

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 1/00

[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 1/10 C07K 1/107

C07K 5/00 C07K 2/00

C07K 14/00 C07K 16/00

C07K 16/18 A61K 39/395

[21] 申请号 00802601.7

[43] 公开日 2002 年 4 月 17 日

[11] 公开号 CN 1345331A

[22] 申请日 2000.1.6 [21] 申请号 00802601.7

[30] 优先权

[32] 1999.1.6 [33] US [31] 60/114,877

[32] 1999.1.6 [33] US [31] 60/114,878

[32] 1999.7.13 [33] US [31] 60/143,534

[32] 1999.9.2 [33] US [31] 60/152,496

[86] 国际申请 PCT/US00/00383 2000.1.6

[87] 国际公布 WO00/40597 英 2000.7.13

[85] 进入国家阶段日期 2001.7.6

[71] 申请人 南加利福尼亚大学

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 彼得·布鲁克斯 埃里克·珀蒂克莱克
徐劲松

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 5 页 说明书 43 页 附图页数 30 页

[54] 发明名称 抑制血管发生的组合物和方法

[57] 摘要

本发明描述了通过给予一种特异性地与蛋白水解的或变性的胶原蛋白结合而不与天然的三螺旋形式的胶原蛋白结合的拮抗剂而抑制组织中血管发生的方法。本发明的拮抗剂能够以例如变性的 I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型胶原蛋白及其组合作为目标。本发明描述了应用这些拮抗剂治疗肿瘤生长、肿瘤转移或再狭窄的方法，本发明也描述了体内或回体(ex vivo)应用这些拮抗剂作为正常或患病组织的血管发生的诊断标志的方法。拮抗剂包括称为 HUI77、HUIV26 和 XI313 的单克隆抗体。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种特异性结合一种或多种变性的胶原蛋白但与所述胶原蛋白的天然三螺旋形式结合的亲和力显著降低的拮抗剂。
2. 如权利要求 1 的拮抗剂，其中所述降低的亲和力比与所述变性的胶原蛋白结合的亲和力低大约 3 倍。
3. 如权利要求 1 的拮抗剂，其中所述降低的亲和力比与所述变性的胶原蛋白结合的亲和力低大约 5 倍。
4. 如权利要求 1 的拮抗剂，其中所述降低的亲和力比与所述变性的胶原蛋白结合的亲和力低大约 10 倍。
5. 如权利要求 1 的拮抗剂，其中所述的拮抗剂抑制血管发生。
6. 如权利要求 1 的拮抗剂，其中所述的变性的胶原蛋白是变性的 I 型胶原蛋白、变性的 II 型胶原蛋白、变性的 III 型胶原蛋白、变性的 IV 型胶原蛋白或变性的 V 型胶原蛋白。
7. 如权利要求 6 的拮抗剂，其中所述的变性的胶原蛋白是变性的 I 型胶原蛋白。
8. 如权利要求 6 的拮抗剂，其中所述的变性的胶原蛋白是变性的 I 型胶原蛋白和变性的 IV 型胶原蛋白。
9. 如权利要求 7 的拮抗剂，其中所述的变性的胶原蛋白是变性的 II 型胶原蛋白、变性的 III 型胶原蛋白和变性的 V 型胶原蛋白。
10. 如权利要求 6 的拮抗剂，其中所述的拮抗剂是一种单克隆抗体。
11. 如权利要求 8 的拮抗剂，其中所述的单克隆抗体是具有单克隆抗体 HUI77、HUIV26 或 XL313D 结合特异性的单克隆抗体。
12. 如权利要求 6 的拮抗剂，其中拮抗剂是一种多克隆抗体。
13. 如权利要求 6 的拮抗剂，其中拮抗剂是一种多肽、线性肽或环肽。
14. 如权利要求 6 的拮抗剂，其中拮抗剂是一种非肽化合物。

15. 如权利要求 6 的拮抗剂，其中拮抗剂是一种寡核苷酸。
16. 如权利要求 6 的拮抗剂，其中拮抗剂是一种人源化或化学修饰的单克隆抗体。
17. 如权利要求 6 的拮抗剂，其中拮抗剂是单克隆抗体的片段。
18. 如权利要求 6 的拮抗剂，其中拮抗剂与细胞毒性或细胞生长抑制剂结合。
19. 一种抑制组织中血管发生的方法，包括给予权利要求 1-17 任何一项权利要求的拮抗剂。
20. 如权利要求 19 的方法，其中所述的拮抗剂通过静脉内、经皮、滑膜内、肌肉内、肿瘤内、眼内、鼻内、鞘内、局部或口服途径给予。
21. 如权利要求 19 的方法，其中所述的拮抗剂与化疗结合在一起施用。
22. 如权利要求 19 的方法，其中所述的拮抗剂与放射结合在一起施用。
23. 如权利要求 19 的方法，其中组织是炎性组织且正在血管发生。
24. 如权利要求 23 的方法，其中组织是哺乳动物组织。
25. 如权利要求 24 的方法，其中组织是关节炎组织、眼组织、视网膜组织或血管瘤。
26. 一种抑制组织中肿瘤生长或转移的方法，包括给予权利要求 1-17 任何一项权利要求的拮抗剂。
27. 如权利要求 26 的方法，其中所述的拮抗剂通过静脉内、经皮、滑膜内、肌肉内、肿瘤内、眼内、鼻内、鞘内、局部或口服途径给予。
28. 如权利要求 26 的方法，其中所述的拮抗剂与化疗结合在一起

一起施用。

29. 如权利要求 26 的方法，其中所述的拮抗剂与放射结合在一起施用。

30. 如权利要求 26 的方法，其中肿瘤或转移瘤是黑素瘤、癌、肉瘤、纤维瘤、神经胶质瘤和星形细胞瘤。

31. 一种抑制组织中银屑病、斑点退化或再狭窄的方法，通过给予权利要求 1-17 任何一项权利要求的拮抗剂。

32. 如权利要求 31 的方法，其中所述的拮抗剂通过静脉内、经皮、滑膜内、肌肉内、肿瘤内、眼内、鼻内、鞘内、局部或口服途径给予。

33. 如权利要求 31 的方法，其中所述的拮抗剂与化疗结合在一起施用。

34. 如权利要求 31 的方法，其中所述的拮抗剂与放射结合在一起施用。

35. 一种检测组织中血管发生的方法，其是通过将权利要求 1-17 任何一项权利要求的拮抗剂与所述组织接触而进行。

36. 如权利要求 35 的方法，其中所述的组织为回体组织。

37. 如权利要求 35 的方法，其中所述的组织为体内组织并且所述的拮抗剂通过静脉内、经皮、滑膜内、肌肉内、肿瘤内、眼内、鼻内、鞘内、局部或口服途径给予。

38. 如权利要求 35 的方法，其中所述的拮抗剂与荧光染料、放射性标记、顺磁性重金属、诊断染料或酶缀合。

39. 一种检测组织中肿瘤或肿瘤侵入的方法，其通过给予权利要求 1-17 任何一项权利要求的拮抗剂而进行。

40. 如权利要求 39 的方法，其中所述的组织为回体组织。

41. 如权利要求 39 的方法，其中所述的组织为体内组织并且所述的拮抗剂通过静脉内、经皮、滑膜内、肌肉内、肿瘤内、眼内、

鼻内、鞘内、局部或口服途径给予。

42. 如权利要求 39 的方法，其中所述的拮抗剂与荧光染料、放射性标记、顺磁性重金属或诊断染料缀合。

43. 一种筛选变性胶原蛋白拮抗剂的方法，包括：

- a) 提供一种推定的拮抗剂；
- b) 测定所述的推定的拮抗剂与选自 I 型、II 型、III 型、IV 型和 V 型胶原蛋白的一种变性胶原蛋白的第一亲和力；
- c) 测定所述的推定的拮抗剂与选自 I 型、II 型、III 型、IV 型和 V 型胶原蛋白的一种天然胶原蛋白的第二亲和力，其中所述所选择的天然胶原蛋白是所选择的变性胶原蛋白的天然形式；
- d) 如果所述的第二亲和力显著低于所述的第一亲和力，那么选择所述推定的拮抗剂作为变性胶原蛋白的拮抗剂。

44. 如权利要求 43 的方法，其中所述的推定拮抗剂是非肽化合物。

45. 如权利要求 44 的方法，其中所述的非肽化合物是小分子有机化合物。

46. 如权利要求 44 的方法，其中所述的非肽化合物是一种寡核苷酸。

47. 如权利要求 43 的方法，其中所述的推定拮抗剂是一种多肽，线性肽或环肽。

48. 如权利要求 43 的方法，其中所述的推定拮抗剂是一种抗体。

49. 如权利要求 48 的方法，其中所述的抗体是单克隆抗体。

50. 如权利要求 48 的方法，其中所述的抗体是多克隆抗体。

51. 如权利要求 43 的方法，其中所述的第一和第二亲和力是通过酶联免疫吸附分析方法而测定的。

52. 如权利要求 43 的方法，其中所述的第二亲和力比第一亲和

力大约低 3 倍。

53. 如权利要求 43 的方法，其中所述的第二亲和力比第一亲和力大约低 5 倍。

54. 如权利要求 43 的方法，其中所述的第二亲和力比第一亲和力大约低 10 倍。

55. 一种筛选变性胶原蛋白拮抗剂的方法，包括选择一种具有与权利要求 11 的拮抗剂竞争结合变性胶原蛋白上表位的拮抗剂。

56. 包含编码能被权利要求 1 的拮抗剂识别的表位的序列的肽。

57. 如权利要求 56 的肽，其中所述的拮抗剂是单克隆抗体。

58. 如权利要求 57 的肽，其中所述的抗体是 HUI77、HUIV26 或 XL313。

59. 如权利要求 58 的肽，其中所述的肽是 SEQ ID NO: 12 的肽。

说明书

抑制血管发生的组合物和方法

相关的申请资料

本申请要求如下申请的优先权：申请日为 1999 年 1 月 6 日的临时申请 60/114877，申请日为 1999 年 1 月 6 日的临时申请 60/114878，申请日为 1999 年 9 月 2 日的临时申请 60/152496 和申请日为 1999 年 7 月 13 日的临时申请 60/143534，上述申请的全文引入本文做参考。

政府资助

本发明受国立卫生研究院资助，资助合同号为 R29CA74132-01。

发明领域

本发明普遍涉及医药领域，特别涉及应用包括但不限于 I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型变性或蛋白水解形式胶原蛋白的拮抗剂来抑制组织中血管发生或检测血管发生的方法和组合物。

背景

每年肿瘤生长和转移威胁到大多数人的健康。实际上，据估计仅在美国一国下一年度所要诊断出的癌症新病例约为 600000 多例 (Varner, J.A., Brooks, P.C., 和 Cheresch, D.A., (1995) 细胞粘附通讯 3, 367-374)。更为重要的是，大多数研究表明所有的实体瘤的生长需要新血管生长以使肿瘤持续扩张 (Varner 等, 1995; Blood, C.H., Zetter, B.R. (1990), 生物化学和生物物理学报, 1995, 1032: 89-118; Weidner, N 等 (1992), 国立癌症研究所期刊, 84: 1875-1887; Weidner, N 等 (1991), 新英格兰医学期刊, 324: 1-7; Brooks, P.C. 等 (1995), 临床投资期刊, 96: 1815-1822; Brooks, P.C. 等 (1994), 细胞, 79: 1157-1164; Brooks, P.C. 等 (1996), 细胞, 85: 683-693; Brooks, P.C. 等 (1998), 细胞, 92: 391-400)。值得注意的是，多数其它人类疾

病也以不受调控的血管发展为特征，包括眼睛疾病例如斑点恶化和糖尿病视网膜病。此外，大多数炎症疾病也与失控的新血管形成有关，如关节炎和银屑病（Varner 等，1995）。血管发生是一种从现有血管发展出新血管的病理过程（Varner 等，1995；Blood 和 Zetter，1990；Weidner 等，1992）。这个复杂的过程需要许多分子包括生长因子、细胞粘附受体、基质降解酶和细胞外基质成分（Varner 等，1995；Blood 和 Zetter，1990；Weidner 等，1992）的协同作用。因此，旨在阻断血管发生的治疗能显著影响实体瘤的生长。实际上，已经有证据清晰地表明阻断肿瘤新血管发生能够在各种不同的动物模型中抑制肿瘤生长，并且人体临床数据也开始支持此论点（Varner, J.A., Brooks, P.C., 和 Cheresch, D.A., (1995) 细胞粘附通讯, 3, 367-374）。更为重要的是，许多研究表明所有实体瘤的生长需要新血管生长以使肿瘤持续扩张（Varner 等，1995；Blood 和 Zetter，1990；Weidner 等，1992；Weidner 等，1991；Brooks 等，1995；Brooks 等，1994；Brooks 等，1997）。

为了达到此目标，许多研究人员已经将他们抗血管发生的方法集中至起始血管发生的生长因子和细胞因子上（Varner 等，1995；Blood 和 Zetter，1990；Weidner 等，1992；Weidner 等，1991；Brooks 等，1995；Brooks 等，1994；Brooks 等，1997）。但是，有很多不同的生长因子和细胞因子能够刺激血管发生。由于这种冗余的情况，阻断单一细胞因子的治疗效果可能有限。但是，人们对其它的抗血管发生的目标很少注意。近来的研究已经表明，为了提供一个有益于新血管发展的微环境血管发生需要环绕在血管周围的细胞外基质（ECM）的蛋白水解重塑（Varner 等，1995；Blood 和 Zetter，1990；Weidner 等，1992；Weidner 等，1991；Brooks 等，1995；Brooks 等，1994；Brooks 等，1997）。

已经提出抑制血管发生可能是一种限制肿瘤生长的有用的治疗

方法。已经提出可以通过下列途径抑制血管发生：（1）抑制“血管发生分子”如 β FGF（成纤维生长因子）的释放，（2）中和血管发生分子，例如通过使用抗 β FGF 抗体和（3）抑制内皮细胞对血管发生刺激的应答。后一种策略已经引起了人们的注意，并且 Folkman 等，癌症生物学，3：89-96（1992），已经描述了几种内皮细胞应答抑制剂，包括胶原蛋白酶抑制剂、基质膜翻转抑制剂、制管张类固醇、真菌来源的血管发生抑制剂、血小板因子 4、血小板反应蛋白、关节炎药物如 D-青霉胺和金 thiomalate、维生素 D3 类似物、 α 干扰素及其可以被用于抑制血管发生的类似物。关于其它提到的血管发生抑制剂，见 Blood 和 Zetter，1990；Moses 等（1990），自然，248：1408-1410；Ingber 等（1988），投资实验室，59：44-51 和美国专利 Nos. 5092885，5112946，5192744 和 5202352。前述参考文献所描述的血管发生抑制剂都不是以变性的或蛋白水解的胶原蛋白为靶的。

发明概述

本发明提供了能够抑制血管发生的变性的或蛋白水解的胶原蛋白的拮抗剂。拮抗剂特异性地与变性的或蛋白水解的胶原蛋白结合，但与天然形式的相同胶原蛋白结合的亲和力显著降低。拮抗剂可以是对任一变性的胶原蛋白特异的，包括变性的 I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型胶原蛋白或其组合。例如，在一个实施方案中，相对于天然三螺旋形式的 I 型胶原蛋白而言，拮抗剂对变性的 I 型胶原蛋白是特异的，但对其它类型的变性的胶原蛋白如 IV 型胶原蛋白的亲合性显著降低。在另一个实施方案中，一种拮抗剂是对变性的 IV 型胶原蛋白特异的。拮抗剂也可以是对变性的 I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型胶原蛋白特异的。

拮抗剂可以是与变性的胶原蛋白发生免疫反应但与天然形式的胶原蛋白免疫反应程度显著降低的抗体或其功能性片段。抗体可为单克隆或多克隆抗体。拮抗剂也可以是具有对变性的胶原蛋白而不

是天然形式胶原蛋白的特异性的多肽或肽。拮抗剂也可以是非肽化合物如小的有机分子或寡核苷酸。

因此，本发明描述了抑制组织中血管发生的方法，包括给予组织包含血管发生抑制量的变性的/蛋白水解的胶原蛋白的拮抗剂的组合物。

待治疗的组织可以是任何需要抑制血管发生治疗的组织，例如正发生新血管化的疾病组织。典型组织包括炎症组织、实体瘤、转移瘤、正经历再狭窄的组织及类似组织。

本发明也提供了通过将本发明的拮抗剂与组织相接触从而检测血管发生的方法，这些方法适于回体（*ex vivo*）或体内应用。

本发明也提供了通过回体或体内将本发明的拮抗剂与组织相接触从而检测肿瘤组织、转移以及肿瘤侵入组织的方法。

本发明也提供了筛选可与变性的胶原蛋白特异性结合，但与天然形式的胶原蛋白亲和力显著下降并能抑制血管发生的拮抗剂。

附图的简要说明

图 1 显示了在固相 ELISA 中 HUI77 单抗与细胞外基质成分的反应性。用细胞外基质成分包括天然的 I 型和 IV 型胶原蛋白、变性的 I 型和 IV 型胶原蛋白、玻连蛋白、纤连蛋白和纤维蛋白原包被微量滴定板（96 孔），每种成分的浓度为 10ug/ml。37℃用溶于 PBS 中的 1%BSA 封闭微孔板微孔 1 小时。向孔中加入 HUI77 单抗至浓度为 1ug/ml，并在 37℃孵育 2 小时。孵育完后，通过与过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗孵育检测免疫反应性。免疫反应性是用邻苯二胺作为底物在 490 纳米波长下用 ELISA 微板读数仪测量的。Coll-I（天然的三螺旋形式的 I 型胶原蛋白），变性的 Coll-I（变性的 I 型胶原蛋白），Coll-IV（天然的三螺旋形式的 IV 型胶原蛋白），变性的 Coll-IV（变性的 IV 型胶原蛋白），VN（玻连蛋白），FN（纤连蛋白），FB（纤维蛋白原）。数据杆代表三个复孔的平均光密度值（O.D.）±标

准偏差。

图 2 显示了 HUI77 单抗与不同基因类型胶原蛋白的反应性。用浓度为 10ug/ml 的不同形式的胶原蛋白包被微量滴定板。37℃用溶于 PBS 中的 1%BSA 封闭微孔板各孔 1 小时，用过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗孵育检测免疫反应性。免疫反应性是用 ELISA 微板读数仪在 490 纳米波长下测量光密度值而测定的。Coll-I；天然的三螺旋形式的 I 型胶原蛋白。Den Coll-I；变性的 I 型胶原蛋白。Coll-II；天然的三螺旋形式的 II 型胶原蛋白。Den Coll-II；变性的 II 型胶原蛋白。Coll-III；天然的三螺旋形式的 III 型胶原蛋白。Den Coll-III；变性的 III 型胶原蛋白。Coll-IV；天然的三螺旋形式的 IV 型胶原蛋白。Den Coll-IV；变性的 IV 型胶原蛋白。Coll-V；天然的三螺旋形式的 V 型胶原蛋白。Den Coll-V；变性的 V 型胶原蛋白。数据杆代表三个复孔的平均光密度值 (O.D.) $\pm$ 标准偏差。

图 3 显示了用 HUI77 单抗体内鉴定环绕在人黑素瘤周围的变性的胶原蛋白。变性的胶原蛋白在体内的产生和定位是通过间接免疫荧光研究来自人鼠嵌合模型以及人肿瘤活组织检查的冷冻组织部分而完成的。来自人黑素瘤的冷冻组织部分在丙酮中固定，用 1%BSA 封闭并用 HUI77 单抗和针对表达在人黑素瘤上的 α_v 整合蛋白的多克隆抗体共染色。抗体结合是通过与羊抗小鼠 FITC 标记的二抗和羊抗大鼠罗丹明标记的二抗孵育而检测的。左图表示人黑素瘤活检组织标本 (630 $\times$)。右图表示在全厚人皮肤中生长的 M21 人黑素瘤细胞系 (200 $\times$)。红色表示 α_v 整合蛋白的表达，绿色表示变性的胶原蛋白的表达，黄色表示 α_v 整合蛋白和变性的胶原蛋白的共同定位。

图 4 显示了用 HUI77 单抗体内鉴定血管相关的环绕在人黑素瘤周围的变性的胶原蛋白。变性的胶原蛋白是通过间接免疫荧光研究人黑素瘤活组织检查的冷冻组织部分而定位的。来自人黑素瘤的冷冻组织部分在丙酮中固定，用 1%BSA 封闭，并用 HUI77 单抗和针

对 VIII 因子，一个已知的血管标志的多克隆抗体进行共染色。抗体结合是通过与羊抗小鼠 FITC 标记的二抗和羊抗大鼠罗丹明标记的二抗孵育而检测的。左图显示对人黑素瘤活检组织进行 VIII 因子染色（红色）显示出肿瘤血管。右图显示出环绕在人肿瘤相关的血管周围的变性的胶原蛋白（绿色）。

图 5 显示了 HUI77 单抗对人内皮细胞粘附的效应。用浓度为 10ug/ml 的天然或变性的 I 型或 IV 型胶原蛋白包被微量滴定板（96 孔）。37℃用溶于 PBS 中的 1%BSA 封闭微孔板各孔 1 小时。然后在存在或不存在纯化的 HUI77 单抗（50ug/ml）或浓度为 50ug/ml 的同型匹配的对照抗体的情况下在包被孔中吸附人内皮细胞（HUVECs）30 分钟。洗涤去除未吸附的细胞，用结晶紫对吸附的细胞进行染色。细胞粘附是通过测量 600 纳米波长下流出的染料的光密度值而测定的。数据杆代表三个复孔的平均光密度值（O.D.）±标准偏差。数据是用对照的百分率来表示的。

图 6 显示了 HUI77 单抗对人内皮细胞迁移的效应。用浓度为 25ug/ml 的变性的 I 型或 IV 型胶原蛋白包被跨孔迁移室的膜。然后在存在或不存在纯化的 HUI77 单抗或同型匹配的对照抗体（100ug/ml）的情况下人内皮细胞（HUVECs）迁移共 6 小时。去除仍停留在膜上部的细胞，然后用结晶紫对迁移到膜下部的细胞染色。通过用微量滴定板读数仪测量 600 纳米波长下流出的染料的光密度值（O.D.）而对细胞迁移进行定量测定。数据杆代表三个复孔的平均光密度值（O.D.）±标准偏差。数据是用对照的百分率来表示的。

图 7 显示了系统给予纯化的 HUI77 单抗后对血管发生的效应。将用βFGF 浸泡过的滤纸片放置到 10 日龄鸡胚的尿囊绒膜（CAMs）上，24 小时后鸡胚接受单一静脉注射 20ug HUI77 单抗或对照。孵育 3 天后去除滤纸片以及周围的 CAM 组织，血管发生是通过对滤

纸片区域的血管分枝点计数而定量测定的。图中显示了来自一个典型试验的 CAM 组织。

图 8 显示了用 HUI77 单抗进行血管发生试验的定量测定。数据杆表示在每一种情况下 5 到 10 只鸡胚的平均值±标准误。血管发生指数等于试验处理的鸡胚的分枝点数目减去不存在βFGF 时 CAMs 上的分枝点数目。

图 9 显示了体内系统给予纯化的 HUI77 单抗对肿瘤生长的效应。A) CS-1 黑素瘤细胞 (5×10^6) 被接种到 10 日龄鸡胚的尿囊绒毛膜 (CAMs) 上, 24 小时后鸡胚接受单一静脉注射 100ug 纯化的 HUI77 单抗或对照。鸡胚孵育 7 天, 在 7 天孵育期结束之时, 切除所得到的肿瘤然后测量其湿重。照片显示了从用或不用 HUI77 处理的鸡胚中得到的代表肿瘤。

图 10 显示了肿瘤湿重的定量测定。数据杆表示在每一种情况下 5 到 12 只鸡胚的肿瘤平均湿重±标准误。

图 11 显示了在固相 ELISA 中 HUIV26 单抗与细胞外基质成分的反应性。用细胞外基质成分包被微量滴定板, 每种成分的浓度为 25ug/ml。A) 加入 HUIV26 单抗至浓度为 1ug/ml, 1 小时后加入过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG。在包被板子之前, 变形的 I 型和 IV 型胶原蛋白是煮沸 15 分钟而制备的。所有的数据都用任一个二抗的非特异性结合校正。数据杆代表三个复孔的平均光密度值 (O.D.) ±标准偏差。B) 用浓度为 25ug/ml 的三螺旋胶原蛋白包被微量滴定板, 在存在或不存在 EDTA、抑酶肽或二者的情况下, 浓缩的 (20×) HUVEC 条件培养基被加入到孔中, 然后孵育 1、6 和 24 小时。然后洗涤、封闭板子, 用 HUIV26 单抗或对照抗体孵育。数据杆代表三个复孔的平均光密度值 (O.D.) ±标准偏差。图中使用了下列缩写: Coll-I, I 型胶原蛋白; Coll-IV, IV 型胶原蛋白。

