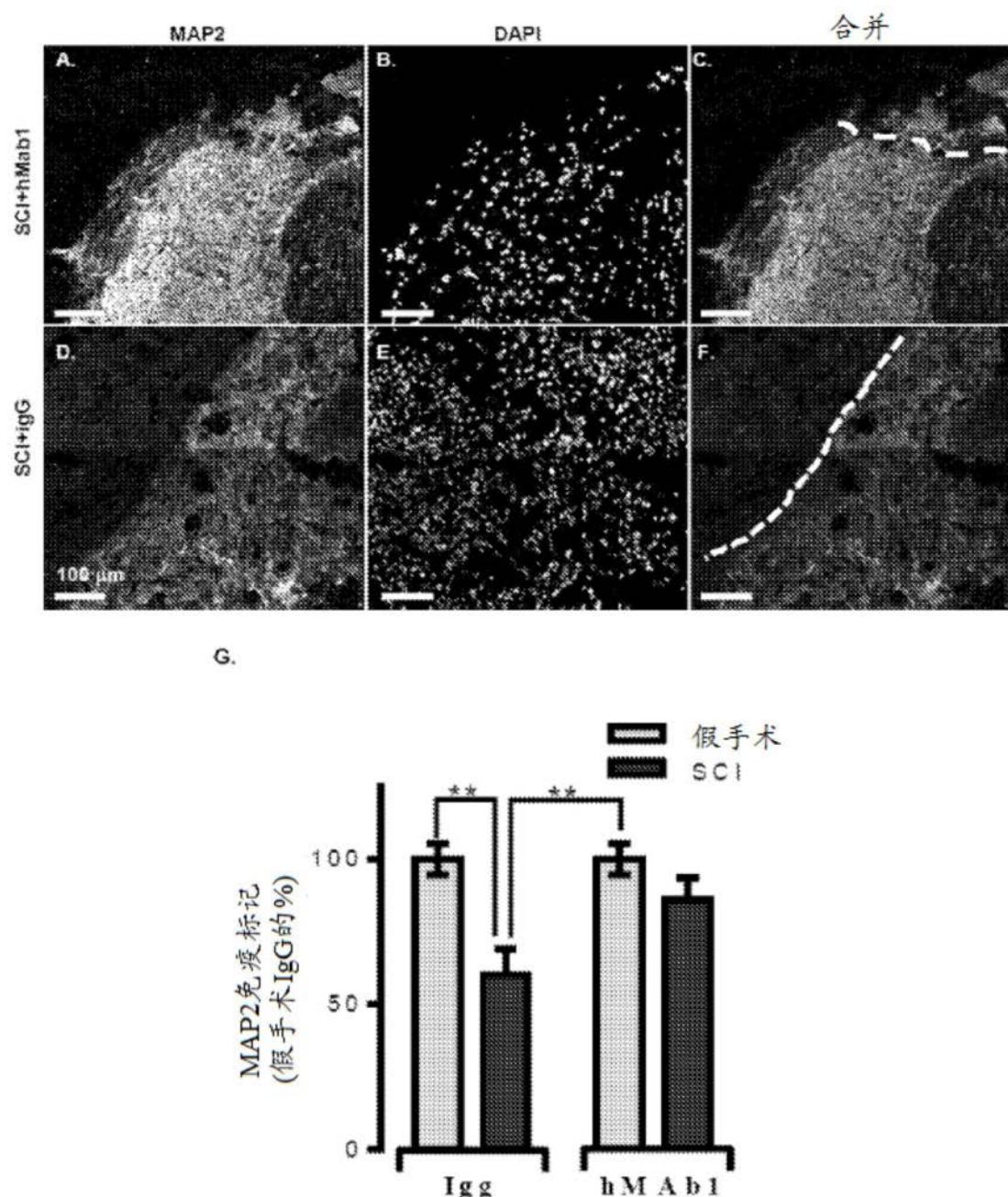


图6A-6G

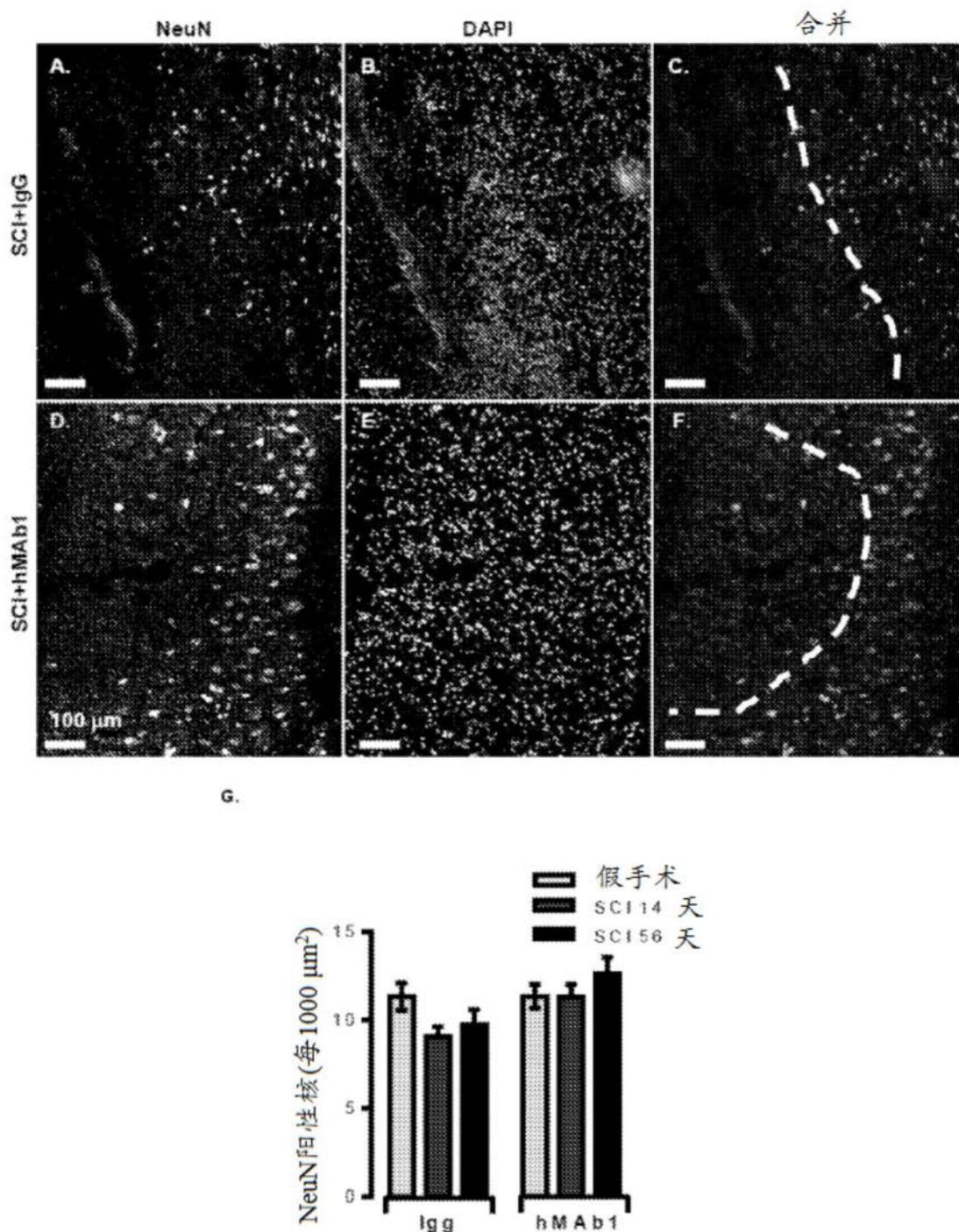


