

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00812835.9

A61K 39/395
A61K 38/00 A61K 31/00
A61K 31/7088 C07K 14/705
A61K 47/48 A61K 51/00
G01N 33/53 A61P 9/00
A61P 17/06 A61P 25/00
A61P 35/00 A61P 35/04
[11] 公开号 CN 1379685A

[43] 公开日 2002 年 11 月 13 日

[22] 申请日 2000.7.13 [21] 申请号 00812835.9

[30] 优先权

[32] 1999.7.13 [33] US [31] 60/143,581

[32] 1999.9.2 [33] US [31] 60/152,495

[86] 国际申请 PCT/US00/19095 2000.7.13

[87] 国际公布 WO01/04157 英 2001.1.18

[85] 进入国家阶段日期 2002.3.13

[71] 申请人 南加利福尼亚大学

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 彼得·C·布鲁克斯 卢布纳·哈桑尼
多萝西·罗德里格斯

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 7 页 说明书 37 页 附图 12 页

[54] 发明名称 用基于 MMP-9 和 $\beta 1$ 整联蛋白的拮抗剂
抑制血管发生的新方法和组合物

[57] 摘要

本发明描述了用于修饰涉及 MMP-9 和/或 $\beta 1$ 整联蛋白的某些氨基酸序列的蛋白质-蛋白质之间相互作用的拮抗剂,这种拮抗剂抑制血管发生、肿瘤生长和疾病状态。举例的拮抗剂为多肽和非肽分子,包括新抗体 Mab FM155 和新合成肽 FRIP-1。本发明还公开了通过施用这种拮抗剂抑制血管发生和疾病状态的方法。本发明也公开了修饰涉及 MMP-9 和/或 $\beta 1$ 整联蛋白的某些氨基酸序列的蛋白质-蛋白质之间相互作用的拮抗剂的鉴别方法。

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

1. 一种通过修饰蛋白质-蛋白质之间相互作用而抑制血管发生的拮抗剂，其中蛋白质-蛋白质之间的相互作用包括第一个蛋白质中的至少一个氨基酸序列与第二个蛋白质中的至少一个氨基酸序列之间的相互作用。

2. 权利要求 1 的拮抗剂，其中第一个蛋白质是 MMP-9。

3. 权利要求 1 的拮抗剂，其中第一个蛋白质是含有 $\beta 1$ 的整联蛋白。

4. 权利要求 1 的拮抗剂，其中第一个蛋白质是 MMP-9，第二个蛋白质是含有 $\beta 1$ 的整联蛋白。

5. 权利要求 4 的拮抗剂，其中蛋白质-蛋白质之间的相互作用使 MMP-9 结合含有 $\beta 1$ 的整联蛋白。

6. 权利要求 3 的拮抗剂，其中含有 $\beta 1$ 的整联蛋白是 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白。

7. 权利要求 4 的拮抗剂，其中含有 $\beta 1$ 的整联蛋白是 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白。

8. 权利要求 1 的拮抗剂，其中蛋白质-蛋白质之间的相互作用使第一个蛋白质和第二个蛋白质共同位于细胞表面或血管上。

9. 权利要求 1 的拮抗剂，其中所述拮抗剂抑制血管发生。

10. 权利要求 1 的拮抗剂，其中所述拮抗剂抑制肿瘤生长。

11. 权利要求 1 的拮抗剂，其中所述拮抗剂抑制转移癌。

12. 权利要求 1 的拮抗剂，其中所述拮抗剂抑制一种疾病状态。

13. 权利要求 12 的拮抗剂，其中疾病是银屑病，黄斑变性，神经病变，或组织再狭窄。

14. 权利要求 1 的拮抗剂，其中所述拮抗剂是单克隆抗体。

15. 权利要求 14 的拮抗剂，其中所述单克隆抗体是 FM155。

16. 权利要求 1 的拮抗剂，其中所述拮抗剂具有结合单克隆抗体 FM155 的至少一个靶的结合特异性。

17. 权利要求 1 的拮抗剂，其中拮抗剂是多克隆抗体。

18. 权利要求 1 的拮抗剂，其中拮抗剂是多肽，线性肽或环肽。

19. 权利要求 1 的拮抗剂，其中拮抗剂是一种非肽化合物。

20. 权利要求 1 的拮抗剂，其中拮抗剂是一种小有机化合物。

21. 权利要求 1 的拮抗剂，其中拮抗剂是一种寡核苷酸。

22. 权利要求 1 的拮抗剂，其中拮抗剂是人源化的或化学修饰的单克隆抗体。

23. 权利要求 1 的拮抗剂，其中拮抗剂是单克隆抗体的片段。

24. 权利要求 1 的拮抗剂，其中拮抗剂缀合于胞毒剂或细胞抑制剂。

25. 一种抑制血管发生和/或肿瘤生长的多肽，其中此多肽特异结合 MMP-9，其结合亲和性明显高于 SEQ ID NO:3 与 MMP-9 的结合亲和性。

26. 权利要求 25 的多肽，其中多肽是一种蛋白质。

27. 权利要求 25 的多肽，其中多肽具有由 SEQ ID NO:1 组成的序列。

28. 权利要求 25 的多肽，其中多肽的氨基酸序列包括 SEQ ID NO:1。

29. 权利要求 25 的多肽，其中多肽是一种单克隆抗体。

30. 权利要求 29 的多肽，其中单克隆抗体是 FM155。

31. 一种抑制血管发生或肿瘤生长的多肽，其中此多肽特异结合含有 $\beta 1$ 的整联蛋白，其结合亲和性明显高于 SEQ ID NO:3 与含有 $\beta 1$ 的整联蛋白的结合亲和性。

32. 权利要求 31 的多肽，其中多肽是一种蛋白质。

33. 权利要求 31 的多肽，其中多肽是 SEQ ID NO:1。

34. 权利要求 31 的多肽，其中多肽的氨基酸序列包括 SEQ ID NO:1。
35. 权利要求 31 的多肽，其中多肽是一种单克隆抗体。
36. 权利要求 35 的多肽，其中单克隆抗体是 FM155。
37. 一种拮抗剂，其特异结合 SEQ ID NO:1，但结合 SEQ ID NO:3 的亲合性大大降低。
38. 权利要求 37 的拮抗剂，其中拮抗剂抑制血管发生。
39. 权利要求 37 的拮抗剂，其中拮抗剂抑制肿瘤生长。
40. 权利要求 37 的拮抗剂，其中拮抗剂是多肽。
41. 权利要求 40 的多肽，其中多肽是一种蛋白质。
42. 权利要求 40 的多肽，其中多肽包括 SEQ ID NO:1。
43. 权利要求 40 的多肽，其中多肽是一种单克隆抗体。
44. 权利要求 43 的多肽，其中单克隆抗体是 FM155。
45. 一种拮抗剂，其破坏 MMP-9 定位于细胞表面或血管。
46. 权利要求 45 的拮抗剂，其中拮抗剂抑制血管发生。
47. 权利要求 45 的拮抗剂，其中拮抗剂抑制肿瘤生长。
48. 权利要求 45 的拮抗剂，其中拮抗剂是一种多肽。
49. 权利要求 48 的多肽，其中多肽是一种蛋白质。
50. 权利要求 48 的多肽，其中多肽包括 SEQ ID NO:1。
51. 权利要求 48 的多肽，其中多肽是一种单克隆抗体。
52. 权利要求 51 的多肽，其中单克隆抗体是 FM155。
53. 一种抑制组织中血管发生的方法，包括施用权利要求 1 的拮抗剂。
54. 权利要求 53 的方法，其中所述拮抗剂是通过静脉内，经皮，滑膜内，肌内，肿瘤内，眼内，鼻内，鞘内，局部或口服施用的。
55. 权利要求 53 的方法，其中所述拮抗剂与化疗结合施用。
56. 权利要求 53 的方法，其中所述拮抗剂与放疗结合施用。

57. 权利要求 53 的方法，其中所述组织发炎并发生血管发生。
58. 权利要求 57 的方法，其中所述组织存在于哺乳动物体内。
59. 权利要求 58 的方法，其中所述组织是关节组织，眼组织，视网膜组织或血管瘤。
60. 一种抑制组织中肿瘤生长或转移的方法，包括施用权利要求 1 的拮抗剂。
61. 权利要求 60 的方法，其中所述拮抗剂是通过静脉内，经皮，滑膜内，肌内，肿瘤内，眼内，鼻内，鞘内，局部或口服施用的。
62. 权利要求 60 的方法，其中所述拮抗剂与化疗结合施用。
63. 权利要求 60 的方法，其中所述拮抗剂与放疗结合施用。
64. 权利要求 60 的方法，其中肿瘤或转移癌是黑素瘤，癌，肉瘤，纤维肉瘤，胶质瘤或星形细胞瘤。
65. 一种通过施用权利要求 1 的拮抗剂抑制银屑病，黄斑变性或组织再狭窄的方法。
66. 权利要求 65 的方法，其中所述拮抗剂是通过静脉内，经皮，滑膜内，肌内，肿瘤内，眼内，鼻内，鞘内，局部或口服施用的。
67. 权利要求 65 的方法，其中拮抗剂与化疗结合施用。
68. 权利要求 65 的方法，其中拮抗剂与放疗结合施用。
69. 一种检测组织中血管发生的方法，通过将权利要求 1 的拮抗剂与所述组织接触而进行。
70. 权利要求 69 的方法，其中所述组织是源自体内的。
71. 权利要求 69 的方法，其中所述组织是在体内的，且所述拮抗剂是通过静脉内，经皮，滑膜内，肌内，肿瘤内，眼内，鼻内，鞘内，局部或口服施用的。
72. 权利要求 69 的方法，其中所述拮抗剂缀合于荧光素，放射性标记，顺磁性重金属，诊断染料或酶。
73. 一种通过施用权利要求 1 的拮抗剂而检测组织中肿瘤或肿瘤

侵袭的方法。

74. 权利要求 73 的方法，其中所述组织是源自体内的。

75. 权利要求 73 的方法，其中所述组织是在体内的，且所述拮抗剂是通过静脉内，经皮，滑膜内，肌内，肿瘤内，眼内，鼻内，鞘内，局部或口服施用的。

76. 权利要求 73 的方法，其中所述拮抗剂缀合于荧光素，放射性标记，顺磁性重金属或诊断染料。

77. 一种筛选 MMP-9 拮抗剂的方法，包括：

a) 提供一种推定的拮抗剂；

b) 测定所述推定的拮抗剂结合 MMP-9 的第一种亲和性；

c) 测定 SEQ ID NO:3 结合 MMP-9 的第二种亲和性；

d) 如果第二种亲和性明显低于第一种亲和性，则选择所述推定的拮抗剂作为 MMP-9 的拮抗剂。

78. 权利要求 77 的方法，其中所述推定的拮抗剂是一种非肽化合物。

79. 权利要求 78 的方法，其中所述非肽化合物是一种小有机化合物。

80. 权利要求 78 的方法，其中所述非肽化合物是一种寡核苷酸。

81. 权利要求 77 的方法，其中所述推定的拮抗剂是一种多肽，线性肽，或环肽。

82. 权利要求 77 的方法，其中所述推定的拮抗剂是一种抗体。

83. 权利要求 82 的方法，其中所述抗体是单克隆抗体。

84. 权利要求 82 的方法，其中所述抗体是多克隆抗体。

85. 权利要求 77 的方法，其中所述第一种和第二种亲和性是通过酶联免疫吸附测定确定的。

86. 权利要求 77 的方法，其中所述第二种亲和性比第一种亲和性大约低 3 倍。

87. 权利要求 77 的方法，其中所述第二种亲和性比第一种亲和性大约低 5 倍。

88. 权利要求 77 的方法，其中所述第二种亲和性比第一种亲和性大约低 10 倍。

89. 一种筛选 β 1 整联蛋白拮抗剂的方法，包括：

a) 提供一种推定的拮抗剂；

b) 测定所述推定的拮抗剂结合 β 1 整联蛋白的第一种亲和性；

c)测定 SEQ ID NO:3 结合 β 1 整联蛋白的第二种亲和性；

d) 如果第二种亲和性明显低于第一种亲和性，则选择所述推定的拮抗剂作为 β 1 整联蛋白的拮抗剂。

90. 权利要求 89 的方法，其中所述推定的拮抗剂是一种非肽化合物。

91. 权利要求 90 的方法，其中所述非肽化合物是一种小有机化合物。

92. 权利要求 90 的方法，其中所述非肽化合物是一种寡核苷酸。

93. 权利要求 89 的方法，其中所述推定的拮抗剂是一种多肽，线性肽，或环肽。

94. 权利要求 89 的方法，其中所述推定的拮抗剂是一种抗体。

95. 权利要求 93 的方法，其中所述抗体是单克隆抗体。

96. 权利要求 93 的方法，其中所述抗体是多克隆抗体。

97. 权利要求 89 的方法，其中所述第一种和第二种亲和性是通过酶联免疫吸附测定确定的。

98. 权利要求 89 的方法，其中所述第二种亲和性比第一种亲和性大约低 3 倍。

99. 权利要求 89 的方法，其中所述第二种亲和性比第一种亲和性大约低 5 倍。

100. 权利要求 89 的方法，其中所述第二种亲和性比第一种亲和性大约低 10 倍。

101. 一种包含编码由权利要求 1 的拮抗剂识别的表位的序列的肽。

102. 权利要求 101 的肽，其中所述拮抗剂是一种单克隆抗体。

103. 权利要求 102 的肽，其中所述抗体是 FM155。

104. 权利要求 101 的肽，其中所述肽是 SEQ ID NO:1。

用基于 MMP-9 和 β 1 整联蛋白的拮抗剂抑制 血管发生的新方法和组合物

相关申请

本申请根据 35U.S.C.119 (e) 要求 1999 年 9 月 2 日申请的美国申请系列 No: 60/152494, 和 1999 年 7 月 13 日申请的美国申请系列 No: 60/143581 的优先权, 所述申请并入参考。