图 12 显示了 HUIV26 单抗鉴定鸡胚尿囊绒毛膜 (CAM) 中环绕

在生血管血管周围的变性的 IV 型胶原蛋白。变性的 IV 型胶原蛋白的产生和定位是通过间接免疫荧光研究来自 β FGF 和肿瘤诱生的血管发生的冷冻 CAM 组织而完成的。冷冻的 CAM 组织在丙酮中固定，用 1%BSA 封闭，然后用 HUIV26 单抗和针对于 IV 型胶原蛋白降解酶 MMP-2 或因子 VIII 的多克隆抗体进行共染色。通过与羊抗小鼠 FITC 标记的二抗和羊抗大鼠罗丹明标记的二抗孵育来测定抗体结合。上图显示了环绕在生血管血管周围的变性的 IV 型胶原蛋白和 MMP-2 的共定位。下图显示了环绕在生血管血管周围的变性的 IV 型胶原蛋白和因子 VIII 的共定位。左图显示了用 β FGF 刺激的 CAM 组织，右图显示了 CS1 黑素瘤在其中生长的 CAM 组织。上图中的红色表示 MMP-2 的表达，下图中的红色表示因子 VIII 的表达。上图及下图中的绿色表示变性的 IV 型胶原蛋白的表达，黄色表示其定位。

图 13 显示了 HUIV26 单抗鉴定环绕在人黑素瘤相关的血管周围的变性的 IV 型胶原蛋白。变性的 IV 型胶原蛋白在体内的产生和定位是通过间接免疫荧光研究来自人黑素瘤活组织检查的冷冻组织而完成的。人黑素瘤的冷冻组织在丙酮中固定，用 1%BSA 封闭，然后用 HUIV26 单抗和针对于已知的血管标志因子 VIII 的多克隆抗体进行共染色。通过与羊抗小鼠 FITC 标记的二抗和羊抗大鼠罗丹明标记的二抗孵育来测定抗体结合。红色表示因子 VIII 的表达并且标记上人血管，绿色表示与肿瘤相关的生血管血管特异性相关的变性的 IV 型胶原蛋白。

图 14 显示了 HUIV26 单抗对人内皮细胞粘附的效应。用天然或变性的 IV 型胶原蛋白包被微量滴定板（96 孔）。37℃用溶于 PBS 中的 1%BSA 封闭微孔板各孔 1 小时。然后在存在或不存在纯化的 HUIV26 单抗或浓度为 100ug/ml 的同型匹配的对照抗体的情况下在包被孔中吸附人内皮细胞 30 分钟。洗涤去除未吸附的细胞，用结晶

紫对吸附的细胞进行染色。细胞与 10% 的乙酸孵育，细胞粘附是通过测量 600 纳米波长下流出的染料的光密度值而测定的。数据杆代表三个复孔的平均光密度值 (O.D.) $\pm$ 标准偏差。

图 15 显示了 HUIV26 单抗对人内皮细胞迁移的效应。用天然或变性的 IV 型胶原蛋白包被跨孔迁移室的膜。然后在存在或不存在纯化的 HUIV26 单抗或同型匹配的对照抗体 (100ug/ml) 的情况下人内皮细胞 (HUVECs) 迁移至包被膜的底端共 6 小时。去除仍停留在膜上部的细胞，然后用结晶紫对迁移到膜下部的细胞染色。然后膜与 10% 的乙酸孵育，细胞迁移是通过用微量滴定板读数仪测量 600 纳米波长下流出的染料的光密度值 (O.D.) 而定量测定的。数据杆代表三个复孔的平均光密度值 (O.D.) $\pm$ 标准偏差。

图 16 显示了体内系统给予纯化的 HUIV26 单抗后对血管发生的效应。将用 β FGF 浸泡过的滤纸片放置到 10 日龄鸡胚的尿囊绒膜 (CAMs) 上，24 小时后鸡胚接受单一静脉注射 20ug HUIV26 单抗或对照。孵育 3 天后去除滤纸片以及周围的 CAM 组织，血管发生是通过对滤纸片区域内的血管分枝点计数而定量测定的。图中显示了来自一个典型试验的 CAM 组织。

图 17 显示了用 HUIV26 单抗进行血管发生试验的定量测定。数据杆表示在每一种情况下 5 到 10 只鸡胚的平均值 $\pm$ 标准误。血管发生指数等于试验处理的鸡胚的分枝点数目减去不存在 β FGF 时 CAMs 上的分枝点数目。

图 18 显示了体内系统给予纯化的 HUIV26 单抗对肿瘤生长的效应。CS-1 黑素瘤细胞 (5×10^6) 被接种到 10 日龄鸡胚的尿囊绒膜 (CAMs) 上，24 小时后鸡胚接受单一静脉注射 20ug 纯化的 HUIV26 单抗或对照。鸡胚孵育 7 天。照片显示了从对照或用 HUIV26 处理的鸡胚 CAM 组织中得到的代表肿瘤。

图 19 显示了切除的肿瘤大小的比较。在 7 天孵育期的末期，所

产生的肿瘤被切除下来并且分析总大小和湿重。图中显示了从对照或用 HUIV26 处理的鸡胚上切除的肿瘤大小的比较。

图 20 显示了肿瘤湿重的定量测定。数据杆表示每种情况下来自 5 到 10 只鸡胚的肿瘤湿重的平均值±标准误。

图 21 显示了 SCID 小鼠模型系统中评价的 HUIV26 单抗对肿瘤生长的效应。对 SCID 小鼠皮下注射 2×10^6 M21 人黑素瘤细胞。三天后开始一个为期 24 天的处理，每天腹腔内注射 100ug HUIV26 单抗或同型匹配的对照抗体，或是不加处理。通过测量直径来监测肿瘤体积从而测定肿瘤大小。每组 5 只小鼠。数据表示每一实验条件下肿瘤体积的平均值±标准误。在每一实验条件下包括 5 到 10 只小鼠的 2 个独立的试验也得到了类似的结果。

图 22 显示了 HUIV26 单抗与含有胶原蛋白多肽的 RGD 反应性的分析。用 50ul 含有胶原蛋白多肽 (100ug/ml) 的 RGD (A) 或变性的人 IV 型胶原蛋白(B)包被微量滴定板,用溶于 PBS 中的 1%BSA 封闭板子以减少非特异性结合。HUIV26 单抗 (1.0ug/ml, 50ul/孔) 与包被板 37℃ 结合 1 小时。通过与过氧化物酶标记的二抗孵育来检测 HUIV26 单抗的结合。通过微板读数仪测量光密度值来定量测定免疫反应。A) 纯化的 HUIV26 单抗与含有胶原蛋白多肽的 RGD 的免疫反应性。B) 在存在或不存在含有胶原蛋白多肽的可溶性 RGD 或变性的 IV 型胶原蛋白的情况下 HUIV26 单抗与静止的变性的 IV 型胶原蛋白的免疫反应性。数据杆代表三个复孔的平均光密度值 (O.D.) ±标准偏差。

图 23 显示了在变性的 I 型胶原蛋白上内皮索的形成。用天然或变性的人 I 型胶原蛋白包被柔软的微孔膜。在不存在加入的生长因子或血清的情况下人内皮细胞 (HUVECs) 与胶原蛋白作用 5 小时。

图 24 显示了在 I 型胶原蛋白上人内皮细胞的存活分析。用天然

的或蛋白水解的/变性的人人 I 型胶原蛋白包被微量滴定板。然后在不加入的生长因子或血清的情况下人内皮细胞（HUVECs）在孔中吸附 5 小时。在 5 小时孵育期结束之时，去除吸附的细胞、固定并且用 ApopTaq 试剂盒进行细胞编程性死亡染色并用流式细胞术分析。数据表示开始经历细胞编程性死亡的人内皮细胞百分率的平均值±标准偏差。数据来自三个复孔。

图 25 显示了 I 型胶原蛋白的隐蔽区在内皮索的形成中的效应。对 I 型胶原蛋白的氨基酸序列以及三维结构的分析显示成熟的三螺旋 I 型胶原蛋白中存在潜在的隐蔽区。对应于 I 型人胶原蛋白的 5 个这样的潜在隐蔽区合成多肽。这些隐蔽区被固定在微量滴定板孔中。并且如上所述进行内皮索形成分析。如图所示，装板 1 小时以后，所有的 5 种胶原蛋白肽都支持内皮细胞粘附。但是，图中人胶原蛋白 2 可以促进内皮索的形成并且在 18 小时后仍使内皮细胞存活，与此同时其它的肽在 18 小时以后很少显示出活性。

图 25 显示了 I 型胶原蛋白的隐蔽区通过不同的整合蛋白受体支持内皮细胞粘附。代表人 I 型胶原蛋白的肽被固定在微量滴定板孔中。在存在或不存在针对特异性整合蛋白的功能性阻断抗体的条件下内皮细胞吸附到肽上去。所有的肽都支持内皮细胞粘附，但水平变化很大。由于针对 $\alpha V\beta 3$ 的 LM609 单抗阻断细胞粘附，细胞对所有 5 种多肽的粘附依赖于整合蛋白 $\alpha V\beta 3$ 的连接。令人惊奇的是，细胞对肽 2 的吸附也依赖于 $\beta 1$ 整合蛋白，由于细胞与这种肽的粘附也被针对于 $\beta 1$ 整合蛋白的 P4C10 单抗阻断。

图 27 显示了与 I 型胶原蛋白的隐蔽区反应的单克隆抗体的生产。I 型胶原蛋白的隐蔽区被用于生产单抗。这些单抗中名为 XL313 的单抗被用于进一步研究。I 型胶原蛋白肽被固定在微量滴定板孔中并且评价 XL313 单抗的结合能力。如下所示，XL313 单抗特异性识别人胶原蛋白肽 2。此外 XL313 单抗特异性识别胶原蛋白肽 4，但

是，胶原蛋白肽 4 并不存在于成熟的 I 型胶原蛋白中。XL313 与其它类似的 I 型胶原蛋白肽不发生反应。

图 28 显示了 XL313 单抗特异性识别变性的人 I 型胶原蛋白。用天然的或变性的 I 型或 IV 型人胶原蛋白包被微量滴定板。通过固相 ELISA 评价 XL313 单抗与天然的或变性的人 I 型胶原蛋白和变性的人 IV 型胶原蛋白结合的能力。XL313 单抗特异性识别变性的人 I 型胶原蛋白而不是天然的 I 型胶原蛋白。此外，XL313 单抗不能与天然的或变性的人 IV 型胶原蛋白结合。

图 29 显示了 XL313 单抗抑制鸡胚中血管发生。用 β FGF 在 10 日龄鸡胚 CAMs 上诱生血管发生。24 小时后鸡胚接受单一静脉内注射 50ug XL313 单抗或同型匹配的对照抗体。三天后，通过测量滤纸片区域的血管分枝点数目来定量测定血管发生。A：来自一典型试验的 CAM 组织的代表例子。

图 30 显示了对图 29 血管发生试验的定量测定。数据杆表示每种情况下 5 到 10 只鸡胚的平均值 $\pm$ 标准误。

图 31 显示了系统给予 XL313 单抗对人成纤维瘤生长的效应。HT1080 人成纤维瘤细胞 (5×10^6) 被接种到 10 日龄鸡胚的尿囊绒毛膜 (CAMs) 上，24 小时后鸡胚接受单一静脉内注射纯化的 XL313 单抗，每鸡胚 50ug。孵育 7 天后切除肿瘤并测量其湿重。对湿重进行定量测定。数据杆表示每种情况下 5 到 10 只鸡胚的平均值 $\pm$ 标准误。

图 32 显示了 MMP 裂解位点突变的 I 型胶原蛋白体内抑制黑素瘤生长。I 型胶原蛋白 MMP 裂解位点存在突变的转基因小鼠被用于测定是否 I 型胶原蛋白的水解在肿瘤生长以及血管发生中起作用。Col a1 转基因小鼠具有一个抑制 MMPs 结合和裂解 I 型胶原蛋白的突变。Col a1 B6 转基因小鼠或野生型对照 B6 小鼠被皮下注射 B16 转基因黑素瘤细胞。肿瘤生长 11 天后用卡钳测量肿瘤直径大小。如下所示，

B16 黑素瘤细胞在可以轻易蛋白水解 I 型胶原蛋白的小鼠体内形成了大的增生肿瘤。与此相反，在 I 型胶原蛋白水解受到抑制的 B6 Col a1 转基因小鼠中 B16 黑素瘤细胞几乎没有形成肿瘤的能力。数据表示每一情况下 5 只小鼠肿瘤体积的平均值±标准误。

图 33 显示了 XL313 单抗在 B6 小鼠中抑制肿瘤生长。在野生型 B6 小鼠或 Col a1 转基因小鼠中检测路易斯肺癌。A；路易斯肺癌细胞皮下注射到野生型 B6 小鼠或 B6 Col a1 转基因小鼠中。B；对野生型 B6 小鼠与 Col a1 B6 转基因小鼠中路易斯肺癌的肿瘤生长进行比较。C；野生型 B6 对照小鼠注射路易斯肺癌细胞，24 小时后用 XL313 单抗或同型匹配的对照抗体（100ug/每注射）系统处理小鼠。肿瘤生长 11 天后用卡钳测量肿瘤直径大小。数据表示每一情况下 5 只小鼠肿瘤体积的平均值±标准误。

本发明的描述

胶原蛋白

本发明的方法适于应用许多胶原蛋白分子，包括来自任何一种动物的胶原蛋白分子。在一个实施方案中胶原蛋白为人胶原蛋白。胶原蛋白也可以来自任何一种哺乳动物如大鼠、小鼠、猪、兔子等或来自鸟类如鸡。通常情况下，胶原蛋白为含有[Gly-Xaa-Xaa]_n序列的细胞外基质蛋白。胶原蛋白类型是本领域众所周知的（见例如 Olsen,B.R.(1995)现代细胞生物学论点，5：720-727；Kucharz, E.J.胶原蛋白生物化学和病理生理学，SpringerVerlag，柏林，1992；Kunn,K.各型胶原蛋白的结构和功能，P.Mayne 和 R.E. Burgeson 编著，科学出版社，奥兰多）。人胶原蛋白为优选的胶原蛋白。变性的胶原蛋白指已经被处理不再包含天然三螺旋形式的胶原蛋白。可以通过加热使胶原蛋白变性。在一个实施方案中，100℃加热 15 分钟使胶原蛋白变性。也可以通过用离液剂处理使胶原蛋白变性。合适的离液剂包括，例如胍盐。胶原蛋白的变性可以通过以下方法监测，例如光

学特性如光吸收度的光谱改变，蛋白荧光的圆二色性，核磁共振，拉曼光谱或任何一种合适的技术。变性的胶原蛋白指变性的全长胶原蛋白或胶原蛋白的片段。胶原蛋白的片段可以是任何比天然的胶原蛋白序列短的胶原蛋白序列。对于具有主要天然结构的胶原蛋白片段，变性可能会影响天然的全长胶原蛋白。片段也可以为不具有明显的天然结构或不具有明显的三螺旋形式天然结构的区域大小。这些片段的全部或部分变性不需要加热或使用离液剂。变性的胶原蛋白这个术语包含蛋白水解的胶原蛋白。蛋白水解的胶原蛋白指被蛋白水解酶酶解为片段化的胶原蛋白。尤为特别的是，可以通过用胶原蛋白酶如 MMP-1、MMP-2 或 MMP-9 处理胶原蛋白，或通过用含有胶原蛋白降解活性的细胞外部分处理胶原蛋白或在组织中新血管发生的位点自发的胶原蛋白降解活性制备蛋白水解的胶原蛋白。

胶原蛋白内隐蔽的表位是在天然的胶原蛋白内不暴露不被识别，但是能被变性胶原蛋白的拮抗剂识别的一段序列。可以通过测定拮抗剂的特异性来鉴别隐蔽表位的序列。也可以通过例如检测天然三螺旋胶原蛋白的三维结构来鉴别侯选的隐蔽表位。在天然结构中不溶解暴露的或是部分溶解暴露的肽序列是潜在的隐蔽表位。

表位是能被本发明拮抗剂识别的一段氨基酸序列或序列。一个表位可以是线性的肽序列或是由非连续氨基酸序列所组成。一种拮抗剂可识别一或多种序列，因此，一种表位能够确定多于一种的不同的氨基酸序列靶。拮抗剂识别的表位可以通过本领域熟练技术人员众所周知的肽图谱或序列分析技术测定。

拮抗剂

本发明的拮抗剂与变性的胶原蛋白特异性结合，但是与天然形式胶原蛋白的亲合力显著下降。“显著下降的亲合力”是指比与变性的胶原蛋白的亲合力低 3 倍左右，优选低 5 倍左右，更低 10 倍左右，最好低 10 倍以上。而且，当与相关亲合力比较时，“显著减少”意

思是指亲和力至少差 3 倍。拮抗剂优选是 I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型胶原蛋白及其组合形式特异性的拮抗剂。在一个实施方案中，一种拮抗剂与变性的 I 型胶原蛋白结合，但其与天然形式的 I 型胶原蛋白和变性的 II 型、III 型、IV 型、V 型胶原蛋白的亲和力显著下降。在另一个实施方案中，一种拮抗剂与变性的 IV 型胶原蛋白结合，但其与天然形式的 IV 型胶原蛋白的亲和力显著下降。在另一个实施方案中，一种拮抗剂与变性的 I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型胶原蛋白结合，但其与天然形式的 I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型胶原蛋白的亲和力显著下降。

表观亲和力可以通过如酶联免疫吸附分析（ELISA）或其它本领域熟练技术人员所熟知的技术来测定。实际亲和力可以通过本领域熟练技术人员所熟知的技术来测定。

在一个实施方案中，含有可被一种拮抗剂识别的表位的肽可被自身应用。在另一个实施方案中，由 HUI77、HUIV26 和 XL313 单抗所确定的表位可以自身用做抗血管组合物。

本发明根据现有方法的应用也提供了鉴别候选胶原蛋白拮抗剂的分析方法。利用这些分析方法评价候选拮抗剂结合变性的和天然的胶原蛋白的能力，而且评价它们抑制组织中血管发生的能力。

结合分析

酶联免疫吸附分析

第一个分析通过 ELISA 测定了拮抗剂与变性的或天然的胶原蛋白在固相中的结合。这种分析方法适用于多类型的胶原蛋白，例如这种分析方法可用于 I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型胶原蛋白以及其它细胞外基质成分。

这种分析方法也可被用于鉴别对变性的而不是天然形式的胶原蛋白表现出特异性的化合物。这种特异性分析是通过平行 ELISAs 进行的，同时在另一个单独的分析板中筛选另一种可能的拮抗剂结

合变性的和天然的胶原蛋白的能力。

变性胶原蛋白的拮抗剂也可以通过它们与本发明拮抗剂竞争结合的能力而被鉴别。例如，推定的拮抗剂可通过监测它们在一个结合分析如 ELISA 中对于一个已知的拮抗剂如 HUI77、HUIV26 或 XL313 亲和力的影响而筛选。这些拮抗剂很可能具有与 HUI77 相似的特异性，并且能够识别同一个隐蔽的表位。通过这种筛选方法选择出的推定的拮抗剂既能够与胶原蛋白结合，又能够与拮抗剂结合。可以通过传统的结合分析以确定哪些与变性的胶原蛋白结合而不与已知的拮抗剂结合，从而从推定的拮抗剂中选择出拮抗剂。

拮抗剂也可以通过它们具有与含有变性的胶原蛋白的固相基质结合的能力而被鉴别。改变溶液条件如盐浓度、pH 值、温度等以后，这些推定的拮抗剂将被收集起来。这些推定的拮抗剂可以凭借它们在适合的溶液条件下通过已经吸附有天然胶原蛋白的固相基质的能力而被进一步鉴别。

血管发生分析

也可分析本发明的拮抗剂调控组织中血管发生的能力。任何一个适用的分析方法都可被本领域熟练技术人员用于监测这些效应。在此将描述几种这样的技术。

第二种分析方法是测量鸡胚尿囊绒毛膜（CAM）中的血管发生，因此叫做 CAM 分析。其他研究者已经详细描述了 CAM 分析方法，并且此方法已经被进一步用于测定肿瘤组织中的血管发生和新血管发生。见 Ausprunk 等，美国病理学期刊，79：597-618（1975）和 Ossonski 等，癌症研究，40：2300-2309（1980）。

由于整个组织正在发生新血管发生，并且实际上鸡胚血管正长入 CAM 或正长入 CAM 上正在生长的组织中，CAM 分析是一种受到广泛认可的用于体外血管发生的分析模型。

如下所述，CAM 分析显示了在新血管生长的数量和程度的基础

上对新血管发生的抑制。而且，很易于监测任何移植到 CAM 上的组织的生长，如肿瘤组织。最后，这个分析方法尤其有用，这是因为在分析系统中对毒性有一个内部控制。鸡胚暴露于任何一种测试试剂中，因此鸡胚的健康是毒性的指示剂。

第三种分析方法是在兔眼模型中体内测定血管发生，因此称做兔眼分析。其他研究者已经详细描述了兔眼分析方法，并且此方法已经被进一步用于测定生血管抑制剂如 thalidomide 存在的情况下的血管发生和新血管发生。见 D' Amato 等(1994), Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 4082-4085。

兔眼分析是一种受到广泛认可的用于体内血管发生的分析模型，这是因为新血管发生的过程，举例说明如兔血管从眼角膜的边缘长入眼角膜，易于通过天然透明的眼角膜显现出来。此外，对新血管发生的刺激或抑制的程度和数量或新血管发生的衰退都可很容易地随时间监测。

最后，兔子暴露于任何一种测试试剂中，因此兔子的健康是测试试剂毒性的指示剂。

第四种分析方法测定嵌合小鼠：人小鼠模型中血管发生，因此称做嵌合鼠分析。其他研究者已经详细描述了这个方法，并且此方法在此被进一步用于测定血管发生、新血管发生和肿瘤组织的退化。见 Yan 等（1993）临床投资期刊，91: 986-996。

嵌合鼠分析是一种有用的体内血管发生的分析模型，这是因为移植的皮肤在组织学上与正常的人皮肤很相像，在整个组织中新血管正在生成，其中正常的人血管从移植的皮肤生长进入移植的皮肤表面的人肿瘤组织中。新血管发生进入移植皮肤可以通过用人特异性的内皮细胞标志对新血管结构进行免疫组化染色而显示出来。

嵌合鼠分析在新血管生长衰退的程度和数量的基础上显示出新血管发生的衰退。而且，很容易对移植到嫁接皮肤上的任何组织如

肿瘤组织的生长效应进行监测。最后，此分析方法很有用，这是因为分析系统内部有毒性控制。嵌合鼠暴露于任何一种测试试剂中，因此嵌合鼠的健康是毒性的指示剂。

抗体

在一个实施方案中，本发明描述了可与变性的胶原蛋白结合但与天然形式胶原蛋白结合亲和力显著下降的抗体形式的变性胶原蛋白的拮抗剂。抗体拮抗剂也能抑制血管发生。本发明也描述了生产此抗体的细胞系，生产细胞系的方法和生产单克隆抗体的方法。

本发明的抗体可为单克隆或多克隆抗体。在一个实施方案中，所使用的抗体为单克隆抗体。本发明的单克隆抗体包含与分离出的变性的胶原蛋白发生免疫反应但与天然形式胶原蛋白免疫反应显著降低的抗体分子。在一个实施方案中，本发明的一种抗体识别变性的 I 型胶原蛋白，其亲和力是其与天然形式胶原蛋白亲和力的优选至少 3 倍，较优选至少 5 倍，最好至少 10 倍。本发明的一种抗体也可优选结合至变性的 IV 型胶原蛋白，但其与天然 IV 型胶原蛋白的亲和力显著下降。本发明的抗体也可与 I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型胶原蛋白结合，但其与天然形式的 I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型胶原蛋白的亲和力显著下降。

优选的优先结合至变性的胶原蛋白的单克隆抗体包括具有 HUI77、HUIV26 和 XL313 单抗免疫反应特性的单克隆抗体。

可以根据本领域熟练技术人员所熟知的方法生产本发明的抗体拮抗剂。例如，可用变性的胶原蛋白或其片段免疫动物。然后从所产生的抗体中选择与变性的蛋白水解的胶原蛋白结合但与同一天然形式的胶原蛋白亲和力显著下降的抗体。例如，可以通过“减法免疫”来生产抗体（见例如 Brooks, P.C.等（1993），细胞生物学期刊，122: 1351-1359）。

