



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108785669 A

(43)申请公布日 2018. 11. 13

(21)申请号 201810659773.9 *A61K 9/00*(2006.01)

(22)申请日 2013.09.05 *A61K 47/12*(2006.01)

(30)优先权数据 *A61K 47/26*(2006.01)

61/697111 2012.09.05 US *A61K 47/10*(2006.01)

(62)分案原申请数据 *A61K 47/18*(2006.01)

201380046405.2 2013.09.05 *A61P 35/00*(2006.01)

(71)申请人 特雷康制药公司 *A61P 35/04*(2006.01)

地址 美国加利福尼亚州 *A61P 27/02*(2006.01)

(72)发明人 S. 贝内迪特 M.C. 曼宁 B.M. 墨菲

S. 里尔 C. 朔伊尔

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 任晓华 黄希贵

(51)Int. Cl. 权利要求书1页 说明书68页

*A61K 39/395*(2006.01) 序列表12页 附图2页

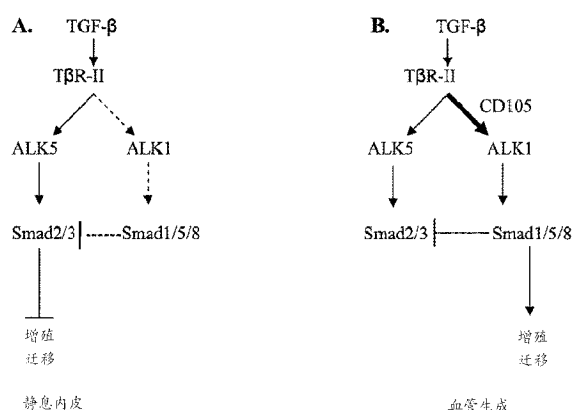
(54)发明名称

抗体制剂及其用途

(57)摘要

本申请涉及抗CD105抗体、其抗原结合片段的制剂及其用途。另一个方面涉及抗CD105抗体或其抗原结合片段的制剂的预充式注射器。另一个方面涉及所述制剂用于减少血管生成相关病症诸如癌症和眼科疾病的一种或多种体征或症状的用途。

CD105 (内皮因子) 对血管生成的调节的模型



1. 制剂,其包含约1 mg/ml至约150 mg/ml抗CD105抗体或其抗原结合片段,至多约100 mM缓冲剂、至多约1 M多元醇和约4.0至约7.5的pH。
2. 权利要求1的制剂,其中,如通过大小排阻色谱法 (SEC) 所测量,至少95%的抗CD105抗体在约2至8°C储存至少12个月之后作为单体存在。
3. 权利要求1的制剂,其中,如通过大小排阻色谱法 (SEC) 所测量,至少95%的抗CD105抗体在约25°C储存至少6个月之后作为单体存在。
4. 权利要求1的制剂,其中,如通过大小排阻色谱法 (SEC) 所测量,至少90%的抗CD105抗体在约25°C储存至少6个月之后作为单体存在。
5. 权利要求1的制剂,其中所述缓冲剂是组氨酸或磷酸盐缓冲盐水。
6. 权利要求1的制剂,其中所述缓冲剂是乙酸盐,且pH是约4。
7. 权利要求1的制剂,其中所述缓冲剂是组氨酸,且pH是约5.5。
8. 权利要求1的制剂,其中所述抗CD105抗体或其抗原结合片段在约2至8°C储存至少12个月之后显示通过CD105 ELISA结合测定法的约50至150%结合。
9. 权利要求1的制剂,其中,如通过毛细管电泳-等电聚焦所测量,在2至8°C储存至少12个月之后,所述抗CD105抗体的平均等电点 (pI) 为约8.7至约9.2。
10. 权利要求1的制剂,其中所述抗CD105抗体包含具有如SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的轻链可变区 (VL);具有如SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链恒定区 (CL);具有如SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的重链可变区 (VH);和具有如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的恒定区 (Fc)。

## 抗体制剂及其用途

[0001] 本申请是申请日为2013年09月05日,申请号为201380046405.2,发明名称为“抗体制剂及其用途”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求2012年9月5日提交的美国临时申请号61/697,111的权益,该申请以其整体通过引用并入本文。本申请涉及以下共同未决的专利申请:美国公开号US 2010-0098692 A1 [代理人案卷号35882-706.201];美国专利号8,221,753 [代理人案卷号35882-706.202];美国申请号13/485,702 [代理人案卷号35882-706.301];和美国申请号13/390,896 [代理人案卷号35882-712.201],其以其整体通过引用并入本文。

[0003] 序列表

本申请含有已经经由EFS-Web以ASCII格式提交且在此以其整体通过引用并入的序列表。所述ASCII拷贝,在2013年9月4日生成,名为35882-714.601\_SL.txt,大小为22,121字节。

### 技术领域

[0004] 本申请涉及抗CD105抗体、其抗原结合片段的制剂及其用途。另一个方面涉及抗CD105抗体或其抗原结合片段的制剂的预充式注射器。另一个方面涉及所述制剂用于减少血管生成相关病症诸如癌症和眼科疾病的一种或多种体征或症状的用途。

### 背景技术

[0005] 癌症是仅次于冠状动脉疾病第二大人类死亡原因。在世界上,每年有数百万人死于癌症。仅在美国,癌症每年造成超过50万人死亡,并且每年有约140万新确诊的病例。尽管因心脏病死亡已经明显下降,由癌症引起的死亡通常是在增加。在很多国家,癌症已经是最主要的死因。

[0006] 此外,即使对于最初度过他们的原发性癌的那些癌症患者,共同的经历已经证实,他们的寿命急剧改变。许多癌症患者会经历强烈的焦虑,所述焦虑由对复发或治疗失败的可能性的知晓驱动。许多癌症患者在治疗以后经历显著的身体虚弱。

[0007] 一般而言,致命性癌症的控制的根本问题是,缺乏有效的且无毒的全身疗法。癌症是一种复杂的疾病,其特征在于导致失控的细胞生长的遗传突变。癌细胞存在于所有生物体中,在正常情况下,它们的过度生长受到不同生理因子的紧密调节。

[0008] 血管生成是从现有血管形成新血管的生理过程。已经提出,血管生成在正常过程和病理过程中都起作用。例如,血管生成过程涉及动物器官和组织的血管系统的发育。

[0009] 在某些病理状态下,血管生成受到刺激,作为为受累组织内的细胞提供充足的血液和营养物供给的方式。许多这样的病理状态包括异常的细胞增殖和/或调节。实体癌和渗出性黄斑变性依赖于为连续的生长以及转移募集新的血液供应。

### 发明内容

[0010] 本文提供了抗CD105抗体的新制剂、含有所述制剂的预充式注射器,和这样的制剂

用于治疗血管生成相关病症的用途。本申请提供了可用于静脉内或眼内施用,例如,治疗与CD105相关的癌症和眼科状况的制剂。

[0011] 在一个方面,本文提供了包含约1 mg/ml至约150 mg/ml抗CD105抗体、或其抗原结合片段,至多约100 mM缓冲剂、至多约1 M多元醇和约4.0至约7.5的pH的制剂。

[0012] 在一个方面,所述制剂在制备后是稳定的,其可根据常规方式进行测试。就所述制剂随着时间的稳定性而言,如通过大小排阻色谱法 (SEC) 所测量,至少95%的抗CD105抗体或其抗原结合片段在约2至8°C储存至少约12个月之后可以作为单体存在。在一些实施方案中,这样的制剂的缓冲剂是组氨酸或磷酸盐缓冲盐水。就所述制剂随着时间的稳定性而言,如通过大小排阻色谱法 (SEC) 所测量,至少90%的抗CD105抗体或其抗原结合片段在约25°C储存至少约6个月之后可以作为单体存在。在一些实施方案中,这样的制剂的缓冲剂是乙酸盐。

[0013] 此外,所述抗CD105抗体或其抗原结合片段在约2-8°C储存至少约12个月之后可以显示约50至约150%结合(通过CD105 ELISA结合测定法)。

[0014] 在2至8°C储存至少约12个月之后,抗CD105抗体的平均等电点 (pI) 可为约8.7至约9.2,如通过,例如,毛细管电泳等电对焦所测量。

[0015] 本领域技术人员会理解,抗CD105抗体或其抗原结合片段可以稳定至少约12个月、至少约18个月、至少约24个月、至少约30个月、至少约36个月或更长时间。

[0016] 在所述制剂的冷冻和融化循环之后,如通过SEC所测量,所述制剂可以含有作为单体存在的至少95%的抗CD105抗体。可替代地,或另外地,当经受搅动应力时,如通过SEC所测量,制剂可以含有作为单体存在的至少95%的抗CD105抗体。

[0017] 抗CD105抗体或其抗原结合片段可以包含能够结合CD105的CDR任何序列。在一个非限制性实施方案中,所述抗CD105抗体包含具有如SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的轻链可变区 (VL);具有如SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链恒定区 (CL);具有如SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的重链可变区 (VH);和具有如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的恒定区 (Fc) (参见,例如,图1)。

[0018] 在另一个非限制性实施方案中,所述抗CD105抗体包含具有如SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的VL CDR1;具有如SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的VL CDR2;具有如SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的VL CDR3;具有如SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的VH CDR1;具有如SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的VH CDR2;和具有如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的VH CDR3。

[0019] 分离的人源化的去免疫的抗CD105抗体可以包含具有如SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的重链可变区和具有如SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的轻链可变区。人源化-去免疫重链的其他非限制性实例包括,但不限于,SEQ ID NO:13、14、15和16。人源化-去免疫轻链的其他非限制性实例包括,但不限于,SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22和23。序列下面提供于实施例17。

[0020] 所述制剂可含有约1 mg/ml至约150 mg/ml的抗CD105抗体或其抗原结合片段,或其中任何值,包括但不限于,约2 mg/ml、约5 mg/ml、约7.5 mg/ml、约10 mg/ml、20 mg/ml、约25 mg/ml、约30 mg/ml、约35 mg/ml、约40 mg/ml、约45 mg/ml、约50 mg/ml、约55 mg/ml、约60 mg/ml、约65 mg/ml、约70 mg/ml、约75 mg/ml、约80 mg/ml、约85 mg/ml、约90 mg/ml、约95 mg/ml、约100 mg/ml、约105 mg/ml、约110 mg/ml、约115 mg/ml、约120 mg/ml、约125

mg/ml、约130 mg/ml、约135 mg/ml、约140 mg/ml、约145 mg/ml、约150 mg/ml或更多。

[0021] 在一个实施方案中,所述制剂包含约25 mg/ml的抗CD105抗体或抗原结合片段。

[0022] 在另一个实施方案中,所述制剂包含约50 mg/ml的抗CD105抗体或抗原结合片段。

[0023] 在又一个实施方案中,所述制剂包含约100 mg/ml的抗CD105抗体或抗原结合片段。

[0024] 如本文所述的制剂可以含有缓冲剂,诸如,例如,组氨酸、乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐。在一个实施方案中,所述制剂包含约5 mM、约7.5 mM、约10 mM、约12.5 mM、约15 mM、约17.5 mM、20 mM、约22.5 mM、约25 mM、约30 mM、约35 mM、约40 mM、约45 mM、约50 mM、约55 mM、约60 mM、约65 mM、约70 mM、约75 mM、约80 mM、约85 mM、约90 mM、约95 mM或约100 mM组氨酸、乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐。

[0025] 制剂可以制备用于已知用于抗体的任何类型的施用,包括,但不限于,玻璃体内和静脉内施用。

[0026] 本文提供的制剂可以进一步包括可接受的载体或赋形剂,包括作为药学上可接受的载体或赋形剂且对于施用于患者可接受的任何载体或赋形剂。

[0027] 在一个实施方案中,本文提供的制剂是等渗的。“等渗”表示目标制剂具有与人血液基本相同的渗透压。等渗制剂将通常具有约250至350毫渗量(mOsm)的渗透压。等渗性可使用蒸汽压或冰-冷冻型渗透计(例如)进行测量。在另一个实施方案中,本文提供的制剂是高渗的。“等渗”制剂是具有与人血液基本相同的渗透压的制剂。相应地,术语“高渗”用来描述具有高于人血液的渗透压的制剂。

[0028] 本文提供的制剂可含有小于1 M的量的多元醇。例如,多元醇可以约50 mM、约75 mM、约100 mM、约150 mM、约200 mM、约225 mM、约240 mM、约250 mM、约300 mM、约350 mM、约400 mM、约450 mM、约500 mM、约550 mM、约600 mM、约650 mM、约700 mM、约750 mM、约800 mM、约850 mM、约900 mM、约950 mM、约1 M或其中任何整数的量存在于所述制剂中。在一个实施方案中,所述制剂被制成等渗的,其中盐浓度为约100 mM至约175 mM。例如,含有小于300 mM量的多元醇的制剂被制成等渗的,其中盐浓度为约130 mM。

[0029] 在一个方面,待用于本文提供的制剂中的多元醇可以是糖,诸如,例如,非还原性糖。非还原性糖的代表性实例包括,但不限于,海藻糖和蔗糖。例如,所述制剂可包含约200 mM至约300 mM海藻糖或蔗糖。在一个实施方案中,制剂可包含约240 mM海藻糖或蔗糖。

[0030] 或者,所述糖可以是约200 mM至约300 mM的量(浓度)的山梨糖醇。在一个实施方案中,制剂可包含约240 mM山梨糖醇。

[0031] 本文提供的制剂的其他非限制性实例是表1的制剂1-39中的任一者。

[0032] 本文提供的制剂可具有约4.0至约7.5的pH。在一个实施方案中,本文提供的制剂可具有约4.5、约5.0、约5.5、约6.0、约6.5或约7.0的pH。

[0033] 在一个实施方案中,本文提供的制剂不含有表面活性剂。任选地,在一些情况下,表面活性剂可以包括在制剂中。表面活性剂的非限制性实例包括聚山梨糖醇酯20、聚山梨糖醇酯80和Pluronic® F68。

[0034] 本文还提供了包含本文所述的制剂的适用于静脉内或玻璃体内施用的预充式注射器。这样的预充式注射器可以被包装且标记用于治疗血管生成相关的状况,诸如任何本文所述的状况。包装可进一步包括用于储存和施用的指示。本文提供了包含前述权利要求

中任一项的制剂的适用于静脉内或玻璃体内施用的一个或多个预充式注射器的包装。

[0035] 本申请的一个实施方案考虑,本文所述的任一种组合物用于配制药物的用途,所述药物用于治疗本文所述的病症。可以基于需要治疗的患者/受试者的身体特征来配制药物,且可以配制成单个制剂或多个制剂。可以将药物包装在具有适当标签的合适包装中以分配给医院和诊所,其中所述标签是用于指示治疗受试者的本文所述的病症。药物可以包装成单个或多个单元。在包装中可以包括关于本文所述组合物的剂量和施用的说明书。

[0036] 本文提供了治疗有需要的患者(受试者)中的血管生成相关的疾病的方法,其包括向所述患者施用本文所述的制剂。这样的制剂可以玻璃体内或静脉内施用于患者。

[0037] 本文所述的血管生成相关的疾病可以是,例如,癌症或转移。在一个实施方案中,所述癌症是实体瘤。待治疗的癌症包括,例如,基于上皮的肿瘤。待用这样的制剂治疗的癌症的非限制性实例,包括,但不限于,肺癌、妇科恶性肿瘤、黑色素瘤、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌、结肠直肠癌、前列腺癌、肾癌、头部癌症、胰腺癌、肝癌(肝细胞癌)、子宫癌、颈部癌症、肾癌(肾细胞癌)、肉瘤、骨髓瘤、和淋巴瘤。用于治疗癌症或转移的制剂可以静脉内施用于患者。

[0038] 或者,本文所述的血管生成相关的疾病可以是,例如,眼科状况。眼科状况包括,但不限于,年龄相关的黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、黄斑水肿和/或脉络膜新生血管形成。年龄相关的黄斑变性(AMD)可以是湿性AMD或干性AMD。用于治疗眼科状况的制剂可以玻璃体内施用于患者。

[0039] 在这样的方法中,所述制剂可以一次或多次施用于患者。例如,所述制剂可以每天一次、每周一次、每个月一次、每个月两次、每两个月一次、每三个月一次、每四个月一次、每5个月一次或每6个月一次施用。治疗方案可以根据患者对治疗的响应根据需要增加或减少。

[0040] 在一个方面,施用制剂,直至血管生成相关的疾病的一种或多种体征或症状减轻。

[0041] 就眼科状况而言,一种或多种体征或症状可能包括,但不限于,收缩血管、抑制与眼部疾病相关的内皮细胞增殖、清除出血的体征或症状、治疗混浊视力、提供视力丧失的停滞、改善视力、改善视敏度、减少黄斑水肿和/或预防血管渗漏。

[0042] 就癌症或转移而言,治疗可导致患者状况的改善,且治疗可以通过确定以下因素中的一个或多个是否已经发生来评价:减少的细胞增殖、减少的细胞数目、增加的细胞凋亡、或至少一部分形成细胞增殖性病症的细胞的存活降低。

[0043] 治疗可导致患者的肿瘤或转移的部分或完全消除和/或存活延长。

[0044] 在一个实施方案中,在向患者施用一个或多个剂量的制剂之后,一种或多种体征或症状的严重程度或持续时间降低约2%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约90%、约95%或约100%。

[0045] 在另一个实施方案中,在向患者施用一个或多个剂量的制剂之后,一种或多种体征或症状的严重程度或持续时间降低约2倍、约5倍、约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、约50倍、约55倍、约60倍、约65倍、约70倍、约75倍、约80倍、约90倍、约95倍、约100倍或更多倍。

[0046] 本文提供了治疗有需要的患者中的眼科状况的方法,其包括向所述患者施用本文所述的制剂,由此所述眼科状况的一种或多种体征或症状被治疗减轻。所述制剂的施用可

以是玻璃体内施用。

[0047] 本文还提供了预防或治疗有需要的受试者中的癌症或转移的方法,其包括向所述患者施用本文所述的制剂,由此所述癌症或转移的一种或多种体征或症状减轻。所述制剂的施用可以是静脉内施用。

[0048] 在本文提供的方法中,待治疗的受试者可以是人或非人受试者。本文提供的制剂可以施用一次或多次,这取决于患者的健康、疾病或状况的进展、和治疗的功效。在治疗过程中,可以调节疗法和治疗(例如,组合物中抗体的剂量)。

[0049] 本文提供了监测任何本文提供的一种或多种方法的功效的方法。可溶性CD105的水平已经与癌症患者的存活相关,并且可以在治疗之前和期间进行监测。因此,可溶性CD105的水平可以是治疗方案有效地治疗患者的一种指示。本文所述的治疗可以包括一种或多种额外治疗。

[0050] 通过引用并入

在本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请都通过引用并入本文中,其程度如同具体地且单个地指出每篇单独的出版物、专利或专利申请通过引用并入。

[0051] 因此,本发明提供了以下各项中所述的具体实施方式:

1. 制剂,其包含约1 mg/ml至约150 mg/ml抗CD105抗体或其抗原结合片段,至多约100 mM缓冲剂、至多约1 M多元醇和约4.0至约7.5的pH。

2. 项1的制剂,其中,如通过大小排阻色谱法(SEC)所测量,至少95%的抗CD105抗体在约2至8°C储存至少12个月之后作为单体存在。

3. 项1的制剂,其中,如通过大小排阻色谱法(SEC)所测量,至少95%的抗CD105抗体在约25°C储存至少6个月之后作为单体存在。

4. 项1的制剂,其中,如通过大小排阻色谱法(SEC)所测量,至少90%的抗CD105抗体在约25°C储存至少6个月之后作为单体存在。

5. 项1的制剂,其中所述缓冲剂是组氨酸或磷酸盐缓冲盐水。

6. 项1的制剂,其中所述缓冲剂是乙酸盐,且pH是约4。

7. 项1的制剂,其中所述缓冲剂是组氨酸,且pH是约5.5。

8. 项1的制剂,其中所述抗CD105抗体或其抗原结合片段在约2至8°C储存至少12个月之后显示通过CD105 ELISA结合测定法的约50至150%结合。

9. 项1的制剂,其中,如通过毛细管电泳-等电聚焦所测量,在2至8°C储存至少12个月之后,所述抗CD105抗体的平均等电点(pI)为约8.7至约9.2。

10. 项1的制剂,其中所述抗CD105抗体包含具有如SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的轻链可变区(V<sub>L</sub>);具有如SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链恒定区(C<sub>L</sub>);具有如SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的重链可变区(V<sub>H</sub>);和具有如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的恒定区(Fc)。

11. 项1的制剂,其中所述抗CD105抗体包含具有如SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1;具有如SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2;具有如SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3;具有如SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1;具有如SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2;和具有如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。

12. 项1的制剂,其包含约25 mg/ml的抗CD105抗体或其抗原结合片段。

13. 项1的制剂,其包含约50 mg/ml的抗CD105抗体或其抗原结合片段。

14. 项1的制剂,其包含约100 mg/ml的抗CD105抗体或其抗原结合片段。
15. 项1的制剂,其中所述缓冲剂是组氨酸或乙酸盐。
16. 项15的制剂,其包含约20 mM组氨酸或乙酸盐。
17. 项1的制剂,其中所述制剂配制用于玻璃体内或静脉内施用。
18. 项1的制剂,其进一步包含可接受的载体或赋形剂。
19. 项18的制剂,其中所述载体或赋形剂是药学上可接受的载体或赋形剂。
20. 项1的制剂,其是等渗或高渗的。
21. 项1的制剂,其中所述多元醇是小于300 mM,且所述制剂用盐制成等渗。
22. 项1的制剂,其中,在所述制剂的冷冻和融化循环之后,如通过SEC所测量,至少95%的抗CD105抗体作为单体存在。
23. 项1的制剂,其中,当经受搅动应力时,如通过SEC所测量,至少95%的抗CD105抗体作为单体存在。
24. 项1的制剂,其中所述多元醇是糖。
25. 项24的制剂,其中所述糖是非还原糖。
26. 项25的制剂,其中所述非还原性糖是海藻糖或蔗糖。
27. 项26的制剂,其包含约240 mM海藻糖或蔗糖。
28. 项24的制剂,其中所述糖是山梨糖醇。
29. 项28的制剂,其包含约240 mM山梨糖醇。
30. 项1的制剂,其进一步包含表面活性剂。
31. 项30的制剂,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80或Pluronic® F68。
32. 包含前述任一项的制剂的适用于静脉内或玻璃体内施用的预充式注射器。
33. 治疗有需要的受试者中的血管生成相关疾病的方法,其包括向所述患者施用包含约1 mg/ml至约150 mg/ml抗CD105抗体或其抗原结合片段,至多约100 mM缓冲剂、至多约1 M多元醇和约4.0至约7.5的pH的制剂。
34. 项33的方法,其中所述抗CD105抗体包含具有如SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的轻链可变区(VL);具有如SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链恒定区(CL);具有如SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的重链可变区(VH);和具有如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的恒定区(Fc)。
35. 项33的方法,其中所述抗CD105抗体包含具有如SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的VL CDR1;具有如SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的VL CDR2;具有如SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的VL CDR3;具有如SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的VH CDR1;具有如SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的VH CDR2;和具有如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的VH CDR3。
36. 项33的方法,其包含约25 mg/ml抗CD105抗体或其抗原结合片段。
37. 项33的方法,其包含约50 mg/ml抗CD105抗体或其抗原结合片段。
38. 项33的方法,其包含约100 mg/ml抗CD105抗体或其抗原结合片段。
39. 项33的方法,其中所述制剂包含小于300 mM多元醇,且所述制剂用盐制成等渗。
40. 项33的方法,其中所述缓冲剂是组氨酸或乙酸盐。
41. 项40的方法,其包含约20 mM组氨酸或乙酸盐。
42. 项33的方法,其中所述多元醇是糖。

43. 项42的方法,其中所述糖是非还原性糖。
44. 项43的方法,其中所述非还原性糖是海藻糖或蔗糖。
45. 项44的方法,其包含约240 mM海藻糖或蔗糖。
46. 项42的方法,其中所述糖是山梨糖醇。
47. 项46的方法,其包含约240 mM山梨糖醇。
48. 项33的方法,其中玻璃体内或静脉内施用所述制剂。
49. 项33的方法,其进一步包含表面活性剂。
50. 项49的方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80或Pluronic® F68。
51. 项33的方法,其中所述血管生成相关疾病是癌症或转移。
52. 项51的方法,其中所述癌症是实体瘤。
53. 项51的方法,其中所述癌症是基于上皮的肿瘤。
54. 项51的方法,其中所述癌症是肺癌、妇科恶性肿瘤、黑色素瘤、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌、结肠直肠癌、前列腺癌、肾癌、头部癌症、胰腺癌、肝癌(肝细胞癌)、子宫癌、颈部癌症、肾癌(肾细胞癌)、肉瘤、骨髓瘤、脑癌或淋巴瘤。
55. 项33的方法,其中所述血管生成相关疾病是眼科疾病。
56. 项55的方法,其中所述眼科状况是年龄相关的黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、或脉络膜新生血管形成。
57. 项56的方法,其中所述年龄相关的黄斑变性(AMD)是湿性AMD或干性AMD。
58. 项33的方法,其中向所述患者施用所述制剂一次或多次。
59. 项33的方法,其中每天一次、每周一次、每个月一次、每个月两次、每两个月一次、每三个月一次、每四个月一次、每5个月一次或每6个月一次施用所述制剂。
60. 项33的方法,其中施用所述制剂,直至所述血管生成相关疾病的一种或多种体征或症状减轻。
61. 项60的方法,其中所述一种或多种体征或症状的严重程度或持续时间降低约2%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约90%、约95%或约100%。
62. 项60的方法,其中所述一种或多种体征或症状的严重程度或持续时间降低约2倍、约5倍、约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、约50倍、约55倍、约60倍、约65倍、约70倍、约75倍、约80倍、约90倍、约95倍、约100倍或更多倍。
63. 项60的方法,其中所述一种或多种体征或症状是收缩血管、抑制与眼部疾病相关的内皮细胞增殖、清除出血的体征或症状、治疗混浊视力、提供视力丧失的停滞、改善视力和/或预防血管渗漏。
64. 项33的方法,其中所述治疗导致患者状况的改善,且可以通过确定以下因素中的一个或多个是否已经发生来评价:减少的细胞增殖、减少的细胞数目、增加的细胞凋亡、或至少一部分形成细胞增殖性病症的细胞的存活降低。
65. 项33的方法,其中治疗导致患者的肿瘤或转移的部分或完全消除和/或存活延长。
66. 治疗有需要的患者中的眼科状况的方法,其包括向所述患者施用包含约1 mg/ml至约150 mg/ml抗CD105抗体或其抗原结合片段,至多约100 mM缓冲剂,至多约1 M多元醇,

约4.0至约7.5的pH和任选的表面活性剂的制剂,由此所述眼科状况的一种或多种体征或症状得到缓解。

67. 项66的方法,其中所述眼科状况是年龄相关的黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、或脉络膜新生血管形成。

68. 项67的方法,其中所述年龄相关的黄斑变性(AMD)是湿性AMD或干性AMD。

69. 项66的方法,其中所述抗CD105抗体包含具有如SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的轻链可变区(VL);具有如SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链恒定区(CL);具有如SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的重链可变区(VH);和具有如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的恒定区(Fc)。

70. 项66的方法,其中所述抗CD105抗体包含具有如SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的VL CDR1;具有如SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的VL CDR2;具有如SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的VL CDR3;具有如SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的VH CDR1;具有如SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的VH CDR2;和具有如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的VH CDR3。

71. 项66的方法,其中所述一种或多种体征或症状是收缩血管、抑制与眼部疾病相关的内皮细胞增殖、清除出血的体征或症状、治疗混浊视力、提供视力丧失的停滞、改善视力和/或预防血管渗漏。

72. 项66的方法,其中所述一种或多种体征或症状的严重程度或持续时间降低约2%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约90%、约95%或约100%。

73. 项66的方法,其中所述一种或多种体征或症状的严重程度或持续时间降低约2倍、约5倍、约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、约50倍、约55倍、约60倍、约65倍、约70倍、约75倍、约80倍、约90倍、约95倍、约100倍或更多倍。

74. 项66的方法,其中所述制剂包含小于300 mM多元醇,且所述制剂用盐制成等渗。

75. 预防或治疗有需要的受试者中的癌症或转移的方法,其包括向所述患者施用包含约1 mg/ml至约150 mg/ml抗CD105抗体或其抗原结合片段,至多约100 mM缓冲剂,至多约1 M多元醇和约4.0至约7.5的pH的制剂,由此所述癌症或转移的一种或多种体征或症状得到缓解。

76. 项75的方法,其中所述抗CD105抗体包含具有如SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的轻链可变区(VL);具有如SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链恒定区(CL);具有如SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的重链可变区(VH);和具有如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的恒定区(Fc)。

77. 项75的方法,其中所述抗CD105抗体包含具有如SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的VL CDR1;具有如SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的VL CDR2;具有如SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的VL CDR3;具有如SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的VH CDR1;具有如SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的VH CDR2;和具有如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的VH CDR3。

