

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680030391.5

[51] Int. Cl.

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 10 月 15 日

[11] 公开号 CN 101287758A

[22] 申请日 2006.7.20

[21] 申请号 200680030391.5

[30] 优先权

[32] 2005.7.21 [33] EP [31] 05076675.7

[86] 国际申请 PCT/EP2006/007241 2006.7.20

[87] 国际公布 WO2007/009816 英 2007.1.25

[85] 进入国家阶段日期 2008.2.20

[71] 申请人 天主教大学基金会

地址 荷兰奈梅亨

[72] 发明人 W·P·J·林德斯 I·罗迪恩克

J·M·H·拉茨

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李 瑛

权利要求书 3 页 说明书 35 页 附图 19 页

[54] 发明名称

作为肿瘤诊断和治疗的靶的丛蛋白 D1

[57] 摘要

本发明涉及用作涉及丛蛋白 D1 的表达的病症的治疗或诊断中的可靶向蛋白的丛蛋白 D1。诊断合适地通过检测体内或身体组织或体液中丛蛋白 D1 的存在而实现，但是治疗通过将用于传递治疗剂的丛蛋白 D1 靶向到需要治疗的部位而实现。本发明更进一步涉及结合丛蛋白 D1，编码丛蛋白 D1 的核酸或丛蛋白 D1 的配体的分子用于制备治疗或诊断涉及丛蛋白 D1 的表达的病症的治疗组合物的应用。病症包括其中丛蛋白 D1 在肿瘤细胞，肿瘤血管或活化巨噬细胞上表达的病症。

1. 用作涉及丛蛋白 D1 的表达的病症的治疗或诊断中的可靶向蛋白的丛蛋白 D1。
2. 如权利要求 1 要求的丛蛋白 D1, 其中诊断通过检测体内或身体组织或体液中丛蛋白 D1 的存在而实现。
3. 如权利要求 1 要求的丛蛋白 D1, 其中治疗通过靶向丛蛋白 D1 用于传递治疗剂到需要治疗的位点而实现。
4. 如权利要求 1 要求的丛蛋白 D1, 其中治疗通过干扰丛蛋白 D1 与它的配体的相互作用而实现。
5. 如权利要求 1 要求的丛蛋白 D1, 其中治疗通过干扰丛蛋白 D1 的功能而实现。
6. 如权利要求 1 要求的丛蛋白 D1, 其中治疗通过干扰编码丛蛋白 D1 的基因的表达而实现。
7. 结合丛蛋白 D1, 编码丛蛋白 D1 的核酸或丛蛋白 D1 的配体的分子用于制备治疗或诊断涉及丛蛋白 D1 的表达的病症的治疗组合物的应用。
8. 如权利要求 7 要求的应用, 其中所述病症包括其中丛蛋白 D1 在肿瘤细胞, 肿瘤血管或活化巨噬细胞上表达的病症。
9. 如权利要求 7 或 8 要求的应用, 其中所述病症选自脑肿瘤, 特别是星形细胞瘤, 少突胶质细胞瘤与成血管细胞瘤, 结肠癌, 特别是结肠导管癌, 前列腺癌, 肾细胞癌, 特别是肾透明细胞癌, 乳房癌, 特别是乳腺导管癌, 卵巢癌, 鳞状细胞癌, 黑素瘤, 肺癌, 特别是小细胞肺癌和非小细胞肺癌, 软组织肉瘤。
10. 如权利要求 7 或 8 要求的应用, 其中所述病症是炎性疾病。
11. 如权利要求 10 要求的应用, 其中所述炎性疾病是自身免疫病。
12. 如权利要求 11 要求的应用, 其中所述自身免疫病是类风湿性关节炎。

13. 如权利要求 10 要求的应用，其中所述炎性疾病是动脉粥样硬化或多发性硬化。

14. 如权利要求 7 要求的应用，其中结合丛蛋白 D1 的分子选自抗体，抗体片段，蛋白功能域，肽，小分子，DNA 或 RNA 适体。

15. 如权利要求 7 要求的应用，其中结合编码丛蛋白 D1 的核酸的分子选自 siRNA，反义 RNA，反义磷酸硫代寡核苷酸。

16. 如权利要求 7 的应用，其中结合丛蛋白 D1 配体的分子选自抗配体的抗体，丛蛋白 D1 的可溶性胞外域，具有对丛蛋白 D1 结合位点的亲和性的肽。

17. 如权利要求 7-16 中任一项要求的应用，其中所述结合分子用可检测标记进行标记。

18. 如权利要求 12 要求的应用，其中所述可检测标记选自放射性标记，顺磁性标记，荧光标记，化学发光标记。

19. 如权利要求 7-18 中任一项要求的应用，其中所述结合分子带有效应化合物或包括效应化合物的纳米装置。

20. 如权利要求 19 要求的应用，其中所述效应化合物是毒素，血栓形成诱导化合物，化疗剂，放射性部分，细胞程序死亡诱导肽，特别是 (KLAKLAK)₂。

21. 如权利要求 20 要求的应用，其中所述毒素损伤或杀死内皮细胞以诱导血栓形成，而且特别是蓖麻毒素。

22. 如权利要求 20 要求的应用，其中所述血栓形成诱导化合物是截短的组织因子。

23. 如权利要求 20 要求的应用，其中所述化疗剂选自阿霉素，顺氯氨铂，博来霉素硫酸盐，亚硝脲氮芥，苯丁酸氮芥和环磷酰胺羟基脲。

24. 如权利要求 20 要求的应用，其中所述放射性实体选自：钨 99m，碘-123，碘-131，铯-186 或-188，镓-67，钇-90，镱-177。

25. 如权利要求 19 要求的应用，其中所述纳米装置是脂质体，聚合物，特别是由嵌段共聚物组成的聚合物。

26. 丛蛋白 D1 结合分子。

27. 如权利要求 26 要求的丛蛋白 D1 结合分子, 包含 A12 (SEQ ID NO: 1), F8 (SEQ ID NO: 2), 11F5H6 (SEQ ID NO: 3) 或 17E9C12 (SEQ ID NO: 4) 的丛蛋白 D1 结合部分。

29. 如权利要求 26 或 27 要求的丛蛋白结合分子, 与如权利要求 18 要求的可检测标记偶联。

30. 如权利要求 26 或 27 要求的丛蛋白结合分子, 与效应分子或包括效应化合物的纳米装置偶联, 其中效应化合物如权利要求 20-24 中任一项所限定。

31. 如权利限定 26 或 27 限定的丛蛋白结合分子, 其中所述纳米装置如权利要求 25 中所限定。

32. 包含如权利要求 29 要求的丛蛋白结合分子的诊断组合物。

33. 包含如权利要求 30-32 中任一项要求的丛蛋白结合分子的治疗组合物。

34. 单链抗体 A12 (SEQ ID NO: 1)。

35. 单链抗体 F8 (SEQ ID NO: 2)。

36. 单链抗体 11F5H6 (SEQ ID NO: 3)。

37. 单链抗体 17E9C12 (SEQ ID NO: 4)。

38. 鉴定能与丛蛋白 D1 结合的分子的方法, 该方法包括使许多分子的集合与丛蛋白 D1 接触, 并从该集合选择显示与丛蛋白 D1 结合分子作为丛蛋白 D1 结合分子。

作为肿瘤诊断和治疗的靶的丛蛋白 D1

技术领域

本发明涉及一种新的可靶向蛋白的鉴定，该蛋白可用于肿瘤，尤其是实体瘤，和病症包括炎症，尤其是类风湿性关节炎，动脉粥样硬化和多发性硬化的治疗和诊断。

背景技术

为了生长超过 $2-3 \text{ mm}^3$ 的大小，肿瘤必须通过血管发生来补充新生血管。肿瘤通过血管内皮生长因子-A (VEGF-A) 的表达，通过肿瘤中心的低氧诱导或者由于使肿瘤抑制基因产物或活化原癌基因功能失常的结果来完成这个过程。已经开发了许多靶向 VEGF-A 信号传导途径的化合物，其旨在抑制血管发生并，因此，抑制肿瘤生长。尽管这种抗血管生成疗法在动物肿瘤模型中是有效的，但是转化到临床水平迄今为止证明是不太成功的 (Eichhorn, ME 等人, Drug Resist Update 7:125-138 (2004))。

对此，存在许多可能的解释。临床上相关的状况中，在诊断的时候，肿瘤已经生长几个月或甚至几年，而且显著比例的脉管系统可能或多或少成熟，从而对血管发生抑制不敏感。这种状况与大多数动物模型成为鲜明的对照，这些动物模型中，通常，对攻击性的，生长迅速的肿瘤进行研究。而且，候选用于抗血管生成疗法的患者一般是患有散布，无法控制的癌症的患者，而且转移性病灶的生长通常可能不严格地依赖于血管发生。因为大多数转移性病灶是血液传播的，它们在器官中向外生长，这些器官本质上具有较高的脉管密度如肝脏，肺和大脑，转移性病灶在这些器官中可以通过之前原有的脉管的共选择以血管发生独立的方式生长。

实际上，在许多皮下的肿瘤模型 (Wedge, SR 等人, Cancer Res

62: 4645-4655 (2002)) 中十分有效地抑制肿瘤生长的血管发生抑制剂, 不能抑制小鼠大脑中渗透性肿瘤的生长。而且, 当对携带高度血管生成脑肿瘤的小鼠进行治疗时, 血管发生抑制没有导致进一步的肿瘤进展的停止, 而是导致了表型转变到共选择和浸润以后的进展 (Leenders, WP 等人, Clin Cancer Res 10: 6222- 6230 (2004))。这些结果意味着, 抗血管生成疗法将通过血管的靶向疗法进行补充, 其中存在的肿瘤血管床被攻击, 由于肿瘤的血液供给破坏, 导致继发肿瘤细胞死亡。

为了实现有效的血管靶向疗法, 必须鉴定肿瘤脉管系统特异性的标记。已经对此进行了许多努力, 但是取得了不同的成功。使用针对纤粘连蛋白的 ED-B 功能域的单链抗体, 已经实现了有效的血管瘤靶向, 其选择性表达并存在于血管生成肿瘤的新形成脉管的胞外基质中 (Santimaria, M 等人, Clin Cancer Res 9: 571-579 (2003))。使用 RGD 肽或 Vitaxin, $\alpha_v\beta_3$ -整联蛋白 (其表达只限于未成熟的脉管), 产生了令人失望的结果, 然而内皮糖蛋白表达不是肿瘤血管特异性的 (Posey, JA 等人, Cancer Biother Radiopharm 16: 125-132 (2001); Balza, E 等人, Int J Cancer 94: 579-585 (2001))。

在炎症性疾病如类风湿性关节炎 (RA) 或动脉粥样硬化中, 血管发生和脉管系统的活化也常常是病理的一部分。脉管系统此时为炎性细胞溢出和发挥它们的破坏作用做好准备。这些疾病从而也可以受益于靶向血管。

发明内容

因此本发明的目标是提供一种新的可靶向蛋白, 其可用于癌症和炎症性疾病或涉及炎症的疾病的治疗和诊断。

在导致本发明的研究中, 发现丛蛋白 D1 表达于肿瘤血管的内皮细胞的腔侧, 肿瘤细胞本身, 以及肿瘤, 炎症和动脉粥样硬化的蚀斑中发现的活化巨噬细胞。

本发明因此涉及用作涉及丛蛋白 D1 的表达的病症的治疗或诊断

中的可靶向蛋白的丛蛋白 D1。

哺乳动物中丛蛋白家族的受体包括 4 类 (PLXN A-D) 和 9 个成员。丛蛋白包括一个大的, 单通膜的家族, 其与分散因子受体同源, 由 MET 基因家族编码。丛蛋白家族的成员共有 Sema 功能域, Met-相关序列 (MRS), 一个横跨膜的区域和细胞内基序, 其是 Rac/Rho-GTP 酶信号的预示 (图 1)。

因为通过 GTP 酶的发出信号导致细胞骨架重排, 该事件决定性地涉及线状伪足和片状伪足以及细胞迁移的形成, 所以丛蛋白被认为是迁移的调节剂。

丛蛋白是脑信号蛋白的受体, 一个分泌的, GPI 锚定的或横跨膜的蛋白质家族, 其被再划分为 7 个亚类。每个丛蛋白都具有它自身的 (一套) 脑信号蛋白结合伴侣, 而且每个丛蛋白-脑信号蛋白结合都导致一个特异性的反应。第 3 类脑信号蛋白是有效的轴突驱避剂, 而且同样涉及神经系统的形态发生 (综述, 参加, (Pasterkamp, RJ 等人, *Curr Opin Neurobiol* 13: 79-89 (2003); Fujisawa, H, *J Neurobiol* 59: 24-33 (2004))。为了通过脑信号蛋白活化丛蛋白, 可能需要另外的丛蛋白结合伴侣。这些结合伴侣, 神经毡蛋白-1 和-2 (NP-I 和 NP-2) 在细胞内功能域中没有信号基序, 而且被认为是被动的共同受体, 能使脑信号蛋白与丛蛋白之间相互作用。

一些丛蛋白还形成大的膜复合物, 并活化信号受体作为出轨 (Otk) 与分散因子受体 Met 与 Ron。丛蛋白 A1 与血管生成血管内皮生长因子-受体-2 (VEGFR2) 之间的直接相互作用也已经证实了 (Toyofuku, T 等人, E-publication in *Genes Dev* 18: 435-447 (2004))。因为 NP-I 结合丛蛋白家族成员, 而且也结合 VEGFR2, 可以想像多组分的膜蛋白复合物存在, 包括 VEGFR2, NP-I 和丛蛋白, 建立了丛蛋白与血管发生之间的关联 (也参见 Weinstein, BM, *Cell*, 120: 299-302 (2005))。

神经毡蛋白也是有效的血管生成因子血管内皮生长因子-A (VEGF-A165) 的共同受体, 并增强它对 VEGFR2 的亲合力。有趣地, NP-1 上的 VEGF-A165 结合位点与脑信号蛋白 3A 的相一致 (Miao, HQ 等人,

J Cell Biol 146:233-242 (1999)). 已经假设, VEGF-A 结合 NP-1 通过竞争结合第 3 类脑信号蛋白来促进内皮细胞的迁移, 其后面通常是 F 肌动蛋白解聚和细胞延伸的排斥 (Bachelder, RE, Cancer Res 63:5230-5233 (2003)). VEGF-A 与第 3 类脑信号蛋白的类似拮抗行为已经描述于神经元的祖细胞系中 (Bagnard, D 等人, J Neurosci 21:3332-3341 (2001)) and tumor cells (Bachelder (2003), 上文)。因为在缺乏 VEGF 受体的肿瘤细胞中观察到拮抗作用, 可以想像根本的机制涉及丛蛋白家族的成员, 建立了丛蛋白与 VEGF-A 信号之间更进一步的关联。

本发明人已经预先发现, 家庭成员丛蛋白 D1 (plxnD1) 不仅仅在神经元细胞中表达, 而且在生长初期阶段期间在脉管系统的内皮细胞中表达 (van der Zwaag, B 等人, Dev Dyn 225:336-343 (2002)), an observation that was confirmed by two other groups (Gitler, AD 等人, Dev Cell 7:107-116 (2004); Torres-Vazquez, J 等人, Dev Cell 7:117-123 (2004))。在成人脉管系统中, plxnD1 是缺乏的。Plxnd1 敲除小鼠与携带 plxnd1 基因突变的斑马鱼的特征为心血管系统发育不良 (Gitler, AD 等人 (2004), 见上; Torres-Vazquez, J 等人, (2004), 上文)。神经毡蛋白-1 (NP-1) 与 NP-1/神经毡蛋白-2 (NP-2) 双重敲除小鼠也遭受血管形成的致命缺陷, 和胚胎发育期间主动脉弓畸形 (Kawasaki, T 等人, Development 126:4895-4902 (1999); Takashima, S 等人, Proc Natl Acad Sci 美国 99:3657-3662 (2002); Gu, C 等人, Dev Cell 5:45-57 (2003))。

而且, 斑马鱼中吗啉代介导的 NP-1 敲除导致节间脉管的发育不良, 而且在该模型系统中建立了 NP-1 与 VEGF-A165 之间的清楚关联 (Lee, P 等人, Proc Natl Acad Sci USA 99:10470-10475 (2002))。plxnD1, 神经毡蛋白-1 与脑信号蛋白 3C 敲除小鼠的表型相似性 (Feiner, L 等人, Development 128:3061-3070 (2001)), 与丛蛋白 D1 是脑信号蛋白 3C 的神经毡蛋白-1 依赖性受体的发现一致 (Gitler, AD 等人 (2004), 上文)。但是, PlxnD1 也是脑信号蛋白 3E 的受体,

而且这种相互作用不需要神经毡蛋白用于脑信号蛋白 3E 介导的信号 (Gu, C 等人, Science 307:265-268 (2005))。

根据本发明, 现在发现丛蛋白 D1 也涉及肿瘤生长期间的血管发生, 并表达于肿瘤血管的内皮细胞的腔侧。此外 丛蛋白 D1 被认为是由活化巨噬细胞表达。丛蛋白 D1 也被认为在各式各样的肿瘤类型中在肿瘤细胞上表达。

本本发明因此涉及用作涉及丛蛋白 D1 的表达的病症的治疗或诊断中的可靶向蛋白的丛蛋白 D1。

诊断通过检测体内或身体组织或液体中丛蛋白 D1 或丛蛋白 D1 编码核酸的存在而实现。通过干扰丛蛋白 D1 与它的配体之间的相互作用, 通过干扰丛蛋白 D1 基因的表达或通过捕获丛蛋白 D1 配体以抑制与丛蛋白 D1 的相互作用, 治疗通过靶向丛蛋白 D1 用于传递治疗剂到需要治疗的丛蛋白位点而实现。

本发明因此更进一步涉及结合丛蛋白 D1, 编码丛蛋白 D1 的核酸或丛蛋白 D1 的配体的分子, 用于制备治疗或诊断涉及丛蛋白 D1 的表达的病症的治疗组合物的应用。所有的这些分子这里鉴定为“结合分子”或“结合个体”。