不同语法形式的“抗体或抗体分子”这个术语在此用做集合名

词，指免疫球蛋白分子和/或免疫球蛋白分子免疫学活性的部分的群体，即含有免疫结合位点或抗原互补位的分子。

“抗体结合位点”是由重链和轻链可变区和高变区所组成的特异性结合抗原的一个抗体分子的结构部分。

本发明所举例使用的抗体为完整的免疫球蛋白分子、基本完整的免疫球蛋白分子和一个免疫球蛋白分子含有抗原互补位的那些部分，包括在本领域熟知的 Fab, Fab' , F(ab')₂ 和 F(v), 也指抗体片段。

在本发明的另一个实施方案中，本发明设想一个来自本发明单克隆抗体的含有一个 Fab 片段的截短的免疫球蛋白分子。缺少 Fc 受体的 Fab 片段是可溶的，并且在血清半衰期中具有治疗价值，可溶性 Fab 片段可用于诊断。可溶性 Fab 片段的制备在免疫学领域是普遍熟知的并且可以通过许多方法完成。

例如，抗体的 Fab 和 F(ab')₂ 部分（片段）可以通过众所周知的方法用木瓜蛋白酶和胰蛋白酶水解基本完整的抗体而制备。见例如授予 Theofilopolous 和 Dixon 的美国专利 No.4342566。Fab' 抗体部分也是众所周知的，可以从 F(ab')₂ 部分制备，先用巯基乙醇减少连接在两条重链部分的二硫键，然后用试剂如碘乙酰胺对产物蛋白硫醇碱基化。优选含有完整免疫球蛋白分子的抗体，并在此做举例说明。

不同语法形式的“单克隆抗体”这个短语指只含有一个物种的抗体结合位点并且能够与某一个特定表位发生免疫反应的抗体分子群。因此，一个单克隆抗体可能包含具有很多抗体结合位点的抗体分子，每一位点对不同表位是免疫特异性的，如双特异性抗体。

单克隆抗体典型地由单细胞克隆所产生的抗体组成，此单细胞克隆称做杂交瘤，仅分泌（产生）一种类型的抗体分子。杂交瘤由抗体生成细胞和骨髓瘤细胞或其它自身永生化的细胞系融合而成。

这些抗体的制备首先由 Kohler 和 Milstein 所描述, 自然 256: 495-497 (1996), 此描述引入本文做参考。在由 CRC 公司 1987 年出版的 Zola 所著的单克隆抗体: 技术手册一书中描述了其它方法。可以筛选用此方法制备的杂交瘤细胞上清以寻找可与变性的胶原蛋白发生免疫反应的抗体分子。

简言之, 为了构成生产单克隆抗体组合物的杂交瘤, 就要将骨髓瘤或其它自身永生化的细胞系与来自用变性的胶原蛋白超免疫的哺乳动物脾脏的淋巴细胞相融合。

用于制备杂交瘤的骨髓瘤优选与淋巴细胞来自同一物种。典型的是, 129G1X.sup.+ 品系小鼠是优选的哺乳动物。本发明所使用的合适的小鼠骨髓瘤包括次黄嘌呤-氨基喋呤-胸苷敏感 (HAT) 的细胞系 P3X63-Ag8.653 和 Sp2/0-Ag14, 位于 Rockville 的美国典型培养物集藏中心有上述细胞, 其说明分别为 CRL1580 和 CRL1581。

具有代表性的是使用聚乙二醇 (PEG) 1500 脾淋巴细胞与骨髓瘤的融合。融合的杂交瘤是根据它们对选择生长培养基如 HAT (次黄嘌呤-氨基喋呤-胸苷) 培养基的敏感性而挑选出来的。生产本发明单克隆抗体的杂交瘤是使用在实施例中所描述的酶联免疫吸附分析 (ELISA) 鉴别的。

本发明的单克隆抗体也可以通过起始由营养培养基构成的含有能够分泌具有合适的特异性的抗体分子的杂交瘤的单克隆杂交瘤培养而产生。此培养物在合适的条件下培养足够时间以使杂交瘤将抗体分子分泌到培养基中。然后收集含有抗体的培养基。然后通过众所周知的技术进一步分离抗体分子。

用于制备这些组合物的培养基是本领域众所周知的, 并且商业上有产品出售, 包括合成培养基、近亲交配小鼠及其类似物。一种合成培养基的例子是含有 4.5 克/升葡萄糖、20nM 谷氨酰胺和 20% 胎牛血清的 Dulbecco' s 基本培养基 (DMEM; Dulbecco 等, 病毒

学, 8: 396, 1959)。近亲交配小鼠的例子是 Balb/c 小鼠。

生产单克隆抗体、杂交瘤细胞或杂交瘤细胞培养物的其它方法也是众所周知的。例如, 见由 Sastry 等 (1998), Proc. Natl. Acad. Sci, 美国, 86: 5728-5732; 以及 Huse 等 (1989) 自然, 246: 1275-1281 中所描述的从免疫学所有组成成分中分离单克隆抗体的方法。

本发明也涉及杂交瘤细胞以及含有生产本发明单克隆抗体的杂交瘤细胞的培养物。特别优选分泌 HUI77、HUIV26 和 XL313 单克隆抗体的杂交瘤细胞。

在一个实施方案中, 本发明也涉及具有 HUI77、HUIV26 和 XL313 单克隆抗体免疫反应性的一种单克隆抗体。

通过确定是否前者阻止后者与预先选定的靶分子结合从而确定是否一种单克隆抗体具有与本发明的单克隆抗体相当的特异性 (免疫反应特性) 是可能的。如果待测单克隆抗体与本发明的单克隆抗体竞争结合, 如同在一个标准的竞争分析中表现出的本发明的单克隆抗体与固相中靶分子结合的降低。因此很可能这两种单克隆抗体与同一表位或紧密相关的表位结合。

另外一个确定一种单克隆抗体是否具有本发明单克隆抗体特异性的方法是确定待测单克隆抗体 CDR 区的氨基酸残基序列。CDR 区具有相同的或功能上相当的氨基酸残基序列的抗体分子也具有同样的结合特异性。对多肽测序的方法是本领域众所周知的, 但这并不表明具有明显不同的 CDR 区的抗体不能与同一表位结合。

抗体的免疫反应特异性、其与靶分子的结合能力以及抗体与表位的亲和性都是通过与抗体发生免疫反应的表位而确定的。表位特异性至少部分由抗体免疫球蛋白分子的重链可变区的氨基酸残基序列确定, 部分由轻链可变区的氨基酸残基序列确定。

“具有结合特异性”这一术语的应用指等效单克隆抗体表现出相同或相似的免疫反应 (结合) 特性并且与预先选定的靶表位竞争

结合。

人源化单克隆抗体比鼠单克隆抗体更具有优势，特别是它们可被用于人体治疗。更为独特的是，人抗体不像外源抗原那样很快被循环所清除，并且不用与外源抗原和外源抗体同样的方式激活免疫系统。制备人源化单克隆抗体的方法是本领域普遍众所周知的，并且随时可用于本发明的抗体之中。

因此，在一个实施方案中，本发明考虑到了本发明的一种单克隆抗体通过嫁接引入人免疫系统的成分并且基本不改变这种抗体结合抗原的能力而被人源化。

本发明的抗体也可以是完全的人抗体，例如那些从展示人单链或双链抗体的抗体噬菌体展示文库中挑选出来的抗体，Haard,H.J.等（1999），生物化学期刊，274：18218-30 和 Winter, G.等（1994），免疫学年度评论，12：433-55。

多肽

变性的胶原蛋白的拮抗剂也可以是多肽或肽。多肽这个术语指相邻氨基酸残基的 α -氨基和羧基通过肽键相连的 3 个以上的氨基酸序列。肽这个术语在本文中指如多肽中两个或更多彼此连接的线性系列。

在一个实施方案中，本发明考虑到了多肽形式的变性的胶原蛋白拮抗剂。变性的胶原蛋白多肽形式的拮抗剂可以是能与变性的胶原蛋白结合，但与天然形式胶原蛋白结合亲和力显著下降的任何肽或多肽。

具有变性的胶原蛋白选择性的优选的变性胶原蛋白拮抗剂多肽可以通过典型的结合抑制分析如在实施例描述的 ELISA 分析而被鉴别。

本领域熟练技术人员可以使用许多已知的技术生产肽和多肽拮抗剂。例如，双杂交系统（例 Fields,S.(1989)，自然，340：245-6）

使用胶原蛋白的一个片段作为从与胶原蛋白结合的文库中选择蛋白质拮抗剂的“诱饵”。潜在的拮抗剂库可以来自如 cDNA 文库。在另外一个实施方案中，潜在的拮抗剂是已知的胶原蛋白结合蛋白的突变体。这些蛋白质被随机诱变、基因重排或使用其它可以技术以产生序列多样性。

本发明的肽和多肽拮抗剂也可以通过分子进化技术生产。蛋白质库可以通过诱变、基因重排或使用其它可以技术以产生分子多样性。代表多种突变体的蛋白质库可以通过它们与变性的胶原蛋白结合的能力被选择出来。例如通过将这些蛋白质库经过一个已经吸附有变性胶原蛋白的固相基质。用梯度盐溶液洗脱可以得到纯化的与变性的胶原蛋白具有亲和力的突变体。阴性选择步骤也包括在其中，这样的蛋白质库经过一个已经吸附有天然胶原蛋白的固相基质。滤液含有蛋白质库中与天然形式胶原蛋白结合亲和力下降的突变体。

本发明的肽和多肽拮抗剂也可以通过噬菌体展示技术生产。随机的肽或蛋白质可以作为噬菌体衣壳蛋白的融合蛋白表达在噬菌粒的颗粒表面。单价噬菌体展示技术已经很普遍（见例如 Lowman, H.B. 等（1991），生物化学，30：10832-8）。将表达随机多肽或蛋白质文库的噬菌体经过一个已经吸附有天然胶原蛋白分子的固相基质。改变溶液条件或对于一个合适设计的构建物来说通过蛋白水解裂解噬菌体衣壳蛋白与随机肽或蛋白质文库连接的接头区将结合的噬菌体从固相基质中分离出来。对分离出的噬菌体测序以确定所选择的拮抗剂的均一性。

在另外一个实施方案中，本文显示氨基酸序列的多肽包括多肽的类似物、片段或化学衍生物，只要此多肽是变性的胶原蛋白而不是天然胶原蛋白的拮抗剂。因此，现有的多肽可以经受各种对其应用提供某些优势的改变、替换、插入和删除。从这一点上来说，本发明的变性胶原蛋白拮抗剂多肽对应于，而不是等同于，一个已经

存在一个或多个改变但仍然在下面所述的一种或多种分析中保持其作为一种变性胶原蛋白拮抗剂功能的复述的肽序列。

因此，多肽可以是任何一种肽衍生物形式的多肽，包括酰胺、与蛋白质结合、环化肽、聚合肽、类似物、片段、化学修饰的肽以及类似的衍生物。

其它拮抗剂

本发明的拮抗剂也可以是小的有机分子，如那些天然产物，或者那些通过传统的有机合成或组合有机合成技术合成的化合物。可以利用如上所述的柱结合技术来检测化合物与变性的胶原蛋白结合的能力。利用一个类似的柱结合技术，与天然形式胶原蛋白结合亲和力和降低的化合物也可以被选择出来。

本发明的拮抗剂也可以是非肽化合物。合适的非肽化合物包括例如寡核苷酸。在本文中所用的寡核苷酸指任何含有嘌呤、嘧啶和其它含有芳香族碱基的杂聚物。如同糖（如 2' 碱基化核糖）和骨架修饰（例如，硫代磷酸寡核苷酸）一样，DNA 和 RNA 寡核苷酸适于本发明应用。寡核苷酸可能包括普遍发现的嘌呤和嘧啶碱基如腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶，以及在杂环部分（如 7' -deazaguanine）或环外位置受到修饰的碱基。寡核苷酸也包括也具有芳香族碱基但结构不同的杂聚物，包括聚胺核酸以及类似物。

本领域熟练技术人员可以使用许多已知的技术生产本发明的一种寡核苷酸类似物。在一个实施方案中，生产出了含有许多序列的寡核苷酸库。例如可以在延伸阶段使用单聚物的混合物通过固相合成技术生产寡核苷酸库。将含有寡核苷酸库的溶液经过已经吸附有变性的胶原蛋白及其片段的固相基质从而对寡核苷酸库进行分类。库内与变性的胶原蛋白结合的序列停留在固相基质上。用不同盐浓度或 pH 值的溶液将这些序列洗脱下来。选择出的序列经历再次选

择步骤。选择出的库经过已经吸附有天然的胶原蛋白的第二固相基质。那些与天然胶原蛋白结合的序列停留在柱中。此库可被扩增，并且如果需要的话可被诱变，并且重复此过程直至此库显示出本发明拮抗剂的特性。通常在将上述序列克隆入宿主如大肠杆菌之后对寡核苷酸库中的成员进行测序来鉴别每一种拮抗剂。

疾病治疗

本发明普遍涉及发现某些表位连接至变性的胶原蛋白而不是天然的胶原蛋白能够抑制血管发生。因为血管发生在一系列疾病进程中的作用，所以此发现非常重要。通过抑制血管发生，人们可以干预疾病、减缓症状和在某些情况下治愈疾病。

当新血管的生长是疾病相关的病理原因或有助于疾病相关的病理时，抑制血管发生将减轻疾病的危害效应。例如银屑病、风湿性关节炎、糖尿病视网膜病、炎症疾病、再狭窄、斑点退化以及类似疾病。在需要新血管生长以支持受损组织生长的地方，抑制血管发生将减少对受损组织的血液供应，并且因此在血液供应需求的基础上有助于组织物质的减少。例如包括肿瘤的生长，在肿瘤生长中肿瘤要超过几毫米厚度并且建立实体瘤转移新血管发生是持续需要的。

本发明的方法是部分有效的，这是因为治疗是一个对血管发生高度选择的过程，而不是其它生物学过程。正如在实施例中所示的，只有新血管的生长受到变性胶原蛋白拮抗剂的抑制，因此治疗方法对成熟的血管没有什么不利影响。也正如在实施例中所示的，拮抗剂与肿瘤中的生血管位点结合，而不是与正常的周围组织结合。

仅仅连接变性的胶原蛋白就可以有效抑制血管发生这一发现使得发展具有潜在的高特异性、相对低毒性的治疗性组合物成为可能。因此，尽管本发明包括可以连接一个或多个变性的胶原蛋白的以抗体为基础的拮抗剂的应用，人们仍然可以设计其它可与变性的胶原

蛋白而不是天然的胶原蛋白特异性连接的拮抗剂。

在本发明的发现之前，人们并不知道可以通过应用识别胶原蛋白，即蛋白水解或变性的胶原蛋白而不是天然形式的同一胶原蛋白，隐蔽表位的试剂在体内抑制血管发生以及其它任何依赖于血管发生的过程。

抑制血管发生的方法

本发明提供了抑制组织中血管发生的方法，和籍此抑制依赖于血管发生的组织的方法。通常来说，此方法包含给予组织一种含有血管发生抑制剂量的变性胶原蛋白拮抗剂的组合物。

如前所述，血管发生包括一系列涉及组织中新血管形成的过程包括“抽芽”、血管发生或血管扩张，所有上述血管发生过程涉及血管中胶原蛋白细胞外基质的破坏。但是创伤愈合、黄体形成和胚胎形成例外，据认为主要的血管发生过程与疾病进程相关，并且因此现有的治疗方法对疾病是有选择的。

有许多疾病其中血管发生被认为非常重要，这些疾病被称为生血管疾病，其中包括但不限于炎症紊乱例如免疫和非免疫炎症、慢性风湿性关节炎和银屑病，与不适合或不适宜血管侵入相关的紊乱如糖尿病视网膜病、新血管性青光眼、再狭窄、动脉粥样硬化和骨质疏松中的毛细血管增生以及癌症相关的紊乱如实体瘤、转移实体瘤、血管纤维瘤、晶状体后纤维组织形成、血管瘤、卡波济氏肉瘤和需要新血管形成以支持肿瘤生长的类似癌症。其它合适的肿瘤包括黑素瘤、癌、肉瘤、纤维瘤、神经胶质瘤和星形细胞瘤。

因此，抑制患病组织中血管发生的方法减缓了疾病症状，并且根据疾病的情况可能有助于治愈疾病。在一个实施方案中，本发明构想抑制组织中血管发生。可以通过各种不同的方法评价组织中血管发生的程度以及由本方法所达到的抑制程度，如实施例中所描述的通过免疫组化方法检测蛋白水解的或变性的胶原蛋白免疫反应阳

性的未成熟或新生血管结构。

正如在本文中所描述的，任何一种组织或由有机组织构成的器官包括皮肤、肌肉、肠、结缔组织、关节、骨和类似在生血管刺激下能被血管侵入的组织都能在患病条件下支持血管发生。组织，正如本文中所用的，也包含所有体液、分泌物以及类似物如血清、血液、脑脊髓液、胞浆、尿液、滑液、玻璃体。

因此，在一个相关的实施方案中，待治疗的组织是炎性组织，并且待抑制的血管发生是炎性组织中新生成的血管。本发明的方法构想抑制关节炎组织中的血管发生，如患有慢性风湿性关节炎的病人，免疫或非免疫炎性组织、银屑病组织或类似组织。

在本发明的许多实施方案中治疗的患者优选是人，尽管我们要明白本发明的原理表明本发明对所有的哺乳动物都是有效的，这其中也包括术语“人”。在本文中，哺乳动物被认为包括任何需要对疾病相关的血管发生进行治疗的动物物种，特别是农用动物物种和家畜。例如这样的患者可以是猪、牛、马、山羊、绵羊、骡子、驴、狗、猫、兔子、小鼠和大鼠。

在另一个相关的实施方案中，待治疗的组织是糖尿病视网膜病、斑点恶化、新血管性青光眼患者的视网膜组织，并且待抑制的血管发生为视网膜组织中新生成血管。

在另外一个相关的实施方案中，待治疗的组织是患有实体瘤、转移瘤、皮肤癌、乳腺癌、血管纤维瘤、血管瘤以及类似癌症的患者的肿瘤组织，待抑制的血管发生为肿瘤组织中新生成血管。可被本发明的方法抑制的典型的实体瘤组织包括肺、胰腺、乳房、结肠、喉、子宫组织、卡波济氏肉瘤以及类似组织。在实施例举例说明了肿瘤组织血管发生及其抑制。

抑制肿瘤组织血管发生是特别优选的实施方案，这是因为新血管发生在肿瘤生长中起重要作用。如果肿瘤组织中新血管发生，

肿瘤组织就会得不到所需要的营养，从而生长缓慢甚至停止生长、衰退，最终坏死导致肿瘤死亡。

换句话说，本发明根据现有的方法提供了通过抑制肿瘤血管发生而抑制肿瘤新血管发生的方法。相似地，本发明提供了实施抑制血管发生从而抑制肿瘤生长的方法。

本方法对抗转移瘤的形成特别有效，这是因为（1）它们的形成需要原发肿瘤的新血管形成以使转移的癌细胞能够退出原发肿瘤；（2）它们在次发位点的建立也需要新血管发生以支持转移瘤的生长。

在一个相关的实施方案中，本发明设想将此方法与其它治疗方法如传统的化疗组合使用用于抗实体瘤或用于控制转移瘤的建立。血管发生抑制剂通常在化疗中或化疗后应用，尽管优选在化疗一段时间后当肿瘤组织通过诱导血管发生以恢复对肿瘤组织的血液和营养供应对毒性攻击发生反应时抑制血管发生。此外，优选在手术切除实体瘤后为预防癌转移而实施血管发生抑制方法。

目前为止，本发明方法应用于抑制肿瘤新血管形成，这些方法也可应用于抑制肿瘤组织生长、抑制转移瘤的形成和抑制已经建立的肿瘤的恶化。

再狭窄是一个平滑肌细胞（SMC）在妨碍了血管成形的经皮透明冠状血管成形术位点迁移和增生的过程。再狭窄过程中血管相关的 SMCs 的迁移和增殖与受到本方法抑制的血管发生过程相关。因此，本发明也根据现有的方法设想在血管成形术后的病人体内通过抑制血管发生相关的过程而抑制在狭窄。为了抑制再狭窄，通常在实施血管成形术 2 到 28 天后给予变性的胶原蛋白拮抗剂，最典型的是在实施血管成形术 14 天后给予变性的胶原蛋白拮抗剂。

用于抑制组织中血管发生，并且因此也实施此方法用于治疗血管发生相关疾病的方法包含将含有能与变性的蛋白水解的胶原蛋白

而不是天然形式的胶原蛋白结合的治疗学有效剂量的变性胶原蛋白拮抗剂的组合物与正发生血管发生的组织或正处于血管发生危险中的组织相接触。因此，此方法包含给予病人生理学可接受的治疗学上有效剂量的含有一种本发明变性胶原蛋白拮抗剂的组合物。

所给予的变性胶原蛋白拮抗剂的剂量范围取决于拮抗剂的形式以及其作用能力，正如将要在本文中进一步描述的，并且剂量应该足够大以产生我们所期望的效应，血管发生和由血管发生介导的疾病症状被缓解。但是剂量不能太大以防止引起副反应，如粘滞性过高症状、肺水肿、充血性心脏病以及类似反应。通常来说，剂量随年龄、状况、性别、患者的患病程度而变化，并且本领域熟练技术人员可确定剂量大小。在有并发症的情况下剂量可根据个人医生的建议而调整。

治疗学有效剂量是变性胶原蛋白拮抗剂在待治疗组织中足以产生可检测到的血管发生受到抑制的剂量。血管发生的抑制可以通过原位免疫组化方法，正如本文中所描述的，或本领域熟练技术人员已知的其它方法来测定。

变性胶原蛋白拮抗剂的作用能力可以通过一系列的方法包括在CAM 分析中、在体内兔眼分析中、在体内嵌合鼠人模型分析以及类似的分析中抑制血管发生来测定。

本发明单克隆抗体形式的变性胶原蛋白拮抗剂的治疗学有效剂量是指当给予生理学耐受的组合物时足以在血浆中获得浓度为0.1ug/ml 至 100ug/ml，优选 1ug/ml 到 5ug/ml，通常是 5ug/ml 的剂量。换一种说法，每天给予一次或多次剂量注射一天或几天时，剂量可以从 0.1mg/kg 到 300mg/kg，优选 0.2mg/kg 到 200mg/kg，最优选 0.5mg/kg 到 20mg/kg 之间变化。

当拮抗剂采用单克隆抗体片段形式时，可以很容易地在相对于总抗体重量的片段重量的基础上对剂量进行调整。用摩尔表示的优

选的胞浆浓度是从 2 微摩尔(uM)到大约 5 毫摩尔(mM)，并且优选大约 100 微摩尔到 1 毫摩尔的抗体拮抗剂。

本发明多肽形式或小分子形式的变性胶原蛋白拮抗剂的治疗学有效剂量是指多肽的剂量，当给予生理学耐受的组合物时足以在血浆中获得从大约 0.1ug/ml 至大约 200ug/ml，优选从大约 1ug/ml 到大约 150ug/ml 的浓度。根据每摩尔多肽大约等于 500 克的重量，优选的优选的胞浆浓度用摩尔数表示是从 2 微摩尔(uM)到大约 5 毫摩尔(mM)，并且优选大约 100 微摩尔到 1 毫摩尔的抗体拮抗剂。换一种说法，每天给予一次或多次剂量注射一天或几天时，每公斤体重的剂量可以从 0.1mg/kg 到 300mg/kg，优选 0.2mg/kg 到 200mg/kg，最优选 0.5mg/kg 到 20mg/kg 之间变化。

本发明的单克隆抗体或多肽可以经肠道外途径注射或随时间逐渐灌输。尽管可以通过全身给予的方法到达体内的待治疗组织，但最经常的治疗方式为静脉内注射治疗性组合物，当靶组织可能含有靶分子时，可以考虑其它的组织和运送途径。因此，包括单克隆抗体、多肽及其衍生物的拮抗剂可以通过静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、腔内、经皮、局部、眼内、肿瘤内、鼻内途径给予并且能通过蠕动的方法运送。

本发明含有单克隆抗体或多肽的治疗性组合物通常采用静脉内注射的方法，例如注射一个单位的剂量。“单位剂量”这个术语当用于本发明治疗性组合物时是指物理学上分立的单位作为物体的单一剂量，每个单位含有预先确定数量的活性物质与稀释液即载体或运送工具一起以产生期望的治疗效应。

