(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104277117 A
(43)申请公布日 2015.01.14

(21)申请号 201410333397.6
(22)申请日 2006.01.24
(30)优先权数据
60/646,333 2005.01.24 US
(62)分案原申请数据
200680007064.8 2006.01.24
(71)申请人 得克萨斯大学体系董事会
地址 美国得克萨斯
申请人 派瑞格恩医药公司
(72)发明人 P·E·斯奥比 T·A·鲁斯特
S·W·金
(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 傅宇昌
(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
A61K 45/00(2006.01)
A61K 47/48(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)

权利要求书1页 说明书186页
序列表12页 附图25页

(54)发明名称

与磷脂酰丝氨酸结合的Fc融合构建体及其治疗用途

(57)摘要

本发明公开了具有不寻常的特性组合的新型结合磷脂酰丝氨酸的构建体，及一系列的其诊断和治疗缀合物。所述新型构建体有效地结合疾病中的磷脂酰丝氨酸靶并增强其破坏，并还可以将所附着的成像或治疗剂特异性地递送至疾病位点。还公开了在肿瘤血管靶向、癌症诊断和治疗中使用所述新型构建体组合物、治疗缀合物及其组合以及用于治疗病毒感染和其他疾病的方法。

CN 104277117 A

打印ID7584222 Pg 2

1. 构建体，其包含可操作地附着至至少第一种磷脂酰丝氨酸结合蛋白的抗体 Fc 区。

2. 权利要求 1 的构建体，其中所述抗体 Fc 区可操作地附着至两个 β 2GPI 多肽，所述两个 β 2GPI 多肽各至少包含 β 2GPI 的结构域 V。

3. 权利要求 2 的构建体，其中所述抗体 Fc 区可操作地附着至两个 β 2GPI 多肽，所述两个 β 2GPI 多肽各至少包含 β 2GPI 的结构域 V，并且其中所述 β 2GPI 多肽在附着至所述 Fc 区时形成二聚体。

4. 任何前述权利要求的构建体，其中所述抗体 Fc 区是人抗体 Fc 区。

5. 任何前述权利要求的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至至少第一种生物学试剂。

6. 权利要求 5 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至至少第一种治疗剂。

7. 任何前述权利要求的构建体，其中所述构建体包括在药物组合物中。

8. 权利要求 7 的构建体，其中所述药物组合物进一步包括至少第二种治疗剂。

9. 权利要求 1 — 8 中任一项的构建体在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途。

10. 权利要求 1 — 8 中任一项的构建体在制备用于治疗或预防病毒感染的药物中的用途。

打印ID7584222 Pg3

与磷脂酰丝氨酸结合的 Fc 融合构建体及其治疗用途

[0001] 本申请是申请日为 2006 年 1 月 24 日、申请号为 200680007064.8、发明名称为“与磷脂酰丝氨酸结合的 Fc 融合构建体及其治疗用途”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 发明背景

[0003] 本申请要求于 2005 年 1 月 24 日提交的共同未决的美国临时申请系列号 60/646,333 的优先权，该临时申请的公开内容，包括说明书、权利要求、附图和序列，特别引入本文作为参考而并未放弃。

[0004] 1. 发明领域

[0005] 本发明涉及磷脂酰丝氨酸生物学领域，以及涉及治疗肿瘤和病毒感染。它提供了不寻常的新构建体、组合物、方法和组合，其用于肿瘤血管靶向和癌症治疗，和用于治疗病毒感染及其他疾病。本发明特别提供了具有不寻常的特性组合的新型结合磷脂酰丝氨酸的构建体，及其诊断和治疗缀合物。所述新型构建体有效地结合磷脂酰丝氨酸疾病靶并增强其破坏，并还可以将治疗剂递送至特定位点，因此提供了一系列用于治疗癌症、病毒感染和其他疾病的方法。

[0006] 2. 相关领域的描述

[0007] 肿瘤细胞对化学治疗剂的抗性在临床肿瘤学中是一个重要问题。在肿瘤治疗中要解决的另一主要问题是期望“全部细胞杀死”，即，杀死所有能不受控制地生长并替代通过治疗可去除的任何肿瘤块的所谓“克隆形成性”恶性细胞。尽管在此领域内有了一定的进展，但这 仍是为何许多普遍形式的人类癌症依然耐受有效的化学治疗干预的两个主要原因。

[0008] 对于开发接近“全部细胞杀死”的疗法这一目的而言，某些类型的肿瘤比其他类型更易受治疗的影响。例如，软组织肿瘤（例如淋巴瘤）以及血液和造血器官肿瘤（例如白血病）通常比实体瘤（例如癌）对化学疗法更具有反应性。

[0009] 软组织肿瘤和基于血液的肿瘤对于化学疗法的易感性的一个原因是淋巴瘤和白血病细胞对于化学治疗干预的更大的可达性。简而言之，大部分化学治疗剂到达实体瘤块的所有细胞比到达软组织肿瘤和基于血液的肿瘤的所有细胞要难得多，因此完成全部细胞杀死也要困难得多。增加化学治疗剂的剂量在大部分情况下常常会导致毒副作用，这通常限制了常规抗肿瘤剂的效力。

[0010] 另一肿瘤治疗策略是使用“免疫毒素”，其中用抗肿瘤细胞抗体将毒素递送至肿瘤细胞。不过，和化学治疗方法一样，免疫毒素疗法在应用于实体瘤时也存在着明显的缺点。例如，抗原阴性或抗原缺乏性细胞能存活并再恢复生成肿瘤或导致进一步的转移。实体瘤对基于抗体的疗法有耐受性的另一原因是肿瘤块对于大分子试剂例如抗体和免疫毒素来说通常是不能渗透的。肿瘤内的物理扩散距离和间质压力都是对此类型疗法的重要限制因素。

[0011] 一种经改良的治疗策略是靶向实体瘤的血管结构。靶向肿瘤血管而非肿瘤细胞本身具有一定的优越之处，即不太可能导致抗性肿瘤细胞的形成，而且被靶向的细胞容易接近。此外，血管的破坏导致抗肿瘤效应的扩大，因为许多肿瘤细胞依赖单一血管来提供其氧

打印ID7584222 Pg 4

气和养分。示例性的血管靶向剂 (VTAs) 在美国专利号 5,855,866、5,965,132、6,261,535、6,051,230 和 6,451,312 中得到描述，这些文献描述了将抗细胞剂和毒素靶向递送至肿瘤血管结构的标记物。

[0012] 另一有效的血管靶向方法是将凝血因子靶向在肿瘤血管结构或基质中表达或吸附的标记物 (Huang 等人，1997；美国专利号 6,093,399、6,004,555、5,877,289 和 6,036,955)。将促凝剂而非毒素递送至肿 瘤血管结构具有另外的优越之处，即降低了免疫原性，并甚至减少了产生毒副作用的风险。如美国专利号 5,877,289 中所公开的，用于此类肿瘤特异性“凝血配体 (coaguligand)”中的优选凝血因子是截短形式的人凝血诱导蛋白质，组织因子 (TF)，其是血液凝固的主要起始因子。

[0013] 最近，磷脂酰丝氨酸 (PS) 被鉴别为肿瘤血管结构的特异性标记物 (Ran 等人，1998)。这引起了对用于递送抗细胞剂、毒素和凝血因子至肿瘤血管的新型抗 PS 免疫缀合物的开发（美国专利号 6,312,694、6,783,760 和 6,818,213)。此外，还发现未缀合的针对 PS 的抗体无需与治疗剂附着就可发挥抗癌作用，这已知为用于肿瘤血管靶向和治疗的磷脂酰丝氨酸“裸露抗体”方法（美国专利号 6,406,693)。

[0014] 尽管前述方法已促进了肿瘤治疗技术的发展，但仍需要开发另外的治疗和血管靶向剂以扩展治疗选择的数目和功效。重要的进展将是鉴定具有抗癌特性及在其他系统例如在治疗病毒感染中的疗效的一组治疗剂。产生可以由两种人组分制备的新型靶向构建体，特别是不依赖于使用用于靶向的抗体的那些构建体，将是重要的发展，其提供了经改善的安全性。设计和开发增强患者自身针对疾病的应答，即增加宿主效应器功能的新试剂，将在治疗应答最大化中具有重大价值，特别是其中相同机制可以影响癌症及其他疾病例如病毒感染和疾病。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明通过提供新型构建体、组合物、方法和组合用于肿瘤血管结构靶向和癌症治疗和用于治疗病毒感染及其他疾病，从而解决了现有技术的前述和其他需要。本发明特别提供了具有不寻常的特性组合的新型结合磷脂酰丝氨酸的构建体，它有效地结合疾病中的磷脂酰丝氨酸靶并增强其破坏，例如通过增加宿主效应器功能。还提供了一系列的缀合物组合物，其中所述新型构建体附着至其他的生物学试剂、 诊断剂和治疗剂，它们可以被特异地递送至疾病位点。本发明进一步提供了在肿瘤血管结构靶向、癌症治疗中使用所述新型构建体和缀合物及其组合以及用于治疗病毒感染和其他疾病的有效方法。

[0017] 当用于整个申请文件各处时，术语“a”和“an”用于指“至少一种（个）”、“至少第一种（个）”、“一种（个）或多种（个）”或“众多”的所提及的组分或步骤，除非在其后特别说明了上限。因此，如本文所使用的，“a construct”指“至少第一种构建体”。正如任何单一试剂的量一样，本领域普通技术人员根据本公开内容将了解各组合的可操作限度和参数。

[0018] 受体 - 抗体 (ReceptorBody) 和 β - 抗体 (BetaBody)：本发明首先提供了一系列结合磷脂酰丝氨酸的构建体组合物，其中所述构建体包含可操作地附着至至少第一种抗体 Fc 区的至少第一种磷脂酰丝氨酸结合蛋白、多肽或受体。连接磷脂酰丝氨酸结合蛋白、多肽或“受体”至“抗体”Fc 区产生了术语“受体 - 抗体”，这在本文中用于指本发明的结合磷脂酰丝氨酸的 Fc 构建体。

打印ID7584222 Pg 5

[0019] 本发明构建体或受体-抗体一般包含至少第一种抗体Fc区，其可操作地附着至至少第一种磷脂酰丝氨酸结合蛋白或多肽、受体、配体或肽。在本文中简洁地使用的术语“磷脂酰丝氨酸结合蛋白”指所有磷脂酰丝氨酸结合蛋白、多肽、受体、配体和肽。

[0020] 在许多实施方案中，“磷脂酰丝氨酸结合蛋白”在附着至抗体Fc区从而形成本发明构建体时将保留磷脂酰丝氨酸结合特性。自然，磷脂酰丝氨酸结合功能的保留在希望用于靶向暴露于疾病位点中的磷脂酰丝氨酸的那些构建体中是重要的。然而，不是本发明的所有实施方案都局限于在附着至抗体Fc区时保留磷脂酰丝氨酸结合特性的磷脂酰丝氨酸结合蛋白。

[0021] 值得注意的是，本发明包括了与“带切口的β2-糖蛋白I”连接的抗体Fc区，其中带切口的β2-糖蛋白I不再结合磷脂酰丝氨酸（参见下文）。因为带切口的β2-糖蛋白I已知是血管发生的抑制剂（美国专利申请公开号US 2003/0219406，将其特别引入本文作为参考），所以本发明的“Fc-带切口的β2”将用作血管发生的抑制剂，并且有着具有延长的半衰期以及必要时具有另外的效应器功能的优点。

[0022] 相应地，术语“磷脂酰丝氨酸结合蛋白”指在本发明构建体中使用的蛋白质、多肽、受体、配体或肽的起源，虽然如上文所阐述的，本发明的某些构建体将不结合磷脂酰丝氨酸并且仍将具有重要的生物学和治疗用途。也就是说，β2-糖蛋白I已知为磷脂酰丝氨酸结合蛋白，而带切口的β2不再结合磷脂酰丝氨酸。

[0023] 在结合磷脂酰丝氨酸的情况下，最初的磷脂酰丝氨酸结合蛋白和所得构建体的磷脂酰丝氨酸结合蛋白将在生物学合适的条件下，优选在生理条件下，结合磷脂酰丝氨酸。这样的磷脂酰丝氨酸结合蛋白在生物学合适的条件下，优选在生理条件下，可以任选地结合其他阴离子磷脂。

[0024] 在某些优选实施方案中，构建体的磷脂酰丝氨酸结合蛋白基本上不结合氨基磷脂、磷脂酰乙醇胺(PE)。在其他优选实施方案中，构建体的磷脂酰丝氨酸结合蛋白不显示可检测的与磷脂酰乙醇胺的结合。

[0025] 一系列磷脂酰丝氨酸结合蛋白可以在本发明构建体中使用。可以使用的某些示例性磷脂酰丝氨酸结合蛋白包括蛋白C、蛋白S、因子II(凝血酶原)、因子V、因子VII、因子IX或因子X。

[0026] 可以使用的其他示例性磷脂酰丝氨酸结合蛋白包括Mer、PS结合性清道夫受体、$\alpha_5\beta_3$整联蛋白、CR3补体受体、CR4补体受体和磷脂酰丝氨酸受体即PSr(Balasubramanian和Schroit，2003，将其特别引入本文作为参考，特别参见表2)。

[0027] 在本发明构建体中可以使用的其他示例性磷脂酰丝氨酸结合蛋白是膜联蛋白，优选膜联蛋白V，其被特别考虑在某些实施方案中使用，例如在进一步的缀合物、脂质体等中。然而，在某些实施方案中，本发明提供了包含可操作地附着至至少第一种磷脂酰丝氨酸结合蛋白的抗体Fc区的构建体，其中所述磷脂酰丝氨酸结合蛋白不是膜联蛋白或其磷脂酰丝氨酸结合片段，即，不是膜联蛋白V或其磷脂酰丝氨酸结 合片段。

[0028] 在本发明构建体中使用的磷脂酰丝氨酸结合蛋白、多肽和肽的优选实例是β2-糖蛋白I(β2-糖蛋白I或β2GPI)蛋白、多肽和肽。将“β”2-糖蛋白I结合蛋白、多肽或肽连接至“抗体”Fc区产生了术语“β-抗体”，这在本文中用于指优选的本发明的Fc-β2GPI构建体。

打印ID7584222 Pg6

[0029] 以前被称为载脂蛋白H的β2GPI是结合磷脂酰丝氨酸的50kDa血浆糖蛋白。来自各种哺乳动物种类的β2GPI的DNA和氨基酸序列是已知的，包括小鼠、大鼠、狗、牛、黑猩猩和人β2GPI。β2GPI有5个结构域，I、II、III、IV和V，并且结构域结构在哺乳动物之间是保守的，如在图18A和图18B中分别显示的小鼠和人β2GPI的结构域I－V所呈现的。

[0030] β2GPI通过其C末端结构域即结构域V结合磷脂酰丝氨酸。因为来自β2GPI结构域V的脂质和磷脂酰丝氨酸结合区域是已知的，所以本发明构建体的磷脂酰丝氨酸结合部分只需包含“来自β2GPI结构域V的脂质结合区域”。

[0031] 示例性地参考图18B中显示的在本文中以SEQ ID NO:22(登录号1C1ZA)提供的人β2GPI氨基酸序列，和图18A中显示的对应的小鼠β2GPI序列，可看出来自β2GPI结构域V的脂质结合区域包括一串带正电荷的氨基酸(282－287)和保守的疏水区(311－317)，其负责β2GPI与阴离子磷脂的结合(图18B和图18A中带下划线的斜体字和带双下划线的斜体字)

[0032] 因此，在某些实施方案中，本发明构建体的磷脂酰丝氨酸结合部分将包括具有如SEQ ID NO:22的氨基酸282－287所示的氨基酸序列的肽、或具有如SEQ ID NO:22的氨基酸311－317所示的氨基酸序列的肽。在其他实施方案中，本发明构建体的磷脂酰丝氨酸结合部分将包括跨越这些区域的肽，即具有SEQ ID NO:24(人)的氨基酸序列的肽或具有SEQ ID NO:20(小鼠)的氨基酸序列的肽。

[0033] 因为前述的较小的肽和多肽可能不是最佳的，所以本发明的其他 优选构建体是其中磷脂酰丝氨酸结合部分是包含全部或完整的β2GPI结构域V的β2GPI多肽，包括至少包含结构域V的β2GPI多肽和只包含结构域V的那些。

[0034] 尽管不存在关于本发明方法的安全性的担心，但来自具有抗磷脂综合征或APS的患者的抗体通常识别β2GPI的结构域I(de Laat等人，2005a)。识别β2GPI结构域II的抗体不是致病性的。因此，在某些实施方案中，本发明构建体的磷脂酰丝氨酸结合部分可以包括至少包含来自β2GPI结构域V的脂质结合区域且基本上缺乏β2GPI结构域I的β2GPI多肽。在优选的实施方案中，这些构建体将包括至少包含β2GPI结构域V且基本上缺乏β2GPI结构域I的β2GPI多肽。

[0035] 本文提供了示例性的β2GPI DNA和氨基酸序列，包括图18B中所显示的SEQ ID NO:22的人β2GPI氨基酸序列(登录号1C1ZA)，和图18A中所显示的对应的小鼠β2GPI氨基酸序列(SEQ ID NO:25中还提供了编码本发明的示例性Fc-β2GPI构建体的表达质粒的序列)。根据这些图、序列和登录号，任选地按照本文的操作实例，本领域技术人员将能够制备并使用一系列至少包含β2GPI结构域V的多肽。

[0036] 如上文所阐述的，某些优选的β2GPI多肽将至少包含β2GPI结构域V且基本上缺乏β2GPI结构域I。与这种描述相一致的β2GPI多肽可以至少包含β2GPI的结构域IV和结构域V；至少包含β2GPI的结构域III、结构域IV和结构域V；或包含β2GPI的结构域II、结构域III、结构域IV和结构域V。

[0037] 然而，β2GPI结构域I的存在不是本发明用途中的重要缺点，并且可以方便地制备其中β2GPI多肽包含结构域I的构建体，例如为了易于制备和使用。因此，本发明进一步包括其中磷脂酰丝氨酸结合部分是全长β2GPI多肽(即，包含结构域I、结构域II、结构域III、结构域IV和结构域V的β2GPI多肽)的构建体。全长β2GPI多肽可以是包含SEQ

打印ID7584222 Pg7

ID NO:22 的氨基酸序列的人 β2GPI 多肽。

[0038] 在本发明的某些实施方案中，重要的是在所述至少第一种磷脂酰丝氨酸结合蛋白附着至 Fc 区时，所述构建体保留了磷脂酰丝氨酸结合 功能，特别是当所述构建体希望用于靶向暴露于疾病位点中的磷脂酰丝氨酸时。磷脂酰丝氨酸结合不是必需的一个实例是将至少第一种带切口的 β2GPI 多肽附着至抗体 Fc 区的情况，它将具有作为血管发生抑制剂的用途。

[0039] “带切口的 (nicked)” β2GPI 多肽是指其中 β2GPI 序列已形成切口的情况，例如通过用纤维蛋白溶酶在 Lys317/Thr318 切割位点处进行切割。如本文所使用的，包含“带切口的 β2GPI 多肽”的构建体可以只包含带切口的结构域 V。备选地，带切口的 β2GPI 多肽可以至少包含“带切口的结构域 V”，从而使得所述多肽可以包含与结构域 IV、III、II 和 I 中任何一个或多个相结合的带切口的结构域 V。

[0040] 当在本发明的构建体中需要保留磷脂酰丝氨酸结合时，本发明提供了与附着至 Fc 区的 β2GPI 多肽的用途相关的进一步的不寻常和有利的特征。惊奇地发现，当抗体 Fc 区可操作地附着至两个 β2GPI 多肽时，β2GPI 多肽在所得的 Fc-β2GPI 构建体中形成了二聚体，并且该二聚构建体有效地结合磷脂酰丝氨酸。

[0041] 因此，本发明的另外的实施方案是其中抗体 Fc 区可操作地附着至两个 β2GPI 多肽的情况，优选其中每个 β2GPI 多肽至少包含 β2GPI 的结构域 V。更优选地，其中抗体 Fc 区可操作地附着至两个 β2GPI 多肽（其各至少包含 β2GPI 的结构域 V），并且其中 β2GPI 多肽在附着至 Fc 区时形成二聚体。优选地，其中抗体 Fc 区可操作地附着至两个 β2GPI 多肽（其各至少包含 β2GPI 的结构域 V），并且其中 β2GPI 多肽在附着至 Fc 区时形成二聚体和其中所得构建体结合磷脂酰丝氨酸，即所述 β2GPI 多肽在附着至 Fc 区时形成二聚体并结合磷脂酰丝氨酸。

[0042] 同样地，优选地，其中抗体 Fc 区可操作地附着至两个 β2GPI 多肽；其中所述 β2GPI 多肽各至少包含 β2GPI 的结构域 V 且基本上缺乏 β2GPI 的结构域 I；并且其中 β2GPI 多肽在附着至 Fc 区时形成二聚体并结合磷脂酰丝氨酸。此外，优选地，其中第一种和第二种 β2GPI 多肽（其各至少包含 β2GPI 的结构域 V）可操作地附着至抗体 Fc 区，从而形成 Fc-β2GPI 二聚体。

[0043] 然而，即使当在本发明的包含 β2GPI 的构建体中需要磷脂酰丝氨酸结合时，构建体也不必包含两个 β2GPI 多肽，在附着至 Fc 区时任何两个或更多个 β2GPI 多肽也不必形成二聚体。例如，Fc 区可以附着至单个 β2GPI 多肽、或附着至在被附着时不形成二聚体的两个或更多个 β2GPI 多肽，并且所得构建体仍可用于结合磷脂酰丝氨酸，例如通过在提供所需的价的支架中的制剂。此类制剂或支架的实例是包含所述构建体的纳米颗粒、脂质体等。

[0044] 对于在人中的使用，任何磷脂酰丝氨酸结合蛋白例如一个或多个 β2GPI 多肽应当是人磷脂酰丝氨酸结合蛋白，例如人 β2GPI 多肽。因为也可使用人 Fc 区，所以这具有提供完全为人的治疗剂的优点，这可以减少副作用，例如与免疫原性相关的那些。

[0045] 在本发明中使用的 Fc 区来源于抗体或“免疫球蛋白”，包括多克隆和单克隆抗体。Fc 区提供了能够刺激宿主效应器功能的所得构建体，以便增强疾病治疗。

[0046] 尽管优选在人中使用人 Fc 区，但也可使用来自其他来源例如小鼠、大鼠、仓鼠、

打印ID7584222 Pg 8

兔、猴子等的 Fc 区。对于临床前测试，Fc 区和磷脂酰丝氨酸结合蛋白均可以选自与在其中将进行临床前测试的动物相同的动物种类，例如小鼠 Fc 区和小鼠 β2GPI 多肽。

[0047] 在本领域中，抗体一般描述为“Y”形分子，其由 4 个多肽（2 个重链和 2 个轻链）制成。给予抗体其结合抗原的特异性的抗原结合区或“可变区”位于轻链和重链的末端。用蛋白酶处理抗体可以切开这个区域，产生分开的 Fab（“抗原结合片段（fragment antigen binding）”）和 Fc（可结晶片段（fragment crystallizable））区域、结构域或片段。因此，术语“Fc”在本领域中用于指“不含抗原结合区域、结构域或片段”的抗体区域、结构域或片段。这是本申请中所希望的含义，从而所述构建体的“Fc 区”是“不包含抗原结合区域、结构域或片段”（即不特异性地结合抗原）的抗体区域、结构域或片段。因此，本发明提供了构建体，其具有不会由于靶向组织而复杂化 的效应器功能。

[0048] 恒定区决定用于破坏抗原的机制，即包含效应器功能的决定簇。基于其恒定区结构和免疫功能将抗体分为 5 个主要的类别，IgM、IgG、IgA、IgD 和 IgE。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 μ、γ、α、δ 和 ε。这些类别中的几个类别进一步分为亚类或同种型，例如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。不同类别的免疫球蛋白的亚单位结构是众所周知的。重链 γ、α 和 δ 的恒定区有 3 个结构域，而重链 μ 和 ε 的恒定区有 4 个结构域。

[0049] 在本发明构建体中，优选使用具有抗体铰链区以及抗体重链恒定结构域 CH2 和 CH3 的抗体 Fc 区。抗体铰链区对于结构方面的考虑例如弹性可能是重要的，这在附着了两个或更多个磷脂酰丝氨酸结合蛋白例如两个或更多个 β2GPI 多肽时可以促进二聚体的形成。铰链区和铰链连接或低级铰链区还可提供效应器功能。尽管这不是必需的，但构建体的 Fc 区还可包括抗体重链恒定结构域 C_H1 或 C_H4 中的至少一个。

[0050] 按照所提供的效应器功能，例如补体激活（C1q 结合）、Fc 受体结合、以及有效刺激诸如 ADCC 和细胞裂解的过程的能力（Bruggemann 等人，1987；Riechmann 等人，1988；Clark，1997；Padlan，1994；各自特别引入本文作为参考），一般优选地，所述抗体 Fc 区是来自人 IgG1（γ1）或人 IgG3（γ3）抗体的 Fc 区。对于小鼠抗体，所述 Fc 区优选是来自小鼠 IgG2a（γ2a）或小鼠 IgG2b（γ2b）抗体的 Fc 区。

[0051] 抗体 Fc 区将通过任何可操作的方法附着、连接或缀合至至少第一种磷脂酰丝氨酸结合蛋白，例如 β2GPI 多肽。例如，通过直接的共价键，例如经由化学交联剂，或者其中抗体 Fc 区和磷脂酰丝氨酸结合蛋白通过重组表达为融合蛋白来制备。可以使用间接附着，例如抗生物素蛋白 - 生物素及其他这样的附着。

[0052] Fc 区和磷脂酰丝氨酸结合蛋白可操作地附着或缀合，从而使得 Fc 区和磷脂酰丝氨酸结合蛋白在附着或缀合后各自如所希望的那样充分起作用。例如，“可操作地附着”表示，Fc 区基本上保留了所希望的效应器功能，并且磷脂酰丝氨酸结合蛋白基本上保留了所希望的特性，特别是在需要时保留磷脂酰丝氨酸结合或抗血管发生活性。

[0053] 在某些实施方案中，“可操作地附着”将包括将磷脂酰丝氨酸结合蛋白以有效允许磷脂酰丝氨酸结合蛋白在被附着时形成二聚体的方式附着至 Fc 区，特别是当磷脂酰丝氨酸结合蛋白是两个或更多个 β2GPI 多肽时。在其他实施方案中，“可操作地附着”将产生磷脂酰丝氨酸结合蛋白的簇集。

[0054] 当所选择的磷脂酰丝氨酸结合蛋白是 β2GPI 多肽时，和 / 或当在 Fc 区上的二聚

打印ID7584222 Pg 9

化作用是特别需要的时候，一般优选使用 Fc 区作为构建体的 N- 末端部分并附着磷脂酰丝氨酸结合蛋白或 β 2GPI 多肽以成为构建体的 C- 末端部分（图 16）。

[0055] 然而，也考虑了可操作地附着的其他方案，从而使得磷脂酰丝氨酸结合蛋白或 β 2GPI 多肽成为构建体的 C- 末端部分，即插入磷脂酰丝氨酸结合蛋白或 β 2GPI 多肽以替代抗原结合区域或替代 C_H1 结构域和抗原结合区域。在此类实施方案中，优选使用为所得构建体提供另外弹性的肽或化学接头，例如具有 4 个谷氨酰胺残基和 1 个丝氨酸残基的肽接头（G4S 弹性接头）。

[0056] 在可操作地附着两个或更多个组分后，所得构建体将显示所希望的生物学特性。示例性的总体上在构建体中所希望的生物学特性包括：结合磷脂酰丝氨酸；刺激宿主的效应器功能；靶向活化的细胞上的磷脂酰丝氨酸，所述活化的细胞例如为活化的、正在分裂的、受损害的或细胞凋亡的内皮细胞、肿瘤细胞或受病毒感染的细胞；定位至靶位点，例如肿瘤血管和肿瘤细胞；和发挥疗效，例如抗癌和 / 或抗病毒效用。

[0057] 所得构建体的生物学特性还将优选包括希望的安全性特征。例如，构建体将优选不会显著损害休眠细胞，显著抑制体外凝血反应，引起体内显著的血栓形成或具有显著的狼疮抗凝剂活性。

[0058] 因此，本发明提供了在治疗癌症、病毒感染和其他疾病中有效的新型受体 - 抗体和 β - 抗体构建体。这些构建体包括有效地结合疾病中的磷脂酰丝氨酸靶并通过增加宿主效应器功能而增强其破坏的那些。

[0059] 另外的缀合物、组合物和试剂盒：尽管单独时是高度有效的，但本发明还提供了进一步的缀合物、组合物和相关方法，其中本发明的构建体、受体 - 抗体和 β - 抗体进一步附着至另外的生物学试剂、诊断剂和治疗剂。本发明的此类“另外的缀合物”是“三功能试剂”，因为它们具有三种性质：结合磷脂酰丝氨酸、刺激宿主效应器功能和将所附着的生物学试剂、诊断剂或治疗剂递送至希望的靶。

[0060] 在根据本发明的缀合物、组合物、药物、组合、混合物（cocktail）、试剂盒、第一种和第二种医学用途和所有方法的下列描述中，“构建体”包括上述主要发明的所有构建体、受体 - 抗体和 β - 抗体。

[0061] 在另外的缀合物实施方案中，本发明还进一步提供了新类别的缀合物、组合物、试剂盒和方法，其中原始构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体可操作地附着至“另外的”、进一步的或外源性的生物学试剂、诊断剂或治疗剂。“外源性的”生物学试剂、诊断剂或治疗剂是“不同于在原始构建体中已经存在的 Fc 结构域的试剂”。

[0062] 另外的或外源性的“生物学试剂”不必直接是治疗剂或诊断剂。例如，因为本发明可以与药物前体联合使用，包括 ADEPT 实施方案，所以生物学试剂可以是切割实质上无活性的药物前体以释放实质上有活性的药物的试剂，优选酶。此类试剂和酶在下文中涉及药物前体和 ADEPT 方法实施方案时进行描述。

[0063] 关于“诊断剂”，用于附着的优选诊断剂是体内诊断、成像或可检测的试剂。此类诊断缀合物可以用于一系列疾病的凋亡前细胞和凋亡细胞成像中，用于组合的肿瘤成像和治疗中，和用于使用本发明作为替代标记物以监测化学疗法的方法中。优选的诊断剂包括 X 射线可检测的化合物、放射性离子、核磁自旋共振同位素和 CEST 或 paraCEST 试剂。

[0064] 合适的可检测标记包括 X 射线可检测的化合物，例如铋（III）、金（III）、镧（III）

打印ID7584222 Pg 10

或铅 (II)；放射性离子，例如铜 ^{67}、镓 ^{67}、镓 ^{68}、铟 ^{111}、铟 ^{113}、碘 ^{123}、碘 ^{125}、碘 ^{131}、汞 ^{197}、汞 ^{203}、铼 ^{186}、铼 ^{188}、铷 ^{97}、铷 ^{103}、锝 ^{99m} 或钇 ^{90}；核磁自旋共振同位素，例如钴 (II)、铜 (II)、铬 (III)、镝 (III)、铒 (III)、钆 (III)、钬 (III)、铁 (II)、铁 (III)、锰 (II)、钕 (III)、镍 (II)、钐 (III)、铽 (III)、钒 (II) 或镱 (III)；或者罗丹明或萤光素。

[0065] 关于“治疗剂”，某些优选的治疗剂是细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、抗细胞剂和抗癌剂。因此可以将本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体连接至至少第一种化学治疗剂、抗血管发生剂、细胞凋亡诱导剂、抗微管蛋白药物、抗生素、放射性同位素或促凝剂。

[0066] 在细胞毒性剂中，目前优选的是蓖麻毒素、白树毒蛋白、相思豆毒蛋白、白喉毒素、假单胞菌毒素和百日咳毒素。在细胞因子和趋化因子中，目前优选的试剂是 IL-2、IL-12、TNF-α、干扰素－α (IFN-α)、IFN-β、IFN-γ 和 LEC(肝表达的趋化因子)。V 型 ATP 酶抑制剂也是目前优选的，例如 salicylihalamide、刀球肮霉素或巴弗洛霉素，还优选的是蛋白质合成抑制剂，例如 psymberin、青腰虫素、irciniastatin A。

[0067] 红豆杉醇、多西他赛、紫杉醇、顺铂、吉西他滨、考布他汀、多柔比星和阿霉素是目前优选的抗癌剂。砷放射性同位素目前也优选作为另外的或外源性的试剂。就促凝剂而言，截短的组织因子是目前优选的。

[0068] 本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体还可进一步可操作地附着至抗病毒剂或药物，例如核苷类逆转录酶抑制剂、非核苷类逆转录酶抑制剂或蛋白酶抑制剂。AZT、西多福韦和利巴韦林目前优选作为外源性的抗病毒剂。

[0069] 再次，在另外的缀合物实施方案中，术语“缀合物”用于定义原始构建体、受体－抗体或 β－抗体和另外的试剂的可操作的联接，并且不希望单指任何类型的可操作的联接，并且不特别限于化学“缀合”。还可使用重组融合蛋白。只要磷脂酰丝氨酸结合蛋白、Fc 区和另外的所附着的试剂如希望的那样充分起作用，特别是当递送至体内靶位点时，任何形式的附着都是合适的。

[0070] 当 β 2GPI 多肽用作构建体的磷脂酰丝氨酸结合蛋白时，一般优选 在 β 2GPI 结构域 V 中，或至少在结构域 V 的脂质结合区域中不附着任何另外的试剂。因此为了简单，在某些实施方案中，例如图 16 中举例说明的那些，优选可操作地将任何另外的试剂附着至构建体的 N- 末端部分，即朝着铰链区或 CH2 区。

[0071] 本发明还提供了包含生物学有效量的至少第一种构建体、受体－抗体或 β－抗体的组合物。优选的组合物是在药学上可接受的载体中包含生物学或治疗有效量的至少第一种本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体或者其缀合物的“药物组合物”。这些组合物希望用于药物学、药理学、治疗学、医学和兽医学用途，优选用于治疗癌症和病毒感染。

[0072] 所述药物组合物包括配制用于胃肠外施用的那些，例如用于静脉内施用，或用于作为脂质体或气雾剂进行施用。气雾剂制剂特别适合于治疗病毒感染。药物组合物中的“生物学或治疗有效量”是对于治疗疾病或病症来说有效的量，特别是对于治疗癌症或病毒感染来说有效的量。

[0073] 尽管单独使用也是有效的，但本发明的各种构建体、受体－抗体或 β－抗体及其缀合物，以及本发明的相关方法，也可有利地用于与其他试剂和疗法相组合以提供本发明的组合的组合物、药物和试剂盒以及相关的组合治疗方法。因此，在进一步的实施方案中，本发明进一步提供了特别的组合的组合物、方法和试剂盒，例如用于癌症和抗病毒治疗，它们

打印ID7584222 Pg 11

已被选择以令人惊讶地好的效果一起工作，如本文更详细地说明的。

[0074] 因此，本发明的方面进一步包括组合物、药物组合物、组合、混合物、药剂和 / 或试剂的药用混合物，其包括与生物学或治疗有效量的至少第二种生物学试剂相组合的至少第一种本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体或者其缀合物。所有此类组合优选包括“组合的生物学或治疗有效量”，例如对于治疗疾病，例如治疗癌症或病毒感染来说有效的组合量。

[0075] 在组合物中，“至少第二种生物学试剂”通常将会是但不必是诊断剂或治疗剂。例如，第二种生物学试剂可以是药物组合物的组分例 如分散剂或吸收延迟剂。其他生物学试剂，例如用于制备在药物前体和 ADEPT 方法中使用的缀合物和药物前体的试剂，和诊断剂，优选保持组合，但与第一种本发明的组合物分开，并因此在下文中关于本发明试剂盒时进行讨论。“组合，但分开”表示一起在紧密的限制中，但不是同一组合物的一部分，例如不是同一溶液或药物组合物的一部分。

[0076] 关于“至少第二种治疗剂”，术语“第二种”是参照作为“第一种”治疗剂的本发明构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体或者其缀合物来说的。

[0077] 当本发明希望用于癌症治疗时，至少第二种治疗剂将优选是“至少第二种不同的抗癌剂”。用于组合应用的第二种抗癌剂可以是放射治疗剂、化学治疗剂、抗血管发生剂或细胞凋亡诱导剂，细胞因子或抗体或抗体 - 治疗剂构建体，其结合肿瘤细胞、从坏死的肿瘤细胞中释放的细胞内抗原或肿瘤血管结构的组分（即抗癌免疫毒素或凝血配体）。如本文所使用的，术语“化学治疗剂”包括基因、载体、反义构建体和核酶。

[0078] 用于组合应用的某些优选的第二种抗癌剂是补充或增强第一种本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体或者其缀合物的那些，和 / 或选择用于特殊的肿瘤类型或患者的那些。“补充或增强疗效的治疗剂”包括放射治疗剂、血管渗透性增强剂、抗血管发生剂、细胞凋亡诱导剂、某些细胞因子、抗肿瘤细胞免疫毒素、以及所选择的化学治疗剂。目前优选的“所选择的化学治疗剂”是具有抗血管发生作用的化学治疗剂，如表 E 中所示；诱导细胞凋亡的化学治疗剂，如表 F 中所示；钙流量诱导剂、炎性细胞因子、H_2O_2、凝血酶和来自考布他汀家族的抗微管蛋白药物。多柔比星、依托泊苷和放线菌素 D 是进一步优选的，而多西他赛是最优选的。

[0079] 当本发明希望用于病毒治疗中时，至少第二种治疗剂将优选是“至少第二种不同的抗病毒剂”。用于组合应用的第二种抗病毒剂可以选自在实施本发明时可用的任何抗病毒剂或药物，包括本文描述的用于 附着至本发明构建体的一系列抗病毒剂和药物。例如，抗逆转录病毒药物例如 NTRIs、非核苷 RT 抑制剂和蛋白酶抑制剂、表 G 中所列出的抗病毒剂，并且优选 AZT 或西多福韦。

[0080] 本发明进一步提供了包含至少第一种本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体或者其缀合物的脂质体、脂质载体、复合物、混合物、超分子结构多分子聚集物或基于脂质的药物递送系统。脂质体或脂质体样组合物可以是单层、双层、多分子聚集物、囊泡、螺旋、圆盘、管、纤维、环形、六角相、凝胶相、液晶相、液晶多分子聚集物、胶团、反胶团、微乳剂、乳剂、微贮库 (microreservoir)、油球、脂肪球、蜡球和 / 或胶粒的形式。

[0081] 脂质体或脂质体样组合物一般包括“外膜”或大体积 (bulk) 水相和“中央核”或内部水相。在优选实施方案中，脂质体或脂质体样组合物是隐蔽的脂质体 (stealthed

打印ID7584222 Pg 12

liposome)、脂质载体、复合物、混合物、超分子结构多分子聚集物或基于脂质的药物递送系统。“隐蔽的”脂质体和脂质体样组合物包含与外膜可操作地联接的生物学有效量的至少第一种隐蔽剂 (stealthing agent)。“隐蔽剂”是在与脂质体或脂质体样组合物的外膜可操作地联接时增加脂质体或脂质体样组合物的生物学半衰期的组分。在“可操作联接”中，脂质体或脂质体样组合物的外膜优选由一种或多种隐蔽剂“包被”。

[0082] 有效的隐蔽剂包括一系列生物相容的亲水聚合物，例如聚胺、聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸－聚乙醇酸 (PLGA)、多肽和相关材料。优选的隐蔽剂是聚乙二醇 (PEG) 组分，其中所得的隐蔽的脂质体称为“PEG 化的脂质体”。

[0083] 本发明的优选脂质体是隐蔽的或 PEG 化的脂质体，其中至少第一种本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体或者其缀合物与脂质体的外膜可操作地联接，优选其中脂质体是以其进行“包被的”。

[0084] 特别优选的脂质体是此类“包被的”和隐蔽的或 PEG 化的脂质体，其中至少第一种治疗剂，例如抗病毒剂或优选抗癌剂，与脂质体可操作地联接或分散在脂质体制剂中。优选地，治疗剂、抗病毒剂或抗癌 剂与脂质体的中央核可操作地联接或保持在脂质体的中央核内。示例性的抗癌剂是放射性核素和化学治疗剂，例如抗微管蛋白药物，多西他赛和紫杉醇，多西他赛是优选的。

[0085] 本发明的进一步的实施方案涉及在至少第一种组合物或容器中包括至少第一种本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体或者其缀合物，其与生物学或治疗有效量的至少第二种生物学试剂、组分或系统相组合。

[0086] “第二种生物学试剂、组分或系统”不限于治疗剂或诊断剂。例如，第二种生物学试剂、组分或系统可以包括用于修饰构建体和 / 或用于附着其他试剂的组分。某些优选的第二种生物学试剂、组分或系统是药物前体或用于制备和使用药物前体的组分，包括用于制备药物前体本身的组分和用于调节本发明构建体以适合在此类药物前体或 ADEPT 实施方案中起作用的组分。

[0087] 至少“第二种诊断剂、组分或系统”可以是通过体外诊断测试可直接或间接检测的诊断剂、组分或系统。“可直接检测的体外报告试剂”包括通过免疫荧光和萤光素酶可检测的放射标记、报告试剂。“可间接检测的体外报告试剂”与其他的外源性试剂相结合地起作用，例如与生色底物接触后产生有色产物的可检测的酶。这些包括附着至可直接或间接检测的试剂例如放射标记或酶的“二抗”，以及其中三抗附着至可检测试剂的“二抗和三抗检测系统”。

[0088] 优选的本发明诊断试剂盒是包括通过体内诊断或成像可检测的诊断剂、组分或系统的那些。本发明的成像实施方案的优点是同一构建体可以用于成像和治疗。因此，本发明提供了试剂盒和药物，其包括：

[0089] (a) 第一种药物组合物，其包含诊断有效量的可操作地附着至可检测标记或诊断剂的本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体；和

[0090] (b) 第二种药物组合物，其包含治疗有效量的本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体，优选治疗有效量的在第一种药物组合物中使用的相同构建体、受体－抗体或 β－抗体。

[0091] 对于在治疗实施方案中使用，试剂盒将包含“至少第二种治疗剂”。 优选地，此类试剂盒包含组合的生物学或治疗有效量的至少两种特定的试剂，例如对于抑制增殖或病毒

打印ID7584222 Pg 13

复制或者对于治疗疾病例如癌症或病毒感染来说有效的组合量。

[0092] 就癌症治疗而言，本发明的试剂盒包含与药物前体和 ADEPT 组合使用的抗体。在此类组合物中，构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体“经修饰以提供转化或酶促能力”。优选地，构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体与至少第一种能够将至少一种药物前体转化为活性形式的药物的转化剂或酶可操作地联接，优选共价连接或缀合。

[0093] 酶促或酶缀合的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体将与最初分开的“药物前体”的制剂相组合。药物前体将是无活性或具有微弱活性的形式的药物，它在接触与本发明构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体相联接的酶促能力、转化功能或酶后被转化为活性形式的药物。

[0094] 因此，提供了试剂盒，其优选在分开的组合物和 / 或容器中包含 ：

[0095] (a) 生物学有效量的至少第一种本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体，其中所述构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体可操作地联接、共价连接或缀合至至少第一种酶 ；和

[0096] (b) 生物学有效量的至少第一种实质上无活性的药物前体，它通过与所述构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体相联接、连接或缀合的酶而被转化为实质上有活性的药物。

[0097] 切割实质上无活性的药物前体以释放实质上有活性的药物的合适的酶包括芳基硫酸酯酶、沙雷氏菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶、组织蛋白酶、D- 丙氨酰羧肽酶、β - 半乳糖苷酶、神经氨酸酶、β - 内酰胺酶、青霉素酰胺酶或胞嘧啶脱氨酶。

[0098] 与药物前体不同，所述至少第二种抗癌剂可以是上文关于本发明的组合抗癌组合物时所描述的第二种抗癌剂中的任何一种。对于治疗病毒感染，所述至少第二种抗病毒剂还可是上文关于本发明的组合抗病毒组合物时所描述的第二种抗病毒剂中的任何一种。然而，“试剂盒”可以包含“组合但分开”的至少两种所述的试剂，从而在试剂选择中提供更大的灵活性。

[0099] 因此，本发明的试剂盒可以在单个的容器或容器装置中包括组合的生物学或治疗有效量的至少两种特定试剂。试剂盒还可包含关于使用本文中所包括的生物学试剂和治疗剂的说明书。成像组分也可组合地包括在内，但与治疗试剂盒分开。

[0100] 肿瘤治疗和相关方法 ：本发明提供了关于本发明构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体或者其缀合物的许多方法和用途。关于所有方法，术语“a”和“an”用于指在所述方法中的“至少一个”、“至少第一个”、“一个或多个”或“众多”步骤，除非特别说明。这与治疗方法中的施用步骤特别相关。因此，本发明不仅可以采用不同的按剂量给药，还可以使用不同次数的按剂量给药，例如注射或吸入，直至且包括多重注射或吸入。

[0101] 提供了具有重要生物学意义的各种有用的体外方法和用途。因此提供了结合磷脂酰丝氨酸的方法和在其中的用途，它一般包括使包含磷脂酰丝氨酸的组合物有效接触至少第一种本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体或者其缀合物。“接触”在对于允许形成结合的复合物来说有效的条件下进行，并且检测这样形成的任何复合物。

[0102] 检测方法和用途可以与生物样品结合使用，例如，在关于细胞凋亡、肿瘤和受病毒感染的细胞的诊断中，并且还提供了基于其上的诊断试剂盒。这些方法和试剂盒提供了关于本发明的构建体、受体 - 抗体、β - 抗体和缀合物的特定且可靠的用途。例如，膜联蛋白 V 通常用于检测凋亡细胞的方法和试剂盒中。然而，膜联蛋白 V 结合磷脂酰乙醇胺以及磷脂酰丝氨酸，然而本发明的构建体、受体 - 抗体、β - 抗体和缀合物结合磷脂酰丝氨酸，而对于磷脂酰乙醇胺没有显著的，或优选没有可检测的结合。因此，本发明的构建体更好地能够在

打印ID7584222 Pg 14

检测方法和诊断测定法中特异性地检测磷脂酰丝氨酸。

[0103] 本发明进一步提供了许多有用的体内方法和用途。例如，基于定位至磷脂酰丝氨酸的用于肿瘤血管靶向、肿瘤成像和治疗的方法，磷脂酰丝氨酸是易接近且稳定的可靶向的肿瘤血管结构标记物。本发明的构建体、受体－抗体和 β－抗体及其缀合物，在施用给具有肿瘤的动 物后特异地定位至实体瘤的血管结构。因此，磷脂酰丝氨酸转位至肿瘤血管内皮细胞的表面，至少在显著的程度上，不依赖于完全的细胞凋亡和细胞死亡而发生，从而使得磷脂酰丝氨酸暴露于形态上完整的血管内皮细胞上。

[0104] 所述方法和用途可以在体外和体内进行，在后一种情况下，其中组织和细胞位于动物中，并且向动物施用本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体或其缀合物。当组织或细胞离体维持时，本发明在药物发现程序中有用。具有可靠的阳性和阴性对照的体外筛选测定法可用作药物开发中的第一个步骤。当组织或细胞位于动物或患者中时，将所述组合物作为一种治疗形式施用给动物。

[0105] 就具有任何疾病或病症或处于形成任何疾病或病症的危险中的动物和患者而言，提供抗血管发生和抗血管疗法，所述疾病或病症的特征为不希望的、不适当的、异常的、过度的和／或病理性的血管发生或血管化作用。本发明的方法和用途特别希望用于具有下列疾病或处于形成下列疾病的危险中的动物和患者：任何形式的血管化肿瘤；黄斑变性，包括年龄相关的黄斑变性；关节炎，包括类风湿性关节炎；动脉粥样硬化症和动脉粥样硬化斑块；糖尿病性视网膜病及其他视网膜病；甲状腺增生，包括格雷夫斯氏病；血管瘤；新生血管性青光眼；和牛皮癣。在某些实施方案中，可操作地附着至 β 2GPI 多肽的 Fc 区的用途将优选用于抑制血管发生，所述 β 2GPI 多肽包含带切口的结构域 V。

[0106] 如在特别引入本文作为参考的美国专利号 5,712,291 和 6,524,583 中所公开的，前述治疗组中的每一种决非详尽的待通过本发明进行治疗的病状类型。引入本文作为参考的美国专利号 5,712,291 和 6,524,583 用于某些特定目的，包括一旦已公开和要求保护经定义的一类化合物，就可鉴定许多可以有效治疗的其他病状；和显示通过来自仅仅单一模型系统的数据能够治疗其他疾病。

[0107] 除了治疗血管疾病外，本发明的重要和统一的方面是用于治疗癌症的组合物和方法。此类方法包括向具有癌症或处于形成癌症的危险 中的动物或患者施用生物学或治疗有效量的至少第一种本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体或者其缀合物。

[0108] 本发明的癌症治疗方法和用途适合于治疗所有形式的癌症，包括具有下列疾病或处于形成下列疾病的危险中的动物和患者：血管化的实体瘤、转移性肿瘤或来自原发性肿瘤的转移灶。本发明的癌症治疗方法不仅仅依赖于发挥抗血管作用，例如通过靶向暴露于肿瘤血管内皮细胞的腔表面上的磷脂酰丝氨酸，因为本发明的构建体也可靶向暴露于肿瘤细胞表面上的磷脂酰丝氨酸。本发明方法优选发挥抗癌作用，而不引起显著的血栓形成并发症。

[0109] 原始发明的未缀合的构建体、受体－抗体或 β－抗体，或者其另外的缀合物，可以在本发明的癌症治疗方面使用。就免疫缀合物的用途而言，本发明提供了用于将所选择的诊断剂或治疗剂递送至肿瘤的方法。此类实施方案包括向具有肿瘤的动物或患者施用生物学有效量的至少第一种缀合物，其中诊断剂或治疗剂可操作地附着至本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体。

打印ID7584222 Pg 15

[0110] 本发明还提供了肿瘤诊断、预后、成像及相关方法，其使用本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体，以检测凋亡前细胞和凋亡细胞。此类方法可以用作替代标记物，以监测其他疗法特别是化学疗法的进展，或在治疗前形成肿瘤的图像。

[0111] 本发明作为替代标记物以监测癌症疗法特别是化学疗法的进展的用途包括：

[0112] (a) 对具有肿瘤的动物或患者实施设计为发挥抗肿瘤效应的至少第一种疗法；和

[0113] (b) 随后向同一动物或患者施用诊断有效量的可操作地附着至可检测的标记或诊断剂的至少第一种本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体，从而形成肿瘤的可检测图像，优选肿瘤内的凋亡前或凋亡肿瘤细胞或者肿瘤血管内皮细胞的图像；和优选地

[0114] (c) 分析肿瘤的可检测图像，优选肿瘤内的凋亡前或凋亡肿瘤细胞或者肿瘤血管内皮细胞的图像，从而评估设计为发挥抗肿瘤效应 的至少第一种疗法的进展或功效。

[0115] 组合的成像和癌症治疗方法包括：

[0116] (a) 形成肿瘤图像，其通过向具有肿瘤的动物或患者施用诊断上最小量或有效量的可操作地附着至可检测的标记或诊断剂的至少第一种本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体，从而形成肿瘤的可检测图像；和

[0117] (b) 随后向同一动物或患者施用治疗上优化或有效量的至少第一种本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体，或者其缀合物，从而引起抗肿瘤效应。

[0118] 在本发明的癌症治疗方法中，本发明进一步提供了药物前体治疗方法，其一般包括：

[0119] (a) 向具有肿瘤的动物或患者施用第一种药物组合物，其包含可操作地联接、共价连接或缀合至至少第一种酶的第一种本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体；其中所述构建体、受体－抗体或 β－抗体在施用后定位至肿瘤，和

[0120] (b) 随后在有效时间段后向动物或患者施用至少第二种药物组合物，其包含生物学有效量的至少一种实质上无活性的药物前体；其中所述药物前体通过与定位于肿瘤中的本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体相联接、连接或缀合的酶而被转化为实质上有活性的药物。

[0121] 本发明进一步提供了一系列组合型癌症治疗方法，包括向具有癌症的动物或患者施用治疗上有效的组合量的至少第一种本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体或者其缀合物，和至少第二种不同的治疗剂或抗癌剂。

[0122] 一般而言，所述至少第二种抗癌剂可以在施用本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体或者其缀合物之前、期间或之后施用给动物或患者。所述至少第二种抗癌剂可以与本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体或者其缀合物“基本上同时”施用给动物或患者；例如从单一药物组合物中或从紧接着在一起施用的两种药物组合物中。

[0123] 备选地，可在相继于施用本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体或 者其缀合物后的时间点将所述至少第二种抗癌剂施用给动物或患者。如本文所使用的，“相继于 . . . 后的时间点”指“错开的时间”，从而使得所述至少第二种抗癌剂在与施用本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体或者其缀合物不同的时间点施用给动物或患者。

[0124] 在顺次施用中，在有效间隔开的时间点施用所述两种试剂以允许所述两种试剂发挥其分别的疗效，即，它们以“生物学上有效的时间间隔”进行施用。所述至少第二种抗癌剂可以在本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体或者其缀合物之前的生物学有效时间点，或

打印ID7564222 Pg 16

者在那种治疗后的生物学有效时间点施用给动物或患者。

[0125] 任何治疗剂或抗癌剂均可在本发明的组合癌症治疗方法中用作第二种治疗剂或抗癌剂，包括上文关于本发明的抗癌组合物和试剂盒时所描述的治疗剂或抗癌剂中的任何一种。优选的试剂是补充或增强本发明构建体、受体-抗体或β-抗体或者其缀合物的疗效的那些，例如血管渗透性增强剂、抗血管发生剂、细胞凋亡诱导剂、钙流量诱导剂、炎性细胞因子、针对肿瘤细胞和坏死的肿瘤细胞的抗体和免疫毒素、来自表E或表F的化学治疗剂、考布他汀、多柔比星、依托泊苷和放线菌素D。

[0126] 多西他赛是在组合疗法中使用的特别优选的试剂。多西他赛可与本发明的构建体、受体-抗体或β-抗体或者其缀合物分开施用，在之前或之后。就同时施用而言，多西他赛可以在分开的或同一制剂中给予，任选在脂质体或隐蔽的脂质体中，并且优选在用本发明构建体、受体-抗体或β-抗体包被的隐蔽的脂质体的核中。

[0127] 治疗病毒感染：在另一总的实施方案中，本发明进一步提供了用于抑制病毒复制、感染和传播的重要的且新的一类组合物和方法以在治疗病毒感染和疾病中使用。这些方法基于使用本发明的构建体、受体-抗体或β-抗体，无论其是否缀合至抗病毒剂。重要地，本发明的构建体、受体-抗体或β-抗体无需附着至任何另外的试剂即可发挥抗病毒作用。如果希望附着至另外的试剂，那么细胞毒性剂及其他试剂在抗病毒治疗中将与传统的抗病毒剂一样是有效的。因此，此类构建 体和缀合物可广泛应用于一系列病毒感染和相关疾病的治疗中。

[0128] 在第一种情况下，本发明的抗病毒方法涉及使包含受病毒感染的细胞的组合物或者包含或怀疑包含受病毒感染的细胞的细胞群或组织与生物学有效量的至少第一种本发明的构建体、受体-抗体或β-抗体或者其缀合物接触。受病毒感染的细胞优选为真核细胞，例如动物细胞，并优选哺乳动物或人细胞。

[0129] 所述抗病毒方法和用途可以在体外和体内进行。在体外实施方案中，所述方法具有重要的效用。例如，在用于开发抗病毒药物或其组合的药物发现程序中，以及在关于病毒感染、复制和传播的进一步信息的描绘中。体外抗病毒方法还可用于从生物样品例如用于实验室用途的细胞群和组织培养物中，从用于农业用途的样品、组织、种子、植物部分和植物中，以及从用于治疗用途的血液和组织样品中清除病毒。

[0130] 在体内方法中，当细胞、细胞群或组织定位于动物内时，本发明的构建体、受体-抗体或β-抗体或者其缀合物作为抗病毒疗法施用给动物。本发明的构建体、受体-抗体或β-抗体或者其缀合物可以结合暴露于受病毒感染的细胞表面上的磷脂酰丝氨酸，或可以结合暴露于病毒颗粒表面上的磷脂酰丝氨酸。

[0131] 在所有情况下，所述组合物、方法和用途抑制对于生产性的或正在进行的病毒感染来说所需的一个或多个步骤或阶段，包括抑制病毒进入。优选地，所述组合物、方法和用途抑制病毒复制和/或传播，例如抑制病毒转录、翻译、装配、包装和/或进入或逸出感染的宿主细胞例如哺乳动物或人细胞中的一个或多个步骤。因此，本发明优选将病毒感染局限或基本上限制于最初受感染的细胞和细胞群中，从而基本上抑制或预防另外的宿主细胞或组织的后续或正在进行的感染。

[0132] 本发明的抗病毒治疗方法优选涉及向具有病毒感染或相关疾病、怀疑具有病毒感染或相关疾病或者处于形成病毒感染或相关疾病的危险中的动物或患者施用生物学有效

打印ID7584222 Pg 17

量的至少第一种本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体或者其缀合物。所述缀合物可以可操作地附着至 V 型 ATP 酶抑制剂，例如 salicylihalamide、刀球肮霉素或巴弗洛霉素；蛋白合成抑制剂，例如 psymberin、青腰虫素、irciniastatin A；蓖麻毒素、白树毒蛋白、相思豆毒蛋白、白喉毒素、假单胞菌毒素或百日咳毒素；或者附着至至少第二种不同的抗病毒剂。用于附着的合适的抗病毒剂包括表 G 中列出的那些，例如 AZT 或西多福韦。

[0133] 因为，本发明抑制所有病毒共同的对于生产性的或正在进行的感染所需的一个或多个步骤或阶段，所以本发明的抗病毒方法和用途适合于治疗所有病毒，包括有包膜病毒和无包膜病毒，包括感染植物、动物、脊椎动物、哺乳动物和人患者的那些。本发明适合于治疗在本文表 H 中所列出的感染脊椎动物特别是人的所有病毒，并且特别是在动物和人中具有致病性的病毒。可以通过本发明治疗的病毒感染以及相关和所得疾病包括表 J 中列出的那些病毒和疾病，如治疗 CMV、RSV、沙粒病毒和 HIV 感染以及肝炎、流行性感冒、肺炎、拉沙热和 AIDS 所例示的。治疗有包膜病毒是特别优选的。

[0134] 本发明的抗病毒治疗方法还可与其他治疗和诊断组合使用。组合型治疗方法包括向具有病毒感染的动物或患者施用治疗上有效的组合量的至少第一种本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体或者其缀合物，和至少第二种不同的治疗剂或抗病毒剂。

[0135] 所述至少“第二种不同的”抗病毒剂是参照作为“第一种”抗病毒剂的本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体或者其缀合物来说的。所述至少第二种抗病毒剂可以在施用所述第一种本发明抗病毒剂期间、或基本上同时施用给动物或患者；或者之前或之后施用给动物或患者，即在相继于施用所述第一种本发明抗病毒剂后施用。

[0136] 任何治疗剂或抗病毒剂可以在本发明的组合型抗病毒治疗方法中用作第二种治疗剂或抗病毒剂，包括上文关于本发明的抗病毒缀合物、组合物和试剂盒时所描述的抗病毒剂中的任何一种。

[0137] 前述癌症和抗病毒治疗方法和用途通常将涉及全身地例如通过经皮、肌内、静脉内注射等向动物或患者施用药学有效组合物。对于治疗病毒感染，特别是呼吸系统病毒感染，递送至肺是另一优选的实施 方案，因为可以使用气雾剂来实现。然而，允许治疗剂定位于肿瘤或病毒感染位点的任何施用途径都将是可接受的。因此，其他合适的递送途径包括口服、直肠、鼻、局部和阴道。对于治疗关节炎的用途和方法，可以采用例如滑膜内施用，如美国专利号 5,753,230 中关于其他免疫试剂所描述的，该文献特别引入本文作为参考。对于与眼相关的病状，考虑了眼制剂和施用。

[0138] 如本文所使用的，“施用”指以对于发挥疗效来说有效的量和时间提供或递送本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体或者其缀合物。蛋白质治疗剂的被动施用通常是优选的，部分是因为其简单性和可重复性。

[0139] 然而，术语“施用”在本文中用于指通过其来递送治疗剂的任何和所有方法。因而，“施用”包括以有效方式提供产生本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体或者其缀合物的细胞。在此类实施方案中，可能希望在可选择性地渗透的膜、结构或可植入装置（一般是可以取出以停止治疗的装置）中配制或包装细胞。外源性施用一般仍是优选的，因为这代表了允许密切监测并控制剂量的非侵入性性方法。

[0140] 本发明的治疗方法和用途还延伸至以有效产生体内表达的方式提供编码本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体或者其缀合物的核酸。任何基因疗法技术均可采用，例如裸

打印ID7584222 Pg 18

露 DNA 递送、重组基因和载体、基于细胞的递送，包括患者细胞的离体操作等。可以使用病毒载体，例如包括在重组逆转录病毒、单纯疱疹病毒 (HSV)、腺病毒、腺伴随病毒 (AAV)、巨细胞病毒 (CMV) 等中。脂质体和隐蔽的脂质体对于在某些实施方案中的使用是优选的。

[0141] 本发明的药物组合物和治疗方法采用“治疗有效量”的本发明构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体或者其缀合物。“疗效”和随之发生的“治疗有效量”通过癌症治疗相比于抗病毒治疗中的不同参数来测量。

[0142] 在癌症治疗中，试剂的量对于下列作用来说是有效的：杀死或特异性地杀死至少部分肿瘤细胞、肿瘤或肿瘤内血管内皮细胞；在至少部分肿瘤细胞、肿瘤或肿瘤内血管内皮细胞中诱导细胞凋亡或特异性 地诱导细胞凋亡；在至少部分肿瘤或肿瘤内血管中促进凝血或特异性地促进凝血；闭塞或破坏、或者特异性地闭塞或破坏肿瘤的至少部分输送血液的导管；在至少部分肿瘤中诱导坏死或特异性地诱导坏死；和 / 或在施用给动物或患者后诱导肿瘤消退或缓解。

[0143] 在治疗病毒感染和相关疾病中，试剂的量对于抑制关于正在进行的病毒感染的一个或多个必要条件来说是有效的，例如病毒进入，并且优选地，来自感染的宿主细胞的病毒复制、逸出和传播。所述量还可以以抵抗病毒复制、传播和正在进行的感染的方式杀死或去除至少部分受病毒感染的细胞。总之，试剂的量对于在施用给动物和患者后减少、显著减少或根除病毒感染来说是有效的。

[0144] 如本文所使用的，术语“优先地”和“特异性地”表示本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体或者其缀合物实现基本上限制于疾病位点的抗癌或抗病毒作用，并且在动物或受试者的正常健康组织中基本上不引起凝血、破坏和 / 或组织坏死。因此，健康细胞和组织的结构和功能基本上维持不受本发明实施的损害。

[0145] 附图简述

[0146] 下列附图形成本说明书的一部分并且包括在内以进一步证实本发明的某些方面。通过参照这些附图中的一个或多个并结合本文所提供的具体实施方案的详述可以更好地理解本发明。本专利的美国文件包含至少一幅彩图。在请求并支付必需的费用后，带彩图的本专利副本将由专利和商标局提供。

[0147] 图 1。在用 3G4 抗体治疗的小鼠中白细胞浸润肿瘤。具有 MDA-MB-231 同位 (orthotopic) 肿瘤的裸鼠用 100 μ g/ 剂的 3G4 抗体或用相同剂量的同种型匹配的对照抗体一周治疗 3 次。在治疗结束时，对动物进行灌注，并将肿瘤速冻、切割并染色以检测白细胞。该图中显示了浸润肿瘤的白细胞。

[0148] 图 2A、图 2B、图 2C 和图 2D。3G4 抗体和 2aG4 抗体的互补性决定 区 (CDR) 的 DNA 和氨基酸序列。提供了 3G4 抗体的重链 (图 2A ;SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2) 和轻链 (图 2B ;SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4) 的 DNA 和氨基酸序列，并显示了 DNA 序列中的限制性位点。将前导序列与成熟蛋白质区分开，成熟蛋白质的起始点在图 2A 和图 2B 中的每一幅图中以第一个箭头指示。列出了用人恒定区对每个可变序列进行接枝的示例性方法，其中各自的人恒定区序列 (SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :8) 的第一部分在图 2A 和图 2B 中的每一幅图中以第二个箭头指示。如图 2C 和图 2D 中所显示的，SEQ ID NO :10 和 SEQ ID NO :11 分别表示 IgG2a 重链和 3G4 轻链 (C_κ) 的氨基酸序列。

[0149] 图 3。使用竞争性磷脂脂质体抑制 3G4 抗体与固定化的 PS 的结合。用磷脂包被的

打印ID7584222 Pg 19

微量滴定板用在10％牛血清中浓度为0.016－33nM的3G4处理。使用山羊抗小鼠IgG-HRP检测结合的抗体。使用由各种磷脂制备的脂质体的竞争测定法证实，阴离子磷脂可以与3G4(6.7nM)竞争结合PS。柱表示三次重复测量的SD。

[0150] 图4。3G4与磷脂的结合。用磷脂包被的微量滴定板用在10％牛血清中浓度为0.016－33nM的3G4处理。使用山羊抗小鼠IgG-HRP检测结合的抗体。3G4特异性地结合阴离子磷脂，包括PS、PI、PA和CL，但不结合中性脂质，包括PE、PC和SM。

[0151] 图5A、图5B、图5C、图5D和图5E。如FACS(图5A)和免疫组织化学(图5B、图5C、图5D和图5E)所显示的，通过H_2O_2处理诱导了3G4与完整的HUVEC和MDA-MB-435细胞的结合。图5A，HUVEC或MDA-MB-435细胞用H_2O_2(200μM)于37℃处理1小时。洗涤细胞并用胰蛋白酶从培养皿中分离。细胞用3G4(实线)或对照小鼠IgG_3(BBG3)(虚线)染色，并通过细胞荧光测定法使用FACS进行分析。设备对完整细胞(碘化丙锭阴性)是开启的。图5A，左上部，HUVEC；右上部，H_2O_2处理的HUVEC；左下部，MDA-MB-435；右下部，H_2O_2处理的MDA-MB-435。图5B、图5C、图5D和图5E，通过下列步骤来测定3G4结合完整的、非渗透化的、经H_2O_2处理的HUVEC的形态学：如上用H_2O_2处理粘附细胞，洗涤细胞，并用3G4或对照小鼠IgG_3(BBG3)，随后用FITC标记的山羊抗小鼠IgG抗体(绿色)进行染色。细胞随后用低聚甲醛固定并透化。细胞骨架用德克萨斯红标记的鬼笔环肽(红色)染色，并且细胞核用DAPI(蓝色)复染。3G4结合出现膜泡的质膜的分散区域。图5B，用BBG3染色的HUVEC；图5C，用3G4染色的HUVEC；图5D，用BBG3染色的MDA-MB-435细胞；和图5E，用3G4染色的MDA-MB-435细胞。未用H_2O_2处理的细胞不用3G4染色。比例尺表示50μm。

[0152] 图6A、图6B、图6C和图6D。针对磷脂酰丝氨酸和阴离子磷脂的抗体导致单核细胞结合至肿瘤血管以及导致巨噬细胞浸润肿瘤。具有同位人乳腺肿瘤的SCID小鼠用100μg对照抗体BBG3(图6A和6C)或3G4抗体(图6B和图6D)经腹膜内途径进行治疗，一周3次共2周。肿瘤是MDA-MB-435(图6A和6B)或MDA-MB-231(图6C和6D)。制备冷冻的肿瘤切片。用大鼠抗小鼠M1/70(Mac-1)抗体，随后用FITC标记的抗大鼠IgG(绿色)来检测小鼠巨噬细胞和单核细胞。抗F4/80和抗FcγR抗体产生与抗M1/70抗体一致的染色图案。血管用仓鼠抗小鼠CD31，随后用德克萨斯红标记的抗仓鼠IgG来检测(红色)。细胞核用DAPI(蓝色)显现。图6A，来自用对照BBG3处理的小鼠的肿瘤，显示出稀少的巨噬细胞浸润。图6B，来自用3G4处理的小鼠的肿瘤，显示出丰富的巨噬细胞浸润。图6C，来自用BBG3处理的小鼠的对照肿瘤，显示出缺乏附着至血管的单核细胞。图6D，来自用3G4处理的小鼠的肿瘤，显示出附着至肿瘤血管内皮的腔表面上的单核细胞(箭头)。图6A和图6B中的比例尺表示50μm，并且图6C和图6D中的比例尺表示10μm。

[0153] 图7。吞噬作用的沉默状态和炎症状态。根据使用3G4抗体的肿瘤治疗研究，提出抗体例如3G4引起从表达PS的肿瘤内皮细胞起的PS信号传导的阻断。通常地，肿瘤内皮细胞上的PS通过结合肿瘤血管和肿瘤细胞的巨噬细胞来抑制炎症应答(沉默状态)。当抗体例如3G4存在时，抗体结合PS，从而使得巨噬细胞上的PS受体不具有结合配偶体。然后，巨噬细胞分泌TNF-α、IL-1及其他炎性因子，它们直 接损害肿瘤内皮并将更多的宿主细胞募集到肿瘤中(炎症状态)。

[0154] 图8。3G4抗体的$F(ab')_2$片段作为抗肿瘤剂与3G4一样有效。在第1天用肿瘤接种小鼠，并在第9天用3G4抗体、3G4抗体的$F(ab')_2$片段或同种型匹配的对照抗体(BBG3)

打印ID7584222 Pg 20

治疗。对照动物中的肿瘤继续快速生长（■），而在用 3G4 抗体（●）或 3G4 抗体的 $F(ab')_2$ 片段（▼）治疗的小鼠中，肿瘤生长明显减慢，$F(ab')_2$ 片段至少与 3G4 一样有效。

[0155] 图 9A 和图 9B。3G4 与用 PS 包被的微量滴定板的结合是血清依赖性的。图 9A，从在包含牛血清的培养基 (SCM) 或无血清培养基 (SFM) 中生长的细胞纯化出 3G4 抗体。微量滴定板用 PS 包被并在 1% OVA 中封闭。在 10% 胎牛血清 (FBS) 或 1% 来自鸡蛋清的卵清蛋白 (OVA) 中进行 3G4 的系列稀释。图 9A，微量滴定板用 PS 包被并在 1% OVA 中封闭。如所说明的，在 10% 来自小鼠、大鼠、人和牛这些物种的血清中进行 3G4SFM 的系列稀释。

[0156] 图 10A 和图 10B。3G4 结合血浆蛋白质 β2GPI（图 10A）并且在 β2GPI 结构域 II 上结合（图 10B）。图 10A，微量滴定板用从人血浆中纯化的人 β2GPI（hβ2GPI）包被并在 1% OVA 中封闭。在 1% OVA 中进行商品化的小鼠抗人 β2GPI（抗 β2GPI 或“α-β2GPI”）、3G4SFM 和对照小鼠 IgG（mIgG）的系列稀释。图 10B，微量滴定板的孔用重组全长 hβ2GPI 肽（结构域 I — V）或者缺乏结构域 I（II — V）、缺乏结构域 I 和 II（III — V）、缺乏结构域 I — III（IV — V）或缺乏结构域 I — IV（V）的 hβ2GPI 肽包被。平板在 1% OVA 中封闭，并且在 1% OVA 中进行 3G4SFM 的系列稀释。

[0157] 图 11。ch3G4 和 β2GPI 必须同时存在以结合具有暴露的 PS 的内皮细胞 (EC)。ABAE 细胞在 DMEM+10% 正常小鼠血清 (MS) 中用 200μM 溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 孵育 30 分钟，同时加上 (i) 纯化的 hβ2GPI、(ii) ch3G4 或 (iii) ch3G4+hβ2GPI。然后，洗涤细胞并分别用 (i) ch3G4、(ii) hβ2GPI、或 (iii) DMEM+10% MS 孵育 30 分钟。最后，洗涤细胞，固定，并用荧光标记染色以检测 ch3G4 的结合。使用浓度为 2μg/ml 的 ch3G4 和 hβ2GPI。使用 MetaVue 软件定量 ch3G4 结合 的像素面积。值是相对于将在条件 (i) 下 ch3G4 的结合设定为 1 而言的。

[0158] 图 12A 和图 12B。β2GPI 的脂质结合区域是介导 ch3G4 与具有暴露的 PS 的内皮细胞结合所必需的。图 12A，ABAE 细胞用 ch3G4 加上 (i) 非脂质结合形式的 β2GPI（带切口的 hβ2GPI）或 (ii) 完整的 hβ2GPI 进行孵育。在 DMEM+10% MS 中于 200μM LPC 存在或不存在下进行 30 分钟孵育。然后，洗涤细胞，固定，并用荧光标记染色以检测 ch3G4 的结合。使用浓度为 2μg/ml 的 ch3G4、hβ2GPI 和带切口的 hβ2GPI。使用 MetaVue 软件定量 ch3G4 结合的像素面积。值是相对于将在没有 LPC 的条件 (i) 下 ch3G4 的结合设定为 1 而言的。图 12B，微量滴定板的孔用 hβ2GPI 或带切口的 hβ2GPI 包被，并在 1% OVA 中封闭。在 1% OVA 中进行 ch3G4 或对照 mIgG 的系列稀释。

[0159] 图 13。过量的 ch3G4 抑制 ch3G4/β2GPI 复合物与具有暴露的 PS 的内皮细胞的结合。ABAE 细胞在 DMEM+10% MS 中用 200μM LPC、40nM 纯化的 hβ2GPI 以及一系列滴度的 ch3G4 滴度孵育 30 分钟。然后，洗涤细胞，固定，并用荧光标记染色以检测 ch3G4 的结合。使用 MetaVue 软件定量 ch3G4 结合的像素面积。值是相对于将 320pM ch3G4 的结合设定为 1 而言的。

[0160] 图 14A、图 14B 和图 14C。ch3G4 的二价性是 β2GPI 介导的与具有暴露的 PS 的内皮细胞结合所必需的。图 14A，ABAE 细胞在 DMEM+10% FBS 中于 200μM LPC 存在或不存在下用 20nM3G4、$3G4F(ab')_2$ 或 3G4Fab' 单体孵育 30 分钟。然后，洗涤细胞，固定，并用荧光标记染色以检测 3G4 或 3G4 片段的结合。使用 MetaVue 软件定量抗体结合的像素面积。值是相对于将在 LPC 不存在下的 3G4 的结合设定为 1 而言的。图 14B，ABAE 细胞在 DMEM+10%

打印ID7584222 Pg 21

MS 中用 200μM LPC、40nM 纯化的 hβ2GPI 以及一系列滴度的 3G4Fab' 单体孵育 30 分钟。然后，洗涤细胞，固定，并用荧光标记染色以检测 3G4Fab' 的结合。使用 MetaVue 软件定量 3G4Fab' 结合的像素面积。值是相对于将 2nM3G4Fab' 的结合设定为 1 而言的。图 14C，ABAE 细胞在 DMEM+10％ MS 中 用 200μM LPC、40nM 纯化的 hβ2GPI、20nM ch3G4 以及一系列滴度的 3G4Fab' 单体孵育 30 分钟。然后，洗涤细胞，固定，并用荧光标记染色以检测 ch3G4 的结合。使用 MetaVue 软件定量 ch3G4 结合的像素面积。值是相对于将没有竞争性 3G4Fab' 时的 ch3G4 的结合设定为 100 而言的。

[0161] 图 15。示意性地图示了 3G4 抗体和称为“巴维昔单抗 (bavituximab)”的人 - 小鼠嵌合抗体对应物与 PS 表面的 β2GPI 依赖性结合。显示出 β2GPI 具有 5 个结构域 (I、II、III、IV 和 V)。抗体与 PS 表面 (包括暴露于细胞膜上的 PS) 的结合由与 β2GPI 结构域 II 的结合介导。

[0162] 图 16。示意性地图示了示例性的 Fc-β2GPI 构建体。在这个构建体中，抗体的可变区已去除，但不用 β2GPI 代替。相反地，将 β2GPI 附着在 Fc 区的 C_H3 结构域的 C- 末端。该图显示了二硫键键合的铰链区，来自小鼠 IgG_{2a} 的 Fc 区的两个 C_H2 和 C_H3 结构域，其可操作地附着至两个小鼠 β2GPI 蛋白。在对应物人构建体中，来自人 IgG_1 的 Fc 区可操作地附着至两个人 β2GPI 蛋白。来自人 IgG_3 的 Fc 区也将优选与两个人 β2GPI 蛋白一起使用。在所描述的示例性 Fc-β2GPI 构建体中，显示出小鼠 β2GPI 具有所有 5 个结构域 (I － V)，尽管可以容易地制备不含所有 5 个结构域的其他小鼠或人构建体，只要保留 β2GPI 结构域 V 的脂质结合区域。

[0163] 图 17。Fc-mβ2GPI 构建体的质粒图。由下列 3 个单元产生称为“Fc-mβ2GPI”的所制备的第一种 Fc-β2GPI 构建体 :(1) 通过 PCR 从 2aG4 构建体扩增出的 3G4 轻链的信号序列 ;(2) 通过 PCR 从 2aG4 构建体扩增出的包含铰链、C_H2、C_H3 的小鼠 IgG2a Fc 区 ;和 (3) 通过 RT-PCR 从商购获得的小鼠肝 RNA 扩增出的小鼠 β2GPI。显示了质粒图。质粒的序列如 SEQ ID NO :25 中所提供的。

[0164] 图 18A。Fc-mβ2GPI 氨基酸序列。被切割的信号肽 (“mIgGκ 信号序列”) MDMRAPAQILGFLLLLFPGTRCLR 由 SEQ ID NO :18 表示。第 1 位标明在切除信号肽后成熟 Fc-mβ2GPI 蛋白的起点。成熟 Fc-mβ2GPI 的氨基酸序列是 SEQ ID NO :19。标明了 Fc 区的铰链、C_H2 和 C_H3 结构域，并标明了小鼠 β2GPI 的结构域 I、II、III、IV 和 V。以粗体和阴影显示了参与 β2GPI 中的结构域内二硫键形成的 Cys 残基。带下划线的斜体形式的氨基酸是参与阴离子磷脂识别的正电荷区域的一部分。带双下划线的斜体形式的氨基酸是对于与脂质膜结合来说所需的疏水环的一部分。SEQ ID NO :20 是氨基酸序列，KNKEKKCSYTVEA HCRDGTIEIPSCFKEHSSLAFWK，其以参与阴离子磷脂识别的那些开始，并以作为对于与脂质膜结合来说所需的疏水环的一部分的那些结束。

[0165] 图 18B。由于制备人 Fc-β2GPI(Fc-hβ2GPI) 的人重链恒定区和人 β2GPI 的氨基酸序列。呈现的人 IgG_1 重链恒定区 (登录号 P01857 ;SEQ ID NO :21) 以可以被删除的 C_H1 结构域开始。在人 Fc-hβ2GPI 中，在铰链 (铰链起点匹配图 18A 中的第 1 位)、人 C_H2 和人 C_H3 结构域之后为人 β2GPI(登录号 1C1ZA ;SEQ ID NO :22)，其被显示出包括结构域 I、II、III、IV 和 V。SEQ ID NO :23 是 Fc-hβ2GPI 的氨基酸序列。人 β2GPI 的结构域结构与小鼠 β2GPI 的结构域结构十分相似 (图 18A)，包括下列部分的定位 :参与结构域内二硫键形

打印ID7584222 Pg 22

成的Cys残基（粗体和有阴影的），作为参与阴离子磷脂识别的正电荷区域的一部分的氨基酸（带下划线的斜体），以及作为对于与脂质膜结合来说所需的疏水环的一部分的氨基酸（带双下划线的斜体）。SEQ ID NO:24是氨基酸序列，KNKEKKCSYTEDAQCIDGTIEVPKCFKEHSSLAFWK，其以参与阴离子磷脂识别的那些开始、并以作为对于与脂质膜结合来说所需的疏水环的一部分的那些结束。

[0166] 图19。Fc-mβ2GPI的表达和通过抗小鼠IgG的捕获。用FuGENE6试剂将Fc-mβ2GPI构建体转染到CHO细胞中。2天后，收集并测定细胞上清液。在表达测定法中，微量滴定板用抗小鼠IgG包被并用1％ OVA封闭。在1％ OVA中进行细胞培养上清液的系列稀释。#8和#18是两种不同的Fc-mβ2GPI克隆。用ch3G4和抗人IgG-HRP检测结合。载体是阴性对照，这是基线。

[0167] 图20。Fc-mβ2GPI结合在用PS包被的板上的PS。在这个结合测定法中，微量滴定板用PS包被并用1％ OVA封闭。在1％ OVA中进行Fc-mβ2GPI细胞培养上清液的系列稀释。#8和#18是两种不同的Fc-mβ2GPI克隆。用抗小鼠IgG-HRP检测结合。

[0168] 图21。Fc-mβ2GPI结合阴离子磷脂。该测定法测量Fc-mβ2GPI在10％ FBS中与磷脂的结合。微量滴定板用所指明的各种脂质包被，并用1％ OVA封闭。在1％ OVA中进行Fc-mβ2GPI细胞培养上清液的系列稀释。用抗小鼠IgG-HRP检测结合。Fc-mβ2GPI结合阴离子磷脂PS、PA、PI和PG，但不结合中性脂质PC和SM。

[0169] 图22A、图22B和图22C。Fc-mβ2GPI检测暴露于天然凋亡的ABAE细胞上的PS。将2×10^4ABAE细胞接种到8孔玻璃腔式载玻片上，在DMEM+10％ FBS中于37℃过夜。第二天，洗涤细胞，并与2aG4（图22A）、来自经Fc-mβ2GPI转染的CHO细胞的上清液（图22B）或来自模拟转染细胞的上清液（“对照上清液”，图22C）一起孵育。用经FITC标记的二抗（绿色）检测2aG4和Fc-mβ2GPI。细胞骨架和细胞核分别用经德克萨斯红标记的鬼笔环肽和DAPI（蓝色）复染。箭头突出显示凋亡细胞。

[0170] 图23A和图23B。Fc-mβ2GPI检测暴露于经LPC处理的ABAE细胞上的PS。将2×10^4ABAE细胞接种到8孔玻璃腔式载玻片上，在DMEM+10％ FBS中于37℃过夜。第二天，洗涤细胞，并与来自经Fc-mβ2GPI转染的CHO细胞的上清液一起孵育。用经FITC标记的二抗（绿色）检测Fc-mβ2GPI。细胞骨架和细胞核分别用经德克萨斯红标记的鬼笔环肽和DAPI（蓝色）复染。图23A和图23B各自描述了Fc-mβ2GPI的结合，如具有绿色染色的小点所示。

[0171] 图24A、图24B、图24C和图24D。人工二聚β2GPI构建体结合具有暴露的PS的内皮细胞。将ABAE细胞在DMEM+10％ FBS中用200μM LPC孵育30分钟，其中加上了纯化的hβ2GPI单体（图24A）、hβ2GPI二聚体（图24B）、或不能结合脂质的突变型hβ2GPI二聚体（图24C）。然后洗涤细胞，并与抗hβ2GPI一起孵育以检测hβ2GPI单体和二聚 体。所述抗β2GPI抗体不识别牛β2GPI；因此，10％ FBS的存在不抑制hβ2GPI单体或hβ2GPI二聚体的检测。然后，洗涤细胞，固定，并用荧光标记染色。细胞骨架呈现红色，细胞核呈现蓝色，并且hβ2GPI单体和hβ2GPI二聚体呈现绿色。图24D，使用MetaVue软件定量hβ2GPI单体或hβ2GPI二聚体的结合面积。所有值是相对于将hβ2GPI二聚体与未经LPC处理的细胞的结合设定为1而言的。

[0172] 例证性的实施方案的描述

打印ID7584222 Pg 23

[0173] 实体瘤和癌在人类所有癌症中所占比例超过90%。虽然在淋巴瘤和白血病的治疗中已经研究了单克隆抗体和免疫毒素的应用(Vitetta等人,1991),但是这些药剂在抗癌和其他实体瘤的临床试验中无效的结果令人失望(Abrams和Oldham,1985)。基于抗体的治疗无效的首要原因是大分子不容易转运进入实体瘤。甚至一旦进入了肿瘤块内,由于肿瘤细胞间存在紧密连接、纤维基质、间质压力梯度和结合位点屏障,这些分子也不能均匀分布(Denekamp,1990;Dvorak等人,1991)。

[0174] 在开发用于治疗实体瘤的新策略的过程中,涉及靶向肿瘤血管结构而非肿瘤细胞的方法具有明显优势。有效破坏或阻断肿瘤血管,则阻止了经过肿瘤的血流并导致雪崩式的肿瘤细胞死亡。抗体-毒素和抗体-凝血剂构建物,例如选择性破坏和/或堵塞肿瘤血管的VTA,早已有效用于特异性靶向并破坏肿瘤血管结构,导致肿瘤坏死(Burrows等人,1992;Burrows和Thorpe,1993;WO 93/17715;WO 96/01653;Huang等人,1997;分别引入本文作为作为参考)。

[0175] VTAs在实体瘤的已有血管上发挥其主要的作用,而不同于阻止新血管形成的抗血管发生剂。VTAs相比于其他癌症治疗剂有许多优越之处。首先,仅仅一条血管为成百上千的肿瘤细胞提供营养并促进代谢废物的去除,只要在某一点被破坏就会阻断上下游的血流。因此VTAs对于已建立的肿瘤尤其有效。其次,无需杀死内皮细胞,尽管这是一个有效的机制。血液凝结的形成或局部引发的变化就足够了。第三,内皮细胞与血流相邻,保证了足够的药物递送。第四,靶目标是不太可能具有造成药物抗性的遗传突变的正常二倍体细胞。第五,生物学活性的代用标记,即血流,是可检测的。

[0176] 第六,对血管功能的短暂影响可能足以产生显著的抗肿瘤效用。研究表明,在局部缺血2小时内体内99%以上的肿瘤细胞能被杀死。最后,与血管发生抑制剂不一样,VTAs只需间歇施用以便协同加强常规疗法的作用,而无需几个月或几年的长期施用。

[0177] 在以下专利中有对细胞毒性VTAs的描述:美国专利号5,660,827;5,776,427;5,855,866;5,863,538;5,965,132;6,004,554;6,051,230;6,261,535和6,451,312,分别引入本文作为参考。其中的抗体、生长因子或其他的结合配基用于特异递送凝血剂至肿瘤血管结构,这样的药剂被称为"凝血配体"。凝血配体VTAs参阅以下专利:美国专利号6,093,399;6,004,555;5,877,289和6,036,955,分别引入本文作为参考。

[0178] 目前优选用于凝血配体的凝血剂是截短的组织因子(tTF)(Huang等人,1997;WO 96/01653;美国专利号5,877,289)。TF是血液凝结的主要起始因子(Ruf等,1991;Edgington等人,1991)。在损伤位点,血液中的因子VII/VIIa开始接触并结合血管周围组织内细胞上的TF。存在磷脂表面时,TF:VIIa复合物激活因子IX和X。这继而导致凝血酶、纤维蛋白、和最终血块的形成(Ruf和Edgington,1994)。

[0179] 缺失胞质和跨膜结构域的重组、截短形式的组织因子(tTF)是诱发凝血能力比天然TF低约5个数量级的可溶性蛋白质(Stone等,1995;Huang等,1997)。这是因为TF需要联合磷脂与VⅡa形成复合物,从而有效激活IXa或Xa。不过,当tTF通过靶向抗体或药剂的方式递送至肿瘤血管内皮时,它重新接近脂质表面并恢复血栓形成活性(Huang等人,1997;美国专利号6,093,399,6,004,555,5,877,289和6,036,955)。由此形成了选择性地在肿瘤血管引起血栓的凝血配体。

[0180] 截短的TF具有几个优势,使其被推荐用于血管靶向凝血配体中:人tTF易于获取,

打印ID7584222 Pg 24

且人蛋白质对人体只具有可忽略的或微弱的免疫原 性；人 tTF 在包括小鼠在内的实验动物中是完有功能的；且靶向 tTF 具有高潜能，因为它可引发凝血蛋白质级联反应的激活，产生大大增强了的效应（美国专利号 6,093,399,6,004,555,5,877,289 和 6,036,955）。

[0181] 已经描述了在肿瘤内皮上可供利用、但在正常内皮上基本上不存在的多种合适的靶分子。例如，可以利用被表达的靶，诸如内皮糖蛋白、E- 选择蛋白、P- 选择蛋白、VCAM-1、ICAM-1、PSMA、TIE、与 LAM-1 反应的配体、VEGF/VPF 受体、FGF 受体、$\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白、多效营养因子、或内皮唾液酸蛋白（美国专利号 5,855,866；5,877,289；Burrows 等人，1992；Burrows 和 Thorpe，1993；Huang 等人，1997；Liu 等人，1997；Ohizumi 等人，1997；分别引入本文作为参考）。

[0182] 吸附的靶是另一组合适的靶，诸如 VEGF、FGF、TGF β、HGF、PF4、PDGF、TIMP、结合 TIE 的配体、或肿瘤相关性纤连蛋白异构体（美国专利号 5,877,289,5,965,132,6,051,230 和 6,004,555）。纤连蛋白异构体是可结合受体整联蛋白家族的配体。肿瘤相关性纤连蛋白异构体是肿瘤血管结构和肿瘤基质二者的可靶向成分。单克隆抗体 BC － 1(Carnemolla 等人，1989) 特异结合肿瘤相关性纤连蛋白异构体。

[0183] 如美国专利号 5,776,427,5,863,538 和 6,036,955 所述，通过天然的肿瘤环境或人为干预后可诱导的其他靶目标也是可靶向的实体。当与正常组织的预先抑制和肿瘤血管诱导结合使用时，也可以采用 MHCII 类抗原作为靶目标（美国专利号 5,776,427,5,863,538,6,004,554 和 6,036,955）。

[0184] 目前优选用于临床的一个靶目标是血管内皮粘附分子 -1(VCAM-1)（美国专利号 5,855,866,5,877,289,6,051,230,6,004,555 和 6,093,399）。VCAM-1 是由炎性细胞因子 IL-1 α、IL-4(Thornhill 等人，1990) 和 TNF α (Munro，1993) 诱导的细胞粘附分子，它在体内的作用是向急性发炎部位补充白细胞 (Bevilacqua，1993)。

[0185] VCAM － 1 存在于许多人类恶性肿瘤的血管内皮细胞中，包括成神经细胞瘤 (Patey 等人，1996)、肾癌 (Droz 等人，1994)、非小细胞肺 癌 (Staal-van den Brekel 等人，1996)、淋巴肉芽肿病（何杰金氏病）(Patey 等人，1996) 和血管肉瘤 (Kuzu 等人，1993)，还存在于良性肿瘤血管内皮细胞上，诸如痣 (Patey 等人，1996) 和血管瘤 (Kuzu 等人，1993)。VCAM-1 在人体中的组成性表达仅限于甲状腺、胸腺和肾的一些血管 (Kuzu 等人，1993；Bruijn 和 Dinklo，1993)，而在小鼠内则限于心脏和肺的血管 (Fries 等人，1993)。

[0186] 本文给出的某些数据甚至进一步补充了美国专利 5,855,866,5,877,289,6,051,230,6,004,555 和 6,093,399 中所提供的数据，并证明了抗 -VCAM-1 • tTF 凝血配体的施用选择性地诱导了血栓症和肿瘤梗死。所展示的结果是以带 L540 人何杰金淋巴瘤的小鼠为材料得到的。当作为异种移植物生长于 SCID 小鼠中时，就炎性细胞因子的表达以及其血管结构上 VCAM － 1 和其他内皮细胞活化分子的存在而言，该肿瘤显示与人类疾病非常类似 (Diehl 等人，1985)。

[0187] 利用共价连接的抗 -VCAM-1 • tTF 凝血配体（其中 tTF 直接与抗 -VCAM-1 抗体直接连接），本文显示了凝血配体选择性地定位于肿瘤血管处，诱导那些血管的血栓形成，在携带 L540 何杰金实体瘤的小鼠中引起了整个肿瘤发生坏死并延缓了肿瘤的生长。肿瘤通常需要直径至少约 0.3cm 才能对凝血配体产生反应，因为在较小的肿瘤上没有 VCAM-1。估计可能是因为在小肿瘤中，肿瘤细胞或浸润肿瘤的宿主细胞分泌的细胞因子水平对于

打印ID?584222 Pg 25

VCAM-1 的诱导来说太低了。这与美国专利 5,855,866,5,877,289,6,051,230,6,004,555 和 6,093,399 中的研究结果是一致的，其中的发明显示出在较大的实体瘤中最有效。

[0188] 尽管最初更多的是在肿瘤周边观察到 VCAM-1 染色，凝血配体明显地结合并堵塞输送血液的血管——因为它能减少所有肿瘤区的血流。此外，有一发明者还考虑到由于最初施加凝血配体所引起的凝血酶的产生有可能导致中枢血管上进一步的 VCAM-1 诱导作用 (Sluiter 等人，1993)，从而产生扩大的信号并导致对肿瘤内区域的明显破坏。这种类型的凝血配体诱导的其他可靶向标记物的表达以及由此产生的信号放大在美国专利 6,036,955 中有所描述。

[0189] 正如本文所显示的，尽管通过施加抗 VCAM-1 凝血配体观察到其定位于小鼠心脏和肺中表达 VCAM-1 的血管上，但此构建物并未在这样的非肿瘤部位诱发血栓形成。而且，抗 VCAM-1 凝血配体对小鼠的毒性并不比具有无关特异性的对照凝血配体更大，再次表明了 VCAM-1 在心脏和肺血管上的组成性表达不会产生毒性。由于 VCAM-1 是人类肿瘤血管内皮中天然存在的标记物，此结果对于当前凝血配体疗法的临床进展尤为重要。另一方面，此现象还为发明者提供了独一无二的视野，导致了不同的破坏肿瘤血管结构的方法。

[0190] A. 发现用于肿瘤治疗的裸露的抗磷脂酰丝氨酸抗体

[0191] 发明者试图了解抗 VCAM-1 凝血配体能结合组成性表达于心脏和肺血管上的 VCAM-1 却不会在那些血管中引起血栓形成这一现象背后的机制。对于此只凭经验观察到的现象有许多科学的可能性解释，通常与肿瘤环境中的前血栓形成特性以及心脏和肺中任何血纤维蛋白溶解诱因相关。

[0192] 一般而言，在凝血系统（纤维蛋白沉积）和纤溶系统（纤维蛋白被酶降解）之间存在着生物学平衡。不过，在恶性病，尤其是肿瘤中，此平衡被破坏，导致了凝血的异常激活（血凝过快或“前血栓形成状态”）。尽管进行了大量的研究，直到最近才了解了肿瘤环境中前血栓形成状态的明确分子机制。

[0193] 在详细分析许多可能后，发明者推断抗 VCAM-1 凝血配体之所以不会在正常组织血管内引起血栓形成是由于这些血管内腔表面缺乏磷脂酰丝氨酸 (PS)。因此，为了证实这一理论，不仅需要证明在这些正常血管上无磷脂酰丝氨酸，还需要证实它们存在于肿瘤相关血管的内腔侧面上。

[0194] 因此，发明者用免疫组织化学染色来确定静脉内注射入患肿瘤小鼠体内的单克隆抗磷脂酰丝氨酸（抗 PS）抗体的分布状态。这些研究显示，在心脏和肺中表达 VCAM－1 的血管缺乏 PS，而在肿瘤中表达 VCAM-1 的血管也表达 PS。发明者还发现结合 PS 的膜联蛋白 V 在体外和体 内均阻断抗 -VCAM-1 •tTF 凝血配体的作用，这进一步证实了在凝血配体的作用中需要表面 PS 的表达。

[0195] 因此，至少在某种程度上，抗 VCAM-1 凝血配体在正常心脏和肺血管上无血栓形成作用的原因可以解释为：由于缺乏磷脂酰丝氨酸，意味着正常血管上没有凝血复合物组装所需要的前凝血表面。在缺乏表面 PS 的情况下，抗 -VCAM-1 •tTF 与表达 VCAM-1 的心脏和肺血管结合，但不会诱发血栓形成。相反，在肿瘤中表达 VCAM-1 的血管显示出同时表达了表面 PS。因此，凝血配体与肿瘤血管结合，并局部激活了凝血因子，从而形成了堵塞的血栓。

[0196] 除了描述抗 VCAM-1 凝血配体的肿瘤特异性血栓形成作用外，在肿瘤血管内腔表面上磷脂酰丝氨酸的特异表达还使发明者能够解释早期研究中观察到却不能理解的前血

打印ID7584222 Pg 26

栓形成表型。PS 表达在肿瘤血管结构的前血栓形成状态中起了重要的作用。

[0197] 在他们发现代表性的氨基磷脂－磷脂酰丝氨酸特异地表达于肿瘤血管内腔表面而不表达于正常血管中后，发明者推断其他的氨基磷脂也具有作为治疗干预靶目标的可能。发明者因此以靶向于磷脂酰丝氨酸和磷脂酰乙醇胺 (PE) 这些氨基磷脂为基础开发了肿瘤血管系统靶向和治疗方法。

[0198] 一旦磷脂酰丝氨酸作为肿瘤血管结构特异标记物的发现得到证实，发明者开始开发一系列靶向磷脂酰丝氨酸的免疫毒素和凝血配体用于肿瘤治疗中。正如美国专利 6,406,693 中所解释的，当研究在将毒素或凝血剂递送至肿瘤血管结构时利用磷脂酰丝氨酸进行靶向的可能性时，发明者意外的发现在未附加任何效应子的情况下裸露的抗 PS 抗体对体内肿瘤血管具有破坏作用。抗氨基磷脂抗体既特异定位于肿瘤血管系统又发挥伴随的破坏作用从而导致肿瘤坏死的能力是根本未曾预料到的。

[0199] 这些发现产生使用结合磷脂酰丝氨酸的未缀合的或“裸露的”抗体的肿瘤治疗，如引入本文作为参考的美国专利 6,406,693 中描述的。尽管在本领域公认的动物模型中的抗肿瘤效应在美国专利 6,406,693 中得到了证实，并在本文中进行了扩展，但从美国专利 6,406,693 之前的研究不能预测氨基磷脂能够充当肿瘤血管系统的安全且有效的可靶向标记物。

[0200] B. 使用抗磷脂酰丝氨酸抗体的广泛的肿瘤治疗

[0201] 在不同细胞中磷脂酰丝氨酸通常被隔离至质膜双层的内表面 (Gaffet 等人，1995 ;Julien 等人，1995)，并且这种脂质隔离产生不对称的跨双层 (Williamson 和 Schlegel，1994)。本发明人在较早的时候证实了，PS 移位至肿瘤血管内皮细胞表面，并且至少在显著的程度上，这种现象的发生与凋亡或其他细胞死亡机制无关（美国专利 6,406,693)。因此，在肿瘤环境中 PS 的表面表达不是细胞死亡的结果，也不是由它引起了即时的细胞破坏。尽管在各种实体瘤中在完整血管内皮细胞上始终可以检测到 PS 暴露，肿瘤血管内皮却不是真正凋亡的，而是形态学上完好的（尽管不同于正常组织中的情形），并且是代谢活跃的。这对于基于 PS 靶向的治疗方法来说是重要的，这意味着在肿瘤血管内皮细胞中 PS 向外膜的移位对于 PS 用作成功治疗（利用裸露的抗体或治疗性缀合物）的可靶向实体来说是足够稳定的。

[0202] 通过开发对不同磷脂具有强特异性的生物学工具，本发明人已确定阴离子磷脂在肿瘤血管内皮细胞上也是上调的。因此，阴离子磷脂是肿瘤血管系统的特异且稳定的标记物，这使得能够利用可与阴离子磷脂结合的裸露抗体和免疫缀合物二者进行治疗干预。

