

[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 200780048665.8

[51] Int. Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/38 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月24日

[11] 公开号 CN 101679506A

[51] Int. Cl. (续)

C12P 21/08 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

[22] 申请日 2007.10.26

[21] 申请号 200780048665.8

[30] 优先权

[32] 2006.10.27 [33] US [31] 60/854,971

[86] 国际申请 PCT/US2007/082647 2007.10.26

[87] 国际公布 WO2008/070344 英 2008.6.12

[85] 进入国家阶段日期 2009.6.29

[71] 申请人 勒帕斯公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 罗格·A·萨巴迪尼

威廉·A·加兰 吉纳维芙·汉森

史蒂文·塔兰·琼斯

戴维·加雷斯·威廉斯

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责
任公司

代理人 吴贵明 张 英

权利要求书 20 页 说明书 167 页 序列表 28 页
附图 18 页

[54] 发明名称

用于结合鞘氨醇-1-磷酸的组合物和方法

[57] 摘要

本发明涉及抗 S1P 剂，例如，人源化单克隆抗体，以及它们用于检测 S1P 或应用于治疗与 S1P 有关的疾病和病症的应用。

1. 一种分离的抗 S1P 抗体重链，所述抗 S1P 抗体重链包含具有选自 SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 35 组成的组中的氨基酸序列的可变结构域。
2. 一种分离的抗 S1P 抗体轻链，所述抗 S1P 抗体轻链包含具有选自 SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 37 组成的组中的氨基酸序列的可变结构域。
3. 一种分离的抗 S1P 抗体，其中，每个免疫球蛋白重链包含具有选自 SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 35 组成的组中的氨基酸序列的可变结构域，而每个免疫球蛋白轻链包含具有选自 SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 37 组成的组中的氨基酸序列的可变结构域。
4. 一种组合物，包含载体，可选地包含药用载体，以及选自下述组中的抗 S1P 剂：
 - a. 包含抗 S1P 抗体重链的抗 S1P 剂，所述抗 S1P 抗体重链包含选自 SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 35 组成的组中的具有氨基酸序列的可变结构域；
 - b. 包含抗 S1P 抗体轻链的抗 S1P 剂，所述抗 S1P 抗体轻链包含具有选自 SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 37 组成的组中的氨基酸序列的可变结构域；以及
 - c. 包含抗 S1P 抗体的抗 S1P 剂，其中每个免疫球蛋白重链包含具有选自 SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 35 组成的组中的氨基酸序列的可变结构域，而每个免疫球蛋白轻链包含具有

- 选自由 SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 37 组成的组中的氨基酸序列的可变结构域。
5. 一种试剂盒, 包含包装在容器中的根据权利要求 4 所述的组合物, 并且可选地进一步包括所述组合物的使用说明。
 6. 一种抗 S1P 剂, 所述抗 S1P 剂在生理条件下对于鞘氨醇-1-磷酸 (S1P) 是具有反应性的并且包含至少一种具有氨基酸序列的 CDR 肽, 所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 50%、可选地至少 65%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 的序列同一性, 其中所述肽氨基酸序列选自由 DHTIH(SEQ ID NO: 13)、CISPRHDITKYNEMFRG(SEQ ID NO: 14)、AISPRHDITKYNEMFRG(SEQ ID NO: 31)、GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15)、ITTTDIDDDMN(SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT(SEQ ID NO: 12)组成的组。
 7. 根据权利要求 6 所述的抗 S1P 剂, 选自由抗体、抗体衍生物、以及非抗体源性成分组成的组, 其中所述抗体可以是嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、全长抗体、抗体片段、以及亲和力成熟的抗体。
 8. 根据权利要求 6 所述的抗 S1P 剂, 其中, 所述抗 S1P 剂是由两个重链和两个轻链组成的抗体, 其中每个重链包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列而每个轻链包含 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列, 或其中每个重链包含 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列而每个轻链包含 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列。

9. 根据权利要求6所述的抗S1P剂,其中,所述抗S1P剂共轭于选自由多聚体、放射性核素、化疗药物、以及检测剂组成的组中的部分。
10. 一种组合物,包含根据权利要求6所述的抗S1P剂和载体,可选地包含药用载体。
11. 根据权利要求6所述的抗S1P剂,与第二制剂结合,所述第二制剂可选地选自由抗体、抗体片段、抗体衍生物、抗体变体、不同于抗S1P剂的治疗剂、或包含对不同于S1P的分子具有反应性的结合部分的制剂组成的组,其中所述结合可选地是借助于所述抗S1P剂与所述第二制剂之间的键,可选地共价键而结合的。
12. 一种分离的核酸分子,包含核苷酸残基的序列,其中所述核苷酸残基的序列编码至少一个具有氨基酸序列的CDR肽,其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少50%、可选地至少65%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的序列同一性,其中所述肽氨基酸序列选自由DHTIH (SEQ ID NO: 13)、CISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 14)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及GGFYGSTIWDFD (SEQ ID NO: 15)组成的组。
13. 根据权利要求12所述的分离的核酸分子,其中,所述CDR肽具有肽氨基酸序列,所述肽氨基酸序列选自由DHTIH (SEQ ID NO: 13)、CISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 14)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及GGFYGSTIWDFD (SEQ ID NO: 15)组成的组,以及可选地其中所述分离的核酸分子编码至少两种CDR肽,其中每种CDR肽具有独立地选自由DHTIH (SEQ ID NO: 13);

- CISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 14) 或 AISPRHDITKYNEMFRG(SEQ ID NO: 31) ; 以及 GGFYGSTIWFDF(SEQ ID NO: 15)组成的组的氨基酸序列, 并且可选地其中所述分离的核酸分子编码第一、第二、以及第三 CDR 肽, 其中所述第一、第二、以及第三 CDR 肽中的每一种具有独立地选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13); CISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 14) 或 AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31) ; 以及 GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15)组成的组中的氨基酸序列。
14. 根据权利要求 12 所述的分离的核酸分子, 其中, 所述第一 CDR 肽包含氨基酸序列 DHTIH (SEQ ID NO: 13), 所述第二 CDR 肽包含氨基酸序列 CISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 14)或 AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31), 以及所述第三 CDR 肽包含氨基酸序列 GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15)。
15. 根据权利要求 12 所述的分离的核酸分子, 编码包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列的免疫球蛋白重链可变结构域。
16. 根据权利要求 12 所述的分离的核酸分子, 编码包含 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列的免疫球蛋白重链可变结构域。
17. 根据权利要求 12 所述的分离的核酸分子, 编码免疫球蛋白重链的片段或全长免疫球蛋白重链。
18. 根据权利要求 12 所述的分离的核酸分子, 其中, 所述免疫球蛋白重链衍生自无脊椎动物或脊椎动物免疫球蛋白重链。

19. 根据权利要求 12 所述的分离的核酸分子, 其中, 所述脊椎动物选自自由鱼、可选地软骨鱼、鸟、以及哺乳动物组成的组, 其中所述哺乳动物可选地选自自由犬、猫、灵长类、啮齿动物、以及有蹄类动物组成的组。
20. 一种载体, 包含根据权利要求 12 所述的分离的核酸分子。
21. 一种用根据权利要求 10 所述的分离的核酸分子或用根据权利要求 20 所述的载体转染的宿主细胞。
22. 一种包含核苷酸残基序列的分离的核酸分子, 编码至少一种具有氨基酸序列的 CDR 肽, 其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 50%、可选地至少 65%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%的序列同一性, 其中所述肽氨基酸序列选自自由 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组。
23. 根据权利要求 22 所述的分离的核酸分子, 其中, 所述 CDR 肽具有肽氨基酸序列, 其中所述肽氨基酸序列选自自由 ITTTDIDDDMN(SEQ ID NO: 10)、EGNILRP(SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组, 并且可选地其中所述分离的核酸分子编码至少两种 CDR 肽, 其中每种 CDR 肽独立地选自自由 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组, 并且可选地其中所述分离的核酸分子编码第一、第二、以及第三 CDR 肽, 其中所述第一、第二、以及第三 CDR 肽中的每一种具有独立地选自自由 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组中的氨基酸序列。

24. 根据权利要求22所述的分离的核酸分子,其中,所述第一CDR肽包含氨基酸序列 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)。
25. 根据权利要求22所述的分离的核酸分子,编码包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列的免疫球蛋白轻链可变结构域。
26. 根据权利要求22所述的分离的核酸分子,编码包含 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列的免疫球蛋白轻链可变结构域。
27. 根据权利要求22所述的分离的核酸分子,编码免疫球蛋白轻链的片段或全长免疫球蛋白轻链。
28. 根据权利要求22所述的分离的核酸分子,其中,所述免疫球蛋白重链衍生自无脊椎动物或脊椎动物免疫球蛋白重链。
29. 根据权利要求22所述的分离的核酸分子,其中,所述脊椎动物选自由鱼、可选地软骨鱼、鸟、以及哺乳动物组成的组,其中所述哺乳动物可选地选自由犬、猫、灵长类、啮齿动物、以及有蹄类动物组成的组。
30. 一种载体,包含根据权利要求22所述的分离的核酸分子。
31. 根据权利要求30所述的载体,进一步包含根据权利要求22所述的分离的核酸分子。
32. 根据权利要求21所述的宿主细胞,所述宿主细胞还被根据权利要求22所述的分离的核酸分子所转染。
33. 一种用根据权利要求22所述的核酸分子或用根据权利要求30所述的载体或根据权利要求31所述的载体转染的宿主细胞。

34. 一种用第一载体和第二载体转染的宿主细胞,其中,所述第一载体是根据权利要求 20 所述的载体而所述第二载体是根据权利要求 30 所述的载体。
35. 一种分离的多肽,所述多肽包含至少一个来自动物免疫球蛋白重链的可变结构域的骨架区,所述多肽在生理范围内对 S1P 具有反应性并且包含至少一个具有氨基酸序列的 CDR 肽,其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 50%、优选至少 65%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95% 的序列同一性,其中所述肽氨基酸序列选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、CISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 14)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及 GGFYGSTIWDFD (SEQ ID NO: 15)组成的组。
36. 根据权利要求 35 所述的分离的多肽,其中,所述 CDR 肽具有肽氨基酸序列,所述肽氨基酸序列选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、CISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 14)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及 GGFYGSTIWDFD (SEQ ID NO: 15)组成的组;以及可选地其中每种 CDR 肽具有氨基酸序列,其中所述氨基酸序列独立地选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、CISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 14)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及 GGFYGSTIWDFD (SEQ ID NO: 15)组成的组,可选地其中所述第一、第二、以及第三 CDR 肽中的每一种具有独立地选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及 GGFYGSTIWDFD (SEQ ID NO: 15)组成的组中的氨基酸序列。
37. 根据权利要求 35 所述的分离的多肽,其中,所述第一 CDR 肽包含氨基酸序列 DHTIH (SEQ ID NO: 13),所述第二 CDR 肽

- 包含氨基序列 CISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 14)或 AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31), 以及所述第三 CDR 肽包含氨基序列 GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15)。
38. 根据权利要求 35 所述的分离的多肽, 选自由动物免疫球蛋白重链的片段、免疫球蛋白重链的全长可变结构域以及全长免疫球蛋白重链组成的组。
39. 根据权利要求 35 所述的分离的多肽, 其中, 所述免疫球蛋白重链衍生自无脊椎动物或脊椎动物免疫球蛋白重链。
40. 根据权利要求 39 所述的分离的多肽, 其中, 所述脊椎动物选自由鱼、可选地软骨鱼、鸟、以及哺乳动物组成的组, 其中所述哺乳动物可选地选自由犬、猫、灵长类、啮齿动物、以及有蹄类动物组成的组。
41. 一种分离的多肽, 所述多肽包含至少一个来自动物免疫球蛋白轻链的可变结构域的骨架区, 所述多肽对 S1P 具有反应性并且包含至少一个具有氨基酸序列的 CDR 肽, 其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 50%、可选地至少 65%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少至少 95%的序列同一性, 其中所述肽氨基酸序列选自由 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组。
42. 根据权利要求 41 所述的分离的多肽, 其中, 所述 CDR 肽具有肽氨基酸序列, 其中所述肽氨基酸序列选自由 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组, 可选地其中所述分离的多肽包含至少两个 CDR 肽, 其中每个 CDR 肽

- 具有独立地选自由 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组中的氨基酸序列, 可选地其中所述分离的多肽包含第一、第二、以及第三 CDR 肽, 其中所述第一、第二、以及第三 CDR 肽的每一个具有独立地选自由 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组中的氨基酸序列, 可选地其中所述第一 CDR 肽包含氨基酸序列 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10), 所述第二 CDR 肽包含氨基酸序列 EGNILRP (SEQ ID NO: 11), 以及所述第三 CDR 肽包含氨基酸序列 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)。
43. 根据权利要求 41 所述的分离的多肽, 选自由动物免疫球蛋白轻链的片段、免疫球蛋白轻链的全长可变结构域以及全长免疫球蛋白轻链组成的组。
44. 根据权利要求 41 所述的分离的多肽, 其中, 所述免疫球蛋白重链衍生自无脊椎动物或脊椎动物免疫球蛋白重链。
45. 根据权利要求 41 所述的分离的多肽, 其中, 所述脊椎动物选自由鱼、可选地软骨鱼、鸟、以及哺乳动物组成的组, 其中所述哺乳动物可选地选自由犬、猫、灵长类、啮齿动物、以及有蹄类动物组成的组。
46. 一种分离的抗体分子, 包含:
- a. 两个免疫球蛋白重链, 其中每个免疫球蛋白重链是在生理范围内对 S1P 具有反应性的动物免疫球蛋白重链, 所述重链包含至少一个来自免疫球蛋白重链的可变结构域的骨架区并且包含至少一个具有氨基酸序列的 CDR 肽, 其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 50%、可选地至少 65%、至

少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%的序列同一性，其中所述肽氨基酸序列选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及 GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15)组成的组；并且与所述两个免疫球蛋白重链功能上相关，

b. 两个免疫球蛋白轻链，其中每个免疫球蛋白轻链是在生理范围内对 S1P 具有反应性的动物免疫球蛋白轻链，所述轻链包含至少一个来自免疫球蛋白轻链的可变结构域的骨架区并且包含至少一个具有氨基酸序列的 CDR 肽，其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 50%、可选地至少 65%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%的序列同一性，其中所述肽氨基酸序列选自由 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组。

47. 根据权利要求 46 所述的分离的抗体分子，其中，每个所述免疫球蛋白重链包含第一、第二、以及第三 CDR 肽，其中所述第一、第二、以及第三免疫球蛋白重链 CDR 肽中的每一个具有独立地选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及 GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15)组成的组中的氨基酸序列，并且其中每个所述免疫球蛋白轻链还包含第一、第二、以及第三 CDR 肽，其中每个所述第一、第二、以及第三免疫球蛋白轻链 CDR 肽具有独立地选自由 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组中的氨基酸序列，可选地其中每个所述免疫球蛋白重链包含第一、第二、以及第三 CDR 肽，其中所述第一免疫球蛋白重链 CDR 肽包含氨基酸序列 DHTIH (SEQ ID NO: 13)，所述第二免疫球蛋白重链 CDR 肽包含氨基酸序列

AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31), 以及所述第三免疫球蛋白重链 CDR 肽包含氨基酸序列 GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15), 而其中每个所述免疫球蛋白轻链包含第一、第二、以及第三 CDR 肽, 其中所述第一免疫球蛋白轻链 CDR 肽包含氨基酸序列 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10), 所述第二免疫球蛋白轻链 CDR 肽包含氨基酸序列 EGNILRP (SEQ ID NO: 11), 以及所述第三免疫球蛋白轻链 CDR 肽包含氨基酸序列 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)。

48. 一种分离的人源化抗体分子, 包含:

a. 两个免疫球蛋白重链, 其中每个免疫球蛋白重链在生理范围内对 S1P 具有反应性并且包含至少一个来自人免疫球蛋白重链的可变结构域的骨架区, 所述重链包含至少一个具有氨基酸序列的 CDR 肽, 其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 50%、可选地至少 65%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%的序列同一性, 其中所述肽氨基酸序列选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及 GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15)组成的组; 并且与所述两个免疫球蛋白重链功能上相关,

b. 两个免疫球蛋白轻链, 其中每个免疫球蛋白轻链在生理范围内对 S1P 具有反应性并且包含至少一个来自人免疫球蛋白轻链的可变结构域的骨架区, 所述轻链包含至少一个具有氨基酸序列的 CDR 肽, 其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 65%、可选地至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%的序列同一性, 其中所述肽氨基酸序列选自由 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组。

49. 根据权利要求 48 所述的分离的人源化抗体分子, 其中每个所述免疫球蛋白重链包含第一、第二、以及第三 CDR 肽, 其中每个所述第一、第二、以及第三免疫球蛋白重链 CDR 肽具有独立地选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及 GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15)组成的组中的氨基酸序列, 而其中每个所述免疫球蛋白轻链也包含第一、第二、以及第三 CDR 肽, 其中每个所述第一、第二、以及第三免疫球蛋白轻链 CDR 肽具有独立地选自由 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组中的氨基酸序列, 可选地其中所述第一免疫球蛋白重链 CDR 肽包含氨基序列 DHTIH (SEQ ID NO: 13), 所述第二免疫球蛋白重链 CDR 肽包含氨基序列 AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31), 以及所述第三免疫球蛋白重链 CDR 肽包含氨基序列 GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15), 并且所述第一免疫球蛋白轻链 CDR 肽包含氨基序列 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10), 所述第二免疫球蛋白轻链 CDR 肽包含氨基序列 EGNILRP (SEQ ID NO: 11), 以及所述第三免疫球蛋白轻链 CDR 肽包含氨基序列 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)。

50. 一种分离的人源化抗体分子, 包含:

a. 两个免疫球蛋白重链, 其中每个免疫球蛋白重链在生理范围内对 S1P 具有反应性并且包含至少一个来自人免疫球蛋白重链的可变结构域的骨架区, 其中每个免疫球蛋白重链包含第一、第二、以及第三 CDR 肽, 其中所述第一免疫球蛋白重链 CDR 肽包含氨基序列 DHTIH (SEQ ID NO: 13), 所述第二免疫球蛋白重链 CDR 肽包含氨基序列 AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31), 以及所述第三免

疫球蛋白重链 CDR 肽包含氨基序列 GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15); 并且与所述两个免疫球蛋白重链功能上相关,

b. 两个免疫球蛋白轻链, 其中每个免疫球蛋白轻链在生理范围内对 S1P 具有反应性并且包含至少一个来自人免疫球蛋白轻链的可变结构域的骨架区, 其中每个免疫球蛋白轻链包含第一、第二、以及第三 CDR 肽, 并且其中所述第一免疫球蛋白轻链 CDR 肽包含氨基序列 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10), 所述第二免疫球蛋白轻链 CDR 肽包含氨基序列 EGNILRP (SEQ ID NO: 11), 以及所述第三免疫球蛋白轻链 CDR 肽包含氨基序列 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)。

51. 一种多价结合分子, 包含至少第一和第二配体结合元件, 其中所述第一配体结合元件对 S1P 具有反应性并且包含至少一个具有氨基酸序列的 CDR 肽, 其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 50%、可选地至少 65%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%的序列同一性, 其中所述肽氨基酸序列选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及 GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15)组成的组。
52. 根据权利要求 51 所述的多价结合分子, 其中所述 CDR 肽具有选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及 GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15)组成的组中的肽氨基酸序列, 可选地其中所述多价结合分子包含至少两个 CDR 肽, 其中每个 CDR 肽具有独立地选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及 GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15)组成的组中的氨基酸序列, 可选地其中所述多价结合分子包含第一、第二、以及第三 CDR 肽, 其中每个所述第一、第二、以及第三 CDR 肽具

- 有独立地选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及 GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15)组成的组中的氨基酸序列。
53. 根据权利要求 51 所述的多价结合分子, 其中所述第一 CDR 肽包含氨基酸序列 DHTIH (SEQ ID NO: 13), 所述第二 CDR 肽包含氨基酸序列 AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31), 以及所述第三 CDR 肽包含氨基酸序列 GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15)。
54. 根据权利要求 51 所述的多价结合分子, 所述多价结合分子是动物免疫球蛋白重链的片段, 其中所述片段可选地选自由免疫球蛋白重链的全长可变结构域和全长免疫球蛋白重链组成的组。
55. 根据权利要求 51 所述的多价结合分子, 其中, 所述免疫球蛋白重链衍生自无脊椎动物或脊椎动物免疫球蛋白重链。
56. 根据权利要求 51 所述的多价结合分子, 其中, 所述第二配体结合元件也对 S1P 具有反应性。
57. 根据权利要求 51 所述的多价结合分子, 进一步包含至少一个另外的配体结合元件, 可选地包含 2 至约 10,000 个配体结合元件, 可选地其中每一个所述配体结合元件对 S1P 具有反应性。
58. 根据权利要求 51 所述的多价结合分子, 其中所述配体结合元件连接于支架。

59. 一种多价结合分子，包含至少第一和第二配体结合元件，其中所述第一配体结合元件对 S1P 具有反应性并且包含至少一个具有氨基酸序列的 CDR 肽，其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 50%、可选地至少 65%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%的序列同一性，其中所述肽氨基酸序列选自 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO : 10)、EGNILRP (SEQ ID NO : 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组。
60. 根据权利要求 59 所述的多价结合分子，其中所述 CDR 肽具有选自 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组中的肽氨基酸序列，可选地其中所述多价结合分子包含至少两个 CDR 肽，其中每个 CDR 肽具有独立地选自 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组中的氨基酸序列，可选地其中所述多价结合分子包含第一、第二、以及第三 CDR 肽，其中每个所述第一、第二、以及第三 CDR 肽具有独立地选自 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组中的氨基酸序列。
61. 根据权利要求 59 所述的多价结合分子，其中所述第一 CDR 肽包含氨基酸序列 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)，所述第二 CDR 肽包含氨基酸序列 EGNILRP (SEQ ID NO: 11)，以及所述第三 CDR 肽包含氨基酸序列 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)。
62. 根据权利要求 59 所述的多价结合分子，所述多价结合分子是动物免疫球蛋白轻链的片段，其中所述片段可选地选自免疫

- 球蛋白轻链的全长可变结构域和全长免疫球蛋白轻链组成的组。
63. 根据权利要求 59 所述的多价结合分子，其中所述免疫球蛋白轻链衍生自无脊椎动物或脊椎动物免疫球蛋白重链。
64. 根据权利要求 59 所述的多价结合分子，其中，所述第二配体结合元件也对 S1P 具有反应性。
65. 根据权利要求 59 所述的多价结合分子，进一步包含至少一个另外的配体结合元件，可选地包含 2 至约 10,000 个配体结合元件，可选地其中每一个所述配体结合元件对 S1P 具有反应性。
66. 根据权利要求 59 所述的多价结合分子，其中，所述配体结合元件连接于支架。
67. 一种多价结合分子，包含连接于至少第一和第二配体结合元件的支架，其中所述第一配体结合元件对 S1P 具有反应性并且包含功能上相关的第一多肽和第二多肽，其中所述第一多肽包含至少一个具有氨基酸序列的 CDR 肽，其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 50%、可选地至少 65%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%的序列同一性，其中所述肽氨基酸序列选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及 GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15)组成的组，以及所述第二多肽包含至少一个具有氨基酸序列的 CDR 肽，其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 50%、可选地至少 65%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%的序列同一性，其中所述肽氨基酸序列选自由 ITTTDIDDDMN (SEQ

ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组。

68. 根据权利要求 67 所述的多价结合分子, 其中, 所述第一配体结合元件的所述第一多肽包含免疫球蛋白重链的可变结构域而所述第一配体结合元件的所述第二多肽包含免疫球蛋白轻链的可变结构域, 其中所述多价结合分子可选地包含 2 至约 10,000 个配体结合元件, 可选地其中每个所述配体结合元件对 S1P 具有反应性。

69. 一种用于治疗或预防与高水平的 S1P 有关的疾病或病症的方法, 包括对需要上述治疗的受治疗者给予降低 S1P 体内有效浓度的有效量的制剂, 所述制剂选自由下述组成的组:

a. 抗 S1P 剂, 所述制剂在生理条件下对于鞘氨醇-1-磷酸 (S1P) 具有反应性并且包含至少一个具有氨基酸序列的 CDR 肽, 其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 50% 的序列同一性, 其中所述肽氨基酸序列选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、CISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 14)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15)、ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组;

b. 分离的多肽, 包含至少一个来自动物免疫球蛋白重链的可变结构域的骨架区, 所述多肽在生理范围内对 S1P 具有反应性并且包含至少一个具有氨基酸序列的 CDR 肽, 其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 50% 的序列同一性, 其中所述肽氨基酸序列选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、CISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 14)、

AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及 GGFYGSTIWDFD (SEQ ID NO: 15)组成的组;

c. 分离的抗体分子, 包含:

(i) 两个免疫球蛋白重链, 其中每个免疫球蛋白重链是在生理范围内对 S1P 具有反应性的动物免疫球蛋白重链, 所述重链包含至少一个来自免疫球蛋白重链的可变结构域的骨架区并且包含至少一个具有氨基酸序列的 CDR 肽, 其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 50%的序列同一性, 其中所述肽氨基酸序列选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及 GGFYGSTIWDFD (SEQ ID NO: 15)组成的组; 并且与所述两个免疫球蛋白重链功能上相关,

(ii) 两个免疫球蛋白轻链, 其中每个免疫球蛋白轻链是在生理范围内对 S1P 具有反应性的动物免疫球蛋白轻链, 所述轻链包含至少一个来自免疫球蛋白轻链的可变结构域的骨架区并且包含至少一个具有氨基酸序列的 CDR 肽, 其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 50%的序列同一性, 其中所述肽氨基酸序列选自由 ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)、EGNILRP (SEQ ID NO: 11)、以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)组成的组;

d. 多价结合分子, 包含至少第一和第二配体结合元件, 其中所述第一配体结合元件对 S1P 具有反应性并且包含至少一个具有氨基酸序列的 CDR 肽, 其中所述氨基酸序列与肽氨基酸序列具有至少 50%的序列同一性, 其中所述肽氨基酸序列选自由 DHTIH (SEQ ID NO: 13)、AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 31)、以及 GGFYGSTIWDFD (SEQ ID NO: 15)组成的组;

e. 分离的抗 S1P 抗体重链, 包含具有选自由 SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 35 组成的组中的氨基酸序列的可变结构域;

f. 分离的抗 S1P 抗体轻链, 所述抗 S1P 抗体轻链包含具有氨基酸序列的可变结构域, 其中所述氨基酸序列选自由 SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 37 组成的组; 以及

g. 分离的抗 S1P 抗体, 其中每个免疫球蛋白重链包含具有选自由 SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 35 组成的组中的氨基酸序列的可变结构域, 而每个免疫球蛋白轻链包含具有选自由 SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 37 组成的组中的氨基酸序列的可变结构域;

从而治疗或预防所述疾病或病症。

70. 根据权利要求 69 所述的方法, 其中, 所述疾病或病症选自由癌症、炎性疾病、脑血管病、心血管疾病、眼部疾病、与过多的纤维发生有关的疾病和障碍、以及与病理性血管发生有关的疾病或病症组成的组。
71. 根据权利要求 69 所述的方法, 其中, 所述受治疗者是人。
72. 根据权利要求 69 所述的方法, 其中, 连同另一种治疗剂一起给予所述抗 S1P 剂、分离的多肽或抗体、多价结合分子或分离的抗 S1P 抗体, 以治疗或预防所述疾病或病症。
73. 一种用于检测 S1P 或 S1P 代谢物的方法, 包括将怀疑包含鞘脂的样品暴露于相对于 S1P 具有反应性的化合物, 其中所述相对于 S1P 具有反应性的化合物选自由根据权利要求 3 所述的分离的抗 S1P 抗体、根据权利要求 6 所述的抗 S1P 剂、根据权利要求 35 所述的分离的多肽以及根据权利要求 51 所述的多

- 价结合分子组成的组，以及确定所述相对于 S1P 具有反应性的化合物与所述样品的结合。
74. 根据权利要求 73 所述的方法，其中，如果存在于所述样品中，在相对于 S1P 具有反应性的化合物结合于所述 S1P 或 S1P 代谢物的条件下，检测已知或怀疑包含所述 S1P 或 S1P 代谢物的样品暴露于所述相对于 S1P 具有反应性的化合物所获得的结合结果。
75. 根据权利要求 73 所述的方法，其中，所述样品是组织或液体样品。
76. 根据权利要求 53 所述的方法，其中，所述液体样品选自由全血、血浆、血清、尿、精液、胆汁、水样液、玻璃体液、粘液、以及痰组成的组。
77. 根据权利要求 73 所述的方法，其中，所述相对于 S1P 或 S1P 代谢物具有反应性的化合物选自由单克隆抗体、抗体片段、抗体变体、以及抗体衍生物组成的组。
78. 根据权利要求 73 所述的方法，其中，所述相对于 S1P 或 S1P 代谢物具有反应性的化合物被附着于载体。
79. 根据权利要求 73 所述的方法是 ELISA 试验。

用于结合鞘氨醇-1-磷酸的组合物和方法

相关申请

本申请要求于 2006 年 10 月 27 日提交的临时申请系列号第 60/854,971 号（代理卷号 LPT-3010-PV）的权益和优先权，出于各种目的将其全部内容以引用方式结合于本文。

序列表

本申请同时提交了包括按照适用的规则和程序加以准备和提交的序列表。该序列表以引用方式结合于本文。

技术领域

本发明涉及结合鞘氨醇-1-磷酸（S1P）的制剂，尤其涉及在生理条件下对 S1P 具有特异反应性的人源化单克隆抗体、抗体片段、以及抗体衍生物。通过递送包含上述制剂的药物组合物，可利用上述制剂来治疗和/或预防各种疾病或病症。

以下描述包括可能有利于理解本发明的信息。但这并不是承认，本文中提供的任何信息、或本文中具体或间接提及的任何出版物是现有技术，或甚至明显与目前要求保护的发明有关。

背景技术

生物活性信号脂质

脂质和它们的衍生物现在被认为是用于医学研究的重要的靶标，而不仅仅是细胞膜中的简单的结构元件或作为用于 β -氧化作用、糖酵解作用或其它代谢过程的能量来源。尤其是，某些生物活性脂质在动物和人疾病中作为重要的信号介质。虽然质膜的大部分脂质仅仅起到结构的作用，但它们的小部分的与将胞外刺激传递到细胞内有关。“脂质信号”是指许多利用细胞膜脂作为第二信使的细胞信号转导途径的任何一种，以及是指脂质信号分子与其本身的特异性受体的直接相互作用。脂质信号通路由各种胞外刺激（从生长因子到炎性细胞因子）激活，并且调节细胞命运决定，如凋亡、分化以及增殖。对生物活性脂质信号的研究是一个热门科学研究领域，因为越来越多的生物活性脂质被鉴定并且它们的作用被表征。

生物活性脂质的实例包括类花生酸类（包括大麻素类、白三烯类、前列腺素类、脂氧素类、环氧二十碳三烯酸、以及异二十烷酸类）、非类花生酸大麻素介质、磷脂及其衍生物如磷脂酸（PA）和磷脂酰甘油（PG）、血小板活化因子（PAF）和心磷脂以及溶血磷脂如溶血卵磷脂（LPC）和各种溶血磷脂酸（LPA）。生物活性信号脂质介质还包括鞘脂，例如鞘磷脂、神经酰胺、神经酰胺-1-磷酸、鞘氨醇、神经鞘氨醇磷酸胆碱、神经鞘氨醇（sphinganine）、神经鞘氨醇-1-磷酸（二氢 S1P）以及鞘氨醇-1-磷酸。鞘脂类和它们的衍生物代表对重要的细胞过程具有多效性的一类胞外和胞内信号分子。生物活性信号脂质的其它实例包括磷脂酰丝氨酸（PS）、磷脂酰肌醇（PI）、磷脂酰乙醇胺（PEA）、甘油二酯（DG）、硫苷脂、神经节苷脂、以及脑苷脂。

鞘脂是一类独特的脂质，由于它们起初的神秘特性，其后被以 Sphinx 命名。鞘脂最初被表征为细胞膜的主要的结构成分，但最近的研究表明，鞘脂还作为细胞信号和调节分子（Hannun, et al, Adv. Lipid Res. 25:27-41, 1993; Spiegel, et al, FASEB J. 10:1388-1397,

1996; Igarashi, J. *Biochem* 122:1080-1087, 1997; Hla, T. (2004). *Semin Cell Dev Biol*, **15**, 513-2; Gardell, S.E., Dubin, A.E. & Chun, J. (2006). *Trends Mol Med*, **12**, 65-75)。鞘脂是细胞膜的主要的结构成分，其还作为细胞信号和调节分子（Hannun 和 Bell, *Adv. Lipid Res.* 25: 27-41, 1993; Igarashi, J. *Biochem* 122: 1080-1087, 1997）。已经对鞘脂信号介质、神经酰胺（CER）、鞘氨醇（SPH）和鞘氨醇-1-磷酸（SIP）进行了最广泛的研究并且最近已明了它们在心血管系统、血管发生和肿瘤生物学中的作用（Claus, et al., *Curr Drug Targets* 1 : 185-205, 2000; Levade, et al., *Circ. Res.* 89: 957-968, 2001; Wang, et al., *J. Biol. Chem.* 274: 35343-50, 1999; Wascholowski 和 Giannis, *Drug News Perspect.* 14: 581-90, 2001; Spiegel, S. & Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signaling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 397-407)。

关于鞘脂代谢的综述，参见 Liu 等, *Crit Rev. Clin. Lab. Sci.* 36:511-573, 1999。关于鞘磷脂信号通路的综述，参见 Hannun, et al., *Adv. Lipid Res.* 25:27-41, 1993; Liu 等, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 36:511-573, 1999; Igarashi, J. *Biochem.* 122:1080-1087, 1997; Oral, et al., *J. Biol. Chem.* 272:4836-4842, 1997; 以及 Spiegel et al., *Biochemistry* (莫斯科) 63:69-83, 1998。

S1P 是细胞增殖的介质并且通过激活生存途径来防止凋亡（Maceyka, et al. (2002), *BBA*, vol. 1585): 192-201, 以及 Spiegel, et al. (2003), *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 4: 397-407)。已经提出 CER/SPH 水平和 SIP 之间的平衡提供了一种可调机制（rheostat mechanism），该机制决定细胞被引向死亡通路或免于凋亡。可调机制的关键调节酶是鞘氨醇激酶（SPHK），其作用是将促进死亡的生物活性信号脂质（CER/SPH）转化成促进生长的 SIP。SIP 具有两种命运：SIP 可以被 SIP 裂解酶（一种酶，其将 SIP 裂解

成磷酸乙醇胺和十六烷醛)降解,或较不常见地,被S1P磷酸酶水解成SPH。

S1P的多效生物学活性是经由最初称作内皮分化基因(EDG)的G蛋白耦联受体(GPCR)的家族介导的。已经确定5种GPCR为高亲和力S1P受体(S1PR):S1P₁/EDG-1、S1P₂/EDG-5、S1P₃/EDG-3、S1P₄/EDG-6、以及S1P₅/EDG-8,它们直到1998年才被鉴定(Lee, et al., 1998)。由S1P诱发的许多应答耦联于不同的异三聚体G蛋白(G_q、G₁、G₁₂₋₁₃)和Rho家族的小GTP酶(Gardell, et al., 2006)。

在成体中,S1P释放自血小板(Murata et al., 2000)和肥大细胞以产生用于促进伤口愈合并参与炎症应答的游离S1P的局部脉冲(足以超过S1PR的K_d)。在正常条件下,血浆中的总S1P相当高(300-500 nM);然而,假设大多数S1P可以通过血清蛋白,尤其是通过脂蛋白(例如,HDL>LDL>VLDL)和白蛋白加以‘缓冲’,以致生物有效的S1P(或S1P的游离部分)不足以明显激活S1PR(Murata et al., 2000)。如果不是这种情况,则会导致不适当的血管发生和炎症。还已提示了S1P的胞内作用(参见例如,Spiegel S, Kolesnick R (2002), *Leukemia*, vol. 16: 1596-602; Suomalainen, et al (2005), *Am J Pathol*, vol. 166: 773-81)。

细胞表面S1P受体的广泛表达使得S1P影响多种不同的细胞应答,其包括增殖、黏着、收缩、运动性、形态发生、分化、以及存活。这种应答范围似乎取决于细胞和组织系统内的S1P受体的重叠或不同表达模式。此外,最近已证明S1P和生长因子信号通路之间的交互作用(串扰,crosstalk),包括血小板衍生的生长因子(PDGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、以及碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)(参见例如,Baudhuin, et al. (2004), *FASEB J*, vol. 18: 341-3)。涉及S1P的各种细胞过程的调节尤其对于神经信号、血管紧张度、伤

口愈合、免疫细胞运输、生殖、以及心血管功能有特定的影响。这些系统内 S1P 的内源水平的改变会具有不利影响，从而诱发若干种病理生理状态，其包括癌症、炎症、血管发生、心脏病、哮喘、以及自身免疫性疾病。

最近治疗各种疾病和病症（包括心血管疾病、脑血管病、以及各种癌症）的新方法涉及单独地或连同其他治疗来降低生物可利用的 S1P 的水平。虽然已提出了靶向鞘脂代谢途径的关键酶（如 SPHK）的基于鞘脂的治疗策略，但直到最近才强调干扰脂质介质 S1P 本身，主要由于难以直接缓和（mitigate）这种脂质靶标，尤其是由于难以首先提高抗体水平，然后针对 S1P 靶标来检测抗体。

最近，已描述了对于 S1P 具有特异性的抗体的产生。参见例如，共有的美国专利申请系列第 20070148168 号；WO 2007/053447。这样的抗体，其可以例如选择性地吸附来自血清的 S1P，作为分子海绵来中和胞外 S1P。还参见共有的美国专利第 6,881,546 号和第 6,858,383 号以及美国专利申请系列第 10/029,372 号。SPHINGOMAB™，鼠单克隆抗体（mAb）（由 Lpath, Inc. 开发并在以上所列的某些专利或专利申请中描述）已显示出在人类疾病模型中是有效的。在某些情况下，人源化抗体可以优选于鼠抗体，尤其用于人类的治疗应用，其中会发生人抗鼠抗体（HAMA）应答。通过中和结合活性和/或通过从体内循环中快速清除抗体，这样的应答可以降低抗体的有效性。在随后给予鼠抗体的情况下，HAMA 应答还会引起毒性。

现已开发了人源化抗 S1P 抗体并在本文中加以描述。就结合 S1P、中和 S1P 和调节与 S1P 有关的疾病状态的效力而言，当用于人类时这种抗体预期具有鼠 mAb 的所有优点，而没有鼠 mAb 的潜在缺点。如在下文的实施例中所描述的，这种人源化抗体（称作 LT

1009 或 sonpcizumab)事实上在疾病的动物模型中已显示出比亲代(鼠)抗体具有更大的活性。

3、定义

在详细描述本发明以前,将定义在本发明的范围内使用的若干术语。除这些术语之外,必要时,则在本说书的其它地方对其它术语加以定义。除非本文中另有明确规定,在本说明书中所用的术语将具有技术领域认可的含意。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。

“免疫衍生部分”包括任何抗体(Ab)或免疫球蛋白(Ig),并且指衍生自免疫球蛋白基因的、按照免疫球蛋白基因制作的、或由免疫球蛋白基因编码的任何形式的肽、多肽,或能够结合抗原或表位的上述肽或多肽的片段(参见例如,Immunobiology,第5版,Janeway, Travers, Walport, Shlomchik. (编者), Garland Publishing (2001))。在本发明中,抗原是生物活性脂质分子。

“抗S1P抗体”或“相对于S1P具有活性的免疫衍生部分”是指结合S1P的任何抗体或抗体源性分子。如根据这些定义将明了的,抗体或免疫衍生部分可以是多克隆的或单克隆的并且可以通过各种方式来产生,和/或可以分离自动物(包括人类对象)。

“生物活性脂质”是指脂质信号分子。通常,当施加其信号效应时,生物活性脂质并不存在于生物膜中,也就是说,虽然这样的脂质物质可以在某个时候存在于生物膜(例如,细胞膜、细胞器膜等)中,但当伴随生物膜时它不是“生物活性脂质”而是“结构脂质”分子。生物活性脂质与结构脂质(例如,膜结合磷脂)的区别在于,它们介导胞外和/或胞内信号,因此通过调节分化、迁移、增殖、分泌、存活、以及其它过程而涉及许多类型的细胞的功能控制。

在体内，生物活性脂质可以存在于细胞外液中，其中它们可以与其它分子复合，例如血清蛋白如白蛋白和脂蛋白，或具有“游离”形式，即，没有与另一种分子物质复合。作为细胞外介质，通过激活膜结合离子通道或 G 蛋白耦联受体，进而又激活复杂的信号系统，某些生物活性脂质可改变细胞信号传导，从而改变细胞功能或存活。作为细胞内介质，生物活性脂质可以通过直接与细胞内成分（如酶和离子通道）的相互作用来施加它们的作用。生物活性脂质的典型实例包括 LPA 和 S1P。

术语“治疗剂”是指这样的制剂，其缓和血管发生和/或新血管形成，例如，CNV 和 BV 成熟、水肿、血管通透性和纤维化、纤维发生和疤痕，其伴随眼病和眼部病症，或者是眼病和眼部病症的部分的基本病理特征。

术语“联合疗法”是指一种治疗方案，其涉及提供至少两种不同的疗法以达到指定的治疗效果。例如，联合疗法可以涉及给予两种或更多种化学上不同的活性组分，例如，抗 LPA 抗体和抗 S1P 抗体。可替换地，联合疗法可以涉及给予相对于生物活性脂质具有活性的免疫衍生部分以及给予一种或多种其它化疗药物。可替换地，联合疗法可以涉及连同进行另一种治疗一起给予抗脂质抗体，如放射治疗和/或外科手术。另外，联合疗法可以涉及给予抗脂质抗体连同一种或多种其它生物制剂（例如，抗 VEGF、TGF β 、PDGF、或 bFGF 制剂）、化疗药物以及另一种治疗如放射治疗和/或外科手术。在利用两种或多种化学上不同的活性组分进行的联合治疗的范围内，应当明了，活性组分可以作为相同组合物的一部分或作为不同的组合物来给予。当作为分开的组合物给予时，可以在相同或不同的时间、通过相同或不同的途径、利用相同或不同的给药方案来给予包含不同活性组分的组合物，其均根据具体情况需要并由主治医生确定。类似地，当一种或多种抗脂质抗体物质（例如，抗 LPA

抗体)单独或连同一种或多种化疗药物而与例如,放射治疗和/或外科手术结合时,可以在外科手术或放射治疗之前或之后递送药物。

“抗 S1P 剂”是指对 S1P 具有特异反应性的任何制剂,并且包括结合 S1P 以及其变体的抗体或抗体源性分子或非抗体源性部分。

“半抗原”是指适合于共轭于半抗原的分子,从而使半抗原具有免疫原性。典型的、非限制性类型的半抗原分子是蛋白质,其实例包括白蛋白、钥孔戚血蓝素、血凝素(hemagglutinin)、破伤风毒素(tetanus)、以及白喉类毒素。适合于本发明使用的半抗原分子的其它类型和实例在本技术领域是已知的。这些以及以后发现或发明的天然存在或合成半抗原可以适用于本发明。

术语“化疗药物”是指抗癌剂和其它抗超增生剂。简而言之,“化疗药物”是指用来破坏细胞和组织的化学物质。这样的制剂包括但不限于:(1)DNA 损伤剂和抑制 DNA 合成的制剂:蒽环类抗生素(多柔比星、柔红霉素(donorubicin)、表柔比星)、烷化剂(苯达莫司汀、白消安、卡铂、卡莫司汀、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、达卡巴嗪、六甲三聚氰胺、异环磷酰胺、洛莫司汀、氮芥、美法仑、米托坦、丝裂霉素、哌泊溴烷、丙卡巴肼、链佐星、塞替派、以及三亚胺嗪)、铂衍生物(顺铂、卡铂、顺式二氯二氨合铂)、端粒酶和拓扑异构酶抑制剂(Camptosar), (2)微管蛋白解聚剂:紫杉烷类(紫杉醇、多西他赛、BAY 59-8862), (3)抗代谢物,如卡培他滨、氯脱氧腺苷、阿糖胞苷(以及其激活形式,ara-CMP)、阿糖胞苷、氮烯咪胺、氟尿苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、5-DFUR、吉西他滨、羧基脲、6-巯基嘌呤、氨甲喋呤、戊制菌素、三甲曲沙、以及 6-巯鸟嘌呤, (4)抗血管形成药(Avastin、沙利度胺、舒尼替尼、来那度胺),血管破坏剂(黄酮类化合物/黄酮、DMXAA、考布他汀衍生物如 CA4DP、ZD6126、AVE8062A

等)，(5)生物制剂，如抗体或抗体片段(赫赛汀(Herceptin)、阿瓦斯汀(Avastin)、Panorex、利必妥(Rituxan)、泽娃灵(Zevalin)、Mylotarg、Campath、Bexar、爱必妥(Erbitux)、Lucentis)，(6)内分泌治疗：芳香酶抑制药(4-氢雄烯二酮、依西美坦、氨鲁米特、阿那曲唑、来曲唑)、抗雌激素药(他莫昔芬、托瑞米芬、Raoxifene、氟维斯群(Faslode))、类固醇(如地塞米松)，(7)免疫调节剂：细胞因子如IFN- β 和IL2、整合素的抑制剂，其它黏附蛋白质和间质金属蛋白酶，(8)组蛋白去乙酰基化酶抑制剂，(9)信号转导的抑制剂如酪氨酸激酶的抑制剂如伊马替尼(格列卫(Gleevec))，(10)热激蛋白的抑制剂，(11)类视黄醇，如全反式视黄酸，(12)生长因子受体抑制剂或生长因子本身的抑制剂，(13)抗有丝分裂化合物，如诺维本、紫杉醇、泰索帝、长春花碱、长春新碱、长春地辛、以及长春瑞滨，(14)消炎药，如COX抑制剂，以及(15)细胞周期调节剂，例如，检验点调节剂和端粒酶抑制剂。

如在本文中所使用的，术语“鞘脂”是指在本技术领域称作鞘脂的一类化合物，其包括但不限于以下化合物(参见<http://www.lipidmaps.org>，其为包含以下由方括号内的字母数字字符串指示的链接的网站，上述链接包含相应化合物的化学式、结构信息等)：

鞘氨基醇碱[SP01]

鞘氨醇(Sphing-4-enines, Sphingosines)[SP0101]

神经鞘氨醇[SP0102]

4-羟双氢鞘氨醇(植物鞘氨醇)[SP0103]

鞘氨基醇碱同系物和变体[SP0104]

鞘氨基醇碱 1-磷酸[SP0105]

溶鞘磷脂和溶血糖鞘脂[SP0106]

N-甲基化鞘氨基醇碱[SP0107]

鞘氨基醇碱类似物[SP0108]

神经酰胺[SP02]

N-酰基鞘氨醇（神经酰胺）[SP0201]

N-酰基神经鞘氨醇（二氢神经酰胺）[SP0202]

N-酰基-4-羟基神经鞘氨醇（植物神经酰胺）[SP0203]

酰基神经酰胺[SP0204]

神经酰胺 1-磷酸[SP0205]

鞘磷脂[SP03]

神经酰胺磷酸胆碱（鞘磷脂）[SP0301]

神经酰胺磷酸乙醇胺[SP0302]

神经酰胺磷酸肌醇[SP0303]

磷酸鞘脂[SP04]

中性鞘糖脂[SP05]

简单 Glc 系列（GlcCer、LacCer 等）[SP0501]

GalNAcb1-3Gal1-4Galb1-4Glc-(Globo 系列) [SP0502]

GalNAcb1-4Galb1-4Glc- (Ganglio 系列) [SP0503]

Galb1-3GlcNAcb1-3Galb1-4Glc- (Lacto 系列) [SP0504]

Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4Glc- (Neolacto 系列) [SP0505]

GalNAcb1-3Gal1-3Galb1-4Glc- (Isoglobo 系列) [SP0506]

GlcNAcb1-2Man1-3Manb1-4Glc- (Mollu 系列) [SP0507]

GalNAcb1-4GlcNAcb1-3Manb1-4Glc-(Arthro 系列)[SP0508]

Gal- (Gala 系列) [SP0509]

其它[SP0510]

酸性鞘糖脂[SP06]

神经节苷脂[SP0601]

硫酸鞘糖脂 (硫苷脂) [SP0602]

葡糖醛酸鞘脂[SP0603]

鞘糖磷脂[SP0604]

其它[SP0600]

碱性鞘糖脂[SP07]

两性鞘糖脂[SP08]

偶砷鞘脂 (arsenosphingolipid) [SP09]

如下文详细描述，本发明提供了抗鞘脂 S1P 剂，其可用于治疗或预防高增生病症（如癌症和心血管或脑血管疾病和病症）以及各种眼部疾病。尤其是本发明涉及 S1P 以及其变体，包括但不限于鞘氨醇-1-磷酸[sphingene-1-磷酸；D-赤型-鞘氨醇-1-磷酸；鞘氨醇-1-磷酸；(E,2S,3R)-2-氨基-3-羟基-十八-4-烯氧基]磷酸(AS 26993-30-6)，DHS1P 被定义为二氢鞘氨醇-1-磷酸[神经鞘氨醇-1-磷酸；[(2S,3R)-2-氨基-3-羟基-十八氧基]磷酸；D-赤型-二氢-D-鞘氨醇-1-磷酸(CAS 19794-97-9)；SPC 是神经鞘氨醇磷酸胆碱、溶鞘磷脂、鞘氨醇磷酸胆碱 (sphingosylphosphocholine)、鞘氨醇磷酸胆碱 (sphingosine phosphorylcholine)、氯化三甲基铵乙酰胂 (ethanaminium)；2-(((2-氨基-3-羟基-4-十八烯基)氧)羟基氧磷基)氧)-N,N,N-三甲基-, 氯化物, (R-(R*, S*-(E))), 2-[[[(E,2R,3S)-2-氨基-3-羟基-十八-4-烯氧基]-羟基-磷酰基]乙氧基-三甲基-氯化铵 (CAS 10216-23-6)。

当在本文中使用时，除非另有规定，术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗 S1P 剂对其具有反应性的 S1P 区。

术语“高增生性病征”是指与不受控制的增殖细胞有关的疾病和病症，包括但不限于器官和组织细胞的不受控制的生长，从而导致癌症或瘤形成以及良性肿瘤。与内皮细胞有关的高增生性病征可以导致血管发生的疾病如血管瘤、子宫内膜异位症、肥胖症、年龄相关性黄斑变性和各种视网膜病、以及由于在治疗动脉粥样硬化时的内支架置入术而引起再狭窄的内皮细胞和平滑肌细胞的增殖。与成纤维细胞有关的高增生性病征（例如，纤维发生）包括但不限于过度的疤痕形成（例如，纤维化）的病症，如与年龄相关的黄斑变性、心脏重塑和与心肌梗死有关的衰竭，过度的伤口愈合如由于外科手术或损伤、瘢痕疙瘩、以及纤维瘤和内支架置入术而通常发生的。

本发明的组合物用于基于鞘脂的治疗方法。“治疗”是指预防和/或治疗疾病、病症、或身体创伤。

“心血管治疗”包括心脏治疗以及预防和/或治疗与心血管系统有关的其它疾病，如心脏病。术语“心脏病”包括涉及心脏或心肌组织的任何类型的疾病、病症、创伤或手术治疗。人们对与心肌组织的缺氧和/或缺血和/或心力衰竭有关的心脏病特别感兴趣。由缺血引起的一种类型的心脏病是再灌注损伤，如当在治疗中使用抗凝剂、溶血栓剂、或抗心绞痛药时、或当通过血管成形术或通过冠状动脉拼接术打开心脏血管时可能发生的。本发明涉及的另一种类型的心脏病是冠状动脉疾病（CAD），其会由动脉硬化，尤其是动脉粥样硬化引起，是缺血的常见原因。CAD 的症状例如是稳定型或不稳定型心绞痛，并且能够导致心肌梗死（MI）和心脏性猝死。特别感兴趣的病症包括但不限于：心肌缺血；急性心肌梗死（AMI）；

冠状动脉疾病（CAD）；急性冠脉综合征（ACS）；心肌细胞和组织损伤，其可以在具有或不具有支架的情况下在经皮血运重建（冠状动脉血管成形术）期间或作为经皮血运重建（冠状动脉血管成形术）的结果而发生；冠状动脉旁路拼接术（CABG）或其它手术或医学操作或疗法，其可以引起人类的缺血或缺血/再灌注损伤；以及心血管创伤。术语“心力衰竭”包括急性心肌梗死、心肌炎、心病、充血性心力衰竭、感染性休克、心脏创伤以及先天性心力衰竭。导致心力衰竭的各种缺血性病征称作急性冠脉综合征（ACS）。

术语“心脏病治疗剂”是指用于治疗由心脏和心肌疾病和病症引起的或伴有心脏和心肌疾病和病症的疾病和病症的制剂。

“脑血管病的治疗”是指涉及预防和/或治疗伴随脑缺血和/或缺氧的疾病和病症的治疗。特别感兴趣的是由完全性缺血（由心脏病引起的）所造成的脑缺血和/或缺氧，包括但不限于心力衰竭。

术语“鞘脂代谢物”是指由其获得鞘脂的化合物、以及降解特定鞘脂所获得的化合物。换言之，“鞘脂代谢物”是指与鞘脂代谢途径有关的化合物。代谢物包括代谢前体和代谢产物。术语“代谢前体”是指从其获得鞘脂的化合物。特别感兴趣的代谢前体包括但不限于 SPC、鞘磷脂、二氢鞘氨醇、二氢神经酰胺、以及 3-酮基神经鞘氨醇。术语“代谢产物”是指由降解鞘脂而获得的化合物，如磷酸胆碱（例如，磷酸胆碱（phosphocholine）、磷酸胆碱（choline phosphate））、脂肪酸（包括游离脂肪酸）、以及十六烷醛（例如，十六醛）。

如本文中所使用的，术语“治疗的”包括对疾病或病症的所有治疗。本发明的“治疗”剂可以防卫或预防的方式起作用，包括与设计用来靶向可以被确定为处于危险中（遗传药理学）的个体的程序相结合的方式；或以改善或治愈的方式起作用；或可以用来减缓