病症包括, 尤其是其中丛蛋白 D1 表达于肿瘤细胞, 肿瘤血管或活化巨噬细胞的病症。

丛蛋白 D1 表达于其上的肿瘤细胞包括脑肿瘤, 尤其是星形细胞瘤, 少突胶质细胞瘤与成血管细胞瘤, 结肠癌, 尤其是结肠导管癌, 前列腺癌, 肾细胞癌, 尤其是肾透明细胞癌, 乳房癌, 尤其是乳腺导管癌, 子宫癌, 鳞状细胞癌, 黑素瘤, 肺癌, 尤其是小细胞肺癌和非小细胞肺癌, 软组织肉瘤等等。

当根据本发明进行治疗的病症是炎症性的疾病时, 它们尤其是自身免疫性疾病, 更特别是类风湿性关节炎, 或者它们是动脉粥样硬化或多发性硬化。

结合丛蛋白 D1 的分子例如选自抗体, 抗体片段, 蛋白质, 蛋白功能域, 肽, 小分子。这些分子可用于靶向丛蛋白。

结合编码丛蛋白 D1 的核酸的分子是例如寡核苷酸,如 RNA 或 DNA 适体,例如选自 siRNA,反义 RNA,反义磷硫代寡核苷酸。这些分子可用于干扰丛蛋白 D1 的表达。

结合丛蛋白 D1 配体的分子例如选自抗配体的抗体,丛蛋白 D1 的可溶性胞外域或小分子,如肽,其结合丛蛋白 D1 配体。这些分子可用于捕获循环丛蛋白 D1 配体,预防配体与肿瘤脉管细胞,肿瘤细胞或活化巨噬细胞上的丛蛋白 D1 结合,妨碍这些细胞上丛蛋白 D1 的功能。

为了进行诊断,结合分子合适地用可检测的标记进行标记。这种可检测的标记例如选自放射性标记,顺磁性的标记,荧光标记,化学发光标记。可以在体内,原位或体外,在体液或组织的样本中进行诊断。诊断技术的例子是在活组织检查或肿瘤细胞上进行例如丛蛋白 D1 mRNA 的原位杂交或免疫组织化学。

为了进行治疗,结合分子是例如拥有损伤或杀死肿瘤细胞和/或肿瘤内皮细胞的实体,特别是细胞毒素实体,如放射性核素,毒素,用于硼中子俘获治疗法(BNCT)的硼,或通过可裂解的接头与结合个体偶联的前体药物,其随接头,或诱导细胞程序死亡的肽的裂解而活化,其的一个例子是(KLAKLAK)₂序列。通过分子遗传工程技术把这种肽添加于结合个体中。如上所述的实体可以直接与结合个体配合,或它们可以纳米装置存在,如脂质体或聚合体,其与结合个体配合。

硼中子俘获治疗法(BNCT)包括用中子对患病区域如肿瘤或炎症进行辐射,其中硼在脂质体缀合物的静脉注射以后已经积累,之后在破坏性的 α -粒子发射之下硼原子将衰退为锂。

作为选择,治疗可能受到在肿瘤脉管中诱导局部血栓形成,以阻挡血液供给到肿瘤并诱导细胞死亡的影响。这种分子的一个例子是组织因子(TF)。

有利地,紧接着静脉内给药,丛蛋白 D1 可以用特异性的结合分子靶向,因为丛蛋白 D1 表达于肿瘤血管中的内皮细胞的腔侧。与结合分子偶联的治疗化合物,其用于损伤或杀死肿瘤细胞,可以从内部

到达肿瘤，而且诱导血栓形成的化合物可以被容易地传递到它们的作用位点。

干扰丛蛋白 D1 功能表示一种抑制血管发生，抑制肿瘤细胞迁移，和抑制巨噬细胞迁移的方法。因此，本发明提供了通过使用特异性存在的丛蛋白 D1 以局部地传递治疗到疾病组织，和/或通过干扰丛蛋白 D1 的功能或丛蛋白 D1 与它的配体之间的相互作用，治疗或抑制其中涉及丛蛋白 D1 的病症的方法。

发明详述

本发明因此基于丛蛋白 D1 可用作肿瘤血管中的可靶向标记，用作肿瘤血管发生中涉及的可靶向蛋白，用作肿瘤细胞中的可靶向标记，和用作细胞迁移中涉及的可靶向蛋白的事实。

本发明因此也涉及结合丛蛋白 D1，它的基因或 mRNA 或它的配体的分子在诊断和治疗中的应用。各种特异性结合分子及其衍生物可用于本发明，尤其是蛋白质的化合物，如，但不限于，抗体，抗体片段，单结构域抗体片段，其他的蛋白质的结合功能域，如，但不限于，脂质运载蛋白，和特异性结合丛蛋白 D1 或它的配体的小分子。为了结合丛蛋白 D1 基因或从丛蛋白 D1 基因核酸分子转录的 mRNA，可以使用如 DNA 或 RNA 适体。

在本发明的第一个实施方案中，丛蛋白 D1 或丛蛋白 D1 配体结合分子是抗体，特别是单克隆抗体，更特别是人或人源化的抗体，其中原始抗体的恒定区被人抗体的恒定区或其片段取代，而仍然结合丛蛋白 D1 或它的配体。

抗体优选是人 IgG1 抗体。但是，本发明也包含其他的人抗体同种型，包括 IgG2，IgG3，IgG4，IgM，IgA1，IgA2，IgAsec，IgD 和 IgE。所有动物来源的抗体的各种同种型也可用于本发明。

抗体可以是全长抗体或抗体的抗原结合片段，包括 Fab，F(ab')₂，单链 Fv 片段，或单结构域 VHH，VH 或 VL 单结构域。

优选地，抗丛蛋白 D1 的抗体是由杂交瘤细胞产生的人单克隆抗

体，该杂交瘤包括获自免疫的转基因动物的 B 细胞，其与无限增殖化细胞融合，该转基因动物具有包括人重链转基因与人轻链转基因的基因组，或者由杂交瘤细胞产生的动物来源的抗体或抗体片段，该杂交瘤细胞包括获自免疫的动物的 B 细胞，其与无限增殖化细胞融合，或者由用编码所述抗体或抗体片段的 cDNA 或基因组 DNA 转染的真核细胞产生的人和动物抗体。

在本发明的一个优选的实施方案中，提供了具有对丛蛋白 D1 的亲合力的单结构域 (VHH) λ 抗体，更具体地说是 λ 单结构域抗体 A12 (SEQ ID NO: 1) 与 F8 (SEQ ID NO: 2)，或不展示于 M13 噬菌体上，本领域技术人员也已知作为噬菌体展示 VHH 抗体。

一个优选的单链抗体来源于抗体 11F5H6 与 17E9C12。单链抗体的序列示于 SEQ ID NO: 3 与 SEQ ID NO: 4。

用于本发明的抗体可以是高亲合力抗体，其在非转基因实验动物，或转基因动物中产生，该转基因动物中内源的球蛋白基因座已经被人类球蛋白基因座取代，从而允许在这种动物中产生人抗体 (Jakobovits, A. *Curr Opin Biotechnol* 6: 561-566 (1995))。

本发明更进一步地涉及一种生产本发明的抗体的方法，包括用丛蛋白 D1，或表达丛蛋白 D1 的细胞，或编码丛蛋白 D1 融合核酸，或丛蛋白 D1 的胞外域的一部分免疫动物，以便通过动物的 B 细胞产生抗丛蛋白 D1 的抗体，从动物分离 B 细胞，并使 B 细胞与骨髓瘤细胞系融合，以获得分泌抗体的无限增殖化细胞。动物优选是具有包括人重链转基因与人轻链转基因的基因组的转基因动物，以便得到的抗体被来源化。

在一个实施方案中，该方法包括用合成肽，选自丛蛋白 D1 胞外域，例如相当于成熟丛蛋白 D1 氨基酸序列的氨基末端的肽 47-63，来免疫实验动物。但是优选对重组体胞外域，优选与丛蛋白的其他家族成员具有低相似性的区域，例如包括氨基酸 47-546 的区域，缺乏 Met-相关序列，进行免疫。可以通过插入编码核酸到适合的原核表达载体中，例如在 β -半乳糖苷酶启动子的调控下，用所述的载体转化大肠杆菌

菌细胞，并从纯化的包涵体分离重组体蛋白，在大肠杆菌细胞中产生所述的重组体丛蛋白 D1 胞外域。但是优选通过用所述的重组体丛蛋白 D1 胞外域免疫来产生，该重组体丛蛋白 D1 胞外域由真核细胞产生，因此包含翻译后修饰，其与天然丛蛋白 D1 中存在的那些胞外域非常类似，例如由用包含在巨细胞病毒启动子调控下的，编码所述胞外域的核酸的载体转染以后的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞产生。重组体胞外的丛蛋白 D1 片段可以与或不与便于纯化的标签融合，例如 VSV 标签或免疫球蛋白的重链恒定区。

生产抗体的方法也可包括把来自于所述的丛蛋白 D1 特异性 B 细胞的抗体编码区克隆到表达载体中，并表达该编码序列。在一个优选的实施方案中，表达载体是 pHENIXHISVSV，能通过抗体的大肠杆菌宿主细胞表达，其羧基末端的旁邻为水泡性口炎病毒 (VSV-标签) 与 8 个 His 标签。VSV 标签是指使用特异性抗体，便于免疫组织化学的检测。8 个 His 标签是指便于基于镍亲和层析的纯化。其他的表达载体同样可以使用。

更具体地说，本发明提供了一种分离的单结构域抗体 A12，其解离常数小于 2×10^{-8} M，其结合丛蛋白 D1 的氨基末端，其在免疫组织化学染色中检测丛蛋白 D1，并朝向表达丛蛋白 D1 的肿瘤血管，还提供了一种分离的单结构域抗体 F8，其解离常数小于 3×10^{-8} M，其结合丛蛋白 D1 的氨基末端，其在免疫组织化学染色中检测丛蛋白 D1，并朝向表达丛蛋白 D1 的肿瘤血管。两个分离的单结构域抗体都可与人 IgG1 重链的恒定区或小鼠 IgG1 重链的恒定区融合。

优选地，完全的人抗体可用于本发明范围内。在另一个实施方案中，可使用人源化的或实验动物来源的抗体。

本发明更进一步提供了双特异性抗体，其具有丛蛋白 D1 的结合特异性，和人抗原递呈细胞或 Fc 受体的结合特异性，其中 Fc 受体是 Fc (γ) R1 或人 Fc (α) 受体。

本发明还提供了编码优选抗体，或抗原结合部分的核酸分子。重组体表达载体，其包括编码本发明的抗体的核酸，以及用这种载体转

染的宿主细胞，也包括在本发明中。

用于本发明的其它结合分子是特异性结合丛蛋白 D1 的小分子。术语“小分子”常常涉及分子量为 500 或以下的分子。术语是目前通常使用的，因此对技术人员来说是清楚的。而且，小分子文库已经是可用的或正在开发中。这种文库的一个例子是 NIH 分子文库小分子贮藏库 (MLSMR)。对这种文库进行高通量筛选 (HTS)，以鉴定能结合丛蛋白 D1 的分子。本发明还涉及来源于这种文库的筛选的小分子。

可以用于本发明的其它化合物包括肽或适体，其结合丛蛋白 D1 的胞外域，从而干扰丛蛋白 D1 配体与丛蛋白 D1 的结合 (Ulrich, Med. Chem. 1(2): 199-208 (2005))。相反地，这种肽或适体也可与丛蛋白 D1 配体的丛蛋白 D1 结合位点结合，从而干扰配体结合丛蛋白 D1。

为了干扰丛蛋白 D1 基因的表达，使用另一种结合分子，特别是 siRNA，反义 RNA 或反义磷酸硫代核苷酸。小的干扰 RNA (siRNA) 包括干扰信使 RNA 翻译的小链 RNA。siRNA 与靶信使 RNA 的互补部分结合并加用于降解的标签于它，从而抑制基因表达。这通常被称为基因“沉默”。siRNA 的长度通常为 21 到 23 个核苷酸。反义 RNA 是从 DNA 的编码链，而不是模板链转录的 RNA 分子，因此它与有义 mRNA 互补。有义与反义 RNA 之间形成的双螺旋阻断了翻译，还可使两个分子都经受双链特异性核酸酶，从而抑制基因的表达。基因表达的抑制可用于阻断血管发生和肿瘤细胞与巨噬细胞的迁移。

优选地，上面描述的结合分子与真核细胞中的丛蛋白 D1，它的基因或它的配体结合。所述分子在静脉注射之后在肿瘤中特异性累积，或在静脉注射之后在肿瘤血管中特异性累积。

全部都结合丛蛋白 D1 的抗体，其片段，小分子或其它蛋白质的化合物，可以各种方式使用。

在一个实施方案中，本发明涉及结合丛蛋白 D1 的胞外部分的化合物，并且该结合导致干扰丛蛋白 D1 的功能。作为选择，本发明涉及结合丛蛋白 D1 的细胞内功能域的化合物，其通过丛蛋白 D1 阻止发出信号。

在一个特定的实施方案中，这种结合分子与丛蛋白 D1 结合，以通过抑制丛蛋白 D1 配体，特别是神经毡蛋白-1，神经毡蛋白-2，脑信号蛋白 3C，神经毡蛋白 3E，VEGF-受体-1，VEGF-受体-2 或 VEGF-A 与丛蛋白 D1 的结合，来干扰多组分的膜复合物的形成。这种结合分子导致通过丛蛋白 D1 对配体诱导的 GTP 酶发出信号的抑制，或抑制表达丛蛋白 D1 的细胞，特别是肿瘤相关的内皮细胞，肿瘤细胞或巨噬细胞的迁移。

根据本发明的另一个方面，其涉及一种诱导表达丛蛋白 D1 的细胞裂解的方法，包括在存在人效应细胞时，使表达丛蛋白 D1 的细胞与结合分子，特别是本发明的抗体接触，以便发生表达丛蛋白 D1 的细胞的裂解。

仍然在更进一步的实施方案中，结合分子与效应化合物结合或偶联，该效应化合物可以检测丛蛋白 D1 的存在用于诊断目的，或者可以执行对表达丛蛋白 D1 的细胞的作用。诊断或治疗的效应化合物可以与结合分子直接偶联，或者可以存在于运载载体中，如纳米装置，特别是脂质体或聚合体，其与结合分子偶联。作为选择，结合分子可以是结合丛蛋白 D1 与效应化合物的双特异性抗体，从而使效应化合物靶向表达丛蛋白 D1 的位点或细胞。

在一个特别的实施方案中，本发明因此提供了这种结合分子在诊断由丛蛋白 D1 的表达介导的疾病的方法中的应用，该方法包括蛋白质的，适体的或小分子丛蛋白 D1 结合分子的静脉传递，该结合分子与效应化合物配合，以允许进行结合分子的体内检测。

诊断效应化合物是例如放射性同位素或用于核磁共振成像 (MRI) 的造影剂，如钆- DTPA，或荧光染料。

放射性物质的例子包括，但不限于钼^{99m} (^{99m}Tc)，碘-123 (¹²³I)，碘-131 (¹³¹I)，铼-186 或-188 (^{186/188}Re)，镓-67 (⁶⁷Ga)，β-射线发射物质钇-90 (⁹⁰Y) 或镥-177 (¹⁷⁷Lu)，正电子发射同位异量素氟-18 (¹⁸F) 与碳-11 (¹¹C)。这种放射性同位素可用于检测或损伤或杀死表达丛蛋白 D1 的细胞。通常各种同位异量素用于诊断与治疗。技

术人员熟知哪种同位异量素用于哪种组织和用于哪种应用。

在另一个实施方案中，用于本发明的蛋白质的，适体的和小分子的结合分子，与毒剂如化疗剂直接结合或偶联，或位于运输载体上，特别是纳米装置，如脂质体或者聚合物。

在另一个实施方案中，本发明的丛蛋白 D1 结合个体与一种或多种化疗剂偶联，该化疗剂选自氮芥（例如，环磷酰胺和异环磷酰胺），氮丙啶（例如，硫替派），烷基磺酸盐（例如，白消安），亚硝基脲（例如亚硝基氮芥和链脲霉素），铂复合物（例如，卡铂和顺氯氨铂），非典型的烷化剂（例如，氮烯唑胺和 temozolamide），叶酸类似物（例如，氨甲喋呤），嘌呤类似物（例如，氟达拉滨和巯基嘌呤），腺苷类似物（例如，克拉屈滨和喷司他丁），嘧啶类似物（例如，氟尿嘧啶（单独或与甲酰四氢叶酸结合）和吉西他滨），代用品尿素（例如，羟基脲），抗肿瘤抗生素（例如，争光霉素和阿霉素），表鬼臼脂素（例如，鬼臼亚乙苷和表鬼臼毒噻吩糖苷），微管剂（例如，docetaxel 和紫杉醇），喜树碱类似物（例如，依立替康和托泊替康），酶（例如，天冬酰胺酶），细胞因子（例如，干扰白细胞素-2 和干扰素- α ），单克隆抗体（例如，曲妥单抗和贝伐单抗），重组体毒素和免疫毒素（例如，重组体霍乱菌毒素-B 和 TP-38），癌症基因治疗剂，和癌症疫苗（例如，抗端粒末端转移酶的疫苗）。

化疗剂优选选自阿霉素，顺氯氨铂，争光霉素硫酸盐，亚硝基氮芥，苯丁酸氮芥和环磷酰胺羟基脲。其他的化合物是本领域技术人员已知的。

也可以通过诱导肿瘤脉管系统中局部血栓形成，来阻断它的血液供给，对肿瘤进行治疗。在这个实施方案中，本发明的结合分子可用于把血栓形成诱导分子，如凝血辅因子 TF（组织因子），放射性实体或毒素如蓖麻毒素，靶向肿瘤的位点。效应化合物可以与结合分子，特别是丛蛋白 D1 结合分子偶联，或者可以存在于纳米装置中，如脂质体或聚合物，其与丛蛋白 D1 结合分子偶联。