图7A-7G

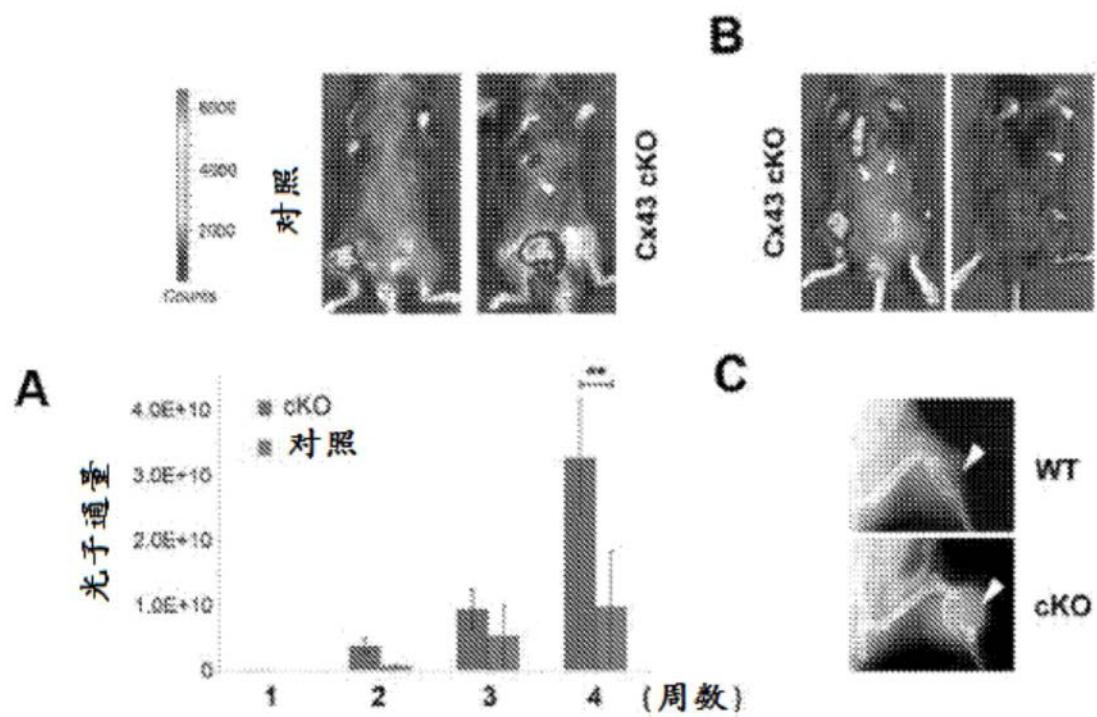


图8A-8C

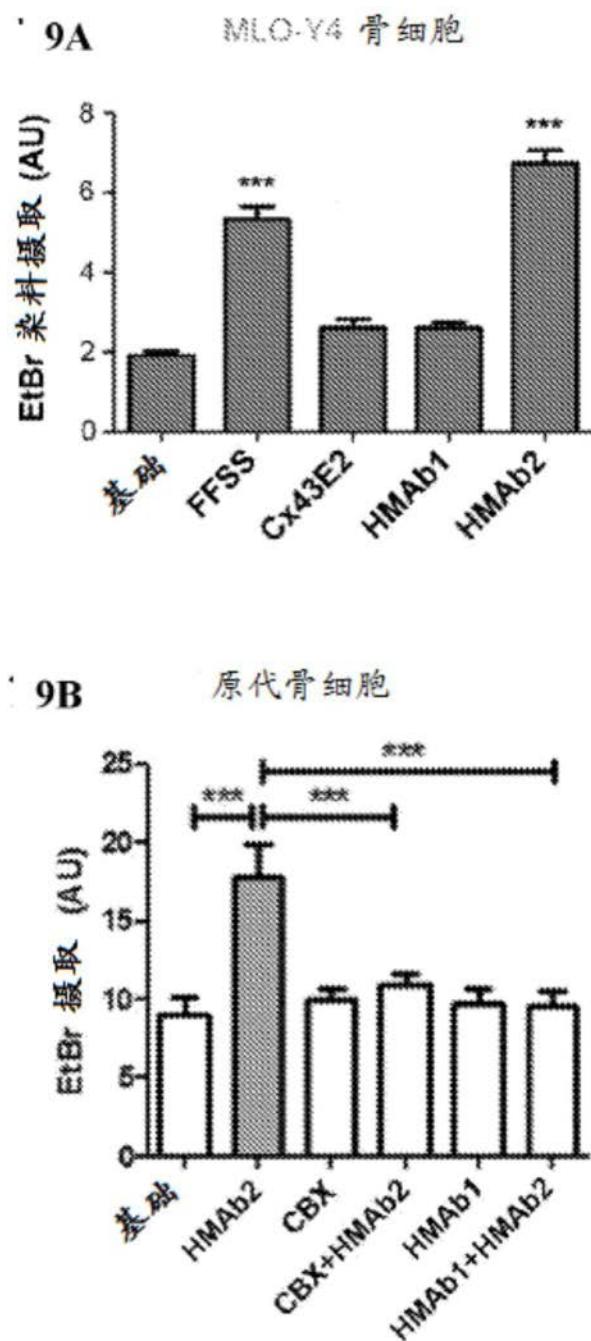


