

[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 03822590.5

A61K 38/43

A61K 38/49

A61K 38/55

A61K 39/395

C12Q 1/37

C12Q 1/25

C12S 3/00

[43] 公开日 2005 年 10 月 19 日

[11] 公开号 CN 1684706A

[22] 申请日 2003.7.21 [21] 申请号 03822590.5

[30] 优先权

[32] 2002. 7. 23 [33] US [31] 60/397,580

[32] 2003. 2. 6 [33] US [31] 60/445,234

[32] 2003. 7. 10 [33] US [31] 60/485,741

[86] 国际申请 PCT/US2003/022521 2003.7.21

[87] 国际公布 WO2004/009773 英 2004.1.29

[85] 进入国家阶段日期 2005.3.23

[71] 申请人 路德维格癌症研究所

地址 美国纽约州

[72] 发明人 布拉德利·麦考尔 梅根·鲍德温

史蒂芬·斯达克 马克·阿亨

[74] 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

代理人 戴建波

权利要求书 3 页 说明书 27 页 附图 3 页

[54] 发明名称 活化或抑制 VEGF - D 和 VEGF - C 的方法和组合物

[57] 摘要

本发明公开了用纤溶酶活化血管内皮生长因子 VEGF - C 或 VEGF - D 的方法和相应的治疗方法, 该治疗方法包括给予患者含纤溶酶的药物组合物。本发明还公开了筛选血管内皮生长因子纤溶酶活化抑制剂的方法和相应的治疗方法, 该治疗方法包括是通过抑制 VEGF - C/D 纤溶酶活化实现的。另外, 本发明还进一步公开了筛选其它的 VEGF - C/D 活化蛋白酶和该抑制活化的抑制剂的方法。同时, 本发明还公开了纤溶酶活性抑制剂和用该抑制剂处理患者的方法。

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

1、一种活化至少一种血管内皮生长因子的方法，所述的至少一种血管内皮生长因子选自于 VEGF-C 和 VEGF-D 中，其中，该方法包括用丝氨酸蛋白酶处理所述的至少一种血管内皮生长因子。

2、如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的丝氨酸蛋白酶为纤溶酶。

3、如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的至少一种血管内皮生长因子为未经处理的形式或部分经过处理的形式。

4、如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的血管内皮生长因子为 VEGF-D。

5、如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的血管内皮生长因子为 VEGF-C。

6、一种筛选蛋白酶的方法，该蛋白酶可以活化 VEGF-C 和 VEGF-D 中的至少一种，其中，所述的 VEGF-C 或 VEGF-D 具有 C-前肽和 N-前肽中的至少一种，该方法包括用候选的蛋白酶处理 VEGF-C 和 VEGF-D 中的至少一种，然后检测 VHD；其中，VHD 的检测指示出所述的候选蛋白酶活化 VEGF-C 或 VEGF-D 的能力。

7、一种利用来源于 VEGF-C 或 VEGF-D 的合成多肽来筛选蛋白酶的方法，该蛋白酶可以活化 VEGF-C 或 VEGF-D 中的至少一种，该方法包括用候选蛋白酶处理所述的合成多肽，然后用近似闪烁检测法来检测所述的候选蛋白酶对所述 VEGF-C 或 VEGF-D 的剪切情况。

8、一种鉴别可以抑制 VEGF-C 和 VEGF-D 中至少一种活化的抑制剂的方法，该方法包括将所述的 VEGF-C 和 VEGF-D 中至少一种同候选物质以及纤溶酶相混合，然后测量从所述 VEGF-C 和 VEGF-D 中至少一种释放 VHD 的抑制情况。

9、如权利要求 8 所述的方法，其中，该方法还进一步包括检验所述的候选物质是否除了抑制 VEGF-C 或 VEGF-D 外，还抑制纤溶酶其它底物的降解，其中，抑制 VHD 释放但不抑制其它底物降解的物质是 VEGF-C 或 VEGF-D 活化的抑制剂。

10、一种利用来源于 VEGF-C 或 VEGF-D 的合成多肽来筛选纤溶酶活化 VEGF-C 或 VEGF-D 的抑制剂的方法，该方法包括用候选的抑制剂和纤溶酶处理所述的合成多肽，然后在所述候选抑制剂存在下，用近似闪烁检测法来检测纤溶酶能否剪切多肽。

11、一种处理方法，包括给予患者所需的至少一种纤溶酶抑制剂的有效剂量。

12、一种处理方法，包括给予患者所需的至少一种 VEGF-C 或 VEGF-D 纤溶酶活化抑制剂的有效剂量。

13、如权利要求 12 所述的方法，其中，所谓的至少一种抑制剂是 VEGF-C 或 VEGF-D 的抗体，或者该抗体的免疫活性片段。

14、一种活化 VEGF-C 或 VEGF-D 或二者的药物组合物，该组合物包括有效剂量的纤溶酶和药物学上可接受的赋形剂。

15、一种处理方法，包括给予患者所需的、如权利要求 14 所述的药物组合物的有效剂量。

16、一种抑制 VEGF-C 或 VEGF-D 或二者的药物组合物，该组合物包括 VEGF-C 和/或 VEGF-D 纤溶酶活化的抑制剂和药物学上可接受的赋形剂。

17、如权利要求 15 所述的方法，其中，所述的抑制剂是抗体或该抗体的片段，其中，所述的抗体或其片段与 VEGF-C 和 VEGF-D 中至少一种相结合，而且，所述的抗体或其片段阻止纤溶酶活化所述的 VEGF-C 和 VEGF-D 中至少一种。

活化或抑制 VEGF-D 和 VEGF-C 的方法和组合物

技术领域

本发明涉及活化内皮生长因子的方法，更具体地讲，本发明涉及用纤溶酶(plasmin)活化血管内皮生长因子 D 和血管内皮生长因子 C 的方法。另外，本发明也涉及识别上述内皮生长因子的活化和/或抑制因子的方法和实验，这些内皮生长因子包括 VEGF-D 和 VEGF-C。

背景技术

血管生成(angiogenesis)是组织正常生长和发育必需的基本过程，其涉及从已有的血管增生出新的毛细血管。血管生成不仅仅包含在胚胎发育以及正常组织生长、修复和再生中，还包含在女性生殖周期中如怀孕的发生和维持以及创伤和骨折的修复中。除在正常个体发生血管生成外，许多病理过程也涉及血管生成的增加，如肿瘤生长和转移及其它的血管增殖状态，尤其是微血管系统中，如糖尿病性视网膜病、牛皮癣及关节病。抑制血管生成有助于抑制或减轻这些病理过程。

另一方面，某些情况下我们需要促进血管生成，此时要建立或扩大血管化的过程，例如在组织或器官移植后，或者要促进组织梗死或动脉狭窄中侧支循环的建立，如在冠心病以及血管闭塞性脉管炎中。

因为在许多生理性和病理性过程中血管生成发挥重要作用，因此，我们对控制血管生成的相关因素进行了深入研究。许多生长因子被发现与调节血管生成有关，其中包括成纤维细胞生长因子(FGFs)、血小板源性生长因子(PDGF)、转化生长因子 α (TGF α)以及肝

细胞生长因子 (HGF)，如参阅：Folkman 等,"Angiogenesis", *J. Biol. Chem.*, 267: 10931-10934,1992。

有证据表明一个独特的内皮细胞特异性生长因子及其相应受体的家族起着如下主要作用：刺激内皮细胞生长和分化以及分化细胞的某些功能。这些因子是 PDGF 家族成员，并且通过内皮细胞受体酪氨酸激酶 (RTKs) 发挥作用。至少四种血管内皮细胞生长因子亚型已经得以识别。

已经从几个来源中分离出血管内皮细胞生长因子(VEGF)，现在也叫 VEGF-A，。VEGF-A 呈现出对内皮细胞高度的特异性促有丝分裂活性，并且可以刺激导致血管生成的整个事件的发生。此外，它对单核细胞具有强烈的趋化作用，能够诱导内皮细胞中的纤溶酶原活化因子和纤溶酶原活化因子抑制剂，并且还可影响微血管的通透性。后一种活性，有时被称作血管通透性因子 (VPF)。关于 VEGF 的分离和特性的相关综述，可参见 Ferrara 等,"The Vascular Endothelial Growth Factor Family of Polypeptides", *J. Cell. Biochem.*, 47: 211-218, 1991 以及 Connolly, "Vascular Permeability Factor: A Unique Regulator of Blood Vessel Function", *J. Cellular Biochem.*, 47: 219-223, 1991。

最近，VEGF 家族的另外三个成员得以识别，分别被指定为 VEGF-B (在 Ludwig Institute for Cancer Research and The University of Helsinki 的国际申请中有描述：PCT/US96/02957 (WO 96/26736))、VEGF-C (在以下文献中有描述：Joukov 等, *EMBO J.*, 1996, 15: 290-298) 以及 VEGF2 (在 Human Genome Sciences, Inc 的国际申请中有描述：PCT/US94/05291 (WO 95/24473))。在血管生成和其它特性方面，VEGF-B 与 VEGF 极为相似，但在组织中的分布和表达方面存在差异。尤其是，VEGF-B 在心脏强烈表达，在肺部表达较弱，而 VEGF