待治疗疾病或病症的至少一种症状的进展速率或程度；或可以用来最大程度减少所需要的时间、任何不适或疼痛的发生或程度、或伴随从疾病、病症或身体创伤恢复后的体力限度；或可以对其它疗法和治疗起到辅助作用。

“治疗”是指治疗性治疗和预防性措施。需要治疗者包括已经患有病症者以及要预防病症者。

术语“联合疗法”是指一种治疗方案，其涉及提供至少两种不同疗法以达到指定的治疗效果。例如，联合疗法可以涉及给予两种或更多种化学上不同的活性组分，例如，快速作用化疗药物和抗脂质抗体。可替换地，联合疗法可以涉及单独给予或连同另一种治疗（如放射治疗和/或外科手术）一起给予抗脂质抗体和/或一种或多种化疗药物。另外，联合疗法可以涉及连同一种或多种其它生物制剂（例如，抗 VEGF、TGF β 、PDGF、或 bFGF 剂）、化疗药物以及另一种治疗（如放射治疗和/或外科手术）一起给予抗脂质抗体。在给予两种或更多种化学上不同的活性组分的情况下，应当明了，活性组分可以作为相同组合物的部分或作为不同组合物来给予。当作为分开的组合物给予时，包含不同活性组分的组合物可以在相同或不同的时间、通过相同或不同的途径、利用相同或不同的给药方案来给予，其均根据具体情况的需要并由主治医生确定。类似地，当一种或多种抗脂质抗体物质（例如，抗 LPA 抗体）单独或连同一种或多种化疗药物而与例如，放射治疗和/或外科手术结合时，可以在外科手术或放射治疗之前或之后递送药物。

“单药治疗”是指基于递送一种治疗有效化合物的治疗方案，不管是作为单剂量或作为随着时间推移的若干剂量来给予。

“瘤形成”或“癌症”是指异常的和不受控制的细胞生长。“新生物”、或肿瘤或癌症，是细胞生长的异常的、不受调节的、以及

紊乱的增殖，并且通常称作癌症。新生物可以是良性的或恶性的。如果新生物具有破坏性生长、侵袭性、以及转移的性能，则是恶性的、或癌性的。侵袭性是指新生物通过浸润或破坏周围组织而局部扩散，通常冲破限定组织边界的基层层，从而经常进入体内循环系统。转移通常是指肿瘤细胞通过淋巴管或血管的散布。转移还指肿瘤细胞通过直接延伸通过浆膜腔、或蛛网膜下隙或其它腔隙的迁移。通过转移过程，肿瘤细胞迁移到身体的其它区域，从而在远离最初出现部位的区域建立新生物。

就治疗来说，“哺乳动物”是指分类为哺乳动物的任何动物，其包括人类、家养和农场动物、以及动物园动物、体育动物、或宠物动物，如狗、马、猫、牛等。优选地，哺乳动物是人。

“天然抗体”和“天然免疫球蛋白”通常是约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白，由两个相同的轻（L）链和两个相同的重（H）链构成。每条轻链通过一个共价二硫键连接于重链，而在不同免疫球蛋白同种型的重链之间二硫键的数目是不同的。每条重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫桥。每条重链在一端具有可变结构域（ V_H ），接着是若干恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域（ V_L ）而在另一端具有恒定结构域；轻链的恒定结构域对准（aligned with）重链的第一恒定结构域，而轻链的可变结构域则对准重链的可变结构域。认为特定的氨基酸残基在轻链可变结构域和重链可变结构域之间形成界面。

术语“可变”区包含骨架和 CDR（在其它情况下称作高变区）并且是指以下事实：在抗体之间，可变结构域的某些部分在序列方面是广泛不同的，并且用于每个特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，变异性并不是均匀地分布于整个抗体的可变结构域。在轻链和重链可变结构域，它均集中在三个称作高可变区的区段。

可变结构域的更高保守部分被称作骨架区 (FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个 FR (分别为 FR1、FR2、FR3 以及 FR4)，大部分采取 β -折叠构型，通过三个高可变区加以连接，该环连接 β -折叠结构形成环并在某些情况下形成 β -折叠结构的一部分。在每个链中的高可变区通过 FR 被紧密地保持在一起，并且与来自其它链的高可变区紧密地保持在一起，有助于形成抗体的抗原结合位点 (参见 Kabat, et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), 第 647-669 页)。恒定结构域并不直接涉及将抗体结合于抗原，但呈现各种效应子功能，如抗体依赖性细胞毒性中抗体的参与。

当在本文中使用时，术语“高可变区”是指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。高可变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基 (例如，在轻链可变结构域中的残基 24-34 (L1)、50-56 (L2)、和 89-97 (L3)，以及在重链可变结构域中的 31-35 (H1)、50-65 (H2)、和 95-102 (H3); Kabat, et al. (1991), 上文) 和/或那些来自“高可变环”的残基 (例如在轻链可变结构域中的残基 26-32 (L1)、50-52 (L2)、和 91-96 (L3) 以及在重链可变结构域中的 26-32 (H1)、53-55 (H2)、和 96-101 (H3); Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。如本文中所定义的，“骨架”或“FR”残基是那些不同于高可变区残基的可变结构域残基。

抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段，称作“Fab”片段，每个具有单抗原结合位点，以及残余“Fc”片段，其名称反映了其容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生 $F(ab')_2$ 片段，其具有两个抗原结合位点并且仍然能够交联抗原。

“Fv”是最小抗体片段，其包含完全抗原识别和结合位点。此区由紧密、非共价缔合的一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体

构成。正是以这种构型，每个可变结构域的三个高可变区相互作用以在 V_H - V_L 二聚体的表面上限定抗原结合位点。共同地，上述 6 个高可变区将抗原结合特异性赋予抗体。然而，甚至单可变结构域（或一半 F_v ，其仅包含对于抗原具有特异性的三个高可变区）也具有识别和结合抗原的能力，虽然亲和力低于整个结合位点。

Fab 片段还包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域（CH1）。Fab' 片段与 Fab 片段的差别在于在重链 CH1 结构域（包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸）的羧基末端加入几个残基。本文中 Fab'-SH 是用于 Fab' 的名称，其中恒定结构域的半胱氨酸残基携带游离硫醇基。F(ab')₂ 抗体片段最初产生为成对的 Fab' 片段，其在它们之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学耦联也是已知的。

基于恒定结构域的氨基酸序列，来自任何脊椎动物物种的抗体（免疫球蛋白）的“轻链”可以被指定为两种明显不同类型之一，称作 κ 和 λ 。

取决于它们重链的恒定结构域的氨基酸序列，免疫球蛋白可以被指定为不同的类型。目前有 5 种主要类型的免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG、以及 IgM，并且这些主要类型的若干种可以进一步分为亚类（同种型），例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、以及 IgA2。对应于不同类的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、以及 μ 。不同类免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。

术语“抗体”在本文中是在广义上加以使用并且具体包括单克隆抗体（包括全长单克隆抗体）。多克隆抗体、多特异性抗体（例如，双特异性抗体），抗体片段，以及结合剂，其采用亲代抗体的 CDR（或其保留抗原结合活性的变体）。本文中抗体被定义为保留亲代抗体的至少一种所期望的活性。所期望的活性可以包括特异性

地结合抗原的能力、体外抑制增殖 (proloration) 的能力、体内抑制血管发生的能力、以及体外改变细胞因子轮廓的能力。"抗体片段"包括全长抗体的一部分, 通常是其抗原结合或可变结构域。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、以及 Fv 片段; 双体分子; 线状抗体; 单链抗体分子; 以及形成自抗体片段的多特异性抗体。

如在本文中所使用的, 术语“单克隆抗体”是指获自基本上同型抗体的群体的抗体, 例如, 包含群体的个体抗体是相同的, 除了可能的天然发生的突变, 其可以少量存在。单克隆抗体是高度特异的, 针对单抗原位点。此外, 不同于常规 (多克隆) 抗体制剂, 其通常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决定簇。修饰词“单克隆”表示抗体的特性: 是获自抗体的基本上同型群体, 而不应看作是需要通过特定的方法来生产抗体。例如, 根据本发明使用的单克隆抗体可以通过首先由 Kohler 等, Nature 256:495 (1975) 描述的杂交瘤方法加以制备, 或可以通过重组 DNA 方法加以制备 (参见例如, 美国专利第 4,816,567 号)。利用例如在 Clackson, et al., Nature 352:624-628 (1991) 和 Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) 中描述的技术, “单克隆抗体”还可以分离自噬菌体抗体文库。

本文中的单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体 (免疫球蛋白), 其中重链和/或轻链的一部分相同于或同源于在衍生自特定物种或属于特定抗体类或亚类的抗体中的对应序列, 而链的剩余部分相同于或同源于在衍生自另一物种或属于另一抗体类或亚类的抗体中的对应序列, 以及上述抗体的片段, 只要它们呈现所期望的生物学活性 (美国专利第 4,816,567 号; 以及 Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :6851-6855 (1984))。

非人（例如，小鼠）抗体的“人源化”形式是嵌合抗体，其包含衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。在大多数情况下，人源化抗体是人免疫球蛋白（受体抗体），其中受体的高可变区残基被来自非人物种（供体抗体）的高可变区残基取代，其中非人物种如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类，其具有所期望的特异性、亲和力、以及能力。在某些情况下，人免疫球蛋白的骨架区（FR）残基被对应的非人残基取代。此外，人源化抗体可以包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步完善抗体性能。通常，人源化抗体将基本上均包含至少一个、以及通常两个可变结构域，其中所有或基本上所有的高可变区对应于非人免疫球蛋白的那些高可变区，以及所有或基本上所有的FR是人免疫球蛋白序列的那些FR。人源化抗体可选地还将包含至少一部分的免疫球蛋白恒定区（Fc），通常为人免疫球蛋白的恒定区。关于进一步的详情，参见 Jones, et al., Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann, et al, Nature 332:323-329 (1988); 以及 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)和 Hansen, WO2006105062。

“单链 Fv”或“sFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域，其中这些结构域存在于单多肽链中。通常，Fv 多肽进一步包含在 V_H 和 V_L 结构域之间的多肽接头，其使 sFv 能够形成所期望的用于抗原结合的结构。关于 sFv 的综述，参见 Pluckthun 的 The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)。

术语“双体分子”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段，该片段包含重链可变结构域（ V_H ），其连接于在相同多肽链（ V_H - V_L ）中的轻链可变结构域（ V_L ）。通过使用太短以致在相同链上的两个结构域之间不允许配对的接头，结构域被迫配对于另一链的互补结构域并产生两个抗原结合位点。例如，在 EP 404,097、WO 93/11161、

以及 Hollinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) 中更充分描述了双体分子。

当在整个本申请中使用时，术语“线状抗体”是指在 Zapata, et al. Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)中所描述的抗体。简单地说，这些抗体包含一对串联 Fd 区段 ($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$)，其形成一对抗原结合区。线状抗体可以是双特异性的或单双特异性的。

在本文中，“变异”抗鞘脂抗体是指一种分子，其在氨基酸序列方面不同于“亲代”抗鞘脂抗体氨基酸序列（借助于在亲代抗体序列中添加、缺失、和/或取代一个或多个氨基酸残基），但保留亲代抗结合抗体的至少一种所期望的活性。所期望的活性可以包括特异性地结合抗原的能力、体外抑制增殖的能力、体内抑制血管发生的能力、以及体外改变细胞因子轮廓的能力。在一种实施方式中，变体包含在亲代抗体的一个或多个高可变区中的一个或多个氨基酸取代。例如，变体可以包含在亲代抗体的一个或多个高可变区中的至少一个，例如，约一个至约 10 个，以及优选约两个至约 5 个取代。通常，变体将具有一种氨基酸序列，其与亲代抗体重链或轻链可变结构域序列具有至少 50%的氨基酸序列同一性，更优选至少 65%，更优选至少 75%，更优选至少 80%，更优选至少 85%，更优选至少 90%，以及最优选至少 95%的序列同一性。相对于此序列的同一性或同源性在本文中被定义为，在对比序列和引入间隙（如果必要的话）以后（以达到最大百分比序列同一性），在候选序列中相同于亲代抗体残基的氨基酸残基的百分比。N 端、C 端、或内部延伸、缺失、或插入抗体序列均不应认为会影响序列同一性或同源性。变体保留结合鞘脂的能力并且优选具有所期望的活性，其优越于亲代抗体的活性。例如，变体可以具有更强的结合亲和力、增强的减少血管发生和/或停止肿瘤进展的能力。为了分析这样的所期望的性能(例如较少免疫原性的、更长的半寿期、增强的稳定性、增强

的潜能),应当比较变体的 Fab 形式和亲代抗体的 Fab 形式或变体的全长形式和亲代抗体的全长形式,例如,因为已发现,抗鞘脂抗体的格式会影响其在本文披露的生物学活性测定中的活性。本文中特别感兴趣的变异抗体可以是这样一种变异抗体,其呈现至少一种所期望活性的至少约 5%,优选至少约 10%、25%、59%、或更大。优选的变体是这样一种变体,当和亲代抗体比较时,其具有优越的生物物理性能(如体外测得的)或优越的生物学活性(如体外或体内测得的)。

本文中的“亲代”抗体是由用于制备变体的氨基酸序列编码的抗体。优选地,亲代抗体具有人骨架区,并且,如果存在的话,具有人抗体恒定区。例如,亲代抗体可以是人源化或人抗体。

“分离的”抗体是这样一种抗体,其已被鉴定和分离和/或回收自其天然环境的成分。其天然环境的污染物成分是将干扰抗体的诊断或治疗应用的物质,并且可以包括酶、激素、以及其它蛋白质或非蛋白质溶质。在优选实施方式中,抗体将被纯化(1)按抗体的重量计达到大于 95%,如通过劳里方法确定的,并且按重量计最优选大于 99%,(2)达到这样的程度,其足以获得 N 端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基,其中通过使用旋杯序列分析仪(spinning cup sequenator),或(3)在还原或非还原条件下通过 SDS-PAGE 达到同质性,其中使用考马斯蓝或优选银染。分离的抗体包括在重组细胞内的原位抗体,因为抗体的天然环境的至少一种成分将不存在。然而,通常将通过至少一个纯化步骤来制备分离的抗体。

当在本文中使用时,术语“标记”是指直接或间接共轭于抗体的可检测化合物或组分。标记本身可以是独自可检测的(例如,放射性同位素标记或荧光标记)或,在酶标记的情况下,可以催化可检测的底物化合物或组分的化学变化。

“固相”是指非水基质，本发明的抗体可以与其黏附或抗体或其它抗-SIP 结合剂可以固定在其上。本文包括的固相的实例包括部分或完全由玻璃（例如，受控孔玻璃）、多糖（例如，琼脂糖）、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇以及聚硅氧烷形成的那些固相。在某些实施方式中，根据具体情况，固相可以包括测定板的孔，而在其它情况下则是纯化柱（例如，亲和层析柱）。此术语还包括离散颗粒的不连续固相，如在美国专利第 4,275,149 号中所描述的那些不连续固相。

“脂质体”是由各种类型的脂质、磷脂和/或表面活性剂组成的小囊，其可用于向哺乳动物递送药物（如本文描述的抗鞘脂抗体以及，可选地，化疗药物）。脂质体的成分通常以双层形式排列，类似于生物膜的脂质排列。“分离的”核酸分子是这样的核酸分子，其被鉴定和分离自至少一种污染物核酸分子，在抗体核酸的天然源中分离的核酸分子通常伴随污染物核酸分子。分离的核酸分子在形式或环境方面不同于在自然界发现的核酸分子。因此分离的核酸分子不同于在天然细胞中存在的核酸分子。然而，分离的核酸分子包括包含在通常表达抗体的细胞中的核酸分子，其中，例如，核酸分子所处的染色体位置不同于在天然细胞中的位置。

术语“调控序列”是指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必要的 DNA 序列。适用于例如原核细胞的调控序列包括启动子、可选的操作子序列、以及核糖体结合位点。已知真核细胞可利用启动子、多腺苷酸化信号、以及增强子。

当核酸被置于与另一核酸序列的功能关系中时，则核酸是“可操作连接的”。例如，如果用于前序列或分泌前导序列的 DNA 被表达为参与多肽分泌的前体蛋白，则用于前序列或分泌前导序列的 DNA 可操作地连接于用于多肽的 DNA；如果启动子或增强子影响

序列的转录，则启动子或增强子可操作地连接于编码序列；或如果核糖体结合位点被定位以致促进翻译，则核糖体结合位点可操作地连接于编码序列。通常，“可操作连接的”是指被连接的核酸分子是邻接的，并且，在分泌前导序列的情况下，是邻接的和处于读码阶段。然而，增强子并不必须是邻接的。通过在方便的限制位点的连接作用来完成连接。如果这样的位点并不存在，则按照常规做法使用合成寡核苷酸衔接子或接头。

如在本文中所使用的，术语“细胞”、“细胞系”、以及“细胞培养”可互换使用并且所有这样的名称包括子代。因此，术语“转化体”和“转化细胞”包括原代主体细胞和从其衍生的培养物，而与传递次数无关。还应当明了，由于蓄意突变（deliberate mutation）或无意突变（inadvertent mutation），所有子代可能并不具有精确相同的DNA含量。包括具有相同功能或生物学活性的突变子代，如在最初转化细胞中筛查的。其中使用了不同名称，根据上下文它将是清楚的。

根据本发明的“具备专利性的”组合物、方法、机器、或制品是指在进行分析时其主题名称满足专利性的所有法定要求。例如，关于新颖性、创造性等，如果以后的研究指出一项或多项权利要求包含否定新颖性、创造性等的一种或多种实施方式，则由“具备专利性的”实施方式限定的权利要求具体地排除不具备专利性的实施方式。而且，所附权利要求将被解释为提供最广的合理范围，以及保护它们的有效性。此外，以这样的方式解释权利要求，即（1）保护它们的有效性以及（2）从本申请作为专利被提交或公开时到一项或多项所附权利要求的有效性受到质疑时，在具备专利性的一项或多项法定要求被修订或如果用于评估专利性的特定法定要求是否满足的标准发生变化的情况下提供最宽的合理解释。

术语“药用盐”是指这样的盐，其保留本发明的制剂和化合物的生物有效性和性能并且其在生物上或其它方面也是需要的。在许多情况下，借助于存在带电荷基团，例如，带电荷氨基和/或羧基基团或与其类似的基团，本发明的制剂和化合物能够形成酸式盐和/或碱式盐。药用酸加成盐可以制备自无机酸和有机酸，而药用碱加成盐可以制备自无机碱和有机碱。对于药用盐的综述(参见 Berge, et al. (1977) J. Pharm. ScL, vol. 66, 1-19)。

“多个”或“多种”是指一个(种)以上。

术语“分开的”、“纯化的”、“分离的”等是指包含在容纳样品的容器中的样品的一种或多种成分被或已被从存在于容器中的一种或多种其它样品成分物理地除去，或被稀释在存在于容器中的一种或多种其它样品成分中。在分离或纯化步骤中可以被除去或稀释的样品成分包括化学反应产物、未反应的化学物质、蛋白质、碳水化合物、脂质、以及未结合的分子。

本文中所使用的术语“物种(或物质)”用于各种情况，例如，化疗药物的特定物质。在每一种情况下，该术语是指在特定范围内提及的化学上难以区分的分子的群体。

“特异性地结合”和“特异性结合”等是指两种分子之间的特异的、非随机相互作用，该相互作用取决于存在使得分子之间可以发生适当的化学或分子相互作用结构、疏水/亲水、和/或静电特征。

“受治疗者”或“患者”是指需要治疗的动物，其中治疗可以通过本发明的分子来进行。按照本发明可以治疗的动物包括脊椎动物，其中哺乳动物如牛、犬、马、猫、绵羊、猪、以及灵长类(包括人类和非人灵长类)动物是特别优选的实例。

“治疗有效量”（或“有效量”）是指当给予受治疗者或患者时足以实施治疗的活性组分（例如，根据本发明的制剂）的量。因此，可以由本领域技术人员容易地确定根据本发明的组合物的治疗有效量。在眼治疗的范围内，“治疗有效量”是这样的量，其在与眼部疾病或病症的治疗有关的一个或多个参数方面产生客观上测得的变化，其包括与眼部疾病或病症有关的一种或多种基因的表达的增加或减少、凋亡或其它细胞死亡通路的诱导、症状的临床改善、异常的新血管形成或炎症的降低等。当然，治疗有效量将取决于待治疗的特定受治疗者和病症、受治疗者的体重和年龄、疾病状态的严重性、选用的特定化合物、采用的给药方案、给予的时间、给予方式等，所有这些可以容易地由本领域技术人员确定。应当明了，在联合疗法的情况下，特定活性组分的治疗有效量可以与作为单药治疗（即，采用仅一种化学实体作为活性组分的治疗方案）给予时的活性组分的治疗有效量不同。

术语疾病或病症的“治疗”包括预防或防止疾病或病症（即，使临床症状不发展）；抑制疾病或病症（即，阻止或抑制临床症状的发展）；和/或缓解疾病或病症（即，使临床症状消退）。如将明了的，并不总是可以区分“预防”和“抑制”疾病或病症，因为最终诱导事件可以是未知的或潜在的。因此，术语“预防”将被理解为构成一种类型的“治疗”，其包括“预防”和“抑制”。因此术语“治疗”包括“预防”。

术语“治疗方案”是指利用化疗药物、放射治疗、外科手术、基因治疗、DNA 疫苗和治疗、基于反义的疗法（包括 siRNA 疗法）、抗血管形成疗法、免疫疗法、骨髓拼接、适体和其它生物制剂如抗体和抗体变体、诱骗受体、以及其它基于蛋白质的疗法对疾病或病症进行的任何治疗。

发明内容

本发明涉及具备专利性的人源化抗鞘脂剂，该人源化抗鞘脂剂包括抗体和抗鞘脂抗体变体，从治疗和/或诊断角度考虑，其具有所期望的性能，包括对鞘脂的强结合亲和力，结合并中和鞘氨醇-1-磷酸（S1P）的能力，尤其是在生理范围内（例如，在活组织、血液等中）和在生理条件下，以及包括亚型（isoform）、变体、同分异构体、和相关化合物。尤其是，本发明涉及针对 S1P 的抗体，尤其是单克隆抗体，更具体地是人源化单克隆抗体及其变体。这样的抗体和变体优选包括在药物组合物中，该药物组合物适合于给予已知或疑似需要用上述化合物进行治疗的受治疗者。除组合物之外，本发明还提供了包括上述组合物的试剂盒、制备上述抗 S1P 抗体和变体的方法，以及利用上述制剂进行治疗的方法。

在一种实施方式中，提供了分离的抗 S1P 抗体重链和轻链，其包含新鉴定的优选序列的可变结构域，尤其是对重链而言的 SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 35 以及对轻链而言的 SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 37。在另一种实施方式中，提供了抗 S1P 剂，其在生理条件下相对于鞘氨醇-1-磷酸(S1P)具有活性并且其包含至少一种 CDR 肽，该肽与在本文其它地方说明的 CDR 序列具有至少 50%的氨基酸序列同一性，以及高达并包括 100%的同一性。

在一种实施方式中，根据本发明的抗鞘脂抗体具有轻链可变结构域，其包含具有以下氨基酸序列的高变互补决定区(CDR): ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10; CDRL1)、EGNILRP (SEQ ID NO:11; CDRL2)以及 LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12; CDRL3)。优选地,重链可变结构域包含具有以下氨基酸序列的 CDR: DHTIH (SEQ ID NO: 13; CDRH1)、GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15; CDRH3) 以及 CISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 14; CDRH2) 或

AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO:31 ; CDRH2)。在本发明的特别优选的实施方式中，一个或多个 CDR 以使 CDR 保留它们的结合并中和 S1P 的能力的方式而拼接到骨架。不限于以下实例，骨架可以表示紧密旁侧 CDR 的抗体轻链和重链的人序列，但也可以表示任何结构，其以一定的方式呈现 CDR 以便优化人源化抗体在其结合于 S1P 方面的性能特征或其它特性，其可以增强抗体的效能、稳定性、表达、生物半衰期、溶解性、免疫原性、药理分布 (pharmacodistribution)、以及贮存期限。

优选地，在人骨架区中具有三个重链高可变 CDR 区，例如，作为由下式表示的邻接序列：
FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4。

本发明进一步提供了一种抗鞘脂抗体重链可变结构域，其包含本文中由 SEQ ID NO:27 表示的氨基酸序列。一种特别有用的重链可变结构域序列是在以下实施例 12 中描述的人源化抗体的重链可变结构域序列，并且包含 SEQ ID NO: 32 的重链可变结构域序列。上述优选的重链可变结构域序列可以结合于例如多肽（其包含本文中由 SEQ ID NO: 33 表示的轻链可变结构域序列），结合于其它轻链可变结构域序列，只要获得的分子结合于鞘脂即可。

在另一种实施方式中，本发明提供了一种人源化抗鞘脂抗体轻链可变结构域，其包含在本文中由 SEQ ID NO: 17 表示的氨基酸序列。在一种实施方式中，一种有用的轻链可变结构域序列是以下实施例 12 的人源化抗体的轻链可变结构域序列，并且包含 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:37 的轻链可变结构域序列。

在一种优选实施方式中，本发明提供了一种人源化抗鞘脂抗体，其具有包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列的轻链和包含 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列的重链。

轻链可变结构域可以包含具有以下氨基酸序列的高可变区：CDRL1 (SEQ ID NO: 10)、CDRL2 (SEQ ID NO: 11)、以及 CDRL3 (SEQ ID NO: 12)。优选地，在人骨架区中可具有上述三个轻链高可变区，例如，作为由下式表示的邻接序列：FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CD-RL3-FR4。

本发明还提供了亲代抗鞘脂抗体的变体，优选其中亲代抗体是人源化或人抗鞘脂抗体。上述变体结合鞘脂，尤其是 S1P，并且包含在亲代抗鞘脂抗体的重链或轻链可变结构域的高可变区中的氨基酸取代。上述变体优选具有在抗鞘脂抗体的一个或多个高可变区中的一个或多个取代。根据一种实施方式，取代是在亲代抗体的重链可变结构域中，例如，氨基酸取代可以是在重链可变结构域 CDRH1 和/或 CDRH3 中。在上述两个高可变区中均可存在取代。本文中证明了这样的“亲和力成熟的”变体比亲代抗鞘脂抗体（由其产生“亲和力成熟的”变体）更强地结合鞘脂。例如，通过亲和力成熟产生的抗体可以具有显著低于亲代抗鞘脂抗体的 K_d 值的 K_d 值。

亲和力成熟的一个典型实例涉及改变人 IgG κ 1 轻链和重链骨架，其中拼接鼠抗 S1P CDR。这导致人源化抗体相对于其靶配体（即 S1P）的增加的亲和力。在其它实施方式中，不同于人 IgG 骨架的氨基酸序列可以支持一个或多个 CDR。可以通过改变高变 CDR 区中的氨基酸序列来实施亲和力成熟，以改善上述抗体性能和/或特性。这种形式的亲和力成熟的一个实例在以下的实施例 12 中示出，其中重链 CDR 中的半胱氨酸残基通过定位诱变被改变成丙氨酸残基，从而导致 S1P 结合亲和力和稳定性的显著增加。在一个这样的重链变体中，可变区包括 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列。在 CDRH2 中的这样的重链可变结构域序列可以可选地结合于轻链可变结构

域，例如，包含 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列的轻链可变结构域、或优选地 SEQ ID NO:30 的轻链可变结构域氨基酸序列。

本文预期包括各种抗 S1P 分子。例如，抗 S1P 剂可以是抗体、抗体衍生物、或非抗体源性部分。例如，抗 S1P 剂可以是抗体，包括全长抗体（例如，具有完整人 Fc 区的抗体）或抗体片段（例如，Fab、Fab'、或 F(ab')₂ 分子）、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、或亲和力成熟的抗体。不是受限于本发明，可以产生上述抗 S1P 剂以改善或在其它情况下改变抗体稳定性、半衰期、效能、药理分布、和/或免疫原性。例如，可以改变人源化 Fc 结构域的氨基酸组成以改善其免疫原性或其它性能特性。

在其它实施方式中，抗 S1P 剂可以共轭于某个组成部分，如多聚体、放射性核素、化疗药物、以及检测剂。

在某些优选实施方式中，用诸如药用载体的载体来配制抗 S1P 剂。在一种实施方式中，抗 S1P 剂结合于第二制剂，如抗体、抗体片段、抗体衍生物、抗体变体、不同于抗 S1P 剂的治疗剂，或可以结合不同于 S1P 的分子的制剂。

本发明还提供了分离的核酸分子，其编码抗体的各种成分、抗体变体、以及根据本发明的片段，包括各种重链和轻链序列和 CDR。还提供了包含这些核酸分子的载体和宿主细胞。进一步提供了分离的多肽，其包含一种或多种优选的氨基酸序列，如 CDR 序列或抗体轻链和/或重链序列。

在本发明的优选实施方式中，提供了分离的抗体分子，其在每个重链和每个轻链中包含精确限定的 CDR 序列。在一种这样的实施方式中，分离的抗体分子是人源化抗体分子。

还提供了多价结合分子，其具有对 S1P 具有反应性的并且包含一个或多个优选 CDR 序列的配体结合元件。这些多价分子可以包含至少一个、并且多达 10,000 个或更多的对 S1P 具有反应性的配体结合元件。如果需要的话，还可以包括对不同配体具有反应性的配体结合元件，因为不同的配体结合元件物种可以各自对 S1P 具有反应性的，但在一个或多个特性（例如，分子结构、结合亲和力等）方面不同于其它 S1P 结合元件。

还提供了用于治疗或预防与异常水平、尤其是高水平 S1P 有关的疾病或病症的方法。通常，上述方法包括将本发明的抗 S1P 组合物之一给予需要这种治疗的受治疗者，例如人。可以通过上述方法治疗的疾病或病症包括癌症、炎症性疾病、脑血管病、心血管疾病、眼部疾病、与过度纤维发生有关的疾病和病症、以及与病理性血管发生有关的疾病或病症。还可以连同另一种治疗剂或治疗方案来给予抗 S1P 组合物。

一个有关方面涉及降低用于治疗或预防高增生病症的治疗方案的毒性的方法。上述方法包括在给予用来治疗或预防高增生病症的治疗方案之前、期间、或之后，给予高增生病症患者有效量的根据本发明的一种制剂(或多种不同制剂)。在一种优选实施方式中，抗体和治疗方案具有相加作用，并且治疗方案中加入抗体可以有助于降低治疗方案的剂量，从而降低治疗相关毒性。

本发明的又一个方面涉及本发明的抗 S1P 剂的诊断应用。在一种诊断应用中，本发明提供了用于在样品中确定靶鞘脂存在的方法。通常，通过下述步骤来实施上述方法：将怀疑包含特定鞘脂（即，“靶”鞘脂）的样品（如体液或组织活检样品）暴露于本发明的抗 S1P 剂如抗鞘脂抗体，然后确定在样品中是否存在异常水平（即，

与疾病或病症有关的水平)的靶鞘脂(例如, S1P)。对于这些应用中的某些应用, 提供了包括抗体及其使用说明的试剂盒。

本发明的又一个方面涉及用于制备抗 S1P 剂的方法。这种制剂的优选实例包括抗体、抗体变体、以及抗体衍生物(例如, 抗体片段)。在优选实施方式中, 尤其是那些涉及包含一种或多种多肽的抗 S1P 剂的实施方式中, 生物生产系统如细胞系是优选的。当然, 也可以采用合成化学方法。

下文将更详细描述本发明的这些和其它方面以及实施方式。根据以下详细描述、附图、以及权利要求, 本发明的前述和其它方面将变得更明显。虽然类似或等效于本文所描述方法和材料的方法和材料可以用于实施或试验本发明, 但下文描述了适宜的方法和材料。此外, 以下的材料、方法、以及实施例仅是说明性的而不是限制性的。

附图说明

本申请包括至少一个彩色附图。要求并支付必要的费用时，即可提供带有彩色附图的本申请的副本。下面提供每个附图的简要介绍。

图 1. 图 1 具有两个图片，A 和 B。图片 A 图示 S1P、SPH、LPA、SPC、以及其它结构类似生物脂竞争生物素共轭抗 S1P 单克隆抗体的竞争性 ELISA 的结果。这些结果说明，抗体对于 S1P 是特异的和选择性的，并且并不识别结构类似的生物活性脂质。如在以下实施例 1 中所描述的，通过对小鼠或人 IgG 特异的、共轭于 HRP 的二抗来检测结合抗体。测量显色反应并报道为光密度(OD)。用于竞争的脂质浓度表示在 X 轴上。未能检测出二抗与仅 S1P 涂布基质的相互作用（数据未示出）。图片 B 示出与图片 A 中列出的 S1P 类似的生物活性脂质的结构。

图 2. 此图示出若干嵌合和重组人源化抗 S1P 抗体变体的结合性能。在 ELISA 结合测定中，比较了嵌合抗体(pATH10+pATH50)和人源化抗 S1P 单克隆抗体的两个变体（pATH201+pATH308）以及（pATH201+pATH309）与 S1P 的结合。pATH308 是在骨架区具有 5 个鼠回复突变的人源化轻链而 pATH309 则是具有 3 个回复突变的人源化轻链。人源化重链（pATH201）在骨架区仅包含一个鼠回复突变。

图 3 是示出 SPHINGOMAB 对于 S1P 是高度特异的曲线图。该曲线图（其数据是利用竞争性 ELISA 而产生）说明，与其它生物活性脂质相比，SPHINGOMAB 对于 S1P 的特异性。SPHINGOMAB 表明对于鞘氨醇（SPH）、S1P 或溶血磷脂酸（LPA）的直接的代谢前体没有交叉反应性，其中溶血磷脂酸（LPA）是一种重要的结构上和功能上类似于 S1P 的胞外信号分子。SPHINGOMAB 并不识

别其它结构类似的脂质和代谢物，包括神经酰胺-1-磷酸(C1P)、二氢鞘氨醇(DH-SPH)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰乙醇胺(PE)、或鞘磷脂(SM)。SPHINGOMAB 确实与二氢鞘氨醇-1-磷酸(DH-S1P)进行交叉反应，并且在更低的程度上与鞘氨醇磷酸胆碱(SPC)进行交叉反应。SPHINGOMAB 对于 S1P 的亲合力(Kd)小于 100pM，远高于大多数治疗性抗体，尤其是其它分子海绵。

图 4. 图 4 具有两个部分，图 4A 和图 4B。产生图中所示数据的实验在以下实施例 4 中加以详细描述。简单地说，这些数据表明，SPHINGOMAB 会减少 CNV 和眼部病变中的瘢痕形成。用 SPHINGOMAB 或同种型配对非特异性单克隆抗体治疗小鼠。通过布鲁赫膜 (Bruchs membrane) 的激光破裂来诱导 CNV 病变。示出的是来自每个治疗组的病变的图解和典型图像，其中用罗丹明共轭蓖麻凝集素 I 染色用于血管形成(A)或用马松三色 (Masson's Trichrome) 染色用于胶原瘢痕形成(B)。图 4A 示出，在鼠 CNV 病变成模型中，在布鲁赫膜的激光诱导破裂后的第 14 天和第 28 天，SPHINGOMAB 显著减弱脉络膜新血管形成。图 4B 示出，在布鲁赫膜的激光诱导破裂后的第 28 天，SPHINGOMAB 显著降低伴随 CNV 病变形成的纤维化。

图 5. 图 5 具有两幅图片，图 5A 和图 5B。在图 5A 中，示出了通过诱导 HUVEC 管形成和迁移，S1P 促进新血管形成，其被 SPHINGOMAB 降低。图 5A 示出了接种在基质膜上并温育 6 小时的 HUVEC 的四张显微照片，以评估管形成。图 5B 示出了在基质膜侵入室中经 1 μ M S1P \pm SPHINGOMAB (1 μ g/ml)处理 6 小时的 HUVEC 的数据。在 5 个独立区域中计数迁移到基质膜的细胞数目。

图 6. 图 6 包括在以下实施例 6 中描述的实验的若干照片(A)以及图解 (B 和 C)，其中利用 SPHINGOMAB 进行实验。

SPHINGOMAB 中和 S1P 诱导的、VEGF 诱导的以及 bFGF 诱导的新血管形成。图 6A 示出若干典型的 FITC 染色血管的照片，其来自基质膜栓±指定生长因子的切片。图 6B 示出，S1P 刺激内皮细胞(EC)浸润。图 6C 示出来自基质膜栓（用 VEGF 或 bFGF 加以刺激的）的相对荧光的量化结果作为新血管形成的指标。当用 1 或 25 mg/kg 的 SPHINGOMAB 系统治疗小鼠时，S1P、VEGF、以及 bFGF 的效应受到抑制。

图 7. 图 7 示出了标记为图 7A-图 7E 的 5 幅图，以及两幅假彩色照片。该数据是利用抗 S1P 单克隆抗体 SPHINGOMAB 所产生。关于实验细节，参见以下实施例 7。简单地说，这些数据表明，SPHINGOMAB 可中和（或抵消）S1P 刺激的瘢痕形成。在这些实验中，成纤维细胞是无血清的，然后用 0、0.1、0.5、或 1 μ M S1P +/- 1 μ g/mL SPHINGOMAB 处理 12-24 小时。数据表明，S1P 刺激瑞士 3T3 成纤维细胞增殖，如通过 3H-胸苷加入所测得的（A），在划痕测定中小鼠心脏成纤维细胞迁移（B），在来自表达胶原 GFP 的转基因小鼠的分离的心脏成纤维细胞中胶原基因表达（相对荧光）（C），以及 WI-38 细胞分化成肌成纤维细胞，如通过降低的细胞增殖和增加的 α -SMA 表达所测得的（D）。SPHINGOMAB 中和这些 S1P 效应的每一种。在永久性心肌梗死的小鼠模型中 SPHINGOMAB 体内降低血管周纤维化（E）。

图 8. 图 8 具有三幅图片，图 8A、图 8B、以及图 8C。这些数据表明，S1P 可促进眼上皮细胞和成纤维细胞转化成产生收缩性、瘢痕组织的肌成纤维细胞。如在以下实施例 8 中所描述的，检查了 S1P 对若干人眼细胞系的肌成纤维细胞转化的影响。研究发现，S1P 可以刺激在人视网膜色素上皮细胞（图 8A）和人结膜成纤维细胞（图 8B）中 α -平滑肌肌动蛋白（ α -SMA；一种肌成纤维细胞标记）的产生。这些数据首次表明，S1P 属于促进眼上皮细胞和成纤维细

胞转化成产生收缩性、瘢痕组织的肌成纤维细胞的因子。还检查了 S1P 对纤溶酶原激活物抑制剂(PAI-1)在人结膜成纤维细胞中的表达的影响。增加的 PAI-1 表达与结缔组织的蛋白降解降低有关并连同与疤痕增加有关的若干纤维变性性疾病被正调节。如图 8C 所示, S1P 以剂量依赖方式刺激 PAI-1 表达。

图 9. 图 9 示出两个条形图, 图 9A 和图 9B, 其示出了使用称作 SPHINGOMAB 的抗 S1P 单克隆抗体所产生的实验数据。SPHINGOMAB 体内降低了免疫细胞创伤浸润。在外科手术后 48 小时, 使小鼠经受 MI, 用盐水或 25 mg/kg SPHINGOMAB 进行治疗, 然后在第 4 天将小鼠处死。SPHINGOMAB 降低了巨噬细胞(A)和肥大细胞(B)浸润进入伤口。数据表示为盐水治疗值成倍下降。

图 10. 图 10 具有两幅图片, 图 10A 和图 10B。每幅图片示出了用于表达鼠抗 S1P 单克隆抗体 V_L 和 V_H 结构域的克隆载体的图谱。图 10A 是用于克隆 V_L 结构域的 pKN100 载体的图谱。图 10B 是用于克隆 V_H 结构域的 pG1D200 载体的图谱。

图 11. 图 11 提供了一些示出若干小鼠、嵌合、以及重组人源化抗 S1P 抗体的结合性能的数据。在 ELISA 结合测定中比较了小鼠(muMAbS1P; 由方形数据点形成的曲线)和嵌合(chMAb S1P; 由竖三角形数据点形成的曲线)与人源化抗体的第一变体(pATH200 + pATH300; 由倒三角形数据点形成的曲线)与 S1P 的结合。

图 12. 图 12 具有两幅图片, 图 12A 和图 12B, 其示出了利用若干人源化单克隆抗体变体进行体外细胞测定所获得的数据。图 12A 示出了人源化 mAb 能够防止 S1P 保护 SKOV3 细胞免于紫杉醇诱导的凋亡。如在以下实施例 16 中所描述的, 在存在或没有 500 nM S1P 的情况下用 500 nM 紫杉醇(Tax), 用浓度为 1 μ g/mL 的

huMAbHCLC₃ (309)、huMAbHCLC₅(308)、muMAb S1P(muMAb)、或非特异性 IgG1 (NS) 来处理 SKOV3 细胞 48 小时。数值表示平均值±SEM (n=3)，其中对于每个数据点进行三次。“NT”是指未处理，而“Veh”表示仅用载体进行处理。图 12B 示出了在用 S1P 和若干不同的抗 S1P 单克隆抗体之一或对照单克隆抗体处理的卵巢癌 (OVCAR3) 细胞中的 IL-8 分泌。在以下实施例 16 中详细描述 的实验中，100,000 个 OVCAR3 细胞/孔饥饿过夜，然后将 1uM S1P 单独加入培养基或用 1 ug/ml 的非特异性抗体 (NS)、pATH201+pATH309 (LC3)、pATH201+pATH308 (LC5)、pATH207+pATH309 (cysLC3)、pATH207+pATH308 (cysLC5)、以及 0.1 ug/ml (M0.1)、1 ug/ml (M1) 或 10 ug/ml (M10) 的抗 S1P 鼠抗体进行预温育。在温育 22 小时以后，收集细胞上清液，然后通过 ELISA 并利用 R&D 系统 Quantikine 人 CXCL8/IL-8 试剂盒来测量 IL-8 分泌。在图中“NT”是指未处理的细胞。

图 13. 图 13 示出了在 CNV 动物模型中，与鼠抗 S1P 单克隆抗体和对照相比，若干人单克隆抗体变体的体内效力。如在以下实施例 17 中描述的，在这些实验中，两次 (第 0 天和第 6 天) 给予小鼠 0.5 ug 的鼠 (Mu) 抗 S1P 单克隆抗体、若干人源化抗 S1P 单克隆抗体变体 (即，变体 LC3、LC5、HCcysLC3、以及 HCcysLC5)、或非特异性单克隆抗体 (NS) (通过玻璃体内给予)，然后经受布鲁赫膜的激光破裂。在激光外科手术后的第 14 天处死小鼠。切开巩膜-RPE-脉络膜复合体并用罗丹明共轭蓖麻凝集素 I 抗体染色。CNV 病变容积表示为平均值±SEM。

具体实施方式

1. 化合物

本发明描述了某些抗 S1P 剂，尤其是那些为免疫衍生部分的抗 S1P 剂，包括抗体，其对于生物活性脂质 S1P 具有特异反应性；换言之，抗 S1P 剂与其进行反应的生物活性脂质是 S1P。

抗体分子或免疫球蛋白是分子量大约为 150 kDa 的大糖蛋白分子，通常由两种不同种类的多肽链组成。一种多肽链，称作“重”链（H），大约为 50 kDa。另一种多肽链，称作“轻”链（L），大约为 25 kDa。每个免疫球蛋白分子通常由两个重链和两个轻链构成。两个重链通过二硫键彼此连接，其中二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链之间是不同的。每个轻链通过一个共价二硫键连接于重链。在任何给定的天然存在的抗体分子中，两个重链和两个轻链是相同的，包含两个相同的抗原结合位点，因而被说成是二价的，即，具有同时结合两个相同分子的能力。

基于恒定结构域的氨基酸序列，来自任何脊椎动物物种的抗体分子的“轻”链可以被指定为两种明显不同类型之一，卡巴（ κ ）和 λ （1）。两种类型的轻链的比率随物种而不同。例如，在小鼠中 κ 与 λ 的平均比率为 20:1，而在人类中为 2:1 以及在牛中为 1:20。

基于恒定结构域的氨基酸序列，来自任何脊椎动物物种的抗体分子的“重”链可以被指定为 5 种明显不同类型（称作同种型）之一。某些同种型具有若干亚型。免疫球蛋白的 5 种主要类型是免疫球蛋白 M（IgM）、免疫球蛋白 D（IgD）、免疫球蛋白 G（IgG）、免疫球蛋白 A（IgA）、以及免疫球蛋白 E（IgE）。IgG 是最丰富的同种型并且具有若干子类（在人类中为 IgG1、2、3、以及 4）。Fc 片段和铰链区的差别在于不同同种型的抗体，从而确定它们的功能特性。然而，结构域的全部机体组成在所有同种型中是类似的。

术语“可变区”是指抗体分子或其片段的 N 端部分。通常，四个链中的每一个具有在其氨基末端部分的可变（V）区，其有助于

抗原结合位点，以及恒定（C）区，其确定同种型。通过许多非共价相互作用和通过二硫键，轻链结合于重链，并且在抗体分子的每个臂中重链和轻链的 V 区配对以产生两个相同的抗原结合位点。认为某些氨基酸残基在轻链和重链可变结构域之间形成界面[参见 Kabat, et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. and Clothia et al. (1985), J. Mol. Biol, vol 186: 651]。

值得注意的是，变异性并不是均匀分布于抗体的整个可变结构域，而是集中在轻链和重链可变结构域中的三个区段，称作“互补决定区”（CDR）或“高可变区”。可变结构域的更高保守部分被称作“骨架区”（FR）。天然重链和轻链的可变结构域各自包括通过三个 CDR 相连的四个 FR 区。在每个链中的 CDR 通过 FR 区与来自其它链的 CDR 紧密地保持在一起，从而形成抗体的抗原结合位点[参见 Kabat, et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md.]。共同地，6 个 CDR 均有助于抗体分子对抗原的结合性能。然而，甚至单个可变结构域（或 Fv 的一半，仅包含对抗原特异的三个 CDR）也具有识别和结合抗原的能力[参见 Pluckthun (1994), The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315]。

术语“恒定结构域”是指抗体重链或轻链的 C 端区。通常，恒定结构域并不直接涉及抗体分子与抗原的结合性能，但呈现各种效应子功能，如在抗体依赖性细胞毒性中参与抗体。在这里，“效应子功能”是指抗体的不同生理效应（例如，调理作用、细胞溶解、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜伊红粒细胞脱粒作用、以及其它过程），其是通过募集免疫细胞并通过免疫系统的 Fc 结构域和蛋白质之间的分子相互作用所介导的。重链的同种型决定抗体的功能特

性。它们的特定的功能特性由不伴随有轻链的重链的羧基末端部分所赋予。

如在本文中所使用的，“抗体片段”是指完整抗体的一部分，其包括完整抗体的抗原结合位点或可变区，其中上述部分可以没有完整抗体的Fc区的恒定重链结构域(例如，CH2、CH3、以及CH4)。可替换地，恒定重链结构域(例如，CH2、CH3、以及CH4)的部分可以包括在“抗体片段”中。抗体片段的实例是那些保留抗原结合的抗体片段并且包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、以及Fv片段；双体分子；三链抗体；单链抗体分子(sc-Fv)；小体、纳米抗体、以及形成自抗体片段的多特异性抗体。例如，Fab片段还包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。

术语“变体”是指一种氨基酸序列，其与抗体的天然氨基酸序列的差别在于至少一个氨基酸残基或修饰。天然或亲代或野生型氨基酸序列是指在自然界发现的抗体的氨基酸序列。抗体分子的“变体”包括但不限于在轻链和/或重链的可变区或恒定区内的变化，包括高变或CDR区、Fc区、Fab区、CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域、以及铰链区。

术语“特异的”是指抗体选择性地结合于其靶表位。可以通过在给定的一组条件下比较抗体与所期望抗原的结合和抗体与不相关抗原或类似抗原或抗原混合物的结合来试验抗体分子的结合特异性。优选地，本发明的抗体会缺乏与不相关抗原、或甚至靶抗原的类似物的显著结合。在本文中，术语“抗原”是指由抗体分子或结合于抗原的免疫衍生部分识别和结合分子。由抗体结合的抗原的特异性部分被称作“表位”。“半抗原”是指小分子，其在大多数情况下并仅当附着于载体分子时，例如，蛋白质、聚乙二醇(PEG)、

胶体金、聚硅氧烷珠等，才能诱发免疫应答（即，作为抗原）。载体还可以是并不独自诱发免疫应答的载体。

术语“抗体”是在广义上使用，并且包括单克隆、多克隆、多特异性的（例如，双特异性的，其中，抗体的每个臂对不同表位或相同或不同抗原具有反应性）微型抗体、异源共轭物、双体分子、三链抗体、嵌合抗体、和合成抗体，以及特异性地结合抗原并具有所期望的结合性能和/或生物学活性的抗体片段。

术语“单克隆抗体”（mAb）是指抗体、或类似抗体的群，其获自基本上同型抗体的群，并且并不认为需要通过任何特定的方法来生产抗体。例如，单克隆抗体可以通过由 Kohler 和 Milstein (1975), *Nature*, vol 256: 495-497 首次描述的杂交瘤方法、或通过重组 DNA 方法，加以制备。

术语“嵌合”抗体（或免疫球蛋白）是指包含重链和/或轻链的分子，其相同于或同源于衍生自特定物种或属于特定抗体类或亚类的抗体中的对应序列，而链的其余部分相同于或同源于衍生自另一物种或属于另一抗体类或亚类的抗体中的对应序列，以及上述抗体的片段，只要它们呈现所期望的生物学活性[Cabilly et al. (1984), 下文; Morrison et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851]。

术语“人源化抗体”是指抗体形式，其包含来自非人（例如，鼠）抗体以及人抗体的序列。人源化抗体可以包括来自相同或不同物种的保守性氨基酸取代或非天然残基，其并不显著改变它的结合和/或生物学活性。这样的抗体是嵌合抗体，其包含衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。在大多数情况下，人源化抗体是人免疫球蛋白（受体抗体），其中来自受体的互补决定区（CDR）的残基被来自非人物种（供体抗体）如小鼠、大鼠、骆驼、牛、山羊、或兔的 CDR 并具有所期望性能的残基替换。此外，人源化抗体可以包含在

受体抗体或在输入的 CDR 或骨架序列中均未发现的残基。进行这些修饰以进一步完善和最大化抗体性能。因此，通常，人源化抗体将包含至少一个，并且在一个方面包含两个可变结构域，其中所有或所有的高可变环对应于非人免疫球蛋白的高可变环，并且所有或基本上所有的 FR 区是人免疫球蛋白序列的那些 FR 区。人源化抗体可选地还将包含至少一部分的免疫球蛋白恒定区 (Fc)、或至少一部分的人免疫球蛋白。参见例如, Cabilly 等, 美国专利第 4,816,567 号; Cabilly 等, 欧洲专利第 0,125,023 B1 号; Boss 等, 美国专利第 4,816,397 号; Boss 等, 欧洲专利第 0,120,694 B1 号; Neuberger, M. S.等, WO 86/01533; Neuberger, M. S.等, 欧洲专利第 0,194,276 B1 号; Winter, 美国专利第 5,225,539 号; Winter, 欧洲专利第 0,239,400 B1 号; Padlan, E. A.等, 欧洲专利申请第 0,519,596 A1 号; Queen 等 (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, vol 86:10029-10033)。

术语“双特异性抗体”可以指对于至少两个不同表位具有结合性能的抗体、或单克隆抗体。在一种实施方式中，表位来自相同抗原。在另一种实施方式中，表位来自两个不同的抗原。用于制备双特异性抗体的方法在本技术领域是已知的。例如，可以利用两个免疫球蛋白重链/轻链对的同时表达来重组产生双特异性抗体。可替换地，可以利用化学键合来制备双特异性抗体。双特异性抗体包括双特异性抗体片段。

术语“异源共轭抗体”可以指两个共价连接的抗体。可以利用合成蛋白质化学中已知的方法来制备上述抗体，包括使用交联剂。如在本文中所使用的，术语“共轭物”是指通过一个或多个抗体片段或结合部分共价附着于一个或多个多聚体分子所形成的分子。

术语“生物活性的”是指抗体或抗体片段，其能够结合所期望的表位并且以某种方式施加生物效应。生物效应包括但不限于生长

信号的调节、抗凋亡信号的调节、凋亡信号的调节、效应子功能级联反应的调节、以及其它配体相互作用的调节。

术语“重组 DNA”是指核酸和从其表达的基因产物，其已由人加以设计、产生、或修饰。“重组”多肽或蛋白质是通过重组 DNA 技术产生的多肽或蛋白质，例如，从通过编码所期望多肽或蛋白质的外源性 DNA 构成物加以转化的细胞。“合成”多肽或蛋白质是那些通过化学合成制备的多肽或蛋白质。

术语“表达框”是指核苷酸分子，其能够在与序列相容的宿主中影响结构基因（即，蛋白质编码序列，如本发明的抗体）的表达。表达框包括至少一个启动子，其可操作连接于多肽编码序列，以及可选地可操作连接于其它序列，例如，转录终止信号。还可以使用进行表达所必要的或有助于表达的其他调节元件，例如，增强子。因此，表达框包括质粒、表达性载体、重组病毒、任何形式的重组“裸 DNA”载体等。

抗体的来源并不限于本文说明的那些来源（例如，鼠和人源化鼠抗体）。可以在许多物种中产生抗体，上述物种包括哺乳动物物种（例如，小鼠、大鼠、骆驼、牛、山羊、马、豚鼠、仓鼠、绵羊以及兔）和鸟类（鸭、鸡）。产生的抗体可以衍生自来自动物（其中它们产生）的不同物种。例如，XenoMouse™（Abgenix, Inc., Fremont CA）产生全人单克隆抗体。对于某些目的来说，可以使用天然人抗体，如 S1P 的自身抗体，其分离自可以显示出一定效价的上述 S1P 自身抗体的个体。可替换地，人抗体序列文库可以用来产生包含人序列的抗体。