根据本发明，治疗癌症或炎症性疾病的一种可选择的方法是用硼。

本发明的结合分子可与运输载体，特别是纳米装置，如脂质体或聚合物配合，这些载体带有硼以获得治疗组合物。该组合物在患病的区域传递和累积以后，用中子对该区域进行辐射，导致能损伤或杀死肿瘤内皮细胞，肿瘤细胞和/或活化巨噬细胞的放射性和细胞毒素 α 颗粒的发射。

用于肿瘤血管靶向的抗体最好对丛蛋白 D1 具有高的亲合力，例如高于 10^{-8} ，优选高于 10^{-9} ，更优选高于 10^{-10} M。但是抗体的高亲合力和高分子量将限制穿透到肿瘤组织。因此，通过 RT-PCR 克隆获得的，编码所述单克隆抗体的核酸，可用于产生抗体衍生物，例如缺乏恒定区而且是一价的抗体，或抗体片段，其适于通过诱变步骤进行的血管靶向或肿瘤穿透的最佳亲合力。这些抗体衍生物降具有较低的亲合力和较低的分子量，而且将具有改良的肿瘤细胞靶向特性。

本发明的各种结合分子可以组合到一个混合物中。在一个特定的实施方案中，混合物的成员具有相异的亲合力。这种组合的一个例子是单克隆抗体和/或抗体片段的混合物或小分子抗体的混合物。高亲合力的单克隆抗体可用于靶向脉管，但是较低亲合力的较小片段能较好地穿透并到达肿瘤细胞。作为选择，丛蛋白 D1 结合分子的混合物可与丛蛋白 D1 配体结合分子，和/或能与编码丛蛋白 D1 的核酸结合分子一起使用。或者丛蛋白 D1 配体结合分子可以与能结合编码丛蛋白 D1 的核酸的分子联合。

本发明的丛蛋白 D1 结合分子可用于治疗由丛蛋白 D1 的表达介导的疾病的方法中，包括以能有效治疗该疾病的剂量静脉传递本发明的结合分子。结合分子还可用于诊断由丛蛋白 D1 的表达介导的疾病的方法中，包括静脉传递丛蛋白 D1 结合分子与顺磁性，荧光或放射性示踪剂的缀合物，接着核磁共振成象，光学成象，SPECT 或 PET。

结合分子更进一步地可用于治疗或抑制由丛蛋白 D1 的表达介导的疾病的方法中，包括静脉传递本发明的蛋白质和小分子结合分子，或蛋白质和小分子结合分子的组合物。

待治疗或诊断的疾病可以是癌症，炎性疾病，特别是自身免疫性

疾病，如类风湿性关节炎，或动脉粥样硬化，或多发性硬化。

诊断可以在体内和体外进行。体内方法是如上所述的，而且可以在放射性标记的结合分子在疾病组织中累积以后，用核磁共振成像(MRI)或用 SPECT 或 PET 照相进行。

另一种诊断方法包括体外或经体内检测样本中丛蛋白 D1 的存在。这种方法包括在抗体与丛蛋白 D1 之间的复合物形成的条件下，使样品与丛蛋白 D1 的结合分子，或结合丛蛋白 D1 基因或它的 mRNA 或来源于该 mRNA 的拷贝 DNA 的核酸接触，所有这些结合分子和核酸都与可检测标记连接，并检测复合物的形成。可以通过目测可检测标记来检测复合物。样品可以是体液，如血液，血清，血浆，唾液，尿，精液，粪便，或组织，如肿瘤细胞的活组织检查。

本发明更进一步涉及一种表达载体，其包括 Llama 抗体 F8 或 A12，或来源于抗体 11F5H6 的单链抗体的编码序列，和合适的调节序列。本发明还涉及用所述的表达载体转染的细胞。本发明更进一步涉及通过表达该表达载体可获得的重组蛋白。

本发明的另一个方面涉及一种表达载体，其包括丛蛋白 D1 的胞外域的编码序列，其任选地与人重链的恒定区融合，以及合适的调节序列。本发明还涉及用所述的表达载体转染的细胞。本发明更进一步涉及通过表达该表达载体可获得的重组蛋白。

重组蛋白包括丛蛋白 D1 的胞外域，其与丛蛋白 D1 配体结合，从而阻止配体与细胞缔合的丛蛋白 D1 结合。优选地，编码重组蛋白的编码序列包括丛蛋白 D1 的第 47-506 位氨基酸，其与丛蛋白 D1 配体结合，从而阻止配体与细胞缔合的丛蛋白 D1 的结合，或者丛蛋白 D1 的胞外域的第 507-1274 氨基酸，其与丛蛋白 D1 配体结合，从而阻止配体与细胞缔合的丛蛋白 D1 的结合。这种重组蛋白可携带能增加对丛蛋白 D1 配体的亲合力的突变，从而具有增加的作为诱导受体的效力。这种突变通常通过改变用于产生重组蛋白的编码序列诱导。

本发明更进一步涉及本发明的结合分子在治疗或抑制由丛蛋白 D1 介导的疾病的方法中的应用，包括静脉或肿瘤内传递如上所述的诱

导丛蛋白 D1 胞外域,或在治疗或抑制由丛蛋白 D1 介导的疾病的方法中的应用,包括腺病毒或慢病毒的静脉传递,其含有编码丛蛋白 D1 的重组体胞外域的核苷酸或其如上所述的部分。

这些拮抗的诱导丛蛋白 D1 受体干扰了丛蛋白 D1 与它的配体,特别是神经毡蛋白-1,脑信号蛋白 3C 和脑信号蛋白 3E 之间的相互作用,从而干扰了丛蛋白 D1 的功能。

优选地,相较于丛蛋白 D1,诱导丛蛋白 D1 受体具有增加的对丛蛋白 D1 配体的亲合力。可通过产生丛蛋白 D1 胞外域的文库,携带随机引入的突变,并选择在细胞迁移分析中具有最有效的拮抗行为的诱导受体,来获得这种增加的亲合力。

为了产生所述的蛋白质的分子(包括肽,多肽与糖基化的多肽或具有其他的翻译后或翻译前修饰的多肽),需要插入编码丛蛋白 D1 的胞外域片段的重组体核酸到表达载体中,该片段包含脑信号蛋白 3C,脑信号蛋白 3E 与 NP-1 的结合位点。本发明的拮抗剂优选由本发明的核酸或表达载体产生,优选在宿主细胞中产生。

本发明的分子可用于如上所述的治疗方法和/或与常规的疗法,或用于更进一步预防肿瘤新血管生成形成的抗血管生成的疗法,或放射治疗和/或辅助化疗联合。

本发明更进一步涉及一种鉴定能与丛蛋白 D1 结合的分子的方法,该方法包括使许多分子的集合与丛蛋白 D1 接触,并从该集合选择显示与丛蛋白 D1 结合的分子作为丛蛋白 D1 的结合分子。分子的集合可以例如小分子文库,蛋白质阵列等等存在。用于筛选分子集合的技术本身是已知的。本发明在于鉴定被结合的靶,其是丛蛋白 D1。

在本申请中,术语“结合分子”用于各种结合分子,也即,与丛蛋白 D1 结合的分子,与编码丛蛋白 D1 基因的核酸结合分子,以及与丛蛋白 D1 配体结合分子。所有这些类型的分子可与如上所述的效应化合物偶联。

附图说明

在下述的实施例中将对本发明进行更进一步地举例说明，而且实施例的目的决不是为了限制本发明。实施例涉及下列图：

图 1：丛蛋白家族成员的结构域：已经鉴定了 4 个亚族，命名为丛蛋白 A-D。水平画影线的盒表示 Sema 功能域，斜着画影线的盒表示 Met-相关序列 (MRS) 基序，空心的盒表示 PLXND1 的非典型 MRS 基序。丛蛋白 B 亚族成员具有可能的弗林蛋白酶样的蛋白水解位点，由灰色条带标记。横跨膜区域由阴影的盒标记，后面是 2 个保守的细胞内功能域，都包括 SP-功能域，其由 2 个椭圆形标记。

图 2：A) 使用地高辛标记的小鼠特异性 *plxnd1* RNA 探针，对大脑的 Me157-VEGF-A165 病变进行原位杂交分析。肿瘤脉管是强阳性的(箭头)，然而远离病变的大脑毛细管是阴性的(图 2B 中比较了 ISH 分布图与 CD34 染色)。

图 3：多形性胶质母细胞瘤(A)，肉瘤的大脑转移性病灶(B)，黑色素瘤(C)与乳房癌(D)的人 PLXND1-特异性 ISH 分析。插图显示连续切片的 CD31 染色。使用有义探针，对照 ISH 是阴性的(未显示)。注意，在这些肿瘤中，PLXND1 表达不限于血管：在肿瘤细胞中也发现了高水平的 PLXND1 转录物。t = 肿瘤，V = 脉管。

图 4：使用人特异性地高辛标记的 RNA 探针(A)进行 ISH 分析，并用正常大脑的 CD31 (B) 进行免疫组织化学染色。注意，脉管丰富存在，但是这些脉管不表达丛蛋白 D1 转录物。

图 5：噬菌体(A)与对应的单结构域抗体(sdabs) (B) A12 和 F8 对肽 $H_2N-ALEIQRRFPSPTPTNC-CONH_2$ 的特异性。在 A 中， 10^{10} 噬菌体允许与 PLXND1 肽，BSA，人 IgG 或本文中描述的不相关的肽结合。严格的洗涤以后，使用抗-M13 抗体对结合的噬菌体进行检测。在 B 中，现在对可溶性 sdabs 进行类似的孵育。洗涤以后，检测结合的 sdabs，并通过 VSV-G-标签进行不完全定量。

图 6：单结构域抗体 A12 与 F8 之间结合的解离常数 (k_d / s)，使用 Biacore 2000 (Uppsala, 瑞典) 生物传感器进行测定。传感器芯片与蛋白质偶联化学制品购自 Biacore AB。PLXND1 肽-KLH 缀合物

(27 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶于乙酸钠, pH 4.0) 或 BSA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶于乙酸钠, pH 5.0), 使用 N-乙基-N'-(二甲基氨基丙基)碳二亚胺, N-羟基琥珀酰亚胺, 在制造商建议的条件下, 与活化的 CM5 表面偶联。未反应的基团通过 1 M 乙醇胺, pH 8.5 进行灭活。

25 $^{\circ}\text{C}$, 在 HBS-EP 缓冲液(10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005%表面活性剂 P20)中, 以 10 ml/分钟的流速, 进行动力学的测定。6 个浓度的 Ni 亲和纯化的 sdabs (1 mM 到 50 μM 的范围), 用于确定 PLXND1 肽的相互作用的解离常数(K_ds)。每个实验以后, 传感器表面用 10mM NaOH 进行再生。

由 PLXND1-表面的结合减去对照 BSA-表面的结合所定义的特异性结合, 使用 BIAevaluation 4.1 软件和 1:1 Langmuir 结合模型进行分析。单结构域抗体 A12 与 F8 的亲合性是 $2.1 \times 10^{-8}\text{M}$ 与 $3.5 \times 10^{-8}\text{M}$ 。

图 7: 单结构域抗体的丛蛋白 D1 特异性的评估。图 A 显示了用单结构域抗体 A12, 利用用于该抗体检测的 VSV-G 标签, 对小鼠胚胎 (E16.5) 的小梁骨的生长板进行的免疫组织化学染色。插图显示了使用小鼠特异性的地高辛标记的丛蛋白 D1 探针, 对类似的胚胎结构进行原位杂交。注意, 原位杂交与免疫染色中丛蛋白 D1 的重叠。图 7B 是裸鼠的大脑中 Me157-VEGF-A165 病变的一个代表性的例子。在丛蛋白 D1 ISH 中也是阳性的脉管系统(也参见图 2), 用单结构域抗体 F8 是免疫阳性的。

图 8: 用单结构域抗体 A12 对人脑肿瘤的选择物进行免疫染色。显示的肿瘤是 A) 多形性胶质母细胞瘤, B) 黑素瘤的转移性病灶, C) 乳房癌与 D) 肾细胞癌。A 和 B 中的插图包括仅仅用抗 VSV 抗体进行的对照染色, 表明肿瘤染色是特异性的。注意, 脉管与肿瘤细胞与抗体高度反应。

图 9: 用单结构域抗体 A12 对黑素瘤的一组进展进行免疫染色。对黑素瘤的痣, 发育异常的痣与横向和纵向生长阶段进行免疫染色。注意, 仅仅赘生性细胞表达丛蛋白 D1。

图 10: 用单结构域抗体 A12, 对用 ZD6474 处理的小鼠中的

Me157-VEGF-A 脑肿瘤切片进行免疫染色。在未处理的或空白对照剂处理的小鼠中，用该抗体肿瘤脉管染色是阳性的。然而，在 ZD6474 处理的小鼠中，丛蛋白 D1 表达存在剂量依赖的降低。ZD6474 以指定的剂量，口服，每天一次给予。

图 11：用巨噬细胞标记 CD68 (染色蓝色)和单结构域抗体 A12 (染色红色)，对乳房癌进行双重免疫染色。如通过紫色染色蛋白所揭示的，巨噬细胞的亚群表达丛蛋白 D1。

图 12：噬菌体 A12，F8 或不相关的噬菌体体内返回到 Me157-VEGF₁₆₅ 大脑病变中。带有肿瘤的小鼠在尾部静脉中注射 10^{12} 噬菌体，5 分钟以后，麻醉小鼠，并用 15 ml 磷酸盐缓冲盐水进行心脏灌注。处死小鼠，取出大脑，并分析冷冻切片的噬菌体含量和分布。A) 大脑 Me157-VEGF₁₆₅ 病变的冻结切片的 M13 染色。噬菌体明显地是脉管缔合的，如通过对连续切片的抗 CD34 免疫染色所证明的，示于 B。箭头指远离病变的 CD34 阳性脉管，其没有被抗 M13 染色突出。(A) 中的插图显示了其中注射不相关的噬菌体的对照实验。C) 在带有肿瘤的小鼠中静脉注射以后，sdab F8 的分布。Sdabs 使用抗 VSV 抗体，通过免疫组织化学目测检验。注意，sdab 发现于肿瘤脉管中，而不是正常大脑毛细管中。插图显示了其中注射不相关的 sdab 的对照实验。观察到间隙的局部化，其与这些肿瘤中脉管有漏隙的性质一致。D) 噬菌体返回的定量。使用激光捕获解剖显微术，对来自 $10\ \mu\text{m}$ 的冷冻切片进行肿瘤组织解剖。TG1 细胞感染以后，对形成克隆的噬菌体数目进行计数。从肿瘤洗脱的 F8 噬菌体，比从未受影响的脑组织的类似区域洗脱的多 20 倍。

图 13：单结构域抗体返回到本身不是新形成的肿瘤脉管中。裸鼠灌输人神经胶质瘤异种移植 E98 的 1.5×10^5 细胞的细胞悬液，其获自皮下 E98 肿瘤。3 周以后，在尾部静脉中注射携带单结构域抗体 F8 的噬菌体，5 分钟以后，麻醉小鼠，并用 15 ml 磷酸盐缓冲盐水进行心脏灌注。然后处死小鼠，取出大脑并固定在福尔马林中。用抗 M13 p8 蛋白的抗体 (A)，内皮标记 CD34 (B) 和 glut-1 (C，一种用于之前原

有的大脑毛细管的标记)对连续切片进行染色。A, B 与 C 的比较揭示, 不仅新形成的肿瘤脉管累积噬菌体 F8, 而且未膨胀的大脑脉管也累积噬菌体 F8, 未膨胀的大脑脉管表达 glut-1, 并因此被认为是已经整合到肿瘤中的之前原有的大脑脉管。

图 14: 丛蛋白 D1 的胞外域对肿瘤脉管系统发育的影响。人黑素瘤细胞系 Me157 的双重转染子, 其表达 VEGF-A₁₆₅ 和包括第 1-850 位氨基酸的丛蛋白 D1 的胞外域, 被注射到裸鼠的右颈内动脉。3 周以后, 小鼠经受钆-DTPA 增强的核磁共振成像。图 14A 显示带有 Me157 脑肿瘤的 2 只对照小鼠的 MR 图象, 其只表达 VEGF-A₁₆₅, 图 14B 显示了带有双重转染子的 2 只小鼠的大脑的 MR 图像。脉管渗漏, 如通过 Gd-DTPA 溢出所分析的, 在双重转染子中趋向较少, 其表明 VEGF-A-诱导的脉管渗漏被丛蛋白 D1 胞外域所抵制。更重要地, 双重转染的肿瘤中血管被活化, 如 CD34 的上调所指示的, 然而它们表达 glut-1, 强烈地表明这些脉管是之前原有的脉管, 其通过共同选择现象整合到肿瘤中。注意, 只表达 VEGF-A₁₆₅ 的肿瘤中的血管, 是 glut-1 阴性的, 因此可以认为是新形成的。

图 15: 用重组体丛蛋白 D1 胞外域产生的 Western 印迹, 其在大肠杆菌中表达, 并包含第 47-506 位(第 1 泳道)或第 225-388 位(第 2 泳道)氨基酸。在用丛蛋白 D1 区域 47-506 免疫之前(图 A)和之后(图 B), 对小鼠 25 的血清进行检测。

如图 15B 所示, 小鼠免疫血清特异性识别大肠杆菌重组蛋白 47-506 (52 kDa, 第 1 泳道), 与含有丛蛋白 D1 残基 225-388 的蛋白 (18 kDa 蛋白, 其完全存在于用于免疫的序列内部, 第 2 泳道)。免疫之前的血清不显示这种反应性(图 A)。当在对肺泡的软组织肉瘤的大脑转移性病灶的免疫组织化学染色中进行检测时, 小鼠免疫血清(图 D), 而不是免疫之前的血清(图 C), 显示对血管和肿瘤细胞阳性, 其染色模式与单结构域抗体 A12 的染色模式类似。

图 16: 用获自小鼠 25 的 B-淋巴细胞的单克隆 IgM 抗体进行免疫组织化学。

抗体 11F5H6 和 17E9C12 基于 ELISA 中对蛋白 47-506 的反应性选择，并分析它们在人肿瘤的冷冻切片中检测丛蛋白 D1 的可能性。这些抗体在肉瘤和黑素瘤的大脑转移性病灶中显示强阳性，如图中所例示的。值得注意的，图 C-F 中的插图表示对照染色，其中不包括第一抗体。图 A 和 B 表明，这些抗体不能特别地识别正常脑组织中的脉管结构。