[0203] 在正常条件下，阴离子磷脂在静息哺乳动物细胞表面上基本上是不存在的。磷脂酰丝氨酸是最丰富的质膜阴离子磷脂，其在正常条件下在大部分细胞类型中被紧密隔离于质膜内表面 (Williamson 和 Schlegel，1994 ;Zwaal 和 Schroit，1997)。另一种主要的阴离子磷脂，磷脂酰肌醇 (PI)，也主要位于质膜的内表面 (Calderon 和 DeVires，1997)。次要的阴离子磷脂，磷脂酸 (PA) 和磷脂酰甘油 (PG)，只在少数细胞类型中检测到，但它们也表现出主要位于质膜的内表面 (Hinkovska-Galcheva 等人，1989)。另一种阴离子磷脂，心磷脂，存在于线粒体膜上而不存在于质膜上 (Daum，1985)。

[0204] 中性磷脂也不对称地分布于质膜内。磷脂酰乙醇胺 (PE) 这种中性氨基磷脂主要位于内表面。含胆碱的中性磷脂，磷脂酰胆碱 (PC) 和鞘磷脂 (SM)，主要位于外表面。

打印ID?584222 Pg 27

[0205] PS的不对称性通过ATP-依赖性转运蛋白即氨基磷脂移位酶(Mg^{2+}ATP酶)来维持，该酶催化氨基磷脂从质膜外表面向内表面转运(Seigneuret和Devaux,1984)。PS不对称性的丧失或崩溃是由于质膜内的这些磷脂向外运动所造成的，或者是由于对移位酶的抑制(Bitbol等人,1987;Comfurius等人,1990)、PS转运蛋白的激活和/或爬行酶(Zhao等人,1998)或ABC-1翻转酶(floppase)(Hamon等人,2000)的激活所引起的，所述爬行酶和翻转酶是双向转运所有脂质的Ca^{2+}依赖性酶。也可激活鞘磷脂酶以产生神经酰胺，其促进跨双层的脂质转位(Contreras等人,2003)。

[0206] 在不同的病理和生理条件下都观察到了PS不对称性的丧失，包括细胞损伤、程序性细胞死亡和凋亡(Blankenberg等人,1998;Bombeli等人,1997)、细胞衰老(Herrmann和Devaux,1990)、血小板活化(Rote等人,1993;Zwaal等人,1989)、损伤(Boyle等人,1996)和恶性转化(Sugimura等人,1994)。PS的暴露还在成肌细胞(Sessions和Horwitz,1981)与营养细胞(Adler等人,1995)的胞间融合、细胞迁移(Vogt等人,1996)和细胞脱粒(Demo等人,1999)中起作用。内皮细胞对由凝血酶(Qu等人,1996)、钙离子载体或佛波酯(Julien等人,1997)、高脂血症(Lupu等人,1993)和非溶胞浓度的补体蛋白质C5b-9(Christiansen等人,1997)所诱导的Ca^{2+}流量增加产生应答而将PS外在化。在无外源激活剂或细胞损伤的情况下在恶性细胞内也观察到自发的PS暴露(Utsugi等人,1991)。

[0207] 膜PS暴露后产生几个主要的后果。有吞噬作用的巨噬细胞识别、附着并消灭PS阳性的衰老和凋亡细胞(McEvoy等人,1986;Tait和Smith,1999)。PS还介导T淋巴细胞与凝血酶活化的内皮细胞附着(Qu等人,1996)。补体系统被PS激活并促成PS阳性细胞的裂解(Test和Mitsuyoshi,1997)。最后，PS的暴露通过为凝血复合物的装配和活 化提供带负电荷的脂质表面而促使前凝血剂移动至内皮上(Williamson和Schlegel,1994;Bombeli等人,1997)。长期以来已对肿瘤内皮的促血栓形成特征有所认识(Donati和Falanga,2001)。

[0208] 本发明人认识到肿瘤内皮的损伤和活化是由以下物质引起的:1)肿瘤来源的细胞因子，例如白介素-1和肿瘤坏死因子，它们激活内皮并诱导细胞粘附分子的表达(Shaughnessy等人,1989;Orr等人,2000);2)由粘附于内皮上的白细胞产生的活性氧类别(ROS)(Orr等人,2000);和3)作为代谢副产物(Shaughnessy等人,1989;Soares等人,1994)或作为暴露于低氧之后又复氧的结果(Zulueta等人,1995)由肿瘤细胞自身产生的ROS。这些观察结果暗示，可能由肿瘤内皮中的这些应激产生Ca^{2+}流量，接着通过爬行酶的活化或氨基磷脂移位酶的抑制而引起PS暴露。

[0209] 为了检测细胞表面阴离子磷脂，本发明人创造了新的单克隆抗体9D2，它与阴离子磷脂而非中性磷脂反应。9D2因此与普通的氨基磷脂结合剂区别开来，因为它与磷脂酰丝氨酸这种阴离子氨基磷脂结合，而不与磷脂酰乙醇胺这种中性氨基磷脂结合。9D2抗体还比天然配体膜联蛋白V更特异于阴离子磷脂，所述膜联蛋白V除了与阴离子磷脂结合外还强烈结合PE(Blankenberg等人,1998)。

[0210] 正如本申请所详述的，本发明人发现9D2和膜联蛋白V在经静脉内注射到带有各种类型实体瘤的小鼠中后特异地定位于肿瘤内皮。这个发现证实了本发明人的假设，即磷脂酰丝氨酸和阴离子磷脂通常在肿瘤血管内皮表面变得暴露，且可用作肿瘤治疗(和成像)的靶分子。

[0211] 从本发明中显现的主要发现之一是磷脂酰丝氨酸和阴离子磷脂暴露在肿瘤内皮

打印ID7584222 Pg 28

的表面上（实施例 VI ;Ran 和 Thorpe,2002 ;Ran 等人,2002b)。此现象通过使用下列两种选择性结合阴离子磷脂的独立试剂得到证明 :单克隆抗体 9D2,这是本发明人特别为了证明这点而开发的,以及膜联蛋白 V。

[0212] 9D2 抗体和膜联蛋白 V 以高亲和力和特异性结合磷脂酰丝氨酸和阴离子磷脂,它们作为脂质体被吸附至塑料,或者被呈现在体外活化或 凋亡内皮细胞的膜表面上。9D2 与 PS、PA 和 CL 强烈结合,但与 PI 和 PG 的结合则弱得多。正如过去所发现的,膜联蛋白 V 除了结合 PS、CL、PA、PI 和 PG 之外,还结合 PE(Andree 等人,1990 ;Schlaepfer 等人,1987 ;Boustead 等人,1993 ;Blackwood 和 Ernst,1990)。9D2 抗体对磷脂酰丝氨酸和阴离子磷脂的识别在血清存在或不存在的情况下都是相同的,这表明结合不需要血清辅因子。9D2 与阴离子磷脂的结合不需要 Ca^{2+} 离子,而膜联蛋白 V 的结合则需要 Ca^{2+}。

[0213] 在经 PS 包被的平板上的交叉阻断研究显示,9D2 和膜联蛋白 V 不会相互阻断与 PS 的结合。这表明所述两种试剂识别 PS 分子上的不同表位,或更有可能识别不同包装形式的 PS。膜联蛋白 V 被认为结合平坦的 PS 表面,而抗 PS 抗体则被认为结合六角形包装的 PS(Rauch 和 Janoff,1990)。两种形式都可能存在于经 PS 包被的平板上。这些实际的交叉阻断研究（实施例 VI）还用于表明,一旦提供参照抗体（例如 9D2),就能容易地鉴别出有效地竞争结合阴离子磷脂的抗体,即与参照抗体结合基本上相同表位的抗体。

[0214] 本申请还显示,9D2 抗体和膜联蛋白 V 特异性地定位于肿瘤血管和定位于在体内检测的所有肿瘤的坏死区域内和周围的肿瘤细胞（实施例 VI)。肿瘤中 15 — 40％的血管具有磷脂酰丝氨酸阳性内皮。相反,正常组织中没有血管具有可检测的外在化阴离子磷脂。表达 PS 的肿瘤内皮细胞是有活力的。它们缺乏细胞凋亡标记物（活性胱天蛋白酶 -3,TUNEL),在形态学上是完整的并且是代谢活跃的,并且血管有输送血液和溶解物的功能。

[0215] 9D2 对肿瘤血管系统的染色特异性通过以下几点得到证明 :1) 用对照大鼠 IgM 则无肿瘤血管的染色 ;2) 用由阴离子磷脂制备的脂质体可以阻断体外 9D2 或膜联蛋白 V 与经 H_2O_2 处理的内皮细胞的结合,而由中性磷脂制备的脂质体则不能 ;3) 发现用去污剂或有机溶剂从肿瘤切片提取出磷脂就消除了染色 ;和 4)9D2 或膜联蛋白 V 都不定位于正常器官中的静止内皮上。

[0216] 肿瘤血管系统中由 9D2 或膜联蛋白 V 定位的主要阴离子磷脂是磷脂 酰丝氨酸,因为它是最丰富的阴离子磷脂,并且它在细胞表面上的暴露受环境变化或损伤的调控。为了检验肿瘤内皮细胞上阴离子磷脂暴露的机制,进行了一系列的研究,其中用已知存在于肿瘤微环境中的各种因子和条件来处理体外的内皮细胞（实施例 VII)。低氧后复氧、酸性和凝血酶使 PS 在活内皮细胞上的暴露提高至当所有细胞均凋亡时所观察到的水平的 10 — 22％。炎性细胞因子 (TNF α 和 IL-1) 也会微弱但明确地诱发 PS 暴露。

[0217] 这些发现与下列可能性相一致 :在肿瘤中,低氧 / 复氧结合炎性细胞因子、凝血酶和酸性会诱导磷脂酰丝氨酸暴露于血管内皮上。尽管对于实施本发明来说并不需要了解确切的机制,但肿瘤细胞可能以作为代谢的副产物或对低氧的响应而产生 ROS(Zulueta 等人,1995)。肿瘤细胞释放的细胞因子可能诱导了内皮上的白细胞粘附分子,其介导活化的巨噬细胞、多形核细胞和血小板与肿瘤内皮粘附,和进一步的 ROS 分泌。然后,ROS 可能通过含巯基的转运分子的氧化或脂质的过氧化来诱导 PS 移位 (Herrmann 和 Devaux,1990),这可能通过引起 Ca^{2+} 流入或从细胞内贮备中释放 Ca^{2+} 而实现 (Wang 和 Joseph,2000)。事实

打印ID7584222 Pg 29

上，过氧化物已显示可在体外通过涉及谷胱甘肽氧化和 / 或脂质过氧化而不是细胞凋亡的机制来诱导活内皮细胞上的 PS 暴露 (van Gorp 等人，1999)。

[0218] PS 和其他阴离子磷脂的暴露在某种程度上解释了长久以来认识到的肿瘤内皮的促凝血状态 (Donati 和 Falanga，2001)。阴离子磷脂提供了用于凝血因子聚集和装配的表面 (Bevers 等人，1985 ;Dachary-Prigent 等人，1996)。它还为帮助白细胞浸润入肿瘤中的循环性巨噬细胞 (McEvoy 等人，1986)、T 淋巴细胞 (Qu 等人，1996) 和多形核细胞提供了附着位点。

[0219] 在本文中所详细描述的进一步研究中，本发明人创造并表征了称为 3G4 的单克隆抗体，其针对磷脂酰丝氨酸和阴离子磷脂。这种抗体还显示出特异性定位于肿瘤中的血管内皮细胞，减少肿瘤的血管供应 (vascularity) 和血浆容量并且延缓肿瘤生长。

[0220] 在血清或 β 2- 糖蛋白 I 存在下，3G4 抗体以高亲和力结合吸收在塑料上的阴离子磷脂，以及在激活或凋亡的细胞表面上的阴离子磷脂。细胞上的 3G4 结合模式与针对阴离子磷脂的膜联蛋白 A5 或 9D2 抗体的模式没有区别。所有 3 种试剂结合类似于膜泡的质膜簇，这与在用 H_2O_2 处理的内皮细胞上的其他观察一致 (van Gorp 等人，1999)。如同 9D2，3G4 识别所测试的所有阴离子磷脂，包括对氧化有抗性的具有饱和脂肪酸的合成磷脂，和溶血磷脂。

[0221] 不像 9D2，3G4 与阴离子磷脂的结合在血清完全不存在下被部分抑制，并且当添加 β 2- 糖蛋白 I 时恢复。因此，3G4 识别脂质 - β 2- 糖蛋白 I 复合物中的表位。无关地，3G4 当施用于动物时显示是安全的，并且与在文献中报道的与抗磷脂综合征 (APS) 有关的抗体的病理学效应不相关。

[0222] 在注射到带有同位人乳腺 MDA-MB-435 肿瘤的小鼠中后，3G4 特异地定位于肿瘤血管以及定位于在肿瘤坏死区域内和周围的肿瘤细胞。平均 40±10％的血管被 3G4 结合。染色模式类似于本文报道的使用 9D2 和膜联蛋白 A5 时的那些。正常组织中的血管内皮不被染色。在这点上，3G4 与识别肿瘤血管标记物的其他抗体不同。大多数肿瘤血管标记物存在于在卵巢（生理性血管发生的部位）中或在肾和胰岛（其中血管具有高渗透性）中的血管上 (Thorpe，2004)。

[0223] 磷脂酰丝氨酸是主要被 3G4 检测的阴离子磷脂。PS 是最丰富的阴离子磷脂，并且是其暴露最熟知受环境条件或损伤调节的阴离子磷脂 (Zwaal 和 Schroit，1997 ; Balasubramanian 和 Schroit，2003)。在体内，肿瘤血管上暴露的 PS 很可能与血清组分例如 β 2- 糖蛋白 I 复合，并且 3G4 很可能结合这些复合物。如本研究自始自终所指明的，在未处理的小鼠中的 PS 阳性肿瘤血管看起来是完整的并且是有功能的。它们输送血液并且是可灌注的。PS 阳性血管的血管内皮不显示晚期凋亡的标记物（活性胱天蛋白酶 3，TUNEL)，是形态学完整的，并且是代谢活跃的，如通过快速周转蛋白 (rapidly turned over protein) VCAM-1 的共表达所判断的。

[0224] 使用 3G4 的治疗延缓了各种鼠类模型中的肿瘤生长，包括已建立的 (0.6 — 0.7cm 直径）同位人 MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 乳癌，大的 (1cm 直径）皮下 L540 人何杰金氏肿瘤，和小的同系 Meth A 纤维肉瘤。3G4 治疗导致这些肿瘤的生长分别延缓 75％、65％、50％和 90％。在本申请中的其他研究证实，这些肿瘤被具有暴露的阴离子磷脂的血管系统滋养。

[0225] 3G4 的抗肿瘤效应至少部分通过损害肿瘤血管系统介导。来自用 3G4 处理的小鼠

打印ID7584222 Pg 30

的同位 MDA-MB-231 肿瘤的组织学检查显示，肿瘤的血管密度和血浆含量明显减少。3G4 至肿瘤血管的定位在巨噬细胞结合肿瘤血管、血管功能损害和坏死发生之前。血管关闭和坏死模式与该首要效应位于肿瘤血管上相一致。观察到肿瘤中心性坏死，而周围边缘的肿瘤细胞存活。这种模式的肿瘤细胞杀死是 VTAs 的特征（美国专利 5,855,866 ;Thorpe,2004）。认为 VTAs 针对肿瘤内部血管是最有效的，因为在这些区域中的高间隙压促使血管崩溃。相反，许多直接作用的肿瘤疗法则针对在富氧的肿瘤外周中快速分裂的肿瘤细胞是最有效的。本发明人因此期望，将 3G4 与抗增殖的抗肿瘤疗法组合将会产生另外的或甚至协同的抗肿瘤活性，如在实验性实体瘤中用其他 VTAs 已观察到的（美国专利 5,855,866 ;Burrows 和 Thorpe,1993 ;Siemann 等人,2002 ;Sum 等人,2004）。

[0226] 如同本文使用的其他抗体一样，3G4 疗法在用治疗剂量（在小鼠中 4mg/kg，一周 3 次）重复治疗的带有肿瘤的动物中是良好耐受的。小鼠保留正常的体征、凝血参数、骨髓细胞构成、白细胞计数和组织学。没有观察到 APS 的表现，这与使用抗心磷脂抗体所观察到的那些相反 (Matzinger,1998 ;Fadok 等人,1998 ;Fadok 等人,2001a ;b)。尽管高浓度 3G4 的效应可部分抑制磷脂依赖性凝血途径，但在治疗剂量和延长体内凝血时间的剂量之间存在基本安全范围。

[0227] 本发明人已考虑了关于在非恶性损伤（例如动脉粥样硬化病变、炎症部位）中 PS 是否会变得暴露在血管内皮上的问题，在所述非恶性损伤中细胞因子、低氧和 ROS 可能诱导 PS 转位 (Moldovan 等人,1994)。这发生了，那么这可能可以导致伴随抗 PS 抗体的某些毒性，从而使得排除具有来自治疗的这些状况的患者是合适的。然而，本发明人的其他研究显示，用嵌合形式的 3G4 抗体治疗动脉粥样硬化的家兔不会加重主动脉的动脉粥样硬化病变。

[0228] 采用药物或凝血剂的血管靶向剂已显示高度有效，并且有时治愈具有大实体瘤的小鼠 (Huang 等人,1997 ;Nilsson 等人,2001 ;美国专利 5,660,827、5,776,427、5,855,866、5,863,538、5,965,132、6,004,554、6,051,230、6,261,535、6,093,399、6,004,555、5,877,289 和 6,036,955)。本发明人提供了针对磷脂酰丝氨酸的裸露抗体和血管靶向剂以用于在人类癌症的诊断和治疗中靶向肿瘤血管系统。

[0229] 尽管不需要对针对磷脂酰丝氨酸的裸露抗体如何在肿瘤治疗中发挥作用有准确的分子水平的了解以便实践治疗，本发明人还是考虑了可能造成所观察到的内皮细胞杀死现象的几种机制。最可能的机制（尤其是对于本文所述的 3G4 抗体来说）是 Fc 结构域介导的免疫效应器功能，例如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)、补体依赖性细胞毒性 (CDC) 和抗体介导的吞噬作用。细胞介导的细胞毒性、补体介导的细胞裂解和 / 或凋亡、抗体诱导的细胞信号传导和 / 或对细胞骨架的扰乱也可能涉及在内。

[0230] 针对磷脂酰丝氨酸的完整抗体，尤其是 3G4，与血管内皮细胞表面的结合意味着抗体的 Fc 部分突入血管的内腔中。由于抗体 Fc 片段激活了补体途径，所以观察到的细胞破坏可能是补体指导的细胞裂解的结果。因此抗体结合激活了补体依赖性凝血级联反应，引起多组分复合物进行装配并最终产生能穿透靶细胞的裂解复合物。“补体激活的 ADCC”还可在破坏中起作用，其中补体与被抗体包被的靶细胞结合，并且其中具有补体受体的细胞，如嗜中性粒细胞，会裂解靶细胞。

[0231] 当裸露或未缀合的抗体，包括其抗原结合片段，与在肿瘤血管内皮细胞表面的磷

打印ID7584222 Pg 31

脂酰丝氨酸结合时，它们将在内腔表面上形成抗体包被层。这可以起到吸引免疫效应细胞例如细胞毒性 T 细胞和 / 或天然杀伤 (NK) 细胞的这样作用，然后免疫效应细胞将在血管内皮细胞上发 挥细胞介导的细胞毒性效应。

[0232] 与磷脂酰丝氨酸结合的抗体还可诱导肿瘤血管内皮细胞中的细胞凋亡。尽管尚无关于与 PS 结合的抗体真正诱导凋亡的已知报道（而非 PS 是由凋亡产生的标记物），本发明人仍考虑这可能是所观察到的抗肿瘤效应的另一可能机制。

[0233] 还可能的是，抗体与肿瘤血管内皮细胞表面上的磷脂酰丝氨酸结合可引起细胞的细胞骨架组织紊乱。由于细胞骨架在表面膜的组织中起着重要的作用，且由于抗体结合可能扰乱（或进一步扰乱）膜，所以抗体与磷脂酰丝氨酸的结合可能将变化传递至与双分子层相互作用的细胞骨架蛋白。已知细胞骨架蛋白的空间结构控制膜的稳定性和细胞形状，并且有可能某些细胞骨架平衡状态的扰动可能对细胞的完整性具有深远的影响。

[0234] 本发明另一种作用机制可能是所述抗体与内皮细胞表面上的磷脂酰丝氨酸结合可能通过目前未确定的途径起始信号转导。抗体结合还可能扰乱已知的信号转导途径，例如通过改变膜受体、信号转导蛋白、膜通道等的构象和 / 或相互作用。关于细胞破坏（凋亡）的信号可能被引发或模拟，和 / 或保护 / 内环境稳定的信号可能被抑制。

[0235] 尽管存在科学方面的意义，但实施本发明无需确定针对磷脂酰丝氨酸的裸露抗体所造成的血管破坏的确切性质。既然这些抗体的施用已显示在体内有利地产生了特异性抗肿瘤效应，那么该疗法就能应用，而不管造成此现象的分子机制是什么。因此，结合磷脂酰丝氨酸的裸露抗体的应用代表了肿瘤疗法中的一个重要进展，其在制备和成本上都具有优势。

[0236] C. 3G4 抗体的详细分析

[0237] 如本文所示，3G4 是有效且良好耐受的抗肿瘤剂，其通过导向肿瘤血管上的磷脂酰丝氨酸并引起宿主细胞介导的抗肿瘤效应起作用。因为 PS 在人和小鼠中是相同分子，并且在这两个物种中具有相同的细胞分布、调节和通过 ROS 的诱导 (Balasubramanian 和 Schroit，2003 ；Whitworth 等人，1990)，所以这些研究进一步支持结合磷脂酰丝氨酸 的抗体和其他构建体在人类中治疗癌症的用途。实际上，已制备了嵌合和人源化形式的 3G4 用于这个及其他目的。

[0238] 结合磷脂酰丝氨酸的抗体及其他配体因此可以用于靶向、成像和 / 或治疗肿瘤血管。由于下列几个原因，磷脂酰丝氨酸作为肿瘤靶血管是吸引人的 ：它是丰富的 (PS 以 3×10^6 分子 / 细胞的量存在）；它在肿瘤内皮的内腔表面上，对于通过血液中的血管靶向剂的结合来说其是可直接接近的 ；它在不同实体瘤中在较大百分比的肿瘤内皮细胞上存在 ；并且它在所有正常组织的内皮上基本上不存在。

[0239] 3G4 抗体已显示特异性地定位于肿瘤中的血管内皮细胞，减少肿瘤血管供应和血浆容量，并延缓肿瘤生长（本文的实施例 ；Ran 等人，1998 ；Ran 和 Thorpe，2002 ；Ran 等人，2002b ；Ran 等人，2005 ；Huang 等人，2005)。

[0240] 正在进行的研究已显示，3G4 治疗抑制了鼠类肿瘤同种异体移植物和人肿瘤异种移植物的生长（本文的实施例 ；Ran 等人，2005)，包括同位人乳腺肿瘤（实施例 XX ；Huang 等人，2005) 和同位人胰腺肿瘤（实施例 XX ；Beck 等人，2005)。3G4 还抑制这些肿瘤的转移扩散和生长（实施例 XX ；Huang 等人，2005 ；Beck 等人，2005)。当组合使用时，3G4 增强了分

打印ID?584222 Pg 32

别用于治疗乳腺肿瘤和胰腺肿瘤的化学治疗药物多西他赛和吉西他滨的治疗效用（实施例 XX ;Huang 等人，2005 ;Beck 等人，2005）。

[0241] 如同本文使用的其他抗体一样，3G4 疗法在用治疗剂量（在小鼠中 4mg/kg，一周 3 次）重复治疗的带有肿瘤的动物中是良好耐受的。小鼠保留正常的体征、凝血参数、骨髓细胞构成、白细胞计数和组织学。尽管非常高浓度的 3G4 的效应可部分抑制磷脂依赖性凝血途径，但在治疗剂量和延长体内凝血时间的剂量之间存在基本安全范围。3G4 因此是有效且良好耐受的抗肿瘤剂，其通过导向肿瘤血管上的阴离子磷脂并引起宿主细胞介导的抗肿瘤效应起作用。3G4 与在文献中对于与抗磷脂综合征有关的抗体所报道的致病效应没有关联。

[0242] 抗磷脂综合征 (APS) 与称为“抗心磷脂”抗体和“狼疮抗凝剂抗体”的自身抗体有关。这些综合征与向着静脉和动脉血栓栓塞、血小 板减少症和许多神经学综合征的倾向相关联。这些患者中的抗磷脂抗体因此是“致病抗体”。在人群中此类抗磷脂抗体存在于全身性红斑狼疮中 (Branch 等人，1987 ;Staub 等人，1989 ;Drouvalakis 和 Buchanan，1998 ; Smirnov 等人，1995 ;Rauch 等人，1986 ;Rauch 和 Janoff，1990)，并且习惯性自然流产相关 (Rote 等人，1995 ;Rote，1996 ;Vogt 等人，1996 ;1997 ;Katsuragawa 等人，1997)。

[0243] 尽管作为“抗磷脂抗体”和“抗 PS 抗体”被描述了多年，但此类致病抗体事实上识别结合心磷脂、PS 或两者的蛋白质辅因子，而不是磷脂本身 (Galli 等人，1990 ;1993 ; McNeil 等人，1990 ;Rote，1996)。在致病抗体中存在相当大的异质性。已报道某些抗心磷脂抗体识别 β 2- 糖蛋白 I 上的特定区域，而狼疮抗凝剂抗体识别凝血酶原。类似地，在疾病状态下出现的抗 PE 抗体结合与蛋白质组合的 PE，所述蛋白质为例如低和高分子量激肽原 (HK)、前激肽释放酶和因子 XI(Sugi 和 Mchityre，1995 ;1996a ;1996b)。

[0244] 因此，在选择用于作为治疗剂进行施用的抗体时，认为此类抗体应当基于不结合与蛋白质辅因子组合的磷脂酰丝氨酸来进行鉴定，而应当寻找相当“真正的”抗磷脂酰丝氨酸抗体 (WO 2004/006847)。

[0245] 然而，3G4 抗体的进一步体外研究显示，与 9D2 不同，3G4 与磷脂酰丝氨酸和阴离子磷脂的结合在血清完全不存在下被部分抑制。此外，当添加 β 2- 糖蛋白 I（β 2GPI）时发现结合恢复。这促使本发明人相信，3G4 识别脂质 - β 2GPI 复合物中的表位，从而使得 3G4 和 PS 之间的相互作用依赖于 β 2GPI（于 2005 年 1 月 24 日提交的美国临时申请序列号 60/646,333 ;Ran 等人，2005)。本发明人推断，在体内肿瘤血管上暴露的 PS 很可能与血清组分例如 β 2GPI 复合，并且 3G4 很可能结合这些复合物。

[0246] 3G4 结合 PS- β 2GPI 复合物的潜力是非常惊人的，不是至少因为 3G4 在众多研究中当施用于动物时已显示是安全的，且在文献中对于与 APS 有关的抗体所报道的致病效应不相关，那种抗体已知结合磷脂 - 血清蛋白质复合物，包括 PS- β 2GPI 复合物。在任何 3G4 治疗中没有观察到 APS 的表现，这与使用针对 β 2GPI 的抗心磷脂抗体所观察到的那些相反 (Matzinger，1998 ;Fadok 等人，1998 ;Fadok 等人，2001a ;b)。在延长的时期内用高剂量的 3G4 治疗的小鼠显示凝血能力没有改变，然而当小鼠注射抗心磷脂或狼疮抗凝剂抗体时有 APS 应答。

[0247] 本发明解决了这个矛盾，阐明了对于结合具有暴露的 PS 的内皮细胞所需的 3G4 和 β 2GPI 的相互作用，并解释了 3G4 如何能够结合 PS- β 2GPI 复合物，而不屈从于与以前已知

打印ID7584222 Pg 33

的致病抗体相关的毒性。

[0248] 如实施例 XXX 中所示，3G4 和 PS 之间的相互作用依赖于 β2GPI。尽管 β2GPI 在生理条件下微弱结合阴离子磷脂，但本发明显示，3G4 极大地增强了 β2GPI 与 PS 阳性内皮细胞的结合。数据显示，二价 3G4/β2GPI 复合物是增强结合所需的，因为 3G4Fab' 片段不结合具有暴露的 PS 的内皮细胞。还证实了，人工二聚 β2GPI 构建体无需 3G4 即可结合具有暴露的 PS 的内皮细胞。总之，这些数据暗示，通过经由形成二价 3G4/β2GPI 复合物而增加 β2GPI 对 PS 的亲和力，3G4 靶向 PS 阳性细胞，包括肿瘤内皮细胞。

[0249] 实施例 XXX 还显示，3G4 结合 β2GPI 的结构域 II。这是重要的，因为来自 APS 患者的识别 β2GPI 结构域 II 的抗体不是致病的。相反，一个重要的近期研究证实，从 APS 患者分离的致病性抗 β2GPI 抗体通常识别 β2GPI 的结构域 I(de Laat 等人，2005a)。3G4 抗体无需结合 β2GPI 结构域 I 而结合 PS-β2GPI 复合物的能力对于缺乏抗体所显示的毒性方面是重要的。β2GPI 还可与载脂蛋白 E 受体 2'(apoER2') 相互作用 (Lutters 等人，2003)。另一项近期研究指出，β2GPI 的结构域 V 与 apoER2' 相互作用并且涉及血小板的激活，这导致血小板至胶原的沉积增加 (van Lummel 等人，2005)。

[0250] 因此，通过不结合结构域 I 或结构域 V，3G4 抗体可以结合 PS-β2GPI 复合物，并根据在各种动物模型中进行的广泛毒理学研究仍显示没有毒性。根据这些发现，结合 PS-β2GPI 复合物的其他抗体现在已制备并在各种病状例如癌症和病毒感染的治疗中安全使用。选择不显著结合 β2GPI 结构域 I 的抗体目前是主要需求，并且设想选择不显著结合 β2GPI 结构域 I 或 β2GPI 结构域 V 的抗体以提供另外的优点。

[0251] 在回顾中，新研究已表征了 3G4 抗体及其主要阴离子磷脂靶（磷脂酰丝氨酸）之间的相互作用。数据证实 3G4 和 PS 之间的相互作用是血清依赖性的。β2GPI 被鉴别为介导 3G4-PS 相互作用所需的血清因子。

[0252] 3G4 最初通过用鼠类内皮细胞免疫小鼠而产生，所述鼠类内皮细胞用 H_2O_2 处理以诱导 PS 暴露 (Example IV ;Ran 等人，2005)。细胞生长在含 FBS 的培养基中并可能注射少量牛 β2GPI，导致产生抗 PS/β2GPI 抗体。在牛血清存在下就与 PS 的反应性筛选初始抗体。稍后的筛选在血清不存在下进行，但如本文所指出的，从 SCM 纯化的抗体与 β2GPI 抗原一起共纯化。因此，由于存在污染性的牛 β2GPI，"纯化的"抗体在血清不存在下可以结合 PS。只有当 3G4 在不含血清的培养基中生长并从中纯化时，才能鉴定出血清依赖性。其他团体已报道了关于获得不含 β2GPI 的抗 β2GPI 抗体制剂的类似关注 (Roubey 等人，1995)。因此，很可能被报道直接结合磷脂的许多所谓的"抗磷脂抗体"实际上识别对磷脂具有亲和力的血清蛋白质。

[0253] β2GPI 是 50-kDa 的糖蛋白，其以～200μg/mL(4μM) 的浓度存在于血浆中 (Cleve 等人，1969)。该蛋白质是补体调控蛋白 (CCP) 家族的成员 (Steinkasserer 等人，1991)。β2GPI 具有 5 个 CCP 重复，其中第 1 个－第 4 个结构域是由～60 个氨基酸组成的有规律的重复。第 5 个结构域不同于其他 4 个结构域，因为它具有 82 个氨基酸，包括一串带正电荷的氨基酸 (282 － 287) 和负责 β2GPI 与阴离子磷脂结合的保守性疏水区 (311 － 317) (Steinkasserer 等人，1992 ;Hunt 和 Krilis，1994 ;Sheng 等人，1996 ;Mehdi 等人，2000 ;各自引入本文作为参考)。

[0254] 关于 β2GPI 的正常生物学功能知之甚少。提出的功能包括促进凋亡细胞清除

打印ID7584222 Pg 34

(Balasubramanian 等人,1997b ;Balasubramanian 等人,2005)、血小板功能的调节 (Nimpf 等人,1985 ;Nimpf 等人,1987) 和凝血的抑制 (Nimpf 等人,1986 ;Schousboe,1985) ;然而,在缺乏 β2GPI 的小鼠或患者中没有观察到确定的表型 (Miyakis 等人,2004 ;Yasuda 等人,2000)。

[0255] 相反,众所周知 β2GPI 涉及自身免疫性病症 APS,在其中它已被鉴定为对于所谓的抗磷脂 (aPL) 抗体与阴离子磷脂表面结合所需的血浆辅因子 (de Laat 等人,2004a ;Bevers 等人,2004)。抗磷脂抗体已知与各种血清蛋白质相互作用,但识别 β2GPI 的 aPL 抗体与 APS 的临床症状的关联性最强 (de Laat 等人,2004b)。因此,已广泛研究了 β2GPI、抗 β2GPI 抗体和阴离子磷脂膜表面之间的相互作用 (Bevers 等人,2004)。

[0256] 本研究还检查了 3G4 结合经 PS 包被的微量滴定板和具有暴露的 PS 的内皮细胞的特征。使用活细胞结合测定法,确定 3G4 和 β2GPI 都不结合具有暴露的 PS 的内皮细胞,除非两种分子同时存在 (实施例 XXX)。这个观察结果与基于 ELISA 的发现一致,所述发现证实 3G4 在结合至阴离子磷脂表面方面依赖于 β2GPI。此外,这个观察结果支持了关于 β2GPI 在生理条件下对阴离子磷脂膜具有低亲和力的报道 (Willems 等人,1996 ;Bevers 等人,2004 ;Bevers 等人,2005),并暗示了 3G4 的存在极大地增强了亲和力。

[0257] 数据还证实,3G4 经由形成二价 β2GPI 复合物增强了 β2GPI 对阴离子磷脂表面的亲和力。当 β2GPI 浓度保持不变并且 3G4 浓度增加时,3G4/β2GPI 与具有暴露的 PS 的内皮细胞的结合在 3G4 与 β2GPI 的比率为 2:1 时到达峰值。在 3G4 浓度更高时,结合增加。钟形曲线暗示单价和二价复合物之间有竞争,导致总体 3G4/β2GPI 复合物结合减少。对于血栓形成模型中的抗 β2GPI 抗体已报道了钟形曲线关系 (Jankowski 等人,2003)。在其他研究中,3G4Fab 片段在 β2GPI 存在下不结合具有暴露的 PS 的内皮细胞,这证实单价 3G4/β2GPI 复合物不能结合阴离子磷脂表面。

[0258] 还证实了人工二聚 β2GPI 构建体无需 3G4 就可结合具有暴露的 PS 的内皮细胞。因此,抗 β2GPI 抗体通过交联两个 β2GPI 分子,形成二价 β2GPI 复合物,而增加了 β2GPI 对阴离子磷脂表面的亲和力。

[0259] 重要地,尽管 3G4/β2GPI 复合物与 PS 的相互作用很类似来自 APS 患者的 aPL 抗体,但 3G4 在测试的任何动物模型中都不引起 APS 的临床表 现。aPL 引起 APS 的机制大部分仍是未知的。某些研究提出,aPL/β2GPI 可以结合并激活静止的内皮细胞 (其不暴露 PS),导致它们采取更具有血栓形成性的表型 (Simantov 等人,1995 ;Pierangeli 等人,1999)。更近期的研究证实,β2GPI 和 aPL/β2GPI 复合物不能结合和完全激活内皮细胞除非它们已“预激活”(Chen 等人,2004)。预激活导致内皮细胞暴露 PS,从而提供了用于结合 aPL/β2GPI 复合物的合适的阴离子磷脂表面。

[0260] 在活细胞测定法中 3G4 不结合静止的 ABAE 细胞或 HUVEC。此外,3G4 不激活静止的 HUVEC 或用低浓度 LPS 预激活的 HUVEC。近期研究报道了识别患者血清中的 β2GPI 结构域 I 的 aPL 抗体存在与 APS 临床症状之间的高度相关性 (de Laat 等人,2005),并且构象变化可能是抗体结合所需的 (de Laat 等人,2005b)。还在患者血清中检测到识别 β2GPI 的其他结构域的抗体,但其与发病机理无关。重要地,本发明证实了 3G4 识别 β2GPI 的结构域 II,这可能解释了体外内皮细胞激活的缺乏以及体内毒性的缺乏。

[0261] 小鼠 β2GPI 的结构域 II 在 60 个氨基酸中只有 7 个不同于大鼠、狗、牛、黑猩猩和

打印ID7584222 Pg 35

人 β2GPI 的结构域 II。因此，3G4 不能在小鼠血清存在下结合 PS 或不能通过免疫印迹检测鼠类 β2GPI 是出人意料的，尤其是考虑到已证明的 3G4 在小鼠中的抗肿瘤活性（本文的实施例；Ran 等人，2005；Huang 等人，2005；Beck 等人，2005）。重要地，使用由 SCM 纯化的 3G4 进行这些研究。如本文所示，由于牛 β2GPI 的共纯化，3G4SCM 能够结合 PS。当 3G4SCM 在 SDS-PAGE 凝胶上电泳、转移至膜支持物并就牛 β2GPI 的存在进行探测时，50kDa 的条带是清晰可见的。此外，在注射 3G4SCM 后从小鼠收集的血清中存在的 3G4 结合 PS。因此，牛 β2GPI 能够介导 3G4 与 PS 在小鼠血浆中的结合并可能促进 3G4 的抗肿瘤效应。使用 3G4 在小鼠中进行的所有肿瘤研究应当补充牛或人 β2GPI 以确保靶向具有暴露的 PS 的肿瘤内皮细胞。

[0262] 将 β2GPI 鉴定为 3G4 和 PS 之间相互作用所需的重要辅因子极大地增强了这种独特的肿瘤血管靶向剂的了解。通过经由形成二聚 β2GPI 复合物而增强 β2GPI 对阴离子磷脂表面的亲和力，3G4 靶向具有暴露的 PS 的肿瘤内皮细胞。除了阐明这些特性外，本研究现在允许开发第三代抗体，其结合在具有血清蛋白质的复合物中的氨基磷脂和阴离子磷脂，而不复制致病抗体的特性。

[0263] 总之，现在可以选择在除 β2GPI 结构域 I 内以外的位置处，或者在除 β2GPI 结构域 I 或结构域 V 内以外的位置处结合 PS 和 β2GPI 的优选的“第三代”或“非致病性 PS-β2GPI 抗体”。根据本文的数据，目前最优选的抗体是在结构域 II 内结合 β2GPI 的那些。根据本文描述的方法和筛选技术，例如使用图 18A 和图 18B 中的序列信息和实施例 XXX 中的结合测定法可以制备一系列非致病性 PS-β2GPI 抗体。此类抗体及其免疫缀合物可以有利地用于病毒感染的安全且有效的治疗以及用于癌症和其他疾病治疗中。

[0264] D. 受体 - 抗体和 β - 抗体

[0265] 3G4 抗体的前述详细分析以及特别是 3G4 与 β2GPI 的相互作用（其与 WO 2004/006847 中所阐述的形成对比）还促使本发明人开发出本发明的受体 - 抗体。重要地，这个发明还提供了称为“受体 - 抗体”的一系列构建体，其结合磷脂酰丝氨酸并唤起宿主效应器功能。受体 - 抗体开发的方面在下文描述。

[0266] 本文呈现的数据显示，用针对磷脂酰丝氨酸的抗体靶向肿瘤血管系统在肿瘤治疗中是有效的。针对磷脂酰丝氨酸的抗体也显示出在治疗病毒感染中是有效的。考虑肿瘤研究作为例子，本文显示肿瘤微环境中的应激条件诱导肿瘤血管内皮上的磷脂酰丝氨酸暴露（实施例 VII、实施例 II、实施例 V 和实施例 VI）。暴露的磷脂酰丝氨酸提供了用于成像和治疗的肿瘤血管系统的选择性标记（实施例 IX、实施例 X、实施例 XI 和实施例 XX）。

[0267] 与肿瘤治疗相关联，针对磷脂酰丝氨酸的抗体损害肿瘤内的血管并引起白细胞浸润（例如，图 1）。此外，此类抗体的施用将巨噬细胞募集到肿瘤内。例如，在使用 3G4 抗体的肿瘤治疗研究中，可见血液单核细胞与肿瘤血管内皮的广泛结合以及巨噬细胞大量浸润到肿瘤间质 中（例如实施例 XXVII；图 6A、图 6B、图 6C 和图 6D）。

[0268] 巨噬细胞浸润到接受治疗的肿瘤中，以及 3G4 以 Fc 依赖性方式使骨髓衍生小鼠巨噬细胞在体外对表达 PS 的细胞的吞噬速率增加 5 倍这一发现，是与抗体例如 3G4 激起巨噬细胞对于肿瘤血管或肿瘤细胞的细胞毒性相一致的。此外，3G4 不直接抑制表达 PS 的内皮细胞或肿瘤细胞增殖，或在体外介导细胞的补体裂解，这暗示该抗体不是直接细胞毒性的。

[0269] 因此，本发明人提出了巨噬细胞介导的对于肿瘤血管或肿瘤细胞的损害的两种可

打印ID7584222 Pg 36

行机制。首先，抗体例如3G4结合肿瘤血管和肿瘤细胞上的阴离子磷脂（主要是磷脂酰丝氨酸）和血清蛋白质的复合物。随后，抗体经由Fc γ 受体刺激单核细胞和巨噬细胞的结合，从而增强抗体依赖性细胞毒性（ADCC）和抗体依赖性巨噬细胞吞噬作用。激活的巨噬细胞已长久地被认为具有直接的杀肿瘤活性（Whitworth等人，1990）。在对于这一点的支持方面，Manfredi等人（1998）已报道，抗磷脂抗体可以促进具有TNF-α 分泌的大量诱导的清道夫巨噬细胞对于表达PS的细胞的调理作用。尽管巨噬细胞具有PS受体并且可以结合和吞食表达PS的细胞（Balasubramanian和Schroit，2003；Utsugi等人，1991；Fadok等人，2001a），但单独的PS暴露不足以刺激吞食（Devitt等人，2003）。

[0270] 其次，抗体例如3G4可以阻断来自表达PS的肿瘤内皮细胞的由PS介导的“静止期”信号，这通常将会抑制由结合肿瘤血管和肿瘤细胞的巨噬细胞所作出的炎症应答（图7）。认为类似机制可以解释巨噬细胞谱系细胞对凋亡细胞缺乏炎症应答（Henson等人，2001；Matzinger，1998；Gallucci和Matzinger，2001；Fadok等人，2001b）。因此，抗体例如3G4可以通过激起巨噬细胞分泌TNF-α、IL-1及其他炎性细胞因子来引起肿瘤血管损害，所述细胞因子直接损害肿瘤内皮（图7）并将更多的宿主细胞募集到肿瘤中（Fadok等人，1998）。

[0271] 理想地，上述可能机制中的每一个应当符合于肿瘤相关的巨噬细胞可以诱导肿瘤血管发生这一建议，所述肿瘤血管发生促进肿瘤生长（例如Sunderkotter等人，1994）。因此，本发明人推断，在巨噬细胞的促血管生成效应和其对肿瘤血管和肿瘤细胞的直接细胞毒性效应之间存在平衡，这通过肿瘤微环境中的局部条件（例如低氧，TGF-β）确定（Breier等人，2002）。目前设想，抗体例如3G4以有利于来自巨噬细胞的直接细胞毒性应答的方式改变肿瘤微环境。

[0272] 考虑到磷脂酰丝氨酸的生物学，和任选地根据本文呈现的关于巨噬细胞在肿瘤治疗中的行为的数据，本发明人从而提供了一系列有利的结合磷脂酰丝氨酸并任选结合其他阴离子磷脂的构建体或“受体-抗体”，和相关缀合物以及使用方法。

[0273] 本发明的此类构建体或受体-抗体一般将包括识别并结合磷脂酰丝氨酸并且任选结合其他阴离子磷脂的结合蛋白或多肽、受体、配体或肽，所述结合蛋白或多肽、受体、配体或肽连接至抗体或免疫球蛋白Fc区或结构域。Fc区修饰所述结合蛋白或多肽、受体、配体或肽以增加其生物学半衰期，但更重要的是，提供具有刺激宿主效应器功能的所得构建体以增强疾病治疗。

[0274] 本发明的受体-抗体可以在任何这样的实施方案中使用，在所述实施方案中可以使用针对磷脂酰丝氨酸的抗体。此类受体-抗体因此具有多重应用，包括结合肿瘤血管和肿瘤细胞上的磷脂酰丝氨酸，导致对肿瘤的由宿主细胞介导的抗血管和抗细胞效应，和结合在病毒或受病毒感染的细胞上的磷脂酰丝氨酸，导致动物中的抗病毒效应。

[0275] 本发明的这些方面的一个优点是，所述受体-抗体使用天然的磷脂酰丝氨酸结合蛋白、多肽或受体以达到特异性结合。尽管在本文中显示出使用针对磷脂酰丝氨酸的抗体在许多治疗实施方案中是有效的，但受体-抗体可以具有比抗PS抗体更高的亲合力或特异性。通过在Fc免疫球蛋白区域上二聚化磷脂酰丝氨酸结合蛋白或多肽（特别是β2GPI），构建体达到更佳的亲合力、稳定性、更长的体内半衰期，并且可能更好地定位于表达磷脂酰丝氨酸的组织，以及刺激体内宿主效应器功能。抗PS抗体在本文中显示出在施用给动物

打印ID?584222 Pg 37

（包括猴子）时是有效且安全的。同样地，包含天然配体的受体－抗体将是有效且安全 的，并且不会引起抗磷脂综合征。因此，本发明的受体－抗体是简单的、人的、特异的和安全的治疗剂，其可以用于治疗一系列肿瘤和病毒感染。

[0276] D1. 磷脂酰丝氨酸结合蛋白

[0277] 受体－抗体中的结合蛋白或多肽、受体、配体或肽可以是几种磷脂酰丝氨酸结合蛋白中的任何一种，包括细胞来源的受体、因子 V、凝血酶原（因子 II）等等。使用 β2-糖蛋白 I 是更优选的。

[0278] 凝血级联反应中的某些因子也结合磷脂酰丝氨酸并且因此可以用于本发明的受体－抗体中。例如，因子 V 和凝血酶原（因子 II）结合磷脂酰丝氨酸。在凝血酶原酶复合物中，因子 Va 与阴离子脂质表面的结合促进因子 Xa 的 Ca^{2+} 依赖性结合，所述因子 Xa 将凝血酶原转化为凝血酶。在两种复合物中，磷脂酰丝氨酸是最有效的阴离子磷脂。因此可以使用蛋白质 C、蛋白质 S、因子 II/IIa、因子 V/Va、因子 VII/VIIa、因子 IX/IXa 和因子 X/Xa 这些磷脂酰丝氨酸结合蛋白。

[0279] Fadok 等人（2000，特别引入本文作为参考）报道了直接结合凋亡细胞的 PS 受体的克隆。这种受体表达于许多细胞类型中，包括巨噬细胞、成纤维细胞和上皮细胞。使用抗体和 PS 小泡的研究指明，该受体的确识别细胞表面上的磷脂酰丝氨酸。因此，这是 PS 特异性受体、“PS 受体”或“PSr”（登录号 AF304118）。这种受体存在于吞噬细胞例如巨噬细胞上，以及还存在于其他细胞类型上。Fadok 等人（2000，特别引入本文作为参考）的 PS 受体因此可以用于本发明的受体－抗体中。

[0280] 可以用于本发明的受体－抗体中的其他磷脂酰丝氨酸结合蛋白描述在 Balasubramanian 和 Schroit，2003（特别引入本文作为参考）中，特别地，参见 Balasubramanian 和 Schroit，2003，表 2，以及描述在本文引用的参考文献中，其全部特别引入本文作为参考。这些磷脂酰丝氨酸结合蛋白包括，例如，CD14；整合素，例如 α5β3（玻连蛋白，CD51/CD61）和 α5β3/CD36；几种清道夫受体，例如 SRB（CD36）、SRC（LOX-1、SRCL）、SRD（CD68、巨噬涎蛋白）和 PSOX；补体受体，例如 CR3（CD11b/CD18）（登录号 NM000632）、CR4（CD11c/CD18）（登 录号 NM000887）和 CD93（cClqr，钙网蛋白）/CD91（α2-巨球蛋白受体）；及其他受体，例如对于表达 PS 的凋亡细胞的 Mer/Gas6 吞噬细胞识别配偶体（登录号 AH010001）。

[0281] 尽管膜联蛋白例如膜联蛋白 V 可以用作受体－抗体中的磷脂酰丝氨酸结合蛋白，但其用途不是本发明的通用部分。因此，在某些实施方案中，本发明提供了其中磷脂酰丝氨酸结合蛋白不是膜联蛋白的构建体。但是，提供下列信息用于其中考虑了膜联蛋白的那些实施方案中。此外，在特别引入本文作为参考的膜联蛋白专利文件中的技术信息，例如关于表达和缀合的信息，可以用于支持本发明的其他 Fc-磷脂酰丝氨酸结合蛋白构建体。

[0282] 在哺乳动物组织中已鉴定出膜联蛋白家族的至少 9 个成员（膜联蛋白 I 至膜联蛋白 IX）。在这些之中目前优选的是膜联蛋白 V（也称为 PAP-I）。关于膜联蛋白的蛋白质和 DNA 序列是本领域已知的，这促进了容易地生产在本发明这些方面中使用的重组融合蛋白。

[0283] 引入本文作为参考的美国专利 5,658,877 描述了膜联蛋白 I、膜联蛋白 I 的有效量及其药物组合物。还描述了治疗动物以预防或减轻内毒素在肺中的不利作用的方法，其包括将安全量的 33kDa 膜联蛋白 I 片段施用到动物的气道中。

打印ID?584222 Pg 36

[0284] 膜联蛋白 V 包含一个游离巯基并且不具有任何附着的糖链。由 cDNA 序列推导出的膜联蛋白 V 一级结构显示，膜联蛋白 V 包括 4 个内部重复单元（美国专利 4,937,324；引入本文作为参考）。美国专利 5,296,467 和 WO 91/07187 也各自引入本文作为参考，因为它们提供了包含膜联蛋白的药物组合物。

[0285] WO 91/07187 提供了膜联蛋白的天然、合成或遗传制备的衍生物和类似物。提供了具有 320 个氨基酸的特定膜联蛋白，其包含不同氨基酸以及任选地在 316-Cys 和 2-Ala 之间包含二硫桥。

[0286] 美国专利 5,296,467 整体引入本文作为参考，包括所有附图和序列，用于更进一步描述膜联蛋白及其药物组合物的目的。美国专利 5,296,467 描述了膜联蛋白克隆、重组表达和制备。还公开了两个或更 多个膜联蛋白的聚集物，所述膜联蛋白例如通过在各自膜联蛋白上的一个或多个半胱氨酸基团之间的二硫键而连接起来。适合的膜联蛋白起始材料的另一例子由 WO 95/27903（引入本文作为参考）提供，其提供了用于检测凋亡细胞的膜联蛋白。

[0287] 美国专利 6,197,278 特别引入本文作为参考，用于下列目的：进一步使得能够获得和提供书面描述以支持一般意义上的膜联蛋白、其安全且有效的体内施用和成像实施方案。至它们清楚地描述用于制备本发明构建体的合适膜联蛋白起始材料的程度，美国专利 5,627,036；WO 95/19791；WO 95/27903；WO 95/34315；WO 96/17618；和 WO 98/04294 的诊断方法中的每一种也特别引入本文作为参考。这些不同文件还涉及有用的重组表达载体。

[0288] 还提供了美国专利 5,632,986，用于进一步描述从组织提取物中分离的膜联蛋白（美国专利号 4,937,324；同样引入本文作为参考）和通过重组方法生产的膜联蛋白的目的。美国专利号 5,632,986 的 cDNA 克隆和表达载体因此各自引入本文作为参考。

[0289] 美国专利 5,632,986 也特别引入本文作为参考，用于进一步描述膜联蛋白分子的突变体和变体的目的，所述突变体和变体在一个或多个氨基酸残基上再分或改变，只要磷脂结合能力基本上不降低。用于使用的合适膜联蛋白因此可以是截短的，例如，以包括一个或多个结构域或者包含比天然蛋白质更少的氨基酸残基，或者可以包含置换的氨基酸。任何改变都是可接受的，只要突变蛋白或第二代膜联蛋白分子不包含对于氨基磷脂基本上减少的亲和力。相同推论应用于除膜联蛋白外的其他蛋白质。

[0290] 膜联蛋白和其他试剂的化学交联也描述在引入本文作为参考的美国专利 5,632,986 中。简单地通过用血栓溶解剂置换本文描述的 Fc 区，可以调整所有此类技术以适合其用途。因此可以使用脂肪族二胺；琥珀酰亚胺酯；杂双官能偶联剂，例如 SPDP；马来酰亚胺化合物；含间隔物的接头，等等。这些试剂还可与除膜联蛋白外的其他蛋白质一起使用。

[0291] 更进一步地，美国专利 5,632,986 被特别引入本文作为参考，用于描述包含膜联蛋白的缀合物的重组生产的目的。因此，将合适的核酸序列连接以产生嵌合编码序列，其从而产生嵌合蛋白。示例性的表达载体是 pKK233-2（大肠杆菌 (E. coli)）、DPOT（酵母）和 pDSP1.1BGH（哺乳动物）。此类教导通过本文提供的进一步信息得到补充。

[0292] 美国专利 6,312,694、6,783,760 和 6,818,213 各自特别引入本文作为参考，以用于下列目的：进一步使得能够获得和提供书面描述以支持一般意义上的磷脂酰丝氨酸结合蛋白及其安全且有效的体内施用。这些专利公开了结合性配体组合物，其中治疗剂可操作

打印ID7584222 Pg 39

地附着至靶向剂，所述靶向剂结合磷脂酰丝氨酸，优选暴露在血管化肿瘤的血管内腔表面上的磷脂酰丝氨酸，以及使用此类结合性配体及其组合的癌症治疗方法。尽管这些专利没有教导或提出连接至 Fc 区的磷脂酰丝氨酸结合蛋白，但将其涉及磷脂酰丝氨酸结合蛋白、所附着的治疗剂以及安全且有效的体内治疗方法的公开内容特别引入本文作为参考。

[0293] 美国专利 6,312,694、6,783,760 和 6,818,213 特别涉及结合性配体，其中治疗剂可操作地附着至至少第一种磷脂酰丝氨酸结合蛋白。尽管这些专利中的蛋白质连接至治疗剂并用于递送不含 Fc 区的治疗剂至肿瘤血管系统，因而不诱发宿主细胞效应器功能，这些专利特别引入本文作为参考，用于进一步使得能够获得和描述蛋白质缀合物及其安全且有效的体内施用（包括治疗癌症）的目的。使用这些专利中的信息以及本公开内容中的教导，从而可以制备一系列受体 - 抗体，其中磷脂酰丝氨酸结合蛋白或其磷脂酰丝氨酸结合性片段，现在被连接至 Fc 区或结构域。

[0294] β 2- 糖蛋白 I（β 2GP1）目前是在本发明的受体 - 抗体中使用的优选磷脂酰丝氨酸结合蛋白质。β 2GP1，也称为载脂蛋白 H，是 50kDa 血浆糖蛋白，其通过其 C 末端结合带负电荷的磷脂 (Wurm，1984，特别引入本文作为参考）。提供下列登录号 ：人 B2GPI(NP000033，AAP72014 和 1C1ZA) 和 小 鼠 B2GPI(AAH53338，NP038503，CAA69401，BAB2721)。 体 外和体内证据表明，β 2GPI 在表达 PS 的凋亡细胞的清除中起作用 (Chonn 等人，1995 ；Balasubramanian 等人，1997 ；Balasubramanian 和 Schroit，1998)。β 2GPI 与吞噬细胞的相互作用在性质上是静电的，并且蛋白质糖基化对于吞噬细胞识别来说不是关键的。因此，对于在受体 - 抗体中使用的 β 2GPI 的重组生产没有明显障碍。

[0295] 当使用本发明中的 β 2GPI 蛋白质、多肽或肽时，所得到的 Fc-β 2GPI 构建体称为“β - 抗体”。如本文图 18A 和图 18B 中所示，β - 抗体将优选包括来自 β 2GPI 结构域 V 的脂质结合区。包含整个结构域 V 的构建体可能是优选的以确保脂质结合。结构域 V 可以单独使用，或与其他 4 个结构域中的一个或多个一起使用。尽管使用全长 β 2GPI 蛋白质是方便的，但不包含 β 2GPI 结构域 I 的 β - 抗体在某些方面可以是优选的，因为来自 APS 患者的抗体通常识别 β 2GPI 的结构域 I(de Laat 等人，2005a)。

[0296] 其他优选的 β - 抗体是其中两个 β 2GPI 多肽在 Fc 区上二聚化的那些。此类 β - 抗体在本文显示出在结合在平板上和暴露在细胞表面上的磷脂酰丝氨酸中是有效的。然而，提供了制备二聚化和多聚化的 β - 抗体的其他方法，例如纳米颗粒、脂质体及其他分子支架。

[0297] D2. Fc 区

[0298] Fc 区将被附着、连接或缀合至磷脂酰丝氨酸结合蛋白或多肽、受体、配体或肽，从而使得所得到的受体 - 抗体的所需活性基本上不会由于附着 Fc 区而被破坏。可以采用本领域已知的任何缀合或接头技术，例如在本文相关部分描述的那些。需要时，可以使用分子生物学技术来制备融合蛋白，其现在对于本领域技术人员来说是标准作业，如本文再次示例的。因此，可以将受体 - 抗体制备为化学缀合物或融合蛋白。

[0299] 在免疫球蛋白的重链内，氨基末端结构域是可变结构域 (VH)。重链和轻链的可变结构域在抗原结合中共同发挥作用。在重链中，可变结构域之后为下列 3 个恒定结构域 ：C_H1、C_H2 和羧基末端的 C_H3。在某些抗体中，存在第 4 个恒定结构域 C_H4。短的伸展部分，转换体 (switch)，连接重链可变区和恒定区。铰链连接 C_H2 和 C_H3(Fc 片段) 与抗体的其余部

打印ID7584222 Pg 40

分 (Fab 片段)。

[0300] 恒定区的性质决定了除抗原结合以外的各种作用机制。基于其恒定区结构和免疫功能,抗体分为 5 个主要类别 :IgM、IgG、IgA、IgD 和 IgE。相应于不同免疫球蛋白类别的重链恒定结构域分别称为 μ、γ、α、δ 和 ε。

[0301] 考虑到 Fc 区提供的效应器功能 (Bruggemann 等人,1987 ;Riechmann 等人,1988 ; Clark,1997 ;Padlan,1994 ;各自特别引入本文作为参考),目前优选的 Fc 区是用于临床使用的人 IgG1(γ1) 和人 IgG3(γ3),以及用于在小鼠中的临床前测试的小鼠 IgG2a(γ2a) 和小鼠 IgG2b(γ2b)。认为 γ2 是沉默的,因此将不选择来提供效应器功能,尽管它仍是用作二聚化结构域的有用的人蛋白质。尽管是根据效应器功能而被选择出的,但免疫球蛋白的 Fc 片还有助于延长的半衰期,这可以由抗体在肾内的主动再吸附而产生。

[0302] 尽管 Fc 区和结合构建体的重组表达是方便的,但此类片段还可以通过完整的免疫球蛋白的蛋白水解而获得,优选通过木瓜蛋白酶这种非特异性巯基蛋白酶。木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab 片段”,它们各自具有单个抗原结合部位,以及剩余的“Fc 片段”。

[0303] 木瓜蛋白酶首先应通过还原在含有半胱氨酸、2- 巯基乙醇或二硫苏糖醇的活性位点中的巯基来激活。贮存的酶中的重金属应当通过用 EDTA(2mM) 螯合来去除以确保最大酶活性。酶和底物通常以 1:100 的重量比混合在一起。孵育后,反应可以通过用碘乙酰胺不可逆地烷基化巯基或简单地通过透析来中止。消化的完全性应当通过 SDS-PAGE 进行监控,并且各个级分通过 A 蛋白 -Sepharose 或离子交换层析进行分离。

[0304] 在某些实施方案中,可以使用两个 Fc 片段,优选两个人 Fc 片段。在这样的方面,两个结合蛋白、受体或配体可以与两个 Fc 片段相组合以制备另一种类型的二价受体 - 抗体。对于制备用于人施用的受体 - 抗体来说,人 Fc 片段将是优选的。事实上,这是本发明的优点,因为产生完全人的治疗性构建体。因此,Fc-β2GPI 构建体包括完全人的 β- 抗体治疗剂。

[0305] D3. 其他构建体和载体

[0306] 尽管连接 Fc 区至磷脂酰丝氨酸结合蛋白或多肽是所述受体 - 抗体发明的优选实施方案,但磷脂酰丝氨酸结合蛋白还可连接至惰性载体以将长寿命赋予生物活性分子。像这样,本发明进一步提供了包含可操作地附着至至少第一种惰性载体的至少第一种氨基磷脂结合蛋白 (包括 β2GPI) 的构建体。

[0307] 如本领域已知的,载体蛋白质可以用于增加生物学半衰期,并且示例性蛋白质是白蛋白和球蛋白,例如中性抗生物素蛋白 (neutravidin) 和链霉抗生物素蛋白。非蛋白质载体也可用于增加生物学半衰期,例如天然或合成的聚合物,包括多糖和 PEG。任何这样的惰性载体可以附着至本文描述的任何磷脂酰丝氨酸结合蛋白。

[0308] 本发明的其他方面涉及通过除使用 Fc 区以外的方法制备的 β2GPI 二聚体组合物,以及涉及各种使用方法。本发明特别提供了治疗癌症的方法和治疗病毒感染的方法,包括向有此需要的动物施用治疗有效量的 β2GPI 二聚体。

[0309] 本发明的再进一步方面是脂质体,其包含 β2GPI 多肽 (无论是否为二聚体形式),和包含除附着至 Fc 区的那些以外的其他 β2GPI 多肽。像这样,本发明涉及包含至少第一种 β2GPI 多肽的纳米颗粒、脂质体、脂质载体、复合物、混合物、超分子结构、多分子聚集物

打印ID7584222 Pg 41

或基于脂质的药物递送系统。β2GPI 多肽可以是二聚体，但不必一定是二聚体。β2GPI 多肽可以附着或不附着至另外的治疗剂。此类脂质体将优选是隐蔽的脂质体，并且在脂质体核心中可以包含治疗剂。

[0310] 本发明的再进一步的方面涉及 β2GPI 多肽（除附着至 Fc 区的 β2GPI 多肽以外）的组合物，其中所述 β2GPI 多肽可操作地附着至至少第一种治疗剂，以及涉及各种使用方法。特别优选的是其中 β2GPI 多肽可操作地附着至至少第一种细胞因子例如 TNFα、IL-2 或 IFNα 的组合物。在某些实施方案中，所述 β2GPI 多肽将是二聚体，并且二聚的 β2GPI 多肽将可操作地附着至至少第一种治疗剂，例如细胞因子。特别考虑 将任何此类 β2GPI 细胞因子构建体或缀合物用于治疗疾病，包括病毒感染。

[0311] 因此，本发明进一步提供了治疗癌症的方法和治疗病毒感染的方法，包括向有此需要的动物施用治疗有效量的构建体，所述构建体包含可操作地附着至至少第一种细胞因子优选 TNFα、IL-2 或 IFNα 的 β2GPI 多肽。所述 β2GPI 多肽可以是二聚的 β2GPI 多肽。

[0312] E. 另外试剂的缀合物

[0313] 本发明的构建体和受体－抗体还可用于递送附着的治疗剂至特定靶，例如肿瘤和肿瘤内血管系统、肿瘤细胞、受病毒感染的细胞和病毒颗粒。尽管不涉及含有 Fc 区的构建体，但美国专利 6,312,694、6,783,760 和 6,818,213 各自特别引入本文作为参考，以为了获得其关于附着至治疗剂的氨基磷脂结合蛋白的一般教导。因为本发明的构建体和受体－抗体还可在安全且有效的抗病毒疗法中使用，所以这些构建体还可有利地连接至一系列已知的抗病毒剂。

[0314] 在本发明的这些方面，本发明的任何构建体、受体－抗体或 β－抗体可以用于制备缀合物。在此类缀合物中使用的试剂优选包括抗细胞剂或细胞毒性剂、细胞因子、趋化因子、V 型 ATP 酶抑制剂、蛋白质合成抑制剂、化学治疗剂、抗血管生成剂、细胞凋亡诱导剂、抗微管蛋白药物、放射性同位素、凝血剂或抗病毒剂。在抗病毒缀合物中，不需要使用第二种抗病毒剂作为附着的试剂。

[0315] E1. 抗细胞剂和细胞毒性剂

[0316] 在某些应用中，治疗剂是细胞毒性剂或药理活性剂，尤其是能杀死细胞（特别是肿瘤内皮细胞、肿瘤细胞或受病毒感染的细胞）或者抑制其生长或分裂的细胞毒性剂、细胞抑制剂、或者抗细胞剂。

[0317] 抗细胞药剂的范例包括化疗剂，以及细胞毒素。可以使用的化疗剂包括：激素，诸如类固醇；抗代谢物，诸如阿糖胞苷、氟尿嘧啶、氨甲蝶呤、或氨基喋呤；蒽环霉素；丝裂霉素 C；长春花生物碱；秋水仙胺；依托泊苷；普卡霉素；抗肿瘤烷化药剂，诸如苯丁酸氮芥或苯丙氨酸氮芥。其他实施方案可以包括诸如细胞因子等药剂。基本上可 以使用任何抗细胞药剂，条件是它能够以某种方式成功地缀合至构建体从而能够在靶向的细胞（如内皮细胞）位点处向血液成分进行靶向、内在化、释放、和／或呈递。

[0318] 可能会有这样的情况，比如靶抗原没有通过与有毒化合物的有效去毒一致的途径发生内在化，需要靶向化疗剂，诸如抗肿瘤药物、细胞因子、抗代谢物、烷化剂、激素、等等。目前多种化疗剂和其他药理活性剂已经成功地缀合，并显示药学功能，包括多柔比星、道诺霉素、氨甲蝶呤、长春花碱、新制癌菌素、大分子霉素、三乙烯亚胺苯醌、和 α－鹅膏蕈碱。

打印ID?584222 Pg 42

[0319] 在其他情况中，可以通过使用 DNA 合成抑制剂来消除来自基于细胞毒素疗法的任何潜在副作用，诸如道诺霉素、多柔比星、阿霉素等等。因此这些药剂是用于本发明某些方面的抗细胞药剂的优选范例。至于抑制细胞的药剂，这些化合物通常扰乱靶细胞的正常细胞周期，优选使得细胞退出细胞周期。

[0320] 已知多种细胞毒性剂可以缀合。范例包括大量有用的植物、真菌、或细菌衍生毒素，例如包括各种 A 链毒素，特别是蓖麻毒蛋白 A 链；核糖体灭活蛋白，诸如皂草素或白树毒蛋白；α - 帚曲菌素；曲霉素；局限曲霉菌素；核糖核酸酶，诸如胎盘核糖核酸酶；白喉毒素；和假单胞菌外毒素等等。

[0321] 在此特别地引入众所周知的由 Arthur E. Frankel 所编的 1992 毒素书籍 “Genetically Engineered Toxins”（包括附录）作为参考以进一步描述或使得能够在目的构建体中使用毒素，所述书籍包括大量毒素的一级氨基酸序列。

[0322] 在毒素中，优选使用白树毒蛋白和蓖麻毒蛋白 A 链。利用白树毒蛋白作为可与标记结合的免疫缀合物的效应物或毒素部分在美国专利 6,051,230（特别引入本文作为参考）以及美国专利 6,451,312（它特别涉及与作为靶向剂的 VEGF 连接的白树毒蛋白）中有描述，其中所述标记是血管化肿瘤的肿瘤内血管中表达的，或易于接近而结合它，吸附或定位在其上。

[0323] 对于篦麻毒素 A 链来说，更优选的毒素部分常常是经处理而修饰或 除去碳水化合物残基的蓖麻毒蛋白 A 链，即所谓的“脱糖基 A 链”(dgA)。脱糖基蓖麻毒蛋白 A 链是优选的，因为它极有效力、半衰期较长，而且进行临床等级和规模的制造在经济上是可行的。

[0324] 从制药学的立场出发，可能希望采用尽可能小的分子而又提供适当的生物学应答。由此可能希望采用提供适当的抗细胞应答的较小 A 链肽。为了这个目标，已经发现蓖麻毒蛋白 A 链可以通过 Nagarase(Sigama) 除去 30 个 N 末端氨基酸而“截短”，但仍保留适当的毒素活性。建议需要时可以将这种截短的 A 链用于本发明的缀合物中。

[0325] 或者，可发现对毒素 A 链部分应用重组 DNA 技术可以提供本发明的额外好处。实现了有生物学活性的蓖麻毒蛋白 A 链的克隆和表达后，现在有可能鉴定并制备仍展示适当毒素活性的更小的肽或变体肽。此外，蓖麻毒蛋白 A 链已被克隆的事实使得能够应用定点诱变，由此容易的制备并筛选 A 链衍生肽，获得可用于本发明的其他有用部分。

[0326] E2. 细胞因子

[0327] 细胞因子和趋化因子是可与本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体连接的药剂的特定实例。可以使用一系列的细胞因子，包括 IL-3、IL-4、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-13、TGF-β、M-CSF、G-CSF、TNFβ、LAF、TCGF、BCGF、TRF、BAF、BDG、MP、LIF、OSM、TMF、IFN-α、INF-β。更优选的细胞因子包括 IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-6、IL-10、GM-CSF、IFN-γ、单核细胞化学吸引蛋白 -1(MCP-1)、血小板衍生生长因子 -BB(PDGF-BB) 和 C- 反应蛋白 (CRP) 等等。尤其优选的例子是 TNFα、TNFα 诱导物、IL-2、IL-12、IFN-α、INF-β、IFN-γ 和 LEC。

[0328] TNFα 增加了血管的通透性。此药剂预计可用于附着本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体，尤其是在所产生的缀合物用于治疗癌症的组合疗法中时。所述构建体将递送附着的 TNFα 至肿瘤环境中，且在肿瘤中引起的血管通透性的增强将促进第二种抗癌剂渗透入肿瘤中，因此扩大了全面的抗肿瘤效果。

打印ID7584222 Pg 43

[0329] 例如，IL-12可与构建体、受体-抗体或β-抗体连接并用于重新指 导宿主防御系统，从而攻击肿瘤血管。趋化因子LEC(肝脏表达的趋化因子，也称为NCC-4、HCC-4或LMC)是另一种优选的组分(Giovarelli等人，2000)。LEC对于树突细胞、单核细胞、T细胞、NK细胞和嗜中性粒细胞是趋化性的，因此能增强宿主介导的抗肿瘤反应。

[0330] E3. 凝血因子

[0331] 本发明的构建体、受体-抗体或β-抗体可与能直接或间接刺激凝血的组分连接形成凝血配体。为了进一步描述凝血剂的操作性附着形成凝血配体，将美国专利6,093,399、6,004,555、5,877,289和6,036,955特别引入本文作为参考。

[0332] 本发明的构建体、受体-抗体或β-抗体可以直接连接凝血剂或凝血因子，或者可以连接可结合而后释放凝血剂或凝血因子的第二种结合区。如本文所用，术语“凝血剂”和“凝血因子”都用于指在适当条件下，优选当到达特定体内环境(诸如肿瘤血管系统)时，能够直接或间接刺激凝血的成分。

[0333] 优选的凝血因子是组织因子组合物，诸如截短的TF(tTF)、二聚体、多聚体、和突变TF分子。“截短的TF”(tTF)指通过除去足够多的实现膜结合特性改变的氨基酸序列从而变成膜结合缺陷型的TF构建物。本文中的“足量”指最初足以使TF分子进入膜或介导TF蛋白质的功能性膜结合的跨膜氨基酸序列的量。通过除去“足够量的跨膜序列”产生了截短的组织因子蛋白质或多肽，其结合磷脂膜的能力是缺陷的，使得该蛋白质是不显著结合磷脂膜的基本上可溶的蛋白质。因此，截短的TF在标准TF测定法中基本上不能够将因子VII转变成因子VIIa，但是仍然保留所谓的催化活性，包括在存在因子VIIa时激活因子X。

[0334] 美国专利5,504,067、6,156,321、6,132,729和6,132,730(特别引入本文作为参考)进一步描述了这些截短的组织因子蛋白质。优选用于本发明这些方面的组织因子通常不含该蛋白质的跨膜和胞质区(第220－263位氨基酸)。但是，也不需要将截短的TF分子局限于长度恰好是219个氨基酸的分子。

[0335] 二聚体的组织因子组合物也是有用的。可以以二聚体的形式制备 任何截短的、突变的、或其他组织因子构建物以用于本发明。本领域普通技术人员可以理解，通过分子生物学和重组表达的标准技术，在同一读码框中制备两个编码区并由表达载体进行表达，可以制备这些TF二聚体。同样，可以将各种化学缀合技术用于制备TF二聚体。可以在缀合前对各TF单体进行衍生化。本领域技术人员清楚的知道所有这些技术。

[0336] 如果需要，可以经生物学可释放键连接组织因子二聚体或多聚体，诸如可选择性切割的接头或氨基酸序列。例如，可使用包含酶切割位点的肽接头，所述酶优先定位于肿瘤环境或在肿瘤环境内有活性。这些肽接头的例示性形式是供尿激酶、纤溶酶、凝血酶、因子IXa、因子Xa、或金属蛋白酶(诸如胶原酶、明胶酶、或溶基质素)切割的肽接头。

[0337] 在某些实施方案中，组织因子二聚体还可以包含受阻的疏水性膜插入部分，以便日后促进组织因子与磷脂酶的功能性联合，但是这只发生于某些特定条件下。正如关于截短的组织因子的内容中所述，疏水性膜联合序列通常是由于其疏水本质可驱动与磷脂环境的联合的氨基酸段。同样，脂肪酸可以用于提供潜在的膜插入部分。

[0338] 这些膜插入序列可以位于TF分子的N末端或C末端，或者通常附着于该分子的任何其他位点，只要它们的附着不阻碍TF构建物的功能特性即可。受阻插入部分的意图是在TF构建物定位于肿瘤环境前保持无功能，并使得疏水性附着物能够接近并进一步促进与膜

打印ID7584222 Pg 44

的物理学联合。此外，预计生物学可释放键和可选择性切割序列在这方面特别有用，其中所述键或序列只在定位于肿瘤环境内并暴露于特定酶或其他生物活性分子时才受到切割或修饰。

[0339] 在其他实施方案中，tTF 构建物可以是多聚体。在此内容中，“多聚体构建物”包含 3 个或更多组织因子构建物。“多聚体 TF 构建物”指包含第一 TF 分子或衍生物可操作附着至少第二和第三 TF 分子或衍生物的构建物。多聚体可以包含大约 3 个－大约 20 个 TF 分子。多聚体中的各 TF 单元也可以通过可选择性切割的肽接头或其他生物学可释放键相连。此外，正如上文就 TF 二聚体所述，可以使用重组操作和表达或使 用标准合成化学来生成构建物。

[0340] 可用于本发明的其他 TF 构建物是激活因子 VII 的能力缺陷的突变体。本文通常将这些“因子 VII 激活突变体”定义为可结合功能性因子 VII/VIIa，通过蛋白水解激活因子 X，但是基本上不能通过蛋白水解激活因子 VII 的 TF 突变体。因此，这些构建物是缺乏因子 VII 激活活性的 TF 突变体。

[0341] 这些因子 VII 激活突变体促进肿瘤特异性凝血的能力基于的是它们对肿瘤血管系统的特异性递送和血浆中低水平存在的因子 VIIa。在施用了这些因子 VII 激活突变体缀合物后，突变体将定位于血管化肿瘤的血管系统内。在定位前，由于 TF 突变体不能将因子 VII 转变成因子 VIIa，因此它通常不能够在任何其他身体部位启动凝血。但是，在定位于肿瘤区并积累后，突变体将遭遇来自血浆的足够因子 VIIa，从而起始外在凝血途径，导致肿瘤特异性血栓症。也可以对患者施用外源因子 VIIa。

[0342] 可以制备多种组织因子 VII 激活突变体中的一种或多种，并用于本发明。现在有了关于 TF 上因子 VII/VIIa 识别位点的充足科技知识。由此可以理解，因子 VII 活化区通常位于 TF 分子的大约第 157 位－大约第 167 位氨基酸之间。但是，预计该区域外的残基也可能与因子 VII 激活活性有关，由此可考虑在 TF 序列大约第 106 位－大约第 209 位氨基酸之间的任何一个或多个残基处导入突变 (WO 94/07515 ;WO 94/28017 ;引入本文作为参考)。

[0343] 如美国专利 6,093,399、6,004,555、5,877,289 和 6,036,955 中所述的，多种其他凝血因子可以用于本发明，例示性药剂见下文。凝血酶、因子 V/Va 及其衍生物、因子 VIII/VIIIa 及其衍生物、因子 IX/IXa 及其衍生物、因子 X/Xa 及其衍生物、因子 XI/XIa 及其衍生物、因子 XII/XIIa 及其衍生物、因子 XIII/XIIIa 及其衍生物、因子 X 激活剂、和因子 V 激活剂可用于本发明。

[0344] Russell 蝰蛇毒因子 X 激活剂预计可用于本发明。已生成了对 Russell 蝰蛇毒液中存在的因子 X 激活剂具有特异性的单克隆抗体，并可作为双特异性结合性配体的一部分用于特异性递送药剂。

[0345] 血栓烷 A 是由内过氧化物通过血小板微粒体中的环加氧酶和血栓烷合成酶的依次反应形成的。血栓烷 A_2 是由血小板产生的，而且由于其能够引起血小板聚集，它还是有效的血管收缩剂。血栓烷 A_2 及其活性类似物预计可用于本发明。

[0346] 血栓烷合酶和合成激活血小板的前列腺素的其他酶也可在本文中作为“凝血剂”使用。针对血栓烷合酶的单克隆抗体和血栓烷合酶的免疫亲和纯化是已知的，人血栓烷合酶的 cDNA 也是已知的。

[0347] α_2- 抗纤溶酶或 α_2- 纤溶酶抑制剂是人血浆中天然存在的蛋白酶抑制剂，能够有

打印ID?584222 Pg 45

效抑制由纤溶酶原激活剂诱导的纤维蛋白凝块的裂解。α_2-抗纤溶酶是特别有效的抑制剂，预计可用于本发明。

[0348] 由于可以获得 α_2-抗纤溶酶的 cDNA 序列，因此优选重组表达和/或融合蛋白质。还可以获得针对 α_2-抗纤溶酶的单克隆抗体，可用于本发明的双特异性结合性配体实施方案。这些抗体可用于将外源 α_2-抗纤溶酶递送至靶位点或储存内源 α_2-抗纤溶酶，并使其集中在靶区内。

[0349] E4. 抗微管蛋白药物

[0350] 一系列药物可经干扰微管蛋白活性来展现其效果。由于微管蛋白的功能是有丝分裂和细胞生存所必需的，所以某些“抗微管蛋白药物”是强有力的化疗剂。如本文中所使用的，“抗微管蛋白药物”指任何这样的药剂、药物、药物前体或其组合，其抑制细胞有丝分裂，优选地通过直接或间接抑制细胞有丝分裂所需的微管蛋白活性，优选微管蛋白聚合化或去聚合化。

[0351] 目前了解得更清楚也更优选用于本发明的抗微管蛋白药物包括秋水仙碱；紫杉烷类，诸如红豆杉醇；长春花生物碱，诸如长春花碱、长春花新碱、和长春碱酰胺；和考布他汀。其他合适的抗微管蛋白药物是细胞松弛素（包括B、J、E）、多拉司他汀、auristatin PE、紫杉醇、ustiloxin D、根霉素、1069C85、秋水仙胺、阿苯达唑、阿扎毒素和诺考达唑。

[0352] 如美国专利 5,892,069、5,504,074 和 5,661,143（本文特别引入作为参考）中所述，考布他汀是通常抑制细胞有丝分裂的雌二醇衍生 物。可用于本发明的例示性考布他汀包括基于考布他汀 A、B、和/或 D 的那些和美国专利 5,892,069、5,504,074、和 5,661,143 中所述的那些。考布他汀 A-1、A-2、A-3、A-4、A-5、A-6、B-1、B-2、B-3 和 B-4 是上述类型的范例。

[0353] 美国专利 5,569,786 和 5,409,953（引入本文作为参考）描述了考布他汀 A-1、A-2、A-3、B-1、B-2、B-3 和 B-4 的分离、结构表征、和合成，以及使用这些考布他汀来治疗肿瘤生长的制剂和方法。这些考布他汀中的一种或多种都可用于本发明。

[0354] 如美国专利 5,892,069、5,504,074、5,661,143 和 4,996,237（本特别引入文作为参考）中所述，考布他汀 A-4 也可用于本文。美国专利 5,561,122（引入本文作为参考）进一步描述了合适的考布他汀 A-4 前药，预计可与本发明联合使用。

[0355] 美国专利 4,940,726（特别引入本文作为参考）特别描述了命名为考布他汀 D-1 和考布他 D-2 的大环内酯，可与本发明的组合物和方法联合使用。美国专利 5,430,062（特别引入本文作为参考）涉及具有抗癌活性、可与本发明联合使用的芪衍生物和考布他汀类似物。

[0356] E5. 抗血管发生剂

[0357] 抗血管发生剂可用于附着至本发明的构建体、受体-抗体或 β-抗体。许多抗癌剂作用机制的一部分是具有抗血管发生效用。针对联合疗法所述的任何一种或多种这样的药剂，包括表 E 中的药剂，都还可以按本文所述与本发明的构建体、受体-抗体或 β-抗体缀合。已发现、设计或选择了某些其他药剂，它们的主要作用机制是具有抗血管发生效用。所说药剂的实例描述如下，其中的任一种都还可以用于制备缀合物或分别用于本发明的联合疗法中。

[0358] 现在已知大量的酪氨酸激酶抑制剂可用于治疗在多种疾病状态中出现的血管发

打印ID?584222 Pg 46

生，包括例如美国专利5,639,757（特别引入本文作为参考）描述的4-氨基吡咯并[2,3-d]嘧啶，它也可以与本发明联合使用。能够调节经VEGFR2受体的酪氨酸激酶信号转导的有机分子的其他范例是美国专利5,792,771的喹唑啉化合物和组合物，这项专利在此特别引入，以便描述可以与本发明联合用于治疗血管发生性疾病的其他组合。

[0359] 其他化学类化合物也已经显示可抑制血管发生，而且可用于与本发明的联合。例如，联合疗法中可以采用类固醇，诸如美国专利5,972,922（特别引入本文作为参考）中描述的抑血管的4,9(11)-类固醇和C21-氧合类固醇。美国专利5,712,291和5,593,990（特别引入本文作为参考）描述了沙利度胺及相关化合物、前体、类似物、代谢物和水解产物，它们也可以与本发明联合用于抑制血管发生。美国专利5,712,291和5,593,990中的化合物可以口服施用。表B列出了可用于联合疗法的其他例示性抗血管发生剂，其中列出的每一种药剂都只是例示而绝非限制。

[0360] 表B. 血管发生的抑制剂和负调控剂

[0361]

物质	参考文献
血管生长抑素	O' Reilly等人，1994
抑内皮素	O' Reilly等人，1997
16kDa催乳素片段	Ferrara等人，1991；Clapp等人，1993；D' Angelo等人，1995；Lee等人，1998
层粘连蛋白肽	Kleinman等人，1993；Yamamura等人，1993；Iwamoto等人，1996；Tryggvason，1993
纤连蛋白肽	Grant等人，1998；Sheu等人，1997
组织金属蛋白酶抑制剂（TIMP 1、2、3、4）	Sang，1998
纤溶酶原激活剂抑制剂（PAI-1、2）	Soff等人，1995
肿瘤坏死因子α（高剂量，体外）	Frater-Schroder等人，1987
TGF-β1	RayChadhury和D' Amore，1991；Tada等人，1994
干扰素（IFN-α、β、γ）	Moore等人，1998；Lingen等人，1998
RLR-CXC趋化因子：IL-12；SDF-1；MIG；血小板因子4（PF-4）；IP-10	Moore等人，1998；Hiscox和Jiang，1997；Coughlin等人，1998；Tanaka等人，1997
血小板反应蛋白（TSP）	Good等人，1990；Frazier，1991；Bornstein，1992；Tolsma等人，1993；Sheibani和Frazier，1995；Volpert等人，1998
SPARC	Hasselaar和Sage，1992；Lane等人，1992；Jendraschak和Sage，1996
2-甲氧基雌二醇	Fotsis等人，1994
增殖蛋白相关蛋白质	Jackson等人，1994
苏拉明	Gagliardi等人，1992；Takano等人，1994；Waltenberger等人，1996；Gagliardi等人，1998；Manetti等人，1998

[0362]

打印ID?584222 Pg 47

沙利度胺	D' Amato等人，1994；Kenyon等人，1997；Wells，1998
可的松	Thorpe等人，1993；Folkman等人，1983；Sakamoto等人，1986
利诺胺	Vukanovic等人，1993；Ziche等人，1998；Nagler等人，1998
烟曲霉素（AGM-1470；TNP-470）	Sipos等人，1994；Yoshida等人，1998
他莫西芬	Gagliardi和Collins，1993；Lindner和Borden，1997；Haran等人，1994
韩国槲寄生提取物（*Viscum album coloratum*）	Yoon等人，1995
视黄醇（醛、酸）类	Oikawa等人，1989；Lingen等人，1996；Majewski等人，1996
CM101	Hellerqvist等人，1993；Quinn等人，1995；Wamil等人，1997；DeVore等人，1997
地塞米松	Hori等人，1996；Wolff等人，1997
白血病抑制因子（LIF）	Pepper等人，1995

[0363] 某些优选用于抑制血管发生的成分是血管生长抑素、抑内皮素、抑血管素(vasculostatin)、制霉菌素(canstatin)和乳腺丝抑蛋白。美国专利5,776,704、5,639,725、和5,733,876(引入本文作为参考)描述了被称为"血管生长抑素"的蛋白质。血管生长抑素是分子量在大约38kDa—大约45kDa之间(通过还原性聚丙烯酰胺凝胶电泳测定)的蛋白质，大致包含纤溶酶原分子的第1—4个Kringle区。血管生长抑素的氨基酸序列通常与完整鼠纤溶酶原分子自第98位氨基酸开始的片段基本上相似。

[0364] 血管生长抑素的氨基酸序列在物种间略有变化。例如，在人的血管生长抑素中，氨基酸序列与上述鼠纤溶酶原片段的序列基本上相似，但是有活性的人血管生长抑素序列可以自完整人纤溶酶原氨基酸序列的第97位或第99位氨基酸开始。而且，人纤溶酶原在小鼠肿瘤模型中具有相似的抗血管发生活性，因而可以使用。

[0365] 某些抗血管发生治疗剂已显示出造成肿瘤的消退，而血管生长抑素就是这样的一种药剂。抑内皮素、胶原蛋白XVIII的20kDa COOH—末端片段、细菌多糖CM101和抗体LM609也具有抑制血管生长的活性。另一方面，根据它们的其他特性，它们被称为抗血管治疗剂或肿瘤血管毒素，因为它们不仅抑制血管发生，还通过几乎尚未明确的机制起始 对肿瘤血管的破坏。

[0366] 由于血管生长抑素和抑内皮素是最早在小鼠中证明不仅能够抑制肿瘤生长而且能够引起肿瘤退化的血管发生抑制剂，因此它们已经成为深入研究的焦点。已经显示多种蛋白酶可由纤溶酶原产生血管生长抑素，包括弹性蛋白酶、巨噬细胞金属弹性蛋白酶(MME)、基质溶素(MMP-7)、和92kDa的明胶酶B/IV类胶原酶(MMP-9)。

[0367] MME能够在肿瘤中由纤溶酶原产生血管生长抑素，而粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GMCSF)通过上调巨噬细胞的MME表达而诱导血管生长抑素生成。MME在血管生长抑素生成中的作用得到MME确实在来自患者的肝细胞癌临床样品中表达这一发现的支持。认为能够产生血管生长抑素的另一种蛋白酶是溶基质素-1(MMP-3)。MMP-3显示在体外可由纤溶酶原产生血管生长抑素样片段。血管生长抑素的作用机制目前还不清楚，猜测它结合内皮细胞上尚未鉴定的细胞表面受体，诱导内皮细胞经历程序化细胞死亡或有丝分裂阻滞。

打印ID?584222 Pg 48

[0368] 抑内皮素似乎是甚至更强有力的抗血管发生和抗肿瘤药剂，尽管它的生物学特性尚不是很清楚。抑内皮素在大量的小鼠肿瘤模型中能够有效引起退化。肿瘤没有形成针对抑内皮素的抗性，而且肿瘤在多个治疗周期后进入体积不再增加的休眠阶段。在此休眠阶段，经历凋亡的肿瘤细胞百分比上升，产生基本上保持相同大小的群体。抑内皮素被认为与介导其作用的尚未鉴定的内皮细胞表面受体结合。

[0369] 授予 Folkman 和 O'Reilly 的美国专利 5,854,205（特别引入本文作为参考）涉及抑内皮素及其作为内皮细胞增殖和血管发生抑制剂的应用。抑内皮素蛋白质对应于 XVIII 型胶原的 C 末端片段，而且可以由多种来源分离该白质。美国专利 5,854,205 还教导抑内皮素具有 XVIII 型胶原、XV 型胶原、或 BOVMPE1pregastric 酯酶片段的氨基酸序列。美国专利 5,854,205 还描述了抑内皮素与其他抗血管发生蛋白质（特别是血管生长抑素）的联合，这些联合的组合物能够有效的使依赖血管发生的肿瘤块消退。

[0370] CM101 是已经详细鉴定为能够在肿瘤中诱导新血管炎症的细菌多 糖。CM101 结合并交联去分化内皮上表达的受体，刺激补体系统的激活。它还启动由细胞因子驱动的、选择性靶向肿瘤的炎症应答。它是下调 VEGF 及其受体的表达的唯一抗病理性血管发生药剂。CM101 目前作为抗癌剂正在进行临床试验，而且可用于与本文的联合。

[0371] 血小板反应蛋白 (TSP-1) 和血小板因子 4(PF4) 也可用于与本发明中。它们都是与肝素有关的血管发生抑制剂，是在血小板 α 颗粒中发现的。TSP-1 是细胞外基质成分，一种 450kDa 的大型多结构域糖蛋白。TSP-1 结合在细胞外基质中发现的许多蛋白聚糖分子，包括 HSPG、纤连蛋白、层粘连蛋白、和不同类型的胶原。TSP-1 抑制体外内皮细胞迁移和增殖以及体内血管发生。TSP-1 还抑制经转化的内皮细胞的恶性表型和肿瘤发生。肿瘤抑制基因 p53 显示直接调控 TSP-1 的表达，p53 活性的丧失将引起 TSP-1 生成显著降低，伴随着由肿瘤起始的血管发生增加。

[0372] PF4 是含 70 个氨基酸的蛋白质，它是 CXC ELR 趋化因子家族的成员，能够在体外有效抑制内皮细胞增殖，在体内有效抑制血管发生。肿瘤内施用或通过腺病毒载体递送的 PF4 能够引起对肿瘤生长的抑制。

[0373] 干扰素和金属蛋白酶抑制剂是能够按照本发明被递送的另外两类天然存在的血管发生抑制剂。20 世纪 80 年代早期就已经知道干扰素的抗内皮活性，但是抑制机制仍然不清楚。已知它们能够抑制内皮细胞迁移，而且它们在体内确实具有一些抗血管发生活性，这可能是由抑制肿瘤细胞产生血管发生促进剂的能力介导的。特别是血管肿瘤对干扰素较敏感，例如用 IFNα 可以成功的治疗增殖的血管瘤。

[0374] 金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMP) 是天然存在的基质金属蛋白酶 (MMP) 抑制剂家族，它们也能够抑制血管发生，可用于本发明的治疗方案中。MMP 在血管发生过程中具有重要作用，因为它们降解内皮细胞和成纤维细胞在延伸或改造血管网络时迁移经过的基质。事实上，MMP 的一个成员 MMP-2 显示与推测为此目的经整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 激活的内皮有关。若这种相互作用被 MMP-2 片段破坏，则血管发生下调，肿瘤生长受抑制。

[0375] 存在大量抑制血管发生的药理学活性剂，其中任何一种或多种都可用作本发明的一部分。这包括 AGM-1470/TNP-470、沙利度胺和羧基酰胺三唑 (CAI)。1990 年发现烟曲霉素是血管发生的有效抑制剂，从此开发了烟曲霉素的合成类似物 AGM-1470 和 TNP-470。这两种药物可抑制体外内皮细胞增殖和体内血管发生。在人临床试验中对 TNP-470 进行了广

打印ID?584222 Pg 49

泛研究，结果表明进行长期给药是最佳的。

[0376] 沙利度胺最初作为镇静剂使用，但是发现是很强的致畸剂，因而停用。1994年发现沙利度胺是血管发生抑制剂。沙利度胺目前作为抗癌剂和血管性眼疾病的治疗正在进行临床试验。

[0377] CAI是小分子量的血管发生合成抑制剂，作为钙通道阻断剂防止肌动蛋白再组织、内皮细胞迁移、和在胶原IV上的展开而起作用。CAI在生理学可达到浓度抑制新血管形成，而且癌症患者口服后耐受较好。CAI的临床试验在49％的治疗前患有进行性疾病的癌症患者中稳定了疾病。

[0378] 在存在肝素或肝素片段时，可的松在小鼠中显示通过阻断内皮细胞增殖来抑制肿瘤生长。类固醇和肝素的加成性抑制效果所涉及的机制尚不清楚，但是认为肝素可能增加内皮细胞对类固醇的摄取。该混和物显示可增加新形成的毛细血管下基底膜的解体，这也是加成性血管抑制性效果的一种可能解释。肝素-可的松缀合物在体内还具有有效的血管抑制性和抗肿瘤效果活性。

[0379] 预计其他特异性血管发生抑制剂也可利用本发明的肿瘤靶向方法递送至肿瘤。这些包括（但不限于）抗侵入因子、视黄酸和紫杉醇（美国专利5,716,981，引入本文作为参考）、AGM-1470(Ingber等人，1990；引入本文作为参考）、鲨鱼软骨提取物（美国专利5,618,925，引入本文作为参考）、阴离子聚酰胺或聚脲寡聚物（美国专利5,593,664，引入本文作为参考）、羟吲哚衍生物（美国专利5,576,330，引入本文作为参考）、雌二醇衍生物（美国专利5,504,074，引入本文作为参考）和噻唑并嘧啶衍生物（美国专利5,599,813，引入本文作为参考）。

[0380] 包含$\alpha_v\beta_3$整联蛋白拮抗剂的组合物也可以与本发明联合用于抑制血管发生。正如美国专利5,766,591（引入本文作为参考）所公开的，含RGD的多肽及其盐，包括环状多肽，是$\alpha_v\beta_3$整联蛋白拮抗剂的合适范例。

[0381] 因为血管生成素是Tie2的配体，所以基于改变通过Tie2受体的信号传导的其他治疗性干预方法也可在本文中联合使用。例如，可以应用能阻断Tie2受体活化的可溶性Tie2受体(Lin等人，1998a)。用重组腺病毒基因疗法递送这样的构建体已显示对于治疗癌症和减少转移是有效的(Lin等人，1998a)。

[0382] 血管生成素，与VEGF家族成员一样，是血管内皮的特异性生长因子(Davis和Yancopoulos，1999；Holash等人，1999；引入本文作为参考）。首先被描述的血管生成素是天然存在的受体激活剂或激动剂——血管生成素-1(Ang-1)，和天然存在的受体拮抗剂——血管生成素-2(Ang-2)，二者都是通过内皮细胞酪氨酸激酶受体Tie2来发挥作用的。

[0383] 两种新的血管生成素--血管生成素-3（小鼠）和血管生成素-4（人）也已经得到鉴定(Valenzuela等人，1999)。血管生成素-3似乎作为拮抗剂（像Ang-2）发挥作用，而血管生成素-4似乎作为激动剂（像Ang-1）发挥作用(Valenzuela等人，1999)。还由人的心脏克隆了称为血管生成素-3的蛋白质，而且据报导对内皮细胞没有促有丝分裂的效果(Kim等人，1999)。

[0384] VEGF是血管发育早期所必需的，而血管生成素-1是血管化晚期通常需要的。由此，VEGF促进内皮细胞分化、增殖、和原始血管形成。血管生成素-1经Tie2受体促进成熟

打印ID7584222 Pg 50

血管的维持和稳定。因此，血管生成素 -1 是成熟或稳定因子，认为它通过促进内皮细胞与周围支持细胞之间的相互作用而将未成熟血管转变成未成熟血管 (Holash 等人，1999)。

[0385] E6. 诱导凋亡的药剂

[0386] 本发明还可用于递送在任何细胞（包括肿瘤细胞、肿瘤血管内皮细胞和受病毒感染的细胞）中诱导凋亡的药剂。许多抗癌药剂可能具有诱导凋亡的效果，这是其作用机制的一部分。按本文所述，针对联合疗法所述的任何一种或多种这样的药剂，包括表 F 中的那些药剂，也可与本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体缀合。已发现、设计或选择出了具有诱导凋亡的作用作为主要机制的某些其他药剂。这些药剂的例子描述如下，其中任何一种都可以用于制备缀合物或分别用于与本发明联合的治疗方法中。

[0387] 据报导，许多形式的癌症在肿瘤抑制基因中包含突变，诸如 p53。p53 的灭活导致不能促进凋亡。由于这一失败，癌细胞进行肿瘤发生，而非注定的细胞死亡。本发明因此还涵盖通过递送肿瘤抑制基因来刺激细胞死亡。例示性的肿瘤抑制基因包括（但不限于）p53、成视网膜细胞瘤基因 (Rb)、Wilm 氏肿瘤 (WT1)、bax α、白介素 -1 β - 转换酶及其家族、MEN-1 基因、1 型神经纤维瘤 (NF1)、cdk 抑制剂 p16、结肠直肠癌基因 (DCC)、家族性多发性腺癌基因 (FAP)、多瘤抑制基因 (MTS-1)、BRCA1 和 BRCA2。

[0388] 优选使用的是 p53（美国专利 5,747,469、5,677,178 和 5,756,455，引入本文作为参考）、成视网膜细胞瘤、BRCA1（美国专利 5,750,400、5,654,155、5,710,001、5,756,294、5,709,999、5,693,473、5,753,441、5,622,829 和 5,747,282，引入本文作为参考）、MEN-1 (GenBank 编号 U93236) 和腺病毒 E1A（美国专利 5,776,743，引入本文作为参考）基因。

[0389] 抑制凋亡或程序性细胞死亡的其他癌基因包括，但不局限于，bcr-abl、bcl-2（不同于 bcl-1，细胞周期蛋白 D1 ；GenBank 登记号 M14745、X06487 ；美国专利号 5,650,491 ；和 5,539,094 ；分别引入本文作为参考）和包括 Bcl-xl、Mcl-1、Bak、A1、A20 在内的家族成员。Bcl-2 的过表达首先在 T 细胞淋巴瘤中发现。Bcl-2 通过与凋亡途径中的一种蛋白质 Bax 结合并使其失活而发挥癌基因的功能。Bcl-2 功能的抑制防止了 Bax 的失活，并使得凋亡途径能继续进行。因此，对此类癌基 因的抑制，如利用反义核苷酸序列进行抑制，预计可用于本发明期望增强凋亡的有关方面（美国专利 5,650,491 ；5,539,094 ；和 5,583,034 ；分别引入本文作为参考）。

[0390] 可以由本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体递送的其他组合物包括肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体（称为 TRAIL）的编码基因及 TRAIL 多肽（美国专利 5,763,223，引入本文作为参考）；24kD 凋亡相关蛋白酶（美国专利 5,605,826，引入本文作为参考）；Fas 相关因子 1(FAF1)（美国专利 5,750,653，引入本文作为参考）。本发明的这些方面还包括提供白介素 -1 β - 转换酶及其家族成员，据报导，它们也刺激凋亡。

