



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102037362 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 23

(21) 申请号 200980118081. 2

(22) 申请日 2009. 03. 18

(30) 优先权数据

61/069, 910 2008. 03. 19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 11. 18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/001689 2009. 03. 18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/117096 EN 2009. 09. 24

(73) 专利权人 中国合成橡胶股份有限公司

地址 中国台湾台北市

(72) 发明人 高国让 安德鲁·T·黄

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

公司 11243

代理人 钟晶

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006. 01)

C07K 16/28 (2006. 01)

C07K 16/30 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

C07K 14/705 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 03024392 A, 2003. 03. 27, 第 132 页.

W0 03024392 A, 2003. 03. 27, 第 132 页.

W0 03023008 A, 2003. 03. 20, 全文.

Laura Strickland 等. 《Plasmalemmal vesicle-associated protein (PLVAP) is expressed by tumor endothelium and is upregulated by vascular endothelial growth factor-A (VEGF)》. 《Journal of pathology》. 2005, 第 206 卷全文.

审查员 王丽华

权利要求书2页 说明书37页

序列表12页 附图28页

(54) 发明名称

用于诊断和治疗肝细胞癌的方法和抗体

(57) 摘要

本发明关于个体肝细胞癌的诊断方法及治疗方法。本发明还关于 PLVAP 蛋白的拮抗剂, 诸如特异性结合 PLVAP 蛋白的抗体, 以及包含 PLVAP 蛋白的拮抗剂的组成物及套组。本发明进一步关于特异性结合 PLVAP 蛋白的人化抗体。

1. 一种经分离多肽,其以小于约 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 之 K_d 特异性结合 SEQ ID NO:23,其包含选自以下的抗体可变域:

A)

1) 包含以下的抗体可变域:

- a) 由 SEQ ID NO:5 组成的 CDR1;
- b) 由 SEQ ID NO:6 组成的 CDR2;及
- c) 由 SEQ ID NO:7 组成的 CDR3;或
- d) 其保守性氨基酸取代;及

2) 包含以下的抗体可变域:

- e) 由 SEQ ID NO:10 组成的 CDR1;
- f) 由 SEQ ID NO:11 组成的 CDR2;及
- g) 由 SEQ ID NO:12 组成的 CDR3;或
- h) 其保守性氨基酸取代;或

B)

1) 包含以下的抗体可变域:

- a) 由 SEQ ID NO:15 组成的 CDR1;
- b) 由 SEQ ID NO:16 组成的 CDR2;及
- c) 由 SEQ ID NO:17 组成的 CDR3;或
- d) 其保守性氨基酸取代;及

2) 包含以下的抗体可变域:

- e) 由 SEQ ID NO:20 组成的 CDR1;
- f) 由 SEQ ID NO:21 组成的 CDR2;及
- g) 由 SEQ ID NO:22 组成的 CDR3;或
- h) 其保守性氨基酸取代。

2. 如权利要求 1 的经分离多肽,其中抗体可变域选自 A),且其中该多肽包含具有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的 V_H 域,具有 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列的 V_L 域,或者其组合。

3. 如权利要求 1 的经分离多肽,其中抗体可变域选自 B),且其中该多肽包含具有 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 V_H 域,具有 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列的 V_L 域,或者其组合。

4. 如权利要求 1 的经分离多肽,其中该经分离多肽与放射性同位素或细胞毒性剂接合。

5. 如权利要求 1 的经分离多肽,其中该经分离多肽是人化单株抗体或其抗原结合片段。

6. 一种用于治疗人类个体中的肝细胞癌的医药组成物,其包含如权利要求 4 的多肽及医药学上可接受的载剂。

7. 如权利要求 6 的医药组成物,其中该组成物适合用于经肝动脉输注或经动脉化学栓塞(transarterial chemoembolization, TACE) 授予。

8. 如权利要求 6 的组成物,其进一步包含至少一种化学治疗剂。

9. 如权利要求 8 的组成物,其中该化学治疗剂选自由阿霉素、顺铂、丝裂霉素、5- 氟尿嘧啶、他莫昔芬、索拉非尼及奥曲肽所组成的群组。

10. 一种如权利要求 4 的多肽在制备用于在需要其的人类个体中治疗肝细胞癌的医药品中的应用,其中该医药品适合用于经肝动脉输注或经动脉化学栓塞 (TACE) 授予。

11. 一种用于侦测哺乳动物个体中的肝细胞癌的诊断套组,其包含如权利要求 1 的多肽。

12. 一种经分离抗体,其具有用于特异性结合 SEQ ID NO:23 的单株抗体 KFCC-GY4 或单株抗体 KFCC-GY5 的抗原决定基特异性。

13. 一种治疗有效量的如权利要求 4 的多肽在制备用于在需要其的人类个体中治疗肝细胞癌 (HCC) 的医药品中的应用,其中该多肽是人化抗体或其抗原结合片段,其特异性结合 PLVAP,其中该人化抗体适合用于动脉内授予至该个体,且其中该人化抗体抑制选自该个体的肝脏中的肿瘤形成、肿瘤生长、肿瘤血管形成及肿瘤进展所组成的群组的活性。

14. 如权利要求 13 的应用,其中该人化抗体适合用于通过选自肝动脉输注及经动脉化学栓塞 (TACE) 所组成的群组的程序动脉内授予至该个体。

15. 如权利要求 13 的应用,其中该抗体与至少一种化学治疗剂组合使用。

16. 一种人化抗体,其具有单株抗体 KFCC-GY4 或单株抗体 KFCC-GY5 的抗原决定基特异性且特异性结合 SEQ ID NO:23,其中该人化抗体与放射性同位素或细胞毒性剂接合。

用于诊断和治疗肝细胞癌的方法和抗体

[0001] 相关申请案

[0002] 本申请案主张 2008 年 3 月 19 日申请的美国临时申请案第 61/069,910 号的利益。以上申请案的完整教示是以引用方式纳入本文中。

[0003] 发明背景

[0004] 肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 为最频发的肝脏原发性恶性疾病且为全世界范围内第 5 位最常见的癌症。HCC 还是第 4 位癌症相关死亡的主要原因 (Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden :Globocan2000. Int J Cancer2001 ;94 :153-156)。1990 年,世界卫生组织 (World Health Organization) 估计全世界范围内约有 430,000 例新发肝癌病例且当年有类似人数的患者因此疾病而死亡。

[0005] HCC 的发病机制与慢性 B 型肝炎病毒 (HBV) 及 C 型肝炎病毒 (HCV) 感染,以及肝硬化诱导病状有关 (Bruix J. 等人, J Hepatol35 :421-430,2001 ;BruixJ. 等人, Cancer Cell15 :215-219,2004)。因此, HCC 的发病率在诸如中国、香港、台湾、韩国及日本的东亚国家或地区最高,在这些国家或地区 HBV 及 HCV 感染最为流行 (Bruix J. 等人, Cancer Cell15 :215-219,2004 ;Haskell CM. 第 46 章 Liver :Natural History, Diagnosis and Staging, 于「Cancer Treatment」第 5 版, W. B, Saunders Company, Philadelphia, 编者 :Haskell CM 及 Berek JS 中)。然而,西方国家的 HCC 发病率在正在稳步递增 (Parkin DM. 等人, Int J Cancer94 ;153-156,2001)。过去 10 年中,在美国, HCC 呈现出在所有癌症中发病率增加第二高且死亡率增加最高 (Ann Int Med139 :817-823,2003)。因此,在美国及全世界范围内, HCC 为死亡率及发病率的主要原因,且由于住院费用及患有 HCC 的人们失去工作而成为显著的经济负担。

[0006] 成功控制 HCC 需要在疾病进展早期正确诊断该疾病。然而,已证明使用目前的技术 (诸如成像研究、核心针穿刺活检 (needle core biopsy) 及 / 或细针抽吸) 来区分小 HCC 肿瘤与其它恶性或非恶性肝病 (包括转移性肿瘤、胆管癌、局灶结节性增生 (focal nodular hyperplasia)、发育不良及再生肝结节) 具有挑战性 (Ferrell LD. 等人, Am J Surg Pathol 17 :1113-1123,1993 ;Horigome H. 等人, Hepato-Gastroenterology 47 :1659-1662,2000 ;Kalar S. 等人, Arch Pathol Lab Med 131 :1648-1654,2007 ;Seki S. 等人, Clin Cancer Res 6 :3460-3473,2000)。此外,治疗性治疗 HCC 的尝试大部分未能成功 (Bruix J. 等人, J Hepatol35 :421-430,2001 ;Bruix J. 等人, Cancer Cell 5 :215-219,2004 ;Haskell CM. 第 46 章 Liver :Natural History, Diagnosis and Staging, 于「Cancer Treatment」第 5 版, W. B, Saunders Company, Philadelphia, 编者 :Haskell CM 及 Berek JS 中 ;Szkларuk J. 等人, AJR 180 :441-453,2003)。因此,尽管存在现行疗法,但在美国患 HCC 患者的 5 年存活率仅为 10.5%,其数值仅次于胰腺癌位居第二 (ACSCancer Facts & Figures(2007))。因此,急迫地需要鉴别更可靠的标记物来区分 HCC 与其它肝病理学且促进此疾病的早期侦测。另外,急迫地需要研发新的且更有效的治疗剂来治疗 HCC。

发明概要

[0007] 在一具体实施方式中,本发明涵盖一种治疗有需要的个体(例如,人类)的肝细胞癌(HCC)的方法,其包含向该个体授予治疗有效量的至少一种抑制个体肝脏中HCC肿瘤的形成、生长及/或进展的一或多个的质膜小泡相关蛋白(Plasmalemma Vesicle-Associated Protein, PLVAP)拮抗剂。在一具体实施方式中,PLVAP拮抗剂为特异性结合PLVAP蛋白(例如,人类PLVAP蛋白)的抗体。在一特定具体实施方式中,PLVAP拮抗剂与第二治疗剂(诸如化学治疗剂)组合授予。

[0008] 在另一具体实施方式中,本发明关于一种治疗有需要的个体的肝细胞癌(HCC)的方法,其包含向该个体授予治疗有效量的特异性结合PLVAP蛋白的抗体及至少一种化学治疗剂。特异性结合PLVAP蛋白的抗体通过动脉内输注(例如,肝动脉输注、经动脉化学栓塞(transarterial chemoembolization))来授予个体且可抑制个体的肝脏中的肿瘤形成、肿瘤生长、肿瘤血管形成或肿瘤进展。在一特定具体实施方式中,将抗体递送至个体肝脏中的HCC肿瘤内或周围的血管的内皮细胞。

[0009] 在另一具体实施方式中,本发明关于一种诊断个体(例如,人类)的肝细胞癌(HCC)的方法,其包含检测来自个体的样本中PLVAP基因产物(例如,PLVAP RNA、PLVAP蛋白)的含量且测定样本中PLVAP基因产物的含量相对于对照增加。根据本发明,样本中PLVAP基因产物的含量相对于对照增加表明个体中存在HCC。在一特定具体实施方式中,使用特异性结合PLVAP的抗体来检测来自个体的样本中PLVAP蛋白的含量。

[0010] 在另一具体实施方式中,本发明提供一种诊断个体的肝细胞癌(HCC)的方法,其包含检测来自个体的肝组织样本中PLVAP基因产物的表现。根据本发明,肝组织样本中PLVAP基因产物的表现表明HCC。在一特定具体实施方式中,检测肝组织样本中血管内皮细胞中PLVAP基因产物的表现。

[0011] 在另一具体实施方式中,本发明关于一种检测个体(例如,人类)的HCC的活体内方法,其包含通过动脉内注射或静脉内注射授予经放射性同位素标记的特异性结合PLVAP的抗体,获得个体肝脏的影像并检测个体肝脏中抗体的累积。根据本发明,检测到肝脏中抗体的累积表明个体的HCC。

[0012] 在另一具体实施方式中,本发明提供一种特异性结合哺乳动物(例如,人类)PLVAP蛋白的经分离多肽。在一特定具体实施方式中,该多肽为抗体。在另一具体实施方式中,该抗体为与单株抗体KFCC-GY4或KFCC-GY5竞争结合人类PLVAP蛋白的抗体。

[0013] 在另一具体实施方式中,本发明涵盖一种医药组成物,其包含至少一种PLVAP拮抗剂及医药学上可接受的载剂。在一具体实施方式中,PLVAP拮抗剂为特异性结合PLVAP蛋白(例如,人类PLVAP蛋白)的抗体。在另一具体实施方式中,该医药组成物进一步包含第二治疗剂,诸如化学治疗剂。

[0014] 在另一具体实施方式中,本发明关于一种用于诊断个体的HCC的套组。在一具体实施方式中,套组包括至少一种与PLVAP RNA转录物特异性杂交(例如,在高严格度条件下)的核酸探针。在另一具体实施方式中,套组包含特异性结合PLVAP蛋白(例如,人类PLVAP蛋白)的多肽(例如,抗体)。

[0015] 在另一具体实施方式中,本发明关于一种治疗有需要的个体的肝细胞癌(HCC)的方法,其包含向该个体授予治疗有效量的特异性结合PLVAP的人化抗体。在一特定具体实

施方式中,该抗体通过动脉内输注(例如,肝动脉输注、经动脉化学栓塞)来授予个体且可抑制个体的肝脏中的肿瘤形成、肿瘤生长、肿瘤血管形成或肿瘤进展。

[0016] 在另一具体实施方式中,本发明提供一种人化抗体,其与单株抗体 KFCC-GY4 或单株抗体 KFCC-GY5 特异性竞争结合 SEQ ID NO:23。

[0017] 附图简述

[0018] 图 1 为描绘鉴别在肿瘤与相邻非肿瘤组织之间展示极端差异性表现的基因的算法的流程图。

[0019] 图 2 为描绘如使用 Affymetrix 基因芯片通过 mRNA 转录物侧写所测定的配对的 HCC(PHCC) 与相邻非肿瘤肝组织(PN) 样本(n=18) 以及未经配对的 HCC 样本(n=82) 中的 PLVAP 基因表现强度的图表。

[0020] 图 3A 为描绘如通过 Taqman 定量性 RT-PCR 所测定的配对的 HCC(PHCC) 与相邻非肿瘤肝组织(PN) 样本中的相对 PLVAP 表现量的图表。相对于非肿瘤肝组织, HCC 中的 PLVAP mRNA 含量显著较高。

[0021] 图 3B 为描绘如通过微数组分析所测定的 18 对 HCC(PHCC) 与相邻非肿瘤肝组织(PN) 样本中的 PLVAP 基因表现强度的图表。除一人外,对于所有经测试个体,来自每一个体的 HCC 中的 PLVAP 转录物含量比相邻非肿瘤肝组织中高。

[0022] 图 4A 及 4B 展示用于产生小鼠抗 PLVAP 多株抗血清的经 His 标记人类 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 蛋白重组融合蛋白的核苷酸序列(SEQ ID NO:1) 及推导氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0023] 图 5 为描绘凝血酶消化以移除 His 标签之前及之后对重组 PLVAP 蛋白的侦测的西方墨渍影像。墨渍左侧的箭头指示墨渍上 His-PLVAP 及 PLVAP 的位置。墨渍左侧的数字指示分子量标准的位置。

[0024] 图 6A 为描绘如通过两步实时定量性 RT-PCR 所测定在自两个 HCC 组织样本(样本 A(黑色) 及样本 B(灰色)) 通过雷射捕捉显微解剖获得的 HCC 内皮细胞中存在相对大量的 PLVAP mRNA 的图表。虚线表示来自用于 PLVAP mRNA 的定量性 RT-PCR 的相同样本中的 β -肌动蛋白 mRNA 的 Taqman 定量性 RT-PCR 信号。结果表明在所解剖内皮细胞中存在易测得的 PLVAP mRNA(实线)。

[0025] 图 6B 为描绘如通过两步 Taqman 实时定量性 RT-PCR 所测定在自两个 HCC 样本(样本 A(黑色) 及样本 B(灰色)) 中邻近于 HCC 组织的非肿瘤肝组织通过雷射捕捉显微解剖获得的细胞中不存在相对大量的 PLVAP mRNA 的图表。结果表明在所解剖细胞中无可侦测(黑色实线) 及几乎无可侦测(灰色实线) PLVAP mRNA。

[0026] 图 6C 为描绘如通过两步 Taqman 实时定量性 RT-PCR 所测定的自两个 HCC 组织样本(样本 A(黑色) 及样本 B(灰色)) 通过雷射捕捉显微解剖获得的 HCC 肿瘤细胞中的 PLVAP mRNA 相对量的图表。结果表明由于不可避免的来自附着于所解剖 HCC 细胞的血管内皮细胞部分的轻微污染,在所解剖 HCC 细胞中存在极少量 PLVAP mRNA(实线)。

[0027] 图 7 为描绘如通过 ELISA 所测定的对抗重组 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 蛋白所产生的小鼠抗血清中的抗 PLVAP 抗体效价的图表。

[0028] 图 8A-8F 为展示来自 3 名患有肝细胞癌的患者经福尔马林固定的配对 HCC(图 8A、8C、8E) 与相邻非肿瘤肝组织(图 8B、8D、8F) 的切片的影像,这些切片使用抗 PLVAP 多株抗血清经免疫组织化学方法染色以侦测 PLVAP 蛋白的定位。图 8A、8B;图 8C、8D 及图 8E、8F

中展示配对组织。仅在肝细胞癌的毛细管内皮细胞中检测到 PLVAP 蛋白,其在 HCC 影像中显现为褐色染色(箭头)(图 8A、8C、8E)。在非肿瘤肝组织中不存在可检测的 HCC(图 8B、8D、8F)。

[0029] 图 9A-9F 为展示来自另外 3 名患有肝细胞癌的患者经福尔马林固定的 HCC(图 9A、9C、9E、9F) 及非肿瘤肝组织(图 9B、9D) 的切片的影像,这些切片使用抗 PLVAP 多株抗血清经免疫组织化学方法染色以检测 PLVAP 蛋白的定位。图 9A、9B 及图 9C、9D 展示 HCC 与相邻非肿瘤肝组织的配对组织样本。仅在肝细胞癌的毛细管内皮细胞中检测到 PLVAP 蛋白,其在 HCC 影像中显现为褐色染色(箭头)(图 9A、9C、9E、9F)。在非肿瘤肝组织中不存在可检测的 HCC(图 9B、9D)。

[0030] 图 10A-10F 为展示来自 6 名不同患者的经福尔马林固定的局灶结节性增生组织的切片的影像,这些切片使用抗 PLVAP 多株抗血清经免疫组织化学方法染色以检测 PLVAP 蛋白的定位。在局灶结节性增生的非肿瘤肝组织的内衬血管窦/毛细管的内皮细胞中未检测到 PLVAP 蛋白。在胆管(图 10A、10D 及 10F) 及门脉周边血管(图 10D 及 10F) 的内皮细胞中注意到一些阳性染色(褐色),而在肝实质的内皮细胞中并无阳性染色。胆管内皮细胞的阳性染色是由于 PLVAP 抗血清中的非特异性抗体的结合。

[0031] 图 11A 及 11B 为展示来自两名患有肝血管瘤的患者的经福尔马林固定的组织切片的影像,这些切片经抗 PLVAP 多株抗血清以免疫组织化学方法染色。肝血管瘤的内皮内衬细胞未展示显著的 PLVAP 蛋白表现。

[0032] 图 12A 及 12B 为展示来自两名患有慢性活性 B 型肝炎的患者的经福尔马林固定的组织切片的影像,这些切片经抗 PLVAP 多株抗血清以免疫组织化学方法染色。在来自慢性 B 型肝炎患者的非肿瘤肝组织的内衬血管窦/毛细管的内皮细胞中未检测到 PLVAP 蛋白。

[0033] 图 13A-13D 为展示来自 3 名患有慢性活性 C 型肝炎的不同患者的经福尔马林固定的组织切片的影像,这些切片经抗 PLVAP 多株抗血清以免疫组织化学方法染色。图 13B 及 13D 中所示的组织切片来自同一患者。在来自慢性 C 型肝炎患者的非肿瘤肝组织的内衬血管窦/毛细管的内皮细胞中未检测到 PLVAP 蛋白。

[0034] 图 14A-14D 为展示来自 3 名患有转移性肝癌的不同患者的经福尔马林固定的组织切片的影像,这些切片经抗 PLVAP 多株抗血清以免疫组织化学方法染色。这些组织切片来自患有转移性结肠直肠癌(图 14A)、肝内胆管癌(图 14B 及 14C) 或转移性卵巢癌(图 14D) 的患者。图 14B 及 14C 中所示的组织切片来自同一患者。在转移癌组织的内衬血管窦/毛细管的内皮细胞中未检测到 PLVAP 蛋白。

[0035] 图 15A 展示单株抗体 KFCC-GY4 的 V_H 域的核苷酸基因(上)(SEQ ID NO:3) 及推导氨基酸(中)(SEQ ID NO:4) 序列。还指出 CDR1(SEQ ID NO:5)、CDR2(SEQ ID NO:6) 及 CDR3(SEQ ID NO:7) 中的氨基酸残基序列(下)。

[0036] 图 15B 展示单株抗体 KFCC-GY4 的 V_L 域的核苷酸基因(上)(SEQ ID NO:8) 及推导氨基酸(中)(SEQ ID NO:9) 序列。还指出 CDR1(SEQ ID NO:10)、CDR2(SEQ ID NO:11) 及 CDR3(SEQ ID NO:12) 中的氨基酸残基序列(下)。

[0037] 图 16A 展示单株抗体 KFCC-GY5 的 V_H 域的核苷酸基因(上)(SEQ ID NO:13) 及推导氨基酸(中)(SEQ ID NO:14) 序列。还指出 CDR1(SEQ ID NO:15)、CDR2(SEQ ID NO:16) 及 CDR3(SEQ ID NO:17) 中的氨基酸残基序列(下)。

[0038] 图 16B 展示单株抗体 KFCC-GY5 的 V_L 域的核苷酸基因 (上) (SEQ ID NO:18) 及推导氨基酸 (中) (SEQ ID NO:19) 序列。还指出 CDR1 (SEQ ID NO:20)、CDR2 (SEQ ID NO:21) 及 CDR3 (SEQ ID NO:22) 中的氨基酸残基序列 (下)。

[0039] 图 17 为描绘如通过 ELISA 所测定的在各种抗体浓度下 KFCC-GY4 (空心圆圈) 及 KFCC-GY5 (实心圆圈) 单株抗体与重组 PLVAP 蛋白的结合的图。

[0040] 图 18 为展示 KFCC-GY4 及 KFCC-GY5 单株抗体可侦测 5ng 重组 PLVAP 蛋白的免疫墨渍。泳道 1:分子量标准;泳道 2:含 KFCC-GY4 单株抗体的免疫墨渍;泳道 3:含 KFCC-GY5 单株抗体的免疫墨渍。

[0041] 重组 PLVAP 蛋白的分子量为 45kD。

[0042] 图 19A 及 19C 为经库马斯蓝 (Coomassie blue) 染色的 SDS 丙烯酰胺凝胶。泳道 1:分子量标准;泳道 2:使用 TX-114 自人类脐带血管内皮细胞提取的疏水性膜蛋白,这些内皮细胞在提取前已经 VEGF (40ng/ml) 刺激 72 小时。

[0043] 图 19B 为免疫墨渍,其中用 KFCC-GY4 单株抗体探测图 19A 的泳道 2 中所示的提取物。泳道 1:分子量标准;泳道 2:使用 TX-114 自人类脐带血管内皮细胞提取的疏水性膜蛋白,这些内皮细胞在提取前已经 VEGF (40ng/ml) 刺激 72 小时。

[0044] 图 19D 为免疫墨渍,其中用 KFCC-GY-5 单株抗体探测图 19C 的泳道 2 中所示的提取物。泳道 1:分子量标准;泳道 2:使用 TX-114 自人类脐带血管内皮细胞提取的疏水性膜蛋白,这些内皮细胞在提取前已经 VEGF (40ng/ml) 刺激 72 小时。

[0045] 图 20A 为描绘人类血管内皮细胞 (HUVEC) 经对照正常小鼠 IgG 免疫荧光染色的荧光显微照片。用 4',6-二甲脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 对细胞核进行染色。放大率=600 倍。

[0046] 图 20B 为描绘人类血管内皮细胞 (HUVEC) 经针对 von Willebrand 因子 (VWF) 的单株抗体免疫荧光染色的荧光显微照片。VWF 为人类血管内皮细胞的阳性标记物。用 4',6-二甲脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 对细胞核进行染色。放大率=600 倍。

[0047] 图 20C 为描绘人类血管内皮细胞 (HUVEC) 经针对 PLVAP 的 KFCC-GY4 单株抗体免疫荧光染色的荧光显微照片。KFCC-GY4 单株抗 PLVAP 抗体与人类血管内皮细胞阳性反应。用 4',6-二甲脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 对细胞核进行染色。放大率=600 倍。

[0048] 图 20D 为描绘人类血管内皮细胞 (HUVEC) 经针对 PLVAP 的 KFCC-GY5 单株抗体免疫荧光染色的荧光显微照片。KFCC-GY5 单株抗 PLVAP 抗体与人类血管内皮细胞阳性反应。用 4',6-二甲脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 对细胞核进行染色。放大率=600 倍。

[0049] 图 21A 为包埋于石蜡块中的经福尔马林固定的肝细胞瘤组织切片的光学显微照片,该切片经 KFCC-GY5 单株抗 PLVAP 抗体染色。在肝细胞瘤的血管内皮细胞中侦测到强 PLVAP 信号 (深灰色染色)。放大率为 100 倍。

[0050] 图 21B 为来自与图 21A 中所示的样本相同的患者的经福尔马林固定的肝细胞瘤组织切片的光学显微照片,该切片经 KFCC-GY4 单株抗 PLVAP 抗体染色。在肝细胞瘤的血管内皮细胞中侦测到中等 PLVAP 信号 (浅灰色染色)。放大率为 100 倍。

[0051] 图 21C 为来自与图 21A 及 21B 中所示的样本不同的患者的经福尔马林固定的肝细胞瘤组织切片的光学显微照片,该切片经 KFCC-GY5 单株抗 PLVAP 抗体染色。在血管内皮细胞中侦测到强 PLVAP 信号 (深灰色染色)。放大率为 100 倍。

[0052] 图 21D 为包埋于石蜡块中的来自与图 21C 中所示的样本相同的患者的经福尔马林固定的肝细胞瘤组织切片的光学显微照片,该切片经 KFCC-GY4 单株抗 PLVAP 抗体染色。在血管内皮细胞中检测到中等 PLVAP 信号(浅灰色染色),从而表明 KFCC-GY4 单株抗体与 PLVAP 抗原的结合比 KFCC-GY5 抗体弱。放大率为 100 倍。

[0053] 图 22A-H 为来自 4 名不同的经随机选择的肝细胞瘤患者的肝细胞瘤组织(图 22A、22C、22E 及 22G)及相邻非肿瘤肝组织(图 22B、22D、22F 及 22H)的切片的光学显微照片。这些切片经 KFCC-GY5 单株抗 PLVAP 抗体染色。在肝细胞瘤组织的血管内皮细胞中检测到 PLVAP 信号(灰色染色),而在非肿瘤肝组织的血管内皮细胞中未检测到信号。放大率为 100 倍。图 22A 与 22B、22C 与 22D、22E 与 22F 及 22G 与 22H 代表四组配对的肝细胞瘤与非肿瘤肝组织。

[0054] 图 23A 为描绘经对照小鼠 IgG 染色的人类血管内皮细胞(HUVEC)的荧光显微照片。用 4',6-二甲脒基-2-苯基吡啶(DAPI)对细胞核进行染色。

[0055] 图 23B 为描绘经针对 PLVAP 的 KFCC-GY4 单株抗体染色的人类血管内皮细胞(HUVEC)的荧光显微照片。KFCC-GY4 单株抗 PLVAP 抗体与人类血管内皮细胞的表面阳性反应。用 4',6-二甲脒基-2-苯基吡啶(DAPI)对细胞核进行染色。

[0056] 图 23C 为描绘经针对 PLVAP 的 KFCC-GY5 单株抗体染色的人类血管内皮细胞(HUVEC)的荧光显微照片。KFCC-GY5 单株抗 PLVAP 抗体与人类血管内皮细胞的表面阳性反应。用 4',6-二甲脒基-2-苯基吡啶(DAPI)对细胞核进行染色。

[0057] 图 24 展示人类 PLVAP 蛋白的氨基酸序列(Genbank 编号 NP_112600 ;SEQ ID NO : 23)。

[0058] 图 25A 及 25B 展示全长人类 PLVAP cDNA 的核苷酸序列(Genbank 编号 NM_031310 ;SEQ ID NO :24)。

[0059] 发明详述

[0060] 定义

[0061] 如本文中所用,术语「质膜小泡相关蛋白(Plasmalemma Vesicle-Associated Protein)」、「PLVAP」及「PV-1」指天然存在或内源性 PLVAP(例如,哺乳动物、人类)蛋白,及具有与天然存在或内源性 PLVAP 蛋白相同或大体上相同的氨基酸序列的蛋白质(例如,重组蛋白、合成蛋白)。因此,在本文中可互换使用的术语「质膜小泡相关蛋白」、「PLVAP」及「PV-1」包括(例如)通过天然存在于哺乳动物(例如,人类)体内的替代性拼接或其它细胞过程产生的 PLVAP 蛋白的多态或对偶基因变异体及其它同功异型物。较佳地,PLVAP 蛋白为具有 SEQ ID NO :23(参见 Genbank 编号 NP_112600 及图 24)的氨基酸序列的人类蛋白质。