78. 项75的方法,其中所述制剂的施用延长所述受试者的生命。

79. 项75的方法,其中所述癌症是原发性肿瘤或转移性肿瘤。

80. 项75的方法,其中所述癌症是实体瘤。

81. 项80的方法,其中所述实体瘤是选自以下的组织或器官的实体瘤:皮肤、黑色素瘤、肺、胰腺、乳房、卵巢、结肠、直肠、胃、甲状腺、喉部、卵巢、前列腺、结肠直肠、头部、颈部、眼、嘴、喉、食管、胸部、骨、睾丸、淋巴、骨髓、骨、肉瘤、肾、汗腺、肝、肾、脑(例如多形性胶质

母细胞瘤、神经胶质瘤)等。

82. 项81的方法,其中所述实体瘤是结肠肿瘤、乳腺肿瘤、肾肿瘤、肺肿瘤、前列腺肿瘤、卵巢肿瘤,或任何这样的肿瘤的转移。

83. 项75的方法,其中所述治疗导致受试者状况的改善,且可以通过确定以下因素中的一个或多个是否已经发生来评价:减少的细胞增殖、减少的细胞数目、增加的细胞凋亡、或至少一部分形成细胞增殖性病症的细胞的存活降低。

84. 项75的方法,其中治疗导致患者的肿瘤或转移的部分或完全消除和/或存活延长。

85. 项75的方法,其中所述一种或多种体征或症状的严重程度或持续时间降低约2%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约90%、约95%或约100%。

86. 项75的方法,其中所述一种或多种体征或症状的严重程度或持续时间降低约2倍、约5倍、约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、约50倍、约55倍、约60倍、约65倍、约70倍、约75倍、约80倍、约90倍、约95倍、约100倍或更多倍。

87. 项75的方法,其包含约25 mg/ml抗CD105抗体或其抗原结合片段。

88. 项75的方法,其包含约50 mg/ml抗CD105抗体或其抗原结合片段。

89. 权利要求75的方法,其包含约100 mg/ml抗CD105抗体或其抗原结合片段。

90. 项75的方法,其中所述缓冲剂是组氨酸或乙酸盐。

91. 项90的方法,其包含约20 mM组氨酸或乙酸盐。

92. 项75的方法,其中所述多元醇是糖。

93. 项92的方法,其中所述糖是非还原性糖。

94. 项93的方法,其中所述非还原性糖是海藻糖或蔗糖。

95. 项94的方法,其包含约240 mM海藻糖或蔗糖。

96. 项92的方法,其中所述糖是山梨糖醇。

97. 项96的方法,其包含约240 mM山梨糖醇。

98. 项75的方法,其中所述制剂包含小于300 mM多元醇,且所述制剂用盐制成等渗。

99. 项75的方法,其进一步包含表面活性剂。

100. 项99的方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80或Pluronic® F68。

101. 项75的方法,其中静脉内施用所述制剂。

102. 制剂,其包含表1的制剂1-39中的任一种。

103. 预充式注射器,其包含项102的制剂。

104. 项102的制剂用于治疗血管生成相关疾病的用途。

105. 项102的制剂在制备用于治疗血管生成相关疾病的药物中的用途。

## 附图说明

[0052] 在随附的权利要求中具体描述了实施方案的新特点。通过参考描述说明性实施方案(其中采用了实施方案的原则)和附图的以下详述可以获得本实施方案的特征和优点的更好理解,所述附图如下:

图1A-J提供了本文所述的抗CD105抗体(TRC105)的示例性氨基酸序列。图1A是抗CD105

抗体的代表性可变轻 (VL) 链 (SEQ ID NO:1); 图1B是抗CD105抗体的代表性恒定轻链 (CL) (SEQ ID NO:2); 图1C是抗CD105抗体的代表性可变重 (VL) 链 (SEQ ID NO:3); 且图1D是抗CD105抗体的代表性恒定  $\gamma$ -1重链 (SEQ ID NO:4)。图1E-G分别代表VL的CDR 1、2和3。图1H-J分别代表VH的CDR 1、2和3。

[0053] 图2提供了TGF- $\beta$ /ALK5信号传导途径的简图。TGF- $\beta$ /ALK5途径 (A) 导致细胞增殖的抑制。TGF- $\beta$ /ALK1途径 (B) 诱导内皮细胞增殖, 并需要CD105 (内皮因子) 进行ALK1信号传导。虚线指示无活性的或阻断的途径。加粗的箭头指示信号传导途径的刺激。

[0054] 发明详述

应当理解, 在本文中使用的术语仅用于描述具体实施方案的目的, 无意进行限制。此外, 应当理解, 与本文所述的那些类似或等效的许多方法和材料可以用于实践本发明。

[0055] 根据本申请, 可以采用常规的细胞生物学、分子生物学、微生物学和重组DNA技术, 如本领域完全解释的。

[0056] 如本说明书和随附权利要求中所使用, 单数形式 “一 (a)”、“一 (an)” 和 “该 (the)” 包括复数对象, 除非上下文另有清楚指明。因此, 例如, 提及 “方法” 包括本文描述和/或在阅读本公开内容之后对于本领域技术人员变得显而易见的该类型的一种或多种方法和/或步骤。

[0057] 抗CD105抗体可用于治疗或预防各种形式的血管生成相关的病症。本文描述了通过施用本文所述制剂来治疗或预防各种形式的癌症、实体瘤和转移等的方法。

[0058] 抗体术语

本文使用的术语 “抗体” 表示免疫球蛋白 (Ig), 无论天然的还是部分地或完全地合成生产的。该术语也涵盖具有结合结构域的任何多肽或蛋白, 所述结合结构域是抗原结合结构域或与抗原结合结构域同源。该术语另外包括 “抗原结合片段” 和诸如下述的类似结合片段的其他可互换的术语。

[0059] 天然抗体和天然免疫球蛋白通常是约150,000道尔顿的异源四聚体糖蛋白, 其由2个相同的轻 (L) 链和2个相同的重 (L) 链组成。每个轻链通常通过一个共价二硫键与重链相连, 而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链之间存在差异。每个重链和轻链也具有规则分布的链内二硫键。每个重链具有在一个末端处的可变结构域 (“V<sub>H</sub>” 或 “VH”), 其后是许多恒定结构域 (“C<sub>H</sub>” 或 “CH”)。每个轻链具有在一个末端处的可变结构域 (“V<sub>L</sub>” 或 “VL”) 和在它的另一个末端处的恒定结构域 (“C<sub>L</sub>” 或 “CL”); 轻链的恒定结构域与重链的第一个恒定结构域对齐, 并且轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐。认为特定氨基酸残基形成轻链和重链可变结构域之间的界面。

[0060] 本文使用的术语 “合成的多核苷酸”、“合成的基因” 或 “合成的多肽” 表示, 对应的多核苷酸序列或其部分或氨基酸序列或其部分源自已经设计的序列, 或从新合成, 或与等效的天然存在的序列相比被修饰。通过本领域已知的方法, 可以制备合成的多核苷酸 (抗体或抗原结合片段) 或合成的基因, 所述方法包括但不限于: 核酸或氨基酸序列的化学合成。合成的基因通常在氨基酸或多核苷酸水平 (或在两个水平) 不同于天然存在的基因, 且通常位于合成的表达控制序列的背景内。与天然的基因相比, 合成的基因多核苷酸序列可能不一定编码具有不同氨基酸的蛋白; 例如, 它们也可以包括合成的多核苷酸序列, 所述多核苷酸序列掺入不同的密码子, 但是它们编码相同的氨基酸 (即, 核苷酸变化代表在氨基酸水平

的沉默突变)。

[0061] 关于抗体,术语“可变结构域”表示,在每个特定抗体与它的特定抗原的结合和特异性中使用的抗体可变结构域。但是,变异性不均匀地分布在抗体的可变结构域中。相反,它集中在3个称作高变区(也称作CDR)的区段中,所述区段在轻链和重链可变结构域两者中。可变结构域的更高度保守的部分被称作“框架区”或“FR”。未修饰的重链和轻链的可变结构域各自含有4个FR(FR1、FR2、FR3和FR4),它们主要采取 $\beta$ -折叠构型,其间散布着3个CDR,所述CDR形成环,并在某些情况下连接 $\beta$ -折叠结构部分。每个链中的CDR被FR保持紧密靠在一起,并与来自其他链的CDR一起,促进抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), 第647-669页)。

[0062] 在本文中使用的术语“高变区”和“CDR”表示,抗体的负责抗原结合的氨基酸残基。CDR包括来自3个序列区的氨基酸残基,所述序列区以互补方式结合抗原,并被称作CDR1、CDR2和CDR3(对于每个 $V_H$ 和 $V_L$ 链)。根据Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)),在轻链可变结构域中,CDR通常对应于大致残基24-34(CDRL1)、50-56(CDRL2)和89-97(CDRL3),在重链可变结构域中,CDR通常对应于大致残基残基31-35(CDRH1)、50-65(CDRH2)和95-102(CDRH3)。应当理解,不同抗体的CDR可以含有插入序列,因而氨基酸编号可能不同。Kabat编号系统用下述编号方案来描述这样的插入序列:所述方案利用与特定残基相连的字母(例如,在轻链中,CDRL1的27A、27B、27C、27D、27E和27F)来反映在不同抗体之间的编号的任何插入。或者,根据Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917(1987)),在轻链可变结构域中,CDR通常对应于大致残基26-32(CDRL1)、50-52(CDRL2)和91-96(CDRL3),并且在重链可变结构域中,CDR通常对应于大致残基26-32(CDRH1)、53-55(CDRH2)和96-101(CDRH3)。

[0063] 本文使用的“框架区”或“FR”表示,形成抗原结合槽或沟的一部分的框架氨基酸残基。在一些实施方案中,所述框架残基形成环,所述环是抗原结合槽或沟的一部分,且在所述环中的氨基酸残基可以接触或不接触抗原。框架区通常包括在CDR之间的区域。根据Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)),在轻链可变结构域中,FR通常对应于大致残基0-23(FRL1)、35-49(FRL2)、57-88(FRL3)和98-109,在重链可变结构域中,FR通常对应于大致残基0-30(FRH1)、36-49(FRH2)、66-94(FRH3)和103-133。如上面关于轻链的Kabat编号所讨论的,重链也以类似的方式描述插入(例如,在重链中,CDRH1的35A、35B)。或者,根据Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917(1987)),在轻链可变结构域中,FR通常对应于大致残基0-25(FRL1)、33-49(FRL2) 53-90(FRL3)和97-109(FRL4),在重链可变结构域中,FR通常对应于大致残基0-25(FRH1)、33-52(FRH2)、56-95(FRH3)和102-113(FRH4)。

[0064] 抗体的恒定结构域(Fc)不直接参与抗体与抗原的结合,但是相反地表现出不同的效应物功能,诸如通过与例如Fc受体(FcR)的相互作用,抗体参与抗体依赖性的细胞毒性。Fc结构域也可以增加抗体在施用给患者以后在循环中的生物利用度。用鼠Fc结构域置换人Fc结构域,也可以减少HAMA副反应。

[0065] 根据它们的重链的恒定结构域的氨基酸序列,可以将免疫球蛋白归入不同的类别。存在5个主要的免疫球蛋白类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,这些中的几个可以进一步分成子类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。与不同类别的免疫球蛋白相对应的重链恒定结构域(Fc)分别被称作 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。

[0066] 基于它们的恒定结构域的氨基酸序列,可以将来自任何脊椎动物物种的抗体的“轻链”归入2个明显不同的类型(称作“ $\kappa$ ”和“ $\lambda$ ”)之一。

[0067] 术语“抗体的抗原结合部分”、“抗原结合片段”、“抗原结合结构域”、“抗体片段”或“抗体的功能片段”在本文中互换地用于表示抗体的一个或多个片段,所述片段保留特异性地结合抗原的能力。在这样的术语内包括的抗体片段的非限制性实施例包括、但不限于:(i) Fab片段,即由 $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$ 和 $C_{H1}$ 结构域组成的单价片段;(ii)  $F(ab')_2$ 片段,即含有2个通过在铰链区处的二硫键相连的Fab片段的二价片段;(iii) 由 $V_H$ 和 $C_{H1}$ 结构域组成的Fd片段;(iv) 含有抗体的单臂的 $V_L$ 和 $V_H$ 结构域的Fv片段;(v) dAb片段(Ward等人,(1989) Nature 341:544-546),其含有 $V_H$ 结构域;和(vi) 分离的CDR。在该定义中另外包括含有单个重链和单个轻链的“一半”抗体。在本文中也包括其他形式的单链抗体,诸如双特异抗体(diabodies)。

[0068] 通过用蛋白酶(诸如胃蛋白酶和木瓜蛋白酶)处理Ig,可以生产“ $F(ab')_2$ ”和“Fab”部分,且 $F(ab')_2$ 和Fab'包括通过在二硫键附近消化免疫球蛋白所产生的抗体片段,所述二硫键存在于2个重链中的每一个内的铰链区之间。例如,木瓜蛋白酶会在存在于2个重链中的每一个内的铰链区之间的二硫键的上游切割IgG,以产生2个同源的抗体片段,其中由 $V_L$ 和 $C_L$ 构成的轻链(轻链恒定区)和由 $V_H$ 和 $C_{H1}$ 区构成的重链片段(在重链的恒定区中)在它们的C端区域通过二硫键相连。这2个同源的抗体片段中的每一个被称作Fab'。胃蛋白酶也会在存在于2个重链中的每一个内的铰链区之间的二硫键的下游切割IgG,以产生这样的抗体片段:所述片段稍微大于2个上述的Fab'在其中在铰链区处相连的片段。该抗体片段被称作 $F(ab')_2$ 。

[0069] Fab片段也含有轻链的恒定结构域和重链的第一个恒定结构域( $C_{H1}$ )。Fab'片段与Fab片段的差别在于,在重链 $C_{H1}$ 结构域的羧基端处添加了几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH在本文中表示这样的Fab':其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基携带游离的巯基。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初被生产为Fab'片段对,它们具有在它们之间的铰链半胱氨酸。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。

[0070] “Fv”表示含有完整抗原识别和抗原结合位点的抗体片段。该区域由紧密地非共价或共价结合的一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体组成(本领域已经描述了二硫键连接的Fv,Reiter等人(1996) Nature Biotechnology 14:1239-1245)。在该构型中,每个可变结构域的3个CDR相互作用,以限定在 $V_H$ - $V_L$ 二聚体的表面上的抗原结合位点。来自每个 $V_H$ 和 $V_L$ 链的一个或多个CDR的组合一起赋予抗体抗原结合特异性。例如,应当理解,例如,当转移至受体抗体的 $V_H$ 和 $V_L$ 链或其抗原结合片段上时,CDRH3和CDRL3足以赋予抗体抗原结合特异性,且可以使用本文所述的任何技术测试该CDR组合的结合、亲和力等。即使单个可变结构域(或仅包含对抗原特异性的3个CDR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,尽管亲和力可能比与第二个可变结构域相组合时更低。此外,尽管Fv片段的2个结构域( $V_L$ 和 $V_H$ )由单

独的基因编码,使用重组方法,通过合成的接头可以连接它们,所述接头使它们能够制成单个蛋白链,其中V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>区配对形成单价分子(称作单链Fv(scFv); Bird等人(1988) *Science* 242:423-426; Huston等人(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883;和 Osbourn等人(1998) *Nat. Biotechnol.* 16:778)。在术语抗体的“抗原结合部分”内,也意图包括这样的scFv。可以将特定scFv的任何V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>序列连接到Fc区cDNA或基因组序列上,以便制备编码完整Ig(例如,IgG)分子或其他同种型的表达载体。V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>也可以用于使用蛋白化学或重组DNA技术制备Fab、Fv或Ig的其他片段。

[0071] “单链Fv”或“sFv”抗体片段包含抗体的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。在一些实施方案中,所述Fv多肽另外包含在V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域之间的多肽接头,其使sFv能够形成抗原结合所期望的结构。关于sFv的综述,参见,例如,Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg和Moore编Springer-Verlag, New York,第269-315页(1994)。

[0072] 术语“AVIMER™”表示一类人来源的治疗蛋白,它们与抗体和抗体片段无关,由几个模块的且可重复使用的结合结构域构成,所述结合结构域称作A-结构域(也称作A类模块、补体型重复序列或LDL-受体类A结构域)。它们通过体外外显子改组和噬菌体展示从人胞外受体结构域发展而成(Silverman等人, 2005, *Nat. Biotechnol.* 23:1493-1494; Silverman等人, 2006, *Nat. Biotechnol.* 24:220)。得到的蛋白可以含有多个独立结合结构域,它们与单表位结合蛋白相比,可以表现出提高的亲合力(在某些情况下,低于纳摩尔)和特异性。参见,例如,美国专利申请公开号2005/0221384、2005/0164301、2005/0053973和2005/0089932、2005/0048512和2004/0175756,它们各自在此以其整体通过引用并入本文。

[0073] 已知的217个人A-结构域中的每一个包含约35个氨基酸(约4 kDa);这些结构域被接头隔开,所述接头的长度是平均5个氨基酸。天然A-结构域快速地且有效地折叠成均匀的、稳定的结构,这主要由钙结合和二硫键形成来介导。该共有结构需要仅12个氨基酸的保守支架基序。最终结果是含有多个结构域的单个蛋白链,每个结构域代表单独的功能。所述蛋白的每个结构域独立地结合,且每个结构域的能量贡献(energetic contributions)是累加的。这些蛋白被称作来自亲合力多聚体的“AVIMERS™”。

[0074] 术语“双特异抗体”表示具有2个抗原结合位点的小抗体片段,所述片段包含在相同多肽链(VH-VL)中与轻链可变结构域(VL)相连的重链可变结构域(VH)。通过使用太短而不允许在相同链上的2个结构域之间配对的接头,迫使所述结构域与另一条链的互补结构域配对,并生成2个抗原结合位点。双特异抗体更完整地描述在,例如,EP 404,097; WO 93/11161;和Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444 6448 (1993)。

[0075] 抗原结合多肽也包括重链二聚体,诸如,例如,来自骆驼类(camelids)和鲨鱼的抗体。骆驼类和鲨鱼抗体包括V-样和C-样结构域的2条链的同源二聚体对(都不具有轻链)。因为骆驼类的重链二聚体IgG的V<sub>H</sub>区不一定与轻链产生疏水相互作用,在骆驼类中,通常接触轻链的重链中的该区域变成亲水氨基酸残基。重链二聚体IgG的V<sub>H</sub>结构域称作V<sub>HH</sub>结构域。鲨鱼Ig-NAR包含1个可变结构域(称作V-NAR结构域)和5个C-样恒定结构域(C-NAR结构域)的同源二聚体。在骆驼类中,抗体所有组成部分的多样性由V<sub>H</sub>或V<sub>HH</sub>区中的CDR 1、2和3决定。骆驼V<sub>HH</sub>区中的CDR3的特征在于它的相对长的长度,平均16个氨基酸(Muyldermans等人,

1994, *Protein Engineering* 7(9): 1129)。这不同于许多其他物种的抗体的CDR3区。例如,小鼠V<sub>H</sub>的CDR3具有平均9个氨基酸。通过例如在美国专利申请系列号20050037421中公开的方法,可以制备骆驼类-衍生的抗体可变区(它们维持骆驼类可变区的体内多样性)的文库。

[0076] “嵌合”形式的非人(例如,鼠)抗体包括:含有源自非人Ig的最小序列的嵌合抗体。在最大程度上,嵌合抗体是这样的鼠抗体:其中插入了免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分(通常人免疫球蛋白的至少一部分)来替代鼠Fc。关于细节,参见Jones等人, *Nature* 321: 522-525 (1986); Reichmann等人, *Nature* 332: 323-329 (1988);和Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)。

[0077] 本文使用的术语“单克隆抗体”表示从基本上同质的抗体群体得到的抗体,即,除了可能以微量存在的可能天然存在的突变以外,构成该群体的个体抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原位点。此外,不同于常规的(多克隆的)抗体制剂(它们可以包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体),每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰词“单克隆”指示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体得到,不应解释为需要通过任何特定方法生产抗体。例如,单克隆抗体可以通过Kohler等人, *Nature* 256:495 (1975) 首先描述的杂交瘤方法来制备,或可以通过重组DNA方法(参见,例如,美国专利号4,816,567)来制备。在某些实施方案中,使用例如在Clackson等人, *Nature* 352:624-628 (1991) 和Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) 中所述的技术,可以从噬菌体抗体文库分离出单克隆抗体。

[0078] 通过饱和硫酸铵沉淀、优球蛋白沉淀法、己酸方法、辛酸方法、离子交换色谱法(DEAE或DE52)或使用抗-Ig柱或蛋白A、G或L柱的亲色色谱法(诸如下面更详细地描述的那些),可以从上述的培养物上清液或腹水分离和纯化抗体。

[0079] 当构建免疫球蛋白分子时,可变区或其部分可以与一个或多个恒定区或其部分融合、连接或以其他方式相连,以生成本文所述的任何抗体。这可以以本领域已知的多种方式来实现,包括但不限于:分子克隆技术,或直接合成编码所述分子的核酸。

[0080] 本文使用的“免疫反应性的”表示这样的结合剂、抗体或其片段:它们对氨基酸残基的序列(“结合位点”或“表位”)是特异性的,而如果与其他肽/蛋白具有交叉反应性,则在它们为了施用于人用途而配制的水平是无毒的。术语“结合”表示在生理条件下由于例如共价、静电、疏水和离子和/或氢键相互作用而发生的2个分子之间的直接结合,包括相互作用诸如盐桥和水桥和任何其他常规结合方式。术语“优先地结合”表示,与它结合无关的氨基酸序列相比,结合剂以更大的亲和力结合结合位点。与结合剂对无关的氨基酸序列的亲和力相比,亲和力可以是至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍或至少1000倍。术语“免疫反应性的”和“优先地结合”在本文中可互换地使用。

[0081] 本文使用的术语“亲和力”表示2种试剂的可逆结合的平衡常数,并表示为K<sub>d</sub>。结合蛋白对配体的亲和力(诸如抗体对表位的亲和力)可以是,例如,约100纳摩尔(nM)至约0.1 nM、约100 nM至约1皮摩尔(pM)或约100 nM至约1飞摩尔(fM)。本文使用的术语“亲合力”表示,2种或更多种试剂的复合物在稀释以后对解离的抵抗力。通过诸如酶联免疫吸附测定

(ELISA) 或本领域技术人员熟悉的任何其他技术等方法,可以测定表观亲和力。通过诸如 Scatchard 分析或本领域技术人员熟悉的任何其他技术等方法,可以测定亲和力。

[0082] “表位”表示,抗原或其他大分子的能够与抗体的可变区结合槽形成结合相互作用的部分。这样的结合相互作用可以显示为与一个或多个 CDR 的一个或多个氨基酸残基的分子间接触。抗原结合可以涉及,例如,CDR3 或 CDR3 对,或在某些情况下, V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 链的多达所有 6 个 CDR 的相互作用。表位可以是线性肽序列(即,“连续的”),或可以由不连续的氨基酸序列(即,“构象的”或“不连续的”)构成。抗体可以识别一个或多个氨基酸序列;因此,表位可以限定超过一个独特的氨基酸序列。通过本领域技术人员众所周知的肽作图和序列分析技术,可以测定由抗体识别的表位。结合相互作用显示为与 CDR 的一个或多个氨基酸残基的分子间接触。TRC105 是一种鼠抗体,它是与在美国专利号 5,928,641、6,200,566、6,190,660 和 7,097,836 中描述为 Y4-2F1 或 SN6j 的鼠抗体相同的氨基酸序列。以前已经鉴定出 Y4-2F1 和 SN6j 识别(因而 TRC105 也识别)的表位。

[0083] 术语“特异性的”表示这样的情形:其中抗体不再显示出对除了含有抗体识别的表位的抗原以外的分子的任何显著结合。该术语也适用于这样的情形:例如,抗原结合结构域对许多抗原携带的特定表位是特异性的,在该情况下,抗体能够结合携带所述表位的不同抗原。术语“优先地结合”或“特异性地结合”表示,与它结合无关的氨基酸序列相比,抗体以更大的亲和力结合表位,且如果与其他含有所述表位的多肽具有交叉反应性,则在它们为了施用于人用途而配制的水平是无毒的。在一个方面,与抗体对无关的氨基酸序列的亲和力相比,这样的亲和力是大至少 1 倍、大至少 2 倍、大至少 3 倍、大至少 4 倍、大至少 5 倍、大至少 6 倍、大至少 7 倍、大至少 8 倍、大至少 9 倍、大 10 倍、大至少 20 倍、大至少 30 倍、大至少 40 倍、大至少 50 倍、大至少 60 倍、大至少 70 倍、大至少 80 倍、大至少 90 倍、大至少 100 倍或大至少 1000 倍。术语“免疫反应性的”、“结合”、“优先地结合”和“特异性地结合”在本文中可互换地使用。术语“结合”表示在生理条件下由于例如共价、静电、疏水和离子和/或氢键相互作用而发生的 2 个分子之间的直接结合,包括相互作用诸如盐桥和水桥以及任何其他常规结合方式。

[0084] 当应用于多肽时,“分离的”(与“基本上纯的”可互换地使用)表示多肽或其部分,其因为它的来源或操作而:(i) 存在于宿主细胞中,作为表达载体的一部分的表达产物;或(ii) 与它在自然界中相连的那些以外的蛋白或其他化学部分相连;或(iii) 在自然界中不存在,例如,如下化学操作的蛋白:向所述蛋白附加或添加至少一个疏水部分,使得所述蛋白处于在自然界中不存在的形式。“分离的”另外表示这样的蛋白,其:(i) 是化学合成的;或(ii) 在宿主细胞中表达,并从结合的蛋白和污染蛋白中纯化出来。该术语通常表示这样的多肽:其已经与它天然地伴随的其他蛋白和核酸分离开。通常,所述多肽也与用于纯化它的物质分离,所述物质诸如抗体或凝胶基质(聚丙烯酰胺)。

[0085] 血管生成术语

本文使用的术语“血管生成抑制性的”、“抑制血管生成的”或“抗血管生成的”包括血管发生(vasculogenesis)的抑制,且意在表示实现新生血管形成的程度、量或速率的减小。实现组织中内皮细胞增殖或迁移的程度、量或速率的减小,是抑制血管生成的具体实例。

[0086] 术语“血管生成抑制性的组合物”表示这样的组合物:其抑制血管生成介导的过程,诸如内皮细胞迁移、增殖、管形成,并随后导致从现有血管产生新血管的抑制,并从而影

响血管生成依赖性的状况。

[0087] 本文使用的术语“血管生成依赖性的状况”意在表示这样的状况：其中血管生成或血管发生的过程支持或增加病理状态，或有利地影响正常的生理过程。因此，其中血管生成支持病理状态的血管生成依赖性的状况的治疗可能导致疾病的缓解，而其中血管生成有利地影响正常的生理过程的血管生成依赖性的状况的治疗可能导致例如正常过程的增强。

[0088] 血管生成是从预先存在的毛细血管或毛细血管后微静脉形成新血管。血管发生源自成血管细胞（它们是内皮细胞前体）产生的新血管的形成。两个过程均导致新血管形成，并被包括在术语血管生成依赖性的状况的含义中。本文使用的术语“血管生成”意图包括，血管的重新形成，诸如从血管发生产生的血管以及从现有血管、毛细血管和微静脉的分支和生长产生的血管。血管生成也可以涉及，诱导ALK1信号传导和有关的Smad 1/5/8磷酸化和/或信号传导。还已知CD105涉及ALK1信号传导途径，因而也被包括在血管生成的含义内。

[0089] 已经在人肾癌中发现了启动肿瘤的CD105<sup>+</sup>细胞群体。CD105<sup>+</sup>细胞呈现出以前关于在其他肿瘤类型中存在的癌症干细胞所述的肿瘤干细胞的特征。观察到的CD105<sup>+</sup>细胞是形成无性系的，表达干细胞标志物，并缺少分化标志物，可以在体外分化成上皮和内皮细胞类型，且可以在体内产生可连续移植的肿瘤。尽管源自表达间质标志物的克隆，所述肿瘤是上皮癌（作为来源肿瘤），且特征在于：CD105<sup>+</sup>致瘤群体的维持，和非致瘤性的分化的CD105<sup>-</sup>群体的存在。

[0090] “诱导宿主免疫应答”表示，患者经历疾病的体征或症状的减轻或减少，具体地包括但不限于存活期的延长。

[0091] 本文使用的术语“增殖病症”和“增殖状况”表示，特征在于异常的或不期望的增殖的任何病理学的或非病理学的生理状况。术语“细胞增殖病症”和“细胞增殖状况”表示，特征在于异常的或不期望的细胞增殖的任何病理学的或非病理学的生理状况，以及包括：特征在于不期望的或不需要的细胞增殖或细胞存活（例如，由于有缺陷的细胞凋亡）的状况，特征在于有缺陷的或异常的或有缺陷的细胞凋亡的状况，以及特征在于异常的或不期望的或不需要的细胞存活的状态。术语“分化病症”表示，特征在于异常的或有缺陷的分化的任何病理学的或非病理学的生理状况。

[0092] 顺从治疗的增殖或分化病症包括：特征在于异常的或不期望的细胞数目、细胞生长或细胞存活的良性的和肿瘤性的疾病状况。这样的病症或状况因此可以构成疾病状态，且包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移组织或恶性转化的细胞、组织或器官。

[0093] 包含增殖或分化病症的细胞可以聚集成细胞团，或是分散的。“非实体瘤”表示：造血系统的瘤形成，诸如淋巴瘤、骨髓瘤和白血病，或在性质上是扩散的瘤形成，因为它们通常不形成实体块。白血病的具体实例包括：例如，急性和慢性淋巴母细胞性白血病、骨髓细胞白血病和多发性骨髓瘤。