[0391] 还可以使用诸如 2- 羟基喹啉衍生物（美国专利 5,672,603 和 5,464,833，引入本文作为参考）、branched apogenic peptide（美国专利 5,591,717，引入本文作为参考）、磷酸酪氨酸抑制剂及不可水解的磷酸酪氨酸类似物（美国专利 5,565,491 和 5,693,627，引入本文作为参考）、RXR 类视色素受体激动剂（美国专利 5,399,586，引入本文作为参考）和甚至抗氧化剂（美国专利 5,571,523，引入本文作为参考）等化合物。还可以将酪氨酸激酶抑制剂（诸如金雀异黄素）连接至本发明的抗体（正如美国专利 5,587,459 所支持的，引

打印ID?584222 Pg 51

入本文作为参考）。

[0392] E7. 抗病毒剂

[0393] 因为 PS 和阴离子磷脂在受病毒感染的细胞上变得暴露，所以本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体也可连接任何一种或多种抗病毒剂。用于连接至构建体、受体－抗体或 β－抗体的示例性抗病毒剂包括表 G 中的那些。这样的抗病毒剂还可分开地用于本发明的联合抗病毒疗法中。

[0394] 除了所谓的典型抗病毒剂外，也可以附着其他 DNA/RNA 抑制剂以形成抗病毒治疗剂。示例性的抗病毒剂列在表 G 中，可以附着它们中的任何一种或多种以制备本发明的抗病毒缀合物，或者可以将它们分开地用于本发明的抗病毒联合疗法中。

[0395] 表 G

[0396] 常见的引起疾病的病毒和抗病毒药物

[0397]

引起疾病的病毒	药物类别	示例性的抗病毒药物
疱疹病毒		西多福韦、阿昔洛韦、喷昔洛韦（泛昔洛韦）、更昔洛韦、脱氧鸟苷、膦甲酸、碘苷、三氟胸苷、阿糖腺苷、索立夫定
逆转录病毒	核苷逆转录酶（RT）抑制剂	齐多夫定、去羟肌苷、扎西他滨、拉米夫定、司他夫定、阿巴卡韦、多核苷耐受性 A、多核苷耐受性 B
	非核苷 RT 抑制剂	奈韦拉平、地拉韦啶、依法韦仑、阿德福韦、dipivoxil
	蛋白酶抑制剂	茚地那韦、利托那韦、沙奎那韦、奈非那韦、氨普奈韦
	细胞周期阶段特异性抗肿瘤药	羟基脲（Hydrea™, Bristol Myers-Squibb）
乙型肝炎病毒		Deoxycytosine iphosphate、三磷酸拉米夫定、emticitabine triphosphate、二磷酸阿德福韦、三磷酸喷昔洛韦、三磷酸洛布卡韦
丙型肝炎病毒		干扰素 α、利巴韦林
流感病毒 A 和 B		金刚烷胺、金刚乙胺、扎那米韦、奥塞米韦

[0398] 在抗病毒剂和药物的范围内，目前优选 AZT 和西多福韦。无论所选择的抗病毒药物是什么，抗病毒缀合物都将与肺中的巨噬细胞结合，与受病毒感染的细胞结合，并且还可

打印ID7584222 Pg 52

能结合病毒颗粒。取决于所用的接头或缀合技术，抗病毒药物可以在靶细胞表面释放，然后被摄取入细胞中。优选地，缀合物本身被摄取入细胞，例如巨噬细胞或受病毒感染的细胞。摄取可以是自然发生的或可以是病毒介导的。一旦进入细胞内，如同用抗体缀合物一样，接头的水解将会释放出活性抗病毒 剂。

[0399] 可以使用含生物学不稳定键的其他连接，诸如二硫键、酸不稳定键、酶促可裂解键或可水解键。因此，被描述用于连接治疗剂的任何生物学可释放或可选择性水解的键都可以与本发明的抗病毒药物相关地使用。

[0400] F. 生物学功能等同物

[0401] 现在可以生成构建体、受体－抗体或 β－抗体的等同物或甚至改良物，通常是使用上文提供的材料作为起点。可以对这种构建体、受体－抗体或 β－抗体的结构进行修饰和改变，但是仍然能够获得具有类似或所需特征的分子。例如，可以用某些氨基酸替代蛋白质结构中的其他氨基酸，而在相互作用性结合能力方面没有明显损失。这些考虑也可应用于毒素、抗血管发生剂、凋亡诱导剂、凝血剂、等等。

[0402] 由于蛋白质相互作用能力和本质确定了该蛋白质的生物学功能活性，因此可以在蛋白质序列（当然也可以是相应的 DNA 序列）中进行某些氨基酸序列替代，从而得到具有类似（激动剂）特性的蛋白质。因此，预计可在以抗体或治疗剂的序列（或相应的 DNA 序列）中进行多种改变，而不会使其生物学效用或活性明显损失。可以根据本文表 A 提供的密码子信息和关于定点诱变的支持性技术细节，通过突变相应的 DNA 序列而产生生物学功能等同物。

[0403] 表 A

[0404]

氨基酸			密码子			
丙氨酸	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU
半胱氨酸	Cys	C	UGC	UGU		
天冬氨酸	Asp	D	GAC	GAU		
谷氨酸	Glu	E	GAA	GAG		
苯丙氨酸	Phe	F	UUC	UUU		
甘氨酸	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU

[0405]

打印ID7584222 Pg 53

组氨酸	His	H	CAC	CAU				
异亮氨酸	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
赖氨酸	Lys	K	AAA	AAG				
亮氨酸	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
甲硫氨酸	Met	M	AUG					
天冬酰胺	Asn	N	AAC	AAU				
脯氨酸	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
谷氨酰胺	Gln	Q	CAA	CAG				
精氨酸	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
丝氨酸	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
苏氨酸	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
缬氨酸	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
色氨酸	Trp	W	UGG					
酪氨酸	Tyr	Y	UAC	UAU				

[0406] 本领域技术人员也深入领会到,“生物学功能等同的”蛋白质或肽这一定义的内在含义是,在分子的确定部分内可以进行的、仍然导致分子具有可接受水平的等同生物活性的改变数目存在限制。因此,本文将生物学功能等同的蛋白质和肽定义为某些而非大多数或所有氨基酸可被替代的蛋白质和肽。当然,根据本发明可以容易的制备和使用具有不同替代的多种不同的蛋白质/肽。

[0407] 氨基酸替代通常基于的是氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如其疏水性、亲水性、电荷、大小等等。对氨基酸侧链取代基大小、形状、和类型的分析揭示了精氨酸、赖氨酸、和组氨酸都是带正电的残基;丙氨酸、甘氨酸、和丝氨酸大小相似;苯丙氨酸、色氨酸、和酪氨酸都具有基本上相似的形状。因此,根据这些考虑,本文将精氨酸、赖氨酸、和组氨酸;丙氨酸、甘氨酸、和丝氨酸;以及苯丙氨酸、色氨酸、和酪氨酸确定为生物学功能等同物。

[0408] 在进行更多的量变时,可以考虑氨基酸的水性指数(hydropathic index)。根据其疏水性和带电特性确定了各种氨基酸的水性指数,即: 异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。

[0409] 本领域技术人员通常都理解氨基酸水性指数在赋予蛋白质相互作用性生物学功能方面的重要性(Kyte 和 Doolittle,1982,引入本文作为参考)。已知某些氨基酸可以被具有相似水性指数或评分的其他氨基酸替代,而仍保留相似的生物学活性。在根据水性指数进行改变时,优选水性指数为 ±2 之间的氨基酸替代,特别优选水性指数为 ±1 之间的氨

打印ID?584222 Pg 54

基酸替代，甚至更特别优选水性指数为 ±0.5 之间的氨基酸替代。

[0410] 因此，可以理解，氨基酸可以用具有相似亲水性值的另一种氨基酸取代，而仍得到生物学等同的蛋白质。如美国专利 4,554,101（引入本文作为参考）中所述，已经为氨基酸残基指定了下列亲水性值：精氨酸 (+3.0)；赖氨酸 (+3.0)；天冬氨酸 (+3.0±1)；谷氨酸 (+3.0±1)；丝氨酸 (+0.3)；天冬酰胺 (+0.2)；谷氨酰胺 (+0.2)；甘氨酸 (0)；苏氨酸 (-0.4)；脯氨酸 (-0.5±1)；丙氨酸 (-0.5)；组氨酸 (-0.5)；半胱氨酸 (-1.0)；甲硫氨酸 (-1.3)；缬氨酸 (-1.5)；亮氨酸 (-1.8)；异亮氨酸 (-1.8)；酪氨酸 (-2.3)；苯丙氨酸 (-2.5)；和色氨酸 (-3.4)。

[0411] 在根据亲水性值进行改变时，优选亲水性值为 ±2 之间的氨基酸替代，特别优选亲水性值为 ±1 之间的氨基酸替代，甚至更特别优选亲水性值为 ±0.5 之间的氨基酸替代。

[0412] G. 缀合作用

[0413] 将抗体 Fc 区与至少第一种磷脂酰丝氨酸结合蛋白可操作地附着、联接或缀合，从而提供本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体。这样的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体可以进一步缀合或联接至例如抗细胞和细胞毒性剂、凝血剂和抗病毒剂。

[0414] 尽管优选共价连接，其他的可操作附着方式也可以使用。例如，可以用抗生物素蛋白：生物素桥产生任何连接的构建体。为了更进一步地描述并使抗生物素蛋白：生物素能用于靶向剂与生物学试剂和治疗剂的可操作性连接中，除了本领域普通技术人员已知的知识外，还将共同拥有的美国专利 6,093,399 特别引入本文作为参考。

[0415] 任何两种或三种药剂可用第二种结合区，优选其抗体或抗原结合区连接。这可以通过凝血配体作为实例说明，其中的靶向剂与凝血剂通过第二种结合区连接（美国专利 6,093,399、6,004,555、5,877,289 和 6,036,955，分别引入本文作为参考），它已制备并成功用于癌症治疗中。

[0416] 本领域普遍知晓免疫缀合物技术。但是，通过在其制备和纯化以供随后临床施用的过程中使用某些优选的技术可获得某些好处。另外，尽管已知多种类型的含二硫键的接头可以成功用于缀合，但是基于不同的药理学特征和能力，某些接头通常优于其他接头。例如，含有空间上“受阻”的二硫键的接头可能是优选的，因为这种接头在体内更加稳定，从而防止在结合至作用位点之前被释放。

[0417] 交联剂的类型，以及如何进行交联将会改变所得缀合物的药效学。可能会希望获得这样的缀合物，它在除了预定作用位点以外的所有其他身体部位中的条件下都能够保持完整，而在所述预定作用位点处具有良好的“释放”特性。因此，具体交联方案，特别包括所用的具体交联剂和被交联的结构，具有一定的意义。

[0418] 取决于所缀合的具体药剂，可能会需要或希望提供可操作地附着所述药剂的肽间隔区。某些肽间隔区能折叠成以二硫键键合的环结构。然后，环内的蛋白水解切割会产生异二聚体多肽，其中所述药剂仅通过单个二硫键连接。这种毒素的范例是蓖麻毒蛋白 A 链毒素。

[0419] 当利用其他一些毒素化合物时，可以提供不能被切割的肽间隔区，以可操作地附着融合蛋白质中的毒素化合物。可以与不能被切割的肽间隔区结合使用的毒素是自身可通过蛋白水解切割而转变成毒害细胞的二硫键键合形式的毒素。这种毒素化合物的范例是假单胞菌外毒素化合物。

打印ID7584222 Pg 55

[0420] 目前多种化疗剂和其他药理活性剂已经成功地进行了缀合，并显示药学功能。已经研究过的例示性抗肿瘤药剂包括多柔比星、道诺霉素、氨甲蝶呤、长春碱、和其他多种药剂。此外，已经描述了诸如新制癌菌素、大分子霉素、三乙烯亚胺苯醌、和 α－鹅膏蕈碱等其他药剂的附着。可对这些附着方法作些改动以用于本发明中。

[0421] 任何共价连接都应当理想地在不同于功能性位点的位点处进行。组合物由此以任何可操作方式“连接”，使得每个部分都能够发挥预定功能而无显著削弱，具体而言，就是使产生的构建体仍然结合预定 PS，并使附着的药剂在从构建体中释放时基本上保持生物学活性并／或恢复生物学活性。

[0422] 还考虑了通过在 Fc 区上的糖部分来附着生物学试剂。在抗体中天然地发生（O 联和 N 联）糖基化。如果需要，可以修饰重组抗体以重新形成或形成另外的糖基化位点，这可以简单地通过将合适的氨基酸序列（例如 Asn-X-Ser、Asn-X-Thr、Ser 或 Thr）改造入抗体的一级序列中来实现。

[0423] G1. 生化交联剂

[0424] 除了本文提供的一般信息，可以使用某些优选的生化交联剂。交联剂用于形成将两种不同分子的官能团维系在一起的分子桥接。为了以分步方式连接两种不同的蛋白质，可以使用杂双功能交联剂来消除不需要的均多聚体形成。例示性的杂双功能交联剂可以参考表 C。

[0425] 表 C. 杂双功能交联剂

[0426]

接头	对下列基团具有反应性	优点和应用	交联后的间隔物臂长
SMPT	伯胺 巯基	较高的稳定性	11.2Å
SPDP	伯胺 巯基	硫化 可切割交联	6.8Å
LC-SPDP	伯胺 巯基	间隔物臂延长	15.6Å
Sulfo-LC-SPDP	伯胺	间隔物臂延长	15.6Å

[0427]

	巯基	可溶于水	
SMCC	伯胺 巯基	稳定的马来酰亚胺反应基团 酶-抗体缀合 半抗原-载体蛋白质缀合	11.6Å
Sulfo-SMCC	伯胺 巯基	稳定的马来酰亚胺反应基团 可溶于水 酶-抗体缀合	11.6Å
MBS	伯胺 巯基	酶-抗体缀合 半抗原-载体蛋白质缀合	9.9Å
Sulfo-MBS	伯胺 巯基	可溶于水	9.9Å
SIAB	伯胺 巯基	酶-抗体缀合	10.6Å
Sulfo-SIAB	伯胺 巯基	可溶于水	10.6Å
SMPB	伯胺 巯基	间隔物臂延长 酶-抗体缀合	14.5Å
Sulfo-SMPB	伯胺 巯基	间隔物臂延长 可溶于水	14.5Å
EDC/Sulfo-NHS	伯胺 羧基	半抗原-载体缀合	0
ABH	碳水化合物 无选择性	与糖基发生反应	11.9Å

[0428] 杂双功能交联剂包含两个反应基团：一个通常与伯胺基团发生反应（如N-羟基琥珀酰亚胺），而另一个通常与硫醇基发生反应（如吡啶二硫化物（pyridyldisulfide）、马来酰亚胺、卤素、等等）。交联剂通过伯胺反应基团与一种蛋白质的赖氨酸残基发生反应，而通过硫醇反应基团，已经与第一种蛋白质连接的交联剂与另一种蛋白质的半胱氨酸残基（游离的巯基）发生反应。

[0429] 由此，组合物通常具有或经衍生具有可用于交联目的的官能基。这一要求不应视作限制性的，因为多种基团可用于这种方式。例如，伯胺或仲胺基、酰肼或肼、羧基醇、磷酸酯、氨基甲酸酯或烷化基团可用于结合或交联。

[0430] 交联剂的两种反应基团之间的间隔臂可以具有不同的长度和化学组成。较长的间隔臂能够使缀合物成分获得较好的柔性，而桥接中的 有些特定成分（如苯基）可以给反应基团带来额外的稳定性或使化学连接对各方面作用的抗性增加（如二硫键对还原剂的抗性）。还包括使用诸如 L-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Ala 等肽间隔物。

[0431] 优选采用在血液中具有合理稳定性的交联剂。已知大量类型的含二硫键接头能够成功的用于缀合中。可以证明含空间受阻的二硫键的接头能够带来较好的体内稳定性，防止药剂在结合作用位点前释放。这些接头因而成为一组优选的连接剂。

[0432] 最优选的交联剂之一是 SMPT，这是一种含二硫键的双功能交联剂，二硫键因邻近的苯环和甲基而“空间受阻”。认为该二硫键的空间位阻有助于保护该键免受硫醇阴离子

打印ID7584222 Pg 57

（诸如组织和血液中可能存在的谷胱甘肽）的攻击，由此有助于防止在缀合物将附着的药剂递送至肿瘤位点前发生脱偶联。预计 SMPT 剂也可用于本发明的缀合物方面。

[0433] 与许多其他已知的交联剂一样，SMPT 交联剂提供了交联官能基（诸如半胱氨酸的 SH 或伯胺如赖氨酸的 ε－氨基）的能力。另一种可能类型的交联剂包括含可切割二硫键的杂双功能光反应性叠氮基苯，诸如磺基琥珀酰亚胺基-2-（对叠氮基水杨基酰氨）-1,3'-二硫代丙酸乙酯。N-羟基－琥珀酰亚胺基团与伯胺基团发生反应，而叠氮基苯（在光分解作用后）无选择性的与任何氨基酸残基发生反应。

[0434] 除了受阻的交联剂，本文还可以采用不受阻的接头。认为不含或不产生受保护二硫键的其他有用交联剂包括 SATA、SPDP 和 2- 亚氨基硫杂环戊环 (2-iminothiolane)。本领域完全理解这些交联剂的应用。

[0435] 一旦完成缀合，将缀合物与未缀合的试剂以及与其他污染物分开。有大量的纯化技术可用于提供足够纯的缀合物，从而能够用于临床。使用最多的通常是基于大小分离的纯化方法，诸如凝胶过滤、凝胶渗透或高效液相层析。也可以使用其他层析技术，诸如 Blue-Sepharose 分离。

[0436] G2. 生物学可释放接头

[0437] 虽然任何连接部分优选具有合理的血液稳定性以防止在靶向到疾 病（如肿瘤位点）前显著释放附着的治疗剂，但是在某些方面，也可以使用生物学可释放键和／或可选择性切割间隔物或接头。“生物学可释放键”和“可选择性切割的间隔物或接头”仍然具有合理的循环稳定性。

[0438] 本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体由此可以经生物学可释放键连接一种或多种治疗剂或另一种药剂。“生物学可释放键”或“可选择性水解键”包括只有或优先在某些条件下可释放的、可切割的、或可水解的所有连键。这包括二硫键和三硫键和酸不稳定键，正如美国专利 5,474,765 和 5,762,918（引入本文作为参考）所述。

[0439] 特别涵盖使用对酸敏感的间隔物将治疗剂附着于本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体上。在这些实施方案中，治疗剂在细胞的酸性区室内释放。预计使酸敏感性释放发生于细胞外，但是是在特异性靶向（优选）肿瘤位点或病毒感染性细胞之后。目前优选的某些范例包括经酸敏感间隔物连接了秋水仙碱或多柔比星的抗体。还涵盖经抗体的碳水化合物部分进行附着。在这些实施方案中，治疗剂在细胞的酸性区室内释放。

[0440] 构建体、受体－抗体或 β－抗体还可以经衍生而导入能够经生物学可释放键附着治疗剂的官能基。构建体、受体－抗体或 β－抗体由此可以经衍生而导入以酰肼、肼、伯胺、或仲胺基终止的侧链。治疗剂可以经 Schiff 碱连接、腙或酰腙键、或酰肼接头而进行缀合（美国专利 5,474,765 和 5,762,918，特别引入本文作为参考）。

[0441] 同样如美国专利 5,474,765 和 5,762,918（特别引入本文作为参考）所述，构建体、受体－抗体或 β－抗体可以经一种或多种对酶敏感的生物学可释放键可操作地附着治疗剂，包括肽键、酯键、酰胺键、磷酸二酯键和糖苷键。

[0442] 本发明的某些方面涉及包含肽酶和／或蛋白酶的至少第一种切割位点的肽接头的使用，而所述肽酶和／或蛋白酶优先定位于疾病位点，特别是肿瘤环境内。由所附着的治疗剂的递送导致疾病位点或肿瘤环境内的特异性切割，继而导致活性治疗剂的特异性释放。某些肽接头 包含由改造中涉及的一种或多种酶可识别的切割位点。

打印ID7584222 Pg 58

[0443] 特别优选包含尿激酶、尿激酶原、纤溶酶、纤溶酶原、TGFβ、链激酶、凝血酶、因子IXa、因子Xa、或金属蛋白酶（诸如间质胶原酶、明胶酶、或溶基质素）的切割位点的肽接头。本文特别引入美国专利6,004,555、美国专利5,877,289和美国专利6,093,399作为参考，以进一步描述和教导如何产生并使用包含生物学可释放键和可选择性切割接头和肽的免疫缀合物。本文特别引入美国专利5,877,289作为参考，以进一步描述和教导如何产生并使用包含可在肿瘤环境内尿激酶、纤溶酶、凝血酶、因子IXa、因子Xa、或金属蛋白酶（诸如间质胶原酶、明胶酶、或溶基质素）切割的可选择性切割肽接头的免疫缀合物。

[0444] 目前优选的可选择性切割肽接头是包含纤溶酶或金属蛋白酶（也称为“基质金属蛋白酶”或“MMP”）（诸如间质胶原酶、明胶酶、或溶基质素）的切割位点的肽接头。可有利地用于本发明的其他肽接头包括，例如，纤溶酶可切割序列，诸如用尿激酶原、TGFβ、纤溶酶原和链激酶可切割的序列；因子Xa可切割序列；MMP可切割序列，诸如明胶酶A可切割序列；胶原酶可切割序列，诸如小牛皮肤胶原（α1(I)链）、小牛皮肤胶原（α2(I)链）、牛软骨胶原（α1(II)链）、人肝胶原（α1(III)链）、人α2M、人PZP、大鼠α1M、大鼠α2M、大鼠α1I3(2J)、大鼠α1I3(27J)、人成纤维细胞胶原酶自溶切割位点。为了更进一步进行描述并教导这些可切割序列的使用，除了本领域普通技术人员已知的知识外，还将共同拥有的美国专利6,342,219、6,524,583、6,342,221和6,416,758的内容和其中的表2所列序列特别引入本文作为参考。

[0445] G3. 融合蛋白和重组表达

[0446] 可将构建体、受体-抗体或β-抗体通过使用分子生物学技术制备成融合蛋白。使用本文公开的和本领域技术人员知道的任何构建体、受体-抗体或β-抗体和第二种治疗剂，可以设计并产生任何融合蛋白。融合蛋白技术可以容易的应用于制备具有其他修饰的融合蛋白，例如 通过可选择性切割的肽序列连接两个部分，等等。

[0447] 使用重组DNA技术来实现这些目标现在对于本领域技术人员而言已是标准实践。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术和体内重组/遗传重组。还可以使用自动合成仪来进行DNA和RNA合成（参阅例如Sambrook等人描述的技术，1989，引入本文作为参考）。

[0448] 这种融合蛋白的制备通常必需制备第一个和第二个DNA编码区，并在同一读码框中功能性连接这些区从而产生编码所需融合蛋白的单个编码区。一旦产生了所需编码区，就可产生表达载体。表达载体在插入的DNA区上游包含一种或多种启动子，该启动子启动DNA的转录并由此启动所编码的重组蛋白质的表达。这就是“重组表达”。

[0449] 为了获得构建体、受体-抗体或β-抗体的所谓的“重组”形式，将载体在重组细胞中进行表达。可以通过重组表达领域技术人员通常知道的技术对用于在原核或真核系统中表达的DNA片段进行改造。我们认为事实上可以采用任何表达系统来表达。

[0450] 本发明的构建体、受体-抗体或β-抗体可以在真核表达系统中成功的表达，如CHO细胞，但是预计细菌表达系统（诸如大肠杆菌pQE-60）对于构建体的大量制备及随后纯化将是特别有用的。cDNA也可以在细菌系统中进行表达，所编码的蛋白质表达为与β-半乳糖苷酶、泛素、日本裂体吸虫(Schistosoma japonicum)谷胱甘肽S转移酶等等的融合形式。我们认为细菌表达系统相对于真核表达系统在使用简便性和由此获得的物质的量方面具有优势。

打印ID7584222 Pg 59

[0451] 关于微生物表达，美国专利5,583,013、5,221,619、4,785,420、4,704,362和4,366,246（引入本文作为参考）进一步补充了本公开书关于重组宿主细胞中基因表达的内容。

[0452] 可以纯化重组产生的构建体、受体-抗体或β-抗体，并加以配制以施用于人。或者，可以经基因疗法递送编码构建体、受体-抗体或β-抗体的核酸。虽然可以采用裸露的重组DNA或质粒，但是优选使用脂质体或载体。某些病毒经受体介导的内吞作用进入细胞的能力，和整合到宿主细胞基因组并稳定的、有效的表达病毒基因的能力，使得它们成为将外来基因转移至哺乳动物细胞内的引人注目的候选者。用于本发明的优选基因治疗载体通常是病毒载体。

[0453] 逆转录病毒有希望作为基因递送载体，因为它们能够将它们的基因整合宿主基因组中，从而转移大量的外来遗传物质，感染广泛的物种和细胞类型，且在特定细胞系中包装。其他病毒，诸如腺病毒、单纯疱疹病毒（HSV）、巨细胞病毒（CMV）和腺伴随病毒（AAV），诸如美国专利5,139,941（引入本文作为参考）中描述的病毒，也可加以改造而作为基因转移的载体。

[0454] 虽然有些能够接受外来遗传物质的病毒所能够容纳的核苷酸的量受到限制，且它们感染的细胞范围也受到限制，但是这些病毒已经证明能够成功的实现基因表达。然而，腺病毒不将其遗传物质整合到宿主基因组中，因而基因表达不需要宿主复制，这使得它们特别适用于快速、有效的异源基因表达。本领域众所周知用于制备复制缺陷的感染性病毒的技术。

[0455] 在其他实施方案中，基因治疗载体是HSV。使HSV成为引人注目的载体的一个因素是基因组的大小和组织。因为HSV比较大，所以与其他较小的病毒系统相比，掺入多个基因或表达盒不太会成问题。另外，与其他系统相比，具有不同性能（如时间、强度）的不同病毒控制序列的可用性使得它有可能更大程度的控制表达。病毒具有相对较少的剪接信息，进一步简化基因操作，这也是优点。HSV还相对易于操作，而且可以生长至高滴度。

[0456] 当然，在使用病毒递送系统时，可能期望充分纯化病毒粒子，使它基本上不含不需要的污染物，诸如缺陷型感染性病毒颗粒或热原，由此不会在接受载体构建物的细胞、动物、或个体中引起任何不恰当的反应。纯化载体的优选方法包括使用浮力密度梯度，诸如氯化铯梯度离心。

[0457] H. 药物组合物

[0458] 本发明的治疗剂将通常被制备成药物组合物。药物组合物将包含生物学或治疗有效量的至少第一种本发明的治疗剂，它们溶解或分散于制药学可接受的载体或水性介质中。还包括联合治疗剂，而相同类型的相应药物组合物可用于单一和联合药物。

[0459] 术语“制药学或药理学可接受的”指当适当施用于动物或人后不会产生不利的、过敏的、或其他不良反应的分子实体和组合物。本发明同样包括兽医应用，且“制药学可接受的”制剂包括可用于临床和/或兽医应用的制剂。

[0460] 如本文所用，“制药学可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂、等等。本领域众所周知这些介质和试剂对制药学活性物质的应用。在此范围内，除了活性成分与任何常规介质或试剂不相容，否则，预计它们能用于治疗组合物中。为了施用于人，制剂应当达到FDA局生物药剂标准要求的无菌、热原性、

打印ID7584222 Pg 60

全面安全性、和纯度标准。组合物中还可以掺入补充的活性成分。

[0461] “单位剂量”制剂是包含所施用成分适用于特定定时递送的一份剂量或亚剂量的类型。例如，例示性的“单位剂量”制剂包含每日剂量或单位或每日亚剂量、每周剂量或单位或每周亚剂量等等。

[0462] H1. 可注射制剂

[0463] 本发明的治疗剂常常被配制成供肠胃外施用，尤其是对于肿瘤治疗来说，例如经配制供静脉内、肌肉内、皮下、经皮或其他这种途径的注射，包括蠕动施用和直接滴注至肿瘤或疾病位点（腔内施用）。本领域技术人员参照本公开书将知道含有抗体或免疫缀合物或肽缀合物作为活性成分的水性组合物的制备。这些组合物通常被制备成可注射的液体溶液或悬浮液；也可以制备成适用于在注射前通过加入液体而制成溶液或悬浮液的固体形式；而且制品也可进行乳化。

[0464] 适于注射使用的制药学形式包括无菌水溶液或分散液；包括麻油、花生油或水性丙二醇的制剂；和用于即时制备无菌注射液或分散液的无菌粉末。在所有情况下都必须是无菌形式，并且流动程度必须易于 注射。制剂在制备和储存条件下必须很稳定，而且必须能够防止微生物（诸如细菌和真菌）的污染作用。

[0465] 治疗剂可配制成中性或盐形式的无菌水性组合物。可以在与表面活性剂（诸如羟丙基纤维素）适当混合的水中制备游离碱或制药学可接受盐形式的治疗剂的溶液。制药学可接受的盐包括酸加成的盐（与蛋白质的游离氨基形成），以及与无机酸（诸如盐酸或磷酸）或有机酸（诸如乙酸、三氯乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等）形成的盐。与游离羧基基团形成的盐也可衍生自无机碱（诸如氢氧化钠、钾、铵、钙、或铁）和有机碱（诸如异丙基胺、三甲基胺、组氨酸，普鲁卡因、等等）。

[0466] 合适的载体包括含例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇、等等）、其适当混和物、和植物油的溶剂和分散介质。在许多情况中，优选包含等渗剂，例如糖或氯化钠。通过使用包衣，诸如卵磷脂，在分散剂的情况中通过维持所需颗粒大小，和／或通过使用表面活性剂，可以维持适当流动性。

[0467] 在普通的储存和使用条件下，所有这些制剂应当包含防腐剂以防止微生物的生长。通过多种抗细菌和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯类、氯代丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等等，可以防止微生物的作用。通过在组合物中使用延迟吸收的试剂，例如单硬脂酸铝和明胶，可以延长可注射组合物的吸收。

[0468] 在配制之前或之后，治疗剂应当彻底透析以除去不需要的小分子量分子，和／或适当时冻干，从而更易于配制到所需载体中。通过将所需量的溶于适当溶剂的活性剂与各种上述其他成分混和，随后过滤除菌，由此制备无菌的可注射溶液。通常，通过将各种无菌的活性成分掺入含基本分散介质和所需的上述其他成分的无菌载体来制备分散剂。

[0469] 在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况中，优选的制备方法是真空干燥和冻干技术，由先前无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何其他所需成分的粉末。

[0470] 本发明的合适药物组合物通常包含与可接受的制药学稀释剂或赋形剂（诸如无菌水溶液）混合以达到所需终浓度范围（取决于预定用途）的一定量的治疗剂。本领域通常众所周知制备技术，例如可参阅《雷明顿制药科学》(Remington’s Pharmaceutical Sciences)，第 16 版，Mack 出版公司，1980（引入本文作为参考）。为了施用于人，制剂应当

打印ID7584222 Pg61

符合FDA局生物制剂标准要求的无菌、致热性、全面安全性、和纯度标准。配制后，以与剂型相容的方式，以治疗有效量施用治疗剂。

[0471] H2. 缓释制剂

[0472] 可以多种剂型容易地施用制剂，诸如上述可注射溶液的形式，但还包括其他制药学可接受形式，如片剂、丸剂、胶囊或用于口服的其他固体、栓剂、阴道栓剂、滴鼻液或喷雾剂、气雾剂、吸入剂、局部制剂、脂质体形式等等。施用形式的类型应与治疗的疾病或紊乱匹配。

[0473] 可以使用制药学“慢释”胶囊或“缓释”组合物或制剂。慢释制剂通常被设计成在较长的一段时间内维持恒定的药物水平，并可用于递送本发明的治疗剂。通常将慢释制剂植入疾病位点（例如肿瘤位点或病毒感染位点）附近。

[0474] 缓释制剂的合适范例包括含治疗剂的固体疏水性聚合物半透性基质，该基质为有形物品的形式，如薄膜或微囊。缓释基质的范例包括聚酯、水凝胶（例如聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯）或聚乙烯醇）、聚交酯（如美国专利3,773,919）、L-谷氨酸与L-谷氨酸γ-乙酯的共聚物、不可降解的乙烯乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物（例如Lupron Depot™，由乳酸-乙醇酸共聚物与乙酸亮丙瑞林组成的可注射微球体）和聚D-(-)-3-羟基丁酸。

[0475] 诸如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸的聚合物能够在长达100天的时间里释放分子时，而某些水凝胶释放蛋白质的时间要短一些。当包囊的抗体在体内维持了较长时间后，它们可能因暴露于37℃的潮湿环境而变性或聚集，导致生物学活性降低和/或免疫原性改变。根据涉 及的机制，可采用合理的策略来进行稳定。例如，若聚集机制涉及经硫一二硫键交换形成分子间S-S键，则可以通过修饰巯基、由酸性溶液冻干、控制水气含量、使用适当添加剂、开发特异性聚合物基质组合物等等来实现稳定。

[0476] H3. 脂质体和纳米颗粒(nanoparticle)

[0477] 在某些实施方案中，可以将脂质体和/或纳米颗粒用于治疗剂。本领域技术人员通常知道脂质体的制备和使用，见下文概述。本发明提供了抗体、脂质体和化疗剂的特别组合，见下文所述。此外，脂质体制剂还可用作本发明全部治疗剂中任一种的常规组分。

[0478] 由分散于水性介质并自发形成多层同心双层囊泡（也称为多层囊泡，MLV）的磷脂可形成脂质体。MLV的直径通常为25nm－4μm。对MLV的超声波处理导致形成小型单层囊泡(SUV)，直径为200－500Å，其核心含有水性溶液。

[0479] 当分散于水中时，根据脂质与水的摩尔比，磷脂还能够形成除脂质体以外的多种结构。在低比率，脂质体是优选结构。脂质体的物理特征取决于pH、离子强度和二价阳离子的存在。脂质体能够对离子性和极性物质显示低通透性，但是当温度升高时发生相变，显著改变其通透性。相变涉及由紧密的有序结构（称为凝胶态）向松散的无序结构（称为流体态）的改变。这发生于特征性相变温度，并导致对离子、糖和药物的通透性增加。

[0480] 脂质体经四种不同的机制与细胞发生相互作用：网状内皮系统吞噬细胞的内吞作用，诸如巨噬细胞和嗜中性细胞；细胞表面的吸附，这通过非特异性弱疏水作用或静电作用来实现，或者通过与细胞表面成分的特异性相互作用；脂质体的脂双层通过嵌入原生质膜而与细胞膜的融合，同时将脂质体内容物释放进入细胞质；和脂质体脂质转移至细胞或亚细胞膜，或反向转移，无脂质体内容物的任何结合。改变脂质体制剂能够改变起作用机制，

打印ID7584222 Pg 62

但是可能同时有超过一种机制起作用。

[0481] 纳米颗粒通常能够以稳定且可重现的方式俘获化合物。为了避免因细胞内聚合物过多引起的副作用，应当使用体内可降解的聚合物来设计这些超微颗粒（大小为大约0.1μm）。预计符合这些要求的生物可降解的聚烷基-氰基丙烯酸酯纳米颗粒可用于本发明，而且这些颗粒易于制备。

[0482] H4. 眼科制剂

[0483] 许多眼科疾病，尤其是具有血管发生成分眼科疾病都可以用本发明治疗。例如，如下所述，眼新血管疾病、与年龄相关的黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、早产儿视网膜病变、角膜移植排斥、新血管性青光眼、晶体后纤维增生症和其他与角膜新血管生成或视网膜/脉络膜新血管生成相关的疾病。

[0484] 本发明的治疗剂由此可以有利的用于制备适合作为眼科用液使用的药物组合物，包括玻璃体内和/或眼房内（intracameral）施用的眼科用液。为了治疗任何上述或其他疾病，以按照传统制药学实践（参阅例如《雷明顿制药科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)，第15版，第1488－1501页(Mack出版公司，Easton，PA)）制成的眼科制剂形式将治疗剂施用于需要治疗的个体的眼部。

[0485] 眼科制剂在制药学可接受的溶液、悬浮液或油膏中含有治疗剂，其浓度为大约0.01－大约1%（重量百分比），优选大约0.05－大约0.5%。根据采用的具体化合物、待治疗个体的状况诸如此类，可能需要改变浓度。负责治疗的人员将为该个体确定最适浓度。眼科制剂通常优选无菌水性溶液的形式，如果需要，还可以包含额外成分，例如防腐剂、缓冲液、张力剂、抗氧化剂和稳定剂、非离子型湿润剂或澄清剂、增稠剂等等。

[0486] 适用于这种溶液的防腐剂包括苯扎氯铵、苄索氯铵、三氯叔丁醇、硫柳汞等等。合适的缓冲液包括硼酸、碳酸氢钠和碳酸氢钾、硼酸钠和硼酸钾、碳酸钠和碳酸钾、醋酸钠、磷酸氢钠、等等，其量足以将pH维持在大约pH6－pH8，优选大约pH7－pH7.5。合适的张力剂是右旋 糖酐40、右旋糖酐70、右旋糖、甘油、氯化钾、丙二醇、氯化钠、等等，使得眼科用液的氯化钠当量为0.9±0.2%。

[0487] 合适的抗氧化剂和稳定剂包括亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、硫代亚硫酸钠、硫脲等等。合适的湿润剂和澄清剂包括聚山梨酯80、聚山梨酯20、泊洛沙姆282和泰洛沙泊。合适的增稠剂包括右旋糖酐40、右旋糖酐70、明胶、甘油、羟乙基纤维素、羟甲基丙基纤维素、羊毛脂、甲基纤维素、凡士林、聚乙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素等等。眼科制剂将通过传统方法局部施用于需要治疗的个体的眼部，例如以滴液的形式或以眼科用液洗眼。

[0488] H5. 局部制剂

[0489] 在最广的意义上，局部施用制剂包括用于经口（口腔）和经皮肤递送的制剂。“局部递送系统”还包括含待施用成分的透皮贴剂。如果需要，还可以通过离子电渗或电转移来实现经皮肤的递送。

[0490] 适用于口局部施用的制剂包括在调味基质（通常是蔗糖与阿拉伯胶或黄芪胶）中包含活性成分的锭剂、在惰性基质（诸如明胶与甘油或蔗糖与阿拉伯胶）中包含活性成分的软锭剂、和在合适液态载体中包含待施用成分的漱口剂。

[0491] 适用于皮肤局部施用的皮肤包括在制药学可接受载体中包含待施用成分的油膏、

打印ID7584222 Pg 63

乳膏、凝胶和糊剂。正如本领域众所周知的，用于局部施用的治疗剂的制剂，诸如乳膏、油膏和凝胶，包括油质或水溶性油膏基底的制剂。例如，这些组合物可以包含植物油、动物脂肪、和更优选的得自石油的半固体碳氢化合物。所用具体成分可以包括白色油膏、黄色油膏、十六烷基酯蜡、油酸、橄榄油、石蜡、凡士林、白色凡士林、鲸蜡、甘油淀粉、白蜡、黄蜡、羊毛脂、无水羊毛脂和甘油单硬脂酸酯。还可以使用各种水溶性油膏基底，包括乙二醇醚及其衍生物、聚乙二醇、硬脂酸 40 聚烃氧基酯和聚山梨酯。

[0492] 用于直肠施用的制剂可以是在合适基底中包含例如可可脂或水杨酸酯的栓剂。适用于阴道施用的制剂可以是除了活性成分之外还包含 本领域已知的适当载体的阴道栓剂、塞子、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾剂制剂。

[0493] H6. 鼻科制剂

[0494] 经鼻和呼吸路径的局部递送可用于治疗各种状况，尤其是用于本发明的抗病毒治疗法中。这些递送路径还适用于将药剂递送到系统循环中。本发明因此包括在适用于鼻施用的载体中包含活性成分的制剂，例如鼻科用液、喷雾剂、气雾剂和吸入剂。当载体是固体时，制剂包括具有 20 — 500 微米颗粒大小的粗粉，当施用时，将装有粉末的容器置于鼻下由鼻孔快速吸入。

[0495] 载体是液体的合适制剂可用于鼻施用。鼻科用液常常是设计并制备成滴液或喷雾剂、经鼻孔施用的水性溶液，它们在许多方面与鼻分泌物相似，使得能够维持正常的纤毛作用。由此，水性鼻科用液通常是等渗并略有缓冲的，维持于 pH5.5 — 6.5。另外，如果需要，制剂中可以包含与用于眼科制剂相似的抗微生物防腐剂和合适的药物稳定剂。已知多种商品化的鼻科制剂，包括例如抗生素和抗组胺剂，并用于预防哮喘。

[0496] 吸入剂是设计用于将药物或化合物递送至患者呼吸树的药物制剂。施用水汽或水雾并使之到达受疾病侵袭区域。此路径还可用于将药剂递送至系统循环中。可以通过鼻或口呼吸路径施用吸入剂。只有当小液滴足够细小且大小均一从而水雾能够到达细支气管时，吸入液的施用才会有效。

[0497] 同样称为吸入剂、有时称为吹入剂的另一组产品包含精细粉状或液体药物，它由特殊递送系统（诸如在液化气体推进剂中包含药物溶液或悬浮液的药物气雾剂）携带进入呼吸通路。当经合适阀门和口接管释放时，将计量剂量的吸入剂推进到患者呼吸道中。颗粒大小在这种类型制剂的施用中特别重要。据报导，渗透进入肺腔的最佳颗粒大小范围为 0.5 — 7μm。通过对气雾剂增压而产生精细水雾，由此使其应用具有上述优点。

[0498] I. 结合、功能和筛选测定法

[0499] 本发明不但在动物和人的治疗方案中具有显著效用，而且它还具有许多其他特殊和可靠的用途，包括在许多体外方案中的实际应用。某些应用涉及构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体的特异性结合特性。由于本发明的所有构建体都包含至少一种可结合 PS 或阴离子磷脂的蛋白质或肽成分，因此事实上它们可用于多种结合方案中，包括有用的结合测定法。

[0500] 尽管相关时存在的 Fc 区或所附着的试剂提供了有益特性，但是不否定第一种区域在任何结合测定法中的效用。因此，适用的结合测定法包括常常被本领域所采用的方法，诸如免疫印迹、Western 印迹、点印迹、RIA、ELISA、免疫组织化学、荧光激活细胞分拣术 (FACS)、免疫沉淀、亲和层析、等等，本文对此有进一步描述。

[0501] 某些标准结合测定法将抗原固定在固体支持物基质，如硝酸纤维素、尼龙或其组

打印ID7584222 Pg 64

合上，诸如免疫印迹、Western 印迹、ELISA 和相关测定法。其他的重要检测法是那些利用细胞的检测法，其中本发明的组分可用于检测在细胞表面具有 PS 或阴离子磷脂的细胞。这些测定法可用于临床前检测，如，关于药物的设计、检测作用机制和 / 或选择联合使用的治疗剂。

[0502] 其他的体外检测法可用于诊断与异常细胞活化和 / 或凋亡相关的疾病，其中检测 PS 或阴离子磷脂在细胞表面的存在尤其有用。本发明的构建体还可在免疫组织化学中与新鲜冷冻的和福尔马林固定、石蜡包埋的组织块相结合使用；用于荧光激活的细胞分拣术、流式细胞计或流式显微荧光测定法中。

[0503] 本发明的构建体还可进一步用于免疫沉淀，用于抗原纯化实施方案，例如亲和层析，和用于本领域技术人员根据本文提供的信息将了解的其他结合测定法。

[0504] 本发明的其他实际用途是在功能测定法中作为对照，包括许多体外和离体测定法和系统。按本文所公布的，由于本发明构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体的结合和功能特性特别有特异性，因此这种“对照”用途事实上极有价值。受益于本发明的这种实际用途的测定法包括例如关注于检测在细胞表面的 PS 或阴离子磷脂的测定法。

[0505] 这些测定系统还可以发展成体外或离体药物筛选测定法，其中本发明提供的具有详细描述特性的生物学物质特别重要。例如，在药物筛选和开发中，利用本发明的构建体作为阳性对照选择具有类似、同等或改良结合特性的小分子。

[0506] 本发明的结合测定法和系统还可以发展成体外或离体药物筛选测定法，其中本发明提供的具有详细描述特性的生物学物质特别重要。例如，在药物筛选和开发中，利用本发明的构建体作为阳性对照选择具有类似、同等或改良结合特性的小分子。

[0507] J. 诊断和治疗药剂盒

[0508] 本发明还提供了包含至少第一种本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体的诊断和治疗药剂盒，可用于治疗方法、组合型治疗方法和 / 或用于成像和治疗实施方案中。这些药剂盒通常在至少第一种合适的容器（或容器装置）中包含至少一种本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体的制药学可接受制剂。药剂盒还包含书面或电子版的说明书，用于如临床前、临床和 / 或畜兽医实施方案中。

[0509] 药剂盒还可以包含用于联合疗法和 / 或诊断 / 成像的其他组合物、制药学可接受制剂和第二生物学和治疗剂。例如，这些药剂盒可以包含任何一种或多种化疗或放疗药物、抗血管发生剂、抗肿瘤细胞抗体、抗肿瘤血管系统或抗肿瘤基质的抗体、免疫毒素或凝血配体、抗病毒剂和 / 或诊断性组分或药剂。还可包括用于组合疗法和 / 或诊断和成像的书面或电子版说明书。

[0510] 药剂盒中可以只有单一容器（容器装置），其中装有所述第一种构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体，含或不含其他成分；或者，药剂盒中可以有不同容器，其中各装有所需药剂。当提供联合治疗剂时，可以以等摩尔或一种成分过量的联合方式预先混和单一溶液；或者，可以 在施用于患者前，在不同容器中分开保存药剂盒中本发明的主要治疗剂和第二种生物活性剂或治疗剂，诸如第二抗癌剂或抗病毒剂。

[0511] 诊断组分最通常保存于至少第二种容器中，其区别于含所述一种或多种治疗剂的其他容器或第一种容器。诊断药剂盒可以包含可结合 PS 的经标记的抗体或肽，或适于诊断待治疗疾病的任何其他试剂。药剂盒中可包括体内或体外使用的诊断剂，或者二者兼之。药

打印ID7584222 Pg 65

剂盒可包括书面或电子版的说明书，用于如临床前、临床和 / 或兽医诊断实施方案中。

[0512] 为了进行体外免疫检测，构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体也可以与诸如微量滴定板的孔等的固体支持物结合。免疫检测药剂盒优选包含至少第一种免疫检测剂。药剂盒的免疫检测剂可以采取多种形式中的任一种，包括那些与给定抗体相关或连接的可检测标记，诸如体内使用的标记。还包括与第二种结合性配体联接或附着的可检测标记。典型的第二种配体是那些与第一种抗体具有结合亲和力的二抗。

[0513] 另外合适的用于本发明药剂盒的免疫检测剂包括含有与第一种抗体具有结合亲和力的二抗以及与第二种抗体具有结合亲和力的第三种抗体的双组分试剂，第三种抗体与可检测标记连接。许多典型的标记是本领域已知的且可与本发明联合应用。这些药剂盒可以包含完全缀合形式、中间态形式或作为分离部分由药剂盒使用者缀合的抗体 - 标记缀合物。成像药剂盒优选包含已与体内可检测标记附着的靶向剂或抗体。不过，标记和附着方式可以分开应用。

[0514] 任一种形式的诊断药剂盒都可进一步包含对照药剂，诸如适当分装的生物学组合物，无论是标记的还是未标记的，如在制作检测试验的标准曲线即会用到。药剂盒的组分可以以水溶液或冻干形式包装。

[0515] 当以一种或多种液态溶液提供药剂盒成分时，液态溶液优选水性溶液，特别优选无菌水性溶液。但是，也可以以干粉形式提供药剂盒成分。当以干粉形式提供药剂或成分时，可以通过向干粉中加入合适溶剂来进行重建。还可以在药剂盒内的其他容器中提供溶剂。

[0516] 诊断和治疗药剂盒的容器通常包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、 玻璃瓶、注射器或其他容器或容器装置，其中装有治疗剂和任何其他所需试剂，且优选适当分装。当优选至少两种分离的组分时，药剂盒将优选包括至少两个这样的容器。药剂盒还可以包含第三种 / 第四种容器装置，用来包装制药学可接受的无菌缓冲液或其他稀释剂。

[0517] 药剂盒还可以包含对动物或患者施用治疗剂的装置，如一套或多套针头或注射器、眼滴瓶、取液器或其他这类装置，由此将制剂注射到动物体内或应用于体内患病区域。本发明的药剂盒通常还包含装这些小瓶等和其他成分以供出售的密封装置，例如注射或吹制成型的塑料容器，其中装有所需小瓶和其他装置。

[0518] K. 免疫检测和成像

[0519] 本发明还提供了供体外和体内使用的诊断和成像方法。这些方法可用于获得诊断、预后和 / 或成像信息，例如与血管发生疾病和病毒感染相关的信息，优选与肿瘤治疗和成像方法相关的信息。本发明的方法包括体外诊断试验，如在可以非侵入方式获得样品并优选在高通量测定法中进行检验时，和 / 或临床诊断不明且需要确认时即如此。在体内诊断和成像领域内，本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体与一种或多种可检测药剂连接并用于形成血管发生位点或肿瘤的图像，任选这作为治疗前的第一步进行。

[0520] K1. 免疫检测方法和药剂盒

[0521] 本发明因此涉及用于结合、纯化、定量或一般性检测 PS 和阴离子磷脂的免疫检测方法，如用于诊断活化的和凋亡的细胞以及相关疾病。本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体可用于在体内、在分离的组织样品、活组织样品或拭子中和 / 或在匀浆组织样品中检测 PS 和阴离子磷脂（见下文）。这些免疫检测方法具有明显的诊断效用，而且还可用于

打印ID7584222 Pg 66

非临床样品，例如抗原样品的滴定等。

[0522] 诸如 Nakamura 等人（1987，特别引入本文作为参考）等科学文献已经描述了各种有用的免疫检测方法的步骤。免疫结合方法通常包括：获得怀疑含有 PS 或阴离子磷脂的样品，优选怀疑在细胞表面有 PS 的细胞，并在能够有效形成免疫复合物的条件下使样品接触本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体。然后检测在结合作用期间形成的任何免疫复合物并优选进行定量。

[0523] 被分析的样品可以是细胞样品，例如在实验室中暴露于一定检测条件下的细胞。样品还可以是来自动物或患者，如怀疑患有与一种或多种细胞类型的活化或凋亡相关的疾病的动物或患者的生物学样品。这些样品可以是组织切片或标本、活检组织样品、待测样品式子或涂片、匀浆组织提取物或者其分离的或纯化的形式。

[0524] 在能够形成免疫复合物（初级免疫复合物）的有效条件和足够时间下使选定的生物学样品接触构建体、受体－抗体或 β－抗体，通常也就是简单地向样品中加入构建体、受体－抗体或 β－抗体，并且将混合物孵育足够长的时间以使所述构建体、受体－抗体或 β－抗体能够形成免疫复合物（即结合存在的任何 PS 或阴离子磷脂）。而此后，通常清洗样品组合物，诸如组织切片或 ELISA 板，从而除去任何非特异性结合的种类，使得只能检测到初级免疫复合物中特异性结合的那些。

[0525] 本领域众所周知免疫复合物形成的检测，而且可以通过多种方法来实现。这些方法通常基于标志或标记物的检测，诸如本领域已知的放射性、荧光、生物学或酶学标签或标记。涉及这些标记物应用的美国专利包括 3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149 和 4,366,241（引入本文作为参考）。通常优选使用在接触显色底物后产生有色产物的酶。正如本领域知道的，也可以使用第二种结合性配体，诸如二抗或生物素／抗生物素蛋白配体结合组。

[0526] 在检测中采用的构建体、受体－抗体或 β－抗体自身可以连接可检测标记物，然后可以通过简单的检测这种标记物来测定组合物中初级免疫复合物的量。

[0527] 优选通过使用对本发明构建体、受体－抗体或 β－抗体具有结合亲和力的第二种结合性配体的方法来检测初级免疫复合物。在这些情况 中，第二种结合性配体可以连接可检测标记物。第二种结合性配体自身常常是抗体，因此可以称为“二抗”。在能够形成次级免疫复合物的有效条件和足够时间下，使初级免疫复合物接触经标记的第二种结合性配体或抗体。然后通常清洗次级免疫复合物以除去任何非特异性结合的经标记的第二种抗体或配体，并检测次级免疫复合物中的剩余标记。

[0528] 其他方法包括通过两步法来检测初级免疫复合物。如上所述，使用对一抗具有结合亲和力的第二种结合性配体（诸如抗体）来形成次级免疫复合物。清洗后，再次在能够形成免疫复合物（三级免疫复合物）的有效条件和足够时间下，使次级免疫复合物接触对二抗具有结合亲和力的第三种结合性配体或抗体。第三种配体或抗体连接了可检测标记物，能够检测由此形成的三级免疫复合物。如果需要，该系统可以提供信号放大。

[0529] 临床诊断或监测可用于患各种疾病的患者，尤其是与细胞表面上 PS 或阴离子磷脂暴露增加相关的疾病。PS 或阴离子磷脂的检测，或与来自正常受试者的相应生物学样品中的水平相比较而言的 PS 或阴离子磷脂水平的增加，是患所述疾病的患者的指标。

[0530] 但是，正如本领域技术人员所知道的，不能孤立的根据这种方法来进行临床诊断。

打印ID?584222 Pg 67

本领域技术人员非常熟悉任何区分代表阳性鉴定的生物标记的显著表达与生物标记的低水平或背景表达。事实上，常常将背景表达水平作为“临界点”(cut-off)，比它更多的染色将评为显著或阳性。

[0531] K2. 体内成像

[0532] 本发明提供了各种体内诊断和成像的实施方案。本发明的某些方面涉及用于体内诊断和成像的新的和出乎意料地有效的组合物。例如，本发明的构建体、受体－抗体或β－抗体可以与体内可检测试剂连接而形成本发明的免疫诊断缀合物。所产生的免疫诊断剂现在可用于前述的与PS或阴离子磷脂检测相关的诊断或成像实施方案中。

[0533] 在这点上，含本发明构建体、受体－抗体或β－抗体的免疫诊断剂可用于血管血栓形成的成像，尤其是在心脏内或心脏附近，诸如深静脉血栓症、肺栓塞、心肌梗死、心房颤动、与修复性心血管材料有关的问题、中风，等等。本发明的这些组合物还可用于活化血小板的成像，如在诸如脓肿、再狭窄、关节发炎和止血失调，例如动脉、冠脉、静脉和脑血栓症等等。本发明的免疫诊断组合物还可用于检测凋亡细胞中，正如可用于其中增加了凋亡或发生了不适当凋亡的各种疾病的诊断和成像中一样。

[0534] 本发明的体内成像组合物和方法可用于成像本身，或在体内对位点预成像以便在治疗前形成可靠的图像。优选成像是肿瘤成像。这些组合物和方法还可应用于与PS和阴离子磷脂相关的其他疾病或病症的成像和诊断，这样的病症涉及细胞活化和/或凋亡，包括血管发生疾病、动脉硬化症、病毒感染和为诊断或预后目的或者为了设计治疗而期望获得内部影像的其他这样的状况。

[0535] 在这些实施方案中，将本发明的构建体、受体－抗体或β－抗体可操作性地附着、连接或缀合至可检测标记。“可检测标记”指能够根据其特定功能特性或化学特征而进行检测的化合物或元素，利用它能够检测出所附着的成分，如果需要，还可以进一步量化。在用于体内诊断方案或“成像方法”的缀合物中，可以使用非侵入式方法来检测所述标记。

[0536] 本领域知道许多适当的成像剂，以及将它们附着于结合性配体的方法（参阅如美国专利5,021,236和4,472,509，引入本文作为参考）。某些附着方法涉及使用金属螯合复合物，其中将例如有机螯合剂（诸如DTPA）附着于抗体上（美国专利4,472,509）。在存在偶联剂（诸如戊二醛或高碘酸盐）时，也可以使单克隆抗体与酶发生反应。在存在这些偶联剂时，或者通过与异硫氰酸酯的反应，可以制备包含荧光素标记物的缀合物。

[0537] 可检测标记物的范例是顺磁离子。在这种情况中，合适的离子包括铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钕(III)、钐(III)、镱(III)、钆(III)、钒(II)、铽(III)、镝(III)、钬(III)和铒(III)，特别优选的是钆。

[0538] 可用于其他情况（诸如X射线成像）的离子包括（但不限于）镧(III)、金(III)、铅(II)，特别是铋(III)。荧光标记包括罗丹明、荧光素和renographin。常常经异硫氰酸酯中间介质来连接罗丹明和荧光素。

[0539] 在用于诊断性应用的放射性同位素的情况中，合适的范例包括^{14}碳、^{51}铬、^{36}氯、^{57}钴、^{58}钴、铜^{67}、^{152}铕、镓^{67}、^{3}氢、碘^{123}、碘^{125}、碘^{131}、铟^{111}、^{59}铁、^{32}磷、铼^{186}、铼^{188}、^{75}硒、^{35}硫、锝^{99m}和钇^{90}。^{125}I常常优选用于某些实施方案，而锝^{99m}和铟^{111}因它们的低能量和适于长期检测也常常是优选的。

[0540] 可以参照本领域众所周知的方法产生用于本发明的经放射性标记的构建体、受

打印ID7584222 Pg 68

体－抗体或 β－抗体。例如，常用于使放射性同位素金属离子结合在抗体上的中介官能基是二乙撑三胺五乙酸 (DTPA) 和乙二胺四乙酸 (EDTA)。

[0541] 也可以通过接触碘化钠或碘化钾与化学氧化剂（诸如次氯酸钠）或酶氧化剂（诸如乳过氧化物酶）使构建体、受体－抗体或 β－抗体碘化。可以通过配体交换方法用锝 ^{99} 标记本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体，例如，通过用亚锡溶液还原过锝酸盐，将还原的锝螯合到 Sephadex 柱上，并将抗体应用于该柱直接标记技术也是合适的，如将过锝酸盐、还原剂（例如 $SNCl_2$）、缓冲液（诸如邻苯二甲酸钠钾溶液）与抗体一起孵育。

[0542] 任何前述类型的经可检测地标记的结合性配体都可用于本发明的成像方面，其或者仅仅用于成像或者用于在治疗前形成疾病位点或肿瘤的图像。无论走任一途径，所述的方法通常包括对动物或患者施用诊断有效量的与以非侵入方法可检测的标记物相缀合的构建体、受体－抗体或 β－抗体。允许所述结合性配体－标记物缀合物有足够时间定位并结合于发病部位（诸如肿瘤或肿瘤血管）中表达 PS 或阴离子磷脂的细胞。然后将患者暴露于检测装置中以鉴别可检测标记，由此形成发 病部位或肿瘤的图像。

[0543] 用核磁成像装置检测诸如钆等核磁共振同位素；用 γ 闪烁相机或检测仪检测诸如锝 ^{99m} 或铟 ^{111} 等放射性物质。为了提供更多的有关可检测标记构建体安全有效进入受试者血液的指导以及用例如 γ 闪烁相机或磁共振检测法体外测定可检测标记的药剂分布的方法，我们将美国专利 5,627,036 也特别引入本文作为参考。

[0544] 用于成像实施方案的剂量通常小于治疗的剂量，但也取决于患者的年龄和体重。每个患者一次剂量为约 0.1mg、0.5mg 或约 1mg 到约 9mg 或 10mg，更优选在约 1mg 到约 5－10mg 之间的抗体或结合性配体缀合物被认为是有用的。

[0545] K3. 用于癌症治疗的替代标记物

[0546] 关于体内诊断和成像，本发明进一步提供了用作癌症治疗替代标记的组合物和使用方法。这样的实施方案涉及使用与体内可检测试剂连接的本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体。

[0547] 目前使用的许多抗癌疗法诱发了凋亡和坏死。阴离子磷脂，尤其是PS，是凋亡前和凋亡细胞的标志物。因此，利用合适的构建体、受体－抗体或 β－抗体进行成像可以用来鉴定凋亡前和凋亡细胞并由此提供有关治疗进展的信息。用于本文时，这是“用于癌症治疗的替代标记物”的含义。

[0548] 利用本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体作为替代标记物对于癌症治疗尤其有利。例如，鉴定凋亡前细胞的能力尤其有好处。该特异性还将为内科医师提供更有意义的图像数据。此外，该安全特性是令人印象深刻的且优越于膜联蛋白，例如，膜联蛋白具有与凝血有关的缺点。

[0549] 因此，上述任何体内诊断和成像方法都可能适于作为替代标记物用于癌症治疗的预后中，仅仅施用于接受癌症治疗的患者中即可。

[0550] L. 肿瘤治疗

[0551] 本发明的重要方面涉及恶性肿瘤、肿瘤和血管化肿瘤的治疗。这包括血管发生有或多或少重要性的肿瘤和具有前血栓性血管的肿瘤。良性肿瘤的治疗也包括于本发明中，诸如听神经瘤、纤维神经瘤、沙眼、化脓性肉芽肿和 BPH。血液肿瘤的治疗也涵盖在内，诸如白血病和各种急性或慢性骨髓瘤疾病。

打印ID7584222 Pg 69

[0552] 本发明可广泛的用于治疗任何恶性肿瘤，无论该肿瘤是否具有血管组分。可治疗的肿瘤包括实体瘤，尤其是癌，它需要血管成分来提供氧气和营养。典型的可用本发明治疗的实体瘤包括，但不局限于，肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、胰腺癌、喉癌、食道癌、睾丸癌、肝癌、腮腺癌、胆道癌、结肠癌、直肠癌、子宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、甲状腺癌、鳞状上皮细胞癌、腺癌、小细胞癌、恶性黑素瘤、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤等等。

[0553] 本发明被包括用于治疗任何患实体瘤的患者。一般而言，本发明可用于治疗所有尺寸的肿瘤，包括约 0.3-0.5cm 和更大的肿瘤以及大于 0.5cm 的肿瘤，所患肿瘤在约 1.0 和约 2.0cm 大小之间的患者，也可以治疗人体中已发现的最大的肿瘤。

[0554] 尽管本发明通常并不意图用作防护性的或预防性的疗法，但本发明的使用当然不局限于治疗患中等大小或大肿瘤的患者。造成本发明的这些方面是有许多原因的。例如，呈现中等大小或更大原发肿瘤的患者还可能具有被认为小尺寸或甚至在转移性肿瘤萌芽早期的各种转移性肿瘤。既然本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体通常施用入患者的全身循环中，它们将自然对次级的、较小的和转移性肿瘤具有效用，尽管这可能不是治疗的最初目的。此外，即使在肿瘤块整体是一单一的小肿瘤的情况下，使用本发明的疗法也将产生某些有利的抗肿瘤效果。

[0555] 本文提供的关于使用本发明治疗更合适的患者的指导意欲指出，某些患者特征可能有助于选择可用本发明治疗的患者。预先选择某些患者，或将患者分类，并不否定本发明可用于治疗患癌症的所有患者。 进一步考虑的事实是本发明抗体疗法对肿瘤的攻击可能使肿瘤易于接受进一步的治疗，从而使随后的治疗导致全面协同效果或甚至导致完全消除或治愈。

[0556] 不认为任何特定类型的肿瘤应当排除在本发明治疗以外。但是，肿瘤细胞的类型可能与本发明与其他治疗剂、特别是化疗剂和抗肿瘤细胞免疫毒素的联合使用有关。由于本发明在其作用模式内包括肿瘤血管系统的靶向和破坏，并且所有实体瘤中的血管系统基本上或完全相同，所以可以理解，本发明方法学广泛或完全适用于治疗所有实体瘤，无论肿瘤细胞自身是哪种特定的表型或基因型。本文所呈现的结果是引人注目的，由于它在多种不同肿瘤模型中都显示了不寻常的结果。

[0557] 使用来自动物模型的资料，如本文详细显示的研究，以及一系列治疗剂的临床使用资料，可以容易的确定治疗有效剂量。在转换成临床环境之前，常常用携有实体瘤的实验动物来优化合适的治疗剂量。已知这些模型能够很可靠的预测有效的抗癌策略。例如，携有实体瘤的小鼠（例如实施例中使用的）被广泛用于临床前检验。发明人已经使用了这样的本领域认可的小鼠模型来确定治疗剂给出有益抗肿瘤效果而毒性最低的工作范围。

[0558] 就肿瘤疗法而言，在考虑到与本发明整体有关的使用安全优势之时，也可以参考关于成功使用其他抗血管疗法的科学和专利文献。作为例示，美国专利 5,855,866、5,877,289、5,965,132、6,051,230、6,004,555、5,776,427、6,004,554、6,036,955 和 6,093,399 在此引入作为参考，以便进一步描述所说治疗剂也可如同本发明中的其他药剂一样应用。美国专利 6,312,694、6,783,760、6,818,213 和 6,406,693 也特别引入本文作为参考，以指导用未缀合的抗 PS 抗体及相关免疫缀合物进行治疗的方法和剂量。

[0559] 正如本领域知道的，有一些现时目标可以作为进行临床治疗前的临床前检验中的

打印ID7584222 Pg 70

指导方针。然而，由于在已认可模型中已证明的安全性，本发明的临床前试验将更倾向于最优化，而不仅仅是证实效力。 因此，临床前检验可用于选择最有利的抗体、剂量或组合。

[0560] 导致任何一致性可检测抗肿瘤效果，包括可检测的肿瘤血管退化、肿瘤血栓症和/或破坏和肿瘤坏死的任何制剂、组合方法或药物都将成为有用的发明。退化、血栓、破坏和坏死效果优选应在约 10％到约 40 － 50％之间的肿瘤血管和肿瘤组织中观察到，甚至在多达约 50％ - 约 99％的肿瘤血管和肿瘤组织中可观察到所说的效果。本发明还对肿瘤下游的脉管有效，即靶向至少一类引流脉管，特别是当由肿瘤释放的细胞因子作用于这些脉管，改变它们的抗原特性时。

[0561] 还可以理解的是，甚至在治疗的抗肿瘤效果为预定治疗范围低端值的情况下，与特定肿瘤靶有关的其他已知疗法相比，这种疗法仍然可能同样甚至更加有效。不幸的是，临床医生知道某些肿瘤不能在中期或长期中获得有效治疗，但是这并不否定本发明疗法的有效性，当它与通常建议的其他策略至少大致一样有效时尤其如此。

[0562] 在为治疗血管化肿瘤设计构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体的适当剂量时，可以容易的由本文所述动物研究进行外推，从而获得临床施用的适当剂量。为了实现这一转变，需要考虑对单位质量的实验动物所施用的药剂量，优选考虑实验动物与人患者之间的体表面积差异。所有这些计算对于本领域普通技术人员而言是众所周知的，而且是常规的。

[0563] 例如，采用小鼠研究中治疗剂的成功剂量，并通过应用基于质量和表面积的标准计算，将得出活性剂用于人患者的有效剂量是每个患者大约 1mg －大约 500mg 抗体，优选大约 10mg －大约 100mg 抗体。

[0564] 由此，根据这一信息，发明人预计施用于人的有用低剂量将是大约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 或 30mg/ 个患者；施用于人的有用高剂量将是每个患者大约 250、275、300、325、350、375、400、425、450、475 或约 500mg 左右。施用于人的有用中间剂量被认为是每个患者大约 35、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200 或大约 225mg 左右。一般而言，优选剂量范围是每个患者约 5-100mg、约 10-80mg、约 20-70mg、约 25-60mg 或约 30-50mg。不过，也 可以考虑使用任何前述示范性剂量的任何特殊剂量范围或在特别提及的范围间的任何有效中间剂量。

[0565] 无所谓提及的范围，应当理解，根据给定的参数和本文所提出的详细指导，活性或最佳范围内进一步的变化都将涵盖于本发明内。因此，可以理解，较低剂量更适于与其他药剂联合，高剂量仍然可以耐受，由于本发明构建体的安全性获得增强，因此更是如此。人构建体以及人效应物的应用使得本发明在临床应用中甚至更安全，可进一步降低在健康组织中产生显著毒性或副作用的机会。

[0566] 本发明治疗方案的目的通常是产生显著的抗肿瘤效果，同时将剂量维持在与不可接受的毒性相关的水平以下。除了改变剂量本身以外，还可以改变施用方案以优化治疗策略。目前优选的治疗策略是施用约 1-500mg，优选约 10-100mg 的抗体或含有它们的治疗剂混合物，在约 7 天期间施用约 3 次。例如，可以在约第 1 天、第 3 或 4 天和第 6 或 7 天给药。

[0567] 在施用特定剂量本身时，优选给患者全身性提供制药学可接受的组合物（符合 FDA 关于无菌、致热性、纯度和全面安全性的标准）。通常优选静脉内注射，最优选在大约 1 或 2 小时左右的时间内进行连续灌注。尽管在使用本发明进行治疗前不需要测定所说的参数，应当提及本文所详述的这些研究在注射约 12 － 24 小时内在实体瘤血管内特异观察到

打印ID7584222 Pg 71

了至少一些血栓形成，且肿瘤细胞本身在约 24 － 72 小时内开始死亡。在紧接着的约 48 － 96 小时内通常观察到普遍的肿瘤坏死，观察到多达 60％、甚至多于 60％的肿瘤坏死。

[0568] 自然，在广泛应用前需要进行临床试验。本领域技术人员参照本公开书将知道进行临床试验的多种要素。提供下列资料作为建立这些试验的一般性指导。

[0569] 选择用于第一种治疗研究的患者应是对至少一个疗程的常规疗法没有应答，而且通过体格检查、实验室技术和 / 或放射显影方法测定出该患者患有客观的可测量疾病。在开始研究前 2 周应当停止任何化疗。当使用鼠单克隆抗体或抗体部分时，患者应当对小鼠免疫球蛋白没有变态反应史。

[0570] 发现使用具有三联腔门的内置式中枢静脉导管具有某些优点。应当使用例如 0.22μm 的滤器过滤治疗剂，并用诸如生理盐水适当稀释至终体积 100ml。使用前，也应当以相似方式过滤待测样品，过滤之前和之后通过测定 A_{280} 评估其浓度。预计回收率应当在 87％－ 99％范围内，然后可以根据蛋白质的损失进行调整。

[0571] 构建体可以在大约 4 － 24 小时的时间内施用，每个患者以 2 － 7 天的间隔接受 2 － 4 次输注。也可以在 7 天的时间内以稳定的输液速率施用。输液的剂量水平应当取决于是否观察到任何毒性。因此，如果任何单次输液后或稳定速率输液的特定时间点达到 II 级毒性，那么应当停止进一步的给药或停止稳定速率输液，直至毒性改善为止。应当将增加的剂量施用于患者组直至任一组中大约 60％的患者显示不可接受的 III 级或 IV 级毒性。将该值 2/3 的剂量确定为安全剂量。

[0572] 当然，治疗之前和治疗后每隔不超过 1 个月应当进行体格检查、肿瘤测量和实验室检验。实验室检验应当包括全血计数、血清肌酸酐、肌酸激酶、电解质、脲、氮、SGOT、胆红素、白蛋白和总血清蛋白。应当通过放射免疫测定法评价治疗后长达 60 天取的血清样品中所施用的构建体和针对其任何部分的抗体的存在情况。使用任何标准测定法（例如 ELISA 或 RIA）对血清进行的免疫学分析，能够评价治疗剂的药代动力学和清除情况。

[0573] 为了评价抗肿瘤应答，应当在最后一次输注后 48 小时－ 1 周内和第 30 天检查患者。当存在可触知的疾病时，应当在治疗过程中的每一天、治疗完成后的 1 周内和第 30 天测定所有肿瘤块的两个正交直径。为了测量不可触知的疾病，应当在 48 小时－ 1 周内和第 30 天，遍及胸、腹和骨盆以 1cm 为间隔进行系列 CT 扫描。还应当使用疾病位点活组织切片或适当时使用血液或流体样品，在组织学上和 / 或通过流式细胞术评价组织样品。

[0574] 可以通过可接受的测量来确定临床应答。例如，治疗后 1 个月所有可测量肿瘤消失可以确定为完全应答。而治疗后 1 个月所有可评估的肿瘤结的正交直径乘积的总和降低 50％或更多，并且无肿瘤位点显示增 大，可以确定为部分应答。相似的，治疗后 1 个月所有可测量病变的正交直径乘积减少 50％或更多，并且一个或多个位点发生恶化，可以确定为混合应答。

[0575] 根据来自临床试验的结果（诸如上文所述），可以设计甚至更精确的治疗方案。虽然如此，根据治疗个体的状况，后来可能必须对剂量做一些改变。负责施用的医师参照本公开书将能够为各个受试者确定适当剂量。这些优化和调整在本领域是常规的，绝非反映需要过多实验。

[0576] M. 组合肿瘤疗法

[0577] 本发明的治疗方法可以与常用于治疗患者展示的特定肿瘤、疾病或紊乱的任何其

打印ID7584222 Pg 72

他方法结合使用。只要知道特定的治疗方法自身对患者状况无害，且不显著抵消本发明的治疗，那么就可以与本发明联合使用。

[0578] 也考虑组合疗法用于非恶性疾病的治疗。具体的例子是良性前列腺肥大(BPH)，它可以用本领域目前实施的其他疗法联合治疗。例如，将免疫毒素靶向于BPH内定位的标记物，诸如PSA。

[0579] 对于实体瘤的治疗，本发明可以联合经典方法，诸如手术、放疗、化疗、细胞因子疗法、抗血管形成等等。本发明由此提供了联合疗法，即在手术或放疗之前、之时或之后使用构建体、受体－抗体或β－抗体；或者，在传统的化疗、放疗剂、细胞因子、抗血管发生剂、凋亡诱导剂、靶向性免疫毒素或凝血配体等之前、之时或之后对患者进行施用。上文针对本发明缀合物方面描述了合适治疗剂的许多实例。在本发明的组合疗法中，开始被描述用作治疗缀合物一部分的任何药剂也可以分开使用。

[0580] 至于手术，任何手术干预都可以与本发明联合实施。至于放疗，包括用于在肿瘤细胞内局部诱导DNA损伤的任何机制，诸如γ照射、X射线、UV照射、微波和甚至电子发射等。也包括将放射性同位素靶向递送至肿瘤细胞，这可以与靶向抗体或其他靶向方法联合使用。

[0581] 众所周知物质联合在癌症治疗中的一般性应用。例如，美国专利5,710,134(引入本文作为参考)公开了与无毒物质或“药物前体”联合时在肿瘤中诱导坏死的成分。由坏死过程释放的酶切割无毒的“药物前体”变成有毒的“药物”，从而导致肿瘤细胞死亡。同样，美国专利5,747,469(引入本文作为参考)公开了编码p53的病毒载体与DNA破坏剂的联合应用。任何这些相似方法都可用于本发明。

[0582] 当一种或多种药剂与本发明的构建体、受体－抗体或β－抗体联合使用时，不要求联合结果是分开进行每种治疗时观察到的效果的加和。虽然通常希望获得至少加和的效果，但是抗肿瘤效果相对于一种单一疗法有任何增长也是有益的。同样，没有特别要求联合治疗展示协同效果，尽管这当然是可能的且有益的。

[0583] M1. 第二抗癌剂的选择

[0584] 本发明的“主要治疗剂”在用于本文中时，是构建体、受体－抗体或β－抗体或其缀合物。“第二治疗剂”在用于本文时，是另一种不同的治疗剂或抗癌剂，即，“除了”主要治疗剂之外的治疗剂或抗癌剂。任何第二治疗剂都可与本发明的治疗剂联合使用。此外，按照下述说明，可以从达到加和、大于加和和潜在的协同效果的出发点选择第二治疗剂或“第二抗癌剂”。

[0585] 为了实施组合的抗肿瘤治疗，可以只是简单的将本发明的构建体、受体－抗体或β－抗体与其他，即另一种不同的抗癌剂以在动物或患者内有效产生其联合抗肿瘤作用的方式联合施用于动物或患者。因此，可以有效地导致其联合存在于肿瘤或肿瘤血管系统中以及它们在肿瘤环境中的联合作用的量和时间提供所说的药剂。为了达到此目的，可以基本上同时施用本发明的主要治疗剂和不同的第二抗癌剂，它们或者在单一的组合物中，或者作为两种不同的组合物通过不同的途径施用。

[0586] 或者，可在该不同的第二抗癌剂之前或之后施用本发明的构建体、受体－抗体或β－抗体，如间隔数分钟到数周。在本发明的主要治疗剂 和该不同的第二抗癌剂分别施用于动物的某些实施方案中，应保证在各递送的时间之间不花费太多时间，从而使各药剂仍

打印ID?584222 Pg 73

然能够发挥其在肿瘤上的优越组合效果。在这些情况下，预计可以相互间间隔约 5 分钟到约 1 周内用两种药剂接触肿瘤，更优选，相互间间隔约 12 — 72 小时内，最优选的延迟时间是只有约 12 — 48 小时。

[0587] 可基于一定的标准，包括那些下述的标准，选择用于分别定时的组合疗法的第二治疗剂。不过，优选一种或多种不同的第二抗癌剂用于在先或后续给药并不排除在需要时将它们基本上在同一时间施用。

[0588] 选择在本发明主要治疗剂施用“之前”施加且设计成达到增大和潜在协同效应的不同的第二抗癌剂包括在肿瘤血管系统中诱导氨基磷脂或阴离子磷脂表达的活性剂。例如，刺激定位钙产生、激活转移 PS 和其他磷脂至质膜外表面的膜转运蛋白、损伤肿瘤内皮、在肿瘤内皮中引起凋亡前变化和 / 或诱导凋亡的药剂通常将导致氨基磷脂和阴离子磷脂表达增加。这些药剂的例子是多西他赛和紫杉醇。然后可用本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体靶向氨基磷脂和阴离子磷脂，由此扩大了整体治疗效果，还通过宿主效应器（补体、ADCC、抗体介导的吞噬作用、CDC）提高了攻击性。

[0589] 对血管发生、重新塑造或活化的内皮细胞具有选择性的药物，诸如存在于肿瘤血管中，但不存在于正常静息血管中的药物，也可用于选择性的引起 PS 和其他磷脂暴露于肿瘤内皮细胞的表面。这些药剂的例子是考布他汀和多西他赛。这将再次导致增加抗体的结合并增强宿主效应器机制的启动。

[0590] 选择在本发明主要治疗剂施用“之后”给药且设计成达到增大和潜在地协同的效应的不同的第二抗癌剂包括在主要治疗剂效果中受益的药剂。本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体将引起肿瘤破坏。因此，随后施用的有效第二独特抗癌剂包括抗血管发生剂，它抑制转移；靶向于坏死肿瘤细胞的药剂，例如特异于体内恶性细胞上变得易接近的细胞内抗原的抗体（美国专利 5,019,368、4,861,581 和 5,882,626，分别引入本文作为参考）；化疗剂和抗肿瘤细胞免疫缀合物，它们攻 击可存活于外围的任何肿瘤细胞。

[0591] 在有些情况中，当相应施用之间间隔几天（2、3、4、5、6 或 7）、几周（1、2、3、4、5、6、7 或 8）或甚至几月（1、2、3、4、5、6、7 或 8）时，可能需要显著延长治疗时间。这对于其中一种治疗（诸如施用本发明的主要治疗剂）意欲充分破坏肿瘤而另一种治疗（例如施用抗血管发生剂）意欲防止微转移或肿瘤再生长的情况也是有益的。应当注意在手术后一段安全时间施用抗血管发生剂以确保有效的创伤愈合。然后可以在患者的一生中施用抗血管发生剂。

[0592] 也可以预计可不止一次的施用主要治疗剂或该第二独特抗癌剂。主要治疗剂或第二独特抗癌剂可以在不同的日子或星期交替施用；或者先进行一系列的某种药剂的治疗，随后再进行一系列的另一种治疗。在任一种情况下，为了实现肿瘤退化而使用联合疗法的任何情况中，只需要以有效展现抗肿瘤效果的联合量递送两种药剂，而不用管施用的次数。

[0593] 无论是基本上同时施用还是顺序施用，本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体及治疗剂都可与一种或多种化疗剂或药物联合施用。化疗剂可以杀死增殖的肿瘤细胞，增加全面治疗所产生的坏死区。药物由此增强了本发明主要治疗剂的血栓形成作用。

[0594] 大部分癌症化疗剂对于分裂的氧化细胞有选择性。这些药物在组合疗法中是有优势的，因为化疗药物作用于与本发明主要治疗剂不同的靶目标上，产生更全面的抗血管或抗肿瘤效果。例如，化疗剂选择性的对肿瘤外围快速分裂的氧化肿瘤细胞具有活性，而本

打印ID7584222 Pg 74

发明的药剂主要作用于“受压”肿瘤核心中的血管或肿瘤细胞，其中富含活化的反应性氧形式。对肿瘤外围的充分氧化的新生血管具有选择性的抗血管发生药物也可被有效的联合使用，因为本发明的药剂作用于肿瘤核心中相对含氧量低的静息血管。

[0595] 通过诱导肿瘤血管中血栓的形成，本发明的主要治疗剂还可通过在肿瘤内保持或截留药物而增强化疗药物的作用。化疗剂由此被保持在肿瘤内，而药物的其他部分则从肿瘤中清除掉。肿瘤细胞因此在更 高浓度的药物中暴露了更长的时间。药物在肿瘤内的这种截留使得有可能减少药物的剂量，使治疗更安全有效。

[0596] 在本发明中可组合使用的其他药物是作用于因主要治疗剂而对所说药物“致敏”的细胞上的药物，从而减少了达到其抗肿瘤效果所需的第二药物的剂量。例如，这可以在这样的情况下发生，即，第二药物的主要组分作用于肿瘤血管中，且本发明的药剂使细胞对该药物敏感。在本发明的主要治疗剂直接地或者通过刺激细胞因子的释放而使肿瘤细胞对第二药物敏感的情况下也是如此。

[0597] 用于组合疗法的其他适当的第二抗癌剂是进一步增强宿主效应细胞活性的药剂，如通过选择性的抑制免疫系统中免疫抑制组分的活性而起作用的那些。所说的药剂使本发明的主要治疗剂更具有攻击性，作为其治疗机制的一部分它刺激了效应细胞的进攻。这样的药剂的例子是多西他赛。

[0598] 尽管进行本发明不需要了解主要治疗剂的确切作用机制，有关这些机制的资料和合理推论可用于选择联合用于本发明的具体第二抗癌剂。所选组合疗法的效力继而支持了原始资料和推测的作用机制，还确定了进行组合疗法的第二抗癌剂的优选范围。

[0599] 诱导凋亡的药物优选用于组合疗法中。例如，多西他赛通过与微管结合并破坏细胞的有丝分裂而诱发了凋亡以及因此而造成的 PS 暴露 (Hotchkiss 等人，2002)。正如体外 3G4 抗体的强结合所证实的，用亚临床浓度的多西他赛处理内皮细胞（排列于肿瘤血管内）和肿瘤细胞在此显示出诱导了 PS 在细胞表面的表达。

[0600] 正如增加的抗体介导吞噬作用所显示的，本发明的发明者还确定了本发明的抗肿瘤作用包括 Fc 结构域介导的免疫效应物功能的增大。因此，其他的 Fc 结构域介导的功能将会发生，例如 ADCC、CDC、刺激细胞因子的产生以及这样的机制组合。这还涉及多西他赛，因为其他的研究已显示出用多西他赛治疗乳癌患者导致血清中 IFN-γ、IL-2、IL-6 和 GM-CSF 细胞因子水平的增高，通过提高天然杀手细胞 (NK) 和淋巴因子活化杀伤细胞 (LAK) 细胞的活性增强了这些患者中的抗肿瘤免疫 反应 (Tsavaris 等人，2002)。

[0601] 因此，本发明的发明者推断多西他赛诱导了 PS 表达和所施用的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体的结合，还增强了免疫效应物的活性，后者介导了抗肿瘤作用。基于前述考虑，本发明的发明者还证实了在带同位 MDA-MB-435 人乳癌异种移植物的小鼠中将 3G4 抗体与多西他赛结合使用明显优越于单独使用多西他赛或 3G4（实施例 XX）。

[0602] 因此，多西他赛和诱导凋亡的其他化疗剂是优选用于本发明联合疗法中的药剂。将构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体与诸如多西他赛等的诱导凋亡的化疗药物组合将协同攻击肿瘤血管内皮细胞和肿瘤细胞组分，不仅产生了显著增强的治疗效果还降低了毒性。这些组合预计可用于乳癌治疗中，尤其是将利用多西他赛的有规律化学疗法与本发明抗体的组合。

[0603] M2. 内毒素

打印ID7584222 Pg 75

[0604] 内毒素和已解毒的内毒素衍生物可用于组合治疗中，优选低剂量（PCT 公开号 WO 03/028840，特别引入本文作为参考）。有各种已解毒的内毒素可供利用，它们优选用于动物尤其是人中。已解毒并精制的内毒素及其组合参阅美国专利 4,866,034、4,435,386、4,505,899、4,436,727、4,436,728、4,505,900，各特别引入本文作为参考。

[0605] 非毒性衍生物单磷酰脂质 A（monophosphoryl lipid A，MPL）是可用于本发明的解毒内毒素的一个例子。已知 MPL 对人是安全的，使用 MPL 作为佐剂的临床试验显示 100 μg/m^2 对于人体应用是安全的，对于门诊患者也是如此。

[0606] M3. 细胞因子

[0607] 已经证明细胞因子疗法是联合治疗方案的有效配对方法。多种细胞因子可用于这些联合疗法。细胞因子的范例包括 IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、TGF-β、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、TNFα、TNFβ、LAF、TCGF、BCGF、TRF、BAF、BDG、MP、LIF、OSM、TMF、PDGF、IFN-α、IFN-β、IFN-γ。根据与诸如患者状况和细胞因子相对毒性等的临床指征一致的标准方案施用细胞因子。子宫珠蛋白也可用于防止或抑制转移（美国专利 5,696,092，引入本文作为参考）。

[0608] M4. TNFα 和 TNFα 的诱导物

[0609] TNFα 和 TNFα 的诱导物还可与本发明组合使用。TNFα 增加了血管的通透性，并因此可用于促进抗癌剂渗透入肿瘤。正如本发明中所述，尽管当靶向于 PS 和阴离子磷脂时，定位决非问题，但 TNFα 的联合使用促进了其他化疗剂和免疫缀合物到达肿瘤，并甚至增加了本发明抗体与远距离肿瘤细胞的结合。

[0610] 还可使用低水平的内毒素、Rac1 拮抗物，例如减毒的或基因工程化的腺病毒、DMXAA（和 FAA）、CM101 和沙利度胺。Rac1 拮抗物还可用于本发明的组合疗法中，因为每个细胞中约 5000 个 DNA 颗粒引起不依赖于 CD14 的 TNF 上调（Sanlioglu 等人，2001）。CM101、沙利度胺和 DMXAA 还可以标准和减少的剂量用于此处的联合疗法中。

[0611] M5. 化疗

[0612] 无论机制为何，多种化疗剂可用于本文公开的联合治疗方法中。预计可组合应用的化疗剂包括如他莫西芬、红豆杉醇、长春碱、依托泊苷（VP-16）、阿霉素、5-氟尿嘧啶（5FU）、喜树碱、放线菌素 D、丝裂霉素 C、考布他汀，尤其是多西他赛（泰索帝）、顺铂（CDDP）、环磷酰胺、多柔比星、氨甲蝶呤、紫杉醇和长春新碱，以及它们的衍生物和药物前体。

[0613] 本领域普通技术人员可以理解，化疗剂的适当剂量包括化疗剂单独施用或与其他化疗剂联合施用的临床疗法中已采用的剂量。不过，由于本发明提供的优越之处，现在有可能使用较低的剂量。例如，可以使用诸如顺铂等的药剂和其他 DNA 烷基化剂。顺铂被广泛用于治疗癌症，其临床应用的有效剂量为每 3 周 5 天给药 20mg/m^2，共 3 个疗程。顺 铂不能口服吸收，因此必须经静脉内、皮下、肿瘤内或腹膜内注射。

[0614] 其他有用的药剂包括干扰 DNA 复制、有丝分裂、染色体分离和 / 或微管蛋白活性的化合物。这些化疗化合物包括阿霉素（也称为多柔比星）、依托泊苷、维拉帕米、鬼臼毒素、考布他汀等。在广泛用于治疗肿瘤的临床环境中，对于阿霉素而言，以 25-75mg/m^2 的剂量范围，每隔 21 天通过大剂量静脉内注射给药；对于依托泊苷而言，以 35-50mg/m^2 的剂量静脉内给药或以双倍于静脉内剂量的剂量口服。

打印ID7584222 Pg 76

[0615] 也可以使用破坏多核苷酸前体的合成和精确性的药剂。特别有用的是已经过深入检验并容易获得的药剂。例如，致瘤性组织优先使用诸如 5- 氟尿嘧啶 (5FU) 等药剂，使得此药剂对靶向致瘤性细胞特别有用。尽管 5-FU 毒性很大，但它可用于宽范围的载体，包括局部使用，然而，常用剂量范围是 3 — 15mg/kg/ 天的静脉内施用。

[0616] 表 D 列出了在联合疗法中可应用的例示性化疗剂，其中所列的各种药剂仅作为例示而非限制。熟练技术人员可参照《雷明顿制药科学》，第 15 版，第 33 章，特别是第 624 — 652 页。根据治疗对象的病情必需对剂量作一些改变。负责治疗的医师能够为各个受试者确定适当剂量。 表 D. 用于致瘤性疾病的化疗剂

[0617]

打印ID7584222 Pg 77

类别	药剂类型	非专有名称（其他名称）	疾病
烷化剂	氮芥类	氮芥(HN_2)	何杰金氏病，非何杰金氏淋巴瘤
		环磷酰胺 异环磷酰胺	急性和慢性淋巴细胞白血病，何杰金氏病，非何杰金氏淋巴瘤，多发性骨髓瘤，成神经细胞瘤，乳腺癌，卵巢癌，肺癌，肾胚细胞瘤，宫颈癌，睾丸癌，软组织肉瘤
		苯丙氨酸氮芥 （L-溶肉瘤素）	多发性骨髓瘤，乳腺癌，卵巢癌
		苯丁酸氮芥	慢性淋巴细胞白血病，原发性巨球蛋白血症，何杰金氏病，非何杰金氏淋巴瘤
	氮丙啶和甲基蜜胺类	六甲基蜜胺	卵巢癌
		三胺硫磷	膀胱癌，乳腺癌，卵巢癌
	烷基磺酸酯	二甲磺酸丁酯	慢性粒细胞白血病
	亚硝基脲	亚硝基脲氮芥 （BCNU）	何杰金氏病，非何杰金氏淋巴瘤，原发性脑瘤，多发性骨髓瘤，恶性黑素瘤
		环己亚硝脲 （CCNU）	何杰金氏病，非何杰金氏淋巴瘤，原发性脑瘤，小细胞肺癌
		甲环亚硝脲 （甲基-CCNU）	原发性脑瘤，胃癌，结肠癌
		链脲霉素 （链佐星）	恶性胰腺胰岛瘤，恶性类癌瘤
	三嗪类	三嗪咪唑胺 （DTIC；二甲基三氮烯基咪唑甲酰胺）	恶性黑素瘤，何杰金氏病，软组织肉瘤

[0618] 表 D —续

[0619]

打印ID7584222 Pg 78

类别	药剂类型	非专有名称 (其他名称)	疾病
抗代谢物	叶酸类似物	氨甲蝶呤 (甲氨蝶呤)	急性淋巴细胞白血病，绒膜癌，蕈样霉菌病，乳腺癌，头颈癌，肺癌，骨原性肉瘤
	嘧啶类似物	氟尿嘧啶 (5-氟尿嘧啶; 5-FU) 氟尿苷 (5-氟脱氧尿苷; FUdR)	乳腺癌，结肠癌，胃癌，胰腺癌，卵巢癌，头颈癌，泌尿膀胱癌，恶化前的皮肤损害(局部)
		阿糖胞苷 (胞嘧啶阿拉伯糖苷)	急性粒细胞和急性淋巴细胞白血病
	嘌呤类似物和相关抑制剂	巯基嘌呤 (6-巯基嘌呤; 6-MP)	急性淋巴细胞、急性粒细胞和慢性粒细胞白血病
		硫代鸟嘌呤 (6-硫代鸟嘌呤; TG)	急性淋巴细胞、急性粒细胞和慢性粒细胞白血病

[0620] 表 D —续

[0621]

类别	药剂类型	非专有名称（其他名称）	疾病
天然产物	长春花生物碱	长春花碱(VLB)	何杰金氏病，非何杰金氏淋巴瘤，乳腺癌，睾丸癌
		长春新碱	急性淋巴细胞白血病，成神经细胞瘤，肾胚细胞瘤，横纹肌肉瘤，何杰金氏病，非何杰金氏淋巴瘤，小细胞肺癌
	表鬼臼毒素类	依托泊苷 Tertiposide	睾丸癌，小细胞肺癌和其他肺癌，乳腺癌，何杰金氏病，非何杰金氏淋巴瘤，急性粒细胞白血病，卡波西氏肉瘤
	抗生素	更生霉素（放线菌素 D）	绒膜癌，肾胚细胞瘤，横纹肌肉瘤，睾丸癌，卡波西氏肉瘤
		柔红霉素（道诺霉素；正定霉素）	急性粒细胞和急性淋巴细胞白血病
		多柔比星	软组织肉瘤，骨原性肉瘤和其他肉瘤，何杰金氏病，非何杰金氏淋巴瘤，急性白血病，乳腺癌，生殖泌尿器癌，甲状腺癌，肺癌，胃癌，成神经细胞瘤
		博来霉素	睾丸癌，头颈癌，皮肤癌，食道癌，肺癌和生殖泌尿道癌；何杰金氏病，非何杰金氏淋巴瘤
		普卡霉素（光辉霉素）	睾丸癌，恶性高钙血症
		丝裂霉素（丝裂霉素 C）	胃癌，宫颈癌，结肠癌，乳腺癌，胰腺癌，膀胱癌，头颈癌
	酶	L-天冬酰胺酶	急性淋巴细胞白血病
	生物反应修饰物	干扰素α	毛细胞白血病，卡波西氏肉瘤，黑素瘤，类癌瘤，肾细胞癌，卵巢癌，膀胱癌，非何杰金氏淋巴瘤，蕈样霉菌病，多发性骨髓瘤，慢性粒细胞白血病

[0622] 表 D —续

[0623]

打印ID7584222 Pg 80

类别	药剂类型	非专有名称 (其他名称)	疾病
其他药剂	铂配位复合物	顺铂 (cis-DDP) 碳铂	睾丸癌，卵巢癌，膀胱癌，头颈癌，肺癌，甲状腺癌，宫颈癌，子宫内膜癌，成神经细胞瘤，骨原肉瘤
	蒽二酮	二羟基蒽酮	急性粒细胞白血病，乳腺癌
	取代的脲	羟基脲	慢性粒细胞白血病，真性红细胞增多症，原发性血小板增多症，恶性黑素瘤
	甲基肼衍生物	丙卡巴肼 (N-甲基肼，MIH)	何杰金氏病
	肾上腺皮质抑制剂	米托坦 (*o*,*p*′-DDD)	肾上腺皮质病
		氨苯乙哌啶酮	乳腺癌
激素和拮抗剂	肾上腺皮质类固醇类	去氢皮质素 (几种其他的功能等同的制品也可以)	急性和慢性淋巴细胞白血病，非何杰金氏淋巴瘤，何杰金氏病，乳腺癌
	孕酮类	己酸羟孕酮 醋酸甲羟孕酮 醋酸甲地孕酮	子宫内膜癌，乳腺癌
	雌激素类	己烯雌酚 炔雌醇 (其他制品也可以)	乳腺癌，前列腺癌
	抗雌激素	他莫昔芬	乳腺癌
	雄激素类	丙酸睾酮 氟甲睾酮 (其他制品也可以)	乳腺癌
	抗雄激素	氟利坦	前列腺癌
	促性腺素释放激素类似物	亮丙瑞林	前列腺癌

[0624] M6. 抗血管发生

[0625] 术语“血管发生”指新血管的产生，通常是进入组织或器官中。在正常生理学条件下，人或动物只在非常特殊的有限情况中才经历血管发生。例如，通常在创伤愈合、胎儿和胚胎发育、卵巢黄体、子宫内膜和胎盘形成中观察到血管发生。不过，新的证据显示血管

打印ID7584222 Pg 81

发生在某些正常状况下是重要的，例如肾上腺组织、前列腺和卵巢中。本发明的治疗剂，其中抗血管发生不是唯一的作用模式，因此具有比著名的抗血管发生治疗剂（例如抗体 A4.6.1）(Berm，1998；Baca 等人，1997；Presta 等人，1997) 更优越之处在于使用本发明时其中的合乎需要的或“生理学”的血管发生将不会被抑制。

[0626] 不受控制的（持续的和/或不受调控的）血管发生与多种疾病状态有关，并在肿瘤发展和转移过程中发生。受到控制和不受控制的血管发生被认为是以相似方式进行的。由基底膜包围的内皮细胞和外膜细胞形成毛细血管。血管发生从由内皮细胞和白细胞释放的酶对基底膜的侵蚀开始。然后沿血管腔排列的内皮细胞凸出基底膜。血管发生刺激物诱导内皮细胞迁移出受侵蚀的基底膜。迁移细胞在亲本血管外形成“萌芽”，内皮细胞在此经历有丝分裂和增殖。内皮萌芽彼此汇合形成毛细血管环，从而形成新的血管。

[0627] 尽管有新的证据显示在某些正常组织中需要有血管生成，抗血管发生疗法在肿瘤和其他疾病的治疗中仍然是重要的。抗血管发生疗法因此意图用于本发明的组合疗法中。尤其考虑将相对频繁的低剂量本发明治疗剂与抑制血管发生的药剂组合。可用于组合疗法中的示例性抗血管发生剂如上文所列举的（针对免疫缀合物）。任何一种或多种这样的药剂，包括表 B 中的药剂，可与本发明联合使用。血管生长抑素、抑内皮素、抑血管素、制霉菌素和乳腺丝抑蛋白是目前优选的。

[0628] 许多已知的抗癌剂也具有抗血管发生效果作为其作用机制的一部分。这些药剂，如表 E 中所列举的，特别考虑用于本发明的组合疗法方面（如上所述，它们也可以与本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体缀合）。

[0629] 表 E

[0630] 具有抗血管发生活性的抗癌剂

[0631]

药剂类别或类型	实例
烷化剂	环磷酰胺、依地福新、雌莫司汀、美法仑
抗代谢物	氟尿嘧啶、氨甲蝶呤、巯基嘌呤、UFT、替加氟、尿嘧啶、阿糖胞苷
抗肿瘤抗生素	博来霉素、道诺霉素、阿霉素、表柔比星、丝裂霉素、米托蒽醌
拓扑异构酶抑制剂	喜树碱、伊立替康、依托泊苷、托泊替康
紫杉烷类	多西他赛、紫杉醇
长春花生物碱	长春碱、长春新碱
其他	顺铂、奥曲肽

[0632] 此外，针对 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白的抗体 LM609 也诱导肿瘤退化并可用组合疗法中。整

打印ID?584222 Pg 82

联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 的拮抗剂，例如 LM609，诱导血管发生性内皮细胞的凋亡，而对静止血管没有影响。LM609 或其他 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂还可以通过抑制 $\alpha_v\beta_3$ 与 MMP-2 的相互作用来发挥作用(MMP-2 被认为是在内皮细胞和成纤维细胞迁移中具有重要作用的蛋白水解酶)。

[0633] LM609 引起的血管发生性内皮的凋亡可能对剩余血管网络具有级联效果。抑制肿瘤血管网络对肿瘤扩张信号产生完全应答，事实上可能启动了网络的部分或全部崩溃，导致肿瘤细胞死亡和肿瘤体积损失。可能抑内皮素和血管生长抑素以相似方式发挥功能。LM609 不影响静止血管但能够引起肿瘤退化的事实强烈说明在治疗中不需要靶向肿瘤中的所有血管来获得抗肿瘤效果。

