



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103561761 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 05

(21) 申请号 201280024596. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 03. 22

A61K 39/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006. 01)

61/466, 791 2011. 03. 23 US

A61K 38/18 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 11. 20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/030204 2012. 03. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/129448 EN 2012. 09. 27

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 沃伦·肖恩·卡伯尼尔

马尼什·库马尔·阿吉

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 李平 郑霞

权利要求书2页 说明书16页

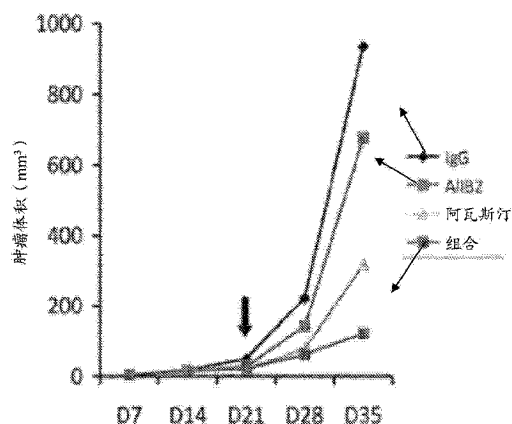
序列表4页 附图8页

(54) 发明名称

用于使用抗-整合素改善抗血管生成疗法的方法和组合物

(57) 摘要

本文描述了用于治疗肿瘤和转移的方法和组合物,其改善了抗-血管生成疗法。通过用抗- $\beta 1$ 整合素组合物和抗-血管生成组合物组合抑制生物系统中的这些机制,肿瘤和转移可以被剥夺充足的血液供给,从而导致肿瘤细胞生长停滞和可能的消退,包括肿瘤细胞死亡。在一种药物组合物或多种药物组合物中,本组合物包含抗- $\beta 1$ 整合素剂与抗-VEGF剂的组合。还描述了治疗方法和成像方法。



1. 一种药物组合物,所述药物组合物用于抑制肿瘤细胞生长,所述药物组合物包含为血管内皮生长因子(“VEGF”)的抑制剂的第一剂;和
阻断 β -1 整合素结合的第二剂的组合,据此所述组合抑制肿瘤细胞生长至比单独的所述第一剂或所述第二剂更大的程度。
2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述 VEGF 的抑制剂是结合 VEGF 的抗体。
3. 根据权利要求 2 所述的组合物,其中所述抗体是人源化的小鼠抗体。
4. 根据权利要求 1、2 或 3 所述的组合物,其中所述第二剂是与 β -1 整合素结合的多肽。
5. 根据权利要求 4 所述的组合物,其中所述多肽与缔合任何 α 亚基的 β -1 整合素结合并抑制肿瘤细胞与细胞外基底物质的结合。
6. 根据权利要求 4 所述的组合物,其中所述多肽是 β -1 整合素特异性抗体。
7. 根据权利要求 6 所述的组合物,其中所述 β -1 整合素特异性抗体是嵌合、单链或人源化抗体。
8. 根据权利要求 7 所述的组合物,其中所述抗体是 AIIB2、BIE11 或源自 AIIB2 或 BIE11 的人源化抗体。
9. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一剂和所述第二剂由具有识别 VEGF 的一个结合位点和识别 β 1 整合素的一个结合位点的二价抗体提供。
10. 一种用于抑制肿瘤细胞生长的方法,所述方法包括向患有所述肿瘤的受试者施用以下物质的步骤:
为抗血管生成剂的第一剂;和
阻断由 β -1 整合素介导的肿瘤细胞结合的第二剂的组合,据此肿瘤细胞生长被抑制至比单独的所述第一剂或所述第二剂引起的抑制更大的程度。
11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述抗血管生成剂是结合 VEGF 的抗体。
12. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述抗血管生成剂选自以下组成的组:人源化的小鼠单克隆抗体和完全人抗体。
13. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述第二剂是与 β -1 整合素结合的多肽。
14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中所述多肽与缔合任何 α 亚基的 β -1 整合素结合。
15. 根据权利要求 13 所述的方法,其中所述多肽是分离的 β -1 整合素特异性抗体。
16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述抗体是嵌合、单链或人源化抗体。
17. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述抗体是 AIIB2、BIE11 或其人源化的衍生物。
18. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述肿瘤选自以下组成的组:胶质母细胞瘤、结直肠癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、肾癌、结肠癌、黑色素瘤和淋巴瘤。
19. 一种治疗神经上皮组织的肿瘤的方法,所述方法包括将所述肿瘤与 β -1 整合素结合抑制剂接触的步骤。
20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述抑制剂是与缔合任何 α 亚基的 β -1 整合素结合的抗体。
21. 一种用于成像肿瘤的方法,所述方法包括:
向患有所述肿瘤的受试者施用与 VEGF 结合的第一剂;和阻断由 β -1 整合素介导的肿

瘤细胞结合的第二剂的组合,其中所述第一剂和所述第二剂的一种或两种被标记。

22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述第二剂是与 β -1 整合素结合的嵌合、单链或人源化抗体。

23. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述肿瘤选自以下组成的组:胶质母细胞瘤、结直肠癌、肺癌、肾癌、肝癌、卵巢癌和乳腺癌。

24. 一种用于抑制肿瘤细胞生长的方法,所述方法包括向所述细胞递送干扰编码 β -1 整合素的基因的表达的核酸构建体的步骤。

25. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述构建体是编码与 β -1 整合素 mRNA 结合以沉默 β 1 整合素基因表达的 shRNA 的慢病毒载体。

26. 一种治疗患有肿瘤的患者,所述患者具有失败的抗-VEGF 抗体治疗,所述方法包括向所述患者施用抗-整合素剂的步骤。

27. 一种用于治疗患有复发性多形性胶质母细胞瘤(GBM)的患者的药盒,所述药盒包含:

(a) 用于瘤内放置在切除的腔内或硬膜下放置的导管;和

(b) 抑制性抗- β 1 整合素组合物,所述组合物被配制用于通过对流增强的递送(CED)装置以临床相关的剂量和频率通过所述导管施用。

28. 一种用于抑制肿瘤细胞生长的方法,所述方法包括向患有所述肿瘤的受试者施用以下物质的步骤:

为抗血管生成剂的低剂量第一剂;和

阻断由 β -1 整合素介导的肿瘤细胞结合的第二剂的组合,据此肿瘤细胞生长被抑制至与由所述第一剂以更高的临床剂量引起的等量的量。

用于使用抗 - 整合素改善抗血管生成疗法的方法和组合物

[0001] 发明人 :Warren Shawn Carbone11 和 Manish Aghi

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求 2011 年 3 月 23 日提交的美国临时专利申请号 61/466, 791 的优先权, 其在此通过引用整体被并入。

[0004] 政府支持的声明

[0005] 无

[0006] 序列表、计算机程序或光盘的引用

[0007] 本申请包含已通过 EFS-Web 以 ASCII 格式提交的序列表并在此通过引用整体被并入。所述 ASCII 拷贝, 于 2012 年 1 月 31 日创建, 被命名为“479-100Sequence Listing.txt”且大小为 5, 287 字节。

[0008] 发明背景

发明领域

[0009] 本发明涉及用于癌症包括转移癌的治疗组合物和疗法、特别是针对肿瘤血管化的疗法的领域。

[0010] 相关技术

[0011] 下面呈现了关于本发明某些方面的背景信息, 尽管它们可能涉及详述中提及的技术特征, 但不必然地被详细描述。即, 本发明所使用的单独的部分或方法可在下面所讨论的材料中被更详细地描述, 这些材料可向本领域技术人员提供用于制造或使用如所要求保护的本发明的某些方面的进一步的指导。下面的讨论不应被解释为承认信息与本文任何权利要求的相关性或所描述的材料现有技术效果。

[0012] 已鉴定许多分子为具有血管生成的特征。然而, 迄今为止被鉴定最有效的是血管内皮生长因子 -A (VEGF-A)。这是药物贝伐单抗(又名, 阿瓦斯汀® Genentech, South San Francisco, CA) 的靶标, 其已在患有包括结肠和直肠 [Hurwitz 等人, New England Journal of Medicine350:2335-2342(2004)]、乳腺 [Miller 等人, New England Journal of Medicine357:2666-2676(2007)]、肺 [Sandler 等人, New England Journal of Medicine355:2542-2550(2006)]、肾 [Escudier 等人, The Lancet370:2103-2111(2007)] 和 脑 [Friedman 等人, Journal of Clinical Oncology, doi:10.1200/JCO.2008.19.8721(2009)] 的各种晚期 - 阶段的癌症的患者中显示临床前景。与 VEGF-A 本身不同, 被设计抗 VEGF-A 受体的药物也已在最近的临床试验中显示相似的前景。

[0013] 雷珠单抗® (兰尼单抗) 也是重组的人源化抗 -VEGF 抗体。兰尼单抗与多种 VEGF-A 亚型结合。作为抗体片段, 兰尼单抗被设计为具有 48kD 分子量的小分子。它被包装用于玻璃体内使用, 而非静脉内或瘤内使用。

[0014] VEGF-A 是血管生长因子家族的最具特征的并可能是最有效的成员 [Ferrara 和 Gerber, Acta Haematologica106:148-156(2002)]。目前, 其他成员包括 VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F 和 PlGF。这些因子通过至少三个已知的受体酪氨酸激酶 :VEGFR1、

VEGFR2 和 VEGFR3 传递信号。

[0015] 不幸地,抗-血管生成假说的预测迄今为止还没有在临床中实现 [Greenberg 和 Cheresch, Expert Opinion on Biological Therapy 9:1347-1356 (2009)]。贝伐单抗治疗和化疗结合最多导致存活延长仅 4.7 个月的中值 [Hurwitz 等人, New England Journal of Medicine 350:2335-2342 (2004)]。患者最终死于持续的癌症发展。该耐药性机制是有争议的并可反映血管生成假说的无效或肿瘤细胞获取可替代的血管源的能力。

[0016] 本领域的治疗策略过分依赖于基于血管生成的肿瘤血管化的单一的概念。对抗-血管生成疗法的临床耐药性很可能是由于肿瘤细胞利用用于获得血管结构的可替代的方法。已描述了多种类型的肿瘤血管化过程,包括血管扩张、血管重塑、血管共选择 (co-option)、血管套叠 (vascular intussusception)、肾小球样血管形成、伪血管形成和循环内皮祖细胞 [在 Dome 等人, American Journal of Pathology 170:1-15 (2007) 中被综述]。

[0017] 本领域中一些策略已提出用于抑制肿瘤血管化的组合治疗策略。然而,这些策略仅靶向肿瘤血管化的血管生成方面或提出新的肿瘤血管的靶向血管破裂。迄今为止,现有技术中没有提供通过向生物系统施用靶向血管生成生长信号传导和基于粘附的共选择信号传导二者组合的化合物用于完全抑制肿瘤和 / 或转移血管化的治疗策略。

[0018] 具体的专利和出版物

[0019] Park 等人 (2009 年 11 月 17 日授权的美国 7,618,627, “Method of increasing radiation sensitivity by inhibition of beta-one integrin”) 使用抗- $\beta 1$ 整合素抗体 AIIB2 与电离辐射联合以促进肿瘤细胞凋亡。

[0020] Theodore Yednock [美国专利 6,033,665 (2000)] “Compositions and methods for modulating leukocyte adhesion to brain endothelial cells.” 这是已被 FDA 批准用于临床使用的导致抗-整合素治疗药物的首批专利之一 (抗 $\alpha 4-\beta 1$ 的 Tysabri® 用于治疗多发性硬化, Elan Pharmaceuticals, Inc.)。

[0021] Friess 等人 [美国专利申请 0050385A1 (2008)] 提出了用靶向血管生成相关的生长因子的抗-VEGF 抗体和抗-HER2 抗体二者的组合治疗。

[0022] Senger 等人 [美国专利 6,596,276 (2003)] 提出了施用抗 $\alpha 1$ 和 / 或 $\alpha 2$ 整合素亚基的抑制抗体以靶向 VEGF 介导的血管生成的这些下游效应子。

[0023] Bissell 等人 [美国专利 5,846,536 (1998) 和美国专利 6,123,941 (2000)] 公开了用于通过向需要此治疗的组织的 $\beta 1$ 整合素受体施用有效量的 $\beta 1$ 整合素功能-封闭抗体或整合素功能的肽抑制剂逆转组织中的恶性表型的方法。

[0024] 发明概述

[0025] 以下的概述并不预期包含本发明的所有特征和方面,也不暗示本发明必须包含该概述中所讨论的所有特征和方面。

[0026] 本发明总体上包含用于抑制肿瘤细胞生长的药物组合物,包括:为 VEGF 活性诸如 VEGF 信号传导和 / 或与 VEGF 受体结合的抑制剂的第一剂;和阻断 $\beta 1$ 整合素的第二剂。阻断 $\beta 1$ 整合素能够阻断细胞附着、阻断细胞附着后发生的 β -整合素细胞内信号传导或二者。所使用的剂是物质,诸如肽或小分子的组合物。它们可以是抗体或抗体-样分子。剂的组合具有协同效应,即,比单独的任一剂更有效。剂可以是单一组合物或匹配配对的组合