[0094] 术语“实体瘤”表示通常聚集在一起并形成块的瘤形成或转移。这样的病症包括肿瘤或癌症，它们可以影响基本上任何细胞或组织类型，例如，癌、肉瘤、黑色素瘤、转移性病症或造血肿瘤性病症。转移性肿瘤可以源自多种原发性肿瘤类型，包括但不限于乳房、肺、甲状腺、头颈部、脑、淋巴样、胃肠道（嘴、食道、胃、小肠、结肠、直肠）、泌尿生殖道（子宫、卵巢、宫颈、膀胱、睾丸、阴茎、前列腺）、肾、胰腺、肝、骨、肌肉、皮肤等。

[0095] 癌表示上皮或内分泌组织的恶性肿瘤,且包括呼吸系统癌、胃肠道系统癌、泌尿生殖系统癌、睾丸癌、乳癌、前列腺癌、内分泌系统癌和黑色素瘤。示例性的癌包括:从宫颈、肺、前列腺、乳房、头颈部、结肠、肝和卵巢形成的那些。该术语也包括癌肉瘤,例如,它们包括由癌性和肉瘤性组织组成的恶性肿瘤。腺癌包括腺组织的癌,或其中肿瘤形成腺样结构。

[0096] 待治疗的癌性组织是,例如,表达异常水平的CD105的内皮组织或转化的细胞。本文使用的术语“转化的细胞”表示,已经自发地转化成无限制生长状态的细胞,即,它们已经获得通过在培养物中无限数目的分裂来生长的能力。在它们生长控制缺失方面,可以用诸如肿瘤性的、间变性的和/或增生性的等术语来表征转化的细胞。为了本发明的目的,术语“恶性哺乳动物细胞的转化表型”和“转化表型”意图包括、但不限于,与哺乳动物细胞的细胞转化有关的任何下述表型特性:永生化、形态或生长转化和致肿瘤性(通过在细胞培养物中的延长生长、在半固体培养基中的生长或在无免疫能力的或同源的动物中的致肿瘤生长来检测)。

[0097] 术语“肿瘤细胞抗原”在本文中被定义为,与无关的肿瘤细胞、正常细胞或在正常体液中相比,抗原以更高的量存在于肿瘤细胞上或在体液中。通过本领域技术人员已知的任何数目的试验,可以测试抗原存在,所述试验包括但不限于使用抗体的阴性和/或阳性选择,诸如ELISA试验、放射免疫测定或通过蛋白印迹。

[0098] 术语“细胞凋亡”或“程序化细胞死亡”表示这样的生理过程:在发育和其他正常生物学过程中,通过该过程来消除不期望的或无用的细胞。细胞凋亡是在正常生理条件下发生的细胞死亡模式,细胞是它自身的死亡的主动参加者(“细胞自杀”)。它最常见于下述过程中:正常的细胞更新和组织体内稳态、胚胎发生、免疫耐受性的诱导和维持、神经系统的发育和内分泌依赖性的组织萎缩。经历细胞凋亡的细胞表现出特有的形态学和生化特征。这些特征包括:染色质聚集、细胞核和细胞质浓缩、细胞质和细胞核分隔成膜结合的囊泡(凋亡小体,它们含有核糖体)、形态学上完整的线粒体和核质。在体内,这些凋亡小体快速地被巨噬细胞、树突细胞或邻近的上皮细胞识别和吞噬。由于在体内去除凋亡细胞的这种有效机制,不会引起炎症应答。在体外,凋亡小体以及剩余的细胞碎片最终膨胀,并最终裂解。该体外细胞死亡的末期已经被称作“次要坏死”。通过本领域技术人员已知的方法,可以测量细胞凋亡,所述方法如DNA片段化、膜联蛋白V的暴露、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶的活化、细胞色素C的释放等。已经诱导死亡的细胞在本文中称作“凋亡细胞”。

[0099] “细胞凋亡诱导剂”在本文中定义为诱导细胞凋亡/程序化细胞死亡,且包括,例如,抗-CD105抗体、抗-VEGF抗体、辐照、化疗剂或受体连接剂,其中细胞(例如,肿瘤细胞或内皮细胞)被诱导经历程序化细胞死亡。在下面更详细地描述了示例性的细胞凋亡诱导剂。

[0100] 使用标准的膜联蛋白V细胞凋亡试验,可以测试细胞凋亡:在6-孔板(NUNC)中培养NIH:OVCAR-3细胞,辐照,或用拮抗剂(或与另一种抗癌药相组合)处理4-48小时,洗涤,并用膜联蛋白V-FITC(BD-Pharmingen)染色1小时。通过流式细胞术(Becton-Dickinson, CellQuest)分析细胞,用碘化丙啶复染色,并在流式细胞计中再次分析。

[0101] 制备和表达抗体的方法

借助于基因工程,已经构建了嵌合的免疫球蛋白。以前已经描述的大多数嵌合的免疫球蛋白已经包含来自小鼠单克隆抗体的 $V_H$ 和 $V_L$ 和人抗体的 $C_L$ 和 $F_c$ 。可以使用来自本文所述的任何同种型的 $F_c$ 区。本文所述的嵌合的也可以包括这样的标准:通过所述标准,修饰轻链

可变区和/或重链可变链的框架中的有限数目的氨基酸,以便增加抗体的亲和力。

[0102] 就用于人治疗而言,嵌合抗体通常具有几个优于小鼠抗体的潜在优点。因为抗体的效应部分是人的,认为它会与人免疫系统的其他部分更好地相互作用(例如,通过补体依赖性的细胞毒性(CDC)或抗体依赖性的细胞的细胞毒性(ADCC)更有效地破坏目标细胞)。另外,人免疫系统不会将嵌合抗体的恒定区识别为外来物,因此针对这样的注射的抗体的抗体应答应当通常小于针对完全外来的小鼠抗体的抗体应答。最后,已知小鼠抗体在人循环中的半衰期远远短于人抗体的半衰期。据推测,嵌合抗体可以具有与天然存在的人抗体更类似的半衰期,这允许施用更小的且更低频率的剂量。

[0103] 当期望增加的抗体的亲和力时,可以额外地用其他氨基酸置换抗体的CDR内的残基。通常,改变CDR中的不超过4个氨基酸残基,更通常地,改变CDR中的不超过2个残基,但是重链CDR2除外,这时可以改变多达10个残基。通过常规方法,诸如本文所述的那些(例如,Biacore),可以测量亲和力的变化。

[0104] 使用本领域已知的常规技术,可以构建和生产抗体。另外,经常可以大量生产重组制备的抗体,特别当使用高水平表达载体时。

[0105] 对于兽医学应用,通过使用非人Fc,可以合成用于施用给非人类(例如,灵长类动物、牛、马、猪等)的抗体。

[0106] 使用在限制性内切核酸酶位点处的重组技术,可以使用本领域公认的技术(诸如本文提供和并入的那些)修饰编码氨基酸序列的核苷酸。

[0107] 为了表达,表达系统是这样的系统:其利用GS系统(Lonza),使用谷氨酰胺合成酶基因作为选择标记。简而言之,使用GS系统(Lonza),使用谷氨酰胺合成酶基因作为选择标记,通过电穿孔(250V),在CHO细胞中进行转染。在含有10%透析的胎牛血清(FCS,含有2 mM谷氨酰胺)的DMEM(Sigma)中,培养野生型CHO细胞。通过电穿孔,用300 $\mu$ g线性化的DNA,转染 $6 \times 10^7$  CHO细胞。在电穿孔以后,将细胞重新悬浮于含有谷氨酰胺的DMEM中,铺板在36x96-孔板(50 $\mu$ l/孔)上,在5% CO<sub>2</sub>中在37 °C孵育。次日,加入150 $\mu$ l/孔的选择性培养基(没有谷氨酰胺的DMEM)。在大约3周以后,使用无关的抗体作为阴性对照,通过ELISA(参见下面)筛选菌落。将生产>20 $\mu$ g/ml的所有菌落扩增到24-孔板中,然后扩增到双份T25烧瓶中。

[0108] 为了高水平生产,广泛使用的哺乳动物表达系统是这样的系统:其利用由脱氢叶酸盐还原酶缺陷型("dhfr-")中国仓鼠卵巢细胞提供的基因扩增操作。所述系统基于脱氢叶酸盐还原酶"dhfr"基因,该基因编码DHFR酶,该酶催化脱氢叶酸盐向四氢叶酸盐的转化。为了实现高产量,用含有功能性DHFR基因连同编码目标蛋白的基因的表达载体转染dhfr-CHO细胞。在该情况下,目标蛋白是重组抗体重链和/或轻链。

[0109] 通过增加竞争性DHFR抑制剂甲氨蝶呤(MTX)的量,重组细胞通过扩增dhfr基因来产生抗性。在标准情况下,采用的扩增单元远远大于dhfr基因的大小,结果共扩增抗体重链。

[0110] 当期望大规模生产蛋白(诸如抗体链)时,考虑采用的细胞的表达水平和稳定性。在长期培养中,重组CHO细胞群体在扩增过程中丧失在它们的特异性抗体生产力方面的同质性,即使它们源自单个亲代克隆。

[0111] 本申请提供了编码本文所述的抗体或其部分的分离的多核苷酸(核酸)、含有这种多核苷酸的载体以及用于将这种多核苷酸转录和翻译成多肽的宿主细胞和表达系统。

[0112] 本申请也提供了质粒、载体、转录或表达盒形式的构建体,其包含至少一个上述多核苷酸。

[0113] 本申请也提供了重组宿主细胞,其包含一个或多个上述的构建体。编码本文所述的任何抗体的核酸形成本申请的一个方面,抗体的生产方法也形成本申请的一个方面,所述方法包括:从由其来源的编码核酸实现表达。通过在适当条件下培养含有所述核酸的重组宿主细胞,可以方便地进行表达。在通过表达生产以后,使用任何合适的技术,可以分离和/或纯化抗体或其部分,然后适当地使用。

[0114] 可以从例如它们的天然环境中,以基本上纯的或同质的形式提供、分离和/或纯化编码特定抗体(或其部分)的核酸分子和含有本文所述的核酸分子的载体。在核酸的情况下,除了编码具有所需功能的多肽的序列以外的游离的或基本上游离的核酸或基因来源。核酸序列可以包含DNA或RNA,且可以是完全或部分合成的。纯化方法是本领域众所周知的。

[0115] 用于在多种不同的宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是众所周知的。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、酵母和杆状病毒系统。在本领域中可用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括、但不限于:中国仓鼠卵巢细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾细胞、NS0小鼠骨髓瘤细胞和许多其他细胞。

[0116] 多种单细胞宿主细胞也可用于表达DNA序列。这些宿主包括众所周知的真核和原核宿主,诸如在组织培养物中的大肠杆菌、假单胞菌属、芽孢杆菌属、链霉菌属、真菌(诸如酵母)和动物细胞(诸如CHO、YB/20、NS0、SP2/0、R1.1、B-W和L-M细胞、非洲绿猴肾细胞(例如,COS 1、COS 7、BSC1、BSC40和BMT10)、昆虫细胞(例如,Sf9)和人细胞和植物细胞的株系。

[0117] 抗体或其部分在原核细胞(诸如大肠杆菌)中的表达在本领域中是充分确立的。关于综述,参见例如Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991)。

[0118] 在培养的真核细胞中的表达也是本领域技术人员可用作为生产本文所述的抗体的一个选择,最新的综述参见,例如Raff, M.E. (1993) *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576; Trill J.J. 等人(1995) *Curr. Opinion Biotech* 6: 553-560,它们中的每一篇以其整体通过引用并入本文。

[0119] 可以选择或构建合适的载体,其含有适当调节序列,包括启动子序列、终止子序列、聚腺苷酸化序列、增强子序列、标志物基因和适当的其他序列。载体可以是适当的质粒、病毒载体,例如噬菌体或噬粒。关于其他细节,参见,例如,*Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 第2版, Sambrook等人, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press。许多已知的核酸操作技术和方法,例如核酸构建体的制备、诱变、测序、将DNA导入细胞中和基因表达以及蛋白的分析,详细描述在:*Short Protocols in Molecular Biology*, 第2版, Ausubel等人编, John Wiley & Sons, 1992。Sambrook等人和Ausubel等人的方法公开内容以其整体通过引用并入本文,且是本领域众所周知的。

[0120] 因而,另一个方面提供了一种宿主细胞,其含有本文公开的核酸。另一个方面提供了一种方法,所述方法包括:将这样的核酸导入宿主细胞中。所述导入可以采用任何可利用的技术。对于真核细胞,合适的技术可以包括,例如,磷酸钙转染、DEAE葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染和使用逆转录病毒或其他病毒(例如,牛痘,或者对于昆虫细胞,杆状病毒)的转导。对于细菌细胞,合适的技术可以包括,例如,氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体的转

染。

[0121] 在导入之后,可以造成或允许从核酸的表达,例如通过在基因表达条件下培养宿主细胞。

[0122] 在一个实施方案中,将核酸整合进宿主细胞的基因组(例如染色体)中。根据标准技术,通过包含促进与基因组的重组的序列,可以促进整合。根据需要,可以初始化Ig增强,以使表达最大化。

[0123] 本申请也提供了一种方法,所述方法包括:在表达系统中使用上述的构建体,以便表达上述的抗体(或其部分)。

[0124] 本申请也涉及分离的核酸,诸如重组DNA分子或克隆的基因或其简并变体、突变体、类似物或其片段,它们编码结合CD105的抗体。

[0125] 在另一个实施方案中,本文所述的抗体或其部分的重组DNA分子或克隆的基因的完整DNA序列可以可操作地连接到表达控制序列上,后者可以导入适当宿主中。本申请因此延伸至单细胞宿主,所述宿主被抗体的克隆基因或包含编码抗体的V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、C<sub>L</sub>和/或Fc的DNA序列的重组DNA分子转化。

[0126] 另一个特征是,本文公开的DNA序列的表达。如本领域众所周知的,可以如下表达DNA序列:将它们可操作地连接至适当表达载体中的表达控制序列上,并采用该表达载体来转化适当的单细胞宿主。

[0127] DNA序列与表达控制序列的这种可操作连接当然地包括(如果不是DNA序列的部分):在DNA序列上游的正确读码框中,提供起始密码子ATG。

[0128] 可以以分离的和/或纯化的形式(例如,不含或基本上不含编码具有所需功能的多肽的多核苷酸以外的来源的多核苷酸)提供多核苷酸和载体。本文使用的“基本上纯的”和“基本上不含”表示,含有少于例如约20%或更少外来物、约10%或更少外来物、约5%或更少外来物、约4%或更少外来物、约3%或更少外来物、约2%或更少外来物或约1%或更少外来物的溶液或悬浮液。

[0129] 多种宿主/表达载体组合可以用于表达本发明的DNA序列。有用的表达载体,例如,可以由染色体的、非染色体的和合成的DNA序列的区段组成。合适的载体包括、但不限于:SV40和已知的细菌质粒的衍生物,例如,大肠杆菌质粒col E1、Pcr1、Pbr322、Pmb9和它们的衍生物,质粒诸如RP4;噬菌体DNA,例如,噬菌体λ的众多衍生物,例如,NM989和其他噬菌体DNA,例如,M13和丝状单链噬菌体DNA;酵母质粒诸如2u质粒或其衍生物;可用于真核细胞中的载体,诸如可用于昆虫或哺乳动物细胞中的载体;源自质粒和噬菌体DNA的组合的载体,诸如已经被修饰成采用噬菌体DNA或其他表达控制序列的质粒;等。

[0130] 本文也提供了一种重组宿主细胞,其包含一种或多种多核苷酸构建体。编码本文提供的抗体的多核苷酸形成本申请的一个方面,抗体的生产方法也形成本申请的一个方面,所述方法包括:从一种或多种多核苷酸进行表达。例如,通过在适当条件下培养含有所述多核苷酸的重组宿主细胞,可以实现表达。然后使用任何合适的技术,可以分离和/或纯化抗体,并适当地使用。

[0131] 多种表达控制序列(控制可操作地连接到它上的DNA序列的表达的序列)中的任何一种可以用于这些载体中,以表达DNA序列。这样的有用的表达控制序列包括,例如,SV40的早期或晚期启动子、CMV、牛痘、多瘤或腺病毒、*lac*系统、*trp*系统、TAC系统、TRC系统、LTR系统、

噬菌体 $\lambda$ 的主要操纵子和启动子区、fd外壳蛋白的控制区、3-磷酸甘油酸酯激酶或其他糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子(例如,Pho5)、酵母 $\alpha$ 交配因子的启动子和已知控制原核或真核细胞的基因或它们的病毒的表达的其他序列和它们的不同组合。

[0132] 应当理解,并非所有载体、表达控制序列和宿主同样好地起表达DNA序列的功能。也并非所有宿主对相同的表达系统同样好地起作用。但是,无需过多实验,本领域技术人员能够选择适当的载体、表达控制序列和宿主,以实现期望的表达,而不脱离本申请的范围。例如,在选择载体时,必须考虑宿主,因为所述载体必须在所述宿主中发挥功能。还会考虑载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力以及由所述载体编码的任何其他蛋白(诸如抗生素标志物)的表达。本领域普通技术人员可以选择适当的载体、表达控制序列和宿主,以实现期望的表达,而不脱离本申请的范围。例如,在选择载体时,考虑宿主,因为所述载体必须在所述宿主中发挥功能。还可以考虑载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力以及由所述载体编码的任何其他蛋白(诸如抗生素标志物)的表达。

[0133] 本申请也提供了在本文别处所述的质粒、载体、转录或表达盒形式的构建体,它们包括至少一个上述的多核苷酸。可以选择或构建合适的载体,其含有适当的调节序列,包括启动子序列、终止子序列、聚腺苷酸化序列、增强子序列、选择标记和适当的其他序列。载体可以是适当的质粒、病毒,例如适当的噬菌体、噬粒等。关于其他细节,参见,例如, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 第2版, Sambrook等人, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press。许多已知的核酸操作技术和方案,例如核酸构建体的制备、诱变、测序、将DNA导入细胞中和基因表达以及蛋白的分析,详细描述在: *Short Protocols in Molecular Biology*, 第2版, Ausubel等人编, John Wiley & Sons, 1992。Sambrook等人和Ausubel等人的方法和公开内容以其整体通过引用并入本文。

[0134] 在选择表达控制序列时,通常考虑多种因素。这些因素包括,例如,系统的相对强度、它的可控性和它与要表达的特定DNA序列或基因的相容性,特别是在潜在二级结构方面。通过考虑例如它们与选择的载体的相容性、它们的分泌特征、它们的正确折叠蛋白的能力、和它们的发酵需要以及由要表达的DNA序列编码的产物对宿主的毒性和表达产物的纯化容易性,选择合适的单细胞宿主。

[0135] 另一个方面提供了一种宿主细胞,其含有一种或多种本文公开的多核苷酸。另一个方面提供了通过任何可利用的技术将这样的一种或多种多核苷酸导入宿主细胞中的方法。对于真核细胞,合适的技术可以包括,例如,磷酸钙转染、DEAE葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染和使用逆转录病毒或其他病毒(例如,牛痘),或者对于昆虫细胞,杆状病毒的转导。对于细菌细胞,合适的技术可以包括,例如,氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体的转染。

[0136] 在导入之后,可以造成或允许一种或多种多核苷酸的表达,例如通过在从一种或多种多核苷酸表达一种或多种多肽的条件下培养宿主细胞。可以使用可诱导的系统,并通过加入活化剂来诱导表达。

[0137] 在一个实施方案中,可以将多核苷酸整合进宿主细胞的基因组(例如染色体)中。根据标准技术,通过包含促进与基因组的重组的序列,可以促进整合。在另一个实施方案中,所述核酸维持在宿主细胞中的附加型载体上。

[0138] 本文提供了这样的方法,所述方法包括:在表达系统中使用上述的构建体,以便表达特定多肽。

[0139] 考虑到这些和其他因素,本领域技术人员能够构建多种载体/表达控制序列/宿主组合,它们在发酵或大规模动物培养中表达所述DNA序列。

[0140] 除了克隆以外,或作为克隆的替代,可以重组地/合成地制备编码抗体或其部分的多核苷酸。可以将多核苷酸设计成具有适当的密码子。一般而言,如果序列要用于表达,将选择对于目标宿主而言优选的密码子。可以从通过标准方法制备的重叠寡核苷酸装配完整多核苷酸,并装配成完整编码序列。参见,例如,Edge, *Nature*, 292:756 (1981); Nambair 等人, *Science*, 223:1299 (1984); Jay等人, *J. Biol. Chem.*, 259:6311 (1984)。

[0141] 通过本领域技术人员已知的多种方法,包括例如重组方法和化学合成,可以同时掺入编码抗体(或其部分)的核酸和选择的氨基酸位置变化。

[0142] 抗-CD105抗体

内皮因子(CD105)在细胞表面上表达为180 kDa同源二聚体跨膜蛋白。外部结构域以高亲和力(50 nM)结合TGF- $\beta$ 1和-3同种型,且CD105的跨膜和细胞内结构域与 $\beta$ 聚糖共有71%序列相似性。人CD105基因位于染色体9q34上(使用荧光原位杂交进行鉴定),编码区含有14个外显子,已经表征了具有结合TGF- $\beta$ 的能力的CD105的2个不同同种型(L和S)。L-CD105由633个氨基酸残基组成,其中47个氨基酸残基在细胞质尾巴中,这不同于S-CD105,后者由600个氨基酸残基组成,其具有14个氨基酸细胞质尾巴。但是,L-CD105是优势形式。CD105在内皮细胞中组成性地磷酸化,主要在丝氨酸和苏氨酸残基上,且该磷酸化是由于在细胞内组成活性的TGF- $\beta$ RII。TGF- $\beta$ 与CD105的结合导致磷酸化的下调,这类似于用蛋白激酶C抑制剂观察到的效应。人CD105氨基酸序列含有位于胞外结构域的暴露区域中的三肽精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)。RGD肽是在ECM蛋白(诸如纤连蛋白、玻璃体结合蛋白、von Willebrand因子(vWF)、I型胶原和纤维蛋白原)上发现的关键识别结构,且被细胞表面整联蛋白识别。整联蛋白附着已经涉及止血、血栓形成、血管生成和炎症,它们是其中内皮起关键作用的过程(Duff等人, *FASEB J.*, 17:984-992 (2003))。

[0143] CD105是TGF- $\beta$ 受体家族的一个成员,其由增殖中的内皮细胞表达。内皮细胞增殖需要正常的CD105水平。CD105表达会被细胞低氧增加(通过低氧诱导因子-1- $\alpha$ (HIF-1- $\alpha$ )的生产),并保护低氧细胞免于细胞凋亡。CD105的几种功能与TGF- $\beta$ 信号传导有关。TGF- $\beta$ 通过异源二聚体受体信号传导,所述受体由丝氨酸激酶、受体I(RI)和受体II(RII)组成。TGF- $\beta$ 与受体的外部结构域的结合,会暴露细胞质的RII激酶活性,所述活性会磷酸化TGF- $\beta$ RI,后者然后可以与下游信号传导物(诸如Smad蛋白)相互作用。CD105形成TGF- $\beta$ 受体复合物的一部分,但是它可以独立地存在于细胞表面上。在许多体外细胞中,CD105抑制TGF- $\beta$ 信号传导。

[0144] CD105也结合其他生长因子,诸如激活蛋白A和骨形态发生蛋白(BMP)-10、-9、-7和-2。TGF- $\beta$ 或其他生长因子配体与CD105的结合,需要至少存在受体RII,且它自己不能结合配体。CD105与受体的结合不会改变它们对配体本身的亲和力。在结合以后,CD105的细胞质结构域被TGF- $\beta$ RI和TGF- $\beta$ RII磷酸化;然后TGF- $\beta$ RI(但是TGF- $\beta$ RII不会)激酶从受体复合物解离。

[0145] CD105表达抑制TGF- $\beta$ RII的磷酸化水平,但是增加TGF- $\beta$ RI的磷酸化水平,导致增加的Smad 2的磷酸化,但是不增加Smad 3的磷酸化。由于Smad 2可以与多种转录因子、辅活化剂和抑制剂相互作用,磷酸化的Smad 2可以起多种信号的整合物的作用,以调节基因转

录。因而,CD105调节TGF- $\beta$ 功能(通过与TGF- $\beta$ RI和TGF- $\beta$ RII的相互作用),并修饰下游Smad蛋白的磷酸化。

[0146] CD105起调节TGF- $\beta$ 超家族的多种激酶受体复合物的信号传导的作用,包括TGF- $\beta$ 受体(TGF- $\beta$ R)、激活蛋白受体-样激酶(ALK)和激活蛋白受体。在没有CD105存在下,TGF- $\beta$ 受体的活化导致SMAD蛋白(SMAD 2和3)的磷酸化,这抑制内皮细胞生长。但是,TGF- $\beta$ 对CD105的活化调节SMAD蛋白磷酸化(包括SMAD 1、5和8的磷酸化)。最终结果是TGF- $\beta$ 受体活化对内皮细胞的生长抑制作用的释放(参见图2)。不令人惊讶的是,抗-CD105抗体或反义寡核苷酸对CD105活化的阻止,与TGF- $\beta$ 协同地起抑制内皮细胞生长的作用。

[0147] CD105启动子的长度是2.6 kb,但是不含有TATA或CAAT转录起始盒。但是,它具有2个富含GC的区域:Sp1、ets、GATA、AP-2、NGF- $\beta$ 和Mad的共有基序,以及TGF- $\beta$ 应答元件。虽然如此,CD105具有相对受限的细胞分布。基础转录水平似乎需要ets位点(在位置-68处)和Sp1位点,但是表达的相对受限(例如,限于内皮细胞)似乎涉及多个调节区,具体地,一个在-1294至-932处,另一个非常接近转录起始位点。CD105被TGF- $\beta$ 上调,这已经表明需要在-37至-29处的Sp1位点,还涉及一个或多个紧靠的上游的SBE位点,所述位点结合Smads 3和/或4(它们被TGF- $\beta$ 信号传导活化)。低氧是缺血组织和肿瘤的共同特征,且是血管内皮细胞(EC)中的CD105基因表达的有效刺激物。与TGF- $\beta$ 1的组合增强这样的效应。上调的CD105可以在低氧应激下的EC中发挥自我保护作用。

[0148] 血管EC是CD105的主要来源。其他细胞类型(包括血管平滑肌细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、前-B和骨髓单核细胞来源的白血病细胞以及红细胞前体)在更低的程度上表达CD105。

[0149] CD105涉及血管生成。反义实验已经证实,与TGF- $\beta$ 1组合地抑制HUVEC中CD105表达,导致体外血管生成的显著抑制,这表明CD105是内皮细胞中的促血管生成组分。CD105在血管生成中的重要作用的其他证据来自CD105敲除的小鼠。没有CD105的小鼠表现出多种血管和心脏缺陷,导致在胚胎早期死亡。在没有CD105的小鼠中观察到的严重血管损伤指示,成熟的血管在胚胎外脉管系统中的形成需要CD105,这进一步证实了CD105在血管生成中的直接作用。

[0150] CD105(尤其也称作内皮因子或edg-1)是I型同源二聚体膜糖蛋白,其以高水平在增殖中的血管内皮细胞中表达。因而,CD105主要是经历活跃的血管生成的内皮细胞的增殖相关的标志物。但是,正常组织的血管内皮可能存在有限的CD105表达。已知人CD105特异性地结合转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ ),推导的CD105氨基酸序列与 $\beta$ -聚糖(TGF- $\beta$ 受体的一种类型)具有强同源性。

[0151] 在基于抗体的减少肿瘤脉管系统的方法中,已经靶向CD105,因为CD105是在内皮和白血病细胞上的增殖相关的抗原。它在肿瘤相关的血管内皮中的表达受到上调,CD105是血管生成所必需的。血管生成包括新毛细血管的形成,这导致新生血管形成以及现有脉管系统的维持。这是一个复杂的过程,该过程包括一系列相继的步骤,包括内皮细胞介导的血管基膜和间质基质的降解、内皮细胞的迁移、内皮细胞的增殖和内皮细胞的毛细血管祥的形成。

[0152] CD105可以存在于:构成和支持现有的脉管系统的细胞上,以及促进新脉管系统的生长并变成新脉管系统的一部分的细胞上。这些抗体可以结合CD105,并从而抑制血管生

成、抑制现有的脉管系统或现有脉管系统的维持和/或抑制小血管膨胀。除了它们用于纯化CD105的用途以外,这些抗体可用于纯化、检测和诊断目的以及治疗目的。本文提供的抗体可以用于配制用于治疗多种状况和疾病的药物、治疗所述状况和疾病的方法和检测方法或诊断方法。本文使用的血管生成包括新血管的生长和/或发育(也称作新生血管形成)、小血管的膨胀、过度的或延长的血管生长和现有脉管系统的维持。血管生成状况和疾病表示与血管生成有关、由血管生成造成或伴随血管生成的那些疾病和状况。这样的疾病的非限制性实例包括,例如,各种形式的癌症(原发性肿瘤和转移)。已经产生了针对CD105的鼠单克隆抗体(mAb),它们调节CD105活性,并从而抑制血管生成和/或抑制小血管的血管舒张。这些鼠抗体描述在美国专利5,928,641、6,200,566、6,190,660和7,097,836中,它们中的每一篇以其整体并入本文。另外,已经证实了许多这样的抗体的先体外后体内和体内有效性;结合CD105的单克隆抗体作为调节CD105的化合物是令人感兴趣的。但是,鼠抗体的治疗性应用是不可行的,因为鼠抗体的施用具有许多限制,包括例如人抗-小鼠抗体(HAMA)形式的免疫原性。

