

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580024914.0

[43] 公开日 2007 年 8 月 22 日

[11] 公开号 CN 101022830A

[22] 申请日 2005.5.25

[21] 申请号 200580024914.0

[30] 优先权

[32] 2004.5.25 [33] US [31] 60/573,896

[86] 国际申请 PCT/US2005/018322 2005.5.25

[87] 国际公布 WO2005/116077 英 2005.12.8

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.23

[71] 申请人 阿特努奥恩公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 格雷厄姆·C·帕里

安德鲁·P·马扎尔

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司
代理人 吴小瑛

权利要求书 8 页 说明书 51 页 序列表 5 页
附图 11 页

[54] 发明名称

抑制下游 u P A R 相互作用并结合了尿激酶类
纤溶酶原激活剂 (u P A) 与其受体 (u P A
R) 的复合物的配位体: 在诊断或治疗中的识
别和用途

[57] 摘要

对二元 uPA - uPAR 复合物、uPA - uPAR 的三元复合物、uPAR 与除如整合蛋白的 uPA 外的蛋白质的复合物特异的抗体或其它配位体, 抑制 uPA 和 uPAR 与其它的和复合物相互作用的分子相互作用。这样的抗体或其它配位体用于诊断和治疗方法中, 特别是用于抗肿瘤。

1. 与二元 uPA-uPAR 复合物结合的配位体，该配位体基本不能结合到 (i) 游离 uPA 或 (ii) 识别并与 uPA 结合的 uPAR 中的区域，因而配位体不能抑制 uPA-uPAR 结合。

2. 与 uPA-uPAR 和其它分子 X 的三元复合物结合的配位体，该配位体：(a) 结合到 uPA-uPAR-X 复合物，

(b) 基本不能结合到下面的任一个：

(i) uPA-uPAR 复合物，

(ii) uPA-X 复合物，

(iii) uPAR 中的 uPA 识别和 uPA 结合区，

(iv) X 中的 uPA 识别和 uPA 结合区，

(iv) 游离 uPA，或

(v) 游离 X，和

(c) 基本不能抑制 uPA-uPAR 结合或 uPA-X 结合。

3. 权利要求 2 的配位体，其中 X 是蛋白质 PAI-1。

4. 权利要求 1-3 中任一项的配位体，其中配位体基本不能与游离 uPAR 结合。

5. 权利要求 1-3 中任一项的配位体，其中配位体是多肽。

6. 权利要求 4 的配位体，其中配位体是多肽。

7. 权利要求 5 的配位体，其中配位体是抗体或其抗原结合片段。

8. 权利要求 6 的配位体，其中配位体是抗体或其抗原结合片段。

9. 权利要求 7 的抗体，其中抗体是 mAb。

10. 权利要求 8 的抗体，其中抗体是 mAb。

11. 权利要求 9 的抗体，其中抗体或抗原结合片段包括：

(a) 包括分别具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 5 的三个 CDR 的 V_L 链；和

(b) 包括分别具有氨基酸酸序列 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8 的三个 CDR 的 V_H 链。

12. 权利要求 9 的抗体，其中抗体或抗原结合片段包括

- (a) 具有序列 SEQ ID NO: 1 的 V_L 链; 和
 - (b) 具有序列 SEQ ID NO: 2 的 V_H 链。
13. 纯化的单克隆抗体或其抗原结合片段, 包括:
- (a) 具有序列 SEQ ID NO: 1 的 V_L 链; 和
 - (b) 具有序列 SEQ ID NO: 2 的 V_H 链。
14. 权利要求 9 的抗体, 其中抗体或抗原结合片段包括:
- (a) 包括分别具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 的三个 CDR 的 V_L 链; 和
 - (b) 包括分别具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 的三个 CDR 的 V_H 链。
15. 权利要求 9 的抗体, 其中抗体或抗原结合片段包括:
- (a) 具有序列 SEQ ID NO: 9 的 V_L 链; 和
 - (b) 具有序列 SEQ ID NO: 10 的 V_H 链。
16. 纯化的单克隆抗体或其抗原结合片段, 包括:
- (a) 具有序列 SEQ ID NO: 9 的 V_L 链; 和
 - (b) 具有序列 SEQ ID NO: 10 的 V_H 链。
17. 权利要求 7 的 mAb, 其中 mAb 选自如下构成的组:
- (a) 由具有 ATCC 登记号#_____的杂交瘤制备的命名为 ATN-615 的 mAb;
 - (b) 由具有 ATCC 登记号#_____的杂交瘤制备的命名为 ATN-658 的 mAb;
 - (c) 与 ATN-615 基本上具有相同抗原结合特征的 mAb; 和
 - (d) 与 ATN-658 基本上具有相同抗原结合特征的 mAb。
18. 权利要求 1 的配位体, 其抑制 uPA-uPAR 复合物与这些复合物的其它生物配位体相结合。
19. 权利要求 4 的配位体, 其抑制 uPA-uPAR 复合物与这些复合物的其它生物配位体相结合。
20. 权利要求 18 的配位体, 其中配位体是多肽。
21. 权利要求 15 的配位体, 其中配位体是多肽。
22. 权利要求 18 配位体, 其中其它生物配位体是整合蛋白。

23. 权利要求 22 的配位体，其中整合蛋白选自 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 5$ 、 $\alpha 3\beta 1$ 和 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 4\beta 1$ 构成的组。

24. 权利要求 2、18、20 或 23 的配位体，其中所述配位体干扰和抑制

(a) uPAR 介导的粘连蛋白的组合，(b) 粘连蛋白或其片段与整合蛋白 $\alpha 5\beta 1$ 的结合，或 (c) 玻连蛋白成分的组合。

25. 权利要求 1-3 中任一项的配位体，其中配位体

(a) 可被诊断性地可检测地标记；或

(b) 标记有、结合到或融合到治疗活性部分，使配位体表现出治疗活性。

26. 权利要求 4 的配位体，其中配位体

(a) 可被诊断性地可检测地标记；或

(b) 标记有、结合到或融合到治疗活性部分，使配位体表现出治疗活性。

27. 权利要求 5 的配位体，其中配位体

(a) 可被诊断性地可检测地标记；或

(b) 标记有、结合到或融合到治疗活性部分，使配位体表现出治疗活性。

28. 权利要求 7 的配位体，其中配位体

(a) 可被诊断性地可检测地标记；或

(b) 标记有、结合到或融合到治疗活性部分，使配位体表现出治疗活性。

29. 权利要求 9 的配位体，其中配位体

(a) 可被诊断性地可检测地标记；或

(b) 标记有、结合到或融合到治疗活性部分，使配位体表现出治疗活性。

30. 权利要求 11 的配位体，其中配位体

(a) 可被诊断性地可检测地标记；或

(b) 标记有、结合到或融合到治疗活性部分，使配位体表现出治疗活性。

31. 权利要求 12 的配位体，其中配位体

(a) 可被诊断性地可检测地标记；或

(b) 标记有、结合到或融合到治疗活性部分，使配位体表现出治疗活性。

32. 权利要求 13 的配位体，其中配位体

(a) 可被诊断性地可检测地标记；或

(b) 标记有、结合到或融合到治疗活性部分，使配位体表现出治疗活性。

33. 权利要求 14 的配位体，其中配位体

(a) 可被诊断性地可检测地标记；或

(b) 标记有、结合到或融合到治疗活性部分，使配位体表现出治疗活性。

34. 权利要求 15 的配位体，其中配位体

(a) 可被诊断性地可检测地标记；或

(b) 标记有、结合到或融合到治疗活性部分，使配位体表现出治疗活性。

35. 权利要求 16 的配位体，其中配位体

(a) 可被诊断性地可检测地标记；或

(b) 标记有、结合到或融合到治疗活性部分，使配位体表现出治疗活性。

36. 权利要求 17 的配位体，其中配位体

(a) 可被诊断性地可检测地标记；或

(b) 标记有、结合到或融合到治疗活性部分，使配位体表现出治疗活性。

37. 诊断组合物，其包括：

(a) 权利要求 25 的标记的配位体；和

(b) 诊断可接受的载体。

38. 权利要求 37 的组合物，其中配位体用放射性核素、PET-可成像试剂、MRI-可成像试剂、荧光增白剂、荧光团、发色团、色原体、发磷光剂、化学发光剂或生物发光剂标记。

39. 权利要求 38 的组合物，其中标记物是放射性核素，其选自 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{89}Zr 、 ^{97}Ru 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{169}Yb 、和 ^{201}Tl 构成的组。

40. 权利要求 38 的组合物，其中标记物是荧光增白剂或荧光团，其选自荧光素、碱性蕊香红、丹酰、藻红蛋白、藻青蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛、荧光胺、荧光素衍生物、俄勒冈绿、若丹明绿、对甲氨基酚绿和得克萨斯红组成的组。

41. 治疗性抗血管发生或抗肿瘤的药物组合物，其中该组合物抑制不受欢迎的血管发生、肿瘤生长和/或肿瘤转移，包括：

(a) 有效量的权利要求 25 的治疗活性配位体；和

(b) 药物可接受的载体。

42. 权利要求 41 的治疗性药物组合物，其形式适于注射。

43. 权利要求 41 的治疗性药物组合物，其中治疗活性部分直接结合到或

间接连接到配位体上。

44. 权利要求 41 的治疗性药物组合物，其中治疗活性部分是化疗药物、毒素或治疗性放射性核素。

45. 权利要求 44 的治疗性药物组合物，其中放射性核素选自 ^{47}Sc 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{109}Pd 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 和 ^{217}Bi 组成的组。

46. 权利要求 41 的治疗性药物组合物，其中治疗活性部分是融合到所述配位体的肽或多肽。

47. 权利要求 46 的治疗性药物组合物，其中所融合的肽或多肽是毒素。

48. 抑制细胞迁移、细胞浸润、细胞增殖或血管发生、或诱导凋亡的方法，包括用有效量的权利要求 25 的治疗活性配位体接触与不受欢迎的细胞浸润、扩散、增殖或血管发生相关的细胞。

49. 治疗患有不受欢迎的血管发生、肿瘤生长和/或肿瘤转移为特征的疾病、紊乱或病症的患者的方法，包括将有效量的权利要求 41 的治疗药物组合物施用于该患者。

50. 检测样品中具有权利要求1的配位体的结合特性的待检物质的分析方法，包括

(a) 用 uPA-uPAR 复合物接触样品，然后检测样品成分与复合物的结合；

(b) 用游离 uPAR 接触样品，然后检测所述样品成分与 uPAR 的结合。

(c) 对比 (a) 和 (b) 的结合，

其中在 (a) 中存在结合而在 (b) 中基本不存在结合或有明显低的结合，则表示在样品中存在所述物质。

51. 权利要求 50 的方法，其中待检配位体基本不能结合到游离 uPAR。

52. 权利要求 50 的方法，其中待检配位体是多肽。

53. 权利要求 50 的方法，其中待检配位体是抗体或其抗原结合片段。

54. 权利要求 50 的方法，其中所述分析是定向结合分析。

55. 权利要求 50 的方法，其中所述分析是结合到 uPA-uPAR 复合物的标记结合伴侣的竞争结合分析，其中样品中的物质与结合伴侣竞争结合。

56. 检测样品中具有权利要求 2-3 任一项的配位体的结合特性的待检物质的分析方法，包括

(a) 用 uPA-uPAR-X 复合物接触样品，然后检测样品的成分与复合物的

结合;

(b) 用一到多个:

(i) uPA:X 复合物

(ii) uPA-uPAR 复合物或

(iii) 非复合的 X,

接触样品, 然后检测所述样品的成分与 uPA-X、uPA-uPAR 或 X 的结合。

(c) 对比 (a) 和 (b) 的结合,

其中在 (a) 中存在结合而在 (b) 中基本不存在结合或有明显低的结合, 则表示在样品中存在所述物质。

57. 权利要求 56 的方法, 其中所述复合物位于细胞表面。

58. 权利要求 56 的方法, 其中所述复合物位于细胞表面。

59. 识别抗体或其它配位体的分析方法, 所述抗体或其它配位体结合到 mAb ATN-615 或 mAb ATN-658 所结合的相同表位上, 该方法包括检测包含抗体或其它配位体的待检样品竞争性抑制可检测出的被标记的 ATN-615 或 ATN-658 结合到如下的物质的能力:

(i) 固定化 suPAR,

(ii) 固定化 suPAR D2D3 域, 或

(iii) 固定化 suPAR 的片段或 suPAR 的 D2D3,

其中至少约 20% 的竞争性抑制表明抗体或配位体结合到所述相同表位上。

60. 识别肽的方法, 该肽被 (a) mAb ATN-615、(b) mAb ATN-658 或 (c) 具有 mAb ATN-615 或 mAb ATN-658 结合特异性的抗体或其它配位体识别, 所述方法包括检测包含所述肽或候选肽的待检样品竞争性抑制可检测出的标记的 mAb ATN-615 或 mAb ATN-658 或具有相同的结合特异性的所述抗体或其它的配位体结合到如下物质的能力:

(i) 固定化 suPAR,

(ii) 固定化 suPAR D2D3, 或

(iii) 固定化 suPAR 或 D2D3 的片段,

其中至少约 20% 的竞争性抑制表明肽具有所述的结合特异性。

61. 用于筛选化合物或确定候选化合物是否具有如与 ATN-615 或 ATN-658 相同的结合到 uPAR 结构的特征的分析方法, 该分析方法包括测量筛

选样品或候选化合物竞争性抑制可检测出标记 ATN-615 或 ATN-658 结合到如下物质的能力：

- (i) 固定化 suPAR,
- (ii) 固定化 suPAR D2D3, 或
- (iii) suPAR 的或 D2D3 的固定化片段,

其中至少约 20% 的竞争性抑制显示化合物具有所述结合特征。

62. 权利要求 61 的分析方法, 其中被筛选的化合物或候选化合物是具有分子量为约 50Da 至约 2500Da 的有机小分子。

63. 权利要求 61 的分析方法, 其中被筛选的化合物或候选化合物是核酸分子。

64. 权利要求 63 的方法, 其中核酸分子是寡核苷酸。

65. 权利要求 64 的方法, 其中寡核苷酸是 RNAi 分子或短核酸。

66. 含至少 3 个氨基酸的分离肽, 其中当肽为较长氨基酸序列的一部分时, 其位于 mAb 结合的线性表位中, mAb 具有如下特征:

(a) 包括分别具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 5 的三个 CDR 的 V_L 链; 和

(b) 包括分别具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8 的三个 CDR 的 V_H 链。

67. 含至少 3 个氨基酸的分离肽, 其中当肽为较长氨基酸序列的一部分时, 其位于 mAb 结合的线性表位中, mAb 具有如下特征:

(a) 具有序列 SEQ ID NO: 1 的 V_L 链; 和

(b) 具有序列 SEQ ID NO: 2 的 V_H 链。

68. 含至少 3 个氨基酸的分离肽, 其中当肽为较长氨基酸序列的一部分时, 其位于 mAb 结合的线性表位中, mAb 具有如下特征:

(a) 包括分别具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 的三个 CDR 的 V_L 链; 和

(b) 包括分别具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 的三个 CDR 的 V_H 链。

69. 含至少 3 个氨基酸的分离肽, 其中当肽为较长氨基酸序列的一部分时, 其位于 mAb 结合的线性表位中, mAb 具有如下特征:

(a) 具有序列 SEQ ID NO: 9 的 V_L 链; 和

(b) 具有序列 SEQ ID NO: 10 的 V_H 链。

70. 含至少 3 个氨基酸的分离肽, 其中当肽为较长氨基酸序列的一部分时, 其位于如下抗体识别的线性表位中:

(a) 由具有 ATCC 登记号#_____的杂交瘤制备的命名为 ATN-658 的 mAb, 或

(b) 与 ATN-658 基本上具有相同抗原结合特征的 mAb。

71. 含至少 3 个氨基酸的分离肽, 其中当肽为较长氨基酸序列的一部分时, 其位于由 mAb ATN-615 识别的线性表位中。

(a) 由具有 ATCC 登记号#_____的杂交瘤制备的命名为 ATN-615 的 mAb; 或

(b) 与 ATN-658 基本上具有相同抗原结合特征的 mAb。

抑制下游uPAR相互作用并结合了尿激酶类纤溶酶原激活剂（uPA）与其受体（uPAR）的复合物的配位体：在诊断或治疗中的识别和用途

背景技术

技术领域

本发明属于生物化学、免疫学和医学领域，涉及对（a）二元uPA-uPAR复合物、（b）包括uPA-uPAR的三元复合物和（c）uPAR与除如整合蛋白的uPA之外的蛋白质的复合物特异性的抗体（“Abs”）或其它配位体。这些Abs或非Ab配位体抑制uPA和uPAR与其它的与上面复合物相互作用的分子相互作用。这样的Abs或其它的非Ab配位体用于诊断和治疗方法中，特别是用于抗肿瘤。

背景技术

体外和体内的研究的重要身体证据证实尿激酶纤溶酶原激活剂系统对转移过程是重要的，并且将其视为对发展肿瘤药物有希望的目标（Mazar, AP et al. (1999) Angiogenesis 3: 15-32）。除uPA之外，它的细胞表面受体（uPAR）是设计和发展肿瘤治疗和诊断试剂的适当目标（Mazar, AP (2001) Anti-Cancer Drugs 12: 397-400），因为：

（a）uPAR选择性地在转移性肿瘤细胞和血管内皮细胞（“Ecs”）上表达，但在其它细胞上不表达；

（b）uPAR在多个转移所需的细胞外和细胞内途径中uPAR是重要的参与物质，所述途径是目前药物发展积极努力的目标；和

（c）有可能干涉uPA途径中的几个不同位点。

这样，uPA和uPAR是发展有益地抗多种不同类型的肿瘤/癌症的诊断和治疗方法的有希望的目标。

uPA/uPAR系统和肿瘤

转移和血管发生共有许多功能性特征，表现为肿瘤细胞和ECs的扩散和迁移过程中。这些特征包括（1）蛋白酶和整合蛋白表达的上调节，（2）细胞-细胞和细胞-基质接触的丢失，（3）增加对生长和分化因子的响应，和（4）重

塑细胞外基质（ECM）和基膜（BasM）。所有这些都有助于肿瘤发展。

uPA“系统”包括丝氨酸蛋白酶uPA、它的受体uPAR和它的特异性丝氨酸蛋白酶抑制剂、纤溶酶原激活剂抑制剂类型1（PAI-1），并在这些活动中起重要作用。该系统的活性造成：

（1）启动导致纤溶酶原活化作用的级联反应，活化多个前体金属蛋白酶（proMMPs），

（2）释放和加工潜在生长因子如纤维原细胞生长因子-2（FGF-2）、血管内皮生长因子（VEGF）、肝细胞生长因子（HGF）和转化生长因子- β （TGF β ），

（3）（a）与ECM的成分如玻连蛋白（Vn）和纤连蛋白相互作用，

（b）与多个整合蛋白包括 $\alpha 5 \beta 1$ 和 $\alpha v \beta 3$ 直接相互作用，和

（c）改造BasM和ECM以促进细胞移动。

进一步，uPA系统可以同时启动定位纤维蛋白的周转，该周转在血管发生中起到重要作用。

uPA和uPAR的表达已经在多数肿瘤类型包括恶性胶质瘤、前列腺、乳腺、结肠、肝细胞、和肾细胞癌中得到证实（Mizukami IF et al. (1994) Clin Immunol and Immunopathol 71:96-104; Hsu DW et al., (1995) Am J Pathol 147: 114-23; de Witte JH et al. (1999) Br J Cancer 79:1190-8）。uPA和uPAR在扩散更快的疾病中表达更明显。在肿瘤细胞上，这些表达在肿瘤扩散的前期经常达到最高点（Buo, L et al., (1995) Human Pathol 26:1133-1138; Yamamoto M et al. (1994) Cancer Res 54:5016-5020）。已经报道在乳腺、结肠、和肾细胞癌相关的血管中的uPAR的强免疫组织化学着色（Bastholm L et al. Appl Immunohistochem Mol Morphol 7: 39-47; Nakata S et al. (1998) Int. J. Cancer 79:179-186）。结肠癌研究表明，uPAR与VEGF共存。uPA和uPAR的表达也已经在多个肿瘤类型中与巨噬细胞相关的肿瘤上发现（Ohtani H et al. (1995) Int J Cancer 62: 691-6; Xu Y et al. (1997) Hum Pathol 28:206-13）。uPA对单核细胞是趋化性的并同时介导这些细胞的粘附和迁移。粘附和迁移仅需要uPAR存在而不需要uPA的催化活性。这样，相信uPA系统通过作用于多种与肿瘤相关的细胞类型有助于肿瘤研究的发展。

近期的研究已经评价了在同源系统中抑制uPA结合到uPAR的治疗潜力。将编码uPA的小鼠氨基末端片段（缩写“ATF”—为含有uPAR结合区域的uPA结构域）的腺病毒直接递送入肿瘤导致了（a）抑制新生血管和（b）阻止肿瘤生长

(Li H et al. (1998) *Gene Ther* 5: 1105-1113)。由于种的“特异性”，小鼠ATF仅与鼠宿主的ECs和白细胞结合，而不与人肿瘤细胞结合。这显示肿瘤抑制是通过抑制宿主血管发生生成反应来介导的。后来，本发明和S.Rabbani和J.Gladu最近的合作研究证明培育的抗大鼠的uPAR的100残基片段的多克隆Ab选择性地定位到大鼠乳腺肿瘤，该肿瘤生长于Mat BIII细胞系中的细胞(Rabbani SA et al. (2002) *Cancer Res* 62: 2390-97)。这些多克隆抗体能够完全抑制肿瘤生长使肿瘤消退。

然而尽管要将uPA系统定向于治疗和诊断目的，研究结果并没有研发出适于临床的试剂。小分子方法已经受到如下方面的妨碍：(1) 难于有效地抑制蛋白质-蛋白质相互作用（例如，uPA-uPAR或uPAR-整合蛋白），和(2) 缺少适当的先例和经得起药物化学检验的结构信息。一些有效的uPA-uPAR相互作用的肽抑制剂已经确定，但它们的肽药理学特性很差，并且还没有证明具有甚至细胞水平所需的活性水平(Ploug M et al. (2001) *Biochemistry* 40:12157-68)。

发明内容

本发明制备了一组结合到uPA-uPAR复合物并抑制它们与下游目标如整合蛋白相互作用的单克隆抗体(mAbs)。该抑制能够抑制肿瘤生长和转移。这些mAbs可以具有如“裸”抗体的效用，同时将治疗试剂和成像试剂靶向肿瘤。靶向uPAR的几种抗体在肿瘤生长的动物模型中是有效的(A2780卵巢癌模型和A549肺癌模型)。由这些mAbs识别的表位是uPAR内的肽区。因此对应于这些区或从其而来的uPAR肽可用作uPAR与下游蛋白质相互作用的对抗剂。