政府支持

本发明是在国立健康研究院合同号 R29CA74132 的政府支持下进行的。

发明领域

本发明涉及医学领域, 尤其涉及用具有在 MMP-9 和/或 β 1 整联蛋白内发现的特异序列的拮抗剂抑制组织血管发生或检测血管发生的方法和组合物。

发明背景

每年肿瘤生长和转移影响了众多人的健康。事实上, 只在美国在未来的一年里估计有 600000 个以上的新癌症患者被诊断 (Varner, J.A., Brooks, P.C., 和 Cheresh, D.A. (1995) *Cell Adh. Commun*3, 367-374)。许多研究提示所有实体肿瘤的生长需要新血管形成以使肿瘤由最小持续扩张 (Varner 等, 1995; 血液, C.H.和 Zetter, B.R. (1990) *Biochim. Biophys. Acta.*1032:89-118; Weidner, N 等 (1992), *J.Natl.Cancer Inst.*84:1875-1887; Weidner, N.等 (1991), *N. Engl. J.Med.*324:1-7; Brooks, P.C.等 (1995), *J. Clin. Invest.*96:1815-1822;

Brooks, P.C.等 (1994), 细胞 79:1157-1164; Brooks, P.C.等 (1996), 细胞 85:683-693; Brooks, P.C.等 (1998), 细胞 92:391-400)。许多其它人体疾病也是特征在于不受调节的血管发生, 包括眼部疾病如黄斑变性和糖尿病视网膜病变。另外, 许多炎症疾病也与失控的新血管形成相关, 如关节炎和银屑病 (Varner 等, 1995)。

从现有的血管中通过生理过程发生新血管已知称为血管发生 (Varner 等, 1995; 血液和 Zetter 1990; Weidner 等, 1992)。此复杂过程要求各种分子的协作, 包括生长因子, 细胞粘着受体, 基质降解酶和胞外基质成分 (Varner 等, 1995; 血液和 Zetter 1990; Weidner 等, 1992)。因此, 阻断血管发生的治疗方法可影响实体肿瘤的生长。事实上, 已经提供了清晰的证据证明在各种动物模型中阻断肿瘤的新血管形成可抑制肿瘤生长, 而且人体临床数据支持此论点 (Varner, J.A., Brooks, P.C., 和 Cheresch, D.A. (1995) *Cell Adh. Commun*3, 367-374)。

也已经提出抑制血管发生可通过 ([1]) 抑制 “血管发生分子” 如 β FGF (成纤维细胞生长因子) 的释放, ([2]) 中和血管发生分子, 如通过使用抗 β FGF 抗体, 和 ([3]) 抑制内皮细胞对血管发生刺激物的应答。后一方案已经引起注意, Folkman 等, 癌症生物学, 3:89-96 (1992) 已经阐述了一些内皮细胞应答抑制剂, 包括胶原酶抑制剂, 基底膜周转抑制剂, 抑制血管 (angiostatic) 的类固醇, 真菌产生的血管发生抑制剂, 血小板因子 4, 血小板反应蛋白, 关节炎药物如 D-青霉胺和硫代苹果酸金, 维生素 D₃ 类似物, α -干扰素及可用于抑制血管发生的其它物质。另外提出的血管发生抑制剂见 Blood 和 Zetter 1990; Moses 等 (1990) 科学 248:1408-1410; Ingber 等 (1988) *Lab. Invest.*, 59: 44-51; 和美国专利 No: 5092885, 5112946, 5192744 和 5202352 所述。

为阻断血管发生, 许多研究人员也着重于起动血管发生的生长

因子和细胞因子 (Varner 等, 1995; Blood 和 Zetter1990; Weidner 等, 1992; Weidner 等, 1991; Brooks 等, 1995; Brooks 等, 1994; Brooks 等, 1997)。然而, 有大量的独特的生长因子和细胞因子具有刺激血管发生的能力。因为此丰余所致, 阻断单一细胞因子的治疗方面的益处是有限的。因此, 需要抑制血管发生和蛋白酶解的其它抗血管发生的靶。

发明概述

侵袭细胞利用蛋白质-蛋白质之间的相互作用, 包括酶和整联蛋白受体, 以将蛋白酶解活性定位于细胞表面, 并促进侵袭细胞行为。本发明提供了抑制血管发生和肿瘤生长的方法和组合物, 使用靶向细胞粘着和胞外基质 (ECM) 的蛋白酶解的拮抗剂。特别地, 基于发现侵袭细胞有助于将蛋白酶解活性定位于细胞表面这一独特机制, 本发明提供了新的组合物和方法以抑制血管发生。

本发明的一方面提供了抑制蛋白质-蛋白质之间相互作用的血管发生拮抗剂的组合物, 包含细胞粘着和胞外基质 (ECM) 的蛋白酶解的拮抗剂。

本发明的另一方面提供了抑制血管发生的组合物, 包括修饰涉及在蛋白酶 MMP-9 和/或 β 1 整联蛋白受体内发现的一些序列的蛋白质-蛋白质之间相互作用的拮抗剂。这种拮抗剂可包括但非限于与 MMP-9 和 β 1 整联蛋白受体免疫反应的抗体或其功能片段, 或特异于 MMP-9 和 β 1 整联蛋白受体复合物的多肽或肽。

本发明的再一方面包含抑制血管发生的方法, 包括将组织与细胞粘着和胞外基质 (ECM) 的蛋白酶解的拮抗剂接触, 所述拮抗剂包括但非限于与 MMP-9 和 β 1 整联蛋白受体免疫反应的抗体或其功能片段, 或特异于 MMP-9 和 β 1 整联蛋白受体复合物的多肽或肽。

本发明的另一方面还阐述了抑制组织中疾病状态或血管发生的

方法。这些方法例如包括对该组织施用一种组合物，该组合物包含抑制血管发生量的蛋白酶 MMP-9 在细胞表面的定位的拮抗剂。本发明所应用的疾病状态可以是肿瘤生长或转移，黄斑变性，银屑病，组织再狭窄等。

进行治疗的组织可以是任何需要抑制血管发生的组织，如发生新血管形成的病变组织。这些组织例如包括炎症组织，实体肿瘤，癌症转移，组织再狭窄等。

本发明还提供了检测血管发生，肿瘤组织，转移，和肿瘤侵袭组织的方法，通过将本发明的拮抗剂与所述组织相接触而进行。

本发明还提供了筛选本发明拮抗剂的方法。

附图简述

图 1：示出利用纤连蛋白的 110kD 细胞结合结构域，从胎盘裂解物中纯化 $\beta 1$ 整联蛋白 $\alpha 5\beta 1$ 的结果。

图 2：示出当纯化的 $\alpha 5\beta 1$ 和 $\alpha v\beta 3$ 在与明胶共聚的 10%SDS PAGE 凝胶上分离时， $\beta 1$ 整联蛋白 $\alpha 5\beta 1$ 的信号识别蛋白体的受体（zymographic）分析结果。

图 3：当纯化的整联蛋白 $\alpha 5\beta 1$ 和 $\alpha v\beta 3$ （1 μ g）被分离时，对 $\beta 1$ 整联蛋白 $\alpha 5\beta 1$ 的 Western 印迹分析的结果。

图 4：重组的 MMP-9 与 $\beta 1$ 整联蛋白 $\alpha 5\beta 1$ ，或对照蛋白 β 酪蛋白的结合分析结果。

图 5：用 $\alpha 5\beta 1$ 阳性和阴性细胞温育重组 MMP-9 的实验结果。

图 6：确定 MMP-9 和 $\beta 1$ 整联蛋白 $\alpha 5\beta 1$ 在人体黑素瘤血管中的共定位的实验结果。

图 7：鉴别结合 MMP-9 的合成肽的实验结果。FRIP-1 是 SEQ ID NO: 1，AAA 是 AAA 肽，其是 SEQ ID NO: 2。

图 8A/8B：将 FRIP-1 肽注射入鸡胚中的实验结果，所用鸡胚中

已经诱导血管发生。

图 9：产生抗合成肽 FRIP-1 (SEQ ID NO: 1) 的 Mab 的实验结果。

图 10：在有或无 Mab FM155 或 LM609 的情况下，结合重组人 MMP-9 (2ug/ml) 的实验结果。

图 11：确定系统施用 FM155 对黑素瘤生长的作用。

发明详述

根据本发明，揭示了涉及蛋白酶 MMP-9 和/或 β 1 整联蛋白受体体内的一些序列的蛋白质-蛋白质之间相互作用通过将蛋白酶解活性定位于细胞表面而有助于血管发生和/或肿瘤生长。因此，修饰这种涉及在 MMP-9 和/或 β 1 整联蛋白受体体内发现的一些序列的蛋白质-蛋白质之间的相互作用，可抑制血管发生和/或肿瘤生长。

MMP-9 和 β 1 整联蛋白之间的相互作用

MMP-9

在生理状态下，结缔组织的合成与胞外基质的降解处于动态平衡。降解有一部分是由于基质金属蛋白酶 (MMPs) 所致，这种酶是参与结缔组织降解和再造型的一个蛋白酶家族。此家族成员内肽酶是从位于或与结缔组织相关的各种类型细胞中以酶原形式分泌的，所述细胞如成纤维细胞，单核细胞，巨噬细胞，内皮细胞和侵袭或转移的肿瘤细胞。MMP 表达是在局部组织环境中通过生长因子和细胞因子的刺激进行的，在此环境中这些酶特异地降解胞外基质的蛋白质成分，如胶原蛋白，蛋白聚糖 (蛋白质核心)，纤连蛋白和层粘连蛋白。这些普遍存在的胞外基质成分存在于关节囊内层，小肠结缔组织，基底膜和软骨中。MMPs 共享许多性质，包括锌和钙依赖性，作为酶原分泌，和 40—50%氨基酸序列同源性。

MMP 对胞外基质的过分降解包含于许多慢性和急性疾病的发病机理中。例如，许多研究如 *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 5, 323—335 (1996) 已经确定 MMPs 的表达和激活在肿瘤生长，侵袭和转移中是关键的。另外，已经发现 MMP 活性是血管发生所需的，血管发生是肿瘤生长以及其它病理状况如黄斑变性所必需的。

这种酶家族成员包括但非限于胶原酶 (MMP-1)，明胶酶或 IV 型胶原酶 (MMP-2, MMP-9)，matrilysin (MMP-7, PUMP-1)，和溶基质素 (MMP-3)。

特别感兴趣的是，明胶酶 MMP-9 是一种由单核巨噬细胞，中性粒细胞，角膜上皮细胞，肿瘤细胞，细胞滋养层和角质细胞释放的 92kD 的酶。

许多生理过程要求细胞与其它细胞和/或胞外基质密切接触。这种粘着事件可以是细胞激活，迁移，增殖和分化所需的。细胞—细胞和细胞—基质间相互作用是通过一些细胞粘着分子家族 (Cams) 介导的，这些分子包括选择蛋白，整联蛋白，钙粘着蛋白和免疫球蛋白。Cams 在正常和病理过程中均起关键作用。因此，不干扰正常细胞功能地将特异的和相关的 Cams 导向一些疾病情形是抑制细胞—细胞和细胞—基质之间的相互作用的有效和安全治疗剂所必需的。

在上述的各种 Cams 中，整联蛋白超家族是在近乎每种哺乳动物细胞类型的各种组合中发现的 (参见 E.C.Butcher, *细胞* 67, 1033 (1991); T.A.Springer, *细胞* 76, 301 (1994); D.Cox 等, “整联蛋白的药理学”, *医学研究综述* 14, 195(1994)和 V.W.Engleman 等, “作为药物靶的细胞粘着整联蛋白”, *Ann.Repts.医学化学* 第 31 卷, J.A.Bristol, Ed., 科学出版社, NY, 1996, p191)。

整联蛋白代表粘着受体的鉴定最为清楚的超家族之一。整联蛋白是糖蛋白异源二聚体，含有非共价结合的 α 和 β 亚单位。整联蛋白

亚单位是跨膜蛋白，含有一个与胞外基质或细胞成分相互作用的胞外结构域，一个跨越细胞膜的跨膜结构域和一个与一或多个细胞骨架成分相互作用的胞质结构域。

已知 14 种 α 亚单位和 8 种 β 亚单位，它们可配对形成至少 20 种不同的整联蛋白分子。一些独特的整联蛋白 α 链能与一类 β 链配对形成 β 链亚家族。

特别感兴趣的是 β 亚 1 ($\beta 1$) 亚家族，其包括 7 个成员（也已知为 VLA 蛋白： $\alpha 1\beta 1-\alpha 7\beta 1$ ）。如以下实施例所示，可使用如下拮抗剂抑制血管发生和疾病状态，所述拮抗剂修饰涉及 $\beta 1$ 整联蛋白例如 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白的一些氨基酸序列的蛋白质-蛋白质间相互作用。本文中术语 $\beta 1$ 整联蛋白和含有 $\beta 1$ 的整联蛋白是可交替使用的。

本发明的拮抗剂

本发明的实施例确定 MMP-9 直接结合 $\beta 1$ 整联蛋白 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白。因此，缺失产生 $\beta 1$ 整联蛋白基因的细胞结合 MMP-9 的能力显著降低。实施例还提示 MMP-9 和 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白可共定位于细胞和血管的表面，因为实施例表明 MMP-9 和 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白在人体血管区室以及在其自身肿瘤细胞上密切结合。

另外，对 MMP-9 和 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白的氨基酸序列分析鉴别了一种多肽 FRIP-1 (SEQ ID NO: 1)，其介导这两个蛋白质之间的相互作用。FRIP-1 结合 MMP-9，但一种对照肽 AAAA (SEQ ID NO: 3) 与 MMP-9 的结合亲和性明显较低。发现 FRIP-1 抑制血管发生。