[0153] 已经描述了几种抗-CD105抗体,尤其是抗-CD105单克隆抗体("mAb")。MAb SN6是用人白血病细胞的细胞膜的糖蛋白混合物免疫小鼠所生成的抗体(Haruta和Seon, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:7898-7902)。SN6是一种识别人CD105的鼠mAb。MAb 44G4是用人前-B白血病细胞的全细胞悬浮液免疫小鼠所生成的抗体(Gougos和Letarte, 1988, *J. Immunol.* 141:1925-1933; 1990, *J. Biol. Chem.* 265:8361-8364)。44G4也是一种识别人CD105的鼠mAb。MAb MJ7/18是用发炎的小鼠皮肤免疫大鼠所生成的抗体(Ge和Butcher, 1994, 同上)。MJ7/18也是一种识别鼠CD105的mAb。mAb Tec-11是用人脐静脉内皮细胞免疫小鼠所生成的抗体(Burrows等人, 1995, *Clin. Cancer Res.* 1:1623-1634)。Tec-11是一种具有限于人CD105的反应性的鼠mAb。本文描述了结合CD105的嵌合抗体,其表现出减小的免疫原性,同时维持和/或提高它们的特异性。另外,为了解决与鼠抗体有关的问题,本文描述了结合CD105并减少和/或抑制血管生成的嵌合抗体,其表现出减小的免疫原性,同时维持和/或提高它们的特异性。这些抗-CD105抗体可用于诊断和治疗各种状况和疾病,以及用于纯化和检测CD105。针对CD105的抗体代表用于治疗多种疾病和状况(它们涉及血管生成,受血管生成的影响或作用)的疗法的发展的一个重要领域。

[0154] 本文提供了结合CD105的其抗体。也提供了它们的抗体(或抗原-结合片段),所述抗体结合CD105,并抑制(部分地或完全地)或控制/治疗(部分地或完全地)血管生成/新生血管形成、小血管膨胀、抑制细胞增殖或抑制肿瘤生长。类似地,在抑制或结合CD105的含义内,也包括抑制CD105功能(例如,信号传导、结合、活化等)。在另一个实施方案中,抗体通过结合CD105来抑制血管生成。本申请也提供了可以用于生产抗体的细胞系、用于生产所述细胞系的方法、用于表达抗体和纯化它们的方法。

[0155] 可以认识到,使用常规方法(包括,但不限于ELISA),使用本文提供的或本领域已知的试验,可以测试使用本文所述方法产生的特异性地结合CD105的抗体的结合CD105的能力。使用常规方法,包括但不限于Biacore或表面等离子体共振,也可以测定本文所述抗体的亲和力。

[0156] 本文提供了结合CD105的抗体。本文也提供了结合CD105并抑制血管生成的抗体。

[0157] 本文提供了一种抗体,其包含:具有SEQ ID NO: 1所述的氨基酸序列的轻链可变

区、具有SEQ ID NO: 2所述的氨基酸序列的轻链恒定区、具有SEQ ID NO: 3所述的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO: 4所述的氨基酸序列的 $\gamma 1$  ( $\gamma 1$ ) 恒定区 (Fc)。SEQ ID NO: 3所述;和具有SEQ ID NO: 4所述的氨基酸序列的恒定区 (Fc)。

[0158] 在另一个非限制性实施方案中,所述抗CD105抗体包含具有如SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1;具有如SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2;具有如SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3;具有如SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1;具有如SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2;和具有如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。

[0159] 在另一个非限制性实施方案中,分离的人源化的去免疫的抗CD105抗体可以包含具有如SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的重链可变区和具有如SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的轻链可变区。人源化-去免疫重链的其他非限制性实例包括,但不限于,SEQ ID NO:13、14、15和16。人源化-去免疫轻链的其他非限制性实例包括,但不限于,SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22和23。所述序列下面提供于实施例17。

[0160] 在另一个方面,本申请提供了一种抗体,其能够在一定条件下与本文所述的抗-CD105抗体竞争,其中在ELISA试验中,通过与这样的抗体的竞争阻断至少5%的具有所述抗体的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>序列的抗体与CD105结合。

[0161] 本文提供了中和抗体,其结合CD105,并调节CD105的活性。中和抗体可以例如通过结合CD105来抑制血管生成。

[0162] 本文描述的抗体可用于在下面更详细地描述的检测或诊断用途。本文描述的抗体可用于结合CD105,这又可以抑制本文所述的血管生成。

[0163] 本文所述的抗体可以另外包含用于治疗应用的治疗部分。

[0164] 本文所述的抗体也可以用作免疫缀合物。如本文使用的,为了说明书和权利要求书的目的,免疫缀合物指由根据本发明的抗-CD105抗体或其片段和至少一种治疗标记构成的缀合物。治疗标记包括抗肿瘤试剂和血管生成抑制剂。这样的抗肿瘤试剂是本领域已知的,包括但不限于:毒素、药物、酶、细胞因子、放射性核素、光动力剂和血管生成抑制剂。毒素包括、但不限于:蓖麻蛋白A链、突变型假单胞菌外毒素、白喉类毒素、链黑霉素、博安霉素(boamycin)、皂草素、白树毒素和美洲商陆抗病毒蛋白。药物包括柔红霉素、甲氨蝶呤和卡奇霉素。放射性核素包括放射性金属。细胞因子包括、但不限于:转化生长因子(TGF)- $\beta$ 、白介素、干扰素和肿瘤坏死因子。光动力剂包括、但不限于:卟啉类和它们的衍生物。额外的治疗标记是本领域已知的,且也在本文中考虑。用于使抗-CD105 mAb或其片段与至少一种抗肿瘤剂复合的方法是本领域技术人员众所周知的(即,Ghetie等人, 1994, *Pharmacol. Ther.* 63:209-34所综述的抗体缀合物)。这样的方法可以利用几种可使用的用于偶联或连接分子的杂双功能试剂之一。额外的放射性核素与额外的用于连接分子(诸如治疗和诊断标记)的方法一起在本文中进行进一步描述。

[0165] 使用本领域已知的用于不同目的的技术,诸如,例如,通过添加聚乙二醇(PEG),可以修饰抗体。PEG修饰(聚乙二醇化)可以导致下述的一项或多项:改善的循环时间、改善的溶解度、改善的对蛋白酶解的抗性、降低的抗原性和免疫原性、改善的生物利用度、降低的毒性、改善的稳定性和更容易配制(关于综述,参见,Francis等人, *International Journal of Hematology* 68:1-18, 1998)。

[0166] 可以修饰抗体的Fc部分,以增加当施用给患者时在血液中的循环半衰期。使用本

领域的常规方式,诸如,例如,在美国专利号7,217,798(它以其整体通过引用并入本文)中所述的方式,可以测定修饰。

[0167] 改善基于抗体的融合蛋白在循环中的半衰期的其他方法也是已知的,诸如,例如,在美国专利号7,091,321和6,737,056(它们各自通过引用并入本文)中所述的方法。另外,可以生产或表达抗体,使得它们不含有在它们的复杂的N-糖苷-连接的糖链上的岩藻糖。已知从复杂的N-糖苷-连接的糖链去除岩藻糖增加抗体和抗原结合片段的效应物功能,包括但不限于:抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性的细胞毒性(CDC)。类似地,可以将结合CD105的抗体在它们的C-末端连接在源自任何抗体同种型(例如,IgG、IgA、IgE、IgD和IgM)和任何同种型亚类(尤其是IgG1、IgG2b、IgG2a、IgG3和IgG4)的所有或部分免疫球蛋白重链上。

[0168] 另外,还可以修饰本文所述的抗体,使得它们能够穿过血脑屏障。本文所述的抗体的这种修饰允许治疗脑疾病,诸如多形性胶质母细胞瘤(GBM)。在美国专利公开20070082380(它以其整体通过引用并入本文)中描述了允许蛋白(诸如抗体)穿过血脑屏障的示例性的修饰。

[0169] 已经显示,免疫球蛋白的糖基化对它们的效应物功能、结构稳定性和从抗体生产细胞分泌的速率具有显著影响(Leatherbarrow等人, *Mol. Immunol.* 22:407 (1985))。负责这些性质的碳水化合物基团通常连接在抗体的恒定(C)区上。例如,IgG的活化补体依赖性的细胞溶解的经典途径的完全能力,需要IgG在C<sub>H</sub> 2结构域中的天冬酰胺297处的糖基化(Tao和Morrison, *J. Immunol.* 143:2595 (1989))。IgM在C<sub>H</sub> 3结构域中的天冬酰胺402处的糖基化,是抗体的适当装配和细胞溶解活性所必需的(Muraoka和Shulman, *J. Immunol.* 142:695 (1989))。在IgA抗体的C<sub>H</sub> 1和C<sub>H</sub>3结构域中的位置162和419处的糖基化位点的去除,导致细胞内降解和至少90%的分泌抑制(Taylor和Wall, *Mol. Cell. Biol.* 8:4197 (1988))。另外,可以生产或表达抗体,使得它们不含有在它们的复杂的N-糖苷-连接的糖链上的岩藻糖。已知从复杂的N-糖苷-连接的糖链去除岩藻糖增加抗体和抗原结合片段的效应物功能,包括但不限于:抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性的细胞毒性(CDC)。利用本领域已知的分子克隆技术,通过多种系统,可以生产这些“去岩藻糖基化的”抗体,所述技术包括但不限于转基因动物、转基因植物或细胞系,它们已经遗传地工程化,使得它们不再含有对于在复杂的N-糖苷-连接的糖链中包含岩藻糖所必须的酶和生化途径(也称作岩藻糖基转移酶敲除的动物、植物或细胞)。可以工程化成岩藻糖基转移酶敲除的细胞的非限制性实施例包括:CHO细胞、SP2/0细胞、NS0细胞和YB2/0细胞。

[0170] 还已经观察到免疫球蛋白在可变(V)区中的糖基化。Sox和Hood报道,约20%的人抗体在V区中被糖基化(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66:975 (1970))。认为V结构域的糖基化源自N-连接的糖基化信号Asn-Xaa-Ser/Thr在V区序列中的偶然出现,且本领域尚未认为在免疫球蛋白功能中起作用。

[0171] 在可变结构域框架残基处的糖基化可以改变抗体与抗原的结合相互作用。本发明包括这样的标准:通过所述标准,选择免疫球蛋白链的框架或CDR中的有限数目的氨基酸进行突变(例如,通过残基的置换、删除或添加),以便增加抗体的亲和力。

[0172] 通常,通过将一个或多个突变导入V区框架中,通常在邻近一个或多个CDR的区域中和/或在一个或多个框架区中,可以调节结合抗原的亲和力。通常,这样的突变涉及保守

氨基酸置换的导入,所述置换破坏或建立糖基化位点序列,但是基本上不会影响多肽的亲疏水(hydrophobic)结构性质。通常,避免导入脯氨酸残基的突变。在美国专利号6,350,861(它关于糖基化通过引用并入本文)中进一步描述了抗体的糖基化。

[0173] 可以配制用于短期递送或延长的(长期)递送的抗体。

[0174] 结合CD105的抗体也可以用于纯化CD105和/或检测样品或患者中的CD105水平,以检测或诊断在下面更详细地描述的与CD105有关的疾病或病症。

[0175] 可以测试使用这样的方法产生的结合CD105的抗体的结合亲和力、亲合力中和能力中的一项或多项。有用的抗体可以用于施用给患者,以预防、抑制、控制或治疗与血管生成有关的状况、疾病或病症。

[0176] 可以评价抗体的结合亲和力、结合速率、解离速率和亲合力中的一项或多项。在一个方面,可以评价抗体的中和CD105或VEGF的活性的能力。使用本领域公认的试验,包括但不限于:酶联免疫吸附测定(ELISA)、Scatchard分析、BIAcore分析(表面等离子体共振)等以及本领域普通技术人员通常使用的和已知的其他试验,可以测量结合亲和力、结合速率、解离速率和亲合力。

[0177] 使用例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、竞争性结合试验、ELISPOT试验或本领域已知的任何其他有用的试验,可以测量抗体与CD105的结合和/或测量例如抗体的抑制血管生成的能力。这些试验是本领域普通技术人员通常使用的和众所周知的。

[0178] 在一个非限制性实施方案中,ELISA试验可以用于测量结合CD105的特定抗体的结合能力。

[0179] 诸如ELISA等试验也可以用于鉴定与其其他抗体相比表现出增加的对CD105的特异性的抗体。诸如ELISA等试验也可以用于鉴定其这样的抗体:所述抗体结合跨一种或多种多肽的表位和跨一种或多种CD105或VEGF的表位。通过运行平行的ELISA,可以进行特异性试验,在所述ELISA中,在分开的试验腔室中同时地筛选实验抗体的结合一种或多种表位(在含有CD105表位的不同物种多肽上)的能力,以鉴定其结合CD105的抗体。本领域技术人员熟悉的另一种测量表观结合亲和力的技术是表面等离子体共振技术(在BIAcore 2000系统上分析)(Liljebblad, 等人, *Glyco. J.* 2000, 17:323-329)。Heeley, R. P., *Endocr. Res.* 2002, 28:217-229描述了标准测量和传统的结合试验。

[0180] 也可以测定特异性结合CD105的抗体的治疗与血管生成有关的不同疾病和状况以及各种形式的癌症(例如,原发性肿瘤、复发性肿瘤和转移)的能力。本领域技术人员已知的任何合适的试验可以用于监测这种效应。本文描述了几种这样的技术。在一个实例中,测试本文描述的抗体的结合CD105的能力。在另一个实例中,通过表面等离子体共振(SPR),测定本文描述的抗体的亲和常数。在另一个实例中,测定本文描述的抗体对血管生成抑制的作用。

[0181] 制剂

除了活性成分(抗-CD105抗体或其抗体片段)以外,本文提供的制剂可以包括:药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂、表面活性剂或本领域技术人员众所周知的其他材料。这样的材料应当是无毒的,且不会干扰活性成分的功效。载体或其他材料的确切性质将取决于施用途径。

[0182] 本文提供了抗CD105抗体的新制剂、含有所述制剂的预充式注射器,和这样的制剂

可用于治疗血管生成相关病症的用途。本申请提供了可用于静脉内或眼内施用,例如,治疗与CD105相关的癌症和眼科状况的制剂。抗体或其抗原结合片段与本文所述的CD105的结合、亲和力、亲合力和活性可以使用本领域公认的方法(包括,但不限于,上文和下文实施例中描述的测定法)进行评价。

[0183] 在一个方面,本文提供了包含约1 mg/ml至约150 mg/ml抗CD105抗体、或其抗原结合片段,至多约100 mM缓冲剂、至多约1 M多元醇和约4.0至约7.5的pH的制剂。

[0184] 在一个方面,所述制剂在制备后是稳定的,其可根据常规方法进行测试。包含蛋白的制剂的安全处理和施用代表了对药物配制人员的显著挑战。蛋白具有呈现稳定性问题的独特的化学和物理特性:对于蛋白存在各种降解途径,暗示化学和物理不稳定性。化学不稳定性包括脱氨基、聚集、肽骨架的修剪和甲硫氨酸残基的氧化。物理不稳定性包括许多现象,包括,例如,聚合。

[0185] “稳定的”制剂是其中的蛋白在储存后基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性的制剂。用于测量蛋白稳定性的各种分析技术在本领域中可用且综述于,例如, *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) 和 Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993)。稳定性可在所选温度持续所选时间段进行测量。优选地,所述制剂在室温(约30°C)或在40°C持续至少1个月是稳定的,和/或在约2-8°C持续至少1年或至少2年是稳定的。此外,所述制剂在制剂的冷冻(至,例如,-80°C)和融化之后可以是稳定的。

[0186] 如果蛋白在颜色和/或澄清度的目视检查之后或如通过UV光散射或通过大小排阻色谱法(SEC)测量显示无聚集、沉淀和/或变性的迹象,则蛋白在药物制剂中“保留其物理稳定性”。用于测定这样的测量值的方法是本领域已知的,且在下面更详细地描述。

[0187] 如果在给定时间的化学稳定性使得所述蛋白被认为仍保留如下所定义的其生物活性,则蛋白在制剂中“保留其化学稳定性”。化学稳定性可通过检测和定量蛋白的化学改变的形式进行评价。化学变化可涉及大小修饰(例如,修剪),其可以使用例如大小排阻色谱、SDS-PAGE和/或基质辅助激光解吸电离/飞行时间质谱(MALDI/TOF MS)来评价。其他类型的化学改变包括电荷改变(例如,作为脱酰胺的结果而发生),其可通过例如离子交换色谱或毛细管电泳等电聚焦(cIEF)来评估。

[0188] 如果例如抗原结合测定法所测定,抗体在给定时间的生物活性是,例如,在制备制剂时表现出的生物学活性的约50至150%内(在测定误差内),则抗体在制剂中“保留其生物学活性”。用于抗体的其他“生物活性”测定法详述如下。

[0189] 就所述制剂随着时间的稳定性而言,如通过大小排阻色谱法(SEC)所测量,至少95%的抗CD105抗体或其抗原结合片段在约2至8°C储存至少约12个月之后可以作为单体存在。此外,本文中考虑本领域公认用于评价稳定性的方法,包括但不限于实施例中描述的那些。

[0190] 此外,所述抗CD105抗体或其抗原结合片段在约2-8°C储存至少约12个月之后可以显示约50至150%结合(通过CD105 ELISA结合测定法)。

[0191] 在2至8°C储存至少约12个月之后,抗CD105抗体的平均等电点(pI)可为约8.8至约9.2,如通过,例如,毛细管电泳等电对焦所测量。

[0192] 本领域技术人员会理解,抗CD105抗体或其抗原结合片段可以稳定至少约12个月、

至少约18个月、至少约24个月、至少约30个月、至少约36个月或更长时间。

[0193] 在所述制剂的冷冻和融化循环之后,如通过SEC所测量,所述制剂可以含有作为单体存在的至少95%的抗CD105抗体。可替代地,或另外地,当经受搅动应力时,制剂可以含有作为单体存在的至少95%的抗CD105抗体。

[0194] 抗CD105抗体或其抗原结合片段可以包含其CDR能够结合CD105的任何序列。在一个非限制性实施方案中,所述抗CD105抗体是TRC105,其包含具有如SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的轻链可变区(V<sub>L</sub>);具有如SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链恒定区(C<sub>L</sub>);具有如SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的重链可变区(V<sub>H</sub>);和具有如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的恒定区(Fc)。

[0195] 在另一个非限制性实施方案中,所述抗CD105抗体包含具有如SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1;具有如SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2;具有如SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3;具有如SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1;具有如SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2;和具有如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。

[0196] 所述制剂可含有约1 mg/ml至约150 mg/ml的抗CD105抗体或其抗原结合片段,或其中任何值,包括但不限于,约2 mg/ml、约5 mg/ml、约7.5 mg/ml、约10 mg/ml、20 mg/ml、约25 mg/ml、约30 mg/ml、约35 mg/ml、约40 mg/ml、约45 mg/ml、约50 mg/ml、约55 mg/ml、约60 mg/ml、约65 mg/ml、约70 mg/ml、约75 mg/ml、约80 mg/ml、约85 mg/ml、约90 mg/ml、约95 mg/ml、约100 mg/ml、约105 mg/ml、约110 mg/ml、约115 mg/ml、约120 mg/ml、约125 mg/ml、约130 mg/ml、约135 mg/ml、约140 mg/ml、约145 mg/ml、约150 mg/ml或更多、或其之间的任何整数。当涉及抗体浓度时,本文使用的术语“约”表示所示值的±2%。

[0197] 在一个实施方案中,所述制剂包含约25 mg/ml的抗CD105抗体或抗原结合片段。在另一个实施方案中,所述制剂包含约50 mg/ml的抗CD105抗体或抗原结合片段。在又一个实施方案中,所述制剂包含约100 mg/ml的抗CD105抗体或抗原结合片段。

[0198] 如本文所述的制剂可以含有缓冲剂,诸如,例如,组氨酸、乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐。可以包括约5 mM至约100 mM的量的缓冲剂。在一个实施方案中,所述制剂包含约5 mM、约7.5 mM、约10 mM、约12.5 mM、约15 mM、约17.5 mM、20 mM、约22.5 mM、约25 mM、约30 mM、约35 mM、约40 mM、约45 mM、约50 mM、约55 mM、约60 mM、约65 mM、约70 mM、约75 mM、约80 mM、约85 mM、约90 mM、约95 mM、约100 mM或其中任何整数的组氨酸、乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐。当涉及缓冲剂浓度时,本文使用的术语“约”表示所示值的±2%。

[0199] 制剂可以用于已知用于抗体的任何类型的施用,包括,但不限于,玻璃体内和静脉内施用。

[0200] 本文提供的制剂可以进一步包括可接受的载体或赋形剂,包括作为药学上可接受的载体或赋形剂且对于施用于患者可接受的任何载体或赋形剂。

[0201] 在一个实施方案中,本文提供的制剂是等渗的。代表性等渗制剂包括,但不限于,为约250至约350 毫渗量的那些。在另一个实施方案中,本文提供的制剂是高渗的。代表性高渗制剂包括,但不限于,为约351至约1000 毫渗量的那些。

[0202] 可以将多元醇以至多约1 M的量添加至本文所述的制剂。例如,多元醇可以包含约50 mM、约75 mM、约100 mM、约150 mM、约200 mM、约225 mM、约240 mM、约250 mM、约300 mM、约350 mM、约400 mM、约450 mM、约500 mM、约550 mM、约600 mM、约650 mM、约700 mM、约750

mM、约800 mM、约850 mM、约900 mM、约950 mM、约1 M或其中任何整数的量的多元醇。在一个实施方案中，本文提供的制剂含有小于300 mM的量的多元醇，并且所述制剂被制成等渗的，其中盐浓度为约100 mM至约175 mM。例如，含有小于300 mM量的多元醇的制剂被制成等渗的，其中盐浓度为约130 mM。当涉及多元醇浓度时，本文使用的术语“约”表示所示值的±2%。在一个方面，待用于本文提供的制剂中的多元醇可以是糖，诸如，例如，非还原性糖。非还原性糖的代表性实例包括，但不限于，海藻糖和蔗糖。例如，所述制剂可包含约200 mM至约300 mM海藻糖或蔗糖。在一个实施方案中，制剂可包含约240 mM海藻糖或蔗糖。或者，所述糖可以是约200 mM至约300 mM的量(浓度)的山梨糖醇。在一个实施方案中，制剂可包含约240 mM山梨糖醇。

[0203] 本文提供的制剂的其他非限制性实例是表1的制剂1-39中的任一者。

表1

制剂编号	pH	phos (mM)	His (mM)	柠檬 酸盐 (mM)	乙酸盐 (mM)	NaCl (mM)	海藻糖 (mM)	山梨 糖醇	蛋白 mg/ml.
F01	7	20	0	0	0	130	0	0	25
F02	6	20	0	0	0	130	0	0	25
F03	6	0	20	0	0	130	0	0	25
F04	5	0	20	0	0	130	0	0	25
F05	6	0	0	20	0	130	0	0	25
F06	5	0	0	20	0	130	0	0	25
F07	4	0	0	0	20	130	0	0	25
F08	5	0	0	0	20	130	0	0	25
F09	5	0	20	0	0	0	240	0	25
F10	5	0	0	20	0	0	240	0	25
F11	5	0	0	0	20	0	240	0	25
F12	6	10	0	0	0	0	240	0	25
F13	6	0	10	0	0	0	240	0	25

制剂编号	pH	phos (mM)	His (mM)	柠檬 酸盐 (mM)	乙酸盐 (mM)	NaCl (mM)	海藻糖 (mM)	山梨 糖醇	蛋白 mg/mL
F14	6	10	0	0	0	80	120	0	25
F15	6	0	10	0	0	80	120	0	25
F16	7	20	0	0	0	130	0	0	25
F17	6	20	0	0	0	130	0	0	25
F18	6	0	20	0	0	130	0	0	25
F19	5	0	20	0	0	130	0	0	25
F20	6	0	0	20	0	130	0	0	25
F21	5	0	0	20	0	130	0	0	25
F22	4	0	0	0	20	130	0	0	25
F23	5	0	0	0	20	130	0	0	25
F24	5	0	20	0	0	0	240	0	25
F25	5	0	0	20	0	0	240	0	25
F26	5	0	0	0	20	0	240	0	25
F27	6	10	0	0	0	0	240	0	25
F28	6	0	10	0	0	0	240	0	50
F29	6	10	0	0	0	80	120	0	50
F30	6	0	10	0	0	80	120	0	50
F31	7	17	0	0	0	145	0	0	5
F32	7	17	0	0	0	145	0	0	7
F33	5.5	0	20	0	0	0	240	0	25
F34	5.5	0	20	0	0	0	0	240	25
F35	4	0	0	0	20	0	0	240	25
F36	5.5	0	20	0	0	0	240	0	50
F37	4	0	0	0	20	0	240	0	50
F38	5.5	0	20	0	0	0	240	0	100
F39	4	0	0	0	20	0	240	0	100

Phos: 磷酸盐缓冲盐水; His: 组氨酸。

[0204] 本文提供的制剂可具有约4.0至约7.5的pH。在一个实施方案中,本文提供的制剂可具有约4.5、约5.0、约5.5、约6.0、约6.5或约7.0的pH。本文使用的术语“约”,当涉及pH时,表示 $pH \pm 0.05, 0.1$ 或 $0.2$ 。

[0205] 本领域技术人员将理解,可以如下制备包含抗体或抗原结合片段的制剂(通过本文所述的方法鉴定)用于储存:以水溶液的形式混合具有期望的纯度程度的蛋白和任选的

生理上可接受的载体、赋形剂和/或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版, Osol, A.编(1980))。

[0206] 可接受的载体是施用的患者在生理上可接受的,并保留与其一起/在其中施用的化合物的治疗性质。可接受的载体和它们的制剂是,且通常描述在,例如,Remington's pharmaceutical Sciences(第18版, A. Gennaro编, Mack Publishing Co., Easton, PA 1990)。一种示例性的载体是生理盐水。本文使用的短语“药学上可接受的载体”表示可接受的材料、组合物或媒介物,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂和/或溶剂,它们涉及主题化合物从一个器官或身体部分的施用部位携带或运输至另一个器官或身体部分。每种载体是可接受的,其含义是,与制剂的其他成分相容,且对它所施用的受试者无害。可接受的载体也不会改变主题化合物的比活性。

[0207] 在一个方面,本文提供了药学上可接受的或生理上可接受的组合物,包括与施用相容的溶剂(水性的或非水性的)、溶液、乳剂、分散介质、包衣剂、等渗剂和吸收促进剂或吸收延迟剂。因此,组合物或制剂表示,适合在受试者中的治疗和/或诊断应用的组合物。组合物和制剂包括一定量的本文所述的化合物和药学上或生理上可接受的载体。

[0208] 可以将组合物配制成与特定施用途径(即,全身的或局部的)相容。因而,组合物包括适合通过不同途径来施用的载体、稀释剂或赋形剂。

[0209] 可以施用组合物,例如,通过注射,包括但不限于:皮下的、玻璃体内的、真皮内的、静脉内的、动脉内的、腹膜内的或肌肉内的注射。可以在组合物中包括等渗剂,例如,糖类、多元醇(诸如甘露醇、山梨糖醇)和氯化钠。可以将得到的溶液包装后原样使用,或冻干;所述冻干的制品可以以后在施用之前与无菌溶液相组合。对于静脉内注射或在累及部位处的注射,活性成分可以是肠胃外地可接受的水溶液的形式,所述水溶液是无热原的,且具有合适的pH、等渗度和稳定性。本领域的相关技术人员能够熟练地制备合适的溶液,其中使用例如等渗媒介物,诸如氯化钠注射液、林格注射液、乳酸盐化的林格注射液。根据需要,可以包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。可以如下制备无菌注射溶液:将需要量的活性成分掺入适当溶剂中,所述溶剂含有上面列举的成分之一或组合(根据需要),然后过滤除菌。

[0210] 在一个实施方案中,本文所述的制剂不包括表面活性剂。在另一个实施方案中,本文所述的制剂任选地包括表面活性剂,诸如,例如,聚山梨糖醇酯20或80、TWEEN®、PLURONIC® F68或聚乙二醇(PEG)。

[0211] 当考虑将组合物用于药物或本文提供的任何方法中时,考虑,所述组合物可以是基本上无热原的,使得所述组合物当施用给人患者时不会造成炎症反应或不安全的变态反应。测试组合物的热原和制备基本上无热原的组合物,是本领域普通技术人员容易理解的,且可以使用可商业得到的包装来实现。

[0212] 短语“药学上可接受的”表示这样的分子实体和组合物:当施用给受试者时,其是生理上可耐受的,且通常不会产生变应性的或类似的不良反应,诸如胃不适、头晕等。

[0213] 当提及治疗组合物时,术语“单位剂量”表示适合作为受试者的单位剂量的物理上分离的单位,每个单位含有经计算以产生期望的治疗效果的预定量的活性材料以及需要的稀释剂(即,载体或媒介物)。