图 17：抗体 11F5H6 的肿瘤返回，以更进一步地评价单克隆抗体 11F5H6 是否能识别肿瘤血管，血管生成 Me157-VEGF-A 肿瘤生长在裸鼠的大脑中，基本上如实施例 10 中所述。抗体 11F5H6 (1 mg) 注射到外侧尾部静脉中，并循环 15 分钟。这个阶段以后，小鼠用 1.3% 异氟烷麻醉，并打开胸部，接着用 20 ml 磷酸盐缓冲盐水进行心脏灌注。该步骤之后，处死小鼠，并取出大脑，急速冷冻或固定于福尔马林中。4 μ m 的冷冻切片用抗 IgM 抗体进行染色。图 17A 中，表明抗体 11F5H6 返回到肿瘤脉管而不是正常脉管中，并在其中累积（比较图 17A 中的抗-IgM 染色与图 17B 中的抗内皮 CD31 染色）。当对未注射的小鼠进行抗 IgM 染色时，观察不到这种染色。因此，11F5H6 是一种允许肿瘤靶向的有希望的抗体。

图 18：类风湿性关节炎的小鼠模型中，丛蛋白 D1 在巨噬细胞中的表达。用单结构域抗体 A12 进行染色。

图 19：丛蛋白 D1 在动脉粥样硬化中的表达。人动脉粥样硬化的蚀斑中巨噬细胞的亚型表达丛蛋白 D1。用单结构域抗体 A12 进行染色。进行双重染色，其显示丛蛋白 D1 成红色，巨噬细胞标记 CD68 成蓝色。紫色表明共表达。

表格表示以下内容：

表 I：用于丛蛋白 D1 表达的各种病理的分析。

表 II：黑素细胞病变中丛蛋白 D1 的表达从开始到恶性病变增加。

具体实施方案

实施例 1

丛蛋白 D1 在肿瘤缔合的血管中的特异性表达

在胚胎发生期间的血管生成脉管中，丛蛋白 D1 不但表达于神经元而且表达于内皮细胞。本发明证实了，丛蛋白 D1 表达于肿瘤缔合的血管，而不是正常的血管。这已经通过小鼠大脑的原位杂交表明，该小鼠大脑包含血管生成的人黑素瘤病变（图 2）。动物肿瘤模型描述于（Kusters, B 等人, Cancer Res 63:5408-5413 (2003)）。简而言之，肿瘤细胞通过微外科手术注射到右颈动脉中，导致肿瘤在右脑半球软组织中的生长。3 周以后，在神经病学症状发病时，处死小鼠，取出大脑并固定于福尔马林中。

使 4 μm 的切片与地高辛标记的有义和反义 RNA 片段进行原位杂交。使用 T3 和 T7 RNA 聚合酶，分别从 PCR 产物转录产生 RNA 探针，其包含 3'-非翻译区的 600 个碱基，而且其旁邻为 T7 和 T3 启动子（Van der Zwaag 等人 (2002), 上文）。

原位杂交中，使用反义 RNA 探针与有义 RNA 探针作为阴性对照，并使用标准方法进行原位杂交。通过 60 $^{\circ}\text{C}$ 熔化石蜡，并用二甲苯与乙醇顺序处理，来对切片进行脱蜡。在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中再水化以后，37 $^{\circ}\text{C}$ 进行蛋白酶 K 消化（10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS 溶于 20 mM Tris-HCl pH7.4/5 mM EDTA 中）15 分钟。切片然后固定于 4% 缓冲的甲醛中 10 分钟，并在 0.1 M 乙酸酐中乙酰化。载玻片接着在 2xSSC（柠檬酸钠/氯化钠）和 milliQ 中洗涤。干燥以后，载玻片与地高辛标记的 RNA 探针在 50% 甲酰胺/2xSSC 中 65 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜。

使用小鼠特异性的丛蛋白 D1 RNA 探针，在血管生成的 Me157 肿瘤的脉管中观察到了高水平的丛蛋白 D1 RNA（图 2）。肿瘤细胞对转录物也是阳性的。小鼠与人丛蛋白 D1 之间的不理想的高源性，导致使用小鼠探针，在人肿瘤细胞中产生了较弱的信号。

实施例 2

丛蛋白 D1 在肿瘤中的表达

为了研究丛蛋白 D1 RNA 在人肿瘤样本中的表达，我们用人特异性的丛蛋白 D1 RNA 探针进行了原位杂交。

在许多人肿瘤中发现了高的丛蛋白 D1 RNA 表达水平，其中（多形性胶质母细胞瘤，肉瘤的大脑转移性病灶，肾细胞癌，结肠和乳房的腺癌），肿瘤脉管系统与肿瘤细胞中都有。表 1 中提供了表达丛蛋白 D1 的肿瘤类型的概述。图 3 显示了原位杂交的一些例子，例如恶性胶质瘤，黑素瘤的大脑转移性病灶与结肠癌的大脑转移性病灶。不仅在肿瘤脉管系统中发现了丛蛋白 D1 RNA，而且在肿瘤细胞本身发现了过量的丛蛋白 D1 RNA。重要地，如图 4A 中，在正常的大脑脉管系统中没有观察到丛蛋白 D1 RNA 表达。图 4B 中，显示了 CD31 染色，其证明丰富的脉管存在于这些切片中。

实施例 3

抗丛蛋白 D1 抗体的制备

为了检测丛蛋白 D1 蛋白，选择对丛蛋白 D1 具有亲和性的抗体。为此，构建表达 Llama 单结构域 V-H 抗体的 M13 pHENIX 噬菌体文库，其通过如所述的从 Llama B-淋巴细胞的 RT-PCR 构建 (van Koningsbruggen, S 等人, J Immunol Methods 279:149-161 (2003))。得到的编码 V-H 单结构域抗体 (sdab) 片段的 cDNAs 的群体，连接到噬菌粒载体 pHENIXHis8 VSV 中 (结果未显示)，得到 C-末端具有 8 * His 标签与 VSV-G-标签的融合产物。大肠杆菌 TG1 细胞中进行电穿孔以后，收集氨苄青霉素抗性克隆，并合并。

得到的文库具有 8×10^8 克隆的复杂组成。百分之八十的质粒包含全长 sdab 插入，如通过 PCR 分析和 sdabs 中的 VSV-G-标签的免疫学点印迹检测所测定的 (参见以下)。噬菌体文库在大肠杆菌 TG1 细菌中繁殖作为噬菌粒。噬菌体颗粒通过用胰蛋白酶敏感的辅助噬菌体 M13K07 (50) 感染进行拯救。通过用 20% 聚乙二醇 / 2.5 M NaCl 沉淀，经过标准方法，从培养物上清液纯化并浓缩噬菌体。

为了选择噬菌体，其显示具有对丛蛋白 D1 的亲合性的抗体，免

疫管用溶于 50 mM NaHCO₃ (pH 9.6) 中的 5 μg/ml KLH 缀合肽 (H₂N-ALEIQRRFPSPTPTNC-CONH₂, 相当于成熟人 PLXND1 蛋白的第 1-16 位氨基酸 (登陆号 AY116661) 4℃ 涂层过夜。值得注意的, 该肽中第 3 位的谷氨酸是小鼠序列中的赖氨酸, 剩余的氨基酸与小鼠 plxnd1 相同。

用 PBS/0.05% 吐温 20 (PBST) 严格洗涤以后, 非特异性结合位点用溶于 PBST 的 5% marvel 封闭 (MPBST, 室温下 (RT) 1 小时), 来自文库原液的 10¹³ 噬菌体颗粒与固定的肽一起室温孵育 90 分钟。用 PBST 与 PBS 严格洗涤以后, 结合的噬菌体通过胰蛋白酶处理洗脱 (10 mg/ml, 室温 30 分钟)。

胰蛋白酶用 1% 新生的小牛血清灭活以后, 洗脱物用于感染对数期的 TG1 细胞, 以扩大结合 PLXND1 的噬菌体, 并计算结合物的数目。

为了富集结合噬菌体, 进行 4 轮选择。从第二轮开始, 对固定于 DNA 结合平板 (Costar) 上的, 非结合肽进行选择, 以防止 KLH-结合物的选择。

检测具有 PCR 证实的全长 sdab 插入的单独的 PLXND1 结合噬菌体对丛蛋白 D1 的特异性。DNA 结合平板或免疫平板 (Nunc) 的孔用 PLXND1 肽或不相关的肽 (1 μg/孔, 溶于 PBS/0.5 M NaCl pH 9.0), 牛血清蛋白 (1 μg/孔, 溶于 50 mM NaHCO₃ pH 9.6) 或人免疫球蛋白 G (1 μg/孔, 溶于 50 mM NaHCO₃ pH 9.6) 涂层过夜。用 MPBST 封闭非特异性结合位点以后, 孔用溶于 MPBST 的噬菌体室温孵育 1 小时, 而且未结合的噬菌体通过严格洗涤除去。使用 HRP-配合的抗 M13 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, 美国) 与四甲基联苯胺, 对结合的噬菌体进行检测 (TMB; bioMérieux B. V., 荷兰)。反应用 2M H₂SO₄ 结束, 使用 ELISA 读数计于 450 nm 测定吸光度来定量酶活性。

使用这种选择过程, 它们表面上的噬菌体展示 V-H 单结构域抗体 A12 与 F8 确定为特异性结合物。图 5A 表明, M13 噬菌体缔合的抗体 A12 与 F8 特异性结合丛蛋白 D1 肽, 而不是牛血清蛋白, 免疫球蛋白

或不相关的肽。

通过 30℃ 培养于 2xTYA 培养基/ 1mM IPTG 中，在对数期大肠杆菌 TG1 细胞中诱导可溶性单结构域抗体的表达。使用含有蛋白酶抑制剂混合物 (Roche, Basel, 瑞士) 的冰冷的 TES 缓冲液 (200mM TrisHCl, 0.5 mM EDTA, 500 mM 蔗糖)，通过渗透裂解来收集 Sdabs。使用小鼠单克隆抗 VSV-G P5D4，碱性磷酸酶-配合的兔抗小鼠免疫球蛋白 (Dako, 丹麦) 与 NBT/BCIP 染色，通过点印迹分析来估算 Sdab 浓度。在 ELISA 中测试 Sdabs 的 PLXND1 肽特异性。单结构域抗体 A12 与 F8 不结合不相关的肽，不结合牛血清蛋白，而且不结合人免疫球蛋白 G (图 5B)。单结构域抗体 A12 与 F8 之间结合的解离常数 (k_d 's)，使用 Biacore 2000 (Uppsala, 瑞典) 生物传感器进行测定。传感器芯片与蛋白质偶联化学制品购自 Biacore AB。PLXND1 肽-KLH 缀合物 (27 μ g/ml, 溶于乙酸钠, pH 4.0) 或 BSA (1 μ g/ml, 溶于乙酸钠, pH 5.0)，使用 N-乙基-N'-(二甲基氨基丙基) 碳二亚胺, N-羟基琥珀酰亚胺，在制造商建议的条件下，与活化的 cm5 表面偶联。未反应的基团通过 1 M 乙醇胺, pH 8.5 进行灭活。

25℃，在 HBS-EP 缓冲液 (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% 表面活性剂 P20) 中，以 10 ml/分钟 的流速，进行动力学的测定。

6 个浓度的 Ni 亲和纯化的 sdabs (在 1 mM 到 50 μ M 的范围内)，用于测定 PLXND1 肽的相互作用的解离常数 (K_d s)。每个实验以后，传感器表面用 10mM NaOH 再生。由 PLXND1-表面的结合减去对照 BSA-表面的结合所定义的特异性结合，使用 BIAevaluation 4.1 软件和 1:1 Langmuir 结合模型进行分析。

单结构域抗体 A12 与 F8 的亲合性分别是 2.1×10^{-8} M 与 3.5×10^{-8} M (图 6)。

实施例 4

用单结构域抗体 A12 和 F8 进行免疫组织化学染色

在羧基末端用 VSV-His 标签对单结构域抗体进行标签, 使能用抗 VSV 抗体进行免疫组织化学染色。按照下列方案, 用单结构域抗体 A12 和 F8 进行免疫组织化学染色。脱蜡以后, 通过用 0.03% H₂O₂ 孵育来封闭内源过氧化物酶活性。根据标准方法, 通过用链霉蛋白酶处理来进行抗原恢复。

接着, 载玻片用正常的马或山羊血清进行预孵育(以分别封闭人与小鼠组织的切片中的非特异性结合位点), 然后用 sdabs 孵育 1 小时。通过用小鼠或兔抗 VSV-G 抗血清(Sigma-Aldrich Chemie B. V., Zwijndrecht, 荷兰), 视情况而定生物素化的抗小鼠或抗兔抗体(Vector, Burlingame, CA), 和抗生物素蛋白-生物素过氧化物酶复合物(Vector, Burlingame, CA) 连续孵育 1 小时, 来检测 Sdabs。最后, 通过与苏木精作为复染色的 3-氨基-9-乙基 carbazole (ScyTek, Utah, 美国) 过氧化物酶反应, 目测检验过氧化物酶。所有步骤于室温进行。

在免疫组织化学染色中, 抗体 A12 和 F8 对丛蛋白 D1 的特异性, 首先通过染色小鼠胚, 其中丛蛋白 D1 在 RNA 水平的表达模式被较好表征(Van der Zwaag 等人 (2002), 上文) 比较分布图与用抗内皮的抗体抗 CD31 (DAKO, Glostrup, 丹麦) 进行的免疫染色来进行检验。在 E16.5 的小鼠胚的小梁骨的生长板中, 观察到 CD31-阳性血管的免疫染色。染色分布图与丛蛋白 D1 转录物的原位杂交较好的相关(图 7A)。血管来源的 PLXND1 表达, 通过用 sdabs 和抗人抗 CD31 抗体(抗人 CD31) 对连续切片进行染色, 更进一步被证实。

实施例 5

用 F8 对肿瘤细胞进行染色

人黑素瘤细胞系 Me157-VEGF-A 的 4 μm 切片大脑的小鼠异种移植(Kusters 等人 (2003), 上文), 用单结构域抗体 F8 进行染色, 根据实施例 4 中举例说明的方案。抗体明显地识别肿瘤血管上的丛蛋白 D1 (图 7B)。为了更进一步地研究丛蛋白 D1 蛋白在肿瘤上的表达,

与之有关的石蜡包埋或各种来源（多形性胶质母细胞瘤（图 8A），黑素瘤的大脑转移性病灶（图 8B），结肠癌（图 8C）和肾细胞癌（图 8D））的肿瘤组织，用抗 PLXND1 sdabs 进行免疫染色。使用抗体的免疫组织化学和对连续切片上的抗人 CD31 染色进行的比较，表明在所有检验的肿瘤上都表达，并证实丛蛋白 D1 在肿瘤细胞和肿瘤血管中蛋白水平的表达。

实施例 6

丛蛋白在恶性细胞上表达的时间选择

为了研究丛蛋白 D1 的表达是否发生在恶变前的细胞中，我们染色了黑素瘤的一系列进展，包括良性痣，发育异常的痣，放射状生长期的黑素瘤，侵入性黑素瘤和散布的黑素瘤。良性痣和发育异常的痣中的黑色素细胞不表达该蛋白，但是恶性转化的细胞，在放射状生长期和径向生长期肿瘤中对该蛋白都是阳性的（图 9 和表 II）。

实施例 7

丛蛋白 D1 表达细胞的活化状态

丛蛋白 D1 表达与肿瘤血管中内皮细胞的活化状态相关。用 ZD6474，一种 VEGFR2 和 EGFR 的抑制剂进行处理，预先表明阻断小鼠脑肿瘤模型中的血管发生，其导致从血管生成到非血管生成，脉管共同选择表型的表型转移（43）。用 ZD6474 进行处理，导致肿瘤缔合血管中丛蛋白 D1 的表达以剂量依赖的方式降低（图 10）。因此，丛蛋白 D1 表达是活化的内皮细胞的特征。

实施例 8

用 A12 对正常组织进行免疫组织化学

丛蛋白 D1 在正常大脑，心脏，皮肤，肾，脾，肠，子宫内膜中的表达，使用抗体 A12 通过免疫组织化学进行检验。增殖的子宫肌层中的脉管表达丛蛋白 D1，其表明丛蛋白 D1 不仅与病理学的血管发生

相关，而且与生理学的血管发生相关（未显示）。

在有些情况下，用 CD68 巨噬细胞标记进行共同免疫染色。这些染色揭示，巨噬细胞的亚群表达该蛋白（图 11）。皮肤中的成纤维细胞和一些增殖的肠上皮细胞中也发现表达丛蛋白 D1（未显示）。

实施例 9

炎症性疾病中巨噬细胞的染色

为了更进一步检验丛蛋白 D1 在患有显著的巨噬细胞牵连的疾病中的牵连，对动脉粥样硬化的蚀斑，多发性硬化和类风湿性关节炎进行免疫组织化学染色。巨噬细胞表达丛蛋白 D1。

实施例 10

丛蛋白 D1 通过静脉注射到达肿瘤脉管

丛蛋白 D1 蛋白在肿瘤血管中的表达，表明丛蛋白 D1 通过静脉注射是可到达的。为了测试这个，表达 VEGF-A₁₆₅ 同工型的 2×10^5 个稳定转染的 Me157 细胞，显微外科手术注射到 BALB/C 裸鼠的右侧内颈动脉。18 天以后，当动物显示神经病学症状时 (Kusters 等人, (2003), 上文), 10^{12} 克隆 A12, F8 的 PLXND1 结合噬菌体或不相关的噬菌体注射到裸鼠的尾部静脉中，其带有确定的 Me157-VEGF-A₁₆₅ 大脑转移性病灶 (A12 的 $n = 2$, F8 的 $n = 4$, 对照噬菌体的 $n = 3$)。