另外，如以下实施例所示，FRIP-1 可用于鉴别修饰涉及 MMP-9 和/或 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白内一些氨基酸序列的蛋白质-蛋白质间的相互作用的拮抗剂。因此，通过用缀合载体蛋白的 FRIP-1 注射小鼠鉴别了 Mab FM155。发现 Mab FM155 与 FRIP 具有高度特异性，但与对照肽 AAAA (SEQ ID NO: 3) 不反应。

实施例例证了 Mab FM155 可强力抑制肿瘤在体内生长。因此 Mab FM155 修饰涉及 MMP-9 和/或 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白内一些氨基酸序列的蛋白质-蛋白质间的相互作用。

本发明的拮抗剂可以是任何类型的分子，包括但非限于肽，多肽，非肽分子，例如有机分子和寡核苷酸，蛋白质，酶，抗体，单克隆和多克隆抗体等。

本发明的拮抗剂结合 FRIP-1，但结合对照肽 AAAA 的亲合性明显较低。表观亲合性可通过如酶联免疫吸附测定 (ELISA) 或任何本领域技术人员已知的其它方法确定。真实的亲合性可通过本领域技术人员已知方法确定。

另外，本领域技术人员已知特异地针对由 Mab FM155 限定的表位的其它拮抗剂可具有相似的抗血管发生和抗肿瘤活性。这种拮抗剂包括其它阻断功能的 Mabs，人源化的 Mabs，嵌合的 Mabs，毒素缀合的 Mabs，多克隆抗体，针对此表位的小肽拮抗剂以及由 FM155 限定的表位的有机和非肽模拟物。另外，由单克隆抗体 FM155 限定的表位可自身作为强力抗血管发生和/或抗肿瘤化合物。另外，可使用含有由拮抗剂识别的表位的肽本身。因此本发明具有若干实施方案。

例如，本发明的一个实施方案是一种拮抗剂，其特异地修饰蛋白质-蛋白质之间的相互作用，其中蛋白质-蛋白质之间相互作用包括第一个蛋白质内的至少一个氨基酸序列与第二个蛋白质内的至少一个氨基酸序列之间的相互作用。这种拮抗剂的第一个蛋白质可以是 MMP-9 或可以是含有 $\beta 1$ 的整联蛋白。或者第一个蛋白质可以是 MMP-9，第二个蛋白质可以是含有 $\beta 1$ 的整联蛋白。另外，在这种情况下，蛋白质-蛋白质之间的相互作用可以是如使 MMP-9 结合含有 $\beta 1$ 的整联蛋白的相互作用。

或者，当第一个蛋白质是含有 $\beta 1$ 的整联蛋白时，其可以是 $\alpha 5\beta 1$

整联蛋白,或当第二个蛋白质是含有 $\beta 1$ 的整联蛋白时,其可以是 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白。

在一个实施方案中,拮抗剂是这样的,即蛋白质-蛋白质之间的相互作用使第一个蛋白质和第二个蛋白质共定位于细胞表面或血管上。

本发明的拮抗剂是一种抑制血管发生,肿瘤生长或癌转移的拮抗剂。在一般情况下,其可以是抑制疾病的一种拮抗剂。这种疾病例如是银屑病,黄斑变性,神经病,和组织再狭窄。

在另一实施方案中,本发明的拮抗剂是一种单克隆抗体。例如,其可以是 Mab FMM155,可以是特异性结合单克隆抗体 FM155 的至少一个靶的单克隆抗体,一种人源化的或化学修饰的单克隆抗体,或单克隆抗体的片段。或者其可以是多克隆抗体。

在另一实施方案中,本发明的拮抗剂是一种多肽,一种线性肽或环肽。或者其可以是非肽化合物。例如,本发明的拮抗剂可以是小有机化合物或寡核苷酸。

在一实施方案中,本发明的拮抗剂缀合于胞毒性或细胞抑制因子。

在另一实施方案中,本发明是一种抑制血管发生或肿瘤生长的多肽,其中此多肽特异结合 MMP-9 的结合能力明显高于 SEQ ID NO: 3 与 MMMP-9 的结合能力。例如,这种多肽是一种蛋白质。

在一个优选实施方案中,本发明多肽是 SEQ ID NO: 1。或者,本发明的多肽的氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 1。

在另一实施方案中,本发明的多肽是一种单克隆抗体。例如,此多肽可以是单克隆抗体 FM155。

在另一实施方案中,本发明是一种抑制血管发生或肿瘤生长的多肽,其中此多肽特异结合含有 $\beta 1$ 的整联蛋白的结合能力明显高于 SEQ ID NO: 3 与含有 $\beta 1$ 的整联蛋白的结合能力。在此实施方案中,

此多肽是一种蛋白质 SEQ ID NO: 1, 一种其氨基酸序列含有 SEQ ID NO: 1 的多肽, 或一种单克隆抗体, 例如 FM155。

在另一实施方案中, 本发明是一种特异结合 SEQ ID NO: 1, 但与 SEQ ID NO: 3 的结合亲和性明显较低的拮抗剂。这种拮抗剂抑制血管发生和肿瘤生长。在此实施方案中, 拮抗剂是一种多肽, 例如一种蛋白质, 或其是一种其氨基酸序列含有 SEQ ID NO: 1 的多肽。此多肽可以是单克隆抗体, 例如 FM155。

在另一实施方案中, 本发明是一种拮抗剂, 其破坏 MMP-9 单位于细胞表面或血管上。在此实施方案中, 拮抗剂抑制血管发生或肿瘤生长。另外, 这种拮抗剂是一种多肽, 例如一种蛋白质, 包含 SEQ ID NO: 1 氨基酸序列的多肽, 或单克隆抗体, 例如 FM155。

在另一实施方案中, 本发明是一种肽, 其包含编码由特异修饰蛋白质-蛋白质之间相互作用的拮抗剂识别的表位的序列, 其中蛋白质-蛋白质之间相互作用包括第一个蛋白质内的至少一个氨基酸序列与第二个蛋白质内的至少一个氨基酸序列之间的相互作用。在此实施方案的一种形式中, 拮抗剂是一种单克隆抗体, 例如 Mab FM155。在另一形式中, 此肽由 SEQ ID NO: 1 氨基酸序列组成。

抗体拮抗剂

在一个实施方案中, 本发明阐述了抗体形式的拮抗剂, 其在一般情况下修饰涉及 MMP-9 和/或 β 1 整联蛋白内的一些氨基酸序列的蛋白质-蛋白质之间的相互作用。这种抗体可包括结合具有 SEQ ID NO: 1 多肽序列的肽, 但不结合具有 SEQ ID NO: 3 序列的对照肽的抗体。这种抗体拮抗剂也可抑制血管发生。本发明还阐述了产生此抗体的细胞系, 产生这种细胞系的方法, 和产生单克隆抗体的方法。

本发明的抗体可以是单克隆或多克隆抗体。在一实施方案中,

使用的抗体是单克隆抗体。本发明的单克隆抗体包括与 MMP-9 和 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白免疫反应的抗体分子。

与 FRIP-1 优先结合的优选的单克隆抗体包括称为 FM155 的单克隆抗体。

本发明的抗体拮抗剂可根据本领域技术人员已知的方法产生。例如，将动物用 FRIP-1 或其片段免疫接种。可选择具有结合 FRIP-1 (SEQ ID NO: 1) 的能力，但不结合对照的 SEQ ID NO: 3 的这样产生的抗体。

文中所用术语“抗体或抗体分子”，指免疫球蛋白分子和/或免疫球蛋白分子的免疫活性部分的群体，即含有抗体结合部位或互补位的分子。

“抗体结合部位”是由重链和轻链可变区和高变区组成的抗体分子的特异结合抗原的结构部分。

用于本发明的抗体例如是完整的免疫球蛋白分子，基本完整的免疫球蛋白分子，和含有互补位的免疫球蛋白分子的一部分，包括本领域已知的那些部分如 Fab, Fab' , $F(ab')_2$ 和 F(v), 也称为抗体片段。

在另一优选的实施方案中，本发明涵盖了一种截短的免疫球蛋白分子，其包含衍生自本发明单克隆抗体的一个 Fab 片段。缺失 Fc 受体的 Fab 片段是可溶的，并提供血清半衰期方面的治疗益处，及在使用可溶的 Fab 片段的模式中的诊断益处。可溶的 Fab 片段的制备是免疫学领域已知的，并可通过各种方法进行。

例如，抗体的 Fab 和 $F(ab')_2$ 部分，是通过熟知的方法分别用木瓜蛋白酶和胃蛋白酶对基本完整的抗体进行蛋白酶解反应而制备的。见例如 Theofilopolous 和 Dixon 的美国专利 No: 4342566 所述。Fab' 抗体部分也是熟知的，是从 $F(ab')_2$ 部分中生产的，随后用巯基乙醇还原连接两个重链部分的二硫键，接着用如碘乙酰胺烷

化所得蛋白质硫醇。含有完整免疫球蛋白分子的抗体是优选的，并在本文举例应用。

文中所用短语“单克隆抗体”是指只含有一种能与特定表位免疫反应的抗体结合部位的抗体分子群体。单克隆抗体因此含有一种抗体分子，该分子具有多个抗体结合部位，每个部位免疫特异于不同的表位，例如双特异性单克隆抗体。

单克隆抗体典型是由称为杂交瘤的一个单细胞克隆产生的抗体组成的，此杂交瘤只分泌（产生）一种抗体分子。杂交瘤细胞是通过将产生抗体的细胞与骨髓瘤或其它自持细胞系融合而形成的。这种抗体的制备是由 Kohler 和 Milstein, 自然 256: 495-497 (1975) 首先阐述的，在此并入参考。其它方法见 Zola, 单克隆抗体技术手册, CRC 出版社(1987)。可以筛选这样制备的杂交瘤上清中与 MMP-9 和/或 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白免疫反应的抗体分子的存在。

简而言之，为形成从中可生产单克隆抗体组合物的杂交瘤，将骨髓瘤或其它自持细胞系与得自用 FRIP-1 超免疫的哺乳动物脾组织的淋巴细胞融合。

优选用于制备杂交瘤的骨髓瘤细胞系是取自与淋巴细胞相同物种的。典型地，129 GIX.sup.+品系小鼠是优选的哺乳动物。用于本发明的适当小鼠骨髓瘤包括次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷敏感的（HAT）细胞系 P3X63-Ag8.653, 和 Sp2/0-Ag14, 它们得自美国典型培养物保藏中心，Rockville, Md., 名称分别为 CRL1580 和 CRL1581。

将脾细胞用聚乙二醇（PEG）1500 与骨髓瘤细胞融合。融合的杂种通过其对选择性生长培养基的敏感性而加以选择，如 HAT（次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷）培养基。产生本发明单克隆抗体的杂交瘤是通过用在实施例 1 中阐述的酶联免疫吸附测定（ELISA）鉴别的。

本发明的单克隆抗体也可通过起始单克隆杂交瘤培养物而产

生，单克隆杂交瘤培养物包括一种含有分泌适当特异性的抗体分子的杂交瘤的营养培养基。将此培养物保持在杂交瘤足以将抗体分子分泌入培养基中的一些条件和时间下，然后收集含有抗体的培养基，抗体分子然后可通过熟知方法进一步分离。

本领域熟知用于制备这些组合物的培养基，并可商购，包括合成培养基，近交小鼠等。合成培养基例如是补加 4.5g/L 葡萄糖，20nM 谷氨酰胺，和 20%胎牛血清的 Dulbecco' s 极限必需培养基 (DMEM; Dulbecco 等，病毒，8: 396, 1959)。近交小鼠例如是 Balb/c 品系。

本领域熟知生产单克隆抗体，杂交瘤细胞，或杂交瘤细胞培养物的其它方法。见例如 Sastry 等 (1989) 美国科学院院报，86:5728—5732 和 Huse 等 (1989) 科学，246:1275—1281 所述的从所有免疫组分中分离单克隆抗体的方法。

本发明还涵盖了产生本发明单克隆抗体的杂交瘤细胞，和含有杂交瘤细胞的培养物。特别优选的是分泌单克隆抗体 FM155 的杂交瘤细胞系。

本发明在一个实施方案中涵盖了一种具有 FM155 的免疫反应特性的单克隆抗体。

本领域技术人员了解怎样确定一种单克隆抗体是否与本发明的单克隆抗体具有相同特异性 (免疫反应特性)，这是通过确定前者是否阻止后者结合预先选择的靶分子进行。如果测试的单克隆抗体与本发明的单克隆抗体竞争，这是通过在标准竞争分析中本发明的单克隆抗体与固相靶分子的结合降低所示出的，则有可能这两个单克隆抗体均结合相同的或密切相关的表位。

另一种确定一种单克隆抗体是否具有本发明单克隆抗体的特异性的方式，是确定所测试抗体的 CDR 区的氨基酸残基序列。在其 CDR 区具有相同或功能等价的氨基酸残基序列的抗体分子具有相同的结合特异性。本领域熟知对多肽进行测序的方法。这不是提示具有不

同 CDR 区的抗体不能结合相同表位。

抗体的免疫特异性，其靶分子结合能力，和抗体对表位所呈现的伴随亲和性，是通过抗体与之免疫反应的表位限定的。表位的特异性至少部分由免疫球蛋白抗体的重链可变区的氨基酸残基序列限定，部分由轻链可变区氨基酸残基序列限定。

文中所用术语“具有结合特异性”是指等价的单克隆抗体竞争结合预先选择的靶表位。

人源化的单克隆抗体比鼠单克隆抗体具有特别的益处，尤其它们可治疗性用于人体。特别地，人抗体不是与“外源”抗原一样迅速从循环中清除，且不是以与外源抗原和外源抗体相同方式激活免疫系统。本领域已知制备“人源化”抗体的方法，并可易于为本发明所利用。