[0062] 如本文中所定义,「PLVAP 拮抗剂(PLVAP antagonist)」为在一具体实施方式中抑制(例如,降低、阻止)PLVAP 蛋白的活性;或在另一具体实施方式中抑制(例如,降低、阻止)PLVAP 基因及/或基因产物的表现的药剂(例如,抗体、小分子、肽、肽模拟物、核酸)。可由本发明的拮抗剂抑制的 PLVAP 蛋白的活性包括(但不限于)肝细胞癌肿瘤的形成、生长、血管形成及/或进展。在一特定具体实施方式中,PLVAP 拮抗剂特异性结合哺乳动物(例如,人类)PLVAP 蛋白且抑制该 PLVAP 蛋白的活性。

[0063] 如本文中所用,「特异性结合(specifically binds)」指药剂(例如,抗体)与

PLVAP 基因产物（例如，RNA、蛋白质）以比 PLVAP 拮抗剂结合非 PLVAP 蛋白质的亲和力大至少约 5 倍，较佳至少约 10 倍的亲和力（例如，结合亲和力）结合。

[0064] 如本文中所用，术语「多肽 (polypeptide)」指氨基酸的聚合物，且不限长度。因此，「多肽」涵盖蛋白质、肽及寡肽。

[0065] 如本文中所用，术语「抗体 (antibody)」指对标靶、抗原或抗原决定基具有亲和力的多肽，且包括天然存在及经工程化的抗体。术语「抗体」涵盖多株、单株、人类、嵌合、人化、灵长类化、镶饰 (veneered) 及单链抗体，以及抗体片段（例如，Fv、Fc、Fd、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、scFab、dAb）。（例如参见 Harlow 等人，Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）。

[0066] 术语「抗体可变区 (antibody variable region)」指独立地或在与其它抗体可变区组合时（例如，V_H/V_L 对），特异性结合抗原决定基的抗体区域（例如，V_H、V_{HH}、V_L）。

[0067] 术语「抗原决定基 (epitope)」指熟知的由抗体 V_H/V_L 对结合的结构单位。抗原决定基定义抗体的最小结合位点且因此代表抗体特异性的标靶。

[0068] 术语「互补决定区 (complementarity determining region)」或「CDR」指来自重链或轻链的抗体可变区的高变区，其含有能够特异性结合抗原标靶（例如，抗原决定基）的氨基酸序列。典型重链或轻链会具有三个 CDR (CDR1、CDR2、CDR3)，其负责抗体对特定抗原决定基的特异性。

[0069] 如本文中所定义，术语「抗原结合片段 (antigen binding fragment)」指含有一或多个 CDR 且本身对抗原决定子具有亲和力的抗体部分。非限制性实例包括 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、重链-轻链二聚体及单链接构，诸如完整轻链或完整重链。

[0070] 如本文中所用，术语「特异性 (specificity)」指抗体优先结合抗原决定基的能力，且未必意味高亲和力。

[0071] 术语「亲和力 (affinity)」指抗体与抗原决定子之间的结合强度的量度。亲和力取决于多种因素，包括抗体与抗原决定子之间立体化学配合的紧密度，其间接接触区域的大小，及带电及疏水性基团的分布。

[0072] 如本文中所用，术语「亲和力常数 (affinity constant)」或「K_d」指用于量测抗体对抗原的亲和力的解离常数。亲和力常数愈低，免疫球蛋白对抗原或抗原决定子的亲和力愈高，且反之亦然。该常数容易由如通过用于抗体反应的标准动力学方法所量测的结合-解离反应的速率常数算得。

[0073] 如本文中所提及，术语「竞争 (competes)」意谓第一多肽（例如，抗体）与标靶抗原的结合受到第二多肽（例如，抗体）结合的抑制。举例而言，结合可因（例如）结合域的物理阻断或结合域的结构或环境改变使得其对标靶的亲和力或结合性降低而受到空间抑制。

[0074] 如本文中所用，术语「肽 (peptide)」指由约 2 个至约 100 个氨基酸残基组成的化合物，其中一个氨基酸的胺基经由肽键连接至另一氨基酸的羧基。这些肽的长度典型地小于约 100 个氨基酸残基且较佳为约 10 个、约 20 个、约 30 个、约 40 个或约 50 个残基。

[0075] 如本文中所用，术语「肽模拟物 (peptidomimetic)」指不为肽或蛋白质，但仿真其结构的外表的分子。肽模拟物拮抗剂可通过熟知的化学方法来制备（例如，参见 Damewood J.R. [Peptide Mimetic Design with the Aid of Computational Chemistry] 于 Reviews

in Computational Biology, 2007, 第 9 卷, 第 1-80 页, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1996 中; Kazmierski W.K., [Methods of Molecular Medicine: Peptidomimetic Protocols,] Humana Press, New Jersey, 1999)。

[0076] 术语「肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma)」、「HCC」及「肝细胞瘤 (hepaoma)」在本文中可互换使用, 用以指自肝细胞 (肝脏的主要细胞类型) 产生的癌症。

[0077] 如本文中所定义, 「疗法 (therapy)」为向个体 (例如, 哺乳动物、人类) 授予特定治疗剂或预防剂, 其对个体产生所需治疗或预防效益。

[0078] 如本文中所定义, 「治疗有效量 (therapeutically effective amount)」为在授予条件下足以达成所需治疗或预防作用的量, 诸如足以抑制 (亦即, 降低、预防) 患 HCC 的患者肝脏中的肿瘤形成、肿瘤生长 (增殖、尺寸)、肿瘤血管形成及 / 或肿瘤进展 (侵袭、转移) 的量。疗法的有效性 (例如, 缩小 / 消除肿瘤及 / 或预防肿瘤生长) 可通过任何合适方法 (例如, 原位免疫组织化学、成像 (超音波、CT 扫描、MRI、NMR)、³H- 胸苷并入) 来测定。

[0079] 如本文中所定义, 「治疗摄生法 (treatment regimen)」为以特定剂量 (例如, 含量、量、数量) 且按特定时程或以特定时间间隔 (例如, 数分钟、数天、数周、数月) 向哺乳动物个体授予一或多种治疗剂或预防剂的摄生法。

[0080] 如本文中所用, 「个体 (subject)」指哺乳动物个体。术语「哺乳动物个体 (mammalian subject)」在本文中定义为包括诸如以下动物的哺乳动物: 灵长类动物 (例如, 人类)、母牛、绵羊、山羊、马、犬、猫、兔、豚鼠、大鼠、小鼠或其它牛科、羊科、马科、犬科、猫科、啮齿动物或鼠类物种。合适个体的实例包括 (但不限于) 患者 HCC 或有发展 HCC 风险的人类患者。发展 HCC 的高风险群组的实例包括患有慢性肝炎感染 (B 型肝炎、C 型肝炎) 的个体及患有肝硬化或相关肝病状的个体。

[0081] 如本文中所用的术语「预防 (prevent、preventing 或 prevention)」意谓降低个体的 HCC 肿瘤形成或进展的机率 / 可能性或风险, 延迟个体体内与 HCC 相关的病状的发病, 减轻个体体内 HCC 相关病状的一或多种症状的严重性, 或其任何组合。一般而言, 预防性摄生法的个体最可能被归类为「处于风险中 (at-risk)」, 例如该个体发展 HCC 的风险高于由相关基线人群所代表的个体的风险。

[0082] 如本文中所用, 术语「治疗 (treat、treating 或 treatment)」意谓抵抗医学 病状 (例如, 与 HCC 相关的病状) 至根据临床可接受的标准使该医学病状得以改良的程度 (例如, 个体肝脏中 HCC 肿瘤的数目及 / 或尺寸降低)。

[0083] 如本文中所用, 术语「低严格度 (low stringency)」、「中严格度 (medium stringency)」、「高严格度 (high stringency)」或「极高严格度条件 (very high stringency conditions)」描述核酸杂交及洗涤的条件。执行杂交反应的指南可见于 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 中, 其全文以引用的方式并入本文中。该参考文献中描述水性及非水性方法且均可使用。本文中所提及的特异性杂交条件如下: (1) 低严格度杂交条件为在约 45°C 下于 6X 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 中, 随后在 50°C 下 (对于低严格度条件可将洗涤温度升至 55°C) 在 0.2X SSC、0.1% SDS 中洗涤两次; (2) 中严格度杂交条件为在约 45°C 下于 6X SSC 中, 随后在 60°C 下在 0.2X SSC、0.1% SDS 中洗涤一或多次; (3) 高严格度杂交条件为在约 45°C 下于 6X SSC 中, 随后在 65°C 下在 0.2X SSC、0.1% SDS 中洗涤一或多次; 及较佳 (4) 极

高严格度杂交条件为在 65℃ 下于 0.5M 磷酸钠、7% SDS 中,随后在 65℃ 下在 0.2X SSC、1% SDS 中洗涤一或多次。极高严格度条件 (4) 为较佳条件,且除非另有规定,否则应使用这些条件。

[0084] 除非另有规定,否则本文中所用的所有技术及科学术语具有与一般技术者(例如,细胞培养、分子遗传学、核酸化学、杂交技术及生物化学)通常所了解相同的含义。使用分子、遗传及生物化学方法(一般参见 Sambrook 等人, *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*, 第 2 版 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 及 Ausubel 等人, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 第 4 版, John Wiley & Sons, Inc., 其以引用的方式并入本文中)及化学方法的标准技术。

[0085] PLVAP

[0086] 质膜小泡相关蛋白 (PLVAP), 还称为 PV1, 为一种 II 型整合膜糖蛋白, 其表现限于特定血管内皮细胞 (*Mol Biol Cell* 15 :3615-3630 (2004))。已证明 PLVAP 为有孔内皮的小孔及气孔隔膜的关键结构组份(同上)。另外, PLVAP 表现为形成内皮小孔隔膜所必需且可能参与调节内皮渗透性及转运 (*Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286 :H1347-1353, 2004)。人类 PLVAP 基因的基因组结构已有报导 (Stan RV, Arden KC, Palade GE. cDNA and protein sequence, genomic organization, and analysis of cis regulatory elements of mouse and human PLVAP genes. *Genomics* 72 :304-313, 2001)。

[0087] 如本文中所述, 本发明者已证明在人类 HCC 患者的肝脏中肝细胞癌组织中的 PLVAP 基因表现相对于相邻非肿瘤组织显著升高。另外, 本发明者已判定 PLVAP 蛋白主要表现且定位于 HCC 肿瘤周围或 HCC 肿瘤内的血管内皮细胞, 而不表现或定位于与其它肝病理学相关的细胞。因此, PLVAP 代表一种用于诊断及治疗 HCC 的新颖标靶。

[0088] 治疗方法

[0089] 在一方面中, 本发明关于一种治疗有需要的个体的肝细胞癌 (HCC) 的方法, 其包含向该个体投予治疗有效量的至少一种 PLVAP 拮抗剂, 其中该 PLVAP 拮抗剂抑制个体肝脏中 HCC 肿瘤的形成、生长、血管形成及 / 或进展的一或多个。在一特定方面中, 本发明的 PLVAP 拮抗剂抑制 HCC 患者的肝脏中肝细胞周围的血管内皮细胞中的 PLVAP 蛋白的表现或活性。

[0090] 在一方面中, 向有需要的个体投予治疗有效量的 PLVAP 拮抗剂以抑制肿瘤生长或杀死肿瘤细胞。举例而言, 直接抑制肿瘤生长的药剂(例如, 化学治疗剂)熟知地以特定给药时程及含量投予以达成最有效的疗法(例如, 最佳杀死肿瘤细胞)。一般而言, 在相对较短的治疗期(例如, 一至数天)内投予约最大耐受剂量, 随后为治疗中断期 (off-therapy period)。在一特定实例中, 每隔一天以最大耐受剂量 150mg/kg 投予化学治疗剂环磷酰胺 (cyclophosphamide) 持续 3 剂, 在第一周期后 21 天给与第二周期 (Browder 等人, *Can Res* 60 :1878-1886, 2000)。

[0091] 举例而言, 可在第一周期中投予治疗有效量的 PLVAP 拮抗剂(例如, 抑制性小分子、中和抗体、抑制性核酸(例如, siRNA、反义核苷酸)), 其中以一次时间间隔 / 给药, 或以数次间距相近的时间间隔(数分钟、数小时、数天)投予约最大耐受剂量的拮抗剂, 在合适的治疗中断期(例如, 一或多周)后投予另一 / 第二周期。PLVAP 拮抗剂的合适给药时程及量可易于由具有一般技术的临床医师判定。如与化学治疗剂相比特定 PLVAP 拮抗剂的毒性

较低可允许授予周期之间的时间较短。当用作（例如，手术、放射疗法、其它基本疗法的）辅助疗法时，治疗有效量的 PLVAP 拮抗剂较佳按与其它癌症疗法（例如，化学疗法）类似的给药时程，或按由熟习此项技术的临床医师判定为更 / 最有效抑制（降低、预防）肿瘤生长的给药时程来授予。治疗有效量的抗体 PLVAP 拮抗剂的治疗摄生法可为（例如）每次治疗每公斤体重约 0.01mg 至约 300mg，且较佳为约 0.01mg/kg 至约 100mg/kg、约 0.01mg/kg 至约 10mg/kg、约 1mg/kg 至约 10mg/kg，每 1 至 7 天一次历时约 4 至约 6 个月的时期。抗肿瘤有效量的小分子 PLVAP 拮抗剂的治疗摄生法可为（例如）约 0.001mg/kg 至约 100mg/kg、约 0.01mg/kg 至约 100mg/kg、约 0.01mg/kg 至约 10mg/kg、约 0.01mg/kg 至约 1mg/kg，每 1 至 7 天一次历时约 4 至约 6 个月的时期。

[0092] 在另一方面中，PLVAP 拮抗剂可以节律性给药摄生法授予，藉此相对于最大耐受给药更频繁地授予较低剂量。多种临床前研究已证明节律性摄生法与最大耐受剂量 (MTD) 对应摄生法相比具有上佳抗肿瘤功效、有效抗血管生成作用及降低的毒性及副作用（例如，骨髓抑制）(Bocci 等人, *Cancer Res*, 62 :6938-6943, (2002) ;Bocci 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(22) :12917-12922, (2003) ;及 Bertolini 等人, *Cancer Res*, 63(15) :4342-4346, (2003))。节律性化学疗法似乎可有效克服与化学疗法相关的一些缺点。

[0093] PLVAP 拮抗剂可作为抗血管生成疗法的部分以节律性给药摄生法授予以抑制（降低、阻止）有需要患者的血管生成。该抗血管生成疗法可通过阻断向肿瘤供给维持肿瘤生长所需的养分且使肿瘤能够转移的新血管的形成来间接影响（抑制、降低）肿瘤生长。以此方式断绝肿瘤的养分及血液供应可最终使肿瘤细胞因坏死及 / 或细胞调亡而死亡。先前的工作已表明当更频繁地授予较低剂量含量而提供抗血管生成剂的持续血液含量时，涉及阻断血管生成因子（例如，VEGF、bFGF、TGF- α 、IL-8、PDGF）或其它信号传输的癌症疗法的临床结果（抑制内皮细胞介导的肿瘤血管生成及肿瘤生长）更为有效（参见 Browder 等人, *Can. Res.* 60 :1878-1886, 2000 ;Folkman J., *Sem. Can. Biol.* 13 :159-167, 2003)。抗血管生成治疗摄生法已用于血管生成的靶向抑制剂（凝血栓蛋白-1 及血小板生长因子-4 (TNP-470)）与化学治疗剂环磷酰胺。每隔 6 天，以低于最大耐受剂量的剂量授予 TNP-470 且以 170mg/kg 的剂量授予环磷酰胺（同上）。此治疗摄生法使得肿瘤完全消退（同上）。事实上，抗血管生成治疗在与其它抗癌治疗剂，例如直接抑制肿瘤生长的彼等药剂（例如，化学治疗剂）协同授予时最为有效（同上）。

[0094] 本文中所述的治疗方法包含将 PLVAP 拮抗剂授予个体。可将 PLVAP 拮抗剂以如下方式授予有需要的个体：作为基本疗法（例如，作为疗法或治疗摄生法中的主要治疗剂）；作为辅佐疗法（例如，作为在疗法或治疗摄生法中与另一治疗剂一起使用的治疗剂，其中治疗剂的组合提供所需治疗；「辅佐疗法」还称为「附属疗法」）；与辅佐疗法组合；作为辅助疗法（例如，作为在已给与疗法或治疗摄生法中的主要治疗剂后给与有需要的个体的治疗剂）；或与辅助疗法（例如，化学疗法（例如，他莫昔芬 (tamoxifen)、顺铂 (cisplatin)、丝裂霉素 (mitomycin)、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil)、阿霉素 (doxorubicin)、索拉非尼 (sorafenib)、奥曲肽 (octreotide)、达卡巴嗪 (dacarbazine, DTIC)、顺铂 (Cis-platinum)、西咪替丁 (cimetidine)、环磷酰胺)、放射疗法（例如，质子束疗法)、激素疗法（例如，抗雌激素疗法、雄激素去除疗法 (androgen deprivation therapy, ADT)、促黄体素释放激素 (LH-RH) 促效剂、芳香酶抑制剂 (AI, 诸如安美达锭 (anastrozole)、依西

美坦 (exemestane)、雷曲唑 (letrozole))、雌激素受体调节剂 (例如, 他莫昔芬、雷洛昔芬 (raloxifene)、托瑞米芬 (toremifene))) 或生物疗法) 组合。在癌症治疗摄生法期间还可授予多种其它疗法以减轻疾病作用及 / 或癌症治疗的副作用, 其包括管理以下症状的疗法: 疼痛 (麻醉药、针灸)、胃不适 (抗酸剂)、头昏 (抗眩晕药物)、恶心 (抗恶心药物)、感染 (例如, 增加红 / 白血球计数的药物) 及其类似症状, 所有这些疗法均可易于由熟习此项技术的人来识别。

[0095] 因此, PLVAP 拮抗剂可作为辅助疗法 (例如, 与另一基本癌症疗法或治疗一起) 授予。作为辅助疗法, PLVAP 拮抗剂可在如放射及 / 或手术移除肿瘤的基本疗法之前、之后或并行授予。在一些具体实施方式中, 方法包含授予治疗有效量的 PLVAP 拮抗剂及一或多种其它疗法 (例如, 辅助疗法、其它靶向疗法)。辅助疗法 (例如, 化学治疗剂) 及 / 或一或多种其它靶向 HCC 疗法与 PLVAP 拮抗剂可以独立调配物的形式或以联合调配物的形式同时 (例如, 并行地) 共授予。或者, 这些疗法可以独立组成物的形式在如由熟习此项技术的临床医师所判定 (例如, 足以允许这些疗法的医药作用重迭的时间) 的适当时间范围 (例如, 诸如 1.5 至 5 小时的癌症治疗时段 / 时间间隔) 内相继授予。辅助疗法及 / 或一或多种其它靶向 HCC 疗法与 PLVAP 拮抗剂可以适于达成所需治疗作用 (例如, 抑制肿瘤生长、抑制血管生成及 / 或抑制癌症转移) 的顺序及时程以单剂或分多剂授予。

[0096] 可以单剂或分多剂授予一或多种为 PLVAP 拮抗剂的药剂。合适的给药及授予摄生法可由临床医师判定且取决于所选药剂、医药调配物及授予途径、各种患者因素及其它考虑因素。关于 PLVAP 拮抗剂与一或多种其它疗法或治疗 (辅助、靶向、癌症治疗相关及其类似疗法) 一起的授予, 典型地以单剂形式 (例如, 通过注射、输注、经口) 授予 PLVAP 拮抗剂, 随后必要时或视病情以特定时间间隔 (例如, 一或多个小时) 重复给药。

[0097] PLVAP 拮抗剂的授予量 (例如, 治疗有效量) 可由临床医师使用本文中所提供的指南及此项技术中已知的其它方法来判定且取决于数种因素, 包括 (例如) 所选特定药剂、患者的年龄、敏感性、药物耐受性及整体健康状况。举例而言, 小分子的合适剂量可为每次治疗每公斤体重约 0.001mg 至约 100mg、约 0.01mg 至约 100mg、约 0.01mg 至约 10mg、约 0.01mg 至约 1mg。抗体的合适剂量可为每次治疗每公斤体重约 0.01mg 至约 300mg, 且较佳为每次治疗每公斤体重约 0.01mg 至约 100mg、约 0.01mg 至约 10mg、约 1mg 至约 10mg。在 PLVAP 拮抗剂为多肽 (线性、环状、仿真物) 的情况下, 较佳剂量会产生约 0.1 μ g/mL 至约 200 μ g/mL 的肽血浆浓度。判定用于特定药剂、患者及癌症的剂量完全在一般技术者的能力范围内。较佳地, 剂量不引起或产生最小不良副作用 (例如, 免疫原性反应、恶心、头昏、嘈杂 (gastric upset)、高血黏度症候群、充血性心脏衰竭、中风、肺水肿)。

[0098] 授予方法

[0099] 根据本发明的方法, 向哺乳动物个体授予治疗有效量的 PLVAP 拮抗剂 (例如, 抗体, 诸如经放射性同位素标记的抗体) 以治疗 HCC。

[0100] 视药剂及所欲治疗的特定癌症而定, 可使用多种授予途径, 包括 (例如) 经口、膳食、局部、经皮、直肠、非经肠 (例如, 动脉内、静脉内、肌肉内、皮下注射、皮内注射)、静脉内输注及吸入 (例如, 支气管内、鼻内或经口吸入、鼻内滴剂) 授予途径。授予可视病情为局部或全身性授予。较佳授予模式 可视所选特定药剂而变化; 然而, 对于授予本发明的治疗剂 (例如, 抗体, 诸如经放射性同位素标记的抗体) 以治疗肝细胞癌而言, 动脉内授予 (例

如,肝动脉输注、经动脉化学栓塞(TACE))通常较佳。

[0101] 举例而言,(例如)在HCC的常规TACE治疗期间,可使用肝动脉输注将化学治疗剂(例如,PLVAP抗体,诸如经放射性同位素标记的PLVAP抗体)经由肝动脉直接递送至HCC肿瘤(Camma等人,Radiology 224:47-54,2002;Befeler等人,Clinics in Liver Disease 9:287-300,2005;Abou-Alfa JAMA299:1716-1718,2008)。此程序借助于荧光透视(x射线类型)成像来进行。简言之,将导管插入腹股沟中的股动脉中且穿入大动脉。自大动脉,使导管前进至肝动脉或其分枝。当鉴别出供给肝癌的肝动脉分枝后,即可经输注实施化学疗法。经常进行此程序的介入放射医师可判定每一治疗期患者接受的化学疗法的量。一些患者可经历6至12周时间间隔的重复治疗期。在6至12周内重复肝脏的成像研究以评估肿瘤尺寸对治疗的反应。

[0102] 或者,可使用经动脉化学栓塞(一种类似于动脉内输注的程序)将PLVAP拮抗剂(例如,抗体)投予有需要的个体。在TACE中,将治疗剂的动脉内输注与用特定阻断化合物(诸如凝胶发泡体、油乳液或甚至小金属线圈)阻断(亦即,栓塞)小血管的额外步骤组合。因此,TACE具有使肿瘤暴露于高浓度化学疗法且局部限制药剂以防止或减少其被血流带走的潜在优点。同时,TACE剥夺肿瘤所需的血液供应,此可使得肿瘤细胞损伤或死亡。

[0103] 对于PLVAP抗体的动脉内投予而言,较佳使用对PLVAP具有高亲和力的抗体(例如, K_d 小于 10^{-7} M)以便使所输注的抗体会集中于HCC的血管中。预期嵌合及人化抗体分别具有至多4天及至多14-21天的循环半衰期。在一特定具体实施方式中,将具有短循环半衰期(例如,约1天至约5天,例如约1、2、3、4或5天)的高亲和力PLVAP抗体(例如,抗原结合片段、单链抗体)投予患者以降低由其投予所产生的任何毒性及其它不良副作用。在另一具体实施方式中,将具有长循环半衰期(例如,约5天至约24天)的高亲和力PLVAP抗体投予患者以治疗HCC。

[0104] 在许多情况下,较佳在治疗期内先投予大负荷剂量,随后为定期(例如,每周)维持剂量。还可通过缓释递送系统、泵及用于向HCC连续输注的其它已知递送系统来递送抗体。给药摄生法可基于特定抗体的药物动力学而改变以提供其所需循环含量。因此,会计算剂量以使所需治疗含量得以维持。

[0105] 实际剂量及治疗摄生法会由医师考虑癌症性质(原发或转移)、肿瘤数量及尺寸、其它疗法及患者特征来判定。鉴于肝细胞癌危及生命的性质,可使用具有显著副作用的大剂量。

[0106] 可将基于核酸的PLVAP拮抗剂(例如,siRNA、反义寡核苷酸、天然或合成核酸、核酸类似物)以多种方式引入所关注的哺乳动物个体体内。举例而言,可使核酸在宿主细胞中自表现载体或PCR产物内源性表现或将其封装于合成或经工程化组成物(例如,脂质体、聚合物、奈米颗粒)中,接着可将这些组成物(例如,通过注射、输注)直接引入哺乳动物个体的血流中。还可将抗PLVAP核酸或核酸表现载体(例如,逆转录病毒、腺病毒、腺相关及单纯疱疹病毒载体、经工程化载体、非病毒介导的载体)使用既定基因疗法策略及方案直接引入哺乳动物个体体内(例如,参见Tochilin V.P. Annu Rev Biomed Eng 8:343-375,2006; Recombinant DNA and Gene Transfer, Office of Biotechnology Activities, National Institutes of Health Guidelines)。

[0107] 类似地,在药剂为蛋白质或多肽的情况下,可将药剂经由重组蛋白的活体内表

现来授予。活体内表现可根据合适方法通过体细胞表现来实现（例如，参见美国专利第 5,399,346 号）。此外，还可将编码多肽的核酸并入逆转录病毒、腺病毒或其它合适载体（较佳为复制缺陷型感染性载体）中以供递送，或可将其引入能够表现该多肽的经转染或经转型宿主细胞中以供递送。在后一具体实施方式中，可将细胞以有效表现治疗有效量的多肽的量植入（单独或于障壁装置中）、注入或以其它方式引入。

[0108] 诊断及预测方法

[0109] 本发明涵盖诊断及预测方法，其包含评估来自哺乳动物个体（例如，患有肝肿瘤的哺乳动物个体）的样本（例如，肝活检、细针抽吸样本）中 PLVAP 的表现。对于本发明的诊断方法而言，样本中 PLVAP 的表现，或相对于合适对照样本中 PLVAP 的表现增加，表明个体患有 HCC，及 / 或个体为使用 PLVAP 拮抗剂的抗癌疗法的候选者。

[0110] 对于本发明的预测方法而言，来自个体的样本中 PLVAP 的表现，或相对于合适对照样本中 PLVAP 的表现增加表明不良预后。预后可为患者存活的预后、转移风险的预后及 / 或复发风险的预后。

[0111] 用于此等方法的合适样本包括组织样本、生物流体样本、细胞（例如，肿瘤细胞）样本及其类似物。可使用任何自个体采样的方法来获得样本，例如通过抽血、脊髓穿刺、组织涂片或刮片，或组织活检。因此，样本可为活检标本（例如，肿瘤、息肉、肿块（实体、细胞））、抽吸物、涂片或血液样本。样本可为来自具有肿瘤（例如，癌性生长）及 / 或肿瘤细胞，或疑似具有肿瘤及 / 或肿瘤细胞的肝脏的组织。举例而言，可在开放式活检中获得肿瘤活检物，开放式活检为一种自靶区域移除全部（切除活检）或部分（切口活检）肿块的程序。或者，可经由经皮活检获得肿瘤样本，经皮活检为一种使用针样仪器经小切口或穿刺（藉助于或不藉助于成像装置）来执行以获得个别细胞或细胞簇（例如，细针抽吸（FNA））或组织核心或片段（穿刺活检）的程序。可以细胞学方法（例如，涂片）、组织学方法（例如，冷冻或石蜡切片）或使用任何其它合适方法（例如，分子诊断方法）来检查活检样本。肿瘤样本还可通过试管内采集来源于个体组织的经培养人类细胞来获得。必要时，可在分析前将肿瘤样本通过在可分析条件下保存样本的蛋白质及 / 或核酸的合适储存方法，诸如快速冷冻或受控冷冻摄生法来储存。必要时，冷冻可在防冻剂（例如，二甲亚砜（DMSO）、甘油或丙二醇 - 蔗糖）存在下执行。适当时，出于分析的目的可在储存之前或之后汇集肿瘤样本。肿瘤样本可来自患有肝癌（例如，肝细胞癌）的患者。