在两组其它的小鼠中，我们静脉内注射 30 μ g sdab F8 或对照 sdab (每组的 $n = 2$)。5 分钟以后，小鼠使用异氟烷，麻醉，打开胸部，并用 15 ml 磷酸盐缓冲盐水 (PBS)，通过心脏灌注把未结合的噬菌体从系统洗涤掉。然后，通过颈部脱位处死小鼠，大脑，心脏，肺，肝脏，脾和肾的一部分在液氮中迅速冷冻。

其他的部分固定于福尔马林中进行石蜡包埋。短暂的苏木精染色以后，使用激光捕获解剖显微术 (Leica 激光解剖显微镜)，从 10 μ m 大脑切片解剖肿瘤。从肿瘤对侧的，未受影响的大脑解剖相当的区域。接着，使用胰蛋白酶处理，从解剖的组织样本洗脱噬菌体，并用于感

染 TG1 细胞。对许多形成克隆的噬菌体计数，并用作肿瘤返回的测定。为了通过噬菌体或 sdabs 定性确定肿瘤返回，4 μm 切片，与用于激光解剖的切片连续，用抗 M13 p8 抗体 (Abeam Limited, Cambridge, UK) 染色以检测结合的噬菌体，或抗 VSV-G 抗体 (Sigma-Aldrich) 染色以检测单结构域抗体。

M13 噬菌体的静脉注射显示，在带有血管生成的黑素瘤病变的小鼠中，抗 PLXND1 单结构域抗体 F8，而不是携带不相关的单结构域抗体的噬菌体，导致噬菌体在肿瘤脉管中的累积，而不是噬菌体在正常大脑脉管，或肝脏，脾，肾的血管中可检测的特异性存在（图 12A, D, 未显示）。这表明丛蛋白 D1 表达于内皮细胞的腔侧，具体地表达于肿瘤血管中，因此可用作可靶向的标记。

部分纯化的单结构域抗体的注射从而导致优先的肿瘤局部化（图 12C）。在后者的情况中，人们认为 20 kDa 的小分子量的单结构域抗体能从高渗透性的肿瘤脉管溢出，并在肿瘤间质中累积。这种后面的作用是非特异性的，而且在不相关的单结构域抗体中也观察到。可以想象，小分子量和相对低亲和性的抗体具有通过肿瘤的较高渗透性，并且更适于靶向肿瘤细胞间隔。

实施例 11

F8 在肿瘤血管中的累积

用 E98，神经胶质瘤异种移植系经头盖注射小鼠。E98 肿瘤作为皮下肿瘤保持。杀死带有皮下 E98 肿瘤的 Balbc/c nu/nu 无胸腺小鼠，并取出肿瘤。肿瘤用无菌的解剖刀切碎，而且匀浆通过无菌的 70 μm 目尼龙过滤器。20 μl 得到的细胞悬浮液，包含 150,000 细胞，经头盖注射到裸鼠的脑中。3 周以后，M13 噬菌体显示单结构域抗体 F8 被静脉内注射，5 分钟以后，小鼠用 15 ml 磷酸盐缓冲盐水进行心脏灌注。

杀死小鼠，取出大脑并固定在福尔马林中。4 μm 切片用抗 M13 抗体进行免疫组织化学，而且连续切片用抗 CD34 的抗体（内皮标记）

和 glut-1 (一种用于之前原有的大脑内皮细胞的标记 (Kusters, B 等人, *Cancer Res* 62: 341-345 (2002)) 进行免疫组织化学染色。

带有抗 丛蛋白 D1 单结构域抗体的噬菌体在肿瘤缔合的血管, 而不是正常脉管中特异性累积 (图 13)。重要地, 噬菌体也在 glut-1 阳性的肿瘤血管中累积, 因此其可以被认为是之前原有的血管, 而不是新形成的血管。这表明, 不仅肿瘤中血管生成的血管, 而且非血管生成的, 但是活化的血管, 也经受了用抗丛蛋白 D1 抗体进行的靶向。

实施例 12

丛蛋白 D1 胞外域的重组体抑制血管形成

人黑素瘤 Me157 细胞用载体 pIRESHyg 中的 VEGF-A₁₆₅ 编码序列转染。通过在补加 10%胎牛血清 (FCS) 和青霉素/链霉素的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM), 200 μg/ml 潮霉素中培养, 来选择稳定转染的细胞。

因为潮霉素抗性基因的表达通过体内的核糖体进入位点 (IRES) 与 VEGF-A cDNA 的表达相关, 所有的潮霉素抗性细胞也将产生 VEGF-A 蛋白。稳定转染的 Me157-VEGF 细胞, 接着用 pIRESneo-丛蛋白 D1 ED 转染。该矢量包含编码从第 1-2745 位核苷酸的胞外域的 cDNA, 其通过 IRES 与新霉素抗性基因的表达相关。

双重转染子被注射到裸鼠的右侧颈动脉, 并允许肿瘤发育。在神经病学症状发病时 (大约 18 天), 对小鼠进行钆-DTPA 增强的核磁共振成像。随后, 处死小鼠, 把大脑固定于福尔马林中, 并经受免疫组织化学染色以检测肿瘤脉管系统。

当与对照进行比较时, 其包括只表达 VEGF-A 的肿瘤, T1-重量的核磁共振成像 (MRI) 中 Gd-DTPA 的增强较少 (比较图 14A 与 14B, 图 14A 代表 Me157-VEGF-A₁₆₅ 肿瘤的 2 个实例, 图 14B 代表 Me157-VEGF-A₁₆₅/丛蛋白 D1-ED 肿瘤的 2 个实例)。在表达 VEGF-A₁₆₅ 和丛蛋白 D1 胞外域的肿瘤中, 脉管系统显示内皮标记 CD34 (一种由 VEGF-A₁₆₅ 内皮活化的标志) 的上调。在只表达 VEGF-A₁₆₅ 的肿瘤中,

脉管系统是脑内皮细胞标记 glut-1 阴性的,其与这脉管是新产生的并因此缺乏大脑-内皮细胞特异性标记的事实是一致的。如图 12B 中可以观察到的,脉管与也表达丛蛋白 D1 胞外域,表达 glut-1 的肿瘤相关。这是这些脉管实际上是之前原有的的强烈指示。因此,丛蛋白 D1 胞外域不能通过 VEGF-A₁₆₅ 防止内皮细胞的活化,但是它阻止了新脉管系统的形成。

实施例 13

抗丛蛋白 D1 的高亲和性抗体

使用表达载体 pQE16 (Qiagen),在大肠杆菌 M15 pREP4 细胞中,表达相当于第 47-506 位氨基酸的蛋白序列(成熟蛋白质的 459 个最氨基末端的氨基酸)。重组蛋白质,其在细菌细胞中作为包涵体产生,溶于变性缓冲液中,其含有 4M 尿素和 1 mM 二硫苏糖醇(DTT),然后用 PBS 逐步透析。该蛋白用于根据标准方法,免疫 BALB c/c 小鼠 25。

图 15 显示了小鼠血清的特征。如图 15B 所示,小鼠免疫血清特异性识别大肠杆菌重组蛋白 47-506 (52 kDa, 第 1 泳道),和 18 kDa 的第二个重组体丛蛋白 D1 序列,其包括第 225-388 位氨基酸(因此完全存在于用于免疫的序列内部,第 2 泳道)。免疫之前的血清不显示这种反应性(图 A)。

当在对肺泡的软组织肉瘤的大脑转移性病灶的免疫组织化学染色中进行检测时,小鼠免疫血清(图 D),而不是免疫之前的血清(图 C),显示对血管和肿瘤细胞阳性,染色模式与单结构域抗体 A12 的染色模式类似。因此,这种小鼠的 B-淋巴细胞认为适于用骨髓瘤细胞系 SP2/0 产生脾 B-淋巴细胞的杂交瘤。

基于 ELISA 中对蛋白 47-506 的反应性,从这些杂交瘤中选择许多抗体生产细胞系,并分析它们在人肿瘤的冷冻切片中检测丛蛋白 D1 的可能性。这些抗体中,11F5H6 和 17E9C12, IgM 亚型的两个抗体,在肉瘤和黑素瘤的大脑转移性病灶中显示强阳性,如图 16 中举例说明的。图 C-F 中的插图表示对照染色,其中不包括第一抗体。图 A 和 B

表明，这些抗体不能特别地识别正常脑组织中的脉管结构。

实施例 14

单克隆抗体 11F5H6 能识别肿瘤血管

为了更进一步地评价单克隆抗体 11F5H6 是否能识别肿瘤血管，血管生成 Me157-VEGF-A 肿瘤生长在裸鼠的大脑中，基本上如实施例 10 中所述。抗体 11F5H6 (1 mg) 注射到外侧尾部静脉中，并循环 15 分钟。这个阶段以后，小鼠用 1.3% 异氟烷麻醉，并打开胸部，接着用 20 ml 磷酸盐缓冲盐水进行心脏灌注。

该步骤之后，处死小鼠，并取出大脑，急速冷冻或固定于福尔马林中。4 μ m 冷冻的切片用抗 IgM 抗体染色。图 17A 中，表明抗体 11F5H6 返回到肿瘤脉管而不是正常脉管中，并在其中累积（比较图 17A 中的抗-IgM 染色与图 17B 中的抗内皮 CD31 染色）。当对未注射的小鼠进行抗 IgM 染色时，观察不到这种染色。因此，11F5H6 是一种允许肿瘤靶向的有希望的抗体。

实施例 15

丛蛋白 D1 在类风湿性关节炎中的表达

在类风湿性关节炎的小鼠模型中，丛蛋白 D1 在巨噬细胞中表达（图 18）。人动脉粥样硬化的蚀斑中巨噬细胞的亚型也表达丛蛋白 D1（图 19）。用单结构域抗体 A12 进行染色。图 19 中，进行双重染色，其显示丛蛋白 D1 呈红色，巨噬细胞标记 CD68 呈蓝色。紫色表明共表达。

序列

A12 (SEQ ID NO: 1) :

```
ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGC  
CGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGG  
TCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCAGTATCAGTATCAATAACTGGGGCTG
```

GTACCGCCAGGCTCCAGGAAAACAGCGCGAGCGGGTCGCAGCTATATCTGGTGGTGGTA
 AAACAGTCTATGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
 AACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGATACGGCCGTCTATTACTG
 TAGAGCAGTCCGGAAAAGTACGGGTGGCTTAGGGGGCTTGACGTCTGGGGCCAGGGGA
 CCCAGGTCACCGTCTCCGCAGAACCCAAGACACCAAAAACCACAACCAGCGGCCGCACAT
 CATCACCATCATCACCATCATTATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGAAGGGGGC
 CGCATAG

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPA
 MAQVQLQESGGGLVQPGGSL
 RLSCAASGSSISINNWGWYR
 QAPGKQRERVAAISGGGKTV
 YADSVKGRFTISRDNKNTV
 YLQMNSLKPEDTAVYYCRAV
 RKSTGWLRLDVGQGTQVT
 VSAEPKTPKPQAAHHHHH
 HHHYTDIEMNRLGKGAAD

F8 (SEQ ID NO: 2) :

ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGC
 CGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGAGAC
 TCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTACTTTGATTATGGCCTG
 GTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAATTTGTAGCGGCGATTAGCCGGGGTGGCG
 GTAGCACAAGCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
 AAGAACGCGGTGTATCTACAAATGAACAGCCTGAAACCTGATGACACGGCCGTCTATTA
 CTGTAATGCCCGGTACGGTAGCCGAATTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCT
 CCTCAGAACCCAAGACACCAAAAACCACAACCAGCGGCCGCACATCATCACCATCATCAC
 CATCATTATACA GACATAGAGATGAACCGACTTGGAAGGGGGCCGCATAG

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPA
 MAQVQLQESGGGLVQAGDSL
 RLSCAASGRFTFSTLIMAWFR
 QAPGKEREFVAAISRGGGST
 SYADSVKGRFTISRDNKNA
 VYLMNSLKPDDTAVYYCNA
 RYGSRIYWGQGTQVTVSSEP
 KTPKPQAAAHHHHHHHHYT
 DIEMNRLGKGA@

序列单链抗体，来源于抗体 11F5H6 (SEQ ID NO : 3)

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADYKDIVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSI
 VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVFNRLSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDL
 GYYCFQGSHPVPLTFGAGTKLELKRGGGSGGGGSGGGGRAPGGGGSEVQLQQSGPELVK
 PGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQKFKGKATLTV
 DKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARAITTDGWFAYWGQGLVTVSAAAHHHHHHHHY
 TDIEMNRLGKGA

序列单链抗体，来源于抗体 17E9C12 (SEQ ID NO : 4)

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADYKDIQMTQTPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVL
 YSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDL
 AVYYCHQYLSSWTFGGGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELVKPG
 ASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQKATITADT
 SSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCAMDYWGQGTSVTVSSAAAHHHHHHHHYTDIEMNRLGK
 GAA

表 1
丛蛋白 1 在人组织中的表达

组织	PLXND1 表达
<u>恶性的</u>	
食管腺癌 (n=1)	肿瘤脉管和肿瘤细胞
直肠腺癌 (n=5)	肿瘤脉管, 肿瘤细胞和巨噬细胞
前列腺癌 (n=1)	肿瘤脉管和肿瘤细胞
股骨的肺泡软组织癌 (n=1)	肿瘤脉管和肿瘤细胞
星形细胞瘤 (n=1)	肿瘤脉管
肺的类癌瘤 (n=1)	肿瘤脉管, 肿瘤细胞和巨噬细胞
乳房的直肠原位癌 (n=5)	肿瘤脉管, 肿瘤细胞, 巨噬细胞, 成纤维细胞
滤泡性淋巴瘤 (n=8)	肿瘤脉管
多形性胶质母细胞瘤 (n=3)	肿瘤脉管和肿瘤细胞
腺癌的脑转移性病灶 (n=4) (乳房, 肺, 直肠)	肿瘤脉管和肿瘤细胞
肺泡软组织癌的脑转移性病灶 (n=1)	肿瘤脉管和肿瘤细胞
肾细胞癌的脑转移性病灶 (n=1)	肿瘤脉管和肿瘤细胞
腺癌结肠的肝脏转移性病灶 (n=2)	肿瘤脉管, 肿瘤细胞和巨噬细胞
乳房的原位小叶癌 (n=3)	肿瘤脉管和肿瘤细胞弱阳性, 巨噬细胞和成纤维细胞
直肠乳房癌的淋巴结转移性病灶 (n=1)	肿瘤细胞和一些肿瘤脉管
腺癌结肠的子宫转移性病灶 (n=1)	肿瘤细胞和肌成纤维细胞
肾细胞癌 (n=1)	肿瘤脉管系统和肿瘤细胞
前列腺的 Urothelial 细胞癌 (n=2)	肿瘤脉管, 肿瘤细胞和巨噬细胞
<u>非恶性的</u>	
膀胱 (n=1)	巨噬细胞
血管, 动脉粥样硬化 (n=6)	巨噬细胞
骨髓 (n=2)	
大脑皮质 (n=1)	一些神经元, 核周的
脑, 阿尔茨海默 + CAA (n=1)	
子宫内膜	
增殖阶段 (n=5)	巨噬细胞
分泌阶段 (n=4)	巨噬细胞

分泌/月经阶段 (n=1)	巨噬细胞
内在性子宫内膜异位症 (n=1)	巨噬细胞
心脏 (n=1)	一些肌细胞, 核周的
大肠 (n=1)	上皮细胞, 巨噬细胞, 成纤维细胞的一些腔染色
肝脏 (n=1)	肝脏细胞核周颗粒状, 巨噬细胞
肺 (n=2)	巨噬细胞
乳房 (n=2)	一些上皮细胞, 核周的
乳房, 直肠增生 (n=1)	病灶上皮细胞, 核周的, 巨噬细胞
食管 (n=1)	巨噬细胞
小肠 (n=1)	上皮细胞, 巨噬细胞, 成纤维细胞的一些腔染色
脾 (n=1)	巨噬细胞

表 2

丛蛋白在黑素瘤进展系列中的表达

	缺乏	适度	丰富
痣细胞 痣 (n = 18)	18		
典型的痣 (n = 14)	14		
原位黑素瘤 (n = 5)	5		
原发黑素瘤 (n = 26)	4	2	20
黑素瘤转移性病灶			
淋巴结 (n = 9)	1	2	6
皮肤 (n = 5)	1	1	3
大脑 (n = 5)			5
肺 (n = 1)			1