物。

[0027] 在某些方面,本发明包含用于抑制肿瘤细胞生长的方法。通常,本方法包括用于抑制肿瘤细胞生长的方法,包含向患有所述肿瘤的受试者施用以下物质的步骤:为抗-血管生成剂的第一剂;和阻断由 $\beta 1$ 整合素介导的肿瘤细胞与细胞外基质(extracellular matrix)相互作用和 $\beta 1$ 整合素信号传导的第二剂的组合,据此肿瘤细胞生长被抑制至比由单独的第一剂或第二剂所引起的抑制更大的程度,即,协同地抑制。优选的受试者是患有肿瘤的人受试者。

[0028] 在一个实施方案中,本方法包含施用抗- $\beta 1$ 整合素抗体与拮抗性抗-VEGF受体、抗-VEGF(例如抗-VEGF-A)抗体联合的剂量。下面进一步详细描述了多种抗-VEGF和抗-整合素剂。用于向患者递送被组合的抗体的方法将是临床肿瘤学领域中具有普通医疗、护理或类似医疗保健技能的人员众所周知的。可通过任何临床手段、特别是肠胃外或瘤内注射施用本组合物。还可在手术切除之后将本组合物直接施加至机体内的实际的或潜在腔,包括肿瘤床。也可以以临床上适当的间隔施用提高血管通透性的剂。这些可增强某些器官诸如中枢神经系统(CNS)中治疗物质的递送。另外,可在包括放疗和化疗的治疗之前、期间或之后给予辅助治疗方案。可提供实施方案的重复施用以获得期望的临床效果。

[0029] 附图简述

[0030] 图1A、1B和1C分别是显示响应急性低氧损害的U87MG神经胶质瘤细胞(1A)、MDA-MB-231乳腺癌细胞(1B)和SW1080结直肠癌细胞(1)的 $\beta 1$ 整合素(MFI)的增加的一系列的三张条形图。

[0031] 图2A和2B是显示具有(2A)和不具有(2B)贝伐单抗处理的处理下染色神经胶质瘤肿瘤异种移植物以确定整合素 $\beta 1$ 表达的一组照片。

[0032] 图3A是显示不同增殖条件的U87MG神经胶质瘤细胞中整合素 $\beta 1$ 表达的条形图;图3B是显示整合素 $\beta 1$ 表达和增殖之间相关性的散点图。

[0033] 图4A和4B是来自多形性胶质母细胞瘤的患者样本的一组照片,显示经染色以确定存在正常血管结构(4A)中和血管生成肾小球样血管(4B)处整合素 $\beta 1$ 表达的细胞。

[0034] 图5是在原代胶质母细胞瘤和抗血管生成逃避(evasive)胶质母细胞瘤的情况下绘制整合素 $\beta 1$ 表达的条形图。

[0035] 图6是显示由不同剂量的AIIB2对原代胶质母细胞瘤细胞系的细胞生长抑制和当AIIB2与低氧(1%氧气持续48小时)组合时对其的协同生长抑制的条形图。

[0036] 图7A和7B是显示三种不同的敲低细胞系的整合素 $\beta 1$ 表达(7A)和增殖(7B)的一组条形图,其中整合素 $\beta 1$ 敲低显示大体上较低的表达和增殖。

[0037] 图8是显示处于不同浓度的AIIB2时,抗血管生成耐受性胶质母细胞瘤细胞系中膜联蛋白和Ki67凋亡标志物的表达的条形图。

[0038] 图9是显示不同浓度的AIIB2抗体下原代GBM细胞系的细胞生长的条形图。

[0039] 图10是显示不同的抗体处理下小鼠肿瘤模型中肿瘤体积变化的图。标记“组合(combo)”的图是AIIB2和贝伐单抗的组合。箭头显示处理的开始。

[0040] 图11是显示用不同浓度的AIIB2处理超过2天的生长期和汇合培养(生长停滞)中GBM细胞的细胞生长随时间推移的条形图。IgG被用作对照。

[0041] 图12是显示经受持续2天的低氧、随后在常氧下生长的GBM细胞的细胞生长随时

间推移的条形图。给予细胞 IgG (对照) 和不同浓度的 AIIB2。

[0042] 图 13 是显示两周一次测量对照 IgG (10mg/kg) (菱形)、贝伐单抗 (10mg/kg) (正方形) 或贝伐单抗 (1mg/kg) 和 AIIB2 (1mg/kg) 的低剂量交替的组合疗法 (圆形) 情况下的 U87MG 神经胶质瘤肿瘤的肿瘤生长随时间推移的线性图。

[0043] 优选实施方案的详述

[0044] 定义

[0045] 除非另外定义, 本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域内普通技术人员所普遍理解的相同的含义。尽管与本文所描述的方法和材料相似或等同的任何方法和材料可被用于本发明的实施或检测, 描述了优选的方法和材料。通常, 使用与细胞和分子生物学和化学相关的术语及细胞和分子生物学和化学的技术是本领域众所周知的和普遍使用的术语和技术。没有具体定义的某些实验技术, 通常根据本领域众所周知的常规方法和如贯穿本说明书被引用和被讨论的多种一般的和更具体的参考文献中描述的被实施。为了清楚的目的, 下面定义了以下的术语。

[0046] “VEGF”指的是血管内皮生长因子, 还称为血管内皮生长因子 (vasoendothelial growth factor), 在 Genbank 登录号 AAA35789 中具有示例性的氨基酸序列, 在 Leung 等人 “Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen,” Science 246 (4935), 1306-1309 (1989) 中被进一步描述。VEGF 是与血小板衍生生长因子 (“PDGF”) 有关的二聚的、二硫键连接的 46-kDa 的糖蛋白。它由正常的细胞系和肿瘤细胞系产生; 是内皮细胞选择性有丝分裂原; 在体内检测体系 (例如, 兔角膜) 中显示血管生成活性; 是内皮细胞和单核细胞趋化的; 并在内皮细胞中诱导纤溶酶原激活物, 其参与毛细血管形成过程中的细胞外基质的蛋白水解的降解中。一些 VEGF 的亚型是已知的, 尽管它们显示可比的生物活性, 但其在分泌它们的细胞类型和它们的肝素结合能力方面存在不同。VEGF 的细胞受体 (VEGFR) 是跨膜受体酪氨酸激酶。它们通过具有 7 个免疫球蛋白 - 样的结构域和 1 个细胞内酪氨酸激酶结构域的胞外域被表征。已表征了不同类型的 VEGF 受体, 包括 VEGFR-1 (还称为 flt-1)、VEGFR-2 (还称为 KDR3) 和 VEGFR-3。大量的人类肿瘤, 特别是神经胶质瘤和癌, 表达高水平的 VEGF 和 VEGFR。这已导致了以下假说: 由肿瘤细胞释放的 VEGF 以旁分泌的方式刺激毛细血管的生长和肿瘤内皮的增殖并通过改善的血液供给加快肿瘤生长。

[0047] 术语 “VEGF 抑制剂”指的是减弱通过 VEGF-VEGFR 通路的信号传导的物质或方法。VEGF 抑制剂可以是, 例如, 小分子, 肽, 多肽, 蛋白、更具体地包括抗体、包括抗 -VEGF 抗体、抗 -VEGFR 抗体、胞内抗体、大抗体 (maxibody)、微抗体 (minibody)、双体, Fc 融合蛋白诸如肽抗体、受体抗体 (receptibody)、可溶性 VEGF 受体蛋白和片段和多种其他的。目前优选的 VEGF 抑制剂是肽, 诸如基于抗体的抑制剂。许多 VEGF 抑制剂通过与 VEGF 或与 VEGF 受体结合起作用。其他的则通过与结合至 VEGF 或结合至 VEGF 受体的因子或与 VEGF 信号传导通路中的其他组成部分结合较为间接地起作用。又其他的 VEGF 抑制剂通过改变调节 VEGF 通路信号传导的调节性翻译后修饰起作用。根据本发明的 VEGF 抑制剂还可通过较为间接的机制起作用。无论参与什么机制, 如本文所用的, 相对于在不存在抑制剂时处于相同环境中的 VEGF 信号传导通路的有效活性, VEGF 抑制剂减弱了给定环境中的 VEGF 信号传导通路的有效活性。另一种 VEGF 抑制剂是基于核酸的, 使用 RNAi 的抑制剂, 如下面所描述的。

[0048] 术语 “人源化”指的是为包含源自非 - 人免疫球蛋白的最少序列的嵌合抗体的

非-人(例如,啮齿动物)抗体的形式。大多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(受者抗体),其中,来自受者高变区的残基被来自非-人物种诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的具有期望的特异性、亲和性和能力的高变区(供体抗体)的残基所代替。在一些情况下,人免疫球蛋白的构架区(FR)残基被相应的非-人残基所代替。此外,人源化的抗体可包含受者抗体或供体抗体中没有发现的残基。做出这些修饰以进一步完善抗体性能。通常,人源化的抗体将包括至少一个且通常两个可变域的基本上所有,其中所有或基本上所有的高变环对应于非-人免疫球蛋白的高变环且所有或基本上所有的FR是人免疫球蛋白序列的FR。人源化的抗体任选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。关于进一步的详细信息,见 Jones 等人, Nature321:522-525(1986); Riechmann 等人, Nature332:323-329(1988); 和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)。

[0049] 术语“对流增强的递送(convection enhanced delivery)”指的是用于通过克服血脑屏障将药物递送至脑的方法。对流增强的递送由 R. Hunt Bobo 等人在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1994 年 3 月,第 91 卷,第 2076-2080 页;“Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain”)中首次描述。对流增强的递送包括通过颅骨钻孔将一些导管立体定向地放置入脑实质及后续治疗剂通过微量注射泵的注入。通过静脉内注射并穿过血脑屏障或通过脑室内注射的大部分药物的局部递送进入脑的标准方法依赖于扩散,其导致大部分剂的非均匀的分布。静脉内施用药物至脑被血脑屏障所阻碍,其阻止了大分子的通过。脑血屏障由血管内皮细胞之间的紧密连接所表征,其阻止或阻碍多种天然存在和合成的物质(包括抗癌药物)进入脑。不同于依赖于扩散的技术,对流增强的递送使用在注入导管的尖端所建立的压力梯度将药物推进细胞外间隙。目的是比通过单独的扩散施用更均匀地、以更高浓度地并经更大区域地分布药物。治疗剂的对流增强的递送可在使用肿瘤切除的开颅术之后进行。药物的对流增强的递送由 Yael Mardor 等人在 Cancer Research(2005 年 8 月,第 65 卷,第 6858-6863 页;“Convection-enhanced drug delivery:Increased efficacy and magnetic resonance image monitoring”)中详细描述。

[0050] 术语“人单克隆抗体”指的是基本上没有非-人(例如,小鼠)序列的抗体。它可以是完全人的或如本领域已知的通过去除除了抗体结合区之外的小鼠序列,Fv 部分或 CDR 区而人源化的。

[0051] 术语“抗体”还包括多种形式的经修饰的或经改变的抗体,诸如多种片段诸如 Fv 片段、仅包含轻链和重链可变区的 Fv 片段、由二硫键连接的 Fv 片段(Brinkmann 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:547-551(1993))、包含可变区和部分恒定区的 Fab 或 (Fab)’2 片段、单链抗体和类似的抗体(Bird 等人, Science242:424-426(1988); Huston 等人, Proc. Nat. Acad. Sci. USA85:5879-5883(1988))。抗体最初可以是动物的(特别是小鼠或大鼠)或人源的或可以是嵌合的(Morrison 等人, Proc Nat. Acad. Sci. USA81:6851-6855(1984))。它可如 Jones 等人, Nature321:522-525(1986) 和公布的 UK 专利申请 #8707252 中所描述的被人源化。

[0052] 术语“细胞外基底物质(extracellular substrate)”指的是用于细胞结合的物质,并可包含所定义的组织诸如血管结构(血管内皮细胞)或细胞外基质(ECM),即,除了执行多种其他重要功能之外通常向动物细胞提供结构支撑的动物组织的细胞外部分;它由纤