2. 应用

本发明涉及用于治疗或预防某些疾病和病症的组合物和方法，其中利用一种或多种治疗剂，其改变一种或多种不希望的生物活性脂质、或其前体或代谢物的活性或浓度。本发明的治疗方法和组合物是通过改变有效浓度，即，某些不希望的生物活性脂质的绝对、相对、有效和/或可用浓度和/或活性，来起作用。降低生物活性脂质的有效浓度可以说成是“中和”靶脂质或其不希望的效应，包括下游效应。在这里，“不希望的”是指生物活性脂质，其由于涉及疾病过程（例如，作为信号分子）而是有害的，或由于有害量的生物活性脂质，当过量存在时其有助于疾病。

不希望受限于任何特定理论，认为不适当浓度的 S1P 和/或其代谢物或下游效应子可以引起或有助于各种疾病或病症的发展。因此，上述组合物和方法可以用来治疗这些疾病或病症，尤其是通过降低特定靶脂质，例如，S1P 或其变体，的有效体内浓度。尤其是，认为，本发明的组合物和方法可用于治疗至少部分地具有以下特征的疾病：异常的新血管形成、血管发生、纤维发生、纤维化、疤痕、炎症、以及免疫应答。

下面描述按照本发明可以治疗的若干类疾病的实例。应当明了，许多疾病和病症至少部分地具有多种病理性过程的特征（例如，病理性新血管形成和疤痕）并且本文提供了分类是为了描述方便而不是限制本发明。

S1P 和高增生性病症

本发明的一个方面涉及用于治疗高增生性病症的方法。这些方法包括给予已知或怀疑患有 S1P 相关高增生病症的哺乳动物（例如，牛、犬、马、绵羊、或猪动物，尤其是人）治疗有效量的优选在药用或兽医载体（当所期望的用途可能需要时）中的组合物，该组合物包含干扰 S1P 活性的制剂。S1P 相关高增生病症包括瘤形成、与

内皮细胞增殖有关的病症、以及与纤维发生有关的病症。最常见地，瘤形成将是癌症。与内皮细胞增殖有关的典型病症是血管发生相关病症，例如，由实体肿瘤、血液肿瘤、以及年龄相关性黄斑变性引起的癌症。与纤维发生有关的病症包括那些涉及异常心脏重塑的病症，如心力衰竭。

存在许多已知的高增生病症，其中各种组织和器官的细胞呈现生长、增殖、迁移、信号、衰老、以及死亡的异常模式。虽然已开创了許多治疗方法来治疗这些疾病中的一些，但许多疾病仍然在很大程度上是不能用现有技术治疗的，而在其它情况下，虽然在治疗中有有效的，但它们经常不是最佳的并且很少能治愈。

癌症也许是最广泛认识的一类高增生病症。癌症是破坏性类型的疾病，并且它们一起具有仅次于心血管疾病的死亡率。许多种癌症并没有在分子水平上充分理解。因此，癌症是美国政府和制药公司的研究和开发计划的主要工作重点。结果是空前的 R&D 努力以及许多有价值治疗剂的生产以帮助抵抗癌症。

不幸的是，许多癌症研究还没有足以克服由癌症引起的显著损伤。仅在美国，每年诊断有一百万以上的癌症新病例并且有五十万以上的死亡。这显著地说明，即使已进行了巨大努力来发现癌症的新疗法，但抵抗疾病的有效治疗剂仍然是难以捉摸的。

目前主要用三种疗法（外科手术、放射治疗、以及化疗）之一或组合来治疗癌症。外科手术涉及大量除去病变组织。虽然外科手术有时可有效除去位于某些部位（例如，胸部、结肠、以及皮肤）的肿瘤，但它不能用于治疗位于其它区域（如脊柱）的肿瘤，也不能用于治疗弥散性肿瘤性病症如白血病。放射治疗涉及将活组织暴露于电离辐射，其引起所暴露细胞的死亡或损伤。放射治疗的副作

用可以是急性的和临时的，虽然其它副作用可以是不可逆的。化疗涉及细胞复制或细胞代谢的破坏。

其他的危害是目前的治疗剂通过涉及对患者而言明显的缺点（毒性以及严重的副作用）。因此，许多专家小组最近已开始寻找新方式来抵抗癌症。这些新的所谓的“创新疗法”包括基因治疗和治疗性蛋白如单克隆抗体。

在临床上首次用于治疗癌症的单克隆抗体是于 1997 年提出的 Rituxan（利妥昔单抗），并且已证明生物特异性单克隆抗体可用作治疗剂。因此，并不意外地，其后已认可 16 种其它单克隆抗体用于临床，其中包括 6 种用于治疗癌症。这些产品的成功，以及和小分子相比，开发单克隆抗体的减少的成本和时间，已使得单克隆抗体治疗成为小分子以后的第二最大类型的药物候选物。另外，与小分子疗法相比，就效力和毒性而言，抗体的灵敏的特异性已证明是一个主要优点。仅对于癌症来说，目前有 270 项以上的工业抗体 R&D 计划，其中 50 家以上的公司参与开发新的癌症抗体治疗。因此，单克隆抗体随时准备着成为治疗癌症的主要角色并且估计它们将获得越来越大的癌症治疗市场的份额。

促进肿瘤生长和存活的细胞外介质的鉴定是发现治疗性干预的关键步骤，其中治疗性干预将降低癌症的发病率和死亡率。如下所述，鞘氨醇-1-磷酸(S1P)，鞘脂信号级联放大的一种关键成分，被认为是多效的、致癌的生长因子。通过刺激细胞增殖、细胞存活以及转移，S1P 可促进肿瘤生长。通过支持内皮细胞的迁移和存活（当它们在肿瘤内形成新血管时），S1P 还促进肿瘤血管发生。总的来说，S1P 引发增生、促血管再生、以及抗凋亡事件，其有助于癌症进展。因此，调节，尤其是降低体内 S1P 水平的疗法将有效治疗癌症。

研究表明,鞘氨醇激酶(SPHK)是一种最近证实的癌基因,该癌基因产生一种细胞外鞘脂信号分子,促进肿瘤生长的鞘氨醇-1-磷酸(S1P)。与肿瘤细胞增殖和转移有关 S1P 的生长因子作用、以及 S1P 的促血管再生效应会直接和间接地促进肿瘤生长。本发明申请人已产生了一种生物特异性单克隆抗 S1P 抗体(抗 S1PmAb),其可以用作治疗性分子海绵来选择性地吸收 S1P,从而降低肿瘤生长因子的胞外浓度,并预计减小肿瘤容积和转移潜能并同时阻断新血管形成,否则会给养生长中的肿瘤。上述分子吸收概念的预计的成功将是治疗癌症的创新方式。如以下段落将说明的,本发明的申请人已开发了一种 mAb,其抵抗一种重要的肿瘤生长因子,鞘氨醇-1-磷酸(S1P)。本发明的申请人相信,这种抗体可以有效降低与许多癌症类型有关的增殖、转移潜能以及血管发生,从而降低一般的癌症以及伴随上述疾病的肿瘤血管发生。

鞘磷脂酶(nSMase)的中性形式是鞘脂信号通路的关键早期成分(Chatterjee, Adv. Lipid Res. 26: 25-46, 1993; Liu, Obein, and Hannun, Semin. Cell Dev. Biol. 8: 311-322, 1997)。nSMase 仅是已鉴定的至少 5 类 SMase 之一,其包括碱性的、酸性的、酸性锌依赖性的、中性镁依赖性的、以及与中性镁无关的(Liu, Obein, and Hannun, Semin. Cell Dev. Biol. 8: 311-322, 1997)。nSMase 类通常与表面膜有关(Das, Cook, and Spence, Biochim Biophys Acta 777: 339-342, 1984; Dobrowsky, Cell Signal 12: 81-90, 2000)并且可以由各种刺激来激活以引起凋亡,如促炎细胞因子、肿瘤坏死因子 α (TNF α)(Segui, et al, J. Clin. Invest. 108: 143-151, 2001)、T 细胞受体(Tonnetti, et al., J. Exp. Med 189: 1581-1589, 1999)、电离辐射(Haimovitz-Friedman, et al., J. Exp. Med 180: 525-535, 1994)以及蒽环霉素抗肿瘤药(Andrieu-Abadie, et al., FASEB J. 13: 1501- 1510, 1999)。在许多细胞类型中,包括癌细胞系(Andrieu-Abadie, et al., FASEB J. 13: 1501-1510, 1999; Hannun and Obein, Trends in Biol. Sci. 20: 72-76,

1995; Kolesnick, trends Biochem Sci 24: 224-5, 1999; Obeid, et al., Science 259: 1769-1771, 1993)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)是众所周知的 nSMase (Adam, et al., J. Bio Chem 271 : 14617-14622, 1996; Dressier, Mathias, and Kolesnick, Science 255: 1715-1718, 1992; Kim, et al., J. Biol. Chem. 266:1 : 484-489, 1991; Kronke, Chem Phys Lipids 102: 157-66., 1999; Yanaga and Watson, FEBS Letters 314: 297-300, 1992)、CER 生产 (Kronke, Chem Phys Lipids 102: 157-66., 1999) 以及凋亡 (Rath and Aggarwal, J. Clin. Immuno. 19: 350-364, 1999; Robaye, et al., Am J Pathol 138: 447-453, 1991; Takeda et al., Int. Immunol. 5: 691-694, 1993) 的激活剂, 并且已表明 nSMase 的激活对于 TNF α 诱导凋亡是关键的 (Luberto, et al., J. Biol. Chem. 277: 41128-41139, 2002; Segui, et al., J. Clin. Invest. 108: 143-151, 2001)。因此, nSMase 也已成为药物研发的目标 (Wascholowski and Giannis, Drug News Perspect. 14: 581-90, 2001)。

通过鞘氨醇激酶 (SPHK) 的作用, 由 SPH 产生鞘脂信号分子, S1P。已鉴定了上述酶的两亚型, SPHK1 和 SPHK2 (Liu, J Biol Chem 275: 19513-20, 2000; Nava, et al, Exp Cell Res 281 : 115-127, 2002)。虽然 CER 和 SPH 通常与凋亡有关, 但相反地 S1P 是细胞增殖和生存途径激活的介质 (An, Ann N Y Acad Sci 905: 25-33, 2000; Maceyka, et al., BBA 1585: 193-201, 2002; Zhang, et al., J. Cell Biol. 114: 155-167, 1991)。最近已明了它作为一种细胞外介质, 可以激活属于 S1P/LPA 受体家族的一组 G 蛋白耦联受体 (GPCR), 以前称作 Edg 受体 (An, Ann N Y Acad Sci 905: 25-33, 2000; An, Goetzl, and Lee, J. cell biochem 30/31 : 147-157, 1998; Lee, et al., Science 279: 1552-1555, 1998; Okamoto, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 260: 203-208, 1999); 然而, 也已指出了 S1P 的胞内作用 (Van Brocklyn, et al., J. Cell Biol. 142: 229-240, 1998)。此外, 已提示, CER/SPH 水平与 S1P 之间的平衡可提供一种可调机制, 其决定细胞被送入死亡通路或免于凋亡 (Kwon, et al., J Biol Chem 276:

10627-10633, 2001; Maceyka, et al., BBA 1585: 193-201, 2002; Pyne, Biochem J. 349: 385-402, 2000)。可调机制的关键调节酶是 SPHK, 其作用是将促进死亡的鞘脂 (CER/SPH) 转化成促进生长的 S1P。

首次提出 SPHK 作为癌基因的划时代的研究由来自阿德莱德 (Adelaide) 的小组发表, 其证明了用激酶稳定转染的 NIH-3T3 成纤维细胞呈现增强的细胞增殖并伴随增加的 S1P 产生 (Vadas and Gamble, Circ. Res. 79: 1216-1217, 1996; Xia et al., Curr Biol 10: 1527-1530, 2000)。此外, SPHK 过表达逃逸的接触抑制, 一种由转化细胞通常呈现的性能。此观测结果与最近的报道一致, 该报道表明 S1P 可增强所选人癌细胞系的转移潜能 (Igarashi, Ann. N. Y. Acad. Sci. 845: 19-31, 1998; Takuwa, Biochim Biophys Acta. 1582: 112-120, 2002)。此外, 当皮下注入 NOD/SCID 小鼠中时, 转染子产生肿瘤。在一项研究中最近证实了这些结果, 该研究表明腹腔内给予 SPHK 的小分子抑制剂可以使接受皮下注射 JC 乳腺癌细胞的 SCID 小鼠体内的肿瘤容积减小 (French, et al, Cancer Res 63: 5962-5969, 2003)。显著地, SPHK 可以是新的致癌基因的观点由以下发现得以巩固: SPHK 在许多实体肿瘤中被过表达, 如胸部、结肠、肺脏、卵巢、胃、子宫、肾、以及直肠的那些实体肿瘤 (French et al. (2003), 上文)。此外, 已证明, 当用 SPHK 小分子抑制剂治疗时若干人肿瘤源性细胞系可以被驱动到凋亡, 并且可以通过它们降低 S1P 水平的能力来说明它们的有效性。总的来说, 这些发现证明了一种重要的观点: S1P 是可能由肿瘤细胞本身产生的生长因子, 以及降低 S1P 的浓度可以引起在生长因子撤除后所观测到的凋亡。

S1P 和肿瘤血管发生

血管发生是一种过程, 借助于该过程新血管形成自存在的脉管系统。血管发生在若干生理过程中具有关键作用并且与各种病症 (包括肿瘤生长、侵袭以及转移) 的发病机制有关。与实体和循环

肿瘤有关的血管发生过程（肿瘤血管发生）被认为是肿瘤发生和疾病发展的关键组成部分，其中与非癌性细胞相比，新血管为肿瘤细胞提供生长优势。因此，对于治疗癌症和其它血管发生相关性疾病来说，血管发生的临床控制是关键组成部分。抗血管形成治疗是人们特别关注的，因为血管内皮细胞（EC）并不和癌细胞一样容易突变；因此与癌细胞相比，EC 获得对长期治疗的抗性的可能更小，从而使它们成为治疗的良好潜在目标。

若干生长因子与癌性血管发生有关。研究发现，生物脂鞘氨醇-1-磷酸（S1P）是对于癌症来说重要的许多细胞过程的介质。作为 G 蛋白耦联受体家族的特异性配体（称作 S1P₁₋₅）而施加其大部分效应。这些受体调节血管发生和血管成熟、细胞运动、以及淋巴细胞运输。与 S1P 相反，S1P 的前体，鞘氨醇和神经酰胺，与生长停滞和凋亡有关。最后，在 S1P 和其它促血管再生生长因子（如 VEGF、EGF、PDGF、bFGF 以及 IL-8）之间存在复杂的通讯。通过结合于受体 S1P₁，S1P 反式激活生长因子受体酪氨酸激酶，如在 VEGFR、EGFR、以及 PDGFR 上发现的生长因子受体酪氨酸激酶。S1P 在血管发生相关性肿瘤中的重要性使得 S1P 成为癌症治疗的特定目标。基于这些观测结果，用来中和胞外 S1P 的抗体方式可以导致在人类中癌症发展的显著降低，这是由于血管形成的抑制以及支持肿瘤生长所需要的营养物和氧的伴随损失。此外，最近的研究指出，许多血管发生抑制剂还可以作为还能够有助于缓解癌症扩散到远离最初肿瘤的部位抗侵袭和反转移化合物。

涉及 S1P 作为最有效的促血管再生剂之一的最近的证据来自直接比较 S1P 与制剂如 VEGF 和 bFGF 的研究。S1P 刺激人静脉内皮细胞（HUVEC）的 DNA 合成和趋化能动性，同时诱导多细胞结构的分化，所有这些都暗示了 S1P 在早期血管形成中的作用（Argraves, et al., 2004; Lee et al., 1999; Liu, et al., 2000）。此外，S1P

促进骨髓源性 EC 前体迁移到新血管形成部位 (Annabi, et al., 2003)。过表达 S1P₁ 的细胞对抗血管形成剂沙利度胺和新伐司他具有抗性 (Annabi et al., 2003)。此外, 已证明, 在 S1P 和其它促血管再生生长因子 (如 VEGF、EGF、PDGF、bFGF 以及 IL-8) 之间存在显著的通讯。例如, S1P 反式激活 EGF (Shida, et al., 2004) 和 VEGF2 受体 (Spiegel & Milstien, 2003), 以及 VEGF 正调节 S1P₁ 受体表达 (Igarashi, et al., 2003)。此外, 借助于 S1P₁ 和 “VEGF 轴” 起作用的 S1P 是下肢血管发生和新血管形成所需要的 (Chae, et al., 2004)。

最近 FDA 批准的抗血管形成药, 贝伐单抗 (Avastin®, Genentech), 作为细胞毒性化疗的添加剂来治疗结肠癌, 治疗癌症的抗血管形成方式已获得很大进展。

最近开发了抗 S1P 小鼠 MAb, LT1002, 其对于 S1P 具有高结合亲和力和特异性。研究表明, 在人癌症的若干动物模型中 LT1002 可显著放慢肿瘤发展和伴随的血管发生。此外, 在年龄相关性黄斑变性 (AMD) 的血管发生的既定模型中, LT1002 减弱脉络膜新血管形成 (CNV) 病变形。CNV 发生在其中存在布鲁赫膜和视网膜色素上皮的异常的疾病中。这种类型的最常见疾病是 AMD, 在老年患者中严重视力丧失的最常见的原因。这些结果表明, LT1002 具有若干作用机制, 包括: (1) 对肿瘤细胞生长的直接影响, (2) 对血管内皮细胞的间接抗血管生成效应, 以及 (3) 防止其它促血管再生生长因子释放和作用的间接抗血管形成效应。

S1P 有助于肿瘤血管发生的最直接的体内证据来自我们最近的集中于小鼠单克隆抗体 (mAb) 的出版物, 其中, 通过分子吸收, 小鼠单克隆抗体 (mAb) 用来中和胞外 S1P (Visentin, et al., 2006)。在利用 HUVEC 进行的各种体外测定中, 抗 S1P mAb 中和管形成、

血管内皮细胞的迁移以及使细胞免于死亡的保护，其中的每一种都是 S1P 诱导的。S1P 增加新的毛细血管生长进入植入小鼠体内的基质栓（Matrigel 栓），一种通过系统给予抗 S1P mAb 加以中和的效应。在鼠 Matrigel 栓子试验中，上述 mAb 基本上中和 bFGF 诱导以及 VEGF 诱导的血管发生，并且抗体缓和的 S1P 刺激体外和体内从肿瘤细胞释放促血管再生细胞因子（VEGF、IL-8、IL-6）。重要的是，在用抗 S1P mAb 进行治疗的情况下，用位于同位的人癌细胞异种拼接的小鼠呈现肿瘤进展的显著迟缓。这在人乳腺癌、卵巢癌以及肺癌的小鼠模型中以及在小鼠黑素瘤一种同种异体拼接模型中得到证明（Visentin, et al., 2006）。

用单克隆抗体（mAb）来治疗性治疗各种疾病和病症正快速增加，这是因为它们已显示出是安全且有效的治疗剂。认可的治疗性 mAb 包括 Avastin®、Erbix®、以及 Rituxan®。另外的 mAb 处于针对各种疾病的临床开发的不同阶段，其中大多数靶向各种形式的癌症。通常，在非人哺乳动物中产生单克隆抗体。然而，鼠单克隆抗体的治疗效用是有限的，主要由于以下事实：病人利用（mount）他们自身对鼠抗体的抗体反应。这种反应，所谓的 HAMA（人抗鼠抗体）反应，导致鼠 mAb 的最终中和和迅速消除。通过开发称作鼠抗体的“人源化”方法已克服了这种限制。人源化大大地减轻了相对于给予的治疗性 mAb 的免疫应答的发展，从而避免因 HAMA 而引起的半衰期的缩短和治疗效力的降低。在大多数情况下，人源化方法包括将鼠互补决定区（CDR）拼接到人免疫球蛋白的骨架区（FR）。这种策略称作“CDR 拼接”。在人 FR 中的所选残基“回复突变”到小鼠氨基酸残基是经常需要的以恢复在最初拼接构造物中丧失的亲和力。

mAb 的制造是一个复杂过程，其起因于蛋白质本身的变异性。mAb 的变异性可以被局限于蛋白质主链和/或碳水化合物部分。异

质性可以归因于可替换的二硫键配对的形成、脱酰胺和异天冬氨酰残基的形成、蛋氨酸和半胱氨酸氧化作用、N端谷氨酰胺残基环化成焦谷氨酸以及通过哺乳动物羧肽酶的C端赖氨酸的部分酶裂解。通常对抗体分子进行设计以改善它们的性能，如增强的稳定性、对蛋白酶的抗性、聚集行为，以及增强在异源系统中的表达水平。

在本文中，描述了小鼠 MAb 相对于 S1P 的人源化。总策略包括将来自 LT1002 的 6 个 CDR 拼接到人骨架。进一步的修饰用来进一步完善和优化抗体性能。人源化 MAb 呈现和 LT1002 相同的特性，因此适用于在临床试验中进行试验。

S1P 和纤维化

在响应细胞损伤和炎症的瘢痕形成中，成纤维细胞，尤其是肌成纤维细胞，是关键细胞元件[Tomasek, et al. (2002), Nat Rev Mol Cell Biol, vol 3: 349-63, 以及 Virag and Murry (2003), Am J Pathol, vol 163: 2433-40]。通过肌成纤维细胞的胶原基因表达是重建标志并且是瘢痕形成所还需要的[Sun and Weber (2000), Cardiovasc Res, vol 46: 250-6, 以及 Sun and Weber (1996), J Mol Cell Cardiol, vol 28: 851-8]。通过激活成纤维细胞迁移和增殖同时增加胶原生产，S1P 可以促进伤口愈合[Sun, et al. (1994), J Biol Chem, vol 269: 16512-7]。由受损细胞局部产生的 S1P 可能是与重建和瘢痕形成有关的不适当伤口愈合的原因。因此认为，S1P 抑制剂可用于治疗至少部分地特征为异常的纤维发生或纤维化的疾病或病症。在本文中，“纤维发生”被定义为成纤维细胞的过度活性或过多数目，以及“纤维化”被定义为过度活性或过多数目的成纤维细胞，其导致过度或不适当的胶原生产和疤痕、生理组织结构的破坏和/或基质的不适当收缩，其引起这样的病理特征如视网膜脱落或导致损害器官功能的其它过程。

S1P 和成纤维细胞胶原表达: S1P 促进休眠成纤维细胞分化成活性肌成纤维细胞, 其在瘢痕形成期间呈现增强的胶原表达[Urata, et al. (2005), Kobe J Med Sci, vol 51: 17-27]。成纤维细胞增殖和迁移到疤痕区的同时, 肌成纤维细胞沉积主要由骨桥蛋白和纤连蛋白构成的临时颗粒网络[Sun and Weber (2000), Cardiovasc Res, vol 46: 250-6]。当重建进行时, 临时基质被吸收并建立起胶原网络[Sun and Weber (2000), Cardiovasc Res, vol 46: 250-6]。我们已证明了, S1P 促进通过肌成纤维细胞的胶原生产。已表明, TGF β , 一种众所周知的纤维变性介质, 正调节若干促纤维化蛋白、将成纤维细胞转化成肌成纤维细胞以及刺激炎症蛋白表达(可能通过 S1P 的作用)[Squires, et al. (2005), J Mol Cell Cardiol, vol 39: 699-707 以及 Butt, Laurent and Bishop (1995), Eur J Cell Biol, vol 68: 330-5]。TIMP1(与将成纤维细胞 TGF β 刺激分化成肌成纤维细胞有关的一种信号分子)的正调节被针对 SPHK1 的 siRNA 阻断[Yamanaka, et al., J Biol Chem. 2004 Dec 24;279(52):53994-4001], 这提示抗 S1P 抗体的人源化变体可以缓解 TGF β 的促纤维化效应以及缓和 S1P 本身的纤维发生效应。

将不适当疤痕降低到最小程度被认为可用于治疗纤维变性性疾病和病症, 包括但不限于眼和心血管疾病、伤口愈合、以及硬皮病。

用于治疗硬皮病的抗 S1P 抗体

本发明的组合物和方法将可以用于治疗这样的病症和疾病, 其至少部分地特征为异常的新血管形成、血管发生、纤维发生、纤维化、疤痕、炎症、以及免疫应答。一种这样的疾病是硬皮病, 其还称作系统性硬化病。

硬皮病是一种自身免疫病，其引起疤痕或皮肤增厚，并且有时涉及身体的其它区域，包括肺脏、心脏、和/或肾。硬皮病的特征在于在身体的皮肤和器官中形成瘢痕组织（纤维化），其可以导致所涉及区域的增厚和坚实，以及随之发生的功能降低。根据美国硬皮病基金会（Scleroderma Foundation）的统计数据，目前有约 300,000 美国人患有硬皮病。三分之一或更少的受感染的患者患有普遍疾病，而其余的三分之二主要具有皮肤症状。当该疾病侵袭肺脏并引起疤痕时，呼吸可能会受到限制，这是因为肺脏不再能如它们应该的那样进行扩张。为了测量肺活量，医生使用了一种用来估计用力肺活量（FVC）的装置。在 FVC 小于 50% 的预期的人群中，起因于硬皮病相关的肺部疾病的 10 年死亡率为约 42%。死亡率如此高的一个原因是目前没有有效的治疗方法。

如在本申请的实施例中所描述的，现有证据表明，S1P 是一种促纤维化生长因子，其可以有助于成纤维细胞激活、增殖、以及增加的与不适当疤痕和重建有关的成纤维细胞活性。此外，已证明了 S1P 在皮肤和其它类型成纤维细胞的活性中的潜在作用。例如，已表明，生物活性脂质可刺激鼠皮肤成纤维细胞的迁移（Hama, et al, *J Biol Chem.* 2004 Apr 23;279(17): 17634-9），以及人皮肤成纤维细胞表达若干 S1P 受体亚型（Zhang, et al., *Blood.* 1999 May 1;93(9):2984-90）。除 S1P 对成纤维细胞活性的许多直接影响之外，S1P 还可以具有对成纤维细胞活性的许多潜在的间接影响。例如，S1P 可以促进其它众所周知的促纤维化因子的作用，如 TGF- β 和血小板衍生生长因子（PDGF）。TGF- β 是纤维化的最广泛研究和识别的促成因素之一（Desmouliere, et al., *J Cell Biol* 122: 103-111, 1993）。TGF- β 正调节 SphK1 表达和活性，导致金属蛋白酶 1（TIMP-1）的组织抑制剂的表达增加，金属蛋白酶 1（TIMP-1）是一种抑制 ECM 降解的蛋白质（Yamanaka, et al., *J Biol Chem* 279: 53994-54001, 2004）。TIMP-1 的表达增加与心力衰竭患者的间质纤

维化和舒张功能不全有关 (Heymans, et al, *Am J Pathol* 166: 15-25, 2005)。相反地, S1P 刺激 TGF- β 的表达和释放 (Norata, et al., *Circulation* 111: 2805-2811, 2005)。还存在 S1P 和 PDGF 之间交互作用的不同证据。S1P 直接刺激 PDGF 的表达 (Usui, et al., *J Biol Chem* 279: 12300-12311, 2004)。此外, S1P₁ 受体和 PDGF 受体彼此结合并且它们的缔合是下游信号的 PDGF 激活所必须的, 其中下游信号有助于各种细胞类型的增殖和迁移 (Long, et al., *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 80: 74-80, 2006; Baudhuin et al., *Faseb J* 18: 341-343, 2004)。因此, TGF- β 和 PDGF 对纤维化的影响可以部分地起因于与 S1P 信号通路的交互作用。因此, 本发明的组合物和方法可以用来治疗硬皮病, 尤其通过降低特定靶脂质 (例如 S1P) 的有效体内浓度用来治疗硬皮病。

人们认为相对于 PDGF 受体的刺激性自身抗体会加剧系统性硬皮病 (Baroni, et al., *N Engl J Med.* 2006 v354(25):2667-76), 并且在硬皮病成纤维细胞响应 TGF- β 中, PDGF 受体被正调节 (Yamakage, et al., *J Exp Med.* 1992 May 1;175(5):1227-34)。由于 S1P、PDGF 以及 TGF- β 信号系统之间显著的交互作用, 用抗 S1P 剂 (例如, 抗 S1P mAb) 阻断 S1P 生物活性可以间接缓和 PDGF 和 TGF- β 的促硬化效应。此外, 用这样的抗 S1P 剂进行治疗可以有益于硬皮病患者, 其中通过缓和 S1P 对皮肤和其它形成的成纤维细胞 (其有助于疾病进展) 的直接影响。

S1P 和眼部疾病以及病症

病理性或异常的血管发生/新血管形成、异常的重建、纤维化和疤痕以及炎症的发生伴有视网膜和眼部疾病, 如年龄相关性黄斑变性 (AMD)、糖尿病性视网膜病 (DR)、以及早产儿视网膜病 (ROP) 和其它发育障碍 [Eichler, et al. (2006), *Curr Pharm Des*, vol 12: 2645-60], 并且是眼部感染和机械损伤的结果 [Ciulla, et al. (2001),

Curr Opin Ophthalmol, vol 12: 442-9 以及 Dart et al (2003), Eye, vol 17: 886-92]。人们认为, 针对 S1P 的抗体将可用于治疗这样的眼部疾病, 其中病理性或异常的血管发生/新血管形成、异常的重建、纤维化、以及疤痕或炎症是组成部分。

眼部的血管发生/新血管形成:

在各种临床病症中, 病理性眼血管发生是失明的主要原因。脉络膜新血管形成 (CNV) 发生在许多眼部疾病中, 其中最常见的是渗出性或“湿”形式的 AMD。由于老年人口增加, 在西方国家的 60 岁以上的患者中, AMD 是一种现代流行病并且是失明的主要原因。尽管由 AMD 引起的流行的视力减退, 但仅有几种疗法, 大部分是基于抗 VEGF, 可以放缓 AMD 的发展并且仅有甚至更少的疗法可以逆转视力减退[Bylsma and Guymer (2005), Clin Exp Optom, vol 88: 322-34, Gryziewicz (2005), Adv Drug Deliv Rev, vol 57: 2092-8, 以及 Liu and Regillo (2004), Curr Opin Ophthalmol, vol 15: 221-6]。因此, 研发用于病理性新血管形成的新治疗方法是非常重要的。

在描述与异常的血管发生/新血管形成、异常的重建、纤维化和疤痕、以及炎症有关的眼病症中, 本文中的 AMD 仅用于说明的目的, 上述病症存在于其它眼部疾病和病症中 (如本文中披露的并要求保护的)。AMD 涉及年龄相关病理性变化[Tezel, Bora, and Kaplan (2004), Trends Mol Med, vol 10: 417-20 以及 Zarbin (2004), Arch Ophthalmol, 122: 598-614]。尽管存在多种理论, 但 AMD 的确切病因和发病机制仍然不十分明了。老化与累积性氧化损伤、布鲁赫膜增厚以及玻璃疣形成有关。氧化应激导致对视网膜色素上皮 (RPE) 细胞并且在某些情况下导致对脉络膜毛细血管层的损伤[Zarbin (2004), Arch Ophthalmol, vol 122: 598-614, 以及 Gorin, et al. (1999), Mol Vis., vol 5: 29]。对 RPE 的损伤可能在布鲁赫膜和脉络膜内诱

发慢性炎性应答[Johnson et al. (2000), *Exp Eye Res.*, vol 70: 441-9]。通过刺激 CNV 和萎缩, 这种损伤和炎症会助长并增强 (potentate) 视网膜损伤[Zarbin (2004), *Arch Ophthalmol*, vol 122: 598-614, 以及 Witmer, et al. (2003), *Prog Retin Eye Res*, vol 22: 1-29]。CNV 导致缺损和渗漏的血管 (BV), 其可能被识别为伤口[Kent and Sheridan (2003), *Mol Vis*, vol 9: 747-55]。伤口愈合源于脉络膜并通过布鲁赫膜和 RPE 侵入视网膜下腔。伤口愈合反应的特征在于典型的早期炎性应答, 显著的血管源性应答以及组织形成, 接着是所有参与要素的终末期成熟。伤口重建会不可逆地损害光感受器和 RPE, 从而证明需要用比抗血管形成疗法更多的疗法来治疗 CNV[La Cour, Kiilgaard, and Nissen (2002), *Drugs Aging*, vol 19: 101-33.12]。

由 CNV 相关纤维化、水肿以及炎症 (单独地或累加地) 所引起的正常视网膜和视网膜下结构的改变导致 AMD 相关视觉丧失 [Tezel and Kaplan (2004), *Trends Mol Med*, vol 10: 417-20, 以及 Ambati, et al. (2003), *Surv Ophthalmol*, vol 48: 257-93]。与渗出性 AMD 有关的多种细胞和细胞因子相互作用使有效治疗方法的寻找更加复杂化。虽然通过抗 VEGF 疗法可以部分地控制 CNV 和水肿, 但还没有适当地提出可能的治疗方法来缓和瘢痕形成和炎症 [Bylsma and Guymer (2005), *Clin Exp Optom*, vol 88 : 322-34, 以及 Pauleikhoff (2005), *Retina*, vol 25: 1065-84]。只要新生血管复合体仍然是完整的, 如在用抗 VEGF 剂治疗的患者中似乎就是这种情况, 视网膜下纤维化和未来的视力减退的潜力就会持续。

抗 VEGF-A 疗法是治疗渗出性 AMD 的最近的显著的进展。然而, 用哌加他尼 (PEGAPTANIB) (一种高亲和力适体, 其选择性地抑制 VEGF-A 的 165 亚型) 进行的第三阶段视觉试验证明, 一般患者会继续丧失视力而仅少部分患者获得了视觉[Gragoudas, et al. (2004), *N Engl J Med*, vol 351 : 2805-16]。用抗体片段

RANIBIZUMAB 抑制 VEGF-A 的所有亚型（全 VEGF 抑制）产生了令人印象更为深刻的结果[Brown, et al., N Eng Med (2006), vol. 355:1432-44, Rosenfeld, et al. N Eng J Med (2006), vol. 355:1419-31]。2 年 MARINA 试验和 1 年 ANCHOR 试验证明，大约 40% 的患者获得一些视力增加。虽然这些结果表明在我们治疗渗出性 AMD 的能力方面的较大进展，但这也证明了 60% 的患者并没有视力改善。此外，这些患者必须满足严格规定的选择标准和淘汰标准。在更大患者群体中的结果不那么有效。

仍然存在意义明确的需要来开发靶向 CNV 发展中的其它步骤以及最终导致光感受器破坏过程的其他治疗剂。首先，脉络膜 BV 的生长涉及许多介质（并不只是 VEGF）之间的协调的相互作用，这提供了一种调节或抑制整个过程的机会[Gragoudas, et al. (2004), N Engl J Med, vol 351: 2805-16]。其次，渗出性 AMD 由血管成分和血管外成分组成。血管成分涉及血管内皮细胞（EC）、EC 前体以及周细胞。容积上似乎是最大成分的血管外成分由炎性细胞、神经胶质细胞、以及视网膜色素上皮（RPE）细胞和成纤维细胞组成。组织损伤可以起因于任何一种成分。目前的抗 VEGF 治疗并没有着眼于病理过程的这些其它方面。靶向与 AMD 有关的生血管级联反应的另外的要素可以提供一种更有效和协同的治疗方式[Spaide, RF (2006), Am J Ophthalmol, vol 141: 149-156]。

眼部疾病中的炎症：

越来越多的证据表明，炎症，具体地说巨噬细胞和补体系统 [Klein, et al. (2005), Science, vol 308: 385-9; 以及 Hageman, et al. (2005), Proc Natl Acad Sci U S A, vol 102: 7227-32] 在渗出性 AMD 的发病机制中具有重要作用。手术切除的脉络膜新生血管膜的组织病理学证明了巨噬细胞几乎普遍存在[Grossniklaus, et al. (1994),

Ophthalmology, vol 101: 1099-111, 以及 Grossniklaus, et al. (2002), Mol Vis, vol 8: 119-26]。越来越多的证据表明, 巨噬细胞可以通过多种效应在介导 CNV 形成和增殖中发挥积极作用[Grossniklaus, et al. (2003), Mol Vis, vol 8: 119-26; Espinosa-Heidmann, et al. (2003), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 44: 3586-92; Oh, et al. (1999), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 40: 1891-8; Cousins, et al. (2004), Arch Ophthalmol, vol 122: 1013-8; Forrester (2003), Nat Med, vol 9: 1350-1, 以及 Tsutsumi, et al. (2003), J Leukoc Biol, vol 74: 25-32]0, 这些效应包括分泌酶, 该酶可以损伤细胞并降解布鲁赫膜以及释放促血管再生细胞因子[Otani, et al. (1999), Ophthalmol Vis Sci, vol 40: 1912-20, 以及 Amin, Puklin, and Frank (1994), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 35: 3178-88]。在损伤部位, 巨噬细胞呈现激活的微形态迹象, 如脱粒作用[Oh, et al. (1999), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 40: 1891-8, 以及 Trautmann et al. (2000), J Pathol, vol 190: 100-6]。因此, 认为限制巨噬细胞浸润进入脉络膜新生血管复合体的分子可以有助于限制 CNV 形成。

在眼部疾病中的脉络膜新血管形成和血管成熟:

血管发生是正常伤口愈合的必不可少的组成部分, 因为它将氧和营养物质递送到炎性细胞并帮助碎片清除[Lingen (2001), Arch Pathol Lab Med, vol 125: 67-71]。进行性血管发生由两种不同的过程组成: 阶段 I: 响应附近刺激, 血管 EC 迁移到毛细血管的尖端, 在这里它们增殖并形成腔结构; 以及阶段 II: 修剪血管网络和优化脉管系统[Guo, et al. (2003), Am J Pathol, vol 162: 1083-93]。

阶段 I: 新血管形成。血管发生通常有助于伤口愈合。然而, 当新血管不受控制时, 则通常是缺损的并会加剧渗漏、出血、以及炎症。已证明通过靶向促血管再生 GF 来减少失调的和渗漏的 BV 具有一定的放缓 AMD 发展的能力[Pauleikhoff (2005), Retina, vol 25:

1065-84.14, 以及 van Wijngaarden, Coster, and Williams (2005), JAMA, vol 293: 1509-13].

阶段 II: 血管成熟和药物脱敏作用。全-VEGF 抑制似乎大部分借助于抗渗作用（其导致视网膜内和视网膜下水肿的消退）来发挥其有益效应, 因为实际 CNV 病变并没有显著退化。缺少显著的 CNV 退化可以部分地是由于新形成血管的成熟（起因于周细胞覆盖）。周细胞在血管组织的发展和维持中具有关键作用。周细胞的存在似乎赋予对抗 VEGF 剂的抗性并减损它们抑制血管发生的能力 [Bergers and Song (2005), Neuro-oncol, vol 7: 452-64; Yamagishi and Imaizumi (2005), Int J Tissue React, vol 27: 125-35; Armulik, Abramsson and Betsholtz (2005), Circ Res, vol 97: 512- 23; Ishibashi et al. (1995), Arch Ophthalmol, vol 113: 227-31]。对周细胞募集具有抑制效应的制剂可能会破坏血管通道装配和脉络膜新血管通道的成熟，从而保全它们对抗血管形成剂的敏感性。

血管网络的重建涉及调节血管（BV）密度以满足营养需要 [Gariano and Gardner (2005), Nature, 438: 960-6]。BV 不成熟期对应于其中新血管发挥作用并还没有获得周细胞涂层的时期 [Benjamin, Hemo, and Keshet (1998), Development, 125: 1591-8, 以及 Gerhardt and Betsholtz (2003), Cell Tissue Res, 2003. 314: 15-23]。这种延迟对于提供可塑性窗口是必要的，其中该可塑性窗口用于根据视网膜或脉络膜的营养需要来微调正在发展的脉管系统。

生物活性脂质鞘氨醇-1-磷酸(S1P)、VEGF、PDGF、血管生成素(Ang)以及其它生长因子(GF)可增加血管生长并将平滑肌细胞(SMC)和周细胞募集到初生血管，其促进正在形成的血管的重建 [Allende and Praia (2002), Biochim Biophys Acta, vol 582: 222-7; Gariano and Gardner (2005), Nature, vol 438: 960-6; Grosskreutz, et al. (1999), Microvasc Res, vol 58: 128-36; Nishishita, and Lin (2004), J

Cell Biochem, vol 91: 584-93, 以及 Erber, et al. (2004), FASEB J, vol 18: 338-40.32]。最可能在 EC 发芽时通过间充质前体的原位分化产生的或产生主动脉平滑肌细胞的迁移和去分化的周细胞紧密地结合并鞘化 (ensheath) EC, 从而导致总血管成熟和存活 [Benjamin, Hemo, and Keshet (1998), Development, vol 125: 1591-8]。最近的研究已证明, S1P、以及 S1P1 受体, 参与细胞表面运输和细胞-细胞黏着分子 N-钙黏着蛋白的激活 [Paik, et al. (2004), Genes Dev, vol 18: 2392-403]。N-钙黏着蛋白是 EC、周细胞和壁细胞之间的相互作用所必要的, 该相互作用促进稳定血管床的发展 [Gerhardt and Betsholtz (2003), Cell Tissue Res, vol 314: 15-23]。S1P1 基因的整体缺失导致异常的壁细胞鞘化 (或包盖, ensheathment) 新生 BV, 其是在胚胎发育期间 BV 稳定化所需要的 [Allende and Praia (2002), Biochim Biophys Acta, vol 1582: 222-7]。在肿瘤异种拼接模型中, 将 siRNA 局部注射到 S1P1 可抑制血管稳定化 [Chae, et al. (2004), J Clin Invest, vol 114: 1082-9]。转基因鼠研究已证明, VEGF 和 PDGF-B 可促进新 BV 的成熟和稳定 [Guo, et al. (2003), Am J Pathol, 162: 1083-93, 以及 Gariano and Gardner (2005), Nature, vol 438: 960-6.50]。VEGF 正调节 Ang-1(mRNA 和蛋白质) [Asahara, et al. (1998), Circ Res, vol 83: 233-40]。Ang-1 在由周细胞募集和维持周围的血管内皮载体中发挥主要作用 [Asahara, et al. (1998), Circ Res, vol 83: 233-40]。眼内注射 VEGF 加速了 EC 丛的周细胞覆盖 [Benjamin, Hemo, and Keshet (1998), Development, vol 125: 1591-8]。PDGF-B 缺陷小鼠胚胎缺少微血管周细胞, 这会导致水肿、微动脉瘤以及致命性出血 [Lindahl, et al. (1997), Science, vol 277: 242-5]。鼠产前研究已证明, 为了血管床成熟的完全的 VEGF 刺激和 PDGF 刺激, 需要另外的信号。基于上述 S1P 的反式激活, 此因子可以是 S1P [Erber et al. (2004), FASEB J, vol 18: 338-40]。血管的稳定和成熟伴随可塑性的损失和缺少消退到 VEGF 和其它 GF 撤除以及对抗血管生成疗法的抗性 [Erber, et al. (2004), FASEB J, vol 18: 338-40, 以及 Hughes and

Chan-Ling (2004), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 45: 2795-806]. BV 对生血管抑制剂的抗性是由最初稳定成熟血管和在治疗后被募集到未成熟血管的周细胞所赋予的[Erber, et al. (2004), FASEB J, vol 18: 338-40]。在鞘化未成熟 EC 以后,周细胞表达补偿性生存因子(Ang-1 和 PDGF-B),其保护 EC 免受促凋亡剂的影响。

在眼部疾病中的水肿和血管通透性:

CNV 膜由有孔血管 EC 组成,其倾向于使它们的血管内内含物渗漏进入周围的腔隙,从而导致视网膜下出血、渗出物和液体积聚[Gerhardt and Betsholtz (2003), Cell Tissue Res, vol 14: 15-23]。多年来 CNV 组织本身,以及最近视网膜内新血管形成,被认为是与 AMD 有关的视力下降的原因。然而现在认为,由血管通透性(VP)的增加和其后血液视网膜屏障(BRB)的击穿所引起的黄斑水肿在与 AMD 和其它眼部疾病(包括与糖尿病有关的失明)有关的视力减退中具有主要作用[Hughes and Chan-Ling (2004), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 45: 2795-806; Felinski and Antonetti (2005), Curr Eye Res, vol 30: 949-57; Jousseaume, et al. (2003), FASEB J, vol 17: 76-8, 以及 Strom, et al. (2005), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 46: 3855-8]。尤其是,糖尿病性视网膜病(DR)和糖尿病性黄斑水肿(DME)是糖尿病患者的常见微血管并发症并且是糖尿病相关性失明的最常见原因。DME 起因于增加的微血管通透性。Jousseaume, et al. (2003), FASEB J, vol 17: 76-8。这些是工作年龄群体中新失明的最常见原因。我们认为,化合物如靶向 S1P 的抗体将可用于治疗这些病症。

下文描述按照本发明可治疗的若干类眼部疾病的实例。应当明了,许多疾病和病症至少部分地特征为多发性病理性过程(例如,病理性新血管形成和疤痕),并且本文提供的分类是为了描述方便而不是限制本发明。

a. 缺血性视网膜病, 其与病理性新血管形成和特征为视网膜前和/或视网膜下膜形成的疾病有关

缺血性视网膜病 (IR) 是一类病症, 其特征在于视网膜血流量受到损害。IR 的实例包括糖尿病性视网膜病 (DR)、早产儿视网膜病 (ROP)、镰状细胞视网膜病以及视网膜静脉闭塞性疾病。所有这些病症可以伴随 VEGF 驱动的病理性视网膜新血管形成的增殖, 其可以最终导致眼内出血、视网膜前膜形成以及牵拉性视网膜脱离。原发性视网膜前膜 (ERM), 还称作黄斑皱褶或玻璃纸样视网膜病变, 可以引起视网膜结构变形之后继发的视力减小。尽管进行了手术切除, 但这些膜有时会复发, 并且有时伴随视网膜缺血。VEGF 及其受体位于 ERM。在伴随增生性糖尿病性视网膜病、增生性玻璃体视网膜病、以及黄斑皱褶的膜中 VEGF 的存在进一步暗示, 这种细胞因子在缺血性视网膜病的血管发生中以及在增生性玻璃体视网膜病的膜生长中具有重要作用。此外, 还在 ERM 中的细胞上鉴定了 VEGF 受体 VEGFR1 和 VEGFR2。这些数据表明, VEGF 可以是自分泌和/或旁分泌刺激剂, 其可以有助于血管和无血管 ERM 的发展。PDGF 和其受体 [Robbins, et al. (1994), Invest Ophthalmol Vis Sci; vol 35: 3649-3663] 已在患有增生性视网膜病的眼中加以描述 [Cassidy, et al. (1998), Br J Ophthalmol; vol 82: 181-85, 以及 Freyberger, et al. (2000), Exp Clin Endocrinol Diabetes, vol 108: 106-109]。这些发现暗示了 PDGF 配体和受体广泛分布在不同来源的增生性视网膜膜中, 并且暗示了 PDGF 的自分泌和旁分泌刺激可能参与 ERM 发病机制。转化生长因子- β (TGF- β) 参与 ERM 的形成 [Pournaras, et al. (1998), Klin Monatsbl Augenheilkd, vol 212: 356-358], 如通过 TGF 染色和免疫反应活性所证明的。此外, TGF- β 受体 II 表达在糖尿病和 PVR 膜的 ERM 的肌成纤维细胞中。这些结果暗示, 在视网膜和 ERM 的多种细胞类型中产生的 TGF- β 是用于治疗 PVR、糖尿病以及继发性 ERM 的有吸引力的靶。已报道, 在

增生性糖尿病性视网膜病(PDR)的人玻璃体中白细胞介素-6(IL-6)增加[La Heij, et al. (2002), Am J Ophthal, 134: 367-375], 以及在一项研究中 100%的所研究的糖尿病 ERM 表达 IL-6 蛋白质[Yamamoto, et al. (2001) Am J Ophthal, vol 132: 369-377]。

已表明, 外源性给予碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)可诱导内皮增殖和 VEGF 表达[Stavri, et al. (1995), Circulation, vol 92: 11-14]。与这些观测结果一致, 在来自 PDR 患者的玻璃体样品中 bFGF 浓度会增加[Sivalingam, et al. (1990), Arch Ophthalmol, vol 108: 869-872, 以及 Boulton, et al. (1997), Br J Ophthalmol, vol 81: 228-233]。bFGF 还参与 ERM 的形成[Hueber, et al. (1996), Int. Ophthalmol, vol 20: 345-350], 如在所研究的 10 个 PDR 膜中的 8 个 PDR 膜中的 bFGF 所证明的。此外, 这些研究者发现相应受体 FGFR1 的阳性染色。在非血管性原发性 ERM 中还已证明了对于 bFGF 的免疫反应活性。这些结果意味着 bFGF 参与血管和无血管 ERM 的形成。Harada, et al. (2006), Prog in Retinal and Eye Res, vol 25; 149-164。在 ROP 患者的血清中还已检测到升高的 bFGF(Becerril, et al. (2005), Ophthalmology, vol 112, 2238]。

鉴于 S1P 的已知的多效性以及它与 VEGF、bFGF、PDGF、TGF- β 以及 IL-6 的相互作用, 我们认为结合、拮抗、抑制 S1P 的效应或生产的制剂将有效抑制在缺血性视网膜病和后节疾病(特征在于血管或无血管 ERM 形成)中的病理性视网膜新血管形成。至少部分地特征为异常的新血管形成或血管发生的其它眼病症包括年龄相关性黄斑变性、角膜拼接排斥反应、新生血管性青光眼、隐形眼镜超戴症、角膜感染, 包括单纯疱疹、带状疱疹以及原虫感染、翼状胬肉、感染性葡萄膜炎、慢性视网膜脱离、激光损伤、镰状细胞视网膜病、静脉闭塞症、脉络膜新血管形成、视网膜血管瘤增殖、以及原发性息肉样脉络膜血管病。

b. 增生性玻璃体视网膜病 (PVR)

在原发性孔源性视网膜脱离以后和在创伤性视网膜脱离以后，观测 PVR。它是视网膜脱离外科手术失败的主要原因。它的特征在于在视网膜两侧、在玻璃体后表面和玻璃体基底部上细胞膜的生长和收缩。在眼中这种过度的瘢痕组织发展会导致牵拉性视网膜脱离的发展，因此针对防止或抑制增生性玻璃体视网膜病 (PVR) 的治疗是处理视网膜脱离的合理原则。组织病理学上 PVR 的特征在于过度的胶原生产、收缩以及细胞增殖 [Michels, Retinal Detachment 2nd Edition. Wilkinsin CP, Rice TA Eds, Complicated types of retinal detachment, pp 641-771, Mosby St Louis 1997]。在 PVR 膜中鉴定的细胞类型主要包括视网膜色素上皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞以及血管内皮细胞 [Jerdan, et al (1989), Ophthalmology, vol 96: 801-10, 以及 Vidinova, et al (2005), Klin Monatsbl Augenheilkd; vol 222:568-571]。这种过度的疤痕反应的病理生理学似乎是由许多细胞因子介导，其中细胞因子包括血小板衍生生长因子 (PDGF)、转化生长因子(TGF) β 、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、白细胞介素-6 (IL-6)、以及白细胞介素-8 (IL-8) [Naginei, et al (2005), J Cell Physiol, vol 203: 35-43; La Heij, et al (2002), Am J Ophthalmol, 134: 367-75; Planck, et al (1992), Curr Eye Res; vol 11: 1031-9; Canataroglu et al (2005) Ocul Immunol Inflamm; vol 13: 375-81, 以及 Andrews, et al (1999), Ophthalmol Vis Sci; vol 40: 2683-9]。这些细胞因子的抑制可以有助于防止 PVR 的发展 (如果及时给予) 或限制其严重性 [Akiyama, et al (2006), J Cell Physiol, vol 207:407-12, 以及 Zheng, et al (2003), Jpn J Ophthalmol, vol 47:158-65]。

鞘氨醇-1-磷酸 (S1P) 是具有多效性的生物活性溶血脂质 (lysolipid)。它是促血管新生的、促炎性的 (刺激巨噬细胞和肥大细胞的征集) 以及促纤维化的 (刺激瘢痕形成)。S1P 通常刺激细胞增殖和迁移并且是抗凋亡的。S1P 通过其与许多细胞因子和生