因此，本发明在一个实施方案中涵盖了本发明的一种单克隆抗体，其是通过移植导入人免疫系统的成分且基本不干扰抗体与抗原的结合能力而人源化。

本发明的抗体也可以是完全人抗体，如例如通过从展示人单链或双链抗体的抗体噬菌体文库中选择而产生的那些抗体，如 Haard, H.J.等(1999), 生物化学杂志 274: 18218-30, 和 Winter, G.等(1994) *Annu. Rev. Immunol.*12:433-55 所述。

肽/多肽拮抗剂

本发明的拮抗剂也可以是多肽或肽。术语多肽是指通过邻近的氨基酸残基的 α -氨基基团和羧基基团之间的肽键彼此相连的3个或更多个氨基酸的序列，并包括在已知称为蛋白质的一类化合物。文中所用术语肽是指与多肽一样两个或多个彼此相连的线性序列。

在一个实施方案中，本发明涵盖多肽形式的拮抗剂。MMP-9 定位于细胞表面的多肽拮抗剂，可以是能破坏 MMP-9 定位于细胞表

面，或更一般地修饰涉及 MMP-9 和/或 β 1 整联蛋白内的一些氨基酸序列的蛋白质—蛋白质之间的相互作用的任何肽或多肽。

鉴别具有针对 MMP-9 或 β 1 整联蛋白的选择性的优选的拮抗剂肽，可在典型的结合抑制分析中鉴别，如实施例中所所述的 ELISA 分析。

肽和多肽拮抗剂可通过许多本领域已知的方法产生。例如，一种双杂种系统（例如 Fields, S. (1989) 自然 340: 245—6）可使用 MMP-9 的片段作“诱饵”，从文库中选择结合 FRIP-1 的蛋白质拮抗剂。此潜在的拮抗剂文库例如可衍生自 cDNA 文库。在另一实施方案中，潜在的拮抗剂可以是已知 MMP-9 结合蛋白的变体。这种蛋白质可随机诱变或进行基因改组，或通过其它产生序列多样性的适当方法。

本发明的肽和多肽拮抗剂也可以是通过分子演变方法产生的。蛋白质文库可以通过诱变，基因改组或其它产生序列多样性的方法产生。代表多种变体的蛋白质集合可以通过其结合 FRIP-1 的能力加以选择，例如通过使这种蛋白质集合经过已经吸附 FRIP-1 的固体基质加以选择。例如用盐梯度洗脱可纯化与 FRIP-1 具有亲和性的变体。也可包括阴性选择步骤，这是将这种集合经过已经吸附对照肽 AAAA (SEQ ID NO: 3) 的固体基质加以选择。滤液中含有集合中与 AAAA 亲和性较低的变体。

本发明的肽和多肽拮抗剂也可以是通过噬菌体展示产生的。随机的肽或蛋白质可作为与噬菌体外壳蛋白的融合蛋白而在噬菌体颗粒表面表达。有许多适用的单价噬菌体展示方法（见例如 Lowman H.B. 等 (1991) 生物化学 30: 10832—8）。表达随机肽或蛋白质文库的噬菌体可以用已经吸附 AAAA 分子的固体基质淘选。剩余的噬菌体不结合 AAAA，或与 AAAA 的结合亲和性低。然后将噬菌体用已经吸附 FRIP-1 的固体基质淘选。从固体基质中分离结合的噬菌体，是

通过改变溶液条件，或针对适当设计的结构是通过蛋白酶解连接噬菌体外壳蛋白与随机的肽或蛋白质文库的接头区而分离。可对分离的噬菌体进行测序以确定选择的拮抗剂的一致性。

在另一实施方案中，多肽包括本文已经示出其氨基酸残基序列的多肽的任何类似物，片段或化学衍生物，只要此多肽是 FRIP-1 而不是对照肽 SEQ ID NO: 3 的拮抗剂。因此，可对现有的多肽进行各种改变，取代，插入和缺失，使这种改变在使用中有一些优点。在这点上，本发明的 FRIP-1 拮抗剂多肽相当于而不是等同于所述肽序列，其进行了一或多种改变，并保留了在一或多种所述分析中作为本发明拮抗剂的能力。

因此，此多肽可以是任何形式的肽衍生物，包括酰胺，与蛋白质的缀合物，环肽，聚合的肽，类似物，片段，化学修饰的肽等。

其它拮抗剂

本发明的拮抗剂也可以是小有有机分子，如那些天然产物，或那些通过常规有机合成或组合有机合成而合成的化合物。对化合物可进行测试其修饰涉及 MMP-9 和/或 β 1 整联蛋白内的一些氨基酸序列的蛋白质-蛋白质之间的相互作用的能力。也选择与对照肽 AAAA, SEQ ID NO: 3 的亲合性降低的化合物。

本发明的拮抗剂也可以是非肽化合物。适当的非肽化合物例如包括寡核苷酸。本文所用的寡核苷酸是指含有嘌呤，嘧啶和其它芳香族碱基的任何杂聚物。DNA 和 RNA 寡核苷酸适用于本发明，具有糖（例如 2'-烷化的核糖）和骨架修饰（例如硫代磷酸酯寡核苷酸）的寡核苷酸也适用。寡核苷酸可存在通常发现的嘌呤和嘧啶碱基如腺嘌呤，胸腺嘧啶，鸟嘌呤，胞嘧啶和尿嘧啶，以及在杂环部分（例如 7-脱氮鸟嘌呤）或环外位置修饰的碱基。寡核苷酸还涵盖具有也存在芳香族碱基的独特结构的杂聚物，包括聚酰胺核酸等。

本发明的寡核苷酸拮抗剂可通过本领域已知的许多方法产生。在一个实施方案中，产生一个含有大量序列的寡核苷酸集合。此集合例如可用单体混合物在一个延伸步骤通过固相合成而产生。寡核苷酸集合通过将含有此集合的溶液经过已经粘附 FRIP-1 或其片段的固体基质而分选。集合中结合 MMP-9 的序列保留在固体基质上。用不同盐浓度或 pH 的溶液洗脱这些序列。将选择的序列进行第二个选择步骤。将选择的集合经过已经粘附 SEQ ID NO :3 的第二个固体基质。层析柱中保留那些集合 SEQ ID NO:3 的序列，这样富集特异于 FRIP-1 的序列集合。可将此集合扩增，及如果需要，进行诱变，并重复此过程直至集合示出本发明拮抗剂的特性。通过对寡核苷酸集合成员进行测序可鉴别各个拮抗剂，通常在将所述序列克隆入宿主生物体如大肠杆菌中之后进行。

鉴别拮抗剂的结合分析

本发明还提供了鉴别本发明方法使用的候选拮抗剂的分析方法。在这些分析方法中，候选拮抗剂是通过其结合 FRIP-1 和 AAAA 对照肽的能力而加以评价的，并可通过其在组织中抑制血管发生的潜力而加以进一步评价。

ELISA

首先通过 ELISA 分析测定拮抗剂与固相中 FRIP-1 和 AAAA 对照肽的结合。此分析也可用于鉴别特异于 FRIP-1 而非 AAAA 对照肽的化合物。此特异性分析是通过平行 ELISA 进行的，其中潜在拮抗剂在分离的分析室中同时筛选其结合 FRIP-1 和 AAAA 对照肽的能力。

破坏 MMP-9 和 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白之间相互作用的拮抗剂，也可通过其与本发明拮抗剂竞争结合的能力而加以鉴别。例如，推定的拮

抗剂可通过在结合分析如 ELISA 中监测其对已知拮抗剂如 FM155 的亲合性的作用而加以筛选。这种拮抗剂可能具有与 FM155 相同特异性，并识别相同隐蔽表位。通过这种选择方法选择的推定的拮抗剂可结合 MMP-9 或 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白，或结合拮抗剂。通过常规结合分析可从推定的拮抗剂中选择拮抗剂，以确定结合 MMP-9 或 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白表位但不结合已知拮抗剂的那些拮抗剂。

以下是可用于鉴别候选拮抗剂的本发明的一些实施方案。

在一个实施方案中，本发明提供了一种筛选 MMP-9 拮抗剂的方法，包括 a)提供一种推定的拮抗剂；b)测定所述推定的拮抗剂结合 MMP-9 的第一种亲和性；c)测定 SEQ ID NO: 3 与 MMP-9 结合的第二种亲和性；及 d)如果所述第二种亲和性大大低于所述第一种亲和性，则选择所述推定拮抗剂作为 MMP-9 的拮抗剂。在此实施方案的一种形式中，推定的拮抗剂是非肽化合物，例如小有机化合物或寡核苷酸。在另一形式中，推定的拮抗剂是多肽，线性肽或环肽。或者，推定的拮抗剂是抗体，其可以是单克隆或多克隆抗体。

在此方法的一个优选的实施方案中，所述第一种和第二种亲和性是通过酶联免疫吸附测定（ELISA）分析测定的。

在一个特定的实施方案中，第二种亲和性比第一种亲和性低大约 3 倍。或者，第二种亲和性比第一种亲和性大约低 5 倍。在本发明的另一实施方案中，第二种亲和性比第一种亲和性低大约 10 倍。

在一个实施方案中，本发明提供了一种筛选 $\beta 1$ 整联蛋白拮抗剂的方法，包括 a)提供一种推定的拮抗剂；b)测定所述推定的拮抗剂结合 $\beta 1$ 整联蛋白的第一种亲和性；c)测定 SEQ ID NO: 3 结合所述 $\beta 1$ 整联蛋白的第二种亲和性；及 d)如果所述第二种亲和性大大低于所述第一种亲和性，则选择所述推定的拮抗剂作为 $\beta 1$ 整联蛋白的拮抗剂。在此实施方案的一种形式中，推定的拮抗剂是非肽化合物，例如小有机化合物或寡核苷酸。在另一形式中，推定的拮抗剂是多肽，

线性肽或环肽。或者，推定的拮抗剂是抗体，其可以是单克隆或多克隆抗体。

在此方法的一个优选的实施方案中，所述第一种和第二种亲和性是通过酶联免疫吸附测定（ELISA）分析测定的。

在一个特定的实施方案中，第二种亲和性比第一种亲和性低大约 3 倍。或者，第二种亲和性比第一种亲和性大约低 5 倍。在本发明的另一实施方案中，第二种亲和性比第一种亲和性低大约 10 倍。

血管发生分析

本发明的拮抗剂也可通过其在组织中调节血管发生的能力加以分析。可使用本领域已知的任何适当方法监测这种作用。在此阐述了一些方法。

例如，一种在鸡尿囊绒膜（CAM）中测定血管发生的分析，将此分析称为 CAM 分析。CAM 分析已经由其它研究人员详细阐述，并已经用于测定肿瘤组织的血管发生和新血管形成。见 Ausprunk 等，*Am.J.Pathol.*，79：597—618（1975），和 Ossonski 等，*癌症研究* 40：2300—2309（1980）。

CAM 分析是一种体内血管发生的公认分析模式，因为发生整个组织的新血管形成，且真正的鸡胚血管生长入 CAM 中或在 CAM 上生长的组织中。

如本文所述，CAM 分析基于新血管生长的量和程度示出对新血管形成的抑制。另外，这种分析易于监测移植在 CAM 上的任何组织如肿瘤组织的生长情况。总而言之，这种分析是特别有益的，因为在分析系统中有针对毒性的内部对照。将鸡胚暴露于任何试剂，由此鸡胚的健康情况是毒性的标示。

另一种测定血管发生的分析是体内兔眼模型，称为兔眼分析。兔眼分析已经由其它研究人员详细阐述，并已经用于在存在血管发

生抑制剂如镇静剂的情况下，测定血管发生和新血管形成。见 D' Amato 等，(1994) 美国科学院院报 91: 4028—4085。

兔眼分析是体内血管发生的公认分析模型，因为新血管形成的过程，例如兔血管从角膜边缘生长至角膜，这一过程易于通过自然透明的眼角膜观测。另外，可易于随时监测刺激或抑制新血管形成或新血管形成消退的程度和量。

最后，将兔暴露于任何试剂，并由此兔的健康情况是试剂毒性的标示。

再一种测定血管发生的分析是嵌合的小鼠：人小鼠模型，被称为嵌合小鼠分析。此分析已经由其它研究人员阐述，并在此进一步阐述以测定血管发生，新血管形成，及肿瘤组织的消退。见 Yan 等 (1993)，临床研究杂志 91: 986—996。

嵌合小鼠分析是一种体内血管发生的有用分析模型，因为移植的皮肤移植物组织学十分类似正常人体皮肤，且整个组织发生新血管形成，其中真正的人体血管从移植的人体皮肤生长至移植的人体皮肤表面的人体肿瘤组织中。人体移植物中新血管形成的起源可以通过对新血管结构用人特异性内皮细胞标记进行免疫组织化学染色表明。

嵌合小鼠分析基于新血管生长消退的量和程度表明新血管形成的消退。另外，这种分析易于监测对移植在移植的皮肤上的任何组织生长的作用。最后，这种分析是实用的，因为分析系统中有针对毒性的内部对照。将嵌合小鼠暴露于任何试剂，由此小鼠的健康情况是毒性的标示。

抑制血管发生的方法

本发明提供了一种抑制组织中血管发生，从而抑制依赖于血管发生的组织中的事件的方法。一般地，此方法包括给予组织一种组

合物，该组合物包含抑制血管发生量的拮抗剂，该拮抗剂修饰涉及MMP-9 和/或 $\beta 1$ 整联蛋白内的一些氨基酸序列的蛋白质-蛋白质之间的相互作用。

如前所述，血管发生包括许多过程，涉及组织新血管形成包括“萌发”，脉管形成，或血管膨大，所有血管发生过程均涉及血管中胞外基质胶原的破坏。除了外伤伤口愈合，黄体形成和胚胎发生，据信大多数血管发生过程与疾病过程相关，并因此可使用本发明的治疗方法选择性治疗疾病。