维蛋白和糖胺聚糖的交错的网构成。

[0053] 术语“shRNA”指的是短发夹 RNA。

[0054] 术语“RNAi”指的是 RNA 干扰。RNAi 是转录后、靶向基因沉默的技术,其使用双链 RNA(dsRNA)以降解包含与 dsRNA 相同序列的信使 RNA(mRNA)(Sharp, P. A. 和 Zamore, P. D. 287, 2431-2432(2000);Zamore, P. D. 等人, Cell 1101, 25-33(2000). Tuschl, T. 等人, Genes Dev. 13, 3191-3197(1999);Cottrell T R 和 Doering T L. 2003. Trends Microbiol. 11:37-43;Bushman F. 2003. Mol Therapy. 7:9-10;McManus M T 和 Sharp P A. 2002. Nat Rev Genet. 3:737-47)。当内源的核糖核酸酶将较长的 dsRNA 裂解为较短,例如, 21-核苷酸或 22-核苷酸-长的 RNA,称为小干扰 RNA 或 siRNA 时,发生该过程。随后,较小的 RNA 区段介导靶 mRNA 的降解。用于合成 RNAi 的试剂盒是例如从 New England Biolabs 或 Ambion 市售可得。在一个实施方案中,本文所描述的用于反义 RNA 的一种或多种化学品可在介导 RNAi 的分子中被采用。

[0055] 术语“药物组合物”指的是包含以指定量与药学上可接受的稀释剂、稳定剂、赋形剂等组合的所列举的治疗剂的产品或一组产品。术语“药学上可接受”指的是具有足够的纯度和质量用于制备本发明的药物组合物、药品或药剂,并当适当地施用至动物或人时不会产生不利的、过敏的或其他不良反应的分子实体和组合物。由于人类使用和兽医使用二者同样被包含在本发明的范围内,药学上可接受的制剂将包括用于人或兽医使用的药物组合物、药品或药剂。

[0056] 在本发明涉及方法、药物组合物的某些方面,可包含单一的剂,但根据本方法,在疗程中与其他剂一起被施用。

[0057] 一般方法和材料

[0058] 本文描述了用于治疗肿瘤和转移的改进的方法和组合物,其通过 1)血管的新生或重塑(即,血管生成)与 2)通过直接的粘附互作(即,共选择(co-option))利用现有血管的组合识别肿瘤血管化的双重机制。通过抑制生物系统中两种机制的组合,肿瘤和转移可被剥夺足够的血液供给,导致肿瘤细胞生长停滞和可能的消退,包括肿瘤细胞死亡。本方法在科学研究和医疗保健中具有多种用途,其中血管化是疾病过程特别是癌症中的促进因素。在另外的实施方案中,可通过同时或顺序地加强血管生成和粘附血管共选择二者实现用于组织修复或代替的血管化的增强。

[0059] 目前靶向 VEGF 通路的抗血管生成疗法是由 Genentech 的阿瓦斯汀®(贝伐单抗)带领下的具有 2009 年销售总额 61 亿美元的快速增长的市场。然而,阿瓦斯汀®仅显示中度的临床成功。其在结肠癌中最多增加 4.7 个月的总存活期且在脑癌(多形性胶质母细胞瘤, GBM)中最多增加 4.2 个月的无进展存活期。甚至更令人沮丧的是,如已在 UK 发生的, FDA 正考虑推翻他们关于在转移性乳腺癌中使用阿瓦斯汀®的批准。

[0060] 阿瓦斯汀®被认为通过阻止新血管形成(血管生成)发挥作用,因此使肿瘤细胞经受葡萄糖和氧的饥饿。尤其, β 1 整合素在肿瘤细胞中的氧缺乏(又名,低氧)过程中被上调。在取自具有失败的阿瓦斯汀®治疗的患者的 GBM 细胞中,与未处理的原代 GBM 细胞相比,该靶标被上调了 50x 至 200x。有趣的是,它在肿瘤细胞增殖过程中和 γ 辐照之后也被上调,表明了在有丝分裂和细胞存活中的双重角色。抑制该靶标还可在 ECM 支架(例如,间质和血管基底膜)上阻止肿瘤细胞的依赖整合素的入侵。

[0061] 本发明的一个方面包括在具有用抗-VEGF 抗体诸如阿瓦斯汀®(贝伐单抗)治疗失败的患者中使用抑制 $\beta 1$ 整合素的剂。如下面描述的,这已被体外和体内证明。短语“失败的抗 VEGF 抗体治疗”此处以其临床意义使用。贝伐单抗失败的临床定义为:1) 从开始就无响应(通常 70% 的患者)和 2) 初始响应之后面对治疗时疾病进展。对于进展存在多种客观的临床标准,但最常用的(并特别在贝伐单抗临床试验中所使用的)一个标准是 McDonald 标准。通常让任一组中的患者服用贝伐单抗并随后被再次手术(28 天之后,由于贝伐单抗使得你容易出血)并被服从于可能的三线治疗或临终关怀。因此,人们认为抗- $\beta 1$ 组合物能够作为用于具有失败的贝伐单抗的 3L GBM 的单一疗法。

[0062] 血管共选择

[0063] Holash 等人 (1999;Science284:1994-1998“vessel co-option, regression and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF”) 在小鼠神经胶质瘤模型中说明了最初通过共选择现有宿主血管而生长的一种亚类肿瘤。该共选择的宿主血管结构及时地显示了上调的 VEGF 和血管生成。本发明人的关于脑转移的研究已显示,已存在的血管的血管共选择或利用是在早期实验脑转移建立过程中和在反映疾病的早期阶段的人临床样本中由肿瘤细胞使用的血管的主要形式。该发现排除了在小集落形成之前对从头血管生成的要求。CNS 实质很大程度上缺少对于上皮细胞和癌细胞粘附和存活必需的非-血管间质基底膜成分。血管共选择,因此,为非神经癌细胞的恶性生长供给基底物质,其在神经纤维网中不是以其他方式广泛可得的。当粘附至基底膜基质时,高度加强了转移瘤细胞的增殖并通过体外抑制 MEK 被减弱。与组织培养中的实验一致,在体内集落形成的早期阶段,发现绝大多数微转移与现有脑血管的 VBM 直接接触且这些细胞中的许多是增殖的。因此,血管基底膜(VBM)被表明是用于脑中肿瘤细胞生长的活性物质。VBM 促进恶性细胞的粘附和入侵并在任何明显的血管生成之前足够用于肿瘤生长。

[0064] 血管共选择中 $\beta 1$ 整合素的作用

[0065] 发现肿瘤细胞粘附至血管的血管基底膜是由 $\beta 1$ 整合素介导的。肿瘤细胞中 $\beta 1$ 整合素亚基的阻断或丢失阻止了与血管基底膜的粘附并减弱了转移形成和体内生长。脑中的转移癌细胞在转移期间对粘附和入侵中的血管结构需求可能更类似于在胰岛的形成期间对 VBM 的需求。胰岛细胞使用 $\beta 1$ 整合素与 VBM 相互作用且该互作对于增殖和内分泌功能是必需的。Nikolova 等人把该基底膜微环境叫作“血管微生态”(Nikolova 等人,2006;Dev Cell10:397-405;“The vascular basement membrane:a niche for insulin gene expression and beta cell proliferation”)。相似地,血管壁细胞需要 $\beta 1$ 整合素亚基用于与血管适当的粘附并用于维持血管稳定。随后,以类似的方式,在脑转移过程中癌细胞表现为劫持脑 VBM 用于必需的功能。有趣地,在有限的、行之有效的 CNS 黑色素瘤转移中抑制血管生成引起血管共选择生长的逆转。这表明肿瘤细胞的连续的血管利用,其可代表用于治疗研究的可行的靶标。

[0066] 肿瘤细胞和血管之间的互作依赖于 $\beta 1$ 整合素-介导的肿瘤细胞与血管的血管基底膜的粘附。该互作足够促进脑中肿瘤系的直接增殖和微转移形成。该亲血管性机制对 CNS 中的癌(贴壁依赖型细胞)和淋巴瘤(贴壁非必需型细胞,anchorage-dispensable cell)二者是通用的。 $\beta 1$ 整合素在正常细胞生物学的许多方面发挥主导作用并涉及癌发生、进展和转移。存在有至少 10 种 $\beta 1$ 整合素异二聚体,其作为不同的配体诸如胶原和层粘连蛋白

的可变的杂性粘附受体。但是,我们的数据表明单独的 $\beta 1$ 整合素亚基的拮抗作用在用于脑转移的治疗策略中可能是有用的。事实上, Park 等人发现抑制性抗- $\beta 1$ 整合素亚基抗体在三维培养中生长的乳腺癌细胞中诱导凋亡,但没有在单层培养中生长的细胞中诱导凋亡(Park 等人 2006;“ $\beta 1$ integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo”Cancer Res. 66:1526-1535)。用相同抗体处理具有来自那些细胞系的乳腺癌异种移植物的老鼠导致减小的肿瘤体积。除了所描述的体外凋亡机制,抑制血管共选择也可减弱生长。在评价 $\beta 1$ 整合素的作用的可选的策略中,在乳腺癌的 MMTV/PyMT 转基因模型中分析肿瘤。诱导肿瘤发生之后, $\beta 1$ 整合素的条件缺失导致 FAK 磷酸化作用和增殖的损害,与对用于肿瘤生长的贴壁依赖型信号传导的依赖一致。

[0067] 本方法可适用于治疗具有 $\beta 1$ 整合素受体的任何类型的上皮或非上皮哺乳动物肿瘤,特别是,胶质母细胞瘤、间变性星形细胞瘤、乳腺(breast)/乳腺(mammary)癌、肺癌、黑色素瘤、结肠和直肠癌、膀胱癌、子宫内膜癌、卵巢癌、肾癌、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌和甲状腺癌。

[0068] 因此,本方面的优势是靶向肿瘤血管化的两种机制包括血管生成和粘附血管共选择。如下面描述的,抑制 $\beta 1$ 整合素的优势是不仅阻断由肿瘤使用的血管的共选择,而且直接抑制肿瘤增殖并阻止由低氧激活的存活信号通路。这避免了仅依赖于单独的抗-血管生成的现有技术策略中所确定的治疗耐药性。用于评价治疗疗效包括肿瘤休眠和消退的手段将是具有普通医疗技能的人员所众所周知的。这些将包括使用医疗成像技术诸如 MRI、CT、PET 和 SPECT 及物理尺寸测量和患者的临床状态。这两种形式的抗血管生成剂和整合素-阻断剂一起具有协同作用。

[0069] 在实行本方法中有用的针对整合素的抗体,且,特别是针对 $\beta 1$ 整合素的抗体是本领域已知的。见 Bissell 等人美国专利号 6,123,941 关于通过应用抗- $\beta 1$ 整合素抗体 AIIB2 逆转癌细胞中恶性表型的描述。针对 CD-29 表位的抗- $\beta 1$ 整合素从 Research Diagnostics, Inc., Flanders, N. J. 可得。另一种抗- $\beta 1$ 整合素抗体为 CSAT,从 University of Iowa Hybridoma Bank 可得。另外的商业可得的抗- $\beta 1$ 整合素抗体为 4B7R,是从 Ancell Immunology Research Products 可得的鼠 IgG1 κ 抗体。

[0070] AIIB2 是最初从人绒毛膜癌杂交瘤中被分离的大鼠单克隆 IgG1,并被鉴定为与 $\beta 1$ 整合素胞外域的所有异二聚体非特异性结合的抗- $\beta 1$ 整合素抗体。使用经酶消化的 AIIB2 的 F(ab)' 片段的实验显示抗体的表位结合部分是有活性的,并导致 $\beta 1$ 整合素介导的信号传导和下游信号传导中间物的下调。关于 $\beta 1$ 整合素生物学的进一步的细节因为 5 种已知的剪接变体而变得更加复杂,其主要区别是关于胞质结构域,下面联合用于免疫制备抗 $\beta 1$ 整合素抗体的多肽进一步描述。已发现 AIIB2 通过胞外域识别所有的变体。Park 等人 (2009 年 11 月 17 日授权的美国 7,618,627,“Method of increasing radiation sensitivity by inhibition of beta-one integrin”)使用 AIIB2 抗体与电离辐射联合起来以促进肿瘤细胞凋亡。

[0071] 如在 Hall 等人,“The $\alpha 1/\beta 1$ and $\alpha 6/\beta 1$ Integrin Heterodimers Mediate Cell Attachment to Distinct Sites on Laminin”J. Cell

Biol. 110:2175-2184(1990) 所报道的, 抗-整合素抗体 AIIB2 根据以下被制备: 以 2 周的间隔, 给予 Lewis 大鼠与 Ribi 佐剂 1:1 混合的 107EDTA- 收获的 JAR 绒毛膜癌细胞的两次腹腔内注射。2 周后, 在不存在佐剂时, 以 2 周的间隔, 给予两次另外的脾内注射。给予 Balb/c 小鼠四次、每两月一次的 5×10^6 早期-妊娠的人细胞滋养层细胞的腹腔内注射。最后的注射后 4d, 根据 Kennett 等人的方法(1980), 如 Wheelock 等人所改良的(1987) 将每一个脾与 Sp2/0 小鼠浆细胞瘤细胞融合。使用以上描述的附着分析, 筛选杂交瘤上清液关于它们抑制 JAR 人绒毛膜癌细胞附着至 FN、LN 或 Co1 IV 的能力。发现两种大鼠杂交瘤上清液仅抑制与 FN 的附着(BIE5 和 BIIG2), 而两种其他大鼠抑制与 LN、FN 和 Co1 IV 的附着(AIIB2 和 BIE11)。一种小鼠的杂交瘤上清液仅抑制 JAR 细胞与 Co1 IV 的附着(S2G3)。通过有限的稀释克隆了这些杂交瘤。使用山羊抗-大鼠琼脂糖通过亲和色谱法从培养上清液中纯化大鼠抗体。于 4℃ 通过 50% 饱和的硫酸铵沉淀将小鼠上清液 S2G3, 一种 IgM, 浓缩 10 倍。在进一步使用之前, 再次检测这些抗体对 FN、LN 和 Co1 IV 涂覆的物质的附着抑制活性。