长因子的相互作用来实现这些生物多样性的功能。已证明借助于单克隆抗体 (SPHINGOMAB) 来抑制 S1P 可以阻断血管内皮生长因子 (VEGF)、bFGF、IL-6、以及 IL-8 的功能[Visentin, B et al. (2006), *Cancer Cell*, vol 9: 1-14]。S1P 与 SIP_1 受体的结合还可以增加 PDGF 生产, 因而结合 S1P 的制剂也将预期会减少 PDGF 生产[Milstien and Spiegel (2006), *Cancer Cell*, vol 9: 148-150]。如在以下实施例中所说明的, 现已证明, 在体外 S1P 将人 RPE 细胞转化成类似于在 PVR 中所看到类型的肌成纤维细胞样表型。鉴于在 PVR 中所看到的最终导致过度的疤痕的病理生理学以及 S1P 对这些相同关键介质的已知效应, 可以认为结合、拮抗、或抑制 S1P 的效应或生产的制剂将有效地消除或最大程度降低 PVR 的发展以及其对眼的严重损害效应。

c. 葡萄膜炎

葡萄膜炎是眼葡萄膜的一种炎性疾病。它可以侵袭眼的前部或后部或侵袭两者。它在病因上可以是原发性或传染性的并且可以威胁视力。原发性葡萄膜炎已与前房中增加的 CD4+ 表达有关[Calder, et al. (1999), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol 40: 2019-24]。数据还提示, T 淋巴细胞和其趋化因子 IP-10 在葡萄膜炎的发病机制中的病理性作用[Abu El-Asrar (2004), *Am J Ophthalmol*, vol 138: 401-11]。在急性前葡萄膜炎中的其它趋化因子包括巨噬细胞炎性蛋白、单核细胞趋化蛋白-1 以及 IL-8。这些细胞因子可能在急性前葡萄膜炎的白细胞募集中起关键作用。Verma, et al. (1997), *Curr Eye Res*; vol 16; 1202-8。鉴于 S1P 信号级联放大的意义深远的多效性, 认为降低生物活性脂质有效浓度的 SPHINGOMAB 和其它免疫部分将作为一种有效的方法来降低或调节与葡萄膜炎有关的眼内炎症。

d. 屈光外科手术

角膜伤口愈合反应特别相关于屈光外科手术，因为它是安全和效力的主要决定因素。进行这些手术以治疗近视、远视以及散光。激光原位角膜磨削术 (LASIK) 和屈光性角膜切除术 (PRK) 是最常见的屈光手术，然而已开发了其它手术以试图克服并发症。这些并发症尤其包括矫正过度、矫正不足、消退以及基质浑浊化。许多常见的并发症与愈合反应有关并且其根源在于对外科手术的生物反应。在角膜生物学中最大的挑战之一是借助于再生而不是纤维化来促进组织修复。认为再生和纤维化之间的选择在于成纤维细胞激活的控制 [Stramer, et al (2003), *Invest Ophthalmol Vis Sci*; vol 44: 4237-4246, 以及 Fini (1999) *Prog Retin Eye Res*, vol 18: 529-551]。在外科手术或损伤后 1-2 周，在上皮下基质中可以出现称作肌成纤维细胞的细胞。肌成纤维细胞可能在 TGF- β 的影响下衍生自角膜细胞 [Jester, et al. (2003), *Exp Eye Res*, vol 77: 581-592]。角膜混浊和基质疤痕的特征在于降低的角膜透明度并且可以伴随成纤维细胞和肌成纤维细胞生成。原位和体外研究已提示，TGF- β 和 PDGF 在刺激肌成纤维细胞分化中是重要的 [Folger, et al. (2001), *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 42: 2534-2541]。在某些情况下，在 LASIK 以后，可以在中心界面观测到混浊。这些混浊包括弥漫性板层角膜炎、环形 (甜甜圈形, donut-shaped) 皮瓣、以及上皮碎片保留在界面。它们的每一种都可能伴有 TGF- β 从上皮细胞增加进入激活的角膜细胞 [Netto, et al. (2005), *Cornea*, vol 24: 509-522]。消退很可能是由于提高的上皮-基质伤口愈合相互作用如通过角膜成纤维细胞和/或肌成纤维细胞的上皮调节生长因子的产生增加 [Netto, et al. (2005), 上文]。已表明，用局部的抗 TGF- β 抗体抑制 TGF- β 结合于受体可减少由 PRK 诱导的混浊 [Jester, et al. (1997), *Cornea*, vol 16: 177-187]。鉴于抗生物活性脂质抗体对纤维化进程和 TGF- β 的已知效应，我们认为，它可以有助于治疗屈光外科手术的某些并发症如混浊、基质疤痕以及消退。

e. 青光眼过滤外科手术的调节

青光眼通常被认为是一种高眼内压引起对视神经的损伤并最终使视野和/或视敏度受到损害的疾病。存在其它形式的青光眼，其中视神经损伤可以发生在常压环境中或所谓的“正常眼压性青光眼”。对于许多患者来说，药物能够控制它们的病情，但对于其它患者而言则需要实施青光眼滤过术，从而在眼中手术产生的瘻使流体可以排出。这可以通过小梁切除术、植入医疗装置或外科干预的其它方法来实现。由于特征在于成纤维细胞增殖的伤口愈合过程而导致青光眼滤过术失败并最终留下疤痕。抗代谢物如 5-氟尿嘧啶和丝裂霉素 C 可以减少术后的疤痕；然而，甚至是在术后长期使用这些药物的情况下，手术失败仍然是严重的临床问题[Mutsch and Grehn (2000), Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol; vol 238: 884-91, 以及 Fontana, et al. (2006), Ophthalmology, vol 113: 930-936]。人 Tenon 囊成纤维细胞的研究证明了它们能够合成 bFGF 和 PDGF 以及 TGF- β 并且这些生长因子参与青光眼滤过术后的组织修复过程，其促成了手术的失败。Trpathi, et al. (1996), Exp Eye Res, vol 63: 339-46。另外的研究还涉及在后滤过伤口反应中的这些生长因子 [Denk, et al. (2003), Curr Eye Res; vol 27: 35-44]，结论是 PDGF 的不同同种型是在青光眼滤过术以后 Tenon 囊成纤维细胞增殖的主要刺激剂，而 TGF- β 是 Tenon 囊成纤维细胞转化成肌成纤维细胞所必需的。我们已证明，S1P 存在于人 Tenon 囊/结膜成纤维细胞中以及 S1P 在伤口愈合反应中被强烈表达。S1P 还刺激多种成纤维细胞细胞类型的促纤维变性功能和转化成肌成纤维细胞表型以及胶原生产。鉴于 S1P 的特定的多效性以及其与 bFGF、PDGF、以及 TGF- β 的已知的相互作用，认为结合、拮抗、抑制 S1P 的效应或生产的制剂将有效调节伤口愈合和/或纤维变性反应（其导致青光眼外科手术的失败）并且将是增加成功的手术结果的有效治疗方法。设想，可以例如借助于玻璃体内注射或结膜下注射或局部地给予上述制剂。

f. 角膜拼接

角膜拼接（穿透角膜拼接术(PK)）是在人类中最成功的组织拼接手术。然而每年在美国进行的 47,000 例角膜拼接中，角膜异体拼接物反应仍然是角膜拼接失败的主要原因 [Ing, et al. (1998), *Ophthalmology*, vol 105: 1855-1865]。虽然免疫抑制和免疫调节可以是一种有希望的方式，但目前还没有足够的能力来避免异体拼接物反应。最近已发现，在角膜异体拼接物的排斥中，CD4(+)T 细胞直接作为效应细胞而不是辅助细胞。Hegde, et al. (2005), *Transplantation*, vol 79: 23-31。鼠类研究已表明角膜基质中增加数目的中性粒细胞、巨噬细胞以及肥大细胞经受排斥。巨噬细胞是主要的浸润细胞类型，接着是 T 细胞、肥大细胞以及中性粒细胞。在高风险角膜拼接中的早期趋化因子表达是 IL-8 的小鼠同源物（巨噬细胞炎性蛋白-2）和单核细胞趋化蛋白-1（MCP-1） [Yamagami, et al. (2005), *Mol Vis*, vol 11, 632-40]。

FTY720 (FTY) 是一种新的免疫抑制药物，其通过改变淋巴细胞运输来起作用；导致外周血淋巴细胞减少和淋巴结中增加的淋巴细胞计数。通过结合于在淋巴细胞上表达的一些 S1P 受体，FTY 介导其免疫调节作用 [Bohler, et al. (2005), *Transplantation*, vol 79: 492-5]。口服给予药物并且单口服剂量降低外周淋巴细胞计数 30-70%。在 FTY 降低 T 细胞亚群中，CD4(+)细胞多于 CD8(+)细胞。Bohler, et al. (2004), *Nephrol Dial Transplant*, vol 19: 702-13。当口服给予时，经 FTY 治疗的小鼠显示出原位角膜拼接存活显著延长。Zhang, et al. (2003), *Transplantation*, vol 76: 1511-3。在角膜异种拼接的大鼠-小鼠模型中，FTY 口服治疗还显著延迟排斥并降低其严重性 [Sedlakova, et al. (2005), *Transplantation*, vol 79, 297-303]。鉴于异体拼接物反应的已知发病机制并结合数据（其提示调节 S1P 信号的效应可以改善角膜拼接存活），认为降低生物活性脂质（例如，

SPHINGOMAB) 的有效浓度的免疫部分也将可用于治疗免疫病症如异物拼接物反应, 例如通过减弱免疫应答, 因此将可能改善 PK 以后的角膜拼接存活。上述药物还可以具有另外的优点, 即除系统给予之外, 可以局部给予, 例如, 借助于局部眼周或眼内递送。

具有炎症或免疫组成部分的其它眼部疾病包括慢性玻璃体炎, 感染, 其包括单纯疱疹、带状疱疹、以及原虫感染, 以及眼组织胞浆菌病。

g. 以疤痕为特征的前节病

还认为, 用靶向生物活性脂质的抗体进行的治疗可以有有益于特征为眼前部疤痕的若干病症。这些病症包括:

i. 创伤

作为眼最前部结构的角膜暴露于各种有害物, 从气载碎片到钝性外伤, 其可以产生自机械损伤。眼的角膜和前部表面还可以被暴露于其它由外科手术形成的创伤、以及化学(如酸和碱)灼伤。这些类型的损伤的结果可以是破坏性的, 经常导致角膜和结膜疤痕睑球粘连形成。此外, 可以接着发生角膜新血管形成。释放白三烯的中性粒细胞积累, 以及白细胞介素-1 和白细胞介素-6 的存在, 起到连续不断地募集炎症细胞的作用[Sotozono, et al. (1997), Curr Eye Res, vol 19: 670-676], 炎症细胞浸润角膜并释放蛋白水解酶, 这导致角膜组织和角膜熔体的进一步损害和破坏。此外, 角膜和结膜成纤维细胞被激活并侵入, 从而导致胶原沉积和纤维化。TGF- β 会促进过度炎症和疤痕的不期望的效应。Saika, et al. (2006), Am J Pathol vol 168, 1848-60。该过程导致角膜透明度的损失和视力受损。减少的炎症, 包括降低的中性粒细胞浸润和降低的纤维化, 导致在碱烧

灼伤角膜的鼠类模型中更快和更完全的愈合[Ueno, et al. (2005), *Ophthalmol Vis Sci*, vol 46: 4097-106]。

ii. 眼瘢痕性类天疱疮 (OCP)

OCP 是一种慢性结膜（瘢痕形成）自身免疫病，其主要侵袭结膜。此病是不可逆地进行性的并且预后相当差。在其最后阶段，结膜疤痕和伴随的角膜病变导致双侧失明。组织学上结膜显示粘膜下疤痕和慢性炎症，其中肥大细胞参与程度非常高[Yao, et al. (2003), *Ocul Immunol Inflamm*, vol 11 : 211-222]。自身抗原导致形成自身抗体。在浸润 T 淋巴细胞的情况下，自身抗体与自身抗原的结合会启动一系列复杂的事件，其中 CD4（辅助）细胞远远多于 CD8（抑制）细胞。巨噬细胞和肥大细胞浸润也接着发生以及促炎和促纤维化细胞因子的释放。结果是细胞因子诱导的结膜成纤维细胞增殖和激活，并发生上皮下纤维化（参见以下实施例）。研究已表明在 OCP 患者中 TGF- β 和 IL-1 在结膜纤维化中的作用[Razzaque, et al. (2004), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol 45 : 1174-81]。

iii. 史蒂文斯-约翰逊综合征 (SJS) 和中毒性表皮坏死溶解症 (TEN)

SJS 和 TEN 是的威胁生命对药物的不良反应。上述两种相关病症的眼后遗症可以是严重的并且涉及延髓和睑结膜、眼睑、以及角膜的病理性变化。药物和感染是最常见的参与因素。由于最初的炎性过程，慢性眼结果包括疤痕、睑球粘连形成、以及结膜的瘢痕形成。这导致睑内翻形成、倒睫、以及泪膜的不稳定。眼表面的破坏导致角膜疤痕、新血管形成、以及在严重情况下导致角质化。如在 OCP 中，则发生结膜的上皮下纤维化。人们认为，对药物或感染的剧烈的自身免疫淋巴细胞反应在 SJS/TEN 的发展中起作用。Harilaos, et al. (2005), *Erythema Multiforme, Stevens Johnson Syndrome, and*

Toxic Epidermal Necrolysis, in *Cornea* 2nd edition. Krachmer, Mannis, Holland eds. Elsevier Mosby Philadelphia. 在 SJS 中的浸润细胞群包括巨噬细胞、CD4 阳性 T 细胞、以及 CD8 阳性 T 细胞。该细胞群类似于在化学灼伤中所看到的那些细胞群。Kawasaki, et al. (2000), *J Ophthalmol*, vol 84: 1191-3。

iv. 翼状胬肉

临床上翼状胬肉表现为肉样、血管团，其发生在睑间裂隙中。翼状胬肉的主体是肉样纤维血管团。活性翼状胬肉的特征在于显著的血管充血和进行性生长。它们被坚固地黏附眼球。在晚期的情况下翼状胬肉侵害角膜并且会引起在视轴内角膜透明度损失之后的视觉损失或不规则散光。在症状上，患者会感到有异物感、撕裂感以及视力模糊。组织病理学证明了固有质的上皮下结缔组织的透明样变化、成纤维细胞的数目增加以及肥大细胞的增加。Butrus, et al. (1995), *Am J Ophthalmol*, vol 119: 236-237。翼状胬肉的处理仍然是个问题。经常进行手术切除，然而复发率较高[Krag, et al. (1992), *Acta Ophthalmol*, vol 70: 530]。为了有助于降低翼状胬肉的复发率，已采用各种药理佐剂，如丝裂霉素 C 和柔红霉素。虽然这些药理佐剂可以是有帮助的，但长期数据有限并且它们可以伴随巩膜变薄和角膜融化。Dougherty 等[(1996), *Cornea*, vol 15: 537-540, 以及 Lee, et al. (2001), *Cornea*, vol 20: 238-42]首先证明了，在翼状胬肉的发展中 VEGF 可以具有重要作用以及鉴定了翼状胬肉上皮中的 VEGF 和一氧化氮。这些研究者假设，这些以及其它细胞因子是翼状胬肉的纤维血管向内生长特性的原因。已证明在原发性或复发性翼状胬肉中均存在碱性 FGF 和 TGF- β 1[Kira, et al. (1998), *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, vol 236: 702-8]并且发表的形态计量和免疫组织化学证据进一步支持这样的观点，即血管发生可以在翼状胬肉的形成中发挥作用[Marcovich, et al (2002), *Curr Eye Res*, vol 25: 17-22]。其

它研究已指出 IL-6 和 IL-8 以及 VEGF 作为介质，可以与翼状胬肉发展有关[Di Girolamo, et al. (2006), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 47: 2430-7]。抵抗翼状胬肉形成和生长的有效制剂可以减少对外科干预的需要或降低复发率。

伴随纤维发生、纤维化或疤痕组成部分的其它眼部疾病和病症包括 AMD、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、镰状细胞视网膜病、缺血性视网膜病、视网膜静脉闭塞性疾病、以及隐形眼镜超戴症。

总之，过度的疤痕是许多眼和非眼部疾病和病症的病理生理学的基本组成部分。生物活性脂质如 S1P 在此过程中具有作用并且用来减少这些制剂的浓度的抗体相关治疗将可能对接受该治疗的患者产生治疗效果。在一种实施方式中，我们认为，生物活性脂质的抑制剂，尤其是针对 S1P 和/或其变体的单克隆抗体，可用于调节手术反应和创伤性伤口愈合反应。

纤维化、纤维发生以及瘢痕形成：

视网膜下纤维化的形成导致对光感受器的不可逆转的损害以及永久性视力减退。只要新生血管复合体仍然是完整的，如在用抗 VEGF 剂治疗的患者中似乎是这种情况，视网膜下纤维化的潜力和未来视力减退会持续。在 RANIBIZUMAB (Lucentis®) 的 PRONTO 研究的最新报导中，发现，由于视网膜下纤维化或 RPE 撕裂，那些失去视力的患者确实如此。可以减少成纤维细胞浸润和胶原沉积程度的制剂将是具有价值的。

成纤维细胞，尤其是肌成纤维细胞，在响应细胞损伤和炎症的瘢痕形成中是关键细胞元件[Tomasek, et al. (2002), Nat Rev Mol Cell Biol, vol 3: 349-63, 以及 Virag and Murry (2003), Am J Pathol,

vol 163: 2433-40]。通过肌成纤维细胞的胶原基因表达是重建的标志并且是瘢痕形成所必要的[Sun and Weber (2000), *Cardiovasc Res*, vol 46: 250-6, 以及 Sun and Weber (1996), *J Mol Cell Cardiol*, vol 28: 851-8]。通过激活成纤维细胞迁移和增殖同时增加胶原生产, S1P 可促进伤口愈合[Sun, et al. (1994), *J Biol Chem*, vol 269: 16512-7]。由受损细胞局部产生的 S1P 可以是造成伴随重建和瘢痕形成的不当伤口愈合的原因。因此, 认为, S1P 抑制剂可用于治疗至少部分地特征为异常的纤维发生或纤维化的疾病或病症。

视网膜下纤维化的形成导致对光感受器的不可逆转的损害和永久性视力减退。只要新生血管复合体是完整的, 如在用抗 VEGF 剂治疗的患者中似乎是这种情况, 则视网膜下纤维化和未来视力减退的可能性就会继续。

通过中和 S1P 来最大程度降低不适当瘢痕形成可以是有益的并且通过限制视网膜下纤维化和其后光感受器损伤的程度可以防止视力的不可逆丧失。越来越多的证据表明 S1P 可以有助于早期和后期阶段的伴随渗出性 AMD 的不适当的视网膜重建。S1P 具有明显的非 VEGF 依赖性促血管再生效应。S1P 还刺激多种细胞类型的迁移、增殖以及存活, 包括成纤维细胞、EC、周细胞以及炎性细胞——参与渗出性 AMD 和其它眼部疾病的多种不适当过程的不同细胞。S1P 与参与渗出性 AMD 的发病机制的 VEGF、bFGF、PDGF、以及其它生长因子 (GF) 的生产和激活有关。最后, S1P 可以调节初生脉管系统的成熟, 该过程导致损失对抗血管形成剂的敏感性。抑制 S1P 的作用可以是用于渗出性 AMD 的有效治疗性治疗, 其可以提供相对于仅仅抗 VEGF 方式的显著优点或可以与它们协同作用以解决最终导致 AMD 相关性视觉损失的复杂过程和多个步骤。

目前偏爱的用于 AMD 的治疗方法包括 Lucentis®和核准适应症外使用 (off-label use) 的 Avastin® (Genentech, Inc.)，两者均靶向单个生长因子 (VEGF-A) 并且似乎借助于抗渗作用来施加大部分它们的有益效应，其导致视网膜下和视网膜内水肿的消退，因为实际的脉络膜新生血管 (CNV) 病变并没有显著地退化。然而，渗出性 AMD 相关的视力减退并不仅起因于 CNV 诱导的视网膜下和视网膜内水肿。由 CNV、视网膜下纤维化、水肿以及炎症一起共同引起的视网膜和视网膜下结构的病理性破坏和重建导致伴随 AMD 的视力损失。可用的治疗方法 (包括 Lucentis™) 并没有针对这些多种原因。因此，可以治疗多种机制 (其引起视力减退) 的治疗剂将具有很大的价值，作为单药治疗或连同另一种制剂，如抗 VEGF 剂 (例如，Lucentis®或 Avastin®)。

因此，不希望受限于任何特定理论，认为不受欢迎的鞘脂如 S1P、和/或它们的一种或多种代谢物的水平引起或有助于各种眼部疾病和病症的发展，其中不适当的炎症、纤维化和/或血管发生参与疾病的发病机制。眼的疾病和病症 (其中抗 S1P 抗体可能是临床上有用的) 包括糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、糖尿病性黄斑水肿、PVR、前段病以及年龄相关黄斑水肿，湿型和干型，以及手术后如青光眼的小梁切除术或瓣膜拼接术。

用于治疗硬皮病的抗 S1P 抗体

本发明的组合物和方法将可用于治疗至少部分地特征为异常的新血管形成、血管发生、纤维发生、纤维化、疤痕、炎症、以及免疫应答的病症和疾病。一种这样的疾病是硬皮病，其还称作系统性硬化病。

硬皮病是一种自身免疫病，其引起疤痕或皮肤增厚，并且有时涉及身体的其它区域，包括肺脏、心脏、和/或肾。硬皮病的特征在

于在身体的皮肤和器官中形成瘢痕组织（纤维化），其可以导致所涉及区域的增厚和坚实，以及随之发生的功能降低。根据美国硬皮病基金会的统计数据，目前有约 300,000 美国人患有硬皮病。三分之一或更少的受侵袭患者患有普遍疾病，而其余的三分之二主要具有皮肤症状。当该疾病侵袭肺脏并引起疤痕时，呼吸可能会受到限制，这是因为肺脏不再能如它们应该的那样进行扩张。为了测量肺活量，医生使用了一种用来估计用力肺活量(FVC)的装置。在 FVC 小于 50%的预期的人群中，起因于硬皮病相关的肺部疾病的 10 年死亡率为约 42%。死亡率如此高的一个原因是目前没有有效的治疗方法。

不希望受限于任何特定理论，认为脂质如 S1P 和/或其代谢物的不适当的浓度会引起或加剧硬皮病的发展。因此，本发明的组合物和方法可以用来治疗硬皮病，尤其是通过降低特定靶脂质例如 S1P 的有效体内浓度。

如在本申请书中其它地方所描述的，现有证据表明，S1P 是一种促纤维变性生长因子，其可以有助于成纤维细胞激活、增殖、以及获得伴随不适当疤痕和重建的增加的成纤维细胞活性。人们认为，具有生物活性的 S1P 和抗 S1P 剂（例如，抗 S1P mAb）能够间接缓和 PDGF 和 TGF- β 的促硬化效应。此外，用这样的抗 S1P 剂通过缓和 S1P 对皮肤和其它形式的成纤维细胞（其有助于疾病进展）的直接影响而进行的治疗能够有益于硬皮病患者。

心血管和脑血管病

不希望受限于任何特定理论，不期望的鞘脂如 CER、SPH、或 S1P、和/或一种或多种它们的代谢物的水平可能是造成心功能不全（心肌缺血期间或以后如再灌注损伤期间）以及得到的心脏重塑和心力衰竭的直接原因。

由于鞘脂(如 S1P)参与肝组织的纤维发生和伤口愈合(Davaille, et al., J. Biol. Chem. 275:34268-34633, 2000; Ikeda, et al., Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 279:G304-G310, 2000), 受伤脉管系统的愈合(Lee, et al., Am. J. Physiol. Cell P hysiol. 278:C612-C618, 2000), 以及其它疾病状态, 或与这样的疾病有关的事件, 如癌症、血管发生和炎症(Pyne, et al, Biochem. J. 349:385-402, 2000), 所以本发明的组合物和方法不仅可以用来治疗这些疾病而且还可以用于治疗心脏疾病。

这表明, 来自心脏或其它非脑源的鞘脂可能有助于卒中。因此, 干扰鞘脂生产和/或作用可以有益于缓和卒中, 尤其是由外周血管疾病引起的卒中、动脉粥样硬化、以及心脏疾病。最近的证据表明, 外源性给予的 S1P 会穿越血脑屏障并促进脑血管收缩(Tosaka, et al., Stroke 32: 2913-2919.2001)。

已表明, 在心肌缺血(即, 供应到心脏的血液缺乏)期间, 一个早期事件是由心肌过量产生天然存在的化合物鞘氨醇, 以及由心脏组织本身或由血液成分产生其它代谢物, 尤其是 S1P, 这是作为在血液中心肌鞘脂生产和其后转化的结果。本发明提供了用特异性人源化单克隆抗体来中和 S1P 的方法。因此本发明提供了人源化抗鞘脂抗体和有关的组合物和方法来降低关键鞘脂(S1P)的血液和组织水平。这样的抗体可用于, 例如, 结合并因此降低全血中不希望存在的鞘脂的有效浓度。

本发明的治疗方法和组合物被描述成是“基于鞘脂的”以表明这些疗法可以改变某些不希望的、毒性或心脏毒性鞘脂的相对、绝对或可用浓度。“毒性鞘脂”是指任何鞘脂, 其可以引起或增强细胞的坏死和/或凋亡或在其它情况下损害器官或组织的功能(例如, 通过过度纤维化), 在某些情况下包括在特定组织或器官中发现的特定细胞类型。“心脏毒性鞘脂”是毒性鞘脂, 其通过不适当的疤

痕（纤维发生）直接或间接促进心力衰竭，引起负变力状态或引起或增强在心脏中或伴随心脏发现的细胞（包括但不限于心脏细胞、心脏神经元等）的坏死和/或凋亡，和/或可以引起心脏功能的丧失，这是由于鞘脂和/或它们的代谢物的负变力效应、心律失常冠状动脉血管收缩/痉挛效应。“不期望的鞘脂”包括毒性和心脏毒性鞘脂，以及代谢物，尤其是毒性和心脏毒性鞘脂的代谢前体。特别感兴趣的不希望的神经酰胺（CER）、酰基神经鞘氨醇-1-磷酸（C1P）、鞘氨醇-1-磷酸（S-1-P）、二氢 S1P（DHS1P）、神经鞘氨醇磷酸胆碱（SPC）、鞘氨醇（SPH；D(+)-赤型-2-氨基-4-反式-十八烯-1,3-二醇、或神经鞘氨醇）以及各种代谢物。

心肌细胞对缺氧和再氧合的最早反应之一是中性鞘磷脂酶的激活和神经酰胺的蓄积是已知的。Hernandez, et al. (2000), *Circ. Res.* 86:198-204, 2000。据称 SPH 涉及介导各种细胞类型中细胞凋亡的早期信号事件（Ohta, et al., *FEBS Letters* 355:267-270, 1994; Ohta, et al., *Cancer Res.* 55:691-697, 1995; Cuvlilier, et al., *Nature* 381:800-803, 1996）。假定缺氧的心脏毒性效应可以部分地来自鞘脂生产和/或来自其它代谢物（例如，质子、钙、以及某些自由基）或信号分子（例如，MAP 激酶、胱冬裂酶）的不适当产生，则会对心脏功能产生有害影响。

S1P 被存储在血小板中并且是人血浆和血清的正常组分（Yatomi, et al., *J. Biochem.* 121 :969-973, 1997）。S1P 是一种冠状动脉血管收缩剂并且对犬心脏具有其它生物效应。Sugiyama, et al. (2000), *Cardiovascular Res.* 46:119-125。已经推定了 S1P 在动脉粥样硬化中的作用（Siess, et al., *IUBMB Life* 49:161-171, 2000）。这已获得其它资料的支持，包括以下证据：HDL 的保护作用起因于阻断

S1P 生产 (Xia, et al., PNAS 95:14196-14201, 1988; Xia, et al., J Biol Chem 274:33143-33147, 1999)。

已报道,鞘磷脂(其为神经酰胺的代谢前体)在经受缺氧的实验动物中会增加(Sergeev, et al., Kosm. Biol. Aviakosm. Med. (Russian) 15:71-74, 1981)。其它研究已报道,肌细胞的内膜包含大量的 SPH 和鞘磷脂(Sumnicht, et al., Arch. Biochem. Biophys. 215:628-637, 1982; Sabbadini, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 193:752-758, 1993)。用串珠镰孢菌素 B 真菌毒素治疗实验动物导致增加 SPH 和 DHSPH 的血清水平(未测量 S1P),并同时心脏发生负变力效应(Smithe, et al., Toxicological Sciences 56:240-249, 2000)。

其它疾病或病症

由于在许多过程(包括新血管形成、血管发生、异常的纤维发生、纤维化和疤痕、以及炎症和免疫应答)中涉及生物活性脂质信号,所以认为,这些生物活性脂质的抑制剂将有助于与一种或多种这些过程有关的各种疾病和病症。这样的疾病和病症可以是全身的(例如,全身性硬皮病)或位于一个或多个特定身体系统、部分或器官(例如,皮肤、肺脏、心血管系统或眼)。

在患者中控制不受欢迎的鞘脂量的一种方式是通过提供一种组合物,其包含一种或多种人源化抗鞘脂抗体以结合一种或多种鞘脂,从而作为治疗性“海绵”,其可以降低游离的不受欢迎的鞘脂的水平。当化合物被称作“游离的”时,则该化合物不以任何方式被限制达到它施加其不受欢迎的效应的部位。通常,游离化合物存在于血液和组织中,其是或包含游离化合物的作用部位,或从其一种化合物可以自由地迁移到其作用部位。一种游离化合物还可以用于被任何酶作用,其中酶将化合物转化成不期望的化合物。

不希望受限于任何特定理论,认为,不受欢迎的鞘脂如 SPH 或 S1P、和/或一种或多种它们的代谢物的水平引起或有助于心脏和心肌疾病和病症的发展。

因为鞘脂还涉及肝组织的纤维发生和伤口愈合 (Davaille, et al., J. Biol. Chem. 275:34268-34633, 2000; Ikeda, et al., Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 279:G304-G310, 2000)、受伤脉管系统的愈合 (Lee, et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. 278:C612-C618, 2000), 以及其它疾病状态或病症,或与上述疾病或病症有关的事件,如癌症、血管发生、与过度纤维化和炎症有关的各种眼部疾病 (Pyne et al., Biochem. J. 349:385-402, 2000), 所以本发明的组合物和方法可以用来治疗这些疾病和病症以及心脏和心肌疾病和病症。

基于鞘脂的疗法的一种形式涉及操作鞘脂的代谢途径,以降低不受欢迎的毒性鞘脂的实际、相对和/或可用体内浓度。本发明提供了用于治疗或预防疾病、病症或身体创伤的组合物和方法,其中将人源化抗鞘脂抗体给予患者以结合不受欢迎的毒性鞘脂、或其代谢物。

这样的人源化抗鞘脂抗体可以被配制在药物组合物中,其可以用于各种目的,包括治疗疾病、病征或身体外伤。可以将包含本发明的一种或多种人源化抗鞘脂抗体的药物组合物结合于用于上述治疗的试剂盒和医疗装置。医疗装置可以用来将本发明的药物组合物给予对其有需要的患者,并且根据本发明的一种实施方式,提供了包括上述装置的试剂盒。上述装置和试剂盒可以用于常规给予(包括自我给予)本发明的药物组合物。上述装置和试剂盒还可以在紧急情况下使用,例如,在救护车或急诊室中,或在外科手术期间,或在可能发生损伤但不能立即获得充分的医疗条件的活动中(例如,徒步旅行和野营,或战斗环境)。

给予方法

本文描述的疾病和病症的治疗可以通过各种途径、采用不同的剂型和装置来给予本发明的制剂和组合物加以实现。适宜的药用稀释剂、载体、以及赋形剂在本技术领域是众所周知的。本领域技术人员将明了，对于任何特定治疗方法所给予的量可以容易地确定。适宜的量可以预期为 10 μg /剂量至 10 g/剂量，优选为 10 mg/剂量至 1 g/剂量。

可以通过本技术领域已知的方法来给予原料药，包括但不限于全身给予、皮下给予、皮内给予、粘膜给予（包括通过吸入）、以及局部给予。粘膜是指上皮组织，其沿着身体的内腔。例如，粘膜包括消化道，其包括口、食管、胃、小肠、以及肛门；呼吸道，其包括鼻通道、气管、支气管、以及肺脏；以及外生殖器。对本说明书来说，粘膜还包括眼的外表面，即角膜和结膜。局部给予（与系统给予相反）可以是有利的，因为这种方式可以限制潜在的全身副作用，而仍然可以获得治疗效果。

在本发明中使用的药物组合物包括但不限于溶液、乳浊液、以及包含脂质体的剂型。这些组合物可以产生自各种成分，其包括但不限于预制液体、自乳化固体以及自乳化半固体。

在本发明中使用的药剂剂型可以按照制药行业熟知的常规技术来制备。这样的技术包括使活性组分与药物载体或赋形剂结合的步骤。优选的载体包括那些药用载体，尤其是当组合物用于人类的治疗应用。对于非人类治疗应用（例如，用于伴侣动物、家畜、鱼、或家禽的治疗），可以采用兽医用载体。通常，剂型的制备如下：均匀地和紧密地使活性组分缔合于液体载体或精细分割的固体载体或两者，然后如果需要的话，使产品成形。

本发明的组合物可以配制成许多可能剂型的任何一种，如但不限于片剂、胶囊剂、液体糖浆剂、软明胶胶囊、栓剂、以及灌肠剂。本发明的组合物还可以配制成在含水、非含水或混合介质中的混悬剂。含水混悬剂可以进一步包含增加悬浮液粘度的物质，其包括，例如，羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或右旋糖酐。该混悬剂还可以包含稳定剂。

在一种实施方式中，该药物组合物可以被配制并用作泡沫。药物泡沫包括的剂型例如是，但不限于，乳剂、微乳剂、乳膏剂、胶冻剂、以及脂质体。

虽然特性基本类似，但这些剂型在最终产品的组分和稠度方面会有所不同。关于上述组合物和剂型的制备的专门技术通常是制药和配制领域的技术人员已知的并且可以用于本发明的组合物的配制。

在一种实施方式中，可以借助于，例如，局部用滴剂或软膏剂、眼周注射、前房内进入前房或玻璃体，借助于植入长效制剂、或系统注射或口服，将免疫衍生部分递送到眼部。所用抗体的量可以容易地由本领域技术人员确定。

将疗法递送到眼部的传统方式包括局部施加、系统给予以后再分布到眼部或直接眼内/眼周注射[Sultana, et al. (2006), *Current Drug Delivery*, vol 3: 207-217; Ghate and Edelhauser (2006), *Expert Opinion*, vol 3: 275-287; 以及 Kaur and Kanwar (2002), *Drug Develop Industrial Pharmacy*, vol 28: 473-493]。抗 S1P 或其它抗生物活性脂质抗体治疗可以和任何这些方式一起使用，虽然均具有某些发觉的优点和缺点。局部用滴剂是方便的，但主要起因于鼻泪引流的流失经常将少于 5% 的所施加药物递送到眼的前部并且甚至将上述剂量的更小部分递送到眼球后节。除滴剂以外，喷雾剂还提供了另一种局部给予

的方式。第三种方式是眼用软膏剂或乳剂，其可以用来延长剂型与眼表面的接触时间，虽然视力模糊和眼睑无光泽可能是令人烦恼的。上述局部方式仍然是优选的，因为治疗眼部疾病的疗法的系统给予会将全身暴露于药物的潜在毒性。

眼后节的治疗在医学上是重要的，因为在美国和其它发达国家，年龄相关性黄斑变性、糖尿病性视网膜病、后葡萄膜炎、以及青光眼是视力衰退的主要原因。Myles, et al. (2005), *Adv Drug Deliv Rev*; 57: 2063-79。将药物递送到后节的最有效方式是通过玻璃体的玻璃体内注射。然而，直接注射需要熟练的医生来实施递送并且许多患者会对其产生治疗受限的忧虑。与玻璃体内注射相比，眼周注射（其包括结膜下注射、球后注射、眼球周注射以及后眼球筋膜下注射）的侵入性稍少一些。重复的和长期的玻璃体内注射会引起并发症，如玻璃体出血、视网膜脱离、或眼内炎。

还可以利用较新的眼递送系统中的一种来给予抗生物活性脂质抗体治疗[Sultana, et al. (2006), *Current Drug Delivery*, vol 3 : 207-217; 以及 Ghate and Edelhauser (2006), *Expert Opinion*, vol 3 : 275-287]，其包括持续或受控释放系统，如(a)眼用膜剂（可溶的、可侵蚀的、不可侵蚀的或基于水凝胶的）、角膜罩，例如基于胶原的绷带和隐形眼镜，其将药物受控递送到眼部，(b)原位胶凝系统，其便于以滴剂形式给予，其中滴剂在眼中被转化成凝胶形式，从而提供药物在眼中的某种持续效应，(c)泡状系统如脂质体、类脂囊泡/discomes等，其提供以下优点：靶向递送、生物相容性以及免于视力模糊，(d)粘膜粘附系统，其提供在眼中的更好保留，(e)前药，(f)渗透增强子，(g)冻干载体系统，(h)颗粒，(i)亚微乳，(j)离子渗入疗法，(k)树枝状聚合物，(l)微球，包括生物粘附微球，(m)纳米球和其它纳米颗粒，(n)collasomes，以及(o)药物递送系统，其包括一种或多种上述系统以提供另外的、甚至协同的有利影响。大多数这些

方式靶向眼的前段并且可以有益于治疗前段病。然而，这些方式的一种或多种仍然可以有利影响眼后区中的生物活性脂质浓度，因为脂质的相对较低分子量将可能允许脂质在眼中的大量流动。此外，引入眼前区中的抗体可以能够在整个眼中迁移，尤其是如果它被制备成更低重量抗体变体如 Fab 片段。还可以采用用于后节的持续药物递送系统如那些批准的或开发中的持续药物递送系统（参见上文的参考文献）。

如前所述，后部视网膜、脉络膜、以及黄斑的疾病治疗在医学上是非常重要的。在这方面，经巩膜离子导入[Eljarrat-Binstock and Domb (2006), *Control Release*, 110: 479-89]是一种重要进展并且可以提供有效的方式来将抗体递送到眼后节。

还可以将各种赋形剂加入配制的抗体以改善治疗性能，使治疗更方便或明显确保配制的抗体仅用于其所期望的、认可的目的。赋形剂的实例包括用来控制 pH 的化学制品、抗微生物剂、用来防止抗体潜能损失的防腐剂、用来确定仅眼用的剂型的染料、用增加剂型中抗体浓度的增溶剂、渗透增强子、以及用来调节等渗性和/或粘度的制剂的使用。可以加入例如蛋白酶的抑制剂，以延长抗体的半衰期。在一种实施方式中，在包含磷酸缓冲盐溶液的溶液中并在对眼适宜的 pH 下，通过玻璃体内注射将抗体递送到眼部。

抗 S1P 剂（例如，人源化抗体）还可以被化学修饰以产生在前述剂型或装置之一中给予的前药。然后通过内源性酶的作用来释放抗体的活性形式。在本申请中所考虑的可能的眼酶是各种细胞色素 p450、醛还原酶、酮还原酶、酯酶或 N-乙酰- β -葡萄糖胺酶。对抗体的其它化学修饰可以增加其分子量，从而增加抗体在眼中的停留时间。上述化学修饰的一个实例是聚乙二醇化[Harris and Chess (2003), *Nat Rev Drug Discov*; 2: 214-21]，一种过程，其可以是通用

于或专用于官能团如二硫化物[Shaunak, et al. (2006), Nat Chem Biol ; 2:312-3]或硫醇[Doherty, et al. (2005), Bioconjug Chem; 16: 1291-8]。

本文以下实施例描述了从治疗角度考虑具有所期望性能（包括与鞘脂的强结合亲和力）的人源化和变体抗鞘脂抗体的生产。尤其是，本发明涉及 S1P 以及它的变体，其可以包括 S1P 本身，定义为鞘氨醇-1-磷酸[sphingene-1-磷酸；D-赤型-鞘氨醇-1-磷酸；鞘氨醇-1-磷酸；(E,2S,3R)-2-氨基-3-羟基-十八-4-烯氧基]膦酸(AS 26993-30-6)，DHS1P 被定义为二氢鞘氨醇-1-磷酸[神经鞘氨醇-1-磷酸；[(2S,3R)-2-氨基-3-羟基-十八氧基]膦酸；D-赤型-二氢-D-鞘氨醇-1-磷酸(CAS 19794-97-9)]；SPC 是神经鞘氨醇磷酸胆碱、溶鞘磷脂、鞘氨醇磷酸胆碱、鞘氨醇磷酸胆碱、三乙基苯酚乙铵盐；2-((((2-氨基-3-羟基-4-十八烯基)氧基)羟基氧膦基)氧基)-N,N,N-三甲基-氯化物、(R-(R*,S*-(E))),2-[[[(E,2R,3S)-2-氨基-3-羟基-十八-4-烯氧基]-羟基-磷酰基]乙氧基-三甲基-氯化铵(CAS 10216-23-6)。

抗体生成和表征

如在以下实施例中所描述的，可以确定抗体亲和力。优选的人源化或变体抗体是那些抗体，其结合鞘脂并且 K_d 值不大于约 1×10^{-7} M，优选不大于约 1×10^{-8} M，并且最优选不大于约 5×10^{-9} M。

除与鞘脂具有强结合亲和力的抗体之外，还希望选择从治疗角度考虑具有其它有益性能的人源化或变体抗体。例如，抗体可以是降低血管发生并改变肿瘤进展的抗体。优选地，抗体具有不大于约 10 ug/ml 的有效浓度 50 (EC50) 值，优选不大于约 1 ug/ml，以及最优选不大于约 0.1 ug/ml，如用直接结合 ELISA 测定所测得的。优选地，抗体具有不大于约 10 ug/ml 的有效浓度值，优选不大于约 1 ug/ml，以及最优选不大于约 0.1 ug/ml，如在有 1 uM S1P 存在的

条件下用细胞测定所测得的，例如，在那些浓度下，抗体能够体外抑制鞘脂-诱导的 IL-8 释放至少 10%。优选地，抗体具有不大于约 10 ug/ml 的有效浓度值，优选不大于约 1 ug/ml，以及最优选不大于约 0.1 ug/ml，如在 CNV 动物模型中在激光烧伤以后所测得的，例如，在那些浓度下抗体能够体内抑制鞘脂-诱导的新血管形成至少 50%。

用于确定本发明的抗鞘脂抗体的活性的测定包括如在下文实施例中所述的 ELISA 测定。

优选地，在将治疗有效量的抗体给予病人以后，人源化或变异抗体没有诱发免疫原性应答。如果免疫原性反应被诱发，优选地，该应答将是这样的以致抗体仍然向用其治疗的患者提供治疗效果。

根据本发明的一种实施方式，人源化抗鞘脂抗体结合如在本文中所定义的“表位”。为了筛选结合于被感兴趣的抗体（例如，那些阻断抗体结合于鞘脂的抗体）结合的鞘脂上的抗体的表位，可以进行如在 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988) 中所描述的常规交叉阻断测定（cross-blocking assay）。可替换地，可以进行表位作图，例如，如在 Champe, et al. [*J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 (1995)] 中所描述的，以确定抗体是否结合感兴趣的表位。

本发明的抗体具有重链可变结构域，该结构域包含由下式表示的氨基酸序列：FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4，其中“FR1-4”表示抗鞘脂抗体重链可变结构域的几个骨架区而“CDRH1-3”则表示三个高可变区。FR1-4 可以衍生自如是在以下实施例中的“共有序列”（例如人免疫球蛋白的重链或轻链的类、亚类或亚组的最常见氨基酸）或可以衍生自个别人抗体骨架区或衍生自不同骨架区序列的组合。例如上文中的 Kabat, et al. 已搜集了许多

人抗体骨架区序列。在一种实施方式中，由人免疫球蛋白亚组（如由上文的 Kabat, et al. 所搜集的）的共有序列提供了重链可变 FR。优选地，人免疫球蛋白亚组是人重链亚组 III（例如，如在 SEQ ID NO: 16 中）。

人重链可变 FR 序列优选其中具有一个或多个取代基，例如，其中人 FR 残基被相应的非人残基所替换（“相应的非人残基”是指当对人和非人序列进行序列对比时，和感兴趣的人残基具有相同 Kabat 位置编号的非人残基），但用非人残基的替换并不是必要的。例如，可以通过噬菌体展示来选择不同于相应的非人残基的替换 FR 残基。可以被取代的典型的重链可变 FR 残基包括任何一种或多种 FR 残基号：37H、49H、67H、69H、71H、73H、75H、76H、78H、以及 94H（本文采用的 Kabat 残基编号）。优选地，这些残基的至少两个、或至少三个、或至少四个被取代。FR 取代的一种特别优选的组合是：49H、69H、71H、73H、76H、78H、以及 94H。关于重链高可变区，优选具有在以下表 2 中所列的氨基酸序列。

本文的优选实施方式的抗体具有轻链可变结构域，其包含由下式表示的氨基酸序列：FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CDRL3-FR4，其中“FR1-4”表示抗鞘脂抗体重链可变结构域四个骨架区而“CDRL1-3”表示三个高可变区。FR1-4 可以衍生自“共有序列”（例如，人免疫球蛋白的重链或轻链的类、亚类或亚组的最常见氨基酸）（如在以下实施例 1 中）或可以衍生自个别人抗体骨架区或衍生自不同骨架区序列的组合。在一种优选实施方式中，由人免疫球蛋白亚组（如由 Kabat, et al. 汇编的，上文）的共有序列提供轻链可变 FR。优选地，人免疫球蛋白亚组是人 κ 轻链亚组 I（例如，如在 SEQ ID NO: 17 中）。

人轻链可变 FR 序列优选在其中具有取代, 例如, 其中人 FR 残基被相应的小鼠残基所替换, 但用非人残基的替换并不是必要的。例如, 可以通过噬菌体展示来选择不同于相应的非人残基的替换残基。可以被取代的典型的轻链可变 FR 残基包括任何一种或多种 FR 残基号, 其包括但不限于 F4、Y36、Y49、G64、S67。

关于 CDR, 优选具有在以下表 2 中所列的氨基酸序列。

下文详细说明用于产生感兴趣的人源化抗鞘脂抗体的方法。

A. 抗体制备

在以下实施例中描述了用于对非人抗鞘脂抗体进行人源化并产生抗鞘脂抗体的变体的方法。为了使抗鞘脂抗体人源化, 制备了非人抗体起始材料。在要产生变体的情况下, 制备了亲代抗体。将在以下部分描述用于产生上述非人抗体起始材料和亲代抗体的示例性技术。

(i) 抗原制备

用于生产抗体的鞘脂抗原可以是, 例如, 完整鞘脂或部分鞘脂 (例如, 包含“表位”的鞘脂片段)。可用于产生抗体的其它形式的抗原对于本领域技术人员而言将是显而易见的。在以下实施例中描述了用来产生抗体的鞘脂抗原。在一种实施方式中, 抗原是衍生形式的鞘脂, 并且可以伴随有载体蛋白。

(ii) 多克隆抗体

优选在动物中通过多次皮下 (sc) 或腹腔内 (ip) 注射有关抗原和佐剂来产生多克隆抗体。利用双功能或衍生剂, 例如, 马来酰亚胺苯甲酰硫代丁二酰亚胺酯 (通过半胱氨酸残基的共轭作用)、

N-羧基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 、或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ ，其中 R 和 R^1 是不同的烷基基团，它可以用于将有关抗原共轭于在要免疫的物种中为免疫原性的蛋白，例如，钥孔戚血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、或大豆胰蛋白酶抑制剂。

通过结合例如 100 ug 或 5 ug 蛋白或共轭物(分别用于兔或小鼠)与三容积的弗氏完全佐剂并在多个部位皮内注射该溶液，来相对于抗原、免疫原性共轭物、或衍生物对动物进行免疫。一个月以后，在多个部位，通过皮下注射，将在弗氏完全佐剂中的 0.1 至 0.2 倍的最初量的肽或共轭物给予动物。7 至 14 天以后，对动物进行放血并测定血清的抗体滴度。动物被增加直到滴度达到稳定状态。优选地，用相同抗原、但共轭于不同蛋白的共轭物和/或通过不同的交联试剂来对动物追加剂量。还可以在重组细胞培养物中作为蛋白质融合来制备共轭物。此外，聚集剂如明矾可以适当地用来增强免疫应答。

(iii) 单克隆抗体

可以利用首先由 Kohler, et al., Nature, 256:495 (1975)描述的杂交瘤方法、或通过其它适当方法，包括通过重组 DNA 方法(参见例如，美国专利第 4,816,567 号)来制备单克隆抗体。在杂交瘤方法中，小鼠或其它适合的宿主动物，如仓鼠或猕猴，被免疫(如上文所述)以诱发淋巴细胞，其产生或能够产生将特异性地结合于用于免疫的蛋白的抗体。可替换地，可以体外免疫淋巴细胞。然后利用适宜的融合剂，如聚乙二醇，将淋巴细胞融合于骨髓瘤细胞，以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986))。

将如此制备的杂交瘤细胞接种并生长在适宜的培养基中，其中培养基优选包含一种或多种物质，其抑制非融合、亲代骨髓瘤细胞

的生长或存活。例如，如果亲代骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（HGPRT 或 HPRT），则用于杂交瘤细胞的培养基通常将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤、以及胸苷（HAT 培养基），这些物质可防止 HGPRT 缺少细胞的生长。

优选的骨髓瘤细胞是那些细胞，其有效融合、支持抗体的稳定的高水平生产（通过所选的抗体生成细胞），并且对培养基如 HAT 培养基是敏感的。其中，优选的骨髓瘤细胞系是小鼠骨髓瘤细胞系，如那些衍生自 MOP-21 和 M.C.-11 小鼠肿瘤的骨髓瘤细胞系，其可获自 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA，以及 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞，其可获自 American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA。还描述了人骨髓瘤和鼠-人异源骨髓瘤细胞系，用于生产人单克隆抗体（Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur, et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)）。

对其中正生长杂交瘤细胞的培养基测定其针对抗原的单克隆抗体的生产。优选地，通过免疫沉淀或通过体外结合测定，如放射免疫测定（RIA）或酶联免疫吸附测定（ELISA）来确定由杂交瘤细胞生产的单克隆抗体的结合特异性。

单克隆抗体的结合亲和力可以，例如，通过 Munson, et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980) 的斯卡查德分析法（Scatchard analysis）加以确定。

在鉴定了产生所期望的特异性、亲和力、和/或活性的抗体的杂交瘤细胞以后，可以通过有限稀释程序和通过标准方法的生长来亚克隆无性系（Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第 59-103 页 (Academic Press, 1986)）。用于此目的适宜培养基包

括，例如，D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外，如动物中的腹水瘤，可以体内生长杂交瘤细胞。

通过常规免疫球蛋白纯化程序如，例如，A 蛋白-琼脂糖凝胶、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、或亲和层析，从培养基、腹水、或血清，适当地分离由亚克隆分泌的单克隆抗体。

可以容易地分离编码单克隆抗体的 DNA 并利用常规程序进行测序（例如，通过使用寡核苷酸探针，其能够特异性地结合于编码单克隆抗体的重链和轻链的基因）。杂交瘤细胞作为上述 DNA 的优选来源。分离后，可以将 DNA 放入表达载体，然后被转染进入，不产生免疫球蛋白的宿主细胞如大肠杆菌细胞、猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、或骨髓瘤细胞中以在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。下面将详细描述抗体的重组生产。

(iv) 人源化和氨基酸序列变体

以下实施例 12 描述了用于抗鞘脂抗体的人源化的程序。用于人源化的一般方法在，例如，US5861155、US19960652558、US6479284、US20000660169、US6407213、US19930146206、US6639055、US20000705686、US6500931、US19950435516、US5530101、US5585089、US19950477728、US5693761、US19950474040、US5693762、US19950487200、US6180370、US19950484537、US2003229208、US20030389155、US5714350、US19950372262、US6350861、US19970862871、US5777085、US19950458516、US5834597、US19960656586、US5882644、US19960621751、US5932448、US19910801798、US6013256、US19970934841、US6129914、US19950397411、US6210671、US6329511、US19990450520、US2003166871、US20020078757、US5225539、US19910782717、US6548640、US19950452462、

US5624821、以及 US19950479752 中已经描述过了。在某些实施方式中，可以希望产生这些人源化抗体的氨基酸序列变体，尤其是可以改善人源化抗体的结合亲和力或其它生物学特性的变体。实施例 12 描述了用于产生抗鞘脂抗体的氨基酸序列变体的方法，其中氨基酸序列变体相对于亲代抗体具有增强的亲和力。

通过将适当的核苷酸变化引入抗鞘脂抗体 DNA、或通过肽合成，来制备抗鞘脂抗体的氨基酸序列变体。这样的变体包括，例如，在本文实施例的抗鞘脂抗体的氨基酸序列内缺失残基、和/或插入残基和/或取代残基。进行缺失、插入、以及取代的任何组合以获得最终构造物，只要最终构造物具有所期望的特性。氨基酸变化还可以改变人源化或变体抗鞘脂抗体的翻译后加工，如改变糖基化位点的数目或位置。

可用于鉴定抗鞘脂抗体的某些残基或区（其是用于诱变的优选位置）的方法被称作“丙氨酸扫描诱变”，如由 Cunningham and Wells Science, 244:1081-1085 (1989)所描述的。在这里，鉴定了残基或目标残基组（例如，带电荷残基如 arg、asp、his、lys、以及 glu）并由中性或带负电荷氨基酸（最优选丙氨酸或聚丙氨酸）替换，以影响氨基酸与鞘脂抗原的相互作用。然后通过取代位点、或为取代位点引入另外的或其它变体来完善那些对取代显示功能敏感性的氨基酸位置。因此，虽然用于引入氨基酸序列变化的位点是预定的，但突变本身的特性无需预定。例如，为了分析在给定位点的突变性能，在靶密码子或区进行 ala 扫描或随机诱变，并且对表达的抗鞘脂抗体变体筛选所期望的活性。氨基酸序列插入包括氨基末端融合和/或羧基末端融合，长度范围是一个残基至包含一百或更多残基的多肽，以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有 N-端甲硫氨酰残基的抗鞘脂抗体或融合于附加表位的抗

体。抗鞘脂抗体分子的其它插入变体包括融合于酶或多肽的抗鞘脂抗体的 N 端或 C 端，其可以增加抗体的血清半寿期。

另一种类型的变体是氨基酸取代变体。这些变体具有至少一个在抗鞘脂抗体分子中的氨基酸残基被除去并且不同的残基被插入在其位置。用于取代诱变的最感兴趣的位点包括高可变区，但还设想 FR 改变。保守取代是优选的取代。如果上述取代导致生物学活性的变化，那么更显著的变化，称为以下所列的"典型的"取代，或如以下参照氨基酸类型进一步描述的，可以被引入并且产物被筛选。

表 1: 典型的氨基酸残基取代

氨基酸残基(符号)	典型的取代
Ala (A)	val; leu; ile val
Arg (R)	lys; gin; asn lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; gln arg
Asp (D)	glu; asn glu
Cys (C)	ser; ala ser
Gln (Q)	asn; glu asn
Glu (E)	asp; gln asp
Gly (G)	ala ala
His (H)	asn; gln; lys, arg arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; leu phe; 正亮氨酸
Leu (L)	正亮氨酸; ile; val; ile met; ala; phe
Lys (K)	arg; gln; asn arg
Met (M)	leu; phe; ile leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr tyr
Pro (P)	ala ala
Ser (S)	thr thr
Thr (T)	ser ser
Trp (W)	tyr; phe tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; leu ala; 正亮氨酸

抗体生物学特性的大量修饰是通过选择这样的取代来完成，其在它们对保持下述的影响方面显著不同：(a)在取代区域中多肽主链的结构，例如，作为片层或螺旋构象，(b)在靶位点处分子的电荷或疏水性，或(c)大部分的侧链。基于常见的侧链特性，将天然存在的残基分为若干组；

- (1) 疏水的：正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile；
- (2) 中性亲水的：cys、ser、thr；
- (3) 酸性的：asp、glu；
- (4) 碱性的：asn、gln、his、lys、arg；
- (5) 影响链取向的残基：gly、pro；以及
- (6) 芳香族的：trp、tyr、phe。