有许多疾病其中血管发生据信是重要的，这种疾病称为血管发生性疾病，包括但非限于炎症如免疫和非免疫性炎症，慢性类风湿性关节炎，和银屑病，与非适当的或非适宜的血管侵袭相关的疾病如糖尿病视网膜病变，新生血管青光眼，再狭窄，动脉硬化斑和骨质疏松中毛细管增殖，及癌症相关的疾病如实体肿瘤，实体肿瘤转移，血管纤维瘤，晶状体后纤维组织形成，血管瘤，Kaposi 肉瘤，及需要新血管形成以支持肿瘤生长的癌症等。其它适当的肿瘤包括黑素瘤，癌，肉瘤，纤维肉瘤，胶质瘤和星形细胞瘤。

因此，抑制疾病组织中血管发生的方法可改善疾病的症状，及根据疾病情况可有助于治疗疾病。在一个实施方案中，本发明涵盖了抑制组织中血管发生。

如本文所述，任何组织或由器官化组织构成的器官，在疾病情况下可支持血管发生，如皮肤，肌肉，内脏，结缔组织，关节，骨及在血管发生刺激下血管可侵袭的组织。本文所用的组织也涵盖了体液，分泌物等如血清，血液，脑脊液，血浆，尿液，滑液，玻璃体液。

因此在一个相关的实施方案中，治疗的组织是炎症组织，被抑制的血管发生是炎症组织血管发生，其中炎症组织有新血管形成。本发明的方法涵盖了抑制如具有慢性类风湿性关节炎的患者的关节

炎组织，免疫或非免疫炎症组织，银屑病组织等组织中的血管发生。

在本发明许多实施方案中治疗的患者是人类患者，尽管知道本发明的原理表明本发明对所有哺乳动物均是有效的，这些动物可概括称为“患者”。本发明中哺乳动物包括任何患有需要治疗的与血管发生相关的疾病的哺乳动物，尤其农用和家庭饲养的哺乳动物。这种患者例如可包括猪，牛，马，山羊，绵羊，骡，驴，狗，猫，兔，小鼠和大鼠。

在另一相关的实施方案中，治疗的组织是具有糖尿病视网膜病变，黄斑变性或新生血管青光眼的视网膜组织，进行抑制的血管发生是其中视网膜组织新血管形成的视网膜组织血管发生。

在另一相关的实施方案中，进行治疗的组织是患有实体肿瘤，转移，皮肤癌，乳腺癌，血管瘤或血管纤维瘤，及癌症的患者的肿瘤组织，进行抑制的血管发生是肿瘤组织血管发生，其中肿瘤组织发生新血管形成。可用本发明方法治疗的实体肿瘤组织包括肺，胰腺，乳腺，结肠，喉，卵巢，Kaposi 肉瘤等组织。实施例中阐述了肿瘤组织的血管发生及其抑制。

抑制肿瘤组织血管发生是尤为优选的实施方案，因为新血管形成在肿瘤生长中起重要作用。在没有新血管形成的肿瘤组织中，肿瘤组织不能获得所需的营养，生长缓慢，停止生长，消退及最后坏死而得以杀死肿瘤。

换而言之，本发明提供了一种通过抑制肿瘤血管发生而抑制肿瘤新血管形成的方法。相似地，本发明提供了一种通过血管发生抑制方法抑制肿瘤生长的方法。

通过其抑制新血管形成的能力，本发明的方法也有效地抗转移癌形成，因为（1）其形成需要原始肿瘤的血管化，以便转移的癌细胞可脱离原始肿瘤，和（2）其在另一位置建立需要新血管形成以支持转移癌的生长。

在一个相关的实施方案中，本发明涵盖了所述方法与其它疗法如常规的直接抗实体肿瘤和控制转移的化疗方法组合使用。在化疗期间或之后施用血管发生抑制剂，但优选在进行几次化疗后抑制血管发生，因为此时肿瘤组织通过诱导血管发生重新获得供应肿瘤组织的血液供给和营养以应答毒性攻击。另外，优选在除去实体肿瘤的外科手术后施用血管发生抑制方法，预防转移。

此方法用于抑制肿瘤新血管形成，也可用于消退存在的肿瘤。

再狭窄是一种平滑肌细胞（SMC）在经皮穿刺冠脉血管成形术的部位迁移和增殖，妨碍血管成形术成功。与在再狭窄期间血管相关的 SMCs 的迁移和增殖与血管发生相关，血管发生可用本发明的方法抑制。因此，本发明还涵盖了在接受血管成形术后的患者中，根据本发明的方法通过抑制血管发生而抑制再狭窄。为抑制再狭窄，本发明的拮抗剂在血管成形术后大约 2—28 天施用，优选在术后前 14 天施用。

本发明的抑制组织中血管发生，及用此治疗血管发生相关的疾病的方法，包括将发生血管发生或有发生危险的组织与一种包含治疗有效量的拮抗剂的治疗组合物接触，所述拮抗剂修饰涉及 MMP-9 和/或 β 1 整联蛋白内一些氨基酸序列的蛋白质—蛋白质之间的相互作用。因此，此方法包括对患者施用治疗有效量的生理可耐受的含有本发明拮抗剂的组合物，所述拮抗剂修饰涉及 MMP-9 和/或 β 1 整联蛋白内一些氨基酸序列的蛋白质—蛋白质之间的相互作用。治疗组合物和治疗有效量的本发明拮抗剂在“治疗组合物”章节中阐述。

根据拮抗剂的形式，其潜力而施用的拮抗剂的剂量范围在此进一步阐述，其数量应足以产生所需效应，其中血管发生和由血管发生所介导的疾病症状得以改善。剂量应以不导致不利的副作用为最大限量，副作用如粘滞性过高综合征，肺水肿，充血性心衰等。通常地，剂量应随患者的年龄，状态，性别，和疾病程度而变化，并

可由本领域技术人员确定。剂量还可通过临床医生在任何并发症的情况下加以调节。

本发明的单克隆抗体或多肽可以随时非肠道地通过注射或通过逐步输注而施用。尽管可通过系统施用而进入机体中需要治疗的组织中，及更通常通过静脉内施用治疗组合物而进行治疗，但也包括其它组织和输送方式，其中有可能靶向的组织含有靶分子。因此，包括单克隆抗体，多肽及其衍生物的拮抗剂可静脉内，腹膜内，肌内，皮下，腔内，经皮，局部，眼内，口服，鼻内施用，及可通过蠕动方式输送。

含有本发明单克隆抗体或多肽的治疗组合物是常规静脉内施用的，例如通过注射单位剂量施用。当阐述本发明治疗组合物时所用的术语“单位剂量”是指适于作为单元剂量给予个体的物理分立的单位，每单位含有计算产生所需治疗作用的预定量的活性物质，及所需的稀释剂，即载体或运载体。

在一个如实施例所示优选的实施方案中，拮抗剂是以单剂量静脉内施用的。

组合物以与剂量配方相容的方式，及治疗有效量施用。施用的数量和时间根据治疗的患者情况，患者的系统利用有效成分的能力，及所需治疗作用的程度而定。需要施用的有效成分的实际数量根据医生的判断和个体差异而定。然而，本发明在此揭示了适当的系统施用的剂量范围，其根据施用途径而定。适当的施用方法是可以变化的，但可通过初始施用后，随后间隔 1 或多个小时通过随后的注射或其它施用方式重复施用。或者，也包括持续静脉内输注以足以保持特异于体内治疗的血药浓度。

抑制血管发生或疾病状态的方法的特异实施例，在本发明的以下实施方案中呈现。

在一个实施方案中，本发明提供了一种抑制组织中血管发生的

方法，包括施用一种特异修饰蛋白质-蛋白质之间相互作用的拮抗剂，其中蛋白质-蛋白质之间的相互作用包括第一个蛋白质中的至少一个氨基酸序列与第二个蛋白质中的至少一个氨基酸序列之间的相互作用。在此方法中，所述拮抗剂是静脉内，经皮，滑膜内，肌内，肿瘤内，眼内，鼻内，鞘内，局部或口服施用的。另外，拮抗剂可结合化疗或放疗施用。当组织发生炎症及发生血管发生时，当组织是存在于哺乳动物时，或组织是关节炎组织，眼组织，视网膜组织或血管瘤组织时，使用此方法。

在本发明的另一种治疗方法中，组织中的肿瘤生长或转移在如下一种方法中被抑制，该方法包括使用一种特异修饰蛋白质-蛋白质之间相互作用的拮抗剂，其中蛋白质-蛋白质之间的相互作用包括第一个蛋白质的至少一个氨基酸序列与第二个蛋白质中至少一个氨基酸序列之间的相互作用。在这种方法中，所述拮抗剂是通过静脉内，经皮，滑膜内，肌内，肿瘤内，眼内，鼻内，局部或口服施用的。另外，拮抗剂可与化疗或放疗结合施用。当肿瘤或转移癌是黑素瘤，癌，肉瘤，纤维肉瘤，胶质瘤或星形细胞瘤时，可使用此方法。在另一实施方案中，本发明提供了一种抑制银屑病，黄斑变性或组织再狭窄的方法，通过施用一种特异修饰蛋白质-蛋白质之间相互作用的拮抗剂而进行，其中蛋白质-蛋白质之间的相互作用包括第一个蛋白质的至少一个氨基酸序列与第二个蛋白质中至少一个氨基酸序列之间的相互作用。在这种方法中，所述拮抗剂是通过静脉内，经皮，滑膜内，肌内，肿瘤内，眼内，鼻内，鞘内，局部或口服施用的。另外，拮抗剂可与化疗或放疗结合施用。

疾病治疗

本发明一般地涉及这一发现，即修饰涉及 MMP-9 和/或 β 1 整联蛋白中一些氨基酸序列的蛋白质-蛋白质之间相互作用能抑制疾病

状态和血管发生。此发现是重要的，因为血管发生在许多疾病过程中起作用。

在新血管的生长导致或有助于疾病发生之处，抑制血管发生可降低疾病的有害作用。例子包括银屑病，类风湿性关节炎，糖尿病视网膜病变，炎症疾病，再狭窄，黄斑变性等疾病。在需要新血管生长以支持有害组织生长时，抑制血管发生可降低对该组织的血液供给，从而基于血液供给需求有助于降低组织质量。例子包括肿瘤生长，其中持续需要新血管形成，以使肿瘤生长厚度超过几毫米，及建立实体肿瘤转移。

本发明的方法是有效的，部分因为这种治疗高度选择性针对血管发生而非其它生物学过程。如实施例所示，只有新血管生长受破坏 MMP-9 定位的拮抗剂的抑制，因此此治疗方法对成熟血管不起作用。另外，由于本发明的一些拮抗剂只影响 MMP-9 的定位，不直接阻断 MMP-9 的蛋白酶解活性或 $\beta 1$ 整联蛋白的附着功能，因此这些化合物的副作用较少，因为 MMP-9 的蛋白酶解活性或 $\beta 1$ 整联蛋白的附着功能可具有正常的生理功能。

另外，本发明的拮抗剂是特别强效的，提示在低浓度即可具有治疗益处。

在本发明的揭示之前，还未知血管发生和依赖于血管发生的任何过程可在体内通过使用拮抗 MMP-9 和 $\beta 1$ 整联蛋白之间的相互作用的试剂而加以抑制。

治疗组合物

本发明涵盖了所述治疗方法中使用的治疗组合物。本发明的治疗组合物含有一种可生理耐受的载体，和一种治疗有效量的溶解于或分散于载体中的作为有效成分的所述拮抗剂。在一个优选的实施方案中，当将治疗性拮抗剂组合物施用于哺乳动物或病人以进行治

疗时，其不是免疫原性的，或免疫原性较低。

治疗有效量是在治疗的组织中足以产生可测定的血管发生抑制作用的本发明拮抗剂的量，即抑制血管发生的量。血管发生的抑制可在原位通过所述免疫组织化学方法或通过其它本领域已知方法测定。

本发明拮抗剂的效力可通过许多方式测定，包括在 CAM 分析中，在体内兔眼分析中，在体内嵌合的小鼠：人分析中通过血管发生的抑制而测定。

单克隆抗体形式的本发明拮抗剂的治疗有效量典型地是这样的量，当在生理可耐受的组合物中施用，足以获得血浆浓度为大约 0.01ug/ml—100ug/ml，优选大约 1ug/ml—5ug/ml，通常为大约 5ug/ml。换而言之，此剂量可以是大约 0.1mg/kg—300mg/kg，优选大约 0.2mg/kg—200mg/kg，更优选大约 0.5mg/kg—20mg/kg，一日一或多次，持续一或多天。

在拮抗剂是单克隆抗体片段形式时，基于片段的质量相对于整个抗体的质量，可易于调节治疗有效量。优选的抗体拮抗剂的血浆摩尔浓度为大约 2uM—5mM，优选大约 100uM—1mM。

多肽或小分子形式的本发明拮抗剂的治疗有效量典型地是这样的多肽量，当在生理可耐受的组合物中施用，足以获得血浆浓度为大约 0.1ug/ml—200ug/ml，优选大约 1ug/ml—150ug/ml。基于多肽的质量为大约 500g/mol 的多肽，优选的多肽拮抗剂的血浆摩尔浓度为大约 2uM—5mM，更优选为大约 100uM—1mM。换而言之，体重剂量为大约 0.1mg/kg—300mg/kg，优选大约 0.2mg/kg—200mg/kg，一日一或多次，持续一或多天。

