

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

A61K 39/00 A61P 43/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02817923.4

[43] 公开日 2004 年 12 月 15 日

[11] 公开号 CN 1555488A

[22] 申请日 2002.7.12 [21] 申请号 02817923.4

[30] 优先权

[32] 2001. 7. 12 [33] US [31] 60/304,889

[32] 2001. 9. 6 [33] US [31] 60/317,610

[86] 国际申请 PCT/US2002/022164 2002. 7. 12

[87] 国际公布 WO2003/006104 英 2003. 1. 23

[85] 进入国家阶段日期 2004. 3. 12

[71] 申请人 路德维格癌症研究院

地址 美国纽约州

共同申请人 利森蒂亚有限公司

[72] 发明人 卡里·阿利塔洛 泰加·马基嫩

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 6 页 说明书 63 页 附图 5 页

[54] 发明名称 淋巴管内皮细胞物质及方法

[57] 摘要

本发明涉及从混合细胞群分离淋巴管内皮细胞的方法和组合物。更具体地说，本发明发现识别 VEGFR-3 胞外区的特定抗体可用于特异性分离基本不含其它污染性非-淋巴管内皮细胞的淋巴管内皮细胞。本发明还公开了用于制备所述细胞以及使用所述细胞的方法和组合物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种从含淋巴管内皮细胞的生物样本中分离淋巴管内皮细胞的方法，该方法包括：
- 5 a) 让所述样本与能优先识别淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的抗体在该抗体能与淋巴管内皮细胞结合的条件下接触，以及
- b) 分离与所述抗体结合的淋巴管内皮细胞。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体为具有针对 VEGFR-3 胞外区中表位的免疫学反应活性的抗体，VEGFR-3 为淋巴管内皮细胞特异性标志物。
- 10 3. 权利要求 1 的方法，其中所述生物样本来自人类患者。
4. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体固定在固相支持物上，所述生物样本与该支持物接触从而使得淋巴管内皮细胞与所述抗体结合。
5. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体用荧光标记物标记，所述淋巴管内皮细胞通过荧光激活细胞分选方法分离得到。
- 15 6. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体用磁性标记物标记，所述淋巴管内皮细胞通过磁性激活细胞分选方法分离得到。
7. 权利要求 1 的方法，其中所述淋巴管内皮细胞用免疫组织化学方法分离得到。
8. 权利要求 1 的方法，其中所述淋巴管内皮细胞用免疫层析方法分离
- 20 得到。
9. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体为多克隆抗体。
10. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体为单克隆抗体。
11. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体为含有 2E11D11 的抗原结合片段的结合试剂。
- 25 12. 权利要求 11 的方法，其中所述抗体能识别 VEGFR-3 蛋白上可被 2E11D11 识别的同一表位。
13. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体为 2E11D11。
14. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体为抗 podoplanin。
15. 一种从微脉管内皮细胞样本中分离血管内皮细胞的方法，该方法包
- 30 括：
- a) 让所述细胞与能优先结合淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的抗体

在该抗体能与淋巴管内皮细胞结合的条件下接触, 以及

b)从未被所述抗体结合的微脉管细胞中取出已被所述抗体结合的淋巴管内皮细胞,

其中所述的未被所述抗体结合的微脉管细胞包括基本不含淋巴管内皮细胞的血管内皮细胞群。

16. 权利要求 15 的方法, 其中所述抗体为具有针对 VEGFR-3 胞外区的免疫学反应活性的抗体。

17. 根据一种方法分离得到的淋巴管内皮细胞群, 该方法包括:

a) 让含淋巴管内皮细胞的生物样本与能优先结合淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的抗体在该抗体能与淋巴管内皮细胞结合的条件下接触, 以及
b) 分离与所述抗体结合的淋巴管内皮细胞。

18. 权利要求 17 中的淋巴管内皮细胞群, 其中所述抗体为具有针对 VEGFR-3 胞外区的免疫学反应活性的抗体。

19. 权利要求 17 中的淋巴管内皮细胞群, 其中所述细胞的生物样本含有异源内皮细胞群。

20. 权利要求 17 中的淋巴管内皮细胞群, 其中所述细胞的生物样本为微脉管内皮细胞群。

21. 权利要求 17 中的淋巴管内皮细胞群, 其中所述的淋巴管内皮细胞群基本未被血管内皮细胞污染。

22. 权利要求 17 的方法, 该方法包括扩增所述淋巴管内皮细胞。

23. 根据一种方法分离得到的血管内皮细胞群, 该方法包括

a) 让微脉管内皮细胞群与能优先结合淋巴管内皮细胞而非血管内皮细胞的抗体在该抗体能与淋巴管内皮细胞结合的条件下接触, 以及

b)从未被所述抗体结合的微脉管细胞中取出已被所述抗体结合的淋巴管内皮细胞,

其中所述的未被所述抗体结合的微脉管细胞包括基本不含淋巴管内皮细胞的血管内皮细胞群。

24. 权利要求 23 中的血管细胞群, 其中所述抗体为具有针对 VEGFR-3 胞外区的免疫学反应活性的抗体。

25. 权利要求 23 中的血管内皮细胞群, 其中所述方法进一步包括扩增所述的血管内皮细胞群。

26. 一种基本不含其它污染性内皮细胞的淋巴管内皮细胞群。

27. 一种基本不含其它污染性内皮细胞的血管内皮细胞群。

28. 一种获得基本富含淋巴管内皮细胞亚群的组合物的方法，该方法包括：

5 (a)获得一种含微脉管内皮细胞的细胞源；

(b)让所述细胞与一种能够优先结合淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的单克隆抗体在确保抗体结合淋巴管内皮细胞的条件下接触；

(c)分离那些被所述单克隆抗体特异性结合的细胞，从而获得基本富含淋巴管内皮细胞亚群的组合物。

10 29. 权利要求 28 的方法，其中所述抗体为抗 podoplanin 抗体。

30. 权利要求 28 的方法，其中所述抗体为 2E11D11。

31. 一种通过权利要求 28、29 或 30 所述方法获得的基本富含淋巴管内皮细胞亚群的组合物。

15 32. 一种改善淋巴管内皮细胞病症的方法，该方法包括：将治疗药物靶向淋巴管内皮细胞，其中所述治疗药物是利用能够优先结合淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的抗体靶向所述细胞的，其中所述抗体是具有针对 VEGFR-3 胞外区免疫反应活性的抗体。

20 33. 权利要求 30 的方法，其中所述病症选自淋巴瘤，遗传性淋巴水肿，淋巴水肿，淋巴管瘤，淋巴管肉瘤，淋巴管肌瘤病，淋巴管扩张，以及水囊状淋巴管瘤。

34. 一种改善淋巴管病症的方法，其中所述方法包括回体治疗，包括：

a)从需要治疗的患者获得微脉管内皮细胞；

b)让所述微脉管内皮细胞与能够优先结合淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的抗体在确保该抗体结合淋巴管内皮细胞的条件下接触；

25 c)分离出被所述抗体结合的淋巴管内皮细胞；

d)用一种表达构建体转染该淋巴管内皮细胞，该构建体含有有效量的可操作地连接于一启动子上的治疗蛋白编码核酸，所述有效量足以使所述蛋白在细胞中表达；

(e)将经过转染的细胞回输入患者体内。

30 35. 权利要求 34 的方法，其中所述抗体为具有针对 VEGFR-3 胞外区的免疫学反应活性的抗体。

36. 一种促进淋巴管内皮细胞在培养中生长的方法，该方法包括：

a) 按照权利要求 1 所述方法获得淋巴管内皮细胞；

b) 用 VEGFR-3 配体刺激所述细胞；

5 其中用 VEGFR-3 配体刺激所述细胞生长与无所述刺激存在相比能够促进所述细胞在培养中的存活。

37. 权利要求 36 的方法，其中所述 VEGFR-3 配体为 VEGF-C、VEGF-C156S 或 VEGF-D。

38. 权利要求 36 的方法，还包括用 VEGFR-2 配体刺激所述细胞。

39. 权利要求 36 的方法，其中刺激所述细胞能够保护细胞免遭凋亡。

10 40. 权利要求 36 的方法，其中所述细胞的保护是通过活化 Akt 或 p42/MAPK 信号传导分子实现的。

41. 权利要求 36 的方法，其中所述刺激使得所述细胞能够保持分化的内皮细胞的特性。

15 42. 一种选择性调控哺乳动物机体内淋巴管内皮细胞的方法，该方法包括：

a) 按照权利要求 1 所述方法从哺乳动物机体分离淋巴管内皮细胞；

b) 让上述分离的淋巴管内皮细胞与一种能调控淋巴管内皮细胞的物质接触；以及

c) 将该淋巴管内皮细胞重新导回该机体。

20 43. 权利要求 42 的方法，其中所述的接触步骤包括将外源性多核苷酸导入所述细胞。

44. 权利要求 42 的方法，其中所述机体患有特征为淋巴管内皮细胞表达基因遗传突变的病症，所述接触包括将外源多核苷酸导入细胞以克服所述基因遗传突变的影响。

25 45. 权利要求 44 的方法，其中所述病症为遗传性淋巴水肿。

46. 一种在取自脊椎动物机体的组织中使淋巴管内皮细胞成像的方法，该方法包括下述步骤：

30 (a) 让疑似含有淋巴管内皮细胞的脊椎动物组织与一种含有能优先结合淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的抗体的组合物在能确保该抗体结合淋巴管内皮细胞的条件下接触；

(b) 检测与所述组织中淋巴管内皮细胞结合的所述抗体；以及

(c) 通过鉴定被所述抗体结合的淋巴管内皮细胞，使淋巴管内皮细胞在组织中成像，其中淋巴管内皮细胞与所述抗体的结合表明该组织中存在或居留有淋巴管内皮细胞。

47. 权利要求 46 的方法，其中所述组织包括人体组织。

5 48. 权利要求 46 的方法，还包括下述步骤：在接触步骤之后成像步骤之前，在能从所述组织中将未与该组织中淋巴管内皮细胞结合的抗体取出的条件下洗涤该组织。

49. 权利要求 46 的方法，其中所述抗体为具有针对 VEGFR-3 胞外区的免疫学反应活性的抗体。

10 50. 权利要求 46 的方法，其中所述抗体为抗 podoplanin 抗体。

51. 权利要求 46 的方法，其中所述抗体还包括与其共价相连的可检测标记物。

52. 权利要求 46 的方法，该方法还包括下述步骤：

15 让所述组织与第二种化合物接触，这种化合物能特异性结合基本不出现在血管内皮中的淋巴管内皮标记物；以及

检测与所述组织中的细胞结合的第二种化合物；

其中所述成像步骤包括鉴定被所述抗体以及第二种化合物这二者标记了的淋巴管，其中被所述抗体和第二种化合物这二者标记了的淋巴管与该组织中淋巴管内皮细胞的出现或居留相关。

20 53. 权利要求 52 的方法，其中所述抗体为具有针对 VEGFR-3 胞外区的免疫学反应活性的抗体，所述第二种化合物为抗-podoplanin 抗体。

54. 一种筛查特征在于淋巴管内皮细胞变化的疾病的方法，该方法包括：

(a) 从疑似患有特征为淋巴管内皮细胞变化疾病的脊椎动物机体获取组织样本；

25 (b) 将该组织样本暴露于一种含有能优先结合淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的抗体的组合物，所用条件允许该抗体结合该生物中的淋巴管内皮细胞；

(c) 洗涤该组织样本；以及

30 (d) 通过检测所述组织样本中结合抗体的存在、量或分布来筛查所述疾病。

55. 一种特异性检测哺乳动物淋巴管内皮细胞的方法，包括下述步骤：

(a) 向哺乳动物施用一种含有能优先结合淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的抗体的组合物, 所用条件允许该抗体结合淋巴管内皮细胞; 以及

(b) 检测结合了淋巴管内皮细胞的抗体, 从而检测所述生物中的淋巴管内皮细胞。

5 56. 权利要求 55 的方法, 还包括向该哺乳动物施用可特异性结合淋巴管内皮细胞标志物的第二种化合物; 其中所述的检测步骤包括检测与淋巴管内皮细胞结合的所述抗体和第二种化合物。

57. 一种修饰淋巴管内皮细胞的方法, 该方法包括:

- 10 a) 获取微脉管内皮细胞;
- b) 让所述微脉管内皮细胞与一种能优先结合淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的抗体在该抗体能结合淋巴管内皮细胞的条件下接触;
- c) 分离被所述抗体结合的淋巴管内皮细胞, 以及
- d) 用表达构建体转染该淋巴管内皮细胞, 该构建体含有有效量的可操作地连接于一启动子上的治疗蛋白编码核酸, 所述有效量足以使所述蛋白在
- 15 细胞中表达, 其中所述转染产生经修饰的淋巴管内皮细胞。

58. 一种按照权利要求 57 所述方法制备的淋巴管内皮细胞。

淋巴管内皮细胞物质及方法

5 发明领域

本发明主要涉及与内皮细胞分离相关的物质和方法，以及根据本发明而分离的细胞。更具体而言，本发明涉及获取分离的淋巴管内皮细胞群。

发明背景

10 淋巴系统是一种以与循环系统平行的方式组合而成的复合结构。与循环系统不同的是，循环系统是利用心脏将血液泵送至全身，而淋巴系统则是用淋巴管自身伸缩泵送淋巴液。淋巴管没有象血管一样交叉相连，而是形成一套辐射状(coordinated)结构，包括初级淋巴窦[Jeltsch 等"Science, 276: 1423-1425 (1997); Castenholz, A., Olszewski, W. L. (ed.), Lymph Stasis: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. CRC Press: Boca Raton, Florida(1991), pp.15-42], 淋巴液由此流入淋巴毛细管，随后到达汇集淋巴管，然后流入淋巴干和淋巴导管，最终流入静脉循环系统。淋巴液所流经管道的组成是不同的[Olszewski, W. L., Olszewski, W. L. (ed), Lymph Stasis: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. CRC Press: Boca Raton, Florida 15 (1991), pp. 235-258; Kinmonth, J. B., Kinmonth, J. B.(ed), The Lymphatic: Diseases, Lymphography and Surgery. Edward Arnold Publishers: London, England (1972), pp. 82-86], 包括初级淋巴管的单内皮层，汇集淋巴管(collecting lymphatic)的复合层，其中包含内皮、肌肉及外膜层，以及淋巴结的复合结构。机体的不同器官如皮肤、肺及GI 通道含有具各种独特特性的淋巴组分。[见 Ohkuma, M. , in Olszewski (1991), 出处同上, pp. 157-190; Uhley, H. and Leeds, S., Olszewski (1991), pp. 191-210; Barrowman, J. A., Olszewski (1991), pp.221-234.]

25 血管内皮细胞生长因子(VEGF)是内皮细胞增殖、血管生成(angiogenesis)、血管发生(vasculogenesis)及血管通透性的主要调节因子(Ferrara, J Mol Med 77: 527-543,1999)。除 VEGF 之外，生长因子的 VEGF 家族目前还含有其它 5 种已知成员，名为胎盘生长因子(PlGF)、VEGF-B、

VEGF-C、VEGF-D 和 orf 病毒 VEGF 同系物(eriksson and alitalo, *Curr Top Microbiol Immunol.*, 237: 41-57; 1999)。近来还从蛇毒中分离出了其它新的 VEGF-样肝素结合蛋白(Gasmi 等, *Biochem Biophys Res Commun.* 268(1): 69-72, 2000; Gasmi 等, *Biochem Biophys Acta* 1481(1): 209-12, 2000; Komori 等, 1999)。编码 VEGF 或 VEGF 家族三受体 VEGFR-1/Flt1、VEGFR-1/Flt1/KDR 或 VEGFR-1/Flt4 中任一的基因的断裂都会由于血管无法发育而导致胚胎的死亡(Dumont 等, *Science*, 282: 946-949, 1998; Fong 等, *Nature*, 376: 66-70, 1995; Shalaby 等, *Nature*, 376: 62-66, 1995)。这些受体及其配体的详细描述见美国专利 5, 776, 755; 美国专利 5, 607, 918; 美国专利 5, 840, 693; 美国专利 5, 928, 939; 美国专利 5, 776, 755; 美国专利 6, 130, 071; 美国专利 6, 221, 839; 美国专利 6, 235, 713; 美国专利 6, 245, 530; 1999 年 10 月 26 日提交的申请号为 09/427,657 美国专利申请; 2000 年 3 月 24 日提交的申请号为 09/534,376 美国专利申请; 2001 年 1 月 17 日提交的申请号为 60/262,476 美国专利申请; 以及 1998 年 2 月 2 日提交的 PCT 申请 PCT/US98/01973。这些文献中的每一篇在此都是作为一个整体专门引入作为参考。其它涉及血管内皮细胞生长因子及其受体的文献还可参见例如, 美国专利 6, 245, 512; 美国专利 6, 168, 778; 美国专利 6, 100, 071; 美国专利 6, 051, 698; 美国专利 6, 040, 157; 美国专利 6, 020, 473; 美国专利 6, 011, 003, 在此引入作为参考。

VEGFR-2 被认为是血管生成和内皮细胞有丝分裂中主要的具信号传导活性的 VEGF 受体。VEGF 通过 VEGFR-2 的活化诱导内皮细胞增殖, 迁移及存活, 随后的信号传导途径包括 MAP(有丝分裂原-活化的蛋白)激酶/ERK(细胞外信号调控激酶)和磷脂酰肌醇(PI)-3 途径(有关综述, 参见 Petrova 等, *Exp. Cell. Res.* 253: 117-130, 1999; Shibuya 等, In Clasesson-Welsh, L (ed.) *Vascular Growth Factors And Angiogenesis*. Springer Verlag, GmbH&Co., KG, Heidelberg, 237: 59-83, 1999)。许多细胞中 p42/p44 MAPK(ERK1/ERK2)级联反应的活化与增殖反应联系在一起。另外, 该途径还能通过刺激原存活基因(pro-survival gene)转录和翻译后修饰以及细胞死亡机制中成分的灭活导致细胞存活率提高(Bonni 等, *Science*, 286: 1358-1362, 1999; Gupta 等, *Exp. Cell. Res.*, 247: 495-504, 1999)。起初认为所述 PI-3 激酶途径还与有丝分裂相连, 但是随后的几个试验表明该途径通过活化丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt(蛋白

激酶 B)在调控细胞存活方面发挥着重要作用(Datta 等 Genes Dev. 13: 2905-2927)。最近的试验还表明 MAPK 和 PI-3 激酶信号传导途径之间存在一些交叉影响(crosstalk): Raf 被 Akt 磷酸化导致 Raf-MEK (MAP 激酶的激酶)-ERK 途径被抑制(rommel 等, Science, 286: 1738-1741, 1999; Zimmermann and Moelling, Science, 286: 1741-1744, 1999)。

分子生物学已证实至少有一些基因和蛋白在调节胚胎生长和/或胚胎发育中发挥着作用。所述基因/蛋白其中之一是名为 Flt4 的受体酪氨酸激酶(fms-样酪氨酸激酶 4; 也称为血管内皮细胞生长因子受体 3 或 VEGFR-3), 克隆自人白血病细胞及胎盘 cDNA 文库[参见美国专利 5, 776, 755 和美国专利 6, 107, 046; Aprelikova 等, Cancer Res., 52: 746-748(1992); Galland 等, Genomics, 13: 475-478(1992); Galland 等, Oncogene, 8: 1233-1240(1993); Pajusola 等, Cancer Res., 52: 5738-5743(1992), 所有文献在此引入作为参考]。试验表明, 在小鼠胚胎中, VEGFR-3 基因的断裂会导致基本血管网络无法改型(remodeling), 胚胎 9.5 天后死亡 [Dumont 等, Science, 282: 946-949, (1998)]。其它试验还表明 VEGFR-3 内的某些突变在遗传性淋巴水肿中起着因果作用(公开号为 WO00/58511 的 PCT 申请)。但是, VEGFR-3 并不仅局限于淋巴管。在淋巴管出现之前, VEGFR-3 在胚胎血管系统发育中起着至关重要的作用。但是, 另外有试验表明, 在进一步发育过程中, VEGFR-3 的表达变得主要限于淋巴管 [Kaipainen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 3566-3570(1995)]。但是, VEGFR-3 的表达还出现在至少一些肿瘤的新生血管中(公开号为 WO00/21560 的 PCT 申请)。

在小鼠胚龄 8.5 天时 VEGFR-3 在发育的血管中开始表达, VEGFR-3 缺陷胚胎会由于基本血管网络无法改型而死于 midgestation(Dumont 等, Science, 282: 946-949, 1998)。但是, 在成人组织中, VEGFR-3 的表达主要发生在淋巴内皮(Kaipainen, 等, proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 3566-3570, 1995; Partanen 等, FASEB J., 14: 2087-2096, 2000), VEGFR-3 的配体 VEGF-C 和 VEGF-D 能引发淋巴管的生长(Jeltsch 等, Science, 276: 1423-1425, 1997; Veikkola 等, EMBO J. 20: 1223-1231)。相反, 用可溶性 VEGFR-3 蛋白阻断 VEGFR-3 信号传导途径会因引发内皮细胞凋亡而导致发育中的淋巴管退化(Mäkinen 等, Nature Med., 7: 199-205, 2001)。但是, 通过 VEGFR-3 活化的生化信号传导途径效果不如 VEGFR-2 的信号传导途径, 因而使得该途径难以确证这些淋

巴管内皮细胞功能的重要调节因子的活化机制。在此类信息缺乏时，这些相互作用异常的治疗和诊断意义还不甚明了。

此前，已有大量的 VEGFR-3 抗体被描述，参见例如，美国专利 US6107046(在此引入作为参考)。此外，最近 podoplanin 已被鉴定为淋巴内皮的特异性标志(Breiteneder-Geleff 等，Am. J. Path., 154(2): 385-394, 1999)，而 LYVE-1 作为 CD-44 糖蛋白的一种同系物，则被认定为是 hyaluron 的淋巴-特异性受体(Banerji 等，J. Biol. Chem., 144(4)789-801, 1999)。但是，尽管有这些标志物的存在，目前还没有适当方法获得分离的淋巴管内皮细胞。如果不能获得所述的分离的淋巴细胞满足分子试验的需要，各种淋巴细胞病症的治疗和诊断试验大多数都无法进行。进一步而言，这类细胞的获得能够提供淋巴管内皮细胞特征方面的有用信息，从而有助于进一步确定治疗干预的具体区域。

有大量疾病如遗传性淋巴水肿，癌转移及术后水肿，都涉及淋巴管内皮细胞及其受体的异常。能够分离、培养并替代淋巴管内皮细胞有利于此类疾病的缓解干预、治疗或其它改善方案。这类干预对例如，损伤导致的淋巴水肿特别有效。而且，这类细胞的获得特别有利于细胞特异性的治疗方案从而大大减小非-细胞特异性基因治疗或化疗方法中出现的不良副反应。

发明概述

本发明在操作内皮细胞以及淋巴和血管系统的能力上提供了明显改进，这些改进在医药和分子生物学中具有众多实际用途。更具体而言，本发明提供了一种从含有淋巴管内皮细胞的生物样本中分离出淋巴管内皮细胞的方法，该方法包括：让所述生物样本与一种抗体接触，该抗体在其可与淋巴管内皮细胞结合的条件下能够优先于其它内皮细胞识别淋巴管内皮细胞；分离与所述抗体结合的淋巴管内皮细胞。本发明中使用的“抗体”是指能特异性结合靶抗原(例如，淋巴管内皮细胞)的任一抗体试剂或者含有能特异性识别该抗原的抗原结合片段的任一多肽。更具体地说，所述抗体具有针对 VEGFR-3 胞外区上表位的免疫反应活性，该表位是淋巴管内皮细胞特异性的。在本发明上下文中，“优先的”或“特异性的”是指所述抗体与靶抗原(例如，淋巴管内皮细胞上的 VEGFR-3)结合时具有比其结合其它细胞上同类抗原(例如，血管内皮细胞上的 VEGFR-3)具有更大的亲和力。这种差异结合使得能够将一种

细胞类型同其它细胞类型分离开来。

应该能够理解的是所述生物样本可以出自任一种哺乳动物机体,可以是预期含有淋巴管内皮细胞的任一组织或体液样本。具体优选的是来自人类患者的生物样本。优选实施方案中,所述抗体被固定在固相支撑物上,所述生物样本与
5 所述支撑物接触使得淋巴细胞与所述抗体结合从而结合到所述支撑物上。其它优选实施方案中,所述抗体用荧光标记物标记,通过荧光激活细胞分选方法分离出所述淋巴管内皮细胞。在另一优选实施方案中,所述抗体用磁性标记物标记,通过磁性激活细胞分选方法分离出所述淋巴管内皮细胞。还提供了用免疫组化方法分离生物样本中的淋巴管内皮细胞。其它实施方案
10 提供了用免疫组化方法分离淋巴管内皮细胞。