与之相反。这表明尽管 VEGF 和 VEGF-B 在许多组织中共同表达，但是在功能上可能存在差异。

利用酵母共杂交作用搜集筛选技术来分离 VEGF-B，对可能同 I 型细胞视黄酸结合蛋白(CRABP-I)作用的细胞蛋白进行筛选。其分离方法以及特性的详细描述参见: PCT/US96/02597 以及 Olofsson 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996 93: 2576-2581。

VEGF-C 从 PC-3 前列腺癌细胞系(CRL1435)的条件培养基中分离出来，通过对能够产生内皮细胞特异性受体酪氨酸激酶 Flt-4 的酪氨酸磷酸化的培养基进行筛选而得到，其中利用细胞转染来表达 Flt-4。VEGF-C 利用重组 Flt-4 的亲色谱法进行纯化，并且根据 PC-3 cDNA 文库进行克隆。其分离方法和特性的详细描述见: Joukov 等, *EMBO J.*, 15: 290-298, 1996。

VEGF-C 作为一种前蛋白进行合成，其中受体结合 VEGF 同源性结构域(VHD)通过肽的氨基末端和羧基末端进行侧面相连。成熟 VHD 的生物合成包括前肽蛋白水解的去除，以及 VHD 对 VEGFR-2 和 VEGFR-3 亲和力的大幅增长，其中 VEGFR-2 和 VEGFR-3 是未被加工过的全长形态(Joukov 等 (1997), *EMBO J.* 16:3898-3911)。故蛋白水解的处理活化了 VEGF-C。这说明 VEGF-C 在淋巴管内皮中发挥原发性功能，在血管生成和通透性调节方面发挥继发性功能，其中血管通透性的调节是与 VEGF 共同承担(Joukov 等, *EMBO J.*, 1996 15:290- 298)。

VEGF2 从高度肿瘤发生性、非雌激素依赖的人乳腺癌细胞系中分离而来。而这种分子据称与 PDGF 大约有 22% 的同源性，与 VEGF 有 30% 的同源性，编码 VEGF2 的基因的分离方法还不清楚，并且还未揭示其生物活性特征。

血管内皮生长因子通过结合到 PDGF 受体家族的受体酪氨酸激酶发挥作用。已经有五种内皮细胞特异性受体酪氨酸激酶得以识别, 分别命名为 FLT-1 (VEGFR-1)、KDR/FLK-1 (VEGFR-2)、FLT-4 (VEGFR-3)、Tie 以及 Tek/Tie-2。所有这些受体均具有信号转导所必需的内在酪氨酸激酶活性。

在小鼠胚胎中利用靶向变异使这些受体失活, 证明 Flt-1、Flk-1、Tie 以及 Tek/Tie-2 在血管生成和血管生成中能发挥特异性的作用。

VEGFR-1 和 VEGFR-2 与 VEGF 以高亲和力相结合, 并且 VEGFR-1 也同 VEGF-B 以及胎盘生长因子 (PlGF) 相结合。VEGF-C 作为 Flt-4 (VEGFR-3) 的配体, 并且还可以活化 VEGFR-2 (Joukov 等, *EMBO J.*, 15: 290-298, 1996)。Tek/Tie-2 的配体已经得以阐明 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc. 的 PCT/US95/12935 (WO 96/11269)), 而 Tie 的配体尚未得以识别。

受体 Flt-4 在胎儿的静脉和淋巴管内皮中表达, 并且在成人的淋巴管内皮中显著表达 (Kaipainen 等, *Cancer Res.*, 1994 54: 6571-6577; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 3566-3570, 1995)。

血管内皮生长因子 D (VEGF-D) 是一种分泌的糖蛋白, 可以结合以及活化 VEGF 受体-2 (VEGFR-2) 和 VEGFR-3 (Achen 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 548-553, 1998), 细胞表面受体酪氨酸激酶在血管和淋巴管内皮中分别显著表达 (Stacker 等, *FASEB J.* 16: 922-934, 2002)。VEGFR-3 为淋巴管生成 (lymphangiogenesis) 的信号 (Veikkola 等, *EMBO J.* 20: 1223-1231, 2001), 而 VEGFR-2 被认为是血管生成的信号。如所期望的, 鉴于人 VEGF-D 的受体特异性, 这种生长因子可以刺激血管生成和淋巴管生成 (Byzova 等, *Blood* 99: 4434-4442, 2002)。

Veikkola 等, *EMBO J.* 20: 1223-1231,2001; Marconcini 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9671- 9676,1999)。

重要的是, VEGF-D 刺激肿瘤血管生成, 从而增强实体瘤的生长, 以及诱导淋巴管生成, 促进肿瘤细胞转移扩散到淋巴管和淋巴结中 (Stacker 等, *Nature Med.* 7: 186-191,2001)。最近有报道说 VEGF-D 的表达是结直肠癌全生存率和无瘤生存率的一个独立预后因素 (White 等, *Cancer Res.* 62: 1669-1675,2002)。

VEGF-D 由相关的非活性形态的细胞分泌而来, 此形态含有 N 末端, C 末端以及一个中央 VEGF 同源性结构域("VHD"), 此结构域包含与 VEGFR-2 和 VEGFR-3 相结合的部位 (Achen, M. G, M. Jeltsch, E. Kukk, T. Makinen, A. Vitali, A. F. Wilks, K. Alitalo 和 S. A. Stacker. 1998. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (FLK-1) and VEGF receptor 3 (Flt-4). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 548-553; Joukov, V., T. Sorsa, V. Kumar, M. Jeltsch, L. Claesson-Welsh, Y. Cao, O. Saksela, N. Kalkinen 和 K. Alitalo. 1997. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J.* 16: 3898-3911; 以及 Stacker 等, *J. Biol. Chem.* 274: 32127- 32136,1999)。随后, 这种前肽蛋白水解性地从 VHD 剪切开, 生成成熟形态, 其含有 VHD 的二聚体, 并以高亲和力同 VEGFR-2 和 VEGFR-3 相结合。成熟形态对 VEGFR-2 和 VEGFR-3 的亲和力较未加工的形态分别强 290 倍和 40 倍 (Stacker 等, 1999, 同上)。

因此, VEGF-D 和 VEGF-C 的蛋白水解过程是一种活化生长因子的机制。然而, 这种活化过程中所涉及的蛋白酶类还是未知的。许多生物学过程中也涉及这种活化, 如调整蛋白定位、生物利用度及受体

特异性的过程。而这些过程与不同的疾病相关。根据患者所需对这些过程及其中的活化因子进行抑制或者活化，从而可提供治疗选择。

已知某种临时基质在血管生成中发挥重要作用。该临时基质充当内皮细胞粘附、迁移和侵入的底物，对于内皮细胞的生存是必需的。如同重塑过程，临时基质不断的生成和分解，直到新血管完全形成。

这种临时基质的重塑通过大量分子的平衡活动进行高度调节。纤溶酶，一种通过激活其酶原纤溶酶原而形成的丝氨酸蛋白酶，在介导该临时基质的降解方面发挥重要作用。因为纤溶酶在临时基质的重塑过程中的重要作用，所以通过对纤溶酶原活化因子、纤溶酶原活化因子抑制剂以及纤溶酶抑制剂之间进行复杂的调协，来严密控制纤溶酶水平，可参见国际申请 WO 01/62799 A2。

发明内容

本发明首次确定出一种能够活化淋巴管生成的生长因子的蛋白酶。在一个实施方式中，本发明提供了一种方法来活化至少一种血管内皮生长因子，包括用丝氨酸蛋白酶来处理该至少一种血管内皮生长因子，该至少一种血管内皮生长因子选自 VEGF-C 和 VEGF-D 中。丝氨酸蛋白酶优选为纤溶酶（plasmin，胞质素）。至少一种的血管内皮生长因子可以是未加工或部分加工过的形态。

在另一个实施方式中，本发明提供了一种方法来筛选可以活化 VEGF-C 和 VEGF-D 中至少一种的蛋白酶，其中，VEGF-D 具有 C 端或 N 端的至少一端，这种方法包括用候选的蛋白酶来处理 VEGF-C 或 VEGF-D 中至少一种，以及检测 VHD，而 VHD 的检测表明候选的蛋白酶是否能够活化 VEGF-C 或 VEGF-D。

在更进一步的实施方式中,本发明提供了一种方法来确定纤溶酶活化 VEGF-C 或 VEGF-D 中至少一种的抑制剂。此方法包括将 VEGF-C 或 VEGF-D 中至少一种同候选物质和纤溶酶相混合,以及测量从该 VEGF-C 或 VEGF-D 中至少一种释放的 VHD 的抑制情况。优选的是,此方法进一步包括如下内容:检验所谓的候选物质是否除了抑制 VEGF-C 或 VEGF-D 之外,还抑制其它纤溶酶底物的降解,如果某种物质抑制纤溶酶对 VHD 的释放,但是并不抑制其它物质的降解,那么就表明这种物质为 VEGF-C 或 VEGF-D 活性的抑制剂。如此确定的抑制剂仅仅抑制纤溶酶对 VEGF-C 或 VEGF-D 的活性,但并不另外影响纤溶酶对其他底物的活性。虽然不希望作任何理论方面的限制,但是可以相信这种抑制剂结合到 VEGF-C 或 VEGF-D 上,从而抑制纤溶酶对其的活性。

本发明进一步提供了一种治疗方法,这种方法包括给予患者所需要的、至少一种纤溶酶抑制剂的有效剂量。优选的是,这种纤溶酶活化 VEGF-C 或 VEGF-D 的抑制剂并不另外影响纤溶酶对其他底物的活性。优选的是,这种抑制剂是 VEGF-C 或 VEGF-D 的某种抗体或其免疫活性片断。