非保守取代将引起这些类型的一类的成员交换另一类的成员。

不参与维持人源化或变体抗鞘脂抗体的适当构象的任何半胱氨酸残基也可以被取代，以改善分子的氧化稳定性以及防止异常交联。相反地，可以将半胱氨酸键加入抗体以改善其稳定性（尤其在抗体是抗体片段如一种 Fv 片段的情况下）。

一种类型的取代变体涉及取代亲代抗体（例如，人源化抗体或人抗体）的一种或多种高可变区残基。通常，所获得的选择用于进一步发展的变体相对于它们从其产生的亲代抗体将具有改善的生物学特性。用于产生上述取代变体的一种方便的方式是利用噬菌体展示的亲和力成熟。简单地说，若干高可变区位点（例如，6-7 个位点）被突变以在每个位点产生所有可能的氨基取代。如此产生的抗体变体以来自丝状噬菌体颗粒的单价方式被展示为与包装在每个颗粒内的 M13 的基因 III 产物的融合。然后，如本文中所披露的，筛选噬菌体展示变体的生物学活性（例如，结合亲和力）。为了鉴

定用于修饰的候选高可变区位点，可以进行丙氨酸扫描诱变，以鉴定显著有助于抗原结合的高可变区残基。可替换地，或此外，可能有益的是，分析抗原-抗体复合体的晶体结构以鉴定抗体和鞘脂之间的接触点。根据本文详细说明的技术，这样的接触残基和邻近残基是用于取代的候选物。在产生上述变体以后，如本文所述对这批变体进行筛选并且在一种或多种有关测定中具有优越性能的抗体可以选择用于进一步发展。

抗体的另一类型的氨基酸变体可以改变抗体的最初糖基化模式。改变是指删去存在于抗体中的一种或多种碳水化合物部分，和/或添加一种或多种在抗体中并不存在的糖基化位点。

抗体的糖基化通常是 N-连接的和/或 O-连接的。N-连接的是指碳水化合物部分附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸，其中 X 是除脯氨酸之外的任何氨基酸，是最常见的用于碳水化合物部分酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。因此，在多肽中这些三肽序列的任何一种的存在会产生潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化是指糖 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖、或木糖之一附着于羟基氨基酸，最常见丝氨酸或苏氨酸，虽然也可以使用 5-羟基脯氨酸或 5-羟基赖氨酸。

可以通过改变氨基酸序列来方便地将糖基化位点加入抗体，以致它包含一种或多种上述三肽序列（用于 N-连接的糖基化位点）。还可以通过在起始抗体的序列中添加、或取代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行这种改变（用于 O-连接的糖基化位点）。

编码抗鞘脂抗体的氨基酸序列变体的核酸分子是通过本技术领域已知的各种方法加以制备。这些方法包括但不限于分离自天然源（在自然发生氨基酸序列变体的情况下）或通过抗鞘脂抗体的早

先制备的变体或非变异变体的寡核苷酸介导（或定位）诱变、PCR 诱变、以及盒式诱变加以制备。

(v) 人抗体

作为人源化的替代，可以产生人抗体。例如，现在可以产生转基因动物（例如，小鼠），其在免疫以后在没有内源性免疫球蛋白生产的情况下能够生产全套人抗体。例如，已描述了在嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区（ J_H ）基因的纯合子缺失导致内源性抗体生产的完全抑制。在上述种系突变小鼠中人类种系免疫球蛋白基因阵列的转移将导致在抗原挑战以后人抗体的生产。参见例如，Jakobovits, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits, et al, Nature, 362:255-258(1993); Bruggermann, et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); 以及美国专利第 5,591,669 号、第 5,589,369 号和第 5,545,807 号。人抗体还可以衍生自噬菌体展示文库（Hoogenboom, et al., J. Mol. Biol, 227:381 (1991); Marks, et al., J. Mol. Biol, 222:581-597 (1991)以及美国专利第 5,565,332 号和第 5,573,905 号）。如上所述，还可以通过体外激活的 B 细胞（参见例如，美国专利第 5,567,610 号和第 5,229,275 号）或通过其它的方法来产生人抗体。

(vi) 抗体片段

在某些实施方式中，人源化或变体抗鞘脂抗体是抗体片段。已开发了用于生产抗体片段的各种技术。通常，借助于完整抗体的蛋白酶消化来衍生这些片段（参见例如、Morimoto, et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117(1992); 以及 Brennan, et al., Science 229:81 (1985)）。然而，通过重组宿主细胞，现在可以直接生产这些片段。例如，Fab'-SH 片段可以直接回收自大肠杆菌并且被化学耦联以形成 $F(ab')_2$ 片段（Carter, et al.,

Bio/Technology 10:163-167 (1992))。在另一种实施方式中,利用亮氨酸拉链 GCN4 来促进 $F(ab')_2$ 分子的装配从而形成 $F(ab')_2$ 。根据另一种方式, Fv、Fab 或 $F(ab')_2$ 片段可以直接分离自重组宿主细胞培养物。技术人员将明了用于生产抗体片段的其它技术。

(vii) 多特异性抗体

在某些实施方式中,可以期望产生对于至少两种不同表位具有结合特异性的多特异性的(例如,双特异性的)人源化抗体或变体抗鞘脂抗体。典型的双特异性抗体可以结合于鞘脂的两种不同的表位。可替换地,抗鞘脂臂可以结合与结合不同分子的臂。双特异性抗体可以制备成全长抗体或抗体片段(例如, $F(ab')_2$ 双特异性抗体)。

根据用于制备双特异性抗体的另一种方式,一对抗体分子之间的界面可以用来最大化异二聚体的百分比,其中异二聚体回收自重组细胞物。优选的界面包含抗体恒定结构域的至少一对 C_H3 结构域。在此方法中,用较大侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替换来自第一抗体分子的界面的一种或多种较小氨基酸侧链。通过用较小氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)代替较大氨基酸侧链,可以将相同或类似大小的补偿性“孔穴”产生在二抗分子的界面上。这提供了一种增加异二聚体的产率的机制(相对于其它有害的最终产物如同二聚体)。参见例如,美国专利第 5,731,168 号。

双特异性抗体包括交联或“异源共轭物”抗体。例如,在异源共轭物中的抗体之一可以耦联于抗生物素蛋白,另一种抗体则耦联于生物素。可以利用任何方便的交联方法来制备异源共轭物抗体。适宜的交联剂在本技术领域是众所周知的,并且披露在,例如,美国专利第 4,676,980 号中,连同若干交联技术。

在文献中还已描述了用于从抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如，可以利用化学键合来制备双特异性抗体。Brennan, et al., *Science* 229:81 (1985)描述了一种程序，其中完整抗体被蛋白酶切割以产生 F(ab')₂ 片段。在有双硫醇络合剂亚砷酸钠存在的条件下还原这些片段以稳定邻位双硫醇以及防止形成分子间二硫化物。然后将产生的 Fab' 片段转化成硫代硝基苯甲酸酯 (TNB) 衍生物。然后通过用巯基乙胺进行还原，将 Fab'-TNB 衍生物之一再转化成 Fab'-硫醇，并与等摩尔量的另一种 Fab'-TNB 衍生物混合以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可以用作用来选择性地固定酶制剂。在另一种实施方式中，直接回收自大肠杆菌的 Fab'-SH 片段可以体外被化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby, et al, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992)。

还已经描述了直接从重组细胞物制备和分离双特异性抗体片段的各种技术。例如，已利用亮氨酸拉链产生了双特异性抗体。Kostelny, et al., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992)。通过基因融合，将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽连接于两种不同抗体的 Fab' 蛋白。在铰链区还原抗体同二聚体以形成单体，然后被再氧化以形成抗体异二聚体。这种方法还可以用于生产抗体同二聚体由 Hollinger, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444- 6448 (1993) 描述的“双特异抗体”技术已提供一种用于制备双特异性抗体片段的可替换机制。这些片段包括重链可变结构域 (V_H)，其通过接头连接于轻链可变结构域 (V_L)，其中接头太短以致不允许在相同链上两个结构域之间进行配对。因此，一个片段的 V_H 和 V_L 结构域被迫使配对于另一片段的互补 V_L 和 V_H 结构域，从而形成两个抗原结合位点。还已经报道了通过使用单链 Fv(sFv) 二聚体来制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见例如，Gruber, et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994)。可替换地，双特异性抗体可以是“线性抗体”，如在 Zapata, et al. *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995) 中所描述的。

还预期具有两价以上的抗体。例如，可以制备三特异性抗体。
Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)。

本发明的抗体（或多聚体或多肽），其包括一种或多种结合位点/其臂或片段，将在本文中称作“多价”抗体。例如本发明的“二价”抗体包含两个结合位点/其 Fab 或片段，而本发明的“三价”多肽包含三个结合位点/其 Fab 或片段。在本发明的多价多聚体中，两个或更多结合位点/Fab 可以结合于相同或不同的抗原。例如，在本发明的多价多肽中的两个或更多结合位点可以针对相同抗原，例如针对所述抗原的相同部分或表位或针对所述抗原的两个或更多的相同或不同的部分或表位，和/或可以针对不同抗原；或它们的组合。因此，本发明的二价多肽例如可以包含两个相同的结合位点，可以包含针对抗原的第一部分或表位的第一结合位点，以及针对所述抗原的相同部分或表位或针对所述抗原另一部分或表位的第二结合位点；或可以包含针对抗原的第一部分或表位的第一结合位点和针对不同抗原的第二结合位点。然而，如根据上文描述将明显的是，本发明并不限于此，这是基于以下意义上讲：本发明的多价多肽可以包含针对相同或不同抗原的任何数目的结合位点。

本发明的抗体（或多聚体或多肽），其包含至少两个结合位点/其 Fab 或片段，其中至少一个结合位点是针对第一抗原以及第二结合位点是针对不同于第一抗原的第二抗原，还将称作“多特异性的”。因此，“双特异性”多聚体包含至少一个针对第一抗原的位点以及至少一个针对第二抗原的第二位点，而“三特异的”是一种多聚体，其包含至少一个针对第一抗原的结合位点、至少一个针对第二抗原的结合位点以及至少一个针对第三抗原的结合位点，等等。因此，在它们的最简单形式中，本发明的双特异性多肽是本发明的二价多肽（每个 Fab）。然而，如按照上文描述将明显看到的，

本发明并不限于此，这是在下述意义上讲：本发明的多特异性多肽可以包含针对两种或更多种不同抗原的任何数目的结合位点。

(viii) 其它修饰

可以设想人源化或变体抗鞘脂抗体的其它修饰。例如，本发明还涉及免疫偶联物，其包含本文描述的共轭于细胞毒性剂的抗体，其中细胞毒性剂如毒素（例如，细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素，或其片段），或放射性同位素（例如，放射性共轭物）。利用各种双功能蛋白质偶联剂如 N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基双硫醇)丙酸酯（SPDP）、巯醇亚胺（IT）、亚氨酸酯的双功能衍生物（如二亚胺代己二酸二甲酯盐酸盐）、活性酯类（如辛二酸二琥珀酰亚胺酯）、醛类（如戊二醛）、二叠氮化合物（如双(对叠氮苯甲酰基)己二胺）、双重氮衍生物（如双(对重氮苯甲酰基)-乙二胺）、二异氰酸酯（如甲苯 2,6-二异氰酸酯）、以及双活性氟化合物（如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯）来制备共轭物。

本文披露的抗鞘脂抗体还可以配制成免疫脂质体。包含抗体的脂质体是通过本领域已知的方法加以制备，如在 Epstein et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); 以及美国专利第 4,485,045 号和第 4,544,545 号中所描述的方法。具有增强的循环时间的脂质体披露在美国专利第 5,013,556 号中。例如，可以通过反相蒸发法来产生脂质体，其中脂质成分包含磷脂酰胆碱、胆固醇以及 PEG 衍生化磷脂酰乙醇胺（PEG-PE）。通过规定孔径的过滤器挤压脂质体以产生具有期望直径的脂质体。借助于二硫互换反应，本发明的抗体的 Fab' 片段可以共轭于脂质体，如在 Martin, et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) 中所描述的。另一种活性组分可选地包含在脂质体中。

通过本领域众所周知的技术如使用上述异双功能交联剂，可以将酶或其它多肽共价结合于抗鞘脂抗体。可替换地，利用本技术领域众所周知的重组 DNA 技术（参见例如，Neuberger, et al., Nature 312:604-608 (1984)），可以构造融合蛋白，其包含至少本发明的抗体的抗原结合区并连接于至少本发明的酶的功能活性部分。

在本发明的某些实施方式中，可以期望使用抗体片段，而不是完整抗体，以增加例如靶组织和细胞的渗透。在这种情况下，可以期望修饰抗体片段以增加其血清半衰期。这可以例如通过将补救受体结合表位加入抗体片段来实现（例如，通过抗体片段中适当区域的突变或通过将表位加入肽标记，其然后在任一端或在中部融合于抗体片段，例如，通过 DNA 或肽合成）。参见例如，美国专利第 6,096,871 号。

人源化或变体抗鞘脂抗体的共价修饰也包括在本发明的范围内。如适用的话，可以通过化学合成或通过抗体的酶促或化学裂解来进行共价修饰。通过抗体的定向氨基酸残基与有机衍生剂（其能够与所选侧链或 N 端或 C 端残基起反应）进行反应，可以将抗体的其它类型的共价修饰引入分子。多肽的典型的共价修饰描述在美国专利第 5,534,615 号中，其以引用方式结合于本文。抗体的优选类型的共价修饰包括，以在美国专利第 4,640,835 号、第 4,496,689 号、第 4,301,144 号、第 4,670,417 号、第 4,791,192 号或第 4,179,337 号中所陈述的方式，将抗体连接于各种非蛋白质多聚体之一，例如，聚乙二醇、聚丙二醇、或聚氧化烯。

B. 载体、宿主细胞以及重组方法

本发明还提供了编码人源化或变体抗鞘脂抗体的分离的核酸、载体和宿主细胞（包含核酸）、以及用于生产抗体的重组技术。

为了抗体的重组生产，可以分离编码它的核酸并将其插入可复制载体，用于进一步克隆（DNA 的扩增）或用于表达。在另一种实施方式中，可以通过同源重组来制备抗体，例如，如在美国专利第 5,204,244 号中所描述的。利用常规程序（例如，通过使用寡核苷酸探针，其能够特异性地结合于编码抗体的重链和轻链的基因），可以容易地对编码单克隆抗体的 DNA 进行分离和测序。许多载体是可用的。载体成分通常包括但不限于下述的一种或多种：信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子、以及转录终止序列，例如在美国专利第 5,534,615 中所描述的。

用于在本文的载体中克隆或表达 DNA 的适宜宿主细胞是上述原核细胞、酵母菌、或高等真核细胞。用于此目的的适宜的原核细胞包括真细菌，如革兰阴性或革兰氏阳性生物体，例如，肠杆菌如埃希氏菌属，例如，大肠杆菌、肠杆菌属、欧文氏菌属、克雷伯氏菌属、变形菌属、沙门氏菌属（例如，鼠伤寒沙门氏杆菌）、沙雷氏菌属（例如，粘质沙雷氏菌）、和志贺氏菌属，以及杆菌如枯草杆菌和地衣芽孢杆菌（例如，地衣芽孢杆菌 41P），假单胞菌属如绿脓杆菌，以及链霉菌属。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294（ATCC 31,446），虽然其它菌株如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1 776（ATCC 31,537）、以及大肠杆菌 W3110（ATCC 27,325）也是适宜的。这些实例是说明性的而不是限制性的。

除原核细胞以外，真核微生物如丝状真菌或酵母菌也是用于编码抗鞘脂抗体的载体的适宜的克隆或表达宿主。在低等真核宿主微生物中，酿酒酵母、或常见的面包酵母，是最常使用的。然而，在本文中许多其它属、物种、以及菌株是通常可用的和有用的，如粟酒裂殖酵母；克鲁维酵母宿主如，例如，乳酸克鲁维酵母、脆壁克鲁维酵母（ATCC 12,424）、保加利亚克鲁维酵母（*K. bulgaricus*）（ATCC 16,045）、*K. wickerhamii*（ATCC 24,178）、瓦尔特克鲁维

酵母 (ATCC 56,500)、*K. drosophilum* (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*)、以及乳清酵母; 耶氏酵母 (EP 402,226); 巴斯德毕赤酵母 (EP 183,070); 念珠菌属; 里氏木霉 (*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); 粗糙脉孢霉; 许旺酵母属如西方许旺酵母; 以及丝状真菌, 例如, 脉孢菌属、青霉属、弯颈霉、以及曲霉属宿主如构巢曲霉 (*A.nidulans*) 和黑曲霉 (*A.niger*)。

用于表达糖基化抗鞘脂抗体的适宜宿主细胞衍生自多细胞生物。脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。已鉴定了许多杆状病毒菌株和变体以及相应的允许昆虫宿主细胞, 其来自宿主如草地夜蛾 (毛虫)、埃及斑蚊 (蚊子)、白纹伊蚊 (蚊子)、黑腹果蝇 (果蝇)、以及家蚕。各种各样的用于转染的病毒株是公开可获得的, 例如, 苜蓿银纹夜蛾 NPV 的 L-1 变体和家蚕 NPV 的 Bm-5 株, 并且根据本发明在本文中上述病毒可以用作病毒, 尤其用于草地夜蛾细胞的转染。棉花、玉米、马铃薯、大豆、牵牛花、番茄、以及烟草的植物细胞培养物也可以用作宿主。

然而, 最感兴趣的是脊椎动物细胞, 并且在培养 (组织培养) 中脊椎动物细胞的增殖已变成一种例行程序。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是用 SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651) 转化的猴肾 CV1 系; 人类胚胎肾系 (293 或 293 细胞, 亚克隆用于在悬浮培养物中的生长, Graham, et al, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); 幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10); 中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR (CHO, Urlaub, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); 小鼠支持细胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243- 251 (1980)); 猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2); 犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34); 布法罗大鼠肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞 (Hep

G2, HB 8065); 小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 细胞 (Mather, et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44- 68 (1982)); MRC 5 细胞; FS4 细胞; 以及人肝癌系 (Hep G2)。

用上述用于抗鞘脂抗体生产的表达或克隆载体转化宿主细胞, 并在常规营养培养基中培养, 其中常规营养培养基被改进成适用于诱导启动子、选择转化体、或对编码所期望序列的基因进行扩增。

用来产生本发明的抗鞘脂抗体的宿主细胞可以在各种培养基中加以培养。商业上可获得的培养基如 Ham's F10 (Sigma)、极限必需培养基 (MEM), (Sigma)、RPMI-1640(Sigma)、以及 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基((DMEM), Sigma)适用于培养宿主细胞。此外, 在 Ham, et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes, et al., Anal. Biochem.102:255 (1980), 美国专利第 4,767,704 号、第 4,657,866 号、第 4,927,762 号、第 4,560,655 号、或第 5,122,469 号, WO 90/03430, WO 87/00195, 或 U.S. Pat. Re. 30,985 中所描述的任何培养基可以用作宿主细胞的培养基。必要时, 任何这些培养基可以补充以激素和/或其它生长因子(如胰岛素、运铁蛋白、或表皮生长因子)、盐(如氯化钠、氯化钙、氯化镁、以及磷酸盐)、缓冲剂(如 HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如 GENTAMYCIN™药物)、微量元素(定义为无机化合物, 其终浓度通常在微摩尔范围), 以及葡萄糖或等量能源。还可以包括适当浓度(其是本领域技术人员已知的)的任何其它必要的补充物。培养条件, 如温度、pH 等, 是先前用于宿主细胞(选择用于表达)的那些培养条件, 并且对于普通技术人员而言将是显而易见的。

当使用重组技术时, 可以在细胞内、在细胞周质腔中产生抗体, 或抗体被直接分泌进入培养基。如果细胞内产生抗体, 作为第一步骤, 除去颗粒碎片(宿主细胞或溶解片段), 例如, 通过离心或超

滤。Carter, et al, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)描述了一种程序, 其用于分离被分泌到大肠杆菌的细胞周质腔的抗体。简单地说, 在有乙酸钠 (pH 3.5)、EDTA、以及苯甲基磺酰氟化物 (PMSF) 存在的条件下融化细胞糊约 30 分钟以上。可以离心除去细胞碎片。在抗体被分泌进入培养基的情况下, 通过利用可商购的蛋白质浓缩过滤器, 例如, Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤装置, 首先浓缩来自上述表达系统的上清液。在任何上述步骤中, 可以包括蛋白酶抑制剂如 PMSF, 以抑制蛋白水解, 并且可以包括抗生素以防止偶然污染物的生长。

可以利用, 例如, 羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、以及亲和层析, 对制备自细胞的抗体成分进行纯化, 其中亲和层析是优选的纯化技术。A 蛋白作为亲和配体的适合性取决于在抗体中存在的任何免疫球蛋白 Fc 结构域的种类和同种型。A 蛋白可以用来纯化基于人重链的抗体 (Lindmark, et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983))。G 蛋白被推荐用于所有小鼠同种型和用于人 $\gamma 3$ (Guss, et al., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986))。亲和配体附着的基质往往是琼脂糖, 但也可以使用其它基质。和琼脂糖相比, 机械稳定基质如受控孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯可以实现更快的流速和更短的处理时间。在抗体包含 C_{H3} 结构域的情况下, Bakerbond ABX™树脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) 可用于纯化。取决于要回收的抗体, 还可以使用蛋白质纯化的其它技术, 如离子交换柱分馏、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅胶层析、肝素 SEPHAROSE™层析、阴离子或阳离子交换树脂层析 (如聚天冬氨酸柱)、层析聚焦、SDS-PAGE、以及硫酸铵沉淀。

在任何初步纯化步骤以后, 可以对包含感兴趣的抗体和污染物的混合物进行低 pH 疏水相互作用层析, 其中使用 pH 在约 2.5-4.5

之间的洗脱缓冲液，并且优选在低盐浓度（例如，约 0-0.25M 盐）下进行。

C. 药剂剂型

通过混合具有所期望纯度的抗体和可选的生理用载体、赋形剂、或稳定剂（参见例如，Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）来制备具有冻干制剂或水溶液形式的、用于存储的本发明的抗体或免疫衍生部分的治疗配方。可接受的载体、赋形剂、或稳定剂在所采用的剂量和浓度对于受体是无毒的，并且包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐、以及其它有机酸；抗氧化剂，其包括抗坏血酸和蛋氨酸；防腐剂（如十八烷基二甲基苄基氯化铵；氯化六烃季铵；苯扎氯铵、苄索氯铵；苯酚、丁醇或苯甲醇；羟苯烷基酯如羟苯甲酯或羟苯丙酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；以及间甲苯酚）；低分子量（小于约 10 个残基）多肽；蛋白质，如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白；亲水多聚体如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、或赖氨酸；单糖、二糖、以及其它碳水化合物，其葡萄糖、甘露糖、或糊精；螯合剂如 EDTA；糖类如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成盐平衡离子如钠；金属复合物（例如，锌蛋白复合物）；和/或非离子型表面活性剂如 TWEEN™、PLURONIC™ 或聚乙二醇（PEG）。

必要时本文中的剂型还可以包含用于特定待治疗适应证的一种以上的活性化合物，优选那些具有并不彼此有害地影响的互补活性的活性化合物。这样的分子的适宜用量是对于所期望的目的有效的量。

活性组分还可以被截留在微胶囊中，其中微胶囊是例如通过凝聚技术或通过界面聚合加以制备，例如，分别在胶体药物递送系统

(例如, 脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米颗粒以及纳米囊)或在粗乳状液中的羟甲基纤维素或明胶-微胶囊以及聚甲基丙烯酸甲酯微胶囊。在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)中描述了上述技术。

用于体内给予的剂型必须是无菌的。这可以容易地例如借助于通过无菌过滤膜的过滤来实现。

可以制备缓释制剂。缓释制剂的适宜实例包括包含抗体的固体疏水多聚体的半透基质, 该基质具有成形物件的形式, 例如, 薄膜、或微胶囊。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如, 聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)、或聚(乙烯醇)、聚交酯(美国专利第 3,773,919号)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如 Lupron Depot™ (可注射微球, 由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成)、以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然多聚体如乙烯乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸能够释放分子 100 天以上, 但某些水凝胶释放蛋白质更短的时间。当包胶抗体长期保留在体内时, 由于在 37°C 下暴露于水分的结果, 它们可能会变性或聚集, 这导致生物学活性的损失以及免疫原性的可能的变化。取决于所涉及的机制, 可以设计合理的稳定策略。例如, 如果发现聚集机制是通过硫代-二硫化物交换的分子间 S-S 键形成, 则可以通过修饰巯基残基、冷冻干燥自酸性溶液、控制水分含量、使用适当的添加剂、以及开发特定的多聚体基质成分, 来实现稳定。

D. 抗体的非治疗应用

本发明的抗体可以用作亲和纯化剂。在此过程中, 利用本技术领域众所周知的方法, 抗体被固定在固相上如 Sephadex 树脂或滤纸。使固定抗体接触包含待纯化鞘脂的样品, 其后用适宜的溶剂洗涤载体, 其中适宜的溶剂将基本上除去样品中除鞘脂之外的所有材

料，其中鞘脂结合于固定抗体。最后，用另一种适宜溶剂，如甘氨酸缓冲液，例如在 pH 3 至 pH 5.0 之间，来洗涤载体，其将从抗体释放鞘脂。

抗鞘脂抗体还可以用于鞘脂的诊断测定，例如，检测其在特定细胞、组织（如活检样品）、或体液中的表达。上述诊断方法可以用于诊断心血管或脑血管病或病症。

为了诊断应用，抗体通常将被标记有可检测部分。许多标记是可用的，其可能通常分为下列几类：

(a) 放射性同位素，如 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、以及 ^{131}I 。可以利用例如在 *Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2*, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991) 中所描述的技术，用放射性同位素标记抗体，并且可以利用闪烁计数来测量放射性。

(b) 荧光标记如稀土螯合物（钆螯合物）或荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹磺酰、丽丝胺、藻红蛋白以及得克萨斯红是可用的。例如，利用在 *Current Protocols in Immunology*（上文）中披露的技术可以将荧光标记共轭于抗体。利用荧光计可以量化荧光。

(c) 各种酶底物标记是可用的。例如，美国专利第 4,275,149 号提供了某些酶底物标记的综述。酶通常催化发色底物的化学变化，其可以利用各种技术加以测量。例如，酶可以催化底物的颜色变化，其可以用分光光度法加以测量。可替换地，酶可以改变底物的荧光或化学发光。以上描述了用于量化荧光变化的技术。通过化学反应，化学发光底物变成电子激发的，然后可以发射可以测量的光（例如，利用化学发光计）或将能量给予荧光受体。酶标记的实例包括荧光

素酶(例如,萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶;美国专利第4,737,456号)、荧光素、2,3-二氢氮杂萘二酮、苹果酸脱氢酶、尿素酶、过氧化物酶如辣根过氧化物酶(HRPO)、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、糖化酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如,葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶、以及葡萄糖-6-磷酸酯脱氢酶)、杂环氧化酶(如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。在 O'Sullivan, et al., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym.* (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981)中描述了用于将酶共轭于抗体的技术。

酶底物组合的实例包括,例如:

(i) 具有氢过氧化物酶作为底物的辣根过氧化物酶(HRPO),其中氢过氧化物酶氧化染料前体(例如,邻苯二胺(OPD)或3,3',5,5'-四甲基联苯胺化盐酸(TMB));

(ii) 具有对硝基苯磷酸酯作为发色底物的碱性磷酸酶(AP); 以及(iii) 具有发色底物(例如,对硝基苯基- β -D-半乳糖苷酶)或荧光发生底物4-甲基伞形基- β -D-半乳糖苷酶的 β -D-半乳糖苷酶(β -D-Gal)。

本领域技术人员可以使用许多其它酶底物组合。关于这些酶底物组合的一般综述可以参见美国专利第4,275,149号和第4,318,980号。

有时,将标记间接共轭于抗体。技术人员将明了用于实现上述的各种技术。例如,可以将抗体共轭于生物素并且可以将上述三大类标记的任何一种共轭于抗生物素蛋白,反之亦然。生物素选择性地结合于抗生物素蛋白,因此可以以这种间接方式将该标记共轭于抗体。可替换地,为了实现标记与抗体的间接共轭作用,将抗体共轭于小半抗原(例如,地高辛)以及将上述不同类型的标记之一共

轭于抗半抗原抗体（例如，抗地高辛抗体）。因此，可以实现标记与抗体的间接共轭作用。

在本发明的另一种实施方式中，抗鞘脂抗体无需被标记，并且其存在可以利用结合于抗鞘脂抗体的标记抗体加以检测。

可以以任何已知测定方法来使用本发明的抗体，如竞争结合测定、直接和间接夹心测定、以及免疫沉淀测定。参见例如，Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987)。

竞争结合测定依赖于标记标准与试样分析物竞争结合于有限量抗体的能力。试样中鞘脂的量与结合于抗体的标准的量成反比。为了便于确定已结合的标准量，在竞争以前或以后抗体通常是不溶性的，以致结合于抗体的标准和分析物可以方便地分离自仍然未结合的标准和分析物。

夹心测定涉及使用两种抗体，每种能够结合于待检测蛋白的不同免疫原性部分、或表位。在夹心测定中，固定在固体载体上的一抗结合试样分析物，其后二抗结合于分析物，因而形成不溶性的由三部分组成的复合体。参见例如，美国专利第 4,376,110 号。二抗可以本身被标记有可检测部分（直接夹心测定）或可以利用标记有可检测部分的抗免疫球蛋白抗体加以测量（间接夹心测定）。例如，一种类型的夹心测定是 ELISA 测定，在这种情况下可检测部分是酶。

对于免疫组织化学，例如，血液或组织样品可以是新鲜的或冰冻的或可以被包埋在石蜡中并用防腐剂如福尔马林加以固定。

抗体还可以用于体内诊断测定。通常，抗体被标记有放射性核素（如 ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 、或 ^{35}S ）以致可以利用免疫闪烁显像来定位结合的靶分子。

E. 诊断试剂盒

为方便起见，可以将本发明的抗体提供在试剂盒中，例如，预定量的试剂的包装组合，并带有用于进行诊断测定的说明书。在用酶标记抗体的情况下，试剂盒将包括底物以及酶所需要的辅因子（例如，底物前体，其提供可检测的发色团或荧光团）。此外，可以包括其它添加剂如稳定剂、缓冲剂（例如，阻断缓冲剂或裂解缓冲剂）等。各种试剂的相对量可能相差很大以提供基本上优化测定敏感性的试剂溶液的浓度。尤其是，试剂可以提供为通常冻干的干粉，包括赋形剂，其在溶解以后将提供具有适当浓度的试剂溶液。

F. 抗体的治疗应用

为了治疗应用，以药用剂型如上述那些药用剂型，将本发明的抗鞘脂抗体给予哺乳动物，优选人，其中药用剂型包括可以作为大丸剂以静脉内方式或通过经一段时间的持续输注、通过肌内途径、腹腔内途径、脑脊内途径、皮下途径、关节内途径、滑膜腔内途径、鞘内途径、口服、局部途径、或吸入途径，来给予人的那些药用剂型。

为了预防或治疗疾病，抗体的适当剂量将取决于待治疗疾病的类型（如上述所定义的）、疾病的严重性和病程、给予抗体是用于预防或治疗目的、以往治疗、患者的临床病史和对抗体的反应、以及主治医生的判断力。一次或经一系列治疗将抗体适当地给予患者。

取决于疾病的类型和严重性，给予患者的起始候选剂量是约 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 50 mg/kg （例如，0.1-20 mg/kg ）的抗体，例如，通过一次或多次分开给予、或通过持续输注。取决于上述因素，典型的每日或每周剂量可以是约 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 20 mg/kg 或更多。对于经若干天或更长时间的重复给予（取决于病症），重复治疗直到出现对疾病症状的所期望的抑制。然而，其它剂量方案可以是有用的。可以通过常规技术和测定，包括，例如，放射线成像，来容易地监测这种疗法的进展。

根据本发明的另一种实施方式，可以例如通过按顺序或连同另一种制剂（其可有效用于那些目的，如化疗抗癌药物）给予抗体来改善抗体预防或治疗疾病的有效性。上述其它制剂可以存在于要给予的组合物中或可以分开给予。可以按顺序或连同其它制剂适当地给予抗体。

G. 制备的物件

在本发明的另一种实施方式中，提供了制备的物件，其包含可用于治疗上述疾病的材料。制备的物件包括容器和标记。适宜的容器包括，例如，瓶、小瓶、注射器、以及试管。这些容器可以形成自各种材料如玻璃或塑料。容器容纳可以有效治疗病症的组合物并且可以具有无菌入口（例如容器可以是输液袋或小瓶，其具有可以通过皮下注射针刺穿的塞子）。组合物中的活性剂是抗鞘脂抗体。在容器上或伴随容器的标签指明组合物用于治疗所选的病症。制备的物件可以进一步包括第二容器，其包含药用缓冲液，如磷酸缓冲盐溶液、林格氏液以及葡萄糖溶液。它可以进一步包括从商业和使用者角度所期望的其它材料，其包括其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射器、包装插件、以及使用说明书。

通过参照以下实施例将可以更好地理解本发明，其中所述实施例仅用于说明目前已知的用于实施本发明的最好方式，但本发明的范围并不限于此。

实施例

实施例 1: S1P(Sphingomab™; LT1002)的鼠单克隆抗体

一种类型的治疗性抗体特异性地结合不受欢迎的鞘脂以获得有利影响如，例如，(1)降低不希望具有的、毒性鞘脂（和/或它们的代谢前体的浓度）的有效浓度，其中鞘脂将促进不受欢迎的效应如心脏毒性、致癌的、或生血管效应；(2)抑制不希望具有的、毒性的、致癌的、或生血管鞘脂结合于细胞受体，从而，和/或降低可用于结合上述受体的鞘脂的浓度。上述治疗效果的实例包括但不限于使用抗 S1P 抗体来降低可用的 S1P 的有效体内血清浓度，从而阻断或至少限制 S1P 的致癌和生血管效应以及其在后 MI 心力衰竭、癌症、或纤维发生疾病中的作用。

合成了硫醇化 S1P 以包含反应基团，其能够将 S1P 的必要的结构特征交联于载体分子如 KLH。在免疫以前，利用标准试验规程并借助于 IOA 或 SMCC 交联将硫代 S1P 类似物共轭于蛋白质载体(例如，KLH)。SMCC 是一种异双功能交联剂，其与伯胺和巯基基团反应，并且是一种优选的交联剂。

经两个月时间通过注射用 50µg 免疫原（硫醇化 1 和 KLH 的 SMCC 易化共轭物）免疫瑞士韦伯斯特 (Swiss Webster) 或 BALB-C 小鼠四次。在第二、第三、以及第四次免疫的两周后收集血清样品，并通过直接 ELISA 筛查抗 S1P 抗体的存在。按照标准融合程序，

来自动物并呈现抗体的高滴度的脾脏随后用来产生杂交瘤细胞。使获得的杂交瘤细胞生长至汇合，其后收集细胞上清液供 ELISA 分析。在经免疫的 55 只小鼠中，8 只是良好的反应者，其呈现对 S1P 具有反应性的抗体的显著血清滴度。随后，按照已建立的程序，利用那些小鼠的脾脏和骨髓瘤细胞进行融合。然后通过直接 ELISA 筛查获得的 1,500 个杂交瘤细胞，产生 287 个阳性杂交瘤细胞。在通过直接 ELISA 筛查的这些 287 个杂交瘤细胞中，159 个细胞显示出显著的滴度。然后将 159 个杂交瘤细胞和每一个扩大进入 24 孔板。然后再筛查经扩大的杂交瘤细胞的细胞条件培养基以鉴定能够分泌感兴趣的抗体的稳定的杂交瘤细胞。对 60 个最高滴度的稳定的杂交瘤细胞进行竞争性 ELISA。

在筛查的 55 只小鼠和几乎 1,500 个杂交瘤细胞中，发现一个杂交瘤细胞呈现这样的性能特点，其证明有限稀释法克隆是正当的，如最终产生真正的单克隆抗体所需要的。此过程产生 47 个无性系，其大部分被认为对于产生 S1P 抗体是阳性的。在这些 47 个无性系中，6 个被扩大进入 24 孔板并随后通过竞争性 ELISA 加以筛查。从仍然阳性的 4 个无性系中，选择一个来引发 S1P 单克隆抗体的大规模生产。用这些细胞注射 SCID 小鼠并且获得的腹水是 A 蛋白，其经纯化（产率为 50%）并用于分析内毒素水平（<3 EU/mg）。为了一轮腹水生产，注射 50 只小鼠，产生总共 125mL 腹水。抗体被同种型为 IgG1 κ ，并且通过 HPLC 认为纯度>95%。将抗体制备在包含 150 mM 氯化钠（pH 7.2）的 20 mM 磷酸钠中并存储在-70°C。这种抗体称为 LT 1002 或 Sphingomab™。

阳性杂交瘤细胞克隆（称为克隆 306D326.26）保藏在 ATCC（安全保藏储藏号 SD-5362），并且该克隆是针对 S1P 的第一鼠 mAb。该克隆还包含抗体重链和轻链的可变区，其可以用于生成“人源化”抗体变体，以及构造嵌合抗体所需要的序列信息。

通过直接 ELISA 并利用硫醇化 S1P 类似物作为抗原来筛查血清和细胞上清液的 S1P 特异性抗体。如下文所述,进行标准 ELISA,不同之处在于,在最初温育期间,用等容积的 PBS/0.1% 吐温-20 (PBST) 稀释 50 ul 样品(血清或细胞上清液)。在涂布有 0.1 μg 化学合成的硫醇化 S1P 的 96 孔高结合 ELISA 板(Costar)中进行 ELISA,其中硫醇化 S1P 被共轭于结合缓冲液(33.6mM Na_2CO_3 、100mM NaHCO_3 ; pH 9.5)中的 BSA。在 ELISA 板孔中,硫醇化 S1P-BSA 在 37°C 下温育 1 小时,然后在 4°C 下温育过夜。然后用 PBS (137 mM NaCl、2.68 mM KCl、10.14 mM Na_2HPO_4 、1.76 mM KH_2PO_4 ; pH 7.4)对板洗涤四次并在室温下用 PBST 阻断 1 小时。关于最初温育步骤,用稀释在 PBST 中的 25uL 的 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 S1P mAb 温育 75uL 样品(包含待测量的 S1P),然后被加入 ELISA 板的孔中。在一式三分的孔中对每种样品进行处理。在室温下温育 1 小时以后,用 PBS 洗涤 ELISA 板四次,然后在室温下用 100 ul/孔的 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HRP 羊抗鼠二抗(secondary)(Jackson Immunoresearch)温育 1 小时。然后用 PBS 洗涤板四次并暴露于四甲基联苯胺(Sigma)1-10 分钟。通过加入等体积的 1M H_2SO_4 来终止检测反应。通过利用 EL-X-800 ELISA 平板读取器(Bio-Tech)在 450nm 处的测量确定了样品的光密度。

关于交叉反应性,如上所述,进行竞争性 ELISA,不同之处在于以下改变。最初温育包括竞争剂(S1P、SPH、LPA 等)和生物素共轭的抗 S1P mAb。利用 EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation 试剂盒(Pierce)进行经纯化单克隆抗体的生物素化。按照试剂盒试验规程确定生物素掺入并且其范围为 7 至 11 个生物素分子/抗体。竞争剂的制备如下:超声处理脂质原液,然后在 DPBS/BSA[在 DPBS(Invitrogen 14040-133)中的 1mg/ml 没有脂肪酸的 BSA(Calbiochem)]中重建以前在氩气下干燥。必要时,将经纯化的抗 S1P mAb 稀释在 PBS/0.5% Triton X-100 中。将竞争剂和抗体溶

液混合在一起以便产生 3 份竞争剂与 1 份抗体。HRP-共轭的链霉亲和素二抗（Jackson ImmunoResearch）用来产生信号。

竞争性 ELISA 数据（示在图 1 中，图 1A）的另一个方面是，它表明抗 S1P mAb 不能区别硫醇化 S1P 类似物与在竞争实验中加入的天然 S1P。它还证明了，抗体并不识别任何氧化产物，因为构造的类似物没有任何双键。还相对于包含双键的天然产物试验了抗 S1P mAb，其允许在室温下放置 48 小时。按照先前报道的方法（Deutschman, et al. (July 2003), *Am Heart J.*, vol. 146(1):62-8）进行天然 S1P 的反相 HPLC，并且结果表明保留时间没有差异。另外，示于图 1 的图片 A 的单克隆抗体与各种脂质的结合特性的比较表明，由抗体识别的表位并不涉及在天然 S1P 的双键区中的炔链。另一方面，由单克隆抗体识别的表位是包含在鞘氨醇碱基主链上的氨基醇加上游离磷酸盐的区域。如果游离磷酸盐被连接于胆碱（如同 SPC 的情况），那么结合被稍微减少。如果氨基基团被酯化成脂肪酸（如同 C1P 的情况），则观测不到抗体结合。如果用甘油主链替换鞘氨醇氨基醇主链（如同 LPA 的情况），则 S1P 特异性单克隆没有呈现任何结合。这些表位作图数据表明，在由单克隆抗体识别的 S1P 上仅存在一个表位，并且此表位由 S1P 的独特的极性首基加以限定。

在利用 ELISA 测量的类似实验中，评估了适宜的对照材料以确保这种抗 S1P 单克隆抗体并不识别蛋白质载体或交联剂。例如，在将硫醇化 S1P 共轭于 BSA 作为 ELISA 中的沉积材料时，通常的交联剂 SMCC 交换 IOA。当使用 IOA 时，抗体的结合特性几乎相同于当使用 BSA-SMCC-硫醇化 S1P 时的抗体的结合特性。类似地，KLH 交换 BSA 作为蛋白质，而 BSA 复合于硫醇化 S1P 作为沉积材料。在此实验中，抗体的结合特性也没有显著差异。

结合动力学：由于脂质的特性，S1P 与其受体或其它部分的结合动力学传统上是成问题的。许多问题与脂质的不溶性有关。对于 BIAcore 测量，这些问题是通过将 S1P 直接固定于 BIAcore 芯片来克服。然后使抗体沿芯片表面流动并测量光密度变化以确定抗体与 S1P 的结合特性。为了绕过抗体的二价结合特性，以低密度将 S1P 涂布在芯片上。另外，用各种密度的 S1P (7、20、以及 1000 RU) 涂布芯片并且抗体结合数据总体上适合于 1:1 相互作用模型。图 2 所示的结果说明了由于单克隆抗体结合于 S1P (在三种不同密度的 S1P 的情况下) 所引起的光密度变化。总的来说，单克隆抗体与 S1P 的亲合力被确定为非常高，在大约 88 皮摩尔 (pM) 至 99 nM 的范围内，其取决于单价或二价结合模型用来分析结合数据。

实施例 2: ELISA 测定

1. 定量 ELISA

在 37°C 下用稀释在 1M 碳酸盐缓冲溶液 (pH 9.5) 中的兔抗鼠 IgG、F(ab')₂ 片段特异性抗体 (Jackson, 315-005-047) 涂布 Microtiter ELISA 板 (微量滴定 ELISA 板) (Costar, Cat No. 3361) 1 小时。用 PBS 对板进行洗涤并在 37°C 下用 PBS/BSA/吐温-20 阻断 1 小时。为了最初温育，非特异性小鼠 IgG 或人 IgG 的稀释，将要测量的整个分子(用于校准曲线)和样品加入孔中。对板进行洗涤并在 37°C 下用稀释为 1:40,000 的 100 ul/孔的 HRP 共轭羊抗鼠(H+L)(Jackson, cat No 115-035-146)温育 1 小时。洗涤以后，用四甲基联苯胺(Sigma, cat No T0440)检测酶促反应并通过加入 1 M H₂SO₄ 来终止。利用 Thermo Multiskan EX 在 450 nm 处测量光密度(OD)。将原始数据传送到 GraphPad 软件供分析。

2. 直接 ELISA

在 37°C 下用稀释在 1M 碳酸盐缓冲溶液 (pH 9.5) 中的 LPA-BSA 涂布 Microtiter ELISA 板 (Costar, Cat No. 3361) 1 小时。用 PBS(137 mM NaCl、2.68 mM KCl、10.1 mM Na₂HPO₄、1.76 mM KH₂PO₄; pH 7.4) 对板进行洗涤, 然后用 PBS/BSA/Tween-20 在室温下阻断 1 小时或在 4°C 下阻断过夜。将待试验的样品稀释为 0.4 ug/mL、0.2 ug/mL、0.1 ug/mL、0.05 ug/mL、0.0125 ug/mL、以及 0 ug/mL, 然后将 100 ul 加入每个孔。对板进行洗涤并在室温下用 100 ul/孔的 HRP 共轭羊抗鼠 (1:20,000 稀度) (Jackson, cat. no. 115-035-003) 温育 1 小时。洗涤以后, 用四甲基联苯胺 (Sigma, cat. no. T0440) 检测酶促反应并通过加入 1 M H₂SO₄ 来终止。利用 Thermo Multiskan EX 在 450nm 处测量光密度 (OD)。将原始数据传送到 GraphPad 软件供分析。

3. 竞争测定

用 ELISA 测定试验了 mAb 的特异性。在 37°C 下用稀释在 1M 碳酸盐缓冲溶液(pH 9.5)中的 18:0 LPA-BSA 涂布 Microtiter ELISA 板 (Costar, Cat No. 3361) 1 小时。用 PBS (137 mM NaCl、2.68 mM KCl、10.1 mM Na₂HPO₄、1.76 mM KH₂PO₄; pH 7.4) 对板进行洗涤, 然后用 PBS/BSA/Tween-20 在 37°C 下阻断 1 小时或在室温下阻断过夜。为了最初温育, 将 0.4 ug/mL 抗 LPA mAb 和指定量 (14:0、16:0、18:0、18:1、18:2 以及 20:4) 的 LPA、DSPA、18:1 LPC (溶血磷脂酰胆碱)、S1P、神经酰胺以及神经酰胺-1-磷酸加入 ELISA 板的孔中, 然后在 37°C 下温育 1 小时。对板进行洗涤, 然后在 37°C 下用稀释为 1:50,000 的 100 ul/孔的 HRP 共轭羊抗鼠 (1:20,000 稀度) (Jackson, cat No 115-035-003) 或 HRP 共轭羊抗人(H+L) (Jackson, cat No 109-035-003) 温育 1 小时。洗涤以后, 用四甲基联苯胺检测酶促反应并通过加入 1 M H₂SO₄ 来终止。利用 Thermo Multiskan EX

在 450nm 处测量光密度 (OD)。将原始数据传送到 GraphPad 软件供分析。

实施例 3: SPHINGOMAB 小鼠 mAb 对于 S1P 是高度特异的

和其它生物活性脂质相比, 竞争性 ELISA 说明了 SPHINGOMAB 对于 S1P 的特异性。SPHINGOMAB 对于鞘氨醇 (SPH) 并没有显示交叉反应性, 其中鞘氨醇是 S1P 或溶血磷脂酸 (LPA) 的直接代谢前体, 一种重要的胞外信号分子, 其结构和功能上类似于 S1P。SPHINGOMAB 并不识别其它结构类似的脂质和代谢物, 其包括神经酰胺-1-磷酸 (C1P)、二氢鞘氨醇 (DH-SPH)、磷脂酰丝氨酸 (PS)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、或鞘磷脂 (SM)。SPHINGOMAB 确实与二氢鞘氨醇-1-磷酸 (DH-S1P)、并且在更小的程度上与鞘氨醇磷脂酰胆碱 (SPC), 进行交叉反应 (图 3)。

实施例 4: 在 CNV 的小鼠模型中 SPHINGOMAB 显著降低 CNV 和瘢痕形成

使雌性 C57BL6/J 小鼠经受布鲁赫膜的激光诱导破裂, 然后给予稀释在 2 μ l 生理盐水中的 0.5 μ g 的 Spingomab 或同种型-配对的非特异性 (NS) 抗体。在激光破裂后的第 14 和第 28 天处死小鼠。

为了诱导 CNV 病变, 用眼用托吡卡胺 (0.5%) 和去氧肾上腺素 (2.5%) 扩张瞳孔。将盖玻片放置在眼上。联接于裂隙灯 (其设置为递送 150 mW 的 100 毫秒脉冲, 光斑大小为 50 μ m) 的 Oculight GL 532 nm (Iridex Corporation, Mountain View, CA) 用来在右眼的三个象限 (位于离视盘大约 50 μ m, 并成相对的 9、12 以及 3 点的位置) 破裂布鲁赫膜。在所有情况下左眼作为未损伤对照。分析中排除与气泡没有关系的任何病变或成为融合的病变。

为了测量 CNV 病变大小，制备了巩膜-脉络膜- RPE 复合体的脉络膜扁平封装并染色脉管系统（蓖麻凝集素 I；红色）和周细胞（CD 140b；绿色）。利用落射荧光 Zeiss Axioplan 2 以及 RGB Spot 高分辨率数码相机和激光扫描共聚焦显微镜（BioRad MRC 1024, BioRad Corporation, Temecula, CA）来捕获数字图像。对于容量分析，使用了 z 系列捕获并且整个 z 系列的病变面积的和乘以 z 厚度（4 μm ）以获得病变容积。

为了评估胶原沉积，用马松三色染色巩膜-脉络膜-RPE 复合体。将巩膜-脉络膜-RPE 复合体包埋在石蜡中，然后按顺序被切片成 6 微米的厚度。评价了大约 30 个切片/病变。以和针对 CNV 病变容积所描述的不同方式，计算了胶原沉积的容积。

利用 ImageJ 软件（Research Services Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD）形态计量上评价了捕获的数字图像。图 4A 示出在布鲁赫膜的激光诱导破裂以后的第 14 和第 28 天 SPHINGOMAB 显著减弱脉络膜新血管形成。图 4B 示出在布鲁赫膜的激光诱导破裂以后的第 28 天 SPHINGOMAB 显著减少与 CNV 病变形成有关的纤维化。

实施例 5: 通过多种机制，包括内皮细胞迁移和管形成的抑制，SPHINGOMAB 抑制新血管形成

S1P 促进人脐静脉内皮细胞（HUVEC）的迁移，以及在基质膜和其它测定中促进体外从头 BV 形成的形成；SPHINGOMAB 可以中和 SIP 的这些效应。如由 Visentin et al.（Cancer Cell 2006 Mar;9(3):225-38）所描述的，进行实验。图 5A 中的数据表明在有 SIP 存在的条件下接种到 GF-减少基质膜上的 HUVEC 形成了多种毛细血管样结构，以及在没有 SIP 存在的条件下或当与 SPHINGOMAB 和 SIP 共同温育时，则没有形成毛细血管样结构。

图 5B 中的数据说明了，相对于非治疗 HUVEC、或在基质膜化学侵入测定中与 SPHINGOMAB 共同温育的 HUVEC，0.1-1 μM S1P 能够刺激 HUVEC 迁移达 2-2.5 倍。合起来讲，这些研究说明了，SPHINGOMAB 可以有效地缓和 S1P 对 EC 的促血管再生影响。

实施例 6: 通过多种机制，包括体内缓解 S1P、VEGF 以及 bFGF 的影响，SPHINGOMAB 抑制新血管形成

基于体内研究，其表明 S1P 增加了内皮毛细血管生长进入皮下植入基质栓，我们推测 SPHINGOMAB 可以减少体内从头 BV 形成。为对此进行研究，我们采用了用于新血管形成的体内基质栓测定。在一组实验中，与 1 μM S1P、0.5 $\mu\text{g/mL}$ bFGF 或 1 $\mu\text{g/mL}$ VEGF 一起补充基质胶，然后 I.P. 注射进入小鼠体内 (n=4)。在 10 天后，将小鼠肝素化并被注射荧光凝集素、异凝集素 B4-FITC，其结合于由形成生长中的 BV 的血管 EC 表达的黏着分子。然后栓被切除，冰冻在 OCT 中，切片并观测 FITC 染色的 BV。图 6A 中的数据表明，S1P 是比 bFGF 或 VEGF 更有效的体内新血管形成的刺激剂 [Lee, et al, (1999), Biochem Biophys Res Commun., vol 264: 743-50]，如由以下事实所证明的：与包含 bFGF 或 VEGF 的栓相比，在包含 S1P 的栓中有大量的 FITC 染色的 BV。

然后用苏木素和伊红对栓的切片进行染色，用于评估 EC 浸润 (图 6B)。EC 的浸润是新血管形成中的关键步骤。和仅栓的基质膜相比。包含 S1P 的栓具有 3 倍增加的 EC 浸润。假定细胞浸润是 EC，虽然我们知道其它细胞类型如免疫细胞也可以被染色。甚至当 S1P 被加入基质膜栓时，每 48 小时系统给予 SPHINGOMAB 的小鼠 (在栓植入前 1 天开始) 也显示出减少量的 EC 浸润。这些结果说明了 SPHINGOMAB 体内抑制 EC 浸润的能力。

来自血液和周围组织的内源性 S1P 可以向伤口提供促血管再生刺激。研究了在伤口中 SPHINGOMAB 减少内源性 S1P 的能力。将最佳刺激的栓（基质膜，补充有 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bFGF 或 10 mg/mL VEGF）植入小鼠。在基质膜植入前 1 天开始，每 48 小时小鼠接受 i.p.注射 25 mg/kg SPHINGOMAB 或盐水。每个治疗组（基质膜、基质膜加上 GF 或基质膜加上 GF 和给予的 SPHINGOMAB）包括至少 6 只小鼠。在 10 天以后，用肝素治疗小鼠，注射异凝集素 B4-FITC，将栓切除，包埋在 OCT 冷冻介质中并切片。通过凝集素-FITC 染色血管来定性了解微血管密度，如图 6C 所示。在对照（未治疗）栓中 BV 染色是偶尔发生的，而包含 bFGF 或 VEGF 的栓呈现显著的血管形成的证据。和来自经盐水治疗的小鼠的 bFGF 或 VEGF 栓相比，来自经 SPHINGOMAB 治疗的小鼠的栓呈现出 BV 形成的显著减少。染色血管的量化揭示了，与用盐水治疗的动物相比，来自用 SPHINGOMAB 治疗的动物的包含 VEGF 或 bFGF 的栓分别减少 5 至 8.5 倍的新血管形成（图 6C）。这种估计进一步证明了内源性血清和组织 S1P 增强微血管形成的能力以及 SPHINGOMAB 中和内源性 S1P 的促血管再生效应的能力。