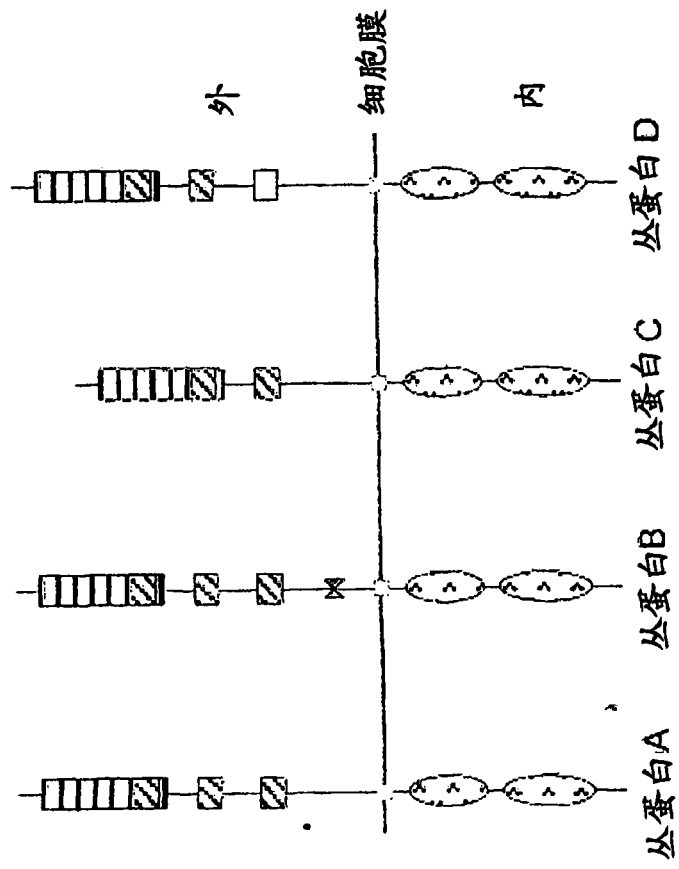


图1

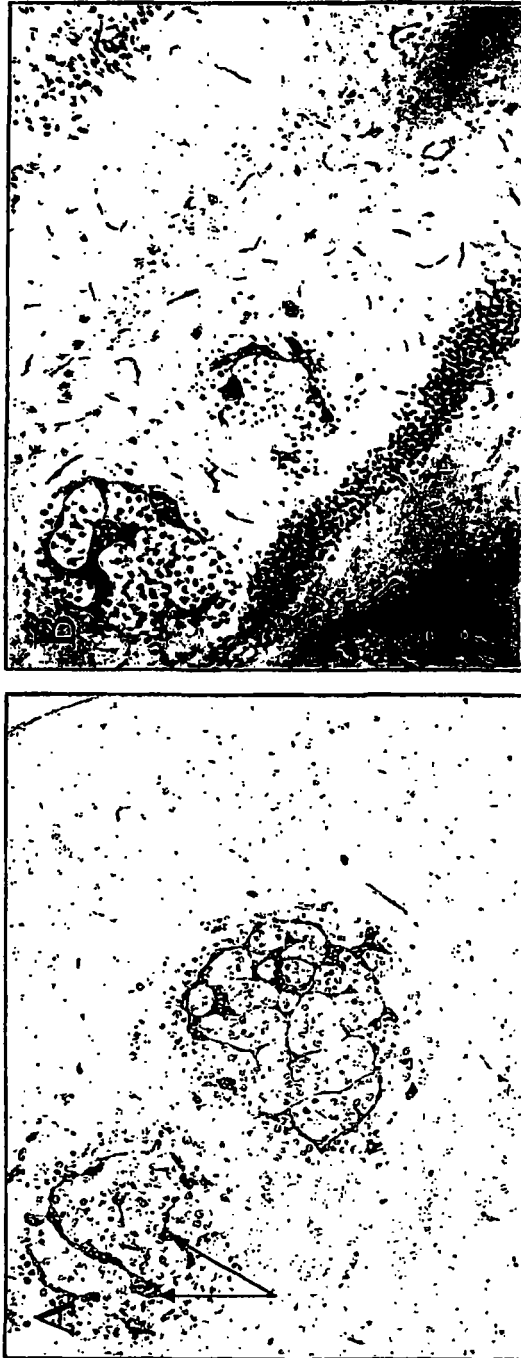


图2

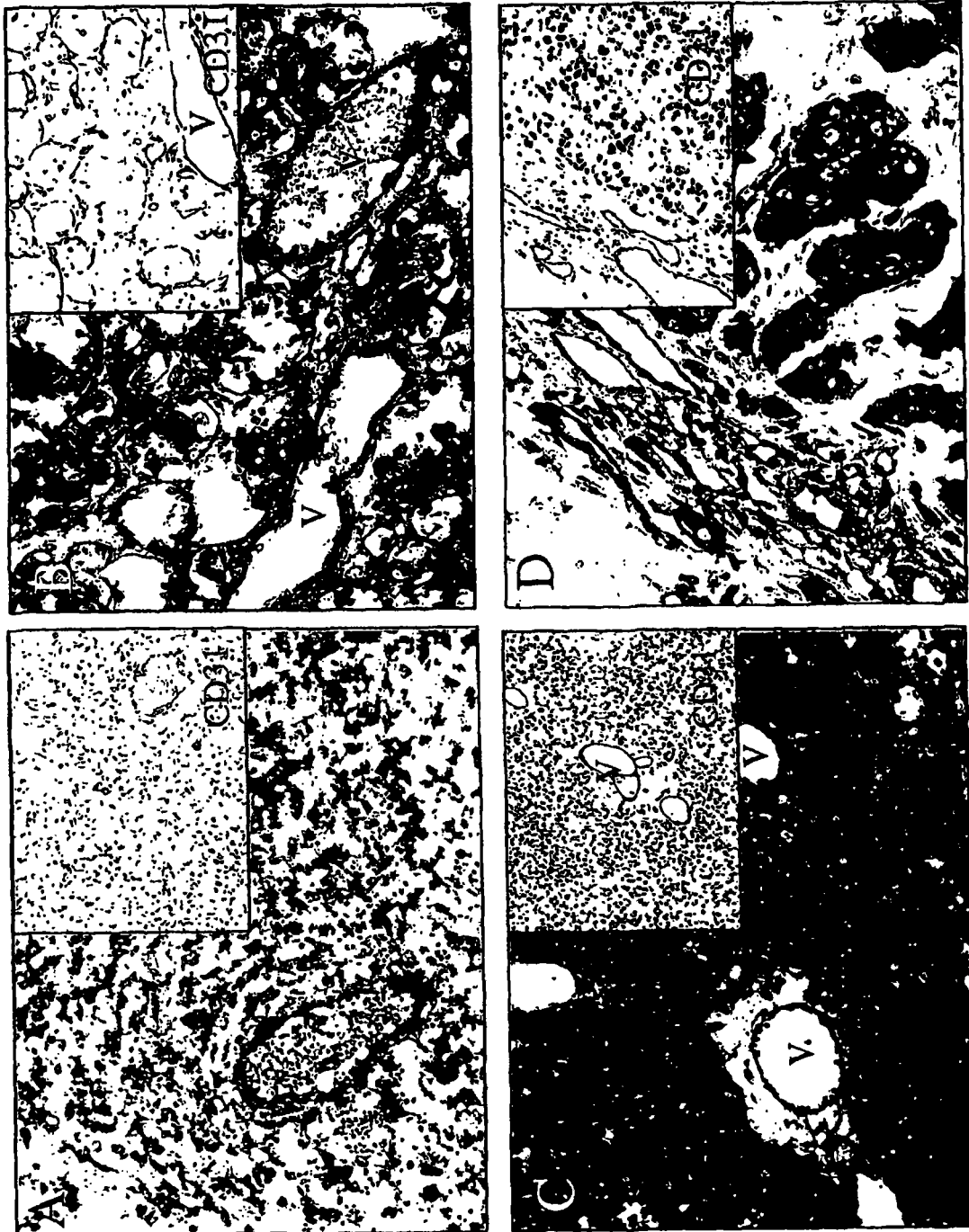


图 3

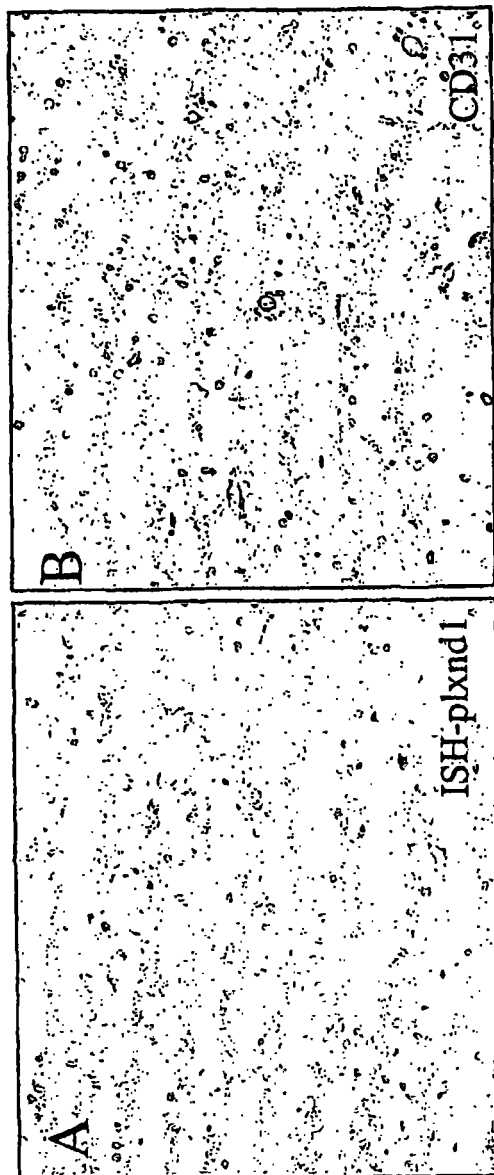


图4

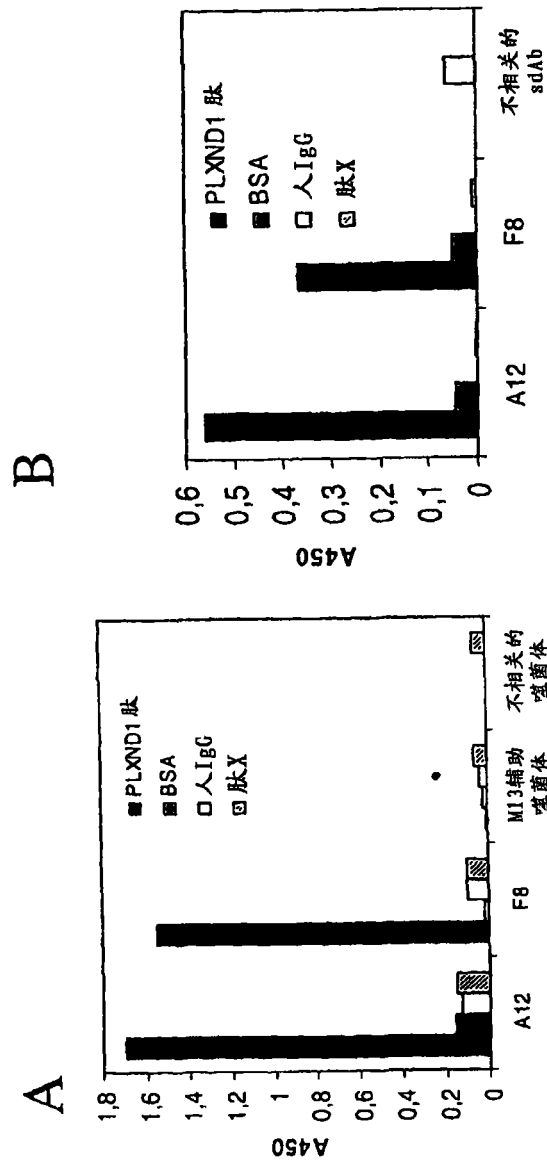


图5

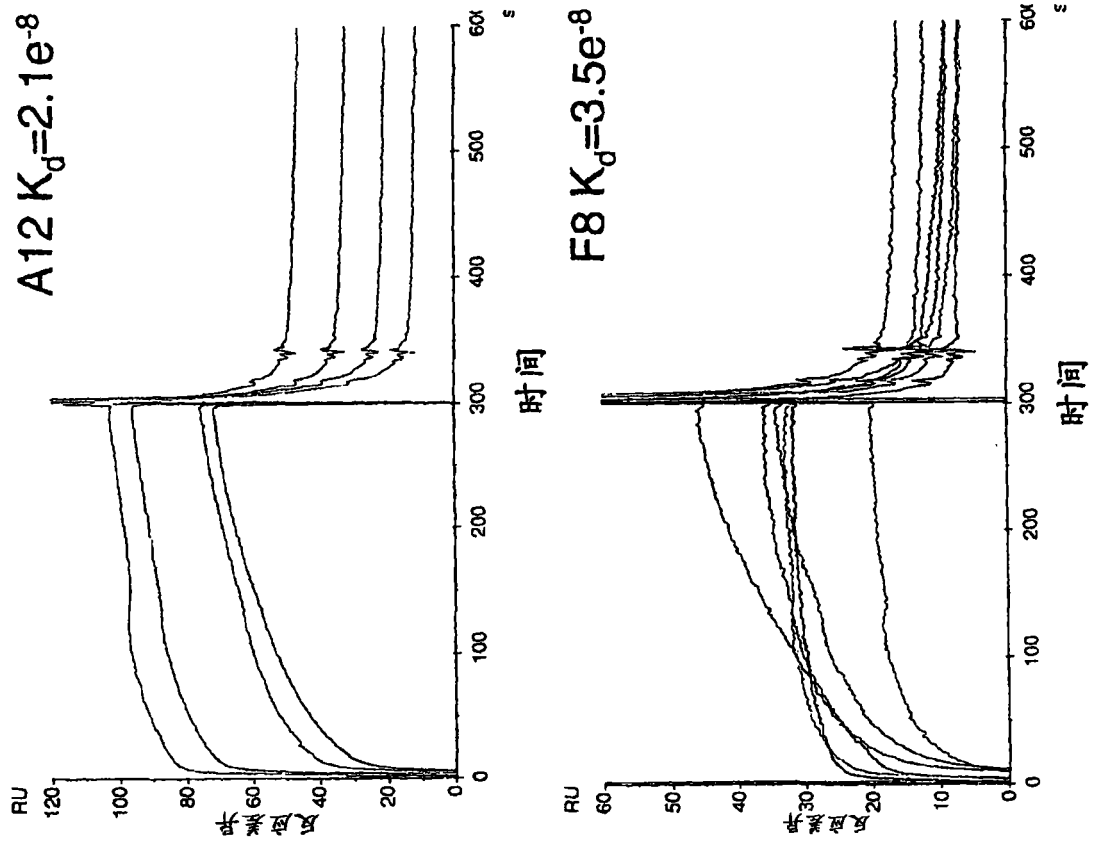
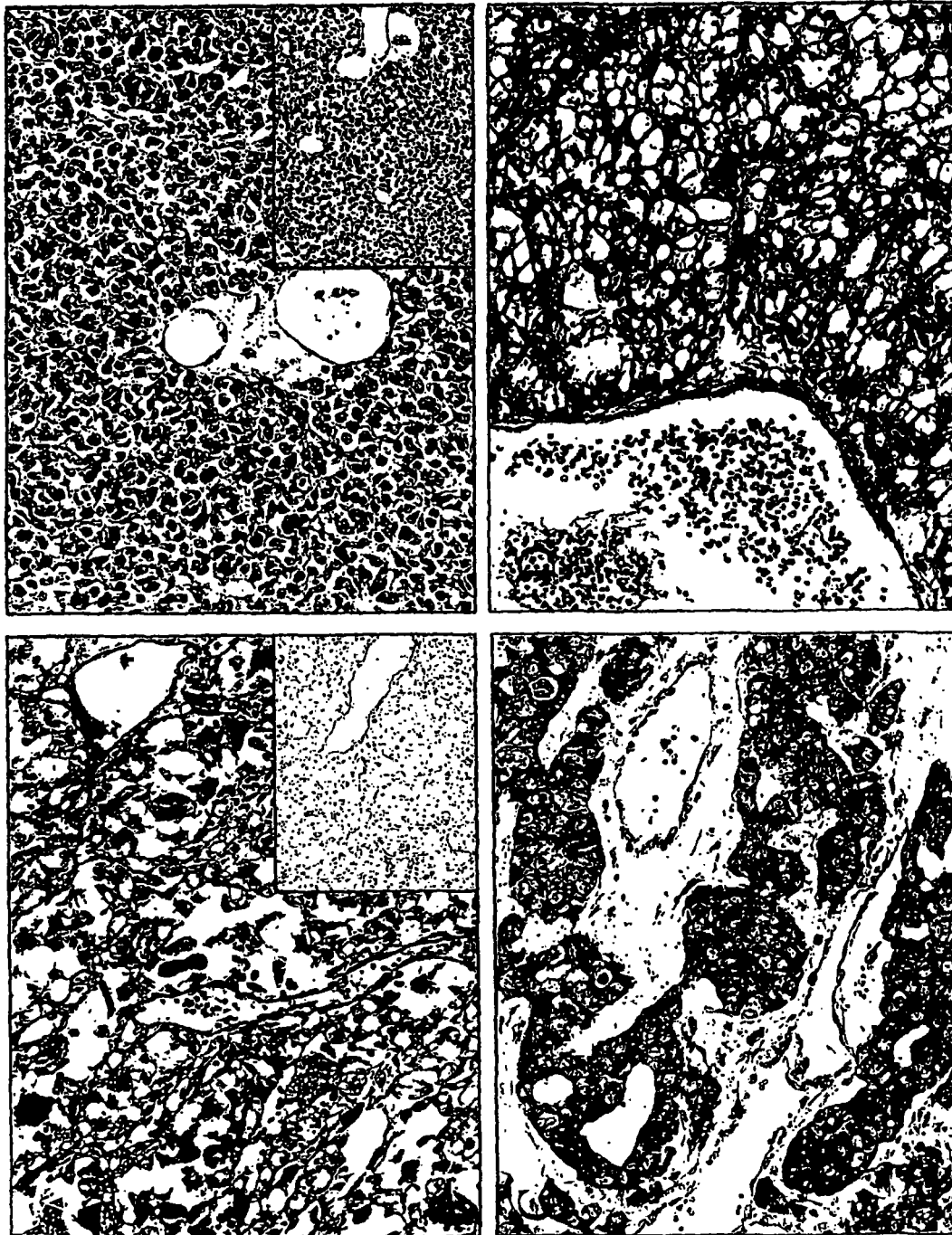