[0112] 可用于评估样本（例如，生物样本）中 PLVAP 的存在或量的合适检定为熟悉此项技术的人所已知。侦测 PLVAP 蛋白或肽的方法包括免疫及免疫化学方法，如流式细胞术（例如，FACS 分析）、酵素结合免疫吸附分析法（ELISA），包括化学发光检定、放射免疫检定、免疫墨渍法（immunoblot）（例如，西方墨渍法（Western blot））、免疫组织化学（IHC）及其它基于抗体的定量方法（例如，基于 **Luminex**[®] 珠粒的检定）。其它合适方法包括（例如）质谱分析。举例而言，可使用针对 PLVAP 的抗体使用（例如）免疫组织化学（IHC）来直接地或间接地测定样本中 PLVAP 的存在及 / 或表现量。举例而言，可通过合适方法自活检物获取石蜡切片，将其固定至载片且与一或多种抗体组合。在一特定具体实施方式中，在样本中肝细胞周围的血管内皮细胞中侦测到 PLVAP 蛋白表明 HCC。

[0113] 侦测 PLVAP 基因表现的方法包括 PLVAP 核酸扩增及 / 或可视化。为侦测 PLVAP 基因表现，可通过此项技术中常规的合适方法（例如，参见 Sambrook 等人，1989）自个体分离

核酸。接着可将经分离核酸扩增（例如，通过聚合酶连锁反应（PCR）（例如，直接 PCR、定量实时 PCR、逆转录酶 PCR）、连接酶链反应、自主序列复制、转录扩增系统、Q- β 复制酶或其类似方法）且可视化（例如，通过在扩增期间标记核酸、暴露于插入化合物 / 染料、探针）。还可使用核酸探针，例如经标记核酸探针（例如，荧光原位杂交（FISH））直接在取自（例如）肿瘤活检物的组织样本的石蜡切片中，或使用其它合适方法来侦测 PLVAP RNA（例如，mRNA）或其表现。还可通过南方墨渍法（Southern blot）或在溶液中（例如，染料、探针）来评估其 PLVAP 基因表现。此外，可使用基因芯片、微数组、探针（例如，量子点）或其它此类装置（例如，传感器、奈米传感器 / 侦测器）来侦测 PLVAP 基因的表现及 / 或差异性表现。

[0114] 在一具体实施方式中，可通过侦测来自患者的样本中 PLVAP 基因产物（例如，PLVAP mRNA、PLVAP 蛋白）的表现来诊断肝细胞癌。因此，该方法不需要将来自患者的样本中的 PLVAP 表现与对照中的 PLVAP 表现作比较。存在或不存在 PLVAP 可通过本文中所述的方法或其它合适检定来确定。在另一具体实施方式中，可通过将样本中的 PLVAP 表现与合适对照的 PLVAP 表现作比较来测定 PLVAP 表现的增加。合适对照包括（例如）来自个体的非瘤组织样本、非癌细胞、非转移癌细胞、非恶性（良性）细胞或其类似物，或合适的已知或经确定参考标准。参考标准可为 PLVAP 蛋白或 RNA 的表现的典型、正常或经标准化范围或量（例如，表现标准）。因此，该方法不需要评估合适对照中的基因 / 蛋白质表现。

[0115] 在另一具体实施方式中，可通过侦测来自患者的样本中的 PLVAP 基因复本数来诊断肝细胞癌。举例而言，在一些具体实施方式中，大于 2 的 PLVAP 基因复本数（例如，基因复本数为 3 或 4）可诊断为患 HCC。典型地，正常人类细胞的 PLVAP 基因复本数会是 2。因此，基于 PLVAP 基因复本数的诊断方法不需要侦测来自患者的对照样本中的 PLVAP 基因复本数，但可使用对照。合适对照包括（例如）来自个体的非瘤组织样本、非癌细胞、非转移癌细胞、非恶性（良性）细胞或其类似物，或合适的已知或经确定参考标准（例如，PLVAP 基因复本数 2）。可通过合适技术（诸如荧光原位杂交（FISH））来确定来自患者的样本中的 PLVAP 基因复本数。

[0116] PLVAP 抗体

[0117] 如本文中所述，结合 PLVAP 的抗体具有诊断及治疗人类个体的 HCC 的效用。举例而言，可使用特异性结合 PLVAP 的抗体通过免疫组织化学染色（IHC）来侦测肝穿刺活检物或针抽吸物标本中肝细胞癌的毛细管内皮细胞上 PLVAP 的存在。另外，针对 PLVAP 的抗体（例如，人化抗体、嵌合抗体）可经用于免疫正电子发射断层摄影术（免疫 PET）（Clin Cancer Res 12:1958-1960, 2006; Clin Cancer Res 12:2133-2140, 2006）的适当示踪剂（例如，放射性同位素）标记以测定个体肝脏中的占位病变（space occupying lesion）是否为肝细胞癌。抗 PLVAP 抗体（例如，人化抗体）还可经用于治疗目的的细胞毒性剂（放射性或非放射性）标记（Weiner LM, Adams GP, Von Mehren M. Therapeutic monoclonal antibodies: General principles. 于 Cancer: Principles & Practice of Oncology. 第 6 版 DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA 编, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001: 495-508 中; Levinson W, Jawetz E. Medical Microbiology & Immunology. 第 4 版 Stamford: Appleton & Lange; 1996: 307-47; Scheinberg DA, Sgouros G, Junghans RP. Antibody-based immunotherapies for cancer. 于 Cancer Chemotherapy & Biotherapy: Principles and Practice. 第 3 版 Chabner BA, Longo DL 编, Philadelphia:

Lippincott Williams & Wilkins;2001:850-82 中)。

[0118] 因此,在一具体实施方式中,本发明提供一种结合(例如,特异性结合)PLVAP 蛋白(例如,人类 PLVAP 蛋白(SEQ ID NO:23))的抗体。特异性结合 PLVAP 蛋白的抗体尤其可为多株、单株、人类、嵌合、人化、灵长类化、镶饰及单链抗体,以及抗体片段(例如,Fv、Fc、Fd、Fab、Fab'、F(ab')、scFv、scFab、dAb)。(例如参见 Harlow 等人, *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。特异性结合 PLVAP 蛋白的抗体可通过熟知的方法或其它合适技术来产生、建构、工程化及/或分离。举例而言,可对抗适当免疫原,诸如重组哺乳动物(例如,人类)PLVAP 蛋白(例如,SEQ ID NO:23)或其部分(例如,SEQ ID NO:2)(包括合成分子,例如合成肽)产生对 PLVAP 蛋白具特异性的抗体。已描述多种此类免疫方法(例如,参见 Kohler 等人, *Nature*, 256:495-497(1975) 及 *Eur. J. Immunol.* 6:511-519(1976); Milstein 等人, *Nature* 266:550-552(1977); Koprowski 等人, 美国专利第 4,172,124 号; Harlow, E. 及 D. Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY); *Current Protocols In Molecular Biology*, 第 2 卷(第 27 号增刊, 94 年夏季), Ausubel, F. M. 等人编, (John Wiley & Sons: New York, NY), 第 11 章, (1991))。还可通过用表现 PLVAP 的细胞(例如,癌细胞/细胞株)或经工程化以表现 PLVAP 的细胞(例如,经转染细胞)免疫合适宿主(例如,小鼠)来产生抗体。(例如参见 Chuntharapai 等人, *J. Immunol.*, 152:1783-1789(1994); Chuntharapai 等人, 美国专利第 5,440,021 号)。

[0119] 在免疫后的适当时间,例如当抗体效价最高时,可自经免疫动物获得产生抗体的细胞且用以通过标准技术来制备单株抗体,这些技术诸如最初由 Kohler 及 Milstein 描述的融合瘤技术(*Nature* 256:495-497, 1975)、人类 B 细胞融合瘤技术(Kozbor 等人, *Immunol. Today* 4:72, 1983)、EBV-融合瘤技术(Cole 等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 第 77-96 页, 1985)或三瘤(trioma)技术。产生融合瘤的技术为熟知的(一般参见 *Current Protocols in Immunology*, Coligan 等人, (编) John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1994)。简言之,使永生细胞株(典型地为骨髓瘤)与来自经如上文所述的免疫原免疫的哺乳动物的淋巴细胞(典型地为脾细胞)融合,且筛选所得融合瘤细胞的培养物上清液以鉴别产生结合本文中所述的多肽的单株抗体的融合瘤。

[0120] 许多用于融合淋巴细胞与永生化细胞株的熟知方案中的任一种均可用于产生针对本发明多肽的单株抗体的目的(例如,参见 *Current Protocols in Immunology*, 前述; Galfre 等人, *Nature*, 266:550-552, 1977; R. H. Kenneth, *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York, 1980; 及 Lerner, *Yale J. Biol. Med.* 54:387-402, 1981)。此外,一般技术人员应了解存在许多还适用的这些方法的变体。

[0121] 在制备分泌单株抗体的融合瘤的一替代方法中,可通过用标靶多肽筛选重组免疫球蛋白文库(例如,抗体噬菌体呈现文库)以藉此分离结合该多肽的免疫球蛋白文库成员来鉴别及分离针对 PLVAP 蛋白的单株抗体。用于产生及筛选噬菌体呈现文库的套组可购得(例如,Pharmacia 重组噬菌体抗体系统,目录号 27-9400-01; 及 Stratagene SurfZAP™ 噬菌体呈现套组,目录号 240612)。另外,特别适用于产生及筛选抗体呈现文库的方法及试

剂的实例可见于(例如)美国专利第 5,223,409 号、PCT 公开案第 WO 92/18619 号、PCT 公开案第 WO91/17271 号、PCT 公开案第 WO 92/20791 号、PCT 公开案第 WO 92/15679 号、PCT 公开案第 WO 93/01288 号、PCT 公开案第 WO 92/01047 号、PCT 公开案第 WO 92/09690 号、PCT 公开案第 WO 90/02809 号;Fuchs 等人, *Bio/Technology* 9:1370-1372, 1991; Hay 等人, *Hum. Antibodies Hybridomas* 3:81-85, 1992; Huse 等人, *Science* 246:1275-1281, 1989; 及 Griffiths 等人, *EMBO J.* 12:725-734, 1993 中。

[0122] 抗体片段(例如, 抗原结合片段)可通过酶促裂解或通过重组技术来产生。举例而言, 木瓜蛋白酶或胃蛋白酶裂解分别可产生 Fab 或 $F(ab')_2$ 片段。还可使用其它具有必需受质特异性的蛋白酶来产生 Fab 或 $F(ab')_2$ 片段。

[0123] 还可使用已在天然终止位点上游引入一或多个终止密码子的抗体基因产生多种截短形式的抗体。举例而言, 编码 $F(ab')_2$ 重链部分的嵌合基因可经设计而包括编码重链的 CH_1 域及铰链区的 DNA 序列。

[0124] 本发明及术语「抗体」还涵盖包含来源于不同物种的部分的单链、人类、嵌合、人化、灵长类化(CDR 接枝)或镶饰抗体。此等抗体的各种部分可通过熟知的技术以化学方式接合在一起, 或可使用遗传工程化技术以相接蛋白(contiguous protein)的形式制备。举例而言, 编码嵌合或人化链的核酸可经表现而产生相接蛋白。例如参见 Cabilly 等人, 美国专利第 4,816,567 号; Cabilly 等人, 欧洲专利第 0,125,023B1 号; Boss 等人, 美国专利第 4,816,397 号; Boss 等人, 欧洲专利第 0,120,694B1 号; Neuberger, M. S. 等人, WO 86/01533; Neuberger, M. S. 等人, 欧洲专利第 0,194,276B1 号; Winter, 美国专利第 5,225,539 号; Winter, 欧洲专利第 0,239,400B1 号; Queen 等人, 欧洲专利第 0 451 216 B1 号; 及 Padlan, E. A. 等人, EP 0 519 596A1。关于灵长类化抗体, 还参见 Newman, R. 等人, *BioTechnology*, 10:1455-1460(1992), 且关于单链抗体还参见 Ladner 等人, 美国专利第 4,946,778 号及 Bird, R. E. 等人, *Science*, 242:423-426(1988)。

[0125] 在一特定具体实施方式中, 本发明关于特异性结合 PLVAP(例如, 包含 SEQ ID NO: 23 的人类 PLVAP 蛋白)的嵌合抗体。在一具体实施方式中, 本发明的嵌合抗体包含人类 IgG4 的至少一条重链及至少一条轻链(例如, κ 轻链)。

[0126] 在另一具体实施方式中, 本发明关于特异性结合 PLVAP(例如, 包含 SEQ ID NO: 23 的人类 PLVAP 蛋白)的人化抗体。人化抗体可使用合成或重组 DNA 技术使用标准方法或其它合适技术来产生。还可使用 PCR 突变诱发方法改变编码人类或人化链的 DNA 序列(诸如来自预先经人化可变区的 DNA 模板)来建构编码人化可变区的核酸(例如, cDNA)序列(例如, 参见 Kamman, M. 等人, *Nucl. Acids Res.*, 17:5404(1989); Sato, K 等人, *Cancer Research*, 53:851-856(1993); Daugherty, B. L. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 19(9):2471-2476(1991); 及 Lewis, A. P. 及 J. S. Crowe, *Gene*, 101:297-302(1991))。还可简便地使用此等或其它合适方法产生变异体。在一具体实施方式中, 可使经选殖可变区(例如, dAb)突变, 且可(例如, 自噬菌体文库)选择编码具有所需特异性的变异体的序列(例如, 参见 Krebber 等人, U. S. 5,514,548; Hoogenboom 等人, WO 93/06213, 公开于 1993 年 4 月 1 日)。人化抗体还可由商业来源(例如, 包括 Antitope Limited(Cambridge, UK))产生及/或自其获得。

[0127] 可使用产生或分离具有必需特异性的抗体的其它合适方法, 包括(例如)自文库

(例如,噬菌体呈现文库)选择重组抗体或抗体结合片段(例如,dAb)的方法或依赖于转殖基因动物(例如,小鼠)免疫的方法。能够产生人类抗体谱的转殖基因动物为此项技术中所熟知(例如,**Xenomouse**[®](Abgenix,Fremont,CA))且可使用合适方法产生(例如,参见 Jakobovits 等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551-2555(1993);Jakobovits 等人,Nature,362:255-258(1993);Lonberg 等人,美国专利第 5,545,806 号;Surani 等人,美国专利第 5,545,807 号;Lonberg 等人,WO 97/13852)。

[0128] 抗体产生后,即可容易地使用此项技术中熟知的筛选及分离特异性抗体的方法来鉴别对 PLVAP 具特异性的抗体。例如参见 Paul(编),Fundamental Immunology, Raven Press,1993;Getzoff 等人,Adv.in Immunol.43:1-98,1988;Goding(编),Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,Academic Press Ltd.,1996;Benjamin 等人,Ann.Rev.Immunol.2:67-101,1984。可使用多种检定来侦测特异性结合 PLVAP 蛋白的抗体。例示性检定详细描述于 Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow 及 Lane(编),Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988 中。这些检定的代表性实例包括:并行免疫电泳、放射免疫检定、放射免疫沉淀、酵素结合免疫吸附分析法(ELISA)、点渍墨渍或西方墨渍检定、抑制或竞争检定及夹心检定。

[0129] 在某些具体实施方式中,本发明的抗体对 PLVAP 具有高结合亲和力。这些抗体较佳会对 PLVAP 具有以 K_d 表示至少约 10^{-7} M(例如,约 0.4×10^{-7} M、约 0.6×10^{-7} M 或更高,例如至少约 10^{-8} M、至少约 10^{-9} M 或至少约 10^{-10} M) 的亲和力(例如,结合亲和力)。抗体的结合亲和力可易于由一般技术人员(例如)通过斯卡查德分析(Scatchard analysis)(Scatchard, G.,Ann.NY Acad.Sci.51:660-672,1949)来测定。结合亲和力还可使用可购得的生物感测仪器(BIACORE,Pharmacia Biosensor,Piscataway,N.J.)来测定,其中将蛋白质固定于受体芯片的表面。参见 Karlsson, J. Immunol.Methods 145:229-240,1991 及 Cunningham 及 Wells, J. Mol. Biol. 234:554-563,1993。此系统允许测定结合及解离速率(可自其计算结合亲和力)及评估结合的化学计量。

[0130] 本发明的抗体可包括标记,诸如允许侦测生物样本中的抗体及抗体所结合的蛋白质(例如,PLVAP)的可侦测标记。可侦测标记尤其适用于诊断应用。举例而言,PLVAP 抗体可经放射性同位素标记,放射性同位素可由熟习此项技术人员使用 γ 计数器、闪烁计数器或通过自动放射摄影术或其它合适方法来侦测。对于本发明而言适用的同位素包括(但不限于):³H、¹²⁵I、¹³¹I、³²P、³⁵S、¹⁴C、⁵¹Cr、³⁶Cl、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe 及 ⁷⁵Se。

[0131] 本发明的抗体还可经荧光化合物(例如,染料)标记。当使经荧光标记的抗体曝露于适当波长的光时,则可因化合物的荧光而侦测到其存在。最常用的荧光标记有异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate)、若丹明(rhodamine)、藻红蛋白(phycoerytherin)、藻青蛋白(phycocyanin)、别藻青蛋白(allophycocyanin)、邻苯二甲醛(o-phthaldehyde)及荧光胺(fluorescamine)。本发明的抗体还可使用荧光发射金属(诸如 ¹⁵²Eu)或其它镧系元素来标记。可将此等金属使用诸如二伸乙三胺五乙酸(DTPA)、四氮杂-环十二烷-四乙酸(DOTA)或乙二胺四乙酸(EDTA)的金属螯合基团连接至抗体分子。

[0132] 还可将本发明的抗体与化学发光化合物偶合。适用化学发光标记化合物的实例为发光胺(luminol)、异发光胺(isoluminol)、芳族吖啶酯、咪唑、吖啶盐及草酸酯。

[0133] 同样,可使用生物发光化合物来标记本发明的抗体。生物发光为一种可见于生物系统中的化学发光类型,其中催化蛋白增加该化学发光反应的效率。生物发光蛋白的存在可通过侦测存在发光来测定。适用于标记抗体的目的的生物发光化合物为虫荧光素(luciferin)、荧光素酶(luciferase)及水母发光蛋白(aequorin)。

[0134] 侦测经标记抗体可通过闪烁计数器(例如,若可侦测标记为放射性 γ 发射体)或通过荧光计(例如,若标记为荧光材料)来完成。在酶标记的情况下,侦测可通过使用酶受质的比色法来完成。侦测还可通过相对于类似制备的标准物视觉比较受质的酶促反应程度来完成。

[0135] 因此,本发明的抗体还可用作组织切片的染色剂。举例而言,可使与PLVAP结合的经标记抗体与组织样本(例如,来自患者的肝组织活检物或细针抽吸物)接触。接着可洗涤此切片且使用适当方法侦测标记。

[0136] 出于治疗HCC的目的,本发明的PLVAP抗体可包括增强破坏表现PLVAP的细胞(例如,HCC细胞周围的血管内皮细胞)的放射性标记或其它治疗剂。适用于HCC疗法的放射性同位素标记的实例包括(但不限于) ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{217}Bi 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{47}Sc 、 ^{109}Pd 、 ^{111}In 及 ^{118}Re 。视情况,可使用经中子辐射轰击后发射 α 及 β 粒子的标记(诸如硼)作为治疗性PLVAP抗体的标记。

[0137] 治疗性抗体还可包括能够选择性杀死表现PLVAP的细胞的细胞毒性剂。举例而言,可使用细菌毒素(诸如白喉毒素(diphtheria toxin))或蓖麻毒素(ricin)。用于产生包含白喉毒素的片段A的抗体的方法教示于美国专利第4,675,382号(1987)中。白喉毒素含有两条多肽链。B链使毒素结合至细胞表面上的受体。A链实际进入细胞质且通过使延长因子2(伴随ETP水解使核糖体沿mRNA易位的因子)失活来抑制蛋白质合成。参见Darnell,J.等人,Molecular Cell Biology,Scientific American Books,Inc.,第662页(1986)。或者,可制备包含蓖麻毒素(一种毒性凝集素)的抗体。其它合适细胞毒性剂为熟习此项技术的人所已知。

[0138] 对于活体内侦测而言,可将本发明的PLVAP抗体直接或通过使用中间官能基与放射性核素接合。常用于将放射性同位素(以金属阳离子的形式存在)与抗体结合的中间基团为二伸乙三胺五乙酸(DTPA)或四氮杂-环十二烷-四乙酸(DOTA)。以此方式结合的金属阳离子的典型实例为 ^{99}Tc 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{131}I 、 ^{97}Ru 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 及 ^{68}Ga 。

[0139] 此外,本发明的抗体可经包括顺磁性原子的NMR成像剂标记。使用NMR成像剂允许使用NMR技术活体内诊断患者中HCC的存在及程度。尤其适于以此方式使用的元素为 ^{157}Gd 、 ^{55}Mn 、 ^{162}Dy 、 ^{52}Cr 及 ^{56}Fe 。

[0140] 在一个具体实施方式中,本发明是关于由融合瘤KFCC-GY4(ATCC编号_____)所制造的PLVAP抗体,该融合瘤已以于_____寄存在美国,维吉尼亚州20108,马纳沙斯,邮政信箱1549,美国菌种保存中心(ATCC)。在另一个具体实施方式中,本发明提供由融合瘤KFCC-GY5(ATCC编号_____)所制造的PLVAP抗体,该融合瘤已于_____寄存在美国,维吉尼亚州20108,马纳沙斯,邮政信箱1549,美国菌种保存中心(ATCC)。

[0141] 在另一个具体实施方式中,本发明是关于融合瘤KFCC-GY4(ATCC编号_____)。在另外的具体实施方式中,本发明提供融合瘤KFCC-GY5(ATCC编号_____)。

[0142] PLVAP拮抗剂

[0143] 本发明的 PLVAP 拮抗剂可为抑制（例如，降低、阻止）PLVAP 基因产物的活性的任何药剂。PLVAP 活性包括（但不限于）HCC 肿瘤的形成、生长、血管形成或进展。在一特定具体实施方式中，PLVAP 拮抗剂通过与 PLVAP 基因产物（例如 PLVAP RNA、PLVAP 蛋白）特异性结合来抑制 PLVAP 基因产物的活性。PLVAP 拮抗剂还涵盖抑制（降低、减少、阻止）PLVAP 基因或基因产物（例如，PLVAP RNA、PLVAP 蛋白）的表现（例如，转录、mRNA 加工、转译）的药剂。PLVAP 拮抗剂尤其可为抗体、小分子、肽、肽模拟物或核酸。

[0144] 抗体拮抗剂

[0145] 本发明的 PLVAP 拮抗剂可为特异性结合 PLVAP 蛋白的抗体。这些抗体包括（但不限于）本文中所述的 PLVAP 特异性抗体中的任一种。

[0146] 小分子抗体

[0147] PLVAP 拮抗剂还可为小分子。小分子的实例包括有机化合物、有机金属化合物、无机化合物及有机、有机金属或无机化合物的盐。小分子中的原子典型地经由共价键及/或离子键连接在一起。小有机分子中的原子排列可表现为链（例如，碳-碳链或碳-杂原子链），或可表现为含有碳原子的环（例如，苯或多环系统）或含有碳与杂原子的组合的环（亦即杂环，诸如嘧啶或喹唑啉）。尽管小分子可具有任何分子量，但其通常包括小于约 5,000 道尔顿 (dalton) 的分子。举例而言，这些小分子可小于约 1000 道尔顿，且更佳小于约 750 道尔顿，或更佳小于约 500 道尔顿。小分子及其它非肽 PLVAP 拮抗剂可存在于自然界（例如，鉴别、分离、纯化）及/或合成产生（例如，通过传统的有机合成、生物介导的合成或其组合）。例如参见 Ganesan, Drug Discov. Today 7(1):47-55 (2002 年 1 月)；Lou, Drug Discov. Today, 6(24):1288-1294 (2001 年 12 月)。天然存在的小分子的实例包括（但不限于）激素、神经递送素、核苷酸、氨基酸、糖、脂质及其衍生物。

[0148] 肽拮抗剂

[0149] 本发明的 PLVAP 拮抗剂还可为与 PLVAP 蛋白结合的肽。肽可包含任何适合的 L- 及/或 D- 氨基酸，例如常见 α - 氨基酸（例如，丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸）、非 α - 氨基酸（例如， β - 丙氨酸、4- 氨基丁酸、6- 氨基己酸、肌氨酸、斯他氨酸 (statine)）及不常见氨基酸（例如，瓜氨酸、高瓜氨酸、高丝氨酸、正白氨酸、正缬氨酸、鸟氨酸）。肽上的氨基、羧基及/或其它官能基可为游离的（例如，未经修饰）或经合适保护基保护。适用于氨基及羧基的保护基及适用于添加或移除保护基的方法为此项技术中所已知且揭示于（例如）Green 及 Wuts, [Protecting Groups in Organic Synthesis], John Wiley and Sons, 1991 中。还可使用此项技术中已知的方法将肽的官能基衍生化（例如，烷基化）。

[0150] 肽 PLVAP 拮抗剂可视需要包含一或多个修饰（例如，氨基酸连接子、酰化、乙酰化、酰胺化、甲基化、末端修饰子（例如，环化修饰））。肽还可含有化学修饰（例如，N- 甲基- α - 氨基取代）。另外，肽拮抗剂可为已知及/或天然存在的肽的类似物，例如具有保守氨基酸残基取代的肽类似物。此等修饰可改良肽的各种特性（例如，稳定性、结合），包括其 PLVAP 拮抗剂活性。

[0151] 肽 PLVAP 拮抗剂可为线性、分枝或环状分子，例如具有包括数个酰胺键的杂原子环结构的肽。在一特定具体实施方式中，肽为环状肽。这些肽可由熟习此项技术人员使用标准技术制得。举例而言，可通过酶促裂解或化学裂解自天然蛋白质衍生或移除肽，或可通过合适方法，例如固相肽合成（例如，梅里菲尔德 (Merrifield) 型合成）（例如，参见

Bodanszky 等人, [Peptide Synthesis,] John Wiley&Sons, 第 2 版, 1976) 来合成肽。作为 PLVAP 拮抗剂的肽还可 (例如) 使用重组 DNA 方法或其它合适方法制得 (例如, 参见 Sambrook J. 及 Russell D.W., Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第 3 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001)。

[0152] 肽可经合成及组合为包含几种至许多种独立分子种类的文库。这些文库可使用组合化学方法制备, 且可使用任何合适方法筛选以测定该文库是否包含具有所需生物活性的肽。接着可将这些肽拮抗剂使用熟习此项技术人员已知的合适方法分离。

[0153] 肽模拟物拮抗剂

[0154] PLVAP 拮抗剂还可为肽模拟物。举例而言, 可制备具有与肽相同的官能基的多糖。肽模拟物可 (例如) 通过确立肽药剂在其由标靶分子结合或会与标靶分子结合的环境中的三维结构来设计。肽模拟物包含至少两种组份、结合部分及骨架或支撑结构。

[0155] 结合部分为会与标靶分子 (例如, 人类 PLVAP) 反应或形成复合物 (例如, 经由疏水性或离子性相互作用) 的化学原子或基团。举例而言, 肽模拟物中的结合部分可与肽或蛋白质拮抗剂中的结合部分相同。结合部分可为与受体以与肽拮抗剂中的结合部分相同或类似的方式反应的原子或化学基团。举例而言, 可使用计算化学来设计结合 PLVAP 蛋白的肽的肽模拟物。对于肽中的碱性氨基酸而言适用于设计肽模拟物的结合部分的实例包括含氮基团, 诸如胺、铵、胍及酰胺或磷。对于酸性氨基酸而言适用于设计肽模拟物的结合部分的实例包括 (例如) 羧基、低碳烷基羧酸酯、磺酸、低碳烷基磺酸酯或亚磷酸或其酯。

[0156] 支撑结构为当与结合部分结合时提供肽模拟物的三维构型的化学实体。支撑结构可为有机或无机结构。有机支撑结构的实例包括多糖、聚合物或有机合成聚合物 (诸如聚乙烯醇或聚交酯) 的寡聚物。支撑结构较佳地具有与肽骨架或支撑结构大体上相同的大小及尺寸。此可通过计算或量测肽及肽模拟物的原子及键结的大小来测定。在一具体实施方式中, 肽键的氮可经氧或硫取代, 例如形成聚酯骨架。在另一具体实施方式中, 羰基可经磺酰基或亚磺酰基取代, 藉此形成聚酰胺 (例如, 聚磺酰胺)。可制备肽的逆酰胺 (reverse amide) (例如, 用一或多个 -CONH- 基团取代 -NHCO- 基团)。在另一具体实施方式中, 肽骨架可经聚硅烷骨架取代。

[0157] 此等化合物可通过已知方法制造。举例而言, 聚酯肽模拟物可通过以下步骤来制备: 用羟基取代氨基酸上的相应 α -胺基, 藉此制备羟基酸且继而将羟基酸酯化, 视情况阻断碱性及酸性侧链以使副反应最少。测定适当化学合成途径通常可在确定化学结构后容易地鉴别。

[0158] 肽仿真物可经合成及组合为包含几种至许多种独立分子种类的文库。这些文库可使用熟知组合化学方法制备, 且可经筛选以判定该文库是否包含一或多种具有所需活性的肽模拟物。接着可将这些肽模拟物拮抗剂通过合适方法分离。

[0159] 核酸拮抗剂

[0160] PLVAP 拮抗剂还包括抑制 PLVAP 基因表现的各种核酸 (包括核酸分子) (例如, siRNA、反义寡核苷酸、核糖核酸酶)。举例而言, 小干扰核糖核酸 (siRNA) 及类似地在细胞中被加工为短 siRNA 样分子的短发夹型核糖核酸 (shRNA) 可阻止 PLVAP 蛋白的表现 (转译)。siRNA 分子可为长度通常为约 20 至约 25 个核苷酸且经设计以结合特定 RNA 序列 (例如, PLVAP mRNA 序列) 的聚核苷酸。siRNA 以序列特异性方式使基因表现沉默,