[0214] 可以以与剂量制剂相容的方式和以治疗有效量施用组合物。待施用的量取决于待

治疗的受试者、受试者的免疫系统利用活性成分的能力和期望的结合能力的程度。需要施用的活性成分的确切量取决于从业人员的判断,且随每个个体而异。适合初次施用和加强注射的方案也是可变的,但是典型为:初次施用,随后是以1小时或几小时间隔通过后续注射或其他施用的重复剂量。或者,考虑足以维持血液中的浓度的连续静脉内输注。

[0215] 一个实施方案考虑本文所述组合物用于制备药物的用途,所述药物用于治疗本文所述的状况、疾病或病症。可以基于需要治疗的患者/受试者的身体特征来配制药剂,且可以基于状况、疾病或病症的阶段配制成单个或多个制剂。可以将药物包装在合适的包装中,所述包装具有适合分配给医院和诊所的标签,其中所述标签用于指示治疗具有本文所述疾病的受试者。可以将药物包装成单个或多个单位。可以在下文所述的包装中,包括关于组合物的剂量和施用的说明书。

[0216] 本文还提供了包含本文所述的制剂的适用于静脉内或玻璃体内施用的预充式注射器。这样的预充式注射器可以被包装且标记用于治疗血管生成相关的状况,诸如任何本文所述的状况。包装可进一步包括用于储存和施用的指示。本文提供了包含前述权利要求中任一项的制剂的适用于静脉内或玻璃体内施用的一个或多个预充式注射器的包装。本文还提供了含有本文所述制剂的药物的制备,其用于治疗血管生成相关的状况,诸如任何本文所述的状况。

#### [0217] 治疗方法

本文提供了一种治疗受试者(人或非人)的方法,其通过给受试者施用抗体的制剂,所述抗体优先地结合CD105。本文提供了预防或治疗与血管生成/新生血管形成、过度血管生成、肿瘤生长、肿瘤细胞增殖或小血管膨胀有关的一种或多种疾病或病症的方法,所述方法包括:施用含有抗CD105抗体或其抗原结合片段的组合物,由此预防、治疗、减轻或减小疾病或其严重程度。

[0218] 当受试者经历疾病的体征或症状的停滞或部分或完全减轻或减少(具体地,包括但不限于存活期的延长)时,实现本发明的有效应答。可以按月至年来测量预期的无进展存活时间,这取决于预后因素,包括复发的次数、疾病的阶段和其他因素。延长存活期包括但不限于至少1个月(mo)、约至少2个月、约至少3个月、约至少4个月、约至少6个月、约至少1年(yr)、约至少2年、约至少3年、约至少4年、约至少5年等、或其中的任何间隔的时间。也可以按月至年来测量总存活或无进展存活。或者,有效应答可以是,受试者的体征、或症状或癌症负荷保持静止且不再恶化。在下面更详细地描述了适应症的治疗的其他指示。

[0219] 本文所述的抗体的组合物可以用作非治疗剂(例如,作为亲和纯化试剂)。通常,在一个这样的实施方案中,使用本领域已知的常规方法,将目标蛋白固定化在固相(诸如Sephadex®树脂或滤纸)上。使固定化的蛋白接触待纯化的含有目标靶标(或其片段)的样品,然后用合适的溶剂洗涤支持物,所述溶剂会去除样品中除了目标蛋白以外基本上所有的材料,所述目标蛋白结合在固定化的抗体上。最后,用另一种合适的溶剂(诸如甘氨酸缓冲液, pH 5.0)洗涤支持物,所述溶剂将释放出目标蛋白。除了纯化以外,组合物可以用于检测、诊断和治疗与CD105有关的疾病和病症。

[0220] “接触”在本文中被定义为,使本文提供的制剂物理地接近本文所述的细胞、器官、组织或流体的方式。接触包括本文提供的任何制剂的全身或局部施用,包括但不限于体外、体内和/或先体外后体内程序和方法。“组合”和“接触”在本文中可互换地使用,且意图以相

同的方式进行定义。对于体内用途,通过例如经由任何合适的方式将组合物施用给患者,可以发生接触;上面已经更详细地描述了含有药学上可接受的赋形剂和载体的组合物。

[0221] 本文使用的“预防”表示预防、防止体征或症状的发作,防止与血管生成相关或与CD105活性相关的疾病或病症的进展。在一个非限制性实施方案中,诊断为1期癌症的患者可以施用本文所述的制剂,由此防止癌症进展至2期。在又一个实施方案中,无症状的、但测试为一种或多种癌症生物标志物阳性的患者可以施用本文所述的制剂,由此防止癌症的进展。本文使用的“抑制(inhibition)”、“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”可互换地使用,并表示,例如,体征或症状的停滞、存活期的延长、体征或症状的部分或完全改善以及肿瘤或转移的部分或完全消除。

[0222] “受试者”或“患者”(例如,哺乳动物诸如人或非人动物,诸如灵长类动物、啮齿动物、牛、马、猪、绵羊、骆驼、骆马等)可以是表现出本文所述的疾病或病症的一种或多种临床表现和/或体征或症状的哺乳动物。在某些情形中,受试者可以是无症状的,且仍然具有所述疾病或病症的临床表现。可以将抗体缀合到治疗部分上,或是含有治疗部分的融合蛋白。可以将抗体缀合到可检测部分上,或是含有可检测部分的融合蛋白。在一个实施方案中,可以将抗体缀合到治疗部分和可检测部分两者上。可以将抗体缀合到亲和标签(例如,纯化标签)上,或与亲和标签(例如,纯化标签)重组地工程化。亲和标签在本领域中是常规的。

[0223] 本文提供的抗体或其片段使得,它们可以缀合或连接至治疗部分和/或成像部分或可检测部分和/或亲和标签上。用于缀合或连接多肽的方法是本领域众所周知的。化合物和标记之间的连接(结合)包括本领域已知的任何方式,包括但不限于:共价和非共价相互作用、化学缀合以及重组技术。

[0224] “血管生成”在本文中用于包括血管维持和发育的所有方面。因而,血管生成包括:导致新生血管形成的新毛细血管形成(无论从新形成还是从预先存在的血管形成),以及现有脉管系统和小血管的维持和控制。血管生成是一个复杂的过程,该过程包括一系列相继的步骤,包括内皮细胞介导的血管基膜和间质基质的降解、内皮细胞的迁移、内皮细胞的增殖和内皮细胞的毛细血管祥的形成。血管生成包括新血管的生长和/或发育(也称作新生血管形成)、小血管的膨胀、过度的或延长的血管生长和现有脉管系统的维持。

[0225] 术语“血管生成相关的疾病”在本文中用于表示人类的某些病理过程,其中血管生成异常地延长。这进一步包括:血管生成状况和疾病,诸如与血管生成有关、由血管生成造成或伴随血管生成的那些疾病和状况。这样的疾病的非限制性实例包括:各种形式的癌症和转移、黄斑变性和CNV。通过结合CD105和抑制血管生成,本文所述的抗体可以用于治疗血管生成相关的疾病。

[0226] 术语“抗血管生成疗法”在本文中用于表示,靶向表达CD105(与静止的脉管系统相比,在增殖中的脉管系统上以更高的水平表达)的细胞和/或脉管系统的疗法;这进一步包括:针对血管生成(即,导致新生血管形成的新毛细血管形成)的疗法,针对现有脉管系统和/或过度血管生成或血管生长的疗法,针对小血管膨胀的疗法,和针对疾病或状况的疗法(例如,血管靶向疗法)。在本发明内考虑的示例性的疾病或状况包括、但不限于:各种形式的癌症和转移。

[0227] 本文提供了治疗有需要的患者(受试者)中的血管生成相关的疾病的方法,其包括向所述患者施用本文所述的制剂。这样的制剂可以玻璃体内或静脉内施用于患者。

[0228] 本文所述的血管生成相关的疾病可以是,例如,癌症或转移。在一个实施方案中,所述癌症是实体瘤。待治疗的癌症包括,例如,基于上皮的肿瘤。待用这样的制剂治疗的癌症的非限制性实例包括但不限于肺癌、妇科恶性肿瘤、黑色素瘤、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌、结肠直肠癌、前列腺癌、肾癌、头部癌症、胰腺癌、肝癌(肝细胞癌)、子宫癌、颈部癌症、肾癌(肾细胞癌)、肉瘤、骨髓瘤和淋巴瘤。用于治疗癌症或转移的制剂可以静脉内施用于患者。

[0229] 或者,本文所述的血管生成相关的疾病可以是,例如,眼科状况。眼科状况包括,但不限于,年龄相关的黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、黄斑水肿和/或脉络膜新生血管形成。年龄相关的黄斑变性(AMD)可以是湿性AMD或干性AMD。用于治疗眼科状况的制剂可以玻璃体内施用于患者。

[0230] 在这样的方法中,所述制剂可以一次或多次施用于患者。例如,所述制剂可以每天一次、每周一次、每个月一次、每个月两次、每两个月一次、每三个月一次、每四个月一次、每5个月一次或每6个月一次施用。治疗方案可以根据患者对治疗的响应根据需要增加或减少。

[0231] 在一个方面,施用制剂,直至血管生成相关的疾病一种或多种标志或症状减轻。

[0232] 就眼科状况而言,一种或多种体征或症状可能包括,但不限于,收缩血管、抑制与眼部疾病相关的内皮细胞增殖、清除出血的体征或症状、治疗混浊视力、提供视力丧失的停滞、改善视力和/或预防血管渗漏。

[0233] 就癌症或转移而言,治疗可导致患者状况的改善,且治疗可以通过确定以下因素中的一个或多个是否已经发生来评价:减少的细胞增殖、减少的细胞数目、增加的细胞凋亡、或至少一部分形成细胞增殖性病征的细胞的存活降低。

[0234] 治疗可导致患者的肿瘤或转移的部分或完全消除和/或存活延长。

[0235] 在一个实施方案中,在向患者施用一个或多个剂量的制剂之后,一种或多种体征或症状的严重程度或持续时间降低约2%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约90%、约95%或约100%。

[0236] 在另一个实施方案中,在向患者施用一个或多个剂量的制剂之后,一种或多种体征或症状的严重程度或持续时间降低约2倍、约5倍、约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、约50倍、约55倍、约60倍、约65倍、约70倍、约75倍、约80倍、约90倍、约95倍、约100倍或更多倍。

[0237] 本文提供了治疗有需要的患者中的眼科状况的方法,其包括向所述患者施用本文所述的制剂,由此所述眼科状况的一种或多种体征或症状被治疗减轻。所述制剂的施用可以是玻璃体内施用。

[0238] 本文还提供了预防或治疗有需要的受试者中的癌症或转移的方法,其包括向所述患者施用本文所述的制剂,由此所述癌症或转移的一种或多种体征或症状减轻。所述制剂的施用可以是静脉内施用。

[0239] 术语“复发”、“复发”或“复发的”表示,在临床评估疾病消失以后,癌症或疾病的返回。远端转移或局部复发的诊断,可以视作复发。

[0240] 术语“维持疗法”表示,为了帮助维持以前的治疗效果而给予的有计划的再治疗。

经常给予维持疗法来帮助保持癌症处于减轻中或延长对特定疗法的应答(无论疾病进展)。

[0241] 术语“无进展存活”在肿瘤学中表示,在治疗过程期间和以后,癌症没有生长的时间的长度。无进展存活包括:患者已经经历完全应答或部分应答的时间的量,以及患者已经经历稳定的疾病的时间的量。

[0242] 在一个方面,本文提供了一种预防或治疗受试者的癌症或转移的方法,其通过将本文提供的任何组合物施用给患有癌症或转移的患者。这样的患者可以是有症状的或无症状的。

[0243] 在某些情况下,组合物的施用延长被治疗的患者的寿命、减小肿瘤体积、消除肿瘤、减少细胞增殖、增加肿瘤细胞的细胞凋亡或它们的组合。

[0244] 如果需要的话,所述方法可以另外包括:外科手术切除癌症和/或施用额外的抗癌剂或治疗。已经在本文别处提供了抗癌剂。

[0245] 在一个方面,患有癌症的患者的体征或症状得到改善。改善可以表现为,例如,疼痛的减轻、肿瘤大小的减小、肿瘤的消除、肿瘤大小增加或疾病进展的阻止、转移形成的阻止、或转移性生长的抑制或它们的组合。

[0246] 在一个方面,本文所述的制剂的施用减少或消除患者对进行外科手术或用一种或多种额外抗癌剂或治疗的治疗的需求。

[0247] 含有抗-CD105抗体的组合物可以与含有抗-VEGF抗体(或其抗原结合片段)的组合物相继地或同时地施用。这样的施用包括、但不限于下述施用:在彼此的约12周内、在彼此的约8周内、在彼此的约4周内、在彼此的约3周内、在彼此的约2周内、在彼此的约1周内、在彼此的1天内、在彼此的约12小时内、在彼此的约6小时内、在彼此的约3小时内、在彼此的约1小时内、在彼此的约30分钟内、在同一天、在同时或它们的组合。当考虑本发明组合物和/或组合的治疗部分的多次剂量时,应当理解,使用可商业得到的产品的标准品,使用基于受试者的年龄、身高、体重、健康和其他身体特征的已知剂量和浓度,可以凭经验确定各自的剂量。

[0248] 可以以治疗有效量将制剂施用给患者,所述治疗有效量通过以适合任何医学治疗的合理的收益/风险比抑制疾病或病症,有效地产生一些期望的治疗效果。为了将本发明的制剂施用给人患者,可以通过本领域技术人员已知的方法来配制制剂。治疗有效量是在器官或组织中至少部分地实现期望的治疗效果或预防效果的量。实现疾病或病症的预防和/或治疗性处理所需的抗-CD105抗体或抗-VEGF抗体的量本身是不固定的。施用的抗体的量可以随疾病的类型、疾病的广泛程度和患有疾病或病症的哺乳动物的大小而变化。在一个实施方案中,以上述的组合,将本文描述的两种抗体施用给患者。联合施用可以指在单一制剂中或在分开的制剂中施用。

[0249] “施用”在本文中表示,以导致制剂在患者体内的方式,将一种或多种制剂提供给患者。这样的施用可以通过任何途径,包括、但不限于:局部地、区域地、或全身地,通过皮下的、玻璃体内的、真皮内的、静脉内的、动脉内的、腹膜内的或肌肉内的施用(例如,注射)。

[0250] 可以改变制剂中活性成分的实际剂量水平,从而获得有效地实现特定患者、制剂和给药模式期望的治疗应答且对患者无毒的活性成分的量。选择的剂量水平将取决于多种因素,包括采用的具体化合物的活性、施用途径、施用时间、采用的具体化合物的排泄速率、治疗持续时间、其他药物、与采用的特定制剂联合使用的化合物和/或材料、待治疗的患者

的年龄、性别、体重、状况、一般健康和先前的医疗史以及医学领域众所周知的类似因素。

[0251] 另外,可以如下施用抗体的一个或多个剂量:每周2次、每周1次、每2周1次、每3周1次、每4周1次、每6周1次、每8周1次、每12周1次、每24周1次或它们之间的任何周组合。也考虑给药循环,诸如,例如,每周1次或2次地施用抗体,持续2、3、4、5或6周,随后的1、2、3、4、5或6周不治疗。或者,根据受试者对治疗的应答,治疗之间的循环时间可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月。在本发明内也考虑额外的给药循环,包括例如:本文描述的剂量和每周循环的不同组合。

[0252] 医师或兽医可以容易地确定和开出需要的制剂的有效量(ED<sub>50</sub>)。例如,医师或兽医可以从低于实现期望的治疗效果所需要的水平的、在制剂中采用的化合物的剂量开始,并逐渐增加剂量,直到实现期望的效果。或者,剂量可以保持恒定。

[0253] 通过任何方便的途径,诸如上述的途径,可以将制剂施用给患者。无论选择的施途径,或通过本领域技术人员已知的其他常规方法,将本发明的化合物(其可以以合适的水合形式使用)和/或制剂配制成可接受的剂型,诸如下述的剂型。

[0254] 从细胞培养试验和/或动物研究获得的数据可以用于配制用于人类的剂量范围。所述剂量可以在该范围内随采用的剂型和使用的施途径而变化。对于任何化合物,可以从细胞培养试验初步估测治疗有效剂量。可以在动物模型中配制剂量,以实现包括在细胞培养物中测定的IC<sub>50</sub>(即,实现半数最大抑制的实验化合物的浓度)的循环血浆浓度范围。可以测量在血浆中的水平,例如,通过高效液相色谱法。这样的信息可以用于更准确地测定在人类中有用的剂量。使用这些方法中的任一种,也可以评估含有化合物组合的制剂。

[0255] 在一个实施方案中,本发明考虑抑制组织中的血管生成。通过多种方法,诸如本文所述的方法,可以评价组织中的血管生成的程度,并从而评价实现的抑制程度。

[0256] 识别(例如,优先结合)CD105或VEGF和抑制血管生成的抗体的独特特异性,会为特征在于血管生成(新生血管形成)、小血管膨胀、过度血管生成、肿瘤细胞增殖和/或肿瘤生长的疾病提供诊断和治疗用途。可以将抗体施用给患有各种形式的癌症(原发性肿瘤和转移)的受试者。

[0257] 应当理解,除了施用本文所述制剂以外,在本文中考虑,也可以用一种或多种额外的血管生成抑制剂治疗受试者。

[0258] 为了说明书和权利要求书的目的,术语“血管生成抑制剂”在本文中用于表示起抑制血管生成的功能的化合物或分子,包括、但不限于:肽、蛋白、酶、多糖、寡核苷酸、DNA、RNA、重组载体和药物。血管生成抑制剂是本领域已知的,在本文中考虑所有类型。化合物和分子的非限制性实例包括:天然的和合成的生物分子,诸如紫杉醇、O-(氯乙酰基-氨基甲酰基)烟霉醇(“TNP-470”或“AGM 1470”)、凝血酶敏感蛋白-1、凝血酶敏感蛋白-2、血管生成抑制因子、人软骨细胞-衍生的血管生成抑制剂(“hCHIAMP”)、软骨-衍生的血管生成抑制剂、血小板因子-4、gro-β、人干扰素诱导蛋白10(“IP10”)、白介素12、Ro 318220、黄原酸三环癸-9-基酯(“D609”)、伊索拉定、8,9-二羟基-7-甲基-苯并[b]喹啉鎓溴化物(“GPA 1734”)、甲羟孕酮、肝素和可的松的组合、葡糖苷酶抑制剂、染料木黄酮、沙利度胺、二氨基-蒽醌、除莠霉素、熊果酸和齐墩果酸。抗体的非限制性实例包括针对诸如VEGF、VEGF受体或CD105的不同表位等分子的那些。另外,VEGF受体的小分子抑制剂是已知的,且在本文中考虑。VEGF受体抑制剂的非限制性实例包括兰尼单抗、阿柏西普、舒尼替尼、索拉非尼、阿昔替尼、培加

尼布和帕唑帕尼。

[0259] 这些VEGF受体抑制剂的多种组合可以与本文所述制剂一起施用。在一个实施方案中,组合可以导致将更低的剂量用于所述的抗体或抗原结合。这样的给药改变可以源自抗体组合的协同效应。

[0260] 癌症

CD105与肿瘤血管生成有关,且与正常组织中的内皮相比,在各种肿瘤组织的内皮中被强烈地上调。CD105在广范围的肿瘤内皮中被上调。另外,与对应的正常组织相比,在肿瘤内皮中存在更强的CD105表达。因而,用抗-CD105抗体抑制血管生成,代表癌性肿瘤的一种治疗选择。本文所述制剂可以用于治疗癌性肿瘤和转移。所述制剂也可以用于药物的配制中,所述药物用于治疗癌性肿瘤和转移。

[0261] VEGF代表抗肿瘤治疗的一种目标,因为它的表达在许多实体瘤中被上调。VEGF是血管生成(从预先存在的血管生长出新血管)的一种主要调节剂。该过程是实体瘤的生长的基础,其依赖于新血管的形成。某些小分子治疗剂能够靶向血管内皮生长因子受体(“VEGFR”);小分子治疗剂的这种靶向可以导致抗癌效应。靶向VEGF受体的试剂通过抑制新血管形成来间接地阻断肿瘤生长。抑制VEGF诱导的血管生成可以发挥抗肿瘤效应或提高的抗肿瘤效应,而不显著抑制巨噬细胞、破骨细胞或破软骨细胞的VEGF刺激。

[0262] 术语“肿瘤”在本文中用于表示表达CD105和/或VEGF的癌性组织(与相同类型的正常组织的表达相比)。肿瘤可以包括实体瘤和半实体瘤。肿瘤的非限制性实例包括:人白血病,包括非T细胞型(非-T)急性淋巴细胞性白血病(ALL)、粒单核细胞白血病;和人实体瘤和半实体瘤,它的周围脉管系统表达中等至高水平的CD105(与相同类型的正常组织的表达相比),包括血管肉瘤、乳癌、胃癌、结肠癌、霍杰金淋巴瘤、淋巴瘤、多形性胶质母细胞瘤(GBM)、肺癌、黑色素瘤、骨髓瘤、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、腮腺肿瘤、咽癌、前列腺癌、肝细胞癌、肾癌和直肠乙状结肠癌。

[0263] 待治疗的癌性组织是,例如,表达异常水平的CD105和/或VEGF的内皮组织。

[0264] 在没有肿瘤组织的新生血管形成的情况下,肿瘤组织不会获得需要的营养物,生长减慢,停止额外的生长,退化,并最终变得坏死,导致肿瘤的杀死。本文提供了通过抑制肿瘤血管生成来抑制肿瘤新生血管形成的方法。类似地,本文提供了抑制肿瘤生长的方法。

[0265] 所述方法对抗转移的形成也是特别有效的,因为它们的形成需要原发性肿瘤的血管生成,使得转移性癌细胞可以离开原发性肿瘤,且它们在第二部位的建立需要新生血管形成来支持转移的生长。

[0266] 应当明白,本发明的“患有癌症/转移的受试者”可以表达突变蛋白(肿瘤相关抗原)或突变基因,且仍然没有疾病的症状。在结肠癌的一个非限制性实例(其与突变型K-ras蛋白有关)中,在一些结肠细胞中具有突变型K-ras蛋白的受试者是待治疗的受试者,即使该受试者可能仍然没有结肠癌的症状。“疾病的体征或症状”代表疾病的临床上识别的表现或指征。

[0267] “治疗”患有肿瘤或转移的受试者表示,在治疗以后,受试者的体征或症状部分减轻、完全减轻或保持静止。已经治疗的患者可以表现出肿瘤负荷的部分或完全减轻。这意图包括预防、治疗和治愈。在一个非限制性实例中,治疗患有高度转移性癌症(例如,乳腺癌)的受试者,其中额外的转移没有发生,或与没有接受治疗的受试者相比,转移的数目减少。

在另一个非限制性实例中,治疗受试者,其中受试者的实体癌的大小减小,或与与没有接受治疗的受试者相比,实体癌的大小没有增加。在另一个非限制性实例中,与没有接受治疗的受试者的癌细胞的数目相比,治疗的受试者中的癌细胞的数目没有增加或数目减少。也可以将改善定义为,例如,细胞增殖的减少、细胞数目的减少、细胞凋亡的增加和/或受治疗的受试者的存活期的增加。

[0268] 治疗可导致患者的肿瘤或转移的部分或完全消除和/或存活延长。

[0269] 在一个实施方案中,在向患者施用一个或多个剂量的制剂之后,一种或多种体征或症状的严重程度或持续时间降低约2%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约90%、约95%或约100%。

[0270] 在另一个实施方案中,在向患者施用一个或多个剂量的制剂之后,一种或多种体征或症状的严重程度或持续时间降低约2倍、约5倍、约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、约50倍、约55倍、约60倍、约65倍、约70倍、约75倍、约80倍、约90倍、约95倍、约100倍或更多倍。

[0271] 待在本文所述的方法中治疗的肿瘤或癌症包括、但不限于:肺癌、妇科恶性肿瘤、黑色素瘤、乳腺癌、脑癌(例如,多形性胶质母细胞瘤、“GBM”或神经胶质瘤)、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌、结肠直肠癌、前列腺癌、肾癌、头癌、肝癌(肝细胞癌)、颈癌、肾癌(肾细胞癌)、阴茎癌、胃癌、甲状腺癌、膀胱癌、肉瘤、癌、骨髓瘤和淋巴瘤。在一个实施方案中,待治疗的肿瘤是实体瘤或半实体瘤。在另一个实施方案中,待治疗的肿瘤是原发性肿瘤。在另一个实施方案中,待治疗的肿瘤是转移性肿瘤。在一个实施方案中,待治疗的肿瘤或癌症属于上皮起源。在另一个实施方案中,待治疗的癌症是骨髓瘤。在另一个实施方案中,待治疗的癌症是卵巢癌。在另一个实施方案中,待治疗的癌症是肾/肾脏癌。在另一个实施方案中,待治疗的癌症是肝细胞癌/肝癌。

[0272] 根据需要,可以与一种或多种额外的治疗性处理联合地施用化合物,包括、但不限于:阿霉素、环磷酰胺、紫杉醇、培美曲塞、替莫唑胺、奥沙利铂、西妥昔单抗、帕尼单抗、索拉非尼、舒尼替尼、吉非替尼、厄洛替尼、5-氟尿嘧啶、伊立替康、托泊替康、亚叶酸、bortezomib、来那度胺、沙利度胺、卡培他滨、多西他赛和本文所述的许多其他常规癌症疗法。本文使用的“辐射”表示,例如,微波、紫外线(UV)、红外线(IR)或 $\alpha$ -、 $\beta$ -或 $\gamma$ -辐射。使用常规技术,可以“集中”或局部地递送辐射,以将辐射靶向一个或多个肿瘤部位,而不辐射整体身体。应当理解,下面列出的治疗方案的列表代表常规疗法,但是本发明包括在本文中不具有具体公开的其他已知的治疗方案。

[0273] 在一个实施方案中,所述癌症是卵巢癌,所述一种或多种额外的治疗性处理是外科手术、化学疗法(例如,多柔比星、盐酸多柔比星脂质体、吉西他滨和基于铂的化学治疗剂诸如顺铂、卡铂和奥沙利铂)、美法仑、拓扑异构酶I抑制剂诸如托泊替康和伊立替康、基于紫杉烷的疗法、激素、辐射疗法、全身低温、异黄酮衍生物、细胞毒性的大环内酯类诸如埃博霉素、血管生成抑制剂诸如贝伐单抗、信号转导抑制剂诸如曲妥单抗、基因疗法、RNAi疗法、免疫疗法、单克隆抗体、磷脂酰肌醇样激酶抑制剂诸如雷帕霉素或它们的任何组合。本文所述的抗体与卵巢癌疗法的联合治疗也可以提供任一种疗法或二者的更低剂量,这是由于共同施用所述疗法的协同效应。

[0274] 在一个实施方案中,所述癌症是肾/肾脏癌,且所述一种或多种额外的治疗性处理是外科手术、化学疗法、帕唑帕尼、干扰素- $\alpha$ 或IL-2。在另一个实施方案中,所述额外试剂是VEGF受体抑制剂。VEGF受体抑制剂的非限制性实例包括上述的那些、阿柏西普、舒尼替尼、索拉非尼、阿昔替尼和帕唑帕尼。本文所述的抗体与肾癌疗法的联合治疗也可以提供一种疗法或二者的更低剂量,这是由于共同施用所述疗法的协同效应。

[0275] 在一个实施方案中,所述癌症是骨髓瘤,且所述一种或多种额外的治疗性处理是外科手术、放射疗法、硼替佐米、来那度胺或沙利度胺。这些疗法中的任一种的剂量是本领域已知的,且可以在联合治疗中相应地进行调节。

[0276] 在一个实施方案中,所述癌症是前列腺癌,且所述一种或多种额外的治疗性处理是外科手术、放射疗法(例如,外线束或近距离放射疗法)、激素剥夺(雄激素抑制,包括使用阿比特龙)、热休克蛋白90(HSP90)抑制剂、化学疗法(例如,多西他赛、雌莫司汀、基于铂的化学疗法诸如顺铂、卡铂、沙铂和奥沙利铂)、泼尼松或泼尼松龙、降低胆固醇的药物诸如他汀类药物、促黄体激素-释放激素(LHRH)激动剂、RNAi疗法、基于树突细胞的疗法、遗传修饰成分泌粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF)的全肿瘤细胞(也称作GVAX)或它们的任何组合。在另一个实施方案中,所述额外试剂是VEGF受体抑制剂。VEGF受体抑制剂的非限制性实例包括:阿柏西普、舒尼替尼、索拉非尼、阿昔替尼和帕唑帕尼。

[0277] 在一个实施方案中,所述癌症是肺癌,且所述一种或多种额外的治疗性处理是外科手术、放射疗法(例如,胸放射疗法、使用带电颗粒的辐射疗法、尿嘧啶-替加氟和基于铂的化学疗法(例如,顺铂、卡铂、奥沙利铂等)和长春瑞滨、厄洛替尼、吉非替尼、抗-表皮生长因子受体抗体(例如,西妥昔单抗)、酪氨酸激酶的小分子抑制剂、参与肺癌细胞增殖涉及的蛋白的直接抑制剂、极光激酶抑制剂、激光诱导的热疗法、RNAi疗法、遗传修饰成分泌粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF)的全肿瘤细胞(也称作GVAX)或它们的任何组合。额外的治疗性处理包括紫杉醇或培美曲塞。在另一个实施方案中,所述额外试剂是VEGF受体抑制剂。VEGF受体抑制剂的非限制性实例包括阿柏西普、舒尼替尼、索拉非尼、阿昔替尼和帕唑帕尼。这些疗法中的任一种的剂量是本领域已知的,且可以在联合治疗中相应地进行调节。