文中所用术语“药理学可接受的”“生理可耐受的”等当指组合物，载体，稀释剂和试剂时是可交替使用的，及表示此物质能施用于哺乳动物。

本领域熟知含有溶解的或分散的有效成分的药物组合物的制备，不需基于配方限制。典型地将这种组合物制备为可注射的液体溶液或悬浮液，然而，也可制备为在使用前在液体中形成溶液或悬浮液的固体形式。适当的赋形剂例如是水，盐水，葡萄糖，甘油，乙醇等，或它们的组合物。另外，如果需要，组合物可含有少量辅助物质如湿润或乳化剂，pH 缓冲剂等，以增强有效成分的效力。

本发明的治疗组合物的成分中可包括药物学可接受的盐。药物学可接受的盐包括酸加合盐（与多肽的游离氨基基团形成的），其是与无机酸例如盐酸或磷酸，或有机酸如乙酸，酒石酸，苯基乙醇酸等形成的。与游离羧基形成的盐也可衍生自无机碱，如氢氧化钠，氢氧化钾，氢氧化铵，氢氧化钙或氢氧化铁，及有机碱如异丙基胺，三甲基胺，2-乙胺乙醇，组胺，普鲁卡因等。特别优选的是 TFA 和 HCl 盐。

本领域熟知生理可耐受的载体。液体载体例如是无菌水溶液，其除了有效成分和水之外不含有其它物质，或含有一种缓冲液如生理 pH 的磷酸钠缓冲液，生理盐水或这二者，如磷酸盐缓冲盐水。另外，水性载体可含有一种以上的缓冲盐，以及盐如氯化钠和氯化钾，葡萄糖，聚乙二醇和其它溶质。

液体组合物除了水之外也可含有液相。这种另外的液相是甘油，植物油如棉籽油，和水—油乳液。

治疗组合物含有抑制血管发生量的本发明拮抗剂，典型地配制为总治疗组合物中含有至少 0.01%重的拮抗剂。重量百分比是抑制剂与总组合物的重量比。例如 0.01%是指每 100g 总组合物中有 0.01g 抑制剂。

抗体可缀合于胞毒素，胞毒剂，以输送至经历血管发生的肿瘤或其它组织中。这种缀合物可用溶细胞素或外毒素产生，例如蓖麻毒蛋白 A，白喉毒素 A，或假单胞杆菌外毒素及其片段。胞毒剂也

可以用同位素放射标记的，以将具有放射性的毒性剂量输送至血管发生组织。

本发明的拮抗剂也可以用于将一种酶输送至目标，其中此酶能将前体药物转变为活性药物，以例如用于抗体指导的酶激活的前体药物治疗（ADEPT）（见例如 Syrigos, K.N. (1999) 抗癌研究 19: 605-13）。简而言之，本发明的拮抗剂与一种能将非毒性或无活性前体药物转变为毒性的或活性药物的酶缀合，如内酰胺酶，蛋白酶或酯酶。因为本发明的拮抗剂定位于血管发生部位，尤其肿瘤或转移癌部位，因此可将毒性药物施用于这个部位。

检测方法

本发明的拮抗剂也适于检测组织中的血管发生。例如，拮抗剂是抗体时，可将拮抗剂用于免疫组织化学方法中，以在体内染色组织。免疫学方法如免疫染色和 ELISA 例如见下述：受体结合技术，分子生物学方法，106，M.Keen.Humana 出版社，1999；Brooks 等 (1998)，细胞 92: 391-400；Brooks 等 (1996)，细胞 85: 683-693；和 Brooks 等 (1993)，细胞生物学杂志 122: 1351-1359。

本发明的拮抗剂一旦与靶组织结合，可直接或间接检测。直接检测可对拮抗剂进行，拮抗剂包括检测标记如荧光染料，放射性标记，顺磁性重金属或诊断染料。

或者，检测可通过二级相互作用进行。例如，一种识别拮抗剂的检测标记的抗体可用于观测拮抗剂的定位。例如，如果拮抗剂是源自小鼠的单克隆抗体，可施用适当标记的山羊抗小鼠抗体。本领域技术人员可确定用于各种拮抗剂的适当二级抗体。

针对体内检测，优选使用检测标记的拮抗剂。将标记的拮抗剂经静脉内，肌内等途径施用于患者。适于在患者体内检测的标记是尤为优选的。例如，顺磁性标记的拮抗剂可通过磁共振显影检测。

也可检测放射性标记的拮抗剂。

适于检测的本发明特异的实施方案例如下述。

在一个实施方案中，本发明提供了一种检测组织中血管发生的方法，通过将特异修饰蛋白质-蛋白质之间相互作用的拮抗剂与所述组织接触而进行检测，其中蛋白质-蛋白质之间相互作用包括第一个蛋白质中的至少一个氨基酸序列与第二个蛋白质中的至少一个氨基酸序列之间的相互作用。在此方法中，例如所述组织是来自体内的或所述组织是在体内的，及所述拮抗剂是经静脉内，经皮，滑膜内，肌内，肿瘤内，眼内，鼻内，鞘内，局部或口服施用的。或者，在此方法中，所述拮抗剂是缀合于荧光染料，放射性标记，顺磁性重金属，诊断染料或酶。

所有引用的参考文献在此以其全文并入参考。

实施例

实施例 1：纯化 $\alpha 5\beta 1$

$\alpha 5\beta 1$ 是用纤连蛋白的 110kD 细胞结合结构域从胎盘裂解物中纯化的。将洗脱的组分浓缩并通过 10% SDS-PAGE 分离，接着进行银染色。一个 90kD 的蛋白质与 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白共同纯化，其分子量与 MMP-9 相同，如图 1 所示。在图中，泳道 1 相当于商购制备的人 $\alpha 5\beta 1$ (1ug)，泳道 2 相当于纯化自人胎盘组织的 $\alpha 5\beta 1$ (50ul)。注意较小的 90kD 的污染物（箭头）。

基于我们预先发现 MMP-2 和 $\alpha v\beta 3$ 之间的直接相互作用，我们测试了此 90kD 蛋白质是否可以是结合整联蛋白的 MMP 的另一实例。

实施例 2： $\alpha 5\beta 1$ 的 zymographic 分析

将纯化的 $\alpha 5\beta 1$ 和 $\alpha v\beta 3$ 在 10% SDS-PAGE 凝胶上分离，所述凝

胶是与明胶共聚的。将 SDS 通过用 Triton X-100 冲洗而从凝胶中除去，并将凝胶在胶原酶缓冲液中温育。通过用考马斯蓝染色观测液化明胶带。纯化的 $\alpha 5\beta 1$ 制备物含有液化明胶活性 (90kD)，其与 MMP-9 相同分子量迁移，如图 2 所示。在图中，泳道 1 相当于 MMP-9 原 (1ug)；泳道 2 相当于 APMA 激活的 MMP-9 (1ug)；泳道 3 相当于来自胎盘组织的 prep-1 纯化的 $\alpha 5\beta 1$ (1ug)；泳道 4 相当于从胎盘组织中纯化的 $\alpha v\beta 3$ (1ug)；泳道 5 相当于来自胎盘组织的 prep-2 纯化的 $\alpha 5\beta 1$ (1ug)。

这些数据提示与 $\alpha 5\beta 1$ 共纯化的污染的 90kD 的蛋白质也许是 MMP-9。另外，这些研究提示 MMP-9 可直接结合 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白。

实施例 3：纯化的 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白的 Western 印迹分析

将纯化的 $\alpha 5\beta 1$ 和 $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白 (1ug) 通过 10%SDS-PAGE 分离，并移至硝化纤维上，用抗 MMP-9 Mab 印迹。用抗 MMP-9 的单克隆抗体进行的纯化的 $\alpha 5\beta 1$ 的 Western 印迹分析，如图 3 所示，证实 $\alpha 5\beta 1$ 制备物中存在 MMP-9。在图 3 中，泳道 1 相当于重组 MMP-9 (1ug)，泳道 2 相当于从胎盘组织中纯化的 $\alpha 5\beta 1$ (1ug)，泳道 3 相当于从胎盘组织中纯化的 $\alpha v\beta 3$ (1ug)。

实施例 4：重组 MMP-9 结合 $\alpha 5\beta 1$

将 $\alpha 5\beta 1$ 或对照蛋白 β -酪蛋白固定在微量滴定孔中 (10ug/ml)。使重组人 MMP-9(2ug/ml)结合对照蛋白包被的孔 1 小时。用抗 MMP-9 Mab 检测 MMP-9 结合。如图 4 所示，纯化的 MMP-9 直接结合 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白。数据杆代表从三份孔中所得的平均光密度 \pm 标准偏差。

实施例 5：MMP-9 与 $\alpha 5\beta 1$ 阴性细胞表面的结合降低

为评价 $\alpha 5\beta 1$ 是否参与促进 MMP-9 与细胞表面的结合，进行结

合分析。将几乎不表达任何内源性 MMP-9 的人 HT29 细胞与重组 MMP-9 (0-100ng/ml) 温育。除去未结合的酶, 并制备总细胞裂解物。细胞裂解物 (100ug/泳道) 在用明胶共聚的 10% SDS-PAGE 凝胶上分离, 并通过用考马斯蓝染色观测液化明胶带。示于图 5 的结果提示缺失 $\alpha 5\beta 1$ 的肿瘤细胞结合 MMP-9 的能力明显降低, 进一步表明 $\alpha 5\beta 1$ 在将蛋白酶解活性定位于细胞表面中起重要作用。在图中, 上部相当于表达 $\alpha 5\beta 1$ 的 HT29-30, 底部相当于不表达 $\alpha 5\beta 1$ 的 HT29-1, NT 相当于未处理的, 50 相当于与 50ng/ml 的 MMP-9 温育的细胞, 100 相当于与 100ng/ml 的 MMP-9 温育的细胞。

实施例 6: MMP-9 和 $\alpha 5\beta 1$ 于人黑素瘤血管中的共定位

将取自黑素瘤患者的人体活检组织速冻, 并用抗 MMP-9 的多克隆抗体和抗 $\beta 1$ 的单克隆抗体共同染色组织切片, 随后与罗丹明缀合的山羊抗小鼠抗体和 FITC 缀合的山羊抗兔 IgGs 温育。在 200X 进行显微照相。在显微照相相片中, 红色表示 $\beta 1$ 整联蛋白表达, 绿色表示 MMP-9 表达, 黄色表示 MMP-9 和 $\beta 1$ 的共定位。在图 6 中, 其是黑白显微摄影片, 白色区代表黄色, 黑色区代表红色, 绿色或肿瘤细胞。图 6 示出 MMP-9 和 $\beta 1$ 整联蛋白共定位于肿瘤细胞表面和人黑素瘤肿瘤活检组织内的血管上。

这些发现提示 MMP-9 和 $\beta 1$ 整联蛋白在人体血管区室以及自身的肿瘤细胞上均是密切结合的。

实施例 7: 产生结合 MMP-9 的合成肽

MMP-9 和 $\alpha 5\beta 1$ 的氨基酸序列分析提示了可介导这两个蛋白质之间的相互作用的序列。例如, 产生合成肽并分析其结合 MMP-9 的活性。这些肽的结合能力通过固相结合分析测定。

在分析的序列中, 发现示出特异结合 MMP-9 或 $\beta 1$ 整联蛋白的

肽。因此，如图 7 所示，在固相结合分析中，称为 FRIP 的肽示出特异结合 MMP-9。除了 3 个关键的氨基酸改变之外与 FRIP-1 相同的 AAA 肽示出结合能力很低。这些发现提示合成肽 FRIP-1 可能存在介导 MMP-9/ α 5 β 1 相互作用的关键氨基酸。

FRIP-1 合成肽具有以下序列：SEQ ID NO:1

CysArgLeuArgSerGlyGluProGlnCys。

FRIP-1(SEQ ID NO:1)氨基酸序列衍生自人 MMP-9 酶的 C-末端血红素结合蛋白类结构域内的一个区域。

AAA 对照肽具有以下序列：SEQ ID NO:2

CysArgAlaAlaAlaGlyGluProGlnCys。

另外还用具有以下序列的 AAAA 对照肽进行了结合对照：

SEQ ID NO:3 CysArgAlaAlaAlaAlaGluProGlnCys。

实施例 8：FRIP-1 肽在鸡胚中抑制血管发生

在 10 天龄的鸡胚 CAM 中用 bFGF 诱导血管发生。24 小时后，将鸡胚单次静脉内注射 100ug 的 FRIP-1 或 AAA 对照肽。3 天后，通过计数在滤膜片区域内的血管分支点数目而定量血管发生。图 8A 示出从典型实验中所取的 CAM 组织的代表性实例。图 8B 是血管发生实验的定量。图 8B 的结果示出结合 MMP-9 的 FRIP-1 合成肽阻断鸡胚 CAM 模型中血管发生。在图 8B 中，NT 相当于未用 bFGF 处理的，FRIP-1 相当于 bFGF+FRIP-1 肽，AAA 相当于 bFGF+对照 AAA 肽。数据杆代表每种条件下 5-10 个鸡胚的平均值±标准误差。

此数据提示 MMP-9/ α 5 β 1 的相互作用在血管发生中起重要作用。

实施例 9：产生抗合成肽的 Mab

将 FRIP 肽缀合于载体蛋白 KLH，并注射入小鼠中。将 5 个代表性杂交瘤克隆的条件培养基通过 ELISA 分析与 FRIP-1 肽或对照 AAA 肽的结合情况。图 9 示出的数据代表得自三份孔的平均相对结合性（光密度） \pm 标准偏差。

如图 9 所示，针对 FRIP-1 肽产生了一些 Mab，这些抗体中有一些例如 Mab FM155 示出对 FRIP-1 肽具有高度特异性，但与对照肽 AAA 不反应。因此，选择 Mab FM155 进行进一步评价。