与靶 RNA (例如, 具有互补序列的 RNA) 结合且使该 RNA 被核糖核酸内切酶降解。能够抑制 PLVAP 基因产物的表现的 siRNA 分子可通过合适方法制得。存在数种可用于设计结合所关注基因序列的 siRNA 分子的算法 (例如, 参见 Mateeva O. 等人, *Nucleic Acids Res.* 35(8) :Epub, 2007 ;Huesken D. 等人, *Nat. Biotechnol.* 23 :995-1001 ;Jagla B. 等人, *RNA* 11 :864-872, 2005 ;Shabalina S. A. *BMC Bioinformatics* 7 :65, 2005 ;Vert J. P. 等人, *BMC Bioinformatics* 7 :520, 2006)。可获得可稳定表现 siRNA 或 shRNA 的表现载体。(例如参见 Brummelkamp, T. R., *Science* 296 :550-553, 2002 ;Lee, NS 等人, *Nature Biotechnol.* 20 :500-505, 2002 ;Miyagishi, M. 及 Taira, K. *Nature Biotechnol.* 20 :497-500, 2002 ;Paddison, P. J. 等人, *Genes & Dev.* 16 :948-958, 2002 ;Paul, C. P. 等人, *Nature Biotechnol.* 20 :505-508 ;2002 ;Sui, G. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(6) :5515-5520, 2002 ;Yu, J-Y 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(9) :6047-6052, 2002 ;Elbashir, SM 等人, *Nature* 411 :494-498, 2001)。siRNA/shRNA 分子的稳定表现有利于治疗癌症, 因为其使得分子能够长期表现, 从而潜在地降低及 / 或消除重复治疗的需要。

[0161] 反义寡核苷酸 (例如, DNA、核糖核酸探针 (riboprobe)) 还可用作抑制 PLVAP 表现的 PLVAP 拮抗剂。反义寡核苷酸通常为与靶核酸序列 (例如, mRNA) 特异性杂交且诱导靶核酸降解 (例如, 经由 RNase H 依赖性机制降解 RNA) 或空间阻碍拼接或转译机制的进程的短 (约 13 至约 25 个核苷酸) 单链核酸。(例如参见 Dias N. 及 Stein C. A., *Mol. Cell Ther.* 1 :347-355, 2002)。存在多种不同类型的可用作 PLVAP 拮抗剂的反义寡核苷酸, 包括甲基膦酸寡核苷酸、硫代磷酸寡核苷酸、核糖 2' 位处的氢经 O-烷基 (例如, 甲基) 置换的寡核苷酸、聚酰胺核酸 (PNA)、磷酸二胺酸吗啉代寡聚物 (脱氧核糖部分经吗啉环置换)、PN (核糖 3' 位处的氧经胺基团 N3' → P5' 置换) 及嵌合寡核苷酸 (例如, 2' -O-甲基-硫代磷酸酯)。可使用预测算法设计对蛋白质具有特异性的反义寡核苷酸。(例如参见 Ding, Y. 及 Lawrence, C. E., *Nucleic Acids Res.*, 29 :1034-1046, 2001 ;Sczakiel, G., *Front. Biosci.*, 5 :D194-D201, 2000 ;Scherr, M. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 28 :2455-2461, 2000 ;Patzel, V. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 27 :4328-4334, 1999 ;Chiang, M. Y. 等人, *J. Biol. Chem.*, 266 :18162-18171, 1991 ;Stull, R. A. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 20 :3501-3508, 1992 ;Ding, Y. 及 Lawrence, C. E., *Comput. Chem.*, 23 :387-400, 1999 ;Lloyd, B. H. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 29 :3664-3673, 2001 ;Mir, K. U. 及 Southern, E. M., *Nat. Biotechnol.*, 17 :788-792, 1999 ;Sohail, M. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 29 :2041-2051, 2001 ;Altman, R. K. 等人, *J. Comb. Chem.*, 1 :493-508, 1999)。反义寡核苷酸可通过合适方法制得, 例如使用自动化核酸合成仪 (例如, 来自 Applied Biosystems) 的核酸 (例如, DNA、RNA、PNA) 合成 (还参见 Martin, P., *Helv. Chim. Acta* 78 :486-504, 1995)。还可使反义寡核苷酸稳定表现于含有适当表现载体的细胞中。

[0162] 反义寡核苷酸可由靶细胞 (例如, 肿瘤细胞) 经吸附性胞饮过程吸收。因此, 在治疗个体 (例如, 哺乳动物) 时, 可 (例如) 通过注射或输注将反义 PLVAP 寡核苷酸递送至靶细胞 (例如, 肿瘤细胞) 中。举例而言, 可将经纯化的寡核苷酸或 siRNA/shRNA 单独或以调配物形式使用合适药物递送媒介 (例如, 脂质体、阳离子聚合物 (例如, 聚-L-离胺酸、PAMAM 树枝状聚合物、聚烷基氨基丙烯酸酯纳米颗粒及聚乙烯亚胺)) 投予或与合适载体肽 (例如, 同源转录因子、触足肽 (Antennapedia peptide)、HIV-1 的 Tat 蛋白、E5CA 肽) 偶

合。

[0163] 核糖核酸酶还可用作抑制 PLVAP 表现的 PLVAP 拮抗剂。核糖核酸酶为具有酶促活性的 RNA 分子。一类核糖核酸酶能够重复地将其它独立 RNA 分子以核苷酸碱基序列特异性方式裂解成两个或两个以上断片。参见 Kim 等人, *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 8788(1987); Haseloff 及 Gerlach, *Nature*, 334: 585(1988); 及 Jefferies 等人, *Nucleic Acid Res*, 17: 1371(1989)。这些核糖核酸酶典型地具有两个功能域: 催化域及引导核糖核酸酶与标靶 RNA 经由互补碱基配对结合的结合序列。使经特定设计的核糖核酸酶与标靶 mRNA 结合后, 其即酶促裂解标靶 mRNA, 典型地降低其稳定性及破坏其直接转译经编码蛋白质的能力。在核糖核酸酶裂解其 RNA 标靶后, 其自该标靶 RNA 释放且随后可结合并裂解另一标靶。亦即, 单一核糖核酸酶分子可重复地结合并裂解新标靶。

[0164] 根据本发明, 核糖核酸酶可靶向编码 PLVAP 的 mRNA 的任何部分。选择核糖核酸酶标靶序列及设计并制造核糖核酸酶的方法通常为此项技术中所已知。例如参见美国专利第 4, 987, 071 号、第 5, 496, 698 号、第 5, 525, 468 号、第 5, 631, 359 号、第 5, 646, 020 号、第 5, 672, 511 号及第 6, 140, 491 号, 这些专利各自的全文以引用的方式并入本文中。举例而言, 合适核糖核酸酶可以各种构型设计, 诸如锤头型基元、发夹型基元、 Δ 型肝炎病毒基元、I 型内含子基元或 RNase P RNA 基元。例如参见美国专利第 4, 987, 071 号、第 5, 496, 698 号、第 5, 525, 468 号、第 5, 631, 359 号、第 5, 646, 020 号、第 5, 672, 511 号及第 6, 140, 491 号; Rossi 等人, *AIDS Res Human Retroviruses* 8: 183(1992); Hampel 及 Tritz, *Biochemistry* 28: 4929(1989); Hampel 等人, *Nucleic Acids Res*, 18: 299(1990); Perrotta 及 Been, *Biochemistry* 31: 16(1992); 及 Guerrier-Takada 等人 *Cell*, 35: 849(1983)。

[0165] 核糖核酸酶可通过用于常规 RNA 合成的相同方法来合成。举例而言, 合适方法揭示于 Usman 等人, *J Am Chem Soc*, 109: 7845-7854(1987) 及 Scaringe 等人, *Nucleic Acids Res*, 18: 5433-5441(1990) 中。经修饰核糖核酸酶可通过揭示于以下文献中的方法来合成: 例如美国专利第 5, 652, 094 号; 国际公开案第 W091/03162 号、第 W0 92/07065 号及第 W0 93/15187 号; 欧洲专利申请案第 92110298.4 号; Perrault 等人, *Nature*, 344: 565(1990); Pieken 等人, *Science*, 253: 314(1991); 及 Usman 及 Cedergren, *Trends Biochem Sci*, 17: 334(1992)。

[0166] 本发明的 PLVAP 拮抗剂还可为与 PLVAP 蛋白结合且抑制其活性的核酸分子(例如, 寡核苷酸)。合适核酸 PLVAP 拮抗剂包括能够经由非经典沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对的相互作用以高亲和力及特异性结合所关注的特定分子(例如, 人类 PLVAP)的适体(Tuerk 及 Gold, *Science* 249: 505(1990); Ellington 及 Szostak, *Nature* 346: 818(1990))。

[0167] 适体, 如通过噬菌体呈现所产生的肽或单株抗体(MAb), 能够特异性结合所选标靶且经由结合阻断其标靶的作用能力。适体可通过试管内选择方法自随机序列寡核苷酸池产生, 已对 100 种以上蛋白质产生适体, 这些蛋白质包括生长因子、转录因子、酶、免疫球蛋白及受体。典型适体的大小为 10-15kDa(30-45 个核苷酸), 以次奈莫耳亲和力结合其标靶, 且排斥密切相关的标靶(例如, 典型地不会结合来自相同基因家族的其它蛋白质)。一系列结构研究已展示适体能够使用相同类型的结合相互作用(氢键结、静电互补、疏水性接触、空间排阻等)驱动抗体-抗原复合物的亲和力及特异性。

[0168] 与所关注标靶（例如，人类 PLVAP 蛋白）结合的适体可使用描述于（例如）美国专利第 5, 475, 096 号及美国专利第 5, 270, 163 号中的称为「通过指数富集进行配位体的系统性演化 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)」(SELEX) 的标准方法来产生及鉴别。

[0169] PLVAP 拮抗剂的鉴别

[0170] 对 PLVAP 基因产物具有结合特异性的药剂可在化合物及 / 或文库（例如，化学品、肽、核酸文库）的筛选（例如，高通量筛选）中鉴别。

[0171] 特异性结合人类 PLVAP 的抗体可（例如）通过筛选可购得的组合抗体文库 (Dyax Corp., MorphoSys AG) 来鉴别。合适组合抗体文库及筛选此等文库的标准方法描述于 Hoet 等人, *Nature Biotechnology* 23(3):344-348(2005) 及 Rauchenberger 等人, *J. Biol. Chem.* 278(40):38194-38205(2003) 中, 这些文献的内容以引用的方式并入本文中。这些分子文库或集合还可使用熟知化学方法来制备。

[0172] 或者, 可（例如）通过用 PLVAP 蛋白、蛋白质片段或肽连同破坏对抗原的耐受性的佐剂免疫小鼠来鉴别特异性结合人类 PLVAP 的鼠类抗体。可根据所需特异性及活性来筛选此等抗体且接着使用已知技术将其人化以产生适用于治疗人类疾病的药剂。

[0173] 化合物或小分子可自多种可获得的化合物文库鉴别, 这些文库例如来自美国国家癌症研究所的化学品储存库 (Chemical Repository of the National Cancer Institute) 及分子文库小分子储存库 (Molecular Libraries Small Molecules Repository) (PubChem), 以及哈佛大学 (Harvard University) 的化学与细胞生物学研究所 (Institute of Chemistry and Cell Biology at Harvard University) 的文库及可自商业来源（例如, Chembridge、Peakdale、CEREP、MayBridge、Bionet）获得的其它文库。这些分子文库或集合还可使用熟知化学方法（诸如熟知组合化学方法）来制备。可筛选文库以鉴别结合且抑制 PLVAP 的化合物。

[0174] 经鉴别的化合物可充当使用熟知药物化学方法进一步分化的主导化合物。举例而言, 可制备作为主导化合物结构变异体的化合物集合且根据 PLVAP 结合及 / 或抑制活性进行筛选。此可使得发展出将化合物结构与生物活性相联系的结构活性关系。具有合适结合及抑制活性的化合物可经进一步研发以供活体内使用。

[0175] 可进一步评价结合 PLVAP 的药剂的 PLVAP 拮抗剂活性。举例而言, 可在筛选或结合检定中使用包含 PLVAP 蛋白的组成物来侦测及 / 或鉴别结合且拮抗 PLVAP 蛋白的药剂。适用组成物包括（例如）天然表现 PLVAP 蛋白的细胞（例如, 肝血管内皮细胞）、这些细胞的提取物及重组 PLVAP 蛋白。

[0176] 可在（例如）竞争结合检定中鉴别结合 PLVAP 蛋白的药剂, 其中评估测试药剂抑制 PLVAP 与参考药剂结合的能力。参考药剂可为全长 PLVAP 蛋白或其部分。参考药剂可经合适标记（例如, 放射性同位素、抗原决定基标记、亲和标记（例如, 生物素及抗生物素蛋白 (avidin) 或抗生蛋白链菌素 (streptavidin)）、自旋标记、酶、荧光基团、化学发光基团、染料、金属（例如, 金、银）、磁性珠粒）标记且可测定检定中使 PLVAP 蛋白饱和和所需的经标记参考药剂的量。可使用合适对照（例如, 未经标记的药剂、单独标记）来测定 PLVAP 蛋白与测试药剂之间形成复合物的特异性。

[0177] 测试药剂抑制参考药剂与 PLVAP 蛋白之间的复合物形成的能力可根据 50% 抑制

经标记参考药剂的特异性结合所需的测试药剂浓度 (IC_{50} 值) 来测定。特异性结合较佳定义为总结合 (例如, 复合物中的总标记量) 减去非特异性结合。非特异性结合较佳定义为在过量未经标记参考药剂存在下所形成的复合物中仍侦测到的标记的量。适用于该方法的参考药剂包括特异性结合 PLVAP 的分子及化合物, 例如结合 PLVAP 的抗体。

[0178] 可通过筛选具有拮抗 (降低、阻止、抑制) PLVAP 的一或多种活性 (诸如肿瘤血管形成) 的能力的药剂来鉴别拮抗 PLVAP 蛋白的药剂。这些活性可由熟习此项技术人员使用任何适当试管内或活体内检定来评估。

[0179] 医药组成物

[0180] 本发明的 PLVAP 拮抗剂可作为医药或生理组成物的部分, 例如作为包含 PLVAP 拮抗剂及医药学上可接受的载剂的医药组成物的部分授予哺乳动物个体。包含 PLVAP 拮抗剂 (例如, 特异性结合 PLVAP 的抗体) 的调配物或组成物或包含 PLVAP 拮抗剂及一或多种其它治疗剂 (例如, 化学治疗剂, 例如阿霉素、5- 氟尿嘧啶、他莫昔芬、奥曲肽) 的组成物会根据所选授予途径而变化 (例如, 溶液、乳液或胶囊)。合适医药载剂可含有不与 PLVAP 拮抗剂相互作用的惰性成份。可使用标准医药调配技术, 诸如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA 中所述的技术。适用于非经肠授予的医药载剂包括 (例如) 无菌水、生理食盐水、抑菌生理食盐水 (含有约 0.9% mg/ml 苯甲醇的生理食盐水)、磷酸盐缓冲生理食盐水、汉克氏溶液 (Hank's solution)、林格氏乳酸盐溶液 (Ringer's lactate) 及其类似物。调配物还可包括少量增强活性成份的有效性的物质 (例如, 乳化剂、增溶剂、pH 值缓冲剂、润湿剂)。囊封组成物 (诸如于硬明胶或环糊精的包衣中) 的方法为此项技术中所已知。对于吸入而言, 可将药剂溶解及装载于适于授予的分配器 (例如, 雾化器或喷雾器或加压气溶胶分配器) 中。

[0181] 诊断套组

[0182] 本发明还提供用于侦测个体中肝细胞癌的存在诊断套组。这些套组包含至少一种用于侦测样本 (例如, 来自哺乳动物个体的生物样本) 中的 PLVAP 基因表现的药剂 (例如, 核酸探针、抗体)。PLVAP 基因表现可 (例如) 通过侦测样本中的 PLVAP 基因产物 (诸如 PLVAP mRNA 或 PLVAP 蛋白) 来侦测。

[0183] 因此, 在一具体实施方式中, 该套组包含至少一种与 PLVAP RNA (例如, mRNA、hnRNA) 转录物特异性杂交的核酸探针 (例如, 寡核苷酸探针)。这些探针能够在高严格度条件下与 PLVAP RNA 杂交。

[0184] 在另一具体实施方式中, 该套组包括能够与样本中的 PLVAP 基因产物 (例如, mRNA、cDNA) 特异性杂交的一对寡核苷酸引子。这些引子可用于任何标准核酸扩增程序 (例如, 聚合酶连锁反应 (PCR), 例如 RT-PCR、定量实时 PCR) 中以侦测样本中 PLVAP 基因产物的含量。

[0185] 在另一具体实施方式中, 本发明的套组包括特异性结合 PLVAP 蛋白 (例如, 人类 PLVAP 蛋白) 的抗体。这些抗体包括本文中所述的本发明 PLVAP 抗体中的任一种。在一具体实施方式中, 该抗体包含具有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的 V_H 域及具有 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列的 V_L 域。在另一具体实施方式中, 该抗体包含具有 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 V_H 域及具有 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列的 V_L 域。

[0186] 本发明套组中的诊断剂可包括一或多种标记 (例如, 可侦测标记)。此项技术中已

知多种适用于诊断剂的标记且其包括（但不限于）本文中所述标记中的任一种。在一特定具体实施方式中，诊断剂（例如，抗体）包括放射性同位素以使得药剂可用于免疫正电子发射断层摄影术（免疫 PET）。

[0187] 现将通过以下实施例说明本发明，这些实施例不欲任何方式构成限制。

实施例

[0188] 实施例 1 :HCC 肝组织中的 PLVAP 表现相对于非 HCC 肝组织升高

[0189] 材料及方法：

[0190] 组织样本

[0191] 自出于治疗目的自人类患者手术移除的新鲜标本收集 HCC 及相邻非肿瘤肝脏的组织。此等标本在主治病理医师的直接监督下收集。在辜公亮基金会和信治癌中心医院 (Koo Foundation Sun Yat-Sen Cancer Center, KF-SYSCC) 的肿瘤库将所收集的组织立即储存于液氮中。可获得来自 18 名 HCC 患者的配对组织样本用于研究。此研究获伦理委员会 (Institutional Review Board) 批准且获得所有患者的书面知情同意书。此研究中的 18 名 HCC 患者的临床特征总结于表 1 中。

[0192] 表 1：自其获得配对的 HCC 与相邻非肿瘤肝组织样本的 18 名 HCC 患者的临床资料。

[0193]

病例号	性别	年龄	HBsAg	HBsAb	HCV IgG	TNM 分期	AFP (ng/ml)	分化
1	M	70	+		-	2	2	中度
2	M	75	-	+	+	4A	5	良好
3	M	59	+		-	4A	1232	中度
4	F	53	+		+	1	261	中度
5	M	45	+		-	2	103	中度
6	M	57	+	+	-	2	5	中度
7	M	53	+	+	-	3A	19647	中度
8	M	54	-	-	+	3A	7	中度
9	M	44	+		-	4A	306	中度
10	M	76	-	-	+	3A	371	中度
11	F	62	+	-	-	3A	302	中度
12	F	73	-	-	+	2	42	中度
13	M	46	+		-	4A	563	中度

[0194]

14	M	45	-	-	3A	64435	中度
15	M	41	+	-	2	33.9	良好
16	M	44	+	+	2	350	中度
17	M	67	+	-	3A	51073	中度
18	M	34	+	-	4A	2331	中度

[0195] mRNA 转录物侧写

[0196] 使用 Trizol 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 自冷冻于液氮中的组织分离总 RNA。将所分离的 RNA 使用 RNeasy Mini 套组 (Qiagen, Valencia, CA) 进一步纯化, 且在 Agilent 2100 生物分析仪 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) 中使用 RNA 6000Nano 检定评估其质量。所有用于研究的 RNA 样本均具有大于 5.7 (8.2 ± 1.0 , 平均值 $\pm$ SD) 的 RNA 完整性指数。自 8 μ g 总 RNA 根据 Affymetrix 方案制备杂交标靶且使其与含有用于大约 13,000 种人类基因的 22,238 个探针组的 Affymetrix U133A 基因芯片杂交。在杂交后, 立即使用 Affymetrix 基因芯片流控台 400 及 EukGE WS2v4 方案使经杂交数组经历自动化洗涤及染色。随后, 在 Affymetrix 基因数组扫描仪 2500 中扫描 U133A 基因芯片。

[0197] 微数组数据的存在及不存呼叫的判定

[0198] 使用 Affymetrix 微数组分析套件 (MAS) 5.0 软件产生所有 18 对 HCC 与相邻非肿瘤肝组织的微数组数据的存在呼叫。存在呼叫判定的所有参数均为默认值。通过 MAS 5.0 将各探针组判定为「存在」、「不存在」或「边缘」。类似地, 使用 dChip 2004 版软件处理相同微数组数据以判定微数组上各探针组的「存在」、「不存在」或「边缘」状态。

[0199] 具有极端差异性表现的探针组的鉴别

[0200] 为鉴别在 HCC 与相邻非肿瘤肝组织之间具有极端差异性表现的基因, 根据以下规则使用实际撷取与报导语言 (Practical Extraction and Report Language, PERL) 编写的软件: 「肿瘤特异性基因 (Tumor-specific gene)」定义为通过 MAS 5.0 与 dChip 在 HCC 中呼叫为「存在」而在相邻非肿瘤肝组织中呼叫为「不存在」或「边缘」的探针组。「非肿瘤肝组织特异性基因 (Non-tumor liver tissue-specific gene)」定义为通过 MAS 5.0 与 dChip 在 HCC 中呼叫为「不存在」或「边缘」而在配对相邻非肿瘤肝组织中呼叫为「存在」的探针组。描绘鉴别算法的流程图展示于图 1 中。

[0201] 实时定量性逆转录酶聚合酶连锁反应 (RT-PCR)

[0202] 使用 TaqMan™ 实时定量性逆转录酶-PCR (qRT-PCR) 来定量 mRNA。自各样本的 8 μ g 总 RNA 使用 1500ng 寡聚 (dT) 引子及 600 个单位的 SuperScript™ II 逆转录酶 (来自 Invitrogen, Carlsbad, CA) 以 60 μ l 的最终体积根据制造商说明合成 cDNA。对于各 RT-PCR 反应而言, 在 25 μ l 的最终体积中遵照制造商说明 (ABI 及 Roche) 使用 0.5 μ l cDNA 作为模板。使用 Applied Biosystems 7900HT 实时 PCR 系统进行 PCR 反应。实验所需的探针及试剂自 Applied Biosystems (ABI) (Foster City, CA) 获得。用于 PLVAP 的实时定量性 RT-PCR 的引子及探针的序列为 5'-CCTGCAGGCATCCCTGTA-3' (正向引子) (SEQ ID NO:25)、5'-CGGGCCATCCCTTGGT-3' (反向引子) (SEQ ID NO:26) 及 5'-CCCCATCCAGTGGCTG-3' (探

针) (SEQ ID NO:27)。使用次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HPRT) 持家基因 (housekeeping gene) 作为标准化的内源参考。所有样本均双重复操作, 在同一 PCR 盘上操作同一靶 mRNA 及内源参考 HPRT mRNA。通过比较性 Ct 方法根据制造商说明 (User Bulletin #2, ABI Prism 7700 序列检测系统) 计算靶 mRNA 的相对量。选择非肿瘤肝样本作为计算的相对校正因子。

[0203] 结果:

[0204] 18 对 HCC 与相邻非肿瘤肝组织中的 PLVAP 基因表现强度展示于图 2 中。配对的 HCC 与相邻非肿瘤肝组织的平均基因表现强度分别为 759.8 ± 436.5 及 170.6 ± 53.4 (平均值 $\pm$ SD)。两组的间配对 t 检验的 p 值为 2.8×10^{-5} 。此等结果表明 PLVAP 表现于 HCC 中而不表现于非肿瘤肝组织中。当 82 个未经配对的 HCC 样本展示出 810.4 ± 482.0 (平均值 $\pm$ SD) 的平均表现强度时, 该表现强度与来自 18 个经配对 HCC 样本的研究结果基本上相同 (通过 t 检验得出 $p = 0.62$) (图 2), 进一步证实 HCC 中 PLVAP 的此升高表现。

[0205] 为证实 PLVAP 显著表现于 HCC 肝组织中而不表现于非肿瘤肝组织中, 对来自 18 对 HCC 与相邻非肿瘤肝组织的 RNA 样本执行实时定量性 RT-PCR。相对于非肿瘤肝组织, HCC 中的 PLVAP mRNA 量显著较高 (参见图 3A 及表 2)。尽管结果在两组间展示出一些重迭, 但除一人外对于所有经测试个体, 在同一个人体内 HCC 中的 PLVAP 转录物比相邻非肿瘤肝组织高 (图 3B)。此例外可能与组织储存过程中的不均匀 RNA 降解度有关。

[0206] 表 2: 18 对 HCC 与相邻非肿瘤肝组织的 PLVAP 基因表现强度。

[0207]

样本号	表现强度*	
	HCC	相邻非肿瘤肝组织
1	1757	195
2	1329	210
3	1148	168
4	1130	211
5	1096	213
6	1068	181
7	932	101
8	804	60
9	630	155
10	612	175
11	607	125
12	519	146
13	478	300
14	422	180
15	275	105
16	251	204
17	251	155
18	186	184

[0208] 实施例 2 :PLVAP 由 HCC 血管内皮细胞特异性表现

[0209] 材料及方法：

[0210] 经福尔马林 (formalin) 固定的石蜡包埋组织的雷射捕捉显微解剖 (LCM) 使用来自 Arcturus Bioscience, Inc. (Mountain View, CA) 的 Arcturus **PixCell**[®] IIe 系统、CapSure[™] HS LCM 盖片及 Paradise[™] 试剂系统进行来自石蜡块的经福尔马林固定的组织的 LCM。切离 7 微米厚的组织切片, 将其去石蜡化、再水合、染色及脱水以根据制造商说明进行 LCM。使用 7.5 μ m 雷射光斑尺寸以 50mW 功率及 1.3ms 持续时间将标靶细胞捕捉至 CapSure[™] HSLCM 盖片上。每个盖片捕捉大约 5000 至 6000 个细胞。然而, 因细胞稀少每个盖片上仅捕捉 1000 至 2000 个肝细胞癌血管内皮细胞。

[0211] 自 LCM 组织切片提取 RNA 以供进行定量性 RT-PCR

[0212] 使用 Paradise[™] 试剂系统根据制造商说明处理如上文所述捕捉于 CapSure[™] HS

LCM 盖片上的细胞以进行 RNA 提取、cDNA 合成、试管内转录及反义 RNA 扩增。接着使用所合成的反义 RNA 作为模板来进行两步 TaqMan 实时定量性 RT-PCR 以定量通过 LCM 所捕捉的细胞中的 PLVAP 及 β -肌动蛋白 mRNA。第一步(亦即,逆转录)使用 4.5 μ l 反义 RNA 及 TaqMan 逆转录试剂(ABI)以 10 μ l 的最终体积遵循制造商方案来进行。第二步(亦即,实时 PCR)使用 2.4 μ l cDNA 模板、引子/探针混合物及来自 Applied Biosystems 的 TaqMan 通用 PCR 母混合物以 25 μ l 的最终体积来执行。在 Smart Cycler II (Cepheid, Inc., Sunnyvale, CA) 中进行实时 PCR。将反应最初在 50°C 下培育 2 分钟且接着在 95°C 下培育 10 分钟。随后,执行 45 个以下循环:95°C 下变性 15 秒钟及 60°C 下黏接/延长 40 秒钟。引子及探针的序列列于表 3 中。

[0213] 表 3:用于对通过雷射捕捉显微解剖所制备的样本中的 PLVAP 及 β -肌动蛋白含量进行实时定量性 RT-PCR 的引子及探针序列

[0214]

	PLVAP 基因	β -肌动蛋白基因
正向引子	5'-CCTTGAGCGTGAGTGTTCCTCA-3' (SEQ ID NO:28)	5'-GTCCCCCAACTTGAGATGTATGAAG-3' (SEQ ID NO:29)
反向引子	5'-GGCAGGGCTGGGAGTTG-3' (SEQ ID NO:30)	5'-GTCTCAAGTCAGTGTACAGGTAAGC-3' (SEQ ID NO:31)
Taqman 探针	5'-CTCCCAGGGAGACCAA-3' (SEQ ID NO:32)	5'-AAGGAGTGGCTCCCCTCC-3' (SEQ ID NO:33)

[0215] 用于重组融合 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 蛋白的表现载体的制备

[0216] 通过将编码 PLVAP 的氨基酸残基 51 至 442 的 PCR 片段插入 pGEM[®]-TEasy 载体 (Promega, Inc., Madison, WI) 中来产生质体 pGEM[®]-T Easy-PLVAP₅₁₋₄₄₂。PCR 片段自来自 OriGene (Rockville, MD) 的 PLVAP 的 cDNA 纯通过使用 5'-**CATATG** AACGTGCACGTGAGCACAGAGTCC-3' (SEQ ID NO:34) 及 5'-**GGATCC** TGAGCATATCCCTGCATCCTCC-3' (SEQ ID NO:35) 的引子组来扩增。为建构质体 pET-15b-PLVAP₅₁₋₄₄₂, 自 pGEM[®]-T Easy-PLVAP₅₁₋₄₄₂ 切离每一各别末端具有 NdeI 及 BamHI 识别序列的编码 PLVAP 的氨基酸残基 51 至 442 的 cDNA 片段且将其插入 pET-15b (Novagen, Inc., San Diego, CA) 中。通过 DNA 定序验证上文所述的表现构筑体。