[0278] 在一个实施方案中,所述癌症是乳腺癌,且所述一种或多种额外的治疗性处理是外科手术、单克隆抗体(例如,Her-2抗体、赫赛汀)、辅助化学疗法诸如单一试剂化学疗法或联合化学疗法(例如,基于蒽环类抗生素的和基于紫杉烷的多种化学疗法)、或目标-特异性的曲妥单抗(有或没有内分泌操作,有或没有PMRT)、长春瑞滨)、阿霉素、环磷酰胺、卡培他滨、多西他赛、选择性的雌激素受体调节剂诸如他莫昔芬和雷洛昔芬、变构的雌激素受体调节剂诸如曲洛司坦、辐射(例如,间质近距离放射疗法、球囊装置、三维共形外辐射和外科手术中的放射疗法)、抑制全身合成的芳香酶抑制剂(例如,阿那曲唑、依西美坦和来曲唑)、RNAi疗法、免疫抑制性的和抗增殖的雷帕霉素的静脉内类似物诸如坦罗莫司或它们的任何组合。用于进行乳腺癌的三维体外组织培养模型的方法的综述,描述在:Kim等人, *Breast Cancer Research Treatment* 85(3): 281-91(2004)。用于测试癌症的其他体内和体外模型是已知的,且可以用于测试本文所述的抗体。在另一个实施方案中,所述额外试剂是VEGF受体抑制剂。VEGF受体抑制剂的非限制性实例包括:阿柏西普、舒尼替尼、索拉非尼、阿昔替尼和帕唑帕尼。这些疗法中的任一种的剂量是本领域已知的,且可以在联合治疗中相应地

进行调节。

[0279] 在一个实施方案中,所述癌症是结肠癌,且所述一种或多种额外的治疗性处理是外科手术、辐射疗法和化学疗法(例如,5-氟尿嘧啶(5-FU)、左旋咪唑、亚叶酸或司莫司汀(甲基CCNU)、N-[2-(二甲氨基)乙基]吡啶-4-甲酰胺和其他有关的羧酰胺抗癌药;非-拓扑异构酶II抑制剂、伊立替康、脂质体托泊替康、紫杉烷类抗癌剂(例如,紫杉醇或多西他赛)、咕吨酮醋酸类化合物(例如,5,6-二甲基咕吨酮-4-乙酸(5,6-dimethylanthrone-4-acetic acid) PMAA)、昆布多糖、位点-选择性的环AMP类似物(例如,8-氯腺苷3',5'-环磷酸盐)、Cox-2的吡喃并咪唑抑制剂、Cox-2的咪唑抑制剂、Cox-2的四氢咪唑抑制剂、Cox-2的茛抑制剂、NSAIDs的局部抑制剂(例如,邻氨基苯甲酸、阿司匹林(5-乙酰水杨酸)、奥柳氮钠、碳杂环酸、卡洛芬、苯丁酸氮芥、双氯苯胺酚乙酸、芬布芬、芬氟酸、非诺洛芬、氟芬那酸、氟比洛芬、氟洛芬、咪塞米、金硫丁二钠、布洛芬、咪唑美辛、咪唑洛芬、酮洛芬、氯那唑酸、洛索洛芬、甲氯芬那酸、甲芬那酸、美法仑、萘普生、青霉胺、苯乙酸、丙酸、水杨酸、柳氮磺吡啶、舒林酸、托美丁、布他酮保泰松扑灭津、NSAID、美洛昔康、昔康类、吡罗昔康、费啉、吡罗昔康β环葡聚糖、替诺昔康、依托度酸和奥沙普秦)、HER-2/neu的抑制剂、RNAi疗法、GM-CSF、单克隆抗体(例如,抗-Her-2/neu抗体、抗-CEA抗体、A33(HB 8779)、100-210(HB 11764)和100-310(HB 11028))、西妥昔单抗、帕尼单抗、激素疗法、嘧啶胺类、喜树碱衍生物(例如,CPT-11)、亚叶酸(FA)、吉西他滨、Ara-C、基于铂的化学疗法诸如顺铂、卡铂和奥沙利铂、cGMP-特异性的磷酸二酯酶抑制剂或它们的任何组合。在一个实施方案中,所述额外的治疗性处理是5-氟尿嘧啶、亚叶酸和奥沙利铂的组合(FOLFOX)。在一个实施方案中,所述额外的治疗性处理是5-氟尿嘧啶、伊立替康和亚叶酸的组合(IFL)。在一个实施方案中,所述额外试剂是西妥昔单抗。在一个实施方案中,所述额外试剂是帕尼单抗。在另一个实施方案中,所述额外试剂是VEGF受体抑制剂。VEGF受体抑制剂的非限制性实例包括:阿柏西普、舒尼替尼、索拉非尼、阿昔替尼和帕唑帕尼。这些疗法中的任一种的剂量是本领域已知的,且可以在联合治疗中相应地进行调节。

[0280] 在一个实施方案中,所述癌症是胰腺癌,且所述一种或多种额外的治疗性处理是外科手术、辐射疗法、5-氟尿嘧啶和放射疗法、全身疗法、支架、吉西他滨、吉西他滨和放射疗法、西妥昔单抗、厄洛替尼、放化疗或它们的任何组合的治疗性处理的组合。在另一个实施方案中,所述额外试剂是VEGF受体抑制剂。VEGF受体抑制剂的非限制性实例包括:aflibercept、舒尼替尼、索拉非尼、阿昔替尼和帕唑帕尼。

[0281] 可以在一个或多个不同的时间点,包括在治疗之前、过程中和之后,关于体征或症状对患者进行评估。治疗可以导致改善受试者的状况,且可以通过测定是否已经发生下述因素中的一项或多项来进行评估:肿瘤大小的减小、细胞增殖的减少、细胞数目的减少、新生血管形成的减少、细胞凋亡的增加、或至少一部分形成细胞增殖病症的细胞的存活期减小。在某些情况下,这些事件中的一个或多个可导致癌症的部分或完全消除和/或患者存活期的延长。或者,对于末期癌症,治疗可导致疾病的停滞、更好的生活质量和/或存活期的延长。

[0282] 当相继施用组合物时,包含本文所述的抗CD105抗体的组合物可以,例如,在抗VEGF抗体(或其抗原结合片段)之前和/或之后施用。

[0283] 当同时施用组合物时,含有抗-CD105抗体的组合物可以在与含有抗-VEGF抗体的

组合物相同的部位或不同的部位施用。

[0284] 在又一个实施方案中,本文提供了含有抗CD105抗体和抗VEGF抗体(或其抗原结合片段)的组合物(药物),其能够抑制CD105和VEGF分别的一种或多种生物活性,诸如促有丝分裂活性、细胞增殖、肿瘤生长、新血管生成、或血管生成活性。

[0285] 应当理解,治疗方案可以包括施用一次或多次本文所述组合物中的每一种。可以在单次剂量或多次剂量中施用组合物。分开的组合物的施用可以是通过相同的途径或通过不同的途径。

[0286] 在一个实施方案中,组合物每1至3周施用,持续6至12个周期,或直到肿瘤进展。所述方法可以进一步包括每1至12周施用每种组合物持续长达2年的步骤。在另一个非限制性实例中,抗CD105抗体和抗VEGF抗体(或其抗原结合片段)的同时施用发生在第1周,随后在第1、2、3、或4周额外施用所述组合物,其中同时施用重复6至12个周期,或直到肿瘤进展,且随后每1至12周施用所述组合物持续长达2年。

[0287] 在用于治疗患者中的癌症的方法的一个非限制性实例中,所述方法包括:手术切除癌症,和在第1至3周施用抗CD105抗体和抗VEGF抗体(或其抗原结合片段)持续12个月,或直到肿瘤进展,随后在第1至12周同时施用一个剂量的抗CD105抗体和抗VEGF抗体(或其抗原结合片段)。此外,抗CD105抗体和抗VEGF抗体(或其抗原结合片段)的同时施用可以每1至3周重复持续长达6周。任选地,所述方法进一步包括每一至十二周施用抗CD105抗体和抗VEGF抗体(或其抗原结合片段)持续长达两年。应该理解的是,治疗方案可与本文提供的监测方法组合,以确定是否和何时需要施用额外剂量的抗CD105抗体和抗VEGF抗体(或其抗原结合片段)。

[0288] 联合治疗可以提供协同作用和/或有益作用,或可以允许更低的组合剂量,以提供更大的安全界限。本发明包括这样的治疗方案:其增强抗-CD105抗体和抗-VEGF(或其抗原结合片段)用于预防、控制、治疗或消除癌症或其他疾病的预防效果或治疗效果。

[0289] 在一个实施方案中,给受试者施用额外的治疗性处理,诸如,例如,血管生成抑制剂(如本文所述)。含有这样的额外的治疗性处理的组合物可以与本文所述的其他组合物联合地(相继地或同时地)施用。

[0290] 在本文提供的用于治疗癌症的一种非限制性方法中,额外的治疗性处理包括:外科手术切除癌症、辐照、一种或多种化疗剂或它们的组合,和并行施用一种或多种本文所述的组合物。在一个方面,组合物的施用可以是,例如,20分钟静脉内输注。

[0291] 涉及血管生成的眼科疾病

在一个方面,本发明提供了通过向患者施用治疗有效量的一种或多种本文提供的制剂治疗糖尿病性视网膜病变、黄斑变性、脉络膜新生血管形成、黄斑水肿和/或新生血管性青光眼的方法。

[0292] 黄斑变性(AMD)是在负责高清晰度视觉的中央视网膜(称作黄斑)的一部分中的光感受器的丧失。黄斑变性与胞外基质组分和其他碎片在视网膜色素上皮和血管脉络膜之间的膜中的异常沉积有关。该碎片-样材料被称作玻璃疣。通过眼底镜检查,观察到玻璃疣。正常的眼可能具有没有玻璃疣的黄斑,而玻璃疣可能大量存在于视网膜周围。在没有任何黄斑视觉损失的情况下,软玻璃疣在黄斑中的存在,被视作早期的AMD。黄斑变性的特征在于脉络膜新生血管生成(CNV),即在视网膜的视网膜色素上皮(RPE)层的下面形成异常血管。

这些血管突破布鲁赫膜,破坏视网膜色素上皮,出血,并最终造成黄斑瘢痕形成,后者导致深度的中心视觉丧失(盘状瘢痕形成)。

[0293] 除了其他眼科疾病以外,脉络膜新血管生成(CNV)常见于黄斑变性中,且与脉络膜内皮细胞的增殖、胞外基质的过量产生和纤维血管视网膜下膜的形成有关。视网膜色素上皮细胞增殖和血管生成因子的产生似乎影响脉络膜新血管生成。

[0294] 糖尿病视网膜病变(DR)是在糖尿病中形成的特征在于过度血管生成的眼科疾病,其原因是毛细血管基底膜增厚和缺少毛细血管的周细胞与内皮细胞之间的接触。周细胞的丧失增加毛细血管的渗漏,并导致血液-视网膜屏障的破坏。糖尿病视网膜病变是微血管视网膜变化的结果。高血糖症诱导的外周细胞死亡和基膜的增厚,导致血管壁的机能不全。这些破坏改变血液-视网膜屏障的形成,并使视网膜血管变得渗透性更高。小血管(诸如眼中的那些)特别易受差的血糖(血液葡萄糖)控制的影响。葡萄糖和/或果糖的过度积累损伤视网膜中的微小血管。当受损的血管渗漏液体和脂质到黄斑上时,也可以形成黄斑水肿。这些液体使得黄斑肿胀,后者使视力模糊。该破坏也导致在视网膜处缺氧。

[0295] 随着疾病进展,在视网膜中的缺氧刺激沿着视网膜和在澄清的凝胶样玻璃体液(其填充在眼内)中的血管生成。如果不及时治疗,这些新血管可以出血,使视力模糊,并破坏视网膜。纤维血管增殖也可以造成牵引性视网膜脱离。新血管还可以生长进眼前房的角中,并造成新生血管性青光眼。

[0296] 增生性玻璃体视网膜病变与在玻璃体膜内以及在视网膜的表面上的细胞膜和纤维变性膜的细胞增殖有关。视网膜色素上皮细胞增殖和迁移常见于该眼科疾病。与增生性玻璃体视网膜病变有关的膜含有胞外基质组分诸如胶原I、II和IV型和纤连蛋白,并逐渐变得纤维化。

[0297] 在发达国家中,年龄相关性黄斑变性(AMD)和糖尿病视网膜病变是失明的2个主要原因。阿柏西普、兰尼单抗和哌加他尼已经改善了对于AMD患者可得的治疗选项。兰尼单抗是Fab,且阿柏西普是融合蛋白。它们二者都结合血管内皮生长因子(VEGF),且迄今为止已经表现出最令人惊叹的治疗AMD的结果;但是,仅少数治疗的患者经历视敏度的明显改善。聚焦于除了VEGF以外的目标上的抗血管生成疗法,可以克服与靶向VEGF途径的试剂有关的一些限制。

[0298] 本文所述的抗-CD105抗体可以用于治疗或预防黄斑变性、CNV、糖尿病视网膜病变或增生性玻璃体视网膜病变。本文描述了经由施用本文所述的抗体治疗或预防黄斑变性、CNV、糖尿病视网膜病变、黄斑水肿或增生性玻璃体视网膜病变的方法。本文所述的抗CD105抗体也可以收缩血管、抑制与眼部疾病相关的内皮细胞增殖、清除出血的体征或症状、治疗混浊视力、提供视力丧失的停滞、改善视力和/或预防血管渗漏。本文所述的抗CD105抗体也可以用于治疗黄斑变性、CNV、糖尿病视网膜病变、黄斑水肿或增生性玻璃体视网膜病变的药物中。

[0299] 此外,本文所述的抗CD105抗体也可以与治疗黄斑变性、CNV、糖尿病视网膜病变、黄斑水肿或增生性玻璃体视网膜病变的已知疗法和/或化合物组合使用。这样的化合物的实例包括,但不限于,兰尼单抗、阿柏西普和哌加他尼。除了本文所述的施用模式以外,可以通过玻璃体内途径施用所述抗-CD105抗体。玻璃体内施用模式的非限制性实例包括玻璃体内注射和玻璃体内植入物的使用。

[0300] 可以评估患者的改善和对治疗的应答。治疗包括、但不限于：减轻黄斑水肿、CNV面积的减小和视敏度的增加。体征或症状的测量如本领域已知，且在以下实施例中进一步说明。

[0301] 根据本文描述的实施方案，本文所述的制剂可以单独施用，或与一种或多种额外的活性剂或惰性剂联合施用。当使用组合时，可以使用抗CD105抗体和抗VEGF抗体（其抗原结合片段）的同时或相继施用。

[0302] 功能试验

可以在多种体外、体内和先体外后体内试验中评估本文所述的制剂。可以使用本领域技术人员已知的任何合适的试验来监测这样的效应。本文描述了几种这样的技术。

[0303] CD105信号传导和功能的测定

CD105（内皮因子）是由增殖中的内皮细胞表达的TGF- $\beta$ 受体家族的一个成员，内皮细胞增殖需要正常水平的CD105。CD105在实体瘤的血管生成脉管系统中强烈表达，涉及血管生成/血管发育，且是辅助性的转化生长因子 $\beta$ （TGF- $\beta$ ）受体。CD105是一种在白血病细胞和内皮细胞上表达的同源二聚体细胞膜糖蛋白。已经表征了CD105的2种同种型L-内皮因子（170 kDa）和S-内皮因子（160 kDa），它们的差别在于它们的细胞质尾巴的氨基酸序列。

[0304] CD105表达被细胞低氧增加（通过低氧诱导因子-1- $\alpha$ （HIF-1- $\alpha$ ）的产生），并保护低氧细胞免于细胞凋亡。CD105的作用是调节TGF- $\beta$ 超家族的多种激酶受体复合物的信号传导，所述TGF- $\beta$ 超家族包括TGF- $\beta$ 受体（TGF- $\beta$ R）、激活蛋白受体-样激酶（ALK）和激活蛋白受体。在没有CD105存在下，TGF- $\beta$ 受体的活化导致SMAD蛋白的磷酸化，后者抑制内皮细胞生长。但是，TGF- $\beta$ 对CD105的活化调节SMAD蛋白磷酸化。最终结果是，TGF- $\beta$ 受体活化对内皮细胞的生长抑制作用的释放。

[0305] 抗-CD105抗体对CD105活化的阻止，与TGF- $\beta$ 协同地起抑制内皮细胞生长的作用。TGF- $\beta$ 可以刺激在内皮细胞中具有相反作用的2种独特的I型受体/SMAD信号传导途径。TGF- $\beta$ /ALK5信号传导途径（A）导致细胞增殖和迁移的抑制，而TGF- $\beta$ /ALK1途径（B）诱导内皮细胞增殖和迁移。在血管生成过程中高度表达的CD105（一种辅助性的TGF- $\beta$ 受体）是ALK1信号传导所必需的。在没有CD105存在下，TGF- $\beta$ /ALK5信号传导占优势，并维持静止的内皮。高CD105表达刺激ALK1途径，并间接地抑制ALK5信号传导，从而促进血管生成的活化状态。

[0306] 在一个非限制性实施方案中，可以关于抑制血管生成和内皮细胞增殖来评估抗体。抗-CD105抗体与HUVEC的结合不会阻止TGF- $\beta$ 与HUVEC的随后结合。因而，抗-CD105抗体对内皮细胞生长的直接抑制，代表在体内观察到的抗血管生成效应和肿瘤抑制效应的根本机制之一。在另一个实施方案中，可以关于阻断血管生成（通过阻止Smad1/5/8磷酸化和/或信号传导）来评估抗体。CD105通过TGF- $\beta$ /ALK1的信号传导而参与促进血管生成，所述信号传导又涉及Smad2/3蛋白的磷酸化的减少和/或阻断。在另一个实施方案中，可以关于阻断血管生成（通过增强Smad2/3磷酸化和/或信号传导）来评估抗体。

[0307] 用于测定本文提供的抗体对TGF- $\beta$ /ALK1信号传导途径和/或Smad1/5的磷酸化的阻断或抑制作用的方法和技术包括、但不限于：已知的分子技术。作为实例，使用对TGF- $\beta$ /ALK5或TGF- $\beta$ /ALK1途径中的任一种蛋白特异性的抗体的蛋白印迹法，可以用于确定本文公开的抗-CD105抗体对TGF- $\beta$ /ALK5或TGF- $\beta$ /ALK1途径的抑制作用和/或刺激作用。类似地，参与TGF- $\beta$ /ALK5或TGF- $\beta$ /ALK1途径的蛋白的mRNA的检测或mRNA的调节，可以用于测定本文

公开的抗体的抑制作用和/或刺激作用。用于测定TGF- $\beta$ /ALK5或TGF- $\beta$ /ALK1途径的细胞信号传导的其他方法是本领域已知的,且在本文中考虑。

[0308] 使用本领域公知的试验,通过例如结合试验诸如ELISA、竞争性ELISA、表面等离子体共振和对HUVEC细胞的影响(在下面更详细地描述),可以评估本文公开的抗-CD105抗体的活性。

[0309] SCID /裸鼠

用于测定肿瘤生长的一种方法如下使用SCID小鼠:收获亚汇合的人M21黑色素瘤细胞,洗涤,重新悬浮于无菌的PBS中( $20 \times 10^6$ /mL)。给SCID小鼠皮下地注射100 $\mu$ L M21人黑色素瘤细胞( $2 \times 10^6$ )悬浮液。在肿瘤细胞注射以后3天,不治疗小鼠,或用一种或多种对照或试验制剂静脉内地或腹膜内地治疗小鼠(例如,100 $\mu$ g/小鼠)。每天治疗小鼠,持续24天。使用测径器测量肿瘤大小,并使用公式 $V = (L \times W^2) / 2$ 估测体积,其中V等于体积,L等于长度,W等于宽度。

[0310] 用于测定肿瘤生长的一种方法如下使用裸鼠:将在50 $\mu$ l PBS中的MDA-MB-435肿瘤细胞( $0.4 \times 10^6$ 细胞/小鼠)正位地植入雌性裸鼠(5-6周龄)的乳房脂肪垫中。当肿瘤达到大约50-80 mm<sup>3</sup>的平均体积时,将小鼠随机化(至少10只/组),并开始使用下述剂量的一种或多种抗体的静脉内或腹膜内治疗,每周2次:在100  $\mu$ l PBS中的1 $\mu$ g (0.05 mg/kg) /剂、10 $\mu$ g (0.5 mg/kg)、100 $\mu$ g (5 mg/kg) 或200 $\mu$ g (10 mg/kg) 或100  $\mu$ g对照抗体,或媒介物PBS 100 $\mu$ l。在一些研究中,也可以评价未治疗组。使用测径器测量肿瘤大小,并使用公式 $V = (L \times W^2) / 2$ 估测体积,其中V等于体积,L等于长度,W等于宽度。

[0311] BALB/c 同源小鼠模型

或者,也可以使用BALB/c同源小鼠模型来评估肿瘤生长和本文所述抗体对肿瘤生长的抑制,如例如Tsuji等人, *Int. J. Oncology*, 29: 1087-1094 (2006) 所例证的。

[0312] 小鼠

另一个试验测量嵌合小鼠:人小鼠模型中的血管生成,并被称作嵌合小鼠试验。所述试验已经由其他人进行了详细描述,并进一步已经在本文中描述用于测量血管生成、新生血管形成和肿瘤组织的消退。参见Yan, 等人(1993) *J. Clin. Invest.* 91:986-996。

[0313] 嵌合小鼠试验是体内血管生成的有用的试验模型,因为移植的皮肤移植在组织学上非常类似于正常的人皮肤,且整个组织的新生血管形成正在发生中,其中实际的人血管正在从移植的人皮肤生长为在移植的人皮肤的表面上的人肿瘤组织中。通过用人特异性的内皮细胞标志物对新血管系统的免疫组织化学染色,可以证实新生血管形成在人移植中的来源。

[0314] 嵌合小鼠试验证实新生血管形成的消退,这基于新血管生长的量和消退程度。此外,可以容易地监测对移植在移植的皮肤上的任何组织(诸如肿瘤组织)的生长的影响。最后,所述试验是有用的,因为在所述试验系统中存在毒性的内部对照。将嵌合小鼠暴露于任何试验试剂,因此小鼠的健康会指示毒性。本文所述的和本领域已知的其他动物模型也可以用于本文所述的方法中。

[0315] 兔眼试验

血管生成的另一种量度是体内兔眼模型,并被称作兔眼试验。所述兔眼试验已经由其他人进行了详细描述,并已经被用于测量在有血管生成抑制剂存在下的血管生成和新生血

管形成,如D' Amato等人(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 (9): 4082-4085所例证的。

[0316] 兔眼试验是公认的体内血管生成的试验模型,因为通过眼的天然透明角膜,可以容易地观察新生血管形成过程,该过程由兔血管从角膜边缘向角膜中的生长来例证。另外,可以容易地随时间监测新生血管形成的刺激或抑制或新生血管形成的消退的程度和量。

[0317] 最后,将兔暴露于任何试验试剂,此后兔的健康会指示实验试剂的毒性。

[0318] 简而言之,进行鸡绒毛尿囊膜 (CAM) 试验,在植入含有一种或多种对照或实验化合物的0.5%羧甲纤维素团粒以后48小时,记录对发育中的脉管系统的影响。由植入的聚(甲基丙烯酸羟乙酯)的团粒 (Hydron; Interferon Sciences, New Brunswick, NJ) 诱导角膜新生血管化,所述团粒含有650 ng与硫糖铝(蔗糖硫酸铝; Bukh Meditec, Copenhagen) 结合的有效血管生成蛋白碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)。硫糖铝向团粒中的添加,保护bFGF免于降解,并提供它的缓慢释放,从而生成一致的侵袭性血管生成,其比单独的bFGF / Hydron诱导的血管生成更显著。在形成团粒以后多达4天,可以在体外检测到bFGF从含有硫糖铝/Hydron的团粒的释放,与此相比,对于只含有Hydron的团粒,仅1天。如下制备团粒:混合110 $\mu$ l含有12 $\mu$ g重组bFGF (Takeda, Osaka) 的盐水和40 mg硫糖铝;将该悬浮液加入80 $\mu$ l在乙醇中的12% (wt/vol) Hydron中。然后将该混合物的等分试样 (10 $\mu$ l) 移取到特氟隆棒 (Teflon pegs) 上,并允许干燥,生成大约17个团粒。

[0319] 将团粒植入麻醉的雌性新西兰白兔的每只眼的角膜微袋中,离边缘2 mm,随后在角膜的表面上单次局部施用红霉素软膏。连续几天的组织学检查证实了角膜中向团粒的渐进性血管生长,仅观察到罕见的炎症细胞。使用全身辐照的严重免疫抑制不会改变该血管生成应答,只含有硫糖铝的团粒不会诱导血管生成。新血管主要由bFGF (而不是炎症) 诱导。从植入以后2天,每天通过胃灌洗给动物饲喂悬浮于0.5% 羧甲纤维素中的一种或多种化合物或单独的媒介物。在即将植入团粒之前,免疫抑制的动物接受6 Gy的全身辐射6分钟。该剂量的辐射导致显著的白血球减少,到第2天白细胞计数减少>80%,到第3天白细胞计数减少>90%,所述结果与以前的报道相一致。

[0320] 相同的角膜专科医生 (M.S.L.) 每隔一日以掩蔽方式用裂隙灯检查动物。通过用分划板测量离边缘的血管长度 (L) 和涉及的边缘的时钟小时数 (C), 确定角膜新生血管形成的面积。使用公式来确定环形带段的面积:  $C/12 \times 3.1416 [r^2 - (r - L)^2]$ , 其中  $r = 6$  mm, 即测量的兔角膜的半径。测量邻近团粒的新生血管形成的均匀连续带,因而,可以评估新生血管形成的总抑制。

[0321] 小鼠基质胶塞血管生成试验

为了证实制剂对血管生成的影响,可以使用小鼠基质胶塞血管生成试验。将各种生长因子 (例如, IGF-1、bFGF或VEGF) (250 ng) 和肝素 (0.0025单位/mL) 与以前所述的生长因子还原的基质胶相混合 (Montesano, 等人, *J. Cell Biol.* 1983, 97:1648-1652; Stefansson, 等人, *J. Biol. Chem.* 2000, 276:8135-8141)。可以将本文所述的制剂或对照抗体包含在基质胶制品中,其中使用动物的一个或多个剂量组。在对照实验中,在没有生长因子存在下,制备基质胶。给小鼠皮下地注射0.5 mL基质胶制品,并允许孵育1周。在孵育时段以后,处死小鼠,通过外科手术取出聚合的基质胶塞。通过2种确定的方法 (包括免疫组织化学分析和血红蛋白含量), 定量在基质胶塞内的血管生成 (Furstenberger, 等人,

*Lancet*. 2002, 3:298-302; Volpert, 等人, *Cancer Cell* 2002, 2(6):473-83;和Su, 等人, *Cancer Res.* 2003, 63:3585-3592)。对于免疫组织化学分析,将基质胶塞嵌入OCT中,快速冷冻,并制备4 $\mu$ m切片。在甲醇/丙酮(1:1)中固定冷冻的切片。用针对CD31的多克隆抗体,将冷冻的切片染色。通过在20高倍(200X)显微场内的微血管密度计数,定量血管生成。

[0322] 可以如以前所述,定量血红蛋白含量(Schnaper, 等人, *J. Cell Physiol.* 1993, 256:235-246; Montesano, 等人, *J. Cell Biol.* 1983, 97:1648-1652; Stefansson, 等人, *J. Biol. Chem.* 2000, 276:8135-8141;和Gigli, 等人, *J. Immunol.* 1986, 100:1154-1164)。在干冰上快速冷冻基质胶植入物,并冻干过夜。将干燥的植入物重新悬浮于0.4 mL 1.0% 皂苷(Calbiochem)中1小时,并通过剧烈吸液来破碎。在14,000 X g离心制品15分钟,以去除任何颗粒。然后通过405 nm测量吸光度,并与纯化的血红蛋白的标准浓度相对比,直接地测定上清液中的血红蛋白浓度。

#### [0323] 测定细胞迁移的方法

细胞迁移试验已经被描述在文献中,例如,Brooks, 等人, *J. Clin. Invest* 1997, 99:1390-1398,用于测量细胞迁移的方法是本领域技术人员已知的。在本文所述的一种测量细胞迁移的方法中,用底物(在这里,CD105和/或VEGF)包被来自透明孔(Transwell)迁移室的膜,洗涤透明孔,并用BSA封闭非特异性的结合位点。收获来自亚汇合培养物的肿瘤细胞,洗涤,并在有或没有试验抗体存在下重新悬浮于迁移缓冲液中。在允许肿瘤细胞迁移至包被的透明孔膜的下侧以后,去除剩余在膜上侧的细胞,并用结晶紫将迁移至下侧的细胞染色。然后通过每个显微场的直接细胞计数,定量细胞迁移。