[0634] 如美国专利 5,520,914(特别引入本文作为参考)所述，可以采用针对血管生成素的抗体。由于 FGF 与血管发生有关，因此也可以使用 FGF 抑制剂。范例是序列中以交替的 N- 乙酰葡糖胺与 2-O- 硫酸化糖醛酸作为主要重复单元的化合物，包括葡糖胺基聚糖，例如 archaran sulfate。美国专利 6,028,061(特别引入本文作为参考)描述了这些化合物，它们可用于与本文的联合。

[0635] M7. VEGF 抑制剂

[0636] VEGF 是低氧和致癌突变诱导的多功能性细胞因子。VEGF 是胚胎发生中血管网络产生和保持的主要刺激物。它起着强通透性诱导剂、内皮细胞趋化剂、内皮存活因子和内皮细胞增殖因子的功能。它的活性是正常胚胎发育所需要的，因为一个或两个 VEGF 等位基因的靶向破坏会导致胚胎致死。

[0637] 利用一种或多种 VEGF 抑制方法是本发明组合疗法的优选方面。由有关 VEGF 是病理状况下血管发生的主要刺激物的认识产生了阻断 VEGF 活性的各种方法。所开发的任何 VEGF 抑制剂现在可有利的应用于此。因此，设计成干扰 VEGF 信号传导的任何一种或多种以下的中和性抗 VEGF 抗体、可溶性受体构建体、反义策略、RNA aptamers 和酪氨酸激酶抑制剂都可应用。

[0638] 合适的药剂包括中和性抗体 (Kim 等人，1992 ;Presta 等人，1997 ;Sioussat 等人，1993 ;Kondo 等人，1993 ;Asano 等人，1995)、可溶性受体构建体 (Kendall 和 Thomas，1993 ;Aiello 等人，1995 ;Lin 等人，1998 ;Millauer 等人，1996)、酪氨酸激酶抑制剂 (Siemeister 等人，1998)、反义策略、RNA aptamer 和针对 VEGF 或 VEGF 受体的核酶 (Saleh 等人，1996 ;Cheng 等人，1996 ;Ke 等人，1998 ;Parry 等人，1999 ;引入本文作为参考)。正如 WO 98/16551(特别引入本文作为参考)所述，还可以采用具有拮抗剂特性的 VEGF 变体。上述各文献均特别引入作为参考。

[0639] 某些实施方案中将优选阻断抗 VEGF 抗体，尤其是为了简单起见。抗 VEGF 的单克隆抗体已显示出抑制小鼠中人肿瘤异种移植物的生长和腹水形成 (Kim 等人，1993 ;Mesiano 等人，1998 ;Luo 等人，1998a ; 1998b ;Borgstrom 等人，1996 ;1998 ;分别引入本文作为参考)。抗体 A4.6.1 是高亲和力的抗 VEGF 抗体，能够阻断 VEGF 与 VEGFR1 和 VEGFR2 二者的结合 (Kim 等人，1992 ;Wiesmann 等人，1997 ;Muller 等人，1998 ;Key 等，1996，分别引入本文作为参考)。A4.6.1 最近已通过单价噬菌体展示技术进行了人源化，目前作为抗癌剂正在进行 I 期临床试验 (Brem，1998 ;Baca 等人，1997 ;Presta 等人，1997 ;引入本文作为参考)。

[0640] 对 A4.6.1Fab 片段结合的 VEGF 的丙氨酸扫描诱变和 X 射线结晶学显示，A4.6.1 结合的 VEGF 表位集中于第 89 — 94 位氨基酸周围。这一结构性结果证明 A4.6.1 竞争性抑制

打印ID7584222 Pg 83

VEGF 结合 VEGFR2，但是最有可能通过位阻现象抑制 VEGF 结合 VEGFR1(Muller 等人，1998；Keyt 等人，1996；引入本文作为参考)。

[0641] A4.6.1 可与本发明联合使用。不过，目前优选被命名为 2C3(4545) 的新抗体，它选择性的阻断 VEGF 与两个 VEGF 受体中只一个的相互作用。2C3 抑制 VEGF 介导的内皮细胞生长，它具有强的抗肿瘤活性并选择性的阻断 VEGF 与 VEGFR2(KDR/Flk-1) 的相互作用，而不阻断 VEGF 与 VEGFR1(FLT-1) 的相互作用。与 A4.6.1 相反，2C3 可以特异抑制 VEGFR2 诱导的血管发生，但不伴随着对巨噬细胞趋化性的抑制(由 VEGFR1 介导)，因此预计可以作为更安全的治疗剂。为了更进一步描述 2C3 抗体和其在抗血管发生疗法和 VEGF 抑制中的用途，将美国专利 6,342,219、6,342,221、6,416,758 和 6,416,758 特别引入本文作为参考。

[0642] M8. 凋亡诱导剂

[0643] 本发明的治疗剂还优选与可诱导肿瘤中任何细胞内诱导(包括肿瘤细胞和肿瘤血管内皮细胞)的凋亡的治疗方法相组合。诱导凋亡的典型药剂列举如上(针对免疫缀合物)。任何一种或多种这样的凋亡诱导剂都可以用于本发明的联合疗法中，无需与本发明抗体连接。

[0644] 许多已知的抗癌剂作为其作用机制的一部分还具有诱导凋亡的作用。这些药剂，如表 F 中列举的，尤其被考虑用于本发明的组合疗法方 面(如上所述，它们还可与本发明的抗体缀合)。

[0645] 表 F

[0646] 诱导凋亡的抗癌剂

[0647]

打印ID7584222 Pg 84

药剂种类或类型	实施例
抗代谢物	阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟-29-脱氧尿苷、吉西他滨、羟基脲、氨甲蝶呤
DNA 交联剂	苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、氮芥
插入剂	阿霉素（多柔比星）、米托蒽酯
拓扑异构酶 II 毒物	依托泊苷、替尼泊苷
微管靶向剂	秋水仙胺、秋水仙碱、多西他赛、长春花新碱
激酶抑制剂	flavopiridol、星孢素、STI571（CPG 57148B）、UCN-01（7-羟基星孢素）
法呢基转移酶抑制剂	L-739749、L-744832
激素	糖皮质类固醇、芬维 A 胺
DNA 断裂剂	博来霉素
激素拮抗剂	他莫西芬、非那雄胺、LHRH 拮抗剂
生物制品	TNF-α、TRAIL、抗 CD20
蛋白质合成抑制剂	L-天冬酰胺酶、环己酰亚胺、嘌呤霉素、白喉毒素
拓扑异构酶 II 毒物	喜树碱、托泊替康

[0648] M9. 免疫毒素和凝血配体

[0649] 本发明还可与其他的免疫毒素或凝血配体联合使用，其中靶向部分靶向于肿瘤细胞、肿瘤血管或肿瘤基质的标志物。用于靶向至肿瘤 细胞、肿瘤血管或肿瘤基质的任何靶向剂都可用于这些实施方案中。在这些免疫毒素中，所附着的药剂包括抗细胞或细胞毒性剂、细胞因子、放疗剂、抗血管发生剂、凋亡诱导剂和抗微管蛋白药物。在凝血配体中，所附着的药剂是凝血剂。美国专利 5,855,866、5,965,132、6,261,535、6,051,230、6,451,312（免疫毒素）、6,093,399、6,004,555、5,877,289 和 6,036,955（凝血配体）特别引入本文作为参考来说明这些构建体。

[0650] M10. ADEPT 和药物前体疗法

[0651] 本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体还可以与药物前体联合应用，其中所述构

打印ID7584222 Pg 85

建体、受体－抗体或 β－抗体可操作地联接激活药物前体的成分，例如激活药物前体的酶，它只有在接触抗体时才将药物前体转变成更有活性的形式。这项技术通常称为“ADEPT”，并描述于如 WO 95/13095、WO 97/26918、WO 97/24143、美国专利 4,975,278 和 5,658,568（特别引入本文作为参考）。

[0652] 如本文所用，术语“药物前体”指生物学或制药学活性物质的前体或衍生物形式，与作为基础的亲本药物相比，它对靶细胞（包括肿瘤血管内皮细胞）的细胞毒性或抗细胞的效果下降。优选的是，药物前体或前体形式与“天然”或亲本形式相比细胞毒性或抗细胞的效果显著降低，或者更优选可以忽略。“药物前体”能够被激活或转变成更有活性的药物亲本形式。

[0653] 用于制备并使用药物前体的技术属于普通技术人员的技术范围之内。Willman 等人 (1986) 和 Stella 等人 (1985) 在特别引入本文作为参考，以补充关于如何制备并使用各种药物前体的描述和教导。可用于本发明的药物前体构建体的范例包括（但不限于）含磷酸的药物前体（美国专利 4,975,278）、含硫代磷酸的药物前体、含硫酸的药物前体、基于肽的药物前体（美国专利 5,660,829、5,587,161、5,405,990、WO 97/07118）、D-氨基酸修饰的药物前体、糖基化的药物前体（美国专利 5,561,119、5,646,298、4,904,768、5,041,424）、含 β－内酰 胺的药物前体、任选含取代的苯氧基乙酰胺的药物前体（美国专利 4,975,278）、任选含取代的苯乙酰胺的药物前体、甚至 5-氟胞嘧啶（美国专利 4,975,278）和 5-氟尿嘧啶药物前体等等（每一项专利特别引入本文作为参考）。

[0654] 可以以药物前体形式使用的治疗剂或细胞毒性药物的类型事实上是不计其数的。优选以这种形式递送的细胞毒性剂比例如凝血剂多，凝血剂较不优选以药物前体的形式使用。在制备药物前体中需要的只是对构建体进行设计，使得药物前体基本上无活性，而“释放的”或激活的药物具有显著活性或者至少足以达到预定目的的活性。

[0655] 正如 WO 95/03830、EP 751,144（蒽环霉素类）、WO 97/07097（环丙基吲哚类 (cyclopropylindoles)）和 WO 96/20169 中公开的，还知道对原始药物前体的多种改进，本文也涵盖其使用。例如，美国专利 5,621,002（特别引入本文作为参考）中描述了 Km 降低的药物前体，可用于本发明中。正如 WO 96/03151（特别引入本文作为参考）所例示的，还知道在细胞内进行的药物前体疗法，本文可以进行实践。

[0656] 为了用于 ADEPT，将激活或转变药物前体形成更有活性药物的药剂可操作附着于本发明的抗体上。所述的抗体由此将药物前体转变能力定位于血管发生性或肿瘤位点，从而只在这些区域产生有活性的药物，而在循环或健康组织中却不会。

[0657] 可附着于本发明的抗体从而发挥激活药物前体功能的酶包括（但不限于）与含磷酸的药物前体联合使用的碱性磷酸酶（美国专利 4,975,278）；与含硫酸的药物前体联合使用的芳基硫酸酶（美国专利 5,270,196）；与基于肽的药物前体联合使用的肽酶和蛋白酶，例如沙雷氏菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶（美国专利 5,660,829、5,587,161、5,405,990）和组织蛋白酶（包括组织蛋白酶 B 和 L）、与 D-氨基酸修饰的药物前体联合使用的 D-丙氨酰羧肽酶；与糖基化的药物前体联合使用的碳水化合物切割酶，例如 β－半乳糖苷酶和神经氨酸酶（美国专利 5,561,119 和 5,646,298）；与含 β－内酰胺的药物前体联合使用的 β－内酰胺酶；与在氨基氮处用苯氧基乙酰胺或 苯基乙酰胺基团衍生的药物联合使用的青霉素酰胺酶，例如青霉素 V 酰胺酶（美国专利 4,975,278）或青霉素

打印ID7584222 Pg 86

G 酰胺酶；和与基于 5- 氟胞嘧啶的药物前体（美国专利 4,975,278）联合使用的胞嘧啶脱氨酶（美国专利 5,338,678 和 5,545,548）（每一项专利特别引入本文作为参考）。

[0658] N. 抗体包被的脂质体和治疗剂

[0659] 脂质体制剂经常用于治疗剂和药物中。不过，有关脂质体分布的最初研究表明这样的制剂并非可广泛用于人体的。脂质体被网状内皮系统 (RES) 的吞噬细胞（包括循环性单核吞噬细胞和定位在肝和脾中的那些细胞）快速摄入。因此，血液循环半衰期可以短至几分钟。

[0660] 因此开发了“隐藏的或被隐藏的”脂质体和制剂技术，它可以使脂质体逃避被 RES 摄取并循环较长的时间 (Hristova 和 Needham, 1993)。优选用于隐藏脂质体的药剂是聚乙二醇 (PEG)，而产生的脂质体也被称为 PEG 化脂质体。其他隐藏剂 (stealthing agents) 包括聚 (2- 甲基 -2- 噁唑啉）和聚 (2- 乙基 -2- 噁唑啉）缀合物 (Woodle 等人，1994)。一系列改进的被隐藏的脂质体描述于美国专利 6,284,267（特别地引入本文作为参考）中，它们可与本发明联合使用。

[0661] 直径比毛细血管中的窗孔平均直径小的脂质体从循环中泄漏出。在快速生长的肿瘤中的窗孔平均直径比在正常组织中大，因而直径小于大约 100nm 的脂质体迁移入肿瘤中。因此，隐藏的脂质体已被推荐用于递送细胞毒性剂至癌症患者的肿瘤中。一系列的药物已被掺入到隐藏的脂质体中，包括顺铂 (Rosenthal 等人，2002)、TNF α (Kim 等人，2002)、多柔比星 (Symon 等人，1999) 和阿霉素 (Singh 等人，1999)，分别引入本文作为参考。不过，最近的报道已显示出隐藏的脂质体柔红霉素和长春瑞滨在转移性乳癌治疗中意外的低效 (Rimassa 等人，2003)。

[0662] 本发明提供了改良的被隐藏的脂质体制剂，克服了现有技术中的各种缺点，其中用本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体功能性地联接或“包被”隐藏的脂质体。在本发明的这些方面中无需二价构建体。

[0663] 任何隐藏的脂质体都可构成新脂质体制剂的主要成分，优选应用 PEG 化的脂质体。隐藏的脂质体是被“包被”的，即可操作地或功能性地联接了构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体。该可操作的或功能性的联接形式能使构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体保持特异性结合靶 PS 或阴离子磷脂的能力，从而将隐藏的脂质体和其中的任何组分递送或靶向至 PS- 阳性细胞，例如肿瘤细胞和肿瘤血管内皮细胞。

[0664] 经包被的隐藏脂质体可以单独使用。不过，优选的，这样的脂质体还将包括一种或多种第二治疗剂，例如抗癌剂或化疗剂（第一治疗剂是抗体本身）。第二治疗剂通常被认为在脂质体的“核心”内。本领域已知和 / 或本文针对缀合或针对组合疗法所述的任意一种或多种第二抗癌剂或化疗剂都可针对用于本发明的经抗体包被的隐藏脂质体中。例如，任何化疗剂或放疗剂、细胞因子、抗血管发生剂或凋亡诱导剂。目前优选的化疗剂是抗微管蛋白药物、多西他赛和紫杉醇。

[0665] 此外，本发明的抗体包被隐藏脂质体还可装载一种或多种抗病毒药物以用于治疗病毒感染和疾病。正如抗癌剂一样，本领域和 / 或本文针对缀合抗体或组合疗法所述的任一种或多种第二抗病毒药物都可用于本发明的抗体包被隐藏脂质体中。西多福韦和 AZT 是目前优选的例子。

[0666] O. 抗血管、抗血管发生和其他疗法

打印ID7584222 Pg 87

[0667] 本发明可用于治疗涉及异常血管发生的其他疾病，包括具有前血栓形成性血管的疾病和紊乱。尽管并非唯一的治疗方法，但本发明的构建体、受体－抗体或 β－抗体也可用于治疗患异常血管发生、例如促成多种疾病和紊乱的异常血管发生的动物和患者。

[0668] 无论是基于抗血管发生、前血栓形成性血管系统还是其他的抗血管机制，本发明都可用于治疗除了癌症之外的最普遍和／或在临床上重要的疾病，包括关节炎、类风湿性关节炎、牛皮癣、动脉粥样硬化、糖尿病性视网膜病变、与年龄有关的黄斑变性、格雷夫氏病、血管再狭窄（包括血管成形术后再狭窄）、动静脉畸形 (AVM)、脑（脊）膜 瘤、血管瘤和新血管性青光眼。其他的干预靶包括血管纤维瘤、动脉粥样硬化病斑、角膜移植物新血管形成、血友病性关节、肥大性瘢痕、Osler-Weber 综合症、脓性肉芽肿、晶状体后纤维增生症、硬皮病、沙眼、血管粘连、滑膜炎、皮炎、各种其他炎症性疾病和紊乱和甚至是子宫内膜异位症。下文列出了本发明可以治疗的其他疾病和紊乱，以及这些血管发生性疾病的统一基础。

[0669] 涉及异常血管和血管发生的一种重要疾病是类风湿性关节炎，其中关节滑膜内层的血管经历血管发生。除了形成新血管网络，内皮细胞还释放导致血管翳生长和软骨破坏的因子和活性氧类。血管发生中涉及的因子可以积极促成并维持类风湿性关节炎的慢性发炎状态。与血管发生有关的因子在骨关节炎中也有作用，促成关节的破坏。包括 VEGF 在内的各种因子已显示出参与类风湿性关节炎和骨关节炎的发病机理。

[0670] 涉及异常血管系统和血管发生的另一重要疾病范例是眼部新血管性疾病。该疾病的特征为新血管侵入眼结构，例如视网膜或角膜。这是失明的最常见原因，并涉及大约 20 种眼科疾病。在与年龄有关的黄斑变性中，相关视觉问题是由脉络膜毛细血管经 Bruch 氏膜（玻璃膜）的缺陷向内生长，同时视网膜色素上皮下的纤维血管组织增殖引起的。血管发生性损伤还涉及糖尿病性视网膜病变、早产儿视网膜病变、角膜移植排斥、新血管性青光眼和晶状体后纤维组织形成。

[0671] 可按本发明进行治疗的与角膜新血管形成有关的其他疾病包括（但不限于）流行性角膜结膜炎、维生素 A 缺乏、隐形眼镜过度佩戴、特应性角膜炎、上缘角膜炎、翼状胬肉干燥性角膜炎、Sjogren 症（干燥症）、玫瑰痤疮（酒糟鼻）、phylectenulosis、梅毒、分支杆菌感染、脂肪变性、化学烧伤、细菌性溃疡、真菌性溃疡、单纯性疱疹感染、带状疱疹感染、原生动物感染、Kaposi 氏肉瘤、Mooren 溃疡、Terrien 氏边缘变性、边缘角质层分离、类风湿性关节炎、系统狼疮、多动脉炎、外伤、Wegeners 类肉瘤、巩膜炎、Steven’s Johnson 病、角膜放射状切开术和角膜移植排斥。

[0672] 可按本发明进行治疗的与视网膜／脉络膜新血管形成有关的疾病包括（但不限于）糖尿病性视网膜病变、黄斑变性、镰刀形红细胞贫血病、结节病、梅毒、弹性假黄色瘤、Pagets 病、静脉堵塞、动脉堵塞、颈动脉梗阻性疾病、慢性色素层炎／玻璃体炎、分支杆菌感染、Lyme 氏病、系统性红斑狼疮、早产儿视网膜病变、Eales 病、Bechets 病、引起视网膜炎或脉络膜炎的感染、推测的眼组织胞浆菌病、Bests 病、近视、视窝、Stargarts 病、平坦部炎、慢性视网膜脱落、高粘滞性综合症、弓形体病、外伤和激光后并发症。

[0673] 可按本发明进行治疗的其他疾病包括（但不限于）与发红有关的疾病（虹膜角的新血管形成）和由纤维血管或纤维组织异常增殖引起的疾病，包括所有形式的增殖性玻璃体视网膜病变，无论其是否与糖尿病相关。

[0674] 慢性炎症也涉及异常血管系统和病理性血管发生。这些疾病状态（如溃疡性结肠

打印ID7584222 Pg 88

炎和 Crohn 氏病）显示组织学变化，其中有新血管进入发炎组织的向内生长。巴尔通体病（在南美洲发现的细菌性感染）能够导致特征为血管内皮细胞增殖的慢性阶段。

[0675] 在动脉粥样硬化中发现了与异常血管系统和血管发生有关的另一种病理学作用。在血管内腔内形成的病斑显示具有血管发生刺激活性。有具体证据证明了诸如 VEGF 等的血管发生标志在人冠状动脉粥样硬化发展中，以及在冠脉梗阻性疾病的血管再成形过程中有病理生理学重要性。本发明为这些状况提供了有效治疗。

[0676] 血管瘤是儿童时期最频繁的血管发生性疾病之一。在大多数情况中，肿瘤是良性的，并在没有干预的条件下就退化。在更严重的情况中，肿瘤发展成大型海绵状和渗透性形式并产生临床并发症。血管瘤的系统形式，血管瘤病，具有较高的死亡率。存在耐受治疗的血管瘤，不能用目前使用的治疗剂进行治疗，本发明则特别针对解决该问题。

[0677] 血管发生还与在遗传性疾病（例如 Osler-Weber-Rendu 病或遗传性出血性毛细管扩张症）中发现的损伤有关。遗传性出血性毛细管扩张是特征为多处小型血管瘤、血管或淋巴管肿瘤的遗传病。血管瘤存在 于皮肤和粘膜中，常常伴随鼻出血或胃肠出血，有时伴随肺或肝动静脉瘘管。

[0678] 血管发生还与正常的生理学过程有关，例如再生和创伤愈合。血管发生是排卵还有受精后囊胚着床中的重要步骤。根据本发明预防血管发生可用于诱导闭经，阻断排卵或防止囊胚着床。在创伤愈合中，过度修复或纤维增生成为手术治疗的有害副作用，而且可能由血管发生引起并恶化。粘附是手术后频繁的并发症，并导致诸如小型肠梗阻等问题。这也可以用本发明进行治疗。

[0679] 所有前述疾病和病症，以及所有类型的肿瘤，都被考虑按照本发明进行治疗。美国专利 5,712,291 特别引入本文作为参考，以便进一步证明本领域内的认识，即，一旦使用某一具体药剂已显示出对血管发生的抑制作用，那么用它或类似药剂治疗与异常血管发生相关的广泛类型疾病就应该能进行。美国专利 6,524,583 也特别引入本文作为参考以达到相似的目的，并特别证明此原理适用于利用所靶向的治疗剂抑制血管发生和治疗血管发生性疾病。

[0680] 本发明进一步提供了用于治疗 PS 或阴离子磷脂在其中起作用的其他疾病。例如，因为细胞粘附、炎性反应和脓毒性休克中涉及 PS，所以构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体可用于治疗发炎和脓毒性休克。

[0681] 阴离子磷脂，尤其是 PS，还与镰状细胞贫血有关，具体而言，是作为清除过程的一部分。因此，构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体可用于治疗或改善镰状细胞贫血。本发明的构建体、受体 - 抗体或 β - 抗体还可以用于治疗寄生虫病和治疗疟疾。

[0682] P. 抗病毒治疗方法

[0683] 本发明还提供了一系列构建体（其任选与抗病毒剂缀合），可用于治疗病毒感染。用药方式、尤其是剂量通常与上文关于本发明癌症治疗所述的一样，适应性是本发明整体的一个优势。尽管实施本发明的抗病毒治疗不需要理解其作用的特殊机制，根据本文中工作实施例所支持的，有关病毒疗法的某些原理如下。

[0684] 最重要的机制被认为是与病毒复制和宿主细胞的活化有关。在病毒感染期间，病毒在其细胞内复制过程期间激活细胞。正如对疱疹病毒、丙肝病毒和 HIV-1 的研究所显示的，此细胞活化过程是病毒复制所必需的。病毒的发展激活了病毒和宿主二者的基因表达。

打印ID7584222 Pg 89

例如，皮钦德病毒 (Pichinde virus) 和马丘坡病毒 (Machupo virus) 的复制在复制周期的晚期被放线菌素 D 所抑制，表明宿主细胞基因转录是完成病毒复制所必需的。

[0685] 病毒对宿主细胞的活化引起细胞使阴离子磷脂例如 PS 外在化。具体地说，发明者推测，病毒活化引起 Ca^{2+} 流入细胞，激活了爬行酶 (scramblase)，使阴离子磷脂（尤其是 PS) 外在化。然后，可结合阴离子磷脂（优选 PS) 的构建体和缀合物结合并干扰活化过程，使病毒不能够正确复制。

[0686] 本发明的实施例显示本发明在病毒感染过程的晚期发挥作用，阻断了病毒成熟或溢出。发明者的研究显示本发明药剂的抑制作用是广泛可用的，因为已显示对利用不同溢出机制的病毒均可起作用。例如，本发明的实施例证实阻断了疱疹病毒 (CMV)（它从高尔基体衍生的胞外囊泡中释放出来），还阻断了沙粒病毒（皮钦德病毒）和副粘病毒 (RSV) 直接从原生质膜中出芽）。

[0687] 受病毒感染的细胞使阴离子磷脂（尤其是 PS) 外在化，正常情况下这些磷脂是细胞内的，即局限于原生质膜的内表面。在病毒释放期间，磷脂在释放的部位重新分布，在病毒出芽或从质膜进行胞吐的期间接纳膜弯曲，在此过程中阴离子磷脂和氨基磷脂被外在化。本发明的构建体和缀合物因此与外在化的阴离子磷脂（尤其是 PS) 结合，并阻止了病毒从被感染细胞中的释放。本发明构建体与受病毒感染的细胞的结合在本发明的实施例中也有显示。

[0688] 本发明的构建体和缀合物可进一步结合外在化的阴离子磷脂（尤其是 PS) 并干扰病毒基因表达和 / 或复制所必需的一种或多种信号传导途径。

[0689] 此外，有包膜的病毒粒子本身在其外表面很可能有阴离子磷脂例 如 PS。由于病毒缺乏转位酶来保持或恢复磷脂的不对称性，所以预期存在磷脂例如 PS 的持续暴露。本发明的构建体和缀合物因此可引起调理作用、补体的结合、诸如巨噬细胞等宿主细胞的内吞作用以及自由病毒颗粒的清除。

[0690] 在本发明的另一方面，病毒很可能需要阴离子磷脂用于感染和 / 或合胞体 (syncitia) 形成。本发明的构建体和缀合物可通过结合阴离子磷脂而进一步阻断病毒生命周期的这些方面。

[0691] 依照前述观察结果并根据本发明的实施例，本发明病毒疗法的范围可以扩展到任何病毒，可以是包膜或没有包膜的，DNA 或 RNA。由于本发明的结合阴离子磷脂的构建体和缀合物至少在部分程度上阻断了病毒在细胞内的复制并 / 或阻止了病毒从细胞中释放，因此本发明并不只限于治疗有包膜的病毒，也不限于任何具体的病毒，这是一个重要的有利之处。例如，本发明随后发表的工作报道了膜联蛋白 V 和 PS 囊泡能抑制巨噬细胞的 HIV-1 感染，但不能抑制 T 细胞的 HIV-1 感染或抑制其他病毒，例如水泡性口炎病毒 G 和兼嗜性小鼠白血病病毒 (Callahan 等人，2003)。

[0692] 自然地，本发明的构建体和缀合物确实作用于有包膜的病毒，尤其是在包膜外表面有阴离子磷脂（尤其是 PS) 的那些病毒，其中所述构建体和缀合物使病毒被清除并 / 或抑制了病毒进入靶细胞。

[0693] 因此本发明的重要方面是它可普遍应用，适于治疗重组、基因工程化和合成的病毒，如作为生物恐怖主义而发展的病毒。事实上，本发明并不限于治疗动物和人。由于在病毒分类群中发现的宿主类型包括藻类、古生菌 (archaea)、细菌、真菌、无脊椎动物、支原体、

打印ID7584222 Pg 90

植物、原生动物、螺旋质体和脊椎动物，本发明可用于抑制在任何这样类型宿主中的病毒感染和复制，包括农业上重要的病毒。目前优选脊椎动物中病毒感染和相关疾病的治疗，而表H中感染脊椎动物的任一种或多种病毒都可用本发明的制剂进行抑制并治疗所产生的感染。

[0694] 表H

[0695] 脊椎动物的病毒

[0696]

科	属	模式种
腺病毒科	乳腺腺病毒属 禽腺病毒属 非洲猪瘟样病毒属	人腺病毒2 禽腺病毒1 非洲猪瘟病毒
沙粒病毒科	沙粒病毒属 动脉炎病毒属	淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 马动脉炎病毒
星状病毒科	星状病毒属	人星状病毒1
双RNA病毒科	水生双RNA病毒属 禽双RNA病毒属	传染性胰腺坏死病毒 传染性囊病病毒
布尼亚病毒科	布尼亚病毒属 汉坦病毒属 内罗毕羊病毒属 白蛉热病毒属	布尼奥罗病毒 汉坦病毒 内罗毕绵羊病病毒 白蛉热西西里病毒
嵌杯样病毒科	嵌杯状病毒属	猪水疱疹病毒
环病毒科	环病毒属	小鸡贫血病毒
冠状病毒科	冠状病毒属 环曲病毒属 δ病毒属	鸟类传染性支气管炎病毒 伯尔尼病毒（berne virus） 肝炎δ病毒
丝状病毒科	丝状病毒属	马尔堡病毒
黄病毒科	黄病毒属 瘟病毒属 丙型肝炎样病毒属	黄热病病毒 牛痢疾病毒 丙肝病毒
嗜肝DNA病毒科	正嗜肝DNA病毒属 乌嗜肝DNA病毒属	乙型肝炎病毒 鸭乙型肝炎病毒
疱疹病毒科 亚科：α疱疹病毒亚科 亚科：β疱疹病毒亚科 亚科：γ疱疹病毒亚科	 单纯疱疹病毒属 水痘病毒属 巨细胞病毒属 鼠巨细胞病毒属 玫瑰疹病毒属 淋巴隐病毒属 Rhadinovirus	 人疱疹病毒1 人疱疹病毒3 人疱疹病毒5 小鼠巨细胞病毒1 人疱疹病毒6 人疱疹病毒4 Ateline herpesvirus 2
虹彩病毒科	蛙病毒属 淋巴囊肿病毒属 金鱼病毒样病毒属	蛙病毒3 比目鱼（flounder）病毒 金鱼病毒1
正粘病毒科	流感病毒A、B 流感病毒C 索戈托样病毒属 （Thogoto-like viruses）	A型流感病毒 C型流感病毒 索戈托病毒
乳多空病毒	多瘤病毒属 乳头瘤病毒属	小鼠多瘤病毒 棉尾兔乳头瘤病毒(Shope)
副粘病毒科 亚科：副粘病毒亚科 亚科：肺病毒亚科	 副粘病毒属 麻疹病毒属 腮腺炎病毒属属 肺病毒属	 人副流感病毒1 麻疹病毒 腮腺炎病毒 人呼吸道合胞病毒

[0697]

打印ID7584222 Pg 92

细小病毒科 亚科：细小病毒亚科	细小病毒属 Erythovirus 依赖病毒属	小鼠细小病毒 B19病毒 腺伴随病毒2
小核糖核酸病毒科	肠道病毒属 鼻病毒属 肝病毒属 心脏病毒属 口蹄疫病毒属	脊髓灰质炎病毒1 人鼻病毒1A 甲型肝炎病毒 脑心肌炎病毒 口蹄疫病毒0
痘病毒科 亚科： 脊椎动物痘病毒亚科	正痘病毒属 副痘病毒属 禽痘病毒属 山羊痘病毒属 野兔痘病毒属 猪痘病毒属 软疣痘病毒属 亚塔痘病毒属	痘苗病毒 口疮病毒 禽痘病毒 羊天花病毒 粘液瘤病毒 猪痘病毒 传染性软疣病毒 亚巴猴瘤痘病毒
呼肠孤病毒科	正呼肠孤病毒属 环状病毒属 轮状病毒属 Coltivirus 水生呼肠孤病毒属	呼肠孤病毒3 蓝舌病病毒1 猿猴轮状病毒SA11 科洛拉多蜱传热病毒 Golden Shiner virus
逆转录病毒科	B型哺乳动物逆转录病毒属 C型哺乳动物逆转录病毒属 C型鸟类逆转录病毒属 D型逆转录病毒属 Blv-htlv逆转录病毒属 慢病毒属 泡沫病毒属	小鼠乳腺瘤病毒 鼠白血病病毒 禽类白血病病毒 摩-傅猴病毒 牛白血病毒 人免疫缺陷病毒1 人泡沫病毒
弹状病毒科	水疱性病毒属 狂犬病病毒属 类短命病毒属	水疱性口炎印第安纳病毒 狂犬病病毒 牛暂时热病毒
披膜病毒科	甲病毒属 风疹病毒属	新培斯病毒 风疹病毒

[0698] 优选将本发明用于治疗哺乳动物中的病毒感染和相关疾病，尤其是有价值的或赋予价值的动物（例如赛马和家养宠物）和用于直接产生（如肉类）或间接产生（如牛奶和蛋）食物供人类消耗的动物和鸟类。除了对人的治疗外，本发明示范性的实施方案包括治疗马、狗、猫等等；治疗牛、猪、野猪、绵羊、山羊、水牛、野牛、骆驼、鹿、麋鹿和其他大型动物，以及它们的幼崽，包括牛犊和羔羊。

[0699] 尤其优选对人的治疗，无论是针对天然产生的病毒或由于生物恐怖主义产生的病毒。对于天然存在的病毒和所引起的疾病来说，本发明在其应用中是不受约束的。因此，表J中的任一种或多种病毒都可用 本发明进行抑制，并由此治疗所产生的感染和疾病。

[0700] 表J

[0701] 人体中的病毒疾病

[0702]

打印ID7584222 Pg 93

疾病	病毒	病毒类型
AIDS	人免疫缺陷病毒（HIV）	逆转录病毒
细支气管炎和病毒性肺炎	呼吸道合胞病毒	副粘病毒
细支气管炎	副流感病毒	副粘病毒
子宫颈癌	人乳头瘤病毒	乳多空病毒
水痘	水痘带状疱疹病毒	疱疹病毒
登革热	登革病毒	黄病毒
埃博拉出血热	埃博拉病毒	线状病毒
生殖器疱疹	单纯疱疹病毒－2	疱疹病毒
汗坦病毒出血热	汗坦病毒	布尼亚病毒
肝炎	甲型肝炎	小核糖核酸病毒
	乙型肝炎	嗜肝DNA病毒
	丙型肝炎	黄病毒
	丁型肝炎	δ病毒
	戊型肝炎	嵌杯状病毒
流感	流感病毒A、B和C	正粘病毒
胡宁阿根廷出血热（Junin Argentinian Hemorrhagic Fever）	胡宁病毒（junin virus）	沙粒病毒
拉沙出血热	拉沙病毒	沙粒病毒
马秋博出血热	马秋博沙粒样病毒	沙粒病毒
麻疹	麻疹病毒	副粘病毒
单核细胞增多症	E.B. 病毒	疱疹病毒
CMV病（病毒性肺炎、单核细胞增多症样综合症）	巨细胞病毒	疱疹病毒
重症急性呼吸道综合症（SARS）	人冠状病毒	冠形病毒
带状疱疹	水痘带状疱疹病毒	疱疹病毒
天花	天花病毒	痘病毒
黄热病	黄热病病毒	黄病毒
西尼罗河热	西尼罗河病毒	
西方马脑炎	西方EE病毒	披膜病毒
肺炎、肝炎、急性呼吸道疾病	腺病毒	腺病毒
肠胃炎	轮状病毒	轮状病毒
脑炎	塞姆利基森林病毒	甲病毒
牛痘	痘苗病毒	痘病毒
脑炎	委内瑞拉EE	甲病毒
脑膜炎、脑炎、脑膜脑炎	淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒	沙粒病毒
委内瑞拉出血热	瓜纳瑞托病毒	沙粒病毒
里夫特裂谷热（出血热、脑炎）	里夫特裂谷热病毒	布尼亚病毒
马尔堡出血热	马尔堡病毒	线状病毒
蜱传性脑炎	蜱传脑炎病毒（TBEV）	黄病毒
脑炎	Hendra virus	副粘病毒

[0703]

脑炎	Nipah virus	副粘病毒
克里米亚－刚果出血热	克里米亚－刚果出血热病毒	布尼亚病毒
巴西出血热	沙比亚病毒	沙粒病毒

[0704] 本发明尤其预计可用于治疗 CMV 相关疾病，例如病毒性肺炎、单核细胞增多症类综合症和相关的先天畸形（耳聋和精神发育迟缓）；呼吸道疾病，例如 RSV 引起的疾病，包

打印ID7584222 Pg 94

括细支气管炎和病毒性肺炎、流行性感冒、普通的感冒和 SARS ;AIDS ;肝炎 ;与病毒感染相关的癌症 ;单核细胞增多症 ;和天花。

[0705] 在其他实施方案中,发明者尤其考虑对在人体中有致病性的沙粒病毒进行抑制。沙粒病毒包括造成拉沙热(拉沙病毒)和淋巴细胞性脉络丛脑膜炎(LCMV)的老世界病毒(Old World viruses)。拉沙热是西非的地方流行病,每年感染多达 300,000 人并引起高达 3000 人死亡。拉沙热的感染在约 10 天内导致发热和不适。腹痛、恶心、呕吐和腹泻是常见的。可能发生咽炎和咳嗽。神经上的症状经常是轻微的。诸如浮肿和胸腔积液等的血管渗漏综合症在更严重的病例中存在。在约四分之一的患者中可见到出血。此疾病可在心血管系统中引起改变并最终导致休克和死亡。

[0706] 沙粒病毒还包括造成大腹菌出血热(胡宁病毒)、波利维亚出血热(马丘坡病毒)和委内瑞拉出血热(瓜纳瑞托病毒)的抗原独特型新世界病毒(New World viruses)。所有这些病毒均在可能的生物恐怖主义武器的 A 类型 CDC 名单上。

[0707] 适用于抗肿瘤实施方案的剂量还适于抗病毒治疗。类似地,多重施用可用于慢性感染,高剂量可用于急性感染。任何适当的施用途径都可应用,如同针对癌症治疗方面所公布的,包括 IV、IM、SC,针对肺或气道的气雾剂等等。

[0708] 本发明所提供的治疗剂是具有广谱抗病毒活性的有用药剂。除了对多种潜在的致命病毒有效外,还可以在暴露于病毒后施用所说的药剂,甚至在病毒的确切特性未知的情况下也可应用。因此,本发明的抗病毒疗法不要求病原体鉴别和进行治疗给药之间的很长时间,与特 异性疫苗的开发、生产或递送所需的时间和费用形成了鲜明的对照。

[0709] 提供下列实施例以证实本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当认识到,下列实施例中公开的技术代表了本发明人发现的技术可在本发明实践中良好运用,由此视为构成了其实践的优选方法。然而,本领域技术人员根据本公开内容应当认识到,无需偏离本发明的精神和范围即可在公开的具体实施方案中进行许多变化而仍获得相同或相似的结果。

[0710] 实施例 I

[0711] 用抗 VCAM-1 — tTF 凝血配体进行肿瘤治疗

[0712] 本实施例显示了在将靶向肿瘤血管系统的凝血剂(“凝血配体”)施用于患肿瘤的动物后造成的体内肿瘤血管系统的特异凝血以及由此产生的抗肿瘤效果。在此凝血配体中,针对 VCAM-1(血管内皮粘附分子 -1,VCAM-1)的抗体被用作靶向剂而将截短的组织因子(tTF)(一种修饰形式的人凝血剂)递送至肿瘤血管。

[0713] 分泌抗小鼠 VCAM-1 的大鼠 IgG1 抗体的 MK2.7 杂交瘤获自美国典型培养物保藏中心(ATCC,Rockville,MD ;ATCC CRL1909)。分泌抗小鼠病毒蛋白 p30gag 的大鼠 IgG1 抗体的 R187 杂交瘤获自 ATCC,并被用作抗 VCAM-1 抗体的同种型匹配对照。

[0714] 用抗 VCAM-1 抗体免疫组化检测具有皮下 L540 人 Hodgkin's 肿瘤的小鼠主要器官和肿瘤的血管中 VCAM-1 的表达。大体上,在作为阳性对照的抗一内皮糖蛋白抗体 MJ7/18 染色的 20 — 30%总肿瘤血管上观察到 VCAM-1 的表达。在患肿瘤动物和正常动物的心脏和肺中都发现了 VCAM-1 的组成型血管表达。在 VCAM-1 严格表达于血管外的睾丸中观察到强的基质染色。

[0715] 用抗 VCAM-1 抗体静脉注射带皮下 L540 肿瘤的小鼠,两小时后,将小鼠放血。切下

打印ID7584222 Pg 95

肿瘤和正常器官，制备冷冻切片并进行免疫组化检测 以确定抗体的位置。在肿瘤、心脏和肺的内皮上检测到抗 VCAM-1 抗体。染色是特异的，因为在用无关特异性的物种同种型匹配抗体 R187 注射的小鼠内肿瘤和器官中观察到无内皮染色。在睾丸和除了心脏和肺之外的任何正常器官中均发现无抗 VCAM-1 抗体的定位。

[0716] 用已截短的组织因子 (tTF) 制备抗 VCAM-1 • tTF 缀合物或“凝血配体”。抗 VCAM-1 • tTF 凝血配体的静脉内施用诱导了患肿瘤小鼠中肿瘤血管的选择性血栓形成，与正常组织中的血管相反。

[0717] 将抗 VCAM-1 • tTF 凝血配体施用于皮下带直径为 0.4 — 0.6cm 的 L540 肿瘤的小鼠。在注射凝血配体前，肿瘤正常，具有无坏死区的均衡的形态。肿瘤是很好的血管化的，完全无自发形成血栓的血管或出血。在凝血配体注射 4 小时后，40 — 70％的血管形成血栓，尽管最初只有 20 — 30％的肿瘤血管染色。形成血栓的血管包含堵塞的血小板聚集、压紧的红细胞和纤维蛋白。在许多区域中，血管已破裂，红细胞溢出至肿瘤间质组织中。

[0718] 凝血配体注射后 24 小时，血管仍然被堵塞，并且广泛的出血已扩散至整个肿瘤。肿瘤细胞已相互分离，具有固缩核并正经历细胞溶解。72 小时时，整个肿瘤中都可见明显的高程度坏死。有可能起始的凝血配体诱导的凝血酶沉积作用导致了主要血管上 VCAM-1 靶抗原的诱导增加，因此扩大了靶向和肿瘤破坏作用。

[0719] 抗 VCAM-1 •tTF 在肿瘤血管上的血栓形成作用是抗原特异性的。同等量施用的对照药剂（只有 tTF、只有抗 VCAM-1 抗体、tTF 加抗 VCAM-1 抗体或无关特异性的对照凝血配体）均不造成血栓形成。

[0720] 除了肿瘤血管的血栓形成外，此研究还显示了抗 VCAM-1 • tTF 凝血配体的静脉内施用不会诱导正常器官中血管的血栓形成。尽管 VCAM-1 在正常小鼠或患 L540 肿瘤的小鼠的心脏和肺血管上均表达，在施用抗 VCAM-1 • tTF 凝血配体后不发生血栓形成。在 4 或 24 小时前注射了 5 — 45μg 凝血配体的 25 只小鼠中未观察到血栓形成、组织损伤或形态改变的迹象。来自较多肿瘤血栓形成的同一小鼠的心脏和肺具有正常组织学外观。所有其他的主要器官（脑、肝、肾、脾、胰腺、肠、睾丸）也 具有未改变的形态。

[0721] 当用抗 TF 抗体，10H10，或抗大鼠 IgG 抗体显色时，来自经凝血配体处理的小鼠的器官和肿瘤冷冻切片显示出一致的染色模式，证实了凝血配体已定位于心脏、肺和肿瘤中的血管。染色强度与凝血配体直接以高浓度施用于切片随后用抗 TF 或抗大鼠 IgG 显色的情况下观察到的相等，表明体内已达到结合饱和。

[0722] 这些研究显示，凝血配体与心脏和肺中正常血管系统内 VCAM-1 的结合不足以诱发血栓形成，且肿瘤血管系统提供了更多的因子来支持凝血。

[0723] 在带有 0.3 — 0.4cm^3L540 肿瘤的 SCID 小鼠中测定抗 VCAM-1 •tTF 凝血配体的抗肿瘤活性。间隔 4 天静脉内注射药物 3 次。与所有其他组相比，处理后 21 天时抗 VCAM-1 •tTF 处理小鼠的平均肿瘤体积显著减小 ($p<0.001$)。用特异性凝血配体处理的总共 15 只小鼠中有 9 只显示出肿瘤体积有超过 50％的降低。此作用是特异的，因为未缀合 tTF、对照 IgG 凝血配体以及游离抗 VCAM-1 与 tTF 的混合物不会影响肿瘤的生长。

[0724] 实施例 II

[0725] 肿瘤血管上的磷脂酰丝氨酸表达

[0726] 为了解释为何抗 VCAM-1 •tTF 在心脏和肺的 VCAM-1 阳性血管系统中无血栓形成作

打印ID7584222 Pg 96

用，某些发明者提出了正常血管和肿瘤血管之间存在有差异的氨基磷脂和阴离子磷脂（如PS和PE）定位的设想。具体的说，他们猜测正常组织中的内皮细胞将氨基磷脂和阴离子磷脂（如PS和PE）隔离于质膜磷脂双分子层的内表面，在此PS不能参与血栓形成反应；而肿瘤中的内皮细胞则将氨基磷脂和阴离子磷脂转位至质膜的外表面，在此PS能支持凝血配体的凝血活动。细胞表面的PS表达使凝血得以形成，因为它使凝血因子能附着于膜上并协调凝血起始复合物的装配。

[0727] 如本文所提出的，发明者将氨基磷脂和阴离子磷脂转位至肿瘤血 管内皮细胞表面的模型是不寻常的，其中PS的表达不是在细胞死亡之后发生，也不会不可避免地引起细胞死亡。肿瘤内皮细胞表面的氨基磷脂和阴离子磷脂因此足够稳定，能使氨基磷脂和阴离子磷脂（如PS和PE）能用作干预治疗的可靶向实体。

[0728] 为了证实肿瘤血管内皮在质膜内腔表面表达PS的猜测，发明者利用以下的免疫组化研究来确定抗PS抗体在静脉内注射入患L540肿瘤的小鼠体内后的分布。

[0729] A. 方法

[0730] 抗PS和抗心磷脂抗体均为小鼠单克隆IgM抗体，如实施例IV所述由Rote等人.(1993，引入本文作为参考）生产和鉴定。3SB的主要反应性是与PS反应，但它也与氨基磷脂磷脂酸（质膜上相对较少的一种组分，它也紧密的被隔离于正常细胞内表面）有反应性。

[0731] 用20μg抗PS或抗心磷脂小鼠IgM抗体静脉内注射患L540肿瘤的小鼠。10分钟后，将小鼠麻醉并用肝素化的盐水灌注其血液循环系统。切下肿瘤和正常组织并速冻。用检测抗PS抗体的HRP标记抗小鼠IgM或者用抗VCAM-1抗体并随后加HRP标记的抗大鼠Ig对器官和肿瘤的连续切片染色。

[0732] 为了在冷冻切片上保留膜磷脂，提出了以下方法。用含2.5mM Ca^{2+}的DPBS灌注动物。将组织放置于3－氨基丙基三乙氧基甲硅烷包被的载片上并在24小时内染色。在载片的固定或清洗中不使用有机溶剂、甲醛或去污剂。用含2.5mM Ca^{2+}和0.2%明胶的DPBS将载片再水合。同样的溶液也用于漂洗切片以去除过量的药剂。将切片与HRP标记的抗小鼠IgM室温保温3.5小时以检测抗PS IgM。

[0733] B. 结果

[0734] 此免疫组化研究显示抗PS抗体在10分钟内定位于大多数肿瘤血管，包括可能缺乏VCAM-1的肿瘤中心区内的血管。对VCAM-1呈阳性的血管对PS也呈阳性。因此，PS在肿瘤内表达VCAM-1的血管上有一致的表达。

[0735] 在体内定位研究中，包括心脏和肺的VCAM-1阳性血管系统在内的 正常器官中没有血管被染色，表明内皮细胞外表面没有PS。相反，当用抗PS抗体体外直接对正常组织和肿瘤的切片染色时，在正常的和肿瘤的内皮或其他细胞类型之间没有明显的不同，表明PS存在于这些细胞内，但只在肿瘤内皮细胞表面表达出来。

[0736] 通过两个独立的实验证实了PS检测的特异性。首先，针对不同的带负电磷脂（心磷脂）的小鼠IgM单克隆抗体在体内不归于肿瘤或任何器官。其次，将冷冻切片用丙酮预处理消除了抗PS抗体的染色，据推测可能是因为它将脂质连同结合的抗PS抗体一起萃取掉了。

[0737] 实施例III

[0738] 膜联蛋白V阻断了凝血配体的活性

打印ID7584222 Pg 97

[0739] 本实施例从利用高亲和力 PS 结合性配体（膜联蛋白 V）在体外和体内阻断 PS 功能的有关研究中提供了进一步的证据证明表面 PS 表达在凝血配体活性中的作用。

[0740] A. 膜联蛋白 V 在体外阻断了因子 X 的凝血配体活化作用

[0741] 用呈色试验测定膜联蛋白 V 影响凝血配体所诱导的因子 X 形成的能力。将 IL-1α 刺激的 bEnd.3 细胞与抗 VCAM-1 • tTF 一起保温并用皂素使其透化。添加 0.1 — 10μg/ml 范围浓度的膜联蛋白 V，将细胞保温 30 分钟，然后加入稀释的 Proplex T。测定在膜联蛋白 V 存在或缺乏的条件下产生的因子 Xa 的量。用双份平行试样进行各个测定并重复至少两次。

[0742] 在凝血配体的作用中需要表面 PS 的表达通过发明者的下述发现得到了进一步的证明，即可与 PS 以高亲和力结合的膜联蛋白 V 在体外阻断了抗 VCAM-1 • tTF 结合 bEnd.3 细胞从而产生因子 Xa 的能力。

[0743] 向与抗 VCAM-1 •tTF 预保温过的透化细胞中加入膜联蛋白 V 会以剂量依赖型的方式抑制因子 Xa 的形成。在缺乏膜联蛋白 V 的情况下，细胞结合的凝血配体每 60 分钟在每 10000 个细胞内产生 95ng 因子 Xa。逐步增加所加入膜联蛋白 V 的量（在 μg/ml 的范围内）抑制了因子 Xa 的产生。当添加量为 10μg/ml 时，膜联蛋白 V 抑制了 58%的因子 Xa 的产生。在试 验期间逐步提高膜联蛋白 V 的浓度未观察到更多的抑制，表明在 10μg/ml 时膜联蛋白 V 饱和了所有可供利用的结合位点。

[0744] B. 膜联蛋白 V 阻断了体内的凝血配体活性

[0745] 在患 L540Hodgkin 的 SCID 小鼠中检测膜联蛋白 V 抑制体内凝血配体诱导血栓形成的能力。在小鼠中生成肿瘤，两只小鼠一组（肿瘤尺寸为直径 0.5cm）用以下药剂中的一种从尾静脉处静脉内注射 :a) 生理盐水 ;b)100μg 膜联蛋白 V ;c)40μg 抗 VCAM-1 • tTF ; d)100μg 膜联蛋白 V 并在 2 小时后注射 40μg 抗 VCAM-1 • tTF。

[0746] 最后一次注射 4 小时后，麻醉小鼠并用肝素化的盐水灌注。切下肿瘤，用 4%的福尔马林固定、石蜡包埋并用苏木精一伊红染色。对形成血栓和未形成血栓的血管进行计数，并计算血栓形成的百分率。

[0747] 膜联蛋白 V 还封闭了体内抗 VCAM-1 • tTF 凝血配体的活性。用对照或实验药剂之一处理带肿瘤的小鼠组。给小鼠施加 a) 生理盐水 ;b)100μg 膜联蛋白 V ;c)40μg 抗 VCAM-1 •tTF ;d)100μg 膜联蛋白 V 并在 2 小时后施加 40μg 抗 VCAM-1 •tTF 凝血配体。在每组的两只小鼠中都得到了相同的结果。

[0748] 在盐水注射小鼠的肿瘤中未观察到自发的血栓形成、出血或坏死。单独用膜联蛋白 V 处理不改变肿瘤的形态。

[0749] 按照本文所提供的其他结果，40μg 抗 VCAM-1 • tTF 凝血配体在总共 70%的肿瘤血管中引起血栓形成。大多数血管被聚集的红细胞和血凝块堵塞，肿瘤细胞相互分离。通过用膜联蛋白 V 预处理小鼠，完全消除了凝血配体诱导的抗肿瘤作用，即血管内血栓形成和肿瘤细胞形态的改变。

[0750] 这些发现证明了凝血配体的抗肿瘤效果是通过肿瘤血管的堵塞介导的。这些数据还证明了 PS 是体内凝血配体诱导的血栓形成所必需的。

[0751] 实施例 IV

[0752] 产生抗氨基磷脂、阴离子磷脂和复合物的抗体

打印ID7584222 Pg 98

[0753] 此实施例描述了发明者根据其对肿瘤血管内皮细胞中氨基磷脂和阴离子磷脂转位的观察设计的、且已发现在抗氨基磷脂和阴离子磷脂抗体产生中运作良好的免疫接种方法。获得了许多与诸如 PS 和 PE 等氨基磷脂和阴离子磷脂有反应性的抗体。在本实施例和以下实施例中，为了简便起见，与 PS 有反应性的抗体可称为“抗 PS 抗体”，尽管某些这样的抗体的结合并不局限于 PS，而是如本文所示延伸到了某些其他的氨基磷脂和阴离子磷脂。

[0754] A. 免疫接种方案

[0755] 为了将氨基磷脂和阴离子磷脂作为较强的免疫原呈递于免疫系统中，将氨基磷脂和阴离子磷脂制备成氨基磷脂阳性和阴离子磷脂阳性细胞。插入膜且被其他膜组分所包围的氨基磷脂和阴离子磷脂对于产生抗体来说具有更好的构象和清除率。

[0756] 意图用表达氨基磷脂和阴离子磷脂（在此实施例中以 PS 为示范说明）的自体细胞免疫有免疫能力的动物，其中所述动物不会产生抗所有自身表面抗原的抗体，但会将膜暴露的磷脂（如 PS）识别为外源成分。此方案可应用于任何标准实验室动物的使用中，例如有免疫能力的 BALB/c 小鼠和 Lewis 大鼠，以及任何氨基磷脂阳性或阴离子阳性细胞。

[0757] 首先选择 BALB/c 小鼠和小鼠内皮细胞 bEnd.3（永生化的小鼠 (BALB/c 株系）内皮细胞）。在 10％ CO_2 培养箱中将 bEnd.3 培养于含 9ml/500ml HEPES 缓冲液的 10％ DMEM 中。将 bEnd.3 细胞在 T175TC 烧瓶中扩大培养，直到获得所期望的细胞数目。一般而言，各烧瓶在细胞汇合至约 70 － 80％时有约 3×10^6 个细胞，各小鼠应接受 1×10^6 至 20×10^6 个细胞，多达 1×10^7 个细胞。

[0758] 在 37℃用 50μM 至 200μM 过氧化氢处理 bEnd.3 细胞 1 小时或 2 小时，以便在免疫前暴露阴离子磷脂（例如 PS）。H_2O_2 的贮液是 [9.8M]；30％ (v/v)。将其 1:1000 稀释，然后将 0.4ml 加入含 40ml 培养基的 T175TC 烧瓶中至终浓度为 100μM H_2O_2。将细胞在 37℃保持 1 小时。为了收获，用温的 PBS(+10mM EDTA) 漂洗细胞 3 次以去除培养基中所有的 BSA 或 血清蛋白。用胰蛋白酶温和处理以取下细胞，漂洗并 1000rpm 离心 5 分钟。吸出上清液，并将细胞重悬于无添加剂的 DMEM 中至适当体积（每只小鼠接受在 200μl 中的约 1×10^7 个细胞）并保存于冰上。

[0759] 用 1ml 注射器和 23 号针头将以此方式处理的细胞 (200μl 细胞悬浮液）腹膜内注射入各个小鼠中。间隔 3 － 4 周免疫小鼠 3 － 7 次。从第二次激发开始，每次激发后 10 天给小鼠放血收集免疫血清。用 ELISA 测定抗 PS 的血清滴度。

[0760] 这些用自体 PS 阳性细胞进行的免疫不会导致自身抗体不受控的产生，而只局限于与 PS 有反应性、与联合了其他氨基磷脂和阴离子磷脂的 PS 有反应性和 / 或与联合了血清蛋白质的 PS 有反应性的抗体的产生。

[0761] 在另一项研究中，用经 200μM 过氧化氢处理 2 小时的 bEnd.3 内皮细胞免疫雌性 Lewis 大鼠。根据 ^{125}I- 标记的膜联蛋白 V 检测，此处理在 70 － 90％的细胞中造成阴离子磷脂转位至外表面。将处理后的细胞漂洗、分离并计数。将 200 万细胞悬浮于无菌 PBS 中并每隔 3 周腹膜内注射 5 次。每次免疫后 2 天测定针对阴离子磷脂的多克隆抗体的滴度。

[0762] B. 高滴度抗血清

[0763] 得到了具有高效价的与诸如 PS 等阴离子磷脂有反应性的抗体的小鼠（表 1）。小鼠未显示出任何的毒性迹象。尽管总体而言此免疫方法在小鼠中比在大鼠中更有效，对大鼠的免疫也是有效的，并且产生了 9D2 抗体（见下文）。

打印ID7584222 Pg 99

[0764] 表 1

[0765] 抗 PS IgG 抗体产生

[0766]

效价范围	每组小鼠的数目（占总数的 %）
1:100-1:1,000	2/30 (6.66%)
1:1000-1:10,000	5/30 (16.6%)
1:10,000-1:100,000	18/30 (60%)
1:100,000-1:1,000,000	5/30 (16.6%)

[0767] 在进一步的免疫中，用经过氧化氢处理的 bEnd.3 细胞免疫多种小鼠 3 次，并在首次免疫后 54 天检测血清。用抗小鼠 IgG，即 Fc 特异性二抗，检测血清中与 PS 有反应性的 IgG 抗体，用抗小鼠 IgG mu 特异性二抗检测血清中的 IgM 抗体。用此免疫方法获得了许多具有对 PS 有反应性的 IgG 和 IgM 的有效抗血清，其中含 IgG 抗体的抗血清通常更有效。

[0768] 这些方法现在可用于产生更多的特殊抗 PS 抗体，例如包括如下所述经筛选有效竞争 3G4 抗体的抗体。一般而言，当预期的抗 PS 抗血清的 IgG 滴度达到大于 200,000，而 PC 滴度小于 50,000 时，可进行融合而产生单克隆抗体。

[0769] 此外，这些方法并不局限于用 H_2O_2 开始处理细胞，因为诱导氨基磷脂和阴离子磷脂表达的其他方法也可应用。例如，用 TNF 和放线菌素 D 进行处理是另一种有用的方法。在一种情况下，在 37℃培养箱中用 10ng/ml 小鼠 TNF 和 1μg/ml 放线菌素 D 处理亚汇合（约 85%汇合）的 bEnd.3 细胞 16 小时。然后通过上述免疫步骤获得细胞。用膜破裂剂即溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 进行处理可以用于诱导 PS 暴露。

[0770] C. IgG 和 IgM 单克隆抗体

[0771] 通过将来自免疫动物的脾细胞与骨髓瘤配偶体 P3X63AG8.653 细胞 (ATCC, Rockville, MD) 融合得到杂交瘤。

[0772] 本发明者用于制备肿瘤治疗中有用的单克隆抗体的技术中一个重要方面是选择的策略，它包括通过筛选而选择可结合氨基磷脂或阴离子磷脂但不结合中性磷脂的抗体。另一重要的方面是选择不引起或显著造成抗磷脂综合症的抗体。

[0773] 分离与 PS 有反应性的单克隆抗体的方法包括例如用抗小鼠 IgG，即 Fcγ 特异性二抗，在 PS 包被平板上筛选杂交瘤上清液。首先进行针对四种磷脂 (PS，磷脂酰丝氨酸；PE，磷脂酰乙醇胺；CL，心磷脂；和 PC，卵磷脂）以及 bEnd.3 细胞的筛选。丢弃与中性磷脂 PC 有反应性的克隆与 bEnd.3 细胞无反应性的克隆。选择高度结合抗 PS 的克隆。首先亚克隆只具有 PS 反应性或强烈倾向于 PS 的孔，其次亚克隆展示了 PS 反 应性并且可与其他阴离子磷脂结合的孔。

[0774] 在以下研究中，按 Rote 等人 (1993) 所述生产且被称为 3SB、D11 和 BA3 的小鼠单克隆 IgM 抗体也包括在内。3SB 抗体在该文献中被描述为抗 PS 抗体，而 D11 抗体在该文献中被描述为抗心磷脂（抗 CL）抗体。Rose 等人 (1993，引入本文作为参考）报道了这些抗

打印ID?584222 Pg 100

体的产生和鉴定的详情。

[0775] 测定发明者所制备的各选定杂交瘤的同种型。IgG 类抗体具有许多优越于 IgM 之处，包括通常亲和力较高、体内清除率较低以及纯化、修饰和处理的简便性，所以它们的产生是尤其合乎需要的。为了集中于具有均一 IgG 同种型的孔，将含 IgM 或不同 Ig 混合物的孔丢弃或重克隆。高阳性克隆的亚克隆被重复 3 － 4 次。

[0776] 根据 ELISA 所测定的代表性的 IgG 和 IgM 抗体同种型见表 2。在将其命名改变成 3G4 之前，发明者最初将 3G4 抗体称为“F3-G4”。这并未反映生物材料的任何变化。抗体的血清依赖性或不依赖性也参见表 2（还可参见实施例 XXX）。

[0777] 表 2

[0778] 抗 PS 抗体的同种型和血清依赖性

[0779]

名称	来源	物种/同种型	血清依赖性？
3SB	Rote等人，1993	小鼠IgMκ	不
D11	N. Rote	小鼠IgMκ	
BA3	Rote等人，1993	小鼠IgMκ	
3G4	此研究	小鼠IgG_3κ	是，β2-糖蛋白I
2aG4	此研究	小鼠IgG_{2a}	是
Ch3G4	此研究	人嵌合型IgG_1	是
9D2	此研究	大鼠IgMκ	不
P2D9	此研究	小鼠IgG_3	
1B12	此研究	小鼠IgG_1κ	
1B9	此研究	小鼠IgG_1κ	是
3B10	此研究	小鼠IgG_3κ	是，至少β2-糖蛋白I
2G7	此研究	小鼠IgG_1κ	是
7C5	此研究	小鼠IgG_1κ	是

[0780]

3F8	此研究	小鼠IgG_3	
膜联蛋白V			不

[0781] D. ELISA 方案和初始抗体鉴定

[0782] 用 ELISA 进一步研究抗体并与 3SB 和 D11 比较。用于本研究实施例中的抗 -PS ELISA 如下进行。除非详细说明具体的差异，这是本申请整个研究中所用的 ELISA 形式。后来开发了其他类型的 ELISA，来自那些研究的结果列在实施例 XXX 中。

[0783] 用抗原 PS（在 2.5ml 瓶中的 P － 664125mg10mg/ml（溶剂是氯仿 :MeOH95:5）示范说明了本实施例的 ELISA。其他的磷脂可以相同的方法利用。PS（或其他磷脂）贮液应等分分装并在 -30℃贮存于密封容器中。优选的 96 孔板是 Dynatech U 形底 Immulon1（来自 Dynatech Labs，目录号 011-010-3550）。

[0784] 本实施例所用的标准封闭缓冲液是溶于 PBS 中的 10％牛血清。其他的封闭溶液

打印ID7584222 Pg 101

也是合适的，但封闭和漂洗溶液中应不含任何去污剂。一抗是待测样品或混合物。优选的二抗是山羊抗小鼠 IgG-HRP。显色溶液是：10ml0.2M Na_2PO_4、10ml0.1M 柠檬酸、一片 10mg 的 OPD 和 10μl 过氧化氢。终止液是 0.18M H_2SO_4。

[0785] 本实施例的方案按如下步骤用 PS 包被 96 孔板：将 PS 贮液在正己烷中稀释至 10μg/ml 并混合均匀。在每个孔中添加 50μl 并使其蒸发 1 小时。在各孔中添加 200μl 10％的血清（或其他封闭缓冲液），覆盖并室温放置 2 小时或在 4℃过夜。用 PBS 漂洗平板 3 次。添加一抗（稀释于封闭缓冲液中）并在 37℃保温 2 小时。用 PBS 漂洗 3 次。添加 100μl/ 孔二抗（通常是山羊抗小鼠 IgG-HRP 或其他合适的二抗）并在 37℃保温 1 小时。用 PBS 漂洗平板 3 次。ELISA 的显色进行如下：添加 100μl 显色溶液至各孔中，显色 10 分钟，然后在各平板中加入 100μl 终止液并读取 490nm 处的 O.D. 值。

[0786] 以下是 9D2、1B12、3G4 和 1B9 的结果。测定这些抗体对 PS 的亲和力并与 3SB 进行比较。与 3SB 相比，新抗体的某些相对亲和力有了很大的提高（表 3）。

[0787] 表 3

[0788] 抗 PS 抗体的相对亲和力

[0789]

名称	EC_{50}（μg/ml）[1]	相对3SB的结合（提高倍数）	EC_{50}（nM）[2]	相对3SB的亲和力（提高倍数）
3SB	0.468	1	0.518	1
D11	>40.0	0.011	>44.4	0.011
9D2	0.104	4.50	0.115	4.50
1B12	0.312	1.50	2.07	0.25
3G4	0.040	11.7	0.266	1.94
1B9	0.019	24.6	0.126	4.11
膜联蛋白V[3]	0.100	4.68	2.77	0.18

[0790] [1] 基于组织培养上清液的稀释液；用抗小鼠或大鼠 Igs 作为俘获抗体通过夹心 ELISA 测定 IgG 和 IgM 的浓度。所有克隆平均分泌 10 － 15μg/ml 的 Ig。

[0791] [2] 用于转换的分子量：IgM － 900kDa，IgG － 150kDa，膜联蛋白 V － 36kDa。

[0792] [3] 膜联蛋白对 PS 的亲和力在 0.1nM 至 1nM 的范围内。此表中的值代表了用与抗 PS 抗体相同的 ELISA 条件通过链霉抗生物素蛋白 -HRP 检测的市售生物素化膜联蛋白 V 的结合。

[0793] 用被以下磷脂包被的平板通过 ELISA 测定抗体的特异性：PS，磷脂酰丝氨酸；PE，磷脂酰乙醇胺；PI，磷脂酰肌醇；PA，磷脂酸；PG，磷脂酰甘油；PC，卵磷脂；CL，心磷脂；和 SM，鞘磷脂。将 9D2、1B12、3G4 和 1B9 的特异性模式与 3SB 和 D11 进行比较，如表 4 中所显示的。

[0794] 表 4

[0795] 抗 PS 抗体的磷脂特异性

打印ID7584222 Pg 102

[0796]

名称	在 ELISA 中反应性的相对强度[1,2]
3SB	PS = PA>>CL、PI、PE、PG
D11	CL = PA>>PS、PI、PE、PG
3G4	PS = PA = PI = PG = CL>>PE
2aG4	PS = PA = PI = PG = CL>>PE
Ch3G4	PS = PA = PI = PG = CL>>PE
9D2	PA>PS = CL>PG = PI>>PE
P2D9	PS>PE = CL(PC 不反应)
1B12	PS = PA>CL>PE = PI, PG
3B10	PS = PA = PI>>PE
1B9	只有 PS 反应
2G7	只有 PS 反应
7C5	只有 PS 反应
3F8	PS>PE>CL(PC 反应很小或不反应)
膜联蛋白 V	PS = PE = PI = PA>CL>PG

[0797]

[0798] [1] 符号“>”表明在相同抗体浓度下测试时与各种磷脂的结合至少有 2 倍的差异。

[0799] [2] 符号“>>”表明在相同抗体浓度下测试时与各种磷脂的结合至少有 10 倍的差异。

[0800] 1B9、2G7 和 7C5 抗体表现基本上相同。这些抗体只识别 PS，并在结合 PS 时需要血清或血清蛋白质。在本实施例中 1B9、2G7 和 7C5 与多种磷脂的结合只有在存在 10％牛血清的条件下才能检测到，而其他抗体则在缺乏或存在血清的条件下都可检测到。3SB 基本上缺乏与磷脂酰乙醇胺和磷脂酰肌醇以及磷脂酰胆碱和鞘磷脂的反应性（表 4）。

[0801] E. 进一步的抗体表征

[0802] 进一步测试 3G4 抗体与塑料固定化的磷脂的反应性。将磷脂溶解于正己烷中至浓度为 50μg/ml。将 100μl 这种溶液加入 96 孔微量滴定板的孔中。溶剂在空气中蒸发后，平板用在包含 2mM Ca^{2+} 的 DPBS（结合缓冲液）中稀释的 10％ FBS 封闭 2 小时。以 33nM 的起始浓度，将 3G4 抗体在 10％牛血清存在下在结合缓冲液中稀释。在平板中制备 2 倍系列 稀释物（100μl/ 孔）。平板随后在室温下孵育 2 小时。洗涤后，使用 HRP 山羊抗小鼠 IgG(1:1000 稀释）来检测 3G4。通过使用生色底物 OPD 随后通过使用微培养板阅读器 (Molecular Devices, Palo Alto, CA) 在 490nm 处读板，来检测第二级试剂。

[0803] 通过使用各种脂质体的竞争测定法来进一步证实磷脂识别的特异性。由在氯仿中的 5mg 单一磷脂 (PS、PI、PC、CL、PA) 来制备脂质体。溶液在氮气中干燥从而在圆底玻璃烧瓶中形成薄层。随后加入 10ml Tris 缓冲液 (0.1M, pH7.4)，并将烧瓶用超声处理 5 次，每次 2 分钟。3G4(6.6nM) 与 200μg/ml 脂质体溶液一起在室温下预孵育 1 小时。将混合物加入经磷脂包被的平板中。如上所述测定在不同脂质体存在或不存在下 3G4 结合固定的磷脂的能力。

[0804] 该正在进行的研究显示，3G4 是特异性地识别阴离子磷脂的小鼠 $IgG_3\kappa$ 单克隆抗体。在 5％牛血清（图 4）或人血清存在下它强烈地结合至用阴离子磷脂 (PS、PA、CL、PI) 包被的 ELISA 板。使用浓度为 0.2 － 0.4nM 的 3G4 时观察到半最大结合（图 4）。3G4 在 ELISA 中不结合中性磷脂 (PE、PC 和 SM)。具有无关特异性的对照小鼠 IgG_3 单克隆抗体不结合。通过从阴离子磷脂制备的脂质体，而不是从中性磷脂制备的脂质体，来阻断结合（图 3）。

打印ID7584222 Pg 103

[0805] 3G4 结合用具有饱和的（不可氧化的）二棕榈酰基侧链的合成 PS、PA 和 CL 包被的 ELISA 板，并结合具有单脂肪酸侧链的溶血磷脂酸。结合不受 5mM EDTA 存在的影响，显示结合不依赖于 Ca^{2+}。

[0806] 在本实施例的研究中，在血清不存在的情况下，与用阴离子磷脂包被的 ELISA 板的结合减少了 90％。在 1mg/ml 人 β2-糖蛋白 I 存在下恢复完全结合。结合不受凝血酶原、蛋白质、蛋白 C、蛋白 S、氧化的 LDL、HMW 激肽原、LMW 激肽原、因子 XII、组织纤溶酶原激活剂或膜联蛋白 A5 的影响。因此，现在已发现 3G4 抗体在血清或 β2-糖蛋白 I 存在下识别阴离子磷脂。本文实施例 XXX 中呈现了来自与这个表征相关的进一步研究的结果。

[0807] PS 是质膜中最丰富的阴离子磷脂，并在正常条件下在正常细胞中 被紧密隔离于质膜内表面。PS 是氨基磷脂。PE 也是氨基磷脂，但 PE 是中性的，非阴离子的。除了是中性氨基磷脂之外，PE 的表现与 PS 类似并通常紧密隔离于质膜的内表面。

[0808] PI 是质膜的另一主要阴离子磷脂，它在正常条件下更紧密的隔离于正常细胞内表面。PA 和 PG 是质膜中较少的阴离子磷脂 (Hinkovska-Galcheva 等人，1989)，它们通常也隔离于内表面。CL 是存在于线粒体膜中的阴离子磷脂，通常在质膜中没有。

[0809] PC 和 SM 是质膜中含胆碱的中性磷脂。PC 和 SM 在正常条件下均主要位于外表面。

[0810] 与本发明者关于正常血管和肿瘤血管之间氨基磷脂和阴离子磷脂表达不同的模型一致，用选定方法开发的抗不有与中性磷脂 PC 和 SM 反应。1B9 抗体特异于 PS，而 9D2、1B12 和 3G4 以表 4 中所示的优先性结合阴离子磷脂和氨基磷脂。9D2 抗体在实施例 VI 中也有描述。

[0811] 实施例 V

[0812] 外在化的磷脂酰丝氨酸是肿瘤血管的总体标记物

[0813] 本实施例显示在小鼠中生长的 10 种不同实体瘤中每一种的内皮细胞上都存在 PS 的暴露，而不是局限于实施例 II 中所述的 L540 肿瘤模型中。

[0814] 通过将针对 PS 的单克隆抗体静脉内注射入携带各种类型人或小鼠肿瘤的小鼠中来检测体内的外在化 PS。抗 PS 抗体显示出在所有 10 种不同的肿瘤模型中均特异性结合血管内皮。来自同一小鼠正常器官的血管内皮则不被染色。同种型匹配的对照单克隆抗体不定位于肿瘤或正常细胞。免疫组化方法还鉴定了凋亡细胞，其中肿瘤中很少内皮细胞表达凋亡的标记物。

[0815] 本实施例因此显示了肿瘤中的血管内皮细胞使 PS 外在化，而正常血管内的内皮细胞则不会使 PS 外在化。大部分具有暴露的 PS 的肿瘤内皮细胞不是凋亡细胞。因此 PS 是肿瘤血管系统中丰富且易接近的标记 物，能用于肿瘤血管的成像和治疗。

[0816] A. L540、H358 和 HT29 肿瘤

[0817] 用于这些研究中的抗 PS 抗体是被称为 3SB 的小鼠单克隆 IgM 抗体（实施例 IV，Rote 等人，1993）。3SB 主要结合 PS，但也与 PA（一种分布类似于 PS 但相对较少的阴离子磷脂）有反应性。所用的抗 CL 抗体是被称为 D11 的小鼠单克隆 IgM 抗体（实施例 IV，Rote 等人，1993）。

[0818] 首先在三种动物肿瘤模型中检测肿瘤血管和正常血管内皮上的 PS 暴露：L540 人 Hodgkin's 淋巴瘤、NCI H358 人非小细胞肺癌 (NSCLC) 和 HT29 人结肠直肠癌。为了在体内形成肿瘤，将 2×10^6 个细胞注射入 SCID 小鼠的右侧，使肿瘤长到直径 0.8 — 1.2cm。

打印ID7584222 Pg 104

[0819] 通过尾静脉将 20μg 抗 PS 或抗 CL 抗体静脉内注射入携带大肿瘤（体积大于 800mm^3）的小鼠。注射后 1 小时，麻醉小鼠并用肝素化的盐水灌注其血液循环系统。切下肿瘤和正常器官并速冻制备冷冻切片。用山羊抗小鼠 IgM（μ 特异性）-HRP 缀合物并随后以咔唑显色来检测小鼠 IgM。以 40 倍的放大倍数在每张切片上观察至少 10 个随机视野，计算阳性血管的平均百分率。

[0820] 抗 PS 抗体在体内特异导向于所有这三种肿瘤（HT29、L540 和 NCI-H358）的血管系统，与用小鼠 IgM 检测所显示的一样。在此第一组研究中，肿瘤中被染色的血管的平均百分率对于 HT29 来说是 80%，对于 L540 来说是 30%，对于 NCI-H358 是 50%。肿瘤中所有区域内的血管都被染色，并且小的毛细血管和较大的血管都被染色。

[0821] 在任何正常组织中都未观察到抗 PS 抗体对血管的染色。在肾中，抗 PS 和抗 CL 接受者二者的小管都被染色，这与 IgM 通过此器官分泌有关。除了肾之外，在任何肿瘤或正常组织中都未检测到抗 CL 抗体。这些发现表明只有肿瘤内皮将 PS 暴露于质膜外侧。

[0822] B. 小的和大的 L540 肿瘤

[0823] 为了估计肿瘤血管丧失将 PS 隔离于膜内侧的能力的时间点，对体积在 140-1600mm^3 之间的 L540 肿瘤检测抗 PS 的定位。

[0824] 按照肿瘤的尺寸将小鼠分成 3 组：140 — 300、350 — 800 和 800 — 1600 mm^3。在携带小 L540 肿瘤（不超过 300mm^3）的三只小鼠中都未检测到抗 PS 抗体。抗 PS 抗体定位于 5 只携带中等大小 L540 肿瘤小鼠中的 3 只内以及携带大 L540 肿瘤的所有小鼠（每组 4 只，4 只都是）内（表 5）。PS 阳性血管占总血管的百分率（通过泛内皮标记 Meca32 进行鉴定）在 L540 中等大小组中是 10 — 20%，在大 L540 肿瘤组中是 20 — 40%（表 5）。

[0825] 表 5

[0826] 在中等大小和大的肿瘤中检测的 PS 外在化

[0827]

肿瘤大小（mm^3）	阳性肿瘤数目 / 总数 *	% PS 阳性血管 / 总数 **
350-800	3/5	10-20
850-1600	4/4	20-40

[0828] * 按照肿瘤大小将携带 L540Cy 肿瘤的小鼠分成 3 组。静脉内注射 20μg 抗 PS 抗体并使其循环 1 小时。用抗小鼠 IgM- 过氧化物酶缀合物检测冷冻切片上的小鼠抗体。

[0829] ** 用泛内皮抗体 Meca32 测定血管的总数。在肿瘤的每张横切片上 4 个视野计数 PS 阳性和 Meca 阳性血管。表中显示了同一组中 PS 阳性血管的百分率范围。

[0830] C. L540、H358、HT29、Colo26、B16 和 3LL 肿瘤

[0831] 利用相同的抗 PS（3SB）和抗 CL（D11）抗体，通过另外三种动物肿瘤模型（总共 6 种）在进一步的研究中检测肿瘤血管和正常血管内皮上 PS 的暴露：L540 人 Hodgkin's 淋巴瘤、NCI H358 人非小细胞肺癌（NSCLC）、HT29 人结肠直肠癌、Colo26 小鼠结肠癌、B16 小鼠黑素瘤和 3LL 小鼠肺肿瘤。

[0832] 在这些研究中，使肿瘤在 SCID 小鼠中皮下生长至体积达到 0.4 — 0.7cm^3。每组用 3 只或更多的小鼠。静脉内注射溶于 200μl 盐水中的抗 PS 或抗 CL 小鼠 IgM 抗体（30μg/小鼠）。30 分钟后，将小鼠处死、放血并用肝素化的盐水灌注其血液循环系统。收获主要器官和肿瘤并速冻制备冷冻切片。用山羊抗小鼠 IgM（μ 特异性）-HRP 缀合物并随后以 咔唑显色检测小鼠 IgM。

打印ID7584222 Pg 105

[0833] 用针对小鼠血管泛内皮标记的单克隆抗体 MECA32 对肿瘤的系列切片染色。通过形态学和它们与抗小鼠 IgM 和 MECA32 一致的染色来识别 PS 阳性血管。由两个独立的观察者以盲法检测每张切片上至少 10 个随机视野 (0.317mm^2/ 视野)。计数 PS 染色阳性的 MECA32 一阳性血管百分率。在两个独立试验中的每一个中检测每种类型的三个肿瘤。计算平均值和标准偏差 (SE)。各组中,肿瘤间的总血管和 PS 阳性血管数目差异约为 10%。

[0834] 此研究中的所有 6 种肿瘤都包含 PS 阳性血管 (表 6A)。用 3SB 进行的 PS 检测是特异的,因为用抗 CL 抗体未观察到肿瘤内皮的染色 (表 6A)。在除了肾 (在抗 PS 和抗 CL 接受者二者中均有小管染色,反映了 IgM 的分泌通过此器官) 以外的正常器官中未观察到抗 PS 或抗 CL 抗体的血管定位。

[0835] 表 6A

[0836] 抗 PS 抗体对肿瘤血管的特异定位

[0837]

组织	抗 PS*	抗 CL
L540 肿瘤	19.3±3.3	0
H358 肿瘤	15.6±4.1	0
HT29 肿瘤	4.2±1.6	0
B16 肿瘤	40.6±5.4	0
3LL 肿瘤	5.3±3.7	0
Colo26 肿瘤	12.4±2.4	0
肾上腺	0	0
脑	0	0
心脏	0	0
肾	0**	0**
肠	0	0
肝	0	0
肺	0	0
胰腺	0	0
脾	0	0
睾丸	0	0

[0838] * 结果表示为每 0.317mm^2 的视野中 MECA32 染色血管中 PS 阳性血管的平均 (±SE) 百分率。分析每种类型的 6 个肿瘤。对于 L540、H358、HT29、B16、3LL 和 Colo26 肿瘤来说,每 0.317mm^2 的视野中 MECA32 阳性血管的平均数目分别是 25、21、17、18、27 和 22±10%血管。

[0839] ** 在抗 PS 和抗 CL 接受者中都可见无抗原特异性的小管染色。

[0840] 在这些研究中,PS 阳性血管的百分率变动范围是从 Colo26 肿瘤中的 10%至 B16 肿瘤中的 40%。抗 PS IgM 存在于肿瘤所有区域毛细血管和小静脉内腔表面。PS 阳性血管看起来在坏死区内和周围特别普遍。阳性血管通常未显示出形态异常,这在光学显微镜下是显而易见的。定位于坏死区的偶发血管显示出消退的形态学迹象。抗 PS 抗体 (但不是抗 CL 抗体) 也定位于坏死的和凋亡的肿瘤细胞。

[0841] 这些对照研究证明了 PS 一致地暴露于各种肿瘤的血管内皮内腔表面,但在正常组织中不会如此,且肿瘤血管系统表达不是模型特异性的。

[0842] D. 大部分 PS 阳性肿瘤血管不是凋亡性的

[0843] 用双标记技术鉴定肿瘤切片中的凋亡内皮细胞。用泛内皮细胞标记 MECA32 鉴定

打印ID7584222 Pg 106

内皮细胞。用两种独立的标记通过免疫组化方式鉴定凋亡细胞：鉴定垂死细胞中胞质变化的活性形式胱天蛋白酶-3(Krajewska 等人，1992) 和鉴定具有核变化的细胞的片段化 DNA(Gavrieli 等人，1992)。

[0844] 通过兔抗胱天蛋白酶-3特异性抗体 (R&D,Minneapolis,MN) 并随后与缀合了碱性磷酸酶的抗兔 IgG(AP,Pierce,Rockford,IL) 一起保温来检测活性胱天蛋白酶-3。以抗毛地黄毒苷-碱性磷酸酶缀合物作为检测药剂通过 Tunel 测定法 (ApopTag™ 试剂盒，Oncor，MD) 分析其他的肿瘤切片。用凋亡标记物（粉色）和内皮细胞标记物 MECA32（褐色）对切片双染色。如果内皮细胞和凋亡细胞的标记物一致，则两种颜色在同一细胞上都清晰可见。

[0845] 在 6 种类型肿瘤中有 5 种 (HT29、H358、B16、Colo26、L540) 的内 皮细胞不展示任何一种凋亡标记物（表 7)。第六种肿瘤 3LL 展示了定位于坏死区内的一些凋亡内皮细胞。相反，在所有类型肿瘤中凋亡的恶性细胞是常见的。凋亡肿瘤细胞的百分率是从 L540 肿瘤中的 1 － 2%到 3LL 肿瘤中的 12.6-19.6%的范围。

[0846] 表 7

[0847] 肿瘤中凋亡标记物的表达

[0848]

	活性胱天蛋白酶-3		Tunel测定法	
肿瘤类型	肿瘤细胞（总数的%）*	肿瘤血管	肿瘤细胞（总数的%）	肿瘤血管
3LL	19.8±4.3	<1.0**	12.6±3.6	0
HT29	13.7±2.3	0	7.8±2.5	0
H358	5.8±2.0	0	4.3±1.6	0
Colo26	5.3±1.5	0	4.1±1.5	0
B16	4.2±1.8	0	3.5±1.6	0
L540	2.3±1.0	0	1.6±0.5	0

[0849] *在每张切片的 10 个高倍视野下测定胱天蛋白酶-3 阳性或 Tunel 阳性的肿瘤细胞或肿瘤血管百分率。沿着从边缘通过肿瘤中心的两个垂直方向随机选择视野。表中显示了来自 6 只小鼠的肿瘤中阳性细胞或血管的平均（±SE) 百分率。

[0850] **3LL 肿瘤坏死区中的偶发血管（大于 100 条中有 1 条）展示了两种凋亡标记物。

[0851] E. MDA-MB-231 和 Meth A 肿瘤

[0852] 还在小鼠内生长的 MDA-MB-231 人乳腺肿瘤中和在皮下生长的小鼠 Meth A 纤维肉瘤中检测肿瘤血管内皮上的 PS 暴露。这些研究中所用的抗体是 9D2 抗体，按实施例 IV 中所述产生，它对阴离子磷脂有反应性。

[0853] 如实施例 VI 中所述，9D2 定位于以下肿瘤的肿瘤血管：L540、NCI-H358 和 B16 肿瘤，以及同位生长于 SCID 小鼠乳房脂垫中的 MDA-MB-231 模型以及皮下生长的 Meth A 纤维肉瘤。9D2 定位于所有 5 种 肿瘤的肿瘤血管。肿瘤中的血管内皮显示出独特的膜染色。9D2 抗体还定位于坏死肿瘤细胞和凋亡肿瘤细胞的膜和胞质上。在被检测的 10 种正常器官中的 9 种内未观察到 9D2 抗体的血管定位，在肾中观察到小管的非特异染色。

打印ID7584222 Pg 107

[0854] 还进行了双染色研究，其中用生物素化的 9D2 抗体静脉内注射携带同位 MDA — MB — 231 乳房肿瘤的小鼠，稍后用 FITC 缀合的 MECA32 对冷冻切片染色（实施例 VI）。约 40％ MECA32 阳性血管可结合 9D2。

[0855] F. MD-MBA-435 肿瘤

[0856] 在进一步的乳癌模型中，在小鼠内生长的 MDA — MB — 435 人乳癌细胞中检测肿瘤血管内皮上的 PS 暴露。用于这些研究中的抗体是嵌合形式的 3G4 抗体 (ch3G4)。3G4 抗体的产生如实施例 IV 所述，而嵌合 3G4 抗体的生产则详见实施例 XIX。ch3G4 对 MDA-MB-435 模型中肿瘤血管内皮的定位更详述于实施例 XIX 中。

[0857] 简而言之，用 MDA-MB-435s 细胞建立肿瘤，并施用生物素化形式的嵌合 3G4 抗体和无关特异性的对照 IgG。肿瘤切片用 Cy3 一缀合的链霉抗生物素蛋白染色来检测生物素化的蛋白质。用 MECA32 抗体及随后加入的 FITC 标记抗大鼠 IgG 二抗进行双染色以检测血管内皮。此检测方法用红色和绿色标记生物素化的蛋白质和血管内皮，所以在会聚的图像中结合在内皮上的生物素化蛋白质呈现黄色。此研究显示嵌合 3G4 抗体对肿瘤血管内皮有特异性定位。

[0858] 在类似研究中，通过腹膜内或静脉内注射抗体并在 1 小时、6 小时或 24 小时后给小鼠放血来测定 3G4 在体内选择性定位于肿瘤血管的能力。给肿瘤和正常组织的冷冻切片染色以确定小鼠免疫球蛋白的存在。使用已证实为具有不可检测的循环免疫球蛋白的 SCID 小鼠以避免背景染色。在这些研究中，切片用抗小鼠 CD31 复染以检测血管内皮并合并图像。将定位的 3G4 和 CD31 之间染色的同时存在视为特异性定位的证据。同时存在的染色呈现黄色，除非那个区域中特别强烈的绿色或红色荧光占优势。血管定位的抗原特异性通过肿瘤中缺乏内皮染色来证实，所述肿瘤来自用同种型匹配的对照抗体 BBG3 注射的小鼠。

[0859] 在这些研究中，如合并图像所测定的，在经腹膜内或静脉内注射到具有同位 MDA-MB-435 乳腺肿瘤的小鼠中后，3G4 定位于平均 40±10％的肿瘤血管中。在腹膜内注射 3G4 后，对肿瘤血管的定位在注射后 1 小时显现并在注射后 6 小时最大，而静脉内注射的 3G4 在注射后 1 小时内产生最大染色。经标记的血管在肿瘤的所有区域中可见，但在坏死区域内和周围特别丰富。在较大的血管中，有时观察到单个血管中 PS 暴露的不均一性。在某些血管的内皮周围也可见其中 3G4 已渗漏到肿瘤间质中的区域。在肿瘤坏死区域内和周围的肿瘤细胞被染色。在来自用对照抗体 BBG3 注射的小鼠的肿瘤中没有观察到坏死的肿瘤细胞的染色，这表明在用 3G4 注射的小鼠中对坏死肿瘤细胞的定位是抗原特异性的。

[0860] 在经静脉内注射 3G4 或对照抗体 (BBG3) 的小鼠中，初期 4 小时没有观察到 3G4 定位于正常组织的血管内皮。经检查的正常组织是：心脏、肺、肝、胆囊、食道、胃、胰腺、十二指肠、盲肠、直肠、肾、肾上腺、脾、脑、眼、唾液腺和卵巢。这些正常组织的非血管组分也是未被染色的。

[0861] G. RIP- 标签肿瘤

[0862] 对于第十种模型，在多阶段癌发生的“RIP- 标签”转基因小鼠模型 (RIP1- 标签 2) 中检测肿瘤血管内皮上的 PS 暴露。在此转基因小鼠模型中，由于 SV40T 抗原（标签）癌基因在产生胰岛素的 β 细胞中的表达，每只小鼠在 12 — 14 周龄前发生胰腺的胰岛肿瘤。肿瘤分多阶段自过度增殖的胰岛发展，且需要有血管发生的开关从而发展成恶性。基质金属蛋白酶 -9 调控血管发生开关 (REF)。

打印ID?584222 Pg 108

[0863] 与 UCSF 病理系教授 Donald McDonald 博士合作在 RIP1- 标签 2 模型中进行 9D2 定位研究。当所有小鼠都具有小的、高度血管化的实体瘤时，将 9D2 静脉内注射入 10 周龄以上大的 RIP1- 标签 2 小鼠。进行厚肿瘤切片 (80 μ m) 的双染色来鉴别肿瘤和正常胰腺中的定位 9D2 和 CD31。胰腺肿瘤中约 50％的血管 (CD31 阳性) 具有已定位的 9D2，而正常胰岛中的血管则未被染色。用对照大鼠 IgM 注射的小鼠具有弱的且不频繁的肿瘤血管染色。9D2 和对照大鼠 IgM 向内皮外的血管外组织的某些渗漏也是明显的。

[0864] H. 肿瘤定位研究概述

[0865] 本发明人现在已研究了各种抗 PS 抗体对在具有许多不同肿瘤的小鼠中的肿瘤血管的定位。来自此类研究的组合结果概括于表 6B 中。抗 PS 抗体定位于所有肿瘤的肿瘤血管中，而在正常器官中没有观察到血管定位 (表 6B)。

[0866] 表 6B

[0867] 抗 PS 抗体对肿瘤和正常血管的定位

[0868]

打印ID7584222 Pg 109

组织	定位
肿瘤组织	
L540 Hodgkin's	+ +
H358 NSCLC	+ +
HT29结肠	+ + +
Colo 26结肠	+ +
B16黑素瘤	+ + +
3LL肺	+ + +
MDA-MB-231	+ + +
MDA-MB-435	+ + +
Rip-Tag	+ + +
正常组织	
肾上腺	-
脑	-
心脏	-
肾	-
肠	-
肝	-
肺	-
胰腺	-

[0869]

脾	-
睾丸	-

[0870] 因此，本实施例证实了肿瘤中的血管内皮细胞使 PS 和阴离子磷脂外在化至其内腔表面，在此它们能被体内的抗 PS 抗体结合。在正常组织中血管内皮细胞外表面无 PS，表明识别 PS 的抗体、膜联蛋白 V 和其他配体可用于递送细胞毒性药物、凝血剂和放射性核素以供实体瘤中血管的选择性成像或破坏。

[0871] 在极大程度上，PS 阳性肿瘤内皮看起来在此研究所用的肿瘤中是有活力的。它没有呈现出凋亡的标记，在形态上是完整的且代谢活跃，正如其中 VCAM-1、E- 选择蛋白和其

打印ID7584222 Pg 110

他快速转换蛋白的表达所显示的。尽管经常被认为是凋亡的指示特征，PS 的暴露还在几种类型的存活细胞中观察到，包括恶性细胞 (Rao 等人，1992)、(Utsugi 等人，1991) 活化的血小板 (Rote 等人，1993) 以及在迁移、基质入侵和融合各阶段的胚胎营养细胞 (Adler 等人，1995)。

[0872] 在去除凋亡原刺激物后恢复 PS 不对称性且正常生长的凋亡前 B 淋巴瘤细胞上也显示出 PS 的暴露与细胞死亡命运之间无相关性 (Hammill 等人，1999)。在正常存活细胞中，通过诸如配体 - 受体相互作用等诱导 Ca^{2+} 流入细胞的表面活动可能引发 PS 暴露 (Dillon 等人，2000)。Ca^{2+} 流激活了爬行酶 (Zhao 等人，1998)，并同时抑制了氨基磷脂转位酶 (Comfurius 等人，1990)。

[0873] 由于以下几个原因，肿瘤血管上的 PS 作为癌症摄像或治疗的靶目标来说是引入注目的：它很丰富（约 3×10^6 个分子 / 个细胞）；位于肿瘤内皮的内腔表面，对于血液中血管靶向剂的结合来说是完全易接近的；它存在于多种实体瘤中高百分率的肿瘤内皮细胞上，而在迄今所检测的所有正常组织的内皮上都没有。因此针对肿瘤血管系统中的 PS 的未缀合抗体、血管靶向剂和成像剂能用于人类中癌症的检测和治疗。

[0874] 实施例 VI

[0875] 阴离子磷脂暴露于肿瘤血管的表面

[0876] 正常条件下哺乳动物细胞质膜外表面基本上没有阴离子磷脂。磷脂酰丝氨酸在例如细胞表面的暴露是在凋亡、坏死、细胞损伤、细胞活化和恶性转化期间发生的。本实施例显示出体内肿瘤血管上阴离子磷脂上调，这通过结合阴离子磷脂的特异性抗体和天然配体二者的定位得到证实。

[0877] 将特异性识别阴离子磷脂的单克隆抗体 9D2 注射入携带多种同位或异位肿瘤的小鼠中。其他小鼠接受可结合阴离子磷脂的天然配体膜联蛋白 V。9D2 和膜联蛋白 V 特异性地定位于所有肿瘤的血管内皮上，还定位于坏死区内和周围的肿瘤细胞处。肿瘤血管中 15 — 40％的内皮细胞被染色。在正常内皮上未检测到定位。

[0878] 根据 9D2 和膜联蛋白 V 的结合进行评估的，检测已知存在于肿瘤微环境中的各种因子和肿瘤相关状态引起培养内皮细胞中阴离子磷脂暴露的能力。低氧 / 复氧、酸性、凝血酶和炎性细胞因子都诱导了阴离子磷脂的暴露。过氧化物酶也是一种强诱导剂。用炎性细胞因子和低氧 / 复氧的组合处理效果大于加和效果。因此，已证实的体内肿瘤内皮上阴离子磷脂的暴露有可能是通过损伤以及细胞因子和反应性氧类的活化引起的。无论是何机制，阴离子磷脂都是目前能用于肿瘤血管靶向、成像和治疗中的肿瘤血管标记物。

[0879] A. 材料和方法

[0880] 1. 材料

[0881] $Na^{125}I$ 获自 Amersham(Arlington Heights, IL)。Dulbecco 改良的 Eagle 组织培养基和含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Dulbecco PBS 获自 Gibco(Grand Island，纽约)。胎牛血清获自 Hyclone(Logan, Utah)。L-α - 磷脂酰丝氨酸、L-α - 卵磷脂、心磷脂、L-α - 磷脂酰乙醇胺、L-α - 磷脂酰肌醇、鞘磷脂、磷脂酸、磷脂酰甘油、O- 苯二胺、过氧化氢和凝血酶获自 Sigma(St. Louis, MO)。24 孔平底板获自 Falcon(Becton Dickinson 和 Co., Lincoln Park, NJ)。

[0882] 重组肝细胞生长因子 (HGF 或扩散因子) 和放线菌素 D 来自 Calbiochem(San

打印ID7584222 Pg 111

Diego, CA)。重组小鼠白介素-1α、β和肿瘤坏死因子α(TNFα)购自R&D Systems(Minneapolis,MN)。I型通用干扰素(取代所有类型干扰素的杂合蛋白质)购自PBL Biomedical Laboratories(New Brunswick,NJ)。重组人血管内皮生长因子121(VEGF)、人血小板衍生生长因子-BB、白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)、白介素-10(IL-10)和人成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)购自PeproTech(Rocky Hill,NJ)。

[0883] 2. 抗体

[0884] 泛小鼠内皮细胞抗体MECA32获自E.Butcher博士(斯坦福大学,加州)并用作免疫组化研究的阳性对照。有关此抗体的详情已发表(Leppink等人,1989)。与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的兔抗大鼠免疫球蛋白、大鼠抗小鼠免疫球蛋白以及山羊抗小鼠和抗大鼠二抗购自Daco(Carpinteria,CA)或Jackson Immunoresearch Labs(West Grove,PA)。

[0885] 这些研究中所用的9D2抗体按实施例IV所述产生。9D2抗体是与阴离子磷脂有反应性的大鼠单克隆抗体。9D2的磷脂特异性的进一步表征参见此实施例的结果部分。

[0886] 3. 细胞

[0887] 来自末期疾病患者的L540Cy Hodgkin淋巴瘤细胞由V.Diehl教授(Koln,德国)提供。NCI-H358人非小细胞肺癌由Adi Gazdar博士(西南医学中心,达拉斯,德州)提供。Meth A小鼠纤维肉瘤和MDA-MB-231人乳癌获自美国典型细胞保藏中心(Rockville,MD)。小鼠脑内皮瘤细胞系bEnd.3由Werner Risau教授提供(Max Plank研究所,Munich,德国)并保持于含10%FBS的DMEM中。成年牛主动脉内皮(ABAE)细胞购自Clonetics(San Diego,加州;Walkerville,MD)。ABAE细胞保持于含10%血清和2ng/ml bFGF的DMEM中。

[0888] 4. 组织培养

[0889] bEnd.3、ABAE细胞和除L540Cy淋巴瘤之外的所有肿瘤细胞均保持 于补充了10%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、2单位/ml青霉素G和2μg/ml链霉素的DMEM中。L540Cy细胞保持于含相同添加剂的RPMI1640中。细胞每周传代培养一次。用溶于含0.2% EDTA的PBS中的0.125%胰蛋白酶进行bEnd.3细胞的胰酶消化。为了进行体外研究,以10×10^3个细胞/ml的密度将内皮细胞接种于24孔板内的1ml培养基中,并在用于本试验前保温48—96小时。每次研究前24小时更换培养基。

[0890] 5. 与塑料固定化的磷脂的反应性

[0891] 将磷脂溶于正己烷中至浓度为50μg/ml。将100μl此溶液加入96孔微量滴定板的孔内。待溶剂在空气中蒸发后,用稀释于含2mM Ca^{2+}的DPBS(结合缓冲液)中的10%胎牛血清封闭平板2小时。