本发明还提供了一种治疗方法,该方法包括给予患者所需要的、有效剂量的纤溶酶,来活化 VEGF-C 或 VEGF-D 或二者一起。同时,本发明也提供了某种药物组合物来活化 VEGF-C 或 VEGF-D 或二者一起,这种组合物含有有效剂量的纤溶酶以及药物学上适宜的赋形剂。优选地,此治疗方法包括给予患者所需要的、有效剂量的上述药物组合物。优选地,该方法使用某种抗体或其片断,其中,这种抗体或其片断可以结合到 VEGF-C 或 VEGF-D 中至少一种,从而抑制纤溶酶对 VEGF-C 或 VEGF-D 中至少一种的活化。

附图说明

图 1 所示为近似性闪烁检测。图 1a: 将包含 VEGF-D 之 VHD 部位的肽序列从 C 端前肽(C-pro)中剪切出来。在来自于 293-EBNA 细胞的 VEGF-D 中, 剪切发生在精氨酸 205 和丝氨酸 206 之间(箭头所示)(Stacker, S. A., K. Stenvers, C. Caesar, A. Vitali, T. Domagala, E. Nice, S. Roufail, R. J. Simpson, R. Moritz, T. Karpanen, K. Alitalo, and M. G. Achen. 1999. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J. Biol. Chem.* 274: 32127- 32136)。上述氨基酸上的数字用来表明在人 VEGF-D 中的位置(Achen, M. G, M. Jeltsch, E. Kukk, T. Mäkinen, A. Vitali, A. F. Wilks, K. Alitalo, and S. A. Stacker. 1998. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (FLK-1) and VEGF receptor 3 (Flt-4). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*95 : 548-553)。未在 VEGF-D 中发现的 C 端半胱氨酸残基可以容易地用放射性同位素进行标记。图 1b 表示 SPA 原理, 其中黑棒条表示生物素化的(B)、氚化(^3H)处理的 VEGF-D 肽, 其用蛋白酶处理, 然后在 β 计数之前结合到链霉抗生物素(蛋白)缀合的闪烁珠上。SB 表示闪烁珠(scintillant beads), 半中括号表示缀合(接合)到闪烁珠上的链霉抗生物素部分。图 1c 表示用蛋白酶处理 VEGF-D 后的 SPA 结果。数值为三次重复平均值 \pm 标准偏差, 并且代表两次实验。同阴性对照(负调控)比较的纤溶酶或凝血酶处理样本的 P 值用 Students't 试验进行计算。阴性对照为未消化的肽。图 1d 表示纤溶酶消化之前(上部面板)和之后(下部面板) VEGF-D 肽的质谱分析。每一面板均显示了最大峰值。

图 2 所示为纤溶酶对 VEGF-D 的蛋白酶解——蛋白质印迹分析(Western blotting)。图 2a 为用 10、1、0.1 或 0 U/ml 纤溶酶消化后,

人 VEGF-D-FULL-N-FLAG(100 ng/lane)与抗-VHD 抗体的分析。图 2b 为纤溶酶的 $\alpha 2$ -抗纤溶酶抑制。纤溶酶(1 U/ml; 130 nM)同不同浓度的 $\alpha 2$ -抗纤溶酶在加入 VEGF-D-FULL-N-FLAG 之前共同在 37°C 孵育 1 小时。 $\alpha 2$ -抗纤溶酶: 纤溶酶的摩尔比率显示在印迹上方。图 2c 为小鼠 VEGF-D 同型异构体(100 ng/lane)的分析。小鼠 VEGF-D³⁵⁸ (358) 和 VEGF-D³²⁶ (326)用 1 U/ml 纤溶酶处理(+)或不消化(-)。分子量标记的大小 (kDa) 显示在每一面板的左边。

图 3 所示为纤溶酶生成的成熟生长因子结合以及交联受体。图 3a 所示为结合到可溶性受体。含有人 VEGFR-2 或 VEGFR-3 的细胞外结构域的受体-Ig 融合蛋白与蛋白-A 琼脂糖接合, 并与成熟的重组人 VEGF-D 共同孵育作为阳性对照 (成熟的), PBS 作为阴性对照, 未消化和纤溶酶消化的全长 VEGF-D (未消化和消化)。上部为 VEGFR-2 结合, 下部为 VEGFR-3 结合。结合到受体-Ig 融合蛋白的物质利用抗-VHD 抗体进行蛋白印迹分析。纤溶酶产生成熟 VEGF-D (-21 kDa)比较明显。分子量 (kDa)大小显示在左边。图 3b 和图 3c 所示为 Ba/F3 生物检测中受体结合和交联的分析。用纤溶酶消化的或未消化的全长 VEGF-D(b)或 VEGF-C (c)进行处理 Ba/F3 细胞, 该 Ba/F3 细胞表达嵌合受体, 其包含 VEGFR-2 或 VEGFR-3 的细胞外结构域以及 EpoR 的细胞质结构域。上部面板: VEGFR-2/EpoR 生物检测。下部面板: VEGFR-3/EpoR 生物检测。对照是缺乏生长因子的介质 (介质) 或缺乏生长因子的纤溶酶消化 (纤溶酶)。数值为两次重复平均值 \pm 标准误, 并且代表三次实验。同未消化物质比较的纤溶酶消化结果的 P 值用 Students't 试验进行计算。

图 4 显示了用不同量纤溶酶或凝血酶消化的小鼠 VEGF-D₃₅₈ (100 ng)的蛋白印迹分析。每一泳道顶部的数字表示每一次孵育的蛋白酶

单位 (unit)。“C”表示阴性对照，孵育中无蛋白酶。左边的数字和箭头表示分子种类，右边表示分子量标记位置。

图5显示了同 VEGF-C 的 VEGFR-2 生物检测(左边)和 VEGFR-3 生物检测(右边)。结果显示了未消化的全长 VEGF-C 和纤溶酶消化的物质。无 VEGF-C 的为阴性对照。数值为三次重复平均值 \pm 标准误，消化同未消化样本比较的 P 值用 Students' t 试验进行计算。

具体实施方式

本发明提供了一种方法，即利用蛋白酶纤溶酶活化 VEGF-C 或 VEGF-D 或二者一起，并公开了确定 VEGF-C 或 VEGF-D 蛋白水解过程中抑制剂或活化剂的实验。

以前，用来处理 VEGF-D 和 VEGF-C 的蛋白酶还未为人所知。本发明首次发现丝氨酸蛋白酶纤溶酶可以剪切未加工和部分加工过的 VEGF-D 以及 VEGF-C 形态，从而产生具有生物学活性的成熟形态。在下面的实施例 2 中，发明者在利用 VEGFR-2 和 VEGFR-3 的生物测定中证明 VEGF-C 同样由纤溶酶活化。

本发明首次揭示了纤溶酶可以激活淋巴管生成生长因子 VEGF-C 和 VEGF-D。纤溶酶也可以调节血管蛋白 VEGF 的作用。纤溶酶可以分裂一些 VEGF 的亚型，将其从细胞外基质或细胞表面释放出来，从而使其可以诱导血管增生(Houck,K.A., D.W.Leung, A.M.Rowland, J.Winer 和 N.Ferara. 1992. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J ; Biol. Chem.* 267: 26031-26037; Plouet,J., F.Moro, S.Bertagnolli, N.Coldeboeuf, H. Mazarguil, S. Clamens 和 F. Bayard, 1997. Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor

189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J Biol. Chem.* 272: 13390-13396); 在一个猪的皮肤创伤愈合模型中, 可以观察到淋巴管与血管同时出现(Paavonen 等, 2000. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am. J. Pathol.* 156: 1499-1504), 表明血管生成与淋巴管发生是协同调节的。因为 VEGF-C 和 VEGF-D 局限在成人组织的血管平滑肌(Achen, M.G,R.A. Williams,M.P.Minekus, G.E. Thornton, K.Stenvers, P.A.W.Rogers, F. Lederman,S. Roufail 和 S.A.Stacker,2001, Localization of vascular endothelial growth factor-D in malignant melanoma suggests a role in tumor angiogenesis. *J Pathol.* 193: 147-154; Partanen,T.A., J. Arola, A. Saaristo, L.Jussila,A.Ora,M.Miettinen,S.A.Stacker, M. Gachen, 和 K. Alitalo,2000, VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J.*14: 2087-2096)以及 VEGF 水平在皮肤损伤中是升高的(Yao, F., S. Visovatti, C. S. Johnson, M. Chen, J. Slama, A. Wenger, 和 Eriksson. E. 2001, Age and growth factors in porcine full-thickness wound healing. *Wound Repair Regen.* 9: 371-377), 所以这些生长因子可以协同血管生成和淋巴管发生, 作为创伤愈合中纤溶酶活化的结果。此外, 纤溶酶降解血纤维蛋白凝块(Collen, D. 和 H. R. Lijnen. 1991. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78 : 3114-3124), 因此能在创伤愈合中整合纤维蛋白溶解及脉管形成。

对来自于小鼠肺部的 VEGF-D 的分析表明, 仅仅一部分、而不是全部的 VEGF-D 属于短链约 21 kDa 全激活状态(Stacker 等, *J. Biol. Chem.* 274: 32127-32136,1999)。因而, 局部给予纤溶酶可以增高体内 VEGF-C 或 VEGF-D 或二者(下文用“VEGF-C/D”表示)的活性,