[0072] 可通过与 Werb, Z.、Tremble, P.、Berensten, O.、Crowley, E. 和 Damsky, C. H. (1989) 中描述的方法类似的方法制备适于与本方法和组合物一起使用的抗-整合素抗体。通过纤连蛋白受体的信号传导诱导胶原酶表达。J. Cell Biol. 109, 877-890; 和 Damsky, C. H., Fitzgerald, M. 和 Fisher, S. J. (1992)。这提供了用于潜在抗体的筛选检测。所使用的免疫原为完全人 JAR 绒毛膜癌细胞。抗体阻断细胞附着至 Fn、Co1-I、IV 和 LN, 并因此可以以这些方式被进一步表征。

[0073] 用大鼠单克隆抗体 AIIB2 抑制 $\beta 1$ 整合素联合低氧协同地减弱了 GBM 细胞的体外生长。AIIB2 还直接减弱阿瓦斯汀® 逃避 GBM 细胞的体外生长。此组合物还可被用于体内肿瘤成像或作为细胞增殖的生物标志物或对细胞损害(例如, 低氧或电离辐射) 的响应。还观察到未经处理的 GBM 的血管生成的血管中 $\beta 1$ 整合素的显著的上调。因此, 其对于直接抑制和 / 或成像体内血管生成过程也是有用的。

[0074] 如上所述, 多种 VEGF 抑制剂可被用于本方法和组合物。如在 Oliner 等人 2009 年 12 月 10 日公布的、题为“ANG2 AND VEGF INHIBITOR COMBINATIONS” 的美国 2009/0304694A1 中所描述的, 适合用于本方法的 VEGF 抑制剂包括以下: (a) 4TBPPAPC, 如在美国 2003/0125339 或美国专利号 6, 995, 162 中所描述的, 其通过引用以其整体、特别是以其公开 4TBPPAPC 的部分并入本文; (b) AMG706, 如在美国 2003/0125339 或美国专利号 6, 995, 162 或美国专利号 6, 878, 714 中所描述的, 其通过引用以其整体特别是以其公开 AMG706 的部分并入本文; (c) 阿瓦斯汀®; (d) 多吉美®, 如在 W000/42012、W000/41698、美国 2005/0038080A1、美国 2003/0125359A1、美国 2002/0165394A1、美国 2001/003447A1、美国 2001/0016659A1 和美国 2002/013774A1 中所描述的, 其通过引用以其整体、特别以其公开多吉美® 的部分并入本文; (e) PTK/ZK; (f) 索坦®, 和 (g) 如美国 2006/0241115 中所描述的式 IV 的 VEGF 抑制剂。在这方面, 目前优选的 VEGF 抑制剂是 AMG706。

[0075] 可根据一些方法制备人源化的抗-VEGF 或抗-整合素抗体。Sliwowski 等人的 2005 年 9 月 27 日授权的、题为“Humanized anti-ErbB2 antibodies and treatment with anti-ErbB2 antibodies” 的美国 6, 949, 245 描述了用于人源化抗体的方法, 其根据本教导可以是适合的。本文的单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体, 其中重链和 / 或轻链的部分与源自特定物种或属于特定抗体种类或亚类的抗体的相应序列相同或同源, 而链的剩余部

分与源自另外的物种或属于另外的抗体种类或亚类的抗体、及此类抗体的片段的相应序列相同或同源,只要它们呈现期望的生物活性(美国专利号 4,816,567;和 Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。本文的感兴趣的嵌合抗体包括包含源自非-人灵长类动物(例如,旧大陆猴、猿等)的可变域抗原-结合序列和人恒定区序列的“灵长类源化”抗体。

[0076] 如以上引用的美国 6,949,245 中进一步描述的,人源化的抗体具有非-人来源的被引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非-人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,其典型取自“输入”可变域。可遵循 Winter 和合作者的方法(Jones 等人, Nature, 321:522-525(1986);Riechmann 等人, Nature, 332:323-327(1988);Verhoeyen 等人, Science, 239:1534-1536(1988)),通过用人抗体的相应序列取代高变区序列基本上执行人源化。因此,此“人源化”抗体为嵌合抗体(美国专利号 4,816,567),其中基本上小于完整的人可变域已被来自非-人物种的相应序列取代。实践中,人源化的抗体通常是一些高变区残基和可能的一些 FR 残基被来自啮齿动物抗体中类似位点的残基所取代的人抗体。

[0077] 还可使用单链重组抗体,如例如 Williams 等人、题为“Methods and compositions comprising single chain recombinant antibodies”的美国专利号 5,840,300 中所描述的,此处为了描述用于制备此组合物的方法的目的通过引用被并入。简要地,分别扩增 κ 、重和 λ 免疫球蛋白链并随后使用重组 PCR 组合为单链,即,通过重叠延伸(SOE)PCR 方法的剪接,其中,单链包含重链加 κ 链或重链加 λ 链。在引物中使用了柔性线性接头肽,其因此包含被用于连接 V_L 与 V_H 以形成包含包括轻链和重链二者作为单链的整合素结合可变区的新的重组 Fv 片段的接头。Fv 片段可被开发为针对 $\beta 1$ 整合素亚基的 Fv 片段的库。

[0078] 还可在经遗传改造旨在表达人抗体的小鼠中制备适合的抗体。可用包含人 $\beta 1$ 整合素片段的抗原免疫小鼠并将包含活性 B 细胞的小鼠脾细胞与合适的骨髓瘤系融合。具有人 Ig 所有组成成分的小鼠市售可得。见 Hemachandra 等人,“Human Monoclonal Antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide Derived from Transgenic Mice Containing Megabase Human Immunoglobulin Loci Are Opsonic and Protective against Fatal *Pseudomonas* Sepsis”, INFECTION AND IMMUNITY, 2001 年 4 月,第 2223-2229 页,第 69 卷,第 4 期。

[0079] 用于制备本抗体的另外的技术,噬菌体展示组合库技术,提供了产生可被筛选抗-整合素活性的人 Mab 的大库的有用的方法。从淋巴细胞 mRNA 制备的库可由直至 10^8 个单克隆 Fab 所有组成成分的重组体组成。通过在丝状噬菌体表面展示库并针对模式表位(如下面描述的 $\beta 1$ 整合素片段)的淘选(panning),可选择单克隆 Fab 抗体并分析它们的免疫特征和生物活性(整合素抑制)。Fab 用于治疗 and 诊断方法二者是理想的,由于它们能够大量廉价地被制备且它们是天然的非免疫原性的。见 Witzum 等人的美国专利号 6,716,410 关于该技术的描述,此处通过引用被并入。

[0080] 如 Marks 等人所描述的,结合 $\beta 1$ 抗原的人单链 Fv(scFv)可从非免疫噬菌体库中被分离。所选择的抗体的轻链(V(L))和重链(V(H))可变区的 CDR3 随后可顺序地被突变,突变的 scFv 展示在噬菌体上,并选择与抗原具有较高亲和力的突变株。见 Schier 等人,“Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular

evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site” J Mol Biol. 1996 Nov. 8; 263(4):551-67。

[0081] 还可采用与其他抗原交联的双特异性抗体(例如, 双体)。不像其他的双特异性形式(format), 可以以功能形式从细菌(大肠杆菌(*E. coli*)) 或酵母(巴斯德毕赤酵母(*P. Pastoris*)) 分泌产生双体。详细的操作说明可见于: Tomlinson I. 和 Holliger P. (2000) Methods for generating multivalent and bispecific antibody fragments, Methods Enzymol, 326, 461-479; 和 Holliger, P. (2001) Expression of antibody fragments in *Pichia pastoris*. Meth. Mol. Biol.。可以以多种已知方式产生二聚抗体片段或微抗体。这些产生非共价或共价的二聚体(sc(Fv)₂)。可用已知的稳定剂和赋形剂将本抗体组合物制备为呈无菌粉末或液体形式的纯化的药物组合物用于静脉内施用, 如本领域已知的和在美国专利号 6, 165, 467 中描述冷冻干燥单克隆抗体中所示例的, 在此通过引用被并入。

[0082] 本文所使用的术语“协同的”以其传统意义, 指的是组分的组合, 其中组合的活性大于该组合的每一个组分的单独的活性之和。

[0083] 可将 VEGF 活性的其他抑制剂用于本方法和组合物。例如, 阿柏西普 (VEGF-Trap, AVE-0005) 是完全人的重组融合蛋白, 由被融合至人 IgG1 的 Fc 区的血管内皮生长因子受体 1 (VEGFR1) 的第二 Ig 结构域和血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2) 的第三 Ig 结构域组成。阿柏西普与所有的 VEGF-A 亚型及胎盘生长因子(PlGF) 结合, 从而阻止这些因子刺激血管生成。与化疗联合, 每两周一次以 4mg/kg 通过静脉注入施用阿柏西普。

[0084] 命名为 KDR-bp (KDR- 结合蛋白) 的 VEGF 受体结合蛋白, 来自东部棉口蛇 (Eastern Cottonmouth) (*Agkistrodon piscivorus piscivorus*) 的毒液, 是无催化活性的 PLA2 同源物, Lys49PLA2, 其具有有效的肌毒性并被发现是拮抗 VEGF 受体的外源分子, 如在 Fujisawa 等人 “Catalytically inactive phospholipase A2 homologue binds to vascular endothelial growth factor receptor-2 via a C-terminal loop region,” Biochem. J. (2008) 411, 515-522 中所描述的。

[0085] 在某些方面, 本发明包括用于抑制肿瘤细胞生长的方法, 包含向患有所述肿瘤的受试者施用为抗血管生成剂的低剂量第一剂; 与阻断由 β 1 整合素介导的肿瘤细胞结合的第二剂的组合的步骤, 据此肿瘤细胞生长被抑制与由较高临床剂量的第一剂所引起的等量的量。低剂量的第一剂可以是例如 VEGF 抑制剂, 其以如产品标签或印刷品上所显示的最小剂量被施用。根据本发明, 肿瘤生长将被抑制至与如同 VEGF 抑制剂以最高批准剂量被给予至少相同的程度。例如, 当治疗结肠癌或直肠癌时, 贝伐单抗的建议剂量为每 14 天通过 IV 给予每 kg 5mg 或 10mg (每磅约 2.3mg 至 4.5mg)。所建议的剂量将基于所给予的化疗的类型而不同 (每 kg 5mg 或 10mg)。

[0086] 为 VEGF 抑制剂的剂和阻断 β -整合素的剂的治疗组合

[0087] 可以一起施用或在规定的時間间隔之后顺序地施用调节粘附血管共选择和血管生成的剂。当一起施用时, 可通过可接受的生物相容的递送平台递送它们。这可以是纳米缀合物或聚合物。可选地, 可将剂与彼此直接融合。另外, 可同时或顺序地施用多种血管生成和 / 或粘附血管共选择调节剂。最终, 可将任何实施方案与辅助治疗诸如放疗、化疗和 / 或增加血管通透性的剂组合。

[0088] 可使用用于抑制血管生成信号传导方面的实施方案,其在信号传导的下游或与其细胞外受体(VEGFR-1/Flt-1、VEGFR-2/Flk-1)结合的能力中对 VEGF-A 具有抑制作用。也可靶向血管生成的其他介导体,包括其他 VEGF 家族成员(VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 和 PlGF)和它们的受体(VEGFR-1/Flt-1、VEGFR2/Flk-1、VEGFR-3/Flt-4)、成纤维细胞生长因子(FGF-1 和 FGF-2)和它们的受体(FGFR-1、FGFR-2、FGFR-3、FGFR4)、表皮生长因子成员(EGF 和 HB-EGF)和它们的受体(EGFR)、CEACAM-1/CD-66a、孤儿受体 HER-2、血管生成素(Ang1、Ang2、Ang3 和 Ang4)和它们的受体(Tie-1 和 Tie2)、血小板衍化生长因子(PDGF)和它们的受体(PDGFR α 型和 PDGFR β 型)、转化生长因子- β 家族成员(TGF- β 1、TGF β 2、TGF- β 3)和它们的受体(TGFR2)、 δ -样配体 4 和其受体(Notch)和先已存在的结构蛋白的天然存在的抗血管生成片段,诸如血管抑素和肿瘤抑素。