应该理解的是所述抗体可以是多克隆抗体也可以是单克隆抗体。在优选实施方案中,所述抗体是一种含有 2E11D11 的抗原结合片段的结合反应物。其它实施方案中,所述抗体是 2E11D11 的衍生物。其它实施方案中,所述抗体是一种含有从 2E11D11 的抗原结合片段衍生的抗原结合片段的结合反应物,所述抗原结合片段经突变或改变具有更强的 VEGFR-3 表位结合特异性,
15 所述表位是淋巴管内皮细胞特异性的。其它实施方案中,所述抗体能识别 VEGFR-3 蛋白上的可被 2E11D11 识别的同一表位。在具体优选的实施方案中,所述抗体是 2E11D11。(欧洲细胞培养物保藏中心的保藏号为 01083129, Center for Applied Microbiology and Research, Porton Down Salisbury, U. K.)。该抗体的制备见美国专利 6,107, 046 (在此引入作为参考)。其它优选实施方案中,抗体为抗-podoplanin。某些实施方案中,抗体为抗-podoplanin 抗体的变体或衍生物,它具有淋巴管内皮细胞的结合特异性。

本发明的一些方面提供了从含微脉管内皮细胞的生物样本中分离血管内皮细胞的方法,该方法包括:让所述生物样本与能够优先于其它内皮细胞
25 识别淋巴管内皮细胞的抗体接触,其中所述抗体具有针对 VEGFR-3 胞外区的免疫反应活性;从未与所述抗体结合的微脉管内皮细胞中移取与所述抗体结合的淋巴管内皮细胞,其中未被所述抗体结合的微脉管细胞中含有血管内皮细胞群且基本不含淋巴管内皮细胞。

本发明的另一方面还提供了按照下述方法分离的淋巴管内皮细胞群,
30 该方法包括:让含有淋巴管内皮细胞的生物样本与能够优先结合淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的抗体接触,其中所述抗体具有针对 VEGFR-3 胞外

区的免疫反应活性；分离被所述抗体结合的淋巴管内皮细胞。优选实施方案中，所述生物样本含有异源的内皮细胞群。其它优选实施方案中，所述细胞样本为微脉管内皮细胞群。具体优选的实施方案中，所述淋巴管内皮细胞群基本没有污染血管内皮细胞。优选方面，所述分离细胞的方法包括在培养中
5 扩增(expand)淋巴管内皮细胞。

本发明的另一方面还提供了按照下述方法分离的淋巴管内皮细胞群，该方法包括：让微脉管内皮细胞群与能够优先结合淋巴管内皮细胞而非血管内皮细胞的抗体接触，其中所述抗体具有针对 VEGFR-3 胞外区的免疫反应活性；将被所述抗体结合的淋巴管内皮细胞从未被该抗体结合的微脉管细胞
10 中移取出来，其中未被抗体结合的微脉管细胞中含有血管内皮细胞群且基本不含淋巴管内皮细胞。在具体实施方案中，获得所述血管内皮细胞群的方法还包括扩增该血管内皮细胞群。

本发明的一个优选方面具体提供了一种基本不含其它污染性内皮细胞的淋巴管内皮细胞群。本发明另一优选方面描述了一种基本不含其它污染性
15 内皮细胞的血管内皮细胞群。

本发明的一个优选实施方案涉及一种获得基本富含淋巴管内皮细胞亚群的组合物的方法，该方法包括：获得一种含微脉管内皮细胞的细胞源；让该细胞与一种能够优先结合淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的单克隆抗体在确保该抗体能结合淋巴管内皮细胞的条件下接触；分离那些被所述单克
20 隆抗体特异性结合的细胞，从而获得基本富含淋巴管内皮细胞亚群的组合物。在优选方面，抗体是具有针对表达于淋巴管内皮细胞上抗原胞外区的免疫反应活性。另外的优选实施方案中，所述抗原是 VEGFR-3。在优选方面，本发明还提供了一种包含通过所述方法得到的基本富集淋巴管内皮细胞亚群的组合物。在优选实施方案中，所述抗体为抗-podoplanin 抗体。其它优选
25 实施方案中，所述抗体为 2E11D11，该抗体能优先识别表达于淋巴管内皮细胞上的 VEGFR-3。

其它实施方案提供了一种改善淋巴管内皮细胞病症的方法，该方法包括：将治疗药物靶向淋巴管内皮细胞，其中所述治疗药物是利用能够优先结合淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的抗体靶向所述细胞，其中所述抗体是
30 具有针对 VEGFR-3 胞外区的免疫反应活性的抗体。在具体实施方案中，所述病症选自：淋巴瘤、遗传性淋巴水肿、淋巴水肿、淋巴管瘤、淋巴管肉瘤、

淋巴管肌瘤病、淋巴管扩张及水囊状淋巴管瘤(cystic hygroma)。

本发明还提供了一种改善淋巴管病症的方法,其中所述方法包括回体(ex vivo)治疗,包括:从需要治疗的患者获得生物样本,其中所述生物样本含有微脉管内皮细胞;让该微脉管内皮细胞与能够优先结合淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的抗体接触,其中所述抗体是具有针对 VEGFR-3 胞外区的免疫反应活性的抗体;分离出被所述抗体结合的淋巴管内皮细胞;用一表达构建体转染该淋巴管内皮细胞,该构建体含有有效量的可操作地连接于一启动子上的蛋白编码核酸,所述有效量足以使所述蛋白在细胞中表达;将转染后的细胞返回导入患者体内。所编码的蛋白可以是本领域技术人员期望表达于淋巴管内皮细胞的任一蛋白(例如,为了治疗疾病,减轻疾病症状,或者为了更好地诊断或成像)。

本发明还提供了一种促进培养物中淋巴管内皮细胞生长的方法,该方法包括:根据本发明方法获得淋巴管内皮细胞;用 VEGFR-3 配体刺激该细胞;其中用 VEGFR-3 配体刺激细胞生长,与无刺激情况下生长相比,能够促进所述细胞在培养中存活。在具体优选实施方案中,所述 VEGFR-3 配体是 VEGF-C、VEGF-C156S 或 VEGF-D。该方法进一步包括用 VEGFR-2 配体刺激细胞。在具体实施方案中,提供了刺激细胞防止凋亡的方法。优选实施方案中,所述防止细胞凋亡的方法是通过活化 Akt 或 p42/MAPK 信号传导分子来介导的。在优选实施方案中,刺激细胞使得该细胞保持了分化的内皮细胞的特性。

本发明提供了一种选择性调控哺乳动物体内淋巴管内皮细胞的方法,该方法包括:按照本发明所述方法从哺乳动物机体中分离淋巴管内皮细胞;让分离的淋巴管内皮细胞与一种能调控淋巴管内皮细胞的物质接触;将该淋巴管内皮细胞重新导入该机体。在优选方面,所述的接触步骤包括将外源多核苷酸导入细胞。其它优选实施方案中,所述机体患有特征为淋巴管内皮细胞表达的基因发生遗传突变的病症,所述接触包括将外源多核苷酸导入细胞以克服该基因中遗传突变的影响。具体实施方案中,所述病症为遗传性淋巴水肿。例如,所述病症是特征为 VEGFR-3 突变的遗传性淋巴水肿,治疗包括导入野生型 VEGFR-3 等位基因。

本发明的另一方面描述了一种在取自脊椎动物机体的组织中使淋巴管内皮细胞成像的方法,该方法包括让疑似含有淋巴管内皮细胞的脊椎动物组

织与一种含有能优先结合淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的抗体的组合物在能确保该抗体可结合淋巴管内皮细胞的条件下接触；检测与组织中淋巴管内皮细胞结合的抗体；通过鉴定被抗体结合的淋巴管内皮细胞而使淋巴管内皮细胞在组织中成像，其中淋巴管内皮细胞与抗体的结合表明该组织中存在或居留有淋巴管内皮细胞。更具体地说，所述组织包括人体组织。具体实施方案中，所述方法进一步包括：在接触步骤之后成像步骤之前，在能从所述组织中将未与该组织中淋巴管内皮细胞结合的抗体取出的条件下洗涤该组织的步骤。所述抗体可以是具有针对 VEGFR-3 胞外区的免疫反应活性的抗体。其它实施方案中，所述抗体为抗-podoplanin 抗体。优选实施方案中，所述抗体还含有一种与其共价相连的可检测标记物。

所述方法还包括：让所述组织与第二种化合物接触，这种化合物能特异性结合基本不出现在血管内皮中的淋巴管内皮标记物；以及，检测与该组织中的细胞结合了的第二种化合物；其中所述成像步骤包括检测被抗体和第二种化合物二者都标记了的淋巴管的步骤，其中被抗体和第二种化合物二者都标记了的淋巴管与组织中出现或居留淋巴管内皮细胞相关。优选实施方案中，所述抗体是具有针对 VEGFR-3 胞外区的免疫反应活性的抗体，所述第二种化合物为抗-podoplanin 抗体。

另外，本发明还提供了一种筛查特征在于淋巴管内皮细胞变化的疾病的方法，该方法包括：从疑似患有特征在于淋巴管内皮细胞变化的疾病的脊椎动物机体获取组织样本；将该组织样本暴露于一种含有能优先结合淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的抗体的组合物，所用条件允许该抗体结合机体内淋巴管内皮细胞；洗涤组织样本；以及，通过检测组织样本中结合抗体的存在、量或分布筛查所述疾病。

另一实施方案提供了一种特异性检测哺乳动物淋巴管内皮细胞的方法，该方法包括：向哺乳动物施用一种含有能优先结合淋巴管内皮细胞而非其它内皮细胞的抗体的组合物，所用的条件允许该抗体结合淋巴管内皮细胞；以及，检测结合了淋巴管内皮细胞的抗体，从而检测机体中的淋巴管内皮细胞。所述方法还包括向哺乳动物施用可特异性结合淋巴管内皮细胞标志物的第二种化合物；其中所述的检测步骤包括检测结合到淋巴管内皮细胞上的所述抗体和第二种化合物。在本发明所有成像方法中，成像方法可用于淋巴管病症，以确定病症是否存在以及监测该病症的治疗效果。所述方法可具体用于

评定淋巴水肿,例如遗传性淋巴水肿,或损伤引发的水肿及其它淋巴管病症。

从本申请的全部内容得到本发明的其它特征及变动对于本领域技术人员来说是显而易见的,所有这类特征都应该是本发明的各个方面。类似地,也可将本申请中所述的本发明特征重组入也作为本发明方面的其它实施方案,而无需考虑这种特征重组是否已在本发明方面或技术方案中专门提及。另外,只有那些在本申请中描述为对本发明至关重要的限制才应该视为如此;而缺乏未被本申请描述为至关重要的限制的本发明的变动应视为本发明的方面。

本发明的方面可概括归类,应该理解的是其中每一不同成员都应视为本发明的不同方面。

附图简述

下列附图形成了本说明书的一部分,是为了进一步说明本发明的各个方面。参照1个或多个附图结合本申请给出的具体实施方案的详细描述可以更好地理解本发明。

图1A-图1C.用Ba/F3生物学测定分析了不同VEGF的受体特异性。测定了所示浓度的不同VEGF的存在下,表达嵌合受体VEGFR-1/EpoR(图1A)、VEGFR-2/EpoR(图1B)或VEGFR-3/EpoR(图1C)的Ba/F3细胞的存活能力。细胞存活力使用MTT测定。数据为三份平行试验的平均值(平均值±标准差)。图1D-图1G为VEGF-C(图1D,图1E)和VEGF-C156S(图1F,图1G)与VEGFR-3(图1D、图1F)和VEGFR-2(图1E、图1G)之间相互作用的生物传感器试验。将嵌合受体蛋白固定于羧甲基葡聚糖表面。以20 ul/分钟的流速将所示浓度的生长因子注射到该表面。所示传感器图形(sensorgram)已经减去了让同样样本通过空白对照通道(channel)时获得的相应信号。生物传感器实验的动力学数据列于表1。

图2A-图2B. VEGFR-2和VEGFR-3活化配体能抑制血清-剥夺引发的HMVE细胞凋亡,而VEGFR-1活化配体不能。测量血清饥饿后的HMVE细胞中(图2A)或者用VEGFR-3抗体经磁性细胞分选后的分离细胞群(图2B)中的细胞质组氨酸-结合型DNA片段(单核小体及寡核小体),所述HMVE细胞由血管内皮细胞和淋巴管内皮细胞两种细胞群组成。把在无血清培养基(BSA)中生长了24小时的凋亡细胞中胞质寡核小体的富集系数选定为

100(%)。数据为三个独立试验的平均值(平均值±标准差)。所用生长因子的浓度如下: bFGF 10 ng/ml, PlGF 500 ng/ml, VEGF 50 ng/ml, VEGF-C 100 ng/ml, VEGF-C156S 500 ng/ml, VEGF-D 500 ng/ml, ORFV2-VEGF 500 ng/ml 以及髓鞘碱性蛋白(MBP)作为相关对照蛋白 500 ng/ml。

5 图 3. 血清饥饿 72 小时后, 对 podoplanin 阳性和阴性细胞群中的膜联蛋白-V 阳性细胞进行定量(占附着细胞的%)。数据为 5 个计数区域(x 400) 的平均值(平均值±标准差)。

图 4. VEGFR-2 或 VEGFR-3 刺激导致 PI3-激酶依赖性 Akt 磷酸化。 VEGF (灰色的圆)、VEGF-C (黑色方框)和 VEGF-C156S (空心三角) 诱导的
10 具有不同动力学特性的 Akt 磷酸化。数据为三个试验中磷酸化的 Akt 蛋白信号与总 Akt 蛋白信号光密度的相对值(平均值±标准差)。

图 5. VEGFR-3 介导的内皮细胞迁移。在 Boyden 槽测定中, 在不同 VEGF 存在的条件下, HMVE 细胞的迁移情况。用 10-倍摩尔过量的可溶性 VEGFR-3 预孵育 VEGF-C156S 后, VEGF-C156S 刺激的迁移被阻断(浅灰色
15 柱条), 而 VEGF 刺激的迁移未被阻断。数据为三个独立试验的平均值(平均值±标准差)。所用的生长因子浓度为: VEGF 10 ng/ml, VEGF-C 500 ng/ml, VEGF-D 500 ng/ml 和 VEGF-C156S 3 μ g/ml。

发明详述

20 在本发明中, 为了提供 VEGFR-3 信号传导途径更详细的特性, 本发明已经使用 VEGF-C 及其 VEGFR-3 特异性突变体(VEGFC156S)研究了该信号传导途径。首次阐明了人皮肤内皮细胞原代培养物是由不同谱系的血管及淋巴管内皮细胞组成的, 而且后者可用抗 VEGFR-3 的抗体分离。

具体而言, VEGFR-3 特异地表达于淋巴管内皮细胞, 其刺激能够防止
25 这些细胞出现血清剥夺诱导的凋亡并增加了细胞迁移。而且, 本申请中的数据表明 VEGFR-3 能够诱导 PKC 依赖性的 p42/p44 MAPK 活化和 Akt 的沃特曼宁(wortmannin)-敏感性磷酸化。这两个重要的信号级联反应与细胞存活相关(Bonni 等, Science, 286: 1358-1362, 1999;Datta 等, Genes Dev. 13: 2905-2927, 1999)。

30 根据本申请提供的细节, 本领域技术人员应当能够利用分子标记物如 VEGFR-3 分离出淋巴管内皮细胞。而且, 本发明教导了在特定生长因子存

在下培养这些细胞可以不损失这些细胞的分化特性。另外，还表明特异性的 VEGFR-3 配体能诱导细胞迁移，并且可以通过活化与细胞存活相关的两种重要信号传导分子 Akt 和 p42/p44 MAPK 防止血清剥夺条件下淋巴管内皮细胞凋亡。现在能够培养淋巴管内皮细胞就应该能进一步定性 VEGFR-3 信号传导途径以及血管内皮细胞相对于淋巴管内皮细胞的分子特性和基因表达谱(profile)。

A. 制备和使用内皮细胞培养物的方法

本发明人已发现微脉管内皮细胞由两种不同的内皮细胞群组成，即，淋巴管内皮细胞和血管内皮细胞。本发明首次提供了一种从混合的微脉管内皮细胞群分离淋巴管内皮细胞的方法。一个相关暗示是能够提供除尽了淋巴管内皮细胞的血管内皮细胞。本部分提供了本发明的综述，本发明各个方面的其它细节可发现于本说明书全文的其它各处。

根据本发明的教导，现在能够培养两种类型的内皮细胞。所述培养不仅可用于细胞信号传导和内皮细胞功能的研究而且还能为涉及新血管形成的疾病的治疗性干预提供条件，所述疾病包括例如，血管生成，淋巴管生成、遗传性淋巴水肿等。

本领域技术人员可通过大量商品化来源获得微脉管内皮细胞。所述商品化来源包括例如，Promocell (Heidelberg, Germany; Suppliers of HDMEC, 增殖的或冻存的微脉管内皮细胞); Cell Applications Inc. , (San Diego, Ca, USA, Supplier of CADMEC', 分离自正常人新生包皮(或成人皮肤)毛细管的微脉管内皮细胞)。其它的商品化来源也已为本领域技术人员已知。除这些细胞外，这些来源通常还能提供为将这些细胞保持在增殖状态所需的范例性培养条件。因此这些商品化来源的细胞系和培养物是本发明所述方法特别有用的起始物质。含有微脉管内皮细胞的任一细胞培养物都可用于本发明。这种细胞培养物优选只含有微脉管内皮细胞，但是应该理解的是还含有除淋巴管和血管内皮细胞以外的细胞的细胞培养物也足以充当本发明的起始宿主细胞，只要该培养物中一些细胞是淋巴管内皮细胞即可。

除从商品化来源获得以外，本领域技术人员也可从各物种，包括人分离微脉管内皮细胞。来自其它物种包括小鼠、大鼠、兔、狗、猪、马及灵长类动物的细胞也可使用。因此，本发明专门涉及使用原代细胞培养物，特别是

原代人微脉管细胞培养物。所述起始原代细胞培养物可以是只含有内皮细胞的细胞培养物，但是当原代细胞首次从受试者分离时，这样的细胞培养物还可能会含有其它细胞如成纤维细胞、平滑肌细胞周皮细胞及从组织中分离所述内皮细胞时该组织所特有的其它细胞。这些污染细胞可以用下述方法很容易地除去，例如，密度梯度离心，使用该细胞特异性标志物进行免疫吸附层析，荧光激活细胞筛选，磁性激活细胞筛选及其它细胞分选技术。

通常，在这些事件中，微脉管内皮细胞有着明显的器官特异性，所以原代微脉管内皮细胞培养物应该取自所要研究或调节的疾病所涉及的组织。通常，分离这些细胞的方法也为本领域技术人员已知，包括：用胰蛋白酶和胶原酶消化给定组织；通过例如暴露于人血浆，密度离心，例如 Percoll 密度离心诱导微脉管内皮细胞聚集；最后用胰蛋白酶/EDTA 定位消化后在光学显微镜下选取细胞并培养。

本发明的细胞培养于适合内皮细胞生长的培养基中，例如 Ham's F12 培养基-10% 胎牛血清 (FCS)。这样的培养物一旦制成，本领域技术人员就能通过观察微脉管内皮细胞相关特性确定是否存在微脉管内皮细胞，例如，出现接触抑制（即，生长为细胞单层），典型内皮标志物的表达，包括 von Willebrand 因子(vWF)，血小板内皮细胞粘附分子 1 (PECAM-1, CD31)，以及血管紧张肽转化酶(ACE)的转录，生成毛细管-样的结构，等等。在本说明书其它地方，已经提供了范例性微脉管内皮细胞功能试验的细节。

如上所述，本领域技术人员一般都知道微脉管内皮细胞的培养条件。在本发明中，细胞培养基可以添加多种生长因子及刺激物。在优选方面，所述细胞培养在有 VEGFR-3 的刺激物和/或 VEGFR-2 的刺激物存在的条件下，所述刺激物包括但不限于包括 VEGF, VEGF-C, VEGF-C156S, VEGF-D 和 ORFV2-VEGF。这些及其它相关物质已为本领域技术人员熟知，见本说明书其它地方的进一步描述。

在本发明的优选用途中，延长分离的内皮细胞在培养基中的生长时间是有益的。通常，这类细胞在培养基中的生长往往是通过细胞凋亡终止的。本发明阐明细胞凋亡可通过用 VEGFR-3 和/或 VEGFR-2 的刺激物刺激来抑制、减缓和/或甚至阻止细胞凋亡。在具体优选的实施方案中，淋巴管内皮细胞在微脉管内皮细胞混合群体中的存活或者基本不含其它内皮细胞污染物的真正的淋巴管内皮细胞分离培养物的存活可通过向培养基中添加 VEGF-C 或

VEGF-C156S 来提高。

在内皮细胞长成后,本发明方法提供了一种用能够优先于其它内皮细胞识别淋巴管内皮细胞的抗体从微脉管内皮细胞混合细胞群中分离淋巴管内皮细胞的方法。更具体地说,所述抗体为具有针对 VEGFR-3 胞外区免疫反
5 应活性的抗体。在一具体优选方面,证明抗-VEGFR-3 抗体 2E11D11 是特异性针对淋巴管内皮细胞的。特异于淋巴管内皮细胞的另一范例抗体为抗-podoplanin 抗体。尽管本发明多数实施例中使用了这些抗体,应该理解的是由于有本发明的教导,也可鉴定满足本发明的分离目的其它抗体。例如,如下文所述,其它这类抗体可用生产单克隆抗体的常规方法制备,这些常规
10 方法可使用由这些范例抗体识别的相同表位。替代地,其它抗体也可用本领域熟知的噬菌体-展示技术制备和分离。另一种方法是生产 2E11D11 或抗-podoplanin 抗体的相关抗体,在抗体的特定位点进行定点诱变制备出特异性针对淋巴管内皮细胞的第二代抗体。制备这类抗体的方法在本申请下文有更详细的描述。

15 "特异性针对淋巴管内皮细胞",是指该抗体能够识别内皮细胞混合群中的淋巴管内皮细胞且不识别或较差程度识别内皮细胞中的血管内皮细胞谱系。这种结合差异使得能够将一种细胞类型从混合群中分离出来。

由于本发明表明微脉管内皮细胞通常由血管内皮细胞和淋巴管内皮细胞混合群组成,而且本发明首次详细提供了如何从微脉管内皮细胞培养物分
20 离淋巴管内皮细胞,从而使内皮细胞基本不含其它污染的内皮细胞,例如血管内皮细胞,所以,应当理解的是本发明也应该包括分离基本不含其它污染内皮细胞如淋巴管内皮细胞的血管内皮细胞的方法。

当提到细胞群“基本不含”污染细胞时,本发明并不是指要求所述细胞培养绝对不含污染细胞。而是意味着,培养物中的大部分细胞都是指定细胞类
25 型。例如,在基本不含其它污染细胞的淋巴管内皮细胞培养物中,希望至少 51 % 的细胞是淋巴管内皮细胞。较优选,至少 60 % 的细胞是淋巴管内皮细胞。另外更优选包含至少 70 % 的淋巴管内皮细胞,甚至更优选 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 % 的淋巴管内皮细胞。本发明的一特别优选方法分离淋巴管内皮细胞,使得培养物中包含多于 90 % 的淋巴管内皮细胞。
30 显然,培养物越纯,培养物中淋巴管内皮细胞百分比就越高,最优选细胞培养物含有 95 %, 96 %, 97 %, 98 % 99 % 甚至 100 % 的淋巴管内皮细胞。当然,

应该理解的是这些数字不仅限于淋巴管内皮细胞，也适用于基本纯化的血管内皮细胞群。为了测定细胞类型，本领域技术人员可测定任一给定细胞的特异性标志物的存在与否。例如，可以通过 VEGFR-3 的存在，podoplanin 以及其它淋巴细胞标志物如 LYVE-1 的存在，鉴定淋巴管内皮细胞。可与上述标志物结合使用的其它 VEGFR-3 特异性抗体包括 9D9F9 和 7B3F9 以及美国专利 6,107,046 中所述的那些抗体。当然，应该理解的是标志物的组合是特别有益的。其它用于测定细胞功能的试验也已在本申请中描述并为本领域技术人员已知。

在替代性实施方案中，本发明方法制备的细胞培养物，无论是基本纯化的淋巴管内皮细胞培养物还是基本纯化的内皮细胞培养物，都可认为其含有最少量的污染细胞。就污染细胞而言，它可以指不是培养物组成主体的细胞类型的任一细胞。例如，淋巴管内皮细胞培养物中的污染细胞为非淋巴管内皮细胞的任一细胞。类似地，血管内皮细胞培养物中的污染细胞为非血管内皮细胞的任一细胞。淋巴管内皮细胞培养物的污染细胞的实例为血管内皮细胞，反之亦然，当然，其它细胞类型如成纤维细胞也落在污染细胞范畴之内。鉴定污染细胞相对容易，例如可筛选具有特异性标志物的细胞。因此，在优选实施方案中，本发明方法制备的细胞培养物含有小于 49% 的污染细胞，更优选这些培养物含有小于 45%，小于 40%，小于 35%，小于 30%，小于 25%，小于 20% 小于 15%，小于 14% 的污染细胞，小于 13% 的污染细胞，小于 12% 的污染细胞，小于 11% 的污染细胞或小于 10% 的污染细胞。显然，培养物越纯，培养物细胞中污染细胞所占百分比越小，最优选的细胞培养物含有小于 9% 的污染细胞，小于 8% 的污染细胞，小于 7% 的污染细胞，小于 6% 的污染细胞，小于 5% 的污染细胞，小于 4% 的污染细胞，小于 3% 的污染细胞，小于 2% 的污染细胞，甚至小于 1% 的污染细胞。