图6



图7



8
8

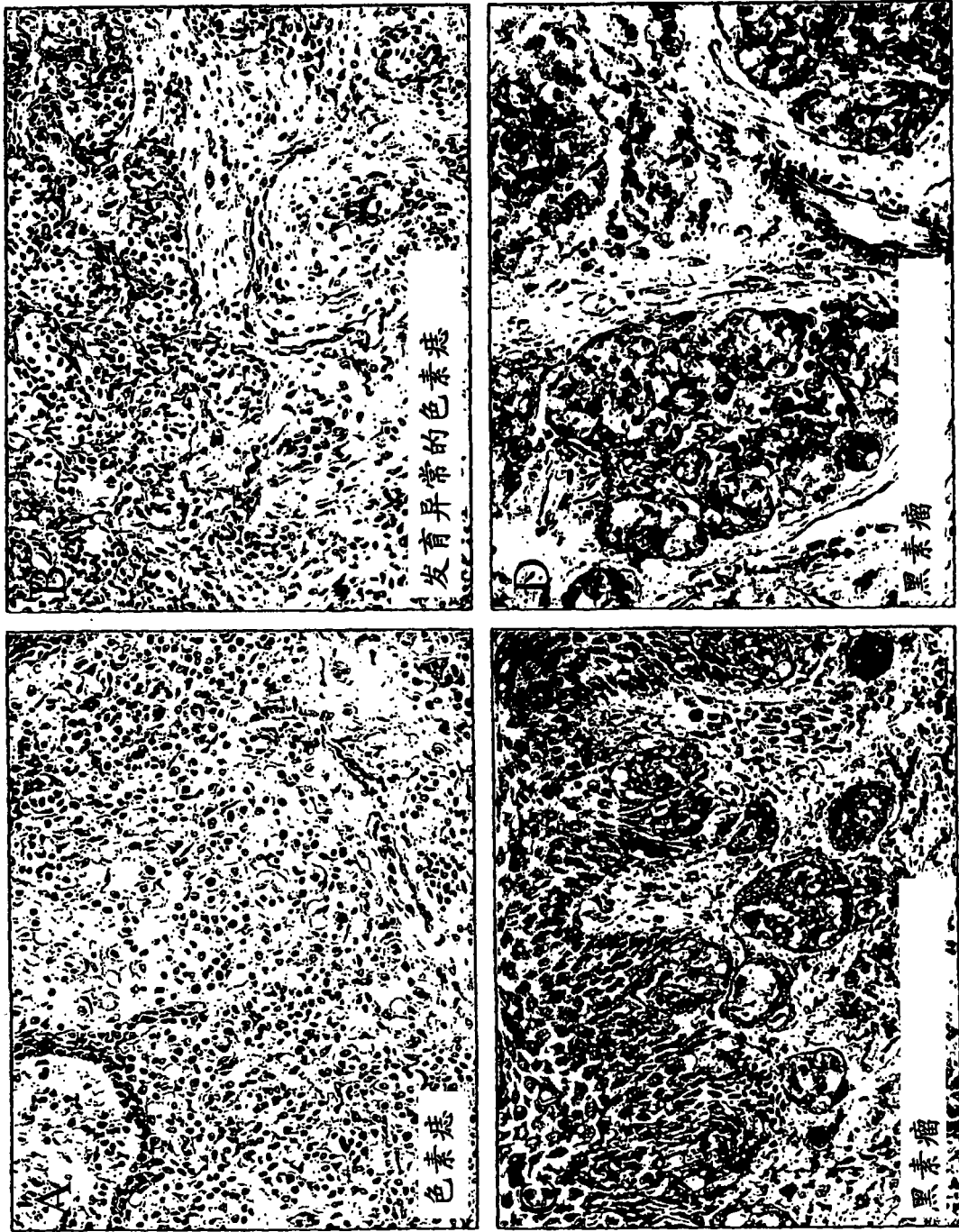


图9

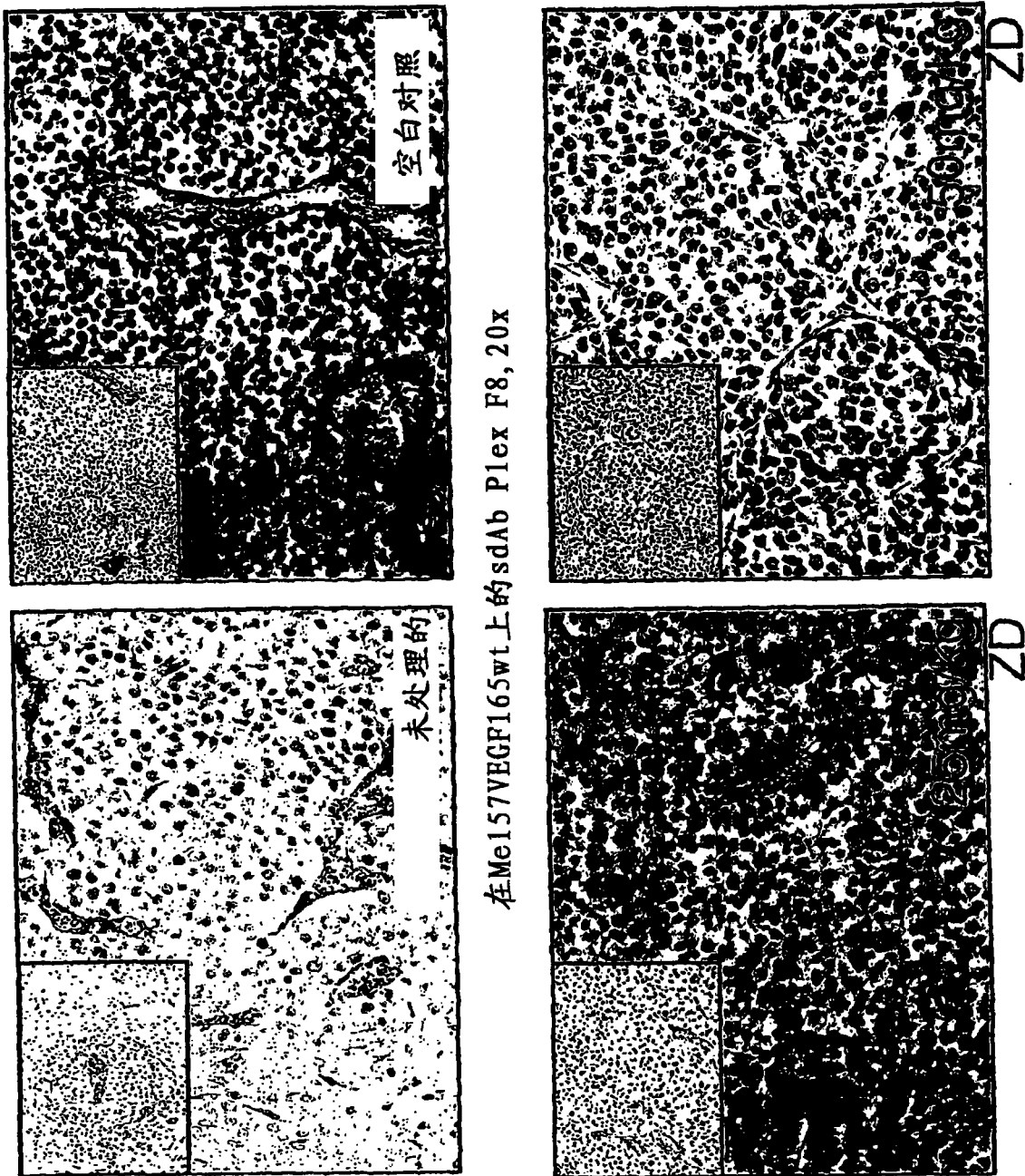


图10



图11

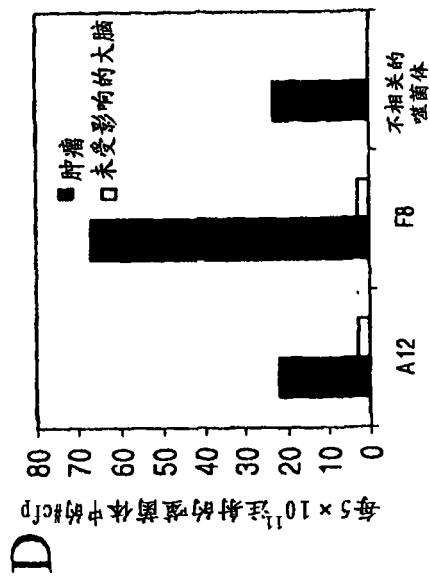


图12

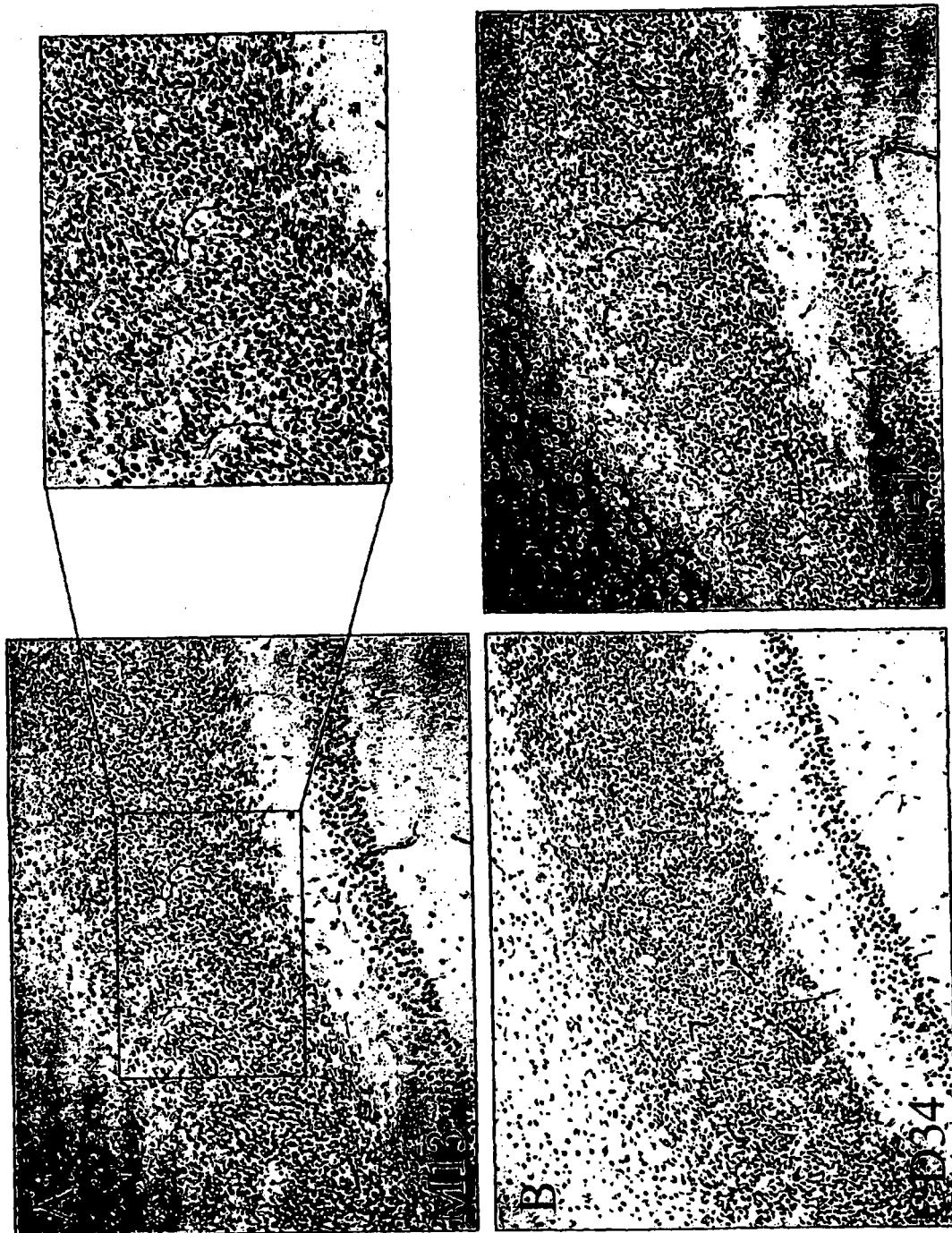


图13

Me157-VEGF-A165 Me157-VEGF-A165/PLEXIN D1-ED

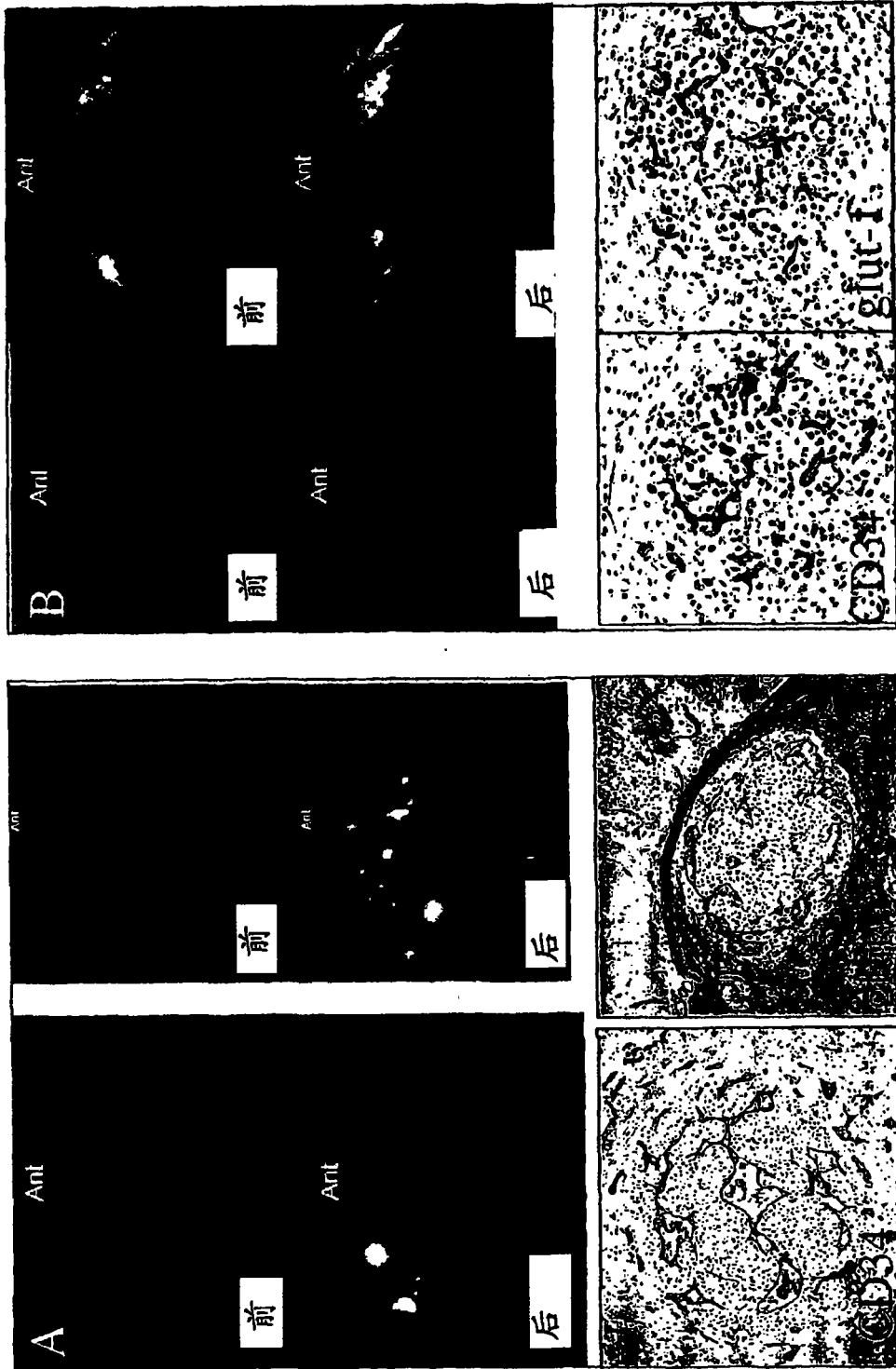


图14

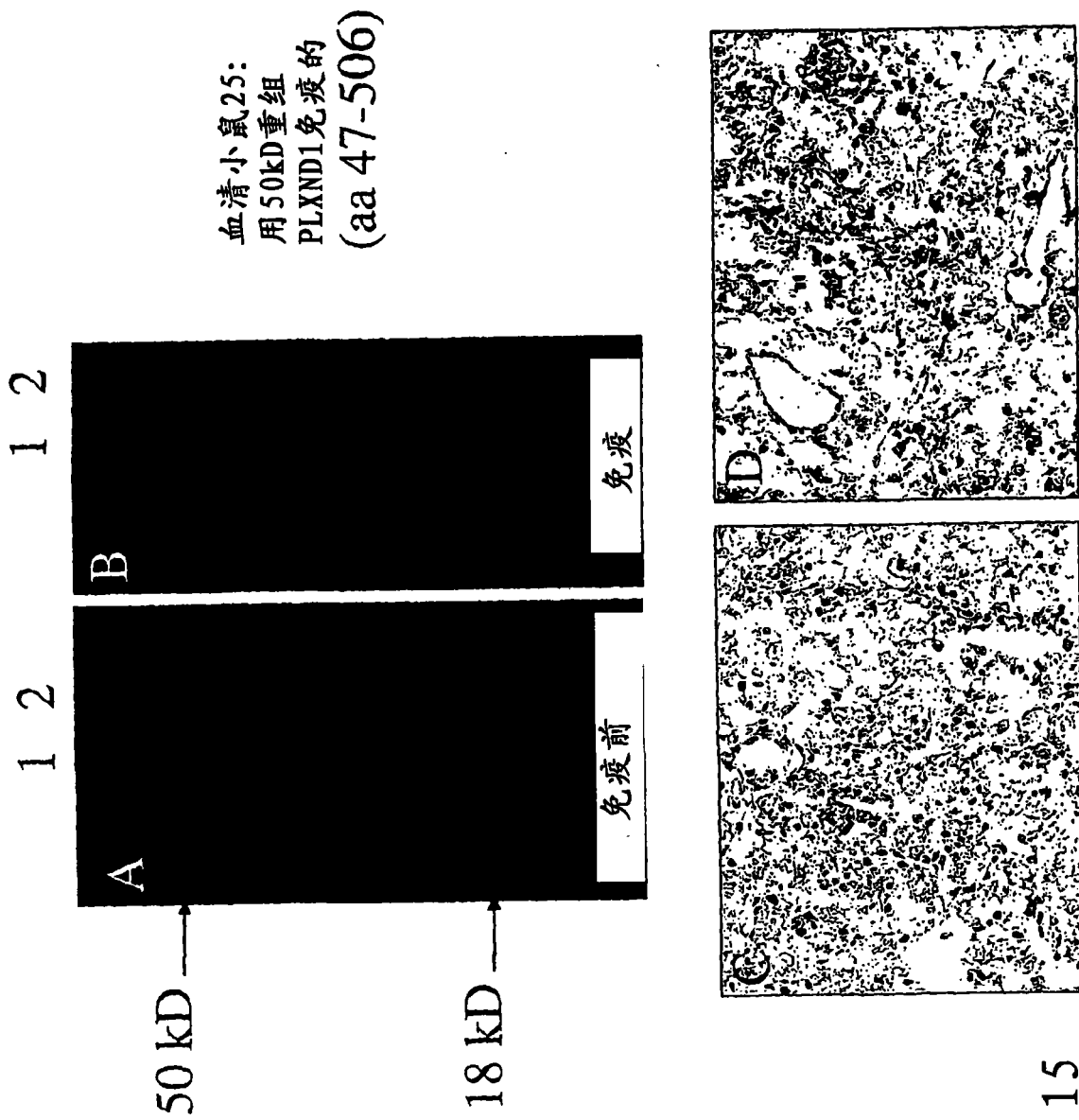
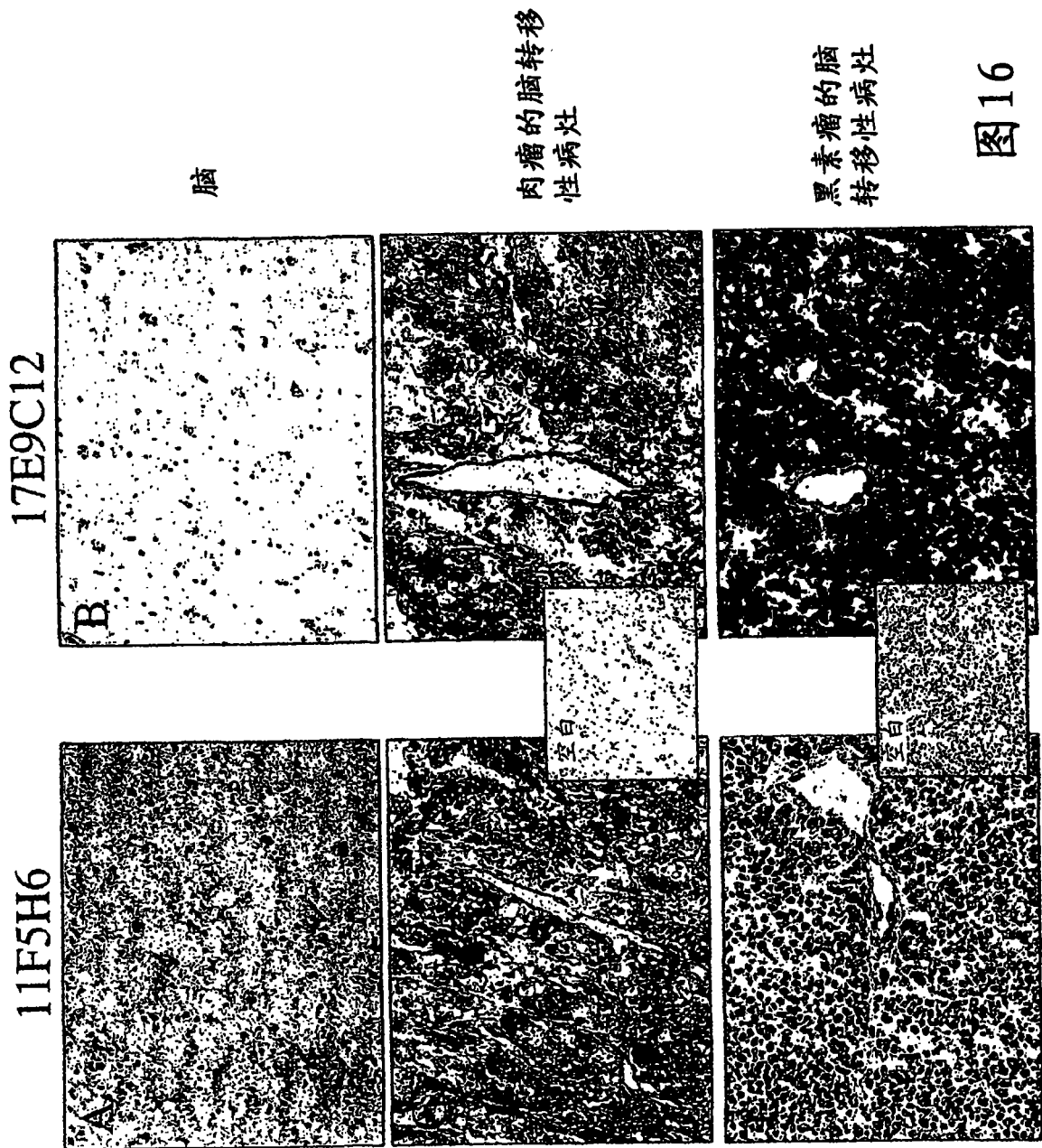


图15



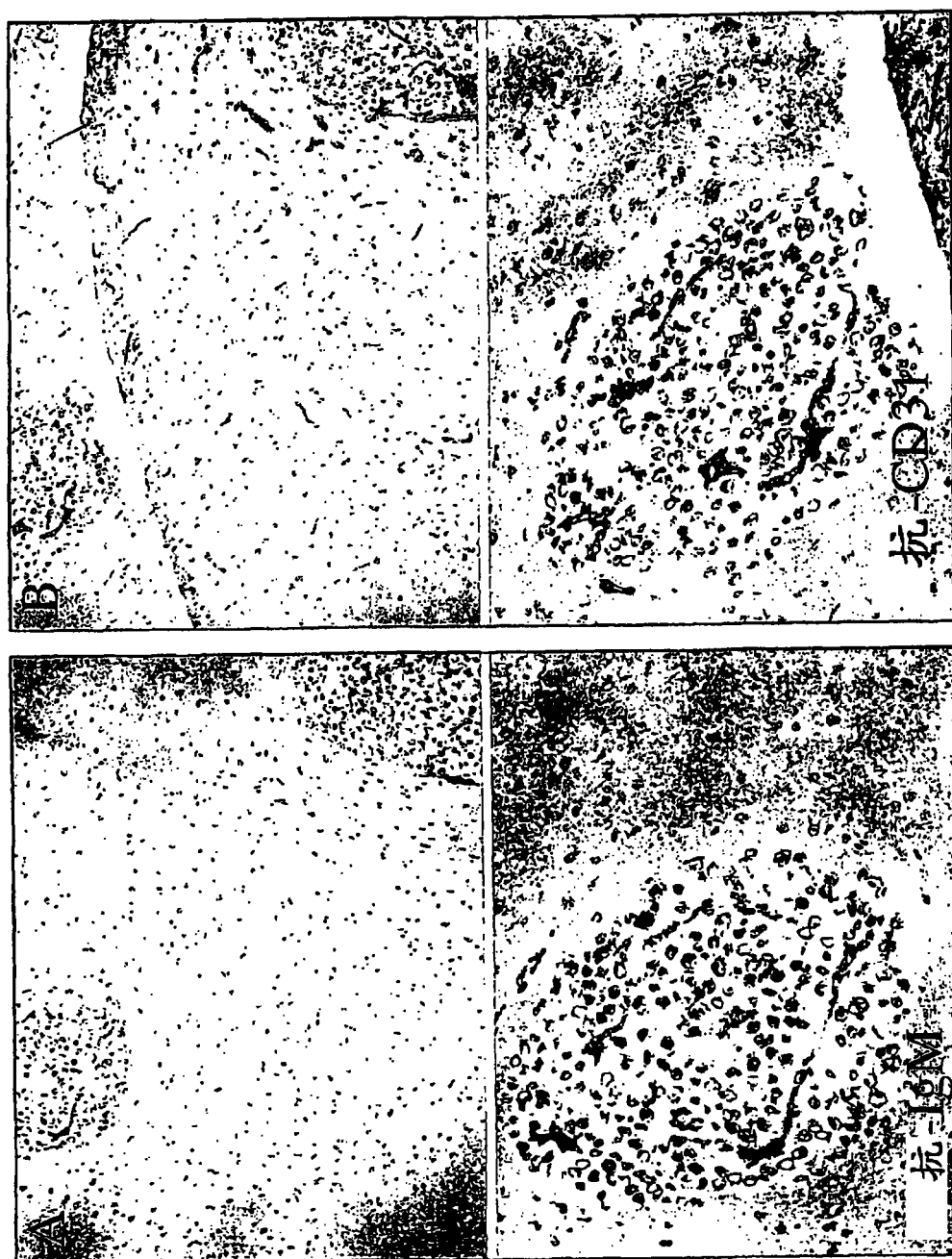


图17

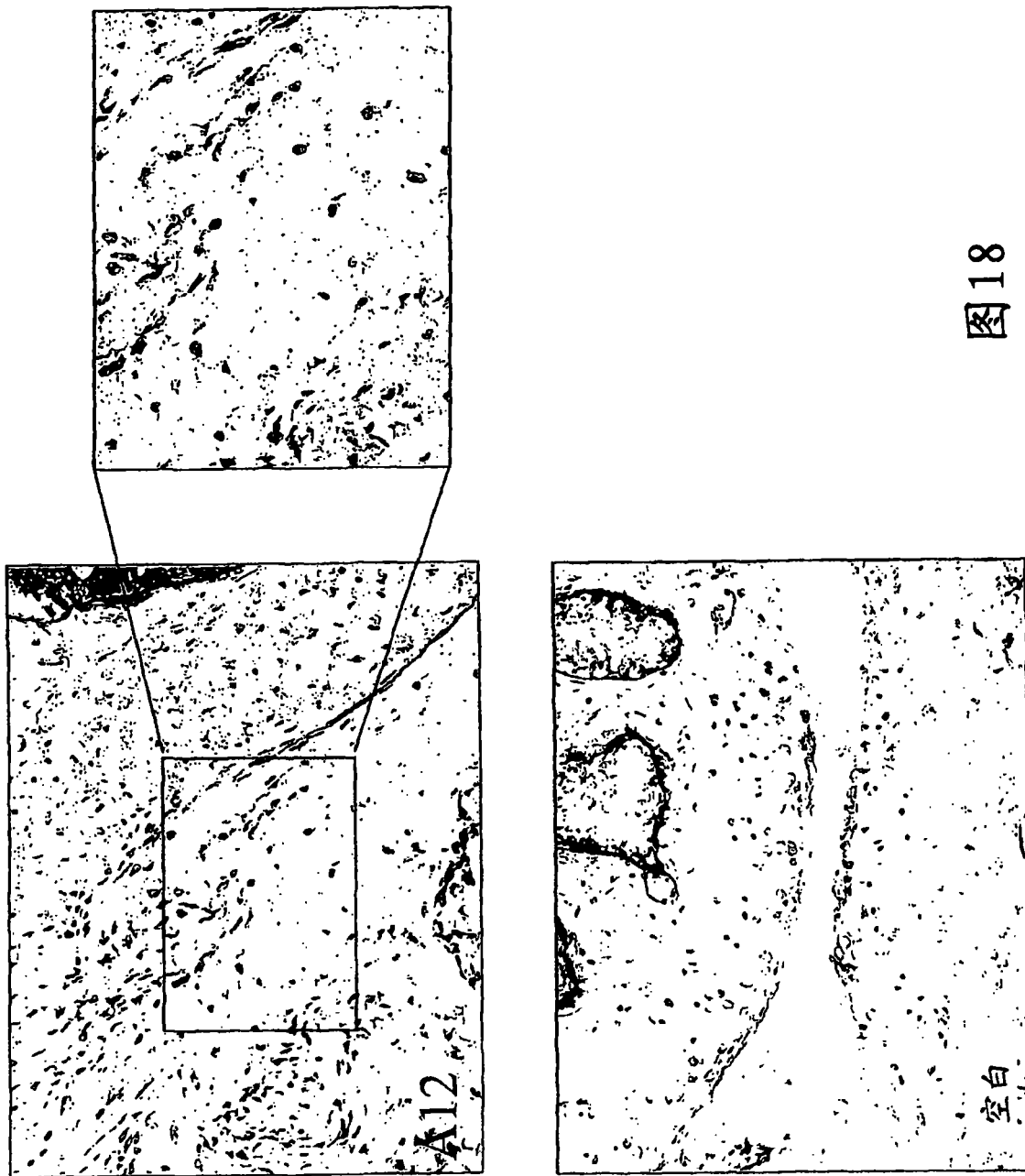


图18

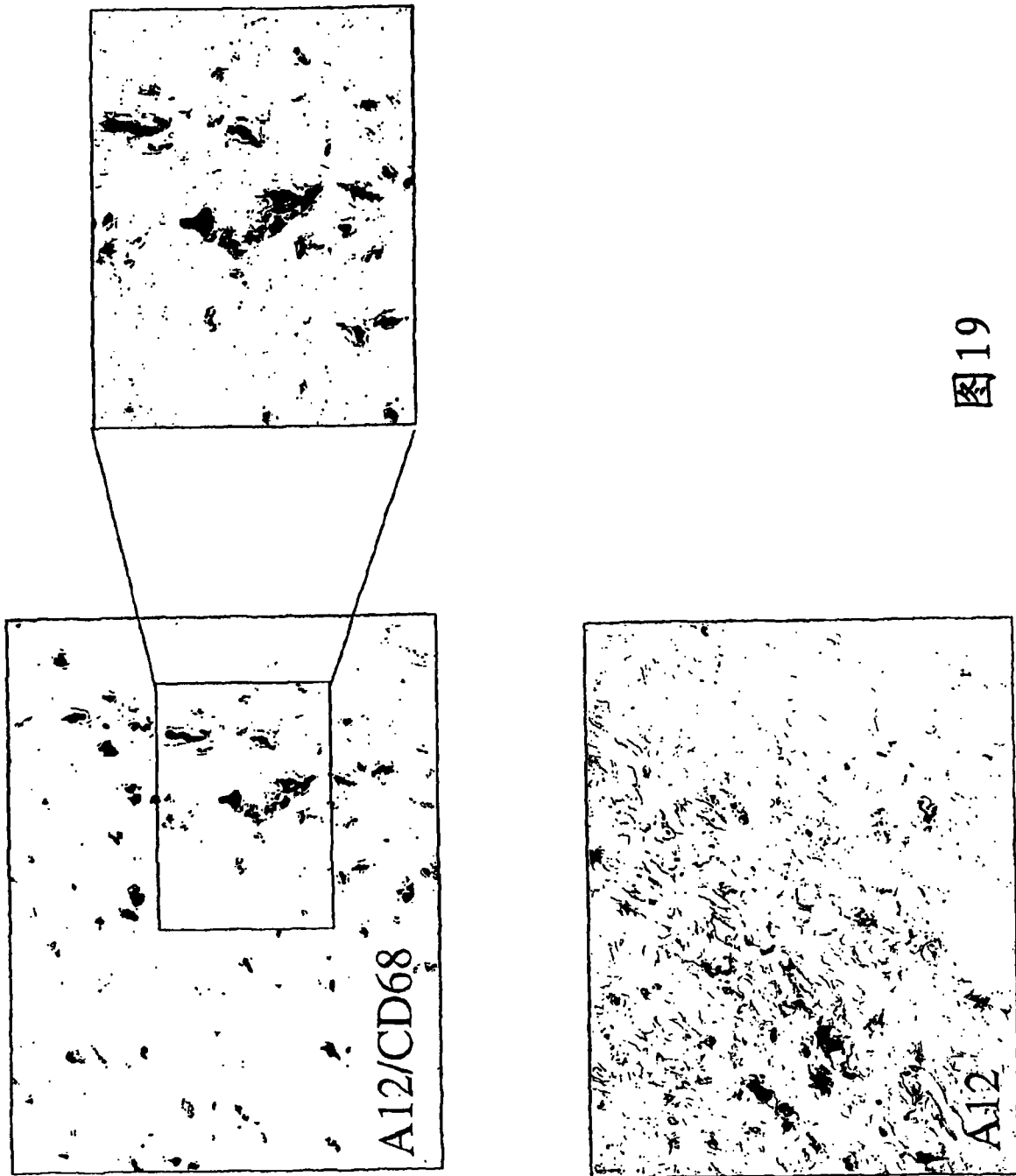


图19

专利名称(译)	作为肿瘤诊断和治疗的靶的丛蛋白D1		
公开(公告)号	CN101287758A	公开(公告)日	2008-10-15
申请号	CN200680030391.5	申请日	2006-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	天主教大学基金会		