因为额外的纤溶酶可以将剩余的全长或部分加工的生长因子转换为全活性状态，从而提升了组织中总的 VEGF-C 或 VEGF-D 的活性。

在一个优选的实施方式中，活化 VEGF-C/VEGF-D 的方法用来处理淋巴水肿。在淋巴水肿中，因为不适当的淋巴引流而致的组织膨胀可以导致淋巴管或淋巴结损伤。已知 VEGF-C 活性的升高（通过 VEGF-C 蛋白的局部释放）可以引起淋巴水肿组织中淋巴管的生长，从而帮助消除淋巴水肿(Szuba 等, *FASEB J.*16: 1985-1987,2002)。

已知 VEGF-C 和 VEGF-D 可以诱导血管生成(Byzova 等, *Blood* 99: 4434-4442,2002 ; Cao 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14389-14394, 1998)。因此，局部给予纤溶酶可以用于治疗某些疾病，例如缺血症，其中纤溶酶能够激活这些分子并促使血管生长。

在周围血管或者冠状动脉疾病的血管成形术后，VEGF-C/D 活性的升高有利于引起血管修复，阻止血管再狭窄。VEGF-C/D 活性的升高也有利于引起血管修复来阻止血管移植后的狭窄，血管移植可用于心脏旁路治疗或治疗外周缺血。VEGF-C/D 活性的升高进一步还有利于引起治疗性血管生成或动脉血管形成，用来治疗缺血性心脏疾病和其它缺血疾病，包括外周组织缺血。

因此，根据本发明的另外一个实施方式，VEGF-C/D 的纤溶酶活化可以通过应用配体结合分子来阻止其同处理蛋白酶相互作用而加以抑制。根据本发明，能够结合 VEGF-C/D 的物质可以用来阻止这些生长因子的活化。这些抑制活化作用的物质可以用来治疗某些疾病，例如癌症。首选的可以用来治疗的癌症属于以下情况：癌瘤中的 VEGF-C 或 VEGF-D 诱导肿瘤淋巴管生成，从而促使肿瘤细胞沿淋巴管转移扩散(Stacker 等, *Nature Med.* 7: 186- 191,2001; Skobe 等, *Nature*

Med. 7: 192-198, 2001; Mandriota 等, *EMBO J.* 20: 672- 682, 2001)。因此这些生长因子的抑制成为癌症治疗中的抗转移手段。VEGF-C/D 也可以引起肿瘤血管生成,刺激实体瘤的生长(Stacker 等, *Nature Med.* 7: 186-191,2001), 因此这种抑制也有利于实体瘤的治疗。

可以用 VEGF-C/D 抑制剂治疗的其它疾病包括淋巴管瘤、淋巴管肉瘤以及非控制性血管增生性疾病,例如糖尿病性视网膜病以及关节炎。VEGF-C/D 的抑制也可以阻止眼睛新生血管的形成,眼睛新生血管的形成的特征是新生血管侵入到眼睛结构中,例如视网膜或角膜。这是失明最常见的原因,并且涉及大约二十种眼部疾病,例如糖尿病性视网膜病,以及严重的年龄相关的黄斑变性。在严重的年龄相关的黄斑变性中,相关的视觉问题由以下因素引起:脉络毛细血管经由正常人眼玻璃膜(Bruch's membrane)缺损处向内生长,伴有视网膜色素上皮下的纤维管组织的增殖。

某种抗 VEGF-D 抗体可以优先选择给予需要 VEGF-C/D 抑制剂的患者,这种抗体可以阻止 VEGF-D 结合到 VEGFR-2 和 VEGFR-3。在另一个具体实施方式中,可溶解的细胞外 VEGFR-3 结构域用来隔离 VEGF-C 和 VEGF-D,从而达到抑制效用。在动物模型中的研究表明,VEGFR-3 信号旁路的抑制阻止了肿瘤淋巴管的生成以及沿淋巴管进行转移(Stacker, S. A., C. Caesar, M. E. Baldwin, G. E. Thornton, R. A. Williams, R. Prevo, D. G. Jackson, S.-I. Nishikawa, H. Kubo 和 M. G. Achen. 2001. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat. Med.* 7: 186- 191; He, Y., K. Kozaki, T. Karpanen, K. Koshikawa, S. Yla-Herttuala, T. Takahashi 和 K. Alitalo. 2002. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node

metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J ; Natl. Cancer Inst.* 94: 819- 825).

临床研究揭示了乳腺癌、卵巢癌和结直肠癌中 VEGF-D 的表达也许是一种淋巴结转移病灶相关的独立生存预后性指示(Yokoyama, Y, D. S. Charnock-Jones, D. Licence, A. Yanaihara, J. M. Hastings, C. M. Holland, M. Emote, M. Umemoto, T. Sakamoto, S. Sato, H. Mizunuma 和 S. K. Smith. 2003. Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma, *BR. J Cancer* 88 : 237-244; White, J. D. , P. W. Hewett, D. Kosuge, T. McCulloch, B. C. Enhohn, J. Carmichael, and J. C. Murray 2002. Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 62: 1669-1675; Nakamura, Y, H. Yasuoka, M. Tsujimoto, Q. Yang, S. IMABUN, M. Nakahara, K. Nakao, M. Nakamura, I. Mori 和 K. Kakudo. 2003. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up. *Clin. Cancer Res.* 9: 716-721)。此外，在动物模型中，淋巴管生成性生长因子的表达促进了肿瘤细胞的转移扩散(Stacker, S. A. , C. Caesar, M. E. Baldwin, G. E. Thornton, R. A. Williams, R. Prevo, D. G. Jackson, S. -I. Nishikawa, H. Kubo 和 M. G. Achen. 2001. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat. Med.* 7: 186-191; Mandriota, S. J. , L. Jussila, M. Jeltsch, A. Compagni, D. Baetens, R. Prevo, S. Banerji, J. Huarte, R. Montesano, D. G Jackson, L. ORCI, K. Alitalo, G Christofori 和 M. S. Pepper. 2001. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumor metastasis, *EMBO J.* 20: 672-682; Skobe, M., T. Hawighorst, D. G Jackson, R. Prevo, L. Janes, P. Velasco,

L. Riccardi, K. Alitalo, K. Claffey 和 M. Detmar. 2001. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat. Med.* 7: 192- 198)。如在应用纤维蛋白溶解系统的模型中所显示, 纤溶酶以及其它纤维蛋白溶解系统成员也与肿瘤生长及转移有关(相关综述见 Andreassen, P. A. , R. Egelund 和 H. H. Petersen. 2000. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 25-40)。例如, 纤溶酶原活化因子抑制剂-2 的过度表达抑制人黑素瘤细胞转移到淋巴结和肺部(Mueller, B. M., Y B. Yu, and W. E. Laug. 1995. Overexpression of plasminogen activator inhibitor 2 in human melanoma cells inhibits spontaneous metastasis in scid/scid mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 205-209)。并且, 当将 Lewis 肺癌植入后, 无纤溶酶原的小鼠比对照组呈现出较少部位的淋巴结转移(Bugge, T. H. , K. W. Kombbinck, Q. Xiao, K. Holmback, C. C. Daugherty, D. P. Witte 和 J. L. Degen. 1997. Growth and dissemination of Lewis lung carcinoma in plasminogen-deficient mice. *Blood* 90: 4522-4531)。这些观察资料中潜在起作用的因素可以下调纤溶酶产物, 从而降低肿瘤淋巴管生成以及沿淋巴管转移。

在一个优选的实施方式中, 活化的封闭物质是一种对抗 VEGF-C/D 的抗体。

在又一实施方式中, 本发明提供了一种方法来筛选特异性封闭纤溶酶对 VEGF-C 以及 VEGF-D 活性的抑制剂。VEGF-C/D 活性的抑制可以通过纤溶酶或其他丝氨酸蛋白酶抑制剂来完成。已知纤溶酶可以剪切许多其它蛋白质(包括 VEGF-A 和血纤维蛋白凝块)。由于潜在的较大范围的副作用, 通常的纤溶酶抑制剂也许并不是非常有效

的。相反，仅封闭纤溶酶对 VEGF-C 和 VEGF-D 活化能力的抑制剂反而比较有效，可特异性的阻止肿瘤淋巴管生成以及血管生成。

本发明中的筛选方法就是用来鉴别这种抑制剂。在一个具体实施方式中，这样的抑制剂可以与 VEGF-C/D 结合，抑制其同纤溶酶相互作用，导致纤溶酶对 VEGF-C/D 活化的抑制，但是并不干扰其剪切与 VEGF-C/D 不相关的蛋白质能力，例如临时基质的重新塑造。

这里所使用的“VEGF-D”总体上是指血管内皮生长因子 D，及其具有 VEGF-D 生物活性的片断或类似物，如同本领域内所熟知的。例如这种生物活性实例包括受体结合以及内皮细胞增殖。

这里所使用的“VEGF-C”总体上是指血管内皮生长因子 C，及其具有 VEGF-C 生物活性的片断或类似物，如同本领域内所熟知的。例如这种生物活性实例包括受体结合以及内皮细胞增殖。