在本发明的一些方面，本发明提供了使用本发明所述分离细胞群进行的治疗和诊断方法。例如，本发明所述方法可用于从疑似患有淋巴管内皮细胞相关或者血管内皮细胞实际相关病症的个体分离细胞。在诊断用途中，可以对来自患者个体的细胞进行分析，确定特定细胞或生化标志物或者作为疾病状态指征的细胞特性是否存在、缺乏或变化。类似测定也可用于治疗目的，其中包括：在施用具体治疗之前及之后分离细胞，该治疗目标在于治疗所述细胞相关病症，然后测定治疗干预是否达到预期效果。在另外的实施方案中，

本发明所述的分离的细胞可用于促进与细胞的物理、生化或分子特性异常相关的病症的有效治疗。在范例性实施方案中，可以通过体外测试潜在治疗对患者细胞的效果，来测定该患者细胞是否应答所述干预，以此促进治疗。替代地，所述细胞也可用于回体基因治疗，其中包括用基因表达构建体体外转

5 导从患者分离的细胞，扩增然后输送回个体以从分子水平上校正患者病症。在另一替代性实施方案中，可用经过分离、扩增的本发明所述细胞将治疗物递送到指定区域。例如，在将细胞送回患者体内之前，在细胞上连接一仅特异性靶向患者淋巴管内皮细胞的细胞毒性治疗药物。本发明的这些及其它方面将在下文作更详细的讨论。

10

B. VEGFR-3 信号传导途径作用的阐释

由于本发明首次能够分离出基本不含污染细胞的淋巴管内皮细胞群，所以现在有可能确定，VEGFR-3 信号传导在淋巴管内皮细胞中令人费解的作用以及这些细胞在淋巴管生成及淋巴管病症等现象中的作用。

15 尽管 VEGFR-2 的刺激能促进细胞活力，但是撤回 VEGF 会导致体内内皮细胞凋亡，抑制血管生成以及引发血管退化(Aiello 等, Proc. Nat'l Acad. Sci., 92: 10457-10461,1995; Ferrara 等, Nature Med., 4: 336-340,1998; Gerber 等, Development, 126: 1149-1159,1999)。类似地，抑制 VEGFR-3 信号传导会导致发育中淋巴管退化(Makinen 等, Nature Med., 7: 199-205, 2001)。与以前公开的研究一致，VEGFR-2 刺激强效防止血清-剥夺条件下原代内皮细胞的凋

20 亡。这种作用通过 VEGFR-2 单个(经 ORFV2-VEGF) 以及与 VEGFR-1 刺激(经 VEGF)联合或与 VEGFR-3 刺激(经 VEGF-C)联合产生。但是，VEGFR-1 (经 PlGF 刺激)只传导非常弱的，如果有的话，细胞存活信号。另外，VEGFR-3 信号传导单独足以抑制血清剥夺导致的凋亡。值得注意的是，尽管 VEGF-C

25 对于血管内皮细胞来说是一种比 VEGF 更弱的存活信号，但是它却能强效促进表达 VEGFR-3 的淋巴管内皮细胞的存活。

VEGFR-3 诱导两种重要存活信号传导分子 p42/p44 MAPK 和 Akt 的磷酸化。PKC 抑制剂大大减少 VEGFR-3 介导的 p42/p44 MAPK 磷酸化，表明这种途径主要是通过 PKC 传送，而不是通过 Ras，这与以前研究 VEGFR-2 的

30 结果类似(Doanes 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 255: 545-548,1999; Takahashi 等, Oncogene, 18: 2221-2230,1999; Yoshiji 等, Cancer Res., 59:

4413-4418, 1999)。该途径是受体酪氨酸激酶中独一无二的, 因为典型的 PKC-依赖性 MAPK 活化被认为主要是通过某种七跨膜区, G 蛋白-偶联受体执行的。PKC 调控血管生成中涉及的许多内皮细胞过程, 包括内皮细胞增殖及迁移(Harrington 等, *Biochem, Biophys. Res. Commun.*, 271: 499-508,2000; 5 Harrington 等, *J. Biol. Chem.*, 272: 7390-7397,1997; Ilan 等, *J. Cell Sci.*, 111: 3621-3631,1998), 抑制 PKC 能够阻断肿瘤新血管生成(Yoshiji 等, *Cancer Res.*, 59: 4413-4418,1999)。

尽管 p42/p44 MAPK 活化的动力学与 VEGF 或 VEGF-C 刺激的 HMVE 细胞类似, 但是后者诱导反应更加持久。已报道 p42/p44 MAPK 的活化持续 10 时间和亚细胞分布上的差异导致不同的细胞应答(Kaiser 等, *Exp. Cell Res.*, 249: 349-358, 1999; Marshall, *Cell* 80: 179-185,1995; Pang 等, *J. Biol. Chem.*, 270: 13585-13588,1995)。所述差异可能是由于只有 VEGF-C 能够同时通过 VEGFR-2 和 VEGFR-3 传导信号。但是, 尽管已查明 VEGF-诱导的 VEGFR-1 和 VEGFR-2 的同源-或异源二聚复合体能有差异地调节有丝分裂发生 15 (Rahimi 等, *J. Biol. Chem.*, 275: 16986-16992,2000), 但是我们还没有在 VEGF-C 刺激的细胞中检测到由 VEGFR-2 和 VEGFR-3 形成的异源二聚体。

VEGF-C 的 VEGFR-3 特异性突变形式 VEGF-C156S 被证实是研究 VEGFR-3 介导的信号传导的很有价值的工具(Joukov 等, *EMBO J.*, 15: 290-298,1998; Veikkola 等, *EMBO J.*, 20: 1223-1231,2001; 美国专利 6,130, 20 071)。在生物传感器试验中, 与野生型 VEGF-C 相比, VEGF-C156S 对 VEGFR-3 的亲合力减小了。而且, VEGF-C156S 诱导的最大限度的 VEGFR-3 磷酸化或 p42/p44 MAPK 活化, 其强度不及 VEGF-C。尽管其中原因不清楚, 但是 VEGF-C156S 可能比野生型 VEGF-C 更不稳定, 因为形成胱氨酸结生长因子结构域的 8 个保守半胱氨酸残基中的 1 个已经变成为丝氨酸残基。但 25 是, 在一转基因模型中, VEGF-C156S 与野生型 VEGF-C 在促进淋巴管生成方面却有着同等效果(Veikkola 等, *EMBO J.*, 20: 1223-1231,2001)。另外, 本申请所述试验中使用浓度应该要使 VEGFR-3 饱和。因此, 由于甚至最大浓度 VEGF-C156S 防止细胞凋亡的效果都不如 VEGF-C, 所以要使淋巴管内皮细胞达到 VEGF-C 诱导的最大限度存活可能要将 VEGFR-2 和 VEGFR-3 二 30 者同时活化。

C.淋巴管内皮细胞特异性抗体

本发明已经表明：用抗 VEGFR-3 胞外区的特定抗体可以将培养的人原代微脉管内皮细胞分离为明显区别的稳定的血管内皮细胞系和淋巴管内皮细胞，而且这两种细胞系都可扩增培养。本部分描述了这些分离技术所用的
5 抗体，而且进一步描述了制备其它可用于本发明的抗体的方法。

本发明具体优选的抗体包括例如 2E11D11(Jussila 等, Cancer Res. 58: 1599-1604, 1998; 美国专利 6,107, 046)和抗-人 podoplanin (Breiteneder-Geleff 等, 等, Am. J. Path., 154 (2) 385-394, 1999)。这些抗体已为本领域技术人员已知。VEGFR-3 特异性抗体(也称为 Flt4)制备的详细描述见美国专利 6,107,
10 046, 在此专门引入作为参考。

由于本发明教导 2E11D11 和抗-podoplanin 抗体可特异性识别淋巴管内皮细胞，所以本领域技术人员应该能够制备出其它能识别这些抗体所识别的特异性表位的抗体。因此，用 VEGFR-3 中被 2E11D11 识别的部分，本领域技术人员应该能制备出其它可识别淋巴管内皮细胞的抗体。所以，所述抗体
15 优选具有针对下述部分的免疫反应活性：VEGFR-3 中被 2E11D11 识别部分，或者 VEGFR-3 中可使抗体能优先特异性识别淋巴管内皮细胞而非任一其它细胞类型的任一其它部分。优先于其它任一细胞类型，那么就意味所述抗体与淋巴管内皮细胞间的反应活性强于与任一其它细胞的反应，包括与其它内皮细胞如血管内皮细胞的反应。

另外，2E11D11 抗体优先识别表达于淋巴管内皮细胞的 VEGFR-3，次而识别表达于血管内皮细胞的 VEGFR-3，这一发现表明可以用常规免疫及筛选技术分离所述抗体(参见，例如，Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1988)。可以根据与本申请所述不同细胞群的结合特异性或交叉-反应
25 性筛选出 VEGFR-3 抗体群。

可用于本发明的抗体包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、Fab 片段和由 Fab 表达文库制得的片段、双功能/双特异性抗体、人源化抗体、CDR-移植抗体，人抗体和含有特异于 VEGFR-3 的 CDR 序列的部分的抗体。中和抗体，即能抑制 VEGFR-3 活性的那些抗体也可使用。
30 优选实施方案中，抗体为单克隆抗体。制备及定性这些抗体的方法已为本领域熟知(参见，例如，Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY

MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1988)。

简而言之，制备多克隆抗体包括，用含本发明多肽的免疫原免疫动物，然后从免疫后的动物收集抗血清。很多种动物都可以用来制备抗血清。通常用于制备抗血清的动物为非人的动物包括兔、小鼠、大鼠、仓鼠、山羊、绵羊、猪或马。由于兔有相对大的血液容量，所以兔是优选用于制备多克隆抗体的选择。

根据宿主种类的不同，可使用不同的佐剂增强免疫应答。包括但不限于 Freund's, 矿物胶如氢氧化铝，表面活性剂如溶血卵磷脂, pluronic polyols, 聚阴离子、肽、油乳剂、匙孔血蓝蛋白，及二硝基苯酚。BCG (卡介菌)和短小棒状杆菌是潜在有用的人用佐剂。

特异性针对抗原同工型的抗体，包括多克隆抗体和单克隆抗体都可用本领域技术人员通常所知的常规免疫技术制备。本申请中使用的“特异性针对”意指抗体的可变区能识别和结合可确保该抗体特异地和优先地识别淋巴管内皮细胞的表位，而且能将所述表位与其它抗原区分开来，例如其它的 VEGF 受体或表达于非-淋巴管细胞的相同受体。含有抗原性表位如 2E11D11 或抗-podoplanin 识别表位的组合物可用于免疫一种或多种试验动物，例如兔或小鼠，然后这些动物产生抗本发明所述化合物的抗体。在经过足够抗体生成的时间后，仅通过动物采血以及从全血制备出血清样品就可以得到多克隆抗体。

本发明使用的单克隆抗体可以用连续细胞系培养物生产抗体分子的任一技术来制备。这些技术包括但不限于最初描述于 Koehler and Milstein (Nature 256: 495-497,1975)的杂交瘤技术，人 B-细胞杂交瘤技术(Kosbor 等, Immunol Today 4: 72,1983; Cote 等, Proc Natl Acad Sci 80 : 2026-2030, 1983)以及 EBV-杂交瘤技术 (Cole 等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss Inc, New York N. Y. , pp 77-96, (1985)。

当使用杂交瘤技术时，可使用骨髓瘤细胞系。适于制备杂交瘤的融合方法的这类细胞系优选是非产抗体的，具有高融合效率，酶缺陷使得它们在仅支持所需融合细胞(杂交瘤)的特定选择性培养基中无法生长。例如，当所免疫动物是小鼠时，可以使用 P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8. 653, NS1/1. Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 和 S194/5XXO Bul; 而所免疫动物是大鼠时，可以使用 R210. RCY3, Y3-Ag 1.2. 3, IR983F 和

4B210; U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 和 UC729-6 都可以用于细胞融合。值得注意的是,用制备单克隆抗体的这类技术制备的杂交瘤和细胞系都是本发明的新组合物。

5 在制备与所选 VEGFR-3 表位发生免疫反应的多克隆抗血清的范例性方法中,将 50 μg VEGFR-3 抗原用 Freund's 完全佐剂乳化后免疫兔。以例如 21 天的间隔,将 50 μg 表位用 Freund's 不完全佐剂乳化后加强免疫。

10 为了制备单克隆抗体,用重组 VEGFR-3 周期性注射小鼠,以制备抗重组 VEGFR-3 的抗体(例如,10-20 μg 用 Freund's 完全佐剂乳化)。用含可特异性识别 PBS 中淋巴管内皮细胞的表位的 VEGFR-3 多肽对小鼠作融合前最后一次加强免疫,4 天后宰杀小鼠,取脾。将脾置于 10 ml 无血清 RPMI 1640 中,用浸没于无血清 RPMI 1640 中的两块玻璃显微镜载片的磨砂端之间研磨脾形成单细胞悬液,添加 2 mM L-谷氨酰胺,1 mM 丙酮酸钠,100 单位/ml 青霉素,和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素 (RPMI) (Gibco, Canada)。将该细胞悬液用无菌 70-目 Nitex 细胞滤网(Becton Dickinson, Parsippany, New Jersey)过滤, 15 然后通过 200 g 离心 5 分钟洗涤两次,将沉淀重悬于 20 ml 无血清 RPMI。用相同的方法从三个未处理的(naive)Balb/c 小鼠制备脾细胞,用作对照。将融合前在添加有 11% 胎牛血清(FBS) (Hyclone Laboratories, Inc., Logan, Utah) 的 RPMI 中以对数期维持了 3 天的 NS-1 骨髓瘤细胞以 200g 离心 5 分钟,按照上文中描述方式洗涤两次。

20 将 1×10^8 脾细胞和 2.0×10^7 NS-1 细胞合并后离心,吸除上清。轻轻击打试管使细胞沉淀松动,1 分钟过程中振荡加入 1 ml 37 $^{\circ}\text{C}$ PEG 1500 (50% 的 75mM HEPES 溶液, pH 8.0) (Boehringer Mannheim), 然后 7 分钟过程中加入 7 ml 无血清 RPMI。再另加入 8 ml RPMI, 200 g 离心细胞 10 分钟。弃去上清后,将沉淀重悬于含 15% FBS, 100 μM 次黄嘌呤酸钠(sodium hypoxanthine), 0.4 μM 氨基喋呤, 16 μM 胸苷(HAT) (Gibco), 25 单位/ml IL-6 (Boehringer Mannheim) 和 1.5×10^6 脾细胞/ml 的 200 ml RPMI 中,铺板于 10 25 Corning 平底 96-孔组织培养平板(Corning, Coming New York)。

30 在融合后的第 2、4 和 6 天时,从融合平板的孔取出 100 μl 培养基,代之以新鲜培养基。第 8 天时,用 ELISA 筛选融合细胞,按照下述方法测试有无可结合 VEGFR-3 的小鼠 IgG。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下将 Immulon 4 平板(Dynatech, Cambridge, MA)用稀释于 25mM Tris, pH 7.5 中的 VEGFR-3 以 100 ng/孔的量

包被 2 小时。吸除包被液，加入 200 μ l/孔封闭液(0.5% 鱼皮凝胶 (Sigma)稀
释于 CMF PBS)，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。用加有 0.05% Tween 20 的 PBS(PBST)
洗涤平板 3 次，加入 50 μ l 培养物上清。37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟后，照上述方法洗
涤，加入 50 μ l 以 1: 3500 稀释于 PBST 的辣根过氧化物酶偶联的山羊抗-小
5 鼠 IgG (fc)(Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania)。按照上述
方法孵育平板，用 PBST 洗涤 4 次，加入底物 100 μ l，该底物由含 1 mg/ml 邻
苯二胺(Sigma) 和 0.1 μ l/ml 30% H_2O_2 的 100 mM 柠檬酸组成，pH 4.5。5 分
钟后加入 50 μ l 15% H_2SO_4 终止反应。用平板阅读仪(Dynatech)读取 A_{490} 值。

通过下述方法对选择的融合孔进行两次克隆：稀释入 96-孔平板，5 天
10 后目测计数克隆数目/孔。用 Isostrip 系统(Boehringer Mannheim, Indianapolis,
IN)对杂交瘤生产的单克隆抗体进行同工型分析。

除制备单克隆抗体外，还发展了制备"嵌合抗体"的技术，可以将小鼠抗
体基因拼接到人抗体基因上，得到具有合适抗原特异性和生物活性的分子
(Morrison 等, Proc Natl Acad Sci 81 : 6851-6855, 1984; Neuberger 等, Nature
15 312 : 604-608, 1984; Takeda 等, Nature 314: 452-454; 1985)。替代地，也可对
已述用于制备单链抗体的技术(美国专利 4,946, 778)调整后用于制备
VEGFR-3-特异性单链抗体。

本领域技术人员可以从已证实能结合 VEGFR-3 或其它淋巴管内皮细胞
抗原的抗体群中，用血管内皮细胞"扣除(subtract)"那些与 VEGFR-3 或所述细
20 胞上其它表位交叉反应的抗体。余下的抗体群便富含优先识别淋巴管内皮细
胞表位的抗体。

还可以通过诱导淋巴细胞群体内生成或者通过对重组免疫球蛋白文库
或一系列高特异性结合反应物进行筛选来制备抗体，这些方法描述见
Orlandi 等,(Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837; 1989)，和 Winter G and Milstein
25 C (Nature 349: 293-299, 1991)。

要指出的是本发明所述抗体，除可用于本发明所述分离方法外，还可用于
常规免疫化学方法例如 ELISA 和 Western 印迹方法，免疫组织化学方法
例如组织染色，以及其它可以利用抗 VEGFR-3-相关抗原表位的特异性抗体的
方法。

30 通常，本发明制备的多克隆抗体和单克隆抗体都可用于多种其它实施方案
中，某些方面，可以将所述抗体用于治疗目的，以期达到对 VEGFR-3 活

性的抑制。抗体可用于阻断 VEGF-C 作用和 VEGFR-3 受体功能从而治疗与淋巴管生成相关的过度增生病症。本发明抗体还可用于诊断目的，例如检测组织样本(包括疑似疾病状态位点的样本)中 VEGFR-3 蛋白的增加或减少。其它方面使用本发明抗体通过抗体克隆方法获得编码其它 VEGFR-3 蛋白的 cDNAs 或基因。它们还可用于抑制试验来分析细胞或动物中 VEGFR-3 相关肽的作用。本发明制备的抗体还可用于免疫定位研究，以便分析 VEGFR-3 在不同细胞事件中的分布，例如，测定 VEGFR-3 多肽在细胞周期不同点的细胞或组织特异性分布。所述抗体特别有用的用途是用于纯化天然或重组 VEGFR-3，例如用抗体亲和柱。根据本说明书的教导，所有这些免疫学技术的操作应为本领域技术人员已知。

除上述“常规”方法制备本发明所用抗体外，还可用噬菌体展示方法筛选本发明所用抗体。现已知 2E11D11 和抗-podoplanin 抗体可特异性识别淋巴管内皮细胞。用这两种抗体分离的细胞可作为用噬菌体展示 2E11D11 或抗-podoplanin 相关分子的所有可能突变体时出现的其它相关抗体的 read-out。替代地，所展示的抗体也可根据其由 2E11D11 或抗-podoplanin 所识别的给定表位结合的能力进行筛选。这种用于分离新抗体的方法已为本领域熟知，具体描述见例如美国专利 5,223,409，在此引入作为参考，其中描述了结合蛋白的直系进化。相关方法描述还可见美国专利 5,403,484；美国专利 5,571,698；美国专利 No.5,837,500；美国专利 5,702,892；美国专利 5,780,279；美国专利 5,821,047；美国专利 No.5,824,520；美国专利 5,855,885；美国专利 5,858,657；美国专利 5,871,907；美国专利 5,969,108；美国专利 6,057,098；美国专利 6,225,447 中描述的技术也用于制备本发明所述抗体。

另外，另一种可用于制备本发明所用抗体的技术是推理性设计模型方法(rational design type approach)。推理性设计的目标是制备生物活性多肽或化合物的能够与其相互作用的结构类似物(激动剂、拮抗剂、抑制剂、肽模拟物(peptidomimetics)、结合伴侣，等)。这种情况下，所述活性多肽是本申请全文讨论的 2E11D11 和抗-podoplanin 抗体。通过制备所述类似物，有可能制备出其它比天然 2E11D11 或抗-podoplanin 分子具有更强免疫反应活性的抗体。一方法中，可以生成该抗体或其表位结合片段的三维结构。这可通过 x-射线晶体学，电脑模型或者通过二者结合实现。另一方法是“丙氨酸扫描”，包括用丙氨酸随机取代整个分子中的残基，和测定最终对功能所产生的影

响。

另外还可解析出特异性抗体的晶体结构。原则上，这种方法生产出药核 (pharmacore)，后续的药物设计可以以此为基础。也可以通过制备功能性药物活性抗体的抗独特型抗体来完全回避蛋白质晶体学。作为镜像的镜像，抗独特型的结合位点有望作为原始抗原的类似物。然后可以用抗-独特型从化学-或生物-制备的肽库中鉴定和分离其它抗体。

D. 分离细胞的方法

本发明提供了一种从混合细胞培养物中分离淋巴管内皮细胞的方法。从根本上说，这种分离方法使用的是能够优先识别淋巴管内皮细胞的抗体。上文已经讨论了这种制备及这类抗体的实例。本部分描述的是与抗体结合使用而分离细胞的技术。这些仅仅是例举性技术，本领域技术人员应该知道其它用于分离细胞的方法也可与本申请所述方法结合使用。

不同技术都可以用于分离本发明细胞。可以将抗体吸附到固相载体上进行粗分离。使用的分离技术应能最大限度保持收集级分的存活能力。各种不同功效的技术都可以用于获得“相对粗”的分离。这种分离为不带标志物的总细胞的最多 10%，通常不超过 5%，优选不超过 1%，可根据要保有的细胞群来定。所使用的具体技术取决于分离效率、相关毒性、操作(performance)难易程度及速度，以及精密设备和/或工艺技术的必要性。

分离用的方法可包括但不限于磁性分离(使用抗体-包被的磁珠)，亲和层析，连接有单克隆抗体或与单克隆抗体联用的细胞毒性试剂，包括但不限于补体和细胞毒素，以及用吸附在固相基质例如平板上的抗体进行“淘选”，洗脱(elutriation)或任一其它常规技术。

分离技术的使用包括但不限于那些根据物理特性(密度梯度离心和反流动离心洗脱(counter-flow centrifugal elutriation))，细胞表面特性(凝集素和抗体亲和力)以及，重要染色特性(线粒体-结合颜料 rho123 及 DNA-结合颜料 Hoechst 33342)上的差异为基础的技术。

提供精确分离的技术包括但不限于荧光激活细胞分选 (FACS) FACS，该技术复杂程度不同，例如多个颜色通道、低角度且钝光散射检测通道，阻抗通道，等。

FACS 是一种细胞分选方法，可根据细胞表面标志的差异分离悬液中的

细胞。在本发明上下文中，FACS 可用于从混合细胞群中特异性移取淋巴管内皮细胞。FACS 可通过物理学方式从杂合群体中分离出目的细胞或颗粒。用该技术，可在无菌环境下分选细胞，这样就可使回收的细胞能够被培养。淋巴管内皮细胞根据本发明抗体所识别抗原的存在与否进行分选。另外，

5 FACS 还可通过识别污染细胞的抗原表达，GFP 表达，DNA 含量或细胞功能（例如，钙流动或凋亡），除去细胞培养物中的污染细胞。污染细胞的去除可在分离淋巴管内皮细胞之前，之后或者之前和之后都进行。

FACS 以流式细胞计数术为基础，流式细胞计数术是一种当悬液中的细胞或颗粒一个个顺次通过感应点时测量它们特定物理及化学性质的方法。因此，流式细胞计数器可以认为是一种特殊的荧光显微镜。现代的流式细胞计数器由光源、集光器(collection optics)、电子设备(electronics)和将信号翻译为数据的电脑组成。在大多数现代细胞计数器中选择的光源为发出特定波长的一致光线的激光。离散的或者放射的荧光通过两个透镜(一个装在光源前面，一个设定为右倾角度)以及通过一系列光学镜片，光束分隔器及滤光器来收集，特定波段的荧光可以被测量。流式细胞计数技术测量的物理特性包括细胞大小、形状及内部组成等特性，当然可被荧光化合物检测的任一细胞组分或功能都可以拿来测试。