在细胞迁移和扩散的过程中，恶性肿瘤细胞和血管发生生成ECs获得选择性优势是常见的。这些优势导致至少部分uPAR分子在细胞表面的表达，并且这些uPAR分子通过结合内源性产生的配位体uPA达到饱和。

这样，靶向和优选抑制uPA-uPAR与下游目标相互作用的mAbs、肽或其它的化学实体对治疗和/或诊断肿瘤很有用。优选的uPA-uPAR或单独的uPAR的下游配位体包括整合蛋白、低密度脂蛋白受体相关蛋白质(LRP)和其它的结合伴侣。其中的一些下游配位体可以介导细胞信号传导、迁移和/或扩散。

本发明已经制备和研究了2个mAbs、ATN-615和ATN-658，它们特异地结合配位体占位的uPAR并因此用作不管配位体是否存在仍可以结合uPAR的示

例分子。mAbs可以同时检测肿瘤或其它的疾病组织中的占位和未占位的uPAR, 在其中uPA系统在病理学中起到重要作用。优选的Abs或其它的非Ab配位体不能结合到uPAR的uPA结合位点。

本发明确定了这些Abs结合的表位。保留这些表位3D结构的这些肽或天然或合成肽或肽衍生物, 对用作治疗和/或诊断试剂很有用。基于这些表位而确定的多个肽序列在此公开。

另外, 本发明已经研究出模拟ATN-615和ATN-658特征来鉴别Abs的方法。该方法可以用于开发识别并结合到相同的如ATN-615和ATN-658结合的表位的人源化或完全人mAbs。这样, ATN-615和ATN-658的仿制品, 尤其是后者具有很强的抗肿瘤活性, 包括在本发明中用作治疗和/或诊断试剂。

本发明进一步涉及高分子, 包括Abs、如单链Abs=(scFv)的抗原结合片段、非-Ab的多肽和肽、短核酸(aptamer)等, 以及有机小分子, 它们都具有结合uPAR但不抑制结合uPA的性质。其中一些分子干扰uPA-uPAR或者单独uPAR的下游相互作用。

除了靶向uPA-uPAR相互作用的特异性组合物外, 本发明还涉及检测专一地结合到uPA-uPAR或抑制uPAR的下游相互作用的Abs的方法。因而本发明包括鉴别这些uPA-uPAR复合物结合分子的方法。该方法也可以经改变以检测结合其它成分或uPA/uPAR系统复合物的分子。例如, 结合到本身天然抑制剂PAI-1的uPA也与uPAR结合, 这样形成uPA: PAI-1/uPAR三元复合物。本发明的一个方法包括利用这种三元复合物筛选仅与该复合物相互作用但不与二元uPA: PAI或uPA-uPAR复合物相互作用的配位体。另一个方法涉及干扰三元复合物与下游目标例如LRP相互作用的抑制剂。

该方法适于鉴别当结合到复合物时内在化的配位体分子。

另外, 本发明包括检测结合到uPA-uPAR复合物(但不结合到非组合的uPA或uPAR)的分子的方法或检测干扰uPA-uPAR或uPAR结合到下游目标以及结合配位体本身的抑制剂的方法。该结合物可以是Abs、其它的蛋白质、肽、短核酸、小分子等。该类型的特定实施方案可以是干扰uPAR介导Fn的组合的或是妨碍Fn或Fn片段结合到整合蛋白如 $\alpha_5\beta_1$ 的uPA-uPAR或uPAR配位体。其它的基质成分(例如玻连蛋白)的组合变体也包含在本发明中。

本发明还涉及鉴定纤溶酶原活化作用的抑制剂的方法, 该抑制剂不抑制

uPA催化活性和具有该活性的新组合物。

更特别地，本发明涉及结合到二元uPA-uPAR复合物的配位体，配位体不能充分地结合到（a）游离的uPA或（b）识别并结合到uPA的uPAR的区域，这样配位体不能抑制uPA-uPAR结合。

另一项实施方案包括结合到uPA-uPAR和一个额外的分子（X）的三元复合物的配位体，例如PAI-1，该配位体：（a）结合到uPA-uPAR-X复合物，

（b）不能充分地结合到下面的的任一个：（i）uPA-uPAR复合物，（ii）uPA-X复合物，（iii）uPAR或X的uPA识别和结合区，（iv）游离uPA，或（v）游离X；和

（c）不能充分地抑制uPA-uPAR结合或uPA-X结合。

优选地，以上所述配位体不能充分地结合到游离uPAR。

以上所述配位体可以是多肽，优选为Ab，例如mAb，或其抗原结合片段。优选的mAbs是人源化嵌合的或人mAbs。

在一个实施方案中，优选mAb或抗原结合片段包括：

（a）包括分别具有氨基酸序列SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4和SEQ ID NO: 5的三个CDR的V_L链；和

（b）包括分别具有氨基酸序列SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7和SEQ ID NO: 8的三个CDR的V_H链。

更优选的mAb或抗原结合片段，如上所述，包括

（a）具有序列SEQ ID NO: 1的V_L链；和

（b）具有序列SEQ ID NO: 2的V_H链。

在另一个实施方案中，mAb或抗原结合片段包括：

（a）包括分别具有氨基酸序列SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 13的三个CDR的V_L链；和

（b）包括分别具有氨基酸序列SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15和SEQ ID NO: 16的三个CDR的V_H链。

更优选的mAb或抗原结合片段，如上面所述，包括：

（a）具有序列SEQ ID NO: 9的V_L链；和

（b）具有序列SEQ ID NO: 10的V_H链。

本发明的优选的Ab选自：（a）由ATCC登记号#_____的杂交瘤制备的命

名为ATN-615的mAb; (b) 由ATCC登记号#_____的杂交瘤制备的命名为ATN-658的mAb; (c) 与ATN-615基本上具有相同抗原结合特征的mAb; 和(d) 与ATN-658基本上具有相同抗原结合特征的mAb;

在一个实施方案中, 以上所述配位体是一种抑制uPA-uPAR复合物与这些复合物复合的其它的生物配位体结合的配位体。“其它生物配位体”的实例包括整合蛋白, 优选为 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 或 $\alpha_4\beta_1$ 。

以上所述配位体可以干扰和抑制(a) uPAR介导的Fn组合, (b) Fn或其片段结合到整合蛋白 $\alpha_5\beta_1$, 或(c) Vn成分的组合。

在优选的实施方案中, 以上所述配位体(a) 被诊断标记(用可检测出的标记); 或(b) 标记、结合到或融合到(在多肽的情况下) 治疗活性部分, 表现出配位体治疗活性。

本发明提供的诊断组合物包括(a) 如上所述的诊断标记配位体; 和(b) 可诊断接受的载体。

在诊断组合物中, 配位体优选用放射性核素、PET可成像剂、MRI可成像剂、荧光增白剂、荧光团(fluorogen)、发色团、色原体、发磷光剂、化学发光剂或生物发光剂标记。优选的放射性核素选自 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{89}Zr 、 ^{97}Ru 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{169}Yb 、和 ^{201}Tl 。优选的荧光增白剂或荧光团是荧光素、碱性蕊香红、丹酰、藻红蛋白、藻青蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛、荧光胺、荧光素衍生物、俄勒冈绿、若丹明绿、对甲氨基酚绿和得克萨斯红。

本发明提供了一种治疗抗血管发生生成或抗肿瘤药物组合物, 其能抑制不需要的血管发生、肿瘤生长和/或肿瘤转移, 包括(a) 有效量的以上所述治疗活性配位体, 和(b) 可药物接受的载体。该组合物优选为适于注射的形式。治疗活性部分可以是直接地结合到、或间接地结合到配位体。优选的治疗部分是化学治疗药物、毒素或治疗性放射性核素(优选 ^{47}Sc 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{109}Pd 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{199}Au 、 ^{121}At 、 ^{212}Pb 或 ^{217}Bi)。

在以上所述治疗组合物中, 治疗活性部分可以是融合到配位体的肽或多肽, 例如毒素。

本发明涉及一种抑制细胞迁移、细胞浸润、细胞增殖或血管发生, 或诱导细胞凋亡的方法, 包括用以上所述有效量的治疗活性配位体接触不需要的细胞

迁移相关的、扩散增殖或血管发生的细胞。

还包括的方法是治疗患有疾病、不需要的血管发生、肿瘤生长和/或肿瘤转移为特征的病症或状态的患者，包括将以上所述有效量的治疗药物组合物给药于患者。

还提供了一种分析方法，用于检测样品中的物质具有以上所述配位体结合特性，包括

- (a) 用uPA-uPAR复合物接触样品然后检测样品成分与复合物的结合；
- (b) 用游离uPAR接触样品然后检测样品成分与uPAR的结合；
- (c) 对比(a)和(b)的结合，

其中在(a)中存在结合和在(b)中基本缺乏或有显著低的结合表示在样品中存在本发明的物质。

分析可以是利用结合于uPA-uPAR复合物的标记结合伴侣的竞争结合分析，其中样品中的物质与结合伴侣竞争结合。

一个实施方案涉及一种分析方法，用于检测样品中的物质具有以上所述配位体结合特性，包括

(a) 用uPA-uPAR-X复合物(X如以上所定义)接触样品然后检测样品的成分与复合物的结合；

(b) 用一个或多个如下物质接触样品(i) uPA: X复合物；(ii) uPA-uPAR复合物；或(iii) 非复合的X，然后检测样品的成分与uPA-X、uPA-uPAR或X的结合；

- (c) 对比(a)和(b)的结合，

其中在(a)中存在结合和在(b)中基本缺乏或有显著低的结合表示在样品中存在本发明的物质。

在以上所述方法中，复合物可以在细胞表面。

本发明包括含至少3个氨基酸的分离肽，当肽为较长氨基酸序列的一部分时，位于mAb结合的线性表位中，其中mAb具有(a)包括分别具有氨基酸序列SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4和SEQ ID NO: 5的三个CDR的V_L链；和(b)包括分别具有氨基酸序列SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7和SEQ ID NO: 8的三个CDR的V_H链。如上述的优选分离肽位于mAb结合的线性表位，其中mAb具有(a)具有序列SEQ ID NO: 1的V_L链；和(b)具有序列SEQ ID NO: 2的

V_H链。

在另一个实施方案中，分离肽包括至少3个氨基酸，当该肽是较长氨基酸序列的一部分时，位于mAb结合的线性表位中，其中mAb具有（a）包括分别具有氨基酸序列SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 13的三个CDR的V_L链；和（b）包括分别具有氨基酸序列SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15和SEQ ID NO: 16的三个CDR的V_H链。如上所述的优选的分离肽位于mAb结合的线性表位，其中mAb具有（a）具有序列SEQ ID NO: 9的V_L链；和（b）具有序列SEQ ID NO: 10的V_H链。

本发明还涉及分离肽或其取代的变体，其包括至少3个氨基酸，当该肽为较长氨基酸序列的一部分时，位于命名为ATN-615或命名为ATN-658的mAb识别的线性表位中。

本发明包括鉴别Ab或其它的配位体的分析方法，所述Ab或其它的配位体与mAb ATN-615或mAb ATN-658一样结合于相同的表位。该方法包括测量包含Ab或其它配位体的待检样品竞争性抑制可检测标记ATN-615或ATN-658结合到如下的物质的能力：（i）固定suPAR，（ii）固定suPAR D2D3，或（iii）suPAR或suPAR的D2D3的固定片段，其中至少约20%、优选50%、更优选70%和最优选90%的竞争抑制显示抗体或配位体结合到了相同的表位。

一个实施方案是关于一种鉴别肽的方法，该肽被如下物质识别（a）ATN-615，（b）ATN-658，或（c）与ATN-615或ATN-658具有相同的结合特异性的Ab或其它配位体，该方法包括测量包含肽或候选肽的待检样品竞争性抑制可检测标记ATN-615或ATN-658或Ab或具有相同结合特异性的其它的配位体结合到如下物质的能力：（i）固定suPAR，（ii）固定suPAR D2D3，或（iii）suPAR或suPAR的D2D3的固定片段，其中至少约20%、优选50%、更加优选70%和最优选90%的竞争抑制显示该肽具有结合特异性。

本发明还涉及一种用于筛选化合物或确定候选化合物是否具有如ATN-615或ATN-658相同的结合到uPAR结构的特征的分析方法，该分析方法包括测量被筛选样品或候选化合物竞争性抑制可检测标记ATN-615或ATN-658结合到如下物质的能力：（i）固定suPAR，（ii）固定suPAR D2D3，或（iii）suPAR或suPAR的D2D3的固定片段，其中至少约20%、优选50%、更加优选70%和最优选90%的竞争抑制显示该肽具有结合特征。

在前述分析方法的一个实施方案中,被筛选的化合物或候选化合物是分子量在约50Da至约2500Da的有机小分子。在另一个实施方案中,被筛选的化合物或候选化合物是核酸分子,优选地是例如RNAi分子或短核酸的寡核苷酸。

附图说明

图1.在S2细胞中表达的ATF和suPAR片段的SDS-PAGE分析。在果蝇schneider S2细胞中ATF(aa 1-143)和suPAR(aa 1-279)被克隆和表达。用铜(0.5nM)诱导细胞表达重组蛋白质7天。收集培养上清液然后通过离心和过滤澄清。加入蛋白酶抑制剂之后,在DEAE-琼脂糖、pH7.5、(ATF)或者SP-琼脂糖、pH8.8、(suPAR)上通过离子交换层析法纯化蛋白质。利用RP-HPLC进一步纯化ATF和suPAR。用胰凝乳蛋白酶消化纯化的重组suPAR以产生可溶的结构域2/结构域3(D2D3)片段。在免疫之前,将D2D3蛋白质结合到载体如钥孔虫戚血蓝蛋白(KLH)。

图2. ATN-658结合到suPAR的非糖基化突变体,表明如其他的抗uPAR的mAbs, ATN-658被引导抗肽(不是糖类)表位。

图3. 用2个抗D2D3的mAbs、ATN-615和ATN-658进行Western印记分析。重组蛋白质用SDS-PAGE溶解然后转移到PVDF膜。用纯化的抗体(5μg/ml)探查膜。ATN-615和ATN-658特异地识别suPAR和D2D3。

图4. 抗D2D3抗体抑制uPA诱导的迁移。利用改良的Boyden chamber分析法测定表达CHO细胞的uPAR向uPA(500nM)的迁移。抗整合蛋白 α_5 、抗uPAR、和抗D2D3抗体抑制迁移,这表明整合蛋白 $\alpha_5\beta_1$ 和uPAR对uPA诱导的迁移是关键。

图5. ^{125}I 标记的ATN-658结合到具有高亲和力的HeLa细胞。室温下用增加浓度的 ^{125}I -ATN-658在24槽盘培养汇合的单层HeLa细胞一个小时。用PBS/Tween-20彻底洗涤细胞然后用1M的NaOH溶解结合材料。在100倍过量的未标记的Ab存在下测定非特异性结合。

图6. 表示mAb ATN-658不参与竞争uPA与HeLa细胞的结合。ATN-658与HeLa细胞结合并不抑制 ^{125}I -scuPA与HeLa细胞的结合。在300nM未标记的scuPA或者300nM的ATN-658存在与否的情况下,用5nM的 ^{125}I -scuPA培养培养HeLa细胞。ATN-617、阻止uPA结合到uPAR的抗uPAR mAb显示与scuPA竞争结合。

图7显示ATN-658同顺铂一样在A2780卵巢癌模型中有效地抑制肿瘤生长。A2780细胞仅表达uPAR而不表达uPA。

图8显示在A549肺肿瘤（非小细胞）模型中，ATN-658抑制肿瘤生长，模型中 10^6 个肿瘤细胞被接种。A549细胞同时表达uPA和uPAR。

图9显示即生物素化的ATN-658饱和地结合到suPAR。

图10A和10B都显示利用生物素标记的ATN-658对鉴别mAbs的竞争分析的结果，mAbs识别suPAR上的相同表位。ATN-616和ATN-617是阻止uPA结合到uPAR的抗uPAR抗体。ATN-616特异地结合配位体占位的uPAR。

具体实施方式

本发明发现靶向uPA/uPAR复合物或uPAR-整合蛋白复合物的mAbs、肽或其它的化学实体对治疗和/或诊断肿瘤很有益。到目前为止，本发明认为还没有能够识别uPA-uPAR复合物的抗体的记载，除了识别（a）单独的uPAR或uPA或（b）存在uPA的uPAR（也就是配位体占位的uPAR）。

进一步地，uPA-uPAR复合物或单独的uPAR具有其它的“下游”配位体，如整合蛋白、低-密度脂蛋白受体相关蛋白质（LRP）和其它的结合伴侣。相信这些下游相互作用对细胞迁移、扩散和增殖的过程是重要的。因此需要研究治疗处理或检测这种处理或从诊断角度研究相互作用成分的方法。

除了如下面详细描述的对这些相互作用的特异性抗体外，本发明还涉及检测专一地结合到uPA-uPAR复合物或抑制uPAR的下游相互作用的抗体的方法。

抗体方法

本发明已经生产了一组靶向uPAR的mAbs。uPAR是抗体的理想的作用靶，因为它能在细胞表面表达。肿瘤-脉管系统交界面（在扩散肿瘤细胞、血管内皮细胞、或肿瘤-相关巨噬细胞）的uPAR表达表明，靶向该蛋白质的抗体对扩散将不受到相同的障碍，其中扩散导致其它的mAbs不能进入肿瘤和用作诊断试剂或发挥治疗作用。重要的是，uPAR不能在由于疾病而代谢静止的组织上正常表达，其应当在应用治疗性Ab的时候将可能的毒性减到最低，在应用诊断性Ab时最小化非特异信号（或假阳性）。

本发明已经培育抗在果蝇S2细胞中表达的可溶形式uPAR（已知如“suPAR”）的片段的mAbs，uPAR。在该细胞中，suPAR最小化糖基化的的同

型体被表达。利用suPAR作免疫原克服观察的uPAR与所有其它的到目前为止已经检验的mAbs的异种结合。在1995-1996年间作为白细胞抗原专题讨论会对比较抗uPAR的可用抗体部分研究发现,这些抗体都对糖类而不是蛋白质、表位具有特异性(Manupello, J. et al., (1996) Tiss. Antigens 48: 368.)。确实,在肿瘤中表达的uPAR被高度异源糖基化,并且不同异构体的糖基化模式和表现在响应多种信号时发生改变(Stoppelli MP et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 4939-4943)。所以,培育的抗糖类表位的抗uPAR抗体不可能识别所有uPAR的异构体并且可能与表达同那些在uPAR上的结构相似的糖基化结构的蛋白质产生不需要的交叉反应。S2的用途已经用于鉴定识别suPAR内部的蛋白质表位的mAbs(图2)。

本发明已经制备稳定的、表达大量的suPAR及suPAR结构域片段的克隆。利用该表达系统在纯化(>95%纯度)后,产量一般大约是25-50mgs/L。因而本发明已经表明表达产生所有本发明抗体所需成分和设计对其进行评价和表征的分析方法是可能的。

已经表达了一种suPAR的突变形式,其中所有糖基化位点已经被突变。现有小鼠mAb克隆可能被人源化或灵长类化。

本发明发明者的生产suPAR构象完整域片段的能力使他们能够生产抗分离的D1和分离的D2D3(suPAR的)的mAbs。暴露在uPAR D2D3片段上的表位也暴露在结合uPA之后的全长、完整uPAR。已经证明该表位对uPA的迁移前活性是关键的(Andolfo A et al. (2002) Thromb Haemost 88: 298-306)。结果,产生的抗D2D3片段的抗体具有抗迁移活性,在D2D3片段处,所述表位已经暴露。通过mAbATN-658已经证明该事实。

因此本发明部分地涉及结合到二元uPA-uPAR复合物的mAb,但不涉及(a)游离uPA或(b)识别并结合到uPA的uPAR的区域,结果,mAb不抑制uPA-uPAR结合,并且mAb通过包括免疫哺乳动物优选为小鼠的起始步骤的方法来制备,其具有

- (a) 在果蝇细胞中表达的suPAR的最小化糖基化同型体,或
- (b) 4或5个糖基化位点已经突变的suPAR的去糖基化突变体。

在使用标准方法进行免疫之后,应用常规技术从免疫动物生产杂交瘤细胞系,然后生产具有所需特性的mAbs。对具有如在此所公开的其它的或稍微不同特

性的uPA-uPAR复合物是特异性的mAbs，以相同的方式利用相同的新suPAR抗原来制备。通过该方法制备的mAbs可能或可能不结合溶液中游离的uPAR。

野生型uPAR有五个N-连接糖基化位点：Asn⁵²（在D1中）Asn¹⁶²和Asn¹⁷²（在D2中）和Asn²⁰⁰和Asn²³³（在D3中）。D2和D3中的后四个位点优选地被突变成Gln以产生培育本发明mAbs的优选的去糖基化suPAR免疫原。

抗D2D3的mAbs也已经生产，其不管uPAR是否被uPA占位都能识别细胞表面的uPAR。因为在肿瘤上占大百分比的uPAR结合到uPA，因此该特异性抗体可用作治疗和诊断的靶试剂。另外，在肿瘤患者中，经常观察到肿瘤表达uPAR，而该uPAR由相同肿瘤表达的蛋白酶切割，留下的残余D2D3片段仍然附着在肿瘤上（Sier CF et al., Thromb Haemost. 2004,;91:403-11）。因而，该肿瘤的成功定位需要抗D2D3抗体。该抗体也用于体内成像应用。

抗D2D3的抗体（和其它本发明的抗体）优选地在异种肿瘤中测试，其中2个优选的实例是A2780和A549模型（更加详细描述于下面）。

两个优选的mAbs 可变（V）区域氨基酸序列

mAb ATN-658：可变区序列

mAb ATN-658的轻链可变区（V_L）和重链可变区（V_H）多肽的共有氨基酸序列（单一字母编码）列于下面。从表达ATN-658的杂交瘤提取总RNA制备cDNA，然后利用标准技术将可变区克隆、扩增和测序。每个可变区的互补检测区域（CDRs）突出显示（***斜体，粗体，下划线***）。

ATN-658 V_L共有蛋白质序列（SEQ ID NO: 1）：

1 DIXLTQSPLT LSVTIGQPAS ISCK***KSSOSLL DSDGKTYLNW***
LLQRPGQSPK

51 RLIY***LVSKLD*** SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV
YYC***WQGTHFP***

101 ***L***TFGAGTKLE LKL

ATN-658 V_H共有蛋白质序列（SEQ ID NO: 2）：

1 VQLQESGPEL VKTGASVKIS CKAS***GYSFTS YYMH***WVKQSH
GKSLEWIG***EI***

51 ***NPYNGGASYN OKIK***GRATFT VDTSSRTAYM QFNSLTSEDS
AVYYCAR***SIY***

101 **GHSVLDYWGQ GTTVTVS**

表1: ATN-658的L和H链的CDRs的特征

CDR*	残 基数	序列	SEQ ID NO:
CDRL1	16	KSSQSLLDSDGKTYLN	3
CDRL2	7	LVSKLDS	4
CDRL3	9	WQGTHFPLT	5
CDRH1	10	GYSFTSYMH	6
CDRH2	17	EINPYNGGASYNQKIKG	7
CDRH3	10	SIYGHSVLDY	8