#### [0324] 测定细胞增殖的方法

通过本领域技术人员已知的方法,可以测定细胞增殖。可以将本文所述的亚汇合的人内皮细胞(HUVEC)重新悬浮于含有低(5.0%)血清的增殖缓冲液(在有或没有来自ECV或ECVL细胞的CM(25 $\mu$ L)存在下)中,并允许内皮细胞增殖24小时。通过使用可商业得到的WST-1试验试剂盒(Chemicon)测量线粒体脱氢酶活性,可以定量增殖。另外,通过使用标准方法测量<sup>3</sup>H掺入(She等人, *Int. J. Cancer*, 108: 251-257(2004)),可以定量本文所述的增殖。

[0325] 评估细胞增殖的其他方法是本领域已知的,且在本文中考虑。在实施例中更详细地描述了其他非限制性实例。

#### [0326] 诱导CDC、ADCC和调理素作用的方法

各种疗法已经指向增强身体对转化的细胞的天然免疫应答。常规的效应物方法包括补体依赖性的细胞溶解(“CDC”)、抗体依赖性的细胞的细胞毒性(“ADCC”)和吞噬作用(在免疫球蛋白包被目标细胞以后,网状内皮系统进行清除)。已知,在抗体存在下,某些效应细胞(诸如具有表面结合的、抗体Fc区的受体的淋巴样细胞)介导针对目标细胞的抗体依赖性的细胞的细胞毒性(“ADCC”)反应。借助于ADCC,这些效应细胞发挥针对这样的目标细胞的细胞溶解活性。

[0327] 已经在体外证实了两类ADCC反应。在经典的ADCC反应中,效应细胞结合到抗体包被的目标细胞上,随后造成目标细胞的细胞溶解(A. H. Greenberg等人, “Characteristics Of The Effector Cells Mediating Cytotoxicity Against Antibody-Coated Target Cells,” *Immunology*, 21,第719页(1975))。效应细胞和目标细

胞之间的这种结合,源自包被目标细胞的抗体的Fc区和效应细胞的Fc受体之间的相互作用。这类ADCC反应的一个缺点是,它可受到循环的抗原-抗体复合物的阻碍,所述复合物经常与各种疾病有关,它们与目标细胞结合的抗体竞争效应细胞的Fc受体(I. C. M. MacLennan, "Competition For Receptors For Immunoglobulin On Cytotoxic Lymphocytes," *Clin. Exp. Immunol.*, 10, 第275页(1972))。由于经典的ADCC的这种缺点,可以使用第二类ADCC反应,即抗体引导的ADCC。在抗体引导的ADCC中,首先使目标特异性的抗体与效应细胞结合,然后使得到的复合物通过抗体“指向”在目标细胞表面上的它的特异性抗原。有利地,抗体引导的ADCC可能不受在宿主系统中循环的抗原-抗体复合物的存在的影响。通过Fc区/Fc受体结合实现的抗体和效应细胞之间的相互作用通常较弱。并且,在某些情况下,抗体不会保持与效应细胞结合足以允许目标细胞裂解的时间段。考虑到该潜在的问题,已使用聚乙二醇和邻苯二甲酸酯油混合物进行预处理,使抗体结合效应细胞(J. F. Jones和D. M. Segal, *J. Immunol.*, 125, 第926-33页(1980))。但是,在抗体-效应细胞复合物上的任何聚乙二醇和邻苯二甲酸酯油残余物可能具有的对身体的毒效应,可能减少该方法用于体内治疗的适用性。

[0328] 或者,已经提出了通过使用细胞毒性药物的辅助化学疗法来增强抗体引导的ADCC的方法(I. R. Mackay等人, *Cancer Immunol. Immunother.*, 16, 第98-100页(1983))。用于测试ADCC的试验是本领域众所周知的,例如,美国专利号5,756,097。

[0329] 因此,本实施方案提供了这样的抗体:所述抗体可以结合在新生血管形成或血管生成中起作用的细胞,或所述抗体可以增强所述细胞的吞噬作用和杀死,从而增强体内保护。也提供了具有相同效应的其他抗体和其功能片段,它们特异性地结合或优先结合这样的抗体可以结合的结合位点或表位,或可与其发生免疫反应。

[0330] 所述抗体也可以对于在新生血管形成或血管生成中起作用的细胞(例如,内皮细胞)是调理素的,或表现出调理素活性。本领域技术人员会认识到,“调理素活性”表示调理素(通常是抗体或血清因子C3b)的下述能力:所述调理素结合抗原或细胞受体,以促进抗原或细胞受体与吞噬细胞的结合,并从而增强吞噬作用。当被调理素抗体包被时,某些细胞变得对吞噬细胞(诸如嗜中性粒细胞和巨噬细胞)非常有吸引力,且它们从血流中的清除速率显著增加。以例如在美国专利号6,610,293中所述的任何常规方式,可以测量调理素活性。

[0331] 在另一个非限制性实施方案中,具有新生血管病症或血管生成依赖性的病症的患者从血管生成脱落抗原/肽(例如,CD105)。这些抗原/肽可以是“肿瘤相关抗原”。可以给这样的患者全身地施用针对所述抗原/肽(例如,CD105)的抗体,且可以开始本文所述的任何途径,以诱导CDC、ADCC、调理素作用或任何其他形式的细胞介导的杀死。

[0332] 其他试验

本领域已知的其他试验也可以用于测试本文所述制剂(诸如,例如,在下面的实施例中描述的那些)的效应。

### 具体实施方式

[0333] 参考下面的非限制性实施例,可以更好地理解本申请,所述实施例作为本申请的示例性实施方案而提供。提供下述实施例,以便更充分地例证示例性实施方案,但是,不应解释为限制本申请的宽范围。尽管在本文中已经显示和描述了本申请的某些实施方案,显

而易见,这样的实施方案仅作为实施例而提供。可以做出许多变化、改变和置换;应当理解,对本文所述的实施方案的不同改变可以用于实践本文所述的方法。

#### [0334] 实施例1: 施用的示例性剂量时间表

抗体和其抗原结合片段的施用的最优剂量时间表可以使用本领域公认且如上所述的方法来确定。

[0335] 在一个非限制性实施方案中,本文描述的抗体可以经各个时间段施用于受试者。可以如下施用抗体或其抗原结合片段的一个或多个剂量:每周2次、每周1次、每2周1次、每3周1次、每4周1次、每6周1次、每8周1次、每12周1次或它们之间的任何周组合。也考虑给药循环,诸如,例如,每周1次或2次地施用抗体,持续4周,随后不治疗2周。本文也考虑额外的给药循环,包括例如:本文描述的剂量和每周循环的不同组合。

#### [0336] 实施例2: BIAcore (表面等离子体共振: SPR) 分析

使用例如BIAcore分析,使用标准方案,可以评估抗体的亲和力。简而言之,将抗-组氨酸标签抗体偶联至BIAcore芯片上,所述BIAcore芯片用于捕获His-标记的重组人CD105,重组人CD105又用于测量抗-CD105抗体的结合。在最少2个芯片制备批次和8个分析批次中,进行SPR试验的开发。在所述试验的开发中,评估下述参数:

##### (a) 抗-his抗体与CM5芯片的偶联

通过常规的胺化学法,使用EDC/NHS,将抗-his标签抗体偶联到BIAcore CM5芯片上。将优化反应条件(浓度和pH)。

##### [0337] (b) 人VEGF的结合和生物传感器芯片的再生

使用各种缓冲剂(基于以前的经验)来洗脱结合的抗体,测试人VEGF结合和再生芯片的条件。一旦已经开发出用于再生的候选方法,在至少25个循环内测量单个芯片表面的结合容量和背景。目标是,得到 $< 10$  RU/循环的平均背景增加和 $< 1\%$ /循环的平均容量减小。

##### [0338] (c) 人CD105的结合

测量人CD105的剂量响应,以便确定适合接近最大结合的浓度。

##### [0339] (d) 抗-CD105抗体的结合

测量抗-CD105抗体的剂量响应,以便确定动力学实验或平衡结合实验(其可以包括对比相对动力学常数 $k_a$ 和 $k_d$ ,或通过平行线方法对比相对功效)的合适范围。

##### [0340] (e) 验证前实验

使用不同的芯片、不同的流动池和在不同情况下,在选择的条件下重复结合实验至少3次,以便得到关于测量的精确度和准确度的初步信息。在 $25^\circ\text{C}$ 在HBS-EP运行缓冲液中进行所有BIAcore实验。

#### [0341] 实施例3: 用于抗-CD105抗体结合的ELISA

ELISA可以用于测定抗-CD105抗体与CD105的结合。简而言之,根据下述步骤,进行ELISA:

1. 以 $100\ \mu\text{l}$ /孔,用MAB9811-01(单克隆抗-CD105抗体,在PBS中, $1500\ \text{ng/ml}$ )包被板。用密封器覆盖板,并在 $4^\circ\text{C}$ 孵育过夜(16-24小时)。
2. 用 $200\ \mu\text{l}$  PBS(没有吐温)洗涤板2次。
3. 用含有吐温的PBS(PBS-T)洗涤板3次。
4. 添加 $100\ \mu\text{l}$ /孔的具有 $0.1\%$  BSA 的PBS-T 中 $100\ \text{ng/ml}$ 的CD105,并在室温孵育60

分钟。

5. 用PBS-T洗涤板3次。

5. 在实验孔中:加入100  $\mu$ l/孔的在20、10、4、2、1、0.5和0.2 ng/ml (在含有0.1% BSA的PBS-T中稀释)的抗- CD105抗体,并在室温孵育60分钟。在阴性对照孔中:加入100  $\mu$ l/孔的同种型匹配的对照抗体。

7. 用PBS-T洗涤板3次。

8. 向所有孔中加入100  $\mu$ l/孔的与HRP缀合的山羊抗-人IgG(在含有0.1% BSA的PBS-T中1:10000稀释);在室温孵育30-60分钟。

9. 用PBS-T洗涤板5次。

10. 加入100  $\mu$ l/孔的TMB底物溶液,并在暗处无遮盖地孵育15分钟。

11. 通过加入100  $\mu$ l/孔的TMB终止溶液,终止反应。

[0342] 一式三份地运行样品,并读出光密度,以构建标准曲线,并测定结合常数。使用Student氏t-检验或另一种标准检验,进行统计分析。

[0343] 应当理解,可以使用类似的方案来测试抗体与VEGF的结合。

[0344] 实施例4: 抗体亲合力和在表达CD105的细胞上可利用的表位的数目

使用斯卡恰特作图分析,使用标准方案,可以评估抗体亲合力和在表达CD105的细胞上可利用的表位的数目。

[0345] 简而言之,进行放射性标记的抗- CD105抗体与表达CD105的KM-3白血病细胞和亚汇合的增殖中的HUVEC的直接结合的斯卡恰特作图分析。使用Iodo-Gen,并根据本领域技术人员已知的标准方法,用<sup>125</sup>I单个地放射性地标记纯化的抗- CD105抗体。关于每个IgG分子中的平均碘原子数,分别测定放射性标记的抗- CD105抗体。使用固定量(0.1  $\mu$ g)的每种<sup>125</sup>I-标记的mAb和2倍系列增量的表达CD105的KM-3或HUVEC细胞,进行滴定实验,以测定抗原结合活性。根据已知的方法,进行结合数据的斯卡恰特作图分析。通过该分析,估测平衡常数和每个细胞结合的mAb的平均最大数目。

[0346] 实施例5: 阻断活性的蛋白印迹试验

通过蛋白印迹,可以测试抗- CD105抗体的阻断CD105刺激的、表达CD105的细胞的活化的能力,以检测参与CD105信号传导途径的蛋白的磷酸化。

[0347] 根据已知的蛋白印迹技术,进行蛋白印迹分析,以鉴定磷酸化的Smad1/5/8或Smad2。PSmad1和PSmad2抗体特异性地识别未转染的内皮细胞中的磷酸化的Smad1/5或磷酸化的Smad2。使用针对Smad1、Smad2、Smad5、Id1 (Santa Cruz) 和CD105的初级抗体,检测样品中的分子。通过增强的化学发光(ECL),进行检测。

[0348] 实施例6: HUVEC生长的抑制和<sup>3</sup>H-胸苷掺入试验

许多试验可用于评估细胞生长的抑制。

[0349] 在一个实施例中,在CO<sub>2</sub>培养箱中,在37 °C,在亚汇合的条件下,在75-cm<sup>2</sup>烧瓶(Falcon, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ)中培养HUVEC。通过用汉克平衡盐溶液(含有15 mM EDTA,在25 mM HEPES缓冲液pH 7.3中)在37 °C孵育15 min,使细胞脱离。用冰冷的PBS洗涤2次以后,以25,000细胞/ml的浓度,将细胞重新悬浮于内皮细胞生长培养基中。

[0350] 在其他实验中,在不含有FBS和牛脑提取物的内皮细胞生长培养基中,悬浮和培养

人脐静脉内皮细胞 (HUVEC)。将细胞悬浮液的200  $\mu$ l等分试样接种至96-孔培养板的每个孔中。在CO<sub>2</sub>培养箱中在37 °C培养细胞过夜,然后一式三份地加入抗- CD105抗体、抗-VEGF抗体、抗- CD105抗体和抗-VEGF抗体的组合、对照IgG或TGF- $\beta$ 1。将培养板在培养箱中保持72小时,在这期间,每24小时更换新鲜培养基和抗体或对照。将<sup>3</sup>H-胸苷(1  $\mu$ Ci)加入每个孔中,将板孵育20小时。用PBS洗涤细胞,随后用100  $\mu$ l/孔的胰蛋白酶-EDTA (0.05% 胰蛋白酶, 0.53 mM EDTA) 在37 °C处理15 min。使用Harvester 96 (TOMTEC, Hamden, CT),将细胞收获到玻璃纤维过滤器(Wallac Printed FiltermatA)上,并在Trilux 1540 MicroBeta液体闪烁和发光计数器(Wallac, Turku, 芬兰)中测定<sup>3</sup>H-放射性。

#### [0351] 实施例7: 细胞迁移抑制试验

使用博伊登室来测量迁移(化学激活),作为细胞增殖和活化的量度。

[0352] 简而言之,如下评估细胞迁移:在4 °C用纤连蛋白包被Costar核孔滤纸(8 mm孔)过夜。用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤该室,用DMEM(有或没有血清,有或没有TGF- $\beta$ 3)填充下室。用胰蛋白酶处理细胞,并在对照抗体、抗- CD105抗体、抗-VEGF抗体或它们的组合存在下,以50,000细胞/ml的终浓度悬浮于DMEM中。将细胞悬浮液的150  $\mu$ l等分试样加入上室中,并在37 °C孵育。在16小时以后,洗涤细胞,擦干上表面,以去除未迁移的细胞。在甲醇中固定膜,用水洗涤,染色,并计数在下表面上存在的细胞的数目。

#### [0353] 实施例8: ADCC试验

使用例如下述的方案,可以关于它们的产生IL-2活化的天然杀伤(NK)细胞和诱导ADCC的能力,评估本文所述的抗体。

#### [0354] NK分离和IL-2活化的NK细胞的产生

分离PBMC,并允许在含有10% FBS的RPMI中在4 °C静置24小时。然后将PBMC放入含有2% FBS的RPMI中(总体积= 50 mL),将10mL细胞悬浮液在培养皿中铺板。在37 °C孵育PBMC 2小时,收集未贴壁的细胞。以8 X 10<sup>6</sup>/mL,用1000 U/mL的IL-2培养NK细胞48小时,随后正常培养5-8天,然后用于试验中。

#### [0355] 天然的细胞毒性和ADCC试验

从培养物中刮出NK细胞,并收集在50mL锥形管中。用RPMI完全培养基洗涤细胞1次,并在1200 rpm离心10分钟。然后将NK细胞重新悬浮于5mL RPMI完全培养基中,并计数。在进行试验之前,将NK细胞计数标准化为10:1的效应物:目标之比。将标准化的NK细胞铺板,并将10  $\mu$ l抗- CD105抗体加入指定的孔中,在37 °C孵育30分钟。对照样品包括未处理的或对照抗体处理的细胞群体。

[0356] 收集目的目标细胞(HUVEC细胞),洗涤,在1200 rpm离心10分钟,并重新悬浮于5 mL RPMI完全培养基中。再次洗涤目标细胞,并重新悬浮于无血清的RPMI中,至1 x 10<sup>6</sup>细胞/mL的终浓度。然后用终浓度为5  $\mu$ g/mL的钙黄绿素AM在37 °C标记目标细胞1小时,随后用RPMI完全培养基洗涤2次。然后重新悬浮目标细胞,并加入NK细胞孔中。在37 °C孵育目标细胞/NK细胞组合4小时。孵育以后,在1200 rpm离心板5分钟,洗涤细胞,并重新悬浮于DPBS中。使用450/530 nm的激发/发射,读出荧光,所述发射是由抗体介导的细胞杀死的量度。

#### [0357] 实施例9: TRC105 (抗CD105抗体)制剂的稳定性评价

本发明人鉴定了对于高于5 mg/ml TRC105的浓度提供足够稳定性的制剂。初始研究显示,TRC105可以被浓缩至至少25 mg/ml,而没有任何明显溶解性问题。因此,选择25 mg/ml

TRC105作为用于筛选研究的初始浓度。在这些研究进程中,评估高达50 mg/ml TRC105的制剂。还评估具有7 mg/ml TRC105和100 mg/ml TRC105的浓度的额外制剂。

[0358] 程序

紫外(UV)吸收光谱。

[0359] 使用UV光谱来测定各种稳定性样品中的蛋白浓度。散装物质(7.0 mg/mL)在280 nm的吸光度使用1 mm光程室测定为1.13,导致1.61 mL/mg\*cm的消光系数。该值用于该项目中的所有计算。进一步测量使用更适合于高浓度样品的0.0096 cm室进行。

[0360] TRC105热稳定性样品的孵育。

[0361] 每种热稳定性制剂通过具有Luer锁注射器外接的0.22微米Millex滤器,然后等分装到1 mL冻干小瓶中。每个小瓶用丁基橡胶塞子密封且用铝帽卷边。将样品在指定温度下放置在稳定性室,且在数周内所示孵育期后取出。

[0362] TRC105的冻融和搅拌。

[0363] 将冻融(F/T)样品冷冻25分钟,然后融化25分钟,或零次、3次或5次。所有冷冻均在-80°C下进行。

[0364] 在返回冰箱之前检查融化样品是否完全融化。每个冻融样品含有100  $\mu$ L溶液且储存在0.5 mL Eppendorf管中。每个样品含有0.1% F68、0.005% Tween 80或不含表面活性剂。

[0365] 搅拌研究样品制备为每瓶350 mL,且标记为静态或摇动的。将所有样品转移到4°C冷室中。将标记为摇动的样品置于以150 RPM操作的定轨摇床上。将静态样品放置在紧挨轨道摇床的样品架上。每个样品含有0.1% F68、0.005% Tween 80或不含表面活性剂。将样品在所示条件孵育24小时。

[0366] 大小排阻色谱法(SEC)。

[0367] 制备含有0.2 M磷酸二氢钠的流动相,且使用1.0 M氢氧化钠调节至pH7.0。TSK Gel G3000 PWxl柱(7.8 mm x 30 cm, 7  $\mu$ m颗粒 # P0047-02PN)用于所有分离。使用1 mL/min的流速,且将检测波长设定为280 nm。注射体积对于25 mg/mL样品为2  $\mu$ L,且对于50 mg/mL样品为1  $\mu$ L。缓冲液空白在每次一式三份样品分析之前运行,且这些色谱得到适当减除。所有峰整合在Chromeleon 6.08中进行。

[0368] 毛细管IEF (cIEF)。

[0369] 毛细管等电(cIEF)分析如Beckman Coulter出版的PA 800 plus应用指南所述进行。更详细的描述可见Mack等人(*Electrophoresis* 2009, 30 (23), 4049-4058)。所有分析均使用具有30 cm总长度(20 cm有效长度)中性毛细管(50  $\mu$ m内径)的在环境温度操作的Beckman Coulter P/ACE™ MDQ系统(Beckman Coulter, Inc.; Brea, CA)进行。中性毛细管通过使用Gao等人(*Anal Chem* 2004, 76 (24), 7179-7186)所述的方法将聚(丙烯酸酰胺)固定至毛细管壁来制备。所有cIEF样品均在通过混合0.25 mg/mL的目的蛋白与含有两性电解质、阴极稳定剂、阳极稳定剂和pI标记的3M尿素-cIEF凝胶的混合物来制备。将样品持续4.1 min以9.5 psi压力注射至毛细管,该时间之后将其通过在阳极电解质和阴极电解质之间施加25 kV的电压15 min而进行聚焦。该步骤之后,在阳极电解质和化学固定剂之间以30 kV化学固定30 min。pI标记和目的蛋白在固定步骤过程中用在280 nm的吸光度进行检测。蛋白的pI从pI vs.从pI标准品获得的第一峰时间的所得回归方程来计算。

## [0370] 结果和讨论

## 研究1

将TRC105的样品成功地浓缩至高于5 mg/mL的浓度。作为结果,研究1使用25 mg/mL的蛋白浓度进行。将样品在40℃储存两周。制备十五种制剂,其重点在于pH和缓冲液组成的影响(表2)。用于评估这些样品的稳定性的主要分析方法是SEC。在40℃储存两周之后,通过SEC看到单体含量或高分子量聚集体的量的非常小的变化(表3)。所有制剂在储存后仍含有多于99%单体。

## [0371] 表2. 研究1中评估的TRC105制剂的组成

制剂编号	pH	phos (mM)	His (mM)	柠檬酸盐 (mM)	乙酸盐 (mM)	NaCl (mM)	海藻糖 (mM)
F01	7	20	0	0	0	130	0
F02	6	20	0	0	0	130	0
F03	6	0	20	0	0	130	0
F04	5	0	20	0	0	130	0
F05	6	0	0	20	0	130	0
F06	5	0	0	20	0	130	0
F07	4	0	0	0	20	130	0
F08	5	0	0	0	20	130	0
F09	5	0	20	0	0	0	240
F10	5	0	0	20	0	0	240
F11	5	0	0	0	20	0	240
F12	6	10	0	0	0	0	240
F13	6	0	10	0	0	0	240
F14	6	10	0	0	0	80	120
F15	6	0	10	0	0	80	120

[0372] 表3. 在初始和两周(t2)时间点来自研究1的制剂的通过SEC测量的单体和聚集体水平的总结

制剂编号	pH	初始 %聚集体	初始 %单体	两周 %聚集体	两周 %单体
F01	7	0.32	99.54	0.48	99.52
F02	6	0.19	99.70	0.22	99.71
F03	6	0.19	99.78	0.14	99.82
F04	5	0.14	99.82	0.13	99.85
F05	6	0.19	99.78	0.28	99.71
F06	5	0.13	99.83	0.21	99.77
F07	4	0.11	99.86	0.10	99.88
F08	5	0.11	99.85	0.26	99.72
F09	5	0.16	99.81	0.09	99.90
F10	5	0.13	99.84	0.19	99.79
F11	5	0.15	99.82	0.16	99.82
F12	6	0.19	99.78	0.53	99.45
F13	6	0.21	99.76	0.15	99.81
F14	6	0.20	99.76	0.45	99.52
F15	6	0.21	99.79	0.21	99.77

[0373] 发现TRC105是非常稳定的。

[0374] 研究2

来自研究1的结果在手,设计了新研究。在研究2中,评估了范围为4.0至5.5的pH以及乙酸盐、组氨酸和柠檬酸盐。选择的张力调节剂/稳定剂是山梨糖醇和海藻糖。最后,除了25 mg/ml的制剂以外,还检查50 mg/ml的三种制剂。

[0375] 表4. 研究2中评估的TRC105制剂的组成

制剂编号	pH	蛋白 Mg/ml	His (mM)	柠檬酸盐 (mM)	乙酸盐 (mM)	山梨糖醇	海藻糖
F01	5.5	25	0	0	20	0	0
F02	4.5	25	0	0	20	0	0
F03	5.5	25	0	20	0	0	0
F04	5.5	25	20	0	0	0	0
F05	4.5	25	0	0	10	0	0

制剂编号	pH	蛋白 Mg/ml	His (mM)	柠檬酸盐 (mM)	乙酸盐 (mM)	山梨糖醇	海藻糖
F06	4.0	25	0	0	10	0	0
F07	5.5	25	20	0	0	240	0
F08	5.5	25	20	0	0	0	240
F09	4.0	25	0	0	20	240	0
F10	4.0	25	0	0	20	0	240
F11	5.5	25	0	10	0	240	0
F12	5.5	25	0	10	0	0	240
F13	5.5	25	10	0	0	240	0
F14	5.5	25	10	0	0	0	240
F15	4.0	50	0	0	10	0	0
F16	5.0	50	0	0	20	0	0
F17	5.5	50	20	0	0	240	0

[0376] 鉴于TRC105的稳定性,将这些样品在40℃储存四周,以试图更大程度区分所述制剂。初始筛选工具是SEC。

[0377] 表5. 在初始和第四周时间点来自研究1的制剂的通过SEC测量的单体和聚集体水平的总结

制剂编号	pH	缓冲剂	初始 %聚集体	初始 %单体	四周 %聚集体	四周 %单体
F01	5.5	乙酸盐	0.17	99.83	0.27	99.73
F02	4.5	乙酸盐	0.10	99.90	0.16	99.84
F03	5.5	柠檬酸盐	0.14	99.86	0.22	99.78
F04	5.5	His	0.17	99.83	0.13	99.87
F05	4.5	乙酸盐	0.11	99.89	0.14	99.86
F06	4.0	乙酸盐	0.10	99.90	0.12	99.88
F07	5.5	His	0.15	99.85	0.13	99.87
F08	5.5	His	0.23	99.77	0.16	99.84
F09	4.0	乙酸盐	0.14	99.86	0.15	99.85
F10	4.0	乙酸盐	0.15	99.85	0.15	99.85
F11	5.5	柠檬酸盐	0.16	99.84	0.30	99.70
F12	5.5	柠檬酸盐	0.21	99.79	0.28	99.72
F13	5.5	His	0.19	99.81	0.15	99.85
F14	5.5	His	0.27	99.73	0.16	99.84
F15	4.0	乙酸盐	0.17	99.83	0.16	99.84
F16	5.0	乙酸盐	0.19	99.81	0.85	99.15
F17	5.5	His	0.24	99.76	0.26	99.74

[0378] 与研究1中看到的类似,几乎所有制剂的单体含量均高于99.5%,甚至在40°C1个月之后(表5)。一个样品似乎显示增加的聚集水平,这是F16;没有重新测试该样品来看这是否是真实结果。该表明,组氨酸中pH 5.5的乙酸盐中pH 4似乎提供足够且相当的稳定性。鉴于柠檬酸盐和刺激的关注,将其从进一步考虑中移除。

[0379] 这些样品还使用毛细管等电聚焦(CIEF)进行分析。cIEF电泳图的整体中心被计算为第一时刻。这些值可以被认为是样品的平均pI值(表6)。

[0380] 表6. 在初始和四周时间点来自研究2的TRC制剂的平均pI值

制剂编号	pH	缓冲剂	初始	4周
F01	5.5	乙酸盐	8.97	8.88
F02	4.5	乙酸盐	8.76	8.94
F03	5.5	柠檬酸盐	8.84	8.88
F04	5.5	His	8.94	8.88
F05	4.5	乙酸盐	8.78	8.87
F06	4.0	乙酸盐	8.86	8.89
F07	5.5	His	8.87	8.88
F08	5.5	His	8.93	8.87
F09	4.0	乙酸盐	8.92	8.90
F10	4.0	乙酸盐	8.92	8.92
F11	5.5	柠檬酸盐	8.96	8.87
F12	5.5	柠檬酸盐	8.92	8.85
F13	5.5	His	8.91	8.90
F14	5.5	His	8.95	8.92
F15	4.0	乙酸盐	8.90	8.87
F16	5.0	乙酸盐	8.90	8.86
F17	5.5	His	8.95	8.93

[0381] 总之,任何制剂的pI值的变化小,表明脱酰胺,即,形成带电Asp产物的Asn侧链的水解,相对缓慢(表6)。因此,TRC105的这些制剂似乎是物理稳定的(即,很少或没有聚集)和化学稳定的(即,没有片段化和很少或没有脱酰胺)。

[0382] 其他关注是,这些较高浓度制剂是否显示不良粘度,由此限制其临床应用。

[0383] 表7. 在~25和 ~ 50 mg/ml 的乙酸盐和组氨酸缓冲剂中TRC105的动态粘度

制剂	pH	[蛋白]	粘度 (cSt)
20 mM 乙酸盐	4.0	25.1	1.19 ± 0.01
	4.0	51.8	1.53 ± 0.01
20 mM 组氨酸	5.5	23.8	1.22 ± 0.01
	5.5	47.6	1.65 ± 0.04