这里所使用的“抗体及其片断”包括任何以及所有生物活性部分，或者完全抗体，包括但不限于 Fab、Fab2、Fscv、Fab'等。抗体类型及其片断可在任何免疫学教科书中找到，例如 Paul 的 *Fundamental Immunology*。

材料和方法

肽的标记: 将 pH 6.0、200 μ l 200 mM 的 2-吗啉代乙磺酸 (MES) 中的 1 毫克生物素化的肽(Auspep, Parkville, Australia)在戊烷中 (Perkin Elmer Lifesciences, Boston, MA) 同 455 μ Ci 的 [3 H]N-乙基马来酰亚胺 (NEM) 相混合，在 N₂ 下移除戊烷。在室温下孵育 10 分钟后，添加含有 50 μ g NEM 的 pH 6.0 的 200 mM MES 并在室温下孵育 1 小时。进一步添加含有 500 μ g NEM 的 pH 6.0 的 200 mM MES 并在

室温下孵育 1 小时。在 150 mM NaCl 中利用 Sephadex G-10 的色谱法将标记的多肽从未整合的标记物分离开。

VEGF-C 和 VEGF-D 的纯化: VEGF-C-FULL-N-FLAG 或 VEGF-D-FULL-N-FLAG (在 N 端用 FLAG 八肽标记的全长人 VEGF-C 或 VEGF-D)、VEGF-D Δ N Δ CFLAG(在 N 端用标记物标记的人 VEGF-D 的 VHD) (Stacker, S. A., K. Stenvers, C. Caesar, A. Vitali, T. Domagala, E. Nice, S. Roufail, R.J. Simpson, R. Moritz, T. Karpanen, K. Alitalo 和 M. G. Achen. 1999. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J. Biol. Chem.* 274:32127-32136)和小鼠 VEGF- D₃₂₆-FLAG 以及 VEGF-D₃₅₈-FLAG (在 C 端用标记物标记的全长异构体) (Baldwin, M.E., S. Roufail, M. M. Halford, K. Alitalo, S.A. Stacker 和 M. G. Achen. 2001. Multiple forms of mouse vascular endothelial growth factor-D are generated by RNA splicing and proteolysis. *J Biol. Chem.* 276: 44307-44314)从转染 293EBNA 细胞的条件培养基中纯化。

蛋白酶水解: 蛋白酶在 pH 7.5、150 mM NaCl 和 10 mM 磷酸钾缓冲液中, 37°C 下消化一个小时。消化液包含来自于人血清的 10-10² U/ml 的纤溶酶(Calbiochem, San Diego, CA)。在加入 VEGF-D-FULL-N-FLAG 之前, α 2-抗纤溶酶(Calbiochem)与纤溶酶在 PBS 中室温条件下孵育 30 分钟, 在 37°C 消化 1 小时。然后用含有 0.5- 50 kU/ml 酶的组织纤溶酶原活化因子(Calbiochem)进行消化。近似闪烁检测包含纤溶酶(0.1 U/ml)、凝血酶(0.1 U/ml)、AMP-2 (5 mU/ml)或 MMP-9(9mU/ml)(Calbiochem)。

近似闪烁检测 (scintillation proximity assay): 用蛋白酶孵育后, 10⁴ cpm 标记的生物素化的肽在 pH 6.0、10 mM 磷酸钾缓冲液中同 200 mg

链霉抗生物素闪烁珠(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)相混合, 在 β -计数之前室温下反应 20 分钟。

蛋白印迹分析: SDS-PAGE 和转膜之后, 用生物素化的小鼠 VEGF-D 的 VHD 抗体以及 HRP 接合的链霉抗生物素抗体探查蛋白质, 并用化学荧光(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)进行显影。

氨基酸测序: 氨基酸 N 端序列用双相 NH₂-端蛋白质测序仪(Model G1005A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA)进行分析。

质谱分析: 将肽用 μ C₁₈ ZipTips (Millipore, Bedford, MA)除去盐分, 然后与含有 2, 5-二羟苯甲酸基质(Agilent Technologies)的 0.1% TFA/60%氰化甲烷共同结晶于 10 × 10 MALDI 不锈钢盘(Applied Biosystems, Foster City, CA)上, 并干燥 10min。在 o-MALDI QStar™ Pulsar 质谱计(Applied Biosystems)上分析样本, 每分钟收集 700-3000 Da 的阳性 TOF MS。

受体结合和交叉连接的测定: 同 VEGF-D- FULL-N-FLAG 以及可溶性受体-Ig 融合蛋白的结合测定如先前所描述的进行, 即用 Ba/F3 和 750 ng/ml 的配体进行生物测定(Achen 等, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 548-553), 可溶性受体-Ig 融合蛋白包含人 VEGFR-2 或 VEGFR-3 的细胞外结构域以及人 IgG¹ 的 Fc 部分(分别来自 Y. Gunji, Haartman Institute 和 K. Pajusola, Biotechnology Institute, Helsinki)。

实施例 1: VEGF-D 处理的分析

为了确定活化 VEGF-D 的蛋白酶, 用近似闪烁检测(SPA)来监测 C 端前肽从 VHD 的剪切。此测定基于 C 端剪切是因为这种剪切只出现在 VEGF-D 的一个部位, 而 N 端前肽的剪切较为复杂, 有两个截然不同的部位(Stacker 等, 1999, *Biosynthesis of vascular endothelial*

growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers, *J. Biol. Chem.* 274 : 32127-32136)。为了这一测定，将跨 VEGF-D C-端剪切部位的一种 17 肽（包含人 VEGF-D 的 198-213 残基）的 N 端进行生物素化，C 端用放射性同位素进行标记（图 1a）。SPA 的原理在图 1b 进行了概述。将多肽用蛋白酶处理后，其结合到闪烁素饱和的链霉抗生物素接合的珠子上。当多肽是完整的时候，其 C 端放射性标记对闪烁物质的亲近可以充分的产生可见的光子。相反，当多肽出现剪切的时候，计数检测显著减少，这是因为放射性标记物不能有效地接近闪烁物质从而产生光子。

蛋白酶类的范围在此测定中进行了检验，包括纤溶酶、凝血酶以及基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)和 MMP-9。这些蛋白酶被选定是因为其涉及血管生成或肿瘤形成。MMP-2 和 MMP-9 对 SPA 检测中的计数无作用，而纤溶酶引起超过 90% 的信号减少，指示了肽的实质性剪切（图 1c）。凝血酶引起少量的信号减少。为了确定蛋白酶水解肽的部位，样本用质谱测定进行分析。如所预期的，未经消化的肽包含一个分子质量 2282.15 的单峰（图 1d，上部面板）。随后纤溶酶处理可观察到一个主要的分子质量 1267.68 的峰，与 Biotin-HPYSIIRR 相符合（图 1d，下部面板）。如在 293 EBNA 细胞中表达的 VEGF-D 所观察到的，这一分子种类是在肽的相同部位剪切的预期产物，例如 R205 和 S206 之间（图 1a）(Stacker 等, 1999, *J. Biol. Chem.* 274: 32127- 32136)。某种生成 Biotin-HPYSIIR（分子质量 1111.59）的可选择的剪切因子也可以检测到。

实施例 2: 纤溶酶处理 VEGF-D。

为了确定 VEGF-D 是否是纤溶酶作用的底物，将这种蛋白酶同全长人 VEGF-D(VEGF-D-FULL-N-FLAG)共同孵育，其中，全长人

VEGF-D 从转染 293EBNA 细胞的培养基中纯化。一定程度的蛋白水解出现在这些细胞的培养基中，产生含有全长材料(约 50 kDa)的 VEGF-D 标本，以及包含 N 端前肽和 VHD 的部分处理过的形态(~ 31 kDa) (图 2a) (StackerR, S. A. , K. Stenvers, C. Caesear, A. Vitali, T. Domagala, E. Nice, S. Roufallo, R. J. Simpson, R. Moritz, T. Karpanen, K. Alitalo 和 M. G Achen. 1999. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J. Biol. Chem.* 274: 32127-32136)。纤溶酶消化后，用蛋白印迹可检测到一条约 21kDa 的条带 (图 2a)。这一种类与先前观察到的成熟的全部处理过的 VEGF-D 形态相符合，表明纤溶酶可以将 N 端和 C 端前肽从 VHD 分离。THIS-21 kDa 的 N 端氨基酸序列分析显示了两种序列：FAATFYDIE 和 VIDE E，表明 N 端前肽的剪切发生在两个部位。FAATF (VEGF-D 的 89-93 残基) 代表完全处理过的、成熟 VEGF-D 主要形态的 N 端序列，这种 VEGF-D 从 293EBNA 细胞条件培养基中纯化而来。VIDEE (VEGF-D 的 101-105 残基) 代表 N 端，此 N 端定位于朝向 C 端的一个残基，与 293EBNA 细胞培养基中检测到的成熟 VEGF-D(KVIDEE)其它形态相比较而言(Stacker, S. A. , K. Stenvers, C. Caesar, A. Vitali, T. Domagala, E. Nice, S. Roufail, R. J. Simpson, R. Moritz, T. Karpanen, K. Alitalo 和 M. G. Achen. 1999. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J. Biol. Chem.* 274: 32127-32136)。因此，纤溶酶将 N 端前肽从 VHD 的基本相同的部位剪切下来，这些部位在先前已得以描述。与纤溶酶相反，丝氨酸蛋白酶凝血因子和组织纤溶酶原活化因子不能将人 VEGF-D 前肽从 VHD 剪切下来 (未给出数据)。