*CDR-L1: L链的第一CDR; CDR-H2: H链的第二CDR, 等。

mAb ATN-615: 可变区序列

单克隆抗体ATN-615的轻链 (V_L) 和重链 (V_H) 可变区的氨基酸序列 (单一字母编码)。从表达ATN-615的杂交瘤提取总RNA制备cDNA, 然后利用标准技术将可变区克隆、扩增和测序。每个可变区的互补检测区域 (CDRs) 用红色突出显示。

ATN-615 V_L 共有蛋白质序列 (SEQ ID NO: 9)

1 DIVLTQSPDI TAASLGQKVT ITC**SASSSVS** **YMH**WYQQKSG
TSPKPWIF**EI**

51 **SKLAS**GVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAAIYYC**QOW**
NYPFTFGGGT

101 KLEIKR

ATN-615 V_H 共有蛋白质序列 (SEQ ID NO: 10)

1 VKLQQSGPEV VKPGASVKIS CKAS**GYSFTN** **FYIH**WVKQRP
GQGLEWIG**WI**

51 **FHGSDNTEYN** **EKFKD**KATLT ADTSSSTAYM QLSSLTSEDS
AVYFCAR**WGP**

101 **HWYFDV**WGQG TTVTVSS

表2. ATN-615的CDRs的特征

CDR*	残 基数	序列	SEQ ID NO:
CDRL1	10	SASSSVSYMH	11
CDRL2	7	EISKLAS	12
CDRL3	8	QQWNYPFT	13
CDRH1	10	GYSFTNFYIH	14
CDRH2	17	WIFHGSDNTEYNEKFKD	15
CDRH3	9	WGPHWYFDV	16

*CDR-L1: L链的第一CDR; CDR-H2: H链的第二CDR, 等。

根据本发明, Ab或mAb如标准mAb, 具有“基本相同的抗原结合特征”, 如果表现出相似的特异性(例如, 根据等级序值比较), 并且对相关抗原(例如 uPA-uPAR复合物)具有标准Ab的1.5数量级内的亲合力, 更加优选1个数量级内的亲合力。

抗体用于评价体内的Matrigel plug模型直接抗血管发生发生的活性。在同时表达受体和配位体的MDA MB 231细胞中使用放射性碘标记抗体测试Ab的内在化作用。在PAI-1: uPA复合物存在下也可以测量抗体内在化作用。

对uPA、uPAR及其二元和三元复合物特异的抗体

在下面的描述中, 将要参考各种为免疫学、细胞生物学、和分子生物学领域的技术人员所熟知的方法。设立这些已知方法的出版物和其它材料以其原样在此作为参考。常规参考资料阐明了免疫学的一般原理, 包括Abbas, AK et al., Cellular and Molecular Immunology (Fourth Ed.), W. B. Saunders Co. , Philadelphia, 2000; Janeway, CA et al., Immunobiology. The Immune System in Health and Disease, 4th ed., Garland Publishing Co. , New York, 1999; Roitt, I et al., Immunology, (current ed.) C. V. Mosby Co. , St. Louis, MO (1999); Klein, J, Immunology, Blackwell Scientific Publications, Inc. , Cambridge, MA, (1990)。

单克隆抗体(mAbs)和生产方法及用途在以下资料有所描述, Kohler and Milstein, Nature 256: 495-497 (1975); 美国专利号4,376,110; Hartlow, E. et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

Spring Harbor, NY, 1988); Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, New York, NY (1980); H. Zola et al., in Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, (1982)。

免疫分析方法在如下资料有所描述, Coligan, JE et al., eds. , Current Protocols in Immunology, Wiley-Interscience, New York 1991 (or current edition); Butt, WR (ed.) Practical Immunoassay: The State of the Art, Dekker, New York, 1984; Bizollon, CA, ed., Monoclonal Antibodies and New Trends in Immunoassays, Elsevier, New York, 1984; Butler, JE, ELISA (Chapter 29), In: van Oss, CJ et al., (eds), IMMUNOCHEMISTRY, Marcel Dekker, Inc. , New York, 1994, pp. 759-803; Butler, JE (ed.), Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, 1991; Weintraub, B, Principles of Radioimmunoassays, The Endocrine Society, March, 1986; Work, TS et al., Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, North Holland Publishing Company, NY, 1978; Dabbs, DJ, Diagnostic Immunohistochemistry, Churchill Livingstone, 2001。

抗个体基因型的抗体在如下资料有所描述, 例如, Idiotypy in Biology and Medicine, Academic Press, New York, 1984; Immunological Reviews Vol. 79, 1984 and Vol. 90, 1986; Curr. Top. Microbiol., Immunol. Vol. 119, 1985; Bona, C. et al., CRC Crit. Rev. Immunol. , pp. 33-81 (1981); Jeme, NK, Ann. Immunol. 125C:373-389 (1974); Urbain, J et al., Ann. Immunol. 133D: 179- (1982); Rajewsky, K. et al., Ann. Rev. Immunol. 1:569-607 (1983)。

本发明提供了多克隆和单克隆抗体,, 其与uPA/uPAR复合物反应以抑制uPAR与整合蛋白或其它的下游目标相互作用。抗体可以是异种、异源、同源、或其改良的形式, 如人源化或嵌合抗体。对例如抗uPA/uPAR Ab的个体基因型特异的抗个体基因型抗体也包括在这里。术语“抗体”是指同时包含完整分子及其片段, 所述片段包括抗原结合位点并能够结合到例如uPA/uPAR或uPAR整合蛋白复合物的靶表位。这些片段包括缺少完整Ab的Fc片段的Fab和F(ab')₂, 能够更快速地从循环中清除, 并具有比完整Ab更少的非特异性的组织结合 (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983))。还包括Fv片段 (Hochman, J. et al. (1973) Biochemistry 12:1130-1135; Sharon, J. et al. (1976) Biochemistry 15:

1591-1594))。利用常规技术如蛋白酶切割或化学切割制备这些片段(参见Rousseaux et al., Meth. Enzymol., 121:663-69 (1986))。

多克隆抗体是以血清从免疫动物如兔、山羊、啮齿动物等获得的,然后不经过进一步处理就直接使用或进行常规富集或纯化,如硫酸铵沉淀、离子交换层析法、亲和力层析法(参见Zola et al., supra)。

产生本发明抗体的免疫原可以包括uPAR、suPAR、uPA/uPAR或uPAR-整合蛋白复合物或具有表位的片段或其衍生物。本领域已知多种方式制备有用的免疫原,例如利用常规重组方法克隆基因的表达、细胞分离、表达高水平的例如uPA或uPAR等的细胞群。针对比较短的片段,它们可以化学合成。优选的免疫原是suPAR的D2D3片段。

可以利用常规杂交瘤技术制备mAbs,例如Kohler和Milstein介绍的方法(Nature, 256: 495-97 (1975))及其改良的方法(参见如上参考)。用如上所述的免疫原对动物,优选是小鼠,进行免疫,激发在该免疫动物中产生所需的Ab反应。

从易感动物的淋巴结、脾或外周血的B淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合淋巴结,一般是在融合增进剂例如聚乙二醇(PEG)的存在下进行。小鼠骨髓瘤细胞系的任何一个可用于该用途:P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-k0Ag8.653、Sp2/0-Ag14或HL1-653骨髓瘤系(可获自ATCC、Rockville、MD)。接下来的步骤包括在选择性培养基中生长,使未融合的亲本骨髓瘤细胞和供体淋巴细胞最终死亡,而仅有杂交瘤细胞存活。利用如免疫测定技术克隆和培育这些细胞,然后上清液用于筛选所需特异性Ab。通过例如限制性稀释,亚克隆阳性克隆,然后分离mAbs。

根据这些方法制备的杂交瘤利用本领域已知技术在体外或体内(在腹水液中)繁殖(一般参见Fink et al., Prog. Clin. Pathol., 9:121-33 (1984))。一般地,在培养基中繁殖单个细胞系,并且含高浓度单一mAb的培养基通过倾析、过滤,或离心而收集。

制备mAbs

生产本发明的mAb的优选方法描述如下。

利用胰蛋白酶致消化和纯化由suPAR制备D2D3(Shliom, O. et al., (2000) J. Biol. Chem. 275:24304-12)。然后将D2D3结合到任一个有用的载体蛋白质,例

如白蛋白、钥孔虫凝血蓝蛋白 (KLH) 或卵清蛋白。一般在完全Freund的佐剂中进行免疫,随后在不完全Freund的佐剂中周期性增强。将动物周期放血然后利用ELISA测量血清的滴度,其中suPAR被固定到微量培养板槽的表面。

如果使用肽,优选将其结合到载体蛋白质,例如 KLH,然后在完全 Freund 的佐剂中(例如 50 μ g 结合物)注射进入 BALB/c 小鼠腹膜内 (i.p.),接着间隔 2 个星期另外注射 2 个在不完全 Freund 佐剂中的相同剂量。一个月以后,最后 i.p.注射(例如 0.5ml PBS 中的 50 μ g)和优选地无佐剂静脉注射 (i.v.) (例如 0.2ml 的 50 μ g)。

终注射后三天收集脾细胞然后利用标准技术与P3X63AF8/653或其它的骨髓瘤细胞融合。

用于筛选和表征抗体的测试细胞

对于初次筛选,将纯suPAR固定到塑料制品上是优选的。过表达uPAR的细胞如HeLa细胞系,也可以用于证明抗suPAR mAb的细胞结合。许多过表达uPAR肿瘤细胞系是熟知的和通过公众途径儿获知的;它们可以用于筛选。细胞一般置放在96槽微量培养板中。细胞可以被固定,例如使用甲醇/丙醇 (50/50),和通过免疫荧光着色检测结合。可选择地, mAbs可以被放射性同位素示踪并通过测量放射能检测结合。

在一个实施方案中,将杂交瘤上清液(例如 50 μ L)加入到包含固定的 293 细胞的槽中在 37 $^{\circ}$ C 停留约 1.5 小时。在洗涤缓冲液(如 PBS/0.05%Tween-20)中洗涤槽两次,然后以适当的稀释度如 1: 100 加入(例如 30 μ l/槽)碱性蕊香红结合的山羊抗鼠 IgG,在 37 $^{\circ}$ C 停留 1.5 小时。在洗涤缓冲液中洗涤之后,检查带有免疫荧光的细胞;本实施方案使用荧光显微术。

在这个实施方案中,免疫荧光是检测杂交瘤上清液是否包含对 uPA/uPAR 复合物(虽然免疫组织化学着色也可以使用)特异的 Ab 的基础。如果上清液显示正着色,则杂交瘤克隆被选择、扩增并通过 ELISA 测试上清液对复合物的反应性。

在优选的 ELISA 中,将肽结合到作为载体蛋白质的卵清蛋白 (OVA),将结合的肽/OVA 结合物涂覆到 96 槽 EIA 盘的槽,,该槽接受例如 50 μ l 涂覆缓冲液中的 2 μ g/ml 的结合物 (0.2M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH9.6)。在 4 $^{\circ}$ C 过夜培养该槽,用适当的例如包含 1%BSA (200 μ l/槽)的 PBS 封闭缓冲液封闭,在 4 $^{\circ}$ C

过夜。将杂交瘤上清液（例如 50 μ l）加入到槽内，在室温停留 1.5 小时。在洗涤缓冲液（例如 PBS/0.05% Tween-20）中洗涤槽两次，然后以适当的稀释度例如 1: 2000，加入酶结合的二级 Ab，如碱性磷酸酶结合的羊抗鼠 IgG（50 μ l/槽）。在室温下培养槽 1.5 小时。在洗涤缓冲液中洗涤 4X 之后，加入酶的适当发色基质，如该实施方案使用的 CP-硝基磷酸苯酯（可获自 Kirkegaard 和 Perry Co., Gaithersburg, MD），停留约 30 分钟，然后用适于显色产品的波长（这里为 405nm）测量吸光度。将与具有表位的肽（例如当负控制 <0.02 时， $A_{405}>1.0$ ）强烈反应的杂交瘤上清液再次克隆（优选两次），然后通过如上描述的 ELISA 再次证实 mAb 的反应性。

术语“抗体”是指同时包含完整免疫球蛋白（Ig）分子和片段及其衍生物，它们可以通过 Ig 分子的蛋白水解切割或工程遗传学或化学制备。这些片段包含，例如：Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv，其中每个都能够结合抗原。这些片段缺少完整 Ab 的 Fc 片段并且如果用于治疗具有其它的优势，如能够更加快速地从循环中清除和比完整抗体更少地与非特异性组织结合。Ig 的木瓜蛋白酶处理产生 Fab 片段；胃蛋白酶处理产生 F(ab')₂ 片段。利用本领域熟知的方法通过遗传或蛋白质工程也可以制备这些片段。Fab 片段是多亚基蛋白质，由 Ig 分子的一部分组成，Ig 分子包含共价结合并能够特异性地与抗原结合的 Ig 重（H）链和 Ig 轻（L）链的免疫活性部分。一般利用本领域熟知的方法，用木瓜蛋白酶来蛋白水解消化基本完整的 Ig 分子制备 Fab 片段。然而，Fab 片段也可以利用本领域熟知的方法，通过在适当的宿主细胞中表达所需的 Ig 的 H 链和 L 链部分进行制备。(Fab')₂ 片段是包含 2 个 H 链和 2 个 L 链的片段的四聚体。Fv 片段是多亚基蛋白质，由共价结合并能够特异性地与抗原结合的 Ig 的 H 链可变（V）区（V_H）和 Ig 的 L 链 V 区（V_L）的免疫活性部分组成。Fv 片段一般利用本领域熟知的方法，通过在适当的宿主细胞表达所需的 Ig 的 V_H 区和 V_L 区的部分来制备。

单链抗原-结合蛋白质或单链 Ab，也称作为如“scFv”，是一种多肽，由通过肽连接到 Ig 的 V_H 氨基酸序列的 Ig 的 V_L 氨基酸序列组成，所述肽将 V_L 序列的 C 端连接到 V_H 序列的 N 端。

在优选的实施方案中，Ab 是命名为 ATN-615 或 ATN-658 的 mAb，二者都是 IgG 抗体。

在另一个优选的实施方案中，Ab 是一种嵌合的 Ab，能识别被 ATN-615 或 ATN-658 识别的表位。

嵌合抗体

本发明的嵌合抗体包括单独的嵌合 H 和 L Ig 链。嵌合 H 链包括来源于对例如 uPA/uPAR 或 uPAR-整合蛋白复合物的非人 Ab 例如 mAb ATN-615 或 ATN-658 特异的 H 链的抗原结合区，其连接到人 C_H 区的至少一部分。嵌合 L 链包括来源于对靶抗原的非人 Ab 如杂交瘤 ATN-615 或 ATN-658 特异的 L 链的抗原结合区，其连接到人 C_L 区域的至少一部分。在此，术语“抗原结合区”是指 Ab 分子的一部分，该 Ab 分子包含与抗原相互作用的氨基酸残基，并使得 Ab 具有抗原特异性和亲合力。Ab 区包括保持抗原-结合（或“接触”）残基适当构象所必需的“框架”在此，术语“嵌合抗体”包含单价、二价或多价 Igs。单价嵌合 Ab 是通过二硫化物桥缔合嵌合 H 链与嵌合 L 链形成的 HL 二聚物形式。二价嵌合 Ab 是通过至少一个二硫化物桥缔合 2 个 HL 二聚物形成的四聚物 H₂L₂ 形式。多价嵌合 Ab 也可以制备，例如通过应用聚集的 C_H 区（例如得自 IgM H 链，术语为 μ 链）。

本发明也提供鼠 mAbs 或嵌合 Abs 的“衍生物”，该术语所指的物质包括通过截短或修饰以获得与 Ig 片段功能类似的分子种类的基因编码的那些蛋白质。修饰包括但不限于加入编码细胞毒素蛋白质如植物和细菌毒素的基因序列。这些片段和衍生物可以从本发明的任一个宿主制备。

具有相同或不同 V 区结合特异性的嵌合 H 链和 L 链的抗体、片段或衍生物，可以通过各个多肽链的缔合制备，如 *Sears et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 353-357 (1975) 中所述。用该方法，将表达嵌合 H 链（或它们的衍生物）的宿主与表达嵌合 L 链（或它们的衍生物）的宿主分别进行培养，分别回收 Ig 链然后缔合。或者，将宿主共同培养，使链在培养基中同时缔合，之后回收组合的 Ig、片段或衍生物。

本发明的嵌合 Ab（或人 mAb）的抗原结合区优选来源于对例如 uPA/uPAR 或 uPAR-整合蛋白复合物特异的非人 Ab。编码所述非人 Ab 的 DNA 的优选来源包括产生 Ab，优选为杂交瘤的细胞系。优选的杂交瘤是 ATN-615 杂交瘤细胞系（ATCC 登记号_____）和 ATN-658（ATCC 登记号_____），其如以上所述制备并且它们的 V 区具有以上所述的序列。

因此, 优选的嵌合 Ab (或人 Ab) 具有 V_L 序列 SEQ ID NO: 1 和 V_H 序列 SEQ ID NO: 2, 它们是 mAb ATN-658 的共有序列。不在 CDR 区的这些 V 区的残基可以改变, 优选地如保守取代, 只要 V 区导致产生具有相同的抗原特异性和基本相同的抗原结合亲合力或亲合强度的 Ab, 优选为亲合力或亲合强度至少 20% 的 Ab, 其中 V_L 序列是 SEQ ID NO: 1, V_H 序列是 SEQ ID NO: 2。在这些嵌合 (或人) Ab 中, 优选 V_L 链的三个 CDR 区是 SEQ ID NO: 3、4 和 5, 以及 V_H 链的三个 CDR 区是 SEQ ID NO: 6、7 和 8。

另一个优选嵌合 Ab (或人 Ab) 具有 V_L 序列 SEQ ID NO: 9 和 V_H 序列 SEQ ID NO: 10, 它们是 mAb ATN-615 的共有序列。不在 CDR 区的这些 V 区的残基可以改变, 优选地如保守取代, 只要 V 区导致产生具有相同的抗原特异性和基本相同的抗原结合亲合力或亲合强度的 Ab, 优选为亲合力或亲合强度至少 20% 的 Ab, 其中 V_L 序列是 SEQ ID NO: 9 和 V_H 序列是 SEQ ID NO: 10。在这些嵌合 (或人) Ab 中, 优选 V_L 链的三个 CDR 区是 SEQ ID NO: 11、12 和 13, 以及 V_H 链的三个 CDR 区是 SEQ ID NO: 14、15 和 16。

构建本发明嵌合 Ab (或人 Ab) 所使用的优选的核酸分子是 (a) 具有编码 V_L 区编码序列的核酸分子, 并且 V_L 区具有序列 SEQ ID NO: 1 和 (b) 具有编码 V_H 区编码序列的核酸分子, 并且 V_H 区具有序列 SEQ ID NO: 2。还优选的是编码包括三个 CDRs SEQ ID NO: 3、4 和 5 的 V_L 区的核酸分子以及编码包括三个 CDRs SEQ ID NO: 6、7 和 8 的 V_H 区的核酸分子。

构建本发明嵌合 Ab (或人 Ab) 所使用的另一个优选核酸分子是 (a) 具有编码 V_L 区编码序列的核酸分子, 并且 V_L 区具有序列 SEQ ID NO: 9 和 (b) 具有编码 V_H 区编码序列的核酸分子, 并且 V_H 区具有序列 SEQ ID NO: 10。还优选的是编码包括三个 CDRs SEQ ID NO: 11、12 和 13 的 V_L 区的核酸分子以及编码包括三个 CDRs SEQ ID NO: 14、15 和 16 的 V_H 区的核酸分子。

或者, 生成本发明 Ab 的 V 区的非人 Ab 生产细胞可以是来自 suPAR 的 D2D3 免疫的动物的血液、脾、淋巴结或其它的组织的 B 淋巴细胞。有助于核苷酸序列编码本发明的嵌合 Ab 的抗原结合区域的 Ab 生产细胞, 也可以通过转化非人如灵长类或人细胞制备。例如, 生产对 uPA/uPAR 或 uPAR-整合蛋白复合物特异的 Ab 的 B 淋巴细胞, 可以被病毒如 Epstein-Barr 病毒感染和转化而获得无限生长分化的 Ab 生产细胞 (Kozbor et al. Immunol. Today 4:72-79

(1983))。或者如本领域所熟知, B 淋巴细胞可以通过提供转化基因或转化基因产物转化。优选地, 抗原结合区是鼠源的。在其它的实施方案中, 抗原结合区可以来源于其它种的动物, 尤其是啮齿动物, 如老鼠或仓鼠。

本发明的小鼠或嵌合的 mAb 可以通过注射杂交瘤或分泌 Ab 的转染瘤细胞进入小鼠腹腔而大量制备, 然后, 在适当的时间之后, 收集包含高滴定度 mAb 的腹水液体并从中分离 mAb。对于用非鼠杂交瘤(例如老鼠或人)体内生成的 mAb, 杂交瘤细胞优选生长在辐射处理的或无胸腺裸鼠中。

或者, 可以通过体外培养杂交瘤(或转染瘤)细胞制备抗体然后从细胞培养基中分离分泌的 mAb。

编码本发明嵌合抗体恒定 C 区的人基因可以来源于人胎儿肝脏文库或包括表达和生产人 Igs 的任何人细胞。人 C_H 区可以来源于任一个已知类别或同型的人 H 链, 包括 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ 及其亚型, 如 G1、G2、G3 和 G4。因为 H 链同型对应于 Ab 的多种效应子功能, C_H 区的选择要由所需的如补体结合的效应子功能或在 Ab 依赖的细胞毒性(ADCC)中的活性来确定。优选地, C_H 区来源于 γ 1 (IgG1)、 γ 3 (IgG3)、 γ 4 (IgG4) 或 μ (IgM)。

人 C_L 区可以来源于人 L 链同型, κ 或 λ 。

通过标准克隆技术从人细胞获得编码人 Ig C 区的基因(Sambrook, J. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989))。人 C 区基因容易得自包含代表两个类别的 L 链、5 个类别的 H 链及其亚类的基因的已知克隆。嵌合 Ab 片段, 如 F(ab')₂ 和 Fab, 可以通过设计被适当截短的嵌合 H 链基因制备。例如, 编码 F(ab')₂ 片段 H 链部分的嵌合基因包括编码 H 链的 C_{H1} 结构域和铰链区的 DNA 序列, 其后为翻译终止密码子以截短分子。