[0892] 将9D2抗体或膜联蛋白V以6.7nM的起始浓度稀释于含10%血清的结合缓冲液中。在平板中配制两倍的系列稀释液(100μl/孔)。然后将平板在室温保温2小时。漂洗平板并分别用与HRP缀合的山羊抗大鼠IgM和兔抗人膜联蛋白V以及随后的与HRP缀合的山羊抗兔IgG(均为1:1000稀释)检测9D2和膜联蛋白V。用生色底物OPD检测第二级试剂,然后用微量平板读数仪(Molecular Devices,Palo Alto,CA)在490nm处对平板读数。

[0893] 用具有无关特异性的对照大鼠IgM(Pharmingen,San Diego,CA)证实了9D2抗体结合的特异性。膜联蛋白V结合磷脂的特异性是Ca^{2+}依赖型的,通过将药剂稀释于含5mM EDTA的DPBS中对其进行测定。另外的阴性对照是用含0.2%去污剂吐温20的结合缓冲液漂洗平板。此处理将脂抽提出来,因此去除了吸附于塑料上的磷脂。9D2抗体和膜联蛋白V

打印ID7584222 Pg 112

都不结合经去污剂漂洗过的平板。

[0894] 6. 在培养的内皮细胞表面上的阴离子磷脂的检测

[0895] 将内皮细胞培养至约 70％汇合。为了诱导 PS 暴露，在 37℃用 H_2O_2(200μM) 处理细胞 1 小时。用含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 DPBS 漂洗对照和处理过的载玻片，并用稀释于相同缓冲液中的 0.25％戊二醛固定。通过与 50mMNH_4Cl 孵育 5 分钟来淬灭过量的醛基。为了检查去污剂和有机溶剂对磷脂检测的影响，将一些载玻片与丙酮 (5 分钟) 或含 1％ (v/v)Triton™ X-100 的 PBS 一起预孵育。

[0896] 细胞用 DPBS(含 Ca^{2+}、Mg^{2+} 和 0.2％ (w/v) 明胶) 漂洗并与 1μg/ml 生物素化膜联蛋白 V(Pharmingen, San Diego, CA) 或 1μg/ml9D2 抗体孵育。孵育 2 小时后，用 0.2％明胶缓冲液漂洗细胞并与链霉抗生物素蛋白 -HRP(1:500 稀释) 保温。无关特异性的大鼠 IgM 和链霉抗生物素蛋白单独使用作为这些试验中的阴性对照。所有步骤都在室温进行。加入溶于柠檬酸盐－磷酸盐缓冲液，pH5.5 中的邻苯二胺 (0.5mg/ml) 和过氧化氢 (0.03％ w/v) 检测 HRP 的活性。15 分钟后，将 100μl 上清液转移至 96 孔板中，加入 100μl0.18M H_2SO_4 并检测 490nm 处的吸收值。或者，通过加入咔唑底物，产生不溶性红褐色沉淀来检测 PS 阳性细胞。每个试验都以双份试样进行并重复至少两次。

[0897] 7. 通过脂质体抑制 9D2 和膜联蛋白 V 与磷脂的结合

[0898] 通过用各种脂质体进行的竞争性试验进一步证实了磷脂识别的特异性。脂质体是从氯仿中含 5mg 单一磷脂的溶液制备的。将溶液在氮气中干燥，使其在圆底玻璃瓶中形成薄层。然后加入 10ml Tris 缓冲液 (0.1M，pH7.4) 并将烧瓶超声处理 5 次，每次 2 分钟。将 9D2 或膜联蛋白 V(6.66nM) 与 200μg/ml 脂质体溶液于室温预保温 1 小时。将混合物加入经磷脂包被的平板或内皮细胞单层上。如上所述测定在存在或不存在不同脂质体的条件下 9D2 结合固定化磷脂或细胞表面的能力。

[0899] 8.9D2 和膜联蛋白 V 竞争结合固定化的 PS

[0900] 通过将纯化蛋白质与 10 倍摩尔浓度过量的 N- 羟基琥珀酰亚胺生物素 (Sigma，MO) 在室温保温 1 小时来制备生物素化 9D2 抗体和膜联蛋白 V。用 PBS 透析除去游离的生物素。生物素化的步骤不会削弱任一蛋白质的 PS 结合能力。为了进行竞争性试验，将未修饰的和生物素化的蛋白质与 10 倍摩尔浓度过量的未修饰蛋白质预混合。然后将混合物加到 PS 包被平板上。用 1:1000 稀释的链霉抗生物素蛋白 -HRP 缀合物检测所结合的药剂。在无竞争剂的条件下各药剂与 PS 的结合值作为 100％。

[0901] 9. 皮下移植肿瘤的生长

[0902] 为了进行定位研究，将 2×10^7 个 L540 人 Hodgkin’s 淋巴瘤细胞或 1 $\times10^7$ 个其他肿瘤类型细胞皮下注射入 SCID 小鼠 (Charles River，Wilmington，MA) 的右侧。使肿瘤长至体积 0. －0.7cm^3。每组最少用 3 只动物。研究重复至少 3 次。

[0903] 10. 人 MDA-MB-231 乳癌的同位模型

[0904] 雌性 nu/nu 或 SCID 小鼠购自 Charles River。按照所公布的方法 (Price，1996) 将 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞移植入乳房脂垫中。简而言之，将小鼠麻醉并在侧面胸腔上方皮肤处做一 5mm 的切口。使乳房垫暴露以保证重悬于 0.1ml 盐水中的 1×10^7 个 MDA-MB-231 细胞注射的位点正确。

[0905] 11. 患肿瘤小鼠体内阴离子磷脂的检测

打印ID7584222 Pg 113

[0906] 将 9D2 或膜联蛋白 V 直接施加到冷冻组织切片上的免疫组化技术不能区别质膜内表面和外表面上的阴离子磷脂。为了检测外部定位的磷脂，基本上如前文所述进行操作（实施例 V；Ran 等人，1998），将 50μg9D2 或生物素化 9D2 抗体或 100μg 生物素化膜联蛋白 V 静脉内注射入患肿瘤的 SCID 小鼠。60 分钟后，如前文所述 (Burrows 等人，1992)，处死小鼠并将其血放干，用肝素化的盐水灌注。收获所有主要器官和肿瘤并速冻以制备冷冻切片。

[0907] 用含 10％血清的 PBS 封闭切片。为了防止磷脂在载片处理过程中丢失，在封闭和漂洗缓冲液中避免使用去污剂和有机溶剂。用山羊抗大鼠 IgM（μ 特异性）-HRP 缀合物及随后用咔唑或 DAB 显色来检测大鼠 IgM(Fries 等人，1993)。用与 HRP 缀合的链霉抗生物素蛋白检测生物素化的药剂。

[0908] 将来自注射了盐水或无关特异性大鼠 IgM 的小鼠的肿瘤切片作为阴性对照。另外的对照包括将载片在 1％ Triton 溶液或丙酮中孵育 10 分钟。这些处理将磷脂抽提出来。在这些条件下检测不到信号。以 100X 的放大倍数测定每个高倍视野中阳性血管的数目。每张切片上至少检查 10 个视野并计算阳性血管的平均百分率。用此方法对切片进行染色以分析 9D2 或膜联蛋白 V 存在情况的研究检测到具有体内药剂易靠近结合的外在化阴离子磷脂的细胞。

[0909] 12. PS 阳性肿瘤血管的鉴别和定量

[0910] 具有定位化 9D2 抗体或膜联蛋白 V 的结构通过 DAB 染色切片上的形态学外观和冷冻组织连续切片上泛内皮细胞标记 MECA32 的一致染色被确认为血管。通过对肿瘤连续切片中被 MECA32、9D2 或膜联蛋白 V 染色的血管计数，进行 DAB 染色切片的定量。检查由注射了 9D2 抗体、对照大鼠 IgM 或膜联蛋白 V 的 6 只小鼠来源的各肿瘤类型的 6 张切片。由两个独立的观察者以盲法对每张切片上至少 10 个随机视野 (0.317mm^2/ 视野）进行评分。计算被 9D2、膜联蛋白 V 或 MECA32 染色的血管的平均数目和标准偏差。将各肿瘤类型组中测定的 9D2 或膜联蛋白 V 阳性血管的平均数目与同一肿瘤组中 MECA32 阳性血管的平均数目进行比较。计算 9D2 或膜联蛋白 V 阳性血管的百分率。

[0911] 在进一步的研究中，将 50μg 生物素化 9D2、对照 IgM 或膜联蛋白 V（每组 6 只小鼠）静脉内注射入患 MDA-MB-231 肿瘤（体积 0.3 － 0.7cm^3）的 SCID 小鼠中。生物素化的试剂首先与链霉抗生物素蛋白 -Cys 缀合物一起孵育，在 PBS 中漂洗，然后与 MECA32 抗体孵育，再与 FITC 标记的抗大鼠 IgG 二抗孵育。分别用针对 Cy3（红色）和 FITC（绿色）荧光的适当滤镜通过数码相机捕捉单一的图像并传输到计算机上。通过 Metaview 软件将表现为黄色（融合了绿色和红色荧光的结果）10 个随机视野 (0.317mm^2/ 视野）的图像叠加。用同样的方法分析来自注射了对照大鼠 IgM 或盐水的小鼠的肿瘤。如下计算具有定位化 9D2 或膜联蛋白 V 的血管的百分率：用每个视野中黄色血管的平均数目除以绿色（总）血管的平均数再乘以 100。

[0912] B. 结果

[0913] 1. 9D2 抗体和膜联蛋白 V 的磷脂特异性

[0914] 在 ELISA 中，9D2 抗体特异性识别阴离子磷脂 (PS、PA、CL、PI、PG)，而对中性磷脂 (PE、PC 和 SM) 无显著的反应性（表 8）。在 ELISA 中 9D2 与磷脂结合的强度顺序是 PA>PS ＝ CL>PG ＝ PI。结合是抗原特异性的，因为用几个无关特异性大鼠 IgM 对照未观察到结合。9D2 与吸附于 ELISA 平板上的任何阴离子磷脂的结合都会被由任何阴离子磷脂制备 的脂

打印ID7584222 Pg 114

质体封闭，但不会被由任何中性磷脂制备的脂质体所封闭。

[0915] 表 8

[0916] 9D2 和膜联蛋白 V 的磷脂特异性

[0917]

磷脂		正常条件下在质膜内的丰度和定位[a]	结合的 EC_{50}（pM）	
名称	类型		9D2	膜联蛋白V
PS	阴离子氨基-PL	主要的PL（15%），定位于内侧	12	100
PA	阴离子PL	占少数的PL（少于1%）	2	100
PG	阴离子PL	占少数的PL（少于1%）	100	250
PI	阴离子PL	主要的PL（7%），主要定位于内侧	100	50
CL	阴离子PL	在质膜上没有	15	130
PE	中性氨基-PL	主要的PL（22%），主要定位于内侧	>8000	100
SM	中性胆碱-PL	主要的PL（9%），主要定位于外侧	>8000	>8000
PC	中性胆碱-PL	主要的PL（46%），主要定位于外侧	>8000	>8000

[0918] [a] 总磷脂的百分数，来自 Fridrikkson 等人，1999。不同细胞类型间百分数可能有变化。

[0919] 膜联蛋白 V 也与阴离子磷脂结合，但它的结合特异性小于 9D2 与阴离子磷脂结合的特异性，因为它也与中性磷脂 PE 强结合。在 ELISA 中膜联蛋白 V 与磷脂结合的强度顺序是 PI>PS = PE = PA = CL>PG（表 8）。这些有关膜联蛋白 V 的发现与较早的资料是一致的（Andree 等人，1990）。

[0920] 9D2 的结合不受 5mM EDTA 存在的影响，表明它与阴离子磷脂的结合不需要 Ca^{2+}。相反，5mM EDTA 存在时会消除膜联蛋白 V 与阴离子磷脂的结合，正如由它与阴离子磷脂或 PE 的结合依赖于 Ca^{2+} 这一已有知识可预计到的（Schlaepfer 等人，1987；Blackwood 和 Ernst，1990）。

[0921] 9D2 或膜联蛋白 V 都不与包被了磷脂、但随后用含 0.2% Tween 的盐水漂洗过的 ELISA 平板结合，证实了它们是结合于所吸附的磷脂上。9D2 和膜联蛋白 V 没有可检测到的与肝素、硫酸乙酰肝素或者双链或单链 DNA 的结合。

[0922] 2. 9D2 抗体和膜联蛋白 V 不会交叉阻断彼此与 PS 的结合

[0923] 为了检查 9D2 抗体和膜联蛋白 V 是否竞争结合 PS，在 PS 包被平板上用生物素化的蛋白质进行交叉封闭研究。生物素化的 9D2 抗体和膜联蛋白 V 分别被 10 倍摩尔浓度过量的未修饰 9D2 和膜联蛋白 V 封闭（表 9）。然而，未修饰的膜联蛋白 V 不会影响生物素化 9D2 与 PS 平板结合的能力。同样的，添加未修饰的 9D2 抗体也不会改变生物素化膜联蛋白 V 结合 PS 平板的能力（表 9）。

[0924] 表 9

[0925] 9D2 和膜联蛋白 V 不会交叉阻断与 PS 的结合

打印ID7584222 Pg 115

[0926]

PS 结合蛋白质	竞争剂[a]	结合（%对照）[b]
生物素化膜联蛋白 V	膜联蛋白 V	8%
生物素化 9D2	膜联蛋白 V	93%
生物素化膜联蛋白 V	9D2	95%
生物素化 9D2	9D2	5%

[0927] [a] 将膜联蛋白 V 或 9D2 抗体以比生物素化的药剂 10 倍摩尔浓度过量的量预混合。用链霉抗生物素蛋白 -HRP 检测微量滴定板上生物素化药剂与 PS 的结合。

[0928] [b] 将缺乏竞争剂的条件下生物素化药剂的反应性作为 100%。表中显示了三份试样测定的平均值。SD 小于平均值的 10%。

[0929] 这些结果表明，9D2 抗体和膜联蛋白 V 不会交叉阻断彼此与 PS 包被平板的结合，这是因为它们或者识别 PS 分子上的不同表位，或者识别塑料上所吸附 PS 的不同构象。

[0930] 3. 与细胞表面上的外在化阴离子磷脂的结合

[0931] 用小鼠 bEnd. 3 内皮细胞或牛 ABAE 细胞检测 9D2 抗体和膜联蛋白 V 与细胞表面的结合。9D2 或膜联蛋白 V 都不结合静止条件下任一细胞类型的未透化单层。这表明大部分质膜阴离子磷脂通常隐蔽于胞质结构域内。相反，当细胞在引起 90 — 100% 内皮细胞凋亡的条件下与 TNF α 和 放线菌素 D 预孵育时，观察到强染色。

[0932] 为了证实 9D2 和膜联蛋白 V 结合于细胞表面上的磷脂，在存在或缺乏各种竞争性脂质体的条件下将经 H_2O_2 处理过的 bEnd. 3 细胞与 9D2 抗体或膜联蛋白 V 一起孵育。在细胞用低于毒性浓度（100 — 200 μ M）的 H_2O_2 预处理后，阴离子磷脂在未凋亡的存活 bEnd. 3 细胞上变得暴露（Ran 等，2002a）。

[0933] 9D2 抗体与经 H_2O_2 处理过的 bEnd. 3 细胞的结合被含阴离子磷脂的脂质体所抑制，但不被含中性磷脂的脂质体抑制。对 9D2 与细胞的结合发生抑制的幅度变化顺序为 PA>PS>CL>PG>PI，与利用塑料固定化磷脂所获得的结果接近一致。类似地，膜联蛋白 V 与经 H_2O_2 的处理过的细胞的结合被含 PS、PA、PE、CL 和 PI 及 PG 的脂质体阻断，后两者的阻断程度较低一些。含 SM 或 PC 的脂质体不会阻断膜联蛋白 V 与细胞的结合，所有这些均与利用塑料固定化的磷脂获得的结果一致。

[0934] 这些结果证实了 9D2 与经 H_2O_2 处理过的内皮细胞中的阴离子磷脂相结合，而膜联蛋白除了阴离子磷脂外还与 PE 结合。

[0935] 4. 体内在细胞上的外在化阴离子磷脂的检测

[0936] 将 9D2 或膜联蛋白 V 直接施加到冷冻组织切片上的直接免疫组化技术不能区别质膜内表面和外表面的阴离子磷脂。为了检测外部定位的磷脂，将 9D2 和膜联蛋白 V 静脉内注射入患肿瘤的小鼠并通过间接的免疫组化方法测定它们对肿瘤血管的定位。

[0937] 用 9D2 抗体或生物素化膜联蛋白 V 静脉内注射带各种类型实体瘤的小鼠，1 小时后，给小鼠放血，切下肿瘤和正常组织并制备冷冻切片。将冷冻组织块切片并用被 HRP 标记的抗大鼠 IgM 或被 HRP 标记的链霉抗生物素蛋白进行染色，以确定 9D2 和膜联蛋白 V 在注射后结合到哪些细胞上。在连续切片上通过形态学和泛内皮细胞抗体 MECA32 的阳性染色对血管进行鉴定。

[0938] 5. 携带肿瘤的小鼠中 9D2 抗体和膜联蛋白 V 的生物分布

[0939] 在此研究所包括的所有 5 种肿瘤中 9D2 抗体和膜联蛋白 V 都定位于肿瘤血管处

打印ID7584222 Pg 116

(表 10)。这些肿瘤是 :SCID 小鼠乳房脂垫中原位生长的 人 MDA-MB-231 乳房肿瘤 ;皮下生长的人 L540Hodgkin's 肿瘤 ;皮下生长的人 NCI-H358NSCLC ;皮下生长的小鼠 B16 黑素瘤和皮下生长的小鼠 Meth A 纤维肉瘤。

[0940] 表 10

[0941] 9D2 和膜联蛋白 V 对肿瘤血管的特异性定位

[0942]

组织	9D2抗体[a]	大鼠IgM对照	膜联蛋白V[b]
肿瘤			
MDA-MB-231	40.6 ± 5.4	-	45.3 ± 5.6
L540cy	19.3 ± 3.3	-	16.7 ± 3.9
NCI-H358	15.6 ± 4.1	-	ND
B16	23.4 ± 4.5	-	21.3 ± 6.6
Meth A	25.7 ± 6.8	-	ND
正常			
肾上腺	-	-	-
脑	-	-	-
心脏	-	-	-
肾	-[c]	-[c]	-
肠	-	-	-
肝	-	-	-
肺	-	-	-
胰腺	-	-	-
脾	-	-	-
睾丸	-	-	-

[0943] [a] 通过注射抗体 (50 μ g)、用盐水灌注小鼠的血循环系统并用抗小鼠 IgM- 过氧化物酶缀合物检测组织切片上的抗体来测定患肿瘤小鼠中 9D2 抗体和大鼠 IgM 对照的定位。结果表示为每个 0.317mm^2 的视野内 MECA32 一染色血管的 PS 阳性血管平均 (±SE) 百分数。每种类型分析 6 个样品。对于 MDA-MB-231、L540cy、H358、B16 和 Meth A 肿瘤来说,每个 0.317mm^2 的视野内 MECA32 一阳性血管的平均数分别为 23、25、21、18 和 19±10 个血管。

[0944] [b] 通过注射生物素化膜联蛋白 V 随后用链霉抗生物素蛋白 - 过氧化物酶缀合物检测冰冻切片来测定膜联蛋白 V 的定位。

[0945] [c] 在 9D2 和对照抗体接受者中都可见非抗原特异性小管染色。

[0946] 9D2 和膜联蛋白 V 基本上有相同的染色模式。9D2 抗体对肿瘤血管的定位是特异的,因为用无关特异性的大鼠 IgM 未观察到肿瘤内皮的染色。推测起来,大概是发生了某种程度的对照大鼠 IgM 从肿瘤血管中向外的渗漏,但血管外 IgM 的染色太分散或太弱以致不能被间接的免疫组化方法所辨别。

[0947] 在被检测的 10 种正常器官中有 9 种未观察到 9D2 抗体或膜联蛋白 V 的血管定位 (表 10)。在肾中,观察到了非抗原特异性的小管染色。小管在 9D2 和对照大鼠 IgM 接受者

打印ID7584222 Pg 117

中都被染色，大概是因为 IgM 或其代谢物通过此器官分泌。生理学上的血管发生部位卵巢则未检测。

[0948] 9D2 和膜联蛋白 V 阳性血管的百分数包括从 MDA-MB-231 肿瘤中的 40％至 H358 肿瘤中的 15％。阴离子磷脂阳性血管存在于肿瘤所有区域内毛细管和血管的内腔表面，但在坏死区内和周围尤其普遍。大部分阴离子磷脂阳性血管未显示出光学显微镜下明显的形态异常。偶发的血管，尤其是那些定位于坏死区的血管显示出形态退化的迹象。9D2 抗体和膜联蛋白 V 也定位于坏死的和凋亡的肿瘤细胞处，而对照 IgM 的定位则检测不到（图 4）。

[0949] 这些发现证实了阴离子磷脂存在于各种肿瘤血管内皮细胞内腔表面但不存在于正常组织中。

[0950] 6. 双染色研究

[0951] 还进行了双染色研究，其中将生物素化 9D2 抗体、生物素化对照 IgM 或生物素化膜联蛋白 V 静脉内注射入带同位 MDA-MB-231 乳腺肿瘤的小鼠。1 小时后，处死小鼠，切下肿瘤并对冷冻块进行切片。然后用 Cy3 一缀合的链霉抗生物素蛋白染色肿瘤切片来检测生物素化的蛋白质以及用 FITC- 缀合的 MECA32 染色来检测血管内皮。此检测方法用红色和绿色标记了生物素化蛋白质和血管内皮。其中生物素化蛋白质与内皮结合，合并的图像呈现出黄色。

[0952] 在这些研究中，生物素化 9D2 和膜联蛋白 V 似乎大部分与血管内皮结合，因为它们的染色模式与 MECA32 的模式合并在一起。约 40％的 MECA32 阳性血管结合 9D2 和膜联蛋白 V，与用间接免疫组化方法获得的 结果接近一致。不过，通过双染色检测到了生物素化蛋白质向肿瘤间质组织内的渗漏，而用间接免疫组化方法则不明显。

[0953] 在少数（约 5％）血管周围的血管内皮外可见生物素化的蛋白质。在来自注射了生物素化无关特异性大鼠 IgM 的小鼠的肿瘤中，生物素化 IgM 已渗漏入相似百分数（约 5％）血管周围的肿瘤间质组织中，但通常未呈现出被血管内皮结合。推测起来，用双染色技术可以检测溢出的 9D2 和膜联蛋白 V，但用间接的免疫组化技术则不可以，反映了前一种技术具有较高的灵敏度且更准确，从而可用于比较两种染色模式。未注射的对照肿瘤完全不被链霉抗生物素蛋白 -Cy3 所染色，这表明红色荧光相应于被定位的蛋白质。

[0954] 实施例 VII

[0955] 肿瘤环境中阴离子磷脂膜的移位

[0956] 有关氨基磷脂和阴离子磷脂作为肿瘤血管内皮细胞独特的体内表面标记的发现促使发明者进一步研究肿瘤微环境对这些分子移位和外膜表达的影响。本实施例显示了将体外内皮细胞暴露于模拟肿瘤微环境的一定条件中再现了较早观察到的氨基磷脂和阴离子磷脂在完整、存活细胞中的表面表达。

[0957] A. 材料和方法

[0958] 1. 膜联蛋白 V 的碘化

[0959] 从 ET12a-P 阴离子磷脂 1 质粒（获自 J. Tait 博士，华盛顿大学，西雅图）转化的大肠杆菌纯化重组人膜联蛋白 V。分别在 SDS-PAGE 上和 PS 包被的塑料板上验证蛋白质的纯度和与 PS 的结合。用亲和纯化的兔多克隆抗膜联蛋白 V 抗体检测与 PS 结合的膜联蛋白 V。如 Bocci(1964) 所述用氯胺 T 对膜联蛋白 V 进行 ^{125}I 放射标记。根据 Bradford 检测法 (1976) 所检测的，比活性约为 $1x10^6$cpm/μg 蛋白质。

打印ID7584222 Pg 118

[0960] 2. 内皮细胞的处理

[0961] 用表 11 所列浓度的细胞因子或生长因子处理内皮细胞。所有试剂 都稀释于含 10％血清的培养基中，并在 37℃与细胞一起孵育 24 小时。

[0962] 为了研究低氧的作用，将细胞接种于 24 孔板中并在潮湿的含氧量正常的空气 (21％ O_2，5％ CO_2) 中孵育 48 小时，然后转移至在一密封舱 (Billups Rothenberg Inc.，Del Mar，Ca) 中潮湿且含氧量低的空气 (1％ O_2，5％ CO_2，94％ N_2) 中。将细胞在低氧舱中 37℃孵育 24 小时，然后转回到含氧量正常的环境中，37℃ 4 小时。将此细胞与相同代数的同一天接种且完全保持于含氧量正常条件下的平行培养物进行比较。在某些研究中，在转移到低氧舱中之前将 IL-1α (10ng/ml) 和 TNFα (20ng/ml) 加入培养基中。

[0963] 为了检测酸性微环境的影响，将细胞暴露于缺乏碳酸氢盐的生长培养基中，用必需量的 HCl 调节成不同的 pH(在 7.3 和 6.2 之间变动)。在缺乏 CO2 的条件下 37℃孵育细胞。确认培养基在 24 小时的培养期间保持给定的 pH 值。这些实验条件对牛或小鼠内皮细胞是无毒的，且对贴壁单层的细胞形态或生存能力是没有影响的。

[0964] 3. 用 ^{125}I 一标记的膜联蛋白 V 检测在培养的内皮细胞上的 PS

[0965] 用上述药剂处理后，将处理过的细胞和对照细胞与结合缓冲液中的 7.1pmol ^{125}I 一标记的膜联蛋白 V(200μl/ 孔) 一起孵育。室温孵育 2 小时后，细胞经大量漂洗后溶于 0.5M NaOH 中。将总体积 0.5ml 转移至塑料管中并在 γ 计数器中计数。在存在 5mM EDTA 的条件下测定非特异性结合并从实验值中将其减去。结果表示为细胞结合型膜联蛋白 V 的净 pmol 值，标准化为每 1×10^6 个细胞中的值。

[0966] 在以放线菌素 D 和 TNFα (各组分 50ng/ml) 同时处理的细胞上测定膜联蛋白 V 的最大结合。正如事先已报道的 (Lucas 等人，1998)，这些药剂在 90 － 100％的内皮细胞中引起凋亡和 PS 暴露。在含 10％血清的培养基中测定 ^{125}I 一膜联蛋白 V 与未处理细胞的基础结合。将与未处理培养物结合的 ^{125}I 一膜联蛋白 V 的量从处理过的培养物的结合值中减去。按照以下公式计算 PS 的暴露 :用实验条件下的细胞结合型膜联蛋白 V 的量 (pmoles) 除以最大膜联蛋白 V 结合量 (pmoles)，乘以 100。每一项研究都以双份试样进行并至少重复 3 次。计算平均值。从这些独 立实验所得平均值的 SE 小于 5％。

[0967] 4. 在培养的内皮细胞和 MDA-MB-435 肿瘤细胞上的 PS 检测

[0968] HUVEC 细胞和肿瘤细胞在 8 孔腔式载玻片上生长至大约 70％汇合。为了诱导 PS 暴露，细胞用在无血清培养基中的 H_2O_2(200μM) 于 37℃处理 1 小时。细胞用 DPBS 洗涤并与在无血清培养基中稀释的 2μg/ml3G4 抗体一起在室温下孵育 1 小时。用 DPBS 轻柔洗涤后，细胞用在 PBS 中的 4％ (v/v) 低聚甲醛固定 15 分钟。

[0969] 为了用经德克萨斯红标记的鬼笔环肽 (Molecular Probes，Eugene，OR) 共染色细胞骨架，细胞用在 PBS 中的 0.1％ Triton-X100 渗透化处理 5 分钟。经德克萨斯红标记的鬼笔环肽 (在包含 1％ BSA 的 PBS 中 1:50 稀释) 和经 FITC 标记的山羊抗小鼠抗体 (在包含 1％ BSA 的 PBS 中 1:200 稀释) 在室温下孵育 1 小时。细胞核用 DAPI 复染。具有无关特异性的小鼠 IgG_3 和单独的二抗在这些研究中用作阴性对照。每项研究都以双份试样进行并重复至少 2 次。

[0970] 在其他研究中，经 H_2O_2 处理的细胞用 0.25％胰蛋白酶脱离，洗涤，在包含 0.05％ w/v 叠氮化钠和 2μg/ml3G4 的冰冷 DMEM 中悬浮 1 小时。细胞粒状沉淀用包含 1％ BSA 的

打印ID7584222 Pg 119

PBS 洗涤，并在包含经 FITC 标记的山羊抗小鼠抗体（1:200 稀释）的相同缓冲液中悬浮 30 分钟。洗涤 3 次后，将细胞粒状沉淀悬浮在包含 1% BSA 和 0.05% w/v 叠氮化钠的 PBS 中。对于活 / 死的区别，在 FACS 分析前加入碘化丙锭。

[0971] B. 结果

[0972] 1. 用 H_2O_2 诱导

[0973] 以 50,000 个细胞 / 孔的起始密度接种小鼠 bEnd.3 内皮细胞。24 小时后将细胞与渐增浓度（从 10μM 至 500μM）的 H_2O_2 在 37℃一起孵育孵育 1 小时或者不对其进行处理。在结束孵育后，用含 0.2%明胶的 PBS 漂洗细胞 3 次并用 0.25%戊二醛固定。同样的孔用抗 PS IgM 染色或胰酶处理并通过 Trypan Blue 排斥试验评估存活力。为了进行抗 PS 染色，在用 2%明胶封闭 10 分钟后，将细胞与 2μg/ml 抗 PS 抗体一起孵育，随后用抗小鼠 IgM-HRP 缀合物进行检测。

[0974] 将内皮细胞暴露于高浓度的 H_2O_2 中会在约 90%细胞中引起 PS 移位。另一方面，这伴随着细胞从基底上脱离且细胞的存活力下降到约 50 － 60%。表面 PS 表达与细胞存活力下降之间的关联是可以理解的，尽管我们仍感兴趣的注意到观察到了约 90%的 PS 移位，而细胞存活力只下降了 50 － 60%。

[0975] 用较低浓度的 H_2O_2 导致了显著的 PS 表达，而细胞存活力没有任何可察觉的降低。例如，在用低达 20μM 的浓度的 H_2O_2 处理的所有孔中约 50%细胞的表面检测到 PS。值得指出的是，在这些低 H_2O_2 浓度下，细胞保持牢固地附着于塑料上以及牢固地相互结合，显示出无形态改变且没有细胞毒性的迹象。详细的分析揭示出基本上 100%的细胞－细胞接触、正确细胞形状的保持和完整的细胞骨架。

[0976] 因此在细胞存活力与未处理细胞对照相同（即 95%）的细胞群中观察到由低水平 H_2O_2 所诱发的 50% PS 表面表达。与高 H_2O_2 浓度相关的 PS 表达伴随着细胞损伤，而暴露于高 H_2O_2 浓度的 PS 阳性细胞脱离下来、漂浮着并具有被破坏的细胞骨架。

[0977] 在低浓度 H_2O_2 存在条件下细胞存活力的保持与来自其他实验室的结果相符。例如，Schorer 等人（1985）揭示了人脐静脉内皮细胞（HUVEC）用 15μM H_2O_2 处理后仍保持平均 90 － 95%的存活力（据报道有 5%－ 10%受损），而暴露于 1500μM H_2O_2 中的那些细胞则只有 0%－ 50%存活（50%－ 100%受损）。

[0978] 利用 H_2O_2 体外模拟肿瘤环境也是恰当的，因为其中肿瘤环境富含诸如巨噬细胞、PMNs 和粒细胞等炎性细胞，它们产生 H_2O_2 和其他反应性氧类。尽管过去从未将其与稳定的肿瘤血管标记联系起来，现已知炎性细胞通过涉及反应性氧类且需要 H_2O_2 存在的机制介导了内皮细胞的损伤（Weiss 等人，1981；Yamada 等人，1981；Schorer 等人，1985）。事实上，研究已显示了 PMNs 的体外刺激产生的 H_2O_2 浓度足以引起致死水平以下的内皮细胞损伤，而不引起细胞死亡（用铬释放检测法检测）或细胞脱离；且这些 H_2O_2 浓度是体内局部可达到的（Schorer 等人，1985）。

[0979] 这些体外移位结果与显示抗 PS 抗体特异定位于体内肿瘤血管内皮细胞而不结合正常组织细胞的已有结果有关。体内类似浓度 H_2O_2 诱导 PS 转移至内皮细胞表面而不会破坏细胞完整性这一发现除了证实了最初的体内结果和发明者的治疗方法外，还具有重要的含义。

[0980] 已知人、牛和小鼠内皮细胞在正常条件下都是 PS 阴性的。任何过去证明的 PS 表

打印ID7584222 Pg 120

达通常与细胞损伤和/或细胞死亡相关。这不是本研究中的情形，其中保持了正常的生存能力。这表明了肿瘤血管内皮中的PS移位是通过与细胞损伤无关的生化机制介导的。这被认为是形态完整的内皮细胞中PS表面表达的第一个证明和PS表达能与凋亡途径分离开的第一个指征。就本发明的可操作性而言，这些观察再次证实了PS是可维持的、而非瞬时的肿瘤血管标记物和干预治疗的适当候选剂。

[0981] 2. 用凝血酶诱导

[0982] 还观察到凝血酶增加了PS的表达，尽管增加的程度与H_2O_2引起的不同。此数据还是本发明发明者开发的PS表达的肿瘤诱导模型中完整的一部分：正常组织中凝血酶诱导的PS表面表达还将进一步诱导凝血，因为PS表达对凝血起始复合物的装配能起到协调作用。

[0983] 已知肿瘤环境是血栓形成前状态的，从而使肿瘤血管倾向于凝血（美国专利5,877,289）。因为凝血酶是凝血级联反应的产物，它存在于肿瘤血管中。事实上，凝血酶的存在诱导了VCAM的表达，使发明者能将VCAM开发成为肿瘤血管的可靶向标记（美国专利5,855,866；5,877,289）。因此目前显示凝血酶还诱导了PS表达的资料与用裸抗体和治疗缀合物靶向于氨基磷脂都相关，这还进一步解释了含组织因子的抗VCAM凝血配体的有利影响（实施例I）。

[0984] 3. 氧化应激的其他药剂

[0985] 用存在于许多肿瘤微环境中的各种浓度的因子和条件处理体外小鼠bEnd.3或牛ABAE细胞24小时（Lichtenbeld等人，1996；Harris等人，1996），例如低氧/复氧、凝血酶、酸度、炎性细胞因子和过氧化氢（表11）。

[0986] 通过检测^{125}I-膜联蛋白V的结合对PS和阴离子磷脂的外在化进行 定量。将膜联蛋白V结合的量与通过放线菌素D和TNFα的组合处理诱导了90－100％的细胞凋亡的细胞中的量相比较。放线菌素D和TNFα在两种细胞类型上都诱导了每10^6个细胞上6.2pmol膜联蛋白V的结合（每个细胞结合3.8×10^6个分子），与文献所报道的结果很相符（Rao等人，1992）。以此数值作为外在化阴离子磷脂的最高水平。

[0987] 表11

[0988] 通过再造肿瘤环境来诱导PS

[0989]

打印ID7584222 Pg 121

处理	浓度	^{125}I-膜联蛋白V（%最大结合）	
		ABAE细胞	bend.3细胞
含10%血清的培养基	N/A	0	0
放线菌素D + TNFα	各为50 ng/ml	100	100
VEGF	20 ng/ml	0	0
FGF-2	20 ng/ml	0	0
扩散因子	40 ng/ml	0	0
TGFβ$_1$	20 ng/ml	0	0
PDGF-BB	20 ng/ml	0	0
IL-10	20 ng/ml	0	0
IL-8	20 ng/ml	0	0
IL-6	20 ng/ml	0	0
IL-1α	10 ng/ml	6.4	7.5
IL-1β	10 ng/ml	5.8	5.5
干扰素	40 ng/ml	8.6	2.8
TNFα	20 ng/ml	7.4	13.7
凝血酶	50 nM	8.8	17.4
低氧	1% O_2	15.0-17.5	22.5
低氧 + IL-1α	同上	26.0	31.0
低氧 + TNFα	同上	33.0	36.0
pH6.6	N/A	20.2	18.9
过氧化氢	200μM	95.5	98.4

[0990] 在表 11 中，所用细胞因子、生长因子和凝血酶的浓度是从文献值中选择的以便对人工培养内皮细胞具有最大刺激作用。由形态学上的外观、缺乏分离和缺乏台盼蓝的摄取判断这些浓度在试验期间（24 小时）不会引起毒性。所用 H_2O_2 的浓度是在选定条件下不会引起细胞毒性的最大浓度。

[0991] 在只有生长培养基存在的条件下测定 ^{125}I- 膜联蛋白 V 的基本结合。 在用放线菌素 D 和 TNFα 联合处理诱导凋亡后测定最大 PS 暴露。显示了来自三项独立研究的双份试样的平均值。标准偏差小于 5%。

[0992] 正如由膜联蛋白 V 或抗 PS(9D2) 抗体结合所判断的，未处理的细胞基本上无外在化的 PS（表 11）。对于 ABAE 和 bEnd.3 细胞来说，单独存在生长培养基条件下的基本结合分别是 0.44 和 0.68pmole^{125}I- 膜联蛋白 V，这相当于 ABAE 和 bEnd.3 细胞最大结合的约 7.1% 和 10.9%，与在相同条件下有约 10% 的细胞结合生物素化膜联蛋白 V 的有关发现一致。

[0993] VEGF、HGF、FGF、TGFβ$_1$、PDGF、IL-6、IL-8 和 IL-10 不将 ^{125}I- 膜联蛋白 V 的结合提高至未处理细胞的基础水平之上（表 11），GM-CSF 也不。炎性介质（IL-1α、IL-1β、TNFα 和干扰素）引起了小的但可重复的 PS 和阴离子磷脂移位的增加，变动范围对于 ABEB 细胞来说是最高水平的 5 — 8%，对于 bEnd3 细胞来说是最高水平的 3 — 14%。

[0994] 低氧 / 复氧、凝血酶或酸性外部条件（pH6.8 — 6.6）诱导了中等高程度的 PS 和阴离子磷脂的外在化，变动范围包括对于 ABEB 细胞来说的最高水平的 8 — 20% 到对于 bEnd3 细胞来说的最高水平的 17 — 22%。在用 100 — 200μM 过氧化氢处理后观察到 PS 和阴离子磷脂移位的最大增加。正如用 ^{125}I- 膜联蛋白 V 结合所进行判断的，此处理引起了 PS 在

打印ID7584222 Pg 122

两种细胞类型中几乎完全（95％）的外在化（表 11）。按照免疫组化的判断，超过 70％的 ABAE 和 bEnd. 3 细胞结合生物素化的膜联蛋白 V。

[0995] 用低氧 / 复氧、凝血酶、酸性、TNF α 、IL-1 或 H_2O_2 处理产生了 PS 和阴离子磷脂移位的内皮细胞在试验期间（24 小时）保持附着于基质上，维持细胞一细胞接触，并保留了它们排除台盼蓝染料的能力。在诱导因子去除或培养条件回复正常后，在 24 — 48 小时后大部分细胞细胞中恢复了正常的 PS 和阴离子磷脂取向。这些结果表明，通过应用 H_2O_2 直接产生或通过低氧 / 复氧、酸性、凝血酶或炎性细胞因子间接产生的中等氧化压力引发了 PS 和阴离子磷脂在存活内皮细胞上的瞬时移位。

[0996] 4. 炎性细胞因子和低氧 / 复氧的组合作用

[0997] 在 IL-1 α 或 TNF α 存在条件下将 ABAE 和 bEnd. 3 细胞放在低氧 / 复氧环境中，观察到了 PS 和阴离子磷脂暴露的增加。在缺乏细胞因子的条 件下，低氧 / 复氧使 ABAE 细胞上的 PS 暴露增加至用凋亡浓度的放线菌素 D 和 TNF α 处理细胞后所能达到的最高水平的 15％— 17. 5％。在亚毒性浓度的 IL-1 α 或 TNF α 存在条件下，低氧 / 复氧使阴离子磷脂暴露分别增加到最大值的 26％和 33％（表 11）。与不存在低氧 / 复氧时细胞因子的作用的比较表明，细胞因子和低氧 / 复氧的联合对 PS 暴露具有大于简单加成的影响效果。在 bEnd. 3 细胞中观察到相似的效果。

[0998] 因此，在肿瘤环境中，由低氧 / 复氧诱导的 PS 和阴离子磷脂的暴露可以通过炎性细胞因子和可能通过诸如酸性和凝血酶等这样的其他刺激所放大。嗜中性粒细胞在该过程中可能起着作用。

[0999] 这些体外研究显示了体内肿瘤内皮细胞上 PS 暴露的机制。它们表明了多种因子诱导了内皮细胞上 PS 暴露而不引起细胞毒性，它们摹拟了体内肿瘤中的条件。低氧随后复氧、酸性和凝血酶显著增加了存活内皮细胞上 PS 的暴露。炎性细胞因子（TNF α 和 IL-1 α ）也引起了微弱但明确的 PS 暴露的诱发。

[1000] 这些条件有可能是体内肿瘤的主要诱发性刺激，因为 :i)PS 阳性内皮在坏死区内和周围是普遍的，在此通常可以观察到低氧、酸性、形成血栓的血管和浸润的宿主白细胞 ; ii) 低氧 / 复氧放大了 TNF α 和 IL-1 对体外内皮细胞的微弱 PS 暴露活性，此发现与肿瘤体内状况相关，其中低氧和分泌细胞因子的肿瘤和宿主细胞共存 ;iii) 已报道低氧 / 复氧和凝血酶通过激活 NADPH 氧化酶样膜酶而在内皮细胞中产生了反应性氧类（ROS）(Zulueta 等人，1995)。恶性细胞产生的 ROS 可能造成内皮细胞损伤（Shaughnessy 等人，1989)。过氧化氢是目前研究中发现的人工培养内皮细胞上 PS 暴露的最强诱导剂，为 ROS 的参与提供了间接的支持。

[1001] 外在化的 PS 提供了一个凝血因子聚集和装配的阴性磷脂表面。这可能造成很久以来所认识到的肿瘤内皮上的前凝血状态。PS 还为辅助白细胞浸润入肿瘤的循环性巨噬细胞（McEvoy 等人，1986)、T 淋巴细胞（Qu 等人，1996）和多形核白细胞提供了附着位点。活化巨噬细胞、多形核白细胞和血小板对肿瘤内皮的 PS 的粘附可能导致了反应性氧种 类的更多分泌，并进一步增强了 PS 的暴露。

[1002] 5. 抗体与经 H_2O_2 处理的 HUVEC 和 MDA-MB-435 细胞的结合

[1003] 通过流式细胞术来分析 3G4 抗体与经 H_2O_2 处理和未处理的 HUVEC 和 MDA-MB-435 细胞的结合（图 5A)。如上文阐述的建立 H_2O_2 处理条件以诱导质膜外表面上的阴离子磷脂

打印ID7584222 Pg 123

暴露。

[1004] 在用 H_2O_2 处理前没有一种细胞类型结合可检测水平的 3G4。在用 H_2O_2 处理后，用 3G4 染色随后用 FITC- 抗小鼠 IgG 染色的细胞的平均荧光强度比用 BBG3 处理随后用第二级试剂处理的细胞高大约 10 倍。经 H_2O_2 处理的细胞不被碘化丙锭染色，这表明它们的外膜是完整的。通过由阴离子磷脂制备的脂质体，而不是由中性脂质制备的脂质体，阻断了 3G4 结合，这表明 3G4 结合细胞的阴离子磷脂。

[1005] 为了确定 3G4 抗体在细胞表面上的分布，将经 H_2O_2 处理的 HUVEC 和 MDA-MB-435 细胞通过间接免疫荧光用 3G4 染色，并使用荧光显微镜术检查（图 5B、图 5C、图 5D 和图 5E）。3G4 抗体染色经 H_2O_2 处理的 HUVEC 和 MDA-MB-435 细胞的质膜的分散区域。细胞膜的染色区域出现小的表面泡（图 5C、图 5E），类似于在用 H_2O_2 处理的内皮细胞上观察到的“膜泡”(Hastie 等人，1997 ;van Gorp 等人，2002)。经 H_2O_2 处理的细胞不被对照抗体 BBG3 染色（图 5B、图 5D），这显示 3G4 与细胞的结合是抗原特异性的。使用经 FITC 标记的膜联蛋白 A5 观察到相同的染色模式。当加入 H_2O_2 后 1 小时进行检查时，3G4 阳性的经 H_2O_2 处理的细胞不显示核浓缩的形态学征兆，这与下述报道一致：在内皮细胞中过氧化物诱导的膜起泡与谷胱甘肽氧化相关，而不是细胞凋亡，并且可以是可逆的 (van Gorp 等人，2000)。

[1006] 因此，这些发现表明，3G4 抗体结合在 HUVEC 或 MDA-MB-435 细胞表面上通常不存在并且在用 H_2O_2 处理细胞时暴露在细胞表面上的阴离子磷脂。

[1007] 实施例 VIII

[1008] 膜联蛋白缀合物的抗肿瘤作用

[1009] 氨基磷脂和阴离子磷脂是肿瘤血管系统的稳定标记物，这一惊人的发现意味着抗体 - 治疗剂构建体可用于癌症治疗中。除了利用抗体作为靶向剂之外，膜联蛋白和其他特异的结合蛋白质也可用于将治疗剂特异递送至肿瘤血管。以下结果显示了体内施用膜联蛋白 -TF 构建体所产生的抗肿瘤作用。

[1010] A. 方法

[1011] 制备膜联蛋白 V-tTF 缀合物并施用于患实体瘤的 nu/nu 小鼠。由人 HT29 结肠直肠癌细胞形成肿瘤，所形成的肿瘤至少约 1.2cm^3。静脉内施用膜联蛋白 V-tTF 凝血配体 (10 μ g) 并使其循环 24 小时。另外培养经盐水处理的小鼠作为对照动物。处理 1 天后，处死小鼠并放血，收获肿瘤和主要器官以供分析。

[1012] B. 结果

[1013] 发现膜联蛋白 V-tTF 缀合物在患 HT29 肿瘤的小鼠内诱发了特异的肿瘤血管凝血。在单次注射膜联蛋白 V-tTF 缀合物处理后的动物内约 55％的肿瘤血管形成血栓。相反，在对照动物的肿瘤血管中只有极少血栓形成的迹象。

[1014] 实施例 IX

[1015] 3SB 抗 PS 抗体的抗肿瘤作用

[1016] 本实施例利用同种和异种肿瘤模型显示了抗 PS 抗体的抗肿瘤作用。此研究中所用的 3SB 抗体结合 PS（和 PA），但基本上不与 PE 反应。此抗 PS 抗体引起肿瘤血管损伤，伴随着血栓形成和肿瘤坏死。

[1017] 首先利用 3SB 抗体在同种和异种肿瘤模型中检测抗 PS 抗体的作用。对于同种模型来说，将 1×10^7 个小鼠结肠直肠癌 Colo26 细胞（获自 Ian Hart 博士，ICRF，伦敦）皮下注

打印ID?584222 Pg 124

射入 BALB/c 小鼠的右侧。在异种模型中，通过在雄性 CB17SCID 小鼠右侧皮下注射 1×10^7 个细胞产生人 Hodgkin's 淋巴瘤 L540 异种移植物。在处理前使肿瘤长至约 0.6 — 0.9cm^3 大小。

[1018] 将 20μg3SB 抗 PS 抗体 (IgM)、对照小鼠 IgM 或生理盐水腹膜内注射入患肿瘤的小鼠（每组 4 只动物）。每隔 48 小时重复此处理 3 次。每天监测动物，检查肿瘤和体重。如实施例 I 所述计算肿瘤体积。当肿瘤长至 2cm^3 时处死小鼠，或者如果肿瘤显示出坏死或溃疡的迹象则更早一些时间处死小鼠。

[1019] 用 3SB 抗 PS 抗体进行的处理有效抑制了同种和异种肿瘤的生长。抗 PS 抗体引起肿瘤血管损伤，伴随着血栓形成和肿瘤坏死。血凝块的出现和被堵塞血管周围肿瘤块的瓦解是明显的。

[1020] 定量地说，3SB 抗 PS 抗体疗法在患大 Colo26 和 L540 肿瘤的小鼠内抑制了肿瘤的生长，抑制程度高达对照肿瘤体积的 60%。在用盐水或对照 IgM 处理的小鼠中未发现肿瘤生长的延缓。在用抗 PS 抗体处理的小鼠内未观察到毒性，正常器官保持未改变的形态，与未处理的或盐水处理的小鼠无区别。

[1021] 在首次处理 24 小时后肿瘤开始消退，在接着的 6 天内肿瘤体积继续减小。在同种和无免疫应答的肿瘤模型中都观察到了此结果，表明这一作用是由不依赖于免疫状态的机制所介导的。而且，与患大于 1500mm^3 的肿瘤的对照小鼠相比，肿瘤的减轻与动物警觉性的增加和通常的健康外观有关。肿瘤的再生长发生在首次处理 7 — 8 天后。

[1022] 用抗 PS 处理 L540 肿瘤获得的结果更多的是由以下原因造成的。值得注意地，尽管事实上在 L540 肿瘤中 PS 染色阳性的血管百分数小于在 HT29 和 NCI-H358 肿瘤中的，但在 L540 肿瘤处理中确实出现了肿瘤坏死。这意味着在处理其他肿瘤类型时可能产生更快速的坏死。此外，通常选择 L540 作为实验模型，因为它们提供了清楚的组织学切片且事实上已知它们对坏死具有一定的抗性。

[1023] 实施例 X

[1024] 抗阴离子磷脂抗体 (9D2) 的抗肿瘤作用

[1025] 此实施例证实了可结合 PS 和其他阴离子磷脂的 9D2 抗体在体内抗 肿瘤研究中的作用。

[1026] 将可结合阴离子磷脂的高剂量 (>150μg) 大鼠抗体 9D2 注射入患 H358 肿瘤的裸鼠中。免疫定位研究显示了它强烈地定位于肿瘤内皮 (4+)，尽管由于高剂量而观察到 9D2 与正常血管有某些低水平的非特异结合（正如对无关特异性对照 IgM 抗体所观察到的一样）。

[1027] 当将 9D2 腹膜内注射入患 L540 肿瘤的 SCID 小鼠中以产生腹水时，肿瘤坏死并分解。将对照抗体 (MK2.7，大鼠 IgG) 注射入患 L540 肿瘤的 SCID 小鼠时，未观察到类似的效果。

[1028] 随后更精确地测定 9D2 抗 -PS 抗体对体内 L540 肿瘤生长的影响。当肿瘤达到 200 — 250μl(0 天）时开始进行处理。在第 0 天至第 7 天，将约 150μg IgM(200μl 上清液）或 200μl 110% DMEM 腹膜内注射入小鼠。在第 7 天至第 22 天，将约 300μg IgM(400μl 上清液）或 400μl 110% DMEM 腹膜内注射入小鼠。第 22 天是处理的最后一天，并在这天处死小鼠。

打印ID?584222 Pg 125

[1029] 如表 12 中所示，从第 10 天到第 22 天，肿瘤的生长通常被抑制约 40％－ 50％。在结束研究的时候，被处理组中只有 4 只小鼠的肿瘤体积大于 2000μl，而对照组中 9 只均如此。

[1030] 表 12

[1031] 抗 PS 抗体对体内 L540 肿瘤的影响

[1032]

开始处理后的天数	平均肿瘤体积（μl）		抑制百分数％	肿瘤体积>2000μl 的小鼠数目	
	对照	处理		对照	处理
0	341	320	6.2	0	0
1	464	325	10.8	0	0
3	412	415	0	0	0
7	687	455	33.8	0	0
10	904	544	39.9	1/9	0
13	945	545	42.4	1/9	0

[1033]

15	1373	685	50.1	4/9	1/10
17	1426	842	41.0	4/9	4/10
20	1992	987	50.5	6/9	4/10
22	2560	1365	53.3	9/9	4/10

[1034] 在另一体内实验中，在肿瘤细胞注射后 45 天内研究大鼠抗 PS 抗体对 CB17SCID 小鼠中的 L540 肿瘤生长的影响。每天用 300μg 抗 PS 抗体腹膜内注射处理这些患肿瘤的小鼠，或每天腹膜内注射 300μl 10％ DMEM 作为对照。与对照相比，被处理组中肿瘤治疗的各种参数明显较好（表 13）。

[1035] 表 13

[1036] 抗 PS 抗体对体内 L540 肿瘤的影响

[1037]

其他参数	对照	处理
％消退的肿瘤[1]（处理后 60 天）	0	40％
％消退的肿瘤[1]（处理后 90 天）	0	20％
次级肿瘤的平均体积（μl）[2]	537±30	366±56

[1038] [1] 在治疗后的指定时间（60 天与 90 天）内在经处理的小鼠中肿瘤太小以致不能检测

[1039] [2] 淋巴结中的转移

打印ID7584222 Pg 126

[1040] 在进一步的研究中，每周 3 次以 100μg 的剂量将 9D2 抗体腹膜内注射入携带 L540 肿瘤的小鼠。每周两次用卡尺测量肿瘤的大小。与对照组相比较的所述抗肿瘤效果是显著的。

[1041] 实施例 XI

[1042] 抗 PS 抗体 3G4 的抗肿瘤作用

[1043] 本实施例证实了利用抗 PS 抗体 3G4 在同种和异种肿瘤模型中另外 的抗肿瘤效果。此研究中所用的 3G4 抗体是可结合 PS 和其他阴离子磷脂的 IgG 抗体（实施例 IV）。

[1044] A. 动物肿瘤研究的方案

[1045] 在同种和异种肿瘤模型中检测 3G4 的作用。用于动物肿瘤治疗研究的一般方案进行如下。除非特别提及具体的差异，否则这就是本申请研究中所用的方案。

[1046] 动物获自 Charles Rivers 实验室。小鼠为 4 — 5 周龄，雌性，C.B-17SCID 或 Fox Chase SCID 小鼠。将小鼠关在高压灭菌的笼子里，喂无菌食物和水，进行无菌处理。所有步骤都在层流净化罩内进行。让小鼠适应 1 周，然后做耳垂标记并从尾静脉处取血样（约 75 — 100μl），用 ELISA 检查泄漏程度。任何在泄漏 ELISA 试验中失败的小鼠都不能用于实验中。在耳垂标记和取血样 2 — 3 天后将肿瘤细胞同位注射入小鼠乳房脂垫 (MFP) 或皮下注射入小鼠右侧。

[1047] 在同位模型中，通常将 0.1ml DMEM 中的 1×10^7 个细胞注射入麻醉小鼠的 MFP 处。腹膜内注射 0.075ml 小鼠混合物麻醉小鼠。小鼠混合物是 5ml 氯胺酮 (100mg/ml)、2.5ml 甲苯噻嗪 (20mg/ml)、1ml 乙酰丙嗪 (10mg/ml)、11ml 无菌水。剂量是每 20 — 30 克体重通过腹膜内途径注射 0.1ml，持续时间为 30 分钟。

[1048] 一旦小鼠被麻醉，即通过它对脚趾 / 足钉无反应来检查，则使小鼠左侧位躺并用 70％的酒精擦拭头正后方和右前臂 / 后背周围区域。在右前臂（侧胸）正后方开一 2 — 3mm 切口，揭开皮肤片就显露出白色的脂垫。用 1ml 注射器和 27 号针头将 0.1ml 细胞注射入脂垫中，在脂垫中产生一大泡。用 9mm 的无菌伤口夹闭合切口。将小鼠放回笼子中并观察直至其从麻醉中苏醒并能活动。检测手术后的健康状况，如果观察到任何疼痛的迹象，在小鼠饮用水中添加对乙酰氨基酚 (0.24mg/ml) 和可待因 (0.024mg/ml)。1 周后去除伤口夹。使用此方法将细胞准确的放入选定的位置而不会进入皮下区域。在 14 — 15 天内肿瘤体积 (LxWxW) 将约为 200μl，收获率基本上为 100％。

[1049] 在皮下模型中，通常用 0.2ml 中的 1×10^7 个细胞注射小鼠。不用 麻醉小鼠，但通过牢固夹紧暴露右侧的小鼠皮肤而将束缚住。用 1ml 注射器和 23 号针头将 1×10^7 个细胞 (200μl) 注射入小鼠皮肤正下方，然后将看到一大泡。看到少量的液体从注射位点处渗漏的现象并不罕见。在皮下注射退针时可以采用转动的方式来减少此渗漏。通过 LxWxH 检查肿瘤体积。

[1050] 在灌注方案中，用溶于 0.2ml 盐水中的 1000U 肝素静脉内注射小鼠。然后通过腹膜内注射 0.1ml 小鼠混合物使其安静。一旦小鼠足够安静（通过它对脚趾 / 足针刺无反应来检查），即打开其胸腔以暴露心脏和肺。将附着于管子和灌注泵上的 30 号针插入左心室。将右心室剪开使血液能滴出来。以 1ml/ 分钟的速度泵入盐水 12 分钟。结束灌注后，取下针头和管子。切下组织以供进一步研究，可以是免疫组化或病理学研究。

[1051] B. 肿瘤治疗结果

打印ID7584222 Pg 127

[1052] 对于同种模型，使用 Meth A 小鼠纤维肉瘤细胞。在一异种模型中，将人 MDA-MB-231 乳房肿瘤细胞接种于乳房脂垫中。在另一异种模型中，通过注射细胞并使肿瘤在处理前长到超过 500mm^3 大小来产生大的人 Hodgkin's 淋巴瘤 L540 异种移植物。将 100μg3G4 抗 PS 抗体 (IgG) 腹膜内注射入携带肿瘤的小鼠 (每组 10 只动物)，与对照相对应。每周重复处理 3 次。每周监测动物两次以检查肿瘤的状况。

[1053] 用 3G4 抗 PS 抗体处理有效抑制了同种和异种肿瘤二者的生长。抗体引起了肿瘤血管损伤、局部的血栓形成和肿瘤坏死。

[1054] 同种 Meth A 肿瘤细胞的治疗尤其成功，而对生长于乳房脂垫中的人 MDA-MB-231 乳房肿瘤细胞的处理也造成了肿瘤消退。即使在携带已知抗坏死的大 L540 肿瘤的小鼠内，与对照相比，3G4 抗体治疗也抑制了肿瘤的生长。在对照小鼠中未发现肿瘤生长的延缓。在用抗 PS 抗体处理的小鼠中未观察到毒性。

[1055] 还用 MD-MBA-435s 细胞产生了肿瘤并如上所述进行处理。用 3G4 抗体处理也有效抑制了这些肿瘤的生长。对大的 L540 肿瘤，MDA-MB-231 和 MD-MBA-435s 肿瘤细胞处理 60 天也是有效的。抗体引起了肿瘤血管损 伤、血栓形成和坏死并延缓了肿瘤生长，且没有毒性的迹象。

[1056] MD-MBA-435s lucerifase 细胞获自 Angels Sierra Jimenez 博士，Barcelona，西班牙，并培养于 10％ DMEM 中。如上所述将肿瘤细胞注射入小鼠，在注射 2 周后，检查肿瘤并记录体积。用按照实施例 XIX 产生的 3G4 抗体和嵌合 3G4 抗体对携带肿瘤平均体积 (200mm^3) 相似的小鼠进行处理，与对照相对比。在第 15 天通过腹膜内注射 (800μg) 开始进行处理，每 2 — 3 天继续注射 200μg，直至最终在第 35 天注射 400μg。在注射当天检查肿瘤体积和小鼠体重。处死小鼠并用盐水灌注 12 分钟。取下器官和肿瘤，在液氮中速冻并将肿瘤切片以供免疫组化分析之用。

[1057] 此研究显示了，与对照相比，3G4 抗体和嵌合 3G4 抗体二者都有效地延缓了肿瘤的生长。

[1058] 实施例 XII

[1059] 抗 PS 抗体针对 CMV 的抗病毒作用

[1060] 通过从肿瘤血管到病毒感染领域的惊人转变，发明者紧接着推断针对氨基磷脂和阴离子磷脂的抗体还有可能发挥抗病毒作用。本实施例的确证明了这一点，首先将 3G4 抗体用于治疗巨细胞病毒 (CMV) 感染。

[1061] A. 方法

[1062] 1. 受 CMV 感染的细胞的体外治疗

[1063] 如前文所述 (Bresnahan 等人，1996)，以感染复数为 0.01 用表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的人 CMV AD169 感染 6 孔板中汇合的人二倍体包皮成纤维细胞 (HHF-R2) 单层。简而言之，以每孔 1ml 的总体积将细胞与病毒在 37℃孵育 90 分钟。在感染期间，每 30 分钟轻轻摇动平板一次。感染后，去除细胞上清液并在每个孔中加入 DMEM/10％ FBS/pen-strep(2ml/ 孔)。

[1064] 将 3G4 或同种型匹配的对照抗体 GV39G(100μg/ml 和 50μg/ml) 的稀释液加入孔中。将感染后的细胞在 37℃孵育共 19 天。每 3 天更换一次 各孔中的培养基和抗体。在第 19 天，收获各孔中的细胞和上清液并冻存于 -80℃直至进行噬斑检测。

打印ID7584222 Pg 128

[1065] 2. 荧光显微镜检查法

[1066] 重组 CMV 在 SV40 启动子调控下表达 GFP。因此，在荧光显微镜下被感染的细胞呈现绿色。在这些研究中，在第 2、3 和 9 天用荧光显微镜观察经抗体处理的受 CMV 感染的细胞。

[1067] 3. 噬斑测定法

[1068] 用标准方案进行噬斑测定法。简而言之，在 37℃快速融化冻存细胞的悬浮液并在 1000rpm 离心 1 分钟去除碎片。将不同稀释度的细胞上清液加入 6 孔板中的亚汇合 HHF-R2 细胞单层上，并在 37℃孵育细胞 90 分钟（每 30 分钟轻摇平板一次）。感染后，去除细胞上清液，并换入 2ml DMEM/10％ FBS。在第 4 天，去除各孔中的上清液，并用 0.01％低熔点琼脂糖 /DMEM/10％ FBS 覆盖细胞。感染后将平板在 37℃共孵育 14 天。在第 14 天，用 10％缓冲福尔马林固定被感染的细胞单层，并用亚甲蓝染色使噬斑显现。

[1069] B. 结果

[1070] 1. 3G4 抑制 CMV 的病毒扩散

[1071] 为了研究 3G4 对 CMV 感染和复制是否具有抑制作用，在以低感染复数加入 CMV 之前用 3G4 预处理汇合的人成纤维细胞。这些研究中所用的 CMV 表达绿色荧光蛋白 (GFP)。因此，在荧光显微镜下观察时被感染的细胞呈现绿色。

[1072] 在用 50μg/ml 和 100μg/ml 抗体处理的第 3 天，在未处理孔和用 3G4 或同种型匹配的对照抗体 GV39G 处理的孔中都有单个被感染的细胞。因此，用 3G4 处理成纤维细胞未显示出显著抑制病毒进入细胞。

[1073] 不过，在第 9 天，在 3G4 处理孔和对照 GV39G 处理孔之间被感染细胞数目有了显著的不同。当病毒传播至对照孔中约 80％的细胞单层时，在 3G4 处理孔中病毒还局限于最初的个别被感染细胞内。因此，3G4 限制了 CMV 从最初的被感染细胞向周围细胞的传播。用 100μg/ml 和 50μg/ml 进行处理的细胞都观察到了病毒传播的这种抑制。

[1074] 2. 病毒抑制是抗体浓度依赖型的

[1075] 为了确定在低感染复数下发挥抗病毒作用所必需的 3G4 浓度，用不同浓度的 3G4 和对照抗体 GV39G 处理被感染的细胞。用 100μg/ml 和 50μg/ml3G4 观察到细胞间传播的完全抑制。当用 25、12.5 和 6.25μg/ml3G4 处理细胞时，有渐增数目的 GFP 阳性受 CMV 感染的细胞。尽管在这些低浓度下 3G4 不会完全阻止病毒从原来的被感染细胞中向外传播，它仍然具有有意义的抗病毒作用，因为与 GV39G 处理的对照孔相比，在 3G4 处理孔中观察到较少的 GFP 一阳性受 CMV 感染的细胞。

[1076] 3. 低感染复数下病毒负荷的定量

[1077] 通过进行噬斑测定法测定抗体处理后的病毒负荷来对 3G4 的抗病毒作用定量。对照包括未处理细胞、GV39G 抗体和利用 C44 抗体（抗秋水仙碱的小鼠 IgG2a 同种型抗体）的附加抗体对照。

[1078] 用 100μg/ml3G4 处理被感染的细胞（感染复数＝ 0.01pfu/ 细胞）导致病毒滴度与对照（经 GV39G 处理的细胞）相比显著下降 6 个 $\log_{10}$。此抑制作用说明约 99.9999％的病毒复制被抑制。在浓度为 50μg/ml 时，用 3G4 处理导致了与 GV39G- 处理相比病毒滴度下降 3.5 个 $\log_{10}$。使用 25μg/ml 和 12.5μg/ml3G4，结果仍然是显著的，甚至在 6.25μg/ml 时仍能观察到抑制作用。

打印ID7584222 Pg 129

[1079] 4. 高感染复数下病毒负荷的定量

[1080] 对以高感染复数 3 被感染的成纤维细胞进行 3G4 处理还导致了病毒滴度显著下降。在浓度为 100 μ g/ml 时，用 3G4 处理导致了与对照（经 GV39G 处理的细胞）相比病毒滴度显著下降 5 个 $\log_{10}$。在浓度为 50 μ g/ml 时，与 GV39G 相比 3G4 抑制病毒复制 3 个 $\log_{10}$。

[1081] 5. 晚期复制的抑制

[1082] 为了确定 CMV 复制周期的哪一个阶段被 3G4 阻断，进行定时的附加研究。为此，在感染后不同的时间点将 3G4 添加入以高感染复数被感染的成纤维细胞中。用标准噬斑测定法对病毒负荷（在细胞和上清液中）定量。

[1083] 感染长达 24 小时后添加 3G4 导致病毒滴度有 5 － 6 个 $\log_{10}$ 的下降。不 过，当 3G4 的添加延迟至 48 小时时，3G4 的抑制作用降低到 2 个 $\log_{10}$，而当添加延迟至 72 － 96 小时时，抑制作用进一步降低。这表明 3G4 干扰了在感染后 24 － 48 小时之间发生的 CMV 晚期复制。因此，3G4 未显著干扰感染或者早早期或早期基因表达。它在稍晚的病毒复制中发挥作用，如在晚期基因表达、病毒 DNA 合成、病毒包装或流出中。

[1084] 实施例 XIII

[1085] 抗 PS 抗体针对 RSV 的抗病毒作用

[1086] 除了实施例 XII 中所显示的针对 CMV 的显著抗病毒作用外，本实施例证明了可使用三种不同的抗 PS 抗体抑制呼吸道合胞病毒 (RSV) 的复制。

[1087] A. 方法

[1088] 1. 受 RSV 感染的细胞的体外治疗

[1089] 将 A-549 细胞在三个 Costar12 孔组织培养板中培养至 100％汇合。将 200 μ L 极限必需 Eagle 培养基加入所有的孔中。在各板的 9 个孔中加入抗磷脂抗体 (Ab) (100 μ g/100 μ l)，30 分钟后以感染复数为 1 用 RSV 长链 100 μ l 感染最初 9 个孔中 6 个孔的细胞。剩下 3 个孔作为未感染的、抗体处理孔。以上述相同感染复数的 RSV 感染无抗体的另三个孔。

[1090] 各板用于检测三种不同的抗体 :3G4、3SB 和 1B9（实施例 IV）。将细胞在 5％ CO_2 中 40℃孵育 2 小时，然后在各个孔中加入 600 μ l 培养基至完整的 1mL 体积。在同一条件下保持 A-549 细胞平板作为对照。在感染后 4、24 和 72 小时收集上清液。在各时间点，从各板的 4 个孔采样 :一个孔中为只用抗体处理的细胞，两个孔具有经抗体处理 / 受 RSV 感染的细胞，而另一个孔中仅有被 RSV 感染的细胞。将样品冻存于 -80℃直至噬斑测定法。

[1091] 2. 噬斑测定法

[1092] 如前所述进行噬斑测定法 (Kisch 等人，1963 ;Graham 等人，1988)。简而言之，将冻存细胞的细胞上清液在 37℃迅速解冻。从未稀释的细 胞上清液制备三份 10 倍稀释液 : 10^{-1}、10^{-2} 和 10^{-3}。将各稀释液 100 μ l 加上未稀释样品接种于 80％汇合的 Hep-2 细胞系平板中，均一式三份。将平板放置于 5％ CO_2、40℃培养箱中 5 天。在第 5 天，将平板显色并用苏木精和伊红染色来展现各个孔中的噬斑。用解剖显微镜对噬斑进行计数来计算 RSV 病毒负荷 pfu（噬斑形成单位）/mL。

[1093] B. 结果

[1094] 用 3SB 或 1B9 处理受 RSV 感染的细胞导致病毒复制发生对数式减少。用 3G4 处理感染细胞时，抗病毒效果更显著。用 3G4 处理导致了病毒滴度降低 2 个 $\log_{10}$。抑制作用比

打印ID7584222 Pg 130

用 CMV 观察到的低，这很可能是因为 3G4 浓度低之故（25 — 50μg/ml）。

[1095] 实施例 XIV

[1096] 单链抗 PS 抗体

[1097] 鉴于本文所述的抗 PS 抗体的许多用途，包括单独作为抗肿瘤剂、作为靶向剂将附着的治疗剂递送至肿瘤以及作为抗病毒剂，本实施例描述了适于产生单链（scFv）抗 PS 抗体的技术，即其中 V_H 和 V_L 结构域存在于单一多肽链中，通常通过肽接头连接。

[1098] A. 噬菌体抗体文库的制备

[1099] 将细菌文库（约 1×10^{10} 个克隆）的次级原种接种于含 100μg/ml 氨苄青霉素和 1%葡萄糖的 100ml2xTY 中。在 37℃振荡培养至 600nm 的 OD 值达到 0.5。

[1100] 加入 10^{13}pfu 的 M13KO7 辅助噬菌体，在不摇动的条件下于 37℃水浴中孵育 30 分钟。将被感染的细胞在 3500g 离心 10 分钟。将沉淀重悬于含 100μg/ml 氨苄青霉素和 75μg/ml 卡那霉素的 200ml2xTY 中并于 30℃振荡培养过夜。

[1101] 将培养物于 10,800g 离心 10 分钟。向上清液中加入 1/5 体积的 PEG/NaCl，混合均匀并在 4℃放置 1 小时。然后 10,800g 离心 30 分钟。将沉淀重悬于 40ml PBS 中并加入 8ml PEG/NaCl。混合并在 4℃放置 20 分钟。然后将其于 10,800g 离心 10 分钟以并吸出上清液。沉淀重悬于 2ml10%人血清中，在微量离心管中 11,600g 离心 10 分钟以去除大部分残留的细菌碎片。

[1102] 为了进行预淘选，将 10%人血清中的噬菌体抗体文库加入用 PC 包被的平皿中并室温孵育 60 分钟。

[1103] B. 生物素化脂质体的选择

[1104] 将 20μmol 磷脂酰肌醇和 20μmol 生物素化磷脂酰丝氨酸溶于 10ml 己烷中。用旋转蒸发器干燥此溶液使其在烧瓶表面形成一薄层。加入 2ml PBS 并于 4℃水浴超声处理 30 分钟。

[1105] 然后在存在 10%人血清的条件下混合 100μl 噬菌体 scFv 和 100μl 生物素化脂质体，并在室温轻轻旋转 1 小时。通过加入 600μl 2.5%酪蛋白 /0.5% BSA 用 100μl 链霉抗生物素蛋白 M-280dynabeads 于室温进行封闭 30 分钟。用 MPC-E（磁性颗粒浓缩仪，来自 Dynal）4 — 5 分钟使珠子从封闭缓冲液中分离出来。

[1106] 将珠子重悬于 100μl PBS 中。将 100μl 封闭后的链霉抗生物素蛋白 Dynabeads 加入结合了生物素化抗原的噬菌体中并于室温轻轻旋转 15 分钟。用 MPC-E5 分钟完成分离并倒出上清液。用 1ml PBS 漂洗 5 次。每一次漂洗时，都将珠子重悬浮并用 MPC-E 沉降。

[1107] 最后，通过重悬于 300μl 100mM 三乙胺中 30 分钟将噬菌体从珠子上洗脱下来。加入 150μl 1M Tris pH7.4 中和。用 MPC-E 再次分离珠子。

[1108] 用 150μl 噬菌体上清液感染 10ml 对数期的 TG1 细菌。在 20μg/ml 氨苄青霉素存在的条件下将 10ml 培养物于 37℃振荡培养 1 小时。加入氨苄青霉素至终浓度 50μg/ml 并再振荡培养 1 小时。在此培养物中加入 10^{13}pfu M13 辅助噬菌体，转移到含 100μg/ml 氨苄青霉素的 100ml2TY 培养基中并于 7℃振荡培养 1 小时。加入卡那霉素至终浓度 100μg/ml 并于 30℃振荡培养过夜。

[1109] 再重复噬菌体制备步骤和选择步骤 3 — 4 次。

[1110] C. 单克隆单链抗体 ELISA

打印ID7584222 Pg 131

[1111] 将平板上的 HB2151 单菌落（经过 4 轮筛选后）接种于 96 孔板中含 100 μg/ml 氨苄青霉素和 1% 葡萄糖的 500μl 2×TY 培养基中并于 37℃振荡 (300rpm) 培养过夜。从此平板中取 5μl 转移到每孔装有含 100μg/ml 氨苄青霉素的 500μl 2×TY 培养基的另一 96 孔板中并于 37℃振荡培养 3 小时 (OD600 = 0.9)。

[1112] 在各孔中加入含 100μg/ml 氨苄青霉素、10mM IPTG（终浓度 1mM）的 50μl 2×TY 培养基，30℃振荡培养过夜。1800g 离心 10 分钟，并将 100μl 上清液用于以下 ELISA 中。

[1113] 用以 10μg/ml 浓度 (P664110mg/ml，溶剂是氯仿：甲醇 95:5) 溶于乙醇中的 PS 包被 96 孔板 (DYNEX IMMULON®1B)。以相同方式用 10μg/ml PC 包被。这些平板在冷室内 4℃挥发。在各孔中加入 250μl 2.5% 酪蛋白，盖上平板并在 37℃封闭 1 小时。

[1114] 用 PBS 漂洗孔 3 次，加入 10% 人血清 100μl/ 孔和含可溶性 scFv 的上清液 100μl/ 孔并在 37℃孵育 60 分钟。弃溶液并用 PBS 洗 6 次。在各孔中加入溶于 5% 酪蛋白 /0.5% BSA — PBS(1:5000 稀释）的 9E10100μl，37℃孵育 1 小时并用 PBS 洗 6 次。在各孔中加入 100μl HRP- 山羊抗小鼠抗体 (1:10000 稀释），37℃孵育 1 小时并用 PBS 洗 5 次。在各孔中加入 0.05% OPD100μl 并显色 5 分钟。加入 100μl 0.18M H_2SO_4 终止反应并在 O.D.490 读数。

[1115] 将抗原阳性克隆在 2xTYAG 平板上划线并 30℃培养过夜。挑出阳性单菌落接种于 3ml2xTYAG 培养基中并在 37℃培养 12 小时。提取质粒并通过酶消化和 PCR 检查 scFv 基因插入片段。对具有正确大小插入片段的菌落进行测序。

[1116] 将具有正确大小插入片段的菌落培养于 100ml2xTYAG 培养基中并 37℃振荡培养至 OD600 = 0.5。将它们转移入 900ml2xTYA 中并培养至 OD600 = 0.9。加入 1M IPTG 至终浓度 1mM 并于 30℃振荡培养过夜。用如前所述的相同 ELISA 方法检查上清液。用 Ni^{++}- 琼脂糖亲和层析从周质部分纯化 scFv 蛋白质。

[1117] D. 结果

[1118] 淘选 4 轮后，以下克隆在 PS 平板上给出了有希望的 ELISA 信号并且 具有正确大小的插入片段：3E5、3A2、G5、C8、E4 和 4D5。这些克隆已被亚克隆，其中 E4 给出了 5 个阳性亚克隆，而 4D5 给出了 5 个阳性亚克隆（表 14）。

[1119] 表 14

[1120] PS 平板上的 ELISA

[1121]

0.099	0.107	0.118	0.115	0.100	0.094	0.084	0.086	0.166	0.164	0.102	**0.191**
0.113	0.106	0.127	**0.150**	0.128	0.097	0.078	0.087	**0.190**	0.144	0.102	0.154
0.122	0.115	0.117	0.112	0.105	0.097	0.085	0.088	**0.230**	0.071	0.168	0.150
0.107	0.108	0.121	0.123	0.107	0.101	0.083	0.085	0.191	**0.246**	**0.186**	0.150
0.138	0.121	0.114	0.131	0.100	0.096	0.082	0.079	0.183	0.187	**0.275**	**0.171**
0.118	0.115	0.116	0.132	0.099	0.094	0.082	0.086	0.185	0.073	**0.208**	0.102
0.111	**0.176**	0.126	0.118	0.096	0.087	0.123	0.087	0.144	**0.226**	0.112	0.126
0.102	0.107	0.131	0.125	0.089	0.102	0.082	0.084	**0.188**	0.073	0.142	0.151
3E5		3A2		G5		C8		E4		4D5	

[1122] 阳性克隆一旦被确定，就进行测序。克隆 3A2 的 scFv 核酸和蛋白质

打印ID?584222 Pg 132

[1123] 序列分别见 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6。大量培养阳性克隆并用镍琼脂糖亲和层析纯化 scFv。已用 Phast-凝胶电泳法获得了纯化的 scFv。

[1124] 实施例 XV

[1125] PE 结合性肽衍生物的合成

[1126] 本发明涉及用于治疗肿瘤和病毒疾病的示范性 PE 结合肽衍生物和缀合物的设计和合成。示范性耐久霉素衍生物的结构通过下列描述产生。

[1127] A. DLB

[1128] 将溶于 0.387ml0.1M $NaHCO_3$ 水溶液的 0.5mg(0.25μmole) 耐久霉素加入 0.113mg(0.25μmole)NHS-LC- 生物素 (Sigma) 中。将反应混合物于室温孵育 1 小时然后 4℃过夜。将样品加到氧化硅柱上,用 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 清洗,用 0.1% TFA 和 70% CH_3CN 洗脱。收集洗脱液并离心浓缩。总产量是 0.5mg。

[1129] B. DIB

[1130] 将溶于 0.286ml0.1M $NaHCO_3$ 水溶液中的 0.5mg(0.25μmole) 耐久霉素加入 0.034mg(0.25μmole) 盐酸 2- 亚氨基硫杂环戊烷 (2-IT) 中。将反应混合物室温孵育 1 小时。加入 0.13mg(0.26μmole) 碘乙酰 -LC- 生物素 (Pierce) 并将反应液室温孵育 1 小时并 4℃过夜。将样品加到氧化硅柱上,用 0.1% TFA 清洗,用 0.1% TFA 和 70% CH_3CN 洗脱。收集洗脱液并离心浓缩。总产量是 0.5mg。

[1131] C. $(DLB)_4NA$

[1132] 将 1.9mg(0.94μmole) 耐久霉素溶于 0.5ml0.1M $NaHCO_3$ 水溶液中。在其中加入溶于 200μl 二甲基甲酰胺 (DMF) 的 0.4mg(0.88μmole)NHS-LC- 生物素 (Sigma) 中。将混合物室温孵育 4 小时。将 1ml 中的 10mg(0.17μmole) 中性抗生物素蛋白 (NA) 加入反应混合物中,室温孵育 2 小时并 4℃过夜。将反应混合物加到 PBS 缓冲液平衡的 G25 柱 (体积 50ml) 上。收集各级分并用 SDS PAGE(phast 凝胶) 进行分析。将含蛋白质的级分 (7 — 16) 合并在一起,通过 0.22μm 滤器过滤除菌并通过检测 280nm 处的吸收值测定浓度。总产量是 5.1mg。

[1133] 然后用 FPLC 分部收集样品。收集相应于以下级分的三个峰 :峰 1 :$[(DLB)_4NA]_3$(级分 17 — 23) ;峰 2 :$[(DLB)_4]_2$(级分 24 — 33) ;和峰 3 :$(DLB)_4NA$(级分 35 — 48)。所有这些样品均通过 0.22μm 滤器过滤除菌。获得的终产量是 :0.34mg$[(DLB)_4NA]_3$;0.59mg$[(DLB)_4]_2$; 和 1.41mg$(DLB)_4NA$。

[1134] D. $(DLB)_4NA$-F

[1135] 将 PBS 缓冲液中的 0.61mg$(DLB)_4NA$ 加入溶于 DMF 的 0.005mg N- 羟基琥珀酰亚胺荧光素 (NHS- 荧光素)(Sigma) 中。将混合物室温孵育 1 小时。然后将反应混合物分级分离于 PD10 柱 (10ml) 上。$(DLB)_4NA$-F 洗脱于含蛋白质的级分 (3 — 4) 中,将它们合并在一起并通过 0.22μm 滤器过滤除菌。总产量是 0.5mg。

[1136] E. $(DIM)_n$ HIgG

[1137] 人 IgG(HIgG) 首先如下纯化 :将 1.3ml HIgG(包括 100mg/ml HIgG、22.5mg/ml 甘氨酸和 3mg/ml 清蛋白,溶于含 1mM EDTA 的硼酸盐缓冲液中,pH9) 加到 FPLC(S200,250ml) 柱上。收集级分并在 phast 凝胶上用 SDS PAGE 进行分析。将含单体 IgG 的级分 (21 — 32) 合并在一起,通过 0.22μm 滤器过滤除菌。按 280nm 处的吸收值测定的总产量是 111mg。

打印ID7584222 Pg 133

[1138] 将纯化的 HIgG(55mg 溶于 13ml 硼酸盐缓冲液中，pH9) 加入溶于 DMF 的 1.003mg SMCC(Pierce)0.5ml 中。混合物室温孵育 1 小时。同一时间，将含 6mg 耐久霉素的另一反应混合物 (3μmole，溶于 0.5ml0.1M $NaHCO_3$ 中) 和 0.413mg2-IT(3μmole ；在 0.1M $NaCO_3$ 中) 室温孵育 1 小时。反应结束后，将两反应混合物合并并室温孵育 2 小时，4℃过夜。反应产物在 phast 凝胶上用 SDS PAGE 进行分析。将反应产物加样到硼酸盐缓冲液 (pH9) 中的 FPLC 柱上。合并相应于三体 (5 — 14)、二体 (15 — 24) 和单体 (25 — 37) 的 FPLC 级分并通过 0.22μm 滤器过滤除菌。单体的总产量是 54.6mg。在每个 HigG 分子上附着了 5 — 7 个耐久霉素基团。

[1139] F. $(DIM)_n$ HIgG-F

[1140] 将 1mg$(DIM)_n$ HIgG(0.7ml) 加入溶于 DMF 的 NHS- 荧光素 5μl 中。反应混合物室温孵育 1 小时并用 PD-10 柱脱盐。合并含蛋白质的级分 (2 — 3) 并通过 0.22μm 滤器过滤除菌。总产量是 0.9mg。

[1141] G. $(DIM)_n$ HIgG-B 和 $[(DIM)_nHIgG]_2$-B

[1142] 为了合成生物素化的 $[(DIM)_nHIgG]_2$ 衍生物，将 0.66mg(1ml)$[(DIM)_nHIgG]_2$ 加入溶于 DMF 的 1mg/ml NHS-LC- 生物素 8μl 中。反应混合物室温孵育 1 小时并用 PD-10 柱脱盐。合并含蛋白质的级分 (3 和 4) 并通过 0.22μm 滤器过滤除菌。终产量是 0.46mg。

[1143] 以相同方式进行单体 $(DIM)_nHIgG$ 的生物素化。简而言之，将 1.06mg(0.75ml)$(DIM)_nHIgG$ 加入溶于 DMF 的 1mg/ml NHS-LC- 生物素 12μl 中。反应混合物室温孵育 1 小时，然后用 PD-10 柱脱盐。合并含蛋白质的级分 (3 和 4) 并通过 0.22μm 滤器过滤除菌。终产量是 0.62mg。

[1144] H. $(DIB)_4NA$

[1145] 将 2mg(0.99μmole) 耐久霉素溶于 0.5ml0.1M $NaHCO_3$ 水溶液并加入 0.136mg(0.99μmole)2-IT 中。将反应混合物室温孵育 1 小时。之后，加入 0.483mg(0.95μmole) 碘乙酰 -LC- 生物素 (Pierce) 并将反应液室温孵育 1 小时。加入溶于 1ml 水中的 10mg(0.17μmole) 中性抗生物素蛋白并 4℃孵育过夜。用 FPLC 分部收集反应混合物。收集并合并三个不同的峰 ：峰 1 ：$[(DIB)_4NA]_3$(级分 17 — 23) ；峰 2 ：$[(DIB)_4NA]_2$(级分 24 — 33) ；和峰 3 ：$(DIB)_4NA$(级分 35 — 48)。所有这些样品均通过 0.22μm 滤器过滤除菌。获得的总产量是 ：0.87mg$[(DIB)_4NA]_3$ ；1.25mg$[(DIB)_4NA]_2$ ；和 1.83mg$(DIB)_4NA$。

[1146] I. $(DIB)_4NA$-B

[1147] 将 0.023mg(0.3μmole)$(DIB)_4NA$ 加入 0.9μg NHS-LC- 生物素 (Pierce) 中。反应液室温孵育 1 小时，然后用 PD-10 柱脱盐。总产量是 0.04mg。

[1148] J. DS-1

[1149] 将溶于 0.5ml0.1M $NaHCO_3$ 水溶液的 5mg(2.5μmole) 耐久霉素加入 0.319mg(2.6μmole)1,3 丙磺酸内酯中。将混合物 4℃孵育过夜。将样品加到二氧化硅柱上，用 0.1% TFA 清洗，用 0.1% TFA 和 70% CH_3CN 洗脱。收集洗脱液并在减压的条件下离心浓缩。总产量是 5mg。

[1150] K. DS-2

[1151] 将溶于 0.3ml0.1M $NaHCO_3$ 水溶液的 1mg(0.497μmole) 耐久霉素加入 0.072mg(0.523μmole)2-IT 中。将反应混合物室温孵育 1 小时。加入 0.125mg(0.49μmole)

打印ID7584222 Pg 134

SBF-氯化物 (Pierce)。反应混合物室温孵育 1 小时并 4℃过夜。在二氧化硅柱上纯化肽。收集洗脱液并在减压的条件下离心浓缩。总产量是 1mg。

[1152] L.DS-3

[1153] 将溶于 0.4ml0.1M $NaHCO_3$ 水溶液的 1mg(0.497μmole) 耐久霉素加入 0.109mg(0.592μmole)2-磺基苯甲酸环酸酐中。将反应液室温孵育 1 小时并 4℃过夜。在二氧化硅柱上纯化得到的肽。收集洗脱液并在减压的条件下离心浓缩。总产量是 1mg。

[1154] M.DS-4

[1155] 将溶于 0.5ml0.1M $NaHCO_3$ 水溶液的 0.25mg(0.124μmole) 耐久霉素加入 0.017mg(0.124μmole)2-IT 中。将反应混合物室温孵育 1 小时。然后将混合物加入 0.049mg(0.124μmole)Ellman's 试剂中。反应混合物室温孵育 2 小时并 4℃过夜。将 250μl1mg/ml4-氨基-5-羟基-2,7-萘二磺酸单钠盐水合物加入 100μl1mg/ml2-IT 中。反应液室温孵育 1 小时。将 50μl 此反应混合物加到前述反应液中并室温孵育 1 小时。在二氧化硅柱上纯化肽。收集洗脱液并在减压的条件下离心浓缩。

[1156] N.DS-5

[1157] 将溶于 0.5ml0.1M $NaHCO_3$ 水溶液的 5mg(2.5μmole) 耐久霉素加入 0.356mg(2.6μmole)1,3-丙磺酸内酯中。将混合物 4℃孵育过夜。将样品加到二氧化硅柱上,用 0.1% TFA 清洗,用 0.1% TFA 和 70% CH_3CN 洗脱。收集洗脱液并在减压的条件下离心浓缩。总产量是 5mg。

[1158] O.DC-1

[1159] 将溶于 0.5ml0.1M $NaHCO_3$ 水溶液的 0.25mg(0.124μmole) 耐久霉素加入 0.017mg(0.124μmole)2-IT 中。将反应混合物室温孵育 1 小时。然后将混合物加入 0.049mg(0.124μmole)Ellman's 试剂中。混合物室温孵育 2 小时并 4℃过夜。在二氧化硅柱上纯化肽。收集洗脱液并在减压的条件下离心浓缩。

[1160] 实施例 XVI

[1161] 耐久霉素衍生物特异性结合 PE

[1162] 本实施例证明了实施例 XV 中合成的耐久霉素衍生物对 PE 是特异的,因此通过与细胞不渗透剂连接可用作特意的靶向剂或抗病毒剂并用于肿瘤和病毒疾病的治疗中。

[1163] 为了测试耐久霉素衍生物的特异性,尤其是与其他磷脂相比优先 结合 PE 的特异性,进行了一系列的竞争性 ELISAs。用以下方法测试耐久霉素衍生物与 DIB 或 DLB 竞争结合 PE 的能力。

[1164] 将 PE 和 PC 分别溶于乙醇中。终浓度为 5μg/ml。将 100μl 加到 96 孔板 (DYNEX **IMMULON®1B**) 的各孔中。使这些平板在冷室内 4℃挥发。在各孔中加入 250μl2.5%酪蛋白,盖上平板并在 37℃封闭 1 小时。弃封闭缓冲液并在各孔中加入 100μl2.5%酪蛋白。在平板上加入耐久霉素化合物的系列稀释液,例如 $(DIM)_nHIgG$、$(DIB)_4NA$、$(DLB)_4NA$、DS、耐久霉素和 DIB。

[1165] $(DIM)_nHIgG$ 起始浓度是 1.4mg/ml, $(DIB)_4NA$ 起始浓度是 800μg/ml,而 (DLB)4NA 的起始浓度是 800μg/ml。将它们 37℃孵育 1 小时并用 PBS 洗 5 次。在各孔中加入 100μl HRP-链霉抗生物素蛋白 (1:5000 稀释),37℃孵育 1 小时并用 PBS 洗 5 次。在各孔中加入 0.05% OPD100μl 并显色 5 分钟。加入 100μl0.18M H_2SO_4 终止反应并在 O.D.490 读数。

打印ID7584222 Pg 135

[1166] 将得到的数据制表，然后作图。渐增浓度的耐久霉素衍生物使490nm处的吸收值下降，这表明耐久霉素衍生物与DIB和DLB竞争性结合磷脂酰乙醇胺。

[1167] 用进一步的ELISAs证实耐久霉素构建体的磷脂结合特性。将各试验脂类PS、PE、PI、CL、PC、PG、SM和胆固醇分别溶于乙醇中并用于包被ELISA平板。将耐久霉素化合物系列稀释液加到平板上。孵育和漂洗后，在各孔中加入次级检测药剂并用上述比色方法测定反应性。

[1168] 将耐久霉素生物素衍生物DIB和DLB的代表性磷脂结合特性作图。它显示出DIB和DLB对PE特异，而与PS、PI、CL、PC、PG和SM的结合是可忽略的或检测不到的。$(DIM)_nHIgG$-B和$[(DIM)_nHIgG]_2$-B具有与DLB基本上相同的结合特性。尽管在高浓度DIB下只观察到极微弱的与PS的结合，这在本研究的范围内并没有很大的意义，因为在饱和及达到最大PE结合一半时的DIB浓度下未检测到与PS的结合。因此，耐久霉素构建体特异结合磷脂酰乙醇胺。

[1169] 还显示了血清对于耐久霉素衍生物与PE的结合没有显著的影响。这是通过在血清(BSA)存在和缺乏条件下耐久霉素生物素衍生物DLB 与PE包被ELISA平板的结合来举例说明的，其中的结合特性未显示出明显的差异。

[1170] 实施例XVII

[1171] PE结合性肽衍生物的抗病毒作用

[1172] 除了如实施例XII和实施例XIII中所示的抗PS抗体介导的抗病毒作用外，本实施例证明了特异结合另一常见氨基磷脂(PE)的肽衍生物的抗病毒作用。

[1173] A. 方法

[1174] 1. 受CMV感染的细胞的体外治疗

[1175] 如实施例XII中所述(Bresnahan等人，1996)以感染复数0.01用表达绿色荧光蛋白(GFP)的人CMV AD169感染汇合的人二倍体包皮成纤维细胞(HHF-R2)单层。以每孔1.5ml的总体积将细胞与病毒在37℃孵育90分钟。在感染期间，每30分钟轻轻摇动平板一次。感染后，去除细胞上清液并在每个孔中加入DMEM/10% FBS/pen-strep(2ml/孔)。

[1176] 在添加病毒之前，将耐久霉素衍生物$(DLB)_4NA$、$(DIM)_nHIgG$、DS-1、DS-2、DS-3和DC-1的不同稀释液加入孔中，然后进行感染。将感染后的细胞在37℃孵育共14天。每3天置换一次各孔中的培养基和耐久霉素衍生物。

[1177] 2. 荧光显微镜检查法

[1178] 如同在实施例XII中一样，重组CMV在SV40启动子调控下表达GFP。因此，在荧光显微镜下被感染的细胞呈现绿色。在这些研究中，在第4和6天用荧光显微镜观察用耐久霉素衍生物处理过的受CMV感染的细胞。

[1179] B. 结果

[1180] 在第4天，在未处理孔和用$(DLB)_4NA$和$(DIM)_nHIgG$处理的孔中都有个别被感染的GFP阳性绿色细胞。因此，用这些耐久霉素衍生物处理HHF-R2细胞似乎不会抑制病毒进入细胞。有一些初步的迹象表明耐久 霉素衍生物DS-1、DS-2和DS-3抑制病毒进入细胞。

[1181] 在用$(DLB)_4NA$和$(DIM)_nHIgG$处理后的第6天，在未处理孔和耐久霉素衍生物处理孔之间被感染的GFP阳性细胞数目有了显著的不同。到第6天，未处理孔中的病毒已从第4天所观察到的个别被感染细胞传播至周围细胞。不过，第6天，在用$(DLB)_4NA$和$(DIM)_nHIgG$

打印ID7584222 Pg 136

处理过的孔中，病毒仍局限于最初的个别被感染细胞中。

[1182] 因此，$(DLB)_4NA$ 和 $(DIM)_nHIgG$ 限制了 CMV 从最初的被感染细胞向周围细胞的传播。用不同浓度的 $(DLB)_4NA$（100 μ g/ml 和 50 μ g/ml）和 $(DIM)_nHIgG$（200 μ g/ml 和 100 μ g/ml）处理细胞都观察到了对病毒传播的这种抑制。

[1183] 实施例 XVIII

[1184] 3G4 抗体的优势

[1185] 如实施例 IV 中所述，用发明者独一无二的方案所开发出的 3G4 抗体具有许多优越于文献中的抗 PS 抗体的特点，包括著名的抗 PS 抗体 3SB（Rote 等人，(1993)）。本实施例描述了其中的某几个优点。

[1186] A. 种类和特异性

[1187] 3G4 是 IgG 抗体，而 3SB 是 IgM。IgG 类抗体具有许多优越于 IgM 之处，包括更高的亲和力、体内的清除率较低以及纯化、修饰和处理的简便性。将 IgM 抗体 3SB 与 3G4 和另一 IgG 抗体的 PS 结合之间的比较作图。

[1188] 3G4 与阴离子磷脂 PS、PA、PI、PG 和 CL 以大约相同的强度强反应，而与氨基磷脂 PE 的结合则没有这么强。它与 PC 和 SM 无反应性，结合特异性趋势如下：PS ＝ PA ＝ PI ＝ PG>CL>>PE（实施例 IV；表 4）。3G4 与肝素、硫酸乙酰肝素或者双链或者单链 DNA 没有可检测到的结合，在蛋白质印迹检测中，与提取自 bEnd.3 细胞的细胞蛋白质也没有可检测到的结合。3G4 的结合不受 5mM EDTA 存在的影响，表明 3G4 与阴离子磷脂的结合不需要 Ca^{2+}。3G4 不与已包被了磷脂但随后用 0.2% Tween20 的盐水溶液漂洗过的 ELISA 平板结合，证明了结合的是被吸附的磷脂。

[1189] 被 3G4 所识别的表位看起来位于阴离子磷脂的磷酸甘油核中，它在所有哺乳动物物种的磷脂中是相同的。因此抗体与小鼠和人二者的磷脂都反应，这对于临床前和临床开发都很重要。3G4 对阴离子磷脂比对天然配体膜联蛋白 V 更特异。与 3G4 不同，在生理浓度 Ca^{2+} 中膜联蛋白 V 还强烈结合中性磷脂。

[1190] 3G4 对阴离子磷脂的特异性通过下述试验得到证实，其中将由不同磷脂形成的脂质体用于与 3G4 竞争结合固定化的 PS。脂质体是由 5mg 单一磷脂在氯仿中形成的溶液制备的。将溶液在氮气中干燥，使其在圆底玻璃烧瓶中形成一薄层。然后加入 10ml Tris 缓冲液（0.1M，pH7.4），并将烧瓶超声处理 5 次，每次 2 分钟。将 3G4 抗体（0.1 μ g/ml）加入缓冲液或不同的磷脂脂质体中，并室温预孵育 30 分钟。将混合物加入 PS 包被的平板（在标准封闭后），孵育 1 小时，洗涤并添加二抗。1 小时后，漂洗平板并用 OPD 显色 5 分钟。

[1191] 如实施例 IV 中所示，3G4 可结合固定化的 PS、PA、PI、PG 和 CL，而以较低程度结合固定化的 PE，但不与固定化的 PC 结合。在存在或不存在不同脂质体的条件下 3G4 与固定化 PS 结合的能力如图 3 所示。来自这些脂质体竞争性试验的结果表明，3G4 与吸附于 ELISA 平板上的 PS 的结合被由 PS、PA、PI 和 CL 制备的脂质体阻断，但由 PE 和 PC 制备的脂质体则不导致 3G4 结合有可检测到的减少（图 3）。此外，SM 脂质体也不是抑制性的。

[1192] B. 细胞增殖的抑制

[1193] 3G4 结合将 PS 和其他阴离子磷脂外在化的活化、分裂、损伤、凋亡和恶性细胞。3G4 抗体抑制了内皮细胞的体外增殖，并显示出对分裂着的内皮细胞有明显的选择性抑制作用，这与静止细胞的情形相反。

打印ID7584222 Pg 137

[1194] 测定抗 PS 抗体 3G4、9D2、3B10、1B9、2G7、7C5 和 3SB 对 bEnd.3 细胞体外生长的影响。将 bEnd.3 细胞（10000/ 孔）接种于 48 孔平板中并使其附着。接种后 4 小时只加入 20% DMEM（对照）或含抗体（20μg－40μg 总 IgG/ 孔）的 20% DMEM。每个克隆均在两个独立平板上以三份试样进行检测。48 － 96 小时后使细胞分离，对各个孔测定细胞计数，并计算每次处理的平均细胞数目。

[1195] 3G4 和 9D2 抗体尤其有效，然后是 3SB 和 3B10，而 1B9、2G7 和 7C5 具有较小的抑制作用。各抗体显示出对分裂着的（亚汇合）内皮细胞有明显的选择性抑制作用，这与静止细胞的情形相反。在比较性研究中，3G4 显示了最大的抑制作用，然后是 9D2，它们的抑制性都强于 3SB。

[1196] C. 抗肿瘤作用

[1197] 3G4 可结合体内肿瘤血管内皮细胞的表面。在静脉内注射入患各种肿瘤的小鼠内后，3G4 特异性并一致地定位于肿瘤，但不定位于正常器官。在肿瘤血管内皮、坏死区和单个恶性细胞上观察到染色。在肿瘤中有 3G4 的多结合位点，这使其能同时靶向于肿瘤内皮和肿瘤细胞。