[0217] 重组融合 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 蛋白的表现及纯化

[0218] 为产生重组经 His 标记的 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 蛋白 (SEQ ID NO:2) (图 4), 通过将胜任细胞与 pET-15b-PLVAP₅₁₋₄₄₂ 质体 DNA 一起在冰上培育 5 分钟, 随后在 42°C 水浴中培育 30 秒钟且接着再于冰上培育 2 分钟来转型大肠杆菌 (Escherichia coli) (Rosetta-gami2 (DE3) pLysS) (Novagen)。在涂铺于选择性培养基上之前, 将转型体在 37°C 下伴随在 250rpm 下的震荡用 SOC 培养基 (0.5% 酵母提取物、2% 胰化蛋白、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgCl₂、10mM MgSO₄、20mM 葡萄糖) 培育 60 分钟。在 30°C 下使用 1mM 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷诱导 Rosetta-gami2 (DE3) pLysS 大肠杆菌中经 His 标记的融合蛋白的表现历时 16 小时。在

诱导之后,通过在补充有8M尿素的平衡缓冲液(50mM磷酸钠、300mM NaCl,pH7)中超音波处理来使细菌细胞溶解且通过在5,600×g下离心30分钟将其分离为可溶部分与不溶部分。为进一步纯化His-PLVAP₅₁₋₄₄₂蛋白,将可溶部分装载于TALON[®]金属亲和树脂(Clontech, Inc., Palo Alto, CA)上,用平衡缓冲液洗涤且用溶离缓冲液(50mM磷酸钠、300mMNaCl、250mM咪唑,pH7)溶离。根据制造商说明通过凝血酶裂解(Novagen)来移除经纯化融合蛋白的His标签(参见图5)。通过以PBS进行广泛性透析来回收所得PLVAP₅₁₋₄₄₂蛋白。为验证重组PLVAP蛋白的特性,自Bioscience Resource Project(Tempe,AZ)购得少量抗GST-PLVAP₃₃₁₋₄₃₀融合蛋白的小鼠抗血清。使用此抗体通过西方墨渍分析检测到无His标签的重组PLVAP₅₁₋₄₄₂蛋白,但其不与针对His标签的抗体反应。此等结果证实重组PLVAP蛋白的特性。

[0219] 小鼠抗人类PLVAP血清的产生

[0220] 使用于PBS中的经纯化PLVAP₅₁₋₄₄₂重组蛋白来免疫6周龄的Balb/cByj小鼠。最初用于完全弗氏佐剂(Freund's adjuvant)(Sigma, Inc., St Louis, MO)中的总共14μg PLVAP₅₁₋₄₄₂蛋白在多个部位经皮下注射免疫每只小鼠。随后,每两周一次用于不完全弗氏佐剂中的7μg PLVAP₅₁₋₄₄₂重组蛋白加强免疫经历3次。最后一次加强免疫后1周,对小鼠取血以制备抗血清。

[0221] 酵素结合免疫吸附分析法(ELISA)

[0222] 试剂及溶液:

[0223] 1. 重组PLVAP蛋白

[0224] 2. 抗小鼠IgG-碱性磷酸酶接合物(目录号AP124A, CHEMICON)

[0225] 3. 涂布缓冲液(0.137M氯化钠、0.01M磷酸氢二钠七水合物、2mM磷酸二氢钾、0.002%(0.3mM)迭氮化钠,pH7.2-7.4)

[0226] 4. 洗涤缓冲液(0.137M氯化钠、0.01M磷酸氢二钠七水合物、2mM磷酸二氢钾、0.2%吐温20(Tween20)(目录号P1379, SIGMA), pH7.2-7.4)

[0227] 5. 阻断缓冲液(0.137M氯化钠、0.01M磷酸氢二钠七水合物、2mM磷酸二氢钾、2%牛血清白蛋白(目录号82-045, PENTEX)、0.05%吐温20(目录号P1379, SIGMA), pH7.2-7.4)

[0228] 6. 碳酸盐缓冲液(0.016M碳酸氢钠、0.014M碳酸钠、2mM氯化镁、0.002%(0.3mM)迭氮化钠,pH 9.6)

[0229] 7. 碱性磷酸酶受质:溶解于40ml碳酸盐缓冲液中的一片40mg磷酸酶受质锭剂(目录号P5994, SIGMA)

[0230] 程序:

[0231] 使用ELISA测定抗PLVAP血清中的抗体效价。首先,在4℃下用50μl以2.5μg/ml范围内的浓度溶解于含有0.002%迭氮化钠的磷酸盐缓冲生理食盐水(PBS)(亦即,涂布缓冲液)中的PLVAP蛋白涂布96孔ELISA培养盘隔夜。在用200μl洗涤缓冲液(含有0.05%吐温20的PBS)洗涤3次后,在室温下将经涂布培养盘的每一孔用150μl阻断缓冲液(亦即,含有2%牛血清白蛋白的洗涤缓冲液)阻断30分钟。再洗涤3次后,在室温下将各孔用50μl制备于稀释缓冲液中的经稀释抗血清(自1,000倍至128,000倍的连续两倍稀释)培育45分钟。随后,在室温下将各孔用5,000倍稀释度的抗小鼠IgG碱性磷酸酶接合物(Chemico, Inc., Temecula, CA)培育30分钟。在3次洗涤后,用100μl碱性磷酸

酶受质 (Sigma, Inc., St Louis, MO) 定量所结合的抗体且在 25 至 40 分钟的培育期后使用 ELISA 培养盘读取器在 405nm 下执行吸光度量测。

[0232] 对经福尔马林固定的组织中的 PLVAP 的免疫组织化学 (IHC) 侦测

[0233] 自经福尔马林固定的组织的石蜡块切离 6 微米的切片。将切片封固至 SuperFrost Plus 黏附载玻片 (Menzel Glaser GmbH, Braunschweig, Germany) 上。接着处理切片以在 Benchmark XT 自动化染色仪 (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) 中使用 XT-iView-DAB-V.1 方案经轻度 CCI 调节将 PLVAP 免疫染色 30 分钟且在 37°C 下将切片用经 400 倍稀释的抗人类 PLVAP 血清培育 36 分钟。用于侦测小鼠抗人类 PLVAP 抗体结合的第二抗体及试剂来自 Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, AZ) 的 iView™DAB 侦测套组。所有试剂及缓冲液均自 Ventana Medical Systems 购得。

[0234] 结果：

[0235] 为判定 HCC 样本中 PLVAP 的细胞来源,使用雷射捕捉显微解剖 (LCM) 将 HCC 血管内皮细胞、肝细胞癌的肿瘤细胞及非肿瘤肝细胞 (包括内衬窦内皮细胞) 自样本中解剖出来。由于肝细胞癌细胞与毛细管内衬内皮细胞之间紧密并列,在解剖期间尽力避免包含毛细管内衬内皮细胞。使用自经解剖细胞提取的 RNA 进行两步实时定量性 RT-PCR 以测定 PLVAP mRNA 的相对量。研究来自两名不同患者的标本。展示于表 4 及图 6A-6C 中的结果表明 PLVAP 由 HCC 血管内皮细胞表现 (图 6A),而在相邻非肿瘤肝组织中未侦测到可侦测的 PLVAP 转录物 (图 6B)。

[0236] 表 4:在通过雷射捕捉显微解剖所解剖的细胞中通过 Taqman 实时定量性 RT-PCR 测定两个 HCC 样本中的 PLVAP mRNA 相对量。

[0237]

PLVAP mRNA 相对量			
HCC 样本	HCC 内皮细胞	相邻非肿瘤肝组织	HCC 肿瘤细胞
A	1	0	0.002
B	1	0.001	0.057

[0238] 为进一步研究 PLVAP 表现的组织及疾病特异性,对抗人类 PLVAP 的细胞外域 (氨基酸 51 至 442) 产生多株抗体用于免疫组织化学 (IHC) 研究。如图 7 中所示,自经重组 PLVAP₅₁₋₄₄₂ 蛋白免疫的 Balb/c 小鼠获得的抗血清含有高效价的抗 PLVAP 抗体。

[0239] 接着使用抗 PLVAP 抗血清判定来自患有肿瘤细胞癌 (n = 7) (图 8A-8F 及图 9A-9F)、局灶结节性增生 (n = 4) (图 10A-10F)、肝血管瘤 (n = 2) (图 11A 及 11B)、慢性活性 B 型肝炎 (n = 2) (图 12A 及 12B) 或慢性活性 C 型肝炎 (n = 4) (图 13A-13D) 及转移癌 (n = 4) (亦即,肝内胆管癌、转移性结肠直肠癌或转移性卵巢癌) (图 14A-14D) 的患者的组织切片中 PLVAP 表现的定位。结果展示仅肝细胞癌的毛细管内皮细胞表现 PLVAP 蛋白 (图 8A、8C、8E 及图 9A、9C、9E、9F)。非肿瘤肝组织 (包括肝硬化症肝脏、局灶结节性增生 (图 10A-10F) 及慢性肝炎 (图 12A 及 12B, 图 13A-13D) 的肝脏) 的内衬血管窦 / 毛细管的内皮细胞不表现 PLVAP 蛋白。肝血管瘤的内皮内衬细胞也未展示显著 PLVAP 表现 (图 11A 及 11B)。此等结果证明 PLVAP 为肝细胞癌而非其它肝病的特异性血管内皮生物标志。因此,

PLVAP 可用作 HCC 的诊断标志及治疗靶。

[0240] 实施例 3 :特异性结合 PLVAP 的小鼠单株抗体的产生及表征

[0241] 材料及方法

[0242] 免疫程序

[0243] 最初用溶解于 0.125mL 磷酸盐缓冲生理食盐水 (PBS) 中且在等体积完全弗氏佐剂中乳化的 20 μ g 经纯化重组 PLVAP 蛋白免疫 5 只 6 周龄雌性 Balb/cByJ 小鼠。将 PLVAP- 佐剂混合物以 0.05mL 体积注射至小鼠腹侧接近腋窝及腹股沟淋巴结的 4 个独立皮下部位中的每一个以及位于肩胛间的第 5 个皮下部位。所有小鼠接受每两周一次 20 μ g 经腹膜内注射的重组 PLVAP 蛋白的加强免疫 3 次。最后一次加强免疫后 1 周,进行测试取血以量测小鼠是否产生显著高效价的抗 PLVAP 抗体 (大于 10,000 倍)。使用固相酶素结合免疫吸附分析法 (ELISA) 以达成此目的。选择产生最高效价的 PLVAP 抗体的小鼠来制备融合瘤。

[0244] 鼠类单株抗 PLVAP 抗体的产生

[0245] 在产生融合瘤的预定融合实验前 3 天,给产生最高效价的 PLVAP 抗体的小鼠静脉内注射 20 μ g 重组 PLVAP。根据先前所述的方案 (参见 Current Protocols in Immunology,编者:Coligan JE,Kruisbeek AM,Margulies DH,Shevach EM 及 Strober W., John Wiley&Sons, Inc., New York,2001 年出版,第 2.5 单元 Production of Monoclonal Antibodies) 稍作修改制备产生抗 PLVAP 的单株抗体 (MAb) 的融合瘤。特定言之,使用 50% 聚乙二醇 1540 将自经免疫小鼠采集的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞以 7.5 : 1 (脾细胞:骨髓瘤细胞) 的比率融合。将融合产物接种于 96 孔平底组织培养盘中,且在次日添加次黄嘌呤-胺基嘌呤-胸苷 (HAT) 选择性培养基。7 至 10 天后,通过 ELISA 针对抗 PLVAP 抗体的产生筛选生长阳性孔的上清液。扩增最初产生抗 PLVAP MAb 的融合瘤且再筛选。通过有限稀释法选殖展示持续产生抗体的融合瘤。使用 ELISA 判定 MAb 同型。通过蛋白 G 亲和力管柱层析自腹水或培养基纯化单株抗体 (Current Protocols in Immunology,编者:Coligan JE,Kruisbeek AM,Margulies DH,Shevach EM 及 Strober W., John Wiley&Sons, Inc., New York,2001 年出版,第 2.7 单元 Purification and Fragmentation of Antibodies)。

[0246] ELISA 检定

[0247] 如本文中所述来执行 Elisa 检定 (参见实施例 2)。

[0248] 结合亲和力测定

[0249] 在 ANT Technology Co., Ltd. (Taipei, Taiwan) 使用 ANTQ300 石英晶体微量天平技术 (Lin S. 等人, J Immunol Methods 239 :121-124 (2000)) 量测 KFCC-GY4 及 KFCC-GY5 抗 PLVAP 单株抗体的结合亲和力。

[0250] 人类脐血管内皮细胞 (HUVEC) 的分离及培养

[0251] 根据 Baudin B, Brune A, Bosselut N 及 Vaubourdolle M. Nature Protocols 2 : 481-485 (2007) 中所述的既定方案进行 HUVEC 的分离及培养。在内皮细胞培养物维持期间,使用溶解于磷酸盐缓冲生理食盐水中的 1% 明胶 (DIFCO, Corp.) 替换胶原蛋白溶液来涂布培养盘或盖玻片。

[0252] 通过含曲拉通 (Triton) X-114 (TX-114) 的缓冲液提取 HUVEC 的疏水性膜蛋白

[0253] 将 500,000 个 HUVEC 接种于 10cm 培养皿中历时 24 小时。接着用人类 VEGF 以 40ng/ml 刺激这些细胞再历时 72 小时。将经培养细胞用 5ml 磷酸盐缓冲生理食盐水 (PBS)

洗涤两次。接着通过用含有 2mM EDTA 的 1ml PBS 培育自培养皿分离且提起细胞,将其置于离心管中,且通过在 $300\times g$ 下离心 5 分钟来收集。通过离心产生的离心块中存在大约两百万个细胞。将细胞离心块再悬浮于含有 5mM EDTA 及 0.5% (v/v) 曲拉通 X-114(TX-114) 的 200 μ l 冰冷 0.05M Tris 缓冲液 (pH 7.4) 中。将所溶解的细胞悬浮液在冰上培育,偶尔轻微涡旋。随后,在 4℃ 下将细胞悬浮液在 $10,000\times g$ 下离心 10 分钟以移除不可溶细胞碎片。将上清液转移至干净的 Microfuge 管中且在 37℃ 下培育 5 分钟。在培育期间, TX-114 自水相分离出来。接着在室温下将 Microfuge 管在 $1000\times g$ 下离心 10 分钟,以将 TX-114 离心至管底。移除管顶的水相且将含有疏水性细胞蛋白质的 TX-114 离心块溶解于 2 倍 SDS 丙烯酰胺凝胶样本缓冲液中,最终体积为 50 μ l。使用 15 μ l 样本进行 SDS 丙烯酰胺凝胶电泳。

[0254] SDS 丙烯酰胺凝胶电泳、西方墨渍制备及免疫墨渍分析

[0255] 程序与先前 Kao KJ, Scornik JC 及 McQueen CF. Human Immunol 27 :285-297 (1990) 所述的程序相同,稍作修改。使用碱性磷酸酶化学发光受质及 LAS-4000 发光影像分析仪 (Fujifilm Corp.) 来进行对西方墨渍上抗体结合的侦测。

[0256] 免疫荧光显微术

[0257] 材料:

[0258] 1) 第一抗体:

[0259] a) 正常小鼠 IgG (Sigma Corp., 目录号: I-5381), 以 1mg/mL 溶解于磷酸盐缓冲生理食盐水 (PBS) 中作为储备溶液, 在使用前用 PBS-0.5% BSA 稀释至 5 μ g/mL 的浓度;

[0260] b) 单株小鼠抗人类 von Willebrand 因子 (vWF) (DakoCytomation Corp., 目录号: M0616), 在使用前用含有 0.5% BSA 的 PBS 稀释 50 倍;

[0261] c) 经纯化 KFCC-GY4 及 KFCC-GY5 抗 PLVAP 单株抗体, 在使用前用含有 0.5% BSA 的 PBS 稀释至 5 μ g/mL;

[0262] 2) 第二抗体: FITC 接合山羊 F(ab')₂ 抗小鼠 IgG (重链及轻链) (Serotec, Corp., 目录号: Star105F);

[0263] 3) 含 DAPI 的 VectaShield 封固介质 (Vector Labs, Corp., 目录号: H-1200);

[0264] 4) 100% 甲醇 (Merck corp., 目录号: 1.06009); 及

[0265] 5) 汉克氏平衡盐溶液 (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS) (Gibco, Corp., 目录号: 12065-056), 在使用前稀释至 1 倍。

[0266] 程序:

[0267] 为制备用于免疫荧光研究的人类脐带血管内皮细胞, 将 50,000 个细胞置于 24 孔培养盘的每一孔中, 在各孔的底部置放有 1.5cm 无菌圆形盖玻片。各孔含有 0.5ml 补充有 20% 胎牛血清、1% L- 麸酰胺酸、1% 抗生素 / 抗真菌溶液、50 μ g/mL 肝素及 75 μ g/mL 内皮细胞生长补充剂 (Sigma, Corp. E0760) 的 M199 培养基。将各盖玻片用 200 μ l 于 0.04% 乙酸 (v/v) 中的 0.4mg/mL 小牛皮胶原蛋白 (Sigma Corp. C9791) 预涂布隔夜。接着将盖玻片用无菌 1 倍磷酸盐缓冲生理食盐水 (PBS) 洗涤, 且随后风干以供使用。将细胞培养隔夜且接着再用 40ng/mL 血管内皮生长因子 (VEGF) 刺激 72 小时。使用盖玻片上的细胞进行免疫荧光程序。

[0268] 为将细胞染色以进行免疫荧光显微术, 用 0.5ml 1 倍 HBSS 洗涤生长于各孔中的盖

玻片上的细胞。接着在 0.5ml 冰冷甲醇中将细胞固定且增强通透性历时 5 分钟。将经固定细胞用 0.5ml 1 倍 PBS 洗涤 3 次,每次洗涤 5 分钟。接着在室温下将经固定细胞用含有 0.5% BSA 的 0.5ml 1 倍 PBS 阻断 1 小时。移除含有经固定细胞的盖玻片且将其置于 0.2ml 经稀释第一抗体溶液之上,该溶液含有 5 μ g/ml 正常 IgG、KFCC-GY4 或 KFCC-GY5 抗 PLVAP 单株抗体或抗人类 vWF 单株抗体的 50 倍稀释液,其中经固定细胞朝下且接触抗体溶液。在有盖的塑料小容器中将抗体溶液置于一小片石蜡上。通过置放一小片用水润湿的滤纸来维持内部湿度。

[0269] 在 37℃ 下于潮湿容器中培育 1 小时后,移除盖玻片且将盖玻片上的细胞用 0.5ml PBS 洗涤 3 次,每次 5 分钟。接着在 37℃ 下如针对使用第一抗体溶液培育所述将经固定细胞用 0.2ml 经 200 倍稀释的 FITC 接合山羊 F(ab')₂ 抗小鼠 IgG 第二抗体培育 50 分钟。随后,如上文所述将细胞用 PBS 洗涤 3 次。使用 VectaShield 抗褪色溶液将经染色细胞封固于载玻片上。自盖玻片边缘移除过量的封固介质且用指甲油密封边缘。使用荧光显微术检查经染色细胞。

[0270] 结果

[0271] 用重组人类 PLVAP 蛋白免疫 Balb/cByJ 小鼠使得产生出产生识别人类 PLVAP 蛋白的单株抗体 (mAb) 的融合瘤。选择两种融合瘤作进一步研究。将由此等融合瘤产生的抗体命名为 KFCC-GY4 及 KFCC-GY5。单株抗体 KFCC-GY4 及 KFCC-GY5 的 V_H 及 V_L 域及此等域的 CDR 的序列分别展示于图 15A 及 15B 及图 16A 及 16B 中。

[0272] 在 ELISA (图 17) 及免疫墨渍 (图 18C 及 18D) 检定中 KFCC-GY4 与 KFCC-GY5 单株抗体均结合重组 PLVAP 蛋白。

[0273] 此等抗体还在免疫墨渍检定中与来自人类脐带血管内皮细胞的提取物中的 PLVAP 蛋白特异性反应 (图 19B 及 19D)。另外,免疫荧光染色实验展示 KFCC-GY4 及 KFCC-GY5 单株抗体与表现 PLVAP 的人类血管内皮细胞结合 (图 20C 及 20D)。

[0274] 使用 ANTQ300 石英晶体微量天平 (Lin 等人, J. Immunol. Methods 239 :121-124, 2000) 测定单株抗体与重组 PLVAP 蛋白的结合亲和力 (K_d) 为 0.41 $\times 10^{-7}$ M (KFCC-GY5mAb) 及 0.6 $\times 10^{-7}$ M (KFCC-GY4mAb)。

[0275] 使用 KFCC-GY4 或 KFCC-GY5 单株抗 PLVAP 抗体对来自两名不同肝细胞瘤患者的肝脏的肝细胞瘤切片执行的免疫组织化学实验展示 KFCC-GY5 单株抗体 (图 21A、C) 在血管内皮细胞中产生比 KFCC-GY4 单株抗体 (图 21B、D) 强的信号。

[0276] 使用 KFCC-GY4 单株抗 PLVAP 抗体对来自 4 名不同的经随机选择的肝细胞瘤患者的样本执行来自同一患者的肝脏的相邻肝细胞瘤及非肿瘤肝组织切片的免疫组织化学实验。在肝细胞瘤组织 (图 22A、22C、22E 及 22G) 的血管内皮细胞中检测到 PLVAP 表现,而在相邻非肿瘤肝组织 (图 22B、22D、22F 及 22H) 中未检测到 PLVAP 表现。

[0277] 实施例 4 :PLVAP 蛋白在血管内皮细胞的表面上表现

[0278] 材料及方法

[0279] 免疫荧光显微术

[0280] 试剂 :

[0281] 用于以下程序的试剂如实施例 3 中所述,修改如下 :

[0282] •1 倍 HBSS 洗涤缓冲液含有 0.1% 迭氮化钠,其用于防止结合至细胞表面的抗体的

胞饮作用；

[0283] •在含 0.1%迭氮化钠的 1 倍 HBSS 洗涤缓冲液中稀释 KFCC-GY4 及 KFCC-GY5 单株抗 PLVAP 抗体。

[0284] 程序：

[0285] 如实施例 3 中所述执行人类脐带血管内皮细胞 (HUVEC) 的免疫荧光染色,其中例外为不用甲醇将细胞固定及增强通透性。而是,在用抗 PLVAP 单株抗体培育后,洗涤细胞且在室温下用 4%聚甲醛固定 10 分钟。在此培育后,将细胞洗涤 3 次,接着用 FITC 接合山羊 F(ab')₂ 抗小鼠 IgG 培育。再洗涤 3 次后,如实施例 3 中所述处理细胞以进行免疫荧光显微术。

[0286] 结果

[0287] 使用上文所述的方法,仅可侦测到表现于细胞表面上的 PLVAP 蛋白。此等实验的结果揭示 KFCC-GY4 与 KFCC-GY5 抗 PLVAP 单株抗体均结合至 HCC 血管内皮细胞的表面(图 23B、23C),从而表明 PLVAP 蛋白表现于此等细胞的表面上。此等研究结果表明以高亲和力特异性结合 PLVAP 的抗体在注射至肝细胞癌肿瘤的血管中后会能够结合至 HCC 血管内皮细胞的表面。

[0288]

申请人或代理人档案号 4261.1001002	国际申请号
-------------------------	-------

[0289] 关于微生物或其他生物材料保藏の説明

[0290] (细则 13 之二)

[0291]

A.对说明书第 34 页，第 13、17 和 20 行所述的已保藏的微生物或其他生物材料进行如下的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 ☐	
保藏单位名称：美国菌种保存中心	
保藏单位地址（包括邮政编码和国名） 美国，维吉尼亚州 20110-2209，马纳沙斯，10801 University Boulevard，美国菌种保存中心	
保藏日期 无	保藏号 无
C.补充说明（如果没有则不填） 该信息在附加页中 ☒	
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）	
E.说明的单独提供（如果没有则不填）	
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”）	

由受理局填写	由国际局填写
☐ 本页已经和国际申请一起收到	☐ 国际局收到本页日期
授权官员	授权官员

[0292] PCT/R0/134 表（1998 年 7 月，2004 年 1 月再版）

[0293] 关于微生物或其他生物材料保藏的说明

[0294] （附加页）

[0295] 补充说明（接上页）

[0296] 关于该主题 PCT 申请在澳大利亚的指定，并根据澳大利亚专利法 3.25(3) 的规定，申请人由此通知：对于在本发明中不享有益且被指定为需要样品提供的收件人，保藏在美国菌种保存中心（编号为 N/A）的生物材料样品的提供仅会在专利授权之前，或该申请失

效、被驳回或撤回之前受到影响。

[0297] 关于该主题 PCT 申请在加拿大的指定, 申请人由此通知国际局: 申请人希望直到加拿大专利已经基于本申请被授权, 或者本申请已经被驳回、被放弃并不再恢复或者被撤回为止, 专利官员仅授权将所述保藏在美国菌种保存中心 (编号为 N/A) 且在本申请中被引用的生物材料样品提供给该官员指定的独立专家。

[0001]

序列表

<110> 中国合成橡胶股份有限公司

<120> 用于诊断和治疗肝细胞癌的方法和剂

<130> 4261.1001003

<150> US 61/069,910

<151> 2008-03-19

<160> 35

<170> FastSEQ视窗4.0版

<210> 1

<211> 1322

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组His-标记的人类PLVAP氨基酸残基51-442的编码序列

<400> 1

```
atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tgggtgccgcg cggcagccat 60
atgaacgtgc acgtgagcac agagtccaac ctgcaggcca ccgagcgccg agccgagggc 120
ctatacagtc agctcctagg gctcacggcc tcccagtcca acttgaccaa ggagctcaac 180
ttcaccaccc gcgccaagga tgccatcatg cagatgtggc tgaatgctcg ccgcgacctg 240
gaccgcatca atgccagctt ccgccagtgc cagggtgacc gggtcatcta cacgaacaat 300
cagaggtaca tggctgccat catcttgagt gagaagcaat gcagagatca attcaaggac 360
atgaacaaga gctgcgatgc cttgctcttc atgctgaatc agaaggtgaa gacgctggag 420
gtggagatag ccaaggagaa gaccatttgc actaaggata aggaaagcgt gctgctgaac 480
aaacgcgtgg cggaggaaca gctggttgaa tgcgtgaaaa cccgggagct gcagcaccaa 540
gagcgccagc tggccaagga gcaactgcaa aaggtgcaag ccctctgcct gcccctggac 600
aaggacaagt ttgagatgga ccttcgtaac ctgtggaggg actccattat cccacgcagc 660
ctggacaacc tgggttacia cctctacat cccctgggct cggaattggc ctccatccgc 720
agagcctgcg accacatgcc cagcctcatg agctccaagg tggaggagct ggcccggagc 780
ctccgggagg ataatgaacg cgtggcccgc gagaactcag acctccaacg ccagaagctg 840
gaagcccagc agggcctgcg ggccagtcag gaggcgaac agaaggtgga gaaggaggct 900
caggcccggg aggccaagct ccaagctgaa tgctcccggc agaccagct agcgctggag 960
gagaaggcgg tgctgcggaa ggaacgagac aacctggcca aggagctgga agagaagaag 1020
agggaggcgg agcagctcag gatggagctg gccatcagaa actcagccct ggacacctgc 1080
atcaagacca agtcgcagcc gatgatgcca gtgtcaaggc ccatgggccc tgtccccaac 1140
ccccagccca tcgaccagc tagcctggag gagttcaaga ggaagatcct ggagtcccag 1200
aggccccctg caggcatccc ttagccccca tccagtggct gaggaggctc caggcctgag 1260
gaccaaggga tggcccgact cggcggtttg cggaggatgc agggatatgc tcacagggat 1320
tc 1322
```

<210> 2

<211> 413

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组His-标记的人类PLVAP 氨基酸残基51-442

[0002]