图9A-9B

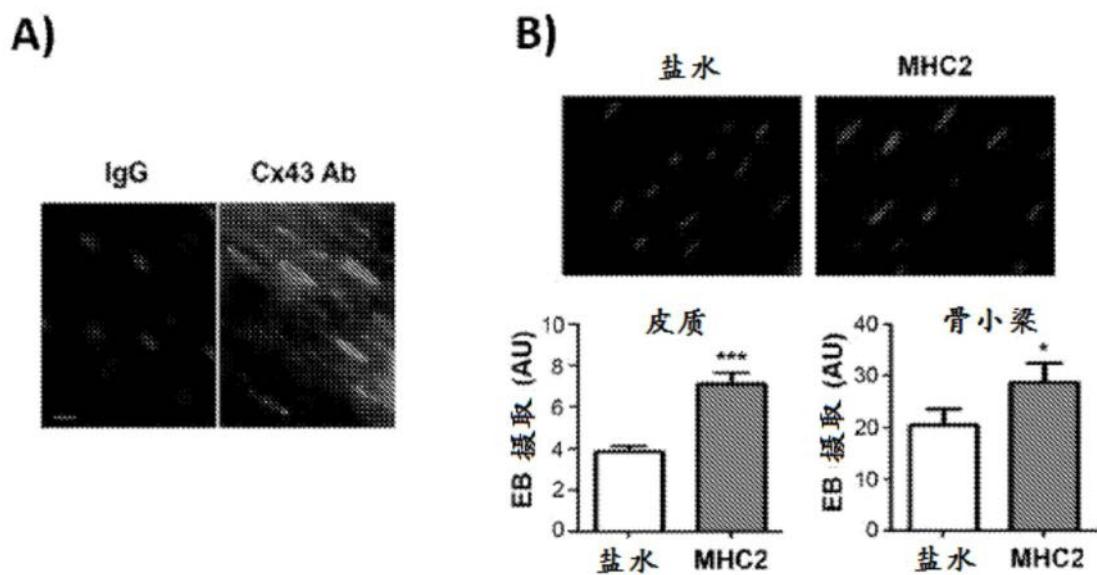


图10A-10B