[1198] 3G4 抑制了体内血管发生和肿瘤生长，并且在患肿瘤的小鼠中显示出无可检测到的器官毒性。在最初的研究中，3G4 已在同种和异种肿瘤模型中显示出给人深刻印象的抗肿瘤作用，其中抗体造成了肿瘤血管的损伤、血管供应的减少和肿瘤坏死（实施例 XI）。在被处理动物中有 30%－ 50%观察到已产生的肿瘤的衰退。

[1199] 在重复的研究中已观察到 3G4 抗体的抗血管发生和血管靶向作用。与用对照抗体处理相比，对来自带有 MDA-MB-231 同位肿瘤并已用 3G4 处理的裸鼠的肿瘤切片的分析证明了在所有被处理的肿瘤中有抗血管发生作用。对照肿瘤显示出无坏死的迹象且高度血管化，正如肿瘤血管上检测的泛－内皮细胞标记 CD31 所证实的。相反，用 3G4 处理过的小鼠肿瘤有 80 － 90%的坏死和 CD31 阳性结构的几乎完全消失，表明此处理产生了实质性的抗血管发生作用。

[1200] 3G4 抗癌活性的另一方面是诱导肿瘤血管的损伤。这通过如下来举例说明：对照肿瘤中的血管灌注良好、形态完整且周围是存活的正分裂的肿瘤细胞，而经 3G4 处理的动物内的血管被频繁观察到具有正在瓦解的内皮层且被脱离的内皮细胞堵塞，并有可能被吸附至裸露血管的宿主细胞堵塞。经 3G4 处理的肿瘤内的血管清楚地显示出功能丧失，由坏死前的周围肿瘤细胞层可显示出这一点。这些研究还显示，用 3G4 处理引起白细胞浸润入肿瘤中（图 1）。

[1201] 在这些研究中，用 3G4 处理具有正位 MDA-MB-231 肿瘤的小鼠还减少了血浆容量并降低了肿瘤中的血管密度。根据血浆标记物 FITC- 葡聚糖减少所判断的，观察到经 3G4 处理的小鼠的总肿瘤血浆容量与经 BBG3 处理的小鼠相比减少了 60%。在来自经 3G4 处理的小鼠的肿瘤中每平方毫米的 CD-31 阳性血管的平均数目是 50±15，而在来自经 BBG3 处理的小鼠的肿瘤中为 160±20，这表示肿瘤血管供应（vascularity）在 3G4 处理后减少了大约 70%。

[1202] 总之，用 3G4 处理同位 MDA-MB-231 肿瘤后进行的组织学检查显示：1）在约 50%肿瘤血管中血管内皮分解；2）白细胞附着于肿瘤内皮且单核细胞浸润入肿瘤间质组织；3）肿瘤血管被血小板聚集物和红细胞堵塞；4）与未处理小鼠相比，经 3G4 处理的小鼠中肿瘤内

打印ID?584222 Pg 138

微血管密度下降 70％；以及 5）肿瘤中心坏死，肿瘤外围边缘细胞存活，这是 VTA 的典型特征。因此，3G4 抗体通过对肿瘤血管产生影响来发挥其主要的抗肿瘤作用。其他的机制，尤其是针对肿瘤细胞本身的抗体依赖型细胞毒性，有可能也造成抗肿瘤作用。这一点是重要的，且可能可以杀死更多的肿瘤细胞，包括外围边缘的肿瘤细胞。

[1203] 在进一步的研究中，在其他小鼠模型上检查 3G4 对肿瘤生长的影响，所说的肿瘤模型包括同种（小鼠 Meth A 纤维肉瘤）、皮下异种移植物（L540 人 Hodgkin's 淋巴瘤）和同位肿瘤（人 MDA-MB-231 乳癌和人 MDA-MB-435 乳癌）。用 3G4 抗体处理小鼠分别导致了这些肿瘤有 90％、65％以及 50％和 70％的生长延缓。小肿瘤（直径 0.1cm）和生长良好的肿瘤（直径 0.3cm，200mm^3）都同样被抑制。抗 PS 疗法导致在 50％的患 Meth A 肿瘤小鼠和 30％的患 MBA-MD-231 肿瘤小鼠中长期的完全的症状缓解。3G4 在免疫活性小鼠中具有最高的抑制作用。将人乳房肿瘤生长于小鼠乳房脂垫中的人乳房肿瘤（MDA-MB-231 和 MDA-MB-435）的同位模型尤为重要，因为这些是生长于人乳房中的人乳腺癌的实用和现实模型。

[1204] D. 安全特性

[1205] 3G4 抗体与文献中所述的抗磷脂抗体不同。通常地，抗磷脂抗体被 认为是会干扰凝血级联反应的致病抗体。它们会抑制体外凝血反应，并引起体内血栓形成。相反，3G4、9D2 和类似抗体是无致病效果的治疗用抗体。

[1206] 1. 凝血

[1207] 3G4、9D2 和类似抗体的重要方面源自发明者能够制备不与抗磷脂综合征或相关病理学相关联的抗体。

[1208] 在体外血液凝结研究中，用高剂量 3G4 抗体观察到对组织因子（TF）诱发的凝血有微弱抑制作用。在使用较低剂量的别的研究中，在组织因子存在下，经 3G4 处理的小鼠的再钙化血浆与来自经 BBG3 处理的小鼠的再钙化血浆以相同的速率凝结。此外，添加 100μg/ml3G4 至体外细胞和组织因子中不影响凝血因子 Xa 在 proplex（外在凝血途径）中的产生速率。

[1209] 尽管体外高抗体水平对 TF 诱导的凝血具有微弱的抑制作用，还在体内检测了 3G4 抗体，它不会在正常或携带肿瘤的小鼠中引起血栓形成并发症（如参见实施例 XI）。在猴子体内也测试了 3G4 抗体，观察到无显著的副作用。

[1210] 2. 低或无毒性的其他指示剂

[1211] 3G4 在小鼠内没有毒性或只有低毒性的第一个证据来自 3G4 作为杂交瘤在小鼠内生长时无毒性迹象的有关发现。此外，在腹膜内注射 1mg 纯 3G4 时，没有观察到毒性。

[1212] 现在还进行了全身性的体内研究，其中对每组三只 8 周龄 BALB/c 小鼠，用 100μg 纯化的 3G4 或同种型匹配对照 IgG_3(BBG3) 每周三次腹膜内注射小鼠，持续 2 — 4 周。未观察到毒性体征，且在 3G4 处理小鼠的主要器官切片中未检测到器官毒性的组织学迹象或形态异常。特别检查了以下参数。

[1213] 在体重方面，经 3G4 处理的小鼠与经 BBG3 处理的小鼠以相同速率增加体重。在早期研究中未观察到体重下降。没有毒性体征，如脱发、无食欲等，并且与对照动物相比较，身体活动性是正常的。

[1214] 与对照动物相比没有鉴别出血液学毒性的证据。外周血液组成是正 常的（基于全血细胞分类计数的测量结果）；红细胞形态学评估显示没有血管内溶血的证据（即不存

打印ID7584222 Pg 139

在裂红细胞）;所有血液凝固参数（PT、APTT、D- 二聚体）都是正常的。血细胞计数无变化，包括红细胞、血小板、白细胞、绝对的淋巴细胞计数或绝对的嗜中性粒细胞计数。

[1215] 骨髓的细胞构成和组成是正常的。为了分析骨髓的细胞构成，检查来自经 3G4 或 BBG3 处理的小鼠（6 次注射，100μg）的骨髓石蜡切片的总细胞含量和细胞组成。被处理动物内的骨髓基本上完全是细胞的（正如对年轻哺乳动物所预期的一样）。红血球、粒细胞、淋巴细胞前体和巨核细胞都以正常数目存在。正如通过肺、肝、心脏、脑、肠、胃和肾的死后检查而评估的，不存在其他器官毒性。

[1216] 总之，在持续 2 － 4 周、每周用高剂量 3G4(0.1mg) 处理 3 次的 200 多只小鼠中，或者在大鼠中，未观察到毒性情况的发生。即使剂量高达 2mg，也未观察到毒性迹象。小鼠保持正常的体征、骨髓细胞构成、白细胞计数、组织学和凝血功能。在进一步的研究中，一组 5 只不具有肿瘤的小鼠接受单次腹膜内注射 2mg3G4，或者腹膜内以每日 0.5mg3G4 重复注射并持续 14 天（7mg 总剂量），这些组没有显示出毒性体征。

[1217] 还在小鼠中进行了血液清除的动力学研究。用 Bolton Hunter 试剂对 3G4 进行放射性碘标记，并静脉内注射入小鼠（25g）。在多个稍后的时间点从尾静脉取血样。3G4 的血液清除速率是小鼠中小鼠 IgG 的特征性方式。清除的 α－阶段中的半衰期是 3 小时，而 β－阶段中的半衰期是 5 天。分布体积是正常的（100ml/kg）。这些研究表明 3G4 不与正常的宿主组织相互作用，导致其清除加速。

[1218] 人源化 3G4 抗体还已施用给动脉粥样硬化的兔子并显示是安全的。

[1219] 3. 猴安全性研究

[1220] 人源化 3G4 抗体（参见下文实施例 XIX）还已在安全性研究中施用给猴，并且没有观察到显著的副作用。人源化 3G4 抗体作为高达 100mg/kg 的快速灌注剂施用给猕猴。这是计算出的治疗剂量（1mg/kg）的 100 倍。

[1221] 在重复给药中无不良反应水平（NOAEL）是大约 10mg/kg/ 周。在 10 － 100mg/kg 的剂量上，APTT 和 PT 有短暂的延长。在血管细胞计数（包括白细胞、红细胞和血小板）或其他临床化学中没有显著改变。

[1222] E. 抗病毒作用

[1223] 3G4 抗体还发挥了显著的抗病毒作用。如实施例 XIII 中所观察到的，用 3G4 对 RSV 感染细胞进行处理的效果优于用 3SB 所观察到的效果。因此这些结果突出了 3G4 抗体超过文献中著名的抗 PS 抗体 3SB(Rote 等人，1993) 的优越之处。

[1224] 3G4 抗体还显示出对抑制 CMV 非常有效，在体外（实施例 XII）和在增加体内 mCMV 感染小鼠的存活力（实施例 XXI）中都是如此。此外，3G4 抗体还显示出抑制皮钦德病毒感染，此病毒是拉沙热的传染物（实施例 XXIV）。此处显示的病毒感染后的细胞表面 PS 暴露以及 3G4 抗体结合受牛痘病毒感染的细胞的能力（实施例 XXIII），表明了 3G4 抗体具有作为广谱抗病毒剂的巨大潜能。

[1225] 实施例 XIX

[1226] 3G4 抗体、CDR 序列和嵌合体

[1227] 因此，3G4 抗体具有抗血管发生、抗肿瘤血管和抗病毒剂的联合特性。3G4 对细胞分裂、血管发生、肿瘤生长和病毒传染性的抑制活性以及无明显的毒性，显示出此抗体有广泛的治疗性指征，包括治疗血管发生紊乱、癌症、糖尿病和病毒感染。

打印ID7584222 Pg 140

[1228] 可产生与3G4抗体基本上识别相同表位的抗体，以用于抗血管发生、抗肿瘤血管和抗病毒治疗中的一种或多种中，如通过免疫接种并用抗体竞争性试验证实。还可从本文提供的有关3G4抗体序列的知识产生与3G4抗体基本上结合相同表位的抗体。本实施例提供了3G4抗体互补性决定区（CDRs）的序列以及此序列信息的用途。

[1229] A.3G4抗体序列

[1230] 抗体可变区的原始序列是通过RACE方法由产生3G4抗体的杂交瘤获得的，并验证了该序列。3G4抗体CDR1－3重链（Vh）可变区的核酸 序列和氨基酸序列分别以SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2表示。

[1231] 如图2A中所示，SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2包括部分小鼠前导序列和恒定链序列。前导序列为SEQ ID NO:2的第1位到第19位氨基酸，成熟蛋白的起点如图2A中箭头所示。成熟蛋白质序列至完成VSS的序列部分包括足够的互补性决定区序列信息，其后的氨基酸序列就不是抗原结合所必需的了。因此，核酸序列中的BstEII位点可用作制备功能性小鼠可变区的方便的位点，例如用于移植到人的恒定区上（图2A）。

[1232] 实践中，利用Lonza pEE载体在BstEII位点已将3G4-2BVH序列移植入人γ1恒定区上。产生的产物包含小鼠前导序列，且其VH以图2A中所示的方式与人CH1序列连接，其中的ASTLGPSVFPLAPSSKSTSG(SEQ ID NO:7)代表人CH1序列的第一部分。

[1233] 3G4抗体CDR1－3轻链可变区（Vκ）的核酸序列和氨基酸序列分别用SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4代表。如图2B中所示，SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4还包括部分小鼠前导序列和恒定链序列。前导序列为SEQ ID NO:4的第1位到第22位氨基酸，成熟蛋白的起点如图2B中箭头所示。成熟蛋白质序列至完成TVF的序列部分包括足够的互补性决定区序列信息，其后的氨基酸序列就不是抗原结合所必需的了。因此，核酸序列中的BbsI位点可用作制备功能性小鼠可变区的方便的位点，例如用于移植到人的恒定区上（图2B）。

[1234] 实践中，利用Lonza pEE载体在BbsI位点已将3G4-2BVL序列移植入人κ恒定区上。产生的产物包含小鼠前导序列，且其VL以图2B中所示的方式与人CL1序列连接，其中的IFPPSDEQLKSGTAS(SEQ ID NO:8)代表人κ恒定区序列的第一部分。

[1235] B.3G4人嵌合抗体的产生和表征

[1236] 已产生了含小鼠互补性决定区和人恒定区的嵌合构建体（ch3G4），并显示出其表现基本上与原始小鼠抗体相同。

[1237] 将鼠类3G4抗体转变成人－小鼠嵌合抗体（Avanir(Xenerex)Biosciences，San Diego，CA）。克隆鼠类V_H并在Lonza2BVH载体的BstEII位点接枝至人的γ1恒定区上。克隆鼠类V_κ并在Lonza2BVL载 体的BbsI位点接枝至人的κ恒定区上。验证序列。整个构建体在CHO细胞中表达并纯化。该人－小鼠嵌合（“人源化”）抗体已被称为“巴维昔单抗”。

[1238] 产生的ch3G4至少与小鼠类3G4同样优良地结合磷脂包被的ELISA平板。嵌合3G4与多种磷脂的体外结合概况如图4所示，其中与PS、PA、CL和PI的结合显得相似。结合是抗原特异性的，因为未观察到与无关特异性的对照抗体的结合。在某些试验中，观察到嵌合3G4有明显高于3G4抗体的结合；这可能是由于二抗的良好结合所造成的。

[1239] C.所述人源化抗体的抗肿瘤作用

[1240] 在体内，ch3G4定位于肿瘤血管内皮且发挥抗肿瘤作用。ch3G4在生长于小鼠内的

打印ID7584222 Pg 141

MDA-MB-435 人乳癌细胞中的抗肿瘤作用如实施例 XI 中所述。与对照相比，用嵌合抗体治疗患 MDA-MB-435 肿瘤的小鼠有效延缓了肿瘤的生长。

[1241] 在小鼠中生长的 MDA-MB-435 人乳癌细胞中检查 ch3G4 的定位。将生物素化的 ch3G4 或无关特异性的对照 IgG 静脉内注射入小鼠。1 小时后，处死小鼠，摘除肿瘤，冷冻切片。使生物素化药剂首先与链霉抗生物素蛋白 -Cy3 缀合物一起孵育，用 PBS 洗，然后与 MECA32 抗体孵育，再与经 FITC 标记的二抗孵育。分别用针对 Cy3（红色）和 FITC（绿色）的适当滤镜通过数码相机拍摄单一图像并传送到计算机上。借助 Metaview 软件将显示黄色（融合绿色和红色荧光的产物）的会聚图像叠加。

[1242] 在此双染色方法中，生物素化蛋白质和血管内皮被红色和绿色所标记。其中生物素化蛋白质与内皮结合，会聚的图像呈现黄色。生物素化的 ch3G4 结合肿瘤血管内皮，因为此染色模式汇合了 MECA32 的染色模式。

[1243] 巴维昔单抗还已进行放射标记，并且显示出朝向大鼠中同系的前列腺肿瘤。在具有肿瘤、用巴维昔单抗处理的大鼠中还观察到肿瘤灌注减少。

[1244] D. 3G4 的重组 IgG_{2a} 同种型的产生和表征

[1245] 鼠类 3G4 抗体的人嵌合体 (ch3G4) 是人 IgG_1 同种型 ($hIgG_1$)。ch3G4 的鼠类 IgG 同系物要求小鼠 IgG_{2a} 同种型 ($mIgG_{2a}$)。制备并测试这种构建体，并显示出具有与亲本抗体基本上一样的表现。

[1246] Lonza 表达载体 pEE12.4 和 pEE6.4 经由与 Peregrine Pharmaceuticals Inc. 的协议从 Lonza Biologics 获得。根据 Lonza Biologics 的“Operating Procedures for use with:NSO Myeloma cells”进行载体的使用、转染和转染的 NSO 小鼠骨髓瘤细胞的筛选。简言之，通过 RT-PCR 从由 3G4 杂交瘤细胞系中分离的总 RNA 扩增 3G4 轻链编码序列。这样设计 RT-PCR 引物，即从而使得扩增的片段在扩增产物的任何一端包含 XmaI 和 EcoRI 限制性内切酶酶切位点，以克隆到 Lonza pEE12.4 载体中。

[1247] 通过 RT-PCR 从由 3G4 杂交瘤细胞系中分离的总 RNA 扩增 3G4 重链的可变区。这样设计引物，即从而使得扩增的片段在扩增产物的任何一端包含 HindIII 和 XmaI 限制性内切酶酶切位点，以克隆到 Lonza pEE6.4 载体中。通过 PCR 从由 Dr. Shozo Izui 提供的质粒载体扩增鼠类 IgG2a 恒定区。这样设计 PCR 引物，从而使得在扩增产物的任何一端具有 BstII 和 EcoRI 限制性内切酶酶切位点，以克隆到 pEE6.4+3G4VH 载体中。重要地，将 BstII 位点设计成按读码框与 3G4VH 可变区序列上游融合在一起。通过用 SalI 和 NotI 切割这两种载体将重链和轻链构建体组合到单个双基因载体 (12.43G4IgG2a) 中。通过在 UT Southwestern 测序中心设施上进行测序来验证重链和轻链编码区。

[1248] 通过电穿孔将 12.43G4IgG2a 载体转染到 NSO 细胞中。转染后，将 NSO 细胞稀释并在缺乏谷氨酰胺的培养基中铺板到 96 孔板中。只有用这种构建体（其包含用于阳性选择的谷氨酰胺合酶基因）转染的细胞可以在缺乏谷氨酰胺的情况下生长。在接下来的 2 个月中，鉴别各种转染子，通过 PS-ELISA 就抗体分泌进行筛选。分泌最高量抗体的那些转染子在大量培养中生长以产生纯化的抗体。使用与用于 3G4 抗体一样的纯化方案来纯化抗体。

[1249] 如图 2C 和图 2D 中所示，IgG2a 重链和 3G4 轻链 (C_k) 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:11 表示。

[1250] 如所预期的，纯化的 2aG4 抗体在 SDS-PAGE 凝胶上作为 150kDa 条带迁 移，并以基

打印ID7584222 Pg 142

本上与 3G4 一样的亲和力和特异性结合 PS-ELISA 中的 PS。因此，2aG4 以与 3G4 一样的特性结合阴离子磷脂（参见上文表 4）。

[1251] 主要产生小鼠 IgG_{2a} 同种型以提供用于人嵌合体 ch3G4（巴维昔单抗）的更佳模型。还认为小鼠 IgG_{2a} 同种型比小鼠 IgG_3（目前的鼠类 3G4 抗体的同种型）更稳定。2aG4 抗体经由增强的 ADCC 可以产生比 $3G4IgG_3$ 更强的抗肿瘤效应。

[1252] 已在初步研究中，在小鼠 WiDr（结肠癌）模型中检测了 2aG4 抗体，连同 3G4 和 ch3G4 抗体一起，而 C44 抗体作为对照。处理在第 5 天当肿瘤很小时开始（10 只小鼠 / 组）。100 μ g 的每种抗体一周注射 3 次，并监控肿瘤生长。所有 3 种测试抗体减缓了肿瘤生长至基本上相同的程度。

[1253] 实施例 XX

[1254] 与疗法（包括多西他赛）相组合的 3G4 抗体

[1255] 本实施例涉及将 3G4 抗体和化疗药物多西他赛联合用于肿瘤治疗的疗法。这些药剂被设计成攻击肿瘤血管系统的内皮细胞和肿瘤细胞区室，产生协同疗法，同时毒性较低。结果显示此组合疗法确实显著增强了疗效。

[1256] A. Fc 结构域介导的抗肿瘤作用

[1257] 检测 3G4 抗体在体外肿瘤细胞上的抑制作用。未观察到对肿瘤细胞有直接的抑制作用。因此，有可能 3G4 抗体的抗肿瘤作用涉及 Fc 介导的免疫效应器功能的增强，例如抗体介导的吞噬作用、ADCC、CDC 和细胞因子产生的刺激作用或这些机制的联合。

[1258] 已检测了 3G4 对巨噬细胞吞噬 PS 阳性细胞的影响作用。用 H_2O_2 处理荧光肿瘤细胞以诱导 PS 暴露。然后收获处理和未处理的细胞，并与 3G4 抗体或对照抗体 (BBG) 接触。然后加入小鼠骨髓巨噬细胞，用荧光显微镜分析巨噬细胞吞噬荧光肿瘤细胞的能力。

[1259] 经测定，3G4 能将巨噬细胞对 PS 阳性细胞的吞噬作用提高 3 倍以上。此发现支持了发明者的推论，即 3G4 抗体的 Fc 结构域有助于抗体的抗肿 瘤效用。也就是说，Fc 结构域激活了宿主的免疫效应物功能，然后后者发挥了抗肿瘤作用。因此 3G4 抗体增强了 NK 细胞的溶胞活性，导致了更有效的 ADCC。

[1260] B. 多西他赛诱导内皮细胞和肿瘤血管上的 PS 暴露

[1261] 通过 FACS 分析体外检测亚临床浓度的多西他赛对内皮细胞上 PS 暴露的诱导。用 10nM 多西他赛处理人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 和人微血管内皮细胞 (HMVEC) 24 小时，然后进行 FACS 检测。与未处理细胞相比，处理过的 HUVEC 和 HNVEC 二者都显示出 3G4 结合的显著增加。还进行了 48 和 72 小时的多西他赛孵育。

[1262] 在体外用浓度为 20pM 的多西他赛处理 HUVEC 细胞也引起了阴离子磷脂外在化而不引起调亡。

[1263] C. 多西他赛诱导肿瘤细胞上的 PS 暴露

[1264] 还利用一组肿瘤细胞系通过 FACS 检测了亚临床浓度多西他赛在体外对 PS 暴露的诱导。用 10nM 多西他赛处理小鼠 lewis 肺癌 3LL、小鼠结肠癌 Colo26 和人乳癌 MDA-MB-435 细胞 24 小时，然后进行 FACS 检测。与未处理细胞相比，所有测试肿瘤细胞系都显示出 3G4 结合的显著增加。还进行了 48 和 72 小时的多西他赛孵育。进一步检查了小鼠黑素瘤 B16 和小鼠纤维肉瘤 Meth A 肿瘤细胞系，与未处理细胞相比，它们也显示出 3G4 结合的显著增加。

打印ID7584222 Pg 143

[1265] 用10nM多西他赛处理人乳癌MDA-MB-231细胞24小时，并与嵌合3G4抗体(ch3G4)或对照(人IgG)一起孵育，然后进行FACS检测。这些结果显示了抗体结合的显著增加是抗原特异性的，且嵌合抗体的表现与亲本3G4抗体相似。

[1266] D. 多西他赛诱导肿瘤血管上的PS暴露

[1267] 来自对照研究的结果还显示，多西他赛增加了肿瘤血管上的PS暴露。在此类研究中，用多西他赛处理小鼠使暴露阴离子磷脂的肿瘤血管的百分比从35%增至60%。即使在用多西他赛全身治疗后，在正常组织血管上也没有观察到PS的诱导。

[1268] E. 3G4和多西他赛的协同肿瘤疗法

[1269] 发明者由此证明了用亚临床浓度的多西他赛处理内皮细胞和肿瘤细胞显著增强了3G4的结合。他们还证明了3G4抗体促进了巨噬细胞介导的对PS暴露于其表面的肿瘤细胞的吞噬作用。因此，由多西他赛介导的3G4结合的增加增强了肿瘤细胞的吞噬作用和由3G4抗体Fc结构域介导的其他抗肿瘤作用，例如提高了NK细胞的裂解活性，从而导致更有效的ADCC。其他研究也显示出用多西他赛治疗乳癌患者导致了血清IFN-γ、IL-2、IL-6和GM-CSF细胞因子水平的增高和NK及LAK细胞活性的增强(Tsavaris等人，2002)。

[1270] 因此，在携带人MDA-MB-435乳癌的SCID小鼠的同位模型中检测3G4与多西他赛组合疗法的抗肿瘤作用。将3G4单独(100μg/剂)、多西他赛单独(10mg/kg)或3G4与多西他赛联合(分别为100μg/剂和10mg/kg)经腹膜内途径治疗携带同位人MDA-MB-435乳房肿瘤的小鼠，持续3周，每周施药3次。在肿瘤细胞植入6天后开始治疗。

[1271] 这些研究显示，用3G4加上多西他赛治疗具有正位MDA-MB-435人乳腺肿瘤的小鼠抑制了93%的肿瘤生长。用3G4加上多西他赛治疗具有散布的MDA-MB-435肿瘤的小鼠使肺中肿瘤集落的平均数目减少了93%，并且一半的动物没有发展出肿瘤。在这两个肿瘤模型中，组合的抗肿瘤效应在统计学上优于单独的多西他赛或3G4($p<0.01$)。组合疗法以比单独的药物更大的程度减少了肿瘤血管密度和肿瘤中的血浆容量。组合疗法并不比单独的多西他赛对小鼠更具毒性。这些结果表明，作为佐剂疗法，3G4可以增强多西他赛在乳腺癌患者中的疗效。

[1272] F. 3G4增强顺铂针对抗药性乳腺肿瘤的活性

[1273] 3G4抗体还在动物中增强顺铂针对抗药性乳腺肿瘤的活性。小鼠被接种抗药性乳腺肿瘤，并在第20天后进行治疗。治疗组是单独的顺铂、单独的3G4抗体、同种型匹配的对照抗体(BBG3)或与3G4抗体组合的顺铂。

[1274] 在对照动物中的肿瘤继续快速生长。在用单独的顺铂或单独的3G4抗体治疗的小鼠中，肿瘤生长减慢。组合治疗组(顺铂和3G4抗体)显示出最佳的抗肿瘤应答。因此，抗体例如3G4增强化学治疗药物例如顺铂的功效，甚至是针对抗药性肿瘤。

[1275] G. 胰腺癌的组合疗法

[1276] 迫切需要关于胰腺癌的改进疗法。在人中，具有胰腺癌的患者的总体长期存活少于4%。大约70－80%的胰腺癌患者由于转移至肝而无法治疗，并且目前没有对于转移疾病的有效疗法。

[1277] 将Pan02小鼠胰腺腺癌细胞注射到具有免疫能力的C57BL/6小鼠的胰腺中。治疗在肿瘤细胞注射后第5天开始。治疗组是作为对照的PBS、单独的3G4抗体(100μg)、单独的吉西他滨(3.5mg)、或与吉西他滨组合的3G4抗体(3G4抗体为100μg，和吉西他滨为

打印ID7584222 Pg 144

3.5mg)。吉西他滨是嘧啶抗代谢物。在肿瘤细胞注射后第22天处死动物，并测定肿瘤重量。

[1278] 在这些研究中，吉西他滨和3G4抗体都显示出显著的抗肿瘤效应。用与3G4抗体组合的吉西他滨治疗的动物显示出显著增强的、超过每种单独试剂的抗肿瘤效应，没有副作用，例如体重减轻。在用吉西他滨或3G4抗体单独治疗中，结节、腹膜和肝转移也显著减少。此外，当与每种单独的试剂比较时，用与3G4抗体组合的吉西他滨治疗的动物显示出结节、腹膜和肝转移显著减少。重要地，在用吉西他滨和3G4抗体的组合进行治疗的动物中，没有检测到至肝的转移。这是重要的，因为在人中，转移至肝是在胰腺癌诊断后最常见的死亡原因。

[1279] 这些研究还显示，在组合处理组中巨噬细胞显著浸润到肿瘤中。在用单独的3G4抗体以及用与吉西他滨组合的3G4抗体治疗后，微血管密度减少。

[1280] H. 用放射和3G4治疗肺癌

[1281] 在具有肺癌的小鼠的研究中，如在双重标记研究中所示，10Gy局部辐射诱导肿瘤血管内皮上的PS暴露。在治疗阶段，单独的辐射和3G4抗体均显示抗肿瘤效应。此外，组合治疗形式，即辐射和3G4抗体，显示出最大的抗肿瘤效应。

[1282] I. 3G4将凋亡的肿瘤细胞靶向于树突细胞上的Fcγ R

[1283] 与对照肿瘤相比，来自用3G4加多西他赛处理后的小鼠的肿瘤还包含不常见量的淋巴细胞。尽管此现象可能代表了典型的分解肿瘤细胞对免疫细胞的化学引诱作用，它可能还反映了通过Fc结合免疫效应细 胞上的Fcγ R而介导的3G4对免疫系统的活化。

[1284] 为了鉴定施用3G4和多西他赛对肿瘤内免疫细胞浸润的影响，可以利用针对巨噬细胞、嗜中性粒细胞、粒细胞、NK细胞和活化淋巴细胞特异性标记的抗体通过对肿瘤组织的冰冻切片和/或石蜡切片的免疫染色鉴定这些浸润物中存在的细胞类型(Pharmingen，San Diego，CA)。可以将此浸润物的程度、表型和活化状态进行分级。由浸润的免疫细胞产生的细胞因子，包括IL-2和INF的量，还可通过免疫组化技术进行分析。血清细胞因子水平可通过ELISA进行评估，可用细胞内染色鉴定负责细胞因子产生的特殊细胞区室。因此可以全身性的评估浸润免疫细胞对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响。

[1285] 根据前述资料，发明者进一步考虑了增强乳癌免疫疗法效力的方法，即通过3G4介导的将凋亡肿瘤细胞靶向于树突细胞上的Fcγ 受体(Fc(γ)R)。诱导有效的细胞和体液免疫反应的有效抗原呈递对于开发肿瘤疫苗和免疫疗法是重要的。树突细胞(DC)是引发抗肿瘤相关抗原的细胞毒性T淋巴细胞的最强的抗原呈递细胞(APC)。树突细胞(DC)对肿瘤抗原呈递的促进应会导致开发出更强的肿瘤疫苗。

[1286] 通过Fc(γ)R受体介导的内在化来进行的DC抗原呈递与流态抗原胞饮作用相比可提高达1000倍。凋亡肿瘤细胞(ATC)是树突细胞负载抗原的极好来源，因为多种肿瘤特异性抗原(已知和未知的)可有效呈递于天然T细胞上，由于封闭了某些表位而降低了出现免疫逃逸变体的可能性。在动物实验中，用ATCs脉冲的DCs已显示出在体外和体内产生了强的抗肿瘤免疫力。不过，最近的资料已证实单独使用ATCs在某种程度上对激活抗肿瘤免疫力无效，可能是由于它们的摄取不足且不能诱导DC成熟。

[1287] 最近的研究还证明了通过抗肿瘤抗体与凋亡肿瘤细胞的结合所形成的ATC-免疫复合物可被靶向于DC上的Fc(γ)R。与单独使用ATC相比，ATC-免疫复合物更有效的被DC内在化，更有效的诱导DC活化和成熟，更重要的是，ATC-免疫复合物能显著增加MHCI和II

打印ID7584222 Pg 145

限制性抗原呈递，因此诱发了强的抗肿瘤 T 辅助物和 CTL 免疫力。

[1288] 发明者因此设想用本发明的抗 PS 抗体增强体液和细胞的抗肿瘤免疫力，并提高基于 ATC 的 DC 肿瘤疫苗的效力。由于 PS 是凋亡肿瘤细胞上普遍的和最丰富的特异标记，本发明的抗体组，尤其是 3G4，可结合 ATC 上的 PS。发明者还证明了通过 Fc(γ)R 介导的 3G4-ATC 复合物的内在化，3G4 可以增加 DC 对凋亡肿瘤细胞的摄取达 300％。通过增强 Fc(γ)R 介导的 DC 对 ATC 的摄取，可以推断 3G4 和类似抗体能大大增强 MHC I 和 II 限制性抗原呈递，诱导强的体液和细胞抗肿瘤免疫力，并提高基于 ATC 的 DC 肿瘤疫苗的效力。这可以通过测定负载了 3G4-ATC 免疫复合物的 DC 诱导 Th1、CTL 和体内抗体反应的效力，以及测定用负载了 3G4-ATC 免疫复合物的 DC 进行体内免疫所诱导的抗肿瘤免疫力的效力来加以证实。

[1289] 实施例 XXI

[1290] 抗 PS 抗体治疗体内 CMV 感染

[1291] 在实施例 XII 中所示的体外针对 CMV 的抗病毒作用之后，本实施例证明了感染小鼠型 CMV 病毒 (mCMV) 的小鼠存活率的提高。

[1292] 用 5×10^5pfu 的 mCMV RVG102 经腹膜内感染 Balb/C 小鼠 (6 周龄，每组 5 只小鼠)。在第 1 天用 3G4 抗体 (1mg/ 只小鼠) 或上述人 - 鼠嵌合抗体 ch3G4(1mg/ 只小鼠) 腹膜内注射小鼠。未处理的小鼠用作对照。之后每 4 天以 0.5mg/ 只小鼠的量用抗体或嵌合抗体处理小鼠，直至第 26 天。感染后 90 天监测小鼠的存活。

[1293] 用亲本和嵌合形式的 3G4 抗体进行处理导致 mCMV 感染小鼠成活率的提高。用 3G4 或 ch3G4 处理的小鼠存活率分别为 100％和 80％，与之相比，未处理小鼠中只有 25％的小鼠在感染中存活。

[1294] 实施例 XXII

[1295] PE 结合性肽衍生物治疗体内 CMV 感染

[1296] 除了实施例 XVII 中所示的针对 CMV 的体外抗病毒作用外，本实施例证实了耐久霉素 - 生物素衍生物 DLB 提高了被 mCMV 感染的小鼠的存活率。

[1297] 用 5×10^5pfu 的 mCMV RVG102 经腹膜内感染 Balb/C 小鼠 (6 周龄，每组 5 只小鼠)。在第 1 天和每 4 天用 20μg/ 只小鼠剂量的耐久霉素衍生物 DLB 腹膜内注射小鼠。未处理的小鼠用作对照。感染后 90 天监测小鼠的存活率。

[1298] 用耐久霉素 - 生物素衍生物 DLB 进行的处理提高了 mCMV 感染小鼠的存活率。用 DLB 处理的小鼠存活率为 100％，与之相比，未处理小鼠只有 25％的小鼠在感染中存活。

[1299] 实施例 XXIII

[1300] 抗 PS 抗体与受病毒感染的细胞相结合

[1301] 本实施例显示了病毒感染诱发了 PS 在细胞表面的暴露且抗 PS 抗体结合受病毒感染的细胞。正如 FACS 分析中所证实的嵌合抗体与细胞表面结合的增加所显示的，感染了牛痘病毒的细胞变成 PS 阳性。

[1302] 以 2 的高感染复数用经胰酶处理的牛痘病毒感染 U937 细胞。简而言之，用等体积的胰酶 0.25mg/ml 在 37℃处理牛痘病毒 30 分钟。将病毒加入 U937 细胞中，总体积 0.5ml。1.5 小时后，将新鲜的培养基加入细胞中，并在 T25 烧瓶中 37℃孵育细胞 2 天。未感染的细胞用作对照。

打印ID7584222 Pg 146

[1303] 用一抗对感染和未感染的 U937 细胞染色，并用嵌合 3G4 抗体 (ch3G4) 或用人 IgG(HIgG) 作为对照。漂洗细胞，用正常的小鼠血清封闭，然后用一抗在冰上染色 45 分钟。漂洗 3 次后，用 1:400 稀释的缀合有 FITC 的山羊抗人二抗对细胞染色并在 FACScan 上进行分析。

[1304] FACS 分析的结果显示，与在未感染的 U937 细胞上获得的结果相比，被牛痘病毒感染的 U-937 细胞上的 ch3G4 有显著的改变。因此此试验显示了，用牛痘病毒感染细胞导致了细胞表面上的 PS 暴露，并且嵌合形式的抗 PS 抗体 3G4 能结合这些受病毒感染的细胞。

[1305] 实施例 XXIV

[1306] 抗 PS 抗体针对皮钦德病毒的抗病毒作用

[1307] 除了针对 CMV 和 RSV 的抗病毒作用外，本实施例进一步证明了抗 PS 抗体体外抑制皮钦德病毒感染。皮钦德病毒是新世界沙粒病毒，它在人类中是非致病的，并用于拉沙热的动物模型中。

[1308] 以 0.01pfu/ 个细胞的低感染复数用皮钦德病毒感染后，用 3G4 抗体或同种型匹配的对照抗体 GV39G 处理汇合的 Vero 细胞单层。简而言之，将细胞与病毒以 1ml/ 孔的总体积于 37℃孵育 90 分钟。感染期间，每 30 分钟轻轻旋转平板一次。感染后，去除细胞上清液并将 DMEM/10% FBS/pen-strep 加入各孔中 (2ml/ 孔)。第 2 天，用胰酶消化收获细胞并使其贴附于 Biocoat 容器载片上。将载片固定，用多克隆兔抗 PIC 血清及随后加入的生物素缀合的山羊抗兔二抗染色 (单独使用二抗不产生染色)。对每 100 个细胞的视野对被感染细胞的数目进行计数。

[1309] 在用 3G4 处理过的细胞内，病毒局限于染成黑红色的单个细胞中，数量大约是 100 个细胞中有 1 个。这些可能是最初被病毒感染的细胞，如用 CMV 所观察到的一样 (实施例 XII)。不过，在用对照 GV39G 抗体处理的细胞中，病毒扩散且感染了所有细胞。

[1310] 此病毒复制的抑制模式类似于当用 3G4 处理受 CMV 感染的人成纤维细胞时所观察到的。因此，抗 PS 抗体 3G4 有效地并可定量地阻止了皮钦德病毒在细胞间的传播。

[1311] 实施例 XXV

[1312] 用 PE 结合性肽衍生物进行肿瘤治疗

[1313] 除了耐久霉素衍生物在体外和体内的抗病毒作用外，本实施例还证明了耐久霉素衍生物对肿瘤血管系统的定位和相关的抗肿瘤作用。

[1314] A. 用耐久霉素 -HuIgG 缀合物进行肿瘤治疗

[1315] 首先如实施例 XV 所述纯化人 IgG(HIgG)。用 SIAB 接头连接纯 HIgG 和耐久霉素，并纯化产生的 $(D\text{-}SIAB)_nHIgG$ 缀合物。

[1316] 培养小鼠纤维肉瘤细胞系 MethA，在对数期收获并重悬于 DPBS 中。将约 10^6 个 MethA 肿瘤细胞皮下注射入 6 － 8 周龄 BALB/c 雄性小鼠背中部。植入 5 天后，将小鼠随机分成两组 (n ＝ 15)。从第 10 天开始，一组持续 2 周通过腹膜内注射接受 150 μ g 耐久霉素 -HuIgG 缀合物。另一组接受相等量的 HuIgG 作为对照。每周两次检查肿瘤体积并用公式 $1/2ab^2$ (其中“a”是肿瘤的长轴，而“b”是短轴) 计算。待肿瘤长至约 $1400mm^3$ 大小时处死小鼠。

[1317] 与人 IgG 对照相比，耐久霉素 -HIgG 缀合物在 150 μ g/ 天的剂量下抑制了 BALB/c 小鼠中 MethA 肿瘤的生长。

打印ID7584222 Pg 147

[1318] B. 耐久霉素 -HuIgG 缀合物定位于肿瘤血管系统

[1319] 利用与上文相同的 MethA 小鼠肿瘤模型，当肿瘤大小达到 500mm^3 时，通过尾静脉注射溶于 100μl PBS 中的 100μg(D-SIAB)$_n$HIgG。注射相同量的人 IgG 作为对照。4 小时后，处死小鼠并用正常的盐水灌注 5 分钟并用 1%的低聚甲醛灌注 10 分钟。切下肿瘤和其他主要器官并在液氮中速冻。用 OCT 包埋后，将组织冰冻切片成 10μm 厚度的切片并放置于硅烷化的载片上。在冷丙酮中固定 10 分钟后，载片用标记了过氧化物酶的山羊抗人 IgG 染色，以检测耐久霉素 -HuIgG 的生物分布。用 Meca32 和标记了过氧化物酶的山羊抗大鼠 IgG 检测组织的血管系统。

[1320] 此研究表明，耐久霉素 -HIgG 缀合物定位于经处理的动物的肿瘤血管系统。

[1321] 实施例 XXVI

[1322] 耐久霉素缀合物的生物分布和特性

[1323] 本实施例证实了细胞不透性耐久霉素衍生物在体外无毒性、体内给予的耐久霉素衍生物的生物分布和耐久霉素抗体缀合物增强巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬作用的能力。

[1324] A. 耐久霉素 - 生物素缀合物是无细胞毒性的

[1325] 本发明的耐久霉素衍生物和缀合物被设计成使亲本耐久霉素分子的非特异性毒性影响最小化的形式。在许多实施例中，通过将耐久霉素与细胞不透性基团连接来达到此目的（实施例 XV）。

[1326] 如实施例 XV 所述制备生物素化的耐久霉素构建体 DLB。用 MTT 检测法测试未修饰的耐久霉素化合物和 DLB 对 HUVEC 的细胞毒性作用。未修饰的耐久霉素显示出剂量依赖型毒性，而 DLB 是无毒性的，与未处理对照相符。

[1327] B. 耐久霉素 - 生物素缀合物定位于肺中的巨噬细胞

[1328] 培养人乳癌细胞系 MDA-MB-435，在对数期收获并重悬于 DPBS 中。将约 10^7 个细胞注射入 6 — 8 周龄雌性 ethylic 裸鼠的乳房脂垫中。通过尾静脉注射溶于 100μl PBS 中的 100μg 耐久霉素 - 生物素。4 小时后，处死小鼠，用正常的盐水灌注 5 分钟并用 1%的低聚甲醛灌注 10 分钟。切下包括心、肺、肝、肾、脑、肠、睾丸和脾在内的主要器官并在液氮中速冻。用 OCT 包埋后，将组织冰冻切片成 10μm 厚度的切片并放置于硅烷化的载片上。在冷丙酮中固定 10 分钟后，载片用标记了 Cy3 的链霉抗生物素蛋白染色以检测耐久霉素 - 生物素构建体的生物分布。用 Meca32 和 FITC 标记的山羊抗大鼠 IgG 检测组织的血管系统。

[1329] 将耐久霉素 - 生物素缀合物静脉内注射入携带 MDA-MB-435 肿瘤的裸鼠导致了药物在肿瘤细胞、肾小管和肺内巨噬细胞中的沉积。在肝中沉积最少，而在脑、肠、睾丸中无可检测到的分布。对肺内巨噬细胞的定位可应用于本发明的抗病毒实施方案中。

[1330] C. 耐久霉素 - 抗体缀合物增强对凋亡细胞的吞噬作用

[1331] 然后对耐久霉素 - 抗体缀合物（耐久霉素 -C44，DuC44）增强吞噬凋亡细胞的能力进行了研究。

[1332] 从小鼠骨髓中分离巨噬细胞并进行人工培养。用于 BM 巨噬细胞分离、培养和刺激的培养基是含 2mM 谷氨酰胺、0.37% (w/v)$NaHCO_3$、10% (v/v) 热灭活 FCS 和 0.5ng/ml 小鼠 GM-CSF 的 DMEM。通过 25 号针头用完全培养基直接冲洗从切下的股骨中洗下骨髓细胞。然后在完全 培养基中将细胞调整成约 3×10^5 个细胞 /ml 的密度，并在 8 孔腔式载玻片中分配成 0.5ml 的等份。

打印ID7584222 Pg 148

[1333] 将细胞于37℃在含5% CO_2 的潮湿容器内培养，以使巨噬细胞粘附并铺展。通过下述方法去除未贴附的细胞：在每孔中加入5ml温热的PBS，适度弹击平板重悬未粘附细胞，然后轻弹载片去除未贴附的细胞。此漂洗共进行3次。将细胞于37℃在含7.5% (v/v) CO_2 的气氛中保持5天。每隔1天换一次完全培养基，直至细胞被使用。

[1334] 以下方法用于用荧光细胞示踪剂标记HL-60靶细胞。临用前现配10mM CFDA SE贮液，即将一小瓶染料内容物溶于90μl DMSO中并用PBS稀释至10μM。离心获取HL-60细胞沉淀并吸出上清液。将细胞重悬于CFDA/PBS中并在37℃孵育15分钟。将样品离心并吸出上清液。细胞重悬于培养基中并再孵育30分钟。细胞活力和荧光被证实超过95%。

[1335] 在此吞噬作用检测中，将标记的HL-60细胞在UV254nm暴露5分钟，然后在37℃孵育1小时以诱导凋亡。将 10^4 个凋亡的HL-60细胞与巨噬细胞孵育1小时。加入10μg/ml浓度的耐久霉素-C44缀合物。将相同浓度的小鼠抗体BBG3用作阴性对照，还包括3G4抗体用于对比。在最后45分钟向培养基中加入10μg/ml的Hoechst33342。

[1336] 用PBS洗载片3次，在4%低聚甲醛中固定15分钟。载片用稀释于0.2%明胶中的大鼠抗小鼠CD11抗体（CD11是巨噬细胞的标记物）染色1小时，漂洗并用经德克萨斯红标记的山羊抗大鼠二抗染色。

[1337] 在荧光显微镜下分析细胞。由于有CD11标记物，巨噬细胞被识别为红色的细胞。由于靶细胞中的荧光示踪剂，已吞噬了凋亡细胞的巨噬细胞被识别为绿色细胞。对红色和绿色细胞进行计数，吞噬作用以摄取呈阳性的巨噬细胞百分数进行定量。

[1338] 此研究表明，耐久霉素-抗体缀合物DuC44增强了巨噬细胞对凋亡HL-60细胞的吞噬作用。因此，耐久霉素部分可结合凋亡细胞的表面，使缀合物中突出的抗体部分被巨噬细胞识别。耐久霉素-抗体缀合物由此发挥了与3G4抗体相似的功能。正如所预期的，缺少Fc区域的3G4抗体 $(Fab)_2$ 片段不诱发高于对照水平的吞噬作用。

[1339] 由于早期研究显示耐久霉素-生物素缀合物在体内施用后定位于肺中的巨噬细胞，因而本试验中所显示的对巨噬细胞介导的凋亡细胞吞噬作用的刺激在本发明的治疗用途中具有重要的含义，例如治疗肺部的病毒感染。

[1340] 实施例XXVII

[1341] 在肿瘤治疗过程中的巨噬细胞浸润

[1342] 如前述研究中所示的，针对氨基磷脂和阴离子磷脂的抗体在肿瘤治疗中是有效的。例如，3G4抗体在多个小鼠模型中特异地定位于肿瘤血管、引起肿瘤血管破坏并延迟肿瘤生长，而不引起毒性（实施例XI；实施例XVIII）。本实施例显示，用3G4治疗具有肿瘤的动物还引起单核白细胞结合肿瘤血管内皮并诱导巨噬细胞浸润到肿瘤中。

[1343] A. 方法

[1344] 对8－10只雌性SCID小鼠的组皮下注射 2×10^7 L540细胞，或同位注射 1×10^7 MDA-MB-435或MDA-MB-231细胞。对BALB/c小鼠皮下注射 1×10^6 Meth A细胞。允许肿瘤生长至平均直径为0.8－1cm(L540)、0.6－0.7cm(MDA-MB-435)、0.5－0.7cm(MDA-MB-231)或<0.1cm(Meth A)。然后，小鼠通过腹膜内途径用100μg3G4抗体或对照抗体(BBG3)进行治疗，一周3次共2－3周。一周3次监测动物的肿瘤大小和体重。当对照小鼠中的肿瘤达到直径1.5－2cm时处死小鼠。

[1345] B. 结果

打印ID7584222 Pg 149

[1346] 用 3G4 治疗具有同位 MDA-MB-435 和 MDA-MB-231 肿瘤的小鼠导致单核白细胞结合肿瘤血管内皮并浸润到肿瘤间质中（图 6A、图 6B、图 6C 和图 6D）。在这个图中，红色染色显示内皮，绿色染色显示巨噬细胞，和蓝色染色显示细胞核。

[1347] 通常，在经 3G4 治疗的肿瘤中的血管被单核白细胞挤满（图 6D），而在来自对照即经 BBG3 治疗的小鼠的肿瘤中只能偶尔看见白细胞粘 附至血管（图 6C）。单核白细胞浸润到来自经 3G4 治疗的小鼠的肿瘤间质中，其数目显著大于在经 BBG3 治疗的小鼠中的数目（比较图 6B 和图 6A）。

[1348] 粘附至肿瘤血管并浸润到肿瘤中的几乎所有（>90％）细胞表达单核细胞 / 巨噬细胞标记物 F4/80、M1/70(CD11b、Mac-1) 和 Fc γ R（图 6A、图 6B、图 6C 和图 6D）。这些细胞缺乏嗜中性粒细胞标记物 Ly-6G，NK 细胞标记物 Ly-49，和树突状细胞标记物 CD11c。如 SCID 小鼠所预期的，不存在淋巴细胞标记物。总之，结果表明，粘附至肿瘤血管并浸润到肿瘤间质中的细胞分别是单核细胞和巨噬细胞。

[1349] 实施例 XXVIII

[1350] F(ab')$_2$ 片段在肿瘤治疗中是有效的

[1351] 针对氨基磷脂和阴离子磷脂的抗体，例如 3G4 抗体，在肿瘤治疗中是有效的（实施例 XI ；实施例 XVIII）。本实施例显示，3G4 抗体的 F(ab')$_2$ 片段在肿瘤治疗中与完整的 3G4 抗体一样有效。

[1352] 在对照研究中，用 3G4 抗体、3G4 抗体的 F(ab')$_2$ 片段或同种型匹配的对照抗体 (BBG3) 治疗（在第 9 天）具有肿瘤的小鼠。对照动物中的肿瘤继续快速生长，而在用 3G4 抗体或 3G4 抗体的 F(ab')$_2$ 片段治疗的小鼠中，肿瘤生长明显减慢（图 8）。F(ab')$_2$ 片段至少与完整的抗体一样有效（图 8），并且 F(ab')$_2$ 片段的抗肿瘤效应在这些研究中可能被低估。

[1353] 这支持了下述提议 ：抗体例如 3G4 增强单核细胞和巨噬细胞发动针对表达 PS 的肿瘤血管系统和肿瘤细胞的炎症应答的能力。抗体例如 3G4 可以防止肿瘤血管系统上的 PS 沉默宿主炎症应答，从而允许巨噬细胞分泌炎性细胞因子，例如 TNF-α 、IL-1 及其他，直接损害肿瘤内皮并募集更多的宿主细胞进入肿瘤（图 7）。

[1354] 实施例 XXIX

[1355] 膜联蛋白 V 二聚体比单体更好地定位于肿瘤血管

[1356] 实施例 XXVII 和实施例 XXVIII 涉及巨噬细胞在使用针对氨基磷脂和阴离子磷脂的抗体的肿瘤治疗中的作用。从此类数据及其他信息中，本发明人形成了整个发明的受体 - 抗体方面。作为此类实施方案的支持，产生膜联蛋白 V 同型二聚体，并发现其比相应的膜联蛋白 V 单体更好地定位于肿瘤血管。

[1357] 实施例 XXX

[1358] 3G4 和 β 2GPI 与 PS 的共结合

[1359] 本实施例证实，3G4 抗体和 PS 之间的相互作用依赖于血浆蛋白质 β 2- 糖蛋白 I（β 2GPI）。3G4 在结构域 II 处结合 β 2GPI，所述结构域 II 不连接至从患有 APS 的患者中分离出的致病性抗体（其通常识别 β 2GPI 结构域 I）。数据显示，二价 3G4/β 2GPI 复合物是增强 PS 结合（包括与 PS 阳性细胞）所必需的，因为 3G4Fab' 片段不具有这种活性。二价 3G4/β 2GPI 与 PS 阳性细胞的结合支持了本发明的 Fc-β 2GPI 构建体靶向 PS 阳性细胞

打印ID7584222 Pg 150

并因此治疗疾病例如癌症和病毒感染的用途，所述 Fc-β2GPI 构建体也是二聚体。

[1360] A. 材料和方法

[1361] 1. 材料

[1362] Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM) 和胰蛋白酶 /EDTA 从 Mediatech, Inc. (Herndon,VA) 获得。胎牛血清 (FBS)、正常的人血清、正常的大鼠血清和正常的小鼠血清从 Biomeda(Foster City,CA) 获得。新鲜的人血浆从 Carter Blood Care(Dallas,TX) 获得。无血浆的杂交瘤培养基、Synthechol NSO 补充物、L-α-磷脂酰丝氨酸 (PS)、牛血清白蛋白 (BSA) 和来自鸡蛋清的卵清蛋白 (OVA) 从 Sigma Chemical Co. (St. Louis,MO) 获得。DEAE 纤维素、肝素 -Sepharose 和 Hybond-P 膜从 Amersham Biosciences (Buckinghamshire,UK) 获得。1- 棕榈酰基 -2- 羟基 -sn- 甘油基 -3- 磷酸胆碱 [溶血磷脂酰胆碱 (LPC)] 从 Avanti Polar Lipids(Alabaster,AL) 获得。96 孔 Immulon-1B 和 -2HB 微量滴定板从 Thermo Lab Systems(Franklin, MA) 获得。Tris-HCl 梯度 SDS-PAGE 凝胶和 Opti-4CN Substrate 试剂盒从 Biorad(Hercules, CA) 获得。8 孔玻璃腔式载玻片从 BD Biosciences(Bedford, MA) 获得。

[1363] 2. 抗体

[1364] 被产生以结合阴离子磷脂 PS 的 3G4 小鼠单克隆抗体是本文的实施例 IV 和其他实施例中所描述的抗体 (还参见，Ran 等人，2005)。3G4 最初在杂交瘤上清液中产生，但随后转化为小鼠 IgG2a 同种型 (实施例 XIX, D)，并且现在在 NSO 小鼠骨髓瘤细胞系中产生。

[1365] NSO 细胞在补充有 10% FBS 的 DMEM 或含有 Synthechol NSO 补充物的无血清杂交瘤培养基中培养。还产生了 3G4 的人 IgG1 嵌合形式 (ch3G4)(实施例 XIX,B)，并且在无血清条件下由 PeregrinePharmaceuticals, Inc. (Tustin, CA) 生产。这种抗体已命名为“巴维昔单抗”。

[1366] 小鼠抗人 β2GPI(抗 β2GPI 或 α-β2GPI)mAb 从 USBiological(Swampscott,MA) 获得。分泌 C44 的杂交瘤从美国典型培养物保藏中心 (Rockville,MD) 获得，并用作 3G4 和抗 β2GPI 的对照，所述 C44 是秋水仙碱特异性的小鼠 IgG2a mAb。利妥昔单抗 (人 IgG1 嵌合 mAb) 从 UT Southwestern pharmacy 获得并用作 ch3G4 的对照。在培养物上清液中产生的所有抗体如前述实施例中所述 (还参见，Ran 等人，2003，其特别引入本文作为参考) 进行纯化。所有二抗从 Jackson Immunoresearch Labs(West Grove,PA) 获得。

[1367] 3. 抗体片段的制备

[1368] 通过与胃蛋白酶一起孵育产生 3G4F(ab')$_2$。通过与木瓜蛋白酶一起孵育产生 3G4Fab 和对照 Fab7H11(抗腺病毒)。所有抗体切割产物通过 FPLC 进行纯化，并通过 SDS-PAGE 进行验证。

[1369] 4. 从人血浆中纯化 β2GPI

[1370] 基本上如先前所述的 (Polz 等人，1980 ;Wurm 等人，1984 ;各自特别引入本文作为参考)，从人血浆中纯化 β2GPI(hβ2GPI)。简言之，向汇集的血浆中加入高氯酸 (70%) 至终浓度为 1.57% (v/v)。弃去沉淀物并用饱和 Na_2CO_3 将上清液调整至 pH7.5，随后为逆 50mM Tris,pH8.0 的广泛透析。将这种材料施加至用 50mM Tris,pH8.0 平衡的 DEAE 纤维素柱以去除污染物。然后，将 DEAE 柱流出物施加至用 50mM Tris, pH8.0 平衡的肝素 -Sepharose 亲和柱，并且用 1.0M NaCl 洗脱结合的蛋白质。最后，将 β2GPI 制剂逆 PBS 进行透析并通

打印ID7584222 Pg 151

过蛋白质A/G进一步进行纯化以去除污染性IgG。最终制剂包含处于50kDa处的均质条带，如非还原性SDS/PAGE和考马斯染色所显示的。

[1371] 5. β2GPI和β2GPI结构域的构建和表达

[1372] 为了产生纯的、重组的、全长和删除形式的β2GPI，使用酵母穿梭表达载体pPIC6αA(Invitrogen)和宿主菌株Mut$^+$X-33(Invitrogen)。表达载体包含醇(甲醇)氧化酶基因(AOX1)的5'启动子和3'转录终止序列。该载体还具有AOX1启动子下游的酵母α交配因子信号序列，外源cDNA可以与该启动子融合以将重组异源蛋白质分泌入培养基中。在巴斯德毕赤酵母(P.pastoris)中的表达提供了类似于在哺乳动物细胞中的糖基化和二硫键形成。

[1373] 为了产生表达构建体，使用人β2GPI cDNA制备下列5种表达构建体：

[1374] (1)不含其关联信号肽的β2GPI cDNA的完整编码区(结构域1－5)

[1375] 5'引物：5'-GGAATTCGGACGGACCTGTCCCAAGC-3'(SEQ ID NO:12)；

[1376] (2)删除结构域1(结构域2－5)

[1377] 5'引物：5'-GGAATTCGTATGTCCTTTTGC-3'(SEQ ID NO:13)；

[1378] (3)删除结构域1和2(结构域3－5)

[1379] 5'引物：5'-GGAATTCGCTCCCATCATCTGC-3'(SEQ ID NO:14)；

[1380] (4)删除结构域1－3(结构域4－5)

[1381] 5'引物：5'-GGAATTCGTAAAATGCCCATTC-3'(SEQ ID NO:15)；

[1382] 和

[1383] (5)只有结构域5

[1384] 5'引物：5'-GGAATTCGCATCTTGTAAAGTAC-3'(SEQ ID NO:16)。

[1385] 对于所有片段的PCR使用共同的3'引物5'-TTCTAGATTAGCATGGCTTTAC-3'(SEQ ID NO:17)。将PCR扩增的片段按阅读框插入pPICαA的EcoRI和XbaI限制性位点之间，刚好在α交配因子信号序列的下游。在每个片段的末端导入终止密码子以防止重组蛋白在C-末端融合成c-myc表位或His标签。质粒构建体在100μg/ml杀稻瘟素存在下在大肠杆菌(E.coli)中增殖，并通过限制性分析和核苷酸测序进行验证。构建体(1)、(2)、(3)、(4)和(5)所表达的重组蛋白编码在糖基化前分别为大约36、29、24、16和9kDa的蛋白质。

[1386] 对于表达克隆的转化和筛选，重组质粒构建体用限制性内切酶SacI线性化，纯化，并将10μg由于通过原生质球方法(Invitrogen)转化宿主菌株X-33。通过在包含400μg/ml杀稻瘟素的YPD(酵母提取物蛋白胨葡萄糖培养基(Yeast extract Peptone Dextrose Medium))平板上培育4天来选择这些构建体中每一种的转化体。这些构建体中每一种的几个克隆在包含400μg/ml杀稻瘟素的YPD平板上再次划线培养，以确定真正的整合体。然后，将每种构建体的10个克隆在最低葡萄糖(Minimal Dextrose,MD)和最低甲醇(Minimal Methanol,MM)平板上划线培养。在MD和MM平板上生长同样良好的每种构建体的5个克隆随后在液体MD和MM培养基中生长24、48、72、96和120小时。每个克隆在每个时间点的上清液和粒状沉淀通过使用抗人β2GPI多克隆抗体的Western印迹法进行分析。在上清液中显示出所述蛋白质最高表达的克隆进一步用于大规模制备。

[1387] 对于所述重组蛋白的大规模制备，使用由Invitrogen推荐的培养条件来生产重组蛋白。将每个克隆的起始培养物在5ml经缓冲的最低甘油复合培养基(buffered minimal

打印ID?584222 Pg 152

glycerol-complex medium,BMGY) 中于 30℃剧烈振荡培养过夜。收集细胞,用于接种 25ml BMGY,并生长 2 天。然后,将来自 25ml 培养物的细胞用于接种 1L 经缓冲 的最低甲醇复合培养基 (buffered minimal methanol-complex medium,BMMY)(1.0%甲醇)。培养于 30℃在剧烈振荡下持续 4 天,并且每 24 小时加入 100%甲醇(终浓度为 1.0%)以维持蛋白质表达。培养基通过离心 (4000×g,15 分钟)澄清,并且上清液在 50mM Tris 缓冲液中于 4℃透析 2 天,随后施加至用 50mM Tris 缓冲液平衡的 DEAE-Sephacel 柱。收集流出液并施加至肝素 -Sepharose 柱。用 1M NaCl 从肝素 -Sepharose 柱上洗脱 β2GPI,逆 50mM Tris 缓冲液透析,使用 Amicon 浓缩器浓缩,并通过 Western 印迹法进行分析。对每种蛋白质的 N- 末端进行测序以确认 α - 因子前导序列的切割。蛋白质产量为 10mg/L(全长 β2GPI) 至 25mg/L(β2GPI 结构域 V)。

[1388] 6. "带切口的"hβ2GPI 的制备

[1389] 由如上所述从人血浆纯化出的完整的 hβ2GPI 制备带切口的 hβ2GPI。hβ2GPI 与用纤维蛋白溶酶包被的小珠一起于 37℃孵育 17 小时。通过离心去除小珠,并回收包含经切割的蛋白质的上清液。纯化产物的 Western 印迹法表明,带切口的 β2GPI 制剂是不含纤维蛋白溶酶的并且不含纤维蛋白溶酶自我蛋白酶解产物(与抗纤维蛋白溶酶或抗血管生长抑素抗体没有反应性)。N- 末端序列分析揭示出相应于 β2GPI N- 末端的 2 个 N- 末端和在 Lys317/Thr318 切割位点处产生的新序列。

[1390] 7. 抗 PS ELISA

[1391] 如下施行该测定法(还参见,Ran 等人,2005,其特别引入本文作为参考)。用 PS 包被的 Immunlon1B 微量滴定板在 1% OVA(w/v) 中封闭过夜。第二天,从 13.33nM 的最初浓度,制备从含血清或无血清的上清液中纯化的 3G4 的 2 倍系列稀释物。在 1% OVA 或来自牛、人、大鼠或小鼠的 10%非热灭活血清中进行稀释。平板于 37℃孵育 1 小时,并且检测 3G4 的结合。所有 ELISA 研究进行至少 3 次。

[1392] 8. 抗 hβ2GPI ELISA

[1393] 如上所述并采用下列修改进行该测定法。以 10μg/ml 的浓度将 hβ2GPI、带切口的 hβ2GPI 或重组 hβ2GPI 肽在 96 孔 Immunlon2HB 微 量滴定板上包被过夜。然后,将平板在 1% OVA 中于室温下封闭 1 小时。3G4、ch3G4 或抗 β2GPI 在 1% OVA 中稀释至 13.33nM 的最初浓度,并制备 2 倍系列稀释物。平板于 37℃孵育 1 小时,并检测抗体的结合。所有 ELISA 研究进行至少 3 次。

[1394] 9. 蛋白质印迹法

[1395] 蛋白质样品在非还原性 SDS 样品缓冲液中加热至 95℃ 5 分钟。然后,将样品加载到 Tris-HCl4 — 15%梯度 SDS-PAGE 凝胶上,并使用 Mini Protean II 装置 (Biorad) 分开。将分开的蛋白质转移至 PVDF 膜上,并在 3% BSA(w/v) 中封闭过夜。膜用在 3% BSA 中稀释至 1μg/ml 的抗 β2GPI、3G4 或对照小鼠 IgG 进行探测,充分洗涤,并与过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 一起孵育。使用 Opti-4CN Substrate 试剂盒使膜显色。

[1396] 10. 内皮细胞上的 PS 暴露的诱导和检测

[1397] 成年牛主动脉内皮 (adult bovine aortic endothelial,ABAE) 细胞维持在补充有 10% FBS 和 2mM L- 谷氨酰胺的 DMEM 中。通过短暂暴露于 0.25%胰蛋白酶 /0.02% EDTA 而从亚汇合 (subconfluent) 培养物中取出 ABAE 细胞,并以 2×10^4 细胞 / 孔接种至 8 孔腔

打印ID7584222 Pg 153

式载玻片。过夜培养后，细胞用 PBS 轻轻地洗涤，并用 200μM 溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 处理以诱导 PS 暴露。在 3G4、ch3G4 或对照 IgG 存在下在 10% FBS 或 10%正常小鼠血清 (MS) 中于 37℃进行 LPC- 处理。如果 LPC- 处理在 10% MS 中进行，那么加入 hβ2GPI 作为辅助因子，因为 3G4/ch3G4 在 MS 中不结合 PS（参见结果）。

[1398] 通过免疫荧光染色来测定 PS 暴露。细胞在 PBS 中充分洗涤，在 4%低聚甲醛 (w/v) 中固定，并与缀合有生物素的抗小鼠二抗一起孵育。接下来，细胞与缀合有 FITC 的链霉抗生物素蛋白 (Jackson Immunoresearch) 一起孵育以检测抗体结合。然后，细胞用在 PBS 中的 0.1% Triton-X100 渗透化，并用缀合有德克萨斯红的鬼笔环肽 (Molecular Probes, Eugene, OR) 和 4',6- 二脒基 -2- 苯基吲哚 (DAPI ;Molecular Probes) 复染。使用装配在 Nikon 显微镜上的 Coolsnap 数码相机 (Photometrics, Tucson, AZ) 捕获图像，并用 MetaVue 软件 (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA) 处理。

[1399] 11. 与 ABAE 细胞结合的抗体的定量

[1400] 使用 MetaVue 图像分析软件测定抗体结合的面积，所述软件能够定量图像中发亮像素的数目。FITC 荧光图像用于定量抗体结合。相应的 DAPI 荧光图像用于就视野中存在的细胞数目对 FITC 图像进行标准化。小的 FITC/DAPI 比表明小的抗体结合面积，而大的 FITC/DAPI 比表明大的结合面积。FITC/DAPI 比用于确定在所选条件下相对于基线抗体结合量来说抗体结合面积的增加或减少。每次分析使用放大 200 倍的 5 个图像。数据呈现为平均的相对 FITC/DAPI 比，误差条表示标准差。

[1401] B. 结果

[1402] 1. 3G4 需要血清因子以结合用 PS 包被的微量滴定板

[1403] 当系列稀释在 10% FBS 中进行时，从含血清的培养基 (SCM) 或无血清培养基 (SFM) 中纯化的 3G4 抗体结合用 PS 包被的微量滴定板（图 9A，实线）。相反地，当系列稀释在 1% OVA（其缺乏牛血清蛋白质）中进行时，从 SFM 中纯化的 3G4 不再结合 PS（图 9A，虚线■）。这个发现表明，在牛血清中存在的因子介导 3G4 和 PS 之间的相互作用。

[1404] 有趣的是，当系列稀释在 1% OVA 中进行时，从 SCM 中纯化的 3G4 微弱地结合 PS（图 9A，虚线▲）。这表明，在 SCM 中生长的 3G4 的纯化不完全去除介导 3G4 和 PS 之间相互作用所需的血清蛋白质。因此，使用从 SFM 中纯化的 3G4 进行下文描述的研究。

[1405] 2. 在来自不同物种的血清中 3G4 与 PS 的结合

[1406] 为了确定来自其他哺乳动物物种的血清是否能够介导 3G4 和 PS 之间的相互作用，在 10%小鼠、大鼠、人或其他血清中进行 3G4 的系列稀释。在大鼠和人血清存在下 3G4 结合 PS，很类似在牛血清存在时（图 9B）。然而，在小鼠血清存在下，3G4 不结合 PS（图 9B）。在其他研究中，在仓鼠、雪貂、豚鼠、兔和猴血清存在下，3G4 结合 PS。因此，被 3G4 识别的血清蛋白质表位在所测试的除小鼠以外的所有哺 乳动物物种中是保守的。

[1407] 3. 3G4 结合血清糖蛋白 β2GPI

[1408] 在 20 世纪 80 年代末期，患有静脉和动脉血栓形成、血小板减少症和 / 或习惯性自然流产 (recurrent pregnancy loss) 的一群患者显示具有循环性抗磷脂 (aPL) 抗体 (Hughes 等人，1986 ;Deleze 等人，1989)。这些患者被描述为具有“抗磷脂综合征”(APS)。在 20 世纪 90 年代早期，显示出许多所谓的 aPL 抗体不是直接识别磷脂，而是结合对磷脂具有亲和力的血清蛋白质 (Galli 等人，1990 ;McNeil 等人，1990)。因此，就 3G4 反应性筛选

打印ID7584222 Pg 154

已知与阴离子磷脂相互作用的一组人血清蛋白质。

[1409] 就 β2GPI 而言，将人 β2GPI(hβ2GPI) 包被在微量滴定板上，并与小鼠抗人 β2GPI 抗体（抗 β2GPI)、3G4 或具有无关特异性的对照小鼠 IgG2a（对照 mIgG) 一起孵育。如所预期的，抗 β2GPI 结合 hβ2GPI，而对照 mIgG 则不（图 10A)。3G4 还强烈结合用 hβ2GPI 包被的平板（图 10A)。

[1410] 为了确定 β2GPI 是否是被 3G4 识别的唯一血清蛋白质，在 SDS-PAGE 凝胶上对纯化的 hβ2GPI 和 10％人血清进行走样，并转移至膜支持物上以用于免疫印迹。3G4 检测出 50-kDa 纯化的 hβ2GPI 和人血清中类似大小的单个条带。重要地，3G4 免疫印迹事实上等同于使用抗 β2GPI 抗体产生的印迹。对照 mIgG 抗体不检测任何蛋白质。总之，这些数据表明 3G4 结合血清蛋白质 β2GPI。

[1411] 在 ELISA 中测试已知与阴离子磷脂相互作用的其他人血清蛋白质的 3G4 反应性。将等量的特定蛋白质包被在微量滴定板上，在 1％ OVA 中封闭，并与 3G4 的系列稀释物一起孵育。充分洗涤平板，并使用过氧化物酶标记的第二检测抗体检测抗体结合。所有研究包括阳性和阴性对照抗体，它们如所预期的进行工作。免疫印迹和 ELISA 研究的结果显示于表 15 中，这因此将 β2GPI 鉴定为 3G4 的共结合因子。

[1412] 表 15

[1413] 与磷脂相互作用的血清蛋白质的 3G4 反应性

[1414]

血清蛋白质	3G4 反应性
膜联蛋白 V	—
β2- 糖蛋白 I	+
因子 XII	—
激肽原	—
氧化的 LDL	—
蛋白 C	—
蛋白 S	—
凝血酶原	—
tPA	—

[1415] 4. 3G4 在结构域 II 处结合 β2GPI

[1416] β2GPI 有 5 个结构域，其中第 5 个结构域负责结合阴离子磷脂。为了确定 β2GPI 的哪个结构域被 3G4 抗体识别，产生具有不同结构域结构的重组人 β2GPI 构建体，并与重组全长 hβ2GPI 并排地进行测试。这些结构域结构通过从 N- 末端开始进行系列截短来制备，因此如下依次缺乏每个 N- 末端结构域：重组全长 hβ2GPI 包含结构域 I — V；已删除结构域 I 的 hβ2GPI 包含结构域 II — V；已删除结构域 I 和 II 的 hβ2GPI 包含结构域 III — V；已删除结构域 I、II 和 III 的 hβ2GPI 包含结构域 IV — V；和已删除结构域 I、II、III 和 IV 的 hβ2GPI 只包含结构域 V。

[1417] 将等量的全长 hβ2GPI 和上述 hβ2GPI 结构域构建体中的每一种包被在微量滴定板上，并与 3G4 的系列稀释物一起孵育。这项研究显示，只有包含 β2GPI 结构域 II 的 hβ2GPI 构建体（结构域 I — V 和结构域 II — V) 可由 3G4 检测（图 10B)。当删除结构域 I 时，3G4 同样良好地结合结构域 II — V（图 10B)。因此，3G4 在结构域 II 处结合 β2GPI。

[1418] 根据关于从患有 APS 的患者分离的致病性抗体的已知信息，3G4 在结构域 II 处结合 β2GPI 这一发现是重要的。从患有 APS 的患者分离的致病性抗 β2GPI 抗体通常识别

打印ID7584222 Pg 155

β 2GPI 的结构域 I(de Laat 等人,2005a)。识别结构域 II 的来自 APS 患者的抗 β 2GPI 抗体通常不是致病性的。这可能可以解释为什么根据在各种动物模型中进行的广泛毒理学研究,缺乏与 3G4 相关的毒性。

[1419] 5. 3G4 和 β 2GPI 与具有暴露的 PS 的细胞的共结合

[1420] 使用经 β 2GPI 包被的微量滴定板来表征抗 β 2GPI 抗体的结合是具有争议的,这是由于取决于微量滴定板的类型或甚至批次所观察到的结果不一致 (de Laat 等人,2004a)。为了在更生理的条件下验证上述发现,开发了活细胞结合测定法。这个测定法检测并测量在用膜破裂剂即溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 处理以诱导 PS 暴露后,与内皮细胞膜表面结合的抗体。

[1421] 在这个测定法中,在 200 μ M LPC 存在或不存在下,ABAE 细胞在 DMEM+10% FBS 中与 3G4 或对照 mIgG 一起孵育 30 分钟。然后,洗涤细胞,固定,并用荧光标记染色以显现抗体与细胞表面的结合。使用 MetaVue 软件定量 3G4 或 mIgG 结合的像素面积。所有值是相对于将 3G4 与未经 LPC 处理的细胞的结合设定为 1 而言的。

[1422] 当在正常条件下将 3G4 加入 ABAE 细胞培养基中时,没有观察到与细胞的结合。然而,当在 LPC 存在下将 ABAE 细胞与 3G4 一起孵育时,可容易地检测到 3G4 结合的众多小点。已知 LPC 诱导暂时的膜变形 (Kogure 等人,2003),这可能引起膜不对称性的丧失和 PS 的暴露。

[1423] 定量结果显示,3G4 结合面积在 LPC 处理后增加了超过 500 倍,而对照 mIgG 的结合仍无法检测。先前,当 3G4 和 PS 结合性分子即膜联蛋白 V 显示出在用 H_2O_2 诱导 PS 暴露后结合内皮细胞时,获得了类似结果 (实施例 VI ;实施例 VII ;还参见,Ran 等人,2005)。

[1424] 重要地,经 LPC 处理的 ABAE 细胞不被膜不透性染料碘化丙锭或 DAPI 染色,这表明 3G4 结合细胞表面上的 PS,而不是质膜内表面上的 PS。

[1425] 为了确定 β 2GPI 是否是 3G4 结合具有暴露的 PS 的内皮细胞所需 的,在包含 10% MS 而不是 10% FBS 的培养基中进行活细胞结合测定法以防止牛 β 2GPI 的干扰。如上文所证实的,在 MS 存在下,3G4 不结合 PS。此外,3G4 通过免疫印迹不检测在 10% MS 中的任何蛋白质,这表明 3G4 不识别鼠类 β 2GPI。

[1426] 对于这项研究,将人嵌合 3G4(ch3G4) 用于防止由于在 MS 中存在的鼠类 IgG 检测产生的背景。当 ABAE 细胞在 10% MS 和 LPC 存在下与 ch3G4 一起孵育时,没有检测到抗体结合 (图 11)。相反地,将纯化的 h β 2GPI 加入至结合反应中支持了 ch3G4 的广泛结合 (图 11),这证实 ch3G4 结合依赖于 h β 2GPI。在所有情况下,ch3G4 结合依赖于 LPC 处理,并且在具有使用无关特异性的对照人 IgG 时没有检测到结合。

[1427] 有趣地,当 ABAE 细胞在 10% MS 和 LPC 存在下与 h β 2GPI 一起孵育,充分洗涤,并随后与 ch3G4 一起孵育以检测 h β 2GPI 的结合时,检测到非常少的 ch3G4 结合 (图 11)。这个发现表明 h β 2GPI 在 ch3G4 不存在时不结合具有暴露的 PS 的内皮细胞,并且与 β 2GPI 在生理条件下对阴离子磷脂膜表面具有低亲和力这一报道相一致 (Willems 等人,1996 ;Bevers 等人,2005)。总之,这些数据显示,ch3G4 和 h β 2GPI 必须同时存在以结合具有暴露的 PS 的 ABAE 细胞,这暗示了 ch3G4 增强 β 2GPI 与阴离子磷脂表面的亲和力。

[1428] 6. β 2GPI 的脂质结合区域是 3G4 共结合所必需的

[1429] 为了确证 β 2GPI 的脂质结合区域是 β 2GPI 和 3G4(和 ch3G4) 与具有暴露的 PS

打印ID7584222 Pg 156

及其他阴离子磷脂的内皮细胞共结合所必需的，使用“带切口的”hβ2GPI 进行活细胞结合测定法。由于在结构域 V 的脂质结合区域内存在纤维蛋白溶酶介导的切割，所以带切口的 hβ2GPI 不能结合 PS 及其他阴离子磷脂 (Hunt 等人，1993 ;Hunt 和 Krilis，1994)。

[1430] 当 ABAE 细胞在 LPC 不存在下与 ch3G4 和 hβ2GPI 或带切口的 hβ2GPI 一起孵育时，没有检测到 ch3G4 结合 (图 12A)。在 LPC 存在下，hβ2GPI 能够介导 ch3G4 与具有暴露的 PS 的 ABAE 细胞的结合， 而带切口的 hβ2GPI 则不能介导结合 (图 12A)。在活细胞测定法中结合的缺乏不是由于 ch3G4 不能结合带切口的 hβ2GPI，因为当等量的蛋白质包被在微量滴定板上时，ch3G4 结合带切口的 hβ2GPI 以及 hβ2GPI(图 12B)。这些发现证实，ch3G4/hβ2GPI 复合物经由 hβ2GPI 结构域 V 的脂质结合区域来检测在 LPC 处理后暴露在 ABAE 细胞上的 PS 及其他阴离子脂质。

[1431] 7. 抗体二价性是 β2GPI 共结合所必需的

[1432] 上文呈现的数据提示，3G4 通过增强 β2GPI 与阴离子磷脂的亲和力来检测 PS 和阴离子磷脂。有趣的是，已知从许多 APS 患者分离的抗 β2GPI 抗体增加 β2GPI 与阴离子磷脂表面的结合 (Bevers 等人，2004)。此外，该现象依赖于二价抗体 - β2GPI 复合物的形成。

[1433] 为了确定二价性是否是 3G4/β2GPI 复合物与 PS 和阴离子磷脂结合所必需的，将经 LPC 处理的 ABAE 细胞与纯化的 hβ2GPI 和不同量的 ch3G4 一起孵育。ch3G4 结合面积以浓度依赖性方式增加，在抗体与 β2GPI 之比为 2:1 时增至峰值 (图 13)。ch3G4 浓度的进一步增加导致结合的浓度依赖性减少。ch3G4 浓度与对具有暴露的 PS 的内皮细胞的结合之间的钟型关系提示，在膜表面上形成二价 ch3G4/β2GPI 复合物。在非常高的抗体浓度时，单价和二价复合物之间的竞争导致与经 LPC 处理的 ABAE 细胞结合的 ch3G4/β2GPI 复合物的量减少。

[1434] 为了进一步检查二价性是否是结合具有暴露的 PS 的内皮细胞所必需的，产生 3G4F(ab')$_2$ 和 3G4Fab' 单体，并与完整的 3G4 一起用于活细胞结合测定法中。如所预期的，完整的 3G4 结合经 LPC 处理的 ABAE 细胞，但不结合未处理的细胞 (图 14A)。等量浓度的 3G4F(ab')$_2$ 也结合经 LPC 处理的 ABAE 细胞，但 3G4Fab' 的结合是可以忽略的 (图 14A)。3G4F(ab')$_2$ 的结合相对于 3G4 来说明显减少 (图 14A) 可能是由于多克隆二抗与 3G4F(ab')$_2$ 上缺少的 Fc 表位的结合丧失。甚至在 2μM 的浓度下，在 ABAE 细胞上也没有检测到 3G4Fab' 的结合 (图 14B)，所述浓度超过了结合包被在微量滴定板上的 β2GPI 所需浓度的 1000 倍。

[1435] 此外，3G4Fab' 以浓度依赖性方式抑制 ch3G4/β2GPI 与经 LPC 处理的 ABAE 细胞的结合 (图 14C)，而具有无关特异性的对照 Fab' 则不。3G4Fab' 抑制 ch3G4 结合的能力证实，3G4Fab' 能够结合 β2GPI，并且单体 3G4Fab'/β2GPI 复合物不能结合具有暴露的 PS 的内皮细胞。这些数据支持下述假设 :二价 3G4/β2GPI 复合物是结合阴离子磷脂表面所必需的。

[1436] 如图 10B 中所示，3G4 抗体在结构域 II 处结合 β2GPI，并且如图 12A 和图 12B 中所示，β2GPI 结构域 V 的脂质结合区域是 3G4(和 ch3G4) 和 β2GPI 共结合暴露于内皮细胞上的 PS 所必需的。此外，如本文所证实的，抗体二价性是 3G4(和 ch3G4) 和 β2GPI 共结合暴露的 PS 所必需的。因此，本发明人已提出了抗体和 β2GPI 共结合暴露于膜外表面上的 PS 的模型，例如在激活的内皮细胞、肿瘤血管内皮细胞和肿瘤细胞上以及在受病毒感染的细胞上发生的 (图 15)。

打印ID7584222 Pg 157

[1437] 实施例 XXXI

[1438] Fc-β2GPI 的制备和表征

[1439] 本实施例涉及示例性 Fc-β2GPI 构建体的制备和表征。在这个构建体中，小鼠 IgG_{2a} 的 Fc 区附着至全长小鼠 β2GPI（结构域 I — V），以形成鼠类 Fc-β2GPI 或 Fc-mβ2GPI。小鼠 IgG_{2a} Fc 用作二聚体化结构域和用于提供效应器功能。所得二聚 Fc-β2GPI 构建体具有各种用途，包括靶向肿瘤血管和受病毒感染的细胞，其中每一种具有暴露的 PS。使用 Fc 区的优点是，Fc-β2GPI 构建体可以标记所靶向的细胞以通过宿主免疫系统进行攻击。

[1440] A. 制备

[1441] 尽管已设计了各种 Fc-β2GPI 构建体，但本实施例的示例性 Fc-β2GPI(Fc-mβ2GPI) 构建体使用鼠类 Fc 区作为 N- 末端和使用鼠类 β2GPI 的结构域 I — V 作为 C- 末端。因此，所述 Fc-β2GPI 包含来自小鼠 IgG_{2a} 的 Fc 区的二硫键键合的铰链区和两个 C_H2 和 C_H3 结构域，每 个 C_H3 结构域的 C- 末端连接至两个全长小鼠 β2GPI 蛋白的 N- 末端（图 16）。

[1442] 为了制备表达质粒，通过 PCR 从 2aG4 构建体中扩增出 3G4 轻链的信号序列；通过 PCR 从 2aG4 构建体中扩增出包含铰链、C_H2 和 C_H3 结构域的小鼠 IgG2a Fc 区；并且通过 RT-PCR 从商购获得的小鼠肝 RNA 中扩增出小鼠 β2GPI。所得 Fc-mβ2GPI 蛋白序列显示于图 18A 中。切割 mIgGκ 信号序列 (SEQ ID NO:18)，留下如 SEQ ID NO:19 所示的成熟的 Fc-mβ2GPI（图 18A）。

[1443] 质粒图显示于图 17 中，并且质粒的完整序列如 SEQ ID NO:25 中所提供的。用 FuGENE6 试剂将 Fc-mβ2GPI 构建体转染到 CHO 细胞中。2 天后，收集上清液并用于几个测定法中。

[1444] 使用图 18B 中的序列信息可以制备相应物人 Fc-β2GPI(Fc-hβ2GPI)，所述序列信息提供了人 IgG_1 重链恒定区的示例性氨基酸序列（登录号 P01857；SEQ ID NO:21）和人 β2GPI 的完整序列（登录号 1C1ZA；SEQ ID NO:22)，包括结构域 I、II、III、IV 和 V 的定位。人铰链、C_H2 和 C_H3 结构域将附着至人 β2GPI 的结构域 I、II、III、IV 和 V，以提供 SEQ ID NO:23 的 Fc-hβ2GPI。

[1445] B. Fc-mβ2GPI 是二聚体

[1446] 所选系统对于表达 Fc-mβ2GPI 来说是有效的。图 19 显示来自使用两种不同的 Fc-mβ2GPI 克隆 (#8 和 #18) 的捕获测定法的结果，其中 Fc-mβ2GPI 细胞培养物上清液结合抗小鼠 IgG。

[1447] 对 Fc-mβ2GPI 蛋白样品实施凝胶电泳。在非还原性凝胶条件下，检测到预期二聚体大小的条带（在凝胶上的表观 Mw 为 150kDa)。在还原性条件下，检测到较小大小的条带（在凝胶上的表观 Mw 为 90 — 100kDa)。

[1448] C. Fc-mβ2GPI 结合 PS 和具有暴露的 PS 的细胞

[1449] Fc-mβ2GPI 能够结合在经 PS 包被的板上的 PS。使用用 PS 包被的微量滴定板，确定 Fc-mβ2GPI 细胞培养物上清液 (#8 和 #18) 以浓度依赖性方式结合 PS（图 20)。

[1450] 与 3G4 抗体和嵌合形式 (ch3G4 或巴维昔单抗）一样，Fc-mβ2GPI 结合不局限于 PS，而是延伸至其他阴离子磷脂。磷脂结合测定法（在 10% FBS 中）的结果显示，

打印ID7584222 Pg 158

Fc-mβ2GPI 细胞培养物上清液结合阴离子磷脂 PS、PA、PI 和 PG，但不结合中性脂质 PC 和 SM。

[1451] Fc-mβ2GPI 还能够结合暴露在细胞表面上的 PS。正在经历凋亡的细胞在外表面上暴露 PS。在使用正在经历凋亡的 ABAE 细胞的研究中，发现 Fc-mβ2GPI 染色凋亡细胞（图 22A、图 22B 和图 22C）。箭头突出显示凋亡细胞，其是圆形的并且具有致密的细胞核。

[1452] 还可以不经历凋亡而诱导细胞在细胞表面上呈递 PS。当 ABAE 细胞在 LPC 存在下进行孵育时，发生暂时的膜变形，引起膜不对称性的丧失和 PS 暴露。使用经 LPC 处理的 ABAE 细胞，还发现 Fc-mβ2GPI 结合暴露在细胞表面上的 PS，如绿色染色的小点所示（图 23A 和图 23B）。在未经 LPC 处理的细胞上或使用对照上清液看不到小点染色。

[1453] 实施例 XXXII

[1454] 二聚 β2GPI 结合具有暴露的 PS 的内皮细胞

[1455] 根据实施例 XXX 中所描述的结果，并且为了进一步验证实施例 XXXI 中列出的信息，本实施例提供的数据显示，二聚 β2GPI 在 3G4 抗体不存在下结合具有暴露的 PS 的内皮细胞。

[1456] 在这些研究中，使用人工 β2GPI 二聚体，其通过使 hβ2GPI 与因子 XI 的苹果 4 二聚体化结构域（apple4dimerization domain）的 C-末端融合来产生（Lutters 等人，2001）。这种 β2GPI 不具有通过附着至 Fc 区而提供的优点，如本申请中早期所描述的。然而，这种二聚体与具有暴露的 PS 的细胞的结合验证了 Fc-β2GPI 二聚体由于结合 PS 阳性细胞的用途。

[1457] ABAE 细胞用 LPC 处理以诱导 PS 暴露，并与纯化的 hβ2GPI、hβ2GPI 二聚体或包含经破坏的脂质结合结构域的突变型 hβ2GPI 二聚体一起孵育。如所预期的，单体 hβ2GPI 与经 LPC 处理的 ABAE 细胞的结合是 可以忽略的（图 24A）。相反地，hβ2GPI 二聚体强烈结合经 LPC- 处理的细胞（图 24B），但不结合未经 LPC 处理的细胞（图 24D）。还发现 hβ2GPI 二聚体的结合依赖于功能性的脂质结合结构域（图 24C）。这些数据表明，二价 β2GPI 构建体结合具有暴露的 PS 的细胞。

[1458] 本发明的 Fc-β2GPI 二聚体还将会结合具有暴露的 PS 的细胞，例如肿瘤血管内皮细胞、肿瘤细胞、受病毒感染的细胞和病毒颗粒。然而，Fc-β2GPI 构建体将具有另外的优点，即 Fc 区将促进宿主效应器功能以增强疾病治疗。另外的试剂还可附着至 Fc-β2GPI 构建体，例如毒素、细胞因子、放射性同位素、药物等，以递送治疗有效负荷至 PS 阳性靶细胞。

[1459] 无需过多实验，根据本公开内容即可制备和执行本文所公开和要求保护的所有组合物和方法。尽管已经以优选实施方案的形式描述了本发明的组合物和方法，但对于本领域技术人员显而易见的是，可以对所述组合物和方法，和在本文所述的方法的步骤中或步骤顺序中施加变化，而不偏离本发明的构想、精神和范围。更具体而言，显而易见的是，可以用化学和生理学上相关的某些药剂替代本文所述的药剂而仍获得相同或相似的结果。对于本领域技术人员而言显而易见的所有这些相似替代和修饰，被认为是位于由所附权利要求书所限定的本发明的精神、范围和构想之内。

[1460] 本发明的优选实施方案如下：

[1461] 1. 构建体，其包含可操作地附着至至少第一种磷脂酰丝氨酸结合蛋白的抗体 Fc 区。

打印ID7584222 Pg 159

[1462] 2. 实施方案 1 的构建体，其中所述磷脂酰丝氨酸结合蛋白是蛋白 C、蛋白 S、因子 II（凝血酶原）、因子 V、因子 VII、因子 IX 或因子 X。

[1463] 3. 实施方案 1 的构建体，其中所述磷脂酰丝氨酸结合蛋白是 Mer、PS 结合性清道夫受体、$\alpha_5\beta_3$ 整联蛋白、CR3 补体受体或 CR4 补体受体。

[1464] 4. 实施方案 1 的构建体，其中所述磷脂酰丝氨酸结合蛋白是磷脂酰丝氨酸受体，即 PSr。

[1465] 5. 实施方案 1 的构建体，其中所述磷脂酰丝氨酸结合蛋白是 β2- 糖蛋白 I（β2GPI）。

[1466] 6. 实施方案 1 的构建体，其中所述抗体 Fc 区可操作地附着至两个 β2GPI 多肽，所述两个 β2GPI 多肽各至少包含 β2GPI 的结构域 V。

[1467] 7. 实施方案 6 的构建体，其中所述抗体 Fc 区可操作地附着至两个 β2GPI 多肽，所述两个 β2GPI 多肽各至少包含 β2GPI 的结构域 V，并且其中所述 β2GPI 多肽在附着至所述 Fc 区时形成二聚体。

[1468] 8. 实施方案 7 的构建体，其中所述 β2GPI 多肽各至少包含 β2GPI 的结构域 V，并且基本上缺乏 β2GPI 的结构域 I。

[1469] 9. 实施方案 7 的构建体，其中所述 β2GPI 多肽各至少包含 β2GPI 的结构域 IV 和结构域 V。

[1470] 10. 实施方案 9 的构建体，其中所述 β2GPI 多肽各至少包含 β2GPI 的结构域 III、结构域 IV 和结构域 V。

[1471] 11. 实施方案 10 的构建体，其中所述 β2GPI 多肽各至少包含 β2GPI 的结构域 II、结构域 III、结构域 IV 和结构域 V。

[1472] 12. 实施方案 11 的构建体，其中所述 β2GPI 多肽各包含 β2GPI 的结构域 I、结构域 II、结构域 III、结构域 IV 和结构域 V。

[1473] 13. 实施方案 6 — 12 中任一项的构建体，其中所述 β2GPI 多肽各至少包含 β2GPI 的带切口的结构域 V。

[1474] 14. 实施方案 6 — 13 中任一项的构建体，其中所述 β2GPI 多肽各是人 β2GPI 多肽。

[1475] 15. 任何前述实施方案的构建体，其中所述抗体 Fc 区包含抗体铰链区和抗体重链恒定结构域 CH2 和 CH3。

[1476] 16. 任何前述实施方案的构建体，其中所述抗体 Fc 区包含抗体铰链区，抗体重链恒定结构域 CH2 和 CH3，以及抗体重链恒定结构域 CH1 或 CH4 中的至少一个。

[1477] 17. 任何前述实施方案的构建体，其中所述抗体 Fc 区是人抗体 Fc 区。

[1478] 18. 任何前述实施方案的构建体，其中所述抗体 Fc 区是来自人 IgG1（γ1）或人 IgG3（γ3）抗体的 Fc 区。

[1479] 19. 实施方案 6 — 16 中任一项的构建体，其中所述抗体 Fc 区是来自小鼠 IgG2a（γ2a）或小鼠 IgG2b（γ2b）抗体的 Fc 区。

[1480] 20. 任何前述实施方案的构建体，其中所述抗体 Fc 区通过直接的共价键或经由化学交联剂而可操作地附着至所述磷脂酰丝氨酸结合蛋白。

[1481] 21. 任何前述实施方案的构建体，其中所述抗体 Fc 区通过重组表达为融合蛋白而

打印ID7584222 Pg 160

可操作地附着至所述磷脂酰丝氨酸结合蛋白。

[1482] 22. 任何前述实施方案的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至至少第一种生物学试剂。

[1483] 23. 实施方案 22 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至至少第一种治疗剂。

[1484] 24. 实施方案 23 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至抗细胞剂或细胞毒性剂。

[1485] 25. 实施方案 24 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至蓖麻毒素、白树毒蛋白、相思豆毒蛋白、白喉毒素、假单胞菌毒素或百日咳毒素。

[1486] 26. 实施方案 23 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至细胞因子或趋化因子。

[1487] 27. 实施方案 26 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至 IL-2、IL-12、TNF-α、干扰素或 LEC。

[1488] 28. 实施方案 23 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至 V 型 ATP 酶抑制剂。

[1489] 29. 实施方案 28 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至 salicylihalamide、刀球肮霉素或巴弗洛霉素。

[1490] 30. 实施方案 23 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至蛋白质合成抑制剂。

[1491] 31. 实施方案 30 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至 psymberin、青腰虫素、irciniastatin A。

[1492] 32. 实施方案 23 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至化学治疗剂、抗血管发生剂、细胞凋亡诱导剂、抗微管蛋白药物、抗生素、放射性同位素或促凝剂。

[1493] 33. 实施方案 32 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至红豆杉醇、多西他赛、紫杉醇、顺铂、吉西他滨、考布他汀、多柔比星或阿霉素。

[1494] 34. 实施方案 32 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至砷放射性同位素。

[1495] 35. 实施方案 32 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至截短的组织因子。

[1496] 36. 实施方案 23 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至抗病毒剂。

[1497] 37. 实施方案 36 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至核苷类逆转录酶抑制剂、非核苷类逆转录酶抑制剂或蛋白酶抑制剂。

[1498] 38. 实施方案 36 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至 AZT、西多福韦或利巴韦林。

[1499] 39. 实施方案 22 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着 至至少第一种诊断、成像或可检测试剂。

[1500] 40. 实施方案 39 的构建体，其中所述构建体进一步可操作地附着至 X 射线可检测的化合物、放射性离子、核磁自旋共振同位素、CEST 或 paraCEST 试剂。

[1501] 41. 任何前述实施方案的构建体，其中所述构建体包括在药物组合物中。

打印ID?584222 Pg 161

[1502] 42. 实施方案 41 的构建体，其中所述药物组合物进一步包括至少第二种治疗剂。

[1503] 43. 实施方案 42 的构建体，其中所述至少第二种治疗剂是抗癌剂、抗血管发生剂或抗病毒剂。

[1504] 44. 实施方案 41 － 43 中任一项的构建体，其中所述药物组合物是纳米颗粒、脂质体或隐蔽的脂质体组合物。

[1505] 45. 实施方案 44 的构建体，其中所述药物组合物是脂质体或隐蔽的脂质体组合物，其中所述构建体可操作地与所述脂质体的外膜相联合，并且其中至少第二种治疗剂包括在所述脂质体的核中。

[1506] 46. 任何前述实施方案的构建体，其用于疗法。

[1507] 47. 实施方案 13 的构建体，其用于抑制血管发生。

[1508] 48. 任何前述实施方案的构建体，其用于治疗或预防癌症。

[1509] 49. 任何前述实施方案的构建体，其用于治疗或预防病毒感染。

[1510] 50. 实施方案 13 的构建体在制备用于通过抑制血管发生来治疗或预防疾病的药物中的用途。

[1511] 51. 实施方案 13 的构建体在制备用于治疗或预防下列疾病的药物中的用途：黄斑变性、年龄相关的黄斑变性、关节炎、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、糖尿病性视网膜病、甲状腺增生、格雷夫斯病、血管瘤、新生血管性青光眼或牛皮癣。

[1512] 52. 实施方案 1 － 49 中任一项的构建体在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途。

[1513] 53. 实施方案 1 － 49 中任一项的构建体在制备用于治疗或预防病毒感染的药物中的用途。

[1514] 54. 用于治疗具有血管发生疾病的动物的方法，包括以对于在所述动物中抑制血管发生和治疗所述疾病来说有效的量向所述动物施用实施方案 13 的构建体。

[1515] 55. 实施方案 54 的方法，其中所述动物具有黄斑变性、年龄相关的黄斑变性、关节炎、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、糖尿病性视网膜病、甲状腺增生、格雷夫斯病、血管瘤、新生血管性青光眼或牛皮癣。

[1516] 56. 实施方案 54 的方法，其中所述动物具有癌症。

[1517] 57. 实施方案 54 的方法，其中所述动物是人患者。

[1518] 58. 用于治疗具有肿瘤的动物的方法，包括以对于治疗所述动物中的所述肿瘤来说有效的量向所述动物施用实施方案 1 － 49 中任一项的构建体。

[1519] 59. 实施方案 58 的方法，其中所述构建体与暴露在肿瘤血管内皮细胞的腔表面上的磷脂酰丝氨酸结合。

[1520] 60. 实施方案 58 的方法，其中所述构建体结合暴露在肿瘤细胞表面上的磷脂酰丝氨酸。

[1521] 61. 实施方案 58 的方法，其进一步包括向所述动物施用治疗有效量的至少第二种治疗剂或抗癌剂。

[1522] 62. 实施方案 58 的方法，其中所述动物是人患者。

[1523] 63. 抑制病毒复制、感染或传播的方法，其包括使细胞群接触实施方案 1 － 49 中任一项的构建体，所述构建体的量对于抑制所述细胞群中的病毒复制、感染或传播来说是有

打印ID7584222 Pg 162

效的。

[1524] 64. 实施方案 63 的方法，其中所述细胞群定位于动物内，并且将所述构建体施用于所述动物。

[1525] 65. 实施方案 64 的方法，其中所述动物是人患者。

[1526] 66. 用于治疗具有病毒感染的动物的方法，包括以对于抑制所述动物中的病毒复制或传播从而治疗所述病毒感染来说有效的量向所述动物施用实施方案 1 — 49 中任一项的构建体。

[1527] 67. 实施方案 66 的方法，其中所述构建体结合暴露在受病毒感染 的细胞的表面上的磷脂酰丝氨酸。

[1528] 68. 实施方案 66 的方法，其中所述构建体结合暴露在病毒颗粒表面上的磷脂酰丝氨酸。

[1529] 69. 实施方案 66 的方法，其进一步包括向所述动物施用治疗有效量的至少第二种治疗剂或抗病毒剂。

[1530] 70. 实施方案 66 的方法，其中所述动物具有 CMV、RSV、肝炎、流行性感冒、HIV、疱疹、副粘病毒或沙粒病毒感染。

[1531] 71. 实施方案 66 的方法，其中所述动物具有病毒性肝炎、流行性感冒、AIDS、病毒性肺炎或呼吸系统疾病或拉沙热。

[1532] 72. 实施方案 66 的方法，其中所述动物是人患者。

[1533] 参考文献

[1534] 特别地将下列参考文献引入本文作为参考，以便他们提供对于本文中所示的那些来说作为补充的示例性的程序上或其他方面的细节

[1535] Abrams and Oldham, In:Monoclonal Antibody Therapy of Human Cancer, Foon and Morgan(Eds.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 103-120, 1985.