正如在实施例中所显示的一个优选的实施方案中，静脉内注射单一剂量的变性胶原蛋白的拮抗剂。

组合物是以一种与剂量配方相容的方式注射的，并且注射治疗学有效剂量。注射剂量和时间取决于待治疗的病人、病人的免疫系

统利用活性成分的能力以及所期望的治疗效果如何。需要注射的活性成分的精确的剂量取决实践者的判断并且每个人都有所不同。但是，本文中说明了全身应用的合适的剂量范围，并且此剂量范围取决于注射途径。合适的注射策略也是不同的，但以首次注射间隔一或数小时后再次注射或其它给药方法为典型。另外，持续静脉内灌输足以维持血液中的浓度范围，特别用于体内治疗。

正如本实施例所显示的，在开始接触拮抗剂 7 天后血管发生受到抑制并且肿瘤退化。附加的或延长的暴露于拮抗剂的时间优选 7 天到 6 周，最好是 14 到 28 天。

治疗性组合物

本发明设想治疗性组合物可用于实施本文所描述的治疗方法。本发明的治疗性组合物包含与一个生理学耐受的载体一起的变性或蛋白水解的胶原蛋白的拮抗剂，正如本文所描述的拮抗剂溶于或分散于其中作为一种活性成分。在一个优选的实施方案中，当为了治疗的目的将变性胶原蛋白的拮抗剂组合物被注射入哺乳动物或患病的人体内时，它是没有免疫原性的。

如同早本文中所用的，“药物学上认可的”、“生理学上耐受的”术语及其变化的语法形式，当它们是指组合物、载体、稀释液和试剂时，可以互换使用并且表明此物质可被注射给哺乳动物。

含有溶于或分散于其中的活性成分的药物学组合物的制备是本领域熟练技术人员众所周知的，并且不能根据配方而受到限制。典型的是这些组合物被制备为可注射的液体溶液或悬液的形式，但是也可以制备适于溶液或悬液的使用前的固体形式的制备物。制备物也可被乳化。

活性成分可以适于本文所描述的治疗方法的剂量与药物学上认可的并且与活性成分相容的赋形剂混合。合适的赋形剂有例如水、盐溶液、右旋葡萄糖、甘油、乙醇以及类似物及其组合形式。此外，

如果需要的话，组合物可以含有少量的辅助物质如加湿剂或乳化剂、pH 缓冲剂以及类似的能够增加活性成分有效性的物质。

本发明的治疗性组合物可包括药物学上认可的盐成分。药物学上认可的盐成分包括由无机酸组成的加酸盐（和多肽的自由氨基基团组成），例如，盐酸或磷酸，或如醋酸、酒石酸、苦杏仁酸以及类似的有机酸。和自由的羧基基团组成的盐也可以衍生自无机盐基例如钠、钾、铵、钙或氧化铁，和如异丙基胺、三甲胺、2-巯基乙醇、组胺、普鲁卡因以及类似的有机盐基。特别优选的盐是 TFA 和 HCL。

生理学耐受的载体是本领域众所周知的。液相载体的例子如无菌的水溶液除了活性成分和水以外不含任何物质，或者在生理 pH 值、生理盐溶液或二者时含有一种缓冲剂如磷酸钠，例如磷酸缓冲的盐溶液。更进一步，液相载体可含有一种以上缓冲盐，和例如氯化钠和氯化钾的盐以及右旋葡萄糖、聚乙二醇和其它溶质。

液体组合物也可以含有除了水以外的液相溶剂。这些另外的液相溶剂的例子有甘油、植物油如棉籽油和水油乳剂。

含有本发明血管发生抑制剂量的变性胶原蛋白拮抗剂的治疗性组合物，典型地配制成拮抗剂的重量百分比至少占总治疗性组合物重量的 0.1% 以上。重量百分比是抑制剂重量与组合物总重量的百分比。因此，例如 0.1 重量百分比即每 100 克总组合物中有 0.1 克抑制剂。

抗体可与细胞毒素、细胞毒性试剂构成结合物以运送到正经历血管发生的肿瘤组织或其它组织中。可以与溶细胞素或外毒素形成这样的结合物，例如白喉毒素 A，或假单胞菌外毒素及其片段。细胞毒性试剂也可以是用放射性同位素标记的以将毒性剂量的放射活性运送给生血管组织。

也可以应用本发明的拮抗剂将酶运送到靶组织，其中此酶能够将前药物转变成为药物的活性形式。即抗体引导酶激活的前药物治

疗 (ADEPT) (见例如 Syrigos, K.N.(1999)抗肿瘤研究, 19: 605-13)。简言之, 本发明的拮抗剂与能够将非毒性或无活性的前药物转变成成为毒性或活性的药物的酶如内酰胺酶、蛋白酶或酯酶结合。因为本发明的拮抗剂定位至血管发生的位点, 并且特别是定位至肿瘤或转移瘤位点, 所以毒性药物可以定向作用于靶组织。

检测方法

本发明的拮抗剂也适用于检测组织中的血管发生。

例如, 当拮抗剂为抗体时, 拮抗剂可被用于免疫组化技术体外对组织染色。例如在受体结合技术, 分子生物学中的方法, 106, M.Keen 编, Humana 出版社, 1999; Brooks 等 (1998) 细胞, 92: 391-400; Brooks 等 (1996) 细胞, 85: 683-693 和 Brooks 等 (1993) 细胞生物学期刊, 122: 1351-1359 中描述了免疫学技术如免疫染色和 ELISA。

本发明的拮抗剂, 一旦与靶组织结合就能通过直接或间接方法检测出来。当拮抗剂含有一个可检测到的标记如荧光染料、放射性标记、顺磁性重金属或诊断染料时可通过直接方法检测到。

另外, 也可以通过第二次交互作用而检测。例如, 一种识别拮抗剂的带有可检测标记的抗体被用于使拮抗剂的位置显现出来。例如, 如果拮抗剂是小鼠来源的单克隆抗体时, 可以使用合适标记的山羊抗小鼠的抗体。例如, 实施例描述了过氧化物酶标记的山羊抗小鼠抗体的应用。本领域熟练技术人员能够确定各种拮抗剂的合适二抗。

对于体内检测, 优选应用一种带有可检测标记的拮抗剂。标记的拮抗剂通过静脉内、肌肉内等途径被注射到患者体内, 适于在病人体内检测的标记是特别优选的。例如, 顺磁性标记可以通过磁共振成像而检测出来。放射性标记的拮抗剂也可以被检测出来。

实施例

实施例 1

HUI77 单克隆抗体

本实施例描述了一种变性胶原蛋白特异性单克隆抗体 HUI77 的生产。

HUI77 单克隆抗体是通过一种名为减法免疫的免疫学技术而生产和分离出来的。

减法免疫技术使得人们能够实验操纵小鼠的免疫系统以选择性增强在一个普遍高抗原性混合物内针对稀有或低丰度表位的免疫应答。简言之，BALB/c 雌鼠腹腔内注射天然的三螺旋形式的 I 型或 IV 型胶原蛋白。注射三螺旋形式胶原蛋白 24 和 48 小时以后，给小鼠注射耐受试剂环磷酰胺以杀死产生针对天然三螺旋形式 I 型和 IV 型胶原蛋白普通优势表位的抗体的活化的 B 细胞。注射耐受试剂以后，给小鼠注射热变性的 I 型或 IV 型胶原蛋白以刺激针对热变性所暴露出来的表位发生免疫应答。胶原蛋白是煮沸 15 分钟而变性的。间隔 3 周注射热变性的 I 型和 IV 型胶原蛋白，共注射 4 至 5 次。检测每只小鼠血清与天然的三螺旋形式和变性的胶原蛋白的免疫反应性。与三螺旋形式胶原蛋白相比，对变性的胶原蛋白显示最高滴度反应性的小鼠被用于生产杂交瘤。所选择的小鼠的脾细胞使用标准技术与骨髓瘤细胞融合。检测每个杂交瘤克隆产生的抗体是针对三螺旋形式 I 型和 IV 型胶原蛋白还是针对变性的 I 型和 IV 型胶原蛋白。与天然三螺旋形式 I 型和 IV 型胶原蛋白相比，对变性的 I 型和 IV 型胶原蛋白显示出高反应性的抗体生成杂交瘤克隆被选择出来。通过标准技术纯化单克隆抗体。

如图 1 所示，HUI77 单克隆抗体特异性识别变性的 I 型和 IV 型胶原蛋白，但与天然的三螺旋形式的 I 型和 IV 型胶原蛋白的结合亲和力和力显著下降。尤其特别的是，通过 ELISA 方法检测出 HUI77 单克隆抗体与变性的 I 型胶原蛋白结合亲和力明显要比其与天然的 I 型胶

原蛋白的结合亲和力高 10 倍以上。此外，HUI77 单克隆抗体基本上不与其它基质成分如层粘连蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白或纤维蛋白原结合，因此表明其特异性识别 I 型和 IV 型胶原蛋白的隐蔽表位。

HUI77 单克隆抗体对其它变性的胶原蛋白也是特异的，但与天然形式的这些胶原蛋白的结合亲和力显著下降。如图 2 所示，通过 ELISA 方法检测出 HUI77 单克隆抗体与变性的 III、IV、V 型胶原蛋白结合的亲和力是其与天然形式的这些胶原蛋白结合亲和力的大约 7 倍，大约 8 倍和大约 10 倍以上。

实施例 2

实体瘤的检测

本实施例显示本发明的拮抗剂可被用于检测肿瘤组织中变性的胶原蛋白。实施例 1 所描述的 HUI77 单克隆抗体被用于对正常组织和肿瘤组织进行间接免疫染色。如图 3 所示，使用 HUI77 单克隆抗体对人黑素瘤肿瘤活检组织以及生长在人全厚皮肤上的 M21 黑素瘤进行间接免疫荧光分析表明在体内变性形式的胶原蛋白的生成与人黑素瘤相关。更重要的是，在无肿瘤的正常组织中几乎未检测到变性的胶原蛋白，表明变性的胶原蛋白可能是实体瘤的特异性标志。

实施例 3

检测人肿瘤中的血管发生

本实施例表明本发明的拮抗剂可被用于检测人肿瘤中的血管发生。

如图 4 所示，对人黑素瘤肿瘤活检组织的间接免疫荧光分析显示了在人肿瘤相关的血管周围的变性形式的胶原蛋白在体内的产生和定位。更重要的是，在无肿瘤的正常血管周围用 HUI77 单克隆抗体几乎未检测到变性的胶原蛋白，这表明变性的胶原蛋白可能是生血管肿瘤相关的血管的特异性标志。

实施例 4

抑制内皮细胞粘附和迁移的拮抗剂

本实施例表明本发明的某些拮抗剂能够抑制人内皮细胞粘附至变性的胶原蛋白上。

与对照抗体相比，HUI77 单克隆抗体显示出能够抑制大约 40% 的人内皮细胞粘附至 I 型胶原蛋白上的能力。这些发现，在图 5 中进行了概括，表明 HUI77 单克隆抗体与 I 型胶原蛋白的一个至少部分涉及内皮细胞粘附至变性 I 型胶原蛋白的隐蔽表位结合。由于内皮细胞粘附过程被认为在肿瘤生长以及血管发生中起重要作用，这种功能阻断抗体可能影响到体内肿瘤生长和血管发生。

如图 6 所示，与未经处理或对照抗体相比，HUI77 单克隆抗体显示出能够抑制大约 80% 的人内皮细胞迁移至 I 型胶原蛋白的能力。这些发现表明与 I 型胶原蛋白隐蔽表位结合的 HUI77 单克隆抗体在内皮细胞迁移至变性 I 型胶原蛋白过程中起重要作用，并且在恶性肿瘤细胞和生血管血管中均检测到了变性的胶原蛋白，这种功能阻断抗体可能对体内血管发生和肿瘤生长具有显著影响。

实施例 6

利用 HUI77 单克隆抗体抑制血管发生

本实施例表明本发明的拮抗剂能够在鸡胚 CAM 分析中有效抑制血管发生。

而且，与对照相比，系统给予 HUI77 单克隆抗体抑制由 β FGF 诱导的大约 90% 的血管发生（图 7 和 8）。通过在鸡胚 CAM 分析中对血管枝点进行计数从而测量生血管指数（图 8）。更重要的是，在分析期间，没有发现对鸡胚具有毒副作用。而且此单克隆抗体对正常的人静息血管几乎没有什么影响。有可能应用较低浓度的单克隆抗体也会导致相似的效果。这些发现表明 HUI77 单克隆抗体是一种强效的抗血管发生物质，可能具有显著的临床应用价值。

实施例 7

HUI77 单克隆抗体抑制肿瘤生长

本实施例表明本发明的拮抗剂能够在体内有效抑制黑素瘤的生长。

与对照相比，系统给予 HUI77 单克隆抗体抑制大约 53% 的黑素瘤的生长，如图 9 和 10 所示。更重要的是，在分析期间，没有发现对鸡胚具有毒副作用。而且此单克隆抗体对周围组织几乎没有什么影响。有可能应用较低浓度的单克隆抗体也会导致相似的效果。这些发现表明 HUI77 单克隆抗体是一种强效的抗肿瘤物质，可能具有显著的临床应用价值。

实施例 8

HUIV26 单克隆抗体

HUIV26 单克隆抗体也是通过实施例 1 中所述名为减法免疫 (S.I.) 的免疫学技术而生产的。如图 11 所示，HUIV26 单克隆抗体特异性识别变性的 IV 型胶原蛋白但是并不与天然三螺旋形式的 I 型 IV 型胶原蛋白结合。此外，HUIV26 单克隆抗体不与其它基质成分如层粘连蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白或纤维蛋白原结合，因此表明其特异性识别 IV 型胶原蛋白的隐蔽表位。

如图 11B 所示，HUIV26 单克隆抗体特异性识别的 IV 型变性胶原蛋白的隐蔽表位在暴露至 HUVEC 条件培养基后显示出来。24 小时后检测发现与 HUIV26 单克隆抗体的反应性增强。这表明这些内皮细胞分泌产生了一种能够暴露由 HUIV26 单克隆抗体识别的 IV 型胶原蛋白的隐蔽表位的蛋白酶。由 HUVEC 所产生的能够暴露 IV 型胶原蛋白的隐蔽表位的蛋白酶受到螯合剂 EDTA 的抑制 (图 11B)。这表明一种金属蛋白酶负责起始对 IV 型胶原蛋白中隐蔽表位的暴露。如图 12 所示，金属蛋白酶，MMP-2，与和 HUIV26 单克隆抗体发生反应的 IV 型胶原蛋白隐蔽表位共同定位至 CAM 组织的生血管位点。丝氨酸蛋白酶抑制剂，抑蛋白酶肽，与 HUVEC 条件培养基

孵育 1 小时后对暴露 IV 型胶原蛋白的隐蔽表位没有什么效果（图 11B）。在第 6 小时和第 24 小时，抑蛋白酶肽分别阻断了在没有蛋白酶抑制剂时所观察到的反应性的 40%和 70%。这表明在稍微晚一点的时间点上，丝氨酸蛋白酶有助于暴露 IV 型胶原蛋白的隐蔽表位。

实施例 9

用 HUIV26 检测血管发生和肿瘤

本实施例表明一种拮抗剂可被用于检测组织内的血管发生过程。

如图 12 所示，对鸡胚 CAM 组织的间接免疫荧光分析显示了与 β FGF 或肿瘤诱导的生血管血管相关的变性的 IV 型胶原蛋白在体内的产生和定位。更重要的是，在无 β FGF 或肿瘤的正常组织中未检测到变性的 IV 型胶原蛋白，这表明变性的 IV 型胶原蛋白在体内是生血管血管的特异性标志。

如图 13 所示，对人黑素瘤肿瘤活检组织的间接免疫荧光分析显示了在人肿瘤相关的血管周围的变性形式的胶原蛋白在体内的产生和定位。更重要的是，在无肿瘤的正常血管周围几乎未检测到变性的胶原蛋白，这表明变性的胶原蛋白可能是生血管肿瘤相关的血管的特异性标志。

实施例 10

HUIV26 单克隆抗体抑制细胞粘附和迁移

本实施例表明单克隆抗体拮抗剂能够抑制内皮细胞粘附和迁移。

与对照抗体相比（图 14），HUIV26 单克隆抗体显示出能够抑制大约 70%的人内皮细胞粘附至变性的 IV 型胶原蛋白上的能力。这些发现表明 HUIV26 单克隆抗体与 IV 型胶原蛋白的一个至少部分涉及内皮细胞粘附至变性 IV 型胶原蛋白的隐蔽表位结合。考虑到 IV 型胶原蛋白的组织分布和内皮细胞粘附过程被认为在肿瘤生长以及血

管发生中起重要作用这个事实，这种功能阻断抗体可能显著影响到体内肿瘤生长和血管发生。

与未经处理或对照抗体相比，HUIV26 单克隆抗体显示出能够抑制大约 70%的人内皮细胞迁移至变性的 IV 型胶原蛋白的能力。这些发现表明 HUIV26 单克隆抗体与 I 型胶原蛋白隐蔽表位的结合在内皮细胞迁移至变性 IV 型胶原蛋白过程中起重要作用。考虑到细胞迁移在肿瘤转移和血管发生中起重要作用，并且在生血管血管中检测到了变性的胶原蛋白，这种功能阻断抗体可能对体内血管发生、肿瘤生长和转移具有显著影响。

实施例 11

系统给予 HUIV26 抑制血管发生

如图 16 和 17 所示，与对照相比，系统给予 HUIV26 单克隆抗体抑制由 β FGF 诱导的大约 90%的血管发生。更重要的是，在分析期间，没有发现对鸡胚具有毒副作用。而且此单克隆抗体对正常的静息血管几乎没有什么影响。有可能应用较低浓度的单克隆抗体也会导致相似的效果。这些发现表明 HUIV26 单克隆抗体是一种强效的抗血管发生物质，可能具有显著的临床应用价值。

实施例 12

抑制肿瘤生长

与对照相比，系统给予 HUIV26 单克隆抗体抑制大约 80%的黑素瘤的生长（图 18）。更重要的是，在分析期间，没有发现对鸡胚具有毒副作用。而且此单克隆抗体对周围组织几乎没有什么影响。由于有可能应用较低浓度的单克隆抗体也会导致相似的效果，因此正在进行另外的实验以确定 IC₅₀ 值。这些发现表明 HUIV26 单克隆抗体是一种强效的抗肿瘤物质，可能具有显著的临床应用价值。

系统给予 HUIV26 单克隆抗体在 SCID 小鼠中抑制黑素瘤生长。治疗 24 小时之后，接受 HUIV26 单克隆抗体治疗的小鼠的平均肿瘤

体积要比用对照抗体或未经治疗的小鼠的肿瘤体积小 5%。

实施例 13

HUIV26 的表位特异性

本实施例表明 HUIV26 单克隆抗体不与变性的胶原蛋白内的 RGD 序列结合。

如图 22 所示, HUIV26 单克隆抗体不能和含有变性的 IV 型胶原蛋白肽的固定的 RGD 序列 (精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸) 反应 (表 1)。研究发现 6 中不同的含有胶原蛋白肽的可溶性 RGD 都不能阻断 HUIV26 单克隆抗体对固定的变性的 IV 型胶原蛋白的识别 (图 22)。这些数据表明 HUIV26 单克隆抗体并不识别在 IV 型胶原蛋白中发现的 RGD 序列。

表 1: 人 IV 型胶原蛋白的 RGD 功能区

<i>SEQ ID NO</i>	<i>氨基酸序列</i>	<i>在人 IV 型胶原蛋白中的位置</i>
1	C-PGSR <u>RGD</u> TGP-C	$\alpha 1$ (IV) 链 (594-602)
2	C-SGPR <u>GD</u> PGL-C	$\alpha 1$ (IV) 链 (914-922)
3	C-KGSR <u>GD</u> PGT-C	$\alpha 1$ (IV) 链 (965-973)
4	C-KGAR <u>GD</u> PGF-C	$\alpha 2$ (IV) 链 (359-367)
5	C-PGPR <u>GD</u> DAGV-C	$\alpha 2$ (IV) 链 (781-789)
6	C-PGDR <u>GD</u> PGD-C	$\alpha 2$ (IV) 链 (865-873)
7	C-SGDR <u>GD</u> DAGF-C	$\alpha 2$ (IV) 链 (886-894)
8	C-KGSR <u>GD</u> PGP-C	$\alpha 2$ (IV) 链 (967-975)
9	C-IGSR <u>GD</u> KGA-C	$\alpha 2$ (IV) 链 (1066-1074)
10	C-PGER <u>GD</u> PGE-C	$\alpha 2$ (IV) 链 (1245-1253)
11	C-PGFR <u>GD</u> DEGP-C	$\alpha 2$ (IV) 链 (1489-1497)

实施例 14

XL313 单克隆抗体

XL313 单克隆抗体是通过用合成肽免疫而生产的, 合成肽的序列来自人 I 型胶原蛋白。之所以选择此序列是因为其深埋在 I 型胶原

蛋白的三维结构内。所使用的合成肽的 11 个氨基酸残基序列如下：

SEQ ID NO 12: CysGlnGlyProArgGlyAspLysGlyGluCys

研究发现 KGE（赖氨酸-甘氨酸- 谷氨酸）对 XL313 单克隆抗体的识别非常重要。XL313 单克隆抗体特异性地与 SEQ ID NO1 的肽结合，但是与 KGE 序列已经被突变的肽（序列如下）的结合亲和力显著下降：

SEQ ID NO 13: CysGlnGlyProArgGlyAspAlaAlaAlaCys

XL313 单克隆抗体是与蛋白水解的/变性的 I 型胶原蛋白反应的高特异性抗体。更重要的是，XL313 不与天然三螺旋形式的 I 型胶原蛋白反应。如图 27 所示，XL313 单克隆抗体识别人 I 型胶原蛋白的隐蔽功能区，但不识别其它类似的肽。这些数据表明 XL313 单克隆抗体可能是一种非常有用的用于在血管发生和肿瘤生长中评价由人胶原蛋白肽 2 确定的隐蔽胶原蛋白功能区的作用的试剂。如图 28 所示，XL313 单克隆抗体特异性识别人 I 型胶原蛋白的在天然三螺旋形成过程中并不暴露出来的隐蔽功能区。而且，由于 XL313 单克隆抗体不与天然三螺旋形式的 IV 型胶原蛋白交叉反应，这种隐蔽区似乎是 I 型胶原蛋白特异性的。

实施例 15

XL313 单克隆抗体抑制细胞粘附和迁移

如图 23 所示，孵育 HUVECs5 小时后使得其粘附至天然的 I 型胶原蛋白形成了一个汇合的单层。与此相反，粘附至变性的胶原蛋白的 HUVECs 开始迁移并且形态上重新形成索状结构。这些数据表明深埋在人 I 型胶原蛋白三维结构中在天然三螺旋状态下不可估价的隐蔽区可能在内皮细胞成形和索形成中起重要作用。

实施例 16

变性的胶原蛋白抑制细胞编程性死亡

如图 24 所示，与天然的 I 型胶原蛋白或悬浮的内皮细胞相比，

人内皮细胞与蛋白水解的胶原蛋白的交互作用抑制了细胞编程性死亡。这些数据表明深埋在人 I 型胶原蛋白三维结构中在天然三螺旋状态下不可估价的隐蔽区可能在内皮细胞存活中起重要作用。

实施例 17

XL313 所识别的表位

如图 25 所示, 似乎人胶原蛋白隐蔽肽 2 支持内皮细胞存活和索形成, 而存在于人 I 型胶原蛋白中的相似的肽则无此效应。这些数据表明由肽 2 所确定的 I 型胶原蛋白隐蔽区可能在体内血管发生和肿瘤生长中起重要作用。

实施例 18

整合蛋白的作用

如图 26 所示, 整合蛋白 $\alpha v\beta 3$ 似乎在介导细胞与所检测的 I 型胶原蛋白的所有隐蔽肽区的相互作用中起重要作用。非常有趣的是, 肽 2 也依赖于 $\beta 1$ 整合蛋白的相互作用。这些数据表明肽 2 通过 2 种不同的整合蛋白支持细胞相互作用。

实施例 19

XL313 单克隆抗体抑制血管发生和肿瘤生长

如图 29 和 30 所示, 与对照相比, 系统给予 XL313 单克隆抗体抑制鸡胚 CAM 模型中大约 95% 的血管发生。这些数据表明由 XL313 单克隆抗体所确定的 I 型胶原蛋白隐蔽区在血管发生中起重要作用。