<400> 2

```

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1          5          10          15
Arg Gly Ser His Met Asn Val His Val Ser Thr Glu Ser Asn Leu Gln
 20          25          30
Ala Thr Glu Arg Arg Ala Glu Gly Leu Tyr Ser Gln Leu Leu Gly Leu
 35          40          45
Thr Ala Ser Gln Ser Asn Leu Thr Lys Glu Leu Asn Phe Thr Thr Arg
 50          55          60
Ala Lys Asp Ala Ile Met Gln Met Trp Leu Asn Ala Arg Arg Asp Leu
 65          70          75          80
Asp Arg Ile Asn Ala Ser Phe Arg Gln Cys Gln Gly Asp Arg Val Ile
 85          90          95
Tyr Thr Asn Asn Gln Arg Tyr Met Ala Ala Ile Ile Leu Ser Glu Lys
100          105          110
Gln Cys Arg Asp Gln Phe Lys Asp Met Asn Lys Ser Cys Asp Ala Leu
115          120          125
Leu Phe Met Leu Asn Gln Lys Val Lys Thr Leu Glu Val Glu Ile Ala
130          135          140
Lys Glu Lys Thr Ile Cys Lys Asp Lys Glu Ser Val Leu Leu Asn Lys
145          150          155          160
Arg Val Ala Glu Thr Glu Gln Leu Val Glu Cys Val Lys Thr Arg Glu
165          170          175
Leu Gln His Gln Glu Arg Gln Leu Ala Lys Glu Gln Leu Gln Lys Val
180          185          190
Gln Ala Leu Cys Leu Pro Leu Asp Lys Asp Lys Phe Glu Met Asp Leu
195          200          205
Arg Asn Leu Trp Arg Asp Ser Ile Ile Pro Arg Ser Leu Asp Asn Leu
210          215          220
Gly Tyr Asn Leu Tyr His Pro Leu Gly Ser Glu Leu Ala Ser Ile Arg
225          230          235          240
Arg Ala Cys Asp His Met Pro Ser Leu Met Ser Ser Lys Val Glu Glu
245          250          255
Leu Ala Arg Ser Leu Arg Ala Asp Ile Glu Arg Val Ala Arg Glu Asn
260          265          270
Ser Asp Leu Gln Arg Gln Lys Leu Glu Ala Gln Gln Gly Leu Arg Ala
275          280          285
Ser Gln Glu Ala Lys Gln Lys Val Glu Lys Glu Ala Gln Ala Arg Glu
290          295          300
Ala Lys Leu Gln Ala Glu Cys Ser Arg Gln Thr Gln Leu Ala Leu Glu
305          310          315          320
Glu Lys Ala Val Leu Arg Lys Glu Arg Asp Asn Leu Ala Lys Glu Leu
325          330          335
Glu Glu Lys Lys Arg Glu Ala Glu Gln Leu Arg Met Glu Leu Ala Ile
340          345          350
Arg Asn Ser Ala Leu Asp Thr Cys Ile Lys Thr Lys Ser Gln Pro Met
355          360          365
Met Pro Val Ser Arg Pro Met Gly Pro Val Pro Asn Pro Gln Pro Ile
370          375          380
Asp Pro Ala Ser Leu Glu Phe Lys Arg Lys Ile Leu Glu Ser Gln
385          390          395          400
Arg Pro Pro Ala Gly Ile Pro Val Ala Pro Ser Ser Gly
405          410

```

<210> 3

<211> 342

[0003]

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> KFCC-GY4 VH域编码序列

<400> 3

```

gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag tttgtgaggt caggggcctc agtcaagttg 60
tcctgcacag cttctggctt caacattaaa gactactata tacactgggt gaagcagagg 120
cctgaacagg gcctggagtg gattggatgg attgacctg agaatgggtga tattgaatat 180
gccccgaagt tccagggcaa ggccactatg actgcagaca catcctcaa tacagcctac 240
ctgcagttca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtct ctaccaagaa 300
ggctcctggg gccaaaggcac cactctcaca gtctcctcag cc 342

```

<210> 4

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> KFCC-GY4 VH域

<400> 4

```

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

```

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR1序列

<400> 5

```

Asp Tyr Tyr Ile His
 1           5

```

<210> 6

<211> 17

[0004]

<212> PRT
<213> CDR2序列

<400> 6
Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ile Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3序列

<400> 7
Gln Glu Gly Ser
1

<210> 8
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> KFCC-GY4 VL域编码序列

<400> 8
gatgttgatga tgaccagac tccactcact ttgtcgggta ccattggaca accagcctcc 60
atctcttgca agtcaagtca gagcctctta aatagtgatg gaaagacata ttggaattgg 120
ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactt atctggtgtc taaattggac 180
tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga ttggggaggt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300
ttcacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 9
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> KFCC-GY4 VL域

<400> 9
Asp Val Val Met Thr Gln Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly Gln
1 5 10 15
Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Asp
20 25 30
Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45
Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

[0005]

Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser
65					70				75					80	
Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly	Thr
			85						90					95	
His	Phe	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
			100					105					110		

<210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR1序列

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

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR2序列

Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser
1				5		

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> CDR3序列

Trp	Gln	Gly	Thr	His	Phe	Pro	Phe	Thr
1				5				

<210> 13
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> KFCC-GY-5-VH域编码序列

caggtccaac	tgcagcagcc	tggggctgag	ctggtgaggc	ctggggcttc	agtgaagctg	60
tcttgaagg	cttctggcta	caccttcacc	agcaactaca	taaactgggt	gaaacagagg	120
cctggacagg	gccttgagtg	gacggaat	atttatcctt	ctgatggttt	tactaactac	180
aatcaaaagt	tcaaggacag	ggccacattg	actgtagaca	aatcctccag	cacagcctac	240

[0006]

atgcagctca gcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagaaacttc 300
gatgtctggg gcgcagggac cacggtcacc gtctcctcag cc 342

<210> 14
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> KFCC-GY5 VH域

<400> 14
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn
20 25 30
Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Asn Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser Ala

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> CDR1序列

<400> 15
Ser Asn Tyr Ile Asn
1 5

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2序列

<400> 16
Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 17
<211> 4

[0007]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3序列

<400> 17
Asn Phe Asp Val
1

<210> 18
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> KFCC-GY5 VL域编码序列

<400> 18
gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gaggcttgtc cacagtaatg gaaacaccta ttacagtgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acacagtctt caaccgattt 180
tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagggc cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300
ttcacgttcg gctcggggac aaagtiggaa ataaaaa 336

<210> 19
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> KFCC-GY5 VL域

<400> 19
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

[0008]

<220>

<223> CDR1序列

<400> 20

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2序列

<400> 21

Thr	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
1				5		

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3序列

<400> 22

Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Phe	Thr
1				5				

<210> 23

<211> 442

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 23

Met	Gly	Leu	Ala	Met	Glu	His	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Arg	Ala	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Ser	Arg	Gly	Cys	Trp	Tyr	Tyr	Leu	Arg	Tyr	Phe	Phe	Leu	Phe	Val
			20					25					30		
Ser	Leu	Ile	Gln	Phe	Leu	Ile	Ile	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Phe	Met	Val
		35				40					45				
Tyr	Gly	Asn	Val	His	Val	Ser	Thr	Glu	Ser	Asn	Leu	Gln	Ala	Thr	Glu
	50					55				60					
Arg	Arg	Ala	Glu	Gly	Leu	Tyr	Ser	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Thr	Ala	Ser
65					70				75					80	
Gln	Ser	Asn	Leu	Thr	Lys	Glu	Leu	Asn	Phe	Thr	Thr	Arg	Ala	Lys	Asp
				85				90						95	
Ala	Ile	Met	Gln	Met	Trp	Leu	Asn	Ala	Arg	Arg	Asp	Leu	Asp	Arg	Ile
			100				105					110			
Asn	Ala	Ser	Phe	Arg	Gln	Cys	Gln	Gly	Asp	Arg	Val	Ile	Tyr	Thr	Asn
		115				120					125				
Asn	Gln	Arg	Tyr	Met	Ala	Ala	Ile	Ile	Leu	Ser	Glu	Lys	Gln	Cys	Arg

[0009]

130	135	140
Asp Gln Phe Lys Asp Met Asn Lys Ser Cys Asp Ala Leu Leu Phe Met		
145	150	155
Leu Asn Gln Lys Val Lys Thr Leu Glu Val Glu Ile Ala Lys Glu Lys		160
	165	170
Thr Ile Cys Thr Lys Asp Lys Glu Ser Val Leu Leu Asn Lys Arg Val		175
	180	185
Ala Glu Glu Gln Leu Val Glu Cys Val Lys Thr Arg Glu Leu Gln His		190
	195	200
Gln Glu Arg Gln Leu Ala Lys Glu Gln Leu Gln Lys Val Gln Ala Leu		205
	210	215
Cys Leu Pro Leu Asp Lys Asp Lys Phe Glu Met Asp Leu Arg Asn Leu		220
225	230	235
Trp Arg Asp Ser Ile Ile Pro Arg Ser Leu Asp Asn Leu Gly Tyr Asn		240
	245	250
Leu Tyr His Pro Leu Gly Ser Glu Leu Ala Ser Ile Arg Arg Ala Cys		255
	260	265
Asp His Met Pro Ser Leu Met Ser Ser Lys Val Glu Glu Leu Ala Arg		270
	275	280
Ser Leu Arg Ala Asp Ile Glu Arg Val Ala Arg Glu Asn Ser Asp Leu		285
	290	295
Gln Arg Gln Lys Leu Glu Ala Gln Gln Gly Leu Arg Ala Ser Gln Glu		300
305	310	315
Ala Lys Gln Lys Val Glu Lys Glu Ala Gln Ala Arg Glu Ala Lys Leu		320
	325	330
Gln Ala Glu Cys Ser Arg Gln Thr Gln Leu Ala Leu Glu Glu Lys Ala		335
	340	345
Val Leu Arg Lys Glu Arg Asp Asn Leu Ala Lys Glu Leu Glu Glu Lys		350
	355	360
Lys Arg Glu Ala Glu Gln Leu Arg Met Glu Leu Ala Ile Arg Asn Ser		365
	370	375
Ala Leu Asp Thr Cys Ile Lys Thr Lys Ser Gln Pro Met Met Pro Val		380
385	390	395
Ser Arg Pro Met Gly Pro Val Pro Asn Pro Gln Pro Ile Asp Pro Ala		400
	405	410
Ser Leu Glu Glu Phe Lys Arg Lys Ile Leu Glu Ser Gln Arg Pro Pro		415
	420	425
Ala Gly Ile Pro Val Ala Pro Ser Ser Gly		430
	435	440

<210> 24

<211> 2317

<212> DNA

<213> 智慧人

<400> 24

```

cggacgcgtg ggtgagcagg gacggtgcac cggacggcgg gatcgagcaa atgggtcttg 60
ccatggagca cggagggtcc tacgtcggg cggggggcag ctctcggggc tgctggtatt 120
acctgcgcta cttcttcctc ttcgtctccc tcatccaatt cctcatcatc ctggggctcg 180
tgctcttcac ggtctatggc aacgtgcacg tgagcacaga gtccaacctg caggccaccg 240
agcgcgcgagc cgagggccta tacagtcacg tcctagggct cacggcctcc cagtccaact 300
tgaccaagga gctcaacttc accaccgcg ccaaggatgc catcatgcag atgtggtga 360
atgctcgccg cgacctggac cgcataatg ccagcttcg ccagtgccag ggtgaccggg 420
tcatctacac gaacaatcag aggtacatg ctgccatcat cttgagttag aagcaatgca 480
gagatcaatt caaggacatg aacaagagct gcgatgcctt gctcttcacg ctgaatcaga 540
aggtgaagac gctggaggtg gagatagcca aggagaagac catttgcaact aaggataagg 600

```

[0010]

```

aaagcgtgct gctgaacaaa cgcgtggcgg aggaacagct ggttgaatgc gtgaaaaccc 660
gggagctgca gcaccaagag gccagctgg ccaaggagca actgcaaaag gtgcaagccc 720
tctgcctgcc cctggacaag gacaagtttg agatggacct tcgtaacctg tggagggact 780
ccattatccc acgcagcctg gacaaccttg gttacaacct ctaccatccc ctgggctcgg 840
aattggcctc catccgcaga gcctgcgacc acatgccag cctcatgagc tccaaggtgg 900
aggagctggc ccggagcctc cgggcggata tcgaacgcgt ggcccgcgag aactcagacc 960
tccaacgcca gaagctggaa gcccagcagg gcctgcgggc cagtcaggag gcgaaacaga 1020
aggtggagaa ggaggctcag gcccgggagg ccaagctcca agctgaatgc tcccggcaga 1080
cccagctagc gctggaggag aaggcgggtgc tgcggaagga acgagacaac ctggccaagg 1140
agctggaaga gaagaagagg gaggcggagc agctcaggat ggagctggcc atcagaaact 1200
cagccctgga cacctgcac aagaccaagt cgcagccgat gatgccagt tcaaggccca 1260
tgggccctgt ccccaacccc cagcccatcg acccagctag cctggaggag ttcaagagga 1320
agatcctgga gtcccagagg cccctgcag gcacccctgt agcccatcc agtggctgag 1380
gaggctccag gcctgaggac caagggatgg ccgactcgg cggtttgcgg aggatgcagg 1440
gatatgtca cagcgcgcc cacaaccccc tcccgcgcc cccaaccacc cagggccacc 1500
atcagacaac tccctgcatg caaaccccta gtaccctctc acaccgcac ccgcgcctca 1560
cgatccctca cccagagcac acggccgcgg agatgacgtc acgcaagcaa cggcgtgac 1620
gtcacatata accgtggtga tggcgtcacg tggccatgta gacgtcacga agagatatag 1680
cgatggcgct gtgcagatgc agcacgtcgc acacagacat ggggaacttg gcatgacgtc 1740
acaccgagat gcagcaacga cgtcacgggc catgtcgacg tcacacatat taatgtcaca 1800
cagacgcggc gatggcatca cacagacggt gatgatgtca cacacagaca cagtgacaac 1860
acacaccatg acaacgacac ctatagatat ggcaccaaca tcacatgcac gcatgccctt 1920
tcacacacac tttctacca attctcacct agtgtcacgt tccccgacc ctggcacacg 1980
ggccaaggta cccacaggat cccatccct cccgcacagc cctgggcccc agcacctccc 2040
ctctccagc ttcttggec cccagccact tctcacecc cagtgcctgg acccgagggt 2100
gagaacagga agccattcac ctccgtcct tgagcgtgag tgtttccagg accccctcgg 2160
ggccctgagc cgggggtgag ggtcacctgt tgcgggagg ggagccactc cttctcccc 2220
aactcccagc cctgcctgtg gcccgttgaa atgttggtgg cacttaataa atattagtaa 2280
atccttaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa 2317

```

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引子

<400> 25

cctgcaggca tccctgta

18

<210> 26

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引子

<400> 26

cgggcatcc cttggt

16

<210> 27

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

[0011]

<220>	
<223> 寡核苷酸探针	
<400> 27	
cccatccag tggctg	16
<210> 28	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸引子	
<400> 28	
ccttgagcgt gagtgtttcc a	21
<210> 29	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸引子	
<400> 29	
gtcccccaac ttgagatgta tgaag	25
<210> 30	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸引子	
<400> 30	
ggcagggctg ggagttg	17
<210> 31	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸引子	
<400> 31	
gtctcaagtc agtgtacagg taagc	25
<210> 32	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸探针	

[0012]

<400> 32 ctcccaggga gaccaa	16
<210> 33 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 寡核苷酸探针	
<400> 33 aaggagtggc tcccctcc	18
<210> 34 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 寡核苷酸引子	
<400> 34 catatgaacg tgcacgtgag cacagagtcc	30
<210> 35 <211> 28 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 寡核苷酸引子	
<400> 35 ggatcctgag catatccctg catcctcc	28

鉴别极端差异性表现基因的算法

“肿瘤”和“相邻非肿瘤组织”对



基因表现侧写研究



通过 MAS 5.0 和 dChip

判断基因表现的

“存在对不存在/边缘”状态



在配对的肿瘤和相邻非肿瘤

组织之间鉴别极端差异性表现基因



肿瘤中“存在”

对相邻组织中“不存在/边缘”



严格过滤

肿瘤特异性基因

肿瘤中“不存在/边缘”

对相邻组织中“存在”



严格过滤

正常或非肿瘤组织特异性

图 1

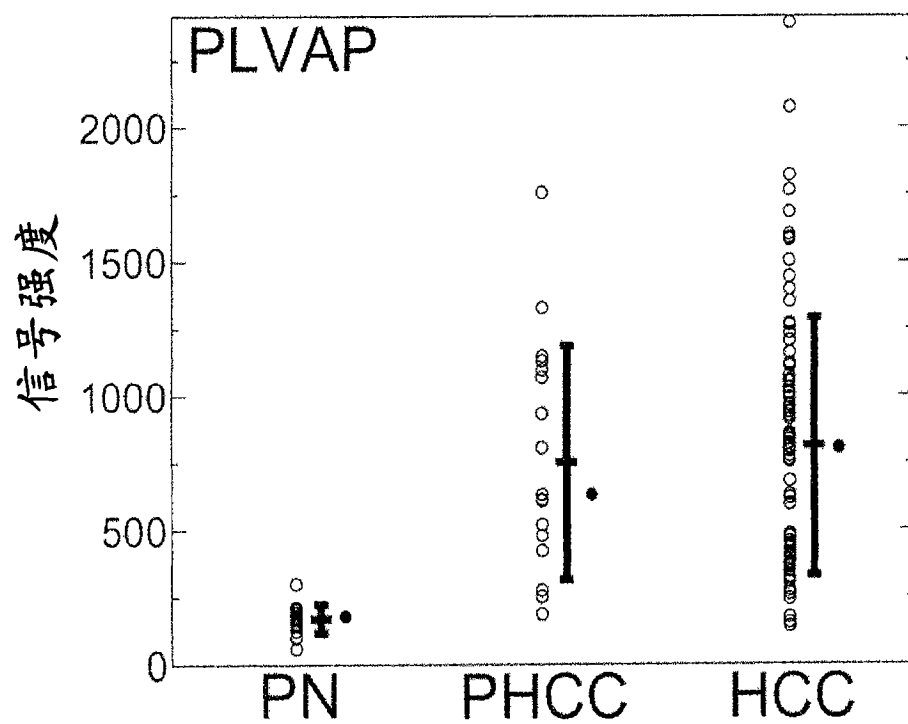


图 2

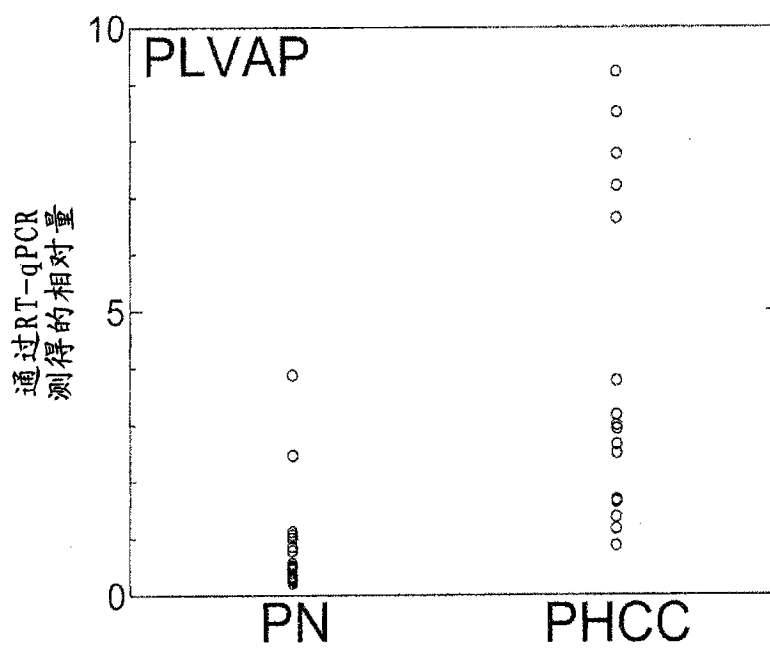


图 3A

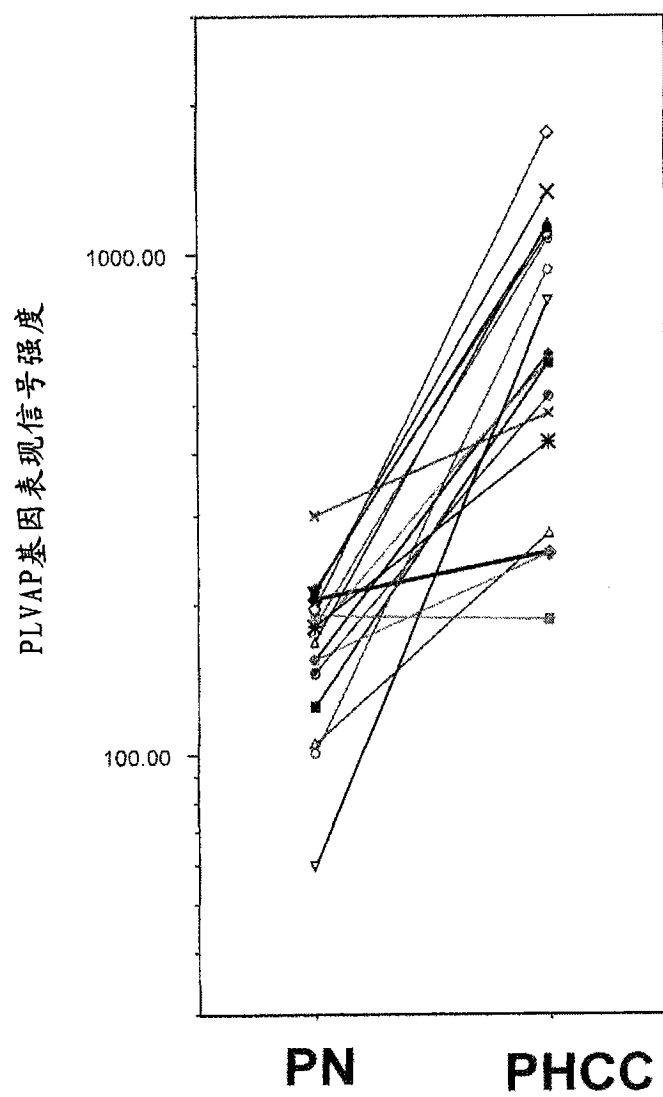


图 3B

1 atgggcagcagccatcatcatcatcacagcagcggcctggtg
M G S S H H H H H S S G L V
46 ccgcgcggcagccatgatgaacgtgcacgtgagcacagagtccaac
P R G S H M N V H V S T E S N
91 ctgcaggccaccgagcgcgcgagccgagggcctatacagtcagctc
L Q A T E R R A E G L Y S Q L
136 ctagggctcacggcctcccagtcctaacttgaccaaggagctcaac
L G L T A S Q S N L T K E L N
181 ttcaccacccgcgccaaggatgccatcatgcagatgtggctgaat
F T T R A K D A I M Q M W L N
226 gctcgcgcgcacctggaccgcatcaatgccagcttccgcccagtg
A R R D L D R I N A S F R Q C
271 caggggtgaccgggtcatctacacgaacaatcagaggtacatggct
Q G D R V I Y T N N Q R Y M A
316 gccatcatcttgagtgagaagcaatgcagagatcaattcaaggac
A I I L S E K Q C R D Q F K D
361 atgaacaagagctgcgatgccttgctcttcatgctgaatcagaag
M N K S C D A L L F M L N Q K
406 gtgaagacgctggaggtggagatagccaaggagaagaccatttgc
V K T L E V E I A K E K T I C
451 actaaggataaggaaagcgtgctgctgaacaaacgcgtggcggag
T K D K E S V L L N K R V A E
496 gaacagctggttgaatgcgtgaaaacccgggagctgcagcaccaa
E Q L V E C V K T R E L Q H Q
541 gagcgccagctggccaaggagcaactgcaaaagggtgcaagccctc
E R Q L A K E Q L Q K V Q A L
586 tgcctgcccctggacaaggacaagtttgagatggaccttcgtaac
C L P L D K D K F E M D L R N
631 ctgtggagggactccattatcccacgcagcctggacaacctgggt
L W R D S I I P R S L D N L G
676 tacaacctctaccatcccctgggctcgggaattggcctccatccgc
Y N L Y H P L G S E L A S I R
721 agagcctgcgaccacatgccagcctcatgagctccaagggtggag
R A C D H M P S L M S S K V E
766 gagctggccccggagcctccgggcgatatacgaacgcgtggccccg
E L A R S L R A D I E R V A R
811 gagaactcagacctccaacgccagaagctggaagcccagcagggc
E N S D L Q R Q K L E A Q Q G
856 ctgcggggccagtcaggaggcgaaacagaaggtggagaaggaggct
L R A S Q E A K Q K V E K E A
901 caggccccgggaggccaagctccaagctgaatgctcccggcagacc
Q A R E A K L Q A E C S R Q T
946 cagctagcgtgaggaggaaggcggtgctgcggaaggaacgagac
Q L A L E E K A V L R K E R D

图 4A

```

991 aacctggccaaggagctggaagagaagaagagggaggcggagcag
    N L A K E L E E K K R E A E Q
1036 ctcaggatggagctggccatcagaaactcagccctggacacctgc
    L R M E L A I R N S A L D T C
1081 atcaagaccaagtcgcagccgatgatgccagtgtcaaggcccatg
    I K T K S Q P M M P V S R P M
1126 ggccctgtccccaacccccagcccatcgacccagctagcctggag
    G P V P N P Q P I D P A S L E
1171 gagttcaagaggaagatcctggagtcccagaggccccctgcaggc
    E F K R K I L E S Q R P P A G
1216 atccctgtagcccatccagtggctga
    I P V A P S S G * (SEQ ID NO:2)
    ggaggctccaggcctgaggaccaagggatggccccgactcggcggt
    ttgcggaggatgcagggatatgctcacagggattc (SEQ ID NO:1)