[1536] Adler, Ng, Rote, "Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, JAR, "Biol. Reprod., 53(4):905-910, 1995.

[1537] Alving, Banerji, Fogler and Alving, "Lupus anticoagulant activities of murine monoclonal antibodies to liposomal phosphatidylinositol phosphate", Clin. Exp. Immunol., 69:403-408, 1987.

[1538] Anderson, Croyle, Lingrel, "Primary structure of a gene encoding rat T-kininogen, "Gene, 81(1):119:28, 1989.

[1539] Andree, Reutelingsperger, Hauptmann, Hemker, Hermens, Willems, "Binding of vascular anticoagulant α (VACα) to planar phospholipid bilayers, "J. Biol. Chem., 265:4923-4928, 1990.

[1540] Antibodies:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

[1541] Aoki, Uenaka, Aoki, Umeda and Inoue, "A novel peptide probe for studying the transbilayer movement of phosphatidylethanolamine, "J. Biochem., 116:291-297, 1994.

[1542] Asano, Yukita, Matsumoto, Kondo, Suzuki, "Inhibition of tumor growth

打印ID?584222 Pg 163

and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor,"Cancer Res.,55:5296-5301,1995.

[1543] Baca et al.,"Antibody humanization using monovalent phage display,"J. Biol. Chem.,272(16):10678-84,1997.

[1544] Balasubramanian,Chandra,Schroit,"Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes;the role of beta2-glycoprotein I in macrophage recognition,"J.Biol. Chem.,272:31113-17,1997a.

[1545] Balasubramanian,Chandra,Schroit,"Macrophage recognition of phosphatidylserine-expressing cells:the role of beta(2)-glycoprotein I in immune clearance,"Blood,90:2864,1997b.

[1546] Balasubramanian,Schroit,"Characterization of phosphatidylserinedependent beta(2)-glycoprotein I macrophage interactions-implications for apoptotic cell clearance by phagocytes,"J.Biol. Chem.,273:29272-77,1998.

[1547] Balasubramanian and Schroit,"Aminophospholipid asymmetry:a matter of life and death,"Annu.Rev.Physiol.,65:701-734,2003.

[1548] Balasubramanian,Maiti,Schroit,"Recruitment of beta-2-glycoproteinlto cell surfaces in extrinsic and intrinsic apoptosis,Apoptosis,10:439-446,2005.

[1549] Barbas,Kang,Lerner,Benkovic,"Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces:the gene III site,"Proc.Natl.Acad. Sci.,USA,88(18):7978-7982,1991.

[1550] Barbas et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,88:4457-4461,1992.

[1551] Barras,Bain,Hoekstra and Lerner,"Semisynthetic combinatorial antibody libraries:a chemical solution to the diversity problem,"Proc.Natl.Acad.Sci. USA,89:4457-4461,1992.

[1552] Beck,Luster,Miller,"Combination of a monoclonal anti-phosphatidylserine antibody with gemcitabine strongly inhibits the growth and metastasis of orthotopic pancreatic tumors in mice,"Int. J.Cancer,published online:13Dec2005,DOI:10.1002/ijc.21684,to be published in volume118,edition10,2006.

[1553] Berman,Mellis,Pollock,Smith,Suh,Heinke,Kowal,Surti,Chess,Cantor,et al.,"Content and organization of the human Ig VH locus:definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus,"EMBO J.,7(3):727-738,1988.

[1554] Bernier and Jolles,"Purification and characterization of a basic23kDa cytosolic protein from bovine brain,"Biochim.Biophys.Acta,790(2):174-181,1984.

[1555] Bernier,Tresca,Jolles,"Ligand-binding studies with a23kDa protein purified from bovine brain cytosol,"Biochim.Biophys.Acta,871(1):19-23,1986.

打印ID7584222 Pg 164

[1556] Bevers, Rosing, Zwaal, "Development of procoagulant binding sites on the platelet surface," Adv. Exp. Med. Biol., 192:359-371, 1985.

[1557] Bevers, Zwaal, Willems, "The effect of phospholipids on the formation of immune complexes between autoantibodies and beta(2)-glycoprotein I or prothrombin," Clin. Immunol., 112:150-160, 2004.

[1558] Bevers, Janssen, Comfurius, et al., "Quantitative determination of the binding of beta(2)-glycoprotein I and prothrombin to phosphatidylserine-exposing blood platelets," Biochem. J., 386:271-279, 2005.

[1559] Bevilacqua, "Endothelial-leukocyte adhesion molecules," Ann. Rev. Immunol., 11:767-804, 1993.

[1560] Bitbol, Fellmann, Zachowski, Devaux, "Ion regulation of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine outside-inside translocation in human erythrocytes," Biochim. Biophys. Acta, 904(2):268-282, 1987.

[1561] Blackwood and Ernst, "Characterization of Ca2(+)-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins," Biochem. J., 266(1):195-200, 1990.

[1562] Blankenberg, Katsikis, Tait, Davis, Naumovski, Ohtsuki, Kopiwoda, Abrams, Darkes, Robbins, Maecker, Strauss, "In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death," Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95(11):6349-6354, 1998.

[1563] Bocci, "Efficient labeling of serum proteins with131I using chloramine T," Int. J. Appl. Radiat. Isot., 15:449-456, 1964.

[1564] Bombeli, Karsan, Tait, Harlan, "Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant," Blood, 89(7):2429-2442, 1997.

[1565] Borgstrom et al., "Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody:novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy," Cancer Res., 56(17):4032-1439, 1996.

[1566] Borgstrom et al., "Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo," Prostate, 35(1):1-10, 1998.

[1567] Bornstein, "Thrombospondins:structure and regulation of expression," FASEB J, 6(14):3290-3299, 1992.

[1568] Borrebaeck and Moller, "In vitro immunization. Effect of growth and differentiation factors on antigen-specific B cell activation and production of monoclonal antibodies to autologous antigens and weak immunogens," J. Immunol., 136(10):3710-3715, 1986.

[1569] Boustead, Brown, Walker, "Isolation, characterization and localization of annexin V from chicken liver," Biochem. J., 291:601-608, 1993.

打印ID7584222 Pg 165

[1570] Boyle, Pohlman, Cornejo, Verrier, "Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion, "Ann. Thor. Surg., 62(6):1868-1875, 1996.

[1571] Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, "Anal. Biochem., 72:248-254, 1976.

[1572] Branch, Rote, Dostal, Scott, "Association of lupus anticoagulant with antibody against phosphatidylserine, "Clin. Immun. Immunopathol., 42:63-75, 1987.

[1573] Breier, Blum, Peli, Groot, M., Wild, Risau, Reichmann, "Transforming growth factor-Band RAS regulate the VEGF/VEGF-Receptor system during tumor angiogenesis, "Int. J. Cancer, 97:142-148, 2002.

[1574] Brem, "Angiogenesis antagonists: current clinical trials, "Angiogenesis, 2:9-20, 1998.

[1575] Bresnahan, Boldogh, Thompson, and Albrecht, "Human Cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1", Virology, 224:150-160, 1996.

[1576] Bruggemann, Williams, Bindon, Clark, Walker, Jefferis, Waldmann, Neuberger, " Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies, "J. Exp. Med., 166:1351-1361, 1987.

[1577] Bruijn and Dinklo, "Distinct patterns of expression of intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and endothelial-leukocyte adhesion molecule-1in renal disease, "Lab. Invest., 69:329-335, 1993.

[1578] Burke et al., "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors", Science, 236, 806-812, 1987.

[1579] Burrows, Watanabe, Thorpe, "A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors, "Cancer Res., 52:5954-5962, 1992.

[1580] Burrows and Thorpe, "Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:8996-9000, 1993.

[1581] Calderon and DeVries, "Lipid composition and phospholipid asymmetry of membranes from a schwann cell line, "J. Neuro. Res., 49:372-380, 1997.

[1582] Callahan et al., J. Immunol., 170:4840-4845, 2003

[1583] Campbell, In:Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg(Eds.), Els eview, Amsterdam, pp. 75-83, 1984.

[1584] Carnemolla et al., "A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors, "J. Cell

打印ID?584222 Pg 166

Biol., 108:1139-1148, 1989.

[1585] Chen, Stone, Woon et al., "Antiphospholipid antibodies bind to activated but not resting endothelial cells:is an independent triggering event required to induce antiphospholipid antibody-mediated disease ? "Thrombosis Res., 114:101-111, 2004.

[1586] Cheng, Huang, Nagane, Ji, Wang, Shih, Arap, Huang, Cavenee, "Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:8502-8507, 1996.

[1587] Chonn, Semple, Cullis, "Beta2glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of' non-self' particles, "J. Biol. Chem., 270:25845-49, 1995.

[1588] Choung, Kobayashi, Inoue, Takemoto, Ishitsuka and Inoue, "Hemolytic activity of a cyclic peptide Ro09-0198isolated from Streptoverticillium, "Biochim. Biophys. Acta., 940:171-179, 1988a.

[1589] Choung, Kobayashi, Takemoto, Ishitsuka and Inoue, "Interaction of a cyclic peptide, Ro09-0198, with phosphatidylethanolamine in liposomal membranes, "Biochem. Biophys. Acta, 940:180-187, 1988b.

[1590] Christiansen, Sims, Hamilton, "Complement C5b-9increases plasminogen binding and activation on human endothelial cells, "Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 17(1):164-171, 1997.

[1591] Clapp et al., "The16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis, "Endocrinology, 133(3):1292-1299, 1993.

[1592] Clark, "Antibody Engineering IgG Effector Mechanisms, "Chemical Immunology, 65:88-110, 1997.

[1593] Cleve, Rittner, "Further family studies on the genetic control of beta2-glycoprotein I concentration in human serum, "Humangenetik, 7:93-97, 1969.

[1594] Comfurius, Senden, Tilly, et al., "Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase, "Biochim. Biophys. Acta., 1026(2):153-160, 1990.

[1595] Contreras, Villar, Alonso, Kolesnick, and Goni, "Sphingomyelinase activity causes transbilayer lipid translocation in model and cell membranes, "J. Biol. Chem., 278:37169-37174, 2003.

[1596] Coughlin et al., "Interleukin-12and interleukin-18synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis, "J. Clin. Invest., 101(6):1441-1452, 1998.

[1597] D' Amato et al., "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(9):4082-4085, 1994.

FTEMID7584222 Pg 167

[1598] D'Angelo et al.,"Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor16-kDa N-terminal fragment of prolactin,"Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(14):6374-6378, 1995.

[1599] Dachary-Prigent, Toti, Satta, Pasquet, Uzan, Freyssinet,"Physiopathological significance of catalytic phospholipids in the generation of thrombin,"Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 22:157-164, 1996.

[1600] Daleke,"Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry,"J. Lipid Res., 44:233-242, 2003.

[1601] Daum,"Lipids of mitochondria,"Biochim. Biophys. Acta, 822(1):1-42, 1985.

[1602] Davis and Yancopoulos,"The angiopoietins:Yin and Yang in angiogenesis", Curr. Top. Microbiol. Immunol., 237:173-85, 1999.

[1603] Demo, Masuda, Rossi, et al.,"Quantitative measurement of mast cell degranulation using a novel flow cytomeric annexin-V binding assay,"Cytometry, 36(4):340-348, 1999.

[1604] de Laat, Derksen, de Groot,"beta(2)-glycoprotein I, the playmaker of the antiphospholipid syndrome,"Clin. Immunol., 112:161-168, 2004a.

[1605] de Laat, Derksen, Urbanus, Roest, de Groot,"beta(2)-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome,"Blood, 104:3598-3602, 2004b.

[1606] de Laat, Derksen, Urbanus, de Groot,"IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43in domain I of beta(2)-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis,"Blood, 105:1540-1545, 2005a.

[1607] de Laat, Derksen, van Lummel, Pennings, de Groot,"Pathogenic anti-beta(2)-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta(2)-glycoprotein I only after a conformational change,"Blood, published online:DOI10. 1182/blood-2005-05-1943, 2005b.

[1608] Deleze, Alarconsegovia, Valdesmacho, Oria, Deleon,"Relationship between antiphospholipid antibodies and recurrent fetal loss in patients with systemic lupus-erythematosus and apparently healthy women, J. Rheumatol., 16:768-772, 1989.

[1609] Denekamp,"Vascular attack as a therapeutic strategy for cancer,"Cancer Metastasis Rev., 9:267-282, 1990.

[1610] Devaux,"Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry,"Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 21:417-439, 1992.

[1611] Devitt, Pierce, Oldreive, Shingler, Gregory,"CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages:the role of phosphatidylserine,"Cell Death Differ., 10:371-382, 2003.

[1612] DeVore et al.,"Phase I study of the antineovascularization drug

打印ID7584222 Pg 168

CM101, "Clin. Cancer Res., 3(3):365-372, 1997.

[1613] Diehl, Pfreundschuh, Fonatsch, Stein, Falk, Burrichter, Schaadt, "Phenotypic genotypic analysis of Hodgkin's disease derived cell lines:histopathological and clinical implications, "Cancer Surveys, 4:399-416, 1985.

[1614] Dillon, Mancini, Rosen, et al., "Annexin V binds to viable B cells and colocalizes with a marker of lipid rafts upon B cell receptor activation, "J. Immunol., 164(3):1322-1332, 2000.

[1615] Donati and Falanga, "Pathogenic mechanisms of thrombosis in malignancy, "Acta Haematol., 106(1-2):18-24, 2001.

[1616] Drouvalakis and Buchanan, "Phospholipid specificity of autoimmune and drug induced lupus anticoagulants;association of phosphatidylethanolamine reactivity with thrombosis in autoimmune disease, "J. Rheumatol., 25(2):290-295, 1998.

[1617] Droz, Patey, Paraf, Chretien, Gogusev, "Composition of extracellular matrix and distribution of cell adhesion molecules in renal cell tumors, "Lab. Invest., 71:710-718, 1994.

[1618] Dvorak, Nagy, Dvorak, "Structure of solid tumors and their vasculature:implications for therapy with monoclonal antibodies, "Cancer Cells, 3(3):77-85, 1991.

[1619] Edgington, Mackman, Brand, Ruf, "The structural biology of expression and function of tissue factor, "Thromb. Haemost., 66(1):67-79, 1991.

[1620] Emoto, Kobayashi, Yamaji, Aizawa, Yahara, Inoue and Umeda, "Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis, "Proc. Natl. Acad. Sci., 93:12867-12872, 1996.

[1621] Emoto, Toyama-Sorimachi, Karasuyama, Inoue and Umeda, "Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells, "Exp. Cell Res., 232:430-434, 1997.

[1622] Fadok, Bratton, Konowal, Freed, Westcott, Henson, "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF, "J. Clin. Invest., 101:890-898, 1998.

[1623] Fadok, Bratton, Rose, Pearson, Ezekewitz, Henson, "A receptor for phosphatidylserinespecific clearance of apoptotic cells, "Nature, 405:85-90, 2000.

[1624] Fadok, de Cathelineau, Daleke, Henson, Bratton, "Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by microphages and fibroblasts, "J. Biol. Chem., 276:1071-1077, 2001a.

[1625] Fadok, Bratton, Guthrie, Henson, "Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines:role of proteases, "J.

ITEMID?584222 Pg 169

Immunol., 166:6847-6854, 2001b.

[1626] Ferrara, Clapp, Weiner, "The16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells, "Endocrinology, 129(2):896-900, 1991.

[1627] Folkman et al., "Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone, "Science, 221:719-725, 1983.

[1628] Fotsis et al., "The endogenous oestrogen metabolite2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth, "Nature, 368(6468):237-239, 1994.

[1629] Frankel, "Genetically Engineered Toxins", Editor Arthur E. Frankel, Marcel Dekker Inc., New York, NY, 1992.

[1630] Frater-Schroder et al., "Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84(15):5277-5281, 1987.

[1631] Frazier, "Thrombospondins, "Curr. Opin. Cell Biol., 3(5):792-799, 1991.

[1632] Fridrikksson, Shipkiva, Sheets, Holowka, Baird and McLafferty, "Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry:, Biochemistry, 38:8056-8063, 1999.

[1633] Fries, Williams, Atkins, Newman, Lipscomb, Collins, "Expression of VCAM-1and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation, "Am. J. Pathol., 143:725-737, 1993.

[1634] Gaffet, Bettache, Bienvenüe, "Transverse redistribution of phospholipids during human platelet activation:evidence for a vectorial outflux specific to a minophospholipids, "Biochem., 34:6762-6769, 1995.

[1635] Gagliardi, Hadd, Collins, "Inhibition of angiogenesis by suramin, "Cancer Res., 52(18):5073-5075, 1992.

[1636] Gagliardi and Collins, "Inhibition of angiogenesis by antiestrogens, "Cancer Res., 53(3):533-535, 1993.

[1637] Gagliardi et al., "Antiangiogenic and antiproliferative activity of suramin analogues, "Cancer Chemother. Pharmacol., 41(2):117-124, 1998.

[1638] Galli, Comfurius, Maassen Hemker, de Baets, van Breda-Vriesman, Barbui, Zwaal, Bevers, "Anticardiolipin antibodies(ACA)directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor, "Lancet, 335(8705):1544-1547, 1990.

[1639] Galli, Barbui, Zwaal, Comfurius, Bevers, "Antiphospholipid antibodies:involvement of protein cofactors, "Haematologica, 78(1):1-4, 1993.

[1640] Gallucci and Matzinger, "Danger signals:SOS to the immune system, "Curr. Opin. Immunol., 13:114-119, 2001.

打印ID7584222 Pg 170

[1641] Gavrieli, Sherman, Ben-Sasson, "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation," J. Cell Biol., 119(3):493-501, 1992.

[1642] Gefter et al., "A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells," Somatic Cell Genet., 3:231-236, 1977.

[1643] Giovarelli et al., "Tumor rejection and immune memory elicited by locally released LEC chemokine are associated with an impressive recruitment of APCs, lymphocytes, and granulocytes", J. Immunol., 164, 3200-3206, 2000.

[1644] Goding, In:Monoclonal Antibodies:Principles and Practice, 2nd Edition, Academic Press, Orlando, Fl., pp. 60-61, 65-66, 71-74, 1986.

[1645] Good et al., "A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(17):6624-6628, 1990.

[1646] Graham, et al., "Primary respiratory syncytial virus infection in mice," J. Med. Virol., 26(2):153-62, 1988.

[1647] Grant et al., "Fibronectin fragments modulate human retinal capillary cell proliferation and migration," Diabetes, 47(8):1335-1340, 1998.

[1648] Hammill, Uhr, Scheuermann, "Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death," Exp. Cell Res., 251(1):16-21, 1999.

[1649] Hamon, Broccardo, Chambenoit, Luciani, Toti, Chaslin, Freyssinet, D evaux, McNeish, Marguet, Chimini, "ABC1promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine," Nat. Cell Biol., 2:399-406, 2000

[1650] Haran et al., "Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7breast cancer by inhibiting endothelium growth," Cancer Res., 54(21):5511-5514, 1994.

[1651] Harris, Zhang, Moghaddam, Fox, Scott, Pattison, Gatter, Stratford, Bicknell, "Breast cancer angiogenesis--new approaches to therapy via antiangiogenesis, hypoxic activated drugs, and vascular targeting," Breast Cancer Res. Treat., 38(1):97-108, 1996.

[1652] Hasegawa, Suzuki, Ishii, Takakuwa, Tanaka, "Establishment of two distinct anti-cardiolipin antibody-producing cell lines from the same individual by Epstein-Barr virus transformation," Throm. Res., 74(1):77-84, 1994.

[1653] Hasselaar and Sage, "SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells," J. Cell Biochem., 49(3):272-283, 1992.

[1654] Hastie, Patton, Hechtmann, Sherpo, "Filamin redistribution in an endothelial cell reoxygenation injury model," Free Rad. Biol. Med., 22:955-966, 1997.

打印ID7584222 Pg 171

[1655] Hayashi, Nagashima, Terui, Kawamura, Matsumoto and Itazaki, "The structure of PA48009 ; the revised structure of duramycin, " J. Antibiotics, XLIII (11) : 1421-1430, 1990.

[1656] Hellerqvist et al., "Antitumor effects of GBS toxin: a polysaccharide exotoxin from group B beta-hemolytic streptococcus, " J. Cancer Res. Clin. Oncol., 120 (1-2) : 63-70, 1993.

[1657] Henson, Bratton, Fadok, "The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch ? "Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2: 627-633, 2001.

[1658] Herrmann and Devaux, "Alteration of the aminophospholipid translocase activity during in vivo and artificial aging of human erythrocytes, "Biochim. Biophys. Acta., 1027 (1) : 41-46, 1990.

[1659] Hinkovska-Galcheva, Petkova, Koumanov, "Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation, "Cryobiology, 26 (1) : 70-75, 1989.

[1660] Hiscox and Jiang, "Interleukin-12, an emerging anti-tumour cytokine, "In Vivo, 11 (2) : 125-132, 1997.

[1661] Holash et al., "Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF", Science, 284: 1994-1998, 1999.

[1662] Hori, Chae, Murakawa, Matoba, Fukushima, Okubo, Matsubara, "A human cDNA sequence homologue of bovine phosphatidylethanolamine-binding protein, "Gene, 140 (2) : 293-294, 1994.

[1663] Hori et al., "Differential effects of angiostatic steroids and dexamethasone on angiogenesis and cytokine levels in rat sponge implants, "Br. J. Pharmacol., 118 (7) : 1584-1591, 1996.

[1664] Hotchkiss, Ashton, Mahmood, Russell, Sparano, Schwartz, "Inhibition of endothelial cell function in vitro and angiogenesis in vivo by docetaxel (Taxotere) : association with impaired repositioning of the microtubule organizing center", Mol. Cancer Ther., 1 (13) : 1191-200, 2002.

[1665] Hristova and Needham, In: Stealth Liposomes, Lasic D. and Martin, F., Eds. CRC Press, Boca Raton, pp. 35-49, 1993.

[1666] Huang, Molema, King, Watkins, Edgington, Thorpe, "Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature, "Science, 275: 547-550, 1997.

[1667] Huang, Bennett, Thorpe, "A monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on tumor blood vessels enhances the antitumor effect of docetaxel on human breast tumors in mice, "Cancer Res., 65: 4408-4416, 2005.

[1668] Hughes, Harris, Gharavi, "The anticardiolipin syndrome, "J. Rheumatol., 13: 486-489, 1986.

[1669] Hunt, Simpson, Krilis, "Identification of a region of

打印ID7584222 Pg 172

beta-2-glycoprotein-I critical for lipid-binding and anticardiolipin antibody cofactor activity,"Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2141-2145, 1993.

[1670] Hunt and Krilis,"The5th domain of beta(2)-glycoprotein-I contains a phospholipid-binding site (Cys281-Cys288)and a region recognized by anticardiolipin antibodies,"J. Immunol., 152:653-659, 1994.

[1671] Huse, Sastry, Iverson, Kang, Alting-Mees, Burton, Benkovic, Lerner, Scienc e, 246(4935):1275-1281, 1989.

[1672] Igarashi, Umeda, Tokita, Soo Nam, Inoue,"Effective induction of anti-phospholipid and anticoagulant antibodies in normal mouse,"Thrombosis Res., 61:135-148, 1991.

[1673] Ingber et al.,"Angioinhibins:Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth,"Nature, 48:555-557, 1990.

[1674] Iwamoto et al.,"Inhibition of angiogenesis, tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells HT1080by a multimeric form of the laminin sequence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg(YIGSR),"Br. J. Cancer, 73(5):589-595, 1996.

[1675] Jackson et al.,"Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein,"Science, 266(5190):1581-1584, 1994.

[1676] Jankowski, Vreys, Wittevrongel et al.,"Thrombogenicity of beta(2)-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in the hamster,"Blood, 101:157-162, 200 3.

[1677] Jendraschak and Sage,"Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin:implications for tumor cell biology,"Semin. Cancer Biol., 7(3):139-146, 1996.

[1678] Jirholt, Ohlin, Borrebaeck, Soderlind,"Exploiting Sequence Space:Shuffling In Vivo Formed Complementarity Determining Regions Into a Master Framework,"Gene, 215:471-476, 1998.

[1679] Jones and Hall,"A23kDa protein from rat sperm plasma membranes shows sequence similarity and phospholipid binding properties to a bovine brain cytosolic protein,"Biochim. Biophys. Acta, 1080(1):78-82, 1991.

[1680] Jones, Dear, Foote, Neuberger, Winter, Nature, 321(6069):522-525, 1986.

[1681] Julien, Tournier, Tocanne,"Differences in the transbilayer and lateral motions of fluorescent analogs of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the apical plasma membrane of bovine aortic endothelial cells,"Exp. Cell. Res., 208(2):387-389, 1993.

[1682] Julien, Tournier, Tocanne,"Basic fibroblast growth factor modulates the aminophospholipid translocase activity present in the plasma membrane of bovine aortic endothelial cells,"Eur. J. Biochem., 230:287-297, 1995.

打印ID7584222 Pg 173

[1683] Julien, Millot, Tocanne, Tournier, "12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate inhibits aminophospholipid translocase activity and modifies the lateral motions of fluorescent phospholipid analogs in the plasma membrane of bovine aortic endothelial cells, "Experimental Cell Res., 234:125-131, 1997.

[1684] Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest"5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, pp647-669in particular.

[1685] Kang, Barbas, Janda, Benkovic, Lerner, Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A, 88(10):4363-4366, 1991.

[1686] Katsuragawa, Kanzaki, Inoue, Hirano, Mori, Rote, "Monoclonal antibody against phosphatidylserine inhibits in vitro human trophoblastic hormone production and invasion, "Biology of Reproduction, 56:50-58, 1997.

[1687] Kellermann, Lottspeich, Henschen, Muller-Esterl, "Completion of the primary structure of human high-molecular-mass kininogen. The amino acid sequence of the entire heavy chain and evidence for its evolution by gene triplication, "Eur. J. Biochem., 154(2):471-478, 1986.

[1688] Kendall and Thomas, "Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:10705-10709, 1993.

[1689] Kenyon, Browne, D'Amato, "Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization, "Exp. Eye Res., 64(6):971-978, 1997.

[1690] Keyt et al., "Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis, "J. Biol. Chem., 271(10):5638-46, 1996.

[1691] Kim, Li, Houck, Winer, Ferrara, "The vascular endothelial growth factor proteins:identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies, "Growth Factors, 7:53-64, 1992.

[1692] Kim et al., "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo, "Nature, 362:841-844, 1993.

[1693] Kim, Kwak, Ahn, So, Liu, Koh, Koh, "Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3", FEBS Lett., 443(3):353-6, 1999.

[1694] Kim et al., "Immunohistological analysis of immune cell infiltration of a human colon tumor xenograft after treatment with Stealth liposome-encapsulated tumor necrosis factor-alpha and radiation", Int. J. Oncol., 21(5):973-9, 2002.

[1695] Kisch, and Johnson, "A plaque assay for respiratory syncytial virus, "Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 112:583-9, 1963.

打印ID7584222 Pg 174

[1696] Kitamura, Takagaki, Furuto, Tanaka, Nawa, Nakanishi, "A single gene for bovine high molecular weight and low molecular weight kininogens, "Nature, 305(5934):545-549, 1983.

[1697] Kitamura, Kitagawa, Fukushima, Takagaki, Miyata, Nakanishi, "Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution, "J. Biol. Chem., 260(14):8610-8617, 1985.

[1698] Kitamura, Ohkubo, Nakanishi, "Molecular biology of the angiotensinogen and kininogen genes, "J. Cardiovasc. Pharmacol., 10(Suppl7):S49-S53, 1987.

[1699] Kitamura, Nawa, Takagaki, Furuto-Kato, Nakanishi, "Cloning of cDNAs and genomic DNAs for high-molecular-weight and low-molecular-weight kininogens, "Methods Enzymol., 163:230-240, 1988.

[1700] Kleinman et al., "The laminins:a family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases, "Vitam. Horm., 47:161-186, 1993.

[1701] Kogure, Nakashima, Tsuchie, Tokumura, Fukuzawa, "Temporary membrane distortion of vascular smooth muscle cells is responsible for their apoptosis induced by platelet-activating factor-like oxidized phospholipids and their degradation product, lysophosphatidylcholine, "Chemistry and Physics of Lipids, 126:29-38, 2003.

[1702] Kohler and Milstein, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, "Nature, 256:495-497, 1975.

[1703] Kohler and Milstein, "Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, "Eur. J. Immunol., 6:511-519, 1976.

[1704] Kondo, Asano, Suzuki, "Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody, "Biochem. Biophys. Res. Commun., 194:1234-1241, 1993.

[1705] Konieczny, Bobrzecka, Laidler, Rybarska, "The combination of IgM subunits and proteolytic IgG fragment by controlled formation of interchain disulphides, "Haematologia, 14(1):95-99, 1981.

[1706] Krajewska, Wang, Krajewski, et al., "Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32(Caspase-3), a cell death protease, "Cancer Res., 57(8):1605-1613, 1997.

[1707] Kuzu, Bicknell, Fletcher, Gatter, "Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors, "Lab. Invest., 69(3):322-328, 1993.

[1708] Kyte and Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, "J. Mol. Biol., 157(1):105-132, 1982.

[1709] Lane, Iruela-Arispe, Sage, "Regulation of gene expression by SPARC during angiogenesis in vitro. Changes in fibronectin, thrombospondin-1, and plasminogen

打印ID7584222 Pg 175

activator inhibitor-1, "J. Biol. Chem., 267(23):16736-16745, 1992.

[1710] Lee et al., "Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor16K prolactin:activation of plasminogen activator inhibitorlexpression," Endocrinology, 139(9):3696-3703, 1998.

[1711] Leppink, Bishop, Sedmak, Henry, Ferguson, Streeter, Butcher, Orosz, "Inducibl e expression of an endothelial cell antigen on murine myocardial vasculature in association with interstitial cellular infiltration, "Transplantation, 48(5):874-877, 1989.

[1712] Levy, Gharavi, Sammaritano, Habina, Lockshin, "Fatty acid chain is a critical epitope for antiphospholipid antibody, "J. Clin. Immunol., 10(3):141-145, 1990.

[1713] Lichtenbeld, Van Dam-Mieras, Hillen, "Tumour angiogenesis:pathophysiology and clinical significance, "Neth. J. Med., 49(1):42-51, 1996.

[1714] Lin, Buxton, Acheson, Radziejewski, Maisonpierre, Yancopoulos, Chann on, Hale, Dewhirst, George, Peters, "Anti-angiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2", Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95(15):8829-34, 1998.

[1715] Lin, Sankar, Shan, Dewhirst, Polverini, Quinn, Peters, "Inhibition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor, "Cell Growth Differ., 9:49-58, 1998b.

[1716] Linder and Borden, "Effects of tamoxifen and interferon-beta or the combination on tumor-induced angiogenesis, "Int. J. Cancer, 71(3):456-461, 1997.

[1717] Lingen, Polverini, Bouck, "Inhibition of squamous cell carcinoma angiogenesis by direct interaction of retinoic acid with endothelial cells, "Lab. Invest., 74(2):476-483, 1996.

[1718] Lingen, Polverini, Bouck, "Retinoic acid and interferon alpha act synergistically as antiangiogenic and antitumor agents against human head and neck squamous cell carcinoma, "Cancer Res., 58(23):5551-5558, 1998.

[1719] Liu, Moy, Kim, Xia, Rajasekaran, Navarro, Knudsen, Bander, "Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium", Cancer Res., 57:3629-3634, 1997.

[1720] Lucas, Garcia, Donati, Hribar, Mandriota, Giroud, Buurman, Fransen, Suter, Nunez, Pepper, Grau, "Both TNF receptors are required for direct TNF-mediated cytotoxicity in microvascular endothelial cells, "Eur. J. Immunol., 28(11):3577-3586, 1998.

[1721] Luo, Toyoda, Shibuya, "Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody, "Cancer Res., 58(12):2594-2600, 1998a.

打印ID7584222 Pg 176

[1722] Luo et al.,"Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors,"Cancer Res.,58(12):2652-2660,1998b.

[1723] Lupu,Moldovan,Ryan,Stern,Simionescu,"Intrinsic procoagulant surface induced by hypercholestrolaemia on rabbit aortic endothelium,"Blood Coagul. Fibrinolysis,4(5):743-752,1993.

[1724] Lutters,Meijers,Derksen,Arnout,de Groot,"Dimers of beta(2)-glycoprotein I mimic the in vitro effects of beta(2)-glycoprotein I-anti-beta(2)-glycoprotein I antibody complexes,"J.Biol. Chem.,276:3060-3067,2001.

[1725] Majewski et al.,"Vitamin D3is a potent inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis,"J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.,1(1):97-101,1996.

[1726] Maneta-Peyret,Bessoule,Geffard,Cassagne,"Demonstration of high specificity antibodies against phosphatidylserine,"J.Immun. Meth.,108:123-127,1988.

[1727] Maneta-Peyret,Freyburger,Bessoule,Cassagne,"Specific immunocytochemical visualization of phosphatidylserine,"J.Immun. Methods,122:155-159,1989.

[1728] Manetti et al.,"Synthesis and binding mode of heterocyclic analogues of suramin inhibiting the human basic fibroblast growth factor,"Bioorg.Med. Chem.,6(7):947-958,1998.

[1729] Manfredi,Rovere,Galati,Heltai,Bozzolo,Soldini,Davoust,Balestrieri,Tincani,Sabbadini,"Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus-I.Opsonization by antiphospholipid antibodies,"Arthritis and Rheumatism,41:205-214,1998.

[1730] Martin,Reutelingsperger,McGahon,et al.,"Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus:inhibition by overexpression of Bcl-2and Abl,"J.Exp. Med.,182:1545-1556,1995.

[1731] Massey et al.,Nature,328:457-458,1987.

[1732] Matzinger,"An innate sense of danger,"Semin.Immunol.,10:399-415,1998.

[1733] McEvoy,Williamson,Schlegel,"Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages,"Proc.Natl.Acad.Sci. USA,83(10):3311-3315,1986.

[1734] McNeil,Simpson,Chesterman,Krilis,"Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation:beta2-glycoprotein I(apolipoprotein H),"Proc.Natl.Acad.Sci. USA,87(11):4120-4124,1990.

[1735] Mehdi,Naqvi,Kamboh,"A hydrophobic sequence at

打印ID7584222 Pg 177

position313-316(Leu-Ala-Phe-Trp)in the fifth domain of apolipoprotein H(beta(2)-glycoprotein I)is crucial for cardiolipin binding,"Eur. J. Biochem., 267:1770-1776, 2000.

[1736] Menon, Rahman, Ravirajan, Kandiah, Longhurst, McNally, Williams, Latchman, Isenberg, "The production, binding characteristics and sequence analysis of four human IgG monoclonal antiphospholipid antibodies", J. Autoimmunity, 10:43-57, 1997.

[1737] Mesiano, Ferrara, Jaffe, "Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer:inhibition of ascites formation by immunoneutralization, "Am. J. Pathol., 153(4):1249-1256, 1998.

[1738] Millauer, Longhi, Plate, Shawver, Risau, Ullrich, Strawn, "Dominant-negative inhibition of Flk-1suppresses the growth of many tumor types in vivo, "Cancer Res., 56:1615-1620, 1996.

[1739] Mills, Brooker, Camerini-Otero, "Sequences of human immunoglobulin switch regions:implications for recombination and transcription, "Nucl. Acids Res., 18:7305-7316, 1990.

[1740] Miyakis, Robertson Krilis, "Beta-2glycoprotein I and its role in antiphospholipid syndrome-lessons from knockout mice, "Clin. Immunol., 112:136-143, 2004.

[1741] Moldovan, Moldovan, Simionescu, "Binding of vascular anticoagulant alpha(annexin V)to the aortic intima of the hypercholesterolemic rabbit. An autoradiographic study, "Blood Coagul. Fibrinolysis, 5:921-928, 1994.

[1742] Moore et al., "Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines, "J. Lab. Clin. Med., 132(2):97-103, 1998.

[1743] Morrison, Johnson, Herzenberg, Oi, "Chimeric human antibody molecules:mouse antigen-binding domains with human constant region domains, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81(21):6851-6855, 1984.

[1744] Morrison, Wims, Kobrin, Oi, "Production of novel immunoglobulin molecules by gene transfection, "Mt. Sinai J. Med., 53(3):175, 1986.

[1745] Muller, et al., "VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody:crystal structure of the complex at2.4A resolution and mutational analysis of the interface, "Structure, 6(9):1153-67, 1998.

[1746] Muyldermans, Cambillau and Wyne, "Recognition of Antigens by Single-Domain Antibody Fragments:The Superfluous Luxury of Paired Domains, "TRENDS, 26(4):230-235, 2001.

[1747] Munro, "Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases, "European. Heart Journal, 14:72-77, 1993.

[1748] Nagler, Feferman, Shoshan, "Reduction in basic fibroblast growth factor mediated angiogenesis in vivo by linomide, "Connect Tissue

打印ID7584222 Pg178

Res., 37(1-2):61-68, 1998.

[1749] Nakamura et al., Enzyme Immunoassays:Heterogeneous and Homogeneous Systems, Chapter27.

[1750] Nakamura and Racker, "Inhibitory Effect of Duramycin or Partial Reactions Catalyzed by (Na^+, K^+)-Adenosinetriphosphatase from Dog Kidney, "Biochemistry, 23(2):385-389, 1984.

[1751] Nakanishi, Ohkubo, Nawa, Kitamura, Kageyama, Ujihara, "Angiotensinogen and kininogen:closing and sequence analysis of the cDNAs, "Clin. Exp. Hypertens., 5(7-8):997-1003, 1983.

[1752] Nilsson, Kosmehl, Zardi, Neri, "Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice, "Cancer Res., 61(2):711-716, 2001.

[1753] Nimpf, Bevers, Bomans et al., "Prothrombinase activity of human-platelets is inhibited by beta-2-glycoprotein-I, "Biochimica et Biophysica Acta, 884:142-149, 1986.

[1754] Nimpf, Wurm, Kostner, "Beta2-glycoprotein-I(Apo-H) inhibits the release reaction of human-platelets during Adp-induced aggregation, "Atherosclerosis, 63:109-114, 1987.

[1755] Nimpf, Wurm, Kostner, "Interaction of beta-2-glycoprotein-I with human-blood platelets-influence upon the Adp-induced aggregation, "Thrombosis and Haemostasis, 54:397-401, 1985.

[1756] Nuttall, Irving and Hudson, "Immunoglobulin VH Domains and beyond:Design and Selection of Single-Domain Binding and Targeting Reagents, "Current Pharma. Biotech., 1(3):253-262, 2000.

[1757] Ohizumi, Tsunoda, Taniguchi, Saito, Esaki, Makimoto, Wakai, Tsutsumi, Nakagawa, Utoguchi, Kaiho, Ohsugi, Mayumi, "Antibody-based therapy targeting tumor vascular endothelial cells suppresses solid tumor growth in rats, "Biochem. Biophys. Res. Comm., 236:493-496, 1997.

[1758] Oikawa et al., "A highly potent antiangiogenic activity of retinoids, "Cancer Lett., 48(2):157-162, 1989.

[1759] O'Reilly et al., "Angiostatin:a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma, "Cell, 79:315-328, 1994.

[1760] O'Reilly et al., "Endostatin:an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, "Cell, 88(2):277-285, 1997.

[1761] Orr, Wang, Lafrenie, Scherbarth, Nance, "Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis, "J. Pathology, 190:310-329, 2000.

[1762] Padlan, "Anatomy of the Antibody Molecule, "Mol. Immunol., 31:169-217, 1994.

打印ID7584222 Pg 179

[1763] Parmley and Smith, "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors:affinity purification of target genes, "Gene, 73(2):305-318, 1988.

[1764] Patey, Vazeux, Canioni, Potter, Gallatin, Brousse, "Intercellular adhesion molecule-3on endothelial cells:Expression in tumors but not in inflammatory responses, "Am. J. Pathol., 148:465-472, 1996.

[1765] Pepper et al., "Leukemia inhibitory factor(LIF)inhibits angiogenesis in vitro, "J. Cell Sci., 108(Pt1):73-83, 1995.

[1766] Perry, Hall, Bell, Jones, "Sequence analysis of a mammalian phospholipid-binding protein from testis and epididymis and its distribution between spermatozoa and extracellular secretions, "Biochem. J., 301(Pt1):235-242, 1994.

[1767] Pierangeli, Colden-Stanfield, Liu et al., "Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo, "Circulation, 99:1997-2002, 1999.

[1768] Polz, Wurm, Kostner, "Investigations on beta-2-glycoprotein-I in the rat-isolation from serum and demonstration in lipoprotein density fractions, "Int. J. Biochem., 11:265-270, 1980.

[1769] Presta, Chen, O' Connor, Chisholm, Meng, Krummen, Winkler, Ferrara, "Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders, "Cancer Res., 57:4593-4599, 1997.

[1770] Price, "Metastasis from human breast cancer cell lines, "Breast Cancer Research Treatment., 39:93-102, 1996.

[1771] Qamar, Gharavi, Levy, Lockshin, "Lysophosphatidylethanolamine is the antigen to which apparent antibody to phosphatidylethanolamine binds, "J. Clin. Immunol., 10(4):200-203, 1990.

[1772] Qu, Conroy, Walker, Wooding, Lucy, "Phosphatidylserine-mediated adhesion of T-cells to endothelial cells, "J. Biochem., 317(Pt2):343-346, 1996.

[1773] Quinn et al., CM101, a polysaccharide antitumor agent, does not inhibit wound healing in murine models, "J. Cancer Res. Clin. Oncol., 121(4):253-256, 1995.

[1774] Ran, Gao, Duffy, Watkins, Rote, Thorpe, "Infarction of solid Hodgkin's tumors in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature, "Cancer Res., 58(20):4646-4653, 1998.

[1775] Ran, Downes, Thorpe, "Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of activated endothelial cells and tumor blood vessels, "Proceedings of AACR, No. 2615(Abstract):527, 2002a.

[1776] Ran, Downes, Thorpe, "Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels, "Cancer Res., 626132-6140, 2002b.

[1777] Ran and Thorpe, "Phosphatidylserine is a marker of tumor vasculature and a potential target for cancer imaging and therapy, "Int. J. Radiat. Oncol. Biol.

打印ID7584222 Pg 180

Phys., 54:1479-1484, 2002.

[1778] Ran, Huang, Downes, Thorpe, "Evaluation of novel antimouse VEGFR2antibodies as potential antiangiogenic or vascular targeting agents for tumor therapy, "Neoplasia, 5:297-307, 2003.

[1779] Ran, He, Huang, et al., "Antitumor effects of a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels in mice, "Clin Cancer Res., 11:1551-1562, 2005.

[1780] Rao, Tait, Hoang, "Binding of annexin V to a human ovarian carcinoma cell line(OC-2008). Contrasting effects on cell surface factor VIIa/tissue factor activity and prothrombinase activity, "Thromb. Res., 67(5):517-531, 1992.

[1781] Rauch, Tannenbaum, Tannenbaum, Ramelson, Cullis, Tilcock, Hope, Janoff, "Hum an hybridoma lupus anticoagulants distinguish between lamellar and hexagonal phase lipid systems, "J. Biol. Chem., 261(21):9672-9677, 1986.

[1782] Rauch and Janoff, "Phospholipid in the hexagonal II phase is immunogenic:evidence for immunorecognition of nonbilayer lipid phases in vivo, "Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87(11):4112-4114, 1990.

[1783] Ravirajan, Harmer, McNally, Hohmann, Mackworth-Young, Isenberg, "Phosph olipid binding specificities and idiotype expression of hybridoma derived monoclonal autoantibodies from splenic cells of patients with systemic lupus erythematosus", Ann. Rheumatic Diseases, 54:471-476, 1995.

[1784] RayChaudhury and D'Amore, "Endothelial cell regulation by transforming growth factor-beta, "J. Cell Biochem., 47(3):224-229, 1991.

[1785] Richer and Lo, "Introduction of human DNA into mouse eggs by injection of dissected human chromosome fragments", Science245, 175-177, 1989.

[1786] Riechmann, Clark, Waldmann, Winter, "Reshaping human antibodies for therap y, "Nature, 332(6162):323-327, 1988.

[1787] Riechmann and Muyldermans, "Single Domain Antibodies:Comparison of Camel VH and Camelised Human VH Domains, "J. Immunol. Methods., 231:25-38, 1999.

[1788] Rimassa et al., "Unexpected low efficacy of stealth liposomal doxorubicin(Caelyx)and vinorelbine in the treatment of metastatic breast cancer", Breast Cancer Research and Treatment, 77(2):185-8, 2003.

[1789] Rosenthal et al., "A phase I study of SPI-077(Stealth liposomal cisplatin)concurrent with radiation therapy for locally advanced head and neck cancer", Investigational New Drugs, 20(3)343-9:, 2002.

[1790] Rote, Ng, Dostal-Johnson, Nicholson, Siekman, "Immunologic detection of phosphatidylserine externalization during thrombin-induced platelet activation, "Clin. Immunol. Immunopathol., 66:193-200, 1993.

[1791] Rote, Chang, Katsuragawa, Ng, Lyden, Mori, "Expression of phosphatidylserine-dependent antigens on the surface of differentiating BeWo

打印ID7584222 Pg 181

human choriocarcinoma cells, "Am. J. Reprod. Immun., 33:114-121, 1995.

[1792] Rote, "Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss, "Am. J. Reprod. Immun., 35:394-401, 1996.

[1793] Roubey, Eisenberg, Harper, Winfield, "Anticardiolipin autoantibodies recognize beta(2)-glycoprotein-I in the absence of phospholipid-importance of Ag density and bivalent binding, "J. Immunol., 154:954-960, 1995.

[1794] Ruf, Rehemtulla, Edgington, "Phospholipid-independent and-dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function, "Biol. Chem., 266:2158-2166, 1991.

[1795] Ruf and Edgington, "Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo, "FASEB J., 8:385-390, 1994.

[1796] Sakamoto et al., "Heparin plus cortisone acetate inhibit tumor growth by blocking endothelial cell proliferation, "Canc. J., 1:55-58, 1986.

[1797] Saleh, Stacker, Wilks, "Inhibition of growth of C6glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence, "Cancer Res., 56:393-401, 1996.

[1798] Sambrook, Fritsch, Maniatis, Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

[1799] Sang, "Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis, "Cell Res., 8(3):171-177, 1998.

[1800] Sanlioglu, Williams, Samavati, Butler, Wang, McCray, Ritchie, Hunninghake, Zandi, and Engelhardt, J. Biol. Chem., 32:30188, 2001.

[1801] Schlaepfer, Mehlman, Burgess, Haigler, "Structural and functional characterization of endonexin II, a calcium-and phospholipid-binding protein, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84(17):6078-6082, 1987.

[1802] Schoentgen, Saccoccio, Jolles, Bernier, Jolles, "Complete amino acid sequence of a basic21-kDa protein from bovine brain cytosol, "Eur. J. Biochem., 166(2):333-338, 1987.

[1803] Schorer, Rick, Swaim, Moldow, "Structural features of endotoxin required for stimulation of endothelial cell tissue factor production ;exposure of preformed tissue factor after oxidant-mediated endothelial cell injury, "J. Lab. Clin. Med., 106:38-42, 1985.

[1804] Schousboe, "Beta-2-glycoprotein-I-a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood-coagulation pathway, "Blood, 66:1086-1091, 1985.

[1805] Seigneuret and Devaux, "ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane:relation to shape changes, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81(12):3751-3755, 1984.

[1806] Sessions and Horwitz, "Myoblast aminophospholipid asymmetry differs

打印ID7584222 Pg 182

from that of fibroblasts, "FEBS Lett., 134(1):75-78, 1981.

[1807] Shaughnessy, Buchanan, Turple, Richardson, Orr, "Walker carcinosarcoma cells damage endothelial cells by the generation of reactive oxygen species" Am. J. Path., 134(4):787-796, 1989.

[1808] Sheibani and Frazier, "Thrombospondinlexpression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(15):6788-6792, 1995.

[1809] Sheng, Sali, Herzog, Lahnstein, Krilis, "Site-directed mutagenesis of recombinant human beta(2)-glycoprotein I identifies a cluster of lysine residues that are critical for phospholipid binding and anti-cardiolipin antibody activity, "J. Immunol., 157:3744-3751, 1996.

[1810] Sheu et al., "Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo:comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti-alpha(v)beta3integrin monoclonal antibody, "Biochim. Biophys. Acta, 1336(3):445-454, 1997.

[1811] Shotwell, Stodola, Michael, Lindenfelser, Dworschack and Pridham, "Antibiotics Against Plant Disease. III. Duramycin, a New Antibiotic from Streptomyces Cinnamomeus Forma Azacoluta, N. Utiliza. Res. Dev. Div., 80:3912-3915, 1958.

[1812] Sideras, Mizuta, Kanamori, Suzuki, Okamoto, Kuze, Ohno, Doi, Fukuhara, Hassan, et al., "Production of sterile transcripts of C gamma genes in an IgM-producing human neoplastic B cell line that switches to IgG-producing cells, "Intl. Immunol., 1(6):631-642, 1989.

[1813] Siemann, Mercer, Lepler, Rojiani, "Vascular targeting agents enhance chemotherapeutic agent activities in solid tumor therapy, "Int. J. Cancer, 99:1-6, 2002.

[1814] Siemeister, Martiny-Baron, Marme, "The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis:molecular facts and therapeutic opportunities, "Cancer Metastasis Rev., 17(2):241-248., 1998.

[1815] Siim, Lee, Shalal-Zwain, Prujin, McKeage, Wilson, "Marked potentiation of the antitumor activity of chemotherapeutic drugs by the antivascular agent5, 6-dimethlyxanthenone-4-acetic acid(DMXAA), "Cancer Chemother. Pharmacol., 51:43-52, 2004.

[1816] Simantov, Lasala, Lo et al., "Activation of cultured vascular endothelial-cells by antiphospholipid antibodies, "J. Clin. Invest., 96:2211-2219, 1995.

[1817] Singh et al., "Stealth monensin liposomes as a potentiator of adriamycin in cancer treatment", Journal of Controlled Release, 59(1):43-53, 1999.

[1818] Sioussat, Dvorak, Brock, Senger, "Inhibition of vascular permeability

打印ID7584222 Pg 183

factor(vascular endothelial growth factor)with antipeptide antibodies,"Arch. Biochem. Biophys., 301:15-20, 1993.

[1819] Sipos et al.,"Inhibition of tumor angiogenesis,"Ann. NY Acad. Sci., 732:263-272, 1994.

[1820] Sluiter, Pietersma, Lamers, Koster,"Leukocyte adhesion molecules on the vascular endothelium:their role in the pathogenesis of cardiovascular disease and the mechanisms underlying their expression,"J. Cardiol. Pharmacol., 22:S37-S44, 1993.

[1821] Smirnov, Triplett, Comp, Esmon, Esmon,"On the role of phosphatidylethanolamine in the inhibition of activated protein C activity by antiphospholipid antibodies,"J. Clin. Invest., 95(1):309-316, 1995.

[1822] Soares, Shaughnessy, MacLarkey, Orr,"Quantification and morphologic demonstration of reactive oxygen species produced by Walker256tumor cells in vitro and during metastasis in vivo,"Laboratory Invest., 71(4):480-489, 1994.

[1823] Soderlind, Ohlin and Carlsson,"Complementarity-Determining Region(CDR) Implantation:A Theme of Recombination,"Immunotech., 4:279-285, 1999.

[1824] Soderlind, Strandberg, Jirholt, Kobayashi, Alexeiva, Aberg, Nilsson, Jansson, Ohlin, Wingren, Danielsson, Carisson and Borrebaeck,"Recombining Germline-Derived CDR Sequences for Creating Diverse Single-Framework Antibody Libraries,"Nature Biotech., 18:852-856, 2000.

[1825] Soff et al.,"Expression of plasminogen activator inhibitor typelby human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model,"J. Clin. Invest., 96(6):2593-2600, 1995.

[1826] Staal-van den Brekel, Thunnissen, Buurman, Wouters,"Expressio n of E-selectin, intercellular adhesion molecule(ICAM)-1and vascular cell adhesion molecule(VCAM)-1in non-small-cell lung carcinoma,"Virchows Arch., 428:21-27, 1996.

[1827] Staub, Harris, Khamashta, Savidge, Chahade, Hughes,"Antibody to phosphatidylethanolamine in a patient with lupus anticoagulant and thrombosis,"Ann. Rheum. Dis., 48(2):166-169, 1989.

[1828] Steinkasserer, Barlow, Willis et al.,"Activity, disulfide mapping and structural modeling of the 5th domain of human-beta-2-glycoprotein-I,"FEBS Letters, 313:193-197, 1992.

[1829] Steinkasserer, Estaller, Weiss, Sim, Day,"Complete nucleotide and deduced amino-acid-sequence of human beta-2-glycoprotein-I, Biochem. J., 277:387-391, 1991.

[1830] Stella et al.,"Prodrugs:A chemical approach to targeted drug delivery", Directed Drug Delivery, Borchardt et al., Eds. Human

打印ID7584222 Pg 184

Press, 1985, pp247-267.

[1831] Stone, Ruf, Miles, Edgington, Wright, "Recombinant soluble human tissue factor secreted by Saccharomyces cerevisiae and refolded from E. coli inclusion bodies: glycosylation of mutants, activity, and physical characterization, "Biochem. J., 310(2):605-614, 1995.

[1832] Sunderkotter, Steinbrink, Goebeler, Bhardwaj, Sorg, "Macrophages and angiogenesis, "J. Leukocyte Biol., 55:410-422, 1994.

[1833] Sugi and McIntyre, "Autoantibodies to phosphatidylethanolamine(PE) recognize a kininogen-PE complex, "Blood, 86(8):3083-3089, 1995.

[1834] Sugi and McIntyre, "Phosphatidylethanolamine induces specific conformational changes in the kininogens recognizable by antiphosphatidylethanolamine antibodies, "Thromb. Haemost., 76(3):354-360, 1996a.

[1835] Sugi and McIntyre, "Autoantibodies to kininogen-phosphatidylethan olamine complexes augment thrombin-induced platelet aggregation, "Thromb. Res., 84(2):97-109, 1996b.

[1836] Sugimura, Donato, Kakar, Scully, "Annexin V as a probe of the contribution of anionic phospholipids to the procoagulant activity of tumor cell surfaces, "Blood Coagul. Fibrinolysis, 5(3):365-373, 1994.

[1837] Symon et al., "Selective delivery of doxorubicin to patients with breast carcinoma metastases by stealth liposomes", Cancer, 86(1):72-8, 1999.

[1838] Tada et al., "Inhibition of tubular morphogenesis in human microvascular endothelial cells by co-culture with chondrocytes and involvement of transforming growth factor beta:a model for avascularity in human cartilage, "Biochim. Biophys. Acta, 1201(2):135-142, 1994.

[1839] Tait and Smith, "Phosphatidylserine receptors:role of CD36in binding of anionic phospholipid vesicles to monocytic cells, "J. Biol. Chem., 274(5):3048-3054, 1999.

[1840] Takano et al., "Suramin, an anticancer and angiosuppressive agent, inhibits endothelial cell binding of basic fibroblast growth fact or, migration, proliferation, and induction of urokinase-type plasminogen activator, "Cancer Res., 54(10):2654-2660, 1994.

[1841] Tanaka et al., "Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor4cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth, "Nat. Med., 3(4):437-442, 1997.

[1842] Test and Mitsuyoshi, "Activation of the alternative pathway of complement by calcium-loaded erythrocytes resulting from loss of membrane phospholipid asymmetry, "J. Lab. Clin. Med., 130(2):169-182, 1997.

[1843] Thornhill, Kyan-Aung, Haskard, "IL-4increases human endothelial cell adhesiveness for T cells but not for neutrophils, "J.

打印ID?584222 Pg 185

Immunol., 144:3060-3065, 1990.

[1844] Thorpe et al., "Heparin-Steroid Conjugates:New Angiogenesis Inhibitors with Antitumor Activity in Mice," Cancer Res., 53:3000-3007, 1993.

[1845] Thorpe and Ran, "Tumor infarction by targeting tissue factor to tumor vasculature", Cancer J. Sci. Am., 6(Suppl3):S237-S244, 2000.

[1846] Thorpe, "Vascular targeting agents as cancer therapeutics," Clin. Cancer Res., 10:415-427, 2004.

[1847] Tolsma et al., "Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1have anti-angiogenic activity," J. Cell Biol., 122(2):497-511, 1993.

[1848] Tryggvason, "The laminin family," Curr. Opin. Cell Biol., 5(5):877-882, 1993.

[1849] Tsavaris, Kosmas, Vadiaka, Kanelopoulos, Boulamatsis, "Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes", Brit. J. Cancer, 87(1):21-7, 2002.

[1850] Umeda, Igarashi, Nam, Inoue, "Effective production of monoclonal antibodies against phosphatidylserine:Stereo-specific recognition of phosphatidylserine by monoclonal antibody," J. Immun., 143(7):2273-2279, 1989.

[1851] Umeda and Emoto, "Membrane Phospholipid Dynamics During Cytokinesis:Regulation of Actin Filament Assembly by Redistribution of Membrane Surface Phospholipid", Chem. Phys. Lipids, 101:81-91, 1999.

[1852] Utsugi, Schroit, Connor, Bucana, Fidler, "Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes," Cancer Res., 51(11):3062-3066, 1991.

[1853] Valenzuela, Griffiths, Rojas, Aldrich, Jones, Zhou, McClain, Copeland, Gilbert, Jenkins, Huang, Papadopoulos, Maisonpierre, Davis, Yancopoulos, "Angiopoietins3and4:diverging gene counterparts in mice and humans", Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 96(5):1904-9, 1999.

[1854] van Dijk, Warnaar, van Eendenburg, Thienpont, Braakman, Boot, Fleuren, Bolhuis, "Induction of tumor-cell lysis by bi-specific monoclonal antibodies recognizing renal-cell carcinoma and CD3antigen," Int. J. Cancer, 43:344-349, 1989.

[1855] van Gorp, Broers, Reutelingsperger, Bronnenberg, Hornstra, Dam-Mieras, Heemskerk, "Peroxide-induced membrane blebbing in endothelial cells associated with glutathione oxidation but not apoptosis," Am. J. Physiol., 277:C20-C28, 1999.

[1856] van Gorp, Hornstra, Van Dam-Mieras, Heemskerk, "Function of glutathione peroxidase in endothelial cell vitality," Arch. Biochem. Biophys., 382(1):63-71, 2000.

[1857] van Gorp, Heeneman, Broers, Bronnenberg, Van Dam-Mieras, Heemskerk, "Gl

打印ID7584222 Pg 186

utathione oxidation in calcium-and p38MAPK-dependent membrane blebbing of endothelial cells, "Biochim. Biophys. Acta, 1591(1-3):129-138, 2002.

[1858] van Lummel, Pennings, Derksen, Urbanus, Lutters, Kaldenhoven, de Groot, "The binding site in β 2-glycoprotein I for ApoER2' on platelets is located in domain V, "J. Biol. Chem., 280(44):36729-36, 2005.

[1859] Vitetta et al., "Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma, "Cancer Res., 15:4052-4058, 1991.

[1860] Vlachoyiannopoulos, Beigbeder, Duelanes, Youinou, Hunt, Krilis, Moutsopoulos, "Antibodies to phosphatidylethanolamine in antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus:their correlation with anticardiolipin antibodies and beta2glycoprotein-I plasma levels, "Autoimmunity, 16(4):245-249, 1993.

[1861] Vogt, Ng, Rote, "A model for the antiphospholipid antibody syndrome:Monoclonal antiphosphatidylserine antibody induces intrauterine growth restriction in mice, "Am. J. Obstet. Gynecol., 174:700-707, 1996.

[1862] Vogt, Ng, Rote, "Antiphosphatidylserine antibody removes Annexin V and facilitates the binding prothrombin at the surface of a choriocarcinoma model of trophoblast differentiation, "Am. J. Obstet. Gynecol., 177:964-972, 1997.

[1863] Volpert, Lawler, Bouck, "A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via thrombospondin-1, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(11):6343-6348, 1998.

[1864] Vukanovic et al., "Antiangiogenic effects of the quinoline-3-carboxamide linomide, "Cancer Res., 53(8):1833-1837, 1993.

[1865] Wakamatsu, Choung, Kobayashi, Inoue, Higashijima and Miyazawa, "Complex Formation of Peptide Antibiotic Ro09-0198with Lysophosphatidylethanolamine: ^{1}H NMR Analysis in Dimethyl Sulfoxide Solution, "Biochemistry, 29(1):113-118, 1986.

[1866] Waltenberger et al., "Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. A contribution to the molecular basis of its antiangiogenic action, "J. Mol. Cell Cardiol., 28(7):1523-1529, 1996.

[1867] Wamil et al., "Soluble E-selectin in cancer patients as a marker of the therapeutic efficacy of CM101, a tumor-inhibiting anti-neovascularization agent, evaluated in phase I clinical trail, "J. Cancer Res. Clin. Oncol., 123(3):173-179, 1997.

[1868] Wang and Joseph, "Mechanisms of hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12cells, "Free Rad. Biol. Med., 28(8):1222-1231, 2000.

[1869] Wells, "Starving cancer into submission", Chem. Biol., 5(4):R87-88, 1998.

[1870] Whitworth, Pak, Esgro, Kleinerman, Fidler, "Macrophages and Cancer, "Cancer Meta. Rev., 8:319-351, 1990.

[1871] Wiesmann, et al., "Crystal structure at1.7A resolution of VEGF in complex with domain2of the Flt-1receptor, "Cell, 91(5):695-704, 1997.

打印ID7584222 Pg 187

[1872] Weiss, Young, LoBuglio, Slivka and Nimeh, "Role of Hydrogen Peroxide in Neutrophil-Mediated Destruction of Cultured Endothelial Cells," J. Clin. Invest., 68:714-721, 1981.

[1873] Williamson and Schlegel, "Back and forth:the regulation and function of transbilayer phospholipid movement in eukaryotic cells," Molec. Mem. Biol., 11:199-216, 1994.

[1874] Willems, Janssen, Pelsers et al., "Role of divalency in the high-affinity binding of anticardiolipin antibody-beta(2)-glycoprotein I complexes to lipid membranes," Biochemistry, 35:13833-13842, 1996.

[1875] Willman et al., "Prodrugs in cancer therapy", Biochem. Soc. Trans., 14:375-382, 1988.

[1876] Winter and Milstein, "Man-made antibodies," Nature, 349:293-299, 1991.

[1877] Wolff et al., "Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary like structures in vitro and angiogenesis in vivo," Klin. Padiatr., 209(4):275-277, 1997.

[1878] Woodle, Engbers, Zalipsky, Bioconjugate Chem., 5:493-496, 1994.

[1879] Wurm, "beta2-Glycoprotein-I(apolipoprotein H)interactions with phospholipid vesicles," Int. J. Biochem., 16:511-15, 1984.

[1880] Xie, Padron, Liao, Wang, Roth and De Brabander, "Salicylihalamide A inhibits the V_0sector of the V-ATPase through a mechanism distinct from bafilomycin A_1," J. Biol. Chem., 279(19):19755-63, 2004.

[1881] Yamada, Moldow, Sacks, Craddock, Boogaens and Jacob, "Deleterious Effects of Endotoxin on Cultured Endothelial Cells:An in vitro Model of Vascular injur y," Inflammation, 5:115-116, 1981.

[1882] Yamamura et al., "Effect of Matrigel and laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis," Semin. Cancer Biol., 4(4):259-265, 1993.

[1883] Yasuda, Tsutsumi, Chiba et al., "Beta(2)-glycoprotein I deficiency:prevalence, genetic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis," Atherosclerosis, 152:337-346, 2000.

[1884] Yasuda et al., Blood, 103:3766-3772, 2004.

[1885] Yoon et al., "Inhibitory effect of Korean mistletoe(Viscum album coloratum)extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumour cells in mice," Cancer Lett., 97(1):83-91, 1995.

[1886] Yoshida et al., "Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fumagillin derivative TNP470:possible involvement of nitric oxide synthase," Cancer Res., 58(16):3751-3756, 1998.

[1887] Zapata et al., Protein Eng., 8(10):1057-1062, 1995.

[1888] Zhao, Zhou, Wiedmer, Sims, "Level of expression of phospholipid scramblase regulates induced movement of phosphatidylserine to the cell surface," J. Biol.

打印ID7584222 Pg 188

Chem., 273:6603-6606, 1998.

[1889] Zhou, Zhao, Stout, Luhm, Wiedmer, Sims, "Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids," J. Biol. Chem., 272(29):18240-18244, 1997.

[1890] Ziche et al., "Linomide blocks angiogenesis by breast carcinoma vascular endothelial growth factor transfectants," Br. J. Cancer, 77(7):1123-1129, 1998.

[1891] Zulueta, Yu, Hertig, Thannickal, Hassoun, "Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygenation:role of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane," Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 12(1):41-49, 1995.

[1892] Zwaal, Bevers, Comfurius, Rosing, Tilly, Verhallen, "Loss of membrane phospholipid asymmetry during activation of blood platelets and sickled red cells;mechanisms and physiological significance," Mol. Cell. Biochem., 91:23-31, 1989.

[1893] Zwaal and Schroit, "Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells," Blood, 89(4):1121-1132, 1997.

打印ID7584222 Pg 189

[0001]

序列表

<110> The University of Texas System
Peregrine Pharmaceuticals, Inc.
Thorpe, Philip E.
Luster, Troy A.
King, Steven W.

<120> 与磷脂酰丝氨酸结合的Fc融合构建体及其治疗用途

<130> 4001.003210

<140> Unknown
<141> 2006-01-24

<150> 60/646,333
<151> 2005-01-24

<160> 25

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 519
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 1
atgggatgga cctggatctt tattttaatc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccactctgag 60

gtccagctgc agcagtctgg acctgagctg gagaagcctg gcgcttcagt gaagctatcc 120

tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tacaacatga actgggtgaa acagagccat 180

ggaaagagcc ttgaatggat tggacatatt gatccttact atggtgatac ttcctacaac 240

cagaagttca ggggcaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300

cagctcaaga gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgtaaa ggggggttac 360

tacgggcact ggtacttcga tgtctggggc gcagggacca cggtcaccgt ctcctcagct 420

acaacaacag ccccatctgt ctatcccttg gtcccgggcg gatccccggg gctgcaggaa 480

ttcgatatca agcttatcga taccgtcgac ctcgagggg 519

<210> 2
<211> 152
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 2

Met Gly Trp Thr Trp Ile Phe Ile Leu Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys
20 25 30

[0002]

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Thr Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly His Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Val Lys Gly Gly Tyr Tyr Gly His Trp Tyr Phe Asp Val
115 120 125

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Thr Thr Thr Ala
130 135 140

Pro Ser Val Tyr Pro Leu Val Pro
145 150

<210> 3
<211> 435
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 3
atggacatga gggctcctgc acagattttg ggcttcttgt tgctcttgtt tccaggtacc 60

agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccttat ctgcctctct gggagaaaga 120

gtcagtctca cttgtcgggc aagtcaggac attggtagta gcttaaactg gcttcagcag 180

ggaccagatg gaactattaa acgcctgatc tacgccacat ccagtttaga ttctggtgtc 240

cccaaaaggt tcagtggcag taggtctggg tcagattatt ctctcaccat cagcagcctt 300

gagtctgaag attttgtaga ctattactgt ctacaatatg ttagttctcc tcccacgttc 360

ggtgctggga ccaagctgga gctgaaacgg gctgatgctg caccaactgt cttcatcttc 420

gggcggatcc cccgg 435

<210> 4
<211> 144
<212> PRT

[0003]

<213> 小鼠

<400> 4

Met Asp Met Arg Ala Pro Ala Gln Ile Leu Gly Phe Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Phe Pro Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Asp Ile Gly Ser Ser Leu Asn Trp Leu Gln Gln Gly Pro Asp Gly
50 55 60

Thr Ile Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Lys Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln
100 105 110

Tyr Val Ser Ser Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
115 120 125

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Phe Ile Phe Gly Arg Ile Pro
130 135 140

<210> 5
<211> 783
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 5
gcccagccgg ccatggccga ggtgcagctg gtggagtctg gggaggcgt ggtccagcct 60

gggaggtccc tgagactctc ctgtgcagcc tctggattca ccttcagtag ctatggcatg 120

cactgggtcc gccaggctcc aggcaagggg ctggagtggg tggcagttat atcatatgat 180

ggaagtaata aatactatgc agactccgtg aagggccgat tcaccatctc cagagacaat 240

tccaagaaca cgctgtatct gcaaatgaac agcctgagag ctgaggacac ggccgtgtat 300

tactgtgcaa gattgcatgc tcagacttgg ggccaaggta ccctggtcac cgtctcgagt 360

[0004]

打印ID7584222 Pg 192

ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtagtg cacttcagtc tgtgctgacg 420

cagccgcctt cagtgtctgc ggccccagga cagaaggtca ccatctcctg ctctggaagc 480

agctccgaca tggggaatta tgcggtatcc tggtaccagc agctcccagg aacagccccc 540

aaactcctca tctatgaaaa taataagcga ccctcaggga ttcctgaccg attctctggc 600

tccaagtctg gcacctcagc caccctgggc atcactggcc tctggcctga ggacgaggcc 660

gattattact gcttagcatg ggataccagc ccgcggaatg tattcggcgg agggaccaag 720

ctgaccgtcc taggtgcggc cgcacatcat catcaccatc acggggccgc agaacaaaaa 780

etc 783

<210> 6
<211> 261
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽

<400> 6

Ala GIn Pro Ala Met Ala GIu VaI GIn Leu VaI GIu Ser GIy GIy GIy
1 5 10 15

VaI VaI GIn Pro GIy Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser GIy
20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr GIy Met His Trp VaI Arg GIn Ala Pro GIy
35 40 45

Lys GIy Leu GIu Trp VaI Ala VaI lie Ser Tyr Asp GIy Ser Asn Lys
50 55 60

Tyr Tyr Ala Asp Ser VaI Lys GIy Arg Phe Thr lie Ser Arg Asp Asn
65 70 75 80

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala GIu Asp
85 90 95

Thr Ala VaI Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu His Ala GIn Thr Trp GIy GIn
100 105 110

GIy Thr Leu VaI Thr VaI Ser Ser GIy GIy GIy GIy Ser GIy GIy GIy
115 120 125

GIy Ser GIy GIy Ser Ala Leu GIn Ser VaI Leu Thr GIn Pro Pro Ser

[0005]

130 135 140

Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser
145 150 155 160

Ser Ser Asp Met Gly Asn Tyr Ala Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro
165 170 175

Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Asn Asn Lys Arg Pro Ser
180 185 190

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr
195 200 205

Leu Gly Ile Thr Gly Leu Trp Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
210 215 220

Leu Ala Trp Asp Thr Ser Pro Arg Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala His His His His His His Gly Ala
245 250 255

Ala Glu Gln Lys Leu
260

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly
20

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
1 5 10 15

[0006]

打印ID?584222 Pg 194

<210> 9
<211> 19
<212> PRT
<213> 肉桂链霉菌

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11).. (18)
<223> Xaa = Abu

<400> 9

Ala Lys GIn Ala Ala Ala Phe GIy Pro Phe Xaa Phe VaI Ala Asp GIy
1 5 10 15

Asn Xaa Lys

SEQ ID NO: 10 (3G4 IgG2a 重链)

```
        /-------前导序列-----\/-------------------------------------------------------
   1    MGWTWIFILI LSVTTGVHSE  VQLQQSGPEL EKPGASVKLS  GKASGYSFTG  YNMNWVKQSH GKSLEWIGHI

        -------------------3G4 VH-------------------------------------------------\/
  71    DPYYGDTSYN QKFRGKATLT VDKSSSTAYM  QLKSLTSEDS AVYYCVKGGY  YGHWYFDVWG  AGTTVTVSSA

        ------------------------------------ 小鼠 IgG2a CH1 结构域 ------------------
 141    KTTAPSVYPL APVCGDTTGS  SVTLGCLVKG  YFPEPVTLTW  NSGSLSSGVH  TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT

        --------------------------\/---- 铰链 -------\/-------------------------------
 211    SSTWPSQSIT CNVAHPASST  KVDKKEPRGP  TIKPCPPCKC  PAPNLLGGPS  VFIFPPKIKD  VLMISLSPIV

        ------------------------------- 小鼠 IgG2a CH2 结构域 ----------------------
 281    TCVVVDVSED DPDVQISWFV NNVEVHTAQT QTHREDYNST LRVVSALPIQ HQDWMSGKEF KCKVNNKDLP

        -----------\/-------------------- 小鼠 IgG2a CH3 结构域 ---------------------
 351    APIERTISKP KGSVRAPQVY  VLPPPEEEMT  KKQVTLTCMV TDFMPEDIYV  EWTNNGKTEL  NYKNTEPVLD

        ---------------------------------------------------\
 421    SDGSYFMYSK LRVEKKNWVE  RNSYSCSVVH  EGLHNHHTTK  SFSRTPGK
```

SEQ ID NO: 11 (3G4 轻链 , CJ

```
        /------前导序列----------\/-------------------------------------------------
   1    MDMRAPAQIL GFLLLLFPGT  RCDIQMTQSP SSLSASLGER  VSLTCRASQD  IGSSLNWLQQ GPDGTIKRLI

        ---------3G4 VL-------------------------------------------------\/-----------
  71    YATSSLDSGV PKRFSGSRSG  SDYSLTISSL  ESEDFVDYYC  LQYVSSPPTF GAGTKLELKR  ADAAPTVSIF

        ----------------------------- 小鼠 C-kappa-----------------------------------
 141    PPSSEQLTSG GASVVCFLNN  FYPKDINVKW  KIDGSERQNG VLNSWTDQDS KDSTYSMEST LTLTKDEYER

        ---------------------------\
 211    HNSYTCEA.TH KTSTSPIVKS FNRWEC
```

[0007]

SEQ ID NO: 12
5 '-GGAATTCGGACGGACCTGTCCCAAGC- 3 '

SEQ ID NO: 13
5 '-GGAATTCGTATGTCCTTTTGC-S '

SEQ ID NO: 14
5 '-GGAATTCGCTCCCATCATCTGC-3 '

SEQ ID NO: 15
5 '-GGAATTCGTAAAATGCCCATTC-S '

SEQ ID NO: 16
5 '-GGAATTCGCATCTTGTAAAGTAC-S '

SEQ ID NO: 17
5 '-TTCTAGATTAGCATGGCTTTAC-S '

SEQ ID NO: 18 (信号肽)
MDMRAPAQILGFLLLLFPGTRCLR

SEQ ID NO: 19 (成熟的 Fc-mB2GPI)

1
KPRGPT IKPCPPCKCP APNLLGGPSV FIFPPKIKDV LMISLSPIVT CVVVDVSEDD

小鼠 IgG2a CH2 结构域
56 PDVQISWFVN NVEVHTAQTQ THREDYNSTL RVVSALPIQH QDWMSGKEFK CKVNNKDLPA PIERTISKPK GSVRAPQVYV

小鼠 IgG2a CH3 结构域
136 LPPPEEEMTK KQVTLTCMVT DFMPEDIYVE WTNNGKTELN YKNTEPVLDS DGSYFMYSKL RVEKKNWVER NSYSCSVVHE

216 GLHNHHTTKS FSRTPGKTGG RICPKPDDLP FATVVPLKTS YDPGEQIVYS CKPGYVSRGG MRRETCPLTG MWPINTLRCV

296 PRVCPFAGIL ENGLVRYTSF EYPKNISFAC NPGFFLNGTS SSKCTEEGKW SPDIPACARI TCPPPPVPKF ALLKDYRPSA

小鼠 β2GPI
376 GNNSLYQDTV VFKCLPHFAM IGNDTVMCTE QGNWTRLPEC LEVKCPFPPR PENGYVNYPA KPVLLYKDKA TFGCHETYKL

结构域 III 结构域 IV

456 DGPEEAECTK TRTWSFLPTC RESCKLPVKK ATVLYQGMRV KIQEQEKNGM MHGDKIHEYC KNKEKKCSYI VEAHCRDGTI

结构域 V

536 EIPSCPKEHS SLAFWKTDAS EDTPC

[0008]

SEQ ID NO: 20

KNKEKKCSYTVEAHCRDGTIEIPSCPKEHSSLAFWK

SEQ ID NO: 21 (人 IgG1 重链恒定区)

/----------CH1 区域 ----------
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSWT VPSSSLGTQT
----------\/----- 铰链 -----\/----------
YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
----------CH2 区域 ----------\/----------
YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
----------CH3 区域 ----------
LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
_____\
QKSLSLSPG

SEQ ID NO: 22 (人 β2GPI)

/---------- 结构域 I----------\/----------
1 GRTCPKPDDL PFSTVVPLKT FYEPGEEITY SCKPGYVSRG GMRKFICPLT GLWPINTLKC TPRVCPFAGI LENGAVRYTT
---- 结构域 II----------\/---------- 结构域 III---
81 FEYPNTISFS CNTGFYLNGA DSAKCTEEGK WSPELPVCAP IICPPPSIPT FATLRVYKPS AGNNSLYRDT AVFECLPQHA
----------\/---------- 结构域 IV----------
161 MFGNDTITCT THGNWTKLPE CREVKCPFPS RPDNGFVNYP AKPTLYYKDK ATFGCHDGYS LDGPEEIECT KLGNWSAMPS
-\/---------- 结构域 V----------
241 CKASCKLPVK KATVVYQGER VKIQEKFKNG MLHGDKVSFF CKNKEKKCSY TEDAQCIDGT IEVPKCFKEH SSLAFWKTDA
-----\
321 SDVKPC

SEQ ID NO: 23 (人 Fc-β2GPI, Fc-hβ2GPI)

----------\/----- 铰链 -----\/----------
EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
----------CH2 区域 ----------\/----------
YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
----------CH3 区域 ----------
LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
/---------- 结构域 I----------\/----------
GRTCPKPDDL PFSTVVPLKT FYEPGEEITY SCKPGYVSRG GMRKFICPLT GLWPINTLKC TPRVCPFAGI LENGAVRYTT
---- 结构域 II----------\/---------- 结构域 III---
FEYPNTISFS CNTGFYLNGA DSAKCTEEGK WSPELPVCAP IICPPPSIPT FATLRVYKPS AGNNSLYRDT AVFECLPQHA
----------\/---------- 结构域 IV----------
MFGNDTITCT THGNWTKLPE CREVKCPFPS RPDNGFVNYP AKPTLYYKDK ATFGCHDGYS LDGPEEIECT KLGNWSAMPS
-\/---------- 结构域 V----------
CKASCKLPVK KATVVYQGER VKIQEKFKNG MLHGDKVSFF CKNKEKKCSY TEDAQCIDGT IEVPKCFKEH SSLAFLIKEDA
-----\
SDVKPC

[0009]

SEQ ID NO:24

KNKEKKCSYTEDAQCIDGTIEVPRCFKEHSSLAFWK

SEQ ID NO: 25 (Fc-mB2GPI 质粒)

```
1     AGCTTCGCGA CGTACGTTCG AACCCGGGCC GCCACCATGG ACATGAGGGC TCCTGCACAG ATTTTGGGCT
      TCGAAGCGCT GCATGCAAGC TTGGGCCCGG CGGTGGTACC TGTACTCCCG AGGACGTGTC TAAAACCCGA
71    TCTTGTTGCT CTTGTTTCCA GGTACCAGAT GCCTAAGGGA GCCCAGAGGG CCCACAATCA AGCCCTGTCC
      AGAACAACGA GAACAAAGGT CCATGGTCTA CGGATTCCCT CGGGTCTCCC GGGTGTTAGT TCGGGACAGG
141   TCCATGCAAA TGCCCAGGTA AGTCACTAGA CCAGAGCTCC ACCCGGGAGA ATGGTAAGTG CTGTAAACAT
      AGGTACGTTT ACGGGTCCAT TCAGTGATCT GGTCTCGAGG TGGGCCCTCT TACCATTCAC GACATTTGTA
211   CCCTGCACTA GAGGATAAGC CATGTACAGA TCCATTTCCA TCTCTCCTCA TCAGCACCTA ACCTCTTGGG
      GGGACGTGAT CTCCTATTCG GTACATGTCT AGGTAAAGGT AGAGAGGAGT AGTCGTGGAT TGGAGAACCC
281   TGGACCATCC GTCTTCATCT TCCCTCCAAA GATCAAGGAT GTACTCATGA TCTCCCTGAG CCCCATAGTC
      ACCTGGTAGG CAGAAGTAGA AGGGAGGTTT CTAGTTCCTA CATGAGTACT AGAGGGACTC GGGGTATCAG
351   ACATGTGTGG TGGTGGATGT GAGCGAGGAT GACCCAGATG TCCAGATCAG CTGGTTTGTG AACAACGTGG
      TGTACACACC ACCACCTACA CTCGCTCCTA CTGGGTCTAC AGGTCTAGTC GACCAAACAC TTGTTGCACC
421   AAGTACACAC AGCTCAGACA CAAACCCATA GAGAGGATTA CAACAGTACT CTCGGGGTGG TCAGTGCCCT
      TTCATGTGTG TCGAGTGTGT GTTTGGGTAT CTCTCGTAAT GTTGTCATGA GAGGCCCACC AGTCACGGGA
491   CCCCATCCAG CACCAGGACT GGATGAGTGG CAAGGAGTTC AAATGCAAGG TCAACAACAA AGACCTCCCA
      GGGGTAGGTC GTGGTCCTGA CCTACTCACC GTTCCTCAAG TTTACGTTCC AGTTGTTGTT TCTGGAGGGT
561   GCGCCCATCG AGAGAACCAT CTCAAAACCC AAAGGTGAGA GCTGCAGCCT GACTGCATGG GGGCTGGGAT
      CGCGGGTAGC TCTCTTGGTA GAGTTTTGGG TTTCCACTCT CGACGTCGGA CTGACGTACC CCCGACCCTA
631   GGGCATAAGG ATAAAGGTCT GTGTGGACAG CCTTCTGCTT CAGCCATGAC CTTTGTGTAT GTTTCTACCC
      CCCGTATTCC TATTTCCAGA CACACCTGTC GGAAGACGAA GTCGGTACTG GAAACACATA CAAAGATGGG
701   TCACAGGGTC AGTAAGAGCT CCACAGGTAT ATGTCTTGCC TCCACCAGAA GAAGAGATGA CTAAGAAACA
      AGTGTCCCAG TCATTCTCGA GGTGTCCATA TACAGAACGG AGGTGGTCTT CTTCTCTACT GATTCTTTGT
771   GGTCACTCTG ACCTGCATGG TCACAGACTT CATGCCTGAA GACATTTACG TGGAGTGGAC CAACAACGGG
      CCAGTGAGAC TGGACGTACC AGTGTCTGAA GTACGGACTT CTGTAAATGC ACCTCACCTG GTTGTTGCCC
841   AAAACAGAGC TAAACTACAA GAACACTGAA CCAGTCCTGG ACTCTGATGG TTCTTACTTC ATGTACAGCA
      TTTTGTCTCG ATTTGATGTT CTTGTGACTT GGTCAGGACC TGACACTACC AAGAATGAAG TACATGTCGT
911   AGCTGAGAGT GGAAAAGAAG AACTGGGTGG AAAGAAATAG CTACTCCTGT TCAGTGGTCC ACGAGGGTCT
      TCGACTCTCA CCTTTTCTTC TTGACCCACC TTTGTTTATC GATGAGGACA AGTCACCAGG TGCTCCCAGA
981   GCACAATCAC CACACGACTA AGAGCTTCTC TCGGACTCCG GGTAAAACCG GGGGACGGAT CTGTCCGAAG
      CGTGTTAGTG GTGTGCTGAT TCTCGAAGAG AGCCTGAGGC CCATTTTGGC CCCCTGCCTA GACAGGCTTC
1051  CCGGATGACC TACCATTTGC TACGGTTGTC CCCTTAAAGA CATCCTACGA CCCTGGGGAG CAGATTGTCT
      GGCCTACTGG ATGGTAAACG ATGCCAACAG GGGAATTTCT GTAGGATGCT GGGACCCCTC GTCTAACAGA
1121  ACTCCTGCAA GCCAGGCTAC GTGTCCAGGG GAGGGATGAG ACGGTTTACC TGTCCTCTCA CAGGAATGTG
      TGAGGAGGTT CGGTCCGATG CACAGGTCCC CTCCCTACTC TGCCAAATGG ACAGGAGAGT GTCCTTACAC
1191  GCCCATCAAC ACCCTGAGAT GTGTCCCCAG AGTATGTCCT TTCGCTGGAA TCTTAGAAAA TGGAATTGTA
      CGGGTAGTTG TGGGACTCTA CACAGGGGTC TCATACAGGA AAGCGACCTT AGAATCTTTT ACCTTAACAT
1261  CGCTACACGA GTTTTGAATA TCCCAAGAAC ATCAGTTTTG CTTGTAACCC TGGGTTTTTT CTGAATGGGA
      GCGATGTGCT CAAAACTTAT AGGGTTCTTG TAGTCAAAAC GAAGATTGGG ACCCAAAAAA GACTTACCCT
1331  CCAGCTCATC TAAGTGCACG GAGGAAGGAA AATGGAGCCC AGATATTCCT GCTTGTGCTC GCATCACCTG
      GGTCGAGTAG ATTCACGTGC CTCCTTCCTT TTACCTCGGG TCTATAAGGA CGAACACGAG CGTAGTGGAC
1401  CCCGCCACCA CCAGTTCCAA AGTTTGCACT CCTTAAGGAT TATAGGCCTT CAGCTGGGAA CAACTGTTTG
      GGGCGGTGGT GGTCAAGGTT TCAAACGTGA GGAATTCCTA ATATCCGGAA GTCGACCCTT GTTGAGAAAC
1471  TATCAGGACA CAGTGGTCTT TAAATGCTTG CCACACTTTG CCATGATCGG AAATGACACA GTCATGTGCA
      ATAGTCCTGT GTCACCAGAA ATTTACGAAC GGTGTGAAAC GGTACTAGCC TTTACTGTGT CAGTACACGT
1541  CAGAACAAGG AAACTGGACC CGATTGCCAG AATGCCTGGA AGTAAAATGT CCCTTCGGTC CGAGGCCAGA
      GTCTTGTTCC TTTGACCTGG GCTAACGGTC TTACGGACCT TCATTTTACA GGGAAGGGAG GCTCCGGTCT
1611  AAATGGGTAT GTGAATTATC CTGCAAAGCC GGTGCTTCTA TATAAGGATA AAGCCACATT TGGTTGCCAT
      TTTACCCATA CACTTAATAG GACGTTTCGG CCACGAAGAT ATATTCCTAT TTCGGTGTAA ACCAACGGTA
1681  GAGACATACA AGCTGGACGG CCCAGAAGAA GCGGAATGTA CCAAGACGAG AACTTGGTCC TTCTTGCCGA
      CTCTGTATGT TCGACCTGCC GGGTCTTCTT CGCCTTACAT GGTTCTGCTC TTGAACCAGG AAGAACGGCT
1751  CCTGTAGAGA GTCTTGCAAA CTCCCCGTTA AGAAAGCCAC CGTGCTGTAC CAAGGGATGA GGGTGAAGAT
      GGACATCTCT CAGAACGTTT GAGGGGCAAT TCTTTCGGTG GCACGACATG GTTCCCTACT CCCACTTCTA
1821  CCAGGAACAG TTTAAGAATG GGATGATGCA TGGCGACAAA ATTCACTTCT ACTGCAAAAA CAAAGAGAAG
      GGTCCTTGTC AAATTCTTAC CCTACTACGT ACCGCTGTTT TAAGTGAAGA TGACGTTTTT GTTTCTGTTC
1891  AAGTGCAGCT ACACTGTGGA GGCTCATTGC AGAGATGGCA CTATCGAGAT TCCCTCGTGC TTCAAGGAGC
      TTCACGTCGA TGTGACACCT CCGAGTAACG TCTCTACCGT GATAGCTCTA AGGGAGCACG AAGTTCCTCG
1961  ACAGTTCTCT GGCTTTCTGG AAAACGGATG CATCAGAACT GACACCGTGC TGAAGTCGAA TTCATTGATC
      TGTCAAGAGA CCGAAAGACC TTTTGCCTAC GTAGTCTTGA CTGTGGCACG ACTTCAGCTT AAGTAACTAG
2031  ATAATCAGCC ATACCACATT TGTAGAGGTT TTACTTGCTT TAAAAAACCT CCCACACCTC CCCCTGAACC
      TATTAGTCGG TATGGTGTAA ACATCTCCAA AATGAACGAA ATTTTTTGGA GGGTGTGGAG GGGGACTTGG
2101  TGAAACATAA AATGAATGCA ATTGTTGTTG TTAACTTGTT TATTGCAGCT TATAATGGTT ACAAATAAAG
      ACTTTGTATT TTACTTACGT TAACAACAAC AATTGAACAA ATAACGTCGA ATATTACCAA TGTTTATTTC
2171  CAATAGCATC ACAAATTTCA CAAATAAAGC ATTTTTTTCA CTGCATTCTA GTTGTGGTTT GTCCAAACTC
      GTTATCGTAG TGTTTAAAGT GTTTATTTCG TAAAAAAAGT GACGTAAGAT CAACACCAAA CAGGTTTGAG
2241  ATCAATGTAT CTTATCATGT CTGGCGGCCG CGACCTGCAG GCGCAGAACT GGTAGGTATG GAAGATCCCT
      TAGTTACATA GAATAGTACA GACCGCCGGC GCTGGACGTC CGCGTCTTGA CCATCCATAC CTTCTAGGGA
```

[0010]

```
2311  CGAGATCCAT TGTGCTGGCG GTAGGCGAGC AGCGCCTGCC TGAAGCTGCG GGCATTCCCA GTCAGAAATG
      GCTCTAGGTA ACACGACCGC CATCCGCTCG TCGCGGACGG ACTTCGACGC CCGTAAGGGT CAGTCTTTAC
2381  AGCGCCAGTC GTCGTCGGCT CTCGGCACCG AAGTGCTATG ATTCTCCGCC AGCATGGCTT CGGCCAGTGC
      TCGCGGTCAG CAGCAGCCGA GAGCCGTGGC TTCACGATAC TAAGAGGCGG TCGTACCGAA GCCGGTCACG
2451  GTCGAGCAGC GCCCGCTTGT TCCTGAAGTG CCAGTAAAGC GCCGGCTGCT GAACCCCAA CCGTTCCGCC
      CAGCTCGTCG CGGGCGAACA AGGACTTCAC GGTCATTTCG CGGCCGACGA CTTGGGGGTT GGCAAGGCGG
2521  AGTTTGCGTG TCGTCAGACC GTCTACGCCG ACCTCGTTCA ACAGGTCCAG GGCGGCACGG ATCAGTGTAT
      TCAAACGCAC AGCAGTCTGG CAGATGCGGC TGGAGCAAGT TGTCCAGGTC CCGCCGTGCC TAGTGACATA
2591  TCGGCTGCAA CTTTGTCATG CTTGACACTT TATCACTGAT AAACATAATA TGTCCACCAA CTTATCAGTG
      AGCCGACGTT GAAACAGTAC GAACTGTGAA ATAGTGACTA TTTGTATTAT ACAGGTGGTT GAATAGTCAC
2661  ATAAAGAATC CGCGCCAGCA CAATGGATCT CGAGGTCGAG GGATCTCTAG AGGATCCTCT ACGCCGGACG
      TATTTCTTAG GCGCGGTCGT GTTACCTAGA GCTCCAGCTC CCTAGAGATC TCCTAGGAGA TGCGGCCTGC
2731  CATCGTGGCC GGCATCACCG GCGCCACAGG TGCGGTTGCT GGCGCCTATA TCGCCGACAT CACCGATGGG
      GTAGCACCGG CCGTAGTGGC CGCGGTGTCC ACGCCAACGA CCGCGGATAT AGCGGCTGTA GTGGCTACCC
2801  GAAGATCGGG CTCGCCACTT CGGGCTCATG AGCGCTTGTT TCGGCGTGGG TATGGTGGCA GGCCCCGTGG
      CTTCTAGCCC GAGCGGTGAA GCCCGAGTAC TCGCGAACAA AGCCGCACCC ATACCACCGT CCGGGGCACC
2871  CCGGGGGACT GTTGGGCGCC ATCTCCTTGC ATGCACCATT CCTTGCGGCG GCGGTGCTCA ACGGCCTCAA
      GGCCCCCTGA CAACCCGCGG TAGAGGAACG TACGTGGTAA GGAACGCCGC CGCCACGAGT TGCCGGAGTT
2941  CCTACTACTG GGCTGCTTCC TAATGCAGGA GTCGCATAAG GGAGAGCGTC GACCTCGGGC CGCGTTGCTG
      GGATGATGAC CCGACGAAGG ATTACGTCCT CAGCGTATTC CCTCTCGCAG CTGGAGCCCG GCGCAACGAC
3011  GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA
      CGCAAAAAGG TATCCGAGGC GGGGGGACTG CTCGTAGTGT TTTTAGCTGC GAGTTCAGTC TCCACCGCTT
3081  ACCCGACAGG ACTATAAAGA TACCAGGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC
      TGGGCTGTCC TGATATTTCT ATGGTCCGCA AAGGGGGACC TTCGAGGGAG CACGCGAGAG GACAAGGCTG
3151  CCTGCCGCTT ACCGGATACC TGTCCGCCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG CGCTTTCTCA TAGCTCACGC
      GGACGGCGAA TGGCCTATGG ACAGGCGGAA AGAGGGAAGC CCTTCGCACC GCGAAAGAGT ATCGAGTGCG
3221  TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC CCCGTTCAGC
      ACATCCATAG AGTCAAGCCA CATCCAGCAA GCGAGGTTCG ACCCGACACA CGTGCTTGGG GGGCAAGTCG
3291  CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACTATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA AGACACGACT TATCGCCACT
      GGCTGGCGAC GCGGAATAGG CCATTGATAG CAGAACTCAG GTTGGGCCAT TCTGTGCTGA ATAGCGGTGA
3361  GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG
      CCGTCGTCGG TGACCATTGT CCTAATCGTC TCGCTCCATA CATCCGCCAC GATGTCTCAA GAACTTCACC
3431  TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGAACA GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG
      ACCGGATTGA TGCCGATGTG ATCTTCTTGT CATAAACCAT AGACGCGAGA CGACTTCGGT CAATGGAAGC
3501  GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTGGTTTTT TTGTTTGCAA
      CTTTTTTCTCA ACCATCGAGA ACTAGGCCGT TTGTTTGGTG GCGACCATCG CCACCAAAAA AACAAACGTT
3571  GCAGCAGATT ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAAGAT CCTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT
      CGTCGTCTAA TGCGCGTCTT TTTTTCCTAG AGTTCTTCTA GGAAACTAGA AAAGATGCCC CAGACTGCGA
3641  CAGTGGAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAAA AAGGATCTTC ACCTAGATCC
      GTCACCTTGC TTTTGAGTGC AATTCCCTAA AACCAGTACT CTAATAGTTT TTCCTAGAAG TGGATCTAGG
3711  TTTTAAATTA AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA ACTTGGTCTG ACAGTTACCA
      AAAATTTAAT TTTTACTTCA AAATTTAGTT AGATTTCATA TATACTCATT TGAACCAGAC TGTCAATGGT
3781  ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA TTTCGTTCAT CCATAGTTGC CTGACTCCCC
      TACGAATTAG TCACTCCGTG GATAGAGTCG CTAGACAGAT AAAGCAAGTA GGTATCAACG GACTGAGGGG
3851  GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCAATGATA CCGCGAGACC
      CAGCACATCT ATTGATGCTA TGCCCTCCCG AATGGTAGAC CGGGGTCACG ACGTTACTAT GGCGCTCTGG
3921  CACGCTCACC GGCTCCAGAT TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCCGAGCGCA GAAGTGGTCC
      GTGCGAGTGG CCGAGGTCTA AATAGTCGTT ATTGGTCGG TCGCCTTCC CGGCTCGCGT CTTCACCAGG
3991  TGCAACTTTA TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAGCTA GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT
      ACGTTGAAAT AGGCGGAGGT AGGTCAGATA ATTAACAACG GCCCTTCGAT CTCATTCATC AAGCGGTCAA
4061  AATAGTTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT ACAGGCATCG TGGTGTCACG CTCGTCGTTT GGTATGGCTT
      TTATCAAACG CGTTGCAACA ACGGTAACGA TGTCCGTAGC ACCACAGTGC GAGCAGCAAA CCATACCGAA
4131  CATTCAGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG
      GTAAGTCGAG GCCAAGGGTT GCTAGTTCCG CTCAATGTAC TAGGGGGTAC AACACGTTTT TTCGCCAAIC
4201  CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC GCAGTGTTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA
      GAGGAAGCCA GGAGGCTAGC AACAGTCTTC ATTCAACCGG CGTCACAATA GTGAGTACCA ATACCGTCGT
4271  CTGCATAATT CTCTTACTGT CATGCCATCC GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC TCAACCAAGT
      GACGTATTAA GAGAATGACA GTACGGTAGG CATTCTACGA AAAGACACTG ACCACTCATG AGTTGGTTCA
4341  CATTCTGAGA ATAGTGTATG CGGCGACCGA GTTGCTCTTG CCCGGCGTCA ATACGGGATA ATACCGCGCC
      GTAAGACTCT TATCACATAC GCCGCTGGCT CAACGAGAAC GGGCCGCAGT TATGCCCTAT TATGGCGCGG
4411  ACATAGCAGA ACTTTAAAAG TGCTCATCAT TGGAAAACGT TCTTCGGGGC GAAAACTCTC AAGGATCTTA
      TGTATCGTCT TGAAATTTTC ACGAGTAGTA ACCTTTTGCA AGAAGCCCCG CTTTTGAGAG TTCCTAGAAT
4481  CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGCAC CCAACTGATC TTCAGCATCT TTTACTTTCA
      GGCGACAACT CTAGGTCAAG CTACATTGGG TGAGCACGTG GGTTGACTAG AAGTCGTAGA AAATGAAAGT
4551  CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAAG GGAATAAGGG CGACACGGAA
      GGTCGCAAAG ACCCACTCGT TTTTGTCCTT CCGTTTTACG GCGTTTTTTC CCTTATTCCC GCTGTGCCTT
4621  ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTTCA ATATTATTGA AGCATTTATC AGGGTTATTG TCTCATGAGC
      TACAACTTAT GAGTATGAGA AGGAAAAAGT TATAATAACT TCGTAAATAG TCCCAATAAC AGAGTACTCG
4691  GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT AAACAAATAG GGGTTCCGCG CACATTTCCC CGAAAAGTGC
      CCTATGTATA AACTTACATA AATCTTTTTA TTTGTTTATC CCCAAGGCGC GTGTAAAGGG GCTTTTCACG
4761  CACCTGACGT CTAAGAAACC ATTATTATCA TGACATTAAC CTATAAAAAT AGGCGTATCA CGAGGCCCTG
      GTGGACTGCA GATTCTTTGG TAATAATAGT ACTGTAATTG GATATTTTTA TCCGCATAGT GCTCCGGGAC
4831  ATGGCTCTTT GCGGCACCCA TCGTTCGTAA TGTTCCGTGG CACCGAGGAC AACCCTCAAG AGAAAATGTA
      TACCGAGAAA CGCCGTGGGT AGCAAGCATT ACAAGGCACC GTGGCTCCTG TTGGGAGTTC TCTTTTACAT
4901  ATCACACTGG CTCACCTTCG GGTGGGCCTT TCTGCGTTTA TAAGGAGACA CTTTATGTTT AAGAAGGTTG
      TAGTGTGACC GAGTGGAAGC CCACCCGGAA AGACGCAAAT ATTCCTCTGT GAAATACAAA TTCTTCCAAC
```