如图 31 所示, XL313 单克隆抗体可以在体内抑制 HT1080 成纤维肉瘤的生长。这些数据表明由 XL313 单克隆抗体所确定的隐蔽区在调控体内肿瘤生长中起重要作用。

实施例 20

胶原蛋白的水解对肿瘤生长非常重要

如图 32 所示, 在本实验中应用了 I 型胶原蛋白的 MMP 裂解位点引入突变的转基因小鼠, 因为这些小鼠裂解它们的 I 型胶原蛋白

的能力受到损害。更重要的是，与野生型对照小鼠相比，B16 黑素瘤细胞在 I 型胶原蛋白水解受到损害的小鼠体内几乎没有形成肿瘤的能力。这些数据表明 I 型胶原蛋白的水解在体内肿瘤生长中起重要作用。

如同用 B16 黑素瘤细胞所显示的结果，当注射入 I 型胶原蛋白水解能力也受到损害的 Col a1 B6 转基因小鼠体内时，路易斯肺癌细胞也几乎没有形成肿瘤的能力，与此同时路易斯肺癌细胞在对照 B6 小鼠体内形成了大的快速生长的肿瘤（图 33）。更重要的是，特异性针对于 I 型胶原蛋白隐蔽区的并且只有在蛋白水解后才暴露出来 XL313 单克隆抗体抑制了大约 80% 的在野生型 B6 小鼠中生长的路易斯肺癌。这些发现表明体外蛋白水解暴露 I 型胶原蛋白的隐蔽区可能在肿瘤生长中起重要作用。而且，这些数据表明 XL313 单克隆抗体是一种体内血管发生和肿瘤生长的特异性抑制剂。

所有下列引用在本发明说明中的著作全部引入本文做参考。

还应理解的是前述本发明的描述仅是为了举例说明和解释，而非本发明仅仅局限于本文中的具体实施方式。因此，本领域熟练技术人员可在本发明的精神内作出改变，本发明的范围应由权利要求书限定。

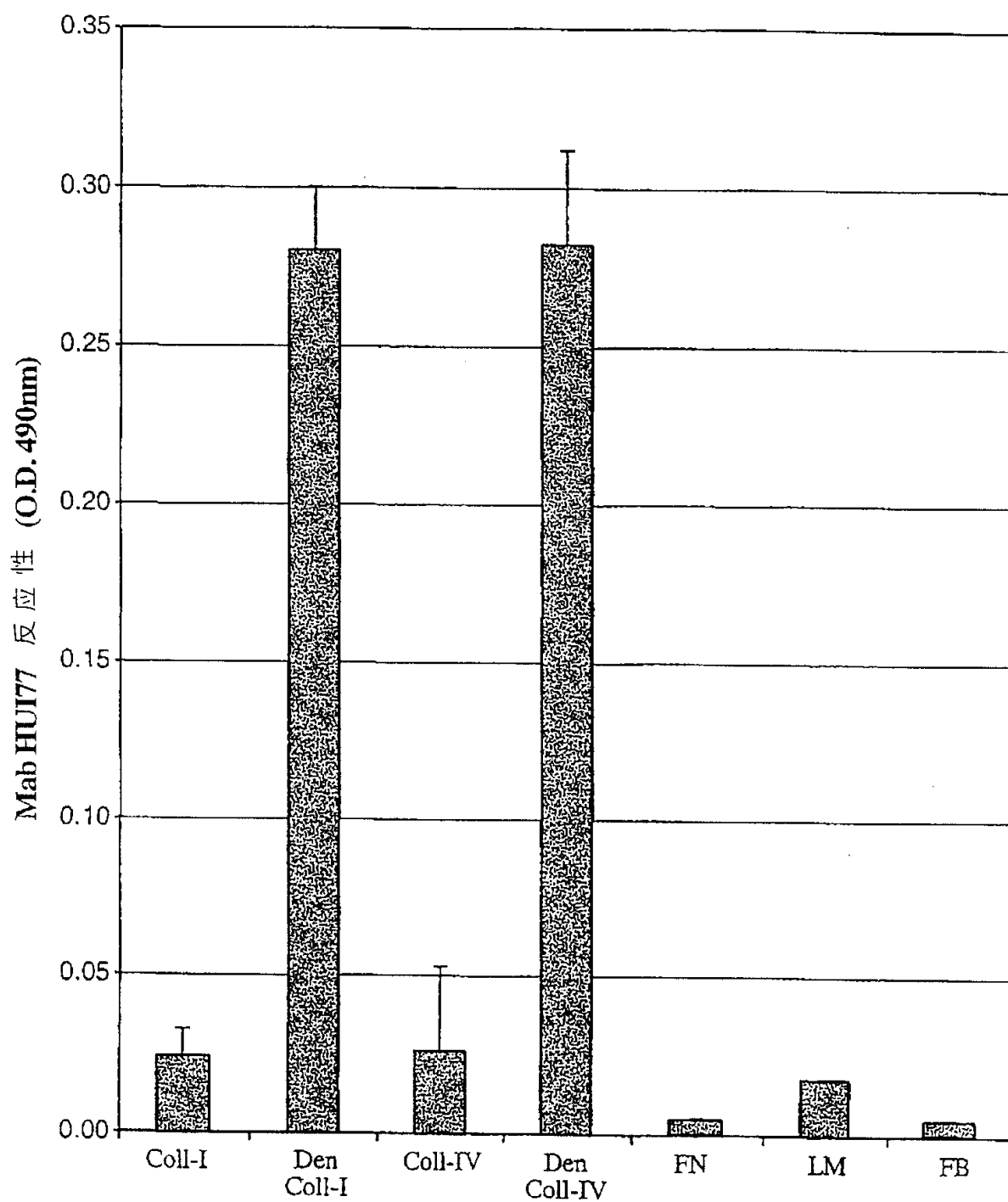


图1

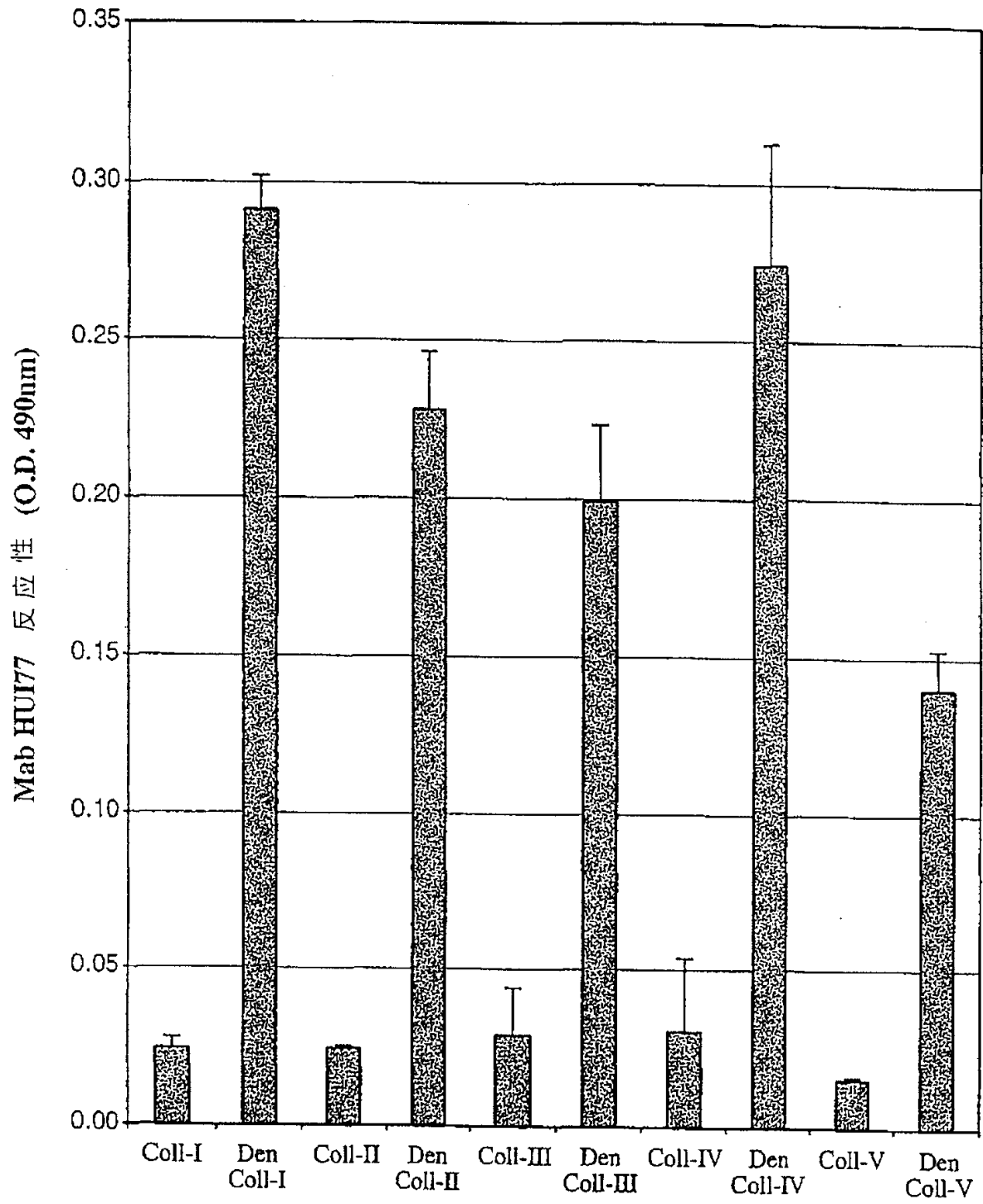


图2

人黑素瘤
(活组织检查)

人黑素瘤
(人/SCID鼠嵌合体)

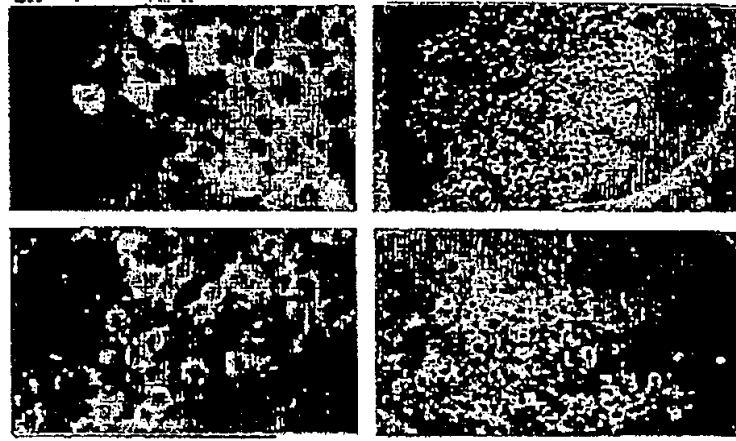


图3

人黑素瘤活组织检查

抗因子Ⅷ抗体
(多克隆抗体)

抗变性的胶原蛋白抗体
(HU177单克隆抗体)



图4

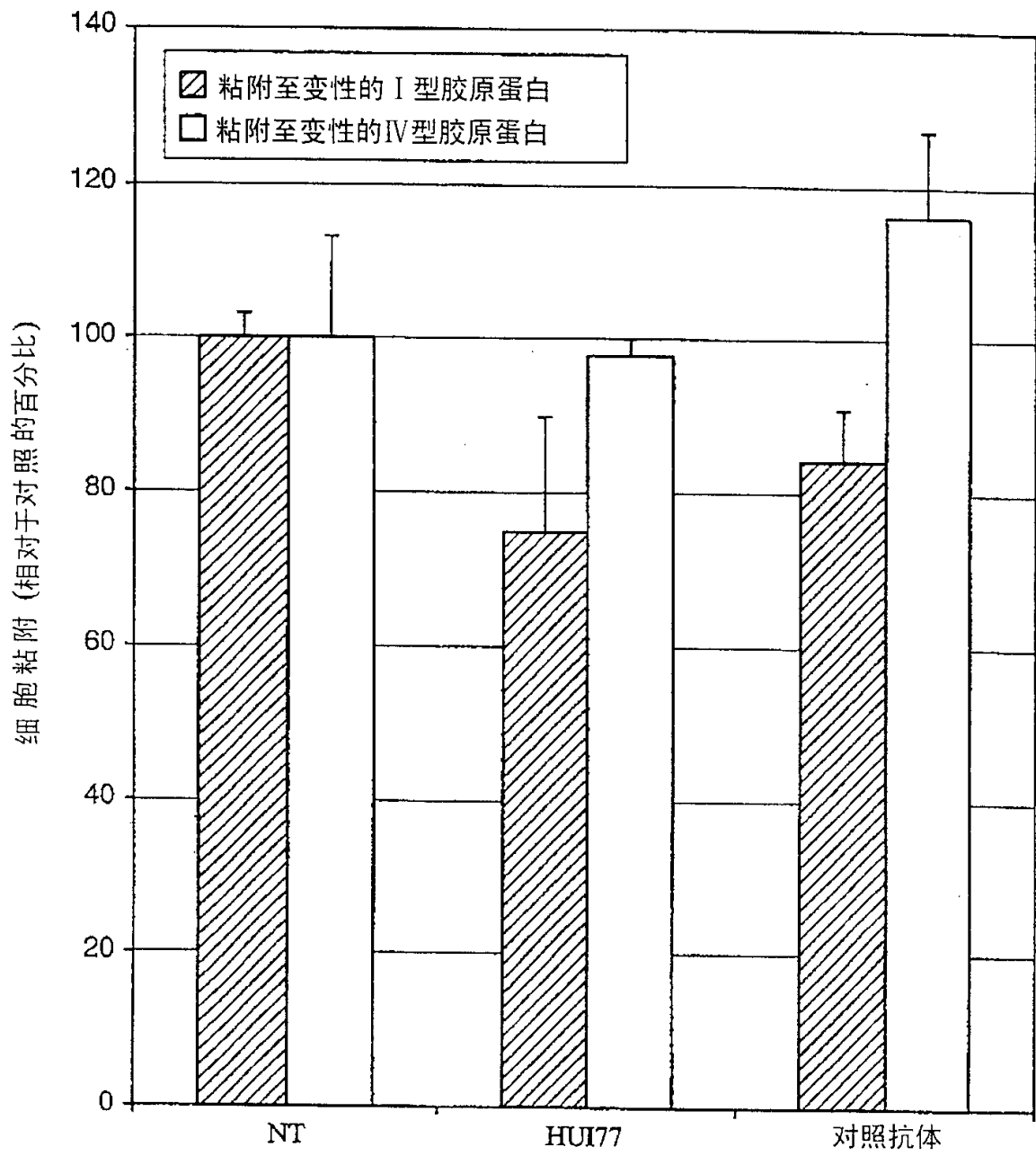


图5

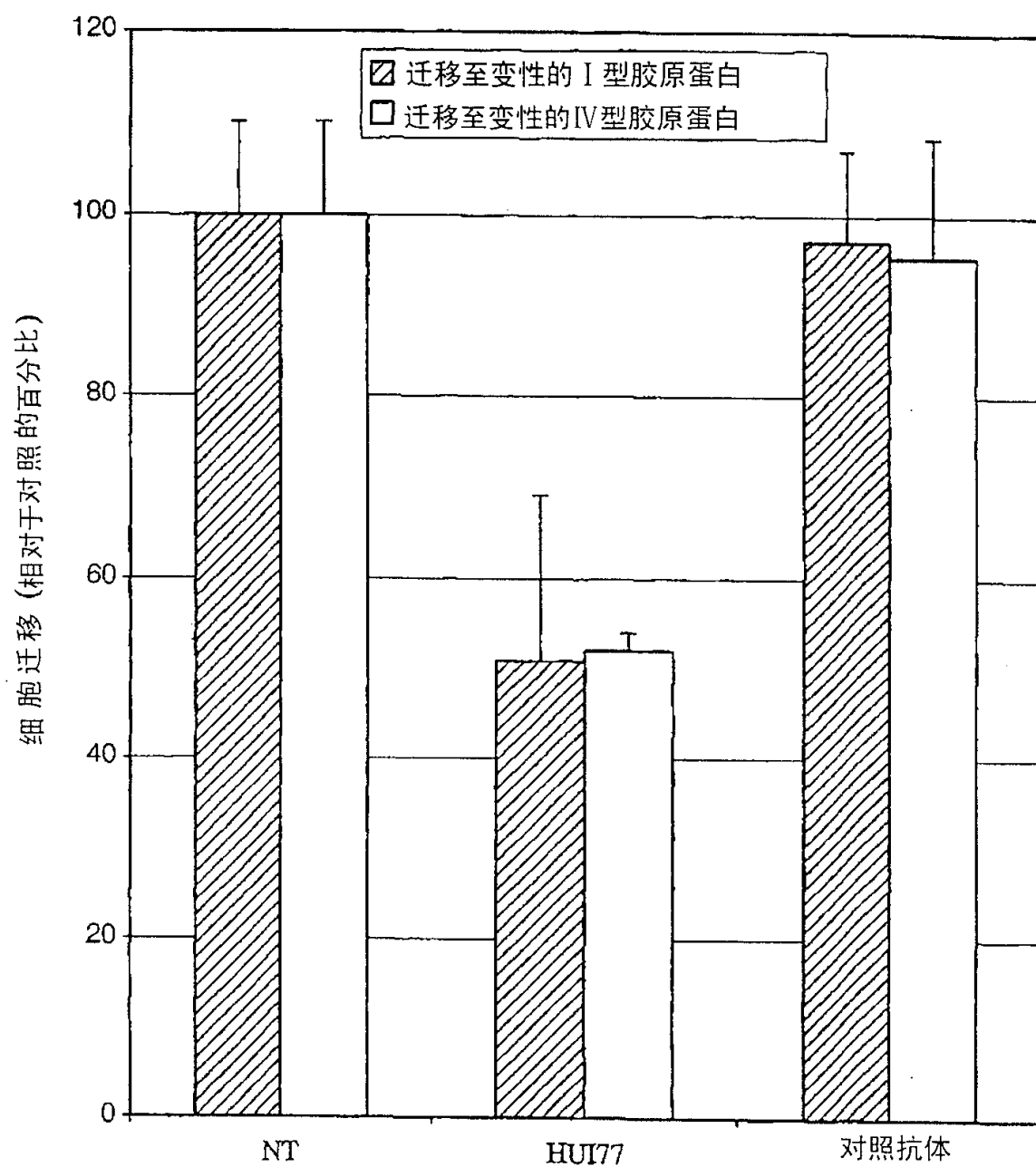
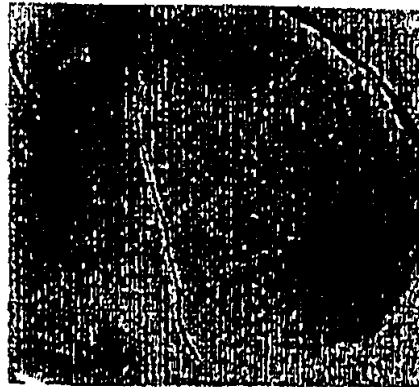


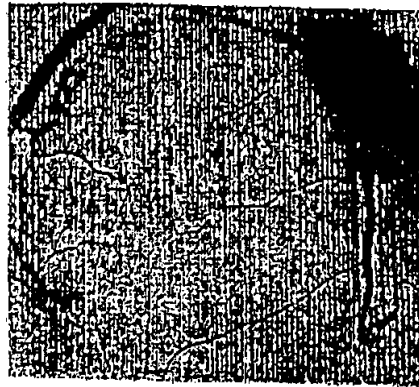
图6

鸡CAM血管生成分析

未处理



bFGF



bFGF + Mab HUI77

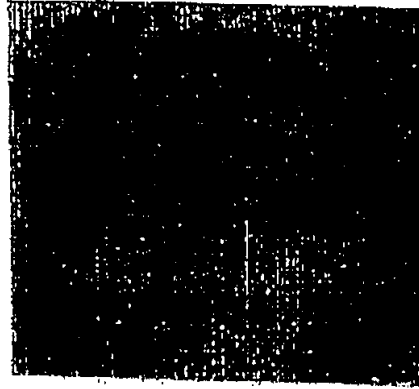


图7

CS-1 黑色素瘤肿瘤分析

对照



Mab HUI77



图9

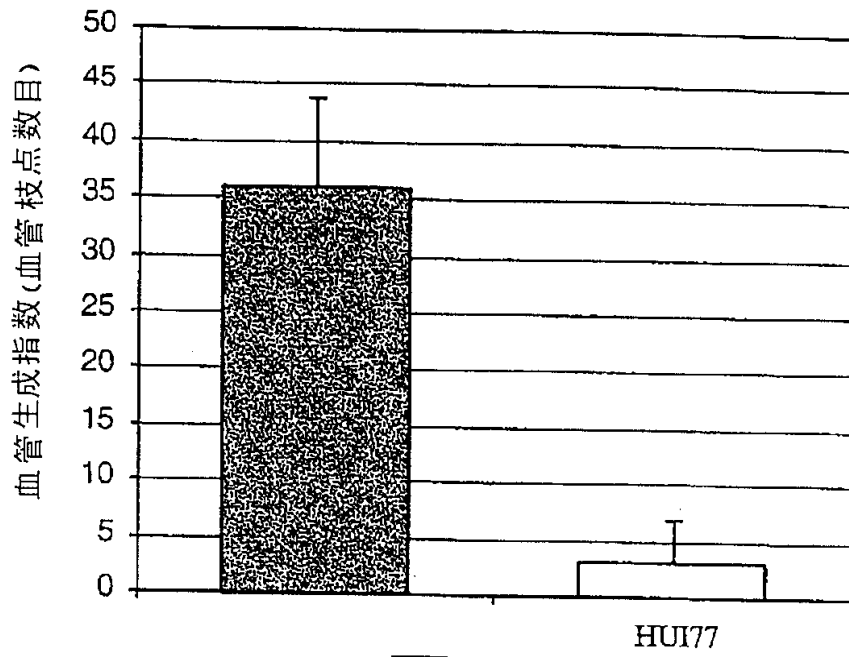


图8

CS-1黑素瘤肿瘤生长

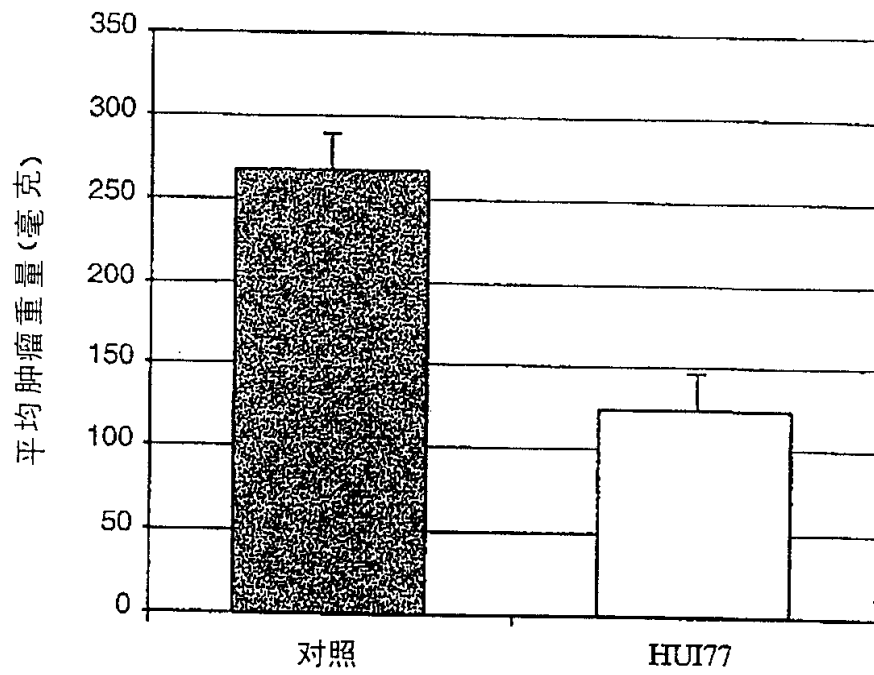
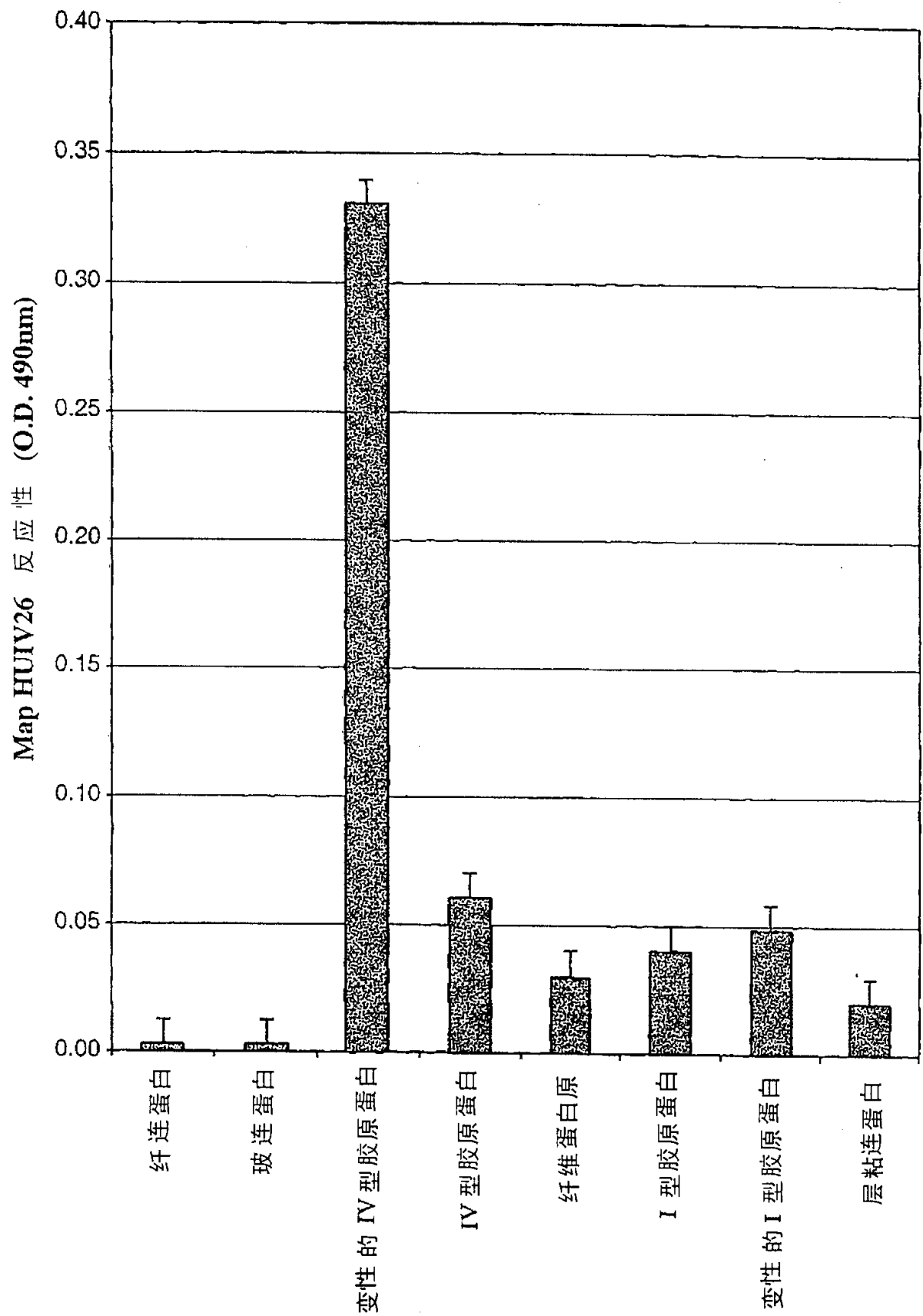