本研究中使用的纤溶酶是从人血浆中纯化而来。为了去除因纤溶酶标本污染而导致的 VEGF-D 处理的可能性, α 2-抗纤溶酶, 一种能够同纤溶酶 1:1 复合产生灭活的特异性抑制剂(Collen 等, 1991, *Blood* 78: 3114-3124), 在 VEGF-D 消化之前与纤溶酶样本共同孵育。当纤溶酶的量超过 5 倍摩尔量时, 对消化产物的分析证明消化受 α 2-抗纤溶酶的完全抑制(图 2b)。因此, 观察到的纤溶酶样本对 VEGF-D 的蛋白水解作用归因于纤溶酶。

全长小鼠 VEGF-D 有两个亚型(同型异构体): VEGF-D₃₂₆ 和 VEGF-D₃₅₈, 它们在蛋白的 C 端存在差异(Baldwin 等, 2001, *J. Biol. Chem.* 276: 44307-44314)。为了分析不同 C 端对蛋白水解的作用, 用纤溶酶对小鼠 VEGF-D 亚型进行消化。两种亚型的纤溶酶处理产生含 VHD 的约 21 kDa 的成分, 表明该酶可完全处理这两种亚型(图 2c)。

实施例 3: 纤溶酶产生生物活性的 VEGF-D 和 VEGF-C。

为了确定是否由纤溶酶产生的成熟 VEGF-D 结合 VEGFR-2 和 VEGFR-3, 我们利用可溶性受体-Ig 融合蛋白进行免疫沉淀研究, 此融合蛋白含有 VEGFR-2 或 VEGFR-3 的细胞外结构域(图 3a)。这一研究揭示了由纤溶酶产生的成熟形态与 VEGFR-2 和 VEGFR-3 的细胞外结构域相结合。

为了比较全长和由纤溶酶产生的成熟 VEGF-D 在细胞表面结合以及交联受体的能力, 利用 Ba/F3 和前 B(pre-B)细胞进行生物测定, 这些细胞表达嵌合受体, 包括人 VEGFR-2 或 VEGFR-3 的细胞外结构域, 以及促红细胞生成素受体(EpoR)的跨膜和细胞质内结构域(Stacker 等, 1999, A Mutant form of vascular endothelial growth factor (VEGF) that lacks VEGF receptor-2 activation retains the ability to induce vascular permeability, *J. Biol. Chem.* 274: 34884-34892; Achen 等,

2000, Monoclonal antibodies to vascular endothelial growth factor-D block interactions with both VEGF receptor-2 and VEGF receptor-3, *Eur. J. Biochem.* 267: 2505-2515)。这些细胞系是 IL-3 依赖性的, 然而, 从 EpoR 细胞质结构域发出的信号可以在缺乏 IL-3 的情况下使细胞生存和增殖, 此信号在嵌合受体的细胞外结构域由配体进行交联时出现。这些生物测定对结合以及交联的受体进行比较, 并且用来说明 VEGFR-2 和 VEGFR-3 配体的受体间相互作用(Achen 等,1998, Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk-1) and VEGF receptor 3 (Flt-4), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 548-553 ; Stacker 等,1999, A mutant form of vascular endothelial growth factor (VEGF) that lacks VEGF receptor-2 activation retains the ability to induce vascular permeability, *J. Biol. Chem.* 274: 34884-34892; Achen 等,2000, Monoclonal antibodies to vascular endothelial growth factor- D block interactions with both VEGF receptor-2 and VEGF receptor-3, *Eur. J. Biochem.* 267: 2505- 2515; Wise 等,1999, Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3071-3076)。在缺乏 IL-3 的情况下, 细胞同未经消化的或者纤溶酶消化的 VEGF-D 进行孵育, 通过整合³H]胸腺嘧啶脱氧核苷入 DNA 来评估增生性应答。表达 VEGFR-2 或者 VEGFR-3 嵌合受体的细胞暴露于纤溶酶消化的 VEGF-D, 较那些未经消化的蛋白处理的细胞而言, 呈现出更大的应答(图 3b)。因此, 对比全长的 VEGF-D, 纤溶酶处理而产生的成熟 VEGF-D 形态更能够在细胞表面结合和交联 VEGFR-2 以及 VEGFR-3。在 VEGF-C 观察到的可比较性的结果(图 3c), 表明纤溶酶活化两种已知的淋巴管生成性生长因子。

实施例 4: 纤溶酶释放成熟 VEGF-D

质粒 pEFBOS-SS-Myc-VEGF-D358-FLAG 编码全长小鼠

VEGF-D₃₅₈, 在 N 端用两个 Myc 抗原决定簇进行标记, 在 C 端用 FLAG 八肽 (octapeptide) 进行标记(Baldwin 等, *J. Biol. Chem.*, 47: 44307-44314, 2001), 根据厂家说明书, 该质粒利用 Fugene 来短暂转染 293EBNA 细胞。利用抗标记性单克隆抗体 M2(Sigma), 用亲和性色谱法从细胞条件培养基中纯化小鼠 VEGF-D₃₅₈。纯化的小鼠 VEGF-D (100 ng) 在 37°C、10 mM 磷酸钾、150 mM NaCl、pH7.5 条件下与 0、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 单位的纤溶酶(Calbiochem)孵育 1 小时。作为对照, 小鼠 VEGF-D 在 37°C 与 0、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 单位的凝血酶(Calbiochem)孵育 1 小时。

利用抗 VEGF-D 中的 VHD 的生物素化抗体(R & D Systems)以及链霉抗生物素-辣根过氧化物酶接合物(Zymed), 将因此而产生的物质进行蛋白印迹分析。图 4 显示了蛋白印迹分析的结果。对照样本中的大量条带 (即未与蛋白酶孵育的样本; 条带 C) 在先前已经得以识别 (Stacker 等, *J. Biol. Chem.* 274: 32127-32136, 1999) 并描述如下: 56 kDa 条带是全长 VEGF-D, 48 kDa 条带包括结合到 C 端前肽的 VHD, 33 kDa 条带是结合到 N 端前肽的 VHD, 21 kDa 条带是成熟 VEGF-D 的亚单位。与纤溶酶孵育完全改变了这些种类的相关丰富程度。当同 1×10^{-4} 单位纤溶酶孵育时, 除了成熟形态的 VEGF-D, 其他所有均检测不到, 而成熟形态(21 kDa)则显著地提高 (图 4, 纤溶酶条带 10^{-4})。

这表明纤溶酶蛋白水解性将 VHD 从全长物质以及部分处理过的形态中释放出来。与 1×10^{-4} 单位处理的结果相比较, 这种效应是剂量依赖性的, 即随着纤溶酶浓度的降低, VHD 变的越来越少, 而其它种类则不断增多 (图 1, 纤溶酶条带 10^{-5} - 10^{-7})。相反, 凝血酶的

效用充其量只是边缘性的，即使在其最高浓度时（图 1，凝血酶条带 10^{-4} - 10^{-7} ）。这些结果证明纤溶酶活化 VEGF-D，可以将成熟 VEGF-D 从未经处理的和部分处理的形态中释放出来。

实施例 5: VEGF-D 作用的抑制剂的鉴别

为了确立一种方法来筛选 VEGF-D 作用的抑制剂，我们利用近似闪烁检测法("SPA")来检测 VEGF-D 的 C 端前肽从 VHD 的剪切。具有以下氨基酸序列的某种肽类用标准方法进行合成，包含在 N 端的生物素部分 (bio)：

bio-His-Pro-Tyr-Ser-Ile-Ile-Arg-Arg-Ser-Ile-Gln-Ile-Pro-Glu-Glu-Asp-Cys (SEQ ID NO: 1)

这种肽的 1-16 残基与人 VEGF-D 的 198-213 残基相应(Achen 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 548-553,1998)，并且 VHD 从 C 端前肽的分离在此肽序列的 C 端精氨酸后立即出现(Stacker 等, *J. Biol. Chem.* 274: 32127-32136,1999)。通过同乙基马来酰亚胺(N-[ethyl-1, 2-³H], Perkin Elmer)作用在 C 端放射性标记此肽(Brown 等, *Anal. Biochem.* 217: 139-147,1994)。

放射性标记的肽同纤溶酶(0.001、0.005、0.01 单位)(Calbiochem)或凝血酶(0.001、0.005、0.01 单位)(Calbiochem)在 10 mM 磷酸钾、150 mM NaCl、pH7.5 条件下，在全容量为 10 μ l 的 eppendorf 管于 37°C 孵育 1 小时。随后产物同链霉抗生物素接合的闪烁珠(Amersham Pharmacia)在 eppendorf 管中孵育 20 分钟，转移到 Unifilter 96 孔板中进行完全反应，并用 Topcount NXT 微孔板闪烁计数器(Packard)计数。

SPA 的理论基础是肽的 C 端的放射性标记仅仅能被 β -计数检测到，如果其与闪烁珠中的闪烁物质有非常紧密的亲力的话。反过来，

这又只出现在如果肽在闪烁珠上结合到链霉抗生物素部分(经由肽 N 端生物素化部分), 以及如果肽仍然是完整的(即如果 C 端放射性标记还未因蛋白水解而从 N 端生物素化部分上分离)。相反, 肽的蛋白水解剪切使得 C 端放射性标记对闪烁珠中的闪烁物质并不足够亲密到能够被 β -计数所检测到。