[0089] 可使用用于靶向粘附血管共选择信号传导方面的实施方案,其在信号传导的下游或与其细胞外受体结合的能力中对 β 1 整合素具有抑制作用。这些可包括去整合素、细胞外基质的组分 / 片段、粘着斑激酶(FAK)、FAK- 相关非激酶和细胞外信号相关激酶(ERK/MAPK)。

[0090] 抗-血管生成组合物可包含人单克隆抗体或抗体片段、人源化抗体或抗体片段、抑制肽、激酶抑制剂、内源抑制剂、小分子抑制剂、纳米抗体、RNAi、适体、反义物(antisense)、或任何这些剂与药学上可接受的载体或运载体(carrier)的组合。

[0091] 抗-基于粘附的血管共选择组合物可包含人单克隆抗体或抗体片段、人源化抗体或抗体片段、抑制肽、激酶抑制剂、内源抑制剂、小分子抑制剂、纳米抗体、RNAi、适体、反义物、或任何这些剂与药学上可接受的载体或运载体的组合。

[0092] 在本发明优选的实施方案中,具有复发性多形性成胶质细胞瘤(GBM)的患者将经受瘤内放置在切除腔内的或硬膜下放置的一个或多个导管的植入。患者将以临床上合适的剂量和间隔被施用标准的贝伐单抗疗法 I. V.。贝伐单抗注射后至少 24 小时或理想 48 小时至 120 小时,将以临床相关剂量和频率通过对流增强的递送(CED)装置通过所述导管施用抑制性抗- β 1 整合素组合物。

[0093] 在另一个实施方案中,以上方案将与另外的辅助疗法诸如电离辐射和 / 或化疗组合。在另外的实施方案中,上述方案将被施用至新的经诊断 GBM。在另外的实施方案中,将通过 CED 施用抗血管生成组合物和抑制性抗- β 1 整合素组合物二者。在另一个实施方案中,将肠胃外施用抗血管生成组合物和抑制性抗- β 1 整合素组合物二者。在另一个实施方案中,将在惰性运载体诸如可溶解的生物相容的聚合物中将一种或两种组合物直接施用至肿瘤床。在另一个实施方案中,将同时施用两种组合物作为二价抗体。在另一个实施方案中,将单独施用抑制性抗- β 1 整合素组合物至具有先前抗血管生成疗法失败的患者。在另一个实施方案中,将单独施用抑制性抗- β 1 整合素组合物至未经历抗血管生成疗法的患者。在另一个实施方案中,抗- β 1 整合素组合物还可包含附着至其的放射性同位素,特别是 β - 放射元素。

[0094] 除了抗-血管生成疗法之外,用于引起低氧的可选的剂是使用用于血管栓塞的血管内技术(超选择栓塞 / 靶向栓塞)。该方法是已知用于高度血管脑损伤诸如脑膜瘤和 AVM,以减少损伤因此为手术切除提供更好的环境。

[0095] 抑制该靶标对于除 GBM 以外表达 β 1 整合素的一些癌症可以是有效的,包括大

部分上皮肿瘤和非上皮肿瘤诸如乳腺癌、肺癌、肝癌、肾癌、结肠癌、黑色素瘤和淋巴瘤。抗- $\beta 1$ 组合物可具有用于非肿瘤疾病诸如年龄相关性湿性黄斑变性中抑制血管生成的另外的用途。最终,抗- $\beta 1$ 组合物可具有用于抗炎适应症的用途,由于 $\beta 1$ 整合素信号传导对于一些免疫细胞功能包括粘附和增殖是重要的。

[0096] 可选的实施方案涉及生物系统中增强血管化如再生医疗策略中。在此实施方案中,选择性调节血管生成和粘附血管共选择二者可导致改善的组织修复或再生。

[0097] 本发明的另外的实施方案包含使用 shRNA (短发夹 RNA) 以敲低肿瘤细胞中 $\beta 1$ 整合素基因表达。这在下面的实施例中被实施,其中在对抗 -VEGF 抗体有耐受性的细胞系中显示肿瘤细胞生长的显著减弱。在示例性的研究中,ShRNA 是短干扰 RNA (siRNA) 的前体,短干扰 RNA 是 RNA 干扰 (RNAi) 的强大的介导体。在 RNAi 中,序列与 siRNA 同源的基因在转录后状态被沉默。存在可以引起有效的 siRNA 的多种不同的发夹结构。慢病毒,诸如人类免疫缺陷病毒 (HIV) 能够感染非分裂细胞,包括脑的分化神经元。可从慢病毒中表达短发夹 RNA,允许多种细胞类型的高效转染。可基于待被沉默的基因的序列设计有效的 RNA 发夹构建体。整合素 $\beta 1$ 是人中由 ITGB1 基因编码的蛋白。关于整合素 $\beta 1$ 亚基的全部人 mRNA 在 Genbank 基因座 X07979 和登录号 BC020057 中被阐明。该序列的 3656 个核苷酸 (SEQ ID NO:1),还在 J. Cell Biol. 105 (3), 1183-1190 (1987) 中被给出,为了简洁起见此处没有复述,但特别通过引用并入本文。该已知序列可被用于设计干扰核酸构建体诸如示例性的 shRNA。

[0098] 尽管不是每一个发夹构建体都将产生有效的 RNAi 响应,已形成了关于富集成功的构建体的规则。这些规则是基于大量的有效构建体的检查和微 RNA 和有效的 siRNA 的热力学分析。规则在例如 Ambion technical bulletin#506 中发布,在线可得。

[0099] 从 DNA 载体中制备复制病毒包括将构建体包装进入细胞系。包装 RNAi 慢病毒本质上与包装携带 cDNA 的慢病毒相同。本质上,将 DNA 载体瞬时转染进入包装细胞系-诸如人 293 细胞,且在 2-3 天之后,上清液中将包含病毒。

[0100] 在大多数情况下,慢病毒载体制备体系基于“断裂(split)”体系,其中天然病毒基因组被断裂为单独的辅助质粒构建体。将不同病毒元件断裂为三个或四个单独的载体降低了通过慢病毒基因组的偶然重组产生能够复制的病毒的风险。

[0101] 当选择用于制备根据本发明的 β 整合素敲低的慢病毒制备体系时,技术人员可制备具有被限制的宿主范围(即,仅可感染啮齿动物的病毒)对广谱宿主范围(可感染小鼠、禽、人等的病毒)的病毒。在大多数情况下,病毒表面外壳蛋白决定了物种特异性。由于慢病毒制备体系是断裂的,通过使用例如水疱性口炎病毒 (VSV/G) 糖蛋白(其展示宽宿主范围取向)对嗜麦芽糖结合表面糖蛋白(其展示有限的特异性)可转换外壳蛋白。

[0102] 使用 Gene link siRNA explorer(<http://colon.slash.slash.www.dot.genelink.com/sirna/shrnai.asp>),鉴定 483 条 shRNA 序列为人 $\beta 1$ 整合素 mRNA 的抑制剂,包括,例如,序列 TTCTGGATTGGACTGATCAGTTC (SEQ ID NO:2)。

[0103] 优选以适于人施用的药物组合物的形式向患有此处所描述的肿瘤的有相应需要的患者递送此处提及的剂。组合物将包含剂,例如呈被分离和大体上纯的形式的抗体或核酸,与如本领域已知的稳定剂、缓冲液、赋形剂等混合,且无外源因子(adventitious agent)。

[0104] 下面的实施例说明此处描述的某些发明概念。

实施例

[0105] 实施例 1:与高 $\beta 1$ 整合素表达相关的低氧

[0106] 此处显示,在快速生长的癌情况下并在抗血管生成疗法之后另一个常见的细胞应激,低氧,与患者多形性胶质母细胞瘤(GBM)样本中高 $\beta 1$ 表达相关。为了直接确证该机制,我们将神经胶质瘤细胞经受 6h 至 48h 的 1% 氧以刺激微环境低氧。我们观察到体外神经胶质瘤细胞中 $\beta 1$ 整合素表达的显著增加(图 1)。这是快速且可逆的细胞响应并在乳腺癌和结直肠癌细胞中也被证明。为了验证抗-血管生成疗法能够强烈地增加体内生长肿瘤中 $\beta 1$ 的表达,我们染色了在最后的贝伐单抗处理的几天内取自小鼠的神经胶质瘤肿瘤。与对照相比,我们在被处理的肿瘤中、特别是在低氧的肿瘤中心观察到 $\beta 1$ 的显著增加(图 2)。

[0107] 实施例 2:在肿瘤细胞增殖过程中观察到增加的 $\beta 1$ 整合素表达

[0108] 在肿瘤细胞本身增殖期间观察到体外肿瘤细胞中 $\beta 1$ 表达的进一步增加。在 U87MG 神经胶质瘤细胞中,体外细胞汇合和 $\beta 1$ 水平之间具有负相关(图 3)。另外,如 FACS 所显示的, U87MG 神经胶质瘤细胞中增殖标志物 Ki-67 的表达与 $\beta 1$ 表达正相关。这与其他人在乳腺癌细胞中所观察到的一致。最后,我们直观地观察到来自原代 GBM 的人手术样本中血管生成血管中 $\beta 1$ 整合素表达的显著增加(图 4)。该增加的 $\beta 1$ 整合素表达被认为与神经胶质瘤细胞中所观察到的 $\beta 1$ 与细胞增殖的关联相关,如以上所讨论的。因此,除了入侵和在血管上生长, $\beta 1$ 整合素呈现密切参与肿瘤细胞增殖、低氧和 IR 后的存活信号传导、及血管生成过程中血管内皮细胞。这多个特征使得 $\beta 1$ 整合素是潜在地直接抑制肿瘤生长和作为减弱抗-血管生成耐受性的形成的与抗-血管生成的结合疗法(conjunctive therapy)的极具吸引力的靶标。

[0109] 实施例 3: $\beta 1$ 整合素参与肿瘤细胞中抗-VEGF 抗体耐受性

[0110] 为了检验 $\beta 1$ 整合素可能参与贝伐单抗耐受性的假说,我们对在贝伐单抗治疗之前和在获得性贝伐单抗耐受性形成之后取得的 GBM 的成对的患者样本中的 $\beta 1$ 整合素使用免疫荧光组织化学。与未处理的样本相比,在 12 对中的 9 对中观察到贝伐单抗后 GBM 组织中清楚的增加(75%,图 5)。

[0111] 为了直接验证获得性贝伐单抗耐受性之后肿瘤细胞中 $\beta 1$ 整合素表达的增加,我们分析了源自原代 GBM (第一次手术)和源自抗血管生成疗法耐受性形成后至少 30 天所分离的组织的细胞系。事实上,与前一组相比,来自后一组的细胞中 $\beta 1$ 整合素表达是平均 13 倍高(图 6)。

[0112] 为了验证所观察到的 $\beta 1$ 整合素的上调是有功能的,我们染色临近的患者肿瘤切片关于被激活的粘附斑激酶(磷酸化-FAK^{tyr397})。与治疗之前取得的样品相比,获得性贝伐单抗耐受性之后取得的患者样品中的磷酸化-FAK^{tyr397} 染色显著较高(图 7)。

[0113] 因此,在获得性贝伐单抗耐受性形成之后取得的临床患者样品中 $\beta 1$ 整合素被功能性上调。

[0114] 实施例 4:抑制 $\beta 1$ 整合素之后抗-VEGF 抗体耐受性细胞系中减少的攻击性

[0115] 慢病毒颗粒中整合素 $\beta 1$ shRNA 从 Santa Cruz Biotechnology, Inc., 目录 #sc-35675 购得。提供了四种不同的 shRNA 序列的混合物。将该物质用于转化源自贝伐单

抗失败的患者的细胞系 SF8106-Ax1 和 SF7796-Ax3 (还分别称为 BRG3 和 BRG2)。我们使用慢病毒载体创建了 $\beta 1$ 和 $\beta 3$ 整合素的稳定的敲低系。我们验证了与 GFP 载体对照细胞或 $\beta 3$ 敲低细胞相比, BRG3 细胞中 $\beta 1$ 的 70% 的敲低和对应的 1 周后细胞生长的 60% 的减少(图 8)。为了更详细地研究这些细胞,我们分离了具有超过 90% 敲低的 $\beta 1$ 的 BRG3 敲低克隆并评价了指示增加的肿瘤细胞攻击性的功能,包括粘附、细胞扩散、细胞迁移和细胞增殖。与载体对照细胞相比,这些敲低克隆的所有四种功能都被显著损害(图 9)。