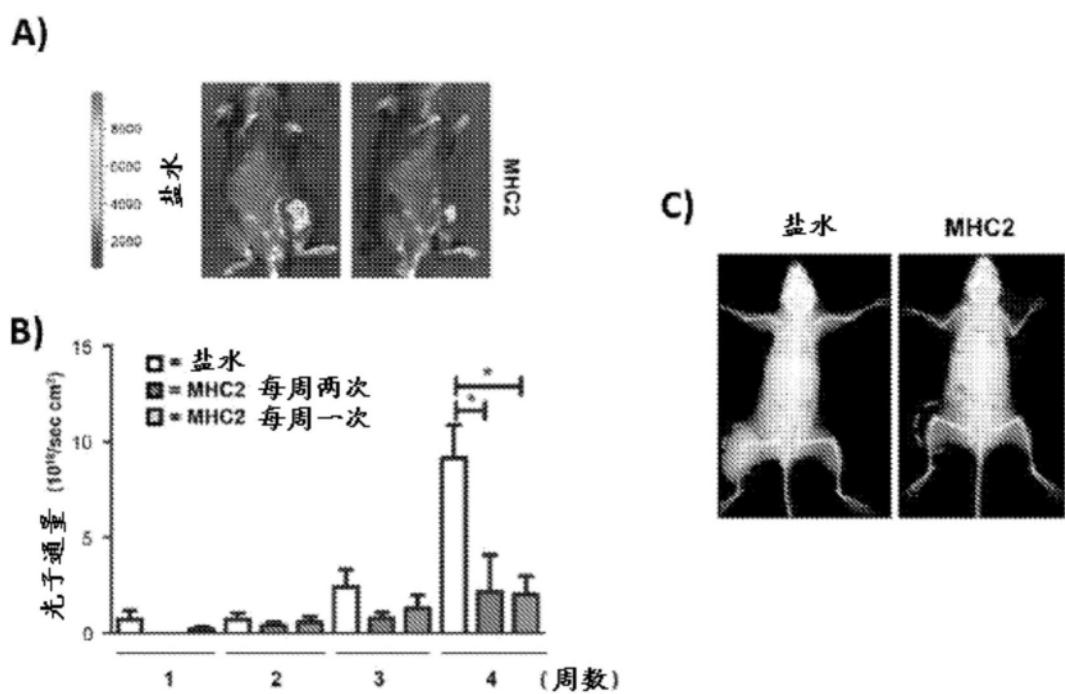


图11A-11B-11C

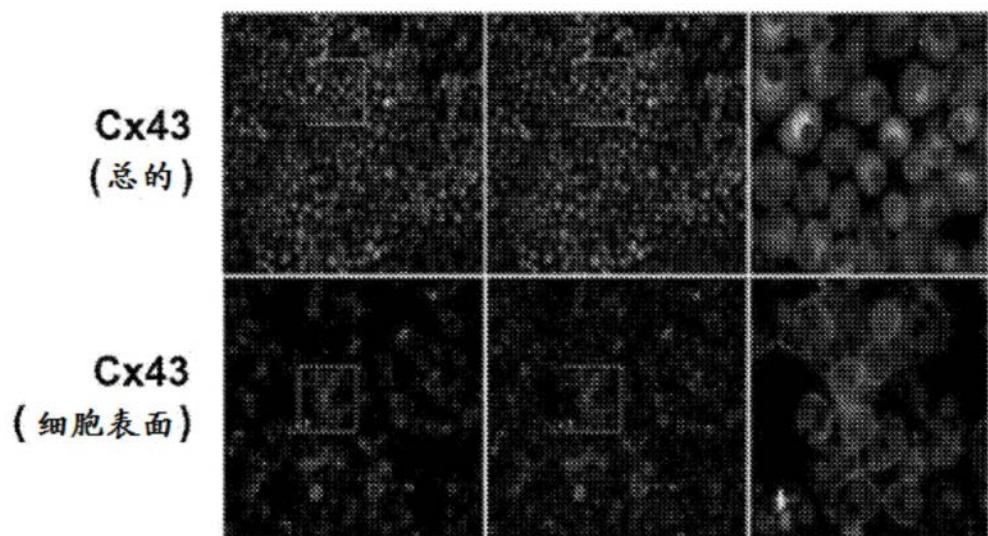