实施例 7: SPHINGOMAB 抑制体内瘢痕形成

通过激活成纤维细胞迁移、增殖以及胶原生产，S1P 对于伤口愈合具有深远的贡献；SPHINGOMAB 则中和这些影响。利用多种类型的成纤维细胞进行的若干研究证实了 S1P 促进伤口愈合的能力：1) S1P 增加了 Swiss-3T3 成纤维细胞增殖，如通过 ^3H -胸苷掺入并利用标准方法所测得的(图 7A)，2) 在标准抓伤伤口愈合测定中 S1P 促进心脏成纤维细胞的迁移（图 7B）；3) S1P 促进了分离自转基因小鼠（具有胶原 1a GFP 受体）的心脏成纤维细胞的胶原表达，如通过免疫荧光显微镜所指明的（图 7C）；以及 4) S1P 诱导 WI-38 肺成纤维细胞分化成肌成纤维细胞（在瘢痕重建中具有活

性的细胞)，如由肌成纤维细胞标记蛋白、平滑肌肌动蛋白的增加的表达所指明的，其中使用了免疫印迹分析（图 7D）。在每种这些测定中，SPHINGOMAB 均中和 S1P 的效应。预计眼成纤维细胞将类似地回应 S1P 和 SPHINGOMAB。已注意到心血管疾病和 AMD 的新生血管病变（包括瘢痕重建和其后不适当的纤维组织形成）之间的类似性（Vine, et al. (2005), Ophthalmology, vol 112: 2076-80 以及 Seddon and Chen (2004), Int Ophthalmol Clin., vol 44: 17-39）；因此，认为 SPHINGOMAB 对眼新血管形成和疤痕的影响类似于它对心血管系统的影响。

研究评价了在小鼠中在借助于左冠状动脉前降支的连接作用永久性心肌梗死（MI）以后 SPHINGOMAB 减少心脏瘢痕形成的效力。在外科手术后 48 小时，开始系统给予 25 mg/kg 的 SPHINGOMAB 或盐水。选择在 48 小时给予抗体以使正常的修复性瘢痕形成可以在早期重建阶段发生并且在 MI 后立即允许有益的 S1P 刺激的血管发生。梗塞后两周，将小鼠处死并通过心脏组织的马松三色染色来了解纤维化。接受 SPHINGOMAB 治疗的动物呈现出几乎完全消除了血管周纤维化（图 7，图片）。作为任何非特异性伤口-愈合反应的对照，使假动物经受没有冠状动脉结扎飞开胸术（图 7E）。

实施例 8: S1P 促进眼上皮细胞和成纤维细胞转化成产生收缩性瘢痕组织的肌成纤维细胞

在许多眼部疾病中，病理性组织纤维化（瘢痕形成）是主要的促成因素，其中眼部疾病包括：年龄相关性黄斑变性、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、增生性玻璃体视网膜病以及青光眼外科手术的后果。

在许多这些疾病中，循环生长因子和趋化因子会促进正常眼细胞转化成产生纤维收缩性瘢痕组织的细胞，其称作“肌成纤维细胞”。通常，肌成纤维细胞负责组织修复一部分作为损伤后伤口愈合反应。然而肌成纤维细胞数目和功能的改变与一些疾病有关，这些疾病的特征在于肝脏、皮肤、肺脏、肾、心脏以及眼中的病理性瘢痕组织形成。在眼中，视网膜色素上皮（RPE）细胞转化成肌成纤维细胞表型涉及纤维收缩膜的形成，其引起视网膜脱离以及随后的视觉缺陷。此外，在眼损伤以后，眼成纤维细胞的肌成纤维细胞转化可以导致产生异常的瘢痕组织，从而导致随后的视力减退。虽然已鉴定了在眼中促进肌成纤维细胞形成的许多循环蛋白因子（circulating protein factor），但并不知道溶脂质如 S1P 在此过程中的作用。因此，我们检查了 S1P 对若干人眼细胞系的肌成纤维细胞转化的影响。如图 8 所示，S1P 刺激在人视网膜色素上皮细胞（图 8A）和人结膜成纤维细胞（图 8B）中产生 α -平滑肌肌动蛋白（ α -SMA；一种肌成纤维细胞标记）。这些数据首次说明了，S1P 处于循环化学因子的环境中，这些循环化学因子促进眼上皮细胞和成纤维细胞转化成产生收缩性、瘢痕组织的肌成纤维细胞，其可以有助于视网膜脱离、眼纤维化以及随后的视觉缺陷。

在这些实验中，S1P 促进 α -SMA 表达的能力以浓度依赖性方式在视网膜色素上皮细胞和结膜成纤维细胞之间有差异。如所示，在上皮细胞中在 0.001 μ M 浓度下观测到 α -SMA 表达的显著增加，其然后降低到在 10 μ M 浓度下的基础水平。与此相反，在结膜成纤维细胞中仅在 10 μ M 浓度下观测到 α -SMA 表达的显著增加。认为这种差异起因于，与成纤维细胞相比，在上皮细胞中增加的 S1P 受体表达。由于增加的 S1P 受体表达水平，视网膜色素上皮细胞可能对低浓度的 S1P 更敏感。与此相反，在高 S1P 水平下，受体变得敏感或可能甚至内在化，从而导致 S1P 的降低的刺激。

胶原是主要结构蛋白之一，其支持体内的所有组织并且是瘢痕组织的主要成分之一。在非病理性环境中，借助于通过成纤维细胞的胶原生产和通过某些酶的降解之间的平衡来维持组织内的总胶原含量。许多涉及增加水平的瘢痕组织的疾病部分起因于生理及分子过程，其抑制瘢痕形成所需要的胶原的降解。据推测，S1P 促进瘢痕组织形成的能力可能起因于其抑制胶原降解的能力，从而导致器官内瘢痕组织的净增加。因此，检查了在人结膜成纤维细胞中 S1P 对纤溶酶原激活物抑制剂（PAI-1）的表达的影响。增加的 PAI-1 表达与结缔组织的蛋白降解的降低相关并且伴随若干纤维变性疾病（其涉及增加的疤痕）被正调节。如图 8C 所示，S1P 以剂量依赖性方式刺激 PAI-1 表达。这些数据表明，通过刺激抑制其降解的蛋白质的表达也可以促进瘢痕组织形成，这提示 S1P 是通过多种途径来发挥作用，以促进和维持与眼部疾病有关的病理性疤痕。

实施例 9: SPHINGOMAB 抑制炎性和免疫细胞浸润

炎症是重建过程中的第一反应。它由缺血和由细胞损伤所触发并且导致细胞因子表达的正调节，其刺激巨噬细胞和中性粒细胞迁移到受伤区域以吞噬死细胞，以及进一步正调节炎性应答[Jordan, et al.(1999), Cardiovasc Res., vol 43: 860-78]。肥大细胞也是炎性应答的重要细胞介质。由肥大细胞释放的 S1P 是在炎症的实验动物模型中看到的许多不良反应的原因[Jolly, et al (2004), J Exp Med., vol 199: 959-70 以及 Jolly et al (2005), Blood., vol 105: 4736-42]。

基于在 CNV 和 CVD 中免疫和炎性应答的类似性，用鼠梗塞模型评价了 SPHINGOMAB 缓和免疫细胞浸润进入伤口的效力，作为在 AMD 期间 SPHINGOMAB 缓和这些损伤的潜在效应的指征[Vine, et al. (2005), Ophthalmology, vol 112: 2076-80; 以及 Seddon and Chen (2004), Int Ophthalmol Clin., vol 44: 17-39]。MI 四天后，分别利用

MAC-1 和 MCG35 抗体评价了在危险区域内巨噬细胞和肥大细胞浸润。SPHINGOMAB 显著减小炎性巨噬细胞(图 9A)和肥大细胞(图 9B)的密度,这提示了 SPHINGOMAB 可以中和 AMD 期间的免疫和炎性损害。

实施例 10: S1P 小鼠单克隆抗体 (LT1002; Sphingomab)的可变结构域的克隆和表征

此实施例报道了相对于 S1P 的小鼠 mAb 的克隆。整体策略包括克隆轻链 (VL) 和重链 (VH) 的小鼠可变结构域。306D VH 的共有序列显示,恒定区片段是与 $\gamma 2b$ 同种型一致的。连同轻链的恒定结构域 (CL) 和连同重链的恒定结构域 (CH1、CH2、以及 CH3) 一起来克隆鼠可变结构域,从而导致嵌合抗体构造物。

1. 鼠 mAb 的克隆

使来自抗 S1P 杂交瘤细胞系 306D326.1 (ATCC#SD-5362) 的克隆在 DMEM (Dulbecco 改良的伊格尔培养基,包含 GlutaMAX™ I、4500mg/L D-葡萄糖、丙酮酸钠; Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, 111-035-003)、10% FBS (Sterile Fetal Clone I, Perbio Science)、以及 IX 谷氨酰胺/青霉素/链霉素 (Gibco/Invitrogen) 中生长。利用基于 RNeasy Mini 试剂盒 (Qiagen, Hilden Germany) 的程序,总 RNA 分离自 10^7 个杂交瘤细胞。按照制造商的说明, RNA 用来产生第一链 cDNA (第一链合成试剂盒, Amersham Biosciences)。

通过 PCR 并利用 MHV7 引物 (MHV7: 5'-ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT-3' [SEQ ID NO: 1]) 连同 IgG2b 恒定区引物 MHCg1/2a/2b/3 混合物 (MHCg1: 5'-CAGTGGATAGAC AGATGGGGG-3' [SEQ ID NO: 2]; MHCg2a: 5'-CAGTGGATAGACCGATGGGGC-3 [SEQ ID NO: 3]; MHCg2b:

5'-CAGTGGATAGACTGATGGGGG-3' [SEQ ID NO: 4]; MHCG3: 5'-CAAGGGATAGACAGATGGGGC-3' [SEQ ID NO: 5])来扩增免疫球蛋白重链可变区(VH)cDNA。利用 TOPO-TA cloning[®]试剂盒和序列将反应产物连接于 pCR2.1[®]-TOPO[®]载体 (Invitrogen)。然后通过 PCR 从此载体扩增重链的可变结构域并作为 Hind III 和 Apa I 片段插入,接着连接于表达性载体 pGID200 (参见美国专利第 7,060,808 号)或 pG4D200 (同上),其包含 HCMVi 启动子、前导序列、以及 γ -1 恒定区,以产生质粒 pGID200306DVH (图 10)。306D V_H的共有序列(如下所示)显示恒定区片段是与 γ 2b 同种型一致的。

类似地,利用 MKV 20 引物(5'-GTCTCTGATTCTAGGGCA-3' [SEQ ID NO: 6])连同 κ 恒定区引物 MKC(5'-ACTGGATGGTGGGAAGATGG-3' [SEQ ID NO: 7])来扩增免疫球蛋白 κ 链可变区(VK)。利用 TOPO-TA cloning[®]试剂盒和序列将此反应的产物连接于 pCR2.1[®]-TOPO[®]载体。然后通过 PCR 来扩增轻链的可变结构域,接着作为 Bam III 和 Hind III 片段插入表达性载体 pKN100 (参见美国专利第 7,060,808 号),其包含 HCMV 启动子、前导序列、以及人 κ 恒定结构域,从而产生质粒 pKN100306DVK。

将重链和轻链质粒 pGID200306DVH 加上 pKN100306DVK 转化进入 DH4a 细菌并贮存在甘油中。如由制造商(Qiagen, 没有内毒素的 MAXIPREP™试剂盒)所描述的,来制备大型质粒 DNA。利用 ABI 3730x1 自动测序仪,其还将荧光信号翻译成它们的相应的核碱基序列,对利用 Qiagen's QIAprep Spin Miniprep Kit 或 EndoFree Plasmid Mega/Maxi Kit 加以纯化的 DNA 样品进行测序。将引物设计在 5'和 3'端,以致获得的序列会发生重叠。引物的长度是 18-24 个碱基,并且优选地它们包含 50%GC 含量以及没有预测

的二聚体或二级结构。来自 Sphingomab™的用于小鼠 V_H 和 V_L 结构域的氨基酸序列分别是 SEQ ID NO: 8 和 9 (表 2)。在表 2 中, CDR 残基 (参见 Kabat, EA (1982), Pharmacol Rev, vol. 34: 23-38) 被下划线, 并且分别示于以下的表 3 中。

表 2: 来自小鼠 mAb, Sphingomab™, 的 V_H 和 V_L 结构域

小鼠 V _H 结构域	QAHLQQSDAELVKPGASVKISCKVSGFIFID <u>H</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>H</u> WMKQR PEQGLEWIGCISPRHDITKYNEMFRGKATLTADKSSTTAYI QVNSLTFEDSAVYFCARGGFY <u>G</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u>	SEQ ID NO: 8
小鼠 V _L 结构域	ETT ^V TQSPASLSMAIGEKVTIRCITTTDIDDDMNWFQKPGEP NLLISEGNILRPGVPSRFSSSGYGTDFLFTIENMLSEDVADYYCL QSDNLPFTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO: 9

表 3: 小鼠 V_H 和 V_L 结构域的小鼠 Sphingomab™ CDR 序列

V _L CDR	CDR
ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)	CDR1
EGNILRP (SEQ ID NO: 11)	CDR2
LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)	CDR3
V _H CDR	
DHTIH (SEQ ID NO: 13)	CDR1
CISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 14)	CDR2
GGFYGSTIWDF (SEQ ID NO: 15)	CDR3

在表 4 中比较了若干嵌合抗体可变(V_H 和 V_L)结构域的氨基酸序列。将这些变体克隆到 Lonza 表达载体中。小鼠 V_H 和 V_L 结构域的序列用来构造分子模型以确定应将哪些骨架残基加入人源化抗体。

表 4: 来自人源化抗 SIP 抗体变体的人源化 V_H 和 V_L 结构域的氨基酸序列

V _H 变体	氨基酸序列
pATH200 SEQ ID NO: 16	mgstailallavlggvcevqlvqsgaevkpkgeslkiscqsfgyifidhtihwvrgmpggglewmgcisprhditkynm.....f.....m.....i.....i.....f.....f.....m.....i.....a.....m.....m.....i.....m.....a.....
pATH201m.....
pATH202f.....m.....i.....
pATH203i.....
pATH204f.....
pATH205f.....m.....i.....
pATH206f.....m.....i.....
pATH207m.....m.....i.....a.....
序列 (续):	
pATH200 (续)	emfrgqvttisadkssstaylqwsslkasdtamyfcarggyfgstiwfdwfgggtmvtvssastkgpsa.l.....a.l.....
pATH201
pATH202
pATH203
pATH204
pATH205
pATH206
pATH207

续表 4	
V _L 变体	
pATH300 (SEQ ID NO: 17)	mdmrvpaqlgllllwlpgarce ^t lltqsp ^s flsasv ^g drvt ⁱ tcit ^t tdi ^d ddm ⁿ wy ^q qep ^g kap ^k ll ⁱ yeg ⁿ llr ^p gvs.....
pATH301s.....
pATH302f.....
pATH303v.....
pATH304f.....
pATH305v.....f.....s.....
pATH306v.....f.....s.....
pATH308v.....f.....s.....
pATH309f.....s.....
序列 (续)	
pATH300 (续)	psr ^f sg ^s g ^s g ^t d ^f t ^l t ⁱ s ^k l ^g p ^e d ^f a ^t y ^y c ^l g ^s d ⁿ l ^p f ^t f ^g g ^g t ^k l ^e i ^k r ^e w ⁱ p
pATH301
pATH302
pATH303
pATH304
pATH305--
pATH306s.....
pATH308s.y.....
pATH309s.y.....

相应的核苷酸序列示在表 5 中：

表 5: pATH 和 CDR 序列

名称	序列	SEQ ID NO:
CDR1 V _L :	ataaccaccactgatattgatgatgatatgaac	18
CDR2 V _L :	gaaggcaatattcttcgctc	19
CDR3 V _L :	ttgcagagtataactaccattcacg	20
CDR1 V _H	gaccatacttcac	21
CDR2 V _H :	tgtatttctcccagacatgatattactaaatacaatgagatgttcagg ggc	22
CDR3 V _H :	ggggggttctacggtagtagtactatctggttgacttt	23
CDR2 V _H (pATH 207):	gctatttctcccagacatgatattactaaatacaatgagatgttcag gggc	24
pATH200 核苷酸序列:	<u>cgccaagcttccgcccaccatgggggtcaaccgccatcctcgccc</u> <u>tctcctggctgttctccaaggagtctgttccgaggtgcagctggt</u> gcagtctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtctctgaag atctcctgtcagagtttggatacatctttatcgaccatacttactg ggtgcgccagatgcccgggcaaggcctggagtggatgtgtattt ctcccagacatgatattactaaatacaatgagatgttcaggggcca ggtcaccatctcagccgacaagtccagcagcaccgcctacttgc agtggagcagcctgaaggcctcggacaccgccaatgtatttctgtg cgagaggggggttctacggtagtagtactatctggttgactttgggg ccaagggacaatggtcaccgtctcttcagcctccaccaagggccc catcg	25
pATH207 核苷酸序列:	<u>cgccaagcttccgcccaccatgggggtcaaccgccatcctcgccc</u> <u>tctcctggctgttctccaaggagtctgttccgaggtgcagctggt</u> gcagtctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtctctgaag atctcctgtcagagtttggatacatcgaccatacttactggatgc gccagatgcccgggcaaggcctggagtggatgggggctatttct cccagacatgatattactaaatacaatgagatgttcaggggcca gtcaccatctcagccgacaagtccagcagcaccgcctacttgc gtggagcagcctgaaggcctcggacaccgccaatgtatttctgtg gagaggggggttctacggtagtagtactatctggttgactttggggc caagggacaatggtcaccgtctcttcagcctccaccaagggccc atcg	26
pATH207 氨基酸序列	mgstailallavlqgvcevqlvqsgaevkkpgeslkiscqsf gyifidhtihwrmrmpgqglewmgaisprhditkynemfr gqvtisadkssstaylqwsslkasdtamyfcarggfystiwfd fwgqgtmvtvssastkgps	27

pATH300 核苷酸序列:	cgccaagcttgccgccaccatggacatgaggggtccccgctcag ctctggggctcctgctgctctggctcccagggtgccagatgtgaa acgacactcacgcagctccatccttctgtctgcatctgtaggag acagagtcaccatcacataaccaccactgatattgatgatgatg aactggtatcagcaggaaccagggaagcccctaagctcctgat ctatgaaggcaatattcttctgctctgggtcccatcaaggtcagc ggcagtggtatctggcacagatttactctcaccatcagcaaattg cagcctgaagattttgcaacttattactgtttgagagtgataactta ccattcacgttcggccaagggaaccaagctggagatcaaactga gtggatcccgcg	28
pATH308 核苷酸序列	cgccaagcttgccgccaccatggacatgaggggtccccgctcag ctctggggctcctgctgctctggctcccagggccagatgtga aacgacagtgacgcagctccatccttctgtctgcatctgtagga gacagagtcaccatcacttgcataaccaccactgatattgatgatg atatgaactggttcagcaggaaccagggaagcccctaagctc ctgatctccgaaggcaatattcttctgctctgggtcccatcaagatt cagcagcagtggtatggcacagatttactctcaccatcagcaa attgcagcctgaagattttgcaacttattactgtttgagagtgataa cttaccattacttctggccaagggaaccaagctggagatcaaac	29
pATH308 氨基酸序列	mrvpaqlglillwlpgarctvtqspstlsasvgdrviticittdd idddmnwlfqepgkapkllisegnilrpgvpsrfsssgygtfdfl tisklqpedfatyyclqsdnlpftfgggtkleik	30

2. 嵌合抗体的表达和结合性能

将 pGID200306DVH 加上 pKN100306DVK 的重链和轻链质粒转化到 DH4a 细菌并贮存在甘油中。如由制造商 (Qiagen, 没有内毒素的 MAXIPREP™ 试剂盒 Cat. No.12362) 所描述的, 制备大型质粒 DNA。

对于在非人哺乳动物系统中的抗体表达, 通过电穿孔 (0.7ml, 10^7 个细胞/ml) 并利用 10 ug 的每种质粒, 将质粒转染到非洲绿猴肾成纤维细胞细胞系 COS 7。在 8 ml 生长培养基中平皿培养经转染的细胞 4 天。在瞬时共转染 COS 细胞条件培养基中, 以 1.5 μ g/ml 表达嵌合 306DH1 x 306DVK-2 抗体。利用 S1P ELISA 测量了此抗体与 S1P 的结合。

用定量 ELISA 确定嵌合抗体的表达水平，具体如下。用稀释在 PBS 中的 100 μl 等分部分的 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 羊抗人 IgG 抗体 (Sigma, St. Louis, MO) 涂布微量滴定板 (Nunc MaxiSorp 多孔板, Invitrogen)，然后在 4°C 温育过夜。然后用 200 μl /孔的洗涤缓冲液(1 x PBS、0.1% TWEEN)洗涤滴定板三次。将等分部分的 200 μL 的每种稀释的血清样品或融合上清液转移到涂布有毒素的滴定板，然后在 37°C 下温育 1 小时。在用洗涤缓冲液洗涤 6 次以后，以 1:5000 稀度将羊抗人 κ 轻链过氧化物酶共轭物 (Jackson Immuno Research) 加入每个孔。在室温下进行反应 1 小时，用洗涤缓冲液洗涤滴定板 6 次，然后在每孔中加入 150 μL 的 K-BLUE 底物 (Sigma)，在室温下并在黑暗中温育 10 分钟。通过加入 50 μl 的 RED STOP 溶液 (SkyBio Ltd.) 来终止反应，然后利用 Microplate Reader 3550 (Bio-Rad Laboratories Ltd.) 在 655 nm 处测定吸收。来自抗体结合测定的结果示在图 11 中。

3. 293F 表达

将重链和轻链质粒转化到 Top 10 大肠杆菌 (One Shot Top 10 化学上能胜任的大肠杆菌细胞 (Invitrogen, C4040-10)) 并贮存在甘油中。如由制造商所描述的 (Qiagen, 没有内毒素的 MAXIPREP™ 试剂盒 CatNo 12362)，制备大规模质粒 DNA。

对于在人体系统中的抗体表达，利用 293fectin (Invitrogen) 和利用用于培养的 293F-FreeStyle Media (Invitrogen)，将质粒转染到人类胚胎肾细胞系 293F (Invitrogen)。均以 0.5 g/mL 转染轻链和重链质粒。以 10^6 个细胞/mL 的细胞密度进行转染。转染 3 天后，在 25°C 下，离心 (1100 rpm) 收集上清液 5 分钟。通过定量 ELISA 来量化表达水平 (参见先前实施例)，并且对于嵌合抗体，表达水平为 $\sim 0.25\text{-}0.5$ g/mL。

4. 抗体纯化

借助于使培养上清液以 0.5 mL/分钟通过 A 蛋白/G 蛋白柱 (Pierce, Cat.No 53133) 以从培养上清液纯化单克隆抗体。流动相包括 1X Pierce IgG 结合缓冲液 (Cat.No 21001) 和 0.1 M 甘氨酸 pH 2.7 (Pierce, Elution Buffer, Cat.No 21004)。用 1 M 磷酸盐缓冲液, pH 8.0, 对在 0.1 M 甘氨酸中的抗体收集物稀释 10%(v/v), 以中和上述 pH。合并 IgG₁ 收集物, 并相对于 1X PBS(Pierce Slide-A-Lyzer Cassette, 3,500 MWCO, Cat.No 66382)充分透析。利用 Centricon YM-3 (10,000 MWCO Amicon Cat.No 4203) 并通过在 2,500 rcf 下离心 1 小时来浓缩洗脱液。通过如上所述的定量 ELISA 并利用商用骨髓瘤 IgG₁ 贮存液作为标准来确定抗体浓度。通过 ELISA 并利用单克隆抗体同种型试剂盒 (Monoclonal Antibody Isotyping Kit, Sigma, ISO-2) 来确定 mAb 的重链类型。

5. 抗体变体与 S1P 的比较结合

下表 6 示出了突变体与嵌合抗体的比较分析。为了产生这些结果, 通过对于小鼠或人 IgG 特异的并共轭于 HRP 的二抗来检测结合的抗体。测量显色反应并报告为光密度 (OD)。抗体小组 (panel of antibody) 的浓度为 0.1 ug/ml。没有检测到二抗与仅涂布 S1P 的基质之间的相互作用。

表 6: 比较结合于嵌合抗 S1P 抗体的变体上的 S1P

可变域	突变	质粒	结合
	嵌合	pATH50+pATH10	1.5
HC	CysAla	pATH50+pATH11	2
	CysSer	pATH50+pATH12	0.6
	CysArg	pATH50+pATH14	0.4
	CysPhe	pATH50+pATH16	2
LC	MetLeu	pATH53+pATH10	1.6

6. 通过表面等离子体共振 (SPR) 来确定结合动力学

用 Biacore 2000 光学生物传感器 (Biacore AB, Uppsala Sweden) 收集所有结合数据。将 S1P 耦联于马来酰亚胺 CM5 传感器芯片。首先, 用 NHS/EDC 的等量混合物激活 CM5 芯片 7 分钟, 接着用乙二胺进行 7 分钟阻断步骤。接着, 使磺基-MBS(Pierce Co.) 以在 HBS 流动缓冲液 (10 mM HEPES、150 mM NaCl、0.005% p20、pH 7.4) 中的 0.5 mM 的浓度通过表面。将 S1P 稀释到 HBS 流动缓冲液中至 0.1 mM 的浓度并注射不同长度的时间, 以产生两种不同密度的 S1P 表面 (305 和 470 RU)。接着, 收集 mAb 的结合数据, 其中使用 3 倍稀释系列, 对于小鼠、201308、201309、以及 207308 抗体分别开始于 16.7 nM、50.0nM、50.0nM、16.7 nM、以及 16.7 nM。

重复试验每个浓度。用 50 mM NaOH 来再生表面。所有数据是在 25°C 下收集。利用参考表面以及空白注射来处理反应数据。将数据集 (来自两个表面的反应并且每种变体试验两次) 适合于相互作用模型以获得结合参数。利用 1:1 (小鼠) 或 1:2 (变体) 相互作用模型总体上拟合来自不同 mAb 浓度的数据, 以确定表观结合速率常数。圆括号内的数目表示在最后一位数的误差。

实施例 11: 与 S1P 的嵌合 mAb

如在本文中所使用的, 术语“嵌合”抗体 (或“免疫球蛋白”) 是指一种分子, 该分子包含重链和/或轻链, 其相同于或同源于在衍生自特定物种或属于特定抗体类或亚类的抗体中的对应序列, 而链的其余部分相同于或同源于在衍生自另一物种或属于另一抗体类或亚类的抗体中的对应序列, 以及上述抗体的片段, 只要它们呈现所期望的生物学活性 (Cabilly, et al., 上文; Morrison et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81 :6851 (1984))。

利用可变区 (Fv)，从包含人 IgG1 免疫球蛋白的 Fc 区的特定的杂交瘤细胞 (ATCC 安全保存保藏号 SD-5362) 产生与 S1P 的嵌合抗体，其中可变区(Fv)包含鼠抗体的活性 S1P 结合区。Fc 区包含人抗体的 CL、ChL、以及 Ch3 结构域。不局限于特定的方法，嵌合抗体还可以产生自人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、或 IgM 的 Fc 区。如那些本领域技术人员将明了的，可以通过拼接鼠抗 S1P mAb 的互补决定区 (CDR，例如，CDR1-4) 来产生“人源化”抗体，其中鼠抗 S1P mAb 包含人抗体骨架区 (例如，Fr1、Fr4 等)，如 IgG1 的骨架区。图 11 示出了在利用硫醇化 S1P 作为沉积材料的直接 ELISA 测量中嵌合的以及全小鼠 mAb 的结合。

对于图 11 所示的直接 ELISA 实验，与 S1P 的嵌合抗体具有与全小鼠单克隆抗体类似的结合特性。在结合缓冲液 (33.6mM Na₂CO₃、100mM NaHCO₃; pH 9.5) 中，并在 96 孔高结合 ELISA 平板 (Costar) 中实施 ELISA，其中平板涂布有 0.1 ug 化学合成的、共轭于 BSA 的硫醇化 S1P。在 ELISA 平板中，在 37°C 下温育硫醇化 S1P-BSA 一小时，或在 4°C 下温育过夜。然后用 PBS (137mM NaCl、2.68 mM KCl、10.14 mM Na₂HPO₄、1.76 mM KH₂PO₄; pH 7.4) 洗涤平板四次，接着在室温下用 PBST 阻断 1 小时。对于最初温育步骤，用在 PBST 中稀释的 25 μL 的 0.1 μg/mL 抗 S1P 单克隆抗体温育 75 uL 样品 (包含待测量的 S1P)，然后将其加入 ELISA 平板的孔中。在三个孔中对每个样品进行测试。在室温下温育 1 小时以后，用 PBS 洗涤 ELISA 平板四次，然后在室温下用 100 ul/孔的 0.1 ug/mL 的 HRP 羊抗鼠二抗 (Jackson Immunoresearch) 温育 1 小时。然后用 PBS 洗涤平板四次并暴露于四甲基联苯胺 (Sigma) 1-10 分钟。通过加入等容积的 1M H₂SO₄ 来终止检测反应。利用 EL-X-800 ELISA 平板读取器 (Bio-Tech) 在 450 nm 处进行测量以确定样品的光密度。

而且，测量免疫动物血清或产生抗体细胞如杂交瘤细胞的细胞条件培养基（例如，上清液）中的抗体滴度的优选方法涉及用靶配体（例如，S1P 的硫醇化类似物、LPA 等）涂布 ELISA 平板，其中该靶配体已共价连接于如 BSA 的蛋白质载体。

不受特定的方法或实施例的限制，可以相对于其它脂质靶如 LPA、PAF、神经酰胺、硫苷脂、脑苷脂、心磷脂、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、类花生酸、以及其它白三烯等来产生嵌合抗体。另外，如果需要的话，许多这些脂质还可以被糖基化和/或乙酰化。

实施例 12: 人源化抗 S1P 单克隆抗体 LT1009(Sonepcizumab)的产生和表征

已表明特异性地结合 S1P 的鼠抗 S1P 单克隆抗体 306D (LT1002; Sphingomab™) 可以在各种动物模型中有效地抑制血管发生和肿瘤生长。如下所述，利用序列同一性和同源性搜索将小鼠 CDR 拼接到其中的人骨架和用来指导某些骨架回复突变的计算机生成的模型来对 LT 1002 进行人源化。两种变体，HuMAbHCLC(LT 1004)（在轻链中具有 3 个回复突变）和 HuMAbHCLC₅ (LT 1006)（在轻链中具有 5 个回复突变），在纳摩尔范围内呈现结合亲和力。进行进一步的设计以努力改善人源化变体的生物物理特性和生物学特性。人源化变体 HuMAbHC_{CysAla}LC₃ (LT1007) 和 HuMAbHC_{CysAla}LC₅ (LT1009)，其中 HCDR2 中的游离半胱氨酸残基被丙氨酸替换，在皮摩尔范围内呈现结合亲和力。所有人源化变体在年龄相关性黄斑变性 (AMD) 的脉络膜新血管形成 (CNV) 模型中抑制血管发生，其中和亲代鼠抗体相比，HuMAbHC_{CysAla}LC₅ (LT1009) 呈现优越的稳定性和体内效力。变体 huMAbHC_{cysala}LC₅ (LT1009) 称作 Sonepcizumab™。

a. 用于抗 S1P 抗体的人源化设计

借助于 CDR 拼接来人源化小鼠 mAb LT1002 (Sphingomab™) 的可变结构域(Winter 美国专利第 5,225,539 号)。如 Kabat et al. 1991 所描述的, 基于序列高变性而鉴定 CDR 残基。

在此研究中, 基于利用结构序列对比程序 (SR v7.6) 在 IMGT 和 Kabat 数据库中进行的人抗体的同源性搜索来选择适宜的受体结构。最初步骤是分别用 LT 1002 VH 和 VL 蛋白质序列查询这些人重链可变 (VH) 和轻链可变 (VL) 序列数据库, 以鉴定在 FR 中、在 Vernier (Foote, J. & Winter, G. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol. Biol.* 224, 487-499 (1992))、Canonical (Morea, et al., Antibody modeling: implications for engineering and design, *Methods* 20, 267-279 (2000)) 以及 VH-VL 界面 (Chothia, C, Novotny J., Brucoleri, R., & Karplus, M. Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J Mol. Biol.* 186, 651-663 (1985)) 残基处具有高序列同一性以及具有相同标准类和/或长度的 CDR 的人骨架 (FR)。利用上述程序计算了此文库的每个成员与鼠抗体的单个序列对比残基的同一性。鉴定了那些人序列, 其具有大部分相同于小鼠 FR 的 FR 序列, 从而产生人“受体”序列的最初短清单。还计算了在微调 (Vernier)、标准 (Canonical) 以及 VH-VL 界面 (VCI) 残基处与鼠抗体具有最大同一性的那些序列。在人和小鼠之间在这些位置的差异分为保守取代和非保守取代, 从而最好的骨架选择将具有与 LT1002 的最少数目的非保守 VCI 差异。LT1002 的 CDR 环 L3 和 H1 可以分为典型结构。这些 L3 和 H1 结构用来选择具有相同典型结构的人抗体 FR。对于未分类的 CDR, 则试图选择具有相同于鼠抗体的 CDR 长度的人骨架。基本理由在于, CDR 环结构不仅取决于 CDR 环序列本身而且还取决于基础的骨架残基 (典型残

基)。因此,具有匹配的典型的 CDR 结构和/或 CDR 长度的人骨架可以以最合适的取向容纳拼接的小鼠 CDR,以保持抗原结合亲和力。对于除 CDR H3 之外的所有 CDR,这可以通过选择人骨架序列来实现。另外,在可能的情况下,排除具有异常半胱氨酸或脯氨酸残基的骨架。分别对重链和轻链序列进行这些计算。最后,在整个骨架区,比较了在最好匹配序列中的单个序列差异。在最合适上述比较计算的人抗体中,分别选择抗体 AY050707 和 AJ002773 作为轻链和重链的最合适的人骨架提供者。

第二步骤是产生 LT1002 的可变区的分子模型以及鉴定 FR 残基,其可能影响抗原结合但并不包括在 Vernier、Canonical 以及界面残基的组中。检查了拼接供体和受体可变结构域的许多结构特征,以更好地理解各种 FR 残基如何影响 CDR 环的构象,并且反之亦然。按照 Vernier 和 Canonical 定义(参见上文)鉴定了在 LT1002 中可能影响 CDR 的非保守 FR 残基,由此将人 FR 的若干残基恢复到原来的小鼠氨基酸(回复突变)。

b. 诱变

利用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Catalog #200524)在可变结构域序列内产生突变。用 50 ng 双链 DNA 模板、2.5 U 的 PfuUltre HF DNA 聚合酶和其相应的缓冲液 (Stratagene, Catalog #200524)、10 mM dNTP 混合物和 125 ng 每种再悬浮在 5 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中的诱变寡核苷酸、以及 0.1 mM EDTA 进行个别反应。在 95°C 下进行预变性 30 秒,接着进行 16 次扩增循环: 95°C 持续 30 秒, 55°C 持续 60 秒以及 68°C 持续 8 分钟。在温度循环以后,然后在 37°C 下借助于 DpnI 消化而消化最终反应 1 小时以除去甲基化亲代 DNA。将获得的突变体转化成感受态的 XLI-Blue 大肠杆菌并平皿培养在包含 50 µg/ml 氨苄西林的

LB-琼脂上。然后通过测序来检查集落。然后将每种突变体在 1 升摇瓶中培养并利用来自 Qiagen 的 EndoFree Plasmid Purification Kit (catalog#12362) 加以纯化。

c. 人源化抗体变体的生成

通过将 LT1002 的可变结构域克隆到载体来构建小鼠-人嵌合抗体 (chMAb S1P)，其中载体包含 κ 和重链的人恒定区以使全长抗体可以表达进入哺乳动物细胞。人源化重链的产生是 Kabat CDR1、2 以及 3 从 LT1002 V_H 拼接到 AJ002773 的受体骨架的结果。AJ002773 的最近的种系基因是 VH5-51，其前导序列被结合到人源化重链变体中作为前导序列。表 4 示出了 pATH200 的蛋白质序列、LT1002 V_H 的第一人源化变体，并具有 VH5-51 前导序列。在 LT1002 的 V_H 结构域的情况下，在位置 2、27、37、48、67 以及 69 处的残基是 Vernier 残基或在 V_H 和 V_L 结构域界面处的残基，由此可能影响 CDR 取向。位置 37 对于 V_H 和 V_L 结构域之间的界面似乎是关键的。在人骨架中在这些位置的残基与存在于相应位置的鼠残基发生回复突变。逐个地试验了突变 V37M、M48I 以及 Y27F。一种变体 (pATH205) 包含所有 3 种突变连同 V67A 加上 I69L，而另一种变体 (pATH206) 包含所有 5 种突变加上 V2A。

人源化轻链的产生是 Kabat CDR1、2 以及 3 从 LT1002 V_L 拼接进入 AY050707 的受体骨架的结果。AY050707 的最近的种系基因是 L11，其前导序列被结合到人源化轻链构建体中。pATF300 (LT1002 轻链) 的蛋白质和 DNA 序列分别是 SEQ ID NO: 17 和 28 (关于氨基酸序列，参见表 4)。在 V_L 的情况下，选择四个非保守 Vernier 位置 4、36、49、64 用于回复突变到鼠残基，因为它们参与支持 CDR 环的结构。LT1002 的分子模型的检查表明，Tyr 67 靠近 CDR 表面并取向于抗原结合平面并且能够与 S1P 相互作用。因此，将

S67Y 回复突变也加入到之后的人源化变体中。分别引入两种突变以产生包含 Y49S 或 Y36F 的两种变体。借助于突变的以下组合产生了若干变体：(Y49S, F4V)、(Y49S, Y36F)、(Y49S, Y36F, F4V)、(Y49S, G64S)、(Y49S, Y36F, F4V, G64S)、(Y49S, Y36F, F4V, G64S, S67Y)、(Y49S, G64S, S67Y)。

d. 人源化前导候选物的选择

将基本拼接本(basic grafted version)(pATH 200 和 pATH 300)和所有包含回复突变的变体的可变区克隆到包含人 V_H 或 V_L 恒定区的表达性载体中。在与嵌合(chMAb)抗体相同的条件下在哺乳动物细胞中产生所有人源化变体,然后通过 ELISA 试验与 S1P 的结合。对于人源化变体,产率为大约 10-20 mg/l,而对于 chMAb S1P,产率则为 0.3-0.5 mg/l。在还原条件下的 SDS-PAGE 揭示了在 25 kDa 和 50 kDa 处并具有高纯度(>98%)的两个条带,其与轻链和重链的预期质量一致。在非还原条件下观测到预期质量约为~150k 的单条带。在人源化抗体结合测定中使用 chMAb 作为标准,因为它包含与亲代鼠抗体相同的可变区并且携带与人源化抗体相同的恒定区,因而可以利用相同的 ELISA 试验规程加以检测。

最初的人源化抗体,其中将 6 个鼠 CDR 拼接到未突变的人骨架中,该抗体并不显示与 S1P 的任何可检测的结合(图 11)。包含 4 个回复突变(Y49S、Y36F、F4V 以及 G64S)的 κ 轻链,连同嵌合重链,呈现与 S1P 的次优结合(如通过 ELISA 测得的)。在位置 Y67 结合另外的突变可显著改善结合。包含回复突变 Y49S、Y36F、F4V、G64S 以及 S67Y 的变体 pATH308 以及包含回复突变 Y49S、G64S 以及 S67Y 的变体 pATH309,连同嵌合重链,均产生抗体,其与嵌合抗体类似地结合 S1P(如通过 ELISA 确定的)。从

S1P 结合的角度考虑，并不认为两个突变 Y36F 和 F4V 是回复突变所必需的。需要在 VL 骨架中设计 3 至 5 个回复突变以恢复活性。

Vernier 回复突变 V37M 连同嵌合轻链结合到重链的人骨架中，足以恢复类似于嵌合抗体的结合特性（图 11）。

总之，LT1002 V_H 结构域的人源化仅需要来自鼠类骨架序列的一个氨基酸，而鼠 V_L 骨架结构域，必须保留三个或五个鼠类残基以实现相当于鼠亲代 LT1002 的结合。

e. 人源化前导候选物的优化

鼠抗 S1P 抗体包含在重链的 CDR2 (Cys50) 中的游离半胱氨酸残基，其能够潜在地引起抗体分子的某种不稳定性。利用定点诱变，并通过用丙氨酸 (huMAbHCcysalaLC) (pATH207)、甘氨酸 (huMAbHCcysalaLC₃)、丝氨酸 (huMAbHCcysserLC₃)、以及苯丙氨酸 (huMAbHCcyspheLC₃) 来取代半胱氨酸残基从而产生 pATH201 的变体。还用包含 5 个回复突变 (huMAbHCcysalaLC₅=LT1009) 的人源化轻链 (pATH 308) 测试了半胱氨酸突变重链。将变体在哺乳动物细胞中表达，然后用一小组体外测定加以表征。重要的是，人源化变体的表达率显著高于 chMAb S1P。

f. 人源化前导候选物的深入表征

i. 特异性。相对于 S1P 和若干其它生物脂类，用竞争性 ELISA 测定测试了人源化变体的特异性（图 1）。这种测定具有便于表位作图的另外益处。人源化抗体 LT1009 表明对于鞘氨醇 (SPH)，S1P 的直接代谢前体，或 LPA (溶血磷脂酸) 没有交叉反应性，其中 LPA 是一种重要的胞外信号分子，其结构和功能上类似于 S1P。

此外, rhuMAb S1P 并不识别其它结构类似的脂质和代谢物, 包括神经酰胺 (CER)、神经酰胺-1-磷酸酯 (C1P)。然而, 正如所预期的, LT1009 确实与鞘氨醇磷酸胆碱 (SPC) 交叉反应, 鞘氨醇磷酸胆碱是一种脂质, 其中 S1P 的游离磷酸基团连接于胆碱残基。重要的是, 所有人源化变体呈现可与鼠抗体比较的特异性分布。

ii. 结合亲和力。如图 11 所示, IgG 结合于 S1P 涂布芯片的 Biacore 测量结果表明变体 LT1004 或 LT1006 在低纳摩尔范围内(类似于 chMAb S1P) 呈现结合亲和力。其中半胱氨酸残基被丙氨酸替换的人源化变体 LT1007 和 LT1009 在皮摩尔范围内呈现结合亲和力, 其类似于小鼠亲代 LT1002 (Sphingomab™)。

iii. 稳定性。在高温刺激以后, 测试人源化变体的稳定性。通过使上清液经受 60 至 74°C 的温度范围, 确定每种人源化变体的热解折叠转变温度 (T_M) 和适当的中点。这些温度的选择是基于在 50 和 80°C 之间的较宽温度范围内在热攻击以后针对鼠抗体分子所观测到的变性轮廓。在热攻击前后确定每种变体的结合性能。鼠抗体呈现 65°C 的 T_M 。和所有其它变体相比, 变体 huMAbHCcysalaLC₅ (LT 1009) 呈现优越的 T_M 。表 7 示出前导人源化候选物以及它们的特性。

表 7: 前导人源化 S1P mAb 候选物和表征

指出在重链和轻链中的突变数目。说明栏给出重链和轻链的同一性。

mAb	描述	重链中的突变		轻链中的突变		体外活性	
		CDR	骨架	CDR	骨架	结合亲和力 (K _{D1})	特异性 (ELISA)
LT1002	鼠类 mAb Sphingomab	N/A	N/A	N/A	N/A	0.026 ± 0.000 nM	高
LT1004	HuHCLC ₃ pATH201HC pATH309LC	0	1	0	3	1.060 ± 0.010 nM	高
LT1006	HuHCLC ₅ pATH201HC pATH308LC	0	1	0	5	0.690 ± 0.010 nM	高
LT1007	HuHCcysalaLC ₃ pATH207HC pATH309LC	1	1	0	3	0.0414 ± 0.0004 nM	
LT1009	HuHCcysalaLC ₅ pATH207HC pATH308LC	1	1	0	5	0.056 ± 0.001 nM	高

iv. 序列

如同天然存在的抗体一样，在每两个轻链多肽和每个重链多肽（其包含每种抗体分子）中 LT1009 包括三个互补决定区（每个“CDR”）。下面提供了这些 6 个 CDR 的每一个的氨基酸序列（“VL”表示免疫球蛋白轻链的可变区，而“VH”表示免疫球蛋白重链的可变区）：

CDR1 VL: ITTTDIDDDMN [SEQ ID NO: 10]

CDR2 VL: EGNILRP [SEQ ID NO: 11]

CDR3 VL: LQSDNLPFT [SEQ ID NO: 12]

CDR1 VH: DHTIH [SEQ ID NO: 13]

CDR3 VH: GGFYGSTIWFDF [SEQ ID NO: 15]

CDR2 VH: AISPRHDITKYNEMFRG [SEQ ID NO: 31]

LT1009 的重链和轻链多肽的核苷酸和氨基酸序列列于如下:

可变结构域的 LT1009 HC 氨基酸序列[SEQ ID NO: 32]:

```
1   mewswvflff lsvttgvhse vqlvqsgaev kkpgeslkis cqsfgyifid
51  htihwmrqmp gqglewmgai sprhditkyn emfrgqvttis adkssstayl
101 qwsslkasdt amyfcarggf ygstiwfdw  gggtmvtvss
```

可变结构域的 LT1009 LC 氨基酸序列[SEQ ID NO: 33]:

```
1   msvptqvlgl lllwltdarc ettvtqpspsf lsasvgdrvt itcitttdid
51  ddmnwfqqep gkapkllise gnilrpgvps rfsssgygtf fttisklqp
101 edfatyyclq sdnlpftfgq gtkleik
```

LT1009 HC 核苷酸序列[SEQ ID NO: 34]:

```

1   aagccttgcog ccaccatgga atggagetgg gtgttcctgt tctttctgtc
51  cgtgaccaca ggcgtgcatt ctgaggtgca gctgggtgcag tctggagcag
101 aggtgaaaaa gcccggggag tctctgaaga tctcctgtca gagttttgga
151 tacatcttta tcgaccatac tattcactgg atgcgccaga tgccccggca
201 aggcctggag tggatggggg ctattttctc cagacatgat attactaaat
251 acaatgagat gttcagggggc caggtcacca tctcagccga caagtccagc
301 agcaccgect acttgcagtg gagcagcctg aaggectcgg acaccgccat
351 gtattttctgt gcgagagggg ggttctacgg tagtactatc tggtttgact
401 tttggggcca agggacaatg gtcaccgtct cttcagcctc caccaagggc
451 ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac
501 agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg
551 tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccgct
601 gtectacagt cctcaggact ctactcctcc agcagcgtgg tgaccgtgcc
651 ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc
701 ccagcaacac caaggtggac aagagagttg gtgagaggcc agcacaggga
751 gggaggggtg ctgctggaag ccaggctcag cgctcctgcc tggacgcctc
801 ccggtatgc agtcccagtc cagggcagca aggcaggccc cgtctgcctc
851 ttcaccggga ggctctgtcc cgcctcctcc atgctcaggg agagggtctt
901 ctggcttttt ccccaggctc tgggcaggca caggetaggt gccctaacc
951 caggccctgc acacaaaggg gcaggtgctg ggctcagacc tgccaagagc
1001 catatccggg aggaccctgc cctgacctc agccccccc aaaggccaaa
1051 ctctccactc cctcagctcg gacacctct ctctcccag attccagtaa
1101 ctcccaatct tctctctgca gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca
1151 tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag gcctcgccct ccagctcaag
1201 gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag gccccagccg
1251 ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcactg aactcctggg
1301 gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga
1351 tctcccggac cctgaggtc acatgcgtgg tgggtggact gagccacgaa
1401 gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa
1451 tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg
1501 tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac
1551 aagtgcaagg tetccaacaa agcctccca gccccatcg agaaaacct
1601 ctccaaagcc aaaggtggga cccgtggggg gcgagggcca catggacaga
1651 ggccggctcg gccaccctc tgccctgaga gtgaccgctg taccaacctc
1701 tgteectaca gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat
1751 cccgggagga gatgaccaag aaccaggta gctgacctg cotgggtcaa
1801 ggcttctatc ccagcgacat cgcctgggag tgggagagca atgggcagcc
1851 ggagaacaac tacaagacca cgcctccctg gctggactcc gacggctcct
1901 tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg
1951 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac
2001 gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atag

```

LT1009 HC 氨基酸序列[SEQ ID NO: 35]:

```

1  mewswvflff lsvttgvhse vqlvqsgaev kkpgeslkis cqsfgyifid
51  htihwmrqmp gqglewmgai sprhditkyn emfrgqvttis adkssstayl
101 qwsslkasdt amyfcarggf ygstiwfdfw gqgtmvtvss astkgpsvfp
151 lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv htfpavlgss
201 glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvap ellggpsvfl
251 fppkpkdtlm isrtpevtcv vdvshedpe vkfnwyvdgv evhnaktkpr
301 eeqynstyrv vsvltvlhqd wlngkeykck vsnkalpapi ektiskakgq
351 prepqvylp psreemtknq vsltclvkgf ypsdiavewe sngqpennyk
401 ttpvldsdg sfflyskltv dksrwqqgnv fscsvmheal hnhytqksls
451 lspgk

```

LT1009 LC 核苷酸序列[SEQ ID NO: 36]:

```

1  aagcttgccg ccaccatgtc tgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct
51  gctgtggctg acagacgccc gctgtgaaac gacagtgacg cagtctccat
101 ccttctctgtc tgcattctgta ggagacagag tcaccatcac ttgcataacc
151 accactgata ttgatgatga tatgaactgg ttccagcagg aaccagggaa
201 agcccctaag ctctctgatct ccgaaggcaa tattcttctgt cctgggggtcc
251 catcaagatt cagcagcagt ggatatggca cagatttcac tctcaccatc
301 agcaaattgc agcctgaaga ttttgcaact tattactggt tgcagagtga
351 taacttacca ttcactttctg gccaaaggac caagctggag atcaaacgta
401 cgggtggctgc accatctgtc ttcattcttc cgccatctga tgagcagttg
451 aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag
501 agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa tggggtaact
551 cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc
601 agcagcacc cagcctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta
651 cgctgcgaa gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct
701 tcaacagggg agagtgttag

```

LT1009 LC 氨基酸序列[SEQ ID NO: 37]:

```

1  msvptqvlgl lllwltdarc ettvtqpspf lsasvgdrvt itcitttdid
51  ddmnwfqqep gkapkllise gnilrpgvps rfsssgygtf ftltisklqp
101 edfatyyclq sdnlpftfgg gtkleikrtv aapsvfifpp sdeqlksgta
151 svvcllnfy preakvqwkv dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt
201 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec

```

实施例 13: 人源化 S1P mAb 的生产和纯化

此实施例描述了重组人源化单克隆抗体 (LT1009; Sonepcizumab™) 的生产, 其高亲和力地结合于生物活性脂质鞘氨

醇-1-磷酸 (S1P)。LT1009 是全长 IgG1k 同种型抗体, 由两个相同的轻链和两个相同的重链组成, 并且总分子量为 150 kDa。重链包含 N 连接的糖基化位点。寡糖结构的特性还未确定, 但预计是具有核心岩藻糖的复合双触角结构。目前并不知道将占主导地位的糖型的特性。由于在重链的恒定结构域中存在赖氨酸残基, 预计会存在某种 C 端异质性。两个重链通过两个链间二硫键彼此共价耦联, 其与人 IgG1 的结构是一致的。

LT1009 最初来源于鼠单克隆抗体 (LT1002; Sphingomab™), 其是利用杂交瘤细胞所产生, 其中杂交瘤细胞产生自用 S1P 免疫的小鼠。鼠抗体的人源化涉及插入 6 个鼠 CDR 来代替人抗体骨架的 CDR, 其选用是基于与鼠亲代抗体的结构类似性。在骨架中进行了一系列取代以设计人源化抗体。这些取代称作回复突变并且用鼠残基代替人残基, 其中鼠残基在抗体与抗原的相互作用中具有重要作用。最后的人源化变体包含在重链的可变结构域的人骨架中的一个鼠回复突变和在轻链的可变结构域的人骨架中的五个鼠回复突变。此外, 在重链的 CDR#2 中存在的一个残基被替换为丙氨酸残基。这种取代显示可增加抗体分子的稳定性和潜能。

将人源化可变结构域克隆到 Lonza 的 GS 基因表达系统以产生质粒 pATH1009。该表达系统由携带抗体基因的恒定结构域的表达性载体和选择标记谷氨酰胺合成酶 (GS) 构成。GS 是负责从谷氨酸酯和氨生物合成谷氨酰胺的酶。携带抗体基因和选择标记的载体被转染到适合于在无血清培养基中生长的专有的中国仓鼠卵巢 (CHOK1SV) 宿主细胞系并为细胞在没有外源性谷氨酰胺的情况下的存活提供足够的谷氨酰胺。此外, 在培养基中补充特异性 GS 抑制剂, 蛋氨酸亚砷亚胺 (MSX), 以抑制内源性 GS 活性, 以致仅由载体提供的具有 GS 活性的细胞系可以存活。根据在有 MSX 存在的条件下在无谷氨酰胺培养基中的生长能力来选择转染细胞, 并

且依据活性 LT1009 的高水平分泌来选择分离株。然后产生用于毒理学研究和临床开发的材料，用于毒性和临床开发。

ATCC 保藏：包含 pATH1009 质粒的大肠杆菌 StB12 保藏在美国典型培养物保藏中心（American Type Culture Collection，保藏号 PTA-8421）。用 DNA 质粒 pATH1009 转染的 CHO 细胞系 LHI 275 也保藏在美国典型培养物保藏中心（American Type Culture Collection，保藏号 PTA-8422）。

实施例 14: 人源化 mAb 的制备

通常，生产过程涉及三个阶段：种子繁殖（seed train）、接种繁殖（inoculum train）、以及生产培养。所有阶段使用无血清试剂和低蛋白细胞培养生长培养基。为了引发种子繁殖，使用了来自工作细胞库的细胞；传代培养细胞每次三至四天并且在种子繁殖培养物规定时间以后，引发接种繁殖。非选择性培养基（无 MTX 培养基）优选用来扩大细胞，用于引入生产阶段。通过连续移种将细胞扩大进入增加容积的血管。在接种物繁殖的一定天数，引发生产阶段。在容积为 200L、400L、2000L、或 20000L 的生物反应器进行生产培养。以下描述生物反应器的一个实例。

生物反应器的实例：从 2 L 生物反应器的按比例增加将首先开始于 Applikon 15 L 搅拌槽，然后顺序地进行到 50 L 生物反应器、200 L 生物反应器并且最后是 2000 L 生物反应器（均建造成相同规模）。这些槽的特性如下：

制造商：ABEC, Inc.