一般来说, 本发明嵌合抗体是通过克隆 DNA 片段而制备, 而该 DNA 片段编码对本发明的 Ab, 优选为非人的 Ab 特异的 H 和 L 链抗原结合区, 然后将这些 DNA 片段分别连接到编码人 C_H 和 C_L 区的 DNA 片段, 以生产嵌合 Ig 编码基因。

因此, 在优选的实施方案中, 建立了融合基因, 其包括至少编码非人起源的抗原结合区的第一 DNA 片段, 如具有连接(J)片段的功能性重排 V 区, 该第一 DNA 片段连接到至少编码部分人 C 区的第二 DNA 片段。

编码 Ab 结合区的 DNA 可以是染色体组的 DNA 或 cDNA。使用染色体基因片段作为编码小鼠 V 区抗原结合片段的 DNA 的来源, 一个方便的选择是利用 cDNA 来构建嵌合 Ig 基因, 如 Liu 等所报道 *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 84: 3439 (1987); *J. Immuno.* 139:3521 (1987)), 其内容在此作为参考。使用 cDNA 需要适于宿主细胞的基因表达元件与基因结合以合成所需蛋白质。cDNA 序列的使用优于染色体组序列 (其包含内含子), 因为, cDNA 序列可以在细菌或其它的缺少适当 RNA 剪接系统的宿主中表达。

所以, 在利用编码 Ab V 区的 cDNA 的实施方案中, 生产嵌合 Ab 的方法包括以下几个步骤:

1. 从生产 mAb 的细胞系分离信使 RNA, 克隆然后制备 cDNA;
2. 从纯化的 mRNA 制备全长 cDNA 文库, 从中 L 和 H 链基因的适当 V 区基因片段可以: (i) 被用适当的探针识别, (ii) 被测序, 和 (iii) 制成与 C 基因片段匹配;
3. 通过 cDNA 的制剂和克隆来制备 C 区基因片段;
4. 如上面所述, 通过将克隆的特异性 V 区基因片段连接到克隆人 C 区基因, 来构建完整的 H 或 L 链编码序列;
5. 在选择的宿主包括原核和真核细胞中, 表达和制备嵌合 L 和 H 链。

所有 Ig H 和 L 链基因及它们的编码 mRNA 的共同特征是具有 J 区。H 和 L 链 J 区具有不同的序列, 但在这些组中, 尤其是靠近 C 区, 存在高等级序列同源性 (大于 80%)。在这些方法中利用了该同源性并且 H 和 L 链 J 区的共有序列可以用于设计作为有益地引入限制性位点进入 J 区的引物的寡核苷酸, 接下来用其连接 V 区片段到人 C 区片段。

从人细胞制备的 C 区 cDNA 载体可以通过位点突变, 在人序列的相似位置替换限制性位点得到修饰。例如: 克隆完全人 κ 链 C (C_{κ}) 区和完全人 γ -1C 区 ($C_{\gamma-1}$)。在这种情况下, 基于作为 C 区载体来源的染色体组的 C 区克隆的可选择的方法将不允许这些基因在细菌系统中表达, 细菌中缺少除去插入序列的酶。克隆的 V 区片段被切断然后连接到 L 或 H 链 C 区载体。或者, 人 $C_{\gamma-1}$ 区可以通过引入终止密码子被修饰, 这样产生编码 Fab 分子的 H 链部分的基因序列。连接 V 和 C 区的编码序列接着被转移进入用于在适当的宿主、原核或真核中表达的适当的表达媒介内。

如果连接导致连续翻译序列而三联密码阅读框没有产生改变或中断,那么两个编码 DNA 序列被称作“可操作连接”。如果连接使那些基因表达元件产生适当的功能以导致编码序列的表达,那么把 DNA 编码序列可操作地连接到基因表达元件。

表达型载体包括质粒或其它遗传媒介。在这些载体中优选的为携带功能性的完全人 C_H 或 C_L 链序列,该序列具有设计的适当限制性位点,这样具有适当的粘末端的任一个 V_H 或 V_L 链序列可以容易地插入其中。因而包含人 C_H 或 C_L 链序列的媒介用作在任一个适当宿主中表达任一所需的完全 H 或 L 链的中间体。

由用于构建体的小鼠 H 和 L 链 V 区的天然染色体基因启动子引发的基因合成嵌合小鼠-人 Ab。剪接通常发生在小鼠 J 区的接合供体位点与位于人 C 区前方的接合受体位点之间,也可以在人 C_H 区内的结合区;聚腺苷酰和转录终止发生在人编码区下游的天然染色体位点。

用于 cDNA 基因表达的基因表达元件包括:(a)病毒转录启动子和它们的增强子元件,比如 SV40 早期启动子 (Okayama, H. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 3:280 (1983)), 鲁斯氏肉瘤病毒 LTR (Gorman, C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 79:6777 (1982)), 和莫洛尼鼠白血病病毒 LTR (Grosschedl, R *et al.*, *Cell* 41:885 (1985)); (b) 接合区和聚腺苷酰位点,如来源于 SV40 晚期区的那些位点 (Okayama *et al.*, *supra*); 和 (c) 如在 SV40 中的聚腺苷酰位点 (Okayama *et al.*, *supra*)。

Ig cDNA 基因被表达,如 Liu *et al.*, *supra*, 和 Weidle, UH *et al.*, *Gene* 51:21-29 (1987)中所述,利用如表达元件 SV40 早期启动子和它的增强子、鼠 Ig H 链启动子增强子、SV40 晚期区 mRNA 剪接、兔 β -球蛋白插入序列、Ig 和兔 β -球蛋白聚腺苷酰位点,和 SV40 聚腺苷酰元件。对于由部分 cDNA、部分染色体组 DNA 组成的 Ig 基因 (Whittle, N *et al.*, *Protein Eng.* 1:499-505 (1987)), 翻译启动子为人细胞巨化病毒,启动子增强子为细胞巨化病毒和小鼠/人 Ig, 和 mRNA 剪接和聚腺苷酰区来源于天然染色体 Ig 序列。在一个实施方案中,对于在啮齿动物细胞中的 cDNA 基因表达,转录启动子为病毒 LTR 序列,转录启动子增强子是或者同时为鼠 Ig H 链增强子和病毒 LTR 增强子,接合区包含大于 31bp 的内含子,并且聚腺苷酰和转录终止区来自对应于合成

Ig 链的天然染色体序列。在其它的实施方案中，编码其它蛋白质的 cDNA 序列与上述表达元件组合并在哺乳动物细胞中表达。

将每个融合基因装配或插入表达型载体。然后单独用嵌合 H 或嵌合 L 链编码基因转染或用嵌合 H 和嵌合 L 链基因共转染能够表达嵌合 Ig 链基因产物的受体细胞。在允许表达合并基因的条件下培养转染的受体细胞，然后从培养基中回收表达的 Ig 链或完整抗体或片段。在一个实施方案中，编码嵌合 H 和 L 链或其一部分的融合基因被装配在独立的将用于共转染受体细胞的表达型载体中。

每个载体可以包含 2 个可选择的基因，第一可选择基因设计用于在细菌系统进行选择，第二可选择基因设计用于在真核系统进行选择，其中每个载体具有不同对的基因。该方案产生的载体在细菌系统首先控制融合基因的制备及允许扩增。在细菌宿主中如此制备和扩增的基因随后用于共转染真核细胞，并选择携带所需的转染基因的共转染细胞。在细菌系统中使用的可选择基因的实例是指对氨苄西林具有耐性和对氯霉素具有耐性的基因。在真核转染子中使用的优选的可选择基因包括黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶基因（命名为 *gpt*）和来自 Tn5 的磷酸转移酶基因（命名为 *neo*）。

表达 *gpt* 的细胞的选择基于该基因编码的酶利用黄嘌呤作为基质合成嘌呤核苷，而相似的内源性酶却不能。在包含（1）霉酚酸，其封闭次黄嘌呤核苷单磷酸盐向黄嘌呤单磷酸盐（XMP）的转化，和（2）黄嘌呤的培养基中，仅表达 *gpt* 基因的细胞可以生存。*neo* 基因的产物通过抗生素 G418 和其它的新霉素类抗生素阻断蛋白质合成的抑制。

两个选择方法可以同时或相继用于选择通过两个不同的 DNA 载体导入真核细胞的 Ig 链基因的表达。对于真核细胞不必包括不同的选择标记；对于 H 和 L 链载体，包含相同的选择标记的每一个都可以被共转染。选择适当的耐性细胞之后，多数克隆将包含同时具有 H 和 L 链载体的整合拷贝。

可选择地，编码嵌合 H 和 L 链的融合基因可以在相同的表达载体上组装。

对于表达载体的转染和嵌合 Ab 的制备，优选的受体细胞系是骨髓瘤细胞。骨髓瘤细胞可以合成、组装和分泌转染的 Ig 基因编码的 Igs，并获得 Ig 的糖基化机制。特别优选的受体细胞是非生产 Ig 的骨髓瘤细胞 SP2/0（ATCC#CRL 8287）。SP2/0 细胞仅生产转染基因编码的 Ig。骨髓瘤细胞可以生长在培养基

中或小鼠腹膜腔内，从腹水液体中获得分泌的 Ig。其它的适当受体细胞包括淋巴细胞，如人或非人源的 B 淋巴细胞，人或非人源的杂交瘤细胞，或种间异源杂交瘤细胞。

携带本发明的嵌合 Ab 构建的表达型载体可以通过任一适当的方式导入适当的宿主细胞，包括如转化、转染、结合、原生质体融合、磷酸钙沉淀和应用聚阳离子如二乙氨基乙基（DEAE）葡聚糖的生物化学方法，和如电穿孔、直接显微注射和显微抛射体轰击的机械方法。

本发明的嵌合 Ig 编码序列或基因也可以在非淋巴哺乳动物细胞或其它的真核细胞如酵母菌，或在原核细胞尤其是细菌中表达。酵母菌优于细菌制备 Ig H 和 L 链。酵母菌可以进行包括糖基化的翻译后肽修饰。现有的许多重组 DNA 方案利用强启动子序列和高拷贝数的质粒用来制备酵母菌所需的蛋白质。酵母菌识别克隆哺乳动物基因产物的前导序列和具有前导序列的分泌肽（例如前肽）。酵母菌基因表达系统可以被常规地评价其嵌合 H 和 L 链蛋白质和组合嵌合 Abs 的制备、分泌和稳定性的水平。一系列酵母菌基因表达系统中的任一个可以利用，该系统合并了来自编码糖酵解酶的活跃的表观基因的启动子和终止元件，且该糖酵解酶在酵母菌生长在富集葡萄糖的培养基中时大量生产。已知糖酵解基因也可以提供非常有效的转录控制信号。例如，可以利用磷酸甘油酸激酶（PGK）基因的启动子和终止子信号。许多方法可以用于评价酵母菌中表达克隆的 Ig cDNA 的最佳表达质粒。（参见 Glover, D. M., ed., DNA Cloning, IRL Press, 1985）。

细菌菌株也可用来作为制备本发明的 Ab 分子或 Ab 片段的宿主，*E.coli* K12 菌株如 *E.coli* W3110（ATCC#_27325），和其它的肠细菌如鼠伤寒沙门氏菌或粘质沙雷氏杆菌和多种假单胞菌种类也可以使用。

包含复制子和来源于与宿主细胞相容的类型的控制序列的质粒载体用来与这些细菌宿主相结合。载体携带复制位点，还有能够在转化细胞中提供表型选择的特异性基因。许多方法可以评价用于在细菌中制备克隆 Ig cDNA 编码的嵌合 Abs 或 Ab 链的表达质粒（参见 Glover, *supra*）。

优选的宿主是体外或体内生长的哺乳动物细胞。哺乳动物细胞提供对 Ig 蛋白质分子的翻译后修饰，包括移除前导肽、折叠和装配 H 和 L 链、糖基化 Ab 分子和功能性 Ab 蛋白质的分泌。可以作为生产 Ab 蛋白质宿主的哺乳动物

细胞,除了如上所述的淋巴细胞,包括纤维原细胞细胞,如 Vero (ATCC CRL 81) 或 CHO-K1 (ATCC CRT 61)。许多载体系统可用于在哺乳动物细胞中表达克隆的 H 和 L 链基因(参见 Glover, *supra*)。可根据不同的方法获得完全 H2L2 Abs。

对于体内使用,特别是向人体内注射,需要通过制备如上所述的鼠-人(或啮齿动物-人)的嵌合 Abs,或利用本领域所熟知的方法人源化 Abs,来降低 mAb 的免疫原性。人源化 Ab 可以是具有转基因人 Ig 恒定区基因的动物的产品(参见例如 WO90/10077 和 WO90/04036)。可选择地,可以遗传法设计目的 Ab 以替代 CH₁、CH₂、CH₃、铰链区、和/或具有与人序列相应的结构域(参见 WO92/02190)。

单链抗体

本发明的 Ab 可以制备成为单链 Ab 或 scFv 而不是常见的多亚基结构。单链 Abs 包括来自于目的 Ig 的高可变区和改造天然 Ig 的抗原结合位点,当作为完整 Ig 大小一的片段时 (Skerra, A. et al. (1988) *Science*, 240: 1038-1041; Pluckthun, A. et al. (1989) *Methods Enzymol.* 178: 497-515; Winter, G. et al. (1991) *Nature*, 349: 293-299) ; Bird et al., (1988) *Science* 242: 423; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879; Jost CR et al., *JBiol Chem.* 1994 269:26267-26273; 美国专利号 4,704,692、4,853,871、4,94,6778、5,260,203、5,455,030)。编码 H 链和 L 链的 V 区的 DNA 序列被连接到编码至少约 4 氨基酸(一般为小的中性氨基酸)的连接子。通过该融合编码的蛋白质允许保留原始 Ab 特异性和亲合力的功能可变区的装配。

一种生产本发明的 Abs 的方法是通过蛋白质化学技术将 2 个或多个肽或多肽连接在一起。例如,利用 Fmoc (9-苄基甲氧基羰基)或者 tBoc (叔-氧基羰基)化学及当前现有的实验室设备,化学合成肽或多肽 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)。本领域熟练的技术人员可以容易知晓对应于 Ab 链或其抗原结合片段的肽或多肽可以通过标准化学反应合成。例如,肽或多肽可以合成但不能从合成树脂上切割,而 Ab 的另一个片段可以合成并随后从离子交换树脂切割,这样暴露了在其他片段的功能性封闭的端基。通过肽浓缩反应,这 2 个片段可以通过在它们的 C 和 N 端的肽键而共价连接,形成 Ab 或其片段。

(Grunt, GA, *Synthetic Peptides: A User Guide*, W. H. Freeman and Co., N. Y.

(1992); Bodansky, M et al., eds, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag Inc., N.Y. (1993))

针对尤其需要的特性选择抗体。Ab 在体内使用的情况下, Ab 筛选方法可以包括体外或体内生物测定的任一个方法, 测定例如与 uPA/uPAR 或 uPAR-整合蛋白复合物的结合, 和与表达相关多肽或肽表位的细胞的结合。而且, 可以用多种肿瘤模型如异种小鼠模型筛选 Abs, 其中表达抗原的人肿瘤细胞系生长免疫损害的机体中, 例如裸鼠中。

诊断标记抗体

术语“诊断标记”是指本发明的 Ab 已经附着了诊断可检测出的标记。目前存在许多本领域普通技术人员熟知的不同的标记和标记方法, 如下所述。本发明使用标记的一般类别包括放射性同位素、顺磁性同位素和可以通过正电子发射断层扫描 (PET) 成像的化合物, 荧光性的或显色的化合物等。适当的可检测出的标记包括放射性的、荧光性的、荧光的、发色的或其它的化学标记。有用的放射性同位素示踪 (放射性核素), 其可通过伽马计数器、闪烁计数器或自动射线照相术检测, 包括 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 和 ^{14}C 。 ^{131}I 也是一种有用的治疗同位素 (参见下面)。

许多作为本发明参考的美国专利公开了复合金属到大分子的方法和组合物, 包括螯合剂。金属优选为可检测出的金属原子包括放射性核素, 并且这些金属被复合到蛋白质和其它的分子。这类的文献包括: 美国专利 5,627,286; 5,618,513; 5,567,408; 5,443,816 和 5,561,220。

一般的荧光标记包括荧光素、碱性蕊香红、丹酰、藻红蛋白、藻青蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛和荧光胺。荧光团, 如丹酰官能团, 必定通过特定波长的光激发而发荧光。参见, 例如 Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Sixth Ed., Molecular Probes, Eugene, OR., (1996)。荧光素, 荧光素衍生物和荧光素样分子, 如俄勒冈绿TM及其衍生物, 碱性蕊香红绿TM和对甲氨基酚绿TM, 利用异硫氰酸盐, 琥珀酰亚胺酯或二氯三嗪基反应官能团将它们结合到胺官能团。相似的, 利用马来酰亚胺、碘乙酰胺、和氮丙啶反应官能团, 荧光团可以同时结合到硫醇。长波长碱性蕊香红, 其是主要的在氮上具有取代基的碱性蕊香红绿TM衍生物, 是已知的最耐光的标记试剂。它们的光谱不会受 pH4-10 的改变而受影响, 对于许多生物应用, 其比荧光素具有

重要的优势。该官能团包括四甲基若丹明，X-碱性蕊香红和得克萨斯红™衍生物。本发明用于衍生肽的其它优选荧光团是被紫外光激发的荧光团。实例包括级联蓝、香豆素衍生物、蔡（其中的丹酰氯化物是一个成分）、茈和吡啶基恶唑衍生物。作为标记的还包括两个相关的无机材料，最近已有对它们的描述：半导体纳米晶，包括例如镉硫酸盐（Bruchez, M et al., Science 281:2013-2016 (1998), 量子点，如锌-硫化物-帽化的Cd硒化物(zinc-sulfide-capped Cd selenide)（Chan, WC et al., Science 281:2016- 2018 (1998)）。

在另一个方法中，Ab的氨基官能团允许与那些产生荧光产物的试剂反应，例如，荧光胺，二醛如邻苯二醛，蔡-2,3-二甲酯基和蒽-2,3-二甲酯基。同为氯化物和氟化物的7-硝基苯-2-噁-1,3-二唑（NBD）衍生物，有益于改进胺以生产荧光产品。

本发明的Ab还可以利用荧光发射金属如 ^{152}Eu 或其它的镧系标记进行检测。利用这样的金属螯合物如二乙撑三胺五醋酸（DTPA，参见下文的实施例X）或乙二胺四醋酸（EDTA）将这些金属附着于肽。例如，DTPA可用作酸酐，其容易修饰本发明的含 NH_2 的肽。

对于体内诊断或治疗，可以利用螯合剂如DTPA和DOTA直接或间接地将放射性核素结合到Ab。这样的放射性核素的实例为 ^{99}Tc ， ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{97}Ru 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Y 和 ^{201}Tl 。一般来说，用于判断诊断检测能力所需的标记Ab的量将随患者的年龄、状态、性别、疾病的范围，和禁忌征（如果有的话）以及其它的变化而改变，并且所用量也将由各自的内科医生或诊断医师来调整。剂量可以在0.001mg/kg到100mg/kg之间变化。

还可以通过将Ab耦合到磷光性的或化学发光的化合物来检测。然后通过检测在化学反应过程中产生的荧光的存在来测定化学发光标记的肽的存在。特别有用的化学发光剂的实例是发光氨、异构发光氨、治疗学的Y啉酯、咪唑、acridinium盐和草酸酯。同样，生物发光化合物可用于标记肽。生物发光是化学发光在生物系统中发现的一种类型，其中催化蛋白质增加了化学发光反应的效率。通过检测荧光的存在来测定生物发光蛋白质的存在。用于标记目的的重要生物发光化合物有虫萤光素、虫荧光素酶和水母发光蛋白。

在另一项实施方案中，基于具有或导致高消光系数的发色团，使用比色检测。

标记肽的原位检测是通过从患者中取出组织学样品,然后在适当条件下通过显微技术对其进行检查以检测出标记而实现的。普通技术人员将容易理解为了达到这样的原位检测目的可以改良任一个宽范围改变的组织学方法(如着色法)。

对于诊断体内放射成像,

选择放射性核素中可用的检测工具类型是主要因素。选择的放射性核素一定有通过特定工具可检测出的一种衰变类型。根据本发明,一般可以利用任一个常规方法进行肉眼观察诊断成像。对于体内诊断选择放射性核素的另一个因素是它们的半衰期要足够长,这样在靶组织最大吸收时仍然可检测出标记,但半衰期还得足够短,这样最小化对宿主的有害放射。在一个优选的实施方案中,用于体内成像的放射性核素不发射粒子,但产生大量的 140-200keV 范围的光子,这样可以容易地通过常规伽马照相机检测。

体内成像可用于检测其它方法不能发现的隐蔽转移。对于非扩散阶段肿瘤可以使用成像技术。

通过免疫测定,利用抗体检测 uPA-或 uPAR-复合物

本发明的抗体在免疫测定检测组织样品或体液如血清或血浆中的包含这些表位的分子很有用。该 Abs 将检测抗原或其具有表位的片段。所以,如果在肿瘤中蛋白分解,那么环境或在组织中导致片段的释放。

为达到该目的,可以应用本领域已知的任一个常规免疫测定,但酶免疫测定如 ELISA 是优选的。免疫测定方法在以上引证的参考中有所描述。

一般使用竞争免疫测定检测测试样品中的分子,该分子是可以在结合特异性、亲合力、能力等方面仿制 mAbs 的复合物的配位体。在一个竞争结合分析的实施方案中,测量结合到复合物的 Ab 的量(直接地或间接地利用标记的抗 Ig)。在测试样品存在下的竞争作用(也就是比较少的 Ab 结合到复合物)证明了样品的一个或多个成分结合到复合物。大部分被测试的化合物被期望具有中等亲合力(大约 1-10 μ M)的结合度。

在另一项实施方案中,用目标 mAb 涂覆固体支持物,如微量培养板。在其中加入测试样品并培养,例如约 30 分钟使相关分子结合到 Ab。将盘洗涤然后将可检测出标记形式的复合物作为竞争配位体加入其中,然后用测试样品竞争结合到 Ab。测试样品产生“阳性”表明较少的标记复合物结合到固相。这种

方法中，复合物溶液和样品溶液不被同时加入，以避免混淆测试样品直接结合到复合物的效果，因为本发明的任一个测试样品首先通过固定的 mAb 获得。优选地，为了确保结合是特异性的，试验一系列稀释液获得稀释曲线。这将显示，例如是否与一半样品具有少于 50% 的结合/信号比率。如果不存在这个稀释结果，可以推断有多个结合实体进入该测验。