[0116] 为了体内验证以上的发现,我们在裸鼠中皮下植入以上的 BRG3 $\beta 1$ 整合素敲低克隆中的三种并持续 6 个月追踪肿瘤生长。载体对照肿瘤细胞正常生长,而我们在整个研究阶段没有观察到任何敲低克隆的生长(图 10)。事实上,15 个敲低肿瘤中的 13 个(87%)被完全消退。为了验证这些发现是 $\beta 1$ 敲低的直接结果,我们皮下植入来自 BRG2 和 BRG3 的多克隆敲低系并相似地监测体内生长。这些系显示平均 70% 的 $\beta 1$ 敲低。如预测的,这些系比载体对照系生长慢。然而,与 90% 敲低克隆相比之下,几周之后,两种系都展示了潜在的体内生长,表明增殖和 $\beta 1$ 整合素水平的剂量 - 响应关系(数据未显示)。

[0117] 因此,贝伐单抗耐受性的神经胶质瘤系中 $\beta 1$ 的 90% 或更大的敲低减弱了体外攻击表型并完全阻止了异种移植模型中的体内生长。

[0118] 实施例 5:抗-VEGF 抗体耐受性细胞系的抗 $\beta 1$ 整合素抗体处理

[0119] 为了验证以上结果具有 $\beta 1$ 抑制的临床相关模式,我们在体外抑制实验中使用充分表征的 AIIB2 抑制性大鼠单克隆抗- $\beta 1$ 整合素抗体。同种型匹配的 IgG 被用作对照。贝伐单抗耐受性神经胶质瘤系显示与 $\beta 1$ 敲低相似的功能抑制,包括减少的粘附(数据未显示)和以 $10 \mu\text{g/ml}$ 的迁移(动态影片分析,未显示)。用免疫荧光染色关于凋亡 / 细胞死亡(膜联蛋白 V)或增殖(Ki-67 抗原)显示对细胞生长的影响。染色之后,通过流式细胞术 / 荧光激活细胞分选术(FACS)分选细胞。该分析显示用 AIIB2 处理的 GBM 细胞中 Ki-67 染色的显著减少,但是对膜联蛋白 V 免疫反应性没有影响,与抑制细胞效应一致(数据未显示)。

[0120] 用原代 GBM 系体外重复了用 AIIB2 的该处理,以观察细胞生长是否将被增殖状态影响。分汇合培养(生长期)中的细胞,而不是汇合培养(生长停滞)中的细胞,被持续 2 天的 AIIB2 处理显著地抑制了生长(图 11)。

[0121] 最后,用直至 5mg/kg 剂量的 AIIB2、每周 2 次体内处理显著抑制了皮下异种移植模型中 BRG3 贝伐单抗耐受性系的生长(数据未显示)。末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling, TUNEL)揭示了 BRG3 系中 AIIB2 处理的肿瘤中增加的凋亡(数据未显示)。

[0122] 因此,与 $\beta 1$ 敲低类似,用功能阻断抗体诸如 AIIB2 的 $\beta 1$ 整合素抑制体外减弱了攻击表型。此外, AIIB2 的肠胃外施用对于抑制典型的和贝伐单抗耐受性的神经胶质瘤异种移植物的肿瘤体内生长是有效的。

[0123] 实施例 6: $\beta 1$ 的抑制逆转上皮 - 间质转化(EMT)和干细胞 - 样表型

[0124] 培养中的球状肿瘤细胞生长是干细胞 - 样表型的替代并能够被应激因素诸如低氧和酸性 pH 促进 / 富集。在典型的神经胶质瘤细胞系(U87MG)和 BRG3 贝伐单抗耐受性细胞系二者中敲低 $\beta 1$ 显著损害了球状体形成(数据未显示)。AIIB2 还抑制了由 48 小时低氧引起的 U87MG 神经胶质瘤细胞的球状生长(数据未显示)。

[0125] 除了损害球状生长, $\beta 1$ 整合素的抑制促进了如肿瘤细胞区域的显著增加所显示

的 EMT 的逆转和间质细胞受体 c-met50% 的减少(数据未显示)。

[0126] 实施例 7 :用 β 1 整合素抑制增强抗血管生成疗法

[0127] 作为抗血管生成疗法的效应的体外模型,我们将生长期的原代 GBM 细胞经受持续 2 天的低氧,随后在常氧中持续 2 天继续生长。低氧被用作抗 - 血管生成疗法诸如贝伐单抗的体外替代。如与单独的低氧或 AIIB2 处理相比,持续 2 天的恢复阶段添加 AIIB2 抗体导致肿瘤细胞生长进一步的减少(图 12)。因此, β 1 整合素抑制和抗血管生成的组合预测加强了治疗疗效。

[0128] 为了验证以上的体外结果,我们用对照 IgG (10mg/kg)、贝伐单抗(10mg/kg)或贝伐单抗(1mg/kg)和 AIIB2 (1mg/kg)的低剂量交替组合疗法,两周一次地处理具有皮下生长 U87MG 神经胶质瘤肿瘤的小鼠。几周处理之后,低剂量交替的组合疗法抑制肿瘤生长被证明与单独的标准剂量的贝伐单抗同样有效(图 13)。因此,用 AIIB2 抑制 β 1 整合素允许贝伐单抗剂量的 20 倍的降低。

[0129] 因此,概括地说,显示 β 1 整合素的抑制可通过 1) 阻止血管共选择和血管周的入侵(或在任何典型的 ECM 基底物质上的入侵),2)在诸如 IR 和低氧损害之后可能通过促进凋亡减少肿瘤细胞的活性,3) 直接抑制肿瘤细胞增殖,4) 通过靶向增殖和迁移的内皮细胞直接抑制血管生成和 5) 逆转攻击性的干细胞 - 样的表型包括上皮 - 间质转化(EMT),抑制肿瘤的生长。重要地,通过慢病毒敲低或用 AIIB2 拮抗 β 1 受体可显著减弱贝伐单抗 - 耐受性神经胶质瘤异种移植物的体内生长。此外, AIIB2 处理可减少神经胶质瘤异种移植模型中贝伐单抗的必需剂量达至少 20x。

[0130] 结论

[0131] 以上的具体描述意在例证并阐述本发明且不应被视为限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的字面上的及等同的范围所界定。本说明书中提及的任何专利或出版物意在传达实施本发明某些方面中有用的方法和材料的详细信息,其可能没有被明确陈述但其将被本领域工作人员所理解。此类专利或出版物在此与如同每一个被特定地并单独地通过引用被并入相同的程度通过引用被并入并被本文所包含,如描述和使得被提及的方法或材料可行的目的所需的。

[0001]