图12

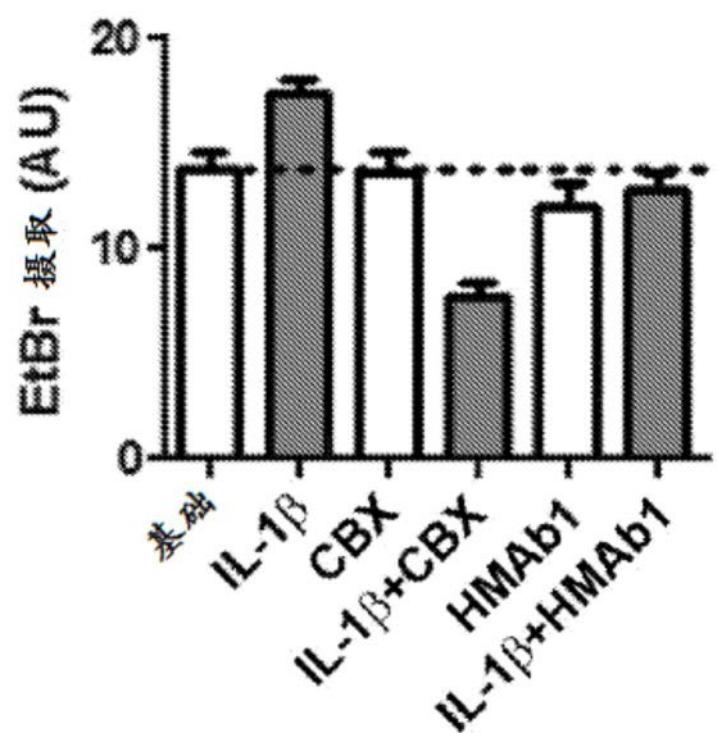


图13

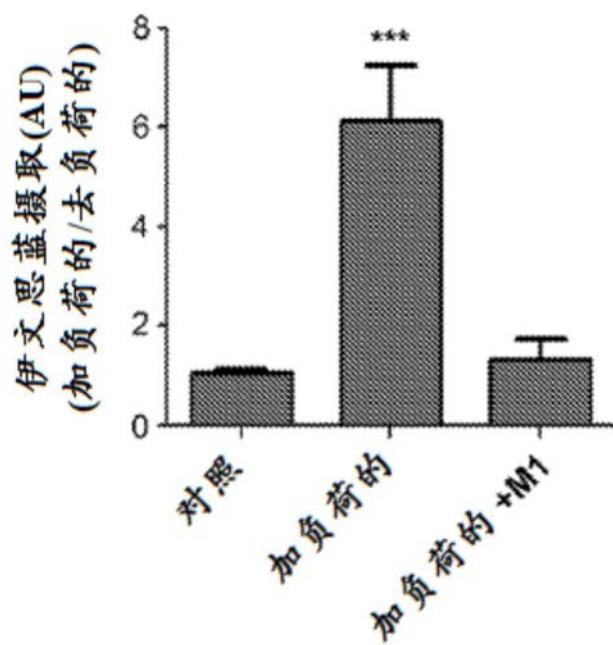