如果在 mAb 结合位点结合的分子具有相似的亲合力，那么结果将更精确。

免疫组织化学分析

检测组织中抗原的一个优选的分析方法是利用任一个常规分析方法进行的免疫组织化学分析，该技术是成熟的。优选的分析方法描述于下面的实施例中。对于该方法的描述，参见，Dabbs, DJ, Diagnostic Immunohistochemistry, Churchill Livingstone, 2001，全文在此作为参考。

非组织学免疫测定

优选的免疫测定是酶免疫测定（EIA 氏法）如 ELISA，其将抗原或 Abs 固定到支持物。对于本发明的组合物和方法，固体支持物优选是聚苯乙烯、聚丙烯，聚乙烯、葡聚糖、尼龙、聚丙烯酰胺、聚乙二烯二氟化物、天然的纤维素、改良的纤维素、硝化纤维、琼脂糖和磁珠中的任一个。在优选的实施方案中，聚苯乙烯或其它塑料制品的多槽盘表面作为固体支持物。在另一个实施方案中，Ab 或抗原粘附到固体支持底部或松散地放置于多槽盘的槽内。还可以使用的多槽盘是在其底部包括硝化纤维或相似的膜材料，并且液体可以在压力或真空下流过去。

一般优选的免疫测定包括“前期”分析，其中，首先将固定到固体支持物的 Ab 与将被测试的样品接触，通过形成二元固定 Ab-抗原复合物，从样品中结合或“提取”抗原。经过适当的培养之后，洗涤固体支持物以除去包括游离抗原（如果有的话）的液体样品的残留物，然后与包含未知量的标记的 Ab（其功能为“报道分子”）的溶液接触。经过第二次培养之后，标记 Ab 通过未标记 Ab 与固定的抗原复合，第二次洗涤固体支持物以除去未参加反应的标记 Ab，然后测定固定的标记。前期三明治类分析可以是简单的“是/不是”的分析以确定抗原是否存在，或当使用包含已知量抗原的标准样品时，通过对比固定标记的 Ab 与固定 Ab 的量进行定量分析。

还可以使用所谓的“同时”和“反向”三明治分析。同时分析包括单一的培养

步骤，如将固定 Ab 和标记 Ab 同时加入到样品中。经过适当的培养之后，洗涤固体支持物以除去样残留物品和未组合化标记的 Ab。然后如上面常规前期三明治分析，测定与固体支持物缔合的标记 Ab 的存在或数量。

在“反向”分析中，经过适当的培养期后，将标记 Ab 的溶液加入到样品中，随后加入固定的未标记 Ab。。经过第二次培养后，用常规方法洗涤固相材料以除去样品的残留物和未参加反应的标记 Ab。然后如在“同时”和“前期”分析中所述测定与固体支持物缔合的固定 Ab。

结合到全细胞上 uPAR 的抗体分析

容易测试靶向 uPAR 的 Ab 和/或其结合物对 uPAR 的结合，优选地通过在竞争配位体结合分析测量 $[^{125}\text{I}]\text{DFP-uPA}$ 与 uPAR 的结合的抑制或通过用 $[^{125}\text{I}]$ 直接标记 Ab。可以应用表达 uPAR 的全细胞例如细胞系如 A2780 或 HeLa 进行分析。优选的分析用如下方法进行。将细胞（约 5×10^4 /槽）置放在 24 槽盘的培养基（例如具有 Earle 盐的 MEM/10%FBS+抗生素）中，然后在潮湿的 5% CO_2 环境中培养直到细胞达到 70%融合。利用 Iodo-gen[®]（Pierce）放射性碘标记来催化灭活的高分子量 uPA（DFP-uPA）达到 250,000cpm/ μg 的特异性活性。然后在冰上冷冻包含细胞的盘，用冷 PBS/0.05%Tween-80 洗涤两次（每次 5 分钟）细胞。在加入 $[^{125}\text{I}]\text{DFP-uPA}$ 的 10 分钟前，将测试 Abs 和/或其结合物在冷 PBS/0.1%BSA/0.01%Tween-80 中连续稀释冷，然后加入到每个槽中到终体积为 0.3mL。然后每个槽接受 9500cpm 的 $[^{125}\text{I}]\text{DFP-uPA}$ ，到终浓度为 0.2nM。然后在 4℃将盘进行 2 小时培养，然后用冷 PBS/0.05%Tween-80 洗涤 3×（每次 5 分钟）细胞。在每个槽加入 0.5mL 的 NaOH（1N）以溶解细胞，然后室温下将盘培养 5 分钟或直到每个槽内的所有细胞通过显微检查确定都被溶解。吸出每个槽的内容物并利用伽马计数器测定每个槽内的总数。每个化合物测试三次，结果用测得的包含单独的 $[^{125}\text{I}]\text{DFP-uPA}$ 槽内总放射能的百分比来表示，其可以表现最大（100%）结合。

$[^{125}\text{I}]\text{DFP-uPA}$ 与 uPAR 的结合的抑制通常与剂量相关，以至于要产生 50% 结合抑制（ IC_{50} 值），并期望其在曲线的线性部分下跌，测试化合物的浓度很容易被确定。。一般来说，Abs 和/或其结合物在 IC_{50} 值时，浓度低于约 10^{-5}M 。优选地，Abs 和/或其结合物在 IC_{50} 值时，浓度低于约 10^{-6}M ，更加优选地，低于约 10^{-7}M 。

抗 uPAR 抗体或其它配位体的生物活性分析

本领域技术人员将理解在这里描述的用于测量本发明 Abs 或其它的 uPAR-结合配位体或其结合物的活性的体外和体内分析是解释性的，不是全面概括也不是限制。

对 EC 迁移的分析

对于 EC 迁移研究，通过向每个转移槽加入 200 μ L 的胶原溶液将其涂覆类型 I 胶原 (50 μ g/mL)，然后在 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。在 24 槽盘中组合转移槽然后将总体积 0.8mL 的培养基中的化学引诱剂 (例如 FGF-2) 加入到小室底部。ECs，如人脐静脉内皮细胞 (HUVEC)，其已经从胰岛素的单层培养物中分离，用无血清培养基稀释到终浓度约 10^6 细胞/mL，然后将 0.2mL 的该细胞悬浮液加入每个转移槽的上部小室。将要测试的抑制剂同时加入到小室的较上部 and 较低部，然后继续在 37 $^{\circ}$ C 的潮湿环境中迁移 5 小时。将转移槽从用 DiffQuik[®] 染色的盘中移除。从上部小室用棉花药签刮削移除不能移动的细胞并分离膜，在玻片滑面上固定，然后在高倍视野 (400 $\times$) 下计数确定移动细胞数量。

抗扩散活性的生物分析

细胞如 ECs 或肿瘤细胞 (例如 PC-3 人前列腺癌瘤细胞) 通过重组基膜 (Matrigel[®]) 进行扩散的能力用已知如 Matrigel[®] 扩散分析系统分析是众所周知的 (Kleinman et al., Biochemistry 1986, 25: 312-318; Parish et al., 1992, Int. J. Cancer 52:378-383)。Matrigel[®] 是重组基膜，含有类型 IV 胶原，laminin，类肝素硫酸盐蛋白多糖类如 perlecan (其结合并定位到 bFGF)、玻连蛋白和转化生长因素- β (TGF β)、尿激酶类纤溶酶原激活剂 (uPA)、组织纤溶酶原激活剂 (tPA) 和已知作为纤溶酶原激活剂抑制剂类型 I (PAI-1) 的丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Chambers et al., Canc. Res. 1995, 55:1578-1585)。本领域公认，用该方法对靶向胞外受体或酶的 Abs 和/或其结合物或其它的配位体进行分析获得的结果，对这些 Abs 和/或其结合物的体内效果具有预见性 (Rabbani et al., Int. J. Cancer 1995, 63: 840-845)。

这种分析法应用转移槽组织培养插入物。扩散细胞被定义为穿过 Matrigel[®] 和聚碳酸酯膜上部然后粘附到膜底部的细胞。包含聚碳酸酯膜 (8.0 μ M 孔径) 转移槽 (例如获自 Costar) 被涂覆 Matrigel[®] (例如得自 Collaborative Research)，其已经用无菌 PBS 稀释到终浓度为约 75 μ g/mL (例如每个插入物 60 μ L 的稀释

Matrigel®), 然后放置到 24-槽盘的每个槽中。将膜在生物安全柜内干燥过夜, 然后加入 100 μ L 的培养基例如 DMEM, 并添加有抗生素, 在摇动工作台再水合 1 小时。从每个插入物中抽吸移除 DMEM, 然后向 24-槽盘的每个槽加入 0.8mL 的完全 DMEM (+/10%FBS 和抗生素) 直到包围转移槽 (“较低小室”) 的外部。将具有抗生素的新鲜 DMEM (100 μ L)、人 Glu-纤溶酶原 (5 μ g/mL)、任一个将被测试的抑制剂加入到顶部, 位于转移槽的 (“上部小室”) 内部。将要被测试的细胞进行胰蛋白酶化并在 DMEM+抗生素中再悬浮, 然后以终浓度为约 8×10^5 细胞/mL 加入到转移槽的顶部小室终浓度。调整上部小室的最后体积到 200 μ L。组装的盘然后在潮湿的 5%CO₂ 环境中培养 72 小时。培养后, 固定细胞并利用 DiffQuik® (Giemsa 染料) 染色, 然后利用棉花药签刮擦上部小室以除去 Matrigel®和任一个没有通过膜扩散的细胞。利用 X-acto®刀片从转移槽分离膜, 利用 Permount®和盖玻片固定到载片上, 然后利用高倍 (例如 400 $\times$) 显微镜计数。计算 5—10 个计数视野的扩散细胞平均数, 并作为抑制剂浓度的函数进行绘图。

抗血管发生活性的管形成分析

ECs, 如可以制备或商业获得的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 或人微脉管内皮细胞 (HMVEC), 以 2×10^5 细胞/mL 浓度与纤维蛋白原 (5mg/mL 在磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中以 1: 1 (v/v) 比例混合。加入凝血酶 (5 单位/mL 终浓度) 然后立即将混合物转移到 24-槽盘 (0.5mL/槽)。纤维蛋白凝胶形成, 然后与测试化合物一起将 VEGF 和 bFGF 加入到槽内 (每个终浓度为 5ng/mL)。在 37°C、5%CO₂ 下培养细胞 4 天, 期间计数每个槽内的细胞, 并分类为没有分支的圆的、伸长的、具有 1 个分支的伸长的或具有 2 个分支的伸长的或者多个分支的伸长的细胞。结果表示为每个浓度化合物的 5 个不同槽的平均数。一般在血管发生抑制剂存在下, 细胞保持圆的或形成未分化管 (如 0 个或 1 个分支)。本领域公认这些分析对体内血管发生 (或抗血管发生) 效果具有预见性 (Min et al., Cancer Res. 1996, 56: 2428-2433)。

在可替换的分析中, 当 ECs 培养在 Matrigel®上时发现了 EC 管形成 (Schnaper HW et al., J. Cell. Physiol. 1995, 165:107-118)。将 10^4 EC/槽转移到 Matrigel®涂覆的 24-槽盘上, 48 小时之后测管形成数量。在加入 ECs 的时间点或者其后的多个时间点测试抑制剂。可以加入 (a) 血管发生生长因子如 bFGF

或 VEGF, (b) 分化刺激试剂 (如 PMA) 或 (c) 它们的组合来刺激管形成。

在不希望受到理论的限制时, 该分析模拟了 Ecs 在特定类型基膜上的血管发生, 该基膜也就是首先期望能够遇到移动和分化 ECs 的基质层。除了结合生长因素外, 在 Matrigel® (和在原位基膜中) 中发现的基质成分或其蛋白水解产物也可刺激 EC 管形成, 该 EC 管形成使得该模型补充了以前描述的纤维蛋白凝胶血管发生模型 (Blood, CH et al., Biochim. Biophys. Acta 1990, 1032:89-118; Odedra, R et al., Pharmac. Ther. 1991, 49:111-124)。

细胞增殖抑制分析

可以在 96-槽格式中通过细胞增殖抑制分析来测定本发明的 Abs 和/或结合物对 ECs 增殖的抑制能力。用类型 I 胶原 (凝胶) 涂覆盘的槽 (在 PBS 中 0.1-1mg/mL, 0.1mL/槽, 室温下 30 分钟)。在洗涤盘 (利用 PBS 进行 3×) 之后, 将 $3-6 \times 10^3$ 细胞放置到每个槽内并在内皮生长培养基 (EGM; Clonetics) 或添加有 0.1-2% 的 FBS 的 M199 培养基中附着 4 小时 ($37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$)。4 小时后, 移除培养基和任何未附着的细胞, 并将添加有 bFGF (1-10ng/mL) 或 VEGF (1-10ng/mL) 的新鲜培养基加入到每个槽内。最后加入将要被测试的抗体和/或结合物, 然后培养盘 ($37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$) 24-48 小时。将发色化合物 MTS (Promega) 加入到每个槽中然后培养 1-4 小时。每个槽的显色度直接与细胞数量成比例, 这样将其用作计数细胞的替代物。在 490nm 读取吸光度以确定对照槽与包含测试的 Abs 和/或结合物的槽之间的细胞数的差异, 也就是增殖。

可以使用培养的粘着肿瘤细胞的相似分析方法。然而, 在该形式中胶原可以省略。沉积肿瘤细胞 (如 $3-10 \times 10^3$ /槽) 并附着过夜。然后加入无血清的培养基, 并强迫细胞同步 24 小时。然后将培养基+10%FBS 加入到每个槽内刺激增殖。要被测试的抗体和/或结合物包括在这些槽中。24 小时后, 将 MTS 加入盘内分析研究, 然后如上述读数。

细胞毒性分析

可以对多种细胞类型包括肿瘤细胞、ECs、纤维原细胞和巨噬细胞进行测定 Abs 和/或其结合物的抗增殖和细胞毒性效果。尤其有益于测试已经结合到治疗结构如放射治疗或毒素的 Ab。例如: 期望本发明的一个 Abs 与已用 ^{131}I 碘化的 Bolton-Hunter 试剂的结合物能抑制表达 uPAR 的细胞的增殖 (大部分可能通过诱导凋亡)。抗增殖效果期望能够抗肿瘤细胞和刺激内皮细胞, 但在

某些情况下不抗疾病遏制的内皮细胞或正常人真皮纤维原细胞。在正常细胞中观察到的任一个抗增殖或细胞毒性效果表现为结合物的非特异毒性。

一般的分析包括将 5-10,000 细胞/槽密度的细胞置于 96-槽盘。加入以 10 倍于结合分析中测量的 IC_{50} 的浓度的被测试的化合物（依据结合物而变化）并与细胞一起培养 30 分钟。用培养基洗涤细胞 3×，然后加入包含 [3H] 胸苷（1 $\mu Ci/mL$ ）的新鲜培养基到细胞中，在 37°C 的 5% CO_2 中培养 24 和 48 小时。用 1M 的 NaOH 在多个时间点溶解细胞，然后利用 β 计数器测定每个槽的量。利用 MTS 试剂或 CyQuant[®] 非放射性测量增殖以测定总细胞数。为分析细胞毒性（测定量细胞溶解），使用 Promega96 槽细胞毒性试剂盒。如果具有抗增殖活性的证据，那么可以利用肿瘤 TACS（Genzyme）测定凋亡的诱导。

Caspase-3 活性分析

Abs 和/或其结合物促进 EC 凋亡的能力可以通过测量 Caspase-3 的活性作用测定。类型 I 胶原（凝胶）涂覆于 P100 盘然后将 5×10^5 的 ECs 播种在 EGM+10%FBS 中。24 小时（37°C/5% CO_2 ）后，用 EGM+2%FBS、10ng/mL 的 bFGF 和所需的测试化合物替换培养基。6 小时后收集细胞，在 1% 的 Triton X-100 清洁剂中制备细胞溶解产物，然后根据产品说明书，利用 EnzChek[®] Caspase-3 分析试剂盒#1（分子探针）分析溶解产物。

角膜血管发生模型

所用的方案基本上与 Volpert, OV et al., J. Clin. Invest 1996, 98:671-679 中的描述相同。简要地说，麻醉雌性 Fischer 鼠（120-140gms），将包含 Hydron[®]、bFGF（150nM）和将被测试的 Abs 和/或其结合物的颗粒（5 μL ）植入角膜缘 1.0-1.5mm 的微小切口。在移植 5 和 7 天后检测新血管的发生。在第 7 天，将动物麻醉然后注入染料如胶态炭以染色脉管。然后无痛致死动物，用福尔马林固定角膜，将角膜压平并被拍照以评价血管发生等级。通过成像总脉管面积或长度，或只是通过简单地计数脉管数来定量分析新脉管。

鸡尿囊绒毛膜（CAM）血管发生分析

该分析方法在 Nguyen et al., Microvascular Res. 1994, 47:31-40 中进行。将包含血管发生因子（bFGF）或肿瘤细胞以及测试化合物的网及抗 uPAR Abs 或者结合物放置到 8 天大鸡胚的 CAM 上，植入样品后观察 CAM3-9 天。通过检测包含可见血液脉管网的面积百分比定量测血管发生数。

Matrigel®栓子分析

该分析 Passaniti, A et al., 1992, Lab Invest. 67:519-528 中进行。用冰冷却的 Matrigel®(例如 500 μ L) (Collaborative Biomedical Products, Inc., Bedford, MA) 与肝素(例如 50 μ g/ml)、FGF-2(如 400ng/mL)和将要被测试的化合物混合。在某些分析中,可以用肿瘤细胞替代 bFGF 作为血管发生刺激物。将 Matrigel®混合物在靠近腹部中线位置的皮下(s.c.)注射进入 4-8 星期大的无胸腺裸小鼠,优选每只小鼠注射 3 次。注射的 Matrigel®形成可触摸的固体凝胶。选择注射位点以至于每个动物接受正控制栓子(plug)(如 FGF2+肝素)、负控制栓子(plug)(如缓冲液+肝素)和包括将被测试血管发生的效果的化合物如(FGF-2+肝素+化合物)的那些栓子(plug)。所有的处理组优选重复三次试验。在注射后约 7 天或其它的可以最佳观察血管发生的时间断颈处死动物。在腹部中线分离小鼠皮肤,然后回收 Matrigel®栓子(plug)并立即在高分辨力下显微镜检查。将栓子(plug)分散在水中并在 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。根据产品说明书利用 Drabkin 溶液(例如得自 Sigma)测定栓子(plug)中的血红蛋白(Hb)水平。栓子(plug)中的 Hb 量是血管发生的一种间接测量,因为其反映了样品中的血液量。

另外,或可选择地,动物在处死之前用包含结合荧光团的高分子量葡聚糖的 0.1mL 缓冲液(优选 PBS)注射。通过荧光法测定胶态栓子(plug)中的荧光量,也作为栓子(plug)中血管发生的测量。用 mAb 抗 CD31(CD31 是“血小板内皮细胞粘附分子”,“PECAM”)着色也可能用于确认栓子(plug)中的新脉管形成和微脉管密度。

利用肿瘤细胞作 Matrigel®栓子(plug)分析,体内评估血管发生抑制作用和抗肿瘤效果

在该分析中,肿瘤细胞,如 $1-5 \times 10^6$ 个细胞的 3LL 刘易斯肺癌瘤或鼠前列腺细胞系 MatLyLu 与 Matrigel®混合,然后注射进入小鼠横腹部,用以上所述方法进行。约 5-7 天后在栓子(plug)中可以发现肿瘤细胞块和强烈的血管发生反应。在实际肿瘤环境中,将化合物置于栓子(plug)中来评价其抗肿瘤和抗血管发生作用。然后测量肿瘤重量、Hb 水平或荧光水平(处死前注射葡聚糖荧光结合物的水平)。为测量 Hb 或荧光,首先用组织匀化器将栓子(plug)均匀化。

皮下肿瘤生长的异种移植模型

人卵巢癌瘤

由未治疗患者的肿瘤组织建立 A2780 人卵巢癌系。A2780 细胞以单层停留于在 2mM 谷酰胺、0.01mg/mL 牛胰岛素和添加 10%FBS 的 RPMI 1640 培养基中。(Hamilton, TC et al., Sem. Oncol. 1984; 11:285- 293; Behrens, BC et al., Cancer Res. 1987; 47:414-418)。将 2 百万个 A2780 接种于裸 BALB/c 雌性鼠的右边横腹部。处理前 A2780 肿瘤处于 50-200mm³ 范围的阶段。每周星期一和星期五两次以 10mg/kg 的剂量腹膜内给药 IgG 对照 Ab 及抗 D2D3 uPAR 的 mAbs。顺铂处理组处于 1000mm³ 的阶段, 动物每周一次接受 6mg/kg 给药。每星期测量两次肿瘤体积。在处死的时候, 从每个动物获得血浆并切除肿瘤。为进行生物化学评估将一半肿瘤快速冷冻和为组织学评估将剩余的放置在锌固定剂中。

人肺癌瘤

A549, 人肺癌瘤 (ATCC 目录号 CCL-185) 细胞系, 是通过移植培养 58 岁男性白种人的肺癌组织建立 (Giard, DJ et al., J. Natl. Cancer Inst. 51:1417-23 (1973))。在 2mM 谷酰胺、0.15% 的 NaHCO₃ 和添加 10FBS 的 Ham 的 F12K 培养基中维持 A549 细胞。

约 10⁶ 个 A549 癌瘤细胞接种于 C.B-17/Sys (*scid/scid*) 严重组合免疫缺陷 (SCID) 的雌性鼠右侧横腹部。优选地, 在肿瘤接种后开始处理。每周星期一和星期五两次以 10mg/kg 的剂量腹膜内给药 IgG 对照 Ab (和 PBS 对照) 及抗 D2D3 uPAR 的 mAb ATN-658。每星期测量一次起始肿瘤体积。当任一个处理组中的体积超过 300mm³ 时, 一个星期两次进行测量。

在处死的时候, 从每个动物获得血浆并切除肿瘤。为进行生物化学评估将一半肿瘤快速冷冻和为组织学评估将剩余的放置在锌固定剂中。

转移的异种移植模型

利用试验转移模型测试 Abs 和/或结合物对晚期转移的抑制, 模型如 Crowley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90 5021-5025 中所描述。晚期转移包括步骤: 肿瘤细胞附着和外渗、局部扩散、播种、增殖和诱导血管发生。用报道基因, 优选绿耐光蛋白质 (GFP) 基因, 但作为选择的, 可使用编码酶氯霉素乙酰转移酶 (CAT)、荧光素酶或 LacZ 的基因转染人前列腺癌瘤细胞

(PC-3), 将该转染的细胞移植进入裸鼠中。该方法利用这些标记 (GFP 的荧光检测或多种酶的组织化学比色检测) 中的一种以跟踪这些细胞的命运。注射细胞, 优选 iv, 然后约 14 天后鉴定在特别是肺, 还有局部淋巴结、股骨和大脑内的转移。这样模拟了在人类中前列腺肿瘤中自然发生转移的器官趋性。例如, 将表达 GFP 的 PC-3 细胞 (10^6 细胞/小鼠) iv 注射入裸 (*nu/nu*) 鼠的尾静脉。用测试组合物以 $100\mu\text{g}/\text{动物}/\text{天}$ 的 q.i.P 给药治疗动物。通过荧光显微术或光显微组织化学或通过粉碎组织对可检测出的标记比色分析来目测和定量单个转移性细胞和病灶。