总之, 肽的蛋白水解剪切使 VEGF-D 的 VHD 从 C 端前肽上分离, 而导致计数检测的显著降低。在不同量的纤溶酶或凝血酶条件下进行的测试结果显示在表 1。结果表明, 在所有测试浓度下, 纤溶酶剪切放射标记的肽, 如同计数检测之减少所指示的, 而凝血酶则不可以。这些结果与前面讨论过的蛋白印迹中所观察到相一致。

本文中描述的 SPA 将来可被用于进行大范围的抑制剂的筛选, 这些抑制剂是指抑制 VEGF-D 的 VHD 从 C 端前肽分离。例如, 一些与筛选方法相关的抑制剂可以是小分子、抗体或者肽模拟物。这种试验或者方法可以用于鉴别纤溶酶抑制剂或者任何其它蛋白酶的抑制剂, 这些蛋白酶能够执行这种剪切。

尽管最初的 SPA 是利用 C 端前肽的剪切来完成, 然而, 这种方法和检测系统可以稍微修改, 并且也可以用来鉴别 VHD 从 VEGF-D N 端前肽剪切的抑制剂。此外, 这些方法也可以用于 VEGF 家族的其它成员, 如 VEGF-C。

表 1 显示了近似闪烁检测的结果, 此检测用于 VHD 和 VEGF-D 的 C 端前肽结合部位的蛋白水解。

表 1

酶	无	纤溶酶 (单位)			凝血酶(单位)		
		0.001	0.005	0.01	0.001	0.005	0.01
次数/分钟	9367	414	217	118	8331	8984	8924

实施例 6: VEGF-C 的纤溶酶活化

VEGFR-2 和 VEGFR-3 的结合和交联的生物检测在白介素-3(IL-3) 依赖的 Ba/F3 前 B 细胞系中进行 (参见国际申请 PCT/US95/16755 和 PCT/US97/14696; Achen 等(2000), *Eur. J. Biochem.* 267,2505- 2515; Stacker 等 (1999), *J. Biol. Chem.* 274: 34884-34892)。在缺乏 IL-3 的情况下, Ba/F3 细胞在 48h 内就会死亡。来源于 Ba/F3 的细胞系表达嵌合受体, 包含 VEGFR-2 或 VEGFR-3 的细胞外结构域, 以及促红细胞生成素受体 (EpoR) 的跨膜和细胞质内结构域。嵌合受体的细胞外结构域通过嵌合配体来交联, 从而经由细胞质 EpoR 结构域产生信号, 导致细胞存活和扩增。因此, 在没有 IL-3 的情况下, VEGFR-2 和 VEGFR-3 配体的活化可以促进这些细胞系的存活。

N 端用 FLAG 八肽标记的人重组全长 VEGF-C, 利用抗-FLAG 亲和色谱法将其从 293EBNA 细胞的培养液中纯化出来, 这发生在短暂的转染质粒 pEFBOS-S- FLAG-hVEGF-C-Full 之后, 该质粒为 pEFBOS-S-FLAG 的衍生物(Stacker 等 (1999), *J. Biol. Chem.* 274: 32127-32136), 其中 FLAG 标记的全长人 VEGF-C 的编码区域在延伸因子-1 的控制之下, 该因子是一种基因增强剂。VEGF-C 在 37°C、PBS 中用来自于人血清(IXLO-3U, Calbiochem)的纤溶酶消化 1 小时。

表达 VEGFR-2/EpoR 或 VEGFR-3/EpoR 嵌合受体的 BA/F3 细胞在 PBS 中洗涤三次, 在缺乏 IL-3 的介质中洗涤一次, 并在缺乏 IL-3

的介质中以 7.4×10^4 cells/ml 的浓度进行重悬。大约 10,000 个细胞 (135 μ l) 加到 96 孔细胞培养板的每孔中。每一孔再加入 250 ng 未消化的全长 VEGF-C 或者 250 ng 纤溶酶消化的 VEGF-C, 或者含有 15 μ l 无 IL-3 的介质的空白对照。在 37°C, 10% CO₂ 环境中孵育 48 小时后, 每孔中加入 1 μ Ci [³H]胸腺嘧啶脱氧核苷并孵育 4 小时。然后收集细胞, 并用闪烁计数评估其生存能力。

结果显示在图 5。纤溶酶消化的 VEGF-C 导致 VEGFR-2/EpoR 和 VEGFR-3/EpoR 系的扩增均显著增高, 因此, 纤溶酶活化 VEGF-C。

实施例 7: 利用抗 VEGF-D 的抗体和/或抗 VEGF-C 的抗体来抑制纤溶酶对 VEGF-D 和/或 VEGF-C 的活化

利用标准方法产生全长或部分 VEGF-D 蛋白的抗体。初步的检测表明这些抗体阻止纤溶酶和 VEGF-D 蛋白的相互作用。用全长或部分 VEGF-C 的抗体可以重复这一结果。

实施例 8: 药物组合物和诊断试剂盒

纤溶酶和/或其它活性蛋白酶的抑制剂同合适的辅助剂结合形成药学上可接受的形态。“患者”包括人和其它哺乳动物。抑制剂包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、前述抗体的片段以及其它可以抑制血管内皮生长因子途径的分子。

本发明也包括诊断试剂盒, 其包括含至少一种可用于筛选检验的商业手段, 该手段将纤溶酶或其它活性蛋白酶或其抑制剂整合其中。

上面的描述及实例只是阐述本发明, 而不是加以限制。本领域的熟练人员, 完全可以根据此处所公开的内容, 对本发明进行相应的改变, 因此, 本发明的保护范围应理解为权利要求及其等同变化。