图14

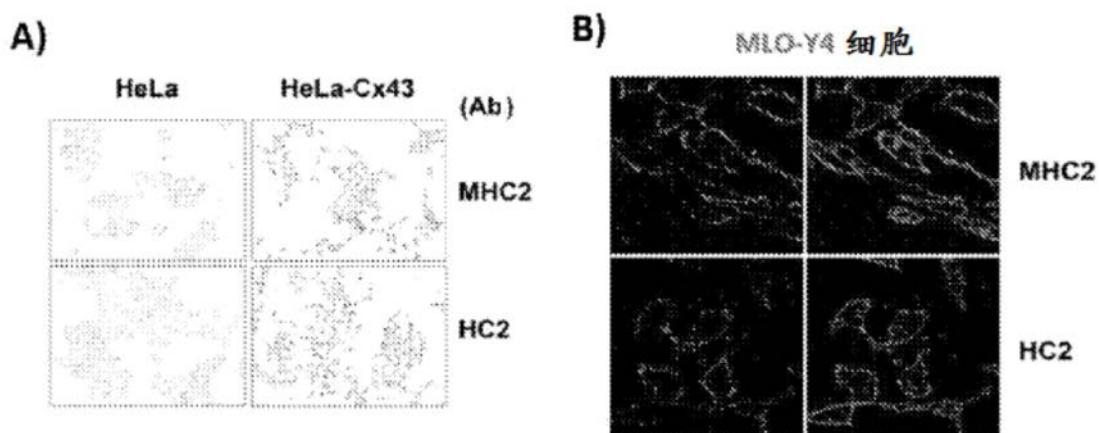


图15