药物和治疗组合物及其给药

可以在本发明的药物组合物中使用化合物, 其包括所有的多肽分子, 优选如上面描述的 Abs, 还有这些化合物的药物可接受的盐。本发明包含碱基的化合物的药物可接受的酸加成盐可以通过现有技术中已知的方法使用适当的强或适当强的、非毒性、有机或无机酸形成。本发明的酸加成盐的实例包括马来酸盐、延胡索酸盐、乳酸盐、草酸盐、甲基酰磺酸盐、乙基磺酸盐、苯磺酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、盐酸化物、氢溴化物、硫酸盐、磷酸盐和硝酸盐。

通过已知方法从有机和无机碱制备本发明的含有酸基团的化合物的药物可接受的碱加成盐, 包括例如, 无毒的碱金属和碱性土碱, 如钙、钠、钾和铵氢氧化物, 和无毒的有机碱如三乙胺、氨丁烷、哌嗪, 和三(羟甲基)甲胺。

如以上所述, 本发明的化合物具有抑制 EC 增殖、移动或扩散和血管发生的能力, 和具有治疗肿瘤尤其是转移性肿瘤的特性。本发明的组合物其本身是活性的, 并可以充当在体内转化为活性形式的“前药物”。

治疗性标记组合物

在优选的实施方案中, 在这里描述的 mAbs 被“治疗性结合”或“治疗性标记”(顺序可交换), 并用于递送治疗试剂到化合物到达并结合的位点, 如肿瘤转移位点或感染/发炎、再狭窄或纤维化病灶。术语“治疗性结合”是指修饰的 mAb 结合到其它的治疗试剂, 该试剂定向到潜在病因或肿瘤扩散、血管发生、发炎或者其它病理学的“成分”。携载适当的治疗性“标记”的治疗标记多肽在这里也称之为“治疗结构”。治疗性结构是原子、分子、化合物或任何一个被加入到肽内的化学成分, 使得所述结构在治疗靶疾病或病症, 主要是与不需要的血管发生缔合的状态中具有活性。该治疗结构可以是直接地结合到, 或间接地结

合到 mAb。治疗标记的 mAb 作为包括药物可接受的载体或赋形剂的药物组合物给药，并且其优选地为适于注射的形式。

有用的治疗性放射性同位素的实例包括（按原子序数顺序） ^{47}Sc 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{109}Pd 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{199}Au 、 ^{121}At 、 ^{212}Pb 和 ^{213}Bi 。这些原子可以直接地、间接地作为螯合物的一部分结合到肽，或就碘而言，间接作为碘化 Bolton-Hunter 官能团的一部分。放射性碘在该官能团结合到肽化合物之前或之后被导入。

放射性核素结合物的优选剂量是递送到靶位点的特定放射能的函数，该靶位点随肿瘤类型、肿瘤定位和血管化、肽载体的动力学和体内分解、核素发射的放射能等变化而变化。放射治疗领域的技术人员可以根据达到所需治疗效果的特定核素的剂量，不经过试验就能容易地调整肽的剂量。

另一个治疗方法使用硼中子捕获治疗，其中将硼化肽递送到所需的靶位点，如肿瘤，优选颅内肿瘤（Barth, RF, *Cancer Invest.* 14: 534-550 (1996); Mishima, Y (ed.), *Cancer Neutron Capture Therapy*, New York: Plenum Publishing Corp., 1996; Soloway, AH et al., (eds), *J. Neuro-Oncol.* 33: 1- 188 (1997)）。稳定的同位素 ^{10}B 用低能量（ $<0.025\text{eV}$ ）热中子进行辐射，所得到的核捕获产生具有高线性能量转移并分别具有约 9 和 $5\mu\text{m}$ 的轨道长的 α 粒子和 ^7Li 核。该方法基于血液、内皮细胞和普通组织（例如脑）的低水平肿瘤中的 ^{10}B 的累积。该递送利用表皮生长因子完成（Yang, W et al., *Cancer Res* 57:4333-4339 (1997)）。

其它根据本发明的方法可以结合到 mAbs 的治疗试剂为药物、前体药物、激活前体药物的酶、光敏剂、核酸治疗剂、抗敏载体、病毒载体、凝集素和其它的毒素。

凝集素是蛋白质，一般来源于植物，与糖类结合。在其它的活性物中，某些凝集素有毒性。已知的大部分细胞毒素物质是细菌和植物源的蛋白质毒素（Frankel, AE et al., *Ann. Rev. Med.* 37:125-142 (1986)）。这些分子结合到细胞表面并抑制细胞蛋白质合成。大部分常规使用的植物毒素是蓖麻毒和相思豆毒素；大部分常规使用的细菌毒素是白喉毒素和假单胞菌外毒素 A。在蓖麻毒和相思豆毒素中，结合和毒性功能被包含在 2 个分离的蛋白质亚单位，A 和 B 链。蓖麻毒 B 链结合到细胞表面糖类并促进 A 链吸收进入细胞。一旦进入细胞，蓖麻毒 A 链通过灭活真核核糖体的 60S 亚基抑制蛋白质合成（Endo, Y. et

al., *J. Biol. Chem.* 262: 5908-5912 (1987))。其它的植物源毒素是单链核糖体抑制蛋白质, 包括商陆抗病毒蛋白质、小麦胚芽蛋白质、细胞毒素、香石竹毒蛋白、苦瓜子蛋白、天花粉蛋白, 及许多其它毒素 (Strip, F. et al., *FEBS Lett.* 195:1-8 (1986))。白喉毒素和假单胞菌外毒素 A 也是单链蛋白质, 且它们的结合和毒性功能定位在相同蛋白质的不同结构域。假单胞菌外毒素 A 具有与白喉毒素相同的催化活性。蓖麻毒已经在治疗中使用, 其通过结合它的毒性 α 链到如 Abs 的靶向分子达到位点特异性递送毒性效果。细菌毒素已经被用于作为抗肿瘤结合物。作为本文的目的, 毒性肽链或域结合到本发明的化合物并以位点特异性方式递送到毒性活性需要的靶位点, 如转移性病灶。毒素与蛋白质如 Abs 或其它的配位体的结合在本领域是已知的 (Olsnes, S. et al., *Immunol. Today* 10:291-295 (1989) ; Vitetta, ES et al., *Ann. Rev. Immunol.* 3: 197-212 (1985))。

干扰关键细胞处理的包括 DNA、RNA、和蛋白质合成的细胞毒素药物已结合到 Abs 并随后用于体内治疗。这样的药物, 包括但不限于柔毛霉素、亚德里亚霉素、甲基蝶啶胺, 和丝裂霉素 C, 结合到本发明的化合物并以该形式用于治疗。

本发明的化合物及其药物可接受的盐可以制备成方便的配药形式, 如胶囊、浸渍干胶片、片剂或可注射的剂型。可以应用固体或液体药物可接受的载体。

固体载体包括淀粉、乳糖、二水合物钙硫酸盐、石膏粉、蔗糖、滑石粉、凝胶、琼脂、果胶、阿拉伯胶、硬脂酸镁和硬脂酸。液体载体包括糖浆、花生油、橄榄油、盐、水、葡萄糖、甘油等。相似的, 载体或稀释液可以包括任何一个缓释材料, 如单独或与蜡混合的硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。当使用液体载体时, 可以使用的剂型形式为糖浆、酏剂、乳剂、软胶囊、无菌可注射的液体 (例如溶液)、如安瓿, 或含水的或非水的液体悬浮液。这样药物组合物的概述可以从例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania (Gennaro 18th ed. 1990)中找到。

根据药物化学的常规技术步骤制备药物, 如混合、粒化和压缩, 或当需要片剂形式时, 进行混合、填充和溶解配料, 以适当地提供口服、肠道外、局部、经皮、阴道内、腹膜内、鼻内、支气管内、颅内、眼内、耳内和直肠所需的给

药产品。药物组合物可能还包含少量的无毒的辅助物质，如湿润或乳化试剂、pH 缓冲液试剂等。

本发明可以用于诊断或治疗任一个动物属和种并可同样地用于人或兽医医药的实践。因此，药物组合物可以用于治疗家养的和商业性的动物，包括鸟类，更加优选为哺乳动物以及人。

术语“系统给药”是指给药本文描述的组合物或试剂如多肽，该方式能够导致组合物进入患者的循环系统或其它的允许其遍及体内的扩散，如静脉（i.v.）注射或灌输。“区域”给药是指给药进入特异的，并且稍微受限制的解剖学空隙，如腹膜内、胸内、硬膜下、或特殊的器官。实例包括阴道内、腹膜内、鼻内、支气管内（或肺滴注）、颅内的、耳内或眼内给药。术语“局部给药”是指给药组合物或药物进入限制的或外围的解剖学空隙，如肿瘤内注射进入肿瘤块、皮下（s.c.）注射、肌肉（i.m.）注射。本领域技术人员将理解局部给药或区域给药经常也导致组合物进入循环系统，例如 s.c.或 i.m.也是系统给药的途径。可注射的或难溶化的剂型可以制备成常规形式，或是溶液或是悬浮液，注射或灌输前适合液体中的溶液或悬浮液的固体形式，或作为乳剂。虽然给药的优选途径是系统给药，如 i.v.，但药物组合物可以局部或经皮给药，例如作为软膏、膏状物或凝胶；口服；直肠；例如作为栓剂。

对于局部应用，可以应用赋形剂如油膏或软膏将化合物局部施用。活性成分的载体可以是可喷雾的或不可喷雾的形式。非喷雾形式可以是半固体或固体形式，包括原始的局部应用的载体并优选具有比水大的动态粘滞度。适当的制剂包括但不限于溶液、悬浮液、乳剂、膏状物、软膏、粉末、搽剂、油膏等。如果需要，这些制剂可以被灭菌或与辅助试剂如防腐剂、稳定剂、湿润试剂、缓冲液，或影响渗透压的盐等混合。优选的非喷雾局部剂型优选包括软膏碱，例如聚乙二醇-1000（PEG-1000）；常规膏状物如 HEB 膏状物；胶凝体；和凡士林等。

适合局部应用及肺滴注的还有可喷射气溶胶剂型，其中优选与固体或液体惰性载体材料结合的化合物包裹在可挤压的瓶中或与通常为气体抛射剂的加压挥发物混合。除了本发明的化合物外，气溶胶剂型可以包含溶剂、缓冲液、表面活性剂、香料，和 / 或抗氧化剂。

对于优选的局部应用，尤其对于人来说，优选给药有效量的化合物到受影

响的区域,例如皮肤表面、黏液膜、眼睛等。依据被治疗区域和症状的严重程度及应用的局部赋形剂性质,每次应用的量一般范围是 0.001mg 到约 1g。

本发明多肽组合物的其它药物可接受载体是脂质体,药物组合物中的活性蛋白质被包含在或分散或多种方式地位于由粘着到油脂层的含水同心层组成的微粒中。活性多肽优选内面或外面地位于含水层和油脂层,,或在任何情况下,在非均匀系统中一般已知为脂质悬浮液。疏水层或油脂层,一般不排除包括磷脂如卵磷脂和鞘磷脂、类固醇如胆固醇、或多或少的离子表面活性物质如三十二烷磷酸酯、十八胺或磷脂酸,和其它疏水性质材料。本领域熟练技术人员将理解本发明脂质制剂的其它适当实施方案。

治疗肿瘤和癌症的治疗组合物除了肽还可以包括一个或多个的抗肿瘤剂,如有丝分裂抑制剂,例如长春花碱;烷基化试剂,例如环磷酰胺;叶酸抑制剂,如甲基蝶啶胺、吡曲克辛或三甲曲沙;抗代谢物,如 5-氟尿嘧啶和胞嘧啶阿拉伯糖苷;嵌入抗生素,例如阿霉素和博来霉素;多种酶或酶抑制剂,如天冬酰胺酶、拓扑异构酶抑制剂如吡喃葡萄糖苷;或生物反应调节剂,如干扰素或白细胞介素。事实上,包括任一个已知的与本文公开的肽结合的癌症治疗物质的药物组合物都在本发明的范围内。药物组合物还可以包括一个或多个其它的治疗处于危险的靶患者的其它症状的药物,例如抗传染性的抗菌、抗真菌、抗寄生虫、抗病毒、和抗球虫的试剂。

给药的治疗剂量是如本领域技术人员已知的或容易确定的治疗有效量。剂量是也根据受体的年龄、健康状况和体重,同时治疗的种类,如果有的话,,治疗频率,和所需效果的性质,如抗炎效果或抗细菌效果来决定。

治疗方法

本发明的方法可以用于抑制患者的肿瘤生长和扩散或用于抑制肿瘤诱导的血管发生,其中诱导是通过抑制内皮细胞生长和迁移来实现。通过抑制肿瘤或血管发生的生长或扩散,该方法抑制肿瘤转移。脊椎动物患者,优选哺乳动物,更优选人,给药化合物的量足以有效抑制肿瘤生长、扩散或血管发生。化合物或其药物可接受的盐优选以上所描述的药物组合物的形式给药。

蛋白质(包括 Abs)、肽、肽多聚体等剂量优选包括有效量肽的药物剂量单位。剂量单位形式是指与哺乳动物患者的单位剂量匹配的物理离散单位;每个单位包含预先确定的产生所需治疗效果并与所需药物载体缔合的活性材料

的量。本发明的剂量单位形式直接依赖于 (a) 活性材料的独有特征和将获得的特定治疗效果, 和 (b) 复合物如活性化合物领域对每个患者的治疗性和敏感性的固有的局限性。

有效量是指足以在体内达到稳定状态浓度的平均量, 其在疾病的任一个相关参数上产生可测定的减少, 并且包括早期或转移性肿瘤的生长, 任何一个可接受的发炎反应性指数, 或可测定的无疾病间隔或生存的期限。例如, 患者肿瘤生长减少 20% 可以认为有效 (Frei III, E., *The Cancer Journal* 3:127-136 (1997))。然而, 根据本发明, 对于所需的有效剂量, 该等级的效果不被认为是最小的。

在一个实施方案中, 体内分析的有效剂量优选高于化合物 50% 有效剂量 (ED50) 的 10 倍和更加优选为 100 倍, 如本发明所描述。

给药的活性化合物的量有赖于精确选择的肽或衍生物、疾病或症状、给药途径、受体的健康和体重、其它的合并治疗的存在 (如果有的话)、治疗频率、所需效果的性质如肿瘤转移的抑制和熟练的专业人员的判断。

治疗肿瘤患者, 优选哺乳动物, 更优选人的优选剂量至多为每千克体重约 100 毫克的活性多肽化合物。肽或拟肽类的一般单剂量约为 1ng 至约 100mg/kg 体重。对于局部给药, 建议剂量为化合物的 0.01-20% 浓度 (按重量计), 优选为 1-5%。对于静脉给药优选的每日总剂量为 0.1 毫克至约 7 克。然而, 前述范围是建议性的, 因为在个体治疗状态中变量的数目是大的, 对这些优选进行值进行改变是可行的。

在体外抑制内皮细胞增殖或迁移的肽的有效量或剂量为每个细胞 1 皮克至约 5 毫微克。利用本发明所描述的方法体外测定有效剂量和最佳剂量范围。

本发明的化合物的特征为对肿瘤细胞或内皮细胞增殖、迁移、扩散、或血管发生、肿瘤转移或炎症反应产生抑制。化合物尤其有益于患有肿瘤的哺乳动物宿主优选人中产生抗肿瘤效果, 其中血管发生抑制导致肿瘤尺寸或生长速率的减少或肿瘤的破坏。优选患者是人。

用上述方法可以有效防治的疾病或状态的更多实例包括早期生长固体肿瘤、白血病或淋巴瘤; 肿瘤扩散、转移或肿瘤转移的生长; 良性细胞增生; 动脉粥样硬化; 心肌血管发生; 球形血管成形术后的血管再狭窄; 血管损伤后的新内膜形成; 血管移植再狭窄; 冠状侧突形成; 深静脉血栓形成; 缺血肢血管

发生；毛细血管扩张；化脓肉芽瘤；角膜疾病；虹膜发红；新脉管青光眼；糖尿病和其它的视网膜病；晶状体后纤维增生；糖尿病血管再生；黄斑变性；子宫内膜异位症；关节炎；慢性发炎状态的纤维化缔合、外伤脊髓损伤包括局部缺血、疤痕斑斑或纤维化；肺纤维化、化学疗法诱导的纤维化；具有疤痕和纤维化的创伤痊愈；消化性溃疡；骨折；瘢痕瘤；或血管发生病症、细胞生成作用、排卵、月经、怀孕或与病原细胞浸润或与血管发生缔合的胎盘形成。

用以上所述方法治疗的优选的疾病或状态是肿瘤生长、扩散或转移。其中包括脑肿瘤。该脑肿瘤的实例为星形细胞瘤、退行发育的星形细胞瘤、胚胎细胞瘤、恶性胶质瘤、*multiformae*、纤维状细胞的星形细胞瘤、异形黄色星形细胞瘤、表皮下巨细胞星形细胞瘤、纤维状星形细胞瘤、饲肥星形细胞瘤、原生质星形细胞瘤、间胶质瘤、退行发育的间胶质瘤、室管膜瘤、退行发育的室管膜瘤、粘生乳头状室管膜瘤、亚室管膜瘤、混合的微星形细胞瘤和恶性微星形细胞瘤。

该方法也用于治疗子宫疾病，如子宫内膜异位症和病原性翳障新血管再生，如与之相关的或其为病因的增殖糖尿病视网膜病、与年龄相关的黄斑变性脉管增生、早熟视网膜病、镰刀细胞视网膜病或视网膜血管堵塞。

血管发生抑制剂可以在预防炎性血管发生和外脊髓损伤后神经胶质瘤病起作用，从而促进神经连通性的恢复（Wamil, AW et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 95:13188-13193 (1998)）。因此，本发明的组合物在外脊髓损伤后尽可能快给药，几天至2个星期后达到抑制将在空间上抑制神经连通性恢复的血管发生和神经胶质瘤病。该治疗减少了脊髓损伤部位的面积，促进神经功能的再生，预防麻痹。期望本发明的化合物也能保护轴突免受 Wallerian 恶化，颠倒氨基丁酸盐介导的去极化（发生在损伤神经原中），并且促进恢复独立的中枢神经系统细胞和组织的神经传导性。

一般重组 DNA 方法

一般分子生物学方法已经在该领域详细地描述（Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd (or later) Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Ausubel, F et al., Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Wiley-Interscience, New York, (current edition); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); Glover, DM,

ed., DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II, IRL Press, 1985; Alberts, B. et al., Molecular Biology of the Cell, 4th (or later) Ed., Garland Publishing, Inc., New York, NY (2002); Watson, JD et al., Recombinant DNA, 2nd Ed. (or later) Ed., WH Freeman & Co.; 2nd edition (1993); 和 Old, RW et al., Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering, 5th (or later) ed., Univ. of Calif. Press, Berkeley (1994)。

除非另外指示, 特定的核苷酸序列具有其保守取代变体(例如简并密码替换)和互补序列。术语“核酸”与“多核苷酸”同义, 包括基因、cDNA 分子、mRNA 分子, 还有这些中的任一个片段如寡核苷酸, 及其等价位(更详细地解释如下)。核酸的大小用千碱基(kb)或者碱基对(bp)描述。用琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)评估其大小, 或通过使用者测定或公布的核苷酸序列评估。蛋白质的大小用千道尔顿(kda)表示的分子量或长度(氨基酸残基的数模)来描述。用 PAGE、测序、基于编码核苷酸序列或公开的氨基酸序列的推测氨基酸序列来测定蛋白质的大小。

尤其是, 可以利用来源于本发明公开的蛋白质序列的引物通过聚合酶链反应(PCR)合成编码对应于本发明多肽或其活性变体的氨基酸序列的 DNA 分子(参见, 例如美国专利号 4,683,202)。然后将这些 cDNA 序列组合进入真核或原核表达载体, 使用产生的载体在适当的宿主细胞例如 COS 或 CHO 细胞中定向合成融合多肽或其片段或衍生物。

在此, 术语“核酸”包括这些片段或等价位。本发明的核苷酸序列可以是 DNA 或 RNA。

转化或转染原核或真核宿主细胞以表达本发明的多肽也属于本发明的范围。例如, 多肽可以在细菌细胞如 E.coli、昆虫细胞(杆状病毒)、酵母菌或哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或人细胞(优选的转染细胞的人治疗用途)中表达。其它的适当的宿主对本领域熟练的技术人员来说是已知的。在真核细胞中的表达导致部分或完全糖基化和/或相应的重组多肽的链内或链间二硫键的形成。在酵母菌 *S.cerevisiae* 中表达的载体的实例包括 pYepSec (Baldari et al., 1987, EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan et al. 1982 Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al., 1987, Gene 54: 113-123), 和 pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)。在培养的昆虫细胞(SF 9 细胞)中表达蛋白质

的杆状病毒载体包括 pAc 系列 (Smith et al., 1983, Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) 和 pVL 系列 (Lucklow et al., (1989) Virology 170:31-39)。一般来说, COS 细胞 (Gluzman 1981 Cell 23:175-182) 结合到这些载体如 pCDM 8 (Aruffo et al., supra) 以在哺乳动物细胞中暂时扩增/表达, 而 CHO (dhfr-阴性 CHO) 细胞结合到载体如 pMT2PC (Kaufman et al., 1987, EMBO J. 6: 187-195) 以在哺乳动物细胞中稳定扩增/表达。NSO 骨髓瘤细胞系 (谷酰胺合成酶表达系统) 可得自 Celltech Ltd。

包含所需编码和对照序列的适当载体的构建应用了该领域已知的标准连接和限制性技术。将分离的质粒、DNA 序列, 或合成的寡核苷酸切割、剪接和以所需的形式再连接。形成载体的 DNA 序列可以从许多来源获得。主链载体和调控系统是一般从构建中用于大量序列的可得到“宿主”载体中发现。对于相关的编码序列, 原始的构建是指可以是和经常是从 cDNA 或染色体组的 DNA 文库中获取适当的序列。然而, 一旦序列公开, 就有可能在体外从各个核苷酸衍生物开始合成完整的基因序列。全长为 500-1000bp 基因的完整基因序列可以合成, 方法为在脱氧核糖核苷酸三磷酸盐存在下利用 DNA 聚合酶合成单独的重叠互补的寡核苷酸然后补充入单链非重叠部分。该方法已经成功地用于多个已知序列基因的构建。参见例如 Edge, Nature 1981, 292:756; Nambair et al., Science 1984, 223:1299; 和 Jay, J. Biol. Chem. 1984, 259:6311。通过上述引证所述的或通过 Beaucage et al., Tetrahedron Lett. 1981, 22:1859 和 Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 1981, 103:3185 中所述的方法合成寡核苷酸。