10

15

通常，流式细胞计数器使用的原理包括带电小滴的静电偏转。从样本中吸出的细胞从喷嘴逐个喷射出去形成一股鞘液(sheath fluid)流，通常为 PBS 但是也可以是任一电离液。由于细胞被激光束中途截取，因而产生了散射光和荧光信号，然后由分选逻辑板(sort logic boards)决定细胞应否被拣选（根据使用者的特定标准）。在本发明情况下，使用者设定的标准是分选的淋巴管内皮细胞是否被淋巴管内皮细胞特异性抗体结合或识别，例如 2E11D11、抗-podoplanin 等。

20

激光截取和 break-off 点之间的距离称之为滴落延迟(drop delay)。如果一种目的细胞，即要拣选的细胞已经被检测，那么细胞计数器一直等到细胞从截取点运行到 break-off 点，然后再让细胞流带电。只要。只要含目的细胞的小滴脱离一致的液流(solid fluid stream)那么它就将带电，要么是正电要么是负电。带电小滴向下再流动一段距离进入两个高压偏转板，然后被吸向极性相反的板。所以能够从同一样本中分拣出两个分离的群体。

25

30

首次分离中，通常用约 $1 \times 10^{8-9}$ 个细胞开始，优选约 $5 \times 10^{8-9}$ 个细胞，淋

巴管细胞特异性抗体可用一种荧光素标记，而其它不同细胞的抗体，或抗-gp80 抗体，可偶联至少 1 种不同的荧光素。尽管每一种细胞谱系可在不同的步骤中分离，但是当决定要选出被 2E11D11 识别的表位和/或其它淋巴管内皮标志时还是期望同时将细胞系分离开来。可以从死细胞中选择出所需细胞，方法如利用与死细胞结合的颜料(包括但不限于，碘化丙锭 (PI))。优选地，将细胞收集在适于细胞培养或存储的培养基中。细胞的选择可以根据光-散射特性以及其不同细胞表面抗原的表达情况进行。本领域技术人员已经熟知可用于本发明细胞的 FACS 分选的具体方案。

在一范例性 FACS 操作方案中，微脉管内皮细胞在悬液中的标记通过与识别淋巴管内皮细胞的一种或多种抗体在 4℃ 下孵育 40 分钟完成。细胞分选之前和之后都要在 4℃ 的适宜培养基中维持。抗体标记完成后，向各个样品管加入终浓度为 10 μg/ml 的碘化丙锭(用于检测死细胞)。荧光激活细胞分选是在使用带 60mW 功率 100μm 喷嘴的 4 W 氩激光器的 Becton Dickinson FACSTAR^{plus}(San Jose, Calif.)上进行的。FACS 还可通过测定细胞的 FSC 和 SSC 散射来测定物理特性。

除 FACS 之外，MACS 也是一种分选细胞的有用技术。它不再使用免疫荧光作为分离细胞的方法，而是将细胞用免疫磁性标记，然后用磁场分离。也可用吸附到磁珠上的抗体从混合群体培养物中分离出淋巴管内皮细胞。呈递抗体的磁珠被固定到设置在磁场中的柱体上。然后让微脉管细胞群通过上述柱体，淋巴管内皮细胞就被抗体结合而剩余细胞被收集在柱体流通池中。

常规的免疫吸附亲和层析也可用于分离淋巴管细胞。该技术中，抗体被固定在惰性柱体层析珠子上，而这些珠子装填到柱体中。当微脉管细胞群经过柱体时，淋巴管内皮细胞与抗体结合而非-淋巴管内皮细胞流经柱体进入柱体流通池。

也可用淘选技术分离本发明的淋巴管内皮细胞。淘选细胞是本领域熟知技术，该技术利用抗体将细胞固定到固相载体如皮氏(petri)培养皿。大体说来，就是将特异于待淘选细胞的抗体，例如特异于淋巴管内皮细胞的 2E11D11，包被在贴壁细胞培养平板上。然后将混合细胞群加到该平板上，让平板漩涡振动以使细胞与固定在平板上的抗体充分接触。从平板上除去剩余未被抗体识别的细胞培养物，留下了与抗体粘附且基本不含污染细胞的淋巴管内皮细胞。收获这些细胞并将其转移入新鲜培养基扩大培养，或者也可

以向粘附抗体的细胞添加新鲜培养基。就微脉管细胞群而言，应该理解的是
15 剩余在悬液中并与吸附的淋巴管细胞脱离的细胞是基本不含淋巴管内皮细胞
的血管内皮细胞群。

在一范例性淘选方法中，将稀释于 9 ml 合适缓冲液内的抗体灌注 100
5 mm² 细菌学用聚苯乙烯皮氏培养皿(Falcon, Lincoln Park, N. J.)上(0.5 mg/平
皿)。漩涡振动平皿以便均匀包被表面，室温下孵育 40 分钟。使用前用缓冲
液洗涤包被后的平皿除去未粘附到皮氏平皿上的任一残余抗体。将一定体
积，例如含最多 3 x10⁷ 个细胞的 10 毫升微脉管细胞悬液在包被有抗体的平
皿中 4 °C 孵育 10 分钟。抽吸除去未-吸附细胞，然后用适于细胞的缓冲液
10 或培养基洗涤平板。可以离心沉淀未-吸附细胞，然后再培养。

E. VEGFR-3 活性测定试验

通过 VEGF-C/D 与 VEGFR-3 受体家族结合介导的许多生物活性(包括但
不限于影响血管内皮细胞和血管的生长及迁移；促进淋巴管内皮细胞和淋巴
15 管的生长；增加血管的通透性；影响髓细胞生成) 支持了本发明分离细胞
的大量体外及体内临床应用。首次，可以在基本无非-淋巴管内皮细胞污染影
响的淋巴管内皮细胞培养物中特异性监测这类活性。可以监测这些细胞中
VEGF-C/D 的 VEGFR-3 结合和活性以及调控这种结合的化合物。因此，本
发明细胞可有效鉴定 VEGF-C/D 介导的生物应答的调控剂及优选实施方案
20 中的相应抑制剂。本发明描述了用于测定 VEGFR-3 结合和/或活性存在的各
种测定方法。本发明分离的细胞中这类活性的出现表明这类细胞是淋巴管内
皮细胞。

可根据细胞能否显示 VEGFR-3 结合活性来监测淋巴管内皮细胞的出
现。范例性结合试验已有描述见 Achen 等, Proc Natl Acad Sci USA 95: 548-53
25 (1998), 整体引入作为参考。这些试验通常包括：将应该表达有 VEGFR-3 受
体的本发明所述细胞与该受体的配体(例如，VEGF-C)混合，测定该受体的结
合情况。

所述细胞可以用于下述情况：即在将药物施用给个体之前就希望测定该
药物在抑制 VEGFR-3 受体方面的治疗效果。作为活性的指征，也可以测定
30 该治疗药物改变细胞上 VEGFR-3 受体自身磷酸化的能力。将一候选治疗药
物加到细胞上，然后裂解该细胞，用抗-VEGF 受体抗血清免疫沉淀，用抗-

磷酸酪氨酸抗体通过 Western 印迹试验分析测定 VEGF 受体的磷酸化。

这些试验中的细胞用本领域技术人员熟知的技术培养。例如，将细胞培养在 Ham's F12 培养基-10% 胎牛血清(FCS)中。在添加有 0.2% 牛血清白蛋白(BSA)的 DMEM 培养基或 Ham's F12 中过夜使这些细胞饥饿，然后单独用 5 VEGF-C 或联用治疗药物和 VEGF-C 孵育 5 分钟。

加入 VEGF-C 后，细胞用含 100 mM 正钒酸钠的冰冷 Tris-缓冲盐溶液 (TBS)洗涤 2 次，然后在含 1 mM 苯甲基磺酰氟(PMSF), 0.1 U/ml 抑蛋白酶肽和 1 mM 正钒酸钠的 RIPA 缓冲液中裂解。裂解物超声波处理，然后 16,000 x g 离心 20 分钟澄清，然后用 3-5 μ l VEGFR-3 或 VEGFR-2 特异性抗血清冰上孵育 3-6 小时。用蛋白 A-Sepharose 结合免疫沉淀物，用含 1mM PMSF, 1mM 正钒酸钠的 RIPA 缓冲液洗涤 3 次，用 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 洗涤 2 次，用 7% 凝胶 SDS-PAGE 电泳分离。通过 Western 印迹将多肽转移到硝酸纤维素膜然后用 PY20 磷酸酪氨酸-特异性单克隆抗体 (Transduction Laboratories)或受体-特异性抗血清和 ECL 检测法(Amersham Corp.)进行分析。 15

候选药物影响自身磷酸化(用抗-磷酸酪氨酸抗体检测)的能力可以评为调节受体的等级。不同浓度治疗药物相对于已知浓度的 VEGF-C 的水平变化，提供了受体调节能力的指示。已经表明可结合受体但不能刺激受体磷酸化的治疗药物，可以视为抑制剂。抑制活性可用下述方法进一步分析：将已知的受体激动剂如重组 VEGF-C 与单纯的培养基或与经浓缩的使用后的培养基混合，测定经浓缩的使用后的培养基能否抑制 VEGF-C-介导的受体磷酸化。 20

淋巴管内皮细胞的出现也可以用与 VEGFR-3 天然或重组配体的结合试验来监测。为了测定所选配体的结合亲和力，可使用 ELISA-型的方法。例如，为了测定与 VEGFR-3 的结合亲和力，将竞争性 VEGFR-3-IgG 融合蛋白和亚饱和浓度的加 myc 表位标签的候选配体系列稀释后，加入包被有 VEGFR-3 的微量滴定板，孵育直至建立平衡。然后洗涤滴定板除去未结合蛋白。与 VEGFR-3 包被滴定板结合的配体用抗- myc 抗体检测，该抗体偶联有易检测的标记物例如辣根过氧化物酶。结合亲和力(EC₅₀)可以计算为导致半数-最大结合(half-maximal binding)的竞争性 VEGFR-IgG 融合蛋白浓度。 25 30

VEGF-C 可以刺激内皮细胞在胶原凝胶上的迁移。可以使用本发明细胞测定胶原凝胶中 VEGF-C 介导的内皮细胞迁移,从而获得关于分离的细胞确实是淋巴管内皮细胞的另一指征。范例性细胞迁移试验已有描述见国际专利公开号为 WO 98/33917 的专利申请,在此引入作为参考。简而言之,将本发明中分离的淋巴管内皮细胞种植于组织培养板胶原层的顶部。将 VEGF-C 置于胶原凝胶内在距吸附的淋巴管内皮细胞位置约 4mm 处制备的孔中。然后计算从胶原凝胶中吸附原始区域迁移至 VEGF-C 孔的内皮细胞数目,以评估 VEGF-C 诱导的细胞迁移。

这些试验的胶原凝胶可用下述方法制备:将 I 型胶原原液 (5 mg/ml 于 1 mM HCl 中)与等体积 2x MEM 及 2 倍体积的含 10% 新生小牛血清的 MEM 混合,得到胶原终浓度为 1.25 mg/ml。组织培养平板(5 cm 直径)用约 1 mm 厚的溶液层覆盖,使该溶液在 37°C 聚合。将本发明淋巴管内皮细胞种植于该层的顶部。

迁移试验中,让细胞吸附在置于第一胶原层顶部的塑胶圆环(1cm 直径)内。30 分钟后,除去圆环,漂洗除去未结合的细胞。加上第二层胶原及培养基层(5% 新生小牛血清 (NCS)),用 0.75% 低熔点琼脂糖(FMC BioProducts, Rockland, ME)凝固。在该细胞斑点两侧距离 4 mm 处制备穿透所有层的孔(3 mm 直径),每天向孔内滴入含 VEGF-C 多肽的培养基。在例如,6 天后,用装有相差镜片的 Olympus CK 2 倒置显微镜获得迁移出斑点边缘的细胞的显微照片。用荧光染料 bisbenzimidazole (1mg/ml, Hoechst 33258, Sigma)对迁移细胞进行核染色,然后计数。

加入培养基的 6 天后,测定从最初附着区向含有 VEGF-C 的孔的方向迁移了不同距离的细胞的数目。用显微镜目镜镜头格栅和 10 X 放大倍数的荧光显微镜,计数 5 个邻接的 0.5 mm x 0.5 mm 正方形区域中迁移离开原始圆环的细胞数目。迁移超出 0.5 mm 范围的细胞通过以 0.5 mm 的步幅移动格栅,然后以相同方式计数。本发明细胞进行 VEGF-C 介导的迁移的能力,表明该分离的细胞是表达有 VEGFR-3 的淋巴管内皮细胞。

此外,VEGF-C 的促有丝分裂活性可用内皮细胞增殖试验测定,例如 Breier 等,Dev 114: 521-532 (1992)中所述的试验,全文引入作为参考。可以通过向细胞添加 VEGF-C 测定细胞的这种效应。3 天后,用胰蛋白酶解离细胞,然后用细胞计数器计数以测定所述肽对淋巴管内皮细胞增殖活性的影

响。

F. VEGFR-3 的刺激物

如本说明书所述, 可以将分离的淋巴管内皮细胞以能促进其在培养中存活的方式培养在培养基中。具体的技术方案中, 可以将细胞培养于有 VEGFR-3 刺激物和/或 VEGFR-2 刺激物存在的条件下, 所述刺激物包括但不限于 VEGF, VEGF-C, VEGF-C156S, VEGF-D 和 ORFV2-VEGF。这些刺激物及其对 VEGF 受体的作用将在本章节进一步详细讨论。应该理解的是, 这些物质可以制备成任一能够使得其与本发明细胞结合使用的配制剂。此外, 这些刺激物可以单独或联合施用给本发明细胞, 以抑制、抑压、减轻或者阻止培养物中淋巴管内皮细胞的凋亡。

上述刺激物属于生长因子的 PDGF/VEGF 家族, 该家族至少包括下列成员: PDGF-A (参见, 例如, GenBank 等记号为 X06374), PDGF-B (参见, 例如, GenBank 等记号为 M12783), VEGF (参见, 例如, GenBank 等记号为 Q16889, 本申请为清楚起见称为 VEGF-A 或具体的同工型), PIGF (参见, 例如, GenBank 等记号为 X54936 胎盘生长因子), VEGF-B (参见, 例如, GenBank 等记号为 U48801; 又称为 VEGF-相关因子 (VRF)), VEGF-C (参见, 例如, GenBank 等记号为 X94216; 又称为 VEGF 相关蛋白 (VRP)), VEGF-D (又称为 c-fos-诱导生长因子 (FIGF); 参见, 例如, GenBank 等记号为 AJ000185), VEGF-E (又称为 NZ7 VEGF 或 OV NZ7; 参见, 例如, GenBank 等记号为 S67522), NZ2 VEGF (又称为 OV NZ2; 参见, 例如, GenBank 等记号为 S67520), D1701 VEGF-样蛋白 (参见, 例如, GenBank 等记号为 AF106020; Meyer 等, EMBO J 18: 363-374), 和 NZ10 VEGF-样蛋白(描述见国际专利申请 PCT/US99/25869) [Stacker and Achen, Growth Factors 17: 1-11 (1999); Neufeld 等, FASEB J 13: 9-22 (1999); Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999)]。

VEGF-C 含有一 VHD, 在氨基水平与 VEGF-A 具有至少 30% 的同一性。VEGF-C 最初表达为一较大的前体蛋白, 前原(prepro)-VEGF-C, 在 VHD 两侧具有延伸的氨基-及羧基-末端肽序列, C-末端肽在巴尔比亚尼(Balbiani)环 3 蛋白的典型基序中包含串联重复半胱氨酸残基。前原-VEGF-C 经历深度 (extensive)蛋白水解性成熟, 其中包括信号肽、C-末端原-肽、N-末端原-肽的

连续性切割。分泌的 VEGF-C 蛋白由非-共价键-连接的同源二聚体组成，其中每一单体都含有 VHD。部分蛋白水解处理产生的 VEGF-C 中间形式表现出与 VEGFR-3 受体的亲和力增加，而成熟蛋白还能结合 VEGFR-2 受体。[Joikov 等, EMBO J, 16: (13): 3898-3911 (1997).] 另外还证实一种突变体

5 VEGF-C，其中第 156 位的单半胱氨酸被另一氨基酸取代或缺失，该突变体失去了与 VEGFR-2 结合的能力但仍能结合并活化 VEGFR-3 [国际专利公开文本 WO 98/33917]。小鼠胚胎中，VEGF-C mRNA 起初表达于尿囊、喉部区域及后肾。[Joukov et al., J Cell Physiol 173: 211-215 (1997)]。VEGF-C 参与淋巴管生成的调节：当 VEGF-C 过表达于转基因小鼠的皮肤中时，会观察到

10 增生的淋巴管网络，这表明 VEGF-C 能诱导淋巴管发育 [Jeltsch 等, Science, 276: 1423-1425 (1997)]。VEGF-C 在成人的连续表达(Continued expression)表明其在维持分化的淋巴管内皮细胞中发挥作用[Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999)]。VEGF-C 还表现血管生成特性(angiogenic properties)：它能刺激牛毛细管内皮细胞(BCE)在胶原中迁移，并能促进人内皮细胞生长[参

15 见，例如，国际专利公开文本 WO 98/33917，在此引入作为参考]。VEGF-C_{156S} 是一种 VEGF-C 半胱氨酸缺失变体，能够结合 VEGFR-3 但显示与 VEGFR-2 结合减弱(相对于 VEGF-C)。VEGF-C_{156S} 及相关的可用于本发明的 VEGFR-3 特异性配体的描述见美国专利 6,130,071，在此专门整体引入作为参考。VEGF-C 物质及方法描述见美国专利 US6,245,530 和 6,221,839，在

20 此引入作为参考。

VEGF-D 在结构和功能上与 VEGF-C 最密切相关[见国际专利公开文本 WO 98/07832 和美国专利 6,235,713，在此引入作为参考]。与 VEGF-C 一样，VEGF-D 初始也表达为一前原-肽，经过 N-末端和 C-末端蛋白水解处理，形成非-共价连接的二聚体。VEGF-D 能够体外刺激内皮细胞的促有丝分裂应

25 答。在胚胎形成过程中，VEGF-D 表达为一复杂的时空模式，其表达在成人的心、肺及骨骼肌中持续。命名为 VEGF-D Δ N Δ C 的 VEGF-D 生物活性片段的分离见国际专利公开文本 WO98/07832，在此引入作为参考。VEGF-D Δ N Δ C 由 VEGF-D 中第 93-201 位残基与亲和标签肽 FLAG[®]连接组成。

VEGF-A 最初是根据其对内皮细胞的促有丝分裂活性而从几种来源中纯

30 化，也可以根据其诱导微血管通透性的能力来纯化，因此它也称为微血管通透因子(VPF)。随后证实 VEGF-A 诱导多种生物过程，包括细胞内钙转移，

诱导血纤蛋白溶酶原激活物和血纤蛋白溶酶原激活物抑制剂-1的合成,促进单核细胞体外迁移,诱导抗凋亡蛋白(antiapoptotic protein)在人内皮细胞中的表达,诱导内皮细胞穿孔,促进细胞粘附分子在内皮细胞中的表达,以及诱导一氧化氮介导的血管扩张和低血压 [Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999); Neufeld 等, FASEB J 13 : 9-22 (1999); Zachary, Intl J Biochem Cell Bio 30: 1169-1174 (1998)].

VEGF-A 是一种分泌型、二硫键连接 23 kD 亚单位组成的同源二聚体糖蛋白。已有描述,人 VEGF-A 的五种同工型长度为 121,145, 165, 189 或 206 个氨基酸 (VEGF₁₂₁₋₂₀₆), 由不同的 mRNA 剪接变体编码,所有这些形式都能刺激内皮细胞中有丝分裂的发生。但是,每一同工型在生物活性、受体特异性及对细胞表面-相连及胞外基质-相连的硫酸乙酰肝素蛋白多糖的亲合力各不相同,这些蛋白多糖是 VEGF-A 的低亲和力受体。VEGF₁₂₁ 不结合肝素或硫酸乙酰肝素; VEGF₁₄₅ 和 VEGF₁₆₅ (GenBank 等记号为 M32977) 二者都能结合肝素; VEGF₁₈₉ 和 VEGF₂₀₆ 表现出与肝素和乙酰肝素的亲和力最强。VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₅ 和 VEGF₁₆₅ 以可溶形式分泌,尽管 VEGF₁₆₅ 大部分固定于细胞表面及胞外基质蛋白多糖,而 VEGF₁₈₉ 和 VEGF₂₀₆ 仍然与胞外基质相连。VEGF₁₈₉ 和 VEGF₂₀₆ 都能通过用肝素或肝素酶处理释放出来,这表明这些同工型都是通过蛋白多糖结合于胞外基质。与细胞结合的 VEGF 189 也可用蛋白酶如纤溶酶切割,导致释放出可溶的活性 VEGF₁₁₀。表达 VEGF 的组织大多数都同时可表达好几种 VEGF 同工型,尽管 VEGF₁₂₁ 和 VEGF₁₆₅ 是主要形式,而 VEGF₂₀₆ 很少能检测到[Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999)]. VEGF₁₄₅ 有所不同,它主要表达在来自生殖器官的细胞中 [Neufeld 等, FASEB J 13 : 9-22 (1999)].

VEGF-A 的表达模式表明它参与正常脉管系统的发育和维持,并且参与了与肿瘤生长及其它病理状况如风湿性关节炎相关的血管生成。VEGF-A 表达在与发育中的脉管系统相关的胚胎组织中,并且被多种肿瘤细胞系分泌。对通过靶基因断裂而敲除了 VEGF-A 的小鼠的分析表明: VEGF-A 对于存活至关重要,心血管系统的发育对 VEGF-A 浓度梯度高度敏感。缺乏单拷贝 VEGF-A 的小鼠在妊娠第 11 至 12 天死亡。这些胚胎显示出受损的生长及数种发育异常,包括心血管发育缺陷。VEGF-A 还是出生后生长、器官发育、调节生长板形态发生及软骨内骨形成所必需的。对 VEGF-A 的需求随年龄减

低,特别是出生后第4周以后。成熟动物体内,对 VEGF-A 的需要主要在于伤口愈合及黄体发育等过程中激活血管生成。[Neufeld 等, FASEB J 13: 9-22 (1999); Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999)]。 VEGF-A 的表达主要受组织缺氧及多种激素和细胞因子的影响,包括表皮生长因子(EGF), TGF- β 及各种白细胞介素。调控发生在转录及转录后,如增加 mRNA 稳定性[Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999)]。

VEGF 亚家族中的其它 4 个成员已经在感染人、绵羊及山羊的痘病毒中检测出。Orf 病毒-编码的 VEGF-E 和 NZ2 VEGF 是强效有丝分裂原和通透性提升因子。二者与哺乳动物 VEGF-A 间表现出约 25 % 的氨基酸同一性,都表达为二硫键连接的同源二聚体。被这些病毒感染的特征为脓胞性皮炎,其中涉及由这些病毒 VEGF 蛋白诱导的内皮细胞增殖和血管通透。[Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999); Stacker and Achen, Growth Factors 17: 1-11 (1999)]。另外,还从另两株 orf 病毒 D1701 [GenBank 登记号为 AF106020; 描述见 Meyer 等, EMBO J 18:363-374 (1999)] 和 NZ10 [描述见国际专利申请 PCT/US99/25869, 在此引入作为参考]鉴定出了 VEGF-样蛋白。已证实这些病毒性 VEGF-样蛋白可结合宿主内皮细胞上的 VEGFR-2, 这种结合对于感染的发展及病毒诱导的血管生成起着重要作用 [Meyer 等, EMBO J 18: 363374 (1999); 国际专利申请 PCT/US99/25869]。

20 G. 治疗 VEGF-C 相关病症的方法

在另一技术方案中,本发明还涉及以配体-介导的 VEGFR-3 活性为特征的病变的诊断和治疗。可因该干预而受益的病症很多,包括但不限于癌症、慢性炎症性疾病、类风湿性关节炎、牛皮癣,糖尿病性视网膜病,等。具体实施方案中,本发明所述治疗方法用于治疗淋巴管病症。本发明的细胞可分离自疑似患有通过 VEGFC 结合 VEGFR-3 介导的疾病的患者。

"淋巴管病症"意指能影响淋巴管系统的任一临床症状,包括但不限于淋巴水肿、淋巴管瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管肌瘤病、淋巴管扩张及水囊状淋巴管瘤。优选的实施方案是筛选出淋巴水肿的患病危险增加了的受试人,即,除已知由非-遗传因素(例如,寄生虫、外科手术)引发的淋巴水肿外,被临床医生诊断为淋巴水肿且特征为与淋巴液聚积相关的肿胀的任一病症。例如,淋巴水肿病症包括 Milroy-Nonne (OMIM 153100)综合征-早发作(early onset)

淋巴水肿 [Milroy, N. Y. Med. J, 56: 505- 508 (1892); Dale, J. Med. Genet., 22: 274-278 (1985)]和原发性(praecox)淋巴水肿 (Meige 综合症, OMIM 153200)-晚发作(late onset) 淋巴水肿 [Lewis 等, J. Ped., 104: 641-648 (1984); Holmes 等, Pediatrics 61: 575-579 (1978); and Wheeler 等, Plastic Reconstructive Surg., 5 67: 362-364 (1981)], 它们通常被描述为单独实体, 都以显性遗传为特征。但是, 在关于区分这类病症的文献中存有令人混淆的地方。在 Milroy's 综合征中, 从出生时便可见水肿的存在, 通常在下肢更为严重。原发性淋巴水肿的存在形式类似, 但肿胀通常于青春期发作。现已报道一些病例子于青春 10 期后的时期发病。在本申请所述的具体试验中, 与 5q34-q35 连锁的淋巴水肿家族中, 大多数受侵袭的个体有早期发作, 而这些家族的个体则出现于青春 10 期或之后出现。