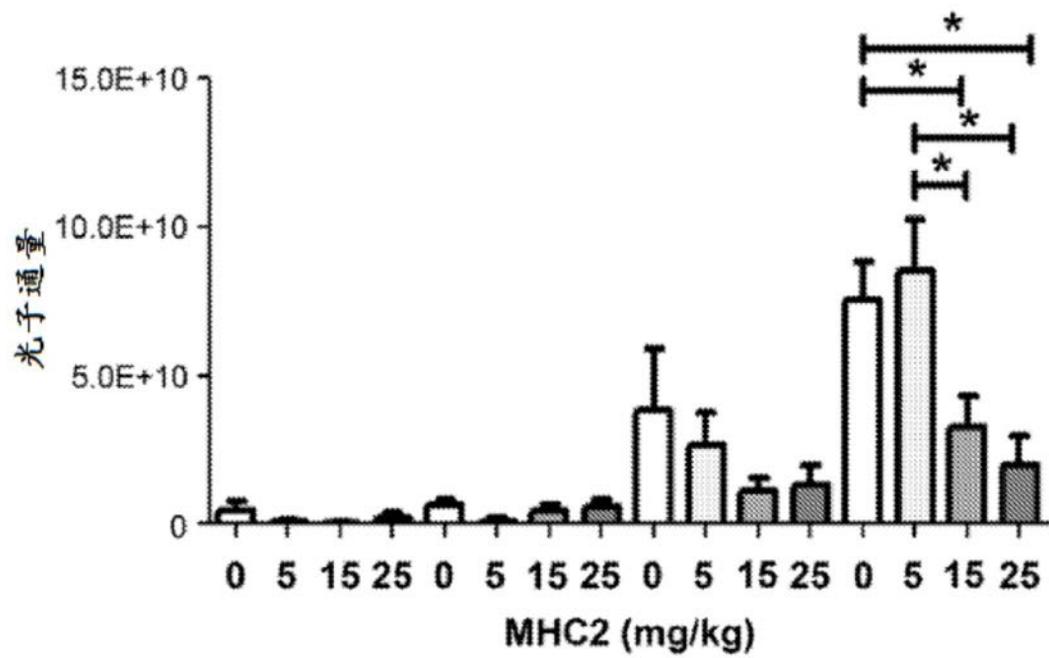


图16

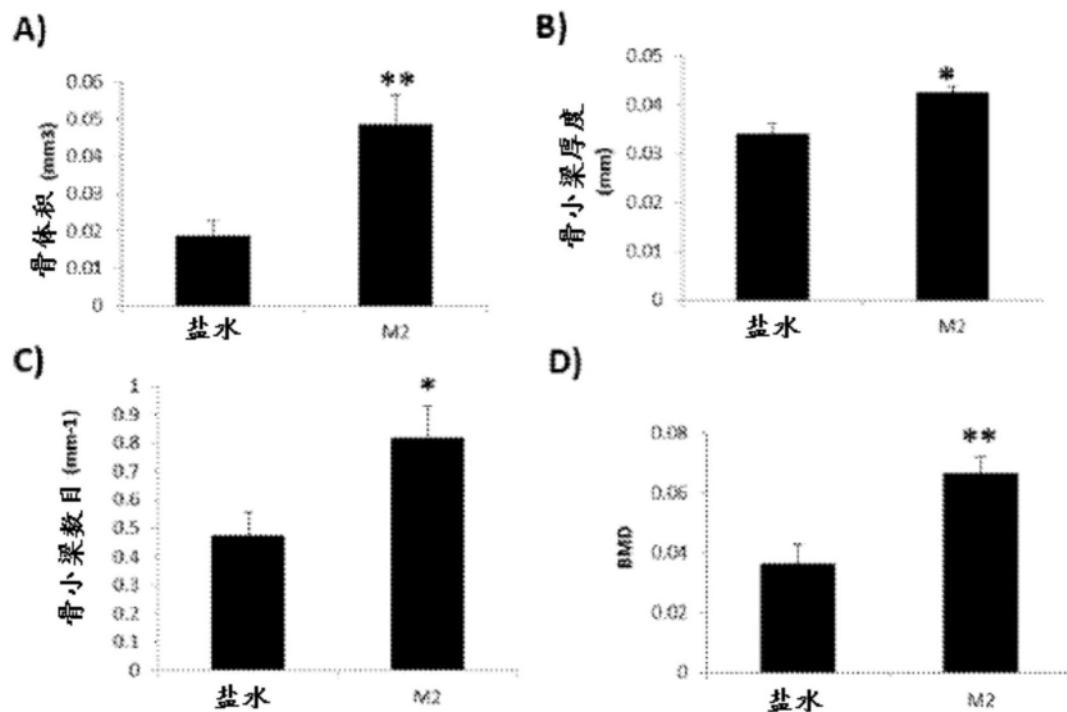


图17A-D