序列表

<110> 加利福尼亚大学董事会

<120> 用于使用抗-整合素改善抗血管生成疗法的方法和组合物

<130> 479-100PCT

<150> US 61/466,791

<151> 2011-03-23

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3656

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

agcgggagtc gcggaacagc aggcccgagc ccaccgcgcc gggcccccga cgcgcgcgg      60
aaaagatgaa ttacaacca atttcttgga ttggactgat cagttcagtt tgcgtgtgtg      120
ttgctcaaac agatgaaaat agatgtttaa aagcaaatgc caaatcatgt ggagaatgta      180
tacaagcagg gccaaattgt ggggtggtgca caaatcaac atttttacag gaaggaatgc      240
ctacttctgc acgatgtgat gatttagaag ccttaaaaaa gaagggttgc cctccagatg      300
acatagaaaa tcccagaggc tccaaagata taaagaaaaa taaaaatgta accaaccgta      360
gcaaaggaa acagcagagaag ctcaagccag aggatattac tcagatecaa ccacagcagt      420
tggttttgcg attaagatca ggggagccac agacatttac attaaaatic aagagagctg      480
aagactatcc cattgacete tactacctta tggacctgtc ttactcaatg aaagacgatt      540
tggagaatgt aaaaagtctt ggaacagatc tgatgaatga aatgaggagg attacttcgg      600
acttcagaat tggatttgge tcatttgtgg aaaagaactgt gatgccttac attageacaa      660
caccagctaa gctcaggaa ccttgacaaa gtgaacagaa ctgcaccage ccatttagct      720

```

[0002]

acaaaaatgt gctcagtcctt actaataaag gagaagtatt taatgaactt gttggaaaac	780
agcgcataatc tggaaatttg gattctecag aaggtaggtt cgaatgcatac atgcaagttg	840
cagtttgttg atcactgatt ggctggagga atgttacacg gctgctggtg tttccacag	900
atgceggggtt teactttgct ggagatggga aacttggttg cattgtttta ccaaatgatg	960
gacaatgtca cctggaaaaa aatatgtaca caatgagcca ttattatgat tatectteta	1020
ttgctcacet tgtccagaaa ctgagtgaat ataataatca gacaattttt gcagttactg	1080
aagaatttca gcctgtttac aaggagctga aaaacttgat cectaagtcg gcagtaggaa	1140
cattatctgc aaattctage aatgtaattc agttgatcat tgatgcatac aattcccttt	1200
cctcagaagt ctttttgaa aacggcaaatt tgcagaagg agtaacaata agttacaaat	1260
cttactgcaa gaacggggtg aatggaacag gggaaaatgg aagaaaatgt tccaatattt	1320
ccattggaga tgaggttcaa tttgaaatta gcataacttc aaataagttt ccaaaaaagg	1380
attctgacag ctttaaaatt aggcctctgg gccttacgga ggaagtagag gttattcttc	1440
agtacatctg tgaatgtgaa tgccaaagcg aaggcatccc tgaaagtcac aagtgtcatg	1500
aaggaaatgg gacatttgag tgtggcgcgt gcaggtgcaa tgaagggcgt gttggtagac	1560
attgtgaatg cagcacagat gaagttaaca gtgaagacat ggatgcttac tgcaggaaag	1620
aaaacagttc agaaatctgc agtaacaatg gagagtgcgt ctgcggacag tgtgtttgta	1680
ggaagaggga taatacaaat gaaatttatt ctggcaaatt ctgcgagtgt gataatttca	1740
actgtgatag atccaatgga ttaatttttg gaggaaatgg tgtttgcaag tgtctgtgt	1800
gtgagtgcga cccaactac actggcagtg catgtgaactg ttctttggat actagtaact	1860
gtgaagccag caacggacag atctgcaatg gccggggcat ctgtgagtgt ggtgtctgta	1920
agtttacaga tcegaagttt caagggcaaa cgtgtgagat gtgtcagacc tgccttggtg	1980
tctgtgctga gcataaagaa tgtgttcagt gcagagcctt caataaagga gaaaagaaag	2040

[0003]

acacatgcac acaggaatgt tcctatttta acattaccaa ggtagaaagt cgggacaaat	2100
taceccagcc ggtccaacct gatccigtgt cccattgtaa ggagaaggat gttgacgaact	2160