图10

图11A



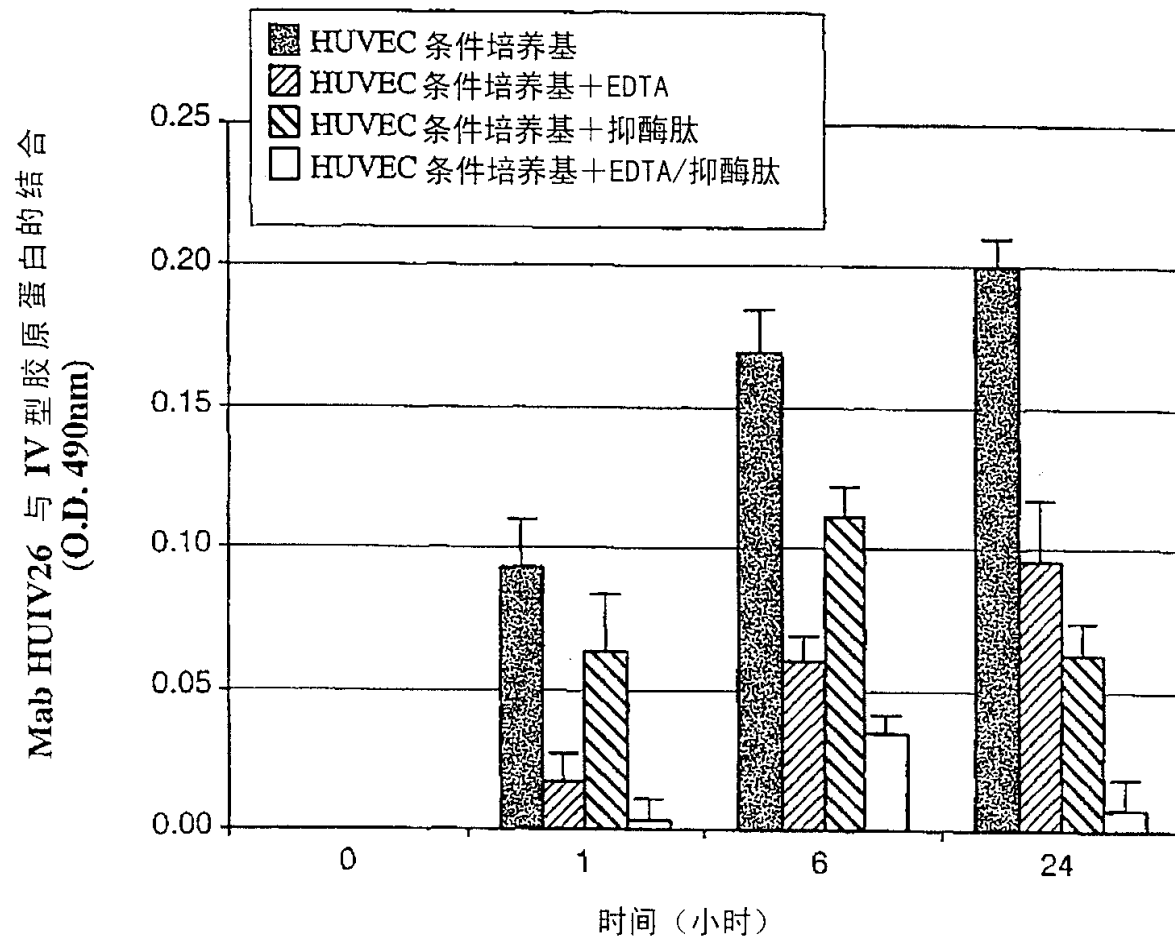


图 11B

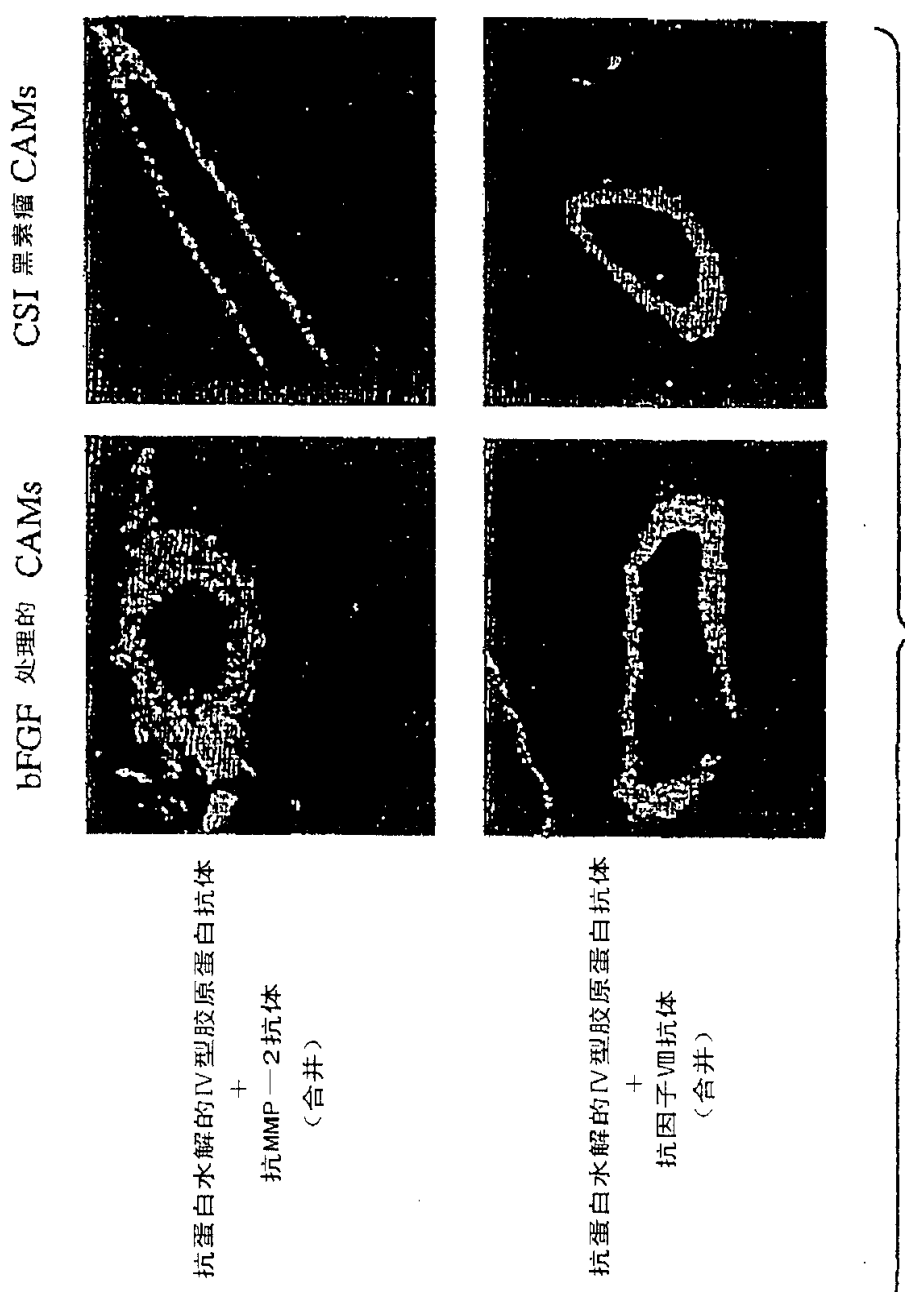
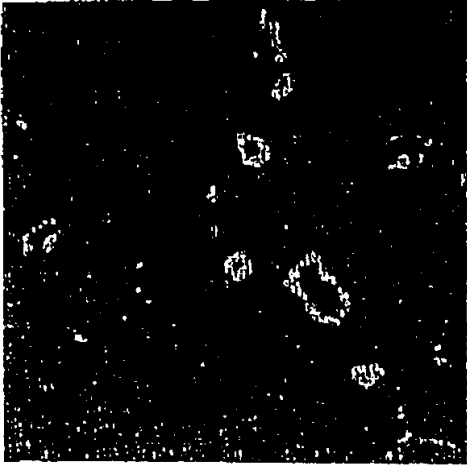


图12

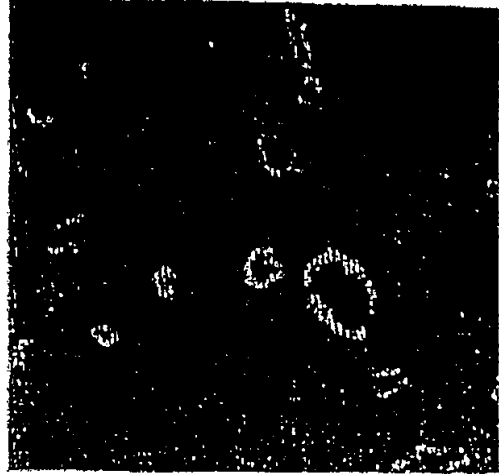
图13

人黑素瘤肿瘤活组织检查

抗因子Ⅷ抗体
(多克隆抗体)



抗变性的Ⅳ型胶原蛋白抗体
(Mab HU1V26)



对人黑素瘤活组织检查共染色
(抗因子Ⅷ抗体/抗变性的Ⅳ型胶原蛋白抗体)

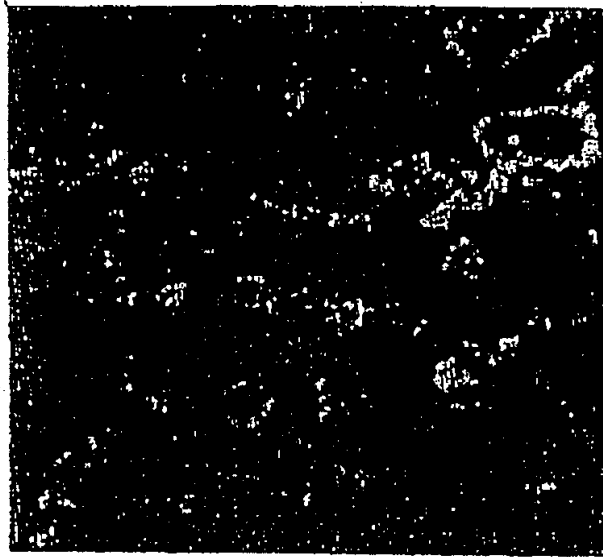


图14

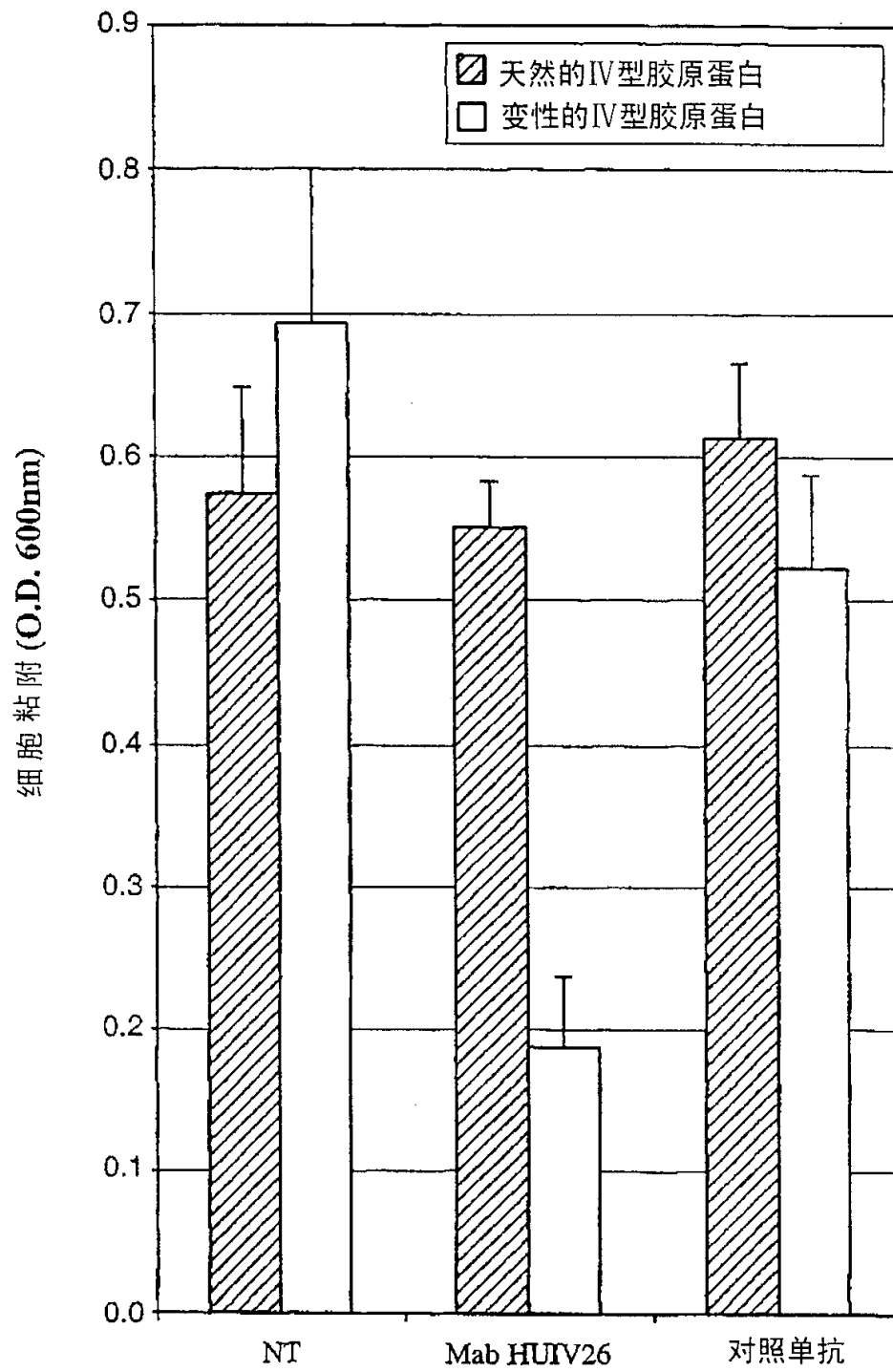
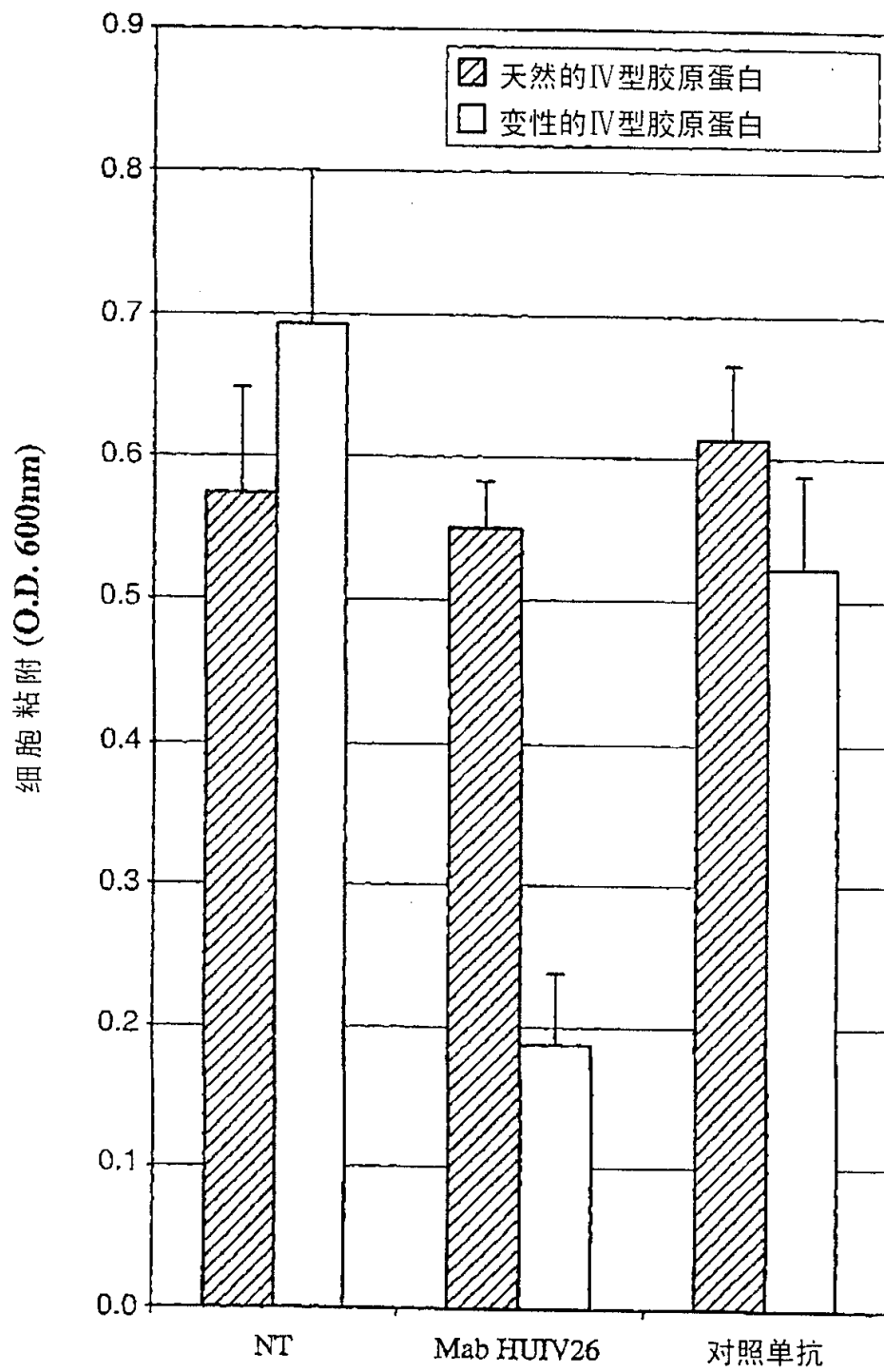
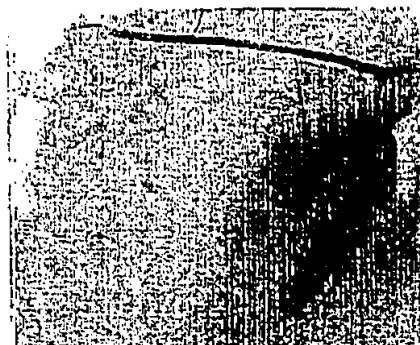


图15



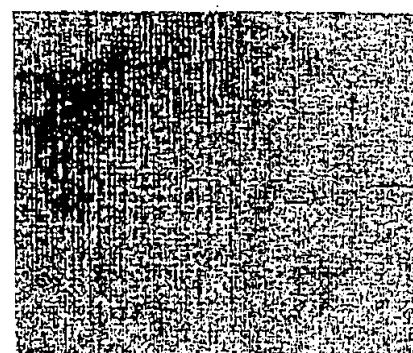
无bFGF



bFGF



bFGF
+
HUIV26



bFGF
+
对照

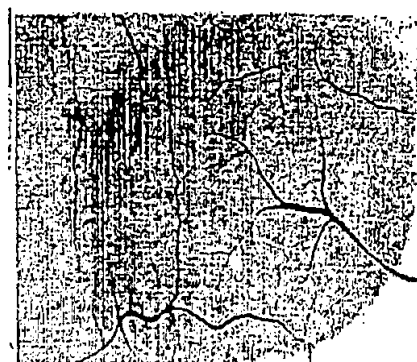


图16

血管生成分析

血管生成指数
(血管枝点数目)

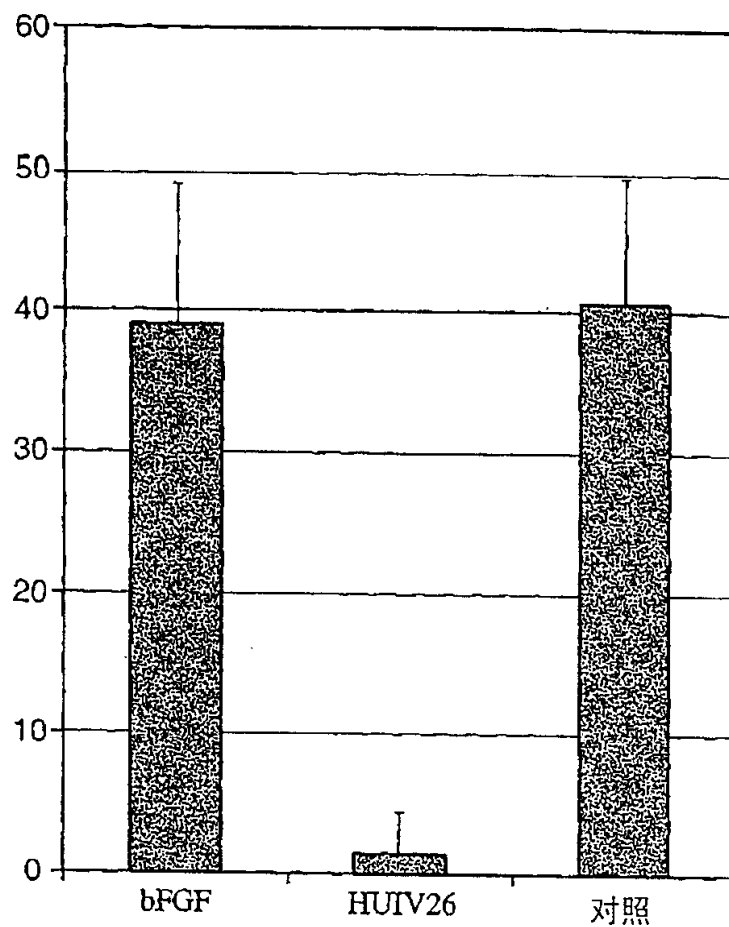


图17

平均肿瘤重量
(毫克)