[0011]

```
4971  GTAMTTCCT TGCGGCTTTG GCAGCCAAGC TAGATCCGGC TGTGGAATGT GTGTCAGTTA GGGTGTGGAA
      CATTTAAGGA ACGCCGAAAC CGTCGGTTCG ATCTAGGCCG ACACCTTACA CACAGTCAAT CCCACACCTT
5041  AGTCCCCAGG CTCCCCAGCA GGCAGAAGTA TGCAAAGCAT GGATGTCAAT TAGTCAGCAA GCAGGTGTGG
      TCAGGGGTCC GAGGGGTCGT CCGTCTTCAT ACGTTTCGTA CGTAGAGTTA ATCAGTCGTT GGTCCACACC
5111  AAAGTCCCCA GGCTCCCCAG CAGGCAGAAG TATGCAAAGC ATGCATGTCA ATTAGTCAGC AACGATAGTC
      TTTCAGGGGT CCGAGGGGTC GTCCGTCTTC ATACGTTTCG TACGTAGAGT TAATCAGTCG TTGGTATCAG
5181  CCGCCCCTAA CTCCGCCCAT CCCGCCCCTA ACTCCGCCCA GTTCCGCCCA TTCTCCGCCC CATGGCTGAC
      GGCGGGGATT GAGGCGGGTA GGGCGGGGAT TGAGGCGGGT CAAGGCGGGT AAGAGGCGGG GTACCGACTG
5251  TAATTTTTTT TATTTATGCA GAGGCCGAGG CCGCCTCGGC CTCTGAGCTA TTCCAGAAGT AGTGAGGAGG
      ATTAAAAAAA ATAAATACGT CTCCGGCTCC GGCGGAGCCG GAGACTCGAT AAGGTCTTCA TCACTCCTCC
5321  CTTTTTTGGA GGCCTAGGCT TTTGCAAAAA GCTAGCTTGG GGCCACCGCT CAGAGCACCT TCCACCATGG
      GAAAAAACCT CCGGATCCGA AAACGTTTTT CGATCGAACC CCGGTGGCGA GTCTCGTGGA AGGTGGTACC
5391  CCACCTCAGC AAGTTCCCAC TTGAACAAAA ACATCAAGCA AATGTACTTG TGCCTGCCCC AGGGTGAGAA
      GGTGGAGTCG TTCAAGGGTG AACTTGTTTT TGTAGTTCGT TTACATGAAC ACGGACGGGG TCCCACTCTT
5461  AGTCCAAGCC ATGTATATCT GGGTTGATGG TACTCGAGAA GGACTGCGCT GCAAAACCCG CACCCTGGAC
      TCAGGTTCGG TACATATAGA CCCAACTACC ATGACCTCTT CCTGACGCGA CGTTTTGGGC GTGGGACCTG
5531  TGTGAGCCCA AGTGTGTAGA AGAGTTACCT GAGTGGAATT TTGATGGCTC TAGTACCTTT CAGTCTGAGG
      ACACTCGGGT TCACACATCT TCTCAATGGA CTCAGCTTAA AACTACCGAG ATCATGGAAA GTCAGACTCC
5601  GCTCCAACAG TGACATGTAT CTCAGCCCTG TTGCCATGTT TCGGGACCCC TCCCGCAGAG ATCCCAACAA
      CGAGGTTGTC ACTGTACATA GAGTCGGGAC AACGGTACAA AGCCCTGGGG AAGGCGTCTC TAGGGTTGTT
5671  GCTGGTGTTC TGTGAAGTTT TCAAGTACAA CCGGAAGCCT GCAGAGACCA ATTTAAGGCA CTCGTGTAAA
      CGACCACAAG ACACTTCAAA AGTTCATGTT GGCGTTCGGA CGTCTCTGGT TAAATTCCGT GAGCACATTT
5741  CGGATAATGG ACATGGTGAG CAACCAGCAC CCCTGGTTTG GAATGGAACA GGAGTATACT CTGATGGGAA
      GCCTATTACC TGTACCACTC GTTGGTCGTG GGGACCAAAC CTTACCTTGT CCTCATATGA GACTACCCTT
5811  CAGATGGGCA CCCTTTTCGT TCGCCTTCCA ATGGCTTTCC TGGGCCCCAA GGTCCGTATT ACTGTCGTGT
      GTCTACCCGT GGGAAAACCA ACCGGAAGGT TACCGAAAGG ACCCGGGGTT CCAGGCATAA TGACACCACA
5881  GGGCGCAGAC AAAGCCTATG GCAGGGATAT CGTGGAGGCT CACTACCGCG CCTGCTTGTA TGCTGGGGTC
      CCCGCGTCTG TTTCGGATAC CGTCCCTATA GCACGTCCGA GTGATGGCGC GGACGAACAT ACGACCCCAG
5951  AAGATTACAG GAACAAATGC TGAGGTCATG CCTGCCCAGT GGGAACTCCA AATAGGACCC TGTGAAGGAA
      TTCTAATGTC CTTGTTTACG ACTCCAGTAC GGACGGGTCA GCCTTGAGGT TTATCCTGGG ACACTTCCTT
6021  TCCGCATGGG AGATCATCTC TGGGTGGCCC GTTTCATCTT GCATCGAGTA TGTGAAGACT TTGGGGTAAT
      AGGCGTACCC TCTAGTAGAG ACCCACCGGG CAAAGTAGAA CGTAGCTCAT ACACTTCTGA AACGCCATTA
6091  ACCAACCTTT GACCCCAAGC CCATTCCTGG GAACTGGAAT GGTGCAGGCT GCCATACCAA CTTTAGCACC
      TCGTTGGAAA CTGGGGTTCG GGTAAGCACC CTTGACCTTA CCACGTCCGA CGGTATGGTT GAAATCGTGG
6161  AAGGCCATGC GGGAGGAGAA TGGTCTGAAG CACATCGAGG AGGCCATCGA GAAACTAAGC AAGCGGGACC
      TTCCGGTACG CCCTCCTCTT ACCAGACTTC GTGTAGCTCC TCCGGTAGCT CTTTGATTCG TTCGCCGTGG
6231  GGTACCACAT TCGAGCCTAC GATCCCAAGG GGGCCTGGA CAATGCCCGT GGTCTGACTG GGTTCCACGA
      CCATGGTGTA AGCTCGGATG CTAGGGTTCC CCCCGGACCT GTTACGGGCA CCAGACTGAC CCAAGGTGCT
6301  AACGTCCAAC ATCAACGACT TTTCTGCTGG TGTCGCCAAT CGCAGTGCCA GCATCCGCAT TCCCCGGACT
      TTGCAGGTTG TAGTTGCTGA AAAGACGACC ACAGCGGTTA GCGTCACGGT CGTAGGCGTA AGGGCCCTGA
6371  GTCGGCCAGG AGAAGAAAGG TTAGTTTGAA GACCGCCGCC CCTCTGCCAA TTGTGACGCC TTTGCAGTGA
      CAGCCGGTCC TCTTCTTTCC AATGAAACTT CTGGCGCCGG GGAGACGGTT AACACTGGGG AAACGTCACT
6441  CAGAAGCCAT CGTCCGCACA TGCCTTCTCA ATGAGACTGG CGACGAGCCC TTCGAATACA AAAACTAATT
      GTCTTCGGTA GCAGGCGTGT ACGGAAGAGT TACTCTGACC GCTGCTCGGG AAGGTTATGT TTTTGATTAA
6511  AGACTTTGAG TGATCTTGAG CCTTTCGTAG TTCATCCCAC CCCGCCCCAG AGAGATCTTT GTGAAGGAAC
      TCTGAAACTC ACTAGAAGTC GGAAAGGATC AAGTAGGGTG GGGCGGGGTC TCTCTAGAAA CACTTCCTTG
6581  CTTACTTCTG TGGTGTGACA TAATTGGACA AACTACCTAC AGAGATTTAA AGCTCTAAGG TAAATATAAA
      GAATGAAGAC ACCACACTGT ATTAACCTGT TTGATGGATG TCTCTAAATT TCGAGATTCC ATTTATATTT
6651  ATTTTTAAGT GTATAATGTG TTAAACTACT GATTCTAATT GTTTGTGTAT TTTAGATTCC AACCTATGGA
      TAAAAATTCA CATATTACAC AATTTGATGA CTAAGATTAA CAAACACATA AAATCTAAGG TTGGATACCT
6721  ACTGATGAAT GGGAGCAGTG GTGGAATGCC TTTAATGAGG AAAACCTGTT TTGCTCAGAA GAAATGCCAT
      TGACTACTTA CCCTCGTCAC CACCTTACGG AAATTACTCC TTTTGGACAA AACGAGTCTT CTTTACGGTA
6791  CTAGTGATGA TGAGGCTACT GCTGACTCTC AACATTCTAC TCCTCCAAAA AAGAAGAGAA AGGTAGAAGA
      GATCACTACT ACTCCGATGA CGACTGAGAG TTGTAAGATG AGGAGGTTTT TTCTTCTCTT TCCATCTTCT
6861  CCCCAAGGAC TTTCCTTCAG AATTGCTAAG TTTTTTGAGT CATGCTGTGT TTAGTAATAG AACTCTTGCT
      GGGGTTCCTG AAAGGAAGTC TTAACGATTC AAAAAACTCA GTACGACACA AATCATTATC TTGAGAACGA
6931  TGCTTTGCTA TTTACACCAC AAAGGAAAAA GGTGCACTGC TATACAAGAA AATTATGGAA AAATATTCTG
      ACGAAACGAT AAATGTGGTG TTTCCTTTTT CGACGTGACG ATATGTTCTT TTAATACCTT TTTATAGAC
7001  TAACCTTTAT AAGTAGGCAT AACAGTTATA ATCATAACAT ACTGTTTTTT CTTACTCCAC ACAGCCATAG
      ATTGGAAATA TTCATCCGTA TTGTCAATAT TAGTATTGTA TGACAAAAAA GAATGAGGTG TGTCCGTATC
7071  AGTGTCTGCT ATTAATAACT ATCCTCAAAA ATTGTGTACC TTTAGCTTTT TAATTTGTAA AGGGGTTAAT
      TCACAGACGA TAATTATTGA TACGAGTTTT TAACACATGG AAATCGAAAA ATTAAACATT TCCCCAATTA
7141  AAGGAATATT TGATGTATAG TCCCTTGACT AGAGATCATA ATCAGCCATA CCACATTTGT AGAGGTTTTA
      TTCCTTATAA ACTACATATC ACGGAACTGA TCTCTAGTAT TAGTCGGTAT GGTGTAAACA TCTCCAAAAT
7211  CTTGCTTTAA AAAACCTCCC ACAGCTCCCC CTGAACCTGA AACATAAAAT GAATGCAATT GTTGTTGTTA
      GAACGAAATT TTTTGGAGGG TGTGGAGGGG GACTTGGACT TTGTATTTTA CTTACGTTAA GAACAACAAT
7281  ACTTGTTTAT TGCAGCTTAT AATGGTTACA AATAAAGCAA TAGCATCACA AATTTCACAA ATAAAGCATT
      TGAACAAATA ACGTCGAATA TTACCAATGT TTATTTCGTT ATCGTAGTGT TTAAAGTGTT TATTTCGTAA
7351  TTTTTCACTG CATTCTAGTT GTGGTTTGTC CAAACTCATC AATGTATCTT ATCATGTCTG GATCTAGCTT
      AAAAAGTGAC GTAAGATCAA CACCAAACAG GTTTGAGTAG TTACATAGAA TAGTACAGAC CTAGATCGAA
7421  CGTGTCAAGG ACGGTGAGTG CAGTGAATAA TAAAATGTGT GTTTGTCCGA AATACGCGTT TTGACATTTC
      GCACAGTTCC TGTCACTGAC GTCACTTATT ATTTTACACA CAAACAGGCT TTATGCGCAA AACTCTAAAG
7491  TGTCGCCGAC TAAATTCATG TCGCGCGATA GTGGTGTTTA TCGCCGATAG AGATGGCGAT ATTGGAAAAA
      ACAGCGGCTG ATTTAAGTAC AGCGCGCTAT CACCACAAAT AGCGGCTATC TCTACCGCTA TAACCTTTTT
7561  TCGATATTTG AAAATATGGC ATATTGAAAA TGTCGCGCGAT GTGAGTTTCT GTGTAACTGA TATCGCCAAT
      AGCTATAAAC TTTTATACCG TATAACTTTT ACAGCGGCTA CACTCAAAGA CACATTGACT ATAGCGGTAA
```

[0012]

7631 TTTCCAAAAG TGATTTTTGG GCATACGCGA TATCTGGCGA TAGCGCTTAT ATCGTTTACG GGGGATGGCG
AAAGGTTTTC ACTAAAAACC CGTATGCGCT ATAGACCGCT ATCGCGAATA TAGCAAATGC CCCCTACCGC
7701 ATAGACGACT TTGGTGACTT GGGCGATTCT GTGTGTCGCA AATATCGCAG TTTCGATATA GGTGACAGAC
TATCTGCTGA AACCACTGAA CCCGCTAAGA CACACAGCGT TTATAGCGTC AAAGCTATAT CCACTGTCTG
7771 GATATGAGGC TATATCGCCG ATAGAGGCGA CATCAAGCTG GCACATGGCC AATGCATATC GATCTATACA
CTATACTCCG ATATAGCGGC TATCTCCGCT GTAGTTCGAC CGTGTACCGG TTACGTATAG CTAGATATGT
7841 TTGAATCAAT ATTGGCCATT AGCCATATTA TTCATTGGTT ATATAGCATA AATCAATATT GGCTATTGGC
AACTTAGTTA TAACCGGTAA TCGGTATAAT AAGTAACCAA TATATCGTAT TTAGTTATAA CCGATAACCG
7911 CATTGCATAC GTTGTATCCA TATCATAATA TGTACATTTA TATTGGCTCA TGTCCAACAT TACCGCCATG
GTAACGTATG CAACATAGGT ATAGTATTAT ACATGTAAAT ATAACCGAGT ACAGGTTGTA ATGGCGGTAC
7981 TTGACATTGA TTATTGACTA GTTATTAATA GTAATCAATT ACGGGGTCAT TAGTTCATAG CCCATATATG
AACTGTAACT AATAACTGAT CAATAATTAT CATTAGTTAA TGCCCCAGTA ATCAAGTATC GGGTATATAC
8051 GAGTTCCGCG TTACATAACT TACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCTGACCGCC CAACGACCCC CGCCCATTGA
CTCAAGGCGC AATGTATTGA ATGCCATTTA CCGGGCGGAC CGACTGGCGG GTTGCTGGGG GCGGGTAACT
8121 CGTCAATAAT GACGTATGTT CCCATAGTAA CGCCAATAGG GACTTTCCAT TGACGTCAAT GGGTGGAGTA
GCAGTTATTA CTGCATACAA GGGTATCATT GCGGTTATCC CTGAAAGGTA ACTGCAGTTA CCCACCTCAT
8191 TTTACGGTAA ACTGCCCACT TGGCAGTACA TCAAGTGTAT CATATGCCAA GTACGCCCCC TATTGACGTC
AAATGCCATT TGACGGGTGA ACCGTCATGT AGTTCACATA GTATACGGTT CATGCGGGGG ATAACTGCAG
8261 AATGACGGTA AATGGCCCGC CTGGCATTAT GCCCAGTACA TGACCTTATG GGACTTTCCT ACTTGGCAGT
TTACTGCCAT TTACCGGGCG GACCGTAATA CGGGTCATGT ACTGGAATAC CCTGAAAGGA TGAACCGTCA
8331 ACATCTACGT ATTAGTCATC GCTATTACCA TGGTGATGCG GTTTTGGCAG TACATCAATG GGCGTGGATA
TGTAGATGCA TAATCAGTAG CGATAATGGT ACCACTACGC CAAAACCGTC ATGTAGTTAC CCGCACCTAT
8401 GCGGTTTGAC TCACGGGGAT TTCCAAGTCT CCACCCCATT GACGTCAATG GGAGTTTGTT TTGGCACCAA
CGCCAAACTG AGTGCCCCTA AAGGTTCAGA GGTGGGGTAA CTGCAGTTAC CCTCAAACAA AACCGTGGTT
8471 AATCAACGGG ACTTTCCAAA ATGTCGTAAC AACTCCGCCC CATTGACGCA AATGGGCGGT AGGCGTGTAC
TTAGTTGCCC TGAAAGGTTT TACAGCATTG TTGAGGCGGG GTAACTGCGT TTACCCGCCA TCCGCACATG
8541 GGTGGGAGGT CTATATAAGC AGAGCTCGTT TAGTGAACCG TCAGATCGCC TGGAGACGCC ATCCACGCTG
CCACCCTCCA GATATATTCG TCTCGAGCAA ATCACTTGGC AGTCTAGCGG ACCTCTGCGG TAGGTGCGAC
8611 TTTTGACCTC CATAGAAGAC ACCGGGACCG ATCCAGCCTC CGCGGCCGGG AACGGTGCAT TGGAACGCGG
AAAACTGGAG GTATCTTCTG TGGCCCTGGC TAGGTCGGAG GCGCCGGCCC TTGCCACGTA ACCTTGCGCC
8681 ATTCCCCGTG CCAAGAGTGA CGTAAGTACC GCCTATAGAG TCTATAGGCC CACCCCCTTG GCTTCTTATG
TAAGGGGCAC GGTTCTCACT GCATTCATGG CGGATATCTC AGATATCCGG GTGGGGGAAC CGAAGAATAC
8751 CATGCTATAC TGTTTTTGGC TTGGGGTCTA TACACCCCCG CTTCCTCATG TTATAGGTGA TGGTATAGCT
GTACGATATG ACAAAAACCG AACCCCAGAT ATGTGGGGGC GAAGGAGTAC AATATCCACT ACCATATCGA
8821 TAGCCTATAG GTGTGGGTTA TTGACCATTA TTGACCACTC CCCTATTGGT GACGATACTT TCCATTACTA
ATCGGATATC CACACCCAAT AACTGGTAAT AACTGGTGAG GGGATAACCA CTGCTATGAA AGGTAATGAT
8891 ATCCATAACA TGGCTCTTTG CCACAACTCT CTTTATTGGC TATATGCCAA TACACTGTCC TTCAGAGACT
TAGGTATTGT ACCGAGAAAC GGTGTTGAGA GAAATAACCG ATATACGGTT ATGTGACAGG AAGTCTCTGA
8961 GACACGGACT CTGTATTTTT ACAGGATGGG GTCTCATTTA TTATTTACAA ATTCACATAT ACAACACCAC
CTGTGCCTGA GACATAAAAA TGTCCTACCC CAGAGTAAAT AATAAATGTT TAAGTGTATA TGTTGTGGTG
9031 CGTCCCCAGT GCCCGCAGTT TTTATTAAAC ATAACGTGGG ATCTCCACGC GAATCTCGGG TACGTGTTCC
GCAGGGGTCA CGGGCGTCAA AAATAATTTG TATTGCACCC TAGAGGTGCG CTTAGAGCCC ATGCACAAGG
9101 GGACATGGGC TCTTCTCCGG TAGCGGCGGA GCTTCTACAT CCGAGCCCTG CTCCCATGCC TCCAGCGACT
CCTGTACCCG AGAAGAGGCC ATCGCCGCCT CGAAGATGTA GGCTCGGGAC GAGGGTACGG AGGTCGCTGA
9171 CATGGTCGCT CGGCAGCTCC TTGCTCCTAA CAGTGGAGGC CAGACTTAGG CACAGCACGA TGCCCACCAC
GTACCAGCGA GCCGTCGAGG AACGAGGATT GTCACCTCCG GTCTGAATCC GTGTCGTGCT ACGGGTGGTG
9241 CACCAGTGTG CCGCACAAGG CCGTGGCGGT AGGGTATGTG TCTGAAAATG AGCTCGGGGA GCGGGCTTGC
GTGGTCACAC GGCGTGTTCC GGCACCGCCA TCCCATACAC AGACTTTTAC TCGAGCCCCT CGCCCGAACG
9311 ACCGCTGACG CATTTGGAAG ACTTAAGGCA GCGGCAGAAG AAGATGCAGG CAGCTGAGTT GTTGTGTTCT
TGGCGACTGC GTAAACCTTC TGAATTCCGT CGCCGTCTTC TTCTACGTCC GTCGACTCAA CAACACAAGA
9381 GATAAGAGTC AGAGGTAACT CCCGTTGCGG TGCTGTTAAC GGTGGAGGGC AGTGTAGTCT GAGCAGTACT
CTATTCTCAG TCTCCATTGA GGGCAACGCC ACGACAATTG CCACCTCCCG TCACATCAGA CTCGTCATGA
9451 CGTTGCTGCC GCGCGCGCCA CCAGACATAA TAGCTGACAG ACTAACAGAC TGTTCCTTTC CATGGGTCTT
GCAACGACGG CGCGCGCGGT GGTCTGTATT ATCGACTGTC TGATTGTCTG ACAAGGAAAG GTACCCAGAA
9521 TTCTGCAGTC ACCGTCCTTG ACACGA
AAGACGTCAG TGGCAGGAAC TGTGCT

打印ID?584222 Pg 201



图 1

打印ID7584222 Pg 202

3G4-2BVH原始序列

```
                                        M  G  W  T  W  I  F  I  L  I  L  S  V
121                                     ATG GGA TGG ACC TGG ATC TTT ATT TTA ATC CTG TCA GTA
                                        TAC CCT ACC TGG ACC TAG AAA TAA AAT TAG GAC AGT CAT
                                           PvuII
                                           ~~~~~~~~
        T  T  G  V  H  S  E  V  Q  L  Q  Q  S  G  P  E  L  E  K  P
181     ACT ACA GGT GTC CAC TCT GAG GTC CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GAG AAG CCT
        TGA TGT CCA CAG GTG AGA CTC CAG GTC GAC GTC GTC AGA CCT GGA CTC GAC CTC TTC GGA
        G  A  S  V  K  L  S  C  K  A  S  G  Y  S  F  T  G  Y  N  M
241     GGC GCT TCA GTG AAG CTA TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC TCA TTC ACT GGC TAC AAC ATG
        CCG CGA AGT CAC TTC GAT AGG ACG TTC CGA AGA CCA ATG AGT AAG TGA CCG ATG TTG TAC
        N  W  V  K  Q  S  H  G  K  S  L  E  W  I  G  H  I  D  P  Y
301     AAC TGG GTG AAA CAG AGC CAT GGA AAG AGC CTT GAA TGG ATT GGA CAT ATT GAT CCT TAC
        TTG ACC CAC TTT GTC TCG GTA CCT TTC TCG GAA CTT ACC TAA CCT GTA TAA CTA GGA ATG
        Y  G  D  T  S  Y  N  Q  K  F  R  G  K  A  T  L  T  V  D  K
361     TAT GGT GAT ACT TCC TAC AAC CAG AAG TTC AGG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAA
        ATA CCA CTA TGA AGG ATG TTG GTC TTC AAG TCC CCG TTC CGG TGT AAC TGA CAT CTG TTT
        S  S  S  T  A  Y  M  Q  L  K  S  L  T  S  E  D  S  A  V  Y
421     TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AAG AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT
        AGG AGG TCG TGT CGG ATG TAC GTC GAG TTC TCG GAC TGT AGA CTC CTG AGA CGT CAG ATA
        Y  C  V  K  G  G  Y  Y  G  H  W  Y  F  D  V  W  G  A  G  T
481     TAC TGT GTA AAG GGG GGT TAC TAC GGG CAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACC
        ATG ACA CAT TTC CCC CCA ATG ATG CCC GTG ACC ATG AAG CTA CAG ACC CCG CGT CCC TGG
          BstEII
          ~~~~~~~~~~
        T  V  T  V  S  S  A  T  T  T  A  P  S  V  Y  P  L  V  P
541     ACG GTC ACC GTC TCC TCA GCT ACA ACA ACA GCC CCA TCT GTC TAT CCC TTG GTC CCG GGC
        TGC CAG TGG CAG AGG AGT CGA TGT TGT TGT CGG GGT AGA CAG ATA GGG AAC CAG GGC CCG
        BamHI                   EcoRI                                   XhoI
        ~~~~~~~~                ~~~~~~~~                                ~~~~~~~~
601     GGA TCC CCC GGG CTG CAG GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC CTC GAG GGG
        CCT AGG GGG CCC GAC GTC CTT AAG CTA TAG TTC GAA TAG CTA TGG CAG CTG GAG CTC CCC
```

克隆RACE产物3G4-2BVH,并在BstEII位点处接枝到人γ1恒定区上。因此，其包含小鼠前导序列,并且其的VH以下列方式与人CH1序列相连接：前导序列/3G4VH/VSS-AST...

```
        小鼠前导序列          ↓成熟的蛋白质
  1  MGWTWIFILI LSVTTGVHSE VQLQQSGPEL EKPGASVKLS CKASGYSFTG
 51  YNMNWVKQSH GKSLEWIGHI DPYYGDTSYN QKFRGKATLT VDKSSSTAYM
                                          ↓BstEII接枝位点
101  QLKSLTSEDS AVYYCVKGGY YGHWYFDVWG AGTTVTVSS ASTKGPSVFPL
151  APSSKSTSG                                  ↑人γ1CH1
```

图 2A

3G4-2BVL原始序列

```
                                                                  M   D   M   R   A
61                                                                ATG GAC ATG AGG GCT
                                                                  TAC CTG TAC TCC CGA
        P   A   Q   I   L   G   F   L   L   L   L   F   P   G   T   R   C   D   I   Q
121     CCT GCA CAG ATT TTG GGC TTC TTG TTG CTC TTG TTT CCA GGT ACC AGA TGT GAC ATC CAG
        GGA CGT GTC TAA AAC CCG AAG AAC AAC GAG AAC AAA GGT CCA TGG TCT ACA CTG TAG GTC
        M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   L   G   E   R   V   S   L   T   C
181     ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC TTA TCT GCC TCT CTG GGA GAA AGA GTC AGT CTC ACT TGT
        TAC TGG GTC AGA GGT AGG AGG AAT AGA CGG AGA GAC CCT CTT TCT CAG TCA GAG TGA ACA
        R   A   S   Q   D   I   G   S   S   L   N   W   L   Q   Q   G   P   D   G   T
241     CGG GCA AGT CAG GAC ATT GGT AGT AGC TTA AAC TGG CTT CAG CAG GGA CCA GAT GGA ACT
        GCC CGT TCA GTC CTG TAA CCA TCA TCG AAT TTG ACC GAA GTC GTC CCT GGT CTA CCT TGA
        I   K   R   L   I   Y   A   T   S   S   L   D   S   G   V   P   K   R   F   S
301     ATT AAA CGC CTG ATC TAC GCC ACA TCC AGT TTA GAT TCT GGT GTC CCC AAA AGG TTC AGT
        TAA TTT GCG GAC TAG ATG CGG TGT AGG TCA AAT CTA AGA CCA CAG GGG TTT TCC AAG TCA
        G   S   R   S   G   S   D   Y   S   L   T   I   S   S   L   E   S   E   D   F
361     GGC AGT AGG TCT GGG TCA GAT TAT TCT CTC ACC ATC AGC AGC CTT GAG TCT GAA GAT TTT
        CCG TCA TCC AGA CCC AGT CTA ATA AGA GAG TGG TAG TCG TCG GAA CTC AGA CTT CTA AAA
        V   D   Y   Y   C   L   Q   Y   V   S   S   P   P   T   F   G   A   G   T   K
421     GTA GAC TAT TAC TGT CTA CAA TAT GTT AGT TCT CCT CCC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG
        CAT CTG ATA ATG ACA GAT GTT ATA CAA TCA AGA GGA GGG TGC AAG CCA CGA CCC TGG TTC
                                                  BbsI                BamHI
                                                  ~~~~~~~             ~~~~~~~~
        L   E   L   K   R   A   D   A   A   P   T   V   F   I   F   G   R   I   P
481     CTG GAG CTG AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTC TTC ATC TTC GGG CGG ATC CCC CGG
        GAC CTC GAC TTT GCC CGA CTA CGA CGT GGT TGA CAG AAG TAG AAG CCC GCC TAG GGG GCC
```

将RACE产物3G4-2BVL在BbsI位点处接枝至人κ恒定区。因此，其包含小鼠前导序列，并且其的VL以下列方式与人CL1序列相连接：前导序列/3G4-VL/TVF-IFP...

小鼠前导序列 ↓成熟的蛋白质

```
  1  MDMRAPAQIL GFLLLLFPGT RCDIQMTQSP SSLSASLGER VSLTCRASQD
 51  IGSSLNWLQQ GPDGTIKRLI YATSSLDSGV PKRFSGSRSG SDYSLTISSL
                                      FR4↓        ↓BbsI接枝位点
101  ESEDFVDYYC LQYVSSPPTF GAGTKLELKR ADAAPTVF IFPPSDEQLKSGTAS
                                      ↑人κ恒定区
```

图 2B

打印ID7584222 Pg 204

3G4 IgG2a 重链 (SEQ ID NO:10)

```
        /-------前导序列-----\/-------------------------------------------------------
  1     MGWTWIFILI LSVTTGVHSE VQLQQSGPEL EKPGASVKLS CKASGYSFTG YNMNWVKQSH GKSLEWIGHI

        --------------------3G4 VH-------------------------------------------------\/
 71     DPYYGDTSYN QKFRGKATLT VDKSSSTAYM QLKSLTSEDS AVYYCVKGGY YGHWYFDVWG AGTTVTVSSA

        ------------------------------------ 小鼠IgG2a CH1结构域 ------------------
141     KTTAPSVYPL APVCGDTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT

        --------------------------\/---- 铰链 -------\/-------------------------------
211     SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKEPRGP TIKPCPPCKC PAPNLLGGPS VFIFPPKIKD VLMISLSPIV

        --------------------------------- 小鼠IgG2a CH2结构域 ----------------------
281     TCVVVDVSED DPDVQISWFV NNVEVHTAQT QTHREDYNST LRVVSALPIQ HQDWMSGKEF KCKVNNKDLP

        -----------\/--------------------- 小鼠IgG2a CH3结构域 ---------------------
351     APIERTISKP KGSVRAPQVY VLPPPEEEMT KKQVTLTCMV TDFMPEDIYV EWTNNGKTEL NYKNTEPVLD

        ---------------------------------------------------\
421     SDGSYFMYSK LRVEKKNWVE RNSYSCSVVH EGLHNHHTTK SFSRTPGK
```

图 2C

3G4轻链 (C_K) (SEQ ID NO:11)

```
        /------前导序列----------\/-------------------------------------------------
  1     MDMRAPAQIL GFLLLLFPGT RCDIQMTQSP SSLSASLGER VSLTCRASQD IGSSLNWLQQ GPDGTIKRLI

        ---------3G4 VL-------------------------------------------------\/-----------
 71     YATSSLDSGV PKRFSGSRSG SDYSLTISSL ESEDFVDYYC LQYVSSPPTF GAGTKLELKR ADAAPTVSIF

        ------------------------------ 小鼠C-kappa-----------------------------------
141     PPSSEQLTSG GASVVCFLNN FYPKDINVKW KIDGSERQNG VLNSWTDQDS KDSTYSMSST LTLTKDEYER

        ---------------------------\
211     HNSYTCEATH KTSTSPIVKS FNRNEC
```

图 2D

打印ID7584222 Pg 205

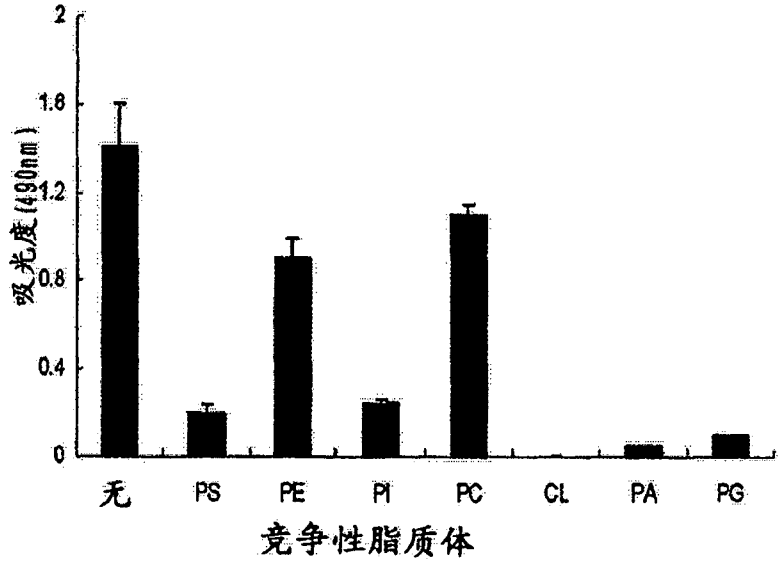

图 3

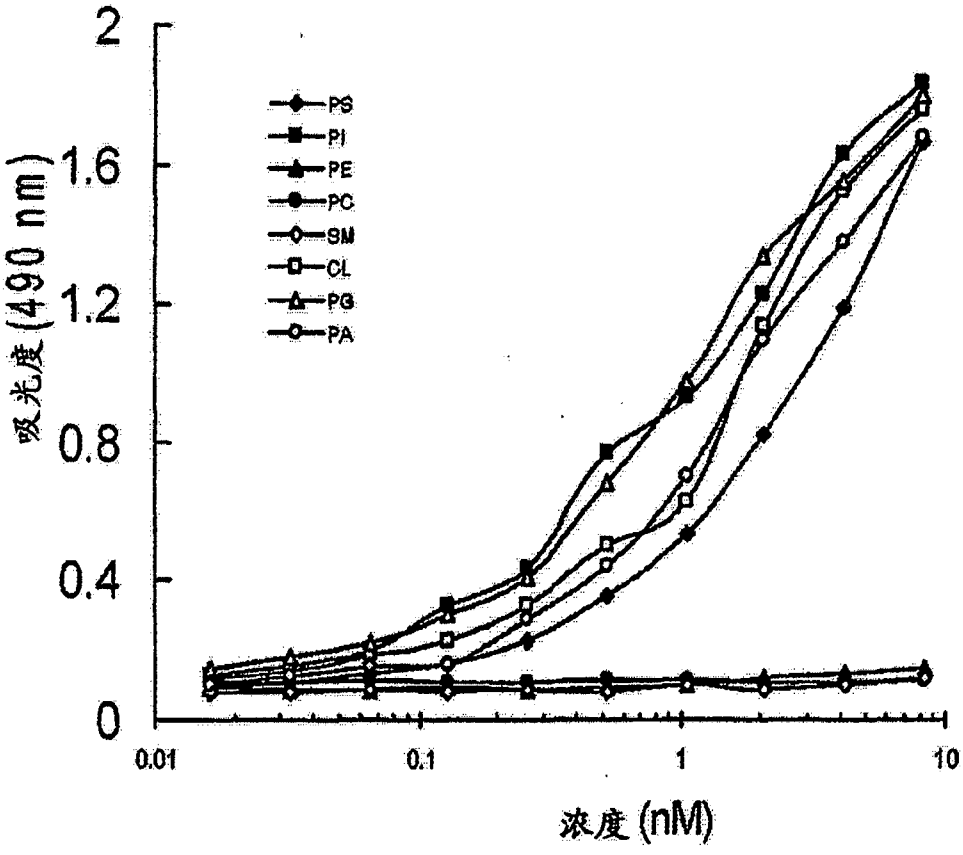

图 4

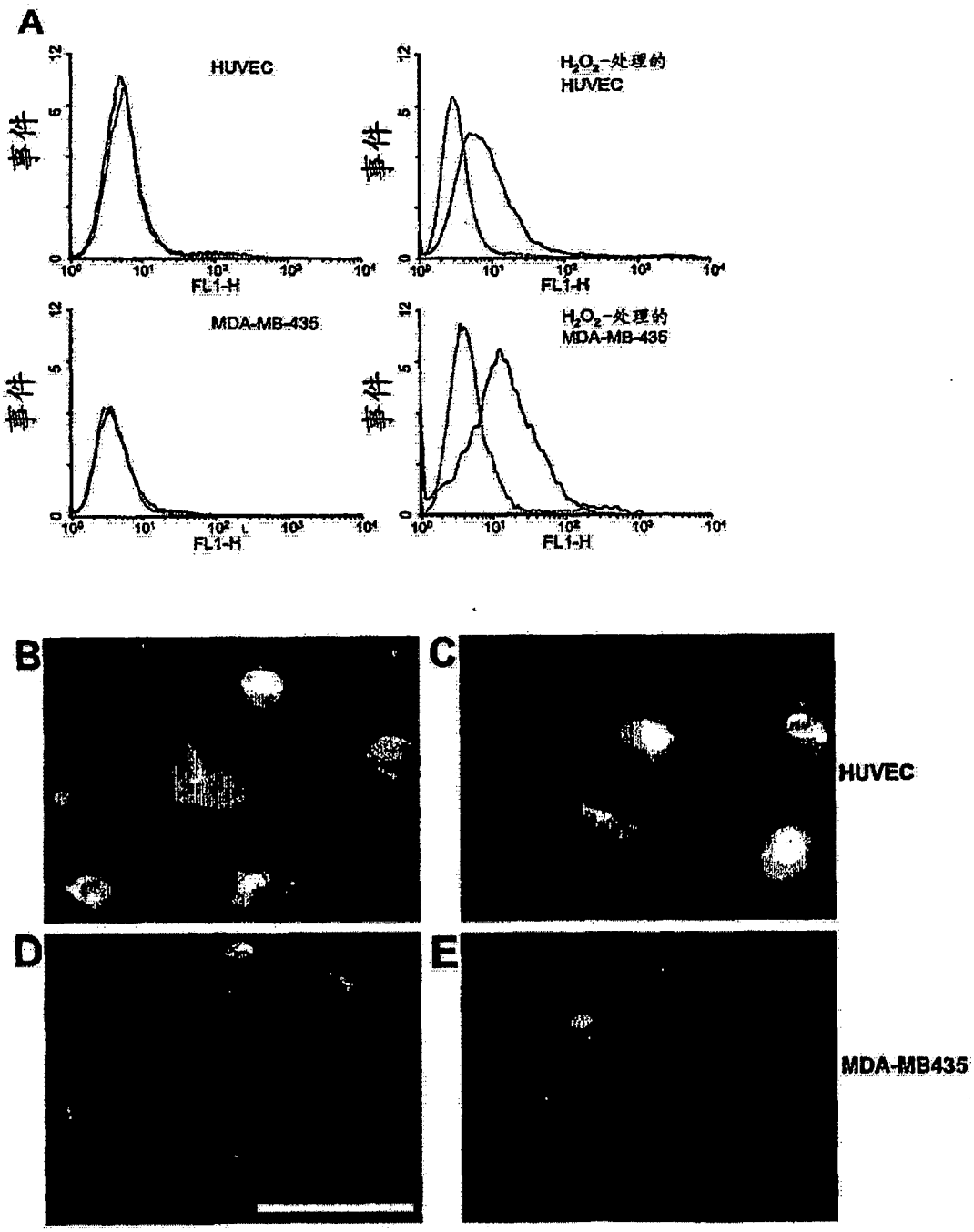
A
HUVEC
H_2O_2-处理的 HUVEC
MDA-MB-435
H_2O_2-处理的 MDA-MB-435
事件
FL1-H
B
C
D
E
HUVEC
MDA-MB435

图 5

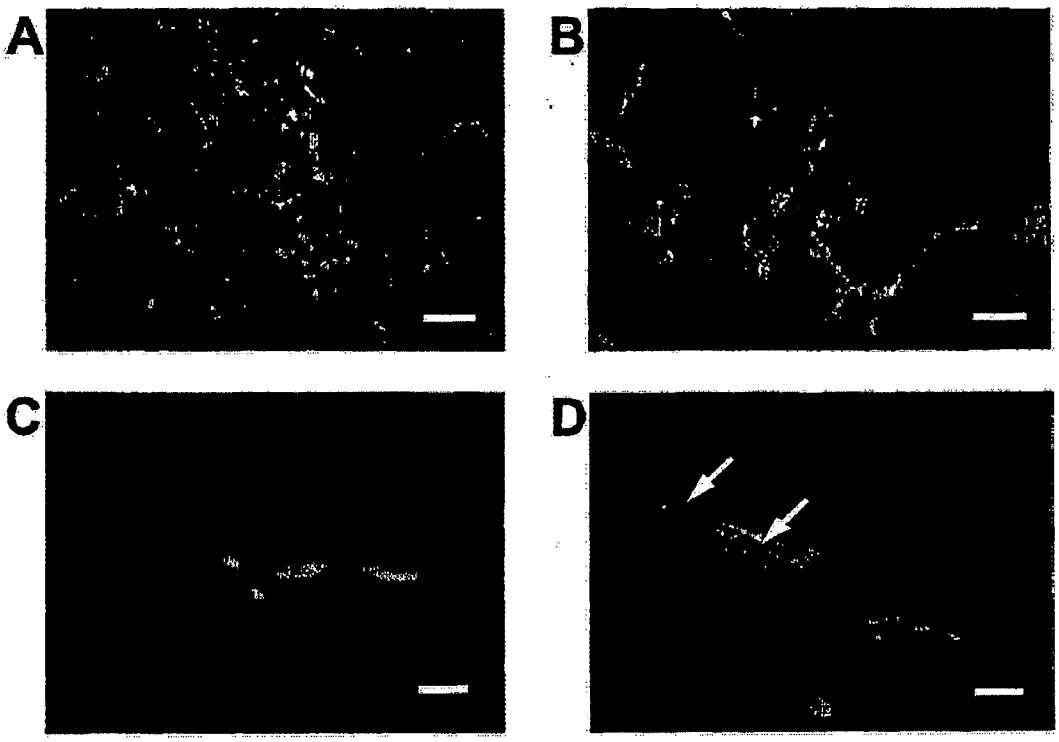

图 6

打印ID7584222 Pg 208

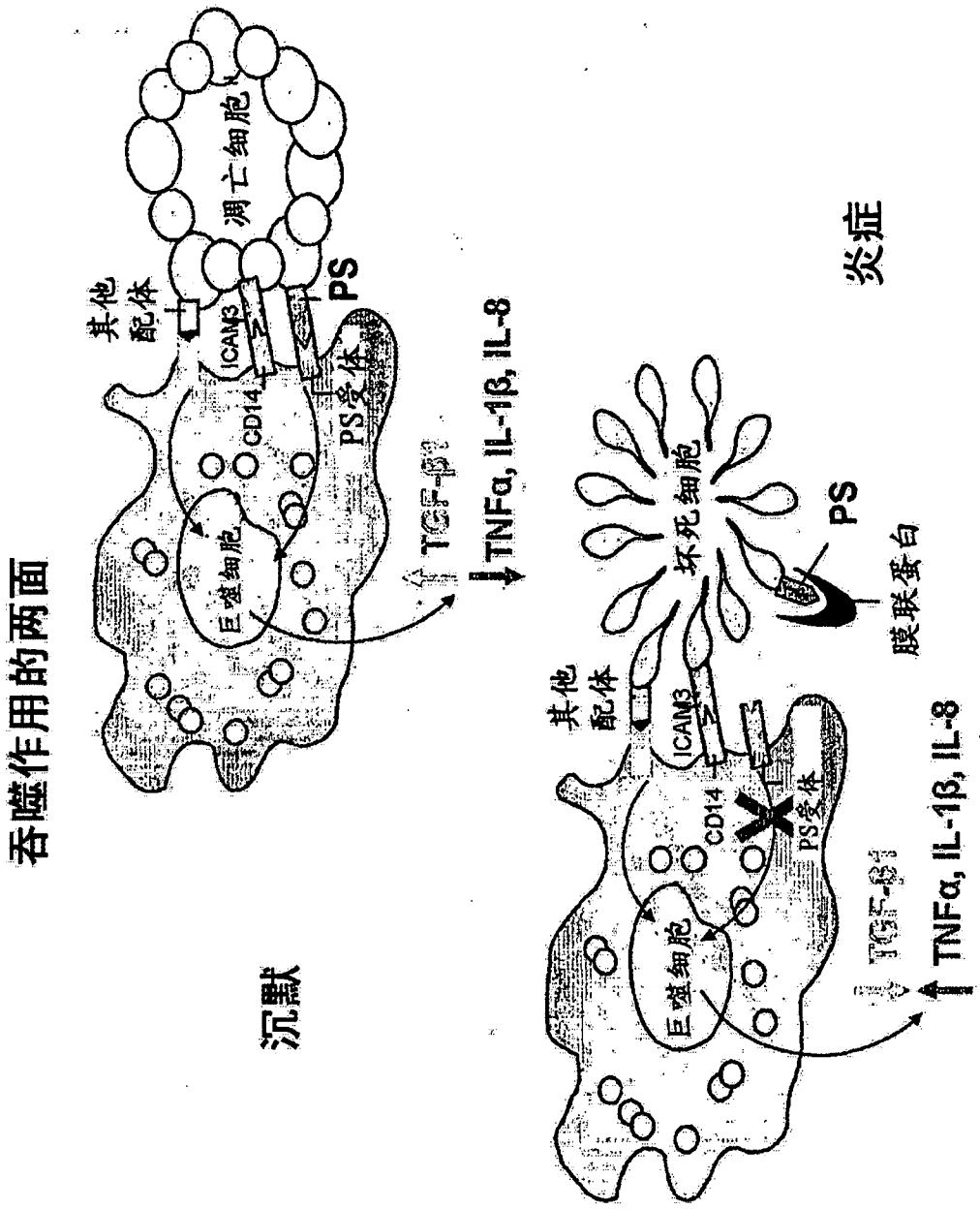

图 7

打印ID7584222 Pg 209

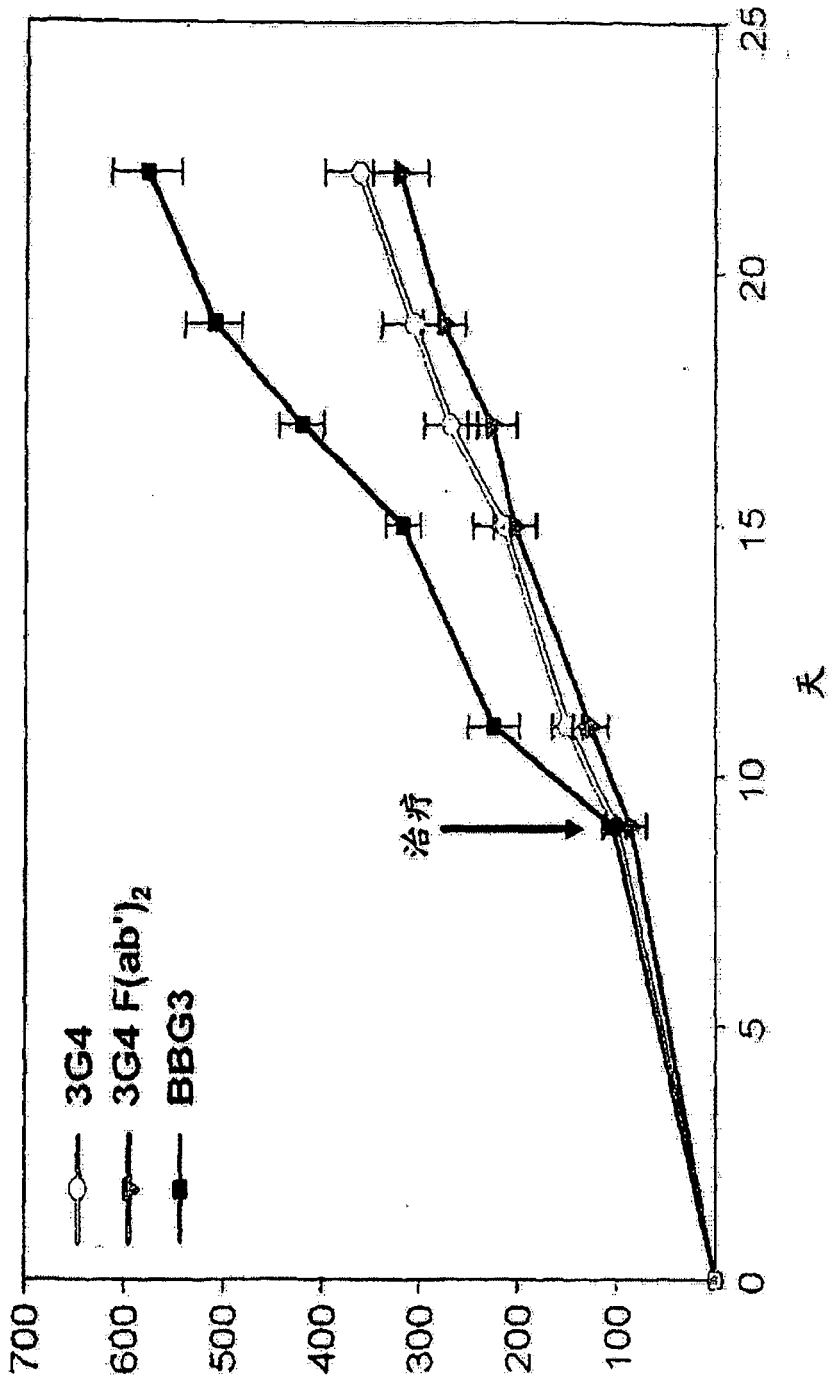

图 8

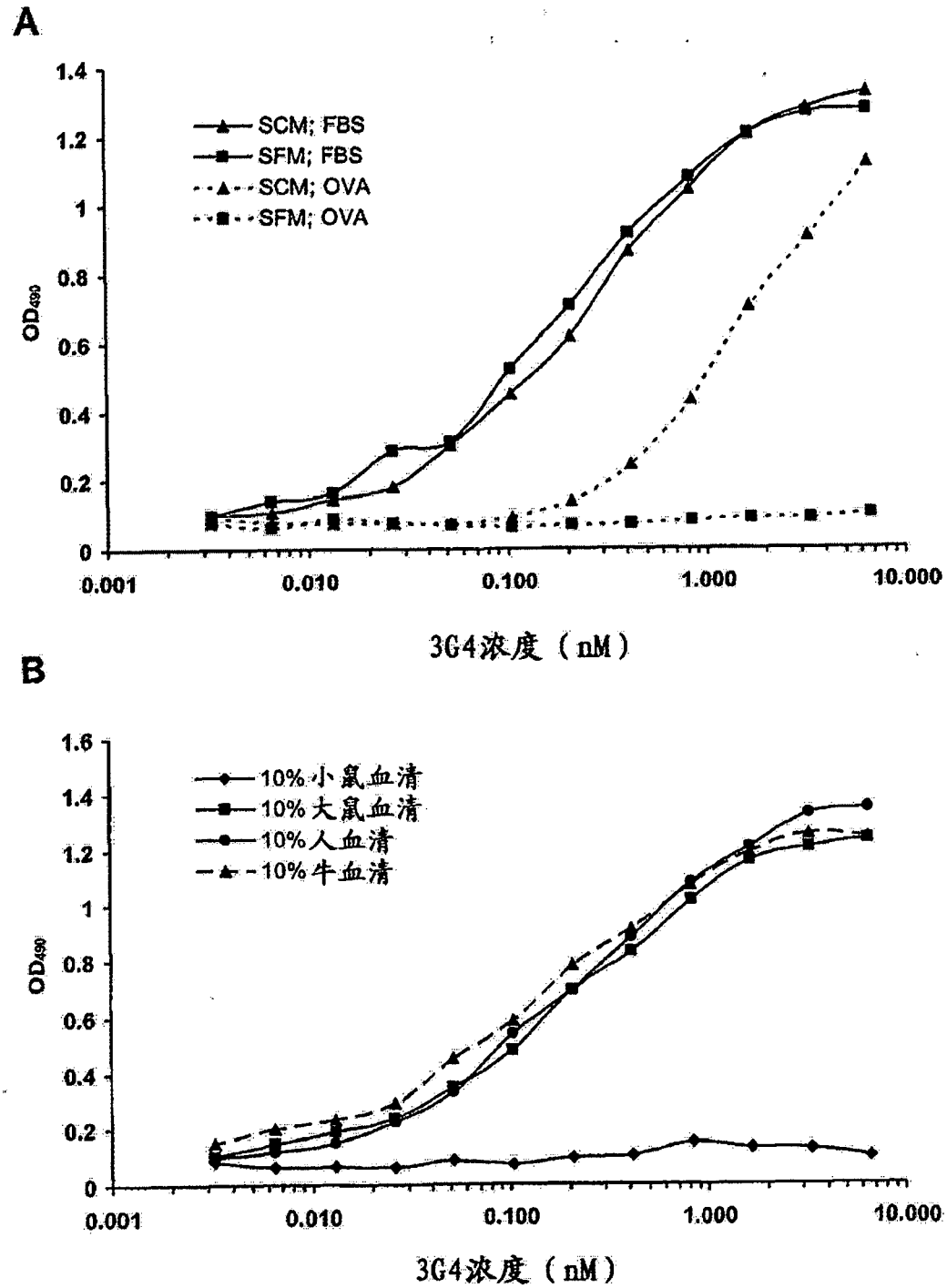
A
SCM; FBS
SFM; FBS
SCM; OVA
SFM; OVA
OD490
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.001
0.010
0.100
1.000
10.000
3G4浓度（nM）
B
10%小鼠血清
10%大鼠血清
10%人血清
10%牛血清
OD490
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.001
0.010
0.100
1.000
10.000
3G4浓度（nM）

图 9

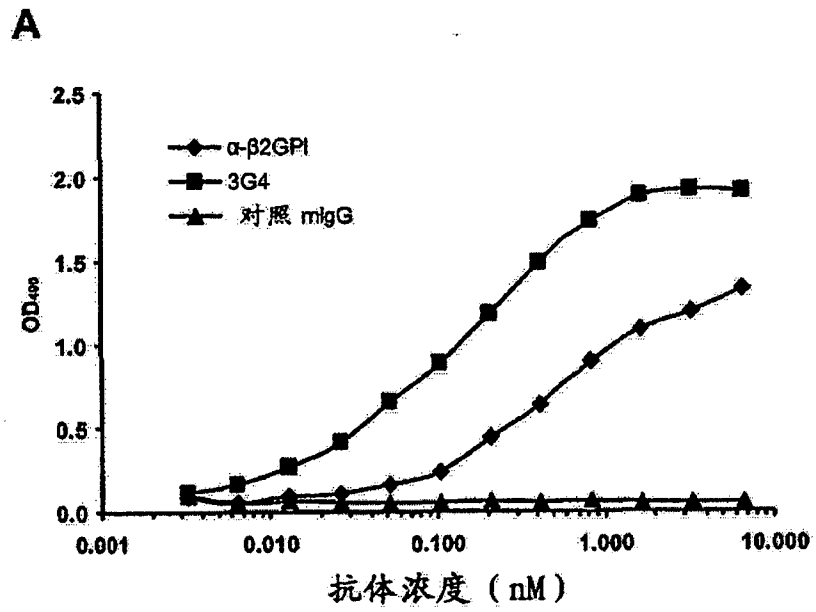
A
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OD490
α-β2GPI
3G4
对照 mIgG
0.001
0.010
0.100
1.000
10.000
抗体浓度（nM）

图 10A

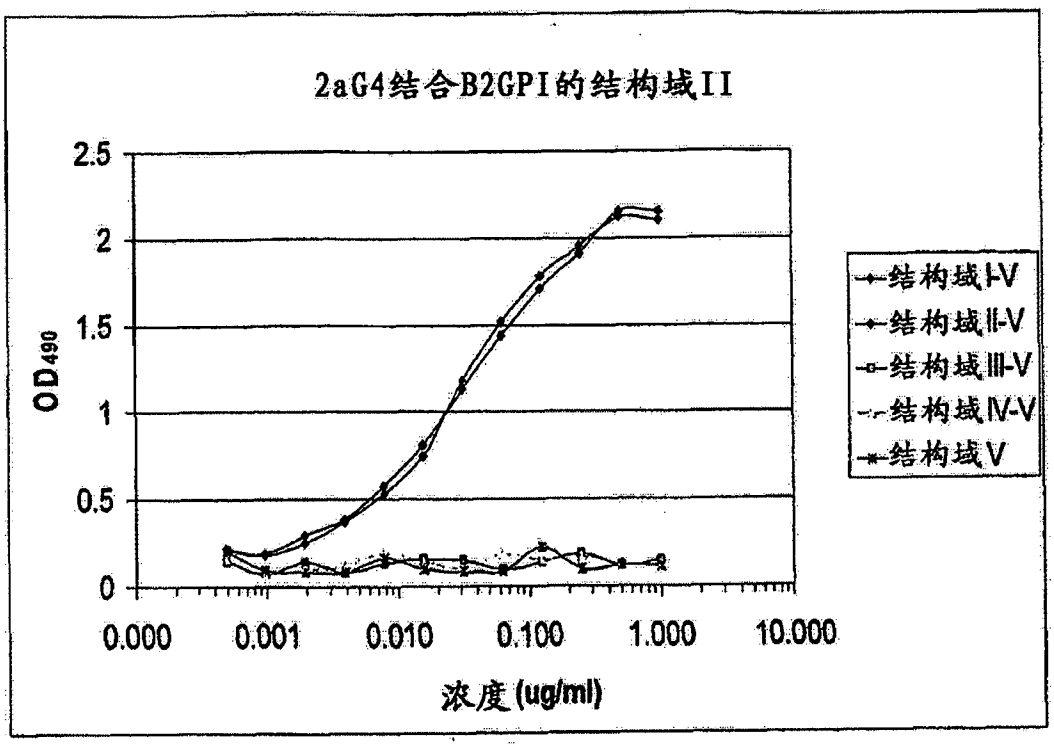
2aG4结合B2GPI的结构域II
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OD490
0.000
0.001
0.010
0.100
1.000
10.000
浓度(ug/ml)
结构域I-V
结构域II-V
结构域III-V
结构域IV-V
结构域V

图 10B

打印ID7584222 Pg 212

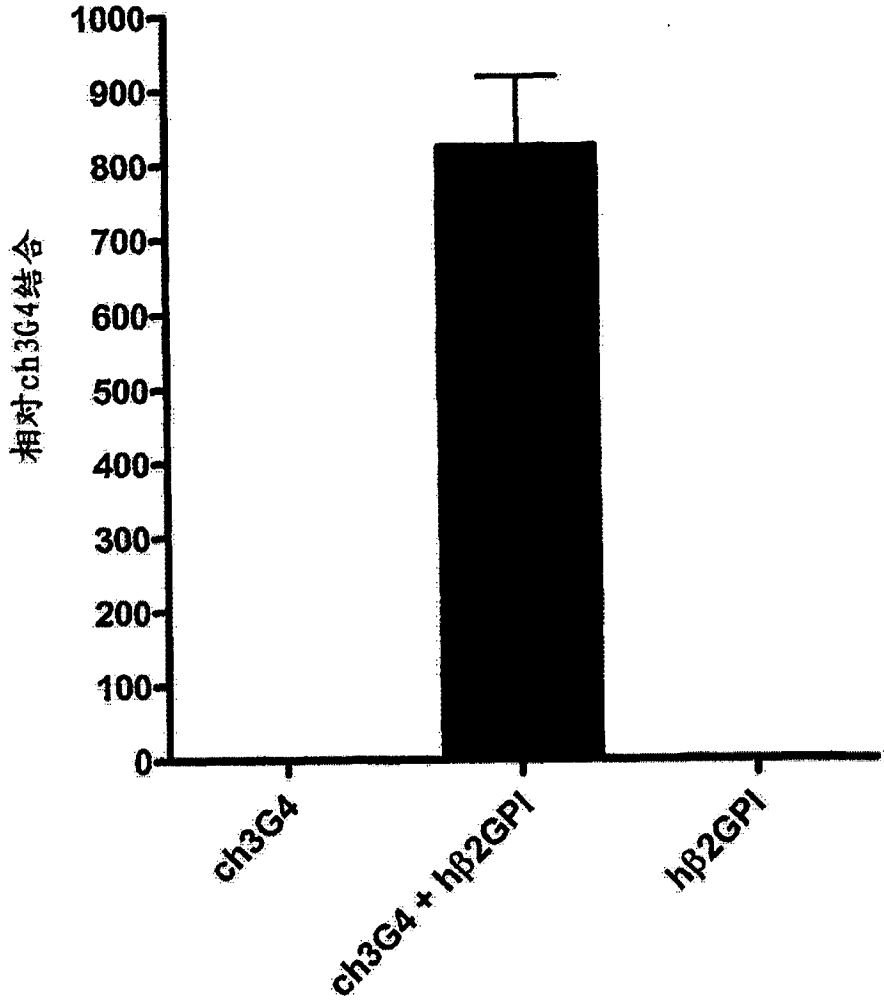

图 11

打印ID7584222 Pg 213

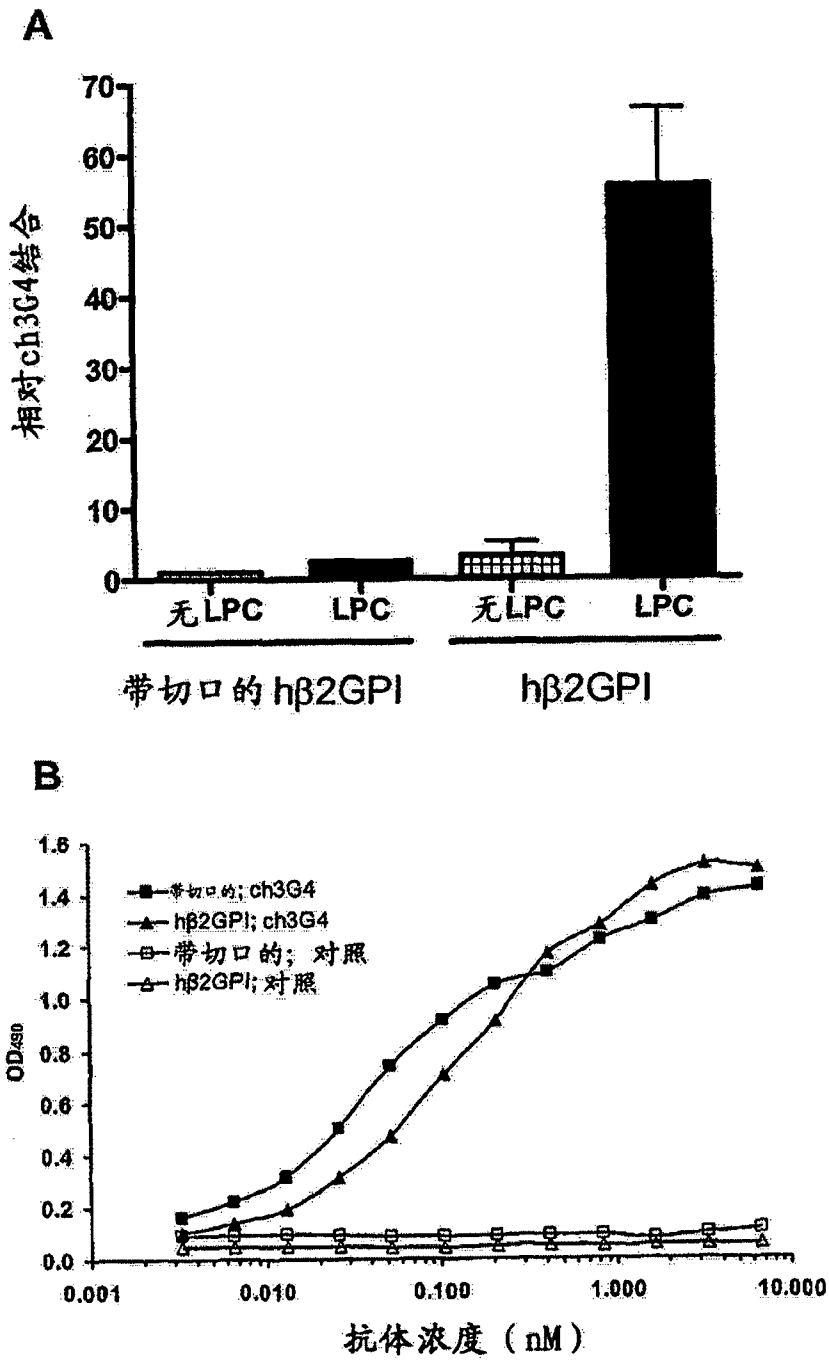

图 12

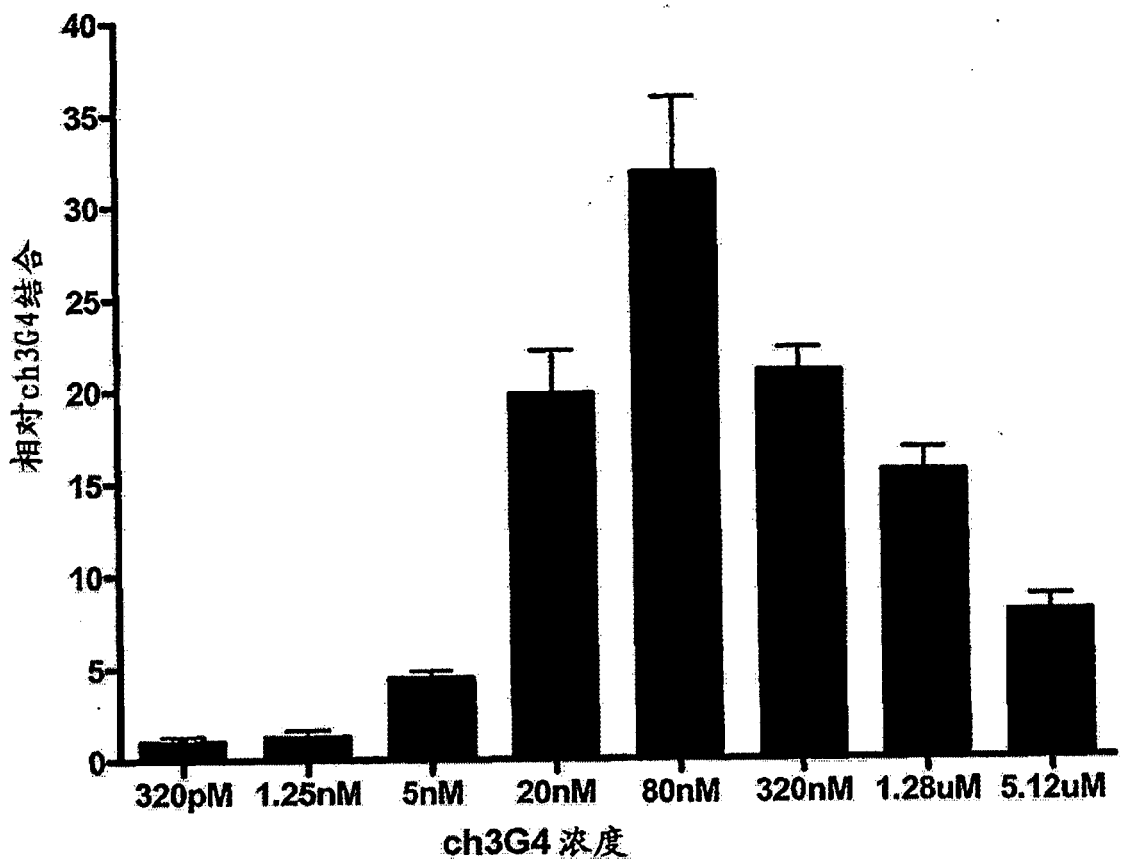
40
35
30
25
20
15
10
5
0
相对ch3G4结合
320pM
1.25nM
5nM
20nM
80nM
320nM
1.28uM
5.12uM
ch3G4 浓度

图 13

打印ID7584222 Pg 215

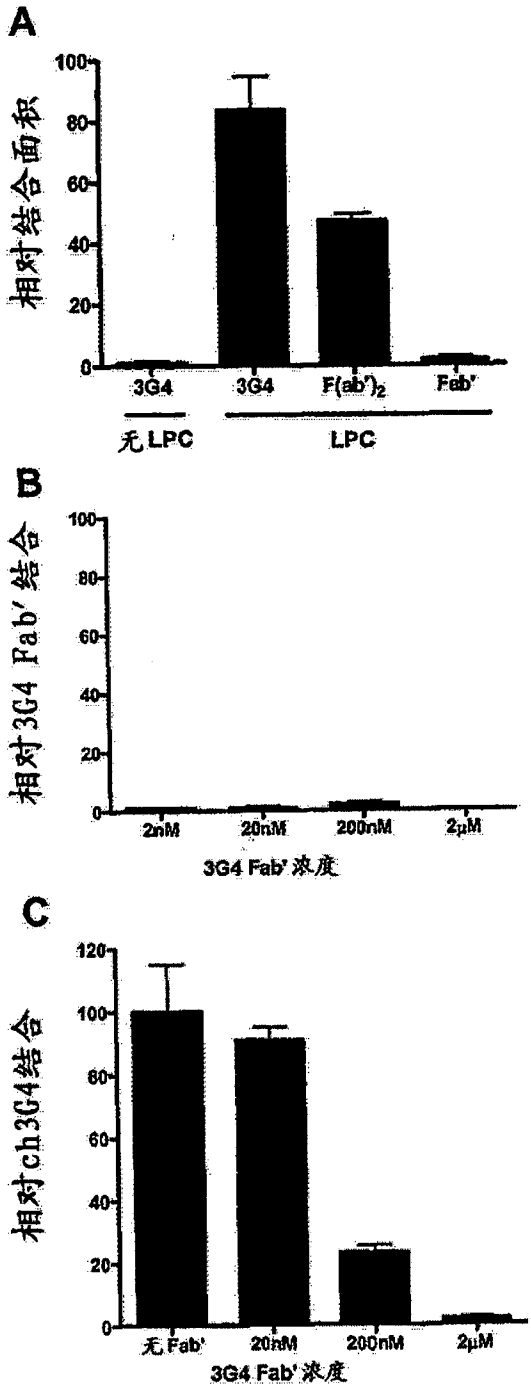

图 14

打印ID7584222 Pg 216

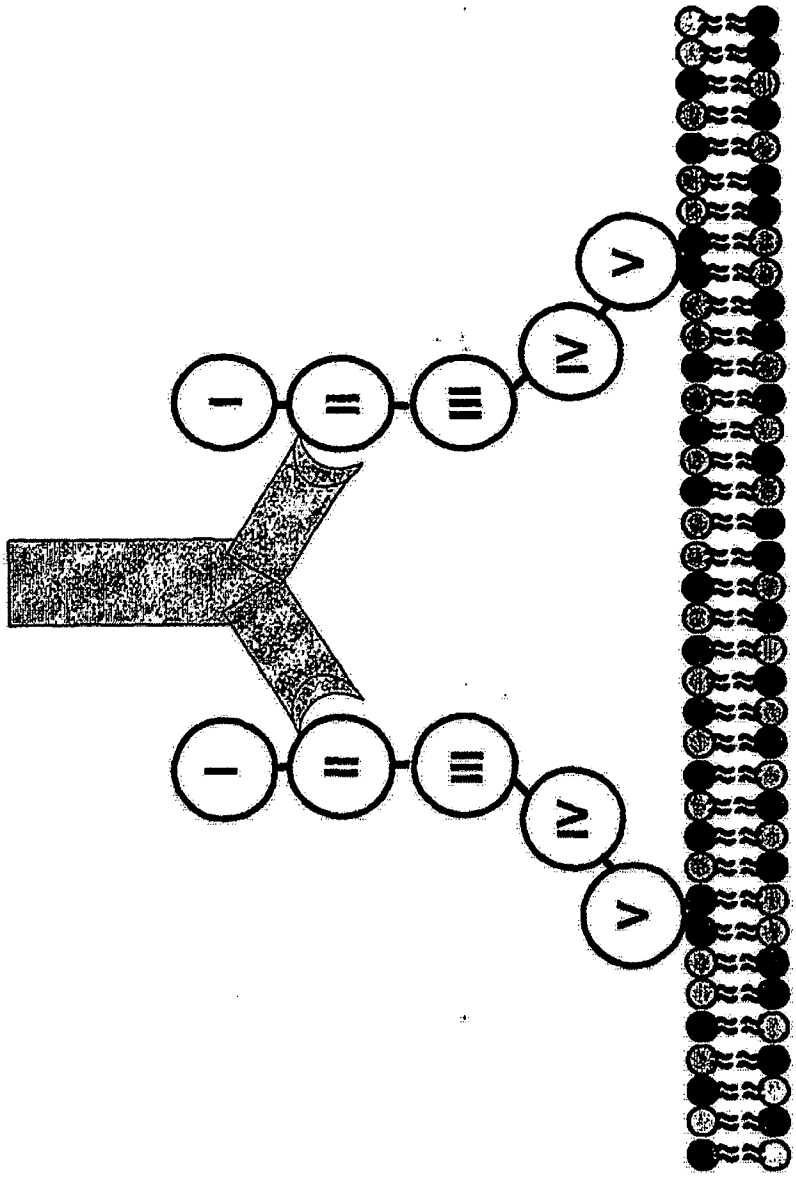

图 15

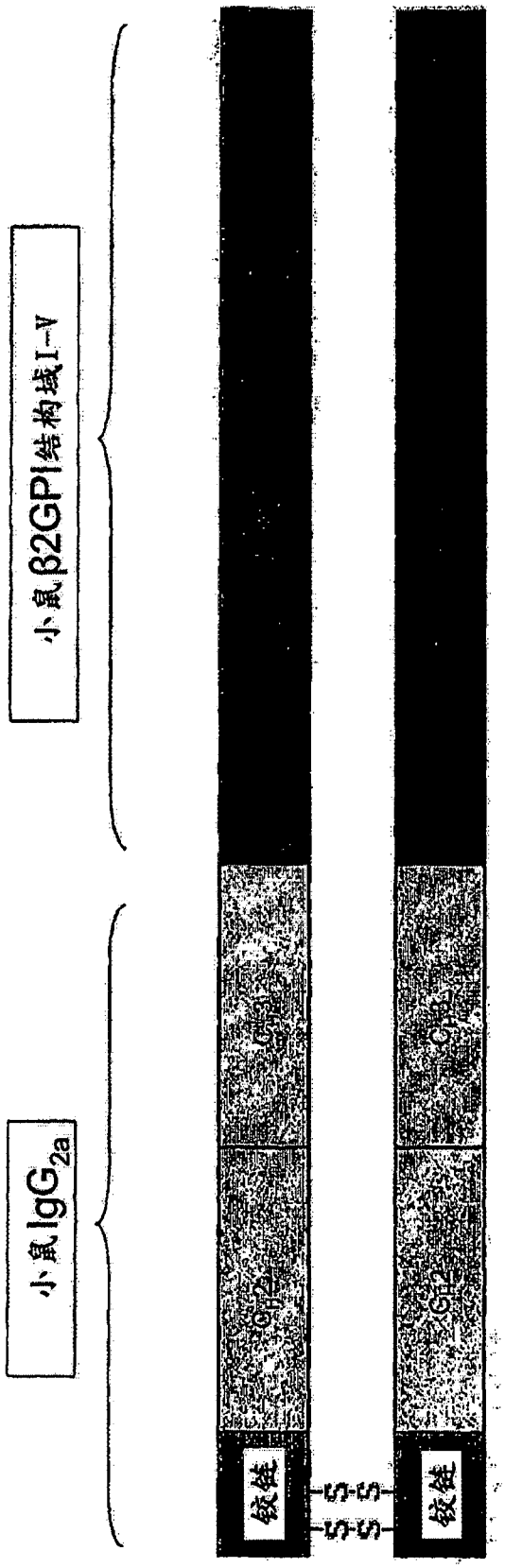

图 16

打印ID7584222 Pg 218

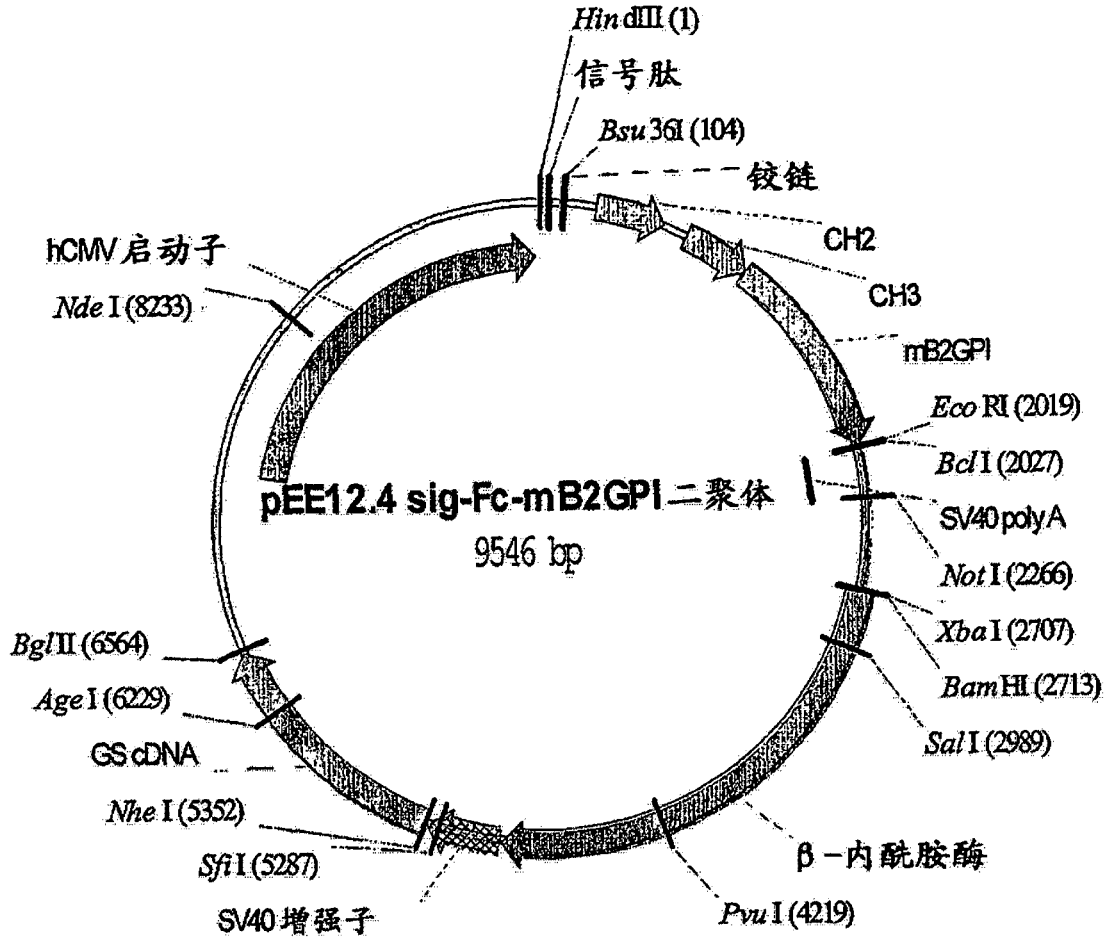

图 17

打印ID7584222 Pg 219

Fc-mβ2GPI蛋白质序列

```
                                  1
        /---mIgGκ信号序列    -----\/----铰链------\ /-----------------------------------------
-24     MDMRAPAQIL GFLLLLFPGT RCLREPRGPT IKPCPPCKCP APNLLGGPSV FIFPPKIKDV LMISLSPIVT CVVVDVSEDD

        ------------------------ 小鼠IgG2a CH2结构域 ----------------------------\ /---------
56      PDVQISWFVN NVEVHTAQTQ THREDYNSTL RVVSALPIQH QDWMSGKEFK CKVNNKDLPA PIERTISKPK GSVRAPQVYV

        --------------------  小鼠IgG2a CH3结构域 ------------------------------------------
136     LPPPEEEMTK KQVTLTCMVT DFMPEDIYVE WTNNGKTELN YKNTEPVLDS DGSYFMYSKL RVEKKNWVER NSYSCSVVHE

        --------------------\/-------------------------------------------------------------
216     GLHNHHTTKS FSRTPGKTGG RICPKPDDLP FATVVPLKTS YDPGEQIVYS CKPGYVSRGG MRRFTCPLTG MWPINTLRCV
                             [---------------------- 结构域I-----------------------------------]

        ------------------------------------------------------------------------------------
296     PRVCPFAGIL ENGIVRYTSF EYPKNISFAC NPGFFLNGTS SSKCTEEGKW SPDIPACARI TCPPPPVPKF ALLKDYRPSA
        [------------------------- 结构域II-----------------------------][-----------------------

        ---------------------------------mouse β2GPI-------------------------------------------
376     GNNSLYQDTV VFKCLPHFAM IGNDTVMCTE QGNWTRLPEC LEVKCPFPPR PENGYVNYPA KPVLLYKDKA TFGCHETYKL
        ---- 结构域III-------------------------------][------------------------ 结构域IV--------

        ------------------------------------------------------------------------------------
456     DGPEEAECTK TRTWSFLPTC RESCKLPVKK ATVLYQGMRV KIQEQFKNGM MHGDKIHFYC KNKEKKCSYT VEAHCRDGTI
        ----------------------][-------------------------------- 结构域V-------------------------

        ---------------------------\
536     EIPSCFKEHS SLAFWKTDAS ELTPC
        ---------------------------]
```

图 18A

打印ID7584222 Pg 220

人IgG_1重链恒定区蛋白质序列:

```
/-----------------------------------------CH1区     ------------------------------------
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT

------------------\/----- 铰链-----\/-------------------------------------------------
YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW

------------CH2区     ------------------------------------------------\/----------------
YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE

-------------------------------------CH3区     ------------------------------------------
LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT

--------\
QKSLSLSPG
```

人β2GPI蛋白质序列:

```
      /----------------------结构域 I-----------------------------------\/-------------------
1     GRTCPKPDDL PFSTVVPLKT FYEPGEEITY SCKPGYVSRG GMRKFICPLT GLWPINTLKC TPRVCPFAGI LENGAVRYTT

      ----结构域 II-----------------------------\/-------------------------------结构域 III---
81    FEYPNTISFS CNTGFYLNGA DSAKCTEEGK WSPELPVCAP IICPPPSIPT FATLRVYKPS AGNNSLYRDT AVFECLPQHA

      ------------------------\/-------------------------结构域 IV-----------------------------
161   MFGNDTITCT THGNWTKLPE CREVKCPFPS RPDNGFVNYP AKPTLYYKDK ATFGCHDGYS LDGPEEIECT KLGNWSAMPS

      -\/-------------------------------结构域 V-------------------------------------------
241   CKASCKLPVK KATVVYQGER VKIQEKFKNG MLHGDKVSFF CKNKEKKCSY TEDAQCIDGT IEVPKCFKEH SSLAFWKTDA

      -----\
321   SDVKPC
```

图 18B

打印ID7584222 Pg 221

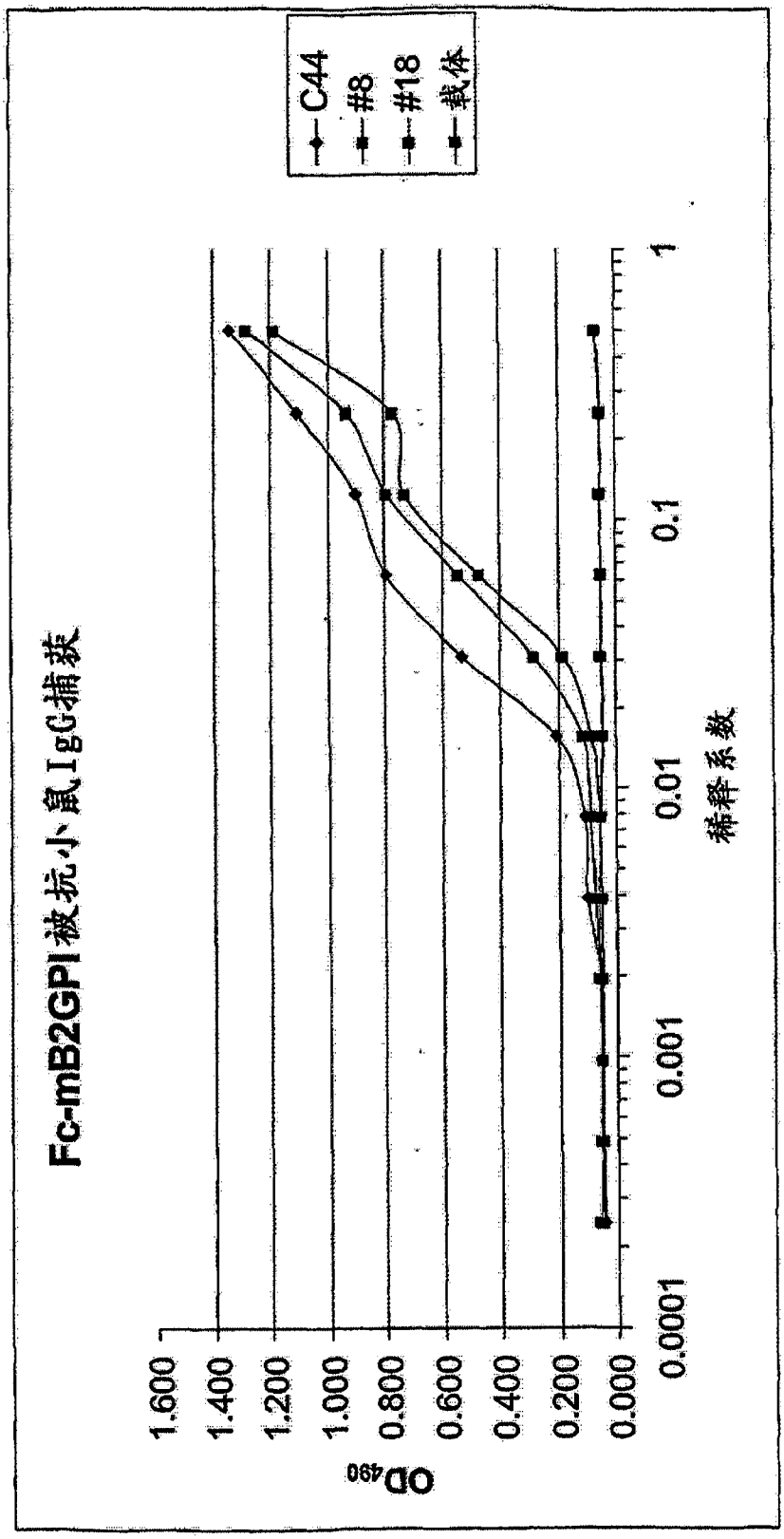

图 19

打印ID7584222 Pg 222

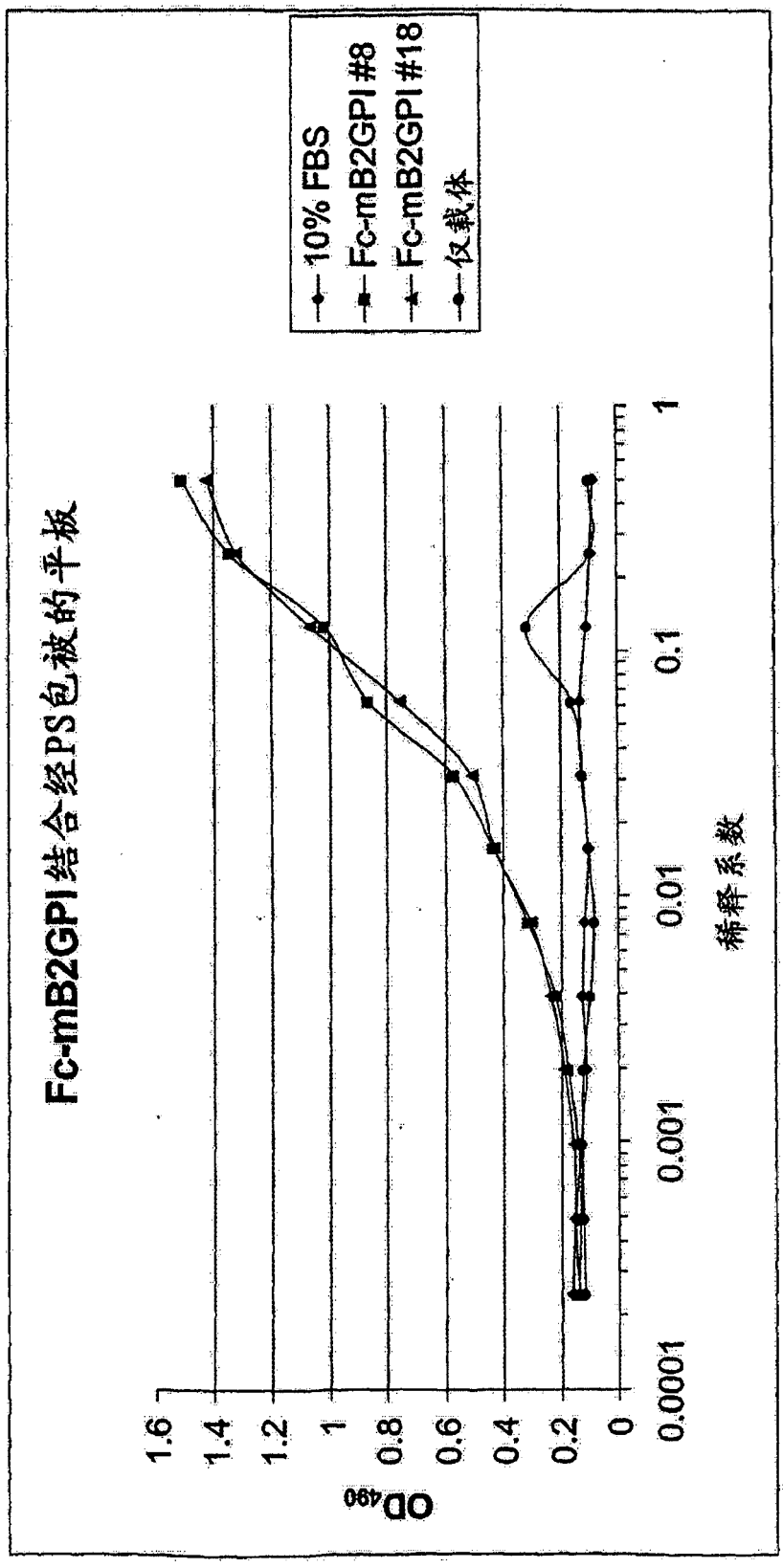

图 20

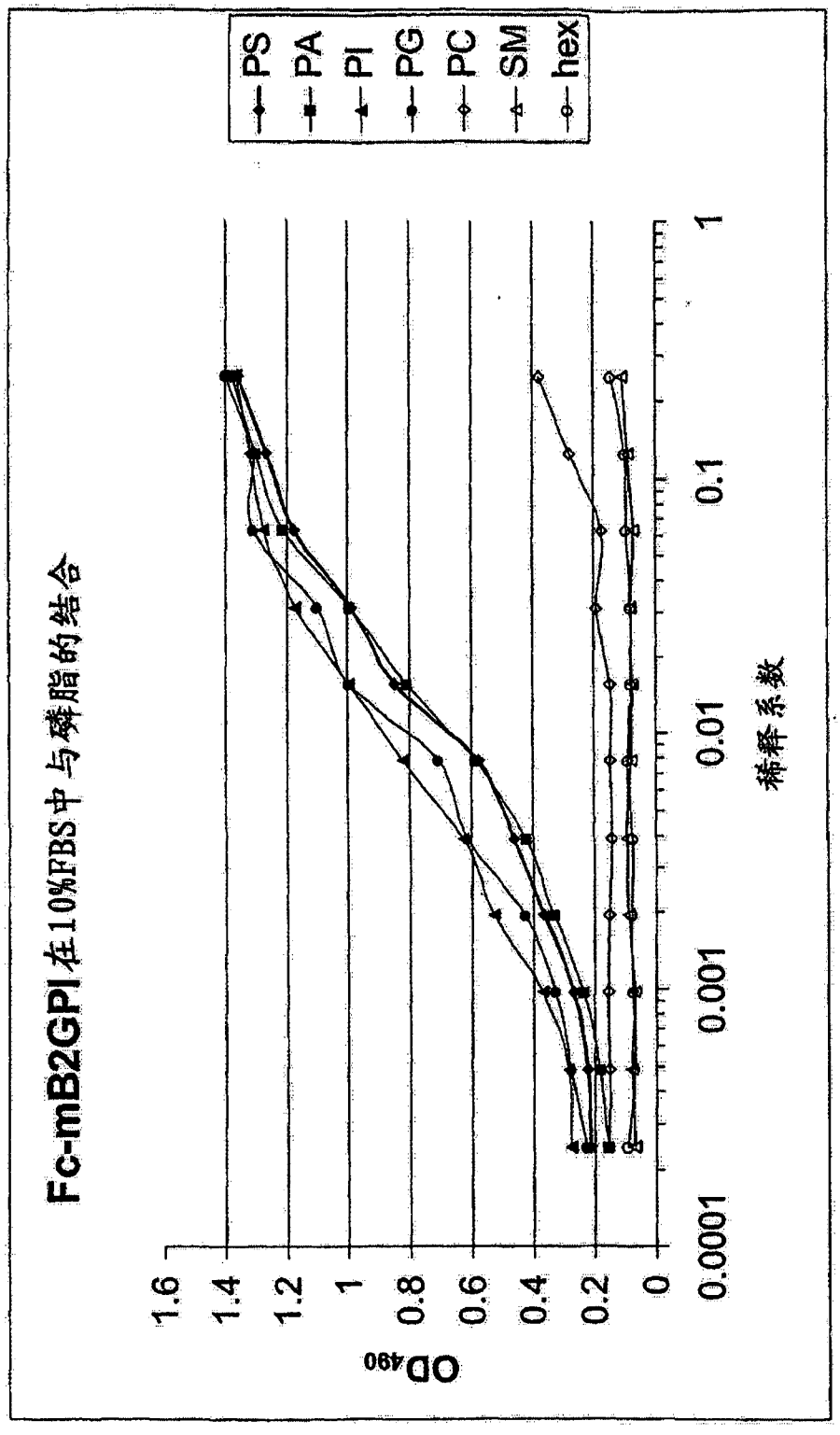
Fc-mB2GPI 在10%FBS中与磷脂的结合
PS
PA
PI
PG
PC
SM
hex
OD490
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
稀释系数

图 21

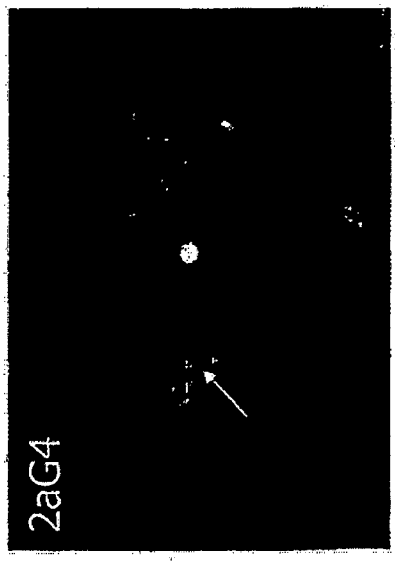

图 22A



图 22B



图 22C

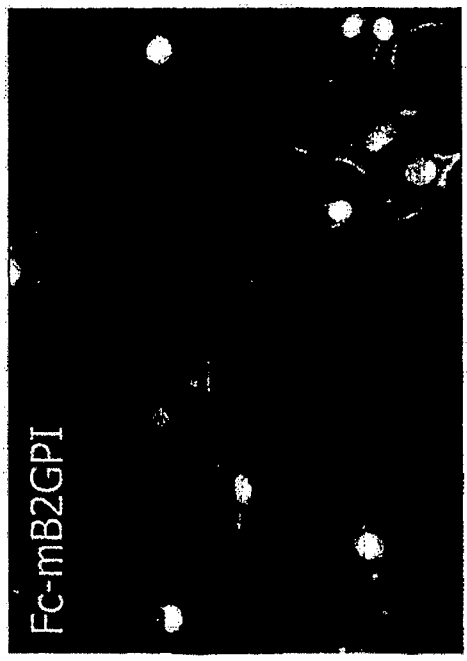

图 23A


Fc-mB2GPI

图 23B

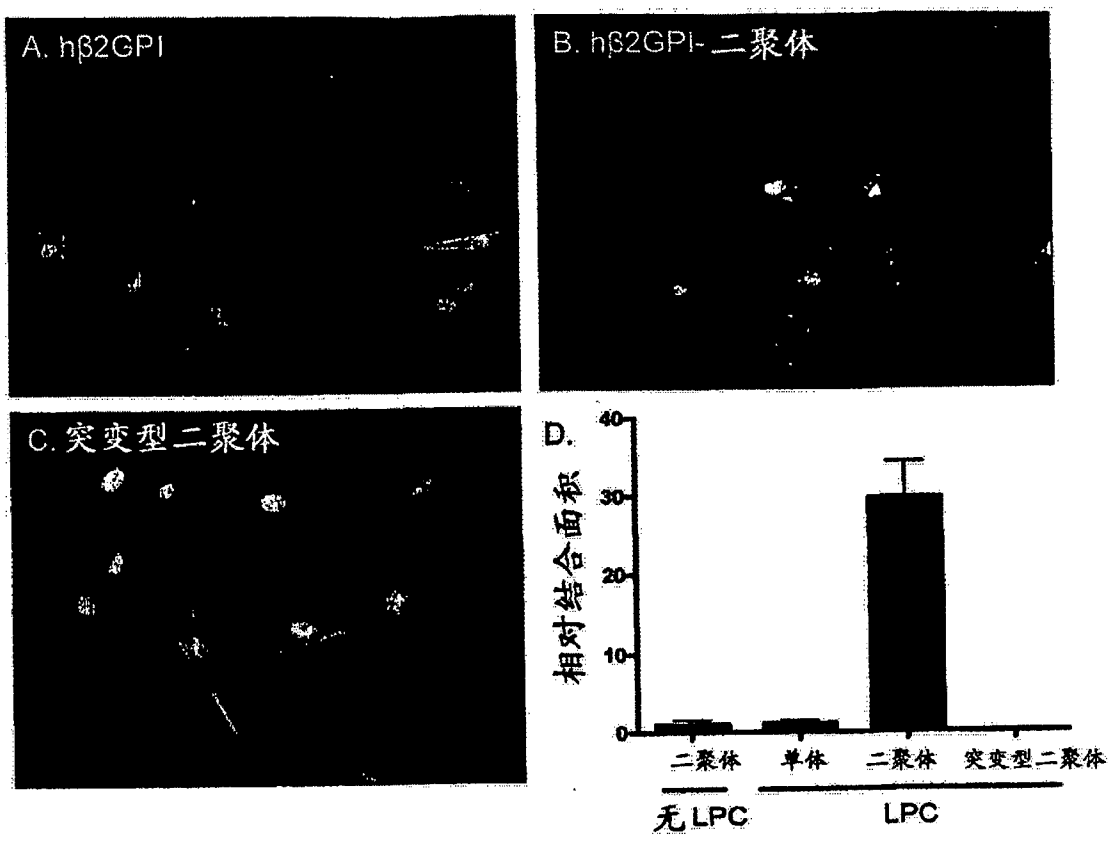
A. hβ2GPI
B. hβ2GPI-二聚体
C. 突变型二聚体
D.
相对结合面积
40
30
20
10
0
二聚体
单体
二聚体
突变型二聚体
无 LPC
LPC

图 24

IHC150231 ABSTRACT

Disclosed are new phosphatidylserine binding constructs with surprising combinations of properties, and a range of diagnostic and therapeutic conjugates thereof. The new constructs effectively bind phosphatidylserine targets in disease and enhance their destruction, and can also specifically deliver attached imaging or therapeutic agents to the disease site. Also disclosed are methods of using the new construct compositions, therapeutic conjugates and combinations thereof in tumor vasculature targeting, cancer diagnosis and treatment, and for treating viral infections and other diseases.