实施例 10: Mab FM155 对 MMP-9/ α 5 β 1 相互作用的影响

将 α 5 β 1 固定于微量滴定孔中（10ug/ml）。使重组人 MMP-9（2ug/ml）在有或无 Mabs FM155 或 LM609 的情况下结合。用抗 MMP-9 多克隆抗体检测 MMP-9 的结合情况。结果示于图 10。数据杆代表得自三份孔的平均光密度 \pm 标准偏差。在图中，NT 相当于未处理，FM155 相当于抗 FRIP-1 的 Mab，LM609 相当于抗 α v β 3 Mab。

图 10 示出 Mab FM155 特异阻断 MMP-9 结合纯化的 α 5 β 1 的能力，这提示 FM155 可用于在体内破坏这种相互作用。

实施例 11: 系统施用 FM155 对黑素瘤生长的作用

将 CS-1 黑素瘤细胞（ 5×10^6 ）接种在 10 天龄的鸡胚 CAM 上。24 小时后，鸡胚经静脉内注射纯化的 Mab FM155（2.0ug，10.0ug，50.0ug）。7 天后，切除肿瘤并确定湿重。图 11 表示确定的肿瘤重量。数据杆代表在每种条件下得自 5—10 个鸡胚的平均值 \pm 标准误差。NT 代表未处理的数据。

图 11 示出 Mab FM155 强力抑制 CS-1 黑素瘤在体内生长。这些发现表明阻断 MMP-9 与 α 5 β 1 之间的相互作用可在体内调节血管发生和肿瘤生长中起明显作用。

所有在说明书中引用的出版物在此以其全文并入参考。

还应意识到前面的关于本发明的阐述只是例证和解释了本发明，而无任何限制本发明的实际应用之意。另外，本领域技术人员在不偏离本发明精神的情况下可对本发明加以改变，本发明范围应由权利要求书解释。

序列表

- <110> 南加利福尼亚大学
彼得·C·布鲁克斯
卢布纳·哈桑尼
多萝西·罗德里格斯
- <120> 用基于MMP-9和 β 1整联蛋白的拮抗剂抑制血管发生的新方法和组合物
- <130> 13761-734PCT
- <140> 未给出
<141>
- <150> US 60/143,581
<151> 1999-07-13
- <150> US 60/152,495
<151> 1999-09-02
- <160> 3
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成序列, FRIP-1
- <223> 与MMP-9和 β 1整联蛋白结合
- <400> 1
Cys Arg Leu Arg Ser Gly Glu Pro Gln Cys
1 5 10
- <210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213>
- <220> 人工序列
<223> 合成序列, AAA
- <223> 以相比于FRIP-1与MMP-9和 β 1整联蛋白的结合能力大大降低的结合能力与
MMP-9和 β 1整联蛋白结合
- <400> 2
Cys Arg Ala Ala Ala Gly Glu Pro Gln Cys
1 5 10
- <210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成序列, AAAA