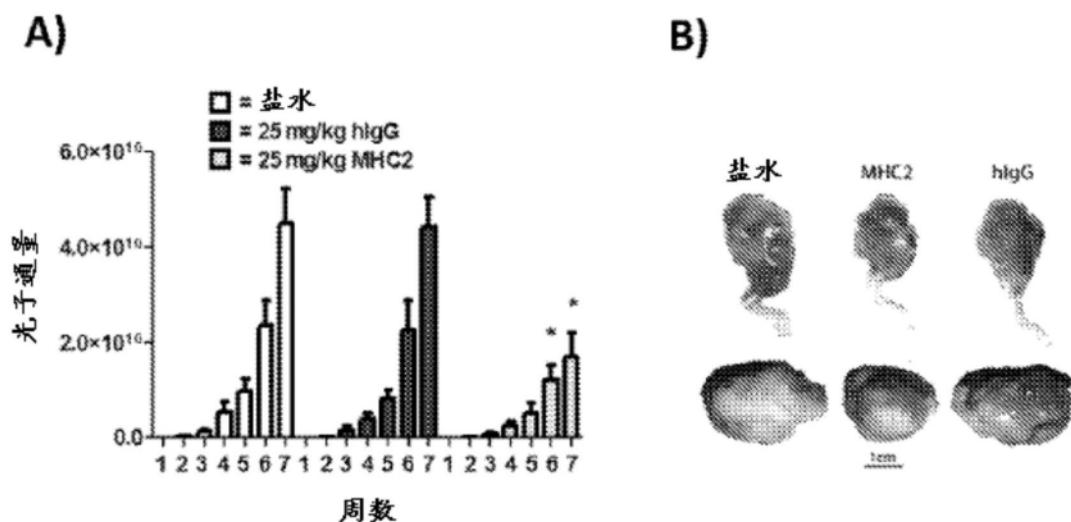


图18A-B

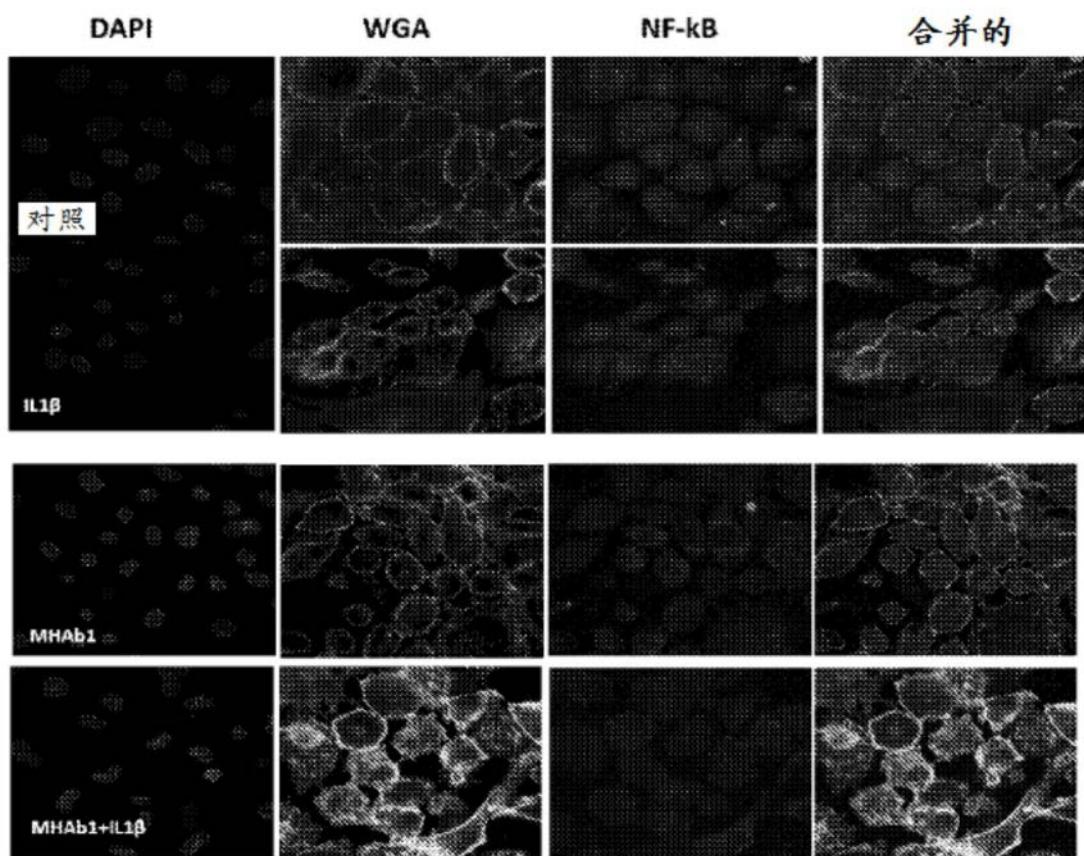


图19