本发明治疗特别关注的是具有可鉴定的遗传诱因的遗传性淋巴水肿。例如, 国际专利公开文本 WO 005/58511 描述了涉及 VEGFR-3 突变的淋巴水肿的筛选和治疗。从所述患者分离淋巴管内皮细胞的能力使得让来自体内的靶 15 细胞与治疗药物结合, 然后回输该细胞, 而改进基于蛋白或基于基因的治疗。

此外, 可根据本发明治疗的另一类型病症仅限于涉及 VEGFC 和/或 VEGFR-3。因此, 例如, 许多肿瘤都可用本发明的细胞测定, 包括脑癌(成 20 胶质细胞瘤、星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤, 室管膜细胞瘤)、肺癌、肝癌、脾癌、肾癌、淋巴结癌、胰腺癌、小肠癌、血细胞癌、结肠癌、胃癌、乳腺癌、子宫内膜癌、前列腺癌、睾丸癌、卵巢癌、皮肤癌、头颈部癌、食道癌、骨髓癌、血癌及其它组织癌。从患有这些疾病的患者分离的细胞可用于向个 20 体提供治疗。

多处上下文中, 在提供治疗时, 无需将肿瘤细胞杀死或诱导其经历正常 25 细胞死亡或“凋亡”。为了实现有意义的治疗, 所要做的全部就是一定程度减缓肿瘤的生长, 或将其固定于特定区域并抑制其扩散至其它位点。肿瘤生长可被完全阻止, 或者实现一定的肿瘤衰退。临床术语如“消退”或“肿瘤的缩小”也都采用其通常用意。在本发明上下文中, 所述治疗效果可通过抑制血 30 管生成和/或抑制淋巴管生成来实现。

30 I. 基因治疗

本发明分离的细胞可用以核酸形式提供的基于基因的治疗来处理, 然后

将其回输入患者体内以便实现回体基因治疗。在回体实施方案中，从患者体内取出细胞，在体外至少保持一段时间。在这段时间内，递送治疗物，然后将细胞回输入患者；顺利的话，样本中的任一肿瘤细胞都被杀死。具体而言，让所述细胞与能够向该肿瘤的淋巴管细胞或血管细胞提供治疗基因的表达构建体接触，接触的方式允许抑制该脉管系统中的 VEGFR-3。

就这些治疗方案而言，范例性表达构建体包含病毒或源自病毒基因组的工程构建体。该表达构建体通常包含编码要表达的治疗基因的核酸以及另加的调控区域，这些调控区域影响该基因在其所施用的细胞内的表达。所述调控区域包括例如启动子、增强子、聚腺苷酸化信号等。

10 目前已经广泛认识到可以使用多种多样的病毒载体将 DNA 导入细胞。在这类实施方案中，表达构建体包括的含目的基因的病毒载体可以是下列病毒载体：腺病毒(参见，例如，美国专利 5,824,544；美国专利 No.5,707,618；美国专利 5,693,509；美国专利 5,670,488；美国专利 5,585,362；每一文献在此引入作为参考)，逆转录病毒(参见，例如，美国专利 5,888,502；美国专利 15 5,830,725；美国专利 5,770,414；美国专利 5,686,278；美国专利 No.4,861,719 每一文献在此引入作为参考)，腺伴随病毒(参见，例如，美国专利 5,474,935；美国专利 5,139,941；美国专利 5,622,856；美国专利 5,658,776；美国专利 5,773,289；美国专利 5,789,390；美国专利 5,834,441；美国专利 5,863,541；美国专利 5,851,521；美国专利 No.5,252,479 每一文献在此引入作为参 20 考)，腺病毒-腺伴随病毒杂合体(参见，例如，美国专利 No.5,856,152 在此引入作为参考)或者痘苗病毒或疱疹病毒(参见，例如，美国专利 5,879,934；美国专利 No.5,849,571；美国专利 5,830,727；美国专利 5,661,033；美国专利 5,328,688 每一文献在此引入作为参考)载体。

其它实施方案涉及非-病毒性递送。这些包括磷酸钙沉淀(Graham and 25 Van Der Be, *Virology*, 52: 456-467,1973; Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7: 2745-2752,1987; Rippe 等, *Mol. Cell Biol.*, 10: 689-695, 1990), DEAE-葡聚糖(Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5: 1188-1190, 1985), 电穿孔(Tur-Kaspa 等, *Mol. Cell Biol.*, 6: 716-718,1986; Potter 等, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81: 7161-7165,1984), 直接微注射(Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101: 30 1094-1099,1985.), 含 DNA 的脂质体(Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721: 185-190, 1982; Fraley 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:

3348-3352,1979; Felgner, *Sci Am.* 276 (6): 102-6,1997; Felgner, *Hum Gene Ther.* 7 (15): 1791-3,1996), 细胞超声波处理 (Fechheimer 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 8463-8467, 1987), 用高速微粒进行基因轰击 (Yang 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 : 9568-9572,1990), 以及受体-介导的转染(Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432,1987; Wu and Wu, *Biochemistry*, 27: 887-892, 1988; Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12: 159-167,1993)。

在本发明的一具体实施方案中, 可将所述表达构建体 (或者实际上是上述的肽) 包裹入脂质体。脂质体是一种囊泡状结构, 特征由磷脂双层膜以及内部含水介质。多层脂质体具有多层被含水介质分隔的脂膜。当将磷脂悬于过量含水溶液中时它们就会自动生成。脂类成分在形成紧密结构之前进行自身-重新排列, 将水和溶解后的溶质包裹于脂质双层之间(Ghosh and Bachhawat, In: *Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands*, Wu G, Wu C ed., New York: Marcel Dekker, pp. 87-104, 1991)。向阳离子脂质体加入 DNA 会导致拓扑学转换, 由脂质体变为光学双折射液相-晶体相凝结球(optically birefringent liquid-crystalline condensed globules) (Radler 等, *Science*, 275 (5301): 810-4, 1997)。这些 DNA-脂质复合体是可用于基因治疗和递送的非-病毒载体。

脂质体-介导的核酸递送及外源 DNA 体外表达已经很成功。本发明另外还实施了各种涉及“脂转染”技术的商品化方法。本发明特定实施方案中, 可以让脂质体与凝血(hemagglutinating)病毒 (HVJ)复合。已证实这样能促进与细胞膜的融合并有助于被脂质体-包裹的 DNA 进入细胞(Kaneda 等, *Science*, 243: 375-378,1989)。其它实施方案中, 可以将脂质体与核非组蛋白染色体蛋白(HMG-1)复合或联合使用(Kato 等, *J. Biol. Chem.*, 266: 3361-3364,1991)。另外的实施方案中, 可将脂质体与 HVJ 和 HMG-1 这二者复合或联合使用。由于这类表达构建体已经成功用于核酸的体内及体外的转移和表达, 所以它们可以用于本发明。

能够用来将编码治疗基因的核酸递送入细胞的其它载体包括受体-介导的递送载体。这些载体优势在于能利用几乎所有真核细胞的受体-介导性内吞作用选择性摄入大分子。由于各种受体的细胞类型-特异性分布, 所以递送可以是高度特异的 (Wu and Wu, 1993, 出处同上)。

受体-介导的基因靶向载体通常由两个组分组成: 细胞受体-特异性配体

和 DNA-结合物。已有几种配体被用于受体-介导的基因转移。研究最为详细的配体是脱唾液酸血清类粘蛋白(ASOR) (Wu and Wu, 1987, supra) 和运铁蛋白(Wagner 等, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 87 (9): 3410-3414,1990)。近来, 一种合成的新糖蛋白已经被用作基因递送载体, 它与 ASOR 识别同样的受体
5 (Ferkol 等, FASEB J., 7: 1081-1091,1993; Perales 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91: 4086-4090, 1994), 表皮生长因子(EGF)也已被用于向鳞状癌细胞 (squamous carcinoma cells)递送基因(Myers, EPO 0273085)。

其它实施方案中, 所述递送载体可以包含配体和脂质体。例如, Nicolau 等(Methods Enzymol., 149: 157-176, 1987)使用乳糖基 (lactosyl)-神经酰胺, 一种半乳糖-末端脱唾液酸神经节苷脂(asialganglioside), 引入脂质体并且观察到肝细胞的胰岛素基因摄入量增加。因此, 通过任意数量的受体-配体系统, 在有或没有脂质体存在的情况下, 将编码治疗基因的核酸特异性递送到具体类型的细胞中, 这也都是切实可行的。

在本发明的另一实施方案中, 所述表达构建体可仅由裸露的重组 DNA
15 或质粒组成。这种构建体的转移可以通过上述任一用物理或化学手段穿透细胞膜的方法实施。这尤其可用于体外转移, 但是, 也可体内使用。Dubensky 等 (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81: 7529-7533,1984)成功地将多瘤病毒DNA以 CaPO_4 沉淀的形式注射入成年和新生小鼠的肝和脾内, 证实活性病毒复制和急性感染。Benvenisty 和 Neshif (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83:
20 9551-9555,1986)也证明直接腹腔注射 CaPO_4 沉淀的质粒也能导致转染基因的表达。

本发明另一用于将裸露 DNA 表达构建体转移入细胞的实施方案涉及微粒轰击。这种方法取决于将 DNA 包被的微粒加速到高速以使它们能穿透细胞膜进入细胞但不杀死细胞的能力(Klein 等, Nature, 327: 70-73, 1987)。现已
25 开发出几种用于加速微粒的装置。一种这样的装置依靠高电压产生电流, 后者提供移动力 (Yang 等, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 87: 9568-9572, 1990)。使用的微粒由生物惰性物质如钨或金珠组成。

本领域技术人员很容易会认识到如何在体内和回体情况下实施基因递送。对于病毒载体而言, 通常制备病毒载体原液。根据病毒种类以及可达到的滴度不同, 可将 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} ,
30 1×10^{11} 或 1×10^{12} 个感染颗粒递送给患者。通过比较相对摄入效率, 可将类

似数据外推到脂质体或其它非-病毒制剂。作为可药用组合物的配制剂将在下文讨论。

不同肿瘤类型采用不同途径。下列有关途径的章节包括了大量可能的途径。对于任一种具体肿瘤而言，都可实施系统递送。这对于攻击显微镜可见的(microscopic)或转移性的癌症特别重要。在鉴定出散在肿瘤实体时，可以采用多种直接的、局部的和区域性的方法。例如，可用表达载体或蛋白直接注射肿瘤。肿瘤的基底 (tumor bed) 可在切除术之前、当中或以后进行处理。切除术后，通常通过手术后该位置留置的导液管递送载体。

10 II. 免疫治疗

免疫治疗通常依赖于免疫效应细胞及分子来靶向并摧毁肿瘤细胞。所述免疫效应物可以是，例如，肿瘤细胞表面上一些标志物的特异性抗体。该抗体可以单独作为治疗效应物或者它也可动员其它细胞去实际实施细胞杀灭。所述抗体还可偶联药物或毒素(化疗药物，放射性核素，蓖麻毒蛋白 A 链，霍乱毒素，百日咳毒素，等)并仅仅作为靶向物质。替代地，所述效应物可以是带有表面分子的淋巴细胞，该分子与肿瘤靶细胞直接或间接作用。各种效应细胞包括细胞毒 T 细胞和 NK 细胞。

在本发明中，可以让单个抗体、多个抗体、抗体偶联物或免疫效应细胞靶向那些选出接受治疗的肿瘤，而与该免疫治疗结合的本发明所述肽靶向肿瘤的脉管系统，从而达到联合治疗效果。

联合治疗的常用方法在下文中讨论。在本发明中，由于已经确证 2E11D11 和抗-podoplanin 抗体能特异性识别淋巴管内皮细胞，所以有可能用细胞毒物质靶向这些细胞。因此，与各种癌症相关的淋巴管生成都可用本申请所述方法抑制。

一些实施方案中，所述抗体可用于将治疗蛋白靶向淋巴管内皮细胞。这些治疗作为抗-淋巴管生成和/或抗-血管生成治疗时特别有效，但是应当理解的是本发明不仅限于这些有益效果。组合物的施用可以是系统的或局部的，并且可包括在单一位点注射治疗有效量的蛋白。本发明涉及本领域技术人员已知可用于给药本发明治疗组合物的任一途径，包括例如，静脉内，肌肉内，皮下或者通过导管长期施用。替代地，也可以将治疗组合物送到患者的多个位点。多位点给药可以同时进行也可以在数小时内进行。特定情况下，提供

连续流动的治疗组合物较有利。其它治疗可周期性施用，例如，每天、每周或每月。此外，也可将化疗药物靶向淋巴管内皮细胞。可用于本发明治疗应用的这类物质将在下文详细讨论。

5 III. 免疫治疗与常规化疗或放疗联合治疗

肿瘤细胞对 DNA 破坏物质的抗性是临床肿瘤学的一大难题。目前肿瘤研究的一个目标就是发现提高化疗和放疗疗效的方法。一种方法是将常规治疗与基因治疗联合进行。例如，单纯疱疹-胸苷激酶(HS-tk) 基因，当通过逆转录病毒载体系统递送到脑部肿瘤时，能成功地诱导出对抗病毒物质甘昔洛韦(ganciclovir)的易感性 (Culver 等, 1992)。本发明的一个实施方案是，可将本发明的肽与化疗或放疗干预、免疫治疗或与其它抗血管生成/抗-淋巴管生成治疗联合施用。

15 为了杀死细胞，抑制细胞生长，抑制转移、抑制血管生成或者逆转或减缓肿瘤细胞的恶变表型，通过使用本发明的方法和组合物，通常可以使“靶”细胞、肿瘤或其脉管系统与至少两种不同治疗组合物接触。这些组合物以联合有效量提供，通过杀死和/或抑制癌细胞和/或供应及服务于这些癌细胞的血管及淋巴管内皮的增殖来杀死或抑制癌症的增生。该过程可能涉及让所述细胞与肽或表达构建体及物质或因因子同时接触。这一点可以通过让细胞与包括这两种物质的单一组合物或药物配制剂接触或者通过让细胞与两种不同

20 组合物或配制剂同时接触来实现。

可替代地，两种不同治疗可间隔数分钟至数周进行。在两种治疗分开进行的实施方案中，通常应当保证这段明显的时间段不能超过每次递送之间的时间，这样才能使得第一和第二次治疗可以发挥有效的联合作用。在这类情形中，可以考虑将两者的施用间隔约 12-24 小时，更优选，约 6-12 小时，最

25 优选延迟时间仅约 12 小时。但一些情况下，期望将治疗时间显著延长，使每次施用治疗的间隔时间从数天(2, 3, 4, 5, 6 或 7)到数周 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 或 8)。本发明特别涉及用一种或两种治疗方案反复进行治疗。在具体实施方案中，通过递送抗-癌治疗来直接攻击癌细胞，所用方式导致杀死、抑制癌细胞或使其坏死，此外也可施用一种以抗血管生成和/或抗-淋巴管生成作用

30 为基础的治疗组合物。所述抗-淋巴管生成组合物可在另一抗-癌物质之后、之前或者同时施用。

适于联合治疗的物质或因素为当施用给细胞时能导致 DNA 破坏的任一化学化合物或治疗方法。这类物质及因素包括诱导 DNA 损伤的辐射和波，如 γ -射线，X-射线，UV-照射，微波，电子发射(electronic emissions)，等。多种化学化合物(也称为“化疗物”)发挥作用导致 DNA 损伤，所有这些都可用于本申请所述的联合治疗方法中。可以使用的化疗物包括，例如阿霉素，5-氟尿嘧啶(5FU)，依托泊苷(etoposide)(VP-16)，喜树碱(camptothecin)，放射菌素-D，丝裂霉素 C，顺铂(CDDP)以及过氧化氢。本发明还包括联用一种或多种 DNA 破坏物质，无论是以辐射为基础的还是真正的化合物，例如 X-射线与顺铂联用或者顺铂与依托泊苷联用。

10 在根据本发明治疗癌症时，要让肿瘤细胞和/或肿瘤脉管的内皮与除了抗淋巴管生成治疗物以外的物质接触。这一点可以通过用，例如 X-射线，UV-光， γ -射线或甚至微波来辐射肿瘤局部而实现。可替代地，可让肿瘤细胞与
15 所述试剂接触，其通过向受试者施用一种治疗有效量的药物组合物来实现，该组合物含有一种化合物，例如阿霉素，5-氟尿嘧啶，依托泊苷，喜树碱，放射菌素-D，丝裂霉素 C，或顺铂。激酶抑制剂也可用来与本发明所述肽联合治疗。可以通过让所述物质与 VEGF-C/D 抑制剂肽联合来制备该物质，并作为联合治疗组合物或试剂盒，例如 2001 年 1 月 17 日提交的美国专利申请 No. 60/262,476 中所述的抑制剂肽，在此引入作为参考。

能够直接交联核酸，特别是交联 DNA 的试剂也会促进 DNA 损伤，从而
20 而导致与抗淋巴管生成物质的协同抗恶变联合作用。顺铂等试剂以及其它 DNA 烷基化试剂也可使用。顺铂已经广泛用于治疗癌症，临床使用的有效剂量，每 3 周有 5 天施用 20 mg/m^2 ，总共 3 个疗程。顺铂口服不能吸收，因此必须通过静脉注射、皮下注射、肿瘤内注射或腹膜内注射递送。

破坏 DNA 的试剂还包括干扰 DNA 复制、有丝分裂及染色体分离的化
25 合物。所述化疗化合物包括阿霉素，依托泊苷，戊脉安(verapamil)，鬼臼毒素(podophyllotoxin)等。这些化合物广泛用于肿瘤治疗的临床方案中，它们通过静脉快速浓注来施用，静脉注射剂量范围从阿霉素的 $25\text{-}75 \text{ mg/m}^2$ 、间隔 21 天到依托泊苷的 $35\text{-}50 \text{ mg/m}^2$ ，或者以静脉注射双倍的量口服。

破坏核酸前体及亚单元合成及忠实度的试剂也可导致 DNA 损伤。因此
30 已经开发了多种核酸前体。特别有用的是那些已经经过大量测试且易获得的试剂。因此，优先被恶变组织使用的 5-氟尿嘧啶(5-FU)等，使得该试剂对于

靶向肿瘤细胞特别有效。5-FU 尽管毒性很强，但是仍然用于很多种载体中，包括局部应用，但是静脉内通常使用的剂量为 3 ~ 15 mg/kg/天。

例如，下列是一系列化疗药物及已证实可通过施用这类药物进行控制的癌症。这些化疗药物与本发明肽联用可有效缓解各种恶变病症。这些化合物的实例包括阿霉素(又称为 adriamycin, doxorubicin), VP-16 (又称为依托泊苷), 5 等, 道诺红菌素(daunorubicin)(插入 DNA, 封闭 DNA-介导的 RNA 聚合酶并抑制 DNA 合成); 丝裂霉素(又称为突变霉素和/或丝裂霉素-C)是一种分离自头状链霉菌(*Streptomyces caespitosus*)培养液的抗生素, 已证实具有抗肿瘤活性; 放射菌素 D 也是一种可以与本发明肽联用的有用药物, 因为, 不能响 10 应系统治疗的肿瘤有时会对局部灌注放射菌素 D (dactinomycin)产生应答, 而这也被认为是一种强效放疗方法。它也可与主要外科手术、放疗及其它药物联合, 尤其是长春新碱和环磷酰胺, 并且已发现可有效地抗尤因(Ewing's)肿瘤, 卡波西(Kaposi)肉瘤及软组织肉瘤, 绒(毛)膜癌, 转移性睾丸癌, 何杰金氏(Hodgkin)病以及非-何杰金氏淋巴瘤。

15 博来霉素是一种分离自轮枝链霉菌(*Streptomyces verticillus*)的细胞毒性糖肽抗生素的混合物, 单独使用能有效控制下列肿瘤或与其它已批准的化疗药物按照已经证实的方式联合用于鳞状细胞癌, 如头和颈部(包括嘴、舌、扁桃腺, 鼻咽, 口咽, 窦, 上腭, 嘴唇, 口腔粘膜, 牙龈, 会厌, 喉), 皮肤, 阴茎, 子宫颈, 以及阴户。另外还用于治疗淋巴瘤和睾丸癌。

20 顺铂已经广泛用于治疗癌症如转移性睾丸癌或卵巢癌, 晚期膀胱癌, 头或颈部癌, 宫颈癌, 肺癌或其它癌症, 并可与本发明肽有效联用。VP16 (依托泊苷)也主要与博来霉素和顺铂联合用于治疗睾丸肿瘤, 与顺铂联合用于肺小细胞癌。它还可有效对抗非-何杰金淋巴瘤、急性非淋巴细胞性白血病、乳腺癌以及与获得性免疫缺陷综合征(AIDS)相关的卡波西肉瘤。能杀死一些 25 类型癌细胞的肿瘤坏死因子[TNF; 恶液质素]能够激活细胞因子的生成, 活化巨噬细胞和内皮细胞, 促进胶原和胶原酶的生成, 是一种炎症介质, 也是败血症性休克的介质, 并能促进分解代谢, 发热和睡眠。TNF 以有效量单独使用时毒性很强, 因此最佳方案是以较低剂量与其它药物联用。它的免疫抑制作用可通过 γ -干扰素增强, 因此联合用药有潜在危险。TNF 和干扰素- α 30 的杂合体也发现具有抗-癌活性。

紫杉醇(taxol)是一种抗有丝分裂试剂, 最初分离自灰树短叶紫杉(*Taxus*

brevifolia)的树皮,它与它的衍生物紫杉酚(paclitaxol)已证实可用于抗乳腺癌,也可用于本发明的联合治疗。已有报道患有多种其它肿瘤的患者对长春新碱产生有益应答,具体为 Wilm 瘤,成神经细胞瘤,脑瘤,横纹肌肉瘤,以及乳腺、膀胱及男女生殖系统癌症。长春花碱也证实与长春新碱对于同种癌症具有有益疗效。长春花碱最经常的临床用途是与博来霉素及顺铂联合用于转移性睾丸肿瘤的治愈性治疗。它还可有效治疗卡波西肉瘤,成神经细胞瘤,和 Letterer-Siwe 病(组织细胞增多症 X),以及女性乳腺癌及绒(毛)膜癌。

美法仑(Melphalan)又称为左旋溶肉瘤素(alderan), L-苯丙氨酸氮芥,苯丙氨酸氮芥, L-PAM, 或 L-溶肉瘤素,是氮芥的苯丙氨酸衍生物。美法仑是一种双功能烷化剂,能有效对抗选择性人恶变病。美法仑是称为 medphalan 的 D-同分异构体的活性 L-同分异构体, medphalan 抗某些动物肿瘤的活性较弱,对染色体产生作用所需剂量大于 L-同分异构体所需剂量。美法仑有适于口服的形式,已用于治疗多发性骨髓瘤。现有证据表明大约有一三分之一到一半的多发性骨髓瘤患者对口服该药物表现出有益应答。美法仑已被用于治疗上皮性卵巢癌。

环磷酰胺在胃肠道中是稳定的,具有良好的耐受性,可通过口服或胃肠道外途径发挥作用,而且不会引发局部起泡、坏死、静脉炎或甚至疼痛。苯丁酸氮芥(chlorambucil),是一种氮芥类型的双功能烷化剂,已经发现它能有效对抗选择性人恶变病。苯丁酸氮芥可用于治疗慢性淋巴(淋巴细胞)白血病、恶性淋巴瘤包括淋巴肉瘤,巨大滤泡性淋巴瘤和何杰金氏病。它虽无法治愈这些病症中的任一个但是可以产生临床有效缓解。

导致 DNA 破坏并已广泛使用的其它因素包括通常已知的 γ -射线, X-射线,和/或放射性同位素直接递送于肿瘤细胞。另外还实施了其它形式的 DNA 破坏因素如微波及 UV-照射。最可能的是所有这些因素对 DNA 前体、DNA 的复制及修复以及染色体的组装和维持发挥大范围的破坏 DNA 作用。X-射线的剂量范围从长期使用(3-4 周)时的日剂量 50 - 200 伦琴到单剂的 2000-6000 伦琴。放射性同位素的剂量范围变化相差很大,取决于同位素的半衰期、辐射的强度和类型以及恶变细胞的摄入。

本领域技术人员可参考"Remington's Pharmaceutical Sciences"第 15 版,第 33 章,具体见第 624-652 页。剂量上的一些变动根据要治疗的受试者身体状况进行。负责施用的人员,如论如何,都应当确定合适受试者个体的剂量。

另外，施用于人时，制剂应当满足 FDA 局对生物标准品要求的无菌性、发热性、常规安全及纯度标准。

5 本发明人提出：将治疗局部递送给 VEGFR-3-相关癌症的患者对于通过递送治疗有效基因来对抗临床疾病是一种非常有效的方法。类似地，可将化疗或放疗物导向受试机体的具体受影响区域。替代地，系统递送表达构建体和/或药物在某些情况下也是合适的，例如，当发生了广泛转移的情况。