[0384] 甚至在50 mg/ml,TRC105表现出小于2 cSt的粘度,其远低于引起对于限制处理和施用的担忧的任何值(参见,表7)。

[0385] 搅拌研究

虽然热应激可用于区分不同稳定性的制剂,但它不是蛋白可遇到的唯一应激。蛋白的界面破坏是常见,且必须评估对界面应激的敏感性。这使用搅拌和重复冻融(F/T)循环进行。

[0386] 表8. 以150 rpm搅拌24小时的TRC105制剂和匹配静态样品的通过SEC的单体含量。所有样品均保持在4℃

制剂	表面活性剂	蛋白	单体 (Q)	单体 (S)
pH 5, 20 mM 乙酸盐	无	25	99.84	99.84
	F68	25	99.83	99.83
	PS80	25	99.81	99.82
pH 5, 20 mM 乙酸盐	无	50	99.82	99.83
	F68	50	99.82	99.82
	PS80	50	99.81	99.83
pH 5.5, 20 mM His	无	25	99.75	99.76
	F68	25	99.74	99.76
	PS80	25	99.76	99.77
pH 5.5, 20 mM His	无	50	99.77	99.75
	F68	50	99.76	99.75
	PS80	50	99.76	99.77

[0387] 搅拌后单体没有明显损失的, 其中所有制剂表现出高于99.7%单体且与静态对照没有显著差异(表8)。添加表面活性剂, 如Pluronic F-68或聚山梨醇酯80, 似乎没有帮助或伤害搅拌后的稳定性。

[0388] F/T研究

检查TRC105对界面应激的敏感性的第二项研究涉及暴露于重复冻融循环。这不仅提供关于界面(像冰-水界面)损伤的信息, 它还提供了关于TRC105样品是否可以冷冻用于随后分析或在运送过程中冷冻的基本信息。

[0389] 表9. 经受0、3和5个F/T循环的TRC105制剂的通过SEC的单体含量。

制剂	表面活性剂	蛋白 Mg/ml	0个循环	3个循环	5个循环
pH 5, 20 mM 乙酸盐	无	25	99.86	99.83	99.82
	F68	25	99.84	99.81	99.82
	PS80	25	99.84	99.83	99.80
pH 5, 20 mM 乙酸盐	无	50	99.81	99.64	99.80
	F68	50	99.81	99.68	99.81
	PS80	50	99.82	99.65	99.80
pH 5.5, 20 mM His	无	25	99.79	99.74	99.72
	F68	25	99.79	99.75	99.73
	PS80	25	99.76	99.74	99.74
pH 5.5, 20 mM His	无	50	99.76	99.79	99.75
	F68	50	99.75	99.82	99.73
	PS80	50	99.75	99.79	99.73

[0390] 重复F/T循环后单体含量几乎没有变化(表9)。令人惊讶的是,添加表面活性剂,如Pluronic F-68或聚山梨醇酯80,没有改变重复F/T循环后的稳定性。连同搅拌数据,没有迹象表明TRC105在担忧界面损伤的程度具有表面活性。因此,表面活性剂不需要用于液体制剂。

#### [0391] 概述

在高达50 mg/ml的蛋白浓度对TRC105进行制剂筛选研究。这种蛋白是相当稳定的,显示通过SEC的单体含量的只有少量降低,甚至在40℃储存四周后。通过SEC完全没有看到任何片段化。同时,cIEF分析显示,观察到整体pI的只是小变化,表明在讨论的pH范围(4.0至5.5)的脱酰胺最小。没有对于界面损伤的敏感性的证据,表明TRC105的液体制剂中不需要表面活性剂。

[0392] 最重要的制剂采用pH 4.0的乙酸盐缓冲剂或pH 5.5的组氨酸缓冲剂,连同山梨糖醇或海藻糖作为张力调节剂和稳定剂。

#### [0393] 实施例10: TRC105制剂的长期稳定性评价

进行长期稳定评价以验证研究1和2中的结果。表10中呈现的制剂样品储存在5℃和25℃。

[0394] 表 10: 用于验证研究的制剂

制剂编号	制剂	[蛋白]
F01	pH 5.5, 20 mM 组氨酸, 240 mM 海藻糖	25 mg/ml
F02	pH 5.5, 20 mM 组氨酸, 240 mM 山梨糖醇	25 mg/ml
F03	pH 4.0, 20 mM 乙酸盐, 240 mM 山梨糖醇	25 mg/ml
F04	pH 5.5, 20 mM 组氨酸, 240 mM 海藻糖	50 mg/ml
F05	pH 4.0, 20 mM 乙酸盐, 240 mM 海藻糖	50 mg/ml

F06	pH 5.5, 20 mM 组氨酸, 240 mM 海藻糖	100 mg/ml
F07	pH 4.0, 20 mM 乙酸盐, 240 mM 海藻糖	100 mg/ml

## [0395] 结果和讨论

七种测试制剂在5°C评估一年的进程,在25°C评估6个月的进程。在5°C,所有制剂都表现良好。所有样品在该研究中所有时间点的视觉外观是澄清且无色的。通常,所有新制剂的pH值在该研究的持续时间保持恒定(参见表11和12)。值比目标略高0.1至0.2个单位,但保持稳定。无论浓度怎样,通过UV测定的新制剂浓度值在目标值的~3-4 %内保持恒定(参见表11和12)。这些值在研究过程中没有显著变化。在5°C通过SEC单体损失最小(参见表13),并且通过cIEF化学降解量最小(参见表15和16)。与参考标准品的结果相比,尽管CD105结合ELISA结果有一些变化(除了F05的初始结果),但所有值均在50%至150%的接受标准之内,这与ELISA测定的显色阶段一致(参见表17)。CE-SDS测试的结果表明,在5°C在超过一年的过程中,所述样品与参考材料相当(数据未显示)。

[0396] 尽管储存在5°C的样品基本不变,但制剂参数对25°C样品的稳定性的确具有影响。最值得注意的是,含有乙酸盐缓冲剂系统的制剂(F03、F05、F07)表现出比含有组氨酸缓冲剂的制剂(F01、F02、F04和F06)的百分比单体的较大减少(参见表14)。同时,蛋白浓度的改变似乎具有很小或没有影响。两种100 mg/mL制剂(F06、F07)与它们的50 mg/mL对应物(F04、F05)在它们的SEC概况和cIEF概况方面相当。

## [0397] 表11. 在5°C的pH和以mg/mL计的UV浓度

制剂	初始		3个月		6个月		12个月	
	pH	浓度	pH	浓度	pH	浓度	pH	浓度
F01	5.6	25	5.6	24	5.6	27	5.6	24
F02	5.6	24	5.5	23	5.6	25	5.6	25
F03	4.2	25	4.2	25	4.3	27	4.2	26
F04	5.6	50	5.6	51	5.6	54	5.5	52
F05	4.2	50	4.3	52	4.3	54	4.2	52
F06	5.6	98	5.7	99	5.7	104	5.6	105
F07	4.3	99	4.4	102	4.4	108	4.3	102

## [0398] 表12. 在25°C的pH和以mg/mL计的UV浓度

制剂	初始		3个月		6个月		12个月	
	pH	浓度	pH	浓度	pH	浓度	pH	浓度
F01	n/a	n/a	5.6	25	5.6	27	5.6	26
F02	n/a	n/a	5.6	24	5.6	25	5.6	24
F03	n/a	n/a	4.3	25	4.3	27	4.3	26
F04	n/a	n/a	5.8	50	5.6	53	5.6	51
F05	n/a	n/a	4.3	53	4.3	53	4.3	52
F06	n/a	n/a	5.7	100	5.8	105	5.6	105
F07	n/a	n/a	4.4	109	4.5	104	4.4	103

[0399] 表13. 在5°C的大小排阻色谱 (SEC)

制剂	%单体			
	初始	3个月	6个月	12个月
F01	99.36	99.36	99.38	99.37
F02	99.37	99.37	99.34	99.37
F03	99.37	99.35	99.31	99.24
F04	99.35	99.33	99.32	99.31
F05	99.38	99.35	99.31	99.24
F06	99.24	99.22	99.19	99.18
F07	99.35	99.29	99.23	99.17

[0400] 表14. 在25°C的大小排阻色谱 (SEC)

制剂	%单体		
	初始	3个月	6个月
F01	99.36	99.27	96.37
F02	99.37	99.28	96.25
F03	99.37	96.02	93.64
F04	99.35	99.18	96.51
F05	99.38	96.07	93.70
F06	99.24	98.99	96.23
F07	99.35	96.02	93.84

[0401] 表 15: 在5°C的cIEF-平均pI

制剂	平均pI			
	初始	3个月	6个月	12个月
F01	9.0	8.9	9.0	9.0
F02	8.9	8.9	8.9	9.0
F03	8.9	8.9	9.0	9.1
F04	8.9	8.9	8.9	9.0
F05	8.9	8.9	8.9	9.0
F06	8.9	8.9	8.9	9.0
F07	8.9	8.9	8.9	9.0

[0402] 表 16: 在25℃的cIEF-平均pI

制剂	平均pI		
	初始	3个月	6个月
F01	9.0	8.9	9.0
F02	8.9	9.0	8.9
F03	8.9	8.9	8.9
F04	8.9	8.9	8.9
F05	8.9	8.9	8.8
F06	8.9	8.9	8.9
F07	8.9	8.9	8.9

[0403] 表 17: 在5℃的CD105结合ELISA

制剂	百分比相对CD105结合效力		
	初始	6个月	12个月
F01	101	94	68
F02	90	90	69
F03	124	NT	77
F04	123	97	74
F05	179	NT	96
F06	93	95	115
F07	100	NT	86

[0404] 实施例11: 4 mg/mL TRC105制剂的长期稳定性评价

对在具有145 mM氯化钠 (pH 7.2) 的17 mM磷酸盐缓冲液中以4 mg/mL配制的TRC105 (批号FIN-0536) 进行稳定性研究。稳定性数据的三十六个月在推荐储存条件 (2 - 8℃) 可用,

且数据的一个月在25℃/ 60%RH的加速条件可用。稳定性数据呈现于下表。对于进行的任何测试没有观察到显著变化。因此,这些研究表明,当储存于2 - 8℃时,在具有145 mM氯化钠(pH 7.2)的17 mM磷酸盐缓冲液中以4 mg/mL配制的TRC105稳定至少36个月。

[0405] 表 18: 在2 - 8℃的推荐储存条件储存的TRC105的稳定性数据

测试	初始	6个月	9个月	12个月
外观和描述	澄清无色溶液。轻微灰色尘土样微粒。	澄清无色溶液,且不存在任何可见微粒。	澄清无色溶液,且存在轻微白色微粒。	澄清无色溶液,且存在轻微白色微粒。
非还原性SDS-PAGE	与参考相当	与参考相当	与参考相当	与参考相当
还原性SDS-PAGE	98%	96%	97%	98%
IEF	与参考相当	与参考相当	与参考相当	与参考相当
SEC-HPLC	96.62%	96.97 %	96.91 %	96.77 %
通过ELISA的CD105结合	结合活性是相对于参考标准品的88%	结合活性是相对于参考标准品的110%	结合活性是相对于参考标准品的104%	结合活性是相对于参考标准品的91%
UV吸光度 (A <sub>280</sub> )	4.3 mg/mL	4.2 mg/mL	4.2 mg/mL	4.2 mg/mL
pH	7.2	7.3	7.2	7.2
无菌性	未测试到	未测试到	未测试到	未测试到

[0406] 表 18续

测试	18个月	24个月	30个月	36个月
外观和描述	澄清无色溶液,且存在轻微白色微粒。	澄清无色溶液,且不存在任何微粒。	澄清无色溶液,且不存在任何微粒。	澄清无色溶液,且不存在任何微粒。
非还原性SDS-PAGE	与参考相当	与参考相当	与参考相当	与参考相当
还原性SDS-PAGE	97%	96%	97%	96%
IEF	与参考相当	与参考相当	与参考相当	与参考相当
SEC-HPLC	96.32 %	96.86 %	96.60 %	94.04%
通过ELISA的CD105结合	结合活性是相对于参考标准品的88%	结合活性是相对于参考标准品的136%	结合活性是相对于参考标准品的88%	结合活性是相对于参考标准品的105%
UV吸光度 (A <sub>280</sub> )	4.2 mg/mL	4.2 mg/mL	4.2 mg/mL	4.2 mg/mL
pH	7.2	7.2	7.2	7.3
无菌性	未测试到	通过	未测试到	通过

[0407] 表 19: 在25℃/ 60% RH的加速储存条件储存的批号FIN-0536的稳定性数据

测试	初始	1个月
外观和描述	澄清无色溶液。轻微灰色尘土样微粒。	澄清无色溶液,且不存在任何可见微粒。
非还原性SDS-PAGE	与参考相当	与参考相当
还原性SDS-PAGE	98%	96%
IEF	与参考相当	与参考相当
SEC-HPLC	96.62%	96.45%
通过ELISA的CD105结合	结合活性是相对于参考标准品的88%	结合活性是相对于参考标准品的91%
UV吸光度 (A <sub>280</sub> )	4.3 mg/mL	4.2 mg/mL
pH	7.2	7.3

[0408] SEC-HPLC和UV的分析程序与实施例9中描述的程序是相同的。CD105结合ELISA的分析程序与实施例3中描述的程序是相同的。非还原性SDS-PAGE、还原性SDS-PAGE和IEF的分析程序描述如下。

[0409] 非还原性蛋白和肽的SDS-PAGE,考马斯染色

身份和纯度使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析进行评估。蛋白在变性条件下分离。使用预制的含有4-12% Bis-Tris SDS的凝胶。SDS是阴离子去污剂,其与蛋白相互作用以形成带负电的络合物。这些络合物根据它们的大小迁移通过聚丙烯酰胺凝胶,使得较小蛋白比较大

蛋白迁移更快。将标准品、对照和测试制品变性且上样到凝胶上。完成运行后，凝胶用考马斯蓝染色。凝胶使用图像密度计扫描。

[0410] 每个测试制品道的每个染色带的相对量通过密度测定法确定。这些量被表示为对于该道获得的总带量的百分比。测试制品带的分子量 (kDa) 值基于与分子量标记的比较来确定。

[0411] 还原性蛋白的 SDS-PAGE, 考马斯染色

用于还原样品的 SDS-PAGE 方法与 1.3.2 节 (上文) 用于非还原样品所述的相同, 其中增加还原步骤 (以裂解分子间和分子内二硫键以释放蛋白亚基以及其他聚集体)。为了还原蛋白, 将二硫苏糖醇 (50 mM) 添加至样品和参考, 然后在 85 °C 加热五分钟。当运行还原蛋白时, 将抗氧化剂添加至运行缓冲液。

[0412] 水平等电聚焦 (IEF)

利用在施加电力下蛋白上的不同电荷来分离蛋白。在阴极和阳极之间建立 pH 梯度, 其中阴极的 pH 值较高。由于蛋白具有两性特性, 它们将具有低于其 pI 的带正电的值和高于其 pI 的带负电的值。在电力的影响下, pH 梯度得到建立且蛋白将迁移并集中在它们的等电点。所述程序涉及使用水平形式的预制凝胶使用蛋白样品的等电聚焦。电泳后, 将凝胶考马斯染色。每个样品道的每个带的面积通过密度测定法确定。带的面积被计算为总带面积的百分比。还测定每个带的 pI 和 Rf 值。

[0413] 实施例 12: 结肠直肠癌的临床试验

该实施例描述了随机化的、设盲的、安慰剂对照的、多中心的、II 期研究, 所述研究用于提供在结肠直肠癌患者中抗- CD105 抗体的安全性和功效的初步评估。招募了大致约 100 至约 800 位患者, 将约 50 至约 400 位患者分配至治疗组, 将约 50 至约 400 位患者分配至安慰剂组。所述试验将由每两周施用静脉内重复剂量的约 0.1 至约 10 mg/kg 的抗 CD105 抗体或安慰剂组成持续 6-10 个周期。可以在所有组中使用化学疗法。所有组中都可使用 VEGF 抑制剂。估测的研究时间范围是约 6 个月至约 5 年, 应答者的后续疗法如在初步研究结束时所示。额外的结果量度如下:

主要结果量度: 总应答率。一个研究目标是证明用抗- CD105 抗体治疗相比于对照 IgG 的总应答率的增加。

[0414] 可以评估的次要结果量度包括: 应答持续时间、肿瘤进展时间、总存活率、严重的和不严重的不利事件。例如, 治疗可以阻止疾病的进展 (即, 停滞), 或可以导致改善。替代地或额外地, 可以关于下述的一项或多项, 测量其他目的: 肿瘤负荷减小、新生血管形成减少、副作用减少、不良反应减少和/或患者依从性增加。

[0415] 实施例 13: 肾癌的临床试验

本实施例描述了随机化的、设盲的、安慰剂对照的、多中心的、II 期研究, 所述研究经设计用于提供在具有肾细胞癌 (肾癌) 的患者中抗- CD105 抗体的安全性和功效的初步评估。招募了大致约 100 至约 800 位患者, 将约 50 至约 400 位患者分配至治疗组, 将约 50 至约 400 位患者分配至安慰剂组。所述试验由以下组成: 每 1-3 周, 静脉内施用重复剂量的抗- CD105 抗体 (约 0.1 至约 30 mg/kg) 或安慰剂, 持续 3-6 个循环, 或直到进展。也可以在 2 个治疗组中使用干扰素。两个治疗组中都可使用 VEGF 抑制剂。估测的研究时间范围是约 6 个月至约 5 年, 应答者的后续疗法如在初步研究结束时所示。额外的结果量度如下:

主要结果量度:无进展存活。一个研究目标是证明用抗-CD105抗体治疗后相比于安慰剂的无进展存活的增加。

[0416] 可以评估的次要结果量度包括:应答持续时间、肿瘤进展时间、总存活率、严重的和不严重的不利事件。例如,治疗可以阻止疾病的进展(即,停滞),或可以导致改善。替代地或额外地,可以关于下述的一项或多项,测量其他目的:肿瘤负荷减小、新生血管形成减少、副作用减少、不良反应减少和/或患者依从性增加。

#### [0417] 实施例14: 肝细胞癌的临床试验

本实施例描述了随机化的、设盲的、安慰剂对照的、多中心的、II期研究,所述研究经设计用于提供在具有肝细胞癌(肝癌)的患者中抗- CD105抗体的安全性和功效的初步评估。招收了大致约100至约800位患者,将约50至约400位患者分配至治疗组,将约50至约400位患者分配至安慰剂组。两个组中都可使用VEGF抑制剂。所述试验由以下组成:每1-3周,静脉内施用重复剂量的抗- CD105抗体(约0.1至约30 mg/kg)或安慰剂,或直到进展。估测的研究时间范围是约6个月至约5年,应答者的后续疗法如在初步研究结束时所示。额外的结果量度如下:

主要结果量度:无进展存活。一个研究目标是证明用抗-CD105抗体治疗后相比于安慰剂的无进展存活的增加。

[0418] 可以评估的次要结果量度包括:应答持续时间、肿瘤进展时间、总存活率、严重的和不严重的不利事件。例如,治疗可以阻止疾病的进展(即,停滞),或可以导致改善。替代地或额外地,可以关于下述的一项或多项,测量其他目的:肿瘤负荷减小、新生血管形成减少、副作用减少、不良反应减少和/或患者依从性增加。

#### [0419] 实施例15: 卵巢癌的临床试验

本实施例描述了随机化的、设盲的、安慰剂对照的、多中心的、II期研究,所述研究经设计用于提供在具有卵巢癌的患者中抗- CD105抗体的安全性和功效的初步评估。招募了大致约100至约800位患者,将约50至约400位患者分配至治疗组,将约50至约400位患者分配至安慰剂组。所述试验由以下组成:每1-3周,静脉内施用重复剂量的嵌合的抗- CD105抗体(约0.1至约30 mg/kg)或安慰剂,持续5个循环。也可以在两个治疗组中使用化学疗法。两个治疗组中都可使用VEGF抑制剂。估测的研究时间范围是约6个月至约5年,应答者的后续疗法如在初步研究结束时所示。额外的结果量度如下:

主要结果量度: 无进展存活。一个研究目标是证明用抗-CD105抗体治疗后相比于安慰剂的无进展存活的增加。

[0420] 可以评估的次要结果量度包括:应答持续时间、肿瘤进展时间、总存活率、严重的和不严重的不利事件。例如,治疗可以阻止疾病的进展(即,停滞),或可以导致改善。替代地或额外地,可以关于下述的一项或多项,测量其他目的:肿瘤负荷减小、新生血管形成减少、副作用减少、不良反应减少和/或患者依从性增加。

#### [0421] 实施例16: 年龄相关性黄斑变性的治疗

##### 第一研究

通过玻璃体内注射抗- CD105抗体或对照抗体,治疗表现出年龄相关性黄斑变性的患者,以减轻或防止新生血管形成、黄斑疾病和视网膜损伤的发展。

[0422] 作为治疗的第一步,患者接受全眼检查,以建立眼健康的基线。眼检查包括:检眼

镜间接检查法、裂隙灯活组织显微镜检查、周边视网膜检查、眼内压测量、视敏度(独立的和最佳校正的)征候学、眼底照相术、荧光素血管造影术、光学相干体层摄影术、视网膜电描记术和A型扫描测量。

[0423] 在初步检查以后,将如上所述的玻璃体内注射给予患者的表现出AMD的受影响的眼。如果双眼都受影响,可以单独地治疗它们。用眼用溶液注射待治疗的眼。

[0424] 治疗后,在第一(1)天、第二(2)天、第七(7)天、第十五(15)天、第三十(30)天和第六十(60)天,和此后2年每个月,检查患者的眼。因为复发的可能性,患者应当在此后每个月返回进行定期检查。在每个检查日,监测患者的玻璃质液化。另外,使用具有巩膜压陷的检眼镜间接检查法,监测患者的后玻璃体脱离。最后,通过定期视网膜检查、光学相干体层摄影术和荧光素血管造影图片,连续地监测患者呈现的AMD的程度,以监测视网膜下积液、血液、渗出物、RPE脱离、囊性视网膜变化的存在,或灰绿色视网膜下新生血管膜的存在。如果观察到复发新生血管形成的迹象,可需要额外的治疗。可以每周或每月给予额外的治疗。在一个优选的实施方案中,在初次治疗以后,间隔1-6个月进行后续治疗。

[0425] 第二研究

目的:证实玻璃体内的抗- CD105抗体用于治疗新生血管的年龄相关性黄斑变性(AMD)的功效。所有患者中都可使用VEGF抑制剂。

[0426] 方法:具有源自AMD的窝下鳞脉络膜新血管生成(CNV)的50-500位患者(50-500只眼)在批准的位点参与研究。

[0427] 再次注射的标准是,黄斑中存在液体、中央视网膜厚度(CRT)增加了至少100微米、与黄斑中增加的液体有关的至少5个字母视力损失、新类型的CNV或新的黄斑出血。主要结果量度是,在12个月以后少于15个字母的视力损失的比例。在1周、1个月时,然后在5-12个月内每个月,进行最佳校正的视敏度测量和临床眼检查。

[0428] 与基线相对比,测量平均视敏度和平均CRT。记录眼的和/或全身的副作用。

[0429] 实施例17: 人源化-去免疫的抗体序列

分离的人源化的去免疫的抗CD105抗体可以包含具有如SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的重链可变区和具有如SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的轻链可变区。

**SEQ ID NO: 11:** Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ala Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

**SEQ ID NO: 12:** Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0430] 人源化-去免疫重链的其他非限制性实例包括,但不限于,SEQ ID NO:13、14、15和16。

**SEQ ID NO: 13:** Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

**SEQ ID NO: 14:** Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile Arg Ser Gln Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

**SEQ ID NO: 15:** Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile Arg Ser Arg Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

**SEQ ID NO: 16:** Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0431] 人源化-去免疫轻链的其他非限制性实例包括,但不限于,SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22和23。

**SEQ ID NO: 17:** Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

**SEQ ID NO: 18:** Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

**SEQ ID NO: 19:** Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

**SEQ ID NO: 20:** Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

**SEQ ID NO: 21:** Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

**SEQ ID NO: 22:** Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

**SEQ ID NO: 23:** Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0432] 可以以其他形式实现或以其他方式实施本文所述的实施方案的方面,而不脱离其精神或基本特征。因此,在例证的所有方面考虑本公开内容,且不是限制性的,意图在其中包括落入等效方案的含义和范围内的所有变化。

## 序列表

<110> TRACON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> 抗体制剂及其用途

<130> 35882-714.601

<140>

<141>

<150> 61/697,111

<151> 2012-09-05

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 1

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

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 2

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

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 3

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

<210> 4

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 4

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	100	105	110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	115	120	125	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	130	135	140	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	145	150	155	160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	165	170	175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	180	185	190	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	195	200	205	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	210	215	220	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	225	230	235	240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	245	250	255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	260	265	270	

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 5

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

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 6

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
 1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 7

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 8

Asp Ala Trp Met Asp

1                    5

<210> 9

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 9

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser

1                    5                    10                    15

Val Lys Gly

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 10

Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser

1                    5

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala

20                    25                    30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35                    40                    45

Gly Glu Ala Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu

50                    55                    60



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

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 14

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

<210> 15

<211> 118

<212> PRT



Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 17

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

Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr  
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 18

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

Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

50	55	60
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu		
65	70	75
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr		
	85	90
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100	105

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述:合成多肽

&lt;400&gt; 19

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

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述:合成多肽

&lt;400&gt; 20

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met		
	20	25
		30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
           35                                  40                                  45  
 Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
           50                                  55                                  60  
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr  
                                   85                                  90                                  95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                                   100                                  105

<210> 21

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 21

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

<210> 22

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 22

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

<210> 23

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 23

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

**A. TRC105 VL: CDRs 加下划线**

QIVLSQSPAILSASPGKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGS  
GTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 1)

**B. TRC105 CL:**

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY  
SLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)

**C. TRC105 VH: CDRs 加下划线**

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKASNHATYYAESV  
KGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYYCTRWRRFFDSWGQGTTLTVSS (SEQ ID  
NO: 3)

**D. TRC105 Cy1**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 4)

- |           |          |                     |                 |
|-----------|----------|---------------------|-----------------|
| <b>E.</b> | VL CDR1: | RASSSVSYMH          | (SEQ ID NO: 5)  |
| <b>F.</b> | VL CDR2: | ATSNLAS             | (SEQ ID NO: 6)  |
| <b>G.</b> | VL CDR3: | QQWSSNPLT           | (SEQ ID NO: 7)  |
| <b>H.</b> | VH CDR1: | DAWMD               | (SEQ ID NO: 8)  |
| <b>I.</b> | VH CDR2: | EIRSKASNHATYYAESVKG | (SEQ ID NO: 9)  |
| <b>J.</b> | VH CDR3: | WRRFFDS             | (SEQ ID NO: 10) |

图 1

CD105 (内皮因子) 对血管生成的调节的模型

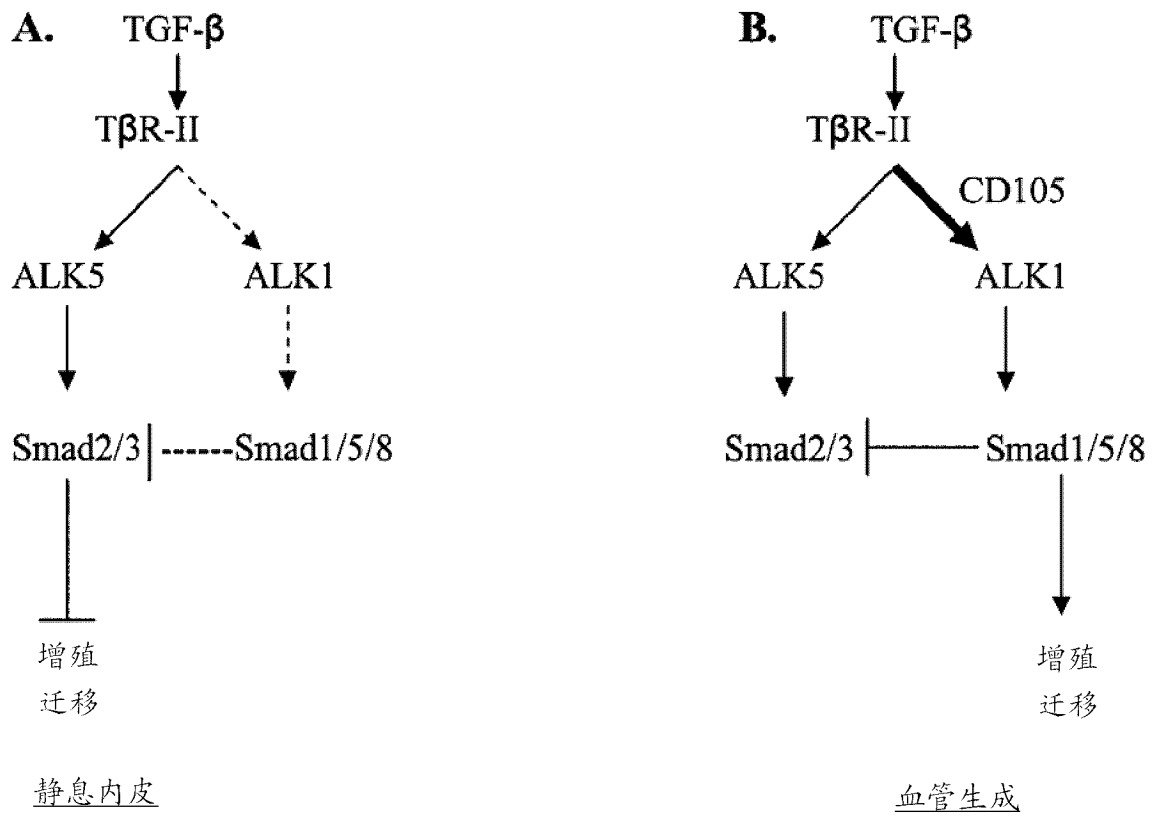


图 2