gttggttcta ttttacgtat tcagtgaatg ggaacaacga ggtcacgggt catgtttgtg	2220
agaatecaga gtgtcccaact ggtccagaca tcattccaat tgtagctgggt gtggttgetg	2280
gaattgttct tatttgccctt gcattactgc tgatatggaa gcttttaatg ataattcatg	2340
acagaaggga gtttgctaaa tttgaaaagg agaaaatgaa tgccaaatgg gacacgggtg	2400
aaaatectat ttataagagt gccgtaacaa ctgtggtcaa tccgaagtat gagggaaaat	2460
gagtactgcc cgtgcaaatc ccacaacact gaatgcaaag tagcaatttc catagtcaca	2520
gttaggttagc tttagggcaa tattgcatg gttttactca tgtgcaggtt ttgaaaatgt	2580
acaatatgta taatttttaa aatgttttat tattttgaaa ataatgttgt aattcatgcc	2640
agggactgac aaaagacttg agacaggatg gttattcttg tcagctaagg tcacattgtg	2700
ccittttgac cttttcttcc tggactattg aaatcaagct tattggatta agtgatattt	2760
ctatagcgat tgaaagggca atagttaaag taatgagcat gatgagagtt tctgttaate	2820
atgtattaaa actgattttt agctttacaa atatgtcagt ttgcagttat gcagaatcca	2880
aagfaaatgt cctgctagct agttaaggat tgttttaaat ctgttatttt gctatttgcc	2940
tgtagacat gactgatgac atatctgaaa gacaagtaig ttgagagttg ctggtgtaaa	3000
atacgtttga aatagtfgat ctacaaaggc catgggaaaa attcagagag ttaggaagga	3060
aaaaccaata gctttaaaac ctgtgtgcca ttttaagagt tacttaatgt ttggtaactt	3120
ttatgccttc actttacaaa ttcaagcctt agataaaaga accgagcaat tttctgctaa	3180
aaagtccctg atttagcact attacatac aggcataact ttacaaagta ttgctgaat	3240
ggggaccttt tgagttgaat ttattttatt atttttattt tgtttaatgt ctggtgcttt	3300
ctatcacctc ttctaacttt ttaatgtatt tgtttgcaat tttggggtaa gacttttttt	3360

[0004]

atgagtactt tttctttgaa gtttttagcgg tcaatttgcc tttttaatga acatgtgaag	3420
ttatactgtg gctatgcaac agctctcacc tacgcgagtc ttactttgag ttagtgccat	3480
aacagaccac tgtatgttta cttctcacca ttigagttgc ccatcttggt tcacactagt	3540
cacattcttg ttttaagtgc ctttagtttt aacagttcac tttttacagt gctatttact	3600
gaagttatft attaaatatg cctaaaatac ttaaatcgga aaaaaaaaaa aaaaaa	3656

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

ttctggattg gactgatcag ttc	23
---------------------------	----

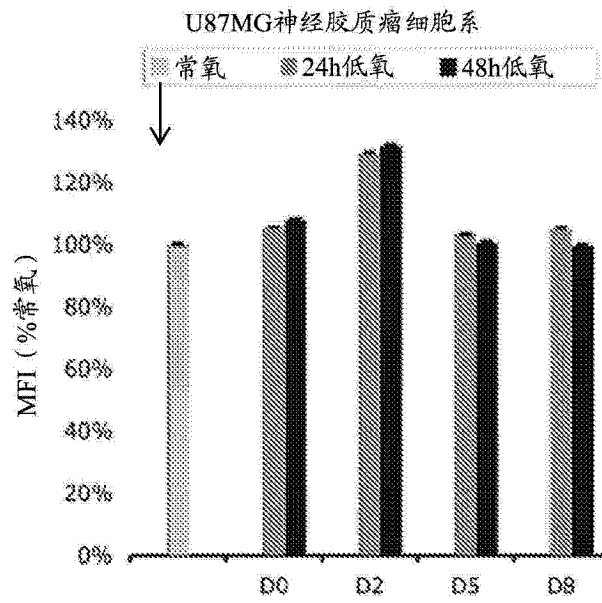


图1A

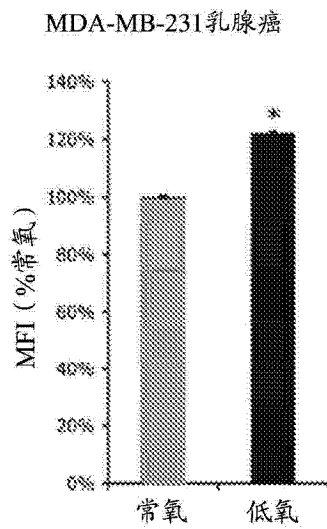


图1B

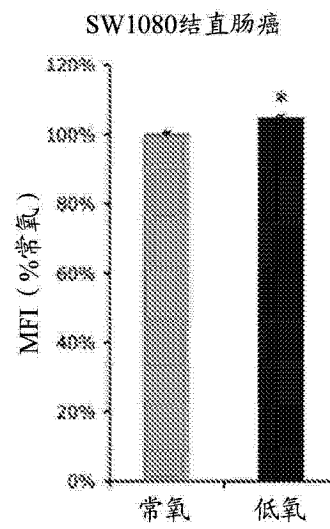


图1C

图 1

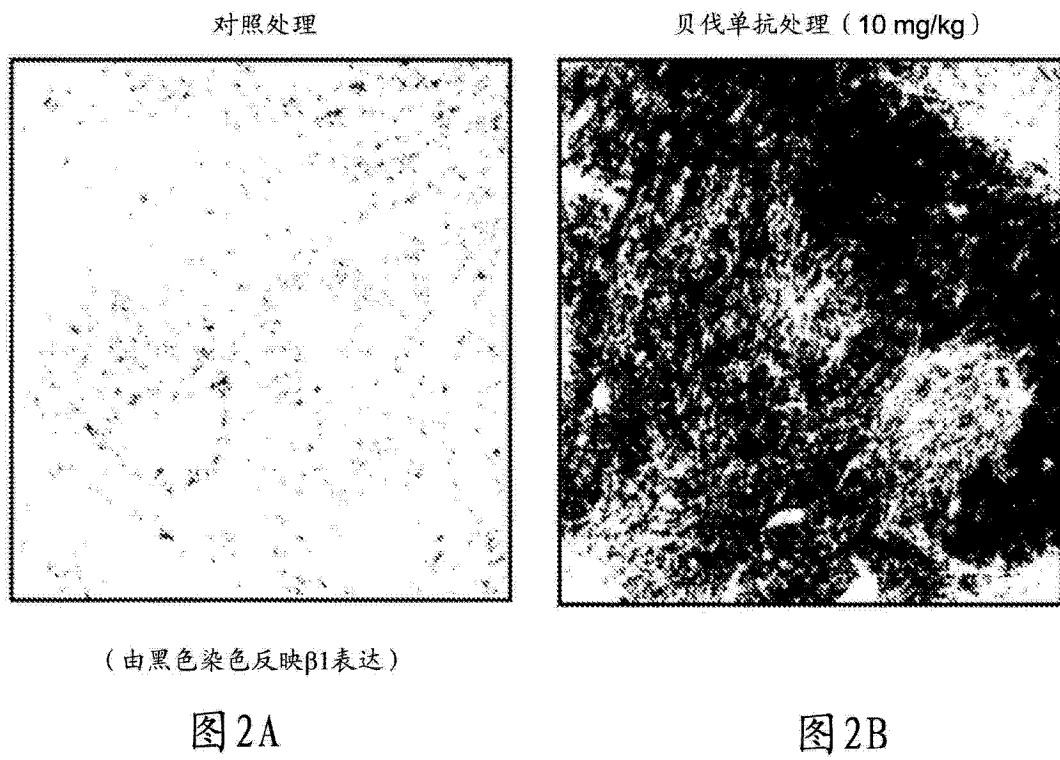
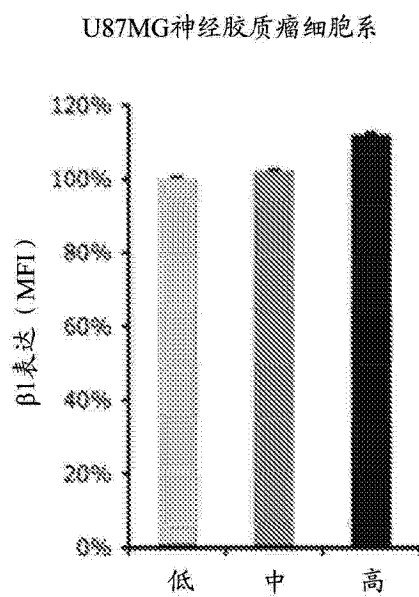


图 2



(低、中、高反映平板中活跃增殖的细胞的比例)

图3A

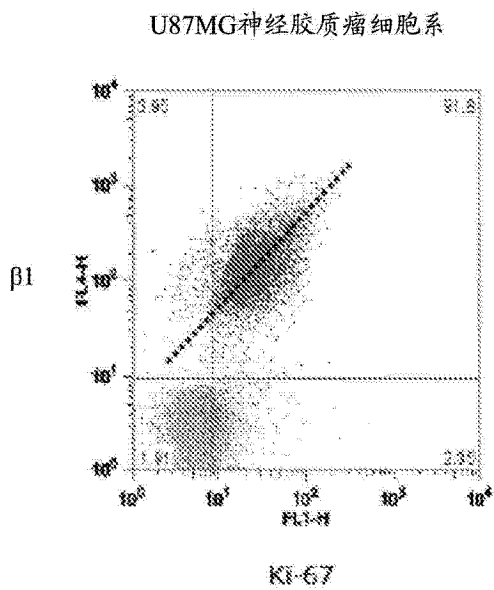


图3B

图3

具有正常血管结构的肿瘤区域

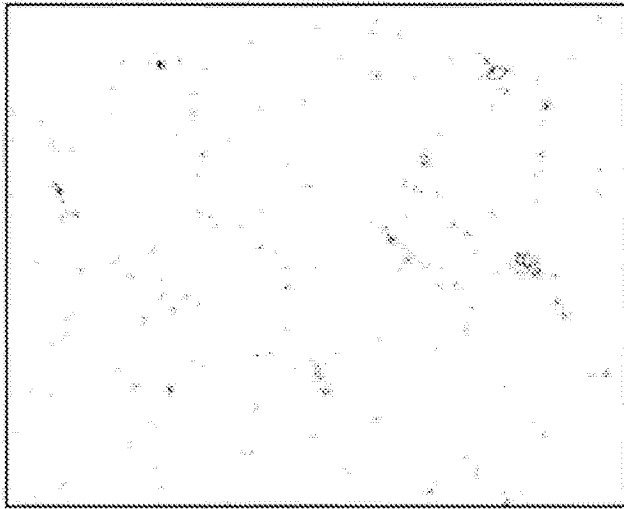


图4A

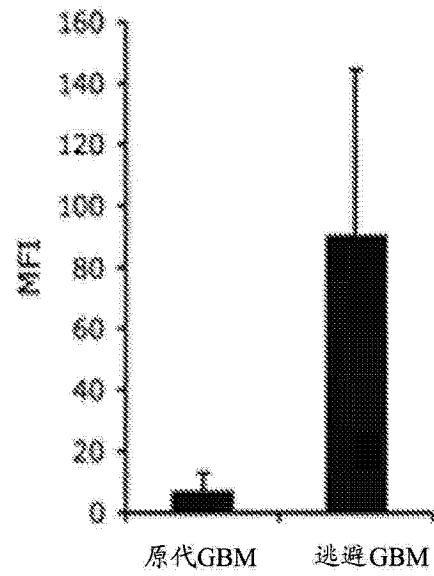


图 5

具有血管生成肾小球样血管的肿瘤区域

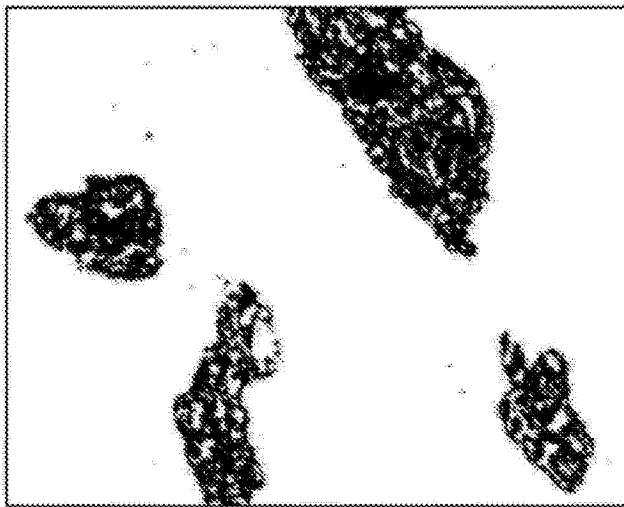
(由黑色染色反映 $\beta 1$ 表达)

图4B

图 4

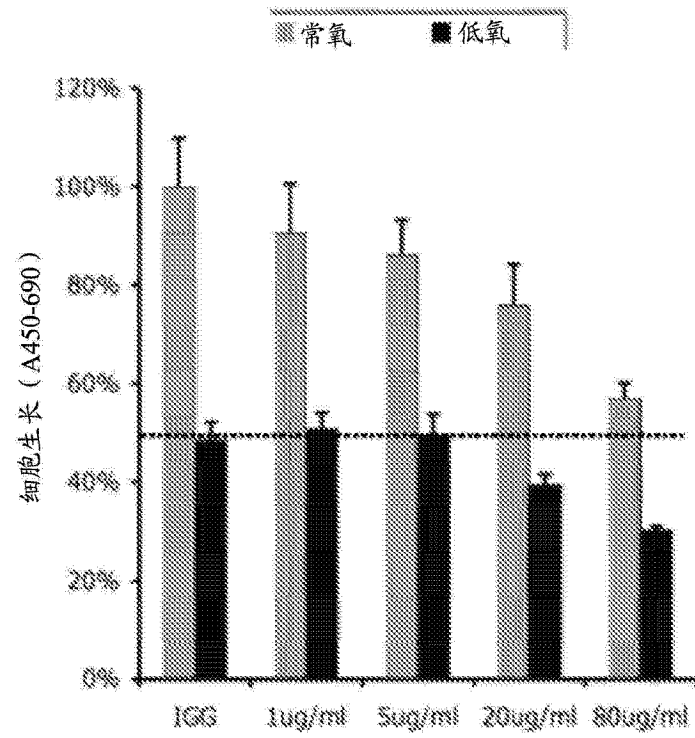


图 6

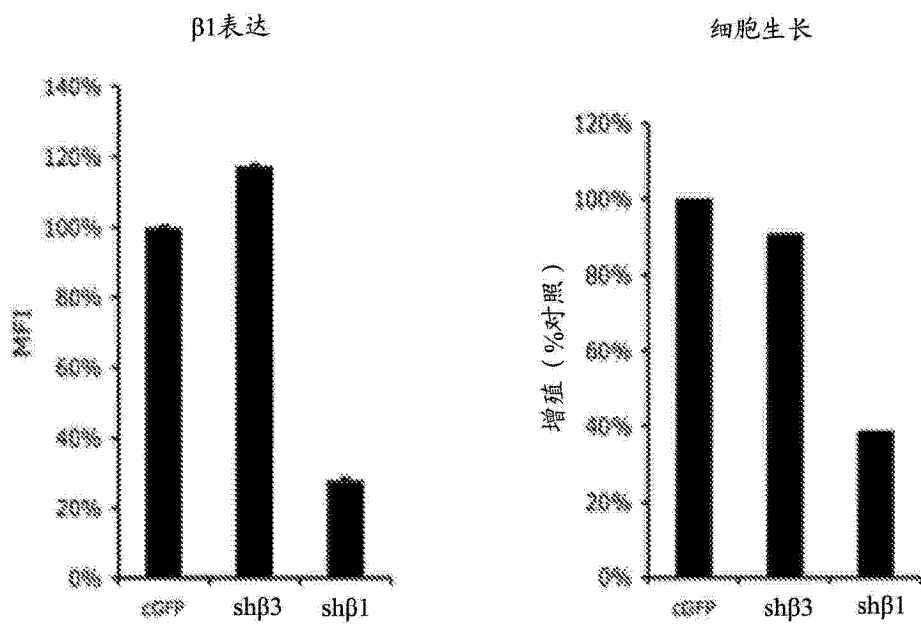


图 7A

图 7B

图 7

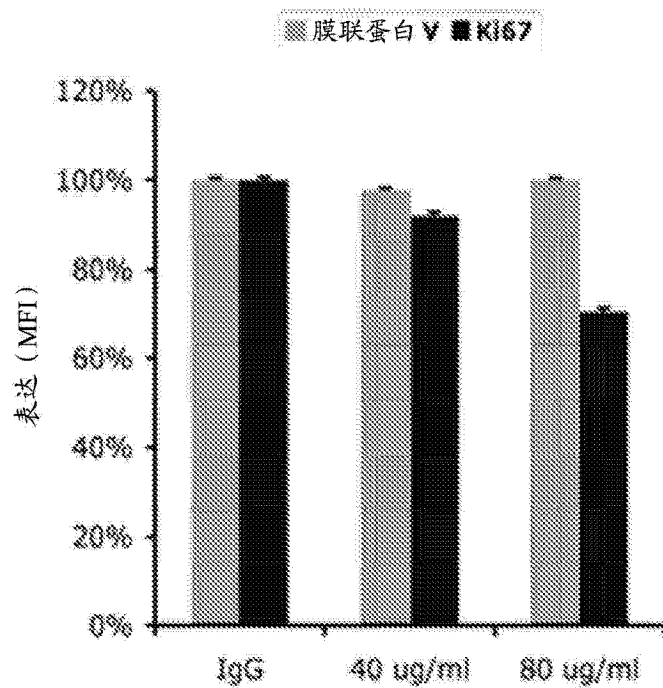


图 8

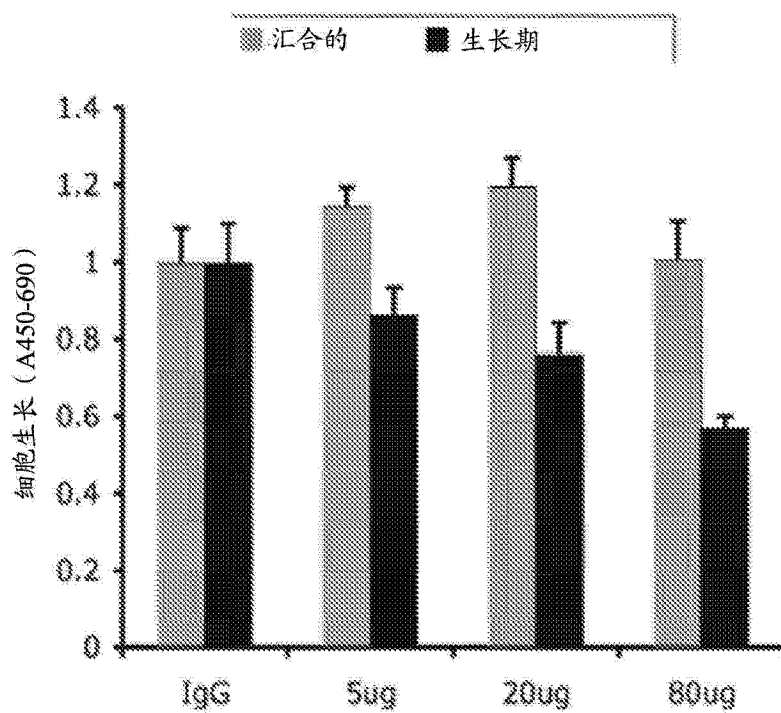


图 9

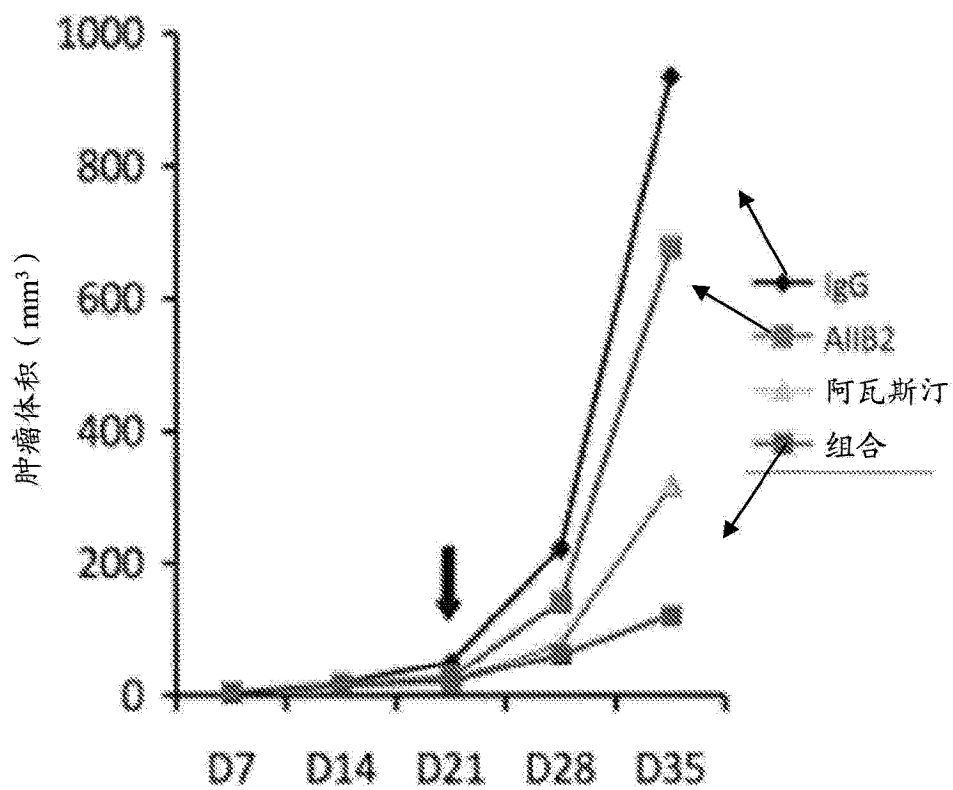


图 10

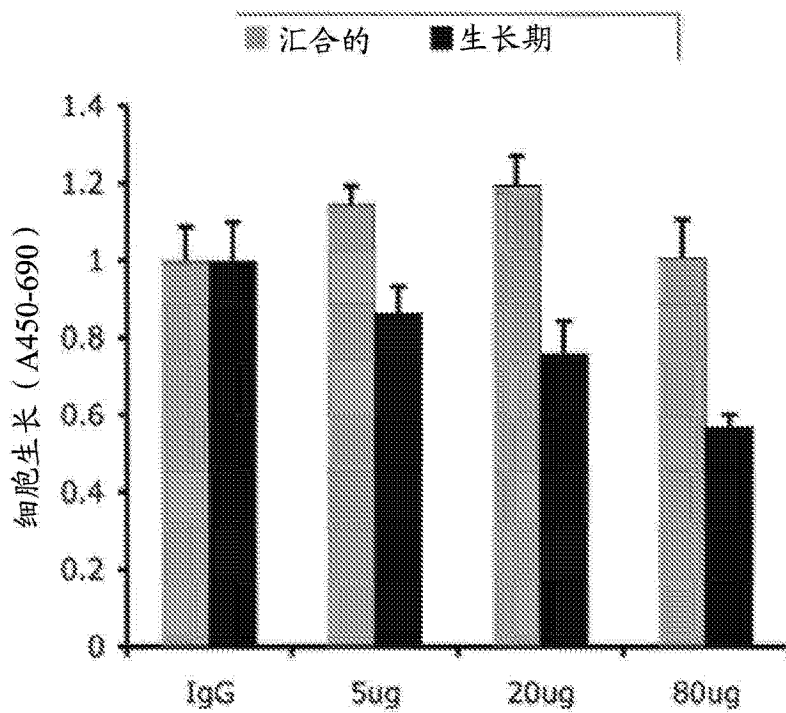


图 11

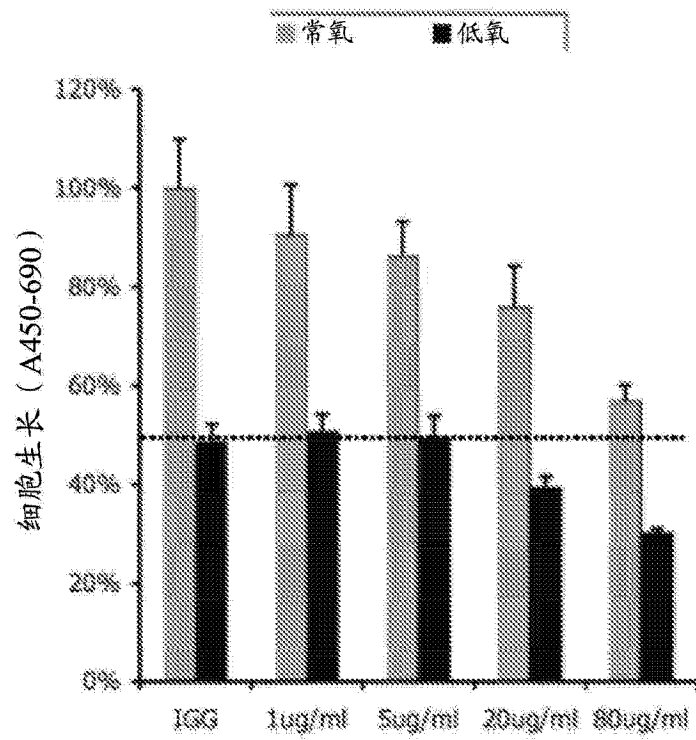


图 12

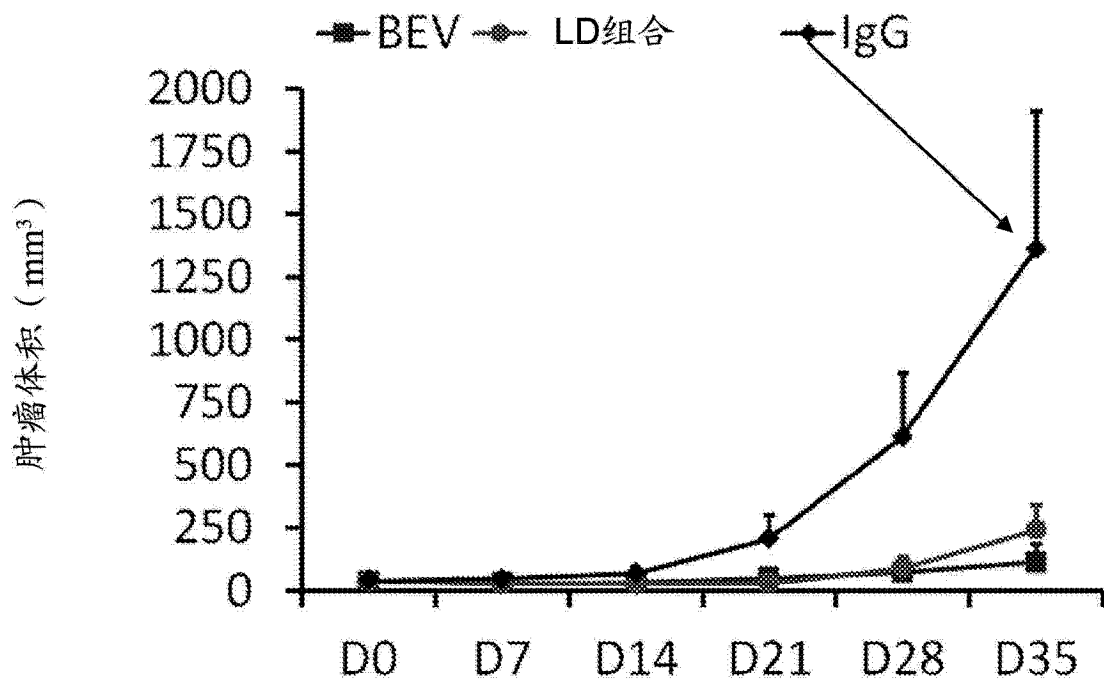


图 13