除上述讨论的抗癌治疗物外，可将本发明所述肽与其它抗血管生成抑制剂结合。本发明的肽期望同时具有抗-淋巴管生成和抗-血管生成的特性。许多抗血管生成药物也具有抗淋巴管生成特性。http://cancertrials. nci. nih. gov/news/angio 是国立卫生研究院所开办的站点，该站点提供了目前进行的抗-血管生成药物试验的即时信息。这些药物包括，例如，Marimastat(British Biotech, Annapolis MD; 针对非小细胞肺癌，小细胞肺癌及乳腺癌); AG3340 (Agouron, LaJolla, CA; 针对多形性成胶质细胞瘤); COL-3 (Collagenex, Newtown PA; 针对脑瘤); Neovastat (Aeterna, Quebec, Canada; 针对肾癌及非小细胞肺癌) BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb, Wallingford CT; 针对转移性非-小细胞肺癌); Thalidomide (Celgen; 针对黑色素瘤，头及颈部癌症，卵巢、卵巢，转移性前列腺，及卡波西肉瘤; 复发性或转移性结肠直肠癌(加助剂); 妇科肉瘤，肝癌; 多发性骨髓瘤; CLL, 复发性或进行性脑癌，多发性骨髓瘤，非-小细胞肺癌，非转移性前列腺癌，顽固性多发性骨髓瘤，及肾癌); 20 Squalamine (Magainin Pharmaceuticals Plymouth Meeting, PA; 非小细胞癌及卵巢癌); Endostatin (EntreMED, Rockville, MD; 针对实体瘤); SU5416 (Sugen, San Francisco, CA; 复发性头颈部肿瘤，晚期实体瘤，IIIB 或 IV 期乳腺癌; 复发性或进行性脑瘤(儿科); 卵巢，AML; 神经胶质瘤，晚期恶性肿瘤，晚期结肠直肠癌，von-Hippel Lindau 病，晚期软组织癌; 前列腺癌，结肠直肠癌，转移性黑色素瘤，多发性骨髓瘤，恶性间皮瘤; 转移性肾癌，晚期或复发性头颈部癌，转移性结肠直肠癌); SU6668 (Sugen San Francisco, CA; 晚期肿瘤); 干扰素- α ; 抗-VEGF 抗体 (National Cancer Institute, Bethesda MD; Genentech San Francisco, CA; 顽固性实体瘤; 转移性肾细胞癌，未经治疗的晚期结肠直肠癌); EMD121974 (Merck KCgA, Darmstadt, Germany; 与 HIV 相关的卡波西肉瘤，进行性或复发性退行性神经胶质瘤); 白细胞介素 12 (Genetics Institute, Cambridge, MA; 卡波西肉瘤)以及 IM862 (Cytran, Kirkland, WA; 卵

巢癌, 未经治疗的转移性结肠及直肠来源的癌以及卡波西肉瘤)。这些药物后的附加信息注明了这些试验中使用的药物所针对的癌症。这些病症中的任何一种都可用本发明肽单独或与所列药物联合治疗。

任一种所述治疗对淋巴管内皮细胞的作用现在终于可以用本发明分离的淋巴管内皮细胞进行测试。获得分离这些细胞的方法, 使得可以开发出更加有效的治疗方案来控制淋巴管内皮细胞病症。

F. 用于鉴定其它治疗药物的试验模式

本发明还将这些淋巴管内皮细胞用于筛选可调节(增强或减弱)这些细胞的特性的化合物, 所述特性例如这些细胞的 VEGFR-3 受体活性, 细胞生长, 淋巴管生成潜能等。这些试验可以使用多种不同模式, 取决于所要筛选的“活性”的种类。所考虑的功能性“读出(read-outs)”包括 VEGFR-3 与底物的结合; 配体与受体的结合; 迁移试验, 或常用监测内皮细胞活性的任一其它功能性试验。这类内皮细胞功能性试验已为本领域技术人员熟知, 一些范例性试验在本文的其它地方已有描述。

a. 试验模式

本发明提供了, 在有和无候选物质存在的条件下检测 VEGFR-3 活性, 并比较所述结果, 从而筛选该活性的抑制剂的方法。这种筛选技术证实可用于对抑制、减弱或阻止 VEGFR-3 活性的化合物进行常规鉴定。这类化合物用于治疗各种病症, 例如, 淋巴瘤, 淋巴水肿, 以新血管形成为特征的实体癌以及其它病症例如 PCT/US99/06133 中讨论的病症, 在此专门引入作为涉及 VEGFR-3 受体的病症的实例, 以及具体地, 包括但不限于遗传性淋巴水肿、淋巴水肿、淋巴管瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管肌瘤病、淋巴管扩张, 以及水囊状淋巴管瘤。

这些实施方案中, 本发明涉及一种用于测定候选物质抑制本发明淋巴管内皮细胞的 VEGFR-3 活性的能力的方法。

该方法通常包括下列步骤:

- (i) 提供本发明所述的分离的淋巴管内皮细胞培养物;
- (ii) 让所述培养物与候选物质接触; 以及
- (iii) 将步骤 (ii) 中细胞培养物的活性或特性与无候选物质时观察到的细胞培养物的活性或特性进行比较,

其中细胞培养物活性或特性上的改变表明所述候选物质为所述细胞的调节物。

上述试验中为了鉴定能调节本发明细胞活性或者改变该细胞特性的候选物质，应当测量或测定不加候选物质时的活性或特性。然后向细胞培养物
5 中加入候选物质，测定候选物质存在时的活性或特性。一种候选物质能使活性相对于其不存在时的观察值发生变化，表明该候选物质具有调节能力。

尽管上述方法一般性描述了本发明培养物中的细胞活性或特性，但是应该理解的是候选物质也可以是能改变 VEGFR-3 的生成的物质，从而增加或减少相对于 VEGFR-3 每单位活性的 VEGFR-3 量。类似地，候选物质可以是一种能增加或减少细胞数目和/或大小的物质。另外，尽管上述讨论涉及使用
10 分离的淋巴管内皮细胞培养物，应当理解的是，也可设计类似试验来鉴定对血管内皮细胞发挥作用或调节其受体及其成分的治疗试剂。

b. 候选物质

本申请中使用的“候选物质”是指能调节淋巴管内皮细胞活性或特性的任一分子。特定实施方案中，所述分子是能调节 VEGFR-3 与其受体间结合活性的分子。替代地，所述候选物质可调节 VEGFR-3 受体/配体相互作用的下
15 游效应，例如受体磷酸化。所述候选物质可以是蛋白或其片段，小分子抑制剂，或甚至核酸分子。可以肯定的是，通过筛选试验鉴定的最有效药物化合物为与其它已知的 VEGFR-3 活性调节物结构上相关的化合物。所述活性
20 化合物可包括天然化合物的片段和部分，或者可以是那些仅在与已知化合物联用时才显示活性、反之则无活性的化合物。但是，在用人或动物模型测试所述化合物前，需要测定多种候选物，将有潜能的物质定为治疗物。

因此，所述活性化合物可包括天然化合物的片段和部分，或者可以是那些在与已知化合物联用时才显示活性、反之则无活性的化合物。因此，本发明提供了筛选试验卡鉴定可调节细胞 VEGF 受体的物质。需要指出的是，分离自天然来源的化合物，例如动物、细菌、真菌、植物，包括叶和皮，以及
25 海产品样本，都可作为作为潜在有效药物的候选物进行鉴定。

应当理解的是，所要筛选的药物还可以源自或合成自化学组合物或人造
30 化合物。因此，应当理解的是本发明鉴定的候选物质可以是多肽、多核苷酸、小分子抑制剂，或者可以通过推理性药物设计从已知的 VEGF 受体调节物

设计出来的任一其它无机或有机化合物。

候选物筛选试验很容易建立并实施。因此，在候选物筛选试验中，当获得了本发明所述分离的淋巴管内皮细胞群之后，可以在能使淋巴管内皮细胞出现特异性可测活性或特异性特性的条件下，将候选物与该细胞群混合。在
5 这种方式中，可以测定出候选物质调节该细胞在无候选物时的活性或特性的能力。

具体情况下的“有效量”是指相对于其正常水平能有效地可重复地改变细胞的给定事件、活性或表型的量。可以使用能实现活性的显著适当变化的化合物。

10 活性或功能特性的显著变化，例如，用迁移试验(migration assays)、细胞增殖试验、受体结合、自身磷酸化等测量的结果，可以表示为活性增加/减少至少约 30%-40%，最优选改变至少约 50%，当然尽可能为较大值。本发明的活性化合物还可用于制备抗体，然后将该抗体用在分析性和制备性(preparatory)技术中，来检测和定量其它这类调节物。

15 本发明分离的细胞培养物可用于本领域已知的高通量筛选(HTS)试验。综述见 Jayawickreme and Kost, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 629-634 (1997)。本发明还涉及自动的小型化 HTS 试验，例如见 Houston and Banks *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 734-740 (1997)。

20 已有大量用于鉴定小分子调节物的不同文库，包括化学文库、天然产物文库及组合文库，包括随机肽或经设计的肽、寡核苷酸或有机分子。化学文库由已知化合物经过天然产物筛选或从潜在治疗靶的筛选中鉴定为满足条件(hits or leads)的结构类似物组成。天然产物文库由来自微生物、动物、植物、昆虫或海洋生物的产物组成，它们用于通过，例如，发酵和提取来自土壤、植物或海洋生物的培养液，而制备筛选混合物。天然产物文库包括多肽、
25 非-核糖体肽及其非-天然变体。综述见 *science* 282: 63-68 (1998)。组合文库由大量肽寡核苷酸或有机化合物的混合物组成。它们可通过常规的自动合成方法、PCR 克隆或其它合成方法相对简单地制备而成。特别感兴趣的是包括肽、蛋白、肽模拟物、多平行合成汇集(multiparallel synthetic collection)，重组以及多肽文库的文库。组合文库以及由其制备的文库的综述见 Myers *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 701-707 (1997)。然后，可以将应用所述各种文库鉴定得到的候选调节物优化，以便通过例如推理性药物设计来调节细胞的活性。
30

当然，应该理解的是本发明的所有筛选方法本身都是有效的，但仍然有可能未能发现有效候选物。本发明提供了用于筛选这类候选物的方法，而不仅仅是发现它们的方法。

5 c. 体外试验

在一个具体实施方案中，本发明包括不同的结合试验，例如，筛选配体-受体复合物的抑制剂，或者筛选能结合 VEGFR-3 的分子，该分子可作为该受体功能的替代物，并因此改变天然配体与该受体的结合和影响其活性。这类试验中，细胞可以游离在溶液中，或者固定在支持物上。可以对细胞表面的配体或受体进行标记，从而可以测定结合。

这类试验很容易实现自动化和高通量。化合物的高通量筛选的描述见 WO 84/03564。大量的小肽测试化合物被合成在固相支持物上，例如塑料大头针或其它一些表面上。让肽测试化合物与细胞反应然后洗涤。用各种方法检测结合的多肽。专门设计了制备合适的肽测试化合物的组合方法。

这种方式中最感兴趣的是筛选 VEGFR-3 受体在这些细胞上的天然配体的多种不同突变体，包括缺失、截短、插入和取代突变体，它们有助于鉴定出哪个结构域参与了配体/受体相互作用。一旦鉴定出这种区域，就可鉴定出虽然已经改变了结构但仍保留部分或全部这些相互作用的功能的那些突变体。

可以将纯化的配体直接包被到平板上用于上述的药物筛选技术。但是，也可以用所述多肽的非-中和抗体将多肽固定到固相物上。另外，也可以用含反应活性区域(优选末端区域)的融合蛋白将配体活性区域连接到固相物。

其它形式的体外试验包括那些采用了功能读出(functional readouts)的试验。这类试验中，可以根据物质的生化特性来适当配制，然后与细胞接触。根据该试验，需要进行培养。然后依靠上述的多种不同生理学试验对细胞进行检测。替代地，也可以实施分子分析，其中对细胞特性进行测定。这包括测定例如蛋白表达、酶功能、底物利用、mRNA 表达(包括全细胞或 polyA RNA 的差异展示)以及其它。

30 G. 用细胞进行诊断试验

在一些技术方案中，本发明的方法可以用于诊断细胞成分的功能或活性

(例如 VEGFR-3/配体相互作用)异常的病症或疾病。例如,可以使用本发明方法从疑似患有淋巴管内皮细胞相关疾病的患者分离出细胞。用来自细胞的多核苷酸序列进行杂交或 PCR 试验,以便检测与疾病相关的表达的存在。这类方法具有可定性或定量的特性,可以包括 Southern 或 Northern 分析,斑点印迹或其它基于膜的技术; PCR 技术; dip stick, 大头针技术(pin), 芯片及 ELISA 技术。所有这些技术已经为本领域熟知,是大多数商品化诊断试剂盒的基础。

此外,所述试验还可用于评估具体治疗方案在动物试验、临床试验或在监测个体患者治疗中的效率。为了提供疾病诊断的基础,需要建立例如 VEGFR-3 受体的正常或标准动态谱。这通常包括获得正常受试者的淋巴管内皮细胞,对其中的疾病标志物进行合适杂交或扩增。常规杂交可以通过与正常受试者用系列稀释的标志物得到的数值进行比较来定量。可以将获自正常样本的标准数值与获自待诊断特定病症的受试者的细胞样本的数值进行比较。标准值和测试值之间出现偏差表明疾病存在。

疾病一经证实,就可施用治疗药物;并且制定治疗方案。这类试验可以有规律地重复,以评估动态变化是否向前进展或回归正常或标准水平。连续治疗图谱可用于显示数天或数月内的治疗效果。

PCR 描述见美国专利 4,683,195 和 4,965,188。用于这类试验的寡聚物通常用化学方法合成,但是也可以如本申请所述用酶促方法或者从重组来源制得。寡聚物通常包括两种核苷酸序列,一为正义链一为反义链,在鉴定特异性基因或病症的最佳条件下使用。同样的两寡聚物,巢式成套寡聚物,或甚至简并寡聚物的集合体可用于较低严谨条件下检测和/或定量密切相关的 DNA 或 RNA 序列。

此外,对具体分子的表达定量的方法包括对核苷酸进行放射性标记 (Melby et al, J Immunol Methods 159: 235-44, 1993)或生物素化标记(Duplax 等, Anal Biochem 229-36,1993),使对照核酸共扩增,以及将试验结果作为内插值插入标准曲线。以 ELISA 方式操作可以加速多样本的定量,在 ELISA 中,目的寡聚物以不同稀释度出现,分光光度或比色反应实现快速定量。这类诊断可使健康专家能够开始积极治疗并且防止病情的进一步恶化。类似地,可以用另外试验监测治疗过程中患者的进程。

H. 试剂盒

本发明涉及使用上述方法分离淋巴管内皮细胞的试剂盒。所述试剂盒可以包括试剂盒、标准 VEGF 受体配体、缓冲液等。由于本发明鉴定出了能特异性检测淋巴管内皮细胞的抗体，这些成分中的任一个或者二者都可提供在
5 试剂盒中。因而试剂盒可以包括，在合适的容器中，作为标准物的淋巴管或血管内皮细胞成分，能优先结合淋巴管内皮细胞的第一抗体，以及免疫检测试剂。

可以以试剂盒方式提供的其它的本发明所述组合物为，基本不含其它非-淋巴管细胞系污染细胞的淋巴管内皮细胞，以及基本不含其它非-血管细胞
10 系污染细胞的血管内皮细胞。所述细胞可以是培养瓶中增殖的培养物，或者深低温保藏的细胞。以细胞为基础的试剂盒还包括合适的培养基、生长补充剂以及用于培养细胞的培养条件的说明。

一些实施方案中，可将能结合淋巴管内皮细胞的第一抗体固定于固相支持物，例如柱体基质或微量滴定板的孔。

所述试剂盒的免疫检测试剂可采用多种形式中的任一形式，包括那些结合或连接到特定抗体或抗原上的可检测标记物，以及结合或连接到第二结合配体上的可检测标记物。范例性的第二配体是那些对第一抗体或抗原具有结合亲和力的第二抗体，和对人抗体具有结合亲和力的第二抗体。
15

用于本发明试剂盒的其它合适免疫检测试剂包括两-组分试剂，其包括
20 对第一抗体或抗原具有亲和力的第二抗体，以及对第二抗体具有亲和力的第三抗体，该第三抗体上连接一可检测标记物。

所述试剂盒还可包括适当等分量的增殖细胞或深低温保藏细胞，它们带有或者不带有标记，可用来制备检测试验的标准曲线。

所述试剂盒可包括抗体-标记物偶联物，该偶联物可以是完全偶联形式，
25 中间体形式，或者是要靠试剂盒使用者进行连接的多个独立组件。试剂盒的组分可以包装于含水介质或冻干形式。

试剂盒的容器通常包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器或其它容器，其中放置抗体或抗原，并且优选进行适当等分。当提供第二或第三种结合配体或附加组分的情况下，所述试剂盒通常还包括第二、第三种或其它
30 另外的容器，可将该配体或组分放置其中。本发明的试剂盒通常还包括装载抗体、抗原的器皿，和任一其它全封闭适于商品化销售的试剂容器。所述容

器可包括注射器或吹制成型的塑料容器，其中可保留(retain)小瓶。

I. 淋巴管内皮细胞成像

5 本发明方法的另一用途是在组织成像中确定具体组织中是否存在淋巴管内皮细胞。所述诊断成像特别适用于从例如患淋巴管病症的患者的组织获得图像。另外，肿瘤实体之中或附近的淋巴管也可通过本发明成像。此前，本领域技术人员已经使用 VEGFR-3 抗体用于成像目的，例如美国专利 6,107,046 中所述(在此引入作为参考)。本发明中的 2E11D11 及相关抗体可用来以与美国专利 6,107,046 中抗体为基础的方法类似的方式成像。

10 可将本发明的成像试剂(即，本申请全文中提及的抗体或抗体衍生物)共价或非共价偶联于合适的超磁、顺磁、电子密集的、产回声的或放射性的试剂从而制备出一种定位成像试剂。这类实施方案中，将成像试剂定位于淋巴管内皮细胞，然后使用上述技术让所定位的区域成像。

本领域已知了许多合适的成像试剂，以及将标记试剂结合到本发明肽上的方法(参见，例如，美国专利 4,965,392，美国专利 4,472,509，美国专利 15 5,021,236 和美国专利 5,037,630，在此引入作为参考)。将可药用载体中的成像试剂施加于患者，让其聚集在具有淋巴管内皮细胞的目标位点。然后该成像试剂作为目标位点 X-射线、磁共振、超声波或闪烁成像的对比试剂(contrast reagent)。对于癌症、淋巴水肿及其它淋巴管内皮细胞病症的诊断研究而言，20 本发明的抗体操作方便，是现有医学成像工具武器库的重要补充。当然，应该理解的是所述成像可以在体外进行，其中，通过活组织检查获得患者组织，借助本申请所述成像试剂，以及用于制备并固定组织的组织化学技术，来确定淋巴管内皮细胞的存在。

用于本发明成像试剂中的顺磁离子包括例如铬(III)，锰(II)，铁(III)，铁 25 (II)，钴(II)，镍(II)，铜(II)，钐(III)，钆(III)，铈(III)，钷(III)，钷(III)，钷(III)，钷(III)，钷(III)和钷(III)。用于 X-射线成像的离子包括但不限于镧(III)，金(III)，铅(II)以及特别是铋(III)。诊断用的放射性同位素包括例如，²¹¹砒，¹⁴碳，⁵¹铬，³⁶氯，⁵⁷钴，⁶⁷铜，¹⁵²Eu，⁶⁷镓，³氢，¹²³碘，¹²⁵碘，¹¹铟，⁵⁹铁，³²磷，¹⁸⁶镓，⁷⁵硒，³⁵硫，^{99m}锝以及⁹⁰钇。

30 本发明的抗体可用本领域熟知的技术标记。例如，本发明肽可通过与碘化钠或碘化钾及化学氧化剂如次氯化钠或酶氧化剂如乳过氧(化)物酶接触实

现碘标记。可以通过配体交换实现抗体的镓^{99m}标记,例如,用二价锡溶液还原高锝酸盐(pertechnate),将还原后的锝螯合于Sephadex柱,然后将抗体加载到该柱体上。这些或其它标记蛋白及肽的技术已为本领域熟知。

5 J. 药物组合物

许多方面,本发明所述的细胞或其它组合物可用于临床用途。因此,有必要将其配制成药物组合物,即一种适于体内使用的形式。通常,应当确保制成的组合物基本不含热原,并且基本不含对人或动物体有害的其它杂质。

本领域技术人员通常使用合适的盐及缓冲液以使递送载体稳定并可作为靶细胞摄入。在将重组细胞导入患者时也可以使用缓冲液。本发明的含水组合物包括有效量的肽或细胞表达载体,溶解或悬浮于可药用载体或含水介质中。所述组合物也被称为接种物。“可药用”是指分子实体及组合物施用给动物或人体时不会产生有害、过敏或其它不良反应。本申请中,“可药用载体”包括任一及所有溶剂、悬浮介质、包衣、抗细菌及抗真菌剂,等渗透及吸收延缓剂等。这些介质及试剂用于药物活性物质已为本领域熟知。任一常用介质或试剂除非其与本发明的载体或细胞不相容,否则都可用于治疗组合物。还可向组合物中添加活性成分。

本发明的活性组合物包括常规药物制剂。本发明的这些组合物可以通过任一常用途径施用,只要通过该途径能够为靶组织利用。药物组合物可通过任一常规方法导入受试者,例如静脉内,皮内,肌肉内,乳房内,腹膜内,鞘内,眼球后,肺内(例如,定期释放(term release));通过,舌下,鼻腔,肛门,阴道,或经皮递送,或者通过外科手术植入具体位点。治疗可以由单剂量或者一段时期内的多剂量组成。

可以将要施用的活性化合物制备为游离碱或可药用盐的水溶液,与表面活性剂(例如羟丙基纤维素)适当混合。也可以在甘油、液态聚乙二醇及其混合物中制备胶体溶液和在油中制备胶体溶液。当在常规条件下存储和使用时,这些制剂含有防止微生物生长的防腐剂。

适于注射用的药物形式包括无菌水溶液或胶体溶液以及即时配制无菌注射液或胶体溶液的无菌粉末。所有情况下,所述形式必须无菌并且必须流动性达到易于注射的程度。在制备及存储条件下它必须稳定,并且保存于抗微生物(例如细菌和真菌)污染作用的条件下。所述载体可以是溶剂或分散介

质包括,例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油,丙二醇,以及液态聚乙二醇,等),其合适的混合物,以及植物油。可以通过下列手段保持合适的流动率:例如,通过使用包衣如卵磷脂,通过保持胶体溶液的所需颗粒大小以及通过使用表面活性剂。防止微生物作用可通过各种各种抗细菌和抗真菌剂实现,例如,对羟基苯甲酸酯类,氯丁醇,苯酚,山梨酸,硫柳汞,等。许多情况下,优选包括等渗剂,例如,蔗糖或氯化钠。可注射组合物的延时吸收可通过在组合物中使用延缓吸收剂实现,例如单硬脂酸铝和明胶。

无菌注射液可以通过下述方法配制而成:将需要量的活性化合物以及必要时连同各种其它上面所列成分,引入合适的溶剂中,然后过滤除菌。通常,胶体溶液通过将各种无菌活性成分和所需其它上列成分引入到含有基础分散介质的无菌载体中来制备。对于制备无菌注射液所用的无菌粉末而言,优选的制备方法是真空干燥技术及冻干技术,从其已经过滤除菌的溶液制备活性成分粉末以及任一附加的所需成分。

本申请中,“可药用载体”包括任一及所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌及抗真菌剂,等渗及吸收延缓剂等。这些介质及试剂用于药物活性物质已为本领域熟知。任一常用介质或试剂除非其与该活性成分不相容,否则都可用于治疗组合物。还可向组合物中引入辅助活性成分。

当口腔施用时,组合物中可引入赋形剂,使用形式为不可消化的漱口药及贴牙剂(dentifrice)。漱口药可通过将合适量的活性成分引入适当溶剂,例如硼酸钠溶液(Dobell's Solution)中来制备。替代地,可以将活性成分引入含硼酸钠、甘油及碳酸氢钾的消毒洗液。还可将活性成分分散于贴牙剂中,包括:凝胶、糊剂、粉末及浆剂。可以将治疗有效量的活性成分加入到糊状贴牙剂中,贴牙剂可包括水、粘合剂、研磨剂、调味剂、发泡剂以及湿润剂。

本发明的组合物可配制成中性或盐的形式。可药用盐包括酸加成盐(用蛋白质的游离氨基形成的)以及用无机酸如盐酸或磷酸形成的或者用醋酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等有机酸形成的盐。用游离羧基形成的盐也可出自无机碱,例如,氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化氨、氢氧化钙或氢氧化铁,以及异丙胺,三甲胺,组氨酸,普鲁卡因(procaine)等有机碱。