申请(专利权)人(译)	天主教大学基金会		
当前申请(专利权)人(译)	天主教大学基金会		
发明人	W·P·J·林德斯 I·罗迪恩克 J·M·H·拉茨		
IPC分类号	C07K14/705 C07K16/28 C12Q1/68 G01N33/53 A61K39/00		
CPC分类号	C07K14/705 C07K16/28 C07K2317/22 C07K2317/569 A61P25/00 A61P25/28 A61P29/00 A61K47/6803 A61K47/6817 A61K47/6849 A61K9/0019 A61K39/39558 A61K51/1018		
代理人(译)	李瑛		
优先权	2005076675 2005-07-21 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用作涉及丛蛋白D1的表达的病症的治疗或诊断中的可靶向蛋白的丛蛋白D1。诊断合适地通过检测体内或身体组织或体液中丛蛋白D1的存在而实现，但是治疗通过将用于传递治疗剂的丛蛋白D1靶向到需要治疗的部位而实现。本发明更进一步涉及结合丛蛋白D1，编码丛蛋白D1的核酸或丛蛋白D1的配体的分子用于制备治疗或诊断涉及丛蛋白D1的表达的病症的治疗组合物的应用。病症包括其中丛蛋白D1在肿瘤细胞，肿瘤血管或活化巨噬细胞上表达的病症。

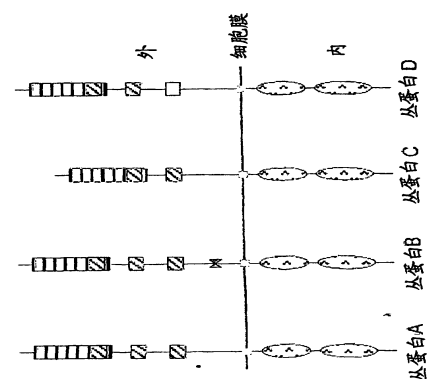


图1