<223> 以相比于FRIP-1与MMP-9和 β 1整联蛋白的结合能力大大降低的结合能力与
MMP-9和 β 1整联蛋白结合

<400> 3
Cys Arg Ala Ala Ala Ala Glu Pro Gln Cys
1 5 10

图 1

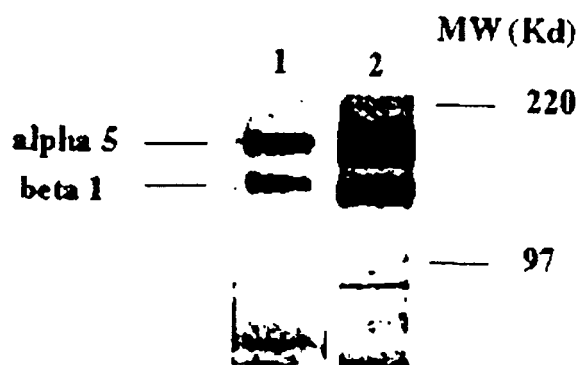


图2

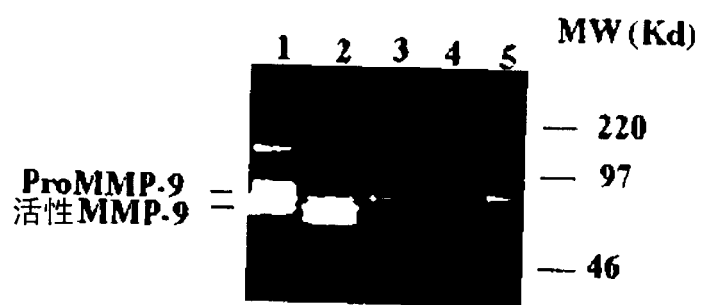


图3

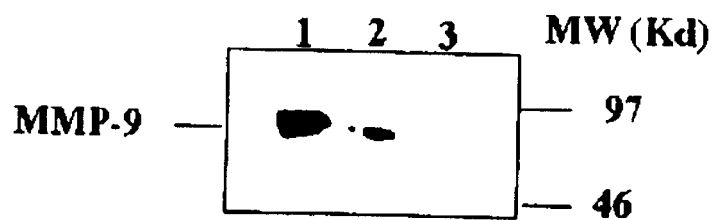


图4

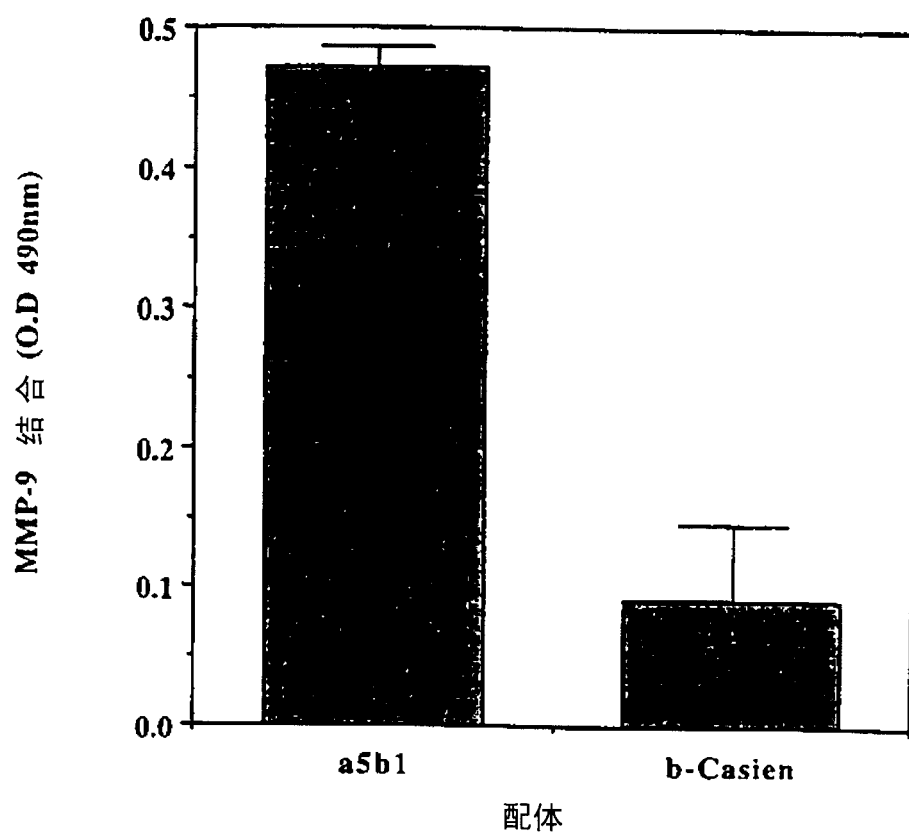


图5

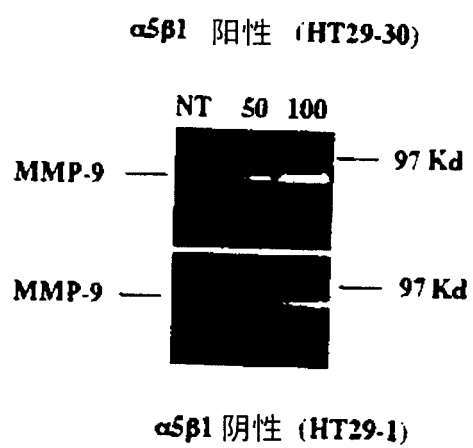


图6

MMP-9和 β 1整联蛋白在人黑素瘤活检样品中的共定位

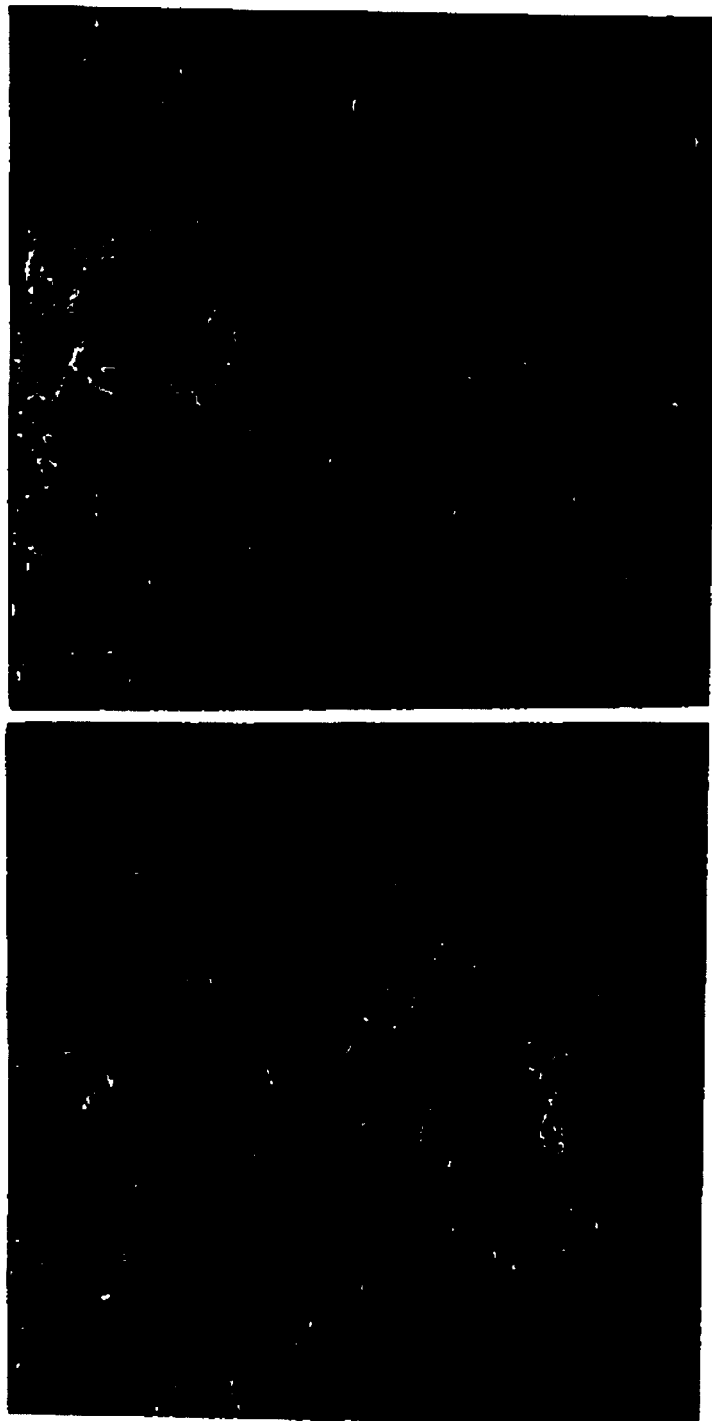


图7

A

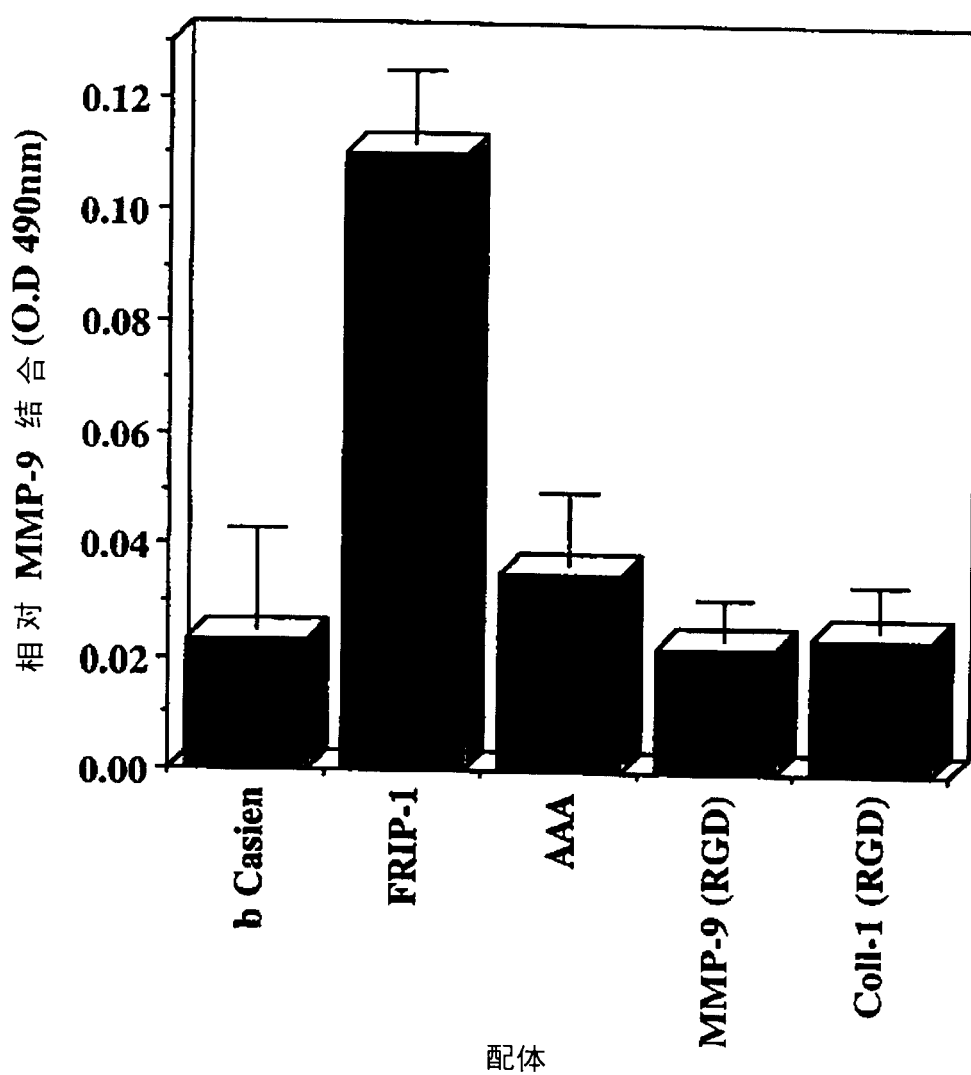


图8A

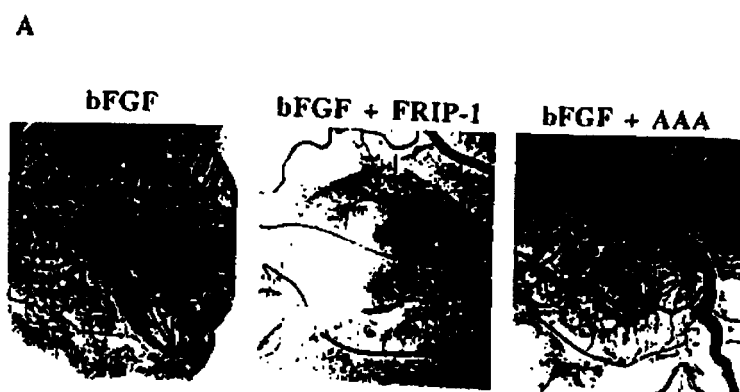


图8B

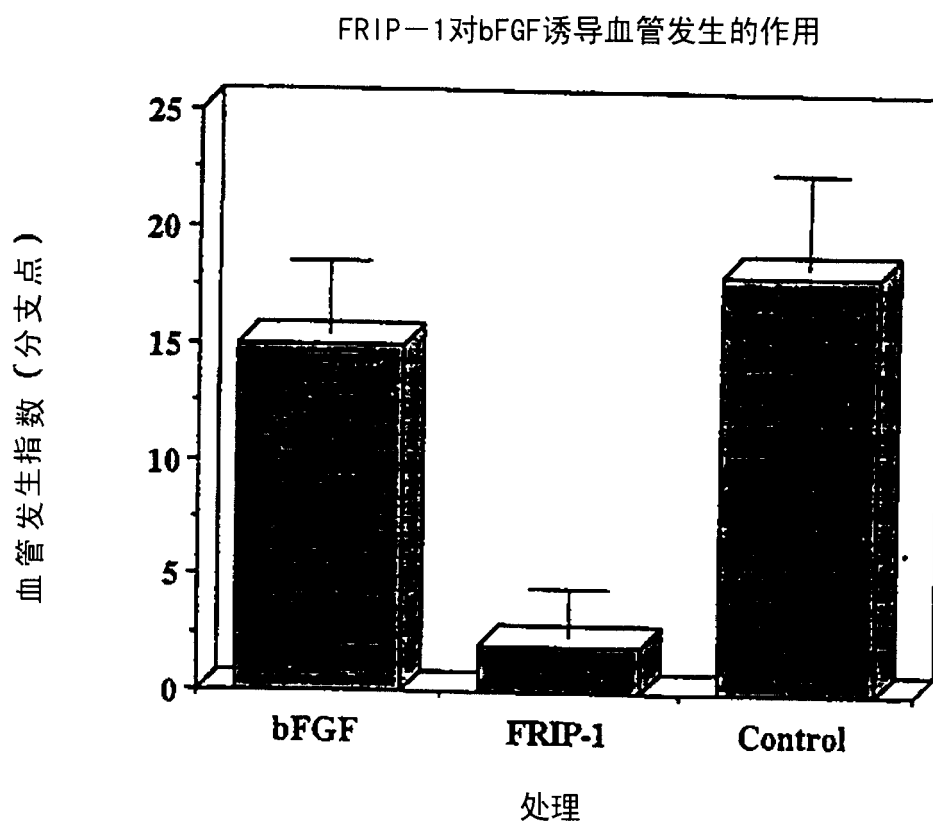
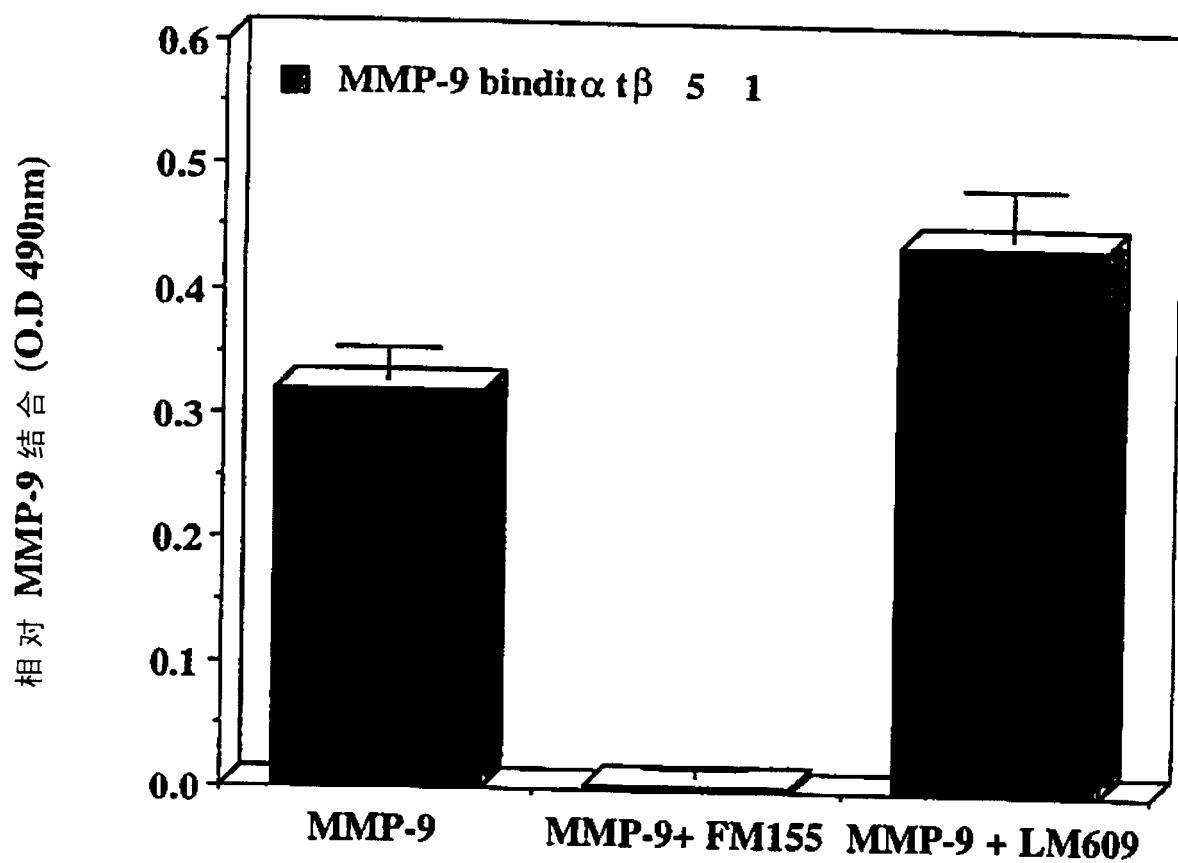


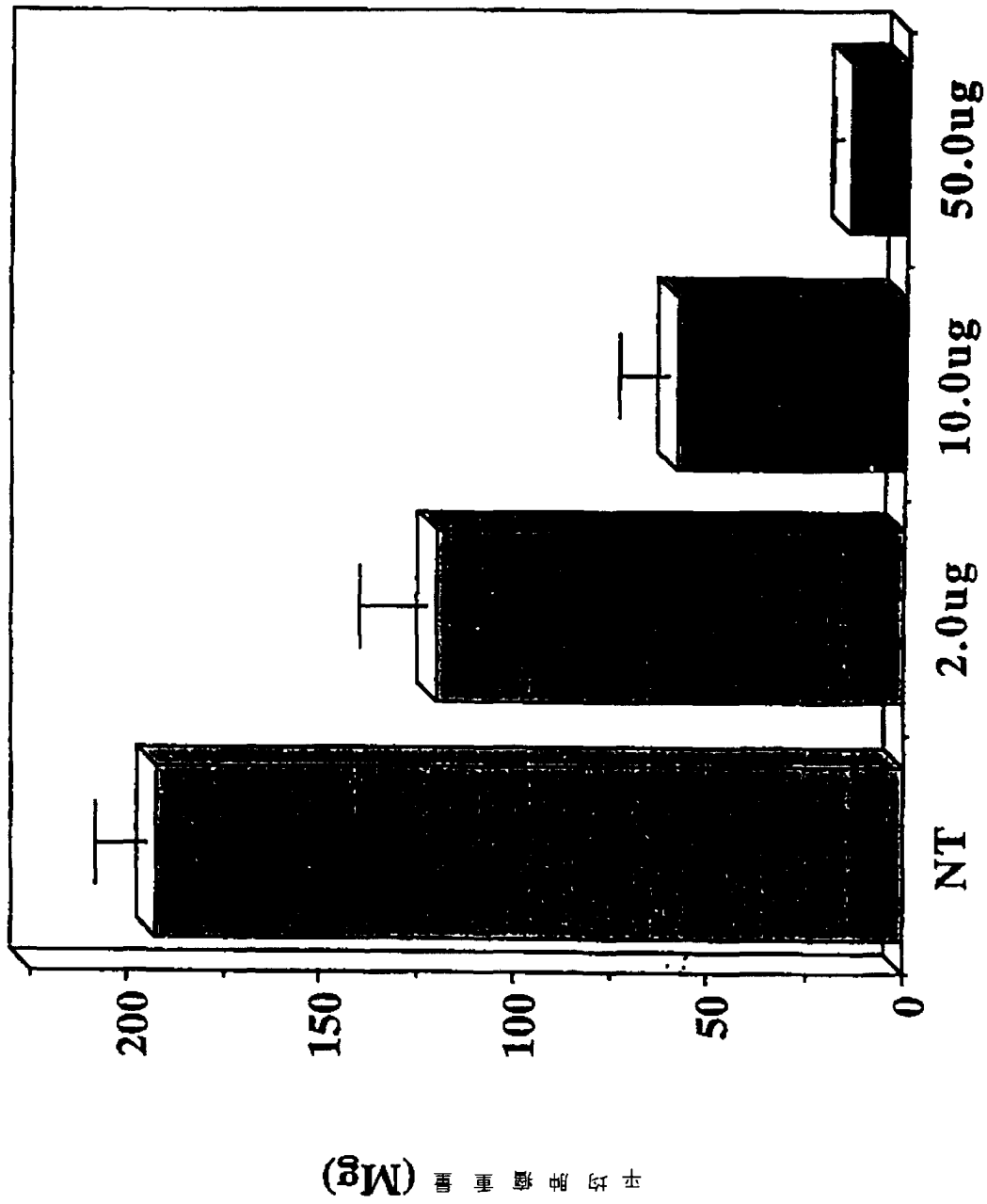
图9

杂交瘤条件培养基对FRIP-1肽的反应性

杂交瘤克隆名称	FRIP-1 (O.D 490nm)	AAA (O.D 490nm)
FM 101	0.306 (\pm 0.041)	0.275 (\pm 0.033)
FM132	0.576 (\pm 0.022)	0.037 (\pm 0.026)
FM155	0.481 (\pm 0.063)	0.055 (\pm 0.039)
FM158	0.339 (\pm 0.039)	0.178 (\pm 0.066)
FM170	0.241 (\pm 0.037)	0.201 (\pm 0.012)

图10





注射的Mab FM155的微克数

图11

专利名称(译)	用基于MMP - 9和 β 1整联蛋白的拮抗剂抑制血管发生的新方法和组合物		
公开(公告)号	CN1379685A	公开(公告)日	2002-11-13
申请号	CN00812835.9	申请日	2000-07-13
[标]申请(专利权)人(译)	南加利福尼亚大学		
申请(专利权)人(译)	南加利福尼亚大学		
当前申请(专利权)人(译)	南加利福尼亚大学		
[标]发明人	彼得C布鲁克斯 卢布纳哈桑尼 多萝西罗德里格斯		
发明人	彼得·C·布鲁克斯 卢布纳·哈桑尼 多萝西·罗德里格斯		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P9/00 A61P17/06 A61P25/00 A61P35/00 A61P35/04 C07K14/705 C07K16/28 C07K16/40 C12N9/50 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 A61K31/00 A61K31/7088 A61K47/48 A61K51/00		
CPC分类号	A61P17/06 A61P25/00 C07K16/2842 C07K2317/34		
代理人(译)	林晓红		
优先权	60/143581 1999-07-13 US 60/152495 1999-09-02 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述了用于修饰涉及MMP - 9和/或 β 1整联蛋白的某些氨基酸序列的蛋白质—蛋白质之间相互作用的拮抗剂,这种拮抗剂抑制血管发生、肿瘤生长和疾病状态。举例的拮抗剂为多肽和非肽分子,包括新抗体Mab FM155和新合成肽FRIP - 1。本发明还公开了通过施用这种拮抗剂抑制血管发生和疾病状态的方法。本发明也公开了修饰涉及MMP - 9和/或 β 1整联蛋白的某些氨基酸序列的蛋白质—蛋白质之间相互作用的拮抗剂的鉴别方法。