按照 ASME, Section VIII Pressure Vessel Code 加以制造。接触表面是 316L SS。

底部偏置驱动，ABEC 设计

低剪切叶轮 316LSS, 抛光到 15-20 微英寸并钝化。直径约血管直径的 1/2。

控制: Allen Bradley Control Logic PLC, 具有 Versa 查看操作者界面。

搅拌: Allen Bradley 传感器, A-B PLC 控制输出, 用于 RPM 控制的 VFI。

温度: 双重控制 100 欧姆铂 RTD 传感器, A-B PLC 控制热、冷和蒸汽阀 w/循环泵。生物反应器为空的情况下, 自动消毒周期。

pH: Ingold 传感器, 凝胶填充, 可加压的, A-B PLC 控制 CO₂ 喷射。

溶解氧: Ingold 极谱电极传感器, A-B PLC 控制 O₂ 喷射。

空气和气体流量: 传感器是 Four Brooks Thermal Mass Flowmeters, 用于空气 O₂、N₂ 以及 CO₂ 喷射, 还提供 Brooks 热质量, 用于空气覆盖, A-B PLC 控制气体流量, 用于 pH 自动、DO 自动或手动控制通过 A-B PLC 的总气体流量。

容器压力: 传感器是 Rosemount 卫生膜片式传感器, 控制是传感器的 A-B PLC 控制, 其中使用背压控制阀。

可编程逻辑控制器(PLC): Allen Bradley Control Logix System, 当指示时, 用于过程的连续环控制。软件: PLC 编程是利用 Rockwell Software (Allen Bradley) RS Logix 5000。

人机界面(HMI): 局部操作员界面是 Allen Bradley HMI Verso View Industrial 计算机, 其具有集成 FPD/触摸屏输入, 以通过以太网与 PLC 通讯。软件是 Rockwell Software RS View 32。

生产过程的实例。

搅拌不锈钢生物反应器, 同时控制温度、溶解氧以及 pH。

确定接种密度，以获得最优产率。

通常使用无血清培养基。

通常使用分批补料过程。

通常具有温度变化。

在生物反应器中的培养持续时间预期是 8 至 14 天。

在规定收获时的生存力。

将通过过滤来澄清收获物。

在澄清以后并在纯化以前，收获物将被存储在 2-8°C。

实施例 15: 人源化 mAb 的大规模纯化

药物物质净化工艺通常由四个步骤构成：A 蛋白层析、阴离子交换层析（Q 琼脂糖凝胶）、阳离子交换层析（CM 琼脂糖凝胶）、以及超滤/渗滤（UF/DF）。亲和柱通常是收获和澄清后的第一步骤。该柱通常采用固定 A 蛋白树脂。亲和步骤可以相对于宿主细胞蛋白和 DNA 来纯化抗体。为了灭活潜在的病毒，洗脱液经常经受病毒灭活过程，接着是阴离子交换层析步骤，以减少宿主细胞蛋白、DNA、A 蛋白、以及潜在病毒。接着，阳离子交换层析步骤通常用来进一步减少残余量的宿主细胞蛋白和抗体聚集物。最后，对池进行渗滤并进一步浓缩。

典型的纯化工艺：

在 A 蛋白柱以前，可以对收获物进行浓缩和缓冲液交换。上述工艺的下一步骤是 A 蛋白柱亲和层析。用低 pH 值缓冲液对结合抗体进行洗脱。保持 A 蛋白洗脱液一段时间以灭活病毒。

上述工艺的下一步骤可以是在其中抗体产物流过而污染物如 DNA 和宿主细胞蛋白结合于树脂柱的条件下用 Q(+)柱进行离子交换层析。

上述工艺的下一步骤可以是在其中污染物流过柱的条件下用 S(-)柱进行第二离子交换层析。可以使用疏水相互作用柱步骤来代替 S(-)柱步骤。上述工艺的下一步骤可以是纳滤病毒清除步骤，其中使用 DV20 或 Planova 过滤器。产物流过过滤器。上述工艺的最后步骤是渗滤进入最后药物物质配制缓冲液并超滤以获得目标蛋白浓度。

实施例 16: 鼠抗 S1P 抗体的人源化变体的生物学活性

体外细胞测定

试验了在有化疗药物存在的条件下，人源化抗体改变肿瘤细胞存活的能力，如图 12 所示。将 SKOV3 肿瘤细胞暴露于泰素，一种化疗药物，通过激活凋亡执行剂，胱冬裂酶-3，其诱导肿瘤细胞死亡。与作为对照的未经处理的细胞相比，S1P 能够降低泰素诱导的胱冬裂酶-3 激活和/或细胞死亡。按照制造商的建议（Promega, Cat.No G7792）进行凋亡测定。简单地说，将 A549 细胞(2500 个细胞/孔)接种到 96 孔板并在处理以前允许生长至 80%汇合。然后用和不用 0.1-1 μM 紫杉醇（Sigma, Cat.No T 7409）、0.1-1 μM S1P 以及 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗 S1P mAb，并在 McCoy 培养基中，处理细胞 48 小时。48 以后，将胱冬裂酶测定缓冲液加入细胞。通过 Apo-One Homogeneous Caspase-3/7 Assay 试剂盒（Promega, Cat.No G7792）并按照制造商的议定书，测得在上清液中的胱冬裂酶-3 活性。胱冬裂酶-3/7 活性表示为相对于经赋形剂处理的细胞的荧光信号的倍数增加。

在有 S1P 存在的条件下, 抗 S1P mAb 的加入增加了胱冬裂酶-3 激活, 这提示抗体对 S1P 的选择性吸收消除了 S1P 的保护性抗凋亡效应。和 LT1002 相比, 人源化抗体变体, huMAbHCLC₃ (LT1004) 和 huMAbHCLC₅ (LT1006), 均呈现优越的活性。同时, 试验了所有变体对从癌细胞的 S1P 诱导的细胞因子释放的影响。已知 S1P 会诱发 IL-8 从癌细胞显著释放进入细胞条件培养基。小鼠对照抗 S1P mAb 的加入以浓度依赖性方式减少从卵巢癌细胞的 IL-8 释放。和 HuMAbHCLC₃ (LT1004) 和 huMAbHCLC₅ (LT1006) 相比, 两种人源化变体 huMAbHCcysalaLC₃(LT1007)和 huMAbHCcysalaLC₅ (LT1009) 呈现 IL-8 释放的更大减少。

实施例 17: 在新血管形成的动物模型中, 鼠 mAb(Sphingomab)与人源化 mAb (Sonpcizumab) 的体内效力

脉络膜新血管形成 (CNV) 是指在眼中来自脉络膜的新血管通过布鲁赫膜的破碎而生长进入视网膜下色素上皮 (sub-RPE) 或视网膜下腔隙。CNV 是黄斑变性和其它眼病症中视觉损失的主要原因。在此实施例中, CNV 的小鼠模型用来相对于 S1P 对 mAb 进行评估。

在 AMD 的 CNV 动物模型中比较了人源化抗体变体和鼠抗体的抑制新血管形成的能力, 如图 13 所示。通过玻璃体内给予, 两次 (第 0 天和第 6 天) 给予小鼠 0.5 ug 的鼠 (Mu; LT1002)、人源化变体 [LC3 (LT1004)、LC5 (LT1006)、HCcysLC3 (LT1007) 以及 HCcysLC5 (LT1009)] 或非特异性 mAb (NS), 然后受到布鲁赫膜的激光破裂。激光外科手术后第 14 天处死小鼠。用含水缓冲液 (PBS) 或同种型配对的非特异性抗体治疗对照小鼠。如通过测量 CNV 面积所评估的, 三种人源化变体对血管发生的抑制基本上等效于鼠抗体。CNV 病变容积表示为平均值 \pm SEM。在轻链中包

含5个回复突变以及在重链的CDR2中包含半胱氨酸突变的人源化变体(huMAbHCcysLC₅; LT1009)显著地抑制新血管形成。这种差异是高度统计上显著的。

为了诱导CNV,用在无菌盐水中的氯胺酮(14 mg/kg)和赛拉嗪(30 mg/kg)的混合物以5 μ L/20 g体重的剂量腹腔内给予来麻醉小鼠。然后用各一滴眼用托吡卡胺(0.5%)和去氧肾上腺素(2.5%)来扩张它们的瞳孔。然后用连接于裂隙灯(用来递送150 mW的100毫秒脉冲,光斑大小为50 μ m)的氩绿眼用激光器(Oculight GL 532 nm, Iridex Corporation, Mountain View, CA)在右眼的三个象限(大约位于离视盘50 μ m处并在相对的9、12以及3点钟的位置)破裂布鲁赫膜。在所有情况下,左眼作为未损伤对照。

形态计量和容积CNV病变的测量如下。激光诱导CNV两周后,通过过量的氯胺酮-赛拉嗪混合物使动物安乐死,然后借助于心脏穿刺并用在PBS中6 ml 4%多聚甲醛, pH 7.5(固定液)进行全身灌注,如先前所描述的(Sengupta et al, 2003)。然后将眼摘除,用27g针并在缘后面1 mm处穿刺,并在室温下浸没在固定液中1小时,然后通过浸没在PBS中30分钟加以洗涤2X。然后将眼切开以分离后节,其由视网膜色素上皮、脉络膜毛细血管层以及巩膜构成。然后渗透此组织并与罗丹明共轭蓖麻凝集素I(Vector Laboratories, Burlingame, CA)进行反应以检测CNV病变,如先前所描述的(Sengupta et al, 2003; Sengupta et al, 2005)。然后后尖被切割成4-7个径向切片,并扁平安放在含有一滴Vectashield抗褪色介质(Vector Laboratories, Burlingame, VT)的显微镜载玻片上,用于通过落射荧光Zeiss Axioplan 2(带有RGB Spot高分辨率数码相机)和激光扫描共聚焦显微镜(BioRad MRC 1024, BioRad Corporation, Temecula, CA)进行数字图像采集。

利用 ImageJ 软件 (Research Services Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD) 对捕获的数字图像进行形态计量评价。图像被分成分开的 RGB 通道, 用于分析红色和绿色通道如下: 1) 进行用于特定物镜和显微镜的校准以设置像素与长度之比; 2) 利用 Otsu 算法施加阈值; 3) 图像将被制成二值的; 4) 画出感兴趣区域 (ROI) 的轮廓以包括整个病变区; 5) 进行颗粒分析以量化在 ROI 内在阈值水平以上的像素面积。对于容量分析, 方法类似于上述方法, 不同之处在于使用了 z 系列捕获。然后在整个 z 系列的病变区的总和乘以 z 厚度 (通常为 4 μm) 以获得病变容积。

用此模型试验的药物产品是 LT1002 (相对于 S1P 的小鼠 mAb; Sphingomab™); LT1004 (人源化 mAb)、LT1006 (人源化 mAb)、LT1007 (人源化 mAb) 以及 LT1009 (人源化 mAb; Sonpcizumab™)。还包括盐水赋形剂和非特异性抗体 (NSA) 对照。如图 13 所示, 小鼠 mAb LT1002 (Sphingomab™) 和人源化 mAb LT1009 (Sonpcizumab™) 在 CNV 的此小鼠模型中均显著使病变的大小减小。所有试验的 mAbs 都显示大约 80-98% 的病变大小的减小, 在所有情况下, 其都是显著的 ($p < 0.001$, 相对于盐水)。此外, 和非特异性抗体对照相比, LT1007 和 LT1009 还显示显著的抑制 ($p < 0.05$)。病变大小的抑制百分比对于 LT1002 (小鼠) 大约为 80%, 对于 LT1004 (人源化) 为 82%, 对于 LT1006 为 81% 以及对于 LT1009 为 99%。因此, 在新血管形成的此体内模型中, LT1009 是最具有活性的人源化 mAb 变体。

实施例 18: Sonpcizumab 剂量反应的确定

在布鲁赫膜的激光诱导破裂前一天, 小鼠 ($n=10$) 接受单次、双侧玻璃体内注射逐步增加剂量的 sonpcizumab (0.05、0.5、1.0 或 3.0 $\mu\text{g}/\text{眼}$) 或高剂量非特异性 (NS) 抗体 (3.0 $\mu\text{g}/\text{眼}$)。激光破

裂后 14 天，小鼠被麻醉并灌注荧光素标记右旋糖酐，然后制得脉络膜扁平封装，用于分析 CNV 病变大小。

在此研究中，利用量化 CNV 面积的另一种得到验证的方法（其中在处死前动物被灌注荧光素标记右旋糖酐）检查了 sonpcizumab 剂量和剂量间隔对 CNV 抑制的影响。Sonepcizumab 诱导 CNV 面积的剂量依赖性减少，在 3.0 $\mu\text{g}/\text{眼}$ 的剂量下，产生约 50% 的最大抑制。这种减小是显著的（ $p < 0.0001$ ，和非特异性抗体对照相比，使用非配对 t 检验）。在用药频率研究中，在用 Sonepcizumab 治疗的组之间，在 14 天研究期间在单时间点（第 0 天）或在多个时间点（第 0 天和第 7 天），观测到类似效力。

用 Sonepcizumab 治疗（3.0 $\mu\text{g}/\text{眼}$ ）所看到的大约 50% 的最大抑制有利地相比于先前用相同模型和由相同研究者所发表的数据，其表明通过 VEGF-Trap（4.92 $\mu\text{g}/\text{眼}$ ）可以减小 CNV 面积。Saishin, et al. *J Cell Physiol*, 2003. 195(2): p.241-8。“Traps”（Regeneron Pharmaceuticals, Inc.）是两种不同受体成分和抗体分子的 Fc 区（称作 Fc 区）之间的融合并且 Regeneron 正寻求 VEGF-Trap 用于眼部疾病和癌症。上述两项独立研究的比较揭示了，通过 Sonepcizumab 所获得的 CNV 病变大小的减小比用 VEGF-Trap 所观测到的高 20 个百分点。因此，这些数据不仅证实我们的初步调查结果（在 CNV 的小鼠模型中抗 S1P 疗法减少病变形成的能力），而且它们证明了人源化抗体，sonepcizumab，抑制 CNV 病变形成的增加的效力，并且提供了对抗渗效果的深入了解。

实施例 19: 在早产儿视网膜病的小鼠模型中 Sonepcizumab 在减少视网膜新血管形成的发展方面的效力

在降生的第 7 天将 C57BL/6 小鼠（ $n=7$ ）放置在 75% 氧气中，以及在降生的第 12 天恢复为室内的空气，并在一只眼中眼内注射 3

μg 的 sonpcizumab 而在对侧眼给予赋形剂。在第 17 天，小鼠接受眼内注射标记有 FITC 的抗 PECAM 抗体，并在 8 小时以后，使小鼠安乐死，将眼摘除并在室温下固定在 PBS 缓冲的福尔马林中 5 小时。切开视网膜并用含有 0.25% Triton X-100 的磷酸缓冲盐溶液洗涤，然后全部封固。用 Nikon Fluorescence Microscope 观察载玻片并通过图像分析来测量视网膜 NV 的面积/视网膜。

与在小鼠激光破裂模型中所观测到的 CNV 的减小一致，我们还观察到在早产儿视网膜病 (ROP) 的小鼠模型中 CNV 的显著减小。与盐水对照相比，玻璃体内给予 Sonpcizumab ($3.0 \mu\text{g}/\text{眼}$) 导致视网膜新血管形成减小大约 4 倍。这些数据证实了在视网膜和脉络膜血管床中 sonpcizumab 抑制病理性眼部血管发生的效力 (不论是否经由缺血或布鲁赫膜的破裂所诱导)。

实施例 20: 在基质膜栓测定中 Sonpcizumab 对 VEGF-诱导血管发生的影响

利用如在 Staton, et al, Int J Exp Pathol, 2004. 85(5): p.233-48 中所描述的 GFR 基质膜栓测定进行体内新血管形成。在 4-6 周龄 nu/nu 小鼠的左肋腹注射 500 μL 冰冷的 GFR 基质膜。仅注射 GFR 基质膜 (对照) 或在添加补充有 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 肝素的 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ VEGF 以后注射 GFR 基质膜。组包括用于对照和 sonpcizumab 治疗的 3 只动物。在植入 GFR 基质膜前一天用盐水或 sonpcizumab ($10\text{mg}/\text{kg}$) 治疗动物，并在实验期间每 72 小时 i.p. 给予剂量。在 12 天以后，处死动物；将栓切除并立即固定在没有锌和福尔马林的固定液中过夜，包埋在石蜡中并切片 (5 μm)。然后石蜡包埋的切片被染色用于 CD31 (PharMingen)。通过数码相机以 20x 放大率获取图像 (9 个图像/切片, 3 个切片/栓)，然后通过 PhotoShop 6.0 程序量化 CD31 正染色并通过 ImageJ 表示为血管发生得分 (像素²)。

在此基质膜栓测定中 sonopizumab 的抗血管形成效应是明显的。如预期的，在补充有 10ug/ml VEGF 的基质膜栓中诱导了广泛新血管形成(大约是在缺少 VEGF 或 sonopizumab 的未治疗对照中所看到的 5.75 倍)。重要的是，在基质膜注射前，用 sonopizumab 进行的全身 i.p.治疗可防止几乎 80%的这种 VEGF 刺激的细胞结构和微血管密度的增加。这种减小是显著的 ($p < 0.05$, 和单独的 VEGF 相比)并且证实了当全身给予动物时 sonopizumab 的有效的抗血管生成活性以及强烈提示 sonopizumab 能够显著抑制 VEGF 诱导的血管发生。此发现是与来自 Lpath 的肿瘤研究计划的数据一致的，其中在小鼠原位乳腺癌模型中 S1P 抗体降低了若干生血管因子(包括 VEGF)的血清水平。

与 AMD 有关的血管生长的主要成分是周细胞的征集，其鞘化和支持生长的内皮管。Jo, et al., Am J Pathol, 2006. 168(6): p.2036-53。转基因小鼠研究已表明，VEGF 和 PDGF-B 是主要因子，其刺激周细胞的浸润和分化，从而导致血管成熟和稳定。Guo, et al., Am J Pathol, 2003. 162(4): p.1083-93; Benjamin, L.E., I. Hemo, and E. Keshet, Development, 1998. 125(9): p.1591-8。重要的是，S1P 促进 VEGF 和 PDGF 的反式激活。因此，sonopizumab 间接中和这些生长因子的能力提示 sonopizumab 可以在 AMD 期间防止异常的血管生长。

实施例 21: Sonopizumab 显著减少布鲁赫膜的激光破裂以后的血管渗漏

用布鲁赫膜的激光破裂的小鼠模型评价了给予用来抑制血管渗漏(除如上所述抑制新血管形成之外)的 sonopizumab 的效力。

在每只眼的 3 个位置 C57BL/6 小鼠 ($n=10$) 经受布鲁赫膜的激光破裂并在一只眼中眼内注射 3 μg 的 sonopizumab 而在对侧眼中

则眼内注射赋形剂。在激光破裂后一周，对小鼠腹腔内注射 12 $\mu\text{l/g}$ 体重的 1% 荧光素钠并在 5 分钟以后被安乐死。将眼除去并在室温下固定在 PBS 缓冲的福尔马林中 5 小时。然后切开视网膜，洗涤，并用一级抗 PECAM-1 加以温育。然后洗涤视网膜，用二抗（羊抗鼠 IgG，共轭于罗丹明）温育，接着扁平封固。

通过 PECAM-1 染色来测量 CNV 病变面积。通过荧光素钠染色来测量血管渗漏的量。从 CNV 的渗漏总面积 = CNV + 渗漏（绿色） - CNV 面积（红色）。数值表示 $n=10$ 小鼠/组的平均值 \pm SEM。脉络膜新血管形成（由 PECAM-1 染色）的面积对于用 LT1009 治疗的动物大约是 0.015mm^2 ，而对于经盐水治疗的对照动物则大约是 0.03mm^2 。这是新血管形成减少 50%（ $p=0.018$ ）。从脉络膜新血管形成（用荧光素染色）的渗漏面积对于用 LT1009 治疗的动物大约是 0.125mm^2 ，而对于经盐水治疗的对照动物则大约是 0.2mm^2 。这是血管渗漏的大约 38% 的减小（ $p=0.017$ ）。

在用 $3.0\text{ }\mu\text{g/眼}$ 的 Sonpcizumab 或 PBS 对照治疗的小鼠中，脉络膜新血管形成和血管渗漏的减小的典型的免疫组织化学图像是与这些结果一致的。因此，除减少 CNV 之外，sonpcizumab 还显著减小布鲁赫膜视网膜水肿的激光破裂以后的血管渗漏，其在视力损失中具有主要作用，并且与下述有关：(i) 在 AMD 中的脉络膜新血管系统渗漏(ii) 在糖尿病中血视网膜屏障的击穿。Gerhardt, H. and C. Betsholtz, *Cell Tissue Res*, 2003. 314(1): p.15-23. Sonpcizumab 可以减少眼中病理性血管形成以及导致视网膜水肿的血管渗漏。这些发现是与从 CNV 面积量化实验所产生的数据一致的，其中小鼠被灌注荧光素标记的右旋糖酐。借助于这种方法的 CNV 量化确实受到血管通透性的影响。这些高度有利的结果支持在脉络膜血管床中的抗渗效果。鉴于这些数据，我们认为 sonpcizumab 具有作为单药

治疗的潜力。还存在与目前的泛 VEGF-A 阻断剂的协同效应的可能性。

实施例 22: 在用相对于 S1P 的抗体进行治疗以后, 减小在视网膜中的巨噬细胞浸润

年龄相关性黄斑变性 (AMD) 是一种与老化有关的疾病, 其中老化会逐渐破坏敏锐的、中央视觉。存在两种主要类型的黄斑变性。干燥或萎缩形式, 其占 AMD 病例的 85-90%, 而 AMD 的湿形式的特点在于异常血管的生长。当黄色斑点 (称作玻璃疣) 开始积累自来自日益恶化组织 (主要在黄斑区域) 的沉积物或碎片时, 则诊断为干黄斑变性。可以发生逐步中央视力减退。对于 AMD 的最流行的萎缩性 (干) 形式, 目前没有有效的治疗方法。萎缩性 AMD 是由视网膜色素上皮 (RPE) 的异常所触发, 其中视网膜色素上皮位于感光细胞的下面并且通常向这些感光细胞提供关键的代谢支持。继发于 RPE 功能障碍, 黄斑棒和视锥会退化, 从而导致不可逆转的视力丧失。氧化应激、缺血、玻璃疣的形成、脂褐素的蓄积、局部炎症以及反应性胶质增生是涉及萎缩性 AMD 的发病机制的病理性过程。在这些过程中, 炎症成为组织损伤的关键促成因素。巨噬细胞浸润进入干 AMD 患者的黄斑已证明是破坏性炎性应答的重要组成部分。因此, 可以缓和巨噬细胞浸润的制剂将是有价值的治疗剂, 因为巨噬细胞浸润的抑制将可能减少黄斑组织损伤。这样的制剂还可以降低干 AMD 转化成湿 AMD 的速率。

在缺血性和炎性视网膜病变的模型中, 现已证明, 在用抗 S1P 抗体治疗以后, 可以抑制巨噬细胞浸润 55%。这些数据是利用已很好确立的小鼠氧诱导视网膜病变模型 (还称作早产儿视网膜病 (ROP) 模型) 所产生。具体来说, 在生活的第 7 天将 C57BL/6 小鼠放置在 75% 氧气中, 以及在生活的第 12 天被恢复到房间空气,

并在一只眼中眼内注射 3 μg 的人源化抗 S1P 抗体 (LT1009, Sonepcizumab™) 而在对侧眼中给予赋形剂。在生活的第 17 天, 小鼠接受眼内注射相对于 F4/80 (泛巨噬细胞标记) 的 FITC 标记的抗体, 并在 8 小时以后, 使小鼠安乐死。将眼球除去并在室温下固定在 PBS 缓冲的福尔马林中 5 小时。切开视网膜并用含有 0.25% Triton X-100 的磷酸缓冲盐溶液洗涤, 然后全部封固。用 Nikon Fluorescence Microscope 观察载玻片并量化视网膜巨噬细胞。结果示在以下的表 8 中。

表 8: 通过用相对于 S1P 的人源化单克隆抗体进行处理来减小视网膜中的巨噬细胞浸润

巨噬细胞的数目/视网膜		巨噬细胞密度的减小%	
盐水对照	S1P 抗体	盐水对照	S1P 抗体
2513 \pm 115	1136 \pm 33	100 \pm 0.5	55.4 \pm 1.3
P<0.001		P<0.0001	

基于这些数据和巨噬细胞在干 AMD 的发病机制中的已知作用, 认为抗 S1P 抗体是用于治疗干 AMD 的有效治疗剂。

实施例 23: 在裸 NCr 小鼠中 SC COLO205 结肠直肠肿瘤异种拼接对用 25-75 mg/kg LT1009 (单独以及连同阿瓦斯汀或紫杉醇) 治疗的反应

此研究的目的是确定 LT1009 (单独和连同其它抗癌剂) 延缓人结肠直肠 (COLO205) 癌肿瘤进展的效力, 其中上述癌肿瘤是皮下(sc)拼接的并且确立在雌性 Ncr (nu/nu) 小鼠中。

在右胁腹附近, 从体内通道, 裸鼠被 sc 植入一段/小鼠的 COLO 205 肿瘤。当在每项实验中 60 只小鼠的确立的肿瘤大小为大约 100 至 200 mm³ 的当天, 开始所有治疗。然后用 25 mg/kg 的 LT1009、50 mg/kg 的 LT1009、40 mg/kg 阿瓦斯汀、50 mg/kg 的 LT1009 加上

40 mg/kg 阿瓦斯汀、15 mg/kg 紫杉醇或赋形剂(盐水)对小鼠(n=10/组)进行治疗。在实验期间每三天 ip 给予 25 或 50 mg/kg LT 1009 和盐水一次,容积为 0.1 mL/20 g 体重。基于 q7d 计划表,以 40 mg/kg/剂量的剂量 iv 给予阿瓦斯汀,注射容积为 0.1 mL/20 g 体重。基于 qld x 5 计划表,以 15 mg/kg/剂量的剂量 iv 给予紫杉醇(阳性对照),注射容积为 0.1 mL/10 g 体重。在第 21 天,在研究期间,将 25 mg/kg LT1009 的剂量增加到 75 mg/kg LT1009。

每天观测动物的死亡率。从治疗的第一天开始并且包括研究终止日,每周两次收集肿瘤尺寸和体重。当在每项研究中用赋形剂治疗的对照组中的正中肿瘤达到大约 4,000 mg 时,终止研究。收获来自每只动物的肿瘤,记录湿重,对肿瘤进行处理,以通过 CD-31 染色来确定微血管密度(MVD)。利用用于椭球的方程($l \times w^2$)/2=mm³来计算肿瘤重量(mg),其中 l 和 w 是指在每次测量时收集的更大和更小尺寸并且假设单位密度(1 mm³=1 mg)。

表 9: 发现的数值总结-Colo205

治疗	最终肿瘤重量(mg)	和赋形剂治疗小鼠相比,减小%
赋形剂	3047.25	-
50 mg/kg LT1009	2071.17	32%
25/75 mg/kg LT1009	2465.60	20%
阿瓦斯汀	1967.90	35%
阿瓦斯汀+50 mg/kg LT1009	1614.40	48%
紫杉醇	0	100%

如通过最终肿瘤重量所测得的,当和来自盐水治疗动物的肿瘤相比时,50 mg/kg LT1009 显著抑制肿瘤进展($p < 0.018$),为 32%。25/75 mg/kg LT1009 也有效降低最终肿瘤重量 20%;然而,这种降低并不是统计显著的。50 mg/kg LT1009 和阿瓦斯汀一样有效降低

最终肿瘤重量（分别为降低 32%和 35%）。LT1009 和阿瓦斯汀的组合比任何单独的制剂更有效，并显示当和盐水治疗动物相比时肿瘤重量减少 48%。因此，LT1009 和阿瓦斯汀的效应似乎是累积的。阳性对照，紫杉醇，完全消除了预先确定的肿瘤。

实施例 24: 在裸 NCr 小鼠中 SC HT29 结肠直肠肿瘤异种拼接对用 50 mg/kg LT1009（单独以及连同阿瓦斯汀和 5-FU）所进行治疗的反应

此研究的目的是相对于 sc 植入雌性无胸腺 HCr-nu/nu 小鼠中的人 HT29 结肠肿瘤异种拼接评估 LT1009（单独和连同其它抗癌剂）的抗肿瘤效力。

在右肋腹附近，从体内通道，裸鼠被 sc 植入一段/小鼠的 HT29 肿瘤。当在每项实验中 60 只小鼠的确立的肿瘤大小为大约 100 至 200 mm³ 的当天，开始所有治疗。每治疗组有 10 只小鼠。在实验期间每两天 ip 给予 50 mg/kg LT 1009 和盐水一次，容积为 0.1 mL/20 g 体重。q4d，以 75 mg/kg/剂量和 20 mg/kg/剂量的的剂量分别 ip 和 iv 给予 75 mg/kg 5-FU 和 20 mg/kg 阿瓦斯汀，注射容积为 0.1 mL/10 g 体重。LT1009 的首次剂量包括 iv 给予的 100 mg/kg。

每天观测动物的死亡率。从治疗的第一天开始并且包括研究终止日，每周两次收集肿瘤尺寸和体重。当在每项研究中用赋形剂治疗的对照组中的正中肿瘤达到大约 4,000 mg 时，终止研究。收获来自每只动物的肿瘤，记录湿重，对肿瘤进行处理，以通过 CD-31 染色来确定 MVD。利用用于椭球的方程 $(l \times w^2)/2 = \text{mm}^3$ 来计算肿瘤重量 (mg)，其中 l 和 w 是指在每次测量时收集的更大和更小尺寸并且假设单位密度 ($1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ mg}$)。

表 10: 最终肿瘤重量-HT29

治疗	最终肿瘤重量 (mg)	显著性(p 值)	和赋形剂治疗 小鼠相比, 减小 %
赋形剂	2723.67	-	-
LT1009	2390.63	1.00	13%
阿瓦斯汀	1927.44	0.39	30%
LT1009+阿瓦 斯汀	1624.90	0.001	41%
5-FU	1963.71	0.099	28%
LT1009+5-FU	1948.00	0.049	29%

如通过肿瘤重量所测得的, 当和来自盐水治疗动物的肿瘤比较时, 50 mg/kg LT1009 会降低肿瘤进展 13%, 而阿瓦斯汀降低肿瘤重量 30%。LT1009 和阿瓦斯汀的组合比任何单独的制剂更有效, 并显示当和盐水治疗动物相比时肿瘤重量统计显著地减少 41%。用 5-FU 进行的治疗降低了肿瘤重量 28%。5-FU 显示最小累积效应, 其中 LT1009 显示抑制最终肿瘤重量 29%。

实施例 25: 在裸 NCr 小鼠中, SC DU145 前列腺肿瘤异种拼接对用 50 mg/kg LT1009 (单独或连同阿瓦斯汀或紫杉醇) 所进行治疗的反应

此研究的目的是确定 LT1009 (单独和连同其它抗癌剂) 延缓人前列腺 (DU145) 癌肿瘤进展的效力, 其中上述癌肿瘤是皮下(sc) 拼接的并建立在雌性 Ncr (nu/nu) 小鼠中。

在右肋腹附近, 从体内通道, 裸鼠被 sc 植入一段/小鼠的 DU145 肿瘤。当在每项实验中 60 只小鼠的确立的肿瘤大小为大约 100 至 200 mm³ 的当天, 开始所有治疗。然后用 50 mg/kg 的 LT1009、20 mg/kg 阿瓦斯汀、7.5 mg/kg 紫杉醇、50 mg/kg 的 LT1009 加上 20 mg/kg 阿瓦斯汀、50 mg/kg 的 LT1009 加上 7.5 mg/kg 紫杉醇或赋形

剂（盐水）来治疗小鼠（n=10/组）。在实验期间，ip 给予 50 mg/kg 的 LT1009 和盐水，q2d，容积为 0.1 mL/20 g 体重。以 7.5 mg/kg/剂量和 20 mg/kg/剂量的剂量，分别 qld x5 和 q4d，iv 和 ip 给予紫杉醇和阿瓦斯汀，注射容积为 0.1 mL/10 g 体重。LT1009 的首次剂量包括 iv 给予的 100 mg/kg。

在研究期间，通过测量在三个轴向的 sc 肿瘤并计算容积来监测肿瘤生长。在研究结束时，确定最终肿瘤重量和容积，然后处死小鼠，并收获肿瘤。然后通过 CD-31 染色来确定肿瘤的微血管密度 (MVD)。

表 11: 发现的数值总结-DU145

治疗	最终肿瘤重量 (mg)	显著性(p 值)	和赋形剂治疗小鼠相比, 减小 %
赋形剂	2703	-	-
LT1009	2242	0.00	28%
阿瓦斯汀	578	0.00	79%
LT1009+阿瓦斯汀	676	0.00	75%
紫杉醇	539	0.00	80%
LT1009+紫杉醇	373	0.00	84%

如通过最终肿瘤重量所测得的，50 mg/kg 的 LT1009 显著 ($p<0.00$) 降低肿瘤进展 28%。当和来自盐水治疗动物的肿瘤相比时，阿瓦斯汀和紫杉醇也显著 ($p<0.00$) 降低最终肿瘤重量 80%。LT1009 并不显著增加阿瓦斯汀或紫杉醇的抗肿瘤活性，如通过最终肿瘤容积所测得的。

实施例 26: 在 CB17 SCID 小鼠中，RPMI 8226 骨髓瘤肿瘤异种拼接对用 25 mg/kg 或 50 mg/kg 的 LT1009（单独和连同 Bortezomib）所进行治疗的反应

此研究的目的是相对于 sc 植入在雌性 CB 17 SCID 小鼠中的人 RPMI 人骨髓瘤肿瘤异种拼接评估 LT1009（单独和连同抗癌剂 Bortezomib）的抗肿瘤效力。

裸鼠（CB 17 SCID，4-5 周龄，重量 18-22 g，雌性小鼠，获自 Harlan）被 sc 注射收获自组织培养物的 RPMI 8226 细胞（ $\sim 1 \times 10^7$ 个细胞/小鼠）。当肿瘤生长到大约 100 mm^3 的大小时，通过肿瘤大小动物被配对成治疗和对照组（10 只小鼠/组）。在配对后的第 1 天开始初次给药。对于所有组的动物，是按重量给药（0.01 ml/g; 10 ml/kg）。通过腹腔内（IP）注射来给予赋形剂中的 LT1009，每三天一次，直到研究结束（Q3D 至结束）。通过经由尾静脉的静脉注射来给予 Bortezomib，每三天一次，共 6 次治疗（Q3Dx6）。为了用作阴性对照，按照 Q3D 至结束的计划表，IP 给予 LT1009 赋形剂（0.9% 盐水）。

开始于第 1 天，每周两次记录个体和组的平均肿瘤容积 \pm SEM，直到研究完成。在研究完成时，报道每组的最终平均肿瘤容积 \pm SEM；按照这些计算结果，检查经受部分或完全肿瘤消退的动物或经受技术或药物相关死亡的动物。

表 12: 最终肿瘤容积-RPMI

治疗	最终肿瘤重量(mg)	和赋形剂治疗小鼠相比, 减小%
赋形剂	2083	0
Bortezomib	1664	20%
25 mg/kg LT1009	1860	11%
50 mg/kg LT1009	1978	5%
50 mg/kg LT1009 +Bortezomib	1832	12%

* * *

依据本文披露的内容，可以制备和实施本文描述和要求的所有组合物和方法而无需过度的实验。虽然已参照优选实施方式描述了本发明的组合物和方法，但本领域技术人员将明了，可以对组合物和方法作出一些变化。对本领域技术人员来说显而易见的所有这样的类似替代和改进被认为是在如由所附权利要求所限定的本发明的精神和范围内。

在本说明书中提及的所有专利、专利申请、以及出版物表明与本发明有关领域的技术人员的水平。所有专利、专利申请、以及出版物（包括对其要求优先权或另外益处的那些专利、专利申请、以及出版物）以引用方式结合于本文。

可以在没有本文未具体描述的任何要素的条件下适当地实施本发明。因此，例如，在本文的每种情况下，任何术语“包含”、“基本上包括”、以及“包括”可以与其它两个术语的任何一个替换。已采用的术语和措辞是用作描述性而不是限制性术语，并且在使用这样的术语和措辞时并不排除所显示和描述特点的任何等效物或其部分，而是应当明了在本发明的范围内各种改进是可能的。因此，应当明了，虽然已通过优选实施方式具体披露了本发明，但本领域技术人员可以利用本文所披露构想的可选的特点、改进和变化，并且这样的改进和变化被认为是在如由所附权利要求所限定的本发明的范围内。

<110> 勒帕斯公司

<120> 用于结合鞘氨醇-1-磷酸的组合物和方法

<130> P25749BTLG

<140> PCT/US2007/082647

<141> 2007-10-26

<150> 60/854,971

<151> 2006-10-27

<160> 37

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 1

atggratgga gckggrtctt tmtctt

26

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 2

cagtggatag acagatgggg g 21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 3

cagtggatag accgatgggg c 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 4

cagtggatag actgatgggg g 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 5

caagggatag acagatgggg c 21

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 6

gtctctgatt ctaggca

18

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 7

actggatggt gggaagatgg

20

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 8

Gln Ala His Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Ile Phe Ile Asp His

Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Thr Thr Asp Ile Asp Asp Asp
 20 25 30

Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45

Ser Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Leu Phe Thr Ile Glu Asn Met Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 10

Ile Thr Thr Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met Asn
 1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 11

Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 12

Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 13

Asp His Thr Ile His

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 14

Cys Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe Arg
 1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 15

Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Thr Ile Trp Phe Asp Phe
 1 5 10

<210> 16

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠抗体可变结构域

<400> 16

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

Val Cys Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Ser Phe Gly Tyr Ile Phe
 35 40 45

Ile Asp His Thr Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Cys Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Met Phe Arg Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Thr Ile Trp Phe Asp
 115 120 125

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser
 145

<210> 17

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠抗体可变结构域

<400> 17

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Thr
 35 40 45

Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Glu Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Lys Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
 100 105 110

Ser Asp Asn Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Glu Trp Ile Pro

130

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠_mAb CDR核苷酸序列

<400> 18

ataaccacca ctgatattga tgatgatatg aac

33

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠_mAb CDR核苷酸序列

<400> 19

gaaggcaata ttcttcgtcc t

21

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠_mAb CDR核苷酸序列

<400> 20

ttgcagagtg ataacttacc attcacg

27

<210> 21

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠mAb CDR核苷酸序列

<400> 21

gaccatactt cac

13

<210> 22

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠mAb CDR核苷酸序列

<400> 22

tgtatttctc ccagacatga tattactaaa tacaatgaga tgttcagggg c

51

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠mAb CDR核苷酸序列

<400> 23

ggggggttct acggtagtac tatctggttt gacttt

36

<210> 24
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> 人源化鼠mAb CDR核苷酸序列

 <400> 24
 ggggggttct acggtagtac tatctggttt gacttt 36

 <210> 25
 <211> 455
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> 人源化鼠mAb核苷酸序列

 <400> 25
 cgccaagctt gccgccacca tggggtcaac cgccatcctc gccctcctcc tggctgttct 60

 ccaaggagtc tgttccgagg tgcagctggt gcagtctgga gcagaggatga aaaagcccgg 120

 ggagtctctg aagatctcct gtcagagttt tggatacatc tttatcgacc atacttcaact 180

 ggggtgcgcca gatgcccggg caaggcctgg agtggatgtg tatttctccc agacatgata 240

 ttactaaata caatgagatg ttcaggggcc aggtcaccaat ctcagccgac aagtccagca 300

 gcaccgccta cttgcagtgg agcagcctga aggcctcggga caccgcatg tatttctgtg 360

 cgagaggggg gttctacggt agtactatct ggtttgactt ttggggccaa gggacaatgg 420

 tcaccgtctc ttcagcctcc accaagggcc catcg 455

<210> 26

<211> 452

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠mAb核苷酸序列

<400> 26

cgccaagctt gccgccacca tggggtcaac cgccatcctc gccctcctcc tggctgttct 60

ccaaggagtc tgttccgagg tgcagctggt gcagtctgga gcagaggta aaaagcccgg 120

ggagtctctg aagatctcct gtcagagttt tggatacacc gaccatactt cactggatgc 180

gccagatgcc cgggcaaggc ctggagtgga tgggggctat ttctcccaga catgatatta 240

ctaaatacaa tgagatgttc aggggccagg tcaccatctc agccgacaag tccagcagca 300

ccgcctactt gcagtgagc agcctgaagg cctcggacac cgccatgtat ttctgtgcga 360

gaggggggtt ctacggtagt actatctggt ttgacttttg gggccaaggg acaatgggtca 420

ccgtctcttc agcctccacc aagggcccat cg 452

<210> 27

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠mAb序列

<400> 27

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

1 5 10 15

 Val Cys Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

 Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Ser Phe Gly Tyr Ile Phe
 35 40 45

 Ile Asp His Thr Ile His Trp Met Arg Gln Met Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

 Glu Trp Met Gly Ala Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn
 65 70 75 80

 Glu Met Phe Arg Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

 Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
 100 105 110

 Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Thr Ile Trp Phe Asp
 115 120 125

 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

 Gly Pro Ser
 145

<210> 28

<211> 419

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠mAb序列

<400> 28

cgccaagctt gccccacca tggacatgag ggtccccgct cagctcctgg ggctcctgct 60

gctctggctc ccagggtgcca gatgtgaaac gacactcacg cagtctccat ccttctctgc 120

tgcactctgta ggagacagag tcaccatcac ataaccacca ctgatattga tgatgatatg 180

aactggtatc agcaggaacc agggaaagcc cctaagctcc tgatctatga aggcaatatt 240

cttcgtcctg gggctccatc aaggttcagc ggcagtgat ctggcacaga tttcactctc 300

accatcagca aattgcagcc tgaagatttt gcaacttatt actgtttgca gaggataaac 360

ttaccattca cgttcggcca agggaccaag ctggagatca aacgtgagtg gatccccgct 419

<210> 29

<211> 407

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠mAb序列

<400> 29

cgccaagctt gccccacca tggacatgag ggtccccgct cagctcctgg ggctcctgct 60

gctctggctc ccaggggcca gatgtgaaac gacagtgcag cagtctccat ccttctctgc 120

tgcacatgta ggagacagag tcaccatcac ttgcataacc accactgata ttgatgatga 180
 tatgaactgg ttccagcagg aaccagggaa agcccctaag ctctgatct ccgaaggcaa 240
 tattcttcgt cctggggctcc catcaagatt cagcagcagt ggatatggca cagatttcac 300
 tctcaccatc agcaaattgc agcctgaaga ttttgcaact tattactggt tgcagagtga 360
 taacttacca ttcactttcg gccaaaggac caagctggag atcaaac 407

<210> 30

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠mAb序列

<400> 30

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Thr Thr Asp
 35 40 45

Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Phe Gln Glu Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 50 55 60

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠mAb序列

<400> 32

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Ser Phe Gly Tyr Ile Phe
 35 40 45

Ile Asp His Thr Ile His Trp Met Arg Gln Met Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Ala Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Met Phe Arg Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Thr Ile Trp Phe Asp
 115 120 125

Lys Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp
 100 105 110

Asn Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 34

<211> 2034

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠mAb序列

<400> 34

aagcttgccg ccacatgga atggagctgg gtgttcctgt tctttctgtc cgtgaccaca 60
 ggcggtgcatt ctgaggtgca gctggtgcag tctggagcag aggtgaaaaa gcccggggag 120
 tctctgaaga tctcctgtca gagttttgga tacatcttta tcgaccatac tattcactgg 180
 atgcgccaga tgccccggca aggcctggag tggatggggg ctatttctcc cagacatgat 240
 attactaaat acaatgagat gttcaggggc caggtcacca tctcagccga caagtccagc 300
 agcaccgcct acttgcagtg gagcagcctg aaggcctcgg acaccgcat gtatttctgt 360
 gcgagagggg ggttctacgg tagtactatc tggtttgact tttggggcca agggacaatg 420
 gtcaccgtct cttcagcctc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctctcc 480
 aagagcacct ctgggggcac agcggcctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
 ccggtgacgg tgtctgtaa ctcaggccc ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgct 600

gtcctacagt cctcaggact ctactcctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc	660
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac	720
aagagagttg gtgagaggcc agcacaggga gggagggtgt ctgctggaag ccaggctcag	780
cgctcctgcc tggacgcac cggctatgc agtcccagtc cagggcagca aggcaggccc	840
cgtctgcctc ttaccccgga ggcctctgcc cgccccactc atgctcaggg agagggtctt	900
ctggcttttt ccccaggctc tgggcaggca caggctaggt gccctaacc caggccctgc	960
acacaaaggg gcaggtgctg ggctcagacc tgccaagagc catatccggg aggacctgc	1020
ccctgaccta agccccccc aaaggccaaa ctctccactc cctcagctcg gacacctct	1080
ctctccag attccagtaa ctccaatct tctctctgca gagcccaat ctgtgacaa	1140
aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag gcctcgcct ccagctcaag	1200
gctggacagg tgccctagag tagcctgcat ccaggacag gccccagccg ggtgctgaca	1260
ctccacctc catctcttc tcagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct	1320
tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac cctgaggtc acatgcgtg	1380
tgtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagtcaa ctggtacgtg gacggcgtg	1440
aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcagc tacctgttg	1500
tcagctcct caccgtctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtcaagg	1560
tctccaaca agcctccca gccccatcg agaaaacct ctccaagcc aaagtgga	1620
cccgtgggt gcgaggcca catggacaga ggccggctcg gccaccctc tgccctgaga	1680

gtgaccgctg taccaacctc tgtccctaca gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1740

ctgccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtea gcctgacctg cctggtcaaa 1800

ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1860

tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta tagcaagctc 1920

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1980

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atag 2034

<210> 35

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠mAb序列

<400> 35

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Ser Phe Gly Tyr Ile Phe

35 40 45

Ile Asp His Thr Ile His Trp Met Arg Gln Met Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Ala Pro
 225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 36

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠mAb序列

<400> 36

aagcttgccg ccaccatgtc tgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct gctgtggctg 60

acagacgccc gctgtgaaac gacagtgacg cagtctccat ccttcctgtc tgcattctgta 120

ggagacagag tcacatcac ttgcataacc accactgata ttgatgatga tatgaactgg 180

ttccagcagg aaccagggaa agcccctaag ctccctgatct ccgaaggcaa tattcttcgt 240

cctggggtcc catcaagatt cagcagcagt ggatatggca cagatttcac tctcaccatc 300

agcaaattgc agcctgaaga ttttgcaact tattactggt tgcagagtga taacttacca 360

ttcactttcg gccaaaggac caagctggag atcaaacgta cggctggctgc accatctgtc 420

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgcctccaa 540

tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600

agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 660

gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 37

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 人源化鼠mAb序列

<400> 37

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser

20	25	30
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Thr Thr Asp		
35	40	45
Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Phe Gln Gln Glu Pro Gly Lys Ala Pro		
50	55	60
Lys Leu Leu Ile Ser Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser		
65	70	75
Arg Phe Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
85	90	95
Lys Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp		
100	105	110
Asn Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
115	120	125
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
130	135	140
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
145	150	155
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
165	170	175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