```

图 4B

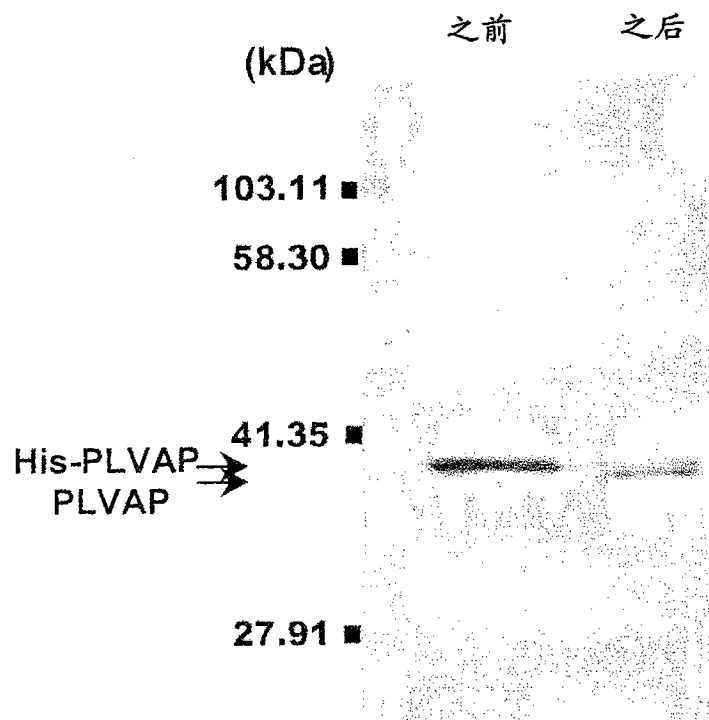


图 5

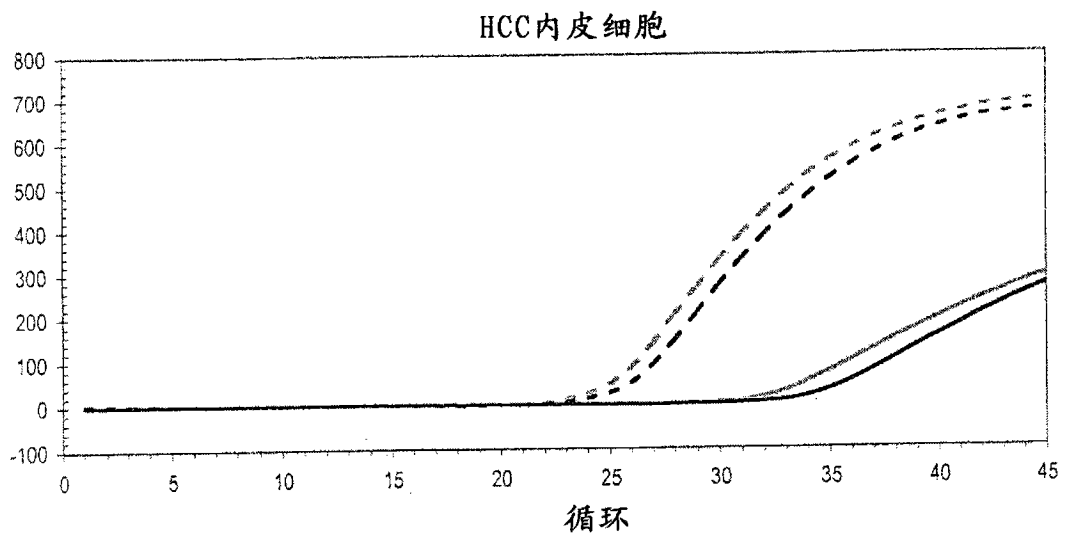


图 6A

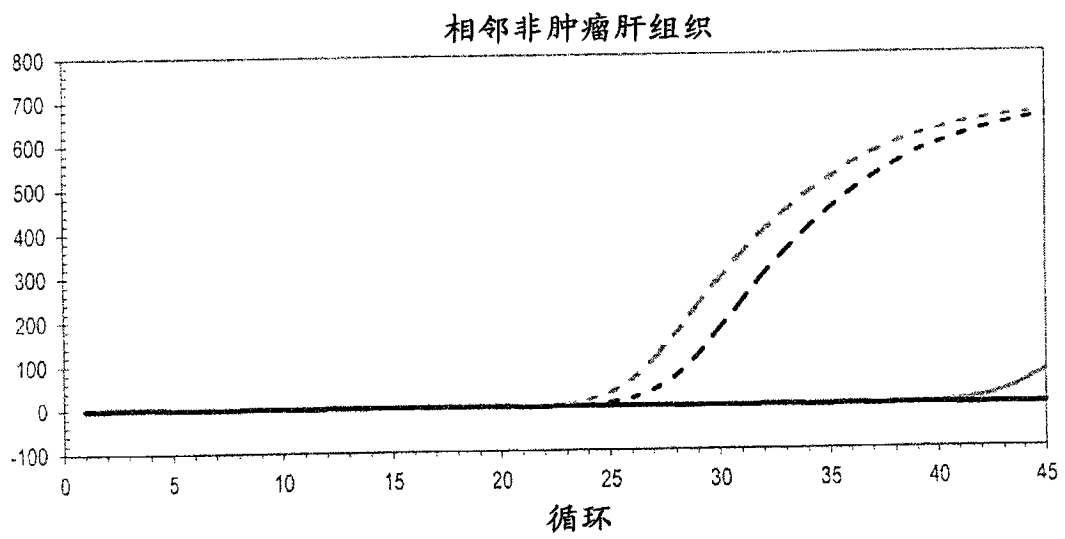


图 6B

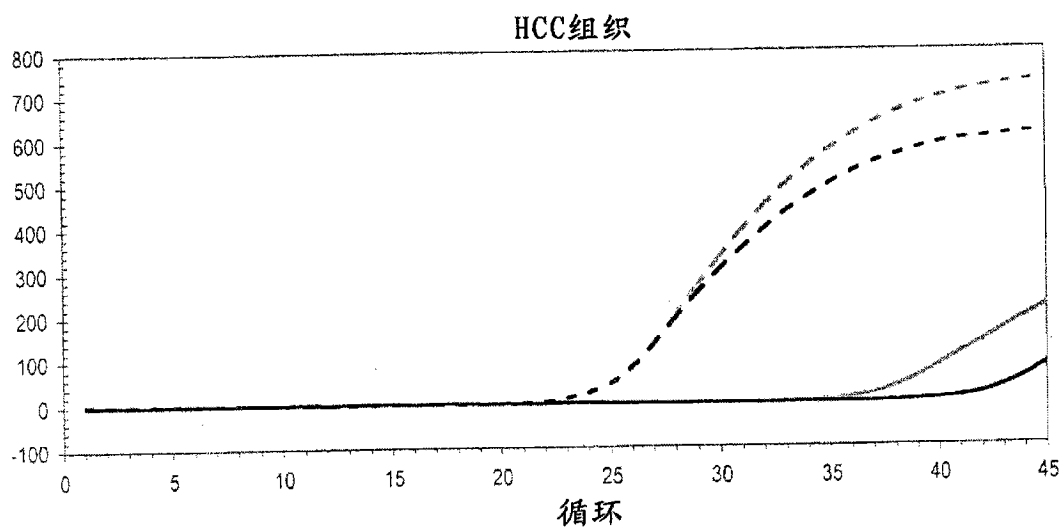


图 6C

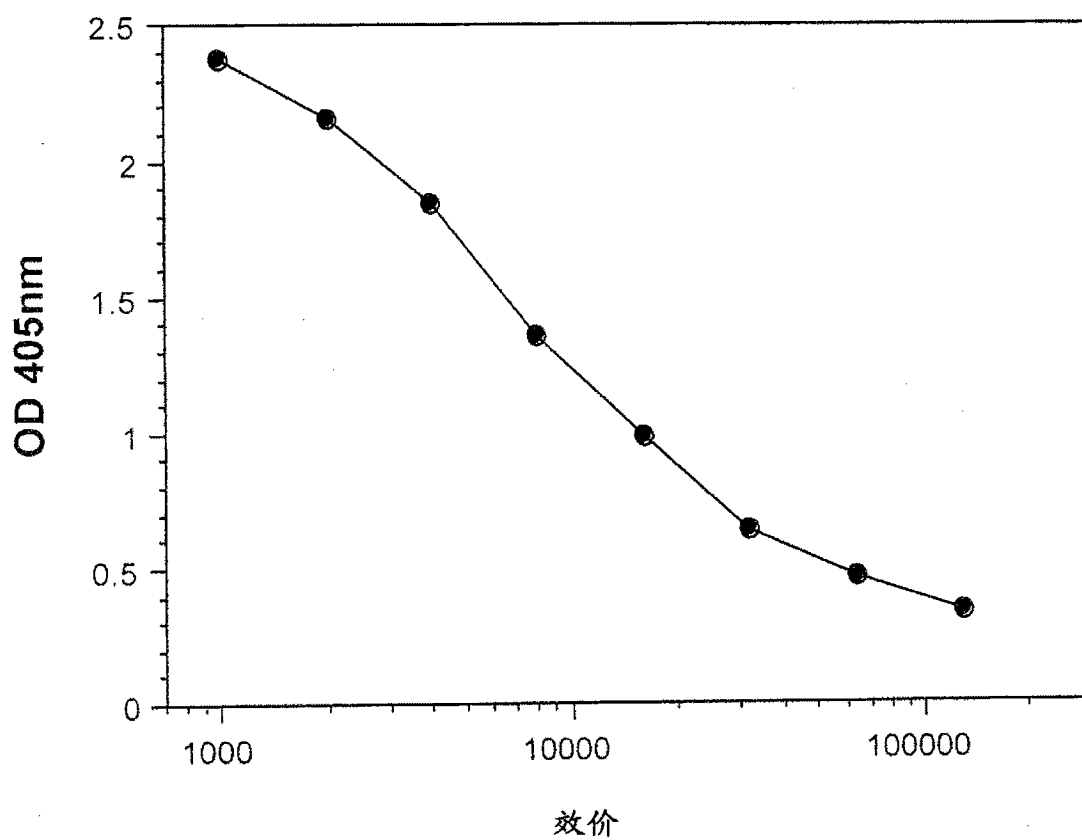


图 7

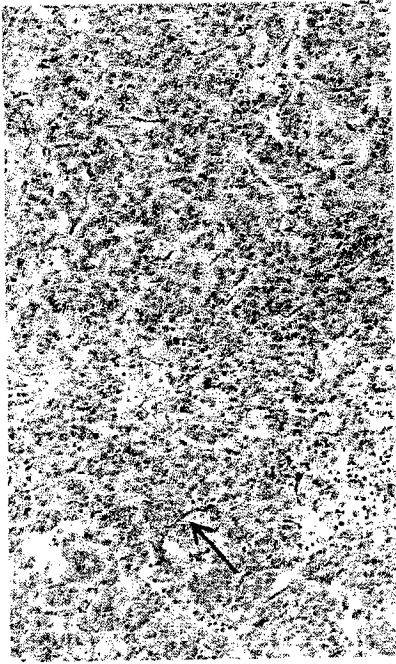


图 8A

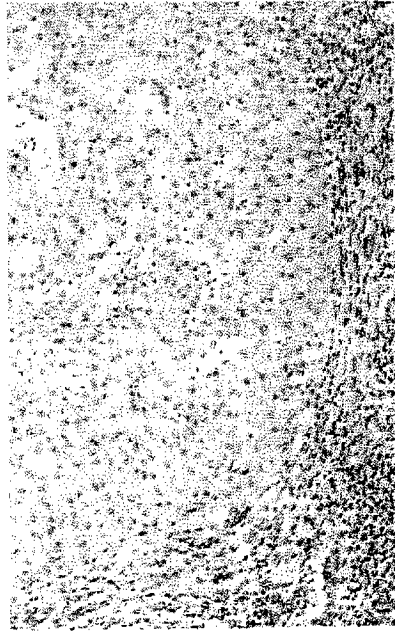


图 8B



图 8C

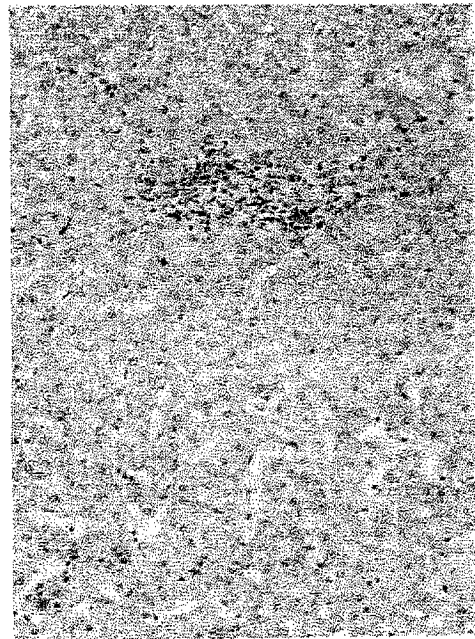


图 8D

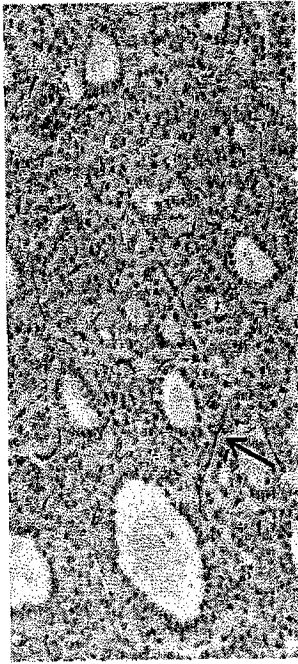


图 8E

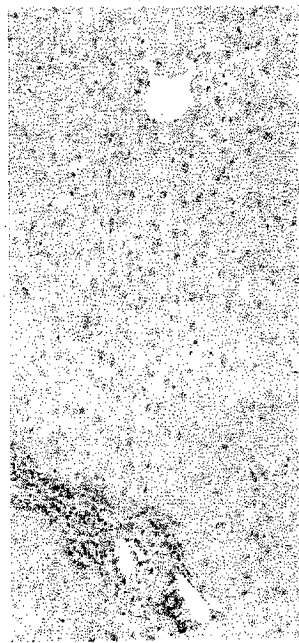


图 8F

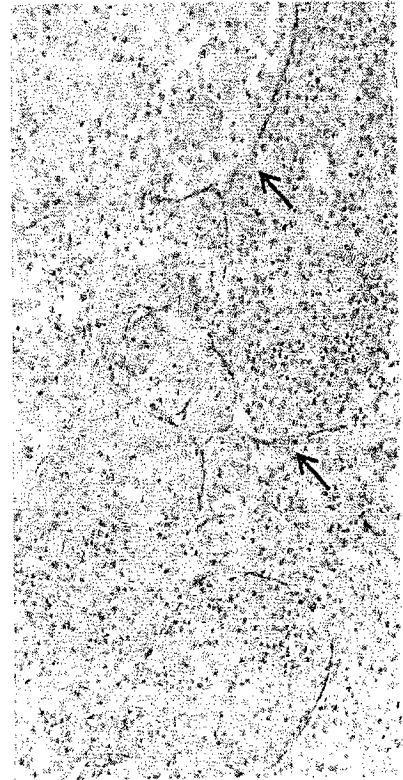


图 9A



图 9B

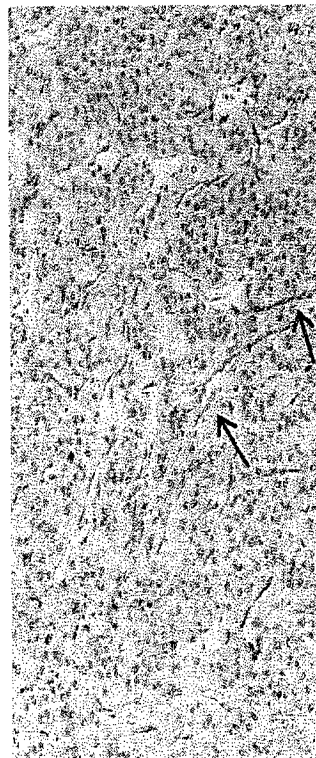


图 9C

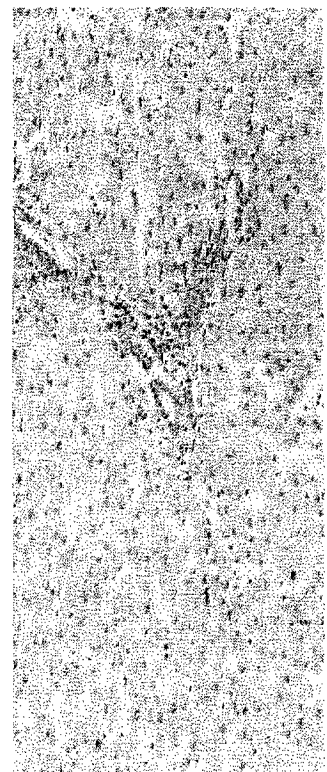


图 9D



图 9E

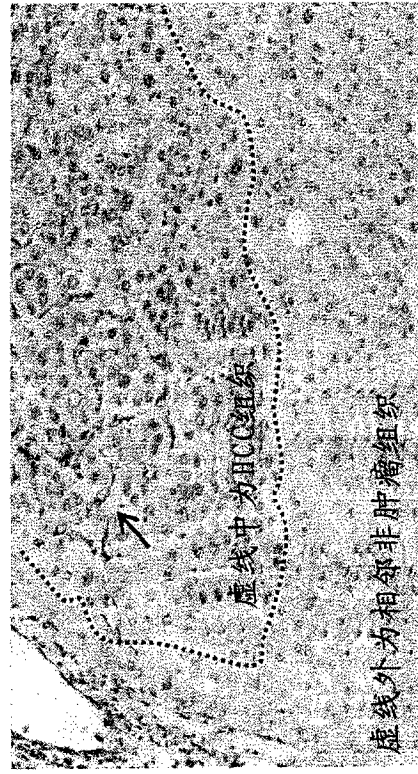


图 9F

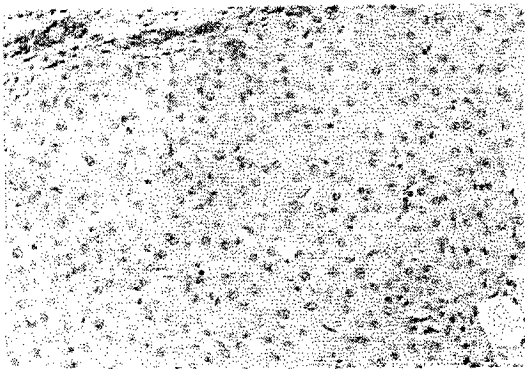


图 10A

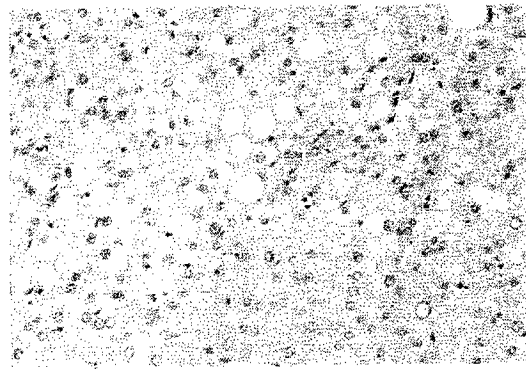


图 10B

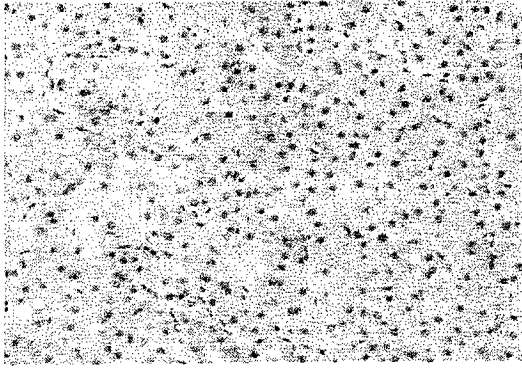


图 10C

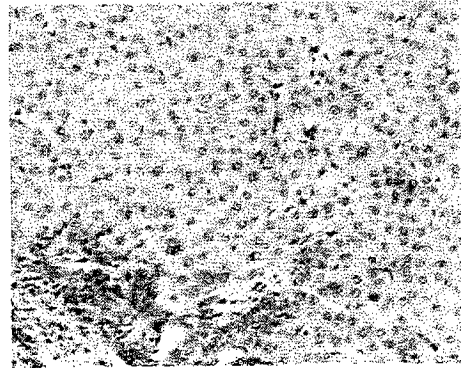


图 10D

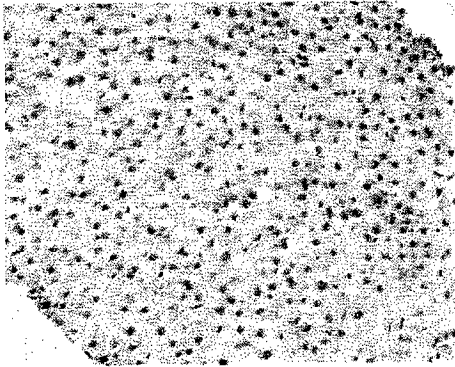


图 10E

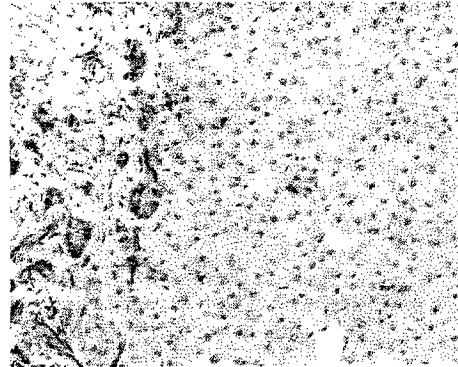


图 10F

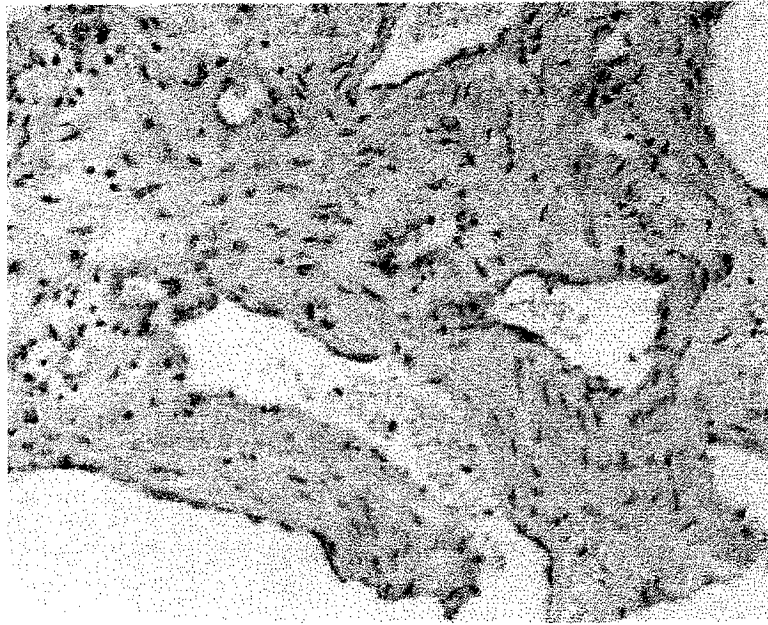


图 11A

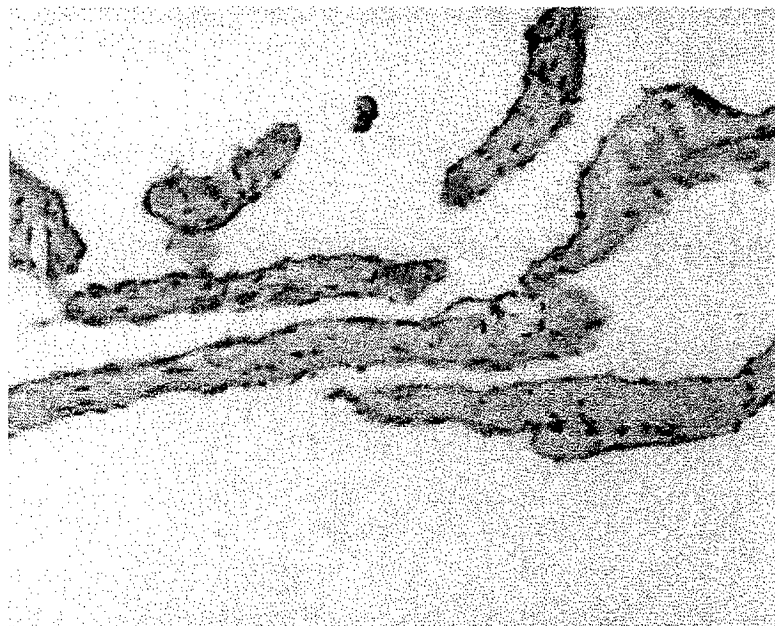


图 11B

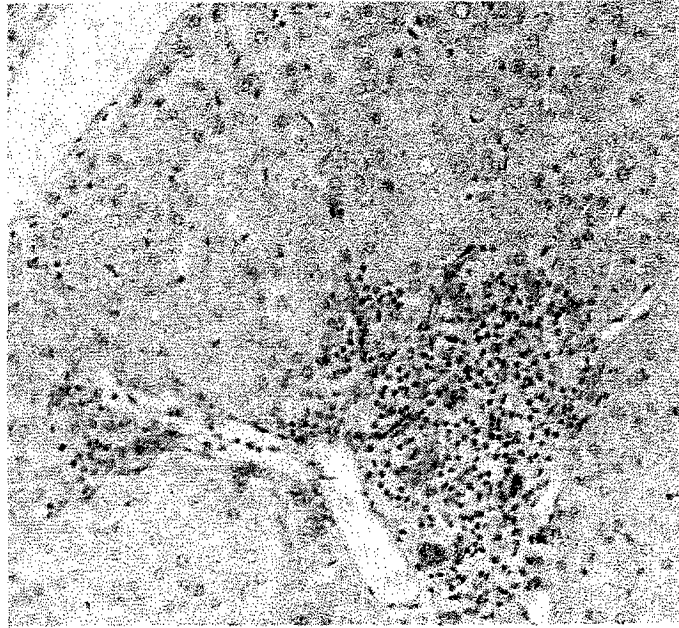


图 12A

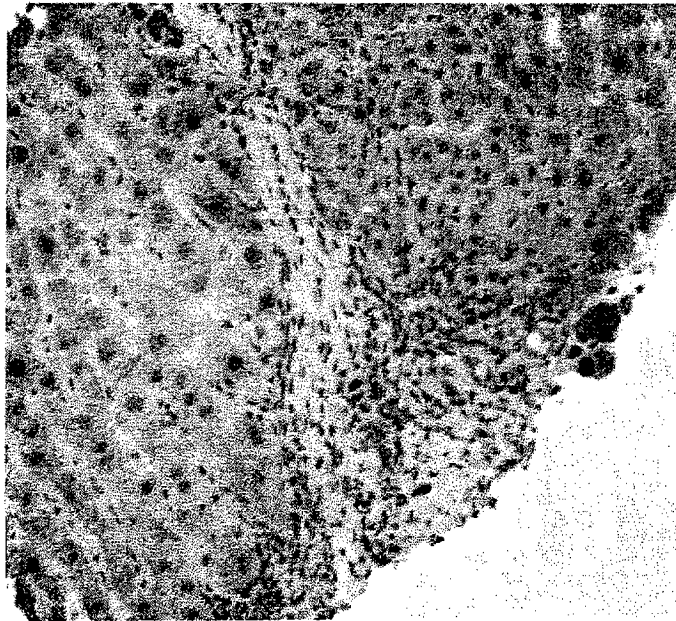


图 12B

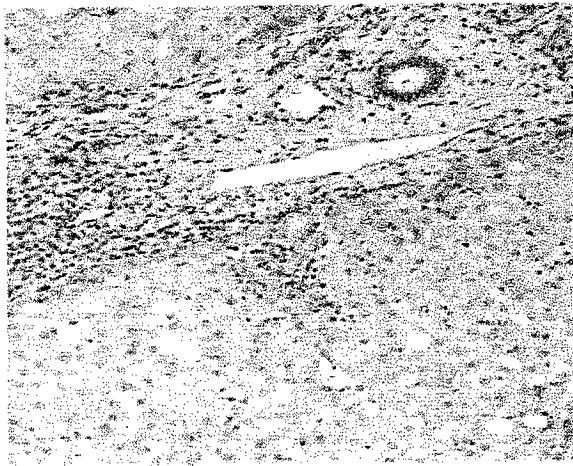


图 13A

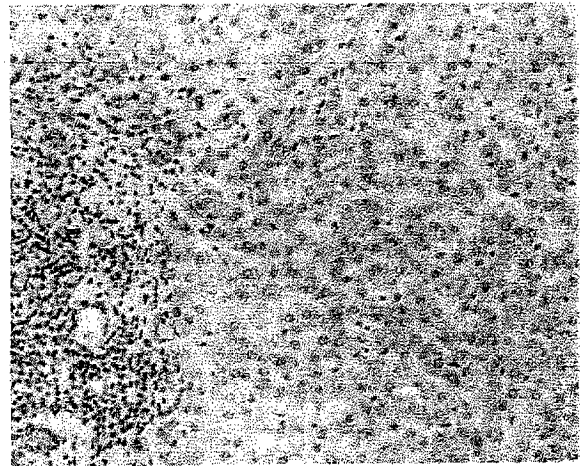


图 13B

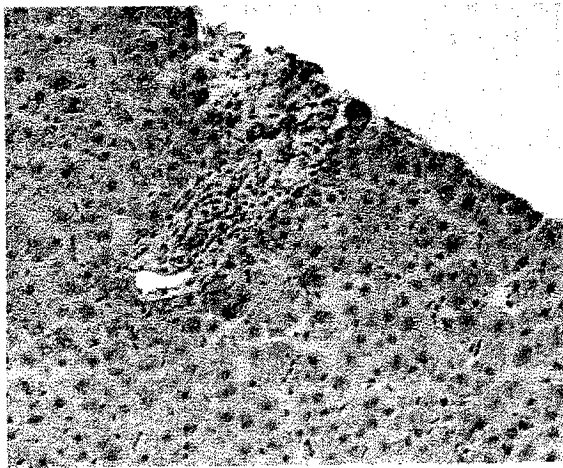


图 13C

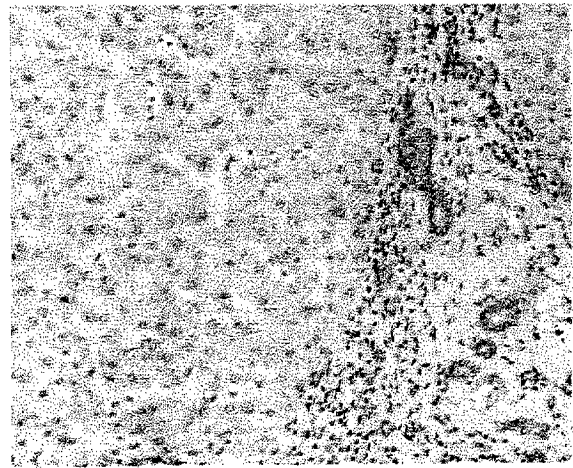


图 13D



图 14A

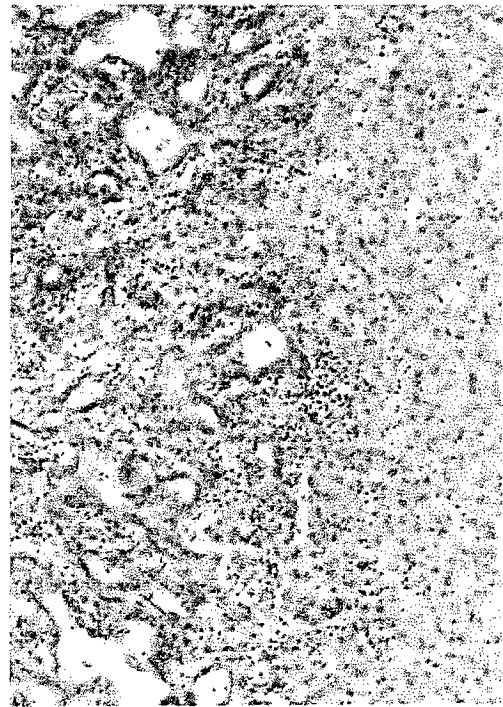


图 14B

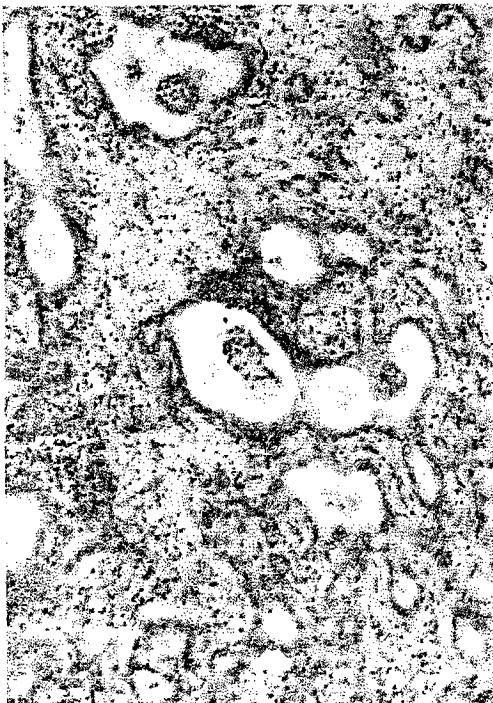


图 14C

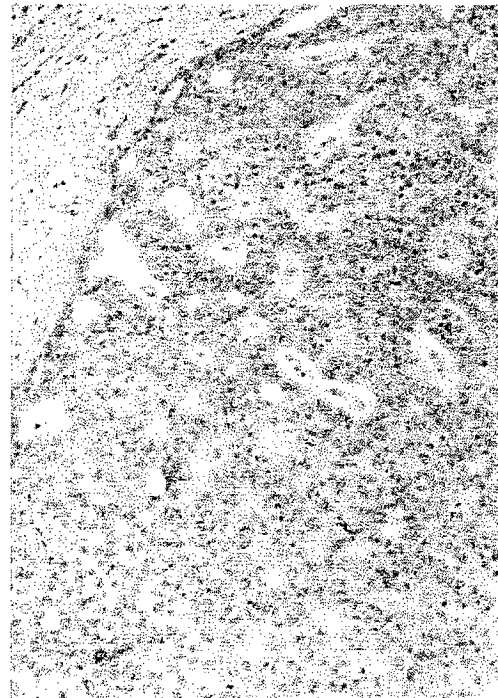


图 14D

GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGTTTGTGAGGTCAGGGGCTCAGTCAAGTTGTCTCCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAA 90
GACTACTATATACACTGGGTGAAGCAGAGGCCCTGAACAGGGGCTGGAGTGGATTGGATTGATCCCTGAGAAATGGTGATATTGAATAT 180
GCCCCGAAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATGACTGCAGACACATCCTCCCAATACAGCCCTACCTGCAGTTCAGCAGCCCTGACATCTGAGGAC 270
ACTGCCGTCTATTACTGTCTCTACCAAGAAGGCTCCTGGGGCCAAAGGCACCACTCTCAGAGTCTCCTCAGCC 342 (SEQ ID NO:3)