本发明的组合物可配制成中性或盐的形式。可药用盐包括酸加成盐(用蛋白质的游离氨基形成的)以及用无机酸如盐酸或磷酸形成的或者用醋酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等有机酸形成的盐。用游离羧基形成的盐也可出自无

机碱,例如,氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化氨、氢氧化钙或氢氧化铁,以及异丙胺,三甲胺,组氨酸,普鲁卡因(procaine)等有机碱。

5 通过配制,以与服用剂型(dosage formulation)相容的方式和治疗有效的量施用溶液。所述配制剂易于以多种剂型施用,例如注射液、药物释放胶囊等。当以水溶液进行胃肠道外施用时,如果必要应将溶液适当缓冲并且首先用足量的盐或葡萄糖使液态稀释液剂等渗。这些具体的含水溶液特别适于静脉内,肌肉内,皮下及腹膜内施用。

10 "单位剂量"定义为治疗组合物分散于合适载体中的离散量,当胃肠道外施用多肽时,多肽组合物通常的注射剂量为 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 体重/天,优选的剂量为 $0.1\text{mg}/\text{kg} \sim$ 约 $50\text{mg}/\text{kg}$ 体重/天。胃肠道外施用可以通过先快速浓注然后连续灌输实现,以便保持药品的治疗循环水平。本领域的普通技术人员很容易就可根据良好的医疗实践及患者个体的临床状况优化治疗有效量以及确定施用方案。

15 用药频率取决于该药物的药物动力学参数及施用途径。本领域技术人员可以根据施用途径及所需剂量确定出最佳的药物剂型。参见,例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, (1990, Mack Publ.Co, Easton PA 18042) pp 1435-1712, 在此引入作为参考。所述剂型可影响身体状况,所施用药物的稳定度、体内释放速率及体内清除速率。依据施用途径,可根据体重、体表面积或器官大小计算出合适剂量。确定合适治疗剂量所需的进一步精确计算,本领域普通技术人员无需过度试验就可很容易地实现,特别是在本申请公开的剂量信息和试验以及动物或人临床试验观察到的药动数据帮助下。

25 合适剂量可以通过已有的测定凝血水平(blood clotting level)的试验结合相关剂量-应答数据来确定。最终的用药方案由主治大夫考虑改变药物作用的因素后决定,例如,药物具体活性、损伤严重程度及患者的敏感程度、年龄、身体状况、体重、性别及患者饮食,任一感染的严重程度,施用时间以及其它临床因素。当试验进行时,还会出现有关合适剂量水平以及针对特定疾病及身体状况的治疗持续时间的进一步信息。

30 在使用病毒递送的基因治疗实施方案中,可以根据所施用病毒颗粒的剂量计算出单位剂量。病毒剂量包括具体数目的病毒颗粒或噬斑形成单位(pfu)。对于使用腺病毒的治疗方案,具体的单位剂量包括 $10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7$,

10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} 或 10^{14} pfu。由于存在感染性缺陷颗粒，所以颗粒剂量可以稍作增加(10 ~ 100 倍)。

应当理解的是本发明的药物组合物及治疗方法可以用于人医和兽医。因此，所治疗的受试者可以是哺乳动物，优选为人或其它动物。对于兽医领域，
5 受试者包括，例如，农场动物，包括奶牛、绵羊、猪、马及山羊；伴侣动物，包括狗和猫，引进的(exotic)和/或动物园动物；实验室动物，包括小鼠、大鼠、豚鼠和仓鼠；以及禽类例如鸡、火鸡和鹅。

K. 实施例

10 下列实施例虽然给出了优选的实施方案和技术，但是无意对本发明进行限制。本领域技术人员，根据说明书的内容，应当能理解到可以对所公开的具体物质和方法进行多种改动，而仍然得到不脱离本发明实质和范围相同或类似结果。

15 实施例 1

材料和方法

本实施例提供了本申请以及本申请实施例部分所使用材料和方法的详细情况。

抗体和生长因子。免疫荧光中使用的第一抗体为小鼠抗人 CD31
20 (Dako)、vWF (Dako)或 VEGFR-3 的 mAbs(克隆 9D9F9、2E11D11 和 7B3F9; Jussila 等, Cancer Res. 58: 1599-1604, 1998), 兔抗人 LYVE-1 抗血清 (Banerji 等, J. Biol. Chem., 144 (4) 789-801, 1999), 亲和纯化的兔抗-人 podoplanin (Breiteneder-Geleff 等, 等, Am. J. Path., 154 (2) 385-394, 1999) 或兔抗-人 VEGF-C (882; Joukov 等, EMBO J., 15: 290-298, 1996)。抗增殖细胞核抗原的
25 单克隆抗体 (克隆 PC10)购自 Santa Cruz Biotechnology。FITC-或 TRITC-偶联的山羊抗-兔 IgG、山羊抗-小鼠 IgG 以及驴抗-小鼠 IgG 购自 Jackson Immunoresearch。兔抗人 VEGFR-2 血清为 Lena Claesson-Welsh (Uppsala, Sweden)惠赠，亲和纯化的山羊抗-人 VEGFR-1 购自 R & D 系统。兔抗 Akt、MAPK 或 CREB 多克隆抗体购自 New England 生物实验室。碱性 FGF, 重组
30 人 VEGF165 和重组成熟人 VEGF-D (由 Phe93 ~ Ser201 残基组成)购自 R & D。重组人 PlGF-1 为 Graziella Persico (Naples, Italy)惠赠。重组人 VEGF-C

(Thr103 ~ Leu215)、VEGF-C156S (Thr103 ~ Ile225)、ORFV2-VEGF 和人 VEGFR-3-Ig 按照此前描述的方法(Joukov 等, EMBO J., 16: 3898-3911, 1997; Mäkinen 等, Nature Med., 7: 199-205,2001; Wise 等, Proc. Nat'l Acad Sci., 96: 3071-3076,1999)制备和纯化。沃特曼宁(wortmannin)、LY294002、PD98059
5 和 Bisindolylmaleimide I (GF109203X) 购自 Calbiochem , U0126 购自 Promega (Madison, WI)。

细胞培养物. HMVE 和 HUVE 细胞购自 PromoCell (Heidelberg, Germany), 用厂商提供的内皮细胞培养基培养, 在传至第 3-7 代时使用。鼠 Ba/F3 原-B 淋巴细胞培养于添加了 10 % 胎牛血清、谷氨酰胺和 2 ng/ml IL-3 的 DMEM
10 (Calbiochem)中。

免疫荧光染色. 将玻璃盖片上的细胞用 4 % 多聚甲醛 (PFA)或甲醇: 丙酮(1: 1) 固定 10 分钟。如果需要, 将细胞用 0.1 % 的 TritonX-100 PBS 溶液通透 5 分钟。细胞用 5 % 山羊血清封闭后, 在室温下用第一抗体染色 30 分钟, 然后用 FITC 或 TRITC-偶联的第二抗体 (15 ug/ml) 孵育 30 分钟。
15 用 Hoechst 33258 荧光染料(Sigma, 以 0.5 μ g/ml 于 PBS 中)染色细胞核。如果细胞活体染色, 操作在冰上进行, 然后用 PFA 固定。

淋巴管和血管内皮细胞的分离. 单克隆 VEGFR-3 抗体 (克隆 2E11D11) 或多克隆的 podoplanin 抗体, MACS 胶体性质的超-顺磁微珠偶联的大鼠抗-小鼠 IgG1 或山羊抗-兔 IgG 抗体 (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach,
20 Germany), 用 MACS MS 分离柱和 MiniMACS 离析器(Miltenyi Biotech)按厂商说明书分选细胞。

VEGFR 刺激的生物分析. 存活力试验使用表达有 VEGFR-2/EpoR (Achen 等, Proc Natl Acad Sci USA 95: 548-53 1998; Stacker 等, J. Biol. Chem., 274: 34884-34892, 1999)或 VEGFR-3/EpoR (Achen 等, Eur. J. Biochem., 267: 2505-2515,2000) 的 Ba/F3 原-B 细胞, 按照前述方法(Mäkinen 等, Nature Med., 7: 199-205,2001)进行。为了制备 Ba/F3 VEGFR-1/EpoR 细胞, 通过下述操作构建一嵌合受体: 将 BglIII 位点导入人 VEGFR-1 cDNA 中编码跨膜区的序列之前, 其后连接由小鼠促红细胞生成素受体跨膜区及胞内区域构成的 BglIII-NotI 片段 (Achen 等, Eur. J. Biochem., 267: 25052515, 2000)。将
25
30 VEGFR-1/EpoR cDNA 亚克隆入 pEF-BOS 表达载体 (Mizushima and Nagata, Nucleic Acid Res., 18: 5322,1990) , 然后与 pCDNA3.1(+)-Zeo 载体(Invitrogen)

共转染 Ba/F3 细胞。用 250 mg/ml zeocin 筛选，得到稳定的细胞库。

生物传感器实验. 所有蛋白制剂在临用之前都用装备在 SMART™ 系统 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 中的 Superose 12 (3.2/30) 柱进行微量制备性大小排阻 HPLC，以便分析同质性和进行缓冲交换(Nice and Catimel, Bioessays, 21: 339-352,1999)。用 E280 1 % 1 cm 的 0-65 在 280 nm 处的吸收值测定 VEGF-C 和 VEGF-D 的浓度。用常规氨基偶联化学方法(Nice and Catimel, Bioessays, 21: 339-352,1999)将受体结构域偶联于 CM5 传感器芯片的羧甲基化葡聚糖层,用 BIAcore 2000 光学生物传感器(BIAcore, Uppsala, Sweden)分析配体的结合情况。被固定的 VEGFR-2 和 VEGFR-3 的水平分别为 3,000 RU 和 7,000 RU。固定后，将剩余的活性酯基团用下述操作封闭：用 pH 8.5 的 1 M 盐酸乙醇胺处理然后用 10 mM 二乙胺洗涤除去未-共价结合的物质。在 VEGF-D 或 VEGF-C 结合试验之间分别用 10 mM 二乙胺或 10 mM HCl 使传感器表面再生。将样本稀释于工作缓冲液(running buffer)(10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005 % Tween 20)。通过下述方法测定 VEGF-C 和 VEGF-C156S 与受体结构域之间的表观结合亲和力：分析初始解离阶段以获得 kd，然后用其约束曲线结合区域的整体分析(global analysis)，采用 1 : 1 Langmuirian 模型。按照此前描述的方法(Catimel et al., J. Chronotogr., 776: 15-30, 1997)用 BIAevaluation 3.0 (BIAcore, Uppsala, Sweden) 进行数据分析。

内皮细胞凋亡试验. 对于凋亡试验,以每孔 70,000 个细胞的量种植于 24-孔平板。进行双份平行处理，通过用死亡检测 ELISA PLUS 试剂盒(Roche, Indianapolis, IN)测量细胞质组氨酸-结合性 DNA 片段，从而检测凋亡。测试得到下列的生长因子浓度范围：bFGF 10-20 ng/ml、PlGF-1 50-1000 ng/ml、VEGF 10-50 ng/ml、VEGF-C 50-1000 ng/ml、VEGF-D 50-1000 ng/ml、VEGF-C156S 50-1000 ng/ml 和 VEGF-E 50-1000 ng/ml。按照厂商说明书通过荧光显微镜检术用膜联蛋白-V-FLUOS (Roche, Indianapolis, IN) 检测凋亡细胞上的磷脂酰丝氨酸。用碘化丙锭 (1 μ g/ml)同时染色，用来区别可能的坏死细胞。

Western 印迹试验. 将内皮细胞培养于 35 mm 平皿至接近铺满，用无血清培养基饥饿 24h，如所述进行刺激。该刺激的 1-3 小时前，加入沃特曼宁 (30 nM)，LY294002 (10-20 μ M)、PD98059 (10-25 μ M) 或 GF109203X

(2.5-5 μ M)。DMSO 中溶入抑制剂用作对照。刺激后，将细胞裂解于裂解缓冲液 (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM NaF, 1 % TritonX-100, 补加 2 mM Na3VO4, 0.5 mM PMSF, 100 U/ml 抑蛋白酶肽和 10 μ g/ml 亮抑蛋白酶肽)中。将澄清的裂解物用 SDS-PAGE 分离，转移至硝酸纤维素膜，用抗 Akt-Ser473、Akt-Thr308、p42/44 MAPK-Thr202/Tyr204 或 CREB-Ser133 的磷酸特异性(phosphospecific)抗体进行免疫印迹。用偶联有辣根过氧化物酶的二抗和增强化学发光检测系统检测结合的上述抗体。将印迹制成小条，用抗 Akt、MAPK 或 CREB 的抗体进行再探测，然后通过用 Multi-Analyst 2.0.1 程序(Bio-Rad)读取光密度信号来定量。

- 5
- 10 **细胞迁移试验.** 迁移试验在 48-孔趋化性 Boyden 槽(Neuroprobe Inc.)中进行。8 微米 Nucleopore 聚碳酸酯滤膜 (Corning)用 100 μ g/ml I 型胶原质 (Upstate Biotechnology) +4 $^{\circ}$ C 下过夜包被，然后空气干燥。将滤膜置于下部的槽孔，该孔中盛装着置于补加有 0.2 % BSA 的无血清培养基中的生长因子。对于封闭试验而言，将 VEGF 和 VEGF-C156S 用 10 倍摩尔过量的可溶性人
- 15 VEGFR-3 预孵育 30 分钟。将 HMVE 细胞悬于培养基中，向上部槽孔每孔中加入含 10,000 个细胞的 50 μ l 上述培养基。然后让细胞 37 $^{\circ}$ C 迁移 6 小时，然后，上述滤膜用冷甲醇固定，并用苏木精(Meyer)染色。用棉签刮去滤膜上表面上的未-迁移细胞，然后计算迁移细胞的数目。共进行 4 组平行试验，并且用三个不同批次的 HMVECs 进行重复。

20

实施例 2

由不同群的血管及淋巴管内皮细胞组成的人真皮微脉管内皮细胞

- 不同 VEGF 受体的功能已经在转染细胞系进行了详细研究，但是由于缺乏合适的细胞背景使这些研究获得的结果打了折扣。因此，本发明着手将微脉管内皮细胞分离为由一种基本不含其它类型内皮细胞的内皮细胞特异性
- 25 组成的内皮细胞群。更具体地说，本发明人制备了基本不含血管内皮细胞的淋巴管内皮细胞群，反之亦然。为了继续这种努力并阐明促进内皮细胞存活的 VEGFR-3 信号传导途径，本发明人使用了原代内皮细胞、人真皮微脉管内皮细胞 (HMVEC) 以及人脐静脉内皮细胞 (HUVEC)。已经证实所有三种
- 30 VEGF 酪氨酸激酶受体以及 neuropilin-1 共受体在 HMVE 和 HUVE 这两种细胞培养物中都有表达。本实施例对这些结果进一步详细解释。

为了测定 VEGFR mRNAs 在原代人真皮微脉管内皮细胞 (HMVEC)、人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 和猪主动脉内皮 (PAE) 细胞中的表达, 用放射性标记的人 VEGF 受体 cDNA 片段探测含 8 μ g mRNA 的 Northern 印迹, 等量加样 b-肌动蛋白作为对照。右侧数字代表转录本的大小(kb)。VEGFR-3 mRNA 的表达在微脉管内皮细胞中较强, 因此, 将这些细胞用于后续试验中 VEGFR-3 信号传导的研究。

使用免疫荧光, 本发明人查明 HMVE 细胞由血管内皮细胞及淋巴管内皮细胞这两种不同群组成。简而言之, 用抗 VEGFR-3 和 LYVE-1 的抗体进行免疫荧光双-染色, 用 Hoechst 荧光素复染细胞核。免疫荧光染色表明: 所有 VEGFR-3 阳性细胞中都没有检测到 LYVE-1 的表达, 而一些 VEGFR-3 阴性细胞也仅被 LYVE-1 抗体微弱染色。另外还用抗 podoplanin、vWF 和 CD31 的抗体进行了免疫标记, 并用 Hoechst 荧光素对核进行染色。这套双染色试验表明 vWF 表达主要发生在 podoplanin 阴性细胞但是在 podoplanin 阳性细胞中也检测到了微量的表达。对 VEGFR-3、LYVE-1 染色, 细胞核用 Hoechst 荧光素复染以及对 podoplanin 染色都使用活的细胞在冰上进行, 而对 vWF 和 CD31 的染色要先用 PFA 固定。

因此, 免疫荧光显微镜检术表明只有一个亚组(subset)的 HMVE 细胞为 VEGFR-3 阳性。抗原-封闭试验以及 3 种不同单克隆抗体的使用表明 VEGFR-3 染色是特异性的。表达 VEGFR-3 的细胞呈独立岛屿状生长, 周围环绕着 VEGFR-3 阴性细胞。根据此前的人组织免疫染色结果(Jussila 等, Cancer Res. 58: 15991604,1998; Lymboussaki 等, Am. J. Pathol., 153: 395-403, 1998), 可以认定前者为淋巴管内皮细胞而后者为血管内皮细胞。这些细胞中大多数但并非所有, 以及一些 VEGFR-3 阴性细胞用淋巴管内皮细胞标记物 LYVE-1 染色(Banerji 等, J. Biol. Chem., 144 (4) 789-801,1999)。VEGFR-3 阳性细胞还可针对另一种最近鉴定的淋巴管内皮细胞标志物 podoplanin(Breiteneder-Geleff 等, 等, Am. J. Path., 154 (2) 385-394,1999)进行特异性染色。在 FACS 分析中也获得了近似结果。vWF 抗原在 podoplanin 阴性的血管内皮细胞中表达更为显著。所有细胞中都检测到了泛-内皮细胞标志物 CD31, 这证实了没有污染非-内皮细胞。另外, 根据 Western 印迹试验, 在两种内皮细胞群中都检测到了 VEGFR-1 和 VEGFR-2。在新鲜分离到的 HMVE 细胞中, VEGFR-3 阳性细胞的比例一般大于 50%, 反复再培养的情

况下有所减少。

实施例 3

细胞存活试验中使用的 VEGFR 特异性配体的分析

- 5 VEGF 是一种内皮细胞有丝分裂原, 另外还发现其能通过活化 VEGFR-2 保护内皮细胞免遭饿死以及 TNF- α 诱导的凋亡(Gerber 等, J. Biol Chem., 273: 30336-30343,1998 ; Spyridopoulos 等 , J Mol. Cell. Cardiol., 29: 1321-1330,1997)。不同 VEGFR 促进内皮细胞存活的能力通过 VEGFR 的特异性 VEGF 进行比较。所用生长因子的特异性用细胞存活生物分析来测定。
- 10 对于生物分析而言, 用嵌合受体稳定转染 Ba/F3 原-B 细胞, 该嵌合受体中含有与小鼠促红细胞生成素受体跨膜结构域及胞质结构域融合的人 VEGFR-1、VEGFR-2 或 VEGFR-3 胞外区。

- 正如所料, 只有 VEGF 和 PlGF 能诱导 VEGFR-1/EpoR 细胞的存活 (图 1A)。VEGF、VEGF-C、VEGF-D 和 orf 病毒性 NZ2 (ORFV2-VEGF) 能够支持 VEGFR-2/EpoR 表达细胞的存活, 而只结合并活化 VEGFR-3 的突变型 VEGF-C156S (Joukov 等, EMBO J., 15: 290-298, 1998) 未对这些细胞的存活产生影响(图 1B)。相反, VEGFR-3/EpoR 表达细胞在有 VEGF-C, VEGF-C156S 和 VEGF-D 存在的条件下存活(图 1C)。VEGF-C 浓度为 100 ng/ml 和 VEGF-C156S 浓度为 500 ng/ml 时, VEGFR-3/EpoR 细胞存活试验获得最大存活力, 在后续的凋亡及信号传导试验中选择上述浓度。
- 15 20

- 用生物传感器试验进一步研究 VEGF-C 及 VEGF-C156S 与 VEGFR-2 及 VEGFR-3 间的相互作用。分析生物传感器结合曲线证实了 VEGF-C156S 只能结合 VEGFR-3 的胞外区, 而野生型 VEGF-C 结合 VEGFR-2 和 VEGFR-3 两种受体 (图 1D-图 1G)。VEGF-C/VEGFR 相互作用的动力学分析(表 I)显示 KD 值低于此前使用受体表达细胞培养物进行放射活性配体结合试验的报道值(Joukov 等, EMBO J., 16: 3898-3911,1997)。但是, 在这两个试验中, VEGF-C 对 VEGFR-3 的亲合力高于对 VEGFR-2 的亲合力。当与 VEGF-C 相比时, VEGF-C156S 对 VEGFR-3 的亲合力明显较低, 但是程度上近似于小鼠 VEGF-D 与小鼠 VEGFR-3 间相互作用的报道结果(Baldwin 等, J. Biol. Chem., 276: 19166-19171,2001)。
- 25 30

表 I

生物传感器分析 VEGF-C 及 VEGF-C156S 与 VEGFR-2 及 VEGFR-3 间相互作用得到的动力学数据。采用 1:1 Langmuirian 模型用 BIAevaluation 3.0 整体适配(global fitting)提取数据, 有质量转换(mass transfer)。

5

配体	受体	$K_a(1/Ms)$	$K_d(1/s)$	$K_D(M)$
hVEGF-C	hVEGFR-2	5.5×10^4	12.3×10^{-4}	2.2×10^{-8}
hVEGF-C	hVEGFR-3	13.6×10^4	6.05×10^{-4}	0.44×10^{-8}
hVEGF-C _{156S}	hVEGFR-2	未结合	未结合	未结合
hVEGF-C _{156S}	hVEGFR-3	0.35×10^4	4.0×10^{-4}	11.5×10^{-8}
hVEGF-D*	hVEGFR-2	1.3×10^4	6.3×10^{-4}	4.8×10^{-8}
hVEGF-D*	hVEGFR-3	1.8×10^4	12×10^{-4}	6.5×10^{-8}
mVEGF-D*	mVEGFR-2	未结合	未结合	未结合
mVEGF-D*	mVEGFR-3	0.8×10^4	7.0×10^{-4}	8.9×10^{-8}

* = 参考文献: Baldwin 等, J. Biol. Chem., 276: 19166-19171, 2001

缩写: h=人; m=小鼠

Baldwin 等试验中使用的配体为成熟形式的 VEGF-D, 本试验中使用的 VEGF-C 和 VEGF-C156S 也为成熟形式。除 mVEGFR-2 为单价以外, 其它所用受体全部都为二价免疫球蛋白融合蛋白。

10

实施例 4

VEGFR-3 信号传导保护内皮细胞免遭血清饥饿-引发的凋亡

能够刺激 VEGFR-2 或 VEGFR-3 或者两者都能刺激的所有 VEGF, 包括 VEGF、VEGF-C、VEGF-C156S、VEGF-D 和 ORFV2-VEGF, 都能保护微脉管内皮细胞免遭饥饿诱导的 DNA 降解, 这种降解用细胞质组氨酸-结合性 DNA 片段的量来测算 (图 2A)。相反, 只结合 VEGFR-1 的 PlGF 并没有提供明显保护。VEGFR-1 介导的存活信号的缺乏也被下述事实所验证: VEGFR-2 的特异性配体 ORFV2-VEGF 提供了与 VEGF 近乎相当的保护。VEGF-C 和 VEGF-C156S 呈剂量-依赖性地抑制寡核小体及单核小体在血清-剥夺后的淋巴管内皮细胞中的积聚。VEGF-C 在 100ng/ml 时达到最强效果, 而 VEGF-C156S 在 500ng/ml 时效果最佳。

20

实施例 5

表达 VEGFR-3 的淋巴管内皮细胞的分离

为了将 VEGF 对淋巴管内皮细胞存活的作用与对血管内皮细胞存活的作用进行比较, 使用特异性抗体和磁性微珠分离并培养 VEGFR-3 阳性及阴性细胞。简而言之, 在该方法中, 培养三组相互独立的表达 VEGFR-3 的淋巴管内皮细胞: 第一组培养于含 5 % 血清的完全培养基, 第二组培养于含 5 % 血清并补加了 VEGF (10ng/ml) 的完全培养基, 第三组培养于含 5 % 血清并补加了 VEGF-C(100ng/ml) 的完全培养基。分选后, 将 VEGFR-3 阳性细胞在血清中或在补加了 VEGF-C 后培养 5 天, 对 podoplanin 染色, 然后增殖细胞核抗原(PCNA)。核用 Hoechst 荧光色素染色。如果补加了 VEGF-C 或 VEGF, 那么细胞就染色 PCNA。另外, 还用抗 podoplanin 或 VEGFR-3 的抗体对未分选细胞或 VEGFR-3 阴性及 VEGFR-3 阳性细胞群进行免疫荧光双染色。

根据免疫荧光染色的结果, 淋巴管内皮细胞培养物的纯度高于 95 %。分离的 VEGFR-3 阳性细胞并未充分吸附到培养皿上, 只有极少数细胞在含血清的完全培养基中增殖。但是, 如果补加了 VEGF 或 VEGF-C, 那么大部分 podoplanin 阳性细胞很容易地就增殖了。相反, 血管内皮细胞在未添加这些因子的条件下生长很好。