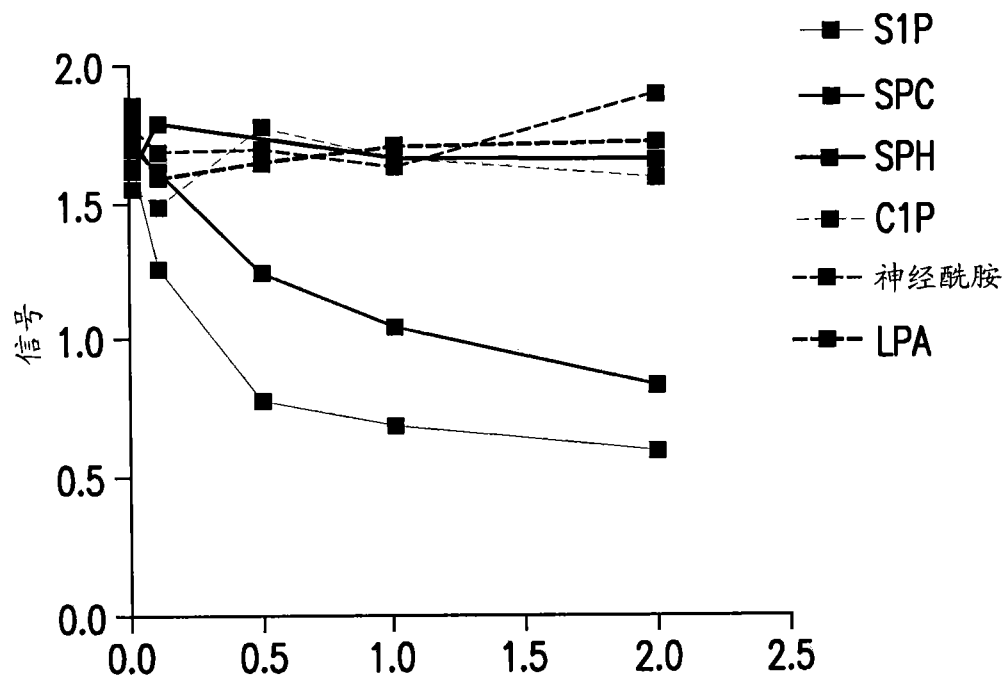


图 1A

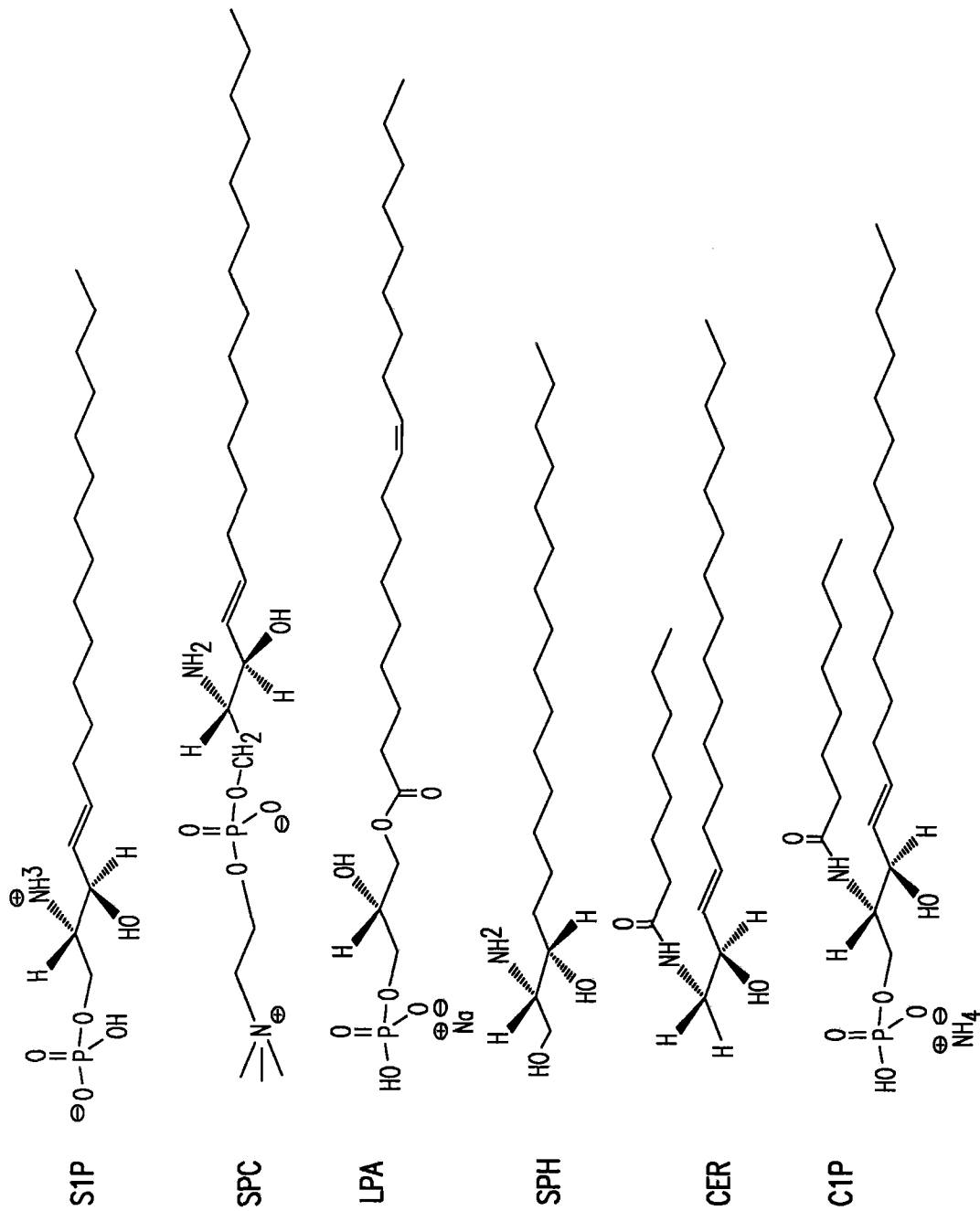


图 1B

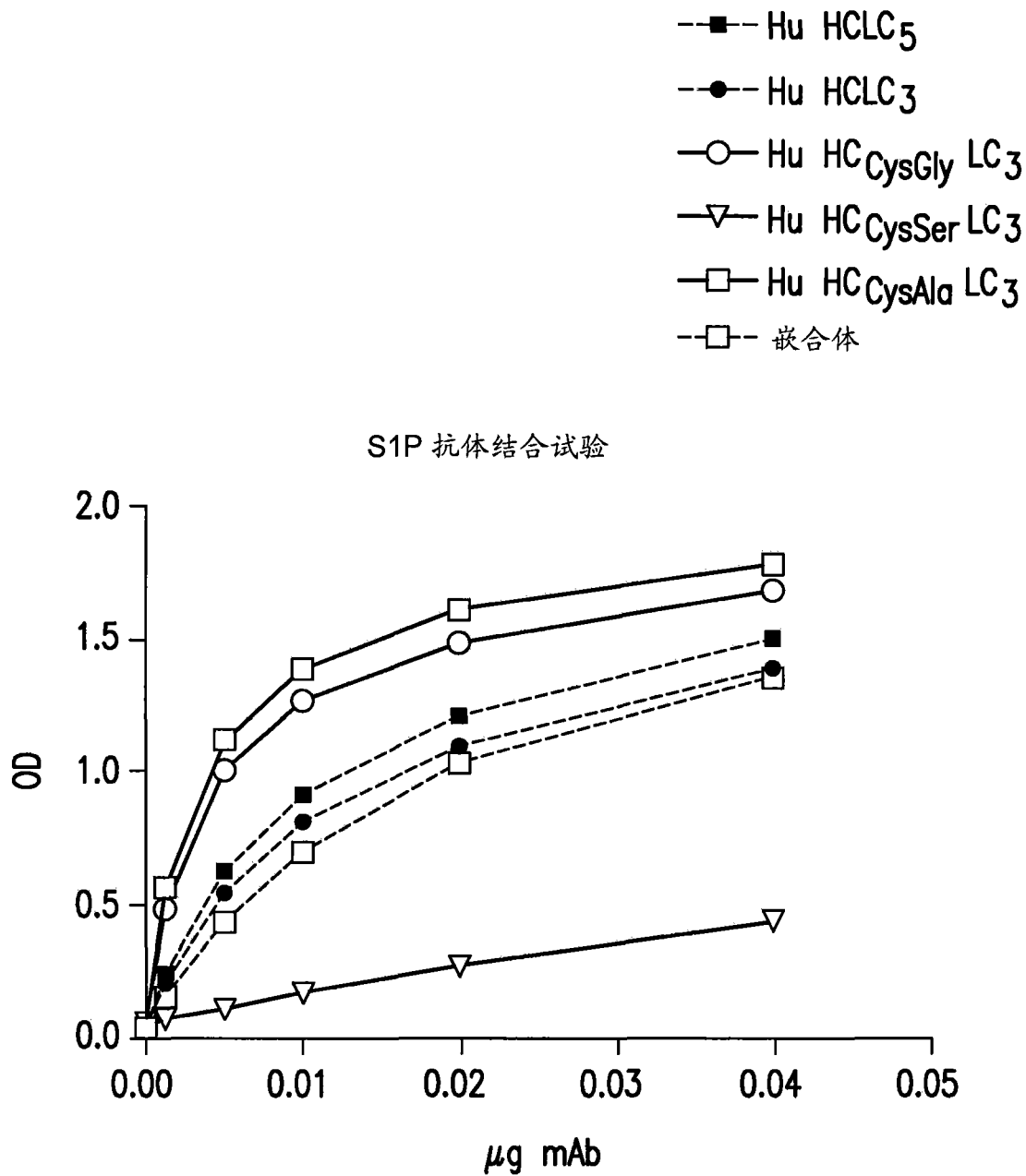


图 2

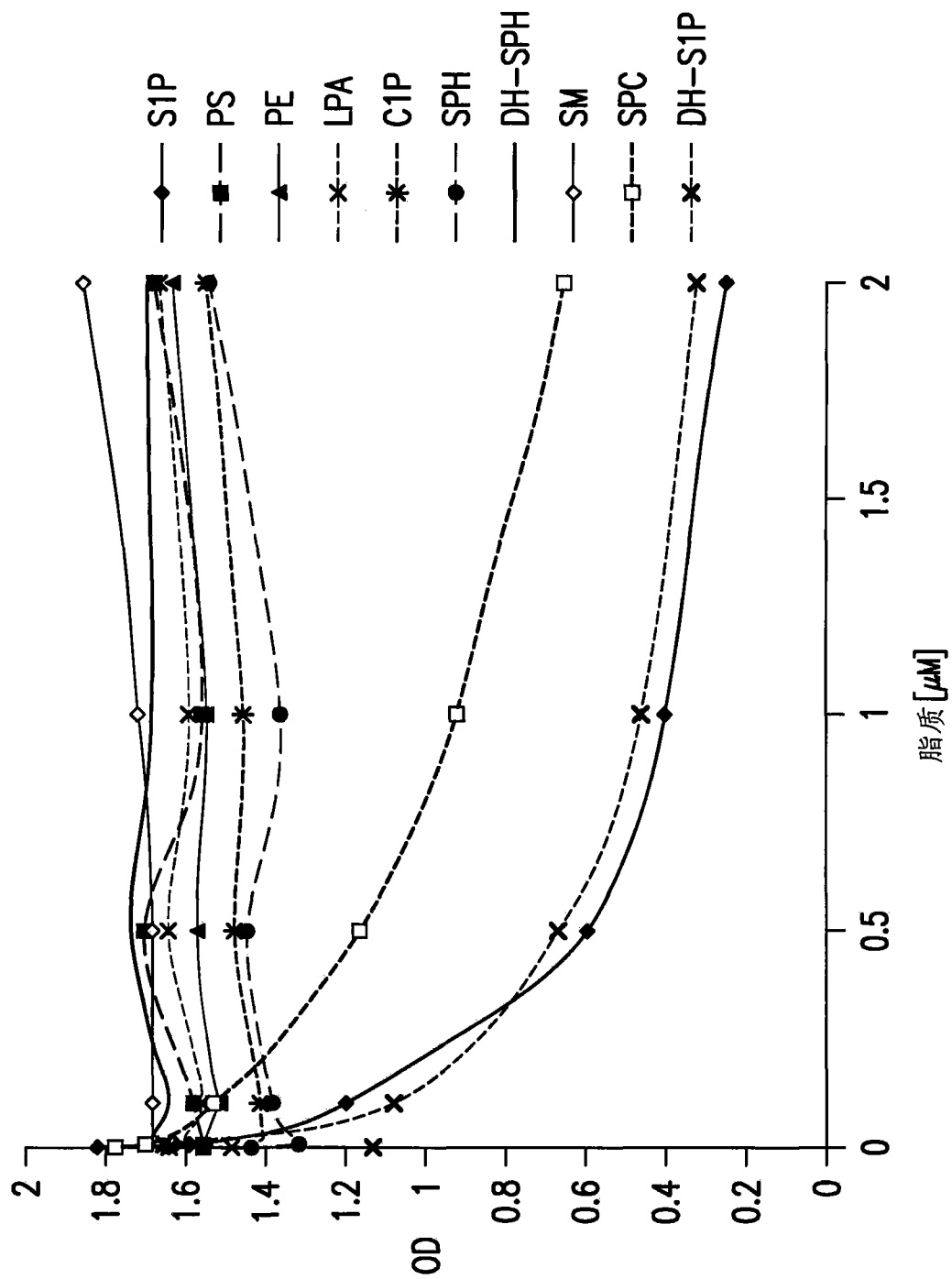


图 3

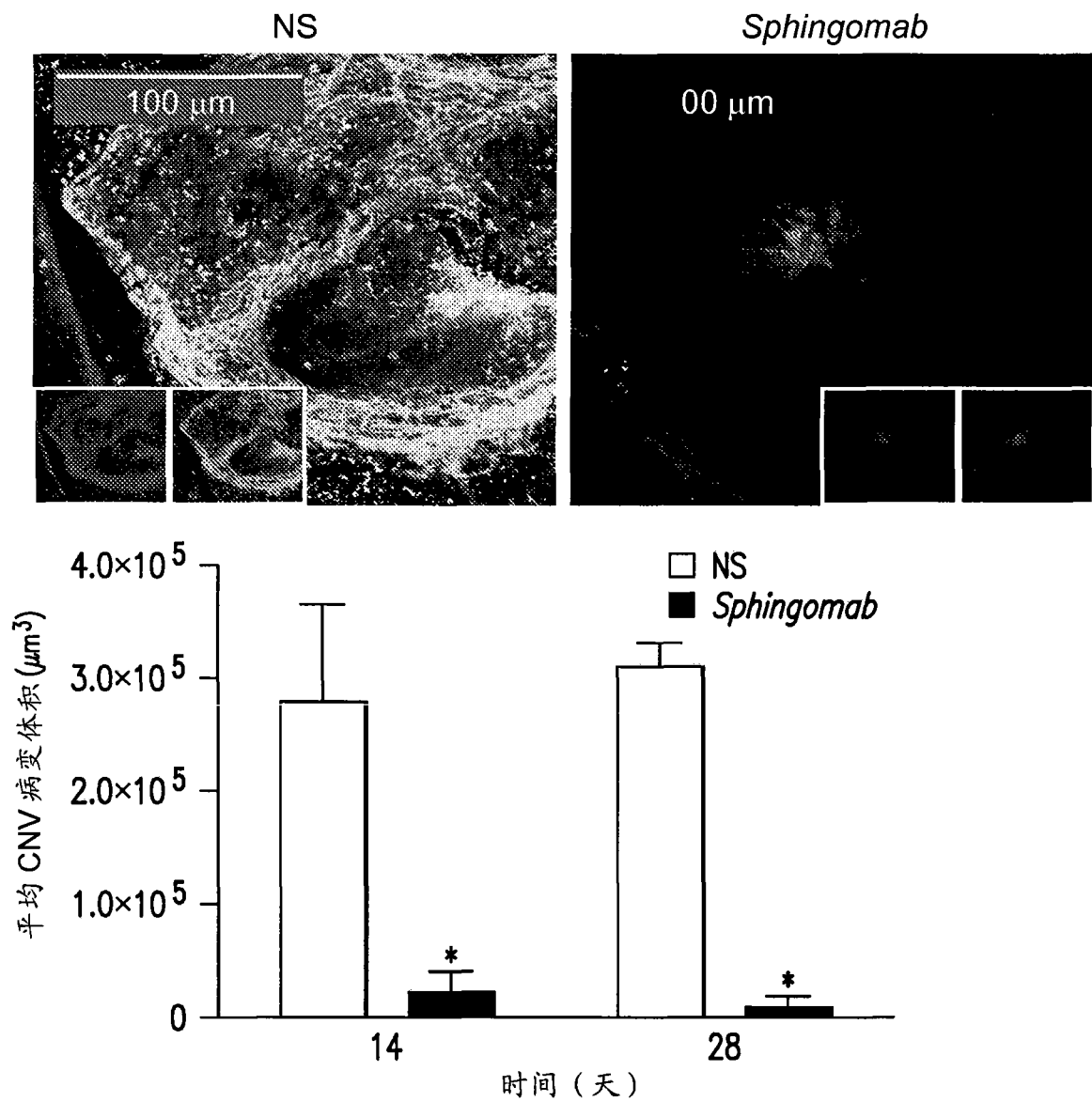


图 4A

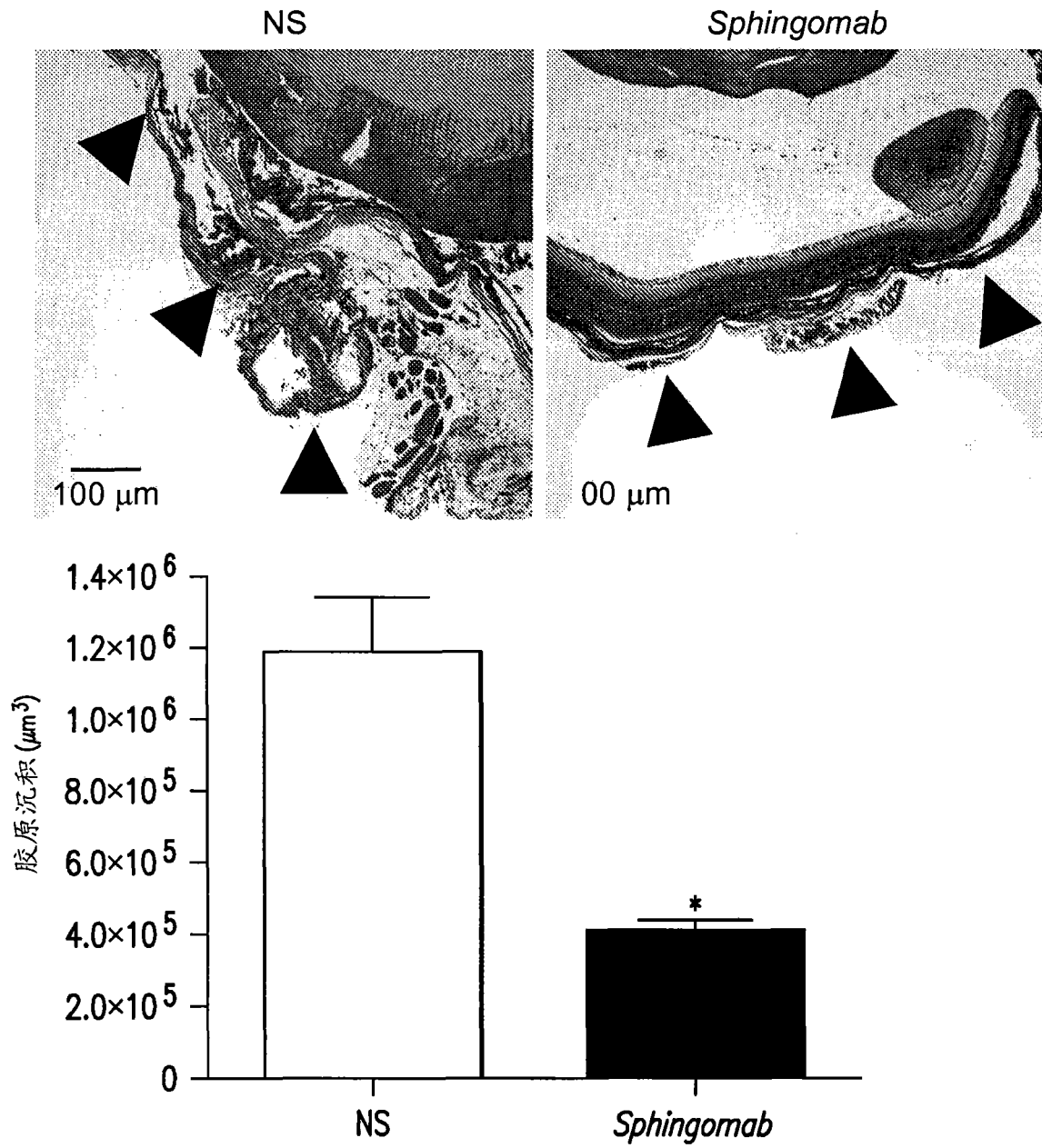


图 4B

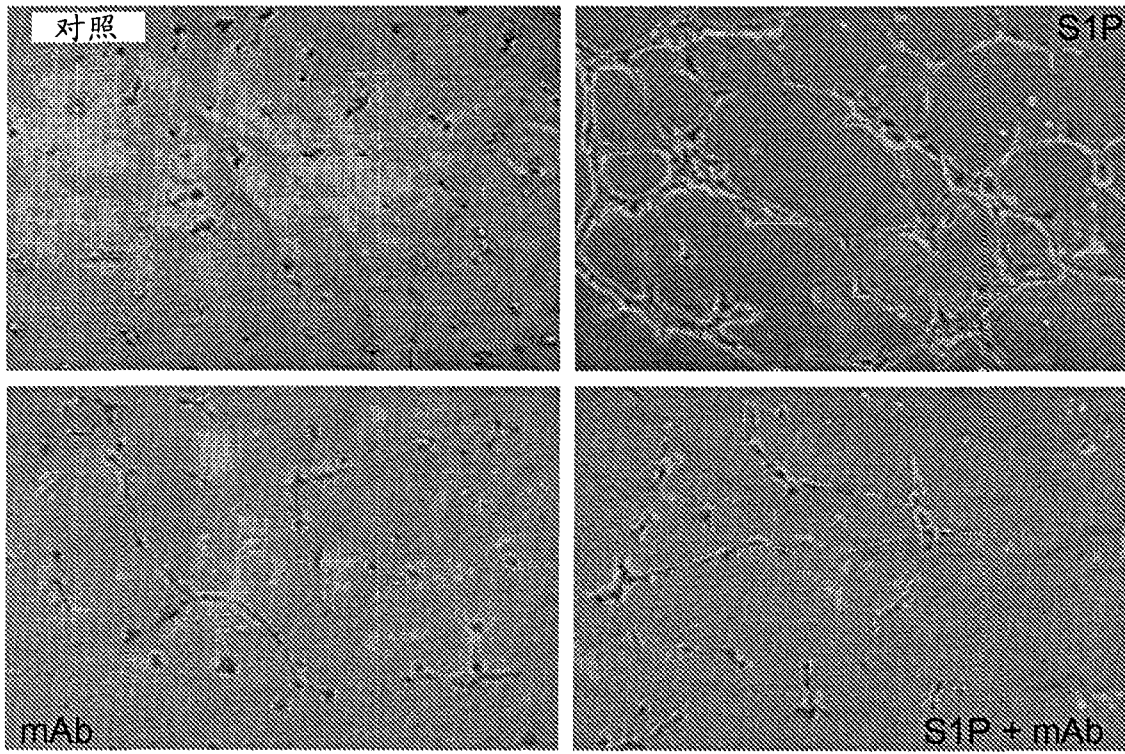


图 5A

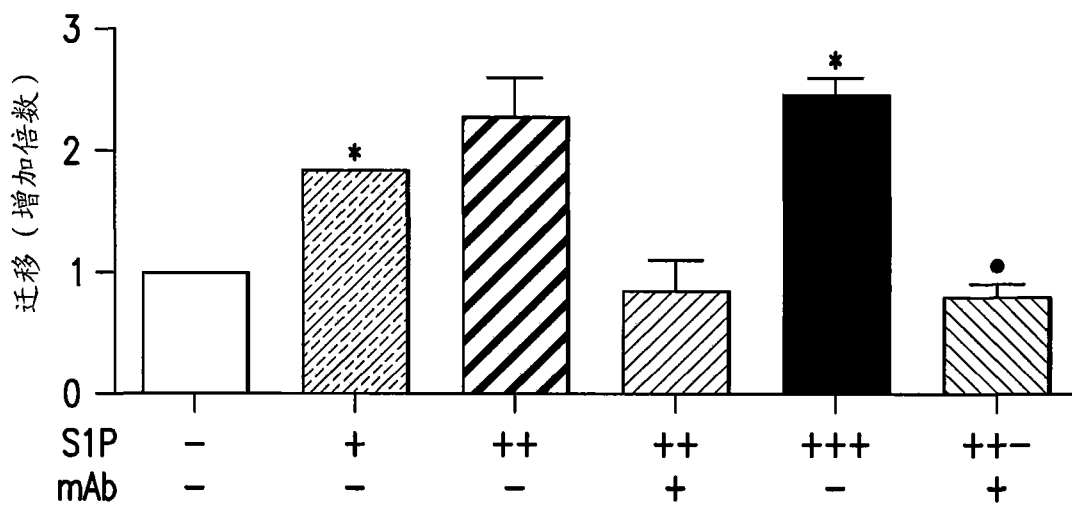


图 5B

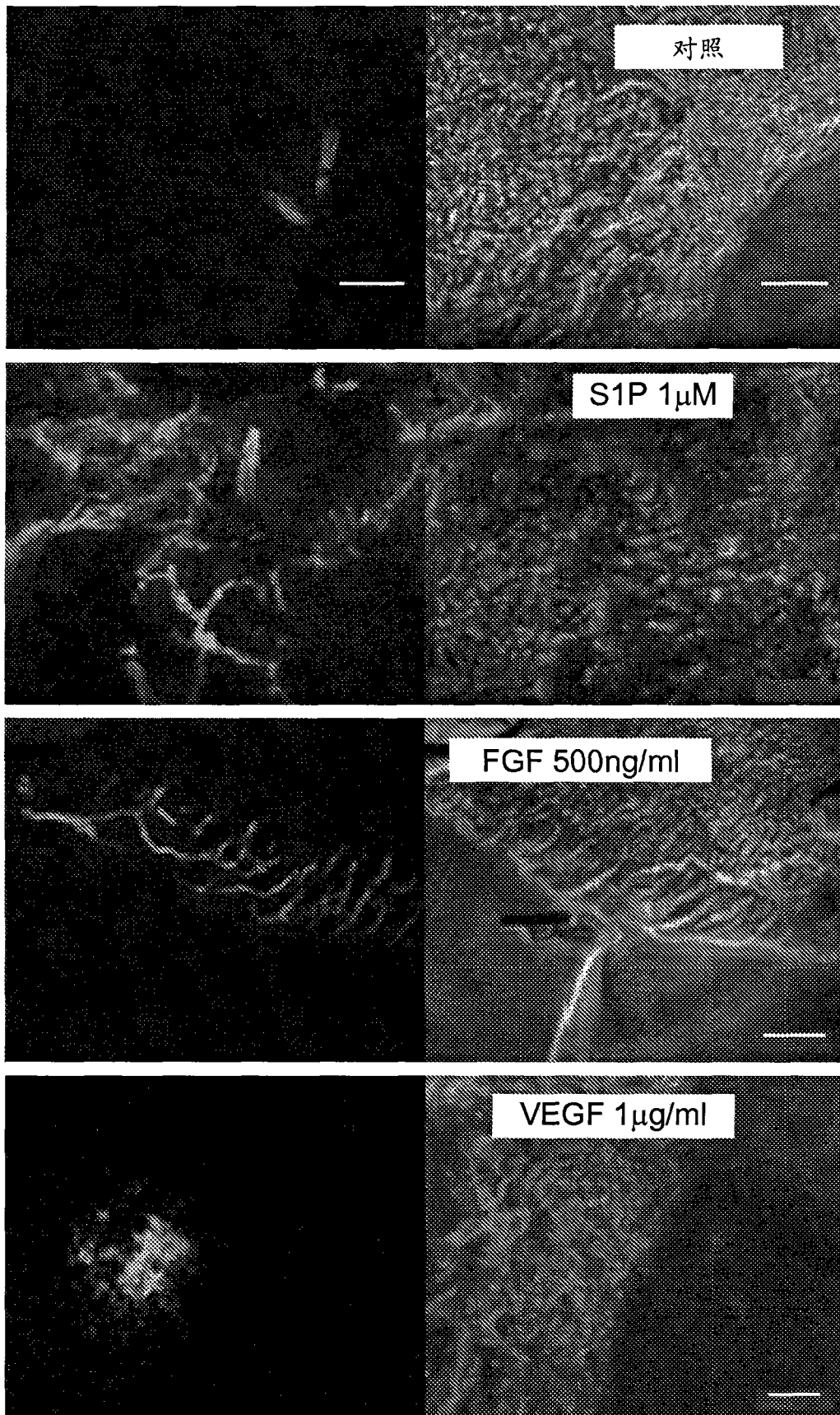


图 6A

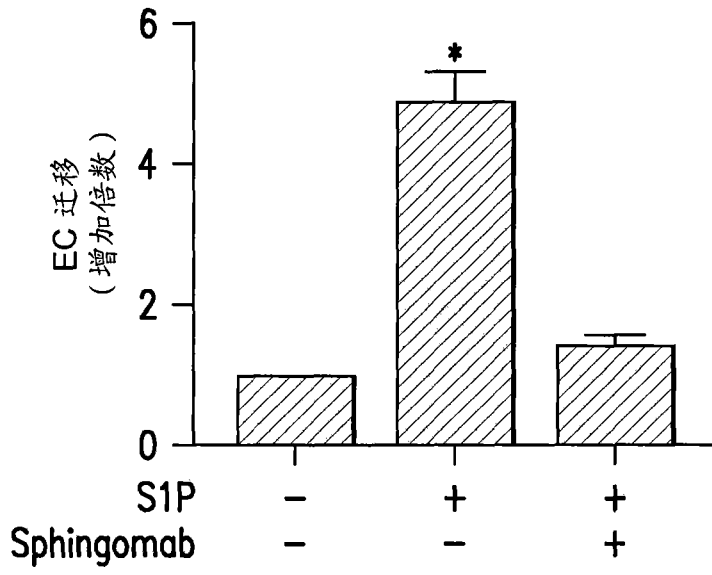


图 6B

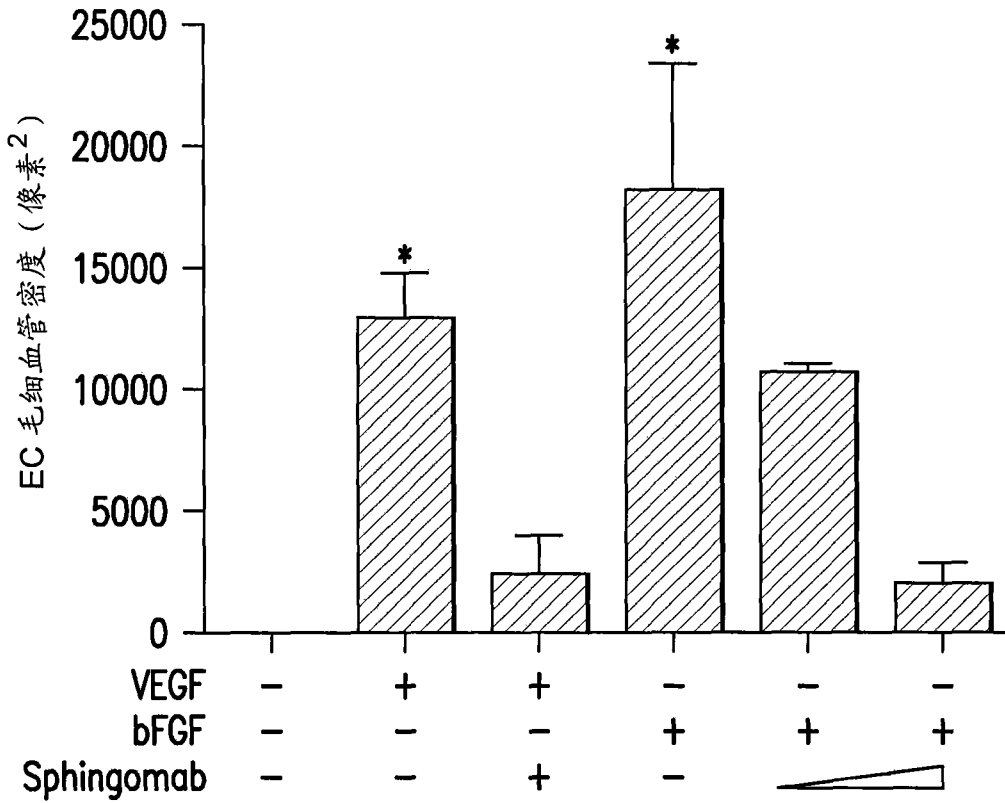


图 6C

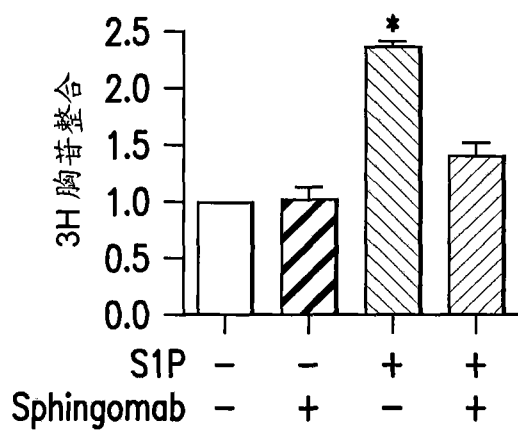


图 7A

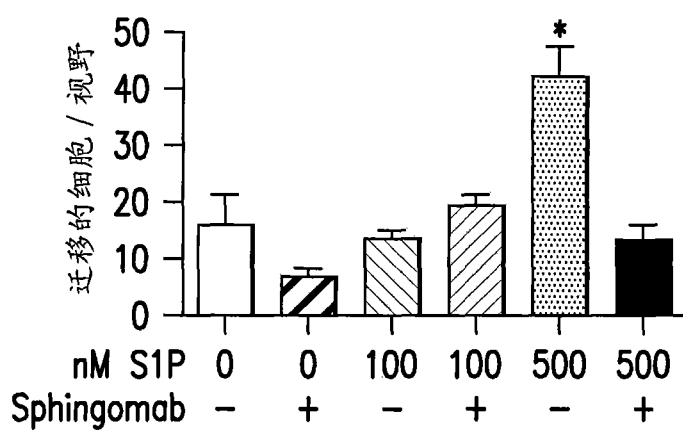


图 7B

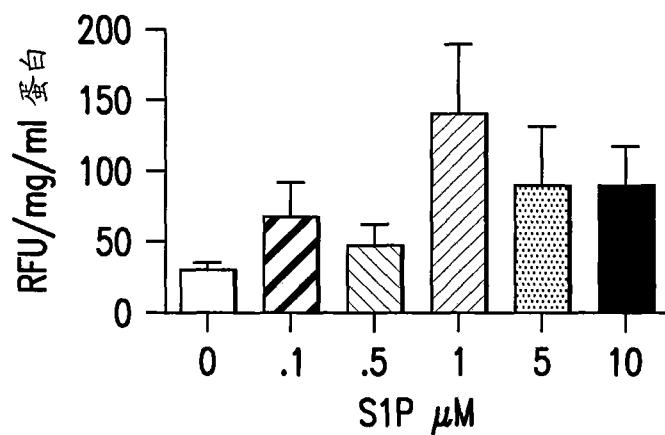


图 7C

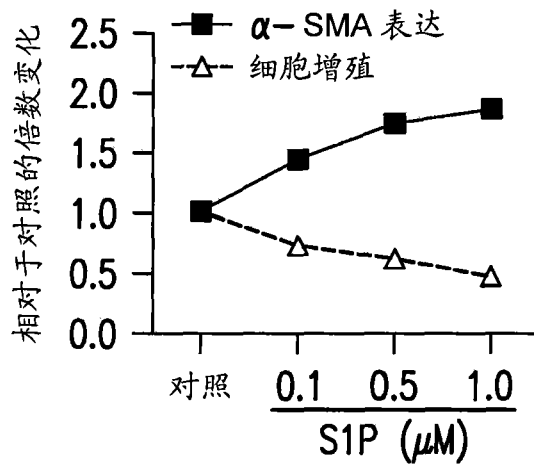


图 7D

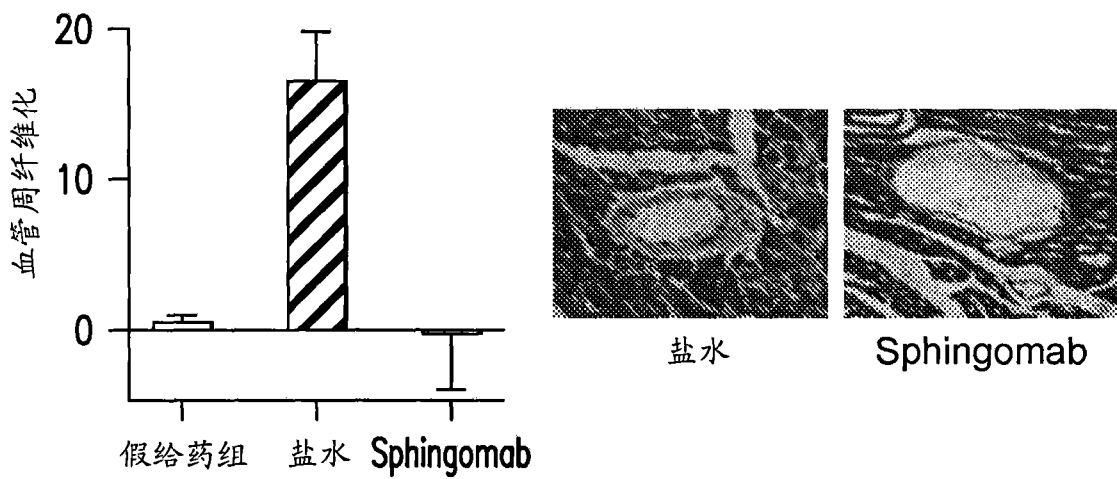


图 7E

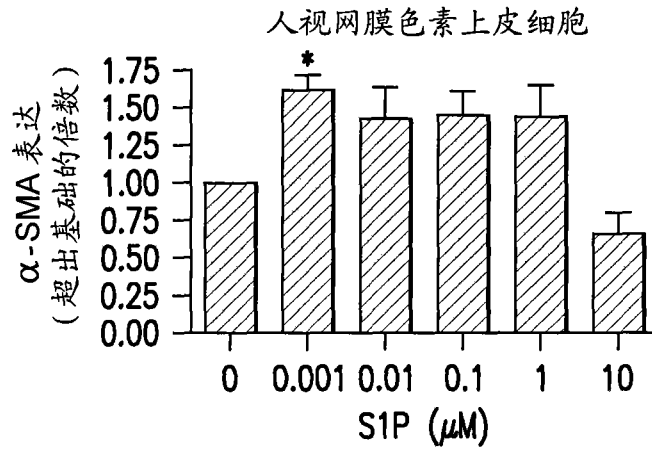


图 8A

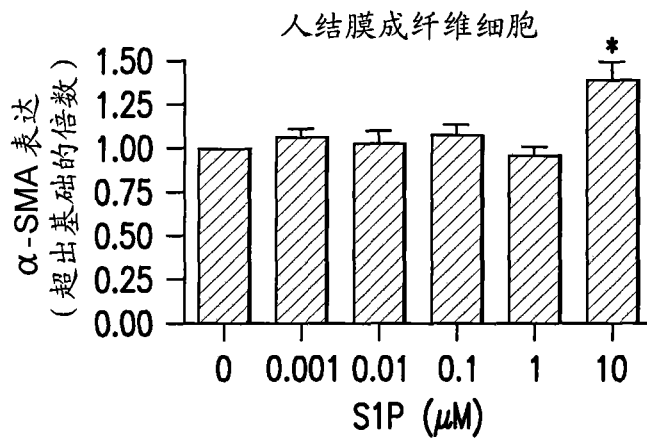


图 8B

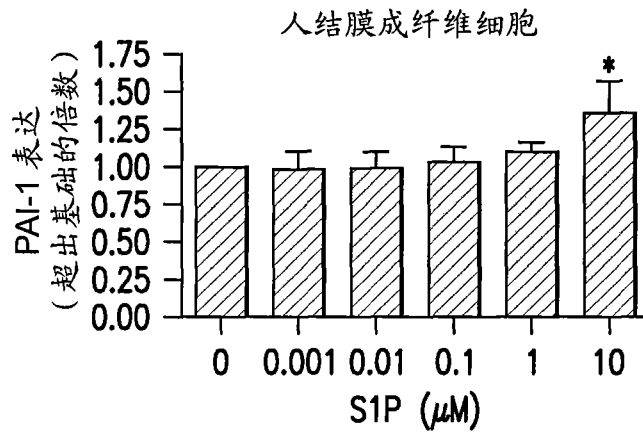


图 8C

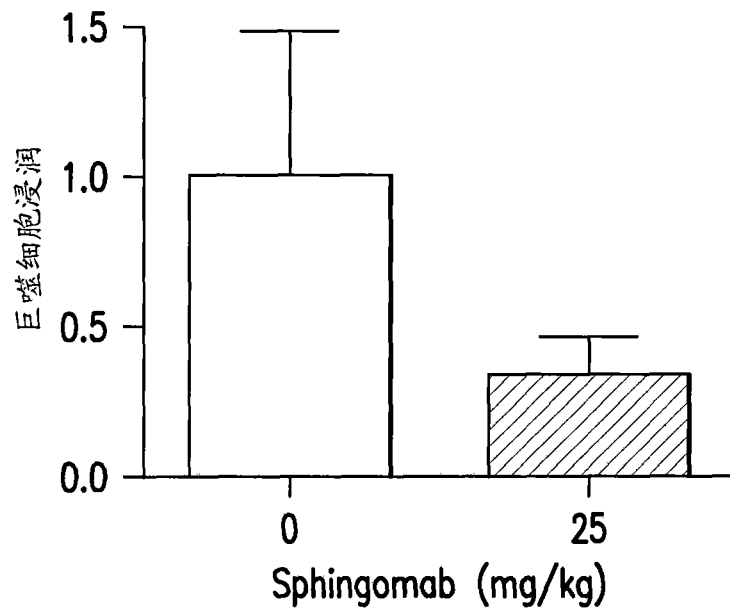


图 9A

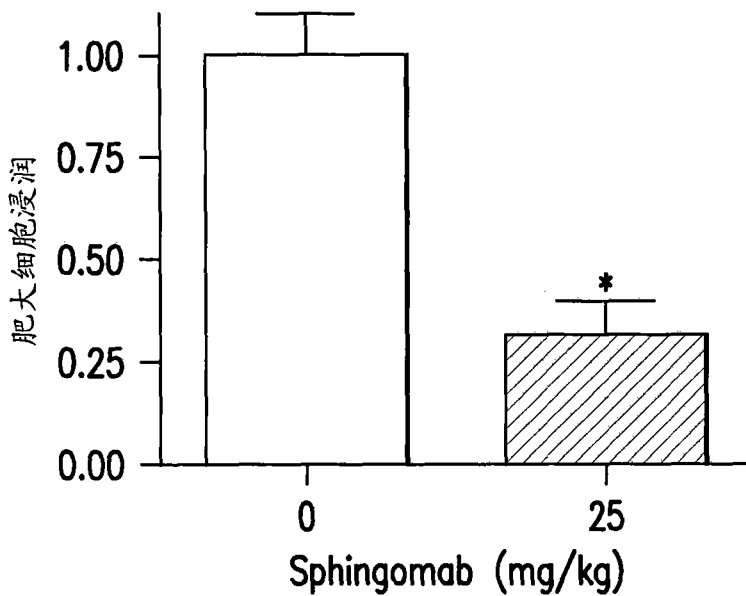


图 9B

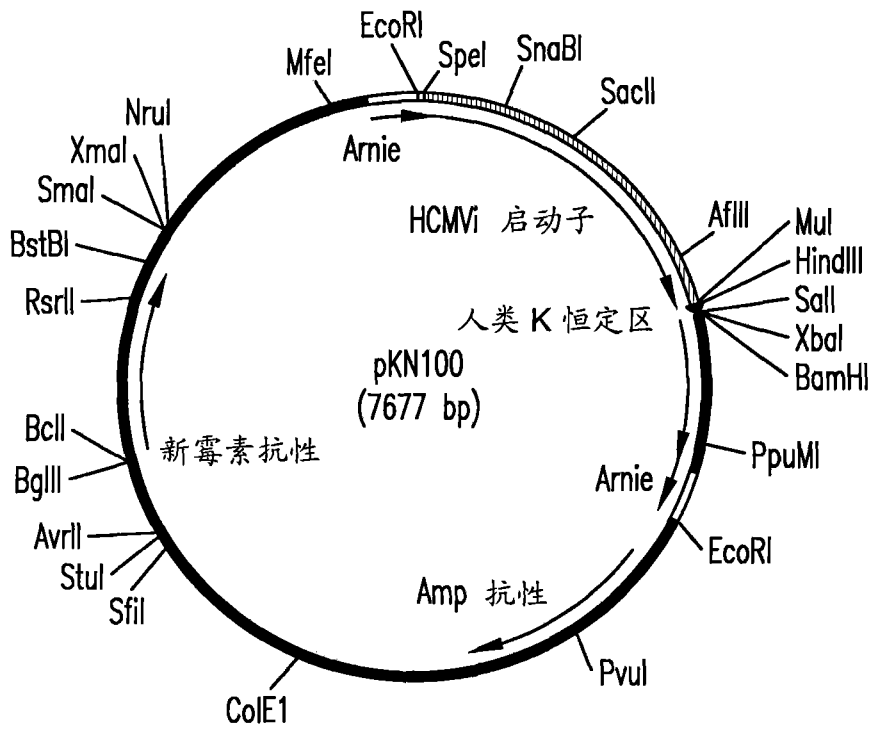


图 10A

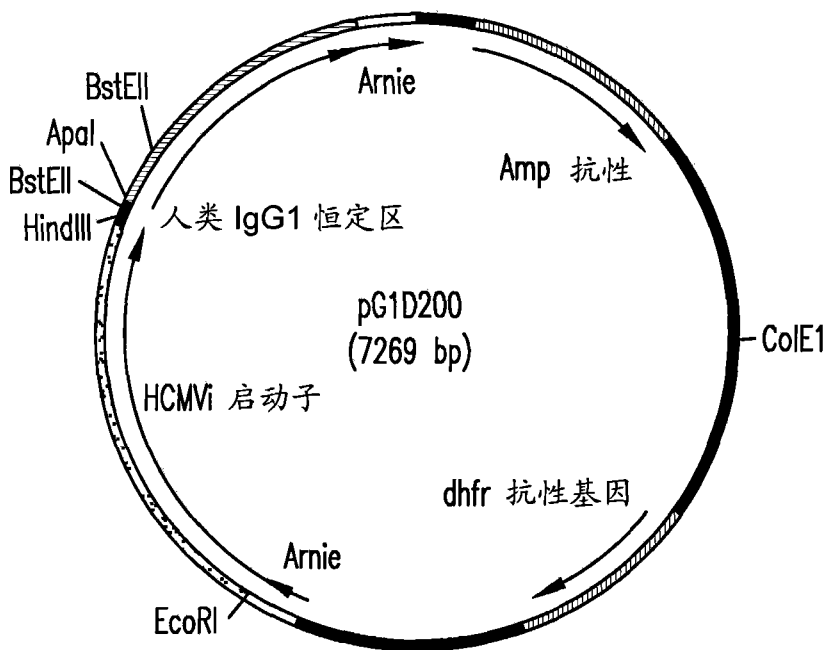


图 10B

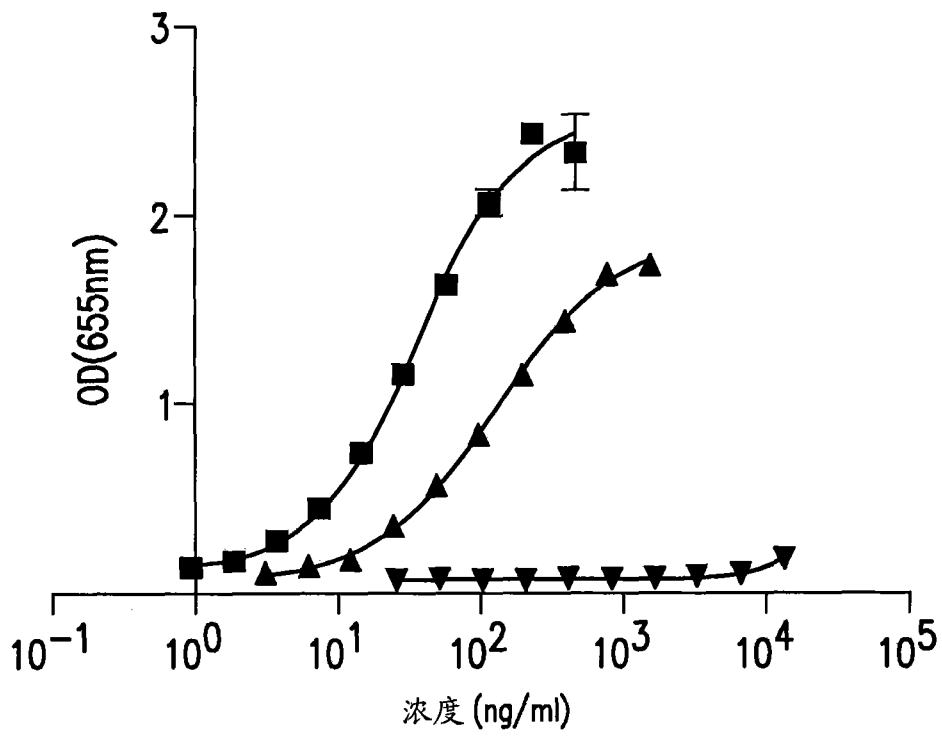


图 11

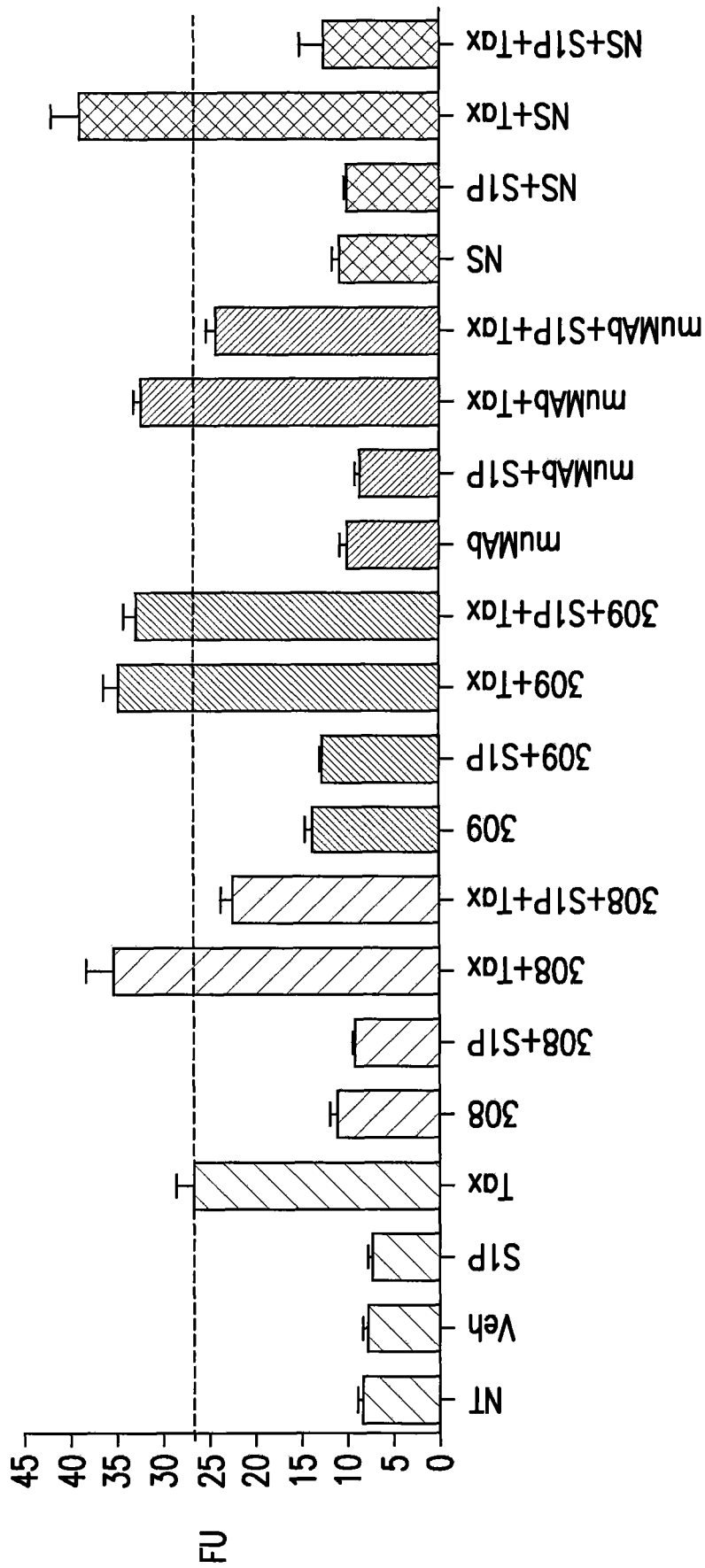


图 12A

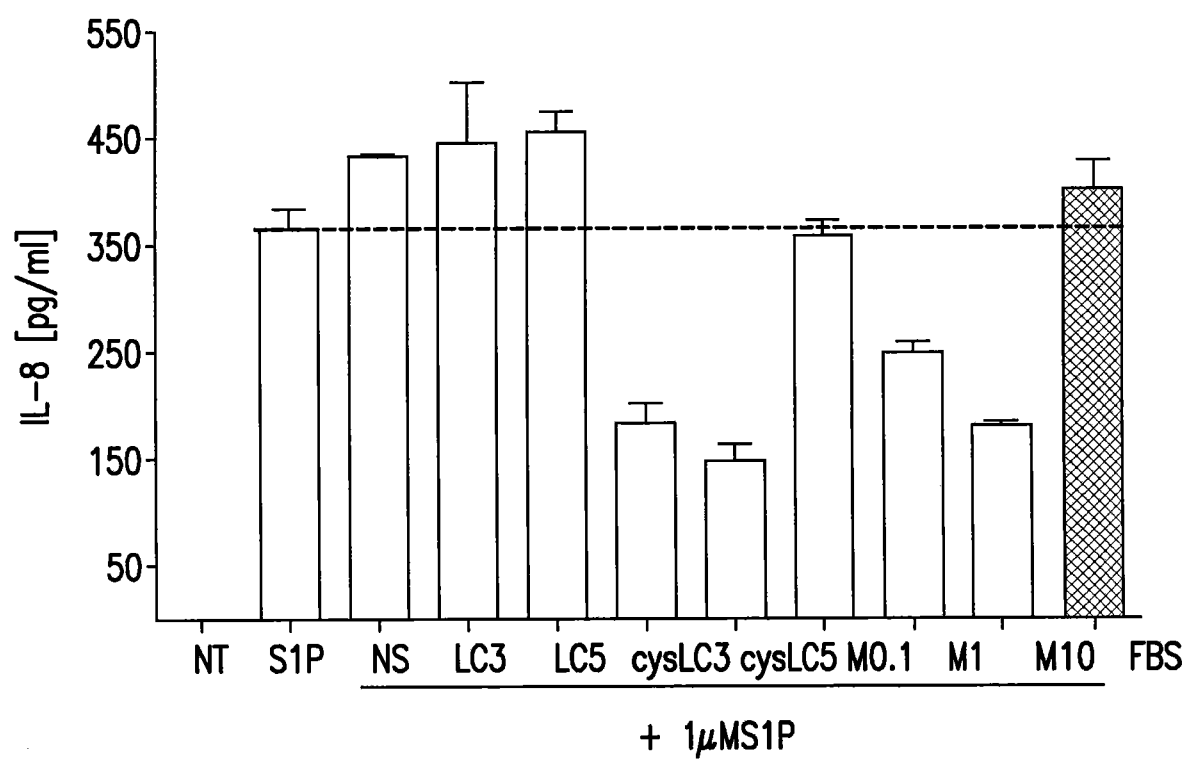


图 12B

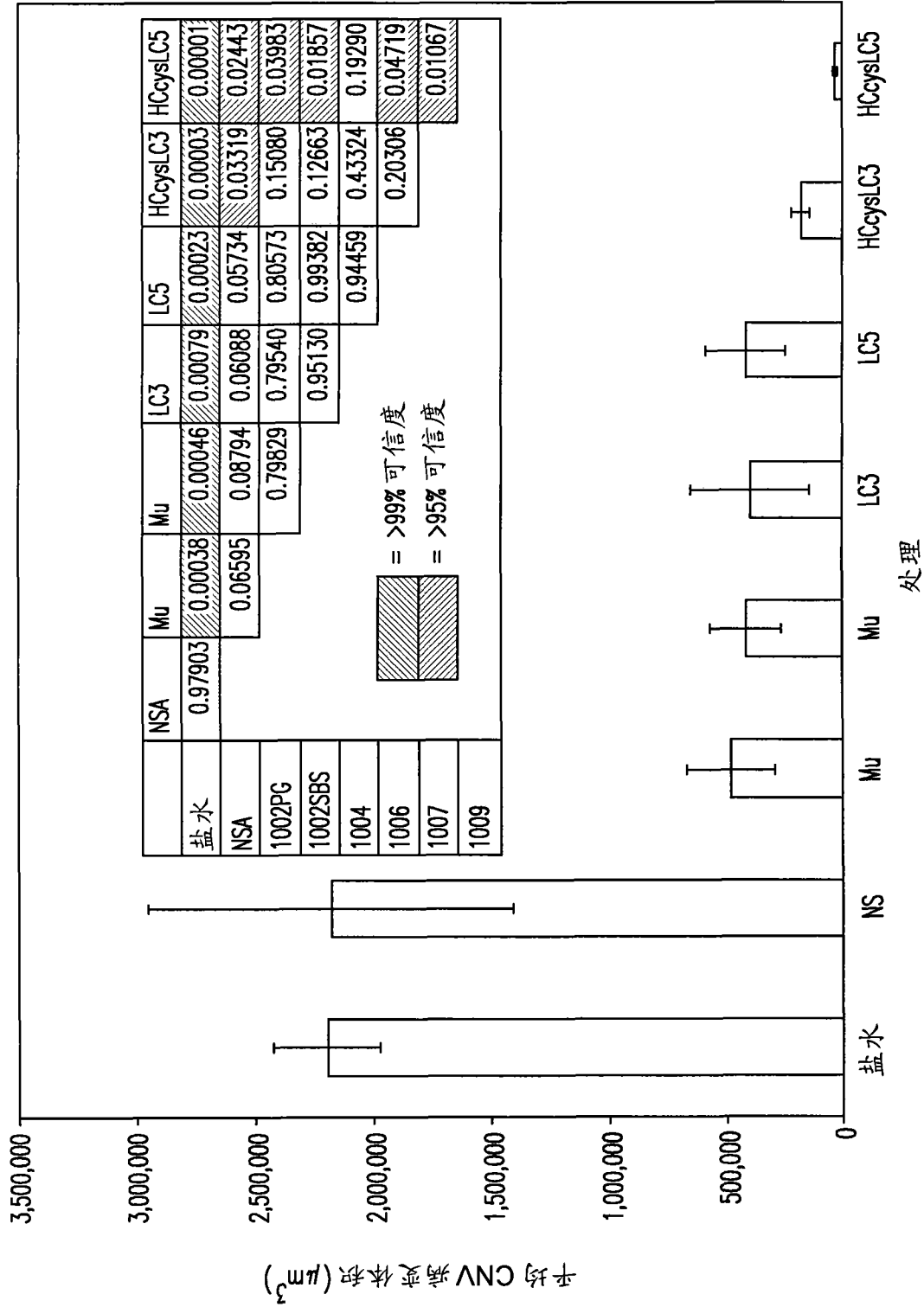


图 13