E V Q L Q Q S G A E F V R S G A S V K L S C T A S G F N I K
D Y Y I H W V K Q R P E Q G L E W I G W I D P E N G D I E Y

CDR1

CDR2

A P K F Q G K A T M T A D T S S N T A Y L Q F S S L T S E D
T A V Y Y C L Y Q E G S W G Q G T T L T V S S A (SEQ ID NO:4)

CDR3

CDR1: D Y Y I H (SEQ ID NO:5)
CDR2: W I D P E N G D I E Y A P K F Q G (SEQ ID NO:6)
CDR3: Q E G S (SEQ ID NO:7)

图 15A

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTTTGTGGTTTACCAATTGGACAACCCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTA 90
AATAGTGATGGAAAGACATAATTGAAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCCCTAATCTATCTGGTGTCTAAATTGGAC 180
TCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTT 270
TATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA 336 (SEQ ID NO:8)

D	V	V	M	T	Q	T	P	L	T	L	S	V	T	I	G	Q	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	
N	S	D	G	K	T	Y	L	N	W	L	L	Q	R	P	G	Q	S	P	K	R	L	I	Y	L	V	S	K	L	D	
CDR1																CDR2														
S	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V	
Y	Y	C	W	Q	G	T	H	F	P	F	T	F	G	G	T	K	L	E	I	K	(SEQ ID NO:9)									

CDR3

CDR1: K S S Q S L L N S D G K T Y L N (SEQ ID NO:10)
CDR2: L V S K L D S (SEQ ID NO:11)
CDR3: W Q G T H F P F T (SEQ ID NO:12)

图 15B

69

CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCTTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACC 90
AGCAACTACATAAACTGGGTGAAACAGAGGGCCTTGACAGGGCCTTGAGTGGATCGGAAATATTATCCTTCTGATGGTTTACTAACTAC 180
AATCAAAAGTTCAAGGACAGGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCCGACATCTGAGGAC 270
TCTGCGGTCTATTACTGTACAGAAACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGACCGGTACCGGTCTCCTCAGCC 342 (SEQ ID NO:13)

Q V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S C K A S G Y T F T
S N Y I N W V K Q R P G Q G L E W I G N I Y P S D G F T N Y

CDR1

CDR2

N Q K F K D R A T L T V D K S S T A Y M Q L S S P T S E D

S A V Y Y C T R N F D V W G A G T T V T V S S A (SEQ ID NO:14)

CDR3

CDR1: S N Y I N (SEQ ID NO:15)

CDR2: N I Y P S D G F T N Y N Q K F K D (SEQ ID NO:16)

CDR3: N F D V (SEQ ID NO:17)

图 16A

GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAAGATCTAGTCAGAGCCTTGTC 90
CACAGTAAATGGAAACACCTATTACAGTGGTACCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCTGATCTACACAGTTTCCAAACCGATT 180
TCTGGGGTCCCAGACAGAGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGCCAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTT 270
TATTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTCTTTCACGTTCTGGCTCGGGGACAAAAGTTGGAATAAAA 336 (SEQ ID NO:18)

D	V	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V		
CDR1																															
H	S	N	G	N	T	Y	L	Q	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	T	V	S	N	R	F		
CDR2																															
S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	P	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V		
Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K	(SEQ ID NO:19)									

CDR3

CDR1: R S S Q S L V H S N G N T Y L Q (SEQ ID NO:20)
CDR2: T V S N R F S (SEQ ID NO:21)
CDR3: S Q S T H V P F T (SEQ ID NO:22)

图 16B
71

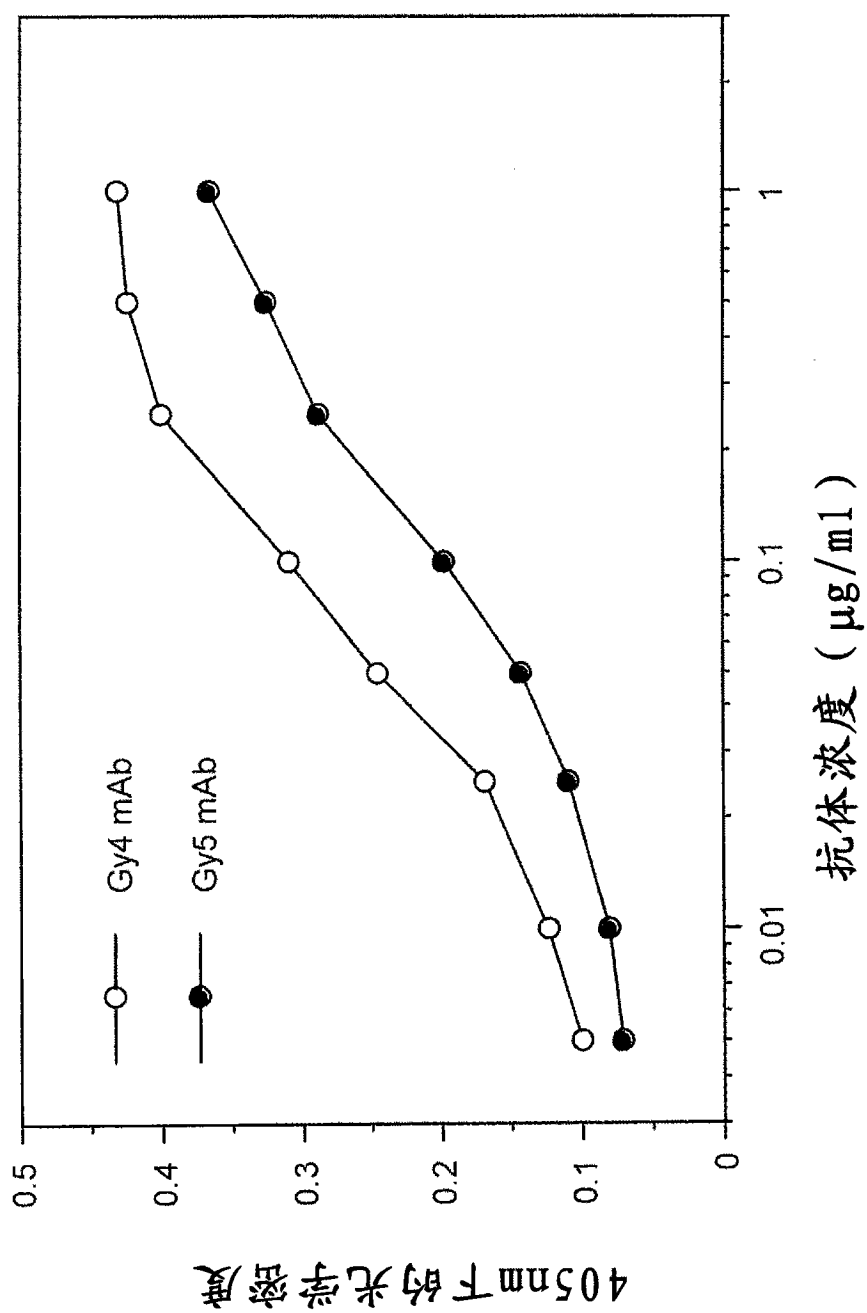


图 17

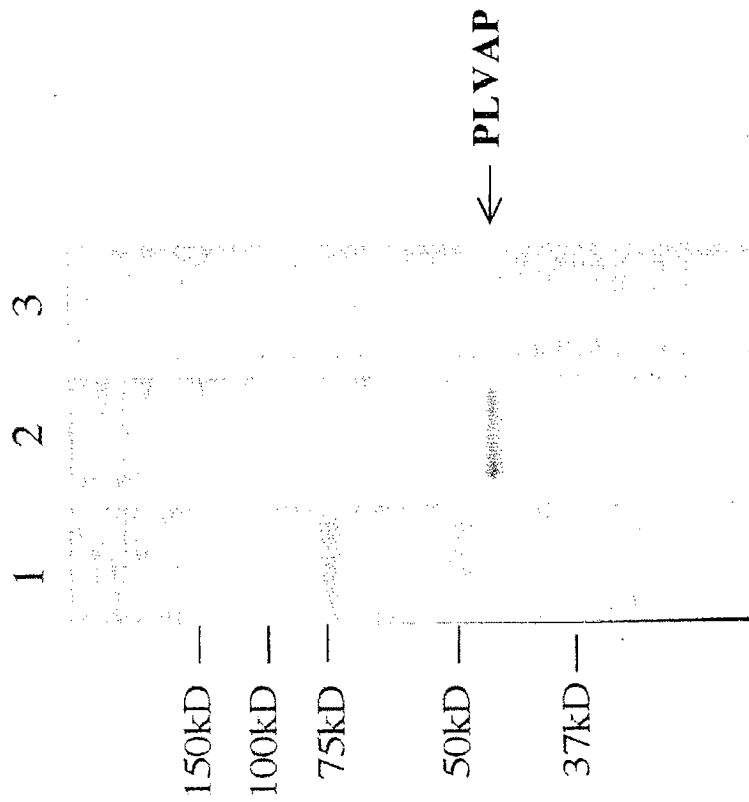


图 18

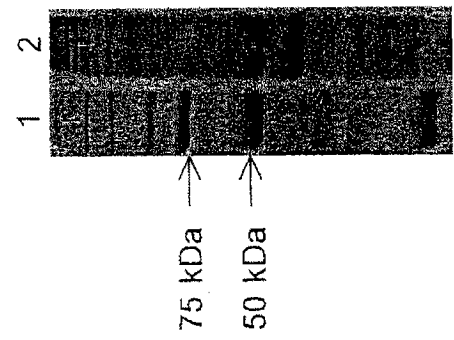


图 19A

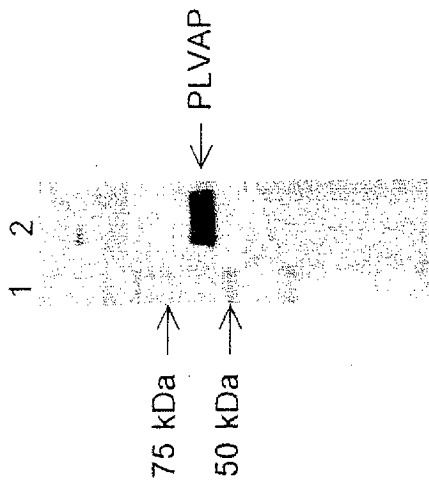


图 19B

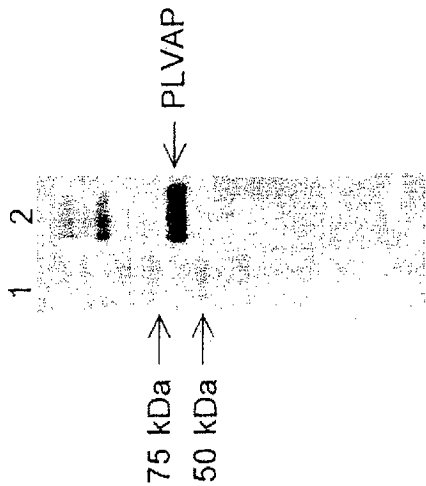


图 19D

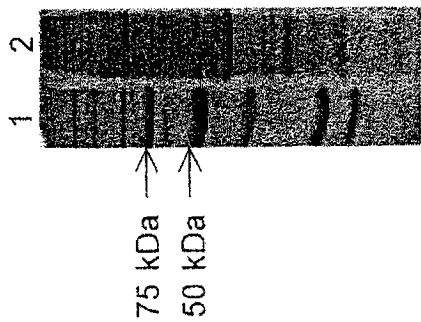


图 19C

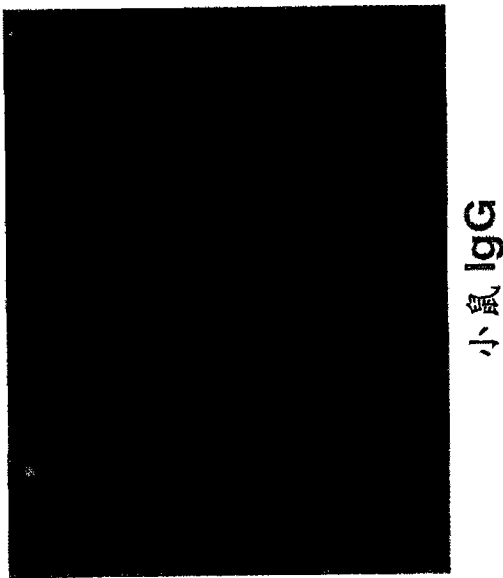
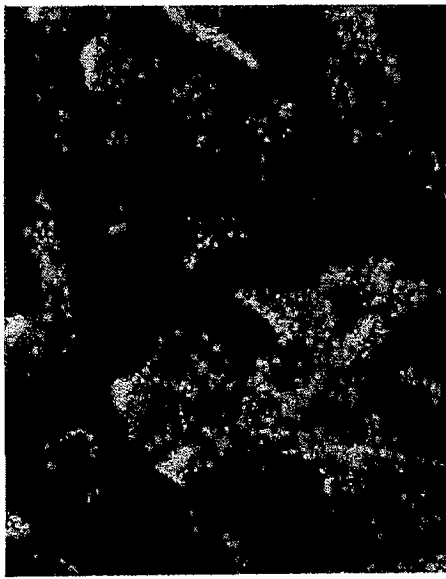


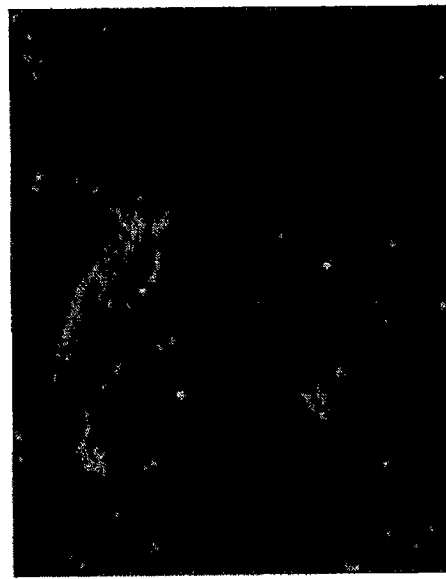
图 20A

小鼠 IgG



小鼠 vWF

图 20B



KFC-CGY4

图 20C



KFC-CGY5

图 20D



A-CGY4

图 21A

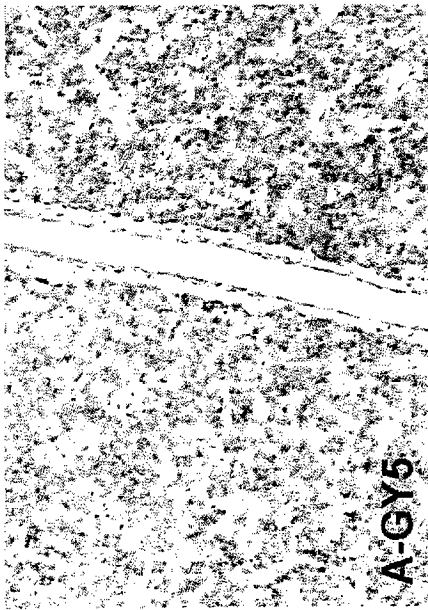


图 21B

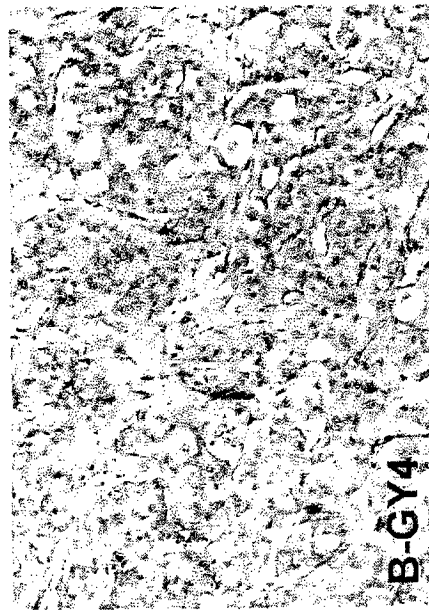


图 21C

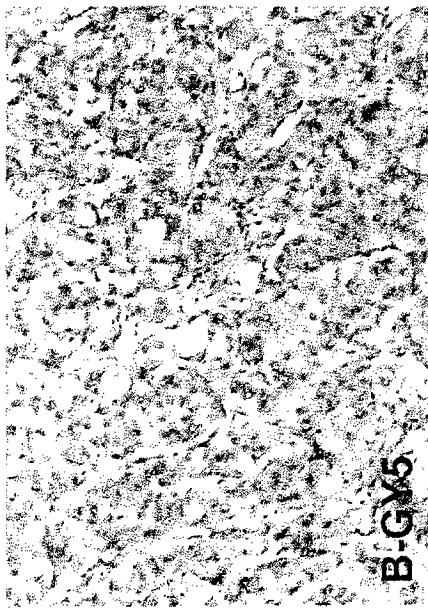


图 21D

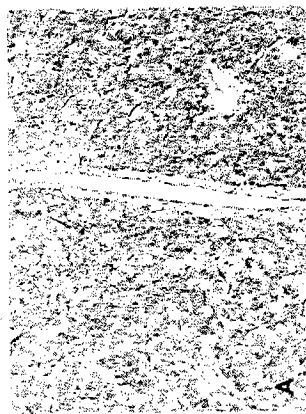


图 22A

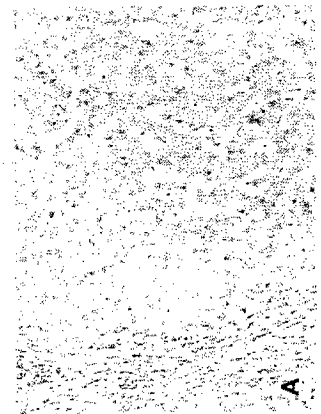


图 22B



图 22C

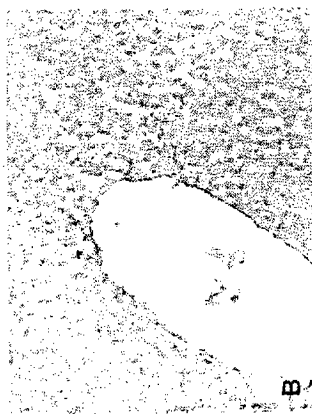


图 22D

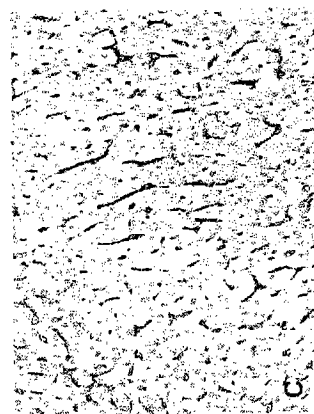


图 22E

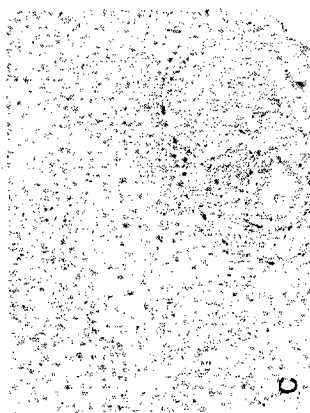


图 22F

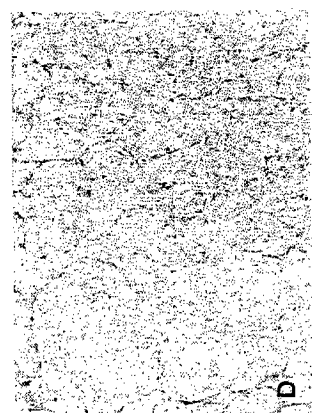


图 22G

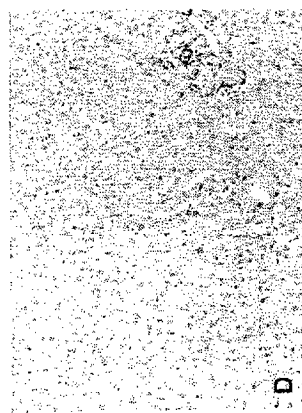


图 22H

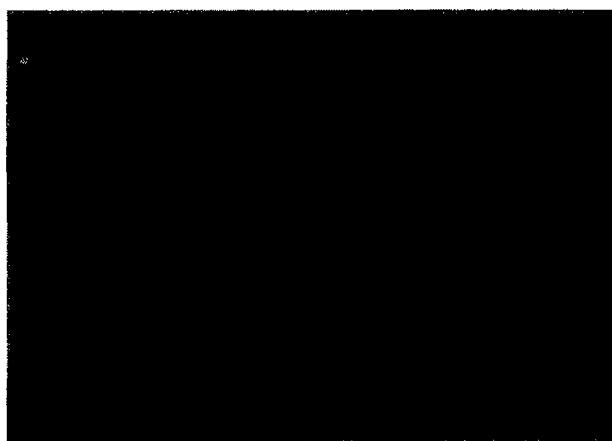


图 23A

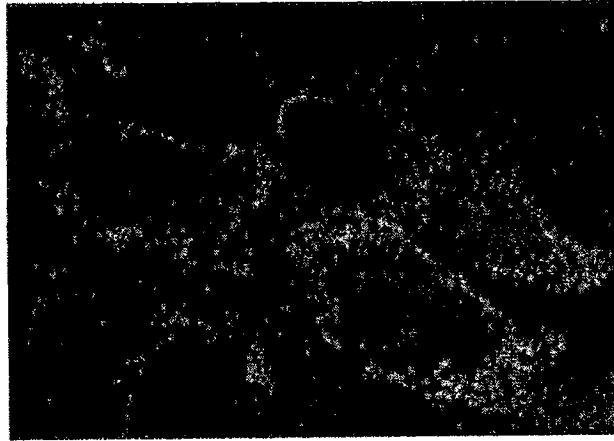


图 23B

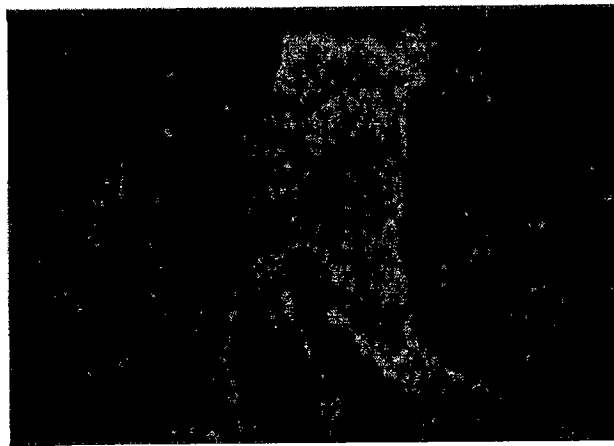


图 23C

1 mglamehggs yaraggssrg cwyylyryffl fvsligflil lglvlfmvyg nvhvstesnl
 61 gaterraegl ysqllgltas qsnltkelnf ttrakdaimq mwlnarrdld rinasfrqcg
 121 gdrviytnnq rymaaiilse kqcrdqfkd m nkscdallfm lnqkvktlev eiakektict
 181 kdkesvllnk rvaeeqlvec vktrelqhge rqlakeqlqk vqalclpldk dkfemdlrnl
 241 wrdsiiprsl dnlgynlyhp lgselasirr acdhmpslms skveelarsl radiervare
 301 nsdlqrqkle agqglrasqe akqkvekeaq areaklgaec srqtqlalee kavlrkerdn
 361 lakeleekkr eaeqlrmela irnsaltdci ktksqpmmpv srpmgvpvnp qpdpaslee
 421 fkrkilesqr ppagipvaps sg (SEQ ID NO:23)

图 24

1 cggacgcgtg ggtgagcagg gacggtgcac cggacggcgg gatcgagcaa atgggtctgg
61 ccatggagca cggaggggtcc tacgctcggg cggggggcag ctctcggggc tgctggtatt
121 acctgcgcta cttcttcctc ttctctccc tcatccaatt cctcatcatc ctggggctcg
181 tgctcttcat ggtctatggc aacgtgcacg tgagcacaga gtccaacctg caggccaccg
241 agcgccgagc cgagggccta tacagtcagc tctaggggt cacggcctcc cagtccaact
301 tgaccaagga gctcaacttc accaccgcg ccaaggatgc catcatgcag atgtggctga
361 atgctcgccg cgacctggac cgcataatg ccagcttccg ccagtgccag ggtgaccggg
421 tcatctacac gaacaatcag aggtacatgg ctgccatcat cttgagttag aagcaatgca
481 gagatcaatt caaggacatg aacaagagct gcgatgcctt gctcttcatg ctgaatcaga
541 aggtgaagac gctggagggtg gagatagcca aggagaagac catttgcact aaggataagg
601 aaagcgtgct gctgaacaaa cgcgtggcgg aggaacagct ggttgaatgc gtgaaaaccc
661 gggagctgca gcaccaagag cgccagctgg ccaaggagca actgcaaaaag gtgcaagccc
721 tctgcctgoc cctggacaag gacaagtttg agatggacct tcgtaacctg tggagggact
781 ccattatccc acgcagcctg gacaacctgg gttacaacct ctaccatccc ctgggctcgg
841 aattggcctc catccgcaga gcctgcgacc acatgcccag cctcatgagc tccaagggtg
901 aggagctggc ccggagcctc cgggcggata tcgaacgcgt ggcccgcgag aactcagacc
961 tccaacgcca gaagctggaa gccagcagg gcctgcgggc cagtcaggag gcgaaacaga
1021 aggtggagaa ggaggctcag gcccgggagg ccaagctcca agctgaatgc tcccggcaga
1081 ccagctagc gctggaggag aaggcgggtg tcggaagga acgagacaac ctggccaagg
1141 agctggaaga gaagaagagg gaggcggagc agctcaggat ggagctggcc atcagaaact
1201 cagccctgga cacctgcata aagaaccagt cgcagccgat gatgccagtg tcaaggccca
1261 tgggcctgt ccccaacccc cagcccatcg acccagctag cctggaggag ttcaagagga
1321 agatcctgga gtcccagagg cccoctgcag gcatccctgt agccccatcc agtggtgag
1381 gaggtccag gcctgaggac caagggatgg cccgactcgg cggtttgagg aggatgcagg
1441 gatatgctca cagcgcccca cacaaccccc tcccgcgcgc cccaaccacc cagggccacc
1501 atcagacaac tccctgcatg caaaccccta gtaccctctc acaccgcac ccgcgcctca
1561 cgatccctca ccagagcac acggccgcgg agatgacgtc acgcaagcaa cggcgctgac
1621 gtcacatata accgtggtga tggcgtcacg tggccatgta gacgtcacga agagatatag

图 25A

1681 cgatggcgtc gtgcagatgc agcacgtcgc acacagacat ggggaacttg gcatgacgtc
1741 acaccgagat gcagcaacga cgtcacgggc catgtcgacg tcacacatat taatgtcaca
1801 cagacgcggc gatggcatca cacagacggg gatgatgtca cacacagaca cagtgacaac
1861 acacaccatg acaacgacac ctatagatat ggcaccaaca tcacatgcac gcatgccctt
1921 tcacacacac tttctaccca attctcacct agtgtcacgt tccccgacc ctggcacacg
1981 ggccaaggta cccacaggat cccatccct cccgcacagc cctgggcccc agcacctccc
2041 ctctccagc ttctggcct cccagccact tctcacccc cagtgcctgg acccggagggt
2101 gagaacagga agccattcac ctccgctcct tgagcgtgag tgtttccagg accccctcgg
2161 ggccctgagc cgggggtgag ggtcacctgt tgcggggagg ggagccactc cttctcccc
2221 aactcccagc cctgcctgtg gcccggtgaa atgttggtgg cacttaataa atattagtaa
2281 atccttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa (SEQ ID NO:24)

图 25B