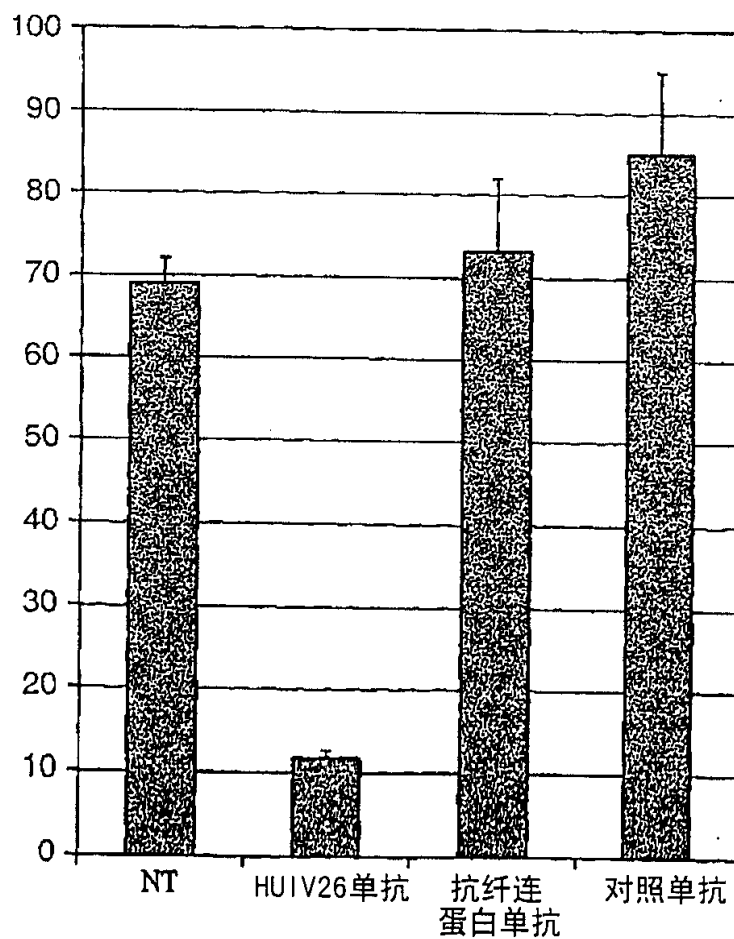


图20

CS-1 黑素瘤在鸡CAM中的生长

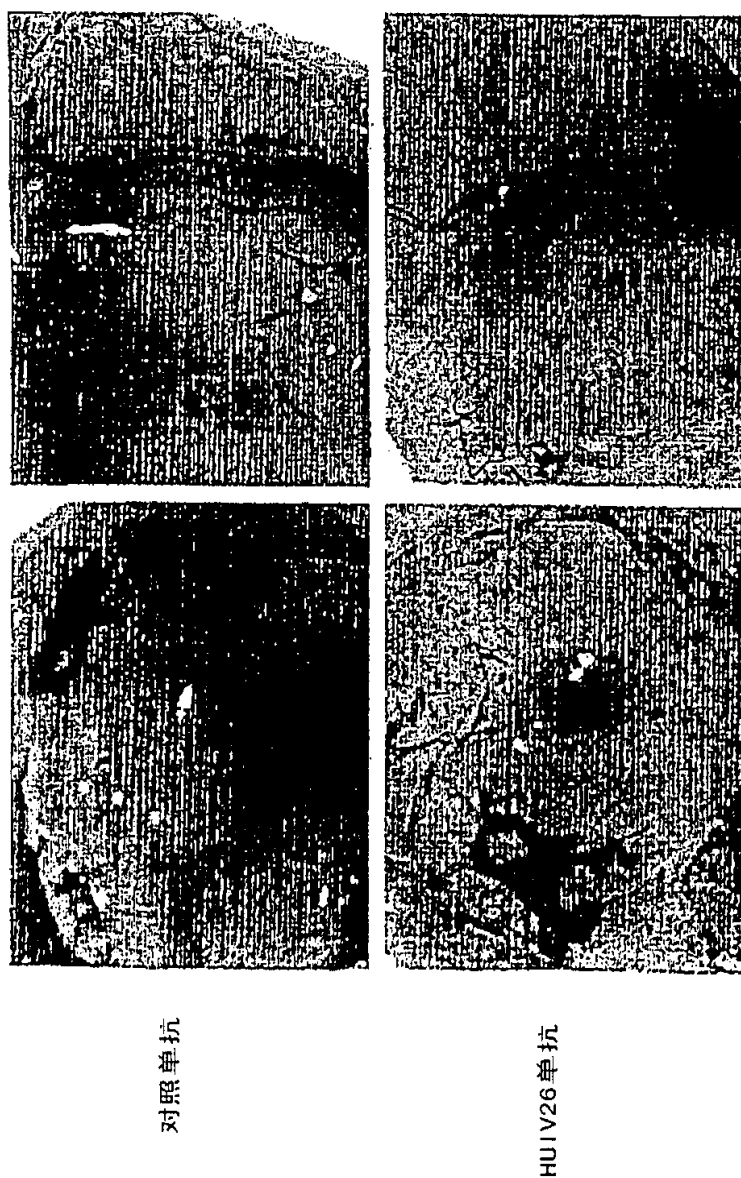


图18

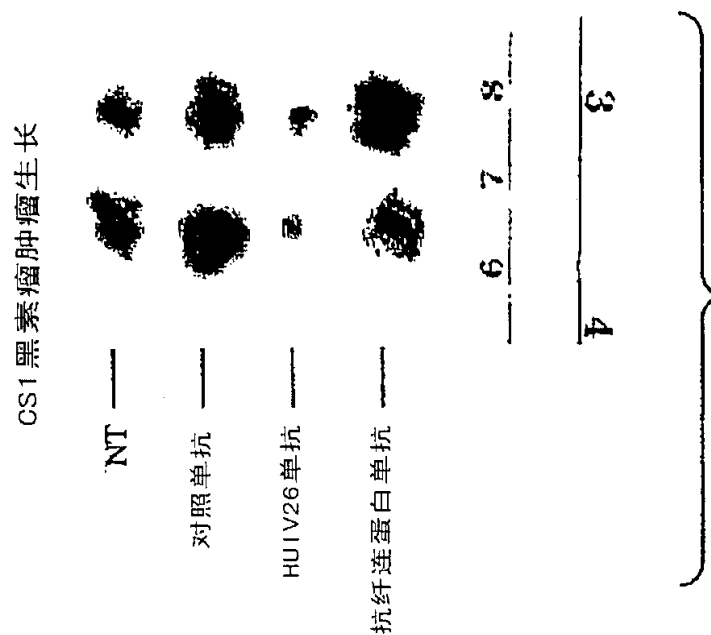


图19

图21

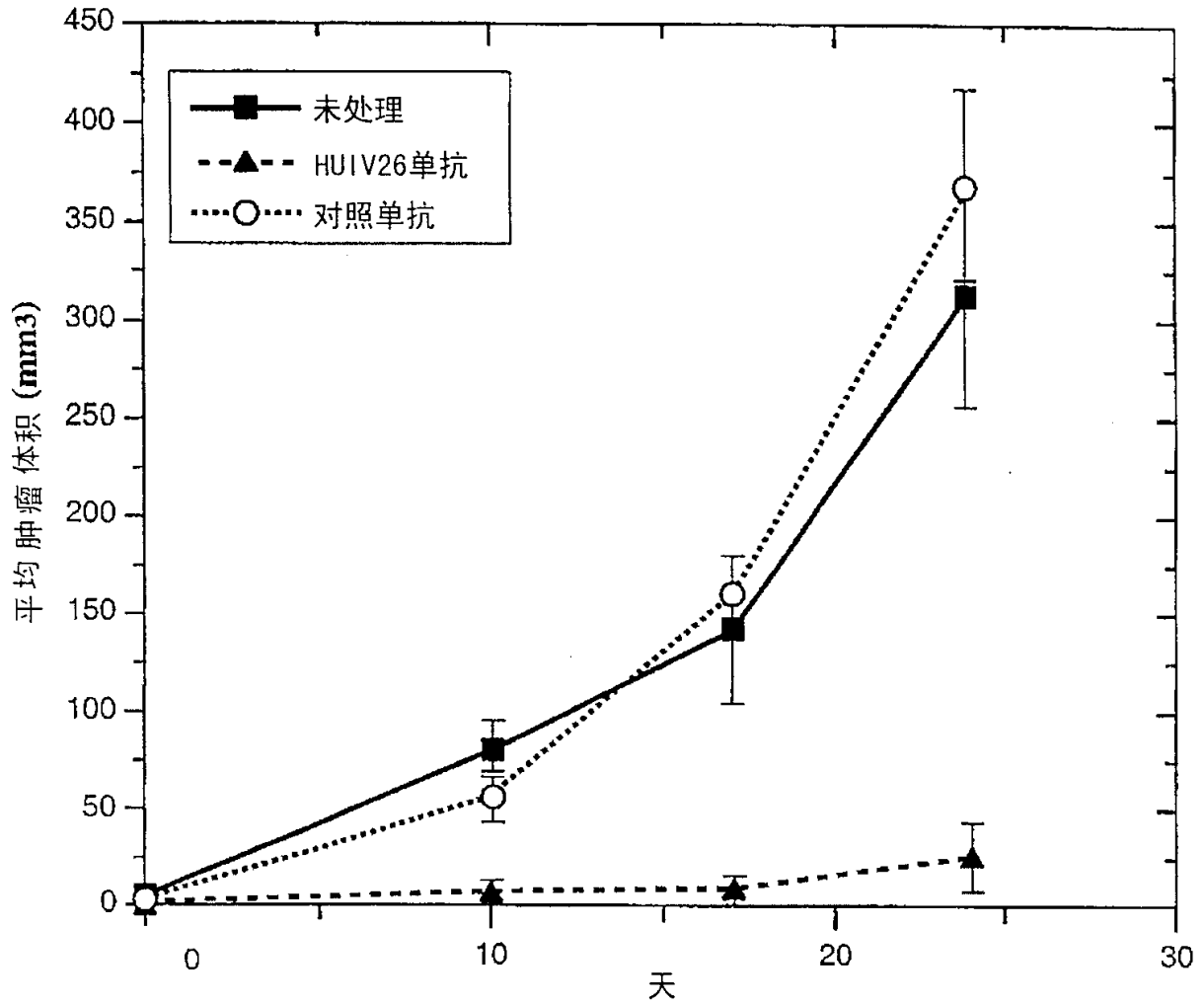
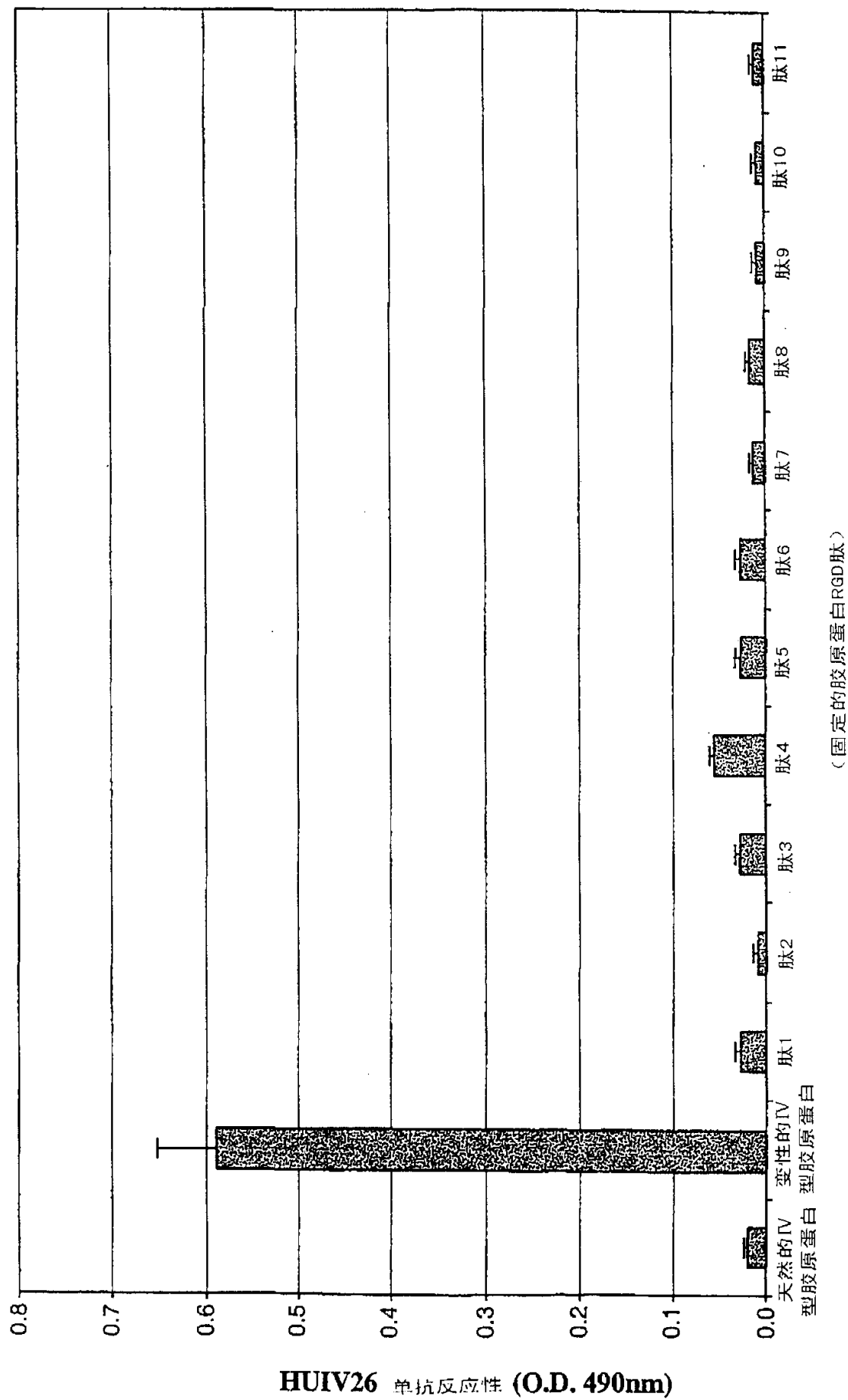
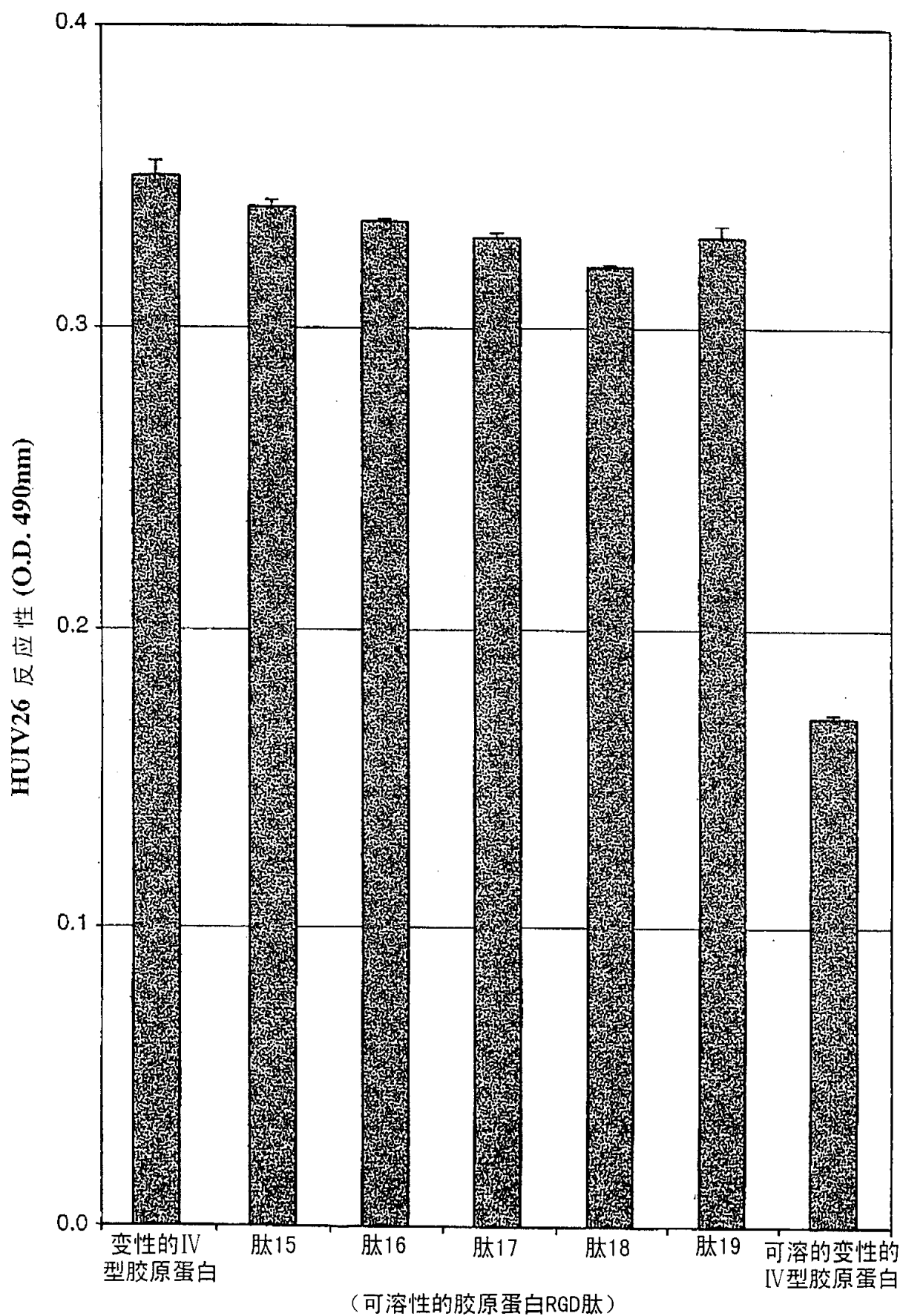


图 22A

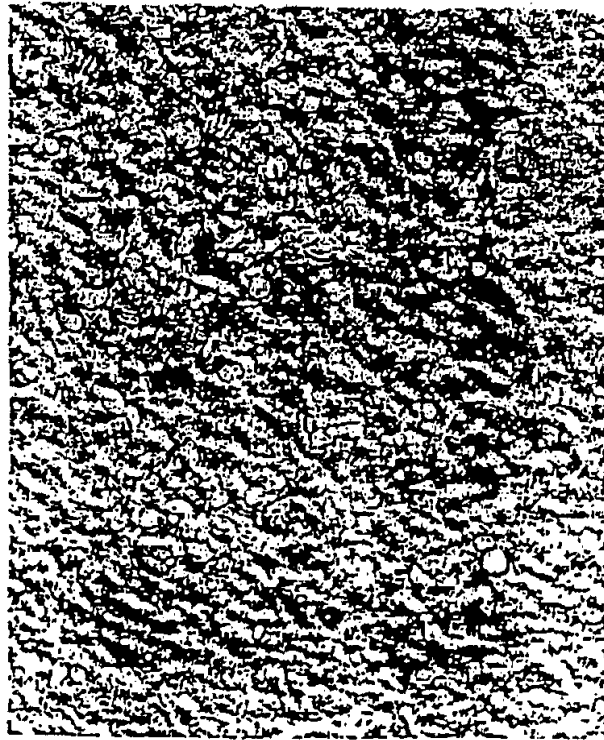


22B



HUVEC索形成

天然的胶原蛋白



热变性的胶原蛋白



图23

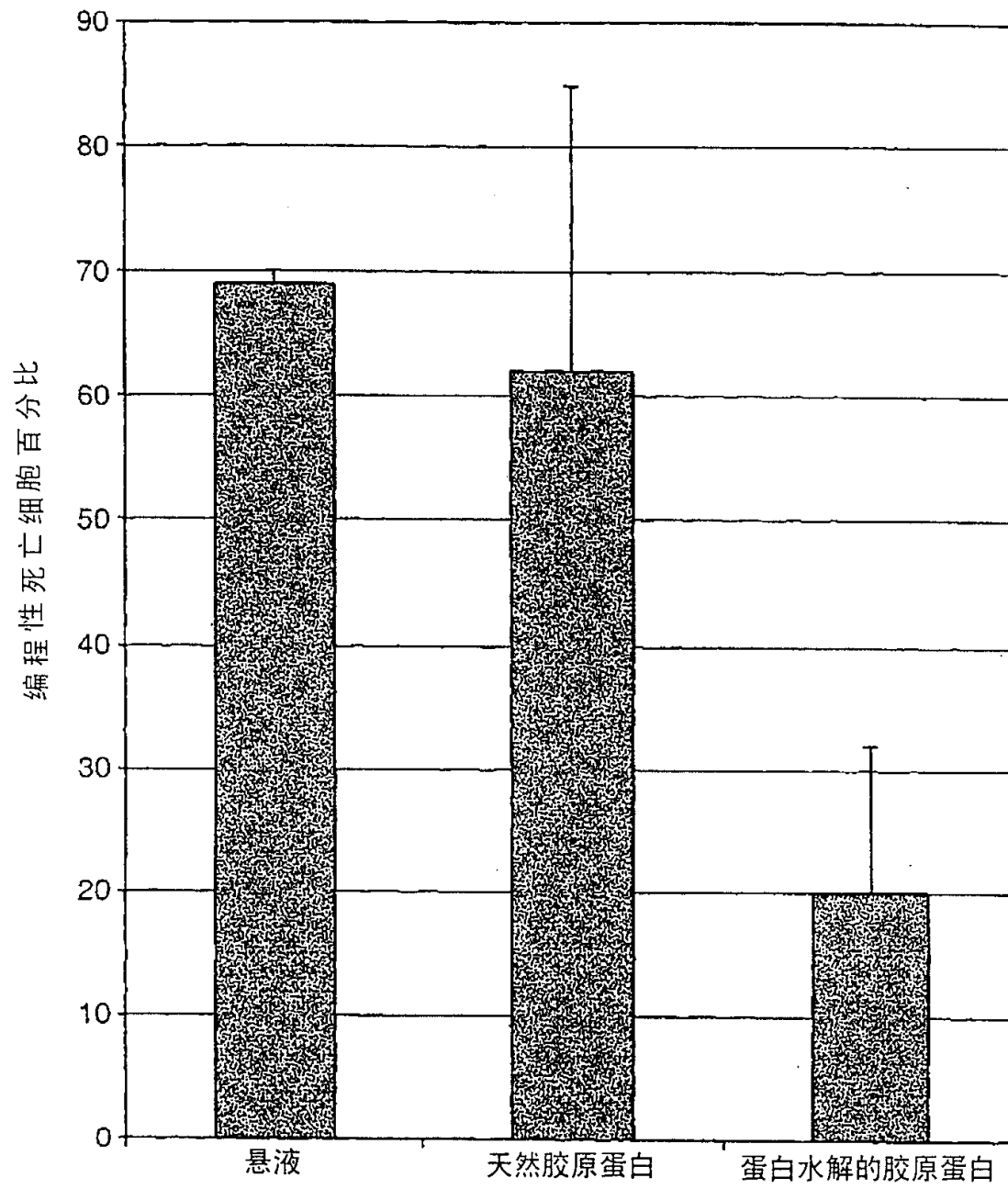
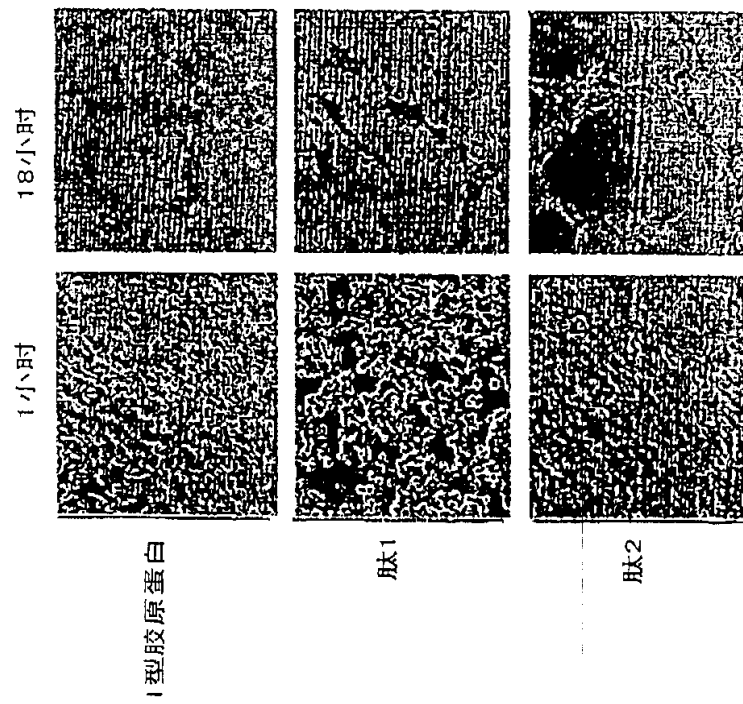