所需载体的成分可以被切断然后利用标准限制酶和连接方法连接。在本领域理解的一般条件下用适当的限制酶(或多种酶)处理来进行位点特异性 DNA 的切割, 特定的切割可指定由商业可得的限制酶来进行。如果需要参见例如 New England Biolabs 产品目录, 用标准聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶电泳技术分离不同大小的切割片段(如 Meth. Enzymol. (1980) 65:499-560)。

用任何一个方法将突变体导入编码序列以产生变异体, 如果这些变异体将通过重组制备。该突变体包括简单缺失或插入、系统缺失、多碱基簇的插入或取代或单碱基的取代。通过位点定向变异的 DNA 序列修饰是熟知的技术, 其方案和试剂也能够商业获得 (Zoller et al., Nucleic Acids Res. 1982, 10:6487-6500; Adelman et al., DNA 1983, 2:183-193)。通过限制酶分析和/或通过双脱氧核苷

酸方法测序分离的 DNA (Sanger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977,74:5463; Messing, et al., Nucleic Acids Res. 1981, 9:3091 或 Maxam et al., Meth. Enzymol., supra)。

通过常规技术如磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导转染、脂转染,或电穿孔可以将载体 DNA 导入哺乳动物细胞。转化宿主细胞的适当的方法发现于上述 Sambrook 等及其它的标准文本。在融合表达载体中,将蛋白水解切割位点导入报告簇和靶蛋白质的结合处以能够从报告簇分离目标蛋白质然后纯化融合蛋白质。用于该切割和它们的识别序列的蛋白水解酶包括因子 Xa、凝血酶和肠激酶。

掌握本发明目前的描述,通过参考下面的实施例能够很容易理解相同的内容,实施例以例证的方式说明但不限制本发明,除非特别说明。

实施例 I

材料和方法

表达蛋白质的细胞系

果蝇表达系统 (DESTM; Invitrogen, Inc.) 利用了来源于果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 Schneider 2 (S2) 细胞系和表达异种蛋白质的质粒载体。在 S2 细胞中用于表达的质粒载体是多用途的,允许亲金属蛋白 (MT) 启动子启动的可诱导的蛋白质表达。相同的质粒允许蛋白质从细胞分泌到周围培养基,极大简化了蛋白质纯化。可以将多拷贝载体稳定地插入到 S2 细胞的染色体组的 DNA,增加蛋白质表达水平。在 S2 细胞中表达的蛋白质最小化糖基化,这对于生产定向地抗 uPAR 的蛋白质成分的 Abs 是重要的。一般的纯化后的蛋白质产量是 25-50mg/L,纯度大约为 95% (图 1)。已经生产出了表达下面蛋白质的细胞系: suPAR、D1、D2D3、scuPA、ATF1-143、ATF1-135、Kring47-143 和 Kring47-135。另外,已经生产出了 suPAR 的克隆,其中 N-连接的糖基化位点已经被敲掉。

试剂

¹²⁵I 是作为 Na¹²⁵I (480-630MBq[13-17mCi]/μg 碘) 购自 Amersham Corp。

肿瘤细胞系

使用了下面的细胞和肿瘤系: A549、HeLa 和 A2780。A2780 人卵巢癌系由未治疗患者的肿瘤组织建立的。在添加有 2mM 谷酰胺、0.01mg/mL 牛胰岛

素和 10%FBS 的 RPMI 1640 培养基中, 单层培养 A2780 细胞。在添加有 2mM 的 L-谷酰胺、0.15%的 NaHCO_3 和 10%FBS 的 Ham 的 F12K 培养基中培养 A549 细胞, 人肺癌瘤, ATCC 目录号 CCL-185, 如上所述。

将 A2780 (2×10^6) 移植入裸 BALB/c 雌性鼠的右边横腹部。治疗开始前, A2780 肿瘤处于 $50\text{-}200\text{mm}^3$ 范围的阶段。每周星期一和星期五两次以 10mg/kg 的剂量腹膜内给药 IgG 对照 Ab 及抗 D2D3 uPAR 的 mAbs。顺铂处理组处于 1000mm^3 的阶段, 动物每周 1 次接受 6mg/kg 给药。每星期测量两次肿瘤体积。

将 A549 癌瘤细 (10^6) 移植入 C.B-17/Sys (*scid/scid*) 雌性小鼠的右侧横腹部 (*scid*: 严重组合免疫缺陷)。优选地, 在肿瘤接种那一天之后开始治疗。每周星期一和星期五两次以 10mg/kg 的剂量腹膜内给药 IgG 标准 Ab (和 PBS 对照) 及抗 D2D3 uPAR 的 mAb ATN-658。每星期测量 1 次起始肿瘤体积。当任一个处理组中的体积超过 300mm^3 时, 一个星期进行两次测量。

在处死动物的时候, 从每个动物获得血浆并切离肿瘤。为进行生物化学评估将一半肿瘤快速冷冻和为组织学评估将剩余放置在锌固定剂中。

实施例 II

抗 D2D3 mAbs

用结合到 KLH 的重组 suPAR 的 D2D3 域免疫 Balb/c 小鼠产生了很强的免疫反应。接下来融合试验产生了与 uPAR 的 D2D3 域具有特异性交叉反应的亲本克隆, 通过利用重组蛋白质进行 Western 印迹和 ELISA 分析测定亲本克隆。有限的稀释这些亲本克隆然后获得特异于 D2D3 的一组 mAbs。四个 Abs 的性质概述在表 3 中。同型鉴定所有克隆为 IgG1, κ 。通过 Western 印迹证实对 uPAR 的特异性。利用定向结合分析测定 Abs 的亲合力。多数克隆具有 1 到 5nM 的亲合力。

表 3: 抗 D2D3 (uPAR) 抗体

克隆#	同型	Western 印迹	K_D (nM)
ATN-615	IgG1, κ	+	2
ATN-658	IgG1, κ	+	1
ATN-616	IgG1, κ	+	5
ATN-617	IgG1, κ	+	3

利用 Abs 中的 2 个、ATN-615 和 ATN-658 进行 Western 印迹试验的结果

显示在图 3 中。mAbs 同时特异地识别 suPAR 和特异地识别 uPAR 的 D2D3 域。

在迁移分析中测试抗 D2D3 抗体的功能活性。以前的实验已经证明在改进的 Boyden 小室分析中表达 uPAR 的 CHO 细胞移向 uPA (图 4)，并且该迁移依赖于 uPA 的 GFD (没有显示)。如图 4 所示，对 D2D3 特异的 mAb 及定向抗 uPAR 的兔多克隆 Ab 抑制细胞迁移。有趣的是，抗 $\alpha 5$ 整合蛋白 Abs 抑制细胞迁移但抗 $\alpha 6$ 整合蛋白 Abs 并不抑制细胞迁移。同时，这些数据表明整合蛋白 $\alpha 5\beta 1$ 和 uPAR 对于 uPA 诱导的迁移是重要的。

利用抗 D2D3 Abs 诊断成像或靶向治疗试剂的依赖于它们在细胞表面以高亲和力结合到 uPAR 的能力。如图 5 所示，碘化的 Ab ATN-658 以约 1.5 nM 的 KD 结合到 HeLa 细胞。这与定向结合试验中 (表 3) 测定 Ab 的 KD 是一致的，表明标记处理没有影响结合。

在体内 uPA 可以在肿瘤表面或内皮细胞结合到 uPAR 受体。这样，在 uPA 的存在下结合到 uPAR 的 Abs 具有其它的如诊断或靶试剂的效用。在 HeLa 细胞表面，mAb ATN-658 不能抑制 scuPA 与 uPAR 的结合 (图 6) 而在 scuPA 存在下能够结合到 HeLa 细胞。这样，ATN-658 可以同时靶向占位和未占位的细胞表面的受体。

共有 V_L 和 V_H 链，和包括 ANT-658 和 ATN-615 的三个 CDR 区的氨基酸序列，用标准方法测定在之前已经阐述过，因而不在此重复，虽然应该考虑将它们并入该实施例，。

实施例 III

uPA 与 uPAR 的结合

利用 ^{125}I 标记的 uPA 和 HeLa 细胞测定 uPA 与 uPAR 的结合。HeLa 细胞表达大量的 uPAR 但不表达 uPA。简要地说，100 μg 的 scuPA 使用 Iodo-GenTM 碘酸盐试剂 (Pierce Biotechnology Inc.)，用 100 μCi 的 [^{125}I]NaI 标记。利用体积排阻柱从标记蛋白质中移除未结合的标记 NaI，然后在包含 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 Tris 缓冲液洗脱标记的蛋白质。用包含 0.1% BSA 的 PBS 稀释增加了浓度的 [^{125}I]-scuPA 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 培养 HeLa 细胞 2 小时。用 PBS/0.1% BSA 彻底洗涤细胞，用 1M 的 NaOH 溶解细胞单层然后测定总结合量。在过量的未标记的 scuPA 存在下测定 [^{125}I]-scuPA 培养的细胞的特异性结合。用同时表达 uPA 和 uPAR 的 MDA-MB231 细胞进行结合。为了确定 scuPA 的结合，首先在 4 $^{\circ}\text{C}$ 用

包含 0.1M 甘氨酸/100mM NaCl, pH3 的缓冲液洗涤 5 分钟将内源性 uPA 从 MDA-MB231 细胞的表面移除。该方案也用于测定 [125 I]-ATF 与 HeLa 细胞的结合。通过在 4°C 用增加量的未标记的 Ab 培养细胞 15 分钟来测定 Abs 抑制 [125 I]-scuPA 或 [125 I]-ATF 与 HeLa 细胞结合的能力, 在加入了 [125 I]-标记的蛋白质之前进行。

实施例 IV

细胞迁移的抑制

利用前面描述的改进的 Boyden 小室分析来测试对 uPA 或 uPAR 特异的 Abs 对细胞迁移的抑制 (Tarui, T et al., (2003) J. Biol. Chem., 278: 29863-29872)。简要地说, Boyden 小室的过滤器的低处侧面用 500nM 的 uPA 涂覆, 然后将无血清的迁移缓冲液 (包含 10mM Hepes 和 0.5% 牛血清白蛋白的 Dulbecco 的改良的 Eagle 的介质) 加入到低处小室。将表达 uPAR 的 CHO 细胞悬浮在无血清的迁移缓冲液 (8×10^5 细胞/mL) 中然后将 100 μ L 加入到上部小室。为了测试抗 uPA 或抗 uPAR 的 Abs 抑制细胞迁移的能力, 加入到上部小室之前用 10 μ g/ml 的 Ab 预培养细胞 15 分钟。然后在 37°C 在 5%CO₂ 中培养细胞 20 小时。用 0.5% 结晶紫和光显微术着色检测移动到低处小室的细胞。

实施例 V

利用生物素化的 ATN-658 分析可以识别与 ATN-658 相同的表位的抗体

根据产品说明书, 利用 EZ-linkTM sulfo-NHS-LC 生物素 (Pierce Biotechnology Inc.), 生物素化抗 D2D3 Ab、ATN-658。一般来说, 用超过生物素标记试剂 20 倍的摩尔数标记 ATN-658, 然后利用体积排阻柱从标记的 Ab 中移除未结合的生物素。为了保证标记的 Ab 保留对 uPAR 的亲合力, 用 ELISA 分析测试 ATN-658 对 suPAR 的结合。利用 HRP 结合的抗生蛋白链菌素检测结合的生物素 ATN-658。生物素标记没有减少 ATN-658 对 suPAR 的亲合力 (图 9)。为了鉴别与 ATN-658 相同的表位的 Abs, 建立 ATN-658 竞争性分析。简要地说, 用 100ng/槽的 suPAR 涂覆 96-槽 EIA/RIA 高蛋白质结合盘, 4°C 过夜。用 1% 酪蛋白封闭非特异性结合之后, 用 PBS 洗涤盘然后将要被测试的 Abs 稀释在包含 0.2nM 的生物素-ATN-658 的 PBS/0.1% 酪蛋白中, 然后加入到适当的槽内。进一步在室温下培养盘 1 小时, 用 PBS/0.05% Tween-20 彻底洗涤, 然后利用 HRP 结合的抗生蛋白链菌素和适当的基质检测结合的生物素-

ATN-658 (图 10A/10B)。

实施例 VI

mAbs 的体内活性

利用描述于实施例 I 的方案和条件，在两个模型 A549 非小细胞人肺癌模型和 A2780 卵巢癌模型测试抗体在体内抑制肿瘤发育的能力。优选地，在肿瘤接种当天后开始治疗。每周星期一和星期五两次以 10mg/kg 的剂量腹膜内给药 IgG 标准 Ab (和 PBS 对照) 及抗 D2D3 uPAR 的 mAb ATN-658。

ATN-658 在这两个模型中显著地抑制生长 (图 7 和 8)。

所有上面引证的参考全部并入本文，无论其是否是特定的合并。

根据本发明的全部描述，本领域技术人员可以理解，相同的发明在广泛的范围内的等效参数、浓度和条件下可以实施，但都没有脱离本发明的思想和范围，并且没有超过实验的范围。

如果上述公开的氨基酸序列和后面所附或以后提交的电子版或纸件中的序列有任何不符之处，以以上所述序列为准。

<110> 阿特努奥恩公司 (ATTENUON LLC)

<120> 抑制下游 uPAR 相互作用并结合了尿激酶类纤溶酶原激活剂 (uPA) 与其受体 (uPAR) 的复合物的配位体: 在诊断或治疗中的识别和用途

<130> 28932.0009

<140> PCT/US05/18322

<141> 2005-05-25

<150> US 60/573,896

<151> 2004-05-25

<160> 16

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 共有序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa可以是任何氨基酸

<400> 1

Asp Ile Xaa Leu Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Leu

<210> 2

<211> 117

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 共有序列

<400> 2

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr
 20 25 30
 Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Glu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Ile Lys
 50 55 60
 Gly Arg Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Arg Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Gln Phe Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ser Ile Tyr Gly His Ser Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser
 115

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 共有序列
 <400> 3

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 共有序列
 <400> 4

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 共有序列
 <400> 5

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 共有序列

<400> 6

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His
 1 5 10

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 共有序列
 <400> 7

Glu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Ile Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 共有序列
 <400> 8

Ser Ile Tyr Gly His Ser Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 9
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 共有序列
 <400> 9

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ile Thr Ala Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Pro Trp Ile Phe
 35 40 45

Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Phe Thr Phe
85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 10
<211> 117
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> 共有序列

<400> 10

Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe Tyr
20 25 30

Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Trp Ile Phe His Gly Ser Asp Asn Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
50 55 60

Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Trp Gly Pro His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> 共有序列
<400> 11

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> 共有序列
<400> 12

Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 共有序列
 <400> 13

Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 共有序列
 <400> 14

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe Tyr Ile His
 1 5 10

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 共有序列
 <400> 15

Trp Ile Phe His Gly Ser Asp Asn Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 共有序列
 <400> 16