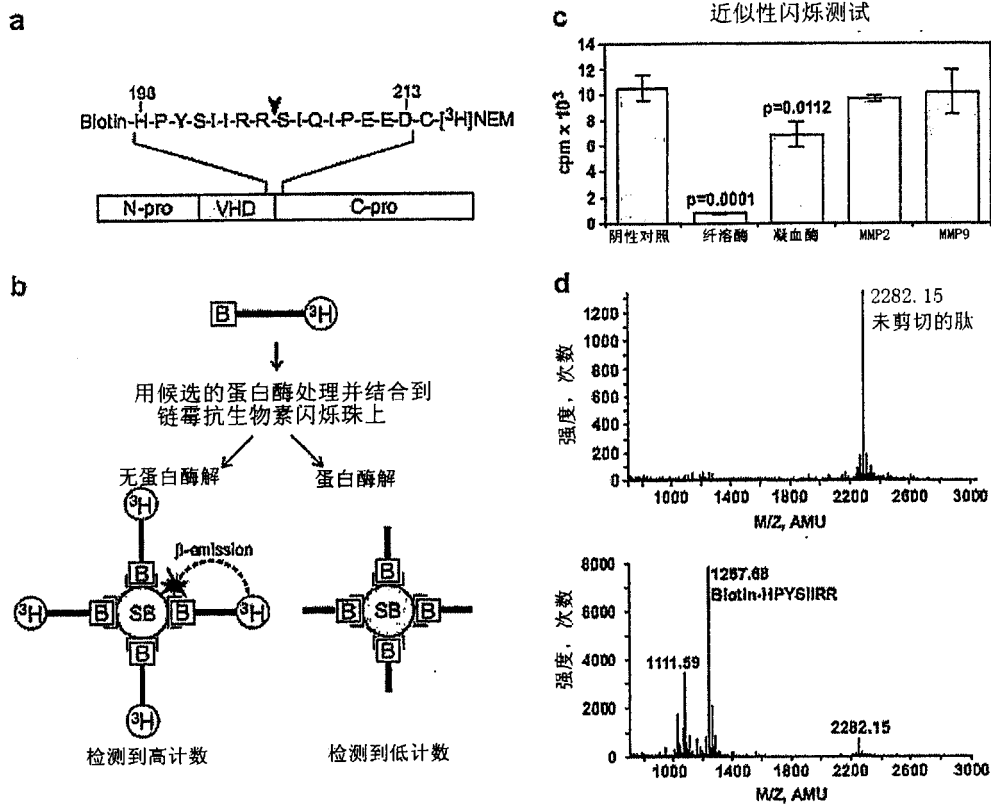


图1

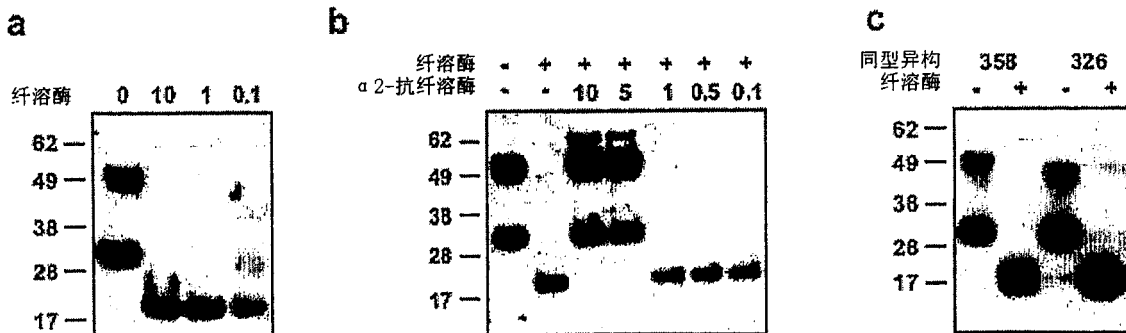


图2

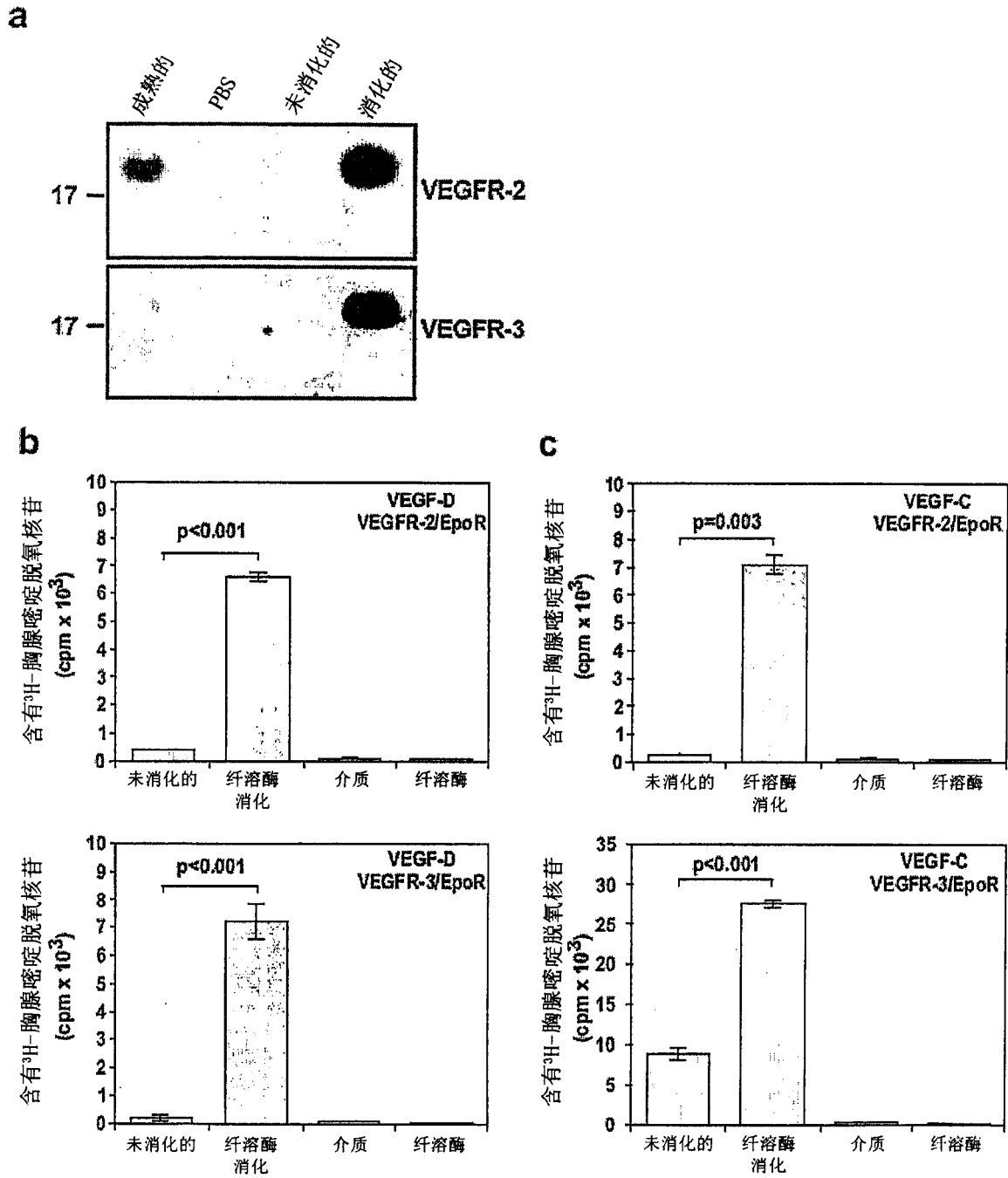


图3

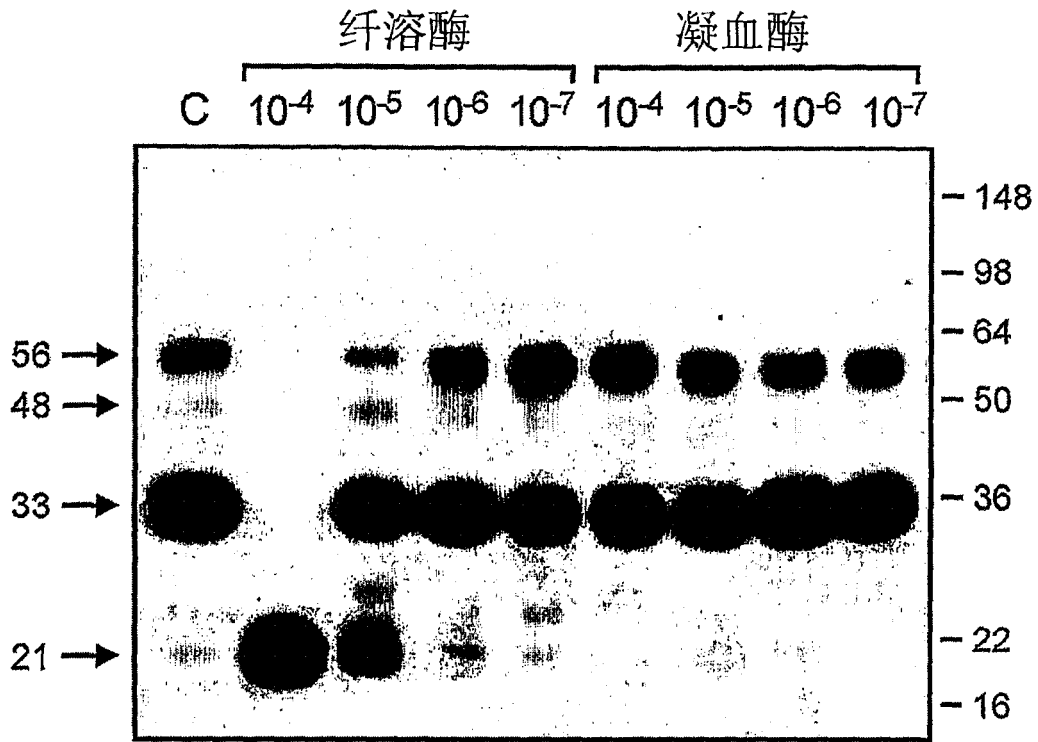


图4

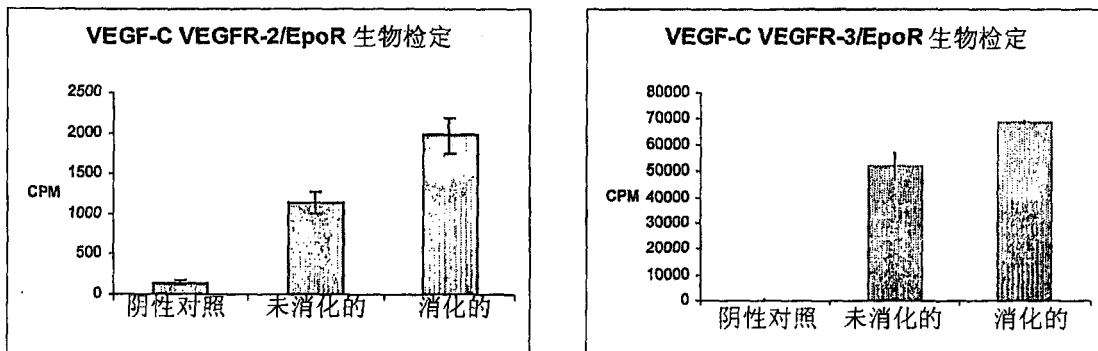


图5

专利名称(译)	活化或抑制VEGF - D和VEGF - C的方法和组合物		
公开(公告)号	CN1684706A	公开(公告)日	2005-10-19
申请号	CN03822590.5	申请日	2003-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究所		
当前申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究所		
[标]发明人	布拉德利麦考尔 梅根鲍德温 史蒂芬斯达克 马克阿亨		
发明人	布拉德利·麦考尔 梅根·鲍德温 史蒂芬·斯达克 马克·阿亨		
IPC分类号	A61K38/48 C07K16/22 C12Q1/37 G01N33/53 A61K38/43 A61K38/49 A61K38/55 A61K39/395 C12Q1/25 C12S3/00		
CPC分类号	A61K38/484 A61K2039/505 C07K16/22 C12Q1/37 G01N2333/475 G01N2333/71 G01N2333/96433 G01N2500/02 G01N2500/04 A61P19/00 A61P21/00		
优先权	60/397580 2002-07-23 US 60/445234 2003-02-06 US 60/485741 2003-07-10 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了用纤溶酶活化血管内皮生长因子VEGF - C或VEGF - D的方法和相应的治疗方法，该治疗方法包括给予患者含纤溶酶的药物组合物。本发明还公开了筛选血管内皮生长因子纤溶酶活化抑制剂的方法和相应的治疗方法，该治疗方法包括是通过抑制VEGF - C/D纤溶酶活化实现的。另外，本发明还进一步公开了筛选其它的VEGF - C/D活化蛋白酶和该抑制活化的抑制剂的方法。同时，本发明还公开了纤溶酶活性抑制剂和用该抑制剂处理患者的方法。