图24

人内皮素形成分析



人内皮素形成分析

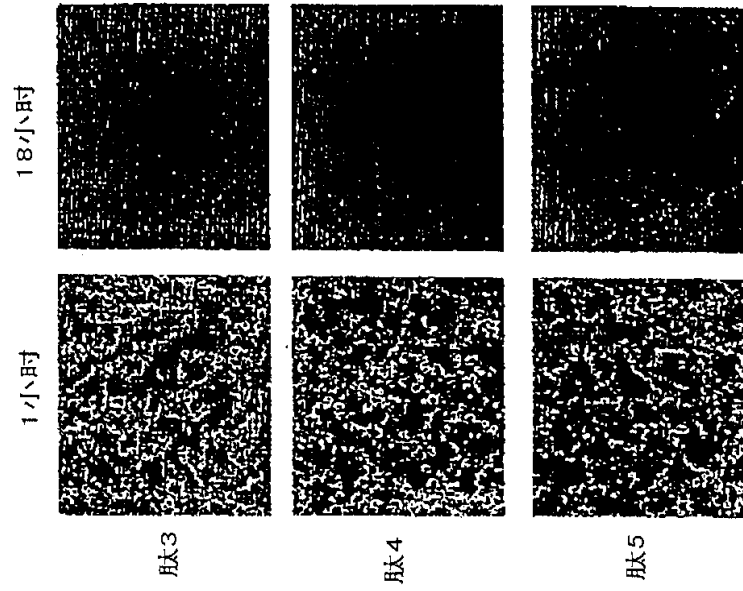


图25

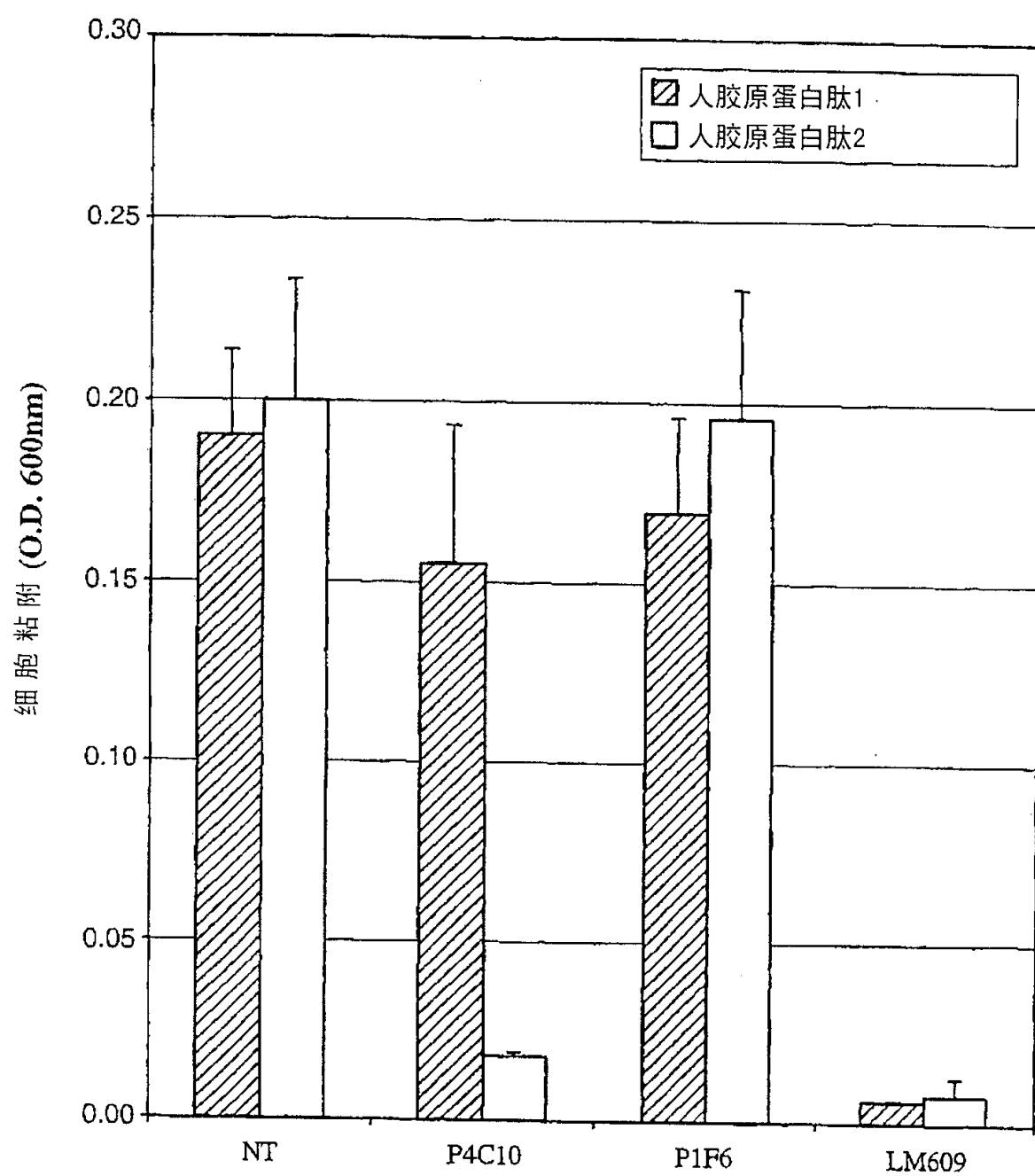


图26A

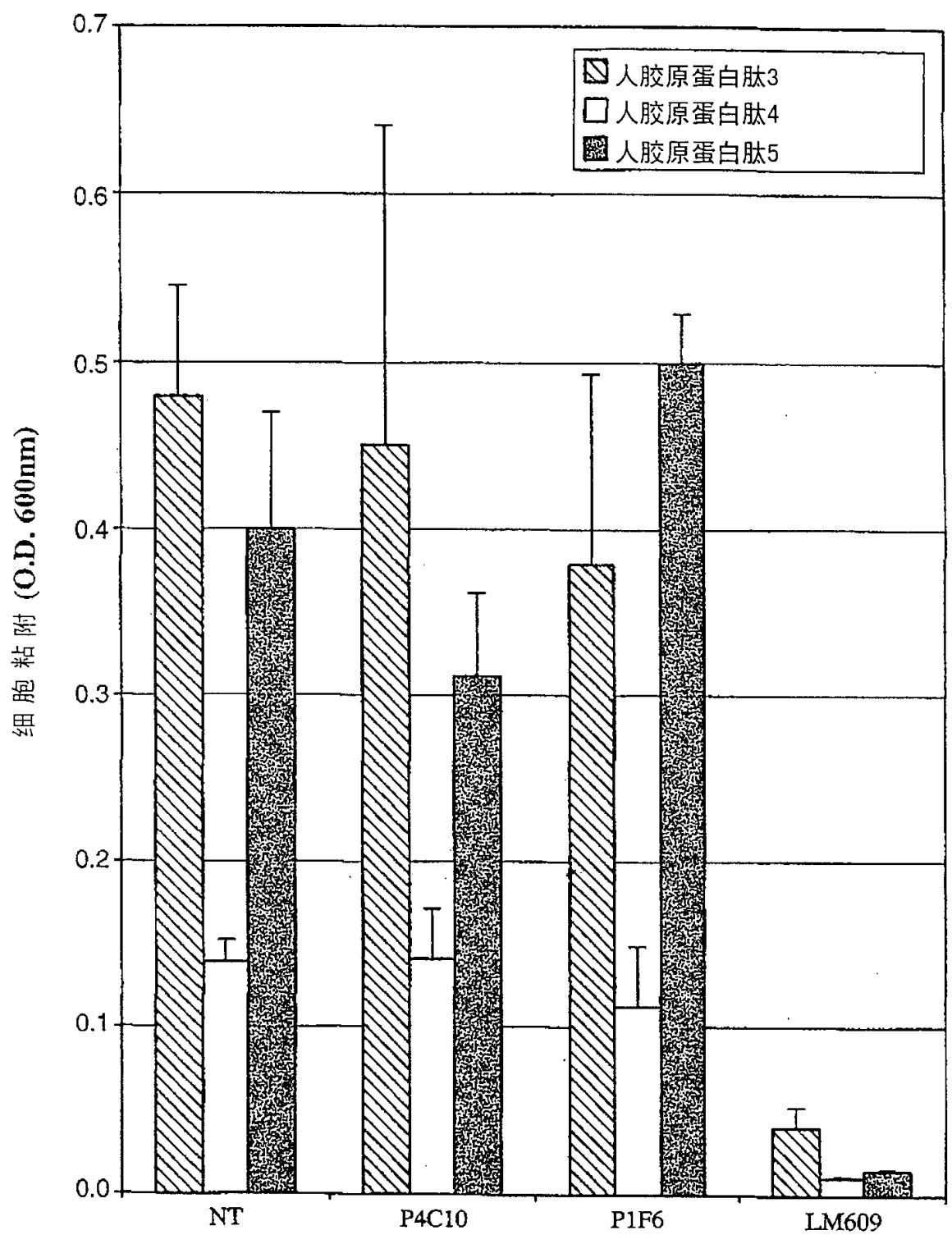


图26B

Mab XL313与人 I 型胶原蛋白肽的反应性

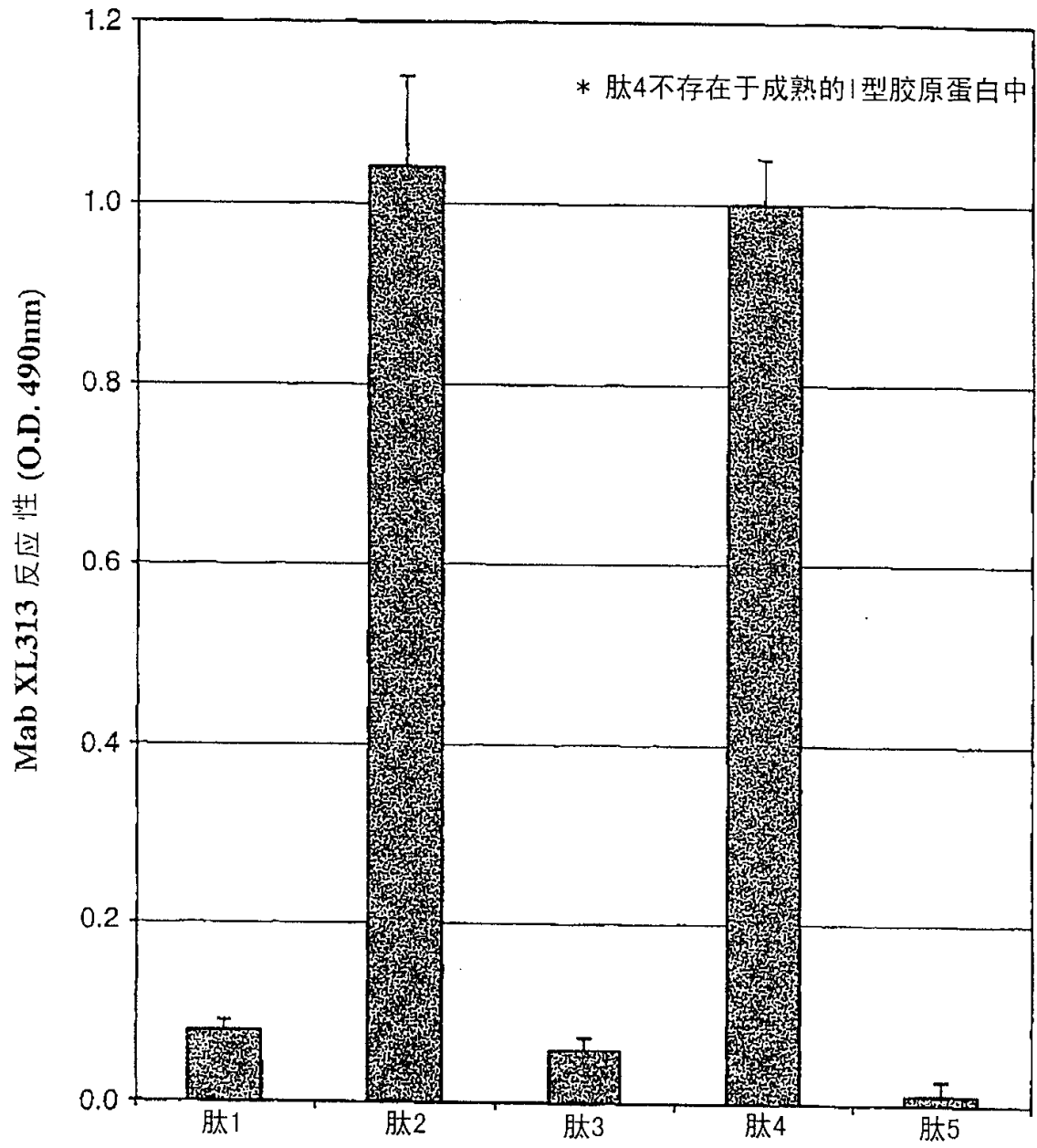
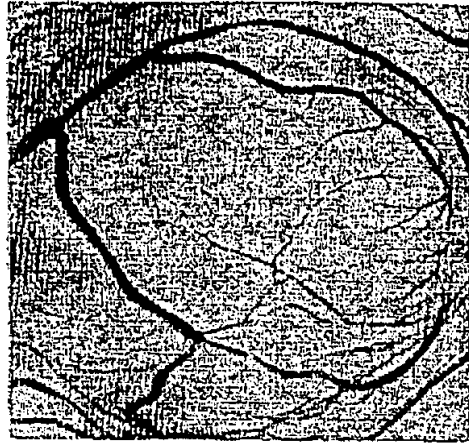


图27

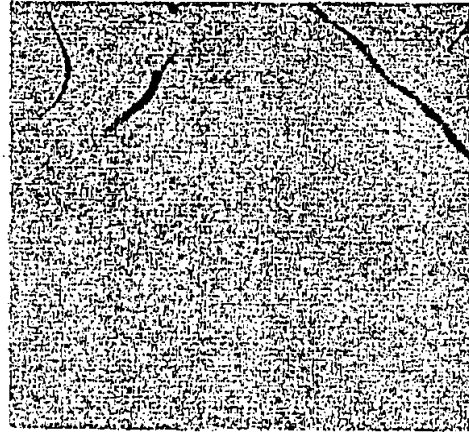
图29

鸡CAM中bFGF诱导的血管生成

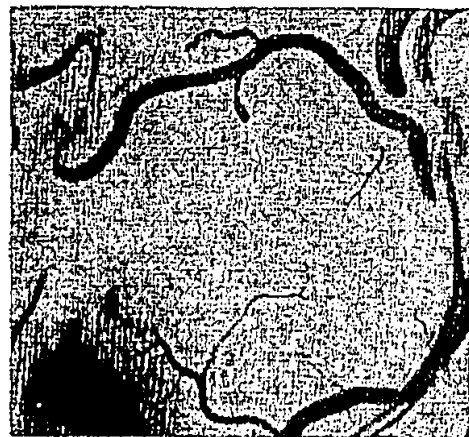
bFGF



bFGF + Mab XL313



bFGF + 对照单抗



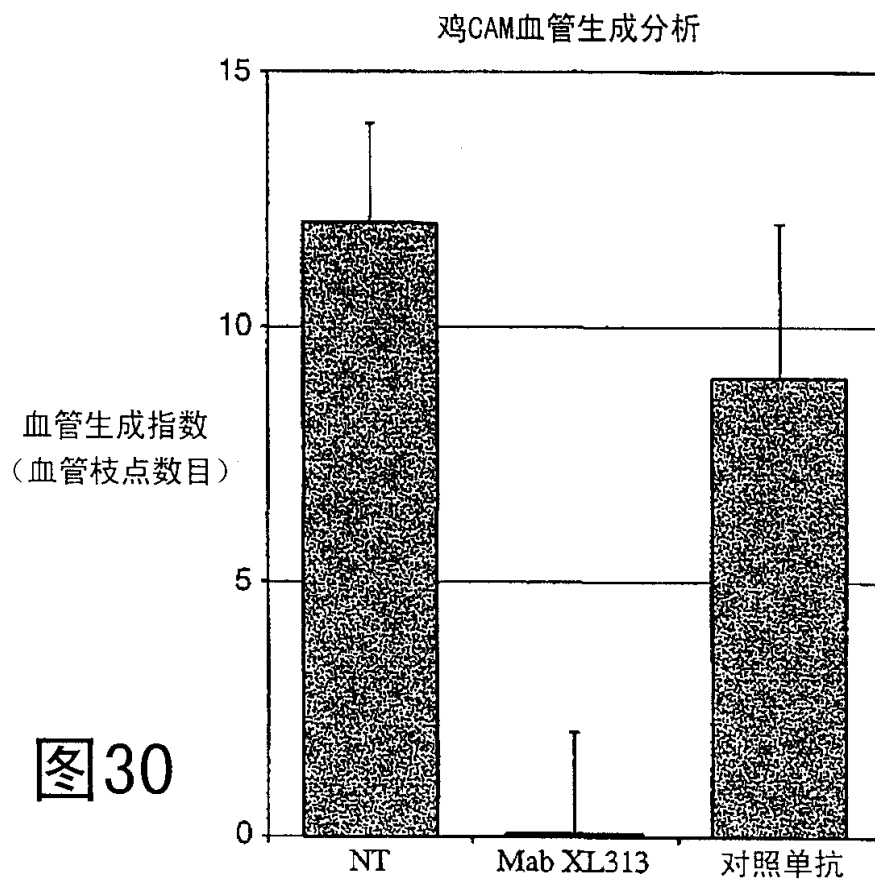


图30

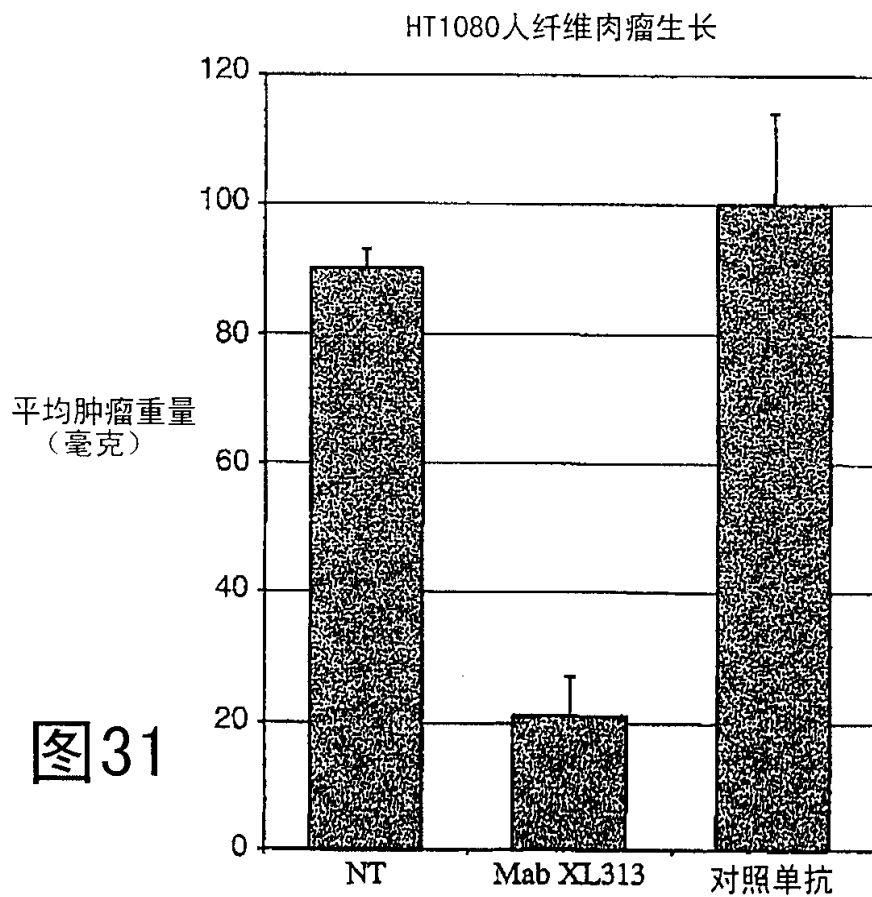


图31

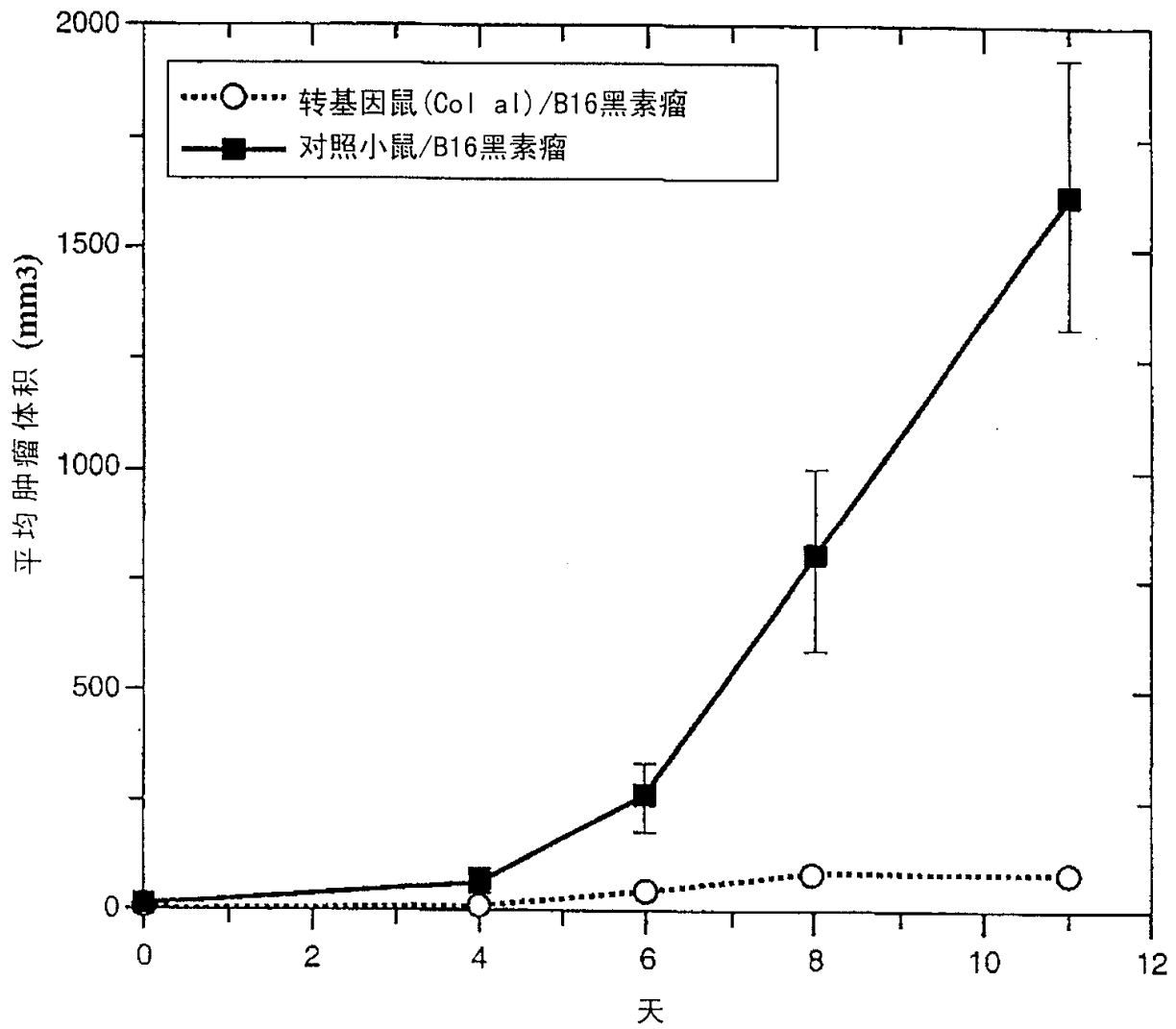


图32