Trp Gly Pro His Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5

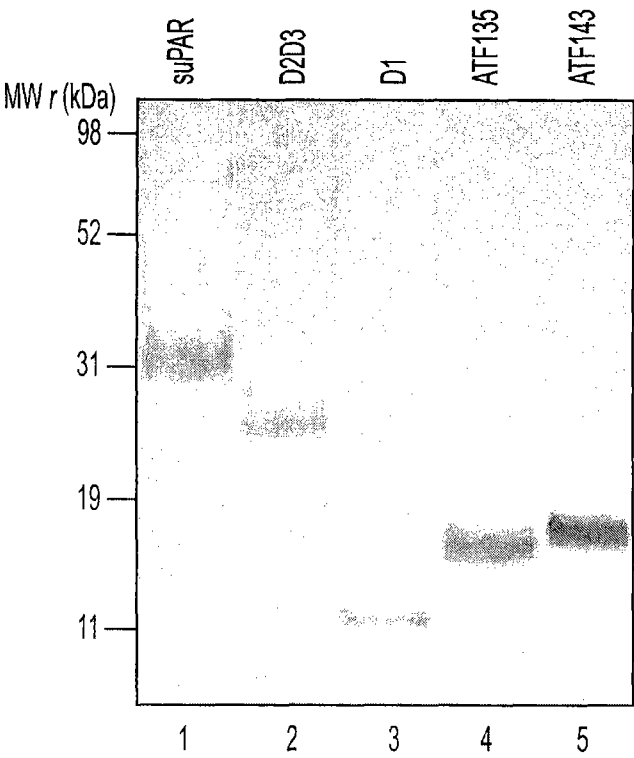


图1

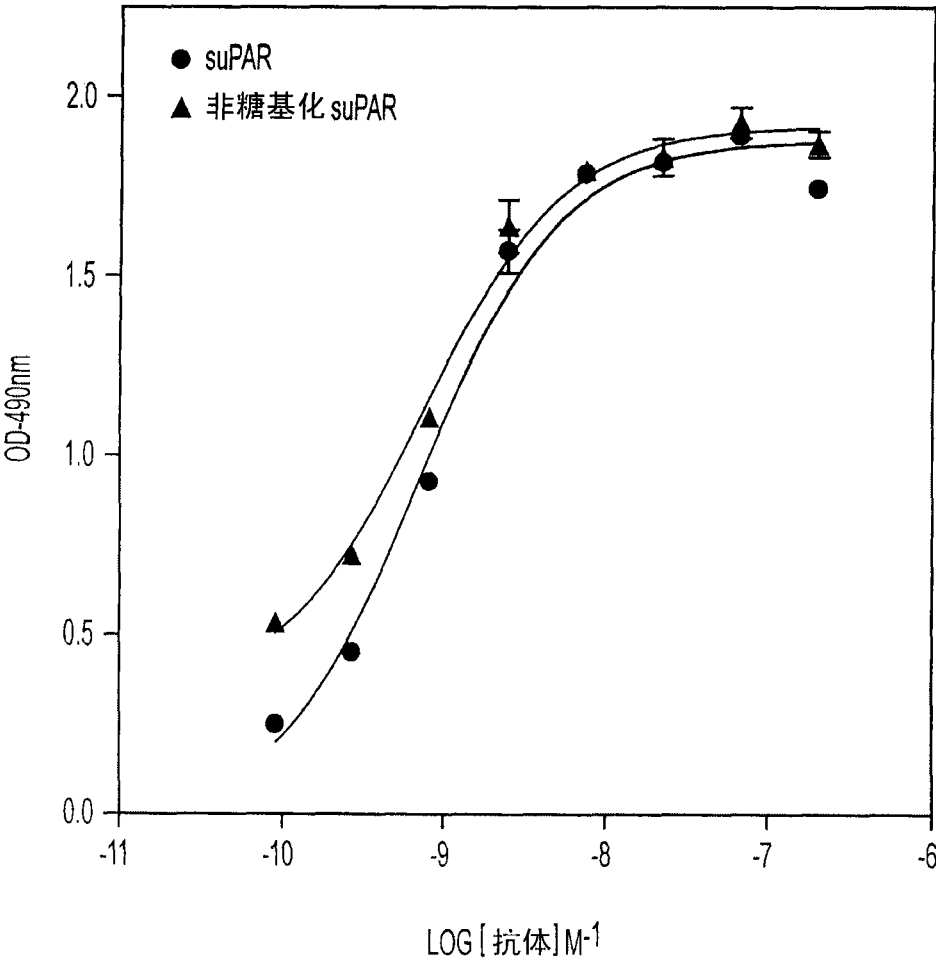


图2

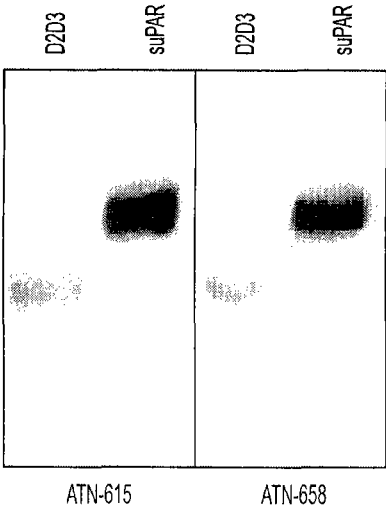


图3

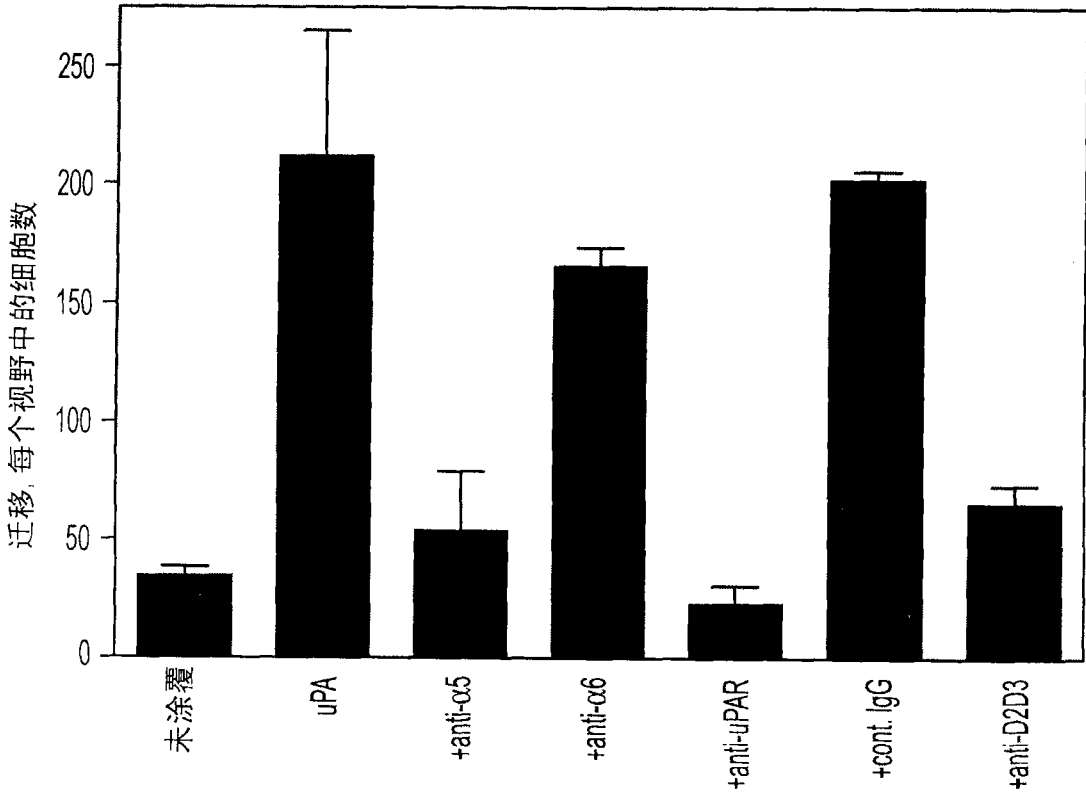


图4

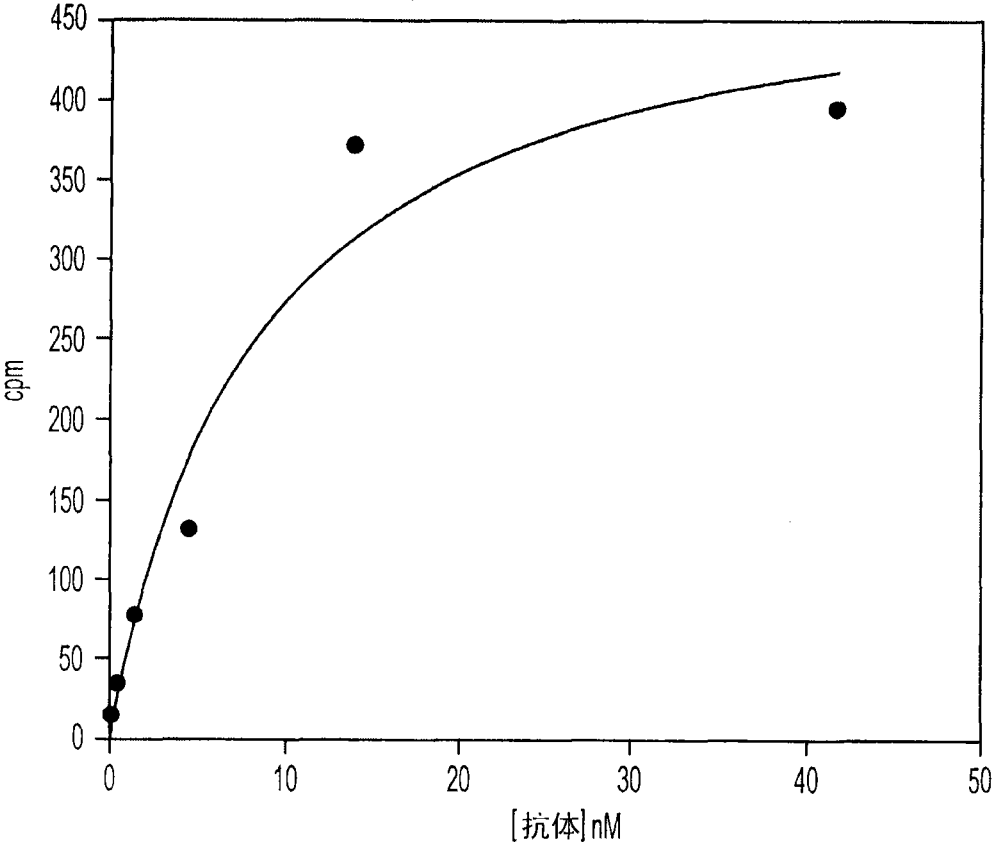


图5

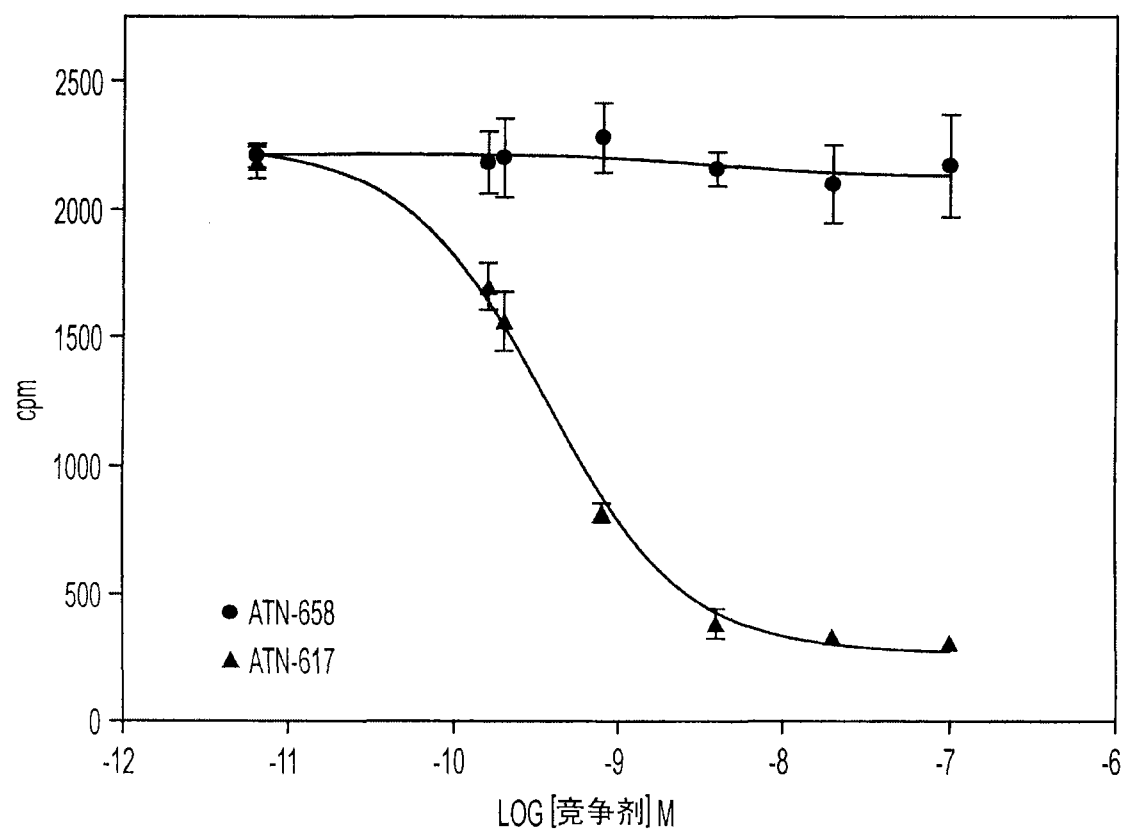


图6

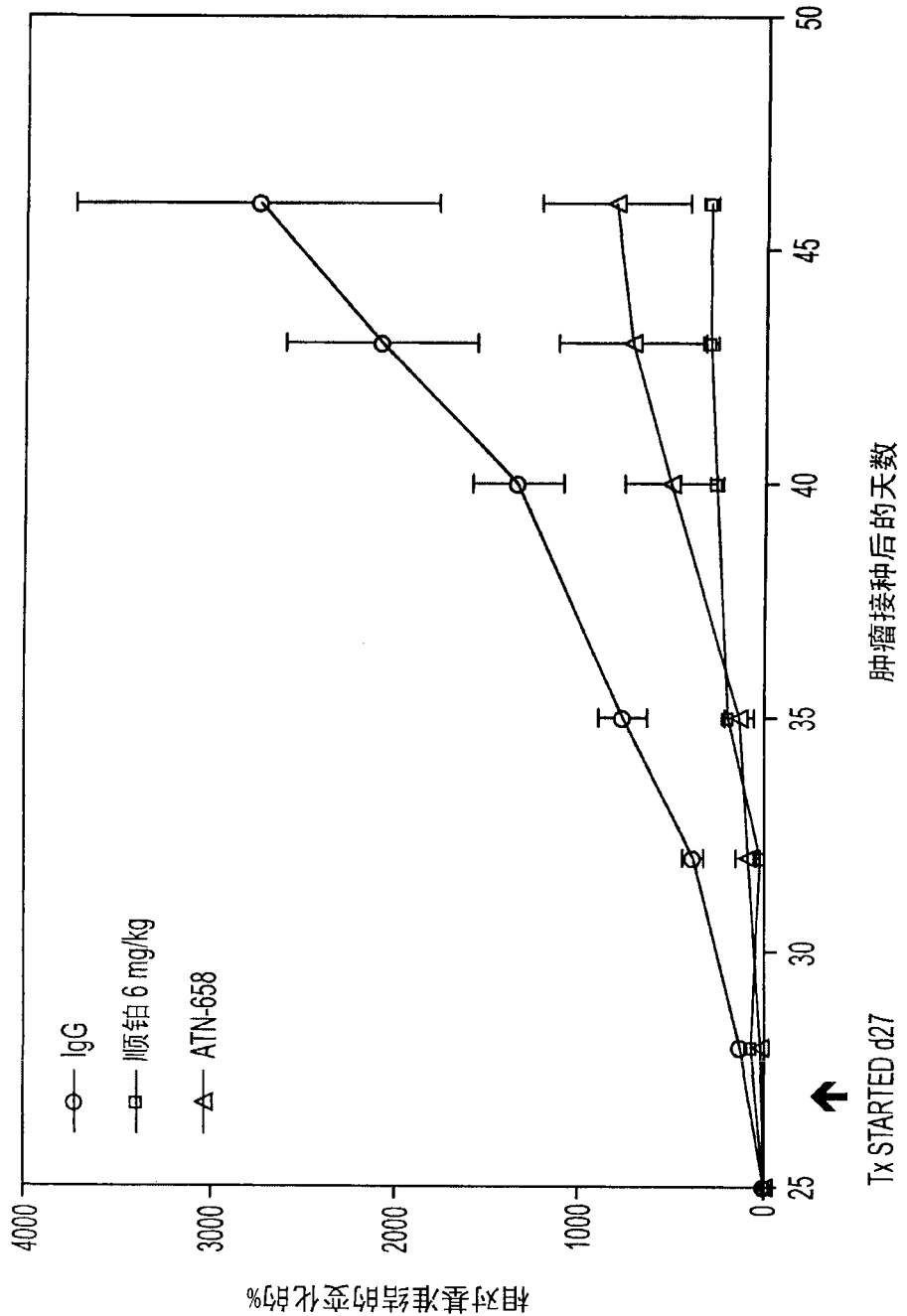


图7

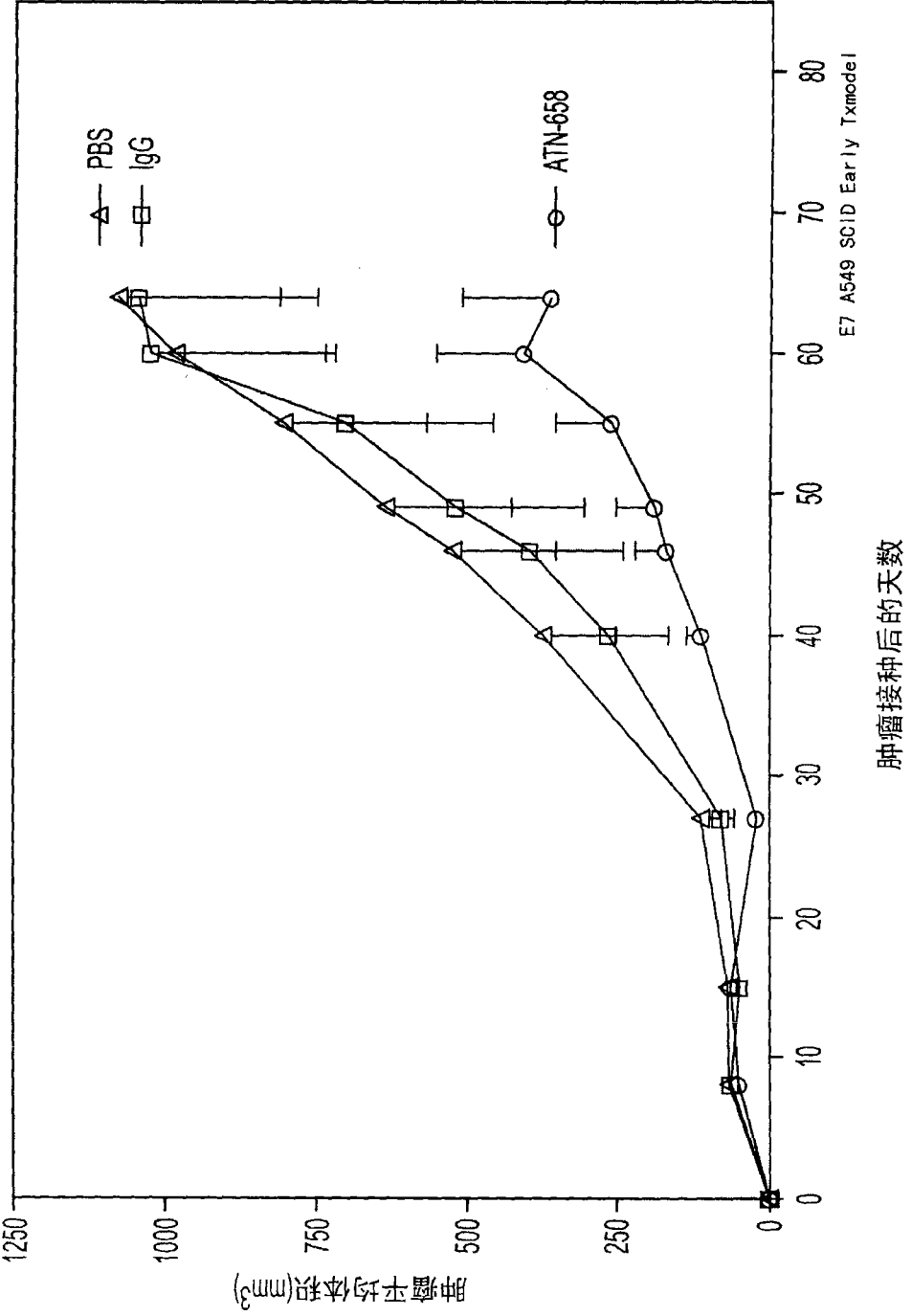


图8

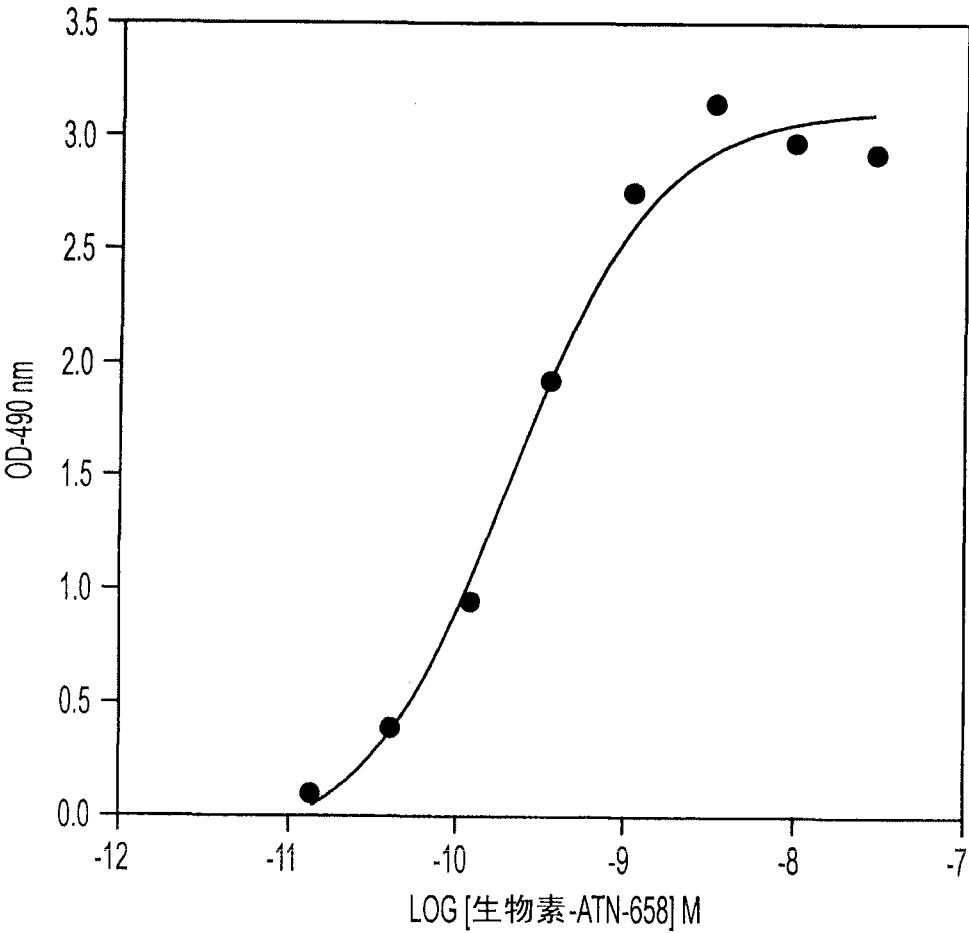


图9

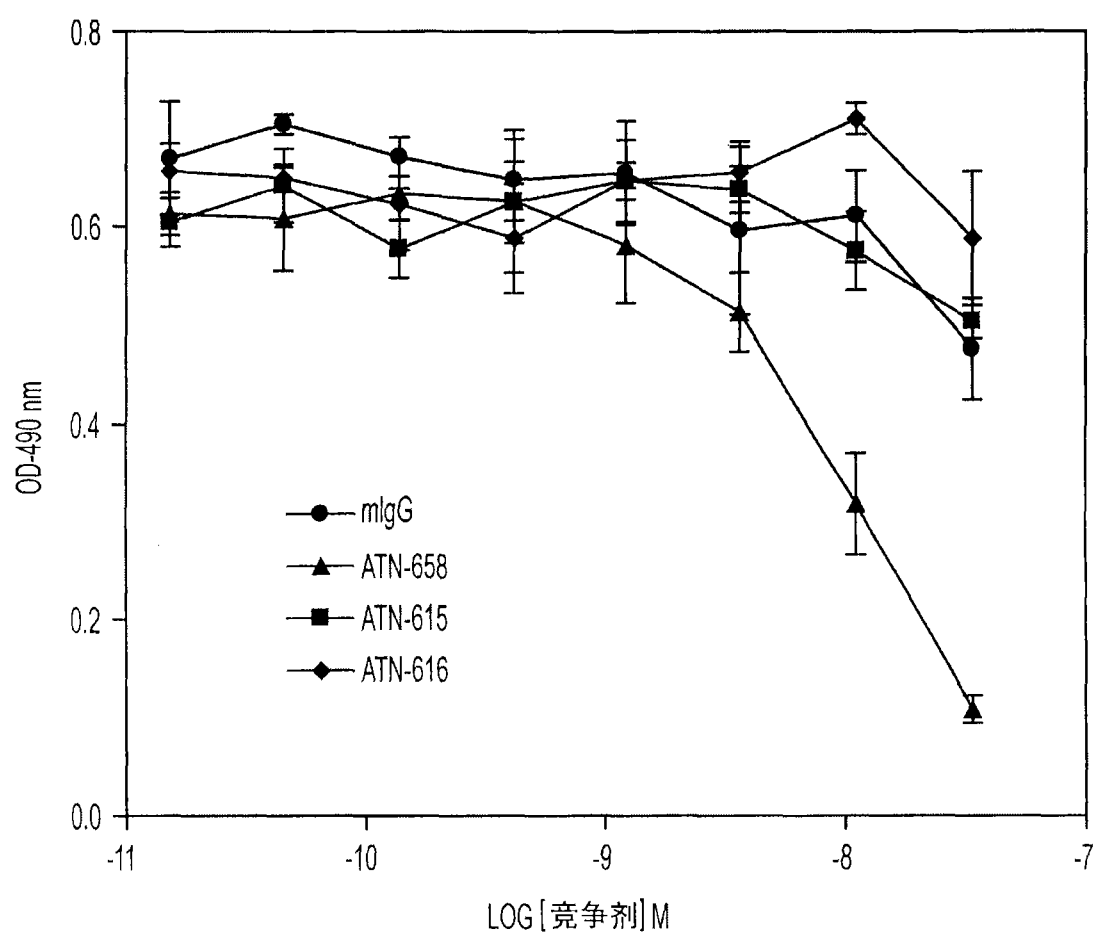


图10A

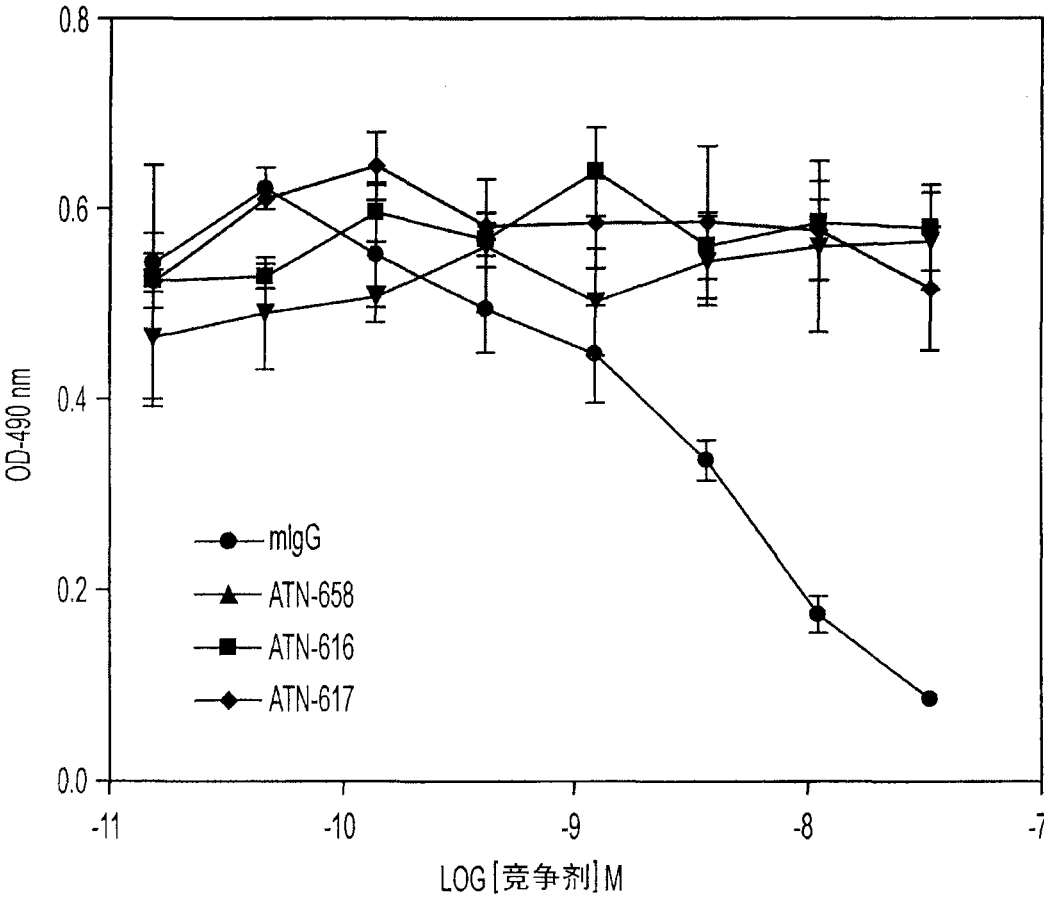


图10B