分离的淋巴管内皮细胞变得更长, 细胞出现数个突出, 尤其是培养在有 VEGF-C 存在的条件下。在未分选的 VEGFR-3 阴性和 VEGFR-3 阳性细胞群中, podoplanin 和 VEGFR-3 的免疫荧光共定位于同一种细胞。在补加了 VEGF-C 的培养基中, 只观察到了针对 VEGFR-3 的细胞质染色, 这与配体-受体复合体的内化相一致。相反, 在有血清或 VEGF 的培养基中, VEGFR-3 分布在细胞表面上。

25

实施例 6

VEGF-C 主要促进表达 VEGFR-3 的淋巴管内皮细胞的存活

测量细胞质单核小体及寡核小体的积聚, 作为血清饥饿过程中两种内皮细胞群凋亡的信号。在 VEGFR-3 表达细胞, VEGF-C 和 VEGF 促进细胞存活(图 2B)。但是, 对于 VEGFR-3 阴性细胞来说, VEGF-C 是一种较低效的存活因子, 要达到与 VEGFR-3 阳性细胞检测到的同等效果需要提高 5-10

倍的浓度。正如所料, VEGF-C156S 只诱导 VEGFR-3 阳性细胞的存活(图 2B)。这些结果证实: VEGFR-3 独自就能传导内皮细胞存活信号, VEGF 和 VEGF-C 分别靶向血管内皮细胞和淋巴管内皮细胞。选择性促进淋巴管内皮细胞生长的能力使得这些类型细胞的细胞培养物进一步富集。

5 另外, 血清-剥夺诱导的凋亡也可以通过用荧光-偶联磷脂-结合蛋白, 膜联蛋白-V, 分析细胞表面磷脂酰丝氨酸的暴露情况来监测。血清饥饿 24 小时后检测到了膜联蛋白-V 染色的细胞, 饥饿 72 小时时, 贴壁细胞中约 40 % 凋亡, 但这些细胞在早期的数代及在融合时对凋亡抗性更强。

向饥饿培养基中加入 VEGF 大大减少了呈膜联蛋白-V 阳性的细胞的数目以及细胞的脱附。膜联蛋白-V 染色 HMVE 细胞在无血清培养基(BSA)单独培养或者 VEGF 或 VEGF-C 刺激 72 小时后进行的。用抗 podoplanin 抗体同时染色, 以区分淋巴管内皮细胞和血管内皮细胞。使用这种染色方法, 能够检测凋亡的、膜联蛋白-V 阳性淋巴管内皮细胞和凋亡的血管内皮细胞。另外, 核用 Hoechst 荧光色素复染。膜联蛋白-V 阳性细胞未被碘化丙锭染色, 15 因此, 它们是凋亡的细胞而非坏死的细胞。另一方面, 核用 Hoechst 荧光色素染色显示凋亡中的细胞典型的固缩核。这些固缩核经 TUNEL 染色也为阳性。值得注意的是, 用 VEGF-C 刺激以及特别是用 VEGF-C 156S 刺激主要增加了淋巴管内皮细胞的存活(图 3)。在 BSA 和 VEGF 处理的培养物中, Podoplanin 阴性细胞中膜联蛋白-V 阳性细胞的数目也较高(图 3)。这可能部分为间接效果, 因为血管内皮细胞而非淋巴管内皮细胞产生 VEGF-C, 因此 20 它们可能促进淋巴管内皮细胞的存活。

实施例 7

VEGFR-3 磷酸化导致 PI-3-激酶依赖性 Akt 活化

25 正如在发明背景中讨论的那样, 生长因子受体促进细胞存活时所利用的一种主要信号传导途径使用 PI-3-激酶及其下游靶, 丝氨酸-苏氨酸激酶 Akt。可以通过使用磷酸特异性抗体测评丝氨酸 473 和苏氨酸 308 的 Akt 磷酸化, 以便分析不同的 VEGF 对 Akt 的作用。在经 VEGF, ORFV2-VEGF, VEGF-C, VEGF-C156S 或 VEGF-D 刺激的 HMVE 细胞中, Akt 在 Ser473 被磷酸化, 30 而经 PlGF 刺激的 HMVE 细胞无此情况。这表明 Akt 是通过由 VEGFR-2 或 VEGFR-3, 而非由 VEGFR-1 传导的生长因子信号活化的。另外还检测到了

Akt Thr308 磷酸化的类似增加。PI3-激酶抑制剂沃特曼宁 (30 nM) 和 LY294002(20, μ M)终止了应答所有 VEGF 时的 Akt 磷酸化,这表明 VEGFR-3 介导的 Akt 活化是通过 PI3-激酶传导的,和此前 VEGFR-2 观察到的情况相同(Gerber 等, J. BiolChem., 273:30336-30343, 1998;Thakker 等, J. BioL Chem., 5 274: 1000210007, 1999)。

在 HMVEC 暴露于 VEGF 后 20-30 分钟, Akt 的磷酸化达到最大程度, 而 VEGF-C 诱导的 Akt 磷酸化峰值出现在之后的 10 分钟时(图 4)。形成鲜明对照的是, VEGF-C156S 刺激导致较慢的磷酸化, 峰值在第 30-40 分钟时。下游靶标活化中的差异表明: 通过 VEGFR-2 或 VEGFR-3 进行的 Akt 磷酸化可以通过不同途径传导。VEGFR-2 通过经典途径传导 Akt 磷酸化的信号, 10 该途径与 PI3-激酶的调控性 p85 亚单元组成性结合(Thakker 等, J: Biol. Chem., 274: 10002-10007,1999)。相反, 本发明人及其它人还未能检测 p85 与 VEGFR-3 的结合或者 VEGFR-3 自身磷酸化后 PI3-激酶活性的刺激(Borg 等, Oncogene, 10: 973-984,1995; Pajusola 等, Oncogene, 9: 3545-3555,1994)。

15

实施例 8

用 VEGF-C 同时刺激 VEGFR-2 和 VEGFR-3 导致持续的 p42/p44 MAPK 活化

本发明人发现: 当 VEGF-C 刺激时, 通过 VEGFR-2 和 VEGFR-3 的同时信号传导导致 HMVE 细胞中持续的 p42/p44 MAPK 活化。p42/p44 MAPK 20 活化通过 Western 印迹用磷-Thr202/Tyr204-MAPK 特异性抗体检测, 而 CREB 磷酸化使用磷-Ser133 特异性抗体检测。所用生长因子浓度为: VEGF 10ng/ml, VEGF-C 100ng/ml 和 VEGF-C156S 500ng/ml。此外, 本试验表明 HMVE 细胞中 VEGFR-3 诱导的 p42/p44 MAPK 活化是通过蛋白激酶 C 诱导的。蛋白 25 激酶 C 被 GF109203X 抑制、MEK1 被 PD98059 抑制 以及 PI-3 激酶被 LY294002 抑制对 HMVE 细胞中 p42/p44 MAPK Thr202/Tyr204 磷酸化、CREB Ser133 磷酸化以及 Akt Ser473 磷酸化的影响。所用生长因子浓度为: VEGF 1ng/ml, VEGF-C 10 ng/ml 以及 VEGF-C156S 500 ng/ml。

有丝分裂原-活化的蛋白激酶(MAPK)信号传导途径是参与生长因子-依 30 赖性细胞存活的另一机制。本发明人发现: 当用 VEGF-C 刺激时, VEGFR-2 和 VEGFR-3 介导的同时信号传导导致 HMVE 细胞中持续性 p42/p44 MAPK

活化。p42/p44 MAPK 活化通过 Western 印迹, 用磷-Thr202/Tyr204-MAPK 特异性抗体检测, 而 CREB 磷酸化用磷-Ser133 特异性抗体检测。

5 本发明人发现 VEGFR-3 被 VEGF-C156S 刺激后检测到 HMVE 细胞中的 MAPK 活化。但是, 被 VEGFR-2 配体 VEGF 和 VEGF-C 诱导的 MAPK 磷酸化在这些细胞中明显更强。尽管在 VEGF-C 和 VEGF 刺激后 MAPK 活化峰值出现第 10-20 分钟, 但是 VEGF 诱导的活化比 VEGF-C 诱导的活化更加短暂, VEGF-C 诱导的活化存续至少 6 小时。

10 MAP 激酶的下游, MAPK 活化的激酶 Rsk, 已经证明其使转录因子 CREB (cAMP 反应元件-结合蛋白) 在 Ser133 位磷酸化, 这样能通过提高原-存活基因的转录促进细胞存活(Bonni 等, Science, 286: 1358-1362, 1999)。CREB 磷酸化与 p42/p44 活化相关, 在 HMVECs 被 VEGF 或 VEGF-C 刺激后检测到了 CREB 磷酸化, 但是 VEGF-C156S 刺激后未检测到。尽管 Akt 也已被证实能使 CREB 磷酸化(Du and Montminy, J. Biol.Chem., 273: 32377-32379 1998), 但是用 LY294002 抑制 Akt 不影响 CREB 磷酸化。相反, PD98059 15 或 U0126 抑制 MEK1 (MAP 激酶激酶), 则抑制了 VEGF-C 诱导的 CREB 磷酸化, 但是不抑制 VEGF 诱导的 CREB 磷酸化。

此外, 本发明人发现 VEGFR-3 诱导的 MAPK 活化是通过 PKC 介导的。VEGF 诱导的 MAPK 级联反应的活化已被证实是通过蛋白激酶 C (PKC) 介导的, 而不是经典 Ras 途径介导的(Doanes 等, Biochem.Biophys. Res. Commun. 20 255: 545-548, 1999; Takahashi 等, Oncogene, 18: 2221-2230, 1999; Yoshiji 等, Cancer Res., 59:4413-4418, 1999)。为了研究 PKC 抑制对 VEGF-C 及 VEGF-C156S 诱导的 MAPK 活化的影响, 通过 Western 印迹用磷酸特异性抗体测量出实现最大程度 p42/p44 MAPK 活化所需 VEGF, VEGF-C 和 VEGF-C156S 的最小浓度。这些条件下, GF109203X 抑制 PKC, 这完全阻断了 VEGF, VEGF-C 或 VEGF-C156S 诱导的 p42/44 MAPK 磷酸化, 以及 25 VEGF 或 VEGF-C 诱导的 CREB 磷酸化。而且, PD98059 抑制 MEK1 导致 VEGF-C 刺激的 CREB 磷酸化减弱。令人奇怪的是, 这种处理没有抑制 VEGF 诱导的 CREB 磷酸化。相一致的是, 最近一项试验中, VEGF 诱导的 CREB 磷酸化被证实是通过 PKC 和 p38 MAPK 介导的, 而不是通过 p42/p44 MAPK 30 介导的。

实施例 9

VEGFR-3 诱导内皮细胞迁移

内皮细胞的迁移在脉管生成中发挥着重要作用，至少一些由 VEGF 诱导的迁移信号是通过 PI3-激酶传导的(Gille 等, J Biol. Chem., 276: 3222-3230,2001; Gille 等, EMBOJ., 19: 4064-4073, 2000; Qi and Claesson-Welsh, Exp. Cell Res., 263: 173-182, 2001)。由于 VEGFR-3 缺陷型胚胎的死亡是由于无法完成脉管重塑(Dumont 等, Science, 282: 946-949,1998), 所以, VEGFR-3 信号传导是否也参与内皮细胞迁移这一问题值得进一步研究。Boyden 槽试验中将 HMVE 细胞在有不同 VEGF 存在的条件下孵育。

10 VEGF 诱导对细胞迁移的 10-倍刺激, VEGF-C 或 VEGF-D 与 VEGF 的效果近乎相当(图 5)。另外, VEGF-C156S 也诱导了 HMVE 细胞迁移, 但这被 10-倍摩尔过量的可溶性 VEGFR-3 特异性阻断(图 5, 浅灰色的柱条)。这些结果表明通过 VEGFR-3 进行的信号传导足以诱导内皮细胞的迁移。

尽管本发明的组合物和方法以优选实施方案的方式进行了描述, 但是本领域技术人员显然能够认识到可对本发明所述方法进行改动而不脱离本发明的概念、实质和范围。所有对于本领域技术人员来说显而易见的类似替代及修饰都必然在本发明的实质、范围和概念范畴之内。制备表达文库的技术以及制备和分离重组肽的技术已为本领域技术人员熟知, 并可与本发明结合使用。

15

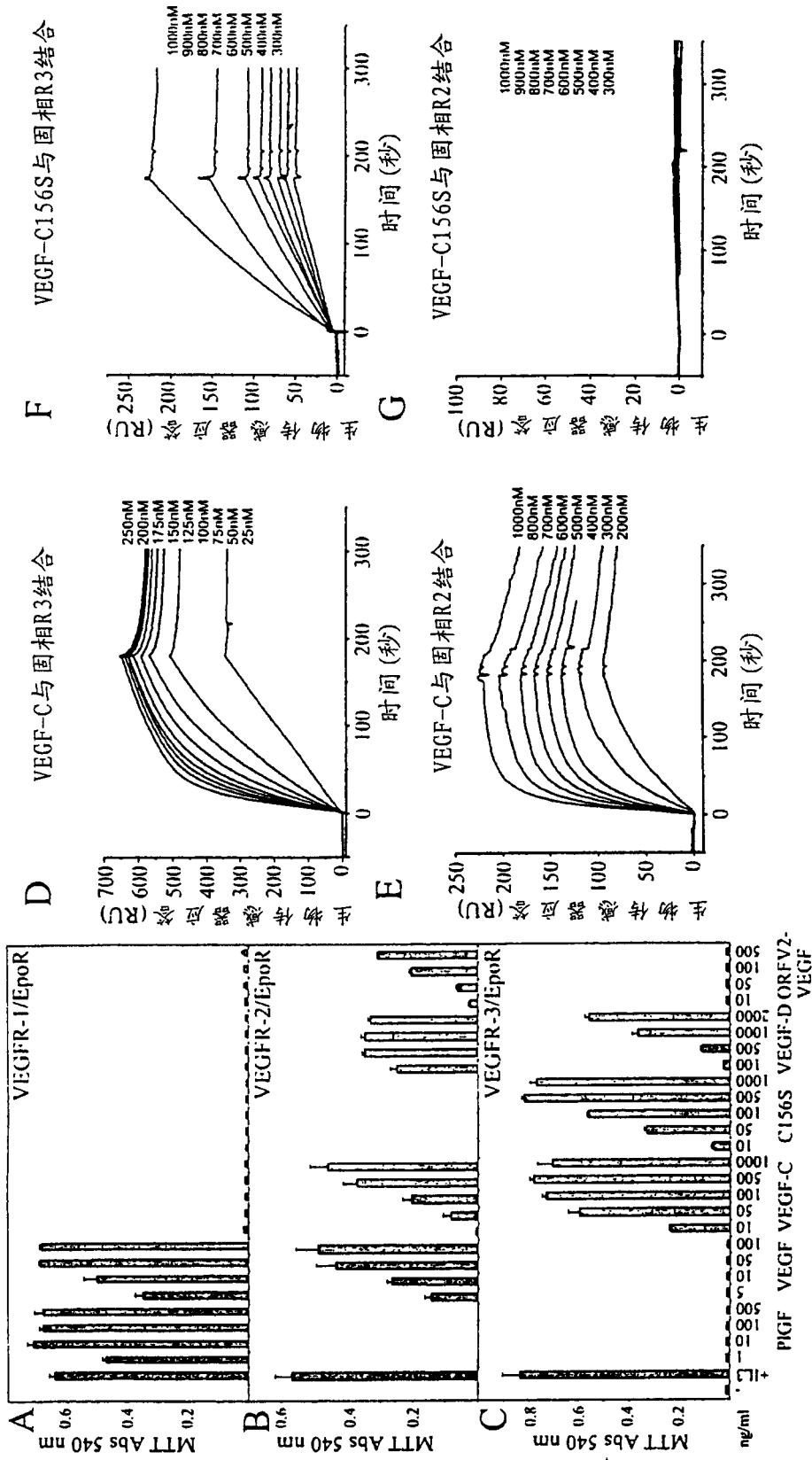
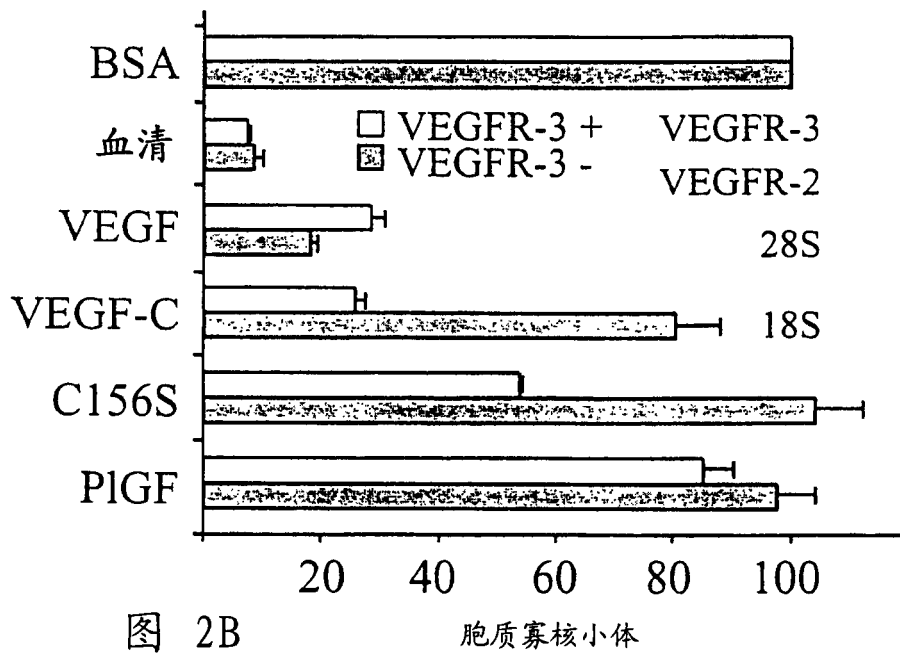
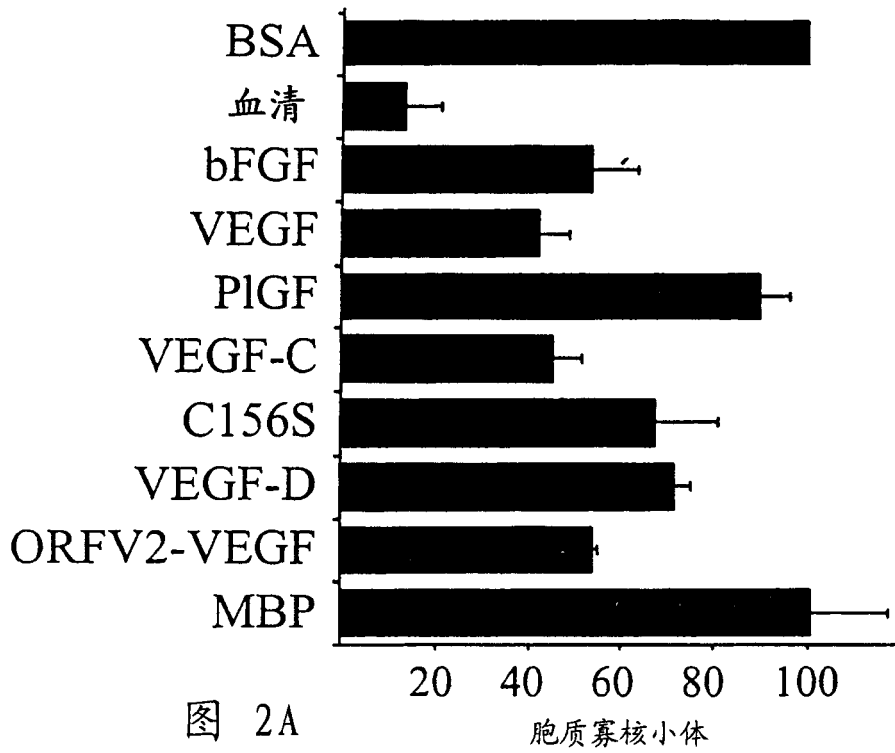


图 1A-图 1G



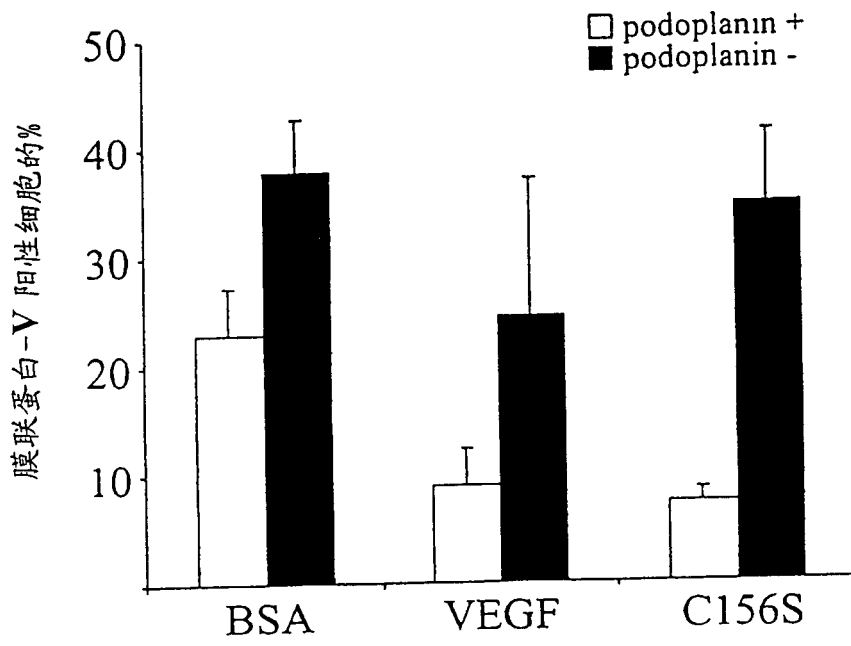


图 3

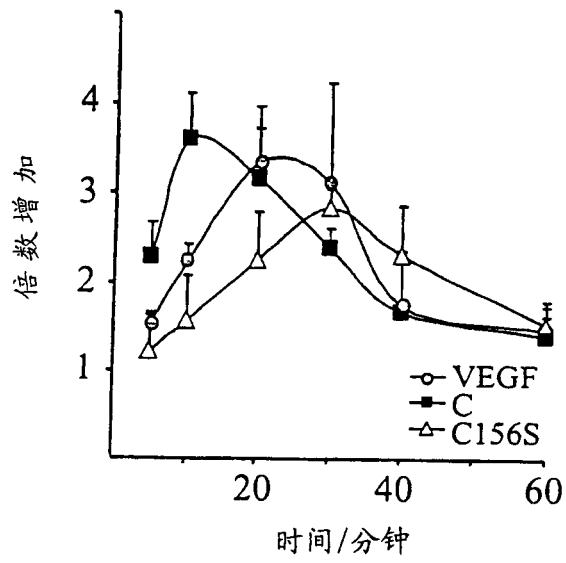


图 4

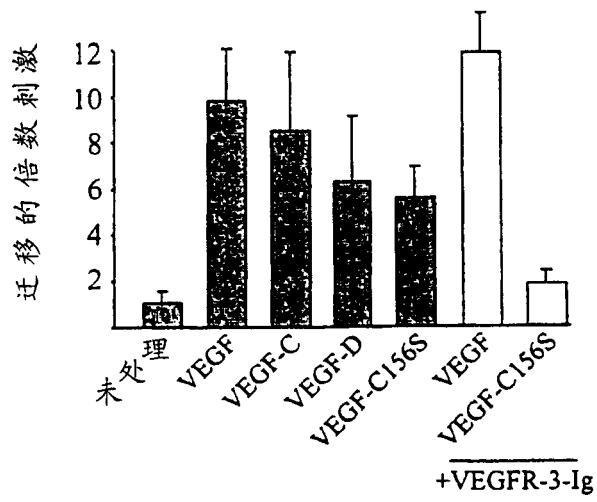


图 5

专利名称(译)	淋巴管内皮细胞物质及方法		
公开(公告)号	CN1555488A	公开(公告)日	2004-12-15
申请号	CN02817923.4	申请日	2002-07-12
[标]申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究院		
申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究院		
当前申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究院		
[标]发明人	卡里阿利塔洛 泰加马基嫩		
发明人	卡里·阿利塔洛 泰加·马基嫩		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P17/06 A61P27/02 A61P29/00 A61P35/00 C12N5/071 C12N5/10 C12N15/09 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/569 A61K39/00 A61P43/00		
CPC分类号	C12N5/069 C12N2501/165 G01N33/56966 G01N2333/71 A61P7/10 A61P17/06 A61P27/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00		
优先权	60/304889 2001-07-12 US 60/317610 2001-09-06 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及从混合细胞群分离淋巴管内皮细胞的方法和组合物。更具体地说，本发明发现识别VEGFR - 3胞外区的特定抗体可用于特异性分离基本不含其它污染性非 - 淋巴管内皮细胞的淋巴管内皮细胞。本发明还公开了用于制备所述细胞以及使用所述细胞的方法和组合物。

